

## 基于 GC-MS 代谢组学的铁皮石斛与胶孢炭疽菌互作机制研究

闫小巧, 王 艳, 李一凡, 钟志敏, 谢观雯, 赖小平, 张桂芳\*

广州中医药大学中医药数理工程研究院, 广东省中药新药研发重点实验室, 广东 广州 510006

**摘要:** 目的 利用代谢组学技术探讨与铁皮石斛炭疽病病程相关的代谢物及其可能的作用机制, 为铁皮石斛抗病品种选育提供依据。方法 分别采集铁皮石斛正常叶片与经胶孢炭疽菌处理的感病叶片, 经样本前处理、GC-MS 分析、生物信息学分析等找出差异代谢物, 初步探讨参与病程的差异代谢物并分析代谢通路。结果 成功建立了各分析组的多维统计分析模型, 选取 VIP>1.0 的分散点为潜在差异物质, 同时结合单维统计分析 (test) 中  $P<0.05$  为标准加以验证, 从鉴定出的 305 个代谢物中共筛选出 84 个差异代谢产物, 被认为是病程相关代谢物; 通过对差异代谢物进行通路富集分析, 共有 34 个差异代谢物参与了代谢途径, 且获得的正常-感病代谢通路具有显著意义。结论 基于 GC-MS 技术对铁皮石斛不同处理组 (正常/感病) 样本进行了代谢组学分析, 并找出与铁皮石斛炭疽病病程相关的代谢物, 可为从分子水平研究铁皮石斛病害及培育抗病品种奠定基础。

**关键词:** 铁皮石斛; 胶孢炭疽菌; 气质色谱-质谱联用; 代谢组学; 互作机制

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)04-0910-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.04.026

## Metabonomics study of interaction mechanism between *Dendrobium officinale* and *Colletotrichum gloeosporioides* based on GC-MS

YAN Xiao-qiao, WANG Yan, LI Yi-fan, ZHONG Zhi-min, XIE Guan-wen, LAI Xiao-ping, ZHANG Gui-fang

Guangdong Provincial Key Laboratory of New Drug Development and Research of Chinese Medicine, Mathematical Engineering Academy of Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

**Abstract: Objective** To investigate the metabolites related to the course of anthracnosis of *Dendrobium officinale* and its possible mechanism based on the technique of metabonomics, so as to provide theoretical support for the creation or breeding of disease resistant varieties of *D. officinale*. **Methods** The normal and infected by *Colletotrichum gloeosporioides* leaves of *D. officinale* were collected respectively, and to find out the differential metabolites through the sample pretreatment, GC-MS analysis, and bioinformatics analysis. Then the differential metabolites and analysis of metabolic pathways involved in the course of disease were carried on the preliminary discussion. **Results** The multidimensional statistical models of each analysis group were successfully established. The dispersion points of VIP > 1.0 were selected as the potential differential materials, combined with  $P < 0.05$  in the analysis of single dimensional Statistics (test) as the standard to verify. A total of 84 differential metabolites screened from 305 identified metabolites were considered to be pathogenesis related metabolites. A total of 34 differential metabolites were found out to be involved in the metabolic pathways through the pathway enrichment analysis, and the obtained ZC-GB metabolic pathways were of significance. **Conclusion** Based on GC-MS technology, the metabonomics analysis of *D. officinale* samples (normal/infected) was carried out and the metabolites related to the course of anthracnosis of *D. officinale* were found out. It could lay the foundation for studying the disease of *D. officinale* and cultivating resistant varieties on molecular level.

**Key words:** *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.; GC-MS; metabonomics; interaction mechanism

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 较高<sup>[1]</sup>。随着需求量的不断增加, 铁皮石斛的人工为兰科石斛属多年生珍贵中药材, 药用和食用价值 种植面积也不断扩大, 大棚栽培的种植模式被广泛

收稿日期: 2017-08-19

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (81001601); 广东省省级科技计划科技基础条件建设领域项目 (2014A030304059); 广东省省级科技计划科技应用型科技研发专项资金项目 (2015B020234008); 广东省优秀青年教师培养计划 (yq2014042); 珍稀南药鉴定产学研合作科技创新平台 (2013B090800052)

**作者简介:** 闫小巧 (1993—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药资源与开发研究。Tel: (020)39356380 E-mail: 823251775@qq.com

\*通信作者 张桂芳 (1980—), 女, 硕士生导师, 副教授, 研究方向为濒危药用植物的研究与开发。Tel: (020)39356380 E-mail: zhanggf@gzucm.edu.cn

应用。但是铁皮石斛生长所需的高温、高湿环境也为有害病菌提供了适宜的生长环境，加上大棚通风不畅、使用年限较久、不及时更换基质等，稍有管理不当，就易滋生病菌，加重病害。因此铁皮石斛病害在种植产区发生普遍且危害严重，不仅影响铁皮石斛的生长发育，还降低其产量和品质。其中由胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. 引起的炭疽病 (anthracnose) 在华南产区发生持久且普遍<sup>[2]</sup>。

