

蜜环菌侵染猪苓菌核多糖与甾体类成分积累的规律研究

杨明姝¹, 尹一飞¹, 陈娟^{1,2}, 李兵¹, 侯梦妍¹, 冷春燕¹, 邢咏梅^{1*}, 郭顺星^{1*}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193; 2. 道地药材品质保障与资源持续利用国家重点实验室, 北京 100700)

摘要: 为了探讨两种蜜环菌 (*Armillaria gallica* 和 *A. mellea*) 侵染猪苓菌核后对其不同部位的甾体类与多糖含量的影响, 本研究通过检测不同采收年限猪苓菌核生物量以及菌核中侵染部位 (隔离腔壁) 与非侵染部位的麦角甾醇、猪苓酮 A、猪苓酮 B 与多糖 4 种有效成分的含量, 根据生物量与含量的差异和动态变化筛选优质蜜环菌, 获得猪苓的最佳采收年限。采用高效液相色谱法与紫外-可见分光光度法分别测定猪苓菌核中上述 4 种成分的含量。另外, 对蜜环菌侵染猪苓菌核不同部位多糖合成相关的差异基因进行筛选与分析。研究发现, 不同种类蜜环菌侵染的猪苓菌核随栽培年份的增长, 猪苓菌核生物量与 4 种成分的含量均存在显著差异, 猪苓隔离腔壁部位的 4 种成分显著高于其非侵染部位, 最佳采收年限是在栽培后的第 3 年。转录组学分析表明蜜环菌的侵染能够显著促进猪苓多糖合成相关差异基因高表达。本研究明确了蜜环菌侵染对猪苓菌核化学成分积累的影响, 为探索两者共生机制奠定了基础, 为筛选优质蜜环菌并指导猪苓人工栽培提供了科学依据。

关键词: 猪苓; 蜜环菌; 麦角甾醇; 猪苓酮 A; 猪苓酮 B; 多糖; 转录组

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)01-0232-07

Study on accumulation of polysaccharide and steroid components in *Polyporus umbellatus* infected by *Armillaria* spp.

YANG Ming-shu¹, YIN Yi-fei¹, CHEN Juan^{1,2}, LI Bing¹, HOU Meng-yan¹, LENG Chun-yan¹,
XING Yong-mei^{1*}, GUO Shun-xing^{1*}

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 2. State Key Laboratory for Quality Assurance and Sustainable Use of Dao-di Herbs, Beijing 100700, China)

Abstract: In view of the few studies on the influence of *Armillaria* spp. infection on the content of the chemical components in different parts of *Polyporus umbellatus* sclerotia, this study determined the biomass of *P. umbellatus* sclerotia and the contents of ergosterol, polyporusterone A, polyporusterone B and polysaccharide in the separated cavity wall of the sclerotia and the uninfected part of the sclerotia in different harvesting years under the conditions of *A. gallica* and *A. mellea* infection respectively. According to the difference of content and dynamic changes of the polysaccharide and the steroid substances, the superior *Armillaria* sp. was screened to obtain the best harvest years of *P. umbellatus*. Using HPLC and UV-VIS spectrophotometry methods, the contents of ergosterol, polyporusterone A, polyporusterone B and polysaccharide in *P. umbellatus* sclerotia infected by the two *Armillaria* spp. in different years were determined. In addition, the differentially expressed genes related to *P. umbellatus* polysaccharide synthesis were screened according to the transcriptomic data of different parts of

收稿日期: 2024-07-11; 修回日期: 2024-10-21.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (CIFMS) (2021-I2M-1-032); 国家自然科学基金 (81973425).

*通讯作者 Tel: 86-10-57833240, E-mail: meimary@163.com;

Tel / Fax: 86-10-57833231, E-mail: sxguo@implad.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0653

P. umbellatus after *A. mellea* infection. With the increase of years, the biomass of sclerotia infected by different *Armillaria* spp. had significant differences, and there were significant differences in the four components of sclerotia. The four components of the separated cavity wall of the sclerotia were significantly higher than those of the uninfected part. The best harvest time was the third year after cultivation. Transcriptomic analysis showed that the infection of *Armillaria* spp. could significantly promote polysaccharide synthesis, which provided a basis for polysaccharide content determination at the molecular level. The study clarified the influence of different *Armillaria* spp. infection on the accumulation of chemical components of *P. umbellatus* sclerotia, laying a foundation for exploring the symbiosis mechanism and provided a scientific clue for screening superior *Armillaria* sp. and guiding the artificial cultivation of *P. umbellatus* sclerotia.

