比较代谢组和转录组学揭示“19 香”水稻香气物质组成及其形成途径

刘志涛[1,2]，梁嘉燕[2]，孔雷蕾[2]，胡晓丹[2]，郑奕雄[1*]，白嵩[2*]

（1.仲恺农业工程学院农业与生物学院 广东广州 510230）（2.广东省农业科学院水稻研究所，农业农村部华南优质稻遗传育种实验室（部省共建），广东省水稻育种新技术重点实验室，广东省水稻工程实验室，广东广州 510640）

摘要：基于气象色谱-质谱联用（Gas Chromatography-Mass Spectrometry，GC-MS）对广东省龙川市和连山市种植的“19 香”乳熟期籽粒胚乳的挥发性代谢物进行代谢组学分析，结合转录组技术挖掘香气物质形成的相关基因，探讨产地对香稻香气物质形成的影响。通过主成分分析（Principal Component Analysis，PCA）、偏最小二乘法判别分析（Partial Least Squares Discriminant Analysis，PLS-DA）对原始数据进行多元统计分析。结果表明，“19 香”异地种植后其挥发性物质含量发生变化，其中有 14 个香气物质的相对含量达显著差异。通过 KEGG 富集分析发现次级代谢物的生物合成对香气物质含量具有显著影响。在转录水平上以连山组为对照，龙川组样本有 56 个显著上调表达基因和 89 个下调表达基因，且主要参与有机物的分解代谢和多糖代谢等生物进程，差异表达基因发挥着糖基键的水解酶活性和氧化还原酶活性等分子功能，此外类胡萝卜素合成途径为显著富集通路。综上所述，不同种植环境对香稻的香气物质含量影响较大，其中乳熟期糖类代谢活动、胁迫应答相关机制可能是种植环境中调控香气物质含量的关键因子。

关键词：香稻；异地种植；香气物质；2-乙酰基-1-吡咯啉；转录组测序

文章编号：1673-9078(2023)09-279-295 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.9.0768

Comparison between Metabolomics and Transcriptomics for Revealing the Composition and Formation Pathway of Aroma Compounds in "19 Xiang" Rice

LIU Zhitao[1,2], LIANG Jiayan[2], KONG Leilei[2], HU XiaoDan[2], ZHENG Yixiong[1*], BAI Song[2*]

(1.College of Agriculture & Biology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510230, China)

(2.Rice Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Genetics and Breeding of High Quality Rice in Southern China (Co-construction by Ministry and Province), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Key Laboratory of New Technology in Rice Breeding, Guangdong Rice Engineering Laboratory, Guangzhou, 510640 China)

Abstract: Using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), a metabolomic analysis of volatile metabolites of "19 Xiang" milk-ripe stage endosperm grains grown in Longchuan City and Lianshan City, Guangdong Province was conducted. The effect of origin on the formation of aroma compounds in aromatic rice was also explored by identifying the genes related to the formation of aroma compounds using

引文格式：

刘志涛,梁嘉燕,孔雷蕾,等.比较代谢组和转录组学揭示“19 香”水稻香气物质组成及其形成途径[J].现代食品科技,2023,39(9):279-295

LIU Zhitao, LIANG Jiayan, KONG Leilei, et al. Comparison between metabolomics and transcriptomics for revealing the composition and formation pathway of aroma compounds in "19 Xiang" rice [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(9): 279-295

收稿日期：2022-06-18

基金项目：广东省重点领域研发计划项目（2020B0202090003；2020B020225004）；广东省农业科学院水稻研究所优谷计划项目（2021YG09）；广东省水稻育种新技术重点实验室（2020B1212060047）

作者简介：刘志涛（1992-），女，硕士研究生，研究方向：稻米品质特性，E-mail：675519342@qq.com

通讯作者：郑奕雄（1963-），男，硕士，教授，研究方向：花生遗传育种，E-mail：123267340@qq.com；共同通讯作者：白嵩（1970-），男，博士，副研究员，研究方向：水稻生理生态和稻米品质研究，E-mail：baisong@gdaas.cn

transcriptome technology. Multivariate statistical analysis was performed on the original data using principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). The results showed that the content of volatile substances in "19 Xiang" varied among grains planted in different places, exhibiting significant differences in the relative contents of 14 aroma substances. KEGG enrichment analysis revealed that the biosynthetic pathways of secondary metabolites significantly affected on the content of aroma substances. At the transcriptional level, taking the Lianshan group as the control, the samples of the Longchuan group had 56 significantly upregulated genes and 89 downregulated genes, which were mainly associated with biological processes such as catabolism of organic matter and polysaccharide metabolism. In conclusion, different planting environments greatly influence the content of aroma substances in aromatic rice, and carbohydrate metabolism activities and stress response-related mechanisms at the milking stage may be crucial factors regulating the content of aroma substances in the planting environment.

Key words: aromatic rice; off-site planting; aroma compound; 2-acetyl-1-pyrroline (2AP); transcriptome sequencing

香气作为优质稻品种重要的品质性状之一，香气浓郁的优质稻米拥有更高的消费吸引力和市场价值。因此，研究香稻的香气物质组成及其形成机制，解析环境对香气物质的影响对香稻品种的选育，以及香稻异地种植后其香气品质的稳定性具有重要意义。

目前已通过气质联用、电子鼻等方法从稻米中鉴定出 200 多种香气物质[1]，其中 2-乙酰基-1-吡咯啉（2-Acetyl-1-Pyrroline，2AP）[2]是研究较多的一种具有爆米花香味的杂环类化合物。此外，有部分气味阈值较低的杂环类化合物，如 2-乙酰基-2-噻唑啉、2-甲基呋喃、2-戊基呋喃等也能为稻米香气贡献不同风味[3]。张江丽等[4]从云南地方香稻品种排香沙糯中发现含量较高的挥发性物质是具有果香、草香等风味的己醛和壬醛。Hinge 等[5]通过比较香稻与非香稻发育时期的挥发性成分发现，香稻中的庚醛、(E)-2-辛醛、苯乙醛、戊醛、壬醛、(E)-2-壬烯醛等醛类物质含量均高于非香稻。有研究表明醇类物质中的 1-己醇和 1-丁醇能赋予稻米甜味、花果香等风味[4]，此外在所有水稻品种中具有较高含量的 1-辛烯-3-醇，可赋予大米蘑菇和秸秆风味。但印度香米则具有较高含量的己醇[6]。

鉴于不同稻米中各类物质的占比有所差异，香稻的最终风味源于多种挥发性物质的共同作用[7]，而能被人类嗅觉系统感知到的挥发性物质主要来自于氨基酸、脂肪酸和类胡萝卜素等前体物质[8]。如稻米的香气物质来源于氨基酸和脂肪酸的生成代谢途径。研究表明脯氨酸、鸟氨酸和谷氨酸的代谢途径是香稻关键性香气成分 2AP 的主要来源，其中脯氨酸的酶促反应产生 2AP 的前体物质吡咯啉-5-羧酸（Pyrroline 5 Carboxylic Acid，P5C），而鸟氨酸和谷氨酸是 2AP 的重要氮源[9]。芳香族氨基酸苯丙氨酸的代谢可产生气味阈值较低且具有花果香味的风味物质，如苯乙醛、苯乙酸、苯乙醇等物质[10]。脂肪酸在脂氧合酶或者 α-和 β-氧化酶作用下，产生具有香气的醛、醇、酮和酸类等物质。据研究报道，油酸和亚油酸的分解产物和氧化速度存在差异[11]，因此对两者分解产物的鉴定可用来作为脂质氧化的标记[12,13]。

根据前人研究以及农户调查发现同一香稻品种异地种植后其香气发生显著差异，该变化不利于维持稻米香气品质的稳定性以及香稻品种种植区域的扩大。目前关于香稻香气成分的研究主要集中于对特征性香气成分 2-乙酰基-1-吡咯啉（2AP）的合成途径及其潜在的分子调控网络的研究，但其他香气物质的合成通路以及分子遗传机制有待研究和解析。

1 材料与方法

1.1 材料及种植

优质籼型香稻品种“19 香”是广东省农业科学院水稻研究所培育的香型丝苗米新品种，是当前广东省各地丝苗米产业园的主栽品种。本实验于 2021 年早季在广东省龙川市和连山市的水稻育种试验基地种植香稻“19 香”，采用人工手插，株行距为 20 cm×20 cm，常规水肥管理。于两地稻苗抽穗期时各选取部分长势一致的开花颖壳并用马克笔标记，在花后 10 d（乳熟期）采用消毒镊子将标记的籽粒胚乳剥取，存放于无菌 2 mL 研磨管，剥取过程于液氮条件下完成。将两地剥取后的样品等量分为 12 份，其中 9 份用于组学实验，3 份用于 qRT-PCR 验证。另外各取 3 份长势一致的剑叶和穗用于相关生理指标测定，所有材料液氮冷冻后存储于-80 ℃冰箱。

1.2 仪器设备

安捷伦 7890B 气相色谱串联 5977B 质谱仪；固相微萃取装置（Supelco 50/30 μm，DVB/CAR/PDMS，Stableflex (2 cm)）；illumine NovaSeq 6000，illumina 公司，美国。

1.3 试验方法

1.3.1 样品制备

将剥取的各类籽粒胚乳样品采用 LUKYM-1 样品冷冻研磨仪（广州）研磨制粉，参数为温度-35 ℃，频率 55 Hz，时间 50 s，全程保持液氮条件下进行。用于生理指标测定的叶、穗分别设定 3 个生物学重复。

1.3.2 GC-MS 检测

准确称取 100 mg 粉状样品于 20 mL 顶空瓶中，加入 10 μL 2-辛醇（2-Octanol，纯度≥99.15%）作为内标，90 ℃水浴锅平衡 5 min 后，迅速插入固相微萃取装置（Supelco 50/30 μm，DVB/CAR/PDMS，Stableflex (2 cm)），60 ℃条件下吸附 30 min。

