

研究报告

兰茂牛肝菌子实体发育的关联物质及其主要通路分析

刘佳艳¹, 杨晓敏¹, 陈幽幽¹, 陈鹏至¹, 吕为¹, 王成凤¹, 刘夏¹, 张实润¹, 董杰¹, 李宗菊^{*2}

1 云南大学生命科学学院, 云南 昆明 650500

2 云南大学生态与环境学院, 云南 昆明 650500

刘佳艳, 杨晓敏, 陈幽幽, 陈鹏至, 吕为, 王成凤, 刘夏, 张实润, 董杰, 李宗菊. 兰茂牛肝菌子实体发育的关联物质及其主要通路分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 4045-4062.

LIU Jiayan, YANG Xiaomin, CHEN Youyou, CHEN Pengzhi, LÜ Wei, WANG Chengfeng, LIU Xia, ZHANG Shirun, DONG Jie, LI Zongju. Active components and main pathways involved in fruiting body development of *Lanmaoa asiatica*[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 4045-4062.

摘要:【背景】兰茂牛肝菌(*Lanmaoa asiatica*)等外生菌根真菌的子实体形成和发育机制仍然未知。【目的】揭示调控子实体发育的关联物质。【方法】同时运用核磁共振、气相质谱和液相质谱3种代谢组学技术, 分析兰茂牛肝菌纯培养8 d原基(Y8)与野生子实体(Z0)的小分子物质。【结果】Y8及Z0分别共指认出451、473种化合物; Y8 vs. Z0, 有362种显著或极显著上调(206种)及下调(156种)差异物质, 其涉及47条调控通路。【结论】推测通过9条主要通路完成物质的深度转化及调控, 极显著上调及下调差异物质如牛肝菌素可能对子实体的发育起着一定的调控作用, 3种方法互相补充扩大了检测的泛度及灵敏度, 这为探究兰茂牛肝菌子实体发育机理及人工培养提供了一定的理论参考。

关键词: 兰茂牛肝菌; 子实体发育; 代谢组学; 调控物质; 调控通路

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

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

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

Received: 2023-01-02; Accepted: 2023-04-03; Published online: 2023-05-29

Active components and main pathways involved in fruiting body development of *Lanmaoa asiatica*

LIU Jiayan¹, YANG Xiaomin¹, CHEN Youyou¹, CHEN Pengzhi¹, LÜ Wei¹,
WANG Chengfeng¹, LIU Xia¹, ZHANG Shirun¹, DONG Jie¹, LI Zongju^{*2}

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

² School of Ecology and Environmental, Yunnan University, Kunming 650500, Yunnan, China

Abstract: [Background] The fruiting body formation and development of ectomycorrhizal fungi such as *Lanmaoa asiatica* still unknown. **[Objective]** To identify the active components regulating the fruiting body development. **[Methods]** We employed Three metabolomics techniques including nuclear magnetic resonance, gas chromatography-mass spectrometry, and liquid chromatography-mass spectrometry were employed to analyze the small molecular components in *L. asiatica* primordia cultured for 8 days (Y8) and feral sterile fruiting bodies (Z0). **[Results]** We found that each of the three analytical methods identified 451 and 473 compounds in Y8 and Z0, respectively. A total of 362 significantly differential components were identified, including 206 up-regulated components and 156 down-regulated components, which were involved in 47 pathways. **[Conclusion]** We hypothesized that the deep transformation and regulation of components were accomplished via nine main pathways. The significantly up-regulated and down-regulated differential components such as bolegrevilol may play a regulatory role in the development of fruiting bodies. The three methods used in this study complemented each other, expanding the scope and improving the sensitivity of the detection. The results provided some theoretical reference for deciphering the mechanism of fruiting body development and exploring the artificial cultivation of *L. asiatica*.

Keywords: *Lanmaoa asiatica*; fruiting body development; metabonomics; regulatory substances; regulatory pathways

兰茂牛肝菌(*Lanmaoa asiatica*)为云南名贵的野生药食兼用菌之一, 隶属于牛肝菌科(*Boletaceae*)^[1]。其子实体菌盖及菌柄基部颜色呈砖红色, 被当地人俗称“红葱”; 受损后伤变部位快速变蓝黑色, 所以也称“见手青”。兰茂牛肝菌的研究主要集中于风味物质、营养成分以及药理等方面, 如梁佳明等^[2]采用反相高效液相色谱技术对其子实体中的游离氨基酸及 5'-核苷酸进行了分析; 孙达锋等^[3]采用电子鼻结合气相-离子迁移谱技术探究了该菌气调贮藏过程中的香气轮廓及变化; 苏璐等^[1]证实了其可对机体免疫系统产生潜在的正向调节作用。

兰茂牛肝菌产量低, 加之受气候如长期干旱等自然因素的影响, 仅靠野外资源尚难以实现其可持续性开发利用。牛肝菌等属外生菌根真菌, 在自然状态下与松科等植物共生, 因其生境复杂、共生机制不明, 至今人们尚未了解其神奇的生活史及其整个生长发育的调控信息, 因而难以实现人工栽培。外生菌根真菌的纯培养可以避开复杂的环境因素, 单一地研究生长发育过程的关键调控物质, 但其在纯培养条件下菌丝生长极其缓慢, 不会纽结发育成原基, 这是制约其人工培养的瓶颈因素^[4]。

代谢组学技术被广泛应用于次生代谢物定

量定性分析、代谢通路确定和基因功能预测等方面^[5]。应用代谢组学分析生物体的代谢组图谱可研究小分子物质对生物体生长发育的调节作用^[6]。该文同时运用核磁(nuclear magnetic resonance hydrogen spectrum, $^1\text{H-NMR}$)、气相质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)、液相质谱(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)三大平台,以子实体及纯培养 8 d 的原基为材料,对二者差异物质及调控通路进行了分析,旨在探讨与兰茂牛肝菌子实体发育过程关联的小分子物质及其调控通路,为今后兰茂牛肝菌等真菌资源的开发利用和人工培养提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

