

研究报告

草菇响应假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) Z9 侵染后的代谢组分析

陈晗, 黄在兴, 丁承培, 韦植元, 苏广林, 刘斌*

广西大学农学院食用菌研究所, 广西 南宁 530005

陈晗, 黄在兴, 丁承培, 韦植元, 苏广林, 刘斌. 草菇响应假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) Z9 侵染后的代谢组分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(7): 2435-2449.

CHEN Han, HUANG Zaixing, DING Chengpei, WEI Zhiyuan, SU Guanglin, LIU Bin. Metabolomics of *Volvariella volvacea* in response to infection by *Pseudomonas* sp. Z9[J]. Microbiology China, 2024, 51(7): 2435-2449.

摘要:【背景】假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) Z9 是引起草菇黄斑病的病原, 称之为草菇黄斑病菌, 但其致病机制尚未明确。【目的】研究草菇黄斑病菌侵染草菇后的差异代谢物及代谢通路, 为认识其致病机制提供依据。【方法】以被病菌侵染前后不同时间的草菇子实体为材料, 测定其细胞膜透性的丙二醛(malondialdehyde, MDA)和相对电导率的变化, 以及活性氧代谢相关酶即超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)的活性变化, 同时利用非靶向代谢组学探究菌株 Z9 侵染草菇 24 h 后的代谢物差异。【结果】接种病菌 48 h 内的草菇 MDA 含量随时间延长呈上升趋势, 且均显著高于 CK 组($P < 0.05$); CAT 和 SOD 活性随时间延长逐渐上升, 24 h 时达到峰值, PPO 活性则先下降后上升; 两组处理草菇相对电导率均呈先上升后趋于稳定的趋势, 12 h 后趋于稳定; 草菇两组样本间的代谢物差异显著, 共筛选并鉴定出 131 个差异代谢物。KEGG 通路富集分析发现差异代谢物主要富集在氨基酸代谢途径, 其中色氨酸代谢和酪氨酸代谢是差异代谢物富集最多的通路。丁香酸是草菇被黄斑病菌 Z9 侵染后含量增加最大的代谢物, 其计算变量投影重要度(variable important for the projection, VIP)值达 1.355 6。【结论】草菇受黄斑病菌侵染后细胞膜被持续过氧化; 推测草菇通过产生丁香酸清除由 *Pseudomonas* sp. Z9 刺激产生的活性氧(reactive oxygen species, ROS)来避免细胞氧化损伤, 酪氨酸代谢途径是病原侵染草菇产生病斑的一个重要代谢途径。

关键词: 草菇; 假单胞菌; 侵染; 抗氧化酶; 代谢组

资助项目: 广西壮族自治区重点研发计划(桂科 AB18221047); 广西食用菌产业科技先锋队(桂农科盟 202308-2)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Guangxi Zhuang Autonomous Region (AB18221047) and the Guangxi Mushroom Science and Technology Vanguard (GNKM202308-2).

*Corresponding author. E-mail: liubin@gxu.edu.cn

Received: 2023-10-16; Accepted: 2023-12-23; Published online: 2024-02-06

Metabolomics of *Volvariella volvacea* in response to infection by *Pseudomonas* sp. Z9

CHEN Han, HUANG Zaixing, DING Chengpei, WEI Zhiyuan, SU Guanglin, LIU Bin*

College of Agriculture, Institute of Edible Fungi, Guangxi University, Nanning 530005, Guangxi, China

Abstract: [Background] *Pseudomonas* sp. Z9 is the pathogen responsible for causing yellow blotch disease in *Volvariella volvacea*. However, the mechanism of this pathogen in inducing yellow blotch disease remains unclear. [Objective] To investigate the differential metabolites and metabolic pathways of *V. volvacea* infected by *Pseudomonas* sp. Z9, providing a basis for understanding the underlying mechanism. [Methods] *V. volvacea* fruiting bodies inoculated with the pathogen and sterile water (CK) were sampled every 12 h within 48 h. The content of malondialdehyde (MDA) and the relative conductivity of the fruiting bodies were measured. Meanwhile, the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and polyphenol oxidase (PPO) associated with the metabolism of reactive oxygen species were determined. Non-targeted metabolomics was employed to explore the differential metabolites and pathways of *Pseudomonas* sp. Z9-infected *V. volvacea* 24 h post-infection. [Results] The MDA content of *V. volvacea* increased over time within 48 h after inoculation of the pathogen and was higher in the inoculation group than in the CK group ($P < 0.05$). CAT and SOD activities gradually increased over time and reached the peak at the time point of 24 h, while the PPO activity first decreased and then increased. The relative conductivity of the two groups first increased and then reached stability after 12 h. A total of 131 differential metabolites between the two groups were screened out and identified. The KEGG pathway enrichment results revealed that the differential metabolites were mainly enriched in amino acid metabolism pathways, especially tryptophan metabolism and tyrosine metabolism. Syringic acid was the metabolite with the largest increase in content after infection by *Pseudomonas* sp. Z9 in *V. volvacea*, with a variable important for the projection (VIP) value of 1.355 6. [Conclusion] The cell membrane of *V. volvacea* infected by *Pseudomonas* sp. Z9 experiences persistent peroxidation. We hypothesize that *V. volvacea* utilizes syringic acid to eliminate reactive oxygen species produced upon infection of *Pseudomonas* sp. Z9, thus avoiding cellular oxidative damage. Tyrosine metabolism is an important metabolic pathway involved in the formation of yellow blotches caused by *Pseudomonas* sp. Z9 in *V. volvacea*.

Keywords: *Volvariella volvacea*; *Pseudomonas* sp.; infection; antioxidant enzymes; metabolomics

草菇(*Volvariella volvacea*)又名中国菇、兰花菇、苞脚菇,是一种广泛种植于热带及亚热带地区的高温食用菌^[1]。草菇含有丰富的蛋白质、多糖等,营养丰富^[2];草菇的活性物质如

甾醇、酚类等物质,具有抗氧化、抗肿瘤、免疫调节等生理功能,具有较高的药用价值^[3-4]。草菇风味独特、口感细腻脆嫩、味道鲜美,深受国内外消费者的喜爱^[5]。

目前,关于草菇的细菌性病害报道较少。刘坚真等^[6]发现 *Xanthomonas fragariae* 能引起草菇褐腐病。Hepperly 等^[7]报道由绿针假单胞菌(*Pseudomonas chlororaphis*)引起的草菇基腐病,感病后子实体基部变软至腐烂,组织内部呈水渍状并变色,失去营养价值和食用价值。

食用菌受到病原侵染或逆境胁迫时,食用菌体内会产生大量的活性氧,活性氧的快速积累会加剧细胞膜脂过氧化,细胞膜损伤,而丙二醛含量(malondialdehyde, MDA)是衡量细胞膜脂过氧化的重要指标之一^[8-9]。相对电导率的变化能直接反映细胞膜受破坏的程度,在病原侵染或逆境胁迫下,细胞膜受损,膜透性增大,电解液外渗导致相对电导率增加^[10]。

食用菌受到病菌侵染或逆境胁迫时会产生一系列的防御反应,引起寄主体内多种抗氧化防御酶活性发生变化。如有害疣孢霉侵染双孢蘑菇后多种防御酶活性明显升高,以抵御病原入侵^[11],糙皮侧耳受高温胁迫时通过增加过氧化氢酶活性来缓解损伤^[12],低温胁迫对草菇造成氧化损伤,草菇通过增强超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)活性来防御^[13]。

代谢组学在食用菌相关机制研究上得到了很好的应用。Gao 等^[14]和 Cai 等^[15]采用代谢组学分别揭示了羊肚菌和双孢蘑菇储藏期间的褐变机制;Zhao 等^[16]研究了 2 种不同草菇菌株对低温的响应及其差异,在代谢水平上揭示了耐低温草菇菌株 VH3 的低温抗性机制;Zhao 等^[17]对 2 株不同耐受性的香菇进行了不同高温持续时间的实验,基于 GC-MS 的代谢组学阐明香菇(*Lentinula edodes*)菌丝体对高温胁迫响应的生理机制;Deng 等^[18]基于非靶向代谢组学揭示了羊肚菌不同生长时期主要代谢物和潜在途径的变化;罗阳兰等^[19]采用非靶向代谢组学分析不

