

不同羊肚菌菌株的遗传差异性与胃黏膜保护作用的比较研究

魏巍¹, 余梦瑶¹, 许晓燕¹, 江南¹, 叶利明², 罗霞^{1,*}

(1.四川省中医药科学院 中药细胞与分子生物学实验室, 四川 成都 610041;

2.四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

摘 要: 为研究不同羊肚菌菌株之间的遗传差异性和比较不同菌株的胃黏膜保护作用。采用简单重复序列区间(inter-simple sequence repeats, ISSR)分子标记技术, 对羊肚菌进行了遗传差异性分析; 以菌丝体干质量为指标, 比较不同菌株液体发酵的菌丝体生物量; 研究不同菌株对酒精引起的小鼠急性胃黏膜损伤的保护作用。结果表明: 16株羊肚菌菌株可分为2组, 羊肚菌M1~M10生物量较高, 羊肚菌M1、M2、M3的胃黏膜保护作用最好。不同羊肚菌菌株在液体发酵生物量和胃黏膜损伤的保护作用方面存在较大的差异。

关键词: 羊肚菌; 简单重复序列区间; 生物量; 胃黏膜保护

Genetic Differences and Gastric Protective Effect of *Morchella* Strains

WEI Wei¹, YU Meng-yao¹, XU Xiao-yan¹, JIANG Nan¹, YE Li-ming², LUO Xia^{1,*}

(1. Cellular and Molecular Laboratory of Chinese Materia Medica, Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China; 2. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: In this study, inter-simple sequence repeats (ISSR) molecular labeling technology was used to explore the genetic diversity of *Morchella* strains on the basis of mycelium biomass in submerged culture, and their gastric protective effects on ethanol-induced acute gastric mucosal injury model in mice were compared. Results showed that 16 *Morchella* strains were divided into two groups. The biomass of M1—M10 was higher than that of other strains, and the gastric protective effect of M1, M2 and M3 was better than that of other strains. Mycelium biomasses and gastric protective effects varied in different *Morchella* strains.

Key words: *Morchella*; inter-simple sequence repeats (ISSR); biomass; gastric protective effects

中图分类号: S567.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 07-0160-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201407032

我国羊肚菌资源丰富, 分布广泛, 据记载, 在中国发现的羊肚菌有8个种, 在全国20多个省均发现。羊肚菌不仅味道鲜美而且具有极高营养保健价值。《中华本草》记载: 羊肚菌消食和胃, 化痰理气。主治消化不良, 痰多咳嗽。还可以增强免疫^[1]、抗辐射^[2]、抗肿瘤^[3]、保肝^[4]、促进胃排空与加强小肠推进^[5-6]。最近的研究报道, 尖顶羊肚菌对多种实验型动物胃溃疡具有保护作用^[7-8], 但是尚无文献报道这种胃黏膜保护作用是否在菌株之间存在差异。本实验利用分子生物学的手段研究了16株野生羊肚菌的遗传差

异性, 并比较了这16株野生羊肚菌对酒精引起的胃黏膜损伤的保护作用, 研究了胃黏膜保护作用在菌株之间的差异性, 为开发具有功效的羊肚菌新产品在菌株选择上提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养基

羊肚菌M1~M16于2004—2006年在四川省攀枝花、阿坝州与甘孜州等地采集, 通过组织或孢子分离而得,

收稿日期: 2013-04-29

基金项目: 菌类药材研究与开发四川省青年科技创新团队项目(2011JTD0021); 四川省“十二五”省农作物育种攻关项目(2011NZ0098-1204); 四川省科技厅食药菌现代产业链关键技术研究集成与产业化示范项目(2012NZ0003); 四川省精深加工研究岗位建设项目(川农业(2009)75号)

