

植物响应病原真菌的代谢组学研究进展

张凡忠 刘小红 章初龙 林福呈*

(浙江大学农业与生物技术学院生物技术研究所, 杭州 310058)

摘要 代谢组学是对特定条件下的生物体内代谢物进行定性或定量分析, 从而得到与特定生理或病理反应相关的代谢物变化的一门新学科, 并因此被广泛应用于植物学、微生物学、毒理学及疾病诊断等领域。近年来, 代谢组学开始应用到植物-微生物互作研究领域, 尤其是在植物响应病原菌胁迫的研究中。该文综述了代谢组学的定义、研究方法及其在植物-病原真菌互作领域中的应用, 并讨论了其研究前景和所面临的挑战。

关键词 代谢组学; 植物-病原体互作; 生物标记; 数据挖掘

Progresses of Metabolomics in Plants Response to Plant Pathogenic Fungi

Zhang Fanzhong, Liu Xiaohong, Zhang Chulong, Lin Fucheng*

(Institute of Biotechnology, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Metabolomics is a powerful approach for monitoring metabolic effects in a particular situation by quantitative and qualitative analyses of metabolites *in vivo*. It has been applied in many fields, such as botany, microbiology, toxicology and disease diagnosis. Recently, this approach has been used in the research of interaction of plant and microbe, especially in the area of responses to pathogen stress. In this review, we focus on methods and applications of metabolomics in the interaction between plants and pathogenic fungi. In addition, we try to discuss the prospects and challenges of metabolomics in the future.

Keywords metabolomics; interaction between plants and pathogens; biomarkers; data mining

“代谢组(metabolome)”一词是由Oliver等^[1]在1998年首次使用的, 用于描述一个生物体合成的所有代谢物。基于metabolome, Fiehn^[2]在2001年提出了“代谢组学(metabolomics)”, 并定义为“对一个生物体系中所有的代谢物进行定性和定量的综合分析”。常与“metabolomics”交换使用的另一个词是“代谢组学(metabonomics)”, 其定义为“定量检测生物体内病理刺激或基因修饰引起的代谢物动态响应^[3]”。从定义可以看出, metabonomics是对代谢物动态信息的研究, 可看作一种完整的系统生物学方法; 而metabolomics是对单个体系的静态研究, 可认

为是metabonomics的子集, 但目前对这两个词的使用并没有严格的界定, 因此常互换使用^[4-5]。

代谢组学是系统生物学中非常重要的一个环节, 与基因组学、转录组学、蛋白质组学共同构成系统生物学研究的主要内容。由于基因或蛋白质的功能补偿作用, 其他基因或蛋白质可以补偿某个基因或蛋白质的缺失, 因此转录组学或蛋白质组学的变化不能完全反映基因或环境变更时在生化层面的表现型改变。代谢组才是这一系列事件下游的最终结果, 是导致表型变化的直接诱因, 能更全面地揭示基因的功能, 是连接最上游的基因功能和最下游的

收稿日期: 2015-12-07 接受日期: 2016-03-01

国家自然科学基金(批准号: 31370171)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-88982183, E-mail: fuchenglin@zju.edu.cn

Received: December 7, 2015 Accepted: March 1, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31370171)

*Corresponding author. Tel: +86-571-88982183, E-mail: fuchenglin@zju.edu.cn

网络出版时间: 2016-04-18 16:58:13

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160418.1658.008.html>

表现型变化的纽带^[6]。

根据代谢组学研究的用途及用途, 一般可以分为靶向代谢组学和非靶向代谢组学, 前者的目的是定量验证特定代谢产物的表达差异, 主要用于进一步分析已知生化途径的生物学功能^[7-8], 而后者旨在研究实验组和对照组中统计学上有显著差异的代谢物, 更多是从定性和半定量角度发现代谢组的差异, 因此可以用于发现各种新的生物标记物甚至整条代谢途径^[9-10]。目前进行的代谢组学研究大部分是靶向与非靶向结合, 从“发现”到“验证”, 更好地发挥代谢组学的作用。

