植物遗传资源学报
Journal of Plant Genetic Resources DOI：10.13430/j.cnki.jpgr.20240108002

大豆四种游离氨基酸高含量优异种质鉴定及 GWAS 分析

熊雅文[1]，贾倩茹[2]，周苗苗[3]，张红梅[2]，陈华涛[1,2]

（[1]南京农业大学生命科学学院，南京 210095；[2]江苏省农业科学院经济作物研究所，南京 210014；[3]青岛农业大学农学院，青岛 266109）

摘要:大豆籽粒中氨基酸含量丰富，是大豆品质的重要组成部分，具有较高的营养价值和生理功能，因此，选育高游离氨基酸含量大豆品种，可以辅助大豆高品质育种，对大豆产业创新性发展有重要现实意义。本研究利用高效液相色谱法测定 264 份大豆品种干籽粒中精氨酸、甘氨酸、谷氨酸、赖氨酸四种游离氨基酸含量。结果表明，游离氨基酸中精氨酸含量最高、谷氨酸含量次之、甘氨酸含量最低，筛选 4 种游离氨基酸高含量的 3 个大豆优质品种，分别为海门羊 104、辽鲜豆 12 号、灌云大四粒。结合大豆自然群体 4 种游离氨基酸含量表型和基因型进行全基因组关联分析，分别鉴定出大豆四种氨基酸显著关联的 SNP 位点，为后续挖掘大豆氨基酸高含量相关候选基因奠定基础，进而加速大豆品种改良、辅助大豆分子育种。

关键词：大豆；游离氨基酸；全基因组关联分析；SNP

Identification and GWAS Analysis of Soybean Germplasm with High Content of Four Free Amino Acids[1]

XIONG Yawen [1], JIA Qianru[2], ZHOU Miaomiao[3], ZHANG Hongmei[2], CHEN Huatao[1,2]

（*[1]College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095; [2]Institute of Cash Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014; [3] College of Agronomy, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109*）

Abstract: The amino acids are rich in soybean grains and are important components of the grain quality. Therefore, identification of soybean germplasm resources with high levels of free amino acids can assist in high-quality soybean breeding, with significance in innovative development of the soybean industry. In this study, 264 soybean genotypes were analyzed using high-performance liquid chromatography (HPLC) to determine the levels of four free amino acids: arginine, glycine, glutamic acid, and lysine in dried soybean grains. Among the free amino acids, arginine was detected with the highest content, followed by glutamic acid, and glycine. Three soybean genotypes with high levels of these four free amino acids were identified, including Haimen Yang 104, Liaoxian Bean 12, and Guanyun Dasiyu. The genome-wide association analysis (GWAS) was performed via combining the

[1] 第一作者: 熊雅文，研究方向为功能性大豆分子育种技术，E-mail：2023216011@stu.njau.edu.cn

通信作者：陈华涛，研究方向为大豆分子育种技术及种质创新研究，E-mail：cht@jaas.ac.cn

基金项目：国家自然科学基金(32001455，32201845)；江苏省农业自主创新基金(cx(22)5002)；江苏省自然科学基金(BK20210154)

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (32001455， 32201845); Agricultural Science and Technology Independent Innovation Fund of Jiangsu Province (cx(22)5002); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20210154)

phenotype and genotype data of the natural soybean population for the four amino acids, and significant SNP loci associated with the four amino acids in soybean were identified. This study provided a basis for subsequent identification of candidate genes regulating the levels of amino acids in soybeans, thereby accelerating soybean variety improvement and facilitating molecular breeding of soybeans.

Key words: soybean; free amino acid; Genome-wide association analysis; SNP

大豆（*Glycine max*（L.）Merr.）是我国的重要经济油料作物，种植历史超过 5000 年。随着生活水平的不断提高，人们对大豆品质的需求日益增加。蛋白质含量及氨基酸组成是大豆品质的重要指标，大豆籽粒中氨基酸具有重要的生理功能，选育品质优良、营养丰富的大豆种质资源是大豆分子育种研究的重要目标。

大豆籽粒中水解氨基酸由蛋白质水解生成氨基酸和游离氨基酸组成，游离氨基酸可以用于能量供应、生化途径等生理过程。大豆籽粒中游离精氨酸、甘氨酸、谷氨酸、赖氨酸具有重要生理功能。精氨酸参与机体代谢，作为游离氨基酸发挥作用，是哺乳动物蛋白质的组成部分，在尿素循环中起着中间体的作用[1]；精氨酸具有免疫调节功能，对 T 淋巴细胞的激活、存活和效应功能至关重要，通过 T 细胞介导的免疫疗法抑制肿瘤[2][3]；精氨酸具有抗肿瘤作用，在肿瘤微环境中的代谢旺盛，由于精氨酸酶在髓系细胞及肿瘤细胞中高表达，加快精氨酸的分解利用，促进巨噬细胞和 T 细胞的生成[4][5][6]。甘氨酸是形成肌酸的重要中间物质，促进氧化代谢，提高肌肉的能量供应[7]；甘氨酸具有保护肝脏的作用，可以有效抑制肝细胞纤维化[8]；甘氨酸可以调节免疫和保护细胞，抑制淋巴细胞等免疫细胞，保护细胞免受氧化损伤、炎症和减少细胞死亡的影响[9]。谷氨酸作为哺乳动物脑中一种兴奋性递质，能够在神经元之间传递信号，在中枢神经系统具有重要作用[10][11]；谷氨酸在味觉受体中具有重要作用，作为鲜味增强剂能够激活味觉受体并增强其对其他味道的感知，从而增强食品的鲜味度[12]。赖氨酸作为必需氨基酸，参与机体酶、骨骼肌等蛋白的合成，促进机体正常的生长发育[13][14]；赖氨酸可以通过多种途径调节免疫系统的功能，如激活 B 细胞、T 细胞等免疫细胞，增强免疫细胞的功能，促进免疫细胞的增殖和分化等[15]；赖氨酸在改善神经系统、缓解焦虑方面具有重要的生理意义[16]。

