

冯玉超, 杨宏志, 安宇, 等. 不同产地稻花香水稻代谢产物差异分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(1): 10–20. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050103

FENG Yuchao, YANG Hongzhi, AN Yu, et al. Analysis on the Difference of Daohuaxiang Rice Metabolites in Different Producing Areas[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(1): 10–20. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050103

不同产地稻花香水稻代谢产物差异分析

冯玉超¹, 杨宏志^{1,2}, 安宇^{1,2}, 张舒¹, 盛亚男¹, 王长远^{1,2,*}

(1.黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江大庆 163319;

2.国家杂粮工程技术研究中心, 黑龙江大庆 163319)

摘要: 基于气相色谱与质谱联用 (GC-MS) 的代谢组学技术, 对黑龙江省宁安市和五常市两个产地的水稻代谢产物与代谢差异进行研究。使用 SIMCA 软件和 R 软件对数据进行多元统计分析。结果表明, 产地对稻花香水稻代谢物的数量、含量、种类及种类占比均具有影响, 两产地水稻样本共定性到 127 个代谢物, 筛选出 22 个差异代谢物, 且发现产地对脂肪酸及其衍生物含量的影响最明显。代谢途径分析结果表明, 不同产地间水稻代谢差异机制主要在于脂肪酸类物质的代谢, 亚油酸、棕榈酸和富马酸是三种关键代谢物。本研究从代谢产物组成方面对不同产地的稻花香水稻代谢差异进行分析, 可为水稻产地区分及农产品溯源提供理论支撑。

关键词: 产地, 代谢组学, 水稻, 气相色谱与质谱联用 (GC-MS), 差异机制

中图分类号: TS21

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)01-0010-11

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050103

本文网刊:



Analysis on the Difference of Daohuaxiang Rice Metabolites in Different Producing Areas

FENG Yuchao¹, YANG Hongzhi^{1,2}, AN Yu^{1,2}, ZHANG Shu¹, SHENG Yanan¹, WANG Changyuan^{1,2,*}

(1.College of Food, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;

2.Chinese National Engineering Research Center, Daqing 163319, China)

Abstract: Based on the metabolomic technique of GC-MS, the metabolites and metabolic differential mechanism of rice from Ning'an and Wuchang city were studied. SIMCA and R software were used for multivariate statistical analysis of the data. The results showed that the place of production had an influence on the quantity, content, type and proportion of the metabolites of Daohuaxiang rice. A total of 127 metabolites were identified in rice samples from the two regions. A total of 22 different metabolites were screened out through the analysis of the differences between the samples from the two regions. And it was found that the origin had the most significant influence on the contents of fatty acids and their derivatives. The results of metabolic pathway analysis showed that the main mechanism of rice metabolism difference in different producing areas was the metabolism of fatty acids. Linoleic acid, palmitic acid and fumaric acid were the three key metabolites. And the difference of metabolites type and content was related to rice quality. The research analyzes the different mechanisms of rice metabolism in different producing areas from the aspect of metabolite composition, which can provide theoretical support for the regional differentiation of rice production and the traceability of agricultural products.

Key words: origin; metabonomics; rice; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); difference mechanism

水稻是我国主要的粮食作物, 它含有丰富的营养成分和人体必需的微量元素, 可满足机体健康需求^[1-2]。不同的地理位置以及环境因素使得水稻品种

多样、类型丰富, 同时其质量品质也存在显著差异。生活水平的不断提高使得人们更加注重稻米风味及营养品质, 地理标志稻米产品品质优味美, 虽价格较高,

收稿日期: 2021-05-13

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFE0206300); 黑龙江省自然科学基金研究团队项目 (TD2020C003); 黑龙江省自然科学基金项目 (LH2019C054); 黑龙江八一农垦大学研究生创新项目 (YJSCX2021-Z04)。

作者简介: 冯玉超 (1993-), 女, 博士研究生, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: byndfyc@qq.com。

* 通信作者: 王长远 (1976-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品科学与工程、粮食、油脂及植物蛋白质工程, E-mail: byndwcy@163.com。

但供不应求。故稻米市场中频繁出现交易行为不规范的情况,违法者利用这些品牌严重损害市场秩序与原产地产品的价值,使消费者权益得不到保障,面对众多食品安全及市场问题,产地识别或溯源成为解决该问题的有效手段。

目前,应用于实际生活的溯源手段为数据编码记录技术,技术门槛不高,易于在产业中推行,但因其相关信息均可被人为更改或操纵,故仍需挖掘更真实、有效的溯源方法及手段。近年,国内外也开展了大量关于水稻产地溯源方面的研究,如采用稳定同位素技术^[3-4]、近红外光谱技术^[5]、矿物元素分析技术^[6-7]、有机组分指纹图谱技术^[8]、拉曼光谱技术^[9-10]、顶空固相微萃取-气质联用技术^[11-12]等进行溯源,这些方式与大米产地的气候、土壤、温度等相关的同位素组成、矿物元素含量、化学成分组成及风味特征物质等相关,而近年更关注水稻本身特性的代谢组学溯源方法逐渐成为研究热点^[13-16]。产地环境对水稻的生长具有重要的影响,不同产地生长的水稻其代谢也会存在差异,最终代谢通路的终端物质则会将这些差异体现出来,水稻的代谢物就是代谢过程的终端物质。王玲^[17]发现水稻种子在不同生长环境、不同传代以及转入外来基因的情况下,其代谢产物都会发生不同程度的改变,且与基因修饰的影响相比较,不同生长环境对水稻代谢物带来的影响更大。程建华等^[18]对海南和武汉的转 *Bt* 基因大米进行了代谢组学研究,发现转 *Bt* 基因大米与其亲本大米中甘油和鼠李糖两种代谢物的含量存在显著性差异,产地对大米间代谢组学的差异影响要显著强于外源基因。

对水稻代谢物进行研究,可以从一个新的角度,直观地分析不同产地水稻的差异,从而为水稻及农产品的产地鉴别以及溯源提供新的研究方向。本研究基于 GC-MS 的代谢组学平台,以稻花香品种水稻为研究对象,通过两产地稻花香水稻在代谢物水平的差异分析,对不同产地间水稻的品质以及代谢差异机制进行分析,为水稻产地区分及农产品溯源提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

稻花香水稻 采自黑龙江省宁安(NA)和五常(WC)两个地理标志稻米保护区,五常地区样品采集点分布于 9 个农场,宁安地区样品采集点分布于 7 个农场,每个保护区共采集 20 个糙米样品(后文图中的 NA 代表宁安地区样本,WC 代表五常地区样本),两产地稻花香水稻施肥、浇灌水源以及耕作方式具有统一性。在大田收割前于保护范围内依据代表性采样原则,采用五点采样法进行随机采集,每个地块随机设置 5 个重复点,从每个位置收集 1~2 kg 的稻穗。将收集的稻谷样品清洗干净并风干至水分含量为 14%~15%,在稻穗顶部相同的位置将稻谷脱粒,然后装入尼龙网眼袋中,实验前将样品混合均匀,

