

DOI: 10.5846/stxb201409291929

彭丽媛,熊兴政,李艳,黄建国.锰对外生菌根真菌生长、养分吸收、有机酸分泌和菌丝锰分布的影响.生态学报,2016,36(10): - .
Peng L Y, Xiong X Z, Li Y, Huang J G. Influence of manganese on growth, nutrient uptake, and organic acid efflux by ectomycorrhizal fungi and manganese distribution in hyphae. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(10): - .

锰对外生菌根真菌生长、养分吸收、有机酸分泌和菌丝锰分布的影响

彭丽媛¹, 熊兴政¹, 李艳², 黄建国^{1,*}

1 西南大学资源环境学院, 重庆 400716

2 四川凉山州西昌农业科学研究所, 西昌 615000

摘要: 外生菌根真菌对于酸性和锰污染土壤的植树造林和生态恢复有重要作用。本文采用液体培养方法, 以大白菇 *Rd Fr* (*Russula delica* Fr.)、彩色豆马勃 *Pt 715* (*Pisolithus tinctorius* 715)、土生空团菌 *Cg Fr* (*Cenococcum geophilum* Fr.) 和厚环粘盖牛肝菌 *Sg KIS* (*Suillus grevillei* (Kl.) Sing) 为供试对象, 研究了 Mn^{2+} 对外生菌根真菌生长、养分吸收、有机酸和氢离子分泌的影响, 以及锰在菌丝细胞内外的分布情况。结果表明: 在 0—800 mg Mn^{2+} /L 的培养液中, Mn^{2+} 对 *Rd Fr* 生长无显著影响; 低浓度的 Mn^{2+} 刺激 *Sg KIS* 生长, 中、高浓度无抑制作用; 但大幅度降低 *Pt 715* 和 *Cg Fr* 的生物量, 说明 *Rd Fr* 和 *Sg KIS* 抗(耐)锰的能力较强。在 Mn^{2+} 胁迫下, 供试菌株的氮、钾含量和吸收量显著降低; 含磷量和吸收量, 以及草酸和柠檬酸的分泌速率因菌株不同而表现出多样性, 说明在减轻 Mn^{2+} 毒的过程中, 磷酸盐(或聚磷酸盐)对 Mn^{2+} 固定作用和有机酸的络合作用因菌株不同而异。但是, Mn^{2+} 显著降低 *Rd Fr* 和 *Sg KIS* 的氢离子分泌速率, 菌丝和原生质中的含 Mn 量显著低于敏感性菌株, 说明降低 Mn^{2+} 的活性和减少吸收可能是外生菌根真菌抗(耐) Mn^{2+} 的重要机制。此外, 菌丝吸收的 Mn^{2+} 绝大部分存在于质外体, 少量进入细胞, 前者是后者的 5.23—9.21 倍, 说明原生质膜是外生菌根真菌防御 Mn^{2+} 进入细胞的重要屏障。

关键词: 锰胁迫; 外生菌根真菌; 有机酸; 养分

Influence of manganese on growth, nutrient uptake, and organic acid efflux by ectomycorrhizal fungi and manganese distribution in hyphae

PENG Liyuan¹, XIONG Xingzheng¹, LI Yan², HUANG Jianguo^{1,*}

1 College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400716, China

2 Agricultural Research Institute of Sichuan, Liangshanzhou, Xichang 615000, China

Abstract: Acid soils are widespread in tropical and subtropical areas in the world and contain a high concentration of active manganese (Mn) at pH lower than 5.5. Ectomycorrhizal (ECM) fungi are important for artificial forestation in acid soils and ecological restoration in Mn-polluted regions. A better understanding of resistance mechanisms to Mn and selection of proper ECM fungi are vital prerequisites for producing ECM seedlings in nursery beds. Therefore, *Russula delica* Fr. (*Rd Fr*), *Pisolithus tinctorius* 715 (*Pt 715*), *Cenococcum geophilum* Fr. (*Cg Fr*), and *Suillus grevillei* (Kl.) Sing (*Sg KIS*) were grown in liquid culture media with various Mn^{2+} concentrations, in order to study the growth, nutrient uptake (nitrogen, phosphorus, and potassium), organic acid efflux, and Mn distribution in fungal hyphae. The results showed no significant influence of Mn^{2+} on the growth of *Rd Fr* at concentrations between 0 and 800 mg Mn^{2+} /L. Low Mn^{2+} concentrations simulated the growth of *Sg KIS* and no growth inhibition was observed at high Mn^{2+} concentrations. In

基金项目: 国家自然科学基金(40771112, 41171215); 西南大学资源环境学院大学生科技创新“光炯”培育重点项目(20130215)

