

基于 $^1\text{H-NMR}$ 及 GC-MS 的中国块菌及其共生云南松的代谢物分析

周雪¹, 袁鹏宇¹, 安霜², 陈鹏至², 陈幽幽², 杨晓敏², 李宗菊^{1*}

1 云南大学生态与环境学院, 云南 昆明 650500

2 云南大学生命科学学院, 云南 昆明 650500

摘要: 采用代谢组学技术研究中国块菌(云南黑松露)及其共生云南松的小分子活性代谢产物。运用核磁共振($^1\text{H-NMR}$)和气相质谱(GC-MS)两种技术, 分析新鲜中国块菌成熟子实体及松根的代谢成分; 将 $^1\text{H-NMR}$ 及 GC-MS 数据导入 SMICA-P 软件进行多元统计分析, 比较二者的差异代谢物。在块菌子实体及松根中分别共检测到了苏氨酸、甘露二糖、延胡索酸、茶碱和表儿茶素等 64 个及 45 个化合物, 其中松醇、1-环己烯-1-甲酸、谷氨酸、海藻糖、甜菜碱等 25 种物质具有显著差异, 这些差异物质以碳代谢及氮代谢为主。两种方法互为补充, 扩大了检测范围。本研究为探明中国块菌与其共生松树的共生机理, 为今后中国块菌相关药物的开发及人工培养的研究提供了理论依据。

关键词: 中国块菌; 云南松; 松根; 核磁共振; 气相色谱质谱联用; 代谢物

[引用本文] 周雪, 袁鹏宇, 安霜, 陈鹏至, 陈幽幽, 杨晓敏, 李宗菊, 2022. 基于 $^1\text{H-NMR}$ 及 GC-MS 的中国块菌及其共生云南松的代谢物分析. 菌物学报, 41(1): 105-123

Zhou X, Yuan PY, An S, Chen PZ, Chen YY, Yang XM, Li ZJ, 2022. Analyses of metabolites of *Tuber sinense* and its symbiotic *Pinus yunnanensis* based on $^1\text{H-NMR}$ and GC-MS. Mycosystema, 41(1): 105-123

Analyses of metabolites of *Tuber sinense* and its symbiotic *Pinus yunnanensis* based on $^1\text{H-NMR}$ and GC-MS

ZHOU Xue¹, YUAN Pengyu¹, AN Shuang², CHEN Pengzhi², CHEN Youyou², YANG Xiaomin², LI Zongju^{1*}

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

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

Abstract: Small molecule active metabolites of *Tuber sinense* (Yunnan black truffle) and its symbiotic *Pinus yunnanensis* were studied by metabonomics technique. Nuclear magnetic

基金项目: 国家自然科学基金(31560575)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31560575).

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

ORCID: LI Zongju (0000-0001-7576-533x), ZHOU Xue (0000-0001-9323-0128)

Received: 2021-04-17, accepted: 2021-07-08

resonance (¹H-NMR) and gas phase mass spectrometry (GC-MS) were used to analyze the metabolic components of mature fruit-body of fresh *Tuber sinense* and pine root. The ¹H-NMR and GC-MS data were imported into SMICA-P software for multivariate statistical analysis, and the differential metabolites between them were compared. A total of 64 and 45 compounds, including threonine, mannobiose, fumaric acid, theophylline and epicatechin, was detected in truffle and pine roots, respectively, among which, 25 compounds, such as terpenol, 1-cyclohexene-1-formic acid, glutamate, trehalose and betaine, showed significant differences, and these differential compounds were mainly related to carbon metabolism and nitrogen metabolism. Mutual complement of the two methods can expand the detection range. This study provides a reference for exploring the symbiotic mechanism of *Tuber sinense* and its symbiotic pine and developing *Tuber sinense* related drugs and artificial culture in future.

Keywords: *Tuber sinense*; *Pinus yunnanensis*; pine root; nuclear magnetic resonance; gas chromatography-mass spectrometry; metabolites

中国块菌 *Tuber sinense* K. Tao & B. Liu 隶属于子囊菌门 Ascomycota、子囊菌纲 Ascomycetes、盘菌亚纲 Pezizomycetidae、盘菌目 Pezizales、块菌科 Tuberaceae、块菌属 *Tuber* F.H. Wigg, 是一种地下生的大型真菌, 别名猪拱菌、无娘果等。中国块菌子囊果呈不规则的球形、半球形或块状, 其表皮上有棕色或黑褐色的疣突, 成熟的块菌切面呈暗褐色或黑色, 具有白色的大理石纹样(张世奇和阚建全 2011; 清源等 2015; 游金坤等 2015; 卯晓岚 2000)。中国块菌主要生长于针、阔叶混交林下, 与松科、壳斗科等植物共生, 为外共生菌根真菌, 因其共生机理研究薄弱, 目前尚不能人工培养(陈应龙 2001; 韩省华 2010)。块菌香气特殊, 因此其化学成分的研究主要集中于挥发性风味物质的定性及定量分析, 在挥发性风味成分中含量较多的是 1-辛烯-3-醇、3-辛醇、2-辛烯-1-醇、1-辛烯-3-酮等八碳化合物(Culleré *et al.* 2012; 李小林等 2015; Splivallo & Ebeler 2015; 李杨等 2021)。近年的研究表明, 块菌提取物具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、抗病毒、抑菌、保肝护肝等多种生理活性(Janakat *et al.* 2005; Al-Laith 2010; Patel 2012; Friedman 2015; 呼鑫荣等 2017; 范勇 2020), 因此被称为预防疾病的“黑色钻石”。

中国块菌为云南的名贵野生菌, 其广泛分布

于滇东、滇西、滇东南地区, 如禄劝、武定、禄丰、楚雄、大理、迪庆、文山等地, 且大多发现于云南松 *Pinus yunnanensis* Franch 林下(薛燕等 2020), 与云南松共生。

代谢组学技术是近年依赖核磁共振(¹H-NMR)、气相质谱(GC-MS)、液质质谱(LC-MS)³大平台及日趋完善的代谢数据库快速发展起来的一种高通量分析技术, 其以代谢组群指标分析为基础, 可对生物的代谢成分进行无差别、整体、全面的分析。目前已广泛用于动物、植物的研究(王小娟等 2010; 李静等 2017; 齐彦爽等 2019), 在菌物研究中报道尚少。因此本研究以采自云南松林下的新鲜块菌成熟子实体为研究材料, 运用¹H-NMR及GC-MS两种技术, 对中国块菌及其共生云南松的小分子代谢产物进行了初步的研究, 并对其差异物质及代谢通路进行了分析, 旨在为探明中国块菌与其共生松树的共生机理和今后中国块菌相关药物的开发及人工培养的研究提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料

新鲜的中国块菌子实体(图 1)及松根:取自云

南省禄劝县新华村;块菌经昆明食用菌研究所鉴定为中国块菌 *Tuber sinense*, 标本号为 YNTuber-1; 松根为云南松 *Pinus yunnanensis* 的细根, 标本号为 YNpinus-6; 标本皆保存于云南大学生命科学学院植物标本馆。



图1 中国块菌子实体及其横截面

Fig. 1 A *Tuber sinense* fruiting body and its cross section.

1.1.2 主要试剂和仪器

D₂O (99.9%, TSP, 0.05%); 甲醇; 甲氧胺盐酸盐(20 mg/mL: 准确称取 200 mg 的甲氧胺盐酸盐, 加入 10 mL 吡啶中, 充分溶解, 现配现用); 吡啶; 99% BSTFA+1% TMCS (99%双三甲基硅烷基三氟乙酰胺+1%三甲基氯硅烷); 核糖醇。600 兆核磁共振仪 (Bruker 600-MHz AVANCE III NMR Spectrometer, 德国布鲁克公司); PTFE 针头过滤器(0.22 μm, 天津市津腾实验设备有限公司); 气相色谱-质谱联用仪(HP6890GC/5973MS, 美国 Agilent Technologies 公司)等。

1.2 样品制备

1.2.1 中国块菌

在无菌条件下分离块菌无菌子实体组织块,

切碎, 加入液氮, 迅速将组织块研磨成粉末状, 然后放入 5 mL 无菌冻存管中并置于-80 °C超低温冰箱冷藏 6 h 以上, 再进行真空冷冻干燥 48 h 至水分完全去除, 用胶带密封管口后放入加有干燥剂的塑料袋中, 扎紧袋口, 于-80 °C冷藏备用。

1.2.2 松根

将新鲜的松树细根用无菌水洗净、晾干, 使用粉碎机将其打碎; 加入液氮, 迅速研磨成粉末状。其余步骤同上。

1.3 ¹H-NMR 分析

1.3.1 ¹H-NMR 提取溶剂的选择

本实验室前期通过水、甲醇、丙酮、氯仿、水与甲醇(1:1)、水与丙酮(1:1)、水与氯仿(1:1)、水+氯仿+甲醇(1:2:1) 8 种溶剂的初筛实验表明, 水提取出来的化合物种类较多, 所以本实验室 ¹H-NMR 用水作为提取溶剂。具体提取方法见 1.3.2, 加入的 8 种溶剂分别为 1 mL D₂O、1 mL MeOD、1 mL C₃D₆O、1 mL CDCl₃、500 μL MeOD+500 μL D₂O、500 μL C₃D₆O+500 μL D₂O、500 μL CDCl₃+500 μL D₂O、1 mL CDCl₃+500 μL D₂O+500 μL MeOD。

