

# 云南黑松露及其共生松根的物质及通路关联分析

张实润<sup>1#</sup>, 董杰<sup>1#</sup>, 张曦予<sup>2</sup>, 王成凤<sup>1</sup>, 刘夏<sup>1</sup>, 刘佳艳<sup>1</sup>, 吕为<sup>1</sup>, 李宗菊<sup>3\*</sup>

1 云南大学 生命科学学院, 云南 昆明 650500

2 云南大学 国际河流与生态安全研究院, 云南 昆明 650500

3 云南大学 生态与环境学院, 云南 昆明 650500

张实润, 董杰, 张曦予, 王成凤, 刘夏, 刘佳艳, 吕为, 李宗菊. 云南黑松露及其共生松根的物质及通路关联分析[J]. 微生物学报, 2025, 65(1): 337-361.

ZHANG Shirun, DONG Jie, ZHANG Xiyu, WANG Chengfeng, LIU Xia, LIU Jiayan, LYU Wei, LI Zongju. Correlation analyses of substances and pathways of *Tuber sinenses* and their symbiotic pine roots[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(1): 337-361.

**摘要:** 松露必须与植物共生形成外生菌根, 通过与菌根进行物质互利交换才能形成子实体。【目的】云南黑松露(*Tuber sinense*, SL)多与云南松(*Pinus yunnanensis*)共生, 探明云南松露与其共生松树的物质交流。【方法】应用液相质谱(liquid chromatograph mass spectrometer, LC-MS)技术, 对新鲜的云南黑松露及云南松松根(*Pinus yunnanensis* roots, SG)的代谢物谱进行分析。【结果】在 SL 及 SG 中分别检测到 1 304 个和 1 516 个物质, 其中 SL 特有物质(*Tuber sinense* specificity, SLS) 399 个, SG 特有物质(*Pinus yunnanensis* roots specificity, SGS) 611 个; 二者共有的显著差异物质 294 个, 包括 SL 上调物质(differential metabolites-up, DEMs-up) 93 个, SL 下调物质 201 个。网络相关分析表明, 相对含量 $\geq 2.0$ 的 100 个(SLS 及 SGS 40 个, DEMs-up 60 个)物质有 92 个存在显著相关性。SLS 及 SGS 中 29 个关联物质及 DEMs-up 中 19 个物质, 富集到 15 条重要通路, 其主要涉及次生代谢产物的生物合成、氨基酸的生物合成及代谢、维生素的生物合成及代谢三大类通路。【结论】松露及松根所含有的代谢物间存在一定的网络关联; 松露及松根中含有的一些物质, 包括环磷酸腺苷(cAMP)、植物甾醇、3-吡啶乙酸等物质对子实体的发育具有重要的调控作用。研究结果为今后分析与子实体发育相关的潜在信号分子及探明云南松露与其共生松树的共生机制提供了理论依据, 同时为筛选菌根苗及子实体的促生物质, 为规模化人工培养松露等奠定了实践基础。

**关键词:** 云南黑松露; 松根; 物质关联; 通路关联

资助项目: 国家自然科学基金(31560575); 云南省自然科学基金(2014FA020)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31560575) and the Natural Science Foundation of Yunnan Province (2014FA020).

<sup>#</sup>Those authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. E-mail: zjlee@ynu.edu.cn

Received: 2024-07-23; Accepted: 2024-11-02; Published online: 2024-11-05

## Correlation analyses of substances and pathways of *Tuber sinenses* and their symbiotic pine roots

ZHANG Shirun<sup>1#</sup>, DONG Jie<sup>1#</sup>, ZHANG Xiyu<sup>2</sup>, WANG Chengfeng<sup>1</sup>, LIU Xia<sup>1</sup>, LIU Jiayan<sup>1</sup>, LYU Wei<sup>1</sup>, LI Zongju<sup>3\*</sup>

1 School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650500, Yunnan, China

2 Institute of International Rivers and Eco-security, Yunnan University, Kunming 650500, Yunnan, China

3 School of Ecology and Environmental Science, Yunnan University, Kunming 650500, Yunnan, China

**Abstract:** Truffles must be symbiotic with plants to form ectomycorrhiza (ECM), which facilitates the formation of fruiting bodies by mutually beneficial exchanges of substances. **[Objective]** To elucidate the flow of substances between *Tuber sinense* and *Pinus yunnanensis* in a symbiosis relationship. **[Methods]** Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) was employed to analyze the metabolite profiles of freshly harvested *T. sinense* (SL) and *P. yunnanensis* roots (SG). **[Results]** In SL and SG, 1 304 and 1 516 substances were detected respectively, including 399 SL-specific substances (SLSs) and 611 SG-specific substances (SGSs). There were 294 common differential substances, including 93 up-regulated substances (DEMs-up) and 201 down-regulated substances in SL. The network correlation analysis revealed that 92 of the 100 substances with the relative content  $\geq 2.0$  (40 SLSs and SGSs and 60 DEMs-up) displayed significant correlations. Twenty-nine associated substances in SLSs and SGSs and 19 substances in DEMs-up were enriched in 15 important pathways, which mainly involved secondary metabolite biosynthesis, amino acid biosynthesis and metabolism, and vitamin biosynthesis and metabolism. **[Conclusion]** A network correlation existed between *T. sinense* and *P. yunnanensis* pine roots metabolites. Some substances in truffles and pine roots, including adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP), phytosterol, and indole-3-acetic acid, had regulatory effects on the development of fruiting bodies. The findings provided a theoretical basis for further studying the potential signaling molecules associated with fruiting body development and elucidating the symbiotic mechanism between *T. sinense* and pines. Additionally, this study laid a practical basis for screening the substances promoting the growth of mycorrhizal seedlings and fruiting bodies and for large-scale artificial cultivation of truffles.

**Keywords:** *Tuber sinense*; pine roots; substance correlation; pathway correlation

松露(truffles), 又名块菌, 泛指生长于地下的块状真菌子实体, 被誉为“地下黄金”, 因其独特的香味、丰富的口感享誉全球<sup>[1]</sup>。近年研究发现, 松露具有增强免疫力、抗癌、抗氧化、抗衰老、抗病原微生物、保护肝脏、调节女性

月经周期和性功能等多种药用功效, 是人类防病治病的宝贵药材<sup>[2-3]</sup>。块菌是典型的外生菌根食用菌, 必须与植物形成菌根后通过物质的共生交换得到生长必需的营养, 才能完成自身生活史形成子实体(松露)<sup>[1,4]</sup>。块菌通常能与桦木

科 (Betulaceae)、壳斗科 (Fagaceae)、胡桃科 (Juglandaceae)、松科 (Pinaceae)、杨柳科 (Salicaceae)、椴树科 (Tiliaceae) 等森林系统的建群树种形成典型的互惠共生的外生菌根<sup>[1]</sup>。块菌属共有 160 余种, 我国有 80 多种, 主要分布于西南地区的云南省和四川省等, 主要的黑块菌品种有中国块菌 (*Tuber sinense* K. Tao & B. Liu)、易贡块菌 (*Tuber yigongense* L. Fan & W.P. Xiong) 等<sup>[1]</sup>。云南黑松露, 俗称猪拱菌, 是中国块菌的典型物种, 属于块菌科 *Tuberaceae*、块菌属 *Tuber* F.H. Wigg. 其为云南珍稀及名贵的野生菌之一, 广泛分布于滇东、滇西、滇东南地区<sup>[5-6]</sup>。云南黑松露成熟子实体一般生长于 1-2 m 的深土中, 其大多发现于云南松 (*Pinus yunnanensis*) 林下, 群生于松树的细根上。

野生块菌生长周期长 (其完成生活史并产生松露通常需要 7-10 年<sup>[7]</sup>)、资源十分有限, 加之, 随着无序的过度采挖及生境的影响, 产量急剧下降、价格大幅上升, 已严重影响了资源的可持续性利用。因此, 加快块菌人工栽培技术的研发具有重要的意义。在法国、意大利和西班牙等欧洲国家, 块菌可于种植园中进行人工栽培<sup>[1,8]</sup>。在中国, 前几年虽有黑孢块菌 (*Tuber melanosporum* Vittad.) 及中国块菌菌根苗培育成功的报道<sup>[9]</sup>, 但仍停留于实验阶段, 目前市场上的松露产品仍全部来源于野外采集。块菌在地下完成整个生活史, 生长发育周期中存在很多谜团, 特别是子实体 (子囊果) 的形成和发育机制尚不清楚<sup>[10]</sup>。因此块菌的纯培养仍停留于菌丝体阶段, 且纯培养菌丝在营养单一的固体或液体培养基生长极其缓慢, 不会发育成子实体, 不能完成整个生活史。生产上块菌菌根苗的培育通常采用块菌子实体匀浆或者孢子悬液进行接种无菌根的树苗<sup>[1]</sup>, 但菌根共生体的形成需 2-3 年, 施用菌根促生物质能加速块菌菌

根建成。然而, 目前尚无高效的菌根促生剂。

块菌与宿主共生机制的研究可为块菌人工栽培奠定重要的理论基础。目前, 块菌属与宿主植物根系的共生机制研究主要围绕二者之间的信号交流及分子对话展开, 如天冬酰胺等有机氮源对块菌菌根的形成有显著促进作用<sup>[11]</sup>; 氮代谢及碳代谢是云南黑松露与云南松共生过程中最重要的 2 个代谢<sup>[5]</sup>; 吡啶乙酸和乙烯是白松露 (*Tuber borchii*)、黑松露 (*Tuber melanosporum*) 与宿主岩蔷薇 (*Cistus incanus*) 相互作用的核心信号分子<sup>[12]</sup>; 沙漠松露 (*Terfezia boudieri*) 通过分泌生长素与翡翠盘 (*Helianthemum sessiliflorum*) 进行信号交流<sup>[13]</sup>; 黑松露 (*Tuber melanosporum*) 细胞壁蛋白 (如疏水蛋白、黏附蛋白和甘露蛋白) 相关基因在与寄主植物 (*Corylus avellana* L.) 共生互作过程中被诱导表达<sup>[14]</sup>; 黑松露 (*Tuber melanosporum*) 外生菌根中的外被层和哈蒂格网层在基因表达和功能上存在明显的差异<sup>[15]</sup>。综上所述, 块菌与宿主植物共生机制的研究虽然取得了一些进展, 但因块菌、宿主植物种类及地域存在较大差异, 如以上研究的块菌种大多分布于欧洲或沙漠地区, 宿主植物大多为阔叶树种, 仍然有必要进行深入研究。中国块菌及针叶树种云南松共生机制的研究, 目前尚未见报道。

代谢产物在生物体中扮演着重要的角色, 是细胞内外相互作用的关键因素之一。除维持正常生理功能外, 其可以作为信号分子, 通过交互链接的代谢通路, 调节生物体的生长。代谢产物在菌根共生体间的信息传递和物质交流中具有重要作用。运用代谢组学技术, 分析松露子实体及松根的小分子代谢物, 关注子实体特有物质及上调物质, 将关注的低成本物质用于人工栽培, 如菌根苗或子实体期的促生剂开发, 是一种人工培养共生菌的快捷途径及创新

思路, 值得尝试。目前, 从代谢物角度探究菌根共生机制的研究相对较少。

本实验室前期利用  $^1\text{H-NMR}$ 、GC-MS 技术对松露及松根的代谢谱分析表明, 两种方法检测到的化合物较少, 而且大多是糖、酸、醇及氨基酸类<sup>[5]</sup>。随着真菌数据库收录物质的增多, 液相色谱-质谱联用(liquid chromatograph mass spectrometer, LC-MS)技术因具有较高的灵敏度和较宽的动态范围, 且具有高特异性和高重现性, 已广泛用于动物、植物的研究<sup>[16]</sup>, 并且在菌物研究中也有相关的报道<sup>[17-18]</sup>。本文以新鲜的云南松露及其共生云南松根为研究材料, 运用 LC-MS 技术, 对松露及松根的代谢谱进行分析, 以了解松露与松根的关联物质, 为深入探究与子实体发育相关的潜在信号分子、阐明云南松露与其共生松树的共生机制提供理论依据, 并为筛选能够促进菌根苗及子实体生长的物质、进而为云南松露的规模化人工培养奠定重要的实践基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

实验材料为新鲜的云南黑松露子实体 (*Tuber sinense* body, SL) 及其共生云南松根 (*Pinus yunnanensis* roots, SG), 二者取自云南省禄劝县新华村(102°51.878'E, 25°55.141'N, 海拔 2 175 m)。2021 年, 于样点采集了 7 个松露居群的 35 个菌块(每个居群取 3-7 个)及 30 根细松根(每个居群取 3-5 根)。次日, 挑取 25 个块菌, 使用流动的清水冲洗, 再以吸水纸吸去表面水分(图 1), 于超净台上切去外面的表皮, 取内部的组织块, 切成小碎块(一个菌块可切分 100-300 个小碎块)后放于无菌大烧杯中, 将取自 25 个块菌的所有碎小组织块混匀, 制备冻干粉; 另外 10 个块菌, 送昆明食用菌研究所鉴定

为中国块菌 *Tuber sinense* 后, 作为标本保存于云南大学生命科学学院植物标本馆, 标本号为 YNTuber-1。挖回的松根, 先将松根(长 70-100 cm)用无菌水洗净、晾干, 用剪刀(细根)或切割机(粗根)剪成小段或薄片(每根切分成 80-200 个小段或薄片), 制备冻干粉, 10 根作为标本与松露一起保存, 标本号为 YNpinus-6。

### 1.2 冻干粉制备

松露: 将以上无菌条件下分离的 25 个块菌的所有碎小组织块放于 5 L 的无菌大烧杯中, 在涡旋仪上振荡混匀。使用灭菌的带盖不锈钢捣碎器(高 16 cm、直径 10 cm)加入液氮后迅速将组织块研磨成粉末状, 将每次研磨的块菌细粉再倒入 5 L 的无菌大烧杯中, 再次混匀; 将混匀的菌粉分装在 5 mL 无菌冻存管中, 一般分装 50 管, 剩余的放入带盖的罐头瓶中; 将所有管子及瓶子, 置于 -80 °C 超低温冰箱冷藏 6 h 以上, 再进行真空冷冻干燥 48 h 以上至水分完全去除; 用封口膜密封管口或瓶口后放入加有硅胶干燥剂的大号密封袋中, 于 -80 °C 冷藏备用。松根: 将以上 20 根松根的所有小段或薄片, 按以上操作混匀, 用高速粉碎机将其打碎; 去除丝状的纤维后, 混匀; 其余步骤同松露。



图 1 云南松露新鲜子实体  
Figure 1 *Tuber sinense* fruiting bodies.

