

孙 畅, 刘美玲, 刘子君, 等. 低磷胁迫下大豆苗期根系性状全基因组关联分析[J]. 沈阳农业大学学报, 2024, 55(6): 663-676.

SUN Chang, LIU Meiling, LIU Zijun, et al. Genome-wide association analysis of root traits at seedlings stage under low phosphorus stress in soybean (*Glycine max* L.) [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2024, 55(6): 663-676.

低磷胁迫下大豆苗期根系性状全基因组关联分析

孙 畅¹, 刘美玲¹, 刘子君¹, 杨 光¹, 梁腾月¹, 周宣汝¹, 赵悦如¹, 张洛桐¹,
谷勇哲², 敖 雪¹

(1. 沈阳农业大学 农学院, 沈阳 110161; 2. 中国农业科学院 作物科学研究所/农作物基因资源与遗传改良国家重大科学工程/农业农村部北京大豆生物学重点实验室, 北京 100081)

摘 要:大豆是喜磷作物, 缺磷会导致大豆减产甚至无法正常生长。大豆根系性状是鉴定大豆耐低磷性的重要指标, 因此, 挖掘调控大豆低磷胁迫功能的相关基因对提高大豆低磷耐受性和大豆育种尤为关键。利用206份大豆种质资源, 在低磷和常磷处理下对大豆根系形态性状进行表型鉴定, 以低磷处理下根重、总根长、根总表面积、根总体积和相对根重、相对总根长、相对根总表面积、相对根总体积作为耐低磷性状鉴定指标, 基于93 436个SNPs (single nucleotide polymorphisms) 进行全基因组关联分析 (genome-wide association study, GWAS), 筛选显著关联的SNPs位点并挖掘候选基因。结果表明: 不同大豆种质的耐低磷性差异明显, 低磷处理下的根重、总根长、根总体积和根总表面积的变化范围分别为0.04~0.75 g、700.95~4 300.12 cm、0.96~8.56 cm³和91.54~614.58 cm², 相对根重、相对总根长、相对根总表面积和相对根总体积的变化范围分别为0.34~2.07, 0.49~1.78, 0.52~1.96, 0.4~1.67。全基因组关联分析共鉴定出49个与大豆耐低磷性显著相关的SNP位点, 其中与低磷处理下根重、根总表面积、根总体积相关的SNP位点共有10个, 与相对根重、相对根长、相对根总表面积和相对根总体积相关的SNP位点共有39个。通过单倍型分析与LD block分析得到候选基因2个, 分别是在根中特异性表达为编码磷酸泛乙炔基转移酶相关的基因和 α -葡聚糖磷酸化酶。qRT-PCR结果显示, 低磷处理后 *GmYB1* 和 *GmYB3* 的表达量在耐低磷品种中显著高于低磷敏感品种。研究结果为深入了解大豆耐低磷胁迫的分子机制提供了理论参考及基因资源。

关键词:大豆; 低磷胁迫; 根系性状; SNP; GWAS; 候选基因

中图分类号: S513

文章编号: 1000-1700(2024)06-0663-14

文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Genome-wide Association Analysis of Root Traits at Seedlings Stage under Low Phosphorus Stress in Soybean (*Glycine max* L.)

SUN Chang¹, LIU Meiling¹, LIU Zijun¹, YANG Guang¹, LIANG Tengyue¹, ZHOU Xuanru¹,
ZHAO Yueru¹, ZHANG Luotong¹, GU Yongzhe², AO Xue¹

(1. College of Agronomy, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China; 2. Institute of Crop Science/State Key Scientific Project of Crop Genetic Resources and Genetic Improvement/Beijing Key Laboratory of Soybean Biology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Soybean is a phosphorus loving crop, the lack of phosphorus can lead to reduced soybean yields or even prevent normal growth. Soybean root traits are an important index to identify soybean tolerance to low phosphorus, therefore, it is particularly important to explore the related genes regulating the function of low phosphorus stress in soybean to improve

收稿日期: 2024-05-26

基金项目: 沈阳市科学技术计划项目(23-410-2-09)

第一作者: 孙 畅(2000-), 女, 博士研究生, 从事大豆遗传改良与生理生态研究, E-mail: sunchang2000sc@163.com

通信作者: 敖 雪(1979-), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 从事大豆遗传改良与生理生态研究, E-mail: a2009syau@syau.edu.com

the low phosphorus tolerance and soybean breeding. In this study, 206 soybean germplasm resources were used for phenotypic identification of root morphological traits under low and normal phosphorus treatments. In the low phosphorus treatment, root weight, total root length, root total surface area, root total volume, as well as relative root weight, relative total root length, relative root total surface area, and relative root total volume were utilized as indicators for assessing low phosphorus tolerance traits. A genome-wide association study (GWAS) was performed based on 93 436 SNPs (single nucleotide polymorphisms) to screen significant associated SNPs loci and mine candidate genes. The results indicate significant variations in phosphorus tolerance among different soybean germplasms. Under low-phosphorus conditions, the range of variation in root weight, total root length, root total volume, and root total surface area is 0.04 to 0.75 grams, 700.95 to 4300.12 centimeters, 0.96 to 8.56 cubic centimeters, and 91.54 to 614.58 square centimeters, respectively. The relative root weight, relative total root length, relative total root volume and relative total root surface area ranged from 0.34 to 2.07, 0.49 to 1.78, 0.52 to 1.96 and 0.4 to 1.67, respectively. Genome-wide association analysis identified a total of 49 SNPs loci significantly associated with soybean phosphorus tolerance. Among them, 10 SNPs loci were associated with root weight, root total surface area, and root total volume under low phosphorus treatment, while 39 SNPs loci were associated with relative root weight, relative root length, relative root total surface area, and relative root total volume. By haplotype analysis and LD block analysis, two candidate genes were obtained, which were specifically expressed in the root for encoding phosphopanethynyltransferase and α -glucan phosphorylase. The results of qRT-PCR showed that the expression levels of *GmYB1* and *GmYB3* in low-P tolerant varieties were significantly higher than those in low-P sensitive varieties after low-P treatment. The findings of this study provide a theoretical reference and genetic resources for a deeper understanding of the molecular mechanisms underlying soybean tolerance to low phosphorus stress.

Key words: soybean; low phosphorus stress; root character; SNP; GWAS; candidate gene

大豆 [*Glycine max* (L.) Merr.] 起源于中国, 是我国重要的粮油兼用作物^[1]。大豆是喜磷作物, 对磷需求量较大, 其吸收的磷主要来自土壤^[2]。磷对作物生长起着至关重要的作用^[3], 磷是除氮以外第二重要的植物所必需的营养元素, 但其极易被吸附固定, 因此在土壤中仅有效磷能被植物吸收利用^[4], 这导致我国约 2/3 的耕地有效磷缺乏^[5]。通常采用施用磷肥来缓解土壤缺磷的问题, 但磷肥的过度施用容易导致环境污染, 且磷矿资源具有有限性和不可再生性^[6]。缺磷将导致作物营养失调, 最终影响其产量和品质^[7]。当土壤中有效磷含量不能满足其需求时, 大豆会出现植株生长缓慢、叶片变小更易脱落以及形成更多的不实籽粒等症^[8]。植物为了适应土壤缺磷, 进化出各种协同调控和应答机制, 如分泌有机酸、改变根系形态构型等^[9-11]。低磷环境导致植物根长、细根比例以及根冠比等根系形态结构的变化, 扩大根系吸收面积可提高磷素的吸收能力^[12-14]。此外, 植物可以通过改变根系的特异分泌物和激素等生理活性物质进而响应低磷胁迫^[15-16]。

