

转基因稻米的非靶向代谢组变异分析及真菌毒素风险预警

赖泽萍, 朱军莉, 赵艳*

(浙江工商大学食品与生物工程学院 杭州 310018)

摘要 采用液相色谱-质谱联用技术(HPLC-MS)研究粳稻品种日本晴(FP1)和PJ574(FP2)及其相应的转基因品种(FT16、FT23)的种子的代谢组学,旨在评价转基因稻米与其亲本代谢物组成的实质等同性,从代谢组变异和真菌毒素含量两方面评价稻米中的风险因素。结果:利用主成分分析和偏最小二乘法-判别分析等多元统计方法从稻米样本检出448种代谢物。筛选差异代谢物发现L-乳酸、玉米赤霉烯酮、10E,12Z-十八碳二烯酸和精胺代谢物浓度变异幅度受品种差异的影响较大。FP1-FP2组、FP1-FT16组、FP2-FT23组分别有9,23,13个特有差异代谢物,FP1-FP2组特有差异代谢物主要包括肌醇、硬脂酸酰胺等;FP1-FT16组特有差异代谢物主要包括脱氧鸟苷酸、咖啡盐和葡萄糖酸;FP2-FT23组特有差异代谢物主要包括前列腺素B2、L-胱氨酸、16-羟基棕榈酸,FP1-FT16组变异幅度最大。转基因育种和品种差异的效应类似,都在一定程度上影响精氨酸生物合成及多条氨基酸代谢通路,而不同品种的转基因稻米中代谢通路的变异不同。经酶联免疫法(ELISA)实测验证,稻米样本中的玉米赤霉烯酮含量在4.2~6 μg/kg之间,两亲本品种间差异显著($P<0.01$),而转基因稻米的玉米赤霉烯酮含量与亲本质实质等同。ITS高通量测序结果表明镰刀菌属为稻米内生真菌的常见菌属。结论:转基因育种引发的稻米代谢组分和代谢通路变异虽可能影响稻米的营养品质,但幅度不大于品种差异,位于安全范围内。在4个货架期内的稻米样本中检出低剂量(小于6 μg/kg)的镰刀菌毒素玉米赤霉烯酮,虽低于国家标准(60 μg/kg),但其可能由稻米内生镰刀菌合成,在特定条件下存在真菌爆发生长并大量产毒的风险。

关键词 转基因稻米;非预期效应;非靶代谢组学;品种差异;玉米赤霉烯酮

文章编号 1009-7848(2024)06-0410-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.06.036

水稻(*Oryza sativa* L.)是为世界一半人口提供热量和蛋白质的主要粮食之一^[1-2]。转基因(Genetically Modified, GM)技术在水稻品种改良中的应用日趋成熟。GM作物除了外源基因表达产生的特定预期遗传效应外,还可能存在着其它不可预料的变化,简称非预期效应(unintended effects)^[3]。目前作为主粮作物的转基因水稻的安全性一直备受争议,严格评估其食用安全性是GM水稻商业化应用的必经之路。GM作物的安全性评估基于实质等同原则^[4-5],即应用各种技术对GM作物与其相应亲本或已有天然品种的生化组分进行比较,以分析二者的微量和宏量营养素以及毒素、抗营养物质等是否实质等同^[6-7],评估GM作物的代谢物组分及含量变异是否在安全范围。包括基因组、

转录组、蛋白质组和代谢组在内的多种组学技术,能比较作物的分子特征差异,被应用于评估GM作物与其亲本内源性代谢物的全面、系统分析^[8]。

代谢组学(Metabonomics或Metabolomics)是对生物体内的代谢物进行定量分析,并寻找代谢物与生理、病理变化之间相对关系的研究方法。靶向代谢组学用于分析已知的特定化合物种类,如宏量和微量营养素、抗营养素和毒素等。非靶向代谢组学分析则比靶向代谢组学能测定更多的代谢物种类^[9],为GM作物的安全性评估提供更全面、更深入的代谢物信息。

基于代谢组学评估转基因作物的非预期效应一直是国内外的研究热点。Chen等^[10]研究转基因和非转基因稻谷两个发育阶段相关代谢变化信息,结果发现成熟期转基因和非转基因水稻代谢物差别不大,在成熟的种子中未发现危险因素。Zhou等^[11]比较了抗虫转基因水稻和野生型水稻的代谢谱,结果表明生长条件和基因修饰对大多数代谢物产生了相似的影响,与非转基因水稻比较,转基因水稻中的蔗糖、甘露醇和谷氨酸含量增加

收稿日期:2023-06-16

基金项目:浙江省基础公益研究计划项目(LTGN23C200011);

浙江省领军研发攻关计划项目(2023C02026);

国家自然科学基金项目(31772100)

第一作者:赖泽萍,女,硕士生

通信作者:赵艳 E-mail: yanzhao9918@163.com

较显著。Chang 等^[12]利用非靶向代谢组学研究了转基因水稻与天然水稻品种之间的差异代谢物,以及不同播种时间或地点的天然水稻之间的差异,发现环境因素对大部分代谢物的变异效应大于基因修饰,而基因修饰引起的代谢物浓度变化较小。Ogawa 等^[13]通过气相色谱 GC-MS 分析比较转基因水稻品种及其非转基因亲本的代谢谱,发现转基因品种中几种氨基酸、有机酸、碳水化合物、脂质和次生代谢物的水平比亲本显著增加,显示出明显的代谢组学非预期变异特征。程建华等^[14]基于 GC-TOF/MS 技术分析来源于两个产地的转 *Bt* 基因大米及其亲本的代谢组学,结果显示仅甘油和鼠李糖两种代谢产物浓度在转 *Bt* 基因大米及其亲本大米间存在一定差异,产地差异比引入外源 *Bt* 基因造成的大米间代谢组差异更为显著。总体上,上述关于转基因稻米非靶向代谢组学的研究主要集中在不同产地、不同播种期的影响,以及转基因与亲本稻米之间等的代谢组学差异^[15],较少区分品种因素与基因修饰所致代谢物的差异,也未见过货架期内稻米中真菌毒素存在的有关报道。本研究收集相同田间条件下生长的粳稻品种——日本晴(FP1)和 PJ574(FP2)及其转基因品种(FT16、FT23)的种子,脱壳进行表面消毒后通过非靶向代谢组学分析比较亲本品种之间、亲本与转基因品种之间代谢物差异,从代谢组学角度评估 GM 稻米的安全性,首次报道货架期内从稻米样本中检出玉米赤霉烯酮真菌毒素,探究其成因和风险。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

水稻转基因品种 (transgenic line, T) 的培育:水稻亲本 (parent, P)→愈伤组织的诱导培养和感受态细胞制备→外源基因 2mG2-epsps 转化愈伤组织→草甘膦抗性愈伤组织的筛选→再生植株鉴定→转基因品种(T),经多代纯合选育为转基因品种。具体包括:亲本品种日本晴(FP1)及其相应的转基因品种 (FT16);亲本品种 PJ574(FP2)及其相应的转基因品种(FT23)。

4 个供试的粳稻样本种植于浙江省杭州市富阳区中国水稻研究所的转基因试验基地大田,每

个水稻样本按 6 株×6 行种植,间距 20 cm,重复 3 次。其中转基因品种于苗期正常喷施草甘膦除草剂 1 次。采用对角线法单株收获稻米,常规干燥脱粒并充分混匀后取样。2020 年 10 月收获水稻种子,自然晾干后 4 ℃保存,隔年 3 月进行代谢组学研究。

甲醇(纯度≥99.0%),赛默飞世尔科技公司;乙腈(纯度≥99.9%),赛默飞世尔科技公司;2-氯苯丙氨酸(纯度 98.5%),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;甲酸(LC-MS grade),东京 Tokyo Chemical Industry 公司;甲酸铵(纯度≥99.9%),西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;玉米赤霉烯酮 ELISA 检测试剂盒,青岛普瑞邦生物工程有限公司。