Key words: *Polyporus umbellatus*; *Armillaria*; ergosterol; polyporusterone A; polyporusterone B; polysaccharide; transcriptome

猪苓 (*Polyporus umbellatus*) 是多孔菌科真菌猪苓的干燥菌核, 主要分布于山西、陕西、云南、甘肃、贵州等地, 早在《神农本草经》就有“猪苓味甘、淡、平, 归肾、膀胱经, 用于水肿、泄泻、淋浊, 带下”的记载。已报道的猪苓中有效成分包括多糖、甾体、非甾体、氨基酸、维生素等^[1], 其中多糖 (polysaccharide) 和甾体类化合物 (steroids) 是猪苓菌核中主要功能性成分。现代药理学研究表明, 猪苓多糖具有抗肿瘤^[2]、免疫调节^[3]、保肝^[4]等作用^[5], 以麦角甾醇 (ergosterol)、猪苓酮 A (polyporusterone A)、猪苓酮 B (polyporusterone B) 为代表的甾体类成分是猪苓中的主要利水渗湿物质^[6], 主要用于治疗急性肾炎、淋病、糖尿病、全身浮肿以及小便不畅等^[7]。

猪苓菌核的生长离不开蜜环菌 (*Armillaria* spp.), 蜜环菌隶属于膨瑚菌科 (Physalacriaceae)^[8]蜜环菌属 *Armillaria* (Fr.) Staude, 是猪苓的共生菌。1955年日本学者川村清一首次观察到在猪苓菌核上有蜜环菌索存在^[9]。上世纪90年代, Xu等^[10,11]认为, 蜜环菌与猪苓之间是一种寄生与反寄生的互利共生关系, 蜜环菌侵染后会激活猪苓菌核的免疫反应, 细胞木质化并增厚, 将入侵蜜环菌菌索和少部分猪苓菌丝包围, 形成隔离腔。蜜环菌通过消化猪苓菌丝维持自身生存, 猪苓菌丝附着在蜜环菌菌索吸取蜜环菌的代谢产物, 从而长出新苓, 随着时间增加, 蜜环菌活力减弱随之解体, 猪苓吸收解体后的蜜环菌, 促进自身的菌核生长及化学成分积累^[12]。近年来, 国内外研究主要集中于猪苓的生物学特性^[1]、药理活性^[3,13,14]及猪苓质量标准方面, 而对不同种类蜜环菌侵染猪苓菌核的隔离腔壁部位以及非侵染部位化学成分含量的变化规律尚未见报道。

本研究比较了两种蜜环菌侵染猪苓菌核在不同生长年限的样品中猪苓多糖、麦角甾醇、猪苓酮 A 和猪苓酮 B 的含量变化。另外, 对猪苓菌核进行了转录组学分析, 筛选猪苓多糖合成的差异基因, 对多糖和甾体类

成分积累的规律进行分析, 揭示蜜环菌侵染对菌核不同部位化学成分积累的影响, 为猪苓对蜜环菌胁迫的防御反应机制的深入研究提供科学依据。

材料与方法

供试菌株 蜜环菌 CX-74 分离于河南洛阳的猪苓菌核样本, 当地生产菌株分离于山西古县的猪苓菌核样本。采用 CTAB 法提取 DNA, 根据 IGS、ITS 等序列设计引物, 对两个菌株的基因组 DNA 进行扩增、测序及序列比对。经鉴定, CX-74 与 *A. gallica* (MT248417.1) 相似性为 100%, 当地生产菌株与 *A. mellea* (KY055440.1) 相似性为 100%。猪苓菌核采集自山西古县, 经鉴定为多孔菌科真菌猪苓 *P. umbellatus* (Pers.) Fries。

仪器设备 EnSpire 2300 多模式微孔板检测仪 (美国珀金埃尔默股份有限公司); 万分之一电子天平 (美国梅特勒-托利多仪器上海有限公司); KQ-700DE 型超声波清器 (昆山市超声仪器有限公司); LUX-24 数显恒温水浴锅 (北京陆希科技有限公司); 1260 InfinityLC 型蒸发光散射高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司) 等。

主要试剂 麦角甾醇对照品 (上海源叶生物科技有限公司, 货号: A10116); 猪苓酮 A 对照品 (批号: wkq22090503) 和猪苓酮 B 对照品 (批号: wkq22090703), 四川省维克奇生物科技有限公司; D-无水葡萄糖对照品 (上海源叶生物科技有限公司, 货号: B21882); 甲醇 (色谱纯, 货号: A452-4) 和乙腈 (色谱纯, 货号: A998-4), 美国赛默飞世尔科技有限公司; 实验用水为超纯水; 其余试剂均为分析纯。

猪苓菌核生物量测定 猪苓按穴栽培, 用于栽培的种苓均是 250 g, 每穴平行等距离放入斜切鱼鳞口的木棒 3 根, 种苓均匀放入鱼鳞口旁及木棒两端, 将 1 瓶蜜环菌 CX-74 栽培种放于靠近种苓处, 再放入 250 g 细枝条, 最上层铺 200 g 树叶, 以当地的蜜环菌生产菌株 (Local) 为对照组。在栽培后 1、2、3、4 年取样, 分析猪