水稻样品采集自 2019 年;吡啶($\geq 99.9\%$ 色谱纯)、甲醇(色谱纯) 阿拉丁试剂有限公司;2-氯苯丙氨酸(纯度 98.5%)、甲氧基胺盐酸盐(纯度 98%)、N,O-双(三甲基硅)三氟乙酰胺(含三甲基氯硅烷)99% BSTFA+1%TMCS 均购自麦克林试剂有限公司。

7890A/5975C GC-MS 美国 Agilent 公司;色谱柱 HP-5ms(30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m) Agilent J & W Scientific 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备 样品处理方法和色谱方法参照程建华等^[18]和 ZHOU 等^[19]的方法并略有修改。水稻种子液氮研磨后称取 50 mg 粉末于 2 mL 的 EP 管中,加入 800 μ L 甲醇涡旋混匀 30 s,而后置于 4 $^{\circ}$ C 离心机中,12000 r/min 离心 15 min,之后吸取 200 μ L 上清液转入进样小瓶中氮气吹干。衍生化:取 30 μ L 甲氧基胺盐酸吡啶溶液至浓缩后的样品中,涡旋混匀至完全溶解,置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱 90 min,取出后加入 30 μ L BSTFA,置于 70 $^{\circ}$ C 烘箱 60 min,取出后待检测。衍生化处理后 24 h 内分析所有样品。

1.2.2 GC-MS 检测 分析平台:Agilent 7890A/5975C GC-MS。用自动进样器进样 1 μ L。色谱柱为 30 m 的 HP-5ms,色谱柱的内径为 0.25 mm,膜厚为 0.25 μ m。采取不分流进样,进样温度为 280 $^{\circ}$ C,界面设置为 250 $^{\circ}$ C,离子源调节为 230 $^{\circ}$ C,四极杆温度调节至 150 $^{\circ}$ C。使用氦气(纯度 $>99.999\%$)作为载气,固定流速为 2 mL/min。温度设定为:80 $^{\circ}$ C 下等温加热 2 min,然后以 10 $^{\circ}$ C/min 将温度升至 320 $^{\circ}$ C,最后维持 320 $^{\circ}$ C 加热 6 min。在注入下一个样品之前系统在 80 $^{\circ}$ C 温度下平衡 6 min。使用全扫描模式,扫描范围为 50~550 m/z。

1.2.3 数据分析 GC-MS 代谢组学数据分析由上海百趣生物医学科技有限公司进行。在 R 软件平台下使用 XCMS 软件包提取 GC-MS 数据并进行预处理,然后将已编辑的数据矩阵导入 SIMCA 软件(V14.1, Sartorius Stedim Data Analytics AB, Umea, Sweden),进行主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘-判别分析(OPLS-DA)等多元统计分析,之后根据学生 *t* 检验(student's *t*-test)的 *P* 值(*P*-value)小于 0.05,同时 OPLS-DA 模型第一主成分的变量投影重要度(variable importance in the projection, VIP)大于 1,进行差异性代谢产物的筛选。

根据保留时间和质荷比(*m/z*),在 Fiehn 代谢组数据库中代谢物及差异代谢物的定性。对单个峰基于四分位数距对偏离值进行过滤以去除噪音,只保留单组空值不多于 50% 或所有组中空值不多于 50% 的峰面积数据,其次对原始数据中的缺失值进行模拟,数值模拟方法为最小值二分之一法进行填补,最后进行数据标准化处理,利用每个样本的总离子流进行归一化,可为代谢物进行定量。

对筛选出的差异代谢物进行 KEGG^[20] 注释,检

索出差异代谢物映射的所有通路,然后通过对差异代谢物所在通路的综合分析(包括富集分析和拓扑分析),对通路进行进一步的筛选,找到与代谢物差异相关性最高的关键通路。

2 结果与分析

2.1 离子流色谱图

通过对 GC-MS 原始数据的处理,五常地区稻花香样本共检测出 291 个峰,宁安地区稻花香样本共检测出 318 个峰,两产地稻花香的离子流色谱图如图 1 和图 2 所示,两个产地间的稻花香样本的总离子流色谱图大体相近,但存在一定的差异性,色谱峰基线平稳。

2.2 代谢物定性结果分析

代谢物通过 Fiehn 数据库进行定性,相似度越接近 1000 越准确,但是组学中代谢产物多数为中间代谢产物,并不是所有物质均有标准品可依据,故存在部分代谢产物相似度不是特别高的情况。两产地共鉴定到 127 个代谢物,五常地区鉴定出 99 个代谢物,宁安地区鉴定出 104 个代谢物(标注见图 1 和图 2),两产地稻花香水稻同时拥有的代谢物有 76 个,两产地相比较,五常地区独有的代谢物有 23 个,宁安地区独有的代谢物有 28 个。代谢物定性结果如表 1 所示,序号 1~76 为共有代谢物,序号 77~99 为五常地区稻花香水稻独有的代谢物,序号 100~127 为宁安地区稻花香水稻独有代谢物。

由表 1 可知,从宁安和五常产地的大米中鉴定出的代谢物包括脂肪酸及其衍生物,氨基酸及其衍生物,糖类及其衍生物,固醇类和其他物质,其他类包括胺、醛、烷烃、腺苷、有机酸、无机盐、酮、烯烃、嘌呤等。从数量上看,五常产地的稻花香样品中,各种物质的比例为脂肪酸及其衍生物占 22.22%,糖及其衍生物占 27.27%,氨基酸及其衍生物占 7.07%,醇及其衍生物占 10.10%,酚类占 7.07%,类固醇及其衍生物占 2.02%,其他类占 24.24%。宁安产地的稻花香样品中,各种物质的比例为脂肪酸及其衍生物占 19.23%,糖及其衍生物占 31.73%,氨基酸及其衍生物占 7.69%,醇及其衍生物占 10.58%。酚类占 4.81%,类固醇及其衍生物占 2.88%,其他类占 23.08%。对比可知,五常产地的稻花香水稻中脂肪酸及其衍生物、酚类物质以及其他类物质在数量上所占的比例要高于宁安地区。宁安产地的稻花香水稻中糖类及其衍生物、氨基酸及其衍生物和固醇类物质在数量上所占的比例要高于五常地区。研究表明,氨基酸除了用于蛋白质的合成外,还是次生代谢产物(如激素和植物防御相关物质)的前体,氨基酸的合成直接或间接影响植物生长发育的各个方面^[21]。糖的代谢和运输分布影响糖类进入储库细胞以及糖在储库细胞中的储存,从而影响植物材料的质量。稻米中的脂类物质(甘油酯类、游离脂肪酸、固醇类等)含量很少,但在水稻生长发育期间的代谢变化对其生长适应性有重要影响,对植物细胞骨架重塑、生长发育、逆境

