



基于超高效液相色谱-串联质谱技术的柑橘黑点病菌(*Diaporthe citri*)发育关联代谢物分析

蒲占滢, 朱莉, 牡丹超, 胡秀荣, 鹿连明, 黄振东*

浙江省柑橘研究所, 浙江 台州 318000

蒲占滢, 朱莉, 牡丹超, 胡秀荣, 鹿连明, 黄振东. 基于超高效液相色谱-串联质谱技术的柑橘黑点病菌(*Diaporthe citri*)发育关联代谢物分析[J]. 微生物学报, 2023, 63(6): 2472-2487.

PU Zhanxu, ZHU Li, DU Danchao, HU Xiurong, LU Lianming, HUANG Zhendong. Development-associated metabolites of *Diaporthe citri*: a metabolomics analysis based on UPLC-MS/MS[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(6): 2472-2487.

摘要:【目的】柑橘黑点病是柑橘间座壳菌(*Diaporthe citri*)引起的真菌性病害, 是危害柑橘的重要病害之一, *D. citri* 在生长发育过程中经历菌丝生长(10 d, T1)、分生孢子形成(20 d, T2)和分生孢子产孢(30 d, T3)三个阶段。通过不同发育阶段代谢组分析, 挖掘病原菌发育过程中标记物、关键代谢物, 为黑点病菌产孢机制、代谢调控等深入研究提供依据。【方法】利用超高效液相色谱-串联质谱(ultra performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)技术分析了 *D. citri* 发育过程中的代谢变化, 采用主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA), 筛选出了显著差异代谢物并进行了 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes)富集分析。【结果】*D. citri* 生长发育的 3 个阶段共鉴定出 1 090 种代谢物, 基于二重筛选条件(VIP \geq 1, fold change \geq 2 和 fold change \leq 0.5), T1 vs. T2、T2 vs. T3、T1 vs. T3 比较组分别筛选出 265、456 和 580 个显著差异代谢物, 差异代谢物主要是有机酸、甘油酯类、脂肪酸和氨基酸等物质, 病原菌在生长发育过程中形态发育与代谢物变化密切相关。亚油酸及其代谢产物[inolenic acid、13-过氧化羟基-9Z,11E-十八碳二烯酸[(\pm)13-HpODE]、(9S,10E,12Z)-9-羟基十八碳-10,12-二烯酸[9(S)-HODE]、9-氧代-10E,12Z-十八碳二烯酸(9-oxoODE)、13-氧代-9Z,11E-十八碳二烯酸(13-oxoODE)、9-过氧化羟基-9Z,11E-十八碳二烯酸[(\pm)9-HpODE]、9,12,13-三羟基-十八碳单烯酸[9(S),12(S),13(S)-TriHOME]和(\pm)9,10-二羟基-12Z-十八碳烯酸(9,10-DiHOME)、 γ -linolenic acid]和花生四烯酸及其代谢物[脂氧素 B4 (LXB4)、15-酮基-前列腺素 F2a (15-keto prostaglandin F2 α)、20-羧基-白三

资助项目: 浙江省重点研发计划(2019C02022); 国家现代农业(柑橘)产业技术体系(CARS-27); 台州市科技计划(1901ny13)
This work was supported by the Key Research and Development Program of Zhejiang Province (2019C02022), the China Agriculture (Citrus) Research System (CARS-27), and the Taizhou Science and Technology Plan (1901ny13).

*Corresponding author. Tel: +86-576-84228029, E-mail: hyhzd121505@163.com

Received: 2022-10-03; Accepted: 2022-12-24; Published online: 2023-01-05

烯 B4 (20-carboxy LTB4)和 15-脱氧- δ 12,14-前列腺素 J2 (15-deoxy- δ -12,14-PGJ2)]可能与 *D. citri* 产孢机制有关。【结论】*D. citri* 在生长发育过程中形态发育与代谢物变化密切相关, 氧化脂类代谢物(亚油酸及其代谢产物和花生四烯酸及其代谢物)是 *D. citri* 产孢的关键代谢物。

关键词: 柑橘黑点病; 代谢组分析; 代谢物; 超高效液相色谱-串联质谱

Development-associated metabolites of *Diaporthe citri*: a metabolomics analysis based on UPLC-MS/MS

PU Zhanxu, ZHU Li, DU Danchao, HU Xiurong, LU Lianming, HUANG Zhendong*

Citrus Research Institute of Zhejiang Province, Taizhou 318000, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] Melanose caused by *Diaporthe citri* is one of the major fungal diseases in citrus. *D. citri* mainly undergoes three developmental stages, including mycelial growth stage (10 d, T1), pycnidium development stage (20 d, T2), and conidial sporulation stage (30 d, T3). The metabolomics analysis of the markers and key metabolites during the development of *D. citri* can provide clues for clarifying the sporulation mechanism and metabolic regulation of *D. citri*. **[Methods]** Ultra performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was employed to analyze the metabolic changes during the development of *D. citri*. Then, principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were performed to screen the differential metabolites. Finally, KEGG pathway enrichment analysis was conducted for the differential metabolites. **[Results]** A total of 1 090 metabolites were identified at the three developmental stages of *D. citri*. According to the thresholds of $VIP \geq 1$ and fold change ≥ 2 or ≤ 0.5 , 265, 456, and 580 differential metabolites were screened out for T1 vs. T2, T2 vs. T3, and T1 vs. T3, respectively. The differential metabolites mainly included organic acids, triglycerides, fatty acids, and amino acids, which were closely associated with the morphological development of the pathogen. Linoleic acid and its metabolites (13-HpODE, 9(S)-HODE, 9-oxoODE, 13-oxoODE, 9-HpODE, 9(S),12(S),13(S)-TriHOME, 9,10-DiHOME, and γ -linoleic acid), as well as arachidonic acid and its metabolites (20-COOH-AA, LXB4, 15-keto prostaglandin F2 α , 20-carboxy LTB4, 15-deoxy- δ -12,14-PGJ2), might play a role in the sporulation of *D. citri*. **[Conclusion]** The morphological development of *D. citri* was closely associated with the changes of metabolites during different developmental stages, and the oxylipid metabolites (linoleic acid, arachidonic acid and their metabolites) were the key metabolites for sporulation.

Keywords: citrus melanose; metabolomics analysis; metabolites; ultra performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)

柑橘黑点病也称砂皮病, 病原为柑橘间座壳菌(*Diaporthe citri*), 受其危害会造成柑橘主干、枝条流胶枯死, 枝条、果实和叶片出现黑色

或红褐色突起的小点或斑块。黑点病在美国^[1]、日本^[2], 以及我国的台湾^[3]、浙江^[4]、江西^[5]等柑橘产区普遍发生。近年来柑橘果实黑点病的发

生日益加重,严重影响果实外观品质,仅江西抚州自2000年以来因黑点病发生蔓延,受害蜜橘面积超过 $3.0 \times 10^4 \text{ hm}^2$,橘农减少收入超过4 500万元。黑点病的发生流行已成为柑橘高品质发展的重要制约因素。

黑点病的侵染来源是枯枝和腐烂枝条中产生的子囊孢子和分生孢子。枝条受感染后从枯死到产生分生孢子器一般需要1.5–4个月,分生孢子器持续产生分生孢子的时期可以保持至少90 d^[6],一般自柑橘抽梢到果实膨大期都会遭受侵染危害^[1,6-7]。因 *D. citri* 生活史长、侵染时期长,田间有效防治柑橘黑点病的药剂少^[1,8-9],防治用药次数多^[10],导致生产中防治难度大。因此,进一步完善黑点病防控策略是目前柑橘产业中的重大需求。

近年来,代谢组学在植物病原真菌中的研究越来越受到人们的重视和关注,并逐步应用于病原真菌的研究^[11-13],主要侧重于病原菌代谢组分析平台的建立^[14-15]、病原菌生物学^[16-17]、病害的诊断^[18]、植物与病原菌互作^[19-20]及病原菌代谢产物开发等方面的研究。尤其是病原菌发育过程中代谢物的研究表明,D-葡萄糖、9(Z)-十八碳烯酸、9,12-十八碳二烯酸、 α -海藻糖^[16]、海藻糖^[17]、13S-HPODE^[21]和1-辛烯-3-醇^[22]等物质具有病原菌发育的生物标记作用。因此,通过代谢组分析病原菌生长发育过程中代谢物的变化,挖掘病原菌发育过程中标记物、关键代谢物

有助于揭示病原菌发育机制,为后续干扰性药剂的开发,实现病害有效防控提供了新的突破口。

目前柑橘黑点病菌生长发育过程中代谢物的变化尚未见报道,为了挖掘 *D. citri* 在发育过程中的关键代谢物,本研究采用超高效液相色谱-串联质谱(ultra performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)代谢组学分析 *D. citri* 在离体条件下,菌丝生长期(T1)、分生孢子器形成期(T2)和分生孢子器产孢期(T3) 3个时期代谢物变化,比较不同发育时期代谢物差异,寻找不同发育阶段的生物标记物,探究代谢物与 *D. citri* 发育的关系,以期为黑点病的防控提供新思路。

1 材料与amp;方法

1.1 试验菌株

试验菌株从位于浙江省台州市黄岩区头陀镇鱼山坪的浙江省柑橘研究所实验果园中采集的枯枝分离获得,经单孢纯化、形态学观察和rDNA ITS 区序列分析鉴定为柑橘间座壳菌(*Diaporthe citri*),编号为LHOH。*D. citri* 接种于PDA平皿上(马铃薯200 g,葡萄糖20 g,琼脂15 g,超纯水1 000 mL),28 °C黑暗静置培养,分别在菌丝生长期(10 d, T1)、分生孢子器形成期(20 d, T2)和分生孢子器产孢期(30 d, T3)(图1)用无菌接种针小心挑取菌丝、分生孢子器



图1 柑橘间座壳菌的不同发育阶段

Figure 1 The developmental stages of *Diaporthe citri*. A: Mycelium growth stage (10 d, T1). B: Conidia formation stage (20 d, T2). C: Sporulation stage of conidia (30 d, T3).