1 代谢组学的研究方法

代谢组学仍处于快速发展阶段, 因此随着应用范围的扩大, 其方法学也在不断地发展^[11]。代谢组学的方法学涵盖样品制备、数据采集、数据挖掘等各方面。

1.1 样品制备方法

代谢组学可用于研究多种不同属性的样品, 如体液(尿、血清/血浆)、粪便、组织器官提取物及细胞等。为了准确测定代谢物浓度用于后续生物学解释, 必须根据样品不同属性选择可靠的样品制备方法^[12]。理想的样品制备方法应该具备: (1)尽可能多地提取样品中的代谢物; (2)简单、耗时短, 以防止制备过程中代谢物损失或降解; (3)可重复; (4)包含代谢淬灭。生物样品在体内酶的作用下, 代谢物很容易发生降解, 为避免或减少代谢物的降解需采取一定的措施抑制酶的活性, 即代谢淬灭, 如立即用液氮冷冻或用酸处理, 组织样品可以用冷甲醇等冷激, 这样才能代表取样时间点的代谢组分^[13]。一般的样品制备程序为: 代谢淬灭—冻干—样品均化—物质提取^[6,14-16]。

1.2 数据采集方法

代谢物的分离和检测是代谢组学数据采集的两个核心组成部分。分离主要采用各种色谱技术, 如气相色谱(gas chromatography, GC)、液相色谱(liquid chromatography, LC)及毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)等, 而检测目前主要是使用质谱(mass spectrometer, MS)、核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)等手段。按照检测方法不同, 常用的数据采集方法可分为两类: 基于质谱(MS)和基于核磁共振(NMR)的数据采集方法。

MS分析的核心是将分离得到的化合物进行电离, 得到特异性的离子, 这是物质定性的依据。直接的MS是高通量识别大量生物样品的有效方法。MS和分离方法的连用能通过提供多维数据(如质荷比、保留时间和峰面积组成的三维数据)提高物质检测的分辨率。GC-MS常用于分析挥发物和耐热聚合物; LC-MS可以检测除了极易挥发的物质以外大部分的有机化合物; CE-MS可检测极性 or 带电代谢物, 它与GC、LC不同的选择性使其成为分析带电物质的潜在工具。MS相对于NMR最主要的优点是它的高度敏感性, 能够检测出微量的代谢物^[17]。另一个优点是, 特别是和分离技术连用时, 能够在复杂的混合物中分离出单独的化合物。但是, 对比NMR来说, MS的再现性较差, 限制了它在不能长期保存的样品研究中的使用^[18]。

NMR是一种无损、高通量的检测技术, 其标记物的鉴定是通过代谢物特定的核磁共振化学位移与相同溶剂条件下的参考化合物的对比进行的。NMR相对于MS的优点是信号强度直接与代谢物浓度相关, 使得NMR成为绝对定量的方法。¹H-NMR应用很广, 因为有机分子中氢原子广泛存在, 检测H相对于¹³C或¹⁵N灵敏度更高、分析速度也更快。然而, ¹H-NMR光谱通常很紧凑, 因为信号重叠可能使得某种代谢物的检测受阻或产生偏差, 而且不敏感(比MS低好几个数量级)。另外, 同分异构体之间分子量、保留时间和NMR化学位移都是一样的, 这就限制了NMR在物质定性中的应用^[18-19]。

各方法的适用条件及优缺点详见表1。

1.3 数据挖掘方法

代谢组学的数据都很复杂, 需要利用统计学、化学计量学等方法进行分析。进行统计学分析前, 还需要经过数据预处理, 如基线修正、峰拾取、峰对齐、降噪、去卷积等。这些过程可通过一系列软件包实现, 如MetAlign^[20]、XCMS^[8,11,21]等。

数据分析主要应用模式识别技术, 包括非监督模式识别方法和有监督模式识别方法^[22]。非监督模式识别方法是不对样本数据进行分组直接进行分析的方法, 可以在不具备样本分组信息的情况下对高维数据降维, 旨在认识多维空间数据点的潜在特点和相互关系。主要的分析方式有主成分分析(principal component analysis, PCA)和系统聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)。因为非监督模

