

DOI: 10.11686/cyxb2024258

http://cyxb.magtech.com.cn

赛牙热木·哈力甫, 杨莉, 李冠宏, 等. 基于非靶向代谢组学分析丛枝病感病与未感病苦豆子代谢物的差异. 草业学报, 2025, 34(5): 105-117.

SAIYAREMU Halifu, YANG Li, LI Guan-hong, et al. Analysis of metabolite differences in *Sophora alopecuroides* infected and non-infected by witches' broom disease based on non-targeted metabolomics. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(5): 105-117.

基于非靶向代谢组学分析丛枝病感病与未感病苦豆子代谢物的差异

赛牙热木·哈力甫^{1**}, 杨莉^{2**}, 李冠宏¹, 朱永琪¹, 李东¹

(1. 石河子大学农学院, 新疆生产建设兵团绿洲生态农业省部共建国家重点实验室, 新疆 石河子 832003; 2. 新疆生产建设兵团林业和草原工作站, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要: 植原体会导致寄主植物黄化、顶枯、丛枝、簇生、小叶、矮化、花变叶等症状, 迄今我国植原体病害有 100 多种, 包括重要的经济作物、中草药及林木等病害。由植原体引起的苦豆子丛枝病导致寄主生长被抑制、种子绝收、产量降低等, 对我国苦豆子相关产业带来了潜在的威胁。以植原体侵染感病苦豆子、健康苦豆子为研究对象, 利用形态学、分子生物学、非靶向代谢组学分析苦豆子丛枝病病原及病原侵染对苦豆子代谢物的影响。结果表明引起苦豆子丛枝病的病原菌为 16Sr V-B 亚组成员; 病原感染显著改变了苦豆子代谢物, 差异代谢物主要注释到环境信息处理、遗传信息处理和新陈代谢三大功能, 其中新陈代谢占 92.38%, 通过 KEGG 通路气泡图分析发现卟啉和叶绿素代谢及苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成通路具有显著差异, 初步推测病原菌的侵染主要通过寄主代谢物的变化引起寄主植物的感病, 其中以上 2 个通路的变化对苦豆子丛枝病的发生具有重要的作用, 即病原菌的侵染降低寄主光合能力从而引起营养匮乏及抗性降低引起感病。

关键词: 苦豆子; 丛枝病; 非靶向代谢组学; KEGG 分析

Analysis of metabolite differences in *Sophora alopecuroides* infected and non-infected by witches' broom disease based on non-targeted metabolomics

SAIYAREMU Halifu^{1**}, YANG Li^{2**}, LI Guan-hong¹, ZHU Yong-qi¹, LI Dong¹

1. The Key Laboratory of Oasis Eco-agriculture, Xinjiang Production and Construction Corps, College of Agriculture, Shihezi University, Shihezi 832003, China; 2. Xinjiang Production and Construction Corps Forestry and Grassland Work Headquarters, Urumqi 830011, China

Abstract: Phytoplasma is a bacterial pathogen that induces a range of symptoms in host plants, including yellowing, apical necrosis, witches' broom, phyllody, dwarfism, and floral changes. In China, more than 100 types of phytoplasma diseases have been identified that affect important economic crops, traditional Chinese medicinal herbs, and forestry. Witches' broom disease, caused by phytoplasma infection in *Sophora alopecuroides*, inhibits growth, causes seed production failure, and reduces yield, posing a potential threat to industries that utilize *S. alopecuroides* in China. This study focused on the impact of phytoplasma infection on *S. alopecuroides* metabolites by comparing infected and healthy plants using morphological, molecular biological, and untargeted metabolomic analyses. Our results indicate that the phytoplasma strain causing witches' broom disease in *S. alopecuroides* belongs to the 16Sr

收稿日期: 2024-07-02; 改回日期: 2024-09-23

基金项目: 石河子大学高层次人才科研启动项目(RCZK2021B23)和石河子大学自主资助支持专项(ZZZC2022009)资助。

作者简介: 赛牙热木·哈力甫(1989-), 女, 新疆石河子人, 副教授, 博士。E-mail: 437246661@qq.com; 杨莉(1990-), 女, 新疆昌吉人, 林业工程师, 硕士。E-mail: 980999523@qq.com. ** 共同第一作者 These authors contributed equally to this work.

V-B subgroup. Infection significantly altered the metabolite profile of *S. alopecuroides*, with differentially annotated metabolites primarily associated with environmental information processing, genetic information processing, and metabolism, with the latter constituting 92.38% of total observed metabolite changes. KEGG pathway analysis revealed significant differences in the porphyrin and chlorophyll metabolism pathways as well as in the biosynthesis of phenylalanine, tyrosine, and tryptophan. It is speculated that phytoplasma infection may induce disease symptoms in the host plant primarily through changes in host metabolites. Alterations in these two pathways play a crucial role in the occurrence of witches' broom disease in *S. alopecuroides*, suggesting that infection reduces the photosynthetic capacity of the host, leading to nutrient deficiency and decreased resistance, which in turn aids disease progression.

Key words: *Sophora alopecuroides*; witches' broom disease; non-targeted metabolomics; KEGG analysis

苦豆子(*Sophora alopecuroides*)为豆科槐属多年生草本植物,全株灰绿色,株高30~60 cm,花期5—7月,单数羽状复叶,茎直立多分枝,枝条密生灰色平伏绢毛,花为黄色,总状花序,顶生,两性,长14~17 mm,果期6—8月,种子稍扁,卵圆形、椭圆形,呈黄色或淡褐色。苦豆子耐寒、耐盐碱,抗风沙,根系发达,是一种优良水土保持植物,其野生资源多分布于荒漠草原、荒漠区较湿润地带,半固定沙丘、固定沙丘的低湿处、绿洲边缘和沟渠、河岸、田埂等处^[1]。其全草、根及种子皆可入药,别名为布亚、苦甘草、苦豆根等,其味苦,性寒,归心、肺经,具有清热润燥、止痛、杀虫功效^[2],在我国主要分布于内蒙古、宁夏、甘肃、新疆、青海等地。苦豆子化学成分主要为生物碱、黄酮类、挥发油、多糖、有机酸和香豆素类等,具有重要的临床药用价值,此外其根茎含较高含量的蛋白质,是一种优质绿肥,在新疆民间瓜果种植中将苦豆子作为重要的追肥施用,每年作为绿肥使用量可达10万t以上^[3]。

植原体(phytoplasma)为一类原核专性寄生物,多数球形至椭圆形,生存于植物韧皮部筛管细胞以及刺吸式口器昆虫肠道等部位,主要通过叶蝉、飞虱、木虱、扦插、嫁接、菟丝子传播扩散^[4]。植原体通过效应因子(phytoplasma effectors)削弱寄主植物的免疫从而使其感病,效应因子TENGU可诱导寄主植物丛枝、矮化及花不育等症,同时抑制宿主茉莉酸(jasmonic acid, JA)及生长素(auxin, IAA)信号转导^[5]。主要引起寄主植物丛枝、黄化、小叶、衰退、矮化、花器变态、发育不良等典型症状,对世界范围经济作物、林木等造成严重的损失^[6]。花生(*Arachis hypogaea*)丛枝植原体(witches' broom phytoplasma, PnWB)引起花生丛枝病,在我国南方花生产区发生较为普遍,花生丛枝病田间主要表现为植株节间缩短,产量大幅降低,腋芽丛生,叶片变小,大多数植株不结荚果,严重影响花生的产量^[7]。张芯伪等^[8]发现紫花苜蓿(*Medicago sativa*)感染丛枝病后,春季苜蓿返青后即可表现症状,病株生长矮小,由根茎基部长出大量分枝,枝条细弱,生长旺盛期病株高度仅有健康株的1/4~1/2,叶片大小不到正常叶片的1/3,发病严重的不开花,发病轻的仍能开花,但开花结实少,该病害的发生造成苜蓿种子大幅减产,严重威胁着新疆苜蓿种子生产。

