

小麦籽粒色泽性状的全基因组关联分析 及候选基因挖掘

董中东, 井震海, 裴丹, 孙丛苇, 陈锋
(河南农业大学农学院, 郑州 450046)

摘要: 小麦籽粒色泽性状亮度(L^*)、红度(a^*)和黄度(b^*)是小麦品质的重要指标。为挖掘调控小麦籽粒色泽相关性状的遗传位点,对黄淮麦区243份小麦材料组成的自然群体进行了4个环境下籽粒色泽性状表型调查,群体基因型信息由小麦660K SNP芯片表征,并在此基础上进行了全基因组关联分析。结果表明,与籽粒色泽关联的显著SNP位点共有785个,可解释11.4%~23.4%的表型变异,其中与 L^* 关联的SNP位点主要分布在1A、1D、2B、3D、7A和7D染色体上,与 a^* 关联的SNP位点主要分布在2A、2B、2D、4B、5B、5D、7A和7D染色体上,与 b^* 关联的SNP位点主要分布在2B、5B、5D、6D、7A、7B和7D染色体上。51个显著SNP位点为一因多效位点。通过基因功能注释挖掘到了36个和籽粒色泽相关的候选基因,其中仅8个基因在籽粒中表达。进一步通过基因多态性分析发现仅有小麦硬度调控基因 *Pinb* (*TraesCS5D02G004300*)和UDP-葡萄糖/GDP-甘露糖脱氢酶基因 *TraesCS5B02G399800* 与目标性状显著关联。单倍型分析挖掘到位于 *TraesCS5B02G399800* 基因内部的差异单倍型与 b^* 显著关联。本研究挖掘到的候选基因对小麦籽粒色泽的分子标记辅助选择和全基因组预测提供了参考。

关键词: 小麦;籽粒色泽;全基因组关联分析

Genome-Wide Association Studies of Kernel Color Traits in Common Wheat and Mining of Candidate Gene

DONG Zhongdong, JING Zhenhai, PEI Dan, SUN Congwei, CHEN Feng
(College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046)

Abstract: Wheat kernel color related traits L^* , a^* , and b^* are important indicators of wheat quality. To elucidate the genetic architecture underlying these traits, we conducted a comprehensive genome-wide association study (GWAS) using 243 wheat accessions from Huang-huai wheat region. Phenotypic evaluations were performed in four environments, complemented by genotyping using the wheat 660K SNP assay. We identified 785 significant SNP markers associated with kernel color traits, collectively explaining 11.4%-23.4% phenotypic variation. Marker-trait associations exhibited distinct chromosomal distributions: SNPs associated with L^* are mainly located on chromosomes 1A, 1D, 2B, 3D, 7A and 7D; SNPs associated with a^* are primarily distributed on chromosome 2A, 2B, 2D, 4B, 5B, 5D, 7A and 7D; SNPs associated with b^* are predominantly distributed on chromosome 2B, 5B, 5D, 6D, 7A, 7B and 7D. Notably, 51 SNPs showed pleiotropic effects. Thirty-six candidate genes related to the kernel color traits were identified by gene annotation, of which eight exhibited kernel-specific expression patterns. Polymorphism analysis revealed significant associations between target traits and two key genes, *Pinb* (*TraesCS5D02G004300*)

收稿日期: 2024-08-16 网络出版日期: 2025-01-06

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240816005>

第一作者主要从事小麦育种研究, E-mail: dongzhongdong@163.com

通信作者: 孙丛苇, 主要从事生物信息学研究, E-mail: clusterreed@163.com

裴丹, 主要从事小麦分子育种研究, E-mail: peidan1115@163.com

基金项目: 国家自然科学基金项目(32201849); 河南省科技攻关项目(232102111109)

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (32201849); Henan Province Science and Technology Attack Project (232102111109)

and UDP-glucose/GDP-mannose dehydrogenase gene *TraesCS5B02G399800*. Haplotype analysis of *TraesCS5B02G399800* identified distinct allelic variants significantly associated with b^* . Therefore, these findings provide valuable genomic resources for marker-assisted selection and genomic prediction strategies for wheat kernel color traits.

Key words: wheat; kernel color; GWAS

小麦籽粒色泽是小麦品质的重要指标之一。紫色小麦的抗氧化物活性最高,其次是红色小麦和白色小麦^[1]。前人研究表明,小麦籽粒颜色指标亮度(L^*)、红度(a^*)和黄度(b^*)与总酚含量、类胡萝卜素含量、抗氧化物活性、类黄酮含量以及粒重显著负相关^[1]。在其他作物中,如水稻^[2]、玉米^[3]和大麦^[4]中也有相似的报告。水稻籽粒颜色参数与酚类物质、类黄酮含量和抗氧化能力呈极显著负相关,其中, a^* 与白色和红色水稻的抗氧化能力均呈负相关关系^[2]。由 HunterLab 色差仪测定的玉米颜色指标与花青素、酚类物质及其活性高度相关,是提高糯玉米抗氧化水平和抗氧化活性的间接选择标准^[3]。在有色大麦中,自由基清除活性与酚类化合物和原花青素含量高度正相关^[4]。此外,小麦籽粒的抗氧化活性对小麦营养品质^[5]、食品风味和种子休眠^[6]均有影响。然而,以上研究并未阐释调控小麦籽粒色泽的遗传基础。因此,挖掘调控小麦籽粒色泽的重要遗传位点或基因,解析其分子机制和调控网络,对小麦品质育种具有重要意义。

全基因组关联分析(GWAS, genome-wide association studies)是一种通过检验全基因组遗传标记与表型变异关联的显著性来确定性状遗传位点在基因组中分布的分析方法,该方法在群体水平上解析性状的遗传基础^[7]。遗传多样性丰富的群体材料和高密度的覆盖全基因组范围的单核苷酸多态性(SNP, single nucleotide polymorphism)标记是挖掘显著位点的重要决定因素^[8]。SNP可用于推断等位基因多态性和连锁不平衡(LD, linkage disequilibrium), LD的大小主要受群体遗传多样性的影响,决定GWAS分析的准确性^[7]。此外,单倍型分析也是挖掘遗传调控位点的重要方法之一^[9-10]。

GWAS已被广泛应用于小麦重要农艺与品质性状重要遗传位点的挖掘。Sun等^[11]利用GWAS对黄淮海区小麦产量相关的13个农艺性状进行分析,检测到41个稳定遗传位点,并发现部分优异等位基因的分布规律。Chen等^[12]利用90K SNP芯片对163份小麦材料进行基因分型,并对包括籽粒硬度、蛋白质含量、湿面筋含量和面粉色泽相关指标 L^* 、

a^* 、 b^* 在内的6个品质性状进行了全基因组关联分析。结果表明,在8个环境中共检测到846个调控品质性状的显著SNP位点,平均可解释30%的表型变异。进一步通过单倍型分析挖掘到了面粉色泽调控基因 *TaRPP13L1*,并在突变体中进行了功能验证。

目前已经有部分小麦面粉色泽遗传位点挖掘的报道。除了上述 *TaRPP13L1* 基因之外^[12], Zhai等^[13]对普通小麦面粉色泽相关性状 L^* 、 a^* 、 b^* 和黄色素含量进行了全基因组关联分析,共挖掘到了分布于所有染色体上的100个显著遗传位点,解释6.5%~20.9%的表型变异,并进一步预测到了16个涉及类胡萝卜素生物合成与降解、萜骨架生物合成和糖酵解或糖异生的候选基因。于海霞等^[14]利用DArT标记将麦面粉色泽相关位点定位在1A、1B、6B、7A和7B染色体上。张立平等^[15]利用双单倍群体将调控小麦面粉 b^* 的数量性状位点(QTL, quantitative trait loci)定位在1D、2D、3A、4D、5D、6A、6D和7A染色体上,其中7A上的QTL效应最大,可解释12.9%~37.6%的表型变异。然而,有关小麦籽粒色泽性状遗传位点的定位报道较少。Hong等^[16]对普通小麦的籽粒色泽性状进行了遗传位点挖掘,共检测到11个显著SNP位点,主要分布在2A、2B、4B染色体上。