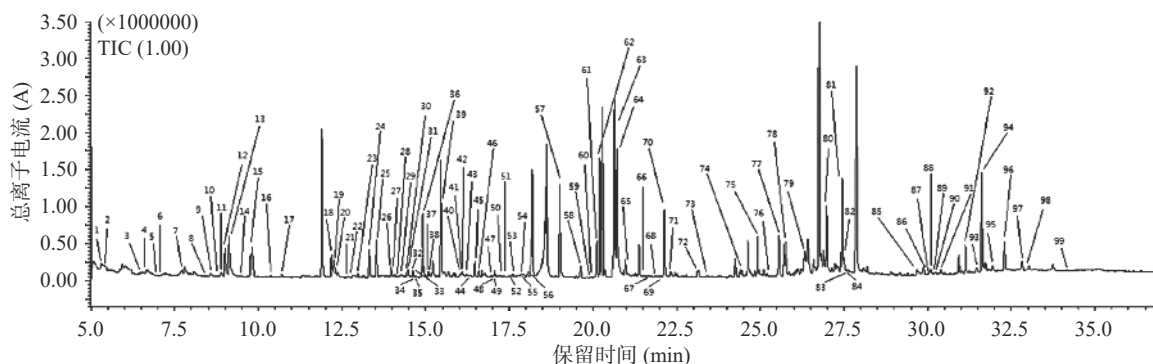


图 1 五常稻花香典型样本总离子流色谱图

Fig.1 Total ion chromatogram of typical samples in the WC

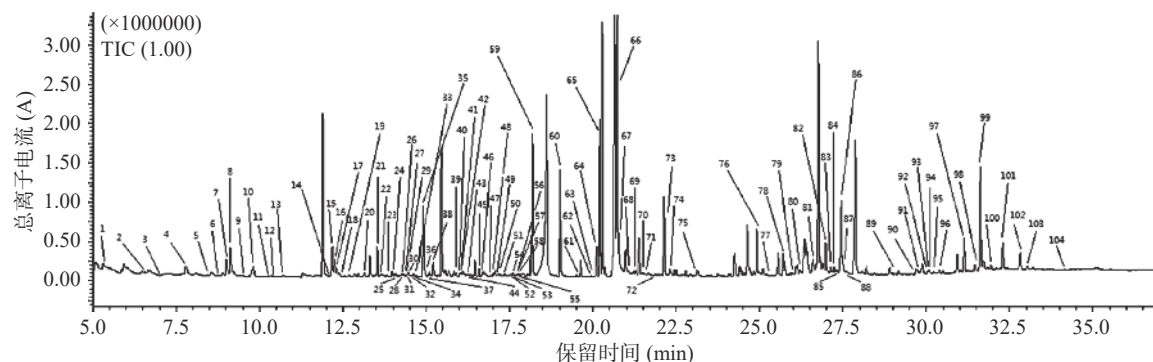


图 2 宁安稻花香典型样本总离子流色谱图

Fig.2 Total ion chromatogram of typical samples in the NA

表 1 代谢产物定性结果
Table 1 Qualitative results of metabolites

序号	保留时间(min)	质核比	相似度	英文名称	中文名称	WC	NA
1	5.36	119	780	hydroxylamine	羟胺	+	+
2	6.53	119	769	o-toluic acid	邻甲苯甲酸	+	+
3	7.17	128	818	cyclohexylamine	环己胺	+	+
4	7.70	120	653	phenylalanine minor	苯丙氨酸小体	+	+
5	8.53	147	880	glycerol	甘油	+	+
6	8.89	141	863	cyanoalanine	氰丙氨酸	+	+
7	9.10	142	410	proline	脯氨酸	+	+
8	9.50	117	726	digitoxose	洋地黄糖	+	+
9	9.77	148	777	benzylalcohol	苄醇	+	+
10	10.40	158	721	trans-4-hydroxy-L-proline	反式-4-羟基-L-脯氨酸	+	+
11	10.73	85	481	tetracosane	二十四烷	+	+
12	12.32	103	763	2-monolein	2-单油酸甘油酯	+	+
13	12.55	143	599	phytol	植醇	+	+
14	12.69	131	644	capric acid	癸酸	+	+
15	12.96	184	535	citrulline minor	瓜氨酸微量	+	+
16	13.61	145	628	diglycerol	二甘醇	+	+
17	13.84	170	663	1-methyladenosine minor	1-甲基腺苷小体	+	+
18	13.97	217	759	deoxypentitol	去氧戊醇	+	+
19	14.24	355	731	epicatechin 1	表儿茶素1(黄烷衍生物)	+	+
20	14.35	129	715	2-monopalmitin	2-单软脂酸甘油酯	+	+
21	14.45	129	822	cholesterol	胆固醇	+	+
22	14.47	143	679	dehydroascorbic acid 2	脱氢抗坏血酸2(烯醇)	+	+
23	14.59	245	564	fumaric acid	富马酸	+	+
24	14.60	147	882	pentonic acid	戊酸	+	+
25	14.62	217	916	UDP-glucuronic acid	尿苷二磷酸葡萄糖醛酸	+	+
26	14.91	97	950	myristyl myristate	肉豆蔻醇肉豆蔻酸酯	+	+
27	15.21	204	940	levoglucosan	左旋葡聚糖	+	+
28	15.23	365	713	1-monolein	1-单油酸甘油酯	+	+
29	16.01	217	705	xylonolactone	木内酯	+	+
30	16.09	217	891	glucose-1-phosphate	葡萄糖-1-磷酸	+	+
31	16.23	145	575	fructose	果糖	+	+
32	16.29	217	588	UDP-N-acetylglucosamine	糖胺	+	+
33	16.59	116	680	gluconic acid lactone	葡萄糖酸内酯	+	+
34	16.60	85	805	1,5-anhydroglucitol	1,5-脱水葡萄糖醇	+	+
35	16.94	204	817	methylhexose nist	甲基己糖NIST	+	+
36	17.00	217	873	ribose	核糖	+	+
37	17.25	117	743	myristic acid	肉豆蔻酸	+	+
38	17.42	161	593	aspartate minor	天门冬氨酸盐	+	+
39	17.54	103	914	tagatose	塔格糖	+	+
40	17.60	117	647	glucose overload	葡萄糖超量	+	+
41	17.76	319	967	glucose	葡萄糖	+	+
42	18.18	217	868	galactitol	半乳糖醇	+	+
43	18.89	217	765	Unknown	未知物	+	+
44	19.63	117	965	palmitic acid	棕榈酸	+	+
45	19.93	355	684	epigallocatechin	表没食子儿茶素	+	+
46	19.95	204	875	N-acetylgalactosamine	N-乙酰半乳糖胺	+	+
47	20.11	305	897	conduitrol-beta-expoxide	连翘酯β-环氧丙烷	+	+
48	20.29	97	596	hypoxanthine	次黄嘌呤	+	+
49	20.71	97	770	d6 cholesterol	D6胆固醇	+	+
50	20.75	237	664	alpha-tocopherol	α-生育酚	+	+
51	21.51	138	857	linoleic acid	亚油酸	+	+
52	21.58	117	891	oleic acid	油酸	+	+
53	21.86	117	835	stearic acid	硬脂酸	+	+