代谢组学 (metabonomics) 是系统生物学的重要组成部分。代谢组学技术可通过现代的检测分析技术对胁迫环境下植物中的代谢物进行定性和定量分析，从而深入解析植物抗逆或感病的作用机制<sup>[3]</sup>。采用代谢组学技术分析植物不同抗性 or 感病胁迫前后代谢物差异的报道较多<sup>[4-6]</sup>，如 Kumaraswamy 等<sup>[7]</sup>研究对赤霉病有不同抗性的小麦的代谢组学，发现抗性小麦品种体内与抗病有关的标示物数量是易感品种的数倍；Abu-Nada 等<sup>[8]</sup>对感染晚疫病病菌 *Phytophthora infestans* 的马铃薯叶片进行了代谢组学研究，初步鉴定出 95 种代谢物，其中 42 种的含量呈现显著改变，被认为是与病害相关的代谢物；Cevallos-Cevallos 等<sup>[9]</sup>应用 GC-MS 技术研究不同处理甜橙品种 Valencia 的代谢组学，结果发现可能与黄龙病有关的 6 种代谢标记物。以代谢组学为主，综合各种组学分析方法能有效识别参与植物代谢过程的基因的功能；并可结合遗传学方法，在生产实践中起到筛选抗性品种、辅助育种的作用<sup>[10]</sup>。因此，本研究以胶孢炭疽菌为病原菌，利用 GC-MS 技术深入开展铁皮石斛感染病菌前后的代谢组学研究，以期找出与炭疽病病害相关的代谢物，为结合更多方法以选育铁皮石斛抗病品种奠定基础。

## 1 材料

本实验所用炭疽病原菌为本实验室人员分离自铁皮石斛感病叶片并鉴定保存的胶孢炭疽菌菌株；采用的铁皮石斛材料由广州中医药大学中医药数理工程研究院张桂芳副教授鉴定为铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 健康植株。

## 2 方法

### 2.1 感病材料处理

将胶孢炭疽菌产生的分生孢子用无菌水配成浓度约  $1 \times 10^6$  个/mL 的孢子悬浮液，采用摩擦接种法，即用 400 目石英砂轻轻摩擦健康铁皮石斛植株干净的叶片表面，立即用脱脂棉蘸取孢子液涂抹接

种；对照采用无菌水涂抹有伤叶表面。定时观察记录发病情况，待发病严重时，采集感病与正常组叶片，各 8 个生物学重复，分别依次命名为 GB1~8 和 ZC1~8。

### 2.2 样本前处理

精密称取 60 mg 铁皮石斛样本置于离心管中，加入 360  $\mu$ L 冷甲醇和 40  $\mu$ L 内标 (0.3 mg/mL L-2-氯-苯丙氨酸，甲醇配制)，-20  $^{\circ}$ C 置 2 min 后匀浆 (Tissuelyser-48 中研磨，60 Hz、2 min)；加入 200  $\mu$ L 氯仿，研磨机涡旋；加入 400  $\mu$ L 水，涡旋；超声提取 30 min，低温离心 10 min (14 000 r/min, 4  $^{\circ}$ C)；取 500  $\mu$ L 上清液，装入玻璃衍生瓶，用快速离心浓缩仪挥干后，加入 80  $\mu$ L 甲氧胺盐酸吡啶溶液 (15 mg/mL)，涡旋震荡 2 min 后，于震荡培养箱中 37  $^{\circ}$ C 脗化反应 90 min；取出加入 80  $\mu$ L 双三甲硅基三氟乙酰胺 (含 1% 三甲基氯硅烷) 衍生试剂和 20  $\mu$ L 正己烷，涡旋震荡 2 min 后，于真空干燥箱 70  $^{\circ}$ C 反应 60 min。样本取出后，放于室温下 30 min，用于 GC-MS 代谢组学分析。

### 2.3 GC-MS 分析

本实验分析仪器为 7890B-5977A 气相色谱质谱联用仪 (Agilent 公司，美国)。1  $\mu$ L 衍生化后的提取物用分流比 (4:1) 模式注入 GC-MS 系统进行分析，样品经非极性 DB-5MS 毛细管柱 (30 m  $\times$  250  $\mu$ m, J&W Scientific 公司) 分离后进入质谱检测。载气 (高纯氦气) 体积流量 1.0 mL/min。程序升温：8  $^{\circ}$ C/min, 60~125  $^{\circ}$ C；4  $^{\circ}$ C/min, 125~210  $^{\circ}$ C；5  $^{\circ}$ C/min, 210~270  $^{\circ}$ C；10  $^{\circ}$ C/min, 270~305  $^{\circ}$ C, 305  $^{\circ}$ C 维持 3 min。进样口温度 260  $^{\circ}$ C，EI 源温度 260  $^{\circ}$ C，电子能量 70 eV。质量扫描范围：m/z 50~450，延迟 5 min 开始采集，采集速度为 36.623 谱/秒。

### 2.4 质控样本

质控样本 (quality control samples, QC) 由 2 组石斛提取物混合制备而成，用与分析样本相同的方法处理和检测，在仪器分析的过程中，每 8 个分析样本中插入 1 个 QC 样本，以考察整个分析过程的重复性。

### 2.5 数据分析

GC-MS 的原始数据经 Chroma TOF (v 4.34) 软件进行预处理，导出 CSV 格式的三维数据矩阵，包括样品信息、物质峰名称、保留时间、质核比和质谱响应强度 (峰面积)；分析样本共能

