

研究报告

藜麦茎部响应瓜笄霉侵染的代谢组分析

彭玉飞, 王天禧, 杨振永, 田淼, 任璐, 吕红, 秦楠, 殷辉*, 赵晓军*

山西农业大学 植物保护学院, 山西 太原 030031

彭玉飞, 王天禧, 杨振永, 田淼, 任璐, 吕红, 秦楠, 殷辉, 赵晓军. 藜麦茎部响应瓜笄霉侵染的代谢组分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(11): 4590-4603.

PENG Yufei, WANG Tianxi, YANG Zhenyong, TIAN Miao, REN Lu, LÜ Hong, QIN Nan, YIN Hui, ZHAO Xiaojun. Metabolomics of the stems of quinoa in response to infection by *Choanephora cucurbitarum*[J]. Microbiology China, 2024, 51(11): 4590-4603.

摘要:【背景】藜麦笄霉软腐病(quinoa *Choanephora rot*)的病原为瓜笄霉(*Choanephora cucurbitarum*), 但藜麦响应其侵染后的代谢变化尚未明确。【目的】研究瓜笄霉侵染藜麦后的代谢物变化及关键代谢途径, 以利于了解该病的生理生化机制。【方法】基于非靶向代谢组学研究技术, 结合多元统计分析方法, 分析瓜笄霉侵染藜麦茎部代谢物差异及代谢途径变化。【结果】相较于对照组, 瓜笄霉侵染藜麦后, 显著差异代谢物有 512 种($P<0.01$), 其中 283 种为上调, 229 种为下调。KEGG 富集分析发现藜麦茎部响应瓜笄霉侵染的主要差异代谢物共 19 种($P<0.05$), 这些主要代谢物显著富集到花生四烯酸代谢、亚油酸代谢、 α -亚麻酸代谢、黄酮和黄酮醇的生物合成共 4 条代谢通路。【结论】瓜笄霉侵染可导致藜麦中花生四烯酸代谢、亚油酸代谢、 α -亚麻酸代谢、黄酮和黄酮醇的生物合成等代谢途径发生变化, 其中 α -亚麻酸代谢及其相关代谢物茉莉酸的积累、黄酮和黄酮醇的生物合成受阻, 可能是藜麦响应瓜笄霉侵染的主要方式。

关键词: 藜麦; 笄霉软腐病; 瓜笄霉; 非靶向代谢组学; 代谢物

资助项目: 山西省重点研发计划(2022ZDYF117); 山西省基础研究计划(20210302123419); 山西省现代农业产业技术体系建设专项(2024CYJSTX03-31); “特”“优”农业高质量发展科技支撑工程项目(TYGC24-31, TYGC24-32)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Shanxi Province (2022ZDYF117), the Fundamental Research Program of Shanxi Province (20210302123419), the Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System of Shanxi Province (2024CYJSTX03-31), and the Specialized Agriculture High-quality Development Science and Technology Support Project (TYGC24-31, TYGC24-32).

*Corresponding authors. E-mail: ZHAO Xiaojun, zhaoxiaojun0218@163.com; YIN Hui, yinhui0806@163.com

Received: 2024-03-26; Accepted: 2024-05-20; Published online: 2024-06-05

Metabolomics of the stems of quinoa in response to infection by *Choanephora cucurbitarum*

PENG Yufei, WANG Tianxi, YANG Zhenyong, TIAN Miao, REN Lu, LÜ Hong, QIN Nan, YIN Hui*, ZHAO Xiaojun*

College of Plant Protection, Shanxi Agricultural University, Taiyuan 030031, Shanxi, China

Abstract: [Background] The pathogen responsible for quinoa *Choanephora* rot is *Choanephora cucurbitarum*. However, the metabolic changes of quinoa in response to the infection remain unclear. **[Objective]** We studied the changes of metabolites and key metabolic pathways in quinoa after infection with *C. cucurbitarum*, aiming to understand the physiological and biochemical mechanisms of the disease. **[Methods]** We employed non-targeted metabolomics and multivariate statistical analysis to investigate the changes in metabolites and metabolic pathways in quinoa stems after infection with *C. cucurbitarum*. **[Results]** Compared with the control, infection with *C. cucurbitarum* in quinoa resulted in 512 differential metabolites ($P < 0.01$), including 283 upregulated metabolites and 229 downregulated metabolites. The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis revealed 19 main differential metabolites in the quinoa stems in response to infection ($P < 0.05$). These differential metabolites were enriched in four metabolic pathways: arachidonic acid metabolism, linoleic acid metabolism, alpha-linolenic acid metabolism, and flavone and flavonol biosynthesis. **[Conclusion]** *C. cucurbitarum* infection leads to changes in arachidonic acid metabolism, linoleic acid metabolism, α -linolenic acid metabolism, and flavone and flavonol biosynthesis in quinoa. The accumulation of jasmonic acid from α -linolenic acid metabolism and the blocked biosynthesis of flavone and flavonol may be involved in the response of quinoa to *C. cucurbitarum* infection.

Keywords: *Chenopodium quinoa*; *Choanephora* rot; *Choanephora cucurbitarum*; non-targeted metabolomics; metabolites

藜麦(*Chenopodium quinoa*), 苋科藜属一年生双子叶植物^[1-2], 有“粮食之母”“超级谷物”等美誉^[3]。目前国内报道的藜麦真菌性病害有8种, 包括叶斑病^[4-6]、软腐病^[7-8]、黑茎病^[9]、茎基腐^[10]、炭疽病^[11]、穗腐病^[12]等。众多病害中, 藜麦笄霉软腐病(quinoa *Choanephora* rot)是近年来发现的一种传播速度快、易暴发的新病害, 主要在山西省、北京市等藜麦种植区发生^[7-8]。藜麦笄霉软腐病的病原为瓜笄霉(*Choanephora cucurbitarum*), 可产生小孢囊孢子和孢囊孢子, 两种孢子通过气孔、伤口等侵

染藜麦的穗、茎、叶。藜麦笄霉软腐病的发生规律和侵染机制复杂, 给防治带来极大困难。

目前, 利用代谢组学技术研究藜麦对非生物胁迫的响应成为研究热点^[13], 但关于病原菌侵染藜麦的代谢组学研究较少。赵丽娟等^[14]发现多变霜霉(*Peronospora variabilis*)侵染导致藜麦叶片中 N-十七烷、琥珀酸半醛、异亮氨酸、丝氨酸含量显著上升; 苹果酸、柠檬酸、蔗糖、酪胺、豆甾醇、天冬氨酸含量显著下降, 使藜麦叶片中糖代谢、核酸代谢、氨基酸代谢、三羧酸循环等代谢通路的代谢物发

生显著变化,进而影响了藜麦叶片的生物膜稳定性、抗氧化能力等正常生理活动。出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*) PA-2 侵染对藜麦(*Chenopodium album*)叶片内嘌呤代谢、次级代谢产物生物合成、氨基酸代谢和碳水化合物代谢产生影响^[15]。关于瓜笄霉侵染对藜麦代谢组的影响,目前少有相关报道。

