

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

杨瑞恒^{1,2,3}, 姚青⁴, 郭俊¹, 龙良鲲¹, 黄永恒¹, 朱红惠¹

(1 广东省微生物研究所, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东 广州 510070; 2 中国科学院南海海洋研究所, 广东 广州 510301; 3 中国科学院研究生院, 北京 100049; 4 华南农业大学园艺学院, 广东 广州 510642)

摘要:在含有 1 mmol/L 磷酸的培养基中设置不同浓度的钙离子、镉离子和钙离子通道抑制剂 Verpamil, 对根内球囊霉 *Glomus intraradices* 孢子萌发、菌丝极性生长以及菌丝分支进行了研究。结果表明: 钙离子促进了孢子萌发、菌丝极性生长和菌丝分支; 镉离子起到了强烈的抑制作用; 然而钙离子没有减弱重金属对孢子萌发和菌丝生长的抑制; 与此同时钙离子通道阻断剂抑制了菌丝生长和分支, 并没有减弱重金属的毒害作用, 镉离子并不是主要通过钙离子通道进入 AMF 的菌丝内。

关键词:根内球囊菌; 孢子萌发率; 菌丝长度; 菌丝分支

中图分类号: Q93

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2011)01-0068-05

The Ion of Ca, Cd and Inhibitor Verpamil of Calcium Channel Effect on Spore Germination, Hyphal Growth of *Glomus intraradices*

YANG Rui-heng^{1,2,3}, YAO Qing⁴, GUO Jun¹, LONG Liang-kun¹, HUANG Yong-heng¹, ZHU Hong-hui¹

(1 Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China;

2 South China Sea Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;

3 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

4 College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The influence of CaCl_2 , CdCl_2 and inhibitor Verpamil of calcium channel on the spore germination, hyphal growth and hyphal branching was studied in the medium contained 1 mmol/L phosphoric acid. The results suggested that spore germination, hyphal growth and hyphal branching were enhanced by Calcium ion and inhibited by Cadmium ion. However, Calcium didn't decrease the toxicity of Cadmium to spore germination and hyphal growth. Hyphal growth and hyphal branching were inhibited by Calcium channel inhibitor Verpamil. The toxicity of heavy metal was not decreased by Verpamil. It also showed that Cadmium transported into hyphal interior was not mainly mediated by Calcium channels.

Key words: *Glomus intraradices*; spore germination rate; hyphal length; hyphal branching

丛枝菌根真菌 (Arbuscular mycorrhizal fungi, AMF) 是一种与植物严格共生的真菌, 能够与陆地上 80% 的植物建立共生关系^[1], AMF 具有重要作用: 可以通过外生菌丝吸收土壤中的矿物质元素, 转运至

内生菌丝, 在内生菌丝中向植物卸载矿质元素^[2]; 能够扩大根系的吸收范围, 抵抗贫瘠的土壤环境; 能够提高植物抗逆性, 提高植物抗病、抗旱、抗土壤污染的能力等^[3-5]. AMF 这些特性赋予了植物对恶劣环境

收稿日期: 2010-04-15

作者简介: 杨瑞恒 (1983—), 男, 硕士; 通信作者: 朱红惠 (1970—), 女, 研究员, 博士, E-mail: zhuhonghui66@yahoo.com.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (31070103); 广东省自然科学基金 (10251007002000001)

的适应性。

重金属污染严重威胁着人类健康,植物修复是治理重金属污染最为经济的一种手段,但是重金属条件下,植株生长缓慢、矮小等限制了这种手段的应用。很多学者指出,AMF能够显著提高植株对重金属的抗性作用,在低浓度镉离子下,AMF能够促进对重金属离子的吸收^[6],但在高浓度下,AMF抑制紫花苜蓿对镉离子的吸收^[7],AMF还能够降低重金属的流动性^[8],降低地上部和根系中重金属含量的比率,把大部分的镉离子固定在根系,AMF在重金属修复中具有重要的作用^[9]。AMF有着一套复杂的抗重金属机制,现在还没有被人们完全阐明。不同学者提出了不同机制主要包括:细胞壁吸附作用、胞内重金属隔离作用、金属硫蛋白作用、胞外分泌以及胞外分泌物对重金属的固定作用、聚磷酸沉淀等机制^[10-11]。

