

外源诱导姬松茸麦角甾醇的合成

范秀芝, 姚芬, 殷朝敏, 史德芳, 高虹

(湖北省农业科学院农产品加工与核农技术研究所, 湖北武汉 430064)

摘要: 为提高姬松茸中麦角甾醇含量, 本研究借助液体培养, 通过添加外源诱导物提高菌丝中麦角甾醇含量。分别以茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 和水杨酸 (salicylic acid, SA) 为外源诱导物, 对其添加量、添加时间以及诱导时长进行优化, 并通过荧光定量 PCR 对诱导条件下参与麦角甾醇合成的相关基因表达量进行分析。结果表明, 两种诱导物对姬松茸菌丝中麦角甾醇的最佳诱导条件分别为菌丝培养到第 8 d 加入 70.00 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 和第 6 d 加入 10.00 $\mu\text{mol/L}$ SA, 并分别继续培养 2 d。优化条件下获得的菌丝中麦角甾醇含量分别为 2.35 mg/g 和 2.43 mg/g, 比对照组分别增加了 147.37% 和 155.79%。根据参与麦角甾醇合成的基因表达谱分析推测其诱导机制可能是 MeJA 和 SA 直接或间接的启动了麦角甾醇合成上游关键酶基因的表达, 并通过参与合成代谢相关酶的相互作用来实现麦角甾醇的合成调控。通过短时间外源诱导培养获得菌丝体中麦角甾醇含量已超过子实体中的, 因此可替代子实体开展麦角甾醇的相关研究。

关键词: 姬松茸; 麦角甾醇; 茉莉酸甲酯; 水杨酸; 基因表达

文章编号: 1673-9078(2021)01-65-72

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.01.0747

Exogenous Induction of Ergosterol Synthesis in *Agaricus blazei*

FAN Xiu-zhi, YAO Fen, YIN Chao-min, SHI De-fang, GAO Hong

(Institute of Agro-Products Processing and Nuclear-Agricultural Technology, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China)

Abstract: To increase the content of ergosterol in *Agaricus blazei*, the content of ergosterol in hyphae was increased by adding exogenous inducer under liquid culture condition. In this study, methyl jasmonate (MeJA) and salicylic acid (SA) were used as inducers, the concentration, adding time and duration of induction were optimized, and the transcriptional level of genes involving in ergosterol synthesis of *A. blazei* was analyzed by quantitative real time PCR. As results, the best induction conditions for ergosterol synthesis of *A. blazei* were adding 70.00 $\mu\text{mol/L}$ of MeJA and 10.00 $\mu\text{mol/L}$ of SA to the culture broth when the hyphal was culture to 8 d and 6 d, respectively, and continuously culturing 2 days under these conditions. The content of ergosterol in the harvested hyphae was respectively 2.35 mg/g and 2.43 mg/g, which increased by 147.37% and 155.79% than control group. Moreover, based on the gene expression profiles involving the ergosterol synthesis of *A. blazei*, it can be speculated that the induction mechanism of MeJA and SA on ergosterol may be they directly or indirectly initiate the expression of upstream key enzyme genes involving in the ergosterol synthesis, and the synthesis was regulated by the interaction of anabolic-related enzymes participating in metabolism. As a conclusion, the content of ergosterol in mycelia obtained by short time exogenous induction culture has exceeded that in fruiting body, so the mycelia obtained in this study can replace the fruiting body to research and apply the ergosterol of *A. blazei*.

Key words: *Agaricus blazei*; ergosterol; methyl jasmonate; salicylic acid; gene transcription

引文格式:

范秀芝, 姚芬, 殷朝敏等. 外源诱导姬松茸麦角甾醇的合成[J]. 现代食品科技, 2021, 37(1): 65-72

FAN Xiu-zhi, YAO Fen, YIN Chao-min, et al. Exogenous induction of ergosterol synthesis in *Agaricus blazei* [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(1): 65-72

收稿日期: 2020-08-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31601806); 湖北省农业科学院青年拔尖人才培养计划 (Q2018032)

作者简介: 范秀芝 (1984-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 食用菌活性物质合成调控及功能食品研发

通讯作者: 高虹 (1971-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 农产品加工和功能食品开发

姬松茸 (*Agaricus blazei*) 又名巴氏蘑菇、巴西蘑菇^[1], 属于担子菌门、伞菌目、蘑菇科、蘑菇属 (*Agaricus*)。姬松茸味道鲜美, 含有丰富的蛋白质、人体必需氨基酸、矿物质和微量元素等营养成分。近年来, 随着国内外对姬松茸研究的不断深入, 发现它不仅是一种美味的食用菌, 还在抗肿瘤、抗氧化、抗衰老、抑菌、降血糖、抗血栓等方面效果奇特^[2], 尤其是其抗肿瘤作用居食(药)用菌首位^[3]。

2001年, Takaku 等从干的姬松茸子实体中分离到一种脂类物质, 通过研究发现该物质能直接抑制肿瘤生长, 经核磁共振和质谱分析后确定此物质为麦角甾醇^[4]。2011年, 高虹等^[5]发现姬松茸菌丝体醇提物中的主要抗肿瘤活性成分也是麦角甾醇, 并经试验证实麦角甾醇是通过抑制肿瘤新生血管的形成来抑制肿瘤生长。已知抑制新生血管形成是抑制肿瘤的潜在治疗手段^[6], 因此, 这一发现为姬松茸在医药领域的应用提供了依据。但目前姬松茸麦角甾醇含量相对较低, 子实体中含量仅为 1.00~2.00 mg/g^[7], 且姬松茸子实体的栽培周期较长, 栽培过程需要消耗大量人力和物力, 产量也不高, 这些问题限制了姬松茸子实体作为原料用于其麦角甾醇产品的开发及应用。