全基因组关联分析（GWAS , genome wide association analysis）是以连锁不平衡原理（LD, linkage disequilibrium）为基础，通过研究检测的表型数据与群体重测序获得基因型信息进行关联分析，精确的定位可能关联表型数据的 SNP 位点，挖掘与表型相关的基因[17]。SNP 标记作为第三代分子遗传标记，具有稳定性好，易于基因分型，不限制环境、缩短育种时间等优点，可以更好地辅助作物分子育种[18]。本研究利用高效液相色谱法（ HPLC，high performance liquid chromatography）测定大豆干籽粒中 4 种游离氨基酸的含量，通过 GWAS 筛选出大豆氨基酸表型相关的 SNP 位点，挖掘候选基因，辅助大豆分子育种。

1 材料与方法

1.1 试验材料

264 份大豆代表性种质材料，包括地方种和栽培种[19]，2021 年、2022 年 6 月种植于江苏省农业科学院六合试验基地（江苏南京六合 32°35′N，118°37′E），平均温度 17.6℃，年平均降水量 1200 mm 以上，所有自然群体田间种植采用随机区组试验，重复 3 次，每份材料种植 2 垄，垄长 3 米，行距 60 厘米，每垄 16 穴，穴距 20 厘米，每穴 2～3 株，常规田间管理，收获后脱粒保存。

1.2 HPLC 条件

色谱柱：日本岛津 shim-pack GIST-NH2；A 相：0.1 mol/L 醋酸钠溶液（pH=6.5）：乙腈=93:7（v:v）；B 相：乙腈：水=80:20（v:v）；流速：1.0 mL/min；温度：36℃；检测：UV 254 nm；进样量：20 μL；检测器：（RID）示差折光检测器

1.3 四种氨基酸标准样品的制备

称取四种氨基酸（甘氨酸、精氨酸、谷氨酸、赖氨酸）标准品各 10 mg，加入 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解至 10 mL 量瓶，并稀释至刻度，摇匀，制成 1 mg/mL 标准品母液，取标准品母液适量，用 0.1 mol/L 盐酸制成 200 μg/mL，150 μg/mL，100 μg/mL，75 μg/mL，20 μg/mL5 个不同浓度梯度的线性溶液，绘制标准曲线。

1.4 四种游离氨基酸的提取

根据《粮食、油料检验—水分测定法》105℃恒重法，收获后大豆种子放至烘箱烘干至恒重。

称取粉碎后大豆样品 50 mg，置于 2 mL 离心管中，加入 1 mL 5%的三氯乙酸溶液，于快速混匀器上混合 30 min 后，将离心管放入离心机内，13000 r/min 离心 15 min，取上清液即得供试品溶液。取线性溶液、供试品溶液各 200 μL，置 2 mL 离心管中，加入 200 μL 三乙胺乙腈溶液、200 μL 异硫氰酸苯酯乙腈溶液，摇匀，置于室温下反应 1 h，加入 800 μL 正己烷，涡旋震荡 10 min，静置分层，取下相加适量超纯水，混匀，经 0.45 μm 滤膜过滤后，进行色谱分析。

1.5 相关性分析

通过 SPASS 26.0 软件分析大豆材料中四种游离氨基酸含量相关性。

1.6 全基因组关联分析

本课题组前期进行的重测序，该高密度物理图谱中获得 2,597,425 个 SNP[19]，利用混合线性模型（MLM）和 R 软件的 GAPIT 包进行关联分析，选择-Log_{10}（P）≥6.0 为显著阈值，当 SNP 的-Log_{10}（P）≥6.0 时，可以被认为是显著关联位点。

1.7 候选基因筛选

大豆干籽粒中四种氨基酸含量与基因型进行全基因组关联分析，定位显著关联 SNP 位点，利用在线数据库 Phytozome 13 中大豆基因组信息（https：//phytozome-next.jgi.doe.gov/info/Gmax_Wm82_a2_v1），在显