代谢组(metabolome)是指细胞、组织、器官或者生物体内的所有小分子代谢物(主要是相对分子量在1000 Da以内的内源性小分子)的集合。代谢组学是继基因组学、转录组学和蛋白质组学之后新发展起来的学科,是目前研究的热点之一。代谢组学是研究某一生物体系在受到生物刺激、病理、生理扰动或遗传信息改变等因素干扰后,其体内所有小分子量(<1000 Da)代谢物水平动态反应的一门学科^[9-10]。代谢组学已被广泛用于研究植物—生物胁迫的相互作用中,目前代谢组学技术已逐渐成为植物病理学特别是植物—病原真菌互作研究的重要工具,通过代谢组学技术分析植物在病菌入侵后代代谢物谱的变化与差异,可以寻找到一系列抗病相关(resistance-related, RR)代谢物^[11]。由病原菌快枯菌亚种(*Xylella fastidiosa* subspecies)引起橄榄(*Olea europaea*)快速衰退综合征(quick decline syndrome, QDS)严重降低橄榄产量,Anwar等^[12]以非靶向代谢组分析发现,有机酸、糖类(如蔗糖和甘露醇)是橄榄感病的早期标志物,指出代谢组对橄榄病害预防工作具有重要的意义。Huang等^[13]通过代谢组学对在不同程度干旱胁迫下苦豆子特化代谢物以及异黄酮生物合成进行分析,研究表明苦豆子黄酮代谢物在轻度干旱胁迫下呈上升趋势,而在中度和重度干旱胁迫下呈下降趋势。

目前对苦豆子相关的研究主要集中在临床方面的应用、化学成分分析、干旱胁迫、地理分布等方面,利用代谢组等现代技术进行研究较少见。此外,以代谢组学为研究手段进行苦豆子丛枝病相关的研究也较少。本研究以丛枝病感病苦豆子、健康苦豆子为研究对象,利用非靶向代谢组学技术探究苦豆子丛枝病病原菌及病原侵染对苦豆子代谢物的影响,为苦豆子丛枝病的研究、防治提供参考及思路。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

研究区玛纳斯县位于昌吉回族自治州最西端,天山山脉北坡中段,准噶尔盆地西南缘,玛纳斯河东岸。地处 $85^{\circ}40'00''-86^{\circ}31'32''$ E, $43^{\circ}21'21''-45^{\circ}20'00''$ N,南北最大长度241.7 km,东西最大宽度88.7 km,总面积11067 km²。玛纳斯县地势南高北低,自东南向西北倾斜,地貌分南部山区、山前冲积平原、北部沙漠三大部分。属于中温带大陆性干旱半干旱气候,冬季严寒,夏季酷热,干燥少雨,日照充足,蒸发量大,降水少,年平均气温8.7℃,年总降水量237.7 mm,年总日照时数2569.0 h,年最大积雪深度25 cm,年最大冻土深度75 cm。

1.2 样本收集

试验材料取自新疆维吾尔自治区昌吉回族自治州玛纳斯县西海公园旁边的农田周围沟渠($44^{\circ}20'00''-44^{\circ}40'00''$ N, $86^{\circ}20'00''-86^{\circ}23'00''$ E),农田主要种植棉花(*Gossypium* spp.),农田周围常年具有野生生长的苦豆子,根据2021—2023年连续观察发现苦豆子出现丛枝病的频率逐年增加,主要表现为丛枝、花器变形、叶脉黄化、叶表出现黄斑等症状。根据丛枝病发生症状,设置健康样品采集样地(种子饱满、叶片深绿)和感病样品采集样地(花序顶端花变叶呈丛枝、叶表面出现黄斑)各4个(5 m×5 m),每个样地采用五点法设置5个小样地,每个小样地采集3个植株混合,采集样品用已高压灭菌的无菌剪刀剪成2 cm小段,混合均匀后各处理取4个重复,装入无菌离心管液氮速冻后干冰运输进行测定。健康植株、感病植株分别用CRA、CRB来表示。

1.3 试验仪器与试剂

本次试验仪器使用德国Thermo Fisher品牌的Q Exactive™ HF/Q Exactive™ HF-X型号质谱仪与Vanquish UHPLC型号色谱仪,以及美国Thermo Fisher品牌的Hypersil Gold column(100×2.1 mm, 1.9 μm)型号色谱柱和美国Scilogex品牌的D3024R型号低温离心机。试验试剂甲醇(4 L)、甲酸(50 mL)、醋酸铵(50 g)均使用美国Thermo Fisher品牌,纯度为LC-MS Grade,水(2.5 L)使用德国Merck品牌,纯度为LC-MS Grade。

1.4 试验方法

1.4.1 病原菌的鉴定 形态学鉴定:使用透射电镜(FEI TECNAI G2 12, Thermo Fisher Scientific, 荷兰)对病原菌进行形态学观察,具体步骤参考李丰^[14]的研究。

分子鉴定:称取感病苦豆子病变组织0.1~0.2 g,采用CTAB法提取总DNA,利用ThermoND-2000微量分光光度计(Thermo Fisher Scientific, 芬兰)检测提取DNA浓度,DNA完整性使用琼脂糖凝胶电泳检测,合格DNA置于-20℃保存。16S rRNA扩增参考Lee等^[15]的方法,引物使用R16mF2/R16mR1(CATGCAAGTCGA ACGGA/CTTACCCCAATCATCGA)和R16F2/R16R2(ACGACTGCTAAGACTGG/TGACGGGCGGTG TGTACAAACCCCG),进行直接PCR和巢式PCR检测。直接PCR:10×2.5 μL PCR buffer、10 μmol·L⁻¹引物、10 mmol·L⁻¹ dNTPs 1 μL、5 U·μL⁻¹聚合酶0.5 μL、DNA模板1 μL。直接PCR产物稀释30倍后取1 μL作为巢式PCR模板,试剂盒收集目的条带。在NCBI中Blast比对同源序列,使用MEGA 7.0进行进化树绘制^[16]。

1.4.2 代谢物提取 1)取100 mg叶片混合样品液氮研磨,置于EP管中,加入500 μL的80%甲醇水溶液;2)涡旋振荡,冰浴静置5 min,12000 r·min⁻¹、4℃离心20 min;3)取一定量的上清液,加质谱级水稀释至甲醇含量为53%;4)12000 r·min⁻¹、4℃离心20 min,收集上清液,进样液相色谱-质谱联用技术(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)进行分析^[17]。

1.4.3 色谱条件 色谱柱为Hypersil Gold column(C18),柱温为40℃,流速为0.2 mL·min⁻¹;正模式流动相A为0.1%甲酸,流动相B为甲醇;负模式流动相A为5 mmol·L⁻¹醋酸铵,pH 9.0,流动相B为甲醇。色谱梯度洗脱程序见表1。

1.4.4 质谱条件 扫描范围选择 m/z 100-1500; ESI源的设置如下,喷雾电压(SprayVoltage):3.5 kV;鞘气流速(Sheathgasflowrate):35 psi;辅助气流速(AuxGasflowrate):10 L·min⁻¹;离子传输管温度(CapillaryTemp),320 °C;离子导入射频电平(S-lensRFlevel):60;辅助气加热器温度(Auxgasheatertemp):350 °C;极性(Polarity):positive、negative;MS/MS二级扫描为数据依赖性扫描(data-dependentscans)。

1.5 数据分析

多元统计分析部分,使用代谢组学数据处理软件 metaX^[18]对数据进行转换后进行主成分分析(principal component analysis,PCA)和偏最小二乘法判别分析(partial least squares discriminant analysis,PLS-DA),进而获得每个代谢物的投影重要变量(variable importance in projection,VIP)值。单变量分析部分,基于 t 检验来计算各代谢物在两组间统计学显著性(P 值),并计算代谢物在两组间的差异倍数(fold change)即FC值。差异代谢物筛选的默认标准为VIP>1, P 值<0.05且FC≥2或FC≤0.5。气泡图用R包ggplot2进行绘制,使用KEGG数据库来研究代谢物的功能与代谢途径,在 $x/n>y/n$ 时,认为该代谢途径富集。其中, x 代表在特定代谢途径中,某一样本或条件下的代谢物数量; n 代表该样本或条件下代谢物的总数; y 代表在相同代谢途径中,另一样本或条件下的代谢物数量。

2 结果与分析

2.1 病原鉴定

采集具有丛枝、花器变形、叶片畸形的苦豆子组织在透射显微镜下观察,可清晰观察到组织中的球形、椭圆形、不规则形植原体颗粒(图1A)。将扩增序列在NCBI上进行Blast操作,获得的16S rRNA序列与苦豆子“丛枝”枝原体菌株SHZSA1 16S核糖体RNA基因(Gen Bank登录号:KC331044.1)相似,系统进化树结果显示该病原菌与苦豆子丛枝植原体聚为一枝,相似性最高,从而确定病原菌为16Sr V-B亚组成员(图1B)。