### 1.3 样品提取

分别称取 80 mg 松露子实体和松根冻干粉于 3 个 2.0 mL 离心管中, 每管分别加入 800  $\mu$ L 80%甲醇(色谱级,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷)。将这些混合物涡旋 90 s 混匀, 接着在冰浴条件下使用 45 kHz 超声波辅助萃取 1 h, 之后将样品 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h, 随后于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min, 收集全部上清液并再次进行离心处理。之后从离心管中移取 200  $\mu$ L 上清液, 加入 5  $\mu$ L 内标(140  $\mu\text{g}/\text{mL}$  二氯苯丙氨酸), 用 1 mL 无菌注射器吸取处理后的样品, 经 0.22  $\mu\text{m}$  聚四氟乙烯超滤膜过滤至进样瓶中, 待上样检测。

### 1.4 LC-MS 分析

#### 1.4.1 色谱及质谱条件

采用液相色谱-质谱联用仪(ThermoFisher Scientific 公司)对样品进行分析。色谱柱为 Hypersil GOLD-C18 柱(2.1 mm $\times$ 100 mm $\times$ 1.9  $\mu\text{m}$ ); 柱温:  $27.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 自动进样器温度:  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 进样量: 10  $\mu\text{L}$ ; 流速: 0.3 mL/min; 流动相: 水+0.1%甲酸为流动相 A, 甲醇为流动相 B; 洗脱程序: 0–2 min 95% A, 2–4 min 95%–30% A, 4–8 min 30% A, 8–10 min 30%–5% A, 10–16 min 保持 5% A, 16–18 min 5%–95% A, 18–20 min 5%–95% A。质谱采用高分辨 FTMS 全扫描模式( $m/z$  范围 70–1 050, 分辨率 60 000)。质谱参数: 离子源, 电喷雾 ESI (正/负离子); 离子源温度,  $350\text{ }^{\circ}\text{C}$  (+, -); 毛细管温度,  $350\text{ }^{\circ}\text{C}$  (+, -); 喷雾电压, 3 000 V (+, -); 加热器温度,  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$  (+, -); 鞘气流速, 35 arb (+, -); 辅气流速 15 arb (+, -); 尾气流速, 1 arb (+, -); S-Lens RF level, 30% (+)和 60% (-)。

#### 1.4.2 代谢物鉴定

将下机数据(.raw)文件导入 Compound Discoverer TM3.1 软件(ThermoFisher Scientific 公司)中, 根据保留时间、质荷比( $m/z$ )、碎片化

模式等参数进行初步定性, 并对各代谢物的峰面积分别进行相对定量分析(用匹配物质的峰面积值/内标峰面积值来表征该物质的含量)。为提高代谢物鉴定的可信度, 将原始峰谱图用 Thermo Xcalibur Qual Browser 软件, 根据保留时间偏差 0.2 min 和质量偏差  $5\times 10^{-6}$  分别进行峰对齐, 依据目标母离子、碎片离子和  $m/z$  等, 并结合公用数据库 MS-DIAL (systemsomicslab.github.io), 与真菌数据库(mzLogic-zhenjun.cdProcessingWF)进一步比较、定性化合物。最后通过空白样本消除背景离子影响, 并对定量结果进行归一化处理, 最终得到各样品 Excel 格式的二维数据矩阵<sup>[19]</sup>。

#### 1.4.3 数据的可靠性及差异物质分析

将含有代谢产物名称, 保留时间, 离子碎片以及代谢产物相对含量的数据矩阵导入 SIMCA-P 14.1 (Umetrics, Umea, Sweden)软件, 对数据进行中心化和规格化之后进行主成分分析(principal component analysis, PCA)和最小二乘法显著性分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)来观察样本之间的总体分布和区分各组样本代谢轮廓的总体差异, 通过正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal PLS-DA, OPLS-DA)中变量权重值(variable importance in projection, VIP)大于 1 的组分和相关系数标注的载荷图中 $|P|>0.02$ 和 $|P(\text{corr})|>0.5$ 的区域来确定差异变量。对差异变量进行定性和内标归一化定量后, 采用 Student's *t*-test 方法的双尾 *t* 检验进行差异显著性分析。选取  $\text{VIP}>1$ ,  $P<0.05$  且差异倍数(fold change, FC) $\geq 2$  或  $\leq 0.5$  (即  $|\log_2 \text{FC}|\geq 1$ )的成分作为显著差异性代谢物。本文火山图利用 TBtools 绘制, 柱状图利用 GraphPad Prism 8.0.2 绘制。

### 1.5 差异物质富集及物质关联分析

分别将松露特有(SLS)、松根特有(SGS)及

二者共有(DEMs)物质,在基迪奥生物信息云平台(<https://www.omicshare.com/>)进行 KEGG 富集分析。SLS 及 SGS 分别用本实验室前期松露及松根的 3 个平台( $^1\text{H-NMR}$ 、GC-MS 和 LC-MS)检测到的所有化合物作为背景文件,DEMs 用松露作为背景文件。SLS 及 SGS 数据库分别选择真菌数据库、植物数据库,DEMs 数据库选择真菌数据库。代谢通路间的网络关联用 KEGG 富集高级网络分析工具完成。物质的网络关联用 MetaboAnalyst 4.0 平台(<https://www.metaboanalyst.ca/>)的 Network Analysis 模块及 Cytoscape\_v3.10.0 软件完成。在 Network Analysis 模块中,将目标化合物,与数据库(PubMed、KEGG)中的化合物,通过 STITCH 提取化合物-化合物关联,以分析化合物与化合物的互作关系;节点展示的参数设置为  $\text{degree}>2$ 、 $\text{betweenness}>1$ 。利用 R 4.2.2 软件的 `corrplot` 包计算各化合物间的皮尔逊相关系数(Pearson's correlation coefficient, PCC),选取  $|\text{PCC}|>0.8$ 、 $P<0.05$  的物质用 Cytoscape (v3.10.0) 软件可视化。

## 2 结果与分析

### 2.1 样本峰谱图及多元统计学分析

图 2A、2B 分别为松露(SL)及松根(SG)的峰谱图。为充分了解组间的数据差异,将松露及松根的两组数据,利用 SIMCA-P 14.1 软件进行多元统计学分析。SL 组内 3 个重复样聚在第一主成分的正半轴,SG 组内 3 个重复样聚在第一主成分的负半轴,分离趋势明显,且均置于 95% 置信区间内,无异常值存在(图 2C),说明两组数据间存在明显差异。采用有监督的正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)进一步确定比较组分之间的差异成分,OPLS-DA 分析必须以模型验证为基础,如图 2D 所示,经过 200 次交叉验证,左端任何一次随机排列产生的  $R^2$ 、 $Q^2$  均

小于右端的原始值, $Q^2$  与纵轴交点为  $-0.556<0$ ,结果显示模型可靠有效且预测性良好,可以继续进行 OPLS-DA 分析。OPLS 模型验证参数  $P<0.05$  (图 2E),表征模型验证成立,两组样品得到最大分离,有效降低了组内差异<sup>[9]</sup>。

### 2.2 代谢组分总体分析及共有差异代谢物筛选

在 SL 及 SG 中分别共检测到 1 304 个和 1 516 个化合物(图 3A),其中 SL 特有物质(SLS) 399 个,SG 特有物质(SGS) 611 个;SL 及 SG 的共有物质 905 个。

基于 OPLS-DA 结果,在 SL 及 SG 的 905 个共有物质中,筛选了 294 个显著差异代谢物(differential metabolites, DEMs),其中,SG vs. SL,上调物质有 93 个,下调物质有 201 个(图 3B)。

用匹配物质的峰面积值/内标峰面积值来表征该物质的相对含量。松露特有物质(SLS)、松根特有物质(SGS)、93 个上调差异物(DEMs-up)都出现了一些高含量物质(图 3C)。按含量高低,将 SLS、SGS、DEMs-up 及 201 个下调差异物质(DEMs-down)的含量分为了  $\geq 10.0$ 、2.0–10.0、1.0–2.0、0.5–1.0、0.1–0.5、 $<0.1$  这 6 个区段。在 SLS 中, $\geq 2.0$  仅占了 2.00%; $<0.1$  占了 68.67%。在 SGS 中, $\geq 2.0$  占了 5.23%; $<0.1$  的占了 67.43%。在 DEMs-up 中, $\geq 2.0$  占了 64.52%; $<0.1$  的占了 11.83%。在 DEMs-down 中, $\geq 2.0$  仅占了 0.50%; $<0.1$  的占了 95.52%。

### 2.3 高含量物质

#### 2.3.1 特有物质

图 4A 展示了 399 个松露特有物质(SLS)、611 个松根特有物质(SGS)中,相对含量  $\geq 2.0$  的 40 个化合物,其中,SLS 中有 8 个化合物,SGS 中有 32 个化合物。SLS 中相对含量居于前 3 的物质依次是美他美宁(metameconine, MTC)、

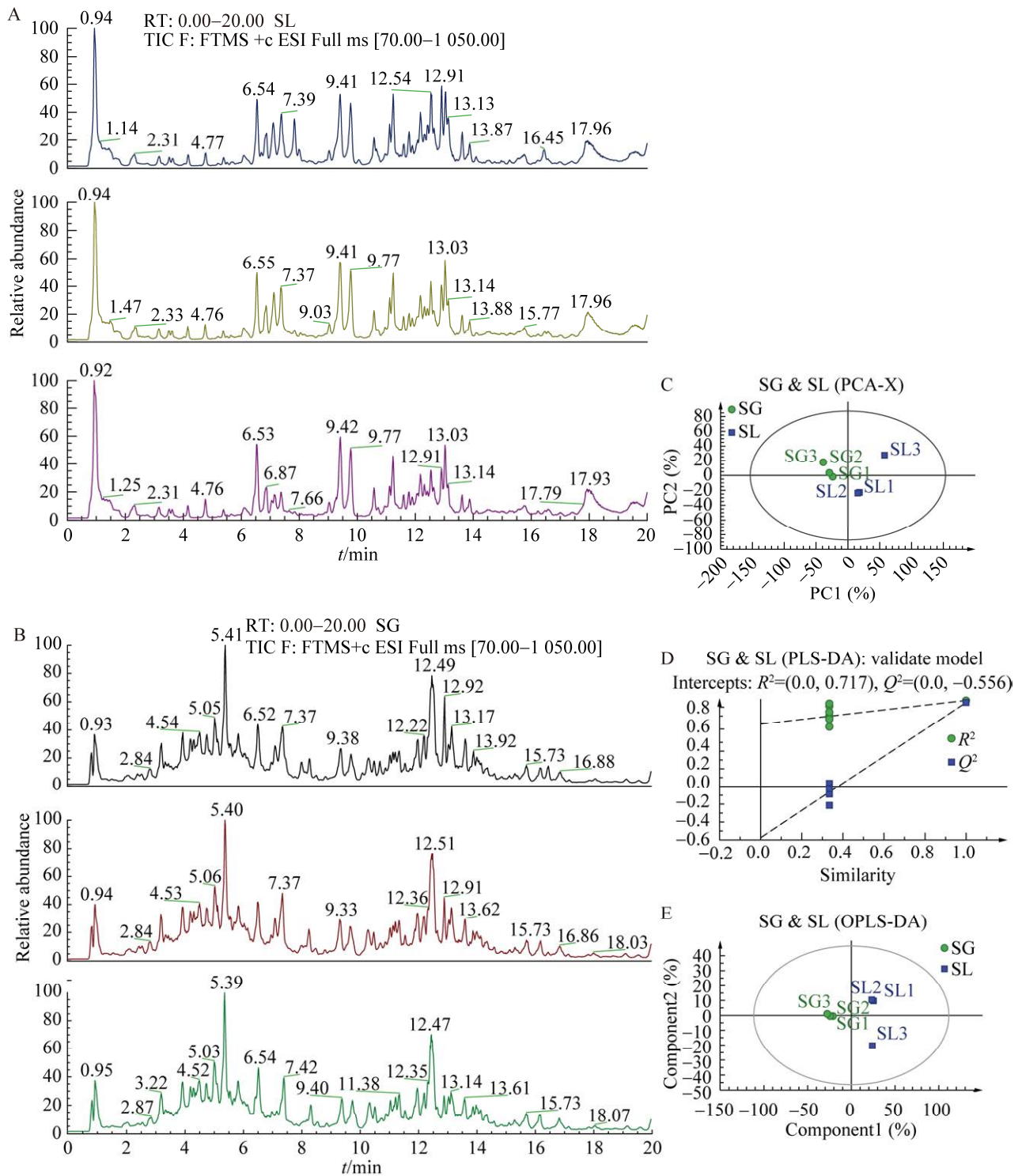


图 2 云南松露(SL)及松根(SG)的峰图及多元统计学分析。A: SL 峰谱图; B: SG 峰谱图; C: PCA 得分图; D: 置换模型验证; E: OPLS-DA 得分图。