得到 805 个质谱信号，内标用于数据的质量控制。内标峰以及任何已知的假阳性峰均从数据矩阵中去除，并进行去冗余和峰合并后，分析样本得到 305 个代谢物。用峰面积归一化法对样本本质谱峰的响应强度进行归一化，得到归一化后的数据矩阵，导入 SIMCA-P + 14.0 软件包 (Umetrics, Umeå, 瑞典)，先采用无监督的主成分分析 (PCA) 来观察各样本之间的总体分布和整个分析过程的稳定性，然后用有监督的偏最小二乘法显著性分析 (PLS-DA) 来区分各组间代谢轮廓的总体差异，找到组间的差异代谢物。(正交) 偏最小二乘法 (O) PLS-DA 分析中，变量权重值 (variable importance in projection, VIP) 大于 1 的变量被认为是差异变量。为防止模型过拟合，采用 7 次循环交互验证和 200 次响应排序检验的方法来考察模型的质量。

### 3 结果与分析

#### 3.1 质控结果分析

对 QC 的 GC-MS 总离子流图 (TIC) 进行重叠 (图 1)，初步考察分析方法的重现性。由图 1 可知 QC 样本本质谱峰的保留时间和相应强度重现性很好，说明整个分析方法 (包括前处理方法和仪器分析系统) 是稳定可靠的；同时分别展示每组 1 个样本的典型 TIC 图 (图 2-A、B)。

#### 3.2 PCA、PLS-DA 和 OPLS-DA

采用多维统计分析，可以在最大程度保留原始信息的基础上将高维复杂的数据进行“简化和降维”，建立可靠的数学模型对研究对象的代谢谱特

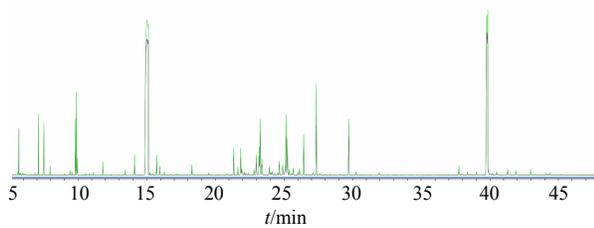


图 1 QC 样本的 TIC

Fig. 1 TIC overlapped of QC samples

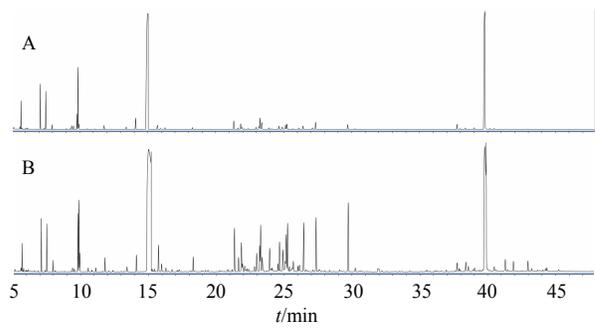


图 2 正常组 (A) 与感病组 (B) 样本 GC-MS 总离子流图  
Fig. 2 GC-MS total ion chromatograms of normal (A) and infected group samples (B)

点进行归纳和总结。对正常组和感病组样本分别进行 PCA、PLS-DA、OPLS-DA 分析，各模型参数见表 1。

执行多维统计分析建立数学模型时，需要选择一部分样本作为交互验证。本实验模型验证结果见图 3， $R^2_X$ 、 $R^2_Y$  和  $Q^2$  3 个参数差距较大， $Q^2 < 0.5$  表示该模型的预测能力较差。虽然模型较差，但仍然有效， $R^2_Y$  和  $Q^2_Y$  直线的斜率较小， $R^2_Y$  的斜率接近水平直线，但  $Q^2$  为 -0.358，未出现过拟合现象，进一步说明二者既存在相似性又有差异性。

PCA 分析是一种无监督的多维统计分析方法，能从总体上反映各组样本之间的代谢差异和组内样本之间的变异度大小。PCA 得分图见图 4，正常组与感病组被很好地区分开，说明对正常组和感病组样本数据处理结果是可信的；同时可看到 QC 样本积聚到圆点附近，由此判断整个分析方法的可靠性，与 GC-MS 总离子流的 QC 分析结果一致，说明各实验组间的差异性是真的，而非假阳性的结果。由图 4 可知  $R^2_X \geq 0.4$ ，可判断该模型的质量较好。

PLS-DA (图 5-A) 与 OPLS-DA (图 5-B) 的散点图可将正常组与感病组区分开，在代谢组水平上，2 组的代谢物质总量存在显著性差异。后者散点图中，2 组的各样本更聚集，但各组的样本间

表 1 多维统计各模型参数

Table 1 Model parameters of multidimensional statistics

分组	模型	主成分个数	多元统计的样本数	$R^2_X/cum$	$R^2_Y/cum$	$Q^2/cum$	$R^2$	$Q^2$
正常-感病 M1	PCA-X	4	19	0.659		0.238		
正常-感病 M3	PLS-DA	2	16	0.498	0.996	0.957		
正常-感病 M4	OPLS-DA	1+1+0	16	0.498	0.996	0.945	0.785	-0.358