本研究以黄淮海区243份小麦为材料,以小麦660K芯片^[14]表征基因型信息,对小麦籽粒色泽相关的3个相关指标 L^* 、 a^* 和 b^* 进行全基因组关联分析,以期挖掘调控小麦籽粒色泽的遗传位点和基因,为小麦品质改良提供参考。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

供试材料为243份来自河南省冬水组比较试验的小麦品系,在2013-2016年分别在驻马店市西平县(XP, Xiping)、驻马店市遂平县(SP, Suiping)、新乡市原阳县(YY, Yuanyang)和郑州市惠济区(ZZ, Zhengzhou)4个地点种植,每份材料种植4行,行长150 cm,行距23 cm,株距10 cm,随机区组设计,在

郑州、原阳进行2次重复,分别用1、2表示。田间管理同一般大田,小麦成熟后统一收获脱粒。

1.2 籽粒色泽指标测定及分析

使用SeedCount SC5000图像分析系统(<http://www.tenovolab.cn/>)测定小麦籽粒色泽性状亮度(L^*)、红度(a^*)和黄度(b^*)。在测量仪自带的定容装置装满小麦籽粒并称量,之后将称重后的小麦籽粒平铺放入样品托盘,在系统中选择Wheat模块(Module)和Australia标准(Standard)进行扫描测定。每份材料每重复进行两次测量。 L^* 、 a^* 和 b^* 多年多环境观测值的最优线性无偏预测值(BLUP, best linear unbiased prediction)通过R语言lme4包计算获得。表型性状的方差分析、相关分析、表型变异分析和遗传力分析采用SAS 9.4软件进行,用IBM SPSS 27.0进行作图。

1.3 全基因组关联分析

自然群体的243份材料由小麦660K SNP芯片^[17]进行基因分型。采用PLINK(<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>)软件过滤次等位基因频率小于5%的标记和基因型缺失率大于10%的材料,PLINK软件命令如下:plink --maf 0.05 --geno 0.1。关联分析在R语言的GAPIT^[18]软件包中进行,采用混合线性模型(MLM, mixed linear model)(PCA+K)进行全基因组关联分析,前3个主成分用

于控制群体结构。有效SNP个数采用GEC软件(<http://pmglab.top/gec/#/>)进行估计,SNP显著性阈值的设定基于关联分析所用到的有效标记数目(n),最终显著性阈值的设定为 $P = 1/n$ 。采用Haploview 4.2软件^[19]对候选SNP进行单倍型分析。基因富集分析采用欧易云工具(<https://cloud.oebiotech.com>)。

1.4 qRT-PCR分析

称取100 mg种子,打碎后使用植物种子RNA提取试剂盒(Cat#082009,贝贝生物科技有限公司)提取RNA。使用dsDNase 1 μ L, 5 \times RT All-in-One Mix 4 μ L(北京诺贝莱生物科技有限公司), ddH₂O 5 μ L, RNA原液10 μ L的体系将RNA反转录成cDNA,反转录条件为37 $^{\circ}$ C 2 min, 55 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 5 min, 转录完成后加入120 μ L ddH₂O稀释。使用2 \times SYBR premix UrTaqII混合缓冲液(北京诺贝莱生物科技有限公司)进行qRT-PCR分析。以小麦(中国春) β -actin作为内参,反应体系为20 μ L,其中包含上述缓冲液10 μ L,正反向引物各0.4 μ L,引物序列见表1, DNA样品2.5 μ L, ddH₂O 6.7 μ L。反应条件为95 $^{\circ}$ C 120 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40个循环; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 5 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达量,将中国春表达量平均值设置为1,对其他数据进行标准化。

表1 候选基因荧光定量PCR引物

Table 1 The primers of qRT-PCR for candidate genes

引物名称 Primer Name	正向序列(5'-3') Forward primer(5'-3')	反向序列(5'-3') Reverse primer(5'-3')
TraesCS2B02G180800	TGGCCCGATGAAGATGAAGA	GGCTATTTGGAGGTTGCTGG
TraesCS4B02G346000	AGGGAAAATGAGCTCTACGTCA	TAGGAGTTGGCCATTCTCGG
TraesCS5A02G003200	ATATGCTCGTGATGGCTCCG	AAGATCACACCGCCATCCAT
TraesCS5B02G399800	AGACCTCACAATCAGTCAGCA	TAACCTTCTGCAGTCTCCGG
TraesCS5D02G004300	CGTGATGGAGCGATGTTTCA	GGATCACTCGCCGGATAGAA
TraesCS7A02G350100	TGGTGTCTGGGTGGTTTAC	TTGGTATGGCGATTCCCCT
TraesCS7A02G350800	ATGAGGTCGCTGATGGTCAT	GCGATCGATTGTCCCCTCTG
TraesCS7B02G408900	CCTGTTGTACGGCCACATCT	GTACGTCGGGTGTAGATGA

2 结果与分析

2.1 籽粒色泽的表型分析

分别对 L^* 、 a^* 和 b^* 进行表型变异分析、多环境方差分析和相关性分析。表型变异分析结果显示供试品种的3个性状表型存在较大差异,各性状的

分布基本服从正态分布(图1)。方差分析结果表明,各品系的籽粒色泽性状存在极显著差异。 L^* 、 a^* 和 b^* 的广义遗传力分别为86.9%、83.4%和81.5%,均表现出较高的遗传特性(表2)。相关性分析表明, L^* 与 b^* 的相关系数为0.65, a^* 与 b^* 的相关系数为0.54,均达到极显著正相关关系。

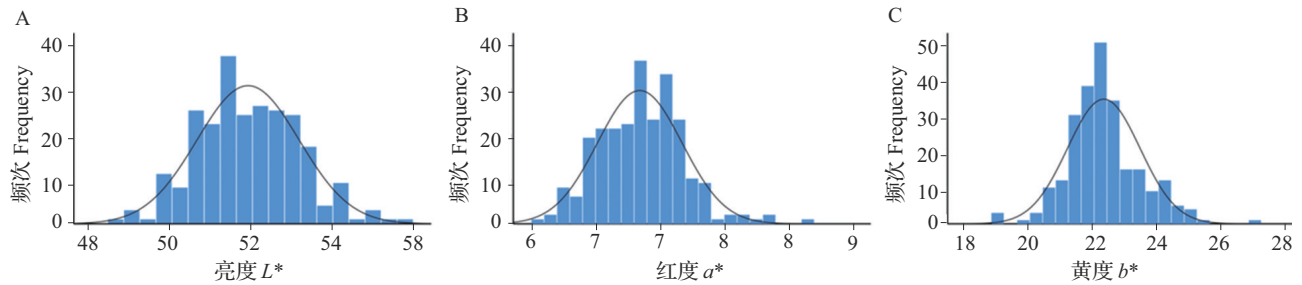


图1 籽粒色泽各性状的次数分布
Fig. 1 Distribution of kernel color traits

表2 籽粒色泽性状的方差分析结果

Table 2 ANOVA results of kernel color traits

变异来源 Source of variation	亮度 L^*	红度 a^*	黄度 b^*
点内区组间 Block in location	76.29***	62.61***	16.58***
地点 Location	2.19 ^{NS}	8.91 ^{NS}	8.52 ^{NS}
品系 Lines	10.32***	10.31***	7.85***
地点×品系 Location×lines	1.94***	1.65***	1.71***
广义遗传力 (%) H^2	86.9	83.4	81.5

^{NS}表示在 $P < 0.05$ 水平上差异不显著, ***表示在 $P < 0.001$ 水平上差异显著

^{NS} and *** represent not significant in $P < 0.05$ level and significant in $P < 0.001$ level, respectively