兰茂牛肝菌子实体购自昆明木水花野生菌市场,并经中国科学院植物研究所鉴定核实,标本保存于云南大学生命科学学院植物标本馆;原基为本实验室利用改良 PDA 培养基接种新鲜组织块继代所得(图 1)。

核磁共振仪,布鲁克公司;气相色谱-质谱联用仪,Agilent Technologies 公司。

改良 PDA 培养基(g/L):在 PDA 培养基中添加以下成分:硫酸镁 1.00,氯化钙 1.00,磷酸二氢钾 0.50,硝酸铵 0.40,硝酸钾 0.40,谷氨酸 0.16,VB₁ 0.10。

1.2 方 法

1.2.1 冻干样品制备

于无菌条件下分离兰茂牛肝菌子实体(Z0)组织块,将其切分成约 1 cm×1 cm 的小块,分别接种于改良的 PDA 培养基中,26 °C 恒温培养,于第 8 天收集初代或继代培养的原基(Y8);将 Z0 及 Y8 按照周雪等^[7]的方法制备成冻干样品。

1.2.2 $^1\text{H-NMR}$ 和 GC-MS 分析

$^1\text{H-NMR}$ 、GC-MS 的提取溶剂、上机样品制备、数据采集、定性及定量分析等参考周雪等^[7]的方法。

1.2.3 LC-MS 分析

样品制备:称取 80 mg 冻干样品于 1.5 mL 离心管中,加入 800 μL 80%甲醇,涡旋 30 s,−40 °C 静置 1 h;再涡旋静置后于 12 000 r/min、4 °C 离心 15 min,上清液−40 °C 静置 1 h 后第二次离心;取 200 μL 上清液于进样瓶中,加入 5 μL 140 $\mu\text{g/mL}$ 二氯苯丙氨酸作为内标。样品送上海敏心生物科技有限公司进行检测及数据分析。

1.2.4 差异物质分析

将以上 $^1\text{H-NMR}$ 、GC-MS 及 LC-MS 的数据矩阵导入 SIMCA-P 14.1 软件进行数据验证及差异物质分析,具体参考周雪等^[7]的方法。

1.2.5 调控通路分析

将差异物质导入 MetaboAnalyst 4.0 平台(<https://www.metaboanalyst.ca/>)的 pathway analysis 模块,得到调控通路。

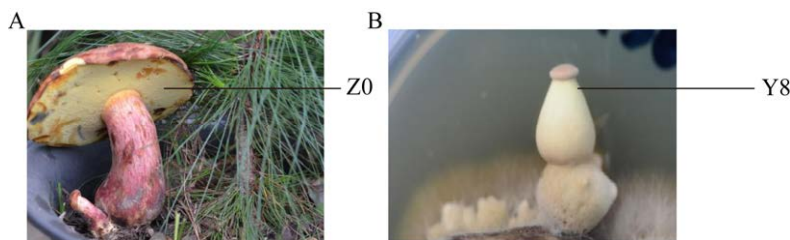


图 1 兰茂牛肝菌子实体及其培养 8 d 的原基 A: 子实体(Z0). B: 培养 8 d 的原基(Y8)

Figure 1 Fruiting bodies and primordia cultured for 8 days of *Lanmaoa asiatica*. A: Fresh fruiting body (Z0). B: Primordia cultured for 8 days (Y8).

2 结果与分析

2.1 化合物鉴定结果

图 2A 及图 2B 分别为原基(Y8)及子实体(Z0)的 ^1H -NMR 谱图, 通过与 Chemomx 等数据库中的标准物质图谱对照, 对各峰谱进行指认; 图

2C、2D 分别为 Y8 及 Z0 的 GC-MS 谱图, 经 NIST14 数据库进行逐一检索和匹配, 对各峰谱进行指认; 图 2E 和图 2F 分别为 Y8 和 Z0 的 LC-MS 谱图, 通过 MS-DIAL 进行峰提取、比对及鉴定。3 种方法的物质鉴定结果如图 3 所示。

