

新疆橙黄疣柄牛肝菌菌丝对 Cu、Zn 和 Pb 的耐受性研究

刘红玲¹, 贺亚玲², 蒋存凯², 张 龙², 王绍明²

(1 石河子大学 师范学院 新疆 石河子 832003; 2 石河子大学 生命科学院 新疆 石河子 832003)

摘 要: 在固体和液体静置纯培养条件下, 研究了 3 种重金属 Cu、Zn 和 Pb 在不同浓度处理下对橙黄疣柄牛肝菌菌丝生长的影响, 并利用 EC₅₀ 值评价真菌对 Cu、Zn 和 Pb 的耐性。结果表明: 通过半致死浓度评价橙黄疣柄牛肝菌耐受性发现, 橙黄疣柄牛肝菌对 Zn 的耐受性强于 Cu 和 Pb; 菌根真菌培养后, 基质 pH 降低与真菌生物量有关, 说明菌根真菌在重金属胁迫下能通过调节自身 pH 环境缓解压力。

关键词: 橙黄疣柄牛肝菌; 重金属; 耐受性

中图分类号: S 436.699 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)08-0197-04

随着现代工业的发展和人类自身的频繁活动, 重金属污染变得越来越普遍和严重, 其破坏性主要表现在重金属进入土壤后, 首先对土壤理化性质及土壤微生物的生理、生化性能产生影响, 从而影响土壤生态系统结构和功能的稳定性^[1]。

外生菌根真菌(Ectomycorrhizal fungi, ECMF)是与植物根系共生的土壤真菌, 它与植物形成的共生体对环境胁迫具有较强的抵抗力^[2]。外生菌根真菌和植物的根系形成菌根, 而外生菌根(ectomycorrhiza)在增强宿主植物抗重金属毒害能力上起着重要的作用。由目前研究结果显示^[3,4], 外生菌根增强寄主植物抗重金属毒害能力的机理主要集中在积累机制和自我调节机制。积累机制认为菌根通过把重金属积累在外延菌丝, 菌套或哈蒂氏网上, 以阻止重金属进入植物体内; 或通过直接向根外分泌有机物质螯合重金属, 使其积累于根外表面。自我调节机制认为菌根可能通过调节自身的代谢作用来缓解重金属胁迫压力, 如增加有机酸的分泌, 增加脱氢酶, 糖酵解酶活性等; 甚至通过调节基因的表达来达到缓解毒害的目的。

橙黄橙黄疣柄牛肝菌(*Laccinum aurantiacum* (Bull.) Gray)是一种大型外生菌根真菌, 其色泽鲜艳, 味道可口, 在新疆阿勒泰地区额尔齐斯河两岸有广泛的分布, 在当地的伴生树种为银白杨。鉴于目前国内外文献中未见对于该种牛肝菌各种研究的报道, 故该试验选取

该种牛肝菌作为供试品种, 研究其对于重金属的耐性具有一定的创新性。

由于重金属较易与其它离子发生螯合、络合等反应而降低金属离子的有效性, 因而在纯培养条件下研究重金属对真菌的影响时, 应尽可能减少重金属与培养基中其它物质的反应, 保证不降低重金属的有效性, 以客观评价菌根真菌对重金属的耐性^[5]。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌种 橙黄疣柄牛肝菌采自新疆阿勒泰地区额尔齐斯河沿岸, 主要与银白杨(*Populus alba* L.)共生, 银白杨由石河子大学生命科学学院阎平教授鉴定, 菌种由中科院昆明植物研究所杨祝良研究员鉴定。

1.1.2 培养基 培养基 1: 根据宋微^[6]等的研究用 PDA 培养基作为母种培养基。培养基 2: 根据邓百万^[7]等的研究, 应用 MMN 培养基作为耐性试验培养基。MMN 液体培养基和加入琼脂(15 g/L)的固体培养基均先调节到 pH 5.5。

