

基于 LC-MS 技术的代谢组学方法研究 根肿菌对拟南芥代谢的影响

何璋超 高知泉 毕凯 赵莹
程家森 谢甲涛 付艳苹 姜道宏 陈桃

华中农业大学植物科学技术学院/华中农业大学农业微生物学国家重点实验室/
华中农业大学湖北省作物病害监测和安全控制重点实验室, 武汉 430070

摘要 为探寻根肿菌侵染拟南芥后期寄主代谢的生物标志物,将罹患根肿病的油菜根切块进行组织培养,获得较为纯化的、单一的根肿菌接种体,与拟南芥种子在 1/2 MS 培养基上共培养,利用液相色谱-质谱联用(LC-MS)技术的非靶向代谢组学方法分析根肿菌侵染后期拟南芥根部代谢物差异。组织培养结果表明,根肿菌可以在愈伤组织中生长和繁殖;共培养结果显示 45 d 后拟南芥侧根尖端肿大,显微观察显示根肿菌能完成侵染循环;代谢组数据 PCA 和 PLS-DA 分析结果显示试验组(接种根肿菌)和对照组(未接种根肿菌)明显分离;OPLS-DA 分析和 t 检验结果表明重要的差异代谢物包括油菜素内酯、类黄酮、木质素、萜类、甾体皂苷和磷脂等物质。提示这些物质可能在根肿菌侵染后期时拟南芥与根肿菌的相互作用中起重要作用。

关键词 根肿菌; 拟南芥; 组织培养; 代谢变化; LC-MS

中图分类号 S 435.654 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)05-0030-09

芸薹根肿菌(*Plasmodiophora brassicae*)属于原生动物界、根肿菌门,危害 100 多种十字花科植物,由其引起的根肿病是一种世界性土传病害,国内常年有近 320 万~400 万 hm^2 的十字花科作物受根肿菌侵染,造成严重的损失^[1]。根肿菌具有生存繁殖能力和传染性强、传播速度快、传播途径多、危害重等特点^[2],其休眠孢子在土壤中的半衰期可达 3~6 a^[3],这给该病害的防治带来极大困难。目前,多从检疫、选用抗病品种、轮作、消毒、移植天气等方面进行根肿病综合防治^[4]。研究寄主与根肿菌的互作机制和发现新的抗病相关生物标志物对选育抗病品种和根肿病防治具有重要意义。

在寄主与根肿菌互作过程中,寄主植物对根肿菌侵染的应答反应从基因的表达变化开始,到基因转录翻译为蛋白,蛋白酶催化代谢反应引起代谢物的变化,代谢物则直接参与寄主抗病防御反应中的能量调度补充(如糖类)、物理防御层的加强(如木质素)、抑菌(如硫代葡萄糖苷^[5-6]、植保素^[7])、免疫信号传导(如水杨酸、茉莉酸、乙烯等)^[8-11]等过程,或

者为根肿菌所“劫持”成为其生长繁殖的营养来源(寄主细胞的糖类和氨基酸为其提供碳源和氮源)和干扰寄主正常生命活动、为自身创造有利生存环境的“武器”(如生长素^[12-15]、细胞分裂素^[5,12,16-18]、油菜素内酯^[19-21]等激素与根部肿大组织形成相关),最终引起寄主外在表型的变化。因而,代谢物是根肿菌与寄主分子互作的最终体现,决定着是寄主防御成功、根肿菌侵染失败抑或相反。

目前,关于寄主-根肿菌互作系统的代谢物变化的数据大多是基于转录组和蛋白质组数据进行分析和研究得到的,完全采用代谢组学方法进行的研究不多。基于代谢组学方法,Soledade 等^[7]发现遭到根肿菌侵染后的油菜根组织代谢提取物中植保素及其他抗菌物质的含量显著上升,而 Wagner 等^[22]则发现初级代谢中的氨基酸代谢与寄主的抗感性具有密切关系。

由于根肿菌是活体专性寄生病原菌,缺乏有效的体外纯培养体系,研究人员大多采用盆栽营养土培养植物,再向土壤中加入从腐烂的感病根组织中

收稿日期: 2017-05-31

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-13)

何璋超,硕士研究生,研究方向:分子植物病理学, E-mail: he_zhangchao@163.com

通信作者: 陈桃,博士,讲师,研究方向:分子植物病理学, E-mail: taochen@mail.hzau.edu.cn

提取的根肿菌孢子液的方法进行根肿侵染实验^[23],由于孢子提取液中含有大量杂质和杂菌,且无法完全去除,因此很难排除杂菌和杂质对实验结果的干扰。本研究采用组织培养的方法获得较为纯净的接种材料,并在1/2 MS(Murashige & Skoog)培养基上对拟南芥进行培养和接种,有效避免了杂菌干扰问题,然后通过基于LC-MS技术的代谢组学方法分析了根肿菌侵染对拟南芥代谢的影响,以期找到一些重要的生物标志物,为寄主与根肿菌的互作机制和根肿菌防治方法研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

试剂:葡萄糖(分析纯,国药集团),蔗糖(分析纯,国药集团),Gelrite 凝胶(荷兰 Duchefa),Murashige & Skoog 培养基(M519,美国 Phyto Technology Laboratories),次氯酸钠溶液(国药集团),84 消毒液,氯胺 T,乙醇(分析纯,国药集团),尼罗红染料,甲醇(色谱纯,国药集团)。

仪器:光照培养箱(HP400GS,武汉瑞华),荧光显微镜(Nikon),超高效液相色谱-串联四极杆-飞行时间质谱仪(UPLC-Q-TOF, Xevo G2-XS QToF, 美国 Waters),真空冷冻干燥仪,离心机(Eppendorf),氮吹仪(MD200-2 型,杭州奥盛),超声波细胞粉碎仪(Scientz-II D 型,宁波新芝)。