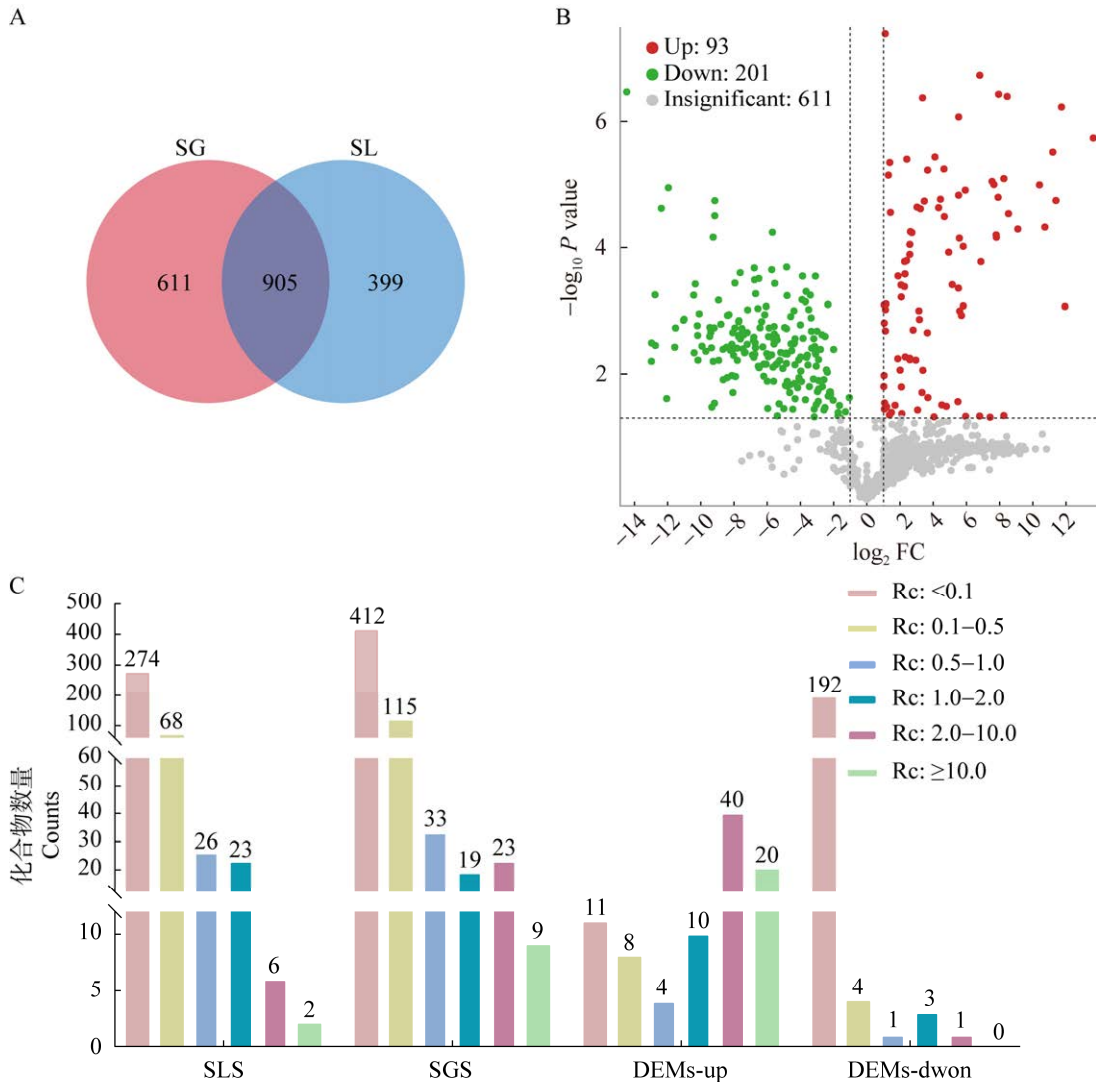
Figure 2 Peak diagrams and multivariate statistical analysis of *Tuber sinense* (SL) and pine roots (SG). A: SL peak spectra; B: SG peak spectra; C: PCA score chart; D: Replacement model verification; E: OPLS-DA score chart.

噻苯隆(thidiazuron, THR)、环磷酸腺苷(adenosine 3',5'-cyclic monophosphate, cAMP), 其含量分别为 19.49、11.98、4.28; SGS 中相对含量居于前 3 的物质依次是双阿魏酰腐胺(diferuloyl putrescine, DIP)、去氧短小蛇根草苷(deoxypumiloside, DEL)、牛磺胆酸(taurohyocholic acid, TAC), 其含量分别为 30.15、21.68、16.53。图 4B 用 Cytoscape (v3.10.0)软件展示了 SLS 及 SGS 间的

物质关联。40 个化合物中存在显著相关性的化合物有 35 个, 其中, SLS 中最高含量 MTC 与 SGS 中最高含量 DIP; SLS 中次高含量 THR 与 SGS 中第 3 含量 TAC; SLS 中第 3 含量 cAMP 与 SGS 中次高含量 DEL 分别显著相关(图 4B)。

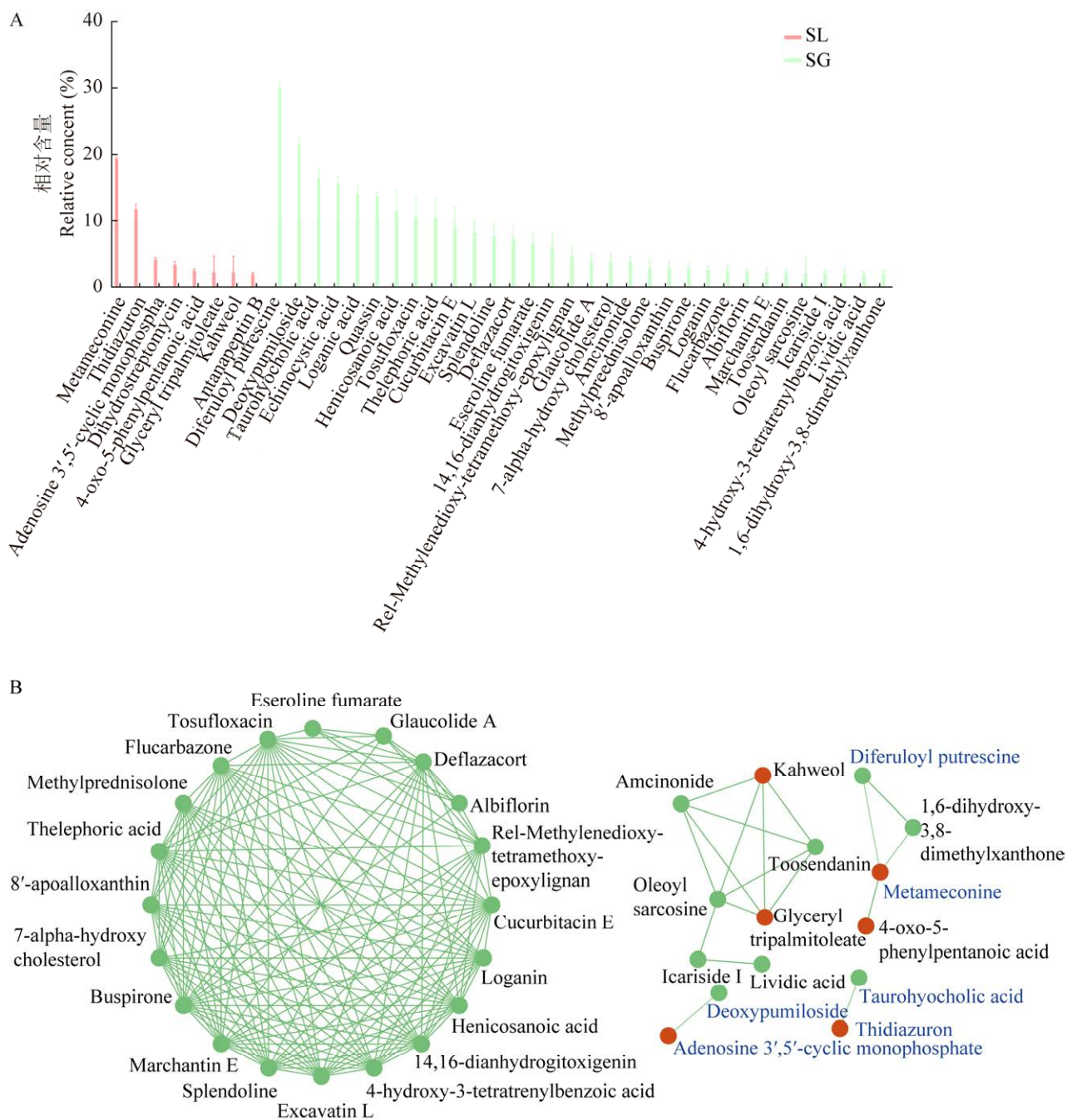
### 2.3.2 共有差异物质

图 5A 展示了 DEMs-up 中相对含量 $\geq 2.0$ 的 60 个化合物(占了 64.52%), 其中相对含量居于



**图 3 松露(SL)及松根(SG)的化合物数。** A: SL 及 SG 的特有物质及共有物质; B: SL 及 SG 共有上调及下调差异物质的火山图; C: SL 及 SG 特有物质、共有上调及下调差异物质的含量分段之化合物数(Rc: 相对含量)。  
**Figure 3 *Tuber sinense* (SL) and pine roots (SG) compounds.** A: Specific substances and common substances of SL and SG; B: Volcanic map of common up-regulated and down-regulated differential substances of SL and SG; C: The number of compounds of the content segments of specific substances and common up-regulated and down-regulated differential substances of SL and SG (Rc: Relative content).





**图 4** SLS 及 SGS 中 40 个化合物的相对含量( $\geq 2.0$ )及其关系。A: SLS 及 SGS 中 40 个化合物的含量; B: 40 个化合物中存在显著相关的 35 个化合物间之网络关系。红色填充圆圈为 SLS 中的化合物; 绿色填充圆圈为 SGS 中的化合物; 蓝色字体表示 SLS 及 SGS 中含量前 3 的 6 个化合物。

Figure 4 Relative contents ( $\geq 2.0$ ) and their relationships of 40 compounds in SLS and SGS. A: Contents of 40 compounds in SLS and SGS; B: Network correlations of 35 compounds with significant correlation among 40 compounds. The red filled circles represent the compounds in SLS; Green filled circles represent compounds in SGS; The blue fonts represent six compounds of the top three contents of SLS and SGS.

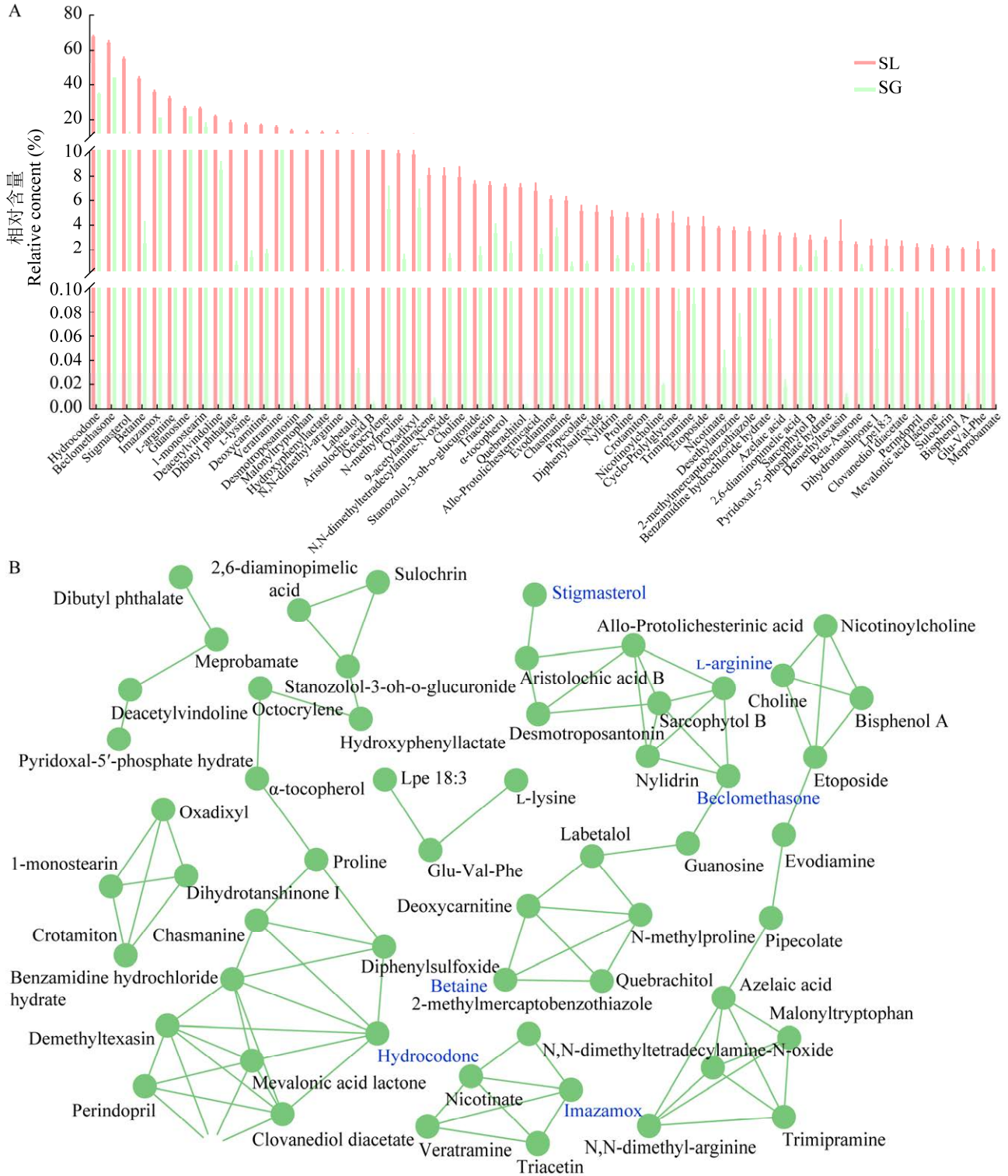


图 5 DEMs-up 中 60 个化合物的相对含量( $\geq 2.0$ )及其关系。A: DEMs-up 中 60 个化合物的含量; B: 60 个化合物中存在显著相关的 57 个化合物间之网络关系。蓝色字体表示 DEMs-up 中含量居前的 6 个化合物。Figure 5 Relative contents ( $\geq 2.0$ ) and their relationships of 60 compounds in DEMs-up. A: Contents of 60 compounds in DEMs-up; B: Network correlation of 57 compounds with significant correlation among 60 compounds. The blue fonts represent the top six compounds of BCD-up.

