重金属矿区深色有隔内生真菌资源及其生态学功能

赵之伟*, 李涛

云南大学省部共建云南生物资源保护与利用国家重点实验室, 昆明 650091

* 联系人, E-mail: zhaozhw@ynu.edu.cn

收稿日期: 2019-04-28; 接受日期: 2019-05-26; 网络版发表日期: 2019-07-02

云南省科技厅-云南大学联合基金重点项目(批准号: 2018FY001-010)资助

深色有隔内生真菌(dark septate endophyte, DSE)不是一个分类学单元, 而是专指一类定殖于植物根内, 在根细胞间隙和细胞内形成颜色较深、有横隔的菌丝以及成堆的厚壁细胞组成的微菌核(microsclerotium)为形态学特征的根内生真菌(图1)。DSE的分类鉴定与其他真菌一样, 基本上以形态学为基础, 但是一些DSE菌株在纯培养条件下不产孢子, 即使采用不同的诱导促孢培养也不易产孢子, 这给DSE的分类鉴定带来了很大的困难。分子系统学的兴起给这些难于借助形态学进行分类鉴定的真菌找到了新方法。基于形态学和分子系统学方法, 目前绝大多数已知的DSE真菌被鉴定在子囊菌门的柔膜菌目(Helotiales)、垂舌菌目(Leotiales)、盘菌目(Pezizales)和格孢菌目(Pleosporales)等目中。常见的DSE真菌有以下一些分类单元: *Cryptosporiopsis*, *Chloridium*, *Exophiala*, *Heteroconium*, *Leptodontidium*, *Microdochium*, *Oidiodendron*, *Periconia*, *Phialocephala*, *Phialophora*, *Scytalidium*, *Trichocladium* 等属的真菌, 其中以分布于北温带林下形成优势菌的 *Phialocephala fortinii* 和 *Phialophora finlandica* 研究报道最多。

DSE在植物根系上定殖后并不引起植物病征, 几乎所有维管束植物的各分类群都有DSE在根系上定

殖, DSE的这些特点, 与丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)相似, AMF也没有宿主专一性, 陆生植物90%以上的科都能与AMF形成丛枝菌根(arbuscular mycorrhiza, AM)。但是, AMF是在起源和亲缘关系都很近的一类真菌, 在分类学上现已独立为一个门, 即球囊霉门(Glomeromycota), 与接合菌门、子囊菌门和担子菌门并列在真菌界下^[2]。目前的研究认为AM是一类古老的共生现象, 其起源可追溯到泥盆纪, 在植物从水生到陆生的演化过程中起到了重要作用^[3], AMF在与植物的共进化的过程中与植物逐渐形成了更加紧密的关系, 例如AMF进化成为一类专性生物活体营养的真菌(至今不能对其进行纯培养), 一些与植物营养相关的基因, 如磷酸盐转运蛋白家族的某些基因必须要有AMF在根上定殖才能表达^[4,5]。从真菌界中几个门的起源、分化时间上看, 属于子囊菌门的DSE在植物根上的定殖起源显然比AMF要晚, 而且从多样的DSE真菌和宿主植物看, DSE应是一个多起源的现象, DSE可以营腐生营养(绝大多数DSE可以进行纯培养), 也可以在植物根内营活体营养。从生态学功能上讲, 目前AMF表现出来的生态学功能在DSE中差不多都有报道, DSE与AMF的进化似乎表现出了趋同现象。但是, 在自然条件下, DSE的宿主植物范围比AMF更为广泛,

引用格式: 赵之伟, 李涛. 重金属矿区深色有隔内生真菌资源及其生态学功能. 中国科学: 生命科学, 2019, 49: 921–926
Zhao Z W, Li T. Dark septate endophytes and their ecological function in metal mining areas (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2019, 49: 921–926, doi: 10.1360/SSV-2019-0093

