

彩色豆马勃对酸铝胁迫的代谢响应

吕亚茹, 胡佳, 辜夕容*, 文思伽, 徐诗蕊, 周晓宇

西南大学 资源环境学院, 重庆

吕亚茹, 胡佳, 辜夕容, 文思伽, 徐诗蕊, 周晓宇. 彩色豆马勃对酸铝胁迫的代谢响应[J]. 微生物学报, 2026, 66(2): 681-702.
LYU Yaru, HU Jia, GU Xirong, WEN Sijia, XU Shirui, ZHOU Xiaoyu. Metabolic responses of *Pisolithus tinctorius* to acidic aluminum stress[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(2): 681-702.

摘要: 【目的】分析酸铝胁迫下外生菌根真菌(ectomycorrhizal fungi, ECMF)细胞内、外的差异代谢物, 揭示 ECMF 抗酸铝胁迫的关键代谢物及其代谢通路, 从代谢生理角度完善 ECMF 抗铝机理, 为将 ECMF 应用于铝毒危害林区的生态修复提供理论依据。【方法】将彩色豆马勃(*Pisolithus tinctorius*)离体培养于含 0.0 mmol/L 和 1.0 mmol/L Al^{3+} 的酸性(pH 3.8)培养基中, 采用非靶向代谢组学分析其细胞内、外代谢物水平变化。【结果】与 0.0 mmol/L Al^{3+} 处理相比, 1.0 mmol/L Al^{3+} 处理下 *P. tinctorius* 菌落直径显著降低 23.67%。细胞内尿嘧啶核苷酸、胞苷磷酸、尿苷、尿苷二磷酸、胞苷和鸟苷等核苷酸上调; 细胞外莽草酸、富马酸、庚酸和酒石酸等有机酸和 L-阿拉伯糖、海藻糖、蔗糖和葡萄糖等糖类上调。嘧啶代谢和柠檬酸循环代谢通路在细胞内富集, ABC 转运子和磷酸转移酶系统通路在细胞外富集。细胞内、外筛选到的潜在生物标志物分别为柠檬酸、海藻糖和酒石酸。【结论】酸铝胁迫抑制 *P. tinctorius* 生长。在细胞内, *P. tinctorius* 通过促进核苷酸积累和柠檬酸循环维持细胞稳态和能量供应; 在细胞外, *P. tinctorius* 通过促进有机酸分泌和糖类外排抵抗铝毒及其诱导的氧化损伤。

关键词: 外生菌根真菌; 铝毒; 代谢组

资助项目: 国家自然科学基金(32171753)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32171753).

*Corresponding author. E-mail: gxr0956@163.com

Received: 2025-08-08; Accepted: 2025-11-01; Published online: 2025-11-19

Metabolic responses of *Pisolithus tinctorius* to acidic aluminum stress

LYU Yaru, HU Jia, GU Xirong*, WEN Sijia, XU Shirui, ZHOU Xiaoyu

College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing, China

Abstract: [Objective] By examining intracellular and extracellular metabolite changes in ectomycorrhizal fungi (ECMF) under acidic aluminum stress, we identified key resistance-related metabolites and pathways, aiming to elucidate the aluminum tolerance mechanisms from the perspective of metabolic physiology and offer a theoretical basis for using ECMF in restoring aluminum-contaminated forests. [Methods] *Pisolithus tinctorius* was cultured *in vitro* in the acidic medium (pH 3.8) containing 0.0 mmol/L or 1.0 mmol/L Al^{3+} . Untargeted metabolomics was employed to analyze changes in intracellular and extracellular metabolite levels. [Results] Compared with that under the 0.0 mmol/L Al^{3+} treatment, the colony diameter of *P. tinctorius* under 1.0 mmol/L Al^{3+} stress decreased significantly by 23.67%. In addition, the intracellular levels of nucleotides including uridylic acid, cytidine monophosphate, uridine, uridine diphosphate, cytidine, and guanosine were upregulated under 1.0 mmol/L Al^{3+} stress. Extracellular levels of organic acids such as shikimic acid, fumaric acid, heptanoic acid, and tartaric acid, along with carbohydrates including L-arabinose, trehalose, sucrose, and glucose, were also upregulated. Pyrimidine metabolism and citric acid cycle pathways were enriched intracellularly, while ABC transporters and phosphotransferase system pathways were enriched extracellularly. The potential biomarkers identified in the intracellular environment was citric acid, and those identified in the extracellular environment were trehalose and tartaric acid. [Conclusion] Acidic aluminum stress inhibits the growth of *P. tinctorius*. Intracellularly, *P. tinctorius* maintains cellular homeostasis and energy supply through enhanced nucleotide accumulation and activation of the citric acid cycle. Extracellularly, *P. tinctorius* promotes organic acid secretion and carbohydrate efflux to resist aluminum toxicity and associated oxidative damage.

Keywords: ectomycorrhizal fungi; aluminum toxicity; metabolome

近年来,随着全球气候变暖、酸沉降和氮沉降的增加,以及人类活动产生的酸性废水(气),土壤酸化进程显著加快^[1-3]。中国南方森林对土壤酸化高度敏感,由于高温、高湿以及酸雨的影响,一些森林土壤 pH 值降至 4.0 以下,导致土壤中活性铝的溶出量增多,大部分阳离子交换位点被 Al^{3+} 占据^[1,3],形成以 Al^{3+} 为主导的生境胁迫。此外,酸性矿山排水也引发

了严重的铝毒问题。例如,对石煤矿和酸性矿山周边水体的检测显示,其 pH 为 3.0–4.0,部分样点的铝含量超标 4 倍以上,且水中 Al^{3+} 浓度随 pH 值的降低而升高^[4],使这些矿山附近及排水流经地区面临着严重的铝毒危害。铝毒会抑制植物根系伸长,破坏根尖结构,阻碍植物对土壤中磷、钾、铁等元素的吸收和利用^[5-8],进而制约植物生长,严重时甚至导致植物死亡。

外生菌根真菌(ectomycorrhizal fungi, ECMF)广泛分布于森林生态系统中,是连接林木根系与土壤的重要纽带^[9]。一些优良的 ECMF 对铝毒具有较强的耐受性,一方面它们能通过细胞壁表面配位和胞内螯合作用固定 Al^{3+} ^[10-12];另一方面 ECMF 的胞外分泌物,如有机酸等能够络合 Al^{3+} ,使铝失活以降低其毒性^[13],从而减少植物根系及 ECMF 自身对 Al^{3+} 的摄入。例如,松乳菇(*Lactarius deliciosus*)在高铝(2.0 mmol/L Al^{3+})处理下生物量增幅达 36.31%^[14];0.8 mmol/L 和 1.6 mmol/L Al^{3+} 处理分别使土生空团菌(*Cenococcum geophilum*)的生物量提高 5.13% 和 21.54%^[15];冯婧玮等^[16]研究发现,1.0 mmol/L Al^{3+} 对粘盖牛肝菌(*Suillus bovinus*)的生长无影响;在受采矿活动和烟尘危害影响的高污染森林土壤中采集的 *C. geophilum* 菌核,积累了大量的铝,其体内铝浓度占土壤铝浓度的 19.6%^[11]。由此可见,部分 ECMF 对铝毒具有一定的耐受性。彩色豆马勃(*Pisolithus tinctorius*)在我国资源丰富^[17],宿主范围广泛,能与 70 多种不同的针叶和阔叶树种形成外生菌根^[18-19]。由于 *P. tinctorius* 抗逆性强,目前已成为林业生产中应用价值最大的 ECMF,其纯培养菌剂已在美国和中国实现商品化^[20]。研究表明 *P. tinctorius* 在 2.0 mmol/L Al^{3+} 处理下仍能保持耐受,显示出其具备高铝耐受性^[21]。尽管已有研究初步表明,*P. tinctorius* 能够通过营养响应^[21]、细胞壁吸附和胞内富集^[10]以及有机酸分泌^[13]等途径缓解铝毒害,但在代谢水平,特别是对胞内与胞外代谢物动态变化的全局性解析方面仍较为缺乏,这限制了人们对 *P. tinctorius* 抗铝机制的系统认识。

真菌代谢组学的研究涵盖胞内与胞外代谢物。胞内代谢物的分析通常称为代谢指纹分析,即将细胞、组织或器官的代谢物集合作为一个整体,通过图谱比对进行鉴定;胞外代谢物分析则称为代谢足迹分析,指通过高通量方法检测细胞或组织分泌的代谢产物^[22-24]。微生物在

胁迫条件下会改变体内的代谢活动,并分泌多种代谢物(如有机酸、酚类、脂类等)进行响应^[16,25-26]。冯婧玮等^[16]采用代谢组学分析了 *S. bovinus* 在酸铝胁迫下的菌丝分泌物,筛选到大量酚酸类、有机酸和脂质等代谢物,初步阐述了其对酸铝胁迫的响应机制。何海燕^[26]通过代谢组学研究发现,土壤镉显著改变了双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)子实体的三羧酸循环和糖酵解途径,促进了酚类物质与镉的螯合,从而提高了自身对镉的抗性。传统分析方法通常局限于特定类别化合物,容易导致信息遗漏,而代谢组学技术能够分离鉴定广泛的代谢物,全面揭示初级与次级代谢物在质和量上的变化^[22-24]。

近几十年来,我国西南地区因土壤酸化及其诱导的铝毒致使大面积林木减少,如重庆南山^[27]和铁山坪^[28]的马尾松曾出现大面积死亡及树冠密度下降的情况。因此,选择抗铝性较强的 ECMF 菌种对于提高林木铝耐受性及林业生产力至关重要。有研究聚焦于 ECMF-宿主植物的共生修复机制,但对 ECMF 在独立铝胁迫下细胞内外代谢活动的系统性认知仍不足,这制约了 ECMF 菌剂在铝污染地区的定向优化与应用效能。微生物在响应胁迫时不仅会改变体内代谢活动以增强适应性,还会调节胞外分泌物以改善生存环境。基于此,本研究以西南地区本土菌种彩色豆马勃(*Pisolithus tinctorius*)为研究对象,前期已在纯培养体系^[21]及共生系统^[29]中证实其具备较高的酸铝耐受性。参考西南林地土壤中活性铝含量>1.0 mmol/L 时即会严重危害林木生长的数据^[30],本研究在纯培养条件下探究 1.0 mmol/L Al^{3+} 处理对 *P. tinctorius* 细胞内、外代谢网络的影响。通过筛选胞内外差异代谢物识别潜在生物标记物,进而揭示 ECMF 响应酸铝胁迫的关键代谢物与通路变化,以期完善 ECMF 抗铝机理并将其应用于铝污染林区的生态修复提供新的见解。

1 材料与amp;方法

1.1 供试菌种

研究所用外生菌根真菌(ECMF)为彩色豆马勃(*Pisolithus tinctorius*),由西南大学资源环境学院微生物实验室提供。*P. tinctorius* 分离自自然生长于四川省西昌市桉树林下的红壤(pH 5.9)。取保存菌种 *P. tinctorius* 接种于 Pachlewski 固体培养基(pH 5.5)上,置于(25±1) °C人工气候箱中暗培养活化 7 d 备用。培养基组成详见文献[14]。

1.2 菌株培养及铝处理

以 Pachlewski 培养基为基础,配制无铝与加铝 2 种培养基。以 $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$ 作为铝源,使无铝处理(-Al)含 0.0 mmol/L Al^{3+} ,铝处理(+Al)含 1.0 mmol/L Al^{3+} 。为确保铝的有效性,使用硫酸将培养基 pH 均调至 3.8。分别取等体积的固体和液体培养基于培养皿和无菌组培瓶中,封口后置于 121 °C 灭菌锅中灭菌 30 min。冷却后,于无菌操作室中用打孔器接种直径为 6 mm 的活化菌饼 1 块,在(25±1) °C 的人工气候箱中暗培养 3 周。每处理设 5 个固体培养重复(用于生长观测和菌落直径测量)和 12 瓶液体培养(用于菌丝体生物量、发酵液 pH 和代谢组测定)。

1.3 样本制备

液体培养 3 周后,为获得足量的菌丝生物量和代谢物浓度以确保代谢组学检测的可靠性,同时考虑到同一处理组内菌丝生长状态和培养液浓度的一致性,将每 2 瓶来源于同一批接种、相同培养条件的培养物合并为一个生物学重复样本。每处理共获得 6 个生物学重复样本。将样品转入 50 mL 离心管,于 20 °C、8 000 r/min 离心 10 min,取上清液过 0.44 μm 滤膜,所得滤液即为滤液样本;取沉淀至 15 mL 离心管中,用预冷 PBS 清洗 3 次,以 1 mL PBS 重悬沉淀,分装至 2 mL 离心管,8 000×g 离心 5–10 min,弃上清,所得沉淀即为菌丝体样本。以上样本

经液氮速冻后,置于-80 °C 冰箱保存。

1.4 菌株生长及滤液 pH 测定

采用交叉法测定菌落直径,绘制生长曲线,并计算直径日增长量和酸铝抑制率,如公式(1)所示。

$$I=(D_0-D)/D_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中: I 为酸铝抑制率, D_0 和 D 分别为 -Al 和 +Al 条件下菌落直径增长量。

收集菌丝,过滤后以去离子水冲洗,置于干燥培养皿中,于 80 °C 烘箱烘干至恒重(约 24 h),用万分之一天平称重,计算菌丝干重。使用 pH 计测量滤液 pH。真菌分泌物面积使用 ImageJ 软件测量。

