

文章编号: 1674-7054(2021)04-0419-09



## 基于高效液相色谱-质谱联用技术解析 山栏稻营养品质的代谢物谱

张忠辉, 邓渊, 强奇, 陈日东, 杨君, 刘贤青,  
王守创, 袁潜华, 罗杰, 罗越华

(海南大学热带作物学院/海南省热带生物资源可持续利用重点实验室, 海口 570228)

**摘要:** 以10份山栏稻(*Oryza sativa* L.)的种子为材料, 利用超高效液相色谱-高分辨质谱联用技术进行山栏稻种子代谢数据库的建立, 并对不同类型的山栏稻种子及种子不同萌发时期的代谢物进行定量分析, 旨在为山栏稻营养品质的改良提供优良亲本和丰富水稻育种的种质资源。本研究成功构建了包含1 058个代谢信号的山栏稻种子代谢数据库, 其中, 氨基酸、脂质、维生素和类黄酮等已知物质645个。与普通水稻种子代谢谱的比较分析表明, 山栏稻种子中不饱和脂肪酸、维生素等物质的相对含量高于普通水稻; 甘油磷脂和类黄酮物质低于普通水稻。在种子萌发过程中, 山栏稻与普通水稻种子中代谢物的积累模式存在差异, 其中, 脯氨酸、亚麻酸乙酯、泛酸和吡哆醇的积累模式在山栏稻和普通水稻中存在差异。

**关键词:** 山栏稻; 代谢组学; 氨基酸; 类黄酮; 脂质

**中图分类号:** S 511.6; O 657.63 **文献标志码:** A

**引用格式:** 张忠辉, 邓渊, 强奇, 等. 基于高效液相色谱-质谱联用技术解析山栏稻营养品质的代谢物谱 [J]. 热带生物学报, 2021, 12(4): 419-427. DOI: [10.15886/j.cnki.rdsxb.2021.04.003](https://doi.org/10.15886/j.cnki.rdsxb.2021.04.003)

山栏稻(*Oryza sativa* L.), 又称山兰稻, 是海南地区黎、苗等少数民族经过长期种植和选择培育出适合中部干旱地区种植的早稻品种, 是珍贵的早稻种质资源<sup>[1-2]</sup>。山栏稻具有抗旱、耐热、抗病、抗虫等优良特性, 食味品质性状优异, 其米饭味香色美, 有“一家煮饭全村香”的美誉<sup>[3]</sup>。大多数山栏稻品种属于热带粳稻型或偏粳稻型种质资源, 籽粒饱满、颖壳颜色、糙米颜色、有无芒等特征性状均表现出山栏稻丰富的种质多样性<sup>[4]</sup>。充分挖掘山栏稻种质资源, 解析其种子中代谢物的种类和含量, 是揭示山栏稻种子中营养品质形成机理的前提, 对培育优质健康的新品种具有重要意义。代谢组学是继基因组、转录组和蛋白组学之后发展起来的新兴组学技术, 是系统生物学重要的组成部分<sup>[5]</sup>。随着质谱检测技术的不断发展, 植物代谢组学的研究也进入快速发展阶段。近年来, 水稻(*Oryza sativa* L.)、玉米(*Zea mays* L.)、番茄(*Solanum lycopersicum*)等主要作物的营养品质代谢数据库已经相继建成, 并且系统研究了作物中各种营养成分的种类、含量差异以及代谢合成途径, 这为深入研究作物营养品质代谢组的生化与遗传机制奠定了基础<sup>[6-8]</sup>。同时, 王守创等<sup>[9]</sup>对柑橘、甜橙、柚子和柠檬等不同类型的木本科材料进行代谢谱分析, 系统地研究了氨基酸等初生代谢物、类黄酮等次生代谢物的组织差异性和群体自然变异; 陈伟等<sup>[10]</sup>发展了新的代谢检测方法, 并建立了包含近1 000种营养物质的水稻代谢数据库。有研究表明, 决定水稻种子颜色差异的代谢物主要是类黄酮物质, 如红色稻米中富含原花青素类代谢物, 而黑色和紫色稻米中主要含糖基化的矢车菊素和芍药花青素<sup>[11-12]</sup>。目前, 关于山栏稻的研究方向主要集中在优质种质资源的收集

收稿日期: 2021-02-02 修回日期: 2021-04-06

基金项目: 海南省重点研发计划(现代农业)(ZDYF2020066); 国家杰出青年科学基金项目(31625021); 海南省自然科学基金青年项目(319QN155); 海南大学科研启动经费项目[KYQD(ZR)1916]

第一作者: 张忠辉(1996-), 男, 海南大学热带作物学院2018级硕士研究生. E-mail: [2503154740@qq.com](mailto:2503154740@qq.com)

通信作者: 罗越华(1965-), 男, 研究员. 研究方向: 水稻雄性不育的理论及盐胁迫的分子机制. E-mail: [lyhkh@163.com](mailto:lyhkh@163.com)

和耐旱机理的研究,其营养成分的定性和定量分析,以及不同品种代谢谱的自然变异尚未报道。因此,本研究利用超高效液相色谱-高分辨质谱联用技术建立了山栏稻种子代谢数据库,同时,还鉴定了一批用于筛选山栏稻优异种质资源的标记代谢物,旨在为山栏稻营养品质的改良提供优良亲本和丰富水稻育种的种质资源。

## 1 材料与amp;方法

**1.1 材料** 本研究选取的实验材料均由海南大学热带作物学院生物多样性与水稻种质创新实验室提供,包括10份山栏稻材料和5份普通水稻(表1)。样品采集:选取长势一致、成熟期一致的水稻植株进行收种,每份材料选取12株随机分为3个生物学重复。萌发试验:选取SR50和ZH11的种子进行萌发,待种子露白后开始计时,分别选取24、48、72 h的萌发种子进行代谢物检测分析。