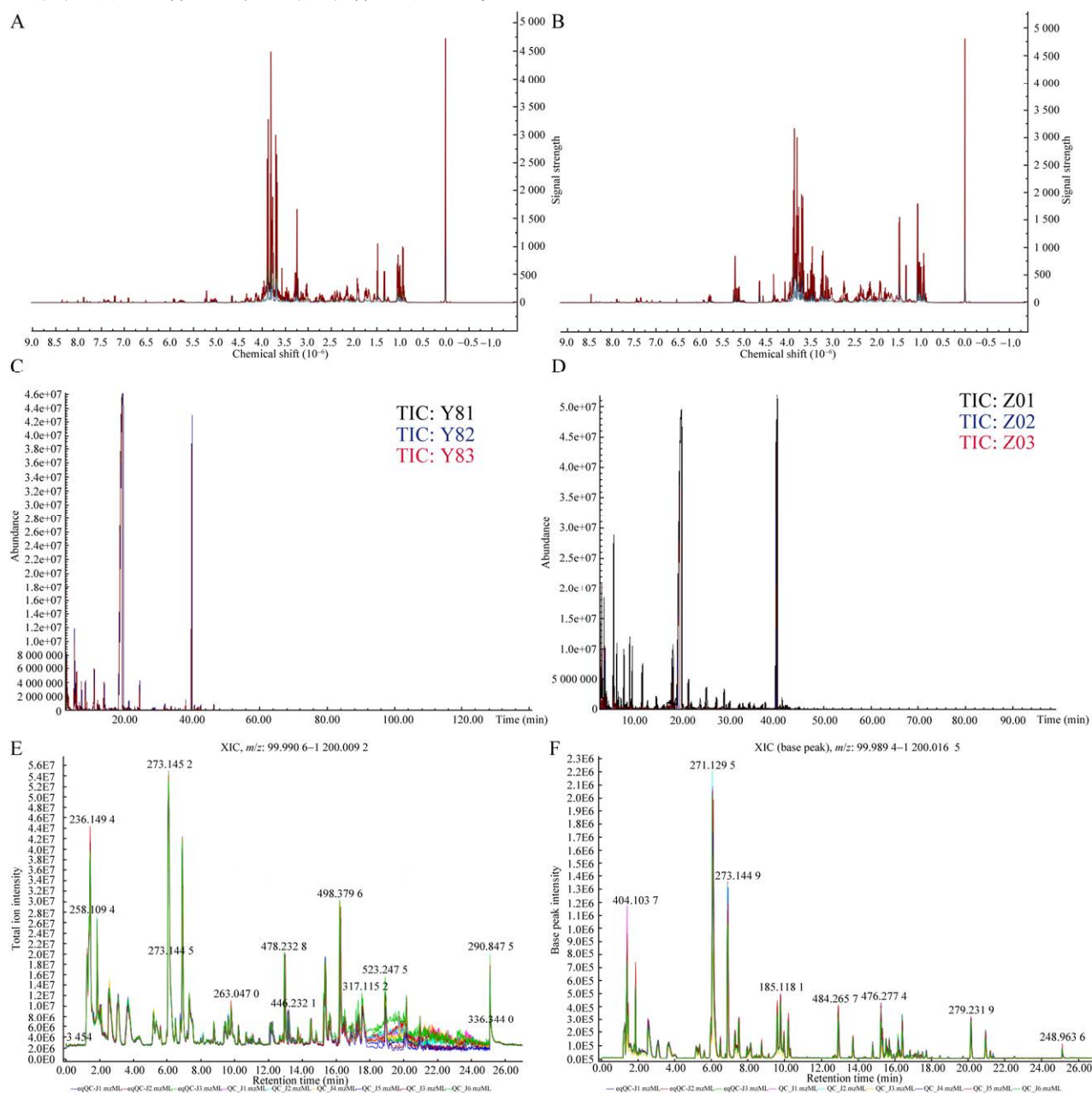


图 2 三种分析方法检测的兰茂牛肝菌原基(Y8)及子实体(Z0)峰谱 A: Y8 的 ^1H -NMR 峰. B: Z0 的 ^1H -NMR 峰. C: Y8 的 GC-MS 峰. D: Z0 的 GC-MS 峰. E: Y8 的 LC-MS 总离子峰. F: Z0 的 LC-MS 总离子峰
Figure 2 The peak spectra of *Lanmaoa asiatica* primordia (Y8) and fruiting bodies (Z0) detected by three methods. A: ^1H -NMR peaks of Y8. B: ^1H -NMR peak of Z0. C: GC-MS peak of Y8. D: GC-MS peak of Z0. E: LC-MS total ion peaks of Y8. F: LC-MS total ion peaks of Z0.

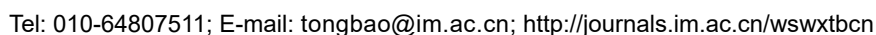




Figure 3 Substances and their contents of *Lasmaoa asiatica* primordia (Y8) and fruiting bodies detected (Z0) by three methods. A: Acids and sugars. B: Amino acids and their derivatives: alcohols and nucleosides. C: Other categories. Y8-¹H-NMR: ¹H-NMR method of Y8. Z0-¹H-NMR: ¹H-NMR method of Z0. Y8-GC-MS: GC-MS method of Y8. Z0-GC-MS: GC-MS method of Z0. Y8-LC-MS: LC-MS method of Y8. Z0-LC-MS: LC-MS method of Z0.

由图 3 可见, $^1\text{H-NMR}$ 、GC-MS 和 LC-MS 这 3 种分析方法在 Y8 中共指认出 451 种化合物, 其中 $^1\text{H-NMR}$ 37 种、GC-MS 70 种、LC-MS 344 种 (M+190 种, M-154 种); 在 Z0 中共指认出 473 种化合物, 其中 $^1\text{H-NMR}$ 40 种、GC-MS 89 种、LC-MS 344 种 (M+190 种, M-154 种)。这些化合物主要是氨基酸及其衍生物、有机酸、糖和糖苷、醇、核苷和酯等。

2.2 差异物质分析结果

2.2.1 $^1\text{H-NMR}$ 技术分析结果

由 $^1\text{H-NMR}$ 技术筛选出的差异物质及其含量(图 4)可知, 共有 29 种差异物质, 其中谷氨酸仅在 Y8 中检测到, 半胱氨酸、甲酸、胆胺及乙二醇仅在 Z0 中检测到; 缬氨酸、异亮氨酸、苏氨酸等 20 种物质在 Z0 中极显著或显著高于 Y8。总体上, Y8 vs. Z0, 共有 24 种物质

(占总差异物质的 82.8%)上调(含量上升为上调, 含量下降为下调)。

2.2.2 GC-MS 技术分析结果

GC-MS 技术对 Y8 与 Z0 的差异物质及含量的分析结果如图 5 所示, 共有 62 种差异物质。其中, 6 种物质(乳糖醇、乳糖、麦芽糖、阿拉伯糖、1-棕榈酸单甘油酯和单硬脂酸甘油酯)仅在 Y8 中检测到; 18 种物质(甲基丙烯酰甘氨酸、高丝氨酸、天冬酰胺、色氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、甘油酸、3-脱氧反酸、 α -羟基戊二酸、黄嘌呤酸、D-呋喃核糖-5-磷酸、尿嘧啶、5-磷酸腺苷、5-甲基尿苷、假尿苷、半乳糖、3,6-二甲基-2,4-二苯基喹啉和 N-乙酰基-D-半乳糖胺)仅在 Z0 中检测到; 丝氨酸、海藻糖、甘油酸等 27 种物质在 Z0 中含量显著或极显著增加。总体上, Y8 vs. Z0 共有 45 种物质(占总差异物质的 72.6%)上调。

