

蜜环菌对镁的耐性和富集特性

朱林 程显好* 冯志彬 屈慧鸽 图力古尔

(鲁东大学生命科学学院 山东 烟台 264025)

摘要: 研究了镁对蜜环菌生长的影响, 蜜环菌对于镁的耐性和富集规律, 以及高浓度镁胁迫下蜜环菌的抗氧化酶的变化情况。3–15 g/L 的 Mg 浓度对于蜜环菌菌体的生长有促进作用。Mg 浓度 19 g/L 以上时, 蜜环菌菌体的生长受到抑制。蜜环菌的子实体形成和子实体生物量在 Mg 的浓度为 11 g/L 以下时不受影响, 超过 11 g/L 则子实体不能萌发。皮壳状菌丝和菌索中 Mg 的含量随培养基中 Mg 浓度的增大而增大, 培养基 Mg 浓度达到 16 g/L 后, 菌丝、菌索中 Mg 的含量都不再上升。子实体对 Mg 的富集量比菌丝体小的多, 在培养基 Mg 浓度在 9、10 g/L 时, 子实体中 Mg 的含量与对照组有显著差异。随着培养基中 Mg 浓度的提高, 菌丝和菌索 POD、CAT、SOD 活性都有增加, 而且菌丝与菌索之间抗氧化酶活力的差异随着培养基中 Mg 浓度的提高而增大。

关键词: 子实体, 菌丝体, 菌索, 抗氧化酶

Magnesium Tolerance and Enrichment Characteristics of *Armillariella mellea*

ZHU Lin CHENG Xian-Hao* FENG Zhi-Bin QU Hui-Ge BAU Tolgor

(College of Life Science, Ludong University, Yantai, Shandong 264025, China)

Abstract: The impact of magnesium on growth, magnesium tolerance and enrichment features, as well as changes in activity of antioxidant enzymes under high-magnesium-concentration stress in *Armillariella mellea* were investigated. Magnesium at concentrations between 3–15 g/L in growth media promoted the growth of mycelia of *A. mellea*, but inhibited the growth at concentrations above 19 g/L. The formation and biomass production of fruiting body were not affected when magnesium concentration was below 11 g/L. At magnesium concentrations above 11 g/L the fruiting body formation stopped. The Mg content in crustose aerial hypha and rhizomorphs of *A. mellea* increased with increasing Mg concentration in growth medium up to a concentration of 16 g/L, but ceased to increase when the Mg concentration in medium was over 16 g/L. The Mg content in fruiting body of *A. mellea* grown on medium containing 9 or 10 g/L Mg was significantly different from that on control medium. The activity of antioxidant enzymes including peroxide (POD), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in crustose aerial hypha and rhizomorphs of *A. mellea*, as well as the differences in the activity of antioxidant enzymes increased with increasing Mg concentration in growth medium.

基金项目: 食用菌技术“泰山学者”建设工程专项经费资助项目(No. 200805); 鲁东大学人才基金资助项目(No. LY20063304); 鲁东大学食用菌技术创新团队基金资助项目

*通讯作者: Tel: 86-535-4922490; 信箱: chengxianhao@sohu.com

收稿日期: 2009-09-21; 接受日期: 2009-12-11

Keywords: Fruiting body, Mycelium, Rhizomorph, Antioxidative enzymes

蜜环菌(*Armillariella mellea*) 隶属于担子菌亚门(Basidiomycotina)、伞菌目(Agaricales)、白蘑科(Tricholomataceae)、蜜环菌属[*Armillaria* (Fr.) Staude.], 别名蜜环蕈、苞谷蕈、青冈蕈。蜜环菌是一类经济价值较高的食药真菌, 在东北地区广泛食用, 蜜环菌发酵产物与天麻有类似的药理作用。蜜环菌广泛分布于热带和温带的许多国家的森林地区, 为名贵中药天麻和猪苓生长繁殖所必需; 而且蜜环菌在全世界温带和寒温带侵染 600 多种树木, 可导致林木根朽病, 造成巨大的经济损失, 因此蜜环菌引起了国内外学者极大的研究兴趣^[1]。

