

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2023.04.009

感染 CTV 甜橙中挥发性成分的分析及 萜类合成相关基因的表达变化

王欢欢, 赵恒燕, 陈琪, 刘露勤,
张耀海, 周彦, 刘金香

西南大学 柑桔研究所/国家柑桔工程技术研究中心, 重庆 400712

摘要: 为明确柑橘衰退病毒(*Citrus tristeza virus*, CTV)对柑橘挥发性物质的影响,本研究采用顶空固相微萃取法(Headspace Solid-phase Micro-Extractions, HS-SPME)结合气相色谱-质谱联用(Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS)技术分析了感染 CTV 的甜橙和健康甜橙挥发性成分。结果表明,CTV 侵染使甜橙挥发性成分总量显著降低,仅为健康甜橙的 71.00%,与健康甜橙中检测出的 59 种挥发性成分相比,感病甜橙中检测出 55 种,两者共有物质 51 种,其中 33 种的质量分数显著降低;此外,还有 8 种仅在健康甜橙中被检出,4 种仅在 CTV 侵染甜橙中被特异检出,分别为百里香酚、香叶酸甲酯、石竹素和 2-亚甲基-苄烷;检出的挥发性物质以萜类居多,为 44 种。采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)技术进一步分析了 4 个萜类合成关键基因(香叶基香叶基二磷酸合酶、法呢基焦磷酸合酶、 γ -萜品烯合酶和柠檬烯合酶)表达量,结果表明,感染 CTV 甜橙中 4 个基因表达显著下降,与感染 CTV 甜橙中 γ -萜品烯和柠檬烯质量分数显著减少趋势一致,暗示了 CTV 侵染甜橙影响了寄主萜类合成途径进而影响了挥发性物质的释放。

关键词: 甜橙; 柑橘衰退病毒; 挥发性物质; 萜类相关合成基因

中图分类号: S666.4

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2023)04-0093-09

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Analysis of Changes in Volatile Compounds by SPME-GC-MS Technique and Expression of Terpenoid Biosynthesis-Related Genes in *Citrus sinensis* Plants Infected with CTV

WANG Huanhuan, ZHAO Hengyan, CHEN Qi, LIU Luqin,
ZHANG Yaohai, ZHOU Yan, LIU Jinxiang

Citrus Research Institute, National Citrus Engineering Research Center, Southwest University, Chongqing 400712, China

收稿日期: 2022-06-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(31972237); 国家重点研发计划项目(2021YFD1400800); 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-26-05B)。

作者简介: 王欢欢, 硕士研究生, 主要从事柑橘衰退病毒研究。

通信作者: 刘金香, 研究员。

Abstract: To clarify the effect of *Citrus tristeza virus* (CTV) on citrus volatile compounds, the technology of Headspace Solid-phase Micro-extractions (HS-SPEM) coupled with Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) was used to analyze the volatile components of CTV-infected and healthy sweet orange plants in this study. The results showed that CTV significantly reduced the content of total volatile components of sweet orange, which was only 71.00% of the healthy ones. Fifty-nine volatile components were identified in healthy sweet orange plants, while 55 volatile components were detected in sweet orange plants infected with CTV isolate CT14. There were 51 common volatile components among them, of which, the contents of 33 components reduced significantly in sweet orange infected with CTV. Besides, eight volatile substances were detected only in healthy plants, and four volatile components were detected only in sweet orange infected with CT14, including thymol, methyl geranate, caryophyllene oxide and 2-methylenebornanene. Among all these volatile substances, the most components was the terpenoids, in total 44. The expression of 4 genes (*GGPPS*, *FPPS*, *TPIS*, and *LMS*) involving in terpenoids biosynthetic pathways was analyzed by reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The results showed that the expression levels of 4 genes were all down-regulated significantly in sweet orange plants infected with CTV, which was consistent with the result that the emission of γ -Terpinene and limonene was decreased in CTV-infected plants. The results indicated that CTV infection affected the biosynthesis of terpenoids and the release of volatile compounds in sweet orange plants.

Key words: *Citrus sinensis*; *Citrus tristeza virus*; volatile compounds; terpenoid biosynthesis-related genes

由柑橘衰退病毒(*Citrus tristeza virus*, CTV)引起的柑橘衰退病对全世界的柑橘产业造成重大经济损失^[1]. CTV 属于长线形病毒属(*Closterovirus*), 是正义单链 RNA 病毒, 其基因组全长约为 19 296 个核苷酸, 是目前已知的植物中最大的病毒^[2-6]. CTV 在田间存在株系分化现象^[7], 不同的 CTV 分离株会引起多种症状, 包括木质部茎陷点症状, 酸橙砧木的快速死亡或严重衰退症状, 酸橙、葡萄柚和柠檬实生苗的枯黄症状^[8]. CTV 根据在指示植物上的症状可区分为强毒株和弱毒株.

