

# 基于广泛靶向代谢组学分析鸟巢蕨栽培嫩叶与老叶次生代谢特征

赵王瑞<sup>1</sup>,罗丹<sup>1</sup>,董诗浪<sup>1</sup>,徐振淮<sup>1</sup>,王步天<sup>1</sup>,林蓉<sup>1</sup>,  
曲鹏<sup>1</sup>,葛宇<sup>1</sup>,杜华波<sup>1</sup>,周春燕<sup>2</sup>

(1. 云南农业大学热带作物学院 云南普洱 665099; 2. 景洪市种业发展中心 云南景洪 666106)

**摘要:**以普洱市现代农业基地栽培的鸟巢蕨为试验材料,采用超高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱(UHPLC-QTOF-MS/MS)技术,对栽培老叶(C组)与嫩叶(D组)进行广泛靶向代谢组学分析,结合正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)筛选差异代谢物,通过KEGG通路富集揭示代谢调控网络,从而解析鸟巢蕨人工栽培过程中嫩叶与老叶次生代谢差异的分子机制。结果表明,鸟巢蕨叶片共鉴定出647种代谢物,锁定276种显著差异代谢物,其中198种上调,78种下调。通过KEGG富集分析,明确了莨菪烷类等生物碱生物合成及黄酮和黄酮醇类生物合成等通路在代谢差异中的重要作用。综上,叶龄显著影响鸟巢蕨的代谢谱:嫩叶中甾体生物碱显著上调,老叶则富集黄酮类物质,差异代谢物主要涉及生物碱和黄酮类合成途径。该研究结果揭示了鸟巢蕨不同叶龄的代谢调控特征,为采收期优化、活性成分开发及药用价值评估提供了理论依据。

**关键词:**鸟巢蕨;甾体生物碱;黄酮类;代谢异质性

中图分类号:S647

文献标志码:A

文章编号:1673-2871(2026)02-060-12

## Comparative study on secondary metabolites characteristics of cultivated tender and mature leaves of *Asplenium nidus* based on widely targeted metabolomics

ZHAO Wangrui<sup>1</sup>, LUO Dan<sup>1</sup>, DONG Shilang<sup>1</sup>, XU Zhenhuai<sup>1</sup>, WANG Butian<sup>1</sup>, LIN Rong<sup>1</sup>, QU Peng<sup>1</sup>, GE Yu<sup>1</sup>, DU Huabo<sup>1</sup>, ZHOU Chunyan<sup>2</sup>

(1. College of Tropical Crops, Yunnan Agricultural University, Pu'er 665099, Yunnan, China; 2. Jinghong Seed Industry Development Center, Jinghong 666106, Yunnan, China)

**Abstract:** Using *Asplenium nidus* cultivated in Pu'er city's modern agricultural base as experimental material, a widely targeted metabolomics analysis was performed on mature leaves(C group) and tender leaves(D group) via ultra-high-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry(UHPLC-QTOF-MS/MS). Orthogonal partial least squares discriminant analysis(OPLS-DA) was employed to screen differential metabolites, and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)pathway enrichment was conducted to reveal metabolic regulatory networks, thereby elucidating the molecular mechanisms underlying secondary metabolic differences between tender and mature leaves during artificial cultivation. The results showed that a total of 647 metabolites were identified in the leaves of *Asplenium nidus*, with 276 significantly differential metabolites identified, including 198 up-regulated and 78 down-regulated. KEGG pathway enrichment analysis revealed that the biosynthesis of alkaloids such as tropane derivatives, as well as flavonoid and flavonol biosynthesis pathways, played crucial roles in the observed metabolic differences. In conclusion, leaf age significantly influences the metabolomic profile of *Asplenium nidus*. Steroidal alkaloids are markedly up-regulated in tender leaves, whereas flavonoids are enriched in mature leaves, with differential metabolites mainly concentrated in alkaloid and flavonoid biosynthetic pathways. These results reveal the metabolic regulation characteristics of *A. nidus* at differ-

收稿日期:2025-06-08;修回日期:2025-09-22

基金项目:国家天然橡胶产业技术体系普洱综合试验站(CARS-33-YN4);云南省黄华孙专家工作站(202305AF150125);孟连县农民院士科技服务站;云南农业大学本科教学改革工程项目(YNAUJG2024010);云南农业大学热带作物学院教育教学改革研究项目(202405)

作者简介:赵王瑞,女,在读硕士研究生,研究方向为热带作物栽培及林下资源创新利用。E-mail:2422694531@qq.com

通信作者:杜华波,男,教授,研究方向为热带作物栽培及林下资源创新利用。E-mail:421808830@qq.com

ent leaf ages and provide a scientific basis for optimizing harvest time, developing bioactive compounds, and evaluating medicinal value.

**Key words:** *Asplenium nidus*; Steroidal alkaloids; Flavonoids; Metabolic heterogeneity

鸟巢蕨(*Asplenium nidus*)作为铁角蕨科巢蕨属的多年生附生植物,近年来因其兼具观赏价值与食用潜力而备受关注,其嫩叶呈阔披针形,辐射状丛生形成鸟巢状结构<sup>[1-2]</sup>。近年来在中国台湾及华南地区,鸟巢蕨嫩叶已被开发为特色蔬菜,嫩叶富含粗蛋白、粗脂肪、维生素C及β-胡萝卜素,且矿质元素含量[如钾含量(w,后同)达4 921 μg·g<sup>-1</sup>]显著高于西芹、生菜等常见蔬菜<sup>[3]</sup>。此外,鸟巢蕨含有18种氨基酸,接近FAO/WHO推荐的理想蛋白模式,并具备抗氧化、抗炎及增强免疫力的潜在功效,被认为是一种符合现代营养学需求的“药食同源”植物<sup>[3-4]</sup>。鸟巢蕨的嫩叶经简单烹饪后可作为凉拌或炒食原料,而老叶因纤维含量较高,通常被弃用,导致资源浪费<sup>[2]</sup>。

次生代谢物是植物适应环境与生理调节的核心物质,蕨类植物次生代谢物主要包括萜类(三萜、倍半萜)、苯丙素类(黄酮、香豆素)及生物碱等,具有抗菌、抗肿瘤及抗氧化等功效<sup>[2,5]</sup>。研究表明,鸟巢蕨中的黄酮类化合物(如槲皮素、山奈酚)可通过清除自由基和抑制炎症因子释放发挥抗氧化及抗炎作用<sup>[2,5]</sup>。然而,现有研究多集中于其营养成分(如可溶性糖、叶绿素含量)及栽培技术优化(如基质配比筛选)等方面,对次生代谢物的系统性分析仍存在空白<sup>[6]</sup>。一方面,发育阶段的代谢动态研究不足。叶片作为主要的功能器官,其代谢特征随发育阶段的变化直接影响资源利用效率。目前对鸟巢蕨的研究多集中于营养成分(如可溶性糖、叶绿素)的静态分析<sup>[7]</sup>,或单一栽培条件(如基质配比)对生长指标的影响<sup>[8]</sup>,而针对嫩叶与老叶在次生代谢物组成、含量及调控网络上的动态差异缺乏系统比较<sup>[9-10]</sup>。虽有研究提及蕨类植物叶片衰老伴随苯丙烷代谢途径关键酶活性下降<sup>[5,11]</sup>,但鸟巢蕨不同叶龄中黄酮类、生物碱等活性成分的具体变化规律尚未明确,无法为适时采收提供依据。另一方面,代谢调控机制的解析存在局限性。现有研究已发现鸟巢蕨的次生代谢受环境因子(如光照、湿度)的影响<sup>[12]</sup>,但代谢差异背后的分子调控网络尚未阐明。此外,与其他蕨类植物的代谢特征对比缺失。蕨类植物的次生代谢具有进化保守性与类群特异性,如铁角蕨属植物多以三萜皂苷为主要防御物质<sup>[13]</sup>,而鸟巢蕨是否演化出独特的代谢模式以适应附生环