前 6 的物质依次是氢可酮(hydrocodone, HYD)、倍氯米松(beclomethasone, BLS)、植物甾醇(stigmasterol, STR)、甜菜碱(betaine, BET)、甲氧咪草烟(imazamox, IMA)、L-精氨酸(L-arginine, ARG), 其含量分别为 68.02、64.50、55.14、43.48、35.80、32.33。60 个化合物中存在显著相关的化合物有 57 个(图 5B), 其中, HYD 及 IMA 各在一个独立模块, BLS、STR、BET、ARG 共联于一个模块中。

## 2.4 通路富集分析

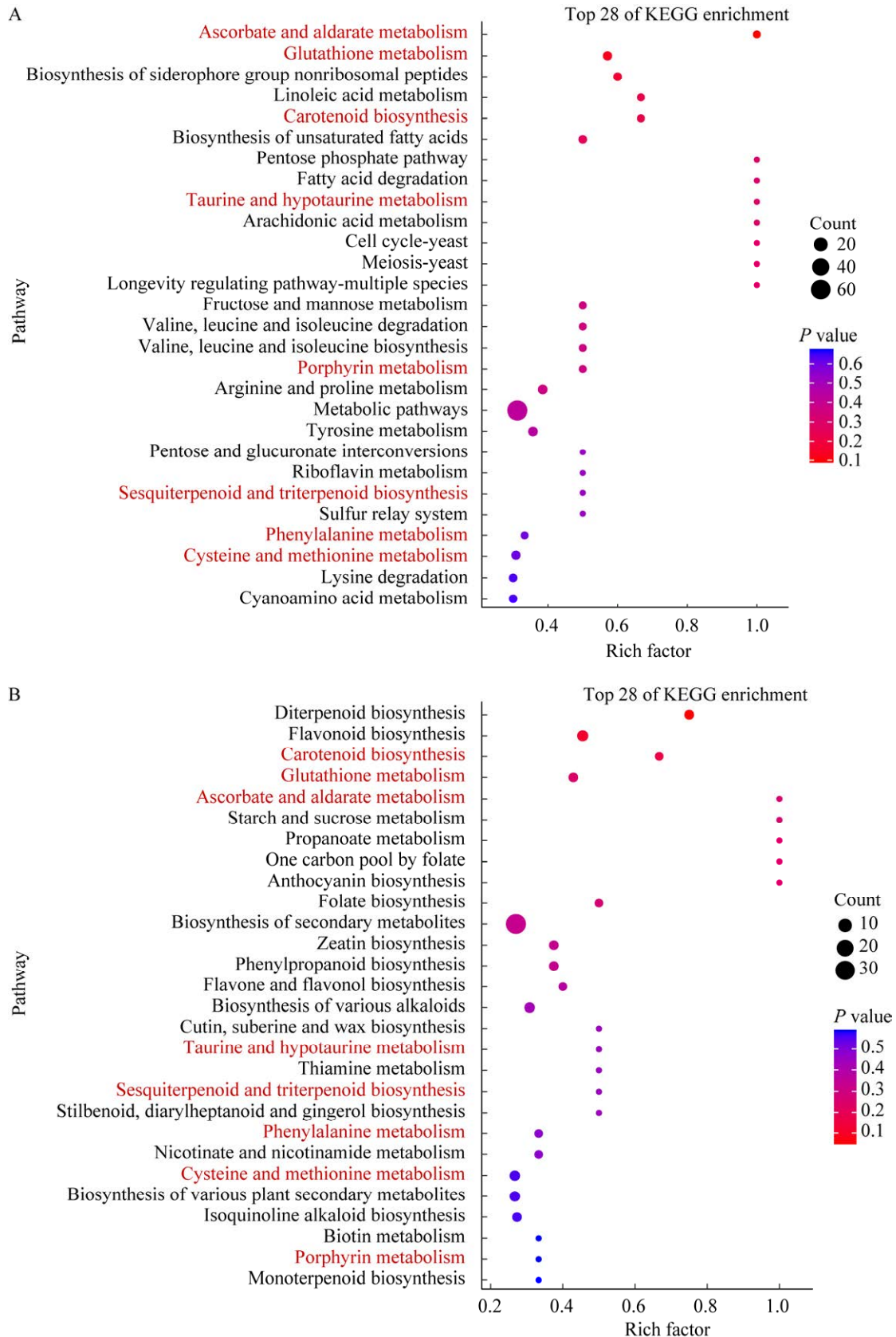
### 2.4.1 特有物质

将松露的 399 个特有物质(SLS)和松根的 611 个特有物质(SGS), 分别进行 KEGG 富集分析, SLS 共富集到 59 条通路, SGS 共富集到 51 条通路。图 6A 和 6B 展示了 SLS 及 SGS 的前 28 条通路, SLS 及 SGS 皆富集到的 8 条共有通路, 其分别为抗坏血酸和醛酸盐代谢(ascorbate and aldarate metabolism, Asc.-ald. met.)、谷胱甘肽代谢(glutathione metabolism, Glu. met.)、类胡萝卜素生物合成(carotenoid biosynthesis, Car. bio.)、牛磺酸和次牛磺酸代谢(taurine and hypotaurine metabolism, Tau.-hyp. met.)、卟啉代谢(porphyrin metabolism, Por.met.)、倍半萜类和三萜类生物合成(sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis, Ses.-tri.bio.)、苯丙氨酸代谢(phenylalanine metabolism, Phe.met.)、半胱氨酸和蛋氨酸代谢(cysteine and methionine metabolism, Cys.-met. met.)。

将以上 SLS 及 SGS 共有的 8 条通路进行网络关联分析, 按通路关联数(degree 值)大小依次为半胱氨酸和蛋氨酸代谢、苯丙氨酸代谢、类胡萝卜素生物合成、谷胱甘肽代谢、牛磺酸和次牛磺酸代谢、卟啉代谢、抗坏血酸和醛酸盐代谢、倍半萜类和三萜类生物合成, degree 值分别依次为 15、8、8、6、6、6、4、4(图 6C), 其中以半胱氨酸和蛋氨酸代谢通路 degree 值最

大, 推测该通路为关联物质代谢各通路的重要或枢纽通路。

SLS 及 SGS 中参与以上 8 条通路的化合物分别有 17 个和 12 个, 共 29 个。如图 7A 所示, SGS 中的 S-(5'-腺苷)-L-甲硫氨酸[S-(5'-adenosyl)-L-methionine]、谷胱甘肽(glutathione)、5'-脱氧甲硫腺苷(5'-methylthioadenosine)、磺基丙氨酸(cysteic acid)通过半胱氨酸和蛋氨酸通路与 SLS 中的 S-腺苷-L-高半胱氨酸(S-adenosylhomocysteine)、甲硫腺苷(methylthioadenosine)、L-半胱亚磺酸(3-sulfinoalanine)、O-乙酰基-L-丝氨酸(O-acetyls erine)关联; SGS 中的 N-乙酰-DL-苯丙氨酸(N-acetylphenylalanine)、 $\beta$ -苯乙胺(phenylethylamine)通过苯丙氨酸代谢通路与 SLS 中的 L-酪氨酸(L-tyrosine)、N-乙酰-L-苯丙氨酸(N-acetyl-L-phenylalanine)关联; SGS 中的番茄红素(lycopene)、3,4-二氢球甾(3,4-dihydrospheroidene)通过类胡萝卜素生物合成通路与 SLS 中的红酵母烯(torulene)、4,4'-二脱辅基链孢红素(4,4'-diaponeurosporene)关联; SGS 中的谷胱甘肽、维生素 C (ascorbic acid)、焦谷胺酸(proglutamate)通过谷胱甘肽代谢通路与 SLS 中的氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione)、1,4-丁二胺(putrescine)、亚精胺(spermidine)、 $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸( $\gamma$ -glutamylcysteine)关联; SGS 中的磺基丙氨酸通过牛磺酸和次牛磺酸代谢通路与 SLS 中的 L-半胱亚磺酸关联; SGS 中的磷酸苏氨酸(phosphothreonine)通过卟啉代谢通路与 SLS 中的胆绿素(biliverdin)、维生素 B<sub>12</sub>(cyanocobalamin)关联; SGS 中的维生素 C 通过抗坏血酸和醛酸盐代谢通路与 SLS 中的黏酸(mucic acid)、L-古洛糖酸- $\gamma$ -内酯(L-gulonolactone)关联; SGS 中的棉酚(gossypol)通过倍半萜类和三萜类生物合成通路与 SLS 中的  $\beta$ -香树脂精( $\beta$ -amyrin)关联。



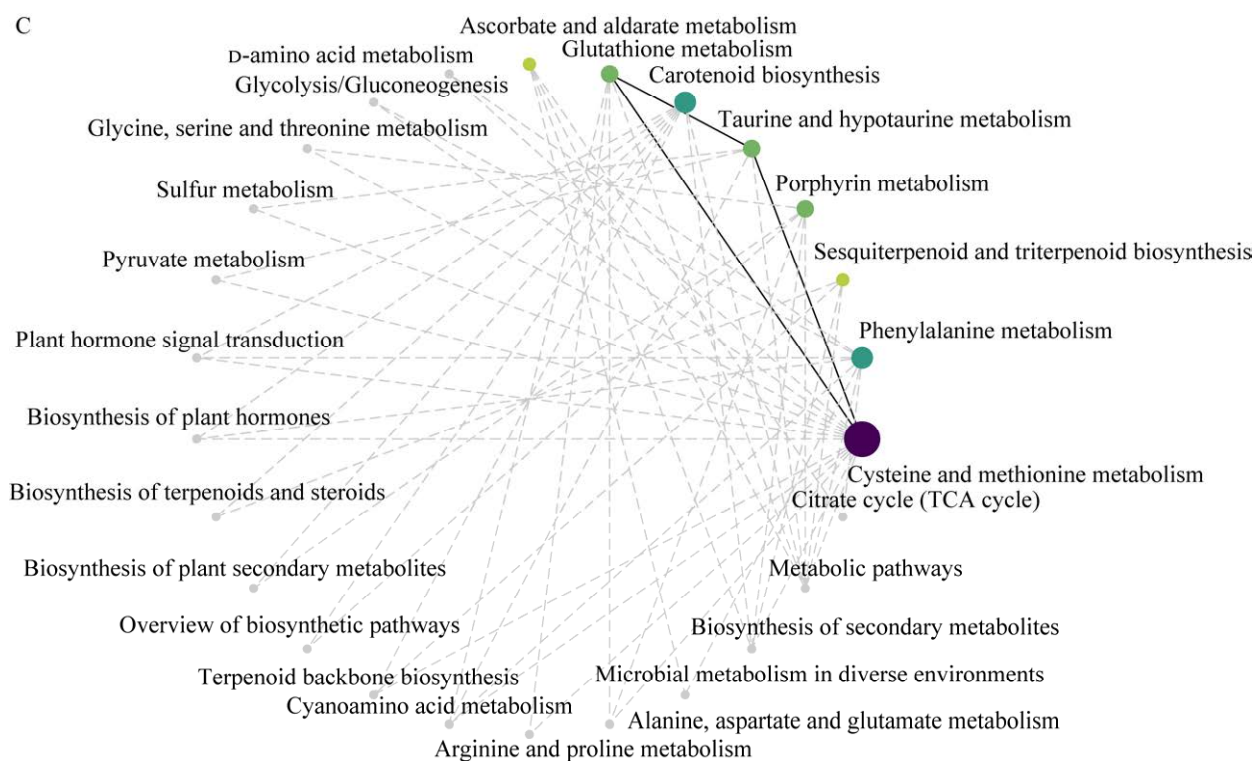


图 6 SLS 及 SGS 的富集分析及 8 条共有通路间网络关系。A: SLS 富集的前 28 条通路; B: SGS 富集的前 28 条通路(标红的字体为 SLS 及 SGS 共有的 8 条通路); C: 8 条共有通路间的关联。

Figure 6 Enrichment analyses of SLS and SGS and network relationships among eight common pathways. A: The top 28 pathways enriched for SLS; B: The top 28 pathways enriched for SGS (The lettering in red show eight common pathways of SLS and SGS); C: The associations among the eight common pathways.

MetaboAnalyst 4.0 平台 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) 的 Network Analysis 模块有助于突显大量注释化合物之间的潜在功能关系。将 8 条通路的 29 个化合物在 Network Analysis 中匹配到 10 个, 如图 7B 所示, SGS 中的 4 个物质(5'-脱氧甲硫腺苷、番茄红素、谷胱甘肽、磷酸苏氨酸, 其关联化合物数分别为 9、1、16、8)与 SLS 中的 8 个物质(S-腺苷-L-高半胱氨酸、亚精胺、1,4-丁二胺、氧化型谷胱甘肽、L-酪氨酸、O-乙酰基-L-丝氨酸、 $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸、L-古洛糖酸- $\gamma$ -内酯, 其关联化合物数分别为 14、14、8、8、7、7、3)存在网络关联。

#### 2.4.2 共有差异物质

将上述 93 个松露上调的共有差异物

(DEMs-up)进行 KEGG 富集分析, 共富集到 32 条通路, 前 30 条富集通路如图 8A 所示, 其中  $P < 0.05$  的通路有 7 条, 从上到下依次为 D-氨基酸代谢(D-amino acid metabolism)、赖氨酸降解(lysine degradation)、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢(glycine, serine and threonine metabolism)、氨酰-tRNA 生物合成(aminoacyl-tRNA biosynthesis)、氨基酸的生物合成(biosynthesis of amino acids)、ABC 转运蛋白(ABC transporters)及次生代谢产物的生物合成(biosynthesis of secondary metabolites)。DEMs-up 中参与 7 条通路的化合物共有 19 个: 植物甾醇(stigmasterol)、甜菜碱(betaine)、L-精氨酸(L-arginine)、L-赖氨酸(L-lysine)、胆碱(choline)、