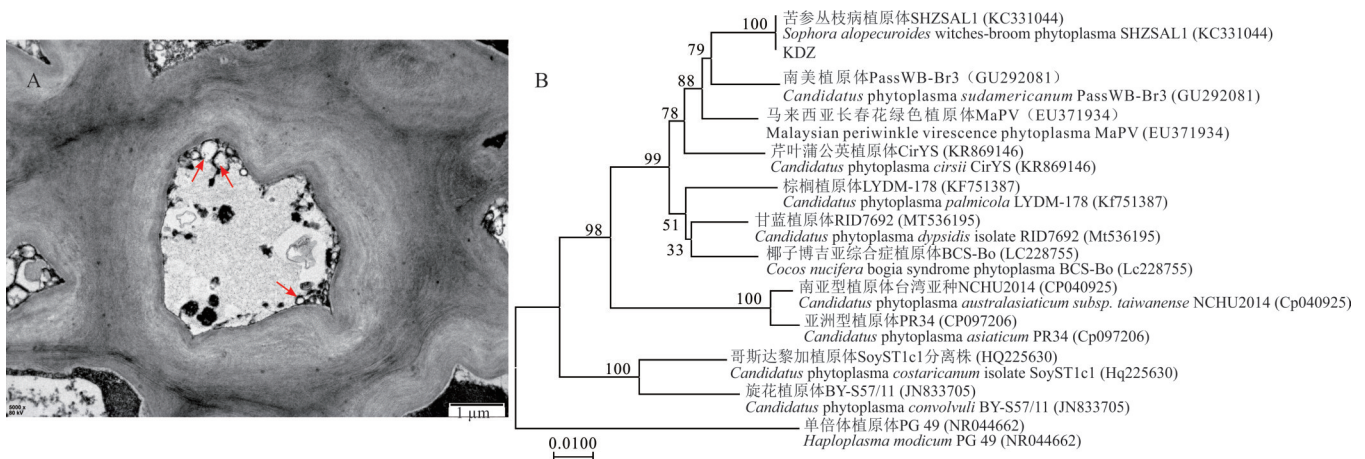


图1 病原菌的鉴定

Fig. 1 Identification of pathogenic bacteria

2.2 数据质控

通过数据分析发现QC样本间的Pearson相关系数为0.98~0.99(图2A,B),说明样本组数据质量可靠。正离子模式下PC1贡献率为74.82%,PC2贡献率为7.93%,总贡献率为82.75%;负离子模式下PC1贡献率为

85.12%, PC2 贡献率为 6.59%, 总贡献率为 91.71%, 健康组、感病组、QC 样本分别分布在不同的象限, 且同一组样本间距离相近(图 2C, D)。综合 QC 及 PCA 分析可知本研究样本数据质量可靠, 可进一步进行分析。

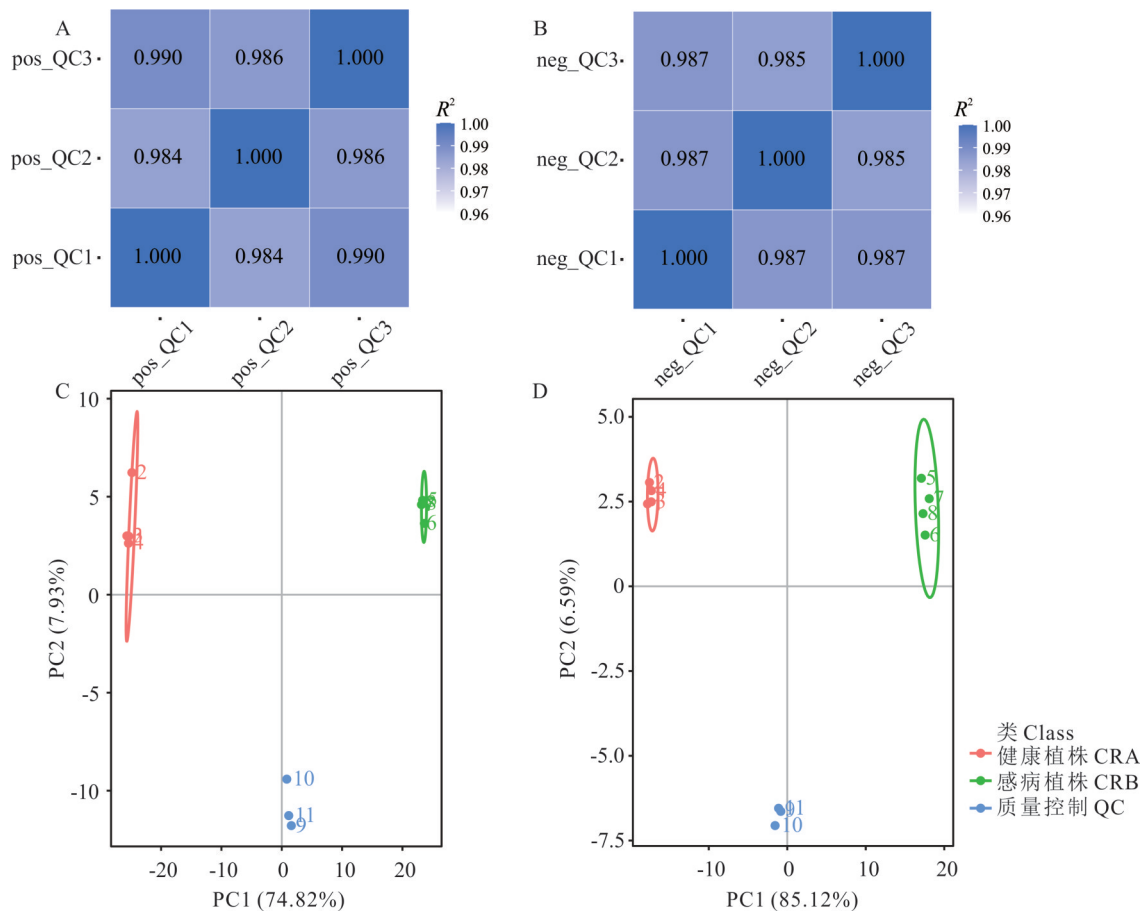


图 2 不同组样品的数据质控分析

Fig. 2 Data audit analysis of different samples

A 和 B 分别为正离子和负离子模式下 QC 样本之间的 Pearson 相关性分析; C 和 D 分别为正离子和负离子模式下不同样本之间的主成分分析。A 和 B represent the Pearson correlation analysis among QC samples in positive ion and negative ion modes, respectively; C and D represent the PCA among different samples in positive ion and negative ion modes, respectively.

2.3 主成分分析

在正离子模式下, 健康组分布在第 2、3 象限, 感病组分布在第 1、4 象限, PC1 的贡献率为 65.42%, PC2 的贡献率为 9.46%, 总贡献率为 74.88% (图 3A)。在负离子模式下, PC1 的贡献率为 73.22%, PC2 的贡献率为 8.79%, 总贡献率为 82.01% (图 3B)。表明感病苦豆子、健康苦豆子代谢物表现出良好的分离度, 检测样本均在各组 95% 置信区间内, 试验重现性良好, 结果可靠, 从整体上可以反映出 2 组样品具有显著差异。

2.4 偏最小二乘法判别分析

利用 PLS-DA 建立模型, 获得感病组、对照组样品的得分图, 更为直观地表明健康苦豆子、感病苦豆子代谢物具有显著差异。感病植株与健康植株分离度较大, 分类效果显著; PLS-DA 模型的 R²_Y 均为 1.00, Q²_Y 均大于 0.9, 表明 PLS-DA 模型稳定可靠, 预测性良好(图 4)。

2.5 差异代谢物筛选

差异代谢物的筛选主要参考 VIP、FC 和 P 值 3 个参数, 设定阈值为 VIP > 1.0, FC > 1.5 或 FC < 0.667 且 P < 0.05^[19-21]。正离子、负离子模式下分别鉴定到 670、364 种代谢物, 显著差异的代谢物分别有 361、217 种, 其中正离子模式下有 223 种上调代谢物、138 种下调代谢物, 负离子模式下有 126 种上调代谢物、91 种下调代谢物(表 2)。