病原菌入侵导致植物体代谢物质发生变化,产生的生理生化反应干扰了植物的正常代谢^[16]。同时,植物会产生一些毒性物质杀死或抑制病原菌生长,或产生信号分子激活自身免疫系统^[17]。目前,代谢组学在植物-病原真菌互作的植物病理学研究中发挥了重要作用,可用于发现与病害有关的代谢物和代谢途径^[18-20],有助于揭示及改善植物发病机制^[21]。Du等^[22]应用代谢组学技术分析了黄瓜响应尖孢镰孢(*Fusarium oxysporum*)侵染的代谢组变化,发现尖孢镰孢侵染黄瓜导致其磷酸戊糖、糖酵解、三羧酸循环代谢途径发生了显著变化。Tugizimana等^[23]对高粱与亚线孢炭疽菌(*Colletotrichum sublineolum*)互作中 72 个具统计意义的代谢物进行代谢途径分析,发现最主要的代谢途径是苯丙酸和类黄酮生物合成途径。尽管植物代谢物在抵御病原菌侵染中有许多报道,但植物体内的代谢物具有物种特异性。

本研究采用超高效液相色谱-串联质谱(*ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, UPLC-MS/MS)技术,结合多变量统计分析方法,分析藜麦响应瓜笄霉侵染后代谢物的变化,明确瓜笄霉对藜麦代谢途径的影响,以期了解该病的生理生化机制。

1 材料与方法

1.1 材料

供试藜麦品种“稼祺 100”,购于山西稼祺农业

科技有限公司;供试菌株:瓜笄霉(*C. cucurbitarum*) LMJM-2 为本实验室分离鉴定的保藏菌种^[8]。

1.2 主要试剂和仪器

甲醇、甲酸和醋酸胺, Thermo Fisher 公司。液相色谱仪、质谱仪和色谱柱, Thermo Fisher 公司;低温离心机, Scilogex 公司;智能人工气候箱,宁波东南仪器有限公司。

1.3 病菌接种

在温室盆钵(直径 20 cm)中播种藜麦,常规管理 60 d。选取生长健壮的藜麦植株带回实验室,用 75%乙醇在茎部表面消毒 2 次,无菌水洗 3 次、自然风干。采用菌饼接种法^[24]将代表性菌株 LMJM-2 接种于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基上,25 °C、12 h 光照和 12 h 黑暗交替条件下培养 1 d 后,从菌落中央处取直径 5 mm 菌饼,将菌饼无伤接种至茎部,在接种部位上方约 1 cm 处包裹蘸有无菌水的脱脂棉,用保鲜膜将其和接种体同时包扎。处理组(A组)和接种无菌水的对照组(B组)均为每组 6 次重复,每个重复 3 株;置于 25 °C 人工气候箱,12 h 光照/12 h 黑暗,接种 1 d 后调查发病症状并测量病斑长度。待病斑褪绿至褐色、水渍状、长度 2-3 cm 时,用消毒手术刀分别采集 A、B 两组植株茎部各 6 株,每株采集约 1 g,将采集样本立即用液氮冷冻后研磨成粉,-80 °C 保存备用。

1.4 代谢物提取

取 100 mg 样本置于 1.5 mL 离心管中,加入 500 μ L 的 80% 甲醇水溶液;涡旋振荡,冰浴静置 5 min,15 000 r/min、4 °C 离心 20 min;取上清液加质谱级水稀释至甲醇含量为 53%,15 000 r/min、4 °C 离心 20 min,收集上清液并保存于进样瓶中,进行 UPLC-MS/MS 分析。

1.5 质控(quality control, QC)样本

从每个实验样本中取等体积样本混匀作为 QC 样本,用于平衡色谱-质谱系统和监测仪器状

态,在整个实验过程中对系统稳定性进行评价。

1.6 空白样本

用 53%甲醇水溶液代替实验样本,前处理过程与实验样本相同。设置空白样本,主要用于去除背景离子。

1.7 仪器参数

色谱柱为 Thermo Hypersil Gold C18,柱温 40 °C,流速 0.2 mL/min。正离子模式:流动相 A: 0.1%甲酸,流动相 B: 甲醇。负离子模式:流动相 A: 5 mmol/L 醋酸铵, pH 9.0,流动相 B: 甲醇。色谱梯度洗脱程序见表 1。

1.8 质谱条件

电喷雾离子源(electrospray Ionization, ESI)的设置如下:喷雾电压为 3.5 kV,鞘气流速为 35 psi,辅助气流速为 10 L/min,离子传输管温度为 320 °C,离子导入射频电平为 60,辅助气加热器温度为 350 °C。扫描范围选择 m/z 100–1 500,MS/MS 二级扫描为数据依赖性扫描。

1.9 数据统计分析

采用 Compound Discoverer 3.3 数据处理软件对下机原始数据进行数据预处理,然后对数据结果进行质控。使用代谢组学数据处理软件 R 包中的 metaX 3.4.3 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)的方法,分析瓜笄霉侵染藜麦后显著差异代谢物。基于 t 检验计算各代谢物在两组间统计学显著性(P -value),并计算代谢物在两组间的差异倍数(fold change, FC),按 $FC \geq 2$ 或 $FC \leq 0.5$ 、变量投影重要度(variable important for the projection, VIP) >1 、 $P < 0.01$ 的标准来筛选差异代谢物。使用 KEGG 数据库(<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)来研究代谢物的代谢途径,当代代谢途径的 $P < 0.05$ 时,认为该代谢途径是显著富集。代谢物定性定量、数据质控、代谢物注释、差异分析、KEGG 富集分析中数据处理主要使用软件 Python 3.5.0 和 Python 2.7.6。使用软件 R3.4.3 和 R4.0.3 绘制图,运用 R 包中的 metaX 的进行 PCA 和 PLS-DA 分析作图、pheatmap 进行热图聚类分析作图、ggplot2 进行火山图和气泡图分析作图。

2 结果与分析

2.1 瓜笄霉对藜麦茎的致病性测定

将瓜笄霉接种在藜麦茎部 1 d 后,茎部产生褐色褪绿的、水浸状、软腐病斑;病斑延茎扩展皱缩,长度为 2–3 cm;植株顶端萎蔫、倒伏;(图 1A),对照植株未出现任何症状(图 1B)。

2.2 代谢物定性分析结果

采用 UPLC-MS/MS 技术共检测到 1 323 种代谢物,能鉴定到分类的有 978 种,可分为 13 类物质,其中脂肪酰类 124 种,萜类 115 种,羧酸及其衍生物 108 种,有机氧化合物 69 种,黄酮类 63 种,甘油磷脂 62 种,苯和取代衍生物 39 种,类固醇和类固醇衍生物 35 种,吲哚及其衍生物 31 种,嘌呤核苷类 28 种,酚类化合物 25 种,肉桂酸及其衍生物 23 种,其余数量相对较少的代谢物为有机氮化合物、香豆素及其衍生物、

表 1 色谱梯度洗脱程序

Table 1 Chromatographic gradient elution procedure

时间 Time (min)	流动相 A 体积分数 Volume fraction of mobile phase A (%)	流动相 B 体积分数 Volume fraction of mobile phase B (%)
0.0	98	2
1.5	98	2
3.0	15	85
10.0	0	100
10.1	98	2
11.0	98	2
12.0	98	2



图 1 接种瓜笄霉(A)和未接种瓜笄霉(B)对藜麦茎部的影响

Figure 1 The effects of inoculation with *Choanephora cucurbitarum* (A) and non inoculation with *Choanephora cucurbitarum* (B) on the stem of quinoa.