苓的菌核生物量。

甾体类成分对照品溶液及供试品溶液制备 精密称取麦角甾醇、猪苓酮A和猪苓酮B对照品适量,用甲醇配制成 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏备用。取猪苓菌核样品粉末过4号筛,精密称定 1 g ,置于 50 mL 离心管中,加95%的乙醇 20 mL ,浸泡 12 h 后,超声处理(功率 100 W) 1 h ,放置室温, $3\ 500\times\text{g}$ 离心 30 min ,将上清液倒入蒸发皿,在 $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅浓缩提取液,蒸干溶剂,残渣以甲醇定容至 1 mL ,制成样品溶液。

色谱条件 色谱柱为XBridge™ Shield RP18柱($250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$, $5\ \mu\text{m}$),流动相为乙腈-水(28:72),流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$,进样量 $20\ \mu\text{L}$,猪苓酮A和猪苓酮B的紫外检测波长为 247 nm ,麦角甾醇的紫外检测波长为 283 nm 。

甾体类成分含量测定方法学验证

线性关系 分别精密量取麦角甾醇对照品溶液适量,用甲醇配制浓度为 4 、 8 、 18 、 36 、 72.5 、 145 、 290 、 580 、 $1\ 160\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液。精密吸取上述对照品溶液各 $20\ \mu\text{L}$,以上述色谱条件进行HPLC分析,以对照品进样浓度 $X(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ 为横坐标,峰面积积分值 Y 为纵坐标进行回归分析。

分别精密量取猪苓酮A和猪苓酮B对照品溶液适量,以猪苓酮A配制浓度 2.5 、 5 、 10 、 20 、 40 、 80 、 $160\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液和猪苓酮B配制浓度 1.25 、 2.5 、 5 、 10 、 20 、 40 、 $80\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液制备成混标溶液。精密吸取上述对照品溶液各 $20\ \mu\text{L}$,以上述色谱条件进行HPLC分析,以对照品的进样浓度 $X(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ 为横坐标,峰面积积分值 Y 为纵坐标进行回归分析。

精密度 分别精密吸取麦角甾醇对照品溶液、猪苓酮A对照品溶液、猪苓酮B对照品溶液 $20\ \mu\text{L}$,在上述色谱条件下,重复进样6次,得麦角甾醇、猪苓酮A、猪苓酮B的吸光度,计算色谱峰面积的相对标准偏差(RSD)。

重复性 精密称定猪苓样品粉末 1 g ,按“甾体类成分对照品溶液及供试品溶液制备”项下操作,制备6份供试品溶液,在上述色谱条件下测定峰面积,计算样品中麦角甾醇、猪苓酮A、猪苓酮B的含量及RSD。

稳定性 精密称定猪苓样品粉末 1 g ,按“甾体类成分对照品溶液及供试品溶液制备”项下操作,制备供试品溶液,在上述色谱条件下,分别在 0 、 2 、 4 、 8 、 12 h 进样,测得麦角甾醇、猪苓酮A、猪苓酮B含量的RSD。

加样回收实验 精密称取6份已知含量的猪苓样品 0.25 g ,分别加入固定量的麦角甾醇对照品溶液、猪苓酮A对照品溶液、猪苓酮B对照品溶液,按“甾体类

成分对照品溶液及供试品溶液制备”项下操作,制备供试品溶液,在上述色谱条件下测定峰面积计算麦角甾醇、猪苓酮A、猪苓酮B的平均回收率。

甾体类成分含量测定 取不同年份隔离腔壁部位和非侵染部位样品,按“甾体类成分对照品溶液及供试品溶液制备”项下操作,制备供试品溶液,在上述色谱条件进行测定,根据标准曲线计算两种蜜环菌侵染条件下隔离腔壁部位与非侵染部位不同年限猪苓酮A、猪苓酮B和麦角甾醇含量,平行重复3次。

总多糖提取 取猪苓菌核样本粉末过4号筛,精密称定 0.05 g ,加入 1 mL 水,充分震荡, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴提取 2 h 。冷却后 $10\ 000\times\text{g}$ 离心 10 min ,取上清液。吸取 0.2 mL 上清液,慢慢加入 0.8 mL 无水乙醇,混匀后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置过夜, $10\ 000\times\text{g}$ 离心 10 min ,弃上清,沉淀中加入 1 mL 水,充分混匀溶解沉淀后待测。

多糖含量测定方法学验证

线性关系 分别精密量取葡萄糖对照品溶液适量,加水配制浓度为 0.02 、 0.04 、 0.06 、 0.08 、 0.10 、 0.12 、 $0.14\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液。精密吸取 $200\ \mu\text{L}$ 待测样本,加入 $100\ \mu\text{L}$ 5%苯酚溶液和 0.5 mL 浓硫酸后混匀, $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min ,流水冷却。以空白试剂做对照,在 490 nm 波长处采用紫外-可见分光光度法测吸光度,以对照品的进样浓度 $X(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$ 为横坐标,吸光度 A 为纵坐标进行回归分析。

