

## 大丽轮枝菌与陆地棉互作过程中棉花次生代谢产物分析

李社增<sup>1,2</sup>, 牛露欣<sup>2</sup>, 李博超<sup>3</sup>, 陈秀叶<sup>2</sup>, 刘畅<sup>4</sup>, 鹿秀云<sup>2</sup>, 郭庆港<sup>2</sup>, 马平<sup>2\*</sup>, 马峙英<sup>1\*</sup>

(1.河北农业大学/教育部华北作物种质资源重点实验室,河北保定 071000;2.河北省农林科学院植物保护研究所/河北省农业有害生物综合防治工程技术研究中心/农业农村部华北北部作物有害生物综合治理重点实验室,河北保定 071000;3.南加州大学生物医学工程系,美国洛杉矶 90089;4.南京农业大学植物保护学院,南京 210095)

**摘要:**【目的】分析大丽轮枝菌与棉花互作过程中的差异代谢产物,发现棉花对大丽轮枝菌防御机制的新线索。

【方法】以中棉所 24 为供试棉花品种,在棉苗 2 片真叶期伤根接种大丽轮枝菌或无菌水,获得病原菌处理和健康对照的根、茎、叶组织样本材料,采用超高效液相色谱电喷雾质谱(UPLC-ESI-MS)技术对样本材料的 70% (体积分数)甲醇水溶液提取物进行分离与检测,经在线 XCMS 软件处理获得代谢组数据,经多元统计和 *t* 检验,获得处理间差异代谢产物,基于相对分子质量实验值与棉花代谢产物准确值比较确定代谢产物的种类。

【结果】UPLC-ESI-MS 分析棉花代谢组时,负离子检测模式比正离子检测模式效率更高。在棉苗根、茎、叶组织中发现,大丽轮枝菌处理与健康对照有重要差异的代谢产物为 576 个,主要存在于棉花根部,其中 77 个鉴定为倍半萜类、二萜类、黄酮类、碳水化合物、脂肪族和酚类物质。除倍半萜物质外,咖啡酸、紫云英苷、异紫云英苷、五羟果素、儿茶素、棉花素-8-鼠李糖苷、棉籽菁、草质素-7-葡萄糖苷、白矢车菊素、槲皮素-3'-葡萄糖苷、槲皮素-3-葡萄糖苷、槲皮素-7-葡萄糖苷、 $\alpha,2',3',4',6'$ -庚羟基查耳酮 2'-葡萄糖苷、蜜二糖、蔗糖、蔗糖 6-磷酸和 1-三十四烷醇这 17 种物质在大丽轮枝菌与棉花互作相关文献中未见报道,可能为新发现的棉花黄萎病病程相关代谢产物。【结论】推定的棉花黄萎病病程相关代谢产物,可能在棉花抵御大丽轮枝菌过程中扮演重要角色,为探索棉花对黄萎病抗病机制提供了新的重要线索。

**关键词:**棉花代谢产物;大丽轮枝菌;互作;黄萎病

Analysis of Cotton Secondary Metabolites under the Interaction between *Verticillium dahliae* and Upland CottonLi Shezeng<sup>1,2</sup>, Niu Luxin<sup>2</sup>, Li Bochao<sup>3</sup>, Chen Xiuye<sup>2</sup>, Liu Chang<sup>4</sup>, Lu Xiuyun<sup>2</sup>, Guo Qinggang<sup>2</sup>, Ma Ping<sup>2\*</sup>, Ma Zhiying<sup>1\*</sup>

(1. North China Key Laboratory for Crop Germplasm Resources of Ministry of Education/Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071000, China; 2. Integrated Pest Management Center of Hebei Province/Key Laboratory of IPM on Crops in Northern Region of North China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Plant Protection Institute, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Baoding, Hebei 071000, China; 3. Department of Biomedical Engineering, University of Southern California, Los Angeles, CA 90098, USA; 4. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** [Objective] The aim of this study is to investigate the cotton differential metabolites in the interaction between *Verticillium dahliae* and cotton plant, and to explore new clues for the further study on the defense mechanism of cotton against *V. dahliae*. [Method] To obtain the cotton root, stem and leaf samples of the pathogen treated and healthy controls, the upland cotton cultivar CCRI 24 was selected as tested cotton material in this paper, and inoculated with *V. dahliae* conidia or sterile water by injuring root at the 2-true-leaf stage. The 70% (volume fraction) methanol extracts of these samples were separated and detected by ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (UPLC-ESI-MS), and the metabolite data were obtained by the online XCMS software. Through multivariate statistics and student's *t*-test, the differential metabolites were investigated. The types of metabolites were putatively identified based on the comparison of the experimental

收稿日期:2020-06-12 第一作者简介:李社增(1966—),shezengli@163.com。\* 通信作者:马平,pingma88@126.com; 马峙英,mazhiying1958@126.com

基金项目:国家重点研发计划(2017YFD0201900);国家现代农业产业技术体系——棉花产业技术体系(CARS-15-18)

molecular mass and the monoisotopic accurate molecular mass of cotton metabolites. [Result] The efficiency of negative ion mode was higher than that of positive ion detection mode in the cotton metabolites in UPLC-ESI-MS analysis. 576 ions mainly distributed in cotton root were found in the cotton seedling tissues including root, stem and leaf, which were the distinguished differential metabolites between *V. dahliae* treatment and healthy control. Among them, 77 ions were identified as sesquiterpenoids, diterpenoids, flavonoids, carbohydrates, aliphatics and phenols. In addition to sesquiterpenes, 17 compounds, including caffeic acid, astragalin, isoastragalin, dillenetin, ent-catechin, gossypetin 8-rhamnoside, gossypicyanin, herbacetin 7-glucoside, leucocyanidin, quercetin 3'-glucoside, quercetin 3-glucoside, quercetin 7-glycosides,  $\alpha,2',3,3',4,4',6$ -heptahydroxychalcone 2'-glucoside, melibiose, sucrose, sucrose 6-phosphate and 1-tetratriacontanol, had not been reported in the literatures on the interaction between *V. dahliae* and cotton, which may be the novel pathogenesis-related metabolites on cotton Verticillium wilt. [Conclusion] The putative pathogenesis-related metabolites of cotton Verticillium wilt may play an important role in the interaction of cotton defense against *V. dahliae*, which provides an important clue for exploring the new resistant mechanism of cotton to Verticillium wilt.

**Keywords:** cotton (*Gossypium hirsutum*) metabolites; *Verticillium dahliae*; interaction; Verticillium wilt

棉花 (*Gossypium* spp.) 作为世界上最重要的经济作物之一和纺织工业天然纤维的主要来源, 在世界 30 多个国家均有种植, 已成为许多发展中国家的经济支柱<sup>[1]</sup>。陆地棉 (*G. hirsutum*) 因其产量高、纤维品质好, 是世界上栽培最广泛的棉种, 占世界棉花种植面积的 92%~95%<sup>[2]</sup>。在陆地棉上, 由大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*) 引起的棉花黄萎病是 1 种严重的土传真菌病害, 每年给棉花生产造成巨大损失<sup>[3-6]</sup>。许多学者认为, 种植抗黄萎病棉花品种是防治黄萎病最经济有效的措施<sup>[7-8]</sup>; 但由于缺乏抗源材料, 抗病棉花育种工作受到极大限制<sup>[9]</sup>。自 1974 年在海岛棉 (*G. barbadense*) 中发现对黄萎病高抗性基因后<sup>[10]</sup>, 近 50 年来, 通过远缘杂交、传统棉花育种等方法, 在改善陆地棉对黄萎病的抗性方面取得了实质性进展<sup>[11-13]</sup>。同时, 随着分子生物学的发展, 棉花分子育种研究越来越受到科学家的重视, 通过导入外源抗病基因或改造调控基因提高了陆地棉对黄萎病的抗性<sup>[14-17]</sup>。尽管在通过传统育种和分子育种提高棉花抗病性方面取得了重要进展, 但这些相关技术和抗性资源材料仍不能满足棉花生产的需求。

为了加速棉花抗病分子育种, 在转录组、蛋白质组和代谢组水平进一步解析棉花抗黄萎病机制是非常必要的。近几十年来, 棉花防御大丽轮枝菌的机制研究取得了一些进展。例如, 棉花的防御机制主要依赖于预先形成的防御结构(厚角质层)和酚类化合物的合成来阻止病原菌的侵

入, 并通过加强细胞壁结构, 释放植保素(黄酮类、酚类和倍半萜类)<sup>[18-19]</sup>、脂质转移蛋白<sup>[20]</sup>和苯丙酸等物质<sup>[21]</sup>, 活性氧(Reactive oxygen species, ROS)积累<sup>[22-23]</sup>和系统获得抗性(Systemic acquired resistance, SAR)<sup>[24]</sup>等特殊抗性反应阻止或延缓病原菌在棉花植株内的扩展。然而, 棉花对大丽轮枝菌的这些防御机制研究成果仍然不足以用于提高棉花抗病育种的效率<sup>[25]</sup>。因此, 在不同组学水平上研究棉花对大丽轮枝菌的防御机制, 挖掘多种与棉花抗病性相关的物质, 对改进棉花抗病育种策略具有重要的理论和应用价值。

代谢组学是对生物体内所有代谢产物组成的分析。对生物体完整代谢组学的研究可进一步解释转录组和蛋白质组的最终结果, 且代谢组的变化将为相应基因表达的潜在变化提供有力证据<sup>[26]</sup>。因此, 研究大丽轮枝菌与棉花互作过程中代谢组的动态变化, 有助于分析代谢途径, 解析代谢产物的生物学作用。在代谢组分析中, 明确代谢产物的种类尤为重要。然而, 由于代谢物的化学种类繁多且含量变化范围大, 缺乏能够同时分离和检测所有代谢物的单一分析方法, 完整代谢组的分析需要不同的互补分析技术, 所以建立高效的分析方法是代谢组分析中 1 项具有技术挑战性的工作。自从一些科学家通过气相色谱-质谱(Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)<sup>[27-28]</sup>或液相色谱-质谱(Liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)<sup>[29-30]</sup>完成对拟南芥、番茄等植物提取物分析后, 色谱与质谱相结

合的综合分析技术被证明对代谢组分析而言是 1 种高效的和最灵敏的方法。

本研究利用超高效液相色谱电喷雾质谱(Ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry, UPLC-ESI-MS)方法,着重针对大丽轮枝菌-陆地棉互作过程中次生代谢产物开展研究,在代谢组学水平上揭示病原菌与棉花互作过程中棉花次生代谢产物变化情况,旨在丰富棉花代谢组学研究数据,为通过病程相关次生代谢产物揭示棉花抗病机制提供科学依据,为进一步基于分子调控技术的抗病棉花品种高效选育奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 棉花育苗与样品材料准备

**1.1.1 棉花育苗。**将土和草炭按质量比 2:1 混匀作为育苗基质,121 °C 间歇灭菌 2 次,每次 1 h,间隔时间 1 d。供试棉花品种为中棉所 24(中国农业科学院棉花研究所李付广博士提供),为早熟棉,纤维品质优良,在田间人工棉花黄萎病病圃(土壤中优势病原菌为大丽轮枝菌 WX-1 菌株)抗病性鉴定试验中,2 年均表现为感病。棉花种子用 10%(质量分数)漂白粉消毒液与 95%(体积分数)酒精的混合液(体积比 1:1)消毒 5 min,用无菌水冲洗 3 次后,播种于盛有育苗基质的书式育苗盒(长 37 cm,宽 22 cm,高 15 cm)中,每个育苗盒共有 32 个育苗孔,每孔播种 2 粒种子。将育苗盒置于 25~30 °C 的温室中进行育苗,根据棉花需求适当浇水。棉苗出齐后,每个育苗孔中仅留健康棉苗 1 棵。

**1.1.2 病原菌接种液制备。**选用大丽轮枝菌 WX-1 菌株(强致病力,分离自河北省威县棉花病株,由作者所在实验室保存)作为本研究的病原菌。先将该菌在马铃薯葡萄糖琼脂(Potato dextrose agar, PDA)平板培养基上 25 °C 下培养 7~10 d。在菌落边缘区域,用直径 3 mm 无菌打孔器将其菌落制成菌片,将 4~5 片菌片加到盛有 100 mL 马铃薯葡萄糖培养液(Potato dextrose broth, PDB)的三角瓶(300 mL)中,在 25 °C、160 r·min<sup>-1</sup> 条件下振荡培养 7 d。然后用 4 层无菌纱布过滤,制得病原菌分生孢子悬浮液,应用血球计数板检