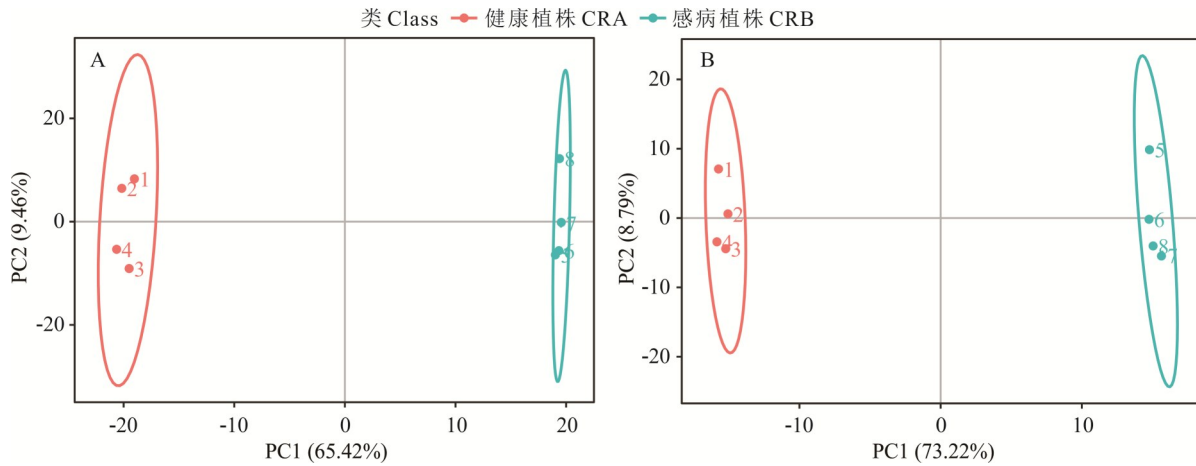


图3 不同组样品的PCA分析

Fig. 3 PCA analysis of different samples

A和B分别为正离子和负离子模式下健康样品和感病样品的PCA分析。A和B represent the PCA analysis between CRA and CRB samples in positive ion and negative ion modes, respectively.

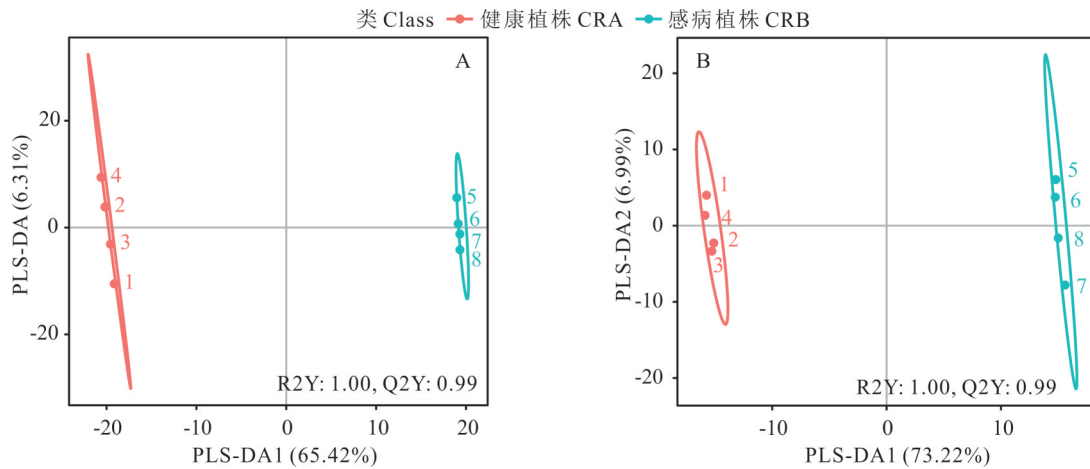


图4 不同组样品的PLS-DA分析

Fig. 4 PLS-DA analysis of different samples

A和B分别为正离子和负离子模式下健康样品和感病样品的PLC-DA分析。A and B represent PLC-DA analysis between CRA and CRB samples in positive ion and negative ion modes, respectively.

2.6 差异代谢物热图分析

热图分析不同处理组的代谢模式,苦豆子感病组与对照组之间的代谢物存在显著差异。在CRB vs CRA样本中,在正离子模式下361种具有显著性差异的代谢物中,感病组相对于健康组增加的代谢物占61.77%,减少的占38.23%,在负离子模式下217种具有显著性差异的代谢物中,感病组相对于健康组增加的代谢物占58.1%,减少的占41.9%(图5)。

2.7 代谢通路及分类注释

2.7.1 KEGG 通路分析

根据KEGG数据库注释,苦豆子代谢物主要分为三大类功能,包括环境信息处理(environmental information processing, 18, 4.42%)、遗传信息处理(genetic information processing, 13, 3.19%)和新陈代谢(metabolism, 376, 92.38%),根据参与到的代谢过程,407种代谢物可进一步划分为14条KEGG通路。在正离子模式下有3种代谢物参与信号转导通路,8种代谢物参与膜运输通路,7种代谢物参与翻译通路,1种代

表2 差异代谢物筛选结果

Table 2 Differential metabolite screening results

模式 Pattern	总代谢物 Total me- tabolites	差异代谢物 Differential metabolites	上调数 Up regula- tion	下调数 Down regulation
正离子 Positive ion	670	361	223	138
负离子 Negative ion	364	217	126	91

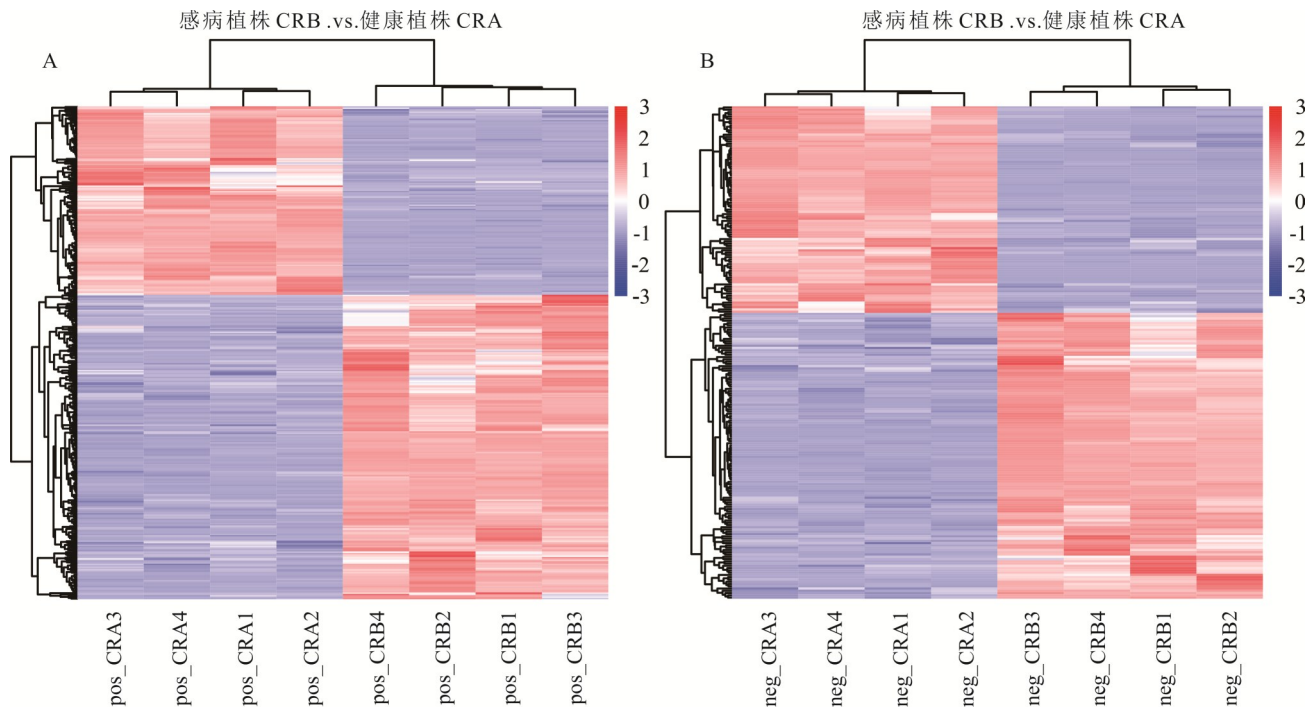


图 5 差异代谢物聚类热图

Fig. 5 Heat map of differential metabolite clustering

A 和 B 分别为正离子和负离子模式下健康样品和感病样品的差异代谢物聚类热图。A and B represent heat map analysis between CRA and CRB samples in positive ion and negative ion modes, respectively.