植物病原体侵染植物后, 往往引发寄主相应的发病机制, 并激活植物防御反应等代谢途径^[9], 产生萜类、醇类、醛类等植物挥发性物质^[10], 萜类化合物是植物挥发物中含量最多且结构多样的次生代谢产物^[11]. 关于病毒对寄主植物挥发性物质的影响越来越受到关注^[12], 如番茄黄化曲叶病毒(Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)显著降低番茄萜烯类挥发物的释放^[13]; 豆荚斑驳病毒(Bean pod mottle virus, BPMV)和大豆花叶病毒(Soybean mosaic virus, SMV)侵染寄主植物后, 其寄主的单萜、倍半萜以及总挥发物的释放量均显著降低^[14]; 南方水稻黑条矮缩病毒(Southern rice black-streaked dwarf virus, SRBS-DV)会诱导水稻产生特有的十三醛^[15]. 目前, 关于 CTV 侵染寄主后引发挥发性物质的变化报道极少. 为明确 CTV 对柑橘挥发性物质的影响, 本研究采用顶空固相微萃取法(Headspace Solid-phase Micro-Extractions, HS-SPEM)结合气相色谱-质谱联用(Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS)技术, 比较并分析感染 CTV 茎陷点型强毒分离株 CT14 甜橙和健康甜橙中挥发性成分的变化, 进一步应用实时荧光定量 RT-PCR(RT-qPCR)技术比较分析 4 个萜类合成相关基因的表达差异.

1 材料与方法

1.1 供试材料

以感染 CTV 分离株 CT14 的 2 年生西蒙斯甜橙实生苗嫩叶作为试验材料, 以 2 年生西蒙斯甜橙健康实生苗嫩叶作为对照, 这些材料均由西南大学柑桔研究所国家柑橘苗木脱毒中心提供.

1.2 挥发性物质收集

分别从长势基本一致的 5 株健康甜橙和 5 株感染 CTV 强毒分离株 CT14 的甜橙嫩梢上随机采取 5 份

嫩叶片, 每份嫩叶取 20 g, 然后迅速加液氮研磨为粉末, 准确称量 2.00 g, 置于 20 mL 螺口样品瓶中, 加入 2 mL 饱和氯化钠溶液, 并加入 2 μ L 环己酮作为内标物, 最后用聚四氟乙烯隔垫密封瓶盖旋紧后, 待上机检测. 试验重复 3 次.

采用 HS-SPME 法, 以二乙烯基苯/碳分子筛/聚二甲基硅氧烷(DVB/CAR/PDMS 50/30 μ m)萃取头(美国 Supelco 公司)收集健康和感染 CT14 的西蒙斯甜橙叶片的挥发性物质, 将样品置于 50 $^{\circ}$ C 平衡 20 min, 顶空吸附 40 min, 解吸 5 min.

1.3 挥发性物质的定性和定量分析

参照何朝飞等^[16]的方法, 利用 7890A/5975C 气相色谱-单四极杆质谱仪(Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS, 美国安捷伦公司)对柑橘叶片挥发性物质进行分子鉴定. 色谱条件: 柱起始温度为 35 $^{\circ}$ C, 保持 5 min, 然后以 3 $^{\circ}$ C/min 升至 180 $^{\circ}$ C, 保持 2 min, 再以 5 $^{\circ}$ C/min 升至 250 $^{\circ}$ C, 保持 2 min; 采用 Combi PAL 气相色谱多功能自动进样器(瑞士 CTC 公司)不分流进样, 进样口温度 250 $^{\circ}$ C, 载气为氦气(纯度大于 99.999%), 流速 1 mL/min. 质谱条件: 离子化方式是电子电离(Electron Ionization, EI), 电子能量 70 eV, 传输线温度 280 $^{\circ}$ C, 离子源温度 230 $^{\circ}$ C, 四极杆温度 150 $^{\circ}$ C, 质量扫描范围 m/z 35-450.

以 C₅~C₂₅ 正构烷烃(色谱纯, 德国 Dr. Ehrenstorfer Gmb H 公司)作为标准, 通过其保留时间的不同计算样品中检测出化合物的保留指数(Retention Indices, RI)^[17]; 经 NIST2008 和 Flavour2.0 图谱库检索结果, 并结合相关文献共同定性^[18], 确定挥发性化合物的成分. 最终采用峰面积归一化法计算各成分相对质量分数进而对比内标物峰面积进行半定量, 计算公式为: 各成分相对质量分数(μ g/g)=各成分峰面积 $\times$ 内标物质量(μ g)/(内标物峰面积 $\times$ 样品质量(g)).

1.4 RNA 提取及 cDNA 的合成

甜橙叶片总 RNA 用 Trizol 试剂盒(Invitrogen 公司)提取, 以 RNA 为模板, 采用反转录试剂盒(TaKa-Ra 公司)合成 cDNA.

1.5 实时荧光定量 PCR

依据本研究挥发性物质分析结果与本研究室前期转录组数据, 选取 4 个萜类合成相关基因进行表达量分析, 这 4 个基因分别为法呢基焦磷酸合酶(FPPS)、香叶基香叶基二磷酸合酶(GGPPS)、 γ -萜品烯合酶(TPIS)、(R)-柠檬烯合酶(LMS), 这些基因序列均从华中农业大学柑橘基因库(<http://citrus.hzau.edu.cn/index.php>)下载, 用 Oligo 7 软件设计引物, 引物序列详见表 1.

