

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, 山东青岛 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。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、赖氨酸等 4 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, 筛选出四种游离氨基酸均高含量的 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。结合大豆自然群体四种游离氨基酸含量和基因型进行全基因组关联分析, 大豆四种氨基酸 2 年均定位到的显著 SNP 位点共 27 个, 其中精氨酸有 2 个 SNP 位点, 包括 S17_19067780 和 S17_19067789, 甘氨酸有 19 个 SNP 位点, 包括 S01_53974257、S08_38878988 等, 谷氨酸有 1 个 SNP 位点, S18_53291599, 赖氨酸有 5 个 SNP 位点, 包括 S08_18555689、S08_18567542 等; 并推测大豆氨基酸高含量相关候选基因, 精氨酸为 *Glyma.17G177400* 和 *Glyma.17G177600*, 甘氨酸为 *Glyma.11G157000* 和 *Glyma.11G161700*, 谷氨酸为 *Glyma.18G244200* 和 *Glyma.18G244700*, 赖氨酸为 *Glyma.08G227600* 和 *Glyma.08G228100*。本研究结果为大豆品种改良、辅助大豆分子育种提供理论基础。

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

XIONG Yawen¹, JIA Qianru², ZHOU Miaomiao³, ZHANG Hongmei², CHEN Huatao^{1,2}

(¹College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095; ²Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014; ³College of Agronomy, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong)

Abstract: The amino acids are rich in soybean grains and are important components of the grain quality. 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 varieties with high levels of these four free amino acids were identified, including Haimen Yang 104, Liaoxian Bean 12, and Guanyun Dasiyu. By genome-wide association analysis combined with the phenotypes and genotypes of four free amino acids in soybean natural population, 27 significant SNPs co-located by four amino acids in soybean were identified in two years, among which there were two SNPs for arginine, including S17_19067780 and S17_19067789, and 19 SNPs for glycine, including S01_53974257, S08_38878988, et al, one SNP (S18_53291599) for glutamic acid, five SNPs for lysine, including S08_18555689, S08_18567542, et al. The candidate genes related to high amino acid content in soybean were inferred to be *Glyma.17G177400* and *Glyma.17G177600* for arginine, and *Glyma.11G157000* and

收稿日期: 2024-01-08 网络出版日期: 2024-02-29

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240108002>

第一作者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, 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)

Glyma. 11G161700 for glycine. Glutamic acid are *Glyma. 18G244200* and *Glyma. 18G244700*, lysine are *Glyma. 08G227600* and *Glyma. 08G228100*. The results of this study provide a theoretical basis for improving soybean varieties and assisting soybean molecular breeding.

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,种植历史悠久。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,因此选育品质优良、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。

大豆籽粒中的水解氨基酸包括游离氨基酸和蛋白质水解生成的氨基酸,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^[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,因此可加快精氨酸的分解利用,促进巨噬细胞和T细胞的生成^[4-6]。甘氨酸是形成肌酸的重要中间物质,可促进氧化代谢,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];还可以调节免疫和保护细胞,抑制淋巴细胞等免疫细胞,减少细胞死亡的影响^[9]。谷氨酸作为哺乳动物脑的一种兴奋性递质,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];作为鲜味增强剂能够激活味觉受体并增强对其他味道的感知,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];在改善神经系统、缓解焦虑方面也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,通过将检测的表型数据与群体重测序获得的基因型信息进行关联分析,精确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]。张红梅等^[19]测定了菜用大豆食味品质相关的精氨酸、丙氨酸、谷氨酸和天冬氨酸含量,并进行了全基因组关联分析,两年均定位到S17_34559022,挖掘到ZIP蛋白(Zinc finger family protein)、转录因子bHLH(bHLHDNA-binding superfamily protein)、生长素反应蛋白家族和天冬氨酸蛋白酶家族蛋白等候选基因。而关于大豆干籽粒中游离氨基酸全基因组关联分析的研究有所空缺,因此本研究利用高效液相色谱法(HPLC, high performance liquid chromatography)测定大豆干籽粒中四种游离氨基酸的含量,通过GWAS筛选大豆氨基酸含量相关的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^[20],于2021年6月、2022年6月种植于江苏省农业科学院六合试验基地(32°35'N, 118°37'E),年平均温度17.6°C,年平均降水量1200 mm以上,随机区组设计,重复3次。每份材料种植2垄,垄长3 m,行距60 cm,每垄16穴,穴距20 cm,每穴2~3株,常规田间管理,收获后脱粒保存。