1.5 代谢物制备与检测

为确保胁迫环境的精确可控,以及代谢物的完整和独立收集,满足代谢组学分析对数据一致性与可靠性的要求,代谢物检测使用液体培养的菌丝体和发酵液(即滤液),分别代表细胞内代谢物和细胞外代谢物^[31],各 6 个生物学重复。将样本送至苏州帕诺米克生物医药科技有限公司进行检测。菌丝体样本内代谢物提取参考 Kaufmann 等^[32]的方法,滤液样本内代谢物提取参考 Dunn 等^[33]的方法。

使用 ACQUITY UPLC[®] HSS T3 (2.1 mm×150 mm, 1.8 μm) (Waters 公司)色谱柱和 Q Exactive 质谱检测器(ThermoFisher Scientific 公司)进行代谢物检测与分析。其中,色谱柱设置流速为 0.25 mL/min,柱温为 40 °C,进样量为 2 μL;正离子模式下流动相为 0.1% 甲酸乙腈(C)和 0.1% 甲酸水(D),梯度洗脱程序为: 0–1 min, 2% C; 1–9 min, 2%–50% C; 9–12 min, 50%–98% C; 12.0–13.5 min, 98% C; 13.5–14.0 min, 98%–2% C; 14–20 min, 2% C; 负离子模式下流动相为乙腈(A)和 5 mmol/L 甲酸铵水(B),梯度洗脱程序为: 0–1 min, 2% A; 1–9 min, 2%–50% A; 9–12 min, 50%–98% A; 12.0–13.5 min, 98% A; 13.5–14.0 min, 98%–2% A; 14–17 min,

2% A。质谱检测器采用电喷雾离子源, 正、负离子模式分别采集数据; 正离子喷雾电压为 3.50 kV, 负离子喷雾电压为 -2.50 kV, 鞘气 30 arb, 辅助气 10 arb, 毛细管温度 325 °C, 以分辨率 70 000 进行一级全扫描, 一级离子扫描范围 m/z 81–1 000, 并采用高能碰撞解离进行二级裂解, 碰撞电压为 30 eV, 二级分辨率为 17 500, 采集信号前 10 离子进行碎裂, 同时采用动态排除去除无必要的 MS/MS 信息。

1.6 数据分析

试验数据用 Microsoft Office Excel 2019 进行基本的运算与分析。使用 IBM SPSS Statistics 23.0 进行一般性描述与统计。采用双尾 t 检验 (Student's test) 进行差异性检验, 显著性水平为 $P < 0.05$ 。图中所有数据均为平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD)。其中, 菌落直径指标为 5 个生物学重复, 菌丝体干重和发酵液 pH 指标为 3 个生物学重复。采用 GraphPad Prism 8.3.0 拟合曲线及作图。

通过 ProteoWizard 软件包 (v3.0.8789)^[34] 中 MSConvert 工具将原始质谱下机文件转换为 mzXML 文件格式; 采用 R XCMS 软件包^[35] 进行峰检测、过滤和对齐处理, 得到物质相对定量列表。对原始数据进行缺失值和离群值处理后, 进行 log 转化和 Pareto 标准化, 采用 R 软件包 ropls^[36] 对样本数据进行主成分分析 (principal component analysis, PCA), 以展示各样本间代谢物组成的差异。代谢物鉴定首先根据精确分子量进行确认, 后续根据 MS/MS 碎片模式对 KEGG (<https://www.kegg.jp>)、苏州帕诺米克生物医药科技有限公司自建标准品数据库 (<http://www.biodeep.cn>, 含微生物及发酵液次级代谢数据) 及收录大量微生物来源天然产物的 GNPS (<https://gnps.ucsd.edu>) 等谱库进行联合检索与确认注释, 以此确保对微生物代谢物的全面鉴定。根据统计检验计算 P , 采用正交偏最小二乘判别分析降维方法计算变量投影重要度 (variable importance in projection, VIP), 计算组

间差异倍数值 (fold change, FC); 差异代谢物 (differentially expressed metabolites, DEMs) 的筛选条件设置为: $P < 0.05$, $VIP > 1$, $FC \geq 1.5$ 或 $FC \leq 0.67$ ^[37]; 采用 MetaboAnalyst^[38] 软件包对筛选的 DEMs 进行功能通路富集和拓扑学分析。每处理组 6 个生物学重复。

2 结果与分析

2.1 酸铝胁迫对 *P. tinctorius* 生长的影响

1.0 mmol/L Al^{3+} 胁迫显著抑制 *P. tinctorius* 的生长, 菌落直径较对照 (0.0 mmol/L Al^{3+} 处理) 显著减少 23.67% (图 1A)。菌落直径的日增长量变化随培养时间段而异 (图 1B): 无铝时菌落直径日增量在第 2 天最大, 第 3–15 天相对平缓, 第 16–21 天迎来生长高峰, 之后急剧下降; 酸铝处理下, 菌落直径日增量在第 2 天最大, 随后保持 2.06–3.14 mm 的日增量, 至第 17 天缓慢下降。酸铝处理对菌落生长的抑制率始终为正值, 表明 *P. tinctorius* 菌丝生长持续受到 1.0 mmol/L Al^{3+} 的抑制, 抑制率在培养结束时达到最高, 为 25.69% (图 1C)。与对照相比, 酸铝处理后菌丝体干重显著增加 12.98%, 表明 *P. tinctorius* 对酸铝胁迫具有一定耐受性 (图 1D)。与试验初始培养液 pH (3.8) 相比, 酸铝处理下的培养液 pH 值显著升高 7.62% (图 1E)。*P. tinctorius* 菌落表面光滑湿润, 无铝处理下的菌落大部分呈米白色, 中间有 14.836 mm² 的少量红褐色物质; 而酸铝处理下的菌落外围呈米白色, 中间呈深红褐色, 分布范围约 96.106 mm², 比对照高出 5.48 倍 (图 1F)。

2.2 酸铝胁迫改变 *P. tinctorius* 细胞内外代谢谱

由主成分分析结果可见, 酸铝胁迫改变了 *P. tinctorius* 细胞内、外的代谢谱 (图 2)。图中样本点均处于置信区间内, 表明生物学重复良好。正离子模式下, 第一主成分 (PC1) 和第二主成分 (PC2) 分别解释了细胞内代谢物信息 33.90% 和

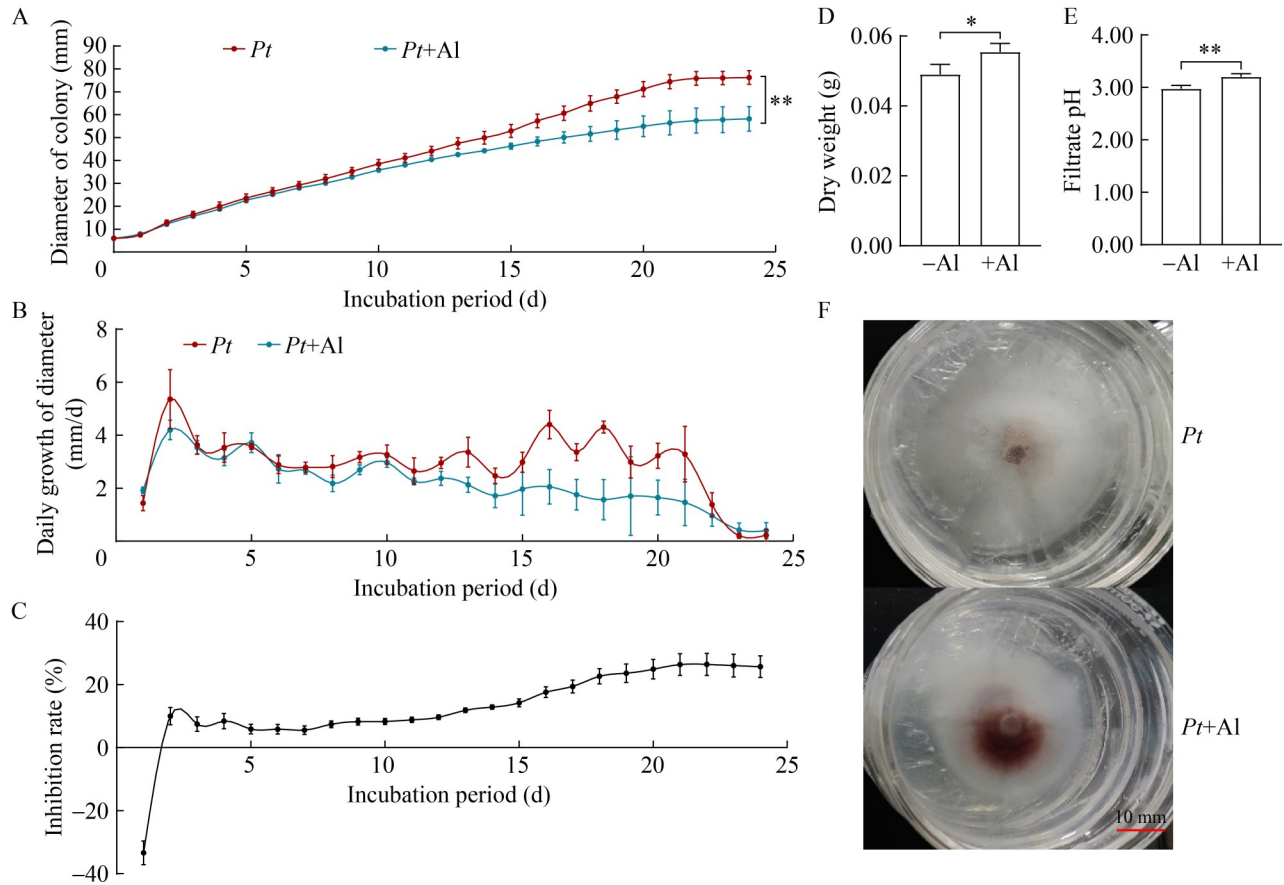


图1 酸铝处理对*Pisolithus tinctorius*生长的影响。A: 菌落直径($n=5$, 固体培养基); B: 直径日增长量($n=5$, 固体培养基); C: 生长抑制率($n=5$, 固体培养基); D: 干重($n=3$, 液体培养基); E: 滤液pH($n=3$, 液体培养基); F: 菌落形态。图中数据代表平均值 \pm 标准差。双尾 t 检验进行组间差异检验($P<0.05$)。Pt: 彩色豆马勃, 无铝处理; Pt+Al: 彩色豆马勃, 酸铝处理。*: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。下同。

Figure 1 Effects of acidic aluminum treatment on the growth of *Pisolithus tinctorius*. A: Diameter of colony ($n=5$, solid medium); B: Daily growth of diameter ($n=5$, solid medium); C: Growth inhibition rate ($n=5$, solid medium); D: Dry weight ($n=3$, liquid medium); E: Filtrate pH ($n=3$, liquid medium); F: Colony morphology. Data are presented as mean \pm SD. Significant differences between treatments were analyzed by Student's t -test ($P<0.05$). Pt: 0.0 mmol/L $Al^{3+}+P. tinctorius$; Pt+Al: 1.0 mmol/L $Al^{3+}+P. tinctorius$. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$. The same below.

10.54% 的差异(图 2A), 以及细胞外代谢物信息 67.24% 和 7.46% 的差异(图 2C)。负离子模式下, PC1 和 PC2 分别解释了细胞内代谢物信息 50.21% 和 8.49% 的差异(图 2B), 以及细胞外代谢物信息 66.67% 和 6.23% 的差异(图 2D)。

2.3 差异代谢物鉴定揭示 *P. tinctorius* 细胞内外响应酸铝胁迫的关键代谢物

为直观地表现 *P. tinctorius* 胞内、外 DEMs

的分布情况, 对细胞内、外鉴定得到的代谢物以火山图展示, 并标注差异变化最显著(P 值)的前 10 种 DEMs, 以寻找潜在生物标志物。细胞内共鉴定到 491 种代谢物, 其中上调 33 种, 下调 37 种(图 3A), 上调代谢物中最显著的是柠檬酸(citric acid), 是细胞内潜在的生物标志物; 下调代谢物中最显著的有茉莉酮(jasmone)和异茉莉酸[(+)-7-isojasmonic acid], 表明酸铝胁迫

