

# 广叶绣球菌不同生长阶段栽培基质中代谢物差异分析

肖冬来\*, 马璐, 杨驰, 刘晓瑜, 林辉, 江晓凌

福建省农业科学院食用菌研究所, 福建 福州 350014

肖冬来, 马璐, 杨驰, 刘晓瑜, 林辉, 江晓凌. 广叶绣球菌不同生长阶段栽培基质中代谢物差异分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(10): 4458-4471.

XIAO Donglai, MA Lu, YANG Chi, LIU Xiaoyu, LIN Hui, JIANG Xiaoling. Metabolite differences in cultivation substrates of *Sparassis latifolia* at different developmental stages[J]. Microbiology China, 2023, 50(10): 4458-4471.

**摘要:**【背景】栽培基质的利用是广叶绣球菌(*Sparassis latifolia*)栽培中重要的生理过程,但栽培过程中基质代谢物的变化尚不清楚。【目的】通过不同生长阶段栽培基质中差异代谢物分析挖掘关键代谢物,为广叶绣球菌基质利用机理研究提供理论参考。【方法】利用UHPLC-MS/MS技术分析广叶绣球菌菌丝(Myc)、原基(Pri)和子实体(FB)生长阶段栽培基质中代谢产物的变化,通过不同数据库进行代谢物注释并进行KEGG通路富集分析。利用LC-MS/MS技术检测不同发育阶段绣球菌中植物类激素含量。【结果】三个不同栽培阶段基质中共鉴定出代谢产物1360个。不同比较组(Pri vs. Myc、FB vs. Myc和FB vs. Pri)间共有的差异代谢产物179个,含量最高的50个代谢物主要包括氨基酸、脂质、吡喃酸、吡喃酮和植物类激素等物质。其中氨基酸含量在Myc、Pri和FB阶段基质中逐渐降低,而吡喃酸和吡喃酮类化合物含量逐渐升高。植物类激素中的赤霉素在Pri和FB阶段基质中含量较高,茉莉酸在Myc阶段基质中含量较高。对不同发育阶段绣球菌植物类激素进行检测,发现赤霉素GA7仅在原基中检测到,12-氧代植物二烯酸在子实体中含量显著升高。不同比较组所有的差异代谢物KEGG分析显示嘌呤代谢、鞘脂信号通路和甘油磷脂代谢等通路显著富集。【结论】氨基酸是Myc阶段基质中重要的代谢物,吡喃酸、吡喃酮和植物类激素可能与Pri和FB阶段基质利用过程中的生理生化调控有关。

**关键词:** 广叶绣球菌; 代谢组分析; 栽培基质; 差异代谢物

资助项目: 福建省属公益类科研院所基本科研专项(2020R1035005); 福建省自然科学基金(2021J01505); “5511”协同创新工程项目(XTCXGC2021007)

This work was supported by the Special Fund for Scientific Research in the Public Interest of Fujian Province (2020R1035005), the Natural Science Foundation of Fujian Province (2021J01505), and the “5511” Collaborative Innovation Project (XTCXGC2021007).

\*Corresponding author. E-mail: xdljiangsu@163.com

Received: 2023-02-19; Accepted: 2023-04-12; Published online: 2023-05-17

## Metabolite differences in cultivation substrates of *Sparassis latifolia* at different developmental stages

XIAO Donglai\*, MA Lu, YANG Chi, LIU Xiaoyu, LIN Hui, JIANG Xiaoling

Institute of Edible Fungi, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350014, Fujian, China

**Abstract:** [Background] Substrate utilization is an important physiological process in the cultivation of *Sparassis latifolia*, while little is known about the metabolite differences in the substrates at different developmental stages. [Objective] To identify the differential metabolites in the cultivation substrates of *S. latifolia* at different developmental stages, explore key metabolites, and provide a theoretical basis for the research on the mechanism of substrate utilization. [Methods] Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) was employed to determine the changes of metabolites in the cultivation substrates of mycelium (Myc), primordium (Pri), and fruiting body (FB). Functional annotation and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment were conducted for the metabolites. The content of phytohormones in *S. latifolia* was determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). [Results] A total of 1 360 metabolites were identified from the substrates of *S. latifolia* at three different stages. There were 179 common differential metabolites among three different comparison groups (Pri vs. Myc, FB vs. Myc, and FB vs. Pri), and the top 50 most abundant metabolites were mainly amino acids, lipids, pyranic acids, pyranones, and phytohormones. The content of amino acids gradually decreased while that of pyranic acids and pyranones gradually increased with the development of *S. latifolia*. The content of gibberellins (GAs) was higher in the substrates of Pri and FB, and that of jasmonic acid was higher in the substrate of Myc. GA7 was detected only in Pri, and the content of 12-oxo-phytodienoic acid was higher in FB. The differential metabolites were mainly enriched in purine metabolism, sphingolipid, glycerophospholipid metabolism pathways. [Conclusion] Amino acids are key metabolites in the substrate of Myc. pyranic acids, pyranones, and phytohormones may be involved in the physiological and biochemical regulation of substrate utilization in the Pri and FB stages.

**Keywords:** *Sparassis latifolia*; metabolomics analysis; cultivation substrates; differential metabolites

广叶绣球菌(*Sparassis latifolia*)作为一种珍稀的食药真菌, 富含 $\beta$ -葡聚糖<sup>[1]</sup>, 具有增强免疫<sup>[2]</sup>、抗癌<sup>[3]</sup>、调节肠道菌群<sup>[4]</sup>和预防阿尔茨海默病<sup>[5]</sup>等生物活性。由于其具有极高的营养和药用价值<sup>[6]</sup>, 近年来国内多个地区已实现袋栽模式工厂化。

食用菌菌包的基本理化性质是影响菇产量的重要因素之一。目前, 绣球菌栽培基质主料以松木屑为主, 栽培菌包与常见的食用菌不同, 具有“高碳低氮”的营养特性<sup>[7]</sup>, 木屑颗粒度、菌包密度、pH及含水量对绣球菌产量也影响较大<sup>[8]</sup>。菌包成熟度也是一些食用菌产量和质量提升的

关键因素。斑玉蕈(*Hypsizygos marmoreus*)菌包后熟至木质纤维素降解相关酶活、pH、还原糖和可溶性蛋白等指标在菌包不同部位趋于一致时,子实体产量最高<sup>[9-10]</sup>。白灵菇(*Pleurotus tuoliensis*)菌包在 17 °C 后熟产量高于在 29 °C 后熟,进一步通过代谢组学技术比较分析推测嘧啶代谢途径与菌丝生理成熟相关, N-氨基甲酰-L-天冬氨酸(N-carbamoyl-L-aspartate, CA-asp)可作为潜在的成熟标志物<sup>[11]</sup>。食用菌自身的某些代谢产物及外源添加物对食用菌的生长发育有着促进或抑制作用。广叶绣球菌在木质纤维素降解过程中可以分泌草酸,高浓度的草酸抑制了木质纤维素降解相关酶的活性,进而降低了菌丝的生长速度和腐生生长能力<sup>[12]</sup>。真菌二羟基苯(dihydroxybenzene)类代谢衍生物可通过调控芬顿反应促进真菌对木质纤维素的降解<sup>[13]</sup>。外源补充曲酸可提高斑玉蕈生殖生长阶段菌丝木质纤维素相关酶活,增加菇的产量<sup>[14]</sup>。因此,食用菌的生长发育与菌包的微生态及代谢物多样性关系密切。目前关于绣球菌栽培生理的研究还较少,菌包作为绣球菌生长发育的基本载体,开展栽培基质在培养过程中代谢物的变化及其与绣球菌发育关系的研究具有重要的理论和应用价值。