外源诱导物, 又称诱导子 (elicitor molecules)、激发子 (elicitor), 是当生物受到胁迫时产生的多种能够响应胁迫并诱导防御基因表达, 以增强抗逆性的一类特殊化合物的总称^[8], 如茉莉酸类 (jasmonates, JAs) 和水杨酸 (salicylic acid, SA) 等。大量研究表明, JAs 和 SA 可诱导酶和防御蛋白的活性水平, 导致次级代谢物质的产生和积累, 被认为是非常有效的诱导子^[9,10]。近年来, JAs 的茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 和水杨酸 (salicylic acid, SA) 在大型真菌代谢产物诱导应用中初见成效。已有的研究主要集中在灵芝 (*Ganoderma lucidum*) 三萜^[11]、桑黄 (*Phellinus igniarius*) 黄酮^[12]和猴头菌 (*Hericium erinaceus*) 麦角甾醇^[13]产量提高及诱导机制的研究中。

因此, 本研究借助液体培养的优势, 通过外源诱导物的添加提高菌丝中麦角甾醇产量, 并通过诱导条件下参与麦角甾醇合成基因的表达分析, 探析姬松茸麦角甾醇合成的分子机理及其调控机制, 为利用基因工程手段构建高产麦角甾醇工程菌株提高麦角甾醇的生物合成量, 以及开发保健食品及功能配方食品奠定基础, 同时为进一步全面阐述姬松茸中次生活性物质代谢合成调控机制提供理论指导。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

姬松茸菌株 JSR3 购自华中农业大学菌种实验中心, 保藏于湖北省农业科学院农产品加工与核农技术研究所。

麦角甾醇标准品购自上海源叶生物科技有限公司; 茉莉酸甲酯、水杨酸、色谱级甲醇等购自 Sigma 公司; 氢氧化钾、无水乙醇、正己烷等试剂均为分析纯。

1.2 培养基及培养条件

固体完全培养基 (CYM): 葡萄糖 20.00 g, 蛋白胨 2.00 g, 酵母膏 2.00 g, KH_2PO_4 0.46 g, K_2HPO_4 1.00 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.50 g, 琼脂 20.00 g, 蒸馏水 1.00 L。

JSR3 菌株接种到 CYM 固体培养基, 于 25 °C, 避光培养 5~7 d 进行活化。

1.3 麦角甾醇诱导合成条件优化

1.3.1 茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 和水杨酸 (salicylic acid, SA) 添加浓度筛选

(1) MeJA 添加浓度筛选

分别向 100 mL (250 mL 三角瓶) 液体 CYM 培养基中加入不同体积的无菌 MeJA 溶液使其终浓度分别为 60.00、70.00、80.00、90.00、100.00 $\mu\text{mol/L}$ 。活化的姬松茸菌丝用 8 mm 打孔器打孔, 等量接种到 CYM 液体培养基中, 25 °C 静止培养 2 d 后于 120 r/min 条件下振荡培养 6 d。菌丝于 60 °C 烘干, 称重, 计算得到菌丝生物量 (g/100 mL)。提取并测定菌丝中麦角甾醇含量 (mg/g), 确定 MeJA 的最佳添加浓度。以 MeJA 浓度为 0 的培养基作对照, 每个处理三个平行。

(2) SA 添加浓度筛选

100 mL 液体 CYM 培养基中分别加入不同体积无菌 SA 溶液使其终浓度分别为 1.00、10.00、100.00、500.00、1000.00 $\mu\text{mol/L}$, 以不含水杨酸的空白培养基作对照, 每个处理三个平行。接种及培养条件同上。提取、测定菌丝中麦角甾醇含量, 确定 SA 最佳添加浓度。

1.3.2 添加时间确定

分别在接种的 0、2、4、6、8、10 d 加入最佳浓度 MeJA 或 SA, 于 25 °C, 120 r/min 振荡培养, 并加入空白对照, 继续培养至第 12 d 收获菌丝体, 测定生物量和麦角甾醇含量, 筛选最佳添加时间。每个处理三个平行。

1.3.3 诱导时长确定

在最佳添加时间(第 n d)时加入最佳浓度的 MeJA 或 SA, 于 25 °C, 120 r/min 振荡培养, 后分别在第 n d、(n+1) d、(n+2) d、(n+3) d、(n+4) d、(n+5) d 收获菌丝, 测定生物量和麦角甾醇含量。每个处理三个平行。

1.4 基因表达分析

参考检测获得的 JSR3 转录组数据 (NCBI: PRJNA305463) 以及酿酒酵母 (*Saccharomyces*

cerevisiae)^[14]中报道麦角甾醇合成途径, 设计基因表达定量分析引物 (表 1)。在优化的条件下分别添加 MeJA 和 SA, 收集 0~60 h 液体培养菌丝液氮速冻后提取总 RNA, 经反转录后用于定量 PCR 扩增^[15]。扩增体系 25.00 μL, 反应程序为 95 °C, 10 min; 95 °C, 15 s→60 °C, 60 s, 循环 40 次; 60 °C→95 °C, +1 °C/30 s。以姬松茸内源 *gpd* 基因为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因的相对表达量^[16]。

