

网络出版时间:2018-05-25 09:43 DOI: 10.13207/j.cnki.jnwafu.2018.11.014
网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20180525.0940.028.html>

两种深色有隔内生真菌的铅耐受性

杨超, 谢清哲, 楚文卉, 冯欢, 刘莹, 张收霞, 王春燕
(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】【目的】比较 2 种深色有隔内生真菌(dark septate endophytes, DSE) *Phialocephala fortinii* 和 *Phaeoacremonium mortoniae* 对重金属铅(Pb^{2+})的耐受性及富集能力, 初步分析相关的重金属铅耐受性机制, 为 DSE 在重金属污染区土壤治理和植被修复中的应用提供理论依据。【方法】采用液体摇瓶培养方法, 比较不同 Pb^{2+} 质量浓度(0 (对照), 300, 600, 900, 1 200 mg/L)胁迫下 *P. fortinii* 和 *P. mortoniae* 的生长状况, 测定其培养液 pH 值和有机酸质量浓度, 以及菌丝内 Pb^{2+} 含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性和还原型谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)、可溶性蛋白含量的变化, 分析其可能的 Pb 耐受性机制。【结果】当 Pb^{2+} 质量浓度为 0~1 200 mg/L 时, 2 种 DSE 均有不同程度的生长, *P. fortinii* 的 Pb^{2+} 半致死浓度(EC_{50}) (951.5 mg/L) 显著高于 *P. mortoniae* (431.0 mg/L) ($P<0.05$)。随培养液中 Pb^{2+} 质量浓度的增加, 2 种 DSE 菌丝干质量逐渐减小, 而菌丝内的 Pb^{2+} 含量却逐渐升高, *P. fortinii* 的铅富集量逐渐增加, 并在 Pb^{2+} 质量浓度为 1 200 mg/L 达到最大, 而 *P. mortoniae* 的铅富集量则是先增加后减少, 在 Pb^{2+} 质量浓度为 900 mg/L 达到最大。当 Pb^{2+} 质量浓度为 300~1 200 mg/L 时, *P. fortinii* 的菌丝干质量和 Pb^{2+} 富集量均高于 *P. mortoniae*, 而菌丝内的 Pb^{2+} 含量却低于后者。随培养液中 Pb^{2+} 质量浓度的升高, *P. fortinii* 菌丝的 SOD 活性和可溶性蛋白含量均先增加后减少, 而 GSH 和 MDA 含量则逐渐增加, 且以上 4 个指标均在 Pb^{2+} 质量浓度为 600 mg/L 时达到最大值; *P. mortoniae* 菌丝内的 SOD 活性以及 GSH、MDA 和可溶性蛋白含量均先增加后减少, 除 SOD 活性在 Pb^{2+} 质量浓度 300 mg/L 达到最大值外, 其他指标均在 Pb^{2+} 质量浓度为 600 mg/L 时达到最大值。2 种 DSE 培养液的 pH 值均随 Pb^{2+} 质量浓度的升高而下降, 从中只检测到草酸和乙酸 2 种小分子有机酸; 2 种 DSE 在供试的 Pb^{2+} 质量浓度下均能产生草酸, 且草酸质量浓度随培养液中 Pb^{2+} 质量浓度的增加(>300 mg/L 后)而极显著增大, 在 Pb^{2+} 质量浓度为 1 200 mg/L 时达到最大值 ($P<0.01$), 而 2 种 DSE 仅在 Pb^{2+} 质量浓度较高(600~1 200 mg/L)时产生乙酸; 在 Pb^{2+} 质量浓度为 600~1 200 mg/L 时, *P. fortinii* 培养液中草酸和乙酸质量浓度都显著高于 *P. mortoniae* ($P<0.05$)。【结论】2 种 DSE 对铅都有一定的耐受性和富集能力, 其中 *P. fortinii* 的耐受性和富集能力明显优于 *P. mortoniae*, SOD 活性提高以及 GSH、可溶性蛋白和小分子有机酸(草酸和乙酸)的大量积累可能是这 2 种 DSE 减轻铅毒害、提高铅耐受性的潜在机制之一。

【关键词】 有隔内生真菌; 铅耐受性; 有机酸
【中图分类号】 Q938.1; Q142.3 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-9387(2018)11-0105-10

Lead tolerance of two dark septate endophytes

YANG Chao, XIE Qingzhe, CHU Wenhui, FENG Huan, LIU Ying,
ZHANG Shouxia, WANG Chunyan
(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract:【Objective】In this study, the lead (Pb) tolerance and enrichment ability of two dark septate endophytes (DSE), *Phialocephala fortinii* and *Phaeoacremonium mortoniae*, were compared and the relat-

【收稿日期】 2017-09-08
【基金项目】 国家自然科学基金项目(31300543); 西北农林科技大学基本科研创新一般项目(2452013QN108, 2452015343); 西北农林科技大学引进人才科研启动费项目(Z111021204); 陕西省专项配套经费项目
【作者简介】 杨超(1991—), 男, 河南洛阳人, 在读硕士, 主要从事森林微生物学研究。
【通信作者】 王春燕(1979—), 女, 河南漯河人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事森林微生物学研究。E-mail: chunyan@nwsuaf.edu.cn

ed lead tolerance mechanisms were preliminarily analyzed to provide basis for the application of DSE in heavy metal pollution control and vegetation restoration. 【Method】 Under liquid culture condition with different Pb^{2+} mass concentrations (0, 300, 600, 900 and 1 200 mg/L), fungal growth status, pH and organic acids mass concentration in liquid culture medium as well as lead content, superoxide dismutase (SOD) activity, contents of glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and soluble protein in mycelia were measured and analyzed. The possible mechanisms of lead tolerance were also analyzed and discussed. 【Result】 With the Pb^{2+} concentration of 0—1 200 mg/L, both DSE grew and the semi-lethal concentration (EC_{50}) of *P. fortinii* (951.5 mg/L) was significantly higher ($P < 0.05$) than that of *P. mertoniae* (431.0 mg/L). With the increase of Pb^{2+} concentration, the mycelia dry weight of both DSE gradually reduced, while the Pb^{2+} contents in mycelia increased. The Pb^{2+} enrichment in *P. fortinii* increased gradually and reached the maximum at 1 200 mg/L, while the enrichment in *P. mertoniae* increased firstly and then decreased with the maximum at 900 mg/L. When Pb^{2+} concentration was 300—1 200 mg/L, the dry weight and lead accumulation of *P. fortinii* were higher than those of *P. mertoniae*, but Pb^{2+} content in mycelia of *P. fortinii* was lower than that of *P. mertoniae*. The SOD activity and soluble protein contents in the mycelia of *P. fortinii* increased firstly and then decreased with the increase of Pb^{2+} concentration, while GSH and MDA contents gradually increased. All indexes reached the maximum at 600 mg/L. With the increase of Pb^{2+} concentration, SOD activity and contents of GSH, MDA and soluble protein in mycelia of *P. mertoniae* increased firstly and then decreased. All reached the maximum at 600 mg/L except SOD activity, which reached the maximum at 300 mg/L. The pH values of two fungal culture media decreased with the increase of Pb^{2+} concentration, and only oxalic acid and acetic acid were detected. Oxalic acid was detected at all tested concentrations, and its mass concentrations increased significantly with the increase of Pb^{2+} concentrations (300—1 200 mg/L) with the maximum at 1 200 mg/L. Acetic acid was only detected under high Pb^{2+} concentration (600—1 200 mg/L). The contents of both oxalic acid and acetic acid in *P. fortinii* culture medium were significantly higher ($P < 0.01$) than in *P. mertoniae* at Pb^{2+} concentration of 600—1 200 mg/L. 【Conclusion】 Both DSE showed high Pb^{2+} tolerance and accumulation ability, and *P. fortinii* was better than *P. mertoniae*. The increase of SOD activity and accumulation of GSH, soluble protein and small molecule organic acids (oxalic acid and acetic acid) may relate with the high Pb^{2+} tolerances.