著关联的 SNP 位点前后 120 kb 区间筛选与大豆四种氨基酸显著相关候选基因，通过拟南芥基因组数据库里基因序列进行 Blastp 比对，确定候选基因。

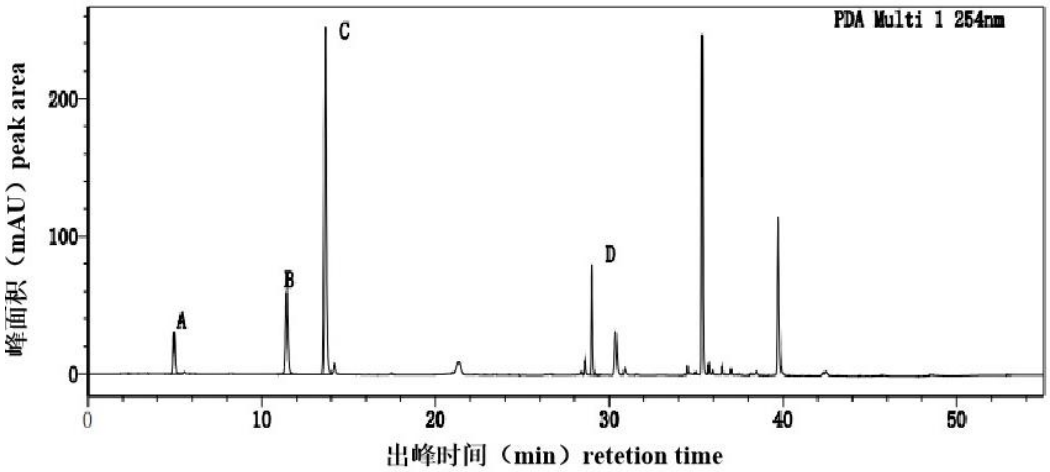
2 结果与分析

2.1 线性关系

配制不同浓度梯度精氨酸、甘氨酸、谷氨酸、赖氨酸标准品溶液，经过 HPLC 分析，X 浓度（μg/mL）、Y 峰面积分别为横坐标和纵坐标，得到回归方程，精氨酸的标准曲线为回归方程 Y=6126.89X-44643.27（R^2=0.9969），甘氨酸为 Y=14443.30X-9264.28（R^2=0.9983），谷氨酸为 y=6034.75x-2659.96（R2=0.9967），赖氨酸为 Y=11667.31X-12290.93（R^2=0.9913），上述四个相关系数较高，其回归方程准确性高。

2.2 HPLC 色谱分析

利用高效液相色谱仪（日本岛津）可以分离洗脱四种氨基酸，洗脱顺序是谷氨酸、甘氨酸、精氨酸、赖氨酸，出峰时间分别是 4.966 min、11.440 min、13.656 min、28.996 min，根据出峰时间确定氨基酸的类型，根据峰面积和标准回归方程可以确定大豆四种游离氨基酸的含量（图 1）。



A:谷氨酸；B：甘氨酸；C：精氨酸；D：赖氨酸

A: Glutamate; B: Glycine; C: Arginine; D: Lysine

图 1 大豆四种氨基酸标准液 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatogram of four amino acid standard liquids of soybean

2.3 含量分析

利用 HPLC 测定大豆自然群体中，2021 年、2022 年精氨酸、甘氨酸、谷氨酸和赖氨酸四种游离氨基酸的含量范围可见图 2、表 1。两年研究表明，大豆干籽粒中，精氨酸、甘氨酸、谷氨酸和赖氨酸四种游离氨基酸含量存在丰富的遗传变异，不同品种间差异显著；大豆游离精氨酸含量显著高于其他 3 种游离氨基酸。

本研究大豆自然群体中部分材料游离氨基酸含量优异，筛选出四种游离氨基酸均高含量的 3 个大豆品种，分别是海门羊 104、辽鲜豆 12 号、灌云大四粒（表 2），其中海门羊 104 在供试材料中两年游离精氨酸含量均为最高值，在 2022 年游离甘氨酸含量为最高值，在 2021 年游离谷氨酸含量为最高值；辽鲜豆 12 号在 2021 年游离甘氨酸含量、游离赖氨酸含量为最高值，2021 年游离谷氨酸含量为第二；灌云大四粒在 2021 年游离精氨基酸含量为第三。

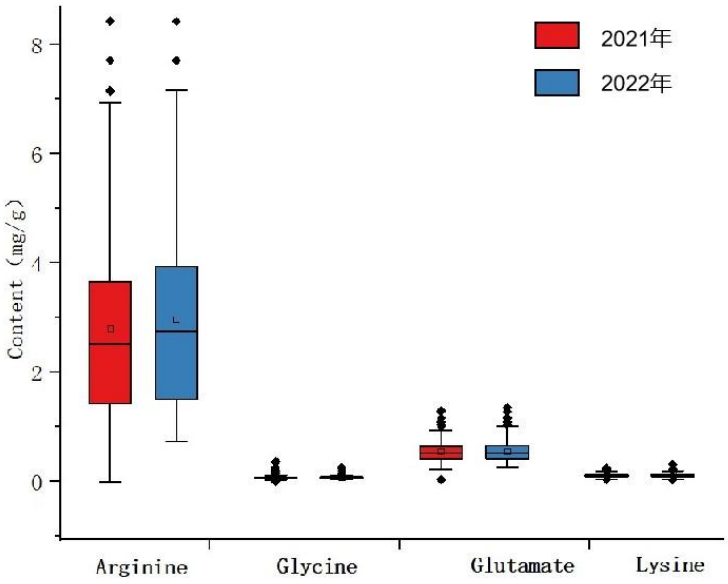


图 2 大豆四种游离氨基酸含量箱线图

Fig.2 Box diagram of content of four free amino acids in soybean

表 1 供试材料中四种游离氨基酸含量统计分析

Table 1 Statistical analysis of the contents of four free amino acids in test material

氨基酸种类 Amino acid type	年份 Year	最小值 Minimum	最大值 Maximum	均值 Mean	标准差 *SD*	变异系数（%）*CV*
精氨酸（mg/g） Arginine	2021	0.46	12.00	2.81	1.77	63.12
	2022	0.73	8.43	3.01	1.71	57.87
甘氨酸（mg/g） Glycine	2021	0.03	0.37	0.08	0.04	55.38
	2022	0.03	0.25	0.07	0.03	48.88
谷氨酸（mg/g） Glutamate	2021	0.22	1.29	0.55	0.19	34.91
	2022	0.25	1.35	0.58	0.23	33.03
赖氨酸（mg/g） Lysine	2021	0.05	0.25	0.11	0.03	28.13
	2022	0.02	0.31	0.15	0.05	44.06

表 2 大豆籽粒中四种游离氨基酸高含量的大豆优质品种

Table 2 Four soybean varieties with high content of free amino acids in soybean grains

品种名称 Cultivar name	年份 Year	精氨酸含量（mg/g） Arginine content	甘氨酸含量（mg/g） Glycine content	谷氨酸含量（mg/g） Glutamate content	赖氨酸含量（mg/g） Lysine content
海门羊 104	2021	12.00	0.20	1.29	0.21
	2022	8.43	0.25	1.32	0.19
辽鲜豆 12 号	2021	7.16	0.37	1.28	0.25
	2022	6.41	0.22	1.01	0.22
灌云大四粒	2021	6.93	0.15	0.62	0.16
	2022	6.10	0.18	0.70	0.14