测其中病原菌分生孢子含量,并用无菌水将其制成分生孢子含量为 10<sup>7</sup> mL<sup>-1</sup> 的悬浮液,作为病原菌接种液。

**1.1.3 病原菌接种。**当棉苗生长到 2 片真叶时,采用伤根接种法进行病原菌接种。具体方法如下:将棉苗自育苗盒取出,用无菌剪刀在距根尖 1.5 cm 处剪断棉根,再放回育苗盒。将盛有伤根棉苗的育苗盒浸泡在盛有 2 L 病原菌接种液的塑料盒(长 40 cm,宽 24 cm,深 25 cm)中 30 min,然后将育苗盒仍放回原来育苗环境中继续培养。同时伤根棉苗在无菌水中浸泡 30 min 作为健康对照处理。每个处理重复 3 次,每个重复 1 个育苗盒,每盒 32 棵棉苗。

**1.1.4 棉花取样与处理。**Daayf 等<sup>[10]</sup>研究证明棉花在伤根接种病原菌 7 d 时,茎部出现症状,表明病原菌与棉花发生了充分互作。因此,本研究于病原菌接种后 8 d 时,分别收集棉苗根、茎、叶的组织材料,应用液氮冷冻干燥后用植物粉碎机(Scientz-48,北京同元聚物科技有限公司)研磨成粉末,并保存在-80 °C 冰箱中备用。

### 1.2 棉苗组织中代谢物提取

称取冷冻棉花组织粉末样品 100 mg,在室温下解冻 15 min,加入 800 μL 溶剂[高效液相色谱(HPLC)级甲醇:蒸馏水=7:3(体积比),甲醇购自 Merck KGaA 公司],研磨 1 min,超声提取 30 min,静置 5 min,在 12 000 r·min<sup>-1</sup>(4 °C)下离心 10 min,取上清液 100 μL 置于进样小瓶中,保存在 4 °C 冰箱中备用。

### 1.3 液相色谱-质谱检测

应用超高效液相色谱电喷雾质谱仪(UPLC-ESI-MS)对棉苗组织提取物进行分析。UPLC 仪为 SHIMADZU LC-30 AD,由日本 Shimadzu 公司生产;质谱仪为 AB Triple TOF TM5600 system-MS/MS,由美国 AB SCIEX 公司生产。

色谱条件:色谱柱为 Shim-pack GIST C18(直径 2.1 mm,长 100 mm,填料粒径 2 μm),流动相 A 相为 0.1%(体积分数)甲酸水溶液,流动相 B 相为 0.1%(体积分数)甲酸乙腈溶液,流速 0.35 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 40 °C,自动进样器温度 4 °C,进样量 4 μL。每个样品 3 次重复。洗脱条件:0~1.0 min,5%(体积分数,下同)B;1.0~

6.0 min, 5%~20% B; 6.0~9.0 min, 20%~50% B; 9.0~13.0 min, 50%~95% B; 13.0~15.0 min, 95% B; 15.0~15.2 min, 95%~5% B; 15.2~17.5 min, 5% B。

正离子模式(Positive mode, ESI<sup>+</sup>)质谱检测: 喷雾气压(GAS1)344.7 kPa (50 psi), 辅助加热气压(GAS2)413.7 kPa (60 psi), 辅助加热气温度 500 °C, 气帘气压(CUR)241.3 kPa (35 psi), 离子化电压(IS)5 500 V, 采集模式为信息依赖型采集(IDA)模式, 飞行时间质谱(TOF-MS)质荷比( $m/z$ )扫描范围 50~1 500, 累积时间 250 ms, TOF-MS/MS 二级  $m/z$  扫描范围 50~1 000, 累积时间 50 ms, 去簇电压(DP)100 V, 碰撞能量(CE)35 eV, 扩展碰撞能量(CES)15 eV。

负离子模式(Negative mode, ESI<sup>-</sup>)质谱检测: 辅助加热气压 379.2 kPa (55 psi), 气帘气压 172.4 kPa (25 psi), 离子化电压 4 500 V, 其他参数设置均与正离子模式质谱检测一致。

应用甲酸钠的相对分子质量作为锁定的相对分子质量, 对质谱系统的稳定性及准确性进行校正, 每 6 个样品自动校正 1 次。

#### 1.4 数据预处理和分析

采用在线 XCMS 软件对 UPLC-ESI-MS 数据进行可视化和手工处理 (<https://xcmsonline.scripps.edu>)<sup>[32]</sup>, 进行特征离子峰提取、峰对齐、色谱峰识别及峰匹配, 获得质荷比( $m/z$ )、保留时间(Retention time, RT)和峰强度(Peak intensity)等数据, 进一步将 RT、 $m/z$  和峰强度等数据导出为 .xlsx 文件, 在 MS Excel 2010 软件中手动搜索和编辑, 包括杂质峰的消除和数据去噪。将最终结果转化为数据矩阵(RT× $m/z$ ×峰强度), 构建 ESI<sup>+</sup>和 ESI<sup>-</sup>变量的 2 个数据集, 并用于进一步的数据分析。

采用 SIMCA 14.1 软件 (MKS Umetrics AB) 和 MS Excel 2010 软件对上述 2 组数据集进行单因子和多元统计分析。在 SIMCA 14.1 软件中数据均采用 Pareto scaling 标准处理。首先进行无监督的数据分析——主成分分析(Principal components analysis, PCA), 观察各组数据的聚类并去除离群样本; 然后采用正交偏最小二乘法判别分析(Orthogonal partial least square-discriminate anal-

ysis, OPLS-DA) 进行有监督的数据分析, 采用 200 次置换检验防止 OPLS-DA 模型的过度拟合, 进一步通过 S-Plot 和模型参数  $R^2X$ 、 $R^2Y$ 、 $Q^2$  评价 OPLS-DA 模型的有效性, 计算变量的重要性值(VIP 值)。应用 MS Excel 软件  $t$  检验, 分析病原菌处理的特征离子峰强度与相应健康对照间的统计学差异。

#### 1.5 病原菌-棉花互作过程中重要次生代谢产物挖掘

根据 OPLS-DA 模型的 VIP 值(VIP 值>1)、病原菌处理后棉花次生代谢产物的特征离子峰强度与相应健康对照间  $t$  检验的  $p$  值( $p<0.05$ )及峰强度变化, 分析病原菌处理与健康对照间棉花次生代谢产物变化规律, 筛选与棉花黄萎病程相关的重要次生代谢产物。

#### 1.6 重要次生代谢产物鉴定

首先, 根据现有的文献资料和在线数据库, 获得已报道的有关棉花代谢产物信息并建立自有数据库。这些信息包括代谢产物名称、CAS 号、分子式、单同位素准确相对分子质量、信息来源。其次, 根据 ESI<sup>+</sup>和 ESI<sup>-</sup>检测中加合物存在的一般规律<sup>[33]</sup>, 利用 Matlab 软件 (Version 2018b, MathWorks, Inc.) 编制计算程序(暂不公开), 根据每个特征离子的  $m/z$  计算出对应的所有可能的准确相对分子质量, 进一步计算与自建棉花代谢产物数据库的各物质准确相对分子质量间的误差, 根据锁定的相对分子质量检测误差设定误差阈值, 以小于此阈值推定的匹配物质作为供试代谢产物的鉴定结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 目前明确的棉花代谢产物信息

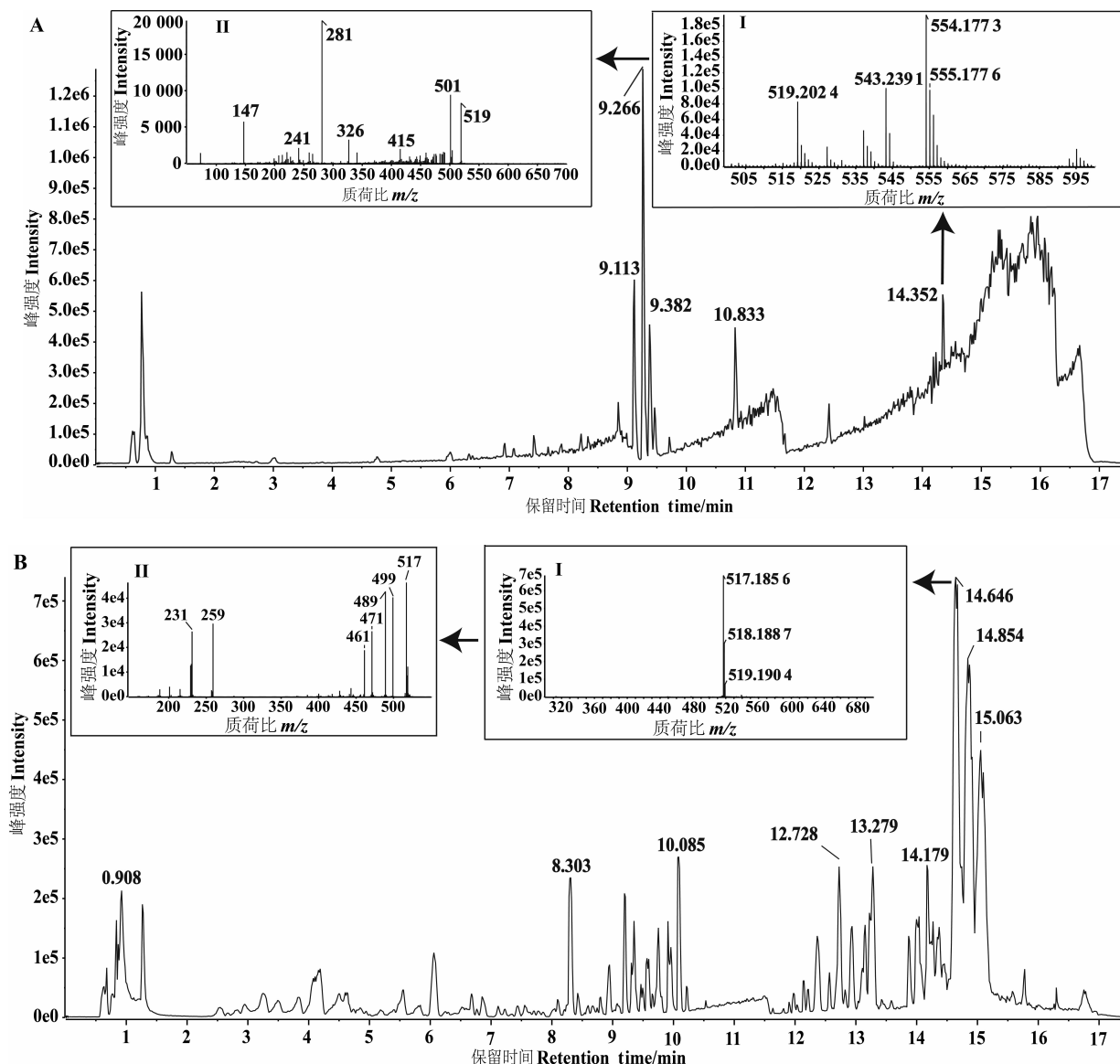
基于文献和在线代谢物数据库, 收集了有关棉花的代谢产物信息, 涵盖亚洲棉 (*G. arboreum*)、海岛棉 (*G. barbadense*)、陆地棉 (*G. hirsutum*)、草棉 (*G. herbaceum*) 和南岱华棉 (*G. sturtianum* var. *nandewarensense*) 5 个种。这些代谢产物属于极性、半极性和非极性化合物。由于本研究用于植物代谢产物提取、分离和检测的程序偏向于半极性化合物, 预期包括酚类、萜类、生物碱及其衍生物等次生代谢物将被检测到。迄今为止,

自棉花根、茎、叶、花和种子提取物中分离和检测到的代谢产物有 111 种,包括萜类化合物 61 种、酚类化合物 6 种、黄酮类化合物 26 种、生物碱 6 种、脂肪族天然产物 6 种、碳水化合物 5 种和简单芳香族天然产物 1 种(附表 1,印刷版省略,电子版参见本刊网站)。

## 2.2 棉苗组织的代谢谱

棉花根、茎、叶各组织的 70%(体积分数)甲醇/水提取物能够通过 UPLC-ESI-MS 进行分

析,图 1 为棉花根样本中代谢产物在正、负离子模式下 UPLC-ESI-MS 总离子色谱图。应用在线 XCMS 软件分别对正离子模式和负离子模式下采集的原始质谱数据进行了处理,导出到.xlsx 文件中构建了 2 个数据集(正离子代谢组数据和负离子代谢组数据),正离子模式检测获得 4 572 个离子峰( $\text{ESI}^+$ 离子),负离子模式检测获得 3 960 个离子峰( $\text{ESI}^-$ 离子),导出的数据中包含了各离子的  $RT$ 、 $m/z$  和峰强度。 $\text{ESI}^+$ 和  $\text{ESI}^-$ 离子的  $RT$



A、B 中插图表示棉酚加合物 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 及 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 的准确相对分子质量(I)及其相应二级离子图谱(II)。

Inserts in A and B showed the accurate molecular weight of gossypol adduct  $[\text{M}+\text{H}]^+$  and  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (I) and their MS/MS spectrum (II).