表 1 萜类合成相关基因引物及扩增长度

基因	基因登录号	相关酶描述	引物序列(5'~3')	片段大小/bp
FPPS	Cs4g08260.1	法呢基焦磷酸合酶	F: CTACGCAACCATATCTCC R: CTTTCTCTCCTTCGATTGTGG	148
GGPPS	Cs4g10240.1	香叶基香叶基二磷酸合酶	F: GAAATCACAGCCGTCCAT R: TACCGGCTCCTTTACGAC	149
TPIS	Cs8g14120.1	γ -萜品烯合酶	F: AACTTCCCTTACACTGGAGGA R: TACTTGAGCTCGTCTTGGTGT	151
LMS	orangel.1t04366.1	(R)-柠檬烯合酶 1	F: GAAGCATACAAAAGACGAGCA R: AAAACGATGAGCCAATCCAAG	129

使用 iCycleriQ 实时荧光定量 PCR 仪(美国伯乐公司)进行 RT-qPCR. 以反转录产物为模板, 用实时荧光定量 PCR 试剂盒(TaKaRa)进行扩增. 反应条件如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 然后 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 58 $^{\circ}$ C 退火、延伸 30 s, 进行 40 个循环; 扩增后采集熔解曲线程序: 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s 后, 从 58 $^{\circ}$ C 开始, 每升高 0.5 $^{\circ}$ C 停留 15 s 采集荧光信号, 直到温度升高到 95 $^{\circ}$ C 熔解曲线采集完成. 为了更好消除样本之间的差异进而归一

化处理实时定量 PCR 数据,本研究同时以甜橙 Actin 和 GAPDH(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)2 个基因作为内参基因,内参基因引物序列分别参考贾瑞瑞等^[19]和胡燕^[20]的文献.

1.6 数据统计与分析

以 Excel 计算样品挥发性物质质量分数和萜类相关基因表达量的平均数、标准误,并进行 *t* 检验检测健康甜橙和感染 CTV 甜橙之间挥发性成分和萜类相关基因表达的差异统计学分析.

2 结果与分析

2.1 CTV 侵染甜橙后挥发性成分的种类比较

应用 SPME-GC-MS 联用技术,分别对感染 CTV 强毒分离株 CT14 的甜橙和健康甜橙(对照)的挥发性成分进行分析,结果表明,与对照(健康甜橙)中检测出的 59 种挥发性物质相比,CTV 侵染的甜橙存在 55 种挥发性物质,其中 51 种为共有,萜类化合物居多,占 39 种;CTV 侵染后其相对质量分数显著下降者为 26 种,非萜类为 12 种,CTV 侵染后其相对质量分数显著下降者为 7 种,共有 33 种物质显著下降;4 种(百里香酚、香叶酸甲酯、石竹素和 2-亚甲基-莰烷)为 CTV 侵染甜橙所特有,其中 2 种(百里香酚和香叶酸甲酯)为萜类化合物;8 种为健康甜橙所特有,分别为 α -石竹烯、 β -蒎烯、 γ -蒎烯、叶醇、顺式-茉莉酮、苯乙醛、2,4-二甲基苯乙烯、4-乙基-3-壬烯-5-炔,其中 3 种为萜类化合物(α -石竹烯、 β -蒎烯、 γ -蒎烯)(表 2). CTV 侵染的甜橙所含的特有成分有些具有防御免疫作用,如百里香酚是一种单萜酚类植物精油,具有抗菌、驱虫等生物活性^[21-25],石竹素具有抗炎、抗真菌和其他活性等作用^[26]. 这些化合物在 CTV 侵染甜橙中的出现,可能与病毒侵染所诱导寄主植物产生一系列防御反应有关;另一方面,健康甜橙中所含的一些特有物质具有抗炎、抗菌的特性,而在 CTV 侵染后的甜橙中这些物质就消失了,如 α -石竹烯和 β -蒎烯^[24-25]. 由此推测,CTV 的侵染可能改变了寄主的一些防御途径,使某些防御物质产生了差异.

2.2 CTV 侵染甜橙后挥发性成分相对质量分数

与健康甜橙每克鲜叶片所含的挥发物 12 255.33 $\mu\text{g/g}$ 相比,CTV 侵染甜橙后每克鲜叶片所含挥发物的总量显著降低(8 701.69 $\mu\text{g/g}$),仅为健康甜橙的 71.00%. 与健康甜橙相比,感病甜橙中有 41 种挥发性化合物释放量呈显著下降或未检测出. 在这些挥发性物质中,主要成分为芳樟醇、柠檬醛、柠檬烯、橙花醛、桉烯、3-蒎烯、反式-罗勒烯、香茅醛、 α -松油醇、月桂烯、萜品油烯,其相对质量分数在 CTV 侵染甜橙和健康甜橙中均大于 200 $\mu\text{g/g}$,但这些物质在感染 CTV 的甜橙中显著减少(表 2). 其中,芳樟醇、柠檬醛和柠檬烯的相对质量分数均高于 1 000 $\mu\text{g/g}$,在 CTV 侵染的甜橙中芳樟醇质量分数最高,为 1 267.94 $\mu\text{g/g}$;在健康甜橙中柠檬醛质量分数最为丰富,为 1 843.73 $\mu\text{g/g}$. 总之,相比于健康甜橙,被 CTV 侵染后的甜橙中挥发物释放的总量显著降低,并且挥发成分总量的降低并不是由于个别挥发物降低或缺失导致的,而是因绝大部分挥发物都受到不同程度的抑制造成的.