及分生孢子, 3 个时期各设 3 个生物学重复。每个时期样品取样后迅速用液氮冷冻后转入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱储存备用。

1.2 主要试剂及仪器

葡萄糖、琼脂购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 甲醇、乙腈购自 Merck 公司, 色谱纯; 甲酸购自 Aladdin 公司, 色谱纯。冻干机 (Scientz-100F), 宁波新芝生物科技股份有限公司产品; 研磨仪 (MM400 Retsch) 购自莱驰; 超高效液相色谱 (SCIEX ExionLC AD) 和串联质谱 (Appleid Biosystems 6500 QTRAP)。

1.3 样品提取

样品委托武汉迈特维尔代谢生物技术有限公司进行代谢物检测数据分析。样品从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱取出, 置于冻干机 (Scientz-100F) 冻干, 准确称取 (20 ± 1) mg 于离心管中, 用球磨仪 (30 Hz, 20 s) 研磨, 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下, 3 000 r/min 离心 30 s 将样品离心至管底, 弃上清, 加入 400 μL 70% 甲醇水内标提取液, 1 500 r/min 振荡 5 min, 离心管放入液氮冷冻 5 min、干冰上解冻 5 min、涡旋 2 min, 重复放入液氮、解冻、涡旋 3 次, 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清后放入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱静置 30 min。在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下, 12 000 r/min 离心 3 min, 取上清 200 μL 用于 UPLC-MS/MS 分析。质控样本 (quality control, QC) 由样品的提取物混合制备而成, 仪器分析过程中用于监测分析样本在相同处理方法下的重复性和分析过程的重复性。

1.4 色谱质谱采集条件

代谢组分析采用 LC-QTRAP-MS/MS 系统进行。分析条件如下:

采用亲水性 UPLC 色谱柱 (Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C18 1.8 μm , 2.1 mm \times 100 mm); 流动相为超纯水 (含 0.1% 甲酸) (A), 乙腈 (含 0.1% 甲酸) (B); 优化的色谱柱梯度洗脱, 0 min 水/乙腈

(95:5, 体积比), 11.0 min 为水/乙腈 (10:90, 体积比), 保持 1 min, 12.1 min 调整为水/乙腈 (95:5, 体积比), 并保持 110 s。流速 0.35 mL/min, 柱温 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 进样量 2 μL 。在三重四极杆线性离子阱质谱仪 (Q TRAP) 上获得的 LIT 和三重四极杆 (QQQ) 扫描, QTRAPLC-MS/MS 系统中电子喷雾电离 (ESI) 设置为正 (ESI+) 和负 (ESI-) 2 种模式, MS 离子喷雾电压为 5 500 V (正离子模式), $-4\text{ }500\text{ V}$ (负离子模式), 离子源气体 (ion source gas, GSI) 50 psi, 气体 (GSII) 50 psi, 幕气 (CUR) 25 psi, 源温度为 $500\text{ }^{\circ}\text{C}$, 碰撞诱导电离 (CAD) 为高, Analyst 1.6.3 软件 (Sciex) 处理数据。

1.5 数据分析

采用 MultiaQuant (Sciex) 软件进行色谱峰的积分和校正、信号强度提取, Analyst 1.6.3 (Sciex) 进行质谱数据的处理, 基于武汉迈特维尔代谢生物技术有限公司的自建数据库 MWDB (Metware database) 和公共数据库 MHK 数据库进行代谢物的定性分析, 三重四级杆质谱的多反应监测模式 (multiple reaction monitoring, MRM) 进行代谢物定量分析。采用 R 软件 (www.r-project.org/) 进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA), 并对 OPLS-DA 模型进行验证。利用建立的 OPLS-DA 模型获得的 VIP (variable importance in projection) 值, 结合单变量分析的 *P*-value 值和差异倍数 (fold change) 值进行差异代谢物的筛选。

2 结果与分析

2.1 *Diaporthe citri* 样品的质量控制 (quality control, QC) 分析

通过对不同质控 QC 样本质谱检测分析的总离子流图 (total ion current, TIC) 分析 (图 2A) 和 QC 样本皮尔逊相关性分析 (图 2B), *D. citri*

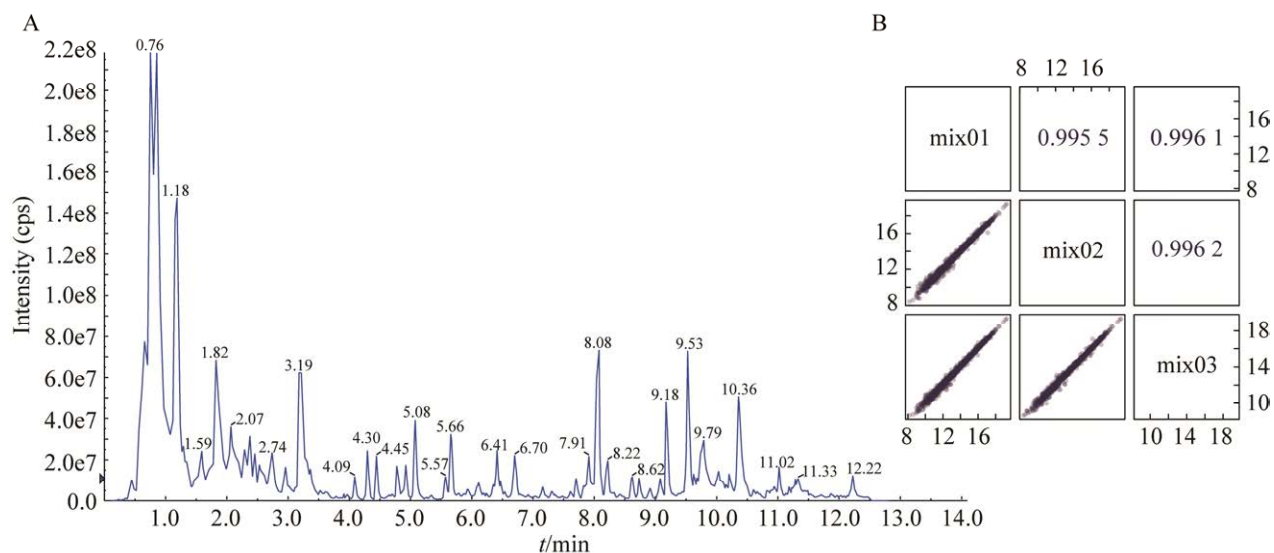


图 2 样品的质量控制分析

Figure 2 The quality analysis of samples. A: The detection of TIC overlap map (positive ion) by QC sample mass spectrometry. B: The Pearson correlation diagram for QC samples.

不同发育阶段的代谢物检测总离子流的曲线重叠性好, QC 样本皮尔逊相关性高, 信号稳定性好, 说明检测得到的数据稳定、可靠。

2.2 *D. citri* 发育过程中代谢谱变化及多元统计分析

根据培养皿上的形态学特征显示菌丝生长期(10 d, T1)、分生孢子器形成期(20 d, T2)和分生孢子器产孢期(30 d, T3) 3 个时间采样, 利用 UPLC-MS/MS 方法, *D. citri* 发育的 3 个阶段共鉴定出 1 090 种代谢物(图 3)。其中氨基酸及其代谢物 399 种, 约占总代谢物的 36.60%; 有机酸及其衍生物 142 种, 约占总代谢物的 13.03%; 苯及其衍生物 98 种, 约占总代谢物的 8.99%; 核苷酸及其代谢物 89 种, 约占总代谢物的 8.16%; 碳水化合物及其代谢物 75 种, 约占总代谢物的 6.88%; 其余 73 种脂肪酰类, 59 种醇、胺类, 10 种醛、酮、酯类, 42 种甘油磷脂类, 25 种辅酶和维生素, 6 种甘油脂类, 4 种色胺、胆碱、色素类, 2 种鞘脂类和 14 种其他代谢物。