Key words: dark septate endophytes; lead tolerance; organic acids

重金属污染已经成为严重的环境问题^[1], 铅(Pb)是普遍的重要污染物之一。重金属 Pb 污染不仅能够引起土壤组成、结构和功能的变化, 还能够抑制作物根系生长和光合作用, 致使作物减产甚至绝收, 更为严重的是 Pb 通过食物链在人体内富集, 从而威胁人体健康^[2], 因此重金属污染土壤生态修复技术研究已成为多个科技领域的热点和难点^[3]。植物根际与微生物系统的相互促进作用能够有效提高污染土壤的生物修复能力, 已成为生物修复领域的研究热点^[4]; 同时, 微生物因其具有繁殖速度快、反应条件温和、处理效率高等优势, 显示出了广阔的应用前景^[4]。已有研究报道, 腐生真菌具有良好的重金属污染修复能力, 如大孢蘑菇 (*Agaricus macrosporus*) 对重金属铜、铅和镉的最高吸收率分别为 96%, 89% 和 96%^[5]。研究表明, 真菌的抗氧化酶

系统能有效降低活性氧的伤害, 分泌多种有机酸, 可螯合、沉淀重金属离子, 从而降低重金属的毒害, 这可能是真菌免受重金属毒害的重要机制之一^[6]。

深色有隔内生真菌 (dark septate endophytes, DSE) 是自然界中普遍定殖于植物根部的内生真菌^[7], 广泛分布于重金属污染区, 对这些地区植物的生长具有保护和促进作用^[8]。已有研究表明, DSE 菌丝具有较强的重金属耐受性和吸附能力, 如嗜鱼外瓶霉 (*Exophiala pisciphila*) 对镉具有很强的吸收和富集能力^[9], 枝状枝孢菌 (*Cladosporium cladosporioides*) B142 的非活性菌丝对 Pb 的吸附能力较强^[10]。目前, 有关 Pb 耐受性 DSE 菌株的筛选和抗性机制研究还相对较少, 本研究采用液体摇瓶培养方法, 比较了 2 种 DSE 对重金属 Pb 的耐受性和富集能力, 检测了相关的生理生化特征, 并初步分析

了可能的耐受机制,以期 DSE 在重金属污染土壤治理和污染区植被修复中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌种

供试 DSE 菌种为 *Phialocephala fortinii* 和 *Phaeoacremonium mortoniae*,分离自陕西秦岭火地塘油松(*Pinus tabulaeformis* Carr.)根部,纯化后保存于西北农林科技大学林学院森林微生物实验室。将保存的菌种接种于马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)固体培养基平板上,25 ℃ 暗培养 10 d 后用打孔器(直径 1 cm)在菌落边缘打取菌饼备用。

1.2 硝酸铅母液的配制

精确称取 1.6 g 分析纯 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$,溶于灭菌(121 ℃,30 min)蒸馏水中并定容到 100 mL,即可得到 Pb^{2+} 质量浓度为 10 g/L 的硝酸铅母液,使用前用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌。

1.3 2 种 DSE 的铅耐受性和铅富集量

将 150 mL 马铃薯葡萄糖液体培养基(potato dextrose broth, PDB)装入 250 mL 的三角瓶中灭菌(121 ℃,30 min),冷却至室温,用移液枪分别准确吸取 4.639,9.574,14.835,20.455 mL 硝酸铅母液于 150 mL PDB 培养基中,充分摇匀后即可得到 Pb^{2+} 质量浓度分别为 300,600,900,1 200 mg/L 的液体培养基(预试验发现,当 Pb^{2+} 质量浓度超过 1 200 mg/L 后,2 种菌丝生长缓慢,受到抑制,因此,本试验中 Pb^{2+} 质量浓度最高设为 1 200 mg/L),以不添加硝酸铅母液的处理为对照(CK)。每个 Pb^{2+} 质量浓度设 3 个平行。每瓶液体培养基中接入 2 个菌饼,25 ℃ 振荡(120 r/min)培养 21 d 后用滤纸过滤收集菌丝体。滤液用于测定 pH 值和有机酸含量,菌丝体用去离子水冲洗 3 次后于 80 ℃ 烘干至质量恒定,称量菌丝体干质量,计算真菌的铅半致死浓度(EC_{50})^[11]。

精确称取 0.1 g 各处理干燥的菌丝体,采用浓硝酸-高氯酸(均为分析纯)湿法消化^[12],用去离子水稀释定容,用原子吸收分光光度计测定铅含量,据此计算菌丝体中的铅含量(mg/kg,干质量)和 2 种 DSE 的铅富集量^[13]。

1.4 测定项目及方法

1.4.1 菌丝中超氧化物歧化酶(SOD)活性和可溶性蛋白含量 称取 0.5 g 新鲜菌丝(收集方法同 1.3)于预冷的研钵中,加 2 mL 粗酶提取液(50

mmol/L pH 7.8 磷酸缓冲液,内含体积分数 1% 聚乙烯吡咯烷酮)和少量石英砂,冰浴下充分研磨后定容至 10 mL;4 ℃ 离心 15 min(8 000 r/min)后取上清液,分别用文献[14]和[15]的方法测定 SOD 活性及可溶性蛋白含量。

1.4.2 菌丝内还原型谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)含量 精确称取 0.5 g 新鲜菌丝,加入少量 5%(体积分数)偏磷酸溶液冰浴研磨至匀浆后定容到 10 mL,4 ℃ 离心(5 000 r/min,10 min)2 次后取上清液,用紫外分光光度计在波长 412 nm 处测定吸光值并计算菌丝内的 GSH 含量^[16]。另取新鲜菌丝 0.5 g,加入少许石英砂和 5 mL 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.8)冰浴研磨成匀浆,4 ℃ 离心(5 000 r/min,10 min)后取上清液,加入 1 倍体积 0.5% 体积分数的硫代巴比妥酸,混匀并置于沸水浴上反应 15 min,迅速冷却后再离心,以体积分数 0.5% 的硫代巴比妥酸为空白对照,用紫外分光光度计在波长 450,532,600 nm 处测定吸光值,并计算菌丝内的 MDA 含量^[17]。

1.4.3 滤液 pH 值和有机酸质量浓度 用 pH 计(PHD-3C-02 紧密型,上海三信仪表厂)测定滤液的 pH 值。用高效液相色谱仪(D-7000,日本 HITACHI 公司)测定滤液中的有机酸质量浓度(样品先用 0.1 mol/L H_2SO_4 酸化,并用 0.22 μm 微孔滤膜过滤),色谱条件为:Diode Array L-7455 紫外检测器,检测波长 210 nm;Agilent TC-C18 柱,柱温 30 ℃;0.01 mol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ (pH 2.8)为流动相,流速 0.5 mL/min;进样量 10 μL 。采用外标法,分别以标准品(草酸、乙酸、苹果酸、柠檬酸、琥珀酸和酒石酸)和去离子水为对照,测定和计算培养液中的有机酸质量浓度(峰面积法)^[18]。