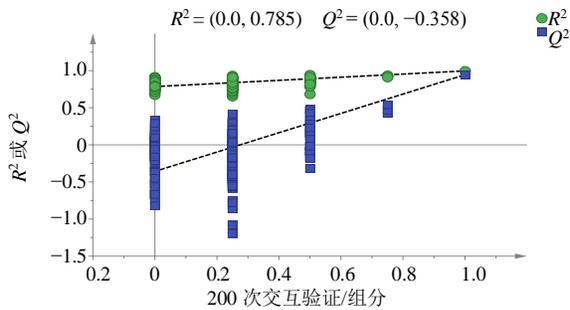


图 3 正常组-感病组的模型验证

Fig. 3 Model validation of normal-infected groups

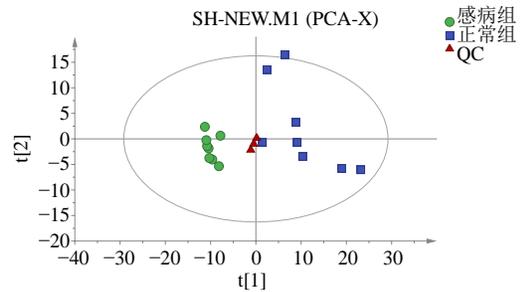


图 4 正常组-感病组的 PCA 得分图

Fig. 4 PCA shot chart of normal-infected groups

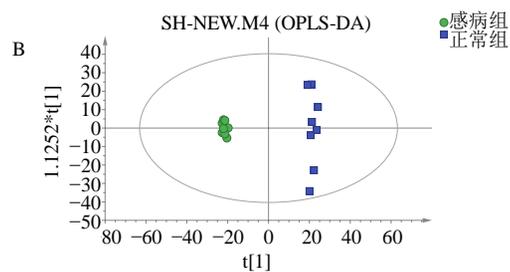
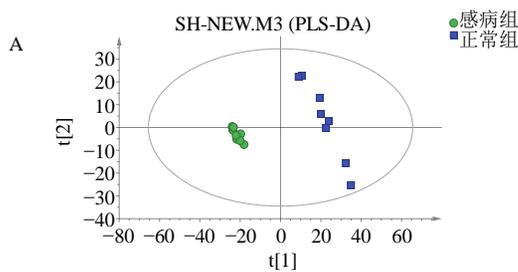


图 5 正常组-感病组的 PLS-DA (A) 和 OPLS-DA (B) 散点图

Fig. 5 PLS-DA (A) and OPLS-DA (B) scatter plots of the normal-infected groups

还是分散的。说明代谢物质含量不仅具有组间差异，而且具有组内差异，是区分铁皮石斛组间和组内差异的重要表型特征。

### 3.3 差异代谢物的筛选及分析

采用多维分析 (O) PLS-DA 和单维分析 (*t* 检验) 相结合的办法筛选组间差异代谢物，通过多维统计时的  $VIP > 1.0$  与单维统计 (*test*) 时  $P < 0.05$  作为筛选的标准，代谢组学的量就是相当于表达量，是选取差异物一般数值为其归一化和  $\log_2$  转化后得到的数值。从鉴定出的 305 个代谢物中共筛选出 84 个差异代谢物 (表 2)，主要包含氨基酸、有机酸、糖类、核苷、核糖等初级代谢物和苷类、酚类、醛类、酮类、酯类、胺类等次级代谢物，其中有 28 种为感病组特有的代谢物，其余代谢物在感病组中的含量也多呈不同程度的上升趋势，而下调的仅有 3 种，分别为 1,3-丙二胺 (1,3-diaminopropane)、顺式-1,2-二氢萘-1,2-二醇 (*cis*-1,2-dihydronaphthalene-1,2-diol)、甘油单油酸酯 (monoolein)。依据 PLS-DA 结果中  $VIP$  值越大，对样品差异的贡献越大。其中  $VIP$  值大于 2.0 的 12 个差异代谢物中有 10 个是感病组特有而正常组没有的，说明胶孢炭疽菌的侵染诱导了铁皮石斛体内相关代谢物的产生与积累。

### 3.4 代谢通路分析

通过对差异代谢物进行通路富集分析，有助于理解其在差异样品中代谢途径变化机制。本研究采用基于 KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) 代谢途径的通路分析。通过 MB Role (<http://csbg.cnbc.csic.es/mbrole/>) 网站的 ID 转换功能，84 个差异代谢物有 47 个获得 KEGG 的输出 ID (表 2)；通过 MB Role 通路分析功能，将 47 个差异代谢物的 KEGG ID 进行通路富集分析，并下载分析结果，查看不同代谢通路，绘制通路富集分析柱状图。正常-感病代谢通路分析结果中，共有 34 个差异代谢物参与了代谢途径 (表 3)；由图 6 的正常-感病代谢通路富集分析柱状图可知获得的正常-感病代谢通路均有显著意义 (蓝线,  $P \geq 0.05$ )，其中  $\beta$ -丙氨酸代谢 (beta-alanine metabolism)、嘧啶代谢 (pyrimidine metabolism)、烟酸和烟酰胺代谢 (nicotinate and nicotinamide metabolism) 3 个代谢通路有极显著意义 (红线,  $P \leq 0.01$ )。

### 4 讨论

铁皮石斛在受到胶孢炭疽菌侵染前后所产生的多种差异代谢物，应与抗病或加重病情的趋势有关。刘淑娟等<sup>[11]</sup>的研究表明海因系聚合物扑海因具有很好的抑菌效果，说明铁皮石斛感病材料产生