境,其与同科或同生境蕨类的代谢差异及生态意义仍不清晰。

近年来,代谢组学技术在植物次生代谢研究中取得了显著进展。尽管传统代谢组学技术(如HPLC、GC-MS)为研究提供了重要工具,但其检测通量和覆盖范围有限,难以实现对多类别代谢物的同步分析。笔者采用广泛靶向代谢组学技术,整合LC-MS、GC-MS及核磁共振技术,对鸟巢蕨嫩叶与老叶进行代谢特征解析,通过对代谢组数据的分析,旨在揭示鸟巢蕨不同发育阶段的代谢特征,发掘潜在的代谢物积累规律,并挖掘老叶中的化合物潜力,为鸟巢蕨资源的合理利用提供新的视角。与以往集中于遗传多样性和栽培基质优化的研究不同,笔者首次将广泛靶向代谢组学应用于蕨类植物发育代谢研究,旨在为全株资源的高效利用和蕨类植物代谢调控研究提供新的范式。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究试验材料为栽培鸟巢蕨,植株由云南农业大学园艺实验室组培苗引种并在云南省普洱市设施栽培基地栽培。试验于2022年8月至2024年11月在云南省普洱市设施基地进行,环境条件由Argus Titan系统控制:昼间温度(25.5±0.3)℃,相对湿度(RH)85%,夜间温度(19.2±0.5)℃,RH90%。在相同设施条件下随机挑选3株生长健壮无病虫害的鸟巢蕨植株,根据前期观察的叶片生长周期与叶片形态特征划分为两组。从中心生长点抽出卷曲状、嫩绿且叶龄≤15 d的叶片为嫩叶,记为D组;而外围叶片完全展开、叶质较硬、叶缘黄化或干枯且叶龄≥60 d的叶片为老叶,记为C组。采集时挑选叶形完整、匀称大小无畸形的叶片,尽量选择大小一致的叶片。将采集好的叶片样本置于液氮冷冻后放入-80℃冰箱保存。试验采用完全随机设计,两组各设3次重复。

### 1.2 代谢物提取方法

将冻干后的鸟巢蕨叶片样品置于JXFST-PRP-24冷冻组织研磨机(上海净信科技,中国)中研磨(45 Hz, 60 s),准确称取(25±1)mg粉末样品于2 mL离心管中,使用BSA124S-CW分析天平(Sartorius,德国)完成称量。加入1000 μL提取液(甲

醇、水体积比 3:1, 含内标), 经 JXFSTPRP-24 冷冻组织研磨机振荡混匀 30 s, 并在 40 Hz 条件下匀浆 4 min, 随后置于冰水浴中使用 PS-60AL 超声破碎仪(深圳市雷德邦电子有限公司, 中国)超声处理 5 min。上述匀浆与超声步骤重复 3 次, 以充分提取代谢物。

处理后的样品置于 4 °C 恒温混匀仪(Thermo-mixer)中静置过夜, 然后于 Heraeus Fresco 17 低温高速离心机(Thermo Fisher Scientific, 美国)以 4 °C、12000 r·min<sup>-1</sup> 条件离心 15 min。收集上清液, 经 0.22 μm 有机系针式滤膜过滤后转移至 2 mL 进样瓶(Agilent Technologies, 美国), 用于后续色谱质谱分析。为监测仪器稳定性及数据质量, 每组样品各取等体积混合制备质量控制样品(QC 样品)。

### 1.3 色谱质谱采集条件

色谱分离采用 EXION LC System(SCIEX, 美国)超高效液相色谱仪, 色谱柱为 UPLC Kinetex C18(2.1 mm × 100 mm, 2.6 μm, Phenomenex)<sup>[14-17]</sup>。流动相 A 为含 0.01% 冰乙酸(LC-MS 级, Sigma-Aldrich)的水相, 流动相 B 为 50% 乙腈/异丙醇(均为 LC-MS 级, CNW Technologies)。柱温箱温度设为 25 °C, 自动进样器温度为 4 °C, 进样体积 2 μL, 流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>。所有用于流动相与样品处理的有机溶剂(甲醇、乙腈、异丙醇)均为 LC-MS 级以降低背景噪声, 试验用水为超纯水(ddH<sub>2</sub>O)。为减少残留与保证进样稳定性, 进样器/针头清洗液采用乙腈或乙腈、异丙醇体积比为 9:1 的混合溶剂; 本研究在色谱条件设置时参考了广泛靶向代谢组学方法<sup>[14,16-18]</sup>与相关优化策略<sup>[19-20]</sup>。

质谱检测采用 Sciex QQQ 6500(SCIEX, 美国)三重四极杆质谱, 配备 IonDrive Turbo V ESI 离子源, 采用多反应监测(MRM)模式进行检测。离子源/参数设置如下: IonSpray Voltage = +5500 V / -4500 V(正/负电离模式), Curtain Gas = 0.24 Mpa, Temperature = 400 °C, Ion Source Gas (Gas1/Gas2) ≈ 0.34 Mpa。质谱定量/定性转子及 MRM 梯度参数依据目标代谢物优化设置, 数据采集与定量使用 SCIEX 软件按常规流程处理。MRM 方法开发参考了 SWATHtoMRM 技术<sup>[18]</sup>、dGOT-MS 方法<sup>[21]</sup> 及 OpenMS 平台<sup>[20]</sup>, 并结合机器学习辅助优化<sup>[22]</sup>。相关代谢组学数据库与质谱定量流程已在前人的研究中得到验证<sup>[16,19,23]</sup>。

### 1.4 代谢物定性定量分析

质谱数据的采集与定量分析通过上海百趣生

物医学科技有限公司开发的自动化数据处理平台 Biobud(Version 3.1)完成, 其核心流程包括: 原始数据导入→代谢物峰提取(peak picking)→基于自建标准品数据库的色谱峰对齐与注释→目标化合物定量。在此过程中, 系统通过动态基线校正与噪声过滤(S/N>10)确保峰检测的准确性, 并采用保留时间(RT)-质荷比(m/z)匹配算法对 726 个初始提取峰进行初步鉴定( $\Delta m/z < 5 \times 10^{-6}$ )。原始数据集包含 3 个 QC 样本(用于监测仪器稳定性)及 6 个试验样本, 所有数据经 Biobud 内置的 QC 样本校正模块执行信号漂移校正后, 进入数据预处理阶段。

### 1.5 数据处理与多元化分析

多元统计分析基于 SIMCA 14.1 平台(Sartorius Stedim Data Analytics AB, Umea, Sweden)进行。该平台支持主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)等多种分析方法。PCA 用于数据降维和样本分布可视化, 而 OPLS-DA 则用于分类分析, 能够有效分离不同组别的样本, 并识别差异代谢物。OPLS-DA 模型的稳健性和预测能力通过七折交叉验证和置换检验进行评估( $n=200$ )。差异代谢物的筛选结合了单变量统计分析(学生 *t* 检验,  $P<0.05$ )和多变量统计分析(VIP 值>1)的结果。

采用 MetaboAnalyst 5.0 平台进行通路分析。该平台支持代谢物的 KEGG 富集分析和通路活性差异计算。差异代谢物被映射到 KEGG 代谢通路数据库, 生成通路注释图, 并通过富集分析计算每个通路的富集程度(rich factor)。通路的整体变化通过差异丰度得分(DA score)进行评估。

## 2 结果与分析

### 2.1 鸟巢蕨两种叶龄次生代谢分析

基于 LC-MS 对鸟巢蕨老叶和嫩叶的次生代谢物质检测, MS 平台正、负两种电离子方式下共检测到 726 种代谢物质, 在经过对原始数据进行基于变异系数去除偏离值; 筛除单组或全组中缺失值超过 50% 的峰; 采用最小值二分之一法填补缺失值; 并以内标物进行标准化处理等步骤处理后获得 647 种代谢物。根据化学结构共分为 7 类, 其中莽草酸及苯丙酸类、萜类及生物碱类物质占比较高(表 1), 莽草酸及苯丙酸类的二级分类中黄酮类为主要成分(占比 41%)(图 1)。