通过对 1 090 种代谢物进行主成分分析 (PCA), 结果显示(图 4A), *D. citri* 在菌丝生长期(T1)和分生孢子器形成期(T2)的代谢产物有聚合也有分离, 分生孢子器产孢期(T3)代谢产物分别与 T1 和 T2 的代谢产物呈现分离趋势, 表明 *D. citri* 不同发育时期样品间代谢物存在显著差异, 样本的总体聚类图也直观地反映了 *D. citri* 不同发育阶段样品间代谢物存在显著差异(图 4B)。为了进一步分析差异的代谢物, 对不同发育阶段的代谢物进行分组比较, 3 个比较组为: T1 vs. T2、T2 vs. T3、T1 vs. T3, 建立正交偏最小二乘法(OPLS-DA)模型(表 1), 获得模型的参数 R^2 、 Q^2 。模型参数 R^2 、 Q^2 数值高, 其中 Q^2 均大于 0.9, 模型能准确描述每个样本数据的真实情况, 建立的模型是稳定可靠的。通过 PCA 分析和建立 OPLS-DA 模型分析, 说明不同发育时期的 3 个比较组的代谢物存在显著的差异, 获得的差异代谢产物具有统计意义。

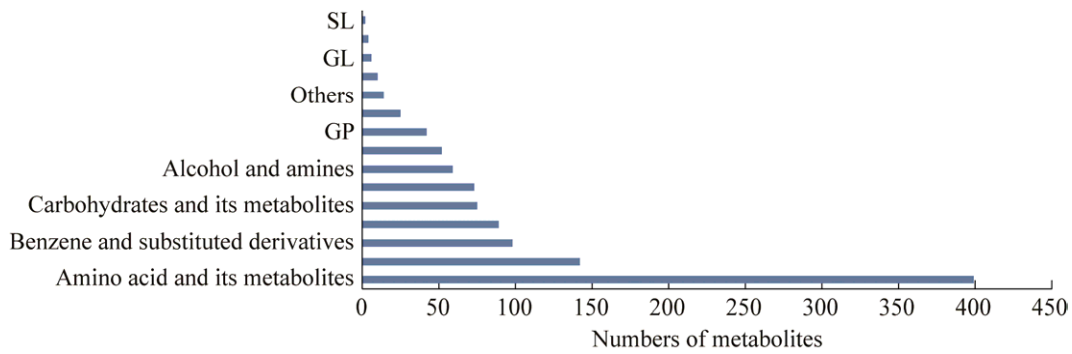


图 3 代谢物分类和数量

Figure 3 The number and classifications of total metabolites. SL: Sphingolipid; GL: Glycerolipid; GP: Glycerophospholipids.

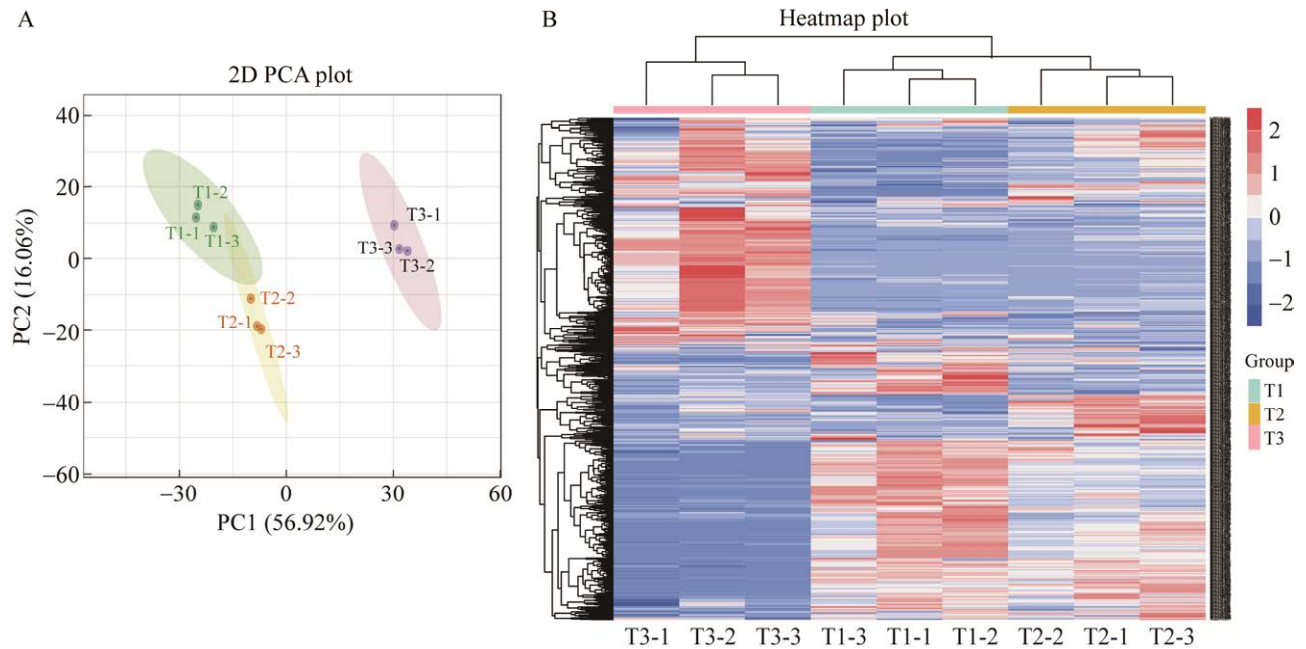


图 4 不同发育阶段代谢物的主成分分析(A)和聚类分析(B)

Figure 4 The principal component analysis (A) and cluster analysis (B) of metabolites at different developmental stages. A: PCA plot of the samples. B: Heatmap plot of the samples.

表 1 不同发育阶段样品的 OPLS-DA 验证

Table 1 The permutation test of OPLS-DA model for developmental stages of *Diaporthe citri*

Group	R^2X	R^2Y	Q^2
T1 vs. T2	0.895	1	0.976
T2 vs. T3	0.948	1	0.999
T1 vs. T3	0.957	1	0.995

R^2X and R^2Y values represent the explanation rate of the established model to X and Y matrix, respectively; Q^2 : Predictive ability of the model.

2.3 *Diaporthe citri* 发育过程中的差异代谢物筛选及分析

通过对代谢物进行单变量和多元统计分析, 获得 OPLS-DA 模型的 VIP 值和单因素分析的差异倍数(fold change), 采取将 fold change、OPLS-DA 模型的 VIP 值结合的方法筛选差异代谢物。在筛选条件(VIP \geq 1, fold change \geq 2 和 fold change \leq 0.5)下, T1 vs. T2 比较组共筛选出 265 种

显著差异代谢物,其中 71 种代谢物在分生孢子形成期呈下调趋势,194 种代谢物在分生孢子形成期呈上调趋势(图 5)。T2 vs. T3 比较组共筛选出 456 种显著差异代谢物,其中 358 种代谢物在分生孢子器产孢过程中呈下调趋势,198 种代谢物在分生孢子器产孢过程中呈上调趋势(图 5)。在 T1 vs. T3 比较组共筛选出 580 种显著差异代谢物,其中 331 种代谢物呈下调趋势,249 种代谢物呈上调趋势,说明黑点病发育过程中代

谢物显著变化。

为了进一步明确各个发育阶段中的关键差异代谢物质,首先绘制 T1 vs. T2、T2 vs. T3、T1 vs. T3 比较组的韦恩图(图 5A),分析 3 组中共享的显著差异代谢物。结果显示,3 个组中共享 91 个显著差异代谢物(表 2),其中氨基酸类 27 个、苯及相关代谢物 12 个、醇/胺类 2 个、甘油磷脂类 4 个、核苷酸类 4 个、碳水化合物 7 个、有机酸类 21 个、脂肪酸 14 个。其次,对 *D. citri*