图 1 重金属污染区植物根样中的DSE各种形态. A: 星毛繁缕根样中的微菌核; B: 车前草根样中浅色菌丝膨大和微菌核; C: 车前草根样中微菌核; D: 匍匐风轮菜根样中浅色微菌核; E: 白花三叶草根样中脑状微菌核; F: 车前草根样中菌丝和微菌核; G: 南黄瑾根样中的深色微菌核; H: 溪生苔草根样中的带状微菌核. 标尺=30 μm ^[1]

Figure 1 Morphologic characteristics of DSE in the plant roots grown in the metal-polluted area. A: The microsclerotia in the roots of *Stellaria vestita*; B: the hyphal swellings and microsclerotia in the roots of *Plantago asiatica*; C: the microsclerotia in the roots of *Plantago asiatica*; D: the hyaline microsclerotia in the roots of *Clinopodium repens*; E: the brain-like microsclerotia in the roots of *Trifolium repens*; F: the hyphae and microsclerotia in the roots of *Plantago asiatica*; G: the melanized microsclerotia in the roots of *Corydalis davidii*; H: the bands of microsclerotia in the roots of *Carex fluvialis*. Bar=30 μm ^[1]

一些在自然界中没有AMF定殖的所谓“非菌根”植物也常被发现其根系上有DSE定殖^[6]。已有的研究发现, DSE几乎分布于全球所有的生态系统中, 特别是在一些极端的生态环境, 如高山和亚高山、极地、干旱、盐胁迫、重金属胁迫等环境中。DSE定殖通常比AMF更为普遍^[7-9]。有人甚至发现在重金属胁迫环境中, AMF随土壤重金属浓度增加定殖率下降, 而DSE却随重金属浓度增加而增加^[10]。另外, 很多自然生长的植物和一些人工栽培的植物根系上AMF和DSE同时定殖的现象非常普遍。所有这些现象都提示着DSE与AMF在植物根系上定殖后具有相似和不同的生态学功能, 但两者不同的生态学功能是什么? 相似的生态学功能有哪些? 两者的作用机制又有什么不同? 这些都是未知的, 也是正在探讨的问题。

1 DSE的潜在生态学功能

DSE无宿主专一性、广泛的生态分布和分类上的多样性, 强烈地表明其在生态系统中可能发挥着多样的生态学功能。借助已有的AM研究技术, 目前研究发现DSE在不同生态系统中可能发挥以下一些生态学功能: (1) 促进宿主植物的矿质营养吸收, 特别是P元素, 已发现溶磷能力较强的DSE菌株; (2) 分解有机物, 加速物质循环和增强宿主植物对有机营养的利用, 土壤中的有机碳、氮, 植物不能直接利用, 一些DSE菌株能产生蛋白酶、核酸酶、漆酶、纤维素酶、木质素酶等而将有机物分解, 从而加速生态系统中的物质循环, 这些功能在极地、高山亚高山生态系统中显得更为重要; (3) 促进宿主水分吸收, 与AMF相似, 一些DSE菌株在植物根系定殖后, 可改善宿主植物的水分利用; (4) 增强宿主植物对非生物胁迫的耐性, DSE可在胁迫环境(如干热河谷、沙漠、重金属矿区等)中生长的植物根系上普遍定殖。盆栽植物实验表明, DSE可增强宿主植物对环境胁迫的耐性; (5) 防止昆虫对宿主植物的侵害, DSE在植物根上定殖后会改变宿主植物的一些次生代谢过程, 对于一些植食性昆虫而言, 次生代谢物的改变也改变了DSE宿主植物作为食物的“适口性”, 从而降低昆虫对植物的侵害; (6) 保护植物免受植物病原菌的侵扰, 许多植物的土传病都是从根部侵染植物的, DSE在植物根系上定殖后, 可“免疫”宿主植物, 或者DSE本身对于病原菌就是一种拮抗菌, 其

在宿主植物根系上定殖后可保护植物免受病原菌侵染; (7) 影响植物的群落组成, 同种DSE接种不同植物, 植物对DSE定殖表现出不一样的应答, 不同DSE接种同种植物, 其接种效应也不一样。因此, 土壤中的DSE种类组成、群落变化可对植物群落的组成形成一定的选择作用, 从而影响到植物群落的组成和演替。