1.3.2 ¹H-NMR 样品制备

精确称量 80 mg 前期准备好的块菌及松根冻干粉, 放于 2 mL 离心管中, 迅速加入 1 mL D₂O (先加入 1.232 g KH₂PO₄, 再用 1 mol/L NaOD 调节 pH 值至 6.8, 含 TSP 0.05%); 在 4 °C 下涡旋 2 min 后, 在冰浴条件下超声 40 min; 取出后, 于 4 °C、13 000 r/min 下离心 10 min; 用 1 mL 无菌注射器吸取其上清液, 经 0.45 μL 聚四氟乙烯 (PTFE)超滤膜过滤; 取滤液 600 μL 装入核磁管中待上样(王小娟等 2010; 苗廷廷 2017)。

1.3.3 ¹H-NMR 数据采集

测定温度为 25 °C, ¹H 核的共振频率为 600.13 MHz, 采用压制水峰的 noesypprld 序列, 谱宽为 8 000 Hz, 采样点数为 32 K, 信号扫描累加 64 次, 数据点 65 536, 均以 0.05% TSP 为内标。手动进行相位、基线以及峰校正。所有的 FID

设定线宽因子为 0.3 Hz。

1.3.4 ¹H-NMR 数据定性分析

将 ¹H-NMR 自由感应衰减(free induction decay, FID)信号导入到 Chenomx NMR suit (version 8.6, Chenomx, Edmonton, Canada)软件中, 自动进行傅里叶转换, 调整相位, 校正基线。以 TSP 峰(δ 0.0)作为全部谱图化学位移的基准, 并对其进行反转卷积操作, 调整谱图峰型(CSI)。根据 ¹H-NMR 谱图中信号的相关信息(如化学位移、峰型、半峰宽、耦合裂分等), 结合 Chenomx 自带数据库对样本谱图的信号逐一比对分析, 再结合核磁共振氢谱化学位移的 3 个区域: 芳香区(δ 10.00–5.50)、糖区(δ 5.50–3.50)和氨基酸区(δ 3.50–0.00)对代谢产物进行指认。

1.3.5 ¹H-NMR 相对定量分析

采用 MestReNova (version 9.0, Mestrelab Research, Santiago de Compostella, Spain)对核磁图谱进行傅里叶转换并手动调整相位、基线, 同时以 TSP 的化学位移(δ =0.00)进行化学位移校正。以 δ 0.04 积分段对化学位移区间 δ 0.5–9.9 进行分段积分, 水相核磁图谱中去除水峰 δ 4.70–5.02 积分区间。分段积分值进行峰面积归一化处理, 使数据集中在 0–1 内, 保存在 Excel 文档, 用于后续多元统计分析。

1.4 GC-MS 分析

1.4.1 GC-MS 样品制备

分别称取 80 mg 的块菌及松根冻干粉于 2 mL 离心管中(每个样重复称取 4 管), 迅速加入 1.5 mL 预冷的混合溶剂(甲醇:三氯甲烷:水=1:1:1), 将其漩涡震荡 2 min 后, 于冰浴中进行 45 KHz 超声波辅助萃取 1 h; 取出, 于 4 °C、13 000 r/min 下离心 10 min; 将甲醇/水相提取物(400 μ L)置于新的 2 mL 离心管中, 加入 100 μ L 20 mg/mL 的核糖醇作为内标, 混匀后用真空浓缩仪将其完全蒸干; 接着进行衍生化处理: 先加入 100 μ L 盐酸羟胺吡啶溶液(将盐酸羟胺溶于吡啶中, 浓度为

20 mg/mL), 漩涡振荡 2 min 后, 置于烘箱中 37 °C 温浴 120 min, 再加入 100 μ L 衍生化试剂(99% BSTFA+1% TMCS), 密封后于 37 °C 反应 90 min, 用 1 mL 注射器吸取液体, 经 0.22 μ m 聚四氟乙烯(PTFE)超滤膜过滤至气相小瓶中, 待上机检测(孙时伟 2015)。

1.4.2 GC-MS 上样条件

色谱分离条件: HP-5 MS 石英毛细管柱(30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 mm); 柱温起始温度 150 °C, 以 2 °C/min 程序升温至 200 °C, 再 5 °C/min 升温至 280 °C, 保持 20 min; 柱流量为 1.0 mL/min; 进样口温度为 250 °C; 柱前压 100 kPa; 进样量 1.0 mL; 分流比 2:1; 载气为高纯氦气。质谱条件: 电离方式为 EI; 电子能量为 70 eV; 传输线温度为 250 °C; 离子源温度为 230 °C; 四极杆温度为 150 °C; 质量范围为 m/z 35–500。

1.4.3 谱图预处理

将所有的 GC-MS 原始数据(Raw 格式)通过 Agilent 工作站导出为 net CDF 格式。将 net CDF 格式的 GC-MS 图谱导入 XCMS-online 进行峰提取、峰对齐、切割、滤噪代谢特征提取等预处理, 去除柱流失、样品制备过程中的杂质峰等外界因素的干扰后, 导入 Excel 中对数据进行归一化。

1.4.4 代谢产物的定性和定量

原始谱图背景扣除, 保留时间校正和 AMDIS 软件解卷积积分(除噪、峰匹配)操作再结合 NIST (2014), PBM 标准谱库, HMDB 数据库 (<http://www.hmdb.ca/>), 标准品对代谢物逐一进行检索和定性。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, 做相对定量分析, 并用 TBtools 软件进行含量热图绘制。

1.5 差异代谢物分析

将 ¹H-NMR 和 GC-MS 积分数据分别矩阵导入 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(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,采用统计分析软件 SPSS 25 进行方差分析,显著性分析采用 t 检验,其中 P 值小于 0.05 的组分被认为是具有显著性差异物质, P 值小于 0.01 的组分认为是具有极显著性差异的物质。

1.6 代谢通路分析

将所筛选出的差异代谢物在 Metaboanalyst 4.0 平台(<https://www.metaboanalyst.ca/>)的 Pathway Analysis 模块里进行检索,再通过差异代谢物对 HMDB、KEGG 和 PubChem 等数据库进行映射,对差异代谢物进行匹配和标准化,获得相应信息之后,通过选择特定的路径分析算法(包括过表达分析和拓扑分析)和对应的路径库进行检索和通路分析,进而找到与差异代谢物相关性最高的通路。

2 结果与分析

2.1 核磁共振($^1\text{H-NMR}$)

通过与 Chenomx NMR suit 数据库、BMRB 数据库中的标准物质图谱对照,对 $^1\text{H-NMR}$ 峰谱进行分析,块菌共指认出 40 种水溶性化合物(表 1),其中氨基酸及其衍生物类有 20 个,酸类有 5 个,醇类有 3 个,糖类有 5 个,以及其他类(胆酸盐、泛酸盐、胱硫醚、乙酰胆碱、甜菜碱、茶碱、表儿茶素)7 个(图 2)。松根共指认出 25 个水溶性化合物,其中氨基酸及其衍生物类有 10 个,糖及糖苷类有 5 个,醇类有 3 个,有机酸类有 3 个,其他类(肌醇、胆碱、1,3-二羟基丙酮、丙酮)有 4 个(图 3)。

2.2 气相色谱质谱联用(GC-MS)

中国块菌子实体色谱峰经 NIST14 数据库进行逐一检索和匹配,共指认出 30 个化合物,其中氨基酸及其衍生物类有 11 个,酸类有 10 个,糖及糖苷类有 6 个,醇类有 3 个。松根色谱峰共指认出 26 个化合物,其中酸类有 8 个,糖及糖苷类有 10 个,醇类有 5 个,其他类有 3 个(图 4、图 5 和表 2)。

2.3 两种检测方法的比较

利用两种方法,中国块菌中共检测出 64 个物质,松根共检测出 45 个物质, $^1\text{H-NMR}$ 技术检测到的物质多于 GC-MS,且从共同检测到的物质来看前者灵敏度较高(图 6–图 9)。总体上看两种方法互为补充,扩大了检测范围。

2.4 中国块菌和松根的差异代谢物分析

2.4.1 主成分分析(PCA)

在主成分分析散点图 10A 中,块菌组内 4 个重复样 SL1、SL3 与 SL2、SL4 相对分散,但全部位于横轴的负半轴,松根组全部位于横轴的正半轴,分离趋势明显,且无异常值存在,说明两组数据间存在明显差异;PCA 虽能反映不同样本之间的整体差别及数据原始的状态,但属于无监督的分析方法,在分析差异成分时不能忽略组内误差和消除随机误差,因此,需要采用有监督的正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)来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(图 10B),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 $-0.114<0$,验证结果显示模型有效,且说明两组之间的化学差异具有统计学意义;图 10C 为 OPLS-DA 散点图,OPLS 模型验证参数 $P=5.75\text{E-}06<0.05$,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;图 10D 为 S-plots 图,图中组成“S”曲线的每一个点代表一个变量,其中表示一个变量的点距离原点越远,表明该变量对这组

表 1 中国块菌子实体与云南松松根的 ¹H-NMR 峰指认Table 1 Assignments of ¹H-NMR peak of *Tuber sinense* fruiting bodies and *Pinus yunnanensis* roots