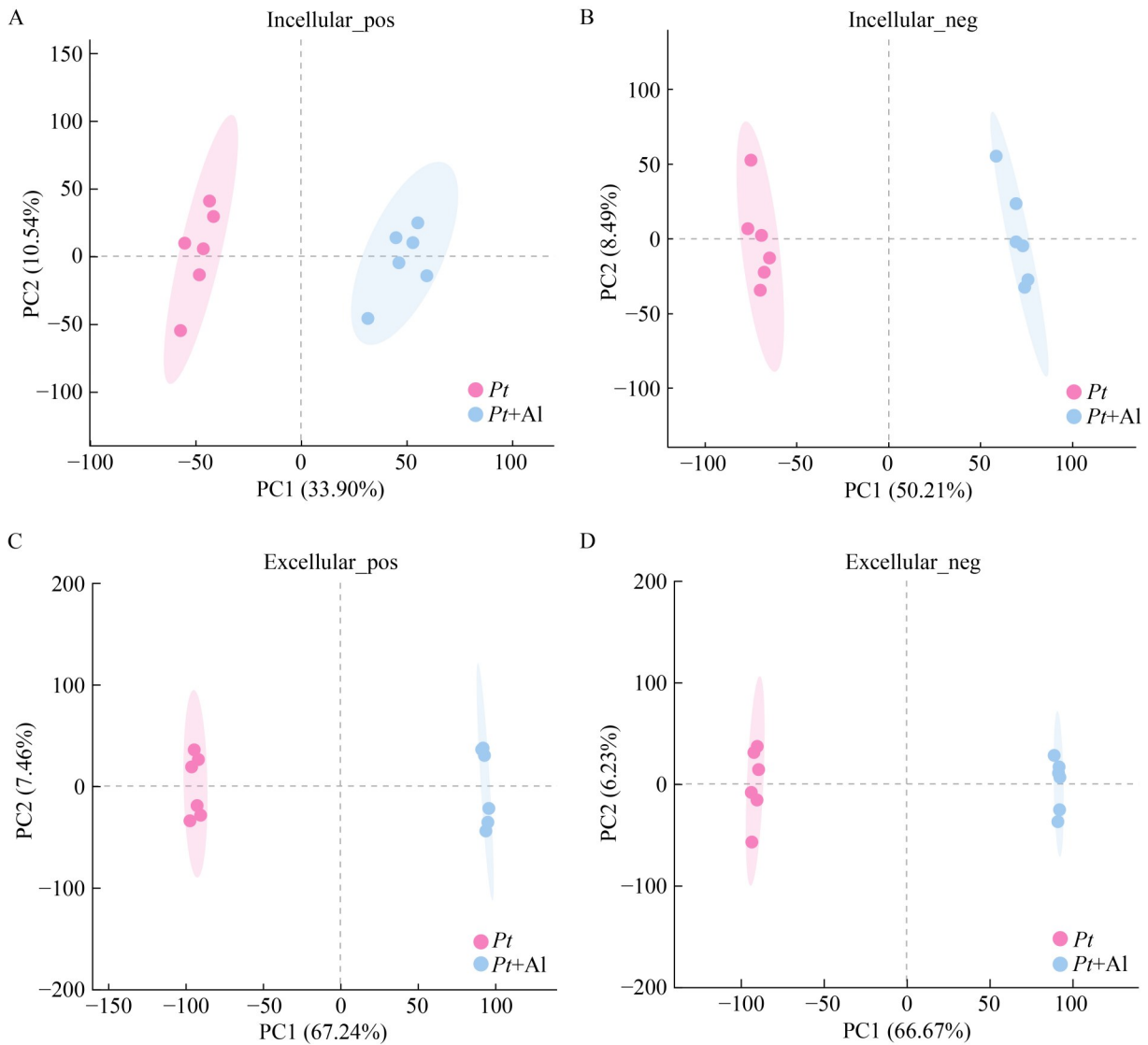


图2 酸铝处理下*Pisolithus tinctorius*细胞内、外代谢物主成分分析图。A: 正离子模式下细胞内代谢物PCA图; B: 负离子模式下细胞内代谢物PCA图; C: 正离子模式下细胞外代谢物PCA图; D: 负离子模式下细胞外代谢物PCA图($n=6$)。

Figure 2 PCA plot of intracellular and extracellular metabolites in *Pisolithus tinctorius* under acidic aluminum treatment. A: PCA plot of intracellular metabolites in positive ion mode; B: PCA plot of intracellular metabolites in negative ion mode; C: PCA plot of extracellular metabolites in positive ion mode; D: PCA plot of extracellular metabolites in negative ion mode ($n=6$).

使 *P. tinctorius* 胞内茉莉酸类物质(jasmonates, JAs)合成受抑。细胞外共鉴定到 553 种代谢物, 其中上调 42 种, 下调 21 种(图 3B), 其中上调最显著的有海藻糖(trehalose)和酒石酸[L-(+)-tartaric acid]等, 是细胞外潜在的生物标志物。

对细胞内、外的 DEMs 进行分类发现, 酸铝处理主要影响 *P. tinctorius* 细胞内的碳水化合物(carbohydrates)、脂质(lipids)和核酸(nucleic acids)类物质(图 4A)。酸铝处理下, 细胞内脂类代谢物质普遍下调, 部分核苷酸类物质如尿苷

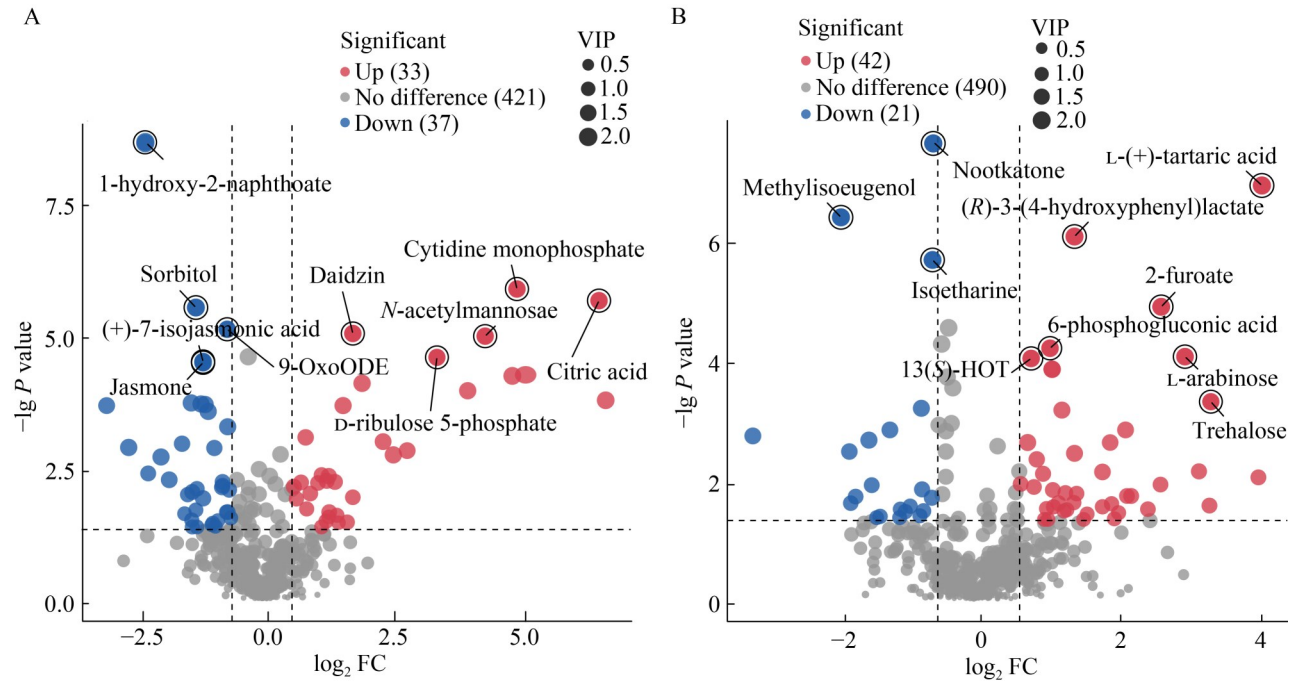


图3 酸铝处理下 *Pisolithus tinctorius* 细胞内(A)、外(B)代谢物火山图

Figure 3 Volcano plots of intracellular (A) and extracellular (B) metabolites in *Pisolithus tinctorius* under acidic aluminum treatment. 9-OxoODE: 10E,12Z-9-oxooctadeca-10,12-dienoic acid; 13-(S)-HOT: 9Z,11E,15Z-(13S)-hydroxyoctadeca-9,11,15-trienoate. The same below.

二磷酸(uridine diphosphate, UDP)、尿嘧啶核苷酸(uridylic acid, UMP)、胞苷磷酸(cytidine monophosphate)、鸟苷(guanosine)和尿苷(uridine)以及柠檬酸和酮戊二酸(oxoglutaric acid)上调,表明 1.0 mmol/L Al^{3+} 处理抑制 *P. tinctorius* 细胞内脂质代谢,促进核苷酸和能量代谢相关物质显著积累。细胞外 DEMs 主要为碳水化合物和有机酸(organic acids)类物质(图 4B),且多数代谢物在酸铝处理后上调:碳水化合物中的 L-阿拉伯糖(L-arabinose)、海藻糖、N-乙酰-D-氨基葡萄糖(N-acetyl-D-glucosamine)和岩藻糖(L-fucose),以及有机酸类物质中的莽草酸(shikimic acid)、富马酸(fumaric acid)和庚酸(heptanoic acid)等显示上调,表明 1.0 mmol/L Al^{3+} 处理促进 *P. tinctorius* 细胞外糖类和有机酸分泌。

2.4 代谢通路富集分析揭示 *P. tinctorius* 细胞内外响应酸铝胁迫的核心代谢网络

通过 KEGG 通路富集分析对 DEMs 进行注释,以确定 *P. tinctorius* 响应酸铝胁迫的关键代谢通路。酸铝胁迫下, *P. tinctorius* 细胞内的嘧啶代谢(pyrimidine metabolism)、氨基酸合成(biosynthesis of amino acids)、植物次生代谢物合成(biosynthesis of plant secondary metabolites)、ABC 转运子(ABC transporters)、植物激素合成(biosynthesis of plant hormones)等通路显著富集($P < 0.05$, 图 5A);而细胞外的磷酸转移酶系统(phosphotransferase system, PTS)、酪氨酸代谢(tyrosine metabolism)、抗坏血酸和醛酸盐代谢(ascorbate and aldarate metabolism)、氨基酸合成(biosynthesis of amino acids)、柠檬酸循环(citrate cycle, TCA)等通路显著富集($P < 0.05$, 图 5B)。 *P. tinctorius* 细胞内、外显著富集的前 10 条代谢