在培养基中加入 3 种金属盐, 使培养基中各种离子的最终浓度分别为: Zn²⁺ (ZnSO₄ · 7H₂O): 0.25、75、225 mg/L; Cu²⁺ (CuSO₄ · 5H₂O): 0.5、10、20 mg/L; Pb²⁺ (Pb(NO₃)₂): 0.10、20、50 mg/L; 将上述液体培养基分别加 25 mL 于 50 mL 的三角瓶中, 每种金属离子的各浓度设 3 个重复, 封口膜封好; 固体培养基分装在 250 mL 三角瓶中, 封口膜封好; 然后再在 121 °C 灭菌 30 min, 冷却待用。

1.2 试验方法

1.2.1 母种培养 将上述灭菌的 PDA 固体培养基倒平板。取新鲜幼嫩无虫害的橙黄疣柄牛肝菌子实体洗净晾干, 用 75% 的酒精擦子实体 3 遍, 为提高成活率, 用无菌镊子取活力旺盛的组织块, 即在菌柄和菌盖连接处取麦粒大小的子实体接种到 PDA 平板培养基上(整个过

第一作者简介: 刘红玲(1978-), 女, 讲师, 现主要从事生物化学研究工作。

通讯作者: 王绍明(1963-), 男, 教授, 现主要从事生态学研究。

E-mail: shaomingw@shzu.edu.cn.

基金项目: 石河子大学 SRP 资助项目(SRP0706057)。

收稿日期: 2009-12-14

程在超净工作台上进行, 要注意严格的无菌操作), 接种完后, 把培养皿放在 25℃ 的恒温培养箱中倒置培养, 待菌丝长成后, 再进行原种扩繁培养。

1.2.2 原种培养 在橙黄疣柄牛肝菌母种的菌丝尖端生长旺盛的区域用打孔器打出 0.8 cm 的菌块, 置于 MMN 固体培养基中, 在 25℃ 培养箱中培养 15~20 d 待用。

将配制好灭菌的 MMN 固体培养基倒平板, 每个浓度倒 5 个培养皿, 用打孔器在原种菌丝生长旺盛的区域用打孔器打出 0.3 cm 的菌块接种, 再把培养皿置于 25℃ 下培养, 每个处理 5 个重复。接种操作在无菌超净室中进行。

把在固体培养基上培养的菌种用以上的方法接种在 MMN 液体培养基中 25℃ 静置培养 5 d 使菌丝适应由固体向液体培养的转变, 再将含有不同浓度 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Pb^{2+} 的 MMN 液体培养基用液体菌种接种, 接种完毕把三角瓶置于 25℃ 下静置培养 25 d。

1.3 测定方法

固体培养 35~40 d, 每隔 5 d 测定菌落的直径(菌落直径测定值=(菌落的最长值+菌落的最短值)/2), 观察菌丝的长度、菌落的颜色、菌丝生长形式。

橙黄疣柄牛肝菌菌丝生物量的测定: 培养 25 d 后, 用真空泵抽滤培养液, 过 50 μm 滤膜, 把菌丝放在烘干恒重并称重的滤纸上, 在 80℃ 干燥 12 h, 置于干燥器中, 冷却恒重后测定干重。培养液 pH 值的测定: 过滤后的培养液用 HANNA PH211 型计测定其 pH 值。

1.4 数据处理

用 Microsoft Excel 2003 和 SPSS15 数据统计分析软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 重金属对橙黄疣柄牛肝菌生长的影响

2.1.1 不同浓度重金属处理后橙黄疣柄牛肝菌菌落直径的变化 橙黄疣柄牛肝菌的菌落直径随着重金属处理浓度的增加, 菌落直径在总体上表现为生长速度减慢, 下降的趋势在不同浓度的 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Pb^{2+} 处理间不完全相同(见图 1)。

