

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2026.08.007

引用格式:李宜娟,白玉芳,陈禹翀,等. Box-Behnken响应面法优化达乌里胡枝子根瘤菌代谢产物前处理方法[J]. 草地学报, 2026, 34(8):2826–2836

LI Yi-juan, BAI Yu-fang, CHEN Yu-chong, et al. Optimization of Pretreatment Methods for Metabolites of Rhizobia Isolated from *Lespedeza davurica* Using Box-Behnken Response Surface Methodology[J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34(8):2826–2836

Box-Behnken响应面法优化达乌里胡枝子根瘤菌代谢产物前处理方法

李宜娟^{1,2,3}, 白玉芳^{1,2,3}, 陈禹翀^{1,2,3}, 马洁⁴, 杨凯元^{1,2,3}, 崔清亮⁴, 赵祥^{1,2,3*}

(1. 山西农业大学草业学院, 山西 太谷 030800; 2. 草地生态保护与乡土草种质创新山西省重点实验室, 山西 太谷 030801; 3. 山西右玉黄土高原草地生态系统国家定位观测研究站, 山西 右玉 037200; 4. 山西农业大学农业工程学院, 山西 太谷 030800)

摘要: 豆科植物-根瘤菌共生体在氮循环中至关重要, 其根系代谢产物显著影响结瘤过程。达乌里胡枝子(*Lespedeza daurica*)根瘤菌代谢产物前处理检测方法尚未进行系统优化。通过优化前处理(超声温度A及时间B、衍生温度C及时间D), 提高其代谢产物提取效率。采用单因素试验筛选检测条件范围, 再采用四因素三水平 Box-Behnken响应面法优化设计(超声温度30~40℃、超声时间7~11 min、衍生时间20~100 min、衍生温度50~90℃), 建立二次回归模型确定最优条件并验证其可靠性。单因素试验确定检测条件: 超声温度35℃、超声时间9 min、衍生温度70℃、衍生时间60 min; 响应面模型($R^2=0.9035$)显示一次项A、C, 交互项CD和二次项 A^2 、 C^2 、 D^2 对结果影响极显著($P<0.01$), 交互项AD影响显著($P<0.05$)。优化后共检测到代谢产物145个, 较优化前提高了198.60%, 误差3.5%; 方法学验证: 内标物质L-2-氯-苯丙氨酸的峰面积RSD为8.2% ($n=6$), 信噪比(S:N)=9.9:1, 符合代谢组学检测要求。确定达乌里胡枝子根瘤菌代谢产物检测前处理方法, 为其提取与检测提供技术依据。

关键词: 达乌里胡枝子; 根瘤菌代谢产物; 前处理方法优化

中图分类号: S541.5

文献标识码: A

文章编号: 1007-0435(2026)08-2826-11

Optimization of Pretreatment Methods for Metabolites of Rhizobia Isolated from *Lespedeza davurica* Using Box-Behnken Response Surface Methodology

LI Yi-juan^{1,2,3}, BAI Yu-fang^{1,2,3}, CHEN Yu-chong^{1,2,3}, MA Jie⁴, YANG Kai-yuan^{1,2,3}, CUI Qing-liang⁴, ZHAO Xiang^{1,2,3*}

(1. College of Grassland Science, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi Province 030800, China; 2. Shanxi Key Laboratory of Grassland Ecological Protection and Native Grass Germplasm Innovation, Taigu, Shanxi Province 030801, China; 3. Youyu Loess Plateau Grassland Ecosystem National Research Station, Youyu, Shanxi Province 037200, China; 4. College of Agricultural Engineering, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi Province 030800, China)

Abstract: The symbiont formed by legumes and rhizobia plays a crucial role in the nitrogen cycle, and root exudates significantly affect the nodulation process. The pretreatment and detection methods for metabolites of rhizobia from *Lespedeza daurica* have not been systematically optimized. In this study, the extraction efficiency of rhizobial metabolites was improved by optimizing pretreatment conditions, including ultrasonic temperature (A), ultrasonic time (B), derivatization temperature (C), and derivatization time (D). Single-factor experiments were used to determine the ranges of detection conditions, followed by a four-factor, three-level Box-

收稿日期: 2025-09-29; 修回日期: 2025-11-21

基金项目: 山西省重点研发计划项目(2402140601011); 中央引导地方科技发展资金项目(YDZJXSX2024B008)资助

作者简介: 李宜娟(2000-), 女, 汉族, 甘肃白银人, 硕士研究生主要从事草地微生物学研究, E-mail: 1328636321@qq.com; *通信作者
Author for correspondence, E-mail: sxndzhaox@126.com

Behnken response surface methodology (ultrasonic temperature: 30–40°C ultrasonic time: 7–11 min derivatization time: 20–100 min derivatization temperature: 50–90°C) for optimization design. A quadratic regression model was established to determine the optimal conditions and verify their reliability. The optimal conditions determined by single-factor experiments were ultrasonic temperature 35°C, ultrasonic time 9 min, derivatization temperature 70°C, and derivatization time 60 min. The response surface model ($R^2=0.9035$) showed that the linear terms A and C, the interaction term CD, and the quadratic terms A^2 , C^2 , and D^2 had extremely significant effects on the results ($P<0.01$), while the interaction term AD had a significant effect ($P<0.05$). After optimization, 145 metabolites were detected, representing an increase of 198.60% compared with the pre-optimization level, with an error of 3.5%. Methodological validation showed that the peak area RSD of the internal standard L-2-chloro-phenylalanine was 8.2% ($n=6$), and the signal-to-noise ratio (S:N) was 9.9:1, which met the requirements for metabolomic detection. This study established a pretreatment method for the detection of metabolites from rhizobia of *Lespedeza daurica*, providing a technical basis for their extraction and analysis.

Key words: *Lespedeza daurica*; Metabolites of Rhizobia; Optimization of pretreatment methods

豆科植物与根瘤菌(*Rhizobium*)共生体是自然界中固氮能力最强的系统,其年固氮量约为 2.59×10^7 t,占地球陆地生态系统生物固氮总量的29.4%,在全球氮循环中发挥着不可替代的作用^[1]。这一共生体系的发生由宿主植物与根瘤菌协同调控,作用期间会产生类黄酮、生长素、细胞分裂素等多种代谢产物。这些物质不仅是共生信号传递的核心载体^[2]——如类黄酮可诱导根瘤菌合成结瘤因子,启动根瘤形成——还通过浓度调控(如生长素的适宜水平)直接影响根瘤的发育与功能^[3]。达乌里胡枝子(*Lespedeza daurica*)作为豆科胡枝子属多年生半灌木,广泛分布于我国东北、华北至西南地区,因其在干旱、寒冷、贫瘠生境中具有强适应性,在草地生态修复与可持续农业中可作为关键牧草^[4],其抗逆性与根瘤菌的共生固氮能力密切相关^[5]。但目前针对该物种与根瘤菌互作的代谢产物研究较匮乏,代谢产物的检测方法尚未得到系统优化,其共生机制解析与活性物质开发难以推进。