表 2 差异代谢物结果

Table 2 Results of differential metabolites

代谢物	$t_R$ /min	定量 Mass 值	VIP 值	$P$ 值	GB/ZC 值	感病组均值	正常组均值	输出 ID
海因-4-羟丁基	16.46	257	2.333	$4.28 \times 10^{-19}$	1 397 248.57	1.397	0.000	*
5-氨基咪唑-4-甲酰胺	43.33	327	2.295	$2.89 \times 10^{-20}$	826 120.43	0.826	0.000	*
亚精胺	33.11	144	2.268	$1.14 \times 10^{-19}$	613 030.49	0.613	0.000	C00315
熊果苷	44.27	327	2.191	$3.41 \times 10^{-6}$	21.95	4.335	0.197	C06186
乌头酸	28.27	285	2.180	$9.51 \times 10^{-18}$	245 390.27	0.245	0.000	*
海藻糖-6-磷酸	24.81	242	2.128	$2.55 \times 10^{-6}$	30.75	2.335	0.076	C00689
2-羟基联苯	8.91	227	2.121	$6.74 \times 10^{-26}$	104 858.73	0.105	0.000	C02499
甲基反式肉桂酸	44.76	212	2.108	$1.07 \times 10^{-21}$	94 110.27	0.094	0.000	*
酒石酸	27.95	355	2.102	$2.32 \times 10^{-23}$	86 166.19	0.086	0.000	C02287
麦芽糖醇	26.68	347	2.081	$6.53 \times 10^{-6}$	1 930 276.99	1.930	0.000	*
对-茴香酸	8.37	224	2.034	$6.69 \times 10^{-22}$	42 414.44	0.042	0.000	*
2-羟基丁酸	8.60	101	2.028	$6.57 \times 10^{-6}$	1 077 842.04	1.078	0.000	C05984
氨基甲酰基-天冬氨酸	26.55	374	1.991	0.000	7.86	4.872	0.620	*
十八醇	29.96	327	1.977	0.000	12.17	2.752	0.226	*
5,6-二氢尿嘧啶	13.91	171	1.941	$7.300 \times 10^{-6}$	12.46	0.316	0.025	C00429
甲酰胺基环己烷	6.42	169	1.934	$6.519 \times 10^{-6}$	178 949.39	0.179	0.000	C11519
2-氨基-3-甲氧基苯甲酸	10.20	224	1.909	$9.792 \times 10^{-6}$	6.28	0.141	0.023	*
白菌二糖	39.32	292	1.889	$6.757 \times 10^{-6}$	119 940.62	0.120	0.000	*
$\alpha$ -D-葡萄糖磷酸	27.79	216	1.880	0.000	5.08	1.023	0.201	*
阿魏酸	29.81	249	1.873	$6.513 \times 10^{-6}$	132 860.01	0.133	0.000	C01494
油酸单甘油酯	7.76	129	1.868	0.001	0.05	0.148	3.097	*
$\beta$ -羟基丙酮酸	16.68	262	1.861	$5.456 \times 10^{-6}$	12.35	0.197	0.016	*
烟酸	10.40	180	1.831	0.001	4.53	0.522	0.115	C00253
4-氧代-1H-喹啉-2-羧酸	39.92	289	1.814	0.001	13.57	2.167	0.160	*
顺式芥子酸	32.97	355	1.809	0.000	43 298.39	0.043	0.000	*
松三糖	40.37	268	1.808	0.000	4.74	0.372	0.079	C08243
L-别苏氨酸	10.34	117	1.747	0.001	3.53	0.904	0.256	C05519
N-乙酰-D-半乳糖胺	38.49	319	1.738	0.000	403 951.55	0.404	0.000	*
异体肌醇	36.02	318	1.730	0.000	3.91	0.367	0.094	*
1,2,4-苯三酚	17.73	239	1.730	0.001	4.40	0.752	0.171	C02814
3,5-二羟基苯基	41.34	282	1.721	0.001	16.52	0.342	0.021	C12026
香兰素	43.35	223	1.713	0.000	257 507.44	0.258	0.000	C00755
乳清酸	16.23	254	1.709	0.001	1.37	1.087	0.794	C00295
前列腺素 E <sub>2</sub>	40.12	225	1.692	0.000	184 199.29	0.184	0.000	C00584
松二糖	22.60	307	1.691	0.000	6.05	0.376	0.062	*
鸟嘌呤	31.22	295	1.689	0.001	2.83	0.192	0.068	C00242
胸苷	8.72	171	1.663	0.001	0.00	0.000	0.452	C00214
对苯二甲酸	34.05	295	1.656	0.000	5.79	0.131	0.023	C06337
1,3-二氨基丙烷	18.76	174	1.631	0.006	0.01	0.023	4.192	C00986
N,N-二甲基对苯二胺	38.83	355	1.621	0.000	69.93	0.032	0.000	C04203
喹啉酸	16.10	224	1.618	0.000	52 411.36	0.052	0.000	C03722
1,2,4-丁三醇	8.32	117	1.594	0.006	3.05	0.330	0.108	*
2-脱氧-D-半乳糖	18.80	199	1.588	0.000	84 463.70	0.084	0.000	C02781
3-ureidopropionate	44.62	261	1.583	0.000	47 150.29	0.047	0.000	C02642