这些生态学功能从植物个体延伸到整个植物生态系统水平, 在植物个体水平上, 不是所有的DSE对植物的生存、生长都表现出促进作用, 但大部分的实验证据仍表明DSE对植物的生存、生长产生明显的正向作用; 一些在生态系统水平上的报道甚至认为DSE在植物根系上的定殖是长期进化中宿主植物对DSE的选择, 或者说是整个植物生态系统协调发展的结果^[11]。从应用实践出发, 与AMF的生物活体营养不同, DSE可纯培养, 易于大规模生产菌剂。因此, 从不同生态环境、不同植物根系分离不同的菌种资源, 筛选不同生态学功能的菌株运用于植被恢复、污染环境的植物修复、生物防治、提高农田生产力等已成为推动DSE研究与应用的重要动力。

2 重金属矿区的DSE与宿主植物的重金属耐性

矿区土壤过量的重金属对生物的致毒性、土壤物理结构差、养分失调等是造成矿区植物、土壤动物和微生物多样性低的重要原因, 但重金属污染土壤仍有部分对重金属具有一定耐性和重金属超积累植物(Hyperaccumulator)生长, 而这些在重金属胁迫环境中生长的植物根系上通常都有DSE定殖^[7]。对于DSE而言, 能在这种胁迫环境中生活的首要条件就是其本身对重金属具有一定的耐性。本实验室前期的研究发现, 从重金属矿区生长的尼泊尔桤木(*Alnus nepalensis*)根系上分离到的DSE比从非矿区尼泊尔桤木根系上分离到的DSE对重金属(Pb, Zn, Cd)表现出更强的耐性, 但不是所有分离自矿区的菌株对重金属都表现出耐受性, 分离自矿区的DSE菌株也有对重金属敏感的菌株, 而非矿区生长的植物根系上也能分离到对重金属表现出耐性的DSE菌株^[12]。因此, DSE在重金属污染土壤中生长的植物根系上普遍定殖的可能解释是DSE本身对重金属具有耐性, 其在植物根系上定殖后可通过菌丝本身对重金属的积累、根外菌丝及其分泌物与土壤中的

重金属离子螯合从而减少植物对重金属的吸收, 当然还有可能就是DSE定殖改变植物的代谢过程而提高植物的重金属耐性^[13]; 另一种解释就是植物根为重金属敏感的DSE菌株提供避护所, 虽然土壤中的重金属含量超出了菌株的耐受性, 但植物根内的重金属含量却不一定高, 因而敏感菌株得以在过量重金属土壤中生长的植物根系上生活. 从来源上看, 这类菌株不太可能来自土壤, 很可能是靠植物种子垂直传播的^[14]. 在重金属污染土壤中生长的一年生植物根系上定殖的DSE更可能是重金属耐受型的, 因为当其宿主植物死亡后, 其必须在土壤中生活一定的时间, 而木本植物根系上定殖的DSE则可能是重金属耐受型, 也可能是敏感型的菌株.

从2000年开始, 本课题组对云南典型铅锌矿区、锡矿区自然生长的植物和农作物根系的DSE定殖情况进行了系统调查发现, 云南矿区植物根系上均有DSE定殖; 从矿区分离鉴定了600多株DSE, 形态学和分子鉴定发现这些菌株属于23个属, 其中以瓶霉(*Phialophora*)、外瓶霉(*Exophiala*)属真菌为优势菌^[7]. 对这些矿区来源的DSE菌株的重金属耐性进行了初步筛选, 表明53%以上的菌株对重金属具有较强的耐性, 一株对重金属耐性较强的DSE代表菌株, 嗜鱼外瓶霉(*Exophiala pisciphila*), 其对Pb, Zn和Cd的EC₅₀分别达到800, 1010和111.2 mg/L^[15]; 在EC₅₀条件下培养该菌株, 其菌丝中Pb, Zn和Cd的含量分别达到菌丝生物量的25%, 16%和4.9%^[16]; EC₅₀ Cd与无重金属胁迫下培养的嗜鱼外瓶霉菌株的比较转录组分析表明, 该菌株对Cd的耐性涉及至少10条相关的代谢途径^[17].

