

大豆耐低磷性全基因组关联分析

梁腾月¹, 谷勇哲², 王辉¹, 杨光¹, 敖雪¹, 邱丽娟²

(1 沈阳农业大学农学院, 沈阳 110866; 2 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要: 大豆是喜磷作物, 缺磷会影响大豆正常生长发育, 使大豆产量下降。大豆的单株粒重为数量性状是鉴定大豆耐低磷性的重要指标, 目前多数研究还处于 QTL 定位阶段, 因而发掘出更多调控基因和优异等位变异, 为促进大豆耐低磷性调控机制的解析及育种利用尤为重要。本研究利用 395 份大豆种质资源, 以低磷处理下单株粒重和相对单株粒重作为耐低磷性鉴定指标, 结合高密度 SNP 标记进行全基因组关联分析并初步预测候选基因。结果表明不同大豆种质的耐低磷性差异明显, 单株粒重在常磷、低磷和相对条件下的均值分为 4.08 g、1.15 g、0.34, 三者变异系数均高于 50%。通过聚类分析筛选出 ZDD00219、ZDD00163 等 4 份地方种质和 ZDD00383、ZDD23714 等 16 份选育种质为磷高效大豆种质。全基因组关联分析共鉴定出 32 个与大豆耐低磷性显著相关的 SNP 位点, 其中低磷处理下单株粒重相关的 SNP 位点 23 个, 相对单株粒重相关的 SNP 位点 9 个。经 LD block 分析得到候选基因 2 个, 分别是在根中特异性表达 WRKY DNA 结合域相关的基因和在根毛中特异性表达磷酸吡哆醛磷酸酶相关的基因。

关键词: 大豆; 耐低磷性; 全基因组关联分析

Genome Wide Association Study of Low Phosphorus Tolerance in Soybean (*Glycine max* L.)

LIANG Teng-yue¹, GU Yong-zhe², WANG Hui¹, YANG Guang¹, AO Xue¹, QIU Li-juan²

(1 College of Agronomy, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866; 2 Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: Soybean is a phosphorus-loving crop, whereas phosphorus deficiency can affect soybean growth and development finally resulting in yield loss. The grain weight per plant of soybean is a quantitative character, which is an important indicator for identifying soybean tolerance to low phosphorus. At present, most studies are still in the stage of QTL mapping, so it is particularly important to discover more regulatory genes and excellent allelic variations in order to promote the analysis of the regulatory mechanism of soybean tolerance to low phosphorus and its breeding utilization. In this study, 395 soybean germplasm resources were used to conduct genome wide association scanning (GWAS) and preliminarily predict candidate genes by using grain weight per plant under low phosphorus and relative conditions as identification indicators for low phosphorus tolerance traits, combined with high-density SNP markers. The results showed that the tolerance to low phosphorus was significantly different among different soybean germplasms. The mean values of grain weight per plant under normal phosphorus, low phosphorus and relative conditions were 4.08 g, 1.15 g and 0.34, and their coefficients of variation were higher than 50%. Through cluster analysis, 4 landraces such as ZDD00219 and ZDD00163 and 16 cultivars such as ZDD00383 and ZDD23714 were screened as phosphorus efficient soybean germplasms. GWAS identified 32 SNP loci significantly associated with low phosphorus tolerance of soybean, including 23 SNP loci associated with single plant grain weight under low phosphorus conditions and nine SNP loci associated with relative single plant grain weight. Two

收稿日期: 2022-07-21

修回日期: 2022-09-05

网络出版日期:

URL:

第一作者研究方向为大豆遗传改良与生理生态, E-mail: 1561347437@qq.com

通信作者: 敖雪, 研究方向为大豆遗传改良与生理生态, E-mail: a2009syau@syau.edu.cn;

邱丽娟, 研究方向为大豆基因资源发掘与创新利用, E-mail: qjulijuan@caas.cn

基金项目: 中国和乌拉圭联合实验室合作项目 (2018YFE0116900-09); 国家自然科学基金项目 (31872854)

Foundation projects: Project of Sino-Uruguayan Joint Laboratory (2018YFE0116900-09), National Natural Science Foundation of China (31872854)

candidate genes were proposed by LD block analysis, including a WRKY DNA binding domain gene that was detected with specific expression in roots, and a pyridoxal phosphate phosphatase gene that was detected with specific expression in root hairs.

Key words: soybean; low phosphorus tolerance; GWAS

大豆[*Glycine max* (L.) Merr.]是重要的粮油作物, 在世界经济发展中起着重要的作用^[1]。磷在植物生长发育和产量形成中是不可缺少的元素之一, 以多种方式参与植物体内各种生物化学反应, 对促进植物生长发育和保持植物正常新陈代谢起着重要的作用^[2]。磷还能增强植物抵抗不良自然条件的能力, 在一定程度上提高作物的耐旱、耐寒性和抗病能力^[3]。全世界 50%的耕地缺磷, 我国耕地中约有 2/3 缺磷^[4]且被大豆有效利用的磷含量较低, 尤其在一些酸性、钙质土中可被有效利用的磷更是少之又少^[5]。大豆是一种喜磷作物, 缺磷会导致大豆细胞分裂、光合作用和呼吸作用等代谢频率降低, 使大豆开花数和叶片减少, 最终影响大豆生长, 造成大豆产量降低^[6-7]。有研究表明, 不同基因型大豆对低磷胁迫的适应机制有显著的遗传差异^[8], 而在缺磷条件下的籽粒产量是衡量植株磷效率的重要性状^[2]。王辉^[9]分析 90 个大豆品种单株粒重和相对单株粒重, 筛选出在低磷条件下减产较少的品种即磷高效大豆品种。目前对于解析低磷对大豆影响的遗传基础研究报道相对较少, 因此, 发掘调控大豆耐低磷的基因及优异等位基因, 为进一步揭示大豆耐低磷的遗传与分子机制奠定坚实基础,同时对实现绿色高效生产具有重要指导意义。

全基因组关联分析 (GWAS, genome-wide associated study) 是正向遗传学中鉴定基因最常用和最有效的方法之一^[10]。Zhang 等^[11]利用 GWAS 分析定位一个主效耐低磷 QTL(qPE8), 分离并克隆了控制该位点的候选基因(*GmACP1*), 通过表达分析、遗传转化等实验证明该基因在低磷下表达显著增高。宁丽华^[12]以 191 份栽培大豆为材料,利用 GWAS 分析获得了 119 个与产量性状相关联的 SNPs, 并同源克隆了大豆中可能与磷效率相关的基因 *GmG3PT1* 基因并对该基因功能进行转基因验证, 结果表明在低磷胁迫条件下 *GmG3PT1* 基因参与植株体内有机磷向无机磷的转变,对于维持植物体内磷酸盐的平衡中发挥重要作用。通过整合高密度连锁图谱和 GWAS 分析, Zhang 等^[13]克隆一个控制乙烯生物合成的重要调节因子 *GmETO1*, 过表达 *GmETO1* 可抑制根系乙烯的合成, 促进毛状根的增多和增长, 增加磷吸收和提高磷利用效率从而提高大豆对低磷胁迫的耐受性。