续表 2

代谢物	t <sub>R</sub> /min	定量 Mass 值	VIP 值	P 值	GB/ZC 值	感病组均值	正常组均值	输出 ID
N-Ω-乙酰基组胺	8.27	166	1.582	0.008	2.26	0.371	0.164	*
组氨酸	12.63	213	1.574	0.007	2.41	0.319	0.132	C00768
二羟基丙酮	8.90	160	1.568	0.001	6.66	0.154	0.023	C00184
乳糖醇	38.39	273	1.556	0.002	9.01	2.013	0.223	*
苯乙醇胺	43.20	259	1.532	0.010	6.43	1.810	0.281	C00561
O-succinylhomoserine	9.24	248	1.529	0.013	1.36	0.279	0.205	C05701
奎尼酸	20.31	255	1.490	0.019	3.81	1.737	0.455	C00296
5-甲基间苯二酚	42.92	253	1.457	0.004	123 153.48	0.123	0.000	C00727
果糖	29.27	230	1.454	0.022	3.25	1.025	0.316	C01496
丙二酸	12.71	305	1.448	0.041	7.28	52.296	7.180	C00383
氨基苄氧基-L-亮氨酸	42.88	107	1.435	0.019	3.72	0.758	0.204	*
3-羟基黄酮	41.54	295	1.429	0.004	154 394.96	0.154	0.000	*
单甘酯	7.99	84	1.428	0.004	139 946.48	0.140	0.000	*
嘌呤核苷	44.47	259	1.417	0.023	2.56	0.693	0.271	C01736
DL-假木贼碱	12.70	270	1.415	0.008	18.31	0.092	0.005	*
邻-乙酰丝氨酸	12.57	174	1.414	0.024	2.52	0.541	0.215	*
亚氨基二乙酸	12.30	164	1.405	0.005	0.00	0.000	0.040	*
环亮氨酸	21.06	156	1.401	0.004	68 785.62	0.069	0.000	*
2,6-二氨基庚二酸	19.72	263	1.399	0.015	4.82	0.314	0.065	*
核酮糖-5-磷酸	33.22	299	1.395	0.008	15.91	0.349	0.022	*
2-氨基-2-去甲菠烷羧酸	10.24	183	1.393	0.010	4.57	0.129	0.028	*
6-羟基烟酸	17.91	284	1.388	0.010	8.89	0.124	0.014	C01020
十六醇	33.92	259	1.385	0.004	68 228.50	0.068	0.000	C00823
蜕皮激素	11.40	120	1.347	0.011	5.00	0.064	0.013	*
菲	22.04	295	1.337	0.038	5.63	0.094	0.017	C11422
甲羟戊酸内酯	31.92	263	1.329	0.029	69.71	0.786	0.011	*
马尿酸	8.46	186	1.319	0.017	2.38	0.180	0.075	C01586
儿茶酚	10.82	254	1.308	0.004	32 490.42	0.032	0.000	C00090
2,4-二氨基丁酸	11.65	174	1.289	0.010	7.43	0.842	0.113	*
N-乙酰-β-D-甘露糖胺	26.76	301	1.288	0.012	4.19	0.067	0.016	C01132
3-羟基棕榈酸	7.62	285	1.285	0.008	1.40	0.255	0.183	*
邻苯三酚	16.14	239	1.242	0.019	174 667.60	0.175	0.000	C01108
顺式-1,2-二氢萘-1,2-二醇	19.32	191	1.227	0.038	0.26	2.206	8.491	C04314
核糖	19.20	307	1.225	0.038	3.49	5.753	1.647	C08353
4-羟基-6-甲基-2-吡喃酮	11.07	183	1.224	0.047	5.41	0.246	0.045	C02752
环己烯四醇 β 环氧化物	10.85	305	1.218	0.046	3.87	0.387	0.100	*
草酸	11.96	175	1.082	0.044	3.41	0.500	0.147	C00209
N-甲基苯胺	12.10	164	1.023	0.046	6.14	0.076	0.012	C02299
肌苷	8.14	285	1.020	0.035	1.34	0.047	0.035	C00294
半胱氨酰甘氨酸	10.75	220	1.001	0.040	5.87	1.870	0.319	*

“\*” 未获得输出 ID

“\*” not obtained Output ID

表 3 正常-感病代谢通路分析

Table 3 Analysis of metabolic pathways in ZC-GB groups

代谢通路 ID	代谢通路名称	-lgP	P 值	调整后的 P 值	百分率/%	化合物 (ID)
ath01100	metabolic pathways	1.49	0.032 2	0.167	62.1	C00209、C00429、C02814、 C11422、C04314、C02642、 C03722、C00295、C00584、 C00090、C00294、C01494、 C00242、C00214、C00184、 C00253、C00315、C05519
ath00410	beta-alanine metabolism	6.82	$1.52 \times 10^{-7}$	$3.96 \times 10^{-6}$	20.7	C00383、C03722、C02642、 C00315、C00429、C00986
ath00240	pyrimidine metabolism	3.92	$1.21 \times 10^{-4}$	$1.58 \times 10^{-3}$	17.2	C00429、C00214、C00383、 C02642、C00295
ath00760	nicotinate and nicotinamide metabolism	2.22	$6.05 \times 10^{-3}$	0.052 4	10.3	C00253、C01020、C03722
ath00770	pantothenate and CoA biosynthesis	1.66	0.022 1	0.144	6.9	C00429、C02642