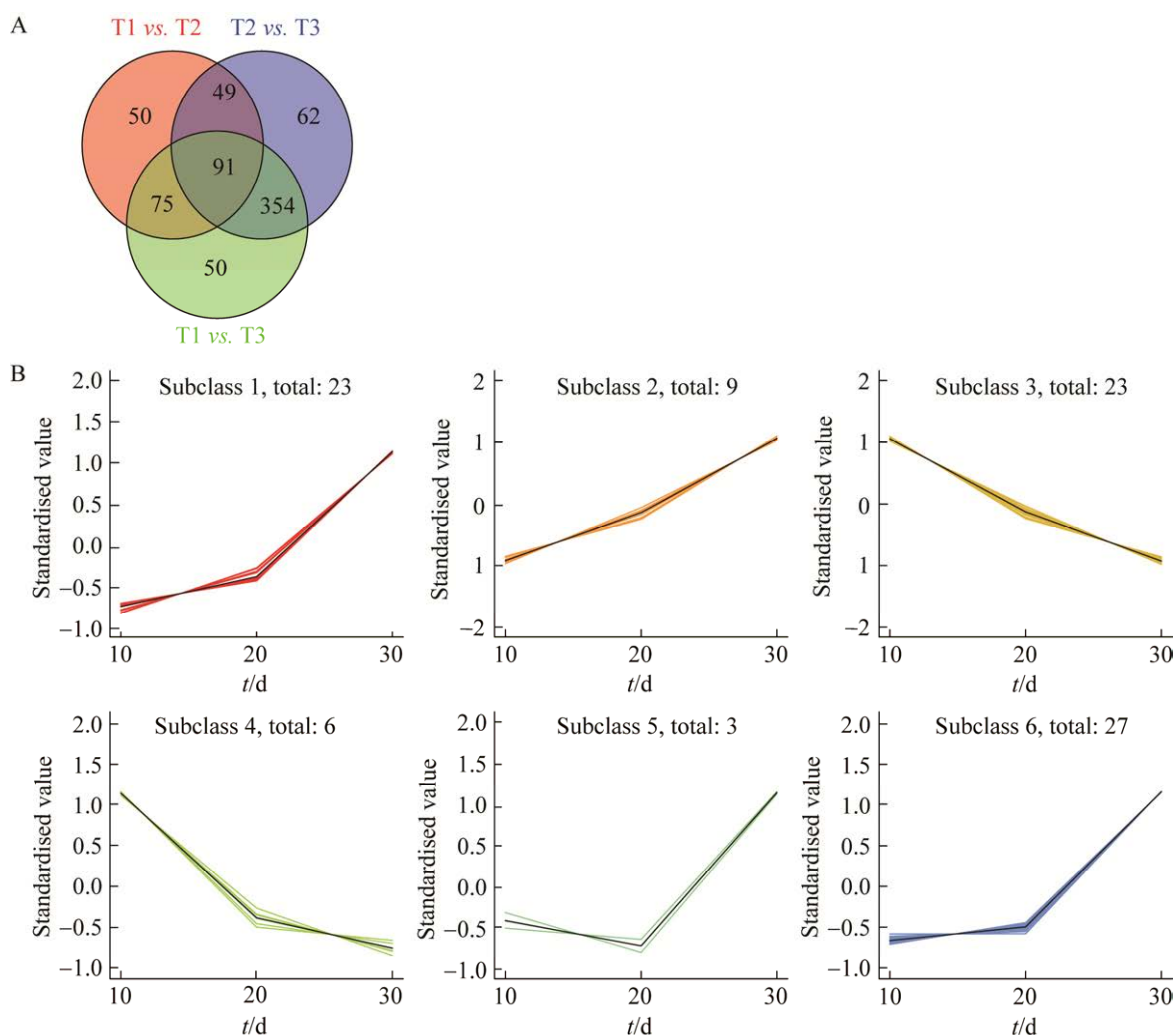


图 5 差异代谢物韦恩图及 K 聚类分析

Figure 5 The Venn diagram and K clustering analysis of differential metabolites. A: The Venn diagram of the differential metabolites. B: The K means of differential metabolites during the different developmental stages of *Diaporthe citri*.

表 2 不同比较组中共有的显著差异代谢物

Table 2 The list of share metabolites that showed significantly difference during the different developmental stages of *Diaporthe citri*

Index	Molecular formula	Metabolite name	Compound type	log ₂ FC			Subclass
				T1/T2	T2/T3	T1/T3	
MEDN0049	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₆	L-saccharopine	Amino acid	1.54	1.30	2.84	2
MEDN0056	C ₈ H ₁₅ NO ₃	N-acetyl-L-leucine		1.31	1.87	3.18	1
MEDN0460	C ₉ H ₂₃ N ₃ O	N8-acetylspemidine		-1.02	-2.06	-3.08	3
MEDN1934	C ₁₀ H ₁₉ N ₃ O ₄	Val-Gln		-1.15	-2.98	-4.13	3
MEDN1936	C ₉ H ₁₅ N ₃ O ₄	Asn-Pro		-2.97	-1.55	-4.52	4
MEDN1937	C ₅ H ₉ NO ₅	4-hydroxy-L-glutamic acid		1.10	2.28	3.38	6
MEDN2117	C ₉ H ₁₆ N ₂ O ₅	Hyp-Thr		-1.01	-2.34	-3.35	3
MEDP0037	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₅	Asp-Phe		-1.04	-1.51	-2.56	3
MEDP0297	C ₅ H ₁₁ NO ₂	5-aminovaleric acid		1.73	2.18	3.91	1
MEDP0318	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃	L-kynurenine		-1.43	-2.26	-3.69	3
MEDP0373	C ₄ H ₇ NO ₃	N-acetylglycine		3.51	1.06	4.56	2
MEDP0637	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₃	Phe-Pro		-1.28	-2.43	-3.71	3
MEDP0664	C ₁₀ H ₁₃ NO ₃	L-tyrosine methyl ester		-1.89	-2.27	-4.16	4
MEDP1177	C ₅ H ₁₁ NO ₂	N-methyl- α -aminoisobutyric acid		6.47	3.09	9.57	6
MEDP1307	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	(2S,3S)-3-methylphenylalanine		-2.33	-1.33	-3.66	4
MEDP1653	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₇	Glu-Glu		1.32	2.16	3.49	1
MEDP1680	C ₁₆ H ₃₁ N ₃ O ₅	Thr-Leu-Ile		-1.19	-2.13	-3.32	3
MEDP1681	C ₁₄ H ₂₇ N ₃ O ₄	Leu-Gly-Leu		-1.17	-3.46	-4.62	3
MEDP1851	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₆	Asp-Tyr		-1.24	-1.68	-2.92	3
MEDP2031	C ₁₀ H ₁₃ NO ₃	Alpha-methyl-m-tyrosine		-1.30	-1.81	-3.10	3
MEDP2037	C ₁₁ H ₁₃ NO ₃	2-((3-oxo-3-phenylpropyl) amino) acetic acid		2.19	2.39	4.58	1
MEDP2321	C ₁₁ H ₂₁ N ₅ O ₃	Pro-Arg		-1.03	-2.64	-3.67	3
MEDP2335	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄	Gly-Thr		-1.05	-4.09	-5.14	3
MEDP2446	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₂	Cyclo (Pro-Pro)		2.61	1.81	4.41	1
MEDP2459	C ₁₂ H ₂₆ N ₄ O ₃	Lys-Lys		-1.44	-13.30	-14.8	3
MEDP2538	C ₉ H ₁₁ NO ₃	3-hydroxy-L-phenylalanine		-1.12	-2.07	-3.19	3
MEDP2552	C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₅	Thr-Thr		-1.01	-3.58	-4.60	3
MEDN0410	C ₇ H ₆ O ₂	4-hydroxybenzaldehyde	Benzene and substituted derivatives	2.24	1.08	3.32	2
MEDN1878	C ₁₄ H ₁₈ O ₄	Trolox		11.72	3.30	15.02	6
MEDP0101	C ₉ H ₈ O ₃	P-coumaric acid		-1.20	-4.66	-5.86	3
MEDP0507	C ₉ H ₈ O ₃	2-hydroxycinnamic acid		-1.27	-4.54	-5.81	3
MEDP0556	C ₁₀ H ₈ O ₃	Herniarin		-2.40	-11.20	-13.6	4
MEDP0654	C ₈ H ₉ NO	2-phenylacetamide		13.79	2.74	16.53	1
MEDP1807	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	Thymoquinone		2.06	1.03	3.09	2
MEDP2137	C ₁₁ H ₁₆ O	5-phenyl-1-pentanol		-1.27	4.29	3.02	5
MEDP2184	C ₈ H ₁₀ O ₃	2,3-dimethoxyphenol		2.39	1.14	3.54	2
MEDP2243	C ₂₇ H ₃₉ NO ₂	AM-1172		10.93	2.08	13.01	1
MEDP2615	C ₁₁ H ₁₂ O ₃	3-4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) but-3-en-2-one		1.79	2.25	4.04	1
MEDP2620	C ₁₁ H ₁₀ O ₂	1,4-dihydroxy-2-methylnaphthalene		1.42	2.07	3.49	1

(待续)

(续表 2)