1.2 培养基、供试菌株和植物

LB 培养基:蛋白胨 10 g、酵母粉 5 g、NaCl 10 g,加水溶解并定容至 1 L,加入 15 g 琼脂粉即 LA 培养基。

PDA 培养基:去皮马铃薯 200 g,加水煮沸,滤出液加入 20 g 葡萄糖、15 g 琼脂粉,溶解后加水定容至 1 L。

MS 培养基:Murashige & Skoog 培养基干粉 4.43 g,蔗糖 30 g, Gelrite 凝胶 4 g,溶解后加水定容至 1 L,调 pH 5.8。

1/2 MS 培养基:Murashige & Skoog 培养基干粉 2.215 g,蔗糖 8 g, Gelrite 凝胶 4 g,溶解后加水定容至 1 L,调 pH 5.8。

以上培养基皆 12℃ 湿热高压灭菌 30 min 后使用。

根肿菌的休眠孢子来自湖北省枝江市发病油菜根的单孢分离物,Williams 1 号生理小种。

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)为野生型 Co-

lumbia-0。

1.3 罹病油菜根的组织培养

将罹病油菜根用自来水冲洗干净后,100%乙醇表面消毒 1 min,30% 84 消毒液(含 1.4% 有效氯)消毒 20 min,无菌水漂洗 3 遍后去掉表皮并切成小块;小块用 100%乙醇浸泡 1 min,再用 2%氯胺 T 消毒 10~20 min,无菌水冲洗 3 次,置于 MS 培养基(含 0.05% 头孢霉素)中 21℃ 下暗培养。3~4 周后,未被污染的小块转移至不含抗生素的 MS 培养基。观察愈伤组织形成情况,将较大的愈伤组织切成数块置于新培养基中扩大培养。

1.4 “无杂菌”根肿菌孢子液的制备

组培得到的较大的愈伤组织作为孢子液制备材料,将 0.2 g 左右的愈伤组织置于研钵中加入 3 mL 无菌水捣碎后用 4 层擦净纸过滤,滤出的孢子液各取 100 μ L 涂布于 PDA 培养基和 LA 培养基上 20℃ 培养,另吸取 100 μ L 置于 LB 培养基 37℃ 摇培。经过三重检测均无杂菌长出的孢子液稀释至 10^7 个/mL 用来接种拟南芥。

1.5 拟南芥培养及根肿菌接种

拟南芥种子用 10% 次氯酸钠溶液消毒 10 min 后用无菌水漂洗 3 遍,种子中加入“无杂菌”的 10^7 个/mL 的根肿菌孢子液,吸取适量种子和根肿菌孢子的混合液在 1/2 MS 培养基上(含 0.05% 头孢霉素)涂布成一条线,培养皿用医用透气纸胶带封口后竖直置于培养箱中培养,培养箱条件设置为白天 22℃、晚上 20℃,光照周期为光 16 h 暗 8 h。对照组中根肿菌孢子液用无菌水代替。

1.6 根肿菌的显微观察

将罹病油菜根切块组织培养形成的愈伤组织切下,切成薄片后用尼罗红染料(0.1 mg/mL 丙酮溶液)染色 3~5 min,无菌水中将表面染料漂洗干净,荧光显微镜下观察。接种根肿菌后的拟南芥根部不用切片直接进尼罗红染色观察。

1.7 代谢物样品的制备

3 个培养皿的拟南芥根部合并为 1 个样品,试验组和对照组各设置 4 个生物学重复。用冰水浴将拟南芥根系表面附着的培养基冲洗干净,液氮速冻后真空冷冻干燥 48 h;将冷冻干燥后的根样研磨成粉末并称量,按 1 mg : 25 μ L 的比例加入 -20℃ 预冷的 50% 甲醇溶液,涡旋 1 min 后,用超声波细胞破碎机以 40 kHz 的频率、超声 1 s 停 2 s 循环冰浴超声 15 min,4℃、13 000 r/min 条件下离心 15

min,收集上清;重复提取 3 次,并将 3 次上清液合并;提取液经过 0.22 μm 细菌过滤器过滤后用氮吹仪浓缩至干,再按 1 mg : 10 μL 的比例加入 50% 甲醇复溶,−80 $^{\circ}\text{C}$ 下保存,待 LC-MS 分析。

1.8 LC-MS 条件

色谱条件:色谱柱为 Waters UPLC C18 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 3.5 μm),柱温 45 $^{\circ}\text{C}$;流动相 A 为 0.1% (V/V) 甲酸超纯水溶液,流动相 B 为乙腈;线性梯度洗脱程序为 99% A、1% B 开始洗脱,25 min 内 B 增加到 25%,接着 10 min 内 B 增加到 40%,再接下来 10 min 内 B 增加到 90%,维持 2 min 后 3 min 内恢复为 99% A、1% B,总分析时间为 50 min。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI),采用正离子模式采集数据;毛细管电压 1 kV; 锥孔电压 30 V;离子源温度 100 $^{\circ}\text{C}$;脱溶剂气温度 400 $^{\circ}\text{C}$;脱溶剂气流量 800 L/h;质量扫描范围: m/z 100~1 200;扫描时间 0.2 s,扫描频率 50 Hz。