2.4 大豆四种氨基酸 GWAS 分析及候选基因挖掘

将 2021 年大豆籽粒中四种游离氨基酸含量数据进行全基因组关联分析共关联到 109 个 SNP 位点（表 3）。大豆精氨酸含量显著相关的 SNPs 共有 11 个（-Log10（P）≥6.0），主要分布在 1、17、18 号染色体上（图 3、表 4），极显著 SNP 位置位于第 17 号染色体 19067780 bp，-Log10（P） 值极大值是 7.63；大豆甘氨酸含量显著关联 SNPs 有 87 个，主要分布在 1、8、11、12、13 号染色体上，极显著 SNP 位置位于第 12 号染色体上 20760427 bp，-Log10（P） 值极大值是 10.87；大豆谷氨酸含量显著关联 SNPs 有 4 个，主要分布在 1、18 号染色体上，极显著 SNP 位置位于第 1 号染色体上 53229579 bp，-Log10（P） 值极大值是 6.56；大豆赖氨酸含量显著关联 SNPs 有 7 个，主要分布在 8、19 号染色体上，极显著 SNP 位置位于第 8 号染色体上 18610062 bp，-Log10（P） 值极大值是 6.09。

2022 年大豆籽粒中四种游离氨基酸共关联到 177 个 SNP 位点（表 3）。大豆游离精氨酸含量显著相关的 SNPs 共有 28 个（$-Log_{10}$（*P*）≥6.0），主要分布在 4、17 号染色体上（图 4、表 4），极显著 SNP 位置位于第 4 号染色体上 49708503 bp，$-Log_{10}$（*P*）值极大值是 6.72；大豆游离甘氨酸含量显著关联 SNPs 有 134 个，主要分布在 1、8、11、12、13、14 号染色体上，极显著 SNP 位置位于第 10 号染色体上 45863879 bp，$-Log_{10}$（*P*）值极大值是 9.31；大豆游离谷氨酸含量显著关联 SNPs 有 6 个，主要分布在 9、18 号染色体上，极显著 SNP 位置位于第 9 号染色体上 1925853 bp，$-Log_{10}$（*P*） 值极大值是 6.28；大豆游离赖氨酸含量显

著关联 SNPs 有 9 个，主要分布在 8、19 号染色体上，极显著 SNP 位置位于第 8 号染色体上 18610062 bp，-Log_{10}（*P*）值极大值是 6.49。

表 3 大豆四种游离氨基酸含量关联的 SNP 位点数量

Table 3 The number of SNPS associated with the contents of four free amino acids in soybean

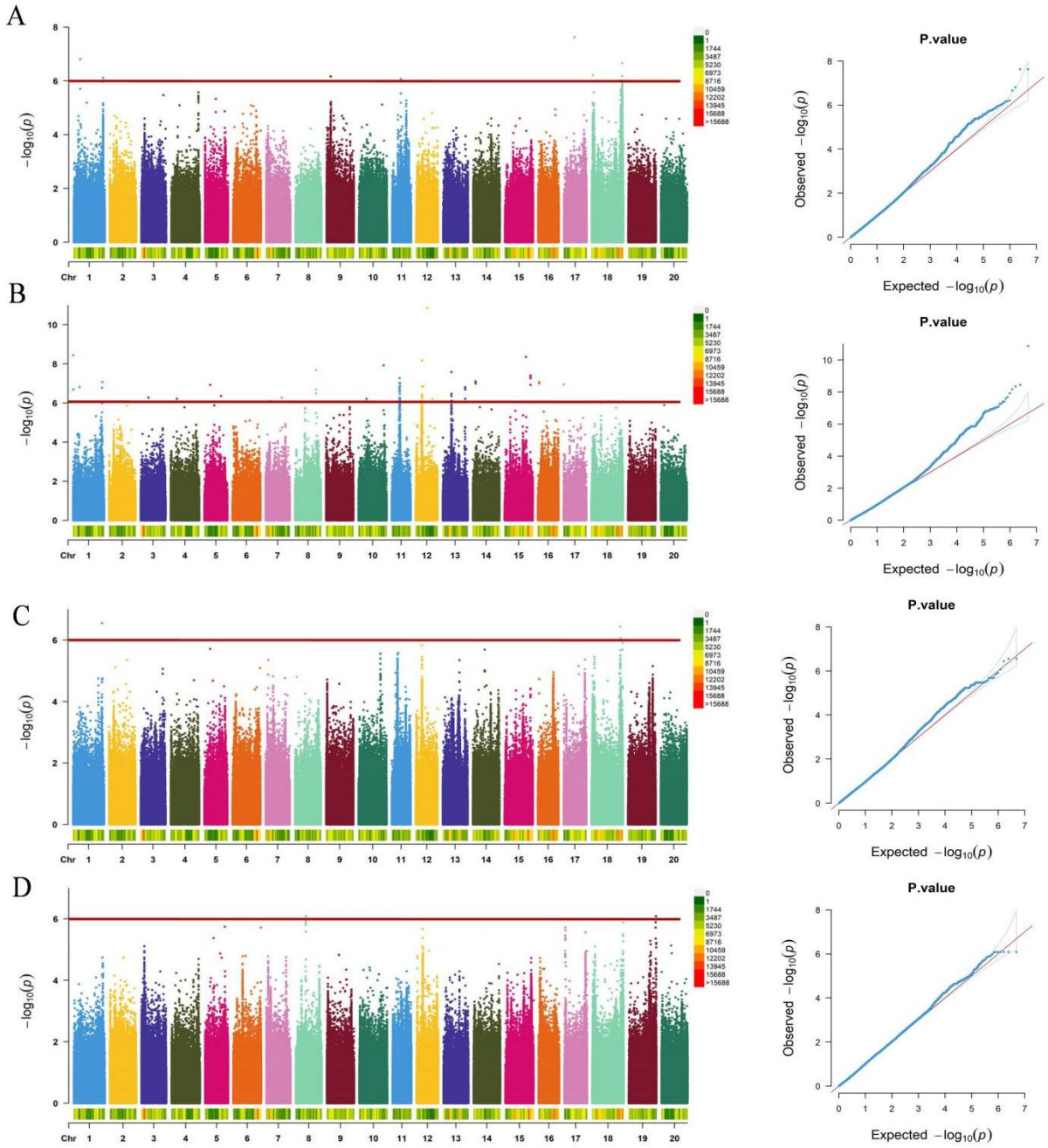
氨基酸种类 Amino acid type	年份 Year	-Log_{10}（*P*）≥5.0
精氨酸 Arginine	2021	11
	2022	28
甘氨酸 Glycine	2021	87
	2022	134
谷氨酸 Glutamate	2021	4
	2022	6
赖氨酸 Lysine	2021	7
	2022	9

