

过量铜对 4 种外生菌根真菌的生长、碳氮和铜积累的影响^{*}

黄 艺¹ 陶 澍² 姜学艳¹ 刘晓蓉³

(¹北京大学 环境科学中心 北京 100871) (²北京大学 城市与环境学系 北京 100871)

(³广东省林业科学研究所 广州 510000)

摘 要: 为了了解外生菌根真菌在过量铜胁迫下的生长和物质积累特点,揭示外生菌根真菌对过量铜胁迫的抵抗能力,研究了四种外生菌根真菌—美味牛肝菌(*Boletus edulis*)、铆钉菇(*Gomphidius viscidus*)、厚环乳牛肝菌(*Suillus grevillei*)和红绒盖牛肝(*Xerocomus chrysenteron*)。在过量铜胁迫条件下菌丝中铜积累量、菌丝生长特性以及碳氮积累速率。四种测试菌种菌丝中的铜积累量,随营养液中铜浓度的增加而增加,在 46mg/L 铜培养基下生长 15d 四种菌种菌丝内铜浓度分别是对照的 40~60 倍。*B. edulis* 和 *X. chrysenteron* 菌丝中铜浓度与培养基中铜浓度呈直线相关,*S. grevillei* 和 *G. viscidus* 为指数相关。菌丝在铜胁迫下依然呈 S 曲线增长,但初始生长推迟,指数增长期比对照晚 1~2d。菌丝生物量和碳氮积累随铜浓度增加而显著降低。综合所有试验结果显示,四种测试菌种对过量铜的抗性强度为:*B. edulis* > *G. viscidus* > *S. grevillei* > *X. chrysenteron*。

关键词: 外生菌根真菌,铜,碳,氮

中图分类号:Q949.32 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2002)06-0737-08

在必需微量元素缺乏的土壤中,菌根真菌通过扩大植物根系吸收范围以增加寄主植物对土壤中微量必需元素的吸收能力^[1,2]。然而,1982 年 Bradley 等在调查矿区植物时发现,在锌、铜等微量元素含量过高导致重金属污染的土壤中,幸存的植物往往有大量的菌根^[3,4]。这个发现引起了植物和微生物研究者的关注。许多对菌根真菌以及菌根植物的研究结果显示,外生菌根真菌能缓解过量重金属对其寄主植物的胁迫^[5~13]。菌根真菌能减轻过量重金属胁迫对其寄主植物的毒害。

然而,大量的研究主要集中在必需微量元素锌以及镉、铅等非必须元素上,对菌根真菌,尤其是外生菌根真菌与过量铜污染的关系,研究非常少。铜作为植物生长的必需元素,参加生物生长中的细胞有丝分裂过程,并与蛋白质结合成铜蛋白参与光和作用、呼吸作用和植物的木质化等。环境中的过量铜,常常导致植物失绿,生物量积累下降,严重时导致生物体死亡^[14,15]。因此,对环境中过量铜与外生菌根真菌的研究,具有理论和实际意义。

本文通过研究铜在四种我国主要松类外生菌根真菌中的积累,了解外生菌根真菌在不同铜浓度下的生长和物质积累,探讨外生菌根真菌对过量铜的反应,筛选抗过量铜的菌

^{*} 国家自然科学基金(39870611 A0024101)项目

作者简介:黄 艺(1964-),女,湖南常德人,北京大学环境科学中心副教授,博士,1997 年 7 月在德国比勒费尔德大学获自然科学博士学位,现主要从事环境生物和环境生态学研究。

收稿日期:2002-01-14,修回日期:2002-06-06

种,为进一步探讨外生菌根真菌抗重金属胁迫的生理机制和铜污染地的植物恢复提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料和培养

1.1.1 材料 四种供试材料分别为美味牛肝菌(*Boletus edulis*)、铆钉菇(*Gomphidius viscidus*)、厚环乳牛肝菌(*Suillus grevillei*)和红绒盖牛肝(*Xerocomus chrysenteron*)均由北京林业大学雷增普教授提供。