序号 No.	化合物名称 Compound	化学位移 δ_{H}	相对峰面积 Relative peak area	
			SL	SG
1	Alloisoleucine 别异亮氨酸	0.960 (d, $J=6$ Hz); 0.931 (t, $J=7.2$ Hz)	0.461±0.068	0.069±0.06
2	Valine 缬氨酸	1.015 (d, $J=7.2$ Hz); 0.994 (d, $J=7.2$ Hz)	0.355±0.064	
3	Isobutyrate 异丁酸	1.047 (d, $J=6.6$ Hz)	0.245±0.036	
4	Ethanol 乙醇	1.186 (t, $J=7.2$ Hz)	0.045±0.005	
5	Cholate 胆酸盐	1.288 (m)	0.886±0.203	
6	Threonine 苏氨酸	1.333 (d, $J=6.6$ Hz); 3.579 (d, $J=7.2$ Hz)	3.346±0.256	0.275±0.024
7	Alanine 丙氨酸	1.480 (d, $J=7.2$ Hz)	1.125±0.478	0.002±0.001
8	Citrulline 瓜氨酸	1.538 (m); 1.556 (m)	0.359±0.031	
9	Arginine 精氨酸	1.934 (m); 1.905 (m); 1.731 (m); 1.649 (m)	2.918±0.728	
10	Tiglylglycine 虎甘氨酸	1.838 (s); 1.783 (d, $J=3$ Hz)	2.612±0.773	
11	5-Hydroxylysine 5-羟基赖氨酸	3.166 (m); 3.158 (m)	1.252±0.224	
12	Glutamine 谷氨酰胺	2.464 (m); 2.437 (m); 2.156 (m); 2.117 (m)	3.266±3.266	
13	4-Aminobutyrate 4-氨基丁酸	2.302 (t, $J=7.8$ Hz)	0.219±0.023	
14	Glutamate 谷氨酸	2.373 (m); 2.340 (m)	1.033±0.366	
15	Isocitrate 异柠檬酸盐	2.548 (m); 2.494 (m)	1.751±0.505	
16	Malate 苹果酸	2.681 (dd, $J_1=3$, $J_2=15$ Hz)	0.720±0.221	
17	Cystathionine 胱硫醚	2.738 (m)	0.684±0.241	
18	Asparagine 天冬酰胺	2.959 (dd, $J_1=4.2$, $J_2=16.8$ Hz)	0.197±0.045	
19	Lysine 赖氨酸	3.015 (t, $J=7.8$ Hz)	0.224±0.016	
20	Saccharopine 酵母氨酸	3.076 (m); 3.044 (m)	0.297±0.044	
21	Homocitrulline 高瓜氨酸	3.107 (m)	0.228±0.058	
22	Acetylcholine 乙酰胆碱	3.207 (s)	0.566±0.175	

待续

续表 1

23	Betaine 甜菜碱	3.235 (s)	2.312±0.278	0.073±0.008
24	Glucose-6-phosphate 6-磷酸葡萄糖	3.269 (t, $J=6$ Hz)	1.370±0.407	
25	Cellobiose 纤维二糖	3.742 (m); 3.725 (m); 3.335 (t, $J=9.6$ Hz)	3.562±0.357	
26	Glucose 葡萄糖	5.236 (d, $J=3.6$ Hz); 4.650 (d, $J=7.8$ Hz); 3.829 (m); 3.536 (d, $J=3$ Hz); 3.492 (m); 3.469 (m); 3.413 (m); 3.403 (m)	6.611±0.781	0.240±0.053
27	Glycine 甘氨酸	3.554 (s)	0.795±0.063	0.766±0.064
28	Theophylline 茶碱	3.564 (s)	0.769±0.144	
29	Sarcosine 肌氨酸	3.607 (s)	1.588±0.177	0.046±0.004
30	Mannose 甘露糖	3.655 (m); 3.652 (m)	9.024±0.430	
31	Ethyleneglycol 乙二醇	3.663 (s)	0.652±0.136	
32	2-Aminobutyrate 2-氨基丁酸	3.682 (t, $J=6.6$ Hz)	4.087±0.193	
33	Sucrose 蔗糖	3.825 (m); 3.781 (m); 3.774 (m)	8.715±0.556	
34	Mannitol 甘露醇	3.873 (dd, $J_1=2.4$, $J_2=12$ Hz)	3.354±0.679	1.623±0.149
35	2-Phosphoglycerate 2-磷酸甘油酸	4.503 (m)	0.316±0.064	
36	Epicatechin 表儿茶素	5.026 (s)	0.007±0.007	
37	Fumarate 延胡索酸	6.524 (s)	0.025±0.008	0.117±0.006
38	Tyrosine 酪氨酸	6.897 (d, $J=8.4$ Hz)	0.038±0.006	
39	Phenylalanine 苯丙氨酸	7.430 (t, $J=7.2$ Hz); 7.378 (t, $J=7.2$ Hz); 7.331 (d, $J=7.8$ Hz)	0.120±0.065	1.555±0.117
40	Pantothenate 泛酸盐	8.006 (s)	0.007±0.002	
41	Proline 脯氨酸	1.97 (m); 2.02 (m); 2.05 (m); 2.36 (m); 3.34 (m)	0.357±0.066	
42	Glycylproline 甘氨酸脯氨酸	3.569 (m); 3.537 (m)	1.517±0.173	
43	Asparate 天冬氨酸	2.82 (dd, $J_1=6$, $J_2=12$ Hz)	0.948±0.082	
44	Fructose 果糖	4.099 (s); 3.808 (d, $J=10.2$ Hz); 3.793 (d, $J=9$ Hz)	0.508±0.047	
45	Trehalose 海藻糖	3.45 (t, $J=9.0$ Hz); 5.20 (d, $J=3.6$ Hz)	0.302±0.044	
46	Fucose 岩藻糖	1.241 (d, $J=7.8$ Hz); 1.207 (d, $J=6$ Hz)	0.537±0.045	

待续

续表 1

47	Arabinose 阿拉伯糖	4.516 (d, $J=8.4$ Hz)	0.127±0.021
48	Arabinitol 阿拉伯糖醇	3.841 (dd, $J_1=3$, $J_2=13.8$ Hz); 3.667 (m); 3.641 (m)	0.962±0.078
49	myo-Inositol 肌醇	3.623 (d, $J=8.4$ Hz)	0.368±0.042
50	4-Carboxyglutamate 4-羧基谷氨酸盐	3.707 (dd, $J_1=2.4$, $J_2=11.4$ Hz)	1.706±0.146
51	Gluconate 葡萄糖酸盐	4.033 (s)	0.394±0.026
52	Choline 胆碱	3.21 (s)	0.011±0.008
53	O-Phosphocholine 磷酸胆碱	4.148 (s)	0.438±0.031
54	1,3-Dihydroxyacetone 1,3-二羟基丙酮	4.409 (s)	0.257±0.022
55	Acetone 丙酮	2.225 (s)	0.111±0.011

注：SL：中国块菌；SG：松根

Note: SL: *Tuber sinense*; SG: *Pinus yunnanensis* root.

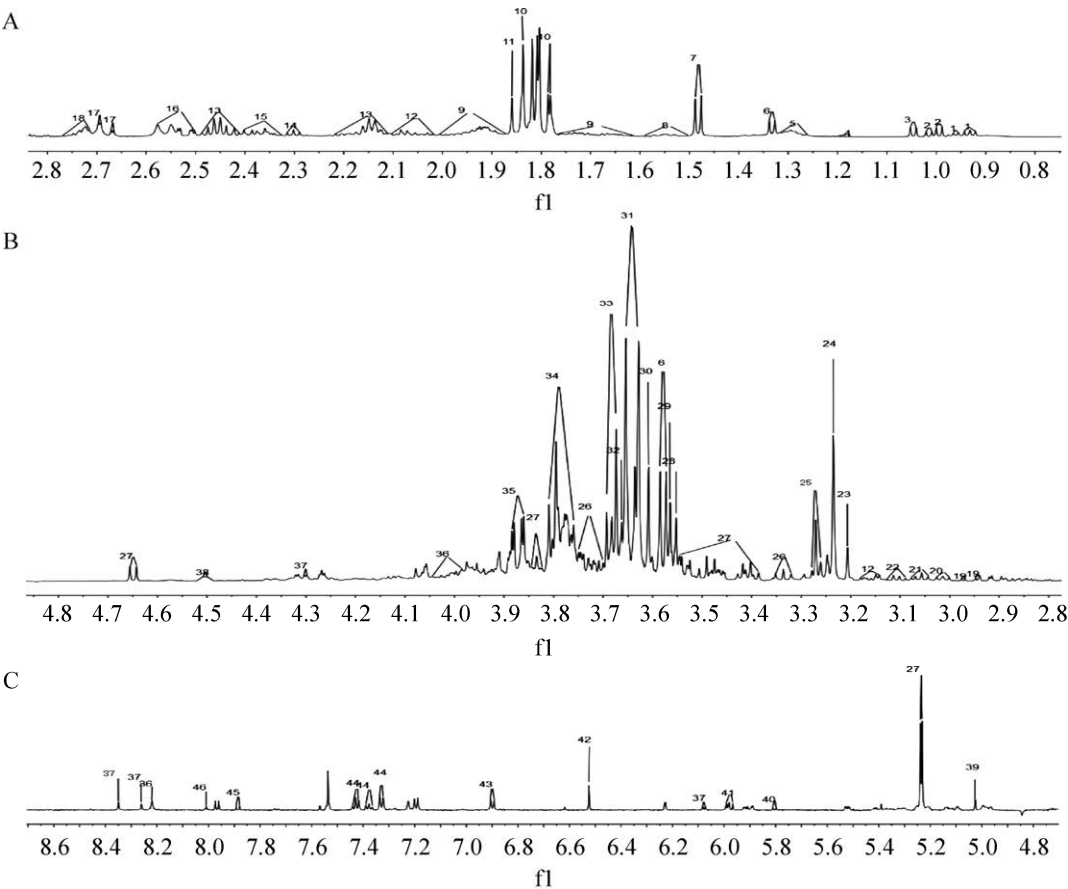


图 2 中国块菌子实体水溶性提取物 ¹H-NMR 指认图谱

Fig. 2 ¹H-NMR identified spectra of water-soluble extract of *Tuber sinense* fruiting bodies. A: δ 0.8–2.8; B: δ 2.8–4.8; C: δ 4.8–8.6.