表1 本实验的水稻品种信息  
Tab. 1 Rice varieties and sources

编号 Code	名称 Name	品种来源 Sources of varieties	分类 Classification	亚种 subspecies
SR31	19LD009	海南大学生物多样性与水稻种质创新实验室	地方品种	山栏稻
SR34	19LD036	海南大学生物多样性与水稻种质创新实验室	地方品种	山栏稻
SR36	19LD062	海南大学生物多样性与水稻种质创新实验室	地方品种	山栏稻
SR39	19LD091	海南大学生物多样性与水稻种质创新实验室	地方品种	山栏稻
SR43	19LD118	海南大学生物多样性与水稻种质创新实验室	地方品种	山栏稻
SR44	19LD136	海南大学生物多样性与水稻种质创新实验室	地方品种	山栏稻
SR45	19LD140	海南大学生物多样性与水稻种质创新实验室	地方品种	山栏稻
SR47	19LD142	海南大学生物多样性与水稻种质创新实验室	地方品种	山栏稻
SR49	19LD145	海南大学生物多样性与水稻种质创新实验室	地方品种	山栏稻
SR50	19LD131	海南大学生物多样性与水稻种质创新实验室	地方品种	山栏稻
DJ	东京	海南大学生物多样性与水稻种质创新实验室	常规品种	粳稻
HHZ	黄华占	海南大学生物多样性与水稻种质创新实验室	常规品种	籼稻
NIP	日本晴	海南大学生物多样性与水稻种质创新实验室	常规品种	粳稻
ZH11	中花11	海南大学生物多样性与水稻种质创新实验室	常规品种	粳稻
MH	明恢63	海南大学生物多样性与水稻种质创新实验室	常规品种	籼稻

**1.2 样品提取** 选取饱满的水稻种子进行脱壳,分别将糙米和颖壳研磨成粉末。称取0.1 g粉末样品,加入1.2 mL  $\varphi=70\%$ 的甲醇涡旋均匀,放到4 °C环境条件下萃取12 h后进行离心(4 °C, 10 000 g, 10 min)。吸取上清用0.22  $\mu\text{m}$ 的滤头过滤,滤液保存到进样瓶中待测。MIX样品:从每个提取样品溶液中吸取50  $\mu\text{L}$ 加入到进样瓶中,混合均匀作为质控样品,通过比较质控样品的稳定性来反映检测仪器的稳定性。

**1.3 仪器检测条件** 选取UPLC-Thermo Scientific Q EXACTIVE plus系统中Full MS/dd-MS<sup>2</sup>的模式进行代谢物检测。仪器:高效液相色谱(UltiMate 3000)-四级杆-Orbitrap(Q EXACTIVE plus)高分辨质谱(美国赛默飞世尔科技有限公司)。色谱条件:色谱柱为shim-pack VP-OSD(pore size 5.0  $\mu\text{m}$ )C18(日本岛津公司),流动相为水(含 $\varphi=0.04\%$ 乙酸)和乙腈(含 $\varphi=0.04\%$ 乙酸)。洗脱梯度: $V_{\text{水}}:V_{\text{乙腈}}=95:5, 0\text{ min}; V_{\text{水}}:V_{\text{乙腈}}=5:95, 10.0\text{ min}; V_{\text{水}}:V_{\text{乙腈}}=5:95, 11.0\text{ min}; V_{\text{水}}:V_{\text{乙腈}}=95:5, 11.1\text{ min}; V_{\text{水}}:V_{\text{乙腈}}=95:5, 15.0\text{ min}$ 。流速为0.4  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;柱温为40 °C;进样量为1  $\mu\text{L}$ 。质谱条件:HESI(可加热电喷雾离子源);正离子模式;鞘气辅助流速比例为40;辅助气流速比例为12;喷雾电压3 000 V;毛细管温度360 °C;S-

lens 电压 55.0 V; 辅助气加热温度 350 ℃; 离子扫描范围  $m/z$  50 ~ 1 500。

**1.4 数据处理** 利用 Compound discover(Compound Discover3.1.0.305, Thermo)软件对检测数据进行定量分析。首先,在软件中创建新的定量分析方法,导入原始的下机数据,根据样品类型对检测数据进行分类,最后,选择合适的工作流(workflow),调整相应参数进行定量和定性分析。主要参数设置如下:前体离子扫描范围 0 ~ 5 000 Da,信噪比阈值大于 1.5 S/N (signal to noise) Threshold >1.5,质量公差 (mass tolerance)  $5 \times 10^{-6}$  最大转换时间(Maximum shift) 2 min,最小峰强度(Min peak intensity)  $10^6$ ,洗脱时间(RT)的误差范围在 0.1 min。并且利用检测样品相对定量的原始数据进行主成分分析(principle component analysis, PCA)。利用 SPSS 软件对差异数据进行独立样本  $t$  检验分析。

## 2 结果与分析

**2.1 山栏稻与普通水稻种子的非靶向代谢组分析** 为了探究山栏稻和普通水稻种子间代谢物谱的差异,笔者利用超高效液相色谱-高分辨质谱联用技术对山栏稻和普通水稻种子的不同组织混合样品进行非靶向代谢组分析。首先,分别提取 4 个混合样品的总离子色谱图(TIC total ion chromatogram)进行比较分析,结果显示(图 1),山栏稻和普通水稻的糙米代谢谱 TIC 图形相似,只有部分代谢信号的强度存在差异(图 1-A);而颖壳间的代谢谱存在显著差异,部分代谢信号只有在山栏稻的颖壳组织中出现(图 1-B)。