1.1.2 母菌培养 将改良 Kottke 营养液^[16]调到 pH5.5,按 12g/L 的浓度加入琼脂制成固体培养基。于 126℃ 灭菌 30min,无菌操作再注入灭菌培养皿,冷却凝固,分别接种四种供试外生菌根真菌。移入 26℃ 恒温箱内培养一周,备用。

1.1.3 液体培养 取 250mL 的三角瓶分别装入 pH5.5 的 Kottke 营养液 50mL,126℃ 灭菌 20min 后,每瓶接入直径为 7mm 的母菌圆形菌块 4 片。将三角瓶固定于频率为 30 次/min 的 P270 型恒温摇床,于 26℃ 下振荡培养。

1.1.4 固体培养 将改良 Kottke 营养液^[14]制成 pH5.5 的固体培养基(方法与母菌培养相同),灭菌后倾入直径为 9cm 的无菌培养皿内,每皿 20mL。冷却凝固。在母菌菌落边缘,用孔径为 7mm 的无菌打孔器取圆形菌块,接种在装有培养基的培养皿中央,于 26℃ 恒温箱内培养。

1.2 试验处理

称取 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 加入 Kottke 营养液,配制浓度为 25、50、100、150、180mg/L 的铜处理培养基,调 pH 至 5.5。取 Kottke 营养液为对照(含硫酸铜 1.25mg/L)。即试验用培养基中铜浓度分别为 0.32、6.5、13、26、38、46mg/L。固体和液体培养中,每个菌种铜处理浓度各 3 个重复。

1.3 测定方法

菌落直径测定 接种后第 3 天开始,每隔一天定时测定固体培养基上 *B. edulis* 和 *X. chrysenteron* 菌落的直径增长,垂直方向测量 2 次,取平均数,连续测量 7 次。对 *G. viscidus* 和 *S. grevillei*,从接种第 2 天开始,与上述同样方法每天定时测定菌落直径,连续测量 8 次。

菌丝干重测定 称好干燥定性滤纸的重量,用滤纸过滤液体培养基,滤出全部菌丝体,用蒸馏水冲洗 2~3 次,连同滤纸一起在 80℃ 烘箱内干燥 24 h,干燥器内冷却 5 h,于分析电子天平上称重,得出菌丝体的干重。

培养液中糖含量测定 用蒽酮比色法,使用 751 型分光光度计,分别测定培养 5d 和 9d 后营养液中葡萄糖含量^[17]。

培养液中氮含量测定 用钠氏比色法,使用 751 型分光光度计,分别测定培养 5d 和 9d 后营养液中氨态氮($\text{NH}_3\text{-N}$)的含量^[18]。

菌丝中铜含量测定 用 WYX-402 型原子吸收分光光度计,分别测定不同铜处理培养基上生长的菌丝中铜含量^[19]。

1.4 数据处理

菌丝耐受指数 (Tolerance index) = (处理的生长率/对照的生长率) × 100%^[6]。

方差分析: 将有关数据进行双因素方差分析和 t 检验等统计分析, 以确定不同处理和菌种间的差异显著性。

2 结果和讨论

2.1 铜在不同菌种中积累

用孔径为 7mm 的无菌打孔器, 从四种供试菌种的母菌培养皿中, 分别取圆形菌块一块, 置于不同铜处理水平的营养液里振荡培养 15d。过滤, 测菌丝干重。结果显示如图 1。

从图 1 可以看出, 四种供试菌种的菌丝铜含量, 随营养液中铜浓度的升高而升高, 但不同菌种在菌丝中积累的速度和增长方式不同。

对菌丝中铜积累量与营养液中铜浓度拟合方程显示(表 1), *B. edulis* 和 *X. chrysenteron* 中铜积累量与营养液中铜浓度呈直线相关, 在试验所用铜的浓度范围内, 铜在该两种菌丝中的积累量, 随营养液中铜浓度的增加而直线增加, 当营养液中铜浓度为 46mg/L 时, *B. edulis* 菌丝中铜积累量达 2890 $\mu\text{g/g}$, 在 *X. chrysenteron* 菌丝中达 2735 $\mu\text{g/g}$, 分别为对照的 40 倍和 62 倍, 显示出 *X. chrysenteron* 菌丝对铜具有较强的吸收和积累能力。