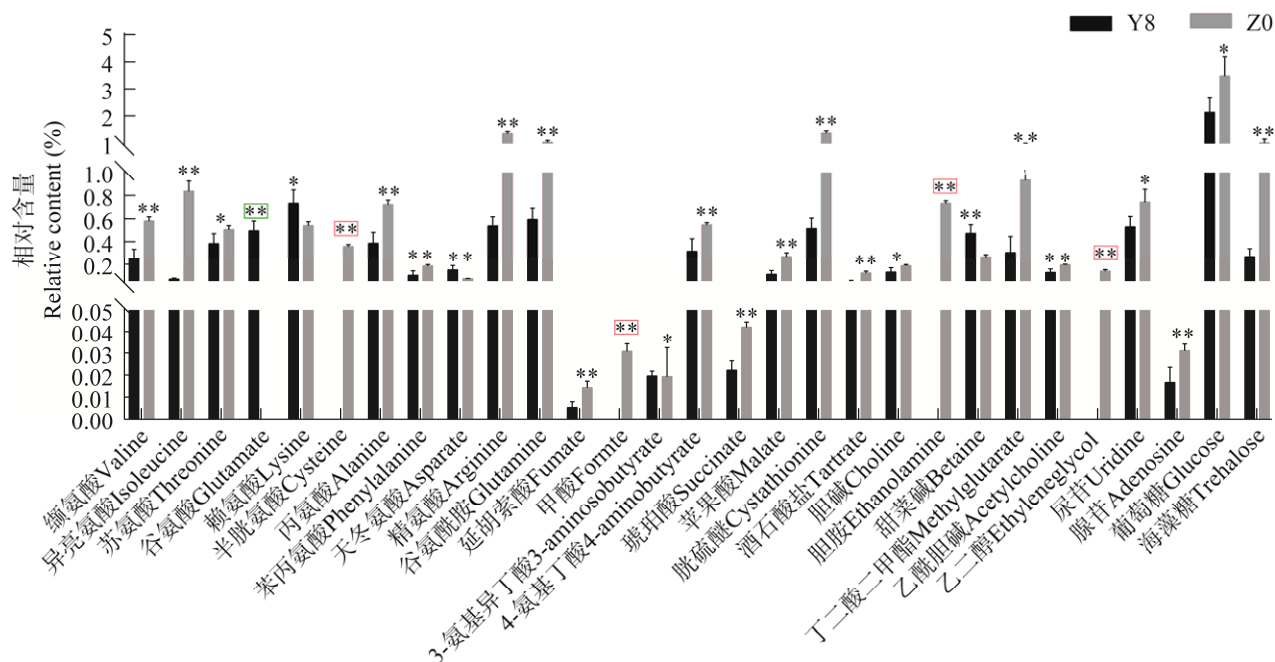


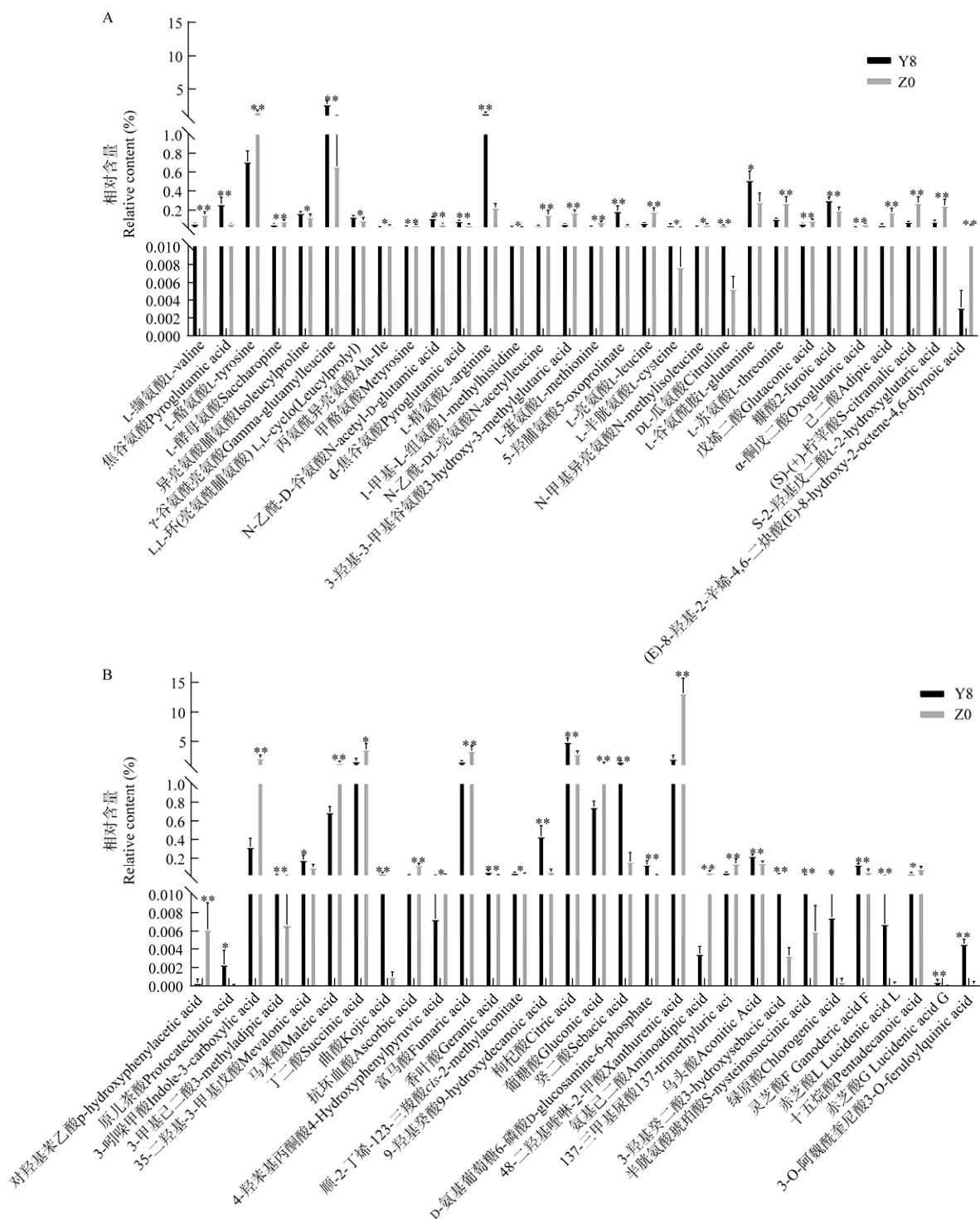
图 4 基于 $^1\text{H-NMR}$ 技术的 Y8 和 Z0 差异物质及其相对含量 Y8: 原基; Z0: 子实体; **: 仅在 Y8 中检测到; **: 仅在 Z0 中检测到; **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$

Figure 4 Differential substances and their relative contents of Y8 and Z0 based on $^1\text{H-NMR}$ technique. Y8: Primordia; Z0: Fruiting bodies; **: Detected only in Y8; **: Detected only in Z0; **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$.

