

锌胁迫对彩色豆马勃体内锌的分布和活性形态及其抗氧化系统的影响

刘紫怡, 胡文涛, 陈辉, 唐明*

华南农业大学林学与风景园林学院 岭南现代农业科学与技术广东省实验室, 广东 广州 510640

摘 要: 彩色豆马勃 *Pisolithus tinctorius* 可广泛与林木建立外生菌根, 其共生可促进植物生长, 提高植物对重金属的耐受性。然而, 关于彩色豆马勃对重金属锌(Zn)胁迫的生理响应还不完全清楚。本研究在纯培养条件下, 测定了 Zn 胁迫对彩色豆马勃生物量、Zn 的活性形态和亚细胞分布, 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)活性, 谷胱甘肽(GSH)、抗坏血酸(AsA)和黑色素含量的影响。结果表明, Zn 胁迫抑制了彩色豆马勃的生长, 在浓度为 563 $\mu\text{mol/L}$ 时, 达到半数最大抑制浓度(IC_{50}), 在浓度为 600 $\mu\text{mol/L}$ 时, 生物量降低 42.6%。Zn 在彩色豆马勃中以活性较低的草酸盐、难溶于水的磷酸盐、果胶酸盐以及与蛋白质呈结合态或吸着态的形式为主。Zn 胁迫显著提高了彩色豆马勃菌丝中 CAT、POD 和 SOD 活性, 增加了 GSH 和黑色素含量, 但对 AsA 的含量没有显著影响。本研究表明, 彩色豆马勃主要通过调节 Zn 的分布及抗氧化系统, 增加黑色素含量, 增强对 Zn 的耐受性, 为外生菌根真菌修复重金属污染土壤提供了理论支持。

关键词: 外生菌根真菌; 重金属; 黑色素; 吸收与固存; 抗氧化应激

[引用本文] 刘紫怡, 胡文涛, 陈辉, 唐明, 2022. 锌胁迫对彩色豆马勃体内锌的分布和活性形态及其抗氧化系统的影响. 菌物学报, 41(7): 1123-1133

Liu ZY, Hu WT, Chen H, Tang M, 2022. Effects of zinc stress on the antioxidant system and the distribution and form of zinc of *Pisolithus tinctorius*. Mycosystema, 41(7): 1123-1133

基金项目: 广州市科技计划重点项目(201904020022); 岭南现代农业科学与技术广东省实验室科研项目(NZ2021025); 国家自然科学基金(32071639)

Supported by the Science and Technology Key Program of Guangzhou, China (201904020022), the Research Program of the Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture (NZ2021025), and the National Natural Science Foundation of China (32071639).

*Corresponding author. E-mail: tangming@scau.edu.cn

ORCID: LIU Ziyi (0000-0002-8123-7274), TANG Ming (0000-0002-8158-6300)

Received: 2021-10-13, accepted: 2021-10-29

Effects of zinc stress on the antioxidant system and the distribution and form of zinc of *Pisolithus tinctorius*

LIU Ziyi, HU Wentao, CHEN Hui, TANG Ming*

Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, Guangdong, China

Abstract: *Pisolithus tinctorius* can extensively establish ectomycorrhizas with forest trees, and the symbiosis can promote plant growth and improve plant tolerance to heavy metals. However, the physiological response of *P. tinctorius* to heavy metal zinc (Zn) stress is not completely clear. In this study, the effects of Zn stress on the biomass of *P. tinctorius*, the active form and subcellular distribution of Zn, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and peroxidase (POD) activity, glutathione (GSH), ascorbic acid (AsA) and melanin content under pure culture were analyzed. The results showed that Zn stress inhibited the growth of *P. tinctorius*, reaching the half maximum inhibitory concentration (IC₅₀) at a concentration of 563 $\mu\text{mol/L}$, and when the concentration was 600 $\mu\text{mol/L}$, the biomass decreased by 42.6%. Zn in *P. tinctorius* is mainly in the form of low-activity oxalate, insoluble phosphate and pectinate, and the form of binding or sorption with protein. Zn stress significantly increased the activity of CAT, POD and SOD in *P. tinctorius* hyphae, increased the content of GSH and melanin, but had no significant effect on the content of AsA. This study shows that *P. tinctorius* mainly regulates the distribution of Zn and the antioxidant system to enhance the tolerance to Zn, and it provides theoretical support for remediation of heavy metal contaminated soil with the help of ectomycorrhizal fungi.

Keywords: ectomycorrhizal fungi; heavy metals; melanin; absorption and retention; anti-oxidative stress

锌(Zn)是污染土壤中常见的重金属,少量Zn对植物的生长发育是有利的,浓度过高则对其产生毒害作用,导致萎黄病发生、光合作用减弱、生长受阻、活性氧(ROS)激增、抗氧化剂活性改变(Broadley *et al.* 2007)和干扰其他微量元素(如铁和锰)的吸收(Hall 2002)。不同植物通过抑制金属的摄取和转运、金属固定化、质膜排出、应激蛋白诱导、水杨酸合成、一氧化氮和多胺的合成等机制耐受重金属胁迫(Bano & Ashfaq 2013)。而菌根植物通过与菌根真菌形成共生体——菌根,在减缓植物重金属危害的过程中起重要作用(Luo *et al.* 2014)。

Khullar & Reddy (2019, 2020)研究发现,当接触浓度不断增加的类金属砷(As)时,外生菌根

真菌(ectomycorrhizal fungi, ECMF)粘滑菇 *Hebeloma cylindrosporum* 在细胞内积累As,诱导谷胱甘肽(GSH)生物合成,增强 γ -谷氨酰基半胱氨酸合成酶(Lb γ -GCS)和谷胱甘肽合成酶(LbGS)活性;进一步发现,编码GSH生物合成基因受As胁迫显著上调,合成GSH与As结合并贮存在液泡中。Zn胁迫使棘孢曲霉 *Aspergillus aculeatus* 菌丝体内GSH的含量显著增加,有效缓解了重金属带来的氧化损伤(刘云国等 2009)。江亚男等(2019)发现,松乳菇 *Lactarius deliciosus* 含有更多的阳离子吸附位点,可吸附大量铝离子(Al^{3+}),阻止 Al^{3+} 进入共质体以应对Al胁迫。菌根真菌细胞中的色素类物质可与重金属结合(Galli *et al.* 1994),豆包菌 *Pisolithus arhizus* 菌丝