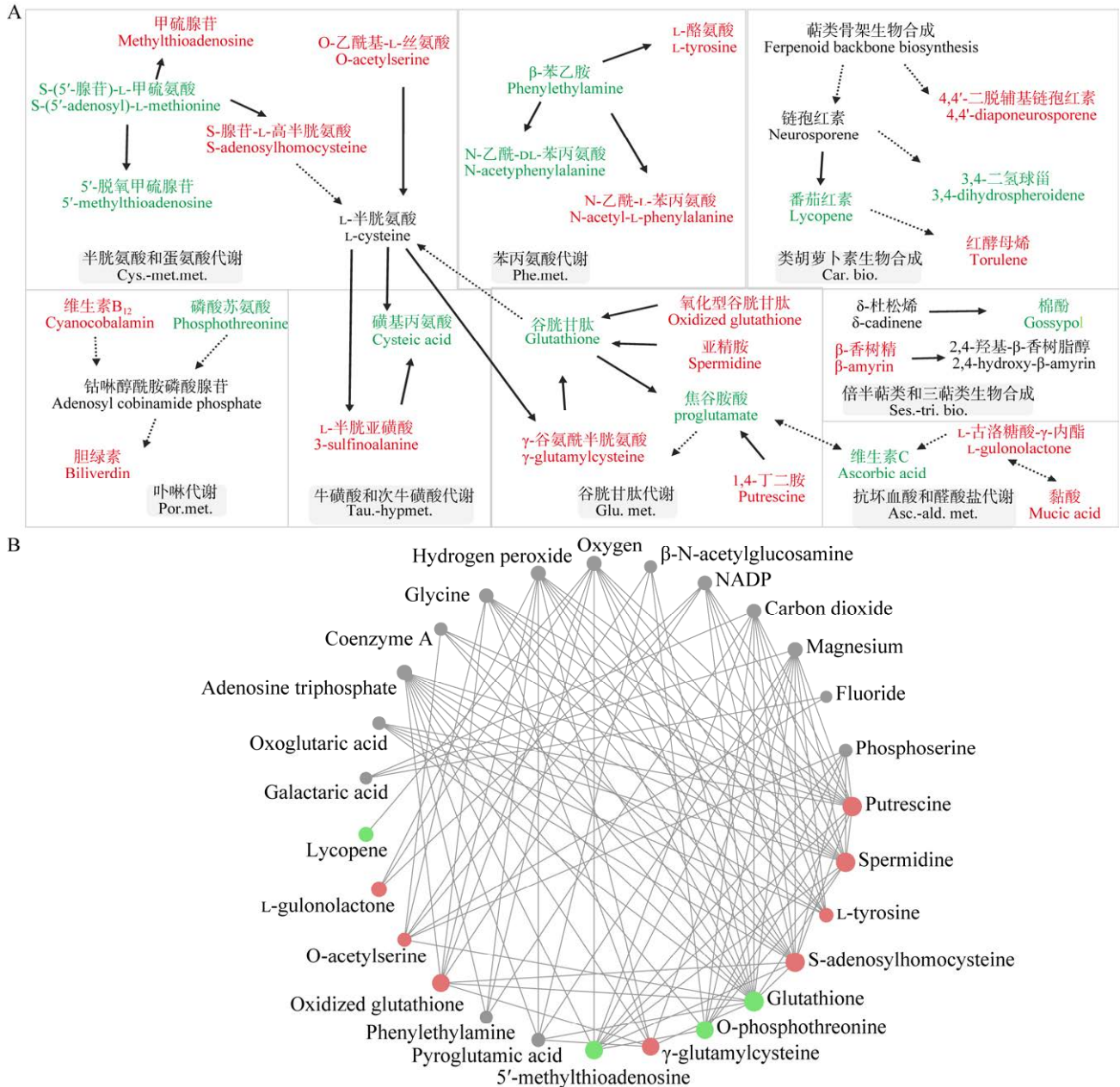


图 7 SLS 及 SGS 中 8 条共有通路的化合物通路及网络关联。A: 29 个化合物的通路关联; B: 29 个化合物中匹配到 12 个化合物的网络关联。红色字体及红色实心圆圈为 SLS, 绿色字体及绿色实心圆圈为 SGS。Asc.-ald. met.: 抗坏血酸和醛酸盐代谢; Glu. met.: 谷胱甘肽代谢; Car. bio.: 类胡萝卜素生物合成; Tau.-hyp. met.: 牛磺酸和次牛磺酸代谢; Por. met.: 卟啉代谢; Ses.-tri. bio.: 倍半萜类和三萜类生物合成; Phe. met.: 苯丙氨酸代谢; Cys.-met. met.: 半胱氨酸和蛋氨酸代谢。

Figure 7 Compound pathways and network associations of eight common pathways in SLS and SGS. A: Pathway associations of 29 compounds; B: The network associations of 12 compounds were matched out of 29 compounds. Red fonts and red filled circles represent SLS, green fonts and green filled circles represent SGS. Asc.-ald. met.: Ascorbate and aldarate metabolism; Glu. met.: Glutathione metabolism; Car. bio.: Carotenoid biosynthesis; Tau.-hyp. met.: Taurine and hypotaurine metabolism; Por. met.: Porphyrin metabolism; Ses.-tri. bio.: Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis; Phe. met.: Phenylalanine metabolism; Cys.-met. met.: Cysteine and methionine metabolism.

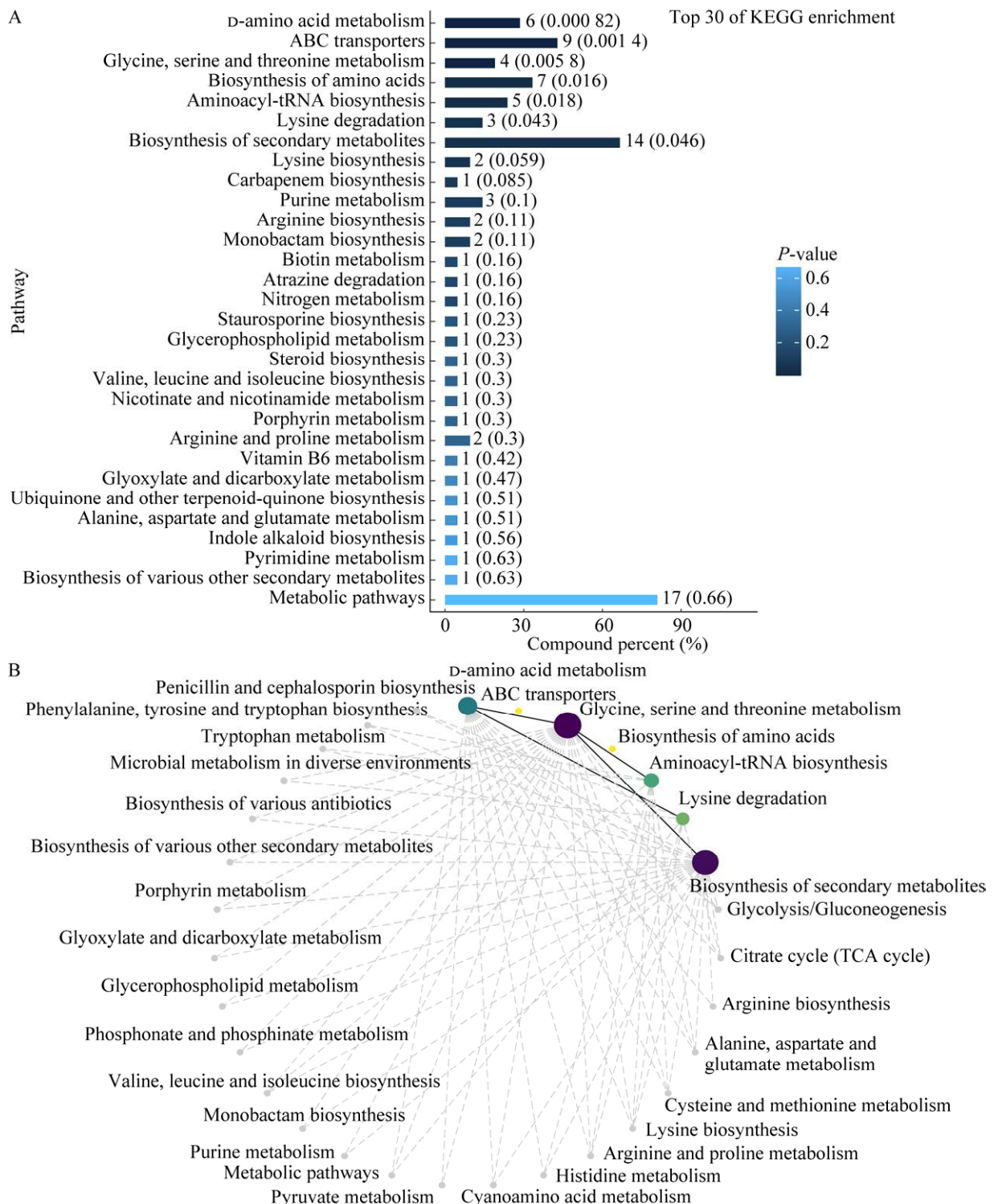


图 8 93 个上调差异物质的富集分析及 7 条显著差异通路间网络关系。A: 前 30 条富集通路; B: 7 条显著富集通路间的关联。

Figure 8 Enrichment analyses of 93 up-regulated differential substances and the network relationships among seven significant differential pathways. A: The top 30 enriched pathways; B: The association among seven significantly enriched pathways.

$\alpha$ -生育酚( $\alpha$ -tocopherol)、脯氨酸(proline)、烟酸(nicotinate)、苏氨酸(threonine)、胱硫醚(cystathionine)、2,6-二氨基庚二酸(2,6-diaminopimelic acid)、腺嘌呤(adenine)、脱乙酰长春刀灵(deacetylindoline)、苯基乳酸(3-phenyllactic acid)、6,7,4'-三羟基异黄酮(demethyltaxasin)、哌啶酸(pipecolate)、谷氨酰胺(L-glutamine)、脱氧肉碱(deoxycarnitine)、鸟嘌呤核甙(guanosine)。其中,植物甾醇、甜菜碱、L-精氨酸的含量居于前6;赖氨酸、胆碱、 $\alpha$ -生育酚、脯氨酸、烟酸的含量也较高,分别为17.39、8.08、7.15、4.64、3.79。

将以上7条通路进行关联分析,degree值较大的有5条通路,按degree值大小依次为甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢(glycine, serine and threonine metabolism, Gly-ser-thr. met.)、次生代谢产物的生物合成(biosynthesis of secondary metabolites, Bio. of sec. met.)、D-氨基酸代谢(D-amino acid metabolism, D-ami. met.)、氨酰-tRNA生物合成(aminoacyl-tRNA biosynthesis, Ami-tRNA bio.)、赖氨酸降解(lysine degradation, Lys.deg.), degree值分别为22、21、13、9、7,其中以甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢以及次生代谢产物的生物合成2条通路最大(图8B)。推测该两条通路为关联物质代谢各通路的重要或枢纽通路。

DEMs-up中参与以上5条通路的化合物共有18个(除以上19个物质中的鸟嘌呤核甙外)。由图9A可看出,这18个物质皆参与了次生代谢产物的生物合成(biosynthesis of secondary metabolites, BSM);其中甜菜碱、胆碱、苏氨酸、胱硫醚4个物质参与了甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢;L-精氨酸、赖氨酸、脯氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、2,6-二氨基庚二酸6个物质参与D-氨基酸代谢;L-精氨酸、赖氨酸、脯氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺5个物质参与了氨酰-tRNA生

物合成;赖氨酸、哌啶酸、脱氧肉碱3个物质参与了赖氨酸降解。另外,植物甾醇通过类固醇生物合成(sterol biosynthesis)通路、腺嘌呤通过玉米素生物合成(zeatin biosynthesis)通路、6,7,4'-三羟基异黄酮通过异黄酮生物合成(isoflavonoid biosynthesis)通路、 $\alpha$ -生育酚( $\alpha$ -tocopherol)通过生育酚生物合成(tocopherol/tocotorienol biosynthesis)通路、脱乙酰长春刀灵(deacetylindoline)通过文多灵生物合成(vindoline biosynthesis)通路参与到BSM大通路中;烟酸通过烟酸和尼克酰胺生物合成(nicotinate and nicotinamide metabolism)通路参与到维生素代谢中。

将以上5条通路的18个化合物在Network Analysis中匹配到8个,这8个物质分别为植物甾醇、甜菜碱、L-精氨酸、L-赖氨酸、胆碱、 $\alpha$ -生育酚、谷氨酰胺、腺嘌呤,其degree值分别为11、9、6、6、8、6、3、3(图9B)。

### 3 讨论

松露等绝大部分名贵及珍稀的大型真菌,皆属于外生菌根真菌。松露因生长于地下,其子实体的生长发育过程至今仍是一个未解之谜。云南黑松露大多与云南松共生,其与松根形成了互惠互利的菌根共生体,这个微妙的共生体是物质和信息交流及传递的重要场所<sup>[5]</sup>。本研究采用代谢组学方法,分析云南黑松露及其共生松根的物质及通路关联,推测与子实体发育相关的潜在物质,以期为下一步筛选子实体的促生物质奠定理论基础。