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>



酸、蜜环菌癸素、蜜环菌内酯 B、蜜环菌壬素和猴头菌多醇 P 等, 极显著下降物质如曲酸、灵芝酸 F、脱落酸、N-苄基葡萄糖酸、N-苄基葡萄糖酸、赤霉素、葡萄糖苷内酯和环萆甲酚等值得重点关注。





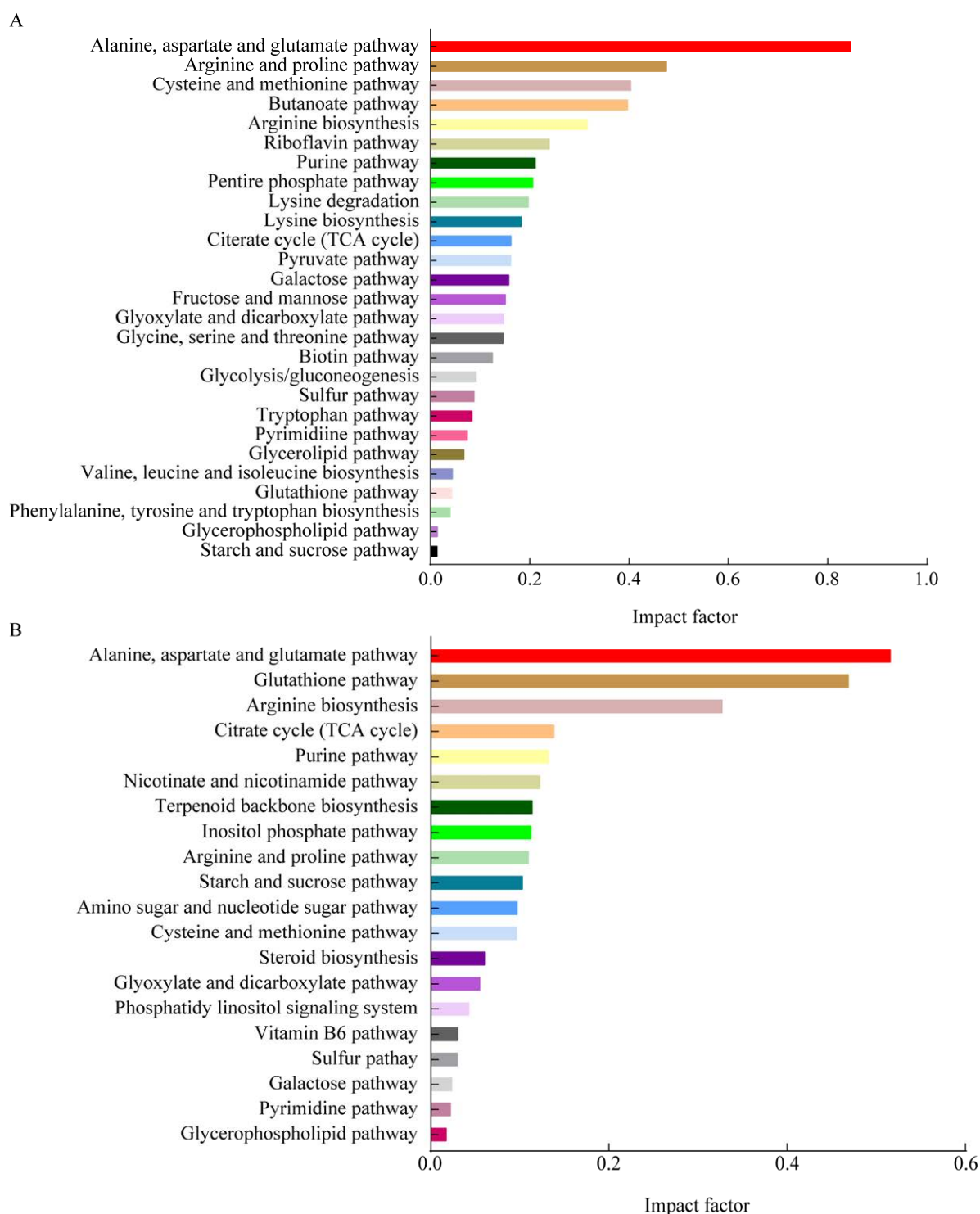


图 8 兰茂牛肝菌原基和子实体差异物质的调控通路 A: 上调差异物质之调控通路. B: 下调差异物质之调控通路

Figure 8 regulatory pathways of differential substances between primordia and fruiting bodies of *Lanmaoa asiatica*. A: Regulatory pathways of up-regulation differential substances. B: Regulatory pathways of down-regulation differential substances.