主成分分析(PCA)结果(图 2)显示, PC1(52.49% 贡献率)和 PC2(15.28% 贡献率)共解释约

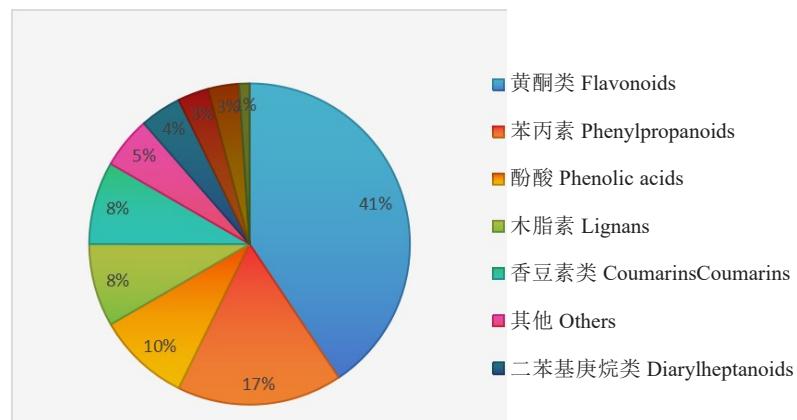
**表 1 鸟巢蕨次生代谢物分类**  
**Table 1 Chemical classification of metabolites in *Asplenium nidus***

种类 Class	数量 Number	占比 Proportion/%
莽草酸及苯丙酸类	236	36.5
Shikimic acid and phenylpropionic acid		
萜类 Terpenoids	122	18.8
生物碱类 Alkaloids	100	15.5
氨基酸及短肽	38	5.9
Amino acids and short peptides		
聚酮 Polyketone	35	5.4
脂肪酸 Fatty acid	34	5.3
碳水化合物 Carbohydrate	28	4.3
其他/未分类 Others/Unclassified	54	8.3
总计 Total	647	100.0

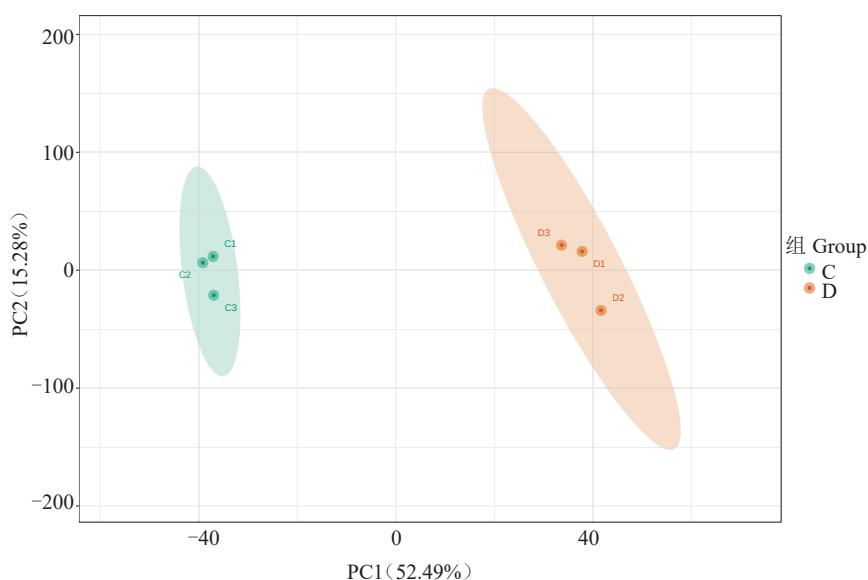
67.77% 的代谢组变异,且所有样本均处于置信区间内,能够支持试验处理的生物重复性和显著性,表明两种叶龄的鸟巢蕨代谢产物存在显著差异。为进一步分析组间差异,对鸟巢蕨老叶(C组)与嫩叶(D组)进行层次聚类分析,结果(图3)显示,老叶中多数莽草酸及苯丙酸类、萜类、生物碱类、脂肪酸类含量高于嫩叶。

## 2.2 差异代谢物的筛选

代谢表型显著分离与关键差异物分析表明,OPLS-DA 模型成功区分 C/D 组( $Q^2=0.982, R^2Y=1.0, P<0.05$ ),置换检验( $n=200$ )显示所有随机模型的  $Q^2$  均分布  $<0.78$ (图 4),原模型预测能力显著高于随机水平(回归线  $Q^2$  截距  $=-0.39, P<0.001$ ;图 5),表明分类结果不受过拟合干扰。得分图中 C/D 组



**图 1 莽草酸及苯丙酸二级分类饼图**  
**Fig 1 Pie chart of secondary classification of shikimic acid and phenylpropionic acid**



**图 2 两种叶龄次生代谢物 PCA 分析**  
**Fig. 2 PCA analysis of secondary metabolites of two leaf developmental stages**

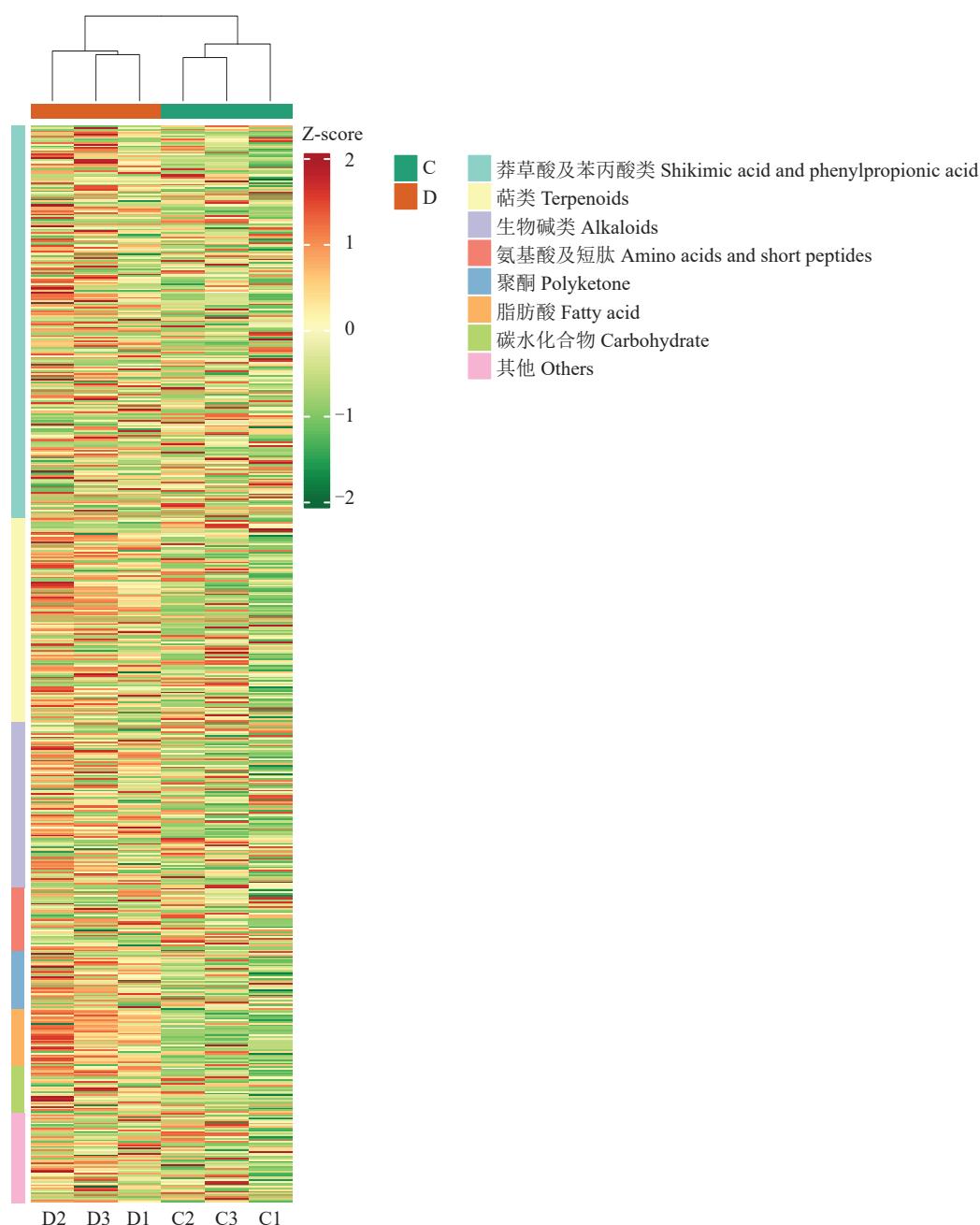


图3 两种叶龄代谢物聚类分析热图

Fig. 3 Cluster heatmap analysis of metabolites in leaves at two developmental stages

沿第一预测成分( $t[1]P$ )形成分离簇(组间质心间距 $>SD \times 5.2$ ;图6),验证代谢谱的发育阶段特异性,可用于后续的差异代谢物分析。