1.9 数据分析

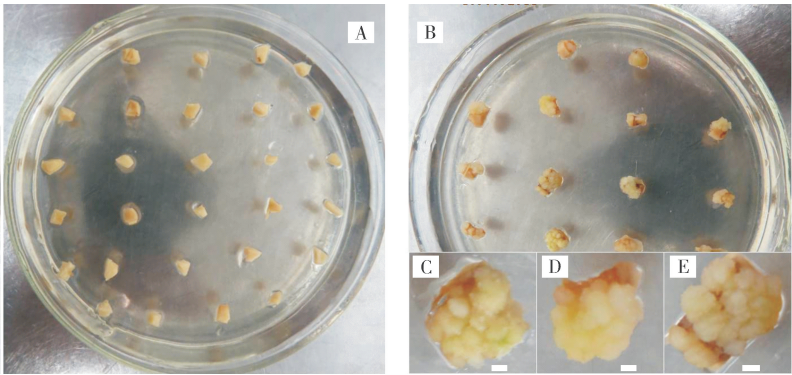
用 xcms 对原始质谱数据进行预处理,包括谱峰提取、滤噪、样本间峰匹配、保留时间校正和缺失

峰补齐等,再用 CAMERA 进行加合物峰、同位素峰、碎片峰的注释。采用 SIMCA 13.0 (Umetrics, Umea, Sweden) 软件进行 PCA、PLS-DA 和 OPLS-DA 多变量统计分析,用 S-plot、VIP 结合 t 检验来筛选差异代谢物。通过准分子离子质荷比信息计算精确分子质量,再结合同位素丰度模式、氮规律和不饱和度计算等方法推断出差异常代谢物的分子式,由分子式及二级质谱信息在 Metlin、kegg、KNAp-SAcK 等公共数据库中搜索可能的结构,结合文献报道对差异代谢物进行定性。

2 结果与分析

2.1 罹病油菜根愈伤组织中根肿菌形态观察

罹病油菜根在 MS 培养基上培养 7 d 后即可见到颗粒状愈伤组织细胞从小块边缘生出,14 d 后白色愈伤组织细胞连接成片附着在小块表面(图 1)。培养 25 d 后,将新生的愈伤组织切片后进行显微观察,发现次级原生质团充斥于愈伤组织细胞,原生质团有大有小,有的原生质团中可见分隔和小的孢子,说明原生质团处于分化中,直到发育成熟释放出休眠孢子(图 2)。



A:罹病油菜根组织切块; B-E:罹病油菜根形成的愈伤组织; 图中标尺为 1 mm。A: Sections of surface sterilized gall; B-E: Extensive callus. Scale bar = 1 mm.

图 1 罹病油菜根愈伤组织的形成

Fig.1 Photographs of developing callus of infected clubroot tissues

2.2 根肿菌在 MS 培养基上侵染拟南芥的结果观察

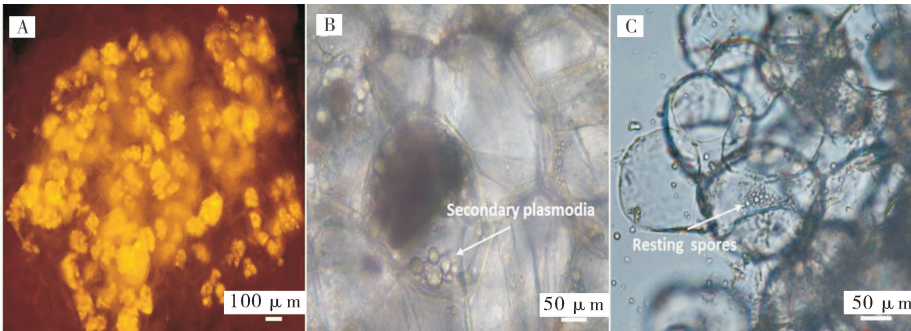
拟南芥种子和根肿菌孢子在 1/2 MS 培养基上共培养 45 d 后,与对照相比,接种根肿菌后的拟南芥根部生长受阻,主根和侧根弯曲,侧根变短且尖端肿大(图 3)。尼罗红染色后,荧光显微镜下观察结果显示,在 1/2 MS 培养基上,根肿菌可以完成完整的侵染循环和生活史(图 4)。

2.3 根肿菌侵染引起拟南芥代谢的差异分析

对接种根肿菌的试验组和不接种根肿菌的对照组的拟南芥根部代谢物样品进行 UPLC-MS 分析,图 5 为正离子模式下典型的基峰离子流图,原始质谱数据经过 xcms 预处理后检测到 16 659 个峰(由保留时间和质荷比值组成的数据对表示)。