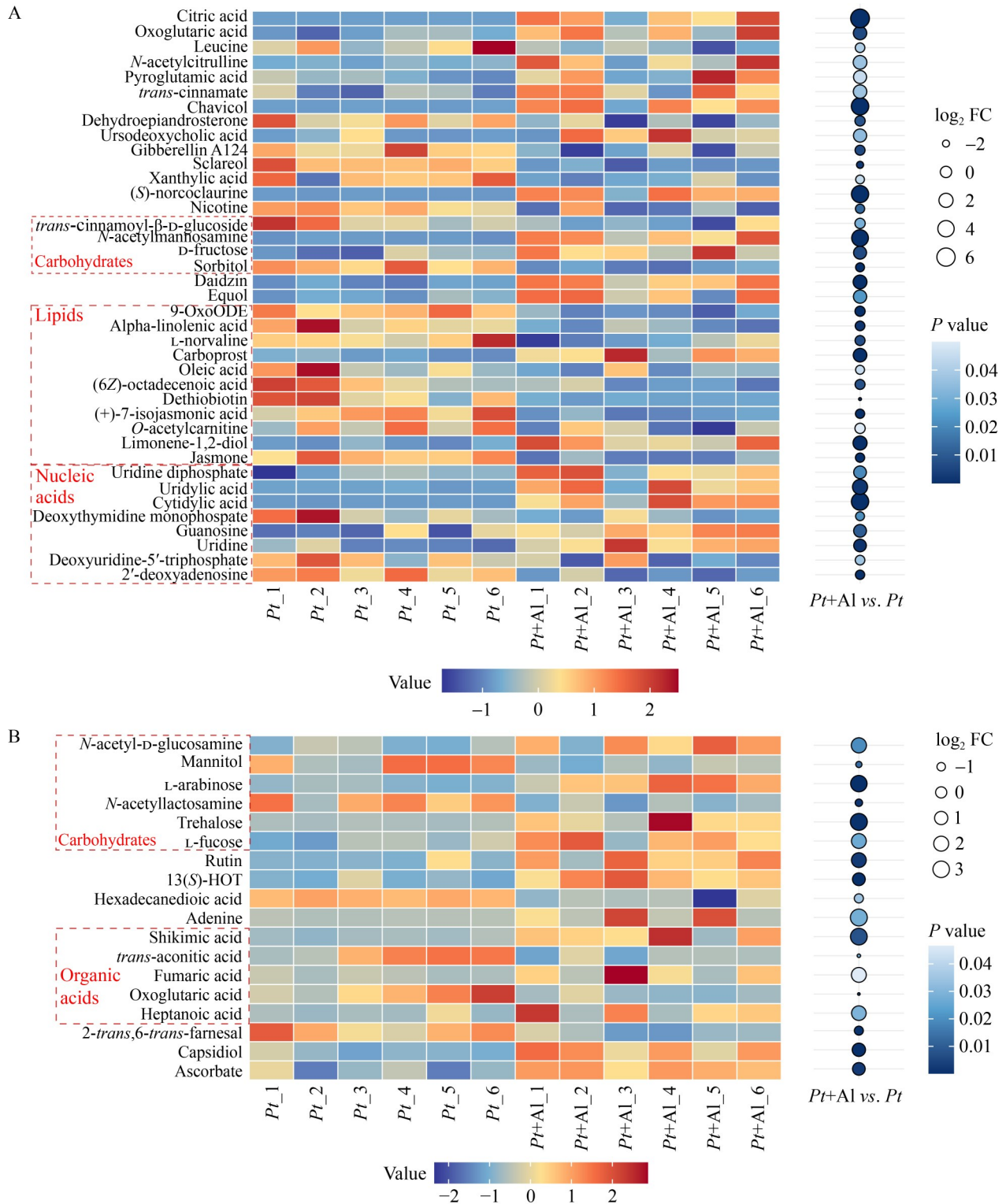
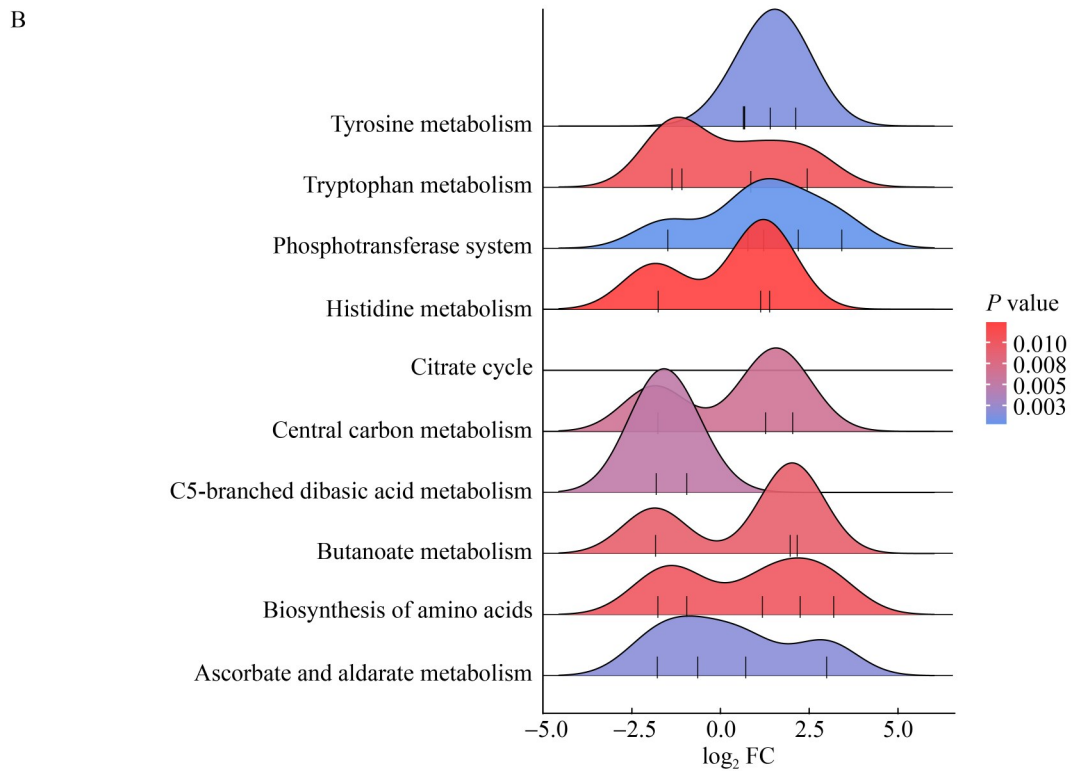
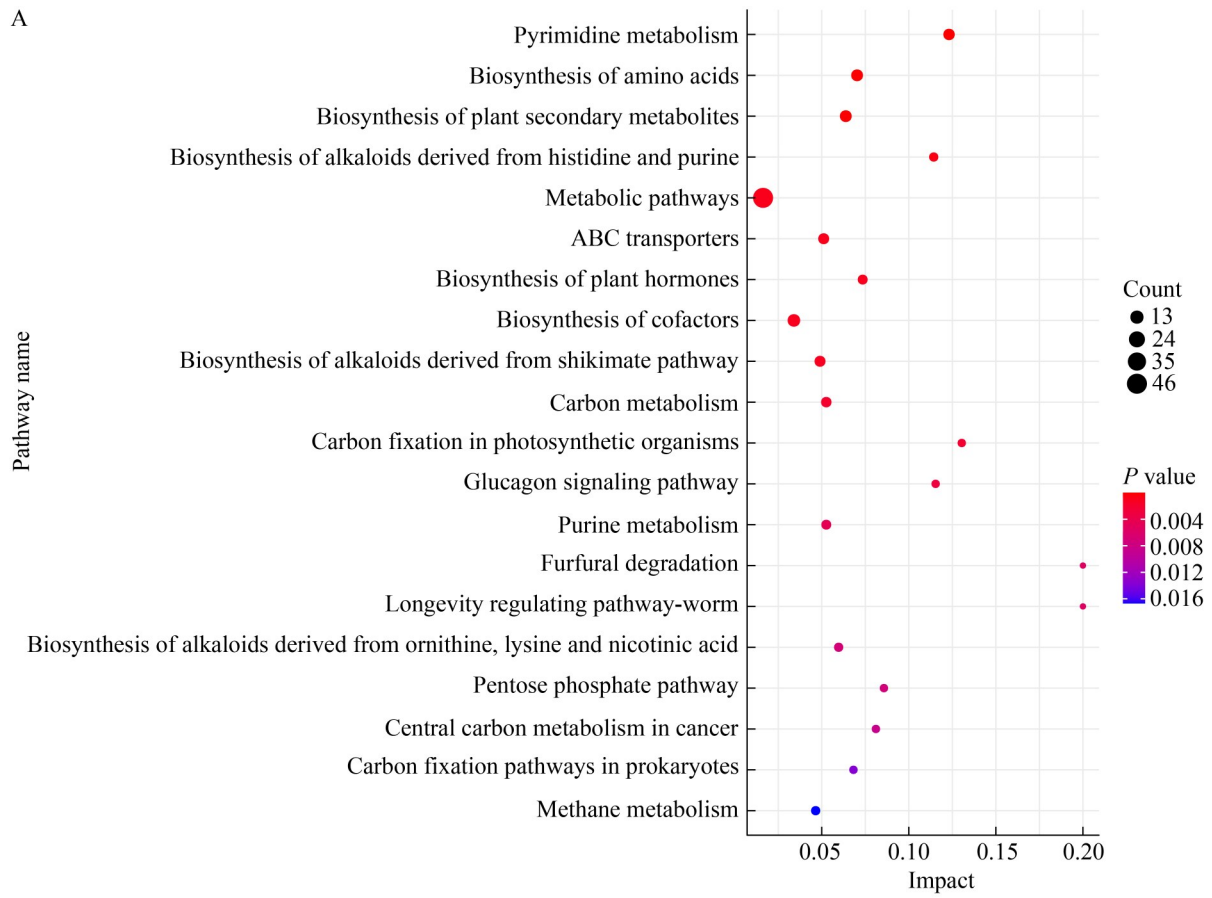


图4 酸铝处理下*Pisolithus tinctorius*细胞内(A)、外(B)差异代谢物气泡热图

Figure 4 Bubble heatmap of intracellular (A) and extracellular (B) differentially expressed metabolites in *Pisolithus tinctorius* under acidic aluminum treatment.



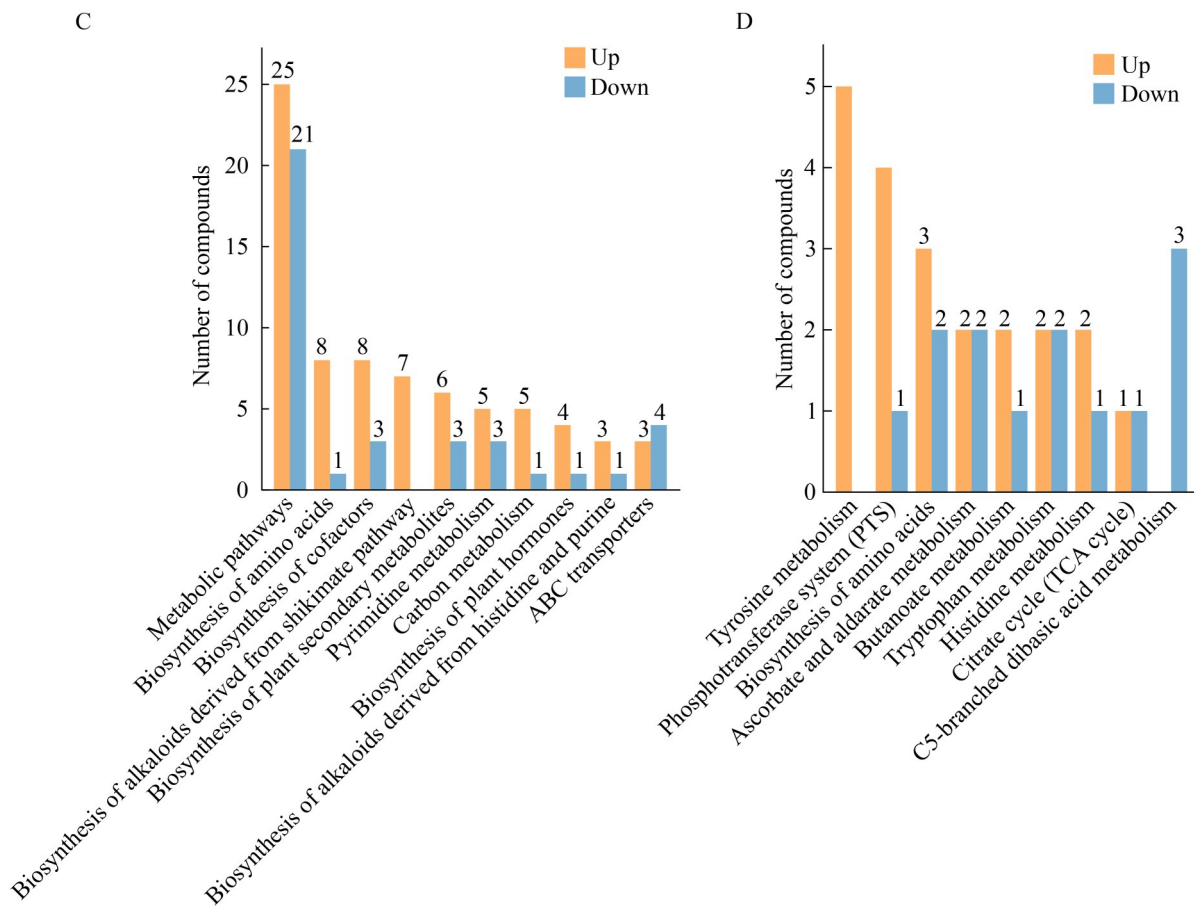


图5 酸铝处理下*Pisolithus tinctorius*细胞内、外差异代谢物的KEGG富集通路分析。A: 细胞内差异代谢物KEGG富集通路分析; B: 细胞外差异代谢物KEGG富集通路分析; C: 细胞内差异代谢物分布; D: 细胞外差异代谢物分布。

Figure 5 KEGG pathway enrichment analysis of intracellular and extracellular differentially expressed metabolites (DEMs) in *Pisolithus tinctorius* under acidic aluminum treatment. A: KEGG pathway enrichment analysis of intracellular DEMs; B: KEGG pathway enrichment analysis of extracellular DEMs; C: Distribution of intracellular DEMs; D: Distribution of extracellular DEMs.

通路中 DEMs 的分布情况(图 5C、5D)显示, 细胞内通路(除 ABC 转运子外)的 DEMs 以上调为主; 细胞外通路中酪氨酸代谢和 PTS 的 DEMs 普遍上调, 而 C5 支链二元酸代谢(C5-branched dibasic acid metabolism)通路中的 DEMs 均下调。

基因富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)结果显示, 细胞内嘧啶代谢、乙醛酸盐和二羧酸代谢(glyoxylate and dicarboxylate metabolism)、柠檬酸循环及戊糖和葡萄糖醛酸的

相互转化(pentose and glucuronate interconversions)通路显著富集($P < 0.05$, $FDR < 0.25$, 图 6A), 其核心代谢物在酸铝处理组中均上调($NES > 0$)。嘧啶代谢通路中的核心代谢物包括尿嘧啶核苷酸、胞苷磷酸、尿苷、假尿苷(pseudouridine)、尿苷二磷酸、2'-脱氧尿苷(deoxyuridine)、4,5-二氢乳清酸(4,5-dihydroorotic acid)和胞苷(cytidine)(图 7A)。此外, α -亚麻酸代谢(alpha-linolenic acid metabolism)也呈现富集趋势($P < 0.05$, 图 7B),

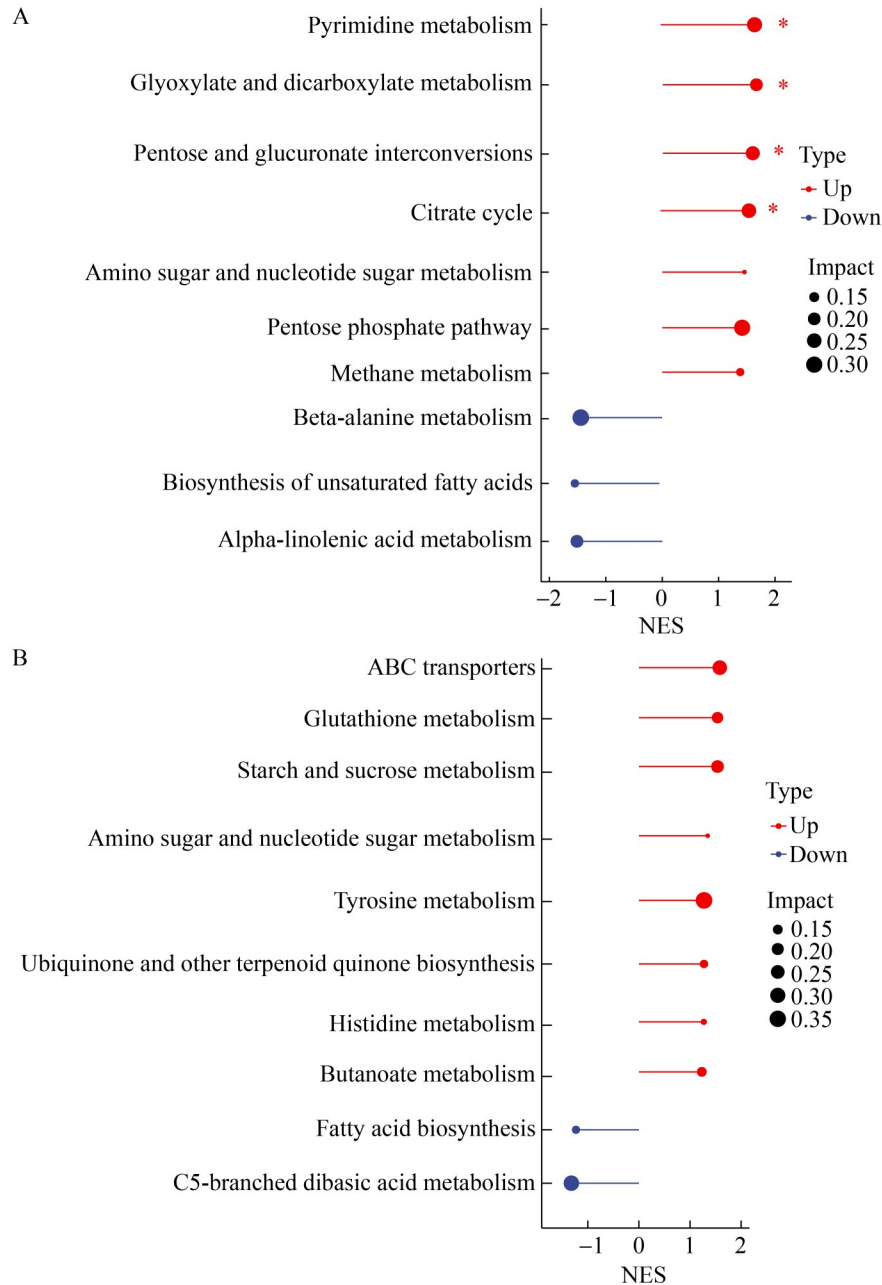


图6 酸铝处理下*Pisolithus tinctorius*细胞内(A)、外(B)代谢物的基因富集分析。Type: 富集的方向(上调/下调); Impact: 通路影响值; NES: 标准化的富集得分。

Figure 6 GSEA of intracellular (A) and extracellular (B) metabolites in *Pisolithus tinctorius* under acidic aluminum treatment. Type: Direction of enrichment (Up or down); Impact: Pathway impact value; NES: Normalized enrichment score.