收稿日期: 2014-09-29; 网络出版日期: 2015-00-00

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: huang99@swu.edu.cn

contrast, the growth rate of *Pt* 715 and *Cg* Fr was significantly reduced by Mn^{2+} , and the biomass was decreased by 22.75% for *Pt* 715 and 33.33% for *Cg* Fr at high Mn^{2+} concentrations, compared to the control (0 mg Mn^{2+} /L). These results suggested that *Rd* Fr and *Sg* KIS were highly resistant to Mn^{2+} , probably because of their environmental adaptation and biological evolution, as a result of their long-term habitation in acid soils with high concentrations of active Mn^{2+} . A significant decrease was observed in both the content and absorption of nitrogen and potassium by ECM fungi in liquid media with Mn^{2+} added, which could be unbeneficial to host nutrient uptake after the formation of ectomycorrhizas under Mn stress. The content and uptake of phosphorus and efflux of oxalate and citrate by ECM fungi showed diverse changes among fungi grown in culture media with added Mn^{2+} . These results indicated that Mn^{2+} fixation by phosphate or polyphosphates and Mn^{2+} complexation by organic acids in the process of alleviating Mn^{2+} toxicity varied among ECM fungal strains. Under Mn^{2+} stress, proton efflux rate, and Mn content in hyphae, particularly in protoplasm, of *Rd* Fr and *Sg* KIS were consistently lower than those of *Cg* Fr and *Pt* 715, the sensitive fungi to Mn^{2+} . The decreased availability and absorption of Mn^{2+} could thus be considered as an important mechanism of ECM fungi to alleviate Mn^{2+} toxicity. In addition, most of Mn^{2+} absorbed by fungal hyphae located in apoplasts and only few entered into protoplasm. Mn^{2+} in apoplast ranged between 5.23 and 9.21 folds of protoplasm. Therefore, plasma membrane could be considered as an important barrier of ECM fungi against Mn^{2+} entry into the cells. Since lab culture and field conditions are different, further studies are necessary on the influence of Mn stress on tree roots and ECM fungi in the field.

Key Words: manganese stress; ectomycorrhizal fungus; organic acid; nutrient

由于矿山开采、金属冶炼、煤炭燃烧、工业生产以及废弃物填埋等,大量的锰(Mn)进入土壤和水体。目前,全世界每年平均排放 1500 万吨 Mn,造成严重的局部污染^[1]。此外,地壳平均含 Mn 量约为 1%^[2],几乎分布于所有的岩石和土壤矿物中。若土壤 pH<5.5,岩石和原生矿物中的 Mn 就会以 Mn^{2+} 的形式进入土壤溶液,危害植物生长发育。值得注意的是,酸性土壤占全球耕地面积的 40%以上^[3],锰是仅次于铝的危害因素^[4]。我国南方也存在大面积的酸性森林土壤,pH 值通常在 4.0—5.5 之间,土壤活性 Mn^{2+} 含量较高,并因酸沉降呈逐渐增加的趋势^[5]。 Mn^{2+} 对森林造成多方面的危害,如抑制树根吸收养分,降低树叶光合作用,妨碍树木生长发育和天然更新,导致森林大面积退化和衰亡^[6-9]。外生菌根真菌是森林生态系统中的重要成分,与树木根系形成外生菌根。在 Hg、Cd、Cu 浓度较高的培养液中,某些菌株表现出较强的抗性,仍能正常生长^[10-12]。树木接种外生菌根真菌,抗旱、抗病、抗重金属能力增强,在逆境中的成活率提高^[13-15]。在含 Mn 较高的煤矿废墟上,非菌根树木一般不能成活,而利用彩色豆马勃(*Pisolithus tinctorius*)接种松树幼苗之后,不仅提高成活率,并且促进生长^[16]。在 Cu、Cd、Zn 严重污染的矿区土壤上,种植桉树、松树和杉树的菌根苗能有效提高造林成功率^[17-18]。因此,利用菌根化苗木植树造林是绿化、美化、治理矿山和污染土壤的重要措施之一^[19-20]。

外生菌根真菌一方面能促进树木吸收养分,促进生长发育;另一方面通过吸附、络合、沉淀等作用减少重金属吸收^[21-23]。在重金属胁迫下,铆钉菇可分泌更多的酸性物质,螯合固定重金属,降低生物有效性^[24]; Ahonen-Jonnarth 等报道,在 Al 胁迫下,接种菌根真菌的松树幼苗比非菌根苗能够分泌更多的有机酸^[25];铝、锰胁迫提高外生菌根真菌 *Sl* 13、*Cg* 04 及 *Pt* 715 分泌草酸和氢离子的速率,有机酸与 Al^{3+} 和 Mn^{2+} 发生络合作用而减轻其毒害^[22]。为此,试验利用不同生态条件下获得的外生菌根真菌,液培研究了 Mn^{2+} 对菌丝生长,养分吸收,有机酸和氢离子分泌的影响,以及锰在菌丝细胞内外的分布等,旨在筛选抗锰性较强的菌株,揭示其抗锰机理,为 Mn 污染土壤的植树造林和生态修复提供科学依据和手段。

1 材料与方法

1.1 材料准备

在初选试验的基础上,利用大白菇 *Rd* Fr (*Russula delica* Fr.)、彩色豆马勃 *Pt* 715 (*Pisolithus tinctorius*

715)、土生空团菌 *Cg Fr* (*Cenococcum geophilum* Fr.) 和厚环粘盖牛肝菌 *Sg KIS* (*Suillus grevillei* (Kl) Sing) 为供试菌株。其中, *Rd Fr* 来自于重庆金佛山马尾松林的强酸性黄壤 ($\text{pH} \leq 4.0$); *Pt 715* 从四川西昌干热河谷的桉树林(红壤, $\text{pH} = 5.9$) 中分离获得; *Cg Fr* 和 *Sg KIS* 源于内蒙古大青山的油松林土壤 ($\text{pH} \approx 6.8-7.1$), 由内蒙古农业大学的白淑兰教授提供。