表1 常用数据采集方法比较
Table 1 Comparing methods of data collection

分析方法 Analytical methods	定性依据 Qualitative basises	分类 Classifications	适用条件 Application conditions	优点 Advantages	缺点 Disadvantages	参考文献 References
Based on MS	Ionization of interested components	Used alone: TOF LTQ-Orbitrap FT-ICR Tandem with seperation approaches: GC-MS LC-MS CE-MS	High-throughput scanning of multiple samples GC: volatiles LC: semi polar metabolites CE: ionic compounds	High throughput, wide dynamic range, high resolution, can be combined with other techniques	Poor reproducibility, samples can't be kept for a long time	[17]
Based on NMR	NMR chemical shift	¹ H-NMR ¹³ C-NMR ¹⁵ N-NMR	Fast detection	Simple sample preparation, strong structure elucidation power	Signal overlap, low sensitivity, limited dynamic range	[18-19]

式识别方法中样本数据不分组, 当样本组间差异不明显, 而组内差异较大时, 难以挖掘组间差异^[23-24]。有监督模式识别方法恰能解决这一问题。有监督模式识别方法是将样本按照类别进行分组后再分析, 从而忽略组内差异, 突出组间差异。常见的方法有偏最小二乘法(partial least squares, PLS)、线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA)、神经网络(neural networks, NN)等^[23]。

2 代谢组学的应用

定性和定量分析生物样品中的初级、次级代谢物能够反映特定条件下的生物细胞状态, 有助于深刻认识调控生物生化表型的细胞水平进程。近年来, 代谢组学迅速发展, 已经渗透到生命科学研究的各个方面。

植物生长过程中不断受到外界胁迫, 包括生物胁迫与非生物胁迫^[25]。代谢组学在植物响应逆境胁迫中的应用, 能够鉴定出系统获得抗性相关的小分子物质以及阻止病原入侵的分子前体物质, 不仅作为寻找新的防御化合物的基础, 也作为描述植物防御状态的标记^[26]。以代谢组学为主, 综合各种组学分析方法能有效识别参与植物代谢过程的基因的功能^[27], 结合遗传学方法, 在生产实践中可以起到筛选抗性品种、辅助育种的作用^[28-30]。

真菌侵染是植物生物胁迫的主要来源之一。在与病原真菌互作的过程中, 植物的代谢和形态学表型都会发生大幅度的改变。在代谢水平上的响应包括: 产生毒性物质杀死病原体或抑制病原体生长, 或

者产生信号分子调整代谢过程^[31]。同时, 植物病原也通过操纵寄主代谢来干涉防御反应, 诱导有利的营养条件。病原真菌一旦成功侵入植物, 将会严重干扰植物的正常代谢以满足自身的营养吸收和利用。因此, 抗病与感病植物品种在病原真菌入侵后的代谢谱变化不同。通过分析代谢组分的变化规律, 代谢组学已经成为研究小分子物质在植物(包括非模式植物)-病原真菌互作过程中的作用的一种有效方法^[26]。

2.1 植物对死体营养病原真菌的代谢组学响应

赤霉病(*Fusarium head blight*, FHB)是一种对小麦、大麦、燕麦、黑麦等经济作物破坏性极强的真菌病害, 不仅造成作物产量和质量大幅下降, 病原菌还能产生真菌毒素影响粮食安全。最常见的赤霉病病原菌是禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)和黄色镰刀菌(*F. culmorum*)^[32]。

镰刀属真菌是进行死体营养的病原菌, 在以寄主植物为营养前, 使用真菌毒素杀死植物组织。真菌毒素脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)是最典型的一种真菌毒素^[10]。研究表明, 抗赤霉病的小麦品种中毒素含量很高, 但发病情况很轻, 这表明DON或其他毒素污染农作物的程度与赤霉病发病率并不是正相关^[33]。在小麦和大麦中发现了100多种赤霉病抗性相关数量性状位点, 表明赤霉病抗性有多重机制。然而, 只有Qfhs.ndsu-3BS位点的功能已知, 它参与了DON脱毒成为低毒的DON-3-O-葡萄糖苷(deoxynivalenol-3-O-glucoside, D3G)的过程^[34-35]。受病原侵染的样品中, 几种植物抗性相关