已有的研究报道表明, 在重金属胁迫下, DSE在植物根系上定殖后能促进植物生长、增强植物对重金属的解毒能力, 从而提高植物对重金属的耐性. Li等人^[18]报道DSE(*E. pisciphila*)在玉米根系上定殖后, 可增强玉米对Pb, Zn和Cd的耐性; Wang等人^[13]报道该菌株在玉米根上定殖后, 可减少玉米对Cd的吸收, 其作用机制涉及胞外改变重金属的赋存态、膜转运蛋白基因的表达、胞内螯合、区室隔离、抗氧化系统解毒等; 该菌株接种玉米后还可影响到玉米激素、光合效力等^[19]. Berthelot等人^[20]从法国三个Pb, Zn和Cd污染的矿区生长的杨树根上分离到7株分属于*Cadophora*, *Leptodontidium*, *Phialophora*和*Phialocephala*的DSE真菌, 7株菌可利用多种碳、氮源生长, 对As, Cd, Mn和

Zn都表现出较强的耐性, 并都能产生植物生长素, 这些菌株除可回接到杨树外, 还可在桦木、桉树、黑麦草根上成功定殖, 并促进植物生长, 特别是两株来自*Cadophora*和*Leptodontidium*菌促进植物生长的效果特别突出, 除产植物激素外, 还产促进植物生长的挥发物质, 在促进矿区重金属污染的植物修复中显现出一定的应用潜力. Likar和Regvar^[21]报道从柳树分离的*Phialophora*和*Cadophora*的DSE菌株在纯培养下对重金属的耐性, 回接到柳树后可降低植物对Cd和Zn的吸收. Berthelot等人^[22]利用分离自重金属污染土壤中生长的杨树的属于*Cadophora*, *Leptodontidium*和*Phialophora*的DSE菌株给杨树和桦树接种, 发现不同菌株、土壤因素均影响到两种植物对Cd的吸收积累, 即不同菌株与植物的组合, 其接种效应存在明显的差异, 因此提出在利用DSE接种植物进行重金属污染土壤修复时, 根据不同的土壤条件, 筛选土著DSE菌株用于生产是不可忽视的问题. 尽管DSE接种植物应用于重金属污染的植物修复还存在一些基础和应用的技术问题, 但DSE可增强宿主植物重金属耐性这一事实表明其在重金属矿区植物修复中具有潜在的应用价值, 因而受到了越来越多的关注.

3 展望

土壤重金属污染是一个全球性的棘手问题, 尤其是针对矿山开采过程中遗留的大面积矿区废弃地, 尚缺乏经济而又有效的治理措施. 近年来, 利用以绿色植物为主的植物修复重金属污染土壤日益受到人们的广泛关注. 由于大多数植物对重金属耐性较低, 而已发现的所谓重金属超积累植物通常生物量低、生长缓慢, 植物本身经济价值低而在实践中受限; 从本地植物资源中选择生长快、具有较大根茎生物量和经济价值的植物, 构建在修复过程中获得经济利益的生物经济(bio-economy)修复系统已成为植物修复实现可持续发展的新方向^[20,23,24].

DSE是一类发现较早的植物根内生真菌, 其与植物的关系、在生态系统中的功能在近二十年才引起广泛关注, 目前对DSE的形态学、解剖学研究还不如AM和外生菌根(ectomycorrhiza)那样透彻^[25], 比如, DSE与宿主植物间无宿主专一性, 但其相互识别的信号分子是什么^[26], 与AMF-植物间的识别有什么相似或不同?