S. grevillei 和 *G. viscidus* 菌丝中铜积累与营养液中的铜浓度呈指数相关(见表 1), 在营养液中铜浓度相对较低的情况下, 菌丝中铜积累量相对较低, 在高浓度铜环境中, 菌丝中铜积累有显著增加的趋势, 如 13mg/L 铜处理营养液中, 菌丝铜积累量为对照的 10 倍和 11 倍, 在 46mg/L 铜处理营养液中, 菌丝铜积累量达到对照的 60 倍和 44 倍。 *S. grevillei* 和 *G. viscidus* 在外界较高铜浓度铜胁迫下, 对菌丝的吸收和积累量比前两菌种相对较高。

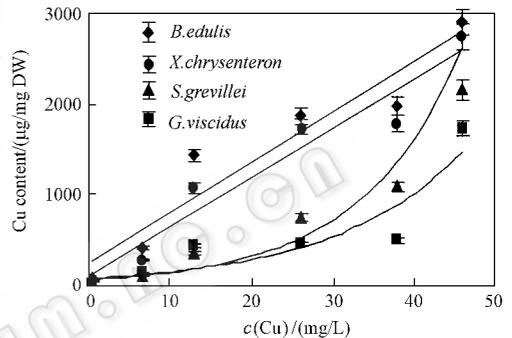


图 1 铜在不同外生菌根真菌中积累量

Fig. 1 Cu concentration in mycelia of different strains

表 1 四种供试菌种铜积累和铜处理浓度的相关关系

Table 1 Dependent equation between Cu concentration in mycelia and nutrition

Fungal strains	Equation
<i>B. edulis</i>	$y = 55.24x + 245.09$ $R^2 = 0.9137$
<i>X. chrysenteron</i>	$y = 54.367x + 98.391$ $R^2 = 0.9357$
<i>S. grevillei</i>	$y = 61.812e^{0.0814x}$ $R^2 = 0.9163$
<i>G. viscidus</i>	$y = 78.136e^{0.0637x}$ $R^2 = 0.7993$

当外界过量铜浓度变化相同的条件下, *B. edulis*、*X. chrysenteron* 与 *S. grevillei*、*G. viscidus* 菌丝内铜的变化趋势不同的结果显示, 虽然同为松的菌根真菌, 不同菌种对铜的生理积累过程可能不同。然而, 过量铜在菌丝细胞内的具体生理过程, 有待于研究。

进一步将不同菌种的菌丝中铜测定浓度与其培养基中铜处理浓度相比,得到不同菌种对铜的吸收指数,其结果显示于图 2。

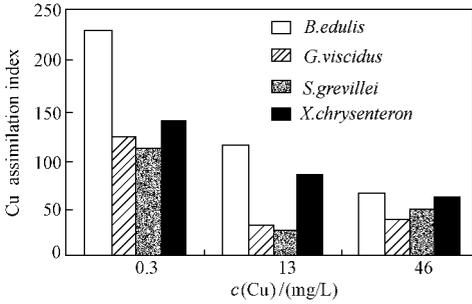


图 2 不同菌种铜吸收指数

Fig. 2 Cu assimilation index of different fungal strains

因此,它们对重金属铜的吸收能力依次为: $B. edulis > X. chrysenteron > S. Grevillei > G. viscidus$ 。

按照 Denny 的研究结果,菌丝对重金属的吸收和积累量,可能反映了菌丝对该元素的过量胁迫的抗性能力^[20]。以上试验结果显示,菌根真菌侵染植物后,大量重金属被滞留在菌丝中,从而提高了植物对铜的抗性,减轻对植物的危害,四种外生菌根真菌在过量铜胁迫环境中,对过量铜的抗性强度依次为 $B. edulis > X. chrysenteron > S. grevillei > G. viscidus$ 。