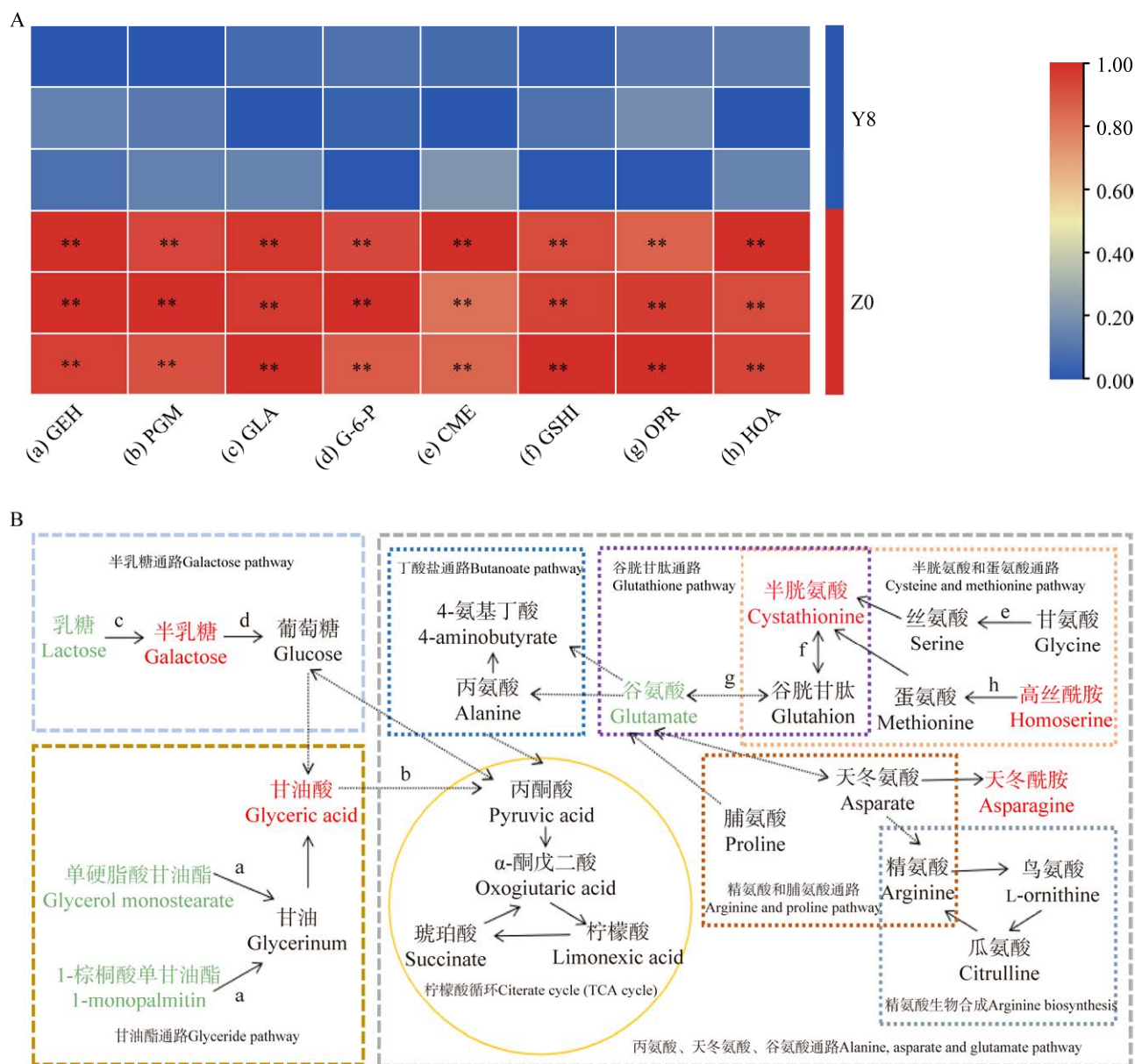


图 9 九条主要调控通路及其 8 个关键酶的基因表达 A: Y8 及 Z0 中 8 个关键酶的基因表达. a: 甘油酯水解酶; b: 磷酸甘油酸变位酶; c: β -半乳糖苷酶; d: 葡萄糖-6-磷酸酶; e: 羧甲基酶; f: 谷胱甘肽合成酶; g: 5-氧脯氨酸酶; h: 高丝氨酸-o-酰基转移酶. **: $P < 0.01$. B: Y8 及 Z0 差异物质关联到的 9 条主要调控通路. 标红的物质为仅在子实体中检测到; 标绿的物质为仅在原基中检测到

Figure 9 Nine main regulatory pathways and the gene expression of 8 key enzymes in pathways. A: The gene expression of 8 key enzymes between Y8 and Z0. a: Glycerol ester hydrolase (GEH); b: Phosphoglycerate mutase (PGM); c: Beta-galactosidase (GLA); d: Glucose-6-phosphatase (G6P); e: Carboxymethylase (CME); f: Glutathione synthase (GSHI); g: 5-oxoprolinase (OPR); h: Homoserine-o-acyltransferase (HOA). **: $P < 0.01$. B: 9 main regulatory pathways associated with Y8 and Z0 differential substances. Substances in red are detected only in fruiting bodies; Substances in green are detected only in primordia.

油再转化成子实体特有物质甘油酸, 然后受 b 基因的调控转化成丙酮酸进入 TCA 循环; 原基中特有的乳糖受 c 基因的调控分解成子实体特有物质半乳糖, 再受 d 基因的调控转化成葡萄糖进入 TCA 循环; 甘氨酸受 e 基因的调控先合成丝氨酸再转化为子实体特有物质半胱氨酸; 半胱氨酸受 f 基因的调控合成谷胱甘肽; 谷胱甘肽可受 g 基因的调控水解成谷氨酸; 子实体特有物质高丝氨酸可受 h 基因的调控, 经由蛋氨酸再到半胱氨酸; 原基特有物质谷氨酸可经由天冬氨酸转化为子实体特有物质天冬酰胺。7 条通路主要涉及氨基酸代谢通路, 与糖代谢通路及脂代谢通路, 共同调控子实体的发育。

3 讨论与结论

3.1 三种分析检测方法比较

$^1\text{H-NMR}$ 具有原位无损检测、预处理操作简单等优点, 但其稳定性差、线性范围窄^[8]。GC-MS 及 LC-MS 皆具有较高分辨率和灵敏度, 定性和定量效果好, 但 GC-MS 只能检测挥发性或可衍生成挥发性的化合物, LC-MS 定性常受数据库的限制^[9-10], 且目前公开的菌物代谢组学数据库极少^[11]。综上所述, 3 种方法各有优缺点, 如能同时使用, 可以扩大检测谱。