检测平台：Agilent7890B/5977B GC-MS。采用自动进样器进样 1 μL 样品量。气相条件：气相色谱柱 DB-Wax（630 m×250 μm×0.25 μm，美国安捷伦公司）；载气为氦气，流速为 1.0 mL/min；不分流进样，程序化升温为 40 ℃保持 4 min，随后以 5 ℃/min 的速率上升至 245 ℃，保持 5 min。质谱条件：电子轰击型离子源；电离电压-70 eV；离子源温度 230 ℃；四级杆温度 150 ℃；接口温度 250 ℃；扫描模式为全扫，质量范围 *m/z*：20~500。

1.3.3 转录组验证测定

用 CTAB 法提取样本总 RNA，完成 cDNA 文库构建后，使用 illumina NovaSeq 6000（illumina 公司，美国）高通量测序平台对 cDNA 文库进行测序，获得原始数据。

采用 qRT-PCR 技术选取 14 个差异表达基因进行验证。基因序列信息从 The Rice Annotation Project Database（RAP）获得，引物采用 Primer 3 设计。RNA 反转录采用 5×ALL-In-One RT MasterMix with AccuRT 试剂盒。按照 Hieff qPCR SYBR Green Master Mix（No Rox）试剂盒操作说明对反转录获得的 cDNA 进行 qRT-PCR 验证。每个基因采用 3 个生物学重复和 3 个技术重复测定表达水平。Actin 基因被用作获得 Ct 值标准化的内源性参照基因，基因的相对表达量采用 ΔΔCt 法计算。

1.3.4 2AP 合成相关生理指标测定

根据 Holmström 等[14-16]的方法提取粗酶液用以测定鸟氨酸转氨酶、吡咯啉-5-羧酸合成酶、二胺氧化酶、吡咯啉-5-羧酸盐和丙酮醛，略做修改。称取剑叶和穗的粉样 0.300 g 左右，加入 3 mL Tris-HCl 缓冲液（50 mmol/L，pH 值 7.5）匀浆，于 8 000 r/min、4 ℃条件下离心 20 min，上清液置于-20 ℃条件下储存。

参考 Chen 等[17-19]等的方法测定鸟氨酸转氨酶活性，酶活性单位为 μmol/(g·h·FW)；参考 Zhang 等[20-22]的方法测定吡咯啉-5-羧酸合成酶活性，酶活性单位为 μmol/(g·h)；参考 Su 等[23-25]的方法测定二胺氧化酶活性，酶活性单位为 u/mg protein；参考 Wu 等[26]的方法测定吡咯啉-5-羧酸含量，单位为 μmol/g；丙酮醛含量的测定参考 Yadav 等[27,28]的方法，单位为 μmol/g。

1.4 数据分析

1.4.1 代谢组数据分析

使用 Chroma TOF 软件（V4.3x，LECO）和 NIST 数据库对质谱数据进行峰提取、基线矫正、解卷积、峰积分、峰对齐等分析[29]，根据质谱匹配度、保留时间指数匹配和 XIC 图特征峰面积等对代谢物进行定性定量鉴定。使用 MetaX[29]软件进行无监督主成分分析（PCA）、偏最小二乘法判别分析（PLS-DA），采用变量投影重要度（VIP）＞1，差异倍数 FC＞1.5 或 FC＜0.667 且 *P* value＜0.05 为差异代谢物的筛选条件。

1.4.2 转录组数据分析

使用 HISAT2 v2.0.5 软件配对末端 clean reads 与参照基因组比对；采用 StringTie（1.3.3b）[30]进行新基因预测；采用 featureCounts（1.5.0-p3）计算映射到每个基因的读数；可变剪切分析使用 rMATS（4.1.0）软件；使用 DESeq2 软件（1.20.0）进行龙川组和连山组样本之间的差异表达分析；通过 clusterProfiler（3.8.1）软件实现差异表达基因的 GO 富集分析及分析 KEGG 通路中差异表达基因的统计富集。

1.4.3 生理指标数据处理

酶活数据采用 office2007 进行原始数据输入与处理，采用“Statixtix 8.1”（数据分析统计软件，Tallahassee，FL，USA）进行数据处理，其中标准误样本数为 3 个重复。数据图各处理平均值后无标记表示 $P \geq 0.05$，无显著差异，标记“*”表示 $P \leq 0.05$，差异显著（LSD），$P \leq 0.01$ 标记用“**”表示差异极显著（LSD）采用 Office 2007 进行绘图。

2 结果与讨论

2.1 “19 香”香气物质成分分析

龙川组和连山组样本中的挥发性代谢物成分见表 1，两个产地的“19 香”共鉴定出 220 种挥发性代谢物，其中共检测出 39 种香气物质，分别有 10 种醛类、8 种醇类、8 种酮类、5 种酸类、3 种酚类、3 种杂环类以及 2 种酯类物质。

表1 “19香”挥发性代谢物

Table 1 "19 Xiang" volatile metabolites

序号	类别	代谢物名称	中文名称	保留时间/min
1		2-Butanone	2-丁酮	3.02
2		3-Pentanone, 2-methyl-	3-戊酮，2-甲基-	4.74
3		2,5-Pyrrolidinedione, 1-ethyl-	2,5-吡咯烷二酮，1-乙基-	27.31
4		2(5H)-Furanone, 3-methyl-	2(5H)-呋喃酮，3-甲基-	23.69
5		2-Butanone, 3-methoxy-3-methyl-	2-丁酮，3-甲氧基-3-甲基-	1.78
6		2,3-Pentanedione	2,3-戊二酮	6.35
7		2(3H)-Furanone, dihydro-5-pentyl-	2(3H)-呋喃酮，二氢-5-戊基-	30.32
8		2-Hydroxy-3-pentanone	2-羟基-3-戊酮	14.97
9		2,3-Octanedione	2,3-辛二酮	14.06
10		1-Penten-3-one, 2-methyl-	2-甲基-1-戊烯-3-酮	6.50
11		Cyclopentanone, 2-(1-methylheptyl)-	环戊酮，2-(1-甲基庚基)-	29.04
12		Acetone	丙酮	2.27
13		Acetophenone	苯乙酮	22.22
14		2-Propanone, 1-methoxy-	2-丙酮，1-甲氧基-	12.91
15		Cyclohexanone, 2,2,6-trimethyl-	环己酮，2,2,6-三甲基-	13.69
16		3(2H)-Thiophenone, dihydro-2-methyl-	3(2H)-噻吩酮，二氢-2-甲基-	19.28
17		Acetoin	乙偶姻	12.99
18		Ethanone, 1-(1-cyclohexen-1-yl)-	乙酮，1-（1-环己烯-1-基）-	8.08
19		4-Hydroxy-3-hexanone	4-羟基-3-己酮	16.37
20		6-Octen-2-one	6-辛烯-2-酮	14.23
21	酮类	6,7-Dodecanedione	6,7-十二烷二酮	22.59
22		Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-	乙酮	29.15
23		3-Octen-2-one	3-辛烯-2-酮	16.31
24		1H-Pyrrole-2,5-dione, 3-ethyl-4-methyl-	1H-吡咯-2,5-二酮，3-乙基-4-甲基-	34.76
25		2,2-Dimethyl-3-heptanone	2,2-二甲基-3-庚酮	19.98
26		2-Butanone, 3,4-epoxy-3-ethyl-	2-丁酮，3,4-环氧-3-乙基-	24.06
27		5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-, (E)-	反式-6,10-二甲基-5,9-十一双烯-2-酮	26.93
28		3,5-Dimethyl-2-octanone	3,5-二甲基-2-辛烷酮	2.26
29		2-Nonanone	2-壬酮	15.84
30		1-Hepten-3-one	1-庚烯-3-酮	13.37
31		2,3-Hexanedione	2,3-己二酮	8.31
32		2(3H)-Furanone, 5-butyldihydro-	2(3H)-呋喃酮，5-丁基二氢-	23.39
33		Cyclopentanone, 2-octyl-	环戊酮，2-辛基-	12.41
34		2H-Pyran-2-one, tetrahydro-6-methyl-	2H-吡喃-2-酮，四氢-6-甲基-	25.38
35		2-Dodecanone	2-十二酮	26.01
36		3-Cyclohexen-1-one, 3,5,5-trimethyl-	3,5,5-三甲基-3-环己烯-1-酮	16.29
37		2-Heptanone	2-庚酮	9.86
38		3-Octen-2-one, 7-methyl-	7-甲基-3-辛烯-2-酮	31.21
39		5-Hepten-2-one, 6-methyl-	6-甲基-5-庚烯-2-酮	14.40
40		2-Hexanone, 4-methyl-	2-六酮，4-甲基-	21.20
41		2,3-Butanedione	2,3-丁二酮	4.31
42		2-Cyclohexen-1-one	2-环己烯-1-酮	23.25

