

大豆需磷关键时期磷高效利用遗传位点挖掘

张 华, 田 蕊, 褚佳豪, 邢馨竹, 陈士亮, 李喜焕, 张彩英

(河北农业大学农学院 / 教育部华北作物种质资源研究与利用重点实验室, 保定 071001)

摘要: 土壤有效磷缺乏已成为影响大豆产量和品质的重要因素, 深入挖掘大豆需磷关键时期磷高效利用遗传位点成为实现其分子遗传改良的重要前提。鉴于此, 本研究利用 SoySNP6K (5403 个 SNP 标记) 通过全基因组关联分析挖掘大豆需磷关键时期磷高效利用 10 个相关性状遗传位点, 结果发现, T_1 关键时期 (四叶期) 适磷条件检测到 78 个关联 SNP, 以根系干重与植株总干重 SNP 较多; 低磷条件检测到 134 个关联 SNP, 以植株总干重检测 SNP 最多, 并在 8 号、13 号、20 号染色体分别检测到同时控制地上部干重和总干重、地上部鲜重和干重与总干重 SNP 簇; T_2 关键时期 (六叶期) 适磷条件检测到 83 个 SNP, 以株高和地上部干重检测 SNP 较多, 低磷条件检测到 53 个 SNP, 以株高和根冠比 SNP 较多, 并在 18 号染色体检测到同时控制根干重和总干重 SNP 簇, 在 11 号、16 号、18 号染色体分别检测到 3 个一因多效 SNP; 上述关联 SNP 中有 9 个 SNP 同时在 T_1 与 T_2 时期被检测到, 分别与地上部鲜重、干重、根冠比、株高等关联, 为大豆磷素高效利用分子标记辅助育种以及候选基因克隆等提供了依据。

关键词: 大豆; 磷高效利用; 关联分析; 一因多效; 共关联 SNP

Mining of Genetic Loci Controlling Phosphorus Efficiency at Crucial Phosphorus Requirement Stages in Soybean

ZHANG Hua, TIAN Rui, CHU Jia-hao, XING Xin-zhu, CHEN Shi-liang, LI Xi-huan, ZHANG Cai-ying

(College of Agronomy, Hebei Agricultural University / Key Laboratory of Ministry of Education for

North China Crop Germplasm Resources, Baoding 071001)

Abstract: The lack of available phosphorus in soil has become the major restricted factor for yield and quality of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). Therefore, the mining of genetic loci at crucial phosphorus requirement stages becomes very important for genetic improvements of phosphorus efficiency in soybean. In view of this, the association analysis based on the SoySNP6K (5403 SNP markers) was used in this study to find 10 genetic loci controlling phosphorus related traits of soybean at the crucial stages, with the result that 78 SNPs were detected under normal phosphorus condition at T_1 stage (four-leaf stage), of which relatively more were associated with root and total dry weights, and 134 SNPs were detected under low phosphorus condition at T_1 stage, of which relatively more were associated with total dry weight, with SNP clusters on chromosomes 8, 13 and 20 detected controlling shoot and total dry weights, shoot fresh and dry weights, and total dry weight. At T_2 stage (six-leaf stage), 83 SNPs were detected under normal phosphorus condition, of which relatively more were associated with plant height and shoot dry weight, and 53 SNPs were detected under low phosphorus condition, of which relatively more were associated with plant height and root/shoot ratio, with an SNP cluster on chromosome 18 detected controlling root and total dry weights, and 3 SNPs on chromosomes 11, 16 and

收稿日期: 2019-12-28 修回日期: 2020-01-28 网络出版日期: 2020-03-26

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20191228001>

第一作者研究方向为大豆遗传育种与分子生物学, E-mail: zhanghua0316@163.com

通信作者: 张彩英, 研究方向为大豆遗传育种与分子生物学, E-mail: zhangcaiyang@hebau.edu.cn

基金项目: 现代农业科技奖励性后补助资金项目 (17927670H); 河北省科技计划项目 (16227516D-1); 河北省重点研发计划项目 (19226356D)

Foundation projects: Modern Agriculture Science and Technology Post-award Support Program (17927670H), Hebei Province Science and Technology Plan Program (16227516D-1), Hebei Province Research and Development Plan Program (19226356D)

18 detected associated with pleiotropism. More importantly, 9 SNPs were detected controlling shoot fresh and dry weights, root/shoot ratio, and plant height at T_1 and T_2 stages simultaneously, which provided some selected molecular markers for soybean phosphorus efficiency genetic improvements in future.

Key words: soybean; high phosphorus efficiency; association analysis; pleiotropism; co-associated SNPs

大豆是重要的粮食和油料作物,对保障国家粮食安全意义重大,然而土壤有效磷缺乏严重影响大豆生长和发育。为解决这一问题,有学者提出利用现代分子育种手段结合常规育种方法培育磷高效大豆品种。然而大豆磷营养效率属于复杂数量性状,受多基因控制,且代谢途径复杂^[1-7]。因此,深入挖掘磷高效遗传位点与候选基因成为实现其分子遗传改良重要前提。

有关大豆磷营养效率遗传位点挖掘,目前已有报道。Zhang 等^[8]采用 SLAF-seq 分析 RIL 群体播种 35 d 两种磷素处理下的 8 个磷营养效率相关性状(株高、根系干重、地上部干重、总干重、磷吸收效率、磷利用效率、磷含量、酸性磷酸酶活性),获得 20 个 QTL,解释表型变异 5.14%~28.10%;Zhang 等^[9]利用 RIL 群体苗期两种磷素处理下的 5 个磷效率相关性状(地上部干重、根系干重、总干重、磷吸收效率、磷利用效率),9 个连锁群定位到 34 个加性 QTL,解释表型变异 6.60%~19.30%;苏辉等^[10]在大豆 V_6 期检测到 3 个磷效率 QTL,分布于 N 和 O 连锁群,解释表型变异 4.80%~18.20%;崔世友等^[11]利用 RIL 群体播种 6 周的磷效率表型,检测到 7 个 QTL,分布于 D1b+W、F、G、N 和 O 连锁群,解释表型变异 4.80%~17.00%;Liang 等^[12]测定 RIL 群体播种 50 d 磷效率表型,获得 31 个 QTL,解释表型变异 9.10%~31.10%。

同时,Zhang 等^[13]利用连锁定位与关联分析,检测到 1 个多环境共定位 QTL ($qPE8$),并挖掘出该 QTL 区间候选基因 *GmACP1*,经转化毛状根发现具有显著提高磷素利用效率的功能;Cai 等^[14]通过连锁分析定位到 14 个磷效率 QTL,其中 1 个与 Zhang 等^[13]定位的 $qPE8$ 重合,并发现另 1 个主效 QTL $qP10-2$,该区间包含酸性磷酸酶 *GmHAD1*;Ning 等^[15]利用 219 份大豆资源构成的自然群体,对其苗期 5 个磷效率性状进行条件关联分析,检测到 19 个 SNP,其中 3 个为新发现的遗传位点。

由上可见,目前虽有关于大豆磷效率相关性状 QTL 报道,但均是基于单一时期定位或关联结果,且多数为连锁定位结果,而针对大豆需磷关键时期开展相关研究报道甚少。鉴于此,本研究利用大豆