体内重金属主要位于细胞壁表面的色素和电子不透明颗粒中(Gruhn & Miller 1991)。深色有隔内生真菌(dark septate endophytes, DSEs)细胞壁富含黑色素,当铅和镉离子浓度增加时,黑色素含量显著增加(Ban *et al.* 2012; Hou *et al.* 2020),提高真菌对重金属胁迫的耐受性(Likar & Regvar 2013)。

彩色豆马勃 *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch 是重要的外生菌根真菌,对重金属逆境具有一定的耐受性(陈保冬等 2015)。铜(Cu)胁迫下,彩色豆马勃可显著提高黑松 *Pinus thunbergii* 幼苗的生长,降低土壤中可交换态 Cu 的含量,减缓 Cu 对植物的毒害(温祝桂等 2017)。彩色豆马勃通过增强营养元素的吸收应对汞(Hg)胁迫(彭剑涛等 2010);调节反硝化作用,产生一氧化氮,减轻铬(Cr)诱导的氧化应激(Shi *et al.* 2020);分泌有机酸,提高对环境中的养分的活化与利用,促进对过量 Al 的耐受性(江亚男等 2019);增加体内过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽 S-转移酶活性,保障真菌的生长免受锰(Mn)的影响(Canton *et al.* 2016)。但是其耐受重金属 Zn 的生理生化机制并不完全清楚。因此,本文通过研究 Zn 胁迫对彩色豆马勃 Zn 亚细胞分布和化学形态、抗氧化系统和黑色素含量的影响,揭示彩色豆马勃 Zn 解毒的生理机制,为进一步利用外生菌根真菌修复重金属污染土壤提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌种

彩色豆马勃 *Pisolithus tinctorius* 21118 菌株由中国林业科学研究院热带林业研究所陈羽研究员提供,分离于广东肇庆西南桦树 *Betula* sp. 林下。于改良 MMN 培养基(Marx 1969)中活化,在菌落边缘打取菌饼(直径 0.8 cm),接种于盛有改良 MMN 培养基的直径 9 cm 培养皿中,25 ℃ 黑暗环境中倒置培养,备用。

1.1.2 供试培养基

改良 MMN 培养基: CaCl₂ 0.05 g/L、NaCl 0.025 g/L、KH₂PO₄ 0.5 g/L、(NH₄)₂HPO₄ 0.25 g/L、MgSO₄ 0.15 g/L、柠檬酸 0.2 g/L、FeCl₃ 0.012 g/L、VB₁ 0.1 mg/L、葡萄糖 15 g/L, pH 5.5。

1.2 试验设计和方法

1.2.1 不同 Zn 浓度下菌根真菌生长速率和重金属抑制率测定

根据预试验结果, Zn 处理采用 4 种浓度(0、600、800 和 1 000 μmol/L),各浓度 10 个重复。将 ZnCl₂ 用蒸馏水溶解,添加到改良 MMN 固体培养基中,调节 pH 至 5.5,并用无菌玻璃纸覆盖。选取生长旺盛的菌株,在菌落边缘用无菌的打孔器打取菌饼(直径 0.8 cm),接种在含不同 Zn 浓度培养基中(培养皿直径 9 cm,盛有 25 mL 培养基),25 ℃ 黑暗环境中倒置培养。待 1 000 μmol/L Zn 处理组中萌发菌丝后(接种 20 d, 80%以上),采用十字交叉法测定菌落直径,每隔 7 d 测定一次,记录其生长速率和生长情况,计算重金属抑制率(inhibition rate, I): $I = (D_0 - D) / D_0 \times 100\%$ (D_0 为对照菌落直径增长量, D 为处理菌落直径增长量)。

1.2.2 彩色豆马勃 Zn 处理

根据 1.2.1 的试验结果,得到 Zn 对彩色豆马勃的半数最大抑制浓度(IC₅₀)为 563 μmol/L,设定 Zn 浓度分别为 0 和 600 μmol/L,作为生理生化指标测定处理浓度。各浓度 16 个重复,菌饼获取方式同 1.2.1。

固体培养:取上述菌饼接种于盛有 25 mL 改良 MMN 固体培养基(覆盖无菌玻璃纸)直径 9 cm 的培养皿中,25 ℃ 倒置暗培养。30 d 后,将玻璃纸上的菌丝体(不含琼脂)收集到 1.5 mL 离心管中。新鲜样品用于 Zn 的亚细胞分布和活性形态测定,其余样品放入-80 ℃ 冰箱中冻存,用于抗氧化酶活性和抗氧化物质含量测定。

液体培养:取上述菌饼接种于盛有 50 mL 改良 MMN 液体培养基的 150 mL 锥形瓶中,每

瓶接种 5 个菌饼, 25 °C、120 r/min 振荡培养 30 d。过滤获得菌丝体, 用超纯水冲洗数次, 洗净表面残留的培养基, 吸干水分, 用于生物量和黑色素含量测定。

1.3 生理生化指标的测定

1.3.1 Zn 活性形态和亚细胞分布测定

称取 0.1 g 新鲜样品, 加入 10 mL 研磨液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5), 研磨匀浆后, 采用化学试剂逐步提取法确定 Zn 在彩色豆马勃中的活性形态(Fu *et al.* 2011)。按照溶剂极性从小到大依次提取: 80%乙醇(FE)、去离子水(FW)、1 mol/L NaCl (FNaCl)、2% HAc (FHAc) 和 0.6 mol/L HCl (FHCl)。

称取 0.1 g 新鲜样品, 采用差速离心法分离彩色豆马勃的亚细胞组分(Hou *et al.* 2013)。将样品与预冷的提取缓冲液 (250 mmol/L 蔗糖、50 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L 二硫赤藓糖醇) 以 1 g:100 mL 的比例在冰浴中研磨至匀浆。2 000 r/min 离心 20 min 得到细胞壁和未破碎残渣组分(F1, 残渣); 4 000 r/min 离心 30 min 得到以细胞核为主的组分(F2, 残渣); 10 000 r/min 离心 20 min 得到线粒体和叶绿体组分(F3, 残渣)以及核蛋白和可溶性组分(F4, 上清液)。

将利用化学试剂逐步提取法得到的上清液和利用差速离心法得到的沉淀和上清液分别转移至消煮管中, 上清液于消煮炉上加热蒸发至近干、冷却。分别加入浓硝酸于 150 °C 加热消解, 将溶液消煮至澄清。使用火焰原子吸收分光光度计(耶拿, novAA350)测定彩色豆马勃不同活性形态和亚细胞组分 Zn 含量。