精密度 精密量取对照品溶液 1.0 mL ,按“线性关系”项下操作,显色测定吸光度(A),重复6次,以 A 值计算RSD。

重复性 取猪苓粉末6份,按“总多糖提取”项制备供试品溶液,按“线性关系”项下操作,显色测定吸光度,重复6次,以 A 值计算RSD。

稳定性 取猪苓粉末1份,精密称定,按“总多糖提取”项制备供试品溶液,按“线性关系”项下操作,显色后于 0 、 30 、 60 、 90 、 120 min 连续测定,以 A 值计算RSD。

加样回收实验 精密称定已知含量的猪苓样品 0.05 g ,共6份,每份加入固定量的葡萄糖标准品,按“总多糖提取”项下操作,得各加样回收供试品溶液,按“线性关系”项下操作,完成显色后测定猪苓多糖含量,计算猪苓多糖回收率。

多糖含量测定 取不同年限隔离腔壁部位和非侵染部位样品,按“总多糖提取”项制备供试品溶液,按“线性关系”项下操作,显色后测定多糖含量,平行重复3次。

多糖合成相关基因的差异表达分析 将待测猪苓菌核隔离腔壁部位与非侵染部位样品以液氮粉碎,

每组菌核设置3个生物学重复,参照QIAGEN RNA试剂盒提取总RNA。质检合格后,委托北京诺禾致源生物科技有限公司进行cDNA文库构建,在文库质量符合测序要求后对转录组进行测序,将所得序列拼接成转录本,在7个数据库(Nr、Nt、Pfam、KOG/COG、Swiss-Prot、KEGG、GO)中进行基因功能注释,将read count转换成FPKM,把 $q\text{-value} < 0.05$ 和 $|\log_2(\text{fold change})| > 1$ 的基因定义为差异表达基因。

统计学分析 使用IBM SPSS Statistics 27软件通过单因素方差分析(ANOVA)进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义;采用Origin 2021软件进行作图。

结果

1 不同采收年限的猪苓菌核生物量

结果见图1。与当地蜜环菌生产菌株相比,CX-74能够显著提高猪苓菌核产量($P < 0.05$),第3年,猪苓菌核产量比对照组提高34%。

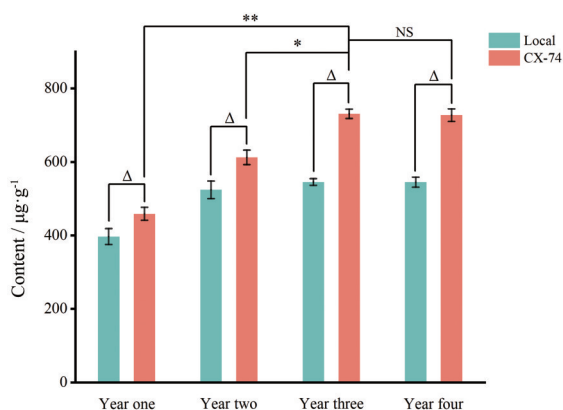


Figure 1 Comparison of the biomass accumulation trend of *P. umbellatus* sclerotia in different years under the infection of *A. gallica* and *A. mellea*. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; NS: No significance. $\Delta P < 0.05$. Local: Sclerotia infected by *A. mellea* collected from Guxian, Shanxi Province; CX-74: Sclerotia infected by *A. gallica* collected from Luoyang, Henan Province

2 猪苓中甾体类成分含量测定

2.1 色谱条件的选择

分别在上述色谱条件下,检测出猪苓酮A、猪苓酮B混合对照品和猪苓菌核样品中猪苓酮B特征峰(14.543 min)和猪苓酮A特征峰(20.632 min),分离度良好;检测出麦角甾醇对照品和猪苓菌核样品中麦角甾醇特征峰,如图2所示,分离度良好。

2.2 方法学验证

2.2.1 线性关系 麦角甾醇线性回归方程为: $Y =$

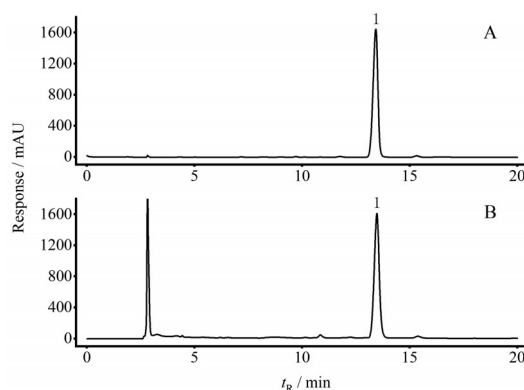


Figure 2 HPLC chromatogram of ergosterol reference substance (A) and sample of *P. umbellatus* sclerotia (B) at 283 nm. 1: Ergosterol

$55.19X - 1.036$, $R^2 = 0.9997$ 。结果表明:麦角甾醇进样浓度在 $4 \sim 1160 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内与峰面积具有良好的线性关系,该标准曲线可用于样品中麦角甾醇的含量计算。