Index	Molecular formula	Metabolite name	Compound type	log ₂ FC			Subclass
				T1/T2	T2/T3	T1/T3	
MEDN1799	C ₂₀ H ₂₈ O ₅	Ingenol	Alcohol and amines	14.74	2.66	17.39	1
MEDP1002	C ₇ H ₁₅ NO ₂	Acetylcholine		-1.08	2.98	1.90	5
MEDN1273	C ₂₅ H ₄₆ NO ₇ P	LPE (0:0/20:3)	GP	9.48	3.61	13.09	6
MEDN1274	C ₂₅ H ₄₆ NO ₇ P	LPE (0:0/20:3) LPE (20:3/0:0) LPE (20:3/0:0)		9.48	3.61	13.09	6
MEDP1686	C ₂₀ H ₄₂ NO ₇ P	LPE (15:0/0:0) LPE (15:0/0:0)		2.15	3.26	5.41	6
MEDP1875	C ₂₂ H ₄₄ NO ₇ P	LPE (17:1/0:0) LPE (17:1/0:0)		1.60	2.83	4.43	6
MEDN0452	C ₉ H ₁₄ N ₃ O ₇ P	2'-deoxycytidine-5'-monophosphate	Nucleotide	1.72	1.13	2.85	2
MEDN1675	C ₅ H ₁₁ O ₇ P	2-deoxyribose 5'-phosphate		1.52	2.63	4.15	6
MEDP0177	C ₅ H ₆ N ₂ O ₂	Thymine		1.73	1.99	3.72	1
MEDP0378	C ₁₄ H ₁₇ N ₅ O ₈	N6-succinyl adenosine		1.48	1.93	3.42	1
MEDN0211	C ₅ H ₁₂ O ₅	D-arabitol	Carbohydrates	-1.07	-5.29	-6.35	3
MEDN0502	C ₅ H ₁₁ O ₇ P	2-deoxyribose 1-phosphate		1.52	2.63	4.15	6
MEDN0832	C ₆ H ₁₄ NO ₈ P	D-glucosamine 6-phosphate		1.00	3.43	4.44	6
MEDN1018	C ₅ H ₁₂ O ₅	Ribitol		-1.07	-5.29	-6.35	3
MEDN1540	C ₇ H ₁₄ O ₈	Glucaptate		2.12	2.82	4.95	6
MEDN2057	C ₃₆ H ₆₂ O ₃₁	Maltohexaose		-1.44	-5.12	-6.55	3
MEDP2343	C ₃₀ H ₅₂ O ₂₆	D-maltopentaose		-1.19	-2.44	-3.63	3
MEDP2359	C ₁₄ H ₂₅ NO ₁₁	N-acetyl-D-lactosamine	Organic acid	-1.32	-1.43	-2.75	4
MEDN0201	C ₄ H ₆ O ₄	Succinic acid		1.40	2.37	3.77	6
MEDN0204	C ₃ H ₄ O ₃	Pyruvic acid		11.24	1.24	12.48	2
MEDN0280	C ₂ H ₇ NO ₃ S	2-aminoethanesulfonic acid		2.23	2.10	4.33	1
MEDN0284	C ₆ H ₁₂ O ₃	2-hydroxyisocaproic acid		2.02	3.49	5.52	6
MEDN0335	C ₄ H ₆ O ₄	Methylmalonic acid		1.40	2.37	3.77	6
MEDN0432	C ₆ H ₁₂ O ₃	5-hydroxyhexanoic acid		2.02	3.49	5.52	6
MEDN0593	C ₄ H ₆ O ₅	D-malic acid		1.75	1.97	3.72	1
MEDN1155	C ₆ H ₁₀ O ₃	4-methyl-2-oxovaleric acid		12.16	4.95	17.12	6
MEDN1197	C ₁₁ H ₉ NO ₄	8-methoxyalkynurate		11.87	2.76	14.63	1
MEDN1328	C ₆ H ₁₂ O ₃	(S)-leucic acid		2.02	3.49	5.52	6
MEDN1499	C ₆ H ₁₂ O ₃	2-hydroxyhexanoic acid		2.02	3.49	5.52	6
MEDN1590	C ₆ H ₈ O ₆	Tricarballic acid		1.99	2.29	4.29	1
MEDN1721	C ₉ H ₁₀ O ₂	M-toluene acetic acid		12.44	3.34	15.79	6
MEDN1874	C ₄ H ₁₀ N ₂ O ₃	L-canaline		-1.12	-4.08	-5.19	3
MEDN2063	C ₆ H ₁₄ O ₁₂ P ₂	1,6-di-o-phosphono-D-fructose		1.19	3.47	4.66	6
MEDP0296	C ₅ H ₁₁ N ₃ O ₂	4-guanidinobutyric acid		-1.32	2.79	1.48	5
MEDP0313	C ₃ H ₇ N ₃ O ₂	Guanidineacetic acid		1.76	2.01	3.77	1
MEDP0528	C ₇ H ₇ NO ₃	5-aminosalicylic acid		12.60	9.49	22.07	6
MEDP0689	C ₈ H ₁₅ NO ₂	Tranexamic acid		1.77	2.59	4.36	6
MEDP1495	C ₉ H ₁₀ O ₃	3-methoxyphenylacetic acid		1.86	1.31	3.17	2

(待续)

(续表 2)

Index	Molecular formula	Metabolite name	Compound type	log ₂ FC			Subclass
				T1/T2	T2/T3	T1/T3	
MEDN0788	C ₂₀ H ₃₀ O ₅	LXA5	FA	13.01	1.81	14.82	1
MEDN1428	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	20-COOH-AA		3.06	1.90	4.96	1
MEDN1840	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	Pinolenic acid		-1.57	-14.20	-15.80	3
MEDP0429	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	FFA (18:3)		-1.81	-2.13	-3.94	4
MEDP0510	C ₉ H ₁₇ NO ₄	Carnitine C2:0		1.89	1.04	2.93	2
MEDP0530	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	15-deoxy- δ -12,14-PGJ2		2.58	1.83	4.41	1
MEDP0577	C ₁₁ H ₂₁ NO ₄	Carnitine isoC4:0		1.83	2.11	3.94	1
MEDP0618	C ₁₂ H ₂₃ NO ₄	Carnitine-2-methyl-C4		1.40	2.77	4.17	6
MEDP1084	C ₁₉ H ₃₇ NO ₄	Carnitine C12:0		14.61	3.27	17.88	6
MEDP1440	C ₁₂ H ₂₃ NO ₄	Carnitine C5:0		1.40	2.77	4.17	6
MEDP1442	C ₁₁ H ₂₁ NO ₄	Carnitine C4:0		1.83	2.11	3.94	1
MEDP1459	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	Epoxy-eicosapentaenoic-acid		11.81	2.81	14.62	6
MEDP1460	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	Hydroxyeicosapentaenoic-acid		13.19	1.85	15.04	1
MEDP1665	C ₁₀ H ₁₉ NO ₄	Carnitine C3:0		1.73	2.63	4.36	6

不同发育阶段共享的 91 个差异代谢物质进行 K 聚类分析(图 5B), 59 个共享代谢物在病原菌生长发育的 3 个过程持续上调, 29 个共享代谢物在病原菌生长发育的 3 个过程持续下调。91 个共享显著差异代谢物中, 66.67% 氨基酸及其代谢物逐渐下降, 而 L-酵母氨酸、N-乙酰基亮氨酸、N-乙酰基甘氨酸、N-3-苯基丙酰基甘氨酸等不断积累; 许多苯及其衍生物类代谢物在菌丝阶段(T1)未检出, 随着菌丝的发育代谢物不断合成和积累, 2-苯基乙酰胺、AM-1172 等在分生孢子器形成期开始大量积累直到产孢; 大多数醇、胺类代谢物在菌丝生长发育过程中不断消耗, 巨大戟醇自分生孢子器形成期开始大量积累直到产孢。90.47% 的有机酸类代谢物在分生孢子器形成期(T2)和分生孢子器产孢过程中大量积累, 丙酮酸、4-甲基-2-氧代戊酸、8-甲基炔脲酸酯、间甲苯乙酸、5-氨基水杨酸代谢物在菌丝阶段(T1)未检出, 在分生孢子器形成期开始大量积累。85.71% 的脂肪酸类代谢物在菌丝生长发育过程中不断积累, 皮诺敛酸和 γ -亚麻酸不断消耗。因此, 有机酸、甘油酯类、

脂肪酸和氨基酸等代谢物在 *D. citri* 形态发育中起着至关重要的作用。

2.4 差异代谢物 KEGG 分析

利用 KEGG 数据库对差异代谢物进行注释和通路富集分析, 进一步探索 *D. citri* 生长发育过程中的代谢物的代谢途径变化与生长发育的关系。比较组 T1 vs. T2、T2 vs. T3、T1 vs. T3 中差异显著且被 KEGG 数据库注释到的代谢物分别为 132 个、203 个和 214 个; 被注释的代谢物在不同比较组中分别进行代谢通路的富集分析, 取显著富集的前 20 条通路绘制富集图(图 6)。3 个比较组中磷酸戊糖途径(ko00030)、葡萄糖醛酸酯互变途径(ko00040)、生物合成(ko00130)、嘧啶代谢(ko00240)、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢(ko00250)、苯丙氨酸代谢(ko00360)、花生四烯酸代谢(ko00590)、亚油酸代谢(ko00591)和不饱和脂肪酸生物合成(ko01040)等通路显著富集。