代谢物, 如茉莉酸、双氢-7-羟基苦甘蓝酮、山萘酚-3-O-葡萄糖苷-7-O-鼠李糖苷、4-甲氧桂皮酸等含量的增加和DON/D3G浓度的增加呈正相关^[10]。

抗病和感病型大麦以及产毒素、不产毒素的禾谷镰刀菌菌株组成的复合系统是研究大麦对赤霉病的代谢响应的理想模型^[34]。研究发现, 赤霉病菌侵染时, 抗性大麦体内的类黄酮、类苯基丙烷、脂肪酸和萜类途径要比敏感型大麦水平高^[36]。

在小麦中, *Fhb1*(小麦赤霉病1号抗性位点)基因的数量性状位点与赤霉病抗性直接相关。蛋白质组学研究确定了这些途径的影响, 以及氧化迸发和PR-1、1,3- β -葡聚糖苷、几丁质酶、PR-10蛋白的相关作用。此外, 甲硫氨酸合成酶、S-腺苷甲硫氨酸合成酶、N⁵,N¹⁰-亚甲基-四氢叶酸还原酶、腺苷高半胱氨酸水解酶等增强了乙烯和类苯基丙烷途径的活性, 在小麦抗性品种中活性更高。*Fhb1*基因参与抗性主要是因为它参与调节类苯基丙烷途径。这些研究也表明, JA-Ile(茉莉酸异亮氨酸)、HCAAs(羟基肉桂酸酰胺, 苯酚聚胺偶合物)如酰基腐胺/胍基丁胺和麦麸腐胺/胍基丁胺在抗性小麦品种中过量积累。这些抗性主要归因于类苯基丙烷、萜类和脂肪酸代谢途径的激活以及DON脱毒成为D3G^[34]。

2.2 植物对活体/半活体营养病原真菌的代谢组学响应

死体营养的病原菌入侵并杀死寄主细胞, 以细胞残骸为营养来源。而活体营养的病原菌是与活的寄主进行互作, 从入侵的细胞获得营养供应并抑制植物防御^[37]。植物对活体/半活体营养病原真菌的代谢组学响应研究较为清楚的有: 水稻与稻瘟菌、玉米与黑粉菌的互作过程。

2.2.1 水稻与稻瘟菌互作

稻瘟病是由病原真菌稻瘟菌(*Magnaporthe oryzae*)引起的, 在全世界水稻种植区都造成严重减产并导致明显的经济损失。稻瘟菌是半活体营养的, 但在完全亲和互作中只进行活体营养生长。稻瘟菌通过在叶片表面的孢子萌发产生附着胞, 附着胞长出侵染钉侵入植物细胞, 影响植物细胞正常生理活动。

对水稻和稻瘟菌代谢互作的详细研究明确了这一过程中发生了代谢重组^[38]。受侵染的叶片组织显示出病变, 光合作用下降, 积累了丙氨酸、脯氨酸、组氨酸、半胱氨酸、色氨酸等氨基酸, 还有蔗糖、苹果酸、果糖和葡萄糖^[39-40]。这与稻瘟菌活体

营养的生活习惯非常吻合, 但是仍然有类苯基丙烷和酚类的积累, 类似于植物对死体营养的响应。一个可能的解释是: 病原侵染后, 植物体内过氧化物酶(peroxidase, POD)活性升高, 催化H₂O₂作为氧化剂合成木质素、软木脂, 诱导植物细胞壁加固, 这在敏感型水稻中不明显, 因此与抗性品种相比细胞内酚类不足。在侵染的后期, 凋亡细胞的营养渗漏为真菌孢子形成提供能量^[39]。

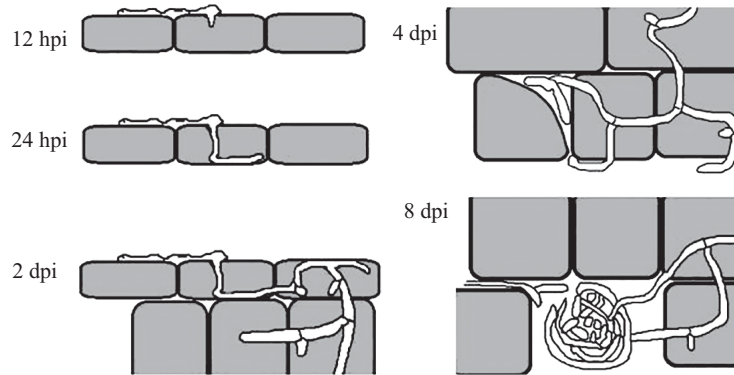
稻瘟菌亲和菌株(致病力强)和非亲和菌株(致病力弱)的结合为研究水稻防御相关的代谢重组提供了条件。Jones等^[40]使用基于MS和NMR的代谢组学方法, 评估了真菌侵染后不同时间点的水稻响应。每个互作中的主要改变包括: 苹果酸、谷氨酰胺、丙氨酸、脯氨酸、肉桂酸和糖类。稻瘟菌侵染敏感型与抗病型水稻, 代谢组也有显著差异, 差别最大的是丙氨酸, 敏感型水稻叶片比抗病型要高30%±9%^[40]。有趣的是, 他们认为, 真菌触发的大量丙氨酸产生可能导致细胞死亡, 从而促进稻瘟菌侵染^[40]。