表 1 麦角甾醇合成途径中基因表达定量分析引物

Table 1 Primers for RT-PCR analysis of genes involving in ergosterol synthesis

基因	引物名称	引物序列 (5'-3')	产物
<i>erg13</i>	ERG13-S	GATGGTGTCTCAAAGGGCAAGT	HMG-CoA 合成酶
	ERG13-A	GCCGCAGTAGATCCATAACAAG	
<i>hmgcr</i>	HMGCR-S	TGCGACTGGTGATGCTATGG	HMG-CoA 还原酶
	HMGCR-A	CCGCAGGCTTCTTATCCGTA	
<i>erg19</i>	ERG19-S	CGGCGTTACTTCAACATCGG	二磷酸甲羟戊酸脱羧酶
	ERG19-A	GCCATCGTAACCTCGCAA	
<i>erg9</i>	ERG9-S	CCGCACTCTCCTCCAGTTCTA	角鲨烯合成酶
	ERG9-A	ATTTTCGGAGTAGGGGTTGCT	
<i>erg1</i>	ERG1-S	CTTCGGAAACTGGGTCTGGAG	角鲨烯环氧化酶
	ERG1-A	GCCACCCTCTTCAATCAGCC	
<i>erg7</i>	ERG7-S	ACAATGCTCCGTCCCACCTC	羊毛固醇合酶
	ERG7-A	TGAGCACGGGCAACGAGAT	
<i>cyp51</i>	CYP51-S	TATCTTGACGGCATCACGAACC	羊毛甾醇 14α 去甲基化酶
	CYP51-A	AGAGGCAGGTTAGGGAACAGGA	
<i>erg24</i>	ERG24-S	CGTCGTGGTGGTATCCAAAATG	C-14 甾醇还原酶
	ERG24-A	GGCTGTAAATGAAAGGAACCCA	
<i>erg25</i>	ERG25-S	AACAAAGTCCCTACACCGCAAG	甲基甾醇单加氧酶
	ERG25-A	GGTGGAATAGCCAAATAGCCG	
<i>erg26</i>	ERG26-S	GACATAGTCCAGCGGCATTTC	C-3 固醇脱氢酶
	ERG26-A	CATTGCCATTGAAAACGACAC	
<i>erg27</i>	ERG27-S	AAGTTTAGGGAGGTTGTGGAGATC	3-酮基固醇还原酶
	ERG27-A	AAGGTAGTAGGTTGGAGTCGTGAG	
<i>erg6</i>	ERG6-S	ACGCCAGGCTCTAAAAACAGTC	C-24 固醇甲基转移酶
	ERG6-A	GTAGCAACCCCATCCACTCCAT	
<i>erg2</i>	ERG2-S	AGCAAGTTTCCAATCATCTCCC	C-8 甾醇异构酶
	ERG2-A	GCTGGATTCCGTTGATGTTACC	
<i>erg3</i>	ERG3-S	TCCTCAATCTCTGCGACGAATA	C-5 甾醇去饱和酶
	ERG3-A	TGAGACCATTTGAAGACGAAGC	
<i>erg5</i>	ERG5-S	CGCCGCATCCAAGAGTAAAC	C-22 甾醇去饱和酶
	ERG5-A	TGGCATCTTGAGAAGCGAATAG	
<i>erg4</i>	ERG4-S	TCATTACTGAGGCTGGAAAGGC	C-24(28)甾醇还原酶
	ERG4-A	TTTGAGCAAGAACGGTTGAATG	
<i>gpd</i>	GAPDH-S	TCTGATGACAACCTGTTACAGCC	三磷酸甘油醛脱氢酶
	GAPDH-A	TTTCCATTGACACCACGACCAC	

1.5 麦角甾醇含量测定

1.5.1 麦角甾醇提取

姬松茸菌丝中麦角甾醇采用碱-醇法提取^[17]。称取 1.00 g 样品溶于 32.00 mL 碱-醇溶液 (KOH 25.00 g, 蒸馏水 40.00 mL, 乙醇定容到 100.00 mL), 40 °C 下 200 W 超声 20 min, 6000 r/min 离心 10 min, 上清液用正己烷萃取 2 次, 收集下层液体水洗到中性, 40 °C 旋转蒸干后加入 20.00 mL 无水乙醇, 超声溶解后定容到 25.00 mL。

1.5.2 麦角甾醇含量测定

麦角甾醇标准品稀释到 0.02~0.08 mg/mL, 采用 Inertsil® ODS-SP (5 μm, 4.6 mm×250 mm) C18 色谱柱, 柱温 30 °C, 流动相为 V (流动相甲醇):V (水)=98:2, 流速 1.00 mL/min, 检测波长 282 nm, 进样体积 10.00 μL。以峰面积 Y 为纵坐标, 标准品进样量 X (mg/mL) 为横坐标, 绘制标准曲线 ($Y=1\times 10^7 X+11493$, $R^2=0.9981$)。样品稀释或不稀释经 0.22 μm 滤膜过滤至进样瓶, 10.00 μL 进样, 以峰面积外标法定量。