同栽培基质对肺形侧耳子实体代谢物差异的影响,为桉树加工主要副产物应用于食用菌栽培提供参考。

本研究以课题组保存的 *Pseudomonas* sp. Z9 为病原,接种草菇子实体并测定草菇被病菌侵染后的生理变化,同时利用非靶向代谢组学技术比较 *Pseudomonas* sp. Z9 侵染草菇子实体 24 h 草菇的代谢物变化,挖掘该病原侵染草菇的关键代谢物及调控通路,以期为草菇黄斑病原 *Pseudomonas* sp. Z9 侵染草菇的生理代谢机制及病害防治提供参考。

1 材料与方 法

1.1 菌株

病原菌 *Pseudomonas* sp. Z9 及草菇 V971 均保存于广西大学食用菌研究所。

1.2 培养基

LB 培养基(g/L):蛋白胨 10.0,氯化钠 10.0,酵母提取物 5.0。

1.3 主要试剂和仪器

甲醇和乙腈, Thermo 公司; 2-氯-L-苯丙氨酸(内标标准物质), Aladdin 公司; 甲酸, TCI 公司; 硫代巴比妥酸钠, 国药集团化工试剂有限公司; 氯化硝基四氮唑蓝, 广州罗恩生物科技有限公司; 邻苯二酚, 上海麦克林生化科技有限公司; 过氧化氢, 重庆川东化工有限公司。冷冻离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; 真空浓缩仪, Eppendorf 公司; 混匀仪, 其林贝尔公司; 液相色谱仪和质谱仪, Thermo 公司。

1.4 草菇丙二醛含量和酶活性的测定

粗酶液的制备:称取草菇 V971 子实体 0.4 g, 加 1.8 mL 0.05 mol/L pH 7.8 磷酸缓冲液, 冰浴研磨, 成匀浆后倒入 10 mL 离心管中, 用缓冲液冲洗研钵 3 次, 每次 1.8 mL, 4 °C、10 000 r/min 离

心 20 min 收集上清液即为粗酶液, 4 °C 保存备用。

丙二醛含量的测定采用硫代巴比妥酸(2-thiobarbituric acid, TBA)方法, 取 2 mL 粗酶液, 加入 2 mL 0.6% 的 TBA 溶液, 混匀后沸水浴 15 min, 冷却至室温后 8 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 分别于 532、600、450 nm 波长处测定吸光度值, 按公式(1)计算丙二醛含量。

MDA 含量(nmol/g)=

$$[6.45 \times (OD_{532} - OD_{600}) - 0.56 \times OD_{450}] \times 2 \times V / m \quad (1)$$

式中: V 为粗酶液总体积(mL); m 为草菇鲜重(g)。

参照氮蓝四唑光化还原法^[20]测定 SOD 活性, 采用邻苯二酚比色法^[21]测定多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)活性; CAT 活性的测定参照裴斌等^[22]的方法。

1.5 草菇相对电导率的测定

将菌株 Z9 接种至草菇 V971 子实体上, 于 25 °C, 空气湿度为 85%–90% 条件下放置 48 h, 每隔 12 h 取样, 用内径 8 mm 的无菌打孔器打取菇体组织, 自表面切取 1–2 片厚 1 mm 的组织, 共取 6 片感病组织放入 100 mL 三角瓶中, 加入超纯水 30 mL, 15 °C、150 r/min 培养 24 h, 取出后放至室温测定 E_1 ; 高温灭活后, 15 °C、150 r/min 培养 24 h 后测定 E_2 , 根据公式(2)求得相对电导率。

$$E (\%) = (E_1 - E_0) / (E_2 - E_0) \quad (2)$$

式中: E_0 为超纯水的电导率。每个处理重复 3 次^[23]。

1.6 代谢组样品的制备

将菌株 Z9 接种于 LB 液体培养基中 28 °C、150 r/min 活化培养 24 h, 获得种子液, 将 100 μ L 种子液接种于 100 mL LB 液体培养基中培养 24 h, 4 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体细胞。将收集的细菌细胞重悬于无菌去离子水中, 制成浓度约为 1×10^8 CFU/mL 的菌悬液, 在草菇 V971 子实体组织块滴加 30 μ L 菌悬液为处理

组, 以接种等体积无菌去离子水作为对照组, 每个处理重复 3 次, 所有处理在 25 °C 和 85%–90% 的湿度条件下放置 24 h。采集 24 h 时处理组和对照组的草菇子实体, 将采集的样品立即放入液氮中冷冻并放入 -80 °C 超低温冰箱中保存备用。

1.7 LC-MS 检测

称取草菇样品 60 mg 于 2 mL 离心管中, 加入 100 mg 玻璃珠, 1 mL 50% 甲醇水, 涡旋振荡 30 s, 液氮冷冻 5 min 后置于 55 Hz 的组织研磨器中研磨 2 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液浓缩干燥, 加入 300 μ L 50% 甲醇水配制的 2-氯-L-苯丙氨酸(4 mg/L)溶液复溶, 经 0.22 μ m 滤膜过滤到检测瓶中, 用于 LC-MS 检测^[24]。

将 2 μ L 样品采用超高效液相分离, 色谱柱为 ACQUITY UPLC[®] HSS T3 (2.1 \times 100 mm, 1.8 μ m) (Waters), 流速为 0.3 mL/min, 柱温 40 °C。阳离子模式的色谱条件以 0.1% 甲酸乙腈(B2)和 0.1% 甲酸水(A2)为流动相, 梯度洗脱程序: 0–1 min, 8% B2; 1–8 min, 8%–98% B2; 8–10 min, 98% B2; 10–10.1 min, 98%–8% B2; 10.1–12 min, 8% B2。阴离子模式, 以乙腈(B3)和 5 mmol/L 甲酸铵水(A3)为流动相, 梯度洗脱程序: 0–1 min, 8% B3; 1–8 min, 8%–98% B3; 8–10 min, 98% B3; 10–10.1 min, 98%–8% B3; 10.1–12 min, 8% B3。

经超高效液相分离的样品采用阴阳离子扫描模式进行质谱数据采集。一级扫描分辨率为 60 000, 一级离子扫描范围 m/z 100–1 000, 并采用高能碰撞解离(high energy collision dissociation, HCD)进行二级裂解, 碰撞能量为 30%, 二级分辨率为 15 000。

1.8 代谢组分析

基于 UPLC-MS/MS 检测平台、采用公共数据库 HMDB、MassBank、LipidMaps、mzCloud、

KEGG 及上海派森诺生物科技有限公司自建物质库进行物质的注释。采用 R 软件包 Ropls 分别对样本数据进行主成分分析 (principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA) 降维分析。按计算变量投影重要度 (variable important for the projection, VIP) > 1, $P < 0.05$ 相结合的方法筛选差异代谢物并进行 KEGG 代谢通路富集分析。

2 结果与分析

2.1 *Pseudomonas sp.* Z9 感染对草菇 MDA 含量的影响

MDA 代表膜过氧化的程度, 如图 1 所示。病原感染后草菇细胞内的 MDA 含量持续上升, 且均高于对照组 ($P < 0.05$), 而对照组草菇的 MDA 含量在 36 h 出现峰值, 随后下降。说明草菇受病原感染 48 h 内细胞膜被持续过氧化。

2.2 *Pseudomonas sp.* Z9 感染对草菇 SOD 活性的影响

如图 2 所示, 接种病原 48 h 内草菇的 SOD 活性先上升后下降, 处理 24 h 时 SOD 活性达到最高值, 而此时对照组 SOD 活性最低; 36 h 时

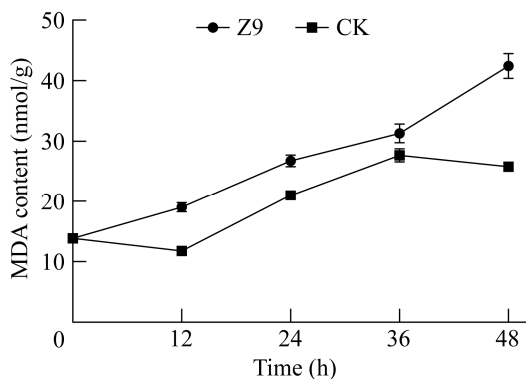


图 1 *Pseudomonas sp.* Z9 对草菇 MDA 含量的影响
Figure 1 Effect of *Pseudomonas sp.* Z9 on MDA content of *Volvariella volvacea*.