通过上述分析之后,结合单元变量和多元变量统计分析结果( $VIP > 1, P < 0.05$ ),筛选出差异代谢物。共从鸟巢蕨C组(老叶)和D组(嫩叶)筛选到276个差异代谢物(198个上调,78个下调),其中变化显著的是生物碱类(表2)。

火山图(图7)中识别出显著上调的差异代谢物有 hellebrigenin glucoside(嚏根草苷)、bufalin(生物

碱类)、1,4-D-gulonolactone(糖酵解的中间产物)、(-)-quinic acid(一种有机酸,参与植物抗氧化防御活动)、DL-METHIONINE(氨基酸类物质)等,显著下调的差异代谢物有 eupafolin(黄酮类化合物)、3-p-coumaroylquinic acid(一种苯丙酸衍生物,属于黄酮类化合物)、2-hydroxyethanesulfonic acid(一种羟基烷基硫酸)、kynurenic acid(一种次生代谢物,通常与植物的防御反应有关)、robinin(生物碱)、clucoxysyringic acid(一种木脂素酸,参与植物的防御和次生代谢)。

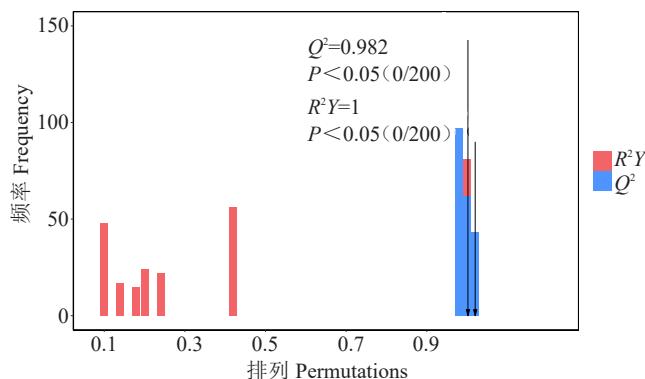


图4 C组对D组OPLS-DA模型的置换检验结果  
Fig. 4 Permutation test of OPLS-DA model for C group vs D group

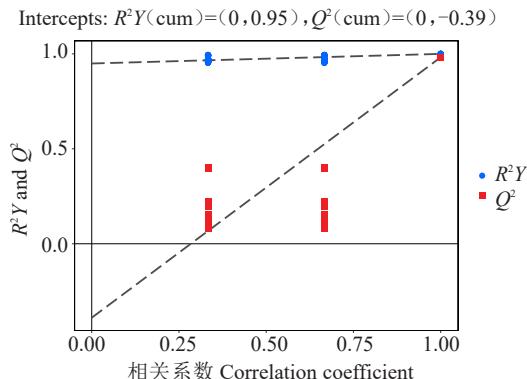


图5 C组对D组OPLS-DA模型的置换检验结果  
Fig. 5 Permutation test of OPLS-DA model for C group vs D group

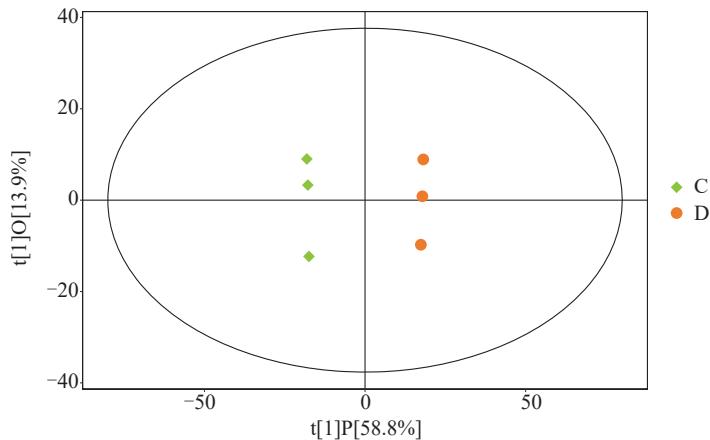


图6 C组对D组的OPLS-DA模型得分散点图  
Fig. 6 Score scatter plot of OPLS-DA model for C group vs D group

表2 代谢物化学结构分类及其差异表达统计

Table 2 Classification of metabolites by chemical structure and their differential expression

种类 Class	总数 Total	上调 Up-regulated	下调 Down-regulated
莽草酸及苯丙酸类	96	61	35
Shikimates and phenylpropanoids			
萜类 Terpenoids	56	43	13
脂肪酸类 Fatty acids	36	25	11
生物碱类 Alkaloids	31	24	7
碳水化合物类 Carbohydrates	16	12	4
聚酮类 Polyketides	13	11	2
氨基酸及短肽类	10	9	1
Amino acids and peptides			
其他/未分类 Others/Unclassified	18	13	5
总计 Total	276	198	78

对检测出的276个差异代谢物进一步分析,筛选老叶和嫩叶两组叶龄的关键代谢物,比较两组代

谢物差异变化倍数  $\log_2(\text{fold-change})$  值,取差异变化倍数前10的上调和下调代谢物(表3)。结果表明,差异代谢物中生物碱类、莽草酸及苯丙酸类、萜类变化显著,其中最显著上调表达的差异代谢物为朱毛菜定(salsolidine),其  $\log_2\text{FC}$  值为14.21,下调表达显著的化合物是2-[5-[2-[2-[2-(2-羟基丙基)四氢呋喃-2-基]丙酰氧基]丙基]四氢呋喃-2-基]丙酸(2-[5-[2-[2-[5-(2-hydroxypropyl) tetrahydrofuran-2-yl]propanoyloxy]propyl]tetrahydrofuran-2-yl]propanoic acid),其  $\log_2\text{FC}$  值为-0.17。

### 2.3 差异代谢物KEGG富集分析

对两种不同叶龄的276个差异代谢物进行KEGG富集分析(图8),发现次生代谢通路最为富集,富集代谢物数量最多,且  $P$ 值最低,表明差异代谢物广泛参与了植物的基础代谢活动。此外,莨菪烷类、生物碱及吡啶类生物碱生物合成(tropane, pi-

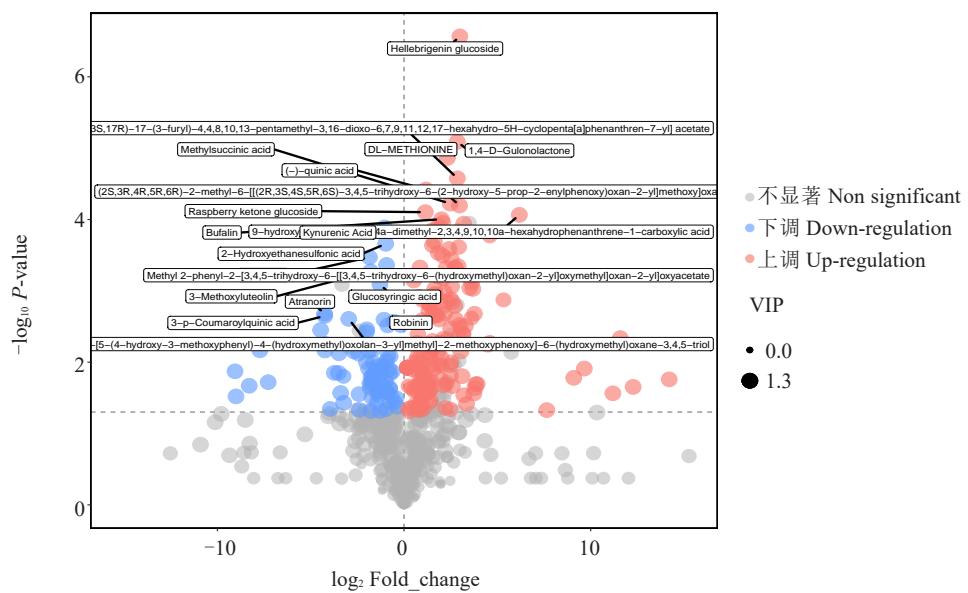


图 7 C 组对 D 组的差异代谢物筛选火山图

Fig. 7 Volcano plot of differential metabolites for C group vs D group

表 3 两种叶龄鸟巢蕨中前 10 个显著上调或下调的差异代谢产物

Table 3 Top 10 significantly up-regulated or down-regulated differential metabolites between two leaf ages of *Asplenium nidus*