迄今, 有关大豆耐低磷的基因发掘研究报道较少, 尚不能满足育种需求, 本研究利用 395 份大豆种质资源, 筛选磷高效大豆种质。利用 GWAS 分析, 挖掘种质资源中控制大豆耐低磷性相关基因位点, 为大豆耐低磷性相关基因的克隆及遗传研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用的 395 份大豆种质资源包含地方大豆种质 139 份和选育大豆种质 256 份, 其中, 国内 21 个省份大豆种质 393 份、国外大豆种质 2 份(附表 1)。

1.2 试验设计

2019—2020 年种植在沈阳农业大学农学院教学科研实验基地盆栽场(41.81° N, 123.56° E), 采用 PVC 管进行砂培, PVC 管内径 16 cm, 高 25 cm, 盆底有 3 个直径 0.3 cm 小孔。设置两个处理, 分别为常磷处理(NP, Normal phosphorus), 调节营养液磷浓度为 0.5 mmol/L 和低磷处理(LP, Low phosphorus), 调节营养

液磷浓度为 0.005 mmol/L。本研究磷源采用磷酸二氢钾，缺乏的钾素用氯化钾补齐。完全随机区组排列 3 次重复，每盆装 5 kg 石英砂，播种 5 粒种子，待大豆出苗后，选长势均匀一致的植株，每盆定苗 3 株。出苗后每天 8:00 浇 500 mL 1/2 营养液；16:00 浇 1 L 蒸馏水，洗掉多余盐分，出苗 7 d 后改 1/2 营养液为全营养液。参照王辉^[9]等人的方法配置大豆营养液配方，营养液 pH 调节为 6.0。

1.3 表型鉴定

395 份大豆种质成熟后，对每盆 3 株大豆进行收获。待大豆籽粒自然晾干后，利用分析天平对大豆籽粒进行称量，每个样本测定 3 次重复，以低磷处理下单株粒重和低磷处理下与常磷处理下的单株粒重比值（相对单株粒重）作为耐低磷鉴定的指标^[9]。利用 R 软件进行大豆单株粒重聚类分析，以低磷处理下单株粒重和相对单株粒重作为鉴定大豆种质磷效分组的指标^[9]。

1.4 基因型测定与质控

本研究使用的基因型 SNP(single nucleotide polymorphism)数据是由中国农业科学院作物科学研究所与北京康普森生物科技有限公司合作研发的“中豆芯一号”芯片^[14]测序而来的。利用 PLINK 对最小等位基因频率小于 0.05 和基因型缺失率大于 0.25 的 SNP 进行基因型过滤^[15]，剩余 91,597 个 SNPs 位点用于后续 GWAS 分析。

1.5 全基因组关联分析

使用 GAPIT(<http://zzlab.net/GAPIT>)进行主成分分析、亲缘关系分析和 GWAS 分析。GWAS 分析采用固定和随机模型交替概率统一(farmCPU)来平衡假阳性和假阴性结果。显著性位点的阈值($-\log_{10}(P)$)设置调整为 4，在结果中筛选出大于阈值的位点，用于后续筛选候选基因。

1.6 候选基因分析

利用 soybase(<https://www.soybase.org/>)网站参考基因组图谱查找候选基因。基于大豆连锁不平衡衰减距离，本研究在显著位点上下游各延伸 100kb，根据所有 SNP 位点物理位置对其进行基因扫描，寻找与耐低磷相关基因。利用 Phytozome(<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)网站查找本研究测序参考基因组 Williams 82 在各组织表达量^[2]，利用 TBtools 软件(<https://github.com/CJ-Chen/TBtools>)绘制候选基因组织表达热图。

2 结果与分析

2.1 表型分析

2.1.1 不同磷处理下大豆单株粒重分析 参试大豆种质资源单株粒重的变异幅度较大，分布范围在常磷处理下为 0.49~14.43 g，在低磷处理下为 0.05~5.35 g，相对单株粒重为 0.04~0.98，且三者变异系数均高于 50%，说明本研究所用试验材料在磷利用效率上具有丰富变异(表 1)。在常磷、低磷处理下的单株粒重及相对单株粒重均呈正态分布(图 1)，符合典型的数量性状遗传特点。相对单株粒重在 0.8 以上的种质有 18 份，包括 ZDD10252、ZDD02864、ZDD02866 等地方种质以及 ZDD24315、ZDD23852、ZDD24323 等选育种质，表现为对低磷环境不敏感。相对粒重在 0.1 以下的种质有 14 份，包括 ZDD03969、ZDD13590、ZDD07540 地方种质以及 ZDD22643、ZDD05572、ZDD24399 等选育种质，表现为对低磷环境极敏感(附表 1 和图 1)。这些结果说明本试验大豆种质的耐低磷抗性变异丰富，适宜进行关联分析。统计分析结果表明

(表 1)，地方种质在常磷和低磷处理下的变异幅度均比选育种质小，但变异系数高于选育种质，耐低磷水平的下限比选育种质略高，二者间在两种条件下单株粒重均有极显著差异(图 2)，表明耐低磷性状可能在大豆改良过程中受到了选择。

表 1 不同磷处理下大豆单株粒重的统计分析

Table 1 Statistical analysis of soybean grain weights per plant under different phosphorus treatments

性状 Trait	种质类型 Type	最小值 Min.	最大值 Max.	均值 Average	标准差 SD	变异系数(%) CV
常磷处理下单株粒重 (g) NP grain weight	地方种质	0.49	11.94	3.60	2.11	58.59
	选育种质	0.81	14.43	4.33	2.21	50.90
	总计	0.49	14.43	4.08	2.20	53.92
低磷处理下单株粒重 (g) LP grain weight	地方种质	0.21	4.44	1.00	0.61	60.87
	选育种质	0.05	5.35	1.22	0.65	52.97
	总计	0.05	5.35	1.15	0.64	56.12
相对单株粒重 Relative grain weight	地方种质	0.04	0.98	0.34	0.20	59.67
	选育种质	0.05	0.98	0.33	0.20	59.79
	总计	0.04	0.98	0.34	0.20	59.67

NP: 常磷处理; LP: 低磷处理。下同
NP: Normal phosphorus; LP: Low phosphorus. The same as below