表 2 健康甜橙和 CTV 感染的甜橙中挥发性成分及相对质量分数

序号	保留时间/ min	化学编号	成分名称	相对质量分数/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)		类别
				健康甜橙	感病甜橙	
1	20.01	013877-91-3	反式-罗勒烯	512.10 $\pm$ 11.29	411.33 $\pm$ 15.98 [*]	单萜烯
2	24.58	007216-56-0	别罗勒烯	4.91 $\pm$ 0.13	3.50 $\pm$ 0.17 [*]	单萜烯
3	19.41	003338-55-4	顺式-罗勒烯	28.93 $\pm$ 2.14	16.68 $\pm$ 0.80 [*]	单萜烯
4	13.43	000099-83-2	α -水芹烯	244.83 $\pm$ 6.98	178.63 $\pm$ 6.41 [*]	单萜烯
5	13.67	007785-26-4	(-)- α -蒎烯	66.34 $\pm$ 2.49	52.32 $\pm$ 3.67	单萜烯
6	18.16	000099-86-5	α -萜品烯	196.14 $\pm$ 12.86	107.99 $\pm$ 2.82 [*]	单萜烯
7	14.37	005794-03-6	(+)-蒎烯	4.19 $\pm$ 0.18	2.82 $\pm$ 0.17 [*]	单萜烯
8	27.72	013466-78-9	3-蒎烯	592.19 $\pm$ 13.63	457.14 $\pm$ 21.00 [*]	单萜烯

续表 2

序号	保留时间/ min	化学编号	成分名称	相对质量分数/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)		类别
				健康甜橙	感病甜橙	
9	20.43	000099-85-4	γ -萜品烯	300.14 $\pm$ 14.92	180.95 $\pm$ 3.61 [*]	单萜烯
10	19.00	000138-86-3	柠檬烯	1565.82 $\pm$ 37.24	1120.22 $\pm$ 38.38 [*]	单萜烯
11	16.96	000123-35-3	月桂烯	312.22 $\pm$ 10.90	235.66 $\pm$ 12.02 [*]	单萜烯
12	15.91	003387-41-5	桉烯	838.03 $\pm$ 3.15	738.31 $\pm$ 22.66 [*]	单萜烯
13	21.89	000586-62-9	萜品油烯	324.67 $\pm$ 9.97	234.49 $\pm$ 6.32 [*]	单萜烯
14	38.53	006753-98-6	α -石竹烯	32.58 $\pm$ 0.63	ND [*]	倍半萜烯
15	34.19	017699-14-8	α -葎澄茄油烯	1.56 $\pm$ 0.01	1.30 $\pm$ 0.01 [*]	倍半萜烯
16	40.83	000502-61-4	α -法呢烯	24.47 $\pm$ 0.31	21.27 $\pm$ 1.01	倍半萜烯
17	38.78	018794-84-8	(E)- β -法呢烯	98.80 $\pm$ 0.98	102.90 $\pm$ 6.56	倍半萜烯
18	37.93	000489-39-4	(+)-香橙烯	4.61 $\pm$ 0.47	3.11 $\pm$ 0.14	倍半萜烯
19	37.17	000087-44-5	β -石竹烯	179.17 $\pm$ 2.45	173.20 $\pm$ 10.87	倍半萜烯
20	39.65	017699-05-7	α -香柠檬烯	6.89 $\pm$ 0.32	5.32 $\pm$ 0.32 [*]	倍半萜烯
21	35.31	003856-25-5	α -可巴烯	6.59 $\pm$ 0.23	4.03 $\pm$ 0.27 [*]	倍半萜烯
22	36.05	000515-13-9	β -榄香烯	128.86 $\pm$ 0.24	142.29 $\pm$ 7.88	倍半萜烯
23	41.41	020307-83-9	β -倍半水芹烯	29.61 $\pm$ 0.15	30.50 $\pm$ 1.86	倍半萜烯
24	40.24	000473-13-2	α -芹子烯	43.31 $\pm$ 2.36	31.79 $\pm$ 1.56 [*]	倍半萜烯
25	40.47	031983-22-9	α -衣兰油烯	2.48 $\pm$ 0.10	2.17 $\pm$ 0.06	倍半萜烯
26	39.88	017066-67-0	β -瑟林烯	30.39 $\pm$ 4.81	ND [*]	倍半萜烯
27	40.24	000515-17-3	γ -芹子烯	36.24 $\pm$ 4.71	ND [*]	倍半萜烯
28	34.93	000106-25-2	橙花醇	42.67 $\pm$ 5.55	19.62 $\pm$ 0.91 [*]	单萜醇类
29	26.28	000562-74-3	4-松油醇	120.99 $\pm$ 2.08	109.86 $\pm$ 3.17	单萜醇类
30	27.04	010482-56-1	α -松油醇	338.79 $\pm$ 4.45	242.71 $\pm$ 6.85 [*]	单萜醇类
31	29.14	000106-22-9	香茅醇	30.52 $\pm$ 0.19	20.25 $\pm$ 0.13 [*]	单萜醇类
32	30.37	000106-24-1	香叶醇	43.53 $\pm$ 1.62	24.43 $\pm$ 0.96 [*]	单萜醇类
33	24.70	059905-53-2	异胡薄荷醇	15.06 $\pm$ 4.72	5.89 $\pm$ 2.36	单萜醇类
34	22.97	000078-70-6	芳樟醇	1778.69 $\pm$ 18.79	1267.94 $\pm$ 38.31 [*]	单萜醇类
35	20.77	007299-41-4	顺式- β -松油醇	92.07 $\pm$ 5.87	85.20 $\pm$ 3.25	单萜醇类
36	32.923	000499-75-2	香芹酚	1.99 $\pm$ 0.47	1.40 $\pm$ 0.24	单萜酚类
37	31.81	000089-83-8	百里香酚	ND	5.61 $\pm$ 0.15 [*]	单萜酚类
38	29.72	000106-26-3	橙花醛	1360.13 $\pm$ 2.41	874.10 $\pm$ 57.95 [*]	单萜醛类
39	31.25	005392-40-5	柠檬醛	1843.73 $\pm$ 3.81	1197.99 $\pm$ 72.95 [*]	单萜醛类
40	27.72	000112-31-2	正癸醛	11.22 $\pm$ 0.22	8.19 $\pm$ 0.01 [*]	单萜醛类
41	25.29	000106-23-0	香茅醛	344.30 $\pm$ 0.87	273.96 $\pm$ 9.44 [*]	单萜醛类
42	29.94	000503-93-5	优葛缕酮	4.49 $\pm$ 0.94	2.23 $\pm$ 0.01	单萜酮类
43	27.57	005948-04-9	反式-二氢香芹酮	7.42 $\pm$ 0.30	3.12 $\pm$ 0.10 [*]	单萜酮类
44	33.17	002349-14-6	香叶酸甲酯	ND	63.74 $\pm$ 7.07 [*]	单萜酯类
45	10.11	000928-96-1	叶醇	2.63 $\pm$ 0.09	ND [*]	GLVs
46	7.31	000066-25-1	正己醛	86.25 $\pm$ 1.36	29.71 $\pm$ 1.10 [*]	GLVs