2.2.2 玉米与黑粉菌互作

玉米黑粉菌(*Ustilago maydis*)是目前研究最为清楚的活体营养病原真菌之一, 能够引起玉米(*Zea mays*)和墨西哥类黍粟(*Euchlaena mexicana*)地上部分形成瘤^[41], 并且在瘤块内产生二倍体冬孢子^[42]。病害发展的不同阶段如图1所示。

真菌效应蛋白维持了病原菌与植物的活体营养互作^[43]。Kämper等^[44]的研究表明, 和致病性强的病原真菌不同, 黑粉菌缺少致病性特征蛋白质, 例如不含一连串的细胞壁降解酶。但是, 它还有一些致病性相关的基因组特征——12个编码分泌蛋白的基因簇。基因表达分析证明, 这些基因簇中的大部分基因在受侵染的组织中被诱导表达^[44]。玉米幼苗侵染实验证明了其中有5个基因簇参与肿瘤形成^[44]。

黑粉菌使得寄主植物的初级和次级代谢都发生了巨大改变, 在整个活体营养阶段都诱导了植物防御反应。侵染12 h时, 植物组织中胁迫相关基因显著表达, 如茉莉酸合成基因, 进而诱导防御相关蛋白质的产生。受侵染第2 d的植物组织中, 许多莽草酸途径相关的基因被诱导表达, 到第4 d、第8 d时, 肿瘤组织中的莽草酸相比未受侵染的叶片增加了约8倍。在侵染第8 d的肿瘤组织中, 苯丙氨酸和酪氨酸分别积累了4倍和5倍, 苯丙氨酸裂解酶



hpi: 侵染后小时数; dpi: 侵染后天数。

hpi: hours post infection; dpi: days post infection.

图1 黑粉菌(*Ustilago maydis*)侵染玉米叶片过程示意图(根据参考文献[41]修改)

Fig.1 Schematic illustration of the development of *Ustilago maydis* in the leaf of maize (modified from reference [41])

(phenylalanine ammonia lyase, PAL)的酶活性和转录水平也显著增加。PAL催化反应的主要产物是羟基肉桂酸(hydroxycinnamic acid, HCA)衍生物,是木质素和黄酮类的合成前体,而木质素和黄酮类则是潜在的植物抗毒素、花青素和紫外保护剂。侵染第8 d,肉眼也可观察到瘤块,受侵染叶片中积累了大量花青素,HCA总含量也增加,己糖含量增加了20多倍,而对照组中己糖含量仍然很低。侵染玉米特定组织的实验表明真菌诱导了莽草酸途径和类黄酮途径^[41]。

3 问题与展望

代谢组学仍处于发展初期,要充分发挥其在植物-病原真菌互作研究中的潜能还面临许多的挑战,这些挑战涉及代谢组学研究的各个阶段^[45]。(1)数据采集:MS方法中样品处理量增加是以缩小代谢物覆盖范围为代价的。一些新兴技术,如微流体、微型化分离技术等可能实现快速而又全面地代谢物分析^[46]。此外,传统的代谢组学分析的生物样品都是离体的,不仅样品制备过程复杂,得到的数据也不能完全反映真实的生物体系^[47]。MS分析法中一类新型电离源——敞开式大气压离子源,无需或只需很少样品前处理步骤,在敞开的大气压环境中直接对活体样品表面进行离子化,可以实现生物活体上进行分析^[47-48]。基于这类离子源的MS分析技术,如二次电喷雾电离(secondary electrospray ionization, SESI)、激光消融电喷雾电离(laser ablation electrospray ionization, LAESI)、基质辅助激光解吸电喷雾电离(matrix assisted laser desorption electrospray ionization, MALDESI),在活体组织代谢