近年来,代谢组学技术逐渐应用于食用菌发育机理<sup>[11,15]</sup>、环境因子胁迫<sup>[16-17]</sup>及品质评价<sup>[18-19]</sup>等研究领域。本研究采用 UPLC-MS/MS 代谢组学技术比较分析了绣球菌菌丝阶段(Myc)、原基阶段(Pri)及子实体阶段(FB)栽培基质中代谢产物的变化,挖掘不同发育阶段基质中关键代谢物,以期广叶绣球菌基质利用机理研究提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

广叶绣球菌(*Sparassis latifolia*) (闽认菌

2013005)由福建省农业科学院食用菌研究所保藏。

#### 1.1.2 培养基

栽培培养基参考文献[7]原种培养基配制,含水量 63%。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

植物类激素标准品, Sigma 公司。超高效液相色谱串联傅里叶变换质谱仪,赛默飞世尔科技有限公司; HSST3 色谱柱, Waters 公司; 高效液相色谱仪和 C18 反相色谱柱, Agilent 公司; 氮气吹扫仪, 上海净信实业发展有限公司; 控温超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 冷冻研磨仪, 上海万柏生物科技有限公司。

### 1.2 栽培方法

选用 300 mm×150 mm×0.05 mm 的聚丙烯塑料菌袋进行袋式栽培,每袋含栽培培养基 300 g,中间不打孔,126 °C 灭菌 120 min,冷却后接种。菌丝培养温度 25 °C, CO<sub>2</sub> 浓度小于 0.2%。40 d 后菌丝蔓延至菌包底部进行原基诱导,光照强度 500 lx,光照时间 10 h。原基诱导 20 d 后随着原基的不断增大出现隆起组织,随后进入子实体分化阶段,培养温度 20 °C,空气相对湿度 90%–95%,光照时间 10 h,继续培养 20 d 后即可采收。分别于第 40、60 和 80 天收集菌丝阶段(Myc)、原基阶段(Pri)及子实体(FB)生长阶段栽培基质料面下 2.0–2.5 cm 处的栽培料并混匀,液氮速冻后放入–80 °C 超低温冰箱保藏,每个阶段取样 5 个不同菌包。样品委托上海美吉生物医药科技有限公司进行代谢组学分析。

### 1.3 代谢组样品制备

称取 50 mg 样本于放有一颗直径 6 mm 研磨珠的 2 mL 离心管中。加入 400 μL 含 0.02 mg/mL L-2-氯苯丙氨酸内标的提取液(甲醇:水体积比为 4:1),冷冻研磨仪研磨 6 min (–10 °C, 50 Hz)后超声提取 30 min (5 °C, 40 kHz)。–20 °C 静置 30 min

后, 4 °C、13 000×g 离心 15 min, 移取上清液上机分析, 同时取等体积的所有样本代谢物混合制备成质控样本(quality control, QC)。

#### 1.4 LC-MS 代谢组检测

将 2 μL 样本经 HSS T3 色谱柱分离后进入质谱检测。流动相 A 为 95%水+5%乙腈(含 0.1%甲酸), 流动相 B 为 47.5%乙腈+47.5%异丙醇+5%水(含 0.1%甲酸)。分离梯度: 0–3.5 min, 流动相 B 从 0%升至 24.5%; 3.5–5.0 min, 流动相 B 从 24.5%升至 65%; 5.0–5.5 min, 流动相 B 从 65%升至 100%; 5.5–7.4 min, 流动相 B 维持 100%; 7.4–7.6 min, 流动相 B 从 100%降至 51.5%; 7.6–7.8 min, 流动相 B 从 51.5%降至 0%; 7.8–9.0 min, 流动相 B 维持 0%; 9–10 min, 流动相 B 维持 0%。柱温 40 °C。样品质谱信号采集采用正负离子扫描模式, 质量扫描范围为 70–1 050 *m/z*。一级质谱分辨率 60 000, 二级质谱分辨率 7 500, 采用 DDA 模式采集数据。

#### 1.5 代谢组数据处理

利用 Progenesis QI 软件进行搜库及数据预处理, 将 MS 和 MSMS 质谱信息与代谢公共数据库 HMDB、METLIN 和 KEGG 进行匹配鉴定。搜库后的矩阵数据用 80%规则去除缺失值, 用总和归一化法对样本质谱峰响应强度进行归一化。删除 QC 样本相对标准偏差>30%的变量, 进行  $\log_{10}$  对数化处理后得到分析的数据矩阵。

#### 1.6 代谢组数据分析

使用 R 软件包 ropls (v1.6.2) 进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交最小偏二乘判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)。差异代谢物基于 OPLS-DA 模型得到的变量权重值 (variable important in projection, VIP) 和单变量分析的 *P* 值确定 (VIP>1 且 *P*<0.05 的代谢物为差异代谢物)。

差异代谢物利用 KEGG 数据库进行代谢通路注释。利用 Python 软件包 scipy.stats 进行通路富集分析。

#### 1.7 植物类激素检测

将菌丝、原基及子实体阶段的绣球菌组织样品液氮研磨后, 精确称取 1.5 g, 加入提取缓冲液 (15 mL 乙腈和 4 μL 内标母液), 4 °C 提取过夜。4 °C、12 000×g 离心 5 min, 收集上清液。沉淀中加入 5 倍体积乙腈再次重复提取 2 次。上清液加入 C18 填料 35 mg, 涡旋振荡 30 s, 10 000×g 离心 5 min, 收集上清液, 氮气吹干后用 400 μL 甲醇溶解。0.22 μm 滤膜过滤后于 -20 °C 冰箱保藏。通过 HPLC-MS/MS 技术检测激素含量。流动相 A 为含 0.1%甲酸的甲醇, 流动相 B 为含 0.1%甲酸的水, 流速 0.3 mL/min。梯度洗脱程序: 0–1 min, 20% A; 1–3 min, 增至 50% A; 3–9 min, 增至 80% A; 9.0–10.5 min, 80% A; 10.5–10.6 min, 递减至 20% A; 10.6–13.5 min, 20% A。进样量为 2 μL。电喷雾离子源, 检测方式为 MRM 多反应检测, 雾化气压力 448 kPa, 辅助气压力 483 kPa, 雾化温度 400 °C。所有样品均包含 3 个生物学重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 绣球菌不同生长阶段栽培基质代谢物主成分分析

菌丝阶段 (Myc)、原基阶段 (Pri) 及子实体阶段 (FB) 栽培基质通过 UHPLC-MS/MS 非靶向代谢组学分析共鉴定出代谢产物 1 360 个, 其中阳离子模式下共检测出代谢产物 747 种, 阴离子模式下共检测出代谢产物 613 种 (表 1)。1 360 个代谢物中可注释到 HMDB、LIPID MAPS 和 KEGG 数据库的代谢物数量分别为 729、121 和 366 个, 可注释到上海美吉生物医药科技有限公司自建库、METLIN 等其他数据库的数量为 481 个。通

表 1 栽培基质中代谢物的鉴定统计

Table 1 Statistics of metabolites of culture substrate

Database	Positive ion	Negative ion	Total identified metabolites
HMDB	356	373	729
LIPID MAPS	82	39	121
KEGG	231	135	366
Others	297	184	481

过 PCA 分析可以看出(图 1), 阳离子模式下 PC1 和 PC2 分别为 47.5%和 12.6%, 阴离子模式下 PC1 和 PC2 分别为 48.4%和 12.4%。同时不同阶段基质样本可显著区分开, 说明各试验组间存在显著差异。3 个 QC 样本在阴阳离子模式下均紧密地聚在一起, 说明试验具有很好的重复性。

## 2.2 正交偏最小二乘判别分析

为进一步分析 Myc、Pri 和 FB 这三组间的代谢物差异建立了 OPLS-DA 模型。置换检验 (200 次)结果显示(图 2): Pri vs. Myc、FB vs. Myc 以及 FB vs. Pri 这 3 个分析组间的  $R^2$  值在阳离子模式下分别为 0.840 8、0.783 8 和 0.748 3; 在阴离子模式下  $R^2$  值分别为 0.897 5、0.868 8 和 0.743 4。