续表 1

序号	保留时间(min)	质核比	相似度	英文名称	中文名称	WC	NA
54	22.36	89	714	linolenic acid	亚麻酸	+	+
55	24.91	89	478	2-ketoisovaleric acid	2-酮异戊酸	+	+
56	25.34	371	786	1-monopalmitin	1-单棕榈碱	+	+
57	25.75	361	942	sucrose	蔗糖	+	+
58	26.32	361	878	1-kestose	1-蓖麻糖	+	+
59	27.11	399	775	1-monostearin	1-单硬脂酸甘油酯	+	+
60	27.45	95	904	squalene	角鲨烯	+	+
61	27.51	204	698	cellobiose minor	纤维二糖微量	+	+
62	27.62	117	492	lignoceric acid	二十四烷酸	+	+
63	29.73	89	775	N-acetylmannosamine	乙酰甘露糖胺	+	+
64	30.09	165	784	tocopherol acetate	醋酸生育酚	+	+
65	30.11	237	720	alpha-tocopherol	α -生育酚	+	+
66	30.17	204	867	maltotriose	麦芽三糖	+	+
67	30.22	117	366	1-deoxyerythritol	1-脱氧赤藓糖醇	+	+
68	30.40	151	317	phenol	苯酚	+	+
69	31.24	129	853	stigmasterol	豆甾醇	+	+
70	31.65	495	489	triacontanol	三十烷醇	+	+
71	31.70	129	807	beta-sitosterol	β -谷甾醇	+	+
72	31.96	361	900	inulotriose	菊粉三糖	+	+
73	32.30	95	691	lanosterol	羊毛甾醇	+	+
74	32.82	95	653	lithocholic acid	胆石酸	+	+
75	33.03	136	606	chenodeoxycholic acid	去氧胆酸	+	+
76	34.23	217	819	melezitose	松三糖	+	+
77	5.25	126	974	N-acetylglutamate	N-乙酰谷氨酸	+	-
78	6.48	117	800	pentadecanoic acid	十五烷酸	+	-
79	6.89	241	930	methanolphosphate	甲醇磷酸酯	+	-
80	8.46	299	874	phosphate	磷酸盐	+	-
81	8.57	136	727	catechol	邻苯二酚	+	-
82	8.83	116	652	adrenaline	肾上腺素	+	-
83	12.20	129	713	elaidic acid	反油酸	+	-
84	12.38	205	577	cinnamic acid	肉桂酸	+	-
85	13.32	243	769	dodecanol	十二醇	+	-
86	14.70	129	516	2-monostearin	2-单硬脂酸甘油酯	+	-
87	15.54	145	466	2-hydroxypentanoic acid	2-羟基戊酸	+	-
88	16.09	271	649	2,4-hexadienedioic acid	1,4-己二烯二酸	+	-
89	17.06	119	439	glycerol-3-galactoside	甘油-3-半乳糖苷	+	-
90	17.77	117	767	galactose	半乳糖	+	-
91	21.22	105	585	hippuric acid	马尿酸	+	-
92	22.03	93	639	linoleic acid methyl ester	亚油酸甲酯	+	-
93	22.33	204	729	piceatannol	苦味酸	+	-
94	23.16	116	759	n-acetyl-5-hydroxytryptamine	N-乙酰-5-羟色胺	+	-
95	23.42	129	575	monomyristin	单孢菌素	+	-
96	24.46	299	544	ethanolamine	乙醇胺	+	-
97	25.56	217	583	4',5-dihydroxy-7-glucosyloxyflavanone	4',5-二羟基-7-葡萄糖苷黄烷酮	+	-
98	27.43	89	634	3,6-anhydro-d-hexose	3,6-脱水-D-己糖	+	-
99	29.97	204	931	galactinol 5	半乳糖醇5	+	-
100	8.84	116	511	alanine	丙氨酸	-	+
101	10.26	355	435	succinic acid	琥珀酸	-	+
102	12.18	129	653	palmitoleic acid	棕榈油酸	-	+
103	12.25	129	742	zymosterol major	酵母甾醇	-	+
104	12.37	185	531	2-piperidinobenzonitrile	2-哌啶苯甲腈	-	+
105	12.49	103	652	xylose	木糖	-	+
106	14.03	145	515	butyraldehyde	丁醛	-	+
107	14.28	173	718	dehydroascorbic acid	脱氢抗坏血酸	-	+
108	14.47	143	629	N-acetylaspartic acid	N-乙酰天冬氨酸	-	+

续表 1

序号	保留时间(min)	质核比	相似度	英文名称	中文名称	WC	NA
109	14.95	143	723	inosine	肌苷	-	+
110	15.84	157	638	3-deoxyhexitol	3-脱氧己醇	-	+
111	16.09	271	711	sucrose-6-phosphate	蔗糖-6-磷酸	-	+
112	17.23	147	599	isohexonic acid	异己酸	-	+
113	17.60	117	673	6-deoxyglucose	6-脱氧葡萄糖	-	+
114	17.62	263	732	arabinose	阿拉伯糖	-	+
115	17.73	318	667	conduritol-beta-epoxide minor	环戊二酸 β -环氧丙烷	-	+
116	17.77	204	709	beta-gentiobiose	β -龙胆二糖	-	+
117	21.07	204	638	digalacturonic acid	二乙酰醛酸	-	+
118	21.22	105	588	arachidonic acid	花生四烯酸	-	+
119	22.31	221	564	dihydrocholesterol	二氢胆固醇	-	+
120	23.16	116	669	2-deoxyerythritol	2-脱氧赤藓糖醇	-	+
121	25.96	131	564	glucosamine	氨基葡萄糖	-	+
122	26.65	169	749	sophorose	槐甲素	-	+
123	27.23	217	739	glucose 4	葡萄糖4	-	+
124	27.26	217	644	6-deoxygalactofuranose	6-脱氧半乳糖呋喃糖	-	+
125	27.33	85	426	cis-gondoic acid	顺式顺丁烯二酸	-	+
126	29.07	204	625	lactobionic acid	乳糖酸	-	+
127	29.69	117	576	cerotinic aci	角化剂ACI	-	+

注: “+”代表定性到该物质, “-”代表未定性到该物质。

胁迫、激素响应、衰老过程等具有显著的生理效应^[22-24]。脂类作为稻米的重要组分, 不仅具有丰富且独特的营养价值^[25], 而且对稻米品质尤其是蒸煮食味品质也具有较大影响^[26-27], 优质水稻品种中脂类物质含量通常要高于非优质的水稻品种。根据两个产地的稻花香样品中代谢产物的情况, 发现同一品种的稻米在不同产地生长其代谢物数量和比例是不同的, 说明产地对稻米代谢产物的种类具有较大影响, 不同产地的稻米具有不同的代谢物组成。

2.3 主成分分析 (PCA)

主成分分析(principal component analysis, PCA) 是将一组观测的可能相关变量, 通过正交变换转换为线性不相关变量(即主成分)的统计方法, 可以揭示数据的内部结构, 有效地利用少量的主成分使得数据的维度降低。图 3 为两产地稻花香样品的 PCA 得分图, 本次分析中 $R^2X=0.515$, $Q^2=0.182$, 第一主成分贡献度为 36.4%, 第二主成分贡献度为 29.7%。由图 3 可以看出, 除个别异常样本外, 基本处于 95% 置信区

间 (Hotelling’s T-squared ellipse) 内, 两产地的稻花香样本并没有区分开, 存在重叠的现象, 可能是由于相同品种, 代谢物种类相近的原因造成的, PCA 是从整体上反映样本的情况, 所以区分不明显, 但同样可以看出两产地的样本均存在明显的聚集区。