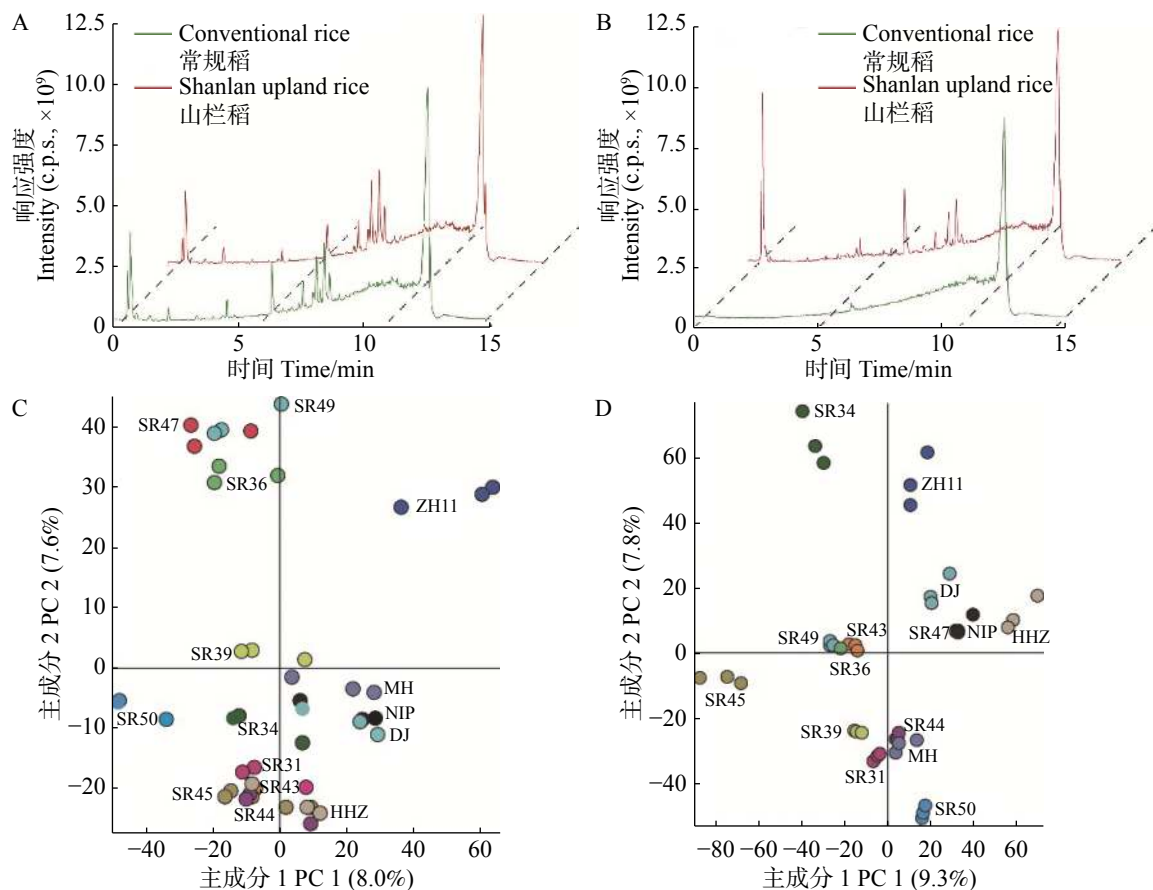


图 1 山栏稻和普通稻种子的代谢谱比较分析

A、B: 为水稻种子的糙米(A)和颖壳(B)非靶向代谢组检测的总离子流色谱图,其中,绿色的代表普通水稻,红色的代表山栏稻;C、D: 是水稻种子的糙米(C)和颖壳(D)代谢组的主成分分析。

Fig. 1 Comparative analysis of the metabolic profile of the seeds of Shanlan upland rice and conventional rice

A, B: The total ion chromatogram of non-targeted metabolome detection of brown rice (A) and glume shell (B) of rice seeds. The green represents conventional rice and the red represents Shanlan upland rice; C, D: Principal component analysis of the metabolome of brown rice (C) and glume shell (D) of the rice seeds.

结果表明,在糙米和颖壳2种组织中,山栏稻和普通水稻的代谢物种类和含量都存在显著差异,其中二者的颖壳代谢谱差异最显著。

为了解析山栏稻和普通水稻的代谢谱差异是由那些代谢物导致,笔者对10份山栏稻和5份普通水稻种子的糙米和颖壳进行非靶向代谢组分析,然后通过Compound discover软件对所检测的原始数据进行主成分分析(principal component analysis, PCA)。从图1-C可知,被检测的所有糙米样品明显的聚为2个分组,其中,第1主成分方向特征值占总方差值的8.0%,第2主成分方向特征值占总方差值的7.6%,说明山栏稻和普通水稻的糙米组织的代谢组存在显著差异。进一步分析所有代谢信号的贡献率,发现氨基酸、脂质和类黄酮等物质的贡献值较高(表2),这些代谢物决定了山栏稻和普通水稻的营养成分存在差异。在不同类型的颖壳样品中也得到了类似的结果,山栏稻和普通水稻可以分为2个明显的区域,其中,类黄酮和有机酸类物质贡献值比较高(表3),它们可能是影响山栏稻和普通水稻颖壳代谢差异的主要代谢物(图1-D)。水稻种子的非靶向代谢组结果表明,山栏稻和普通水稻种子的代谢组存在显著的差异,并且二者的营养成分也有明显的不同。

**2.2 山栏稻种子代谢数据库的建立** 为了建立山栏稻种子代谢数据库,对山栏稻种子高分辨质谱数据

表2 山栏稻糙米中部分代谢物的贡献率  
Tab. 2 Contribution rate of some metabolites in the brown rice of Shanlan upland rice

相对分子质量 Molecular mass	主成分1 PCA 1	主成分2 PCA 2	化合物名称 Compound	洗脱时间/min Retention time
354.276 43	0.034 378 9	0.000 918 437	1-Linoleoyl glycerol	9.701
302.042 38	0.028 997 9	0.010 197 6	Quercetin	3.976
519.332 24	0.028 574 7	-0.004 207 23	1-Linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	8.091
336.265 98	0.028 378 8	-0.004 709 19	1-Linoleoyl glycerol	7.886
517.316 27	0.028 177 8	0.002 056 97	LysoPC(18:3(9Z,12Z,15Z))	6.647
306.255 39	0.027 342 1	0.019 024 1	Linolenic acid ethyl ester	9.523
175.095 66	0.027 040 7	0.009 328 32	DL-Citrulline	0.737
298.250 43	0.026 830 9	0.004 084 56	ricinelaidic acid	9.425
181.074 04	0.026 607 3	0.014 026 1	L-Tyrosine	0.952