作者简介: 魏巍(1982—), 男, 助理研究员, 博士, 主要从事食药菌的研究与开发。E-mail: 21822546@qq.com

*通信作者: 罗霞(1974—), 女, 副研究员, 博士, 主要从事食药菌的研究与开发。E-mail: lx1443_cn@163.com

4℃条件下保存于PDA综合培养基上,每6个月活化传代一次(表1)。羊肚菌子实体为市场购买尖顶羊肚菌。

表1 菌株信息表

Table 1 Information about *Morechella* strains

菌株编号	采集地点	采集年份	分离方法
M1	攀枝花	2004	孢子分离
M2	攀枝花	2004	孢子分离
M3	攀枝花	2004	组织分离
M4	阿坝州	2005	孢子分离
M5	攀枝花	2004	组织分离
M6	阿坝州	2005	组织分离
M7	攀枝花	2004	组织分离
M8	攀枝花	2004	组织分离
M9	攀枝花	2004	组织分离
M10	攀枝花	2004	组织分离
M11	攀枝花	2004	组织分离
M12	攀枝花	2004	组织分离
M13	攀枝花	2004	组织分离
M14	攀枝花	2004	组织分离
M15	甘孜州	2006	孢子分离
M16	甘孜州	2006	孢子分离

1.2 引物

所用引物参照加拿大哥伦比亚大学UBC公司公布的第9套简单重复序列区间(inter-simple sequence repeats, ISSR)引物序列(<http://www.biotech.ubc.ca/services/naps/primers/Primers.pdf>),共100个引物。

1.3 动物

昆明种小鼠,雌雄各半,18~22 g,由四川省中医药科学研究院动物室提供(SPF级,合格证号:SCXK(川)2005-19),动物实验前适应性饲养3 d。

1.4 ISSR聚类分析

1.4.1 DNA提取

采用十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyltrimethyl ammonium bromide, CTAB)法提取DNA^[9]。

1.4.2 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增

PCR反应体系^[10]:模板DNA(100 ng/μL) 1 μL、10×PCR Buffer (Mg²⁺ free) 2.0 μL、ISSR引物(10 μmol/L) 0.2 μL、Opti-Taq (2.5 U/μL) 0.4 μL、dNTPs Mixture (each 2.5 mmol/L) 1.6 μL、Mg²⁺ (25 mmol/L) 1.6 μL、ddH₂O 13.2 μL。PCR扩增反应程序:94℃充分变性5 min;94℃变性45 s,50℃退火45 s,72℃延伸1 min,35个循环;72℃延伸10 min;反应完成后,PCR产物采用2%琼脂糖凝胶进行电泳,EB染色后利用凝胶成像系统成像。

1.4.3 引物的筛选

根据条带清晰度、多态性以及重复性进行PCR反应,以对100个ISSR引物进行筛选,筛选获得引物见表2。

表2 ISSR所用引物
Table 2 Primers used in ISSR

引物	5'→3'序列	条带数		多态率/%
		总数	多态条数	
807	TAT ATA TAT ATA TAT AG	20	20	100
808	ATA TAT ATA TAT ATA TYA	25	25	100
809	TAT ATA TAT ATA TAT ART	22	22	100
827	GGA TGG ATG GAT GGA T	21	21	100
842	DBD ACA CAC ACA CAC AC	20	20	100
855	TCT CTC TCT CTC TCT CRA	15	15	100
859	TGT GTG TGT GTG TGT GRT	19	19	100
864	CTC TCT CTC TCT CTC TG	22	22	100
884	TCT CTC TCT CTC TCT CRG	22	22	100
885	ACA CAC ACA CAC ACA CYG	25	25	100
886	TGT GTG TGT GTG TGT GRC	21	21	100
888	ACT TCC CCA CAG GTT AAC ACA	27	27	100
889	GAT CAA GCT TNN NNN NAT GTG G	24	24	100
890	CAT GGT GTT GGT CAT TGT TCC A	21	21	100
891	GGG TGG GGT GGG GTG	20	20	100
总数		324	324	100
平均		21.6	21.6	100

1.4.4 PCR产物的电泳图谱分析

对各个分子标记的PCR产物的电泳图谱进行分别分析。具有条带记为“1”,没有条带记为“0”,对每一菌株和每一引物进行数据转换,进而将电泳图谱转化一个仅包含“0”“1”的矩阵。采用NTSY Spc version 2.1软件,运用非加权组平均(unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA)法进行聚类分析。