1.5 数据处理与分析

用 Microsoft Excel 2007 软件进行试验数据整理,计算平均值及标准差并进行绘图,试验数据均以“平均值 $\pm$ 标准差(SD)”($n=3$)表示,用 SPSS 17.0 进行差异显著性方差分析,以 $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 2 种 DSE 的铅耐受性和富集作用

表 1 显示, Pb^{2+} 质量浓度为 0~1 200 mg/L 时,2 种 DSE 均有不同程度的生长,但它们的菌丝干质量随着培养液中 Pb^{2+} 质量浓度的增加而逐渐减小,表明重金属铅对 2 种菌的生长均有抑制作用,除

Pb²⁺ 质量浓度为 300 mg/L 时 *P. fortinii* 菌丝体干质量略低于对照外,2 种 DSE 菌丝体干质量在其余 Pb²⁺ 质量浓度下均显著低于对照($P<0.05$)。不加 Pb²⁺ 时,*P. mortoniae* 的生长明显优于 *P. fortinii*,菌丝体干质量显著高于后者($P<0.05$);当 Pb²⁺ 质量浓度为 300~1 200 mg/L 时,随 Pb²⁺ 质量浓度的增加,*P. mortoniae* 生长速率快速下降;同一 Pb²⁺ 质量浓度下,*P. mortoniae* 菌丝干质量均显著低于 *P. fortinii* ($P<0.05$),其铅半致死浓度(EC₅₀) (431.0 mg/L) 也显著低于 *P. fortinii* (951.5 mg/L),表明铅对 *P. mortoniae* 生长的抑制作用明显大于 *P. fortinii*,即 *P. fortinii* 的铅耐受性优于 *P. mortoniae*。

表 1 还显示,2 种 DSE 菌丝中的 Pb²⁺ 含量随培养液中 Pb²⁺ 质量浓度的增加而显著增大,在 Pb²⁺ 质量浓度为 1 200 mg/L 时均达到最大值,同一 Pb²⁺ 质量浓度下,*P. mortoniae* 菌丝中的 Pb²⁺ 含量

均高于 *P. fortinii*,尤其当 Pb²⁺ 质量浓度为 900~1 200 mg/L 时二者差异达到显著水平,表明相同 Pb²⁺ 质量浓度下进入 *P. mortoniae* 菌丝体内的 Pb²⁺ 较多,这可能是其铅耐受性较低的原因之一。随培养液中 Pb²⁺ 质量浓度的增加,*P. fortinii* 的菌丝 Pb²⁺ 富集量显著增大;而 *P. mortoniae* 菌丝中的 Pb²⁺ 富集量则先升高后降低,在 Pb²⁺ 质量浓度为 900 mg/L 时达到最大值,当 Pb²⁺ 质量浓度为 1 200 mg/L 时降低,这与 Pb²⁺ 质量浓度较高时其生长受到抑制,菌丝干质量快速降低直接相关。此外,在各 Pb²⁺ 质量浓度下,*P. fortinii* 菌丝体的 Pb²⁺ 富集量均高于 *P. mortoniae*,除 Pb²⁺ 质量浓度为 300 mg/L 外,其余 Pb²⁺ 质量浓度下二者差异均达到显著水平,尤其在 Pb²⁺ 质量浓度为 1 200 mg/L 时,*P. fortinii* Pb²⁺ 富集量约为后者的 2.5 倍,显示出了较强的 Pb²⁺ 富集能力。

表 1 2 种深色有隔内生真菌(DSE)的铅耐受性和富集能力
Table 1 Lead tolerances and enrichment abilities of two DSE

铅处理/(mg·L ⁻¹) Lead mass concentration	真菌 Fungi	铅半致死浓度/ (mg·L ⁻¹) Semi-lethal concentration	菌丝干质量/ (g·瓶 ⁻¹) Dry weight of mycelia	菌丝 Pb ²⁺ 含量/ (mg·kg ⁻¹) Lead content in mycelia	Pb ²⁺ 富集量/ (mg·瓶 ⁻¹) Lead accumulation
0(CK)	<i>P. fortinii</i>	951.5±16.04 A	0.83±0.104 Ba	—	—
300			0.79±0.041 Aa	1 658±33.84 ABd	1.31±0.25 Ad
600			0.52±0.079 Ab	3 000±651.20 ABc	1.56±0.27 Ac
900			0.43±0.014 Ac	4 948±358.24 Bb	2.13±0.19 Ab
1 200			0.37±0.052 Acd	8 003±881.51 Ba	2.96±0.34 Aa
0(CK)	<i>P. mortoniae</i>	431.0±65.21 B	0.94±0.053 Aa	—	—
300			0.58±0.109 Bb	2 164±179.7 Ad	1.25±0.33 ABcd
600			0.36±0.044 Bc	3 922±427.75 Ac	1.42±0.26 Bb
900			0.25±0.033 Bd	6 013±745.49 Ab	1.50±0.18 Ba
1 200			0.13±0.035 Be	9 163±441.98 Aa	1.19±0.08 Bd

注:不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$),不同大写字母表示 2 种真菌差异显著($P<0.05$)。
Note:Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$) among different lead concentrations,while capital letters indicate significant difference ($P<0.05$) among the two fungi under same lead mass concentrations.

2.2 铅胁迫对 2 种 DSE 菌丝生化指标的影响

2.2.1 SOD 活性 图 1-A 显示,与对照相比,铅胁迫下 2 种 DSE 菌丝的 SOD 活性总体增加,除 *P. mortoniae* 在 Pb²⁺ 质量浓度为 1 200 mg/L 时极显著低于对照($P<0.01$)外,其余 Pb²⁺ 质量浓度下 2 种 DSE 菌丝的 SOD 活性都极显著高于对照。随培养液中 Pb²⁺ 质量浓度的增加,2 种 DSE 菌丝的 SOD 活性均呈先升高后降低的趋势,其中 *P. fortinii* 在 Pb²⁺ 质量浓度为 600 mg/L 时 SOD 活性达到最大值($P<0.01$),而 *P. mortoniae* 在 Pb²⁺ 质量浓度为 300 mg/L 时 SOD 活性达到最大值。此外,不加铅时,2 种 DSE 菌丝的 SOD 活性无显著差异

($P>0.05$),随培养液中 Pb²⁺ 质量浓度的增加,*P. fortinii* 菌丝的 SOD 活性除在 Pb²⁺ 质量浓度为 300 mg/L 时极显著低于 *P. mortoniae* 外,其他 Pb²⁺ 质量浓度(600~1 200 mg/L)下均显著高于 *P. mortoniae*,尤其是在 Pb²⁺ 质量浓度为 600 和 1 200 mg/L 时二者差异达到极显著水平($P<0.01$),这可能也是 *P. fortinii* 的铅耐受性高于 *P. mortoniae* 的原因之一。

2.2.2 GSH 含量 图 1-B 显示,与对照相比,铅胁迫下 2 种 DSE 菌丝的 GSH 含量极显著增加。随培养液中 Pb²⁺ 质量浓度的增加,*P. fortinii* 菌丝的 GSH 含量快速升高,并在 Pb²⁺ 质量浓度为 600

mg/L 时达到最大 ($P<0.01$), 但与 Pb^{2+} 质量浓度为 900~1 200 mg/L 时无显著差异 ($P>0.05$); *P. mortoniae* 菌丝的 GSH 含量则是先升高, 在 Pb^{2+} 质量浓度为 600 mg/L 时达到最大, 之后又快速下降。 Pb^{2+} 质量浓度为 300~1 200 mg/L 时, *P. fortinii*