代谢组学技术是揭示共生代谢调控的重要工具,其中气相色谱-质谱联用(GC-MS)因高灵敏度和对挥发性化合物的高适配性,在微生物代谢物检测中具有重要作用^[6-7]。然而,代谢产物的提取效率与检测灵敏度受超声温度、衍生化时间等条件显著影响,且不同样本的最优参数间存在差异,需对其进行针对性优化^[8]。响应面分析法(Response surface methodology, RSM)是通过构建二次回归模型,可在较少试验次数内解析多因素及其交互作用对结果的影响,精准预测最优条件,克服了传统单因素试验忽略交互作用的缺陷,已成功应用于植物与微生物代谢产物前处理方法中^[9]。本研究基于已有研究基础以达乌里胡枝子根瘤分离的华氏新根瘤菌TG64(*Neorhizobium huautlense*)为对象,首

先通过单因素试验筛选超声温度、超声时间、衍生温度及衍生时间的检测范围,再结合Box-Behnken设计优化GC-MS检测条件,旨在确定根瘤菌代谢产物高效检测体系的前处理方法,为达乌里胡枝子与根瘤菌的共生机制与代谢活性物质开发提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试植物为‘晋农1号’达乌里胡枝子,由山西农业大学草业学院提供;供试菌株为华氏新根瘤菌TG64(*Neorhizobium huautlense*),由山西农业大学草业学院微生物实验室提供。

1.2 培养基

酵母蛋白胨(Tryptone yeast, TY)液体培养基^[10]:胰蛋白胨5.00 g、酵母粉3.00 g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.70 g、pH 6.8~7.2、蒸馏水1000 mL。

酵母甘露醇(Yeast mannitol agar, YMA)琼脂培养基^[11]:甘露醇10 g、 K_2HPO_4 0.25 g、 KH_2PO_4 0.25 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.20 g、NaCl 0.10 g、酵母粉3 g、琼脂18 g、蒸馏水1000 mL、pH值6.8~7.0。

1.3 菌种活化及菌悬液制备

将供试菌株从-80°C低温冰箱取出后,置于37°C水浴中热激2 min,使其快速复苏。用无菌接种环将复苏菌株划线接种在YMA培养基上,28°C恒温培养24 h。挑取单菌落接种在TY液体培养基中,28°C、 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 恒温振荡培养24 h。

取10 mL上述培养液,置于离心机上4°C、 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,倒去上清液,用无菌水

冲洗3次,收集菌体。向获得的菌体中加入5 mL无菌水,充分混匀,调节OD₆₀₀为0.5,备用。

1.4 样品采集与处理

将OD₆₀₀=0.5的根瘤菌菌液接入盆栽达乌里胡枝子中,培养一月后进行采样。检测仪器为气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)(GC MS-5977B,美国),方法参考文献^[11-12]进行检测。

称取90 mg样品,放入1.50 mL的离心管中,依次加入两颗小钢珠,540 μ L的冷甲醇和60 μ L内标(L-2-氯-苯丙氨酸,0.3 mg·mL⁻¹,甲醇配置),在-80℃冰箱中放置2 min。在研磨机中以60 Hz研磨10 min,然后取出离心管放入超声仪35℃超声9 min。将超声后的样品进行离心,于4℃,12 000 r·min⁻¹离心15 min。取500 μ L上清液,转入离心管自然风干,备用。向离心管中加入200 μ L的甲氧胺盐酸吡啶溶液(15 mg·mL⁻¹),快速混匀至完全溶解,37℃恒温箱放置1.5 h后取出。再加入200 μ L的BSTFA(含1%TMCS)衍生试剂和40 μ L正己烷,70℃烘箱中放置1 h。甲氧胺盐酸吡啶溶液用于将羰基化合物转化为肟类衍生物,BSTFA(含1%TMCS)用于硅烷化衍生,增强极性代谢物(如糖类、氨基酸)的挥发性,以适配GC-MS检测;衍生化效率通过平行试验验证,确保目标物衍生转化率>90%。过0.45 μ m的滤膜过滤到进样小瓶中,待上机检测。

分析仪器为Agilent-8890气相色谱质谱联用仪(Agilent, USA)以及弱极性HP-5 ms毛细管色谱柱(30 m×250 μ m I. D.)。衍生化后提取物经过自动进样,以1 μ L体积用无分流模式注入仪器系统进行分析,样品进入质谱检测前经过弱极性的HP-5ms毛细管柱进行分离。载气为高纯氦气,载气流速1.0 mL·min⁻¹,程序升温:8℃·min⁻¹,60~125℃;4℃·min⁻¹,125~210℃;5℃·min⁻¹,210~270℃;10℃·min⁻¹,270~305℃,305℃维持3 min。进样口的温度为260℃,EI源温度为260℃,电子能量为70 eV。质量扫描范围:m·z⁻¹ 50~600,延迟5 min开始采集,采集速度为20谱·s⁻¹。

1.5 根瘤菌代谢产物测定单因素条件筛选试验

超声温度设置30,35,40,45,50℃五个处理,超声时间设置7,8,9,10,11 min五个处理,衍生时间设置20,40,60,80,100 min五个处理,衍生温度设

置50,60,70,80,90℃五个处理,测定代谢产物的产量以确定单因素代谢产物提取的检测条件。每个处理设3次重复。

1.6 根瘤菌代谢产物测定条件的优化试验

在单因素试验的基础上,将超声温度(A)、超声时间(B)、衍生时间(C)及衍生温度(D)为响应因素,代谢产物产量为(Y)响应值,采用Box-Behnken设计4因素3水平的响应面试验对检测条件进行优化(表1)。

表1 达乌里胡枝子根瘤菌代谢产物检测的响应面优化试验因素与水平

Table 1 Response surface optimization experiment factors and levels for detecting metabolites of *Lespedeza dahurica* rhizobia

因素 Factor	水平 Level		
	-1	0	1
A 超声温度 Ultrasonic temperature/℃	30	35	40
B 超声时间 Ultrasonic time/min	7	9	11
C 衍生时间 Derivation time/min	20	60	100
D 衍生温度 Derivation temperature/℃	50	70	90

注:-1,0,1是编码水平,代表该因素的最低水平(下限),中间水平(中心点),最高水平(上限)

Note: -1, 0, 1 are coding levels, representing the lowest level (lower limit), the intermediate level (center point), and the highest level (upper limit) of the factor, respectively

1.7 根瘤菌代谢产物测定优化条件的验证

筛选出最优组合及预测值在100以上的组合,进行重复验证试验,每个组合设置3次重复,使用1.4的方法测定根瘤菌代谢产物的实际含量,结果以平均值±标准差表示。取同一批次样品,按优化后的方法重复处理6次,计算内标物质L-2-氯-苯丙氨酸峰面积的相对标准偏差(Relative standard deviation, RSD)。同时以空白样品为对照,计算内标物质的S:N值。

1.8 数据分析

采用Excel 2019进行数据汇总和整理,Design-Expert 11.0软件对Box-Behnken的试验结果进行分析,用SPSS 26.0统计分析软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA),其结果以平均值±标准差表示。采用Xcalibur 4.2软件进行谱图分析,峰识别参数:信噪比(S:N)≥3,峰宽≥0.1 min;基线校正采用线性校正法;代谢产物定性通过NIST 2020质谱库匹配(匹配度≥80%)。