表3 山栏稻颖壳中部分代谢物的贡献率  
Tab. 3 Contribution rate of some metabolites in the glume shell of Shanlan upland rice

相对分子质量 Molecular mass	主成分1 PCA 1	主成分2 PCA 2	化合物名称 Compound	洗脱时间/min Retention time
386.136 07	0.015 757 9	-0.004 902 46	4'-Hydroxychalcone 4'-glucoside	5.466
478.110 56	0.015 471 6	0.000 835 281	Isorhamnetin 3-O-galactoside	4.378
206.058 07	0.015 443	-0.008 363 35	Sinapinic acid	3.259
556.157 3	0.015 091 2	0.000 527 638	Epicatechin-5-O-glucopyranoside-3-benzoate	5.422
148.052 31	0.015 055 7	0.000 478 577	Cinnamic acid	6.361
402.131 11	0.013 031 7	0.008 570 33	7-Hydroxyflavone-glucopyranoside	5.256
556.157 08	0.016 353 8	0.008 196 75	Epicatechin-5-O-glucopyranoside-3-benzoate	4.47
242.203 3	0.015 277 9	-0.000 825 511	10-Propoxydecanoic acid	8.974
302.078 91	0.015 036 1	0.000 469 467	Hesperetin	3.638
418.089 42	0.014 878 6	0.000 474 911	Luteolin 3'-xyloside	4.07

进行提取,共获得 6 809 个原始质谱信号。经过冗余信号的去重、峰型筛选,最终获得 1 058 个高质量的代谢信号。首先,利用标准品比对的方法进行物质鉴定,采用相同检测条件获取标准品数据包括洗脱时间 (retention time, RT)、 $[M+H]^+$ 精确荷质比 ( $m/z$ ) 和二级质谱碎片信息。代谢信号 (metabolite rice, mr) mr1008 的质荷比为 303.042 2, RT 为 5.20 min, 与槲皮素的质荷比和 RT 一致。通过比较二者的二级质谱碎片信息,发现 mr1 008 包含 285、257、229、153、137 和 121 等碎片与槲皮素的碎片信息基本一致。其中特征碎片 153 和 257 的响应强度较高,分别为  $1.86 \times 10^5$  和  $8.96 \times 10^4$ , 故鉴定该物质为槲皮素。在鉴定过程中发现 mr690 的质荷比为 639.195 7 与 Tricin 7-*O*-neohesperidoside 的质荷比 639.191 9 基本一致, RT 均为 4.28 min。mr690 的母离子丢失 2 种类型的糖基碎片 (五碳糖: 146 Da, 六碳糖: 162 Da), 形成 493 和 331 等特征碎片,其碎片强度分别  $2 \times 10^6$  和  $7 \times 10^6$ 。由于 mr690 的  $m/z$ 、RT 以及质谱裂解规律与 Tricin 7-*O*-neohesperidoside 一致,故鉴定 mr690 为 Tricin 7-*O*-neohesperidoside。本研究通过标准品比对的方法共鉴定到 126 个代谢物。

图 2 为亚麻酸乙酯的鉴定过程,在人工解谱的过程中,发现 mr220 的  $m/z$  为 307.262 4, 分子式为  $C_{20}H_{34}O_2$ , 与亚麻酸乙酯的  $m/z$  307.263 1 相近, RT 为 9.76 min, 故推断该物质可能为亚麻酸类物质 (图 2-A)。在 mr220 的二级质谱碎片中包含 261、243、123、95、67 等碎片信息,其中,261 碎片的产生说明 mr220 的结构式中包含酯键 (图 2-B), mr220 物质的碎片信息与亚麻酸乙酯推断的断裂碎片相一致,故鉴定该物质为亚麻酸乙酯 (图 2-C)。通过人工解谱的方式,本研究共鉴定到 519 个代谢物。本研究成功构建了包含 1 058 个代谢信号的山栏稻种子代谢数据库,其中 645 个 (61%) 的代谢信号被注释,413 个 (39%) 代谢信号未被注释,注释的代谢物中涵盖了氨基酸、脂质、有机酸、维生素和类黄酮等多种代谢物,其中,与营养品质相关的代谢物如氨基酸、脂质、类黄酮所占比例较高,分别为 12%、6% 和 4% (图 2-D)。