#### 3.1 松露及松根物质的调控通路及网络关联

生物体中的代谢产物形成了一个复杂的网络关联。代谢通路在生物体内依赖成千上万的代谢物质作为节点,相互连通、相互交叉,



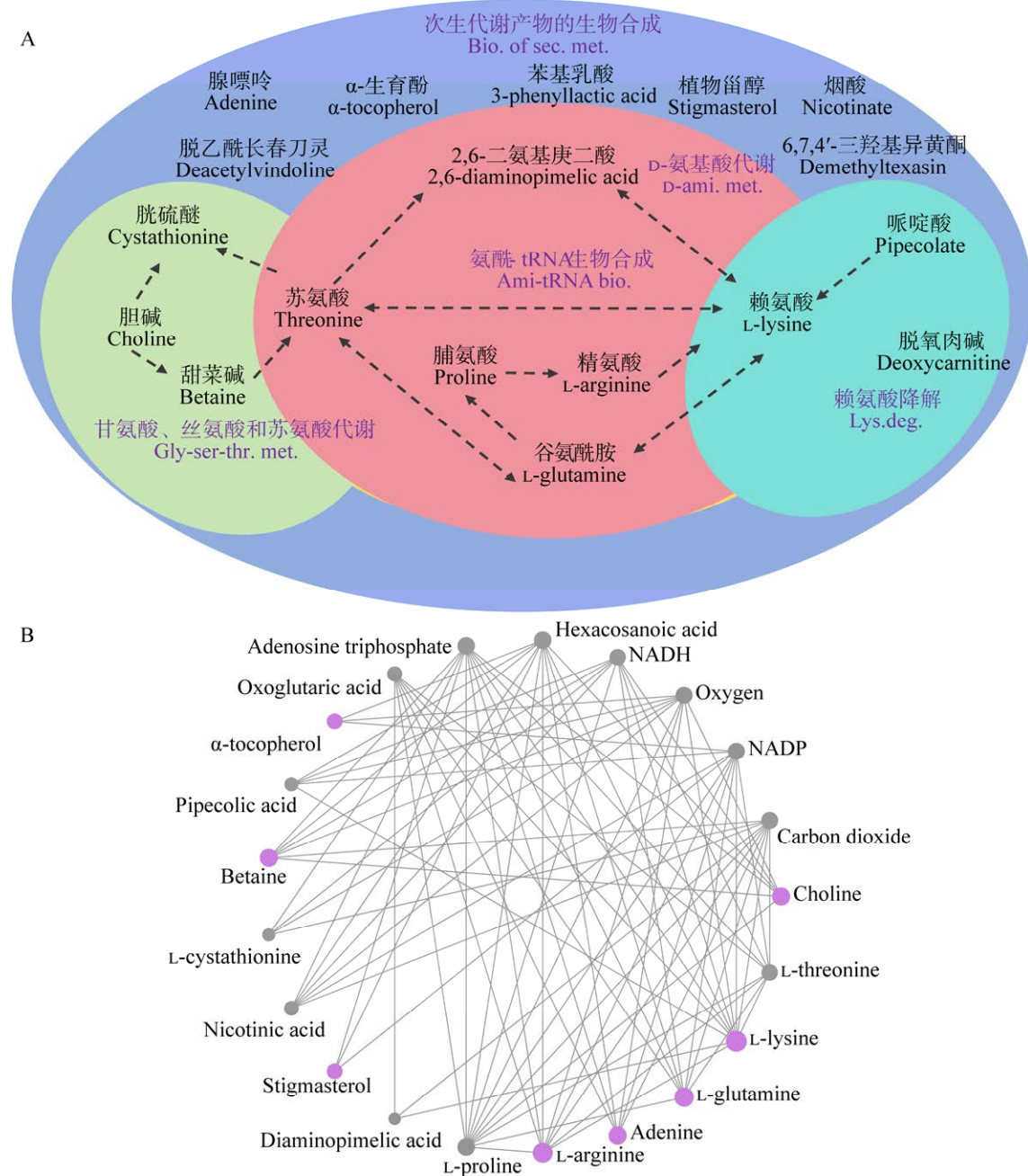


图 9 DEMs-up 中 5 条通路的化合物通路及网络关联。A: 18 个化合物的通路关联; B: 18 个化合物中匹配到 8 个化合物的网络关联。紫色字体为通路名; 紫色实心圆圈为 8 个化合物。Gly-ser-thr. met.: 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢; Bio. of sec. met.: 次生代谢产物的生物合成; D-ami. met.: D-氨基酸代谢; Ami-tRNA bio.: 氨基-tRNA 生物合成; Lys.deg.: 赖氨酸降解。

Figure 9 Compound pathways and network associations of five pathways in DEMs-up. A: Pathway associations of 18 compounds; B: The network associations of eight compounds were matched out of 18 compounds. The purple fonts are the pathway names; The purple filled circles are eight compounds. Gly-ser-thr. met.: Glycine, serine and threonine metabolism; Bio. of sec. met.: Biosynthesis of secondary metabolites; D-ami. met.: D-amino acid metabolism; Ami-tRNA bio.: Aminoacyl-tRNA biosynthesis; Lys.deg.: Lysine degradation.

构成了复杂的代谢网络。随着各种代谢通路研究的日趋成熟，可以探究相互衔接的各代谢物如何通过网络通路调控生物体的生长。本研究中 399 个松露特有物质(SLS)、611 个松根特有物质(SGS)及 93 个上调差异物质(DEMs-up)，富集到的 15 条通路(包括 SLS 及 SGS 富集到的 8 条共有通路，DEMs-up 显著富集的 7 条通路)，主要涉及次生代谢产物生物合成(biosynthesis of secondary metabolites, BSM)、氨基酸的生物合成及代谢(biosynthesis and metabolism of amino acids, ABM)、维生素的生物合成及代谢(biosynthesis and metabolism of vitamins, VBM)三大类通路(图 10)。SLS、SGS 及 DEMs-up 物质通过交互复杂的 3 类通路发生网络关联。

以 SLS 及 SGS 中相对含量 $\geq 2.0$  的 40 个化合物(SLS 8 个, SGS 32 个)为例, 利用 Cytoscape (v3.10.0)软件展示了其中具有显著相关性的 35 个化合物, 其中 SLS 中最高含量的美他美宁(MTC)与 SGS 中最高含量双阿魏酰腐胺(DIP); SLS 中次高含量噻苯隆(THR)与松根中第 3 含量的牛磺胆酸(TAC); SLS 中第 3 含量环磷酸腺苷 cAMP 与松根中次高含量去氧短小蛇根草苷(DEL)分别发生了显著关联。由此推测 399 个 SLS 与 611 个 SGS 间存在一定的网络关联。

以 DEMs-up 中相对含量 $\geq 2.0$  的 60 个化合物为例, 展示了其中存在显著相关的 57 个化合物的网络关联。其中, 第 2 含量的倍氯米松(BLS)、第 3 含量的植物甾醇(STR)、第 4 含量的

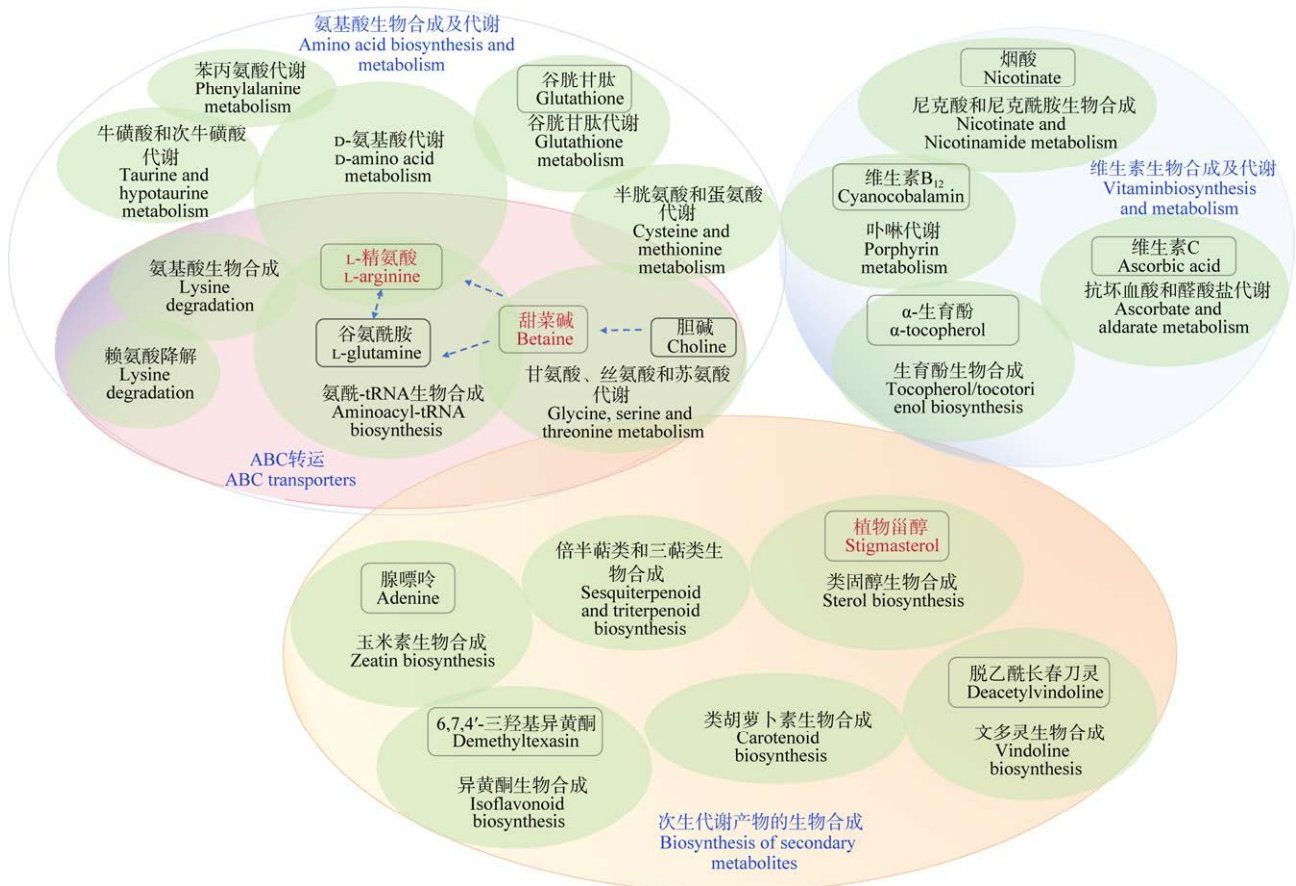


图 10 松露及松根中关联物质的调控通路

Figure 10 Regulatory pathways of associated substances in truffles and pine roots.

甜菜碱(BET)、第 6 含量的 L-精氨酸(ARG)共同关联于一个模块中。由此推测 294 个差异物质 DEMs 间存在一定的网络关联。

### 3.2 调控松露子实体发育的潜在物质分析

松露与松根共生过程的物质及信号传导研究仍然薄弱。松露与松根的关联物质, 在子实体的生长发育过程中起着一定的调控作用。

#### 3.2.1 松露与松根特有物质

将 399 个 SLS 及 611 个 SGS 分别进行 KEGG 富集分析, SLS 和 SGS 富集到共有的通路有 8 条, SLS 中的 17 个物质与 SGS 中的 12 个物质通过 8 条通路发生上、下游关联。如 SGS 中的 S-(5'-腺苷)-L-甲硫氨酸、谷胱甘肽、5'-脱氧甲硫腺苷、磺基丙氨酸通过半胱氨酸和蛋氨酸通路与 SLS 中的 S-腺苷-L-高半胱氨酸、甲硫腺苷、L-半胱亚磺酸、O-乙酰基-L-丝氨酸发生关联; SGS 中的 VC 通过抗坏血酸和醛酸盐代谢通路与 SLS 中的黏酸、L-古洛糖酸- $\gamma$ -内酯关联; SGS 中的棉酚通过倍半萜类和三萜类生物合成通路与 SLS 中的  $\beta$ -香树精关联。推测 29 个物质对子实体的发育起着重要的调控作用。

SLS 相对含量 $\geq 2.0$ 的 8 个 SLS (美他美宁、噻苯隆、环磷酸腺苷、双氢链霉素、4-氧代-5-苯基戊酸、三棕榈油酸甘油酯、咖啡豆醇、安他帕肽 B)中, 只有环磷酸腺苷(cAMP)、三棕榈油酸甘油酯能匹配到代谢通路中(图 11)。三棕榈油酸甘油酯为松露特有物质, 其相对含量(2.39)居于第 6 位, 其通过甘油酯代谢进入三羧

酸(TCA)循环, 调控自身的物质转化及代谢。甘油酯可作为生物膜的主要组成成分, 参与能量与信号转导、蛋白转运等一系列生物学过程<sup>[20]</sup>。环磷酸腺苷(cAMP)为松露特有物质, 其相对含量(4.28)居于第 3 位。cAMP 可通过嘌呤代谢通路转化为 AMP, 参与能量及物质代谢调控。cAMP 作为第二信使, 在原核及真核细胞中均有发现, 能够响应多种胞外刺激, 调节生物的生长发育, 如 1 mmol/L 的 cAMP 可加速糙皮侧耳原基的萌发<sup>[21]</sup>; cAMP/PKA 信号转导途径参与调控金针菇子实体的形成与发育<sup>[22]</sup>; 8 mmol/L 的 cAMP 可明显促进长根菇原基的分化<sup>[23]</sup>。噻苯隆(THR)为松露特有物质, 其相对含量(11.98)居于第 2 位。THR 是一种细胞分裂素, 推测其在共生过程中对菌根的生长、子实体的发育有一定的调控作用<sup>[24]</sup>。

#### 3.2.2 松露与松根共有差异物质

在松露及松根 905 个共有物质中, 存在显著差异的物质(DEMs)有 294 个, 其中, SG vs. SL, 上调物质(DEMs-up)有 93 个, 下调物质(DEMs-down)有 201 个。294 个 DEMs, 特别是 93 个上调物质对子实体的发育可能起着一定的调控作用。

93 个 DEMs-up 中, 植物甾醇、甜菜碱、L-精氨酸、赖氨酸、胆碱、 $\alpha$ -生育酚、脯氨酸、烟酸等 8 个物质的含量较高, 其中, 植物甾醇、甜菜碱、L-精氨酸的含量居于前 6 位; 赖氨酸、胆碱、 $\alpha$ -生育酚、脯氨酸、烟酸的含量也较高, 分别为 17.39、8.08、7.15、4.64、3.79 (图 12)。



图 11 三棕榈油酸甘油酯及环磷酸腺苷参与的代谢通路

Figure 11 The metabolic pathways involved in glyceryl tripalmitoleate and cAMP.