1.2 设备与仪器

H1850-R 冷冻离心机,湘仪仪器有限公司;BE-2600 混匀仪,其林贝尔仪器制造有限公司;KQ-100TDV 超声波清洗器,舒美超声仪器有限公司;MB-96 组织研磨器,浙江美壁仪器有限公司;U3000 液相色谱仪,赛默飞世尔科技公司;QE 质谱仪,赛默飞世尔科技公司。

1.3 方法

1.3.1 样品制备 参照文献[16]选取外观正常、颗粒饱满且大小一致的水稻种子 80 粒,研磨脱壳后,对水稻种子进行表面消毒处理。即脱壳种子用无菌水清洗 5 次,再依次用 70%乙醇浸泡 3 min,5%次氯酸钠浸泡 5 min,70%乙醇清洗 30 s,无菌水冲洗 6 次。取最后 1 次清洗液 100 μL 涂布在 PDA 培养基上,28 ℃条件下培养 7 d,作为检验种子表面彻底消毒的对照。

称量约 500 mg 经过表面消毒稻米样本于 2 mL EP 管中,加入 0.6 mL 2-氯苯丙氨酸(4×10^{-6} mg/L)甲醇(-20 ℃)配制,涡旋振荡 30 s。加入 100 mg 玻璃珠,放入组织研磨器中,55 Hz 研磨 60 s;室温超声 15 min;12 000 r/min 4 ℃离心 10 min,取上清液 300 μL 过 0.22 μm 膜过滤,过滤液加入到检测瓶中,自每个待测样本各取 20 μL 混合成 QC 样本^[17]。用剩余待测样本进行 LC-MS 检测。每个样品进行 3 个生物学重复测定。

1.3.2 色谱分析 采用 ACQUITY UPLC® HSS T3 1.8 μm(2.1 mm×150 mm)色谱柱,自动进样

器温度设为 8 ℃, 以 0.25 mL/min 的流速, 40 ℃ 的柱温, 进样 2 μL 进行梯度洗脱, 流动相为正离子 0.1% 甲酸水 (C)-0.1% 甲酸乙腈 (D); 负离子 5 mmol/L 甲酸铵水 (A)-乙腈 (B)。梯度洗脱程序为 0~1 min, 2% B/D; 1~9 min, 2%~50% B/D; 9~12 min, 50%~98% B/D; 12~13.5 min, 98% B/D; 13.5~14 min, 98%~2% B/D; 14~20 min, 2% D-正模式 (14~17 min, 2% B-负模式)^[18]。

1.3.3 质谱分析 仪器使用电喷雾离子源 (ESI), 正负离子电离模式, 正离子喷雾电压为 3.50 kV, 负离子喷雾电压为 2.50 kV, 鞘气 30 arb, 辅助气 10 arb。毛细管温度 325 ℃, 以分辨率 70 000 进行全扫描, 扫描范围 81~1 000, 并采用 HCD 进行二级裂解, 碰撞电压为 30 eV, 同时采用动态排除去除无必要的 MS/MS 信息^[19]。

1.3.4 酶联免疫法 (ELISA) 测定稻米中玉米赤霉烯酮毒素的含量 取 5.0 g 粉碎的稻米样品与 25.0 mL 60% 甲醇/水溶液混合均匀。强力振荡 5 min, 4 000 g 离心 15 min。取 50 μL 上清液, 按照试剂盒操作说明进行检测。

1.3.5 水稻种子内生真菌类群 ITS 高通量测序 将表面消毒的水稻种子样品放置在预冷的无菌研钵中, 用液氮冷冻并快速研磨成细粉, 用 Minkagene pLANT DNA kit 试剂盒对各个样本总 DNA 进行提取后, 利用 Thermo NanoDrop One 超微量紫外分光光度计检测 DNA 的纯度和浓度, 保证每个样本 3 个重复处理的 DNA 提取品质。

以提取的总 DNA 为模板, 根据真菌 *rRNA* 基因的内部转录间隔区 (Internal Transcribed Spacer, ITS) 选择用前端引物 ITS3 (5'-GCATC-GATGAAGAACGCAGC-3')、后端引物 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 进行扩增, 后端引物 ITS4 带有含 12 个碱基的 Barcode, 用于区分样品来源, 扩增区段为 5.8S *rDNA* 和 ITS2 区域^[20]。PCR 反应条件为: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 52 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 30 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 反应体系为: 2x Premix Taq 25 μL, 引物 (10 μmol/L) 各为 1 μL, 模板 DNA 为 50 ng, 加 ddH₂O 补齐 50 μL。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物的片段长度和浓度。利用 GeneTools Analysis Software (Version 4.03.

05.0, SynGene) 对 PCR 产物进行浓度对比后。目标 DNA 经纯化回收后, 在广东美格基因科技有限公司使用 Illumina Nova 6000 平台对构建的扩增子文库进行 PE250 测序。

1.4 数据分析

通过 Proteowizard 软件 (v3.0.8789) 将获得的原始数据转换成 mzXML 格式。利用 R (v3.3.2) 的 XCMS 程序包进行峰识别 (peaks identification)、峰过滤 (peaks filtration)、峰对齐 (peaks alignment)。得到包括质核比 (mass to charge ratio, *m/z*) 和保留时间 (retention time) 及峰面积 (intensity) 等信息的数据矩阵; 正离子模式获得 15 165 个前体分子 (precursor molecule), 负离子模式获得 16 151 个前体分子, 导出数据至 excel 进行后续分析。为使不同量级的数据能够进行比较, 对数据进行峰面积的批次归一化 (batch normalization)。

使用 R 语言 ropls 包进行偏最小二乘法-判别分析 (partial least squares-discriminate analysis, PLS-DA)。以 $P \leq 0.05$ 、VIP ≥ 1 以及多组间 $P \leq 0.05$ 的条件对代谢物进行筛选, 得到差异代谢物。代谢物的鉴定首先确认代谢物精确分子质量 (分子质量误差 $< 30 \times 10^{-6}$), 后续根据 MS/MS 模式所得碎片信息在 Metlin (<http://metlin.scripps.edu>), MoNA (<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>), 以及帕诺米克自建标准品数据库中匹配注释获得代谢物准确信息。LC-MS 代谢组学数据由苏州帕诺米克公司进行分析。

水稻种子内生真菌 ITS 序列的 Raw Reads 经过滤, 去除引物, 得到质控后的 paired-end Clean Read 数据, 然后拼接、过滤得到有效拼接片段, 用 UPARSE 算法进行 OTU 聚类。利用 usearch -sintax 将每个 OTU 的代表序列与 Unite 数据库进行比对获得物种注释信息。基于物种分类分析, 使用 R 软件进行群落组成分析。

2 结果与分析

2.1 多元分析

为表征不同稻米间的总体代谢差异以及各样品间的差异性, 对所有样品进行主成分分析 (图 1)。PCA 得分图模型具有 2 个主成分, 两个主成分累积占总变异量的 53.1%, 其中 PC1 解释 34.5%,

PC2 解释 18.6%。每个稻米的重复样本聚集在一起形成 4 个类群,但 4 个品种的稻米代谢物差异很大。FT16 远离 FP1,FT23 远离 FP2,转基因组远离亲本样本组,转基因组均在 PC1、PC2 轴的阴性侧。亲本 FP1 与转基因 FT16 主要在 PC2 轴上有差异,而亲本 FP2 与转基因 FT23 主要在 PC1 轴上有差异。两个亲本在 PC1 和 PC2 轴上均有差异。FP1、FP2 品种间、以及转基因 FT16、FT23 与亲本间均能够被明显区分,证明品种和基因修饰能够明显影响代谢物的组成,使得各个样品间的代谢物种类和含量存在明显的差异。根据 HMDB (<https://www.hmdb.ca/>) 的代谢组数据库,发现共计 448 种代谢物(图 2),包括 75 个氨基酸,42 个碳水化合物,23 个辅助因子和维生素,112 个脂质,27 个核苷酸,5 个能量和 22 个外源性物质等代谢物,142 个未知代谢物。