2.4 正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 及置换检验

使用 PCA 模型进行分析, 因相关变量的影响, 差异变量会分散到更多的主成分上, 无法进行更好的可视化和后续分析。所以下面采用正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal projections to latent structures-discriminant analysis, OPLS-DA) 的统计方法对结果进行分析。通过 OPLS-DA 分析, 可以过滤掉代谢物中与分类变量不相关的正交变量, 并对非正交变量和正交变量分别进行分析, 从而获取更加可靠的代谢物组间差异与实验组的相关程度信息。图 4 为两产地稻花香 OPLS-DA 得分图。

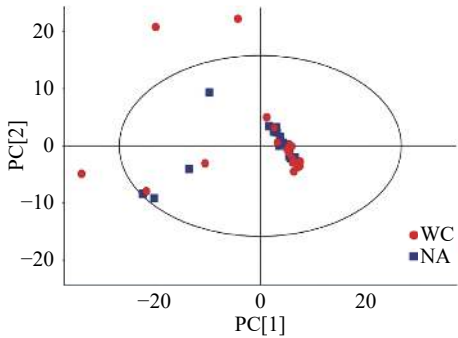


图 3 NA 组与 WC 组的 PCA 模型的得分散点图

Fig.3 Score scatter plot of PCA model for group NA vs WC

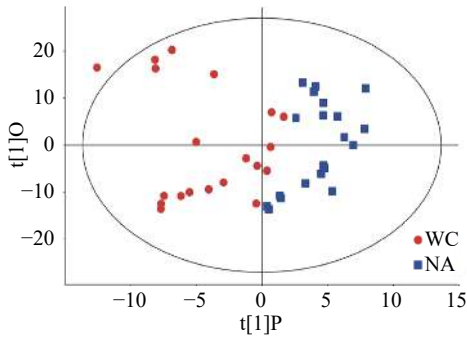


图 4 NA 组与 WC 组的 OPLS-DA 模型的得分散点图

Fig.4 Score scatter plot of OPLS-DA model for group NA vs WC

从 OPLS-DA 得分图的结果可以看出,两组样本区分比较明显,样本基本处于 95% 置信区间内。本次分析共得到两个主成分,第一主成分贡献度为 29.8%,第二主成分贡献度为 21.3%。 $R^2X=0.449$, $R^2Y=0.649$, $Q^2=0.531$, R^2X 与 R^2Y 数值相差不多,且 Q^2 值大于 0.5,说明 OPLS-DA 模型的预测性较好,不存在过拟合现象。由图 4 可知,五常地区稻花香样本主要分布在左侧的置信区间内,而宁安地区稻花香样本分布在右侧的置信区间内,样本点间没有重叠,区分效果较好。同时可以发现每个产地的 20 个样本点之间存在较大的距离,相对较分散。这可能与采样地点不同有关,为了体现产地的区别,所以水稻样本的采集覆盖整个地理保护区域,而不局限于一个采样点,使研究结果具有普遍性。由 OPLS-DA 结果可以看出,产地对水稻的代谢具有显著的影响。

置换检验通过随机改变分类变量 Y 的排列顺序,多次(次数 $n=200$)建立对应的 OPLS-DA 模型以获取随机模型的 R^2Y 和 Q^2 值,在避免检验模型的过拟合以及评估模型的统计显著性上有重要作用。OPLS-DA 模型的置换检验结果如图 5 所示。图中横坐标表示置换检验的置换保留度(与原模型 Y 变量顺序一致的比例,置换保留度等于 1 处的点即为原模型的 R^2Y 和 Q^2 值),纵坐标表示 R^2Y 或 Q^2 的取值,绿色圆点表示置换检验得到的 R^2Y 值,蓝色方点表示置换检验得到的 Q^2 值,两条虚线分别表示 R^2Y 和 Q^2 的回归线。原模型 R^2Y 比较接近 1,说明建立的模型比较符合样本数据的真实情况;原模型 Q^2 大于 0.5,说明如果有新样本加入模型,会得到较为近似的分布情况,总的来说原模型可以较好地解释两组样本之间的差异。置换检验随机模型的 Q^2 值均小于原模型的 Q^2 值; Q^2 的回归线与纵轴的截距小于零;同时随着置换保留度逐渐降低,置换的 Y 变量比例增大,随机模型的 Q^2 逐渐下降。说明原模型具有良好的稳健性,不存在过拟合现象,即 OPLS-DA 得分图结果准确。

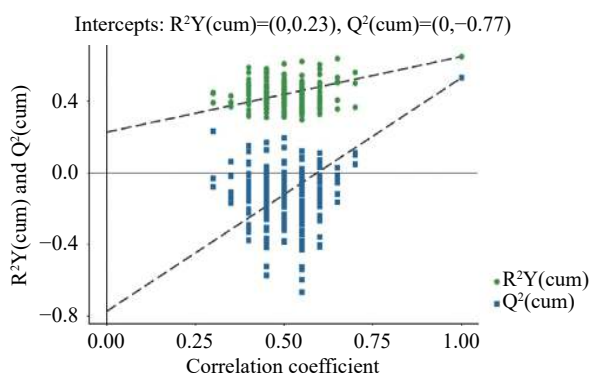


图 5 NA 与 WC 组的 OPLS-DA 模型的置换检验

Fig.5 Permutation test of OPLS-DA model for group NA vs WC

2.5 差异代谢物的筛选

采用 OPLS-DA 模型的 VIP(variable impor-

tance in the projection)值(阈值 ≥ 1),并结合学生氏 t 检验(student's t -test)的 P 值(阈值 <0.05)来筛选差异代谢物。在 Fiehn 数据库中通过保留时间等条件与库中物质进行匹配,从而进行物质差异性代谢物的定性,宁安地区对五常地区筛选的差异代谢物定性结果如表 2 所示。

宁安产地和五常产地的稻花香样品中共筛选出 22 个差异代谢物。差异代谢物为两产地水稻共同拥有的代谢物,但是含量上存在显著差异。大部分差异代谢物是脂肪酸和脂肪酸衍生物,以及少量糖、有机酸、多元醇和其他物质。在含量上,由表 2 可知,宁安产地稻花香样品中有 9 个差异代谢物的含量均低于五常地区,这些物质多为酚、醛、醇类物质。宁安地区稻花香水稻中有 13 个代谢物的含量高于五常地区,这些物质多数为脂肪酸及脂肪酸的衍生物,倍性变化在 1.34~1.81 倍之间。研究表明,温度对水稻中脂肪酸的含量有较大的影响^[28]。宁安地区属于温带大陆性季风气候,五常属于中温带大陆性季风气候,宁安独特的玄武岩“石板地”使地温、水温都要略高于五常地区,水稻成熟度更高,所以导致宁安稻花香中脂肪酸的含量要高于五常地区。与 2.2 中得到的结果综合分析,可以发现数量上,宁安地区的水稻其脂肪酸等脂类物质在全部代谢物中所占的比例要少于五常地区。但是在含量上,宁安地区脂类物质要显著高于五常地区,酚类物质在数量和含量上均是宁安地区低于五常地区,醇类物质在数量上两产地占比相近,含量上宁安地区要低于五常地区。综上所述,产地对稻米代谢物中影响最大的物质为脂肪酸及其衍生物。