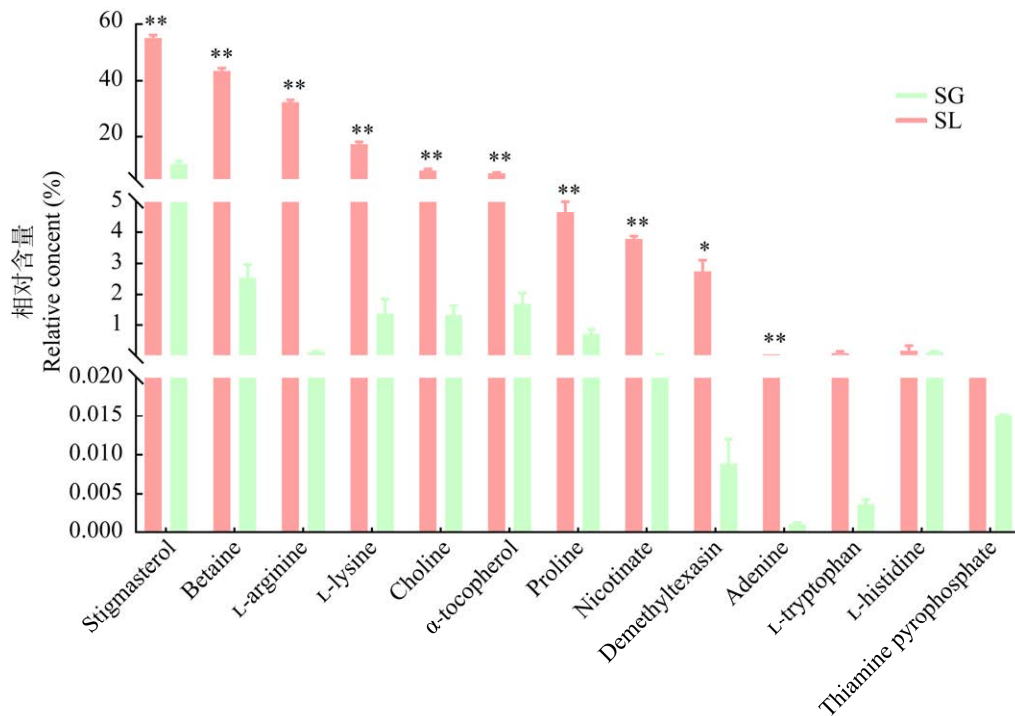


图 12 松露(SL)及松根(SG)中 13 个上调物质的含量

Figure 12 Contents of 13 up-regulated substances in truffle (SL) and pine roots (SG). \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

将 93 个 DEMs-up 进行 KEGG 富集, 显著富集到 7 条通路。参与 7 条通路的化合物有植物甾醇、甜菜碱、L-精氨酸、赖氨酸、胆碱、 $\alpha$ -生育酚、脯氨酸、烟酸、6,7,4'-三羟基异黄酮、腺嘌呤等 19 个物质。值得注意的是, 8 个较高含量的物质及我们前期关注的 6,7,4'-三羟基异黄酮、腺嘌呤都富集到了 7 条通路中。另外色氨酸、组氨酸、硫胺素焦磷酸为非显著差异上调物质。推测 13 个物质对子实体的发育有重要的调控作用。

植物甾醇最先在植物中发现, 几乎存在于所有植物中<sup>[25]</sup>。一般由植物通过类固醇生物合成(sterol biosynthesis)通路合成(图 13)。植物甾醇在松露中的含量(55.14)显著高于松根(12.62), 推测其先由松根合成, 再通过主动运输传入松露, 介导松露子实体的发育及生长。研究表明, 植物甾醇可以通过防止脱落酸(ABA)诱导的人工磷脂酰胆碱/磷脂酰乙醇胺双分子层的破坏, 参与抑制 ABA 对细胞膜的损伤作用<sup>[26-27]</sup>。He

等<sup>[28]</sup>认为植物甾醇可能作为调控分子, 与激素介导的信号通路协同作用, 参与激素的信号传导, 从而调控植物的代谢和发育。植物甾醇在菌根真菌中的研究尚未见报道。

腺嘌呤参与细胞分裂素的生物合成及代谢。本研究中, 腺嘌呤共存于松露及松根中, 但其在松露中的含量(0.056)显著高于松根(0.001)。腺嘌呤与松根特有物质 S-(5'-腺苷)-L-甲硫氨酸、松露特有物质(腺苷)发生了上、下游关联(图 14)。考虑到腺苷是腺嘌呤的直接前体物质, 推测松露可合成腺嘌呤, 并合成细胞分裂素(如玉米素), 调控自身及菌根的生长。细胞分裂素是真菌与菌根的主要信号传导物质, 研究表明在菌根共生体形成过程中, 植物中细胞分裂素(cytokinin, CTKs)大量积累<sup>[29]</sup>。在干旱胁迫下, 菌根中玉米素普遍降低<sup>[30]</sup>。已发现细胞分裂素与生长素在外生菌根形成过程中起协同或拮抗作用<sup>[31-33]</sup>。

6,7,4'-三羟基异黄酮属于黄酮类,是天然存在于植物体内的一类重要次生代谢产物<sup>[34]</sup>,在植物的生长、发育过程中可作为细胞分裂素样化合物起着重要的调控作用<sup>[35]</sup>。6,7,4'-三羟基异黄酮(demethyltaxasin, THF)的生物合成始于前体物质对香豆酰辅酶 A (*p*-coumaroyl-CoA),经由类黄酮及异黄酮的生物合成通路,先合成甘草素(liquiritigenin),最后在 CYP71D9 酶的催化下完成整个合成过程(图 15)。THF 在松露中的含量(2.74)显著高于松根(0.01)。推测 THF 先在松根里合成,再传输入松露,诱导松露快速合成,对子实体的生长发育发挥重要调控作用。研究表明在外共生菌根形成过程中,宿主植物可通过分泌类黄酮来实现信号传导<sup>[36-37]</sup>;黄酮类化合物可作为信号分子诱导外生菌根真菌黏盖牛肝菌(*Suillus bovinus*)的担孢子萌发<sup>[38]</sup>。

大型外共生菌根真菌子实体的发育很大程度上受宿主植物的营养物质及信号分子调控。氮营养对菌根的合成及子实体的发育具有至关重要的作用。氨基酸是氮素合成的重要基石。93 个松露上调的共有差异物显著富集到的 7 条通路中,有 5 条参与了氨基酸的生物合成与代谢,其中以甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢(glycine, serine and threonine metabolism, GST)的 degree 值最大(22)。甜菜碱、胆碱通过 GST 通路,精氨酸、脯氨酸通过精氨酸和脯氨酸通路、D-氨基酸代谢,赖氨酸通过赖氨酸降解参与到 ABM 大通路中。甜菜碱(SL 43.48; SG 2.54)、胆碱(SL 8.08; SG 1.31)、精氨酸(SL 32.33; SG 0.13)、脯氨酸(SL 4.64; SG 0.71)、赖氨酸(SL 17.39; SG 1.38) 5 种氨基酸,在松露(SL)中的含量皆显著高于松根(SG)。另外,组氨酸虽然为

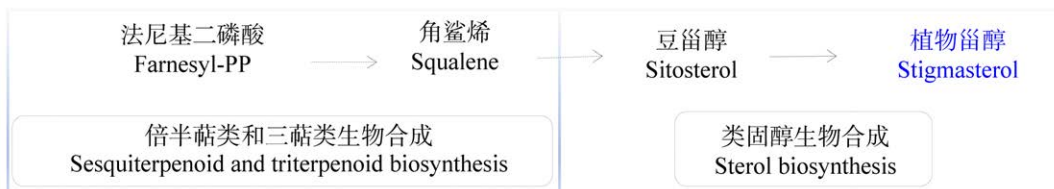


图 13 植物甾醇的生物合成

Figure 13 Biosynthesis of stigmasterol.



图 14 腺嘌呤的生物合成及代谢通路

Figure 14 Biosynthesis and metabolic pathways of adenine.

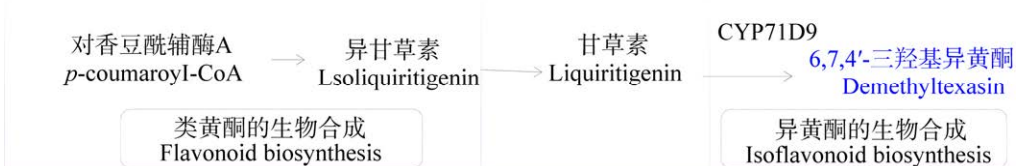


图 15 6,7,4'-三羟基异黄酮的生物合成

Figure 15 Biosynthesis of demethyltaxasin.

非显著差异上调物质,在图 11 中,与松露特有物质 cAMP 共同参与到物质及能量代谢中。推测这些氨基酸一部分由 SL 自身合成,一部分由松针通过光合作用合成运输到 SG,再转入 SL 中。这些物质可能在松露子实体发育中起着重要的物质和信号传递作用。本实验室前期的研究表明,甜菜碱可以促进兰茂牛肝菌菌丝及原基的生长(论文待公开)。精氨酸是一种重要的氮素贮藏营养物,其作为多胺和一氧化氮等物质的前体物质,参与包括植物生长发育、抗逆性等在内的几乎所有的生理生化过程<sup>[39]</sup>。据 Gong 等<sup>[40]</sup>报道,L-精氨酸可以调控丝状真菌分生孢子菌(*C. minitans*)的分生孢子产生。

维生素是菌根体互益共生中非常重要的一大类生物活性物质。如图 12 所示, $\alpha$ -生育酚在松露中的含量(7.15)显著高于松根(1.70),烟酸在松露中的含量(3.79)显著高于松根(0.03)。虽然硫胺素焦磷酸在松露及松根中的含量(分别为 0.023 及 0.015)无显著差异,但在图 11 中,二者与松露特有物质 cAMP 共同参与到物质及能量代谢中。因此推测松露可能通过富集松根中的  $\alpha$ -生育酚、烟酸、硫胺素焦磷酸来调控自身的生长

发育。早年的研究表明, $\alpha$ -生育酚可以促使紫色铜锈菌(*Ustilago violacea*)形成双核异质菌丝<sup>[41]</sup>。

综上所述,除 6,7,4'-三羟基异黄酮外,植物甾醇、腺嘌呤、甜菜碱、精氨酸、赖氨酸、胆碱、 $\alpha$ -生育酚(VE)、脯氨酸、烟酸(VB3)、色氨酸、组氨酸、硫胺素焦磷酸都是常见的、成本低廉的营养物质,可考虑用于纯培养的培养基及菌根苗培育的基质中。

下调物质(DEMs-down)中相对含量 $\geq 2.0$ 的化合物有 30 个(图 16)。然而能匹配到代谢通路中的只有吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)、黄嘌呤(xanthine)(图 17)。IAA 在松根中显著上调(在松露中显著下调),与松露中的上调物质色氨酸通过色氨酸代谢通路发生关联(图 17),推测松露及松根都能合成 IAA。IAA 为 19 世纪末在植物中发现的天然生长素,能够促进植物的根生长发育,增加根的长度和表面积<sup>[42]</sup>。在菌根真菌中的研究表明,IAA 在真菌与植物之间的信号交流中起到关键的调控作用,如红鳞口蘑(*Tricholoma vaccinum*)合成的 IAA 可提高其与云杉(*Spruce*)菌根形成的速度和效率,并能调控自身的生长和子实体发育<sup>[43]</sup>;已有研究表明吲哚乙

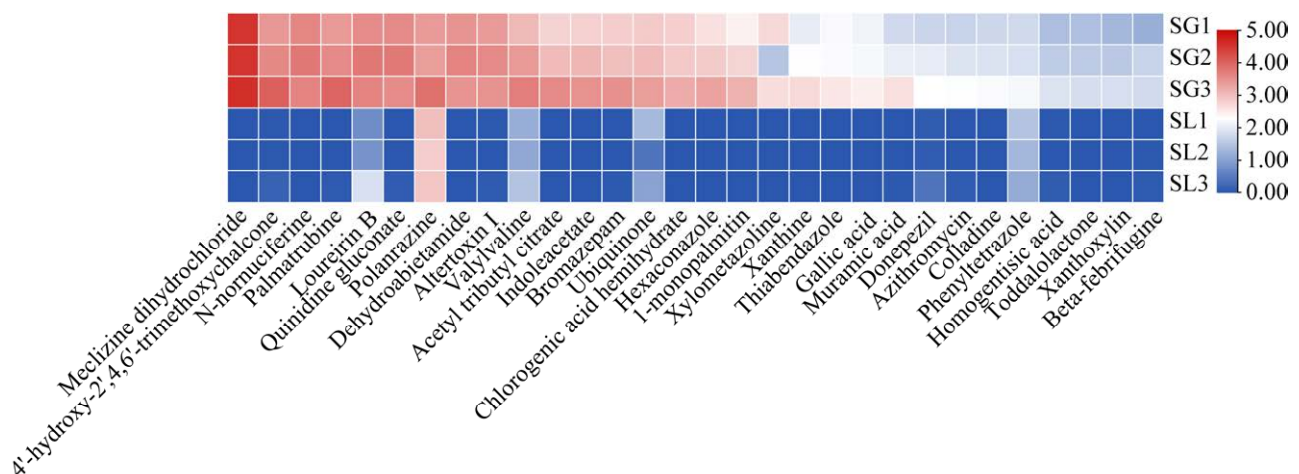


图 16 DEMs-down 中 30 个化合物的相对含量( $\geq 2.0$ )

Figure 16 Relative contents ( $\geq 2.0$ ) of 30 compounds in DEMs-down.

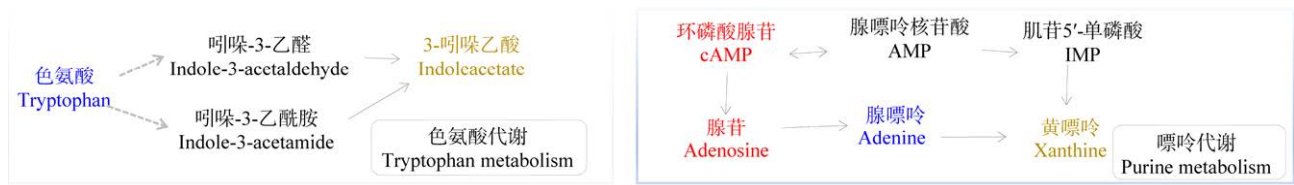


图 17 吲哚乙酸及黄嘌呤参与的代谢通路

Figure 17 Metabolic pathways involved in indoleacetic acid and xanthine.