2.2 铜胁迫对菌丝生长的影响

2.2.1 对菌丝增长的影响

对生长在铜处理的固体培养基上的菌落直径做连续测定,其结果展示如图 3。

在固体培养基上,测试菌种菌丝表现出不同的生长特性。*G. viscidus* 和 *S. grevillei* 菌落直径增长迅速,9d 时间里达到 9cm,充满整个培养皿。*X. chrysenteron* 和 *B. edulis* 直径增长相对较慢,第 9d 直径为 2cm 和 4cm。但后者菌落菌丝比前者厚且密度大。菌丝在土壤迅速蔓延的菌种,显示其具有较强适应新环境的能力^[1,2]。结果显示,*G. viscidus* 和 *S. grevillei* 对新环境适应快,是改良铜污染时良好的先锋种。

在过量铜胁迫下,四种菌种都表现出初始生长受到抑制。培养 1d 后,对照出现生长,而铜处理菌种都未见菌丝生长,2d 后,*G. viscidus*、*S. grevillei* 和 *X. chrysenteron* 开始生长,*B. edulis* 在培养的第 3 天,还没有出现菌落直径的增大。这种抑制作用,随铜浓度的增加而加强。

从图 3 可以看出,虽然过量铜胁迫不同程度地抑制了菌丝增长,但四种菌种菌落直径增长依然保持典型 S 生长模式(见表 2)。然而,各菌种指数期出现滞后,且随铜处理浓度增大,指数期出现时间变晚,增长率降低。*B. edulis* 培养的第 5~7 天是菌丝生长的指数期,但在 26mg/L 铜处理下,指数期延迟到生长的第 9~11 天。第 3~5 天是 *X. chrysenteron* 生长的指数期,而在铜浓度为 38mg/L 时,指数期推迟到第 9~11 天。过量铜对菌丝增长指数期和增长率的影响,导致四种菌种菌落生长随铜处理浓度的增加而显著下降。这个结果与一些研究者对 AM 菌根研究的结果相似^[21]。

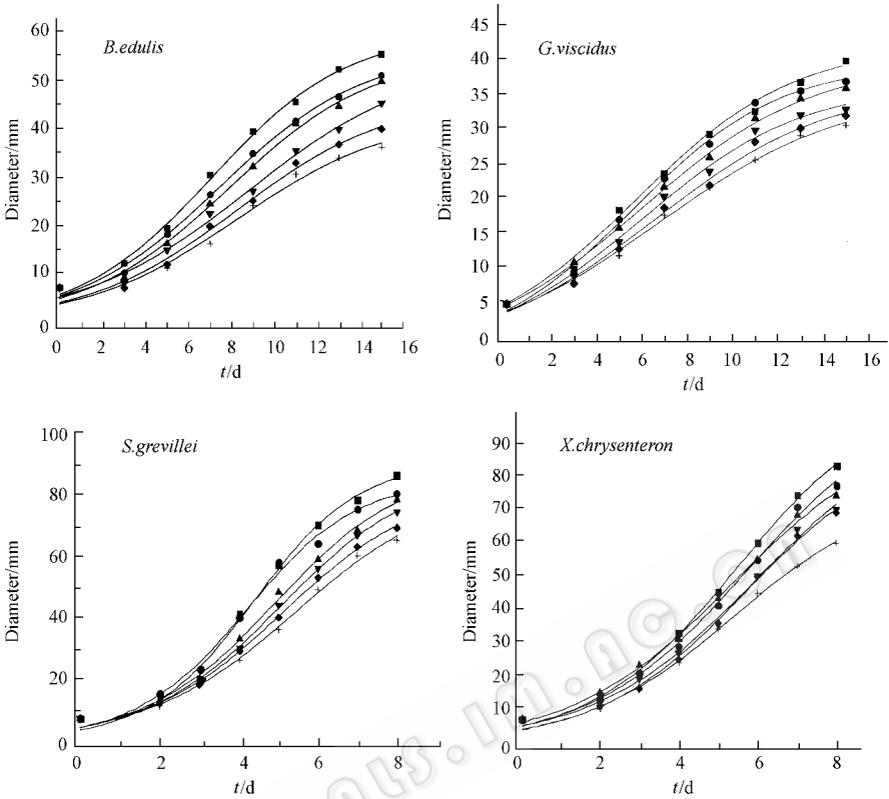


图 3 铜对菌斑直径生长的影响

Fig. 3 Diameter increase response to Cu stress

表 2 过量铜胁迫下四种试验外生菌根真菌生长模型

Table 2 Growth model of for kinds of test ectomycorrhizal mycelia under Cu stress