蜜环菌具有多种特化菌丝结构, 固体培养基上, 培养基表面的气生菌丝可以特化成质硬的皮壳状菌丝, 而培养基内部的基内菌丝可以特化成称为根状的“菌索”结构, 另外气生菌丝表面还可以形成子实体^[2]。采用相同的培养体系可以培养出皮壳状菌丝、菌索、子实体不同结构的菌体, 而且容易与培养基分离开来, 这对于担子真菌发育过程中生理生化的研究是很好的研究材料。

镁是生物生长的必需元素, 是核糖体的组成部分, 对于稳定蛋白质合成所必需的核糖体构型有重要作用, 缺镁可导致核蛋白体解离^[3]。当镁营养不足时, 会影响生物的正常生长发育, 如对于植物表现于叶绿素含量下降、叶片失绿、光合强度降低, 以及碳水化合物、脂肪、蛋白质的合成受阻等。同时, 由于镁是金属离子, 所以当环境中镁浓度过高时, 过量的镁离子会对生物产生毒害, 会对钾、钙等营养离子的吸收和运输^[4-5]产生影响, 对生物产生环境胁迫作用。近年来, 国内外对植物镁素的吸收与运转, 镁在光合作用、蛋白质合成中的作用及机理, 在酶活性、缺镁胁迫时对植物的伤害机理及施肥效果等进行了多方面的研究^[6]。但有关镁营养对大型真菌生长影响的机制报道很少, 尤其是较高的镁浓度对大型真菌产生的胁迫作用以及大型真菌对于镁的富集作用鲜见报道。

作为生物体中的保护酶类, 超氧化物歧化酶(SOD, EC 11151111)能有效清除超氧阴离子自由基, 在防御活性氧毒害中起重要作用。过氧化物酶(POD, EC11111117)和过氧化氢酶(CAT, EC 11111116)能把

细胞代谢产生的 H_2O_2 分解, 避免了 H_2O_2 在体内的积累, 具有解毒作用^[7]。这些抗氧化酶活性的增加, 能在一定程度上提高生物对环境胁迫的抵抗能力; 反之, 生物体中抗氧化酶活性的增加也表明生物受到了环境胁迫。

本文研究了镁对蜜环菌生长的影响, 以及蜜环菌对于镁的耐性和富集规律, 并研究了高浓度镁胁迫下蜜环菌的抗氧化酶的变化规律。

1 材料与方法

1.1 菌种

蜜环菌(*A. mellea*)菌种购于中国普通微生物菌种保藏管理中心, 编号 5146, 保藏于 PDA 培养基。

1.2 培养基

采用半固体麦芽汁培养基^[2]。

1.3 培养方法

半固体麦芽汁培养基中, Mg 添加水平设 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 g/L (以 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 加入, 单 Mg^{2+} 计算) 20 个实验组和 1 个空白对照组, 每组 3 个重复。500 mL 三角瓶中培养基装量 200 mL。

在半固体培养基上接种直径 0.5 cm 大小的蜜环菌菌种块, 于 25°C 的培养箱中暗培养 25 d, 然后于 18°C、光照周期 12 h 的条件下诱导蜜环菌子实体的形成^[1]。

1.4 Mg 对蜜环菌菌丝体生物量、蜜环菌子实体形成及子实体生物量的影响

培养基表面生长的质地坚硬的皮壳状菌丝体, 以及在半固体培养基内生长的蜜环菌菌索, 取出后分别在 60 目不锈钢筛网上用自来水急水冲洗, 充分洗去附带的半固体琼脂成分, 洗过的培养物在 60°C 烘干至恒重后称重。

观察记录各实验组子实体原基形成以及子实体形成的情况。子实体开伞成熟后, 及时采集, 于 60°C 烘干至恒重后称重。

1.5 Mg 在蜜环菌皮壳状菌丝体、菌索和子实体中的富集量测定

称取 0.1 g 烘干至恒重的子实体、皮壳状菌丝体或菌索样品, 加入 10 mL 的 HNO_3-HClO_4 的消化液(体积比为 4:2)在沸水浴下加热至澄清, 用去离子水