3 个分析组间的  $Q^2$  值在阳离子模式下分别为 0.043、-0.170 4 和 -0.090 2; 在阴离子模式下  $Q^2$  值分别为 -0.090 5、0.026 6 和 -0.012 3。说明模型未存在过拟合现象, 结果稳定可靠。

## 2.3 差异代谢物的筛选及分析

根据 OPLS-DA 模型获得的 VIP 值和  $t$  检验  $P$  值筛选差异代谢物。依据  $VIP > 1$  且  $P < 0.05$  的标准: Pri vs. Myc 组共筛选获得 443 个差异代谢物, 其中上调 227 个、下调 216 个; FB vs. Myc 组共筛选获得 493 个差异代谢物, 其中上调 250 个、下调 243 个; FB vs. Pri 组共筛选获得 436 个差异代谢物, 其中上调 219 个、下调 217 个。3 个比较组间共有的差异代谢产物 179 个。

### 2.3.1 差异代谢物的分类

为进一步了解绣球菌不同发育阶段基质中的关键差异代谢物, 利用 HMDB 数据库对不同比较组间共有的 179 个差异代谢物进行了分类分析。179 个差异代谢物中 79 个代谢物在 HMDB superclass 层级可以划分到 10 个类型, 其中脂质和类脂分子(lipids and lipid-like molecules)占 37.97%,

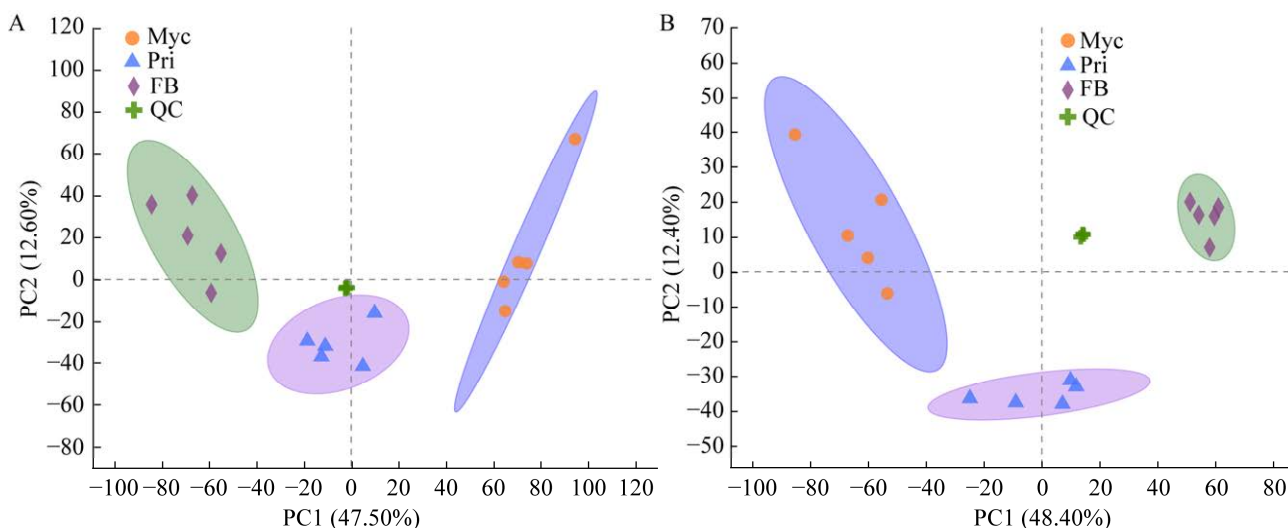


图 1 不同发育阶段代谢物的主成分分析 A: 阳离子模式. B: 阴离子模式

Figure 1 The principal component analysis of metabolites at different developmental stages. A: Positive ion model. B: Negative ion model.

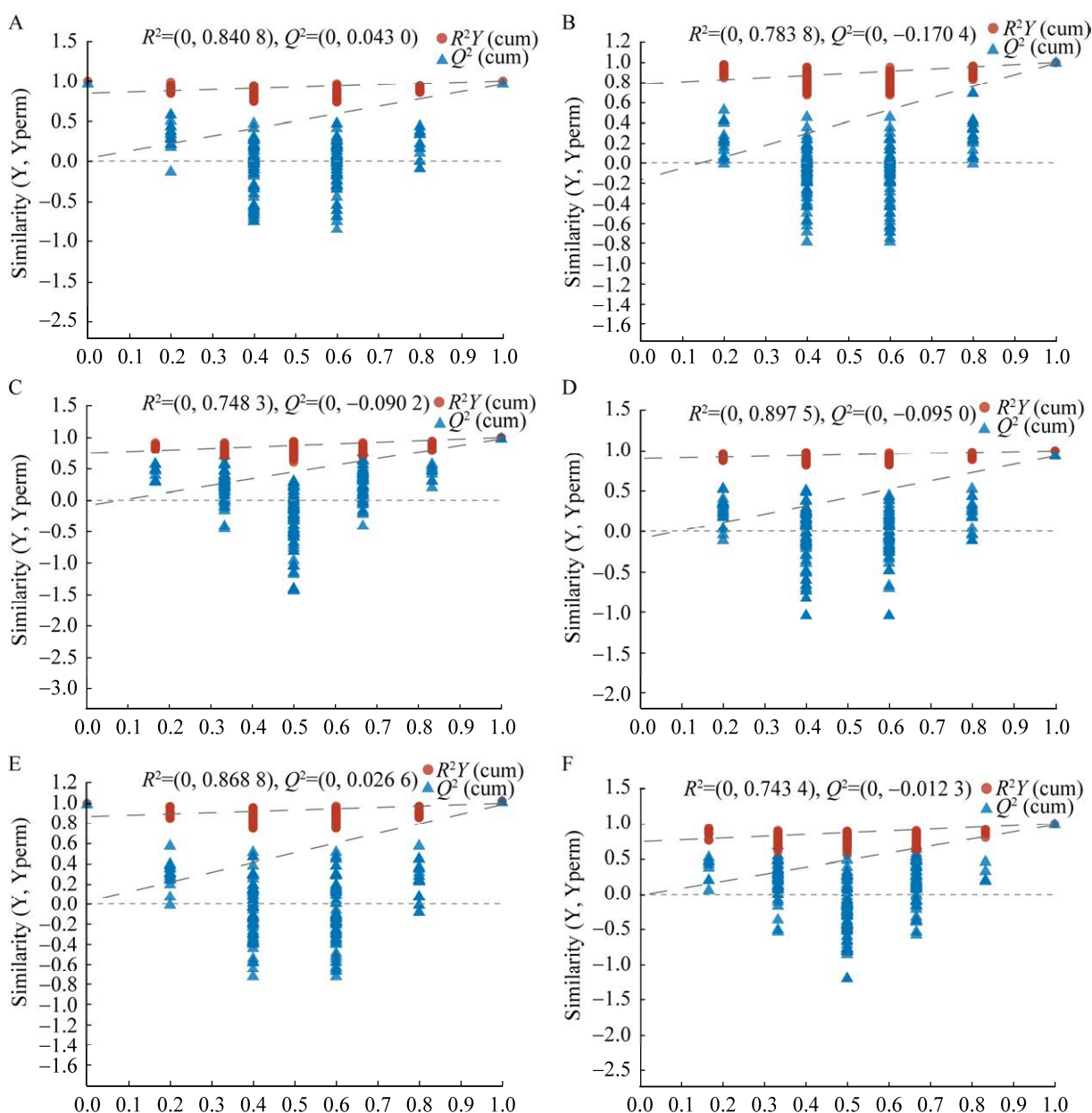


图2 OPLS-DA模型200次置换检验 A、B和C分别为Pri vs. Myc、FB vs. Myc和FB vs. Pri比较组阳离子模式。D、E和F分别为Pri vs. Myc、FB vs. Myc和FB vs. Pri比较组阴离子模式

Figure 2 200 times permutation test of OPLS-DA models. A, B and C: Positive ion model of Pri vs. Myc, FB vs. Myc and FB vs. Pri group respectively. D, E and F: Negative ion model of Pri vs. Myc, FB vs. Myc and FB vs. Pri group respectively.