异黄酮类、嘧啶核苷、喹啉、丹宁酸、酚醚、吡啶及其衍生物、酮酸及其衍生物、肉桂醛、木酚素、黄素核苷酸和生物碱等。

2.3 代谢物差异分析结果

PCA 结果显示 QC 样本聚集程度较好且趋于“0”点(图 2), 说明检测仪器在整个检测分析过程中有高度的精确性和稳定性, 实验数据可靠。PC1 (第一主成分)为 50.13%, PC2 (第二主成分)为 12.92%, 表明代谢物约 63%的代表性特征得到较好的聚类。各点的分布表明对照组和处理组有明显的界线, 表明两组间差异显著($P<0.01$)。

从 PLS-DA 散点得分图(图 3)可知, 2 个主成分 PC1、PC2 的贡献率分别为 51.70%、11.72%, $R^2Y=0.98$, $Q^2Y=0.88$, 接近于 1, 并且 $R^2Y>Q^2Y$, 表示模型稳定可靠, 预测能力较好。“过拟合”验证表明 $R^2>Q^2$, 并且 Q^2 回归线与 Y 轴截距为 $-0.79>0$ (图 4), 说明模型不存在过度拟合现象, 能够有效用于对照组和处理组的最大差异对比, 适合进行后续分析。

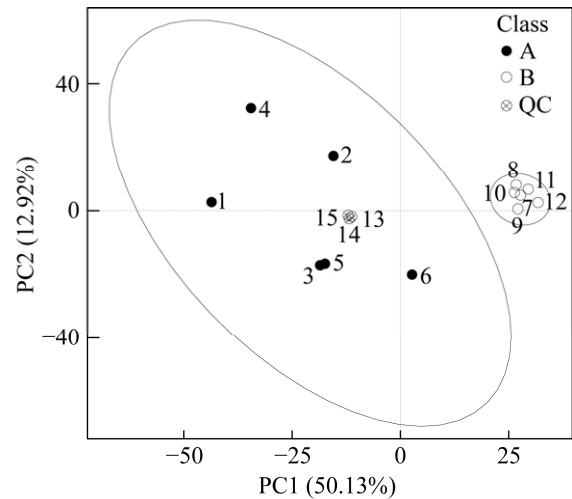


图 2 QC 组和实验组 PCA 得分图 A: 处理组; B: 对照组; QC: 质控样本. 横坐标 PC1 和纵坐标 PC2 分别表示排名第一和第二的主成分得分

Figure 2 PCA scores of QC group and experimental group. A: Treatment group; B: Control group; QC: Quality control sample. The horizontal axis PC1 and the vertical axis PC2 represent the scores of the first and second principal components, respectively.

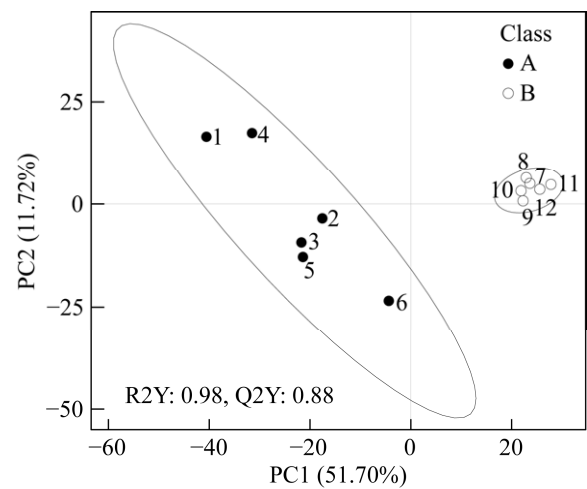


图 3 处理组和对照组代谢物的 PLS-DA 得分图 R2Y: 模型的解释率; Q2Y: 模型的预测能力; A: 处理组; B: 对照组

Figure 3 PLS-DA scores of metabolites in treatment group and control group. R2Y: the explanatory rate of the model; Q2Y: the predictive power of the model; A: Treatment group; B: Control group.

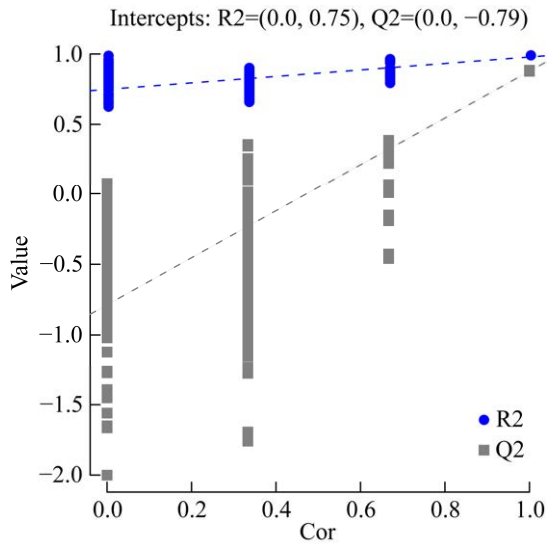


图 4 瓜笄霉侵染下藜麦茎的代谢物排序检验图
横坐标代表随机分组的 Y 与原始分组 Y 的相关性，纵坐标代表 R2 和 Q2 的得分

Figure 4 Sequencing test diagram of metabolites in quinoa stems infected by *Choanephora cucurbitarum*. The abscissa represents the correlation of random group Y with the original group Y, and the ordinate represents the scores of R2 and Q2.

2.4 差异代谢物鉴定与分析

处理组与对照组相比较有 512 种代谢物含量发生显著变化($P < 0.01$), 其中 283 种代谢物显著上调, 229 种代谢物显著下调(图 5)。显著上调代谢物有 59 种脂肪酰基包括: 茉莉酸、茉莉酸甲酯、花生四烯酸、次亚麻酸甲酯、亚油酸、 γ -亚麻酸等, 萜类 36 种包括: 赤霉素、细叶远志皂苷、地榆皂苷 II、白桦酸等, 类固醇和类固醇衍生物 14 种包括: 维生素 D2、远志酸、脱氧皮质酮、蒜藜芦碱等, 核苷酸及其衍生物 13 种包括: 腺苷 5'-单磷酸、5'-腺苷酸、胸苷等, 甘油磷脂类 13 种包括: LPE 16:1、LysoPC 16:1、Lysopa 16:0 等, 其余数量较少的差异代谢物为吲哚及其衍生物、苯和取代衍生物、酚类、异黄酮类、萜类化合物等。显著下调代谢物中黄酮类物质有 27 种包括: (+)-儿茶素、异补骨脂

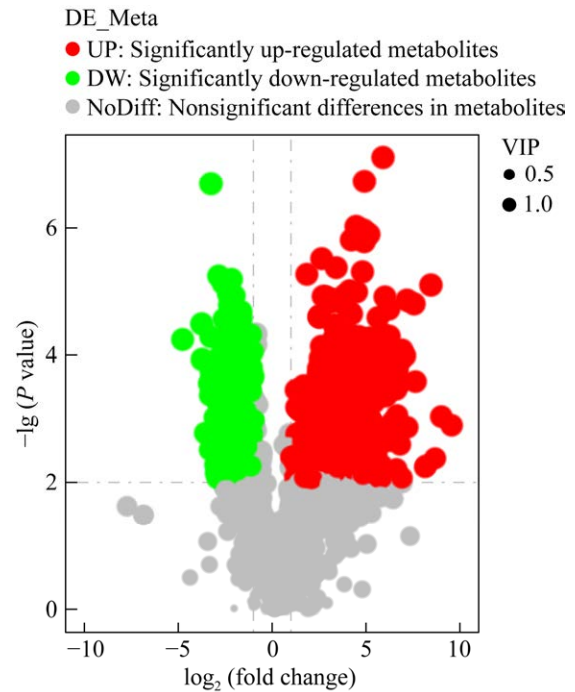


图 5 瓜笄霉侵染下藜麦茎的差异代谢物火山图
Figure 5 Volcano plot of differential metabolites in quinoa stems infected by *Choanephora cucurbitarum*.