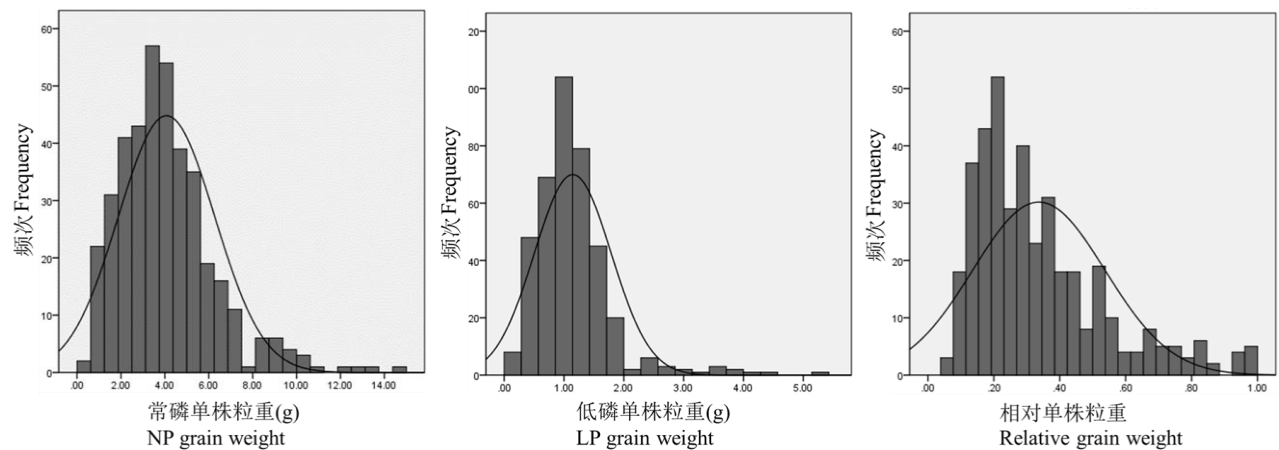
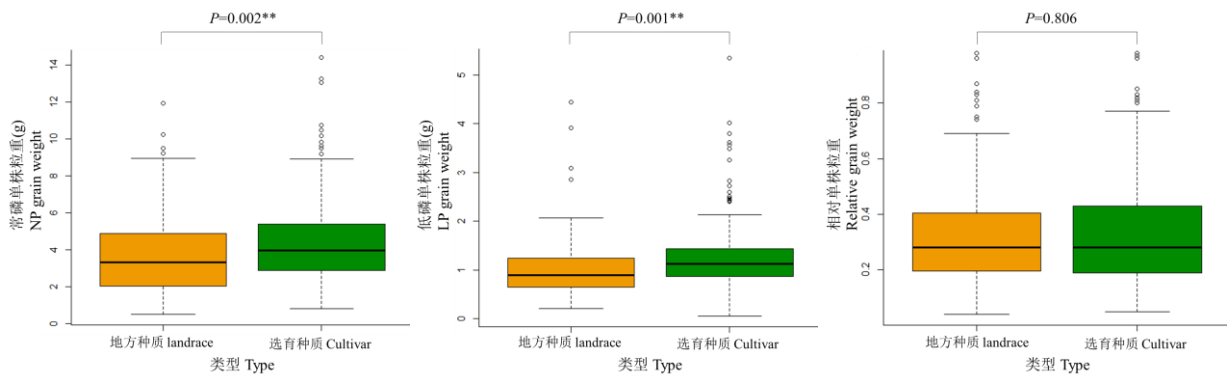


图 1 大豆在常磷、低磷和相对条件下的单株粒重频次分布

Fig.1 Phenotypic distribution of grain weight frequency per plant in soybean under normal phosphorus, low phosphorus and relative conditions



** :在 P<0.01 水平差异显著

** : Correlation is significant at P<0.01 level

图 2 大豆地方种质与选育种质在常磷、低磷和相对条件下的单株粒重差异分析

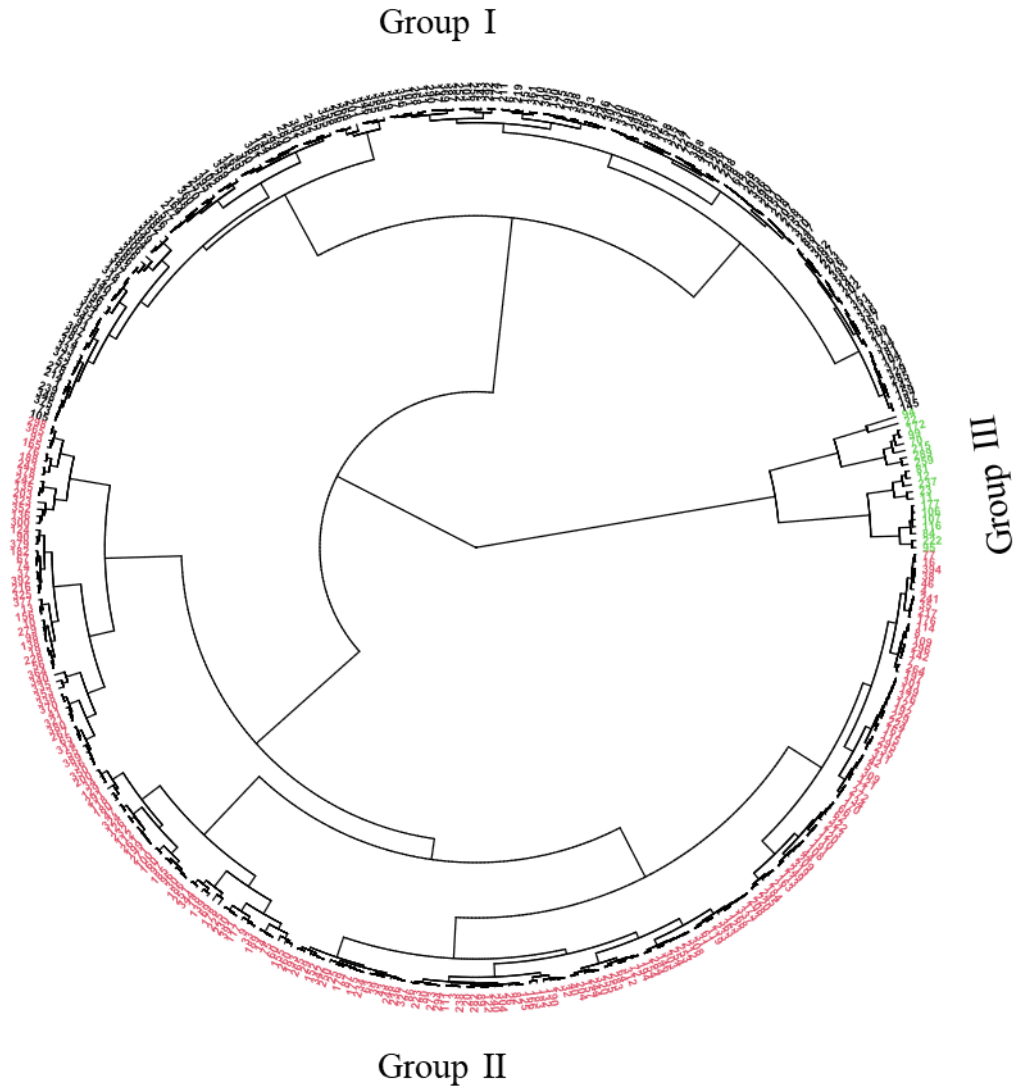
Fig.2 Analysis of differences in grain weight per plant between soybean landrace and cultivar under normal phosphorus, low phosphorus and relative conditions