在AM真菌中,外生菌丝通过磷酸转运体将磷酸转运至菌丝内,合成聚磷酸,运输到内生菌丝,卸载给植物体,并与植物交换营养必需的碳水化合物,聚磷酸是一种磷酸残基通过高能磷酸键连接的无机聚合物,具有强负电性,在生物体内具有重要作用,能够增强生物体抗热、抗渗透压能力,能够影响生物体的生长发育、形态建成、抗菌作用等^[12-14],有些学者指出,在大肠杆菌中聚磷酸对于提高菌体抗重金属能力具有重要作用^[15]。有些报道指出,聚磷酸与钙镁离子存在一定的作用^[16]。由于重金属镉与钙离子的化学结构相似,在一些植物中重金属是通过钙离子通道进入植物体内^[15,17],而在AM真菌鲜见研究。

本试验在聚磷酸合成必需元素磷的高浓度下,初步研究钙离子、镉离子对AM真菌孢子萌发情况的影响,因为对AMF侵染前的影响,直接影响后续与植株的共生作用以及促生作用。同时在试验中应用了钙离子通道抑制剂Verpamil研究钙离子通道的作用,为进一步研究丛枝菌根真菌中钙离子、镉离子的作用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 生物材料

本文采用根内球囊霉 *Glomus intraradices* (北京农林科学院植物营养与资源研究所“丛枝真菌种质资源库”BGC BJ09,国家自然科技资源平台编号1511C00BGCAM0042)为菌种。

1.2 试验方法

挑选合适的孢子,在 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯胺 T、 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素、 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 庆大霉素和 φ 为 1% 的吐温-20 的混合液中灭菌 5 min;利用改良的 Long-Ashton 培养基^[18],其中磷酸浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,设置 CaCl_2 ($0, 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、 CdCl_2 ($0, 0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、钙离子通道抑制剂 Verapamil ($0, 0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 8 个处理,每处理 3 个重复,每个平板接种 20 个灭菌孢子。在孢子接种 12、19 和 26 d 时,在体视镜下观察记录孢子的萌发情况,计算萌发率;同时观察菌丝的分支情况;每次观察记录菌丝长度,方法参照朱红惠^[19]。

1.3 数据分析

应用 SPSS 17.0 系统的 Two-way ANOVA 对试验数据进行多因素方差分析,在 5% 水平下比较检验各处理间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 不同处理对孢子萌发率的影响

由表 1 和表 2 可知,3 种不同的处理中只有钙离子和镉离子对孢子萌发产生了影响,钙离子通道抑制剂 Verpamil 并没有起到作用。显然,在镉离子胁迫作用下,萌发率显著降低,并且表现出明显的梯度关系,钙离子却极大地促进了孢子的萌发,26 d 时的萌发率由 13.75% 增长到 30.00%,贡献率多于 100%,但是添加钙离子通道抑制剂以后,并没有减弱镉离子的毒害作用,萌发率和没有添加处理没有区别。

表 1 不同处理对根内球囊霉孢子萌发率的影响¹⁾

Tab. 1 Influence of different treatments on spore germination rate of *Glomus intraradices*

$c(\text{Ca}^{2+})/$ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	$c(\text{Cd}^{2+})/$ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	$c(\text{Verpamil})/$ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	孢子萌发率/%		
			12 d	19 d	26 d
0	0	0	7.50 ± 6.45	12.50 ± 6.45	13.75 ± 4.78
0	0	0.2	2.50 ± 5.00	6.25 ± 6.29	13.75 ± 10.31
0	0.05	0	0	0	1.25 ± 2.50
0	0.05	0.2	0	0	0
1	0	0	15.00 ± 14.72	21.25 ± 16.01	30.00 ± 17.80
1	0	0.2	10.00 ± 7.07	17.50 ± 2.89	22.50 ± 11.90
1	0.05	0	2.50 ± 2.89	2.50 ± 2.89	3.75 ± 2.50
1	0.05	0.2	0	1.25 ± 2.50	1.25 ± 2.50