其核心代谢物 α -亚麻酸(alpha-linolenic acid)、茉莉酸甲酯(methyl jasmonate)和异茉莉酸在酸铝处理组中均下调。该通路调控 JAs 合成, 进一步

证明酸铝胁迫抑制 *P. tinctorius* 体内 JAs 合成。在细胞外, 虽无通路达到 $FDR < 0.25$ 的显著性阈值(图 6B), 但 ABC 转运子和谷胱甘肽代谢

(glutathione metabolism)显示出明显的富集趋势 ($P < 0.05$, 图 7C、7D), 且其核心代谢物在酸铝处理组中上调 ($NES > 0$)。ABC 转运子通路的核心代谢物包括 L-阿拉伯糖、海藻糖、N-乙酰-D-氨基葡萄糖、4-氨基-5-羟甲基-2-甲基嘧啶 (4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine)、蔗糖 (sucrose)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、牛磺酸 (taurine)、葡萄糖 (D-glucose) 和 L-精氨酸 (L-arginine) (图 7C)。谷胱甘肽代谢通路的核心代谢物集包括 γ -谷氨酰丙氨酸 (gamma-glutamylalanine)、尸胺 (cadaverine)、GSH 和抗坏血酸 (ascorbate, ASA) (图 7D)。这些满足 $P < 0.05$ 且 $|NES| > 1.5$ 的通路, 通常被认为具有较大的生物学效应强度, 仍然是值得关注的潜在代谢通路。综上所述, *P. tinctorius* 主要通过上调细胞内嘧啶代谢、TCA 循环等通路, 并在细胞外激活 ABC 转运子及谷胱甘肽代谢等途径来响应酸铝胁迫。

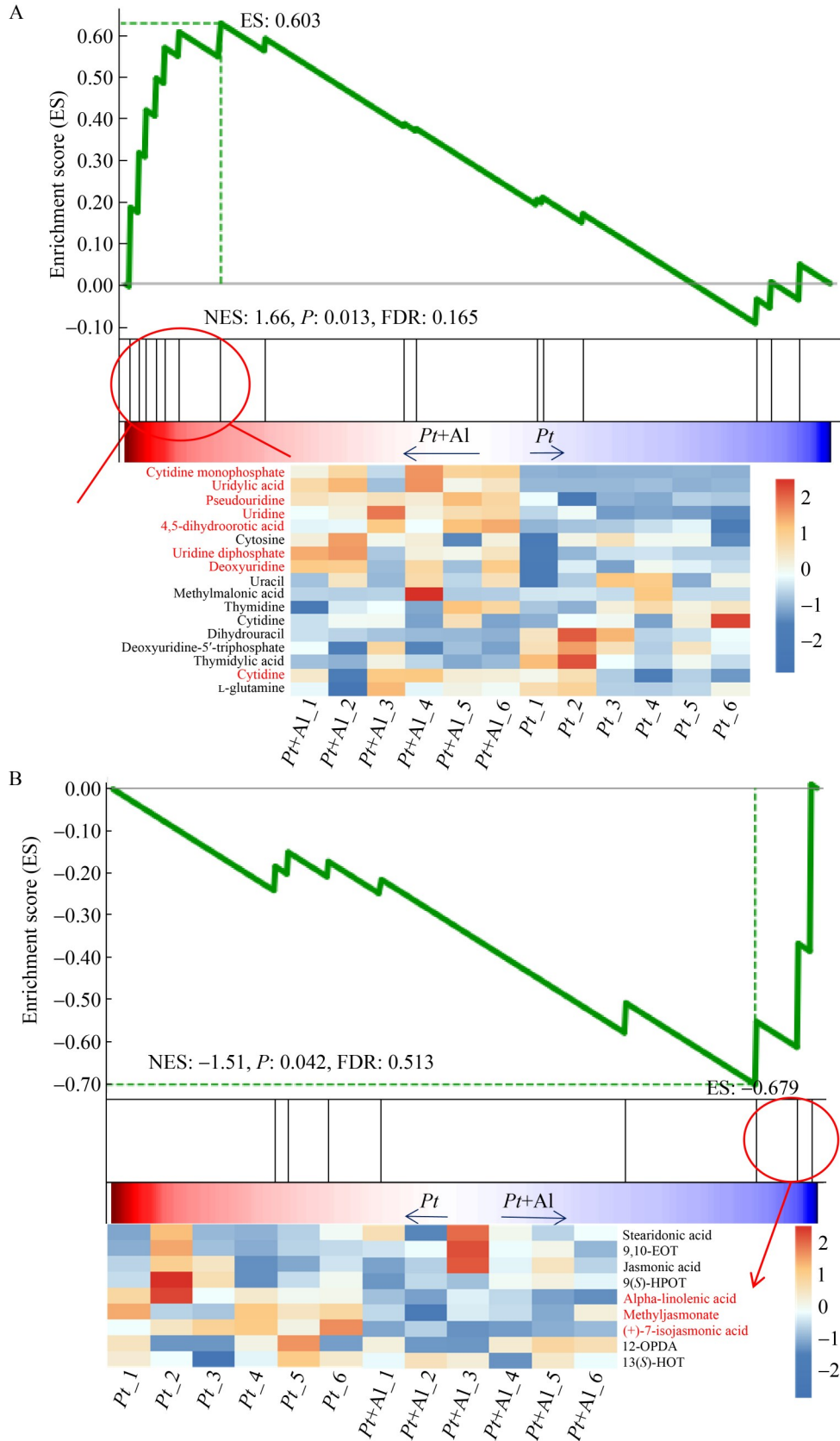
3 讨论

3.1 *P. tinctorius* 细胞内代谢对酸铝胁迫的响应

微生物受到非生物胁迫时通常会导致体内核酸受损。本研究发现, 嘧啶代谢通路在 *P. tinctorius* 细胞内显著富集, 核酸类代谢物如尿嘧啶核苷酸、胞苷磷酸、尿苷、尿苷二磷酸、胞苷和鸟苷在酸铝处理后上调 (图 6A、图 7A)。从嘧啶代谢通路的上下游关系来看^[39], RNA 的合成主要通过 2 条途径实现: 一是尿苷下游生成尿嘧啶核苷酸, 经磷酸化生成尿苷二磷酸, 进一步转化为尿苷三磷酸并参与 RNA 合成; 另一途径是胞苷下游生成胞苷磷酸, 后经胞苷二磷酸和胞苷三磷酸最终参与 RNA 合成。这些核苷酸作为 RNA 生物合成的直接前体, 其积累表明 *P. tinctorius* 可能通过调控嘧啶代谢以增加核苷酸库容, 为应激响应提供必要的核酸合成基础。此外, 尿苷不仅在核酸合成中至关重要,

还具有多种生理功能: (1) 具有一定的抗氧化能力, 可协助清除细胞内活性氧, 减轻氧化损伤^[40]; (2) 通过分解代谢产生乙酰辅酶 A, 进入 TCA 循环, 从而在能量代谢和碳骨架供应中起重要作用^[41]; (3) 在 Al^{3+} 诱导的细胞凋亡和线粒体损伤中, 尿苷及其衍生物 (如 UMP 和 UDP) 可能有助于维持线粒体功能^[42], 缓解铝毒害。同时, 本研究还观察到鸟苷含量上升, 鸟苷能够抑制细胞凋亡^[43]。何海燕^[26]也发现在镉胁迫下 *A. bisporus* 体内胞嘧啶含量增加, 腺苷和脱氧腺苷含量显著降低, 脱氧核糖磷酸含量降低, 表明其通过促进核苷酸合成、抑制分解以增强 DNA 合成与细胞分裂能力。这一结果进一步支持 *P. tinctorius* 可能通过促进核苷类物质的积累以维持细胞稳态 (图 8)。由于 1.0 mmol/L Al^{3+} 处理下 *P. tinctorius* 对磷的吸收量比无铝处理提高了 62.54%^[21], 推测多出的磷很可能被用于核苷酸的合成, 从而增强 *P. tinctorius* 对酸铝胁迫的抗性。未来可对 *P. tinctorius* 在酸铝胁迫下细胞内吸收磷的去向及运输途径展开研究, 以进一步完善 ECMF 抗铝机理研究。

脂肪酸包括饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸, 是细胞膜质的重要单体成分^[44]。不饱和脂肪酸通常与胁迫抗逆有关, 其中最常见的是 C18 不饱和脂肪酸, 包括油酸、亚油酸和亚麻酸^[45], 它们不仅是细胞外屏障的构成成分, 同时也是 JAs 等抗逆信号分子的前体^[46]。此外, C18 不饱和脂肪酸还具有抗氧化性能, 能直接清除活性氧, 并可在氧化后生成以 JA 为代表的各种氧脂素^[47]。Tan 等^[48]发现, 铅处理会诱导水稻 (*Oryza sativa*) 氧化应激, 并促进不饱和脂肪酸增加。Liu 等^[49]则报道, 农药处理后 *O. sativa* 稻米的脂质代谢发生重塑, 表现为棕榈酸和硬脂酸等饱和脂肪酸减少, 而不饱和脂肪酸亚麻酸含量上升。本研究中酸铝胁迫导致 *P. tinctorius* 多种 C18 不饱和脂肪酸下调, 包括油酸 (oleic acid)、 α -亚麻酸和十八碳四烯酸 [(6Z)-octadecenoic acid], 而且油酸的氧化产物 9-氧化辛二烯酸