全基因组关联分析 (GWAS) 是鉴定某一群体内目标性状与遗传标记或候选基因关系的分析方法^[17]。YUAN 等^[18]通过对甘蓝型油菜苗期进行全基因组关联分析发现, 在低磷胁迫下与苗期根系结构显著相关的有 52 个 SNP 标记位点。MAQBOOL 等^[19]对小麦根系性状研究发现, 在低磷胁迫下 *TraesCS1A02G313600* 基因编码 C2H2 型结构域蛋白与根毛伸长相关。ZHANG 等^[20]对大豆四叶期和六叶期磷利用相关性状进行全基因组关联分析检测到与耐低磷相关的 SNP 标记位点有 200 个。XU 等^[21]研究发现 *GmPAP17* 主要在根中表达, 并在低磷胁迫下的磷利用效率中发挥着重要作用。ZHANG 等^[22]通过全基因组关联分析鉴定了一个与磷效率相关的大豆基因 *GmACPI* (酸性磷酸酶 1), 在低磷胁迫下酸性磷酸酶活性更高, 从而提高了大豆的磷效率。DU 等^[23]通过对 211 份大豆材料的 3 个磷效率相关性状数值以及 2 个性状的相对值进行全基因组关联分析, 结果发现 155 个 SNP 与磷效率性状显著相关并确认了与磷效率相关的候选基因 *GmSPX-RING1*, 该基因可以通过负向调节大豆毛状根中大豆磷浓度从而影响大豆磷效率。

目前, 报道与大豆耐低磷相关的基因较少, 无法充分满足大豆育种的需求。因此, 本研究选取 206 份大豆核心种质, 并在其苗期进行低磷处理。针对 4 个根生物量相关性状进行 GWAS 分析, 从而筛选出与耐低磷紧密相关的 SNPs 位点, 并进一步挖掘出潜在的候选基因。这些发现不仅为深入探究大豆

耐低磷的遗传特性提供了数据支持,同时也为培育出具备更高耐低磷能力的大豆品种奠定了基础,为农业生产的可持续发展贡献了重要信息。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为206份大豆核心种质资源,由中国农业科学院作物科学研究所提供。

1.2 试验设计

试验于2019–2020年在沈阳农业大学农学院教学科研实验基地盆栽场进行(41.81°N, 123.56°E),采用PVC管(内径16 cm,高25 cm)进行砂培,盆底有直径为0.3 cm的小孔。本试验设置两个处理:常磷处理(0.5 mmol·L⁻¹)和低磷处理(0.005 mmol·L⁻¹),设置3次重复,完全随机区组排列,每个PVC管内装石英砂5 kg,并在每个管内播种5粒大豆种子。本研究磷源采用磷酸二氢钾,缺乏的钾素用氯化钾补齐。大豆出苗后,每盆留长势均匀一致的幼苗3株。出苗后每天8:00浇1/2营养液500 mL,16:00浇蒸馏水1 L,洗掉多余盐分,出苗一周后改1/2营养液为全营养液。大豆营养液配方(表1)参照王辉^[24]的方法。

表1 营养液配方

Table 1 Nutrient solution formula

常磷 Normal phosphorus		低磷 Low phosphorus		浓缩液 Concentrated liquor	
试验药品 Experimental drug	浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) Concentration	试验药品 Experimental drug	浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) Concentration	试验药品 Experimental drug	浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) Concentration
CaSO ₄ ·2H ₂ O	3 600.00	CaSO ₄ ·2H ₂ O	3 600.00	H ₃ BO ₃	10.06
KNO ₃	2 000.00	KNO ₃	2 000.00	MnSO ₄ ·H ₂ O	2.66
FeSO ₄ ·7H ₂ O	18.00	FeSO ₄ ·7H ₂ O	18.00	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	4.52
KCl	18.90	KCl	513.90	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.79
MgSO ₄ ·7H ₂ O	250.00	MgSO ₄ ·7H ₂ O	250.00	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂ ·4H ₂ O	3.89
KH ₂ PO ₄	500.00	KH ₂ PO ₄	5.00		

1.3 表型鉴定

在苗期(V1期)对206份大豆根系进行取样。用蒸馏水清洗根系,擦干后用Win–RHIZO根系分析系统对根系进行扫描分析,获得总根长、根总体积、根总表面积等指标。将鲜根置烘箱内105 °C杀青30 min后,80 °C烘干至恒重,称量其根系干重。参照王辉^[24]的方法,测定大豆根系含磷量,计算根系磷利用效率和根系磷相对利用效率。

$$\text{磷利用率}(\text{g}\cdot\text{mg}^{-1})=\text{生物量}/\text{磷积累量}$$

$$\text{根系相对磷利用效率}=\text{低磷下测得根系磷利用效率}/\text{常磷下测得根系磷利用效率}$$

1.4 基因型测定与质控

本试验使用由“中豆芯一号”芯片^[25]测序的基因型SNP(single nucleotide polymorphism)数据。利用PLINK对最小等位基因频率<0.05和基因型缺失率>0.25的SNP进行基因型过滤^[26],剩余93 436个SNPs位点用于后续GWAS分析。

1.5 全基因组关联分析

使用GAPIT进行GWAS分析。GWAS分析采用farmCPU模型来平衡假阳性和假阴性结果。显著性位点的阈值[-log₁₀(p)]设置为4,在结果中筛选出大于阈值的位点,作为检索候选基因的显著位点。

1.6 候选基因表达验证分析

在soybase (<https://www.soybase.org/>)网站参考基因组图谱中查找候选基因,在显著位点上下游各延伸200 kb参考序列,根据所有SNP位点物理位置对候选基因进行基因扫描,寻找与磷相关基因。利用课题组前期研究筛选的磷高效(耐低磷)品种和磷低效(低磷敏感)品种验证低磷胁迫下候选基因的

表达。以大豆管家基因 Actin 为内参基因,每个样品设置 3 个生物学重复,使用公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算基因相对表达量^[27],所用部分引物见表 2。

2 结果与分析

2.1 根生物量及形态性状的表型变异

由表 3 可知,低磷处理下的根重、总根长、根总体积、根总表面积的变化范围分别为 0.04 ~ 0.75 g、700.95 ~ 4 300.12 cm、0.96 ~ 8.56 cm³ 和 91.54 ~ 614.58 cm²,其中低磷下的根总体积变异系数最大,达到 37.94%。体现耐低磷性的相对根重、相对总根长、相对根总体积和相对根总表面积的变化范围分别为 0.34 ~ 2.07, 0.49 ~ 1.78, 0.52 ~ 1.96, 0.4 ~ 1.67,其中相对根重的变异系数最大,达到 27.45%。此外,不同处理下大豆根重、总根长、根总体积和根总表面积及相对根重、相对总根长、相对根总体积和相对根总表面积均呈正态分布(图 1),符合典型的数量性状遗传特点,且三者变异系数均高于 20%,说明试验材料在磷利用效率方面具有丰富的变异。由此可见,低磷胁迫对大豆根系性状的影响较大,可以通过调节大豆根部发育进而改变根系性状来响应低磷胁迫。

表 2 候选基因 qRT-PCR 所用引物

Table 2 Primers for qRT-PCR of candidate gene

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')
GmaPHO1-H1-F	CATATTGGTGGCGTGCAATTAC
GmaPHO1-H1-R	GCAACCATTGCTGACACATA
GmaPHO1-H8-F	CGAGACGGTGGTTTGATGAT
GmaPHO1-H8-R	GGTCATTCTGTCTGCTGTATGT
GmPHT1;14-F	GATCGCTGGAATGGGTTTCT
GmPHT1;14-R	GTGCACCTGGTTCTGTGTAATA