表 4 大豆四种游离氨基酸含量显著相关的主要 SNPs

Table 4 Main SNPs in soybean were significantly correlated with the contents of four free amino acids

名称 Name	年份 Year	染色体 Chromosome	SNP 数目 SNP number	最显著 SNP 位置 Peak SNP position	-Log_{10}（*P*）值极大值 -Log_{10}（*P*）max
精氨酸 Arginine	2021 年	1	2	11721470	6.81
		17	2	19067780	7.63
		18	5	19067789	6.66
	2022 年	4	26	49708503	6.72
		17	2	19067780	6.49
甘氨酸 Glycine	2021 年	1	9	81559	8.45
		8	4	38885282	7.69
		11	20	14276392	7.27
		12	12	11052823	8.17
		13	16	15808471	7.59
	2022 年	1	2	53974257	7.89
		8	29	38885282	9.29
		11	31	13780991	7.58
		12	5	11366121	6.47
		13	13	41191811	8.15
谷氨酸 Glutamate	2021 年	1	2	53229579	6.56
		18	2	53291599	6.44
	2022 年	9	4	1925853	6.28
		18	5	53291599	6.14
赖氨酸	2021 年	8	6	18610062	6.09
		19	1	49980979	6.08

名称 Name	年份 Year	染色体 Chromosome	SNP 数目 SNP number	最显著 SNP 位置 Peak SNP position	-Log$_{10}$（*P*）值极大值 -Log$_{10}$（*P*）max
Lysine	2022 年	8	8	18610062	6.49
		19	1	49115726	6.20