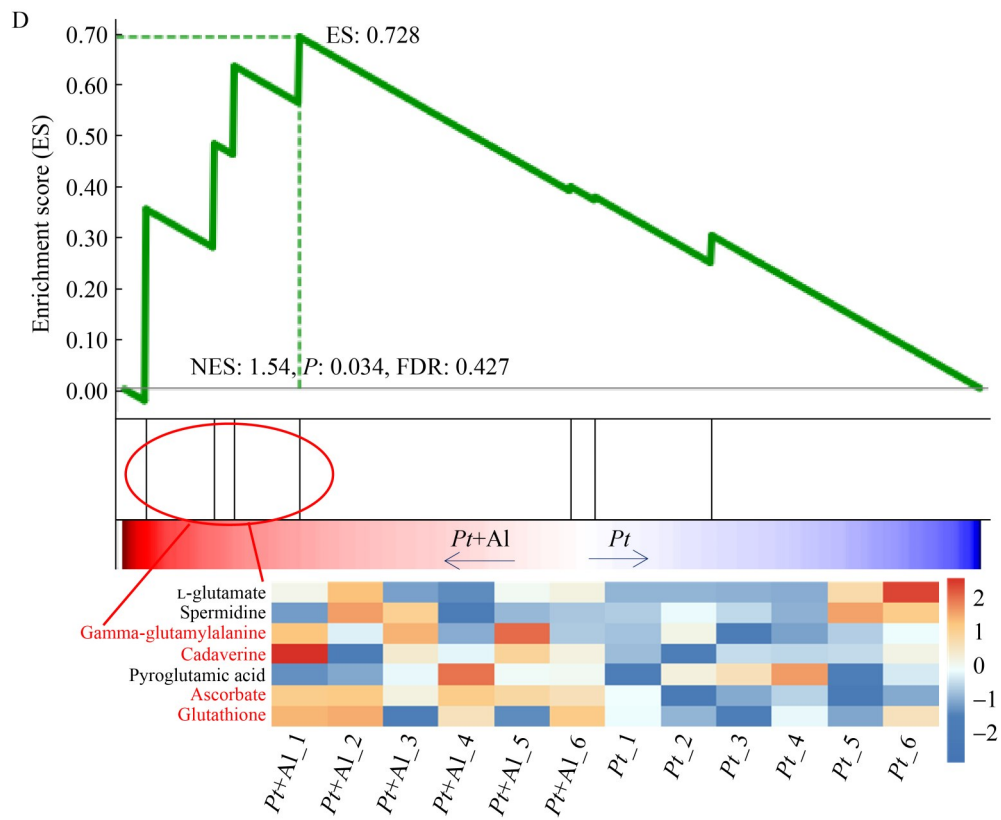
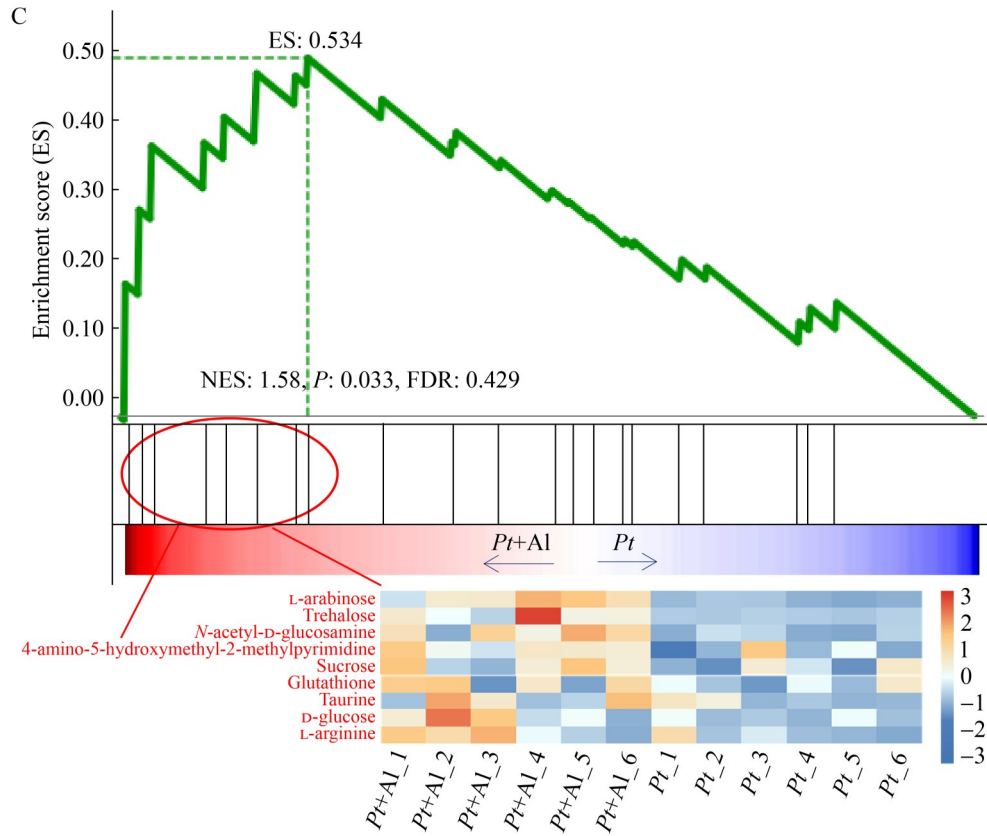


图7 酸铝处理下 *Pisolithus tinctorius* 细胞内、外关键代谢通路基因富集分析。A: 嘧啶代谢; B: α -亚麻酸代谢; C: ABC转运子; D: 谷胱甘肽代谢。曲线: 代谢物集在排序列表中的累积/分布情况; 峰值=运行富集分数(ES); 条形码: 目标列表中功能代谢物集的分布位置; 热图: 通路中富集的核心代谢物; FDR: 多重检验校正后的P值(FDR<0.25表示显著富集, 严格标准); ES (GSEA核心指标): 数值越高=富集程度越强/通路关联性越显著; 正值=代谢物集在排序中靠前, 负值=靠后; 最低点=最终通路ES值; NES: 标准化后的ES值。9,10-EOT: 9,10-epoxyoctadecatrienoic acid; 12-OPDA: 12-oxophytodienoic acid。

Figure 7 GSEA of intracellular and extracellular key metabolic pathways in *Pisolithus tinctorius* under acidic aluminum treatment. A: Pyrimidine metabolism; B: Alpha-linolenic acid metabolism; C: ABC transporters; D: Glutathione metabolism. Curve: Accumulation/distribution of metabolite sets in sorted lists; Peak=Running enrichment score (ES); Barcode: Positions of functional metabolite sets in target lists; Heat map: Core metabolites enriched in the pathway; FDR: *P* value after multiple testing, FDR<0.25=Significant enrichment, stricter; ES: GSEA core index; Higher=Greater enrichment/Stronger pathway association; Positive=Metabolite sets ranked earlier, Negative=Ranked later; Lowest point=Final pathway ES; NES: Normalized ES. 9,10-EOT: 9,10-epoxyoctadecatrienoic acid; 12-OPDA: 12-oxophytodienoic acid.

(9-OxoODE), 以及 α -亚麻酸代谢通路的下游产物茉莉酸甲酯、异茉莉酸和茉莉酮均下调(图 4A, 图 7B)。酸铝处理下 *P. tinctorius* 对铝的富集作用明显增强^[21], 细胞内积累的高浓度 Al^{3+} 极有可能会破坏膜结构, 本研究细胞内代谢物研究结果进一步证实酸铝胁迫可能使 *P. tinctorius* 细胞膜受损(图 8)。此外, 因为前体(亚麻酸)供应不足也降低了下游以 JA 为代表的抗逆防御水平, 导致 JAs 合成受抑。值得注意的是, 脂肪酸(如亚麻酸)不仅是 JAs 的前体, 还可通过 β -氧化分解为乙酰辅酶 A, 进而进入 TCA 循环以提供能量^[50]。研究表明亚麻酸的积累会影响 TCA 循环, 如以亚麻酸为碳源培养鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas*) RRS1 时其体内柠檬酸和苹果酸含量下降, TCA 循环受到影响^[47]。本研究也发现, 1.0 mmol/L Al^{3+} 使 *P. tinctorius* 胞内脂肪酸下调, 而 TCA 通路中的柠檬酸与酮戊二酸上调(图 4A), 这些现象提示亚油酸与 TCA 循环负相关。TCA 循环是细胞内糖、蛋白质和脂肪三大物质代谢及能量转化的枢纽^[51]。酮戊二酸是生物体内重要代谢节点, 参与多种生理过程, 如抗氧化防御、能量生成、信号传导与基因修饰^[52]。柠檬酸不仅是关键的代谢中间产物, 参与植物激素、辅因子、氨基酸等多种生

物合成途径, 还具有较强的螯合能力与高稳定系数^[53], 能与 Al^{3+} 形成无毒复合物^[54], 从而降低铝在细胞内的生物有效性。推测在膜脂代谢下调导致 JA 信号防御减弱的同时, *P. tinctorius* 可能通过增强 TCA 循环以维持能量供应, 补偿膜修复和逆境响应所需的能量(图 8)。需要指出的是, 尽管柠檬酸螯合 Al^{3+} 这一功能已得到广泛证实^[53-54], 未来仍可进一步采用飞行时间二次离子质谱等技术检验 Al^{3+} 在 *P. tinctorius* 细胞内的主要存在形态, 验证其是否与柠檬酸发生了络合。

3.2 *P. tinctorius* 细胞外代谢对酸铝胁迫的响应

在重金属胁迫下, ECMF 能够通过增加低分子量有机酸的分泌来抵抗金属毒性^[13]。这些有机酸主要包括草酸、柠檬酸、甲酸、乙酸、乳酸和丙酸等^[13,55]。ECMF 通过合成并释放有机酸, 能够沉淀 Al^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 等金属离子, 或形成毒性较低的可溶性金属络合物^[55], 从而降低它们的生物有效性。本研究结果显示, 在 1.0 mmol/L Al^{3+} 处理下 *P. tinctorius* 细胞外的莽草酸、富马酸、庚酸(图 4B)和酒石酸(图 3B)等有机酸均上调。其中, 酒石酸的相对含量上升尤为显著, 较对照组增加 1 559.44%, 表明它

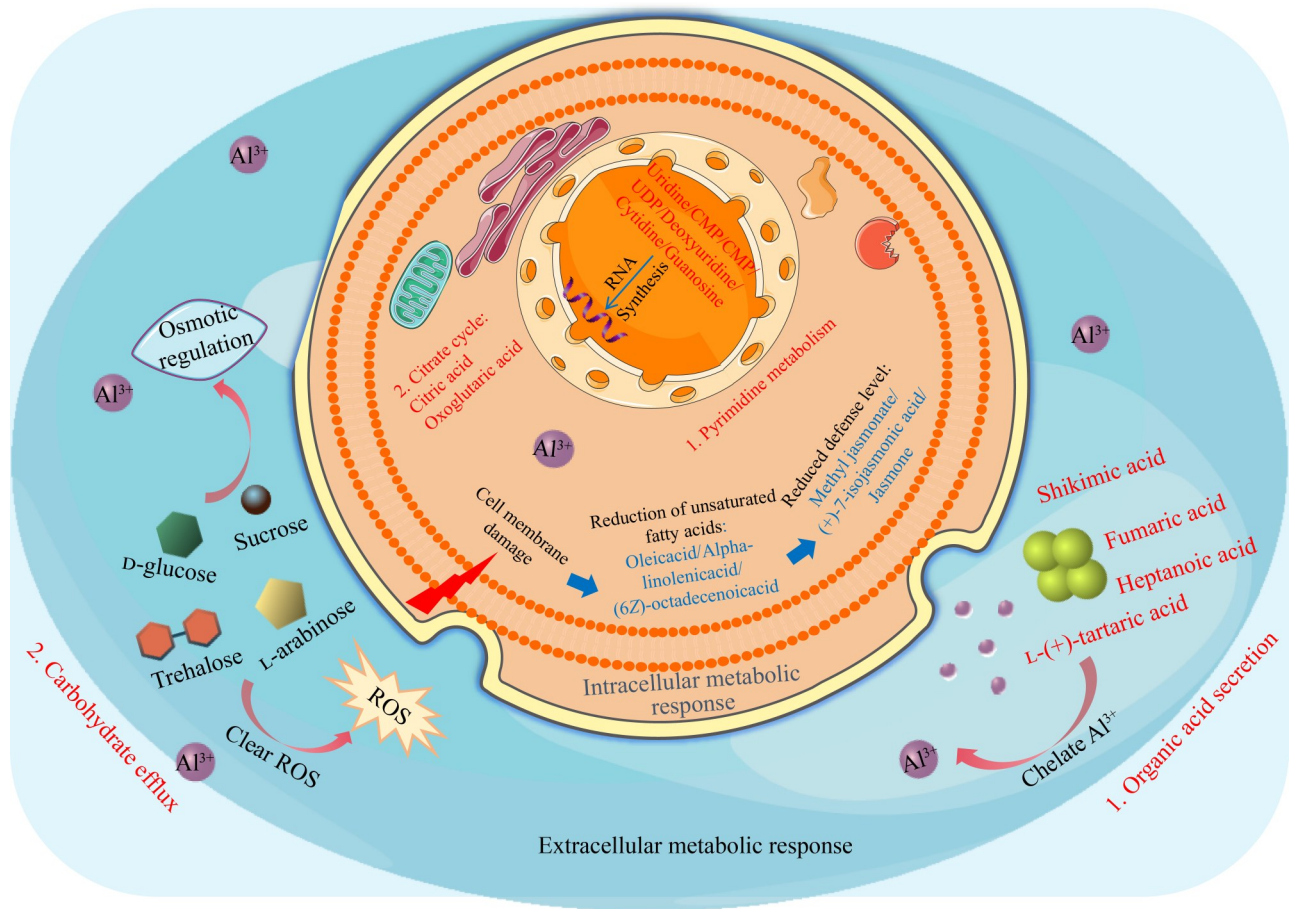


图8 *Pisolithus tinctorius*对酸铝胁迫的代谢响应

Figure 8 Metabolic response of *Pisolithus tinctorius* to acidic aluminum stress.