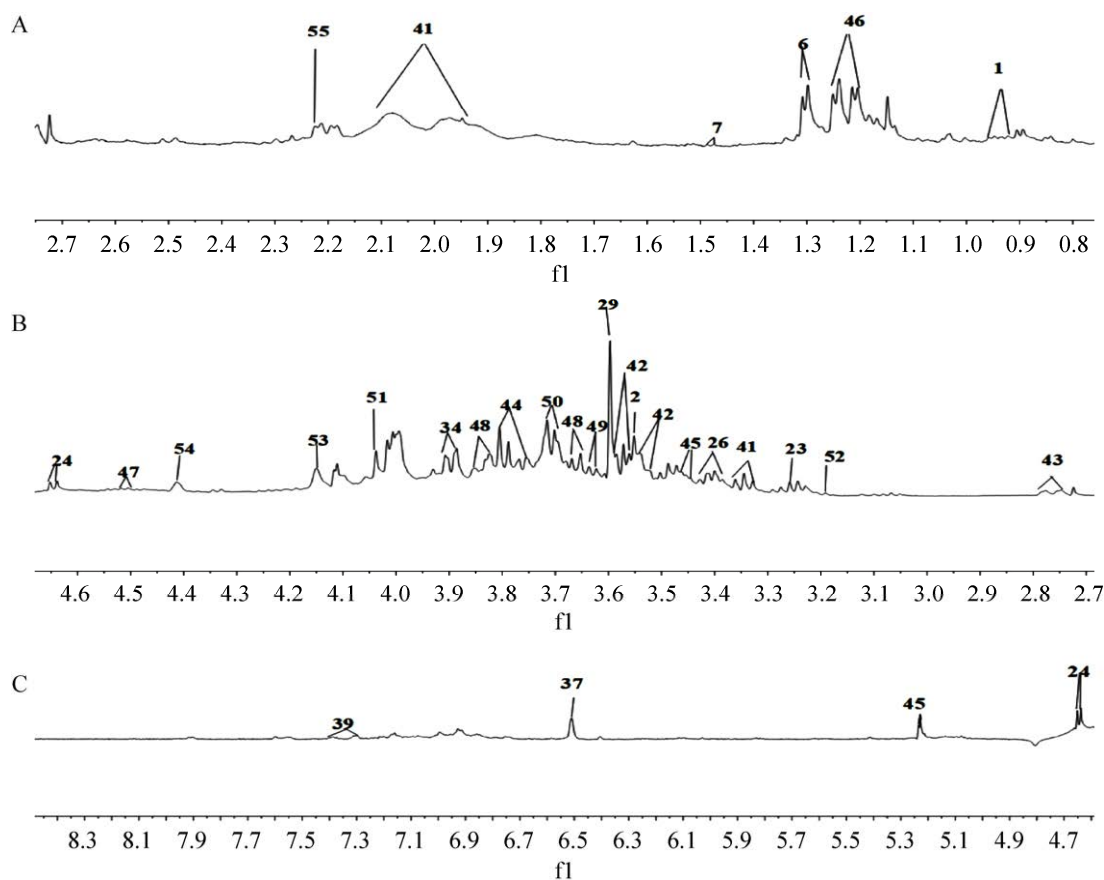


图3 松根水溶性提取物 $^1\text{H-NMR}$ 指认图谱

Fig. 3 $^1\text{H-NMR}$ identified spectra of water-soluble extract of *Pinus yunnanensis* root. A: δ 0.8–2.7; B: δ 2.7–4.6; C: δ 4.6–8.5.

差异的置信水平越高, 结合图 E 中 $\text{VIP}>1$ 以及独立样本 t 检验 $P<0.05$ 来筛选出具有显著性差异的代谢物。

筛选出的差异代谢产物及含量见图 11, 有 16 个差异代谢产物。其中阿拉伯糖醇和 4-羧基谷氨酸盐仅存在于松根中, 精氨酸、肌苷、谷氨酸、虎甘氨酸、谷氨酰胺、2-氨基丁酸、蔗糖、纤维二糖、6-磷酸葡萄糖以及异柠檬酸盐为块菌特有, 苏氨酸、肌氨酸、葡萄糖、甜菜碱 4 个物质, 在块菌中极显著高于松根。

2.4.2 基于 GC-MS 技术的块菌和松根的差异代谢物分析

通过多元统计学分析表明, 两组数据在第一主成分上有明显的分离, 模型建立参数 $P=2.60\text{E-}$

$05<0.05$, 显示出模型具有较好的预测能力, 可用于进一步的差异代谢产物分析。模型验证后筛选出的差异代谢产物及含量见图 12, 有 9 个差异代谢产物。松醇和 1-环己烯-1-甲酸仅存在于松根中, 甘氨酸和柠康酸仅存在于块菌中, 除果糖以外, 山梨醇、肌醇、琥珀酸、海藻糖在块菌中的含量显著高于松根。

2.5 中国块菌和云南松松根之间差异代谢物的代谢通路分析

通过两种技术检测到的所有块菌与松根之间的差异代谢产物的代谢通路分析结果见图 13。图中 Y 轴基于 P 值(来自通路富集分析), X 轴基于代谢通路影响值(来自通路拓扑分析); 节点颜色受 P 值影响, 由浅到深, P 值由大到

表 2 中国块菌子实体及松根的 GC-MS 峰的指认

Table 2 Assignment of GC-MS peak of *Tuber sinense* fruiting bodies and *Pinus yunnanensis* roots

序号 No.	保留时间 RT (min)	代谢产物名称 Metabolites	分子式 Formula	分子量 m/z	相对峰面积 Relative peak area	
					SL	SG
1	3.037	Propanoic acid 丙酸	C ₃ H ₆ O ₂	74.08	0.092±0.030	0.017±0.006
2	3.97	L-Valine 缬氨酸	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.15	0.029±0.013	
3	4.198	l-Alanine 丙氨酸	C ₃ H ₇ NO ₂	89.09	0.059±0.032	
4	4.44	Glycine 甘氨酸	C ₂ H ₅ NO ₂	75.07	0.089±0.019	
5	4.838	Ethanedioic acid 乙二酸	H ₂ C ₂ O ₄	90.03	0.033±0.005	0.013±0.006
6	7.418	Serine 丝氨酸	C ₃ H ₇ NO ₃	105.09	0.053±0.013	
7	7.821	L-Leucine 亮氨酸	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.17	0.006±0.003	
8	8.44	l-Threonine 苏氨酸	C ₄ H ₉ NO ₃	119.12	0.066±0.021	
9	8.908	Butanedioic acid 琥珀酸	C ₄ H ₆ O ₄	118.09	0.490±0.041	0.024±0.008
10	9.897	2-Butenedioic acid 柠康酸	C ₅ H ₆ O ₄	130.1	0.092±0.010	
11	11.641	l-Aspartic acid 天门冬氨酸	C ₄ H ₇ NO ₄	133.10	0.008±0.004	
12	15.805	L-Proline 脯氨酸	C ₅ H ₉ NO ₂	115.13	0.152±0.013	
13	15.935	Meso-Erythritol 赤藓糖醇	C ₄ H ₁₀ O ₄	122.12	0.046±0.019	
14	17.51	3-Pyridinecarboxylic acid 烟酸	C ₆ H ₅ NO ₂	123.11	0.014±0.006	
15	17.977	Pentanedioic acid 戊二酸	C ₅ H ₈ O ₄	132.11	0.005±0.002	
16	18.422	L-Asparagine 天冬酰胺	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	132.12	0.035±0.018	
17	19.514	Glutamic acid 谷氨酸	C ₅ H ₉ NO ₄	147.13	0.042±0.010	
18	25.723	2-Keto-l-gluconic acid 2-酮基-D-葡萄糖酸	C ₆ H ₁₀ O ₇	194.14	0.079±0.005	
19	26.857	1,2,3-Propanetricarboxylic acid 1,2,3-丙三羧酸	C ₆ H ₈ O ₆	176.12	1.741±0.864	
20	27.185	Lysine 赖氨酸	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	146.19	0.036±0.010	
21	28.837	D-(-)-Fructose 果糖	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.16	0.026±0.362	1.104±0.365
22	29.691	d-Glucose 葡萄糖	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.16	0.613±0.117	0.426±0.141
23	30.17	D-Allose 阿洛糖	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.15	0.111±2.784	
24	32.395	Glucopyranose 吡喃葡萄糖	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.16	0.043±0.025	
25	32.86	D-Gluconic acid 葡萄糖酸	C ₆ H ₁₂ O ₇	196.16	0.012±0.006	0.015±0.005
26	33.042	Hexadecanoic acid 棕榈酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.42	0.032±0.005	0.032±0.020
27	38.103	Octadecanoic acid 硬脂酸	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284.48	0.037±0.010	0.018±0.015
28	38.42	Glucitol 山梨醇	C ₆ H ₁₄ O ₆	182.17	4.838±0.027	0.025±0.009
29	47.856	D-(+)-Trehalose 海藻糖	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.30	0.187±0.019	0.023±0.008
30	48.669	D-Myo-Inisitol 肌醇	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.16	1.262±0.004	
31	5.501	Pentasiloxane 十二甲基五硅氧烷	C ₁₂ H ₃₆ O ₄ Si ₅	384.84	0.001±0.001	
32	17.72	L-Threonic acid 苏糖酸	C ₄ H ₈ O ₅	136.10	0.003±0.001	
33	21.288	DL-Arabinose 阿拉伯糖	C ₅ H ₁₀ O ₅	150.13	0.009±0.003	
34	22.459	Levogluconan 内醚糖	C ₆ H ₁₀ O ₅	162.14	0.001±0.001	
35	22.57	Xylitol 木糖醇	C ₅ H ₁₂ O ₅	152.15	0.004±0.001	
36	26.371	1-Cyclohexene-1-carboxylic acid 1-环己烯-1-甲酸	C ₇ H ₁₀ O ₂	126.15	0.302±0.101	
37	27.226	D-Pinitol 松醇	C ₇ H ₁₄ O ₆	194.18	0.714±0.236	
38	30.003	d-Mannose 甘露糖	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.16	0.073±0.025	
39	30.447	D-Mannitol 甘露醇	C ₆ H ₁₄ O ₆	182.17	0.022±0.007	
40	35.078	Myo-Inositol 肌醇	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.16	0.133±0.045	
41	35.709	2-Propenoic acid	C ₁₅ H ₂₈ O ₂	240.38	0.009±0.003	