1.3.2 抗氧化酶活性和抗氧化物质含量测定

将 1.2.2 中保存于-80 °C 的真菌样品取出, 在液氮中研磨成粉备用。

抗氧化酶活性测定: 称取上述真菌粉末 0.1 g, 超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定参考 Xu *et al.* (2010)的方法; 过氧化物酶(POD)活性的测定参考 Zhu *et al.* (2004)的方法; 过氧化氢

酶(CAT)活性的测定参考 Beers & Sizer (1952)的方法。SOD、POD 和 CAT 的酶活性分别以 U/g FW、U/g FW·min 和 U/g FW·min 表示。

抗氧化物质含量测定: 称取上述真菌粉末 0.1 g, 加入 2 mL 5%三氯乙酸(TCA 溶液), 充分混匀后, 15 000×g 离心 10 min, 上清液定容至 2 mL, 取部分上清液用于抗坏血酸(AsA)和谷胱甘肽(GSH)含量测定。

AsA 含量的测定参考 Kampfenkel *et al.* (1995)的方法稍作修改。分别吸取上清液 0.2 mL, 加入 150 mmol/L NaH₂PO₄ 200 μL, H₂O 200 μL, 混合均匀。30 s 后加入 10% TCA 溶液 400 μL、44% H₃PO₄ 400 μL、4% 2,2-二联吡啶 400 μL、3% FeCl₃ 200 μL, 混匀后在 37 °C 水浴中保温 60 min, 测 525 nm 处的 OD 值。根据标准曲线计算样品中 AsA 的含量。

GSH 含量用巯基试剂 DTNB 测定(Anderson 1985), 并稍作修改。分别吸取上清液 0.25 mL, 各加入 150 mmol/L NaH₂PO₄ (pH 7.7) 2.6 mL, DTNB 试剂 0.15 mL, 磷酸缓冲液代替 DTNB 试剂作空白对照。摇匀后, 30 °C 保温 5 min, 测 412 nm 处的 OD 值。根据标准曲线计算样品的 GSH 含量。

AsA 和 GSH 含量用 μg/g FW 表示。

1.3.3 生物量和黑色素含量测定

将液体培养收获的菌丝体置于 50 °C, 72 h 烘干, 称量干重, 统计真菌生物量。

黑色素含量测定采用 Zou *et al.* (2010)的方法稍作修改。将烘干的菌丝研磨成粉末, 移至离心管中, 用 5 mL 蒸馏水洗涤 5 min, 8 000 r/min 离心 10 min, 去除上清液, 将沉淀重新悬浮在 6 mol/L NaOH 中, pH 12。将混合物在 50 °C 下超声作用 24 h (40 kHz, 250 W), 8 000 r/min 离心 15 min。用 8 mol/L 盐酸将上清液酸化至 pH 2 以沉淀黑色素, 10 000 r/min 离心 20 min, 弃去上清液。用氯仿洗涤黑色素, 去除多余油脂, 用 0.1 mol/L NaOH 溶解黑色素, 测定 400 nm 处的 OD

值, 0.1 mol/L NaOH 作为空白对照。通过标准曲线计算黑色素含量。黑色素含量用 mg/g 表示。

1.4 数据处理和分析

使用 Microsoft Excel 2019 数据统计分析软件对原始数据进行整理。使用 IBM SPSS statistics 25.0 进行数据的显著性分析。单样本 *T* 检验 (one-sample *T*-test)用于检测同一 Zn 浓度处理下试验参数的平均值和标准偏差。单因素方差分析 (One-way ANOVA)中的邓肯检验(Duncan’s test, *P*<0.05)用于检测不同 Zn 处理之间试验参数显著差异性。使用 Origin 2018 作图软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 Zn 对彩色豆马勃生长和生物量的影响

2.1.1 Zn 对彩色豆马勃生长抑制率的确定

接种 34 d 后, 彩色豆马勃在不同 Zn 浓度处

理下均能生长, 但是随着 Zn 浓度的增加, 彩色豆马勃的菌落直径逐渐减小(图 1), 对其生长的抑制作用逐渐增强(表 1)。与对照组相比, 不同 Zn 浓度处理下菌落直径差异显著(*P*<0.05), 当 Zn 浓度为 600 μmol/L 时, 彩色豆马勃的生长受到显著抑制(*P*<0.05), 20 d 时抑制率为 46.15%, 27 d 时抑制率提高到 51.84%, 随后趋于稳定, 34 d 时抑制率为 52.58%; 当 Zn 浓度提高到 800 μmol/L 和 1 000 μmol/L, 20 d 时 Zn 胁迫对彩色豆马勃的生长抑制率分别为 53.15%和 54.2%, 27 d 时提高到 56.91%和 61.98%, 34 d 时 800 μmol/L Zn 处理下, 抑制率维持在 55.95%, 而 1 000 μmol/L Zn 处理下, 则提高至 63.1%。由此说明, 高浓度 Zn 对彩色豆马勃的金属抑制率较高, 而较低浓度 Zn 处理之间的金属抑制率无显著差异。

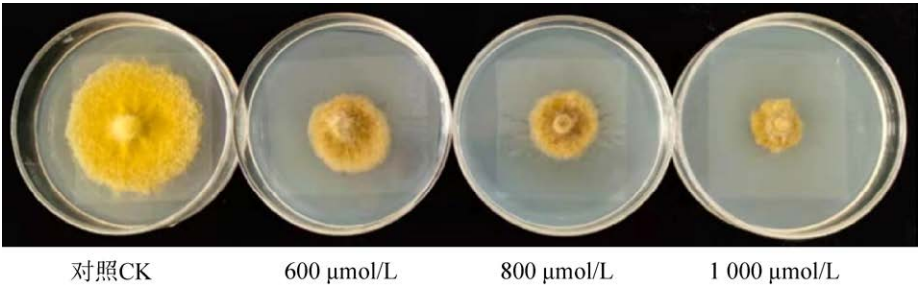


图 1 Zn 处理对 *Pisolithus tinctorius* 生长的影响
Fig. 1 Effects of Zn treatment on the growth of *Pisolithus tinctorius*.