图 1 正离子模式(A)和负离子模式(B)下棉花根样本中代谢产物 UPLC-ESI-MS 总离子色谱图

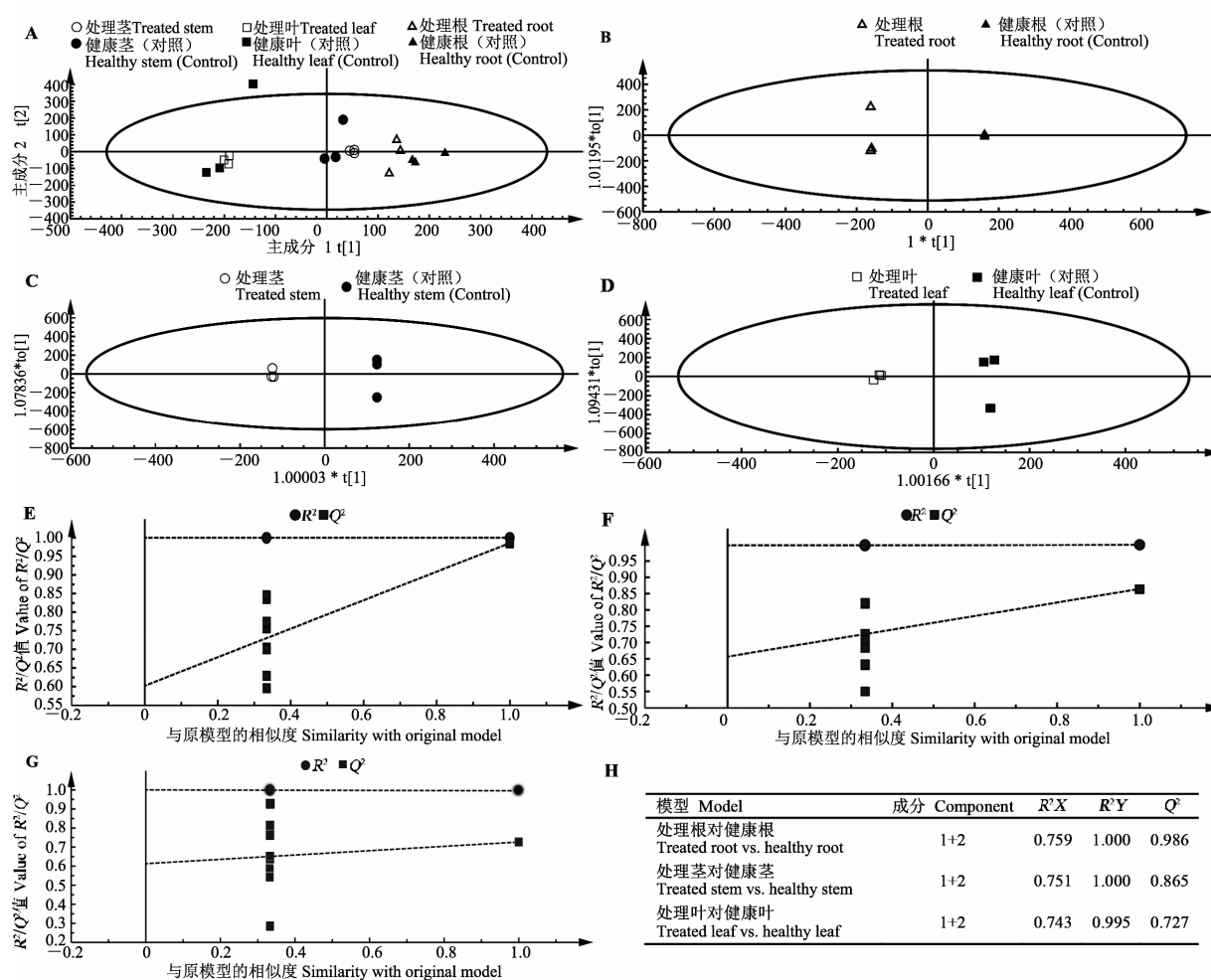
Fig. 1 UPLC-ESI-MS TICs of metabolites occurring in cotton root under positive (A) and negative (B) ionization modes

分别为 0.14~17.39 min 和 0.15~17.28 min,  $m/z$  分别为 49.999 14~999.290 865 和 61.990 806~1 497.974 607。同时,根样本总离子图显示,棉花中常见代谢产物棉酚在 2 个模式中保留时间和峰强度均有所不同:在正离子模式下,棉酚的保留时间为 14.32~14.37 min (图 1A), 峰面积为  $4.5 \times 10^5$ ;负离子模式下,其保留时间为 14.56~14.71 min(图 1B),峰面积为  $1.4 \times 10^6$ 。图 1A 还显示了正离子模式下棉酚在保留时间为 14.352 min 时,其加合物  $[M+H]^+$  的质荷比 ( $m/z$  519.202 4)、

峰强度及相应 MS/MS 光谱;图 1B 还显示了负离子模式下棉酚在保留时间为 14.646 min 时其加合物  $[M-H]^-$  的质荷比 ( $m/z$  517.185 6)、峰强度及相应 MS/MS 光谱。

### 2.3 代谢组数据有效性和可靠性

对 2 个数据集的主成分分析结果(图 2A、图 3A) 显示, 样本数据都处于 95%置信区间内,但根、茎、叶 3 个组织能够明显独立分开,并且同一棉花组织近距离聚集;同时病原菌处理的棉花组织与相应健康对照也呈现明显分离趋势,同一处



A: 病原菌处理与健康对照的根、茎、叶样本的主成分分析得分图; B、C、D: 病原菌处理与健康对照棉根样本、棉茎样本和棉叶样本的 OPLS-DA 得分图; E、F 和 G: 根、茎、叶样本 200 次置换检验的验证图; H: 根、茎、叶样本 OPLS-DA 模型参数。

A: PCA score plot of pathogen-treated root, stem, leaf and corresponding healthy control; B, C, D: OPLS-DA score plot of pathogen-treated root vs. healthy root, OPLS-DA score plot of pathogen-treated stem vs. healthy stem and OPLS-DA score plot of pathogen-treated leaf vs. healthy leaf, respectively; E, F and G: validation plot of root, stem and leaf obtained from 200 tests, respectively; H: OPLS-DA model parameters of root, stem and leaf.

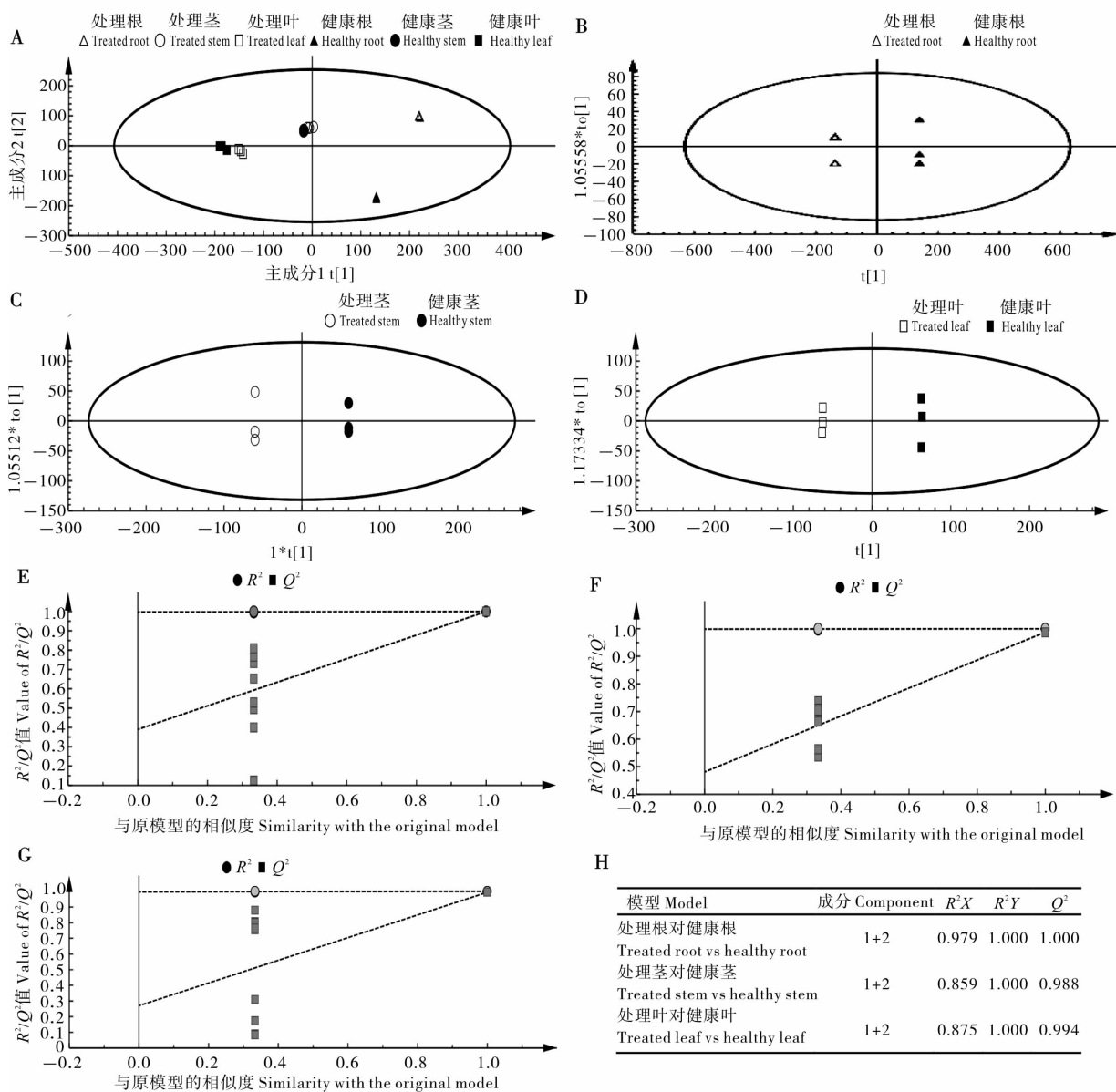
图 2 正离子模式下根、茎、叶样本的主成分分析模型和正交偏最小二乘法判别分析模型

Fig. 2 PCA model and OPLS-DA model of root, stem and leaf under positive ionization modes

理能近距离聚集。初步说明获得数据有效可信,植物组织间及不同处理间存在差异。

进一步采用 OPLS-DA 法对不同组织样本分析,结果表明供试样本数据均处于 95%置信区间内,同一组织样本数据在病原菌处理与相应健康对照间存在明显的分离趋势,同一处理样本近距

离聚集(图 2B~D、图 3B~D),而且对 OPLS-DA 的置换检验表明建立的 OPLS-DA 模型没有过度拟合(图 2E~G、图 3E~G)。并且无论正离子模式下,还是负离子模式下,根、茎、叶 3 个棉花组织的 OPLS-DA 模型参数  $R^2Y$  均不低于 0.995,  $Q^2$  均不低于 0.727(图 2H 和图 3H),说明建立的 O-



A: 病原菌处理与健康对照的根、茎、叶样本的主成分分析得分图; B、C、D: 病原菌处理与健康对照棉根样本、棉茎样本和棉叶样本的 OPLS-DA 得分图; E、F 和 G: 棉根、茎、叶样本 200 次置换检验的验证图; H: 根、茎、叶样本 OPLS-DA 模型参数。

A: PCA score plot of pathogen-treated root, stem, leaf and corresponding healthy control; B, C and D: OPLS-DA score plot of pathogen-treated root vs. healthy root, OPLS-DA score plot of pathogen-treated stem vs. healthy stem and OPLS-DA score plot of pathogen-treated leaf vs. healthy leaf, respectively; E, F and G: validation plot of cotton root, stem and leaf obtained from 200 tests, respectively; H: OPLS-DA model parameters of root, stem and leaf.

