

外源钙离子对香菇菌丝生长的影响

张江萍¹, 辛泽平²

(1. 山西省林业厅 山西林业职业技术学院, 山西 太原 030012; 2. 关帝山国有林管理局 吴城林场, 山西 吴城 033000)

摘 要:以香菇 66[#]、236[#] 和 808[#] 菌株为试材, 采用统计分析及荧光显微镜观察等方法, 将富钙和无钙培养基与对照培养基对比, 分析了钙离子对香菇菌丝生长速度、菌丝尖端分支和菌丝生物量的影响。结果表明:与对照相比, 香菇菌丝在富钙和无钙平板培养基中满板时间分别减少或增加 1 d。显微观察发现富钙培养基生长的菌丝尖端长势旺盛, 分枝减少; 无钙培养基生长的菌丝尖端长势较弱, 分枝增多。生物量统计表明, 钙离子对香菇菌丝生物积累具有促进作用, 且在不同香菇品种中钙离子对香菇菌丝生长的影响趋势相同。

关键词:香菇; 菌丝长速; 尖端生长; 钙离子

中图分类号:S 646.1⁺2 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2016)18-0143-03

高等食用真菌富含独特的生物活性物质, 因此有关其菌丝营养生长以及次生代谢等是近年来研究的热点内容^[1-4]。香菇含有多钟抗肿瘤活性物质, 已作为免疫增强剂广泛应用于临床肿瘤辅助治疗中^[5-6]。然而, 目前关于香菇的研究主要集中于不同营养源如碳、氮, 以及不同外界环境条件如温度、pH 对其菌丝生长的影响, 对菌丝生长调控的分子机制解析还相对欠缺。

从原核生物到哺乳动物乃至人类, 钙离子(Ca^{2+})都是细胞内的重要信号分子, 并且调控着多种细胞发育过程, 其中植物胞浆内 Ca^{2+} 调控着气孔关闭、种子萌发、根的伸长以及根毛生长^[6]; 微生物中, Ca^{2+} 调控菌丝极性生长以及次生代谢产物的生物合成^[8-9]。然而, 目前关于 Ca^{2+} 与大型食用真菌菌丝生长的关系研究鲜有报道, 因此, 该研究以香菇为试验材料, 分析 Ca^{2+} 对其菌丝生长的影响, 以期深入研究 Ca^{2+} 对大型食用真菌菌丝生长的调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株为香菇(*Lentinula edodes*) 66[#]、236[#] 和 808[#] 菌株, 由山西林业职业技术学院食用菌项目组提供。

1.2 试验方法

改良的 PDA 培养基: 200 g 去皮马铃薯, 20 g 葡萄

糖, 20 g 琼脂, 1.5 g 蛋白胨, 3.5 g 磷酸二氢钾, 1.8 g 硫酸镁, 1 L 水, pH 自然。液体 PDA 不加琼脂。试验设 2 个处理分别添加 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$ 和 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{EGTA}$ 于改良的 PDA 培养基, 分别记作富钙(control + Ca^{2+}) 和无钙(Ca^{2+} -free) 培养基^[2,10], 以无处理 PDA 培养基为对照(control)。

1.3 项目测定

1.3.1 菌丝直径 取 3 个香菇品种的供试菌株接种于 PDA 固体平板(直径 90 mm)进行菌丝活化 2 代, 待菌丝长势和活性一致后, 采用菌饼接种法(打孔直径 0.6 cm), 分别接种于富钙和无钙以及对照的固体 PDA 平板中央, 每处理 5 个平板, 25 °C 黑暗培养, 每 24 h 观察 1 次, 每个平板统计 3 个菌落直径, 记录菌丝生长直径^[11]。

1.3.2 菌丝尖端观察 待 3 个香菇品种菌丝生长至 5 d 后, 在菌丝生长边缘, 将盖玻片斜插入 PDA 固体培养基中, 继续培养 2 d 待菌丝爬上盖玻片后, 用荧光增白剂染色, 置于荧光显微镜下观察。

1.3.3 生物量 取 3 个香菇品种分别打孔菌饼 3 块接种于液体 PDA 三角瓶中, 液体 PDA 分别为富钙、无钙和对照培养基, $180 \text{ r} \cdot \text{m}^{-1}$ 震荡培养 10 d, 过滤收集菌丝, 55 °C 烘干至恒重称质量, 每处理重复 3 次。