2.2 全基因组关联分析

关联群体的基因型经过质控后保留了 395783 个高质量 SNP, 进一步计算出 74957 个有效 SNP, 考虑到 3 个性状在多年多环境的表型变异等因素, 最

终将 GWAS 显著性阈值设定为 10^{-4} 。全基因组关联分析共检测到 785 个显著 SNP 位点, 其中与 L^* 关联的显著 SNP 有 83 个, 单个 SNP 可解释 13.5%~23.4% 的表型变异; 与 a^* 关联的显著 SNP 有 413 个, 单个 SNP 可解释 12.7%~19.5% 的表型变异。与 b^* 关联的显著 SNP 有 289 个, 单个 SNP 可解释 11.4%~22.1% 的表型变异。

显著 SNP 在不同染色体上的数量分布如图 2 所示, 与 L^* 显著关联的 SNP 主要分布在 1A (21 个)、2B (14 个)、1D (6 个)、3D (6 个)、7A (6 个) 和 7D (5 个) 染色体上; 与 a^* 显著关联的 SNP 分布在 2B (147 个)、2A (109 个)、4B (38 个)、7A (34 个)、5D (22 个)、2D (14 个)、7D (14 个) 和 5B (12 个) 染色体上; 与 b^* 显著关联的 SNP 分布在 2B (65 个)、7A (57 个)、5B (49 个)、5D (38 个)、7B (22 个)、7D (16 个) 和 6D (12 个) 染色体上。3 个性状显著关联的 SNP 主要分布在 2B、7A 和 7D 染色体。

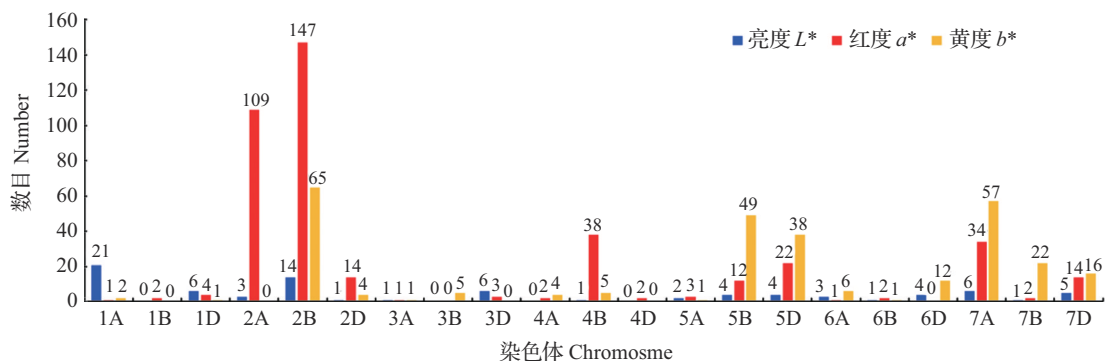


图2 染色体上显著SNP分布
Fig. 2 Chromosomal distribution of significant SNPs

2.3 籽粒色泽显著相关SNP的环境稳定性分析

在进行 GWAS 分析时, 某一地点的某一次重复视为一个环境。显著 SNP 的环境稳定性评价包括以下两个方面: (1) 不同环境条件下重复检测到的显著 SNP 个数; (2) 以多年多地点 3 个性状的 BLUP

值为表型进行 GWAS 挖掘显著 SNP 位点, 并计算基于 BLUP 值关联到的显著 SNP 和单个环境显著 SNP 的交集。

与 L^* 关联的 83 个显著 SNP 中有 7 个均在多个环境中被关联到, 占比为 8.43%, 其中 1 个 SNP

(AX-86170796)在3个环境中被检测到;与 a^* 关联的413个显著SNP中有96个在多环境中被关联到,占比为23.24%,其中21个SNP在3个及以上环境中出现;与 b^* 关联的289个显著SNP中有62个在多环境中被关联到,占比为21.45%,其中9个SNP在3个及以上环境中被检测到。

以BLUP值进行GWAS分析, L^* 、 a^* 和 b^* 关联到显著SNP的个数分别为10个、228个和144个,其中 L^* 关联的显著SNP中有9个可以在单环境中检测到,占

比为90.0%; a^* 关联的显著SNP中有211个可以在单环境中检测到,占比为92.5%; b^* 关联的显著SNP中有75个可以在单环境中检测到,占比为52.1%。综合分析 L^* 、 a^* 和 b^* 在单环境和基于BLUP值关联到的显著SNP发现:12个与 L^* 关联的显著SNP在两个及以上环境中检测到;20个与 a^* 关联的显著SNP在4个及以上环境中检测到;9个与 b^* 关联的显著SNP在4个及以上环境中检测到(表3)。因此, a^* 性状相关的遗传位点表现出最好的环境稳定性,其次分别为 L^* 和 b^* 。

表3 稳定检测到的与 L^* 、 a^* 和 b^* 显著关联的SNP

Table 3 The stable significant SNPs associated with L^* , a^* , and b^*

染色体 Chromosome	SNP	性状 Trait	环境 Environment
1D	AX-108902473	L^*	西平、BLUP
1D	AX-111484181	L^*	原阳1、原阳2
1D	AX-94556277	L^*	原阳1、原阳2
3D	AX-110423300	L^*	郑州1、BLUP
3D	AX-94663542	L^*	遂平、原阳1、BLUP
5A	AX-108947616	L^*	郑州2、BLUP
5A	AX-95250489	L^*	郑州1、BLUP
5D	AX-86170796	L^*	原阳1、原阳2、郑州1、BLUP
6A	AX-108898115	L^*	原阳1、郑州2
6B	AX-110472468	L^*	郑州2、BLUP
6D	AX-109898786	L^*	原阳1、郑州1、BLUP
6D	AX-94699483	L^*	原阳1、郑州2、BLUP
2A	AX-108736897	a^*	原阳1、原阳2、郑州1、BLUP
2B	AX-108736846	a^*	遂平、西平、郑州1、BLUP
2B	AX-108984235	a^*	遂平、西平、郑州1、BLUP
2B	AX-110620516	a^*	遂平、西平、郑州1、BLUP
4B	AX-109333795	a^*	遂平、原阳1、原阳2、郑州1、BLUP
4B	AX-109368556	a^*	遂平、原阳1、原阳2、BLUP
4B	AX-109552654	a^*	遂平、原阳1、原阳2、BLUP
4B	AX-110052982	a^*	遂平、原阳1、原阳2、BLUP
4B	AX-110425610	a^*	遂平、原阳1、原阳2、郑州1、BLUP
4B	AX-110517373	a^*	遂平、原阳1、原阳2、BLUP
4B	AX-110648483	a^*	遂平、原阳1、原阳2、郑州1、BLUP
4B	AX-111274839	a^*	遂平、原阳1、原阳2、BLUP
4B	AX-111465706	a^*	遂平、原阳1、原阳2、BLUP
4B	AX-111516967	a^*	遂平、原阳1、原阳2、BLUP

表 3 (续)

染色体 Chromosome	SNP	性状 Trait	环境 Environment
4B	AX-111579343	a^*	遂平、原阳1、原阳2、BLUP
4B	AX-111747488	a^*	遂平、原阳1、原阳2、BLUP
4B	AX-111820468	a^*	遂平、原阳1、原阳2、BLUP
4B	AX-86164894	a^*	遂平、原阳1、原阳2、BLUP
5B	AX-109877815	a^*	遂平、原阳1、原阳2、郑州1、郑州2、BLUP
5D	AX-109549041	a^*	遂平、原阳2、郑州1、BLUP
4B	AX-108837712	b^*	遂平、原阳1、原阳2、BLUP
4B	AX-109333795	b^*	遂平、原阳1、原阳2、BLUP
4B	AX-110425610	b^*	遂平、原阳1、原阳2、BLUP
4B	AX-110648483	b^*	遂平、原阳1、原阳2、BLUP
5B	AX-109050097	b^*	遂平、原阳1、原阳2、BLUP
5B	AX-111077474	b^*	原阳2、郑州1、郑州2、BLUP
5B	AX-111468272	b^*	原阳1、郑州1、郑州2、BLUP
5B	AX-95004777	b^*	遂平、原阳1、原阳2、郑州2、BLUP
5D	AX-86170796	b^*	遂平、原阳1、原阳2、郑州1、郑州2、BLUP