1) 表中数据为平均值 \pm 标准误差。

表2 不同处理影响根内球囊霉孢子萌发率的方差分析(P值)

Tab.2 ANOVA of the influence of different treatments on spore germination of *Glomus intraradices* (P value)

因子	12 d	19 d	26 d
钙离子浓度(Ca)	0.070	0.020	0.028
镉离子浓度(Cd)	0.002	0.000	0.000
Verpamil 浓度(V)	0.189	0.248	0.370
Ca × Cd	0.189	0.100	0.097
Ca × V	0.789	0.896	0.484
Cd × V	0.425	0.366	0.763
Ca × Cd × V	0.789	0.696	0.616

2.2 不同处理对萌发菌丝分支的影响

由表3和表4可知,对菌丝分支的影响各种处理表现出了不同于萌发率的现象,各个因素以及相互作用都对菌丝分支造成了影响,镉离子显著地降低了萌发菌丝分支,而钙离子却极大促进了菌丝分支,钙离子与镉离子共存时比单独镉离子存在时增加菌丝分支,由每孢子0.25个分支增加到1个分支,钙离子通道抑制剂也极大程度上抑制了菌丝分支,能够减弱钙离子的促进作用,但是并没有减弱重金属毒害作用,使菌丝分支降低的程度更严重。

表3 不同处理对根内球囊霉孢子的萌发菌丝分支的影响¹⁾Tab.3 Influence of different treatments on germ tube branching of *Glomus intraradices* spores

c(Ca ²⁺)/ (mmol · L ⁻¹)	c(Cd ²⁺)/ (mmol · L ⁻¹)	c(Verpamil)/ (mmol · L ⁻¹)	每孢子萌发菌丝分支/个		
			12 d	19 d	26 d
0	0	0	2.33 ± 2.16	2.81 ± 1.46	3.79 ± 1.58
0	0	0.2	0.63 ± 1.25	1.58 ± 1.34	2.28 ± 1.93
0	0.05	0	0	0	0.25 ± 0.50
0	0.05	0.2	0	0	0
1	0	0	2.47 ± 1.71	6.15 ± 2.22	12.32 ± 5.10
1	0	0.2	1.92 ± 1.32	2.87 ± 0.63	2.70 ± 0.55
1	0.05	0	1.00 ± 1.15	1.00 ± 1.41	1.00 ± 0.82
1	0.05	0.2	0	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50

1) 表中数据为平均值 ± 标准误差。

表4 不同处理影响根内球囊霉孢子萌发菌丝分支的方差分析(P值)

Tab.4 ANOVA of the influence of different treatments on germ tube branching of *Glomus intraradices* spores (P value)

因子	12 d	19 d	26 d
钙离子浓度(Ca)	0.177	0.002	0.002
镉离子浓度(Cd)	0.001	0	0
Verpamil 浓度(V)	0.074	0.004	0
Ca × Cd	0.809	0.052	0.011
Ca × V	0.931	0.101	0.007
Cd × V	0.477	0.031	0.002
Ca × Cd × V	0.230	0.435	0.015

2.3 不同处理对萌发菌丝长度的影响

由表5和表6可知,镉离子对萌发菌丝生长具有强烈的抑制作用;钙离子的促进作用明显,26 d时,每孢子菌丝长度由0处理的5.52 mm增加到1 mmol · L⁻¹钙离子处理的15.50 mm;26 d以后,钙离子通道抑制剂 Verpamil 也降低了菌丝的生长速度,但是它的抑制能力没有镉离子的抑制能力强,而两者的结合作用此时表现出了更强的抑制作用;钙离子并没有表现出对镉离子毒性抑制菌丝生长的减弱作用。