1.6 统计分析

试验数据利用单因素方差分析 (one-way ANOVA test) 进行差异显著性分析, 以 $p<0.05$ 判断差异显著性程度。采用 Origin 8.0 软件进行数据分析作图。利用 Hemi 软件绘制基因表达量热图。

2 结果与讨论

2.1 外源诱导物添加量筛选

有报道指出, MeJA 和 SA 的浓度会影响细胞的生长和次级代谢产物的产量^[9,11-13], 因此本研究分别对 MeJA 和 SA 诱导姬松茸麦角甾醇合成的最佳浓度进行了筛选。从图 1 中可以看出, 虽然 MeJA 和 SA 可以诱导姬松茸麦角甾醇的合成, 但麦角甾醇的合成量并不会随着诱导物浓度的增加而持续增加。图 1a 中, 姬松茸菌丝中麦角甾醇的含量随着培养基中 MeJA 浓度的提高呈现出先增加后减少的趋势, 在浓度为 70.00 μmol/L 时, 菌丝中麦角甾醇含量最高, 为 1.35 mg/g, 其含量是对照组 (MeJA 浓度为 0) 的 1.52 倍。但在 MeJA 不同浓度条件下, 菌丝生物量并未表现出与麦角甾醇含量相同的趋势。且与麦角甾醇含量趋势相反, 菌丝的生物量在 MeJA 浓度为 70.00 μmol/L 时最低, 为 1.17 g/100 mL, 而在不添加 MeJA 时生物量最高, 为 1.43 g/100 mL。这一现象与其他物种中报道一致,

原因可能是 MeJA 抑制初级代谢, 而激活次级代谢, 且 MeJA 对细胞生长的抑制可能有利于次生代谢物的合成^[9,18]。

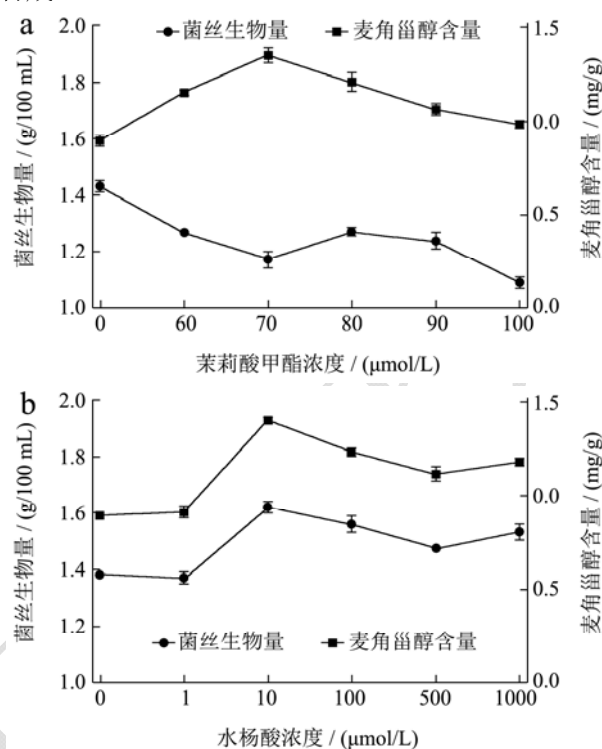


图1 茉莉酸甲酯 (a) 和水杨酸 (b) 添加浓度对姬松茸菌丝生物量和麦角甾醇含量的影响

Fig.1 Effects of concentrations of MeJA and SA on the mycelial biomass and ergosterol content in *Agaricus blazei*

与 MeJA 不同, SA 浓度对姬松茸菌丝生物量和麦角甾醇含量的影响具有相同的趋势 (图 1b)。虽然生物量和麦角甾醇含量不与 SA 浓度成正比, 但在 SA 浓度为 10.00~1000.00 μmol/L 时, 所有测试浓度均促进了菌丝生物量和代谢产物麦角甾醇的合成, 这一结果与 SA 对桑黄 (*P. igniarius*)^[12]、猴头菇 (*H. erinaceus*)^[13]、灵芝 (*G. lucidum*)^[19] 中黄酮、麦角甾醇、灵芝酸等次级代谢产物的影响报道一致。在 SA 浓度为 10.00 μmol/L 时, 姬松茸菌丝生物量和其中麦角甾醇含量达到最大值, 分别为 1.62 g/100 mL 和 1.40 mg/g, 比对照组 (SA 浓度为 0) 分别提高了 17.39% 和 57.30%, 表明 SA 可增加姬松茸中麦角甾醇含量^[12,19]。

与本文确定的 MeJA 和 SA 对麦角甾醇的最佳诱导浓度 (70.00 μmol/L 和 10.00 μmol/L) 不同, 猴头菇中报道的 MeJA 和 SA 对麦角甾醇的最佳诱导浓度为 50.00 μmol/L 和 100.00 μmol/L^[13], 分析原因可能是不同食用菌菌种对这 2 种诱导物的耐受性存在差异。