将 xcms 提取出的数据矩阵进行单变量和多变量统计分析,通过 t 检验,在变化倍数(FC) ≥ 2 和

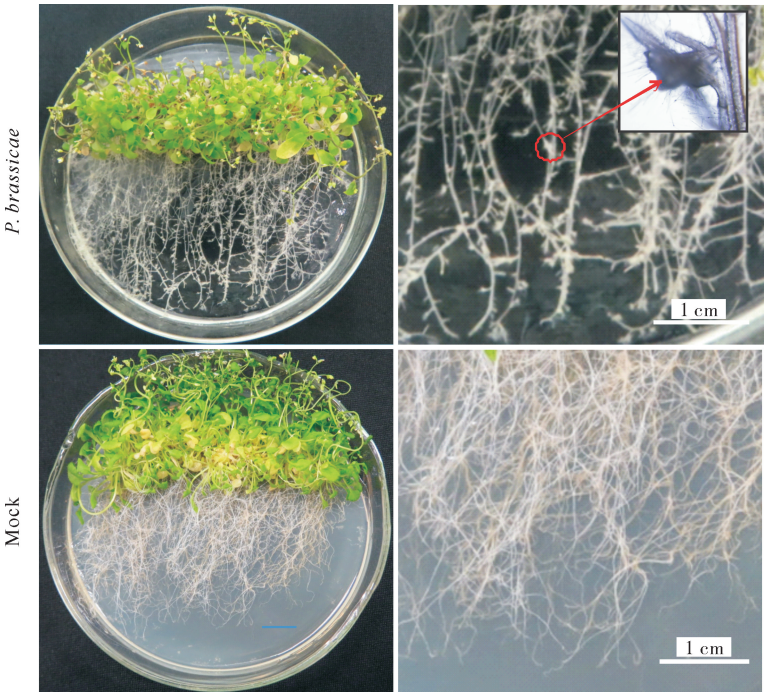
$P \leq 0.05$ 水平上检测出 326 个差异代谢物,其中试验组相对于对照组有 305 个上调(图 6 中右侧红点)、21 个下调(图 6 中左侧红点)。主成分分析(PCA)的二维得分图(图 7)显示,试验组和对照组样本在整体分布上有分离趋势,说明根肿菌侵染对拟南芥代谢产生了影响。第一和第二主成分对 X 累积解释率 $R^2 X(\text{cum}) = 0.662$,累积交叉有效性 $Q^2 X(\text{cum}) = 0.203$,说明 PCA 模型的稳定性还不够高。



A: 尼罗红染色后,荧光显微镜下观察到根肿菌的次级原生质团; B: 分化中的次级原生质团(箭头); C: 次级原生质团分化形成休眠孢子(箭头)。A: Secondary plasmodia (yellow fluorescence, stained with Nile Red) were full of callus cells; B: Secondary plasmodia (arrows); C: Resting spores (arrows) were released from plasmodia.

图 2 罹病油菜根愈伤组织中根肿菌的发育形态

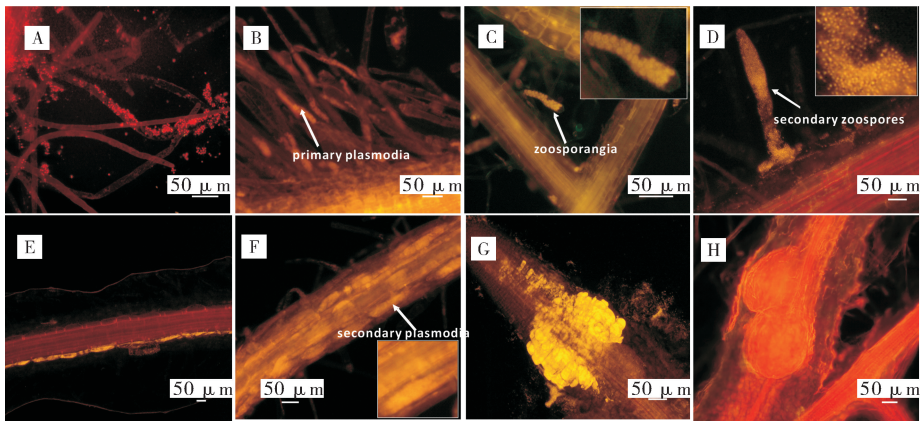
Fig.2 Development of *P. brassicae* in the callus cells generated from the infected clubroot tissues



P. brassicae: 接种根肿菌的拟南芥; Mock: 未接种根肿菌的对照组拟南芥。 *P. brassicae*: *A. thaliana* infected with *P. brassicae*; Mock: *A. thaliana* without inoculation with *P. brassicae*.

图 3 根肿菌在 1/2 MS 培养基上对拟南芥的侵染效果

Fig.3 *Arabidopsis* plants were infected with *P. brassicae* on 1/2 MS medium plates



A: 根毛吸附阶段; B: 初级原生质团形成; C: 初级原生质团分化形成游动孢子囊; D: 次级游动孢子从游动孢子囊中释放并塞满根毛; E: 次级游动孢子感染皮层细胞; F: 次级原生质团形成; G: 次级原生质团分裂形成大量未成熟休眠孢子使细胞膨大; H: 根部形成肿瘤。A: Root hair adsorption; B: Formation of primary plasmodia; C: Plasmodia cleave into zoosporangia; D: Roots are filled with secondary zoospores released from zoosporangia; E: Secondary zoospores penetrate root cortex cells; F: Formation of secondary plasmodia (SP); G: Proliferation and division of SP cause hypertrophic cells fulfilled with immature resting spores; H: Gall formation on *Arabidopsis* roots.

图 4 尼罗红染色观察 1/2 MS 培养基上根肿菌对拟南芥的不同侵染阶段

Fig.4 Different development stage of *P. brassicae* infected *Arabidopsis* roots on 1/2 MS medium with Nile Red staining