续表 1

序号	类别	代谢物名称	中文名称	保留时间/min
43		3-Octanone	3-辛酮	12.00
44	酮类	3,3-Dimethyl-hepta-4,5-dien-2-one	3,3-二甲基-庚 4,5-二烯-2-酮	7.42
45		Ethanone, 1-(4,5-dihydro-2-thiazolyl)-	乙酮，1-（4,5-二氢-2-噻唑基）-	24.65
46		3,5-Heptadien-2-one, 6-methyl-, (E)-	3,5-庚二烯-2-酮，6-甲基-，(E)-	20.95
47		3-Hexen-1-ol, (E)-	反式-3-己烯-1-醇	15.84
48		Trifluoroacetyl-lavandulol	三氟乙酰-薰衣草醇	30.74
49		3,4-Dihydroxyphenylglycol, 4TMS derivative	3,4-二羟基苯基乙二醇，4TMS 衍生物	23.32
50		2-Amino-2-methyl-1,3-propanediol	2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇	13.29
51		4,4,6-Trimethyl-cyclohex-2-en-1-ol	4,4,6-三甲基-环己-2-烯-1-醇	23.27
52		1,2-Ethanediol, dipropanoate	1,2-乙二醇，二丙酸酯	17.17
53		2-Dodecanol	2-十二烷醇	17.41
54		3-Hexanol, 2-methyl-	3-己醇，2-甲基-	16.99
55		cis-1,4-Cyclohexanediol,O,O'-bis(trifluoroacetyl)	顺式-1,4-环己二醇，O,O'-双(三氟乙酰基)	33.47
56		1-Propanol, 2-methyl-	1-丙醇，2-甲基-	7.67
57		Phenylethyl Alcohol	苯乙醇	28.18
58		1-Penten-3-ol, 3-ethyl-2-methyl-	1-戊烯-3-醇，3-乙基-2-甲基-	20.74
59		Cyclopentanol, 2,4,4-trimethyl-	环戊醇，2,4,4-三甲基-	25.25
60		1-Butanol, 3-methyl-	1-丁醇，3-甲基-	10.98
61		Linalool	芳樟醇	20.03
62		1-Hexanol	1-己醇	15.04
63		1-Heptanol	1-庚醇	17.82
64		Ethanol	乙醇	3.58
65		Terpineol	松油醇	23.52
66	醇类	3-Buten-1-ol, 3-methyl-	3-丁烯-1-醇	12.06
67		2,2,3,4-Tetramethylhex-5-en-3-ol	2,2,3,4-四甲基己基-5-烯-3-醇	22.27
68		Benzyl alcohol	苯甲醇	27.39
69		1-Propanol	1-丙醇	5.90
70		1-Penten-3-ol	1-戊烯-3-醇	9.59
71		1-Octen-3-ol	1-辛烯-3-醇	17.60
72		2-Propanol, 1-methoxy-	2-丙醇，1-甲氧基-	8.77
73		1-Octanol	1-辛醇	20.51
74		2-Furanmethanol, 5-ethenyltetrahydro-5-trimethyl-, cis-	2-呋喃甲醇，5-乙烯基四氢-5-三甲基-，顺式-	17.35
75		(S)-(+)-3-Methyl-1-pentanol	(S)-(+)-3-甲基-1-戊醇	14.32
76		1-Hexanol, 2-ethyl-	1-己醇，2-乙基-	18.733
77		2-Decen-1-ol, (E)-	反-2-癸烯醇	26.341
78		5-Hepten-2-ol, 6-methyl-	6-甲基-5-庚烯基-2-醇	17.98
79		Methyl Alcohol	甲醇	3.00
80		2-Hepten-1-ol, (E)-	反式-2-庚烯-1-醇	19.20
81		2,5-Dimethylcyclohexanol	2,5-二甲基环己醇	21.19
82		2-Octen-1-ol, (Z)-	顺式-2-辛烯-1-醇	21.84
83		Silanol, trimethyl-	硅烷醇，三甲基-	5.62
84		Cyclohexanol, 1-ethynyl-	环己醇，1-乙炔基-	22.29
85		1-Butanol	1-丁醇	9.26

续表 1

序号	类别	代谢物名称	中文名称	保留时间/min
86		2-Buten-1-ol, (Z)-	2-丁烯-1-醇，(Z)-	11.21
87	醇类	3-Pentanol	3-戊醇	14.50
88		1-Pentanol	1-戊醇	12.18
89		3-Isopropoxy-1,1,1,7,7,7-hexamethyl-3,5,5 -tris(trimethylsiloxy)tetrasiloxane	3-异丙氧基-1,1,1,7,7,7-六甲基-3,5,5 -三(三甲基硅氧基)四硅氧烷	19.37
90		Cyclohexene, 4-ethenyl-	环己烯，4-乙烯基-	20.13
91		Cyclohexene, 3-(bromomethyl)-	环己烯，3-（溴甲基）-	20.43
92		n-Hexane	正己烷	1.64
93		Cyclohexane, 1,1-dimethyl-	环己烷，1,1-二甲基-	15.49
94		Propane, 2,2-difluoro-	丙烷，2,2-二氟-	12.13
95		Decane, 2,2,3-trimethyl-	癸烷，2,2,3-三甲基-	10.94
96		Prenol	异戊二烯	14.13
97		Cyclotrisiloxane, hexamethyl-	环三硅氧烷，六甲基-	2.60
98		Benzene	苯	3.60
99		Propane, 2-methyl-2-nitro-	丙烷，2-甲基-2-硝基-	14.10
100		Benzene, (1,1,4,6,6-pentamethylheptyl)-	苯，(1,1,4,6,6-五甲基庚基)-	16.61
90		Cyclohexene, 4-ethenyl-	环己烯，4-乙烯基-	20.13
91		Cyclohexene, 3-(bromomethyl)-	环己烯，3-（溴甲基）-	20.43
92		n-Hexane	正己烷	1.64
93		Cyclohexane, 1,1-dimethyl-	环己烷，1,1-二甲基-	15.49
94		Propane, 2,2-difluoro-	丙烷，2,2-二氟-	12.13
95		Decane, 2,2,3-trimethyl-	癸烷，2,2,3-三甲基-	10.94
96	烃类	Prenol	异戊二烯	14.13
97		Cyclotrisiloxane, hexamethyl-	环三硅氧烷，六甲基-	2.60
98		Benzene	苯	3.60
99		Propane, 2-methyl-2-nitro-	丙烷，2-甲基-2-硝基-	14.10
100		Benzene, (1,1,4,6,6-pentamethylheptyl)-	苯，(1,1,4,6,6-五甲基庚基)-	16.61
101		Cyclopentasiloxane, decamethyl-	环戊硅氧烷，十甲基-	9.99
102		cis-4,5-Epoxy-(E)-2-decenal	顺式-4,5-环氧-(E)-2-癸烯	29.89
103		Undecane, 2,4-dimethyl-	十一烷，2,4-二甲基-	11.83
104		Methane, oxybis[dichloro-	甲烷，氧代双[二氯-	5.31
105		1-Dimethylthexylsilyloxyheptane	1-二甲基乙基甲硅烷氧基庚烷	39.67
106		Styrene	苯乙烯	11.90
107		Hexadecane	十六烷	16.22
108		Heptadecane, 2,6,10,14-tetramethyl-	庚烷，2,6,10,14-四甲基-	18.87
109		1,3,5-Cycloheptatriene	1,3,5-环庚三烯	5.73
110		Heptanal	庚烷	9.88
101		Cyclopentasiloxane, decamethyl-	环戊硅氧烷，十甲基-	9.99
102		cis-4,5-Epoxy-(E)-2-decenal	顺式-4,5-环氧-(E)-2-癸烯	29.89
103		Undecane, 2,4-dimethyl-	十一烷，2,4-二甲基-	11.83
104		Methane, oxybis[dichloro-	甲烷，氧代双[二氯-	5.31
105		1-Dimethylthexylsilyloxyheptane	1-二甲基乙基甲硅烷氧基庚烷	39.67
106		Styrene	苯乙烯	11.90

续表 1

序号	类别	代谢物名称	中文名称	保留时间/min
107		Hexadecane	十六烷	16.22
108		Heptadecane, 2,6,10,14-tetramethyl-	庚烷，2,6,10,14-四甲基-	18.87
109		1,3,5-Cycloheptatriene	1,3,5-环庚三烯	5.73
110		Heptanal	庚烷	9.88
111		Bicyclo[3.2.1] oct-2-ene, 3-(1,1-dimethylethoxy)-	双环[3.2.1]辛-2-烯，3-(1,1-二甲基乙氧基)-	19.19
112		Heptane, 2,2,4,6,6-pentamethyl-	庚烷，2,2,4,6,6-五甲基-	4.06
113		2,6-Octadiene, 2,7-dimethyl-	2,6-辛二烯，2,7-二甲基-	16.12
114		Pentadecanal-	十五烷-	30.51
115		trans-1-Butenylcyclopentane	反式-1-丁烯基环戊烷	16.45
116		Butanal, 3-methyl-	丁烷，3-甲基-	3.25
117	烃类	m-Aminophenylacetylene	M-氨基苯乙烯	37.64
118		2-Cyclopenten-1-one, 4-acetyl-2,3,4,5,5-pentamethyl-	2-环戊烯-1-酮，4-乙酰基-2,3,4,5,5,5-五甲基-	21.62
119		Trisiloxane, octamethyl-	三硅氧烷，八甲基-	2.66
120		Cyclotetrasiloxane, octamethyl-	环四硅氧烷，八甲基-	5.15
121		Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	环六硅氧烷，十二甲基-	15.01
122		Bicyclo[3.1.1]heptane,2,6,6-trimethyl-, [1R-(125]-Octane,2,4,6-trimethyl-1,1,3,3-Tetramethyl-1,3-bis[(2Z)-	双环[3.1.1]庚烷,2,6,6-三甲基-[1R-(125]-2,4,6-三甲基-辛烷 1,1,3,3-四甲基-1,3-双[(2z)-	39.40
123		pent-2-en-1-yloxy] disiloxane	戊二烯-二烯烃]二氧硅氧烷	13.37
124		5,10-Pentadecadiyne, 1-chloro-	5,10-十五二炔，1-氯-	11.07
125		6-Dodecyne	6-十二炔	20.34
126		1-Hexyne, 5-methyl-	1-己炔，5-甲基-	35.74
127		3-Methyl-2-butenoicacid, cyclobutyl ester	3-甲基-2-丁烯酸，环丁酯	18.47
128		Carbamicacid, (1,3-dithian-2-ylmethyl)-, methyl ester	氨基甲酸，(1,3-二噻吩-2-基甲基)-，甲酯	16.15
129		3-Methylcyclopentyl acetate	3-甲基环戊酯乙酸酯	18.26
130		Butyrolactone	丁内酯	9.28
131		Ethyl Acetate	乙酸乙酯	21.61
132		Pregnan-18-oicacid,	Pregnan-18-油酸	2.88
133		20,20-[1,2-ethanediylbis(oxy)]-, methyl ester, (5-1-(3-Benzyl-2-thioureido)-1-deoxy-d-Glucopyranose 2,3,4,6-tetraacetate	20,20-[1,2-ethanediylbis(oxy)]-，甲酯，(5-1-(3-Benzyl-2-thioureido)-1-deoxy-d-吡喃葡萄糖 2,3,4,6-四乙酸酯	12.89
134		Hexanoic acid, ethyl ester	己酸乙酯	8.11
135	酯类	Hydratropic acid, undec-2-en-1-yl ester	氢化丙酮酸,十一碳-2-烯-1-基酯	11.43
136		Ethyl trifluoromethanesulfonate	三氟甲磺酸乙酯	14.85
137		Hexanoic acid, anhydride	己酸酐	15.26
138		Acetic acid ethenyl ester	乙酸乙烯基酯	12.76
139		Undecanoic acid, methyl ester	十一酸甲酯	3.44
140		2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate	2,2,4-三甲基-1,3-戊二醇二异丁酸酯	34.90
141		2-Butenedioicacid (Z)-, monomethyl ester	2-丁烯二酸 (Z)-,单甲酯	27.47
142		Phthalic acid, heptyl pentyl ester	邻苯二甲酸庚基戊酯	32.54
143		Succinicacid, tridec-2-yn-1-yl	琥珀酸，十三烷基-2-炔-1-基	39.44
144		3-methylbut-3-en-1-yl ester	3-甲基丁-3-烯-1-基酯	28.45
145		Tributyl phosphate	磷酸三丁酯	28.34