2.2 外源诱导物添加时间

为同时提高麦角甾醇的含量以及菌丝生物量, 对

外源诱导物的添加时间进行了优化,结果如图2所示。图2a中,培养至第6d时加入70.00 μmol/L MeJA,培养结束收获的菌丝量达到最大值,为1.92 g/100 mL,是空白对照组(1.40 g/100 mL)的1.37倍。麦角甾醇的含量随着添加时间的推后,总体呈现先抑制后促进再抑制的趋势,在第8d添加MeJA时,麦角甾醇含量达到最大值,为2.52 mg/g,是对照组(0.89 mg/g)的2.83倍。而在第4d加入MeJA,菌丝的生物量和麦角甾醇含量均最小,在第4d达到最小峰值,推测原因可能是菌丝在刚刚度过“适者生存”期向指数生长期转变时,加入的MeJA后又一次引起“适者生存”现象^[20],抑制了菌丝的初级和次级代谢,从而导致菌丝生物量和麦角甾醇含量值最低。考虑到菌丝生物量和麦角甾醇出现最大值的MeJA添加时间不一致,我们以培养终点所获得菌丝中麦角甾醇总量为参考指标,确定第8d为MeJA的最佳添加时间点,此时获得的麦角甾醇总量最高,为4.56 mg/100 mL。

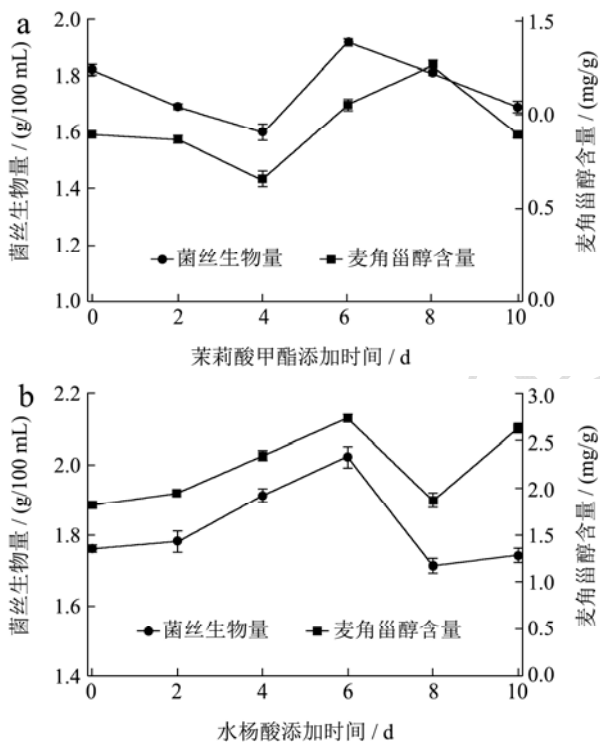


图2 茉莉酸甲酯(a)和水杨酸(b)添加时间对姬松茸菌丝生物量和麦角甾醇含量的影响

Fig.2 Effects of adding time of MeJA and SA on the mycelial biomass and ergosterol content in *Agaricus blazei*

由图2b可以看出,在12d的培养周期内,不同时间点加入SA,菌丝的生物量和麦角甾醇含量表现出相同的趋势。在培养至第6d加入10.00 μmol/L的SA时最终收获的菌丝量和其中麦角甾醇的含量均达到最大值,分别为2.02 g/100 mL和2.73 mg/g,分别为空白对照组的1.44和3.07倍。根据以上结果,可以

看出SA比MeJA具有对姬松茸菌丝量和麦角甾醇具有更好的诱导效果,推测可能是因为二者的诱导机制或作用底物不同^[21,22]。

2.3 外源诱导物诱导时长

Shi等^[12]研究指出,高浓度或长时间的诱导物处理会造成一个环境压力,从而影响菌丝的生长并引起代谢的改变。因此本研究在已确定的添加浓度和添加时间条件下,分别继续对菌丝进行5d的培养,每天取样以确定MeJA和SA最佳诱导时长,以提高菌丝生物量和麦角甾醇含量。

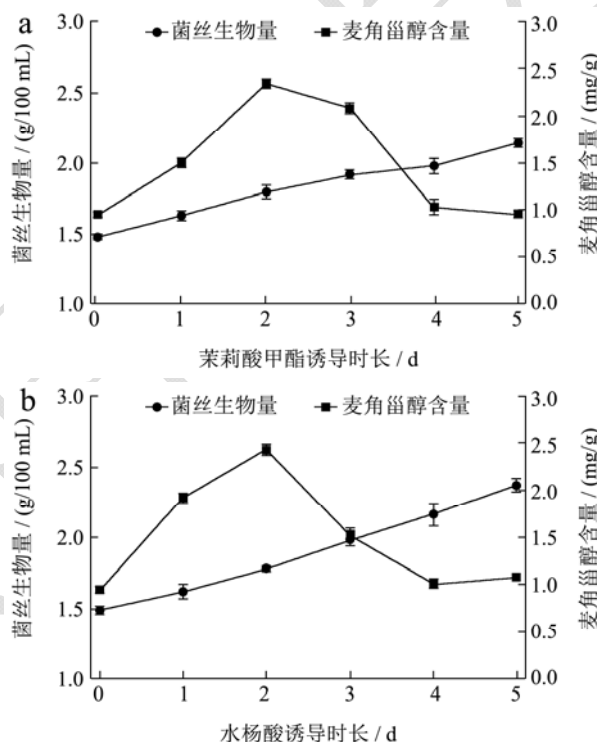


图3 茉莉酸甲酯(a)和水杨酸(b)诱导时长对姬松茸菌丝生物量和麦角甾醇含量的影响

Fig.3 Effects of duration of MeJA and SA induction on the mycelial biomass and ergosterol content in *Agaricus blazei*