采用 Pachlewski 固体培养基, (25 ± 1) °C 暗培养供试菌株 14 天备用。培养基组成为 (g/L): 0.5 酒石酸铵、1.0 KH_2PO_4 、0.5 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、20 葡萄糖、20 琼脂、0.1 维生素 B_1 、1.0 mL/L 微量元素混合液(每 L 含 8.45 mg H_3BO_3 、5 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、6 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.625 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、2.77 mg ZnCl_2 和 0.27 mg $(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_4\text{O}_{13} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), $\text{pH} 5.5$ 。

1.2 试验设计

在我国西南锰矿和有色金属矿区, 土壤溶液中的活性锰变化于 157.1 mg/L—824.50 mg/L, 平均 440.3 mg/L^[26]。因此, 试验在 Pachlewski 液体培养基中(固体培养基除去琼脂), 分别加入不同浓度的 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (分析纯), 形成以下 4 个处理: 0 mg Mn^{2+} /L(无 Mn^{2+} , 对照)、200 mg Mn^{2+} /L(低 Mn^{2+})、400 mg Mn^{2+} /L(中 Mn^{2+}) 和 800 mg Mn^{2+} /L(高 Mn^{2+})。分别取 25 mL 含不同 Mn^{2+} 浓度的液体培养基置于 150 mL 三角瓶中, 121 °C 高压灭菌 30 min。冷却后每瓶分别接种一块直径为 6 mm 固体菌块, (25 ± 1) °C 暗培养 21 天, 重复 10 次。

1.3 测定项目与方法

培养结束后, 用精密酸度计测定培养液 pH。然后, 用 0.1 mol/L H_2SO_4 酸化培养液至 $\text{pH} 3.0$, 过滤收集菌丝, 高效液相色谱测定滤液中的有机酸。色谱条件为: Ion-300 有机酸分析专用柱(Phenomenex, Torrance, CA, USA), 20 μL 进样量, 2.5 mmol/L 硫酸为流动相, 流速 0.5 mL/min, 柱温 35 °C, 压力 450 psi, Diode Array L-7455 紫外检测器, 检测波长 210 nm。检测的有机酸包括草酸、柠檬酸、乙酸, 其出峰时间(min) 依次为 8.88、11.52、19.71。(80 \pm 1) °C 烘干菌丝, 测定生物量后用硫酸—高氯酸消化, 依次用靛酚蓝比色法、钼蓝比色法、火焰光度计法、原子吸收光度计法测定消化液中的氮(N)、磷(P)、钾(K)、锰(Mn)^[27]。另取部分 400 mg Mn^{2+} /L 培养的新鲜菌丝, 去离子水洗净, 滤纸吸干, 置于 25 mmol HCl /L + 40 mmol $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ /L 交换溶液中, 振荡 10 min (70 rpm), 过滤, 重复 3 次, 合并滤液, 硫酸—高氯酸硝化菌丝。用原子吸收光度计分别测定滤液和消化液中 Mn^{2+} , 前者为质外体中的 Mn^{2+} , 后者为原生质中的 Mn^{2+} ^[10]。

1.4 数据处理

用 Excel 2013 对试验数据进行基本计算, SPSS 软件进行统计分析, Duncan 法比较试验处理间的差异性, 显著水准为 5% 和 1%。

2 试验结果

2.1 外生菌根真菌的菌丝生物量

外生菌根真菌的菌丝生物量(干重)因菌株不同而异, 平均值变化于 4.27 mg 瓶⁻¹ (*Cg Fr*) — 44.25 mg 瓶⁻¹ (*Rd Fr*) 之间(图 1)。 Mn^{2+} 对 *Rd Fr* 生长无显著影响; 低浓度 Mn^{2+} 刺激 *Sg KIS* 生长, 中、高浓度无抑制作用; 但是, Mn^{2+} 显著降低 *Pt 715* 和 *Cg Fr* 的菌丝生物量, 最大降幅分别为 22.75% 和 33.33%。

2.2 N、P、K 含量和吸收量

N: Mn^{2+} 显著降低外生菌根真菌菌丝含 N 量和吸收量(表 1)。在 800 mg Mn^{2+} /L 的培养液中, *Rd Fr*、*Pt 715*、*Cg Fr* 和 *Sg KIS* 的菌丝含 N 量分别比对照降低了 59.26%、46.37%、17.07% 和 79.87%, 吸收量依次减少了