图 3 负离子模式下根、茎、叶样本的主成分分析模型和正交偏最小二乘法判别分析模型

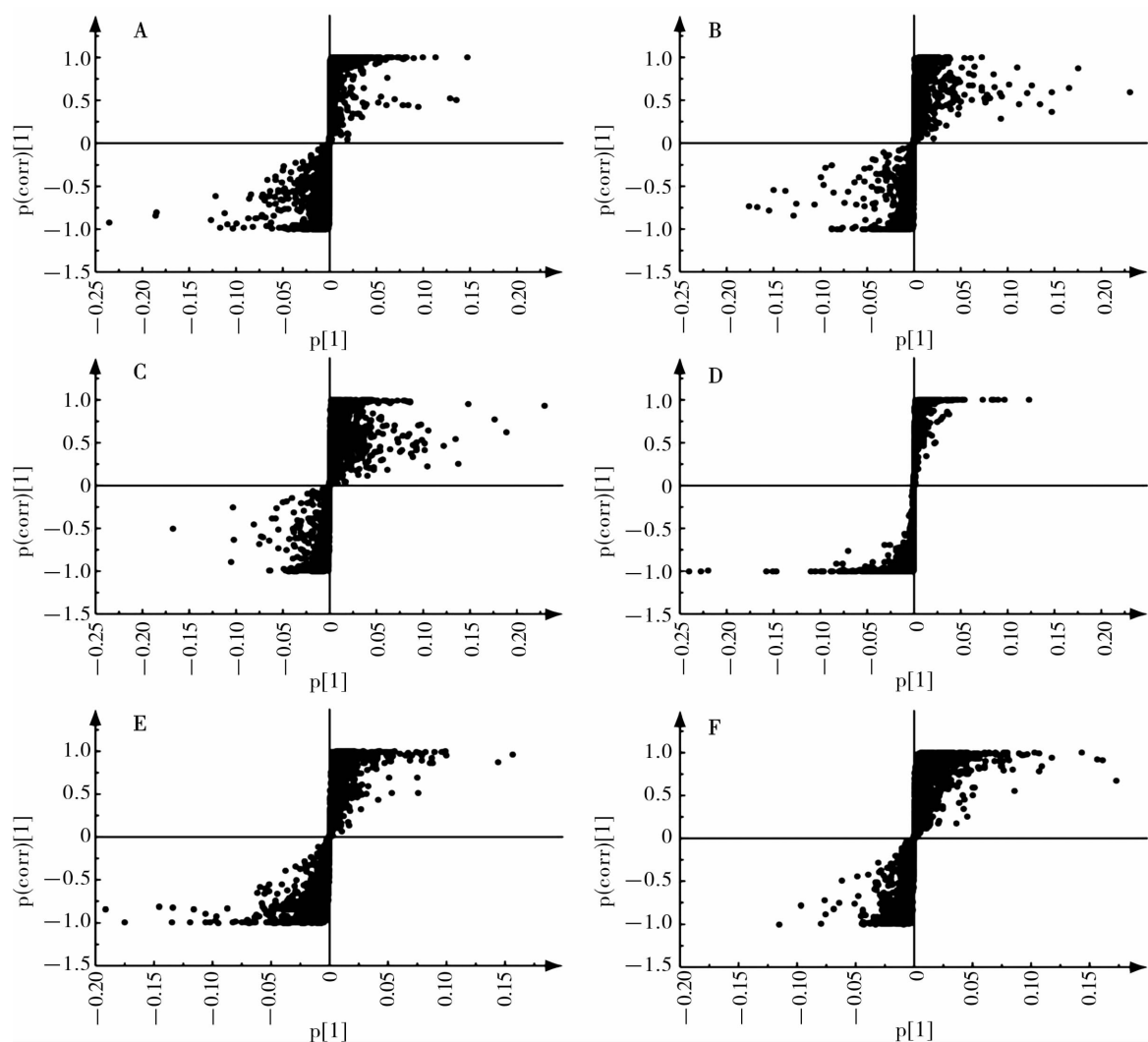
Fig. 3 PCA model and OPLS-DA model of root, stem and leaf under negative ionization modes

PLS-DA 模型有效和可靠。上述结果表明同一组织不同处理间存在明显的差异。

## 2.4 与大丽轮枝菌侵染相关的棉花代谢产物挖掘

**2.4.1 大丽轮枝菌处理与健康对照间棉花差异代谢产物。**棉花根、茎、叶样本中代谢产物的 O-PLS-DA S-plot 结果(图 4)表明,检测到的棉花代

谢产物离子在模型中呈现 S 型分布,说明同一棉花组织不同处理间部分代谢产物存在明显差异。根据 OPLS-DA 模型计算的各离子 VIP 值和不同处理间学生  $t$  检验  $p$  值进行了差异棉花代谢产物筛选,989 个离子的  $VIP > 1$  和  $p < 0.05$ ,其中正离子模式下检测到 131 个离子( $ESI^+$ 离子),负离子模式下检测到 858 个离子( $ESI^-$ 离子)。这 989 个



A、B、C 分别为正离子模式下病原菌处理与健康对照样本的根部、茎部和叶部 S-plot 图;D、E、F 分别为负离子模式下病原菌处理与健康对照样本的根部、茎部和叶部 S-plot 图。横坐标  $p[1]$  为主成分与代谢物的协相关系数,纵坐标  $p(corr)[1]$  为主成分与代谢物的相关系数。

A, B, C: the S-plot of pathogen-treated root vs. healthy root, the S-plot of pathogen-treated stem vs. healthy stem and the S-plot of pathogen-treated leaf vs. healthy leaf ( $ESI^+$ ); D, E, F: the S-plot of pathogen-treated root vs. healthy root, the S-plot of pathogen-treated stem vs. healthy stem and the S-plot of pathogen-treated leaf vs. healthy leaf ( $ESI^-$ ).  $p[1]$  (horizontal coordinate): co-correlativity coefficient between principal components and metabolites;  $p(corr)[1]$  (vertical coordinate): correlation coefficient between principal components and metabolites.

图 4 正、负离子模式下棉花根、茎、叶样本中代谢产物的 OPLS-DA S-plot 图

Fig. 4 OPLS-DA S-plots of metabolites presenting in root, stem and leaf under positive and negative ionization modes

差异代谢产物中,59 个 ESI<sup>+</sup>离子和 441 个 ESI<sup>-</sup>离子存在于棉花根中,41 个 ESI<sup>+</sup>离子和 323 个 ESI<sup>-</sup>离子存在于棉花茎中,48 个 ESI<sup>+</sup>离子和 342 个 ESI<sup>-</sup>离子存在于棉花叶片中(图 5),其中 9 个 ESI<sup>+</sup>离子和 40 个 ESI<sup>-</sup>离子同时存在于 3 个棉花组织中。

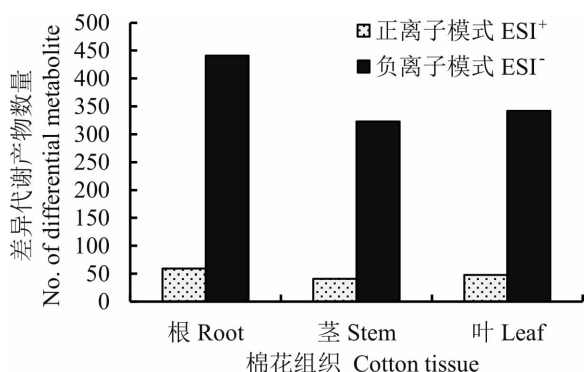


图 5 病原菌处理与健康对照间差异离子在不同棉花组织中分布情况

Fig. 5 Distribution of differential ions between pathogen-treated tissues and healthy controls in different cotton tissues

**2.4.2 与大丽轮枝菌侵染相关的重要棉花代谢产物。**在上述 989 个差异代谢产物离子中,576 个离子(82 个 ESI<sup>+</sup>离子和 494 个 ESI<sup>-</sup>离子)的峰强度在病原菌处理下较对照增加 1 倍及以上或降低 50%及以上(图 6),详细离子信息列于附表 2 和附表 3(印刷版省略,电子版参见本刊网站)。在这 576 个显著变化离子中,461 个离子(33 个 ESI<sup>+</sup>离子和 428 个 ESI<sup>-</sup>离子)出现在棉花根部,77 个离子(20 个 ESI<sup>+</sup>离子和 57 个 ESI<sup>-</sup>离子)出现在茎部,72 个离子(34 个 ESI<sup>+</sup>离子和 38 个 ESI<sup>-</sup>离子)出现在叶部,其中仅有 2 个 ESI<sup>-</sup>同时出现在棉花根、茎、叶 3 个棉花组织中。

与对照相比,病原菌处理的根部出现 376 个离子(27 个 ESI<sup>+</sup>和 349 个 ESI<sup>-</sup>)的峰强度增加 1 倍及以上和 85 个离子(6 个 ESI<sup>+</sup>离子和 79 个 ESI<sup>-</sup>离子)的峰强度降低 50%及以上,茎部出现 49 个离子(11 个 ESI<sup>+</sup>离子和 38 个 ESI<sup>-</sup>离子)峰强度增加 1 倍及以上和 28 个离子(9 个 ESI<sup>+</sup>离子和 19 个 ESI<sup>-</sup>离子)峰强度降低 50%及以上,叶部出现 31 个离子(19 个 ESI<sup>+</sup>离子和 12 个 ESI<sup>-</sup>离子)峰强度增加 1 倍及以上和 41 个离子(15 个

ESI<sup>+</sup>离子和 26 个 ESI<sup>-</sup>离子)峰强度降低 50%及以上。

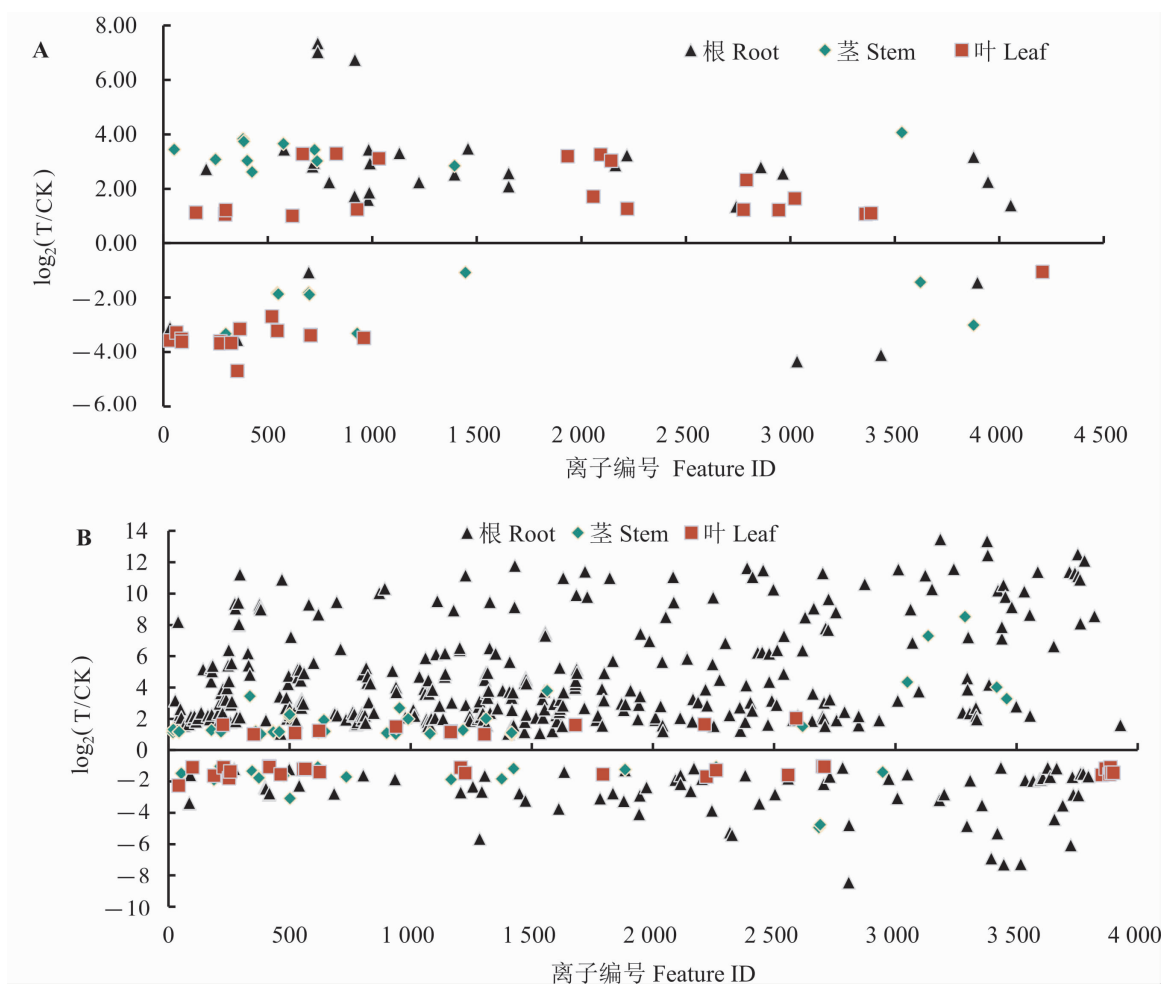
## 2.5 与大丽轮枝菌侵染相关的重要棉花代谢产物鉴定

本检测中,锁定相对分子质量的实验误差为  $2.1 \times 10^{-5}$ ,因此推定误差介于  $-2.0 \times 10^{-5} \sim 2.0 \times 10^{-5}$  的匹配物质作为供试次生代谢产物的鉴定结果。据以上 576 个重要差异代谢产物  $m/z$  计算出对应的所有可能准确相对分子质量,进一步计算与自建棉花代谢产物数据库的各物质准确相对分子质量的误差。结果表明 9 个 ESI<sup>+</sup>离子和 68 个 ESI<sup>-</sup>离子匹配 47 个文献报道的棉花代谢产物,分别占相应供鉴定离子数量的 11.0%和 13.8%,86.6%的离子没能得到鉴定。