4 个品种的稻米已鉴定的前 30 代谢物的层次聚类分析热图如图 3 所示。FP2 与其它 3 个品种聚类为独立的两支,可见 FP2 与其它 3 个品种的代谢物成分差异较大。两个转基因品种 FT16 和 FT23 聚为一支,说明转基因品种的代谢物主要成份相似。而两个转基因品种与其相应亲本间的代谢物成份差异较大。转基因品种 FT16 和 FT23 的核苷酸和脂质丰度最高,尤其是嘌呤核苷酸。而 FP2 以氨基酸积聚为主,FP1 以碳水化合物积聚为主。

2.2 品种间、亲本与转基因稻米间的差异代谢物比较

2.2.1 PLS-DA 分析 PCA 分析结果表明,品种之间、亲本与转基因稻米之间具有代谢差异。为获得导致这个显著差异的代谢物信息,进一步对每个对比组进行偏最小二乘法-判别分析(partial least squares-discriminate analysis, PLS-DA)。图 4 为 PLA-DA 得分图,可见每个对比组间均不重叠,分离效果较好。样本间有部分分离,可能是因为水稻代谢物的种类大体相同,代谢物的浓度存在差异,导致样本点的分离。采用 PLS-DA 模型的主成分 1 的变量投影重要度(variable importance in the projection, VIP) 大于 1 并结合 t 检验的 P 值(阈值 ≤ 0.05)寻找差异性表达代谢物:FP1-FP2 组稻米比较得到 200 个差异代谢物;FP1-FT16 组

有 152 个差异代谢产物;FP2-FT23 组差异代谢产物有 199 个,可见品种间差异代谢物数量多于转基因品种与亲本的差异。由图 5 可知,不同对比组的差异代谢物分布类似,均表现为未知差异代谢物占比最大,其次为氨基酸和脂质。相比 FP1-FP2 组差异,FP1-FT16、FP2-FT23 组的氨基酸、辅助因子和维生素、能量差异代谢物所占比例降低了 0.18%~2.24%,碳水化合物、脂质、外源性物质差异代谢物所占比例升高了 1.12%~3.74%,总体上代谢物分布占比差异幅度较小,均在 5%以内。

2.2.2 差异代谢物种类比较分析 为了更好地评估 GM 稻米的非预期效应,在所有两两比较中筛选出差异最大的 30 种代谢物作为主要贡献分离物质进行分析(表 1)。

FP1-FP2 组的差异代谢物中,与 FP1 相比,

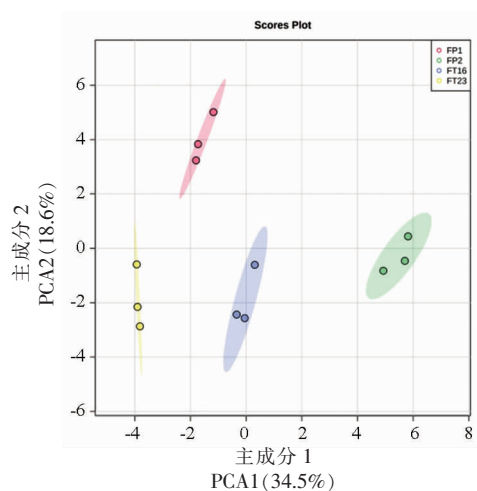


图 1 稻米样本 FP1、FT16、FP2 和 FT23 的 PCA 得分图

Fig.1 PCA scores of rice samples FP1, FT16, FP2 and FT23

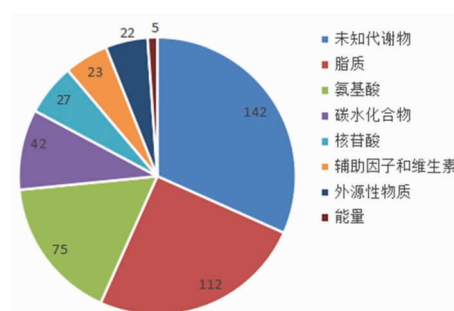


图 2 稻米样本 FP1、FT16、FP2 和 FT23 的代谢物汇总分类图

Fig.2 Summary classification map of metabolites of FP1, FT16, FP2 and FT23 rice samples

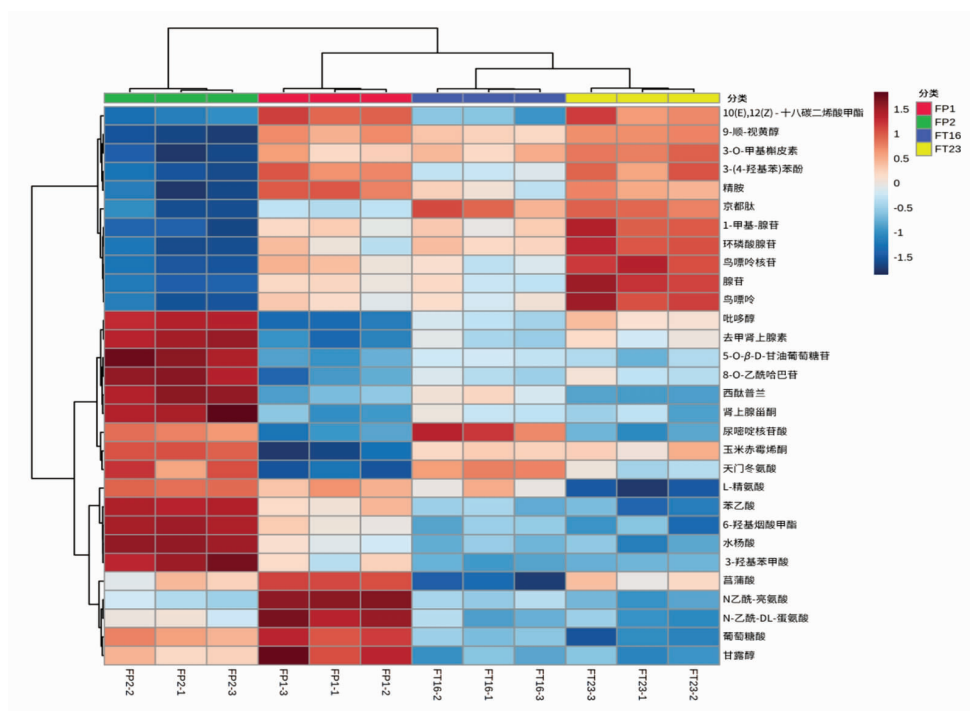


图3 稻米样本FP1、FT16、FP2和FT23前30代谢物的层次聚类分析热图

Fig.3 Heat map of the first 30 metabolites of FP1, FT16, FP2 and FT23 rice samples