2.6 差异代谢物的层次聚类分析

对差异代谢物的定量值计算欧式距离矩阵(Euclidean distance matrix),以完全连锁方法对差异代谢物进行聚类分析,并以热力图进行展示,结果如图 6 所示。

图 6 中横坐标代表不同实验分组,左侧为五常地区稻花香样本,右侧为宁安地区样本;纵坐标代表该组对比的差异代谢物,不同位置的色块代表对应位置代谢物的相对表达量,红色代表高表达量,蓝色代表低表达量。图 6 可以分成上下两个区域,图右侧的前 9 个代谢物为上半部分,下方 13 个差异代谢物为下半部分。在上半部分中可以看出五常地区的样本中 9 个代谢物的表达量明显高于宁安地区样本代谢物的表达量,这 9 个代谢物分别为甜菜碱 β -环氧丙烷、未知物 217、2-脱氧赤藓糖醇、亚油酸、苜蓿醇、2-氨基苯酚、苯酚、水杨醛、皮糖醇 3,多数为酚类、醛类以及多元醇类物质。在下半部分中由颜色区域可知,宁安地区的除上述 9 个代谢物外的 13 个差异代谢物的表达量要明显高于五常地区,这 13 个差异代谢物多数为脂肪酸以及脂肪酸的衍生物。从聚类分析的颜色变异程度上可以看出,产地不同,脂肪酸

表 2 差异代谢物定性结果
Table 2 Differential metabolite qualitative results

序号	英文名称	中文名称	相似度	保留时间(min)	质核比	P值	VIP	倍数变化	log ₂ 倍数变化
1	salicylaldehyde	水杨醛	793	6.52	119	0.030139	1.556	0.6787	-0.5591
2	2-aminophenol	2-氨基苯酚	719	9.28	150	0.036889	1.026	0.6022	-0.7317
3	digitoxose	洋地黄糖	774	9.50	117	3.23E-07	2.912	1.3760	0.4605
4	benzylalcohol	苯甲醇	778	9.77	148	0.00012	2.353	0.3068	-1.7044
5	2-monoolein	2-单油精	789	12.32	103	0.000632	2.590	1.4640	0.5499
6	2-piperidinobenzonitrile	2-哌啶子基苄腈	531	12.37	185	3.36E-06	2.027	1.4551	0.5411
7	capric acid	癸酸	644	12.68	131	0.035737	1.514	1.3851	0.4700
8	1,5-anhydroglucitol	1,5-脱水葡萄糖醇	741	13.15	129	0.031234	1.723	1.5358	0.6190
9	1-monoolein	1-单油酸甘油酯	719	13.31	129	0.00043	2.163	1.7684	0.8225
10	2-monopalmitin	2-单软脂酸甘油酯	711	14.35	129	0.005343	1.793	1.3399	0.4221
11	fumaric acid	富马酸	628	14.59	245	0.005112	1.695	1.5117	0.5962
12	2-monostearin	2-单硬脂酸甘油酯	516	14.7	129	1.23E-06	2.752	1.7978	0.8463
13	glucose	葡萄糖	664	15.26	145	9.54E-06	2.891	1.8075	0.8540
14	gluconic acid lactone	葡萄糖酸内酯	680	16.58	116	0.001695	1.671	1.5022	0.5871
15	Unknown217	未知物217	765	18.89	217	0.03449	1.509	0.8068	-0.3097
16	palmitic acid	棕榈酸	969	19.63	117	0.045499	1.380	1.2690	0.3437
17	conduiritol-beta-expoxide	连翘酯β-环氧丙烷	901	20.11	305	0.004145	2.098	0.7493	-0.4165
18	linoleic acid	亚油酸	852	21.52	138	0.000632	1.453	0.2910	-1.7810
19	oleic acid	油酸	889	21.58	117	0.012901	1.417	1.3369	0.4189
20	2-deoxyerythritol	2-脱氧赤藓糖醇	617	28.07	117	0.013363	1.630	0.7535	-0.4083
21	piceatannol	苦味酚	679	29.69	117	0.016967	1.453	0.7055	-0.5033
22	phenol	苯酚	317	30.39	151	0.036358	1.143	0.5944	-0.7506

注: 倍数变化为两组样本定量的比值; log₂倍数变化为倍数变化取以2为底的对数, “+”代表含量升高, “-”代表含量下降。

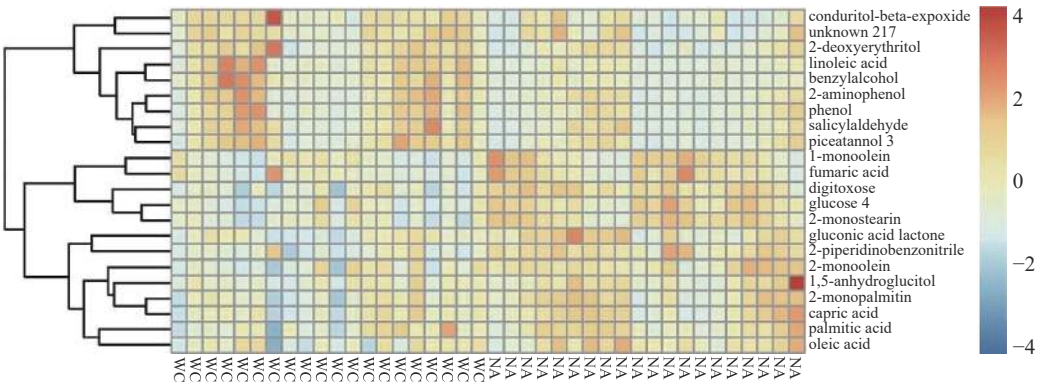


图 6 NA 与 WC 组的层次聚类分析热图

Fig.6 Heatmap of hierarchical clustering analysis for group NA vs WC

类物质含量差异更显著。

2.7 差异代谢物的代谢通路分析

生物体中的复杂代谢反应及其调控并不单独进行,往往由不同基因和蛋白质形成复杂的通路和网络,它们的相互影响和相互调控最终导致代谢组发生系统性的改变。通过京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) Pathway 数据库 <http://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>,共检索到差异代谢物参与的 19 个水稻的代谢通路,分别为不饱和脂肪酸的生物合成(ReFSEQ),水稻的代谢途径(ReFSEQ),脂肪酸生物合成,水稻角质、丝氨酸和蜡生物合成(ReFSEQ),枸橼酸循环(TCA 循环),水稻脂肪酸延伸,脂肪酸降

解,水稻氧化磷酸化,精氨酸生物合成,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,酪氨酸代谢,苯丙氨酸代谢,亚油酸代谢,丙酮酸代谢,丁酸代谢,烟酰胺和烟酰胺代谢,次生代谢物的生物合成,碳代谢,脂肪酸代谢。KEGG 注释分析仅找到所有差异代谢物参与的通路,为了找到与产地影响密切相关的通路,需要对差异代谢物进行进一步的代谢通路分析。通过对差异代谢物所在通路的综合分析(包括富集分析和拓扑分析),可以对通路进行进一步的筛选,找到与代谢物差异相关性最高的关键通路。首先,通过差异代谢物对 KEGG、PubChem 等权威代谢物数据库进行映射,映射出 3 个物质,亚油酸、棕榈酸以及富马酸,且均为精确匹配。在取得差异代谢物的匹配信息后,对

