

初 龙, 李 伟, 李欣亚, 等. 重金属超富集植物种子内生真菌多样性及其重金属抗性[J]. 江苏农业学报, 2017, 33( 1 ): 43-49.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.01.007

## 重金属超富集植物种子内生真菌多样性及其重金属抗性

初 龙, 李 伟, 李欣亚, 熊 帆, 李海燕

(昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500)

**摘要:** 为探讨重金属超富集植物种子中内生真菌的种群组成及其在植物重金属耐受和富集方面可能发挥的生态学功能, 通过分离纯化小花南芥(*Arabis alpine*)及土荆芥(*Chenopodium ambrosioides*)两种重金属超富集植物种子内生真菌, 结合形态学特征和分子生物学数据对其进行鉴定, 研究其多样性, 并通过对内生真菌在含不同重金属培养基上生长速率的测定, 研究其重金属抗性。结果显示: 小花南芥和土荆芥两种重金属超富集植物种子中内生真菌的种类和数量均较少, 存在绝对优势类群。两种植物中内生真菌的定殖率和多样性指数分别为 74.0%、42.0% 和 0.78、1.35, 远低于其他非极端环境植物内生菌的定殖率和多样性。重金属抗性测定结果表明, 优势类群菌株的重金属抗性较其他类别突出, 抗性菌株比例较高, 个别菌株还表现为镉毒理兴奋型。通过最小抑制浓度检测发现镉毒理兴奋型菌株 FXZ2 可耐受 40 mmol/L  $Pb^{2+}$ 、60 mmol/L  $Zn^{2+}$  和 220 mmol/L  $Cd^{2+}$ 。这些菌株可能在宿主植物抵御不良环境及重金属累积过程中发挥着重要作用。

**关键词:** 重金属超富集植物; 种子; 内生真菌; 多样性; 重金属抗性

中图分类号: Q939.99

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2017)01-0043-07

## Diversity and heavy metal resistance of endophytic fungi from seeds of hyperaccumulators

CHU Long, LI Wei, LI Xin-ya, XIONG Zhi, LI Hai-yan

(Faculty of Life Sciences and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

**Abstract:** To understand the population composition of endophytic fungi (EF) from hyperaccumulators seeds as well as their possible ecological role in host plants' heavy metal (HM) tolerance and accumulation, the culturable EF from the seeds of two HM hyperaccumulators *Arabis alpina* and *Chenopodium ambrosioides* were isolated and further identified based on their morphological characteristics and molecular analysis. The HMs tolerance capacity was assessed through the growth rate measuring on PDA plates which contained different contents of HMs. The results showed that both the diversity and the colonization rate (CR) of EF in the seeds of two hyperaccumulators were lower, and the most dominant EF in them was different, too. The CR of *A. alpina* and *C. ambrosioides* were 74.0% and 42.0%, and the Shannon Index of them were 0.78 and 1.35, respectively. They were lower than those from the plant growing in non-extreme environment. HMs tolerance tests

收稿日期: 2016-03-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31360128, 31560566)

作者简介: 初 龙 (1989-), 男, 山东青岛人, 硕士研究生, 研究方向为内生真菌多样性及其生态学功能。(Tel) 18213461423; (E-mail) 769945807@qq.com。李伟为共同第一作者。

通讯作者: 李海燕, (Tel) 13888082968; (E-mail) 13888082968@163.com

indicated that the isolates of dominant genera/species showed better HMs tolerance capacity than that of the other genera/species isolates (with higher ratio of resistant isolates), and some of them showed Cd toxicity excitatory. The result of minimum inhibitory concentration (MIC) tests indicated that the strain FXZ2 could tolerate lead, zinc and cadmium as high as 40 mmol/L, 60 mmol/L and 220 mmol/L, respectively. These strains may play an important role in improving host plants stress

tolerance and affecting their HM accumulation.

**Key words:** hyperaccumulator; seed; endophytic fungi; diversity; heavy metal tolerance

重金属污染已成为全球严重的生态问题<sup>[1-2]</sup>,植物修复是减少重金属污染的重要手段之一。超富集植物由于能超量吸收重金属并将其转运到植物地上部分,在植物修复方面显示了巨大的应用潜力<sup>[3-5]</sup>。然而,在实际应用中由于绝大部分超富集植物生长缓慢、生物量小,致使其修复效率低、应用受限<sup>[6]</sup>。而植物-微生物联合修复可有效解决这个问题,这是由于许多微生物能通过产生植物生长素,改善植物营养吸收等途径促进宿主植物生长,从而增加其生物量,提高修复效率<sup>[7]</sup>。