黄酮、山柰酚、槲皮苷、芦丁、橘皮苷、异牡荆素等, 萜类 27 种包括: 脱落酸、熊果酸、茯苓新酸、齐墩果酸、羟基积雪草苷等, 其余是数量相对较少的差异代谢物分别为肉桂酸及其衍生物、脂肪酰基、酚类、吲哚及其衍生物、苯及其取代衍生物、喹啉及其衍生物等(表 2)。512 种差异代谢物的聚类热图显示(图 6), 处理组和对照组的差异代谢物组内差异较小, 组间差异较大, 颜色差异明显, 表明瓜笄霉侵染显著改变了藜麦茎部代谢物水平。为了进一步探究这些差异代谢物响应瓜笄霉侵染的机制, 对其参与的代谢通路进行分析。

2.5 差异代谢物 KEGG 富集分析

通过 KEGG 数据库对差异代谢物进行注释和通路富集分析, 共得到了 26 条差异代谢通路(图 7), 其中有 4 条通路差异显著($P < 0.05$), 分别为花生四烯酸代谢、黄酮和黄酮醇的生物

表 2 瓜筲霉侵染下藜麦茎的差异代谢物类群

Table 2 Categories of differential metabolites in quinoa stems infected by *Choanephora cucurbitarum*

类别 Category	上调的数量 Up-regulated number	下调的数量 Down-regulated number
脂肪酰基 Fatty acyls	59	5
萜类 Terpenes	36	27
黄酮类 Flavonoids	11	27
核苷酸及其衍生物 Nucleotides and derivatives	13	5
类固醇和类固醇衍生物 Steroids and steroid derivatives	14	4
氨基酸及其衍生物 Amino acids, peptides, and analogues	11	6
甘油磷脂类 Glycerophospholipids	13	4
吲哚及其衍生物 Indoles and derivatives	8	7
碳水化合物 Carbohydrates	4	9
酚类 Phenols	5	7
苯及其取代衍生物 Benzene and substituted derivatives	4	7
生物碱 Alkaloids	7	3
肉桂酸及其衍生物 Cinnamic acids and derivatives	1	9
香豆素及其衍生物 Coumarins and derivatives	2	5
异黄酮 Isoflavones	4	2
醇和多元醇 Alcohols and polyols	4	2
查尔酮和二氢查尔酮 Chalcones and dihydrochalcones	5	0
醛酮 Aldehydes ketones	3	2
苯吡喃类 Benzopyranes	2	3
喹啉及其衍生物 Quinolines and derivatives	2	2
木脂素及相关化合物 Lignans and related compounds	0	4
胺类 Amines	1	2
嘌呤和嘌呤衍生物 Purines and purine derivatives	3	0
鞣质 Tannins	0	2
其他类 Other types	9	20
未鉴定到分类 Classification not identified	62	65
总计 Total	283	229

合成、亚油酸代谢、 α -亚麻酸代谢。而其他 22 条差异代谢通路也发生变化,但差异未达到显著水平($P>0.05$),分别为:类固醇生物合成,类胡萝卜素生物合成,单萜类化合物的生物合成,植物激素信号转导,黄酮类化合物生物合成,抗坏血酸和醛酸盐代谢,肌醇磷酸代谢,叶酸的一碳池,倍半萜类和三萜类生物合成,磷脂酰肌醇信号系统,色氨酸代谢,萜萜烷、吡咯烷和吡啶类生物碱的生物合成,不饱和脂肪酸的生物合成,嘌呤代谢,赖氨酸退化, β -丙氨

酸代谢,丙酮酸代谢,生物素代谢,二萜生物合成,异黄酮类化合物的生物合成,水溶性色素的生物合成。

显著富集的 4 条代谢通路中,有 7 种被注释到的差异代谢产物富集于花生四烯酸代谢通路,除前列腺素 D2 含量下调外,其余 6 种[5-氧代花生四烯酸、花生四烯酸、15(S)-羟基二十碳四烯酸、前列腺素 J、前列腺素 A2、前列腺素 H2]含量都上调;富集在亚油酸代谢通路的差异代谢产物(花生四烯酸、13-氧代油酸、亚油酸、 γ -亚麻酸)