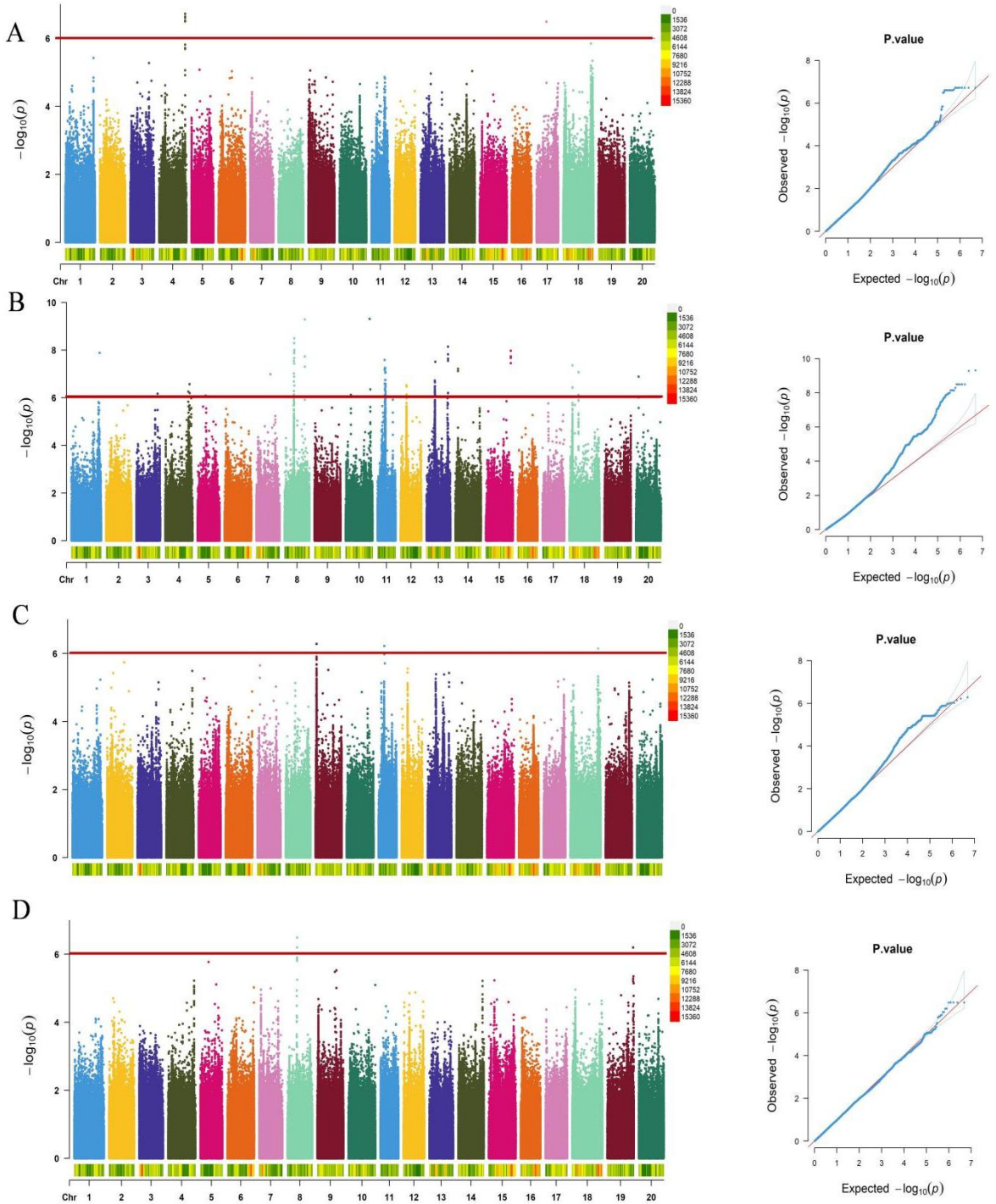


A、B、C、D 分别是游离精氨酸、甘氨酸、谷氨酸和赖氨酸的 GWAS 结果

A, B, C and D are the GWAS results of free arginine, glycine, glutamate and lysine, respectively

图 3 2021 年大豆籽粒中四种游离氨基酸含量全基因组关联分析结果的曼哈顿图和 QQ 图

Fig. 3 Manhattan map and Quantile-Quantile plot of genome-wide association analysis results of the contents of 4 hydrolyzed amino acids in soybean grains in 2021



A、B、C、D 分别是游离精氨酸、甘氨酸、谷氨酸和赖氨酸的 GWAS 结果

A, B, C and D are GWAS results of free arginine, glycine, glutamate and lysine, respectively

图 4 2022 年大豆籽粒中四种游离氨基酸含量全基因组关联分析结果的曼哈顿图和 QQ 图

Fig. 4 Manhattan map and Quantile-Quantile plot of genome-wide association analysis results of four free amino acids in soybean grains in 2021

GWAS 结果表明，两年大豆籽粒中游离精氨酸共定位到 2 个 SNP 位点，分别为 S17_19067780、S17_19067789；游离甘氨酸共定位到 19 个 SNP 位点（表 5）；游离谷氨酸共定位到 1 个 SNP 位点，S18_53291599；

游离赖氨酸共定位到 5 个 SNP 位点，S08_18555689、S08_18567542、S08_18583122、S08_18603949、S08_18610062（图 3、图 4、表 5）。

进一步选择两年显著性较高的 SNP 位点，筛选四种游离氨基酸含量相关候选基因。大豆游离精氨酸共定位的 S17_19067780，游离甘氨酸共定位的 S11_14837079，游离谷氨酸共定位的 S18_53291599，游离赖氨酸共定位的 S08_18555689 附近上下 120 kb 区间，筛选出可能控制大豆干籽粒四种游离氨基酸含量的候选基因。通过 phytozome 13 数据库网站（https：//phytozome. jgi. doe. gov/pz/portal. html）中大豆基因组注释信息，在 4 个区间内分别有 13、32、31、27 个候选基因。根据拟南芥中同源基因比对后，推测可能为控制大豆四种游离氨基酸的候选基因（表 6），游离精氨酸候选基因分别是 *Glyma.17G177400* 编码 Myb/SANT 样 DNA 结合域蛋白，种子中表达量最高，可能参与游离氨基酸形成，*Glyma.17G177600* 编码肽基脯氨酸顺反异构酶，种子中表达量较高，参与蛋白折叠和蛋白质肽基-脯氨酰异构化；游离甘氨酸候选基因分别是 *Glyma.11G157000* 编码天冬氨酸蛋白酶家族蛋白，种子和花中表达量较高，可能通过参与天冬氨酸的生成间接调控游离甘氨酸含量，*Glyma.11G161700* 编码蛋白激酶超家族蛋白，可能通过影响蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性调控游离甘氨酸含量；游离谷氨酸候选基因分别是 *Glyma.18G244200* 编码丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶 21，可能通过蛋白质磷酸化来调控游离谷氨酸含量，*Glyma.18G244700* 编码氨酰基-tRNA 连接酶，可能通过影响氨酰基-tRNA 编辑活性调控游离谷氨酸含量；游离赖氨酸候选基因分别是 *Glyma.08G227600* 编码蛋白质 c 端 s -异戊酰半胱氨酸羧基 o -甲基转移酶，种子中表达量较高，推测可能参与赖氨酸的生成、*Glyma.08G228100* 编码转导蛋白家族蛋白/ WD-40 重复家族蛋白，参与蛋白质泛素化，可能与赖氨酸含量调控相关。

表 5 大豆籽粒四种游离氨基酸两年共定位 SNPs

Table 5 colocalization SNPs of four free amino acids in soybean grains

名称 Name	SNP 位置 SNP position
精氨酸 Arginine	S17_19067780、S17_19067789
甘氨酸 Glycine	S01_53974257、S08_38878988、S08_38883478、S08_38884153、S08_38885282、S11_13780991、S11_13804849、S11_14837079、S11_14837422、S11_14984873、S11_14984877、S11_14985048、S11_15269923、S11_15269925、S14_4979609、S15_47569362、S15_47570050、S15_47570209、S15_47570419
谷氨酸 Glutamate	S18_53291599
赖氨酸 Lysine	S08_18555689、S08_18567542、S08_18583122、S08_18603949、S08_18610062

表 6 大豆游离精氨酸、甘氨酸、谷氨酸、赖氨酸含量相关候选基因

Table 6 Soybean free arginine, glycine, glutamate, lysine content related candidate genes