其次, 有机酸及其衍生物(organic acids and derivatives)占16.46%, 有机氧化合物(organic oxygen compounds)占10.13%, 苯丙类和聚酮类(phenylpropanoids and polyketides)占8.86%, 苯

环型化合物(benzenoids)占7.59%, 核苷、核苷酸及其类似物(nucleosides, nucleotides and analogues)占7.59%, 有机杂环化合物(organoheterocyclic compounds)占6.33%, 有机氮化合物(organic

nitrogen compounds)占 2.53%。

### 2.3.2 差异代谢物聚类分析

共有的 179 个差异代谢产物中,丰度前 50 的代谢物聚类分析显示不同生长阶段栽培基质中代谢物含量存在明显差异(图 3)。其中分支 I 包含 25 个代谢物,其含量在 Myc 阶段较高,随着培养时间的增加,在 Pri 和 FB 阶段逐渐降低。涉及的代谢物以氨基酸类化合物(9 个)为主,如蛋氨酸-缬氨酸-异亮氨酸(Met-Val-Ile)、缬氨酸-

精氨酸-苯丙氨酸(Val-Arg-Phe)、L-谷氨酰胺(L-glutamine)、谷胱甘肽(glutathione)等。同时还包含脂肪酸类化合物如 2-异丙基苹果酸(2-isopropylmalic acid)、 $\Delta$ 17-6-酮前列腺素 F1 $\alpha$ (delta 17-6-keto PGF1 $\alpha$ ),碳水化合物类如 L-半乳糖酮糖(L-galacto-2-heptulose)和天冬氨酰葡萄糖胺(aspartylglycosamine),嘌呤核苷酸类如黄原酸(xanthylic acid)、腺苷二磷酸核糖(adenosine diphosphate ribose)和肌苷(inosine),糖苷

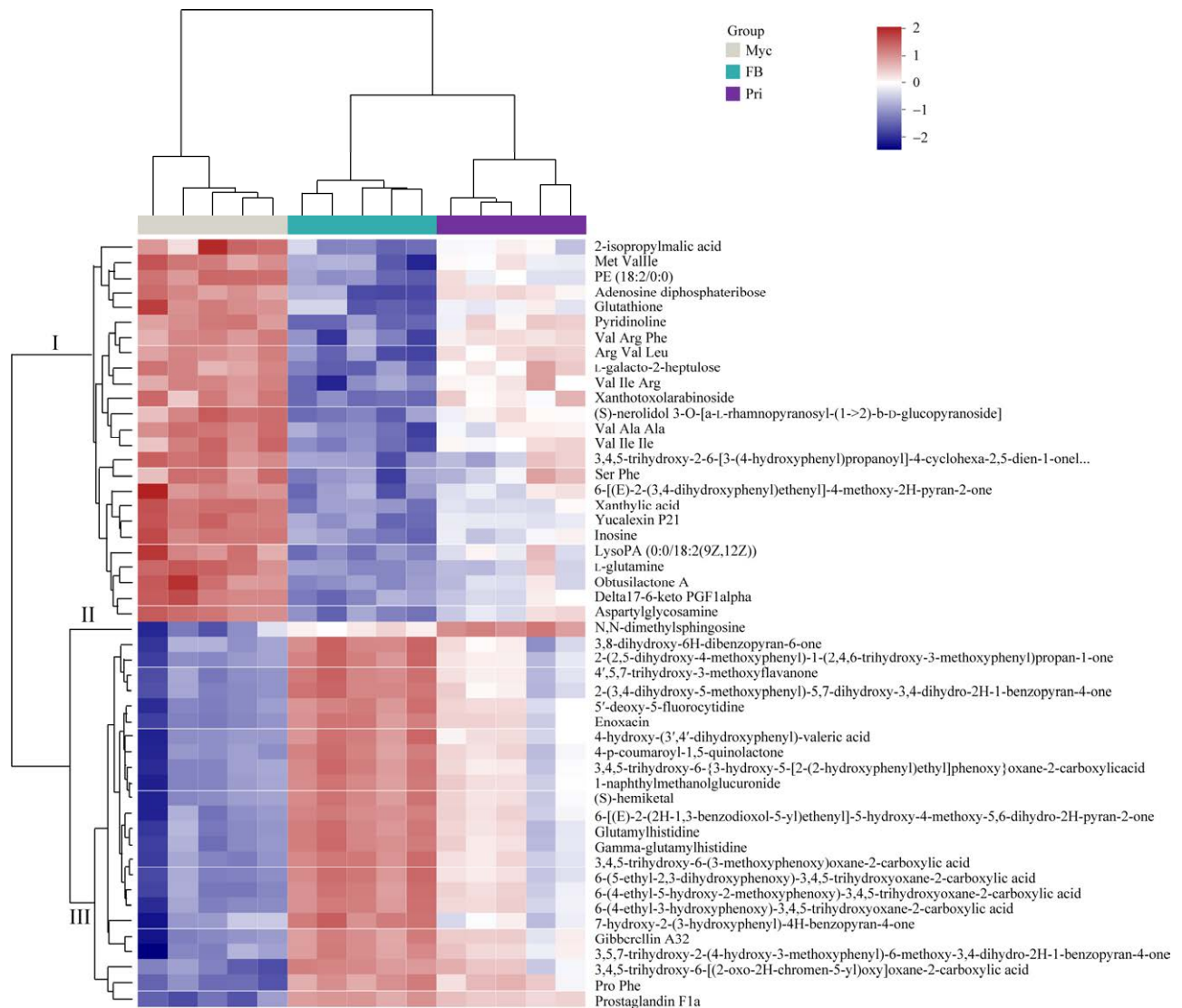


图 3 丰度前 50 差异代谢物层次聚类分析

Figure 3 Hierarchical clustering analysis of top 50 abundance differential metabolites.

类如黄原醇阿拉伯糖苷(xanthoxol arabinoside)和(S)-橙花叔醇 3-O-[ $\alpha$ -L-鼠李糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷][(S)-nerolidol 3-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranoside]], 磷脂类如磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)和溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid, LysoPA), 以及4-甲氧基-2H-吡喃-2-酮(4-methoxy-2H-pyran-2-one)和4-环己-2,5-二烯-1-酮(4-cyclohexa-2,5-dien-1-one)等化合物。分支II包含一个代谢物N,N-二甲基鞘胺醇(N,N-dimethylsphingosine), 其含量在Pri阶段含量最高, Myc阶段含量最低。分支III包含24个代谢物, 其含量在Myc阶段含量较低, 在Pri和FB阶段含量逐渐升高。主要包括吡喃酸(6个)和吡喃酮(5个)类化合物, 如2-四氢吡喃酸(oxane-2-carboxylic acid)、苯并吡喃-4-酮(benzopyran-4-one)、二苯并吡喃-6-酮(dibenzopyran-

6-one)和吡喃-2-酮(pyran-2-one)类化合物。同时还含有少量其他物质: 氨基酸类如谷氨酰组氨酸(glutamylhistidine)和脯氨酸-苯丙氨酸(Pro-Phe), 脂类化合物如赤霉素 A32 (gibberellin A32)和前列腺素 F1 $\alpha$  (prostaglandin F1 $\alpha$ ), 肉桂酸类衍生物4-对古马酰基-1,5-醌内酯(4-p-coumaroyl-1,5-quinolactone), 萘吡啶类化合物依诺沙星(enoxacin), 以及丙烷-1-酮(propan-1-one)和甲氧基黄烷酮(methoxyflavanone)等化合物。

### 2.3.3 植物类激素代谢物的筛选及分析

对3个比较组所有差异代谢物中涉及植物类激素功能注释的检索分析表明, 多个植物类激素及其衍生物在不同生长阶段的基质中变化显著(图4), 如赤霉素 A59 (gibberellin A59)、茉莉酸(jasmonic acid, JA)、3-醛基水杨酸(3-formylsalicylic acid)和12-氧代-2,3-二硝基-10,15-植物二烯酸