待续

续表 2

		正十一烷基甲基丙烯酸酯			
42	44.695	3- α -Mannobiose 甘露二糖	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.40	0.050 $\pm$ 0.017
43	46.29	β -Gentiobiose 龙胆二糖	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.30	0.052 $\pm$ 0.017
44	50.194	Aucubin 桃叶珊瑚苷	$C_{15}H_{22}O_9$	346.33	0.016 $\pm$ 0.004
45	44.057	D-(+)-Cellobiose 纤维二糖	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.30	0.006 $\pm$ 0.004
46	46.214	α -D-Glucopyranoside 吡喃葡萄糖苷	$C_{26}H_{44}O_8$	484.63	0.028 $\pm$ 0.006

注: SL: 中国块菌; SG: 松根
Note: SL: *Tuber sinense*; SG: *Pinus yunnanensis* root.

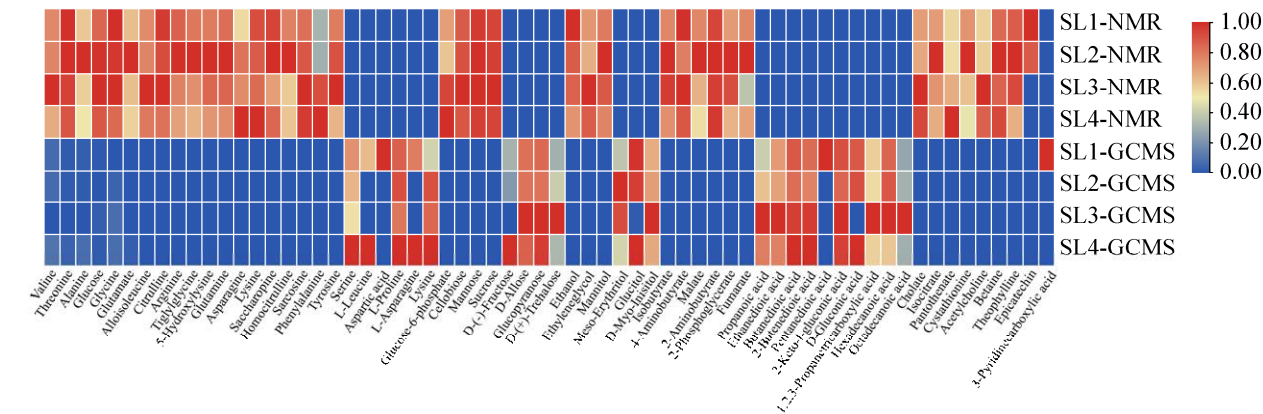


图 6 两种方法检测的中国块菌子实体的代谢产物及其含量
Fig. 6 Metabolites and their content of *Tuber sinense* fruit bodies detected by two methods.

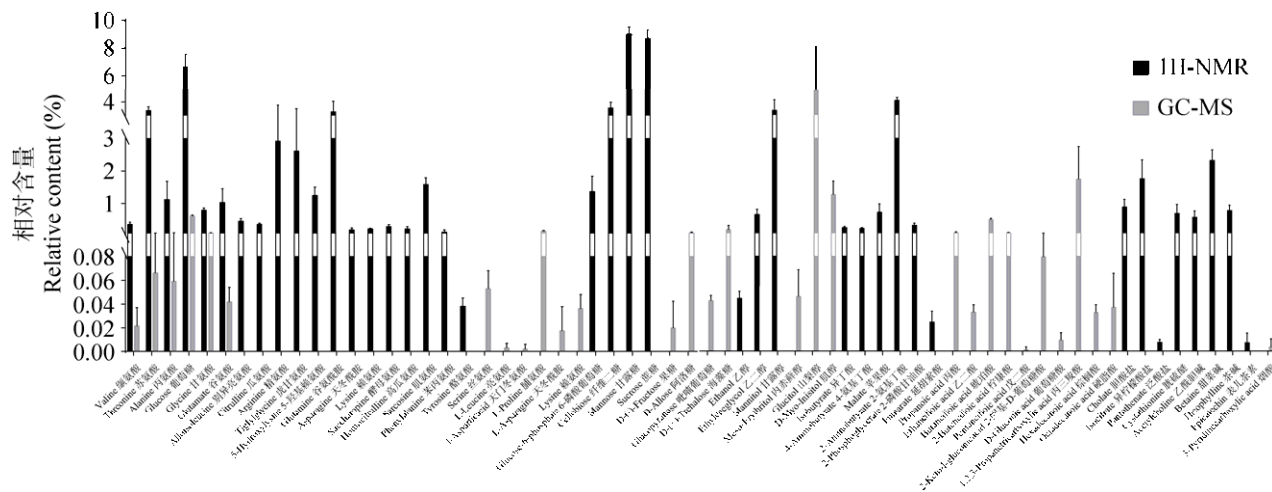


图 7 两种方法检测的中国块菌子实体的代谢产物及其含量比较
Fig. 7 Comparison of metabolites and their content of *Tuber sinense* fruit bodies detected by two methods.

3 讨论

3.1 ¹H-NMR 及 GC-MS 方法

核磁共振氢谱法(¹H-NMR)具有无偏向性、样品处理简单且无损伤性、定量准确、重复性高和

成本低等特性,但其缺点是,检测的动态范围较狭窄(Emwas 2015; 朱航等 2016)。GC-MS 具有较高的分辨率,可以对多个化合物同时进行分析和鉴定,且有成熟的标准参考谱库,通过比对标准谱库可以简单高效地对代谢产物进行定性分析,但其缺

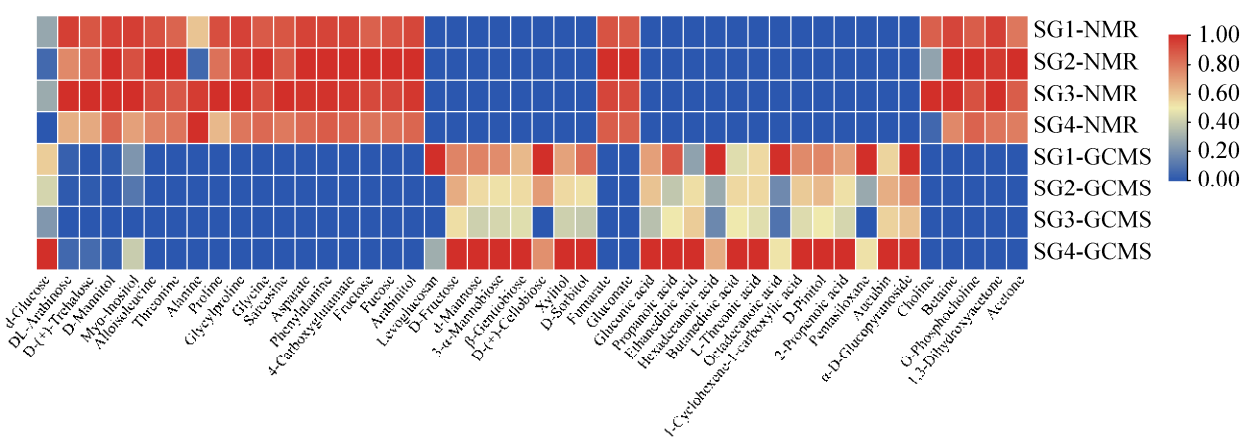


图 8 两种方法检测的云南松松根的代谢产物及其含量

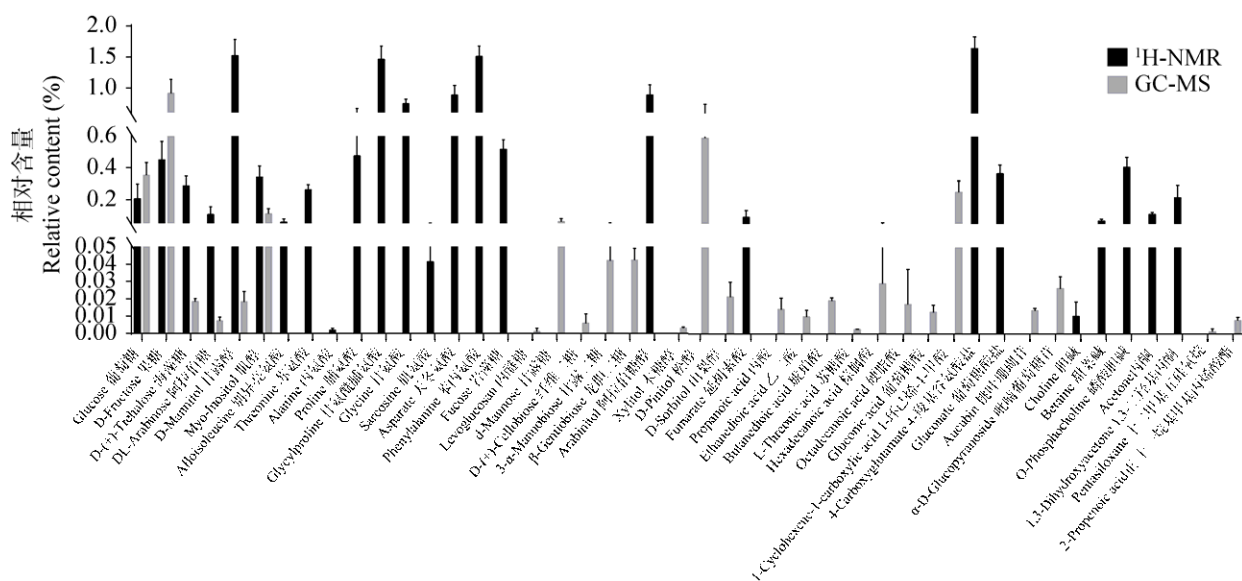
Fig. 8 Metabolites and their content of *Pinus yunnanensis* roots detected by two methods.