两组处理草菇的 SOD 活性相近, 36 h 后, 接种病原的草菇 SOD 活性下降, 到 48 h 时酶活性最低。相反地, 对照组草菇的 SOD 活性持续上升, 48 h 时达到最高值。

2.3 *Pseudomonas sp.* Z9 感染对草菇 CAT 活性的影响

由图 3 可知, 病原 *Pseudomonas sp.* Z9 感染草菇后 CAT 活性在 48 h 内均高于对照组, 且呈现上升趋势, 其中前 24 h 上升趋势较快, 而后 24 h 上升趋势缓慢。说明草菇受病原侵入后激活了细胞内 CAT 以避免过氧化氢的积累造成的损失。

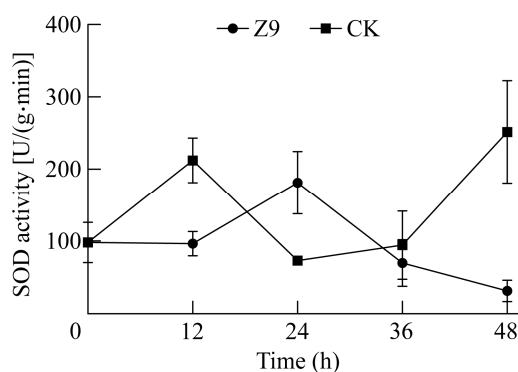


图 2 *Pseudomonas sp.* Z9 对草菇 SOD 活性的影响
Figure 2 Effect of *Pseudomonas sp.* Z9 on SOD activity of *Volvariella volvacea*.

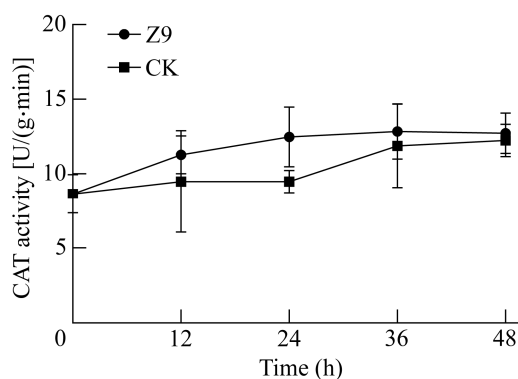


图 3 *Pseudomonas sp.* Z9 对草菇 CAT 活性的影响
Figure 3 Effect of *Pseudomonas sp.* Z9 on CAT activity of *Volvariella volvacea*.

2.4 *Pseudomonas* sp. Z9 侵染对草菇 PPO 活性的影响

由图 4 可知, *Pseudomonas* sp. Z9 侵染草菇后细胞内的 PPO 活性在 48 h 内先下降后上升, 且任一时间 PPO 活性均高于对照组。在病原侵染草菇 12 h 时 PPO 活性最低, 12 h 后活性持续上升。草菇受病原侵染 24 h 时, 其 PPO 活性相较于对照组差异最大, 提高 28.63%。

2.5 *Pseudomonas* sp. Z9 侵染对草菇相对电导率的影响

相对电导率用于衡量细胞膜受逆境伤害的程度。由图 5 可知, 随着时间延长, 两组处理草菇子实体的相对电导率均呈先上升到 12 h 后保持稳定的趋势, 12 h 时两组处理草菇细胞膜相对电导率均超过 90%, 说明 12 h 后两组处理草菇细胞膜已基本被破坏, 电解质流出导致其相对电导率达到最大值。

2.6 代谢组分析结果

2.6.1 主成分分析

为判别病原侵染后对草菇子实体代谢物累积差异, 对代谢物进行了主成分分析(PCA)。结

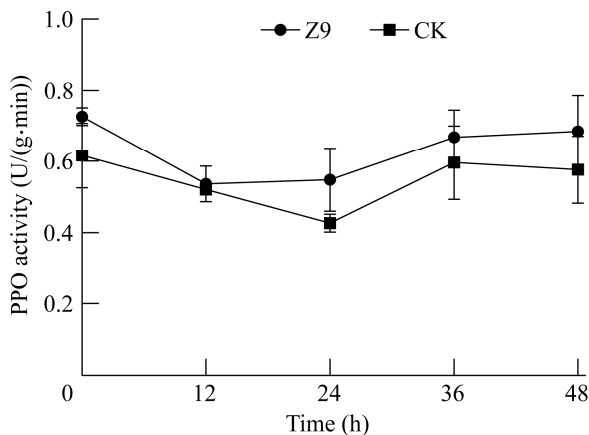


图 4 *Pseudomonas* sp. Z9 对草菇 PPO 活性的影响
Figure 4 Effect of *Pseudomonas* sp. Z9 on PPO activity of *Volvariella volvacea*.

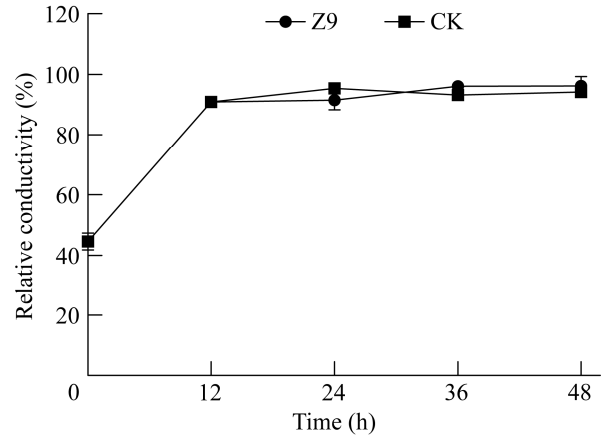


图 5 *Pseudomonas* sp. Z9 对草菇相对电导率的影响

Figure 5 Effect of *Pseudomonas* sp. Z9 on relative conductivity of *Volvariella volvacea*.

果表明在阳离子模式下(图 6A) PC1 (第一成分) 得分为 62.9%, PC2 (第二成分) 得分为 11.7%, 两个主要成分共解释了原始数据的 74.6%; 在阴离子的模式下(图 6B) PC1 (第一成分) 得分为 52.7%, PC2 (第二成分) 得分 21.9%, 两个主要成分共解释原始数据的 74.6%。阳、阴离子模式下, 处理组(Z9)和对照组(CK)两组样本间 PCA 得分差异显著并且相距较远, 说明两组样本间代谢物存在较大的差异。

2.6.2 正交偏最小二乘法分析

进一步采用 OPLS-DA 模型对两组草菇样本差异代谢物进行统计分析, 结果表明在阳、阴离子模式下处理组(Z9)与对照组(CK)样本区分效果明显(图 7), 说明两种处理的代谢物差异显著。阳离子模式下, PC1 的贡献率为 62.9%, OC2 的贡献率为 11.1%; 阴离子模式下, PC1 的贡献率为 52.5%, OC2 的贡献率为 21.7%。