氨基酸种类 Amino acid type	基因 ID Gene ID	同源基因 Homologous gene	功能注释 Function annotation
精氨酸	*Glyma.17G177400*	*AT3G11290*	Myb/SANT 样 DNA 结合域蛋白
	Glyma.17G177600	*AT2G15790*	肽基脯氨酸顺反异构酶
甘氨酸	*Glyma.11G157000*	*AT5G07030*	天冬氨酸蛋白酶家族蛋白
	Glyma.11G161700	*AT4G33950*	蛋白激酶超家族蛋白
谷氨酸	*Glyma.18G244200*	*AT4G36950*	丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶 21
	Glyma.18G244700	*AT1G09620*	氨酰基-tRNA 连接酶
赖氨酸	*Glyma.08G227600*	*AT5G59500*	蛋白质 c 端 s -异戊酰半胱氨酸 羧基 o -甲基转移酶
	Glyma.08G228100	*AT4G33270*	转导蛋白家族蛋白/ WD-40 重复家族蛋白

3 讨论

通过 HPLC 法检测大豆自然群体的精氨酸、甘氨酸、谷氨酸、赖氨酸四种游离氨基酸的含量，结果表明，本研究大豆自然群体四种氨基酸不同品种间差异显著，群体遗传变异丰富，分别筛选出精氨酸、甘氨酸、谷氨酸和赖氨酸四种游离氨基酸高含量的优质品种，海门羊 104、辽鲜豆 12 号、灌云大四粒等，为大豆游离氨基酸含量较高优异品种选育提供种质资源。利用混合线性模型（MLM）进行全基因组关联分析，显著阈值为以-Log_{10}（P）≥6 ，结果发现，2021 年大豆精氨酸、甘氨酸、谷氨酸和赖氨酸四种游离氨基酸含量，分别关联到 11、87、4、7 个 SNP 位点，2022 年大豆精氨酸、甘氨酸、谷氨酸和赖氨酸四种游离氨基酸含量，分别关联到 28、134、6、9 个 SNP 位点。与一般线性模型（GLM）相比，混合线性模型需要考虑亲缘关系矩阵，可以减少结果的假阳性。

前人关于大豆籽粒中水解氨基酸的研究较多。李楠[20]选用的 167 份大豆，利用高效液相色谱法测定水解谷氨酸含量的变化范围在 42.31 ~ 95.52 mg/g 之间；赖氨酸变化范围在 14.77 ~ 49.44 mg/g。Panthee 等[21]选用了由 N87-984-16 × TN93-99 杂交的 101 个 F_6 的重组自交系群体，利用近红外光谱仪分析大豆籽粒样品的水解氨基酸含量，精氨酸含量范围是 34.9 ~ 38.4 mg/g，平均值 37.1 mg/g，甘氨酸含量范围是 29.7 ~ 32.0 mg/g，平均值 30.9 mg/g，谷氨酸含量范围是 56.2 ~ 64.4 mg/g，平均值 60.3 mg/g，赖氨酸含量范围是 22.4 ~ 24.1 mg/g，平均值 23.3 mg/g。通过 2021、2022 年两年大豆籽粒四种游离氨基酸含量测定，与前人研究结果相比，发现大豆籽粒中水解氨基酸含量远高于其游离氨基酸含量，可能因为大豆蛋白含量较高，水解氨基酸含量包含构成蛋白质的氨基酸和游离氨基酸。

种子中约 90～99%的氨基酸参与蛋白质的合成，只有 1-10%是游离氨基酸[22]。尽管游离氨基酸含量相对较低，但它们在种子发育、成熟和干燥过程中发挥着重要作用。游离氨基酸参与核心代谢，是许多初级和次级代谢产物的前体，在抵御植物逆境胁迫方面，发挥重要作用[23][24]。王丽等[25]利用高效液相色谱仪测定大豆中的 20 种游离氨基酸含量，发现精氨酸含量范围为 0.969～8.370 mg/g，甘氨酸含量范围为 0.018～0.091 mg/g，谷氨酸含量范围为 0.075～0.462 mg/g，赖氨酸含量范围为 0.094～0.161 mg/g。李爱君等[26]探究不同大豆品种发酵前后游离氨基酸变化，发现大豆籽粒发酵前游离精氨酸、甘氨酸、谷氨酸含量范围分别是 2.36～8.51 mg/g、0.01～0.24 mg/g、0.57～1.57 mg/g。前人研究结果与本研究中谷氨酸、甘氨酸和赖氨酸含量大体一致，但是精氨酸含量范围差异较大，这可能是因为本研究供试大豆籽粒中游离精氨酸含量遗传变异丰富，不同品种间含量差异显著。本研究针对四种游离氨基酸含量共筛选出 3 个优异品种，可用于大豆优质种质资源的选育，后续可对四种游离氨基酸高含量相关候选基因进行功能验证。

参考文献

[1] Nieves C J, Langkamp-Henken B. Arginine and immunity: a unique perspective. Biomed Pharmacother, 2002, 56(10):471-82

[2] Wu G, Bazer F W, Davis T A,Kim S W, Li P, Rhoads J M, Satterfield M C, Smith S B, Thomas E, Yin Y L . Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. Amino Acids, 2009, 37(1):153-68

[3] Kim S H, Roszik J, Grimm E A, Ekmekcioglu S. Impact of L-Arginine Metabolism on Immune Response and Anticancer Immunotherapy. Frontiers in Oncology, 2018, 8:67