2 结果与分析

2.1 单因素检测条件对根瘤菌代谢产物检测数量的影响

超声温度 35℃ 的根瘤菌代谢产物检测数量最多,为 130 个,分别比超声温度 30℃、40℃、45℃ 和 50℃ 的代谢产物检测数量显著增加了 27.48%, 11.79%, 19.78% 和 34.15% (图 1a)。超声时间 9 min 时,代谢产物数量最多,为 127 个,分别比超声时间 7 min、8 min、10 min 和 11 min 显著增加了

109.33%, 20.95%, 5.54% 和 4.67% (图 1b)。衍生时间 60 min 最佳,代谢产物检测数量为 94 个,显著高于其他处理的检测数量 ($P < 0.05$)。衍生温度 70℃ 时,代谢产物数量最多,为 93 个,分别比衍生温度 50℃、60℃、80℃ 和 90℃ 显著增加了 91.67%, 39.99%, 24.99% 和 48.92% (图 1c)。衍生时间 60 min 时,代谢产物数量最多,分别比衍生时间 20 min、40 min、80 min 和 100 min 显著增加了 195.77%, 51.10%, 81.29% 和 84.86% (图 1d)。

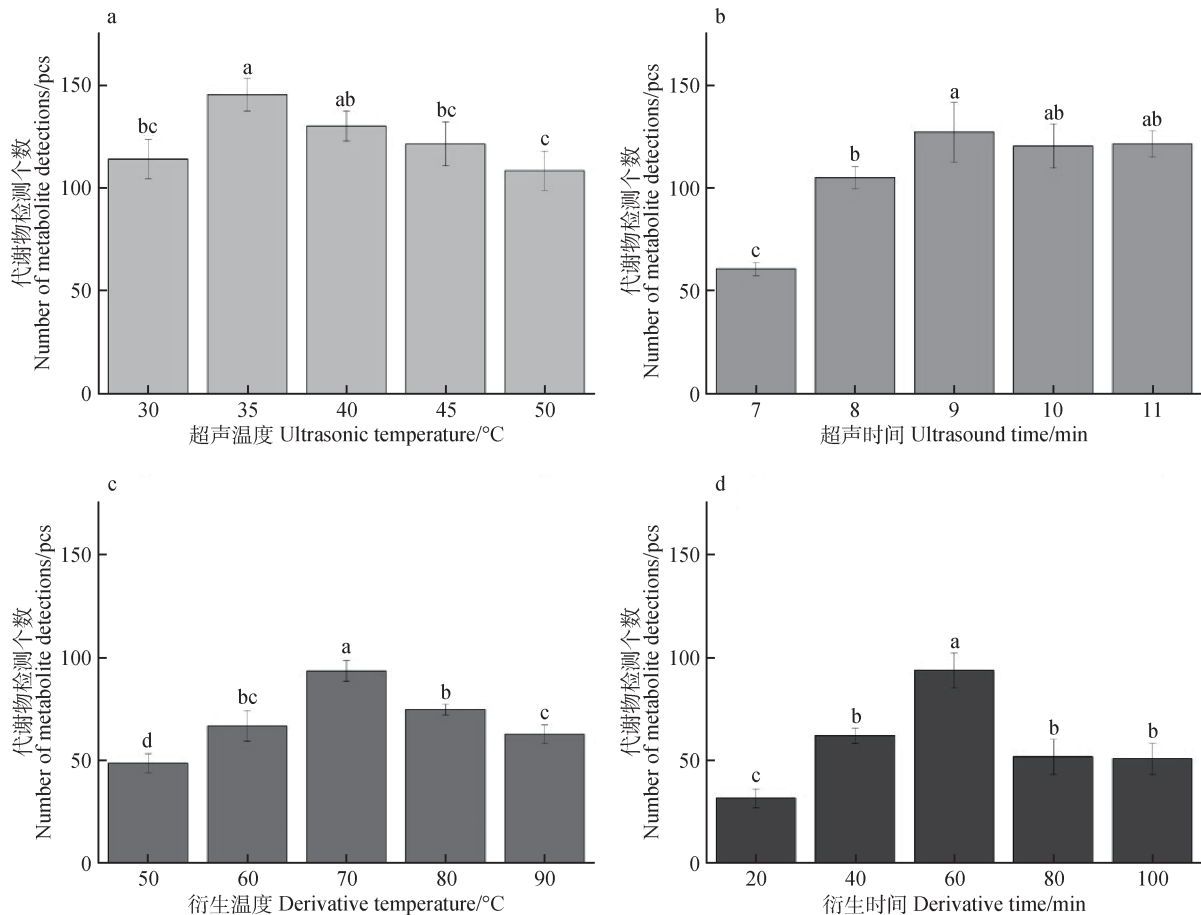


图1 超声温度、超声时间、衍生温度及衍生时间对根瘤菌代谢产物检测数量的影响

Fig. 1 The number of metabolites under different ultrasonic temperature, ultrasonic time, derivative temperature and derivative time
注:图a为超声温度试验结果,图b为超声时间试验结果,图c为衍生温度试验结果,图d为衍生时间试验结果;不同小写字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$);柱状图为平均值±标准偏差

Note: a represents the results of the ultrasonic temperature test, b represents the results of the ultrasonic time test, c represents the results of the derivative temperature test, and d represents the results of the derivative time test; different lowercase letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$); the bar graph shows the mean±standard deviation

2.2 Box-Behnken响应面法优化检测条件对根瘤菌代谢产物检测数量的影响

应用 Box-Behnken 响应面法对四个检测条件

(超声温度 A、超声时间 B、衍生时间 C、衍生温度 D) 交互进行优化,得出根瘤菌代谢产物检测数量见表 2、表 3。

表 2 响应曲面设计及根瘤菌代谢产物检测结果

Table 2 Response surface design and detection results of metabolites from rhizobia

试验号 Test No.	A:超声温度 Ultrasonic temperature/℃	B:超声时间 Ultrasonic time/min	C:衍生时间 Derivation time/min	D:衍生温度 Derivation temperature/℃	代谢产物检测个数 Number of metabolites detected/个
1	35	9	100	90	103
2	35	11	60	50	91
3	35	9	20	50	133
4	35	7	60	50	115
5	35	11	100	70	104
6	35	9	60	70	127
7	30	9	100	70	108
8	40	7	60	70	94
9	35	9	60	70	150
10	35	9	60	70	150
11	35	7	60	90	100
12	40	11	60	70	96
13	35	7	100	70	131
14	40	9	20	70	101
15	35	9	60	70	150
16	35	9	60	70	150
17	30	9	60	90	82
18	35	7	20	70	125
19	40	9	60	90	63
20	35	9	20	90	92
21	35	9	100	50	85
22	40	9	60	50	52
23	30	9	60	50	110
24	30	9	20	70	111
25	30	7	60	70	120
26	35	11	20	70	129
27	30	11	60	70	103
28	35	11	60	90	109
29	40	9	100	70	71

注: 试验号 9, 10, 15, 16 为中心点重复试验 ($n=4$), 验证模型稳定性

Note: Test No. 9, 10, 15 and 16 are center point repeated tests ($n=4$) to verify the stability of the model