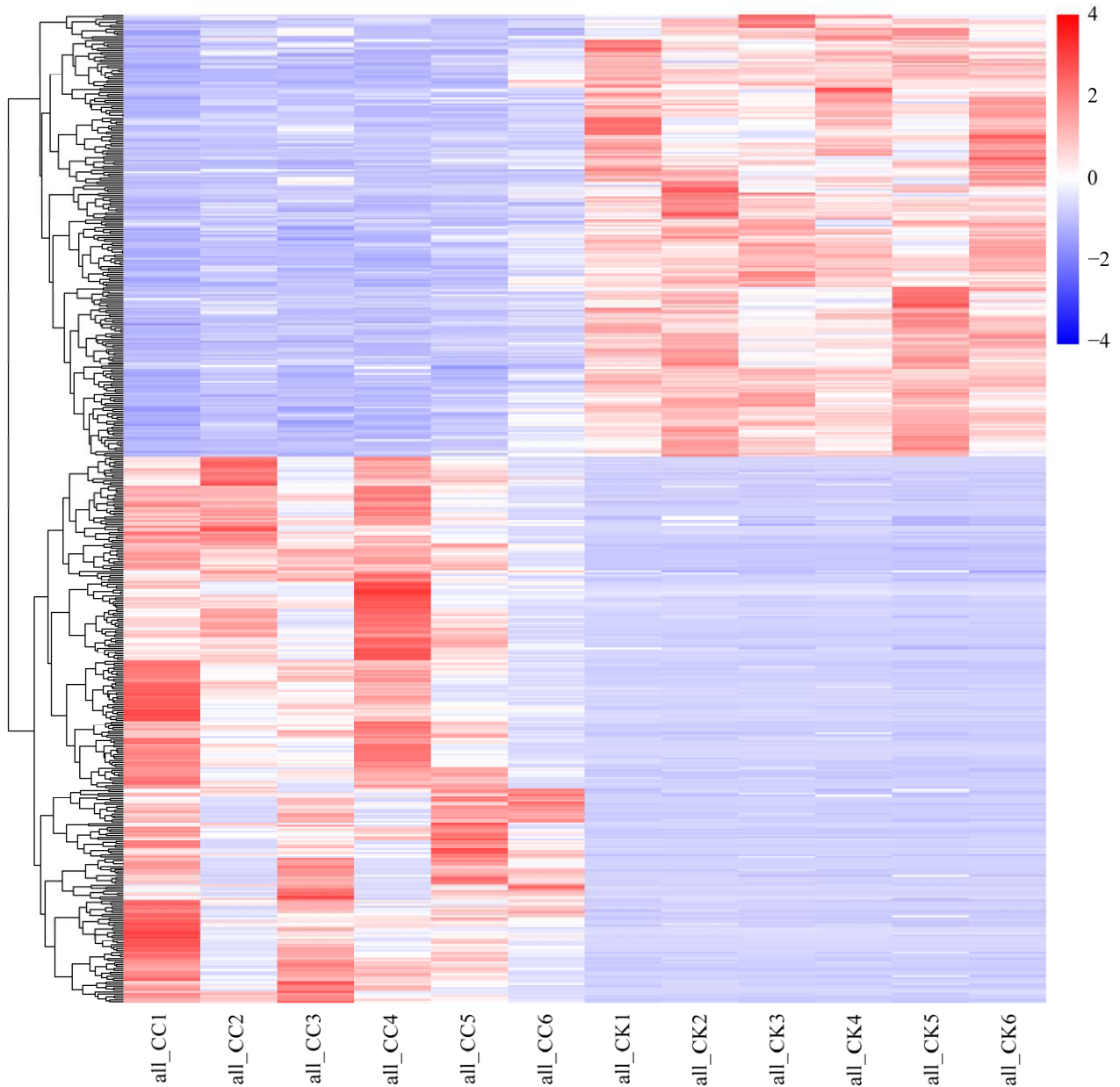


图 6 处理组与对照组差异代谢物聚类热图 CC1-CC6: 处理组; CK1-CK6: 对照组. 左侧的聚类树为差异代谢物聚类树, 不同颜色为相对含量标准化处理后得到的值(红色代表高含量, 蓝色代表低含量)
 Figure 6 Cluster heat map of differential metabolites between treatment group and control group. CC1-CC6: Treatment group; CK1-CK6: Control group. The cluster tree on the left is the differential metabolite cluster tree, and the different colors are the values obtained after the relative content standardization treatment (red represents high content, blue represents low content).

含量都上调; 富集在 α -亚麻酸代谢通路上的差异代谢产物 13(S)-羟基油酸三烯酸、茉莉酸和茉莉酸甲酯含量都上调; 黄酮和黄酮醇的生物

合成途径的 6 种差异代谢物中, 除西伯利亚落叶松黄酮含量上调外, 其余山奈酚、槲皮素、异牡荆素、三叶豆苷、芦丁含量都下调(表 3)。

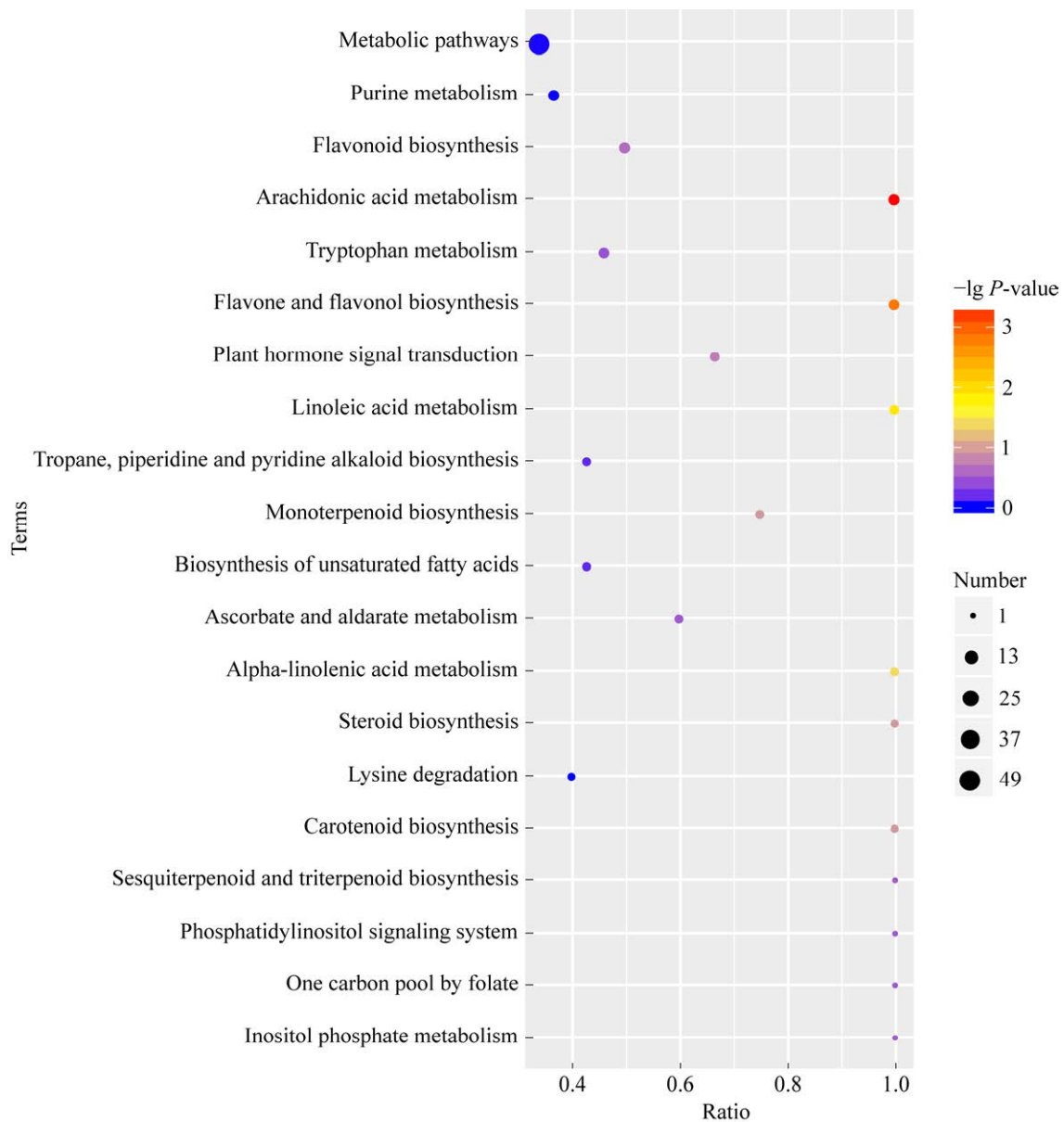


图 7 瓜笄霉侵染下藜麦茎的差异代谢物 KEGG 富集气泡图 横坐标为相应代谢通路中差异代谢物的数目与该通路中鉴定的总代谢物数目的比值, 值越大表示该通路中差异代谢物富集程度越高. 点的颜色代表超几何检验的 P -value 值, 值越小说明检验的可靠性越大、越具统计学意义. 点的大小代表了相应通路中差异代谢物的数量, 点越大说明该通路中的差异代谢物就越多. 仅显示 top20 的结果

Figure 7 KEGG enrichment of differential metabolites in quinoa stems infected by *Choanephora cucurbitarum*. The x-axis represents the ratio of the number of differential metabolites to the total number of identified metabolites in the corresponding metabolic pathway. The larger the value, the higher the concentration of differential metabolites in the pathway. The color of the dots represents the P -value of hypergeometric test. The smaller the value is, the more reliable and statistically significant the test is. The size of the point represents the number of differential metabolites in the corresponding pathway. The larger the point, the more differential metabolites in the pathway. Only the results of top20 are shown.