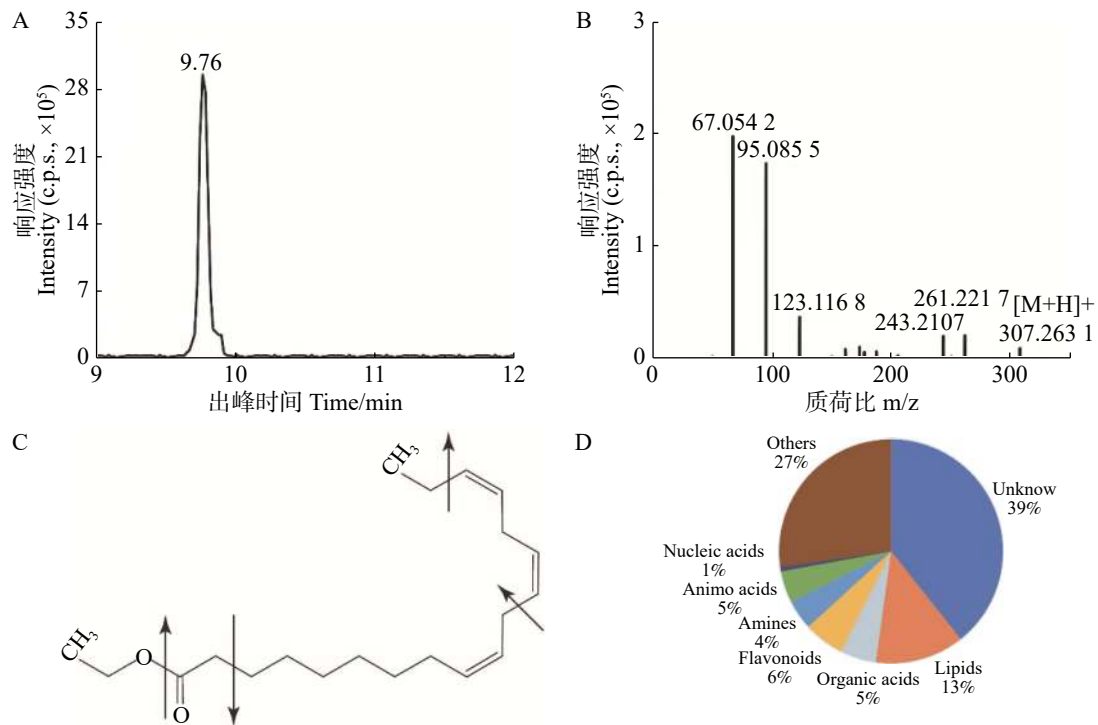


图 2 亚麻酸乙酯的鉴定和解析

A: mr220 在 9.76 min 时的色谱图; B: mr220 的二级质谱碎片信息; C: 亚麻酸乙酯的结构式及可能断裂的位置; D: 山栏稻种子代谢数据库的物质组成。

Fig. 2 Identification and analysis of ethyl linolenate

A: Chromatogram of mr220 at 9.76 min; B: MS-MS<sup>2</sup> fragment information of mr220; C: Structural formula of ethyl linolenic acid and possible fracture location; D: The metabolite composition of the Shanlan upland rice seed in the metabolism database.

**2.3 山栏稻和普通水稻种子中营养品质的代谢差异** 从图3可知:普通水稻与山栏稻种子间氨基酸总相对含量存在显著差异,普通水稻种子中氨基酸含量普遍高于山栏稻(图3-A),其中,脯氨酸和天冬氨酸的相对含量显著高于山栏稻,分别是山栏稻种子中含量的2.6倍和1.4倍;山栏稻种子中仅脯氨酸、酪氨酸和还原型谷胱甘肽的相对含量高于普通水稻,其中谷胱甘肽的相对含量是普通水稻种子中含量的1.2倍(图3-B,图3-C),说明山栏稻种子中仅部分氨基酸类物质含量高于普通水稻。

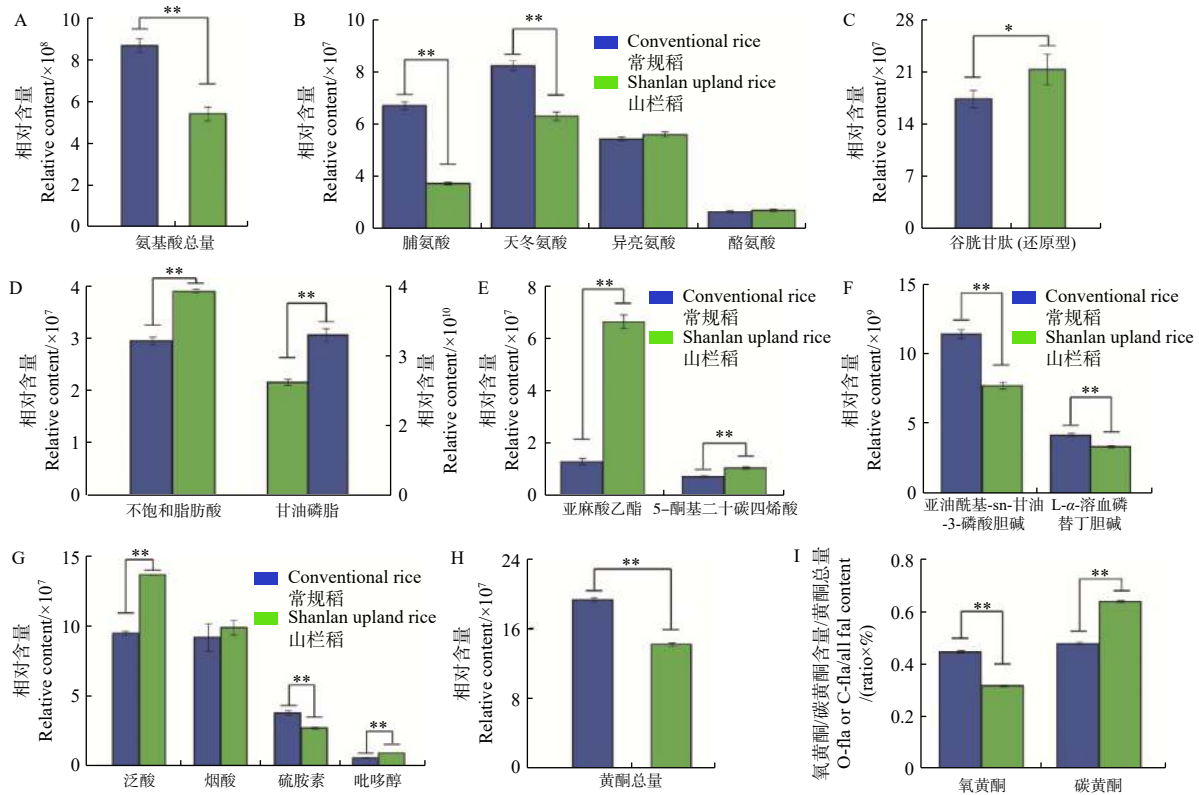


图3 山栏稻与普通水稻种子间营养物质含量的差异

A: 种子中氨基酸类物质总量; B: 种子中脯氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸和酪氨酸的含量差异; C: 种子中谷胱甘肽的含量差异; D: 种子中不饱和脂肪酸(左侧)和甘油磷脂(右侧)类物质总含量; E: 种子中亚麻酸乙酯和ETE的含量差异; F: 种子中甘油磷脂的含量差异; G: 种子中维生素类物质的含量差异; H: 种子中黄酮类物质总量; I: 种子中碳黄酮和氧黄酮的含量比例。\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ , 下同。