1.5 生物量的测定与样品的提取

1.5.1 菌丝体的制备

使用前将保存菌种转入新鲜斜面活化,于25℃活化1周;将活化的斜面琼脂块(1 cm²)接入液体培养基中,于25℃、150 r/min摇床培养7 d^[10]。液体种子按体积分数10%接入发酵培养基中,于25℃、150 r/min摇床培养7 d。

1.5.2 生物量的测定

发酵液3 000 r/min离心10 min,收集菌丝体,用蒸馏水洗涤菌丝3次,离心后菌丝体冷冻干燥后,置于干燥器中保存。

1.5.3 样品提取

菌丝体冷冻干燥后,以20、15、10、10倍蒸馏水在功率800 W,超声提取4次,每次30 min,超声时间5 s,间隔5 s。将4次提取液混合,60℃减压浓缩至0.1 g/mL(即每0.1 g羊肚菌菌丝提取后浓缩至1 mL),-20℃保存。

1.6 胃黏膜保护作用比较

130只KM种小鼠,雌雄各半,随机分为13组,给药组每日灌胃羊肚菌水提液或子实体水提液2 g生药/kg(即提取液20 mL/kg),空白组和模型组给予等量蒸馏水,小鼠连续灌胃9 d,实验前1 d禁食不禁水24 h,第10天各组灌胃样品30 min后,除空白组外,各组灌胃95%乙

醇10 mL/kg, 1 h后颈椎脱臼处死取胃, 用磷酸盐缓冲液冲洗胃内杂质, 每只灌注3 mL福尔马林固定液后结扎幽门, 置入福尔马林固定液固定2 h。沿胃大弯剪开胃, 在解剖镜下记录观察胃黏膜损伤情况。按Guth评分标准, 计算胃黏膜损伤指数, 并计算损伤抑制率^[12]。

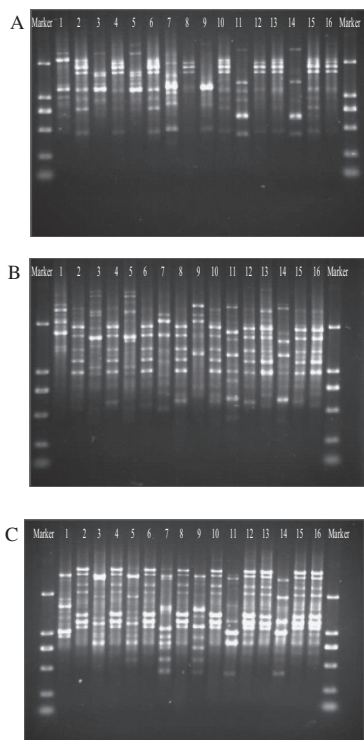
$$\text{胃黏膜损伤抑制率}/\% = \frac{\text{模型组损伤指数} - \text{给药组损伤指数}}{\text{模型组损伤指数}} \times 100$$

为比较各个菌株之间的胃黏膜保护作用的差别, 统计采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为有显著差异, 各组之间的比较采用Duncan's新复极差法比较。

2 结果与分析

2.1 ISSR多态性分析

将表2中15个引物应用于正式实验。通过15条引物对16个样本的扩增(图1), 共得到扩增产物324条, 无共有条带, 多态性100%。



A. 引物807; B. 引物808; C. 引物886。

图1 16株羊肚菌扩增ISSR图谱分析结果

Fig.1 ISSR profile of 16 *Morchella* strains

2.2 聚类分析

采用UPGMA法构建了系统发育树。由图2可知, 在相似系数0.51处截取聚类线, 可将16株羊肚菌菌株可分为2组, 即M15、M7、M13、M2、M1、M4、M5、M9等8株菌株一组, M16、M14、M12、M10、M8、M6、M3等8株菌株一组。