D. citri 在菌丝生长期(T1)至分生孢子器形成期(T2)和整个生长发育期 T1-T3 差异代谢物在亚油酸代谢(ko00591)通路上显著富集($P < 0.01$),

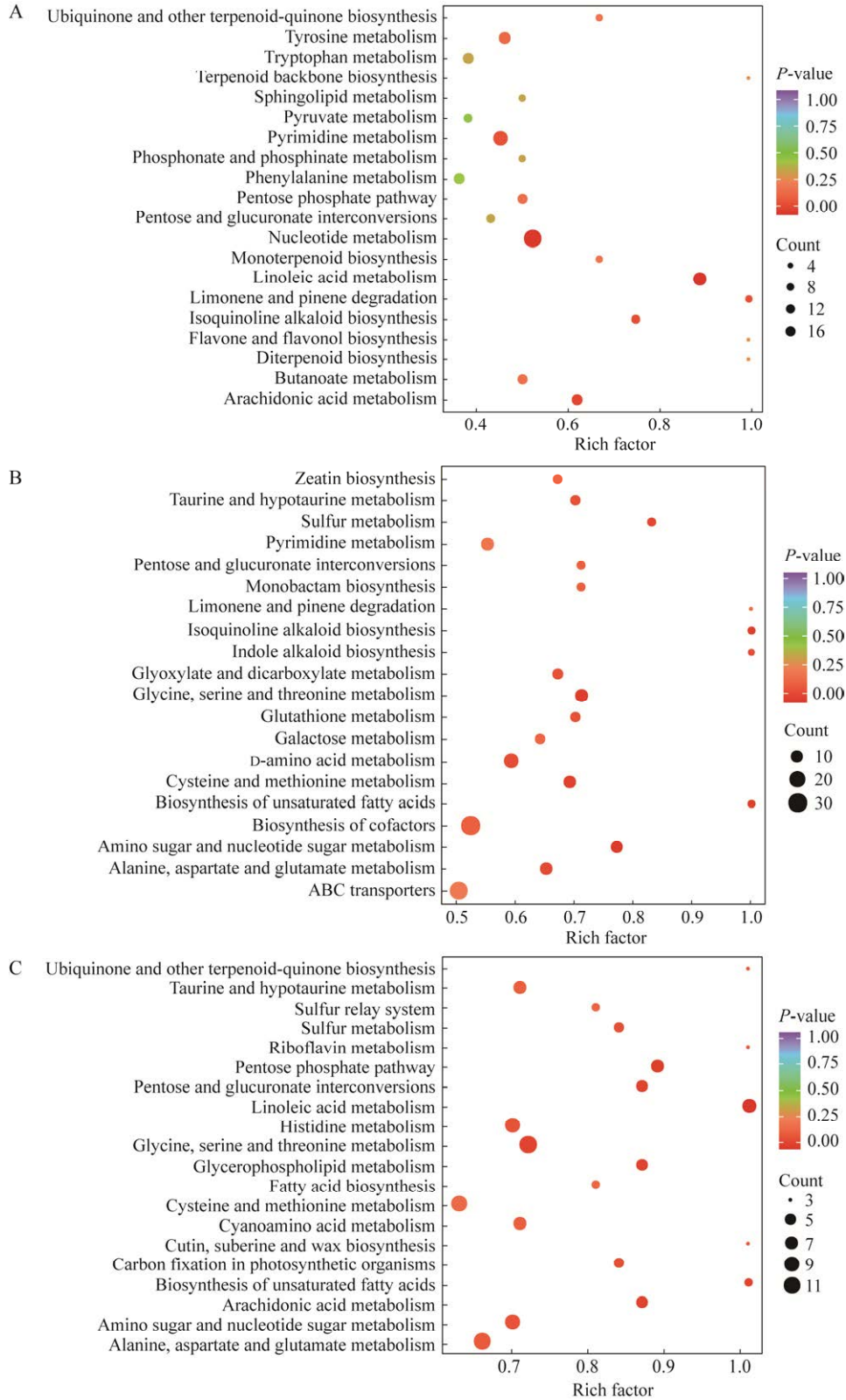


图 6 差异代谢物 KEGG 富集图

Figure 6 Top 20 KEGG enrichment map of different metabolites. A–C: T1 vs. T2, T2 vs. T3, and T1 vs. T3 groups.

表 3)。亚油酸代谢(ko00591)通路被注释到的差异代谢物有 8 个, 其中 13-过氧化羟基-9Z,11E-十八碳二烯酸[(±)13-HpODE]、(9S,10E,12Z)-9-羟基十八碳-10,12-二烯酸[9(S)-HODE]、9-氧代-10E,12Z-十八碳二烯酸(9-oxoODE)、13-氧代-9Z,11E-十八碳二烯酸(13-oxoODE)、9-过氧化羟基-9Z,11E-十八碳二烯酸[(±)9-HpODE]、9,12,13-三羟基-十八碳单烯酸[9(S),12(S),13(S)-TriHOME]和(±)9,10-二羟基-12Z-十八碳烯酸(9,10-DiHOME)在生长发育过程中显著积累, γ -亚麻酸不断消耗(图 7)。代谢途径图显示, 在 ko00591(KEGG 数据库)通路中 γ -亚麻酸转化为 dihomog- γ -linolenate \rightarrow arachidonic, 通过花生四烯酸代谢(ko00590)转化为脂氧素 B4 (LXB4)、15-酮基-前列腺素 F2a (15-keto prostaglandin F2 α)、20-羧基-白三烯 B4 (20-carboxy LTB4)和 15-脱氧- δ 12,14-前列腺素 J2 (15-deoxy- δ -12,14-PGJ2)。因此, 筛选出的参与亚油酸代谢(ko00591)和花生四烯酸代谢(ko00590) (图 8)的差异代谢物可能与 *D. citri* 产孢机制密切相关, 作为产孢调控的代谢物研究潜力巨大。

3 讨论与结论

通过 UPLC-MS/MS 分析 *D. citri* 共鉴定出 1 090 种代谢物, T1 vs. T2、T2 vs. T3、T1 vs. T3 比较组分别筛选出 265、456 和 580 个显著差异

代谢物, 鉴定出的重要差异代谢物主要包括糖类、脂肪酸、苯及其衍生物、氨基酸和有机酸等(图 3), 说明基于 UPLC-MS/MS、GC-MS 和 HPLC-MS 等分析技术平台的代谢组学方法可以分析与真菌形态变化相关的复杂代谢物变化^[23-26]。

本研究显示 *D. citri* 在菌丝生长、分生孢子器形成和分生孢子器产孢的生长发育过程中与代谢物的变化密切相关(图 1, 表 1), 与冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*)^[24]、白色念珠菌(*Candida albicans*)^[25]形态变化与代谢物谱、代谢物网络的变化有关的研究结果相一致。基于 OPLS-DA 模型、单因素分析和 Kmeans 聚类分析明确了 8 类代谢物(氨基酸类、苯及相关代谢物、醇/胺类、甘油磷脂类、核苷酸类、碳水化合物、有机酸类、脂肪酸类)在 *D. citri* 生长发育过程中的变化特征(图 5, 表 2), 其中, 大多数氨基酸类代谢物在 *D. citri* 发育过程逐渐消耗, 包括 L-色氨酸-L-酪氨酸、苯丙氨酸-丙氨酸-亮氨酸、L-精氨酸-L-丝氨酸等, 氨基酸类代谢物的大量下降可能为形成分生孢子器提供了养分, 已有研究表明氨基酸可能是构成所有真菌的主要营养来源^[27], 虽然 *D. citri* 发育过程中氨基酸不断消耗, 然而, 少数的氨基酸如 L-酵母氨酸、N-乙酰基亮氨酸、N-乙酰基甘氨酸、N-3-苯基丙酰基甘氨酸等在产孢阶段积累, 其代谢的相关机理有待于进一步研究。早期研究已经确定了冠突散囊菌(*E. cristatum*)^[24]、

表 3 代谢物显著富集通路

Table 3 Significant enriched pathways of metabolites

Group	KEGG pathway	Ko-ID	P value	Metabolite
T1 vs. T2	Linoleic acid metabolism	ko00591	4.39 \times 10 ⁻⁴	C04717+C14767+C14766+C14765+C14827+C06426+C14833+C14828
	Nucleotide metabolism	ko01232	8.93 \times 10 ⁻³	C00526+C00299+C00106+C00239+C05512+C00360+C00881+C01762+C00178+C00380+C00262+C00214+C00559+C00294+C00387+C00385
T1 vs. T3	Linoleic acid metabolism	ko00591	2.62 \times 10 ⁻³	C14833+C14767+C06426+C04717+C14765+C01595+C14766+C14827

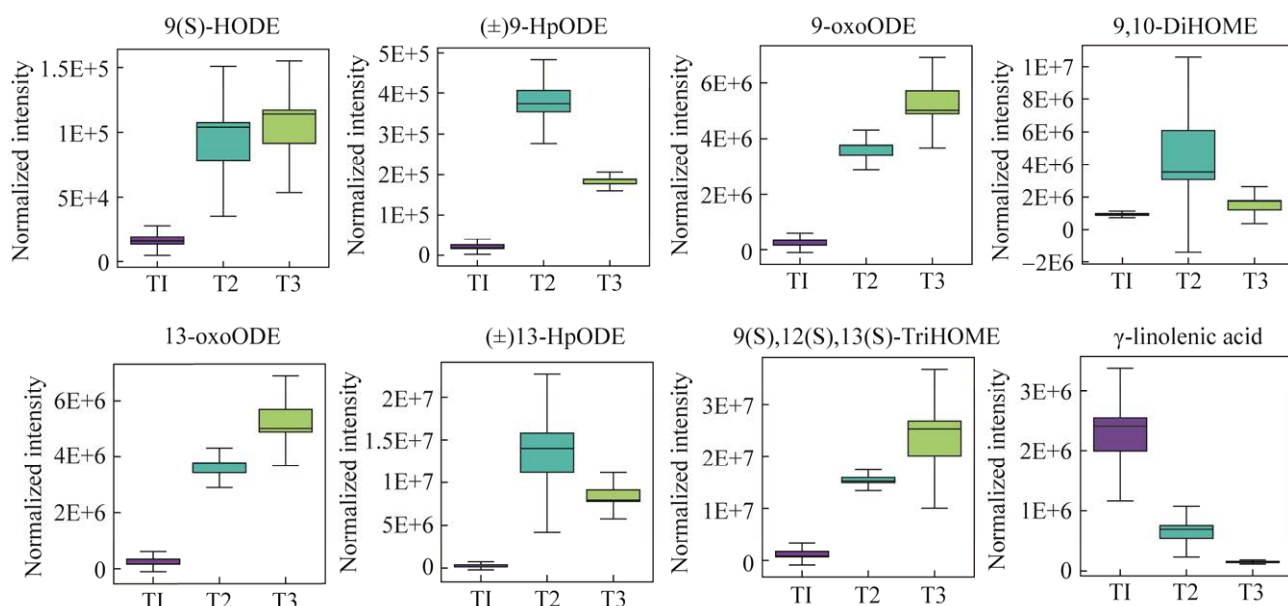


图 7 ko00591 通路富集的代谢物水平变化箱线图

Figure 7 Box plot of changes in metabolite levels enriched by the ko00591 pathway.