自然群体,通过全基因组关联研究其需磷关键期(四叶、六叶期)相关性状遗传位点与基因,旨在为大豆磷素高效利用分子标记辅助选择及候选基因克隆等提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

以前期构建的包含 281 份大豆种质资源自然群体为材料,其中育成品种 226 份,地方品种 55 份。

1.2 试验方法

1.2.1 大豆自然群体磷高效相关性状测定方法 供试大豆自然群体采用盆栽蛭石方法播种于人工气候室,温度 $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$,每份材料播种 8 盆,每盆播种 5 粒,间苗后每盆保留 2 株。待植株对生真叶展开,分别进行 2 种磷素处理,其中低磷处理(LP)以植酸磷为磷源,适磷处理(NP)以磷酸二氢钾为磷源,浓度均为 0.5 mmol/L ^[16]。播种 21 d 后(四叶期, T_1 时期)进行第 1 次取样,每份材料按照低磷、适磷处理分别取样 4 株,取样时,植株从子叶节处分为地上部、地下部,随后进行株高、根冠比、地上部鲜重与干重、根系鲜重与干重、植株总鲜重与干重、根系磷含量、根系磷利用效率等 10 个磷高效相关性状测定,其方法参照前人文献^[17-18];播种 36 d 后(六叶期)进行第 2 次取样,方法同第 1 次,记为 T_2 时期;试验按照完全随机试验设计,独立重复 2 次。

1.2.2 大豆磷高效相关性状统计分析方法 利用 Microsoft Excel 2010 软件进行大豆磷高效相关性状描述统计分析,SPSS Statistics V19.0 软件进行方差分析、t 检验及相关分析。

1.2.3 自然群体全基因组关联分析 利用课题组前期已有供试群体 SNP 基因型(SoySNP 6K 芯片,5403 个 SNP 标记分析获得),采用 PLINK 7 软件去除最小等位基因频率(MAF) < 0.05 与缺失率 > 0.15 的标记;R 平台(<https://www.r-project.org/>)GAPIT V2 软件包的混合线性模型进行关联^[19-23],其中显著关联位点阈值设为 $-\log P > 3.0$ ^[24]。

1.2.4 大豆磷高效相关性状候选基因筛选 利用入选显著关联 SNP,比对大豆基因组(*Glyma.Wm82.a2*),依据衰减率在显著关联 SNP 附近寻找候选基

因,并通过 SoyNet (<https://www.inetbio.org/soynet/>) 在线工具分析候选基因间的网络互作关系^[25]。

2 结果与分析

2.1 群体磷高效相关性状遗传变异分析

通过分析供试大豆自然群体在 2 种不同磷素处理下的相关性状,结果发现(表 1),10 个性状在不同处理间的差异均达到显著或极显著(t 检验),说明低磷胁迫显著影响了大豆植株地上部和根系生

长发育,低磷处理有效。进一步分析相关性状还发现,低磷处理下的根冠比、根系磷利用率和 T_1 时期的根系鲜重、干重显著高于适磷处理,而其他性状均显著低于适磷处理,说明大豆植株在低磷胁迫条件下可通过增加其根系生长量以及磷素利用效率来抵御低磷胁迫。另外还发现,各相关性状变异系数分布在 16.76%~51.54% 之间,遗传变异较大,且偏度与峰度系数绝对值接近 0,呈连续分布,属于数量性状。

表 1 大豆自然群体磷效率相关性状遗传变异

Table 1 Genetic variations of phosphorus efficiency related traits in soybean natural population

性状 Traits	时期 Stage	处理 Treatment	均值 $\pm$ 标准差 Mean $\pm$ SD	变异范围 Range	变异系数(%) CV	偏度 Skew	峰度 Kurt	t 值 t value
株高(cm) PH	T_1	LP	27.04 $\pm$ 4.75	15.23~41.58	17.57	0.56	0.37	4.162***
		NP	27.78 $\pm$ 4.75	16.25~42.43	17.10	0.54	0.34	
	T_2	LP	50.42 $\pm$ 8.70	26.68~72.88	17.25	0.06	-0.08	9.473***
		NP	54.22 $\pm$ 9.09	27.95~86.28	16.76	0.21	0.33	
根冠比 R/S	T_1	LP	0.51 $\pm$ 0.11	0.26~0.82	20.72	0.77	0.46	-15.681***
		NP	0.41 $\pm$ 0.08	0.20~0.67	19.78	0.34	0.45	
	T_2	LP	0.44 $\pm$ 0.08	0.22~0.69	18.04	0.34	0.51	-6.03***
		NP	0.40 $\pm$ 0.09	0.14~0.65	22.06	0.28	0.17	
地上部鲜重(g) SFW	T_1	LP	1.71 $\pm$ 0.38	0.68~2.75	22.22	-0.07	0.23	13.074***
		NP	2.00 $\pm$ 0.47	0.87~3.22	23.35	0.03	-0.27	
	T_2	LP	2.37 $\pm$ 0.47	1.33~3.75	19.95	0.13	-0.32	16.663***
		NP	2.98 $\pm$ 0.69	1.52~5.34	23.23	0.53	0.32	
地上部干重(g) SDW	T_1	LP	0.21 $\pm$ 0.06	0.08~0.37	26.74	-0.02	-0.30	12.989***
		NP	0.25 $\pm$ 0.07	0.10~0.43	26.68	0.14	-0.52	
	T_2	LP	0.35 $\pm$ 0.08	0.15~0.60	24.10	0.31	-0.23	7.532***
		NP	0.40 $\pm$ 0.11	0.20~0.81	27.21	0.74	0.89	
根鲜重(g) RFW	T_1	LP	1.41 $\pm$ 0.31	0.65~2.11	21.95	-0.01	-0.47	2.713***
		NP	1.37 $\pm$ 0.30	0.43~2.07	21.91	-0.05	-0.23	
	T_2	LP	1.37 $\pm$ 0.33	0.62~2.36	24.34	0.37	-0.01	5.746***
		NP	1.52 $\pm$ 0.42	0.73~2.94	27.50	0.43	-0.16	
根干重(g) RDW	T_1	LP	0.11 $\pm$ 0.03	0.05~0.18	24.56	0.14	-0.47	-5.396***
		NP	0.10 $\pm$ 0.02	0.04~0.15	23.51	0.07	-0.59	
	T_2	LP	0.15 $\pm$ 0.04	0.05~0.32	29.06	0.58	0.51	2.328*
		NP	0.16 $\pm$ 0.05	0.06~0.38	32.27	0.66	0.59	
总鲜重(g) TFW	T_1	LP	3.08 $\pm$ 0.64	1.17~4.80	20.71	-0.21	-0.08	8.76***
		NP	3.37 $\pm$ 0.72	1.38~5.28	21.31	-0.05	-0.24	
	T_2	LP	3.74 $\pm$ 0.74	2.06~5.91	19.87	0.17	-0.33	13.537***
		NP	4.50 $\pm$ 1.01	2.35~7.80	21.50	0.34	-0.06	

表 1(续)