由图3可以看出,在加入MeJA和SA后,随着培养时间的延长菌丝生物量基本上呈现出增加的趋势,随着培养时间的延长,菌丝生物量缓慢增加。此外,菌丝中麦角甾醇含量均在添加MeJA和SA后的第2d达到最大值,分别为2.35 mg/g和2.43 mg/g,比对照组(0d, 0.95 mg/g)分别增加了147.37%和155.79%。此时,虽然菌丝生物量比较低,但其中麦角甾醇总量均达到最高值,分别为4.24 mg/100 mL和4.33 mg/100 mL。而且,该诱导条件下获得的麦角甾醇含量已超过姬松茸子实体中的含量(1.00~2.00 mg/g)^[7],比较姬松茸子实体栽培周期长以及所耗费的人力、物力和财力,本研究所获得的麦角甾醇具有

时间短、成本低、产量高等优势,尤其是以 SA 为诱导物时,培养时间更短而产量更高,因此可以考虑用培养所得菌丝体来代替子实体开展相关研究。

2.4 基因表达分析

Hu 等^[14]指出麦角甾醇的生物合成途径可分为三个模块,即戊酸合成、焦磷酸法尼酯合成和麦角甾醇合成。合成涉及至少 23 步反应,25 个结构基因^[23],这些基因中既有必需基因,也有非必需基因^[24]。Ren^[11]和 Shi^[12]等研究指出,MeJA 和 SA 可通过调控参与目标产物合成的基因转录水平或改变次级代谢途径中某些酶的活性来提高目标产物的合成。因此,为探明 MeJA 和 SA 诱导姬松茸麦角甾醇合成的机制,本文对添加诱导物前后参与麦角甾醇合成相关酶的编码基因(16 个,表 1)转录水平进行了定量。图 4a 和 4b 分别显示在姬松茸菌丝培养到第 8 d 加入 70.00 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 和第 6 d 加入 10.00 $\mu\text{mol/L}$ SA 后每隔 12 h 菌丝中参与麦角甾醇合成基因表达情况。

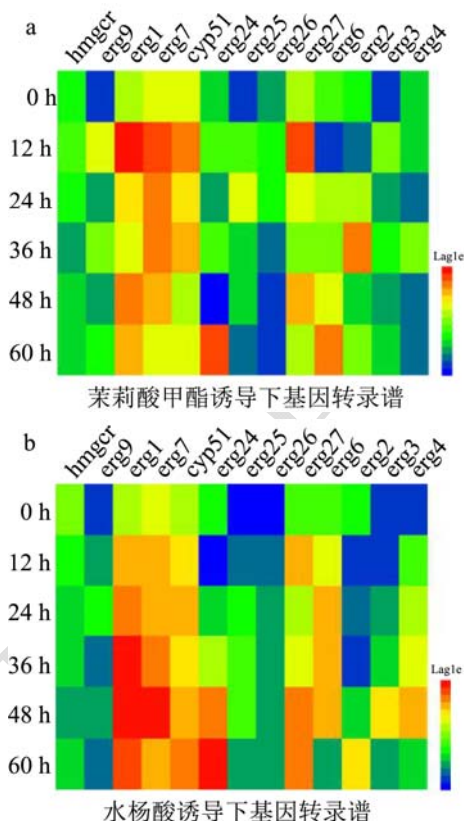


图4 茉莉酸甲酯(a)和水杨酸(b)诱导对姬松茸中麦角甾醇合成相关基因转录水平影响

Fig.4 The results of transcription analysis of the genes involving in ergosterol biosynthesis of *Agaricus blazei* in response to MeJA (a) and SA (b)

注: 标签数值以基因相对表达量的 log10 值表示。

从图 4 中可以看出,在添加 MeJA 和 SA 后,姬

松茸菌丝中 *erg1*, *erg7*, *cyp51* (*erg11*) 基因的表达量基本都表现为上调,这一结果可能与它们是麦角甾醇合成前期的必需基因有关^[14]。此外, *erg27* 的表达量虽也有所提高,但在不同时间点其表达量会出现波动,这可能是其编码的 3-酮基固醇还原酶与 *erg7* 基因编码的羊毛固醇合酶存在相互调控作用所导致的^[25]。

除以上 3 个基因转录水平明显提高外,在添加 SA 诱导的中后期, *erg6* 基因表达量出现上调,且随着诱导时间的延长 *erg4* 基因的表达量逐渐增加。有报道指出,在酿酒酵母中 *erg6* 基因和 *erg4* 基因的高表达会增加酿酒酵母中麦角甾醇的合成,预示着它们在麦角甾醇合成中具有重要调控作用^[26,27]。据此推测 *erg6* 和 *erg4* 基因在 SA 诱导的麦角甾醇含量提高中起到调控作用。但在 MeJA 诱导的菌丝中未检测到 *erg6* 和 *erg4* 这 2 个基因转录水平明显的改变,推测可能是 MeJA 和 SA 诱导麦角甾醇合成的机制存在差异。

hmgcr 基因编码的 HMG-CoA 还原酶是甾醇生物合成途径中第一个报道的限速步骤,高表达 HMG-CoA 还原酶可以促进中间体角鲨烯的积累^[23],但在 MeJA 和 SA 诱导下(图 4),姬松茸菌丝体中 *hmgcr* 基因的表达量始终处于一个较低的水平,推测可能是因为较高的麦角甾醇引起的反馈调控^[14]。而 *erg13*、*erg19*、*erg5* 基因也因其表达量过低而未检测到,推测可能跟蔡鹏丽等报道的结果一致,这些基因的表达量与麦角甾醇含量负相关^[28],较低的表达量更有利于麦角甾醇的合成。