图 9 两种方法检测的云南松松根的代谢产物及其含量比较

Fig. 9 Comparison of metabolites and their content of *Pinus yunnanensis* roots detected by two methods.

点是,对于难挥发性的代谢产物需要进行衍生化或甲酯化反应,增加了样品前处理的复杂程度(Farag *et al.* 2009; 王斯婷等 2010; Fiehn 2016)。两种方法都见于大型真菌的代谢产物研究。

本研究同时利用 ¹H-NMR 和 GC-MS 两种方法对中国块菌及其共生的松根进行了小分子活性代谢物的检测,在块菌中分别指认出了 40 和 30 个物质,可见 ¹H-NMR 检测到的物质相对多于 GC-MS。总体上两种方法互为补充,扩大了检测效果。但由于提取方法的多样性及数据库的完整

性等,提取到的化合物不够全面,大部分峰谱尚难以识别,后续可以进一步结合 LC-MS 技术,进行更加系统性及完整性的分析。

3.2 中国块菌的代谢产物

在检测到的块菌代谢产物中,除了氨基酸、糖类和酸类外,还检测到几种活性物质如烟酸(维生素 B₃)、甜菜碱、茶碱及表儿茶素。烟酸是细胞代谢辅酶烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP⁺)的前体,其通过参与人体的脂质代谢、氧化过程和无氧分解过程,

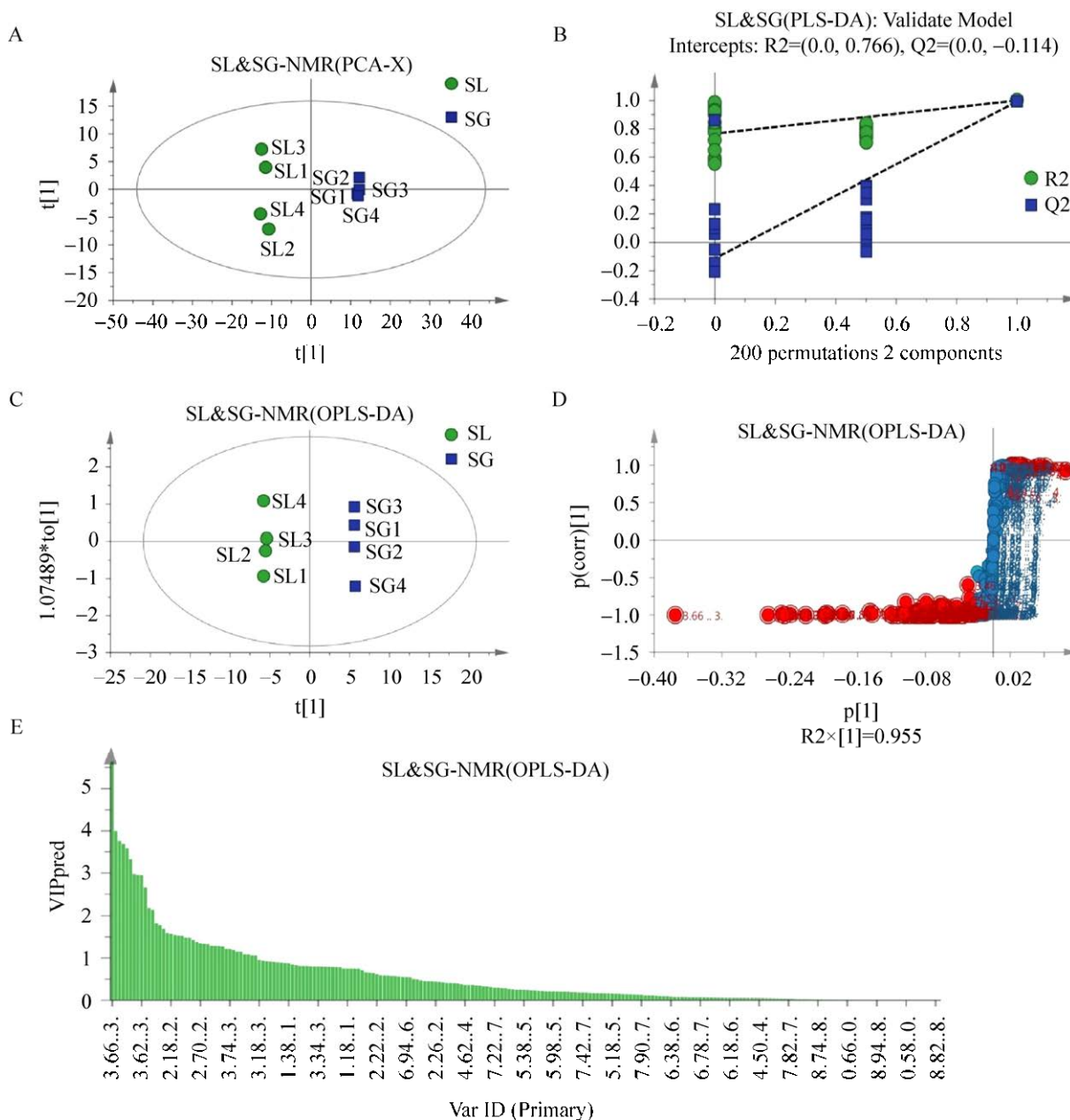


图 10 基于 $^1\text{H-NMR}$ 技术的中国块菌和松根代谢产物的多元统计学分析 A: PCA 得分图; B: 置换模型验证; C: OPLS-DA 得分图; D: S-Plots; E: VIP 值

Fig. 10 Multivariate statistical analysis of metabolites of *Tuber sinense* fruit bodies and *Pinus yunnanensis* roots based on $^1\text{H-NMR}$ technique. A: PCA score scatter plot; B: PLS-DA model validation diagram; C: OPLS scatter plot; D: S-Plot; E: VIP value.

调控炎症反应、调节肠道稳态及维持肠道健康状态,还可治疗维持性血液透析患者高磷血症(高格 2019)。甜菜碱参与生物体内合成肉碱、肌酸等必需物质的系列化反应,是生物体内稳定高效的甲基供体,不仅可改善高脂饮食诱导的小鼠体重增

加和胰岛素抵抗,并增强脂质和能量代谢,还可促进骨骼肌发育、提高人或小鼠的运动能力、缓解酒精性脂肪肝等(Du *et al.* 2018;何劲等 2020)。茶碱可非特异性地抑制环核苷酸磷酸二酯酶活性,进而有效增加细胞内环磷酸腺苷浓度水平,

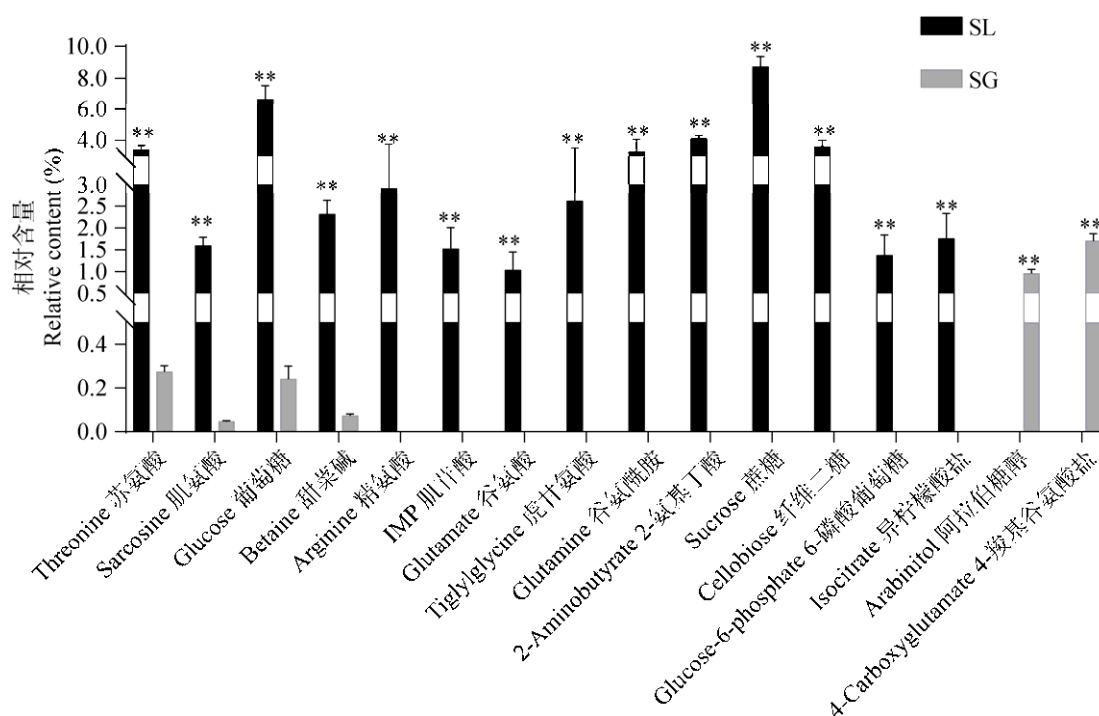


图 11 基于 ¹H-NMR 技术的中国块菌和松根之间差异代谢产物的相对含量 SL: 中国块菌; SG: 松根.
** $P < 0.01$

Fig. 11 Relative content of differential metabolites of *Tuber sinense* fruit bodies and *Pinus yunnanensis* roots based on ¹H-NMR technique. SL: *Tuber sinense*; SG: *Pinus yunnanensis* root. ** $P < 0.01$.