植物内生菌是指一类生活在健康植物组织内部而不引起植物组织产生明显症状的微生物。可以通过组织学方法从彻底表面消毒后的植物组织中分离出微生物或通过从表面消毒后的植物组织中扩增到微生物核 DNA 证实其存在<sup>[8]</sup>。已有研究结果表明,在植物-微生物联合修复中,植物内生菌由于定殖在植物体内,并与植物形成互惠共生关系而在强化宿主植物修复效果方面发挥着重要作用,能显著提高宿主植物对铅、锌、镉等重金属胁迫的抗性,促进其生长,增强其修复效率<sup>[9-10]</sup>。在前期调查中我们发现,云南本土植物小花南芥能够同时富集铅、锌两种重金属,而入侵植物土荆芥则被报道为铅超富集植物<sup>[11-12]</sup>。本研究组发现超富集植物小花南芥的部分内生真菌菌株,在离体条件下显示出对铅、锌、镉的较好抗性,在盆栽试验中,能显著促进宿主植物对重金属的吸收和累积<sup>[13]</sup>。

作为植物繁殖器官的种子,在植物性状和品质传承中发挥着重要作用。已有研究结果表明,在长期协同进化过程中,植物有选择地保留了一些具有重要生态学功能的内生菌菌株,并通过种子进行垂直传播,从而使后代获得一些重要的、由内生菌赋予的性状和功能。例如麦角菌科的内生真菌 *Epichloë*,它能够在宿主体内产生生物碱从而增强宿主植物的病虫害抵御能力,它就是通过种子进行垂直传播的<sup>[14-15]</sup>。然而,据我们所知,到目前为止尚无任何关于超富集植物种子内生菌的研究报道。在重金属超富集植物的种子中,其内生真菌的种群组成及其在植物重金属耐受和富集方面可能发挥的生态学功能也不清楚。基于此,本研究对两种重金属超富集

植物小花南芥和土荆芥的种子内生真菌多样性及其重金属抗性进行研究,为进一步探明在超富集植物重金属耐受及富集方面可能发挥作用的内生真菌关键功能群及其作用机制打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

植物样品于 2014 年 11 月采自云南省曲靖市会泽县者海镇铅锌尾矿区,其中小花南芥 (*Arabis alpina*) 采自窝岩厂村旁废弃矿渣堆(北纬 26°28'17",东经 103°37'34"),而土荆芥 (*Chenopodium ambrosioides*) 采自阿依卡村旁矿渣堆(北纬 26°34'32",东经 103°36'50")。在每个采样点,随机选取健康植物 15 株,分别采集其种子、植物全株及土壤样品(2 株样品植物之间至少相距 8 m)。样品采集后立即放入塑料袋中,贴上标签带回实验室。用于内生真菌分离的植物样品保存于 4℃ 冰箱并在 2 d 内处理完毕,而用于重金属分析的土样则自然风干备用。

### 1.2 内生真菌的分离纯化

从每种植物样品中随机挑选出种子 50 粒,在自来水下冲洗干净,按下列程序进行表面消毒:体积分数 75% 的乙醇漂洗 2 min、无菌水冲洗 3 次;6% NaClO 溶液漂洗 2 min、无菌水冲洗 3 次,置于无菌滤纸上吸干水分。将表面消毒后的种子贴到 PDA (Potato dextrose agar) 平板上(90 mm),每皿 5 粒,25℃ 培养 60 d,隔天观察,培养期间见组织块周围有真菌长出,则挑取、纯化并保藏。同时,通过漂洗液检验法检验种子表面消毒是否彻底。

### 1.3 内生真菌的鉴定

内生真菌的鉴定采用形态学和分子生物学相结合的方法进行。首先根据菌落形态、颜色、表面结构、质地、生长速率等将所获菌株分为不同的形态型 (Morphotype) 并进行促孢培养,之后则结合菌落形态、产孢结构、产孢方式和孢子形态特征等对各形态型进行种属鉴定<sup>[16-18]</sup>。对促孢培养后仍不产孢或产孢之后仍无法确定其分类地位的形态型,则进一步进行分子鉴定:采用十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法或 PowerSoil 试剂盒提取菌株 DNA,并利用真菌通用引物 ITS1 和 ITS4 对其进行 18S rDNA

扩增,扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测为目的条带后,送上海生工生物工程有限公司测序。将所获序列与 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上的序列进行比对,根据相似度、覆盖率以及菌株的形态特征确定菌株的分类地位。