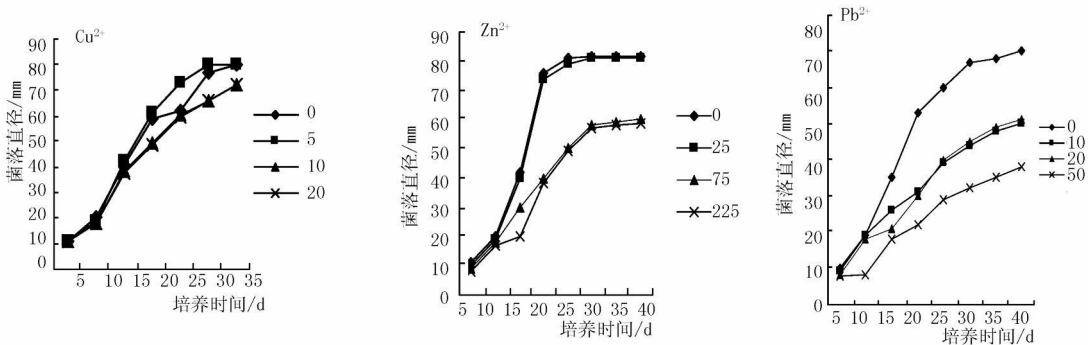


图1 不同 Cu、Zn 和 Pb 浓度处理后橙黄疣柄牛肝菌菌落的直径

图 1 表明, 在 Cu^{2+} 处理下, 在观测的 35 d 内各处理间菌落直径变化不大(图 1), 在 10 d 后, 5 mg/L 处理下的生长速度大于对照, 说明微量的 Cu^{2+} 对其生长具有促进作用; 在 Zn^{2+} 处理下, 对照和 25 mg/L 处理与 75 mg/L 处理和 225 mg/L 处理之间变化明显; 在 Pb^{2+} 处理下, 对照与处理组间变化较大。用 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Pb^{2+} 浓度最高时, 菌落直径都是该实验组最小; 在对照组 都是在经过 35 d 左右长满整个培养皿。从接种后到第 25 天, 每种处理的生长速度都加快, 但在第 30 天开始, 菌落直径变化很小。

2.1.2 不同浓度重金属处理后橙黄疣柄牛肝菌生物量的变化 真菌生长总体趋势表现为真菌干物重随加入的重金属离子浓度的升高而下降, 降低的趋势在不同浓度 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Pb^{2+} 各自处理间表现明显(见图 2)。 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Pb^{2+} 浓度最高时, 真菌生物量最低。用 Cu^{2+} 处理下降最快, 其次是 Zn^{2+} 、 Pb^{2+} 处理下降最慢, 3

种处理各自间差异达到显著。在重金属胁迫下, 菌块颜色变深, 并随处理浓度的增加, 变色程度有加深的趋势。颜色变化分别是: Cu^{2+} 胁迫下, 由白色转变为黄褐色, Zn^{2+} 胁迫下, 由白色转变为淡黄色, Pb^{2+} 胁迫下, 由白色转变为淡黄褐色。从表 1 可知, 在对照中, 菌丝都很稠密, 直生, 菌丝长, 为纯白色; 在 Cu^{2+} 处理下, 菌丝逐渐稀少, 直生, 颜色也逐渐变为黄褐色, 长度也依次变短; 在 Zn^{2+} 处理下, 菌丝逐渐稀少, 直生, 颜色也逐渐变为淡黄色, 长度也依次变短; 在 Pb^{2+} 处理下, 菌丝逐渐稀少, 由直生到弯曲生长, 颜色也逐渐变为淡黄褐色, 长度也依次变短, 各个变化梯度明显。

表 1 固体培养下 3 种重金属处理对菌丝生长的影响

	菌丝密度变化	菌丝生长形式	菌丝颜色变化	菌丝长度变化
对照	菌丝都很稠密	直生	白色(不变)	菌丝长
Cu^{2+} 处理	菌丝逐渐稀少	直生	白色变为黄褐色	依次变短
Zn^{2+} 处理	菌丝逐渐稀少	直生	白色变为淡黄色	依次变短
Pb^{2+} 处理	菌丝逐渐稀少	直生到弯曲	白色变为淡黄褐色	依次变短