2.6.3 差异代谢物鉴定

以 OPLS-DA 模型的 VIP 得分(VIP>1), 并结合 *t* 检验的结果 *P* 值(*P*<0.05)来寻找两组样本

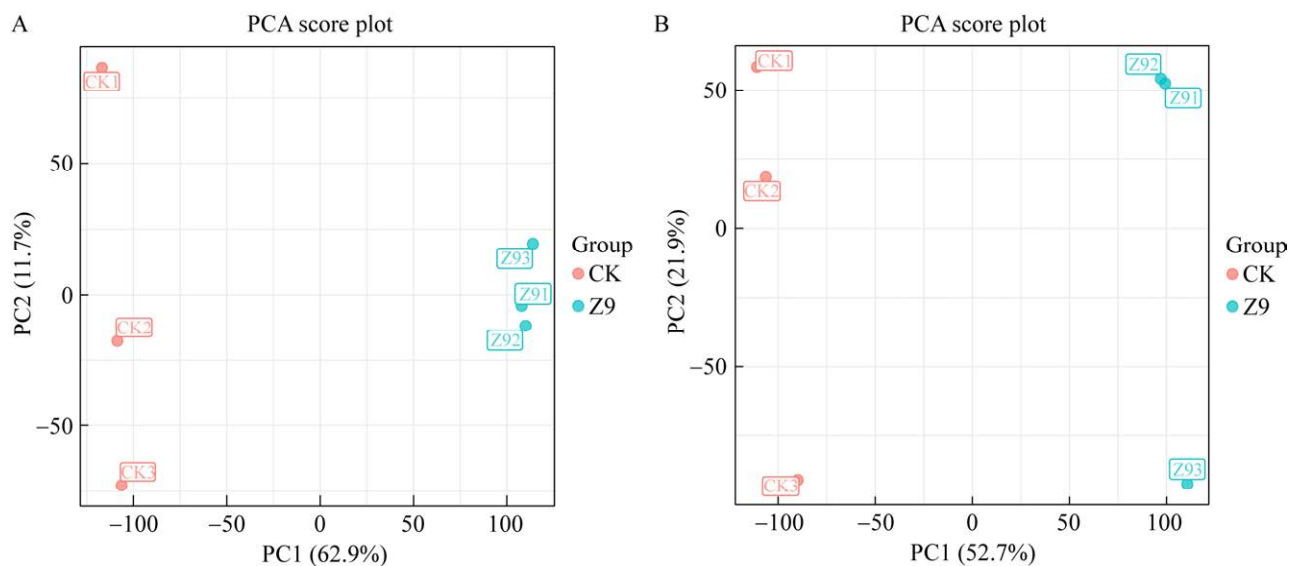


图 6 对照组和处理组代谢物的主成分分析 A: 阳离子模式. B: 阴离子模式

Figure 6 Principal component analysis of metabolites between control group (CK) and the treatment group (Z9). A: Positive ion mode. B: Negative ion mode.

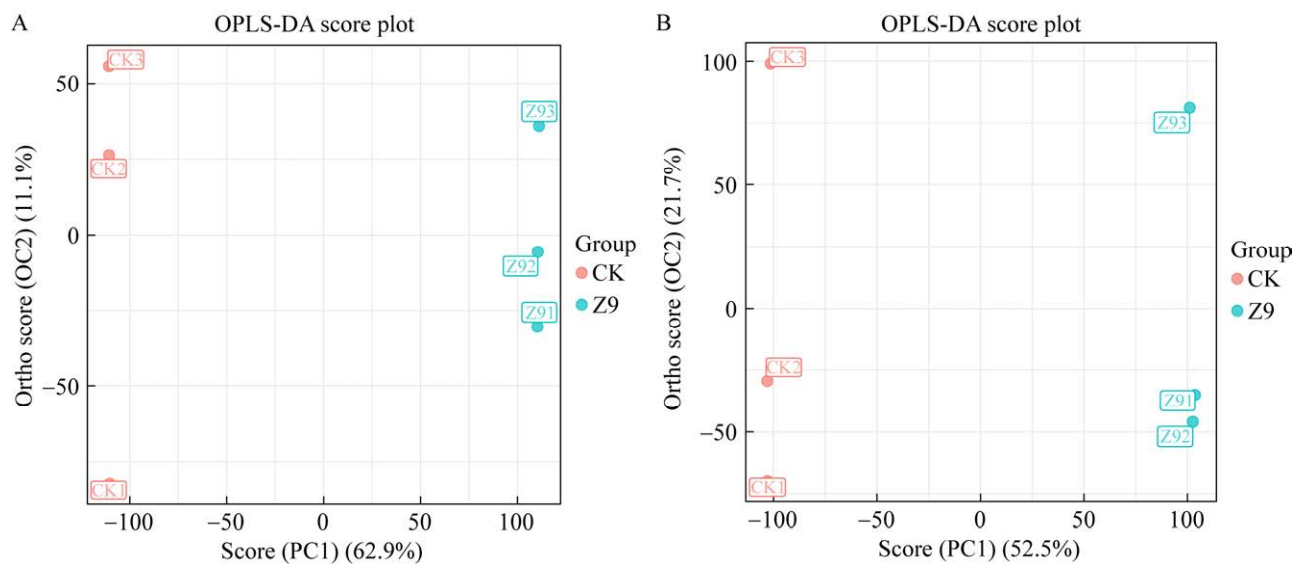


图 7 对照组和处理组代谢物的 OPLS-DA 分析 A: 阳离子模式. B: 阴离子模式

Figure 7 OPLS-DA analysis of metabolites between control group (CK) and the treatment group (Z9). A: Positive ion mode. B: Negative ion mode.

间的差异性代谢物, 差异代谢物火山图(图 8)说明阴、阳离子模式下两组处理间代谢物差异显著。阴、阳离子模式下共筛选并鉴定出 131 种显著差异代谢产物, 为了更直观地观察不同

处理下不同代谢物之间的变化, 绘制部分代谢物的 Z-score 图(图 9), 可以直接观察代谢物相对含量。其中丁香酸、芒柄花黄素、胍基乙酸、间苯二酚、黄嘌呤核苷、4-甲基儿茶酚、L-犬脲

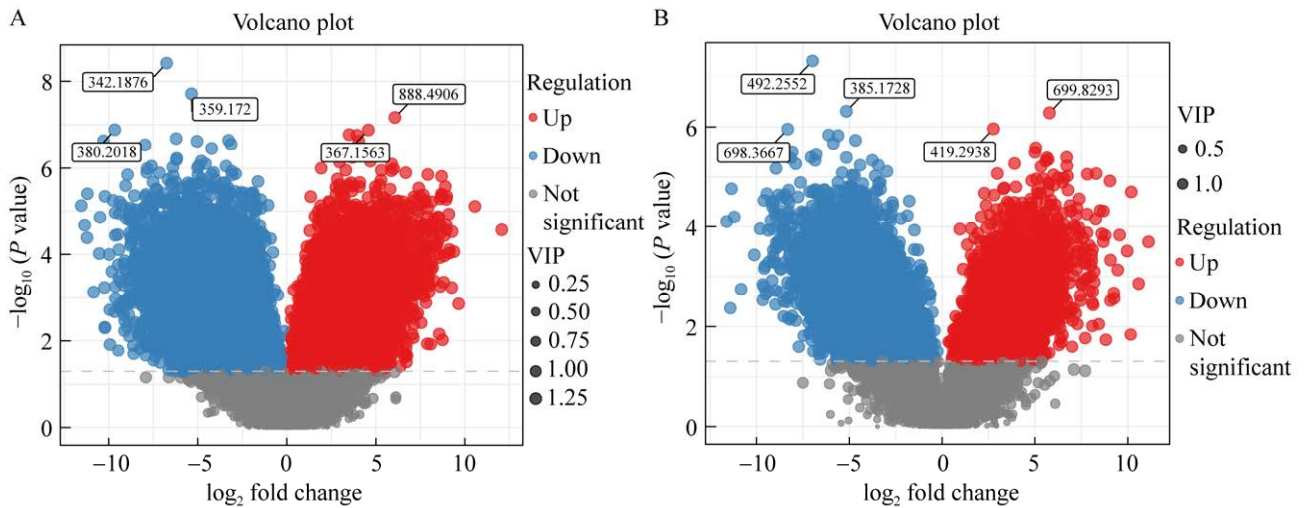


图8 阴、阳离子模式下差异代谢物火山图 A: 阳离子模式; B: 阴离子模式. 图中每个点代表一种物质, Up: 上调差异表达代谢物; Down: 下调差异表达代谢物; Not significant: 差异不显著的代谢物, 默认显示 P 值最小的前 5 个代谢物名称

Figure 8 Volcano plot of differentially expressed metabolites under positive and negative ion modes. A: Positive ion mode; B: Negative ion mode. Each dot in the graph represents a substance, Up: Up-regulated differentially expressed metabolites; Down: Down-regulated differentially expressed metabolites; Not significant: Metabolites with insignificant differences. The top 5 metabolite names with the lowest P value are shown by default.