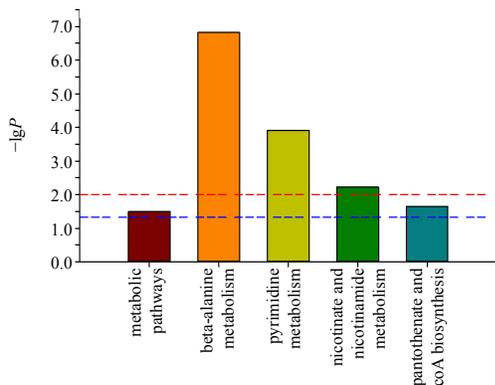


图 6 正常-感病代谢通路富集分析

Fig. 6 Enrichment analysis of metabolic pathways in ZC-GB groups

海因-4-羟丁基 (hydantoin-4-hydroxybutyl) 对胶孢炭疽菌的侵染起到一定的保护作用。亚精胺 (spermidine) 可以直接参与生物体的许多生理活动, 在动、植物生长过程中起到延缓衰老、提高抗逆性的作用<sup>[12]</sup>, 是一种至关重要的生物活性物质, 感病铁皮石斛产生的亚精胺可能通过改善生理功能提高植物体的抗病性。熊果苷 (arbutin) 是一种具有杀菌、抗炎、抗氧化等多种药理作用的药用成分<sup>[13]</sup>, 感染胶孢炭疽菌后的铁皮石斛中熊果苷含量较健康植株增加近 22 倍。海藻糖-6-磷酸 (trehalose-6-phosphate) 是海藻糖的前体, 也参与植物生长发育、植物的代谢调控及基因表达<sup>[14]</sup>, 为抵

御病原真菌侵染, 铁皮石斛感病材料中海藻糖-6-磷酸含量提高了 30 多倍。前人研究表明肉桂酸对真菌类具有较强的抑制作用<sup>[15]</sup>, 铁皮石斛感病材料中产生的甲基反式肉桂酸 (methyl *trans*-cinnamate) 可能起到类似的作用。奎尼酸 (quinic acid) 在铁皮石斛感病材料里的含量增加近 4 倍, 是一类具有抗氧化能力的多酚化合物。依据隋媛媛等<sup>[16]</sup>研究不同浓度马尿酸 (hippuric acid) 对作物幼苗抗氧化酶活性作用结果, 可推测马尿酸含量的增加提高了感病铁皮石斛抗氧化酶的活性。外源草酸 (oxalic acid) 可提高抗氧化酶的活性, 并提高其抗病性<sup>[17]</sup>, 也可抑制病原真菌孢子的萌发生长以减少病害发生和发展<sup>[18]</sup>; 草酸可改变  $Ca^{2+}$  浓度及  $Ca^{2+}$  信号通路, 对植物与病原菌互作进行调控<sup>[19]</sup>, 是重要的病程相关代谢物; 铁皮石斛感病材料中草酸含量较健康材料相比增加 3 倍多, 对植株体的抗病性产生积极作用。

丙二酸 (malonic acid) 在铁皮石斛感病材料里的含量增加 7 倍多, 丙二酸可降低植物体的呼吸强度, 减缓可溶性固形物的损耗<sup>[20]</sup>, 但降低作物根系活力, 株高、干物质质量和根系活跃吸收面积也降低, 叶片相对电导率的增加破坏了生物膜结构, 使逆境胁迫植株的抵抗力下降<sup>[21]</sup>。酒石酸 (tartronic acid) 有降低酶活性<sup>[22]</sup>的负面影响, 感病铁皮石斛材料中产生的少量酒石酸可能也有加重病情的作

用。铁皮石斛感病材料产生的酚酸类物质阿魏酸(ferulic acid)可通过降低酶活性<sup>[23]</sup>、破坏细胞膜、增加超氧负离子含量、降低叶绿素 a 含量<sup>[24]</sup>等抑制细胞功能。铁皮石斛感病材料产生的儿茶酚(catechol)可使细胞表面出现凹陷或者孔洞,增大丙二醛(MDA)的含量,损坏生物膜结构<sup>[25]</sup>。

研究发现肌醇可提高氧化酶活性、降低 MDA 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量来缓解胁迫影响<sup>[26]</sup>, 异体肌醇(allo-inositol)是否产生以上反应对抗真菌侵染有待进一步研究。香兰素(vanillin)具有较强的抑菌作用<sup>[27]</sup>, 但其又是苯甲酸最容易分解产生的衍生物, 极易氧化成香草酸, 而香草酸能影响植物体内细胞分裂、蛋白质合成、酶活性等生理过程, 不利于植物幼苗生长<sup>[28]</sup>, 故其在感病铁皮石斛中产生的作用有待考证。

本实验采用基于 GC-MS 的代谢组学方法对不同处理组(感病组与正常组)的铁皮石斛叶片样本进行了代谢组学分析, 成功建立了各分析组的 PCA、PLS-DA、OPLS-DA 多维统计分析模型, 并结合单维统计分析, 筛选出 84 个显著性差异代谢物, 为铁皮石斛感染胶孢炭疽菌病程相关代谢物。其中, 海因-4-羟丁基、亚精胺、熊果苷等多种代谢物可能通过改善生理功能提高植物体抗病性, 酒石酸、丙二酸、儿茶酚等则影响其生理功能产生负面作用而使病情加重, 而肌醇、香兰素等代谢物的具体作用有待研究。84 个差异代谢物有 47 个获得 KEGG 的 Output ID, 依据拟南芥数据源分析仅有 34 个差异代谢物参与了代谢途径, 且获得的代谢通路具有显著意义; 但由于与铁皮石斛的代谢物相关数据源的不足, 对其代谢通路分析比较不利, 且由于 GC-MS 数据库的局限性, 多数峰难以确定, 其定性也有待加强<sup>[29]</sup>。故此代谢组学研究可为进一步分析铁皮石斛感病响应的分子生理机制研究提供有力的数据源, 并为培育铁皮石斛抗病性新品种提供一定的理论支持。

#### 参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.  
[2] 邱道寿, 刘晓津, 郑锦荣, 等. 棚栽铁皮石斛的主要病害及其防治 [J]. 广东农业科学, 2011(S1): 118-120.  
[3] 滕中秋, 付卉青, 贾少华, 等. 植物应答非生物胁迫的代谢组学研究进展 [J]. 植物生态学报, 2011, 35(1): 110-118.  
[4] Parker D, Beckmann M, Zubair H, et al. Metabolomic analysis reveals a common pattern of metabolic

re-programming during invasion of three host plant species by *magnaporthe grisea* [J]. *Plant J*, 2009, 59(5): 723-737.