表 3 瓜笄霉侵染后藜麦茎的显著富集代谢通路中的差异代谢物

Table 3 Differentially metabolites in significantly enriched metabolic pathways of quinoa stems after infection by *Choanephora cucurbitarum*

KEGG 通路名称	代谢物	变化倍数	P 值	VIP 得分	趋势
KEGG pathway name	Metabolite	Fold change	P-value	VIP score	Trend
花生四烯酸代谢 Arachidonic acid metabolism	5-氧代花生四烯酸 5-OxoETE	6.151 23	0.000 07	1.329 41	↑
	花生四烯酸 Arachidonic acid	22.639 82	0.000 15	1.355 08	↑
	前列腺素 D2 Prostaglandin D2	0.104 60	0.000 00	1.451 63	↓
	前列腺 H2 Prostaglandin H2	5.768 93	0.000 03	1.311 84	↑
	前列腺 J2 Prostaglandin J2	31.440 51	0.000 72	1.208 57	↑
	15(S)-羟基二十碳四烯酸 15(S)-HpETE	24.257 72	0.000 98	1.282 17	↑
亚油酸代谢 Linoleic acid metabolism	前列腺素 A2 Prostaglandin A2	18.260 21	0.001 65	1.249 36	↑
	花生四烯酸 Arachidonic acid	22.639 82	0.000 15	1.355 08	↑
	13-氧代油酸 13-OxoODE	67.177 67	0.000 06	1.380 48	↑
α -亚麻酸代谢 Alpha-linolenic acid metabolism	亚油酸 Linoleic acid	11.159 14	0.001 38	1.200 79	↑
	γ -亚麻酸 Gamma-Linolenic acid	3.221 69	0.006 89	1.045 94	↑
	13(S)-羟基油酸三烯酸 13(S)-HOTrE	35.605 29	0.000 00	1.373 31	↑
	茉莉酸 Jasmonic acid	10.428 72	0.000 22	1.280 65	↑
黄酮和黄酮醇的生物合成途径 Flavone and flavonol biosynthesis	茉莉酸甲酯 Methyl jasmonate	5.855 56	0.000 11	1.295 63	↑
	山奈酚 Kaempferol	0.270 67	0.001 32	1.257 74	↓
	槲皮素 Quercetin	0.084 32	0.001 67	1.260 58	↓
	三叶豆苷 Trifolin	0.225 55	0.000 50	1.279 92	↓
	异牡荆素 Isovitexin	0.239 48	0.001 73	1.255 20	↓
	西伯利亚落叶松黄酮 Laricitrin	5.299 75	0.002 67	1.160 00	↑
	芦丁 Rutin	0.146 39	0.002 95	1.217 45	↓

3 讨论与结论

本研究中显著差异代谢物参与了花生四烯酸代谢、黄酮和黄酮醇的生物合成、类胡萝卜素生物合成、色氨酸代谢等 26 条通路，其中有 4 条通路显著富集，分别为花生四烯酸代谢、亚油酸代谢、 α -亚麻酸代谢、黄酮和黄酮醇的生物合成(图 7)。4 条显著富集的通路中，被注释到花生四烯酸代谢、亚油酸代谢和 α -亚麻酸代谢这 3 条脂类代谢通路中的 13 种显著差异代谢物都是脂肪酰基类，6 种黄酮类物质被注释

到黄酮和黄酮醇的生物合成中(表 3)。

植物中的亚油酸和 α -亚麻酸代谢产物参与了植物激素茉莉酸的合成，亚油酸可以通过一系列酶促反应转化为 α -亚麻酸^[25]， α -亚麻酸是茉莉酸合成的直接底物，它们之间的关系是通过一系列酶促反应连接的^[26]。茉莉酸甲酯和 13(S)-HOTrE 都是茉莉酸的衍生物，并且可能参与茉莉酸的生物合成途径^[27]。本研究与茉莉酸的生物合成有关的代谢物：亚油酸、茉莉酸、茉莉酸甲酯、13(S)-HOTrE 等含量显著上升(表 3)，而茉莉酸的生物合成对于植物适应环境变化、

抵御病虫害以及维持生长发育至关重要^[28-29]。这些发现共同指向了茉莉酸可作为藜麦抵御瓜笄霉侵染的关键代谢物。在藜麦对瓜笄霉侵染的防御响应中， α -亚麻酸代谢通路尤为突出，表现在富集在 α -亚麻酸代谢通路中的茉莉酸、茉莉酸甲酯和 13(S)-HOTrE 含量显著增加，这可能是藜麦防御机制的关键组成部分，有助于藜麦抵御瓜笄霉的侵染。

花生四烯酸参与细胞内信号转导，影响其他信号转导通路以调控细胞的生物活动^[30]。Savchenko 等^[31]利用真菌、卵菌、细菌侵染可产生花生四烯酸的转基因拟南芥，表明花生四烯酸是一种进化上保守的调节植物胁迫的信号分子。本研究中花生四烯酸及与之相关的代谢物 5-OxoETE、15(S)-HpETE、prostaglandin J、prostaglandin A2、prostaglandin H2、prostaglandin D2 在花生四烯酸代谢通路中极显著富集(表 3)，这些代谢物可能参与了藜麦对瓜笄霉侵染的信号转导和防御反应。亚油酸在植物体内可通过特定的酶促反应转化为花生四烯酸，亚油酸在 $\Delta 6$ -去饱和酶的作用下首先转化为 γ -亚麻酸； γ -亚麻酸在 $\Delta 5$ -去饱和酶的作用下进一步转化为二十二碳四烯酸(dihomo- γ -linolenic acid, DGLA)；DGLA 在环氧合酶的作用下转化为花生四烯酸^[32]。瓜笄霉侵染藜麦后花生四烯酸、13-OxoODE、亚油酸和 γ -亚麻酸显著富集在亚油酸代谢通路中(表 3)。亚油酸通过沉积形成蜡层和脂质以减少病原菌在植物中的渗透和扩展^[33]，例如玉蜀黍赤霉(*Gibberella zeae*)侵染大麦时，大麦中亚油酸和游离脂肪酸的沉积可以加强角质层从而形成一个物理屏障，增强大麦的抗病性^[34]。在本研究中，花生四烯酸和亚油酸代谢显著富集，促进了相关代谢物积累用来抵御其侵染，表明这 2 条代谢途径在藜麦防御瓜笄霉中起作用。

黄酮类的结构多样性和抗氧化特性使其在

植物生长发育以及响应生物和非生物胁迫的过程中发挥着重要的作用^[35]。例如，槲皮素被证明具有抗真菌活性，能够显著抑制病菌孢子萌发^[36]；棉花中的儿茶素和槲皮素能够抑制棉花黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)的产孢、孢子萌发和菌丝生长^[37]。大量的研究表明，杨树中黄酮类途径基因的表达可增强杨树对病原菌的抗性^[38]，黄酮类代谢相关基因的表达增强了大麦对禾谷镰孢(*Fusarium graminearum*)的抗性^[39]。多数情况下，植物受到生物胁迫时，一些黄酮类代谢物如儿茶素、槲皮素、芦丁等大量合成，增强抵御病原体入侵的物理屏障^[40-42]。Zhu 等^[43]和 Repo-Carrasco-Valencia 等^[44]实验发现，槲皮素和山奈酚是藜麦中的主要黄酮类物质。本研究发现瓜笄霉侵染藜麦后 5 种黄酮类差异代谢物槲皮素、山奈酚、异牡荆素、三叶豆苷和芦丁含量显著下调，并且显著富集在黄酮和黄酮醇的生物合成中(表 3)，表明藜麦的黄酮和黄酮醇的生物合成受阻，这可能是影响藜麦防御机制的关键。

综上所述，瓜笄霉侵染导致了藜麦中花生四烯酸代谢、亚油酸代谢、 α -亚麻酸代谢、黄酮和黄酮醇的生物合成等代谢途径发生变化。其中 α -亚麻酸代谢、黄酮和黄酮醇的生物合成这两条代谢途径的变化可能是藜麦响应瓜笄霉侵染的主要方式。 α -亚麻酸代谢途径被激活及其相关代谢物茉莉酸的积累，可能是藜麦启动防御系统的关键，但未达到防御要求，这可能是因为这些物质含量不足。黄酮和黄酮醇的生物合成受阻，表明这一通路及相关代谢物在藜麦笄霉软腐病发病过程中起着关键作用。

REFERENCES

- [1] The Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II[J].