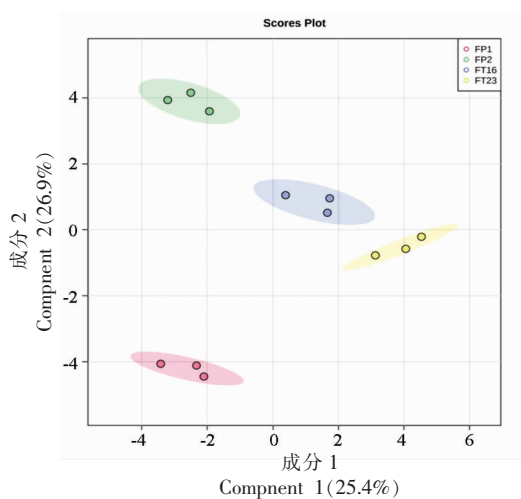


图4 稻米样本间的PLS-DA分析图

Fig.4 PLS-DA analysis diagram of rice samples

FP2有11个上调,19个下调。主要包括玉米赤霉烯酮,核苷酸(腺苷、鸟嘌呤等),脂质(壬酸、硬脂酸酰胺等),辅助因子和维生素(维生素B₆、脱硫生物素、9-顺式黄醇乙酸酯),碳水化合物(L-乳酸、果糖、肌醇),以及氨基酸(苯丙氨酸、精胺、N-乙酰-亮氨酸等)。按照倍差排序,差异最大的5个代谢物依次为玉米赤霉烯酮、9-顺式黄醇乙酸酯、西

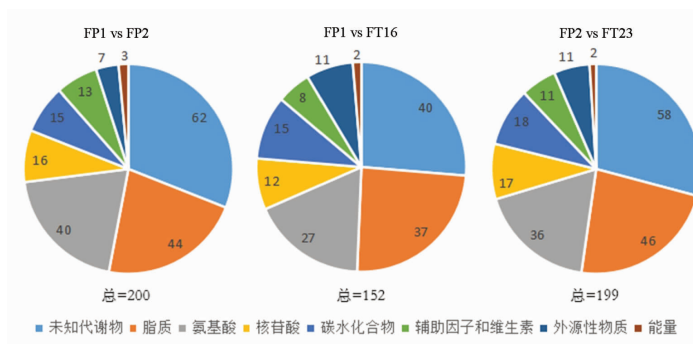


图5 各稻米比对组间差异代谢物种类汇总饼图

Fig.5 Pie chart of differential metabolites among different rice comparison groups

酞普兰、N-乙酰-亮氨酸和Delta12-前列腺素J₂。

FP1-FT16组中,大多数差异代谢物的水平经过转基因技术育种后下调。相对FP1,FT16差异代谢物中有8个上调,包括氨基酸(如甲基硫代腺苷、天冬氨酸、咪唑丙烯酸、邻氨基苯甲酸)、玉米赤霉烯酮、核苷酸(如脱氧鸟苷酸)、脂质(如脱氧胆酸)和碳水化合物(如甘露糖);FT16有22个下

调,包括氨基酸(精胺、*L*-精氨酸、*N*-乙酰-亮氨酸等)、碳水化合物(*L*-乳酸、葡萄糖酸)、脂质((*S*)脱落酸、庚酸、1-十六(烷)醇等)等。其中 FP1-FT16 组中的主要贡献差异代谢物有 23 个在 FP1-FP2、FP2-FT23 组中均无检测到显著差异,倍差较大的脱氧鸟苷酸、咖啡盐和葡萄糖酸,其 $\log_2(\text{FC}_{\text{T16/P1}})$ 的绝对值均大于 4。FP1-FT16 组筛选出的 30 个差异代谢物中有 7 个差异代谢物也在 FP1-FP2 组出现,包括玉米赤霉烯酮、甲基硫代腺苷、*L*-乳酸、精胺、吡啶洛尔、10E,12Z-十八碳二烯酸、*N*-乙酰-亮氨酸,且这些差异代谢物的变异趋势与 FP1-FP2 组相同,相比 FP1,FP2 和 FT16 的玉米赤霉烯酮、甲基硫代腺苷上调,其余差异代谢物均下调。

FP2-FT23 组中,大多数差异代谢物的水平经过转基因技术育种后上调。相对 FP2,FT23 的主要贡献差异代谢物中有 24 个上调,包括氨基酸(*L*-

胱氨酸、精胺、苯丙氨酸等)、脂质(16-羟基棕榈酸、花生四烯酸、前列腺素 B2 等)、玉米赤霉烯酮、核苷酸(鸟嘌呤、腺苷、1-甲基腺苷酸等)、辅助因子和维生素(抗坏血酸盐、脱硫生物素)等,6 个下调,包括脂质(壬酸、Delta12-前列腺素 J2)、氨基酸(*L*-组氨酸)等。其中 FP2-FT23 组中的主要贡献差异代谢物有 13 个在 FP1-FP2、FP1-FT16 组中均无检测到显著差异,倍差较大的前列腺素 B2、*L*-胱氨酸、16-羟基棕榈酸,其 $\log_2(\text{FC}_{\text{T23/P2}})$ 的绝对值均大于 11。FP2-FT23 组筛选出的 30 个差异代谢物中有 17 个差异代谢物也在 FP1-FP2 组出现,且除玉米赤霉烯酮外其它共有的差异代谢物的变异趋势与 FP1-FP2 组相同,相比 FP2,9-顺式黄醇乙酸酯、1-甲基腺苷酸、鸟嘌呤、腺苷、果糖等差异代谢物在 FP1 和 FT23 中均上调,维生素 B₆、壬酸、5-*O*- β -*D*-葡(萄)糖基吡哆醇等差异代谢物在 FP1 和 FT23 中均下调。

表 1 在所有的两两比较中选择的差异代谢物

Table 1 Differential metabolites selected in all pairwise comparisons

	类别	$\log_2(\text{FC}_{\text{FP2/}}$	$\log_2(\text{FC}_{\text{FT16/}}$	$\log_2(\text{FC}_{\text{FT23/}}$
		FP1)	FP1)	FP2)
Delta12-前列腺素 J2	脂质	3.00		-2.95
Astringin	脂质	0.80		
壬酸	脂质	0.63		-0.87
9-OxoODE	脂质	-1.21		
10E,12Z-十八碳二烯酸	脂质	-1.51	-1.20	1.29
硬脂酸酰胺	脂质	-1.78		
前列腺素 F2a	脂质	-2.89		
前列腺素 B2	脂质			14.91
16-羟基棕榈酸	脂质			11.75
EPA (d5)	脂质			3.08
花生四烯酸	脂质			1.50
脱氧胆酸	脂质		1.14	
1-十六(烷)醇	脂质		-1.20	
9,10-12,13-二辛基环氧化乙烷辛酸	脂质		-1.79	
9(S)-HPODE	脂质		-1.93	
庚酸	脂质		-3.04	
(S)脱落酸	脂质		-3.27	
甲基硫代腺苷	氨基酸	1.47	2.04	
苯丙氨酸	氨基酸	-0.88		0.86
高香草酸	氨基酸	-1.52		
精胺	氨基酸	-1.67	-0.81	1.33
<i>N</i> -乙酰-亮氨酸	氨基酸	-3.42	-3.57	
<i>L</i> -胱氨酸	氨基酸			14.70
3-脱氢莽草酸	氨基酸			1.70
<i>L</i> -蛋氨酸亚砷	氨基酸			0.95
<i>L</i> -组氨酸	氨基酸			-0.83

(续表 1)