在 100 mL 容量瓶中定容后采用原子吸收分光光度计(上海精密科学仪器有限公司, AA320N 型, 附带微机和打印机)进行测定。测试条件为: 波长 285.2 nm, 狭缝 3 mm, 灯电流 5 mA, 灯电压 170 V, 空气流量 0.15 MPa/min, 乙炔流量 0.05 MPa/min。

1.6 皮壳状菌丝体和菌索中抗氧化酶的提取与活性测定

培养 50 d 后的新鲜材料用于抗氧化酶的测定。

过氧化氢酶(CAT)的提取与测定: 称取新鲜样品 5 g, 加入 500 mmol/L 磷酸盐缓冲液 5 mL (pH 7.5, 含 5 mmol/L DTT 和 5% PVP), 在冰浴条件下研磨成匀浆, 于 4°C、1200 r/min 离心 30 min, 收集上清液即为酶液。过氧化氢酶的活性以紫外吸收法^[8-9]测定。

过氧化物酶(POD)的提取与测定: 称取 1 g 新鲜样品, 加入 10 mL、20 mmol/L KH_2PO_4 , 在冰浴条件下研磨成匀浆, 于 4°C、4000 r/min 离心 15 min, 收集上清液即为酶液。过氧化物酶的活性以愈创木酚法^[10-11]测定。

超氧化物歧化酶(SOD)的提取与测定: 称取 5 g 新鲜样品, 加入 500 mmol/L 磷酸盐缓冲液 5 mL (pH 7.8, 含 5 mmol/L DTT 和 5% PVP), 在冰浴条件下研磨成匀浆, 于 4°C、1200 r/min 离心 30 min, 收集上清液即为酶液。超氧化物歧化酶的活性以氮蓝四唑(NBT)光化还原法^[12-13]测定。

2 结果与分析

2.1 Mg 对蜜环菌生长的影响

培养基中加入不同浓度的 Mg, 培养过程中观察其形态变化情况, 发现 1-18 g/L 的实验组与对照组在外观形态上没有明显区别, 皮壳状菌丝都完全覆盖了培养基表面。但 19、20 g/L 的处理组与对照组有了区别, 这两组皮壳状菌丝未能长满培养基的表面, 其中 20 g/L 的实验组培养基表面裸露的更为严重, 表明 Mg 达到一定浓度后, 抑制了蜜环菌皮壳状菌丝的生长。

从图 1 中可以看出, 随着培养基中 Mg 的浓度增加, 菌体生物量先增大后减少。统计分析结果表明, 在 3-15 g/L 的 Mg 浓度下, 蜜环菌菌体的量有明显的增加, 说明此浓度范围内促进了菌体的生长。在 9-11 g/L 的 Mg 浓度下, 菌体生物量与其他促进生长组又有显著差异, 说明在培养蜜环菌时, Mg 添加

量适宜于选择此浓度范围内。19、20 g/L 的 Mg 浓度组, 菌体量显著小于对照组, 这和形态观察的结果一致, 说明 Mg 浓度达到一定水平后, 开始抑制蜜环菌的生长。1、2、5、16、17、18 g/L 的 Mg 浓度下, 菌体生物量与对照组没有显著差异。

子实体形成也受到了培养基内 Mg 浓度的影响。当 Mg 的浓度超过 11 g/L 时, 各实验组都没能形成子实体, 说明高浓度的 Mg 会抑制子实体的形成。图 2 表明在 Mg 添加量 1-10 g/L 实验组中, 发现子实体产量与对照组并没有明显差异, 即添加 Mg 后并没有促进蜜环菌子实体的产量。在子实体形成时间上, 各组之间也是一致的。Mg 的添加影响了菌丝体产量, 而没有影响子实体的产量, 这一现象需要进一步研究。