虽然基因表达量不能完全代表其编码酶的活性,但综上可以推测 MeJA 和 SA 诱导麦角甾醇合成主要是通过直接或间接的作用启动麦角甾醇合成上游关键酶基因的表达来提高中间代谢产物的量,并通过中间代谢物与下游相关酶的协同、抑制等互作来实现的麦角甾醇合成的调控。

3 结论

外源添加 MeJA 和 SA 可以诱导姬松茸菌丝体中麦角甾醇合成。经过试验获得二者最佳的诱导条件分别是 25 $^{\circ}\text{C}$ 下液体培养的菌丝在第 8 d 加入 70.00 $\mu\text{mol/L}$ 的 MeJA 和第 6 d 加入 10.00 $\mu\text{mol/L}$ 的 SA,并继续培养 2 d。获得的菌丝中麦角甾醇含量分别为 2.35 mg/g 和 2.43 mg/g,比对照组分别增加了 147.37% 和 155.79%,并且高于姬松茸子实体中麦角甾醇含量,因此外源诱导,尤其是 SA 诱导获得菌丝体可替代子实体开展相关研究。通过荧光定量 PCR 对参与麦角甾醇合成基因表达量进行分析后推测 MeJA 和 SA 诱导麦角甾醇合成的机制可能是通过直接或间接的作用启

动麦角甾醇合成上游关键酶基因的表达,并通过参与麦角甾醇合成代谢相关酶的相互作用来实现的。

参考文献

- [1] 卯晓岚,蒋丹.我国重要食用菌的名称探析[J].食药菌, 2012,20(4):195-201
MAO Xiao-lan, JIANG Dan. An discussion of the names of important edible fungi in China [J]. Edible and Medicinal Mushrooms, 2012, 20(4): 195-201
- [2] 周宁.姬松茸多糖对人体健康的改善作用及机制[J].中国食用菌,2020,39(1):38-41
ZHOU Ning. Effect and mechanism of polysaccharide from *Agaricus blazei* on human health [J]. Edible Fungi of China, 2020, 39(1): 38-41
- [3] 近藤贤.巴西蘑菇与癌症[M].台湾:正义出版社,1998:23-24
Kondo. *Agaricus blazei* and Cancer [M]. Taiwan: Justice Press, 1998: 23-24
- [4] Takaku T, Kimura Y, Okuda H. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action [J]. Biochemical and Molecular Action of Nutrients, 2001,131(5): 1409-1413
- [5] 高虹,史德芳,杨德,等.巴西蘑菇麦角甾醇抗肿瘤活性及作用机理初探[J].中国食用菌,2011,30(6):35-39
GAO Hong, SHI De-fang, YANG De, et al. Antitumor activity of ergosterol from *Agaricus blazei* Murrill and its mechanism [J]. Edible Fungi of China, 2011, 30(6): 35-39
- [6] Carmeliet P, Jain R K. Angiogenesis in cancer and other diseases [J]. Nature, 2000, 407: 249-257
- [7] Mizuno T. Kawariharatake, *Agaricus blazei* Murill: medicinal and dietary effects [J]. Food Reviews International, 1995, 11(1): 167-172
- [8] 刘梅芳,朱晓程,肖华山.植物激发子及其信号传导之研究进展[J].中国农学通报,2008,24(3):215-220
LIU Mei-fang, ZHU Xiao-cheng, XIAO Hua-shan. Research progress of elicitor and its signal transduction in plants [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2008, 24(3): 215-220
- [9] Hu Y, Yu Y, Piao C, et al. Methyl jasmonate and salicylic acid induced D-chiro-inositol production in suspension cultures of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2011, 106(3): 419-424
- [10] Wu G, Gao Z, Du H, et al. The effects of abscisic acid, salicylic acid and jasmonic acid on lipid accumulation in two freshwater *Chlorella* strains [J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2018, 64(1): 42-49
- [11] Ren A, Qin L, Shi L, et al. Methyl jasmonate induces ganoderic acid biosynthesis in the basidiomycetous fungus *Ganoderma lucidum* [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(17): 6785-6790
- [12] Shi L, Tan Y, Sun Z, et al. Exogenous salicylic acid (SA) promotes the accumulation of biomass and flavonoid content in *Phellinus igniarius* (Agaricomycetes) [J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2019, 21(10): 955-963
- [13] Dai X, Zhan Y, Zhang J, et al. Regulatory effect of salicylic acid and methyl jasmonate supplementation on ergosterol production in *Hericium erinaceus* mycelia [J]. Journal of Forestry Research, 2015, 26(1): 71-77
- [14] Hu Z, He B, Ma L, et al. Recent advances in ergosterol biosynthesis and regulation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Indian Journal of Microbiology, 2017, 57(3): 270-277
- [15] 范秀芝.黑木耳 *gpd* 和漆酶基因克隆、表达及分子进化分析[D].武汉:华中农业大学,2013
FAN Xiu-zhi. Cloning, expression and molecular evolution of *gpd* and laccase genes in *Auricularia auricula-judae* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013
- [16] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29: 2002-2007
- [17] 高虹,程薇,周明,等.高效液相法测定香菇柄麦角甾醇的含量[J].菌物研究,2013,11(2):78-81
GAO Hong, CHENG Wei, ZHOU Ming, et al. Determination of ergosterol in *Lentinus edodes* stem by high-performance liquid chromatography [J]. Journal of Fungal Research, 2013, 11(2): 78-81
- [18] Kang S M, Min J Y, Kim Y D, et al. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of bilobalide and ginkgolides in cell cultures of *Ginkgo biloba* [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2006, 42(1): 44-49
- [19] Cao P F, Wu C G, Dang Z H, et al. Effects of exogenous salicylic acid on ganoderic acid biosynthesis and the expression of key genes in the ganoderic acid biosynthesis pathway in the Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes) [J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2017, 19(1): 65-73
- [20] 焦蒙丽.水杨酸和茉莉酸甲酯对丹参培养细胞迷迭香酸生物合成的诱导作用[D].杨凌:西北农林科技大学,2012
JIAO Meng-li. Effects of salicylic acid and methyl jasmonate on synthesis of rosmarinic acid in the suspension cultures of *Salvia miltiorrhiza* bung [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2012