	类别	$\log_2(\text{FC}_{\text{FP2}}/\text{FP1})$	$\log_2(\text{FC}_{\text{FT16}}/\text{FP1})$	$\log_2(\text{FC}_{\text{FT23}}/\text{FP2})$
天门冬氨酸	氨基酸		1.21	
咪唑丙烯酸	氨基酸		1.12	
邻氨基苯甲酸	氨基酸		0.90	
L-精氨酸	氨基酸		-1.08	
3-(4-羟基苯基)乳酸	氨基酸		-1.30	
肌醇	碳水化合物	2.02		
左旋乳酸	碳水化合物	-0.56	-0.63	0.39
果糖	碳水化合物	-1.44		1.90
一磷酸葡萄糖	碳水化合物			4.78
甘露糖	碳水化合物		1.13	
葡萄糖酸	碳水化合物		-4.04	
维生素 B ₆	辅助因子和维生素	1.61		-0.67
脱硫生物素	辅助因子和维生素	-1.27		1.02
9-顺式黄醇乙酸酯	辅助因子和维生素	-4.45		4.59
抗坏血酸盐	辅助因子和维生素			2.79
6-羟基烟酸甲酯	辅助因子和维生素		-0.60	
水杨酸	外源性物质		-0.79	
双(4-羟基苯基)甲醇	外源性物质		-0.95	
酚磷酸	外源性物质		-1.28	
咖啡盐	外源性物质		-4.09	
腺苷	核苷酸	-1.76		2.68
鸟嘌呤	核苷酸	-1.88		2.80
1-甲基腺苷酸	核苷酸	-1.89		3.08
脱氧鸟苷酸	核苷酸		4.06	
果糖 1,6-二磷酸	能量			3.09
玉米赤霉烯酮	未知代谢物	4.84	3.46	1.17
西酞普兰	未知代谢物	3.52		-3.74
尼群地平	未知代谢物	2.14		
5-O- β -D-葡(萄)糖基吡哆醇	未知代谢物	1.75		-1.52
苦杏仁甙	未知代谢物	1.30		
5-氨基乙酰丙酸盐酸盐	未知代谢物	-0.98		1.45
乙醇醛二聚体	未知代谢物	-1.13		1.22
(2R,3S)-3-苯基异丝氨酸酸盐酸盐	未知代谢物	-1.38		
吡啶洛尔	未知代谢物	-2.22	-0.97	
硬脂酰甘氨酸	未知代谢物			4.41
乙基丙二酸	未知代谢物			2.44
4-喹啉甲酸	未知代谢物		-0.81	
硫酸胍基丁胺	未知代谢物		-1.41	
菖蒲酸	未知代谢物		-2.06	
N-乙酰-DL-甲硫氨酸	未知代谢物		-2.29	

2.2.3 不同对比组共同差异代谢物比较分析 表 1 的各个对比组中均出现了玉米赤霉烯酮、L-乳酸、10E,12Z-十八碳二烯酸和精胺 4 种差异代谢物, 这些化合物浓度的差异可能是由基因修饰或品种差异引起的。为了更加明显显示品种对比组和转基因品种变异对比组之间的差异, 我们使用

箱形图来比较 4 种差异代谢物的相对水平 (图 6)。发现除 L-乳酸在 FP1-FT16 组中略高于 FP1-FP2 组外, 转基因变异对比组中其余 3 种差异代谢物的变异幅度均小于品种对比组, 说明基因修饰引起的这 4 种差异代谢物变异在安全范围内。值得注意的是, 玉米赤霉烯酮是普遍存在于 4 个

稻米样本中的真菌毒素类型, 仔细查看非靶向代谢组的检测结果, 发现 4 个稻米品种共 12 个重复

样本中都检测到了玉米赤霉烯酮的存在, 说明结果可信, 并非试验的偶然误差导致。

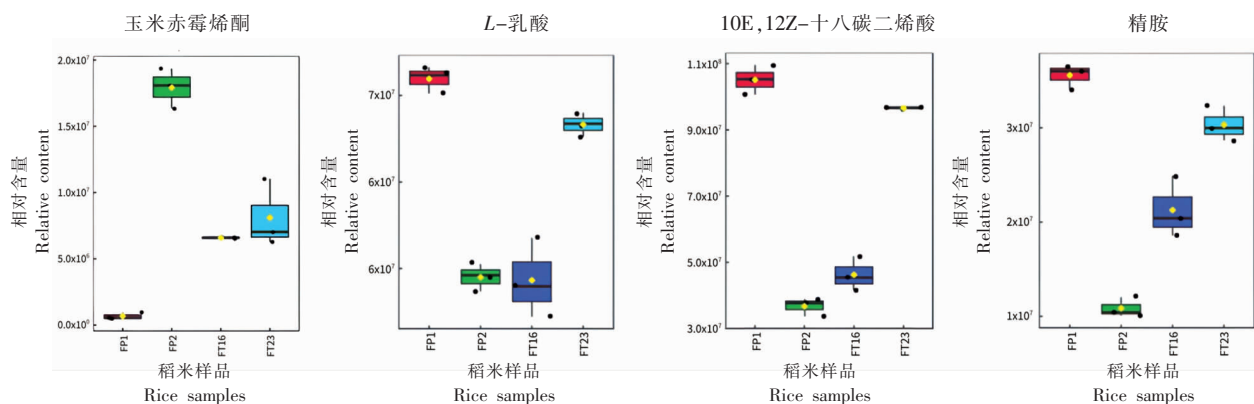


图 6 稻米比对组间共同的差异代谢物相对含量箱型图

Fig.6 Box plot of common differential metabolite's relative content among rice comparison groups

2.2.4 稻米中玉米赤霉烯酮含量的实测验证和变异特征分析 为了验证新鲜稻米中真菌毒素玉米赤霉烯酮的存在, 进一步采用 ELISA 法定量检测稻米样本中玉米赤霉烯酮, 结果(图 7)发现, 4 个稻米样本中的玉米赤霉烯酮含量位于 4.2~6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间, 两亲本品种 FP1 和 FP2 玉米赤霉烯酮含量有显著差异($P<0.01$), 但 FP1 和转基因 FT16、FP2 和转基因 FT23 稻米样本其含量没有显著差异。

分析图 6 的差异代谢物中玉米赤霉烯酮的相对含量可知, FP2 的玉米赤霉烯酮毒素相对含量显著高于 FP1, $\log_2(\text{FC}_{\text{FP2}/\text{FP1}})$ 的绝对值为 4.84。转基因样本 FT16 玉米赤霉烯酮毒素的相对含量显著高于亲本 FP1, $\log_2(\text{FC}_{\text{FT16}/\text{FP1}})$ 的绝对值为 3.46。转基因 FT23 玉米赤霉烯酮毒素的相对含量显著低于亲本 FP2, $\log_2(\text{FC}_{\text{FT23}/\text{FP2}})$ 的绝对值为 1.17。在转基因比对组中玉米赤霉烯酮相对含量倍差值均小于品种比对组间, 说明稻米玉米赤霉烯酮含量受品种基因型影响较大, 转基因稻米的非预期变异效应较小。这与 ELISA 实测试验结果一致。

2.3 品种间、亲本与转基因稻米间差异代谢物通路分析

基于 KEGG 数据库, 共鉴定出 54 条代谢通路, 并在每组中标注了前 25 条代谢通路(图 8)。对 FP1-FP2 组中的通路进行注释, 发现显著富集代谢通路有 3 个, 包括精氨酸生物合成($P=0.002$)、

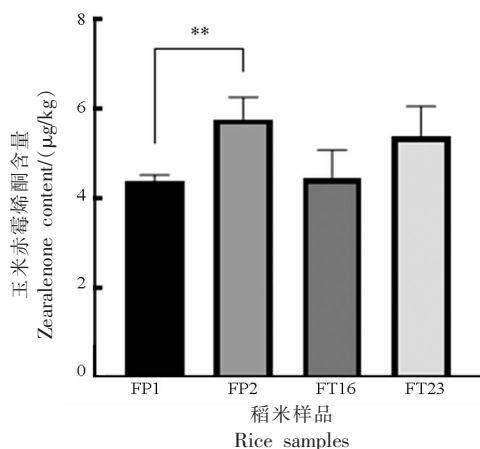


图 7 稻米样本玉米赤霉烯酮毒素含量

Fig.7 Toxin contents of zearalenone in rice samples

氨酰-tRNA 生物合成($P=0.008$)、缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸的生物合成($P=0.041$)。FP1-FT16 组中的 3 个显著富集代谢通路, 包括精氨酸生物合成($P=0.003$)、丁酸代谢($P=0.026$)、D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢($P=0.034$), 其中转基因修饰使转基因品种 FT16 的稻米中丁酸代谢、D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢通路显著富集。FP2-FT23 组中显著富集代谢通路有 3 个, 包括精氨酸生物合成($P=0.002$)、氨酰-tRNA 生物合成($P=0.004$)、缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸的生物合成($P=0.048$), 其中转基因修饰使 FT23 的稻米中氨酰-tRNA 生物合成、缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸生物合成的代谢通路显