#### 1.4 重金属含量测定

土壤样品于室温风干后,去除碎石及植物根系,用研钵研磨后过 100 目筛备用。称取土壤样品 0.5 g,加入 4 ml HCl-HNO<sub>3</sub> (体积比 3:1) 混合液后按下述程序进行消解:80 ℃ 消解 30 min、100 ℃ 消解 30 min、120 ℃ 继续消解 1 h 并冷却。加入 1 ml HClO<sub>4</sub> 后于 100 ℃ 条件下继续消解 20 min 后,120 ℃ 再消解 1 h,冷却后用三蒸水定容至 50 ml 备用<sup>[19]</sup>。

将植物样品在自来水下冲洗干净后,用蒸馏水冲洗以去除样品表面离子,然后分为地上及地下部分,置于恒温干燥箱中 65 ℃ 下干燥 48 h 至恒质量、磨碎备用。称取磨碎的植物样品 0.2 g 加入 5 ml HNO<sub>3</sub> (质量分数 65%) 于 110 ℃ 条件下消解 2 h,冷却后加入 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (质量分数 30%) 继续保持微沸消解 1 h,最后用三蒸水定容至 50 ml 备用<sup>[20]</sup>。

利用火焰原子吸收分光光度法对上述处理好的样品进行 Pb<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 和 Cd<sup>2+</sup> 含量测定。每个样品 3 次重复。

#### 1.5 内生真菌重金属抗性及其最小抑制浓度测定

以 Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 和 3CdSO<sub>4</sub>·8H<sub>2</sub>O 分别配制含 Pb<sup>2+</sup> (9.66 mmol/L)、Zn<sup>2+</sup> (46.20 mmol/L) 和 Cd<sup>2+</sup> (0.50 mmol/L) 的 PDA 培养基,倒平板备用。从内生真菌各分类单元中随机选取约 1/2 的菌株,在 PDA 平板上活化后,用无菌打孔器沿菌落边缘打下直径 4.4 mm 的菌块,分别接种到含重金属及不含重金属的 PDA 平板上,25 ℃ 培养 6 d,隔天测量菌落直径,每个样品设置 3 个重复,计算菌株在各重金属胁迫下的相对生长速率,并将相对生长速率超过 50% 的菌株定义为重金属耐受菌株。

将对重金属抗性较好的菌株活化后,分别接种到含不同重金属浓度梯度的 PDA 平板上 (Pb、Zn: 1 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L、30 mmol/L 至 80 mmol/L; Cd: 1 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L、30 mmol/L 至 220 mmol/L), 25 ℃ 培养 7 d 后,观察菌株在不同重金属含量 PDA 平板上的生长情况,并以不含重金属 PDA 平板上的生长作为对照,每组设置 3 个重复,获得各重金属对菌株的最小抑制浓度 (能

够抑制菌株生长的最低浓度)<sup>[21-22]</sup>。

#### 1.6 数据统计分析

内生真菌的定殖率可以衡量植物受多重侵染的频率,相对分离频率可以衡量植物某种内生真菌的优势度,多样性指数 ( $H'$ ) 可以反映每种植物内生真菌的物种多样性程度,分别按以下公式计算<sup>[23-24]</sup>。定殖率=被内生真菌感染的种子数/试验种子总数;相对分离频率(%)=样品中分离到的某种内生真菌的菌株数/分离到的总菌株数;多样性指数  $H' = -\sum_{i=1}^k P_i \times \ln P_i$ , 其中  $P_i$  是指某种内生真菌的菌株数占全部内生真菌菌株数的百分数。相似性系数 ( $CS$ ) 可以比较两种植物之间内生真菌种类组成的相似程度,按 Sorenson 系数公式计算。 $CS = 2j/(a+b)$ , 其中  $j$  是两种植物共同具有的内生真菌种类数, $a$  是一种植物内生真菌的种类数, $b$  是另一种植物内生真菌的种类数。相对生长速率 ( $V$ ) = 菌株在重金属胁迫下的菌落直径/菌株在无重金属胁迫下的菌落直径。

## 2 结果

### 2.1 小花南芥和土荆芥内生真菌分离结果

从小花南芥及土荆芥共 100 粒种子中分离得到内生真菌 80 株,其中小花南芥中 51 株,土荆芥中 29 株,其定殖率分别为 74.0% 和 42.0%。由于观察至第 7 d 时,作为对照检验的平板上均无菌落出现,表明表面消毒彻底,所分离到的菌株全为植物种子内生真菌。