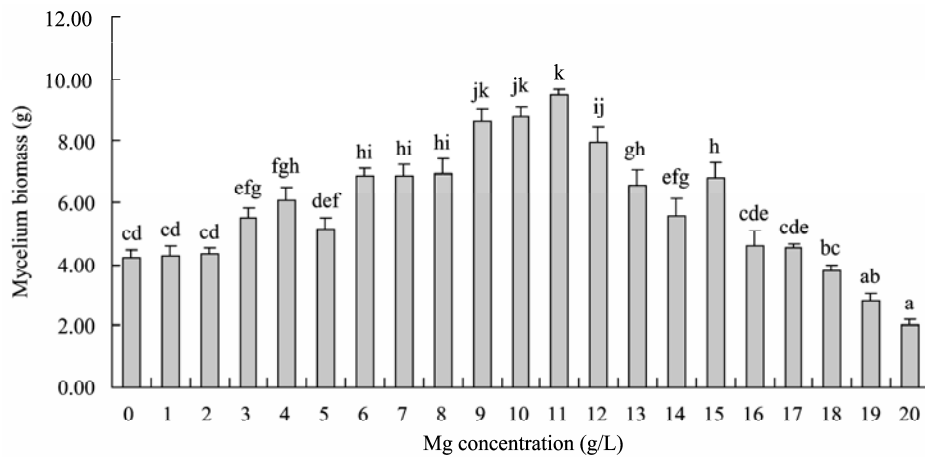
2.2 Mg 在蜜环菌菌丝体、菌索和子实体中的富集规律

在一定 Mg 浓度范围内(小于 15 g/L), 随着培养基 Mg 浓度的增加, 蜜环菌的皮壳状菌丝和菌索中 Mg 的含量也逐渐增加, 见图 3。图 3、4 表明, 培养基 Mg 浓度达到 15 g/L 以后, 皮壳状菌丝和菌索中 Mg 含量都趋于恒定, 说明蜜环菌菌体对于镁的富集有极限。皮壳状菌丝和菌索对于镁的富集极限都在 103-104 mg/g 左右, 二者具有一致性。镁的浓度达到 16 g/L 时, 皮壳状菌丝对镁的富集达到极限, 之后的 16-20 g/L 范围内的实验组的皮壳状菌丝含镁量没有显著性差异。镁的浓度达到 15 g/L 时, 菌索对镁的富集达到极限, 15-20 g/L 范围内的实验组菌索的含镁量没有显著性差异。

而子实体中的镁的含量则受培养基中镁浓度变化的影响不大, 见图 5。值得注意的是子实体中镁的含量远远低于皮壳状菌丝和菌索。在培养基中镁的含量为 8 g/L 时, 皮壳状菌丝和菌索中镁的含量分别是子实体中镁含量的 25.76 倍和 24.27 倍。大型真菌营养生长一般在达到一定时期后才可能形成子实体, 子实体形成过程中大量的营养主要来自于营养生长的菌丝。蜜环菌子实体形成过程中, 营养物质由菌丝体向子实体的流动过程中, 为什么对镁进行了阻挡, 又是用什么机制进行了阻挡, 这一问题值得进一步研究和探讨。