表 3 206 份大豆根生物量相关性状表型统计

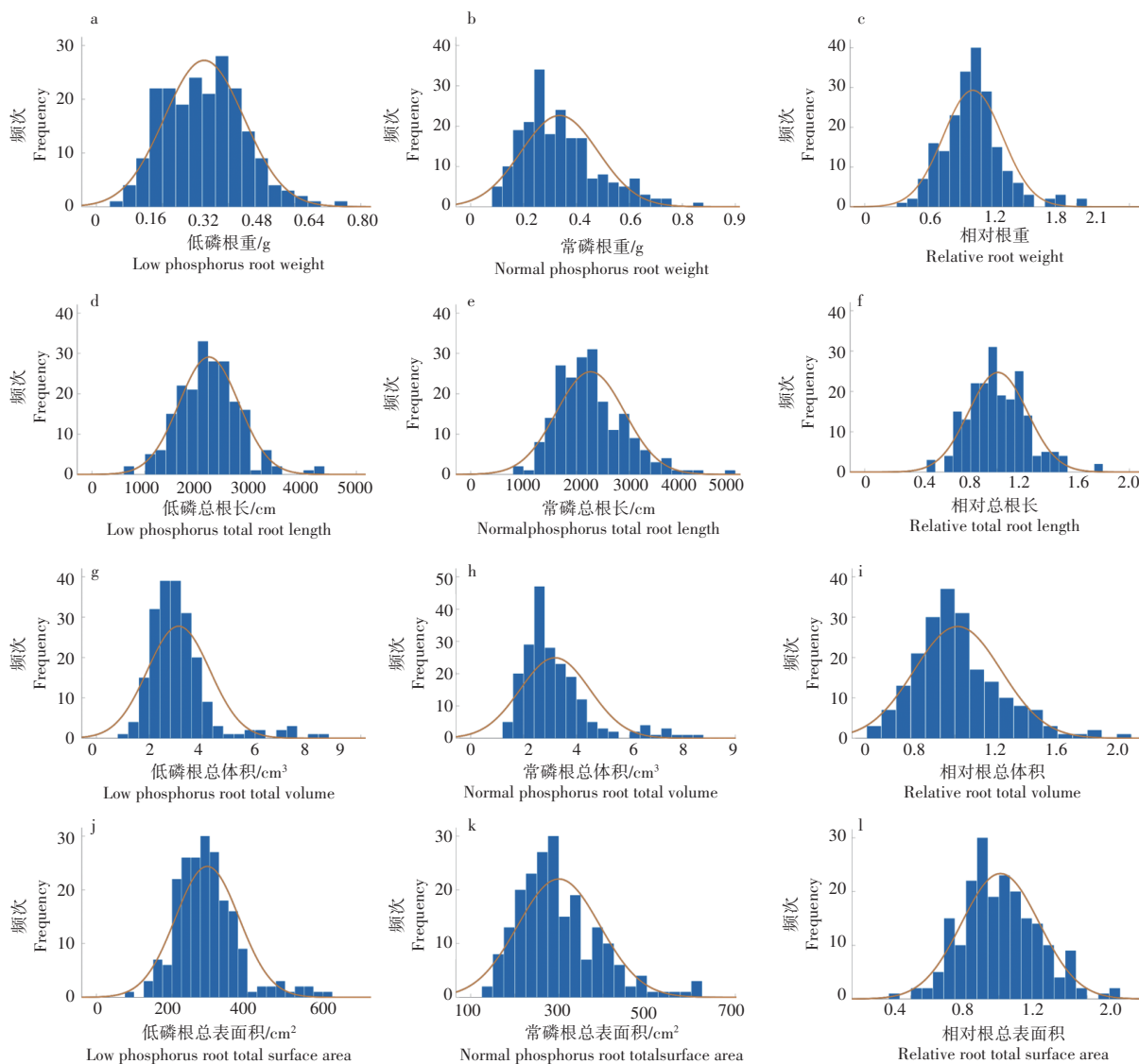
Table 3 Phenotypic statistics of 206 soybean root biomass related traits

性状 Trait	最大值 Max.	最小值 Min.	平均值 Mean	标准差 SD	变异系数 CV
低磷根重/g Low phosphorus root weight	0.75	0.04	0.33	0.12	36.36
低磷总根长/cm Low phosphorus total root length	4 300.12	700.95	2 213.44	564.91	25.52
低磷根总体积/cm ³ Low phosphorus root total product	8.56	0.96	3.11	1.18	37.94
低磷根总表面积/cm ² Low phosphorus root total surface area	614.58	91.54	293.47	84.32	28.73
相对根重 Relative root weight	2.07	0.34	1.02	0.28	27.45
相对总根长 Relative total root length	1.78	0.49	1.01	0.22	21.78
相对根总体积 Relative root total product	1.96	0.52	1.02	0.25	24.51
相对根总表面积 Relative root total surface area	1.67	0.40	1.01	0.22	21.78

2.2 全基因组关联分析

本研究利用 GAPIT 对低磷处理下 206 份大豆材料的根系特性(根重、总根长、根总体积和根总表面积)和耐低磷相对能力(相对根重、相对总根长、相对根总体积和相对根总表面积)共 4 个表型结合测序数据使用 farmCPU 模型进行全基因组关联分析(图 2)。分析结果表明低磷处理下与这 4 个性状相关联的 SNPs ($-\log_{10}p > 4$) 共有 49 个(表 4)。

与根重显著相关的 SNPs ($-\log_{10}p > 4$) 共有 15 个,分别位于 2, 6, 8, 11, 13, 16, 17, 18, 19, 20 染色体上,位于 2 号染色体上的 SNPs 最多(4 个)。与根长显著相关的 SNPs ($-\log_{10}p > 4$) 共有 10 个,分别位于 2, 4, 6, 9, 15, 18, 20 号染色体上,位于 6 号染色体上的 SNPs 最多(3 个)。与根系总体积显著相关的 SNPs ($-\log_{10}p > 4$) 共有 11 个,分别位于 2, 4, 6, 10, 13, 15, 16, 17, 20 号染色体上,位于 13 号染色体上的 SNPs 最多(2 个)。与根系总表面积显著相关的 SNPs ($-\log_{10}p > 4$) 共有 13 个,分别位于 6, 7, 10, 13, 15,



a~c. 低磷、常磷处理下根重和相对根重频次分布; d~f. 低磷、常磷处理下根长和相对根长频次分布; g~i. 低磷、常磷处理下根总体积和相对根总体积频次分布; j~l. 低磷、常磷处理下根总表面积和相对根总表面积频次分布

a~c. Distribution of soybean in LP, NP root weight, and relative root weight frequency; d~f. Distribution of soybean in LP, NP root length, and relative root length frequency; g~i. Distribution of soybean in LP, NP total root volume, and relative total root volume frequency; j~l. Distribution of soybean in LP, NP total root surface area, and relative total root surface area frequency