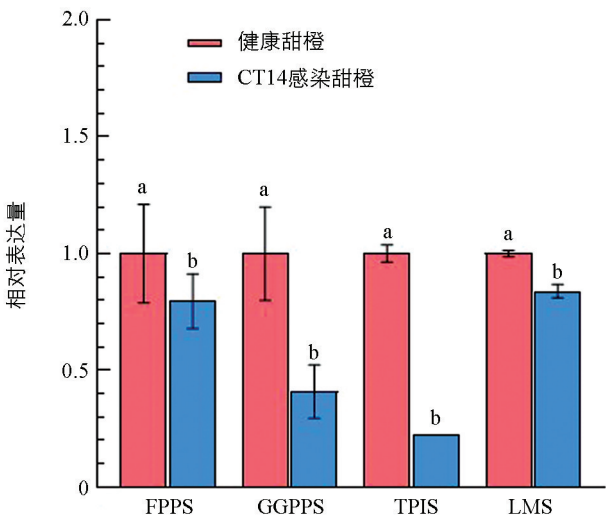
续表 2

序号	保留时间/ min	化学编号	成分名称	相对质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		类别
				健康甜橙	感病甜橙	
47	12.64	000142-83-6	2, 4-己二烯醛	16.30±1.11	6.03±0.65 [*]	GLVs
48	9.70	006728-26-3	反式-2-己烯醛	257.21±3.18	104.77±6.48 [*]	GLVs
49	15.16	000100-52-7	苯甲醛	3.39±0.02	2.94±0.13	醛类
50	19.58	000122-78-1	苯乙醛	4.04±0.03	ND [*]	醛类
51	36.35	000488-10-8	顺式-茉莉酮	6.74±0.10	ND [*]	酮类
52	44.17	000084-66-2	酞酸二乙酯	4.74±0.09	3.02±0.18 [*]	酯类
53	36.72	000085-91-6	邻甲氨基苯甲酸甲酯	177.82±0.21	63.66±4.71 [*]	酯类
54	56.04	000112-39-0	棕榈酸甲酯	1.06±0.03	1.19±0.04	酯类
55	43.65	001139-30-6	石竹素	ND	1.80±0.20 [*]	其他
56	21.19	027538-47-2	2-亚甲基-莰烷	ND	3.72±0.94 [*]	其他
57	21.54	001195-32-0	2, 4-二甲基苯乙烯	3.28±0.03	ND [*]	其他
58	23.33	074744-26-6	4-乙基-3-壬烯-5-炔	9.06±1.41	ND [*]	其他
59	36.96	000571-58-4	1, 4-二甲基萘	2.44±0.94	1.56±0.47	其他
60	31.72	000091-57-6	2-甲基萘	17.74±0.11	11.98±0.01 [*]	其他
61	32.41	000090-12-0	1-甲基萘	10.58±2.36	7.62±1.41	其他
62	44.35	000544-76-3	正十六烷	1.74±0.19	0.63±0.02 [*]	其他
63	51.54	000593-45-3	正十八烷	1.03±0.20	0.46±0.14	其他
总量				12 255.33	8 701.69	
种类				59	55	