可能是 *P. tinctorius* 响应铝胁迫的关键分泌物。这一发现与我们前期的研究结果一致^[13], 即在更高铝浓度(2.0 mmol/L Al³⁺)处理下, *P. tinctorius* 分泌的总有机酸含量增加 29.1%, 而酒石酸含量增加 55.3%, 是分泌量最大的有机酸。值得注意的是, 在相同处理条件下 *L. deliciosus* 并未分泌酒石酸, 说明不同种类 ECMF 在有机酸分泌策略上存在明显差异, 这可能与其遗传背景和生态适应方式有关。比较不同铝浓度下的应答模式可以发现, 酒石酸在 1.0 mmol/L 和 2.0 mmol/L Al³⁺处理中均表现出显著积累, 表明它可能是 *P. tinctorius* 应对铝毒的核心有机

酸, 具备作为潜在生物标志物的价值。然而, 在 2.0 mmol/L Al³⁺处理下酒石酸的增幅远低于 1.0 mmol/L 处理, 说明在高强度 Al³⁺胁迫下, *P. tinctorius* 可能调整了有机酸分泌谱系, 转向其他种类有机酸的合成与释放。例如, 2.0 mmol/L Al³⁺处理下发现 *P. tinctorius* 甲酸分泌量显著增加, 但在该实验中并未鉴定到甲酸。甲酸能与 Al³⁺形成 1:2 络合物^[56]。我们推测, 在高铝环境中 *P. tinctorius* 可能倾向于促进甲酸等的分泌, 以更高效地钝化铝离子。此外, 2.0 mmol/L Al³⁺处理实验中还发现丁二酸显著降低, 草酸无显著变化, 而该研究中丁二酸

无显著变化,也未鉴定到草酸,相反却检测到莽草酸等有机酸。这种分泌谱的差异反映了 *P. tinctorius* 在不同胁迫强度下对代谢网络的调控,即通过动态调整有机酸的种类与数量以优化解毒效率。因此,铝胁迫浓度显著影响 *P. tinctorius* 的有机酸分泌行为:在中等铝浓度下以酒石酸等多种有机酸协同应答为主,在高铝胁迫下则可能转向分泌络合能力更强的有机酸。未来研究可进一步结合不同有机酸对 Al^{3+} 的络合常数及其解毒效应,系统评估酒石酸等在 *P. tinctorius* 铝抗性中的相对贡献,从而深化有机酸增强 ECMF 抗铝性的机制理解。

酸铝胁迫下, *P. tinctorius* 不仅通过分泌有机酸缓解铝毒,还通过调控糖类物质的代谢与转运增强自身适应性。本研究发现,ABC 转运子通路中的核心代谢物 L-阿拉伯糖、海藻糖、N-乙酰-D-氨基葡萄糖、蔗糖和葡萄糖含量在细胞外有所增加(图 4B, 图 7C)。N-乙酰-D-氨基葡萄糖是真菌细胞壁的代表性氨基糖^[57],它通过线性链构成几丁质,为细胞壁提供关键的结构支撑^[58]。该成分广泛存在于曲霉(*Aspergillus*)等多种真菌的菌丝体中^[59],通常由几丁质经酸水解或几丁质酶解产生^[60],而几丁质酶普遍存在于真菌体内^[61]。该物质在细胞外含量显著增加,暗示在 Al^{3+} 及酸性环境(pH 3.8)的共同作用下,细胞壁中的几丁质可能发生酶促或酸水解,进而导致细胞壁结构改变。然而这一推论仍需通过透射电镜等细胞超微结构观测技术加以验证。另一方面,蔗糖和葡萄糖含量的增加可能与 *P. tinctorius* 维持细胞外渗透压的机制有关。此外,L-阿拉伯糖还被报道具有抗氧化特性,能够有效清除阴离子自由基(O_2^-)和羟基自由基,并显著抑制高葡萄糖诱导的 LLC-PK1 细胞脂质过氧化,从而提高细胞活性^[62]。值得注意的是,PTS 作为真菌中广泛存在的转运系统,同样在糖类应激响应中发挥关键作用,其不仅负责碳水化合物的吸收和运输,还参与金属离子稳态及其他应激反应的调节^[63]。本研究结果显示,抗坏

血酸、谷胱甘肽、海藻糖等代谢物富集于该通路上。其中,海藻糖是一种重要的非生物胁迫应激物质,具有调节渗透压、促进抗氧化剂积累、清除活性氧以及保护细胞结构等多种功能^[64-67]。研究表明外源添加海藻糖能显著提高生物体内抗氧化物 GSH 和 AsA 含量,降低丙二醛水平,并通过清除过氧化氢和 O_2^- 来参与非生物胁迫响应^[65]。本研究也发现 *P. tinctorius* 胞外 GSH 和 ASA 含量升高(图 7D),推测胞外海藻糖也可能促进菌株外排抗氧化剂,通过积累抗氧化物质来减轻细胞外氧化损伤。综上所述, *P. tinctorius* 可能通过 ABC 转运子和磷酸转移酶系统的协同作用调控糖类物质的向外分泌,共同实现胞外环境稳态维持和氧化应激缓解,从而提高酸铝胁迫下的生存适应性(图 8)。此外,作为一类特殊的微生物,ECMF 分泌的代谢物可能具有调节土壤环境的潜力。这些物质可作为信号分子,对共生体系中的宿主植物根系存在重要影响,调控其生理生化过程。当 ECMF 与植物共生时海藻糖向胞外的分泌或许可作为外源信号物质,通过提高光合作用^[66]、渗透调节^[67]、增强抗氧化^[65]及促进养分吸收^[68]等方面作用共同增强宿主植物对铝胁迫的抗性。未来可以定量检测并筛选 ECMF 的这些胞外代谢物,通过外源添加方式探究其对宿主植物根系生长生理及抗铝性的影响。

本研究还观察到,酸铝胁迫下的菌落中心有大量红褐色物质积累(图 1F),推测可能是真菌应激产生的色素或酚类等次级代谢产物。此类物质通常对 pH 和金属离子较为敏感^[69],其具体组成成分及潜在功能(如抗氧化或物理屏障)有待未来进一步研究阐明。此外,在 1.0 mmol/L Al^{3+} 胁迫下, *P. tinctorius* 的核心代谢响应体现为初生代谢网络的重塑,而大量已鉴定的次生代谢物(如苯酚、黄酮类等)则保持稳定。未来的研究可借助微生物专属数据库(如 microbeMASST 和 MetOrigin)或靶向代谢组学技术进一步验证和探索其次生代谢调控机制。本研究中

P. tinctorius 细胞内代谢物在正离子模式下的解释率不足 50.00% (图 2A), 推测是因正离子模式对氨基酸等代谢物检测更敏感^[70]引起, 而本研究发现的差异表达氨基酸极少, 导致解释率达不到 50.00% 的常规要求。为弥补此不足, 未来可通过靶向代谢组学检测 *P. tinctorius* 氨基酸代谢对酸铝胁迫的响应。需要指出的是, 本研究采用的体外纯培养体系与复杂自然环境存在差异, 因此筛选到的潜在代谢物在自然林地生态系统中的适用性可能具有一定限制。同时, 纯培养体系不同于自然共生状态, 未来可开展其与宿主植物(如桉树或马尾松等)共生体系下的代谢组学研究。此外, 试验仅在固定铝浓度 (1.0 mmol/L Al³⁺) 和 pH 3.8 条件下进行, 未能系统评估不同胁迫强度与 pH-铝毒性的交互效应。今后可在此基础上开展多梯度胁迫实验, 以更全面揭示 ECMF 的抗铝机制。

4 结论

本研究从生长、细胞内外代谢水平探究了 ECMF 自身代谢对铝毒的响应及潜在解毒策略。结果表明, 酸铝胁迫显著抑制 *P. tinctorius* 生长, 同时导致茉莉酸类防御代谢物合成受抑。为响应胁迫, *P. tinctorius* 促进了细胞内尿嘧啶核苷酸、胞苷磷酸、尿苷、尿苷二磷酸、胞苷和鸟苷等核苷酸积累来维持细胞稳态, 并增强 TCA 循环以保障能量和物质交换。在细胞外, *P. tinctorius* 一方面促进莽草酸、富马酸、庚酸和酒石酸等有机酸分泌缓解铝毒, 另一方面通过调控 ABC 转运子和磷酸转移酶系统通路促进 L-阿拉伯糖、海藻糖、蔗糖和葡萄糖等糖类的外排, 维持渗透平衡与抗氧化防御。本研究从代谢层面深化了对 ECMF 抗铝机制的理解, 为利用 ECMF 修复铝污染林地提供了理论依据和新视角。

作者贡献声明

吕亚茹: 数据分析与可视化, 文献查阅, 文章撰

写与修改; 胡佳: 执行实验和数据收集; 辜夕容: 选题与课题设计, 获取基金, 文章润色; 文思伽: 实验方法查阅; 徐诗蕊: 协助实验操作; 周晓宇: 协助样品收集。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] JIANG J, WANG YP, YU MX, CAO NN, YAN JH. Soil organic matter is important for acid buffering and reducing aluminum leaching from acidic forest soils[J]. *Chemical Geology*, 2018, 501: 86-94.
- [2] ZHANG QY, ZHU JX, WANG QF, XU L, LI MX, DAI GH, MULDER J, XI Y, HE NP. Soil acidification in China's forests due to atmospheric acid deposition from 1980 to 2050[J]. *Science Bulletin*, 2022, 67(9): 914-917.
- [3] DING Y, SUN LH, LI C, CHEN ML, ZHOU YX, MENG MJ, LI ZH, ZHANG JC, LIU X. Effects of short-term simulated acid rain and nitrogen deposition on soil nutrients and enzyme activities in *Cunninghamia lanceolata* plantation[J]. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2024, 12: 1365954.
- [4] WANG XY, YANG M, CHEN HQ, CAI ZM, FU WS, ZHANG X, SUN FQ, LI YQ. Monitoring and prevention strategies for iron and aluminum pollutants in acid mine drainage (AMD): evidence from xiaomixi stream in Qinling Mountains[J]. *Minerals*, 2025, 15(1): 59.
- [5] DELHAIZE E, RYAN PR. Aluminum toxicity and tolerance in plants[J]. *Plant Physiology*, 1995, 107(2): 315-321.
- [6] OSAWA H, ENDO I, HARA Y, MATSUSHIMA Y, TANGE T. Transient proliferation of proanthocyanidin-accumulating cells on the epidermal apex contributes to highly aluminum-resistant root elongation in camphor tree[J]. *Plant Physiology*, 2011, 155(1): 433-446.
- [7] SHETTY R, VIDYA CS, PRAKASH NB, LUX A, VACULÍK M. Aluminum toxicity in plants and its possible mitigation in acid soils by biochar: a review[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 765: 142744.
- [8] SINGH S, TRIPATHI DK, SINGH S, SHARMA S, DUBEY NK, CHAUHAN DK, VACULÍK M. Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: a review[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2017, 137: 177-193.
- [9] EDIRIWEERA AN, LU WH, PEREZ MORENO J, KALAMULLA R, MAYADUNNA N, PELEWATTA A, DISSANAYAKE G, MADUWANTHI I, WIJESORIYA M, DAI DQ, YAPA N, TIBPROMMA S. Ectomycorrhizal fungal symbiosis on plant nutrient acquisition in tropical ecosystems[J]. *New Zealand Journal of Botany*, 2025, 63(5): 1871-1894.
- [10] GU XR, JIANG YN, WANG XH, JIA H, LI J, CUI Y, HU

- J, MAO QZ, HE XH. Differences in aluminum tolerance and immobilization between two indigenous ectomycorrhizal fungi *Lactarius deliciosus* and *Pisolithus tinctorius* from Southwest China's forest stands[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 213: 112042.
- [11] NYAMSANJAA K, GENSEKI A, HATANO T, OYUNTSETSEG B, NARISAWA K, WATANABE M. Accumulation of aluminium and arsenic in *Cenococcum geophilum Sclerotia* from forest soil affected by mining smoke[J]. *Chemistry and Ecology*, 2024, 40(3): 276-291.
- [12] VÄRE H. Aluminium polyphosphate in the ectomycorrhizal fungus *Suillus variegatus* (Fr.) O. Kunze as revealed by energy dispersive spectrometry[J]. *New Phytologist*, 1990, 116(4): 663-668.
- [13] 江亚男, 辜夕容, 周倩, 贾豪. 铝胁迫下两种外生菌根真菌的有机酸分泌与吸收动力学特征[J]. *生态学杂志*, 2019, 38(11): 3441-3449.
- JIANG YN, GU XR, ZHOU Q, JIA H. Organic acid secretion and aluminum absorption kinetics by *Lactarius deliciosus* and *Pisolithus tinctorius* under aluminum stress[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2019, 38(11): 3441-3449 (in Chinese).
- [14] 周倩. 低pH时外生菌根真菌对铝毒的响应及抗(耐)性机理研究[D]. 重庆: 西南大学, 2013.
- ZHOU Q. Research on the response and tolerance mechanism of ectomycorrhizal fungi to aluminum toxicity in low pH condition[D]. Chongqing: Southwest University, 2013 (in Chinese).
- [15] 李华, 黄建国, 袁玲. 铝和锰对外生菌根真菌生长、养分吸收及分泌作用的影响[J]. *环境科学*, 2013, 34(1): 315-320.
- LI H, HUANG JG, YUAN L. Influence of aluminum and manganese on the growth, nutrient uptake and the efflux by ectomycorrhizal fungi[J]. *Environmental Science*, 2013, 34(1): 315-320 (in Chinese).
- [16] 冯婧玮, 冯万艳, 孙学广. 粘盖乳牛肝菌在低磷、酸铝胁迫下的生长和代谢响应[J]. *菌物学报*, 2022, 41(7): 1055-1067.
- FENG JW, FENG WY, SUN XG. Growth and metabolic responses of *Suillus bovinus* under low phosphorus and acidic-aluminum stress[J]. *Mycosystema*, 2022, 41(7): 1055-1067 (in Chinese).
- [17] 邓叔群. 中国的真菌[M]. 北京: 科学出版社, 1963: 683.
- DENG SQ. *Fungi of China*[M]. Beijing: Science Press, 1963: 683 (in Chinese).
- [18] 弓明钦, 陈应龙, 仲崇禄. 菌根研究及应用[M]. 北京: 中国林业出版社, 1997: 14-60.
- GONG MQ, CHEN YL, ZHONG CL. *Mycorrhizal Research and Application*[M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 1997: 14-60 (in Chinese).
- [19] CAIRNEY JWG, CHAMBERS SM. Interactions between *Pisolithus tinctorius* and its hosts: a review of current knowledge[J]. *Mycorrhiza*, 1997, 7(3): 117-131.
- [20] 花晓梅. 外生菌根真菌彩色豆马勃优良菌株营养源的研究[J]. *林业科学研究*, 1995, 8(6): 597-604.
- [21] 吴雪莲, 周倩, 辜夕容, 万宇轩, 毛文韬, 宋影, 曾清苹. 西南林区3株外生菌根真菌对酸铝胁迫的营养响应与抗铝性[J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2015, 37(8): 13-19.
- WU XL, ZHOU Q, GU XR, WAN YX, MAO WT, SONG Y, ZENG QP. Resistance and nutritional response to aluminum toxicity of three ectomycorrhizal fungi from forest soils in southwest China[J]. *Journal of Southwest University (Natural Science Edition)*, 2015, 37(8): 13-19 (in Chinese).
- [22] 闫震, 陈万权, 张昊, 刘太国, 刘长仲, 冯洁. 丝状真菌代谢组学研究方法进展[J]. *植物保护*, 2021, 47(5): 98-109.
- YAN Z, CHEN WQ, ZHANG H, LIU TG, LIU CZ, FENG J. Advances in research methods of filamentous fungal metabolomics[J]. *Plant Protection*, 2021, 47(5): 98-109 (in Chinese).
- [23] LU HM, GAN DD, ZHANG ZM, LIANG YZ. Sample classification of GC-ToF-MS metabolomics data without the requirement for chromatographic deconvolution[J]. *Metabolomics*, 2011, 7(2): 191-205.
- [24] 梁强, 郭晓晖, 周蓓莉, 赵国华. 代谢指纹分析及其在食品科学中的应用[J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(10): 134-138.
- LIANG Q, GUO XH, ZHOU BL, ZHAO GH. Metabolic fingerprinting analysis and the application in food science[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2011, 37(10): 134-138 (in Chinese).
- [25] 姚雪丹, 付建红, 徐彤, 孙浩然. 重金属胁迫下的微生物代谢组学研究进展[J]. *生物资源*, 2020, 42(6): 678-685.
- YAO XD, FU JH, XU T, SUN HR. Metabolomics of microorganisms in response to heavy metal stress[J]. *Biotic Resources*, 2020, 42(6): 678-685 (in Chinese).
- [26] 何海燕. 双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)对土壤镉胁迫的抗性机制研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2020.
- [27] 张萍, 杨光滢, 李柏忠. 大气污染条件下马尾松针叶营养元素变化的研究[J]. *林业科学研究*, 1995, 8(4): 462-465.
- [28] WANG YH, SOLBERG S, YU PT, MYKING T, VOGT RD, DU SC. Assessments of tree crown condition of two Masson pine forests in the acid rain region in South China[J]. *Forest Ecology and Management*, 2007, 242(2/3): 530-540.
- [29] GU XR, JIA H, WANG XH, JIANG YN, LI J, HE XH. Differential aluminum tolerance and absorption characteristics in *Pinus massoniana* seedlings colonized with ectomycorrhizal fungi of *Lactarius deliciosus* and *Pisolithus tinctorius*[J]. *Journal of Forestry Research*, 2023, 34(5): 1523-1533.
- [30] 刘厚田, 田仁生. 重庆南山马尾松衰亡与土壤铝活化的关系[J]. *环境科学学报*, 1992, 12(3): 297-305.
- LIU HT, TIAN RS. Relationship between decline of a Masson pine forest and aluminum activation in Nanshan, Chongqing[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 1992, 12(3): 297-305 (in Chinese).
- [31] PINU FR, VILLAS-BOAS SG, AGGIO R. Analysis of intracellular metabolites from microorganisms: quenching and extraction protocols[J]. *Metabolites*, 2017, 7(4): 53.
- [32] KAUFMANN M, KLINGER C. *Functional Genomics*[M]. New York: Springer New York, 2012.
- [33] DUNN WB, BROADHURST D, BEGLEY P, ZELEN A, FRANCIS-MCINTYRE S, ANDERSON N, BROWN