猪苓酮A线性回归方程为 $Y = 20.997X + 35.202$, $R^2 = 0.9993$,猪苓酮B线性回归方程为 $Y = 29.246X + 23.217$, $R^2 = 0.9993$ 。结果表明,猪苓酮A进样浓度在 $2.5 \sim 160 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内与峰面积具有良好的线性关系,猪苓酮B进样浓度在 $1.25 \sim 80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内与峰面积具有良好的线性关系,该标准曲线可用于样品中猪苓酮A和猪苓酮B的含量计算。

2.2.2 精密度 麦角甾醇、猪苓酮A、猪苓酮B色谱峰面积的RSD为1.45%、1.98%、1.64%,结果符合要求。

2.2.3 重复性 麦角甾醇、猪苓酮A、猪苓酮B色谱峰面积的RSD分别为1.55%、1.38%、2.19%,说明该方法具有良好的重复性。

2.2.4 稳定性 麦角甾醇、猪苓酮A、猪苓酮B含量的RSD分别为1.87%、1.82%、1.26%,表明样品溶液在12 h内稳定。

2.2.5 加样回收实验 麦角甾醇、猪苓酮A、猪苓酮B的平均回收率为98.26%、95.44%、98.75%,RSD为2.19%、2.47%、1.87%,符合要求。

2.3 含量测定

通过测定两种蜜环菌侵染的猪苓菌核隔离腔壁部位(Local QR, CX-74 QR)以及非侵染部位(Local CK, CX-74 CK)麦角甾醇、猪苓酮A、猪苓酮B含量(图3)发现,在第1年至第3年,随着生长年限的增加,猪苓菌核内的麦角甾醇、猪苓酮A、猪苓酮B含量也随之迅速增加。在第3年至第4年,猪苓酮A、猪苓酮B增长缓慢,甚至隔离腔壁部位的麦角甾醇含量出现负增长。隔离腔壁部位麦角甾醇、猪苓酮A、猪苓酮B的含量显著高于非侵染部位,在第3年,CX-74侵染的猪苓菌核

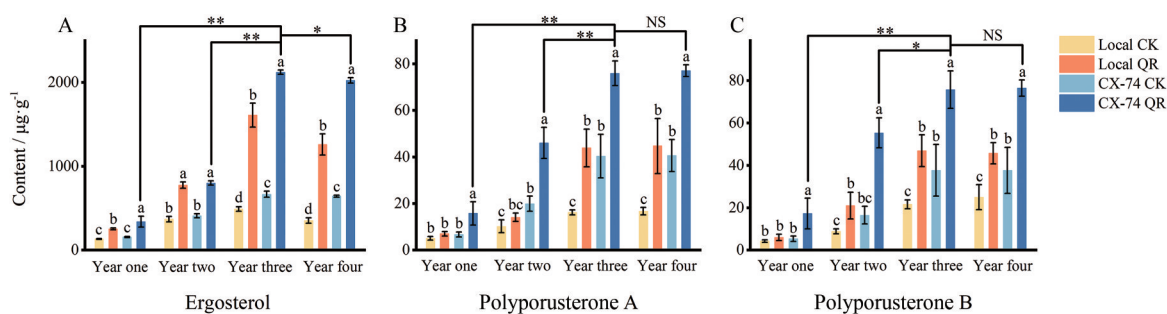


Figure 3 The change trend of ergosterol (A), polyporusterone A (B) and polyporusterone B (C) contents in *P. umbellatus* sclerotia infected by *A. gallica* and *A. mellea* in different years. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; NS: No significance. Different letters (a, b, c and d) indicate significant differences within the same year, $P < 0.05$. Local CK: Uninfected parts of sclerotia infected by *A. mellea*; Local QR: Separated cavity wall parts of sclerotia infected by *A. mellea*; CX-74 CK: Uninfected parts of sclerotia infected by *A. gallica*; CX-74 QR: Separated cavity wall parts of sclerotia infected by *A. gallica*

隔离腔壁部位麦角甾醇、猪苓酮A、猪苓酮B含量分别比非侵染部位高217.96%、101.42%、88.18%。从第3年开始, CX-74侵染的猪苓菌核麦角甾醇、猪苓酮A、猪苓酮B含量显著高于当地蜜环菌生产菌株侵染的菌核。

3 猪苓中多糖含量测定

3.1 方法学验证

3.1.1 线性关系 以葡萄糖作为对照品, 标准条件下测定回归方程为 $A = 7.981X - 0.0037$, $R^2 = 0.9973$ 。结果表明葡萄糖含量在 $0.02 \sim 0.14 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时与吸光度呈现良好的线性关系。

3.1.2 精密度 以A值计算, RSD值为1.46%, 结果符合要求。

3.1.3 重复性 以A值计算, RSD值为2.32%, 结果符合要求。

3.1.4 稳定性 以A值计算, RSD值为1.65%, 表明2 h内样品稳定性良好。

3.1.5 加样回收率 计算猪苓多糖回收率为99.30%, RSD为2.13%。

3.2 含量测定

通过对猪苓菌核中多糖含量测定(图4)发现, 猪苓菌核中多糖含量同甾体类成分表现出相似的积累规律, 从第1年到第3年多糖含量随生长年限的增加而升高, 第3年达到最高值, 随后略有下降。隔离腔壁部位多糖含量显著高于非侵染部位, 在第3年, CX-74侵染的猪苓菌核隔离腔壁部位多糖含量分别比非侵染部位高87.38%。从第2年开始, CX-74侵染的猪苓菌核多糖含量积累优势显著高于当地生产菌株侵染的菌核。