注：ND 表示未检测到；* 表示该化合物在病株中的质量分数与健康植株相比差异有统计学意义($p<0.05$)；GLVs 表示绿叶挥发物(Green leaf volatiles, GLVs)。

2.3 萜类合成相关基因的相对表达量

为了探索萜类成分质量分数显著减少是否与这些物质的合成途径受阻有关，依据本研究挥发性物质分析结果与本研究室前期转录组数据，本研究选择了萜类合成途径中 4 个关键酶基因进行表达量分析。香叶基香叶基二磷酸合酶(GGPPS)和法呢基焦磷酸合成酶(FPPS)是萜类碳骨架合成途径中的关键合成酶， γ -萜品烯合成酶(TPIS)和(R)-柠檬烯合成酶(LMS)则分别合成 γ -萜品烯和柠檬烯。结果表明，4 个萜类合成关键基因的表达量在感染 CT14 的甜橙中均比在健康甜橙中显著降低(图 1)，这与 γ -萜品烯和柠檬烯在 CTV 侵染后的质量分数(180.95 $\mu\text{g/g}$ 和 1 120.22 $\mu\text{g/g}$)比在健康甜橙中(300.14 $\mu\text{g/g}$ 和 1 565.82 $\mu\text{g/g}$)显著降低的结果相一致，暗示了萜类合成途径中关键基因表达量下调是 CTV 侵染后萜类化合物质量分数减少的重要原因。



小写英文字母表示在 $p=0.05$ 使用 t 检验比较差异有统计学意义。

图 1 甜橙中萜类合成酶相关基因表达量

化物质质量分数减少的重要原因。

3 讨论

病毒侵染寄主植物可以引起其营养成分和次生代谢等发生变化, 挥发性化合物作为具有防御作用的次生代谢产物, 在各种植物中广泛存在. 为了明确 CTV 侵染对甜橙挥发性物质的影响, 本研究采用 HS-SPME 结合 GC-MS 技术对甜橙实生苗叶片挥发性成分进行分析. HS-SPME 是集采样、萃取、富集及进样于一体的样品前处理技术, 重现性良好, 已成功应用于挥发性成分测定^[27]. 研究结果发现, CTV 侵染甜橙幼叶的挥发性物质总量比健康甜橙显著降低了 29.00%, 种类也比健康甜橙(59 种)减少了 4 种, 其中, 51 种为共有, 26 种的相对质量分数显著下降, 4 种为 CTV 侵染后所特有, 8 种为健康甜橙中所特有. 在这些挥发物中, 萜类化合物居多, 以单烯萜类、单萜醛类和单萜醇类等为主; 月桂烯、3-蒎烯、罗勒烯等 12 种单萜烯及 4 种单萜醛和 5 种单萜醇的相对质量分数在 CTV 侵染甜橙后均显著降低. 这与植物病毒 TYLCV、BPMV 和 SMV 导致寄主降低植物挥发物释放量的报道一致. Cheung 等^[28]通过 Twister™ 吸附系统及全二维气相色谱-飞行时间质谱(TD-GC×GC-TOFMS)技术发现感染 CTV 的田间柑橘树中月桂烯、3-蒎烯、罗勒烯等挥发性物质的相对含量均显著降低, 并且提出将这些物质作为柑橘感染 CTV 的标志物质. 本研究检出的 4 种 CTV 侵染甜橙的特有物质分别为百里香酚、香叶酸甲酯、石竹素和 2-亚甲基-莰烷. 百里香酚是一种单萜酚类植物精油, 具有抗菌、驱虫等生物活性^[21-25], 石竹素具有抗炎、抗真菌和其他活性等作用^[26], 香叶酸甲酯和 2-亚甲基-莰烷的功能目前尚未见报道, 这些化合物在 CTV 侵染甜橙中的出现, 可能与病毒侵染所诱导寄主植物产生一系列防御反应有关, 这些物质是否也可以作为 CTV 的标志物质尚待进一步研究.

挥发性物质对柑橘果实感官质量有着重要作用, 柠檬烯、月桂烯和柠檬醛等挥发物是柑橘的主要香气成分^[29-31], 并且橙花醛和柠檬醛的相互作用几乎确定了甜橙的香气^[32]. 在本研究中健康甜橙和感染 CTV 甜橙叶片挥发性物质主要成分都是柠檬醛、柠檬烯、芳樟醇和橙花醛等, CTV 的侵染显著降低了这 4 种挥发物的释放量, 可能是造成感病柑橘果实品质降低的原因之一. 另外, 柑橘挥发性物质具有较强的抗菌和抗氧化等生理活性^[33], 例如柠檬烯具有抗菌抑菌等作用^[34-36]. Hijaz 等^[37]发现甜橙被感染细菌性病原-柑橘黄龙病菌(*Candidatus Liberibacter asiaticus*, CLas)后其释放的柠檬烯、十一烷醛的量在增加, 而在本研究中 CTV 的侵染显著降低了甜橙叶片中柠檬烯的释放量. 因此, 不同的病原引起寄主植物挥发性物质的变化有所不同.