通过多元回归分析, 得到检测数量与检测条件的二阶多项式方程:

代谢产物检测个数 $Y=145.4000-13.0833A-4.4167B-7.4167C-3.0833D+4.7500AB-6.7500AC+9.7500AD-7.7500BC+8.2500BD+14.7500CD-34.9917A^2-9.2417B^2-12.2417C^2-31.9917D^2$ 。

若响应面方程模型的 $P<0.0001$ (极显著), 表明建模成功; 失拟值 $P=0.8704>0.05$ (不显著), 表明试验误差较小; 决定系数 $R^2=0.9035$, 表明模型中 90.35% 的试验数据可由模型解释; 变异系数 (CV) 为 7.30%, 表明试验中误差小。一次项 A, C, 交互项 CD 和二次项 A^2, C^2, D^2 对试验结果具有极显著影响 ($P<0.01$), 交互项 AD 对试验结果影响显著 ($P<0.05$), 其余项对试验结果影响不显著。由 F 值得出, 提取方法中影响根瘤菌代谢产物检测的因

素顺序为超声温度>衍生时间>超声时间>衍生温度。

使用 Design-Expert 11.0 绘制三维响应面图和等高线图, 发现响应面均有向下的开口, 交互作用较明显 (图 2-7)。

2.3 Box-Benhken 响应面法优化检测条件的验证

为验证模型方程的拟合度以及单因素条件组合是否为最适条件, 从 Box-Behnken 响应面法 (BBD) 设计的 29 组试验中选取 9 组 (试验号 3, 4, 6, 13, 18, 23, 24, 25, 26) 具有代表性的数据作为验证对象, 应用 Design-Expert 11.0 软件的“模型诊断”模块进行分析。筛选依据如下: 9 组试验覆盖 BBD 设计的关键区域, 包括 2 个中心点 (试验 18, 23)、3 个因素交互临界点 (试验 3, 6, 13) 和 4 个边界条件点

表 3 响应面试验结果方差分析
Table 3 Analysis of variance of response surface test results

方差来源 Variance source	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方根误差 Root mean square error	F 值 F value	P 值 P value
模型	17 406.56	14	1243.33	19.73	<0.0001**
A	2054.08	1	2054.08	32.60	<0.0001**
B	234.08	1	234.08	3.71	0.0745
C	660.08	1	660.08	10.48	0.0060**
D	114.08	1	114.08	1.81	0.1998
AB	90.25	1	90.25	1.43	0.2513
AC	182.25	1	182.25	2.89	0.1111
AD	380.25	1	380.25	6.03	0.0277
BC	240.25	1	240.25	3.81	0.0712
BD	272.25	1	272.25	4.32	0.0565
CD	870.25	1	870.25	13.81	0.0023**
A ²	7942.16	1	7942.16	126.04	<0.0001**
B ²	554.00	1	554.00	8.79	0.0102
C ²	972.05	1	972.05	15.43	0.0015**
D ²	6638.70	1	6638.70	105.35	<0.0001**
残差 Residual	882.2	14	63.01		
失拟项 Anomalistic term	459	10	45.9	0.4338	0.8704
纯误差 Pure error	423.2	4	105.8		
总离差 Total deviation	18 288.76	28			
R ²			0.9035		
变异系数 Coefficient of variation			7.3%		

注:**表示差异极显著($P<0.01$)
Note: ** indicates significant difference ($P<0.01$)

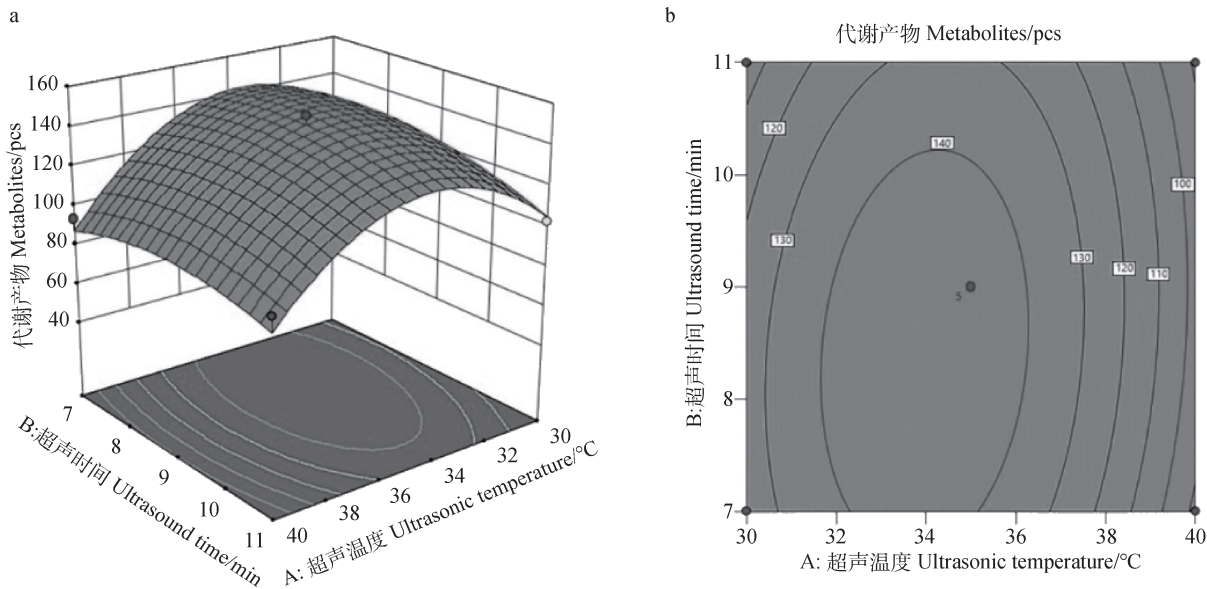


图 2 超声温度和超声时间对代谢产物检测数量交互影响的三维曲面(a)和相应等高线图(b)
Fig. 2 Three dimensional surface (a) and corresponding contour map (b) of the interaction between ultrasonic temperature and ultrasonic time on the number of metabolites

(试验 4, 24, 25, 26), 可全面验证二次回归模型在不同因素水平组合下的预测准确性, 同时包含超声温度 30℃(低温)、40℃(高温), 衍生时间 20 min(短时间)、100 min(长时间)等极端条件, 可验证优化工艺的抗干扰能力。9 组验证结果分别为: 130 ± 3.06 ,

111 ± 3.79 , 123 ± 3.79 , 128 ± 3.00 , 121 ± 3.46 , 106 ± 3.51 , 109 ± 2.65 , 115 ± 4.58 , 124 ± 4.58 。最优条件通过响应面法确定, 同时用于试验验证和基于模型方程预测响应值。实际试验得到的最大提取率为 146 ± 4.04 ($n=3$), 验证了最优的单因素条