Fig. 3 The difference in nutrient content between the seeds of Shanlan upland rice and conventional rice

A: The total amount of amino acids in seeds; B: The difference in the contents of proline, aspartic acid, isoleucine and tyrosine in the seeds; C: The difference in the contents of glutathione in the seeds; D: The total content of unsaturated fatty acids (left) and glycerophospholipids (right) in the seeds; E: The difference in the contents of ethyl linolenate and 5-OxoETE in the seeds; F: The difference in the contents of glycerophospholipids in the seeds; G: The difference in the contents of vitamins in the seeds; H: Total content of flavonoids in the seeds; I: The ratio of C-flavonoids and O-flavonoids in seeds. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; similarly hereinafter.

本研究发现,山栏稻与普通水稻种子中脂类物质的积累存在显著差异,山栏稻种子中不饱和脂肪酸的相对总含量为 $4 \times 10^7$ ,显著高于普通水稻,其中,亚麻酸乙酯的相对含量是普通水稻的5.1倍;普通水稻种子中甘油磷脂的相对总含量是山栏稻的1.4倍,其中,1-亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱的相对含量是普通水稻的1.4倍(图3-D,图3-E,图3-F);说明山栏稻种子中不饱和脂肪酸的含量显著高于普通水稻,甘油磷脂的含量低于普通稻。比较山栏稻与普通水稻种子中维生素类物质的含量,发现山栏稻种子中大部分维生素类物质含量显著高于普通水稻(图3-G)。比较分析发现,普通水稻种子中黄酮类物质的相对总含量显著高于山栏稻,是山栏稻种子中含量的1.36倍(图3-H)。普通水稻种子中氧黄酮(氧黄酮,糖羟基与类黄酮的羟基脱水缩合,形成C-O糖苷键)和碳黄酮(碳黄酮,糖与类黄酮母核上直接脱水结合,形成

C-C)的总相对含量均高于山栏稻,说明普通水稻种子中黄酮类物质含量高于山栏稻,但山栏稻种子中碳黄酮所占比例(碳黄酮相对总含量(水稻种子中检测到的碳黄酮物质的总和)/黄酮总含量)为0.63,大于普通水稻的0.47,氧黄酮所占比例[氧黄酮相对总含量(水稻种子中检测到的氧黄酮物质的总和)/黄酮总含量]为0.31,低于普通水稻的0.44(图3-I)。说明山栏稻种子中碳黄酮所占比例高于普通水稻,氧黄酮所占比例低于普通水稻。

**2.4 种子萌发过程中营养品质相关代谢物变化规律** 图4展示了山栏稻种子萌发过程中部分代谢物的含量变化趋势。通过比较分析发现,在种子萌发初期,山栏稻与普通水稻中脯氨酸的相对含量相近,无明显差异;在24~48 h阶段脯氨酸的相对含量达到 $1.05 \times 10^9$ ,远高于普通水稻;随后山栏稻种子中脯氨酸的积累速率下降,但脯氨酸的相对含量依然显著高于普通水稻(图4-A)。蔡能等<sup>[13]</sup>研究发现,植物体内游离脯氨酸含量越高抗逆能力越强,说明山栏稻种子萌发过程中的抗逆能力强于普通水稻。在种子萌发过程中亚麻酸乙酯也存在类似的积累模式,在萌发初期山栏稻种子中的亚麻酸乙酯含量低于普通水稻;在24~48 h阶段山栏稻种子中的亚麻酸乙酯快速积累;48 h时,其相对含量达到最高,为 $2.81 \times 10^7$ ,是普通水稻的4.66倍,然后其含量迅速下降(图4-B)。泛酸在种子萌发过程中的积累模式与亚麻酸乙酯类似均