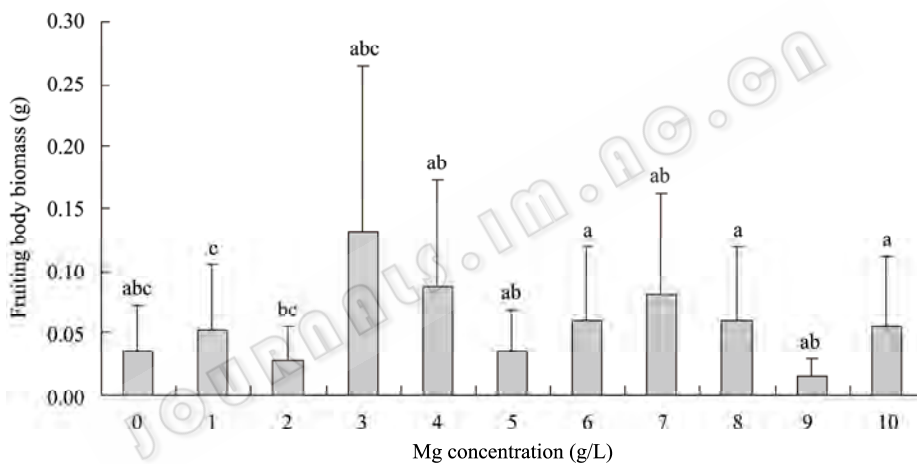
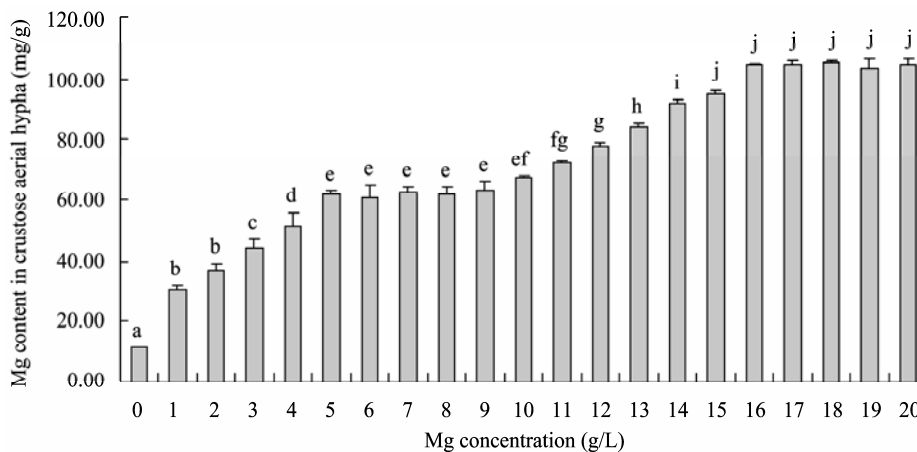
2.3 Mg 对蜜环菌抗氧化酶系统的影响

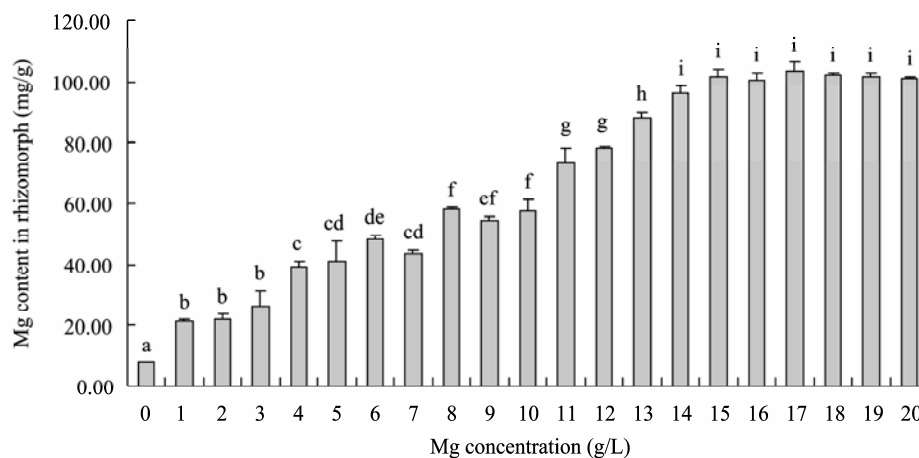
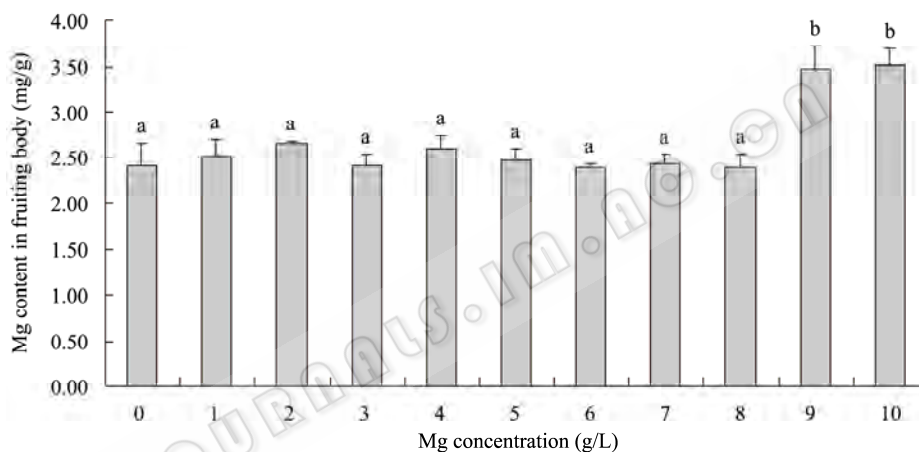
Mg 添加量对蜜环菌 POD 活性的影响见图 6。