2.1.2 不同磷处理下大豆单株粒重聚类分析 对 395 份大豆种质低磷处理下单株粒重和相对单株粒重，以平方欧式遗传距离利用离差平方和法(Ward 法)进行系统聚类分析(图 3)，结果表明，以欧式遗传距离 5 为阈值，可将 395 个大豆种质划分为 3 大类(表 2)：第 I 类包含 160 份种质，占材料总数的 40.51%，分别为 72 份地方种质和 88 份选育种质，其低磷处理下单株粒重和相对单株粒重分布范围分别为 0.05~1.01 g 和 0.04~0.58，表现为低磷处理下单株粒重和相对单株粒重均较低，被划分为磷低效大豆种质。第 II 类包含 215 份种质，占材料总数的 54.43%，分别为 63 份地方种质和 152 份选育种质，低磷处理下单株粒重和相对单株粒重的变化范围分别在 0.47~2.13 g 和 0.08~0.98，表现为低磷处理下单株粒重和相对单株粒重处于中间型，被划分为中间型大豆种质。第 III 类包含 20 份种质，占材料总数的 5.06%，分别为 4 份地方种质和 16 份选育种质，其低磷处理下单株粒重和相对单株粒重变化范围分别为 2.40~5.35 g 和 0.24~0.84，表现为低磷处理下单株粒重和相对单株粒重均较高，被划分为磷高效大豆种质。这些磷高效大豆种质包括 ZDD00219、ZDD00163 等地方种质，也包含 ZDD00383、ZDD23714 等选育种质。

表 2 大豆种质低磷处理下单株粒重和相对单株粒重聚类分组

Table 2 Cluste grouping of soybean germplasm under LP grain weight and relative grain weight of

分组 Groups	种质数量 Number of germplasm	低磷处理下单株粒重(g) LP grain weight	相对单株粒重 Relative grain weight	磷效率类型 Phosphorus efficiency types
I	160	0.05~1.01	0.04~0.58	磷低效大豆种质
II	215	0.47~2.13	0.08~0.98	中间型大豆种质
III	20	2.40~5.35	0.24~0.84	磷高效大豆种质



1~395: 供试材料编号, 不同颜色表示不同分组

1~395: Number of test materials, different colors indicate different groups

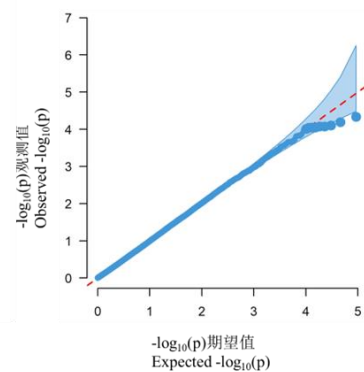
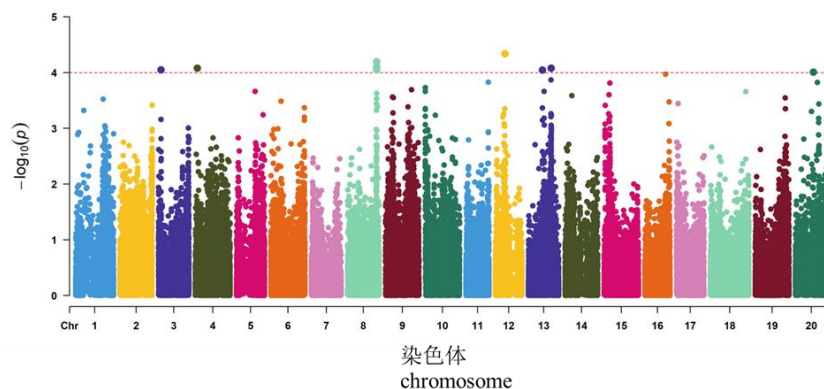
图3 大豆种质在低磷处理下单株粒重和相对单株粒重聚类结果

Fig.3 Clustering results of grain weight under LP grain weight and relative grain weight of soybean germplasm

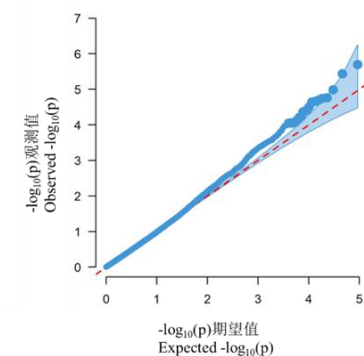
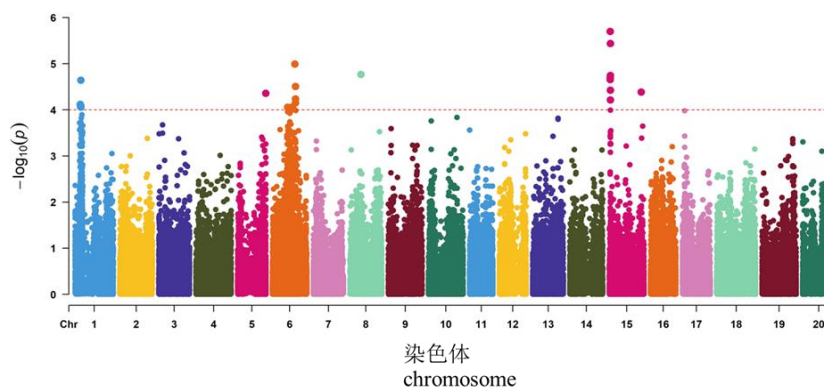
2.2 大豆耐低磷相关性状 GWAS 分析

本研究利用 GAPIT 将基于自然群体的 395 份供试材料的低磷处理下单株粒重和相对单株粒重表型结合测序数据使用 farmCPU 模型进行全基因组关联分析(图 4)。低磷处理下单株粒重在 farmCPU 模型下紧密关联的 SNPs($-\log_{10}P>4$)有 9 个, 分布在 3 号、4 号、8 号、12 号、13 号和 20 号染色体上。相对单株粒重在 farmCPU 模型下紧密关联的 SNPs($-\log_{10}P>4$)有 23 个, 分布在 1 号、5 号、6 号、8 号和 15 号染色体上。根据这些 SNP 的物理位置, 将定位结果与前人研究进行比较后发现, 其中 13 号染色体上定位到的 QTL 与耿雷跃等^[16]定位的 satt335—satt522 重叠。除这个共定位的 QTL 以外, 其他定位到的 QTL 还未见报道, 表明这些 QTL 是控制大豆耐低磷性的新位点。

A



B



A: 低磷处理下单株粒重在 farmCPU 模型下关联分析 Manhattan 图(左)和 Q-Q plot 图(右); B: 相对单株粒重在 farmCPU 模型下关联分析 Manhattan 图(左)和 Q-Q plot 图(右)

A: LP grain weight correlation analysis Manhattan plot and Q-Q plot under the farmCPU model; B: Relative grain weight correlation analysis Manhattan plot and Q-Q plot under the farmCPU model