氨酸等 85 种物质上调, 占总显著差异代谢物总数的 64.89%; L-蛋氨酸、7-甲基黄嘌呤、亮氨酸、N-氨基-L-天冬氨酸、天冬氨酸等 46 种物质下调, 占总显著差异代谢物的 35.11%。顺式 1,2-二羟基-4-甲基环己-3,5-二烯-1-羧酸酯、4-甲基儿茶酚、L-犬脲氨酸是上调最显著的 3 种物质, 烟酰胺、3,4-二羟基苯丙酸酯、L-酪氨酸是下调最显著的 3 种物质。

2.6.4 差异代谢物通路分析

对 *Pseudomonas* sp. Z9 侵染的草菇子实体和对照组所鉴定到的差异代谢物进行 KEGG 代谢通路的富集分析, 对照组(CK)和处理组(Z9)差异表达代谢物中显著富集($P < 0.05$)的代谢通路共有 48 条, 结果如表 1 所示, 表中展示 P 值显著($P < 0.05$)的部分通路。氨基酸代谢为差异代谢产物注释的主要通路, 其中包括了色氨酸代

谢、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成和酪氨酸代谢是氨基酸代谢中差异代谢物富集较多的通路。

绘制代谢通路影响因子气泡图, 影响因子反映代谢通路的富集程度, 每个气泡代表一个代谢通路, 气泡越大, 表示富集到该通路上的代谢物数目越多。由图 10 可知, 以影响因子 Impact 值 > 0.1 和 $P < 0.05$ 为差异代谢通路筛选条件, 筛选出 8 条差异显著的代谢通路, 分别为: 癌症的中心碳代谢, 蛋白质的消化和吸收, 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成, 氨酰-tRNA 的生物合成, 植物激素的生物合成, 色氨酸代谢, 植物次级代谢物的生物合成, 以及氨基酸的生物合成。其中影响因子最大的代谢通路是癌症的中心碳代谢途径, 这可能是病原侵染草菇的关键通路。该通路中谷氨酰胺、柠檬酸共两种差异代

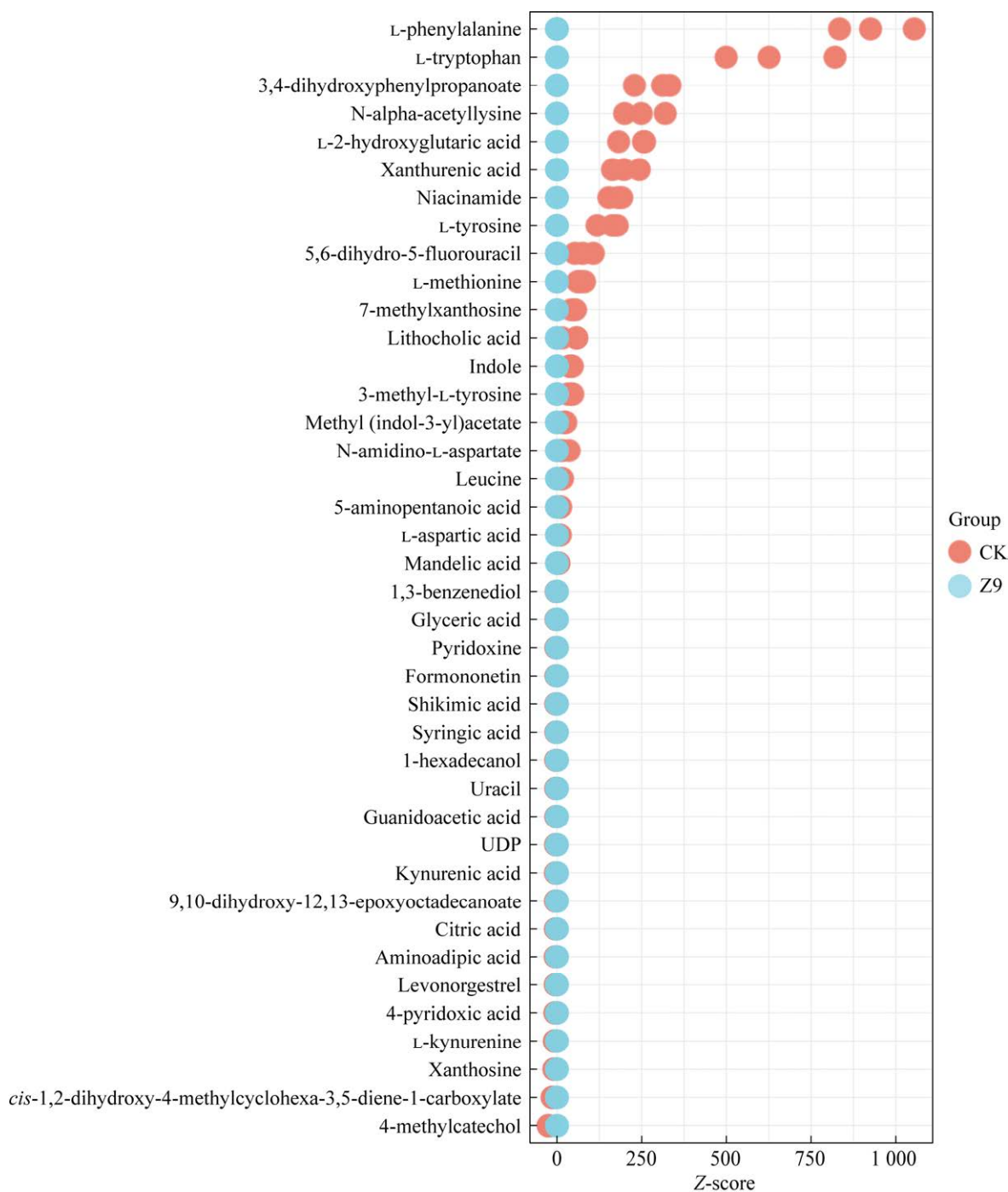


图 9 阴阳离子模式总差异代谢物 Z-score 图 纵坐标为代谢物名称, 点的颜色代表不同组别, 横坐标为代谢物在组中相对含量通过 Z-score 换算得到的数值, 越靠右代表该代谢物在该组中越多

Figure 9 Z-score plot of overall differentially expressed metabolites under positive and negative ion modes. Vertical coordinate is the name of the metabolite, the color of the dots represent different groups, horizontal coordinate is the relative content of the metabolite in the group by Z-score conversion of the value, the more to the right means that the metabolite is more in the group.