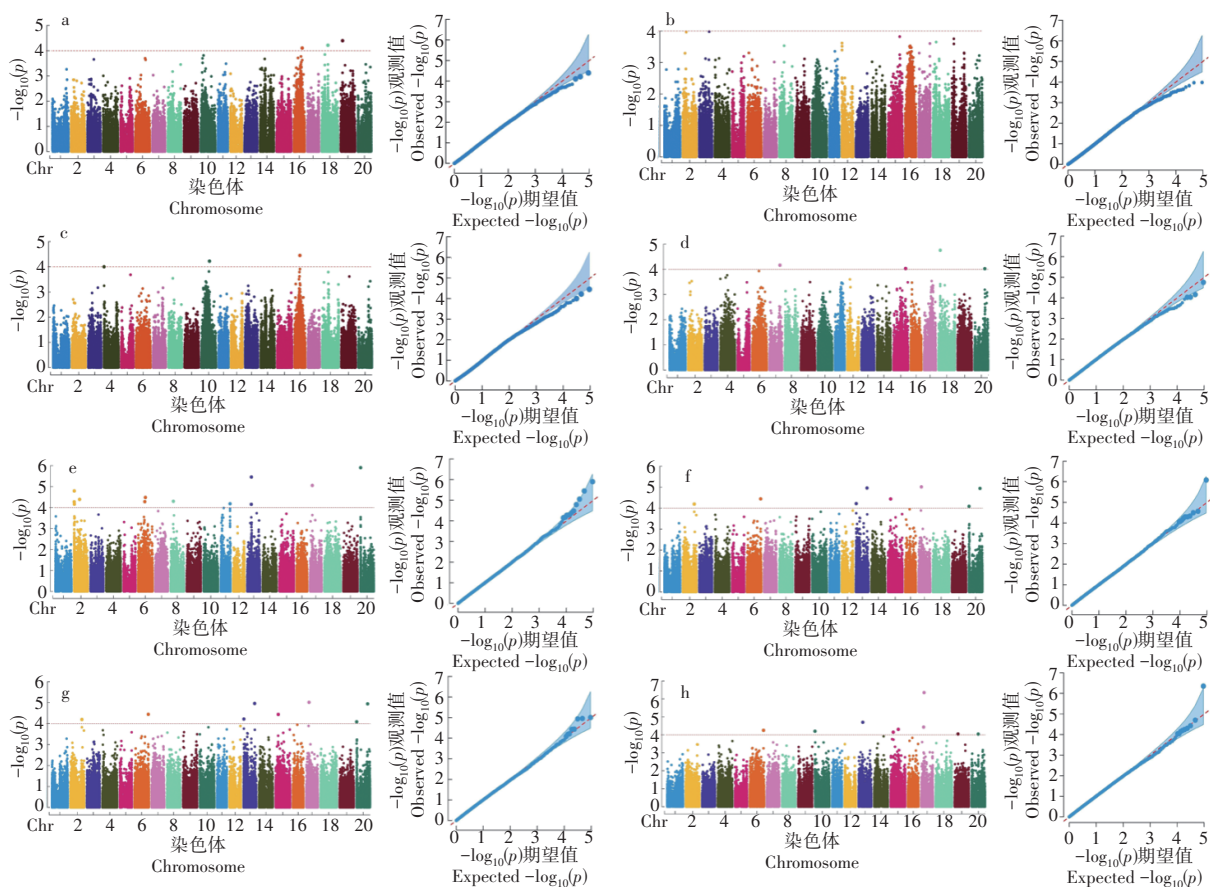
图1 大豆在低磷、常磷处理下根系性状和相对根系性状频次分布

Figure 1 Distribution of soybean in LP, NP root character, and relative root character frequency

17, 18, 19, 20号染色体上。其中, Gm13_14737195和Gm17_8693889在相对根重和相对根总表面积中同时检测到, Gm15_9404754和Gm20_23663337在相对总根长和相对根总表面积中同时检测到, Gm17_10236654和Gm06_49116475在相对根总体积和相对根总表面积中同时检测到。

2.3 候选基因预测

为挖掘与大豆耐低磷有关的候选基因,本研究采用了与耐低磷相关的等位基因效应分析方法。结果发现其中有部分SNP对大豆耐低磷性表现出显著的等位基因效应,这表明与耐低磷性相关的候选基因可能与这些SNP有关联。通过分析不同磷处理下的SNP等位基因型与Manhattan图和QQ图关联位点的差异显著性,研究结果发现:与2号染色体Gm02_249928、Gm02_626869和Gm02_846239位点等位基因型对应的相对根重均表现极显著差异($p=8.00 \times 10^{-4} < 0.01$, $p=1.00 \times 10^{-4} < 0.01$, $p=3.00 \times 10^{-4} < 0.01$);与8号染色体Gm08_9924574位点等位基因型对应的相对根重表现极显著差异($p=6.00 \times 10^{-4} < 0.01$);与15号染色体Gm15_9738846位点等位基因型对应的相对根总体积表现极显著差异($p=2.00 \times$



a ~ d. 低磷处理下根重、总根长、根总体积和根总表面积在 farmCPU 模型下关联分析 Manhattan 图(左)和 Q-Q plot 图(右); e ~ h. 相对根重、相对总根长、相对根总体积和相对根总表面积 farmCPU 模型下关联分析 Manhattan 图(左)和 Q-Q plot 图(右)

a-d. LP root weight, total root length, total root volume and total root surface area correlation analysis Manhattan plot and Q-Q plot under the farmCPU model; e-h. Relative root weight, relative total root length, relative total root volume and relative total root surface area correlation analysis Manhattan plot and Q-Q plot under the farmCPU model

图2 大豆苗期根系性状GWAS分析

Figure 2 GWAS analysis of root traits in soybean seedling stage

$10^{-4} < 0.01$); 与 15 号染色体 Gm15_9404754 位点等位基因型对应的相对总根长表现极显著差异 ($p = 3.00 \times 10^{-4} < 0.01$); 与 15 号染色体 Gm15_9404754 位点等位基因型对应的相对根总表面积表现极显著差异 ($p = 3.00 \times 10^{-4} < 0.01$); 与 18 号染色体 Gm18_6078421 位点等位基因型对应的低磷处理下根总表面积表现极显著差异 ($p = 1.00 \times 10^{-4} < 0.01$); 与 20 号染色体 Gm20_44507753 位点等位基因型对应的相对总根长表现极显著差异 ($p = 2.20 \times 10^{-3} < 0.01$)。

基于该群体的 LD 衰减距离, 从与耐低磷性显著相关的 8 个位点 (Gm02_249928、Gm02_626869、Gm02_846239、Gm08_9924574、Gm15_9738846、Gm15_9404754、Gm18_6078421 和 Gm20_44507753) 上下游 200 kb 范围内筛选候选基因。通过取位点前后 200 kb 进行 LD block 绘图结果表明, 以上 8 个位点上下游 200 kb 范围内, SNP 位点均存在明显的 LD block (图 3)。

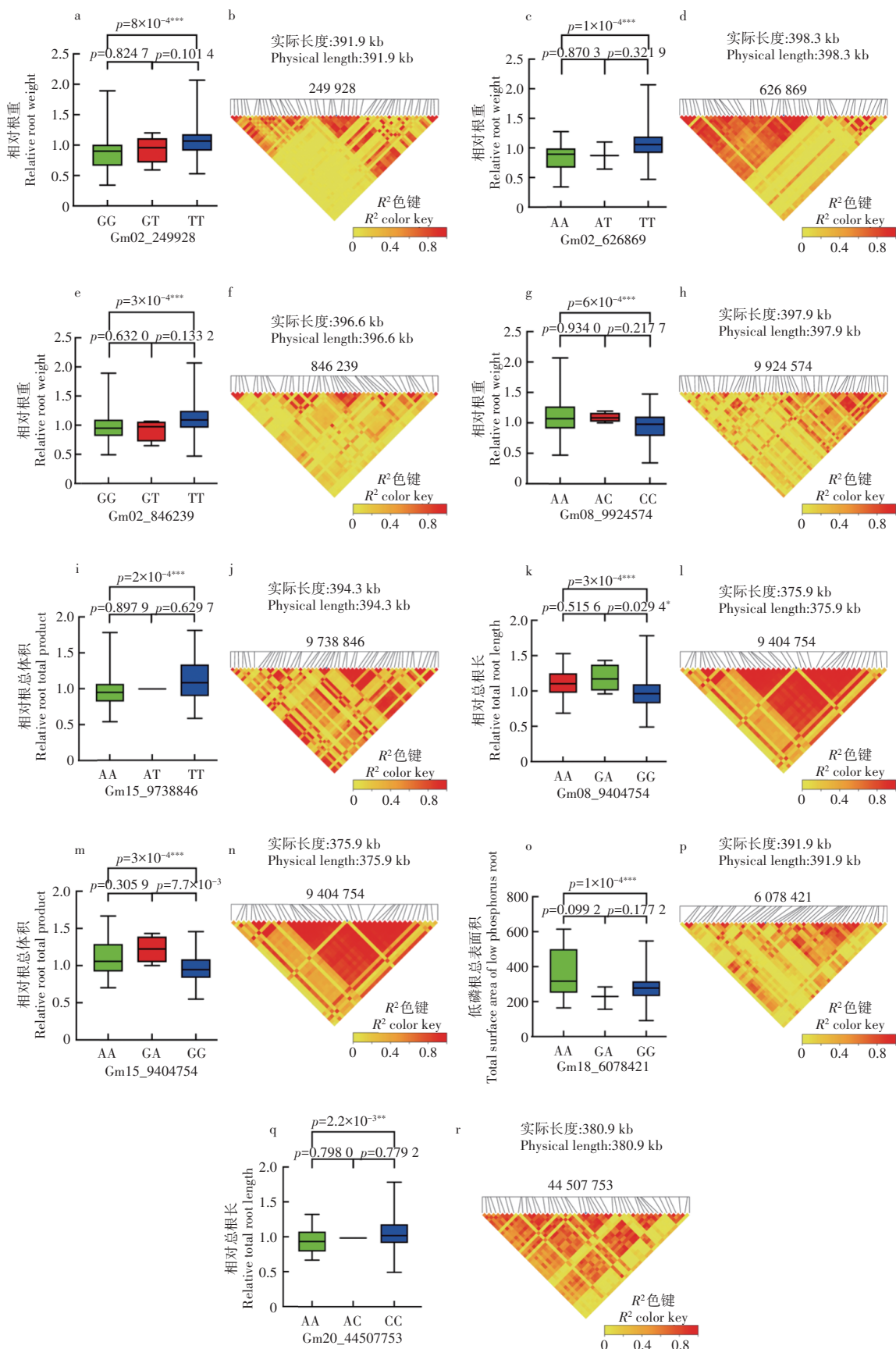
以显著关联 SNPs 上下游 200 kb 的区域进行候选基因筛选, 共筛选到基因 1 669 个。对上述基因进行与低磷胁迫相关的基因注释筛选 (表 5), *GmYB1* 位于 15 号染色体上编码磷酸泛乙炔基转移酶 (phosphopantetheinyl transferase, PPT), *GmYB2* 在拟南芥中的同源基因编码 Sec14p 类磷脂酰肌醇转移家族蛋白 SFH9 (Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein SFH9); *GmaPHO1-H1* 和 *GmaPHO1-H8* 在拟南芥中的同源基因编码磷酸盐转运蛋白 (phosphate 1, PHO1); *GmYB3* 的拟南芥同源基因编码 α -葡聚糖磷酸化酶, H 同工酶 (alpha-glucan phosphorylase 2; PHS2); *GmPHT1;14* 在拟南芥同源基因编码磷酸盐转运蛋白 1;7 (phosphate transporter 1; 7, PHT1;7)。