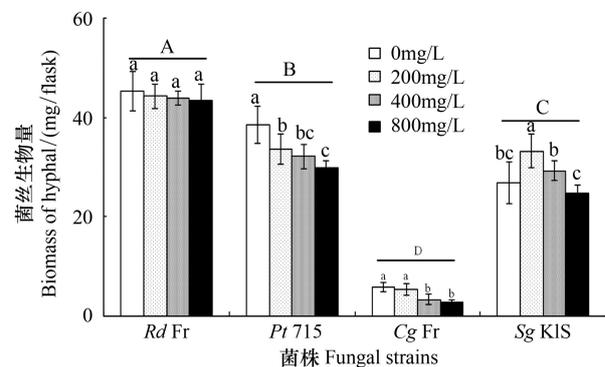


图 1 Mn^{2+} 对外生菌根真菌的菌丝生物量的影响

Fig.1 Influence of Mn^{2+} on the hyphal biomass of ECM fungi

Rd Fr, 大白菇 *Russula delica* Fr.; *Pt 715*, 彩色豆马勃 *Pisolithus tinctorius* 715; *Cg Fr*, 土生空团菌 *Cenococcum geophilum* Fr.; *Sg KIS*, 厚环粘盖牛肝菌 *Suillus grevillei* (Kl.) Sing; 不同小写字母者表示 Mn^{2+} 处理间差异显著 ($P < 0.05$); 不同大写字母表示菌株间差异极显著 ($P < 0.01$)

60.00%、56.25%、50.00%和75.00%。

P:Mn²⁺对外生菌根真菌的菌丝含P量和吸收量的影响因菌株不同而表现出多样性。随培养液中的Mn²⁺浓度提高,Rd Fr的含P量和吸收量增加;Pt 715的含P量无显著变化,但吸收量降低;Cg Fr的含P量增加,吸收量无显著变化(低浓度Mn²⁺除外);Sg KIS的含P量和吸收量均降低。

K:Mn²⁺显著降低内生菌根真菌菌丝含K量和吸收量。在800 mg Mn²⁺/L培养液中,Rd Fr、Pt 715、Cg Fr和Sg KIS的含K量分别比对照降低了57.57%、23.32%、47.26%、40.91%,吸收量依次减少了61.90%、41.67%、62.50%、50.00%。

表1 Mn²⁺对外生菌根真菌菌丝N、P、K含量(mg/g)和吸收量(mg/瓶)的影响

Table 1 Effects of Mn²⁺ on the concentration and absorption of N, P and K by ECM fungal hyphae

菌株 Fungal strains	Mn ²⁺ 浓度/(mg/L) Mn ²⁺ concentrations	养分含量 Nutrient concentration			养分吸收量 Nutrient absorption		
		N	P	K	N	P	K
大白菇 <i>Rd Fr</i>	0	1.08±0.06a	5.14±1.14b	4.69±0.53a	0.05±0.01a	0.23±0.04b	0.21±0.08a
	200	0.88±0.02ab	6.88±0.18a	4.37±0.28a	0.03±0.00b	0.31±0.01a	0.19±0.06a
	400	0.72±0.02bc	6.72±0.70a	4.48±0.73a	0.03±0.00b	0.30±0.02a	0.17±0.02a
	800	0.44±0.05c	6.06±0.56a	1.99±0.56b	0.02±0.01b	0.25±0.04ab	0.08±0.01b
彩色豆马勃 <i>Pt 715</i>	0	8.13±1.74a	21.94±0.79a	18.36±1.92a	0.32±0.07a	0.83±0.06a	0.72±0.10a
	200	6.68±1.99b	21.99±0.88a	16.68±0.64ab	0.29±0.06a	0.67±0.01b	0.53±0.06b
	400	5.51±0.98c	20.86±0.39a	15.50±0.28bc	0.18±0.09b	0.68±0.01b	0.50±0.00b
	800	4.36±0.77d	20.52±0.43a	14.08±1.34c	0.14±0.04b	0.64±0.01b	0.42±0.03b
土生空团菌 <i>Cg Fr</i>	0	4.10±0.37a	3.57±0.46b	8.21±0.98a	0.02±0.01a	0.02±0.01b	0.04±0.01ab
	200	3.95±0.56ab	5.98±0.64a	9.05±0.55a	0.02±0.01a	0.04±0.01a	0.06±0.01a
	400	2.81±0.68b	4.64±0.54ab	6.56±1.31b	0.02±0.01a	0.02±0.01b	0.02±0.00bc
	800	3.40±0.03b	4.83±0.01ab	4.33±0.84c	0.01±0.00b	0.02±0.00b	0.01±0.00c
厚环粘盖牛肝菌 <i>Sg KIS</i>	0	6.31±0.41a	19.21±0.18a	7.04±0.45a	0.12±0.00a	0.54±0.01a	0.20±0.01a
	200	3.99±0.58b	17.66±0.64ab	6.63±0.16a	0.16±0.02a	0.51±0.01a	0.20±0.00a
	400	4.42±1.21b	17.03±0.82b	7.72±0.21a	0.13±0.04a	0.50±0.06a	0.23±0.03a
	800	1.27±0.28c	16.82±0.11b	4.16±0.61b	0.03±0.01b	0.43±0.01b	0.10±0.00b
菌株 Fungal strain		**	**	**	**	**	* *
Mn ²⁺ 浓度 Mn ²⁺ Concentrating		**	**	**	**	**	* *
菌株×Mn ²⁺ 浓度 Fungal strain×Mn ²⁺		ns	ns	ns	ns	ns	ns