1.2 四种氨基酸含量测定

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/mL 5个不同浓度梯度的线性溶液,绘制标准曲线。

四种游离氨基酸的提取根据《粮食、油料检验—水分测定法》^[21]105°C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

待测样品溶液。取线性溶液、待测样品溶液各200 μL ,置于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,3次重复。

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 $^{\circ}\text{C}$;检测:UV 254 nm;进样量:20 μL ;检测器:(RID)示差折光检测器。

1.3 统计分析

通过SPASS 26.0软件分析大豆材料中四种游离氨基酸含量的标准差、变异系数等参数。

1.4 全基因组关联分析

利用本课题组前期获得的重测序数据,选择高密度物理图谱中的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,以 $-\text{Log}_{10}(P) \geq 6.0$ 为显著阈值,当SNP的 $-\text{Log}_{10}(P) \geq 6.0$ 时,认为是显著关联位点。

1.5 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(<https://www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp>)的基因序列进行Blastp比对,确定候选基因。

2 结果与分析

2.1 标准曲线

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(图1)。

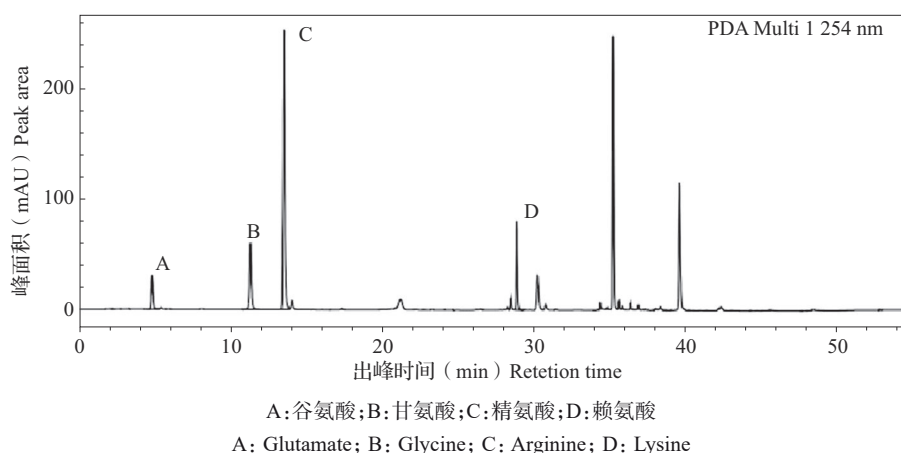


图1 大豆四种氨基酸标准液HPLC图谱

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

配制不同浓度梯度的精氨酸、甘氨酸、谷氨酸、赖氨酸标准品溶液,经过HPLC分析,浓度、峰面积分别为横坐标和纵坐标,得到回归方程,精氨酸的标准曲线回归方程为 $Y=6126.89X-44643.27(R^2=0.9969)$,甘氨酸为 $Y=14443.30X-9264.28(R^2=0.9983)$,谷氨酸为 $Y=6034.75X-2659.96(R^2=0.9967)$,赖氨酸为 $Y=11667.31X-12290.93(R^2=0.9913)$,4个回归方程的相关系数较高,表明准确性高,可用于四种游离氨基酸的测定。

2.2 四种游离氨基酸含量分析

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检测结果(图2、表1)显示,2021年,游离精氨酸含量范围为0.46~12.00 mg/g,

变异系数为63.12%;游离甘氨酸含量范围为0.03~0.37 mg/g,变异系数为55.38%;游离谷氨酸含量范围为0.22~1.29 mg/g,变异系数为34.91%;游离赖氨酸含量范围为0.05~0.25 mg/g,变异系数为28.13%。2022年,游离精氨酸含量范围为0.73~8.43 mg/g,变异系数为57.87%;游离甘氨酸含量范围为0.03~0.25 mg/g,变异系数为48.88%;游离谷氨酸含量范围为0.25~1.35 mg/g,变异系数为33.03%;游离赖氨酸含量范围为0.02~0.31 mg/g,变异系数为44.06%。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三种游离氨基酸。