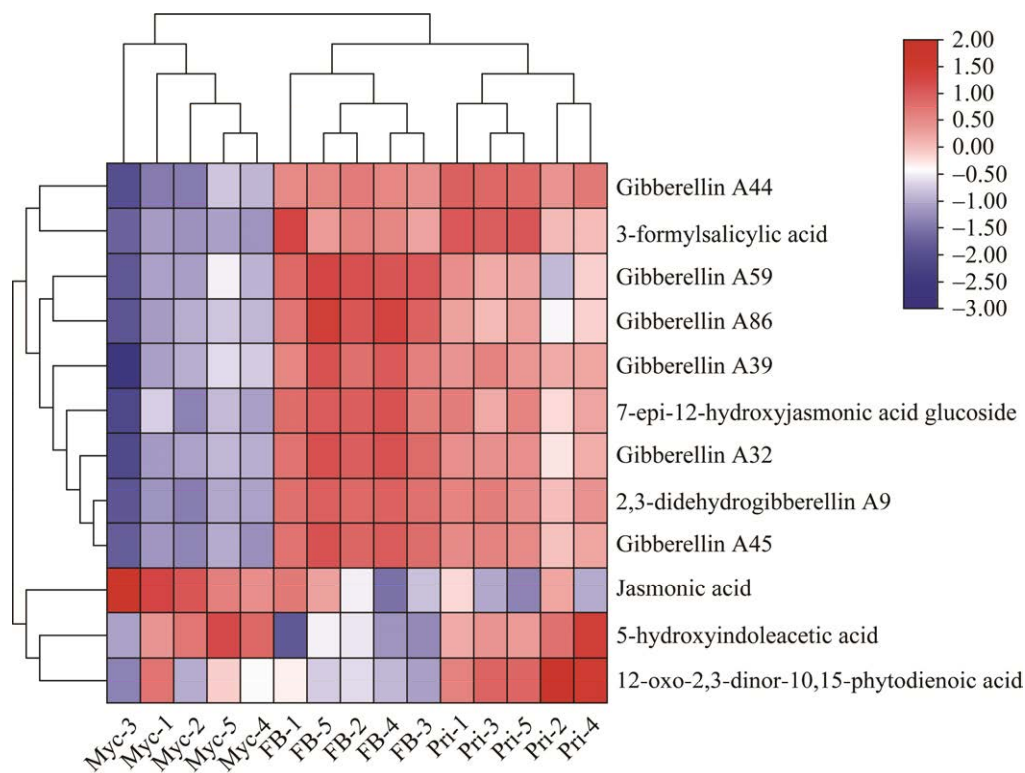


图4 植物类激素及其衍生物层次聚类分析

Figure 4 Hierarchical clustering analysis of different phytohormones and relative derivatives.



(12-oxo-2,3-dinor-10,15-phytodienoic acid, dnOPDA) 等。JA 在 Myc 阶段基质中含量较高, 随着培养时间的变化, 含量逐渐降低。JA 合成前体物质 dnOPDA 在 Pri 阶段含量较高, 5-羟基吲哚乙酸(5-hydroxyindoleacetic acid)在 Myc 和 Pri 阶段含量较高, 其余植物类激素在 Myc 阶段含量较低, 而在 Pri 和 FB 阶段含量均较高。

进一步利用 LC-MS/MS 技术检测了 Myc、Pri 和 FB 阶段绣球菌中活性赤霉素(GA1、GA3、GA4 和 GA7)、JA 及其合成前体物质 12-氧代植物二烯酸(12-oxo-phytodienoic acid, OPDA)的含量。结果显示(图 5): GA1 在 Myc 阶段含量最高, Myc 与 Pri、FB 阶段差异极显著( $P<0.001$ ), 而 Pri 与 FB 阶段差异不显著; GA3 在 Myc 和 Pri 阶段含量较高, 在 FB 阶段含量较低, 且 Pri 和 FB 阶段差异极显著( $P<0.001$ ); GA4 在 Myc、Pri 和 FB 阶段含量逐渐降低, 且 3 个阶段绣球菌中含量均差异显著( $P<0.05$ ); GA7 在 Myc 和 FB 阶段均未检出, 仅在 Pri 阶段检出, 且含量较 GA1、GA3 和 GA4 均大幅升高。JA 在不同发育阶段的绣球菌中均未检测到, 但其合成前体物质 OPDA 在不同发育阶段均可检测到, 且在子实体中含量最高。OPDA 含量在 Myc 和 Pri 阶段差异不显著, 在 Myc 和 FB、Pri 和 FB 阶段差异极显著( $P<0.01$ )。

#### 2.4 差异代谢物 KEGG 富集分析

为进一步了解不同生长阶段栽培基质中代谢通路的差异, 利用 KEGG 数据库对 3 个比较组间所有的差异代谢物进行检索匹配获得差异代谢物参与的代谢途径。通路富集分析结果(图 6)显示: 显著富集的通路有嘌呤代谢、甘油磷脂代谢、鞘脂信号通路和胆碱代谢等。如图 7 所示, 差异代谢物中涉及嘌呤代谢的包括黄原酸、腺苷(adenosine)、次黄嘌呤(hypoxanthine)、鸟嘌呤

(guanine)、肌苷、5-氨基咪唑-4-甲酰胺核苷酸(5-aminoimidazole-4-carboxamide ribotide)和磷酸核糖甲酰胺(phosphoribosyl formamidocarboxamide)等, 其含量在 Myc 阶段含量均最高, 整体随着培养时间的增加呈现下降趋势。甘油磷脂代谢中涉及的化合物包含磷酸胆碱(phosphocholine)、溶血磷脂酰胆碱(lysophosphatidyl-choline, LysoPC)、磷脂酰乙醇胺 PE、甘油磷酸胆碱(glycerophosphocholine)、sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(sn-glycero-3-phosphoethanolamine)和 L-丝氨酸(L-serine)等。其中, PE [18:1(11Z)/18:2(9Z, 12Z)] 在 FB 阶段含量最高, 而在 Myc 和 Pri 阶段均较低。其余甘油磷脂代谢相关物质均在 Myc 阶段含量最高, 在 Pri 和 FB 阶段较低。差异代谢物中涉及鞘脂信号通路的主要包括 L-丝氨酸、甘油二酯(diglyceride, DG)、腺苷、鞘氨醇(sphingosine)和二氢神经酰胺(dihydroceramide)。DG (8:0/13:0/0:0)在 FB 阶段含量最低, DG [14:0/22:4(7Z, 10Z, 13Z, 16Z)/0:0]含量在 Myc 阶段较低, 其余相关代谢物在 Myc 阶段含量均最高。

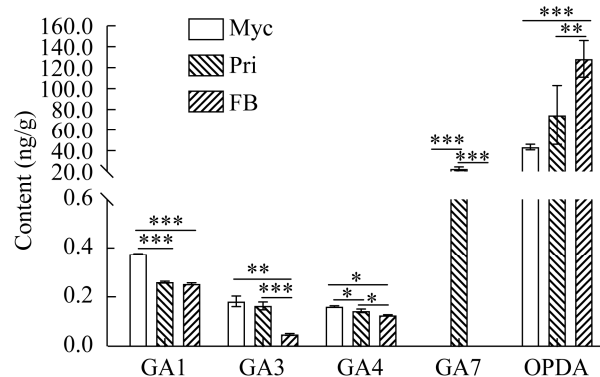


图 5 植物类激素在不同发育阶段绣球菌中的含量  
Figure 5 The content of plant hormones in *Sparassis latifolia* at different developmental stages.  
\*:  $P<0.05$ , \*\*:  $P<0.01$ , \*\*\*:  $P<0.001$ .