### 2.2 小花南芥和土荆芥内生真菌的组成与相似性系数

所分离得到的 80 株内生真菌被分为 9 个形态型 (Morphotype), 其中 6 个形态型根据其菌落形态、产孢结构、产孢方式和孢子形态特征等被鉴定为交链孢属 (*Alternaria*)、枝孢属 (*Cladosporium*)、小不整球壳属 (*Plectosphaerella*)、茎点霉属 (*Phoma*)、侧枝盘孢属 (*Catenophora*) 和炭疽菌属 (*Colletotrichum*)。而其余 3 个形态型促孢培养后仍不产孢或产孢之后仍无法确定其分类地位,经 18S rDNA-ITS 测序并与 NCBI 上的序列进行比对后,发现它们分别与序列登录号为 HM467833.1、KP117270.1 和 KP300880.1 的菌株具有较高的相似度 (99%) 与覆盖率 (93% 以上),结合形态学特征,最终将这 3 类菌鉴定为黑附

球菌 (*Epicoccum nigrum*)、派伦霉属 (*Peyronellaea*) 和柱隔孢属 (*Ramularia*) , 我们用于鉴定的菌株序列登录号分别为 KT291417、KT291418 和 KT291424。

在这 9 个分类单元中, 土荆芥种子中有 7 种, 小花南芥种子中有 5 种, 只有 3 种 (交链孢属、黑附球菌以及枝孢属) 同时存在于两种植物中并为两种植物的优势类群, 其分离频率分别为 57.5%、25.0%、10.0%。土荆芥及小花南芥种子内生真菌的多样性指数分别为 1.35 和 0.78, 而相似性系数为 0.5。

### 2.3 两种超富集植物及土壤的重金属含量

小花南芥和土荆芥植物样品及 2 个样地土壤重

金属含量见表 1, 小花南芥与土荆芥植物样品中铅、锌、镉 3 种重金属含量均明显超过植物重金属中毒临界值。铅含量最低的土荆芥地下部分铅含量是中毒临界值上限的 1.7 倍, 镉含量最低的土荆芥地下部分超出上限 7.0 倍以上, 锌含量最低的小花南芥地下部分是上限的 8.0 倍<sup>[25-26]</sup>, 且所有植物样品地上部分的铅、锌、镉含量均高于地下部分。土壤样品中铅、锌、镉的含量均超过《土壤环境质量标准》(GB15618-1995) 三级标准, 属于严重污染。

表 1 2 种超富集植物及其环境土壤重金属含量

Table 1 Content of heavy metals in two hyperaccumulators and soil

重金属	重金属含量 (mg/kg)					
	小花南芥 ( <i>A. alpina</i> )			土荆芥 ( <i>C. ambrosioides</i> )		
	植物地上部分	植物地下部分	土壤	植物地上部分	植物地下部分	土壤
铅	98.90	27.37	2 132.40	27.23	25.71	4 276.18
锌	502.19	408.03	29 700.00	915.55	733.39	18 500.00
镉	10.95	10.28	5.81	22.72	4.39	8.89

### 2.4 内生真菌的重金属抗性及其最小抑制浓度

在 0.5 mmol/L 的镉胁迫下, 有 32.4% 的测试菌株 (11 株) 的相对生长速率超过 50%, 表现出较好的镉抗性。其中黑附球菌 4 株, 交链孢属 5 株, 枝孢属 1 株以及对照菌株 1 株 (弯孢属 *Curvularia*) , 分别占各类检测菌株的 57.1%、21.7%、33.3%、100.0%。在这些菌株中, 来自小花南芥的黑附球菌菌株 FXZ2 的相对生长速率高达 124.1%, 表现为镉毒理兴奋型。而在 9.66 mmol/L 的铅和 46.20 mmol/L 的锌胁迫下, 没有任何菌株显示出抗性, 相对生长速率均低于 50%。

对抗性突出的菌株 FXZ2 进行最小抑制浓度测定, 结果显示其铅、锌、镉的最小抑制浓度分别为 40 mmol/L、60 mmol/L 和 220 mmol/L。

## 3 讨论

定殖率能反映植物样品中内生菌的数量, 它会随着宿主植物的种类、植物区系组成、海拔、温度、湿度和降雨量等环境条件的变化而不同<sup>[27-29]</sup>。在本研究中, 小花南芥和土荆芥两种重金属超富集植物种子内生真菌的定殖率分别为 74.0% 和 42.0%, 与