著富集。说明不同遗传背景的转基因插入突变效应存在差异,影响的代谢通路不同。精氨酸生物合成代谢通路主要受品种基因型背景的影响。而且富集前 25 的其它代谢通路也多为氨基酸代谢,其中在 FP1-FP2、FP2-FT23 组中发现苯丙氨酸,酪氨酸和色氨酸生物合成差异代谢物通路。代谢物

通路分析结果说明转基因育种的变异效应和品种基因型差异类似,都对稻米的氨基酸代谢影响较大。氨基酸是蛋白质的基本组成单元,氨酰-tRNA 生物合成的速率和代谢水平与稻米籽粒蛋白质合成密切相关,这些代谢通路的差异可能是导致稻米蛋白质含量变异的重要因素。

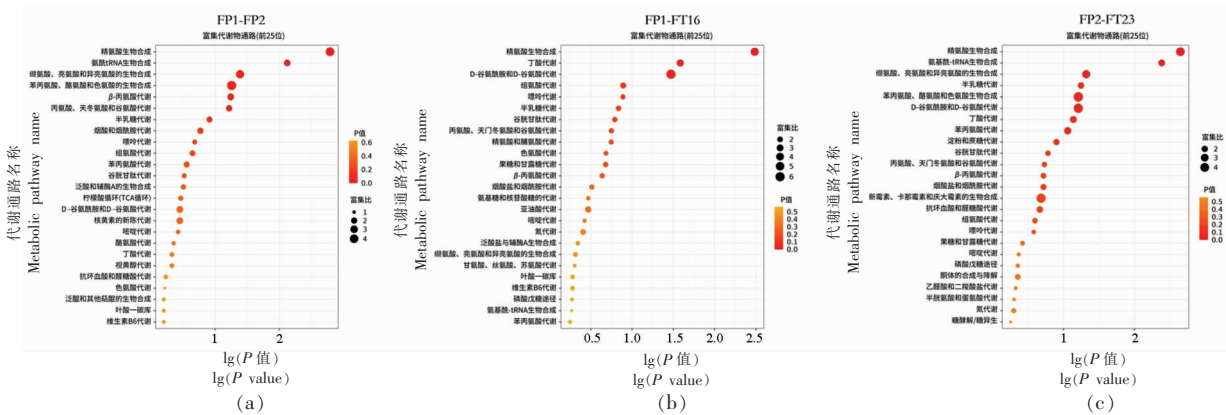


图 8 稻米比对组间前 25 代谢通路气泡图

Fig.8 Bubble chart of the top 25 metabolic pathways among rice comparison groups

2.4 稻米内生真菌 ITS 高通量测序分析及玉米赤霉烯酮的来源初探

玉米赤霉烯酮主要由禾谷镰刀菌、尖孢镰刀菌、木贼镰刀菌、雪腐镰刀菌等镰刀菌产生^[21]。由于稻米样本外观和发芽率正常,并且测试前都按照种子内生菌的检测要求进行了严格的表面清洗和消毒,能排除外源毒素污染,推测稻米中检测的玉米赤霉烯酮可能由内生真菌产生。植物内生菌(Endophyte)是指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物的组织或器官内部,但对宿主不会产生明显有害症状的微生物^[22],包括内生细菌和内生真菌。对 4 个供试稻米样本的内生真菌类群进行 ITS 高通量测序分析,并将属水平上的真菌类群及相对丰度示于图 9,发现 4 个稻米样本中都检测到了比较丰富的镰刀菌属,其中 FP1 和 FT16 的稻米内生镰刀菌属相对丰度分别为 1.24%和 75.16%,FP2 和 FT23 的镰刀菌属相对丰度分别为 23.77%和 1.59%。这为稻米样本中玉米赤霉烯酮的来源提供了一种可能的微生物基础。这些稻米内生镰刀菌属中是否含有产毒株,以及产毒能力和条件等有待后续研究。

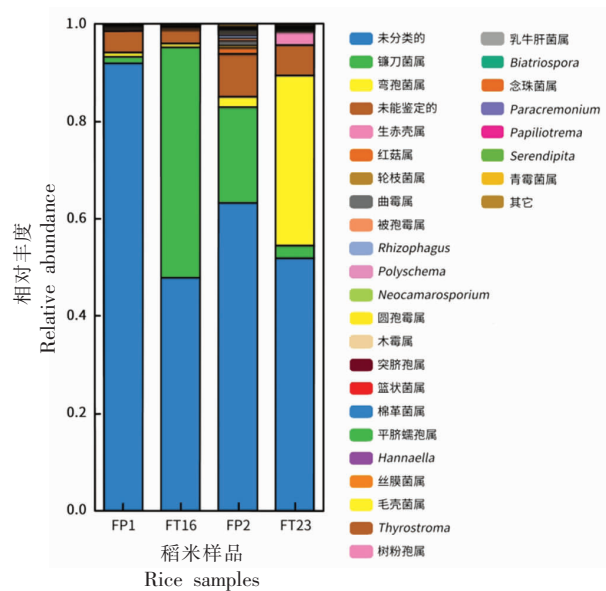


图 9 稻米样本的内生真菌属水平物种相对丰度分布图

Fig.9 Relative abundance distribution of endophytic fungi at the genus level in rice samples

3 讨论

分析转基因稻米代谢物的非预期效应是安全性评估的重要环节^[23]。转 2mG2-epsps 纯合株系 FT16 和 FT23 分别是赵艳基因工程课题组前期以

FP1 和 FP2 的成熟胚愈伤组织为受体,利用基因枪介导洁净 DNA 转化法将目的基因 *2mG2-epsps* 表达框导入水稻获得的转基因水稻第 4 代纯合阳性株系^[24]。代谢物的层次聚类分析热图表明,FP2 与其它 3 个品种的代谢物成份差异较大。转基因品种 FT16 和 FT23 核苷酸和脂质的丰度最高,尤其是嘌呤核苷酸。相比之下,FP2 以氨基酸积聚为主,FP1 以碳水化合物积聚为主。研究表明脂类化合物含量是影响米饭咀嚼感和米饭光泽的主要因素^[25],说明转基因稻米 FT16 和 FT23 的口感可能会比亲本稻米 FP1 和 FP2 的更好。转基因稻米 FT23 中绝大多数必需氨基酸和非必需氨基酸的含量均比亲本稻米 FP2 低。氨基酸不仅是水稻营养物质,还可以帮助水稻适应恶劣的环境^[26],供试水稻品种的抗逆表现是否存在差异,需要进一步探究。所有两两比较中筛选出差异最大的 30 种代谢物分析发现,FP1-FP2 组特有差异代谢物占主要贡献差异代谢物的 30%,倍差幅度为 0.8~2.89。FP1-FT16 组特有差异代谢物占主要贡献差异代谢物的 76.67%,倍差幅度为 0.6~4.09。FP2-FT23 组特有差异代谢物占主要贡献差异代谢物的 43.33%,倍差较大,幅度为 0.83~14.91,特有差异代谢物中转基因品种比对组其数量以及倍差幅度均大于亲本品种差异。在转基因品种比对组中存在的特有差异代谢物,这些化合物浓度的差异很可能是由基因修饰引起的,但绝大多数差异代谢物在转基因品种 FT16、FT23 中没有发生一致性的变化,仅在单个转基因品种中发生变异,说明 GM 作物的安全性评估应遵循个案分析原则。Chen 等^[10]研究发现有些代谢物在成熟阶段的所有 6 种转基因品种中都没有同时发生变化,表明外源转基因编码蛋白的表达并未改变成熟种子中的代谢物。而本研究发现不同转基因品种中差异代谢物水平的上下调趋势不同,与对应亲本相比,转基因稻米 FT16 差异代谢物含量以下调为主,而 FT23 差异代谢物含量以上调为主。而且绝大多数差异代谢物仅在单个转基因品种中发生变异,可见受亲本品种的遗传背景影响较大。