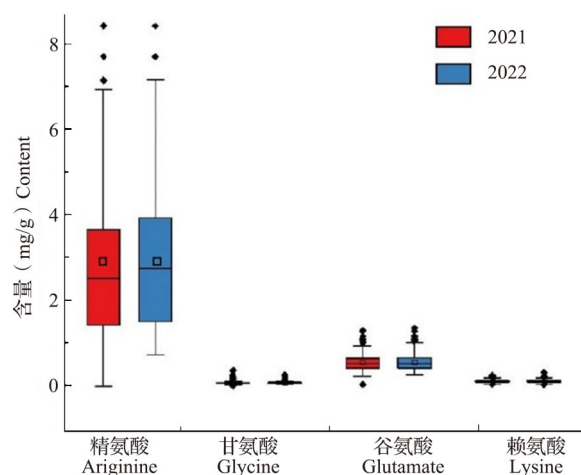


图2 大豆四种游离氨基酸含量箱线图

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 Min.	最大值 Max.	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 Soybean varieties with high content of four 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 Haimen Yang 104	2021	12.00	0.20	1.29	0.21
辽鲜豆12号 Liaoxian Bean 12	2021	7.16	0.37	1.28	0.25
灌云大四粒 Guanyun Dasiyu	2021	6.93	0.15	0.62	0.16
	2022	8.43	0.25	1.32	0.19
	2022	6.41	0.22	1.01	0.22
	2022	6.10	0.18	0.70	0.14

2.3 大豆四种氨基酸GWAS分析及SNP定位

2021年大豆籽粒中四种游离氨基酸共关联到109个SNP位点。大豆精氨酸含量显著相关的SNPs共有11个($-\text{Log}_{10}(P) \geq 6.0$),分布在第1、9、11、17、18号染色体上(表3、图3),极显著SNP位置位于第17号染色体19067780 bp, $-\text{Log}_{10}(P)$ 值极大值是7.63;大豆甘氨酸含量显著关联SNPs有87个,分布在第1、3、4、5、7、8、10、11、12、13、14、15、16、17