表 1 差异代谢物的 KEGG 通路富集分析

Table 1 KEGG pathway enrichment analysis of differential metabolites

代谢通路类型 Metabolic pathway type	代谢通路 Pathway name	代谢物总数 Total metabolites	差异代谢物 数目 Number of differential metabolites	上调差异代 谢物数目 Numbers of up-regulated differential metabolites	下调差异代 谢物数量 Numbers of down-regulated differential metabolites
氨基酸代谢 Amino acid metabolism	色氨酸代谢 Tryptophan metabolism	83	11	4	7
	苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成 Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	34	7	1	6
	酪氨酸代谢 Tyrosine metabolism	78	7	3	4
	精氨酸的生物合成 Arginine biosynthesis	23	4	2	2
	丙氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸的代谢 Alanine, aspartate and glutamate metabolism	28	4	3	1
化学结构转化图 Chemical structure transformation maps	植物次级代谢物的生物合成 Biosynthesis of plant secondary metabolites	141	19	8	11
	植物激素的生物合成 Biosynthesis of plant hormones	68	10	4	6
	莽草酸途径衍生生物碱的生物合成 Biosynthesis of alkaloids derived from shikimate pathway	143	11	4	7
消化系统 Digestive system	蛋白质的消化和吸收 Protein digestion and absorption	47	10	1	9
	矿物质吸收 Mineral absorption	29	4	1	3
内分泌系统 Endocrine system	卵巢类固醇生成 Ovarian steroidogenesis	24	4	3	1
	皮质醇的合成和分泌 Cortisol synthesis and secretion	12	3	3	0
全局和概述地图 Global and overview maps	氨基酸的生物合成 Biosynthesis of amino acids	128	14	5	9
	辅助因子的生物合成 Biosynthesis of cofactors	324	20	11	9
脂质代谢 Lipid metabolism	α -亚麻酸的代谢 Alpha-linolenic acid metabolism	44	5	5	0
膜运输 Membrane transport	ABC 转运蛋白 ABC transporters	137	9	5	4
神经系统 Nervous system	多巴胺能神经突触 Dopaminergic synapse	12	3	2	1
翻译 Translation	氨基酸-tRNA 的生物合成 Aminoacyl-tRNA biosynthesis	52	8	1	7
癌症：概述 Cancer: overview	癌症的中心碳代谢 Central carbon metabolism in cancer	37	9	2	7
内分泌代谢疾病 Endocrine and metabolic disease	库欣综合征 Cushing syndrome	13	3	3	0

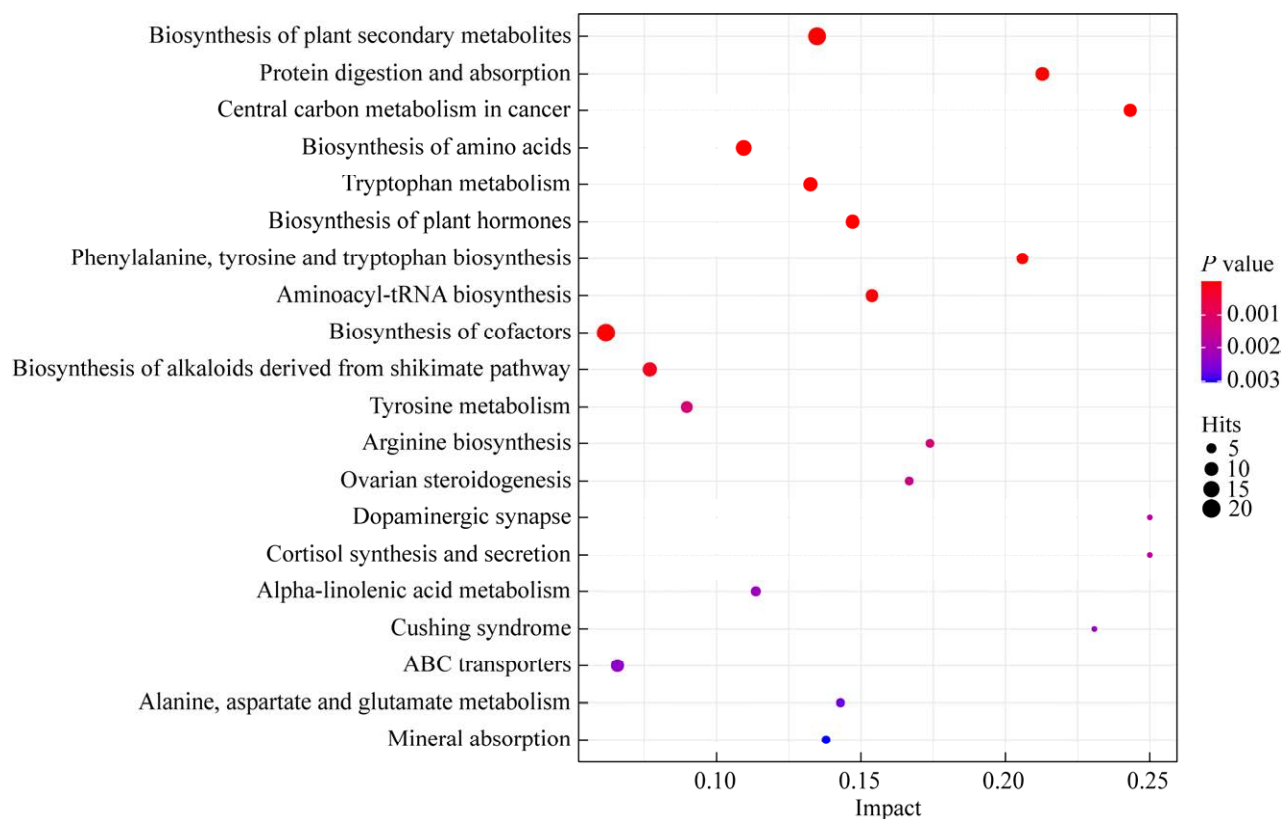


图 10 代谢通路影响因子气泡图 每个点代表一个代谢通路，横坐标是富集到不同代谢通路中的 Impact 值，纵坐标是富集通路。圆点表示通路上对应的代谢分子数目。颜色与 P 值相关，颜色越红， P 值越小，颜色越蓝， P 值越大

Figure 10 Metabolic pathway impact factor bubble chart. Each dot represents a metabolic pathway, the horizontal coordinate is the value of Impact enriched into the different metabolic pathways, and the vertical coordinate is the enriched pathway. The dots indicate the number of corresponding metabolic molecules in the pathway. The color correlates with the P value, the redder the color, the smaller the P value, the bluer the color, the larger the P value.

谢物上调，天冬氨酸、L-蛋氨酸、L-精氨酸、L-色氨酸、L-苯丙氨酸、酪氨酸、L-组氨酸 7 种差异代谢物下调。

3 讨论与结论

MDA 是膜脂氧化的最终产物之一^[8]，接种病原菌后 48 h 内的草菇子实体 MDA 含量仍保持在一个持续上升的水平，说明 *Pseudomonas sp.* Z9 刺激草菇产生了过量的活性氧，超出了过氧化物酶系统的清除能力，从而导致膜脂过

氧化，使草菇细胞受损。这与白静等^[25]的研究结果一致，羊肚菌菌丝中丙二醛含量随着温度的增加也随之增加，羊肚菌菌丝受到高温胁迫，细胞膜受损。在郭铭等^[26]的研究中，大麦条纹病菌侵染大麦叶片后，大麦叶片 MDA 含量随侵染时间的增加而增加，这与本文的研究结果一致。相对电导率的变化能直接反映细胞膜受破坏的程度。本研究中，两组处理草菇的相对电导率变化均呈先上升后持续稳定的趋势，在 12 h 时均达到 90% 以上，两组处理之间差异

性不显著,说明草菇相对电导率的变化受病原侵染的影响不明显,且12 h时草菇细胞膜已基本完全被破坏。赵妍等^[23]发现,草菇在4 °C储藏过程中,草菇相对电导率随时间的增加呈先上升后趋于稳定的趋势,且在12 h达到最大值,这与本研究结果一致。

当寄主受病原菌侵染或诱导处理后,寄主会形成一套防御机制来抵御病原的入侵,与抗病反应密切相关的一系列防御系统酶会发生明显的变化^[11]。在本研究中,草菇接种病原后48 h内CAT活性呈上升趋势,且均高于对照组,接种病原后SOD活性先上升后下降,在24 h时SOD活性达到最高值。这说明病原菌的侵染后草菇激活了自身防御系统,增强抗氧化能力,促使其消除体内的过量活性氧,从而避免细胞氧化损伤。这与周春元等^[11]对有害疣孢霉侵染双孢蘑菇的研究一致,该研究发现有害疣孢霉侵染双孢蘑菇后,几种防御酶活性明显升高。草菇被病原菌侵染后PPO活性在48 h内先下降后上升,PPO在食用菌中参与酚类物质的氧化,可以将酚类物质氧化成醌类物质,这也是双孢菇采后褐变的主要原因^[27],草菇受*Pseudomonas sp. Z9*侵染后体内发挥了相似的防御机制。