序号	代谢物名称 Metabolite name	物质一级分类 Superclass_CH	Q1	Q3	VIP	Log.FC
1	猪毛菜定碱 Salsolidine	生物碱 Alkaloids	208.13	191.12	1.30	14.21
2	庚二酸 Pimelic acid	脂肪酸 Fatty acids	159.07	97.07	1.30	12.28
3	2-羟基-3-(10-甲基-2,7-二氧杂威-5-基)苏基丙酸 2-Hydroxy-3-(10-methyl-2,7-dioxooxecan-5-yl)sulanylpropanoic acid	羟基酸类化合物 Hydroxy acids	322.13	85.03	1.30	11.59
4	2-羟基-6-甲氧基苯甲酸 2-Hydroxy-6-methoxybenzoic acid	莽草酸及苯丙酸类 Shikimates and phenylpropanoids	167.03	123.05	1.30	11.19
5	苦豆碱 Aloperine	生物碱 Alkaloids	233.20	98.10	1.30	9.66
6	柚皮素查尔酮 Naringenin chalcone	莽草酸及苯丙酸类 Shikimates and phenylpropanoids	271.06	151.01	1.30	9.10
7	天名精内酯酮 Carabrone	萜类 Terpenoids	266.18	145.10	1.30	7.65
8	9-羟基-7-异丙基-1,4a-二甲基-2,3,4,9,10,10a-六氢菲-1-羧酸 9-Hydroxy-7-isopropyl-1,4a-dimethyl-2,3,4,9,10, 10a-hexahydrophenanthrene-1-carboxylic acid	萜类 Terpenoids	315.20	297.19	1.30	6.18
9	棘针碱 Spinacine	生物碱 Alkaloids	168.08	95.06	1.09	5.33
10	富马啶 Fumaridine	生物碱 Alkaloids	356.15	277.09	1.04	4.60
11	2-[5-[2-[2-(2-羟基丙基)四氢呋喃-2-基]丙酰氧基]丙基]四氢呋 喃-2-基]丙酸 2-[5-[2-[2-[5-(2-hydroxypropyl)tetrahydrofuran-2-yl] propanoyloxy]propyl]tetrahydrofuran-2-yl]propanoic acid	聚酮 Polyketides	387.24	111.08	1.25	-0.17
12	茶碱 Theophylline	生物碱 Alkaloids	179.06	164.03	1.06	-0.36
13	1,7,7-三甲基-5-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-三羟基-6-(羟甲基) 四氢吡喃-2-基]氧基-双环[2.2.1]庚烷-2-酮 1,7,7-Trimethyl-5-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6- (hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxybicyclo[2.2.1]heptan-2-one	萜类 Terpenoids	389.19	89.02	1.07	-0.40
14	红景天苷 Salidroside	莽草酸及苯丙酸类 Shikimates and phenylpropanoids	299.11	119.05	1.12	-0.48
15	肌醇半乳糖苷 Galactinol	碳水化合物 Carbohydrates	341.11	89.02	1.24	-0.54
16	3-氨基哌啶-2-酮 3-Aminopiperidin-2-one	生物碱 Alkaloids	115.09	70.07	1.20	-0.62
17	D-脯氨酸 D-Proline	氨基酸及短肽 Amino acids and peptides	116.07	116.07	1.16	-0.67
18	纤维二糖 D-(+)-Cellobiose	碳水化合物 Carbohydrates	401.13	161.05	1.24	-0.74
19	东莨菪碱 Scopolamine	生物碱 Alkaloids	304.16	138.09	1.15	-0.75
20	(2R,3S,4S,5R,6R)-2-(羟甲基)-6-[(2R,3S,4S,5R,6R)-3,4,5- 三羟基-6-(羟甲基)四氢吡喃-2-基]甲氧基]四氢吡喃-3,4,5-三醇 (2R,3S,4S,5R,6R)-2-(Hydroxymethyl)-6-[(2R,3S,4S,5R, 6R)-3,4,5-trihydroxy-6-pentan-2-yloxyoxan-2-yl]methoxy]oxane-3, 4,5-triol	脂肪酸 Fatty acids	430.23	85.03	1.17	-0.76

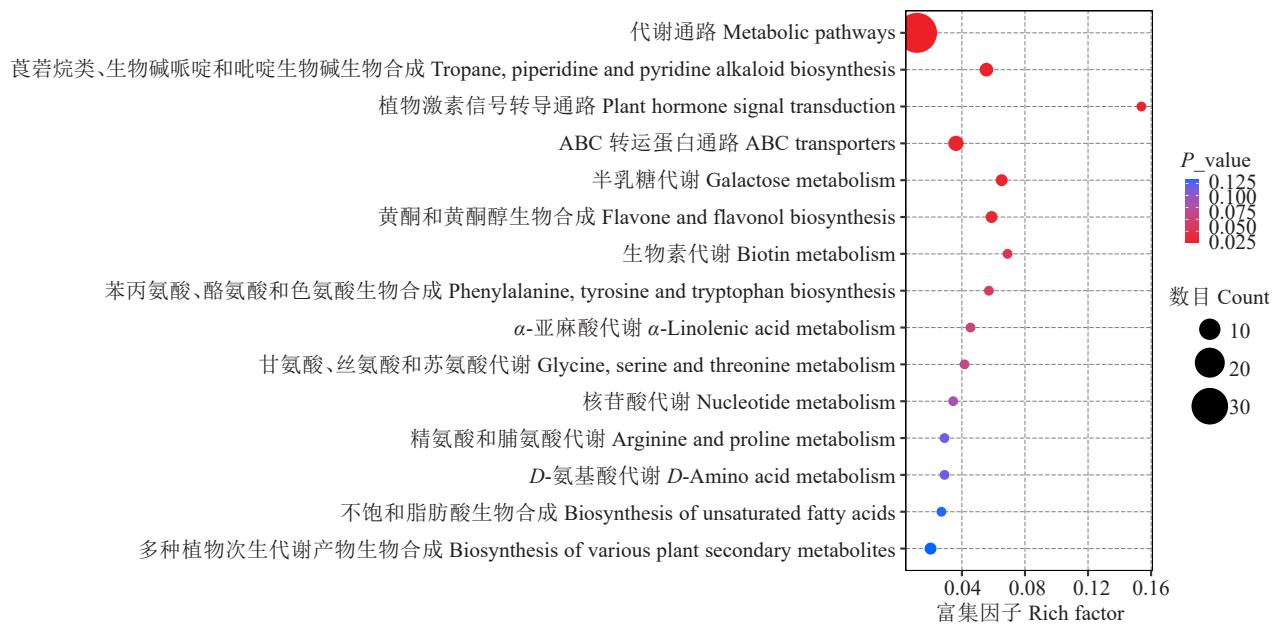


图 8 C 组对 D 组的差异代谢物 KEGG 富集图

Fig. 8 KEGG enrichment of differential metabolites for C group vs D group

peridine and pyridine alkaloid biosynthesis)、植物激素信号转导(plant hormone signal transduction)、ABC 转运蛋白(ABC transporters)及半乳糖代谢(galactose metabolism)等通路也呈现出显著富集。黄酮和黄酮醇类生物合成(flavone and flavonol biosynthesis)和生物素代谢(biotin metabolism)等次生代谢相关通路也显示出较高的富集度。这些富集显著的通路中差异变化倍数(log<sub>2</sub>FC)最大的化合物是庚二酸(pimelic acid)，其主要参与通路为辅因子生物合成(biosynthesis of cofactors)，差异变化倍数最小的化合物为罗汉松脂素(matairesinol)(表 4)。两种叶龄差异丰度得分图(图 9)揭示了富集到通路中差异代谢物的总体变化趋势，表明两种叶龄下鸟巢蕨在多数代谢通路中化合物整体上调的趋势。如在氨基酸代谢(amino acid metabolism)相关通路中，“苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成”、“甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢”以及“精氨酸和脯氨酸代谢”均显著上调，提示这些氨基酸合成与代谢在响应过程中具有重要作用。在次级代谢物合成通路中，“莽草酸类和黄酮类化合物生物合成”通路亦显著富集，上调的代谢物如异槲皮苷(isoquercitrin)、芦丁(rutin)、木犀草素 7-葡萄糖醛酸苷(luteolin 7-O-glucuronide)及 3,4-二氢香豆素(3,4-dihydrocoumarin)等，进一步支持了该类代谢活性的增强。生物素合成、ABC 转运通路和半乳糖代谢也表现出上调趋势，涉及泛酸(D-pantothenic acid)、胆碱(choline)和 D-棉子糖(D-raffinose)等关键代谢物。