Copper treatment (mg/L)	Growth model $D = a(1 + be^{\lambda t})$	
	<i>B. edulis</i>	<i>X. chrysenteron</i>
0.32	$D = 59.37282(1 + 9.51925e^{0.31954t})$	$D = 44.62875(1 + 5.49508e^{0.28707t})$
13	$D = 55.10559(1 + 10.48014e^{0.29884t})$	$D = 42.14565(1 + 5.07696e^{0.26895t})$
46	$D = 42.34994(1 + 10.43771e^{0.28391t})$	$D = 37.77188(1 + 5.35067e^{0.24752t})$
	<i>S. grevillei</i>	<i>G. viscidus</i>
0.32	$D = 90.72035(1 + 26.09977e^{0.74727t})$	$D = 105.05031(1 + 19.57779e^{0.54318t})$
13	$D = 88.70156(1 + 19.49108e^{0.60936t})$	$D = 95.12229(1 + 14.38738e^{0.49934t})$
46	$D = 82.72676(1 + 17.73361e^{0.53432t})$	$D = 75.35091(1 + 17.36923e^{0.53142t})$

D :The mycelia diameter λ :The growth time.

2.2.2 对生物量积累的影响 :为了消除培养皿直径对菌丝增长的限制,用液体培养测定铜对四种菌种生物量积累的影响。四种菌在营养液里振荡培养 15d 后,过滤,测菌丝干

重。结果如图 4 所示。

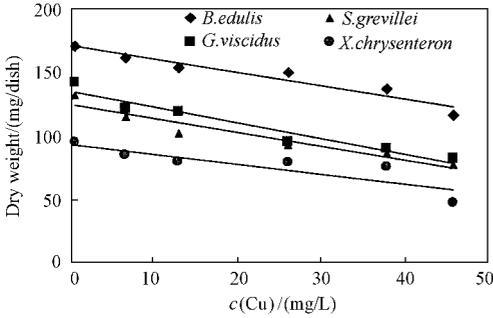


图 4 过量铜胁迫对菌丝生物量积累的影响

Fig. 4 Biomass of mycelia response to Cu stress

在过量铜胁迫下,四种菌种生物量积累速度与铜处理浓度呈负相关。*B. edulis* 对照在 15d 里生物量增加到 170mg,在 46mg/L 铜处理培养基中,生物量为 116mg,为对照的 68%;同样,46mg/L 铜处理下,*G. viscidus*、*S. grevillei* 和 *X. chrysenteron* 生物量分别为其对照的 64%、65% 和 80%。对不同铜浓度下四种菌种生物量与其对照做方差分析,结果显示,过量铜对菌丝的生长和物质积累产生了抑制作用。

2.3 铜胁迫对碳氮积累的影响

对培养菌丝 9d 后的不同铜胁迫营养液中碳和氮剩余量做测定,以初始碳含量 4237.6mg/L 和氮含量 111.7mg/L 为 100%,计算出菌丝 9d 内碳和氮相对消耗量,结果展示如图 5。