BLUP: 最佳线性无偏预测, 1、2为同一年的2次重复, 下同

BLUP: Best linear unbiased prediction, 1, 2 is two repetitions in the same year, the same as below

2.4 一因多效显著 SNP 分析

在单环境关联分析中, 共检测到 51 个显著 SNP 同时与两个性状关联(表 4), 其中两个性状均在同一个环境条件下检测到的 SNP 有 35 个, 两个性状均

是在多个环境条件下检测到的 SNP 有 16 个。一因多效 SNP 表明可能存在相同基因在性状的形成中起调控作用, 进一步证明了 L^* 和 b^* 、 a^* 和 b^* 的相关性。

表 4 L^* 、 a^* 和 b^* 关联的一因多效 SNPTable 4 The pleiotropic SNPs associated with L^* , a^* , and b^*

染色体 Chromosome	SNP	性状 Trait	环境 Environment	染色体 Chromosome	SNP	性状 Trait	环境 Environment
2B	AX-111049983	a^*, b^*	遂平	5B	AX-109499327	a^*, b^*	遂平
2B	AX-109459969	a^*, b^*	遂平	5D	AX-95142657	a^*, b^*	郑州1、遂平
4A	AX-110468618	a^*, b^*	原阳1、遂平	5D	AX-94562472	a^*, b^*	遂平
4B	AX-110648483	a^*, b^*	遂平	5D	AX-86170796	L^*, b^*	原阳1、原阳2、遂平
4B	AX-110425610	a^*, b^*	遂平	5D	AX-111710883	a^*, b^*	遂平
4B	AX-109333795	a^*, b^*	遂平	5D	AX-111608176	a^*, b^*	遂平
4B	AX-108837712	a^*, b^*	原阳2、遂平	5D	AX-111553017	a^*, b^*	遂平
4B	AX-108731779	a^*, b^*	遂平	5D	AX-111548818	a^*, b^*	遂平
5B	AX-95004777	a^*, b^*	遂平	5D	AX-111462611	a^*, b^*	郑州1、遂平
5B	AX-110994024	L^*, b^*	郑州2	5D	AX-111441725	a^*, b^*	遂平
5B	AX-110921294	L^*, b^*	郑州2	5D	AX-111185783	a^*, b^*	遂平
5B	AX-110064547	a^*, b^*	遂平	5D	AX-111061951	a^*, b^*	遂平

表 4 (续)

染色体 Chromosome	SNP	性状 Trait	环境 Environment	染色体 Chromosome	SNP	性状 Trait	环境 Environment
5D	AX-110996413	<i>a*,b*</i>	遂平	7A	AX-111483986	<i>a*,b*</i>	郑州1、原阳1
5D	AX-110985232	<i>a*,b*</i>	遂平	7A	AX-110943976	<i>a*,b*</i>	郑州1、原阳1
5D	AX-110576250	<i>a*,b*</i>	遂平	7A	AX-110524850	<i>a*,b*</i>	郑州1
5D	AX-110532402	<i>a*,b*</i>	遂平	7A	AX-109958382	<i>a*,b*</i>	郑州1、原阳1
5D	AX-110504529	<i>a*,b*</i>	遂平	7A	AX-109877102	<i>a*,b*</i>	郑州1、原阳1
5D	AX-109760956	<i>a*,b*</i>	遂平	7A	AX-109050060	<i>a*,b*</i>	郑州1、原阳1
5D	AX-109549041	<i>a*,b*</i>	遂平	7A	AX-108858065	<i>a*,b*</i>	郑州1、原阳1
5D	AX-109426744	<i>a*,b*</i>	遂平	7A	AX-108774375	<i>a*,b*</i>	郑州1、原阳1
5D	AX-109387951	<i>a*,b*</i>	遂平	7B	AX-89724805	<i>L*,b*</i>	郑州1
5D	AX-108772796	<i>a*,b*</i>	遂平	7D	AX-94890186	<i>L*,b*</i>	原阳2
6D	AX-94699483	<i>L*,b*</i>	原阳1、遂平	7D	AX-94749119	<i>L*,b*</i>	原阳2、遂平
7A	AX-89444413	<i>a*,b*</i>	郑州1	7D	AX-94470386	<i>L*,b*</i>	原阳2
7A	AX-86165096	<i>a*,b*</i>	郑州1、原阳1	7D	AX-86162668	<i>L*,b*</i>	原阳2、遂平
7A	AX-111737274	<i>a*,b*</i>	原阳1				

2.5 候选基因分析

2.5.1 候选基因挖掘 根据中国春参考基因组 1.1 版本基因注释信息 (https://urgi.versailles.inra.fr/download/iwgc/IWGC_RefSeq_Annotations/v1.1/),

对稳定检测或一因多效 SNP 在上下游 2 kb 范围检索候选基因。42 个显著 SNP 共挖掘到 36 个候选基因(表 5),其中 27 个基因为一因多效基因。

表 5 籽粒色泽相关的候选基因

Table 5 The candidate genes related to the kernel color traits

染色体 Chromosome	SNP	性状 Trait	基因 ID Gene ID	环境 Environment
1D	AX-111484181	<i>L*</i>	<i>TraesCS1D02G390900LC</i>	原阳1、原阳2
1D	AX-94556277	<i>L*</i>	<i>TraesCS1D02G291400</i>	原阳1、原阳2
1D	AX-108902473	<i>L*</i>	<i>TraesCS1D02G409500</i>	西平、BLUP
2B	AX-110620516	<i>a*</i>	<i>TraesCS2B02G180800</i>	遂平、西平、郑州1、BLUP
2B	AX-108736846	<i>a*</i>	<i>TraesCS2B02G252100LC</i>	遂平、西平、郑州1、BLUP
2B	AX-108984235	<i>a*</i>	<i>TraesCS2B02G253300LC</i>	遂平、西平、郑州1、BLUP
3D	AX-94663542	<i>L*</i>	<i>TraesCS3D02G354800LC</i>	遂平、原阳1、BLUP
3D	AX-110423300	<i>L*</i>	<i>TraesCS3D02G027800</i>	郑州1、BLUP
4A	AX-110468618	<i>a*,b*</i>	<i>TraesCS4A02G424200LC</i>	原阳1、遂平
4B	AX-108731779	<i>a*,b*</i>	<i>TraesCS4B02G404100LC</i>	遂平
4B	AX-111747488	<i>a*</i>	<i>TraesCS4B02G346000</i>	遂平、原阳1、原阳2、BLUP
4B	AX-86164894	<i>a*</i>	<i>TraesCS4B02G346000</i>	遂平、原阳1、原阳2、BLUP
4B	AX-109552654	<i>a*</i>	<i>TraesCS4B02G346100</i>	遂平、原阳1、原阳2、BLUP
5A	AX-95250489	<i>L*</i>	<i>TraesCS5A02G003200</i>	郑州1、BLUP
5A	AX-108947616	<i>L*</i>	<i>TraesCS5A02G487600LC</i>	郑州2、BLUP
5B	AX-109877815	<i>a*</i>	<i>TraesCS5B02G358300</i>	遂平、原阳1、原阳2、郑州1、郑州2、BLUP

表 5 (续)