菌丝的 GSH 含量均显著高于 *P. mortoniae*, 尤其是在 Pb^{2+} 质量浓度为 1 200 mg/L 时, 前者约是后者的 2.7 倍 ($P<0.01$), 这可能也是 *P. fortinii* 的铅耐受性高于 *P. mortoniae* 的原因之一。

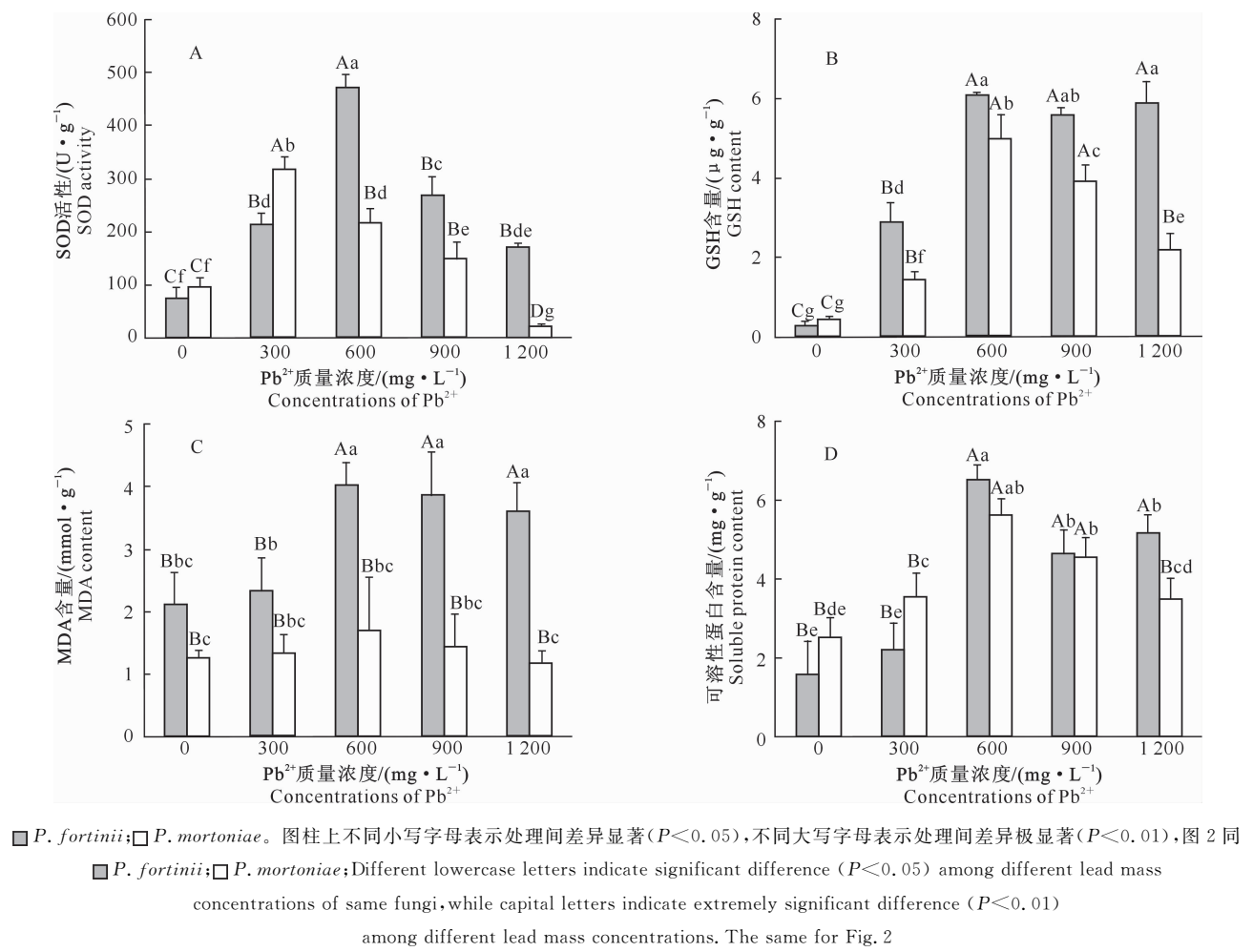


图 1 铅胁迫对 2 种深色有隔内生真菌(DSE)菌丝生化指标的影响

Fig. 1 Effects of Pb^{2+} stress on biochemical indicators of two DSE mycelia

2.2.3 MDA 含量 图 1-C 显示, *P. fortinii* 菌丝的 MDA 含量随培养液中 Pb^{2+} 质量浓度的增加先升高, 在 Pb^{2+} 质量浓度为 600 mg/L 时达到最大值, 之后随 Pb^{2+} 质量浓度的增加略有下降, 但均极显著高于对照和 Pb^{2+} 质量浓度 300 mg/L 处理。随 Pb^{2+} 质量浓度的增加, *P. mortoniae* 菌丝的 MDA 含量也呈先升高后降低的趋势, 并在 Pb^{2+} 质量浓度为 600 mg/L 时达到最大值, 之后略有降低, 但是 Pb^{2+} 胁迫处理与对照差异均不显著, 表明铅胁迫对其影响较小。除 Pb^{2+} 质量浓度为 0~300 mg/L 外, *P. fortinii* 菌丝的 MDA 含量均极显著高于 *P. mortoniae*, 且随 Pb^{2+} 质量浓度的增加, 2 种 DSE 之间菌丝的 MDA 含量差异逐渐增大。

2.2.4 可溶性蛋白含量 图 1-D 显示, 铅胁迫下 2 种 DSE 菌丝的可溶性蛋白含量均有所升高, 除 Pb^{2+} 质量浓度为 300 mg/L 外, *P. fortinii* 菌丝的可溶性蛋白含量均极显著高于对照 ($P<0.01$); 除 Pb^{2+} 质量浓度为 1 200 mg/L 外, *P. mortoniae* 菌丝的可溶性蛋白含量也显著高于对照。随培养液中 Pb^{2+} 质量浓度的增加, 2 种 DSE 菌丝的可溶性蛋白含量均呈先升高后降低的趋势, 且都在 Pb^{2+} 质量浓度为 600 mg/L 时达到最大。此外, *P. fortinii* 菌丝的可溶性蛋白含量在 Pb^{2+} 质量浓度较低 (0~300 mg/L) 时低于 *P. mortoniae*; 而在 Pb^{2+} 质量浓度较高 (600~1 200 mg/L) 时均高于 *P. mortoniae*, 在 Pb^{2+} 质量浓度为 1 200 mg/L 时, *P. fortinii* 菌丝

的可溶性蛋白含量约是 *P. mortioniae* 的 1.5 倍,说明高质量浓度 Pb^{2+} 胁迫下 *P. fortinii* 菌丝可溶性蛋白含量的增幅明显高于 *P. mortioniae*,这可能也是 *P. fortinii* 的铅耐受性高于 *P. mortioniae* 的原因之一。

2.3 铅胁迫对 2 种 DSE 培养液 pH 值和有机酸质量浓度的影响

图 2-A 显示,随 Pb^{2+} 质量浓度的增加,2 种 DSE 培养液的 pH 值均下降,除在 Pb^{2+} 质量浓度为 300 mg/L 时 *P. mortioniae* pH 值与对照无显著差异外($P>0.05$),2 种 DSE 培养液 pH 均显著低于对照($P<0.05$)。 Pb^{2+} 质量浓度为 0~1 200 mg/L 时,随 Pb^{2+} 质量浓度的增加,*P. fortinii* 的 pH 值由不加铅时的 8.2 降至 3.9,且在 Pb^{2+} 质量浓度为 600 mg/L 时 pH 急剧下降($P<0.01$), Pb^{2+} 质量浓度高于 900 mg/L 后趋于平稳;*P. mortioniae* 的 pH 值由不加铅时的 7.4 降至 5.7,降幅相对较小,且在 Pb^{2+} 质量浓度达 900 mg/L 后趋于平稳。 Pb^{2+} 质量浓度为 0~300 mg/L 时 *P. fortinii* 的 pH 值显著高于 *P. mortioniae*;随 Pb^{2+} 质量浓度的增加(600~1 200 mg/L),*P. fortinii* 的 pH 值快速下降,降幅