- Botanical Journal of the Linnean Society, 2003, 141(4): 399-436.
- [2] 黄久香, 陈文娜, 李玉玲, 姚纲. 基于多个叶绿体基因序列片段重建广义苋科系统发育关系[J]. 植物学报, 2020, 55(4): 457-467.
HUANG JX, CHEN WN, LI YL, YAO G. Phylogenetic study of *Amaranthaceae sensu lato* based on multiple plastid DNA fragments[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2020, 55(4): 457-467 (in Chinese).
- [3] DINI A, RASTRELLI L, SATURNINO P, SCETTINO O. A compositional study of *Chenopodium quinoa* seeds[J]. Nahrung, 1992, 36(4): 400-404.
- [4] 陈亚蕾, 田森, 孙江伟, 周建波, 任璐, 秦楠, 殷辉, 赵晓军. 昆诺阿藜链格孢叶斑病病原及其生物学特性[J]. 菌物学报, 2022, 41(5): 713-729.
CHEN YL, TIAN M, SUN JW, ZHOU JB, REN L, QIN N, YIN H, ZHAO XJ. Biological characteristics of the pathogen causing *Alternaria* leaf spot on quinoa[J]. Mycosystema, 2022, 41(5): 713-729 (in Chinese).
- [5] 殷辉, 周建波, 吕红, 常芳娟, 秦楠, 翟世玉, 邢鲲, 赵飞, 赵晓军. 藜麦尾孢叶斑病的病原鉴定[J]. 植物病理学报, 2019, 49(3): 408-414.
YIN H, ZHOU JB, LÜ H, CHANG FJ, QIN N, ZHAI SY, XING K, ZHAO F, ZHAO XJ. Identification of the pathogen causing *Cercospora* leaf spot on quinoa[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2019, 49(3): 408-414 (in Chinese).
- [6] BRAHMANAGE RS, LIU M, WANASINGHE DN, DAYARATHNE MC, MEI L, JEEWON R, LI X, HYDE KD. *Heterosporicola beijingense* sp. nov. (*Leptosphaeriaceae*, *Pleosporales*) associated with *Chenopodium quinoa* leaf spots[J]. Phytopathologia Mediterranea, 2020, 59(2): 219-227.
- [7] SUN SL, ZHU ZD, ZHANG JL, MEI L. Outbreak of *Choanephora* stem rot caused by *Choanephora cucurbitarum* on quinoa (*Chenopodium quinoa*) in China[J]. Plant Disease, 2018, 102(11): 2379.
- [8] YIN H, TIAN M, PENG YF, QIN N, LÜ H, REN L, ZHAO XJ. First report on *Choanephora cucurbitarum* causing *Choanephora* rot in *Chenopodium* plants and its sensitivity to fungicide[J]. Journal of Fungi, 2023, 9(9): 881.
- [9] YIN H, ZHOU JB, LV H, QIN N, CHANG FJ, ZHAO XJ. Identification, pathogenicity, and fungicide sensitivity of *Ascochyta caulina* (Teleomorph: *Neocamarosporium calvescens*) associated with black stem on quinoa in China[J]. Plant Disease, 2020, 104(10): 2585-2597.
- [10] YIN H, TIAN M, PENG YF, CHEN YL, QIN N, LÜ H, SUN JW, REN L, ZHAO XJ. Characterization, phylogeny and pathogenicity of *Fusarium solani* causing quinoa basal stem rot in Shanxi Province, China[J]. Plant Pathology, 2024, 73(2): 272-291.
- [11] 薛婧, 侯学萍, 姜晓东, 殷辉, 赵晓军, 李新风. 藜麦炭疽病病原菌鉴定、生物学特性及室内药剂毒力测定[J/OL]. 植物病理学报, 2024. DOI: 10.13926/j.cnki.apps.001638.
XUE J, HOU XP, JIANG XD, Yin H, ZHAO XJ, LI XF. Identification and biological characteristics of the pathogen causing quinoa anthracnose and indoor toxicity determination of several fungicides to the pathogen[J/OL]. Acta Phytopathologica Sinica, 2024. DOI: 10.13926/j.cnki.apps.001638 (in Chinese).
- [12] YIN H, ZHOU JB, CHEN YL, REN L, QIN N, XING YL, ZHAO XJ. Morphology, phylogeny, and pathogenicity of *Trichothecium*, *Alternaria*, and *Fusarium* species associated with panicle rot on *Chenopodium quinoa* in Shanxi Province, China[J]. Plant Pathology, 2022, 71(2): 344-360.
- [13] 王慧, 曹天光, 秦垒, 唐君蔚, 张新旭, 耿金鹏. 碳离子辐射藜麦多酚含量变化的多组学分析[J/OL]. 分子植物育种, 2023. <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/46.1068.S.20230724.2116.011.html>.
WANG H, CAO TG, QIN L, TANG JW, ZHANG XX, GENG JP. Multi-omics analysis of changes in polyphenol content of quinoa irradiated with carbon ions[J/OL]. Molecular Plant Breeding, 2023. <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/46.1068.S.20230724.2116.011.html> (in Chinese).
- [14] 赵丽娟, 闫素月, 史晓晶, 尉俊海, 张洪. 霜霉病菌侵染对藜麦叶片代谢的影响[J]. 植物病理学报, 2021, 51(3): 334-339.
ZHAO LJ, YAN SY, SHI XJ, WEI JH, ZHANG H. Downy mildew-infection changes the metabolism of quinoa leaves[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2021, 51(3): 334-339 (in Chinese).
- [15] 高汉峰, 杨莹, 陈红雨, 程亮, 郭青云. 出芽短梗霉菌PA-2侵染对藜叶片代谢的影响[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(2): 286-296.
GAO HF, YANG Y, CHEN HY, CHENG L, GUO QY. Effect of *Aureobasidium pullulans* PA-2 metabolism of *Chenopodium album* leaves[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2021, 37(2): 286-296 (in Chinese).
- [16] HAMZEHZARGHANI H, KUSHALAPPA AC, DION Y, RIOUX S, COMEAU A, YAYLAYAN V,