**2.5.1 正离子鉴定。**9 个被鉴定的 ESI<sup>+</sup>离子(离子编号 205、545、721、794、916、1032、1223、1653 和 2966)对应 11 个物质,被推定 15 次,均属于萜类物质(表 1)。其中,6 个离子匹配唯一报道过的棉花代谢产物,5 个为杜松烷倍半萜(半棉酚 2 个、6-甲氧基棉酚 2 个和 6,6'-二甲氧基棉酚 1 个),1 个为二萜类(赤霉素 A<sub>4</sub>);2 个离子各匹配 2 个棉花代谢产物,均为杜松烷倍半萜棉素和 6-甲氧基半棉酚;1 个离子匹配 5 个棉花代谢产物,为杜松烷倍半萜 1 (10),4-cadinadien-2-ol、12-羟基-β-石竹烯、氧化红没药烯、桉油烯醇和氧化石竹烯。

病原菌处理与对照相比,离子 545(鉴定为赤霉素 A<sub>4</sub>)峰强度仅在茎部减少 72%,离子 1032 [1(10),4-cadinadien-2-ol、12-羟基-β-石竹烯、氧化红没药烯、桉油烯醇和氧化石竹烯]仅在叶部增加 7.6 倍,其他 7 个离子均在根部增加 3.2 倍以上,变化最大的为离子 916(6-甲氧基棉酚),增加了 105 倍。

**2.5.2 负离子鉴定。**68 个被鉴定的 ESI<sup>-</sup>离子对应了 41 个物质,被推定 89 次,其中 53 个离子匹配唯一报道过的棉花代谢产物,13 个离子匹配 2 个棉花代谢产物,1 个离子匹配 4 个棉花代谢产物,1 个离子匹配 6 个棉花代谢产物(表 2)。这 41 个物质分别属于杜松烷倍半萜(出现频次 51 次)、黄酮(18 次)、碳水化合物(9 次)、二萜(4 次)、杂倍半萜(4 次)、脂肪族(1 次)、环法尼烷倍



A: ESI<sup>+</sup> 差异离子分布图; B: ESI<sup>-</sup> 差异离子分布图。公式中 T、CK 分别代表差异离子在病原菌处理、对照中的峰强度。

A: scatter plot of ESI<sup>+</sup> differential ions; B: scatter plot of ESI<sup>-</sup> differential ions. T and CK in the formula represent peak intensity of differential ions in pathogen-treated cotton and healthy cotton.

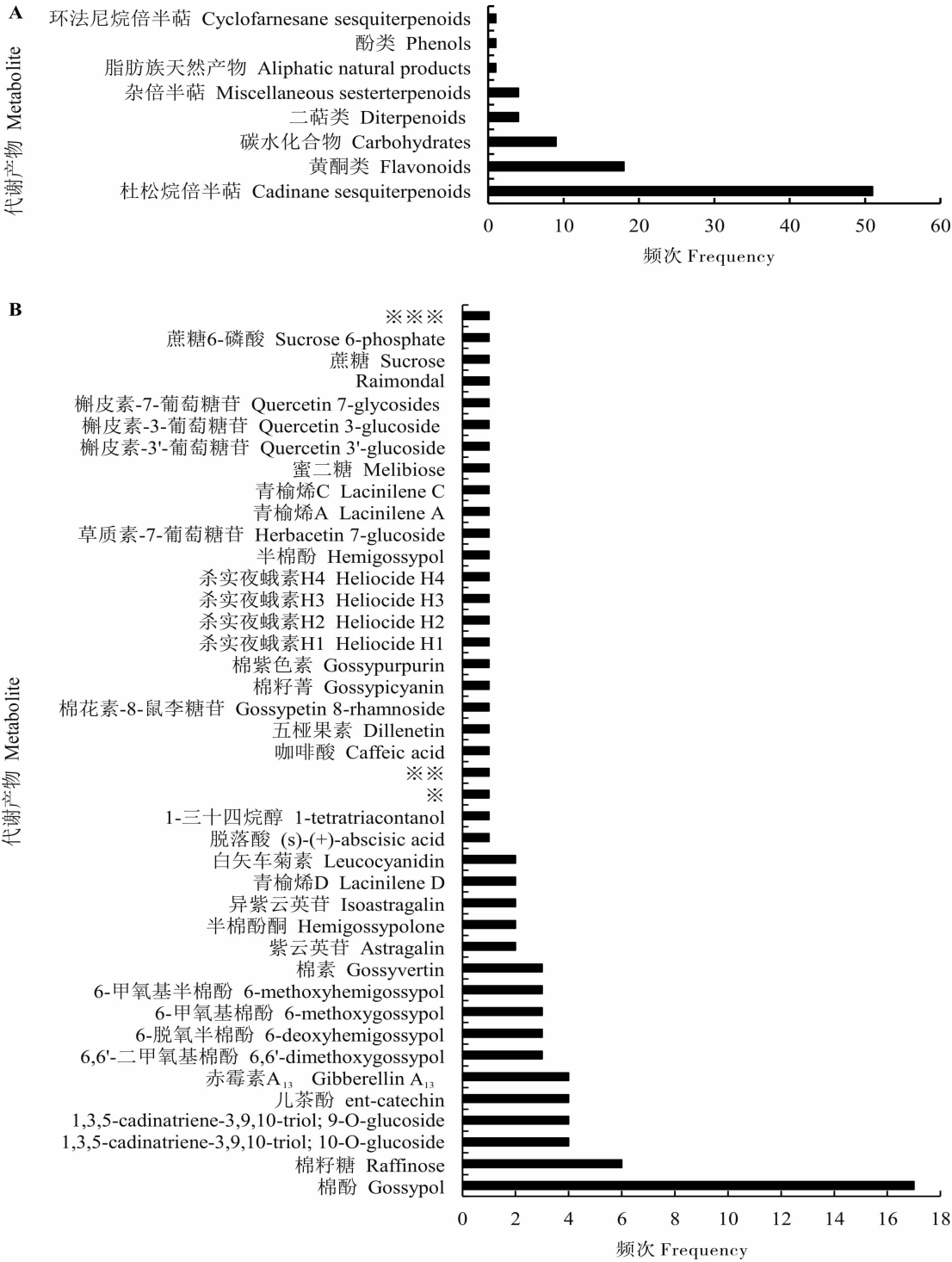
图 6 病原菌处理较健康对照峰强度增加 1 倍及以上或降低 50% 及以上的差异离子在棉花组织中分布情况

Fig. 6 Distribution of distinguished differential ions of peak intensity increased by  $\geq 1$  fold or decreased by  $\geq 50\%$  in pathogen-treated cotton tissues compared to corresponding healthy controls

半蒎(1 次)和酚类(1 次); 出现频次最多的物质为棉酚(17 次), 其次为棉籽糖(6 次), 儿茶酚、1,3,5-cadinatriene-3,9,10-triol 9-glucoside、赤霉素 A<sub>13</sub> 和 1,3,5-cadinatriene-3,9,10-triol 10-glucoside 各出现 4 次, 6,6'-二甲氧基棉酚、6-甲氧基半棉酚、6-甲氧基棉酚、6-脱氧半棉酚和棉素各出现 3 次, 白矢车菊素、青榆烯 D、紫云英苷、异紫云英苷和半棉酚酮各出现 2 次, 其他 25 个物质分别仅出现 1 次(图 7)。

病原菌处理与健康对照相比, 离子 43(鉴定为 6-脱氧半棉酚) 峰强度在茎部增加 1.2 倍, 叶部减少 79%; 离子 499(半棉酚酮) 仅在根部减少

57%, 其他 66 个离子均在根部表现增加, 其中 30 个离子推定的物质的峰强度均增加 10 倍以上[脱落酸(离子编号 1476)、1,3,5-cadinatriene-3,9,10-triol 10-glucoside 和 1,3,5-cadinatriene-3,9,10-triol 9-glucoside(2274)、6-脱氧半棉酚(1056)、6-甲氧基棉酚(1090、1679、2724)、6,6'-二甲氧基棉酚(560、3454)、紫云英苷和异紫云英苷(1036)、儿茶酚(1104、2712)、棉籽糖(1325)、棉酚(823、1060、1061、1202、1203、1789、2217)、棉紫色素(2617)、半棉酚(494)、青榆烯 A(175)、青榆烯 C(40)、青榆烯 D(506)、白矢车菊素(469、1719)、棉籽糖(543、1555、1556、1799)]。



A: 重要差异代谢产物所属种类;B: 重要差异代谢产物检出频次。B 中※为 2,14-epoxy-1,3,5,7,9-cadinapentaene-8,9,12-triol, 15-hydroxy, 9-O-(6-sulfo-glucoside);※※为 2,14-epoxy-1,3,5,7,9-cadinapentaene-8,9,12-triol, 9-O-(6-sulfo-glucoside);※※※为 α,2',3,3',4,4',6-庚羟基查耳酮 2'-葡萄糖苷。

A: types of distinguished differential metabolites; B: detection frequency of distinguished differential metabolites. In figure B, ※ is 2,14-epoxy-1,3,5,7,9-cadinapentaene-8,9,12-triol, 15-hydroxy, 9-O-(6-sulfo-glucoside); ※※ is 2,14-epoxy-1,3,5,7,9-cadinapentaene-8,9,12-triol, 9-O-(6-sulfo-glucoside); ※※※ is α,2',3,3',4,4',6-heptahydroxychalcone 2'-glucoside.

图 7 负离子模式下超高效液相色谱电喷雾质谱推测鉴定的重要差异代谢物种类及检出频次  
Fig. 7 Types and detection frequency of distinguished differential metabolites putatively identified by UPLC-ESI-MS under negative ionization mode

表 1 正离子模式下超高效液相色谱电喷雾质谱推测鉴定的棉花组织提取物中重要差异代谢物  
Table 1 Distinguished differential metabolites in cotton tissue extracts putatively identified by UPLC-ESI-MS under positive ionization mode

离子 编号	质荷比 <i>m/z</i>	保留时 间( <i>RT</i> )	计算精确相		单同位素相		误差 Error/ (10 <sup>-6</sup> )	鉴定结果 Putative ID	离子丰度变化 log <sub>2</sub> (T/CK)**
			对分子质量 Calculated accurate molecular weight	分子式 Molecu- lar form	对分子质量 Monoiso- topic molecular weight				
205	261.113 316	12.76	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	260.106 040	260.104 860	-4.5	半棉酚 Hemigossypol	2.72(根 root)
545	416.217 443	12.44	[M+IsoProp+Na+H] <sup>+</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>	332.162 333	332.162 374	0.1	赤霉素 A <sub>4</sub> Gibberellin A <sub>4</sub>	-1.83(茎 stem)
721	533.219 086	14.91	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>31</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	532.211 810	532.209 720	-3.9	6- 甲氧基棉酚 6-methoxygossypol	2.96(根 root)
794	547.234 523	15.12	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>32</sub> H <sub>34</sub> O <sub>8</sub>	546.227 247	546.225 370	-3.4	6,6'- 二甲氧基棉酚 6,6'-dimethoxygossypol	2.24(根 root)
916	609.127 371	6.52	[M+2K+H] <sup>+</sup>	C <sub>31</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	532.208 331	532.209 720	2.6	6- 甲氧基棉酚 6-methoxygossypol	6.73(根 root)
1032	468.391 635	14.53	[2M+3H <sub>2</sub> O+2H] <sup>2+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220.184 258	220.182 715	-7.0	1(10),4-cadinadien-2-ol; 12- 羟基-β- 石竹烯; 氧化红没药烯; 桉油烯醇; 氧化石竹烯 1(10),4-cadinadien-2-ol; 12-hydroxy-β-caryophyllene; bisabo- lene oxide; spathulenol; β-caryophyllene oxide	3.11(叶 leaf)
1223	548.237 907	15.12	[2M+3H <sub>2</sub> O+2H] <sup>2+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	260.107 393	260.104 860	-9.7	半棉酚 Hemigossypol	2.24(根 root)
1653	549.240 729	15.12	[2M+H] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	274.116 727	274.120 509	13.8	棉素; 6- 甲氧基半棉酚 Gossyvertin; 6-methoxyhemigossypol	2.09(根 root)
2966	576.261 153	13.79	[2M+3H <sub>2</sub> O+2H] <sup>2+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	274.119 016	274.120 509	5.4	棉素; 6- 甲氧基半棉酚 Gossyvertin; 6-methoxyhemigossypol	2.56(根 root)

注: \* 该列字符含义, M—化合物分子; K—钾离子; Na—钠离子; IsoProp—异丙醇。 \*\* 公式中 T 和 CK 分别表示病原菌处理和对照中离子的峰强度。  
Note: \* M, compound molecular; K, potassium ion; Na, sodium ion; IsoProp, isopropanol. \*\* the "T" and "CK" in the formula represent peak intensity of the ions in pathogen-treated cotton and the healthy cotton (control), respectively.