图 1 Mg 对蜜环菌菌体生物量的影响($x \pm s_{\bar{x}}$)Fig. 1 Effect of Mg on mycelium biomass ($x \pm s_{\bar{x}}$) in *A. mellea*

注: 不同字母表示在 0.05 水平的差异显著.

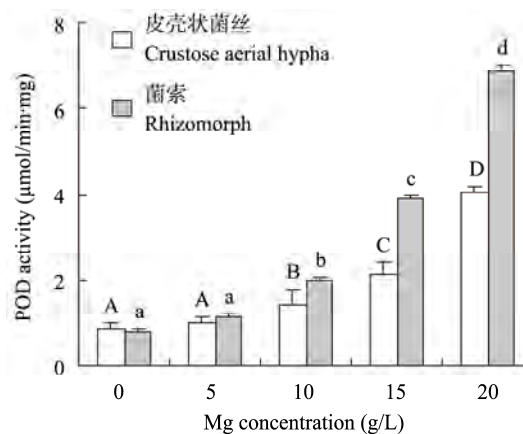
Note: The different letter meats significant differences at 0.05 level.

图 2 Mg 对蜜环菌子实体生物量的影响($x \pm s_{\bar{x}}$)Fig. 2 Effect of Mg on fruiting body biomass ($x \pm s_{\bar{x}}$) in *A. mellea*图 3 蜜环菌皮壳状菌丝体中的镁含量($x \pm s_{\bar{x}}$)Fig. 3 The Mg content ($x \pm s_{\bar{x}}$) in crustose aerial hypha of *A. mellea*

图4 蜜环菌菌索中的镁含量($x \pm s_{\bar{x}}$)Fig. 4 The Mg content ($x \pm s_{\bar{x}}$) in rhizomorph of *A. mellea*图5 蜜环菌子实体中的镁含量($x \pm s_{\bar{x}}$)Fig. 5 The Mg content ($x \pm s_{\bar{x}}$) in fruiting body of *A. mellea*

从图6中可以看出,随着Mg浓度的增加,皮壳状菌丝和菌索中的POD活性呈增加的变化趋势。随着Mg浓度的增加,蜜环菌的皮壳状菌丝与菌索的POD活性之间的差别也增大,菌索中POD活性变化比皮壳状菌丝变化更大。皮壳状菌丝与菌索的生长环境不同,皮壳状菌丝生长在培养基表面,与培养基接触面积小,与空气接触面积大,菌索则生长在培养基内部,与培养基接触面积大,而与空气不直接接触。菌索接受来自培养基的镁的渗透胁迫程度要高于皮壳状菌丝,这可能是其POD活性高于皮壳状菌丝的原因。

Mg对蜜环菌菌体CAT活性的影响如图7所示,随着Mg浓度的增加,皮壳状菌丝和菌索中的CAT活性随着增加。当镁的浓度高于10 g/L时,皮壳状

图6 Mg对蜜环菌POD活性的影响($x \pm s_{\bar{x}}$)Fig. 6 Effect of Mg on POD activity ($x \pm s_{\bar{x}}$) in *A. mellea*