染色体 Chromosome	SNP	性状 Trait	基因 ID Gene ID	环境 Environment
5B	AX-95004777	a^*, b^*	<i>TraesCS5B02G399800</i>	遂平
5B	AX-110064547	a^*, b^*	<i>TraesCS5B02G591600LC</i>	遂平
5B	AX-110921294	L^*, b^*	<i>TraesCS5B02G753200LC</i>	郑州2
5D	AX-86170796	L^*, b^*	<i>TraesCS5D02G004300</i>	原阳1、遂平
5D	AX-94562472	a^*, b^*	<i>TraesCS5D02G565100</i>	遂平
5D	AX-110504529	a^*, b^*	<i>TraesCS5D02G565400</i>	遂平
5D	AX-111185783	a^*, b^*	<i>TraesCS5D02G567700</i>	遂平
5D	AX-111553017	a^*, b^*	<i>TraesCS5D02G661900LC</i>	遂平
5D	AX-110985232	a^*, b^*	<i>TraesCS5D02G568300</i>	遂平
5D	AX-95142657	a^*, b^*	<i>TraesCS5D02G568800</i>	郑州1、遂平
5D	AX-109549041	a^*, b^*	<i>TraesCS5D02G663600LC</i>	遂平
5D	AX-111710883	a^*, b^*	<i>TraesCS5D02G663600LC</i>	遂平
6A	AX-108898115	L^*	<i>TraesCS6A02G416500</i>	原阳1、郑州2
6D	AX-94699483	L^*, b^*	<i>TraesCS6D02G401700</i>	原阳1、遂平
7A	AX-111737274	a^*, b^*	<i>TraesCS7A02G150400</i>	原阳1
7A	AX-110524850	a^*, b^*	<i>TraesCS7A02G350100</i>	郑州1
7A	AX-86165096	a^*, b^*	<i>TraesCS7A02G350100</i>	郑州1、原阳1
7A	AX-89444413	a^*, b^*	<i>TraesCS7A02G350300</i>	郑州1
7A	AX-109050060	a^*, b^*	<i>TraesCS7A02G502900LC</i>	郑州1、原阳1
7A	AX-110943976	a^*, b^*	<i>TraesCS7A02G350800</i>	郑州1、原阳1
7A	AX-109877102	a^*, b^*	<i>TraesCS7A02G350800</i>	郑州1、原阳1
7B	AX-89724805	L^*, b^*	<i>TraesCS7B02G408900</i>	郑州1
7D	AX-86162668	L^*, b^*	<i>TraesCS7D02G638500LC</i>	原阳2、遂平
7D	AX-94890186	L^*, b^*	<i>TraesCS7D02G638500LC</i>	原阳2
7D	AX-94470386	L^*, b^*	<i>TraesCS7D02G467100</i>	原阳2
7D	AX-94749119	L^*, b^*	<i>TraesCS7D02G467100</i>	原阳2、遂平

2.5.2 候选基因表达量分析 根据小麦族多组学网站中国春基因在不同组织和时期的表达量数据库^[20],进一步对36个候选基因在小麦籽粒中的表达量进行了初步分析,结果表明,24个候选基因在小麦籽粒中的表达量几乎为零,仅有8个候选基因在籽粒中有较高的表达。进一步分别选择分析了极端表型籽粒色泽材料,其中,许科877、中丰麦2号、丰麦53、奥麦18为高表型材料,亮度-红度-黄度组合($L^*-a^*-b^*$)分别为56.6-6.5-24.0、55.2-6.8-24.8、55.3-7.2-25.3、54.7-7.1-24.0,济研麦7号和耕麦237为低表型材料, $L^*-a^*-b^*$ 分别为52.0-6.3-20.9、51.2-6.3-

21.4。对以上材料进行了qRT-PCR分析以验证基因的表达水平,结果表明以上8个基因在所选择的极端材料中的表达趋势一致,即在高 $L^*-a^*-b^*$ 材料中表达较高,在低 $L^*-a^*-b^*$ 材料中表达较低,*TraesCS7B02G408900*基因在低 $L^*-a^*-b^*$ 材料济研麦7号中几乎不表达(图3)。因此对以上8个候选基因进行功能注释,分别为emp24/gp25L/p24家族、PLAC8家族蛋白、Core-2/I-Branching酶、UDP-葡萄糖/GDP-甘露糖脱氢酶家族、蛋白酶抑制剂/种子贮藏/LTP家族、精胺和亚精胺合成酶、聚酮环化酶/脱水酶和脂质转运、脂肪酸羟化酶超家族(表6)。

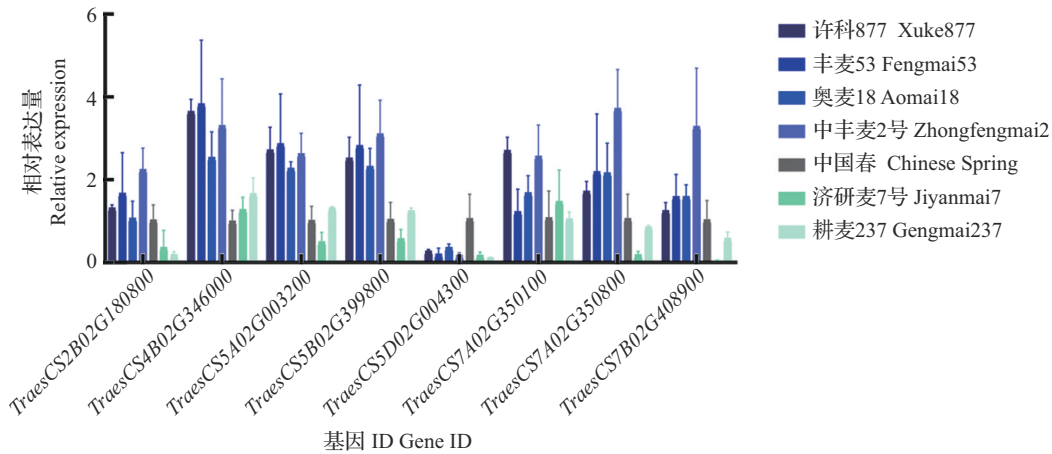


图3 候选基因在籽粒中的qRT-PCR分析

Fig. 3 qRT-PCR analysis of candidate genes in kernel

表6 在籽粒中高表达的籽粒色泽相关候选基因

Table 6 The highly expressed candidate genes related to the kernel color traits

染色体 Chromosome	性状 Trait	基因ID Gene ID	基因功能 Function of gene	富集编号 Enrichment ID
2B	<i>a</i> *	<i>TraesCS2B02G180800</i>	emp24/gp25L/p24 家族	GO:0033116, GO:0030134, GO:0005793, GO:0032580, GO:0016021
4B	<i>a</i> *	<i>TraesCS4B02G346000</i>	PLAC8 家族蛋白	-
5A	<i>L</i> *	<i>TraesCS5A02G003200</i>	Core-2/I-Branching 酶	GO:0016021, GO:0008375
5B	<i>a</i> *, <i>b</i> *	<i>TraesCS5B02G399800</i>	UDP-葡萄糖/GDP-甘露糖 脱氢酶家族	ko00053, GO:0003979, GO:0006065, GO:0006024
5D	<i>L</i> *, <i>b</i> *	<i>TraesCS5D02G004300</i>	蛋白酶抑制剂/种子贮藏/LTP 家族	-
7A	<i>a</i> *, <i>b</i> *	<i>TraesCS7A02G350100</i>	精胺和亚精胺合成酶	ko00330, GO:0006596, GO:0006597, GO:0004766, GO:0016768
7A	<i>a</i> *, <i>b</i> *	<i>TraesCS7A02G350800</i>	聚酮环化酶/脱水酶和脂质转运	ko04075, GO:1905183, GO:0010427, GO:0004864
7B	<i>L</i> *, <i>b</i> *	<i>TraesCS7B02G408900</i>	脂肪酸羟化酶超家族	-