对筛选到 1 669 个基因进行单倍型分析共筛选到 5 个基因 (表 6), 并且进一步对这些候选基因的

表4 farmCPU模型下低磷处理下根系性状和相对根系性状显著关联的SNP

Table 4 SNP significantly associated with root traits and relative root traits under low phosphorus treatment in farmCPU model

性状 Trait	染色体 Chromosome	位置 Position	等位基因型 Alleles	$-\log_{10}(p)$ 值极大值 $-\log_{10}(p)_{\max}$
低磷根重 Low phosphorus root weight	16	29519713	A/C	4.11
	18	22159817	G/A	4.22
	19	6514967	C/T	4.40
低磷根总体积 Low phosphorus root total product	2	641140	G/A	4.00
	10	28578714	T/G	4.22
	16	19058451	C/T	4.45
低磷根总表面积 Low phosphorus root total surface area	7	36979248	T/A	4.16
	15	42772842	A/C	4.03
	18	6078421	A/G	4.75
	20	36344177	G/T	4.03
相对总根长 Relative total root length	2	7637088	A/T	4.30
	4	3962423	T/C	4.23
	6	9071254	C/T	4.57
	6	9705743	T/A	4.14
	6	9768049	C/T	4.50
	9	50064651	C/T	4.10
	15	9404754	A/G	4.34
	18	39067709	C/T	4.06
	20	23662227	A/G	6.08
相对根重 Relative root weight	20	44507753	C/A	4.30
	2	19402246	C/G	4.40
	2	249928	T/G	4.27
	2	626869	T/A	4.79
	2	846239	T/G	4.16
	6	23726888	A/C	4.28
	6	25881969	C/A	4.48
	8	9924574	A/C	4.30
	11	32971254	T/C	4.18
	13	14630892	G/A	4.15
	13	14737195	T/C	5.45
	17	8693889	T/C	5.05
	20	1085347	A/G	5.90
相对根总体积 Relative root total product	2	40514223	G/A	4.19
	6	49116475	A/G	4.44
	13	1330440	A/G	4.22
	13	39753897	A/C	4.96
	15	9738846	T/A	4.44
	17	10236654	G/A	5.01
	20	39471718	A/C	4.94
	20	553256	G/A	4.09
相对根总表面积 Relative root total surface area	6	49116475	A/G	4.25
	10	80244	C/T	4.20
	13	14737195	T/C	4.70
	15	27312933	A/G	4.30
	15	9404754	A/G	4.15
	17	10236654	G/A	6.36
	17	8693889	T/C	4.43
	19	12112966	T/C	4.05
20	23662227	A/G	4.04	



** 在 $p < 0.01$ 水平差异显著; *** 在 $p < 0.001$ 水平差异显著

** Correlation is significant at $p < 0.01$ level; *** Correlation is significant at $p < 0.001$ level.

图3 极显著SNP位点的等位基因差异显著性分析及LD block分析

Figure 3 Allelic difference significance analysis for highly significant SNP loci and LD block analysis

表5 候选基因相关信息
Table 5 Information of candidate genes

基因 Gene	性状 Traits	SNP 标记 SNP marker	注释 Annotation
<i>GmYB1</i>	相对根总表面积 Relative root total surface area 相对总根长 Relative total root length	Gm15_9404754	L-氨基己二酸-半醛脱氢酶-磷酸泛酰基转移酶 L-aminoadipate - semi-aldehyde dehydrogenase - phosphopantoyltransferase
<i>GmYB2</i>	相对根总表面积 Relative root total surface area 相对总根长 Relative total root length 相对根总体积 Relative root total product	Gm15_9404754 Gm15_9738846	磷脂酰肌醇/磷脂酰胆碱转移蛋白 SFH9 Phosphatidyl inositol/Phosphatidyl choline transfer pro- tein SFH9
<i>GmaPHO1-H1</i>	低磷根总表面积 Low phosphorus root total surface area	Gm18_6078421	α -葡聚糖磷酸化酶, H 同工酶 α -glucan phosphorylase, H isoenzyme
<i>GmaPHO1-H8</i>	相对根重 Relative root weight	Gm02_626869	磷酸盐转运蛋白 PHO1 Phosphate transporter PHO1
	相对根重 Relative root weight	Gm02_249928	
<i>GmYB3</i>	相对总根长 Relative total root length	Gm20_44507753	PHO1 家族蛋白 PHO1 family proteins
<i>GmPHT1;14</i>	相对根重 Relative root weight	Gm02_626869	无机磷酸盐转运蛋白 1-14 (PHT1-14) Inorganic phosphate transporter 1-14 (PHT1-14)
	相对根重 Relative root weight	Gm02_846239	

不同单倍型表型性状进行显著性差异分析,结果表明只有候选基因 *GmYB1* 和 *GmYB3* 在不同单倍型间表型性状中存在显著差异(图4)。对候选基因 *GmYB1* 进行单倍型分析,结果显示分为3种单倍型,分别为 Hap1(AAAACCCCGG)、Hap2(AAGGTTAAGG)和 Hap3(GGAACCAAAA), Hap1、Hap2 和 Hap3 在相对根长和相对根总表面积中的均值分别为:1.01, 1.12, 0.95 和 1.00, 1.18, 0.93。对候选基因 *GmYB3* 进行单倍型分析,结果显示分为2种单倍型,分别为 Hap1(CCTTAATTAAAA)和 Hap2(CCTTAATTG-GAA), Hap1 和 Hap2 在低磷根总表面积中的均值为 276.87 和 332.81。