4 多糖合成相关差异基因的转录组数据分析

以猪苓菌核隔离腔壁部位和非侵染部位进行转录组测序, 发现与多糖生物合成相关的10个差异表达基因, 且这些基因在蜜环菌侵染的猪苓菌核部位均为高

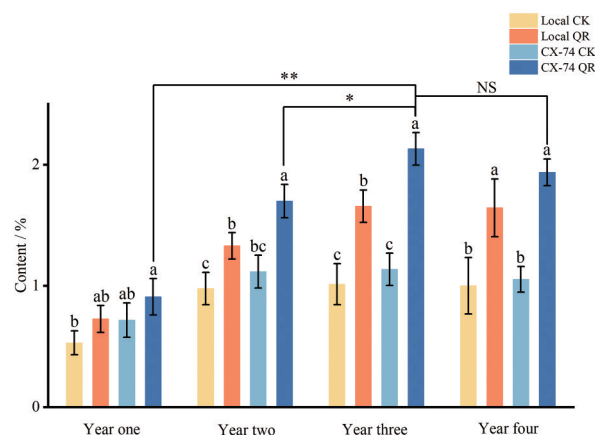


Figure 4 The change trend of polysaccharide contents in *P. umbellatus* sclerotia infected by *A. gallica* and *A. mellea* in different years. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; NS: No significance. Different letters (a, b and c) indicate significant differences within the same year, $P < 0.05$

表达, 详见表1。

讨论

在栽培的前三年, 随着猪苓生长年限的增加, 菌核中的麦角甾醇、猪苓酮A、猪苓酮B、多糖含量是不断升高的, 在第3年达到或趋于最高值, 在第4年增长缓慢。推测从第3年开始菌核逐渐老化, 吸收蜜环菌菌索营养的能力降低; 蜜环菌生长占优势进一步消化菌核; 接种蜜环菌的木材腐烂, 影响蜜环菌的质量, 进而影响猪苓菌核中有效成分的积累。麦角甾醇含量变化与Li等^[15]的报道一致, 猪苓多糖的含量变化与Guo等^[16]、Yang等^[17]、Xia等^[18]所报道的前四年多糖含量变化趋势相一致。因此, 猪苓并不是生长年限越长质量就一定越好, 从药材质量和经济收益综合考虑, 在栽培的第3年采收最为科学合理, 既能保证有效成分的高效利

Table 1 Differential genes involved in polysaccharide synthesis of *P. umbellatus* sclerotia infected by *Armillaria* sp. QR: Separated cavity wall parts of sclerotia infected by *Armillaria* sp.; CK: Uninfected parts of sclerotia infected by *Armillaria* sp.

Annotation or function of enzymes	Compared group	Adjusted <i>P</i> value	Log ₂ fold change	Up or down regulated	Gene ID
Chitin synthase 1	QR vs CK	3.30E-09	17.3	Up	comp22190_c0
Chitin synthase export chaperone	QR vs CK	1.22E-10	17.2	Up	comp31208_c0
Glucokinase	QR vs CK	6.29E-08	16.2	Up	comp21436_c0
Glucokinase	QR vs CK	2.42E-03	14.4	Up	comp28547_c0
1,3-Alpha-glucan synthase	QR vs CK	3.24E-11	16.4	Up	comp43858_c0
1,3-Alpha-glucan synthase	QR vs CK	4.32E-10	15.9	Up	comp43857_c0
Hexokinase	QR vs CK	5.93E-07	16.0	Up	comp29269_c0
Hexokinase	QR vs CK	8.40E-05	15.0	Up	comp26037_c0
Glucose-6-phosphate isomerase	QR vs CK	1.56E-05	16.5	Up	comp28199_c0
1,3-Beta-glucan synthase	QR vs CK	8.91E-07	16.6	Up	comp11969_c0

用,又能提高种植人员的经济收入,为猪苓的实际生产提供理论指导。

以往的研究都是以整个猪苓菌核作为研究对象^[19,20],而本研究将菌核的隔离腔壁部位和非侵染部位分别进行取样,该方法更加直接科学地反映蜜环菌促进猪苓菌核次级代谢产物积累的作用。从代谢产物的角度来看,蜜环菌隔离腔壁部位化合物的多样性和含量均优于非侵染部位,推测菌核可从蜜环菌直接获取营养,也可在蜜环菌的刺激下,改变自身代谢,吸收某些根系分泌物或者其他微生物的代谢产物^[21]。