表 1 Zn 对 *Pisolithus tinctorius* 直径的影响

Table 1 Effects of Zn on the diameter of *Pisolithus tinctorius* colony

Zn 浓度 Zn concentration (μmol/L)	直径 Diameter (cm)			抑制率 Inhibition rate (%)		
	20 d	27 d	34 d	20 d	27 d	34 d
0	2.86±0.27a	4.34±0.33a	5.04±0.40a			
600	1.54±0.30b	2.09±0.74b	2.39±0.78b	46.15±10.94b	51.84±17.92a	52.58±16.30b
800	1.34±0.19c	1.87±0.34c	2.22±0.50c	53.15±8.52ab	56.91±8.00a	55.95±11.62ab
1 000	1.31±0.31c	1.65±0.52d	1.86±0.55d	54.2±12.57a	61.98±12.33a	63.10±11.85a

注: 同一列中的不同字母表示不同 Zn 浓度间菌株直径差异显著. 直径: $F_{20d}=128.974$, $P_{20d}=0.000$; $F_{27d}=106.783$, $P_{27d}=0.000$; $F_{34d}=114.754$, $P_{34d}=0.000$. 抑制率: $F_{20d}=4.23$, $P_{20d}=0.02$; $F_{27d}=2.601$, $P_{27d}=0.084$; $F_{34d}=3.956$, $P_{34d}=0.025$
Note: Different letters in the same column indicate significant differences in colony diameters between treatments of different Zn concentrations. Diameter: $F_{20d}=128.974$, $P_{20d}=0.000$; $F_{27d}=106.783$, $P_{27d}=0.000$; $F_{34d}=114.754$, $P_{34d}=0.000$. Inhibition rate: $F_{20d}=4.23$, $P_{20d}=0.02$; $F_{27d}=2.601$, $P_{27d}=0.084$; $F_{34d}=3.956$, $P_{34d}=0.025$.

根据 34 d 时不同 Zn 浓度处理下的金属抑制率绘制 Zn 作用的量效关系曲线(图 2),随着 Zn 浓度的增加,金属抑制率先上升而后逐渐趋于平缓。当 Zn 浓度为 563 $\mu\text{mol/L}$ 时,抑制率为 50%,此时达到 Zn 对彩色豆马勃的半数最大抑制浓度(IC_{50})。当 Zn 浓度小于等于 451 $\mu\text{mol/L}$ 时, Zn 对彩色豆马勃的生长不产生抑制作用,说明此时 Zn 可能作为营养元素,参与彩色豆马勃的生长。

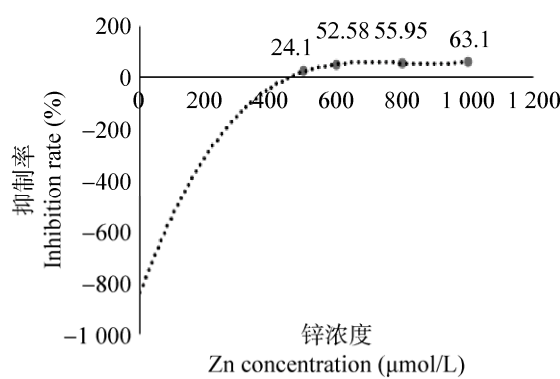


图 2 Zn 作用的量效关系曲线
Fig. 2 Dose-effect curve of Zn action.

2.1.2 Zn 对彩色豆马勃生长速率和生物量的影响

随着 Zn 浓度的增加,20–27 d 时,彩色豆马勃的生长速率呈下降的趋势,但在 27–34 d 时,生长速率无显著差异(图 3,表 2)。在对照组中,20–27 d 和 27–34 d 时,彩色豆马勃生长速率分别为 52.37%和 16.28%。当 Zn 浓度为 600 $\mu\text{mol/L}$ 和 800 $\mu\text{mol/L}$ 时,20–27 d 的生长速率分别为 35.41%和 40.12%,27–34 d 时下降到 12.34%和 17.99%。当 Zn 浓度为 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 时,生长速率分别为 20–27 d 时的 32.80%和 27–34 d 时的 15.10% (表 2)。说明高浓度的 Zn 对彩色豆马勃生长的影响较大。而在低浓度 Zn 处理下,培养基中有限的营养可能更大程度地限制了彩色豆马勃的生长。

采用 600 $\mu\text{mol/L}$ 测定 Zn 对彩色豆马勃菌丝干重的影响,分析彩色豆马勃生物量的变化

(表 3)。发现 Zn 胁迫显著降低了彩色豆马勃的生物量($P<0.05$),与对照相比生物量降低 42.6%。

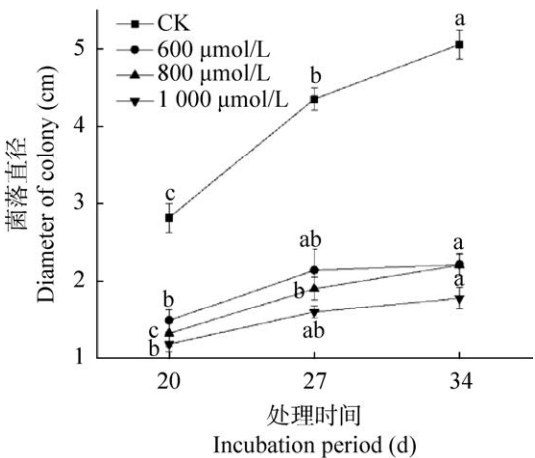


图 3 *Pisolithus tinctorius* 生长曲线
Fig. 3 The growth curve of *Pisolithus tinctorius*.

表 2 Zn 对 *Pisolithus tinctorius* 生长速率的影响
Table 2 Effects of Zn on the growth rate of *Pisolithus tinctorius*

Zn 浓度 Zn concentration ($\mu\text{mol/L}$)	生长速率 Growth rate (%)	
	20–27 d	27–34 d
0	52.37 $\pm$ 0.08a	16.28 $\pm$ 0.05a
600	35.41 $\pm$ 0.14b	12.34 $\pm$ 0.08a
800	40.12 $\pm$ 0.22ab	17.99 $\pm$ 0.11a
1 000	32.80 $\pm$ 0.11b	15.10 $\pm$ 0.13a

注:同一列中的不同字母表示不同 Zn 浓度间生长速率差异显著。 $F_{20-27\text{ d}}=5.897$, $P_{20-27\text{ d}}=0.001$; $F_{27-34\text{ d}}=0.945$, $P_{27-34\text{ d}}=0.424$
Note: Different letters in the same column indicate that the growth rate is significantly different between treatments of different Zn concentrations. $F_{20-27\text{ d}}=5.897$, $P_{20-27\text{ d}}=0.001$; $F_{27-34\text{ d}}=0.945$, $P_{27-34\text{ d}}=0.424$.