### 3 讨论与结论

蕨类植物凭借丰富多样的次生代谢物，在生物活性与医学应用领域展现出重要价值，这些代谢物涵盖琥珀酸、莽草酸、萜类及生物碱等，对植物的生长发育、防御机制及药理活性等均有显著影响<sup>[7,24]</sup>。笔者对鸟巢蕨老叶与嫩叶的次生代谢物进行分析，经标准化处理后保留 647 种代谢物，其中莽草酸及莽草酸类(36.5%)、萜类(18.9%)和生物碱类(15.5%)占比较高，这一结果与蕨类植物富含莽草酸类和生物碱等次生代谢物以增强化学防御的整体特征相契合，充分表明鸟巢蕨蕴含丰富的生物活性成分，具备较高的潜在应用价值<sup>[25]</sup>。

差异代谢物分析揭示了鸟巢蕨不同叶龄间的代谢分化特征。与嫩叶相比，老叶中显著下调的差异代谢物有 198 种，上调的有 78 种，其中莽草酸及莽草酸类、生物碱类和萜类的差异变化最为显著。具体而言，嫩叶中甾体生物碱类显著上调，老叶中黄酮类物质则特异性积累。黄酮类化合物具有抗氧化、抗炎、抗菌等多种生物活性，在植物应对环境胁迫和防御机制中发挥关键作用<sup>[26-27]</sup>。嫩叶中生物碱类物质的含量显著增多，可能与嫩叶处于快速生长阶段，需要通过合成更多生物碱来增强自身防御能力以应对外界潜在的威胁有关<sup>[28]</sup>。

叶龄差异导致鸟巢蕨生长环境所面临的压力

表4 差异代谢物的化学表征、组间动态趋势及关键生物通路关联分析

Table 4 Chemical characterization, intergroup variation trends and key pathway associations of differential metabolites

KEGG ID	化合物名称 Compound name	化学式 Formula	$\text{Log}_2(\text{FC})$	种类 Class	C vs D	主要参与通路 Major pathways involved
C00864	泛酸 D-Pantothenic acid	$\text{C}_{9\text{H}}\text{H}_{17}\text{NO}_5$	1.41	氨基酸及短肽 Amino acids and peptides	上调 Up-regulation	辅因子生物合成 Biosynthesis of cofactors
C00493	莽草酸 Shikimic acid	$\text{C}_{7\text{H}}\text{H}_{10}\text{O}_5$	1.57	莽草酸及苯丙酮类 Shikimates and phenylpropanoids	上调 Up-regulation	各类植物次生代谢物生物合成 Biosynthesis of cofactors/Biosynthesis of various plant secondary metabolites
C02656	庚二酸 Pimelic acid	$\text{C}_{7\text{H}}\text{H}_{12}\text{O}_4$	12.28	脂肪酸 Fatty acids	上调 Up-regulation	辅因子生物合成 Biosynthesis of cofactors
C01909	脱硫生物素 Dethiobiotin	$\text{C}_{10\text{H}}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$	0.18	生物碱 Alkaloids	上调 Up-regulation	辅因子生物合成 Biosynthesis of cofactors
C01081	一磷酸硫胺素 Thiamine monophosphate	$\text{C}_{12\text{H}}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4\text{PS}^+$	0.30	溶血磷脂 Lysophospholipid	上调 Up-regulation	辅因子生物合成 Biosynthesis of cofactors
C00114	胆碱 Choline	$\text{C}_{5\text{H}}\text{H}_{14}\text{NO}$	1.55	季铵盐类化合物 Quaternary ammonium compounds	上调 Up-regulation	ABC 转运蛋白 ABC transporters
C00137	肌醇 Myo-Inositol	$\text{C}_{6\text{H}}\text{H}_{12}\text{O}_6$	1.43	碳水化合物 Carbohydrates	上调 Up-regulation	ABC 转运蛋白 / 半乳糖代谢 ABC transporters/Galactose metabolism
C00559	2'-脱氧腺苷 2'-Deoxyadenosine	$\text{C}_{10\text{H}}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_5$	0.89	碳水化合物 Carbohydrates	上调 Up-regulation	ABC 转运蛋白 ABC transporters
C00881	2'-脱氧胞苷 2'-Deoxycytidine	$\text{C}_{9\text{H}}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_4$	0.18	碳水化合物 Carbohydrates	上调 Up-regulation	ABC 转运蛋白 ABC transporters
C00492	棉子糖 D-Raffinose	$\text{C}_{8\text{H}}\text{H}_{12}\text{O}_{16}$	1.98	碳水化合物 Carbohydrates	上调 Up-regulation	ABC 转运蛋白 / 半乳糖代谢 ABC transporters/Galactose metabolism
C01479	DL - 3 - 苯基乳酸 <i>DL</i> -3-Phenyllactic acid	$\text{C}_{9\text{H}}\text{H}_{10}\text{O}_3$	1.82	莽草酸及苯丙酮类 Shikimates and phenylpropanoids	上调 Up-regulation	莨菪烷类、生物碱及吡啶类生物碱合成 Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis
C00408	哌可酸 Picolic acid	$\text{C}_{6\text{H}}\text{H}_{11}\text{NO}_2$	-1.28	氨基酸及短肽 Amino acids and peptides	下调 Down-regulation	莨菪烷类、生物碱及吡啶类生物碱合成 Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis
C00783	托品酮 Tropinone	$\text{C}_{8\text{H}}\text{H}_{13}\text{NO}$	0.94	生物碱 Alkaloids	上调 Up-regulation	莨菪烷类、生物碱及吡啶类生物碱合成 Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis
C01851	东莨菪碱 Scopolamine	$\text{C}_{17\text{H}}\text{H}_{21}\text{NO}_4$	-0.75	生物碱 Alkaloids	下调 Down-regulation	莨菪烷类、生物碱及吡啶类生物碱合成 Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis
C01235	肌醇半乳糖昔 Galactinol	$\text{C}_{12\text{H}}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	-0.54	碳水化合物 Carbohydrates	下调 Down-regulation	半乳糖代谢 Galactose metabolism
C05623	异槲皮苷 Isoquercitrin	$\text{C}_{21\text{H}}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	0.18	莽草酸及苯丙酮类 Shikimates and phenylpropanoids	上调 Up-regulation	黄酮和黄酮醇生物合成 Flavone and flavonol biosynthesis
C05625	芦丁 Rutin	$\text{C}_{27\text{H}}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	0.18	莽草酸及苯丙酮类 Shikimates and phenylpropanoids	上调 Up-regulation	黄酮和黄酮醇生物合成 Flavone and flavonol biosynthesis
C03515	木犀草素 7 - 葡萄糖醛酸昔 Luteolin 7-O-glucuronide	$\text{C}_{21\text{H}}\text{H}_{18}\text{O}_{12}$	0.18	莽草酸及苯丙酮类 Shikimates and phenylpropanoids	上调 Up-regulation	黄酮和黄酮醇生物合成 Flavone and flavonol biosynthesis
C02274	3,4-二氢香豆素 3,4-Dihydrocoumarin	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2$	3.21	莽草酸及苯丙酮类 Shikimates and phenylpropanoids	上调 Up-regulation	各类植物次生代谢物生物合成 Biosynthesis of various plant secondary metabolites
C10682	罗汉松脂素 Matairesinol	$\text{C}_{20\text{H}}\text{H}_{22}\text{O}_6$	-7.72	莽草酸及苯丙酮类 Shikimates and phenylpropanoids	下调 Down-regulation	各类植物次生代谢物生物合成 Biosynthesis of various plant secondary metabolites