注:Rd Fr,大白菇(*Russula delica* Fr.); Pt 715,彩色豆马勃(*Pisolithus tinctorius* 715); Cg Fr,土生空团菌(*Cenococcum geophilum* Fr.); Sg KIS,厚环粘盖牛肝菌(*Suillus grevillei* (Kl.) Sing). 在相同菌株不同Mn²⁺浓度处理的数据中,不同字母者表示差异显著(P < 0.05), * *表示差异极显著(P < 0.01), ns表示差异不显著

2.3 有机酸和H⁺分泌

2.3.1 有机酸

草酸:在Mn²⁺胁迫下,内生菌根真菌菌丝分泌草酸的速率因菌株不同而异(表2)。其中,低浓度Mn²⁺促进Rd Fr分泌草酸,但中、高浓度无显著影响;Mn²⁺浓度增加,Pt 715和Cg Fr分泌草酸的速率提高,Sg KIS则相反。此外,草酸分泌速率Cg Fr > Pt 715 > Sg KIS > Rd Fr,平均分泌速率高低相差6.39倍。

柠檬酸:Mn²⁺对外生菌根真菌菌丝分泌柠檬酸的影响也因菌株不同而异(表2)。Mn²⁺促进Rd Fr分泌柠檬酸,但降低Pt 715、Cg Fr和Sg KIS的分泌速率。此外,分泌柠檬酸速率Cg Fr > Sg KIS > Rd Fr和Pt 715。

乙酸:在Rd Fr、Pt 715和Cg Fr的培养液中,未检测出乙酸(表2)。但是,Sg KIS分泌乙酸的速率随Mn²⁺浓度增加而降低。在800 mg Mn²⁺/L的培养液中,其分泌速率比对照降低了76.30%。

2.3.2 氢离子

表2可见,随培养液中的Mn²⁺浓度提高,Rd Fr、Pt 715和Sg KIS分泌H⁺的速率持续降低(仅Rd Fr在高

浓度 Mn^{2+} 时例外, 但仍显著低于对照), 但 *Cg Fr* 分泌 H^+ 的速率则相反。在 $800\text{ mg } Mn^{2+}/L$ 的培养液中, *Rd Fr*、*Pt 715* 和 *Sg KIS* 分泌 H^+ 的速率分别比对照降低了 17.58%、65.91% 和 48.89%, *Cg Fr* 增加了 38.39%。

表 2 Mn^{2+} 胁迫条件下, 外生菌根真菌菌丝分泌草酸、柠檬酸、乙酸及 H^+ 的速率 ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{d}^{-1}$)

Table 2 Efflux rate of oxalate, acetate, citrate and H^+ by ECM fungi under Mn^{2+} stress

菌株 Fungal strains	Mn^{2+} 浓度/(mg/L) Mn^{2+} concentrations	草酸 Oxalate	柠檬酸 Citrate	乙酸 Acetate	H^+
大白菇 <i>Rd Fr</i>	0	6.24±0.27b	5.18±0.04b	nd	1.65±0.08a
	200	8.19±0.20a	7.13±1.49ab	nd	1.43±0.14b
	400	5.87±0.48b	7.51±1.99ab	nd	1.15±0.01c
	800	5.73±0.23b	7.86±0.39a	nd	1.36±0.10b
彩色豆马勃 <i>Pt 715</i>	0	26.34±3.74c	6.99±1.72a	nd	5.66±0.44a
	200	28.24±0.73bc	6.80±1.47a	nd	3.45±0.25b
	400	30.36±4.15b	5.30±0.40ab	nd	1.81±0.16c
	800	37.05±7.54a	4.22±0.27b	nd	1.93±0.28c
土生空团菌 <i>Cg Fr</i>	0	23.09±2.05c	1144.9±60.17a	nd	5.12±0.39c
	200	42.28±1.21b	930.5±52.41b	nd	5.58±1.97bc
	400	46.52±5.66ab	959.3±94.74b	nd	6.29±1.63ab
	800	54.83±6.65a	835.4±67.16c	nd	8.31±0.31a
厚环粘盖牛肝菌	0	14.59±0.28a	196.8±4.27a	72.28±0.93a	30.60±0.58a
<i>Sg KIS</i>	200	10.88±0.81b	136.8±16.19b	33.38±5.30b	22.20±0.52b
	400	8.58±0.87c	135.6±24.11b	22.49±2.39c	17.48±1.48c
	800	5.67±0.85d	134.9±12.47b	17.13±3.68c	15.64±2.28c
菌株 Fungal strain		**	**	**	* *
Mn^{2+} 浓度 Mn^{2+} Concentrating		**	**	**	* *
菌株× Mn^{2+} 浓度 Fungal strain× Mn^{2+}		ns	ns	ns	ns

nd 表示未检出

2.4 菌丝 Mn 含量、吸收量及其分布

2.4.1 含量和吸收量

菌株不同, 菌丝含 Mn 量和吸收量也不一样, 平均含 Mn 量 *Cg Fr* > *Pt 715* > *Rd Fr* > *Sg KIS*; 平均吸收量 *Rd Fr* 最高, *Cg Fr* 最低。随培养液中的 Mn^{2+} 浓度提高, 菌丝含 Mn 量和吸收量显著增加。在 $800\text{ mg } Mn^{2+}/L$ 培养液中, 菌丝含 Mn 量和吸收量分别比对照增加了 6.57—96.67 倍和 6.58%—112.42% (图 2)。