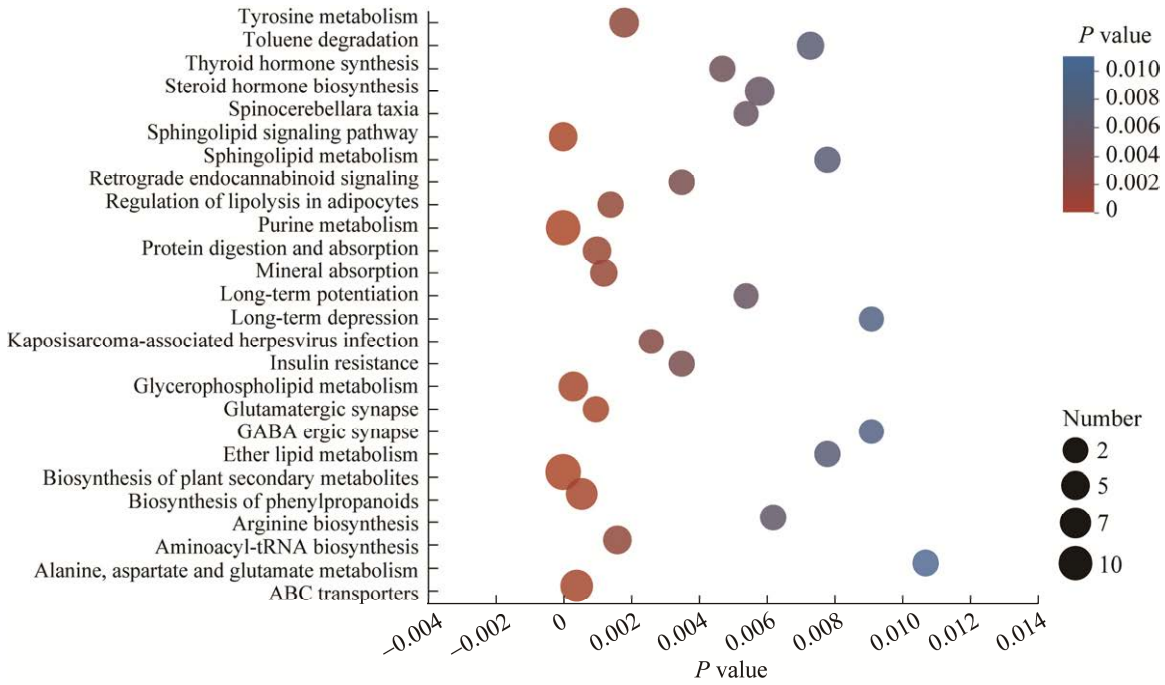


图 6 差异代谢物 KEGG 富集分析  
Figure 6 KEGG pathway enrichment analysis of metabolites.

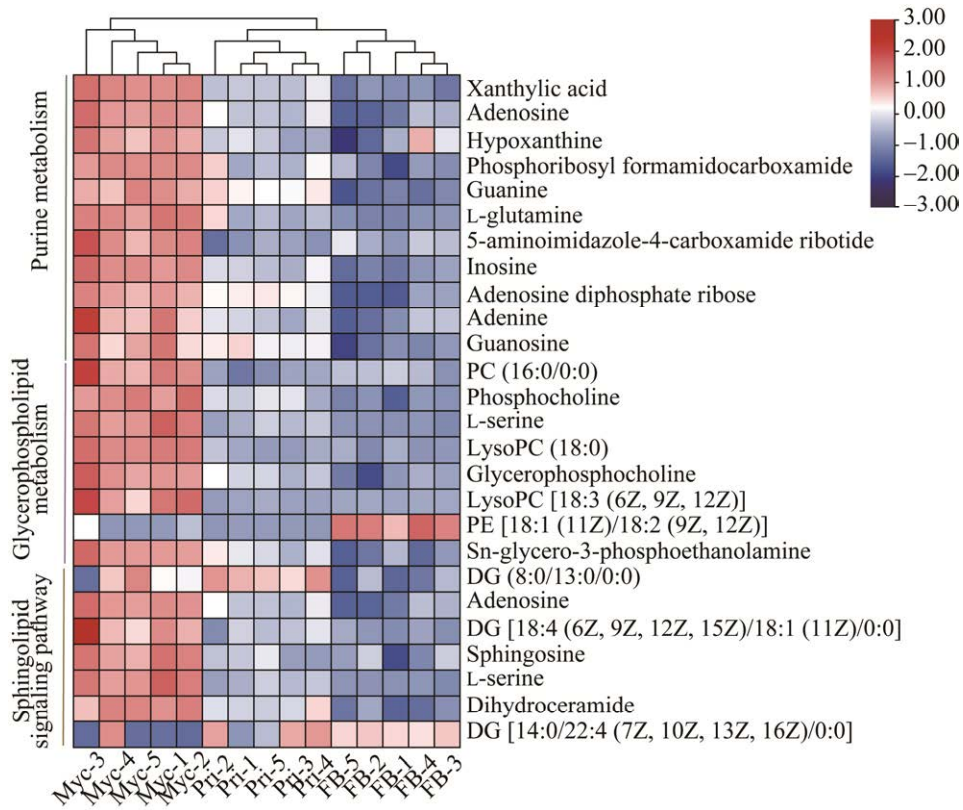


图 7 嘌呤代谢、鞘脂信号通路和甘油磷脂代谢相关差异代谢热图分析  
Figure 7 Heat map analysis of metabolites involved in purine metabolism, sphingolipid signaling pathway and glycerophospholipid metabolism.

### 3 讨论与结论

本研究的结果显示, 绣球菌菌丝长满菌包后(Myc 阶段), 随着培养时间及培养方式的变化, 在 Pri 和 FB 阶段培养基中嘌呤代谢相关的物质含量呈现下降趋势, 大部分氨基酸类和脂类代谢相关物质也表现类似的变化趋势。嘌呤是核酸的基本成分, 主要在细胞生长和分化过程中大量需要, 因此当细胞进入稳定生长阶段后嘌呤的合成大幅降低<sup>[20]</sup>。脂类化合物在生物体生长发育过程中同样发挥着重要作用。鞘脂可促进真菌菌丝的生长、产孢等<sup>[21]</sup>。胆碱不仅是鞘磷脂(sphingomyelin, SM)和磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)的重要组成部分, 还是细胞膜的重要组分, 可调控细胞生长发育<sup>[22]</sup>。综合氨基酸、嘌呤和脂类代谢的变化趋势, 推测随着培养时间的增加, 菌丝生长由早期定殖扩张生长逐渐转入基质分解及物质运输的相对稳定生长阶段, 发育相关代谢物转运至快速分化的原基和子实体为其提供物质保障, 氨基酸可能是原基分化和子实体发育重要的氮源形式。同时, 由于在 Pri 阶段生产管理上开始光照诱导, FB 阶段菌包需开袋并在高湿度环境下培养, 菌包受到光照、湿度等环境因素的胁迫, 生长受到一定抑制, 也可能导致生长发育相关的氨基酸、嘌呤和脂类物质含量降低。然而一些含量表现上调的氨基酸或脂类可能与胁迫的应答或调控有关<sup>[16]</sup>。

赤霉素最初作为毒素从赤霉菌(*Gibberella fujikuroi*)中分离, 后来被发现这些化合物广泛存在于其他生物体中。赤霉素可以促进真菌孢子的萌发及菌丝生长<sup>[23-24]</sup>。作为真菌的次级代谢产物, 赤霉素不是真菌生长发育必需的代谢物, 赤霉素的产生可能与真菌受到生长环境因素的胁迫相关<sup>[25-26]</sup>。从图 4 可以看出, 赤霉素在 Myc 阶段基质中含量较低, 当菌包进入 Pri 和 FB 阶