Luan 等^[12]发现在中国番茄黄化曲叶病毒侵染番茄后, 萜类合成途径相关基因的表达水平发生改变. 本研究选择了 4 个萜类化合物合成途径中的关键基因, 分析了其表达是否与 CTV 侵染甜橙的萜类物质的显著减少一致, 这 4 个基因分别是香叶基香叶基二磷酸合酶(GGPPS)、法呢基焦磷酸合酶(FPPS)、 γ -萜品烯合酶(TPIS)和(R)-柠檬烯合酶(LMS). 在萜类碳骨架合成途径中, 香叶基香叶基二磷酸合酶(GGPPS)和法呢基焦磷酸合酶(FPPS)是 2 个关键的合成酶, γ -萜品烯合酶(TPIS)和(R)-柠檬烯合酶(LMS)分别是 γ -萜品烯和柠檬烯合成酶. 结果表明, 这 4 个基因的表达量在 CTV 侵染甜橙后均显著下调, 与其生成的直接产物 γ -萜品烯和柠檬烯质量分数显著下降一致, 表明 CTV 影响了寄主萜类合成途径进而影响了挥发性物质的释放.

4 结论

本研究采用 HS-SPME 结合 GC-MS 技术分析了感染 CTV 甜橙和健康甜橙的挥发性成分, 结果表明, CTV 侵染甜橙后挥发性成分总量显著降低了 29.00%, 且以萜类化合物为主, 感染 CTV 甜橙中 4 个萜类合成关键基因表达量显著下降, 与萜类挥发性物质减少一致, 说明 CTV 侵染甜橙影响了寄主萜类合成途径和挥发性物质的释放.

参考文献:

- [1] MORENO P, AMBRÓS S, ALBIACH-MARTÍ M R, et al. Citrus Tristeza Virus: a Pathogen that Changed the Course of the Citrus Industry [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2008, 9(2): 251-268.
- [2] DOLJA V V, KARASEV A V, KOONIN E V. MOLECULAR BIOLOGY AND EVOLUTION OF CLOSTEROVIRUSES: Sophisticated Build-up of Large RNA Genomes [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1994, 32: 261-285.
- [3] KOONIN E V, DOLJA V V, MORRIS T J. Evolution and Taxonomy of Positive-Strand RNA Viruses: Implications of Comparative Analysis of Amino Acid Sequences [J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 1993, 28(5): 375-430.
- [4] BROADBENT P. Biological Characterization of Australian Isolates of Citrus Tristeza Virus and Separation of Subisolates by Single Aphid Transmissions [J]. *Plant Disease*, 1996, 80(3): 329.
- [5] RUIZ-RUIZ S, SOLER N, SÁNCHEZ-NAVARRO J, et al. Citrus Tristeza Virus P23: Determinants for Nucleolar Localization and Their Influence on Suppression of RNA Silencing and Pathogenesis [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*; MPMI, 2013, 26(3): 306-318.
- [6] 刘金香, 王欢欢, 王洪苏, 等. 柑橘衰退病橘蚜传播率不同的分离株 CPm 的表达特性和分子特征 [J]. *园艺学报*, 2021, 48(5): 1023-1030.
- [7] DAWSON W O, GARNSEY S M, TATINENI S, et al. Citrus Tristeza Virus-Host Interactions [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 88.
- [8] RUIZ-RUIZ S, MORENO P, GUERRI J, et al. The Complete Nucleotide Sequence of a Severe Stem Pitting Isolate of Citrus Tristeza Virus from Spain: Comparison with Isolates from Different Origins [J]. *Archives of Virology*, 2006, 151(2): 387-398.
- [9] BAR-JOSEPH M, MARCUS R, LEE R F. The Continuous Challenge of Citrus Tristeza Virus Control [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1989, 27: 291-316.
- [10] NOGIA V K, SINGH V, MEGHWAL R R. Effect of Cotton Leaf Curl Virus Infected Plants on the Biology of the Whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae): Vector-Virus Mutualism [J]. *Phytoparasitica*, 2014, 42(5): 619-625.
- [11] ROHMER M, KNANI M, SIMONIN P, et al. Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria: a Novel Pathway for the Early Steps Leading to Isopentenyl Diphosphate [J]. *The Biochemical Journal*, 1993, 295(Pt 2): 517-524.
- [12] LUAN J B, YAO D M, ZHANG T, et al. Suppression of Terpenoid Synthesis in Plants by a Virus Promotes Its Mutualism with Vectors [J]. *Ecology Letters*, 2013, 16(3): 390-398.
- [13] FANG Y, JIAO X G, XIE W, et al. Tomato Yellow Leaf Curl Virus Alters the Host Preferences of Its Vector Bemisia Tabaci [J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 2876.
- [14] PENAFLORES M F G V, MAUCK K E, ALVES K J, et al. Effects of Single and Mixed Infections of Bean Pod Mottle Virus and Soybean Mosaic Virus on Host-Plant Chemistry and Host-Vector Interactions [J]. *Functional Ecology*, 2016, 30(10): 1648-1659.
- [15] HE X C, XU H X, GAO G C, et al. Virus-Mediated Chemical Changes in Rice Plants Impact the Relationship between Non-Vector Planthopper Nilaparvata Lugens STÅL and Its Egg Parasitoid Anagrus Nilaparvatae Pang et Wang [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e105373.
- [16] 何朝飞, 冉玥, 曾林芳, 等. 柠檬果皮香气成分的 GC-MS 分析 [J]. *食品科学*, 2013, 34(6): 175-179.
- [17] VANDENDOOL H, KRATZ P D. A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed gas-Liquid Partition Chromatography [J]. *Journal of Chromatography*, 1963, 11: 463-471.
- [18] HÖGNADÓTTIR Á, ROUSEFF R L. Identification of Aroma Active Compounds in Orange Essence Oil Using Gas Chromatography-Olfactometry and Gas Chromatography-Mass Spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2003, 998(1-2): 201-211.
- [19] 贾瑞瑞, 周鹏飞, 白晓晶, 等. 柑橘响应溃疡病菌转录因子 *CsBZIP40* 的克隆及功能分析 [J]. *中国农业科学*, 2017,