1.4 数据分析

采用 Graphpad 软件进行数据处理、分析及图表绘制。生物量数据处理时, 将香菇 236[#] 在对照 PDA 培养基中的菌丝生物量取平均值进行归一化处理, 计算不同处理之间生物量的相对比值(ratio)。

2 结果与分析

2.1 Ca^{2+} 对香菇菌丝生长速度的影响

图 1 表明, 不同香菇品种之间与对照处理的固体

第一作者简介:张江萍(1979-)女, 山西襄汾人, 硕士, 讲师, 现主要从事食用菌栽培与育种的技术研究与示范推广及教学工作。E-mail: sxlyzjp@163.com.

基金项目:2014 年度山西省煤基重点科技攻关资助项目(FT2014-03-01); 2015 年山西林业职业技术学院科研教改资助项目(201506)。

收稿日期:2016-04-21

PDA 平板(contorl)上菌丝生长速度存在差异,香菇 66[#]、236[#] 和 808[#] 长满平板时间分别为 11、13、12 d。相同香菇品种在富钙(contorl + Ca²⁺)和无钙(Ca²⁺-free)固体 PDA 培养基中长满平板时间与 contorl 相比,分别减少或增加 1 d,如香菇 66[#] 在富钙和无钙固体 PDA 培养基上长满平板时间分别为 10 d 和 12 d,该结果说明,Ca²⁺ 可以促进香菇菌丝的生长速度。

2.2 菌丝尖端观察

由图 2 可知,香菇菌丝在富钙和无钙培养基上的尖端生长存在明显差异,与对照相比(图 2-A,D),富钙培养基生长的尖端菌丝(图 2-B,E)长势旺盛,分枝减少;无钙培养基生长的尖端菌丝(图 2-C,F)长势较弱,分枝增多。试验结果表明,Ca²⁺ 对香菇菌丝尖端生长具有促进作用,且不同香菇品种间影响趋势一致。

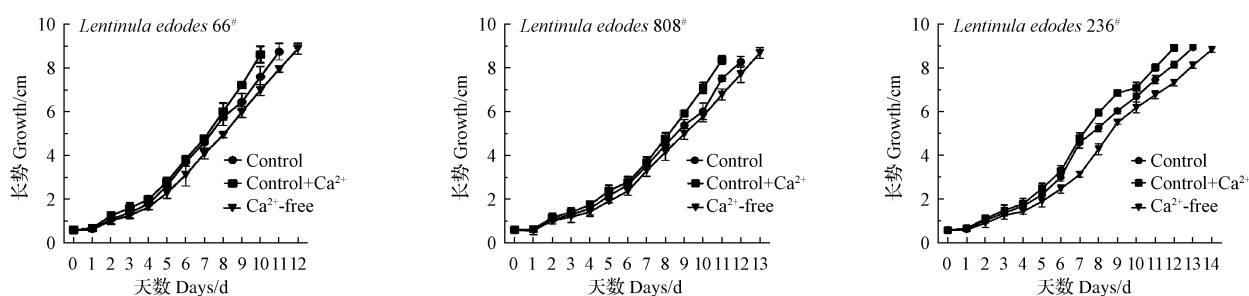
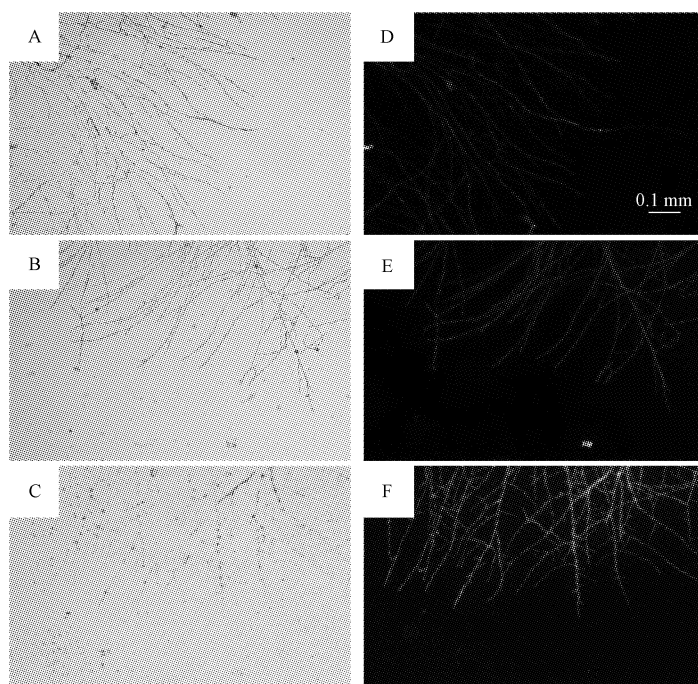