组分析中的应用,将大大提高代谢组学数据采集的效率和解释生物学机理的真实性^[49-50]。(2)代谢物鉴定:非靶向代谢组研究中要将分析数据转变成有意义的生物学信息,代谢物的鉴定是必不可少的。现阶段代谢物鉴定主要依赖于分析平台、方法的稳定性以及数据库等^[51]。然而现有的代谢组数据库还很有限,特别是非模式植物的数据库^[19]。(3)生物学解释:按照代谢途径识别、解析细胞进程是代谢组学研究的目标之一,可以通过鉴定相关代谢物并映射到特定代谢途径上来实现。但是因为细胞进程的复杂性以及鉴定单个代谢物的难度,这一步骤实施起来并不容易。Dubey等^[52]提出了一种新的方法——ChemSMP(化学位移到代谢途径),不需要鉴定与分析单个代谢物,而是从二维的NMR波谱中得到化学位移,直接识别有效的代谢途径,实现快速分析。

在植物-病原真菌互作研究中,利用代谢组学可以识别鉴定植物体内由病原诱导产生的新型抗菌物质,但是,要全面准确地评价互作相关的代谢物以及这些代谢物的特定功能还需要更多的研究^[31]。将基因组学、转录组学、蛋白质组学与代谢组学方法结合能够更好地识别植物-病原互作过程中新的代谢物和代谢途径^[26],有助于从整体水平上把握植物应答病原真菌胁迫的机制,这在生物学研究及农业应用方面有重要意义。然而,目前国内在这一方面的研究还鲜有报道,充分发挥代谢组学在植物真菌病害研究中的应用,进而推动农作物病害防治工作任重而道远。

参考文献 (References)