在猪苓的实际生产中,必须依靠蜜环菌与菌核共生提供营养^[22]。蜜环菌种类繁多,全世界已经鉴定的生物种大约有40种^[23],筛选优质蜜环菌对猪苓的生产尤为重要。经过鉴定,当地生产菌株和CX-74属于不同的生物种,前者是蜜环菌,后者是高卢蜜环菌,二者在形态上有差异,蜜环菌菌索呈带状,二叉分枝;高卢蜜环菌菌索呈圆柱状,顶端尖锐,单轴分支^[23],蜜环菌是导致森林木腐病的病原菌,致病性强^[24],而高卢蜜环菌具有低病原性的特点,作用较温和,常常作为天麻、猪苓伴栽的优势种^[25,26]。本研究表明,CX-74相较于当地生产菌株在提高猪苓产量和质量方面均表现出明显优势,这与先前报道一致,本文的研究结果将为筛选适合猪苓生长发育的优质蜜环菌菌株以及猪苓产业的高质量发展奠定基础。

前期研究发现,蜜环菌侵染猪苓菌核后,会使甾体类成分合成增加,表现在编码麦角甾醇合成的3个差异基因均上调表达^[27]。同时,蜜环菌的侵染能够促进猪苓菌核多糖合成显著增加,编码几丁质合成酶、1,3-β-葡聚糖合成酶等的差异基因均上调表达(表1)。真菌细胞壁多糖主要由几丁质和葡聚糖构成^[28]。几丁质是在几丁质合成酶的作用下合成,几丁质合酶是一种膜结合的糖苷转化酶,主要包括CHS1、CHS2和CHS3^[29]。葡萄糖、果糖等前体物质经过一系列合成反应形成多糖合成前体,前体物质在位于质膜内的1,3-β-

葡聚糖合成酶的作用下不断延伸聚合形成1,3-β-葡聚糖^[30,31]。Bian等^[32]指出,猪苓菌核的生长发育受非生物胁迫(如温差)以及生物胁迫(蜜环菌侵染)的共同刺激,几丁质合成酶和1,3-β-葡聚糖合成酶显著高表达。这些转录组数据为多糖含量在猪苓菌核不同部位中呈现显著差异提供了证据支持。

综上所述,本文探究了猪苓菌核中多糖和甾体类成分的积累规律,验证了不同种类蜜环菌的侵染对猪苓菌核药效学成分积累的显著影响,比较了侵染部位(隔离腔壁)与非侵染部位药效成分的含量差异,为进一步探究猪苓与蜜环菌的共生机制以及两者之间复杂的基因调控方式奠定理论基础。

作者贡献: 杨明妹和尹一飞为本文所涉及的实验的主要操作者、实验数据处理及论文的撰写者;陈娟和李兵参与论文修改;侯梦妍和冷春燕均参与实验数据分析;邢咏梅和郭顺星设计实验并对文章进行了构思和修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Chen XM, Tian LX, Guo SX. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of sclerotia of *Polyporus umbellatus* (Polyporaceae, Basidiomycota) [J]. *Mycosystema* (菌物学报), 2017, 36: 35-47.
- [2] Liu T, Han T, Liu C, et al. *Polyporus umbellatus* polysaccharide iron-based nanocomposite for synergistic M1 polarization of TAMs and combinational anti-breast cancer therapy [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 251: 126323.
- [3] Liu CP, Li X, Lai GN, et al. Mechanisms of macrophage immunomodulatory activity induced by a new polysaccharide isolated from *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries [J]. *Front Chem*, 2020, 8: 581.
- [4] Gao W, Zhang L, Wu J, et al. Extraction, characterization, and anti-nonalcoholic steatohepatitis activity of a (1,3) (1,6)-β-D-glucan from the *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 230: 123252.