图 4 大豆单株粒重 GWAS 分析

Fig.4 GWAS analysis of soybean grain weight

表 3 farmCPU 模型下低磷处理下单株粒重和相对单株粒重关联显著 SNP

Table 3 Significant SNP associated with LP grain weight and relative grain weight under farmCPU model

性状 Trait	染色体 Chromosome	位置 Position	等位基因型 Alleles	-logP 值极大值 -log P max
低磷处理下 单株粒重 LP grain weight	3	3794570	T/C	4.05
	4	2971132	C/T	4.08
	8	43814202	T/A	4.05
	8	43815543	T/C	4.10
	8	43852584	T/A	4.19
	12	14472037	G/A	4.34
	13	21163574	A/G	4.04
	13	34368248	G/A	4.08
相对单株粒重 Relative grain weight	20	27144081	G/A	4.00
	1	7755407	A/G	4.12
	1	7778930	C/A	4.07
	1	8467401	T/C	4.64
	1	8553492	T/G	4.06

1	8555369	T/C	4.08
1	8651431	G/A	4.05
5	41913145	C/T	4.36
6	22891623	G/A	4.06
6	29287355	C/T	4.06
6	29949637	C/T	4.05
6	33464838	T/C	4.99
6	34251031	C/T	4.24
6	34360346	C/T	4.51
6	34434873	T/G	4.15
8	16553159	C/A	4.76
15	1512455	G/A	5.70
15	1532279	A/G	4.69
15	1553014	C/T	4.66
15	1612581	T/C	5.44
15	1623131	G/A	4.42
15	1761674	C/T	4.21
15	1778761	A/T	4.74
15	47479136	A/T	4.38

2.3 候选基因分析

为进一步确定与大豆耐低磷相关的候选基因，对耐低磷相关的等位基因效应进行了分析，一些 SNP 对大豆耐低磷性表现出显著的等位基因效应，表明大豆耐低磷性的候选基因可能与这些 SNP 相关。通过分析 SNP 等位基因型对应的不同磷处理下的显著差异性，以及 Manhattan 图和 QQ 图关联位点的显著性，选择低磷处理下单株粒重关联到的 8 号染色体位点 Gm08_43852584 和相对单株粒重关联到的 15 号染色体位点 Gm15_1778761 进一步进行分析。其中 Gm08_43852584 位点等位基因型对应的耐低磷性状表现极显著差异 ($P=6.40\times10^{-5}<0.01$)，Gm15_1778761 位点等位基因型对应的耐低磷性状也表现极显著差异 ($P=1.81\times10^{-5}<0.01$)。基于该群体的 LD 衰减距离，从与耐低磷性显著相关的 Gm08_43852584 和 Gm15_1778761 位点上下游 100kb 范围内进行候选基因筛选。通过 LD block 绘图取位点前后 100kb 表明，Gm08_43852584 位点、Gm15_1778761 位点前后 100kb 内，SNP 位点均存在明显的 LD block(图 5)。

其中 Gm08_43852584 的 LD block 区间内共有 23 个基因(表 4)，其中 *GmLPW22* 基因注释为 WRKY DNA 结合域，其拟南芥同源基因功能注释为 WRKY6，转录因子 WRKY6 通过下调 PHO1 的表达调节磷稳态，且在磷饥饿期间被降解，泛素 E3 连接酶磷酸反应泛素 E3 LIGASE1(PRU1)可调节 WRKY6 蛋白水平以响应低磷压力^[17]。*GmWRKY6* 的转基因植株体内有效磷含量显著高于野生型^[18]。除该基因外，其他基因均未有报道与耐低磷相关。Gm15_1778761 的 LD block 区间内共有 20 个基因(表 5)，*GmRW14*、*GmRW15* 基因注释为磷酸乙醇胺/磷酸胆碱磷酸酶/PHOSPHO1，其拟南芥同源基因功能注释为磷酸吡哆醛磷酸酶相关蛋白。磷酸乙醇胺/磷酸胆碱磷酸酶 1(PECP1)和磷酸饥饿诱导基因 2(PS2)属于磷酸饥饿诱导的一类新型磷酸酶，可在体内使磷酸胆碱和磷酸乙醇胺(PEtn)去磷酸化^[19]。*PHOSPHO1* 亚家族 *OsACP1* 基因在水稻研究中突变体和过表达株系在 Pi 充足和缺乏条件下，其产物乙醇胺(EA)和相应胆碱(Cho)的浓度显著增加，二者含量浓度的高低会对植株磷含量高低进行响应^[20]。除该基因外，基因均未有报道与耐低磷相关。

大豆中相关文献报道^[21]与大豆耐低磷性有关的组织部位主要是根系，为进一步分析 LD block 区域内的

基因，利用 Phytozome 数据库，查找候选基因在不同组织的表达量。结果表明，*GmLPW22* 基因在根中高表达；*GmRW14* 基因在根毛中高表达；*GmRW15* 基因在豆荚中高表达。因而，根据基因表达量和基因功能注释推测 *GmLPW22* 和 *GmRW14* 为大豆耐低磷性候选基因。

表 4 Gm08_43852584 的 LD block 区间内候选基因注释
Table 4 Annotation of candidate genes in the LD blocks interval of Gm08_43852584