续表 1

序号	类别	代谢物名称	中文名称	保留时间/min
146		Acetic acid, methyl ester	乙酸，甲酯	2.36
147	酯类	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl 2-methylpropyl ester	1,2-苯甲酸，丁基 2-甲基丙基酯	41.85
148		Eicosanoic acid, ethyl ester	二十烷酸乙酯（花生酸乙酯)	34.78
149		Pentadecanoicacid, 2,6,10,14-tetramethyl-, methyl ester	十五烷酸，2,6,10,14-四甲基-，甲酯	15.46
150		Butanoic acid, 2-methyl-	丁酸，2-甲基-	22.88
151		Octanoic acid	辛酸	31.13
152		Pentanoic acid, 2-methyl-, methyl ester	戊酸，2-甲基，甲酯	23.62
153		Propanoic acid, 2,2-dimethyl-	丙酸，2,2-二甲基-	20.76
154		Pentanoic acid	戊酸	24.39
155		Nonanoic acid	壬酸	33.16
156		Butanoic acid	丁酸	21.85
157		Hexanoic acid	己酸	26.70
158		Pentanoic acid, 3-methyl-	戊酸，3-甲基-	25.65
159	酸类	Propanoic acid	丙酸	19.67
160		Pentanoic acid, 2-methyl-	乙酸，2-甲基-	25.10
161		2-Heptenoic acid	2-庚烯酸	31.51
162		Butanoic acid, 3-methyl-	丁酸，3-甲基-	22.85
163		Heptanoic acid	庚酸	29.01
164		Acetic acid	醋酸	17.39
165		2-Butenoic acid, 3-methyl-	2-丁香酸，3-甲基-	25.66
166		Propanoic acid, 2-methyl-	丙酸，2-甲基-	20.44
167		Hexanoic acid, 2-ethyl-	己酸，2-乙基-	28.97
168		Pentanoic acid, 4-methyl-	戊酸，4-甲基-	25.89
169		Propanoic acid, 2-methyl-, anhydride	丙酸，2-甲基-，酸酐	16.84
170		Butanamide, 3-methyl-	丁酰胺，3-甲基-	28.16
171		Pyrrole	吡咯	18.99
172		1-Aziridinepropanenitrile, methyl-	1-氮丙啶丙腈，甲基-	21.32
173		Aziridine, 1-ethenyl-	氮丙啶，1-乙烯基-	5.98
174		Furan, 2-hexyl-	呋喃，2-己基-	8.20
175		Pyridine	吡啶	10.12
176		1,3-Dioxolane, 2-heptyl-	1,3-二氧戊环，2-庚基-	1.782
177		Benzofuran, 2,3-dihydro-	苯并呋喃，2,3-二氢-	36.847
178	杂环类	trans-Linalool oxide (furanoid)	反式芳樟醇氧化物（呋喃）	18.082
179		Furan, 2-pentyl-	呋喃，2-戊基-	11.211
180		Benzene, 1,3-dimethyl-	苯，1,3-二甲基-	8.322
181		2H-1-Benzopyran, 3,5,6,8a-tetrahydro-2,5,5,8a-tetramethyl-, trans-	2H-1-苯并吡喃，3,5,6,8a-四羟基-2,5,5,8a-四甲基，反式	28.639
182		Furan, 2-methyl-	呋喃，2-甲基 -	2.957
183		2-Acetyl-1-pyrroline	2-乙酰基-1-吡咯啉	14.359
184		2-Furanmethanol, tetrahydro-5-methyl-, trans-	2-呋喃甲醇，四氢-5-甲基-，反式	28.056
185		Indole, 3-methyl-2-(2-dimethylaminopropyl)-	吲哚，3-甲基-2-(2-二甲基氨基丙基)-	26.721
186		Furan, 2,3-dihydro-3-methyl-	呋喃，2,3-二氢-3-甲基-	4.592

续表 1

序号	类别	代谢物名称	中文名称	保留时间/min
187		2-Butenal, 3-methyl-	2-丁烯醛，3-甲基-	10.341
188		Nonanal	壬醛	15.94
189		2,4-Nonadienal, (E,E)-	2,4-壬二烯醛，(E,E)-	23.50
190		Hexanal	己醛	1.80
191		Acetaldehyde	乙醛	9.33
192		Oxiranecarboxaldehyde, 3-methyl-3-(4-methyl-3-pentenyl)-	环氧乙烷甲醛	4.34
193	醛类	Pentanal	戊醛	24.94
194		2,4-Decadienal	2,4-癸二烯醛	19.59
195		2-Nonenal, (E)-	2-壬烯醛，(E)-	21.98
196		Benzeneacetaldehyde	苯乙醛	13.95
197		2-Heptenal, (Z)-	2-庚醛，(Z)-	2.79
198		Methacrolein	甲基丙烯醛	22.21
199		2-Decenal, (E)-	反式-2-癸烯醛,	15.94
200		Benzaldehyde	苯甲醛	19.12
201		3-Furaldehyde	3-糠醛	16.79
202		Phenol	苯酚	29.83
203	酚类	2-Methoxy-4-vinylphenol	2-甲氧基-4-乙烯基苯酚	33.42
204		Phenol, 2-methoxy-	苯酚，2-甲氧基-	26.87
205		3-Pyridinecarboximidoyl chloride, N-[2-hydroxy-3-(1-piperidinyl) propoxy]-	3-吡啶羧亚胺酰氯, N-[2-羟基-3-(1-哌啶基)丙氧基]-	16.26
206		2-Methyl-2-propyl methylphosphonofluoridate	2-甲基-2-丙基甲基膦酰氟	29.76
207		Tetramethylbutanedinitrile	四甲基丁二腈	5.40
208		Benzeneethanamine, 3-fluoro-5-dihydroxy-N-methyl-	苯乙胺，3-氟-5-二羟基-N-甲基-	2.20
209		Disulfide, dimethyl	二硫化物，二甲基	6.58
210		Carbon dioxide	二氧化碳	1.53
211		Morpholine,4-[5-(2-furfurylthio) -2-nitrophenyl]-	吗啉，4- [5-（2-糠硫基）-2-硝基苯基]-	25.92
212	其他	Hydroxylamine, O-decyl-	羟胺，邻癸基-	21.35
213		Sulfoxide, methyl phenethyl	亚砜，甲基丙基甲基	9.62
214		Caffeine	咖啡因	48.87
215		Methylene chloride	二氯甲烷	3.42
216		Acetonitrile	乙腈	4.77
217		Carbon disulfide	二硫化碳	1.90
218		Methanesulfonic anhydride	甲磺酸酐	10.61
219		4-Methyl-2,4-bis(p-hydroxyphenyl)pent-1-ene, 2TMS derivative	4-甲基-2,4-双（P-羟基苯基）PET-1-ENE, 2TMS 衍生物	7.56
220		CH3C(O)OCH(CH3)C(O)CH3	未知	15.64

为更好表达异地种植后“19 香”的挥发性代谢物差异性，本实验进行了有监督的 PLS-DA 分析（图 1）。结果表明，两组样本差异显著，另外模型中的 R2Y（0.98）和 Q2Y（0.90）接近 1，且 R2Y＞Q2Y，说明模型建立良好。

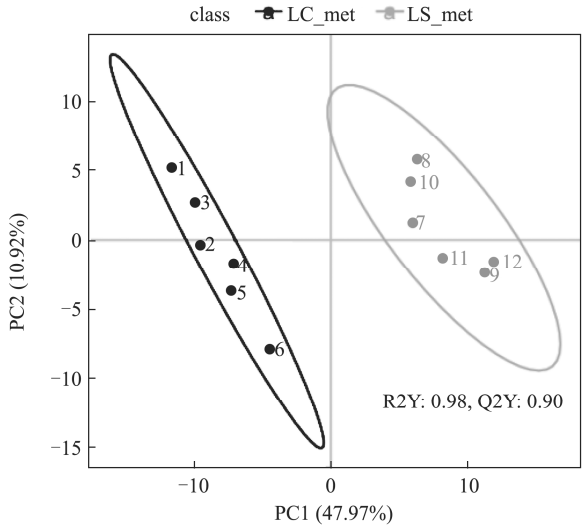


图 1 龙川组和连山组比较对的 PLS-DA 模型得分散点图

Fig.1 The scatter plot of the PLS-DA model for the comparison of the Longchuan formation and the Lianshan formation

2.2 差异香气物质筛选和通路富集分析

进一步基于 PLS-DA 模型第一主成分的变量投影重要度（Variable Importance in the Projection，VIP）值和差异倍数（Fold Change，FC），并结合 T-test 的 *P* 值筛选差异表达代谢物，设置条件为 VIP＞1.0，差异倍数 FC＞1.5 或 FC＜0.667 且 Pvalue＜0.05。两组样本中共筛选到 14 种香气物质的相对含量存在显著差异（表 2）。与连山组样本相比，龙川组样本中的 2-乙酰基-1-吡咯啉（2AP）和一种表现为泥土味的 2-乙基-1-己醇相对含量显著增加，另外 12 种香气物质相对含量显著减少，主要是酮类、醛类、醇类和酸类物质，这些物质大部分呈现花香、果香等风味。

KEGG 通路富集分析有助于确定差异代谢物参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。本实验发现的差异代谢物共注释到 12 条代谢通路（图 2），其中显著富集于次级代谢物合成途径。