- M, KNOWLES JD, HALSALL A, HASELDEN JN, NICHOLLS AW, WILSON ID, KELL DB, GOODACRE R. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry[J]. *Nature Protocols*, 2011, 6(7): 1060-1083.
- [34] SMITH CA, WANT EJ, O' MAILLE G, ABAGYAN R, SIUZDAK G. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification[J]. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(3): 779-787.
- [35] NAVARRO-REIG M, JAUMOT J, GARCÍA-REIRIZ A, TAULER R. Evaluation of changes induced in rice metabolome by Cd and Cu exposure using LC-MS with XCMS and MCR-ALS data analysis strategies[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015, 407(29): 8835-8847.
- [36] THÉVENOT EA, ROUX A, XU Y, EZAN E, JUNOT C. Analysis of the human adult urinary metabolome variations with age, body mass index, and gender by implementing a comprehensive workflow for univariate and OPLS statistical analyses[J]. *Journal of Proteome Research*, 2015, 14(8): 3322-3335.
- [37] KIEFFER DA, PICCOLO BD, VAZIRI ND, LIU SM, LAU WL, KHAZAEI M, NAZERTEHRANI S, MOORE ME, MARCO ML, MARTIN RJ, ADAMS SH. Resistant starch alters gut microbiome and metabolomic profiles concurrent with amelioration of chronic kidney disease in rats[J]. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 2016, 310(9): F857-F871.
- [38] XIA JG, WISHART DS. Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst[J]. *Nature Protocols*, 2011, 6(6): 743-760.
- [39] 刘聪, 冯佳妮, 李玮玮, 朱伟伟, 薛云新, 王岱, 赵西林. 细胞 dNTP 库的稳态维持与基因组稳定性[J]. *遗传*, 2022, 44(2): 96-106.
LIU C, FENG JN, LI WW, ZHU WW, XUE YX, WANG D, ZHAO XL. Maintenance of dNTP pool homeostasis and genomic stability[J]. *Hereditas (Beijing)*, 2022, 44(2): 96-106 (in Chinese).
- [40] AL N, ÇAKIR A, KOÇ C, CANSEV M, ALKAN T. Antioxidative effects of uridine in a neonatal rat model of hyperoxic brain injury[J]. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 2020, 50(8): 2059-2066.
- [41] ZHANG YM, GUO SG, XIE CY, FANG J. Uridine metabolism and its role in glucose, lipid, and amino acid homeostasis[J]. *BioMed Research International*, 2020, 2020(1): 7091718.
- [42] 白雪仪, 黄锭, 谢盼, 孙瑞强, 周航, 刘煜. 尿苷对线粒体功能的影响[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(9): 3695-3709.
BAI XY, HUANG D, XIE P, SUN RQ, ZHOU H, LIU Y. Effect of uridine on mitochondrial function[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(9): 3695-3709 (in Chinese).
- [43] KELLY KJ, PLOTKIN Z, DAGHER PC. Guanosine supplementation reduces apoptosis and protects renal function in the setting of ischemic injury[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2001, 108(9): 1291-1298.
- [44] ADIGUN OA, NADEEM M, PHAM TH, JEWELL LE, CHEEMA M, THOMAS R. Recent advances in biochemical, molecular and physiological aspects of membrane lipid derivatives in plant pathology[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2021, 44(1): 1-16.
- [45] HE M, DING NZ. Plant unsaturated fatty acids: multiple roles in stress response[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 562785.
- [46] WASTERNAK C, STRNAD M. Jasmonates: news on occurrence, biosynthesis, metabolism and action of an ancient group of signaling compounds[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(9): 2539.
- [47] 木其尔. 基于脂质组学研究毒死蜱对水稻及根际微生物代谢的影响[D]. 桂林: 桂林理工大学, 2023.
MU QE. The effect of chlorpyrifos on rice and rhizosphere microbial metabolism was studied based on lipidomics[D]. Guilin: Guilin University of Technology, 2023 (in Chinese).
- [48] TAN B, TAN X, LIU C, ZENG Y, LI YH. Effects of lead stress on rice (*Oryza sativa* L.) growth and metabolism in the rhizosphere microenvironment: the role of eicosanoid compounds[J]. *Plant Growth Regulation*, 2022, 96(3): 483-495.
- [49] LIU N, ZHU LZ. Metabolomic and transcriptomic investigation of metabolic perturbations in *Oryza sativa* L. triggered by three pesticides[J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(10): 6115-6124.
- [50] 丁颖, 贺江, 刘艳艳, 李晓莎, 刘兴华. 病原真菌中 β -氧化途径研究进展[J]. *现代农业科技*, 2025(3): 76-81.
DING Y, HE J, LIU YY, LI XS, LIU XH. Research progress on β -oxidation pathway in pathogenic fungi[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2025(3): 76-81 (in Chinese).
- [51] HUI S, GHERGUROVICH JM, MORSCHER R, JANG C, TENG X, LU WY, ESPARZA LA, REYA T, L ZHAN, YANXIANG GUO J, WHITE E, RABINOWITZ JD. Glucose feeds the TCA cycle *via* circulating lactate[J]. *Nature*, 2017, 551(7678): 115-118.
- [52] LEGENDRE F, MacLEAN A, APPANNA VP, APPANNA VD. Biochemical pathways to α -ketoglutarate, a multi-faceted metabolite[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2020, 36(8): 123.
- [53] RAJAN KS, MAINER S, RAJAN NL, DAVIS JM. Studies on the chelation of aluminum for neurobiological application[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 1981, 14(4): 339-350.
- [54] MUJIKI JI, UGALDE JM, LOPEZ X. Aluminum speciation in biological environments. the deprotonation of free and aluminum bound citrate in aqueous solution[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2012, 14(36): 12465-12475.
- [55] JOHANSSON EM, FRANSSON PMA, FINLAY RD, van HEES PAW. Quantitative analysis of root and ectomycorrhizal exudates as a response to Pb, Cd and stress[J]. *Plant and Soil*, 2008, 313(1): 39-54.
- [56] ETOU M, YOSHIDA M, OKAUE Y, INOUE T, YOKOYAMA T. Complexation of aluminum ions with formic acid under acidic condition: 27Al NMR, ESI-MS, and DFT study[J]. *European Journal of Inorganic*

- Chemistry, 2025, 28(11): e202400839.
- [57] JOERGENSEN RG. Amino sugars as specific indices for fungal and bacterial residues in soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2018, 54(5): 559-568.
- [58] ARROYO J, FARKAŠ V, SANZ AB, CABIB E. 'Strengthening the fungal cell wall through chitin-glucan cross-links: effects on morphogenesis and cell integrity'[J]. *Cellular Microbiology*, 2016, 18(9): 1239-1250.
- [59] LEAL AFG, LOPES NEP, CLARK ATR, de PONTES FILHO NT, BELTRÃO EIC, NEVES RP. Carbohydrate profiling of fungal cell wall surface glycoconjugates of *Aspergillus* species in brain and lung tissues using lectin histochemistry[J]. *Medical Mycology*, 2012, 50(7): 756-759.
- [60] BINOD P, SANDHYA C, SUMA P, SZAKACS G, PANDEY A. Fungal biosynthesis of endochitinase and chitinase in solid state fermentation and their application for the production of *N*-acetyl-D-glucosamine from colloidal chitin[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98(14): 2742-2748.
- [61] HARTL L, ZACH S, SEIDL-SEIBOTH V. Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(2): 533-543.
- [62] SONG YB, KIM B, CHOI MJ, SONG YO, CHO EJ. Protective effect of arabinose and sugar beet pulp against high glucose-induced oxidative stress in LLC-PK1 cells[J]. *Food Chemistry*, 2012, 134(1): 189-194.
- [63] 刘倩钰, 吴丽雯, 牛建军, 赵西林. 细菌磷酸转移酶系统(PTS)的组成与功能研究进展[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(7): 2266-2277.
LIU QY, WU LW, NIU JJ, ZHAO XL. Research progress of the composition and function of bacterial phosphotransferase system[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(7): 2266-2277 (in Chinese).
- [64] 刘兵. γ -氨基丁酸和海藻糖对高温胁迫香菇菌丝胞外酶活性的影响[D]. 太谷: 山西农业大学, 2017.
- LIU B. Effect of GABA and trehalose on the activity of exoenzyme induced by heat stress in mycelia of *Lentinus edodes*[D]. Taiyu: Shanxi Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [65] 杨滢. 番茄植株耐盐性对海藻糖的响应机制[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2023.
YANG Y. Mechanism of salt tolerance response to trehalose in tomato plants[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2023 (in Chinese).
- [66] SAMADI S, HABIBI G, VAZIRI A. Exogenous trehalose alleviates the inhibitory effects of salt stress in strawberry plants[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2019, 41(7): 112.
- [67] NOUNJAN N, THEERAKULPISUT P. Effects of exogenous proline and trehalose on physiological responses in rice seedlings during salt-stress and after recovery[J]. *Plant, Soil and Environment*, 2012, 58(7): 309-315.
- [68] ROHMAN MM, ISLAM MR, MONSUR MB, AMIRUZZAMAN M, FUJITA M, HASANUZZAMAN M. Trehalose protects maize plants from salt stress and phosphorus deficiency[J]. *Plants*, 2019, 8(12): 568.
- [69] 刘敏芳. 红心曲来源 *Thermoascus aurantiacus* QH-1 红色色素的合成条件优化、生物活性及组分分析[D]. 太原: 山西师范大学, 2024.
LIU MF. Study on optimization of synthesis conditions, biological activity and component analysis of the red pigment from *Thermoascus aurantiacus* QH-1 derived Hongxinqu[D]. Taiyuan: Shanxi Normal University, 2024 (in Chinese).
- [70] 黄建鹏, 张锦, 刘丹, 高杉杉, 张瑞萍, 贺玖明. 正负离子切换扫描质谱成像分析方法及其整体动物体内代谢应用研究[J]. *分析测试学报*, 2021, 40(2): 256-262.
HUANG JP, ZHANG J, LIU D, GAO SS, ZHANG RP, HE JM. A positive/negative ion mode-switched mass spectrometry imaging method and its application in metabolomics analysis of whole-body animals[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2021, 40(2): 256-262 (in Chinese).