2.4.2 Mn 分布

表 3 可见, 菌丝原生质含 Mn 量变化于 0.53—2.01mg/g 之间, 质外体含 Mn 量为 4.88—10.52mg/g, 后者是前者的 5.23—11.2 倍。此外, 原生质和质外体含 Mn 量 *Cg Fr* 最高, 分别是其它菌株的 2.45—3.79 倍(原生质)和 1.64—2.15 倍(质外体)。

表 3 Mn 在外生菌根真菌细胞内外的分布

Table 3 Mn distributions in and out of ECM cells

菌株 Fungal strains	Mn 含量 Mn concentration / (mg/g)		原生质/质外体 Protoplasm/Apoplast
	原生质 Protoplasm	质外体 Apoplast	
大白菇 <i>Rd Fr</i>	0.82±0.08c	6.41±0.08b	1:7.82
彩色豆马勃 <i>Pt 715</i>	1.05±0.13b	6.58±0.13b	1:6.27
土生空团菌 <i>Cg Fr</i>	2.01±0.49a	10.52±0.56a	1:5.23
厚环粘盖牛肝菌 <i>Sg KIS</i>	0.53±0.11c	4.88±0.50c	1:9.21

在同一列中, 有不同字母者表示差异显著 ($P = 0.05$)

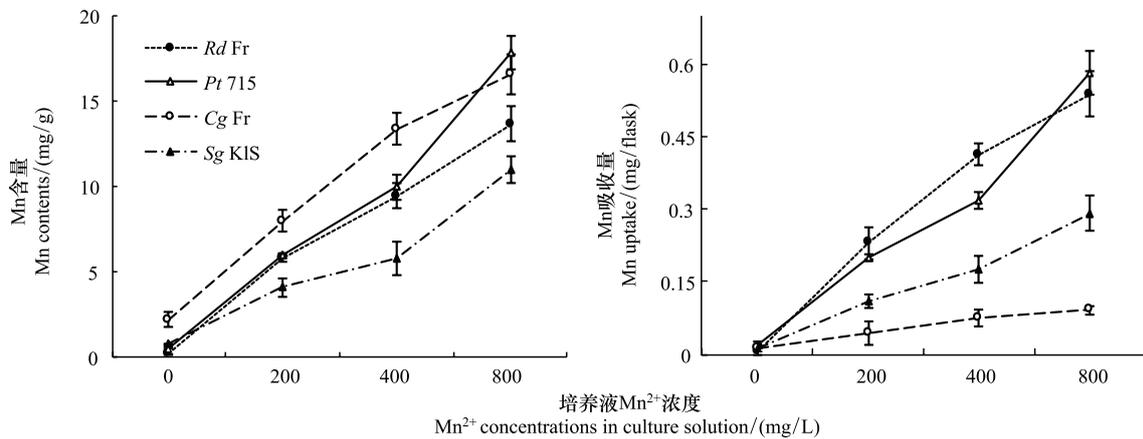


图2 在不同 Mn^{2+} 浓度的培养液中,外生菌根真菌的菌丝含 Mn 量 (a) 和吸收量 (b)

Fig.2 Mn^{2+} concentration (a) and absorption (b) by ECM hyphae grown in culture solution with variable Mn^{2+} concentrations

3 讨论

在逆境条件下,生物的生长状况是反映其抗性的最重要指标^[28-29]。 Mn^{2+} 对 *Rd Fr* 生长无显著影响;低浓度 Mn^{2+} 刺激 *Sg KIS* 生长,中、高浓度仍无抑制作用,说明 *Rd Fr* 和 *Sg KIS* 抗(耐)Mn 的能力较强。继续开展 *Rd Fr* 和 *Sg KIS* 菌根植物抗(耐)Mn 的研究,有益于它们的实际应用。

Blaudez 等认为,外生菌根真菌对重金属抗性的差异与它们的来源地有关^[30]。供试菌株 *Rd Fr* 生长于重庆市金佛山马尾松林下强酸性土壤($pH \leq 4.0$),活性 Mn^{2+} 含量高,为了适应生存环境,物竞天择,逐渐进化出抗(耐)Mn 能力较强的生物学特性。但是,*Sg KIS* 则来源于内蒙古大青山油松林的中性土壤($pH 6.8-7.1$),活性锰含量较低^[9],推测 *Sg KIS* 抗锰性较强可能为固有生物学特性。在培养基中添加不同浓度的 Mn^{2+} ,均未抑制 *Rd Fr* 和 *Sg KIS* 生长。推测在 Mn^{2+} 含量较高的土壤中,*Rd Fr* 和 *Sg KIS* 也可能较好的生长。当它们与树木根系形成外生菌根之后,生长良好的外延菌丝广泛深入土壤,有益于扩大养分吸收空间,维持养分吸收,保持寄主植物健康,增强抗逆能力^[31]。