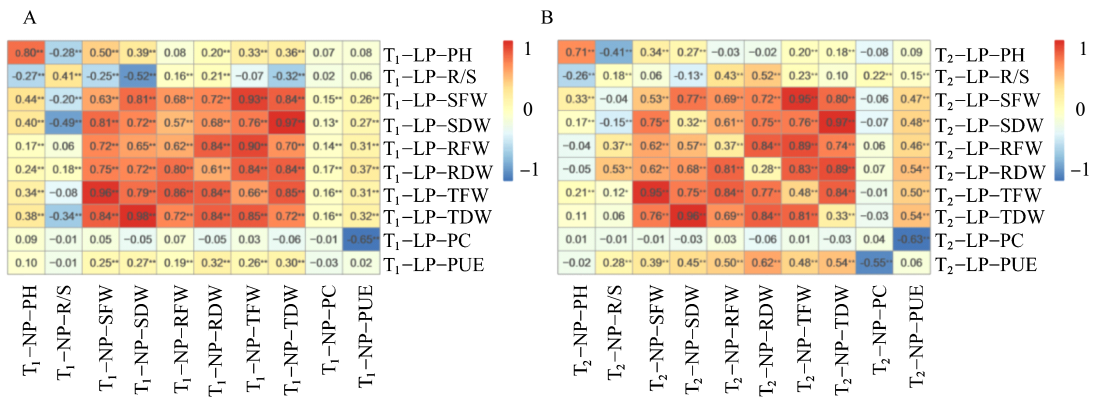
性状 Traits	时期 Stage	处理 Treatment	均值 ± 标准差 Mean ± SD	变异范围 Range	变异系数(%) CV	偏度 Skew	峰度 Kurt	t 值 t value
总干重(g) TDW	T ₁	LP	0.32 ± 0.08	0.12~0.53	24.20	-0.03	-0.37	8.321***
		NP	0.35 ± 0.08	0.16~0.56	24.37	0.05	-0.65	
	T ₂	LP	0.50 ± 0.12	0.22~0.88	24.16	0.37	0.04	6.387***
		NP	0.56 ± 0.15	0.28~1.05	26.11	0.54	0.24	
根系磷含量(%) PC	T ₁	LP	0.42 ± 0.15	0.11~0.99	36.88	0.74	0.75	11.496***
		NP	0.58 ± 0.17	0.16~1.11	28.72	0.16	0.11	
	T ₂	LP	0.48 ± 0.15	0.11~0.99	30.22	0.34	0.37	14.325***
		NP	0.69 ± 0.21	0.21~1.39	29.73	0.65	0.68	
根系磷利用率 (%) PUE	T ₁	LP	3.26 ± 1.49	0.91~7.28	45.55	0.86	0.11	-10.645***
		NP	2.17 ± 0.92	0.70~4.75	42.46	0.89	-0.07	
	T ₂	LP	3.81 ± 1.75	0.84~9.08	45.89	0.89	0.15	-5.313***
		NP	3.08 ± 1.59	0.50~7.20	51.54	0.94	0.14	

t 值: 2 个磷素处理之间配对 t 检验; * 和 ***: $P<0.05$ 和 $P<0.001$ 水平下的显著性
t value: indicates paired t-test between two phosphorus treatments, * and *** indicate the significant differences at $P<0.05$ and $P<0.001$ levels. PH: Plant height, R/S: Root shoot ratio, SFW: Shoot fresh weight, SDW: Shoot dry weight, RFW: Root fresh weight, RDW: Root dry weight, TFW: Total fresh weight, TDW: Total dry weight, PC: Phosphorus concentration, PUE: Phosphorus use efficiency, the same as below

2.2 群体磷效率性状相关性分析

通过对供试自然群体磷高效性状进行相关分析,结果发现(图 1),多数性状间存在显著或极显著相关,如适磷处理下 T₁ 时期的地上部鲜重与干重、

根鲜重、根干重、总鲜重和总干重均呈显著正相关,并且其在低磷处理下的相关系数也达到(极)显著,同时 T₂ 时期的上述性状之间也同样存在显著或极显著正相关。



A: T₁ 时期; B: T₂ 时期; 上三角为低磷条件; 下三角为适磷条件; 对角线为同一性状适磷与低磷条件 ($r_{0.05}=0.12$; $r_{0.01}=0.15$)
A: T₁ stage, B: T₂ stage, Upper triangular: Low phosphorous treatment, Lower triangular: Normal phosphorous treatment,
The diagonal indicated the same trait between low phosphorous and normal phosphorous treatments ($r_{0.05}=0.12$; $r_{0.01}=0.15$)

图 1 大豆磷效率性状间的相关系数

Fig.1 Correlation coefficients of phosphorus efficiency related traits in soybean

2.3 自然群体磷高效性状关联位点分析

2.3.1 自然群体 T₁ 时期关联位点分析 对 T₁ 时期各相关性状进行关联分析,结果发现(图 2),共检测到 212 个显著关联 SNP,其中适磷条件下检测到 78 个,分布于 15 条染色体,以 13 号、18 号染色体分布较多,并以根系干重与总干重检测 SNP 较多;同时,

低磷条件下检测到 134 个显著关联 SNP,分布于 15 条染色体,以 8 号、20 号染色体分布较多,并以总干重检测 SNP 最多。

进一步分析发现,低磷条件关联 SNP 有 3 个一因多效 SNP 簇(表 2、图 3),分别为位于 8 号染色体的地上部干重与总干重共关联 SNP 簇(关联标记为