段后含量升高。推测可能由于在 Pri 阶段和 FB 阶段, 菌包中的菌丝受到光照、湿度等的胁迫, 赤霉素含量开始升高, 通过某些调控机制适应生长环境的变化。通过检测不同发育阶段菌体组织中活性赤霉素 1、3、4 和 7 的含量发现, GA7 在原基中特异性检出且含量较高。原基形成和分化是绣球菌发育过程中重要的生理过程, 栽培中直接影响到子实体的形成率、整齐度和产量, GA7 有可能参与了绣球菌原基的发育过程, 下一步可开展相关应用研究。茉莉酸及其衍生物在植物的生长发育和对环境变化的应激反应中起着重要作用<sup>[27-28]</sup>。茉莉酸甲酯可促进金针菇(*Flammulina filiformis*)原基的形成及发育<sup>[29]</sup>。JA 在 Myc 阶段基质中含量较高, 而其衍生物 7-表-12-羟基茉莉酸糖苷(7-epi-12-hydroxyjasmonic acid glucoside)在 Pri 和 FB 阶段含量较高。12-羟基茉莉酸(12-hydroxyjasmonic acid)及其糖苷衍生物在植物中被认为具有调控茉莉酸信号通路开关的作用<sup>[30-31]</sup>, 推测在 Pri 和 FB 阶段菌包培养条件发生了变化, 7-表-12-羟基茉莉酸糖苷调控了 JA 合成相关基因表达量的降低。但不同发育阶段绣球菌在菌丝、原基和子实体中均未检测到 JA, 而其合成前体 OPDA 在 3 个阶段均可检测到, 且在子实体中含量最高。OPDA 在植物生长发育<sup>[32]</sup>及诱导抗性上发挥着重要作用<sup>[33]</sup>, 在金针菇中可能与子实体形态发育有关<sup>[15]</sup>, 因此, OPDA 可能与绣球菌子实体的分化有关。目前, 众多的真菌中已检测出多种类型的植物类激素, 并开展了相关合成机制的研究<sup>[34]</sup>, 但相关信号传导途径及生理响应的诱导机制等方面的研究还较少, 激素在绣球菌基质利用、生长发育过程中的作用及其调控机制还需要进一步深入研究。吡喃酸和吡喃酮类化合物在 Myc、Pri 和 FB 阶段基质中的含量逐渐增加。吡喃酸含量的升高可能与维持基质低 pH 值, 保障基质降解酶

适宜的活性条件有关<sup>[35]</sup>。2-异丙基苹果酸可以螯合铝离子降低其对酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)生长的抑制作用<sup>[36]</sup>,低分子量有机酸可能参与了基质中金属离子的螯合,从而达到解毒效果<sup>[37]</sup>,因此2-异丙基苹果酸在Myc阶段基质中高表达可能与降解早期基质中金属离子螯合调控有关。Pri和FB阶段基质中吡喃酮类化合物数量和含量增多,一方面可能与绣球菌等褐腐菌中聚酮化合物合成酶基因扩张有关<sup>[35,38]</sup>;另一方面,吡喃酮类化合物通常具有抗菌和还原活性,在褐腐菌扁红孔菌(*Rhodonia placenta*)和密粘褶菌(*Gloeophyllum trabeum*)基质降解后期吡喃酮类化合物含量也显著升高,可能与降低活性氧对菌丝的损伤,以及降低因生长缓慢和营养物质释放增加而产生的杂菌入侵风险<sup>[35]</sup>,因此吡喃酮类代谢物对绣球菌保持生长优势具有促进作用。

本研究基于UHPLC-MS/MS技术比较了广叶绣球菌不同生长阶段栽培基质中代谢产物的变化。结果显示,随着培养时间的变化,基质中代谢产物的积累存在显著差异。差异显著的代谢物可能是诱导菌丝生长转入原基和子实体分化的重要物质基础。差异代谢物的功能注释分析结果表明,脂类、氨基酸、嘌呤、吡喃酸、吡喃酮和植物类激素等与绣球菌栽培生理关系密切。由于代谢物数据库的不完善,且LC-MS技术对代谢物鉴别有一定的偏向性,仍有大量代谢物不能鉴定。因此,可进一步开展相应的多组学技术研究,提高结果的全面性和准确性,为广叶绣球菌基质利用机理研究提供参考。

## REFERENCES

- [1] KIMURA T. Natural products and biological activity of the pharmacologically active cauliflower mushroom *Sparassis crispa*[J]. *BioMed Research International*, 2013, 2013: 982317.
- [2] HIDA TH, KAWAMINAMI H, ISHIBASHI KI, MIURA NN, ADACHI Y, OHNO N. Oral administration of soluble  $\beta$ -glucan preparation from the cauliflower mushroom, *Sparassis crispa* (Higher Basidiomycetes) modulated cytokine production in mice[J]. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2013, 15(6): 525-538.
- [3] YOSHIKAWA K, KOKUDO N, HASHIMOTO T, YAMAMOTO K, INOSE T, KIMURA T. Novel phthalide compounds from *Sparassis crispa* (Hanabiratake), Hanabiratakelide A-C, exhibiting anti-cancer related activity[J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2010, 33(8): 1355-1359.
- [4] WEI X, CHENG FE, LIU JY, CHENG YF, YUN SJ, MENG JL, CHANG MC, GENG XR, XU LJ, CAO JL, FENG CP. *Sparassis latifolia* polysaccharides inhibit colon cancer in mice by modulating gut microbiota and metabolism[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 232: 123299.
- [5] ZHANG WY, GUO YH, CHENG YL, YAO WR, QIAN H. Neuroprotective effects of polysaccharide from *Sparassis crispa* on Alzheimer's disease-like mice: involvement of microbiota-gut-brain axis[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 225: 974-986.
- [6] SHARMA N, TAPWAL A, VERMA R, KUMAR D, NEPOVIMOVA E, KUČA K. Medicinal, nutritional, and nutraceutical potential of *Sparassis crispa* s. lat.: a review[J]. *IMA Fungus*, 2022, 13(1): 8.
- [7] 马璐, 杨驰, 肖冬来, 刘晓瑜, 江晓凌, 应正河, 林衍铨. 基质碳氮比对广叶绣球菌生长发育的影响[J]. *菌物学报*, 2021, 40(12): 3196-3213.  
MA L, YANG C, XIAO DL, LIU XY, JIANG XL, YING ZH, LIN YQ. Effects of different substrate carbon to nitrogen ratio(C/N) on the growth and development of *Sparassis latifolia*[J]. *Mycosystema*, 2021, 40(12): 3196-3213 (in Chinese).
- [8] 耿缘. 绣球菌栽培关键参数研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2017.  
GENG Y. The key parameters for the cultivation of *Sparassis crispa*[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2017 (in Chinese).
- [9] 张职视, 林辉, 王丽芬, 陈桂珍, 赖淑芳, 詹森然, 李佳欢, 孙淑静, 胡开辉. 斑玉蕈菌包理化指标与其成熟度之间的关系[J]. *中国食用菌*, 2015, 34(5): 53-59.  
ZHANG ZS, LIN H, WANG LF, CHEN GZ, LAI SF, ZHAN SR, LI JH, SUN SJ, HU KH. Relationship between physical and chemical indicators and maturity of *Hypsizygus marmoreus*[J]. *Edible Fungi of China*, 2015, 34(5): 53-59 (in Chinese).