代谢物参与折叠、分类和降解通路,10 种代谢物参与核苷酸代谢通路,12 种代谢物参与萜类和多酮类的代谢通路,8 种代谢物参与其他氨基酸的代谢通路,10 种代谢物参与辅助因子和维生素的代谢通路,13 种代谢物参与脂质代谢通路,80 种代谢物参与全局图和概览图,1 种代谢物参与能量代谢通路,5 种代谢物参与碳水化合物代谢通路,34 种代谢物参与其他次级代谢物的生物合成通路,37 种代谢物参与氨基酸代谢通路;在负离子模式下有 1 种代谢物参与信号转导通路,6 种代谢物参与膜传输通路,5 种代谢物参与翻译通路,5 种代谢物参与核苷酸代谢通路,3 种代谢物参与萜类和多酮类的代谢通路,7 种代谢物参与其他氨基酸的代谢通路,9 种代谢物参与辅助因子和维生素的代谢通路,9 种代谢物参与脂质代谢通路,61 种代谢物参与全局图和概览图,5 种代谢物参与能量代谢通路,21 种代谢物参与碳水化合物代谢通路,21 种代谢物参与其他次级代谢物的生物合成通路,25 种代谢物参与氨基酸代谢通路(图 6)。

根据上述富集结果,绘制 KEGG 通路气泡图(图 7),根据 x/y (相应代谢通路中差异代谢物的数目/该通路中鉴定出总代谢物数目)及 P 值,发现卟啉和叶绿素代谢及苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成具有显著差异,并进行了进一步的分析。

2.7.2 卟啉和叶绿素代谢 在卟啉和叶绿素代谢通路中(图 8),卟啉原(porphobilinogen)、L-谷氨酸(L-glutamic acid)、原卟啉 IX (protoporphyrin IX)、胆红素(bilirubin)为差异代谢物,感病组卟啉原含量比健康组高 1.43 倍,感病组原卟啉 IX 含量比健康组高 10.90 倍,感病组胆红素含量比健康组高 7.40 倍;健康组 L-谷氨酸含量比感病组高 9.20 倍(表 3)。

2.7.3 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成 在苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成通路中(图 9),D-赤藓糖-4-磷酸(D-erythrose 4-phosphate)、L-酪氨酸(L-tyrosine)、L-苯丙氨酸(L-phenylalanine)、吲哚(indole)、L-色氨酸(L-tryptophan)为差异代谢物,感病组 D-赤藓糖-4-磷酸含量比健康组高 3.36 倍,感病组 L-色氨酸含量比健康组高 1.60 倍;健康组 L-酪氨酸含量比感病组高 2.85 倍,健康组 L-苯丙氨酸含量比感病组高 4.26 倍,健康组吲哚含量比感病组高 4.00 倍(表 3)。

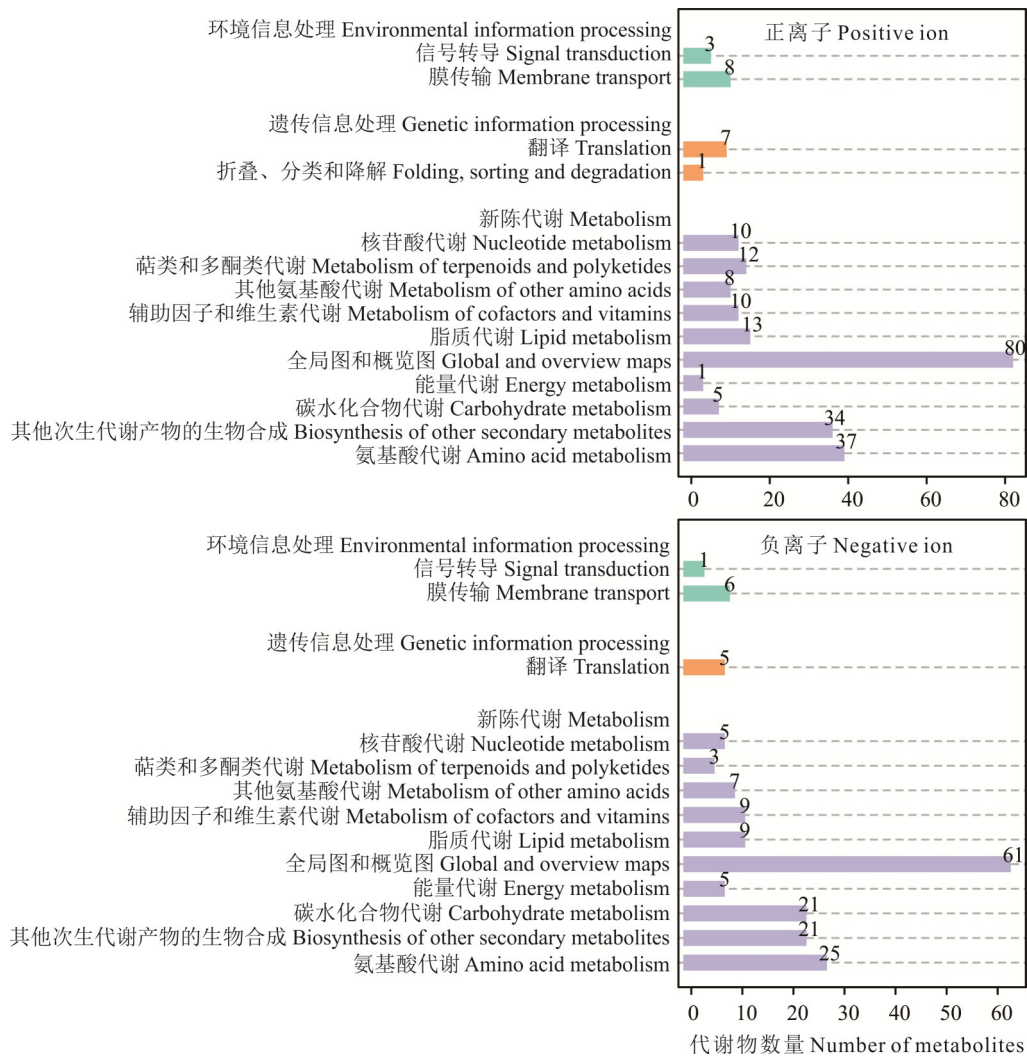


图6 KEGG通路分析

Fig. 6 KEGG pathway analysis

3 讨论

苦豆子不仅是优良的固沙植物及可利用牧草,又是重要的药用植物资源,是制造中医药、兽药、绿色农药、绿肥和保健药品的重要原料。新疆苦豆子资源遍布南北疆,一定产量的区域主要集中在伊犁、塔城、呼图壁、喀什、焉耆等地,常用于农家肥,对瓜果增产、增加甜度有较好促进作用,全株煮水可作杀虫剂和叶面肥使用,既可防止病虫害又可提高产量,在新疆南部区域广泛使用。苦豆子在新疆分布较广,据统计新疆2020年全年苦豆子产量不到1200 t,连供给一个制药提取厂的量都达不到,市场缺口巨大,苦豆子丛枝病的发生也是降低苦豆子产量的主要因素。本研究在新疆昌吉州玛纳斯县发现较大数量被丛枝病感病的苦豆子,其表现为丛枝、花器变形、叶子表面出现黄斑、叶脉黄化、叶变枝、无法接种等症状,病原菌侵染降低苦豆子接种量,对苦豆子相关产业造成极大的潜在威胁。

近年来代谢组学技术已广泛地应用于中药材质量控制与品质评价、资源鉴定、植物分类、亲缘关系评估以及代谢调控网络等领域^[21-22]。同时,代谢组学在植物病理学中广泛应用,为植物病害的研究以及预防提供了帮助。张志鹏等^[23]通过不同抗性番茄(*Solanum lycopersicum*)砧木对象耳豆(*Enterolobium cyclocarpum*)根结线虫的代谢组研究,抗性品种、易感品种筛选出差异显著代谢物415种,其中280种上调,135种下调,KEGG数据库进行代谢通路富集分析发现,以甘油磷脂代谢富集最为显著,其中磷酸胆碱、磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、sn-甘油-3-磷酸胆碱、三乙醇胺、二乙醇胺等物质在抗病品种、易感品种间存在显著差异,推测甘油磷脂代谢通路在一定程度上