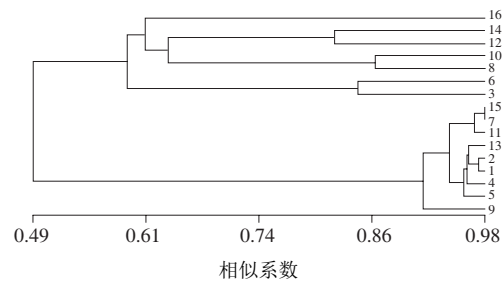


图2 16株羊肚菌ISSR聚类树

Fig.2 Dendrogram of 16 *Morchella* strains based on ISSR bands

2.3 液体发酵生物量比较

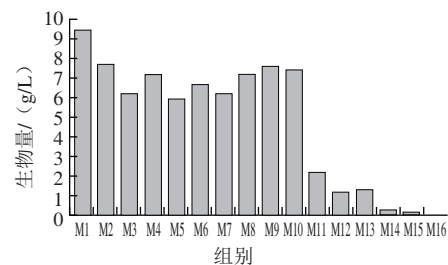
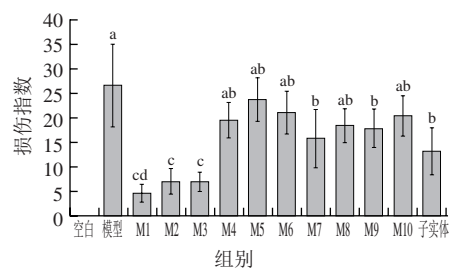


图3 16株羊肚菌液体发酵生物量比较

Fig.3 Comparison of biomass among 16 *Morchella* strains

由图3可知, 16株羊肚菌的液体发酵生物量差异较大, 其中羊肚菌M1的生物量最高, 达9.4 g/L, 其次为羊肚菌M2~M10, 生物量在6~8 g/L之间, 可以进行液体发酵培养, 羊肚菌M11~M16生物量较低, 最高仅有2.12 g/L, M14~M16几乎无法进行液体培养。因此, 在对酒精引起的急性胃黏膜损伤的保护作用比较实验中, 只选用生物量较高的羊肚菌M1~M10。

2.4 胃黏膜保护作用比较



小写字母不同表示显著差异 ($P < 0.05$)。

图4 小鼠胃黏膜损伤指数 ($n=10$)

Fig.4 Lesion index of gastric mucosa in mice ($n=10$)

由图4可知, 灌胃羊肚菌M1、M2、M3、M7、M9以及羊肚菌子实体水提液的小鼠胃黏膜损伤指数明显低于模型组 ($P < 0.05$), 其抑制率分别为82.39%、73.58%、73.58%、40.87%、32.71%和50.49%, 羊肚菌M1、M2、M3效果最好, 3组之间无显著差异 ($P > 0.05$)。羊肚菌M4、M5、M6、M8、M10损伤指数虽然低于模型组, 但是与模型组比较无显著差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

羊肚菌的人工栽培虽然已有成功报道^[13-14],但是成本高、工序复杂、重复性差等问题,至今仍无法大面积的推广和应用。而羊肚菌液体发酵技术比较成熟^[15-17]并且有着:原料来源广泛,价格低廉;生产周期短;污染率低;无季节性等诸多优势,适合工业化生产,具有替代子实体开发的潜力。结果中也发现部分液体发酵菌丝体的胃黏膜保护作用较子实体强,其作用机制与增加胃黏液的分泌和抗氧化作用有关^[18]。但是菌种之间的药理作用是否具有差异尚未有研究报道。

通过对16株羊肚菌采用ISSR分子标记的扩增产物表明,ISSR多态性丰富,重复性较高。采用UPGMA法对ISSR结果进行分析发现2组羊肚菌的遗传差异较大。遗传背景上存在差异,导致它们代谢产物或活性物质存在差异,引起药效的差异,有研究^[19]表明,灵芝不同菌株间在主要成分和药效上就存在明显的差异。提示各组团羊肚菌在功效上也可能存在较大的差异。在其胃黏膜保护作用的比较研究发现,羊肚菌的这种生物活性在菌株间也存在较大差异,其中保护作用较强的有羊肚菌M1、M2和M3,保护作用较弱的羊肚菌菌株有M4、M5、M8和M10。通过后续的研究,经形态学和内转录间隔区序列(internal transcribed spacer, ITS)的鉴定方法将其中保护作用较强的羊肚菌M1鉴定为尖顶羊肚菌(*M. conica*)^[20]。这种在亲缘关系很接近的菌株中存在生物活性的较大差异的现象,可能是由于生长条件、生长方式和生长阶段的不同导致的,具体原因尚有待研究。