- 1 Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F. Systematic

- functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol* 1998; 16(9): 373-8.
- 2 Fiehn O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comp Funct Genomics* 2001; 2(3): 155-68.
- 3 Ryan D, Robards K. Metabolomics: the greatest omics of them all? *Anal Chem* 2006; 78(23): 7954-8.
- 4 Raamsdonk LM, Teusink B, Broadhurst D, Zhang N, Hayes A, Walsh MC, *et al.* A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nat Biotechnol* 2001; 19(1): 45-50.
- 5 Lindon J C, Holmes E, Nicholson JK. Peer Reviewed: So what's the deal with metabolomics? *Anal Chem* 2003; 75(17): 384A-91A.
- 6 Fiehn O. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 2002; 48(1/2): 155-71.
- 7 Kato H, Izumi Y, Hasunuma T, Matsuda F, Kondo A. Widely targeted metabolic profiling analysis of yeast central metabolites. *J Biosci Bioeng* 2012; 113(5): 665-73.
- 8 Hall R, Beale M, Fiehn O, Hardy N, Sumner L, Bino R. Plant metabolomics: the missing link in functional genomics strategies. *Plant Cell* 2002; 14(7): 1437-40.
- 9 Tugizimana F, Piater L, Dubery I. Plant metabolomics: A new frontier in phytochemical analysis. *S Afr J Sci* 2013; 109(5/6): 1-11.
- 10 Cajka T, Vaclavikova M, Dzuman Z, Vaclavik L, Ovesna J, Hajslova J. Rapid LC-MS-based metabolomics method to study the *Fusarium* infection of barley. *J Sep Sci* 2014; 37(8): 912-9.
- 11 Li N, Song YP, Tang H, Wang Y. Recent developments in sample preparation and data pre-treatment in metabolomics research. *Arch Biochem Biophys* 2015; doi: 10.1016/j.abb.2015.08.024.
- 12 Ahmad S, Veyrat N, Gordon-Weeks R, Zhang Y, Martin J, Smart L, *et al.* Benzoxazinoid metabolites regulate innate immunity against aphids and fungi in maize. *Plant Physiol* 2011; 157(1): 317-27.
- 13 Vuckovic D. Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2012; 403(6): 1523-48.
- 14 Gonzalez B, François J, Renaud M. A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. *Yeast* 1997; 13(14): 1347-55.
- 15 Fiehn O, Kopka J, Trethewey RN, Willmitzer L. Identification of uncommon plant metabolites based on calculation of elemental compositions using gas chromatography and quadrupole mass spectrometry. *Anal Chem* 2000; 72(15): 3573-80.
- 16 Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat Protoc* 2006; 1(1): 387-96.
- 17 Balmer D, Papajewski DV, Planchamp C, Glauser G, Mauch-Mani B. Induced resistance in maize is based on organ-specific defence responses. *Plant J* 2013; 74(2): 213-5.
- 18 Kim HK, Choi YH, Verpoorte R. NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nat Protoc* 2010; 5(3): 536-49.
- 19 Creek D, Dunn W, Fiehn O, Griffin J, Hall R, Lei Z, *et al.* Metabolite identification: Are you sure? And how do your peers gauge your confidence? *Metabolomics* 2014; 10(3): 350-3.
- 20 Lommen A. MetAlign: Interface-driven, versatile metabolomics tool for hyphenated full-scan mass spectrometry data pre-processing. *Anal Chem* 2009; 81(8): 3079-86.
- 21 Wei X, Shi X, Kim S, Zhang L, Patrick JS, Binkley J, *et al.* Data preprocessing method for liquid chromatography-mass spectrometry based metabolomics. *Anal Chem* 2012; 84(18): 7963-71.
- 22 Fukusaki E, Kobayashi A. Plant metabolomics: Potential for practical operation. *J Biosci Biol* 2005; 100(4): 347-54.
- 23 Mastrangelo A, Ferrarini A, Rey-Stolle F, Garcia A, Barbas C. From sample treatment to biomarker discovery: A tutorial for untargeted metabolomics based on GC-(EI)-Q-MS. *Anal Chim Acta* 2015; 900: 21-35.
- 24 Taylor J, King RD, Altmann T, Fiehn O. Application of metabolomics to plant genotype discrimination using statistics and machine learning. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2002; 18(Suppl 2): S241-8.
- 25 Nakabayashi R, Saito K. Integrated metabolomics for abiotic stress responses in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2015; 24: 10-6.
- 26 Feussner I, Polle A. What the transcriptome does not tell - proteomics and metabolomics are closer to the plants' pathophenotype. *Curr Opin Plant Biol* 2015; 26: 26-31.
- 27 Saito K. Phytochemical genomics—a new trend. *Curr Opin Plant Biol* 2013; 16(3): 373-80.
- 28 Hamzehzarghani H, Kushalappa A, Dion Y, Rioux S, Comeau A, Yaylayan V, *et al.* Metabolic profiling and factor analysis to discriminate quantitative resistance in wheat cultivars against *Fusarium* head blight. *Physio Mol Plant Pathol* 2005; 66(4): 119-33.
- 29 Swarbrick PJ, Schulze-Lefert P, Scholes JD. Metabolic consequences of susceptibility and resistance (race-specific and broad-spectrum) in barley leaves challenged with powdery mildew. *Plant Cell Environ* 2006; 29(6): 1061-76.
- 30 Gauthier L, Atanasova-Penichon V, Chereau S, Richard-Forget F. Metabolomics to decipher the chemical defense of cereals against *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol accumulation. *Int J Mol Sci* 2015; 16(10): 24839-72.
- 31 Arbona V, Gomez-Cadenas A. Metabolomics of disease resistance in crops. *Curr Issues Mol Biol* 2015; 19: 13-30.
- 32 Bai G, Shaner G. Management and resistance in wheat and barley to *Fusarium* head blight. *Annu Rev Phytopathol* 2004; 42: 135-61.
- 33 Bollina V, Kumaraswamy GK, Kushalappa AC, Choo TM, Dion Y, Rioux S, *et al.* Mass spectrometry-based metabolomics application to identify quantitative resistance-related metabolites in barley against *Fusarium* head blight. *Mol Plant Pathol* 2010; 11(6): 769-82.
- 34 Balmer D, Flors V, Glauser G, Mauch-Mani B. Metabolomics of cereals under biotic stress: Current knowledge and techniques. *Front Plant Sci* 2013; 4(82): 1-12.
- 35 Buerstmayr M, Lemmens M, Steiner B, Buerstmayr H. Advanced backcross QTL mapping of resistance to *Fusarium* head blight and plant morphological traits in a *Triticum macha* × *T. aestivum* population. *Theor Appl Genet* 2011; 123(2): 293-306.
- 36 Choo TM. Breeding barley for resistance to *Fusarium* head blight and mycotoxin accumulation. *Plant Breed Rev* 2006; 26: 125.
- 37 Skibbe DS, Doehlemann G, Fernandes J, Walbot V. Maize tumors caused by *Ustilago maydis* require organ-specific genes in host