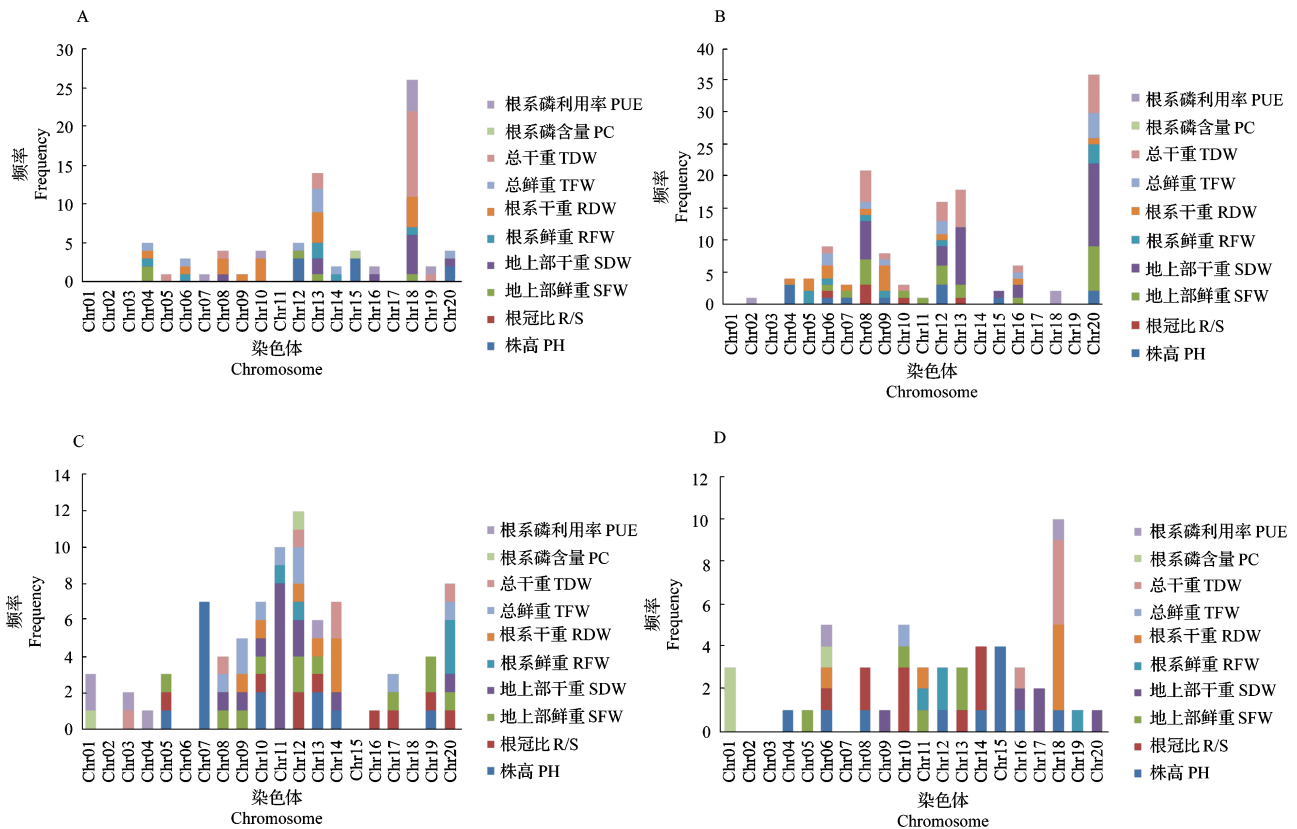
A: T_1 时期适磷处理; B: T_1 时期低磷处理; C: T_2 时期适磷处理; D: T_2 时期低磷处理A: Normal phosphorous treatment in T_1 stage, B: Low phosphorous treatment in T_1 stage,C: Normal phosphorous treatment in T_2 stage, D: Low phosphorous treatment in T_2 stage

图 2 大豆磷高效相关性状显著关联 SNP 染色体分布

Fig.2 Chromosome distributions of the SNPs for phosphorus efficiency related traits in soybean

ss71559905、ss71559912、ss71559932 和 ss71559942), 位于 13 号染色体的 SNP 簇(关联标记为 ss715617244、ss715617260 和 ss715617268) 和位于 20 号染色体的地上部鲜重、干重与总干重共关联 SNP 簇(关联标记为 ss715637220、ss715637225、ss715637229、ss715637234、ss715637240 和 ss715637241)。

同时, 适磷条件关联 SNP 有 2 个一因多效 SNP 簇(表 2, 图 3), 其中之一是根系干重与总干重共关联 SNP 簇, 位于 18 号染色体, 关联标记为 ss715630653、ss715630669 和 ss715630715; 另一 SNP 簇为根系干重与地上部干重共关联位点, 也位于 18 号染色体, 关联标记为 ss715630720、ss715630771 和 ss715630794, 且距离该染色体的根系干重与总干重 SNP 簇仅 160 kb 左右; 另外, 在 19 号染色体还发现 1 个一因多效 SNP(表 2), 同时控制总干重与根系磷利用效率(ss715634961)。

2.3.2 自然群体 T_2 时期关联位点分析 对 T_2 时期各性状进行关联分析发现(图 2), 共检测到 136 个显著关联 SNP, 其中适磷条件检测到 83 个, 分布于

16 条染色体, 以 11 号、12 号染色体分布较多, 并以株高和地上部干重检测 SNP 较多; 低磷条件检测到 53 个显著关联 SNP, 分布于 17 条染色体, 以 18 号染色体分布较多, 并以株高和根冠比检测 SNP 较多。

进一步分析发现, 低磷条件关联 SNP 中有 1 个一因多效 SNP 簇(表 2、图 3), 该 SNP 簇为根干重与总干重共关联, 位于 18 号染色体, 关联标记为 ss715630653、ss715630669 与 ss715630715; 同时还发现 3 个一因多效 SNP(表 2), 具体包括 11 号染色体的根鲜重和干重共关联 SNP(ss715610444)、16 号染色体的地上部干重和总干重共关联 SNP(ss715623780) 以及 18 号染色体的根干重与总干重共关联 SNP(ss715630832)。同时, 适磷条件关联 SNP 中有 6 个一因多效 SNP(表 2), 包括 9 号染色体的地上部鲜重、干重和总鲜重共关联 SNP(ss715603786)、10 号染色体的根冠比、地上部鲜重、干重、根干重和总鲜重共关联 SNP(ss715605561) 以及 12 号染色体的关联 SNP(ss715612166) 等。

表 2 大豆磷高效相关性状—因多效与两时期共关联 SNPs

Table 2 The pleiotropic and co-associated SNPs for phosphorus efficiency related traits in soybean