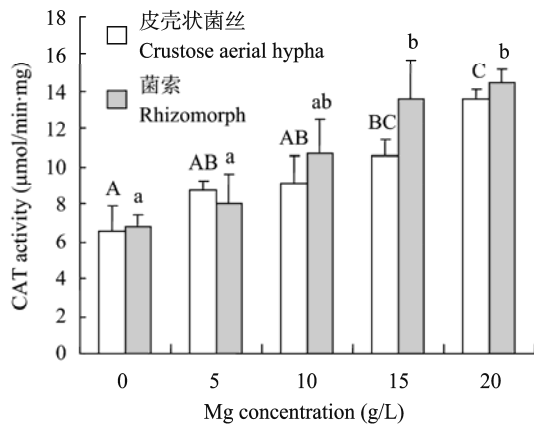


图7 Mg对蜜环菌CAT活性的影响($x \pm s_{\bar{x}}$)

Fig. 7 Effect of Mg on CAT activity ($x \pm s_{\bar{x}}$) in *A. mellea*

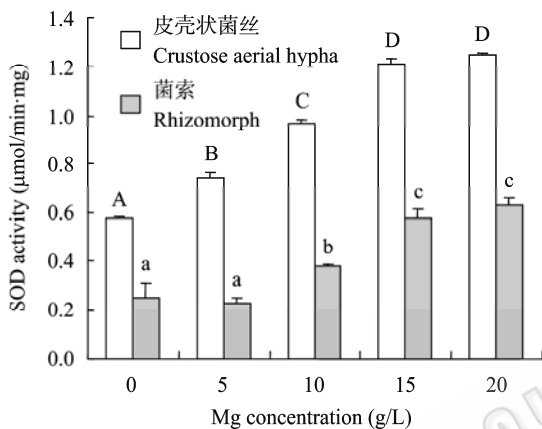


图8 Mg对蜜环菌SOD活性的影响($x \pm s_{\bar{x}}$)

Fig. 8 Effect of Mg on SOD activity ($x \pm s_{\bar{x}}$) in *A. mellea*

菌索中的CAT比菌丝中的CAT活性更高,这与POD活性特点一样,可能其原因也是菌索所受到的周围环境的渗透胁迫高于皮壳状菌丝所致。

如图8所示,Mg对蜜环菌SOD活性的影响也是随着Mg浓度的增加,皮壳状菌丝和菌索中的SOD活性增加。与POD、CAT不同的是,皮壳状菌丝中SOD的活性远高于菌索中SOD的活性。说明超氧化物歧化酶除了与镁胁迫相关之外,与空气的接触也相关。空气与镁有协同效应,会共同引起胞内SOD活性的显著增加。

3 讨论

从镁在皮壳状菌丝、菌索和子实体中的含量分析发现,同一培养系统内皮壳状菌丝与菌索中镁的含量基本保持一致,但与子实体中镁的含量差别极大。这说明在子实体生长发育过程中,所需要的营

养物质是从营养菌丝中有选择性地吸收利用,而不是简单的营养流动。就镁元素而言,子实体只是从营养菌丝中获取了足够的镁,采取一定的机制阻止了营养菌丝中大量的镁进入到子实体的细胞中。这说明在蜜环菌在有性生殖形成的子实体和无性的营养繁殖形成的内皮壳状菌丝、菌索之间存在一个屏障,有性系统之间与无性系统之间虽然存在物质交换,但不是简单交换,而是有选择的物质交换。

蜜环菌对于镁的耐受性非常高,在培养基中镁的浓度达到18 g/L ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 为185 g/L)时仍能正常生长,说明蜜环菌耐受高渗透压的能力较强。

生物对逆境的反应涉及到生物体内一系列生理生化变化。在高渗透胁迫下,细胞内自由基的产生和清除平衡会受到破坏,积累下来的自由基首先攻击质膜系统,使细胞膜受到伤害,透性增大^[14]。细胞内活性氧水平大幅度提高可造成氧化胁迫,并引起脂质过氧化、蛋白质与核酸的氧化修饰,而生物在长期的进化过程中也形成了一系列的抗氧化酶和抗氧化剂来对抗与清除活性氧^[15-16]。超氧化物歧化酶(SOD)是一种能消除生物体内过剩的超氧阴离子自由基的酶,从而保护生物免受活性氧伤害。SOD的活性决定了 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 的含量,而 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 是Haber Weiss反应的底物,SOD酶活力与生物的反逆性关系密切,因此它可能是膜防护中心^[17]。