表5 不同处理对根内球囊霉孢子的萌发菌丝长度的影响¹⁾Tab.5 Influence of different treatments on germ tube length of *Glomus intraradices* spores

c(Ca ²⁺)/ (mmol · L ⁻¹)	c(Cd ²⁺)/ (mmol · L ⁻¹)	c(Verpamil)/ (mmol · L ⁻¹)	每孢子萌发菌丝长度/mm		
			12 d	19 d	26 d
0	0	0	1.27 ± 1.53	3.59 ± 3.19	5.52 ± 2.95
0	0	0.2	0.46 ± 0.92	3.49 ± 3.30	3.16 ± 2.42
0	0.05	0	0	0	0.23 ± 0.45
0	0.05	0.2	0	0	0
1	0	0	2.73 ± 1.91	7.21 ± 4.15	15.50 ± 10.42
1	0	0.2	2.03 ± 1.63	4.43 ± 2.84	4.73 ± 3.03
1	0.05	0	0.63 ± 0.72	0.70 ± 1.04	0.63 ± 0.43
1	0.05	0.2	0	0.25 ± 0.50	0.45 ± 0.90

1) 表中数据为平均值 ± 标准误差。

表6 不同处理影响根内球囊霉孢子萌发菌丝长度的方差分析(P值)

Tab. 6 ANOVA of the influence of different treatments on germ tube length of *Glomus intraradices* spores (P value)

因子	12 d	19 d	26 d
钙离子浓度(Ca)	0.031	0.124	0.038
镉离子浓度(Cd)	0.001	0	0
Verpamil 浓度(V)	0.190	0.343	0.025
Ca × Cd	0.144	0.307	0.070
Ca × V	0.752	0.374	0.151
Cd × V	0.580	0.487	0.033
Ca × Cd × V	0.645	0.525	0.147

3 讨论与结论

在本试验中,孢子萌发处于较低的状况,是由于培养基中磷浓度达到了 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,高浓度磷抑制孢子萌发.在以前的试验中,研究 0 、 0.1 和 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 K_2HPO_4 对 *G. intraradices* 孢子萌发的影响时发现,无磷处理中孢子萌发率达到了 70% ,而在 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的处理中萌发率下降到了 50% ,此时菌丝生长和菌丝分支得到了极大地促进作用^[20].另外很多学者指出:高磷环境能够显著降低 AMF 侵染率和促生作用,Nagahashi 等^[21]利用 *Gigaspora margarita* 研究不同磷浓度对发芽孢子的影响,结果发现 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷能够抑制菌丝分支,在 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时可显著抑制菌丝分支和菌丝生长;Hepper^[22]也指出 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ K_2HPO_4 能够抑制 *G. caledonium* 和 *G. mosseae* 的萌发和生长.本试验中所利用的磷酸浓度远小于其他研究,可能是由于 *G. intraradices* 比其他的菌种对磷酸的反应更为敏感,但是需要进一步寻找证据.

重金属在生物体内具有剧烈的毒害作用,能够产生自由基等氧化性物质;还能够与一些蛋白结合成络合物,影响生理代谢过程等,使生物体的生长发育受到极大的限制^[23-25],在本研究结果中显示几乎所有的指标都受到了极大的限制.

在孢子萌发初始阶段,钙离子并没有影响到孢子萌发和菌丝分支,可能是在开始阶段孢子主要利用自身孢子携带的元素,提供萌发所必需的无机离子.在 AMF 菌丝生长和分支的过程中,涉及到多种代谢途径和信号分子,许多学者指出,菌丝分支的机制多种多样:TORC2、磷酸酯、钙离子和细胞壁的综合信号控制着菌丝的分支及生长^[26],在表3中显示,钙离子极大地促进了菌丝的生长,可能高浓度的外界钙离子使菌丝顶端钙离子梯度增加,极大地促进

菌丝的极性生长^[27-29].但是,在外部钙离子浓度较低的情况下,能够抑制菌丝极性生长并且促进菌丝分支、分化^[27],在 *Claviceps purpurea* 中,钙离子通道 Mid1 突变以后,表现出多分支和抑制生长速率的现象^[30].在本试验中 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 钙离子反而促进了菌丝的分支,与以前的研究相悖,可能是培养基中磷元素的吸收,菌丝亚顶端菌丝内聚磷酸的合成增加,可以在体内形成一种钙离子隔离系统,从细胞质延伸至细胞周质,聚磷酸的高负电性吸附钙离子,从而减少胞内钙源向胞内释放^[31],促进了菌丝的分支,但需要进一步证实.