明显大于 *P. mortioniae*,且极显著低于 *P. mortioniae*,尤其是在 Pb^{2+} 质量浓度为 600 mg/L 时二者差异达到最大。

值得注意的是,2 种 DSE 培养液 pH 值的变化与其菌丝干质量呈正相关,即菌丝干质量均随 pH 值的降低而减小。与对照相比, Pb^{2+} 质量浓度较低(300 mg/L)时,*P. fortinii* 培养液 pH 值显著减小,但菌丝干质量无显著变化;*P. mortioniae* 培养液 pH 值无显著变化,但菌丝干质量却显著减小;而在 Pb^{2+} 质量浓度较高(600~900 mg/L)时,2 种 DSE 培养液 pH 值急剧降低,菌丝干质量也显著减小;随着 Pb^{2+} 质量浓度的持续增加,2 种 DSE 培养液 pH 值均保持稳定,*P. fortinii* 菌丝干质量无显著变化($P>0.05$),而 *P. mortioniae* 菌丝干质量则显著降低。可见,较低的 Pb^{2+} 质量浓度和较高的 pH 对 *P. fortinii* 菌丝体的生长无显著影响,而在 Pb^{2+} 质量浓度较高(600~1 200 mg/L)时,较低的培养液 pH 值对 *P. fortinii* 菌丝体的生长影响更为显著;*P. mortioniae* 菌丝体生长受 Pb^{2+} 胁迫影响显著,而受培养液 pH 影响较小。

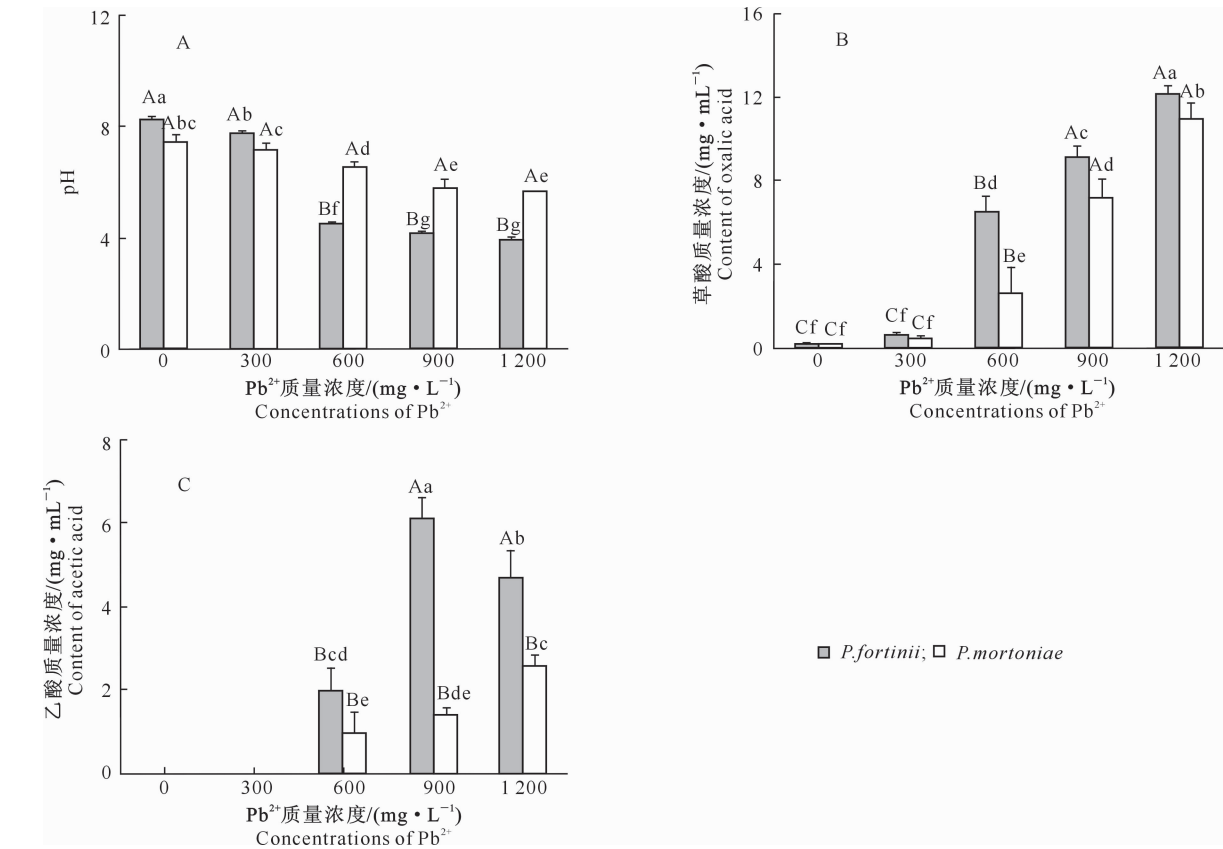


图 2 铅胁迫对 2 种深色有隔内生真菌(DSE)培养液 pH 值和有机酸质量浓度的影响

Fig. 2 Effects of Pb^{2+} stress on pH and organic acids concentrations of liquid culture media of two DSE

从 2 种 DSE 培养液中仅检测到草酸和乙酸 2 种小分子有机酸,故对这 2 种有机酸进行测定,结果见图 2。由图 2-B 可知,无论有无 Pb^{2+} 存在,2 种 DSE 培养液中都含有草酸,但只是其质量浓度在对照中极低;在 Pb^{2+} 质量浓度较低(300 mg/L)时草酸质量浓度虽有增加,但与对照相比无显著差异;而在 Pb^{2+} 质量浓度较高(600~1 200 mg/L)时,随 Pb^{2+} 质量浓度增加草酸质量浓度急剧升高,在 Pb^{2+} 质量浓度为 1 200 mg/L 时达到最大值($P<0.01$)。此外,*P. fortinii* 的草酸质量浓度在各 Pb^{2+} 质量浓度(0~1 200 mg/L)下均高于 *P. mortioniae*,除 Pb^{2+} 质量浓度为 0~300 mg/L 时二者之间无显著差异外,二者差异均达到显著水平。

由图 2-C 可知,乙酸只在 Pb^{2+} 质量浓度较高(600~1 200 mg/L)时才产生,*P. fortinii* 培养液中的乙酸质量浓度随 Pb^{2+} 质量浓度的增加呈先升高后降低的趋势,在 Pb^{2+} 质量浓度为 900 mg/L 时达到最大值($P<0.01$), Pb^{2+} 质量浓度为 1 200 mg/L 时虽有下降但仍极显著高于 Pb^{2+} 质量浓度 600 mg/L 处理。*P. mortioniae* 培养液中的乙酸质量浓度随 Pb^{2+} 质量浓度的增加则逐渐升高,且在 Pb^{2+} 质量浓度为 1 200 mg/L 时达到最大值。此外,*P. fortinii* 培养液中的乙酸质量浓度均显著高于 *P. mortioniae*。