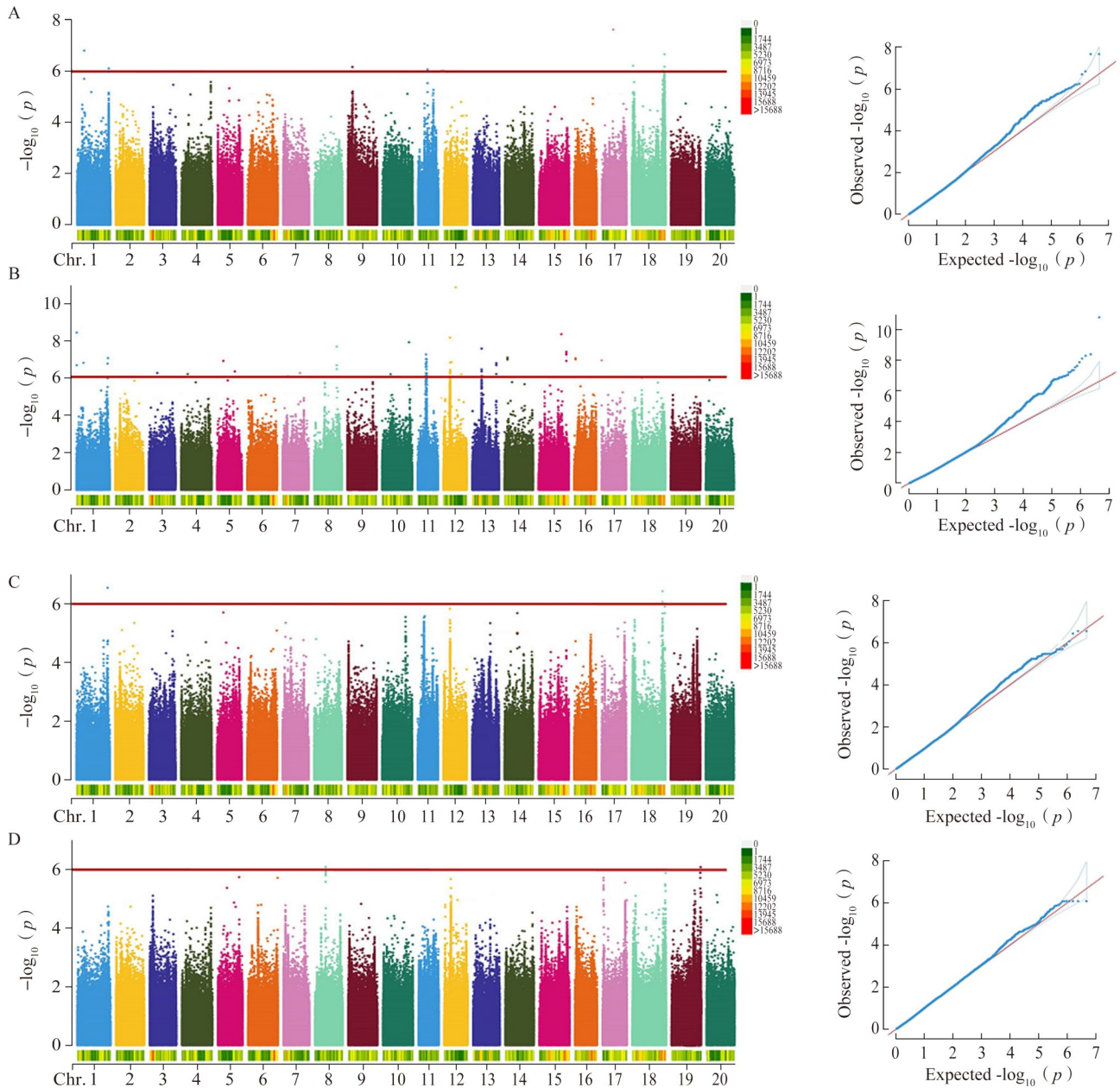
本研究264份大豆品种中部分材料游离氨基酸含量表现优异,筛选出2021年、2022年两种或两种以上游离氨基酸含量排名前五的大豆品种共3个,分别是海门羊104、辽鲜豆12号、灌云大四粒(表2),其中海门羊104两年游离精氨酸含量在供试材料中均为最高,2022年游离甘氨酸含量为最高,2021年游离谷氨酸含量为最高;辽鲜豆12号2021年游离甘氨酸含量、游离赖氨酸含量在供试材料中均为最高,2021年游离谷氨酸含量为第二;灌云大四粒2021年游离精氨酸含量在供试材料中为第三,2021年游离赖氨酸含量第五,2022年游离甘氨酸含量第四。

号染色体上,极显著SNP位置位于第12号染色体上20760427 bp, $-\text{Log}_{10}(P)$ 值极大值是10.87;大豆谷氨酸含量显著关联SNPs有4个,分布在第1、18号染色体上,极显著SNP位置位于第1号染色体上53229579 bp, $-\text{Log}_{10}(P)$ 值极大值是6.56;大豆赖氨酸含量显著关联SNPs有7个,分布在第8、19号染色体上,极显著SNP位置位于第8号染色体上18610062 bp, $-\text{Log}_{10}(P)$ 值极大值是6.09。