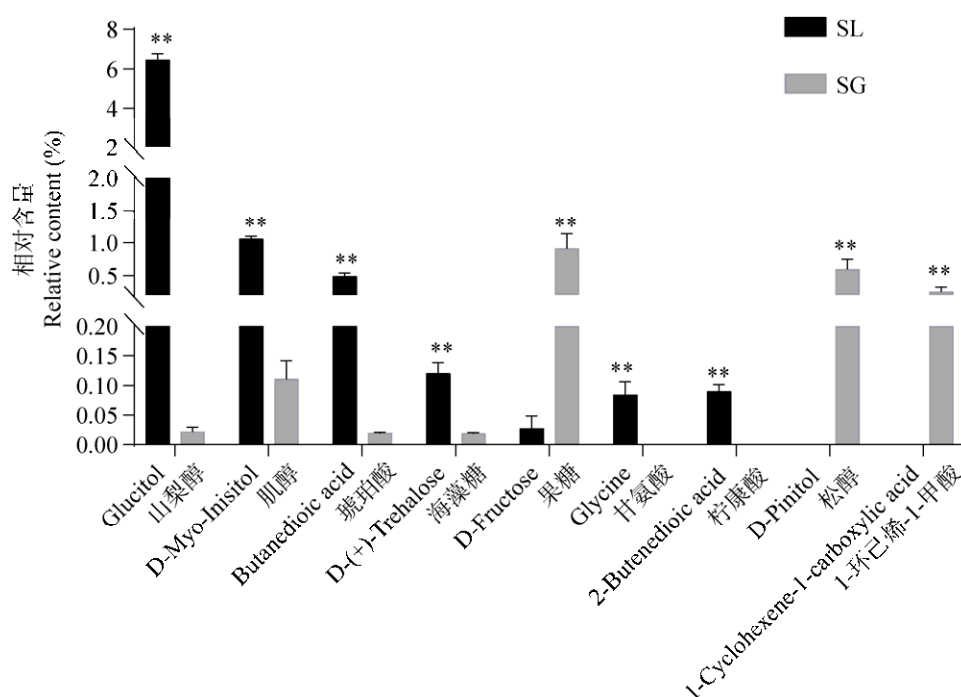


图 12 基于 GC-MS 技术的中国块菌和松根之间差异代谢产物的相对含量 SL: 中国块菌; SG: 松根
Fig. 12 Relative content of differential metabolites of *Tuber sinense* fruit bodies and *Pinus yunnanensis* roots based on GCMS technique. SL: *Tuber sinense*; SG: *Pinus yunnanensis* root.

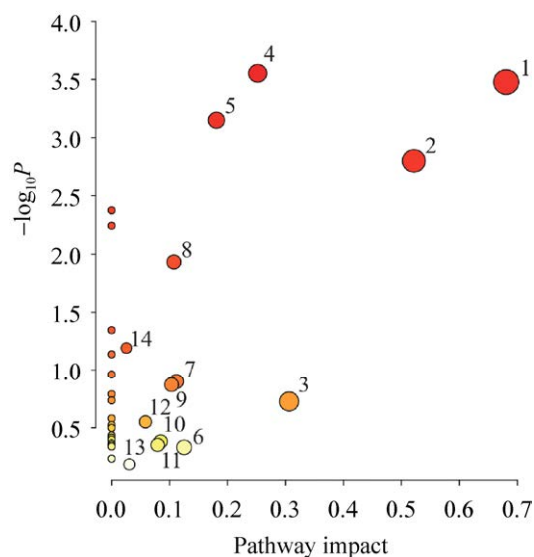


图 13 中国块菌和松根之间差异代谢物的代谢通路分析 1: 淀粉和蔗糖代谢; 2: 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢; 3: 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸的代谢; 4: 乙醛酸和二羧酸代谢; 5: 精氨酸生物合成; 6: 嘌呤代谢; 7: 精氨酸和脯氨酸的代谢; 8: 三羧酸循环(TCA 循环); 9: 谷胱甘肽代谢; 10: 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成; 11: 甲烷代谢; 12: 硫代谢; 13: 半胱氨酸和蛋氨酸代谢; 14: 半乳糖代谢

Fig. 13 Metabolic pathway of differential metabolites between *Tuber sinense* fruit bodies and *Pinus yunnanensis* roots. 1: Starch and sucrose metabolism; 2: Alanine, aspartate and glutamate metabolism; 3: Glycine, serine and threonine metabolism; 4: Glyoxylate and dicarboxylate metabolism; 5: Arginine biosynthesis; 6: Purine metabolism; 7: Arginine and proline metabolism; 8: Citrate cycle (TCA cycle); 9: Glutathione metabolism; 10: Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis; 11: Methane metabolism; 12: Sulfur metabolism; 13: Cysteine and methionine metabolism; 14: Galactose metabolism.

提高细胞内环磷酸腺苷/环磷酸鸟苷比值,抑制钙离子内流及促进钙离子外流,起到扩张支气管平滑肌的作用,在临床上主要用于治疗慢性阻塞性肺疾病和哮喘;茶碱还具有抗炎、调节免疫、抑制血小板活性的作用(李媛和林青 2013)。表儿茶素是一种分布广泛的天然植物黄烷醇化合物,研

究表明表儿茶素具有抗氧化、调节免疫、预防心血管疾病、降脂降糖、降低胰岛素、抑菌、抗炎、保护神经等作用(童观珍等 2018)。这些有效活性成分为块菌保健药物的开发提供了理论依据。

3.3 中国块菌与松根的差异物质分析

中国块菌(云南黑松露)主要与松根共生,属于外生菌根真菌,菌根真菌与宿主植物通过菌根共生体互惠互益共同生长。菌根共生体是物质和信息传递的场所。

研究发现,在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;外生菌根真菌则通过合成并分泌生长素和脂壳寡糖、释放倍半萜实现信号传递,这些物质进入植物根系细胞后,激活植物生长素信号通路和通用共生信号通路等相关通路,抑制植物根系生长并影响侧根和哈蒂氏网的形成(冯邦和杨祝良 2019)。

碳素同化及氮营养对菌根的合成具有至关重要的作用。菌根共生过程会产生重度的碳饥饿,促使高达 30%的光合产物转移到菌根合成中,以供给菌根菌使用(Stitt 1991)。菌根最初的合成需要大量的氮源,已经证明了内聚合氨基酸影响共生真菌的侵染(Baum 2002)。

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。块菌与松根的差异物质主要是苏氨酸、肌氨酸、葡萄糖、甜菜碱、山梨醇、肌醇、琥珀酸、海藻糖及果糖(图 11, 图 12),其中果糖在松根中显著高于块菌。这些物质可能在块菌子实体发育中起着重要的物质和信号传递作用。代谢通路分析也可以看出碳代谢及氮代谢是共生过程中最重要的两个代谢(图 13)。

[REFERENCES]

- Al-Laith AAA, 2010. Antioxidant components and antioxidant/antiradical activities of desert truffle (*Tirmania nivea*) from various Middle Eastern origins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(1): 15-22
- Baum C, Weih M, Verwijst T, Makeschin F, 2002. The effects