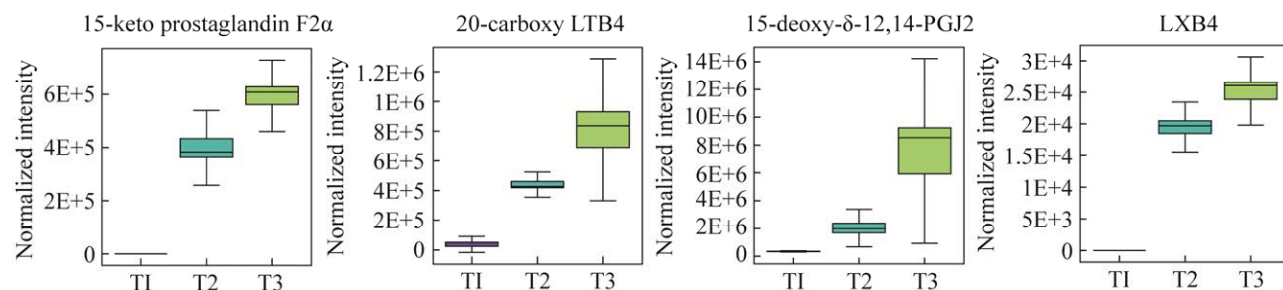


图 8 ko00590 通路富集的差异代谢物水平变化箱线图

Figure 8 Box plot of changes in metabolite levels enriched by the ko00590 pathway.

白色念珠菌(*C. albicans*)^[25]在形态变化和性发育过程中的关联代谢物主要是氨基酸、脂肪酸和有机酸盐等, 并且不同物种间代谢物对形态变化和性发育调节作用存在显著的差异。尽管 *D. citri* 发育过程中代谢物变化未见报道, 我们初步推测筛选出显著差异的有机酸、甘油酯类、脂肪酸和氨基酸等代谢物对 *D. citri* 发育过程起重要的调节作用, 单个代谢产物的功能^[28-29]有待于进一步研究。

由多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty

acids, PUFA)产生的氧脂素(oxylinpin)广泛存在于各种生物中, 是植物、动物和真菌之间的一种常见的交流物质, 氧脂素类代谢物在真菌中的功能涉及调节生长、分化、致病性、有性生殖和无性生殖^[30-32]。据报道, 1-辛烯-3-醇可调控蘑菇轮枝霉褐斑病(*Lecanicillium fungicola*)分生孢子的形成和萌发^[22], 8-HPODE 对曲霉(*Aspergillus fumigatus*)产孢有影响^[33], 光照条件下 18-HODE 促进粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)分生孢子的形成、18-HOTrE 抑制分生孢子的形

成^[34]。我们发现亚油酸消耗(表 2), 注释到亚油酸代谢(ko00591)的 13-HpODE、9(S)-HODE、9-oxoODE、13-oxoODE、9-HpODE、9(S),12(S),13(S)TriHOME 和 9,10-DiHOME, 并在 *D. citri* 分生孢子器形成过程中显著积累, 这表明这些代谢物参与了 *D. citri* 无性生殖的过程。前人研究表明花生四烯酸(arachidonic acid, AA)生物合成是决定葱枯萎病菌(*Stemphylium eturmiunum*)性发育的关键因素^[35], 沉默单酰基甘油脂肪酶(*magl*)基因能显著减少 *S. eturmiunum* 合成 AA, 5 $\mu\text{mol/L}$ 花生四烯酸处理后光照条件下 *N. crassa* 无性孢子减少了 45%^[36], 本研究中 γ -亚麻酸的消耗是通过 ko00591 转化为 dihomog- γ -linolenate \rightarrow arachidonic, arachidonic 是通过花生四烯酸代谢(ko00590)途径转化为 15-酮基-前列腺素 F2a、脂氧素 B4、20-羧基-白三烯 B4 和 15-脱氧- δ -12,14-前列腺素 J2 的前体, 20-羧基花生四烯酸(20-carboxyl arachidonic acid)在 *D. citri* 发育过程中不断积累(表 2), 代谢物脂氧素 B4 和 15-酮基-前列腺素 F2a 在菌丝生长期(T1)未检出, 到分生孢子器形成期(T2)开始大量积累, 可能是菌丝生长期积累量较少, 随着性发育过程中 20-羧基花生四烯酸的增加而积累。因此, 推测亚油酸及其代谢产物 [linolenic acid、13-HpODE、9(S)-HODE、9-oxoODE、13-oxoODE、9-HpODE、9(S),12(S),13(S)-TriHOME、9,10-DiHOME、 γ -linolenic acid]和 20-羧基花生四烯酸及其代谢物(20-COOH-AA、LXB4、15-keto prostaglandin F2a、20-carboxy LTB4、15-deoxy- δ -12,14-PGJ2)可能与 *D. citri* 产孢机制有关。研究发现的这些氧化脂类差异代谢物为其产孢机制、调控等的研究提供了重要的依据。

本研究基于 UPLC-MS/MS 研究了 *D. citri* 生长发育、无性生殖过程中代谢物变化, 并对差异代谢物进行了 KEGG 功能注释和通路富集

分析, 发现菌丝生长至分生孢子器产孢过程中差异代谢物显著富集于花生四烯酸代谢、亚油酸代谢和不饱和脂肪酸生物合成等多条代谢途径, 氧化脂类代谢物(亚油酸及代谢物和花生四烯酸及代谢物)是 *D. citri* 产孢的关键代谢物。由于真菌代谢物质谱数据库不健全、尚有大量的真菌代谢产物有待鉴定, 影响了试验结果的进一步精准分析。

参考文献

- [1] TIMMER LW, ZITKO SE, ALBRIGO LG. Split applications of copper fungicides improve control of melanose on grapefruit in Florida[J]. Plant Disease, 1998, 82: 983-986.
- [2] YUTAKA A, YASUO H, TOMOMASA M. Studies on citrus melanose and citrus stem-end rot by *Diaporthe citri* Wolf[J]. Japanese Journal of Phytopathology, 1986, 52: 39-46.
- [3] 蔡竹固, 庄再扬. 柑橘黑点病及其防治[J]. 中国园艺, 1985, 31(3): 132-140.
CAI ZG, ZHUANG ZY. Citrus melanose and its control[J]. Horticulture of Chinese, 1985, 31(3): 132-140 (in Chinese).
- [4] 姜丽英, 徐法三, 黄振东, 黄峰, 陈国庆, 李红叶. 柑橘黑点病的发病规律和防治[J]. 浙江农业学报, 2012(4): 647-653.
JIANG LY, XU FS, HUANG ZD, HUANG F, CHEN GQ, LI HY. Occurrence and control of citrus melanose caused by *Diaporthe citri*[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2012(4): 647-653 (in Chinese).
- [5] 曾炳隆, 曾知富, 朱晓云, 彭明强, 李跃进, 吴德志, 蔡柏龄. 南丰蜜橘果实黑点病发生规律与综合防治措施[J]. 浙江柑橘, 2010(2): 24-26.
ZENG BL, ZENG ZF, ZHU XY, PENG MQ, LI YJ, WU DZ, CAI BL. Occurrence regularity and comprehensive control measures of Nanfeng orange fruit black spot disease[J]. Zhejiang Ganju, 2010(2): 24-26 (in Chinese).
- [6] MONDAL SN, AGOSTINI JP, ZHANG L, TIMMER LW. Factors affecting pycnidium production of *Diaporthe citri* on detached *Citrus* twigs[J]. Plant Disease, 2004, 88(4): 379-382.
- [7] 蔡竹固, 庄再扬. 柑橘黑点病之田间发病消长[J]. 中国园艺, 1989, 35(4): 239-246.