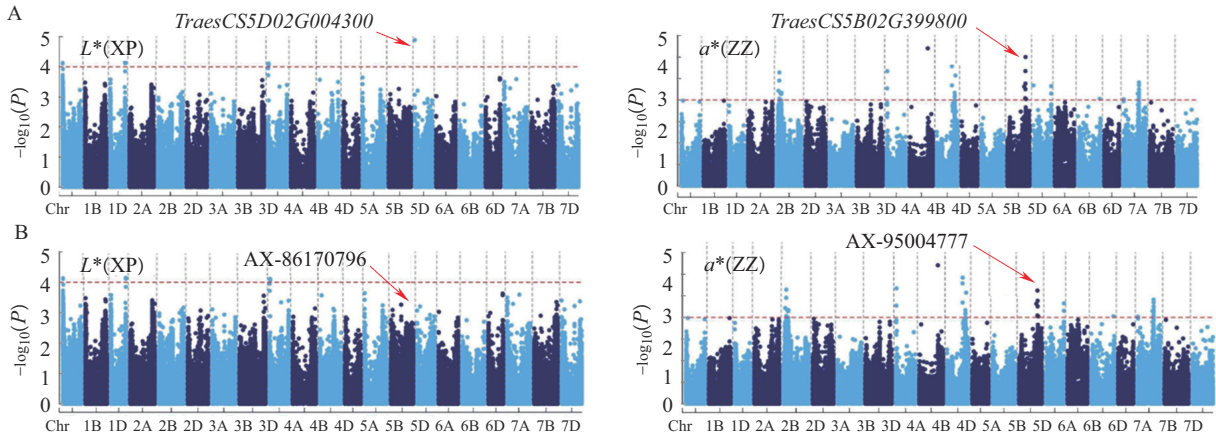
- 表示本研究中没有显著富集

- indicates not significant enriched in this study

2.5.3 基于候选基因多态性的基因功能验证 采用小麦 Pan800K 数据库(未发表数据)对8个候选基因进行了多态性分析,共挖掘到位于基因或上下游 2 kb 范围内的 1489 个多态性位点,并将以上多态性位点重新加入到上述小麦 660K 芯片进行 GWAS,结果表明仅有 2 个基因的多态性能够在西平和郑州环境中重新被关联到(图4),分别为 *TraesCS5B02G399800* 和 *TraesCS5D02G004300*,其中位于 5D 染色体上的 *TraesCS5D02G004300* 为小麦硬度调控基因 *Pinb*。此外有研究表明,位于 5B 染色体上的 UDP-葡萄糖/GDP-甘露糖脱氢酶家族基因

TraesCS5B02G399800 同时调控小麦抽穗期和开花期^[21]。

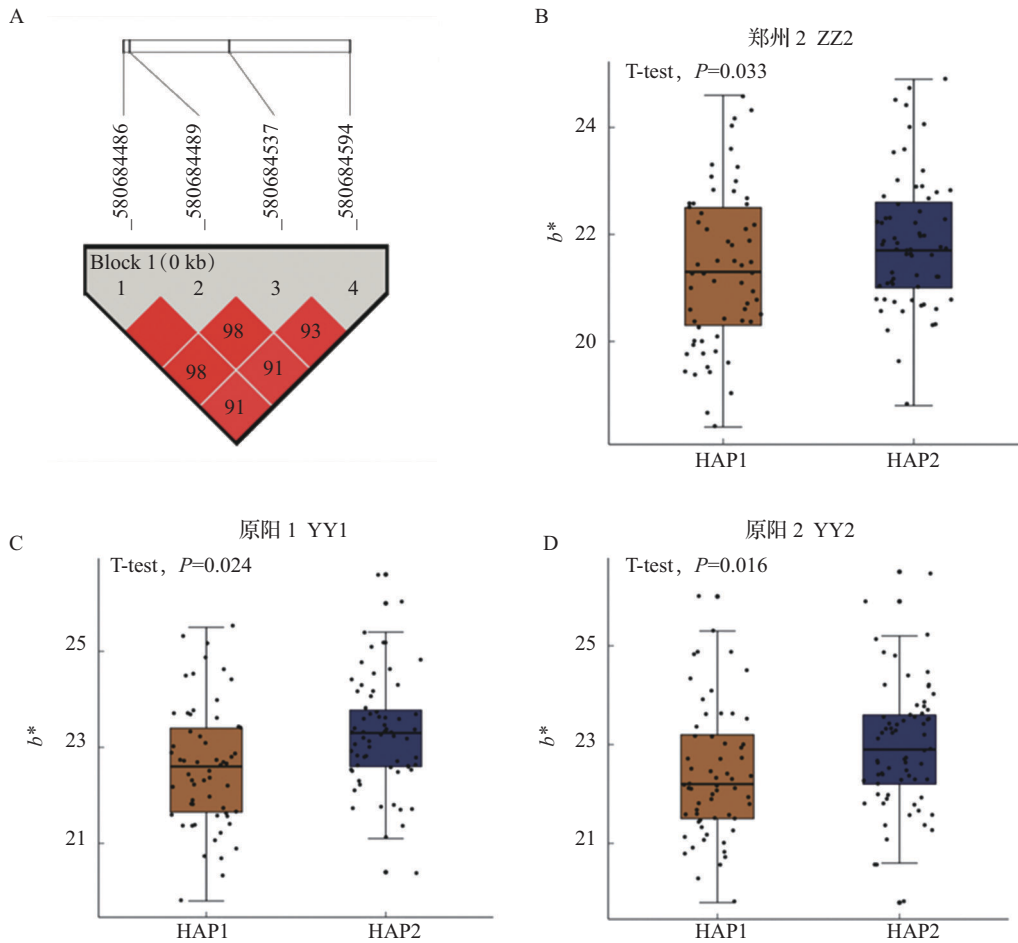
2.5.4 候选基因单倍型分析 因 5D 染色体上的 *Pinb* 基因在群体中并未形成有效单倍型,因此仅对位于 5B 染色体上的 *TraesCS5B02G399800* 进行了单倍型分析(图5)。结果表明,该基因内部的 4 个 SNP 在群体中共形成了 2 种单倍型,分别为 CTC (HAP1)和 TGCG (HAP2),其中单倍型 HAP2 表现出更高的小麦籽粒黄度,且表型差异在 3 个环境郑州 2(ZZ2)、原阳 1(YY1)、原阳 2(YY2)中达到显著或极显著水平。



A: 添加基因多态性之后; B: 添加基因多态性之前; XP: 西平, ZZ: 郑州
 A: After adding gene polymorphism; B: Before adding gene polymorphism; XP: Xiping, ZZ: Zhengzhou

图4 加入基因多态性前后的GWAS对比

Fig. 4 Comparison of manhattan plots before and after adding gene polymorphism



A: 单倍型区块; B~D: 不同单倍型表型差异, HAP1 和 HAP2 序列分别为 CCTC 和 TGCG

A: Haplotype block; B-D: Phenotype of different haplotypes, the sequences of HAP1 and HAP2 were CCTC and TGCG, respectively

图5 候选基因 *TraesCS5B02G399800* 的单倍型分析

Fig. 5 Haplotype analysis of candidate gene *TraesCS5B02G399800*

3 讨论

不同于Hong等^[16]采用的韩国SCINCO荧光分光光度计法测量籽粒色泽性状,本研究对黄淮麦区243份小麦材料籽粒色泽相关性状 L^* 、 a^* 和 b^* 采用SeedCount SC 5000种子图像分析系统进行了测定。该系统主要有如下特点:(1)虚拟种子技术结合专利托盘可模拟出籽粒的三维结构参数;(2)针对不同种子空间构造设计专有算法;(3)其产生的详细数据表格可直接存储;(4)包含有自动杂质剔除、异常粒剔除等功能,且在不损坏样品的情况下提供样品的详细信息(<http://www.tenovolab.cn/>),以上特征保证了表型数据的可靠性。