表3 大豆四种游离氨基酸含量显著相关的SNPs

Table 3 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(bp) Peak SNP position	-Log ₁₀ (P)值 极大值 -Log ₁₀ (P)max
精氨酸 Arginine	2021	1	2	11721470	6.81
		9	1	7711564	6.17
		11	1	15826079	6.07
		17	2	19067780	7.63
		18	5	19067789	6.66
	2022	4	26	49708503	6.72
		17	2	19067780	6.49
甘氨酸 Glycine	2021	1	9	81559	8.45
		3	1	14208230	6.28
		4	1	11098818	6.22
		5	2	10644040	6.93
		7	2	29891911	6.28
		8	4	38885282	7.69
		10	2	45863879	7.92
		11	20	14276392	7.27
		12	13	20760427	10.87
	2022	13	16	15808471	7.59
		14	2	4979609	7.10
		15	9	38947949	8.35
		16	2	2150636	7.06
		17	1	3674	6.95
		18	3	58009016	6.10
		1	2	53974257	7.89
		3	3	40650830	6.17
		4	7	46581622	6.57
		5	1	15535820	6.03
谷氨酸 Glutamate	2022	7	1	27072107	6.99
		8	29	38885282	9.29
		10	3	45863879	9.31
		11	31	13780991	7.58
		12	5	11366121	6.47
		13	30	41191811	8.15
		14	2	4979609	7.22
		15	8	47570209	7.98
		18	9	6088561	7.36
		20	2	5221048	6.89
赖氨酸 Lysine	2021	1	2	53229579	6.56
		18	2	53291599	6.44
赖氨酸 Lysine	2022	9	4	1925853	6.28
		18	5	53291599	6.14
		8	6	18610062	6.09
赖氨酸 Lysine	2021	19	1	49980979	6.08
		8	8	18610062	6.49
		19	1	49115726	6.20



A、B、C、D分别对应游离精氨酸、甘氨酸、谷氨酸和赖氨酸,下同

A, B, C and D are free arginine, glycine, glutamate and lysine, respectively, the same as below

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 four free amino acids in soybean grains in 2021

2022年大豆籽粒中四种游离氨基酸共关联到177个SNP位点。大豆游离精氨酸含量显著相关的SNPs共有28个($-\text{Log}_{10}(P) \geq 6.0$),分布在第4、17号染色体上(表3、图4),极显著SNP位置位于第4号染色体上49708503 bp, $-\text{Log}_{10}(P)$ 值极大值是6.72;大豆游离甘氨酸含量显著关联SNPs有133个,分布在第1、3、4、5、7、8、10、11、12、13、14、15、18、20号染色体上,极显著SNP位置位于第10号染色体上

45863879 bp, $-\text{Log}_{10}(P)$ 值极大值是9.31;大豆游离谷氨酸含量显著关联SNPs有9个,分布在第9、18号染色体上,极显著SNP位置位于第9号染色体上1925853 bp, $-\text{Log}_{10}(P)$ 值极大值是6.28;大豆游离赖氨酸含量显著关联SNPs有9个,分布在第8、19号染色体上,极显著SNP位置位于第8号染色体上18610062 bp, $-\text{Log}_{10}(P)$ 值极大值是6.49。