DSE在植物根系定殖后并不会形成肉眼可识别的形态学特征, 但是否有肉眼不能识别的其他形态特征呢? 从解剖学上看, DSE侵染植物根是否形成附着胞、吸器? 其入侵的门径是根毛还是伸长区? 侵入到细胞内的菌丝是否有来自植物细胞膜包裹着菌丝的外膜? 除产横隔的深色菌丝、菌丝圈和微菌核外, 是否还有其他菌丝的变形结构? DSE侵染根后, 菌丝在根细胞和胞间生长扩散, 菌丝是否会侵染到维管束中, 若可到达维管束, 其又以什么样的形态特征展示? 根内的各种菌丝变形, 其功能是什么? 这些DSE的基础生物学问题现在都还没有明确的回答, 将来需要加强这些基础性工作. DSE可以在活体植物根内营活体营养, 也可以在土壤中营腐生营养, 其营养方式的转换机制是如何完成的? 在重金属胁迫下, DSE除自身对重金属

具有一定耐性外, 其增强宿主植物重金属耐性又涉及哪些根际和根内过程, 其调控机制如何? DSE与宿主的交易(trade-off)仅只是植物为DSE提供营养物和避护所, DSE为宿主植物解毒吗? 此外, DSE与宿主植物的营养物交易场所发生在什么地方? 以什么为物质基础, 是氨基酸、蛋白质, 单糖、双糖, 还是脂类物质? 从应用角度出发, DSE接种剂、接种方式、接种时间等也是值得研究和探索的技术问题.

总之, 重金属矿区的DSE资源是一种特殊和重要的真菌资源, 其在重金属污染的植物修复中已显示出应用潜力, 但其基础和应用研究还较薄弱, 还有很多需要深入探索的问题, 将来还需要更多的研究人员投入到DSE的研究行列对上述问题进行系统研究.

参考文献

- 1 Zhang Y. Studies on dark septate endophytes (DSE) in special ecosystems of Yunnan (in Chinese). Dissertation for Doctoral Degree. Kunming: Yunan University, 2012 [张燕. 云南几种特殊生境中深色有隔内生真菌(DSE)研究. 博士学位论文. 昆明: 云南大学, 2012]
- 2 Redecker D, Schüssler A, Stockinger H, et al. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). *Mycorrhiza*, 2013, 23: 515–531
- 3 Taylor T N, Remy W, Hass H, et al. Fossil arbuscular mycorrhizae from the Early Devonian. *Mycologia*, 1995, 87: 560–573
- 4 Castrillo G, Teixeira P J P L, Paredes S H, et al. Root microbiota drive direct integration of phosphate stress and immunity. *Nature*, 2017, 543: 513–518
- 5 Pudake R N, Mehta C M, Mohanta T K, et al. Expression of four phosphate transporter genes from finger millet (*Eleusine coracana* L.) in response to mycorrhizal colonization and Pi stress. *Biotech*, 2017, 7: 17
- 6 Liu H, Li T, Ding Y, et al. Dark septate endophytes colonizing the roots of ‘non-mycorrhizal’ plants in a mine tailing pond and in a relatively undisturbed environment, Southwest China. *J Plant Interactions*, 2017, 12: 264–271
- 7 Zhang Y, Li T, Zhao Z W. Colonization characteristics and composition of dark septate endophytes (DSE) in a lead and zinc slag heap in southwest China. *Soil Sediment Contam-An Int J*, 2013, 22: 532–545
- 8 Newsham K K, Upson R, Read D J. Mycorrhizas and dark septate root endophytes in polar regions. *Fungal Ecol*, 2009, 2: 10–20
- 9 Bissett J, Parkinson D. The distribution of fungi in some alpine soils. *Can J Bot*, 1979, 57: 1609–1629
- 10 Likar M. Dark septate endophytes and mycorrhizal fungi of trees affected by pollution. In: Pirttilä A M, Frank A C, eds. *Endophytes of Forest Trees Biology and Applications*. New York: Springer, 2011. 189–201
- 11 Urcelay C. Co-occurrence of three fungal root symbionts in *Gaultheria poeppigii* DC in Central Argentina. *Mycorrhiza*, 2002, 12: 89–92
- 12 Xu R B, Li T, Cui H L, et al. Diversity and characterization of Cd-tolerant dark septate endophytes (DSEs) associated with the roots of Nepal alder (*Alnus nepalensis*) in a metal mine tailing of southwest China. *Appl Soil Ecol*, 2015, 93: 11–18
- 13 Wang J L, Li T, Liu G Y, et al. Unraveling the role of dark septate endophyte (DSE) colonizing maize (*Zea mays*) under cadmium stress: Physiological, cytological and genic aspects. *Sci Rep*, 2016, 6: 22028
- 14 Domka A M, Rozpaček P, Turnau K. Are fungal endophytes merely mycorrhizal copycats? The role of fungal endophytes in the adaptation of plants to metal toxicity. *Front Microbiol*, 2019, 10: 371
- 15 Zhang Y J, Zhang Y, Liu M J, et al. Dark septate endophyte (DSE) fungi isolated from metal polluted soils: Their taxonomic position, tolerance, and accumulation of heavy metals *in vitro*. *J Microbiol*, 2008, 46: 624–632
- 16 Diao Y H, Li T, Zhao Z W. Zinc accumulation characteristics of two exophiala strains and their antioxidant response to Zn^{2+} stress. *J Environ*