L^* 、 a^* 和 b^* 在所研究的自然群体中表现出丰富的表型变异;方差分析结果表明各品系之间差异达到极显著水平,地点间的差异不显著,3个性状的广义遗传力均达到了80%以上,表明 L^* 、 a^* 和 b^* 主要受遗传因素影响,为其遗传位点的挖掘奠定了基础。本研究采用高密度的小麦660K SNP芯片表征群体的基因型信息,经质控后仍保留了395783个高质量SNP位点,而相关研究多采用小麦90K SNP芯片^[16]和DARt^[14]标记进行关联分析,标记密度远低于本研究采用的芯片标记密度,且小麦660K SNP芯片目前已广泛应用于小麦分子育种领域^[17]。

前人研究主要集中在小麦面粉色泽相关遗传位点挖掘。本研究挖掘到的小麦籽粒色泽调控位点和前人研究的面粉色泽相关位点定位在相同染色体上,如Parker等^[22]挖掘到 b^* 性状相关的位点位于3A和7A染色体,Ma等^[1]挖掘到 L^* 和 b^* 性状相关位点位于1A和7B染色体,于海霞等^[14]将 a^* 性状相关的位点定位到1A染色体,Alemu等^[23]将籽粒 a^* 性状相关的遗传位点定位于2A染色体。然而以上研究通常采用低密标记来定位遗传位点,没有对候选基因进行预测。目前仍有部分小麦籽粒色泽遗传位点挖掘的报道,Hong等^[16]利用小麦90K SNP芯片对普通小麦的籽粒色泽性状进行了遗传位点挖掘,共检测到11个显著SNP位点,主要分布在2A、2B、4B染色体上,挖掘到69个注释基因,主要包括类黄酮相关基因、泛素家族和相关酶调控基因、MYB转录因子结合位点。其中本研究也挖掘到位于2B、4B染色体上重复检测到的一因多效位点,但挖掘到的候选基因与Hong等^[16]并不相同,可能由于籽粒色泽相关性状受多基因调控。

本研究基于GWAS、基因表达量、基因功能注

释、基因多态性分析等手段挖掘到了2个可能的候选基因,包括已知的硬度调控基因*Pinb*。并通过单倍型分析检测到了调控籽粒黄度基因*TraesCS5B02G399800*的差异单倍型。葡萄糖脱氢酶是一种依赖NAD⁺的酶,可催化葡萄糖的双重氧化,生成葡萄糖醛酸,在植物细胞壁合成中起重要作用^[24]。 β -葡聚糖、阿拉伯基本聚糖是细胞壁的结构多糖,在胚乳细胞壁相互连接,增大了细胞壁的支撑性,有研究表明,大麦籽粒中的非淀粉多糖含量与籽粒硬度正相关^[25]。本研究挖掘的基因*Pinb*和*TraesCS5B02G399800*,推测以上两个基因共同通过影响细胞壁的合成和色素的积累调控小麦籽粒色泽,以上两个基因的互作调控关系将是今后研究的重点方向。

亚精胺(Spermidine)广泛存在于植物中,具有刺激生长^[26]、抗氧化^[27]等作用。近年来的研究发现,天然的亚精胺类物质存在于黑枸杞(*Lycium ruthenicum* Murr.)、红花(*Carthamus tinctorius* L.)等植物中,分别表现出抗抑郁、镇痛和降血压等多种功能特性^[28],与花青素有相似功能。Zhang等^[29]揭示了花青素的生物合成及在不同颜色小麦籽粒中的调控网络,发现小麦籽粒的颜色主要由果皮或糊粉层中的花青素决定,花青素有助于增加小麦的营养。紫色和蓝色籽粒中*TaMYC1*和*TaMYC4*分别参与了花青素的生物合成。本研究挖掘到了*TraesCS7A02G350100*注释为精胺和亚精胺合成酶,该基因很可能通过参与精胺和亚精胺合成来调控小麦籽粒色泽。

位于7A染色体上的*TraesCS7A02G350800*被显著富集参与MAPK(Mitogen-activated protein kinase)植物信号通路(ko04016)。植物MAPK是一类高度保守的Ser/Thr类蛋白激酶,广泛存在于级联反应途径,MAPK可磷酸化多种底物,包括转录因子、蛋白激酶和细胞骨架相关蛋白等,在调控植物响应逆境(盐分、干旱、极端温度、重金属等)胁迫中起重要作用^[30]。近年来研究表明MAPK信号在决定植物配子体发育、胚胎发育、株型、产量等方面发挥重要作用^[31]。在拟南芥中,MPK3和MPK6介导的SPOROCYTELESS蛋白磷酸化促进了花药发育^[32]。MPK3和MPK6也调节拟南芥的胚胎发育,MPK3/MPK6双突变植物导致胚胎发育异常^[33]。此外,水稻的种子发育和籽粒大小也受MAPK的调控。OsRac1是Rho家族的GTP酶,通过促进小穗壳细胞分裂,提高籽粒灌浆率,从而正向调节籽粒大小和产量。OsRac1被发现与OsMPK6相互作用并调节

其磷酸化状态改变籽粒大小^[34],分别抑制 *OsMKK10*、*OsMKK4* 和 *OsMPK6* 可导致籽粒更小、穗型更密,因此籽粒大小和数量基因 *GSN1* 编码蛋白是决定水稻穗部通路 *OsMKKK10*-*OsMKK4*-*OsMPK6* 的负调控因子,而 MAPK 通路通过限制小穗壳的细胞分裂负调控水稻籽粒大小^[35]。在小麦中 MAPK 参与籽粒的调节与代谢相关的研究报道较少,本研究挖掘到的参与 MAPK 代谢通路基因为小麦籽粒相关性状的表达调控提供了新见解,其功能仍需进一步验证。