本研究结果表明,POD、CAT、SOD、活性变化在镁胁迫的进程中总体趋势一致,但具体变化不同。随着渗透胁迫加重,SOD、CAT活性变化随着镁浓度的增加呈现升高趋势,镁浓度超过15 g/L后,不再升高。而POD活性变化随着镁浓度的升高一直升高,说明细胞对于POD活性的调节能力更强。SOD细胞的氧气接触相关显著,说明SOD受到 O_2 的诱导。保护酶系统对自由基的清除能力的变化可能是生物抗逆性的共同机制。生物体在逆境胁迫下,保护酶的作用可能是通过它们之间相互协调而实现的。





参考文献

- [1] 程显好,郭顺星. 蜜环菌子实体的诱导和发生条件. 菌物学报, 2006, 25(2): 302-307.
- [2] 程显好,王春兰,郭顺星. 蜜环菌不同特化菌体的hplc-Dad图谱比较. 食用菌学报, 2006, 13(4): 39-43.
- [3] Marschner H. Mineral nutrition of higher plants. London:

- Academic press London, 1986: 235-243.
- [4] Chatterjee C, Nautiyal N, Agarwala, SC. Influence of changes in manganese and magnesium supply on some aspects of wheat physiology. *Soil Science and Plant Nutrition (Tokyo)*, 1994, **40**(2): 191-197.
- [5] Narwal RP, Kumar V, Singh JP. Potassium and magnesium relationship in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. *Plant and Soil*, 1985, **86**(1): 129-134.
- [6] 童贯和, 肖家军, 孙坤. 不同供镁水平对不同时期小麦幼苗生长速率的影响. *中国农学通报*, 2008, **24**(11): 132-138.
- [7] 王沙生, 高荣孚, 吴贯明. 植物生理学. 北京: 中国林业出版社, 1993: 89.
- [8] 郝再彬, 苍晶, 徐仲. 植物生理实验. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2004: 113-114.
- [9] 李玲. 植物生理模块实验指导. 北京: 科学出版社, 2009: 95-97.
- [10] 郝再彬, 苍晶, 徐仲. 植物生理实验. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2004: 115-116.
- [11] 李玲. 植物生理模块实验指导. 北京: 科学出版社, 2009: 97-98.
- [12] 郝再彬, 苍晶, 徐仲. 植物生理实验. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2004: 110-113.
- [13] 李玲. 植物生理模块实验指导. 北京: 科学出版社, 2009: 98-100.
- [14] Smart RE, Coombe BJ. Water relations of grapevines//Kozlowski TT. Water deficits and plant growth. VII. New York: Academic Press, 1983: 137-196.
- [15] Li CZ, Jiao J, Wang GX. The important roles of reactive oxygen species in the relationship between ethylene and polyamines in leaves of spring wheat seedlings under root osmotic stress. *Plant Science*, 2004, **166**(2): 303-315.
- [16] 焦健, 李朝周, 黄高宝. 钴对干旱胁迫下大豆幼苗叶片的保护作用及其机理. *应用生态学报*, 2006, **17**(5): 796-800.
- [17] Bowler C, Montagu MV, Inze D. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 1992, **43**(1): 83-116.

征订启事

2010年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订全面启动!

	《微生物学报》月刊(每月4日出版), 单价55.00元, 全年定价660元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。
	《生物工程学报》月刊(每月25日出版), 单价65.00元, 全年定价780元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。
	《微生物学通报》月刊(每月20日出版), 单价48.00元, 年价576元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。
	《菌物学报》双月刊(单月15日出版), 单价80元, 全年定价480元。刊号: ISSN 1672-6472; CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。
订阅	欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄。
	汇款地址: (100101)北京市朝阳区北辰西路1号院3号中科院微生物所B401
	收信人: 《 》编辑部; 电话: (010)64807521; E-mail: bjb@im.ac.cn
	请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量。