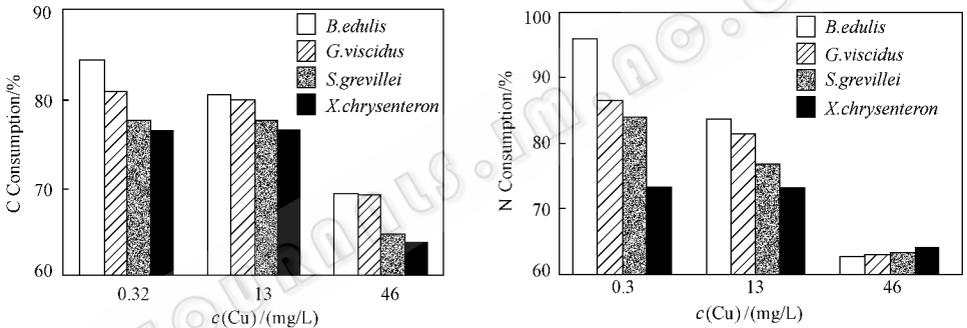


图 5 铜胁迫下菌丝碳氮积累量

Fig. 5 Accumulation amount of mycelia for carbon and nitrogen

因为菌丝生长在一个封闭的环境里,培养液中碳氮的消耗量表现了菌丝对碳氮的需求量和消耗速度,直接呈现了菌丝生理代谢速率。在过量铜胁迫环境里,四种测试菌种的营养液中,其相对碳氮消耗量都随营养液中铜含量的增加而减少,且差异性显著。这个结果显示,过量铜影响了碳氮代谢途径,减低了菌丝对碳和氮的消耗速度。铜对碳氮代谢生理途径的具体影响,还需要做进一步的测试。

在不同铜处理水平下,*B. edulis* 和 *G. viscidus* 的碳相对消耗量大于 *S. grevillei* 和 *X. chrysenteron*,尤其在铜浓度相对较高的情况下(46mg/L),但四种菌种种间菌丝碳消耗量与对照相比差异不显著($p \leq 0.05$)。在试验用铜处理水平下,四种菌种种间碳消耗速度排序为:*B. edulis* > *G. viscidus* > *S. grevillei* > *X. chrysenteron*。

与碳消耗相似,培养 9d 后,*B. edulis* 氮相对消耗量最大,在铜处理浓度为 13mg/L 的生长条件下,四种菌种种间氮相对消耗量排序为:*B. edulis* > *G. viscidus* > *S. grevillei* > *X. chrysenteron*,与碳消耗情况相同。但随着铜处理浓度增大,各菌种间氮消耗量差异逐渐减少,当铜浓度达到 46mg/L 时,相对消耗量趋于相等(63% ~ 64%)。

当外生菌根真菌与其寄主植物结合后,通过共生组织(菌根)从寄主植物获得碳水化合物,从土壤直接吸收有机养分供其生长^[1,2]。离体培养的菌根真菌虽然与菌根真菌结合体上的菌丝不一样,但其对培养基中碳水化合物和无机氮的消耗量,反映了菌丝的生理活性^[22]。过量铜胁迫下菌丝碳氮消耗量与对照相比显著受影响的结果显示,菌丝生理活性受到铜的抑制。然而,菌丝在铜处理下的碳氮相对消耗量并不太低,在最高铜处理浓度 46mg/L 条件下,所有菌种碳氮相对量都大于对照的 60%,这个结果与铜对菌丝生物量积累相一致(见 2.2.2)。菌丝在过量铜胁迫下,菌丝内铜含量随营养液中铜浓度的升高而增加,以及相对碳氮消耗量较高的结果,显示供试菌种对铜具有较强的主动吸收能力。这说明,测试菌种可能通过调节细胞的生理生化过程,减轻铜的生理毒害,达到抵抗外界过量铜作用。然而,但是,具体调节机制,还需要通过测试铜污染环境菌丝细胞的碳氮代谢酶活性来了解。

2.4 结论

在过量铜胁迫下,四种外生菌根真菌都表现出初始生长受到抑制,但菌落直径增长依然保持典型 S 生长模式。生物量积累随处理浓度增加而显著降低。

四种供试菌种在过量铜胁迫下,菌丝内铜含量随营养液中铜浓度的升高而升高,显示出对铜具有较强的主动吸收能力。在测试的铜浓度范围内,不同菌种菌丝内铜积累量与铜浓度相关关系不同,*B. edulis* 和 *X. chrysenteron* 为线性相关,*S. grevillei* 和 *X. chrysenteron* 为指数相关。它们对碳和氮的积累速率顺序分别为:*B. edulis* > *G. viscidus* > *S. grevillei* > *X. chrysenteron*。