对应物种 *Oryza sativa japonica* (Japanese rice) 的通路数据库进行搜索和代谢通路分析, 代谢通路分析如表 3 所示。

由表 3 可知, 共找到 8 条与代谢物差异相关性最高的关键通路, 包含两大类代谢即脂肪酸代谢和氨基酸代谢, 而这 8 条通路中的差异代谢物分别为亚油酸、棕榈酸以及富马酸, 其中富马酸参与的代谢通路有 4 条, 棕榈酸参与的有 3 条, 可见这两种差异代谢物是处于多条通路的交集处, 对通路影响较大。

代谢通路分析的结果以气泡图进行展示, 如图 7 所示。气泡图中每一个气泡代表一个代谢通路, 气泡所在横坐标和气泡大小表示该通路在拓扑分析中的影响因子大小, 越大影响因子越大; 气泡所在纵坐标和气泡颜色表示富集分析的 P 值(取负自然对数, 即 $-\ln P$ -value), 颜色越深 P 值越小, 富集程度越明显。由图 7 可知, 亚油酸代谢处的气泡颜色最深, 而且最大, 可见亚油酸对两产地稻花香米之间差异的影响最大, 其次是棕榈酸和富马酸。亚油酸、

棕榈酸和富马酸是稻米脂肪酸的主要组成成分, 亚油酸和富马酸属于不饱和脂肪酸, 而棕榈酸属于饱和脂肪酸。脂肪酸是水稻品质的关键决定因子^[29], 稻米中脂类含量与稻米品质呈显著正相关^[30], 亚油酸在水稻脂肪中含量较高, 可提高蒸煮时的食味品质, 富马酸不仅可以提升蒸煮时的水稻香味, 还起到酸度调节剂的作用, 也可以提高水稻的食味品质, 而棕榈酸是一种高级的饱和脂肪酸, 对稻米的色泽、口感等也具有显著地影响, 尤其是色泽, 但棕榈酸含量与稻米色泽以及食味品质呈负相关。

由结果可知, 产地对影响稻米品质的代谢物含量具有明显影响, 说明产地对稻米品质具有一定的影响。还有研究表明, 棕榈酸、亚油酸的含量与生长环境的温度有关, 宁安和五常两个地区中环境温度也不相同, 由代谢通路结果可知, 五常与宁安两个产地的稻花香米在代谢中最大的差异体现在脂肪酸代谢过程, 则说明不同产地间水稻代谢差异机制可能主要在于脂肪酸类物质的代谢。

表 3 差异代谢物的代谢途径

Table 3 Metabolic pathways of the differential metabolites

Pathway	Total	Hits	Raw p	$-\ln(p)$	Holm adjust	FDR	Impact	Hits Cpd
亚油酸代谢	5	1	0.013146	4.3316	1	0.9037	1	Linoleic acid cpd:C01595
线粒体脂肪酸的延长	13	1	0.03394	3.3832	1	0.9037	0	Palmitic acid cpd:C00249
酪氨酸代谢	18	1	0.046786	3.0622	1	0.9037	0	Fumaric acid cpd:C00122
柠檬酸循环(TCA循环)	20	1	0.051893	2.9586	1	0.9037	0.034	Fumaric acid cpd:C00122
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	21	1	0.054439	2.9107	1	0.9037	0.007	Fumaric acid cpd:C00122
脂肪酸代谢	37	1	0.094563	2.3585	1	1	0	Palmitic acid cpd:C00249
精氨酸和脯氨酸代谢	37	1	0.094563	2.3585	1	1	0	Fumaric acid cpd:C00122
脂肪酸生物合成	47	1	0.11906	2.1282	1	1	0	Palmitic acid cpd:C00249

注: Pathway为代谢通路名称; Total为该代谢通路中代谢物的数量; Hits为差异代谢物命中该通路的个数; Raw p代表通路富集分析的 P 值; $-\ln(p)$ 为 P 值取以 e 为底的负对数(负自然底对数); Holm adjust 为经Holm-Bonferroni方法进行多重假设检验校正后的 P 值; FDR为经错误发现率(false discovery rate,FDR)方法进行多重假设检验校正后的 P 值; Impact为代谢通路拓扑分析的Impact值; Hits Cpd为命中该通路的差异代谢物名称及KEGG ID。

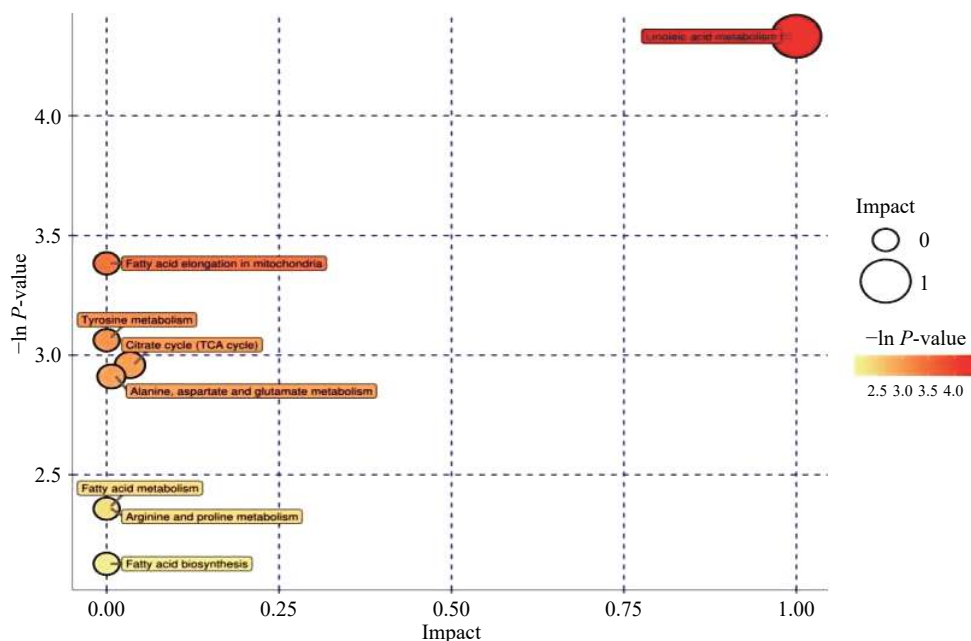


图 7 NA 与 WC 组的代谢通路分析气泡图

Fig.7 Pathway analysis for group NA vs WC

3 结论

基于 GC-MS 代谢组学技术对不同产地水稻代谢产物与代谢差异机制进行研究具有可行性。研究结果表明产地对稻花香水稻代谢物的数量和含量均具有影响,且代谢物种类与含量的差异可能与稻米品质相关。产地不同,对水稻中脂类物质的影响最为显著,且不同产地间水稻代谢差异机制主要在于脂肪酸类物质的代谢。亚油酸,棕榈酸和富马酸是产地影响的脂肪酸代谢中的三种关键代谢物。产地对稻米的代谢具有明显的影响。