通过LC-MS技术检测草菇子实体被*Pseudomonas sp. Z9*侵染后代谢物含量变化,结果发现,相较于对照组,*Pseudomonas sp. Z9*侵染后草菇子实体中共检测并鉴定到了131种显著差异代谢产物,主要代谢物有氨基酸、酚类化合物、黄酮类化合物、核苷酸、脂肪酸等,推测这些化合物在*Pseudomonas sp. Z9*侵染草菇中起到了重要的作用。Zhao等^[16]采用非靶向代谢组技术探究了低温胁迫下不同持续时间草菇菌丝的差异代谢物分析,结果表明,氨基酸、

有机酸、核苷酸、糖、脂肪酸、生物碱等物质在持续低温胁迫下影响了草菇的生长和保存。本研究中病原侵染引起的代谢物变化与低温胁迫下草菇的代谢物变化相似。

病原侵染草菇后烟酰胺显著下调,推测草菇在响应病原入侵时,抑制了草菇免疫信号传递。烟酰胺被认为是刺激植物免疫系统的初始信号分子,在植物体内能提高植物的抗逆性^[28]。Sidiq等^[29]报道,施用烟酰胺可触发抗氧化剂和抗真菌化合物的上调,从而有效抑制小麦赤霉病的侵染。*Pseudomonas sp. Z9*侵染会引起草菇的防御反应,其中一种重要的反应是合成一系列次生代谢产物,丁香酸是上调最多的代谢产物。鲁晓峰等^[30]发现丁香酸能降低草莓根系抗氧化酶活性及根系线粒体功能,丁香酸还有清除活性氧(reactive oxygen species, ROS)的功能。推测在*Pseudomonas sp. Z9*侵染后,草菇的活性氧含量可能会明显增加,从而刺激丁香酸的生物合成途径。丁香酸的升高可能是草菇对病原侵染的一个防御策略,减轻病原对细胞的损害。

通过KEGG通路富集分析,主要涉及的代谢通路有氨基酸代谢、中心碳代谢、次生代谢物的生物合成等,其中代谢产物富集最多的代谢通路是氨基酸代谢途径,该途径中色氨酸代谢、酪氨酸代谢是氨基酸代谢中差异代谢物富集较多的通路。Zhao等^[16]利用非靶向代谢组探究草菇对冷胁迫的响应机制,推测主要和氨基酸代谢、能量代谢等通路相关,这与病原侵染草菇的代谢组分析一致。吴志亮等^[31]利用蛋白质组学技术研究了草菇子实体的低温自溶,他们也认为草菇对冷胁迫的响应机制与能量代谢、氨基酸代谢、氨基肽酶活性、活性氧代谢、脂肪酸合成等相关。氨基酸是生物体内所有蛋

白质的基本组成单位,植物正常的生命活动离不开氨基酸代谢^[32]。色氨酸代谢途径产生的次生代谢物有一定的抗菌消炎作用,与植物的防御反应密切相关^[33],本研究中草菇被 *Pseudomonas sp.* Z9 侵染后, L-犬脲氨酸的含量显著上调,这与草菇抵御病原入侵密切相关。酪氨酸是黑色素的合成前体,在酪氨酸代谢途径中,酪氨酸被多酚氧化酶催化氧化为多巴胺,多巴胺进一步氧化为醌,最终转化为深色色素物质,如黑色素^[34-35]。Gao 等^[14]和 Cai 等^[15]发现羊肚菌和双孢蘑菇褐变的主要原因是酪氨酸代谢途径上调。在本研究中,酪氨酸显著下调表达,导致黑色素合成受阻,这可能是 *Pseudomonas sp.* Z9 侵染草菇产生黄色斑点,而不是褐色的关键物质之一。

本研究结果表明草菇被 *Pseudomonas sp.* Z9 侵染后差异代谢物发生了显著的变化,为认识 *Pseudomonas sp.* Z9 侵染草菇的分子机制奠定了基础。

REFERENCES

- [1] LIU Z, ZHANG K, LIN JF, GUO LQ. Breeding cold tolerance strain by chemical mutagenesis in *Volvariella volvacea*[J]. *Scientia Horticulturae*, 2011, 130(1): 18-24.
- [2] BAO DP, GONG M, ZHENG HJ, CHEN MJ, ZHANG L, WANG H, JIANG JP, WU L, ZHU YQ, ZHU G, ZHOU Y, LI CH, WANG SY, ZHAO Y, ZHAO GP, TAN Q. Sequencing and comparative analysis of the straw mushroom (*Volvariella volvacea*) genome[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58294.
- [3] WU JY, CHEN CH, CHANG WH, CHUNG KT, LIU YW, LU FJ, CHEN CH. Anti-cancer effects of protein extracts from *Calvatia lilacina*, *Pleurotus ostreatus* and *Volvariella volvacea*[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2011, 2011: 982368.
- [4] RUKSIRIWANICH W, SIRITHUNYALUG J, BOONPISUTTINANT K, JANTRAWUT P. Potent *in vitro* collagen biosynthesis stimulating and antioxidant activities of edible mushroom *Volvariella volvacea* aqueous extract[J]. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2014, 6(2): 406-412.
- [5] 王富民, 宫秀荣, 高君辉, 刘日新. 草菇保鲜技术及有关生理变化[J]. *上海农业学报*, 1992, 8(3): 60-66. WANG FM, GONG XR, GAO JH, LIU RX. The technique of keeping freshness of straw mushroom and related physiological changes[J]. *Acta Agriculturae Shanghai*, 1992, 8(3): 60-66 (in Chinese).
- [6] 刘坚真, 罗吟珍. 草菇褐腐病原细菌种的鉴定及抗病研究[J]. *华南农业大学学报*, 1993, 14(3): 17-21. LIU JZ, LUO YZ. Identification of pathogenic bacteria of straw mushroom brown rot disease and its control[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 1993, 14(3): 17-21 (in Chinese).
- [7] HEPPELRY PR, RAMOS-DÁVILA E. Bacterial basal rot of straw mushrooms[J]. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, 1986, 70(3): 219-221.
- [8] 王红, 刘岩岩, 李红, 曹君, 刘俊杰. 菌包后熟期高温胁迫对黑木耳生理特性及生长发育的影响[J]. *食用菌学报*, 2022, 29(5): 33-42. WANG H, LIU YY, LI H, CAO J, LIU JJ. Effects of heat stress on physiological characteristics and growth of *Auricularia heimuer* during late maturation[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2022, 29(5): 33-42 (in Chinese).
- [9] KÄRKÖNEN A, KUCHITSU K. Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants[J]. *Phytochemistry*, 2015, 112: 22-32.
- [10] 查磊, 陈明杰, 严舒瀚, 李传华, 汪虹, 奚莉萍, 王晨光, 赵妍. 15 °C贮藏下草菇的品质与生理生化分析[J]. *食品与机械*, 2018, 34(8): 110-114. ZHA L, CHEN MJ, YAN SH, LI CH, WANG H, XI LP, WANG CG, ZHAO Y. Morphological and physiological indexes of *Volvariella volvacea* during storage at 15 °C[J]. *Food & Machinery*, 2018, 34(8): 110-114 (in Chinese).
- [11] 周春元, 李玉. 双孢蘑菇不同品种感染有害疣孢霉后防御酶活性变化[J]. *菌物学报*, 2015, 34(3): 504-510. ZHOU CY, LI Y. Changes of defensive enzyme activities in different *Agaricus bisporus* varieties after inoculation with *Mycogone perniciosa*[J]. *Mycosystema*, 2015, 34(3): 504-510 (in Chinese).
- [12] 王丽宁, 赵梦然, 邬向丽, 黄晨阳, 曲积彬. 两个糙皮侧耳菌株的比较基因组学研究[J]. *菌物学报*, 2019, 38(12): 2133-2143. WANG LN, ZHAO MR, WU XL, HUANG CY, QU JB. Comparative genomic analyses of two *Pleurotus ostreatus* strains[J]. *Mycosystema*, 2019, 38(12): 2133-2143 (in Chinese).