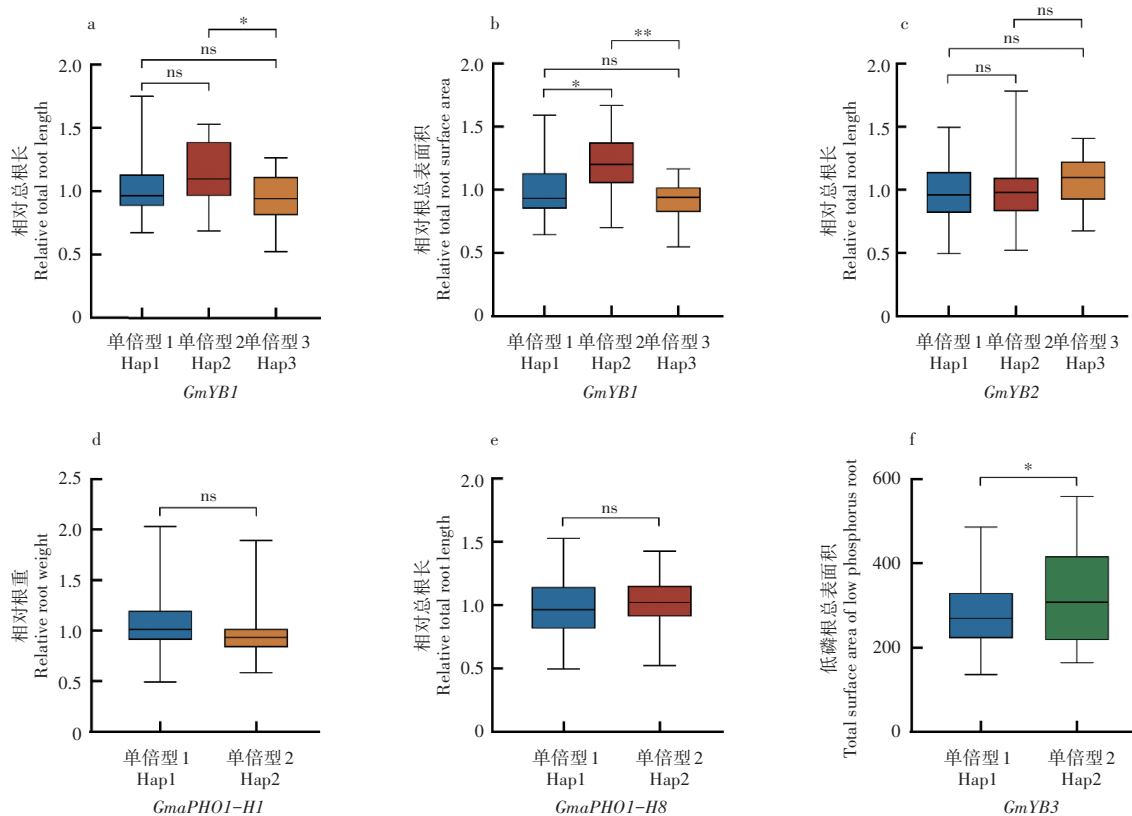
表6 候选基因单倍型分组及每种单倍型的SNP组成

Table 6 Candidate gene haplotype group and the composition of each haplotype SNP

基因 Gene	单倍型 1/品种数 Hap1/Number	单倍型 2/品种数 Hap2/Number	单倍型 3/品种数 Hap3/Number
<i>GmYB1</i>	AAAACCCCGG/25	AAGGTTAAGG/19	GGAACCAAAA/14
<i>GmYB2</i>	GGTTTT/51	TTCCCC/29	TTTTCC/25
<i>GmaPHO1-H1</i>	AAGGGG/62	TTAAAA/22	
<i>GmaPHO1-H8</i>	AAAA/69	GGTT/54	
<i>GmYB3</i>	CCTTAATTA AAAA/70	CCTTAATTG GAA/10	

2.4 基因表达分析

为验证上述与低磷处理有关的候选基因,在磷高效品种(耐低磷)和磷低效品种(低磷敏感)进行低磷营养液砂培试验,并对候选基因的表达水平进行分析。qRT-PCR 结果表明,磷高效品种的根中(图5) *GmYB1*、*GmYB2*、*GmaPHO1-H1*、*GmaPHO1-H8*、*GmYB3* 和 *GmPHT1;14* 的表达量在低磷胁迫处理



a. 与相对总根长相关的 *GmYB1* 单倍型分析; b. 与相对根总表面积相关的 *GmYB1* 单倍型分析; c. 与相对总根长相关的 *GmYB2* 单倍型分析; d. 与相对根重相关的 *GmaPHO1-H1* 单倍型分析; e. 与相对总根长 *GmaPHO1-H8* 相关的单倍型分析; f. 与低磷根总表面积相关的 *GmYB3* 单倍型分析; ns. 无显著差异; * 在 $p < 0.05$ 水平差异显著; ** 在 $p < 0.01$ 水平差异显著

a. Haplotype analysis of *GmYB1* correlated with relative total root length; b. *GmYB1* haplotype analysis correlated with the relative total root surface area; c. *GmYB2* haplotype analysis correlated with relative total root length; d. Haplotype analysis of *GmaPHO1-H1* correlated with relative root weight; e. Haplotype analysis associated with relative total root length *GmaPHO1-H8*; f. Haplotype analysis of *GmYB3* in relation to total surface area of low-phosphorus roots; ns. No significance; *.Correlation is significant at $p < 0.05$ level; **.Correlation is significant at $p < 0.01$ level

图4 与大豆苗期根系性状显著关联基因的单倍型分析

Figure 4 Haplotype (Hap) analysis of genes significantly associated with root traits in soybean seedling stage

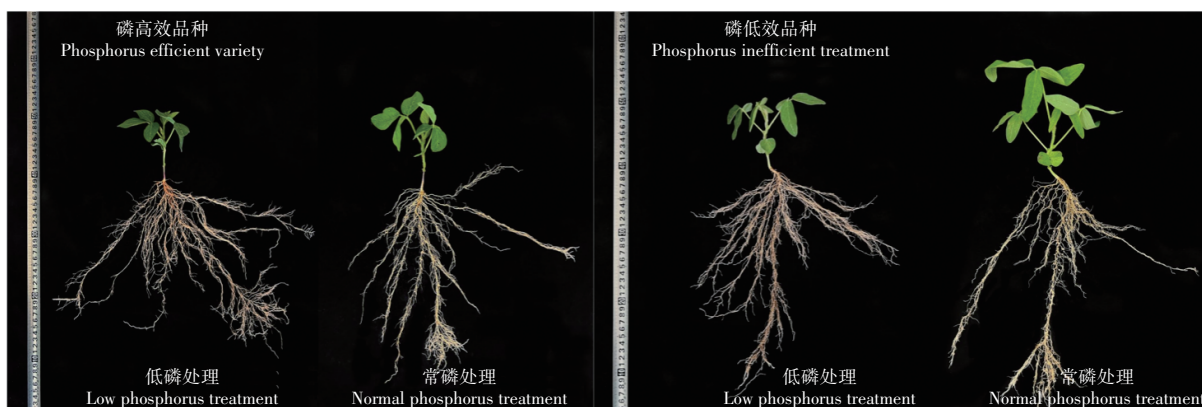
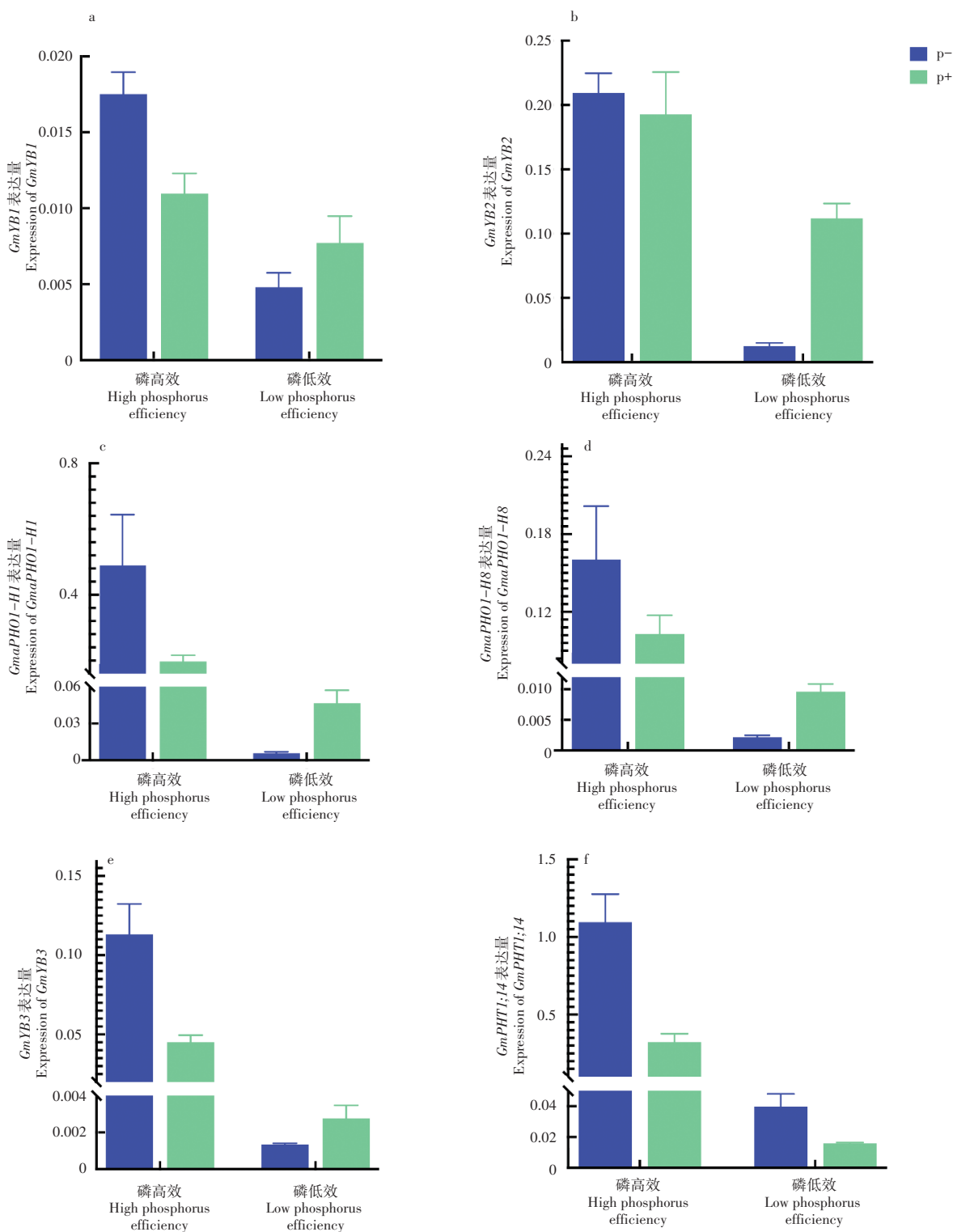