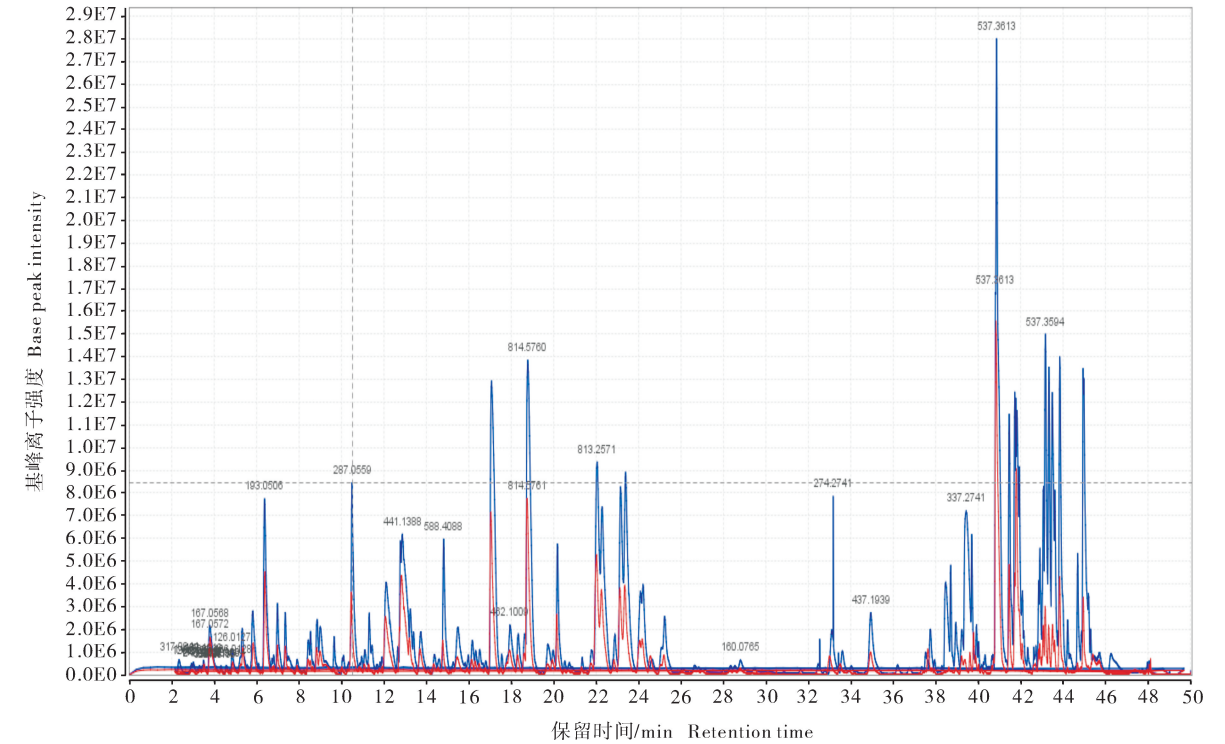


图 5 试验组(蓝色)和对照组(红色)样品的基峰离子流图

Fig.5 Base peak ion current chromatograms of *A. thaliana* roots of treatment group (blue) and mock group (red)

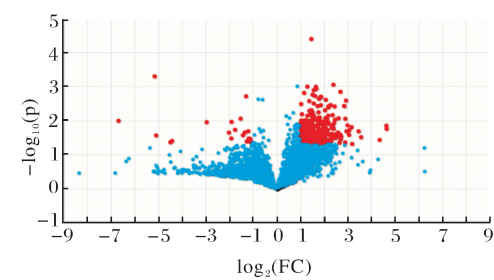


图 6 差异代谢物的火山图

Fig.6 Volcano plot of differentially expressed metabolites (DEMs)

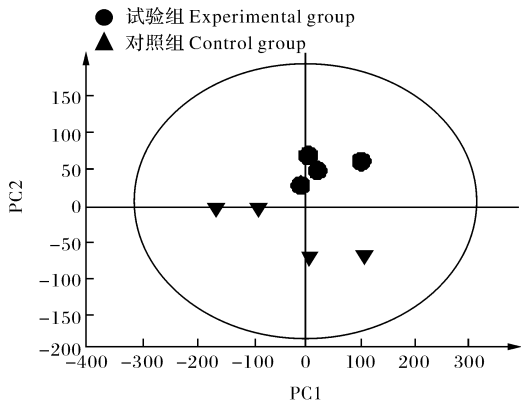


图 7 试验组和对照组 PCA 分析的得分图

Fig.7 PCA score plot of treatment group (circles) and mock group (triangles)

为了进一步探讨由根肿菌引起的拟南芥的代谢变化,找到潜在的生物标志物,采用有监督的模式识别方法——偏最小二乘判别分析(PLS-DA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)对代谢组数据重

新进行建模。与 PCA 相比,PLS-DA 和 OPLS-DA 能够将样品分类信息用于建模,从而放大组间差异,得到更好的分类效果。此外,OPLS-DA 还能够剔除掉与分类无关的变量,减少噪音干扰,使重要变量得到凸显,有利于标志代谢物的识别,OPLS 建模需要以 PLS 模型通过验证为基础。

图 8 为 PLS-DA 分析的得分图,对照组和试验组分离趋势明显。运用交叉验证法(cross validation)对 PLS-DA 模型进行验证(表 1),前 3 个主成分的交叉有效性 Q^2 均大于临界值 0.097 5,累计值 Q^2 (cum)达到 0.885,且 3 个成分对 X 和 Y 的累积解释能力 R^2X (cum)和 R^2Y (cum)分别为 0.736 和 0.994,说明模型的稳定性和可预测能力以及对数据的拟合度较好,满足 OPLS-DA 的建模要求。

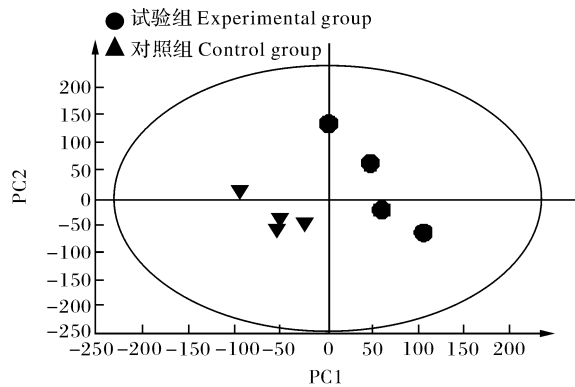


图 8 试验组和对照组 PLS-DA 分析的得分图

Fig.8 PLS-DA score plot of treatment group and mock group

表 1 PLS-DA 模型的验证

Table 1 Validation of PLS-DA model

成分 Components	R^2	R^2X (cum)	R^2Y	R^2Y (cum)	Q^2	Q^2 临界值 Q^2 critical value	Q^2 (cum)
PC1	0.355	0.355	0.757	0.757	0.317	0.097 5	0.317
PC2	0.303	0.658	0.206	0.963	0.719	0.097 5	0.808
PC3	0.078	0.736	0.031	0.994	0.400	0.097 5	0.885