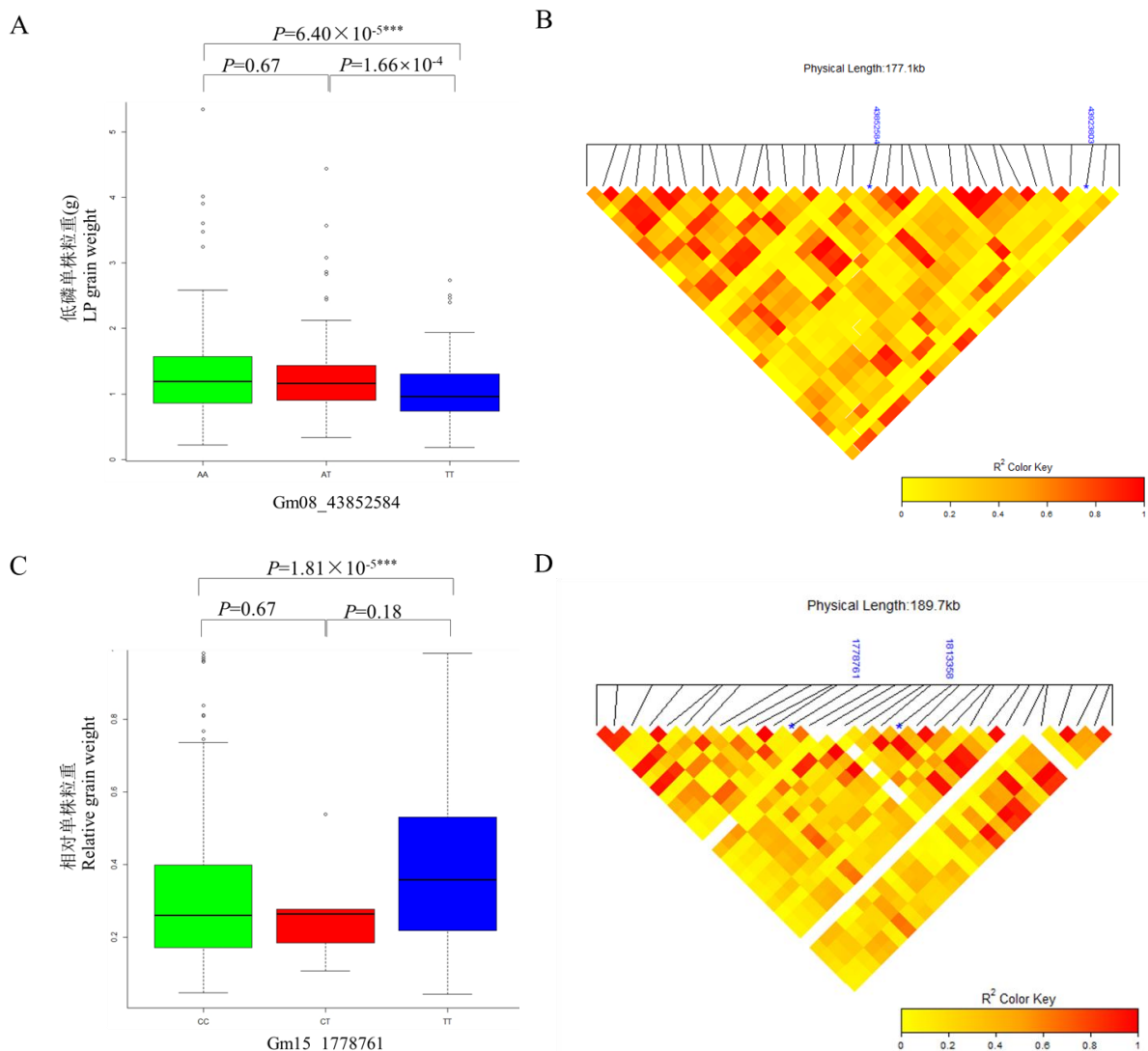
基因 Gene	注释 Annotation
GmLPW1	SWSN-9 蛋白
GmLPW2	SWSN-9 蛋白
GmLPW3	四酰二糖 4'-激酶
GmLPW4	含锌指 FYVE 结构域的蛋白质
GmLPW5	NA
GmLPW6	NA
GmLPW7	PPR 重复序列家族(PPR_2) / DYW 核酸脱氨酶家族(DYW_deaminase)
GmLPW8	NA
GmLPW9	小热休克蛋白 HSP20 家族
GmLPW10	类 C2H2 锌指蛋白
GmLPW11	NA
GmLPW12	NA
GmLPW13	富含亮氨酸的重复蛋白
GmLPW14	咪唑甘油磷酸合成酶 HISHF
GmLPW15	预测水解酶(HIT 家族)
GmLPW16	NA
GmLPW17	NA
GmLPW18	参与细胞分化/ 性发育的蛋白质
GmLPW19	脯氨酸合成酶共转录细菌同源蛋白
GmLPW20	STIG1 样蛋白相关
GmLPW21	蛋白质转运蛋白 SEC13 相关
GmLPW22	WRKY DNA 结合结构域(WRKY)
GmLPW23	NA

NA: 基因无功能注释。下同
NA: No functional annotation of genes. The same as below

表 5 Gm15_1778761 的 LD block 区间内候选基因注释
Table 5 Annotation of candidate genes in the LD blocks interval of Gm15_1778761

基因 Gene	注释 Annotation
GmRW1	富含亮氨酸重复序列/ 蛋白酪氨酸激酶/ ER 的碳水化合物结合蛋白
GmRW2	富含亮氨酸重复序列/ 蛋白酪氨酸激酶/ ER 的碳水化合物结合蛋白
GmRW3	富含亮氨酸重复序列/ 蛋白酪氨酸激酶/ ER 的碳水化合物结合蛋白
GmRW4	转录因子 BHLH87
GmRW5	NA
GmRW6	23S rRNA(尿嘧啶(1939)-C(5))-甲基转移酶/ RNA 尿苷甲基转移酶 A
GmRW7	IAA-氨基酸水解酶 ILR1 样 1 相关
GmRW8	NA
GmRW9	Jacalin 样凝集素结构域
GmRW10	带电多泡体蛋白
GmRW11	60S 核糖体蛋白 L28
GmRW12	DOF 锌指蛋白 1
GmRW13	蛋白磷酸酶 PP2A 调节亚单位 B
GmRW14	磷酸乙醇胺/ 磷酸胆碱磷酸酶/ PHOSPHO1
GmRW15	磷酸乙醇胺/ 磷酸胆碱磷酸酶/ PHOSPHO1

GmRW16	具有腺嘌呤核苷酸 α 水解酶样结构域的蛋白激酶蛋白
GmRW17	核酸外切酶样蛋白
GmRW18	PRA1 家族蛋白 C 相关
GmRW19	磷脂酶 D ϵ
GmRW20	NA