图 1 Ca²⁺ 对香菇菌丝生长速度的影响

Fig. 1 Effect of Ca²⁺ on *Lentinula edodes* mycelium growth rate



注:A、B和C是光学显微镜观察结果,D、E和F是荧光显微镜观察结果。标尺为0.1 mm。

Note: A, B and C are examined by using bright-field microscopy, D, E and F are examined by using fluorescence microscopy. Bars=0.1 mm.

图 2 Ca²⁺ 对香菇菌丝生物量的影响

Fig. 2 Effect of Ca²⁺ on *Lentinula edodes* mycelium tip growth

2.3 Ca²⁺ 对香菇菌丝生物量的影响

由图 3 可知,与对照相比,香菇在富钙和无钙液体培养基中的菌丝生物量,分别显著增加和降低($P < 0.01$)。其中香菇 236[#] 在富钙培养基中的菌丝生物量是对照的 1.49 倍,在无钙培养基中的菌丝生物量是对照的 0.80 倍;香菇 808[#] 在富钙(1.6)和无钙(1.1)培养基中生物量是对照(1.3)的 1.23 倍和 0.85 倍;香菇 66[#] 在富钙

(1.8)和无钙(1.3)培养基中生物量是对照(1.5)的 1.20 倍和 0.87 倍。试验结果表明,Ca²⁺ 对香菇菌丝生物量具有显著促进作用,且不同香菇品种间影响趋势一致。

3 讨论与结论

该研究结果表明,钙离子可以促进香菇菌丝的生长,进一步分析微观形态发现,钙离子促进香菇菌丝生

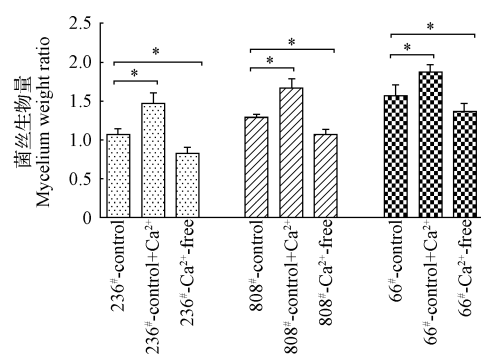


图3 Ca²⁺对香菇菌丝生物量的影响

Fig. 3 Effect of Ca²⁺ on *Lentinula edodes* mycelium weight ratio
长是因为菌丝尖端生长旺盛,分支减少,该结果与杨瑞恒等^[12]研究根内球囊霉的菌丝及LI等^[13]研究灵芝菌丝生长结果相符合。此外,钙离子促进香菇菌丝生长进而增加了香菇菌丝的生物量,这与陈永发等^[14]的研究结果相一致,并且该结果应用在香菇生长栽培,将有利于香菇栽培周期的减少。

钙离子作为有机体顶端生长的调控因子已在模式真菌中大量报道,越来越多的试验表明,菌丝极性生长依靠菌丝尖端高浓度钙离子,并且高浓度钙离子是由磷脂酶C分解位于细胞膜上的磷脂酰肌醇形成的产物三磷酸肌醇激活钙库液泡或囊泡释放钙离子所形成^[15-16]。该试验结果表明,香菇菌丝在富钙培养基和无钙培养基中分别促进和抑制菌丝生长,这可能是由于培养基中钙离子浓度影响香菇菌丝胞内钙离子浓度所致,而香菇菌丝极性生长的胞内调控机理是否与模式真菌相同,还有待进一步研究。

参考文献

- [1] ZHONG J J, XIAO J H. Secondary metabolites from higher fungi: Discovery, bioactivity, and bioproduction[J]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2009, 113(113): 79-150.
- [2] MU D, LI C, ZHANG X, et al. Functions of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase family in *Ganoderma lucidum*: an essential role

in ganoderic acid biosynthesis regulation, hyphal branching, fruiting body development, and oxidative-stress resistance[J]. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(6): 1709-1728.