- Prot, 2013, 4: 12–19
- 17 Zhao D K, Li T, Shen M, et al. Diverse strategies conferring extreme cadmium (Cd) tolerance in the dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*: Evidence from RNA-seq data. *Microbiol Res*, 2015, 170: 27–35
 - 18 Li T, Liu M J, Zhang X T, et al. Improved tolerance of maize (*Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a dark septate endophyte (DSE) *Exophiala pisciphila*. *Sci Total Environ*, 2011, 409: 1069–1074
 - 19 He Y M, Yang Z X, Li M R, et al. Effects of a dark septate endophyte (DSE) on growth, cadmium content, and physiology in maize under cadmium stress. *Environ Sci Pollut Res*, 2017, 24: 18494–18504
 - 20 Berthelot C, Leyval C, Foulon J, et al. Plant growth promotion, metabolite production and metal tolerance of dark septate endophytes isolated from metal-polluted poplar phytomanagement sites. *FEMS Microbiol Ecol*, 2016, 92: fiw144
 - 21 Likar M, Regvar M. Isolates of dark septate endophytes reduce metal uptake and improve physiology of *Salix caprea* L.. *Plant Soil*, 2013, 370: 593–604
 - 22 Berthelot C, Blaudez D, Leyval C. Differential growth promotion of poplar and birch inoculated with three dark septate endophytes in two trace element-contaminated soils. *Int J Phytorem*, 2017, 19: 1118–1125
 - 23 Amulya K, Dahiya S, Mohan SV. Building a bio-based economy through waste remediation: Innovation towards sustainable future. In: Prasad M N V, ed. *Bioremediation and Bioeconomy*. New York: Elsevier Science Pub., Co., 2016. 497–521
 - 24 Jia T, Cao M W, Jing J H, et al. Endophytic fungi and soil microbial community characteristics over different years of phytoremediation in a copper tailings dam of Shanxi, China. *Sci Total Environ*, 2017, 574: 881–888
 - 25 Feng B, Yang Z L. Ectomycorrhizal symbioses: Diversity of mycobionts and molecular mechanisms that entail the development of ectomycorrhizae (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2019, 49: 436–444 [冯邦, 杨祝良. 外生菌根共生: 共生真菌多样性及菌根形成的分子机制. 中国科学: 生命科学, 2019, 49: 436–444]
 - 26 Kan J H, Fang R, Jia Y. Interkingdom signaling in plant-microbe interactions (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2017, 47: 903–916 [阚金红, 方荣祥, 贾燕涛. 植物与微生物之间的跨界信号调控. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 903–916]