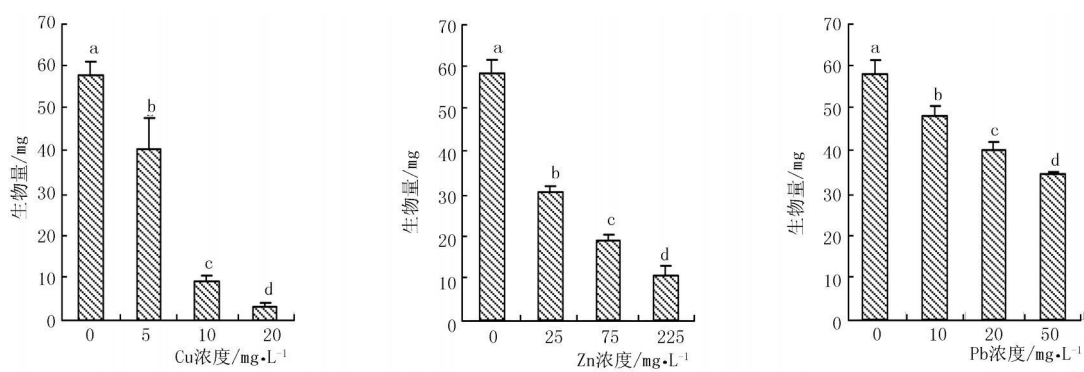


图 2 不同 Cu²⁺、Zn²⁺ 和 Pb²⁺ 浓度处理后橙黄疣柄牛肝菌的生物量

注: 不同字母表示同一重金属浓度水平橙黄疣柄牛肝菌生物量之间差异达到 5% 显著水平, 用 LSD 法检验。

2.1.3 不同浓度重金属处理橙黄疣柄牛肝菌生长后基质 pH 值的变化 菌根真菌培养前后, 菌根真菌培养液 pH 表现出明显的下降趋势。除了 20 mg/L Cu²⁺ 处理下培养液没有发生显著变化外, 其余各处理 pH 都下降到 2.5~3.5 之间, 显著低于培养前的营养液 pH (5.5)。

重金属 Cu²⁺、Zn²⁺ 处理后, 菌根真菌培养液的 pH 变化大致相同, 总体趋势均表现为高浓度处理变化小于低浓度处理, 各处理水平间达到显著性差异; 而 Pb²⁺ 处理真菌生长后基质的 pH 值均随 Pb²⁺ 浓度的升高显著下降, 各处理水平间差异显著。

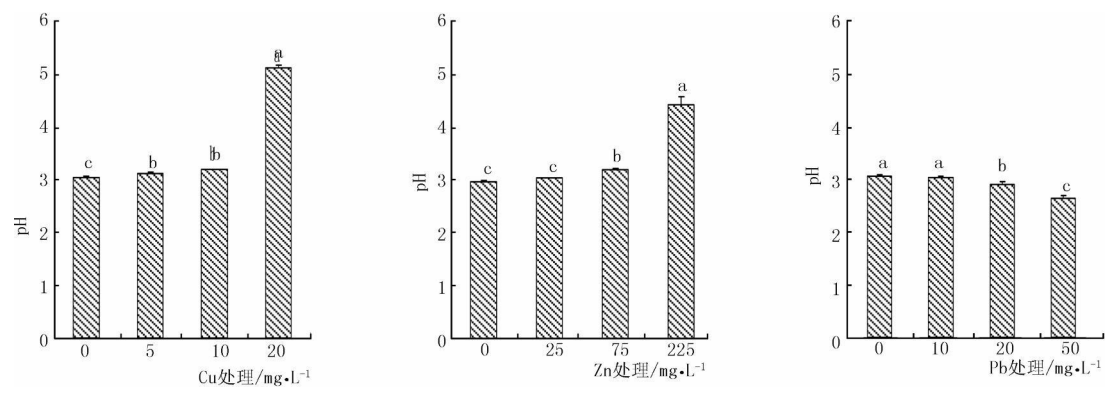


图 3 不同 Cu²⁺、Zn²⁺ 和 Pb²⁺ 浓度处理后基质的 pH

注: 不同字母表示同一真菌不同浓度重金属处理间差异达到 5% 显著水平, 用 LSD 法检验

2.2 EC₅₀ 值

EC₅₀ 值作为真菌对重金属的耐性指标, 能够比较客观反映不同真菌的金属耐性^[819]。EC₅₀ 值越小, 重金属的毒害作用越大。从表 2 中可以得出, 橙黄疣柄牛肝菌抵抗重金属能力的顺序为: Zn²⁺ > Pb²⁺ > Cu²⁺。