表 3 Zn 对 *Pisolithus tinctorius* 生物量的影响
Table 3 Effects of Zn on the mycelium biomass of *Pisolithus tinctorius*

Zn 浓度 Zn concentration ($\mu\text{mol/L}$)	生物量 Biomass (g)
0	0.12 $\pm$ 0.018 7a
600	0.07 $\pm$ 0.002 9b

注:同一列中的不同字母表示不同 Zn 浓度间菌丝体生物量差异显著。 $F=18.530$, $P=0.004$
Note: Different letters in the same column indicate significant differences in mycelial biomass between treatments of different Zn concentrations. $F=18.530$, $P=0.004$.

2.2 Zn 在彩色豆马勃中的亚细胞分布

彩色豆马勃各亚细胞组分中 Zn 含量比例总体表现为细胞壁组分(F1)>核蛋白和可溶性组分(F4)>以细胞核为主的组分(F2)>线粒体和叶绿体组分(F3) (图 4)。对照组中, Zn 在各亚细胞组分中比例分别为 F1: 39.97%、F4: 29.86%、F2: 20.00%和 F3: 10.17%。Zn 胁迫下,各组分中 Zn 含量的比例差异显著($P<0.05$), 表现为细胞壁组分中含量最高(83.45%), 与对照组相比, 增加 43.48%; 核蛋白和可溶性组分以及细胞核组分含量比例分别为 12.70%和 2.71%; 线粒体和叶绿体组分中含量最少, 仅为 1.14%。说明彩色豆马勃中的 Zn 绝大多数贮存在细胞壁组分中, 少部分储存在胞质和液泡中。Zn 胁迫显著提高了彩色豆马勃细胞壁组分中的 Zn 含量, Zn 在细胞核、线粒体和叶绿体等细胞器中含量很少。

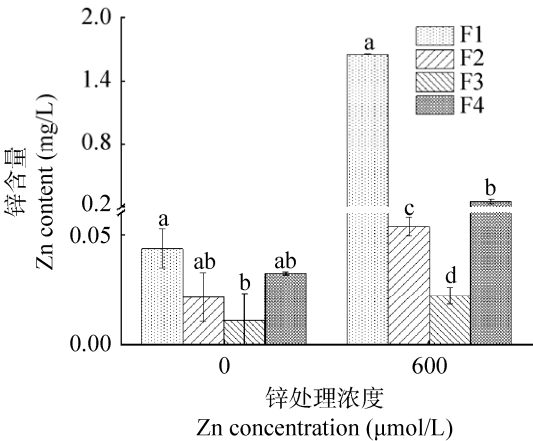


图 4 *Pisolithus tinctorius* 中 Zn 的亚细胞分布 F1: 细胞壁及未破碎残渣组分; F2: 以细胞核为主的组分; F3: 线粒体和叶绿体组分; F4: 核蛋白和可溶性组分. $F_0=4.459$, $P_0=0.04$; $F_{600}=11\ 040.285$, $P_{600}=0.000$
Fig. 4 The subcellular distribution of Zn in *Pisolithus tinctorius*. F1: The cell wall and unbroken residue component; F2: The nucleus-based component; F3: The mitochondrial and chloroplast component; F4: The nuclear protein and soluble component. $F_0=4.459$, $P_0=0.04$; $F_{600}=11\ 040.285$, $P_{600}=0.000$.

2.3 Zn 在彩色豆马勃中的活性形态

根据溶剂极性从小到大, 依次提取以硝酸盐、氯化物为主的无机盐和氨基酸盐(FE)、水溶性有机酸盐和一代磷酸盐(FW)、果胶酸盐以及与蛋白质呈结合态或呈吸着态(FNaCl)、难溶于水的重金属磷酸盐(FHAc)和草酸盐(FHCl)等形态的 Zn。

在对照组中, 不同活性形态 Zn 的比例为: FHCl>FNaCl>FE>FW>FHAc, 主要以活性最低的 FHCl 提取态(45.67%)存在, 其次是活性较低的 FNaCl (22.24%)和活性最高的 FE 提取态 (16.69%), FW 和 FHAc 提取态的 Zn 含量最少, 分别为 8.12%和 7.28%。Zn 胁迫下, 彩色豆马勃各活性形态比例总体表现为: FNaCl>FE>FHAc>FHCl>FW, 含量比例分别为 FNaCl 33.53%、FE 24.93%、FHAc 18.17%、FHCl 18.10%和 FW 5.27% (图 5)。说明在 Zn 胁迫下, 彩色豆马勃中 Zn 主要以活性较低的聚合物的形式存

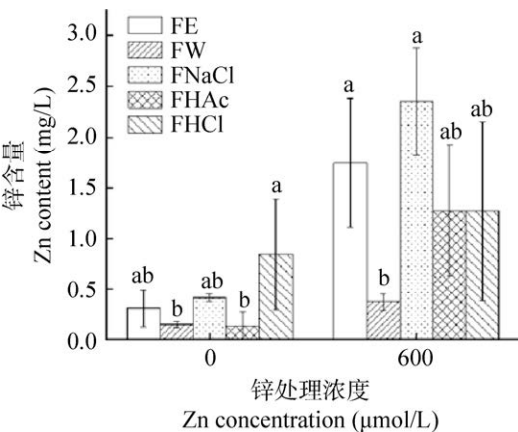


图 5 *Pisolithus tinctorius* 中 Zn 的活性形态 FE: 乙醇提取态; FW: 去离子水提取态; FNaCl: 氯化钠提取态; FHAc: 醋酸提取态; FHCl: 盐酸提取态. $F_0=3.526$, $P_0=0.048$; $F_{600}=4.181$, $P_{600}=0.03$
Fig. 5 Active form of Zn in *Pisolithus tinctorius*. FE: Ethanol extraction state; FW: Deionized water extraction state; FNaCl: Sodium chloride extraction state; FHAc: Acetic acid extraction state; FHCl: Hydrochloric acid extraction state. $F_0=3.526$, $P_0=0.048$; $F_{600}=4.181$, $P_{600}=0.03$.