参 考 文 献

- [1] Brundrett M. *Advances in Ecological Research*, 1991 **21** :171 ~ 313.
- [2] Harley J L, Smith S E. *Mycorrhizal Symbiosis*. London, New York :Academic Press, 1983.
- [3] Bradley R, Burt A J, Read D J. *Nature*, 1981 **292** 335 ~ 337.
- [4] Bradley R, Burt A J, Read D J. *New Phytol*, 1982, **91** :197 ~ 209.
- [5] Brown M T, Wilkins D A. *New Phytol*, 1985 **99** 91 ~ 100.
- [6] Colpaert J V, Van Assche J. *Funct Ecol*, 1987 **1** 415 ~ 421.
- [7] Colpaert J V, Van Assche J A. *Plant and Soil*, 1992 **143** 201 ~ 211.
- [8] Dalitz H. Untersuchungen Zum Einfluss Niedriger Blei-Applikationen Bei Verschiedenen pH-Regimen auf *Fagus sylvatica*-Keimlinge in Hydrokultur. Dissertation :University Bielefeld, 1996.
- [9] Denny H J, Willkins D A. *New Phytol*, 1987, **106** 517 ~ 553.
- [10] Frey B, Zierold K, Brunner I. *Plant Cell and Environment*, 2000 **23**(11) :1257 ~ 1265.
- [11] Godbold D L, Jorst W J, Marschner H, et al *Pflanzenphysiol*, 1983 **112** 315 ~ 321.
- [12] Jentschke G, Godbold D L. *Physiologia Plantarum*, 2000 **109**(2) :107 ~ 116.
- [13] Li X L, Christie P. *Chemosphere*, 2001 **42**(2) :201 ~ 207.
- [14] Kabata-Pendias A, Pendias H. *Trace Elements in Soils and Plants*. Boca Raton, Florida :CRC Press, 1985.
- [15] 陈怀满, 文启孝, 邢光熹, 等. 土壤—植物系统中的重金属污染. 北京 :科学出版社, 1996. 168 ~ 194.
- [16] Kottke I, Guttentberger M, Hammpp R. *Trees*, 1987 **1** :191 ~ 194.
- [17] 张志良, 沈曾佑, 沈宗英, 等. 植物生理学实验指导. 北京 :高等教育出版社, 1990. 160 ~ 162.
- [18] 周德庆, 张纪忠, 程皆能, 等. 微生物学实验手册. 上海 :科学技术出版社, 1986. 294 ~ 298.
- [19] 李盛亮. 原子吸收光谱法. 上海 :科学技术出版社, 1989

- [20] Denny H J , Ridge I. *New Phytol.* 1995 **130** 252 ~ 257.
[21] Gildong A , Tinker P B. *New Phytol.* 1983 **95** 263 ~ 268.
[22] Griffin D H. *Fungal Physiology* , Second Edition. New York :Wiley-Liss , 1994.

Influence of Excessive Copper on Growth and Accumulation of Carbon and Nitrogen in Mycelia of Four Kinds of Ectomycorrhizal Fungi^{*}

Huang Yi Tao Shu Jiang Xueyan Liu Xiaorong

(Center for Environmental Science in Peking University , Beijing 100871 , China)

Abstract : In order to understand the characteristic and tolerance of ectomycorrhizal fungous under the stress of excessive copper , research carried out with four kinds of ectomycorrhizal fungi strains , *Boletus edulis* , *Gomphidius viscidus* , *Suillus grevillei* and *Xerocomus chrysenteron* . Copper amount accumulated in mycelia of 4 strains had increased with the increase of concentration of copper in cultural substrate. Copper concentration in mycelia was 40 ~ 60 time higher in 46 mg/L copper treatment than in control. Dependence to relationship between copper concentration in *B. edulis* and *X. chrysenteron* mycelia and in culture substrate is linear. Concentration of copper in *B. edulis* and *X. chrysenteron* mycelia with that in culture substrate shows exponential dependence. Even though development modeling of mycelia of 4 strains shows S curve under excessive copper stress , the initial time delayed 1 to 2 days comparing with control. But excessive copper limited the accumulation of biomass and carbon and nitrogen in mycelia. The amounts of accumulation of them are decreased with the increase of copper concentration in cultivation substrate. Combination with all result , the strength order of 4 tested ectomycorrhizal strain on tolerance to excessive copper stress is *B. edulis* > *G. viscidus* > *S. grevillei* > *X. chrysenteron* .

Key words : Ectomycorrhizal fungous , Copper , Carbon , Nitrogen.

* Supported by NNSFC(39870611 /40024101)