- [21] Ali M B, Hahn E J, Paek K Y. Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures [J]. *Molecules*, 2007, 12: 607-621
- [22] Shi L, Gong L, Zhang X, et al. The regulation of methyl jasmonate on hyphal branching and GA biosynthesis in *Ganoderma lucidum* partly via ROS generated by NADPH oxidase [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2015, 81: 201-211
- [23] 张振颖,何秀萍,李巍巍,等.甾醇 C-24 甲基转移酶和甾醇 C-8 异构酶在酿酒酵母麦角甾醇生物合成中的调控作用[J].*微生物学报*,2009,49(8):1063-1068
- ZHANG Zhen-ying, HE Xiu-ping, LI Wei-wei, et al. Regulation role of sterol C-24 methyltransferase and sterol C-8 isomerase in the ergosterol biosynthesis of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(8): 1063-1068
- [24] Kristan K, Rižner T L. Steroid-transforming enzymes in fungi [J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 129(1-2): 79-91
- [25] Layer J V, Barnes B M, Yamasaki Y, et al. Characterization of a mutation that results in independence of oxidosqualene cyclase (Erg7) activity from the downstream 3-ketoreductase (Erg27) in the yeast ergosterol biosynthetic pathway [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2013, 1831(2): 361-369
- [26] He X, Zhang B, Tan H. Overexpression of a sterol C-24(28) reductase increases ergosterol production in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biotechnology Letters*, 2003, 25: 773-778
- [27] 孟云霞,何秀萍,刘楠,等.甾醇 C-24 甲基转移酶基因在酿酒酵母中的内源表达及工程菌麦角甾醇的合成[J].*生物工程学报*,2008,24(1):40-45
- MENG Yun-Xia, HE Xiu-ping, LIU Nan, et al. Endogenesis expression of sterol C-24 methyltransferase increases ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2008, 24(1): 40-45
- [28] 蔡鹏丽,何秀萍,刘楠,等.甾醇 C-22 去饱和酶高表达对酵母细胞麦角甾醇合成的影响[J].*微生物学报*,2007,47(2):274-279
- CAI Peng-li, HE Xiu-ping, LIU Nan, et al. Effect of over-expression of sterol C-22 desaturase on ergosterol production in yeast strains [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(2): 274-279

(上接第 6 页)

- [24] Ganther H E. Selenotrisulfides. Formation by the reaction of thiols with selenious acid [J]. *Biochemistry*, 1968, 7: 2898-2905
- [25] Ganther H E. Reduction of the selenotrisulfide derivative of glutathione to a persulfide analog by glutathione reductase [J]. *Biochemistry*, 1971, 10: 4089-4098
- [26] Kumari R P, Ramkumar S, Thankappan B, et al. Transcriptional regulation of crystallin, redox, and apoptotic genes by C-Phycocyanin in the selenite-induced cataractogenic rat model [J]. *Molecular Vision*, 2015, 21: 26-39
- [27] BAO P, CHEN Z, TAI R Z, et al. Selenite-induced toxicity in cancer cells is mediated by metabolic generation of endogenous selenium nanoparticles [J]. *Journal of Proteome Research*, 2015, 14(2): 1127-1136
- [28] Lazard M, Dauplais M, Blanquet S, et al. Recent advances in the mechanism of selenoamino acids toxicity in eukaryotic cells [J]. *Biomolecular Concepts*, 2017, 8(2): 93-104
- [29] Lazard M, Dauplais M, Blanquet S, et al. Trans-sulfuration pathway seleno-amino acids are mediators of selenomethionine toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290: 10741-10750
- [30] Kajander E O, Harvima R J, Eloranta T O, et al. Metabolism, cellular actions, and cytotoxicity of selenomethionine in cultured cells [J]. *Biological Trace Element Research*, 1991, 28: 57-68
- [31] Bockhorn J, Balar B, He D, et al. Genome-wide screen of *Saccharomyces cerevisiae* null allele strains identifies genes involved in selenomethionine resistance [J]. *Proceedings of the National Academy of Science*, 2008, 105: 17682-17687
- [32] Lazard M, Dauplais M, Blanquet S, et al. Recent advances in the mechanism of selenoamino acids toxicity in eukaryotic cells [J]. *Biomolecular Concepts*, 2017, 8(2): 93-104