参考文献

- [1] WANG N N, FENG X, SUNG Y P, et al. Gas chromatography combined with stoichiometry to distinguish rice storage time and origin[J]. *Analysis and Testing Journal*, 2013, 32: 1227–1231.
- [2] LIU C J, XIE Y H, LI J, et al. The eating quality of rice has different regions and the comparative study of chemical composition[J]. *J Food Sci*, 2013, 34: 165–169.
- [3] CHEN T, ZHAO Y, ZHANG W, et al. Variation of the light stable isotopes in the superior and inferior grains of rice(*Oryza sativa* L.) with different geographical origins[J]. *Food Chemistry*, 2016, 209: 95–98.
- [4] CHUNG I M, KIM J K, LEE K J, et al. Geographic authentication of Asian rice (*Oryza sativa* L.) using multi-elemental and stable isotopic data combined with multivariate analysis[J]. *Food Chemistry*, 2018, 240: 840–849.
- [5] PASQUINI, CELIO. Near infrared spectroscopy: A mature analytical technique with new perspectives-a review[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 1026: 8–36.
- [6] ARIYAMA K, SHINOZAKI M, KAWASAKI A. Determination of the geographic origin of rice by chemometrics with strontium and lead isotope ratios and multielement concentrations[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2012, 60(7): 1628–1634.
- [7] KUKUSAMUDE C, KONGSRI S. Elemental and isotopic profiling of Thai jasmine rice(Khao Dawk Mali 105) for discrimination of geographical origins in Thung Kula Rong Hai area, Thailand[J]. *Food Control*, 2018, 91: 357–364.
- [8] 李红, 田福林, 刘成雁, 等. 气相色谱-串联质谱法测定不同产地大米中的角鲨烯[J]. *分析测试学报*, 2011, 30(10): 1179–1182.
- [9] LI H, TIAN F L, LIU C Y, et al. Determination of squalene in rices from different areas by gas chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2011, 30(10): 1179–1182.
- [10] PANKIN D, KOLESNIKOV I, VASILEVA A, et al. Raman fingerprints for unambiguous identification of organotin compounds[J]. *Spectrochimica Acta Part A Molecular & Biomolecular Spectroscopy*, 2018, 204: 158.
- [11] ZHU L, SUN J, WU G, et al. Identification of rice varieties and determination of their geographical origin in China using Raman spectroscopy[J]. *Journal of Cereal Science*, 2018, 82: 175–182.
- [12] BRYANT R J, MCCLUNG A M. Volatile profiles of aromatic and non-aromatic rice cultivars using SPME/GC-MS[J]. *Food Chemistry*, 2010, 124(2): 501–513.
- [13] KYU D, PHUOC N, WON S. Non-destructive profiling of volatile organic compounds using HS-SPME/GC-MS and its application for the geographical discrimination of white rice[J]. *Journal of Food & Drug Analysis*, 2018, 26(1): 260.
- [14] CALINGACION M N, BOUALAPHANH C, DAYGON V D, et al. A genomics and multi-platform metabolomics approach to identify new traits of rice quality in traditional and improved varieties[J]. *Metabolomics*, 2012, 8(5): 771–783.
- [15] 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.
- [16] JUNG ES, LEE S, LIM SH, et al. Metabolite profiling of the short-term responses of rice leaves(*Oryza sativa* cv. Ilmi) cultivated under different LED lights and its correlations with antioxidant activities[J]. *Plant Science*, 2013, 210: 61–69.
- [17] FENG Y C, FU T X, ZHANG L Y, et al. Research on differential metabolites in distinction of rice(*Oryza sativa* L.) origin based on GC-MS[J]. *Journal of Chemistry*, 2019, 7: 1–7.
- [18] 王玲. 转基因水稻的代谢组学研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2013. [WANG L. Metabonomics research of genetically modified rice[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2013.]
- [19] 程建华, 桑志红, 李海静, 等. 基于 GC-TOF/MS 技术的转 Bt 基因大米代谢组学研究[J]. *分析测试学报*, 2016, 35(10): 1217–1224. [CHENG J H, SANG Z H, LI H J, et al. Metabolomics analysis of Bt-transgenic and parental rice based on gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2016, 35(10): 1217–1224.]
- [20] ZHOU J, WANG S Y, CHANG Y W, et al. Development of a gas chromatography-mass spectrometry method for the metabolomic study of rice(*Oryza sativa* L.) grain[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2012, 30(10): 1037–1042.
- [21] KANEHISA M. KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(1): 355–360.
- [22] CHENG J, SUN Y Y, SHI Y H, et al. Branched-chain amino acids regulate plant growth by affecting the homeostasis of mineral elements in rice[J]. *Science China Life Sciences*, 2019, 62: 1107–1110.
- [23] LI Y L, LI D D, GUO Z L, et al. Os ACOS12, an orthologue of Arabidopsis acyl-CoA synthetase5, plays an important role in pollen exine formation and anther development in rice[J]. *BMC Plant Biology*, 2016, 16(1): 256.
- [24] YANG X J, LIANG W Q, CHEN M J, et al. Rice fatty acyl-CoA synthetase Os ACOS12 is required for tapetum programmed cell death and male fertility[J]. *Planta*, 2017, 246(1): 1–18.
- [25] ZHANG D S, LIANG W Q, YUAN Z, et al. Tapetum degeneration retardation is critical for aliphatic metabolism and gene regu-

- lation during rice pollen development[J]. *Molecular Plant*, 2008, 1(4): 599–610.
- [25] KIM N H, KWAK J, JI Y B, et al. Changes in lipid substances in rice during grain development[J]. *Phytochemistry*, 2015, 116: 170–179.
- [26] TUFVESSON F, WAHLGREN M, ELIASSON A C. Formation of amylose-lipid complexes and effects of temperature treatment: Part 2: Fatty acids[J]. *Starch Starke*, 2003, 55(3/4): 138–149.
- [27] 刘海, 赵欢, 何佳芳, 等. 稻米营养品质影响因素研究进展[J]. *贵州农业科学*, 2013, 41(6): 85–89. [LIU H, ZHAO H, HE J F, et al. Advances in the influencing factors of rice nutritional quality[J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2013, 41(6): 85–89.]
- [28] 王海涛. 影响稻谷脂肪酸值测定的因素分析[J]. *现代食品*, 2017(13): 74. [WANG H T. Analysis of the factors affecting the determination of fatty acids in rice[J]. *Modern Food*, 2017(13): 74.]
- [29] 钟一平. 稻谷脂肪酸值测定的影响因素分析[J]. *粮食科技与经济*, 2017, 42(4): 52–53. [ZHONG Y P. Analysis of factors the determination of fatty acid in rice[J]. *Grain Science and Technology and Economy*, 2017, 42(4): 52–53.]
- [30] 许光利. 稻米脂类对品质的影响及脂类代谢对高温弱光的响应[D]. 雅安: 四川农业大学, 2017. [XU G L. Studies on effect of lipid on rice quality and lipid metabolism in response to high temperature and weak light stresses[D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2017.]