- [5] Liu GK, Yang TX, Wang JR. Polysaccharides from *Polyporus umbellatus*: a review on their extraction, modification, structure, and bioactivities [J]. Int J Biol Macromol, 2021, 189: 124-134.
- [6] He D, Ren Y, Hua X, et al. Phytochemistry and bioactivities of the main constituents of *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries [J]. Phytomedicine, 2022, 103: 154196.
- [7] Lu WJ, Ren H, Cui XM, et al. Research progress on effective components, pharmacological mechanisms and clinical use of *Polyporus umbellatus* in diuresis-promotion and dampness-clearance [J]. China Pharm (中国药房), 2023, 34: 1399-1403.
- [8] Henkel TW, Smith ME, Aime MC. *Guyanagaster*, a new wood-decaying sequestrate fungal genus related to *Armillaria* (Physalacriaceae, Agaricales, Basidiomycota) [J]. Am J Bot, 2010, 97: 1474-1484.
- [9] Xu GB, Li TY, Li YR. Research and prospect of the medicinal Fungi *Polyporus umbellatus* [J]. J Yanbian Univ Agric (延边大学农学学报), 2012, 34: 262-266.
- [10] Xu JT, Guo SX. The relationship between *Armillaria mellea* and *Grifola umbellata* [J]. Mycosystema (菌物学报), 1992, 11: 142-145.
- [11] Xu JT, Guo SX, Li Y, et al. The ontogeny of sclerotia of *Polyporus umbellatus* [J]. Chin Pharm J (中国药理学杂志), 1991, 26: 714-716, 759.
- [12] Guo SX, Xu JT. Genesis and function of defense structure of sclerotia of *Grifola umbellata* after *Armillaria mellea* infection [J]. Mycosystema (菌物学报), 1993, 12: 283-288.
- [13] Lin ZY, Geng L, Liu X, et al. Research progress on pharmacological action and mechanism of *Polyporus umbellatus* polysaccharide [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med (中药药理与临床), 2023, 39: 100-105.
- [14] Jia W, Luo S, Lai G, et al. Homogeneous polyporus polysaccharide inhibits bladder cancer by polarizing macrophages to M1 subtype in tumor microenvironment [J]. BMC Complement Med Ther, 2021, 21: 150.
- [15] Li JL, Tian F, Kang LW, et al. Content comparison of ergosterol in *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries from different producing areas [J]. Chin J Spectrosc Lab (光谱实验室), 2012, 29: 2818-2822.
- [16] Guo SX, Cao WQ, Wang QY, et al. Studies on the content of sugar in different parts of *Grifola umbellata* sclerotium in the courses of symbiosis with *Armillaria mellea* [J]. Chin Pharm J (中国药理学杂志), 2002, 37: 493-495.
- [17] Yang HY, Yin LL, Zeng H, et al. Research on the relationship of elevation, slope and years with production and quality of Zhuling [J]. Pharm Clin Chin Mater Med (中药与临床), 2017, 8: 8-10.
- [18] Xia Q, Li M, Zhou J, et al. Analysis on the content of ergosterol and polysaccharide of *Polyporus umbellatus* from different producing areas, commodity specifications and growing years [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2015, 38: 45-48.
- [19] Ren LL, Zhao ZH, Yang Y, et al. Correlation between medicinal components and inorganic elements in *Polyporus umbellatus* from different habitats [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med (辽宁中医药大学学报), 2020, 22: 49-53.
- [20] Song RQ, Song TG, Yuan Y, et al. Study on polysaccharide content and monosaccharide composition of *Polyporus umbellatus* from different production area [J]. Chin Pharm J (中国中药杂志), 2019, 44: 3608-3614.
- [21] Liu LL, Qin S, Zhu GS, et al. Advances in studies on ecosystem of *Grifola umbellata* and *Armillaria mellea* [J]. Hubei Agric Sci (湖北农业科学), 2012, 51: 655-659.
- [22] Wei ZQ, Xiao B, Li N, et al. Preliminary screening of *Armillaria mellea* with symbiotic nutritional advantages in sclerotia of *Polyporus umbellatus* [J]. South China Agric (南方农业), 2021, 15: 1-3.
- [23] Men JX. A Study on the Symbiotic *Armillaria mellea* Group of Medicinal Fungus *Polyporus umbellatus* (药用真菌猪苓菌株共生蜜环菌类群的研究) [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2017.
- [24] Gu YJ, Tang ZH, Zhang RY. Action of *Armillaria* in ecology and pathology of forest [J]. Edible Fungi China (中国食用菌), 2007, 26: 15-16.
- [25] Men JX, Xing XK, Guo SX. A comparison of *Armillaria* spp. associated with *Polyporus umbellatus* and *Gastrodia elata* in China [J]. Mycosystema (菌物学报), 2017, 36: 1072-1082.
- [26] Liu MM, Xing YM, Guo SX. Investigation of symbiotic *Armillaria* species with Chinese traditional medicinal fungus *Polyporus umbellatus* [J]. Chin Pharm J (中国药理学杂志), 2015, 50: 390-393.
- [27] Xing YM, Li B, Liu L, et al. *Armillaria mellea* symbiosis drives metabolomic and transcriptomic changes in *Polyporus umbellatus* sclerotia [J]. Front Microbiol, 2022, 12: 792530.
- [28] Ibe C, Munro CA. Fungal cell wall proteins and signaling pathways form a cytoprotective network to combat stresses [J]. Fungi, 2021, 7: 739.
- [29] Chen DD, Wang ZB, Wang LX, et al. Structure, catalysis, chitin transport, and selective inhibition of chitin synthase [J]. Nat Commun, 2023, 14: 4776.
- [30] Zhao CR, You ZL, Chen DD, et al. Structure of a fungal 1,3- β -glucan synthase [J]. Sci Adv, 2023, 9: EADH7820.
- [31] Fu X, Zan XY, Sun L, et al. Functional characterization and structural basis of the β -1, 3-glucan synthase CMGLS from mushroom *Cordyceps militaris* [J]. J Agric Food Chem, 2022, 70: 8725-8737.
- [32] Bian XY, Pei TL, Liang ZS, et al. A landscape of transcriptome analysis of three sclerotia growth stages in *Polyporus umbellatus* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2019, 44: 3718-3723.