钙离子通道抑制剂并没有影响孢子萌发,而对孢子的菌丝分支和极性生长,起到了极大的限制作用,说明钙离子通道抑制剂能够对钙离子通道起到强烈的抑制作用,从而破坏了上述菌丝顶端钙离子梯度的形成,影响菌丝的生长.在很多研究中指出,重金属主要通过钙离子通道进入生物体内^[17],而在本试验中,由于钙离子通道抑制剂的加入并没有减弱重金属对孢子萌发、菌丝生长和分支的限制作用,因此预测,在 AMF 中,重金属向生物体渗透的过程中,并不是主要通过钙离子通道进入细胞内,钙离子并没有减轻重金属对菌丝生长的毒害作用,可能钙、镉离子在进入体内时并不存在竞争作用,而是通过其他机制进入体内,这部分可能涉及到菌丝细胞壁和细胞膜处存在的聚磷酸,它可以形成一种离子选择性、电压激活性的离子通道,参与膜运输,此种机制首次在大肠杆菌 *Escherichia coli* 的双层膜中发现,参与了大肠杆菌感受态的制作过程中 DNA 的转运,很多的研究在体内和体外发现了 Polyp-PHB- Ca^{2+} 复合物^[31-32],使钙离子转运至胞内.由于镉离子与钙离子相似的二价阳离子,细胞壁中的聚磷酸可能也存在与重金属镉存在这种的复合物形式,从而转运重金属至菌丝内部.

本试验表明:钙离子促进了孢子萌发、菌丝极性生长和菌丝分支;镉离子起到了抑制的作用;钙离子没有减弱重金属对孢子萌发和菌丝生长的抑制;钙离子通道阻断剂抑制了菌丝生长和分支,并没有减弱重金属的毒害作用;镉离子并不是主要通过钙离子通道进入 AMF 的菌丝内.

参考文献:

- [1] BRUNDRETT M C. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants[J]. New Phytologist, 2002, 154(2): 275-304.
- [2] HARRISON M J. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis[J]. Annual Review of Microbiology, 2005, 59: 19-42.
- [3] 毕丽银. 丛枝菌根培养新技术及其对土壤复垦生态效