表 2 负离子模式下超高效液相色谱电喷雾质谱推测鉴定的棉花组织提取物中重要差异代谢物  
Table 2 Distinguished differential metabolites in cotton tissue extracts putatively identified by UPLC-ESI-TOF/MS under negative ionization mode

离子 编号 Ion ID	质荷比 <i>m/z</i>	保留时 间 ( <i>RT</i> ) Reten- tion time ( <i>RT</i> )/min	计算精确相		单同位素相		误差 Error/ (10 <sup>-6</sup> )	鉴定结果 Putative ID	离子丰度变化 log <sub>2</sub> ( <i>T/CK</i> )**
			离子名称* Ion name	对分子质量 Calculated accurate molecular weight	分子式 Molecular form	对分子质量 Monoisotopic molecular weight			
1245	223.046 060	0.82	[M-2H] <sup>-</sup>	448.106 672	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>11</sub>	448.100 565	-13.6	紫云英苷; 异紫云英苷 Astragalgin; isoastragalgin	1.86(根 root)
2474	377.084 380	0.82	[M+Cl] <sup>-</sup>	342.114 978	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	342.116 215	3.6	蜜二糖; 蔗糖 Melibiose; sucrose	1.62(根 root)
1719	305.066 908	4.12	[M-H] <sup>-</sup>	306.074 184	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	306.073 955	-0.7	白矢车菊素 Leucoyanidin	11.40(根 root)
469	611.139 368	4.14	[2M-H] <sup>-</sup>	306.073 322	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	306.073 955	2.1	白矢车菊素 Leucoyanidin	10.89(根 root)
2712	579.139 523	5.54	[2M-H] <sup>-</sup>	290.073 400	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	290.079 040	19.4	儿茶素 ent-catechin	7.79(根 root)
1104	579.149 561	6.07	[2M-H] <sup>-</sup>	290.078 419	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	290.079 040	2.1	儿茶素 ent-catechin	6.12(根 root)
1325	580.152 946	6.07	[M-H] <sup>-</sup>	581.160 222	C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> O <sub>15</sub>	581.150 650	-16.5	棉籽菁 Gossypicyanin	6.51(根 root)
1717	289.071 815	6.07	[M-H] <sup>-</sup>	290.079 091	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	290.079 040	-0.2	儿茶素 ent-catechin	2.70(根 root)
1036	447.092 193	6.41	[M-H] <sup>-</sup>	448.099 469	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>11</sub>	448.100 565	2.4	紫云英苷; 异紫云英苷 Astragalgin; isoastragalgin	4.70(根 root)
1772	443.064 351	6.55	[M+TFA-H] <sup>-</sup>	330.078 765	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330.073 953	-14.6	五椴果素 Dillenetin	2.23(根 root)
			[M+Na-2H] <sup>-</sup>	422.089 685	C <sub>12</sub> H <sub>23</sub> O <sub>14</sub> P	422.082 542	-16.9	蔗糖 -6- 磷酸酯 Sucrose 6-phosphate	
219	517.101 028	7.26	[M-H] <sup>-</sup>	518.108 304	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>13</sub> S	518.109 415	2.1	2,14-epoxy-1,3,5,7,9-cadinapentaene-8,9,12-triol, 15-hydroxy, 9-O-(6-sulfo-glucoside)	2.23(根 root)
510	333.137 793	7.80	[M+Hac-H] <sup>-</sup>	274.123 942	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	274.120 510	-12.5	棉素; 6- 甲氧基半棉酚 Gossypvertin; 6-methoxyhemigossypol	2.04(根 root)
484	179.035 466	8.69	[M-H] <sup>-</sup>	180.042 742	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	180.042 259	-2.7	咖啡酸 Caffeic acid	2.69(根 root)
3336	457.206 706	8.81	[M+FA-H] <sup>-</sup>	412.208 505	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	412.209 720	2.9	1,3,5-cadinatriene-3,9,10-triol 10-glucoside; 1,3,5-cadinatriene-3,9,10-triol 9-glucoside	1.98(根 root)

表 2 (续)  
Table 2 (Continued)

离子 编号 Ion ID	质荷比 <i>m/z</i>	保留时 间 ( <i>RT</i> ) Reten- tion time ( <i>RT</i> )/min	离子名称* Ion name	计算精确相 对分子质量 Calculated accurate molecular weight	分子式 Molecular form	单同位素相 对分子质量 Monoisotopic molecular weight	误差 Error/ (10 <sup>-6</sup> )	鉴定结果 Putative ID	离子丰度变化 log <sub>2</sub> (T/CK)**
680	463.086 741	8.82	[M-H] <sup>-</sup>	464.094 017	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>12</sub>	464.095 480	3.2	棉花素-8-鼠李糖苷; 草质素-7-葡萄糖苷; 槲皮素-3'-葡萄糖苷; 槲皮素-3-葡萄糖苷; 槲皮素-7-葡萄糖苷 Gossypetin 8-rhamnoside; Herbacetin 7-glucoside; quercetin 3'-glucoside; quercetin 3-glucoside; quercetin 7-glycoside	2.23 (根 root)
1298	491.158 394	9.01	[M+TFA-H] <sup>-</sup>	482.105 131	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>13</sub>	482.106 045	1.9	α,2',3,3',4,4',6-庚羟基查耳酮 2'-葡萄糖苷 α,2',3,3',4,4',6-heptahydroxychalcone 2'-glucoside	2.36 (根 root)
802	509.222 512	9.08	[2M+FA-H] <sup>-</sup>	232.112 156	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	232.109 944	-9.5	赤霉素 A13 Gibberellin A13 青杨烯 D Lacinilene D	1.98 (根 root)
	567.206 883	9.12	[M+Na-2H] <sup>-</sup>	546.232 217	C <sub>32</sub> H <sub>34</sub> O <sub>8</sub>	546.225 370	-12.5	6,6'-二甲氧基棉酚 6,6'-dimethoxygossypol	2.06 (根 root)
1288	457.206 714	9.31	[M+FA-H] <sup>-</sup>	412.208 513	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	412.209 720	2.9	1,3,5-cadinatriene-3,9,10-triol 10-glucoside; 1,3,5-cadinatriene-3,9,10-triol 9-glucoside	2.26 (根 root)
800	501.105 628	9.41	[M-H] <sup>-</sup>	502.112 904	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub> S	502.114 500	3.2	2,14-epoxy-1,3,5,7,9-cadinapentaene-8,9,12-triol, 9-O-(6-O-sulfo-glucoside)	2.19 (根 root)
2597	491.157 791	9.50	[M+TFA-H] <sup>-</sup>	378.172 205	C <sub>30</sub> H <sub>36</sub> O <sub>7</sub>	378.167 853	-11.5	赤霉素 A <sub>13</sub> Gibberellin A <sub>13</sub>	2.20 (根 root)
209	491.158 075	9.73	[M+TFA-H] <sup>-</sup>	378.172 489	C <sub>30</sub> H <sub>36</sub> O <sub>7</sub>	378.167 853	-12.3	赤霉素 A <sub>13</sub> Gibberellin A <sub>13</sub>	1.87 (根 root)
1170	869.415 795	9.94	[2M+FA-H] <sup>-</sup>	412.208 797	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	412.209 720	2.2	1,3,5-cadinatriene-3,9,10-triol 10-glucoside; 1,3,5-cadinatriene-3,9,10-triol 9-glucoside	3.04 (根 root)
1469	491.157 862	9.96	[M+TFA-H] <sup>-</sup>	378.172 276	C <sub>30</sub> H <sub>36</sub> O <sub>7</sub>	378.167 853	-11.7	赤霉素 A <sub>13</sub> Gibberellin A <sub>13</sub>	1.16 (根 root)



表 2 (续)  
Table 2 (Continued)

离子 编号	质荷比 <i>m/z</i>	保留时 间( <i>RT</i> )	计算精确相		分子式	单同位素相		误差	鉴定结果	离子丰度变化
			离子名称*	对分子质量		Molecular	Monoisotopic			
Ion	<i>m/z</i>	Reten- tion time	Ion name	Calculated	form	molecular	weight			log <sub>2</sub> (T/CK)**
ID		( <i>RT</i> )/min		accurate molecular weight						
53	273.076 416	10.02	[M-H] <sup>-</sup>	274.083 692	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	274.084 125	1.6	半棉酚酮 Hemigossypolone		2.07(根 root)
827	579.159 840	10.10	[2M-H] <sup>-</sup>	290.083 558	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	290.079 040	-15.6	儿茶素 ent-catechin		3.06(根 root)
506	277.108 212	10.55	[M+FA-H] <sup>-</sup>	232.110 011	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	232.109 944	-0.3	青榆烯 D Lacinilene D		7.23(根 root)
458	431.182 110	12.30	[M+Na-2H] <sup>-</sup>	410.207 444	C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	410.209 325	4.6	杀实夜蛾素 H <sub>1</sub> , H <sub>2</sub> , H <sub>3</sub> 和 H <sub>4</sub> Helicicide H <sub>1</sub> , H <sub>2</sub> , H <sub>3</sub> , H <sub>4</sub>		1.18(茎 stem)
1555	549.174 865	12.37	[M+FA-H] <sup>-</sup>	504.176 664	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	504.169 040	-15.1	棉籽糖 Raffinose		7.51(根 root)
1799	563.190 363	12.62	[M+FA-H] <sup>-</sup>	518.192 162	C <sub>30</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	518.194 070	3.7	棉酚 Gossypol		4.93(根 root)
			[M+Hac-H] <sup>-</sup>	504.176 512	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	504.169 040	-14.8	棉籽糖 Raffinose		
494	259.097 582	12.72	[M-H] <sup>-</sup>	260.104 858	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	260.104 860	0.0	半棉酚 Hemigossypol		4.23(根 root)
43	243.102 432	12.75	[M-H] <sup>-</sup>	244.109 708	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	244.109 945	1.0	6-脱氧半棉酚 6-deoxyhemigossypol		1.15(茎 stem)、 -2.26(叶 leaf)
499	273.076 873	12.75	[M-H] <sup>-</sup>	274.084 149	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	274.084 125	-0.1	半棉酚酮 Hemigossypolone		-1.23(根 root)
2380	273.112 752	12.75	[M-H] <sup>-</sup>	274.120 028	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	274.120 510	1.8	棉素;6-甲氧基半棉酚 Gossyvertin; 6-methoxyhemigossypol		1.81(根 root)
50	271.097 312	12.95	[M-H <sub>2</sub> O-H] <sup>-</sup>	290.115 702	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	290.115 425	-1.0	Raimondal		2.63(根 root)
1556	549.175 026	12.96	[M+FA-H] <sup>-</sup>	504.176 825	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	504.169 040	-15.4	棉籽糖 Raffinose		7.33(根 root)
40	227.108 051	13.05	[M-H <sub>2</sub> O-H] <sup>-</sup>	246.126 441	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	246.125 595	-3.4	青榆烯 C Lacinilene C		8.20(根 root)
42	243.102 760	13.16	[M-H] <sup>-</sup>	244.110 036	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	244.109 945	-0.4	6-脱氧半棉酚 6-deoxyhemigossypol		1.76(根 root)
823	563.190 484	13.23	[M+FA-H] <sup>-</sup>	518.192 283	C <sub>30</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	518.194 070	3.4	棉酚 Gossypol		4.72(根 root)
			[M+Hac-H] <sup>-</sup>	504.176 633	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	504.169 040	-15.1	棉籽糖 Raffinose		
175	445.234 403	13.28	[2M+FA-H] <sup>-</sup>	200.118 101	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O	200.120 115	10.1	青榆烯 A Lacinilene A		5.26(根 root)