在, 活性较高的离子态含量较少。

与对照组相比, 活性较低的 FNaCl 和 FHAc 提取态的 Zn 含量增加, 分别增加 11.29% 和 10.89%, 但同时, 活性最高的 FE 提取态的 Zn 含量也增加 8.23%, FHCl 和 FW 提取态含量下降, 分别下降 27.56% 和 2.86%。说明 Zn 胁迫改变了 Zn 在彩色豆马勃中的存在形式, 贮藏在细胞中的 Zn 从活性最低的 FHCl 提取态转变为活性较低的 FNaCl 提取态, 但是活性最高的 FE 提取态含量仍有升高。

2.4 Zn 对彩色豆马勃 SOD、CAT 和 POD 活性的影响

Zn 胁迫时, 彩色豆马勃中的 Zn 主要以结合态或吸附态的形式存在, 但仍有部分游离 Zn^{2+} (FE 提取态: 24.93%; FW 提取态: 5.27%) 存在于胞质中, 造成氧化损伤。Zn 胁迫显著提高彩色豆马勃 SOD、CAT 和 POD 活性($P<0.05$) (表 4)。

与对照组相比, SOD 活性升高 101.76%, CAT 活性升高 331.1%, POD 活性升高 70.68%。表明彩色豆马勃可以通过提高抗氧化酶活性, 清除体内活性氧(ROS) (冯欢等 2017), 缓解 Zn 毒害。

2.5 Zn 对彩色豆马勃 GSH、AsA 和黑色素含量的影响

Zn 胁迫时, 彩色豆马勃中抗氧化物质含量有所增加。其中黑色素和谷胱甘肽(GSH)含量显著增加($P<0.05$), 而抗坏血酸(AsA)含量较对照组无明显差异(表 5)。与对照组相比, 黑色素含量增幅为 214.9%, GSH 含量较对照组增加 56.65%。同一浓度下, AsA 含量均高于 GSH 含量, 表明彩色豆马勃中 AsA 始终处于一个相对较高的水平维持体内的氧化平衡。说明 Zn 胁迫同时上调抗氧化剂类物质含量和金属螯合剂类物质含量, 参与 Zn 的固定和解毒, 增强真菌的耐重金属能力。

表 4 Zn 对 *Pisolithus tinctorius* 抗氧化酶活性的影响

Table 4 Effects of Zn on the antioxidant enzyme activities of *Pisolithus tinctorius*

Zn 浓度 Zn concentration ($\mu\text{mol/L}$)	SOD (U/g FW)	POD (U/g FW·min)	CAT (U/g FW·min)
0	2 466.61 $\pm$ 233.93a	55.79 $\pm$ 4.07a	14.31 $\pm$ 6.89a
600	4 976.58 $\pm$ 736.71b	95.22 $\pm$ 11.47b	61.69 $\pm$ 12.10b

注: SOD: 超氧化物歧化酶; POD: 过氧化物酶; CAT: 过氧化氢酶。同一列中的不同字母表示不同 Zn 浓度间菌丝体抗氧化酶活性差异极显著。 $F_{\text{SOD}}=23.125$, $P_{\text{SOD}}=0.005$; $F_{\text{CAT}}=26.445$, $P_{\text{CAT}}=0.004$; $F_{\text{POD}}=23.141$, $P_{\text{POD}}=0.005$

Note: SOD: Superoxide dismutase; POD: Peroxidase; CAT: Catalase. The different letters in the same column indicate that the mycelial antioxidant enzyme activity differs significantly between treatments of different Zn concentrations. $F_{\text{SOD}}=23.125$, $P_{\text{SOD}}=0.005$; $F_{\text{CAT}}=26.445$, $P_{\text{CAT}}=0.004$; $F_{\text{POD}}=23.141$, $P_{\text{POD}}=0.005$.

表 5 Zn 对 *Pisolithus tinctorius* 抗氧化物含量的影响

Table 5 Effects of Zn on the antioxidant content of *Pisolithus tinctorius*

Zn 浓度 Zn concentration ($\mu\text{mol/L}$)	AsA ($\mu\text{g/g FW}$)	GSH ($\mu\text{g/g FW}$)	黑色素 Melanin (mg/g)
0	39.46 $\pm$ 12.25a	1.43 $\pm$ 0.29a	39.79 $\pm$ 8.70a
600	68.56 $\pm$ 22.02a	2.24 $\pm$ 0.33b	125.30 $\pm$ 7.96b

注: AsA: 抗坏血酸; GSH: 谷胱甘肽。同一列中的不同字母表示不同 Zn 浓度间菌丝体抗氧化物含量差异极显著。 $F_{\text{AsA}}=5.179$, $P_{\text{AsA}}=0.072$; $F_{\text{GSH}}=13.402$, $P_{\text{GSH}}=0.006$; $F_{\text{黑}}=130.485$, $P_{\text{黑}}=0.000$

Note: AsA: Ascorbic acid; GSH: Glutathione. Different letters in the same column indicate that the anti-oxidant content of mycelium varies significantly between treatments of different Zn concentrations. $F_{\text{AsA}}=5.179$, $P_{\text{AsA}}=0.072$; $F_{\text{GSH}}=13.402$, $P_{\text{GSH}}=0.006$; $F_{\text{Melanin}}=130.485$, $P_{\text{Melanin}}=0.000$.

3 讨论

3.1 Zn 在彩色豆马勃中以低毒性化学形态存在

Zn 的化学形态关系到 Zn 在真菌中的活性(Xu *et al.* 2011)、毒性(Wang *et al.* 2008)和迁移能力(Wang *et al.* 2012)等。由于金属在不同提取剂中的溶解度有很大差别,故不同提取剂中的提取量反映了重金属的存在形态,随着提取溶剂极性的增强,提取出的 Zn 的活性不断降低,与真菌基质的结合程度越来越紧密。

在本研究中,彩色豆马勃 *Pisolithus tinctorius* 吸收的 Zn 均主要以较低活性形态存在。与对照相比,锌胁迫降低了草酸盐形态的含量,提高了磷酸盐、果胶酸盐以及与蛋白质呈结合态或吸附态的形态的含量。Zhan *et al.* (2015)通过傅里叶变换红外光谱(FTIR)分析,发现镉(Cd)胁迫下嗜鱼外瓶霉 *Exophiala pisciphila* 菌丝中镉-磷酸络合物是主要存在的化学形式,且随着 Cd 浓度的增加这种络合物的比例增加,指出羟基、胺、羧基和磷酸基团与 Cd 结合有关。Teng *et al.* (2018)发现 Zn 过量时青霉菌 *Penicillium* sp. 细胞中非活性形态 Zn 的比例较高,与本研究结果一致。说明真菌可通过特定的金属络合蛋白、有机酸根或无机酸根离子与金属形成晶体或沉淀,使金属从高毒性化学形态转化到低毒性化学形态,达到耐受重金属的目的。