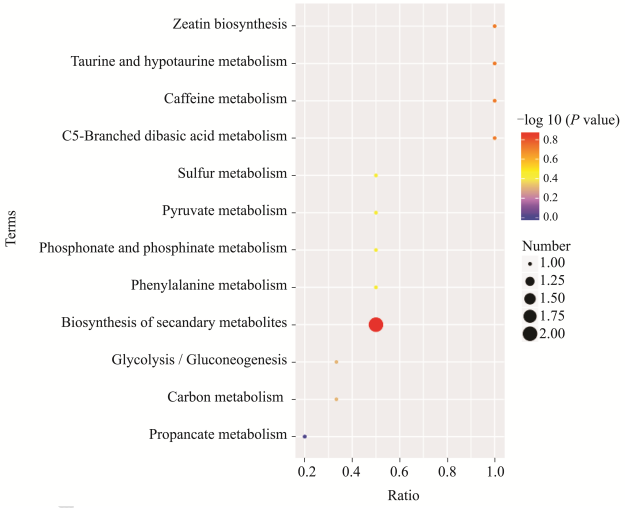


图 2 差异代谢物 KEGG 代谢通路散点图

Fig.2 Scatter plot of differential metabolites KEGG metabolic pathway

表 2 差异香气物质

Table 2 Differential aroma substances

序号	代谢物	中文名称	气味描述	LC vs LS
1	3-methyl-2(5H)-Furanone	3-甲基-2(5H)-呋喃酮	焦糖味	down
2	3-methyl-Butanoic acid	3-甲基-丁酸	奶酪香、果香	down
3	Acetic acid	乙酸	醋香	down
4	2-methyl-Butanoic acid	2-甲基-丁酸	奶酪香、果香	down
5	Hexanoic acid	己酸	油脂香、青香、香辣香	down
6	Pentanoic acid	戊酸	奶酪香、辛辣香	down
7	(Z)-2-Octen-1-ol	顺式-2-辛烯-1-醇	香料味	down
8	1-Octen-3-ol	1-辛烯-3-醇	蘑菇、干草香	down
9	Phenylethyl Alcohol	苯乙醇	果香	down
10	Ethyl Acetate	乙酸乙酯	焦糖香、甜香	down
11	Hexanoic acid, ethyl ester	己酸乙酯	果香	down
12	(Z)-2-Heptenal	顺式 2-庚醛	脂肪味	down
13	2-ethyl-1-Hexanol	2-乙基-1-己醇	重质、泥土味	up
14	2-Acetyl-1-pyrroline	2-乙酰基-1-吡咯啉	爆米花味	up

注：气味描述来源于文献[6]。

2.3 差异表达基因筛选

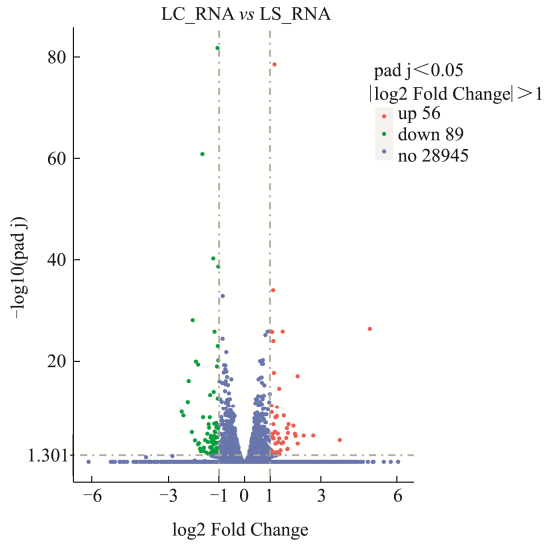


图 3 差异表达基因筛选结果

Fig.3 Differentially expressed genes screening results

注：蓝色的虚线表示差异基因筛选标准的阈值线，红色点表示上调基因，绿色表示下调基因。

以|log2(FoldChange)|≥1 且 pad j≤0.05 为筛选条件，从龙川和连山两组样本中共获得 145 个差异表达基因，其中以连山组样本为对照，龙川组样本有 56 个基因上调表达，89 个基因下调表达，差异结果通过火山图表示（图 3）。结果表明同一香稻品种在不同地区种植后在转录水平上存在明显差异。

2.4 功能注释、通路富集和香气物质形成相关基因筛选

采用 GO 功能和 KEGG 数据库对差异表达基因进行功能注释和通路富集分析。结果表明，GO 功能注释结果表明 145 个差异表达基因主要参与 74 个生物过程，涉及到 16 类细胞组分，在 53 种分子功能上发挥作用。将生物过程、细胞组分和分子功能前十个条目及注释到对应条目上的基因数量绘制成柱状图进行展示（图 4），如图 4a 结果显示，与连山组相比，龙川组样本中参与生物进程的大部分基因表达量显著下调，但在有机酸分解代谢、多糖分解代谢、光合作用和大分子分解代谢 4 个生物进程有四个基因的表达量呈上调表达。与所涉及的细胞组分上两组样本表达情况较为相似（图 4b），但在分子功能上有所区别（图 4c）。以连山组样本为对照，龙川组样本在提高 *β*-淀粉酶活性、水解酶活性、水解 O-糖基化合物、氧化还原酶活性以及双加氧酶活性的相关基因表达量显著上调。

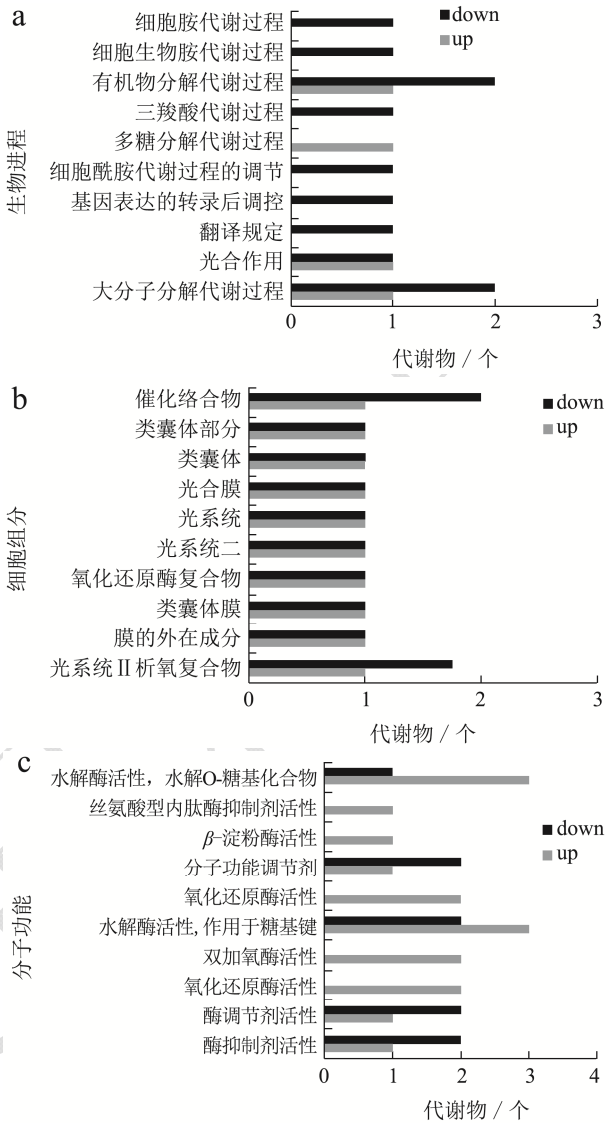


图 4 差异表达基因在 GO 功能类别中的分布情况

Fig.4 Distribution of differentially expressed genes in GO functional categories

注：a、b、c 图分别代表生物过程、细胞组分和分子功能。横坐标为 GO Term 富集的 gene 数目，纵坐标为 GO Term。黑色表示上调基因，灰色表示下调基因。

基于转录组的 KEGG 数据发现 145 个差异表达基因共注释到 20 条通路上（图 5），其中类胡萝卜素生物合成（dosa00906）为显著富集通路，注释到该途径有三个差异表达基因，两个上调表达基因 *OsNCED4*（*Os07g0154100*）和 *OsNCED5*（*Os12g0617400*），一个下调表达基因 *Os04g0578400*，三个基因都是控制脱落酸（ABA）合成关键基因[31]。在本实验中还发现另外三个与脱落酸代谢以及茉莉酸含量调控相关的基因 *OsFbx352*（*Os10g0127900*）、*OsPGIP4*（*Os05g0104700*）和一个 MYB 转录因子（*Os01g0975300*）。

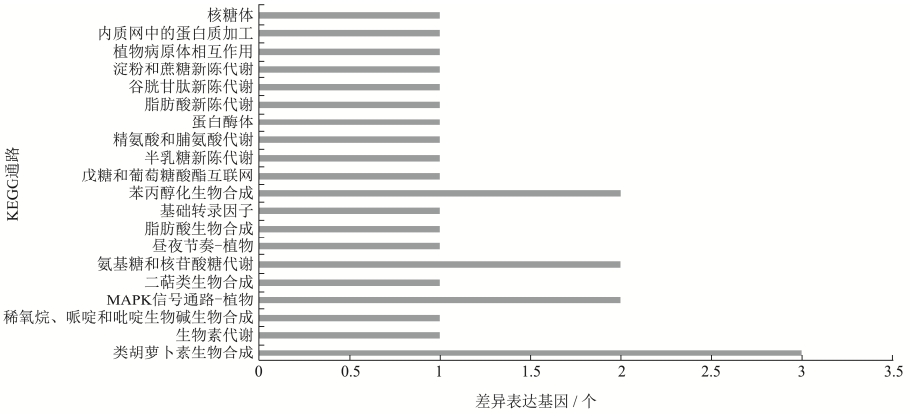


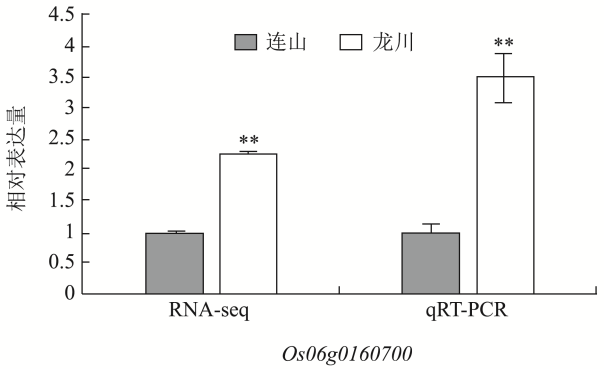
图 5 差异表达基因 KEGG 通路分析

Fig.5 KEGG pathway analysis of differentially expressed genes

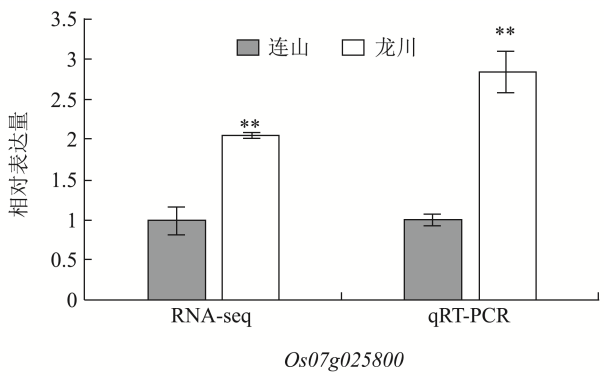
进一步筛选出最有可能参与香气物质形成的 14 个差异表达基因，利用 qRT-PCR 技术进行表达水平验证，其中基因表达量上调有 10 个，下调表达 4 个。结果表明，14 个差异基因的表达量变化趋势与转录组测序结果变化趋势保持一致（图 6）。