酸在松露与宿主信号交流中起重要作用<sup>[13-14]</sup>。黄嘌呤在松根中显著上调，与松露特有物质 cAMP、腺苷及显著上调物质腺嘌呤共同发生上下游关联(图 17)，由此推测黄嘌呤在松露中合成，之后传递到松根，共同调控菌根共生体的物质及能量代谢。

## 作者贡献声明

张实润：写作、作图；董杰：作图；张曦予：采样；王成凤：实验、数据整理；刘夏：实验、数据整理；刘佳艳：实验；吕为：相关系数计算；李宗菊：实验指导、创新指导及写作指导。

## 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] 王溢洋, 张国庆, 秦岭, 陈青君, 曹庆芹, 徐诗毅, 卢宇成. 块菌人工栽培现状及菌根苗培育方法的研究进展[J]. 微生物学通报, 2023, 50(3): 1245-1264. WANG YY, ZHANG GQ, QIN L, CHEN QJ, CAO QQ, XU SY, LU YC. Current status of artificial cultivation of truffles and research progress on preparation methods of seedlings with truffle mycorrhiza[J]. Microbiology China, 2023, 50(3): 1245-1264 (in Chinese).
- [2] PATEL S. Food, health and agricultural importance of truffles: a review of current scientific literature[J]. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy, 2012, 6: 15-27.
- [3] PATTANAYAK M, SAMANTA S, MAITY P, MANNA DK, SEN IK, NANDI AK, PANDA BC, CHATTOPADHYAY S, ROY S, SAHOO AK, GUPTA N, ISLAM SS. Polysaccharide of an edible truffle *Tuber rufum*: structural studies and effects on human lymphocytes[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 95: 1037-1048.
- [4] QIN J, FENG B. Life cycle and phylogeography of true truffles[J]. Genes, 2022, 13(1): 145.
- [5] 周雪, 袁鹏宇, 安霜, 陈鹏至, 陈幽幽, 杨晓敏, 李宗菊. 基于 1H-NMR 及 GC-MS 的中国块菌及其共生云南松的代谢物分析[J]. 菌物学报, 2022, 41(1): 105-123. ZHOU X, YUAN PY, AN S, CHEN PZ, CHEN YY, YANG XM, LI ZJ. Analyses of metabolites of *Tuber sinense* and its symbiotic *Pinus yunnanensis* based on <sup>1</sup>H-NMR and GC-MS[J]. Mycosystema, 2022, 41(1): 105-123 (in Chinese).
- [6] 薛燕, 周雪梅, 王庆莉, 边茜, 李平兰, 张利平. 攀西地区块菌气候生态适宜性与地理分布区划研究[J]. 西南农业学报, 2020, 33(3): 619-625. XUE Y, ZHOU XM, WANG QL, BIAN Q, LI LP, ZAHNG LP. Ecological climate suitability and geographical distribution of truffle in west panxi area[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2020, 33(3): 619-625 (in Chinese).
- [7] BACH C, BEACCO P, CAMMALETTI P, BABEL-CHEN Z, LEVESQUE E, TODESCO F, COTTON C, ROBIN B, MURAT C. First production of Italian white truffle (*Tuber magnatum* Pico) ascocarps in an orchard outside its natural range distribution in France[J]. Mycorrhiza, 2021, 31(3): 383-388.
- [8] 张笑萍, 叶雷, 李小林, 张小平. 块菌菌根培育技术研究进展[J]. 食用菌, 2017, 39(6): 1-6, 15. ZHANG XP, YE L, LI XL, ZHANG XP. Research progress on mycorrhizal cultivation technology of truffles[J]. Edible Fungi, 2017, 39(6): 1-6, 15 (in Chinese).
- [9] 弓明钦. 块菌首次在国内栽培成功[J]. 中国食用菌, 2009, 28(3): 15. GONG MQ. Tuber was successfully cultivated in China for the first time[J]. Edible Fungi of China, 2009, 28(3): 15 (in Chinese).
- [10] 李淑超, 乔鹏, 刘思思, 陈娟, 郭顺星. 块菌属分子系统学及菌根共生机制研究进展[J]. 菌物学报, 2017, 36(2): 131-144. LI SC, QIAO P, LIU SS, CHEN J, GUO SX. Research progress in the molecular systematics and symbiotic mechanism of *Tuber* (*Tuberaceae*, *Ascomycota*)[J]. Mycosystema, 2017, 36(2): 131-144 (in Chinese).
- [11] SABELLA E, NUTRICATI E, APRILE A, MICELI A, SORCE C, LORENZI R, DEBELLIS L. *Arthrinium*

- phaeospermum* isolated from *Tuber borchii* ascomata: the first evidence for a “Mycorrhization Helper Fungus”?[J]. *Mycological Progress*, 2015, 14(8): 59.
- [12] SPLIVALLO R, FISCHER U, GÖBEL C, FEUSSNER I, KARLOVSKY P. Truffles regulate plant root morphogenesis *via* the production of auxin and ethylene[J]. *Plant Physiology*, 2009, 150(4): 2018-2029.
- [13] TURGEMAN T, LUBINSKY O, ROTH-BEJERANO N, KAGAN-ZUR V, KAPULNIK Y, KOLTAI H, ZAADY E, BEN-SHABAT S, GUY O, LEWINSOHN E, SITRIT Y. The role of pre-symbiotic auxin signaling in ectendomycorrhiza formation between the desert truffle *Terfezia boudieri* and *Helianthemum sessiliflorum*[J]. *Mycorrhiza*, 2016, 26(4): 287-297.
- [14] BALESTRINI R, SILLO F, KOHLER A, SCHNEIDER G, FACCIO A, TISSERANT E, MARTIN F, BONFANTE P. Genome-wide analysis of cell wall-related genes in *Tuber melanosporum*[J]. *Current Genetics*, 2012, 58(3): 165-177.
- [15] HACQUARD S, TISSERANT E, BRUN A, LEGUÉ V, MARTIN F, KOHLER A. Laser microdissection and microarray analysis of *Tuber melanosporum* ectendomycorrhizas reveal functional heterogeneity between mantle and Hartig net compartments[J]. *Environmental Microbiology*, 2013, 15(6): 1853-1869.
- [16] 蔡玉莹, 殷继明, 高玉雪, 杨鹏翔, 关媛月, 陈德喜. LC-MS/MS 定量检测小鼠尿液 RNA 氧化标志物 8-oxoGsn[J]. *国际检验医学杂志*, 2024, 45(1): 109-112.
- CAI YY, YIN JM, GAO YX, YANG PX, GUAN YY, CHEN DX. Quantitative detection of mouse urine RNA oxidation marker 8-oxoGsn by LC-MS/MS[J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2024, 45(1): 109-112 (in Chinese).
- [17] ZHANG B, ZHOU J, LI Q, GAN BC, PENG WH, ZHANG XP, TAN W, JIANG L, LI XL. Manganese affects the growth and metabolism of *Ganoderma lucidum* based on LC-MS analysis[J]. *PeerJ*, 2019, 7: e6846.
- [18] 杨晓敏, 崔凤仙, 詹晓坤, 袁鹏宇, 张曦予, 陈鹏至, 陈幽幽, 安霜, 周雪, 刘佳艳, 吕为, 李宗菊. 代谢组分析亚洲兰茂牛肝菌原基发育的潜在调控物质[J]. *菌物学报*, 2023, 42(5): 1185-1202.
- YANG XM, CUI FX, ZHAN XK, YUAN PY, ZHANG XY, CHEN PZ, CHEN YY, AN S, ZHOU X, LIU JY, LÜ W, LI ZJ. Metabonomic analysis of potential regulatory substances for primordial development of *Boletus asiatica*[J]. *Mycosystema*, 2023, 42(5): 1185-1202 (in Chinese).
- [19] 刘芹, 黄保, 胡素娟, 牛森园, 吴杰, 周奥硕, 孔维丽. 基于非靶向代谢组学的平菇子实体发育过程中菌丝体差异代谢物分析[J]. *中国瓜菜*, 2024, 37(1): 45-55.
- LIU Q, HUANG B, HU SJ, NIU SY, WU J, ZHOU AS, KONG WL. Analysis of differential metabolites during fruiting body development of *Pleurotus ostreatus* based on untargeted metabolomics[J]. *China Cucurbits and Vegetables*, 2024, 37(1): 45-55 (in Chinese).
- [20] 韩妮莎, 丁硕, 郑月萍, 魏琳燕, 柯星星, 刘宏波, 刘娟, 郑志富. 植物甘油酯合成途径第一步酰化反应的进展[J]. *中国油料作物学报*, 2022, 44(4): 699-711.
- HAN NS, DING S, ZHENG YP, WEI LY, KE XX, LIU HB, LIU J, ZHENG ZF. Advance in studies on the initial step of the glycerolipid biosynthetic pathway in plants[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2022, 44(4): 699-711 (in Chinese).
- [21] 张梦珂. 外源性 ASA 和 cAMP 对糙皮侧耳原基诱发的影响[D]. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文, 2019.
- ZHANG MK. Effects of exogenous ASA and cAMP on primordial induction of *Pleurotus ostreatus*[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [22] 卢园萍. 腺苷酸环化酶对金针菇菌丝生长和子实体形成的调控[D]. 福州: 福建农林大学博士学位论文, 2016.
- LU YP. Regulation of adenylate cyclase on mycelium growth and fruiting body formation of *Flammulina velutipes*[D]. Fuzhou: Doctoral Dissertation of Fujian Agriculture and Forestry University, 2016 (in Chinese).
- [23] 梁焱. 长根菇碳氮营养及 cAMP 对子实体生长发育的调控研究[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2020.
- LIANG Y. Effects of carbon and nitrogen nutrients and cAMP on growth and development of *oudemansiella raphanipes*[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [24] HARIKRISHNAN P, ARAYAMBATH B, JAYARAMAN VK, EKAMBARAM K, AHMED EA, SENTHILKUMAR P, IBRAHIM HI M, SUNDARESAN A, THIRUGNANASAMBANTHAM K. Thidiazuron, a phenyl-urea cytokinin, inhibits ergosterol synthesis and attenuates biofilm formation of *Candida albicans*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2022, 38(12): 224.
- [25] FONTAINE J, GRANDMOUGIN-FERJANI A, GLORIAN V, DURAND R. 24-methyl/methylene sterols increase in monoxenic roots after colonization by arbuscular mycorrhizal fungi[J]. *The New Phytologist*, 2004, 163(1): 159-167.
- [26] RENKOVA AG, KHABIBRAKHMANOVA VR, VALITOVA JN, MUKHITOVA FK, MINIBAYEVA FV. Effects of stress phytohormones on sterol metabolism of *Triticum aestivum* L.[J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2021, 68(3): 474-482.
- [27] STILLWELL W, CHENG YF, WASSALL SR. Plant sterol inhibition of abscisic acid-induced perturbations in phospholipid bilayers[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1990, 1024(2): 345-351.
- [28] HE JX, FUJIOKA S, LI TC, KANG SG, SETO H, TAKATSUTO S, YOSHIDA S, JANG JC. Sterols regulate development and gene expression in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2003, 131(3): 1258-1269.
- [29] BARKER SJ, TAGU D. The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbioses[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2000, 19(2): 144-154.
- [30] CALVO-POLANCO M, ARMADA E, ZAMARREÑO AM, GARCÍA-MINA JM, AROCA R. Local root ABA/cytokinin status and aquaporins regulate poplar



- responses to mild drought stress independently of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70(21): 6437-6446.
- [31] DITENGOU FA, LAPEYRIE F. Hypaphorine from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* counteracts activities of indole-3-acetic acid and ethylene but not synthetic auxins in eucalypt seedlings[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2000, 13(2): 151-158.
- [32] FELTEN J, KOHLER A, MORIN E, BHALERAO RP, PALME K, MARTIN F, DITENGOU FA, LEGUÉ V. The ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* stimulates lateral root formation in poplar and *Arabidopsis* through auxin transport and signaling[J]. *Plant Physiology*, 2009, 151(4): 1991-2005.
- [33] MARTIN F, DUPLESSIS S, DITENGOU F, LAGRANGE H, VOIBLET C, LAPEYRIE F. Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes[J]. *The New Phytologist*, 2001, 151(1): 145-154.
- [34] 林春草, 陈大伟, 戴均贵. 黄酮类化合物合成生物学研究进展[J]. *药学学报*, 2022, 57(5): 1322-1335.
- LIN CC, CHEN DW, DAI JG. Advances of synthetic biology of flavonoids[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2022, 57(5): 1322-1335 (in Chinese).
- [35] BINNS AN, CHEN RH, WOOD HN, LYNN DG. Cell division promoting activity of naturally occurring dehydrodiconiferyl glucosides: do cell wall components control cell division?[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1987, 84(4): 980-984.
- [36] 冯邦, 杨祝良. 外生菌根共生: 共生真菌多样性及菌根形成的分子机制[J]. *中国科学: 生命科学*, 2019, 49(4): 436-444.
- FENG B, YANG ZL. Ectomycorrhizal symbioses: diversity of mycobionts and molecular mechanisms that entail the development of ectomycorrhizae[J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2019, 49(4): 436-444 (in Chinese).
- [37] LAGRANGE H, JAY-ALLGMAND C, LAPEYRIE F. Rutin, the phenolglycoside from eucalyptus root exudates, stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentrations[J]. *The New Phytologist*, 2001, 149(2): 349-355.
- [38] KIKUCHI K, MATSUSHITA N, SUZUKI K, HOGETSU T. Flavonoids induce germination of basidiospores of the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus*[J]. *Mycorrhiza*, 2007, 17(7): 563-570.
- [39] MIRMIRAN P, MOGHADAM SK, BAHADORAN Z, GHASEMI A, AZIZI F. Dietary L-arginine intakes and the risk of metabolic syndrome: a 6-year follow-up in Tehran lipid and glucose study[J]. *Preventive Nutrition and Food Science*, 2017, 22(4): 263-270.
- [40] GONG XY, FU YP, JIANG DH, LI GQ, YI XH, PENG YL. L-arginine is essential for conidiation in the filamentous fungus *Coniothyrium minitans*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2007, 44(12): 1368-1379.
- [41] WILCH G, WARD S, CASTLE A. Transmission of mitochondrial DNA in *Ustilago violacea*[J]. *Current Genetics*, 1992, 22(2): 135-140.
- [42] 黄妍, 吴迪. 微生物合成吲哚乙酸及其对植物作用的研究进展 [J/OL]. *浙江农业科学*, 2024. <https://link.cnki.net/urlid/33.1076.S.20240808.0837.003>.
- HUANG Y, WU D. Research progress on microbial synthesis of indole-3-acetic acid and its effects on plants[J/OL]. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2024. <https://link.cnki.net/urlid/33.1076.S.20240808.0837.003> (in Chinese).
- [43] KRAUSE K, HENKE C, ASIIMWE T, ULBRICHT A, KLEMMER S, SCHACHTSCHABEL D, BOLAND W, KOTHE E. Biosynthesis and secretion of indole-3-acetic acid and its morphological effects on *Tricholoma vaccinum*-spruce ectomycorrhiza[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(20): 7003-7011.