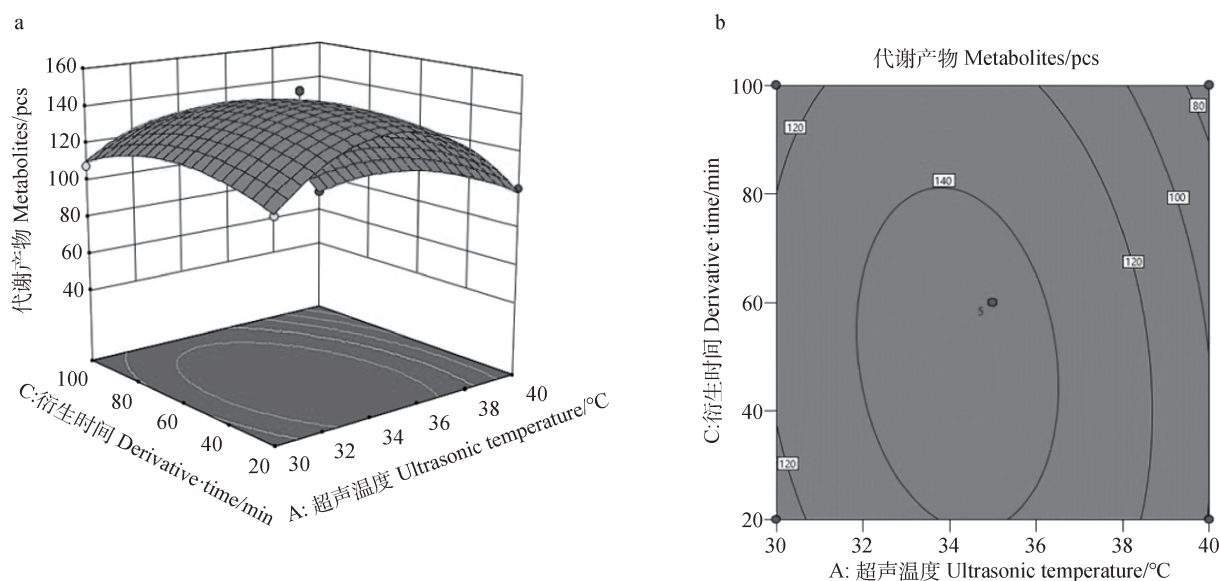


图3 超声温度和衍生时间对代谢产物检测数量交互影响的三维曲面(a)和相应等高线图(b)

Fig. 3 Three dimensional surface (a) and corresponding contour map (b) of the interaction between ultrasonic temperature and derivation time on the number of metabolites

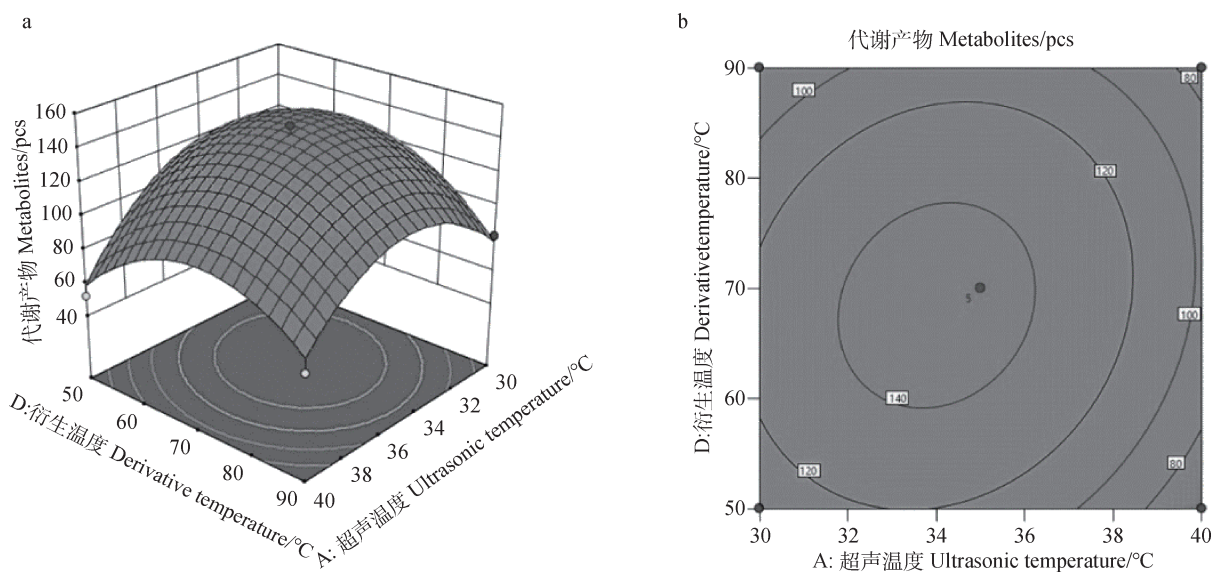


图4 超声温度和衍生温度对代谢产物检测数量交互影响的三维曲面(a)和相应等高线图(b)

Fig. 4 Three dimensional surface (a) and corresponding contour map (b) of the interaction between ultrasonic temperature and derivative temperature on the number of metabolites

件组合在一起也是最优的(表4),实验值与预测值无显著差异,说明该响应模型能有效反映预期的优化效果,该模型具有良好的适用性和准确性。

为保证方法的可靠性,取同一批次样品,按优化后的方法重复处理6次,计算内标物质L-2-氯-苯丙氨酸峰面积的RSD。同时以空白样品为对照,计算内标物质的S:N值。得到的RSD为8.2%($n=6$),小于10%,信噪比为9.9:1(表5),满足GC-MS代谢组学检测对精密度和灵敏度的要求。

3 讨论与结论

关于豆科植物与根瘤菌互作的代谢产物已有较深入研究^[2],但胡枝子属植物相关研究较少,这为本次针对达乌里胡枝子根瘤菌的研究留下了探索空间。刘巧利^[13]从苦马豆根瘤菌中检出黄酮类、生物碱类等多种复杂次生代谢产物,表明该根瘤菌具备合成此类化合物的潜在途径,根瘤菌次生代谢产物多样性可能与宿主种类相关。赵亮^[14]发现黄芪根瘤内生菌的次生代谢产物以黄酮及其苷类、甾体