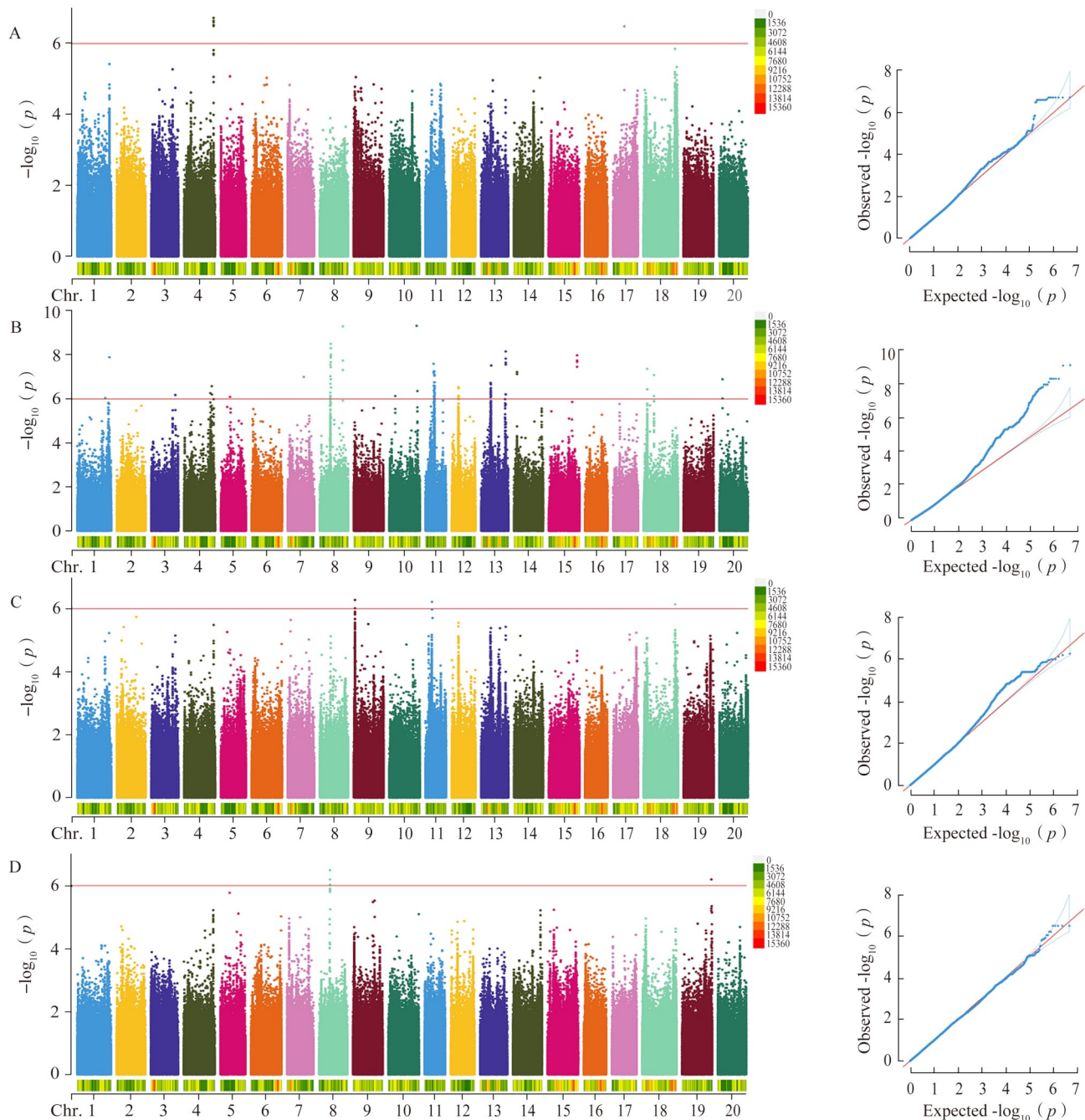


图4 2022年大豆籽粒中四种游离氨基酸含量全基因组关联分析结果的曼哈顿图和QQ图

Fig. 4 Manhattan map and Quantile-Quantile plot of genome-wide association analysis results of the contents of four free amino acids in soybean grains in 2022

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;游离谷氨酸共定位到1个SNP位点,为S18_53291599;游离赖氨酸共定位到5个SNP位点,为S08_18555689、S08_18567542、S08_18583122、S08_18603949、S08_18610062(表4)。

2.4 候选基因挖掘

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。在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上下游120 kb区间,筛选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个、32个、31个、27个候选基因。根据拟南芥中同源基

因比对结果,推测可能控制大豆四种游离氨基酸的候选基因(表5),游离精氨酸候选基因分别是 *Glyma.17G177400* 和 *Glyma.17G177600*,其中 *Glyma.17G177400* 编码 Myb/SANT 样 DNA 结合域蛋白,在种子中表达量最高,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,在种子中表达量较高,参与蛋白折叠和蛋白质肽基-脯氨酸异构化;游离甘氨酸候选基因分别是 *Glyma.11G157000* 和 *Glyma.11G161700*,其中 *Glyma.11G157000* 编码天冬氨酸蛋白酶家族蛋白,在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* 和 *Glyma.18G244700*,其中 *Glyma.18G244200* 编码丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶20,可能通过蛋白质磷酸化来调控游离谷氨酸含量,*Glyma.18G244700* 编码氨基-tRNA 连接酶,可能通过影响氨基-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* 和 *Glyma.08G228100*,其中 *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,在种子中表达量较高,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4 大豆籽粒四种游离氨基酸两年共定位 SNPs