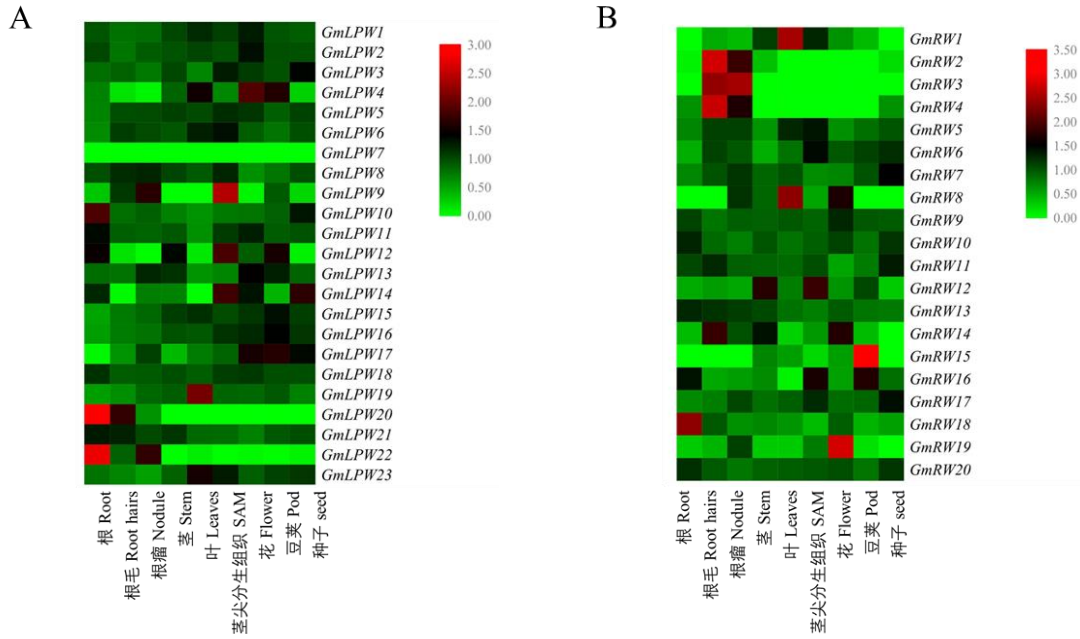


A: 极显著 SNP 位点 Gm08_43852584 等位基因差异显著性分析, 其中 AA 和 TT 表示该位点出现 AA 和 TT 纯合的频率, AT 表示该位点出现 AT 杂合的频率; B: 极显著 SNP 位点 Gm08_43852584 LD block 分析, 其中蓝色的点分别表示极显著 SNP 位点 Gm08_43852584 和 GmLPW22 基因在 8 号染色体上的 1 个 SNP 位点; C: 极显著 SNP 位点 Gm15_1778761 等位基因差异显著性分析, 其中 CC 和 TT 表示该位点出现 CC 和 TT 纯合的频率, CT 表示该位点出现 CT 杂合的频率; D: 极显著 SNP 位点 Gm15_1778761 LD block 分析, 其中蓝色的点分别表示极显著 SNP 位点 Gm15_1778761 和 GmRW14 基因在 15 号染色体上的 1 个 SNP 位点; ***: 在 $P<0.001$ 水平差异显著

A: Peak SNP site Gm08_43852584 allele difference analysis, AA and TT represent the frequency of AA and TT homozygosity at this site, AT indicates the frequency of AT heterozygosity at this site; B: Peak SNP site Gm08_43852584 LD block analysis, where the blue dots respectively represent a peak SNP locus Gm08_43852584 and a SNP in the GmLPW22 gene on chromosome 8; C: Peak SNP site Gm15_1778761 allele difference analysis, CC and TT represent the frequency of CC and TT homozygosity at this site, CT indicates the frequency of CT heterozygosity at this site; D: Peak SNP site Gm15_1778761 LD block analysis, where the blue dots respectively represent a peak SNP locus Gm15_1778761 and a SNP in the GmRW14 gene on chromosome 15; ***: Correlation is significant at $P<0.001$ level

图 5 2 个显著关联位点分析

Fig.5 Analysis of 2 significant association sites



A: Gm08_43852584 LD block 区间内候选基因表达谱; B: Gm15_1778761 LD block 区间内候选基因表达谱

A: Candidate gene expression profile in the Gm08_43852584 LD block interval; B: Candidate gene expression profile in the Gm15_1778761 LD block interval

图 6 候选基因组织表达 heatmap

Fig.6 Heatmap profiles of the candidate genes in tissues

3 讨论

3.1 大豆单株粒重表型与耐低磷性关系

大豆粒重作为表型性状易于观察和测定，可作为育种选择的最直观的性状。本研究利用 395 份大豆在常磷和低磷及相对单株粒重平均值进行分析，结果表明单株粒重在不同磷浓度处理下差异明显。本研究发掘到 20 份磷高效大豆种质，共包含地方种质 4 份，这些种质经过长期驯化具有耐逆性强特点；选育种质 16 份，这些种质适宜种植在土壤磷含量较低的地区，在低磷条件下的产量损失减少。这些种质均可作为亲本用于耐低磷遗传改良育种，可为后续筛选大豆耐低磷性研究提供参考。

3.2 大豆耐低磷性 GWAS 相关位点分析

通过 GWAS 分析，鉴定出 11 个 QTL 与大豆耐低磷性相关，分布在 10 条染色体。其中 13 号染色体上定位到的 QTL 与前人报道^[16]重叠。Zhang 等^[13]通过定位发现一些受到低磷胁迫强烈诱导的基因分别分布在 1、6、7、15 号染色体，与本研究在 1、6、15 号定位到的 QTL 与其位置相距较远。武兆云^[22]在 20 号染色体上克隆到的大豆耐低磷基因 *GmPT2*(chr20.42980124~42981928)，与本研究在 20 号染色体上定位到的 QTL 位置相距较远。徐影^[18]在大豆 16 号和 15 号染色体上分别克隆了转录因子 *GmWRKY75* 和 *GmWRKY6*，与本研究定位到的 WRKY DNA 结合域相关的基因位置相距较远，但属于同一个基因家族。因而本研究定位到的 QTL 可能是潜在新的 QTL。显著位点 Gm08_43852584 的 LD block 区域内关联到 23 个基因，其中 *GmLPW22* 基因注释是 WRKY DNA 结合域，拟南芥同源基因注释为 WRKY6，转录因子 WRKY6 通过下调 PHO1 的表达来调节磷稳态。Gm15_1778761 的 LD block 区域内关联到 20 个基因，其中 *GmRW14* 基因注

释是磷酸乙醇胺/磷酸胆碱磷酸酶/PHOSPHO1，其含量高低会影响植株磷含量。

通过表达谱分析表明 *GmLPW22* 和 *GmRW14* 基因在根和根毛中高表达，推测这 2 个基因很可能与大豆耐低磷相关。而 *GmRW15* 基因注释虽然为磷酸乙醇胺/磷酸胆碱磷酸酶/PHOSPHO1，但是不在根、根毛中高表达，而是在豆荚中高表达，因而推测其不与大豆耐低磷性相关。此外，*GmLPW10*、*GmLPW11*、*GmLPW18*、*GmLPW20*、*GmLPW21*、*GmRW2*、*GmRW3*、*GmRW4*、*GmRW5*、*GmRW10*、*GmRW13*、*GmRW18*、*GmRW20* 这 13 个基因在根、根毛中表达量都相对较高，但 3 个基因注释为未鉴定蛋白，另外 10 个基因注释分别与 C2H2 样锌指蛋白、参与细胞分化/性发育的蛋白质、STIG1 类似蛋白质相关、蛋白质转运蛋白 SEC13 相关、富含亮氨酸重复蛋白激酶家族蛋白、转录因子 BHLH87、蛋白磷酸酶 PP2A 调节亚基这些相关，暂未发现与大豆耐低磷性相关。

4 结论

本研究以 395 份大豆种质资源低磷处理下单株粒重和相对单株粒重表型和基因型进行性状鉴定和 GWAS 分析，共鉴定出磷高效大豆种质 20 份，大豆耐低磷性显著相关的 SNP 位点 32 个。其中与低磷处理下单株粒重相关的 SNP 23 个，相对单株粒重相关的 SNP 9 个，共关联到 QTL 11 个，分别位于 10 条染色体上。其中，Gm08_43852584 位点 LD block 区间内关联到 1 个与 WRKY DNA 结合域相关的基因 *GmLPW22*，在根中特异性表达。Gm15_1778761 位点 LD block 区域内关联到 1 个与磷酸吡哆醛磷酸酶相关的基因 *GmRW14*，且在根毛中特异性表达。