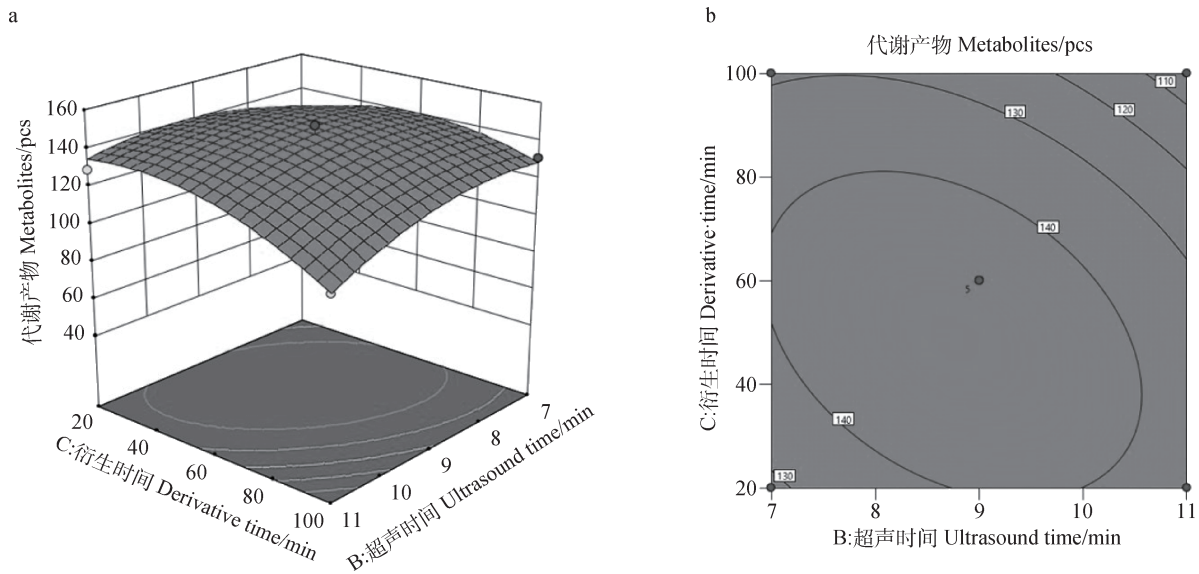


图5 超声时间和衍生时间对代谢产物检测数量交互影响的三维曲面(a)和相应等高线图(b)

Fig. 5 Three dimensional surface (a) and corresponding contour map (b) of the interaction between ultrasonic time and derivation time on the number of metabolites

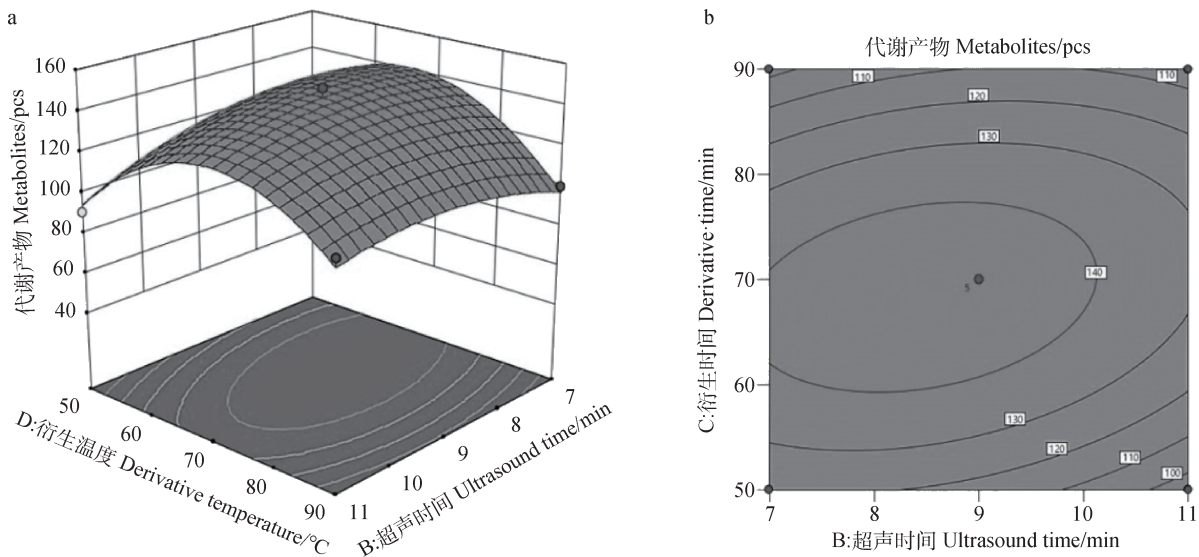


图6 超声时间和衍生温度对代谢产物检测数量交互影响的三维曲面(a)和相应等高线图(b)

Fig. 6 Three dimensional surface (a) and corresponding contour map (b) of the interaction between ultrasonic time and derivative temperature on the number of metabolites

及皂苷类等成分为主,进一步佐证了根瘤菌与宿主在次生代谢产物上存在一定相关性。刘淑霞^[15]研究发现,盐胁迫下根瘤菌SD101与紫花苜蓿表现出高度匹配亲和,该菌可侵入紫花苜蓿根毛以形成共生结瘤固氮关系,揭示了根瘤菌代谢特征与其共生结瘤功能的关联。上述研究均表明,根瘤菌次生代谢产物组成既受宿主植物种类影响,也与其共生固氮功能密切相关,为本研究解析达乌里胡枝子根瘤菌代谢产物特征提供了参考依据。

目前针对达乌里胡枝子根瘤菌代谢产物的研

究较少,同时对其代谢产物的检测方法也较缺乏。因此本试验参考郭云^[12]基于GC-MS非靶向代谢组学的豆科植物分析方法,对超声(温度、时间)与衍生(温度、时间)条件进行优化,确定检测达乌里胡枝子根瘤菌代谢产物的最适GC-MS条件为:超声35℃ 9 min、衍生70℃ 60 min,可为后续该植物代谢产物提取研究奠定基础。

王威等^[16]和张丽媛等^[17]分别研究鹰嘴豆(*Cicer arietinum* L.)、绿豆(*Vigna radiata* (L.) Wilczek)的代谢产物提取工艺,发现最适衍生条件

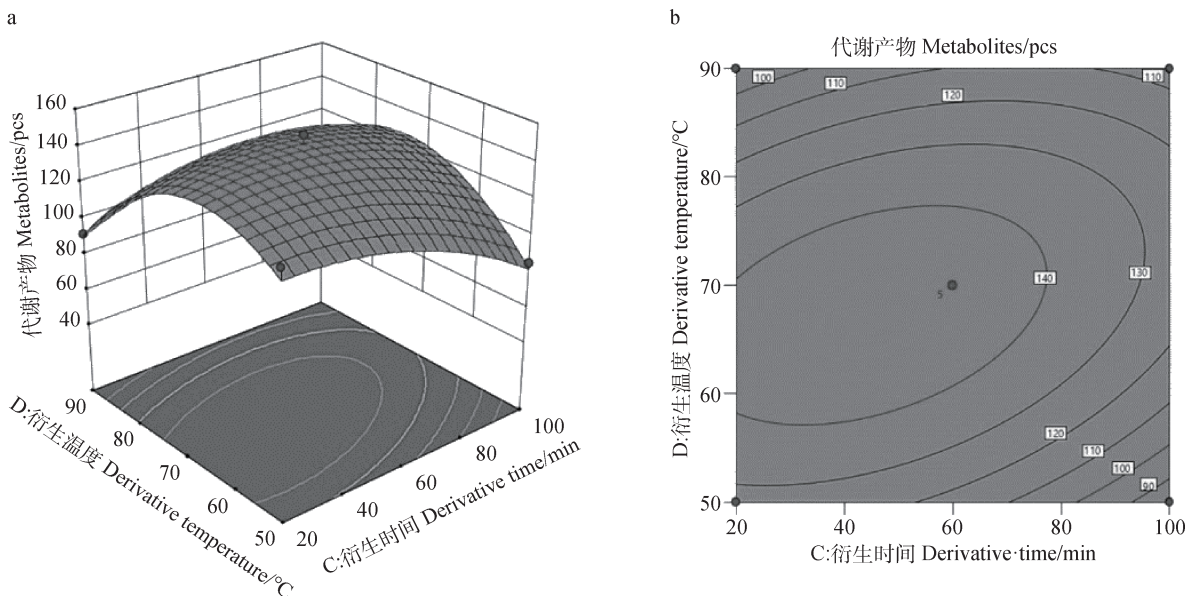


图 7 衍生时间和衍生温度对代谢产物检测数量交互影响的三维曲面(a)和相应等高线图(b)