化, 说明重金属对橙黄疣柄牛肝菌产生了胁迫作用。橙黄疣柄牛肝菌在 3 种重金属胁迫下不同的表现, 可能预示着重金属对橙黄疣柄牛肝菌不同的毒害机理以及橙黄疣柄牛肝菌对重金属不同的耐受理。这种颜色的改变是由于重金属离子在真菌细胞中的本来颜色, 还是菌根真菌自我调节作用所分泌的色素等分泌物所造成, 需要在以后的实验中继续作深入的研究。

3.2 固、液培养方法的比较

该试验中重金属对真菌菌落生长和生物量增长在不同体系的培养下得到了不相同的结果。在固体平板培养下, 高浓度 Pb²⁺、Zn²⁺ 明显抑制菌落生长, Cu²⁺ 的作用不明显, 5 mg/L Cu²⁺ 处理下的生长速度高于其它处理, 但是 3 种重金属处理对菌丝的生长影响较大, 如图 1 和表 1 所示; 而在液体培养下, 3 种重金属的抑制都达到显著, 生物量和重金属离子浓度成反比, 如图 2 所示。该结果表明, 固体培养下, 金属离子不能在基质中自由

表 2 橙黄疣柄牛肝菌 Cu²⁺、Zn²⁺ 和 Pb²⁺ 的 EC₅₀ 值

菌种	EC ₅₀ 值/ mg · L ⁻¹		
	Cu(CuSO ₄ · 5 H ₂ O)	Zn(ZnSO ₄ · 7 H ₂ O)	Pb(Pb(NO ₃) ₂)
橙黄疣柄牛肝菌	8.67	86.77	53.14

3 结论与讨论

3.1 真菌生物量

真菌的生物量在加入 Cu²⁺、Zn²⁺ 和 Pb²⁺ 后随着金属离子浓度的增加, 真菌的生物量逐渐降低, 且生物量下降程度在 Cu²⁺ 处理中较 Zn²⁺ 和 Pb²⁺ 迅速, 说明 3 种重金属元素中 Cu²⁺ 的毒性较大。该试验橙黄疣柄牛肝菌的生物量均随重金属离子浓度的升高而下降, 这与黄志基^[3] 等的研究结果相一致。试验结果菌丝颜色的变

移动, 经过几天的培养后, 真菌对其产生了一定的耐受性, 使培养基中离子浓度不再平衡, 低的离子浓度对菌丝抑制效果不明显; 液体培养则是离子浓度都保持平衡, 在培养全过程对菌丝有强的抑制作用, 菌丝生长位置不同, 氧气供给不同。两体系中菌丝生长位置和氧气的影响将会在以后的研究中作深入的分析。

固体培养真菌菌落直径的变化不能在根本上反映重金属对真菌的抑制; 液体培养的生物量测定方法更能反映重金属对真菌的抑制效果。所以该试验认为液体静置培养是研究真菌对重金属耐性反应的一种有效的培养基质和方法, 这与李芳^[4]等的研究结论一致。

3.3 基质 pH 值

真菌培养后基质 pH 值的下降与许多因素有关, 主要原因可能是在培养过程中 ECMF 新陈代谢分泌一些低分子量有机酸类物质, 这些物质引起了基质 pH 值下降^[11]。从图 3 可以看出, 在 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 的处理下, 基质 pH 值变化还与真菌的生物量有关, 金属浓度最高时, 真菌生物量最低, 基质 pH 值降低得较少, 在 Pb^{2+} 处理下, 基质 pH 值变化与在 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 的处理下相反, 这可能与 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 中的 NO_3^- 有关。由于基质 pH 值的变化直接影响到重金属有效性, 因而在研究中应考虑加入的金属盐的酸根直接或间接对基质 pH 值的影响。

3.4 EC_{50} 值

该试验橙黄疣柄牛肝菌的 3 种重金属的 EC_{50} 值与其它研究结果有差异, 可能与菌种、试验条件及培养时间的不同有关^[12]。另外, 橙黄疣柄牛肝菌作为一种外生菌根菌, 其共生的树种以及生长环境也可能导致同一真菌的不同分离菌株之间 EC_{50} 值的差异。在该次试验条件下, 橙黄疣柄牛肝菌对 3 种重金属的 EC_{50} 值表明, 即对 Zn^{2+} 的抵抗性最强, 对 Cu^{2+} 的最弱, Pb^{2+} 间于二者之间。