图 10 为 3 种方法检测到的物质韦恩图, 可见, 3 种方法总体上呈现 LC-MS 检测出的化合

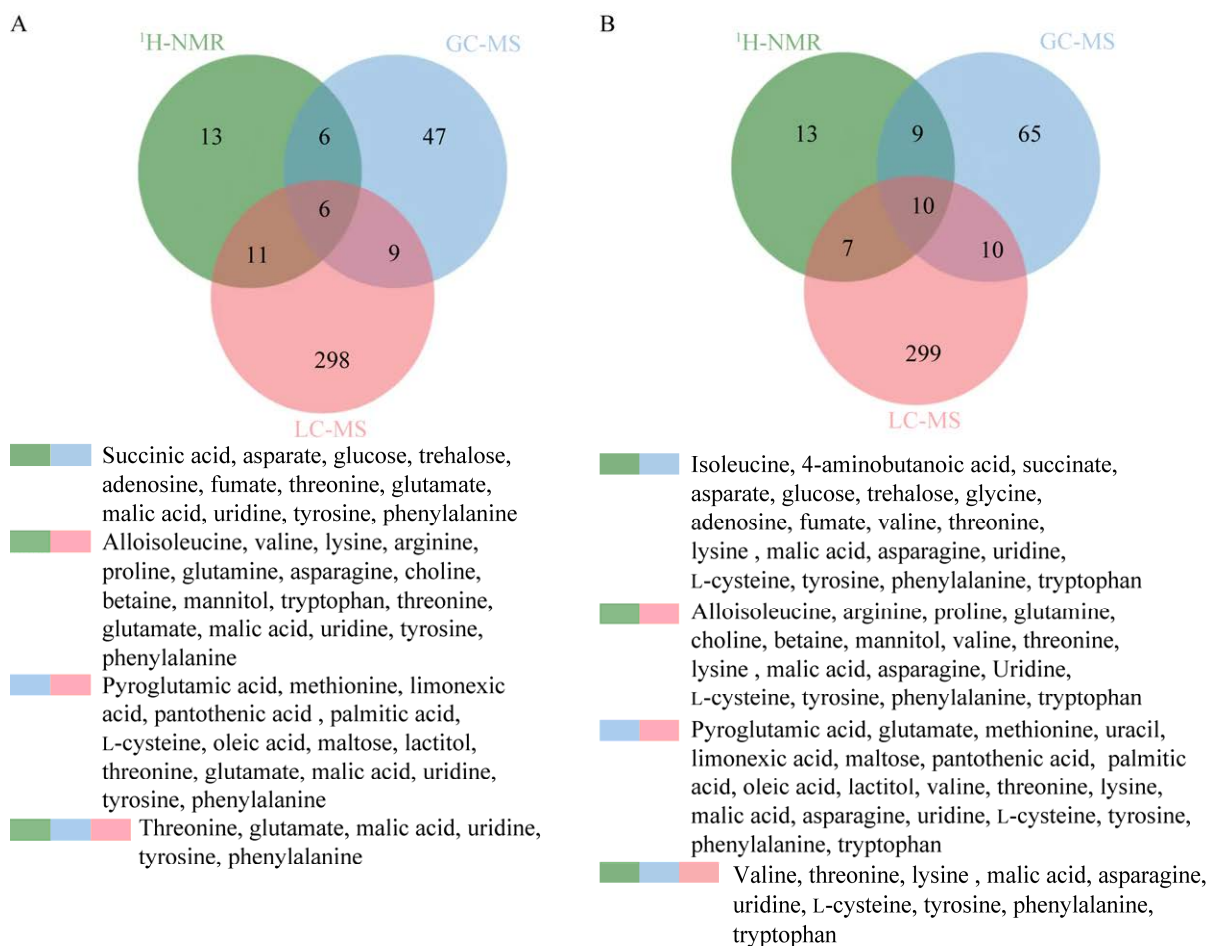


图 10 三种分析方法检测出兰茂牛肝菌原基及子实体的物质韦恩图 A: 原基(Y8). B: 子实体(Z0)

Figure 10 Venn of substances of *Lanmaoa asiatica* primordia and fruiting bodies detected by three methods. A: Primordia (Y8). B: Fruiting bodies (Z0).

物数量最多, $^1\text{H-NMR}$ 最少; Y8 与 Z0 中, 3 种方法共同检测到的物质分别有 6 种及 10 种; 两种方法如 $^1\text{H-NMR}$ 和 GC-MS 都能检测出的物质分别有 12 种和 19 种; GC-MS 与 LC-MS 分别有 15 种和 20 种; $^1\text{H-NMR}$ 和 LC-MS 均有 17 种。总体上, 3 种或 2 种方法共同检测到的物质不多, 3 种方法互相补充, 扩大了检测范围。检测灵敏度与化合物有关, 如苹果酸的含量呈 GC-MS>LC-MS, 琥珀酸呈 LC-MS>GC-MS> $^1\text{H-NMR}$, 苏氨酸呈 $^1\text{H-NMR}$ >GC-MS。

3.2 子实体发育过程相关的调控物质及其通路

本文根据代谢组学方法, 分析原基与子实体的差异物质及其调控通路, 推测与子实体发育相关的潜在物质, 以期为进一步筛选子实体的促生物质奠定理论基础。

三种方法联合分析表明, Y8 及 Z0 分别共指出 451、473 种化合物。Y8 vs. Z0, 共有 362 种显著或极显著差异物质, 其中有 206 种上调、156 种下调。这些物质特别是极显著上调、下调物质如牛肝菌素等, 对子实体的发育可能起着一定的调控作用, 今后值得进一步探究。

仅在原基中检测到的物质如谷氨酸、1-棕榈酸单甘油酯、单硬脂酸甘油酯、乳糖、乳糖醇、麦芽糖和阿拉伯糖共 7 种。仅在子实体中检测到的物质有 22 种: 半胱氨酸、高丝氨酸、天冬酰胺、半乳糖、甘油酸、甲酸、胆胺、乙二醇、甲基丙烯酰甘氨酸、色氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、N-乙酰基-D-半乳糖胺、5-磷酸腺苷、5-甲基尿苷、假尿苷、尿嘧啶、3,6-二甲基-2,4-二苯基喹啉、3-脱氧反酸、 α -羟基戊二酸、黄嘌呤酸和 D-呋喃核糖-5-磷酸。