对代谢组数据进行 OPLS-DA 分析,前 3 个有效主成分的 R^2X (cum)=0.831, R^2Y (cum)=0.996, Q^2 (cum)=0.91,表明模型质量较好。图 9 为 OPLS-DA 的得分图,试验组和对照组明显分开。在该模型基础上,通过 S-plot、VIP(variable importance in the projection)分析来筛选根肿菌引起的差异变量。一般 VIP 越大、S-plot(图 10)中位于上下两翼距离原点越远的变量对分类的贡献越大。

通过设置筛选条件:VIP > 1,且 S-plot 中 $|w(P1)| \geq 0.05$ 、 $|p(\text{corr})| \geq 0.5$, t 检验中差异倍数大于 2、 $P \leq 0.05$,共筛选出 34 个重要的差异代谢物。利用代谢物的精确分子质量和二级质谱信息在公共数据库中搜索比对,鉴定出的物质(含量在试验组样本中均显著上调)包括类黄酮、油菜素内酯、木质素、甾体皂苷、萜、倍半萜等,此外还有 5 种磷脂类物质(表 2)。

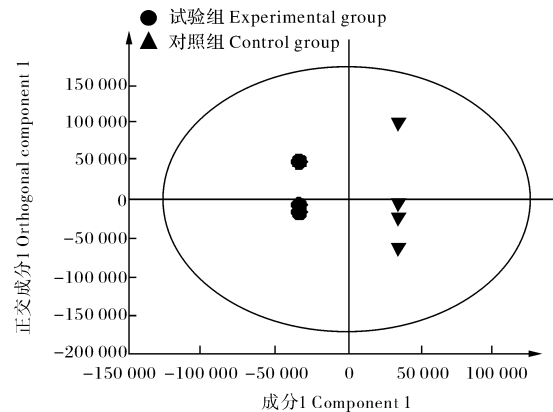


图 9 试验组和对照组 OPLS-DA 分析的得分图

Fig.9 OPLS-DA score plot of treatment group (circles) and mock group (triangles)

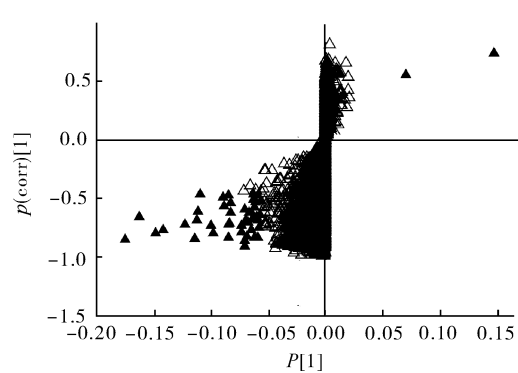


图 10 OPLS-DA 的 S-plot 图

(黑色三角形为重要的潜在生物标志物)

Fig.10 S-plot for OPLS-DA (The black triangles indicate important candidate biomarkers)

表 2 部分重要差异代谢物的鉴定结果

Table 2 Identification of partial important DEMs

代谢物 Metabolite	保留时间/min Retention time	质荷比 m/z [M] ⁺	分子式 Formula	鉴定结果 Identification
M519T2508	41.800	495.346 26	C ₂₈ H ₄₈ O ₇	油菜素内酯 Brassinosteroid
M438T2096	34.939	435.189 06	C ₂₆ H ₂₈ O ₆	类黄酮 Flavonoid
M437T2096	34.938	413.196 26	C ₂₄ H ₃₀ O ₆	木质素 Lignan
M479T2487	41.456	455.351 26	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	萜类 Triterpenoid
M301T2353_2	39.214	277.144 26	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	倍半萜 Sesquiterpenoid
M519T2694	44.906	517.285 06	C ₂₉ H ₄₂ O ₈	甾体皂苷 Steroidal glycosides
M701T1025	17.086	677.495 26	C ₃₆ H ₇₁ O ₉ P	磷脂酰甘油 Phosphatidyl glycerol
M816T1129	18.811	813.641 06	C ₄₇ H ₉₁ O ₈ P	磷脂酸 Phosphatidic acid
M580T2508_9	41.794	578.360 06	C ₂₈ H ₅₄ NO ₉ P	磷脂酰丝氨酸 Phosphatidyl serine
M702T1025	17.088	700.488 06	C ₃₈ H ₇₂ NO ₈ P	磷脂酰乙醇胺 Phosphatidyl ethanolamine
M588T890_2	14.829	564.411 26	C ₂₉ H ₆₀ NO ₇ P	磷脂酰胆碱 Phosphatidyl choline

3 讨论

根肿菌能够刺激寄主细胞产生生长素、细胞分裂素等植物激素,因此,在不添加外源激素的情况下,油菜患根肿病的肿大根部组织能够在 MS 培养基上进行组织培养,长出愈伤组织,根肿菌能够随着愈伤组织的形成而进行繁殖^[23-24]。因此,将根肿菌和寄主通过组织培养的方式进行共培养可以作为一种有效的根肿菌“体外”培养体系,进而获得较为纯净、单一的根肿菌接种材料。本研究将组织培养获得的组织块提取根肿菌孢子后,又对孢子液进行杂菌检测,接种则采用根肿菌孢子和拟南芥种子的混合液涂布 MS 培养基共培养的方式,既避免了先培养后接种中极易引入的外部污染,又能对杂菌的滋生情况进行监控,以实现根肿菌的“无杂菌”接种,确保实验结果的可靠性。组织培养和侵染实验结果显示,根肿菌在愈伤组织能够进行繁殖,在 MS 培养基上根肿菌对拟南芥可以完成侵染循环,证明本研究采用的根肿菌“无杂菌”接种体系的有效性。