表 2 (续)  
Table 2 (Continued)

离子 编号 Ion ID	质荷比 <i>m/z</i>	保留时 间( <i>RT</i> ) Reten- tion time ( <i>RT</i> )/min	离子名称* Ion name	计算精确相 对分子质量 Calculated accurate molecular weight	分子式 Molecular form	单同位素相 对分子质量 Monoisotopic molecular weight	误差 Error/ (10 <sup>-6</sup> )	鉴定结果 Putative ID	离子丰度变化 log <sub>2</sub> ( <i>T/CK</i> )**
500	273.112 896	13.28	[M-H] <sup>-</sup>	274.120 172	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	274.120 510	1.2	棉素; 6- 甲氧基半棉酚	2.24 (根 root)
2031	503.169 735	13.57	[M-H] <sup>-</sup>	504.177 011	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	504.169 040	-15.8	Gossyvertin; 6-methoxyhemigossypol	2.13 (茎 stem)
1553	517.184 915	13.59	[M-H] <sup>-</sup>	518.192 191	C <sub>30</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	518.194 070	3.6	棉籽糖 Raffinose	2.81 (根 root)
2709	517.184 561	13.90	[M-H] <sup>-</sup>	518.191 837	C <sub>30</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	518.194 070	4.3	棉酚 Gossypol	2.61 (根 root)
1056	487.210 974	13.98	[2M-H] <sup>-</sup>	244.109 125	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	244.109 945	3.4	棉酚 Gossypol	1.55 (根 root)
543	503.169 432	14.07	[M-H] <sup>-</sup>	504.176 708	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	504.169 040	-15.2	6- 脱氧半棉酚 6-deoxyhemigossypol	3.92 (根 root)
1471	499.172 638	14.13	[M-H <sub>2</sub> O-H] <sup>-</sup>	518.191 028	C <sub>30</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	518.194 070	5.9	棉籽糖 Raffinose	5.14 (根 root)
3010	517.182 392	14.23	[M-H] <sup>-</sup>	518.189 668	C <sub>30</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	518.194 070	8.5	棉酚 Gossypol	1.81 (根 root)
2724	1 063.397 914	14.36	[2M-H] <sup>-</sup>	532.202 595	C <sub>31</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	532.209 720	13.4	棉酚 Gossypol	3.16 (根 root)
1061	499.174 478	14.38	[M-H <sub>2</sub> O-H] <sup>-</sup>	518.192 868	C <sub>30</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	518.194 070	2.3	6- 甲氧基棉酚 6-methoxygossypol	9.66 (根 root)
548	515.513 301	14.65	[M+Na-2H] <sup>-</sup>	494.538 635	C <sub>34</sub> H <sub>40</sub> O	494.542 665	8.1	棉酚 Gossypol	5.88 (根 root)
549	517.184 946	14.65	[M-H] <sup>-</sup>	518.192 222	C <sub>30</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	518.194 070	3.6	1- 三十四烷醇 1-tetatriacontanol	3.17 (根 root)
687	539.166 257	14.65	[M+Na-2H] <sup>-</sup>	518.191 591	C <sub>30</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	518.194 070	4.8	棉酚 Gossypol	2.70 (根 root)
1202	1 035.366 132	14.65	[2M-H] <sup>-</sup>	518.186 704	C <sub>30</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	518.194 070	14.2	棉酚 Gossypol	2.31 (根 root)
1203	1 035.379 106	14.65	[2M-H] <sup>-</sup>	518.193 191	C <sub>30</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	518.194 070	1.7	棉酚 Gossypol	6.40 (根 root)
2617	1 057.360 724	14.66	[M+FA-H] <sup>-</sup>	1 012.362 523	C <sub>60</sub> H <sub>86</sub> N <sub>2</sub> O <sub>13</sub>	1 012.378 243	15.5	棉酚 Gossypol	6.54 (根 root)
								棉紫色素 Gossypurpurin	6.37 (根 root)、 1.51 (茎 stem)
1060	499.174 434	14.74	[M-H <sub>2</sub> O-H] <sup>-</sup>	518.192 824	C <sub>30</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	518.194 070	2.4	棉酚 Gossypol	3.60 (根 root)



表 2 (续)  
Table 2 (Continued)

离子 编号 Ion ID	质荷比 <i>m/z</i>	保留时 间( <i>RT</i> ) Reten- tion time ( <i>RT</i> )/min	计算精确相 对分子质量 Calculated accurate molecular weight		分子式 Molecular form	单同位素相 对分子质量 Monoisotopic molecular weight		鉴定结果 Putative ID	离子丰度变化 log <sub>2</sub> (T/CK)**
1679	531.200 503	14.87	[M-H] <sup>-</sup>	532.207 779	C <sub>31</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	532.209 720	3.6	6- 甲氧基棉酚 6-methoxygossypol	3.98(根 root)
1090	553.181 565	14.88	[M+Na-2H] <sup>-</sup>	532.206 899	C <sub>31</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	532.209 720	5.3	6- 甲氧基棉酚 6-methoxygossypol	3.86(根 root)
560	545.215 766	15.06	[M-H] <sup>-</sup>	546.223 042	C <sub>32</sub> H <sub>34</sub> O <sub>8</sub>	546.225 370	4.3	6,6'- 二甲氧基棉酚 6,6'-dimethoxygossypol	4.93(根 root)
3454	1 091.439 978	15.06	[2M-H] <sup>-</sup>	546.223 627	C <sub>32</sub> H <sub>34</sub> O <sub>8</sub>	546.225 370	3.2	6,6'- 二甲氧基棉酚 6,6'-dimethoxygossypol	9.78(根 root)
2510	517.185 032	15.14	[M-H] <sup>-</sup>	518.192 308	C <sub>30</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	518.194 070	3.4	棉酚 Gossypol	2.90(根 root)
2274	471.215 473	15.23	[M+Hac-H] <sup>-</sup>	412.201 622	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	412.209 720	19.6	1,3,5-cadinatriene-3,9,10-triol 10-glucoside; triene-3,9,10-triol 9-glucoside	4.48(根 root)
2217	517.185 007	15.61	[M-H] <sup>-</sup>	518.192 283	C <sub>30</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	518.194 070	3.4	棉酚 Gossypol	3.87(根 root)
1476	587.282 899	15.79	[2M+Hac-H] <sup>-</sup>	264.134 524	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	264.136 159	6.2	脱落酸 (s)(+)-abscisic acid	4.51(根 root)
1416	517.185 072	16.04	[M-H] <sup>-</sup>	518.192 348	C <sub>30</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	518.194 070	3.3	棉酚 Gossypol	3.41(根 root)、 1.02(茎 stem)
1789	517.185 333	16.35	[M-H] <sup>-</sup>	518.192 609	C <sub>30</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	518.194 070	2.8	棉酚 Gossypol	3.92(根 root)
1417	517.185 001	16.69	[M-H] <sup>-</sup>	518.192 277	C <sub>30</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	518.194 070	3.5	棉酚 Gossypol	3.34(根 root)、 1.11(茎 stem)

注: \* 离子名称中字符含义, M—物质分子, K—钾离子, Na—钠离子, Cl—氯离子, FA—甲酸, Hac—乙酸, TFA—三氟乙酸。 \*\* 公式中 T、CK 分别表示病原菌处理和对照中离子的峰强度。

Note: \*Meanings of letters in ion names: M, compound molecular; K, potassium ion; Na, sodium ion; Cl, chloride ion; FA, formic acid; Hac, acetic acid; TFA, trifluoroacetic acid. \*\* the "T" and "CK" in the formula represent peak intensity of the ions pathogen-treated cotton and the healthy cotton (control), respectively.

### 3 讨论

#### 3.1 棉花代谢组分析时质谱检测模式选择

本研究在棉花代谢组分析中,采用正离子模式( $\text{ESI}^+$ )和负离子模式( $\text{ESI}^-$ )对所有供试样本中代谢产物进行了检测,分别获得了 4 572 个  $\text{ESI}^+$  离子和 3 960 个  $\text{ESI}^-$  离子。经多元统计分析,筛选到  $\text{VIP}>1$  和处理间峰强度差异显著( $p<0.05$ )的  $\text{ESI}^-$  离子 858 个,为  $\text{ESI}^+$  离子(131 个)的 6.5 倍,在根、茎、叶组织中 2 种模式下差异离子比例分别为 7.5、7.9 和 7.1。进一步分析发现,病原菌处理较对照离子峰强度增加 1 倍及以上或降低 50%及以上的差异离子中, $\text{ESI}^-$  离子数量为 494 个,为  $\text{ESI}^+$  离子总数(82 个)的 6.0 倍,在根、茎、叶组织中 2 种模式下差异离子比例分别为 13.0、2.9 和 1.1。以上结果表明,采用质谱检测时,2 种检测模式检测到的棉花代谢产物离子数量相差不大,但在进一步挖掘处理间差异代谢产物时, $\text{ESI}^-$  离子的数量明显大于  $\text{ESI}^+$  离子,并且在棉花根、茎、叶组织中也表现同样的规律。Moco 等<sup>[34]</sup>在利用液相色谱-质谱分析番茄代谢组时,发现不同离子模式检测下番茄代谢产物的离子信号强度存在明显差异。因此,建议在采用 UPLC-ESI-MS 进行棉花代谢组学分析时,选择负离子模式检测方法。

#### 3.2 不同处理间棉花差异代谢产物分布

基于  $\text{VIP}>1$  和处理间离子峰强度  $t$  检验  $p<0.05$  挖掘出大丽轮枝菌接种处理与健康对照间的差异代谢产物,在根、茎、叶组织中分别分布 500 个离子(59 个  $\text{ESI}^+$  离子和 441 个  $\text{ESI}^-$  离子)、364 个离子(41 个  $\text{ESI}^+$  离子和 323 个  $\text{ESI}^-$  离子)、390 个离子(48 个  $\text{ESI}^+$  离子和 342 个  $\text{ESI}^-$  离子),比例为 1.37:1:1.07。这一结果表明,差异代谢产物在根部分布比例较高,在叶部和茎部分布比例较低且差异不大;进一步分析发现,病原菌处理较对照离子峰强度增加 1 倍及以上或降低 50%及以上的重要差异代谢产物,在根、茎、叶各组织中,分别分布 461 个离子(33 个  $\text{ESI}^+$  离子和 428 个  $\text{ESI}^-$  离子)、77 个离子(20 个  $\text{ESI}^+$  离子和 57 个  $\text{ESI}^-$  离子)、72 个离子(34 个  $\text{ESI}^+$  离子和 38 个  $\text{ESI}^-$  离子),比例为 5.98:1:0.94。这一结果表明,病原菌处理与健康对照间重要差异代

谢产物在根部分布数量也最高,远远高于叶部和茎部。综上所述,在棉花苗期大丽轮枝菌接种 8 d 时,病原菌处理和健康对照间重要差异代谢产物的分布具有一定的组织偏好性,主要存在于棉花根部。对造成此种现象的原因,应进一步进行研究。

#### 3.3 代谢产物鉴定

LC-MS 分析技术是代谢组分析的最高效和最灵敏的方法,但 LC-MS 系统的多样性以及 LC 较低的保留时间再现性,严重限制了单一优化分析方法的建立,妨碍实验室间 LC-MS 色谱图的比较。同时,缺少将 LC-MS 质谱数据自动转换为(推定的)植物代谢物的高效软件工具。这意味着对大量信号数据集的分析只能在现有的化学数据库(如 SciFinder、Pub-Chem、Massbank 或 Dictionary of Natural Products)中进行手动搜索<sup>[34]</sup>,而这些数据库的信息来自一般的化学物质,在化合物来源上缺乏与植物关联,导致植物代谢组鉴定时推定的物质种类存在多种可能性,同时因为手动搜索,筛选效率也受到极大限制。因此,如何实现代谢产物的准确鉴定成为代谢组分析中的重要难题。在线 XCMS 软件的出现,在一定程度上解决了不同型号 LC-MS 系统采集的数据处理,实现特征离子检测、保留时间校正、对齐、注释、统计分析和数据可视化处理的自动化,为完整的非目标元组工作流程提供了解决方案<sup>[35]</sup>。同时,该技术能自动搜索和匹配 METLIN 串联质谱数据库,实现代谢产物高通量和高效鉴定<sup>[36]</sup>。本研究结果表明,通过在线 XCMS 软件进行了代谢产物鉴定,发现匹配物质与报道的棉花代谢产物存在较大差异,所以该软件在针对具体植物的代谢产物进行鉴定时存在较大的局限性。为保证鉴定的代谢产物均为棉花代谢产物,本研究建立了棉花代谢数据库,根据 LC-ESI-MS 分析中  $\text{ESI}^+$  和  $\text{ESI}^-$  模式下加合物存在的一般规律,利用 MATLAB 软件计算程序计算出检测到的代谢产物离子  $m/z$  对应的所有可能准确相对分子质量,进一步计算与代谢产物数据库中各物质准确相对分子质量间的误差,根据锁定的相对分子质量(甲酸钠)检测误差设定误差阈值,以小于此阈值推定的匹配物质作为供试代谢产物的鉴定结果,保证了供鉴