总而言之,高质量浓度(600~1 200 mg/L) Pb^{2+} 胁迫下 *P. fortinii* 培养液中的有机酸质量浓度显著高于 *P. mortioniae*($P<0.05$),这与 *P. fortinii* 培养液中的 pH 值在 Pb^{2+} 质量浓度较高时显著低于 *P. mortioniae* 相对应,这可能也是 *P. fortinii* 铅耐受性相对较高的原因之一。

3 讨论与结论

3.1 2 种 DSE 的铅耐受性和富集作用

菌丝生长量是判定真菌抗重金属能力的可靠指标之一^[19]。张淑彬等^[20]研究表明,重金属在较低质量浓度时能刺激某些真菌菌丝的生长,在高质量浓度时则会抑制真菌生长。而黄志基等^[21]发现,液体培养条件下美味牛肝菌(*Boletus edulis*)和铆钉菇(*Gomphidius viscidus*)的生物量与重金属离子的质量浓度呈反比。本研究中,2 种 DSE 的菌丝干质量随着重金属 Pb^{2+} 质量浓度的增加而逐渐下降,表明 Pb^{2+} 对这 2 种真菌生长具有明显的抑制作用,与上述研究结果相一致。从菌丝干质量下降幅度和铅半致死浓度来看,*P. fortinii* 比 *P. mortioniae* 具有更

高的铅耐受性,这可能是因为在各 Pb^{2+} 质量浓度下进入 *P. mortioniae* 菌丝中的 Pb^{2+} 含量均高于 *P. fortinii*, Pb^{2+} 对 *P. mortioniae* 造成的毒害程度更重,从而抑制了其菌丝生长^[22]。因而使得 *P. fortinii* 菌丝体的铅富集量也高于 *P. mortioniae*; *P. fortinii* 则通过阻止 Pb^{2+} 进入胞内,降低了菌丝体中的铅含量和毒害,从而增强了其对重金属铅的耐受性。

3.2 2 种 DSE 铅耐受性的潜在机制

3.2.1 SOD 活性提高 重金属胁迫下生物体内会产生活性氧(ROS)的累积,打破了活性氧产生与清除系统的平衡,从而引起膜脂的过氧化伤害^[23],导致细胞的新陈代谢无法正常进行,从而使真菌的生长受到抑制^[24];而生物体诱导产生的抗氧化酶(SOD、CAT、POD 等)能清除活性氧,对生物体起到保护作用^[25]。本研究中 2 种 DSE 菌丝内的 SOD 活性均随着 Pb^{2+} 质量浓度的增加呈现先增加后降低的趋势,与前人的研究结果^[26]相一致,表明低 Pb^{2+} 胁迫可以在一定程度上提高这 2 种 DSE 菌丝的 SOD 活性,以应对重金属 Pb^{2+} 造成的过氧化损伤和由此产生的活性氧自由基,从而减少 Pb^{2+} 对菌丝细胞的损伤^[27];而当 Pb^{2+} 质量浓度增加, Pb^{2+} 造成的损伤超出了菌丝所能承受的范围时,细胞的自我调节机制就不再起作用,SOD 活性随之降低^[22]。可见菌丝 SOD 活性的提高是这 2 种 DSE 具有铅耐受性的潜在机制之一。在 Pb^{2+} 质量浓度较高(600~1 200 mg/L)时,*P. fortinii* 菌丝的 SOD 活性显著高于 *P. mortioniae*($P<0.05$),表明高质量浓度 Pb^{2+} 胁迫下 *P. fortinii* 菌丝的 SOD 活性较强,可以更好地清除活性氧,从而使 *P. fortinii* 表现出较强的铅耐受性,这是 *P. fortinii* 的铅耐受性高于 *P. mortioniae* 的原因之一。

3.2.2 GSH 含量升高 作为生物体内最主要的非蛋白巯基和含量最丰富的低分子量多肽,GSH 在真菌抗逆过程中直接或间接地参与了许多功能活动^[28]。一方面,GSH 作为一种螯合剂具有很强的重金属亲和力,可螯合许多重金属(如铅、镉等)形成无毒化合物,进而降低细胞内游离重金属离子的浓度^[29],防止金属离子敏感酶因变性而失活,从而减轻重金属对真菌的毒害作用^[30]。另一方面,GSH 也是一种高化学活性的有机物,能通过巯基二硫化反应清除生物体内的活性氧自由基,从而减轻其对机体的伤害^[29]。本研究中,2 种 DSE 菌丝的 GSH 含量在 Pb^{2+} 胁迫下明显增加,均极显著高于对照

($P < 0.01$),表明这 2 种 DSE 在受到重金属 Pb^{2+} 胁迫后不断产生 GSH 以螯合重金属 Pb^{2+} ,从而减轻其毒害作用,提高自身的铅耐受性,这与前人研究结果^[31]相一致。本研究中,*P. fortinii* 菌丝的 GSH 含量在 Pb^{2+} 质量浓度为 300~1 200 mg/L 时均显著高于 *P. mortoniae*($P < 0.05$),这也是 *P. fortinii* 的铅耐受性高于 *P. mortoniae* 的原因之一。

3.2.3 MDA 含量先升后降 MDA 是生物体在逆境条件下产生的膜脂过氧化重要产物之一^[32],其含量是反映生物器官衰老进程和受逆境胁迫程度的重要指标之一。本研究中,2 种 DSE 菌丝内的 MDA 含量在 Pb^{2+} 胁迫下增加,且随 Pb^{2+} 质量浓度的增加均呈先升高后降低的趋势,并在 Pb^{2+} 质量浓度为 600 mg/L 时达到最大值,表明 Pb^{2+} 胁迫使这 2 种 DSE 的菌丝体受到了不同程度的毒害作用;当 Pb^{2+} 质量浓度为 900~1 200 mg/L 时,菌丝的 MDA 含量开始下降,表明菌丝受到的重金属毒害有所降低,这与高质量浓度 Pb^{2+} 胁迫下菌丝内 GSH 和有机酸的大量积累正好相反,可见 GSH 和有机酸的积累可能是 2 种 DSE 减轻重金属毒害的可能机制之一。

3.2.4 可溶性蛋白含量升高 生物体受到逆境胁迫时,体内会启动一系列保护系统,大部分可溶性蛋白质作为酶类参与生物体代谢过程,通过调节细胞渗透势和维持渗透压平衡来抵御外界伤害^[33]。真菌可通过分泌可溶性蛋白螯合重金属以降低体内的重金属含量,从而减少重金属胁迫造成的损伤^[34]。冯欢等^[22]发现,2 种外生菌根真菌的可溶性蛋白含量均随 Pb^{2+} 质量浓度的增加呈先增加后降低的趋势。本研究中,重金属 Pb^{2+} 胁迫下,*P. fortinii* 和 *P. mortoniae* 菌丝内可溶性蛋白含量均高于对照,且随着 Pb^{2+} 质量浓度的增加也呈先增加后降低的趋势,表明低质量浓度 Pb^{2+} 胁迫促进了菌丝可溶性蛋白的分泌,通过调节细胞内渗透压和增进酶促反应形成自我保护机制,而随着 Pb^{2+} 质量浓度的持续增大,细胞内需要大量的可溶性蛋白以螯合过量的重金属离子,因而高质量浓度 Pb^{2+} 胁迫时菌丝的可溶性蛋白含量逐渐下降^[35]。可见菌丝内可溶性蛋白的积累对于提高 2 种 DSE 的重金属铅耐受性发挥了积极的作用。此外,高质量浓度(600~1 200 mg/L) Pb^{2+} 胁迫下 *P. fortinii* 菌丝的可溶性蛋白含量明显高于 *P. mortoniae*,这也是 *P. fortinii* 的铅耐受性高于 *P. mortoniae* 的重要原因之一。