拟南芥种子和根肿菌孢子在 MS 培养基上共培养 45 d 后,LC-MS 分析鉴定出的差异代谢物主要包括油菜素内酯、类黄酮、木质素、萜类、甾体皂苷和磷脂类物质。油菜素内酯是一种甾醇类激素,与细胞伸长、细胞分裂、细胞分化、衰老、繁殖、光形态建成、应激反应等生理生化过程有关,还能与生长素等其他激素发生协同交互作用^[21-22]。已有报道表明受根肿菌侵染后寄主根部油菜素内酯合成相关基因显著上调表达^[21],本试验进一步证实油菜素内酯可能参与感病寄主根部肿瘤的形成与发展;类黄酮源自与植物防卫相关的苯丙素代谢途径,是植物中与应激和免疫反应相关的一类次级代谢产物,还涉及丛枝菌根和根瘤菌与寄主的识别互作^[25-26]。有研究表明,类黄酮可能作为生长素转运的一种调节因子间接参与根部肿瘤的形成^[3]。本试验中,根肿菌处于侵染后期使寄主细胞肿大阶段,因此,类黄酮可能更多起到促进生长素在肿大细胞中积累的作用;木质素、萜类和皂苷类物质都与抗病相关^[26],说明根肿菌侵染晚期,拟南芥依然有较强的抗病反应。

值得注意的是,筛选出的差异代谢物中,磷脂类物质较多。一方面这些磷脂类物质可能直接来自于根肿菌,参与根肿菌膜结构和脂滴的形成。据报道根肿菌休眠孢子中含有大量脂滴,脂滴的核心是由甘油三酯(TAG)等中性脂肪组成,核心外有一层单层磷脂分子及各种蛋白包裹,磷酸甘油酯则参与下游甘油三酯的合成^[27];另一方面,众多证据显示植物中磷脂等脂质类物质不仅仅是构成细胞膜结构的简单初级代谢产物,更重要的是当细胞受到生物和非生物胁迫时,磷脂、糖脂、自由脂肪酸及其相关脂水解酶和合成酶通过改变脂代谢物积累、产生脂信号分子、促进初级代谢产物向次级代谢产物转化等方式参与各种防御反应^[28],因此,磷脂类物质也可能参与寄主对根肿病的抗病反应。

本试验采用一种“无杂菌”接种体系并结合LC-MS代谢组学分析技术研究了根肿菌侵染对拟南芥代谢的影响,所鉴定出的差异代谢物如油菜素内酯、类黄酮等进一步验证了前期报道中从基因和蛋白层面得到的结果,同时发现磷脂类物质可能广泛参与到寄主与根肿菌的相互作用中。后期将通过脂质组学(lipidomics)分析技术对寄主受根肿菌侵染后的脂代谢网络的变化进行进一步研究,探讨磷脂等脂类物质在其中的重要生物学意义并找到关键的脂生物标志物,为寄主与根肿菌的互作机制研究提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] 王靖,黄云,李小兰,等.十字花科根肿病研究进展[J].植物保护,2011,37(6):153-158.
- [2] 朱琢然.油菜根肿病的危害及综合防控技术[J].安徽农业学报,2013,19(16):84-99.
- [3] WALLENHAMMARA C. Monitoring and control of *Plasmodiophora brassicae* in spring oilseed *Brassica* crops [C]//HANSEN M. 5th International Symposium on Brassicas and 16th Crucifer Genetics Workshop-Brassica 2008. Lillehammer, Norway: International Society for Horticultural Science, 2010:181-190.
- [4] 邱家德.芸苔根肿菌致病特性及防治[J].植物保护,2016(5):87-88.
- [5] LUDWIG-MÜLLER J, PRINSEN E, ROLFE S, et al. Metabolism and plant hormone action during the clubroot disease [J]. Journal of plant growth regulation, 2009, 28: 229-244.
- [6] DEVOS S, LAUKENS K, DECKERS P, et al. A hormone and proteome approach to picturing the initial metabolic events during *Plasmodiophora brassicae* infection on *Arabidopsis* [J]. Molecular plant-microbe interactions, 2006, 19: 1431-1443.
- [7] SOLEDADE M, PEDRAS C, ZHENG Q A, et al. Metabolic changes in roots of the oilseed canola infected with the biotroph *Plasmodiophora brassicae*: phytoalexins and phytoanticipins [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2008, 56: 9949-9961.
- [8] ROBERT-SEILANIANITZ A, GRANT M, JONES J D G. Hormone cross talk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism [J]. Annual review of phytopathology, 2011, 49: 317-343.
- [9] JUBAULT M, LARIAGON C, TACONNAT L, et al. Partial resistance to clubroot in *Arabidopsis* is based on changes in the host primary metabolism and targeted cell division and expansion capacity[J]. Functional & integrative genomics, 2013, 13: 191-205.
- [10] LEMARIE S, ROBERT-SEILANIANITZ A, LARIAGON C, et al. Camalexin contributes to the partial resistance of *Arabidopsis thaliana* to the biotrophic soilborne protist *Plasmodiophora brassicae* [J]. Frontier in plant science, 2015, 6: 539.
- [11] KNAUST A, LUDWIG-MÜLLER J. The ethylene signaling pathway is needed to restrict root gall growth in *Arabidopsis* after infection with the obligate biotrophic protist *Plasmodiophora brassicae* [J]. Journal of plant growth regulation, 2013, 32: 9-21.
- [12] GRSIC-RAUSCH S, KOBELT P, SIEMENS J, et al. Expression and localization of nitrilase during symptom development of the clubroot disease in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant physiology, 2000, 122: 369-378.
- [13] NEUHAUS K, GRSIC-RAUSCH S, SAUERTEIG S, et al. *Arabidopsis* plants transformed with nitrilase 1 or 2 in anti-sense direction are delayed in clubroot development [J]. Journal of plant physiology, 2000, 156: 756-761.
- [14] UGAJIN T, TAKITA K, TAKAHASHI H, et al. Increase in indole-3-acetic acid (IAA) level and nitrilase activity in turnips induced by *Plasmodiophora brassicae* infection [J]. Plant biotechnology, 2003, 20: 215-220.
- [15] ISHIKAWA T, OKAZAKI K, KURODA H, et al. Molecular cloning of *Brassica rapa* nitrilases and their expression during clubroot development [J]. Molecular plant pathology, 2007, 8: 623-637.
- [16] KOBELT P, SIEMENS J, SACRISTAN M D. Histological characterisation of the incompatible interaction between *Arabidopsis thaliana* and the obligate biotrophic pathogen *Plasmodiophora brassicae* [J]. Mycological research, 2000, 2: 220-225.
- [17] SIEMENS J, KELLER U, SARX J, et al. Transcriptome analysis of *Arabidopsis* clubroot indicates a key role for cytokinins in disease development [J]. Molecular plant-microbe interactions, 2006, 19: 480-494.
- [18] CAO T, SRIVASTAVA S, RAHMAN M H, et al. Proteome-