定的物质匹配的仅是棉花代谢产物,在一定程度上解决了物质鉴定的准确性。但鉴定结果表明仍有 86.6% 的离子未能得到鉴定。这可能与本研究建立的棉花代谢产物数据库库容量小有关。所以,应进一步加强研究和建设棉花次生代谢产物数据库。

### 3.4 病程相关的代谢产物

据文献报道,在大丽轮枝菌与棉花早期互作(接种后 1~4 d)中,脱氧半棉酚、半棉酚、棉酚、半棉酚酮、杀实夜蛾素( $H_1$ 、 $H_2$ 、 $H_3$  和  $H_4$ )及其甲氧基和二甲氧基衍生物等倍半萜类物质、黄酮类物质、酚类物质可在抗病棉花植株中大量出现<sup>[31,37]</sup>,而且倍半萜类物质合成途径的分子调控研究是棉花分子抗病育种工作的重点之一<sup>[38]</sup>。

本研究结果表明,经本方法鉴定,大丽轮枝菌处理与健康对照棉株间 77 个重要差异次生代谢产物离子(9 个  $ESI^+$  离子和 68 个  $ESI^-$  离子)推定到匹配物质 48 个,在供鉴定离子(576 个)中占比仅为 13.4%。被鉴定的  $ESI^+$  离子对应 11 个物质,被推定 15 次,均属于倍半萜类物质;被鉴定的  $ESI^-$  离子对应 41 个物质,被推定物质 89 次,其中倍半萜类 56 次(杜松烷倍半萜 51 次、杂倍半萜 4 次、环法尼烷倍半萜 1 次)、二萜类 4 次,黄酮类 18 次、碳水化合物 9 次、脂肪族 1 次和酚类 1 次。该结果表明在大丽轮枝菌与棉花互作过程中,这些物质在棉花体内的积累量发生了显著变化,与健康对照相比,除二萜类物质赤霉素  $A_4$  (在茎部减少 72%)外,其余在棉花体内积累量均增加 1 倍以上。这与文献报道<sup>[31,37]</sup>一致。

本研究鉴定出的酚类物质(咖啡酸)、黄酮类物质(紫云英苷、异紫云英苷、五桠果素、儿茶素、棉花素 -8- 鼠李糖苷、棉籽萜、草质素 -7- 葡萄糖苷、白矢车菊素、槲皮素 -3'- 葡萄糖苷、槲皮素 -3- 葡萄糖苷、槲皮素 -7- 葡萄糖苷和  $\alpha,2',3,3',4,4',6$ -庚羟基查耳酮 2'- 葡萄糖苷),在大丽轮枝菌与棉花互作相关文献中未见报道;鉴定出的碳水化合物(蜜二糖、蔗糖、蔗糖 -6- 磷酸酯)和脂肪族物质(1- 三十四烷醇),在病原菌-植物互作有关的文献中也未见报道。另外,本研究中获得的大丽轮枝菌与棉花互作重要差异次生代谢产物中 86.6% 的离子未获得鉴定,这些物质中可能有大丽轮枝

菌与棉花互作过程中新的病程相关代谢产物。这些物质是否影响及通过何种方式影响棉花对黄萎病的抗病性,应进一步进行验证和深入研究。

## 4 结论

UPLC-ESI-MS 负离子检测模式比较适合棉花代谢组分析。这些重要次生代谢产物的差异是大丽轮枝菌与棉花互作的结果,与棉花黄萎病的病程相关。除半萜类外,新发现的黄酮类、酚类、碳水化合物、脂肪族以及未获得鉴定的物质可能在棉花黄萎病病程中发挥重要作用,为深入解析棉花黄萎病机制提供了重要线索。

### 参考文献:

- [1] Ullah A, Sun H, Yang X, et al. Drought coping strategies in cotton: increased crop per drop[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 15(3): 271-284.
- [2] Qin Y, Zhu Y. A brief summary of major advances in cotton functional genomics and molecular breeding studies in China [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2007, 52(23): 3174-3178.
- [3] Sherbakoff C D. Wilt caused by *Verticillium albo-atrum*[J]. *Plant Disease Report Supplement*, 1928, 61: 283-284.
- [4] El-Zik M K. Integrated control of *Verticillium* wilt of cotton [J]. *Plant Disease*, 1985, 69(12): 1025-1032.
- [5] Bejarano-Alcázar J, Blanco-López M A, Melero-Vara J M, et al. Etiology, importance, and distribution of *Verticillium* wilt of cotton in Southern Spain[J]. *Plant Disease*, 1996, 80(11): 1233-1238.
- [6] Pegg G F, Brady B L. *Verticillium* wilts[M]. Wallingford, USA: CABI Publishing, Wallingford, 2002: 482.
- [7] Wheeler T A, Woodward J E. Field assessment of commercial cotton cultivars for *Verticillium* wilt resistance and yield [J]. *Crop Protection*, 2016, 88: 1-6.
- [8] Göre M E, Canerö K, Altın N, et al. Evaluation of cotton cultivars for resistance to pathotypes of *Verticillium dahliae*[J]. *Crop Protection*, 2009, 28(3): 215-219.
- [9] Song X, Yang G. The progress on the breeding of resistance to *Verticillium* wilt in cotton[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29(21): 12-16.
- [10] Wilhelm S, Sagen J E, Tietz H. Resistance to *Verticillium* wilt in cotton: sources, techniques of identification, resistance trends, and the resistance potential of multiline cultivars [J]. *Phytopathology*, 1974, 64: 924-931.
- [11] 肖松华, 刘剑光, 赵君, 等. 棉花远缘杂交创制抗黄萎病新种质[J]. *棉花学报*, 2015, 27(6): 524-533.

- Xiao Songhua, Liu Jianguang, Zhao Jun, et al. Creation of a new resistant germplasm to *Verticillium* wilt by distant hybridization in upland cotton[J]. *Cotton Science*, 2015, 27(6): 524-533.
- [12] 陈红, 李吉莲, 刘萍, 等. 4 个抗黄萎病海岛棉染色体片段导入系黄萎病抗性配合力分析[J]. *棉花学报*, 2014, 26(4): 290-294.
- Chen Hong, Li Jilian, Liu Ping, et al. Analysis on combining ability of resistance traits to *Verticillium* wilt in four chromosomal segment introgression lines in *Gossypium barbadense*[J]. *Cotton Science*, 2014, 26(4): 290-294.
- [13] Zhang J, Sanogo S, Flynn R, et al. Germplasm evaluation and transfer of *Verticillium* wilt resistance from Pima (*Gossypium barbadense*) to upland cotton (*G. hirsutum*) [J]. *Euphytica*, 2012, 187(2): 147-160.
- [14] Wang Y, Liang C, Wu S, et al. Significant improvement of cotton *Verticillium* wilt resistance by manipulating the expression of *Gastrodia* antifungal proteins[J]. *Molecular Plant*, 2016, 9(10): 1436-1439.
- [15] Hu G, Lei Y, Liu J, et al. The ghr-miR164 and GhNAC100 modulate cotton plant resistance against *Verticillium dahliae*[J]. *Plant Science*, 2020, 293: 110438.
- [16] Zhang T, Jin Y, Zhao J, et al. Host-induced gene silencing of the target gene in fungal cells confers effective resistance to the cotton wilt disease pathogen *Verticillium dahliae*[J]. *Molecular Plant*, 2016, 9(6): 939-942.
- [17] Meng J, Gao H, Zhai W, et al. Subtle regulation of cotton resistance to *Verticillium* wilt mediated by MAPKK family members [J]. *Plant Science*, 2018, 272: 235-242.
- [18] Singh R, Chandrawat K S. Role of phytoalexins in plant disease resistance[J]. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2017, 6(1): 125-129.
- [19] Daayf F. *Verticillium* wilts in crop plants: Pathogen invasion and host defence responses[J]. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2015, 37(1): 8-20.
- [20] Shen H, Wang A, Li Y, et al. Study on characteristics of constitutive expression of *GbLTP1* and *GbLTP3* genes in land-cotton [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2013(6): 87-93.
- [21] Li X, Zhu L, Tu L, et al. Lignin metabolism has a central role in the resistance of cotton to the wilt fungus *Verticillium dahliae* as revealed by RNA-Seq-dependent transcriptional analysis and histochemistry[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011(15): 15.
- [22] Li Y B, Han L B, Wang H Y, et al. The thioredoxin GbNRX1 plays a crucial role in homeostasis of apoplastic reactive oxygen species in response to *Verticillium dahliae* infection in cotton [J]. *Plant Physiology*, 2016, 170: 2392-2406.
- [23] Yang J, Zhang Y, Wang X, et al. HyPRP1 performs a role in negatively regulating cotton resistance to *V. dahliae* via the thickening of cell walls and ROS accumulation[J]. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1): 339.
- [24] 卜冰武, 邱德文, 曾洪梅, 等. 大丽轮枝菌蛋白激发子 PevD1 诱导棉花抗病性及作用机理[J]. *中国植物病理学报*, 2014, 44(3): 254-264.
- Bu Bingwu, Qiu Dewen, Zeng Hongmei, et al. Induced resistance and mechanism of protein elicitor PevD1 against *Verticillium dahliae* in cotton[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2014, 44(3): 254-264.
- [25] Shaban M, Miao Y, Ullah A, et al. Physiological and molecular mechanism of defense in cotton against *Verticillium dahliae*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 125: 193-204.
- [26] Dixon R A, Strack D. Phytochemistry meets genome analysis, and beyond..... [J]. *Phytochemistry*, 2003, 62(6): 815-816.
- [27] Schauer N, Steinhäuser D, Strelkov S, et al. GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples [J]. *FEBS Letters*, 2005, 579(6): 1332-1337.
- [28] Tikunov Y, Lommen A, de Vos C H R, et al. A novel approach for nontargeted data analysis for metabolomics. Large-scale profiling of tomato fruit volatiles[J]. *Plant Physiology*, 2005, 139(3): 1125.
- [29] von Roepenack-Lahaye E, Degenkolb T, Zerjeski M, et al. Profiling of *Arabidopsis* secondary metabolites by capillary liquid chromatography coupled to electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. *Plant Physiology*, 2004, 134(2): 548-559.
- [30] Bino R J, de Vos C H R, Lieberman M, et al. The light-hyperresponsive *high pigment-2dg* mutation of tomato: Alterations in the fruit metabolome[J]. *New Phytologist*, 2005, 166(2): 427-438.
- [31] Daayf F, Nicole M, Boher B, et al. Early vascular defense reactions of cotton roots infected with a defoliating mutant strain of *Verticillium dahliae*[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 1997, 103(2): 125-136.
- [32] Smith C A, Want E J, O'Maille G, et al. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification[J]. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(3): 779-787.
- [33] Huang N, Siegel M M, Kruppa G H, et al. Automation of a Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer for acquisition, analysis, and e-mailing of high-resolution exact-mass electrospray ionization mass spectral data[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 1999, 10(11): 1166-1173.
- [34] Moco S, Bino R J, Vorst O, et al. A liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato [J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(4): 1205-1218.
- [35] Tautenhahn R, Patti G J, Rinehart D, et al. XCMS online: A

- web-based platform to process untargeted metabolomic data [J]. Analytical Chemistry, 2012, 84(11): 5035-5039.
- [36] Benton H P, Ivanisevic J, Mahieu N G, et al. Autonomous metabolomics for rapid metabolite identification in global profiling [J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(2): 884-891.
- [37] Tian X, Ruan J X, Huang J Q, et al. Gossypol: phytoalexin of cotton [J]. Science China Life Sciences, 2016, 59(2): 122-129.
- [38] Tian X, Ruan J X, Huang J Q, et al. Characterization of gossypol biosynthetic pathway[J/OL]. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 2018, 115 (23): E5410-E5418 (2018-05-21) [2020-06-01]. <https://doi.org/10.1073/pnas.1805085115>. ●