50(13): 2488-2497.

[20] 胡燕. 野生柑橘响应韧皮部杆菌亚洲种侵染的生物学和转录组学研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2017.

[21] 仇昆伦, 毛海舫, 欧文华, 等. 百里香酚的研究进展 [J]. 香料香精化妆品, 2008(2): 28-32.

[22] 仇昆伦, 欧文华, 毛海舫, 等. 百里香酚的合成研究 [J]. 食品工业科技, 2009, 30(1): 266-268.

[23] 张静, 冯岗, 袁旭超, 等. 百里香酚抑菌活性初探 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(21): 277-280.

[24] 高永生, 金斐, 朱丽云, 等. 植物精油及其活性成分的抗菌机理 [J]. 中国食品学报, 2022, 22(1): 376-388.

[25] 张玥. 植物精油研究进展及其在禽类生产中的应用 [J]. 饲料博览, 2021(10): 11-16, 31.

[26] 刘晓宇, 陈旭冰, 陈光勇. β -石竹烯及其衍生物的生物活性与合成研究进展 [J]. 林产化学与工业, 2012, 32(1): 104-110.

[27] 崔婷婷, 单长松, 吴澎, 等. 金银花和红银花挥发性成分的顶空固相微萃取气质联用检测与比较 [J]. 园艺学报, 2015, 42(11): 2283-2290.

[28] CHEUNG W H K, PASAMONTES A, PEIRANO D J, et al. Volatile Organic Compound (VOC) Profiling of Citrus Tristeza Virus Infection in Sweet Orange Citrus Varietals Using Thermal Desorption Gas Chromatography Time of Flight Mass Spectrometry (TD-GC/TOF-MS) [J]. Metabolomics, 2015, 11(6): 1514-1525.

[29] TATUM J H, NAGY S, BERRY R E. Degradation Products Formed in Canned Single-Strength Orange Juice during Storage [J]. Journal of Food Science, 1975, 40(4): 707-709.

[30] TØNDER D, PETERSEN M A, POLL L, et al. Discrimination between Freshly Made and Stored Reconstituted Orange Juice Using GC Odour Profiling and Aroma Values [J]. Food Chemistry, 1998, 61(1-2): 223-229.

[31] REGA B, FOURNIER N, GUICHARD E. Solid Phase Microextraction (SPME) of Orange Juice Flavor: Odor Representativeness by Direct Gas Chromatography Olfactometry (D-GC-O) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(24): 7092-7099.

[32] 宋焕禄. 食品风味化学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.

[33] 陈玉婷, 傅曼琴, 吴继军, 等. 不同生长时期玫瑰柑果实品质分析 [J]. 南方农业学报, 2022, 53(3): 869-878.

[34] 贺兵, 郝玉庆. 天然活性单萜——柠檬烯的抑菌作用研究进展 [J]. 中国微生态学杂志, 2009, 21(3): 288-289.

[35] IBRAHIM M A, KAINULAINEN P, AFLATUNI A. Insecticidal, Repellent, Antimicrobial Activity and Phytotoxicity of Essential Oils: With Special Reference to Limonene and Its Suitability for Control of Insect Pests [J]. Agricultural and Food Science, 2001, 10(3): 243-259.

[36] 王伟江. 天然活性单萜——柠檬烯的研究进展 [J]. 中国食品添加剂, 2005(1): 33-37.

[37] HIJAZ F, KILLINY N. Collection and Chemical Composition of Phloem Sap from *Citrus sinensis* L. Osbeck (Sweet Orange) [J]. PLoS One, 2014, 9(7): e101830.

责任编辑 王新娟