- 应[M].北京:地质出版社,2007:2-4.
- [4] 李晓林,刘润进.丛枝菌根真菌及其应用[M].北京:科学出版社,2000:98-147.
- [5] SURESH N,ROBERTS M F,COCCIA M, et al. Cadmium-induced loss of surface polyphosphate in *Acinetobacter Lwoffii*[J]. FEMS Microbiology Letters,1986,36(1):91-94.
- [6] LEUNG H M, YE Z H, WONG M H. Interactions of mycorrhizal fungi with *Pteris vittata* (as hyperaccumulator) in as-contaminated soils[J]. Environmental Pollution, 2006, 139(1):1-8.
- [7] WEISSENHORN I, LEYVAL C. Root colonization of maize by a Cd-sensitive and a Cd-tolerant *Glomus-Mosseae* and Cadmium uptake in sand culture[J]. Plant and Soil, 1995, 175(2):233-238.
- [8] GÖHRE V, PASZKOWSKI U. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation [J]. Planta, 2006, 223(6):1115-1122.
- [9] RASHID A, AYUB N, AHMAD T, et al. Phytoaccumulation prospects of cadmium and zinc by mycorrhizal plant species growing in industrially polluted soils[J]. Environmental Geochemistry and Health, 2009, 31(1):91-98.
- [10] HILDEBRANDT U, REGVAR M, BOTHE H. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance[J]. Phytochemistry, 2007, 68(1):139-146.
- [11] GHORBEL S, SMIRNOV A, CHOUAYEKH H, et al. Regulation of ppk expression and *in vivo* function of ppk in *Streptomyces lividans* TK24 [J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(17):6269-6276.
- [12] SAITO K, KUGA-UETAKE Y, SAITO M. Acidic vesicles in living hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*[J]. Plant and Soil, 2004, 261(1/2):231-237.
- [13] KORNBERG A. Inorganic polyphosphate-toward making a forgotten polymer unforgettable [J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177(3):491-496.
- [14] KORNBERG A, RAO N N, AULT-RICHE D. Inorganic polyphosphate: A molecule of many functions [J]. Annual Review of Biochemistry, 1999, 68:89-125.
- [15] HIDEMITSU P H, KIYONO M, OMURA H, et al. Polyphosphate produced in recombinant *Escherichia coli* confers mercury resistance [J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 207(2):159-164.
- [16] LEE R M, HARTMAN P A, STAHR H M, et al. Antibacterial mechanism of long-chain polyphosphate in *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Food Protection, 1994, 57(4):289-294.
- [17] PERFUS-BARBOECH L, LEONHARDT N, VAVASSEUR A, et al. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status [J]. Plant Journal, 2002, 32(4):539-548.
- [18] 朱红惠,姚青,龙良鲲,等.不同氮形态对AM真菌孢子萌发和菌丝生长的影响[J].菌物学报,2004,23(4):590-595.
- [19] 朱红惠,姚青. pH 值对 *Gigaspora margarita* 孢子萌发、菌丝生长与聚磷酸盐含量的影响[J].菌物学报,2006,25(11):120-124.
- [20] 杨瑞恒,姚青,郭俊,等.磷和镉对 *Glomus intraradices* 孢子萌发、菌丝生长和外生菌丝内聚磷酸累积的影响[J].菌物学报,2010,29(3):421-428.
- [21] NAGAHASHI G, DOUDS D D, ABNEY C D. Phosphorus amendment inhibits hyphal branching of the VAM fungus *Gigaspora margarita* directly and indirectly through its effect on root exudation [J]. Mycorrhiza, 1996, 6(5):403-408.
- [22] HEPPEL C M. Effect of phosphate on germination and growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi [J]. Transactions of the British Mycological Society, 1983, 80(3):487-490.
- [23] 叶锦韶,尹华,彭辉.微生物抗重金属毒性研究进展[J].环境污染治理技术与设备,2003,3(4):1-4.
- [24] GUZZO J, DUBOW M S. A novel selenite-and tellurite-inducible gene in *Escherichia coli* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(11):4972-4978.
- [25] RIGGLE P J, KUMAMOTO C A. Role of a *Candida albicans* P1-type ATPase in resistance to copper and silver ion toxicity [J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(17):4899-4905.
- [26] MEYER V, ARENTSHORST M, FLITTER S J, et al. Reconstruction of signaling networks regulating fungal morphogenesis by transcriptomics [J]. Eukaryotic Cell, 2009, 8(11):1677-1691.
- [27] REGALADO C M. Roles of calcium gradients in hyphal tip growth: A mathematical model [J]. Microbiology, 1998, 144:2771-2782.
- [28] SILVERMAN-GAVRILA L B, LEW R P. Regulation of the tip-high $[Ca^{2+}]$ gradient in growing hyphae of the fungus *Neurospora crassa* [J]. European Journal of Cell Biology, 2001, 80(6):379-390.
- [29] HYDE G J, HEATH I B. Ca^{2+} gradients in hyphae and branches of *Saprolegnia ferax* [J]. Fungal Genetics and Biology, 1997, 21(2):238-251.
- [30] BORMANN J, TUDZYNSKI P. Deletion of Mid1, a putative stretch-activated calcium channel in *Claviceps purpurea*, affects vegetative growth, cell wall synthesis and virulence [J]. Microbiology, 2009, 155:3922-3933.
- [31] REUSCH R N. Polyphosphate/poly-(R)-3-hydroxybutyrate ion channels in cell membranes [J]. Prog Mol Subcell Biol, 1999, 23:151-182.
- [32] REUSCH R N. Transmembrane ion transport by polyphosphate/poly-(R)-3-hydroxybutyrate complexes [J]. Biochemistry-Moscow, 2000, 65(3):280-295.