- [10] 张职视, 林辉, 王丽芬, 陈桂珍, 赖淑芳, 詹森然, 李佳欢, 孙淑静, 胡开辉. 斑玉蕈培养过程中酶活性与菌包成熟度的关系[J]. 中国食用菌, 2016, 35(1): 53-58. ZHANG ZS, LIN H, WANG LF, CHEN GZ, LAI SF, ZHAN SR, LI JH, SUN SJ, HU KH. Relationship between enzyme activities and the maturity of *Hypsizygus marmoreus* bag[J]. Edible Fungi of China, 2016, 35(1): 53-58 (in Chinese).
- [11] DU F, ZOU YJ, HU QX, JING YG, YANG XH. Metabolic profiling of *Pleurotus tuoliensis* during mycelium physiological maturation and exploration on a potential indicator of mycelial maturation[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 9: 3274.
- [12] SHU LL, WANG MY, WANG S, LI Y, XU H, QIU ZH, LI TL. Excessive oxalic acid secreted by *Sparassia latifolia* inhibits the growth of mycelia during its saprophytic process[J]. Cells, 2022, 11(15): 2423.
- [13] CONTRERAS D, RODRÍGUEZ J, FREER J, SCHWEDERSKI B, KAIM W. Enhanced hydroxyl radical production by dihydroxybenzene-driven Fenton reactions: implications for wood biodegradation[J]. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2007, 12(7): 1055-1061.
- [14] 张津京, 汪虹, 陈明杰, 王倩, 宋晓霞, 隗加香, 冯志勇, 叶明, 陈辉. 曲酸对斑玉蕈子实体形成过程中木质纤维素酶的影响研究[J]. 菌物学报, 2018, 37(12): 1680-1687. ZHANG JJ, WANG H, CHEN MJ, WANG Q, SONG XX, JUAN JX, FENG ZY, YE M, CHEN H. Effects of kojic acid on lignocellulase at fruiting body formation process of *Hypsizygus marmoreus*[J]. Mycosystema, 2018, 37(12): 1680-1687 (in Chinese).
- [15] 姚森, 刘媛媛, 赵琛, 严俊杰, 谢宝贵. 不饱和脂肪酸参与调控金针菇菌柄伸长的潜在分析[J]. 菌物学报, 2019, 38(12): 2232-2240. YAO S, LIU YY, ZHAO C, YAN JJ, XIE BG. Unsaturated fatty acids as potential regulator involved in stipe elongation of *Flammulina filiformis*[J]. Mycosystema, 2019, 38(12): 2232-2240 (in Chinese).
- [16] ZHAO X, CHEN MJ, LI ZP, ZHAO Y, YANG HL, ZHA L, YU CX, WU YJ, SONG XX. The response of *Volvariella volvacea* to low-temperature stress based on metabolomics[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1787.
- [17] ZHAO X, CHEN MJ, ZHAO Y, ZHA L, YANG HL, WU YJ. GC-MS-based nontargeted and targeted metabolic profiling identifies changes in the *Lentinula edodes* mycelial metabolome under high-temperature stress[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(9): 2330.
- [18] SATO M, MIYAGI A, YONEYAMA S, GISUSI S, TOKUJI Y, KAWAI-YAMADA M. CE-MS-based metabolomics reveals the metabolic profile of maitake mushroom (*Grifola frondosa*) strains with different cultivation characteristics[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2017, 81(12): 2314-2322.
- [19] SATRIA D, TAMRAKAR S, SUHARA H, KANEKO S, SHIMIZU K. Mass spectrometry-based untargeted metabolomics and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of Lingzhi (*Ganoderma lingzhi*) during the developmental stages[J]. Molecules, 2019, 24(11): 2044.
- [20] LJUNGDAHL PO, DAIGNAN-FORNIER B. Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Genetics, 2012, 190(3): 885-929.
- [21] SANTOS FC, FERNANDES AS, ANTUNES CAC, MOREIRA FP, VIDEIRA A, MARINHO HS, de ALMEIDA RFM. Reorganization of plasma membrane lipid domains during conidial germination[J]. Biochimica et Biophysica Acta Molecular and Cell Biology of Lipids, 2017, 1862(2): 156-166.
- [22] JAMESON E, FU TT, BROWN IR, PASZKIEWICZ K, PURDY KJ, FRANK S, CHEN Y. Anaerobic choline metabolism in microcompartments promotes growth and swarming of *Proteus mirabilis*[J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(9): 2886-2898.
- [23] 赵葵, 郜熙阳, 邱立友. 真菌激素研究进展[J]. 微生物学通报, 2019, 46(11): 3102-3109. ZHAO K, GAO XY, QIU LY. Research progress on fungal hormone[J]. Microbiology China, 2019, 46(11): 3102-3109 (in Chinese).
- [24] 方新新, 张猛, 李蝶, 刘斌. 外源激素对金针菇菌丝生长的影响[J]. 农业研究与应用, 2017(4): 23-26. FANG XX, ZHANG M, LI D, LIU B. Effects of exogenous hormones on the growth of *Flammulina velutipes* mycelia[J]. Agricultural Research and Application, 2017(4): 23-26 (in Chinese).
- [25] FOX EM, HOWLETT BJ. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology[J]. Current Opinion in Microbiology, 2008, 11(6): 481-487.
- [26] SALAZAR-CEREZO S, MARTÍNEZ-MONTIEL N, GARCÍA-SÁNCHEZ J, PÉREZ-Y-TERRÓN R, MARTÍNEZ-CONTRERAS RD. Gibberellin biosynthesis and metabolism: a convergent route for plants, fungi and bacteria[J]. Microbiological Research, 2018, 208: 85-98.

- [27] BROWSE J. Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2009, 60: 183-205.
- [28] WASTERNAK C, KOMBRINK E. Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development[J]. *ACS Chemical Biology*, 2010, 5(1): 63-77.
- [29] 李玉, 朱秋瑾, 李巧珍, 陆欢, 王瑞娟, 杨慧, 尚晓冬, 刘建雨. 利用转录组分析茉莉酸甲酯对金针菇原基生长的影响[J]. *食用菌学报*, 2022, 29(3): 1-9.  
LI Y, ZHU QJ, LI QZ, LU H, WANG RJ, YANG H, SHANG XD, LIU JY. Transcriptome analysis of effects of methyl jasmonate on primordium development of *Flammulina filiformis*[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2022, 29(3): 1-9 (in Chinese).
- [30] MIERSCH O, NEUMERKEL J, DIPPE M, STENZEL I, WASTERNAK C. Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling[J]. *The New Phytologist*, 2008, 177(1): 114-127.
- [31] NAKAMURA Y, MITHÖFER A, KOMBRINK E, BOLAND W, HAMAMOTO S, UOZUMI N, TOHMA K, UEDA M. 12-hydroxyjasmonic acid glucoside is a COI1-JAZ-independent activator of leaf-closing movement in *Samanea saman*[J]. *Plant Physiology*, 2011, 155(3): 1226-1236.
- [32] MAYNARD D, GRÖGER H, DIERKS T, DIETZ KJ. The function of the oxylipin 12-oxophytodienoic acid in cell signaling, stress acclimation, and development[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(22): 5341-5354.
- [33] WANG KD, BORREGO EJ, KENERLEY CM, KOLOMIETS MV. Oxylipins other than jasmonic acid are xylem-resident signals regulating systemic resistance induced by *Trichoderma virens* in maize[J]. *The Plant Cell*, 2020, 32(1): 166-185.
- [34] ENG F, MARIN JE, ZIENKIEWICZ K, GUTIÉRREZ-ROJAS M, FAVELA-TORRES E, FEUSSNER I. Jasmonic acid biosynthesis by fungi: derivatives, first evidence on biochemical pathways and culture conditions for production[J]. *PeerJ*, 2021, 9: e10873.
- [35] CASTAÑO JD, MUÑOZ-MUÑOZ N, KIM YM, LIU J, YANG L, SCHILLING JS. Metabolomics highlights different life history strategies of white and brown rot wood-degrading fungi[J]. *mSphere*, 2022, 7(6): e0054522.
- [36] KOBAYASHI A, EDO H, FURIHATA K, YOSHIMURA E. Secretion of an aluminum chelator, 2-isopropylmalic acid, by the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2005, 99(5): 1260-1263.
- [37] PLASSARD C, FRANSSON P. Regulation of low-molecular weight organic acid production in fungi[J]. *Fungal Biology Reviews*, 2009, 23(1/2): 30-39.
- [38] KIYAMA R, FURUTANI Y, KAWAGUCHI K, NAKANISHI T. Genome sequence of the cauliflower mushroom *Sparassis crispa* (Hanabiratake) and its association with beneficial usage[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 16053.