3.2.5 有机酸产生 真菌抵抗重金属胁迫的一个重要机制是向胞外分泌小分子有机酸,如草酸、柠檬

酸、苹果酸、琥珀酸等,这些有机酸与重金属配位结合后可改变环境中重金属的存在形态,从而直接降低环境中重金属的有效浓度^[36-37]。此外,真菌不仅能通过调节有机酸的分泌量,还可通过调节分泌的有机酸种类来应对不同程度的重金属胁迫^[31]。Fomina 等^[38]研究发现,一定质量浓度的重金属胁迫能诱导许多真菌分泌草酸,而草酸在胞外易与重金属离子发生微沉淀作用,形成难溶的草酸盐,进而降低了环境中的重金属离子质量浓度,虽然草酸的分泌没有改变环境中重金属的绝对含量,但却降低了重金属的毒性。湛方栋^[9]发现,在 Cd^{2+} 质量浓度为 50~400 mg/L 时,嗜鱼外瓶霉草酸分泌量增加了 2.1~14.7 倍。本研究中,2 种 DSE 培养液的 pH 值随 Pb^{2+} 质量浓度的增加而下降,这与有机酸的产生和积累呈正相关。无论有无 Pb^{2+} 存在,2 种 DSE 培养液中都可检测到草酸,但草酸在对照处理中极少, Pb^{2+} 质量浓度较低(300 mg/L)时略有增加;而在 Pb^{2+} 质量浓度较高(600~1 200 mg/L)时,随 Pb^{2+} 质量浓度增大而急剧升高。此外,在 2 种 DSE 有机酸总量中草酸的分泌量占绝对优势,其质量浓度明显高于乙酸。可见铅胁迫对 2 种 DSE 草酸分泌有显著的刺激和促进作用,且 Pb^{2+} 质量浓度越高,促进作用越明显,表明草酸的分泌在缓解 2 种 DSE 菌丝体的铅毒害、提高铅耐受性方面发挥了至关重要的作用。

与外生菌根真菌只在高质量浓度 Pb^{2+} 胁迫时产生琥珀酸^[22]相似,本研究中,当培养液中 Pb^{2+} 质量浓度达到 600 mg/L 时,才开始刺激 2 种 DSE 分泌乙酸,这可能是 2 种 DSE 缓解高质量浓度铅胁迫的关键因子之一。另外,铅胁迫下 *P. fortinii* 培养液中的草酸和乙酸质量浓度均显著高于 *P. mortoniae*($P < 0.05$),这也是 *P. fortinii* 铅耐受性相对较高的原因之一。以上结果表明,这 2 种 DSE 可通过调节有机酸的种类和分泌量来应对重金属铅不同程度的胁迫。

综上所述,*P. fortinii* 和 *P. mortoniae* 具有较好的铅耐受性及富集能力,且前者表现优于后者;菌丝中 SOD 活性的提高,以及 GSH、可溶性蛋白和有机酸(草酸和乙酸)含量的大量积累是这 2 种 DSE 具有较好铅耐受性的潜在机制,也是 *P. fortinii* 的铅耐受性高于 *P. mortoniae* 的原因。

[参考文献]

[1] Aryal M, Liakopoulou-Kyriakides M. Bioremoval of heavy met-

- als by bacterial biomass [J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2015, 187(1): 1-26.
- [2] 雷良奇, 陈斯耐, 莫 家, 等. 黄沙坪碳酸盐型尾矿中重金属的赋存状态与污染评价 [J]. 岩石矿物学杂志, 2015, 34(6): 844-852.
- Lei L Q, Chen S N, Mo J, et al. Modes of occurrence and pollution risk of heavy metals within the carbonate type tailings of the Huangshaping Pb Zn ore district [J]. Acta Petrologica Et Mineralogica, 2015, 34(6): 844-852.
- [3] Gaur A, Adholeya A. Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils [J]. Current Sciences, 2004, 86(4): 528-534.
- [4] Iskandar N L, Zainudin N A, Tan S G. Tolerance and biosorption of copper (Cu) and lead (Pb) by filamentous fungi isolated from a freshwater ecosystem [J]. Journal of Environmental Sciences, 2011, 23(5): 824-830.
- [5] Melgar M J, Alonso J, García M A. Removal of toxic metals from aqueous solutions by fungal biomass of *Agaricus macrosporus* [J]. Science of the Total Environment, 2007, 385(1): 12-19.
- [6] 傅晓萍, 豆长明, 胡少平, 等. 有机酸在植物对重金属耐性和解毒机制中的作用 [J]. 植物生态学报, 2010, 34(11): 1354-1358.
- Fu X P, Dou C M, Hu S P, et al. A review of progress in roles of organic acids on heavy metal resistance and detoxification in plants [J]. Chinese Journal of Plant Ecology, 2010, 34(11): 1354-1358.
- [7] Jumpponen A, Trappe J M. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi [J]. New Phytologist, 1998, 140(2): 295-310.
- [8] Likar M, Regvar M. Isolates of dark septate endophytes reduce metal uptake and improve physiology of *Salix caprea* L. [J]. Plant and Soil, 2013, 370(1/2): 593-604.
- [9] 湛方栋. 嗜鱼外瓶霉(*Exophiala pisciphila* ACCC32496)镉耐性机制研究 [D]. 昆明: 云南大学, 2012.
- Zhan F D. Study on the tolerance mechanisms of *Exophiala pisciphila* ACCC32496 for cadmium [D]. Kunming: Yunnan University, 2012.
- [10] 宋瑛瑛, 王春燕, 杨玉荣, 等. 铅吸附深色有隔内生真菌的筛选及其吸附特性 [J]. 环境科学学报, 2016, 36(5): 1630-1638.
- Song Y Y, Wang C Y, Yang Y R, et al. The screening and biosorption characteristics of dark septate endophytes to lead [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2016, 36(5): 1630-1638.
- [11] 曹志华, 束庆龙, 程义明, 等. 12 种农药对油茶炭疽菌的室内毒力测定 [J]. 农药, 2012, 51(4): 304-306.
- Cao Z H, Shu Q L, Cheng Y M. Toxicity measurement of 12 fungicides on *Colletotrichum gloeosporioides* from *Camellia oleifera* [J]. Agrochemicals, 2012, 51(4): 304-306.
- [12] Cheng X H, Gai Y P, Sun H Y, et al. Zinc tolerance and accumulation characteristics of *Cordyceps militaris* [J]. Acta Ecologica Sinica, 2010, 30(6): 1449-1455.
- [13] 徐在超, 史亚楠, 张仁铎, 等. 三株具重金属抗性油菜内生真菌对镉铅锌富集特性研究 [J]. 中山大学学报, 2016, 55(6): 153-160.
- Xu Z C, Shi Y N, Zhang R D, et al. Bioaccumulation of Cd, Zn and Pb by three heavy metal-resistant endophytic fungi isolated from rapeseeds [J]. Journal of Sun Yat-sen University, 2016, 55(6): 153-160.
- [14] Zhang J E, Ouyang Y, Ling D J. Impacts of simulated acid rain on cation leaching from the latosol in south China [J]. Chemosphere, 2007, 67(11): 21-31.
- [15] Hou W, Chen X, Song G, et al. Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*) [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2007, 45(1): 62-69.
- [16] Zhan F, He Y, Li T, et al. Tolerance and antioxidant response of a dark septate endophytes (DSE), *Exophiala pisciphila*, to cadmium stress [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2015, 94(1): 96-102.
- [17] 黄 健. 废水处理中黄孢原毛平革菌对 Cd 胁迫的适应性及抗性反应研究 [D]. 长沙: 湖南大学, 2014.
- Huang J. Adaptability and resistance of *Phanerochaete chrysosporium* with Cd (II) in wastewater treatment [D]. Changsha: Hunan University, 2014.
- [18] Fomina M A, Hillier S, Charnock J M, et al. Role of oxalic acid overexcretion in transformations of toxic metal minerals by *Beauveria caledonica* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(1): 371-381.
- [19] 辜夕容, 黄建国. 铅对外生菌根真菌草酸分泌及磷、钾、铝吸收的影响 [J]. 生态学报, 2010, 30(2): 357-363.
- Gu X R, Huang J G. Effect of aluminum on growth, oxalate exudation, and uptake of aluminum, phosphorus and potassium by ectomycorrhizal fungi *in vitro* [J]. Acta Ecologica Sinica, 2010, 30(2): 357-363.
- [20] 张淑彬, 冯 固, 李晓林. 土壤中镉对丛枝菌根真菌 *Glomus mosseae* 生长的效应 [J]. 菌物学报, 2005, 24(4): 576-581.
- Zhang S B, Feng G, Li X L. The direct effect of cadmium in soil on growth of arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* [J]. Mycosystema, 2005, 24(4): 576-581.
- [21] 黄志基, 黄 艺, 彭 博. 铜镉胁迫对两种菌根真菌生长和细胞壁离子交换量的影响 [J]. 环境科学, 2006, 27(8): 1654-1658.
- Huang Z J, Huang Y, Peng B. Influence of copper, cadmium on growth and cation exchange capacity of two kinds of ectomycorrhizal funguses [J]. Environmental Science, 2006, 27(8): 1654-1658.
- [22] 冯 欢, 豆 青, 王海华, 等. 2 种外生菌根真菌的铅耐受性及相关机制 [J]. 西北林学院学报, 2017, 32(2): 188-196.
- Feng H, Dou Q, Wang H H, et al. Lead tolerance of two ectomycorrhizal fungi and related mechanisms [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2017, 32(2): 188-196.
- [23] Khan M S, Zaidi A, Goel R, et al. Biomanagement of metal-contaminated soils [M]. Dordrecht: Springer Science & Business Media, 2011: 225-240.
- [24] 张玉洁, 李洪超. 矿区植物根内嗜鱼外瓶霉对重金属的耐性和