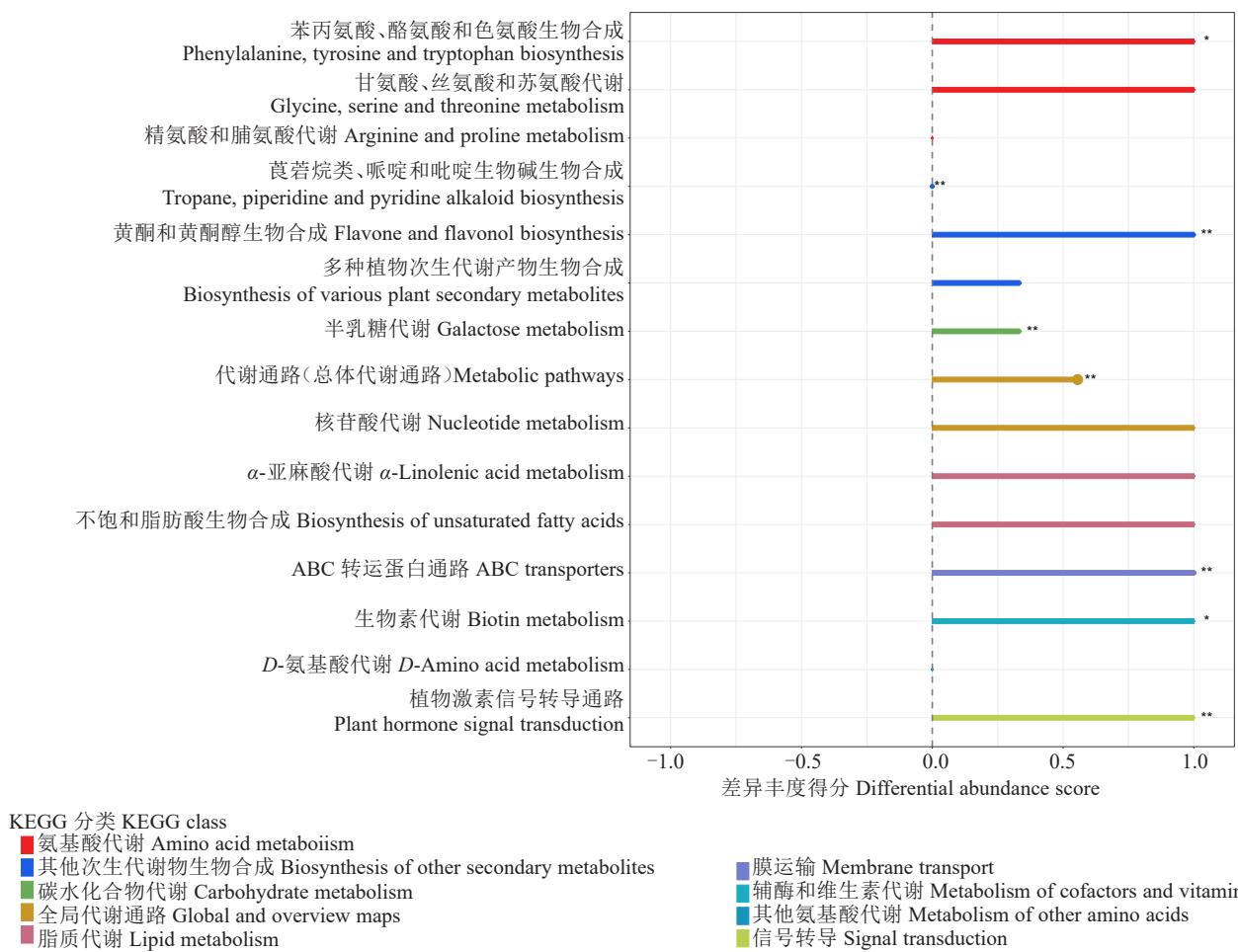


图9 C组对D组差异丰度得分图  
Fig. 9 Differential abundance score for C group vs D group

不同,这可能引发其体内代谢调控机制的适应性改变,进而影响次生代谢物的合成途径<sup>[29]</sup>。本研究中,老叶中3-对香豆酰奎宁酸和泽兰叶黄素等黄酮类代谢物显著上调,推测这是植物随着叶龄增长,为维持自身抗氧化稳态、应对叶片衰老过程中氧化胁迫而产生的代谢响应,这可能会对其药用活性产生影响。此外,嫩叶中多种与氮代谢相关的物质含量明显升高,如甲基琥珀酸( $\log_2 FC=2.5$ ),其作为代谢中间产物,可能为嫩叶的快速生长提供能量支持,提示叶龄差异可能促进了氮代谢途径的激活<sup>[30-31]</sup>。

嫩叶中嚏根草苷( $\log_2 FC=3.0$ )的特异性富集,表明其在嫩叶快速生长阶段化学防御系统的活跃性。生物碱类化合物广泛参与植物对植食性昆虫侵袭、病原菌感染等胁迫的响应<sup>[32]</sup>。一些植物中的甾体生物碱具有抑制昆虫取食和病原菌生长的功能<sup>[33]</sup>,这与嫩叶生长阶段面临的外界生物胁迫压力

较大的特性相符<sup>[34]</sup>。嫩叶中DL-蛋氨酸的高表达,暗示其可能参与植物的生长调控机制。虽然该物质在植物生长中的具体功能研究尚浅,但类比其他氨基酸在植物生长中的作用<sup>[35]</sup>,推测其可能通过参与蛋白质合成或作为甲基供体,促进嫩叶细胞的分裂与生长,以适应快速生长的需求<sup>[36]</sup>。

老叶在黄酮和黄酮醇类生物合成通路中表现出显著富集,这可能与其在生长后期的抗氧化防御需求密切相关<sup>[12]</sup>。该通路的富集因子较大且富集显著性水平较低,共涉及多个差异代谢物,进一步凸显了黄酮和黄酮醇生物合成途径在老叶与嫩叶代谢分化中的核心地位。黄酮类化合物的生物合成受多种因素调控,叶龄作为重要的内在因素,可能通过影响相关基因的表达和酶活性,导致黄酮类物质含量在不同叶龄间发生变化<sup>[25,37]</sup>。ABC转运蛋白通路也参与了两者的代谢差异,该通路与代谢物的

跨膜运输和细胞内稳态调节密切相关<sup>[38]</sup>,其差异富集可能反映了老叶与嫩叶在物质运输和细胞调控机制上的不同,这种差异可能与植物在不同生长阶段对环境的适应以及次生代谢产物的积累和分布有关<sup>[25,30]</sup>。氨基酸代谢通路同样参与其中,氨基酸作为基本的生物合成原料,其代谢途径的变化可能与鸟巢蕨不同叶龄阶段的生长发育、抗逆性以及次生代谢产物合成密切相关<sup>[39]</sup>。叶龄引起的生长需求变化可能影响了氨基酸代谢相关基因的表达和代谢流的分配,进而导致氨基酸及其衍生物含量的变化。

综上所述,笔者基于代谢组学技术系统比较了鸟巢蕨老叶与嫩叶的代谢差异,结果表明,叶龄显著影响其代谢谱。嫩叶中甾体生物碱显著上调,而老叶则富集黄酮类物质;差异代谢物主要涉及莨菪烷类和吡啶类生物碱合成途径以及黄酮和黄酮醇类生物合成途径。本研究结果揭示了鸟巢蕨在不同叶龄阶段的代谢调控特征,为优化采收期、定向获取目标活性成分及其药用价值评估提供了理论依据,同时为蕨类植物的代谢调控机制研究提供了参考。