外生菌根真菌通过固定、钝化、分隔、抑制吸收和解毒等多种途径拮抗重金属危害^[32-33]。 PO_3^- 与 Mn^{2+} 形成难溶性磷酸盐 $[Mn_3(PO_4)_2 \cdot nH_2O, K_{sp} = 6.13 \times 10^{-32}]$,有效地固定 Mn^{2+} 。因此,菌根真菌组织中的磷酸盐或聚磷酸能结合固定重金属,降低有效浓度,减轻锰害^[34]。在 Mn^{2+} 胁迫条件下,外生菌根真菌增加 P 的吸收可能是减轻 Mn^{2+} 毒的原因之一^[9]。尽管 *Rd Fr* 和 *Sg KIS* 同属抗(耐)性较强的菌株,但培养液中的 Mn^{2+} 使 *Rd Fr* 含 P 量和吸收量增加,*Sg KIS* 则相反,故增加 P 吸收可能是 *Rd Fr* 而非 *Sg KIS* 减轻 Mn^{2+} 毒的策略。此外, $[Mn(C_2O_4)_3]^{3-}$ 和 $Mn_3(C_6H_5O_7)_2$ 的稳定常数($\lg \beta$)分别为 19.4 和 11.4,故外生菌根真菌增加草酸和柠檬酸分泌能降低 Mn^{2+} 的有效浓度,有益于减轻 Mn 毒。但是, Mn^{2+} 对供试菌株分泌草酸和柠檬酸的影响也表现出多样性,说明它们通过分泌有机酸络合 Mn^{2+} 而减轻毒害的作用因菌株不同而异。

值得注意的是,培养液中的 Mn^{2+} 显著降低 *Rd Fr* 和 *Sg KIS* 分泌氢离子的速率。在土壤 pH 3—9 范围内,每提高一个 pH 值单位, Mn^{2+} 浓度下降 100 倍,故 pH 对活性 Mn 含量影响巨大^[35]。因此,在 Mn^{2+} 胁迫条件下,外生菌根真菌减少氢离子分泌可降低 Mn 的活性,是防止 Mn^{2+} 进入菌丝的有效途径之一。在 *Rd Fr* 和 *Sg KIS* 的菌丝和原生质中,含 Mn 量显著低于 *Cg Fr* 和 *Pt 715*,说明抗(耐)Mn 能力较强的菌株能有效地阻止 Mn^{2+} 进入菌丝和原生质,减轻 Mn 毒。松树幼苗接种彩色豆马勃(*Pisolithus tinctorius*)之后,Mn 主要存在于根系表面的菌套中,仅有少量进入根系和运输到地上部,由此减轻 Mn 的毒害作用^[16]。此外,无论抗 Mn^{2+} 性强弱,外生菌根真菌吸收 Mn^{2+} 后,大量存在于质外体,仅少量进入原生质,类似 Bidwell 等^[36] 的研究结果。说明原生质膜是防御 Mn^{2+} 进入细胞的重要屏障。

总之, *Rd Fr* 和 *Sg KIS* 具有较强的抗(耐) Mn^{2+} 性。在 Mn^{2+} 胁迫的条件下, 外生菌根真菌吸收 P 和分泌有机酸表现出多样性, 但减少氢离子分泌和 Mn^{2+} 进入菌丝和原生质是抗性菌株的共同特性, 可视为拮抗 Mn^{2+} 害的重要机制之一。

参考文献 (References):