综合所检测的物质的上调、下调结果, Ala-Asp-Glu、Arg-Pro、Cys-Met、But、Arg-syn、

Gluta 及 TCA 为影响较大的 7 个主要调控通路。将原基特有物质(谷氨酸、1-棕榈酸单甘油酯、单硬脂酸甘油酯和乳糖)、子实体特有物质(半胱氨酸、高丝氨酸、天冬酰胺、半乳糖和甘油酸)与 7 条调控通路进行关联。另外原基特有的 4 个物质是子实体 5 个特有物质的代谢前体, 通过糖代谢、脂代谢及氮代谢通路, 富集了子实体快速生长所需的糖、脂及氨基酸后进入 TCA 通路, 进一步参与物质的转化及调控。特别是谷氨酸是连接各氨基酸通路的关键物质, 值得关注。此外, 分析发现谷胱甘肽也是氮代谢中的重要物质, 其将原基特有氨基酸与子实体特有氨基酸连结及集合, 今后可对其进行重点关注及研究。据报道, 谷氨酸可调节生物体的生长、发育和防御反应, 在植物体内是一种多功能物质和信号分子^[12]。谷胱甘肽在参与细胞信号转导、维持细胞正常生命活动中也起着重要作用^[13]。

REFERENCES

- [1] 苏璐, 苏冀彦, 李丹, 谢意珍, 焦春伟, 赖泳, 李文治. 兰茂牛肝菌含药血清对小鼠脾淋巴细胞的影响[J]. 食用菌学报, 2018, 25(2): 113-120.
SU L, SU JY, LI D, XIE YZ, JIAO CW, LAI Y, LI WZ. Effects of *Lanmaoa asiatica* extracts administered mice serum on mice splenocytes[J]. Acta Edulis Fungi, 2018, 25(2): 113-120 (in Chinese).
- [2] 梁佳明, 王肖肖, 张蓝云, 胡旭佳. 兰茂牛肝菌菌柄和菌盖中鲜味成分的分析及菌盖中鲜味肽的鉴定[J]. 食品科学, 2021, 42(22): 232-239.
LIANG JM, WANG XX, ZHANG LY, HU XJ. Analysis of umami components in stipe and Pileus of *Lanmaoa asiatica* and identification of umami peptides in pileus[J]. Food Science, 2021, 42(22): 232-239 (in Chinese).
- [3] 孙达锋, 胡小松, 张沙沙. 电子鼻结合气相-离子迁移谱联用技术分析兰茂牛肝菌气调贮藏期间挥发性风味物质的变化[J]. 食品工业科技, 2021, 42(21): 111-117.
SUN DF, HU XS, ZHANG SS. Changes in volatile compounds of *Lanmaoa asiatica* during controlled atmosphere storage using electronic nose combined with

- gas chromatography-ion mobility spectroscopy[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(21): 111-117 (in Chinese).
- [4] 王冉, 刘朝贵, 须建. 外生菌根菌的分离与培养的研究进展[J]. 中国食用菌, 2013, 32(1): 4-7.
- WAND R, LIU CG, XU J. The separation and cultivation of ectomycorrhizal fungi[J]. Edible Fungi of China, 2013, 32(1): 4-7 (in Chinese).
- [5] 仪莹, 孙莹璐, 王道平, 李晓曼, 巫祥云, 潘映红, 张丽娜. 植物代谢组学中几种重要的次生代谢物液质分析技术研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(10): 3674-3681.
- YI Y, SUN YL, WANG DP, LI XM, WU XY, PAN YH, ZHANG LN. Research progress in liquid chromatography of several important secondary metabolites in plant metabonomics[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(10): 3674-3681 (in Chinese).
- [6] WONG MY, EMERY PW, PREEDY VR, WISEMAN H. Health benefits of isoflavones in functional foods? Proteomic and metabonomic advances[J]. Inflammopharmacology, 2008, 16(5): 235-239.
- [7] 周雪, 袁鹏宇, 安霜, 陈鹏至, 陈幽幽, 杨晓敏, 李宗菊. 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[J]. 菌物学报, 2022, 41(1): 105-123.
- ZHOU X, YUAN PY, AN S, CHEN PZ, CHEN YY, YANG XM, LI ZJ. Analyses of metabolites of *Tuber sinense* and its symbiotic *Pinus yunnanensis* based on $^1\text{H-NMR}$ and GC-MS[J]. Mycosystema, 2022, 41(1): 105-123 (in Chinese).
- [8] FIEHN O. Metabolomics by gas chromatography-mass spectrometry: combined targeted and untargeted profiling[J]. Current Protocols in Molecular Biology, 2016, 114(1): 30-34.
- [9] KUEGER S, STEINHAUSER D, WILLMITZER L, GIAVALISCO P. High-resolution plant metabolomics: from mass spectral features to metabolites and from whole-cell analysis to subcellular metabolite distributions[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2012, 70(1): 39-50.
- [10] FARAG MA, WESSJOHANN LA, PORZEL A. Comparative metabolite profiling and fingerprinting of medicinal licorice roots using a multiplex approach of GC-MS, LC-MS and 1D NMR techniques[J]. Phytochemistry, 2012, 76: 60-72.
- [11] KIND T, FIEHN O. Metabolomic database annotations via query of elemental compositions: mass accuracy is insufficient even at less than 1 ppm[J]. BMC Bioinformatics, 2006, 7: 234.
- [12] LIAO HS, CHUNG YH, HSIEH MH. Glutamate: a multifunctional amino acid in plants[J]. Plant Science, 2022, 318: 111238.
- [13] HASANUZZAMAN M, NAHAR K, ANEE TI, FUJITA M. Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2017, 23(2): 249-268.