### 参考文献

- [1] 钱玉杰.鸟巢蕨及其栽植与养护[J].现代园艺,2015(10):47-48.
- [2] 杜高齐,孟静,胡本湘,等.鸟巢蕨孢子体试管外诱导与移栽基质筛选[J].湖南农业科学,2021(12):9-12.
- [3] 徐诗涛,陈秋波,宋希强,等.新型食用蔬菜鸟巢蕨嫩叶营养成分检测[J].热带作物学报,2012,33(8):1487-1493.
- [4] CHEN X Z, HOGAN J A, WANG C P, et al. Responses of a common tropical epiphyte, *Asplenium nidus*, to changes in water and nutrient availability[J]. AoB Plants, 2023, 15 (6) : plad076.
- [5] 孙立影,于志晶,李海云,等.植物次生代谢物研究进展[J].吉林农业科学,2009,34(4):4-10.
- [6] 关智晶,孙超.植物次生代谢的区室化研究进展[J].生物技术通报,2024,40(1):1-11.
- [7] HUI C, TSUN-THAI C, XIN W, et al. Phytochemicals from fern species: Potential for medicine applications[J]. Phytochemistry Reviews, 2017, 16(3):379-440.
- [8] 许泽康,武华周,朱国鹏,等.不同基质对鸟巢蕨生长和叶片生理特性的影响[J].热带作物学报,2015,36(1):41-46.
- [9] MATTEO D, XU X T. Optimal leaf life strategies determine vitamin C, max dynamic during ontogeny[J]. The New Phytologist, 2020, 228(1):361-375.
- [10] ANASTASIA K, VLADIMIR B, PALAK C, et al. Quantifying the impact of dynamic plant-environment interactions on metabolic regulation[J]. Journal of Plant Physiology, 2023, 290: 154116.
- [11] 王春荣,高红真,盖安生,等.树皮替代草炭对鸟巢蕨生长的影响[J].林业科技开发,2013,27(3):107-110.
- [12] ROY A, KHAN A, AHMAD I, et al. Flavonoids a bioactive compound from medicinal plants and its therapeutic applications [J]. BioMed Research International, 2022, 2022:5445291.
- [13] 王梦迪,雍旭红,印敏,等.代谢组学技术在植物次生代谢调控研究中的应用[J].植物科学学报,2023,41(2):269-278.
- [14] SAWAD Y J, AKIYAMA K J, SAKATA A, et al. Widely targeted metabolomics based on large-scale MS/MS data for elucidating metabolite accumulation patterns in plants[J]. Plant Cell Physiol, 2009, 50(1):37-47.
- [15] DE VOS R C H, MOCO S, LOMMEN A, et al. Untargeted large- scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry[J]. Nature Protocols, 2007, 2(4): 778-791.
- [16] CHEN W, GONG L, GUO Z L, et al. A novel integrated method for large- scale detection, identification, and quantification of widely targeted metabolites: Application in the study of rice metabolomics[J]. Molecular Plant, 2013, 6(6):1769-1780.
- [17] DOPPLER M, KLUGER B, BUESCHL C, et al. Stable isotope-assisted evaluation of different extraction solvents for untargeted metabolomics of plants[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(7):1017.
- [18] ZHA H H, CAI Y P, YIN Y D, et al. SWATHtoMRM: Development of high- coverage targeted metabolomics method using SWATH technology for biomarker discovery[J]. Analytical Chemistry, 2018, 90(6):4062-4070.
- [19] CAI Y P, WENG K, GUO Y, et al. An integrated targeted metabolomic platform for high-throughput metabolite profiling and automated data processing[J]. Metabolomics, 2015, 11 (6) : 1575-1586.
- [20] RÖST H L, SACHSENBERG T, AICHE S, et al. OpenMS: A flexible open-source software platform for mass spectrometry data analysis[J]. Nature Methods, 2016, 13(9):741-748.
- [21] SHI X J, WANG S, PANIZ J, et al. Database-assisted globally optimized targeted mass spectrometry (dGOT-MS) : Broad and reliable metabolomics analysis with enhanced identification[J]. Analytical Chemistry, 2019, 91(21):13737-13745.
- [22] PEDREGOSA F, VAROQUAUX G, GRAMFORT A, et al. Scikit-learn: Machine learning in python[J]. Journal of Machine Learning Research, 2011, 12:2825-2830.
- [23] LIU S S, GUAN L, PENG C, et al. Mycobacterium tuberculosis suppresses host DNA repair to boost its intracellular survival[J]. Cell Host & Microbe, 2023, 31(11):1820-1836.
- [24] 侯祥文,徐诗涛,王德立,等.海南岛鸟巢蕨自然种群遗传多样性SRAP分析[J].热带生物学报,2021,12(1):25-32.
- [25] MOUSSA A Y, LUO J H, XU B J. Insights into chemical diversity and potential health-promoting effects of ferns[J]. Plants, 2024, 13(18):2668.
- [26] FATIMA A, SIDDIQUE Y H. Role of flavonoids in neurodegenerative disorders with special emphasis on tangeritin[J]. CNS Neurological Disorders Drug Targets, 2019, 18(8):581-597.

- [27] 汪飘逸.蕨类植物萜合酶和类黄酮合成相关 2-ODD 酶功能研究[D].济南:山东大学,2020.
- [28] KARMA Y S, DARREN C, EDITA R, et al. Plant secondary metabolites produced in response to abiotic stresses has potential application in pharmaceutical product development[J]. Molecules, 2022, 27(1): 313.
- [29] XIAORI Z, ZHEHAO C, RONG C, et al. Environmental and genetic factors involved in plant protection-associated secondary metabolite biosynthesis pathways[J]. Frontiers in Plant Science, 2022;13:877304.
- [30] GUO Y F, REN G D, ZHANG K W, et al. Leaf senescence: Progression, regulation, and application[J]. Molecular Horticulture, 2021, 1(1): 5.
- [31] MAEDA A H. Evolutionary diversification of primary metabolism and its contribution to plant chemical diversity[J]. Front Plant Science, 2019;10:881.
- [32] GHOSH B M, ANINDITA G, ANINDITA B. An insight into the potent medicinal plant *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn[J]. The Nucleus, 2022, 65(3): 437-472.
- [33] KOZA N A, ADEDAYO A A, BABALOLA O O, et al. Microorganisms in plant growth and development: Roles in abiotic stress tolerance and secondary metabolites secretion[J]. Microorganisms, 2022, 10(8): 1528.
- [34] 张雪,王希付,赵荣华,等.药用植物甾体皂苷生物合成途径研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(14):225-234.
- [35] ŽIVKOVIĆ S, MILUTINOVIC M, MAKSIMOVIĆ V, et al. Antioxidant and antimicrobial activity of two *Asplenium* species[J]. South African Journal of Botany, 2020, 132: 180-187.
- [36] 李哲轩.翠绿针毛蕨中黄酮类化合物的生物信息学与肾保护药理研究[D].武汉:武汉工程大学,2023.
- [37] JARIAL R, THAKUR S, SAKINAH M, et al. Potent anticancer, antioxidant and antibacterial activities of isolated flavonoids from *Asplenium nidus*[J]. Journal of King Saud University Science, 2018, 30(2): 185-192.
- [38] 曲俊泽,陈天华,姚明东,等.ABC 转运蛋白及其在合成生物学中的应用[J].生物工程学报,2020,36(9):1754-1766.
- [39] 贾新平,孙晓波,邓衍明,等.鸟巢蕨转录组高通量测序及分析[J].园艺学报,2014,41(11):2329-2341.

## (上接第 49 页)

- [8] 侯赵玉,龚亦钊,钱祎,等.芍药耐热性评价及其鉴定指标筛选[J].中国农业科学,2023,56(23):4742-4756.
- [9] 中国作物种质信息网.不结球白菜种质资源描述规范[EB/OL].[2025-03-17]<http://111.203.21.74:8093/doc>.
- [10] 张素红.莆田市青梗菜新品种比较试验[J].现代农村科技,2023(11):65-67.
- [11] 韩艳红,于沐,石彦召,等.基于隶属函数法对 13 个花生品种品质的综合评价[J].中国农学通报,2022,38(2):7-11.
- [12] SONG C, YE Y X, LIU Y G, et al. Comprehensive evaluation of nutritional qualities of Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) varieties based on multivariate statistical analysis[J]. Horticulturae, 2023, 9(12): 1264.
- [13] 孙晓妍.根用芥菜优良杂交组合筛选及晚抽薹性状遗传规律研究[D].武汉:华中农业大学,2023.
- [14] CHEN Y L, BAO W W, HONG W J, et al. Evaluation of eleven

kiwifruit genotypes for bicarbonate tolerance and characterization of two tolerance-contrasting genotypes[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2023, 194: 202-213.

- [15] BAKHOUM S G, BADR E A E, SADAK S M, et al. Improving growth, some biochemical aspects and yield of three cultivars of soybean plant by methionine treatment under sandy soil condition[J]. International Journal of Environmental Research, 2019, 13(1): 35-43.
- [16] WEN D, WANG X, SUN K N, et al. Effects of different forms of microbial agents on the growth and quality of *Brassica rapa* L. ssp. *chinensis* Makino (non-heading Chinese cabbage) [J]. The Journal of Applied Ecology, 2021, 32(5): 1777-1782.
- [17] GODARA M, KHICHAR L M, KAMBOJ M, et al. Agro-climatic indices, plant growth and yield of bt cotton as influenced by planting time and spacing[J]. International Journal of Environment and Climate Change, 2023, 13(11): 3412-3419.