由代谢通路结果可知,亲本 FP1 和转基因品种 FT16 稻米在代谢中最大差异是丁酸代谢和 *D*-谷氨酰胺和 *D*-谷氨酸代谢。丁酸作为脂肪酸可为

稻米提供能量,且对植物抗逆性有着重要作用^[27]。谷氨酸、酮戊二酸差异代谢物同时参与 FP1-FT16 组的两条显著富集代谢通路,说明该差异代谢物对通路影响较大。亲本 FP2 和转基因品种 FT23 稻米在代谢中最大的差异代谢物通路是氨酰-tRNA 生物合成和缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成。氨酰-tRNA 生物合成是形成蛋白质的重要通路之一^[28],该通路映射出来的代谢物包括异亮氨酸、亮氨酸、谷氨酸等各类氨基酸,说明氨基酸在 FP2-FT23 组氨基酸代谢通路中相关性很高,且这些氨基酸代谢物在转基因稻米 FT23 中含量下调。草甘膦对莽草酸途径中的植物酶烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸合酶的高度特异性,导致芳香族氨基酸的生物合成^[29]。但在 FP1-FT16 组中未发现苯丙氨酸,酪氨酸和色氨酸生物合成差异代谢物通路,仅在 FP1-FP2 组、FP2-FT23 组发现,这可能是不同转基因株系中,外源基因插入位点不同,受体基因组的变异特征存在差异。

玉米赤霉烯酮是对粮食作物污染最广泛的霉菌毒素之一,一旦在作物中蓄积超过限量,会对人和动物的健康造成严重的危害,比如引起动物流产、死胎、返情等生殖异常现象,毒素进入人体诱发肿瘤,产生血液和免疫毒性影响^[30]。本文首次经非靶代谢组测定和 ELISA 法实测验证,在 4 个货架期内的稻米样本中检出低剂量(小于 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$)的镰刀菌毒素玉米赤霉烯酮,并能排除外源毒素的污染。两个转基因品种 FT16 和 FT23 的稻米中玉米赤霉烯酮含量均与亲本实质等同,且玉米赤霉烯酮相对含量倍差值均小于品种比对组间,说明其在安全范围内。李季伦等^[31]提出高等植物可内源产生玉米赤霉烯酮,但一直缺乏植物中存在玉米赤霉烯酮生物合成的关键基因序列等分子证据。Walitang 等^[32]研究发现水稻内生微生物群落的多样性和组成结构随植物基因型的不同而不同。我们课题组前期研究发现稻米样本的可培养内生真菌群落结构中,镰刀菌属是常见优势菌属^[33]。本文稻米内生真菌 ITS 高通量测序结果(图 9)再次表明稻米内生镰刀菌属相对丰度较高,我们推测其可能由稻米内生镰刀菌合成,稻米中是否存在产毒真菌以及产毒条件如何还需要更深入的研究。本研究的转基因水稻获得抗除草剂特性的同

时,影响了水稻芳香族氨基酸代谢途径,导致种子蛋白质等营养物质组成发生变异,从而对外界真菌感染发生免疫或影响内生真菌定植。内生真菌细胞或孢子具有在特定条件下真菌爆发生长并大量产毒的特性,因此是威胁稻米食品安全的主要风险因素,玉米赤霉烯酮毒素产生的原因可能是镰刀菌内生真菌导致。

4 结论

通过非靶向代谢组学分析粳稻品种日本晴(FP1)和PJ574(FP2)以及其转基因品种(FT16、FT23)的种子代谢产物,共检测出448种代谢物。转基因稻米FT16和FT23的脂类化合物含量较高,FP1的碳水化合物含量较高,FP2的氨基酸含量较高。转基因育种引发的稻米代谢组分和代谢通路变异虽然可能影响稻米的营养品质,但幅度不大于品种差异,位于完全范围内。本文首次报道应用非靶向代谢组分析技术在4个货架期内的稻米样本中检出低剂量(小于6 $\mu\text{g}/\text{kg}$)的镰刀菌毒素玉米赤霉烯酮,虽然低于国家标准(60 $\mu\text{g}/\text{kg}$),但其可能由稻米内生镰刀菌合成,在特定条件下存在真菌爆发生长并大量产毒的风险。