- [5] 周永斌, 朱敬芳, 秦胜金. 基于 GC-MS 联用技术的杨树抗锈病代谢物 [J]. 东北林业大学学报, 2013, 41(4): 62-65.  
[6] 徐 飞. 不同抗性水稻植株感染 RSV 后的代谢轮廓分析 [D]. 福州: 福建农林大学, 2009.  
[7] Kumaraswamy K G, Kushalappa A C, Choo T M, et al. Mass spectrometry based metabolomics to identify potential biomarkers for resistance in barley against fusarium head blight (*Fusarium graminearum*) [J]. *J Chem Ecol*, 2011, 37(8): 846-856.  
[8] Abu-Nada Y, Kushalappa A, Marshall W, et al. Temporal dynamics of pathogenesis-related metabolites and their plausible pathways of induction in potato leaves following inoculation with *phytophthora infestans* [J]. *Eur J Plant Pathol*, 2007, 118(4): 375-391.  
[9] Cevallos-Cevallos J M, García-Torres R, Etxeberria E, et al. GC-MS analysis of headspace and liquid extracts for metabolomics differentiation of citrus Huanglongbing and zinc deficiency in leaves of 'Valencia' sweet orange from commercial groves [J]. *Phytochem Anal*, 2011, 22(3): 236-246.  
[10] 张凡忠, 刘小红, 章初龙, 等. 植物响应病原真菌的代谢组学研究进展 [J]. 中国细胞生物学学报, 2016, 38(4): 434-440.  
[11] 刘淑娟, 陈秀蓉, 杨成德, 等. 生防芽孢杆菌与扑海因混配对番茄早疫病菌的抑制作用 [J]. 甘肃农业大学学报, 2007, 42(1): 49-53.  
[12] 张 凤, 何恩鹏, 王国元, 等. 外源亚精胺对生物抗性影响的研究进展 [J]. 化学与生物工程, 2015, 32(7): 1-4.  
[13] 国家医药管理局中草药情报中心站. 植物药有效成分手册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986.  
[14] O'Hara L E, Paul M J, Wingler A. How do sugars regulate plant growth and development? New insight into the role of trehalose-6-phosphate [J]. *Mol Plant*, 2013, 6(2): 261-274.  
[15] 张春乐, 宋康康, 陈祥仁, 等. 肉桂酸及其衍生物的抑菌活性研究 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(增刊): 16-18.  
[16] 隋媛媛, 颜 丽, 关连珠. 马尿酸对小麦幼苗抗氧化酶活性的影响 [J]. 农业科技与装备, 2009(3): 20-21.  
[17] 郑小林, 田世平, 李博强, 等. 外源草酸延缓采后芒果成熟及其生理基础的研究 [J]. 中国农业科学, 2007, 40(8): 1767-1773.  
[18] 朱玉燕, 邬波龙, 姜天甲, 等. 外源草酸对猕猴桃采后果实扩展青霉生长及展青霉素积累的影响 [J]. 果树

- 学, 2015, 32(2): 298-303.
- [19] 李 阳, 赵 媛, 徐幼平, 等. 草酸对植物体内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度及信号传导途径的影响 [J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2014, 40(2): 141-145.
- [20] 叶 月, 徐文娟, 伍 超, 等. 不同浓度丙二酸对芹芽保鲜效果的研究 [J]. 长江蔬菜: 学术版, 2012(16): 125-127.
- [21] 王树起, 韩丽梅, 杨振明. 丙二酸和邻苯二甲酸对大豆生长发育的化感效应 [J]. 吉林农业科学, 2001, 26(5): 15-19.
- [22] 周 磊, 刘 伟, 刘军平, 等. 酒石酸对双孢蘑菇多酚氧化酶活性及热敏性的影响 [J]. 食品科学, 2014, 35(15): 178-182.
- [23] 母 容, 潘开文, 王进闯, 等. 阿魏酸、对羟基苯甲酸及其混合液对土壤氮及相关微生物的影响 [J]. 生态学报, 2011, 31(3): 793-800.
- [24] 郭亚丽, 傅海燕, 黄国和, 等. 阿魏酸和香豆素对铜绿微囊藻的化感作用 [J]. 环境科学, 2013, 34(4): 1492-1497.
- [25] 李 延, 刘丽君, 梁文艳, 等. 儿茶酚胁迫下铜绿微囊藻的生理生化响应 [J]. 环境工程学报, 2016, 10(6): 2781-2785.
- [26] 姚 慧, 夏 凯. 肌醇对玉米幼苗低温胁迫伤害的缓解效应 [J]. 作物杂志, 2014(4): 133-138.
- [27] 周庆礼, 张智维, 王昌禄, 等. 香兰素抑菌作用的研究 [J]. 食品科学, 2005, 26(增刊): 23-25.
- [28] Rice E L. *Allelopathy* [M]. Orlando: Academic Press, 1984.
- [29] Strehmel N, Hummel J, Erban A, *et al.* Retention index thresholds for compound matching in GC-MS metabolite profiling [J]. *J Chromatogr B*, 2005, 871(2): 182-190.