- [1] 周泽义. 中国蔬菜重金属污染及控制. 资源生态环境网络研究动态, 1999, 10(3): 21-27.
- [2] 臧小平. 土壤锰毒与植物锰的毒害. 土壤通报, 1999, 30(3): 139-141.
- [3] 任立民, 刘鹏, 谢忠雷, 徐根娣, 李志刚, 蔡妙珍, 罗虹. 植物对铝毒害的抗逆性研究进展. 土壤通报, 2008, 39(1): 177-181.
- [4] Foy C D. Physiological effects of hydrogen, aluminum and manganese toxicities in acid soils. Soil acidity and liming, 1984, 12: 57-97.
- [5] Liu K H, Fang Y T, Yu F M, Liu Q, Li F R, Peng S L. Soil acidification in response to acid deposition in three subtropical forests of subtropical China. Pedosphere, 2010, 20(3): 399-408.
- [6] Driscoll C T, Han Y J, Chen C Y, Evers D C, Lambert K F, Holsen T M, Kamman N C, Munson R K. Mercury contamination in forest and freshwater ecosystem in the northeastern United States. BioScience, 2007, 57(1): 17-28.
- [7] Grigal D F. Mercury sequestration in forests and peatlands: a review. Journal of Environmental Quality, 2003, 32(2): 393-405.
- [8] Watras C J, Huckabee J W. Mercury pollution integration and synthesis. Boca Raton: CRC Press, 1994: 295-304.
- [9] 任立民, 刘鹏. 锰毒及植物耐性机理研究进展. 生态学报, 2007, 27(1): 357-367.
- [10] 李勇, 袁玲, 高中慧, 黄建国. 外生菌根真菌吸收汞的动力学. 菌物学报, 2004, 23(1): 139-143.
- [11] 张琴. 汞、镉对外生菌根真菌生长、分泌作用和养分吸收的影响[D]. 重庆: 西南农业大学, 2003.
- [12] 黄艺, 陶澍, 姜学艳, 刘晓蓉. 过量铜对 4 种外生菌根真菌的生长, 碳氮和铜积累的影响. 微生物学报, 2002, 42(6): 737-744.
- [13] Lou Z B, Li K, Gai Y, Göbel C, Wildhagen H, Jiang X N, Feußner I, Rennenberg H, Polle A. The ectomycorrhizal fungus (*Paxillus involutus*) modulates leaf physiology of poplar towards improved salt tolerance. Environmental and Experimental Botany, 2011, 72(2): 304-311.
- [14] Colpaert J V, Wevers J H L, Krznaric E, Adriaensen K. How metal-tolerant ecotypes of ectomycorrhizal fungi protect plants from heavy metal pollution. Annals of Forest Science, 2011, 68(1): 17-24.
- [15] Smith S E, Read D J. Mycorrhizal Symbiosis. 3rd ed. New York: Academic Press, 2008: 126-160.
- [16] Marx D H. Mycorrhizae and establishment of trees on strip-mined land. Ohio Journal of Science, 1975, 75(6): 288-297.
- [17] Zheng W S, Fei Y H, Huang Y. Soluble protein and acid phosphatase exuded by ectomycorrhizal fungi and seedlings in response to excessive Cu and Cd. Journal of Environmental Sciences, 2009, 21(12): 1667-1672.
- [18] 黄艺, 彭博, 李婷, 梁振春. 外生菌根真菌对重金属铜镉污染土壤中油松生长和元素积累分布的影响. 植物生态学报, 2007, 31(5): 923-929.
- [19] 林双双, 孙向伟, 王晓娟, 豆存艳, 李媛媛, 罗巧玉, 孙莉, 金樑. 我国菌根学研究进展及其应用展望. 草业学报, 2013, 22(5): 310-325.
- [20] 岳辉, 毕银丽, Zhakypbek Y, 蒋明明, 高斐. 接种菌根对神东矿区采煤沉陷地的生态修复效应. 科技导报, 2012, 30(36): 56-60.
- [21] 黄艺, 黄志基. 外生菌根与植物抗重金属胁迫机理. 生态学杂志, 2005, 24(4): 422-427.
- [22] 李华, 黄建国, 袁玲. 铝和锰对外生菌根真菌生长、养分吸收及分泌作用的影响. 环境科学, 2013, 34(1): 315-320.
- [23] 张茹琴, 唐明, 张峰峰, 黄继川. 酸碱度和重金属对 3 种外生菌根真菌生长的影响. 北京林业大学学报, 2008, 30(2): 113-118.
- [24] 黄艺, 黄志基, 范玲, 赵曦. 铆钉菇对重金属的耐性及其对油松分泌 TOC 的影响. 农业环境科学学报, 2006, 25(4): 875-879.
- [25] Ahonen-Jonnarh U, van Hess P A W, Lundström U, Finlay R D. Organic acids produced by mycorrhizal *Pinus sylvestris* exposed to elevated aluminium and heavy metal concentrations. New Phytologist, 2000, 146(3): 557-567.
- [26] 王秋菊, 崔战利, 王贵森, 张少良. 土壤锰的研究现状及展望. 黑龙江八一农垦大学学报, 2005, 17(3): 39-42.
- [27] 鲍士旦. 土壤农化分析 (第三版). 北京: 中国农业出版社, 2008: 55-55, 268-271, 278-279.
- [28] 黄志基, 黄艺, 彭博. 铜镉胁迫对 2 种菌根真菌生长和细胞壁离子交换量的影响. 环境科学, 2006, 27(8): 1654-1658.
- [29] 郭天荣, 张国平. 大麦耐铝毒机理及遗传改良研究进展. 大麦科学, 2002, (2): 6-10.
- [30] Blaudez D, Jacob C, Turnau K, Colpaert J V, Ahonen-Jonnarh U, Finlay R, Botton B, Chalot M. Differential responses of ectomycorrhizal fungi to heavy metals in vitro. Mycological Research, 2000, 104(11): 1366-1371.
- [31] 朱教君, 徐慧, 许美玲, 康宏樟. 外生菌根菌与森林树木的相互关系. 生态学杂志, 2003, 22(6): 70-76.
- [32] 廖继佩, 林先贵, 曹志洪. 内外生菌根真菌对重金属的耐受性及机理. 土壤, 2003, 35(5): 370-377.
- [33] 张小燕, 黄建国, 许金山, 范春丽, 孙群. 外生菌根真菌与重金属相互作用研究现状. 江苏林业科技, 2004, 31(2): 41-43.
- [34] 罗巧玉, 王晓娟, 林双双, 李媛媛, 孙莉, 金樑. AM 真菌对重金属污染土壤生物修复的应用与机理. 生态学报, 2013, 33(13): 3898-3906.

-
- [35] 刘铮. 土壤与植物中锰的研究进展. 土壤学进展, 1991, 19(6): 1-10.
- [36] Bidwell S D, Woodrow I E, Batianoff G N, Sommer-Knudsen J. Hyper accumulation of manganese in the rain forest tree *Austromyrtus bidwillii* (Myrtaceae) from Queens land, Australia. Functional Plant Biology, 2002, 29(7): 899-905.