位点 SNP	染色体 Chromosome	物理位置 (bp) Physical position	性状 Trait	位点 SNP	染色体 Chromosome	物理位置 (bp) Physical position	性状 Trait
ss715593012	6	13264621	T ₁ -LP-RFW	ss715612154	12	3230818	T ₁ -LP-TDW
ss715593012	6	13264621	T ₁ -LP-RDW	ss715612154	12	3230818	T ₂ -LP-PH
ss715593012	6	13264621	T ₁ -LP-TFW	ss715612609	12	3593342	T ₁ -LP-SFW
ss715600312	8	1973360	T ₁ -LP-SDW	ss715612609	12	3593342	T ₁ -LP-SDW
ss715600312	8	1973360	T ₁ -LP-TDW	ss715612609	12	3593342	T ₁ -LP-RDW
ss715599905	8	17207837	T ₁ -LP-SDW	ss715612609	12	3593342	T ₁ -LP-TFW
ss715599905	8	17207837	T ₁ -LP-TDW	ss715612609	12	3593342	T ₁ -LP-TDW
ss715599912	8	17241295	T ₁ -LP-SDW	ss715613005	12	3979185	T ₂ -NP-SFW
ss715599912	8	17241295	T ₁ -LP-TDW	ss715613005	12	3979185	T ₂ -NP-RFW
ss715599932	8	17333566	T ₁ -LP-SDW	ss715613005	12	3979185	T ₂ -NP-TFW
ss715599932	8	17333566	T ₁ -LP-TDW	ss715613179	12	5486355	T ₁ -LP-SDW
ss715599942	8	17464069	T ₁ -LP-SDW	ss715613179	12	5486355	T ₁ -LP-TDW
ss715599942	8	17464069	T ₁ -LP-TDW	ss715612166	12	32347348	T ₂ -NP-R/S
ss715601936	8	42195720	T ₁ -LP-R/S	ss715612166	12	32347348	T ₂ -NP-SFW
ss715601936	8	42195720	T ₂ -LP-R/S	ss715612166	12	32347348	T ₂ -NP-SDW
ss715603786	9	3700452	T ₂ -NP-SFW	ss715612166	12	32347348	T ₂ -NP-RDW
ss715603786	9	3700452	T ₂ -NP-SDW	ss715612166	12	32347348	T ₂ -NP-TFW
ss715603786	9	3700452	T ₂ -NP-TFW	ss715617240	13	13691537	T ₁ -NP-RFW
ss715604063	9	41449318	T ₁ -LP-RFW	ss715617240	13	13691537	T ₁ -NP-TFW
ss715604063	9	41449318	T ₁ -LP-RDW	ss715617240	13	13691537	T ₂ -LP-SFW
ss715604063	9	41449318	T ₁ -LP-TFW	ss715617303	13	11887842	T ₁ -LP-SFW
ss715604063	9	41449318	T ₁ -LP-TDW	ss715617303	13	11887842	T ₂ -LP-SFW
ss715607334	10	4353967	T ₁ -LP-SFW	ss715617244	13	13626971	T ₁ -LP-SDW
ss715607334	10	4353967	T ₂ -LP-SFW	ss715617244	13	13626971	T ₁ -LP-TDW
ss715605561	10	1227933	T ₂ -NP-R/S	ss715617260	13	13331067	T ₁ -LP-SDW
ss715605561	10	1227933	T ₂ -NP-SFW	ss715617260	13	13331067	T ₁ -LP-TDW
ss715605561	10	1227933	T ₂ -NP-SDW	ss715617268	13	13136275	T ₁ -LP-SDW
ss715605561	10	1227933	T ₂ -NP-RDW	ss715617268	13	13136275	T ₁ -LP-TDW
ss715605561	10	1227933	T ₂ -NP-TFW	ss715614459	13	27478816	T ₂ -NP-RDW
ss715607431	10	44852490	T ₂ -NP-PH	ss715614459	13	27478816	T ₂ -NP-PUE
ss715607431	10	44852490	T ₂ -LP-R/S	ss715616158	13	40093680	T ₁ -LP-SDW
ss715607450	10	45023591	T ₁ -LP-R/S	ss715616158	13	40093680	T ₁ -LP-TDW
ss715607450	10	45023591	T ₂ -LP-R/S	ss715623780	16	2428113	T ₂ -LP-SDW
ss715610444	11	33309696	T ₂ -LP-RFW	ss715623780	16	2428113	T ₂ -LP-TDW
ss715610444	11	33309696	T ₂ -LP-RDW	ss715622182	15	47478799	T ₁ -LP-PH
ss715612154	12	3230818	T ₁ -LP-SFW	ss715622182	15	47478799	T ₂ -LP-PH
ss715612154	12	3230818	T ₁ -LP-SDW	ss715630653	18	41965392	T ₁ -NP-RDW
ss715612154	12	3230818	T ₁ -LP-TFW	ss715630669	18	42299316	T ₁ -NP-TDW

表 2(续)

位点 SNP	染色体 Chromosome	物理位置 (bp) Physical position	性状 Trait	位点 SNP	染色体 Chromosome	物理位置 (bp) Physical position	性状 Trait
ss715630715	18	43090752	T ₂ -LP-RDW	ss715637225	20	30744968	T ₁ -LP-TDW
ss715630715	18	43090752	T ₂ -LP-TDW	ss715637229	20	30862344	T ₁ -LP-SFW
ss715630720	18	43143256	T ₁ -NP-SDW	ss715637229	20	30862344	T ₁ -LP-SDW
ss715630720	18	43143256	T ₁ -NP-TDW	ss715637229	20	30862344	T ₁ -LP-TDW
ss715630771	18	43486787	T ₁ -NP-SDW	ss715637234	20	31016379	T ₁ -LP-SFW
ss715630771	18	43486787	T ₁ -NP-TDW	ss715637234	20	31016379	T ₁ -LP-SDW
ss715630794	18	43602711	T ₁ -NP-SDW	ss715637234	20	31016379	T ₁ -LP-TDW
ss715630794	18	43602711	T ₁ -NP-TDW	ss715637240	20	31129249	T ₁ -LP-SFW
ss715630832	18	43794293	T ₂ -LP-RDW	ss715637240	20	31129249	T ₁ -LP-SDW
ss715630832	18	43794293	T ₂ -LP-TDW	ss715637240	20	31129249	T ₁ -LP-TDW
ss715634961	19	40246729	T ₁ -NP-TDW	ss715637241	20	31195048	T ₁ -LP-SFW
ss715634961	19	40246729	T ₁ -NP-PUE	ss715637241	20	31195048	T ₁ -LP-SDW
ss715637220	20	30662956	T ₁ -LP-SFW	ss715637241	20	31195048	T ₁ -LP-TDW
ss715637220	20	30662956	T ₁ -LP-SDW	ss715637241	20	31195048	T ₂ -LP-SDW
ss715637220	20	30662956	T ₁ -LP-TDW	ss715637690	20	36473914	T ₂ -NP-SDW
ss715637225	20	30744968	T ₁ -LP-SFW	ss715637690	20	36473914	T ₂ -NP-TFW
ss715637225	20	30744968	T ₁ -LP-SDW	ss715637690	20	36473914	T ₂ -NP-TDW

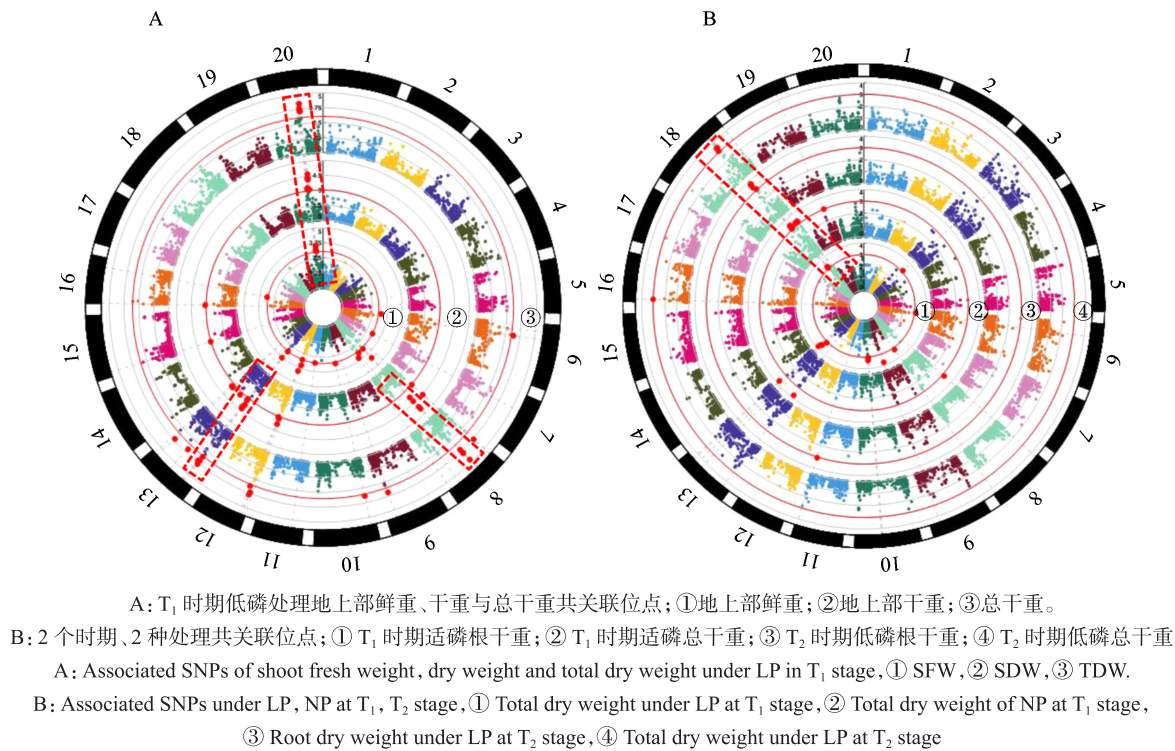


Fig.3 Analysis of co-associated genetic loci for phosphorus efficiency related traits in soybean