Fig. 7 Three dimensional surface (a) and corresponding contour map (b) of the interaction of derivative time and derivative temperature on the number of metabolites

表 4 最优条件下代谢产物检测数量的预测值与实验值

Table 4 Predicted and experimental values of the detected number of metabolites under optimal conditions

最优条件 Optimal conditions				代谢产物检测个数 Number of metabolites detected	
超声温度 Ultrasonic temperature/°C	超声时间 Ultrasonic time/min	衍生时间 Derivation time/min	衍生温度 Derivation temperature/°C	试验值 Test value	预测值 Predicted value
35	9	20	50	130±3.06	129
35	7	60	50	111±3.79	110
35	9	60	70	123±3.79	122
35	7	100	70	128±3.00	127
35	7	20	70	121±3.46	120
30	9	60	50	106±3.51	105
30	9	20	70	109±2.65	108
30	7	60	70	115±4.58	114
35	11	20	70	124±4.58	123
35	9	70	60	146±4.04	152

表 5 内标物质的峰面积、峰高、基线噪声峰高以及信噪比

Table 5 Peak area, peak height, baseline noise peak height and signal-to-noise ratio of internal standard substances

试验号 Test No.	内标峰面积 Internal standard peak area	峰高 Peak height	基线噪声峰高 Baseline noise peak height	信噪比(S:N) Signal to noise ratio (S:N)
1	2 492 409.8	1.0×10 ⁶ Counts	0.1×10 ⁶ Counts	10:1
2	2 526 934.2	1.0×10 ⁶ Counts	0.1×10 ⁶ Counts	10:1
3	2 676 592.2	2.0×10 ⁶ Counts	0.2×10 ⁶ Counts	10:1
4	2 545 216.9	1.0×10 ⁶ Counts	0.1×10 ⁶ Counts	10:1
5	2 575 200.2	1.0×10 ⁶ Counts	0.1×10 ⁶ Counts	10:1
6	2 616 228.7	1.8×10 ⁶ Counts	0.2×10 ⁶ Counts	9:1
CK	—	1.0×10 ⁶ Counts	0.1×10 ⁶ Counts	10:1

为 70℃ 60 min, 与本试验结果一致, 证明该条件是检测豆科植物代谢产物的较适衍生参数, 可有效提取多种目标代谢产物。但胡九龙^[18]研究大豆代谢产

物时, 衍生时间为 20 min(较本研究少 40 min), 推测差异与样本选择相关——达乌里胡枝子与根瘤菌互作可能产生大量高极性、大分子的糖类、氨基酸

类和脂肪酸类化合物,导致衍生时间延长。对比王玲^[19]的禾本科植物研究与周春娜等^[20]的菊科植物研究后发现,后两者采用的衍生温度更低,因为禾本科和菊科次生代谢物相对简单、干扰物质少,低温可有效避免衍生试剂与杂质发生副反应,如多糖在高温下可能焦化^[21]。而豆科植物含氮次生代谢物更复杂、干扰成分更多,需升温以提升衍生化效率及产物稳定性,因其细胞壁含较多纤维素、木质素,提取物易混入多酚(如单宁)、多糖、蛋白质^[22],这些物质可能吸附衍生试剂或与目标物竞争反应,高温可增强反应效率,该差异也体现植物化学多样性对分析化学条件的直接影响。

超声辅助提取因其高效、低成本的特点,广泛用于微生物代谢产物研究^[23]。王永徐等^[8]发现甘薯叶多酚提取中超声温度对热敏感化合物稳定性影响显著,最佳范围为30~40℃。本试验超声温度达35℃时达乌里胡枝子根瘤菌代谢产物检测量最高,超此温度因类黄酮等降解而下降,与刘佳^[24](人参组织)、郭云^[12](豆科药用植物)研究一致。超声可通过空化效应破碎细胞、释放胞内目标物(如脂肪酸、萜类)^[25],但长时间或高强度超声会引发局部高温(致热敏感化合物分解)及细胞碎片增多(干扰衍生反应),故需控制超声时间与功率。本试验超声时间较郭云^[12]显著缩短,推测这一差异与达乌里胡枝子-根瘤菌共生体中存在较多的热不稳定代谢产物相关,过长时间易引发局部高温导致此类化合物降解,故需通过缩短超声时间以保障其稳定性。

前处理方法的科学性与稳定性是GC-MS代谢组学研究的前提,其核心目标是最大化保留目标代谢物、减少基质干扰并保证检测重复性^[26]。内标物质作为贯穿前处理全流程的“参照标准”,其峰面积稳定性直接反映超声提取、衍生化、离心等步骤的操作一致性及仪器检测稳定性^[27]。代安娜等^[28]选择L-2-氯-苯丙氨酸作为内标物,该物质具有化学性质稳定、衍生化效率高,在样品中无本底干扰等优势,可精准评价前处理方法的可靠性。

本试验通过单因素试验及Box-Behnken分析,得出根瘤菌代谢产物检测数量的影响排序为:超声温度>衍生时间>超声时间>衍生温度。检测最优条件为:超声温度为35℃、超声时间为9 min、衍生时间为60 min、衍生温度为70℃。代谢产物检测数量达到了145个,比优化前增长了198.60%。内标物质L-2-氯-苯丙氨酸的峰面积RSD=8.2%(n=

6)、S:N=9.9:1。该方法的建立为达乌里胡枝子与根瘤菌共生机制解析、活性代谢产物筛选提供了可靠技术支撑。

参考文献

- [1] 高英志,任健. 植物根瘤共生固氮研究进展与展望[J]. 中国科学(生命科学),2025,55(1):131-145
GAO Y Z, REN J. Advances and prospects in plant root nodule symbiotic nitrogen fixation[J]. Science in China (Series C), 2025, 55(1):131-145
- [2] 杨军,刘承武,李霞,等. 豆科植物-微生物共生固氮研究进展[J]. 植物生理学报,2023,59(8):1407-1435
YANG J, LIU C W, LI X, et al. Advances in the legume - rhizobia symbiosis[J]. Plant Physiology Journal, 2023, 59(8): 1407-1435
- [3] WANG Y N, YANG W, ZUO Y Y, et al. *GmYUC_{2a}* mediates auxin biosynthesis during root development and nodulation in soybean[J]. Journal of Experimental Botany, 2019, 70(12): 3165-3176
- [4] 孙艳,张娟,杨志恒. 胡枝子属植物生态价值及应用研究进展[J]. 园艺与种苗,2021,41(8):38-40
SUN Y, ZHANG J, YANG Z H. Research progress on ecological value and application of *Lespedeza* plants[J]. Horticulture & Seed, 2021, 41(8):38-40
- [5] BRUNING B, ROZEMA J. Symbiotic nitrogen fixation in legumes: perspectives for saline agriculture[J]. Environmental and Experimental Botany, 2013, 92:134-143
- [6] 陶静雨,闫玉鑫. GC-MS技术的应用研究进展[J]. 云南化工,2022,49(3):1-3
TAO J Y, YAN Y X. Application and research progress of GC-MS technology[J]. Yunnan Chemical Technology, 2022, 49(3):1-3
- [7] 曹富,徐宁,刘慧娟. GC-MS技术在中药谱效关系研究中的应用进展[J]. 云南化工,2022,49(12):1-3
CAO F, XU N, LIU H J. Application progress of GC-MS in the study of profile-effect of traditional Chinese medicine[J]. Yunnan Chemical Technology, 2022, 49(12):1-3
- [8] 王永徐,李臣,邱天越,等. 超声耦合双水相提取甘薯叶多酚的响应面优化[J]. 江苏师范大学学报(自然科学版),2018,36(4):44-48
WANG Y X, LI C, QIU T Y, et al. Response surface optimization of polyphenols extracted from sweetpotato leaves by ultrasonic coupled aqueous two-phase extraction[J]. Journal of Jiangsu Normal University (Natural Science Edition), 2018, 36(4):44-48
- [9] SAMAVATI V. Polysaccharide extraction from *Abelmoschus esculentus*: optimization by response surface methodology[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 95(1):588-597
- [10] 苗阳阳,周彤,师尚礼,等. 硼对根瘤菌在紫花苜蓿体内运移和定殖及对幼苗生长的影响[J]. 草业学报,2017,26(4): 120-133