- and pathogen. *Science* 2010; 328(5974): 89-92.
- 38 Beckmann M, Parker D, Enot DP, Duval E, Draper J. High-throughput, nontargeted metabolite fingerprinting using nominal mass flow injection electrospray mass spectrometry. *Nat Protoc* 2008; 3(3): 486-504.
- 39 Parker D, Beckmann M, Zubair H, Enot DP, Caracuel-Rios Z, Overy DP, *et al.* Metabolomic analysis reveals a common pattern of metabolic re-programming during invasion of three host plant species by *Magnaporthe grisea*. *Plant J* 2009; 59(5): 723-37.
- 40 Jones OAH, Maguire ML, Griffin JL, Jung Y-H, Shibato J, Rakwal R, *et al.* Using metabolic profiling to assess plant-pathogen interactions: An example using rice (*Oryza sativa*) and the blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Eur J Plant Pathol* 2010; 129(4): 539-54.
- 41 Doehlemann G, Wahl R, Horst RJ, Voll LM, Usadel B, Poree F, *et al.* Reprogramming a maize plant: Transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *Plant J* 2008; 56(2): 181-95.
- 42 Lambie SC. Lipid and acetate metabolism influence host colonization by the fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. Thesis/Dissertation 2014; doi: 10.14288/1.0135647.
- 43 Boller T, He SY. Innate immunity in plants: An arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* 2009; 324(5928): 742-4.
- 44 Kamper J, Kahmann R, Bolker M, Ma LJ, Brefort T, Saville BJ, *et al.* Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* 2006; 444(7115): 97-101.
- 45 More T, RoyChoudhury S, Gollapalli K, Patel SK, Gowda H, Chaudhury K, *et al.* Metabolomics and its integration with systems biology: PSI 2014 conference panel discussion report. *J Proteomics* 2015; 127(Pt A): 73-9.
- 46 de Raad M, Fischer CR, Northen TR. High-throughput platforms for metabolomics. *Curr Opin Chem Biol* 2015; 30: 7-13.
- 47 Bartels B, Svatos A. Spatially resolved *in vivo* plant metabolomics by laser ablation-based mass spectrometry imaging (MSI) techniques: LDI-MSI and LAESI. *Front Plant Sci* 2015; 6: 471.
- 48 栗 则, 张佳玲, 常翠兰, 白玉, 刘虎威. 敞开式离子化质谱新技术及其应用. *食品安全质量检测学报*(Li Ze, Zhang Jialing, Chang Cuilan, Bai Yu, Liu Huwei. New technologies and their applications of ambient mass spectrometry. *J Food Safety Quality*) 2012; 3(5): 345-54.
- 49 Etalo DW, de Vos RC, Joosten MH, Hall RD. Spatially resolved plant metabolomics: Some potentials and limitations of laser-ablation electrospray ionization mass spectrometry metabolite imaging. *Plant Physiol* 2015; 169(3): 1424-35.
- 50 Shrestha B, Vertes A. Relative quantitation in single-cell metabolomics by laser ablation electrospray mass spectrometry. *Methods Mol Biol* 2014; 1083: 31-9.
- 51 Ogura T, Bamba T, Fukusaki E. Development of a practical metabolite identification technique for non-targeted metabolomics. *J Chromatogr A* 2013; 1301: 73-9.
- 52 Dubey A, Rangarajan A, Pal D, Atreya HS. Chemical shifts to metabolic pathways: Identifying metabolic pathways directly from a single 2D NMR spectrum. *Anal Chem* 2015; doi: 10.1021/acs.analchem.5b03082.