2.3.3 自然群体 T₁ 与 T₂ 时期共关联 SNP 位点分析

为进一步寻找 T₁ 和 T₂ 时期共关联 SNP, 经联合分析上述位点, 结果发现(表 2、图 3), 有 9 个 SNP 同时在 T₁ 与 T₂ 时期被检测到, 分别位于 8、10、13、15、20 号染色体, 关联性状包括地上部鲜重、干重、根冠比、株高等, 如 8 号染色体低磷条件根冠比共关联 SNP(ss715601936)、10 号染色体低磷条件地上部鲜重共关联 SNP(ss715607334) 以及根冠比共关联 SNP(ss715607450)、13 号染色体低磷条件地上部鲜重共关联 SNP(ss715617303)、15 号染色体低磷株高共关联 SNP(ss715622182)、20 号染色体低磷地上部干重共关联 SNP(ss715637241) 等。同时发现, 18 号染色体 SNP 簇(ss715630653、ss715630669 和 ss715630715) 与 T₁ 时期适磷根

干重和总干重、T₂ 时期低磷根干重和总干重共关联。

2.4 大豆磷高效相关性状候选基因筛选

为进一步验证上述关联位点, 本研究利用关联 SNPs 比对大豆基因组, 在其上下游寻找与磷高效相关候选基因, 并通过基因注释进行筛选, 获得 54 个响应磷胁迫的基因, 包括蛋白磷酸酶、焦磷酸酶、苹果酸酶和磷脂生物合成基因等(表 3)。对上述 54 个候选基因进行互作关系分析, 结果发现(图 4), 有 41 个候选基因间存在直接或间接的网络互作关系, 其中 *Glyma.10g218800* 与 *Glyma.09g191300*、*Glyma.10g048400* 与 *Glyma.10g014900* 间存在直接互作关系, 为今后进一步挖掘利用上述磷高效候选基因奠定了基础。

表 3 大豆磷高效相关性状候选基因筛选

Table 3 Analysis of candidate genes associated with phosphorus efficiency related traits in soybean

染色体 Chromosome	候选基因 Candidate gene	基因注释 Gene annotation	染色体 Chromosome	候选基因 Candidate gene	基因注释 Gene annotation
8	<i>Glyma.08g213700</i>	DNA 结合	10	<i>Glyma.10g217500</i>	锌指, C3HC4 型(环指)
8	<i>Glyma.08g214200</i>	磷酸转移酶活性, 以醇基团为受体	10	<i>Glyma.10g218100</i>	蛋白质酪氨酸磷酸酶活性
8	<i>Glyma.08g214300</i>	无机 H ⁺ 焦磷酸酶	10	<i>Glyma.10g218400</i>	磷脂酰肌醇磷酸激酶活性
8	<i>Glyma.08g214700</i>	磷酸戊糖途径	10	<i>Glyma.10g218800</i>	蛋白质磷酸化
9	<i>Glyma.09g187900</i>	植物磷酸核糖基转移 酶 C 末端	10	<i>Glyma.10g220400</i>	次黄嘌呤磷酸核糖转移酶
9	<i>Glyma.09g191300</i>	蛋白质磷酸化	10	<i>Glyma.10g220700</i>	蛋白质磷酸化
10	<i>Glyma.10g010800</i>	磷脂酰胆碱酰基编辑	10	<i>Glyma.10g221000</i>	肌醇聚磷酸 5- 磷酸酶
10	<i>Glyma.10g011000</i>	甘油 -3- 磷酸乙酰转移酶	10	<i>Glyma.10g221200</i>	蛋白激酶超家族蛋白
10	<i>Glyma.10g012000</i>	蛋白质磷酸化	12	<i>Glyma.12g040900</i>	磷脂酰肌醇转移蛋白 SEC14 及相关蛋白
10	<i>Glyma.10g012100</i>	果胶酶活性	12	<i>Glyma.12g042400</i>	葡萄糖 -1- 磷酸腺苷酰(基) 转移酶
10	<i>Glyma.10g013600</i>	锌指, C3HC4 型(环指)	12	<i>Glyma.12g043600</i>	蛋白质磷酸化
10	<i>Glyma.10g014900</i>	UTP 和 CTP 去磷酸化 I	12	<i>Glyma.12g044200</i>	锌指, ZZ 型
10	<i>Glyma.10g015400</i>	磷酸吡哆醛依赖性转移 酶超家族蛋白	12	<i>Glyma.12g045000</i>	核苷酸二磷酸糖转移酶
10	<i>Glyma.10g046400</i>	磷脂酸磷酸酶	12	<i>Glyma.12g045400</i>	二磷酸氢二糖蛋白质糖转移酶
10	<i>Glyma.10g047500</i>	蛋白磷酸酶 2C	12	<i>Glyma.12g045700</i>	磷脂生物合成 II
10	<i>Glyma.10g047900</i>	蛋白质磷酸化	12	<i>Glyma.12g045800</i>	磷脂酶 a-2 激活蛋白
10	<i>Glyma.10g048100</i>	磷光反应调节器活性	12	<i>Glyma.12g046000</i>	甲基赤藓糖醇磷酸酯途径 II
10	<i>Glyma.10g048400</i>	锌指 C-x8-C-x5-C-x3-H 型 家族蛋白	12	<i>Glyma.12g047300</i>	锌指, C3HC4 型(环指)
10	<i>Glyma.10g048800</i>	蛋白质磷酸化	12	<i>Glyma.12g047400</i>	磷脂酰胆碱酰基编辑
10	<i>Glyma.10g050100</i>	核苷酸二磷酸糖转移酶超 家族蛋白	12	<i>Glyma.12g049000</i>	吡哆醛磷酸结合
10	<i>Glyma.10g050300</i>	磷脂酸磷酸酶(PAP2) 家族蛋白	12	<i>Glyma.12g052300</i>	蛋白质磷酸化
10	<i>Glyma.10g050900</i>	蛋白质磷酸化	12	<i>Glyma.12g052400</i>	蛋白质磷酸化
10	<i>Glyma.10g051200</i>	锌指, C3HC4 型(环指)	12	<i>Glyma.12g053400</i>	蛋白激酶活性
10	<i>Glyma.10g216900</i>	蛋白质磷酸化	15	<i>Glyma.15g248600</i>	光合作用
10	<i>Glyma.10g217000</i>	蛋白质磷酸化	18	<i>Glyma.18g177600</i>	光敏色素相关蛋白
10	<i>Glyma.10g217300</i>	ABC 转运体			磷酸酶 2C 型
			18	<i>Glyma.18g177700</i>	吡哆醛磷酸结合
			18	<i>Glyma.18g181500</i>	蛋白激酶活性
			20	<i>Glyma.20g081400</i>	苹果酸脱氢酶 (草酰乙酸脱羧酶)