[4] Steggerda S M, Bennett M K, Chen J, Emberley E, Huang T, Janes J R, Li W, MacKinnon A L, Makkouk A, Marguier G, Murray P J, Neou S, Pan A, Parlati F, Rodriguez M L, Van de Velde L A, Wang T, Works M, Zhang J, Zhang W, Gross M I. Inhibition of arginase by CB-1158 blocks myeloid cell-mediated immune suppression in the tumor microenvironment. Journal for Immunotherapy of Cancer, 2017, 5(1):101

[5] Kesarwani P, Prabhu A, Kant S, Chinnaiyan P. Metabolic remodeling contributes towards an immune-suppressive phenotype in glioblastoma. Cancer Immunology Immunotherapy, 2019, 68(7):1107-1120

[6] Afshinpour M, Mahdiuni H. Arginine transportation mechanism through cationic amino acid transporter 1: insights from molecular dynamics studies. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2023, 10:1-15

[7] Buford B N, Koch A J. Glycine-arginine-alpha-ketoisocaproic acid improves performance of repeated cycling sprints. Medicine and Science Sports and Exercise, 2004, 36(4):583-7

[8] Satyanarayana G, Turaga R C, Sharma M, Wang S, Mishra F, Peng G, Deng X, Yang J, Liu Z R. Pyruvate kinase M2 regulates fibrosis development and progression by controlling glycine auxotrophy in myofibroblasts. Theranostics, 2021, 11(19):9331-9341

[9] Den B G, Marsh D C, Lindell S L. Effect of glycine on isolated, perfused rabbit livers following 48-hour preservation in University of Wisconsin solution without glutathione. Transplant International, 1994, 7(3):195-200

[10] Paoletti P, Neyton J. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. Current Opinion In Pharmacology, 2007, 7(1):39-47

[11] Hardingham G E, Bading H. Synaptic versus extra synaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. Nature Reviews Neuroscience, 2010, 11(10):682-96

[12] Geneva A. Safety evaluation of certain contaminants in food. prepared by the sixty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA). FAO Food Nutrition Paper, 2006, 82:1-778

[13] Ishida A, Kyoya T, Nakashima K, Katsumata M. Muscle protein metabolism during compensatory growth with changing dietary lysine levels from deficient to sufficient in growing rats. Journal of. Nutritional. Science and Vitaminology, 2011, 57(6):401-8

[14] Mastellar S L, Coleman R J, Urschel, K L. Controlled trial of whole body protein synthesis and plasma amino acid concentrations in yearling horses fed graded amounts of lysine. Veterinary Journal, 2016, 216:93-100

[15] Huang D, Maulu S, Ren M, Liang H, Ge X, Ji K, Yu H. Dietary lysine levels improved antioxidant capacity and immunity via the TOR and p38 MAPK signaling pathways in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* fry. Frontiers in Immunology, 2021, 25(12):635015

[16] 姚炜, 库宝善, 李中华, 李雪林. L-赖氨酸对大鼠脑损伤的作用. 青岛大学医学院学报, 2001(04):282-284

Yao W, Ku B S, Li Z H, Li X L. Effect of L-lysine on brain injury in rats.Journal of Medical College of Qingdao University, 2001(04):282-284

[17] Qian L, Hickey L T, Stahl A, Werner C R, Hayes B, Snowdon R J, Voss-Fels K P. Exploring and harnessing haplotype diversity to improve yield stability in crops. Frontiers in Plant Science, 2017, 8:1534

[18] Wainschtein P, Jain D P, Yengo L. Recovery of trait heritability from whole genome sequence data. Yearbook of Paediatric Endocrinology, 2019, 21:345

[19] Zhang W, Xu W J, Zhang H M, Liu X Q, Cui C Y, Li S S, Zhu Y L, Chen X , Chen H T. Comparative selective signature analysis and high-resolution GWAS reveal a new candidate gene controlling seed weight in soybean. Theoretical and Applied Genetics，2021，134（5）：1329-1341

[20] 李楠. 利用近红外光谱技术快速检测大豆氨基酸含量及分析其相关性研究. 北京交通大学, 2012

Li N. Rapid determination of amino acid content of soybean by near infrared spectroscopy and correlation analysis. Beijing Jiaotong University, 2012

[21] Panthee D R, Pantalone V R, Saxton A M. Quantitative trait loci for agronomic traits in soybean. Plant Breeding, 2007, 126(1):51-57

[22] Cohen H, Israeli H, Matityahu I, Amir R. Seed-specific expression of a feedback-insensitive form of cystathionine-gamma-synthase in arabidopsis stimulates metabolic and transcriptomic responses associated with desiccation stress. Plant Physiology, 2014, 166:1575-1592

[23] Angelovici R, Fait A, Fernie A R. A seed high-lysine trait is negatively associated with the TCA cycle and slows down Arabidopsis seed germination. New Phytologist, 2011, 189:148-159

[24] Galili G, Amir R, Fernie A R. The regulation of essential amino acid synthesis and accumulation in plants. Annual Review of Plant Biology, 2016, 67:153-178

[25] 王丽, 宋志峰, 纪锋, 黄璜. 高效液相色谱法测定大豆中游离氨基酸含量. 中国粮油学报, 2008(01):180-184

Wang L, Song Z F, Ji F, Huang H. Determination of free amino acids in soybean by high performance liquid chromatography. China Journal of Grain and Oil, 2008(01):180-184

[26] 李爱君, 王迪, 阳刚, 宋军, 孔祥兵, 廖胜蓝, 阚建全. 后发酵温度对不同大豆品种细菌型豆豉氨基酸态氮生成动力学及理化性质的影响. 食品科学, 2023, 44(02):195-203

Li A J, Wang D, Yang G, Song J, Kong X B, Liao S L, Kan J Q. Effects of post-fermentation temperature on the kinetics and physicochemical properties of amino acid nitrogen formation in bacterial tempeh of different soybean varieties. Food Science, 2023, 44(02):195-203