香稻香气品质对环境极为敏感，有研究发现香稻巴斯马蒂品种在印度和巴基斯坦的 Punjab 地区种植时，相较于其他地区或国家，香气质量更高[32]。同时有研究表明生态环境中的光、温、水、土壤性质以及非生物胁迫均能影响稻米最终的香气物质[33,34]。其中温度、土壤性质以及非生物胁迫的影响较大。本研究根据 KEGG 富集分析同样发现差异代谢物富集到次级代谢物的生物合成途径。而次生代谢物的生物合成途径与环境中的气候、土壤条件等因素密切相关[35]。Yu 等[36]研究表明香稻品种间差异香气物质与次生代谢物的生物合成、蛋白质消化及吸收有关。本研究中通过对两组样本的 qRT-PCR 验证发现有两个上调基因在两组样本中具有显著差异。其中 *Os01g0975300* 是一个 MYB 转录因子，通过调节胁迫诱导脱落酸合成，对水稻耐盐和耐旱具有重要作用[37]，还有 *Os03g0745000* 是一个热激转录因子，是热胁迫防御响应中的一个调节因子[38]。脱落酸作为一种胁迫激素，因此推测在连山种植“19 香”可能遇到了较强的逆境胁迫。广东省的龙川市和连山市均属于亚热带季风气候，根据广东省气象数据显示在六七月份的日平均气温一般达到 29~30 ℃，以上两个基因的上调表达，说明“19 香”在连山种植时候受到的温度胁迫程度较高，进而引起两地香气物质相对含量上的差异。

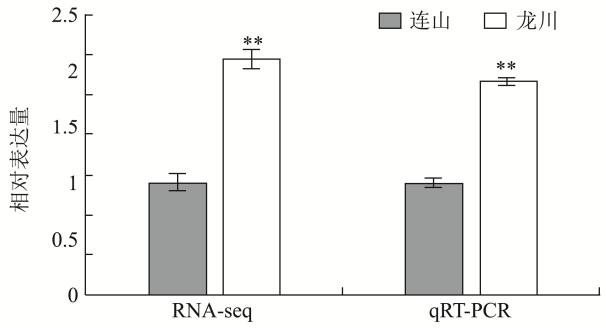
脱落酸在籽粒发育过程中具有关键性的作用。Kong 等[39]研究在香稻幼苗时期加入外源脱落酸后，采用 GC-O 和 SPME-GC-MS 技术发现籽粒中的壬醛气味活性值降低，作者推测脱落酸可能会影响到籽粒中香气物质的改变。同年作者[40]在研究茉莉酸含量与香气物质之间的相关性实验发现，脱落酸和茉莉酸的信号通路之间不同的调节作用有可能会影响香味物质壬醛的代谢途径。结合本研究的 RNA-seq 数据表明，注释到类胡萝卜素合成途径的三个差异表达基因，*Os07g0154100*、*Os12g0617400* 和 *Os04g0578400* 都是控制脱落酸（ABA）合成相关基因[41]。还发现另外三个与脱落酸代谢以及茉莉酸含量调控相关的基因 *OsFbx352*（*Os10g0127900*）、*OsPGIP4*（*Os05g0104700*）和一个 MYB 转录因子（*Os01g0975300*），以上基因在龙川组与连山组比较对中，除了 *Os04g0578400* 外，其余基因在龙川组样本中表达量显著上调，结合代谢组学结果中壬醛相对含量在两组样本中的变化，推测脱落酸合成代谢相关基因及茉莉酸含量调控相关基因的表达可能与香气物质壬醛的形成有一定的调控作用，在本实验中表现为负相关。具体的调控机制有待进一步探索。