参考文献

- [1] Ma D Y, Sun D X, Zuo Y, Wang C Y, Zhu Y J, Guo T C. Diversity of antioxidant content and its relationship to grain color and morphological characteristics in winter wheat grains. *Journal of Integrative Agriculture*, 2014, 13:1258-1267
- [2] Shen Y, Jin L, Xiao P, Lu Y, Bao J. Total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight. *Journal of Cereal Science*, 2009, 49:106-111
- [3] Harakotr B, Suriharn B, Scott M P, Lertrat K. Genotypic variability in anthocyanins, total phenolics, and antioxidant activity among diverse waxy corn germplasm. *Euphytica*, 2015, 2:237-248
- [4] Kim M J, Hyun J N, Kim J A, Park J C, Kim M Y, Kim J G, Lee S J, Chun S C, Chung I M. Relationship between phenolic compounds, anthocyanins content and antioxidant activity in colored barley germplasm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55:4802-4809
- [5] 宗学风, 张建奎, 李帮秀, 余国东, 石有明, 王三根. 小麦籽粒颜色与抗氧化作用. *作物学报*, 2006, 32(2):237-242
Zong X F, Zhang J K, Li B X, Yu G D, Shi Y M, Wang S G. Relationship between antioxidant and grain colors of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Acta Agronomica Sinica*, 2006, 32(2):237-242
- [6] Gfeller F, Svejda F. Inheritance of post-harvest seed dormancy and kernel colour in spring wheat lines. *Canadian Journal of Plant*, 1960, 40:1-6
- [7] 赵宇慧, 李秀秀, 陈倬, 鲁宏伟, 刘羽诚, 张志方, 梁承志. 生物信息学分析方法 I: 全基因组关联分析概述. *植物学报*, 2020, 55(6):715-732
Zhao Y H, Li X X, Chen Z, Lu H W, Liu Y C, Zhang Z F, Liang C Z. An overview of genome-wide association studies in Plants. *Chinese Bulletin of Botany*, 2020, 55(6):715-732
- [8] Xiao Y J, Liu H J, Wu L J, Warburton M, Yan J. Genome-wide association studies in maize: Praise and stargaze. *Molecular Plant*, 2017, 10:359-374
- [9] Chen H L, Hao Z Y, Zhao Y F, Yang R. A fast-linear mixed model for genome-wide haplotype association analysis: Application to agronomic traits in maize. *BMC Genomics*, 2020, 21:151
- [10] Luján Basile S M, Ramírez I A, Crescente J M, Conde M B, Demichelis M, Abbate P, Rogers W J, Pontaroli A C, Helguera M, Vanzetti L S. Haplotype block analysis of an Argentinean hexaploidy wheat collection and GWAS for yield components and adaptation. *BMC Plant Biology*, 2019, 19:553
- [11] Sun C W, Zhang F Y, Yan X F, Dong Z D, Cui D Q, Chen F. Genome-wide association study for 13 agronomic traits reveals distribution of superior alleles in bread wheat from the Yellow and Huai Valley of China. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 15(8):953-969
- [12] Chen J, Zhang F, Zhao C, Lv G, Sun C, Pan Y, Guo X, Chen F. Genome-wide association study of six quality traits reveals the association of the *TaRPP13L1* gene with flour colour in Chinese bread wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(11):2106-2122
- [13] Zhai S, Liu J, Xu D, Wen W, Yan J, Zhang P, Wan Y, Cao S, Hao Y, Xia X, Ma W, He Z. A genome-wide association study reveals a rich genetic architecture of flour color-related traits in bread wheat. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9:1136
- [14] 于海霞, 肖静, 田纪春. 小麦面粉色泽(白度)DArT 标记的关联分析. *作物学报*, 2014, 40(12):2198
Yu H X, Xiao J, Tian J C. Genome-wide association analysis of flour color (whiteness) using dart markers in common wheat. *Acta Agronomica Sinica*, 2014, 40(12):2198
- [15] 张立平, 阎俊, 夏先春, 何中虎, Mark W Sutherland. 普通小麦籽粒黄色素含量的 QTL 分析. *作物学报*, 2006, 32(1):41-45
Zhang L P, Yan J, Xia X C, He Z H, Sutherland M W. QTL mapping for kernel yellow pigment content in common wheat. *Acta Agronomica Sinica*, 2006, 32(1):41-45
- [16] Hong M J, Ko C S, Kim D Y. Genome-wide association study to identify marker-trait associations for seed color in colored wheat (*Triticum aestivum* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25:3600
- [17] Sun C, Dong Z, Zhao L, Ren Y, Zhang N, Chen F. The Wheat 660K SNP array demonstrates great potential for marker-assisted selection in polyploid wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(6):1354-1360
- [18] Lipka A E, Tian F, Wang Q, Peiffer J, Li M, Bradbury P J, Gore M A, Buckler E S, Zhang Z. GAPIT: Genome association and prediction integrated tool. *Bioinformatics*, 2012, 28(18):2397-2399
- [19] Barrett J C, Fry B, Maller J D, M J, Daly M J. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 2004, 21(2):263-265
- [20] Ma S, Wang M, Wu J, Guo W, Chen Y, Li G, Wang Y, Shi W, Xia G, Fu D, Kang Z, Ni F. WheatOmics: A platform combining multiple omics data to accelerate functional genomics studies in wheat. *Molecular Plant*, 2021, 14(12):1965-1968

- [21] Qiao P, Li X, Liu D, Lu S, Zhi L, Rysbekova A, Chen L, Hu Y G. Mining novel genomic regions and candidate genes of heading and flowering dates in bread wheat by SNP-and haplotype-based GWAS. *Molecular Breeding*, 2023, 43 (11):76
- [22] Parker G D, Chalmers J K, Rathjen A J, Langridge P. Mapping loci associated with flour color in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 97: 238-245
- [23] Alemu A, Feyissa T, Tuberosa R, Maccaferri M, Sciarra G, Letta T, Abeyo B. Genome-wide association mapping for grain shape and color traits in Ethiopian durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. *durum*). *The Crop Journal*, 2020, 8(5):757-768
- [24] Jia T, Ge Q, Zhang S, Zhang Z, Liu A, Fan S, Jiang X, Feng Y, Zhang L, Niu D, Huang S, Gong W, Yuan Y, Shang H. UDP-Glucose dehydrogenases: Identification, expression, and function analyses in upland cotton (*Gossypium hirsutum*). *Frontiers in Genetics*, 2021, 11:597890
- [25] Gamlath J, Aldred G P, Panozzo J F. Barley (1lead to 3; 1 lead to 4) - β -glucan and arabinoxylan content are related to kernel hardness and water uptake. *Journal of Cereal Science*, 2008, 47(2):365-371
- [26] Yang Q, Zheng C, Cao J, Shou P, Lin L, Velletri T, Jiang M, Chen Q, Han Y, Li F, Wang Y, Cao W, Shi Y. Spemidine alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis through inducing inhibitory macrophages. *Cell Death & Differentiation*, 2016, 23(11):1850-1861
- [27] Gupta V K, Pech U, Bhukel A, Fulterer A, Ender A, Mauermann S F, Andlauer T F M, Anwi-Adjei E, Beuschel C, Thriene K, Maglione M, Quentin C, Bushow R, Sigrist S J. Spemidine suppresses age-associated memory impairment by preventing adverse increase of presynaptic active zone size and release. *PLoS Biology*, 2016, 14(9):e1002563
- [28] 赵硕, 幸岑臻, 王艳, 锁然, 王凤忠. 植物中亚精胺类物质的化学结构及生理活性研究进展. *核农学报*, 2018, 32(1): 123-130
- Zhao S, Xing C C, Wang Y, Suo R, Wang F Z. Review on chemical structures and biological activities of spermidine derivatives in plants. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2018, 32(1):123-130
- [29] Zhang S, Sun F, Zhang C, Zhang M, Wang W, Zhang C, Xi Y. Anthocyanin biosynthesis and a regulatory network of different-colored wheat grains revealed by multiomics analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(3): 887-900
- [30] 张鑫苗, 伍国强, 魏明. MAPK在植物响应逆境胁迫中的作用. *草业学报*, 2024, 33(1):182-197
- Zhang X M, Wu G Q, Wei M. The role of MAPK in plant response to abiotic stress. *Acta Prataculturae Sinica*, 2024, 33 (1):182-197
- [31] Manna M, Rengasamy B, Sinha A K. Revisiting the role of MAPK signalling pathway in plants and its manipulation for crop improvement. *Plant, Cell & Environment*, 2023, 46(8): 2277-2295
- [32] Zhao F, Zheng Y F, Zeng T, Sun R, Yang J Y, Li Y, Ren D T, Ma H, Xu Z H, Bai S N. Phosphorylation of SPOROXYTELESS/NOZZLE by the MPK3/6 kinase is required for anther development. *Plant Physiology*, 2017, 173 (4):2265-2277
- [33] López-Bucio J S, Dubrovsky J G, Raya-González J, Ugartechea-Chirino Y, López-Bucio J, de Luna-Valdez LA, Ramos-Vega M, León P, Guevara-García A A. *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinase 6 is involved in seed formation and modulation of primary and lateral root development. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(1): 169-183
- [34] Zhang Y, Xiong Y, Liu R, Xue H W, Yang Z. The Rho-family GTPase OsRac1 controls rice grain size and yield by regulating cell division. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2019, 116(32):16121-16126
- [35] Guo T, Chen K, Dong N Q, Shi C L, Ye W W, Gao J P, Shan J X, Lin H X. *GRAIN SIZE AND NUMBER1* negatively regulates the OsMKKK10-OsMKK4-OsMPK6 cascade to coordinate the trade-off between grain number per panicle and grain size in rice. *The Plant Cell*, 2018, 30(4):871-888