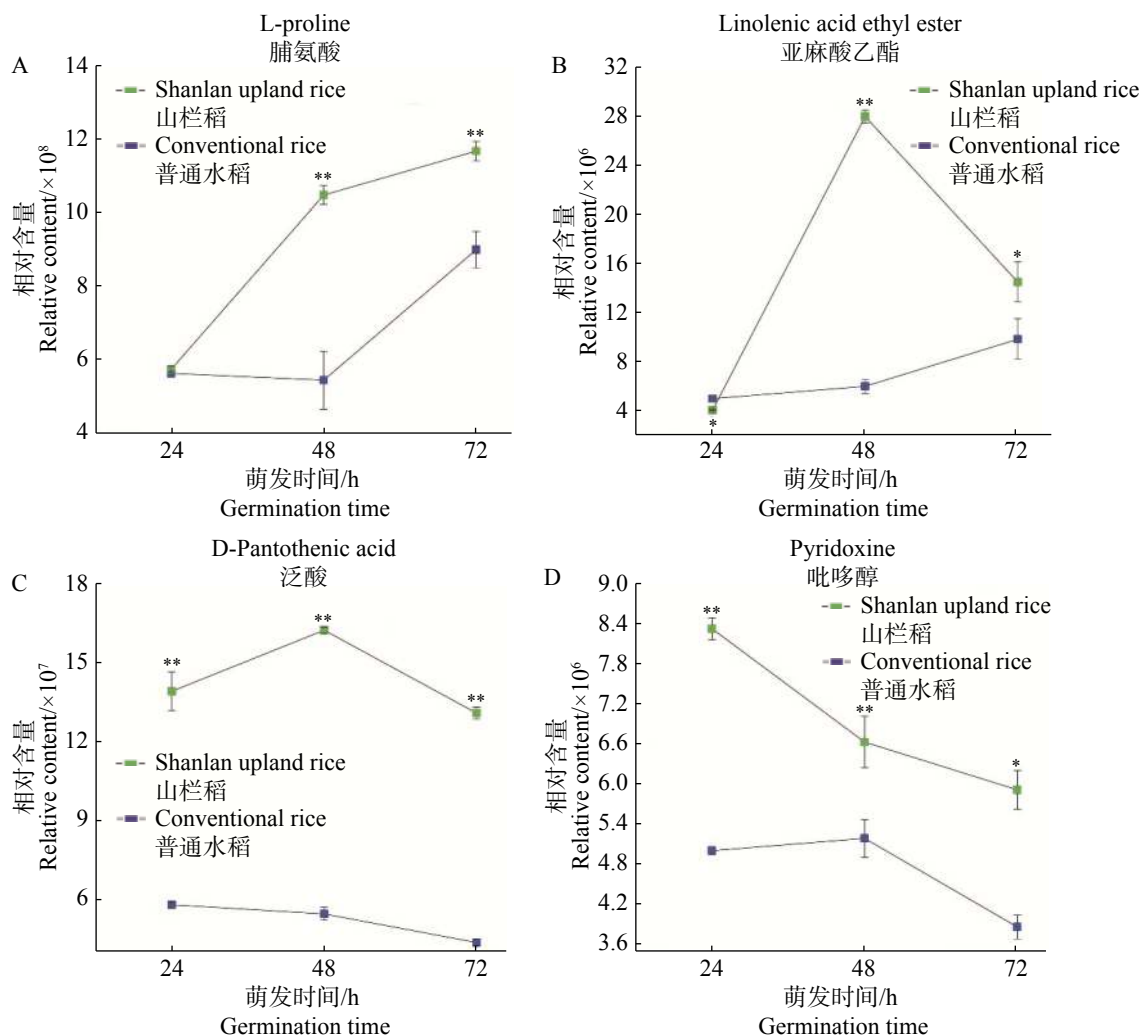


图4 种子萌发过程中4种代谢物的含量变化

A: 脯氨酸在种子萌发过程中的含量变化; B: 亚麻酸乙酯在萌发过程中的含量变化; C、D: 种子萌发过程中泛酸和吡哆醇的含量变化。

Fig. 4 Changes in the content of metabolites during seed germination

A: Changes in the content of proline during seed germination; B: Changes in the content of ethyl linolenate during germination; C, D: Changes in the contents of pantothenic acid and pyridoxine during seed germination.

是先升高后降低,但在山栏稻萌发过程中泛酸含量始终显著高于普通水稻(图4-C)。在种子萌发过程中山栏稻种子中吡哆醇的积累模式与上述代谢物的积累存在明显差异。在山栏稻萌发过程中吡哆醇含量持续下降,在萌发初期山栏稻种子中吡哆醇的相对含量显著高于普通水稻;在24~48 h阶段山栏稻种子中的吡哆醇含量迅速下降,在48 h吡哆醇的相对含量仅为普通水稻中的1.28倍;后期吡哆醇的含量缓慢下降,但总体含量依然显著高于普通水稻(图4-D)。

### 3 讨论

山栏稻是海南地区特有的早稻种质资源,但关于山栏稻种子代谢组学的研究还存在许多未知。本研究利用超高效液相色谱高分辨质谱联用技术,成功构建了山栏稻种子代谢数据库。通过比较山栏稻与普通水稻种子间的代谢差异,发现山栏稻与普通水稻间代谢物的积累存在差异,导致代谢差异的主要原因可能是遗传基础。在研究水稻进化和自然变异过程中,发现不同亚种间遗传信息的差异,导致代谢物的积累存在差异<sup>[14-15]</sup>。袁楠楠等<sup>[16]</sup>研究发现,山栏稻是不属于普通野生稻的栽培农家种,说明山栏稻具有独特的遗传基础。因此,导致山栏稻与普通水稻代谢差异的根本原因是遗传基础的差异。

本研究发现,山栏稻种子中谷胱甘肽、亚麻酸乙酯、泛酸和吡哆醇的含量均显著高于普通水稻,导致代谢差异的原因可能是栽培方式的不同。山栏稻主要以旱作栽培为主,普通水稻主要以水作栽培为主;与普通水稻相比山栏稻的生长环境更复杂,容易发生干旱、高温、冷害等非生物胁迫<sup>[17-18]</sup>。生长环境的不同,会导致植物体内代谢物的积累和合成途径发生改变。水稻在干旱、冷害等胁迫条件处理下,体内的谷胱甘肽、脂肪酸、吡哆醇含量会增加<sup>[19]</sup>。因此,栽培方式也会影响植物体内代谢物的积累。本研究发现,山栏稻种子中碳黄酮所占比例高于普通水稻,氧黄酮所占比例低于普通稻。研究发现,氧黄酮可以预防苗期根腐病,碳黄酮可以预防病虫害<sup>[20-21]</sup>。因为碳黄酮和氧黄酮生理功能的差异,所以栽培方式是引起山栏稻与普通水稻种子中黄酮比例差异的主要原因。

本研究发现,在种子萌发过程中,山栏稻种子中吡哆醇的含量逐渐下降,普通水稻种子中吡哆醇的含量逐渐升高。在种子萌发过程中,吡哆醇参与调节种子胚根的形成<sup>[22]</sup>。非生物胁迫条件下,也会影响植株的正常发育,从而导致生长周期的改变<sup>[23]</sup>。说明引起山栏稻和普通水稻萌发过程中代谢物积累差异的原因是种子萌发机理的不同。本研究构建的山栏稻种子代谢数据库,能为深入研究山栏稻种子营养品质提供依据。