- [13] 姜威. 低温胁迫下草菇抗氧化应答反应中关键酶的表达量变化及活性研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2014.
- JIANG W. Study on the expression changes and activities of key enzymes in the antioxidant response of *Volvariella volvacea* under low temperature stress[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [14] GAO FH, XIE WY, ZHANG H, LI ZY, LI SH, LI TP. Metabolomic analysis of browning mechanisms of morels (*Morchella sextelata*) during storage[J]. Postharvest Biology and Technology, 2022, 185: 111801.
- [15] CAI ZX, CHEN MY, LU YP, GUO ZJ, ZENG ZH, LIAO JH, ZENG H. Metabolomics and transcriptomics unravel the mechanism of browning resistance in *Agaricus bisporus*[J]. PLoS One, 2022, 17(3): e0255765.
- [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] DENG KJ, LAN XH, FANG Q, LI MK, XIE GB, XIE LY. Untargeted metabolomics reveals alterations in the primary metabolites and potential pathways in the vegetative growth of *Morchella sextelata*[J]. Frontiers in Molecular Biosciences, 2021, 8: 632341.
- [19] 罗阳兰, 王灿琴, 胡秀月, 韦仕岩, 韦娇君, 吴圣进. 利用非靶向代谢组学分析椴树加工副产物与常规基质栽培的肺形侧耳代谢物差异[J]. 食用菌学报, 2023, 30(2): 19-31.
- LUO YL, WANG CQ, HU XY, WEI SY, WEI JJ, WU SJ. Untargeted metabolomics analysis of *Pleurotus pulmonarius* cultivated with *Eucalyptus* processing byproducts and conventional substrates[J]. Acta Edulis Fungi, 2023, 30(2): 19-31 (in Chinese).
- [20] MORIDANI MY, O'BRIEN PJ. Iron complexes of deferiprone and dietary plant catechols as cytoprotective superoxide radical scavengers[J]. Biochemical Pharmacology, 2001, 62(12): 1579-1585.
- [21] 余科林, 方东路, 陈梅香, 胡秋辉, 赵立艳. 纳米聚乙烯包装结合打孔气调对草菇采后贮藏品质的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(16): 292-298.
- YU KL, FANG DL, CHEN MX, HU QH, ZHAO LY. Effect of perforation mediated nano-packaging on postharvest quality of *Volvariella volvacea* during storage[J]. Food Science, 2016, 37(16): 292-298 (in Chinese).
- [22] 裴斌, 张光灿, 张淑勇, 吴芹, 徐志强, 徐萍. 土壤干旱胁迫对沙棘叶片光合作用和抗氧化酶活性的影响[J]. 生态学报, 2013, 33(5): 1386-1396.
- PEI B, ZHANG GC, ZHANG SY, WU Q, XU ZQ, XU P. Effects of soil drought stress on photosynthetic characteristics and antioxidant enzyme activities in *Hippophae rhamnoides* Linn. seedlings[J]. Acta Ecologica Sinica, 2013, 33(5): 1386-1396 (in Chinese).
- [23] 赵妍, 查磊, 陈明杰, 严舒瀚, 张劲松, 马丹丹, 严培兰. 草菇 4 °C 贮藏期间的品质及生理生化研究[J]. 分子植物育种, 2018, 16(21): 7179-7186.
- ZHAO Y, ZHA L, CHEN MJ, YAN SH, ZHANG JS, MA DD, YAN PL. Morphological and physiological indexes of straw mushroom (*Volvariella volvacea*) during storage at 4 °C[J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(21): 7179-7186 (in Chinese).
- [24] LI Q, SONG J. Analysis of widely targeted metabolites of the eukaryote *Suaeda salsa* under saline conditions provides new insights into salt tolerance and nutritional value in halophytic species[J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 388.
- [25] 白静, 陈明杰, 唐利华, 杜军华, 冯志勇, 张津京, 陈辉. 温度对梯棱羊肚菌抗氧化酶活及其基因表达的影响[J]. 菌物学报, 2021, 40(12): 3276-3285.
- BAI J, CHEN MJ, TANG LH, DU JH, FENG ZY, ZHANG JJ, CHEN H. Effects of temperature on antioxidant enzyme activities and gene expression in *Morchella importuna*[J]. Mycosystema, 2021, 40(12): 3276-3285 (in Chinese).
- [26] 郭铭, 孙莉莎, 司二静, 姚立蓉, 汪军成, 李葆春, 杨轲, 孟亚雄, 马小乐, 王化俊. 大麦条纹病病菌对大麦叶片防御酶活性的影响[J]. 西北农业学报, 2021, 30(2): 295-303.
- GUO M, SUN LS, SI EJ, YAO LR, WANG JC, LI BC, YANG K, MENG YX, MA XL, WANG HJ. Effect of *Pyrenophora graminea* stress to defensive enzymes activity in barley leaves[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2021, 30(2): 295-303 (in Chinese).
- [27] JOLIVET S, ARPIN N, WICHERS HJ, PELLON G. *Agaricus bisporus* browning: a review[J]. Mycological

- Research, 1998, 102(12): 1459-1483.
- [28] BERGLUND T. Nicotinamide, a missing link in the early stress response in eukaryotic cells: a hypothesis with special reference to oxidative stress in plants[J]. FEBS Letters, 1994, 351(2): 145-149.
- [29] SIDIQ Y, NAKANO M, MORI YM, YAENO T, KIMURA M, NISHIUCHI T. Nicotinamide effectively suppresses *Fusarium* head blight in wheat plants[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(6): 2968.
- [30] 鲁晓峰, 杜国栋, 邵静, 张静茹, 孙海龙. 草莓根系线粒体对外源酚酸胁迫的生理响应[J]. 中国农业科学, 2021, 54(5): 1029-1042.
LU XF, DU GD, SHAO J, ZHANG JR, SUN HL. Physiological response of mitochondrial function of strawberry roots to exogenous phenolic acid[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2021, 54(5): 1029-1042 (in Chinese).
- [31] 吴志亮, 黄莹, 王则金. 草菇响应低温胁迫的差异蛋白质组学分析[J]. 食品科学, 2020, 41(19): 212-220.
WU ZL, HUANG Y, WANG ZJ. Differential proteomic analysis of the response of straw mushrooms (*Volvariella volvacea*) to cold stress[J]. Food Science, 2020, 41(19): 212-220 (in Chinese).
- [32] 宋奇超, 曹凤秋, 巩元勇, 程晓园, 毕昕媛, 刘来华. 高等植物氨基酸吸收与转运及生物学功能的研究进展[J]. 植物营养与肥料学报, 2012, 18(6): 1507-1517.
SONG QC, CAO FQ, GONG YY, CHENG XY, BI XY, LIU LH. Current research progresses of amino acids uptake, transport and their biological roles in higher plants[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2012, 18(6): 1507-1517 (in Chinese).
- [33] 苗玉焕. 色氨酸代谢与棉花抗黄萎病免疫调控[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2019.
MIAO YH. Signalling and regulatory roles of tryptophan metabolites in cotton immune system to *Verticillium dahliae*[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [34] SARANYA G, JIBY MV, JAYAKUMAR KS, PILLAI PP, JAYABASKARAN C. L-DOPA synthesis in *Mucuna pruriens* (L.) DC. is regulated by polyphenol oxidase and not CYP 450/tyrosine hydroxylase: an analysis of metabolic pathway using biochemical and molecular markers[J]. Phytochemistry, 2020, 178: 112467.
- [35] SOJO MM, NUÑEZ-DELICADO E, SÁNCHEZ-FERRER A, GARCÍA-CARMONA F. Oxidation of salsolinol by banana pulp polyphenol oxidase and its kinetic synergism with dopamine[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(11): 5543-5547.