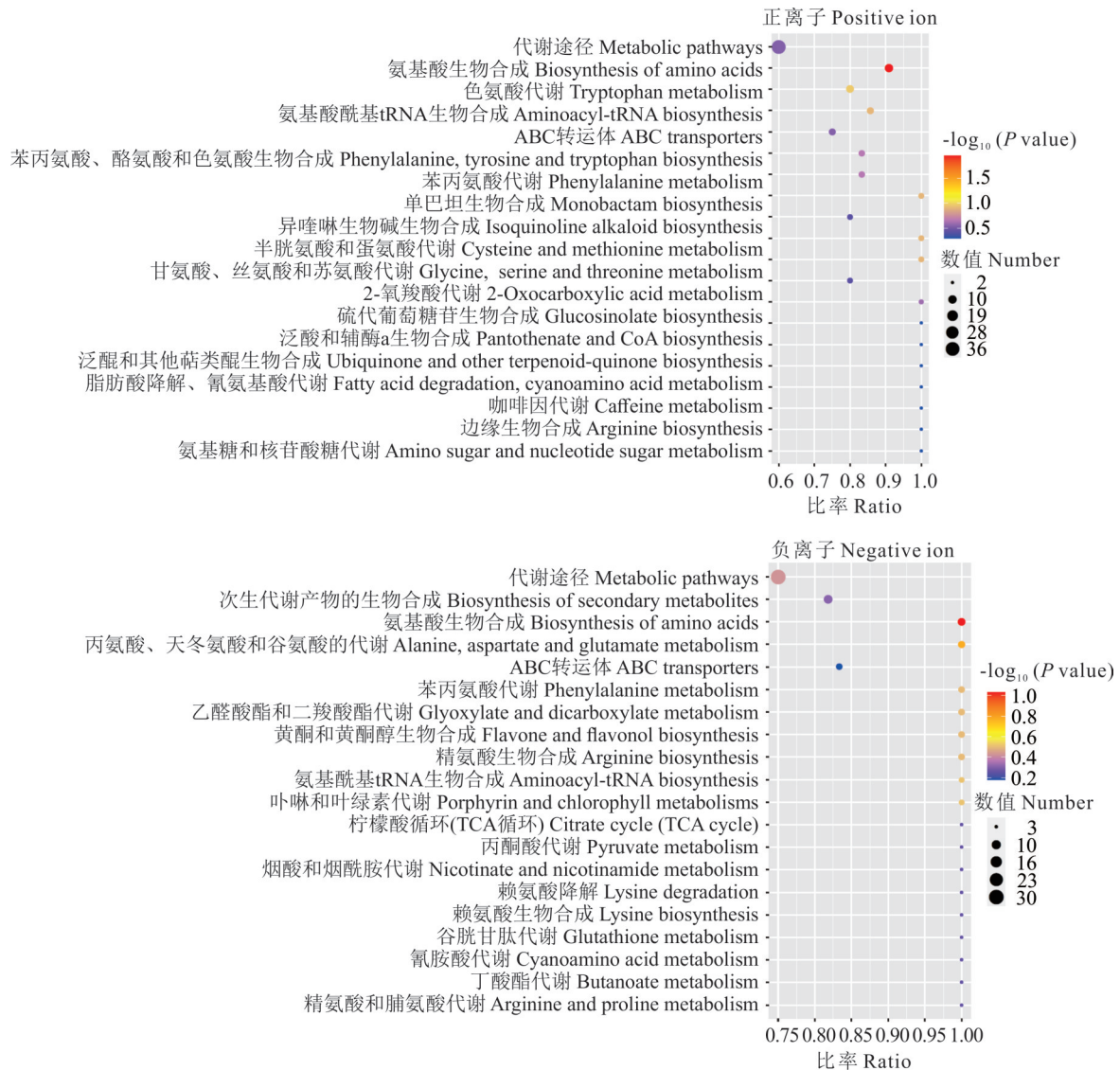


图 7 KEGG 通路气泡图

Fig. 7 KEGG pathway bubble analysis

提高了“桂砧 1 号”对根结线虫的抗性。龚意辉等^[24]利用非靶向代谢组学研究柑橘 (*Citrus reticulata*) 不同感病程度果皮代谢物, 表明不同感病程度柑橘代谢物具有显著差异, 差异代谢物主要富集在 10 条代谢途径, 其中全局和总览图、其他次生代谢产物的生物合成、氨基酸代谢数量较多, 同时表明代谢物的研究对柑橘果皮褐斑病形成机制研究具有重要的意义。本研究以苦豆子为对象, 通过非靶向代谢组学对丛枝病感病苦豆子、健康苦豆子代谢物进行了分析, 健康组与感病组代谢物具有显著差异, 这与以上结果一致^[23-24], 正离子、负离子模式下分别有 361、217 种差异代谢物, 差异代谢物主要富集到环境信息加工、遗传信息加工、新陈代谢, 其中富集到新陈代谢通路的差异代谢物占 92.38%, 数据分析结果表明卟啉和叶绿素代谢及苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成对本研究具有重要的研究意义。

卟啉及其衍生物在自然环境中具有重要的作用, 它们广泛存在于生物体及能量转移相关组织器官中, 在植物体中叶绿素 (镁卟啉)、维生素 B12 (钴卟啉) 等卟啉化合物在光合作用、电子传递、氧传递、能量产生等生命活动中具有重要的功能。Uniconazole[S-(+)-uniconazole]是一种植物生长调节剂, 对植物的生长发育及抗非生物胁迫具有重要的作用, Jiang 等^[25]以大麻 (*Cannabis sativa*) Hanma No. 2 品种进行人为干旱胁迫发现, 外源使用 Uniconazole[S-(+)-uniconazole]可通过提高叶绿素含量和光合能力、调节碳氮代谢酶活性、改变内源激素水平提

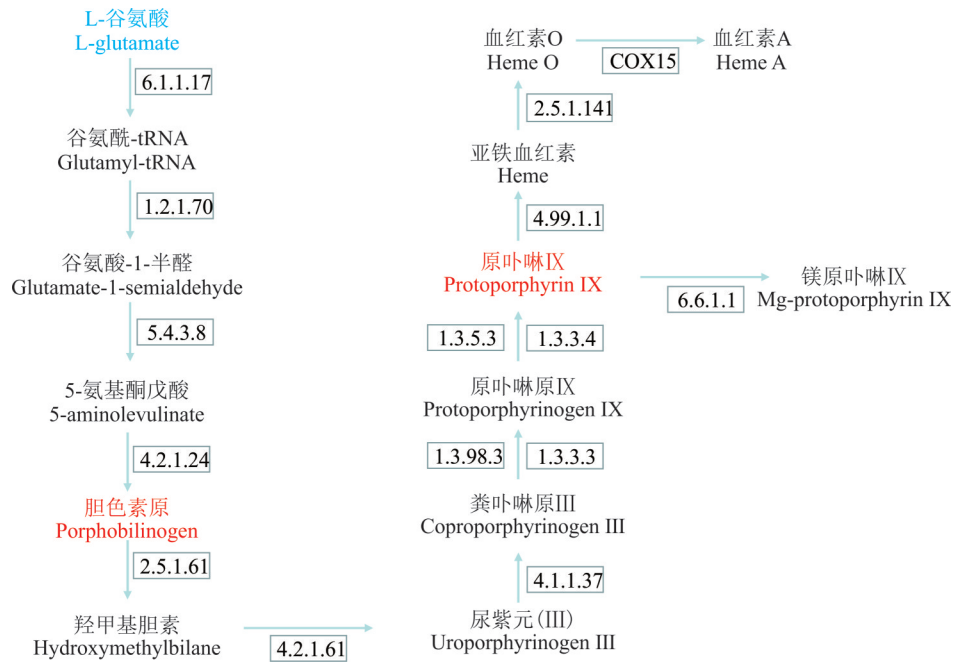


图8 卟啉和叶绿素部分代谢通路

Fig. 8 Porphyrin and chlorophyll metabolic pathways

红色字体代表该代谢物上调;方框中数字代表酶的EC编号。The red font indicates that the metabolite is upregulated; The numbers in the box represent the enzyme commission number. 下同 The same below.

表3 部分代谢通路中代谢物的变化

Table 3 Metabolite changes in some metabolic pathways

代谢物 Metabolite	ID	健康植株 CRA	感病植株 CRB	FC=CRB/CRA
卟啉原 Porphobilinogen	Com_11857_neg	26533130.21	64482547.45	2.43
原卟啉 IX Protoporphyrin IX	Com_2543_neg	3804321.43	45306217.92	11.90
胆红 Bilirubin	Com_6145_neg	19186067.00	161795366.00	8.40
L-谷氨酸 L-glutamic acid	Com_12661_neg	175614518.60	17230857.15	0.10
D-赤藓糖-4-磷酸 D-erythrose 4-phosphate	Com_12658_pos	481393.16	2098673.97	4.36
L-色氨酸 L-tryptophan	Com_8850_pos	2216018.31	5757659.85	2.60
L-酪氨酸 L-tyrosine	Com_203_pos	1769276119.00	455236147.10	0.26
L-苯丙氨酸 L-phenylalanine	Com_21_pos	11760291258.00	2213525450.00	0.19
吲哚 Indole	Com_250_pos	1378106746.00	272702018.80	0.20

ID: 标识符 Identifier; FC: 感病植株和健康植株中的代谢物含量的比值 The ratio of metabolite content in CRB and CRA.