- MIAO Y Y, ZHOU T, SHI S L, et al. Effect of boron on migration and colonization by rhizobia and seedling growth in *Medicago sativa* [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2017, 26(4): 120-133
- [11] ZHAO L F, DENG Z S, YANG W Q, et al. Diverse rhizobia associated with *Sophora alopecuroides* grown in different regions of Loess Plateau in China [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2010, 33(8): 468-477
- [12] 郭云. 应用代谢组学研究内蒙古6种豆科药用植物的代谢基础[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2020: 31-33
- GUO Y. Using metabolomics to study the metabolic basis of six leguminous medicinal plants in Inner Mongolia [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2020: 31-33
- [13] 刘巧利. 苦马豆根瘤菌次生代谢产物的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2009: 26-32
- LIU Q L. Study on secondary metabolites of rhizobia isolated from *Sophora alopecuroides* [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2009: 26-32
- [14] 赵亮. 黄芪根瘤内生菌次生代谢产物研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2009: 19-24
- ZHAO L. Study on secondary metabolites of endophytes from *Astragalus* root nodules [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2009: 19-24
- [15] 刘淑霞. 根瘤菌SD101提高紫花苜蓿耐盐生理和分子机制研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2021: 23-42
- LIU S X. Study on the mechanism of *Sinorhizobium meliloti* SD101 improving salt tolerance of alfalfa (*Medicago sativa*. L) [D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2021: 23-42
- [16] 王威, 徐乐, 樊艳星, 等. 鹰嘴豆种子代谢产物的GC-MS分析[J]. *新疆农业科学*, 2023, 60(12): 2962-2972
- WANG W, XU L, FAN Y X, et al. Multivariable comparative analysis of chickpea seed metabolites based on GC-MS [J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2023, 60(12): 2962-2972
- [17] 张丽媛, 于英博, 赵子莹, 等. 不同品种绿豆中代谢产物的分离鉴定及代谢机制分析[J]. *食品科学*, 2021, 42(16): 169-175
- ZHANG L Y, YU Y B, ZHAO Z Y, et al. Separation and identification of metabolites and metabolic mechanism in two cultivars of mung bean [J]. *Food Science*, 2021, 42(16): 169-175
- [18] 胡九龙. 大豆疫霉胞外多糖及其分泌蛋白处理下大豆的代谢组学研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2019: 18-20
- HU J L. Metabonomics study on soybean treated with extracellular polysaccharides and secreted proteins of *Phytophthora sojae* [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2019: 18-20
- [19] 王玲. 转基因水稻的代谢组学研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2013: 31-35
- WANG L. Metabolomics research of genetically modified rice [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2013: 31-35
- [20] 周春娜, 陈磊, 卞艳芳, 等. 墨旱莲代谢产物的GC-MS分析[J]. *药学服务与研究*, 2019, 19(3): 205-209
- ZHOU C N, CHEN L, BIAN Y F, et al. Analysis of ecliptae herba metabolites by GC-MS method [J]. *Pharmaceutical Care and Research*, 2019, 19(3): 205-209
- [21] 张郡赫, 于海业, 党敬民. 基于双光谱技术的高温紫外胁迫下小麦多糖反演模型研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2023, 43(9): 2705-2709
- ZHANG J H, YU H Y, DANG J M. Research on inversion model of wheat polysaccharide under high temperature and ultra-violet stress based on dual-spectral technique [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2023, 43(9): 2705-2709
- [22] 任敏. 水分胁迫对达乌里胡枝子单宁和黄酮类物质的影响[D]. 太谷: 山西农业大学, 2018: 49-53
- REN M. Effects of water stress on tannin and flavonoids in *Lespedeza davurica* [D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2018: 49-53
- [23] 许英一, 王宇, 杨伟光. 紫花苜蓿叶总黄酮提取及抗氧化性[J]. *草地学报*, 2018, 26(3): 757-763
- XU Y Y, WANG Y, YANG W G. Extraction process and antioxidant activity of total flavonoids from alfalfa leaf [J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2018, 26(3): 757-763
- [24] 刘佳. 运用代谢组和转录组解析人参皂苷组织和发育特异性的代谢差异[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2017: 38-45
- LIU J. The dissection of ginsenoside metabolic differences controlled by tissue, development and species through metabolomics and transcriptomic approaches [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2017: 38-45
- [25] 胡雪, 林年丰. 响应面法优化黄花草木樨脂脂肪酸的超声提取工艺[J]. *食品工业*, 2015, 36(11): 102-105
- HU X, LIN N F. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of fatty acid from *Melilotus officinalis* [J]. *The Food Industry*, 2015, 36(11): 102-105
- [26] 邓高琼, 陈亨业, 刘瑞, 等. 气相色谱-质谱联用技术在食药检测中的应用与发展[J]. *化学试剂*, 2021, 43(5): 555-562
- DENG G Q, CHEN H Y, LIU R, et al. Application and development of gas chromatography-mass spectrometry technology in food and Chinese herbal medicine testing [J]. *Chemical Reagents*, 2021, 43(5): 555-562
- [27] 狄欣宜. 顶空固相微萃取-气质联用法测定水中4种痕量环状缩醛类异嗅物质[J]. *净水技术*, 2024, 43(3): 194-203
- DI X Y. Trace level quantification of four cyclic acetals odorous compounds in water by use of headspace SPME followed by GC-MS [J]. *Water Purification Technology*, 2024, 43(3): 194-203
- [28] 代安娜, 张丽媛, 闵广柳, 等. 不同产地裸燕麦代谢产物差异分析[J]. *食品与机械*, 2022, 38(3): 32-37
- DAI A N, ZHANG L Y, MIN G L, et al. Analysis on the difference of metabolites of naked oats from different produced areas [J]. *Food & Machinery*, 2022, 38(3): 32-37