- 超积累作用 [J]. 土壤, 2012, 44(3): 467-473.
- Zhang Y J, Li H C. Tolerance and accumulation of heavy metals by *Exophiala pisciphila* strain isolated from plant roots growing in metal polluted soils [J]. Soils, 2012, 44(3): 467-473.
- [25] 吴琦, 季辉, 张卫建. 土壤铅和镉胁迫对空心菜生长及抗氧化酶系统的影响 [J]. 中国农业科技导报, 2010, 12(2): 122-127.
- Wu Q, Ji H, Zhang W J. Effects of soil Pb and Cd stresses on the growth and antioxidative enzyme system of swamp cabbage [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2010, 12(2): 122-127.
- [26] 王松华, 张华, 崔元戎, 等. 镉对灵芝菌丝抗氧化系统的影响 [J]. 应用生态学报, 2008, 19(6): 1355-1361.
- Wang S H, Zhang H, Cui Y R, et al. Effects of cadmium stress on the antioxidative system in *Ganoderma lucidum* mycelia [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2008, 19(6): 1355-1361.
- [27] Andrade S A L, Silveira A P D, Mazzafera P. Arbuscular mycorrhiza alters metal uptake and the physiological response of *Coffea arabica* seedlings to increasing Zn and Cu concentrations in soil [J]. Science of the Total Environment, 2010, 408(22): 5381-5391.
- [28] Xu P, Zeng G, Huang D, et al. Metal bioaccumulation, oxidative stress and antioxidant defenses in *Phanerochaete chrysosporium* response to Cd exposure [J]. Ecological Engineering, 2016, 87: 150-156.
- [29] Garg N, Chandel S. Role of arbuscular mycorrhiza in arresting reactive oxygen species (ROS) and strengthening antioxidant defense in *Cajanus cajan* (L.) Mills *P. nodules* under salinity (NaCl) and cadmium (Cd) stress [J]. Plant Growth Regulation, 2015, 75(2): 521-534.
- [30] Wójcik M, Skórzyńska-Polit E, Tukiendorf A. Organic acids accumulation and antioxidant enzyme activities in *Thlaspi caerulescens* under Zn and Cd stress [J]. Plant Growth Regulation, 2006, 48(2): 145-155.
- [31] 楚文卉, 谢清哲, 杨超, 等. 1 株镉耐受真菌 C12 的鉴定及其镉耐受性研究 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2017, 45(9): 71-80.
- Chu W H, Xie Q Z, Yang C, et al. The identification and study on Cd tolerance of C12, a fungus which shows high tolerance to Cd [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed), 2017, 45(9): 71-80.
- [32] 全瑞建, 刘雪琴. AM 真菌对铅胁迫下小麦生长和生化特性的影响 [J]. 西南农业学报, 2015, 28(4): 1578-1582.
- Tong R J, Liu X Q. Effects of arbuscular mycorrhizal fungus on growth and biochemical characteristics of wheat under Pb stress [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2015, 28(4): 1578-1582.
- [33] 魏秀君, 殷云龙, 芦治国, 等. NaCl 胁迫对 5 种绿化植物幼苗生长和生理指标的影响及耐盐性综合评价 [J]. 植物资源与环境学报, 2011, 20(2): 35-42.
- Wei X J, Yin Y L, Lu Z G, et al. Effects of NaCl stress on growth and physiological indexes of five greening plant seedlings and comprehensive evaluation of their salt tolerance [J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2011, 20(2): 35-42.
- [34] 赵琪琦, 徐恒. 镉、铅胁迫下长根菇菌丝体中巯基化合物和抗氧化酶系统的变化研究 [J]. 四川大学学报, 2014, 51(5): 1051-1055.
- Zhao Q Q, Xu H. Explore the changes of thiol compounds and antioxidant enzymes in *Oudemansieha radicata* mycelium under cadmium and lead stresses [J]. Journal of Sichuan University, 2014, 51(5): 1051-1055.
- [35] 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 [J]. 应用生态学报, 2006, 17(5): 796-800.
- Jiao J, Li C Z, Huang G B. Protective effects and their mechanisms of cobalt on soybean seedling's leaf under droughts [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2006, 17(5): 796-800.
- [36] 黄艺, 黄志基. 外生菌根与植物抗重金属胁迫机理 [J]. 生态学杂志, 2005, 24(4): 422-427.
- Huang Y, Huang Z J. Ectomycorrhizae and heavy metals resistance of higher plants [J]. Chinese Journal of Ecology, 2005, 24(4): 422-427.
- [37] Vodnik D, Grcman H, Macek I, et al. The contribution of glomalin-related soil protein to Pb and Zn sequestration in polluted soil [J]. Science of the Total Environment, 2008, 392(1): 130-136.
- [38] Fomina M, Hillier S, Charnock J M, et al. Role of oxalic acid overexcretion in transformations of toxic metal minerals by *Beauveria caledonica* [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(1): 371-381.