### 参考文献:

- [1] 陈成斌, 赖群珍. 我国特种稻研究概述[J]. 广西农业科学, 1993(2): 58-61.
- [2] 叶凡, 杨小波, 党金玲, 等. 中国山栏稻的研究进展[J]. 作物杂志, 2008(2): 12-15.
- [3] 杨国峰, 黄春燕, 王波, 等. 海南山栏稻米品质分析及优异资源筛选[J]. 植物遗传资源学报, 2017, 18(1): 40-45.
- [4] 郑成木, 黄东益, 陈辉. 海南山栏稻种质类缘与杂交育种利用的研究[J]. 热带作物学报, 1998(2): 74-81.
- [5] LUO J. Metabolite-based genome-wide association studies in plants [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2015, 24: 31-8.
- [6] LI Y, CHEN Y, ZHOU L, et al. MicroTom metabolic network: Rewiring tomato metabolic regulatory network throughout the growth cycle [J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1203-1218.
- [7] CHEN W, WANG W, PENG M, et al. Comparative and parallel genome-wide association studies for metabolic and agronomic traits in cereals [J]. *Nature Communications*, 2016, 7(1): 223-230.
- [8] ZHU G, WANG S, HUANG Z, et al. Rewiring of the fruit metabolome in tomato breeding [J]. *Cell*, 2018, 172(1/2): 249-261.
- [9] WANG S, TU H, WANG J, et al. Spatio-temporal distribution and natural variation of metabolites in citrus fruits [J]. *Food Chemistry*, 2016, 199: 8-17.
- [10] CHEN W, GONG L, GUO Z, et al. A novel integrated method for large-scale detection, identification, and quantification of widely targeted metabolites: Application in the study of rice metabolomics [J]. *Molecular Plant*, 2013, 6(6): 1769-1780.
- [11] 蒋家焕, 王玲, 叶新福, 等. 特种稻黑米遗传研究进展[J]. 福建稻麦科技, 1999(1): 5-8.
- [12] ZHU Q, YU S, ZENG D, et al. Development of "Purple Endosperm Rice" by engineering anthocyanin biosynthesis in the endosperm with a high-efficiency transgene stacking system [J]. *Molecular Plant*, 2017, 10(7): 918-929.
- [13] 蔡能, 王晓明, 曾慧杰, 等. 3个金银花新品种逆境条件下脯氨酸含量初步分析[J]. 中南林业科技大学学报, 2012,



- 32(5): 161 – 165.
- [14] HUANG X, KURATA N, WEI X, et al. A map of rice genome variation reveals the origin of cultivated rice [J]. *Nature*, 2012, 490(7421): 497 – 501.
- [15] DONG X, GAO Y, CHEN W, et al. Spatiotemporal distribution of phenolamides and the genetics of natural variation of hydroxycinnamoyl spermidine in rice [J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(1): 111 – 121.
- [16] 袁楠楠, 魏鑫, 薛达元, 等. 海南黎族聚居区山栏稻的起源演化研究[J]. *植物遗传资源学报*, 2013, 14(2): 202 – 207.
- [17] 吴丹, 吴川德, 何美丹, 等. 水作和旱作对山栏稻生长的影响[J]. *热带生物学报*, 2017, 8(3): 318 – 323.
- [18] 刘志超, 黄孟雨, 翟楠鑫, 等. 水旱两种栽培模式下海南山栏稻对白叶枯病抗性鉴定与评价[J]. *植物保护*, 2021(1): 1 – 11.
- [19] ZHANG J, LUO W, ZHAO Y, et al. Comparative metabolomic analysis reveals a reactive oxygen species - dominated dynamic model underlying chilling environment adaptation and tolerance in rice [J]. *New Phytologist*, 2016, 211(4): 1295 – 1310.
- [20] DONG N, SUN Y, GUO T, et al. UDP-glucosyltransferase regulates grain size and abiotic stress tolerance associated with metabolic flux redirection in rice [J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 2629.
- [21] LAM P, LUI A, YAMAMURA M, et al. Recruitment of specific flavonoid B - ring hydroxylases for two independent biosynthesis pathways of flavone - derived metabolites in grasses [J]. *New Phytologist*, 2019, 223(1): 204 – 219.
- [22] CHEN H, XIONG L. Pyridoxine is required for post - embryonic root development and tolerance to osmotic and oxidative stresses [J]. *Plant Journal*, 2005, 44(3): 396 – 408.
- [23] GONG Z, XIONG L, SHI H, et al. Plant abiotic stress response and nutrient use efficiency [J]. *Science China. Life Sciences*, 2020, 63(5): 635 – 674.

## Analysis of the Metabolic Profile of the Nutritional Quality of Shanlan Upland Rice Based on High Performance Liquid Chromatography-mass Spectrometry

ZHANG Zhonghui, DENG Yuan, QIANG Qi, CHEN Ridong, YANG Jun, LIU Xianqing,  
WANG Shouchuang, YUAN Qianhua, LUO Jie, LUO Yuehua  
(School of Tropical Crops/Hainan Key Laboratory of Sustainable Utilization of Tropical  
Biological Resources, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

**Abstract:** Seeds of 10 accessions of Shanlan upland rice were determined by using ultra-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry to establish a Shanlan upland rice seed metabolism database, based on which the metabolites of the seeds of different types of Shanlan upland rice before germination and at different germination stages were analyzed by performing quantitative analysis. A database for Shanlan upland rice seed metabolism containing 1 058 metabolic signals was constructed, including 645 known substances such as amino acids, lipids, vitamins, and flavonoids. Comparison and analysis of the metabolic profile of the seeds of Shanlan upland rice and conventional rice found that the relative contents of unsaturated fatty acids, vitamins and other substances were higher in Shanlan upland rice seeds than in the conventional rice seeds. While the contents of glycerophospholipids and flavonoids were lower in the Shanlan upland rice seeds than in the conventional rice. During seed germination, there were differences in the accumulation patterns of metabolites in the seeds of the Shanlan upland rice and the conventional rice, especially in the accumulation of proline, ethyl linolenate, pantothenic acid and pyridoxine.

**Keywords:** Shanlan upland rice; metabolomics; amino acids; flavonoids; lipids