Table 4 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5 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 5 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 Arginine	<i>Glyma.17G177400</i> <i>Glyma.17G177600</i>	<i>AT3G11290</i> <i>AT2G15790</i>	Myb/SANT 样DNA 结合域蛋白 肽基脯氨酸顺反异构酶
甘氨酸 Glycine	<i>Glyma.11G157000</i> <i>Glyma.11G161700</i>	<i>AT5G07030</i> <i>AT4G33950</i>	天冬氨酸蛋白酶家族蛋白 蛋白激酶超家族蛋白
谷氨酸 Glutamate	<i>Glyma.18G244200</i> <i>Glyma.18G244700</i>	<i>AT4G36950</i> <i>AT1G09620</i>	丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶20 氨基-tRNA 连接酶
赖氨酸 Lysine	<i>Glyma.08G227600</i> <i>Glyma.08G228100</i>	<i>AT5G59500</i> <i>AT4G33270</i>	蛋白质C端S-异戊酰半胱氨酸羧基O-甲基转移酶 转导蛋白家族蛋白/ WD-40重复家族蛋白

3 讨论

通过高效液相色谱法检测264份大豆品种的精氨酸、甘氨酸、谷氨酸、赖氨酸四种游离氨基酸的含

量,结果表明四种氨基酸在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,为海门羊104、辽鲜豆12号、灌云大四粒,为大豆游

离氨基酸含量较高优异品种选育提供种质资源。

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]。李楠^[25]选用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;赖氨酸变化范围在14.77~49.44 mg/g。Panthee等^[26]选用由N87-984-16 × TN93-99杂交的101个F₆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。王丽等^[27]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^[28]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,可能是因为大豆蛋白质含量较高,水解氨基酸含量包含构成蛋白质的氨基酸和游离氨基酸,本研究中谷氨酸、甘氨酸和赖氨酸含量与前人研究大体一致,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。

张红梅等^[19]以264份大豆种质资源为材料,在2020年和2021年测定了与菜用大豆食味品质相关的精氨酸、丙氨酸、谷氨酸和天冬氨酸含量,并进行全基因组关联分析,精氨酸、丙氨酸和谷氨酸在2年或2个性状被重复检测到的显著性SNP位点有5个,S03_40647948、S05_2727464、S10_4122977、S17_34559022和S19_48541685。利用全基因组关联分析,本研究定位到大豆干籽粒中四种游离氨基酸共27个SNPs位点(两年均定位到),其中精氨酸为S17_19067780、S17_19067789,甘氨酸为S01_53974257等,谷氨酸为S18_53291599,赖氨酸为S08_18555689等,为后续分子机制研究奠定基础。

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):153-168
- [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) : 583-587
- [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) :

- 682-696
- [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):401-408
- [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, 37(4):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, 37(4):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] 张红梅, 熊雅文, 许文静, 张威, 王琼, 刘晓庆, 刘慧, 崔晓艳, 陈新, 陈华涛. 大豆 R6 期籽粒氨基酸含量的全基因组关联分析. *作物学报*, 2023, 49(12):3277-3288
Zhang H M, Xiong Y W, Xu W J, Zhang W, Wang Q, Liu X Q, Liu H, Cui X Y, Chen X, Chen H T. Genome-wide association analysis of amino acid content in soybean R6 grain. *Acta Agronomica Sinica*, 2013, 49(12):3277-3288
- [20] 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
- [21] 高修吾, 杨浩然, 吴艳霞, 吕桂芬. GB/T 5497-1985 粮食、油料检验水分测定法. 北京: 国家标准局, 1985
Gao X W, Yang H R, Wu G F, Lv G F. GB/T 5497-1985 grain, oil inspection-determination of moisture. Beijing: State Bureau of Standards, 1985
- [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] 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: 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: Beijing Jiaotong University, 2012
- [26] Panthee D R, Pantalone V R, Saxton A M. Quantitative trait loci for agronomic traits in soybean. *Plant Breeding*, 2007, 126(1):51-57
- [27] 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, 1(23):180-184
Wang L, Song Z F, Ji F, Huang H. Determination of free amino acids in soybean by high performance liquid chromatography. *Journal of the Chinese Cereals and Oils*, 2008, 1(23):180-184
- [28] 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(2):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(2):195-203