参考文献

- [1] 陈玲玲, 李战, 刘亨萱, 谷勇哲, 宋健, 王俊, 邱丽娟. 基于 783 份大豆种质资源的叶柄夹角全基因组关联分析. 作物学报, 2022, 48 (6): 1333-1345
Chen L L, Li Z, Liu T X, Gu Y Z, Song J, Wang J, Qiu L J. Genome wide association analysis of petiole angle based on 783 soybean resources (*Glycine max* L.). *Acta Agronomica Sinica*, 2022, 48 (6): 1333-1345
- [2] 李志刚. 不同磷效率基因型大豆的筛选及其对磷素水平的反应机理研究. 沈阳: 沈阳农业大学, 2004
Li Z G. Screening of soybeans with high phosphorus absorption efficiency and their responses to different phosphorus levels. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2004
- [3] 沈启维, 李艳春, 张健. 提高植物磷高效利用能力方法的研究进展. 绿色科技, 2021, 23 (11): 157-160
Shen Q W, Li Y C, Zhang J. Research progress on methods to improve the efficient utilization of phosphorus in plants. *Journal of Green Science and Technology*, 2021, 23 (11): 157-160
- [4] 刘海旭, 吴俊江, 王金生, 鹿文成, 徐鹏飞, 张淑珍. 大豆耐低磷研究进展. 大豆科学, 2017, 36 (4): 639-644
Liu H X, Wu J J, Wang J S, Lu W C, Xu P F, Zhang S Z. Progress of research on tolerance to low-phosphorus stress in soybean. *Soybean Science*, 2017, 36 (4): 639-644
- [5] Dan Z, Cheng H, Geng L, Kan G, Cui S, Meng Q, Gai J, Yu D. Detection of quantitative trait loci for phosphorus deficiency tolerance at soybean seedling stage. *Euphytica*, 2009, 167 (3): 313-322
- [6] Terry N, Ulrich A. Effects of potassium deficiency on the photosynthesis and respiration of leaves of sugar beet under conditions of low sodium supply. *Plant physiology*, 1973, 51 (6): 1099-1101
- [7] 余松烈. 作物栽培学. 北方本. 北京: 农业出版社, 1980: 102-108
Yu S L. Crop cultivation. North. Beijing: Agriculture Press, 1980: 102-108
- [8] 丁洪, 李生秀. 大豆品种耐低磷和对磷肥效应的遗传差异. 植物营养与肥料学报, 1998 (3): 257-263
Ding H, Li S X. Genetic differences in low phosphorus tolerance and phosphorus fertilizer effects in soybean varieties. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 1998 (3): 257-263
- [9] 王辉. 磷高效大豆品种的筛选及苗期鉴定方法. 沈阳: 沈阳农业大学, 2020
Wang H. Screening and seedling stage identification of phosphorus high-efficient soybean varieties. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2020

- [10] Du W, Ning L, Liu Y, Zhang S, Yang Y, Wang Q, Chao S, Yang H, Huang F, Cheng H, Yu D. Identification of loci and candidate gene GmSPX-RING1 responsible for phosphorus efficiency in soybean via genome-wide association analysis. *BMC Genomics*, 2020, 21 (1): 1-16
- [11] Zhang D, Song H, Cheng H, Hao D, Wang H, Kan G, Jin H, Yu D. The acid phosphatase-encoding gene *GmACP1* contributes to soybean tolerance to low-phosphorus stress. *PLoS Genet*, 2014, 10 (1): e1004061
- [12] 宁丽华. 大豆磷效率相关性状的关联分析及 *GmG3PT1* 基因功能的初步研究. 南京: 南京农业大学, 2014
Ning L H. Association analysis for phosphorus efficiency-related traits in soybean (*Glycine max* L.) and function properties of *GmG3PT1*. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014
- [13] Zhang H, Yang Y, Sun C, Liu X, Lv L, Hu Z, Yu D, Zhang D. Up-regulating *GmETO1* improves phosphorus uptake and use efficiency by promoting root growth in soybean. *Plant Cell Environ*, 2020, 43 (9): 2080-2094
- [14] Sun R, Sun B, Tian Y, Su S, Zhang Y, Zhang W, Wang J, Yu P, Guo B, Li H, Li Y, Gao H, Gu Y, Yu L, Ma Y, Su E, Li Q, Hu X, Zhang Q, Guo Q, Chai S, Feng L, Wang J, Hong H, Xu J, Yao X, Wen J, Liu J, Li Y, Qiu L. Dissection of the practical soybean breeding pipeline by developing ZDX1, a high-throughput functional array. *Theoretical and Applied Genetics*, 2022, 135(4): 1413-1427
- [15] 赵兴震. 大豆耐旱性评价及耐旱相关基因挖掘. 北京: 中国农业科学院, 2020
Zhao X Z. Drought tolerance identification and gene discovery in soybean. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2020
- [16] 耿雷跃, 崔士友, 张丹, 邢邯, 盖钧镒, 喻德跃. 大豆磷效率 QTL 定位及互作分析. *大豆科学*, 2007, 26 (4): 460-466
Geng L Y, Cui S Y, Zhang D, Xing H, Gai J Y, Yu D Y. QTL mapping and epistasis analysis for P-efficiency in soybean (*Glycine max* L.) *Soybean Science*, 2007 (4): 460-466
- [17] Ye Q, Wang H, Su T, Wu W H, Chen Y F. The ubiquitin E3 ligase PRU1 regulates WRKY6 degradation to modulate phosphate homeostasis in response to low-Pi stress in arabidopsis. *Plant Cell*, 2018, 30 (5): 1062-1076
- [18] 徐影. 大豆耐低磷相关转录因子和 *GmWRKY75* 和 *GmWRKY6* 的克隆及功能分析. 南京: 南京农业大学, 2014
Xu Y. Cloning and functional analysis of two transcription factors *GmWRKY75* and *GmWRKY6* related to soybean tolerance to low-phosphorus stress. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014
- [19] Angkawijaya A E, Ngo A H, Nguyen V C, Gunawan F, Nakamura Y. Expression profiles of 2 phosphate starvation-inducible phosphocholine/phosphoethanolamine phosphatases, PECP1 and PS2, in arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10:662
- [20] Deng S, Li J, Du Z, Wu Z, Yang J, Cai H, Wu G, Xu F, Huang Y, Wang S, Wang C. Rice ACID PHOSPHATASE 1 regulates Pi stress adaptation by maintaining intracellular Pi homeostasis. *Plant Cell and Environment*, 2022, 45 (1): 191-205
- [21] 王树起, 韩晓增, 严君, 李晓慧, 乔云发. 缺磷胁迫对大豆根系形态和氮磷吸收积累的影响. *土壤通报*, 2010, 41 (3): 644-650
Wang S Q, Han X Z, Yan J, Li X H, Qiao Y F. Effects of phosphorus deficiency stress on soybean root morphology and nitrogen and phosphorus uptake and accumulation. *Chinese Journal of Soil Science*, 2010, 41 (3): 644-650
- [22] 武兆云. 大豆苗期耐低磷性状评价和低磷胁迫的分子机理初步研究. 南京: 南京农业大学, 2011
Wu Z Y. Evaluation of low phosphate tolerance at seedling stage and molecular essential study on phosphate stress in soybean. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011