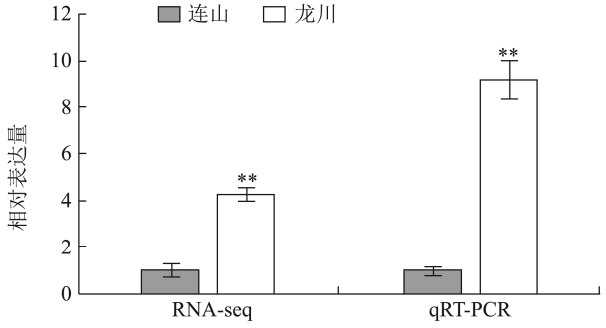
Os06g0160700



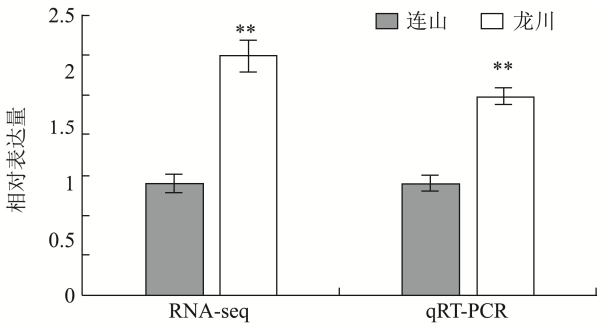
Os07g025800



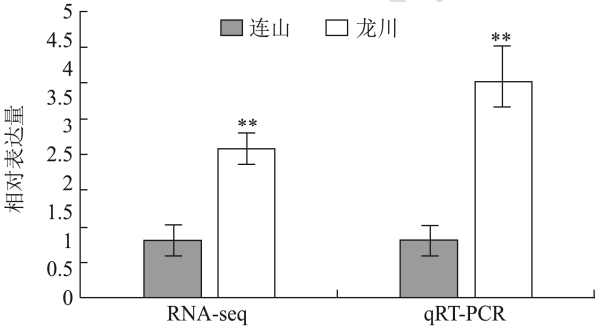
Os10g0127900



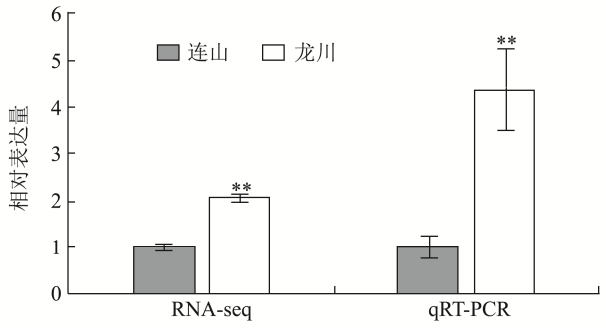
Os01g0975300



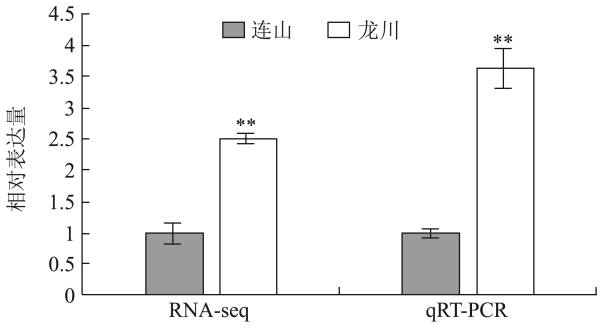
Os12g0617400



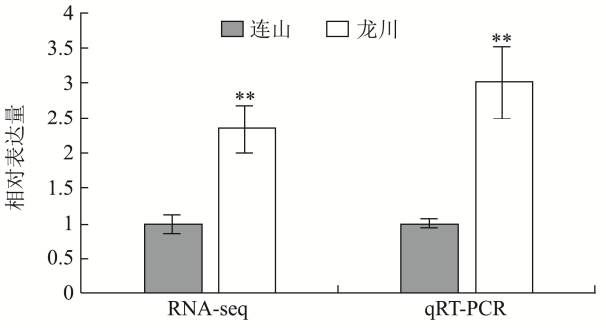
Os04g0178300



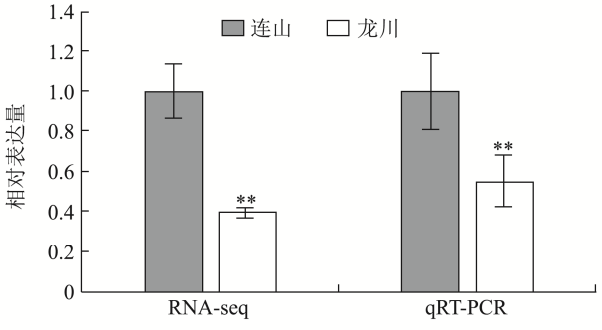
Os01g0102900



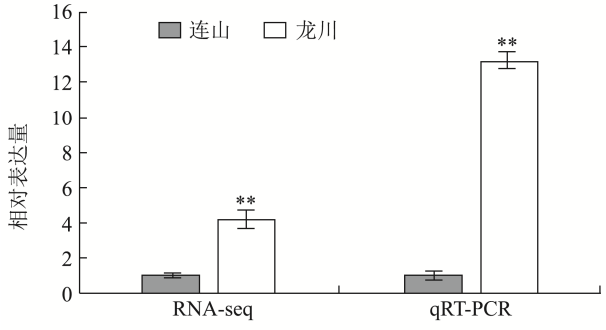
Os05g0104700



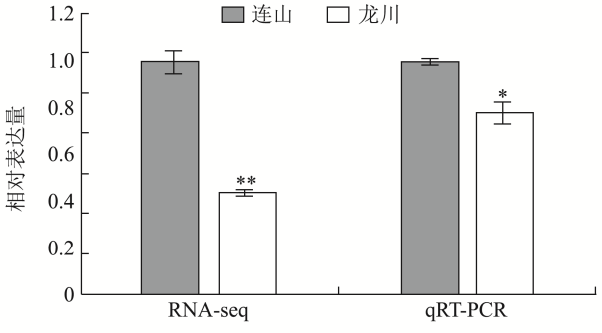
Os06g0569500



Os04g0578400



Os03g0745000



Os03g0369100

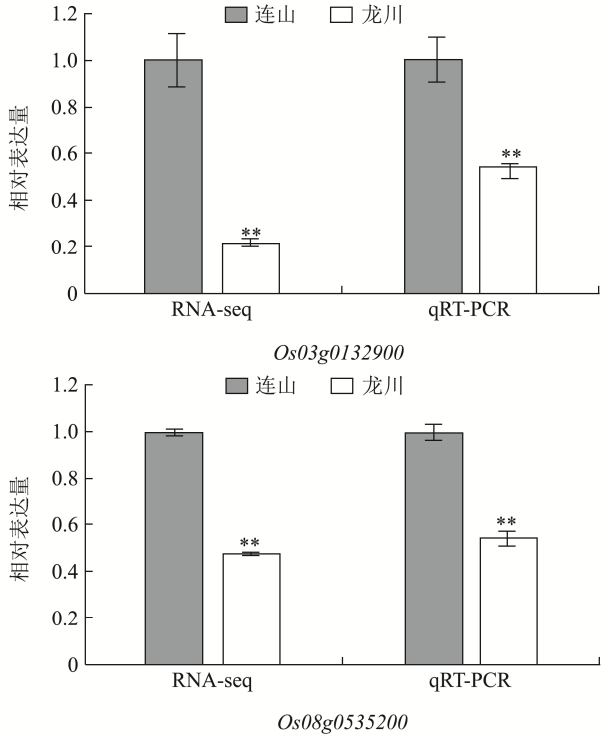


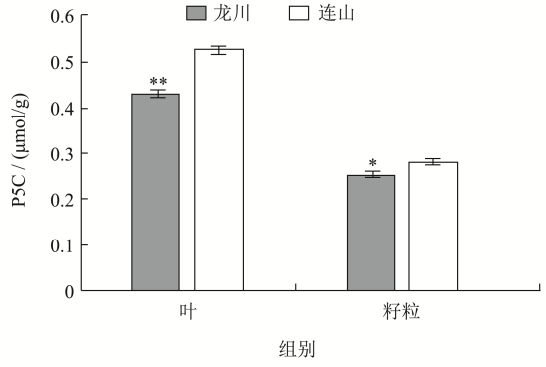
图 6 转录组验证结果

Fig.6 Transcriptome validation results

注：图中横坐标为基因，纵坐标为相对表达量。*表示 0.05 的显著水平，**表示 0.01 的显著水平。

脂肪酸的合成代谢中的相关基因对C5醛和C9醛物质，如庚醛、戊醛、壬醛和(E)-2-壬烯醛等的合成有一定的调控作用[6]。醇类中的1-辛醇和1-辛烯-3-醇、呋喃类的2-戊基呋喃等是由脂质氧化途径所产生的香气物质。本研究筛选出的差异表达基因里，根据KEGG数据库发现，与脂肪酸合成代谢相关的基因 *Os04g0445700*（编码3-氧代酰基合酶基因）是乙酰辅酶A合成脂肪酸途径的调控基因之一，进一步分析可知，以连山为对照，该基因在龙川样本中的表达量下调，说明在连山样本中合成的脂肪酸含量较高，在相关酶作用下发生的脂质氧化程度也较高，进而在代谢组中表现为具有较高含量的醛醇类等香气物质。

2.5 2AP 合成相关生理指标测定



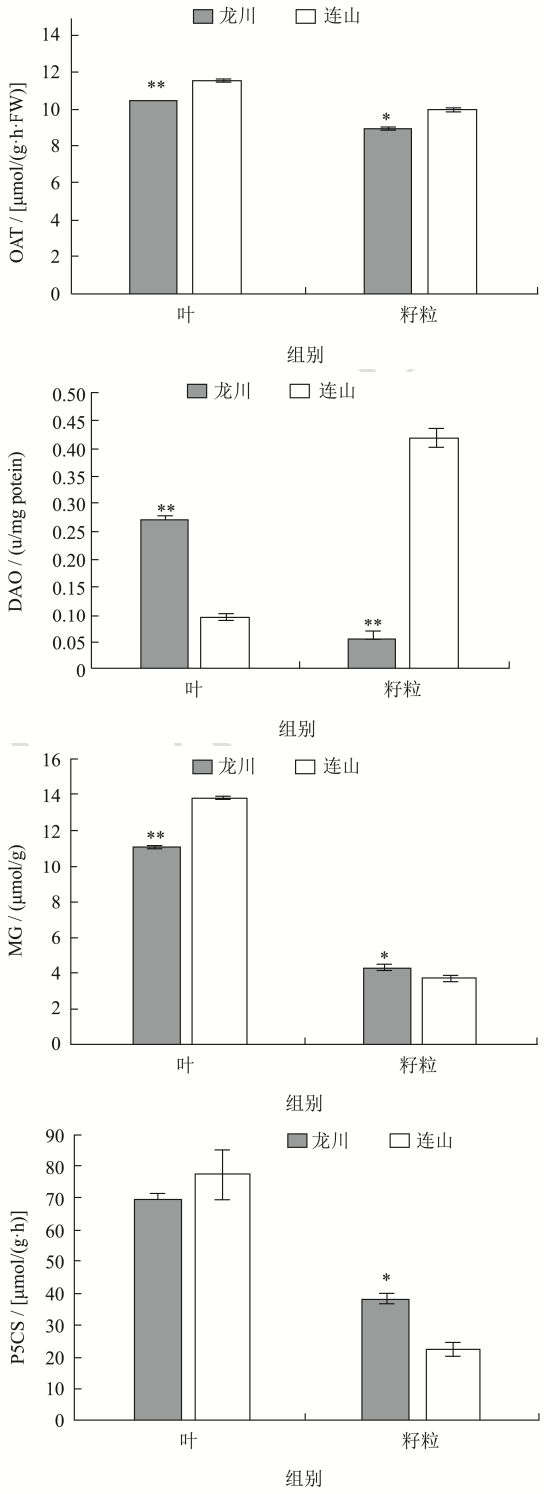


图 7 乳熟期 2AP 在叶片和籽粒中的相关生理指标

Fig.7 Physiological indicators of 2AP in leaves and grains at milk maturity

注：图中横坐标为两种植点的叶片和籽粒，纵坐标为 2AP 合成相关生理指标，*表示 0.05 的显著水平，**表示 0.01 的极显著水平。

香稻品种中的特征性香气成分 2AP 的合成途径目前已得到较为清晰地研究。脯氨酸代谢是 2AP 合成相关的重要途径之一，在相关酶作用下脯氨酸代谢产

物 Δ1-吡咯啉（2AP 的前体物质），能够与糖酵解途径产物甲基乙二醛发生化学反应产生 2AP[42,43]，另外鸟氨酸和谷氨酸是 2AP 合成的重要氮源[9]。

比较两组样本的转录组结果得出，氨基酸代谢途径及多胺降解途径相关基因在两组样本间未达到显著差异，但与 2AP 前体物质的合成途径的一些关键酶活性具有差异性（图 7）。如图所示，与连山相比，龙川组样本显著提高了乳熟期叶片二胺转氨酶（DAO）活性，显著提高了 165.38%，而对甲基乙二醛（MG）、鸟氨酸转氨酶（OAT）活性以及吡咯啉-5-羧酸盐（P5C）分别显著降低了 24.57%、10%和 22.29%。对该时期的叶片而言，与连山相比，龙川样本的吡咯啉-5-羧酸合成酶活性（P5CS）差异不显著。而在籽粒中，与连山相比，龙川样本中的 P5C 含量、OAT 和 DAO 活性分别显著降低了 10.75%、12.33%和 641.18%，对 P5CS 活性和 MG 含量则显著提高了 70.79%和 16.40%。结果表明，与连山组样本相比，P5C 含量、OAT 活性以及 DAO 活性在龙川组样本中显著降低，而 MG 含量和 P5CS 活性则显著提高，说明不同地区种植引起 2AP 前提物质的合成相关酶活性的差异，其次糖酵解途径产物 MG 可能是引起最终 2AP 含量差异的关键物质。另外我们还发现这些酶活性和产物含量在叶片和籽粒中具有不同的表现，说明 2AP 的生物合成潜在机制较为复杂。目前关于水稻 2AP 合成的潜在机制的两种说法，有一种说法表明是叶片和茎鞘合成 2AP 转运到籽粒中，另外一种说法则表示叶片中的脯氨酸转移到籽粒中进行 2AP 的合成[44,45]，但尚未有研究证明关键性调控机制，还需进一步的研究及验证。

3 结论

本研究着眼于同一香稻品种“19 香”通过异地种植所引起的香气品质差异现象以及为扩大香稻种植区域的需求，紧密围绕香稻香气对环境敏感的问题，开展香稻乳熟期籽粒胚乳中香气物质合成相关调控机制的研究。在结合 GC-MS 非靶向代谢组学和转录组学研究下发现，“19 香”在经过两地种植后其香气物质的相对含量发生显著差异，温度胁迫和脂肪酸代谢可能是引起香气物质含量差异的关键因子，脱落酸合成代谢相关基因对香气物质可能具有一定的调控作用，此外在本研究中发现，异地种植同一香稻品种，能量代谢和碳水化合物代谢途径是香气物质 2AP 合成的关键调控机制。基于对香稻香气物质形成机制的初探，旨在通过代谢组和转录组多组学分析方法，挖掘在大田环境下稻米香气物质形成过程中可能的关键物质与通路，为完善稻米香气形成的网络调控以及日后香稻品种改良提供理论依据。

参考文献

[1] Wakte Kantilal, Zanan Rahul, Hinge Vidya, et al. Thirty-three years of 2-acetyl-1-pyrroline, a principal basmati aroma compound in scented rice (*Oryza sativa* L.): A status review [J]. J Sci Food Agr, 2017, 97(2): 384-395.