高大麻对于干旱胁迫的耐受性,Uniconazole[S-(+)-uniconazole]喷施显著提高宿主卟啉和叶绿素代谢、光合作用、淀粉和蔗糖代谢、氮代谢以及植物激素信号转导相关基因的表达。Martins等^[26]以病原菌 *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae* (Psa)引起的猕猴桃 (*Actinidia chinensis*) 溃疡病为研究对象发现,阳离子卟啉 Tetra-Py⁺-Me 可作为光敏剂(photosensitizer)主要成分进行病原菌的防治,并表示 Psa 不产生抗性且此方法对病原具有显著的抗病作用。光合作用为植物正常生长发育及生理活性提供物质基础和能量支持,而叶绿素是植物进行光合作用的主要色素,叶绿素的含量直接影响着光合作用的强弱。叶绿素是植物体内重要的化合物及光合色素,与植物接受、转化能量过程及健康状况密切相关,叶绿素在植物体内合成途径为谷氨酸→氨基乙酰丙酸→胆色素原→尿卟啉原 III→原卟啉 IX→镁原卟啉 IX→原叶绿素酸酯→叶绿素 a→叶绿素 b,其中任何一个途径受到影响都会阻碍叶绿素的合成从而降低植物健康状况。天然叶绿素具有抗氧化活性,Ferruzzi等^[27]研究表明体外喷施叶绿素 b 衍生物

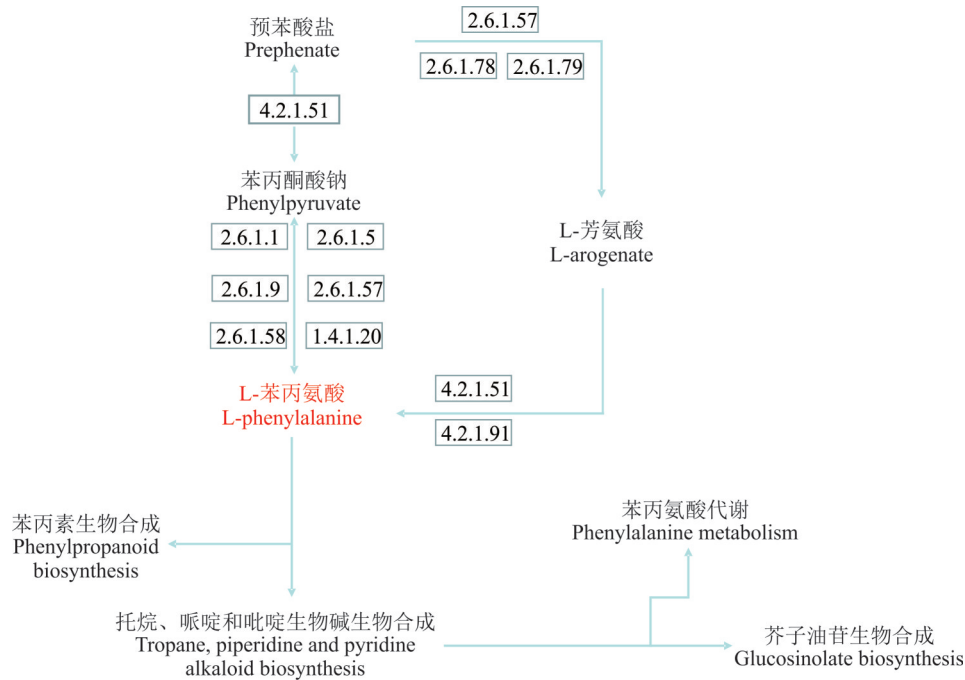


图 9 苯丙氨酸的生物合成通路

Fig. 9 Phenylalanine biosynthetic pathways

比标准叶绿素 a 衍生物具有更高的抗氧化能力,同时发现金属叶绿素衍生物(如镁叶绿素、锌脱镁叶绿素、锌焦脱镁叶绿素、铜脱镁叶绿素 a 和铜叶绿素)比不含金属的衍生物(如二氢卟吩、脱镁叶绿素和焦脱镁叶绿素)具有更强的抗自由基能力。感病组卟啉原含量比健康组高 1.43 倍,感病组原卟啉 IX 含量比健康组高 10.90 倍,感病组胆红素含量比健康组高 7.40 倍,初步认为病原菌的侵染降低了苦豆子光合效率,引起了寄主营养缺乏从而导致接种量及健康状况降低。

芳香族代谢物种类繁多,在维管植物中有大约 30% 来自光合作用的碳源最终都用来合成以芳香族氨基酸为前体的化合物,这些化合物结构迥异,种类繁多,广泛参与调节植物生长发育、繁殖和防御等各种植物生理活动。苯丙氨酸作为芳香族氨基酸的一种广泛分布于植物中,植物中至少有 25% 的光合产物储存在由苯丙氨酸衍生的代谢物中,对植物生长发育、信号传导、代谢、生物及非生物胁迫抵抗能力等具有重要的影响^[28]。植物次生代谢产物的合成包括苯丙氨酸代谢及下游分支中的其他次生代谢物的合成,植物体内超 8000 种的代谢产物均与苯丙氨酸代谢途径相关^[29]。苯丙氨酸在莽草酸途径中通过转氨作用生成,其在酶的催化下形成酚类化合物中间体,中间体再形成木质素单体,木质素单体在酶的催化作用下最终生成木质素。木质素为植物体内大分子有机物,主要分布在机械组织、维管输导组织及保护组织的细胞壁中,可增强植物输导组织水分、养分运输及抵抗植物生物、非生物胁迫能力^[30]。Samani 等^[31]研究发现,将 L-苯丙氨酸喷施在鼠尾草(*Salvia japonica*)叶面上,可以增加鼠尾草的鲜重及干重,提高叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素含量及类胡萝卜素含量,促进鼠尾草的生长。Ramzan 等^[32]研究表明在干旱胁迫条件下(50%),芥菜(*Brassica campestris*)两种品种 Faisal 和 Rachna 分别降低了地茎(18%、17%)、根长(12%、12.3%)、叶绿素含量(47%、45%)和总生物量(21%、26%),叶面使用苯丙氨酸(phenylalanine, PA)提高了两种品种地茎(20%、21%)、叶绿素含量(46%、58%)和总生物量(19%、22%),同时降低了 H₂O₂ 含量(18%、19%)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量(21%、24%)和电导率(19%、21%)。Li 等^[33]研究苯丙氨酸对李(*Prunus salicina*)果实腐烂病的影响,结果表明苯丙氨酸处理提高了果实苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)、对香豆酸:辅酶 A 连接酶(4-coumarate: CoA ligase, 4CL)、过氧化物酶、多酚氧化酶等酶活性,此外上调表达 *PcC3H1*、*PcCAD*、*PcCOMT*、*pcccr*、*PcCCoAOMT*、*PcF5H*、*PcF3H* 和 *PcDFR*,促进李果实苯丙氨酸、咖啡酸、花青素、黄酮类、木质素和总酚类化合物的积累。酪氨酸作为芳香族氨基酸,是所有生物蛋白

质合成所必需的,在植物体内具有电子载体、抗氧化剂、引诱剂和防御化合物等特殊的作用。酪氨酸降解产生的能量可能成为植物细胞能量恢复的重要来源,特别是在生物、非生物胁迫及衰老胁迫条件下产生的马来酰乙酰乙酸水解成乙酰乙酸酯和富马酸酯并参与三羧酸循环从而对寄主植物光合作用起重要的作用。本研究中健康组苦豆子酪氨酸、苯丙氨酸、吲哚含量均高于感病组,初步认为寄主植物出现病变主要与光合作用相关功能的降低有关。

4 结论

本研究以苦豆子为对象,利用形态学、分子鉴定、非靶向代谢组学技术探究病原菌及其对苦豆子代谢物的影响及致病能力。形态学、分子学结果表明引起苦豆子感病的病原菌为16Sr V-B亚组成员;QC、PCA分析结果表明健康苦豆子、感病苦豆子代谢物具有显著的差异,代谢物主要注释到环境信息处理(18,4.42%)、遗传信息处理(13,3.19%)和新陈代谢(376,92.38%),通过KEGG通路气泡图分析发现植原体侵染对苦豆子吡啶和叶绿素代谢及苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成途径具有重要的影响,初步认为植原体侵染主要通过以上通路的变化引起寄主感病。

参考文献 References:

- [1] Li W H, Zhang J. The artificial cultivation techniques of *Sophora alopecuroides*. Contemporary Horticulture, 2023, 46(14): 37–39.
李文海, 张军. 苦豆子人工栽培技术. 现代园艺, 2023, 46(14): 37–39.
- [2] Chen L. Study on the resource chemistry of *Sophora alopecuroides* L. Yinchuan: Ningxia Medical University, 2017.
陈丽. 苦豆子植物资源化学研究. 银川: 宁夏医科大学, 2017.
- [3] Qi X C, Ye Z P, Zhao K, et al. Effects of *Sophora alopecuroides* as green manure on diurnal changes of photosynthetic performance and quality of melon. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2019(4): 178–186.
齐晓晨, 叶祖鹏, 赵库, 等. 苦豆子绿肥对甜瓜光合性能日变化及品质的影响. 中国土壤与肥料, 2019(4): 178–186.
- [4] Sugio A, Maclean A M, Kingdom H N, et al. Diverse targets of phytoplasma effectors: From plant development to defense against insects. Annual Review of Phytopathology, 2011, 49(1): 175–195.
- [5] Minato N, Himeno M, Hoshi A, et al. The phytoplasmal virulence factor TENGU causes plant sterility by downregulating of the jasmonic acid and auxin pathways. Scientific Reports, 2014, 4: 7399.
- [6] Bertaccini A. Plants and phytoplasmas: When bacteria modify plants. Plants, 2022, 11: 1425.
- [7] Tang Y F, Lin Q, She X M, et al. Molecular identification of peanut witches' broom phytoplasma in Guangdong province. Plant Protection, 2022, 48(5): 83–90.
汤亚飞, 林祺, 余小漫, 等. 广东花生丛枝病病原体的分子鉴定. 植物保护, 2022, 48(5): 83–90.
- [8] Zhang X W, Zhu L L, Li K M. Molecular detection and identification of lucerne witches broom disease in Xinjiang. Pratacultural Science, 2016, 33(6): 1183–1188.
张芯伪, 朱里里, 李克梅. 新疆紫花苜蓿丛枝病分子检测及鉴定. 草业科学, 2016, 33(6): 1183–1188.
- [9] Matich E K, Soria N G C, Aga D S, et al. Applications of metabolomics in assessing ecological effects of emerging contaminants and pollutants on plants. Journal of Hazardous Materials, 2019, 373: 527–535.
- [10] Yan Z, Chen W Q, Zhang H, et al. Advances in research methods of filamentous fungal metabolomics. Plant Protection, 2021, 47(5): 98–109.
闫震, 陈万权, 张昊, 等. 丝状真菌代谢组学研究方法进展. 植物保护, 2021, 47(5): 98–109.
- [11] Zhao L, Chao J B, Guo J, et al. Study on plant resistance-related metabolites against pathogenic fungi based on metabolomics. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2021, 41(6): 1071–1078.
赵利, 钞建宾, 郭捷, 等. 基于代谢组学技术的植物抗病相关代谢物研究进展. 西北植物学报, 2021, 41(6): 1071–1078.
- [12] Anwar M A, Galal D, Khalifa I, et al. Metabolomics: A compilation of applications for enhancing agricultural traits, disease resistance, biotic interaction, byproducts valorization, and quality control purposes of olive. Trends in Food Science & Technology, 2024, 143: 104311.
- [13] Huang X, Chu G, Wang J, et al. Integrated metabolomic and transcriptomic analysis of specialized metabolites and isoflavonoid biosynthesis in *Sophora alopecuroides* L. under different degrees of drought stress. Industrial Crops and Products, 2023, 197: 116595.

- [14] Li F. Identification and genetic differentiation of salt cedar witches' broom phytoplasma in Southern Xinjiang. Alaer: Tarim University, 2022.
李丰. 新疆南疆桤柳丛枝植原体鉴定及遗传分化研究. 阿拉尔: 塔里木大学, 2022.
- [15] Lee I M, Hammond R W, Davis R E. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*, 1993, 83(8): 834–842.
- [16] Li F, Lai G G, Zhao Z H, *et al.* Molecular identification of phytoplasma associated with willow phyllody in Xinjiang. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2022, 31(10): 1374–1380.
李丰, 赖刚刚, 赵志慧, 等. 新疆柳树花变叶植原体分子鉴定. *西北农业学报*, 2022, 31(10): 1374–1380.
- [17] Want E J, Masson P, Michopoulos F, *et al.* Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC–MS. *Nature Protocols*, 2013, 8(1): 17–32.
- [18] Wen B, Mei Z, Zeng C, *et al.* MetaX: a flexible and comprehensive software for processing metabolomics data. *BMC Bioinformatics*, 2017, 18(1): 183.
- [19] Heischmann S, Quinn K, Cruickshank-quinn C, *et al.* Exploratory metabolomics profiling in the kainic acid rat model reveals depletion of 25-hydroxyvitamin D3 during epileptogenesis. *Scientific Reports*, 2016, 6: 31424.
- [20] Haspel J A, Chettimada S, Shaik R S, *et al.* Circadian rhythm reprogramming during lung inflammation. *Nature Communications*, 2014, 5: 4753.
- [21] Sreekumar A, Poisson L M, Rajendiran T M, *et al.* Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature*, 2009, 457: 910–914.
- [22] Son N, Hur H J, Sung M J, *et al.* Liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolomic analysis of livers from aged rats. *Journal of Proteome Research*, 2012, 11(4): 2551–2558.
- [23] Zhang Z P, Li H, Tian X X, *et al.* Differential analysis of metabolome of different resistant tomato rootstocks in response to nematode infection. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2024, 45(4): 1–8.
张志鹏, 李涵, 田潇潇, 等. 不同抗性番茄砧木响应象耳豆根结线虫侵染的代谢组差异分析. *热带作物学报*, 2024, 45(4): 1–8.
- [24] Gong Y H, Zhou G H, Peng S J, *et al.* Differential analysis of the metabolites on citrus pericarp brownspot based on untargeted metabolomics. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, 22(8): 316–324.
龚意辉, 周桂花, 彭淑君, 等. 基于非靶向代谢组学的柑橘果皮褐斑病发生过程中代谢差异分析. *中国食品学报*, 2022, 22(8): 316–324.
- [25] Jiang Y, Sun Y, Zheng D, *et al.* Physiological and transcriptome analyses for assessing the effects of exogenous uniconazole on drought tolerance in hemp (*Cannabis sativa* L.). *Scientific Reports*, 2021, 11: 14476.
- [26] Martins D, Mesquita M Q, Neves M G P M S, *et al.* Photoinactivation of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit plants by cationic porphyrins. *Planta*, 2018, 248: 409–421.
- [27] Ferruzzi M G, Failla M L, Schwartz S J. Sodium copper chlorophyllin: *In vitro* digestive stability and accumulation by Caco-2 human intestinal cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(7): 2173–2179.
- [28] Teixeira W F, Fagan E B, Soares L H, *et al.* Foliar and seed application of amino acids affects the antioxidant metabolism of the soybean crop. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 327.
- [29] Govindaraju S, Arulselvi P I. Effect of cytokinin combined elicitors (l-phenylalanine, salicylic acid and chitosan) on *in vitro* propagation, secondary metabolites and molecular characterization of medicinal herb-*Coleus aromaticus* Benth (L.). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 2018, 17(4): 435–444.
- [30] Qin Q L. Molecular cloning and characterization of transcription factors involved in lignin biosynthetic pathway and phenylpropanoid pathway in *Ginkgo biloba* L. Shanghai: Fudan University, 2007.
秦秋琳. 银杏中与木质素合成和苯丙氨酸代谢相关的转录调控因子的克隆与研究. 上海: 复旦大学, 2007.
- [31] Samani M R, Pirbalouti A G, Moattar F, *et al.* L-Phenylalanine and bio-fertilizers interaction effects on growth, yield and chemical compositions and content of essential oil from the sage (*Salvia officinalis* L.) leaves. *Industrial Crops and Products*, 2019, 137: 1–8.
- [32] Ramzan T, Shahbaz M, Maqsood M F, *et al.* Phenylalanine supply alleviates the drought stress in mustard (*Brassica campestris*) by modulating plant growth, photosynthesis, and antioxidant defense system. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2023, 201: 107828.
- [33] Li C, Wang M, Guo Y, *et al.* Activation of the calcium signaling, mitogen-activated protein kinase cascade and phenylpropane metabolism contributes to the induction of disease resistance in pear fruit upon phenylalanine treatment. *Postharvest Biology and Technology*, 2024, 210: 112782.