参考文献:

- [1] 孙晓明,张卫明,吴泰玲,等.羊肚菌免疫调节作用研究[J].中国野生植物资源,2001,20(2):12-13;20.
- [2] 吕晓莲,郭宏,贾建会,等.羊肚菌发酵产物功能性研究[J].食品科学,2013,34(1):311-314.
- [3] 陈彦,潘见,周丽伟,等.羊肚菌胞外多糖抗肿瘤作用的研究[J].食品科学,2008,29(9):553-555.
- [4] 孙玉军,陈彦,周正义,等.羊肚菌胞内多糖对小鼠急性肝损伤的影响[J].中国食用菌,2008,27(2):41-42;45.
- [5] 吴映明.羊肚菌对小鼠胃排空的影响[J].辽宁中医药大学学报,2007,9(4):170-171.
- [6] 吴映明,陈奋,林建新,等.羊肚菌对小鼠小肠推进功能的研究[J].广东教育学院学报,2005,25(3):80-82.
- [7] 高明燕,郑林用,余梦瑶.尖顶羊肚菌菌丝体水提液对实验型胃溃疡的作用[J].菌物学报,2011,30(2):325-330.
- [8] 任丹,罗霞,余梦瑶,等.具有胃黏膜保护作用的羊肚菌菌株的筛选及液体发酵[J].食品科学,2010,31(17):240-244.
- [9] YU Mengyan, MA Bo, LUO Xia, et al. Molecular diversity of *Auricularia polytricha* revealed by inter-simple sequence repeat and sequence-related amplified polymorphism markers[J]. Current Microbiology, 2008, 56(3): 240-245.
- [10] ZHENG Linyong, JIA Dinghong, FEI Xiaofan, et al. An assessment of the genetic diversity within *Ganoderma* strains with AFLP and ITS PCR-RFLP[J]. Microbiological Research, 2009, 164: 312-321.
- [11] RICHARD S W. Cultural studies of *Morchella elata*[J]. Mycological Research, 2006, 110: 612-623.
- [12] HIROTO Y, SATOSHI T, KAORU T, et al. Intracisternal injection of orexin-A prevents ethanol-induced gastric mucosal damage in rats[J]. Journal of Gastroenterol, 2007, 42: 336-341.
- [13] 赵琪,徐中志,杨祝良,等.羊肚菌仿生栽培关键技术研究初报[J].菌物学报,2007,26(增刊1):360-363.
- [14] 李素玲,尚春树.羊肚菌子实体培育研究初报[J].中国食用菌,2000,19(1):8-10.
- [15] 邢增涛,孙芳芳,刘景圣.尖顶羊肚菌液体培养条件的研究[J].食用菌学报,2004,11(4):38-43.
- [16] 李晓明,赵嘉平,唐周斌.羊肚菌液体发酵的研究[J].西北林学院学报,2004,19(3):116-118.
- [17] 王莹,朴美子,孙永海.基于遗传算法的羊肚菌液体发酵动力学模型的建立[J].生物工程学报,2008,24(8):1454-1457.
- [18] 罗霞,魏巍,余梦瑶,等.尖顶羊肚菌对急性酒精性胃黏膜损伤保护作用研究[J].菌物学报,2011,30(2):319-324.
- [19] 郑林用.不同灵芝的遗传特异性和药效差异的比较研究[D].成都:四川大学,2008.
- [20] WEI Wei, LUO Xia, ZHENG Linyong, et al. Isolation of a wild *Morchella* spp. strain and the effects of its extract on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats[J]. Zeitschrift für Naturforschung C, 2011, 66(1/2): 55-62.