[2] Buttery R G, Ling L C, Juliano B O, et al. Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 1983, 31(4): 823-826.

[3] Xianqiao Hu, Lin Lu, Zhenling Guo, et al. Volatile compounds, affecting factors and evaluation methods for rice aroma: A review [J]. Trends Food Sci Tech, 2020, 97(C): 136-146.

[4] 张江丽,普世皇,张春龙,等.云南地方香稻品种排沙香糯稻米的挥发性成分分析[J].分子植物育种,2019,17(2):612-619.

[5] Hinge Vidya R, Patil Hemant B, Nadaf Altafhusain B. Aroma volatile analyses and 2AP characterization at various developmental stages in Basmati and Non-Basmati scented rice (*Oryza sativa* L.) cultivars [J]. Rice (New York, N.Y.), 2016, 9(1): 38.

[6] Sarika V Mathure, Narendra Jawali, Ratnakar J Thengane, et al. Comparative quantitative analysis of headspace volatiles and their association with BADH2 marker in non-basmati scented, basmati and non-scented rice (*Oryza sativa* L.) cultivars of India [J]. Food Chem, 2014, 142(1): 383-391.

[7] Qingyu Zhao, Yong Xue, Qun Shen. Changes in the major aroma-active compounds and taste components of Jasmine rice during storage [J]. Food ReS Int, 2020, 133: 109160.

[8] Stephen A Goff, Harry J Klee. Plant volatile compounds: Sensory cues for health and nutritional value? [J]. Science, 2006, 311(5762): 815-819.

[9] Yoshihashi T. Quantitative analysis on 2-acetyl-1-pyrroline of an aromatic rice by stable isotope dilution method and model studies on its formation during cooking [J]. J Food Sci, 2002, 67(2): 619-622.

[10] 马宇.基于风味组学策略研究酱香型白酒关键成分及其呈香呈味特性[D].贵阳:贵州大学,2019:144.

[11] Monsoor M A, Proctor A. Volatile component analysis of commercially milled head and broken rice [J]. J Food Sci, 2004, 69(8): C632-C636.

[12] Bergman C J, Delgado J T, Bryant R, et al. Rapid gas chromatographic technique for quantifying 2-acetyl-1-pyrroline and hexanal in rice (*Oryza sativa,* L.) [J].Cereal Chem, 2000, 77(4): 454-458.

[13] Wang Y, Ha J. Determination of hexanal in rice using an automated dynamic headspace sampler coupled to a gas chromatograph-mass spectrometer [J]. J Chromatogr Sci, 2013, 51(5): 446-452.

[14] Holmström K O, Welin B, Mandal A, et al. Production of the *Escherichia coli* betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine, in transgenic plants [J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 1994, 6(5): 749-58.

[15] Gemperlová Lenka, Nováková Marie, Vanková Radomíra, et al. Diurnal changes in polyamine content, arginine and ornithine decarboxylase, and diamine oxidase in tobacco leaves [J]. J Exp Bot, 2006, 57(6): 1413-21.

[16] Milena Cvikrová, Lenka Gemperlová, Olga Martincová, et al. Effect of drought and combined drought and heat stress on polyamine metabolism in proline-over-producing tobacco plants [J]. Plant Physiol Bioch, 2013, 73: 7-15.

[17] Umair S, Leung Y M, Bland R J, et al. Enzymes of the ornithine-glutamate-proline pathway in the sheep abomasal nematode parasites *Haemonchus contortus* and *Teladorsagia circumcincta* [J]. Exp Parasitol, 2011, 129(2): 115-119.

[18] Chen C T, Chen L, Lin C C, et al. Regulation of proline accumulation in detached rice leaves exposed to excess copper [J]. Plant Sci, 2001, 160(2): 283-290.

[19] Grantham B D, Barrett J. Amino acid catabolism in the nematodes *Heligmosomoides polygyrus* and *Panagrellus redivivus*. 1. Removal of the amino group [J]. Parasitology, 1986, 93(Pt 3): 481-493.

[20] Hayzer D J, Leisinger T. The gene-enzyme relationships of proline biosynthesis in *Escherichia coli* [J]. J Gen Microbiol, 1980, 118(2): 287-293.

[21] Zhang C S, Lu Q, Verma D P. Removal of feedback inhibition of delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants [J]. J Biol Chem, 1995, 270(35): 20491-20496.

[22] Esteban Sánchez, Juan Manuel Ruiz, Luis Romero. Proline metabolism in response to nitrogen toxicity in fruit of French bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv *Strike*) [J]. Sci Hortic-amsterdam, 2002, 93(3): 225-233.

[23] Su G, An Z, Zhang W, et al. Light promotes the synthesis of lignin through the production of H_2O_2 mediated by diamine oxidases in soybean hypocotyls [J]. J Plant physiol, 2005, 162(12): 1297-1303.

[24] Xing S G, Jun Y B, Hau Z W, et al. Higher accumulation of gamma-aminobutyric acid induced by salt stress through stimulating the activity of diamine oxidases in *Glycine max* (L.) Merr. roots [J]. Plant Physiol Biochem, 2007, 45(8): 560-566.

[25] Yang R, Chen H, Gu Z. Factors influencing diamine oxidase activity and gamma-aminobutyric acid content of fava bean (*Vicia faba* L.) during germination [J]. J Agric Food Chem, 2011, 59(21): 11616-11620.

[26] Wu Mei-Li, Chou Kuo-Lung, Wu Chi-Ruei, et al. Characterization and the possible formation mechanism of 2-acetyl-1-pyrroline in aromatic vegetable soybean (*Glycine max* L.) [J]. J Food Sci, 2009, 74(5): 187-192.

[27] Yadav S K, Singla-Pareek S L, Ray M, et al. Methylglyoxal levels in plants under salinity stress are dependent on glyoxalase I and glutathione [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 337(1): 61-67.

[28] Mst Nasrin Akhter Banu, Md Anamul Hoque, Megumi Watanabe-Sugimoto, et al. Proline and glycinebetaine ameliorated NaCl stress via scavenging of hydrogen peroxide and methylglyoxal but not superoxide or nitric oxide in tobacco cultured cells [J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2010, 74(10): 2043-2049.

[29] Kind Tobias, Wohlgemuth Gert, Lee Do Yup, et al. FiehnLib: mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2009, 81(24): 10038-10048.

[30] Pertea Mihaela, Pertea Geo M, Antonescu Corina M, et al. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads [J]. Nat Biotechnol, 2015, 33(3): 290-295.

[31] ZHU Guohui, YE Nenghui, Zhang Jianhua. Glucose-induced delay of seed germination in rice is mediated by the suppression of ABA catabolism rather than an enhancement of ABA biosynthesis [J]. Plant & Cell Physiology, 2009, 50(3): 644-651.

[32] E A S, L R V, J N. Basmati rices: Genetics, breeding and trade [J]. Agricultural Research, 2012, 1(1): 25-36.

[33] Tomio I, Masahiko T, Yasuyoshi H, et al. Variation of 2-Acetyl-1-Pyrroline concentration in aromatic rice grains collected in the same region in japan and factors affecting its concentration [J]. Plant Production Science, 2004, 7(2): 178-183.

[34] Mo Z, Li W, Pan S, et al. Shading during the grain filling period increases 2-acetyl-1-pyrroline content in fragrant rice

[J]. Rice (N Y), 2015, 8: 9.

[35] Yanhua Zeng, Xueming Tan, Yongjun Zeng, et al. Changes in the rice grain quality of different high-quality rice varieties released in southern China from 2007 to 2017 [J]. J Cereal Sci, 2019, 87: 111-116.

[36] JIE Yu, SHI Tianyu, ZHANG Zhongjei, et al. Identification of key volatiles differentiating aromatic rice cultivars using an untargeted metabolomics approach [J]. Metabolites, 2021, 11(8): 528.

[37] XIONG Haiyan, LI Jinjie, LIU Pengli, et al. Overexpression of OsMYB48-1, a novel MYB-related transcription factor, enhances drought and salinity tolerance in rice [J]. Plos One, 2014, 9(3): e92913.

[38] WANG Chuang, ZHANG Qian, SHOU Huixia. Identification and expression analysis of OsHsfs in rice [J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2009, 10(4): 291-300.

[39] Zheng Kong, Degang Zhao. The inhibiting effect of abscisic acid on fragrance of kam sweet rice [J]. Journal of Food & Nutrition Research, 2014, 2(7): 395-400.

[40] Kong Zheng, Zhao Degang. Modulation of the fragrance of kam sweet rice by jasmonic acid and abscisic acid might involve the MYC2 and ABI5 transcription factors [J]. J Food Biochem, 2016, 40(5): 639-646.

[41] ZHU Guohui, YE Nenghui, ZHANG Jianhua. Glucose-induced delay of seed germination in rice is mediated by the suppression of ABA catabolism rather than an enhancement of ABA biosynthesis [J]. Plant & Cell Physiology, 2009, 50(3): 644-651.

[42] Zakaria Hossain Prodhan, SHU Qingyao. Rice aroma: A natural gift comes with price and the way forward [J]. Rice Sci, 2020, 27(2): 86-100.

[43] Kumar V, Shriram V, Kishor P B K, et al. Enhanced proline accumulation and salt stress tolerance of transgenic indica rice by over-expressing P5CSF129A gene [J]. Plant Biotechnol Rep, 2010, 4(1): 37-48.

[44] Zhaowen Mo, Jinxia Huang, Di Xiao, et al. Supplementation of 2-Ap, Zn and La improves 2-acetyl-1-pyrroline concentrations in detached aromatic rice panicles *in vitro* [J]. Plos One, 2017, 11(2): e0149523.

[45] Janchai Poonlaphdecha, Pascal Gantet, Isabelle Maraval, et al. Biosynthesis of 2-acetyl-1-pyrroline in rice calli cultures: Demonstration of 1-pyrroline as a limiting substrate [J]. Food Chem, 2016, 197(Pt A): 965-971.