- of nitrogen fertilization and soil properties on mycorrhizal formation of *Salix viminalis*. Forest Ecology and Management, 160: 35-43
- Chen YL, 2001. Ecological studies on truffles (*Tuber* spp.). Edible Fungi of China, 20(5): 28-30 (in Chinese)
- Culleré L, Ferreira V, Venturini ME, Marco P, Blanco D, 2012. Evaluation of gamma and electron-beam irradiation on the aromatic profile of black truffle (*Tuber melanosporum*) and summer truffle (*Tuber aestivum*). Innovative Food Science and Emerging Technologies, 13: 151-157
- Du JJ, Shen LY, Tan ZD, Zhang PW, Zhao X, Xu Y, Gan ML, Yang Q, Ma JD, Jiang AA, Tang GQ, Jiang YZ, Jin L, Li MZ, Bai L, Li XW, Wang JY, Zhang SH, Zhu L, 2018. Betaine supplementation enhances lipid metabolism and improves insulin resistance in mice fed a high-fat diet. Nutrients, 10(2): 131
- Emwas AHM, 2015. The strengths and weaknesses of NMR spectroscopy and mass spectrometry with particular focus on metabolomics research. Methods in Molecular Biology, 1277: 161-193
- Fan Y, 2020. Action principle of tuber polysaccharide improving sports fatigue. Edible Fungi of China, 39(2): 43-44+48 (in Chinese)
- Farag MA, Porzel A, Wessjohann LA, 2009. Comparative metabolite profiling and fingerprinting of medicinal licorice roots using a multiplex approach of GC-MS, LC-MS and 1D NMR techniques. Phytochemistry, 69(12): 60-72
- Feng B, Yang ZL, 2019. Ectomycorrhizal symbioses: diversity of mycobionts and molecular mechanisms that entail the development of ectomycorrhizae. Scientia Sinica (Vitae), 49(4): 150-158 (in Chinese)
- Fiehn O, 2016. Metabolomics by gas chromatography-mass spectrometry: combined targeted and untargeted profiling. Current Protocols in Molecular Biology, 114: 30-34
- Friedman M, 2015. Chemistry, nutrition, and health-promoting properties of *Herichium erinaceus* (lion's mane) mushroom fruiting bodies and mycelia and their bioactive compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(41): 7108-7123
- Gao G, 2019. A systematic review: niacin and nicotinamide for the treatment of hyperphosphatemia in maintenance hemodialysis patients. Master Thesis, North Sichuan Medical College, Nanchong. 24-29 (in Chinese)
- Han SH, 2010. The black diamond "truffle" in edible fungi. Edible and Medicinal Mushrooms, 18(4): 53-55 (in Chinese)
- He J, Zhang PW, Du JJ, Xiao JS, Yang DL, Wang DG, Zhang SH, Zhu L, 2020. Preliminary study on the effect of betaine on lipid deposition in muscle tissue of mice with leptin deficiency. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 51(1): 99-108 (in Chinese)
- Hu XR, Xiong HK, Xue WT, 2017. Research progress on the composition and functional activity of truffles. Science and Technology of Food Industry, 38(22): 341-345+352 (in Chinese)
- Janakat SM, Al-Fakhiri SM, Sallal AKJ, 2005. Evolution of antibacterial activity of aqueous and methanolic extracts of the truffle *Terfezia clavaryi* against *Pseudomonas aeruginosa*. Saudi Medical Journal, 26(6): 952-955
- Li J, Wei YH, Qin XM, Li ZY, 2017. Chemical comparison on different parts of *Angelica sinensis* radix based on NMR metabolomics. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 48(7): 1409-1415 (in Chinese)
- Li XL, Chen C, Qing Y, Huang WL, Yang YC, Zheng LY, 2015. Analysis of volatile aroma components in different species of truffle in Huidong County by GC-MS. Food Science, 36(18): 132-136 (in Chinese)
- Li Y, Guo SX, Chen J, 2021. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Tuber* (Pezizales, Ascomycota). Mycosystema, 40(4): 873-894 (in Chinese)
- Li Y, Lin Q, 2013. Research progress and application of theophylline drugs. Guide of China Medicine, 11(4): 421-422 (in Chinese)
- Mao XL, 2000. Chinese macrofungi. Henan Science and Technology Press, Zhengzhou. 1-719 (in Chinese)
- Miao TT, 2017. The ¹H-NMR analysis of water soluble metabolites of three major growth and development stages of *Xerocomus spadiceus*. Master Thesis, Yunnan University, Kunming. 43-47 (in Chinese)
- Patel S, 2012. Food, health and agricultural importance of truffles: a review of current scientific literature. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy, 6(1): 15-27
- Qi YS, Li J, Guo D, Wang YL, Lei ZH, Qin XM, Li ZY, 2019. Chemical comparison of the stems and leaves of *Tussilago farfara* L. using NMR-based metabolomics. Chinese Pharmaceutical Journal, 54(8): 608-613 (in Chinese)
- Qing Y, He XL, Liu CY, Yang M, Zheng LY, 2015. Application of electronic nose and tongue for discrimination of truffles with different processing technology. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 28(3): 1210-1216 (in Chinese)
- Splivallo R, Ebeler SE, 2015. Sulfur volatiles of microbial origin are key contributors to human-sensed truffle aroma. Applied Microbiology and Biotechnology, 99(6): 2583-2592

- Stitt M, 1991. Rising CO₂ levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant Cell and Environment*, 14: 741-762
 - Sun SW, 2015. The preliminary construction and analysis on the metabolic profiling of three medicinal dendrobes. Master Thesis, Anhui Agricultural University, Hefei. 15-17 (in Chinese)
 - Tong GZ, Fu XP, Yang Y, Feng L, Xiang ZM, Pu YH, Fan JP, 2018. Advances in research on the distribution and pharmacological activities of epicatechin. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 33(2): 343-349 (in Chinese)
 - Wang ST, Li XN, Wang J, Ling XM, 2010. Metabonomics and its analytical technique. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 30(9): 1792-1799 (in Chinese)
 - Wang XJ, Huang RQ, Xiao BK, Yang JY, Liu YR, Yang Y, Duan WH, 2010. Sample pretreatment method in metabolomics research based on NMR. *Modern Instruments & Medical Treatment*, 16(2): 16-19 (in Chinese)
 - Xue Y, Zhou XM, Wang QL, Bian Q, Li PL, Zhang LP, 2020. Ecological climate suitability and geographical distribution of truffle in west Panxi area. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 33(3): 165-171 (in Chinese)
 - You JK, Tang XM, Chen ZQ, Luo R, Wu SR, 2015. Nutrient analysis of two *Tuber huidongense* from Yunnan. *Science and Technology Innovation Herald*, 12(32): 250-254 (in Chinese)
 - Zhang SQ, Kan JQ, 2011. Aroma compound analysis of *Tuber huidongense* by GC-MS. *Food Science*, 32(8): 281-285 (in Chinese)
 - Zhu H, Tang HR, Zhang X, Liu ML, 2006. NMR based metabonomics. *Chemistry*, 69(7): 559 (in Chinese)
- [附中文参考文献]**
- 陈应龙, 2001. 块菌生态生理学研究. *中国食用菌*, 20(5): 28-30
- 范勇, 2020. 块菌多糖改善运动疲劳的作用原理. *中国食用菌*, 39(2): 43-44+48
- 冯邦, 杨祝良, 2019. 外生菌根共生: 共生真菌多样性及菌根形成的分子机制. *中国科学: 生命科学*, 49(4): 150-158
- 高格, 2019. 烟酸和烟酰胺治疗维持性血液透析患者高磷血症的系统评价. 川北医学院硕士论文, 南充. 24-29
- 韩省华, 2010. 食用菌中的黑钻石“松露”. *食药用菌*, 18(4): 53-55
- 何劲, 张铭文, 堵晶晶, 肖军森, 杨东丽, 王定国, 张顺华, 朱砺, 2020. 甜菜碱对瘦素缺陷小鼠肌肉组织中脂质沉积的影响初探. *畜牧兽医学报*, 51(1): 99-108
- 呼鑫荣, 熊海宽, 薛文通, 2017. 松露的组成成分及功能活性研究进展. *食品工业科技*, 38(22): 341-345+352
- 李静, 魏玉海, 秦雪梅, 李震宇, 2017. 基于 NMR 代谢组学技术的当归不同部位化学成分比较. *中草药*, 48(7): 1409-1415
- 李小林, 陈诚, 清源, 黄文丽, 杨远朝, 郑林用, 2015. 会东县不同品种块菌挥发性香气成分的 GC-MS 分析. *食品科学*, 36(18): 132-136
- 李杨, 郭顺星, 陈娟, 2021. 珍稀名贵食药真菌块菌属的化学成分及药理活性研究进展. *菌物学报*, 40(4): 873-894
- 李媛, 林青, 2013. 茶碱类药物的研究进展及应用. *中国医药指南*, 11(4): 421-422
- 卯晓岚, 2000. 中国大型真菌. 郑州: 河南科学技术出版社. 1-719
- 苗廷廷, 2017. 砖红绒盖牛肝菌三个主要生长发育时期水溶性代谢产物的 ¹H-NMR 分析. 云南大学硕士论文, 昆明. 43-47
- 齐彦爽, 李静, 郭冬, 王玉龙, 雷振宏, 秦雪梅, 李震宇, 2019. 基于核磁共振代谢组学技术的款冬茎和叶的化学成分比较. *中国药理学杂志*, 54(8): 608-613
- 清源, 何晓兰, 柳成益, 杨梅, 郑林用, 2015. 电子鼻和电子舌技术在块菌样品分类识别中的应用. *西南农业学报*, 28(3): 1210-1216
- 孙时伟, 2015. 三种药用石斛代谢谱的初步构建与分析. 安徽农业大学硕士论文, 合肥. 15-17
- 童观珍, 付晓萍, 杨艳, 冯励, 向泽敏, 普岳红, 范江平, 2018. 表儿茶素的分布及药理活性研究进展. *云南农业大学学报(自然科学版)*, 33(2): 343-349
- 王斯婷, 李晓娜, 王皎, 凌笑梅, 2010. 代谢组学及其分析技术. *药物分析杂志*, 30(9): 1792-1799
- 王小娟, 黄荣清, 肖炳坤, 杨建云, 刘妍如, 杨雁, 段卫华, 2010. 基于 NMR 的代谢组学研究中样品的预处理方法. *现代仪器*, 16(2): 16-19
- 薛燕, 周雪梅, 王庆莉, 边茜, 李平兰, 张利平, 2020. 攀西地区块菌气候生态适宜性与地理分布区划研究. *西南农业学报*, 33(3): 165-171
- 游金坤, 汤昕明, 陈正启, 罗瑞, 吴素蕊, 2015. 云南产 2 种块菌营养成分分析比较. *科技创新导报*, 12(32): 250-254
- 张世奇, 阚建全, 2011. 会东块菌香气成分的 GC-MS 分析. *食品科学*, 32(8): 281-285
- 朱航, 唐惠儒, 张许, 刘买利, 2006. 基于 NMR 的代谢组学研究. *化学通报*, 69(7): 559