- [3] SILVERMAN-GAVRILA R R. An IP3-activated Ca²⁺ channel regulates fungal tip growth[J]. *Journal of Cell Science*, 2002, 115(Pt 24): 5013-25.
- [4] 彭浩, 乔艳明, 陈文强, 等. 用 L₉(3⁴) 正交实验筛选富硒香菇液体培养基[J]. *北方园艺*, 2014(15): 152-157.
- [5] 唐拥政, 宋春艳, 尚晓东, 等. 主成分分析法在香菇化学成分评价中的应用[J]. *食用菌学报*, 2014(3): 66-69.
- [6] CARNEIRO A A J, FERREIRA I C F R, DUEÑAS M, et al. Chemical composition and antioxidant activity of dried powder formulations of *Agaricus blazei*, and *Lentinula edodes*[J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(4): 2168-2173.
- [7] FINIMUNDY T C, GAMBATO G, FONTANA R, et al. Aqueous extracts of *Lentinula edodes* and *Pleurotus sajor-caju* exhibit high antioxidant capability and promising *in vitro* antitumor activity[J]. *Nutrition Research*, 2013, 33(1): 76-84.
- [8] TORRALBA S, HEATH I B. Cytoskeletal and Ca²⁺ regulation of hyphal tip growth and initiation[J]. *Current Topics in Developmental Biology*, 2001, 51(4): 135-187.
- [9] XU Y N, ZHONG J J. Impacts of calcium signal transduction on the fermentation production of antitumor ganoderic acids by medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*[J]. *Biotechnology Advances*, 2012, 30(6): 1301-1308.
- [10] ANA-MARIJA D, STJEPANA K, ABRAMOV A Y. Lipid peroxidation is essential for phospholipase C activity and the inositol-trisphosphate-related Ca²⁺ signal[J]. *Journal of Cell Science*, 2014, 127(1): 21-26.
- [11] 赵玉卉, 路等学, 韩润冰, 等. 茶薪菇品种比较研究[J]. *北方园艺*, 2016(9): 154-156.
- [12] 杨瑞恒, 姚青, 郭俊, 等. 钙、镉和钙离子通道抑制剂对根内球囊霉孢子萌发和菌丝生长的影响[J]. *华南农业大学学报*, 2011(1): 68-72.
- [13] LI C, LIANG S, CHEN D, et al. Functional analysis of the role of glutathione peroxidase (GPx) in the ROS signaling pathway, hyphal branching and the regulation of ganoderic acid biosynthesis in *Ganoderma lucidum*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2015, 82: 168-180.
- [14] 陈永发, 肖少香, 陈振雄, 等. 香菇摇瓶发酵中钙盐对菌丝体生长的影响[J]. *食品与机械*, 2013(3): 58-60.
- [15] LEW R R, GIBLON R E, LORENTI M S H. The phenotype of a phospholipase C (ple-1) mutant in a filamentous fungus, *Neurospora crassa* [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2015, 82: 158-167.
- [16] SILVERMANGAVRILA L B, LEW R R. Calcium gradient dependence of *Neurospora crassa* hyphal growth[J]. *Microbiology*, 2003, 149(9): 2475-2485.

Effect of Exogenous Calcium on *Lentinula edodes* Mycelium Growth

ZHANG Jiangping¹, XIN Zeping²

(1. Shanxi Forestry Vocational and Technical College, Forestry Department of Shanxi Province, Taiyuan, Shanxi 030012; 2. Wucheng Forestry Station, Guandishan National Forest, Wucheng, Shanxi 033000)

Abstract: Statistical analysis and fluorescence microscopy were used to analysis the effect of calcium on the mycelium growth rate, mycelium tip growth and mycelium weight of *L. edodes* 66[#], 236[#] and 808[#] which were cultured in calcium-enriched, calcium-free and control culture medium. The results showed that compared with the control, the time of the full plate in the calcium-enriched and calcium-free plate culture medium was decreased or increased by one day. Microscopic observation showed that the medium tip of cultured on calcium rich medium was growing vigorously, fewer branches. Medium tip of cultured on calcium free medium was growing weaker, more branches. The biomass statistics showed that the calcium could promote the accumulation of the mycelium. Moreover, the effect of calcium on the medium growth was the same in different *L. edodes* strains.

Keywords: *Lentinula edodes*; mycelium growth rate; tip growth; calcium