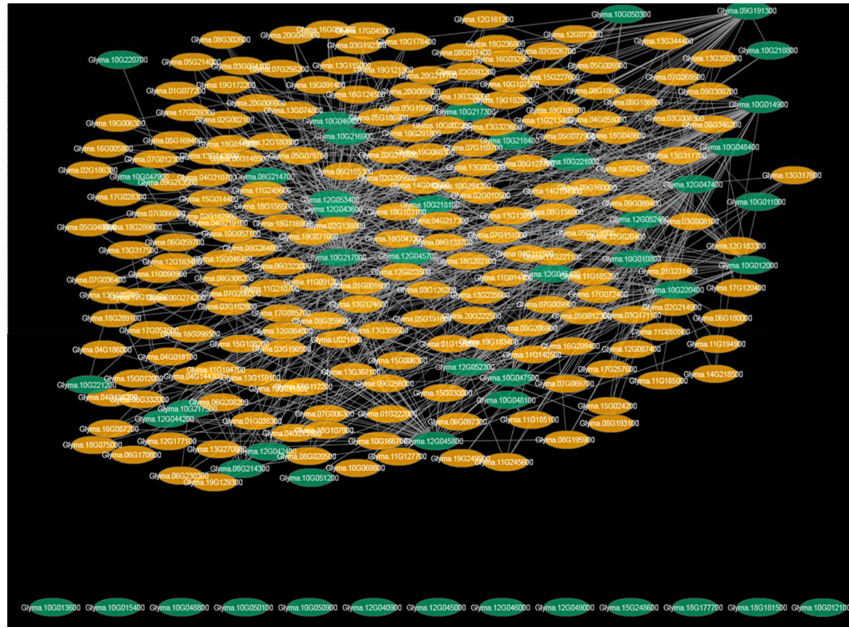


图 4 大豆磷高效候选基因的互作网络分析

Fig.4 The network of candidate genes for phosphorus efficiency related traits in soybean

3 讨论

大豆幼苗期(四叶期)和开花前后(六叶期)是磷营养临界期,充足的营养吸收对大豆生长发育至关重要。因此,本研究利用前期构建的 281 份大豆资源自然群体,对 10 个磷高效利用性状进行全基因组关联分析,挖掘上述 2 个关键时期磷高效遗传位点。结果发现,在 2 种不同磷素处理(适磷、低磷)条件下,2 个时期分别检测到 78、134、83、53 个显著关联 SNP,且其中部分 SNP 在 2 个关键需磷时期均可检测到,充分说明其与大豆磷素高效利用密切相关。

进一步比较本研究结果与已有报道发现,部分 SNP 与前人报道具有较好的一致性,如本研究在 8 号染色体检测到 T_1 时期控制地上部干重与总干重一因多效 SNP 簇(关联标记为 ss715599905、ss715599912、ss715599932 和 ss715599942),恰好位于 Zhang 等^[13]定位的大豆植株磷含量与酸性磷酸酶主效 QTL 区间,并与该研究发现的酸性磷酸酶 *GmACP1* 相邻;更重要的是,本研究在上述关联 SNP 附近筛选到 1 个新的候选基因 *Glyma.08g214300*,该基因与拟南芥 *AVP1* 同源,为焦磷酸酶类,并有学者在拟南芥、番茄中过表达 *AVP1*,显著增加了低磷胁迫下的植株根系生物量和果实产量^[26-27],故推测候选基因 *Glyma.08g214300* 可能对低磷条件下的大豆根系与产量具有重要

作用。

同时发现,本研究在 T_1 时期低磷条件下检测到的 12 号染色体控制地上部鲜重 SNP (ss715613339),与宁丽华^[28]通过关联分析寻找到的磷高效 *GmG3PT1* 距离较近(相距 262 kb 左右),而 *GmG3PT1* 已被证实具有显著提高低磷条件拟南芥有效磷含量的功能。并且,本研究发现的 T_1 时期低磷条件下控制磷素利用效率的 SNP (ss715583855),距离 Ning 等^[15]在低磷条件下检测到的大豆磷含量遗传位点 BARC-037223-06746 约 290 kb 左右。另外,本研究在 10 号、13 号染色体发现的控制 T_2 时期大豆株高关联标记 ss715607431、ss715616158,恰好位于大豆公共数据库(<https://www.soybase.org>)公布的株高 QTL (*Plant height 5-g1.1*、*mqPlant height-006*) 区间内^[29-30]; 13 号染色体控制 T_2 时期根干重关联标记 ss715614459 也与前人已报道的控制大豆根干重 QTL (*q13-2*) 共定位^[8],这充分证明了这些 QTL 的真实性和本研究的可靠性。

除上述与前人研究一致性的关联位点外,本研究还新发现了多个与大豆磷高效利用密切相关的一因多效 SNP 簇(表 2),如 T_1 时期低磷条件下检测到的 13 号染色体可同时控制地上部干重与总干重 SNP 簇、20 号染色体可同时控制地上部鲜重、干重与总干重的一因多效 SNP 簇; T_2 时期低磷条件下检测到的 18 号染色体可同时控制根干重与总干

重的一因多效 SNP 簇等。所有这些新发现的关联 SNP 一方面为进一步挖掘大豆磷高效利用相关基因提供了依据,另一方面也为进一步揭示大豆磷高效分子机制奠定了基础。