level changes in the roots of *Brassica napus* as a result of *Plasmodiophora brassicae* infection [J]. Plant science, 2008, 174: 97-115.

[19] HALLIDAY K J. Plant hormones: the interplay of brassinosteroids and auxin [J]. Curr Biol, 2004, 14: 1008-1010.

[20] YE H, LI L, YIN Y. Recent advances in the regulation of brassinosteroid signaling and biosynthesis pathways [J]. Journal of integrative plant biology, 2011, 53: 455-468.

[21] SCHULLER A, KEHR J, LUDWIG-MÜLLER J. Laser microdissection coupled to transcriptional profiling of *Arabidopsis* roots inoculated by *Plasmodiophora brassicae* indicates a role for brassinosteroids in clubroot formation [J]. Plant cell physiology, 2014, 55(2): 392-411.

[22] WAGNER G, CHARTON S, LARIAGON C, et al. Metabotyping: a new approach to investigate rapeseed (*Brassica napus* L.) genetic diversity in the metabolic response to clubroot infection[J]. Molecular plant-microbe interactions, 2012, 11: 1478-1491.

[23] BULMAN S R, SIEMENS J, RIDGWAY H J, et al. Identification of genes from the obligate intracellular plant pathogen, *Plasmodiophora brassicae* [J]. FEMS microbiology letters, 2006, 264: 198-204.

[24] BULMAN S, CANDY J M, FIERIS M, et al. Genomics of biotrophic, plant-infecting plasmodiophorids using *in vitro* dual cultures [J]. Protist, 2011, 162 (3): 449-461.

[25] WINKEL-SHIRLEY B. Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology [J]. Plant physiology, 2001, 26: 485-493.

[26] DIXON R A. Natural products and plant disease resistance [J]. Nature, 2001, 411: 843-847.

[27] BI K, HE Z C, GAO Z X, et al. Integrated omics study of lipid droplets from *Plasmodiophora brassicae* [J]. Scientific reports, 2016, 6: 36965.

[28] WELTI R, SHAH J, LI W, et al. Plant lipidomics: discerning biological function by profiling plant complex lipids using mass spectrometry [J]. Frontiers in bioscience, 2007, 12: 2494-2506.

Metabolic changes of *Arabidopsis thaliana* infected with *Plasmodiophora brassicae* based on LC-MS analysis

HE Zhangchao GAO Zhixiao BI Kai ZHAO Ying CHENG Jiasen
XIE Jiatao FU Yanping JIANG Daohong CHEN Tao

*State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University/
The Provincial Key Lab of Plant Pathology of Hubei Province, College of
Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

Abstract The aim of the present study was to find some important metabolic biomarkers of *Arabidopsis thaliana* roots infected with *Plasmodiophora brassicae* at the late infection stage. *P. brassicae* spores were extracted from callus cultures of clubroot gall sections, co-cultured with *A. thaliana* seeds on 1/2 MS medium and then after 45 d metabolic changes of the *A. thaliana* roots were analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) technique. The results showed that *P. brassicae* could grow and develop in callus, and after co-cultured with *A. thaliana* for 45 d, microscopic observation showed that the pathogens had a complete life cycle on the medium. Multivariate statistical methods of PCA and PLS-DA suggested that the metabolites of experimental group (inoculated with *P. brassicae*) and control group (uninoculated with *P. brassicae*) differentially expressed. The results of OPLS-DA and *t-test* showed that the metabolites of flavonoids, lignans, terpenoids, steroidal glycosides, brassinosteroids and phospholipids were significantly increased during *P. brassicae* infection, suggesting their potential important roles in interaction between *A. thaliana* and *P. brassicae* at the late stage of infection.

Keywords *Plasmodiophora brassicae*; *Arabidopsis thaliana*; callus culture; metabolic change; LC-MS

(责任编辑:边书京)