图5 低磷处理和常磷处理下磷高效品种和磷低效品种的根部表型差异

Figure 5 Root phenotype difference between phosphorus efficient and phosphorus inefficient varieties under low phosphorus treatment and constant phosphorus treatment

后显著上调表达(图 6)。此外,研究结果发现,候选基因在低磷处理下磷高效品种中的表达量要高于常磷处理下的表达量,这与本研究发现的已知与低磷胁迫相关的基因结果一致。



a-f. 在低磷处理和常磷处理下 *GmYB1*、*GmYB2*、*GmaPHO1-H1*、*GmaPHO1-H8*、*GmYB3* 和 *GmPHT1;14* 在磷高效品种和磷低效品种中的表达量
a-f. Gene expression of *GmYB1*, *GmYB2*, *GmaPHO1-H1*, *GmaPHO1-H8*, *GmYB3* and *GmPHT1;14* in phosphorus-efficient varieties and phosphorus-inefficient varieties under low and constant phosphorus treatments

图6 低磷胁迫下候选基因的表达分析

Figure 6 Expression analysis of candidate genes under low phosphorus stress

3 讨论与结论

本研究对206份核心种质大豆进行表型调查发现,低磷处理下总根长、根重、根总体积和根总表面积,相对总根长、相对根重、相对根总体积和相对根总表面积的平均值均呈正态分布,结果表明在不同磷浓度处理下根系相关表型性状存在显著差异。本研究对4个大豆根系相关表型性状进行了鉴定,利用93 436个SNPs进行GWAS分析,揭示了大豆耐低磷的分子机制,对未来选育大豆耐低磷品种奠定了基础。胁迫会导致大豆发生一系列反应^[28],苗期是大豆生长期中响应低磷胁迫的关键时期^[29-30]。本研究深入探索了大豆苗期根系的4个关键性状——根重、总根长、根总体积以及根总表面积,这些性状的表型变异被用作衡量大豆磷利用效率和耐低磷能力的关键指标。研究结果显示,这4个根生物量性状均与大豆的耐低磷特性相关,这一发现为理解大豆耐低磷的遗传机制提供了有力证据。通过GWAS分析表明,分布于整个基因组的49个SNPs与低磷胁迫下大豆的4个根生物量性状呈现出显著的关联性。通过这些SNPs位点筛选到了6个基因(*GmYB1*、*GmYB2*、*GmaPHO1-H1*、*GmaPHO1-H8*、*GmYB3*和*GmPHT1;14*)可能与低磷胁迫相关。其中有3个基因(*GmaPHO1-H8*、*GmaPHO1-H8*和*GmPHT1;14*)为已知功能的基因且已有报道^[31-33]。本研究在2号染色体和20号染色体定位到的与相对根重和相对总根长相关的Gm02_626869位点和Gm20_44507753位点分别为基因*GmaPHO1-H1*和*GmaPHO1-H8*。HE等^[34]研究发现*GmaPHO1*基因可能具有独特的表达模式来响应磷胁迫,并且表明大多数*GmaPHO1*基因在根中表达,这与本研究结果一致。此外*GmaPHO1*基因已被O'ROURKE等人验证是*AtPHO1*的同源基因,*AtPHO1*是磷进入根系的主要转运体^[31-32]。

本研究在2号染色体定位到的与相对根重相关的Gm02_626869位点基因为*GmPHT1;14*,FAN等^[33]研究发现该基因仅在根部表达,并且在低磷胁迫下所有*GmPHT1*基因根中的表达均上调,这与本研究结果相似。此外,本研究在相对根总表面积和相对总根长中检测到的Gm15_9404754位点以及在相对根总体积中共同检测到的Gm15_9738846位点发现标记的*GmYB2*编码为Sec14p类磷脂酰肌醇转移家族蛋白SFH9,该蛋白影响着植物的根部性状以及在环境胁迫中的耐受性。玉米中磷脂酰肌醇转移相关蛋白*ZmSEC14p*主要定位于细胞核,在低温、盐胁迫和ABA处理下,在玉米叶片和根系中均可诱导其转录^[35]。在水稻中*OsSNDPI*编码的磷脂酰肌醇转移蛋白(PITP)介导的磷脂信号和代谢对水稻根毛伸长至关重要^[36]。在大豆中有关于Sec14p相关的蛋白Patellin1(PATL1)的研究,发现*GmPATL*基因主要在大豆的根和茎中表达,在低磷胁迫中有上调表达的趋势^[37],该基因与本研究发现的基因同属于一个家族蛋白,并且本研究发现在低磷胁迫下该基因在磷高效品种的表达量高于磷低效品种。

通过单倍型分析仅发现在与相对总根长和相对根总表面积相关的*GmYB1*和与低磷根总表面积相关的*GmYB3*存在单倍型且差异显著。在Gm15_9738846位点中检测到标记的*GmYB1*编码为L-氨基己二酸-半醛脱氢酶-磷酸泛酰基转移酶(L-aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase-phosphopantetheinyl transferase),其在拟南芥的同源基因编码为磷酸苯乙酰转移酶(phosphopantetheinyl transferase, PPT)。在低磷根总表面积中检测到的Gm18_6078421位点发现标记的*GmYB3*编码为 α -葡聚糖磷酸化酶,H同工酶(alpha-glucan phosphorylase, H isozyme)。低磷胁迫下*GmYB1*和*GmYB3*在磷高效品种根系中的表达量均高于磷低效品种,因此推测这2个基因很可能具有正向调控大豆苗期耐低磷能力的作用,因此可作为候选基因进一步开展验证功能。