- MARSHALL WD, MATHER DE. Metabolic profiling and factor analysis to discriminate quantitative resistance in wheat cultivars against *Fusarium* head blight[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2005, 66(4): 119-133.
- [17] FEUSSNER I, POLLE A. What the transcriptome does not tell-proteomics and metabolomics are closer to the plants' patho-phenotype[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2015, 26: 26-31.
- [18] NICHOLSON JK, LINDON JC, HOLMES E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data[J]. *Xenobiotica: the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, 1999, 29(11): 1181-1189.
- [19] TENG ZQ, FU HQ, JIA SH, MENG WW, DAI RJ, DENG YL. Review of current progress in the metabolomics for plant response to abiotic stress[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2011, 35(1): 110-118.
- [20] WANT EJ, WILSON ID, GIKA H, THEODORIDIS G, PLUMB RS, SHOCKCOR J, HOLMES E, NICHOLSON JK. Global metabolic profiling procedures for urine using UPLC-MS[J]. *Nature Protocols*, 2010, 5(6): 1005-1018.
- [21] FENG J, YU Y, SONG LM, ZHANG RY, CAO YQ, DU X, TAO FY, GAO HY, XUE P. Comparison of the anti-inflammatory effects of different polar ginsenosides on rheumatoid arthritis[J]. *Industrial Crops and Products*, 2022, 181: 114845.
- [22] DU NS, YANG Q, GUO H, XUE L, FU RK, DONG XX, DONG H, GUO ZX, ZHANG T, PIAO FZ, SHEN SS. Dissection of *Paenibacillus polymyxa* NSY50-induced defense in cucumber roots against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* by target metabolite profiling[J]. *Biology*, 2022, 11(7): 1028.
- [23] TUGIZIMANA F, DJAMI-TCHATCHOU AT, STEENKAMP PA, PIATER LA, DUBERY IA. Metabolomic analysis of defense-related reprogramming in *Sorghum bicolor* in response to *Colletotrichum sublineolum* infection reveals a functional metabolic web of phenylpropanoid and flavonoid pathways[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 9: 1840.
- [24] 沈才琦, 孙磊, 张颖, 姜建福, 刘崇怀, 樊秀彩. 胶孢炭疽菌侵染不同抗性葡萄叶片的转录组学分析[J]. *果树学报*, 2022, 39(5): 730-742.
- SHEN CQ, SUN L, ZHANG Y, JIANG JF, LIU CH, FAN XC. Transcriptomic analysis of different resistant leaves infected by *Colletotrichum gloeosporioides* in grape[J]. *Journal of Fruit Science*, 2022, 39(5): 730-742 (in Chinese).
- [25] 吴端, 王力军, 杨仕梅, 沈奇, 赵德刚. 植物种子 α -亚麻酸形成及调控机理研究进展[J]. *植物遗传资源学报*, 2020, 21(1): 49-62.
- WU D, WANG LJ, YANG SM, SHEN Q, ZHAO DG. Advances on formation and regulation mechanism of α -linolenic acid in seeds[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2020, 21(1): 49-62 (in Chinese).
- [26] TANG HT, LIN SM, DENG JL, KEASLING JD, LUO XZ. Engineering yeast for the *de novo* synthesis of jasmonates[J]. *Nature Synthesis*, 2024, 3(2): 224-235.
- [27] WASTERACK C, HAUSE B. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*[J]. *Annals of Botany*, 2013, 111(6): 1021-1058.
- [28] 李永华, 肖能文, 刘勇波. 植物防御中茉莉酸信号通路抑制与终止的作用机制[J]. *植物保护学报*, 2021, 48(3): 563-569.
- LI YH, XIAO NW, LIU YB. Mechanisms of repression and termination of jasmonate signaling in plant defense[J]. *Journal of Plant Protection*, 2021, 48(3): 563-569 (in Chinese).
- [29] GRIFFITHS G. Jasmonates: biosynthesis, perception and signal transduction[J]. *Essays in Biochemistry*, 2020, 64(3): 501-512.
- [30] 罗大力, 张幼怡, 韩启德. 花生四烯酸的生物活性及其钙信号转导作用[J]. *生理科学进展*, 2002, 33(3): 251-254.
- LUO DL, ZHANG YY, HAN QD. Biological activity of arachidonic acid and its calcium signal transduction[J]. *Progress in Physiological Sciences*, 2002, 33(3): 251-254 (in Chinese).
- [31] SAVCHENKO T, WALLEY JW, CHEHAB EW, XIAO YM, KASPI R, PYE MF, MOHAMED ME, LAZARUS CM, BOSTOCK RM, DEHESH K. Arachidonic acid: an evolutionarily conserved signaling molecule modulates plant stress signaling networks[J]. *The Plant Cell*, 2010, 22(10): 3193-3205.
- [32] 袁成凌, 姚建铭, 余增亮. 花生四烯酸及其代谢物的生物学作用[J]. *中国药物化学杂志*, 2000, 10(1): 75-78.
- YUAN CL, YAO JM, YU ZL. Biological effects of arachidonic acid and its metabolites[J]. *Chinese Journal of Medicinal Chemistry*, 2000, 10(1): 75-78 (in

- Chinese).
- [33] KUMAR A, YOGENDRA KN, KARRE S, KUSHALAPPA AC, DION Y, CHOO TM. WAX INDUCER1 (HvWIN1) transcription factor regulates free fatty acid biosynthetic genes to reinforce cuticle to resist *Fusarium* head blight in barley spikelets[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67(14): 4127-4139.
- [34] KUMARASWAMY GK, BOLLINA V, KUSHALAPPA AC, CHOO TM, DION Y, RIOUX S, MAMER O, FAUBERT D. Metabolomics technology to phenotype resistance in barley against *Gibberella zeae*[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2011, 130(1): 29-43.
- [35] AGATI G, CEROVIC ZG, PINELLI P, TATTINI M. Light-induced accumulation of ortho-dihydroxylated flavonoids as non-destructively monitored by chlorophyll fluorescence excitation techniques[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2011, 73: 3-9.
- [36] LIANG ML, YE HJ, SHEN Q, JIANG XY, CUI GB, GU WX, ZHANG LH, NAQVI NI, DENG YZ. Tangeretin inhibits fungal ferroptosis to suppress rice blast[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(12): 2136-2149.
- [37] LONG L, LIU J, GAO Y, XU FC, ZHAO JR, LI B, GAO W. Flavonoid accumulation in spontaneous cotton mutant results in red coloration and enhanced disease resistance[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, 143: 40-49.
- [38] BAI QX, DUAN BB, MA JC, FEN YN, SUN SJ, LONG QM, LV JJ, WAN DS. Coexpression of *PalbHLH1* and *PalMYB90* genes from *Populus alba* enhances pathogen resistance in poplar by increasing the flavonoid content[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 10: 1772.
- [39] KARRE S, KUMAR A, YOGENDRA K, KAGE U, KUSHALAPPA A, CHARRON JB. HvWRKY23 regulates flavonoid glycoside and hydroxycinnamic acid amide biosynthetic genes in barley to combat *Fusarium* head blight[J]. *Plant Molecular Biology*, 2019, 100(6): 591-605.
- [40] McLUSKY SR, BENNETT MH, BEALE M, LEWIS MJ, GASKIN P, MANSFIELD J. Cell wall alterations and localized accumulation of feruloyl-3'-methoxytyramine in onion epidermis at sites of attempted penetration by *Botrytis allii* are associated with actin polarisation, peroxidase activity and suppression of flavonoid biosynthesis[J]. *The Plant Journal*, 1999, 17(5): 523-534.
- [41] SAIJO Y, TINTOR N, LU XL, RAUF P, PAJEROWSKA-MUKHTAR K, HÄWEKER H, DONG XN, ROBATZEK S, SCHULZE-LEFERT P. Receptor quality control in the endoplasmic reticulum for plant innate immunity[J]. *The EMBO Journal*, 2009, 28(21): 3439-3449.
- [42] SCHENKE D, BÖTTCHER C, SCHEEL D. Crosstalk between abiotic ultraviolet-B stress and biotic (flg22) stress signalling in *Arabidopsis* prevents flavonol accumulation in favor of pathogen defence compound production[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2011, 34(11): 1849-1864.
- [43] ZHU NQ, SHENG SQ, LI DJ, LAVOIE EJ, KARWE MV, ROSEN RT, HO CT. Antioxidative flavonoid glycosides from quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd)[J]. *Journal of Food Lipids*, 2001, 8(1): 37-44.
- [44] REPO-CARRASCO-VALENCIA R, HELLSTRÖM JK, PIHLAVA JM, MATTILA PH. Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*)[J]. *Food Chemistry*, 2010, 120(1): 128-133.