- CAI ZG, ZUANG ZY. Disease incidence of citrus melanose in Taiwan, China[J]. *Horticulture of Chinese*, 1989, 35(4): 239-246 (in Chinese).
- [8] 黄振东, 蒲占滢, 胡秀荣, 张小亚, 陈国庆, 李红叶. 不同药剂组合对柑橘黑点病的防治效果[J]. *浙江柑橘*, 2011, 28(2): 23-24.
HUANG ZD, PU ZX, HU XR, ZHANG XY, CHEN GQ, LI HY. Control effect of different chemical combinations on citrus black spot disease[J]. *Zhejiang Ganju*, 2011, 28(2): 23-24 (in Chinese).
- [9] 刘欣, 王明爽, 梅秀凤, 姜丽英, 韩国兴, 李红叶. 柑橘黑点病菌种群对代森锰锌的敏感性评价及其替代药剂的筛选[J]. *植物保护学报*, 2018, 45(2): 373-381.
LIU X, WANG MS, MEI XF, JIANG LY, HAN GX, LI HY. Sensitivity evaluation of *Diaporthe citri* populations to mancozeb and screening of alternative fungicides for citrus melanose control[J]. *Journal of Plant Protection*, 2018, 45(2): 373-381 (in Chinese).
- [10] 黄茜斌, 梁克宏, 黄振东. 柑橘果实黑点病防治适期及用药方法研究[J]. *浙江柑橘*, 2010, 27(2): 26-29.
HUANG XB, LIANG KH, HUANG ZD. Study on the suitable time and medication method of controlling citrus black spot disease[J]. *Zhejiang Ganju*, 2010, 27(2): 26-29 (in Chinese).
- [11] 张凡忠, 刘小红, 章初龙, 林福呈. 植物响应病原真菌的代谢组学研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*, 2016, 38(4): 434-440.
ZHANG FZ, LIU XH, ZHANG CL, LIN FC. Progresses of metabolomics in plants response to plant pathogenic fungi[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2016, 38(4): 434-440 (in Chinese).
- [12] 刘鹏飞, 胡志宏, 代探, 梁莉, 刘西莉. 代谢组学-植物病理学研究有力的生物分析工具[J]. *植物病理学报*, 2018, 48(4): 433-444.
LIU PF, HU ZH, DAI T, LIANG L, LIU XL. Metabolomics-a robust bioanalytical approach for phytopathology[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2018, 48(4): 433-444 (in Chinese).
- [13] 刘宏有, 陈柳龙, 高江涛. 代谢组及其在真菌研究中的应用[J]. *菌物学报*, 2019, 38(12): 2078-2086.
LIU HY, CHEN LL, GAO JT. Metabolomics and its use in fungal metabolic analyses: a review[J]. *Mycosystema*, 2019, 38(12): 2078-2086 (in Chinese).
- [14] 徐天润, 刘心昱, 许国旺. 基于液相色谱-质谱联用技术的代谢组学分析方法研究进展[J]. *分析测试学报*, 2020, 39(1): 10-18.
XU TR, LIU XY, XU GW. Advances of analytical methods for liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolomics[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2020, 39(1): 10-18 (in Chinese).
- [15] 赵逍遥, 张倩倩, 杨子怡, 刘美玉, 赵佳丽, 张金玥, 曹志艳, 刘宁, 董金皋. 基于液质联用的玉米大斑病菌代谢组的方法优化[J]. *玉米科学*, 2021, 29(5): 166-171.
ZHAO XY, ZHANG QQ, YANG ZY, LIU MY, ZHAO JL, ZHANG JY, CAO ZY, LIU N, DONG JG. Optimization of metabolomics analysis method of *Setosphaeria turcica* based on LC-MS[J]. *Journal of Maize Sciences*, 2021, 29(5): 166-171 (in Chinese).
- [16] ALIFERIS KA, JABAJI S. 1H NMR and GC-MS metabolic fingerprinting of developmental stages of *Rhizoctonia solani* sclerotia[J]. *Metabolomics*, 2010, 6: 96-108.
- [17] LOWE R, LORD M, RYBAK K, TRENGOVE RD, OLIVER RP, SOLOMON PS. Trehalose biosynthesis is involved in sporulation of *Stagonos poranodorum*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2009, 46(5): 381-389.
- [18] CEVALLOS-CEVALLOS JM, GARCÍA-TORRES R, ETXEBERRIA E, REYES-de-CORCUERA JI. GC-MS analysis of headspace and liquid extracts for metabolomic differentiation of citrus Huanglongbing and zinc deficiency in leaves of 'Valencia' sweet orange from commercial groves[J]. *Phytochemical Analysis*, 2011, 22(3): 236-246.
- [19] AGUDELO-ROMERO P, ERBAN A, REGO C, CARBONELL-BEJERANO P, NASCIMENTO T, SOUSA L, MARTÍNEZ-ZAPATER JM, KOPKA J, FORTES AM. Transcriptome and metabolome reprogramming in *Vitis vinifera* cv. *Trincadeira* berries upon infection with *Botrytis cinerea*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(7): 1769-1785.
- [20] CHEN F, MA R, CHEN XL. Advances of metabolomics in fungal pathogen-plant interactions[J]. *Metabolites*, 2019, 9: 169.
- [21] AFFELDT KJ, BRODHAGEN M, KELLER NP. *Aspergillus* oxylipin signaling and quorum sensing pathways depend on G protein-coupled receptors[J]. *Toxins (Basel)*, 2012, 4: 695-717.
- [22] BERENDSEN RL, KALKHOVE SI, LUGONES LG, BAARS JJ, WÖSTEN HA, BAKKER PA. Effects of the mushroom-volatile 1-octen-3-ol on dry bubble disease[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97: 5535-5543.
- [23] LIU HX, ZHAO XS, GUO MX, LIU H, ZHENG ZM. Growth and metabolism of *Beauveria bassiana* spores

- and mycelia[J]. *BioMed Central Microbiology*, 2015, 15: 267.
- [24] REN CG, TAN YM, REN XX, LIU YX, LIU ZY. Metabolomics reveals changes in metabolite concentrations and correlations during sexual development of *Eurotium cristatum* (synonym: *Aspergillus cristatus*)[J]. *Mycosphere*, 2017, 8(10): 1626-1639.
- [25] HAN TL, CANNON RD, VILLAS-BOAS SG. Metabolome analysis during the morphological transition of *Candida albicans*[J]. *Metabolomics*, 2012, 8: 1204-1217.
- [26] FEOFILOVA EP, IVASHECHKIN AA, ALEKHIN AI, SERGEEVA YE. Fungal spores: dormancy, germination, chemical composition, and role in biotechnology (review)[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2012, 48(1): 5-17.
- [27] GOURNAS C, PRÉVOST M, KRAMMER EM, ANDRÉ B. Function and regulation of fungal amino acid transporters: insights from predicted structure[M]// RAMOS J, SYCHROVA H, KSCHISCHO M. Chapter 4. *Advances in Experimental Medicine and Biology, Yeast Membrane Transport* (volume 892). Switzerland: Springer International Publishing, 2016: 69-106.
- [28] 耿青如, 杨飞洋, 王雨荷, 车雨微, 杨坤龙. 丝状真菌次级代谢产物的功能与合成调控研究进展[J]. *菌物学报*, 2020, 39(3): 539-547.
- GENG QR, YANG FY, WANG YH, CHE YW, YANG KL. Research advance in functional and synthetic regulation of secondary metabolites of filamentous fungi[J]. *Mycosystema*, 2020, 39(3): 539-547 (in Chinese).
- [29] 冯莹莹, 徐兴然, 邹祥. 钙调磷酸酶信号调控真菌生长代谢、毒力及抗逆性能[J]. *微生物学报*, 2021, 61(12): 3844-3855.
- FENG YY, XU XR, ZOU X. Calcineurin signaling cascade regulates fungal growth, metabolism, virulence and stress resistance[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(12): 3844-3855 (in Chinese).
- [30] BECCACCIOLI M, PUCCI N, SALUSTRI M, SCORTICHINI M, ZACCARIA M, MOMENI B, LORETI S, REVERBERI M, SCALA V. Fungal and bacterial oxylipins are signals for intra- and inter-cellular communication within plant disease[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 823233.
- [31] GESSLER NN, FILIPPOVICH SY, BACHURINA GP, BACHURINA EA, KHARCHENKO NV, GROZA TA, BELOZERSKAYA. Oxylipins and oxylipin synthesis pathways in fungi[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2017, 53(6): 628-639.
- [32] FISCHER GJ, KELLER NP. Production of cross-kingdom oxylipins by pathogenic fungi: an update on their role in development and pathogenicity[J]. *Journal of Microbiology*, 2016, 54(3): 254-264.
- [33] JERNERÉN F, OLIW EH. The fatty acid 8,11-diol synthase of *Aspergillus fumigatus* is inhibited by imidazole derivatives and unrelated to PpoB[J]. *Lipids*, 2012, 47: 707-717.
- [34] FILIPPOVICH SY, BACHURINA GP, GESSLER NN, GOLOVANOV AB, MAKAROVA AM, GROZA NV, BELOZERSKAYA TA. Influence of oxygenated derivatives of linoleic and linolenic acids on the formation of conidia and protoperithecia in wild-type and photoreceptor complex mutants of *Neurospora crassa*[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2015, 51(6): 655-659.
- [35] ZHAO YX, WANG Q, WANG S, LIU X, YU JH, ZHENG W, ZHANG X. Disturbance in biosynthesis of arachidonic acid impairs the sexual development of the onion blight pathogen *Stemphylium eturmiunum*[J]. *Current Genetics*, 2019, 65: 759-771.
- [36] FILIPPOVICH SY, GESSLER NN, BACHURINA GP, KHARCHENKO EA, IVANOV IV, SIROTENKO TI, GOLOVANOV AB, BELOZERSKAYA TA, GROZA NV. Effect of 20-hydroxy-(5Z,8Z,11Z,14Z)-eicosatetraenoic acid and arachidonic acids on differentiation of *Neurospora crassa*[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2018, 54(3): 309-315.