3.2 Zn 主要存在于彩色豆马勃细胞壁组分中

在本研究中,Zn 胁迫下,彩色豆马勃中的 Zn 主要分布在细胞壁和以液泡为主的可溶性组分中,可能是细胞壁上大量的黑色素对 Zn 的固定(Eisenman & Casadevall 2012)以及液泡的区室化降低了 Zn 对其生长的毒害。Teng *et al.* (2018)发现随着 Zn 浓度增加,青霉菌 *Penicillium* sp. 细胞壁和可溶性组分中 Zn 含量增加。不仅如此, Li *et al.* (2019)研究发现当茶树菇 *Agrocybe*

aegerita 子实体中 Cd 积累量较低时, Cd 主要存在于可溶性细胞组分中;随着子实体中 Cd 积累量的增加,细胞壁中 Cd 的比例增加,而在可溶性部分中呈现下降的趋势。表明细胞壁在真菌耐受高浓度重金属中起关键作用,与本研究结果一致。然而,李勇等(2004)研究发现,彩色豆马勃和土生空团菌 *Cenocuccum geophilum* 将大部分的汞(Hg^{2+})吸收进细胞内,而少部分的 Hg^{2+} 吸附于胞外,这与本研究结果不同,原因可能是菌根真菌对不同金属离子的吸收和转运机制不同。因此,本研究表明菌根真菌对金属的耐受性和解毒,可能与金属亚细胞分布的限制和化学结构的改变相关。

3.3 Zn 胁迫显著提高抗氧化酶活性和抗氧化物质含量

GSH 和 AsA 可以在细胞内形成抗坏血酸-谷胱甘肽循环系统,通过维持细胞的氧化还原平衡进而减轻金属离子的毒害(Aravind & Prasad 2005)。在本研究中,Zn 胁迫显著提高了 POD、CAT 和 SOD 的活性,尤其是 CAT 和 SOD 的活性。表明 CAT 和 SOD 主要参与逆境中的氧化应激(张钰和唐明 2021),并且在体内形成活性氧清除循环系统,在自由基的清除中发挥重要作用(冯欢等 2017)。在本研究中,Zn 胁迫下,GSH 和黑色素含量显著增加,GSH 更多作为一种重要的金属螯合剂(Ha *et al.* 1999),参与细胞中 Zn 的固存;真菌中产生的黑色素也具有抗氧化的功能(de Cássia R Goncalves & Pombeiro-Sponchiado 2005),在一定程度上帮助真菌在重金属污染的环境中生存(Butler *et al.* 2001)。表明菌根真菌中抗氧化酶和抗氧化剂在减缓重金属毒性方面的重要作用。

综上所述,Zn 胁迫下,彩色豆马勃中的 Zn 主要以草酸盐、难溶于水的磷酸盐、果胶酸盐以及与蛋白质呈结合态或吸附态的低活性形式存在;彩色豆马勃中大部分 Zn 固定在细胞壁组分上,少部分贮藏在以液泡为主的可溶性组分中;

Zn 胁迫显著提高与耐受重金属相关的抗氧化酶 (CAT、POD 和 SOD) 活性, 显著提高 GSH 和黑色素等抗氧化物质含量。ECMF 还可活化一系列土壤酶, 增加土壤中营养元素的含量; ECMF 也被用于辅助超积累植物提取金属元素, 对重金属污染土壤的改良发挥着相比单一的植物修复更为有效的作用, 具有更大的修复潜力。因此, 了解菌根真菌中重金属解毒的耐受性机制对土壤修复、矿区造林以及生态保护具有重大意义。

[REFERENCES]

- Anderson ME, 1985. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in Enzymology*, 113: 548-555
- Aravind P, Prasad MNV, 2005. Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate-glutathione cycle and glutathione metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(2): 107-116
- Ban YH, Tang M, Chen H, Xu ZY, Zhang HH, Yang YR, 2012. The response of dark septate endophytes (DSE) to heavy metals in pure culture. *PLoS One*, 7(10): e47968
- Bano SA, Ashfaq D, 2013. Role of mycorrhiza to reduce heavy metal stress. *Natural Science*, 5(12): 16-20
- Beers RF Jr, Sizer IW, 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 195(1): 133-140
- Broadley MR, White PJ, Hammond JP, Zelko I, Lux A, 2007. Zinc in plants. *New Phytologist*, 173(4): 677-702
- Butler MJ, Day AW, Henson JM, Money NP, 2001. Pathogenic properties of fungal melanins. *Mycologia*, 93(1): 1-8
- Canton GC, Bertolazi AA, Cogo AJD, Eutrópico FJ, Melo J, de Souza SB, Krohling CA, Campostrini E, da Silva AG, Façanha AR, Sepúlveda N, Cruz C, Ramos AC, 2016. Biochemical and ecophysiological responses to manganese stress by ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* and in association with *Eucalyptus grandis*. *Mycorrhiza*, 26(5): 475-487
- Chen BD, Sun YQ, Zhang X, Wu SL, 2015. Underlying mechanisms of the heavy metal tolerance of mycorrhizal fungi. *Environmental Science*, 36(3): 1123-1132 (in Chinese)
- de Cássia R Gonçalves R, Pombeiro-Sponchiado SR, 2005. Antioxidant activity of the melanin pigment extracted from *Aspergillus nidulans*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(6): 1129-1131
- Eisenman HC, Casadevall A, 2012. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3): 931-940
- Feng H, Dou Q, Wang HH, Yang C, Xie QZ, Liu Y, Wang CY, 2017. Lead tolerance of two ectomycorrhizal fungi and related mechanisms. *Journal of Northwest Forestry University*, 32(2): 188-196 (in Chinese)
- Fu XP, Dou CM, Chen YX, Chen XC, Shi JY, Yu MG, Xu J, 2011. Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *Phytolacca americana* L. *Journal of Hazardous Materials*, 186(1): 103-107
- Galli U, Schüepp H, Brunold C, 1994. Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiologia Plantarum*, 92(2): 364-368
- Gruhn CM, Miller OK Jr, 1991. Effect of copper on tyrosinase activity and polyamine content of some ectomycorrhizal fungi. *Mycological Research*, 95(3): 268-272
- Ha SB, Smith AP, Howden R, Dietrich WM, Bugg S, O'Connell MJ, Goldsbrough PB, Cobbett CS, 1999. Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *The Plant Cell*, 11(6): 1153-1163
- Hall JL, 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53(366): 1-11
- Hou M, Hu CJ, Xiong L, Lu C, 2013. Tissue accumulation and subcellular distribution of vanadium in *Brassica juncea* and *Brassica chinensis*. *Microchemical Journal*, 110: 575-578
- Hou LF, Yu J, Zhao LL, He XL, 2020. Dark septate endophytes improve the growth and the tolerance of *Medicago sativa* and *Ammopiptanthus mongolicus* under cadmium stress. *Frontiers in Microbiology*, 10: 3061
- Jiang YN, Gu XR, Zhou Q, Jia H, 2019. Organic acid secretion and aluminum absorption kinetics by *Lactarius deliciosus* and *Pisolithus tinctorius* under aluminum stress. *Chinese Journal of Ecology*, 38(11): 3441-3449 (in Chinese)
- Kampfenkel K, Vanmontagu, Inze D, 1995. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Analytical Biochemistry*, 225(1): 165-167
- Khullar S, Reddy MS, 2019. Cadmium and arsenic responses in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* glutathione metabolism and its role in metal (loid) homeostasis. *Environmental Microbiology Reports*, 11(2): 53-61
- Khullar S, Reddy MS, 2020. Arsenic toxicity and its mitigation in ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* through glutathione biosynthesis. *Chemosphere*, 240:

124914

- Li XD, Ma H, Li LL, Gao YF, Li YZ, Xu H, 2019. Subcellular distribution, chemical forms and physiological responses involved in cadmium tolerance and detoxification in *Agrocybe aegerita*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 171: 66-74
- Li Y, Yuan L, Gao ZH, Huang JG, 2004. Kinetics of Hg^{++} absorption by ectomycorrhizal fungi. *Mycosystema*, 23(1): 139-143 (in Chinese)
- Likar M, Regvar M, 2013. Isolates of dark septate endophytes reduce metal uptake and improve physiology of *Salix caprea* L. *Plant and Soil*, 370(1): 593-604
- Liu YG, Zhou N, Fan T, He YC, Lv ZJ, Guo S, Liu L, Xia WB, 2009. Screen of resistant fungus with copper (II) and zinc (II) ions and study on the characteristics of biosorption. *Journal of Hunan University (Natural Sciences Edition)*, 36(2): 80-84 (in Chinese)
- Luo ZB, Wu CH, Zhang C, Li H, Lipka U, Polle A, 2014. The role of ectomycorrhizas in heavy metal stress tolerance of host plants. *Environmental and Experimental Botany*, 108: 47-62
- Marx DH, 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*, 59: 153-163
- Peng JT, Yuan L, Huang JG, 2010. Effects of Hg on activities of nitrogen utilizing enzymes in ectomycorrhizal fungi. *Mycosystema*, 29(3): 414-420 (in Chinese)
- Shi L, Dong PC, Song WY, Li CX, Lu HN, Wen ZG, Wang CC, Shen ZG, Chen YH, 2020. Comparative transcriptomic analysis reveals novel insights into the response to Cr (VI) exposure in Cr (VI) tolerant ectomycorrhizal fungi *Pisolithus* sp. 1 LS-2017. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 188: 109935
- Teng Y, Du XZ, Wang T, Mi CY, Yu HY, Zou LY, 2018. Isolation of a fungus *Penicillium* sp. with zinc tolerance and its mechanism of resistance. *Archives of Microbiology*, 200(1): 159-169
- Wang X, Liu YG, Zeng GM, Chai LY, Song XC, Min ZY, Xiao X, 2008. Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *Bechmeria nivea* (L.) Gaud. *Environmental and Experimental Botany*, 62(3): 389-395
- Wang YP, Huang J, Gao YZ, 2012. Arbuscular mycorrhizal colonization alters subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *Medicago sativa* L. and resists cadmium toxicity. *PLoS One*, 7(11): e48669
- Wen ZG, Wang J, Tang YZ, Shi L, Hong LZ, Shen ZG, Chen YH, 2017. The application potential of ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* assisting plant in phytoremediation of Cu-contaminated soil. *Biotechnology Bulletin*, 33(4): 149-156 (in Chinese)
- Xu J, Yin HX, Li YL, Liu XJ, 2010. Nitric oxide is associated with long-term zinc tolerance in *Solanum nigrum*. *Plant Physiology*, 154(3): 1319-1334
- Xu WF, Shi WM, Yan F, Zhang B, Liang JS, 2011. Mechanisms of cadmium detoxification in cattail (*Typha angustifolia* L.). *Aquatic Botany*, 94(1): 37-43
- Zhan FD, He YM, Li Y, Li T, Yang YY, Toor GS, Zhao ZW, 2015. Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in a dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*. *Environmental Science and Pollution Research International*, 22(22): 17897-17905
- Zhang Y, Tang M, 2021. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on biomass and disease-resistance enzyme activities of Cathay poplar against canker. *Mycosystema*, 40(5): 1110-1122 (in Chinese)
- Zhu ZJ, Wei GQ, Li J, Qian QQ, Yu JQ, 2004. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Science*, 167(3): 527-533
- Zou Y, Xie CY, Fan GJ, Gu ZX, Han YB, 2010. Optimization of ultrasound-assisted extraction of melanin from *Auricularia auricula* fruit bodies. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(4): 611-615

[附中文参考文献]

- 陈保冬, 孙玉青, 张莘, 伍松林, 2015. 菌根真菌重金属耐受机制研究进展. *环境科学*, 36(3): 1123-1132
- 冯欢, 豆青, 王海华, 杨超, 谢清哲, 刘莹, 王春燕, 2017. 2 种外生菌根真菌的铅耐受性及相关机制. *西北林学院学报*, 32(2): 188-196
- 江亚男, 辜夕容, 周倩, 贾豪, 2019. 铝胁迫下两种外生菌根真菌的有机酸分泌与吸收动力学特征. *生态学杂志*, 38(11): 3441-3449
- 李勇, 袁玲, 高中慧, 黄建国, 2004. 外生菌根真菌吸收汞的动力学. *菌物学报*, 23(1): 139-143
- 刘云国, 周娜, 樊霆, 何义超, 吕志江, 郭帅, 刘来, 夏文斌, 2009. 铜、锌离子抗性菌筛选及重金属作用下富集特性研究. *湖南大学学报(自然科学版)*, 36(2): 80-84
- 彭剑涛, 袁玲, 黄建国, 2010. 汞对外生菌根真菌氮素利用酶活性的影响. *菌物学报*, 29(3): 414-420
- 温祝桂, 王杰, 汤阳泽, 史良, 洪立洲, 沈振国, 陈亚华, 2017. 外生菌根真菌彩色豆马勃(*Pisolithus tinctorius*)辅助植物修复重金属 Cu 污染土壤的应用潜力. *生物技术通报*, 33(4): 149-156
- 张钰, 唐明, 2021. 丛枝菌根真菌对青杨抗溃疡病生物量和抗病酶活性的影响. *菌物学报*, 40(5): 1110-1122