参 考 文 献

- [1] CANTRELL R P, REEVES T G. The cereal of the world's poor takes center stage[J]. *Science*, 2002, 296(5565): 53-53.
- [2] YU J, HU S, WANG J, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*)[J]. *Science*, 2002, 296(5565): 79-92.
- [3] 王森, 李健爽, 杜晓燕. 代谢组学在转基因作物非预期效应评价中的应用[J]. *食品科学*, 2014, 35(9): 312-316.
WANG S, LI J S, DU X Y. Application of metabolomics in the evaluation of unexpected effects of transgenic crops[J]. *Food Science*, 2014, 35(9): 312-316.
- [4] OH S W, PARK S Y, LEE S M, et al. Multivariate analysis for the safety assessment of genetically modified rices in the anti-nutrients and phenolic compounds[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2016, 51(3): 765-776.
- [5] KOK E J, KUIPER H A. Comparative safety assessment for biotech crops[J]. *Trends in Biotechnology*, 2003, 21(10): 439-444.
- [6] KUIPER H A, KLETER G A, NOTEBORN H P, et al. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods[J]. *Plant Journal*, 2010, 27(6): 503-528.
- [7] ZOLLA L, RINALDUCCI S, ANTONIOLI P, et al. Proteomics as a complementary tool for identifying unintended side effects occurring in transgenic maize seeds as a result of genetic modifications[J]. *Journal of Proteome Research*, 2008, 7(5): 1850-1861.
- [8] CHRIST B, PLUSKAL T, AUBRY S, et al. Contribution of untargeted metabolomics for future assessment of biotech crops[J]. *Trends in Plant Science*, 2018, 23(12): 1047-1056.
- [9] SHEPHERD L V T, MCNICOL J W, RAZZO R, et al. Assessing the potential for unintended effects in genetically modified potatoes perturbed in metabolic and developmental processes. Targeted analysis of key nutrients and anti-nutrients[J]. *Transgenic Research*, 2006, 15(4): 409-425.
- [10] CHEN P, LIN D, HU C Y, et al. Effect on metabolome of the grains of transgenic rice containing insecticidal *cry* and glyphosate tolerance *epsps* genes[J]. *Plant Growth Regulation*, 2019, 88(1): 1-7.
- [11] ZHOU J, MA C F, XU H L, et al. Metabolic profiling of transgenic rice with *cryIac* and *sck* genes: an evaluation of unintended effects at metabolic level by using GC-FID and GC-MS[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009, 877(8/9): 725-732.
- [12] CHANG Y W, ZHAO C X, ZHEN Z, et al. Metabolic profiling based on LC/MS to evaluate unintended effects of transgenic rice with *cryIac* and *sck* genes[J]. *Plant Molecular Biology*, 2012, 78(4/5): 477-487.
- [13] OGAWA T, KASHIMA K, YUKI Y, et al. Seed metabolome analysis of a transgenic rice line expressing cholera toxin B-subunit[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 5196.
- [14] 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 study of transgenic Bt rice based on GC-TOF/MS[J]. *Journal of Analysis and Testing*, 2016, 35(10): 1217-1224.
- [15] BEDAIR M, GLENN K C. Evaluation of the use of untargeted metabolomics in the safety assessment of genetically modified crops [J]. *Metabolomics*, 2020, 16(10): 111.
- [16] 姜晓宇, 高菊生, 徐凤花, 等. 水稻种子内生细菌多样性及其分泌植物生长素能力的测定[J]. *微生物学报*, 2013, 53(3): 269-275.
- JIANG X Y, GAO J S, XU F H, et al. Diversity of endophytic bacteria from rice seeds and their ability to secrete plant auxin[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(3): 269-275.
- [17] VASILEV N, BOCCARD J, LANG G, et al. Structured plant metabolomics for the simultaneous exploration of multiple factors[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 37390.
- [18] OMNIA H A, EMAN M O, et al. Metabolomics analysis and biological investigation of three Malvaceae plants[J]. *Phytochem Anal*, 2020, 31(2): 204-214.
- [19] MONNERAT G, SEARA F, EVARISTO J, et al. Aging-related compensated hypogonadism: Role of metabolomic analysis in physiopathological and therapeutic evaluation[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2018, 183: 39-50.
- [20] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, ScienceDirect[J]. *PCR Protocols*, 1990, 18(1): 315-322.
- [21] NAHLE S, KHOURY E L, ANDRÉ, ATOUI A. Current status on the molecular biology of zearalenone: its biosynthesis and molecular detection of zearalenone producing *Fusarium* species[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2021, 159(2): 247-258.
- [22] PETRINI O. Fungal endophytes of tree leaves [G]. ANDREW J H, HIRANO S S. *Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience: Microbial Ecology of Leaves*. New York, NY: Springer, 1991: 179-197. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4612-3168-4_9.
- [23] 李敏, 朴建华, 杨晓光. 抗性淀粉转基因大米和本地大米营养成分的比较研究[J]. *科学技术与工程*, 2009, 9(7): 1847-1849.
- LI M, PU J H, YANG X G. Comparative study on the nutritional components of resistant starch transgenic rice and its parent rice[J]. *Science, Technology and Engineering*, 2009, 9(7): 1847-1849.
- [24] 赵艳, 邓春泉, 邓丽蝶. 洁净 DNA 转化获得 *2mG2-epsps* 基因单拷贝整合的抗草甘膦水稻[J]. *中国水稻科学*, 2014, 28(1): 15-22.
- ZHAO Y, DENG C Q, DENG L D. Glyphosate-resistant rice with *2mG2-epsps* gene single copy integration was obtained by clean DNA transformation[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2014, 28(1): 15-22.
- [25] 于永红, 周鹏, 段彬伍, 等. 水稻脂肪含量分布及与食味品质的相关性分析[J]. *浙江农业科学*, 2007, (6): 56-58.
- YU Y H, ZHOU P, DUAN B W, et al. Distribution of fat content in rice and its correlation with food quality[J]. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2007(6): 56-58.
- [26] LUGAN R, NIOGRET M F, LEPORT L, et al. Metabolome and water homeostasis analysis of *Thellungiella salsuginea* suggests that dehydration tolerance is a key response to osmotic stress in this halophyte[J]. *Plant Journal*, 2010, 64(2): 215-229.
- [27] KAPLAN F, KOPKA J, SUNG D Y, et al. Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of *Arabidopsis* reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content[J]. *Plant Journal*, 2007, 50(6): 967-981.
- [28] 谢兆辉. 氨酰-tRNA 合成酶维持翻译忠实性的机制[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2011, 27(2): 110-115.
- XIE Z H. Mechanism of Aminoacyl-tRNA synthetase in maintaining translation fidelity[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 27(2): 110-115.
- [29] POLLEGIONI L, SCHONBRUNN E, SIEHL D. Molecular basis of glyphosate resistance—different approaches through protein engineering[J]. *The FEBS journal*, 2011, 278(16): 2753-2766.
- [30] ZHANG G L, FENG Y L, SONG J L, et al. Zearalenone: A mycotoxin with different toxic effect in domestic and laboratory animals' granulosa cells[J]. *Front Genet*, 2018, 9: 667.
- [31] 李季伦, 朱彤霞, 张麓, 等. 玉米赤霉烯酮的研究

- [J]. 北京农业大学学报, 1980, 15(1): 13–28.
- LI J L, ZHU D X, ZHANG C, et al. Study on zearalenone[J]. Journal of Beijing Agricultural University, 1980, 15(1): 13–28.
- [32] WALITANG D I, KIM C G, KIM K, et al. The influence of host genotype and salt stress on the seed endophytic community of salt-sensitive and salt-tolerant rice cultivars[J]. BMC Plant Biology, 2018, 18(1): 1–16.
- [33] 赵艳, 王天圻, 朱军莉. 基于 PTN 系统分析不同种植地转基因水稻种子可培养内生真菌菌群的多样性[J]. 中国农业科学, 2020, 53(11): 2305–2320.
- ZHAO Y, WANG T Q, ZHU J L. Analysis of diversity of cultivable endophytic fungi in transgenic rice seeds from different planting areas based on PTN system[J]. Chinese Agricultural Sciences, 2020, 53(11): 2305–2320.

Analysis of Non-targeted Metabolomic Variation in Transgenic Rice and Warning of Mycotoxin Risk

Lai Zeping, Zhu Junli, Zhao Yan*

(School of Food and Bioengineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018)

Abstract The main objectives were to evaluate the substantial equivalence of metabolite composition in transgenic rice and its parents, and assess the risk factors in rice from two aspects of metabolomic variation and mycotoxin content. High performance liquid chromatography–mass spectrometry (HPLC–MS) was used to analyze Japonica rice varieties Nipponbare (FP1) and PJ574(FP2) and their corresponding transgenic lines (FT16 and FT23). The results were as follows: multivariate statistical methods such as principal component analysis and partial least squares discriminant analysis were used to detect 448 metabolites from rice samples. Different metabolites were screened and it was found that the concentration variations of zearalenone, *L*-lactate, 10*E*, 12*Z*-octadecanodienoic acid and spermine were significantly affected by gene modification or variety differences. There were 9, 23 and 13 unique differential metabolites in group FP1–FP2, FP1–FT16 and FP2–FT23, respectively, with the highest variation in FP1–FT16. The unique differential metabolites of group FP1–FT16 mainly included deoxyguanolate, coffee salt and gluconic acid. The distinct metabolites of FP2–FT23 were mainly prostaglandin B2, *L*-cystine, 16-hydroxypalmitic acid. The unique differential metabolites of FP1–FP2 consisted of inositol and stearate amides. The effects of transgenic breeding and variety differences were similar, both of which affect arginine biosynthesis and multiple amino acid metabolic pathways to a certain extent, but the variation of metabolic pathways in different varieties of transgenic rice was different. Enzyme-linked immunoassay (ELISA) showed that the zearalenone content in rice samples ranged from 4.2 to 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, with a significant difference between the two parent varieties ($P < 0.01$), but the content of zearalenone in transgenic rices was substantial equivalence to that in the parents. *Fusarium* was found to be a common endophytic fungus in rice by high-throughput sequencing. Conclusions: Although the variation of metabolic components and metabolic pathways induced by transgenic breeding may affect the nutritional quality of rice, the extent of variation is not greater than that of rice varieties, and it is within the safe range. A low dose (less than 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$) of *Fusarium* toxin zearalenone was detected in rice samples from four rice samples by untargeted metabolomic analysis technique. Although lower than the national standard (60 $\mu\text{g}/\text{kg}$), *Fusarium* toxin may be synthesized by endophytic *Fusarium* fungi in rice, and there is a risk of fungal outbreaks under certain conditions with significant accumulation of toxicity.

Keywords transgenic rice; unintended effects; non-targeted metabolomics; variety difference; zearalenone