牛肝菌是一种共生菌根真菌, 其菌丝与宿主植物的侧根共生, 可以建立良好的营养互作关系, 改善宿主的

P, N, K 等营养, 并提高宿主的抗寒、抗旱等特性, 通过橙黄疣柄牛肝菌菌丝对 3 种重金属的耐受性研究, 发现该菌丝对 3 种重金属的胁迫均产生了一定的抗性, 由此可见, 由该菌与伴生树种的侧根形成的菌根也能一定程度上抵御来自重金属的危害。由此可见菌根的应用未来将有助于缓解日益紧张的工业、农业与生活用水之间的矛盾。

参考文献

- [1] 龚平, 孙铁珩, 李培军. 重金属对土壤微生物的生态效应[J]. 应用生态学报, 1997, 8(2): 218-224.
- [2] 刘营, 孔繁翔, 杨积晴. 菌根真菌对环境污染物的降解、转化能力概述[J]. 上海环境科学, 1998, 17(2): 4-6.
- [3] 黄志基, 黄艺, 彭博. 铜胁迫对 2 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.
- [4] 江行玉, 赵可夫. 植物重金属伤害及其抗性机理[J]. 应用与环境生物学报, 2001, 7(1): 92-99.
- [5] 李芳, 张俊伶, 冯固. 两种外生菌根真菌对重金属 Zn、Cd 和 Pb 耐性的研究[J]. 环境科学学报, 2003, 23(6): 807-812.
- [6] 宋微, 吴小芹. 12 种林木外生菌根真菌的培养条件[J]. 南京林业大学学报, 2007, 31(3): 133-135.
- [7] 邓百万, 陈文强. 美味牛肝菌母种培养基的筛选[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2004, 33(3): 396-399.
- [8] Colpaert J V, Van Assche J A. Heavy metal tolerance in some ectomycorrhizal fungi[J]. Funct Ecol, 1987, 415-421.
- [9] Jones M D, Muchliden A. Effects of the potentially toxic metals, aluminium, zinc and copper on ectomycorrhizal fungi[J]. Environ Sci Health, 1994, 29: 949-966.
- [10] Tam P C F. Heavy metal tolerance by ectomycorrhizal fungi and metal amelioration by *Pisolithus tinctorius*[J]. Mycorrhiza, 1995, 181-187.
- [11] Yamaji K, Ishimoto H, Usui et al. Organic acids and water-soluble phenolics produced by *Paxillus* sp. 60/92 together show antifungal activity against *Pythium vexans* under acidic culture conditions[J]. Mycorrhiza, 2005, 15(1): 17-23.
- [12] Darlington A B, Rauger W B. Cadmium alters the growth of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*; a new growth model accounts for changes in branching[J]. Can J Bot, 1988, 66: 225-229.

Study on the Toleration of Hypha of *Leccinum aurantiacum* (Bull.) Gray to Heavy Metals Cu^{2+} , Zn^{2+} and Pb^{2+}

LIU Hong-ling¹, HE Ya-ling², JIANG Cun-kai², ZHANG Long², WANG Shao-ming²

(1. College of Teacher Science, Shihezi University, Xinjiang Shihezi 823003; 2. College of Life Science, Shihezi University, Shihezi Xinjiang 832003)

Abstract: The premise to study on the influence of the heavy metals Cu, Zn and Pb to hypha growth of one mycorrhizal fungi — *Leccinum aurantiacum* (Bull.) Gray under condition of agar media and standing liquid cultures. We use fungi on EC_{50} to evaluate the toleration of *Leccinum aurantiacum* (Bull.) Gray to Cu, Zn and Pb. Through the evaluation of semi-lethal concentration to the toleration of *Leccinum aurantiacum* (Bull.) Gray found that the toleration to Zn is stronger than Cu and Pb. After culture the reduce of the pH of substance will influence the biomass of Mycorrhizal fungi, This showing that the Mycorrhizal fungi under heavy metal stress can regulate their own pH to ease the pressure of the environment.

Key words: *Leccinum aurantiacum* (Bull.) Gray; heavy metals; toleration