本研究对206份大豆种质在低磷处理下根重、总根长、根总体积、根总表面积和相对根重、相对总根长、相对根总体积、相对根总表面积相关的表型和基因型进行性状鉴定并进行GWAS分析,共发现49个与大豆耐低磷性显著相关的SNP位点,并筛选到候选基因2个,其中,Gm15_9404754位点LD block区间内关联一个与磷酸泛酰基转移酶相关的候选基因*GmYB1*和Gm18_6078421位点的LD block区间内关联到候选基因*GmYB3*与 α -葡聚糖磷酸化酶相关。以上两个基因在大豆低磷胁迫下均未有报道,通过进行qRT-PCR发现*GmYB1*和*GmYB3*在低磷胁迫下的磷高效品种中根部表达量均高于磷低效品种。

参考文献:

- [1] 于 芮,王 斌,王建忠,等.我国大豆市场发展现状及建议[J].合作经济与科技,2021(19):92-93.
- [2] 沈 鸣,陈受宜,张劲松.乙烯对豆科植物生长发育和根瘤形成的影响[J].大豆科学,2016,35(2):330-336.
- [3] 鲁如坤.土壤磷素水平和水体环境保护[J].磷肥与复肥,2003,18(1):4-8.
- [4] TANG H L, CHEN X Y, GAO Y J, et al. Alteration in root morphological and physiological traits of two maize cultivars in response to phosphorus deficiency[J]. Rhizosphere, 2020, 14: 100201.
- [5] GAO D D, SHENG R, WHITELEY A S, et al. Effect of phosphorus amendments on rice rhizospheric methanogens and methanotrophs in a phosphorus deficient soil[J]. Geoderma, 2020, 368: 114312.
- [6] 张文献,李增强,胡亚丽,等.不同浓度磷胁迫对大豆幼苗生长及根系DNA甲基化水平的影响[J].中国农业大学学报,2020,25(12):9-18.
- [7] 董蓉娇,彭进乔,尹元萍,等.低磷胁迫条件下大豆磷高效近等基因系相关酶活性的变化[J].西南农业学报,2022,35(6):1289-1294.
- [8] ZHANG J Y, XU M L, DWIYANTI M S, et al. A soybean deletion mutant that moderates the repression of flowering by cool temperatures[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 429.
- [9] 吴 佩,李 浩,早浩龙,等.植物对缺磷和铝毒协同进化应答的分子生理机制[J].生物技术通报,2020,36(7):170-181.
- [10] LIAO H, WAN H Y, SHAFF J, et al. Phosphorus and aluminum interactions in soybean in relation to aluminum tolerance. Exudation of specific organic acids from different regions of the intact root system[J]. Plant Physiology, 2006, 141(2): 674-684.
- [11] LIANG C Y, PINEROS M A, TIAN J, et al. Low pH, aluminum, and phosphorus coordinately regulate malate exudation through *GmALMT1* to improve soybean adaptation to acid soils[J]. Plant Physiology, 2013, 161(3): 1347-1361.
- [12] WANG X X, LI H B, CHU Q, et al. Mycorrhizal impacts on root trait plasticity of six maize varieties along a phosphorus supply gradient[J]. Plant and Soil, 2020, 448(1): 71-86.
- [13] LAMBERS H, SHANE M W, CRAMER M D, et al. Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: Matching morphological and physiological traits[J]. Annals of Botany, 2006, 98(4): 693-713.
- [14] LYNCH J P. Rightsizing root phenotypes for drought resistance[J]. Journal of Experimental Botany, 2018, 69(13): 3279-3292.
- [15] 马祥庆,梁 霞.植物高效利用磷机制的研究进展[J].应用生态学报,2004,15(4):712-716.
- [16] 严小龙,廖 红,戈振扬,等.植物根构型特性与磷吸收效率[J].植物学通报,2000,17(6):511-519.
- [17] FLINT-GARCIA S A, THORNSBERRY J M, BUCKLER E S 4th. Structure of linkage disequilibrium in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2003, 54: 357-374.
- [18] YUAN P, LIU H J, WANG X H, et al. Genome-wide association study reveals candidate genes controlling root system architecture under low phosphorus supply at seedling stage in *Brassica napus*[J]. Molecular Breeding, 2023, 43(8): 63.
- [19] MAQBOOL S, SAEED F, MAQBOOL A, et al. Genome-wide association study for phosphate responsive root hair length and density in bread wheat[J]. Current Plant Biology, 2023, 35/36: 100290.
- [20] ZHANG H, WU H Y, TIAN R, et al. Genome-wide association and linkage mapping strategies reveal genetic loci and candidate genes of phosphorus utilization in soybean[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2022, 21(9): 2521-2537.
- [21] XU H Q, ZHANG H Y, FAN Y K, et al. The purple acid phosphatase *GmPAP17* predominantly enhances phosphorus use efficiency in soybean[J]. Plant Science: an International Journal of Experimental Plant Biology, 2022, 320: 111283.
- [22] ZHANG D, SONG H N, CHENG H, et al. The acid phosphatase-encoding gene *GmACPI* contributes to soybean tolerance to low-phosphorus stress[J]. PLoS Genetics, 2014, 10(1): e1004061.
- [23] DU W K, NING L H, LIU Y S, et al. Identification of loci and candidate gene *GmSPX-RING1* responsible for phosphorus efficiency in soybean via genome-wide association analysis[J]. BMC Genomics, 2020, 21(1): 725.
- [24] 王 辉.磷高效大豆品种的筛选及苗期鉴定方法[D].沈阳:沈阳农业大学,2020.

- [25] SUN R J,SUN B C,TIAN Y,et al.Dissection of the practical soybean breeding pipeline by developing ZDX1, a high-throughput functional array[J].TAG Theoretical and Applied Genetics Theoretische Und Angewandte Genetik, 2022,135(4):1413-1427.
- [26] 赵兴震.大豆耐旱性评价及耐旱相关基因挖掘[D].北京:中国农业科学院,2020.
- [27] PFAFFL M W.A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J].Nucleic Acids Research,2001,29(9):e45.
- [28] 王婷婷,陈 鸽,包悦琳,等.大豆根系响应早期缺铁胁迫的转录组分析[J].南京农业大学学报,2022,45(2):224-234.
- [29] 敖 雪.磷素对不同磷效率基因型大豆的影响[D].沈阳:沈阳农业大学,2009.
- [30] VAN DE WIEL C C M,VAN DER LINDEN C G,SCHOLTEN O E.Improving phosphorus use efficiency in agriculture:Opportunities for breeding[J].Euphytica,2016,207(1):1-22.
- [31] LIN Y F,LIANG H M,YANG S Y,et al.Arabidopsis IRT3 is a zinc-regulated and plasma membrane localized zinc/iron transporter[J].The New Phytologist,2009,182(2):392-404.
- [32] O'ROURKE J A,GRAHAM M A.Gene expression responses to sequential nutrient deficiency stresses in soybean [J].International Journal of Molecular Sciences,2021,22(3):1252.
- [33] FAN C M,WANG X,HU R B,et al.The pattern of Phosphate transporter 1 genes evolutionary divergence in *Glycine max* L.[J].BMC Plant Biology,2013,13:48
- [34] HE L L,ZHAO M,WANG Y,et al.Phylogeny,structural evolution and functional diversification of the plant PHOSPHATE1 gene family:A focus on *Glycine max*[J].BMC Evolutionary Biology,2013,13:103.
- [35] WANG X Y,SHAN X H,XUE C M,et al.Isolation and functional characterization of a cold responsive phosphatidylinositol transfer-associated protein,*ZmSEC14p*,from maize (*Zea mays* L.)[J].Plant Cell Reports,2016,35(8):1671-1686.
- [36] HUANG J,KIM C M,XUAN Y H,et al.OsSNDPI,a Sec14-nodulin domain-containing protein,plays a critical role in root hair elongation in rice[J].Plant Molecular Biology,2013,82(1):39-50.
- [37] SHA A H,QI Y N,SHAN Z H,et al.Identifying patellin-like genes in *Glycine max* and elucidating their response to phosphorus starvation[J].Acta Physiologiae Plantarum,2016,38(6):138.

[责任编辑 亓 国]