参考文献

- [1] Lung S C, Lim B L. Assimilation of phytate-phosphorus by the extracellular phytase activity of tobacco (*Nicotiana tabacum*) is affected by the availability of soluble phytate. *Plant and Soil*, 2006, 279 (1-2): 187-199
- [2] 刘灵,廖红,王秀荣,严小龙. 不同根构型大豆对低磷的适应性变化及其与磷效率的关系. *中国农业科学*, 2008, 41 (4): 1089-1099
Liu L, Liao H, Wang X R, Yan X L. Adaptive changes of soybean genotypes with different root architectures to low phosphorus availability as related to phosphorus efficiency. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41 (4): 1089-1099
- [3] Yan X, Liao H, Beebe S E, Blair M W, Lynch J P. QTL mapping of root hair and acid exudation traits and their relationship to phosphorus uptake in common bean. *Plant and Soil*, 2004, 265 (1-2): 17-29
- [4] Mamidi S, Lee R K, Goos J R, McClean P E. Genome-wide association studies identifies seven major regions responsible for iron deficiency chlorosis in soybean (*Glycine max*). *PLoS One*, 2014, 9: e107469
- [5] Smith F W, Mudge S R, Rae A L, Glassop D. Phosphate transport in plants. *Plant and Soil*, 2003, 248 (1-2): 71-83
- [6] 刘渊,李喜焕,王瑞霞,张彩英. 大豆耐低磷指标筛选与耐低磷品种鉴定. *中国农业科技导报*, 2015, 17 (4): 30-41
Liu Y, Li X H, Wang R X, Zhang C Y. Screen indexes for soybean tolerance to phosphorus deficiency and identification of low phosphorus tolerant soybean cultivars. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2015, 17 (4): 30-41
- [7] 刘渊,孔佑宾,李喜焕,张彩英. 基于 SLAF-BSA 技术挖掘大豆酸性磷酸酶候选基因及标记开发. *植物遗传资源学报*, 2020, 21 (1): 164-173
Liu Y, Kong Y B, Li X H, Zhang C Y. Mining acid phosphatase candidate genes and development of functional markers based on SLAF-BSA in soybean. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2020, 21 (1): 164-173
- [8] Zhang D, Li H Y, Wang J S, Zhang H Y, Hu Z B, Chu S S, Lv H Y, Yu D Y. High-density genetic-mapping identifies new major loci for tolerance to low-phosphorus stress in soybean. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 372
- [9] Zhang D, Cheng H, Geng L Y, Kan G Z, Cui S Y, Meng Q C, Gai J Y, Yu D Y. Detection of quantitative trait loci for phosphorus deficiency tolerance at soybean seedling stage. *Euphytica*, 2009, 167 (3): 313-322
- [10] 苏辉,李志刚,宋书宏. 低磷胁迫下大豆主要农艺性状的 QTL 定位. *西北农业学报*, 2009, 18 (1): 98-101, 116
Su H, Li Z G, Song S H. Molecular mapping of QTLs major agronomic traits in soybean (*Glycine max* L.) under phosphorus deficiency stress. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2009, 18 (1): 98-101, 116
- [11] 崔世友,耿雷跃,孟庆长,喻德跃. 大豆苗期耐低磷性及其 QTL 定位. *作物学报*, 2007, 33 (3): 378-383
Cui S Y, Geng L Y, Meng Q C, Yu D Y. QTL mapping of phosphorus deficiency tolerance in soybean (*Glycine max* L.) during seedling stage. *Acta Agronomica Sinica*, 2007, 33 (3): 378-383
- [12] Liang Q, Cheng X H, Mei M T, Yan X L, Liao H. QTL analysis of root traits as related to phosphorus efficiency in soybean. *Annals of Botany*, 2010, 106: 223-234
- [13] Zhang D, Song H N, Cheng H, Hao D R, Wang H, Kan G Z, Jin H X, Yu D Y. The acid phosphatase-encoding gene *GmACP1* contributes to soybean tolerance to low-phosphorus stress. *PLoS Genetics*, 2014, 10 (1): e1004061
- [14] Cai Z D, Cheng Y B, Xian P Q, Ma Q B, Wen K, Xia Q J, Zhang G Y, Nian H. Acid phosphatase gene *GmHAD1* linked to low phosphorus tolerance in soybean, through fine mapping. *Theoretical and Applied Genetics*, 2018, 131 (8): 1715-1728
- [15] Ning L H, Kan G Z, Du W K, Guo S W, Wang Q, Zhang G Z, Cheng H, Yu D Y. Association analysis for detecting significant single nucleotide polymorphisms for phosphorus-deficiency tolerance at the seedling stage in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Breeding Science*, 2016, 66 (2): 191-203
- [16] Kong Y B, Wang B, Du H, Li W L, Li X H, Zhang C Y. *GmEXLB1*, a soybean expansin-like B gene, alters root architecture to improve phosphorus acquisition in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 808
- [17] 武海燕. 大豆苗期耐低磷相关性状非条件和条件 QTL 分析. 保定: 河北农业大学, 2016
Wu H Y. Unconditional and conditional QTL mapping of low phosphorus tolerance related traits at seedling stage in soybean. Baoding: Hebei Agricultural University, 2016
- [18] 王英,李喜焕,张彩英. 河北大豆地方品种耐低磷种质筛选. *大豆科学*, 2009, 28 (4): 42-48
Wang Y, Li X H, Zhang C Y. Screening of low-P tolerant soybean landraces from Hebei Growing-areas. *Soybean Science*, 2009, 28 (4): 42-48
- [19] Fan J B, Gunderson K L, Bibikova M, Yeakley J M, Chen J, Garcia E W, Lebruska L L, Laurent M, Shen R, Barker D. Illumina universal bead arrays. *Methods in Enzymology*, 2006, 410: 57-73
- [20] Akond M, Liu S M, Schoener L, Anderson J A, Kantartzi S K, Meksem K, Song Q J, Wang D C, Wen Z X, Lightfoot D A, Kassem M A. A SNP-based genetic linkage map of soybean using the SoySNP6K Illumina Infinium BeadChip genotyping array. *Journal of Plant Genome Sciences*, 2013, 1 (3): 80-89
- [21] Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira M A, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker P I, Daly M J, Sham P C. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *The American Journal of Human Genetics*, 2007, 81 (3): 559-575
- [22] Tang Y, Liu X L, Wang J B, Li M, Wang Q S, Tian F, Su Z B, Pan Y C, Liu D, Lipka A E, Buckler E S, Zhang Z W. GAPIT Version 2: an enhanced integrated tool for genomic association and prediction. *Plant Genome*, 2016, 9 (2): 1-9
- [23] Vuong T D, Sonah H, Meinhardt C G, Deshmukh R, Kadam S, Nelson R L, Shannon J G, Nguyen H T. Genetic architecture of cyst nematode resistance revealed by genome-wide association study in soybean. *BMC Genomics*, 2015, 16 (1): 1-13

- [24] Hwang E Y, Song Q J, Jia G F, Specht J E, Hyten D L, Costa J, Cregan P B. A genome-wide association study of seed protein and oil content in soybean. *BMC Genomics*, 2014, 15 (1): 1-12
- [25] Kim E, Hwang S, Lee I. SoyNet: a database of co-functional networks for soybean *Glycine max*. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45 (1): 1-13
- [26] Yang H B, Knapp J, Koirala P, Rajagopal D, Peer W A, Silbart L K, Murphy A, Gaxiola R A. Enhanced phosphorus nutrition in monocots and dicots over-expressing a phosphorus-responsive type I H^+ -pyrophosphatase. *Plant Biotechnology Journal*, 2007, 5 (6): 735-745
- [27] Yang H B, Zhang X, Gaxiola R A, Xu G H, Peer W A, Murphy A S. Over-expression of the *Arabidopsis* proton-pyrophosphatase *AVP1* enhances transplant survival, root mass, and fruit development under limiting phosphorus conditions. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65 (12): 3045-3053
- [28] 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
- [29] Pathan S M, Vuong T, Clark K, Lee J D, Shannon J G, Roberts C A, Ellersieck M R, Burton J W, Cregan P B, Hyten D L, Nguyen H T, Sleper D A. Genetic mapping and confirmation of quantitative trait loci for seed protein and oil contents and seed weight in soybean. *Crop Science*, 2013, 53 (3): 765-774
- [30] Fang C, Ma Y M, Wu S W, Liu Z, Wang Z, Yang R, Hu G H, Zhou Z K, Yu H, Zhang M, Pan Y, Zhou G A, Ren H X, Du W G, Yan H R, Wang Y P, Han D Z, Shen Y T, Liu S L, Liu T F, Zhang J X, Qin H, Yuan J, Yuan X H, Kong F J, Liu B H, Li J Y, Zhang Z W, Wang G D, Zhu B G, Tian Z X. Genome-wide association studies dissect the genetic networks underlying agronomical traits in soybean. *Genome Biology*, 2017, 18 (1): 161