已报道的极端环境植物内生真菌的定殖率相似, 却明显低于非极端环境植物内生真菌的定殖率。我们在前期研究中发现会泽铅锌矿 6 种植物内生真菌的定殖率为 59%~75%<sup>[13]</sup>。Xing 等<sup>[30]</sup>报道中国南海红树林植物内生真菌的定殖率为 26.2%~58.7%。Bezerra 等<sup>[31]</sup>发现巴西干热环境中植物内生真菌的定殖率为 42.22%。而在非极端环境条件下, 植物内生真菌的定殖率往往较高。生长于宁夏草原的小花棘豆的种子内生真菌定殖率为 87.8%<sup>[32]</sup>。周雯娜等<sup>[33]</sup>报道云南大围山亚热带雨林 4 种苔藓植物内生真菌的定殖率高达 96.88%~100.00%。与定殖率偏低情况相似, 两种重金属超富集植物种子中内生真菌的多样性也远低于其他热带、亚热带、甚至极地维管植物的内生真菌多样性。澳大利亚热带雨林 4 种常见维管植物内生真菌的多样性指数高达 2.96~3.76, 南极维管植物 *Colobanthus quitensis* 的内生真菌多样性指数也达到 1.44<sup>[34-35]</sup>。这表明在重金属污染环境中, 包括种子在内的植物各组织器官中内生真菌的种类和数量都明显减少。这可能是由于重金属含量较高的土壤中微生物种类和数量往往较低<sup>[36-37]</sup>, 从而导致主要来源于土壤的内生菌种类

和数量也较低<sup>[38]</sup>。此外,我们还发现,虽然生长环境相似,两种超富集植物种子中内生真菌的相似性却较低(相似性系数仅为 0.5),绝对优势类群也不相同。这可能是由于两种植物的化学组成、体内累积的重金属种类及含量不同所致。

重金属抗性研究结果表明,在镉胁迫条件下,有 32.4% 的测试菌株表现出较好的重金属抗性。而在这些抗性菌株中,分别有 36.4% 和 45.5% 的菌株来源于黑附球菌和交链孢,抗性最为突出的菌株 FXZ2 和 FZT2-26 也来自黑附球菌。这表明重金属超富集植物种子中优势类群菌株的重金属抗性较其他类别突出。交链孢属是常见的植物内生真菌属<sup>[39-40]</sup>,已有研究表明,有些交链孢属菌株能够显著增强宿主植物对病原菌的抗性,促进其生长<sup>[41-42]</sup>。而黑附球菌作为内生真菌的报道则较少,但已有研究表明,有些黑附球菌菌株对桃褐腐病、豌豆菌核病和马铃薯晚疫病等具有较好的生防效果<sup>[43-44]</sup>。Lledó 等<sup>[45]</sup>还发现,将内生黑附球菌菌株 E631 接种到三叶草后,可以降低植物体内的铅含量。本试验中最小抑制浓度测定结果表明,黑附球菌菌株 FXZ2 对铅、锌、镉都具有较好的抗性,其中对镉的抗性极其突出,最小抑制浓度高达 220 mmol/L,据我们所知是目前所报道过的最好镉耐受菌株。例如 Babu 等<sup>[46]</sup>从废弃尾矿土壤中分离的真菌菌株 PDR-28,能够耐受 11.6 mmol/L  $\text{Cd}^{2+}$ 。Zafar 等<sup>[47]</sup>从被城市废水和工业污水污染过的农田中分离的部分真菌菌株能够耐受 44.5 mmol/L  $\text{Cd}^{2+}$ 。而隆美容<sup>[48]</sup>发现的  $\text{Cd}^{2+}$  耐受能力最高的菌株 *Paecilomyces lilacinus* 的最小抑制浓度也仅为 200 mmol/L。

综上所述,黑附球菌及交链孢作为小花南芥和土荆芥种子中绝对优势类群具有较高的抵御重金属毒害的能力,但其是否也在宿主植物病虫害抗性、重金属胁迫抗性及其促生长方面发挥关键作用,并且在长期协同进化过程中被宿主植物选择,并通过种子垂直传播给后代,有待进一步深入研究。目前认为丝状真菌主要通过外排、胞外沉淀、细胞壁结合、胞内螯合、亚细胞分隔和抗氧化作用等方式增强其重金属抗性<sup>[49-50]</sup>。本研究也发现,不同种属的菌株抗性不同,即使是同一个种的不同菌株,其重金属抗性的差异也很大。因此,这些菌株的重金属抗性机制可能完全不同,存在多样性,它们在宿主植物体内协同作用,从而影响了宿主植物的重金属耐受性及

其富集作用。此外,本研究中用作对照的弯孢属菌株 G1-29,也表现出较好的镉胁迫抗性,我们认为这可能是由于对照菌株来源于云南洱源地热环境,而地热环境中重金属含量也较高<sup>[51]</sup>,生活在该环境的部分菌株往往也具有较强的重金属耐受性<sup>[52]</sup>,它们也可作为重金属抗性菌株的一个重要筛选源。

## 参考文献:

- [1] 俞华齐,王 娟,姜忍忍,等. 重金属铬单克隆抗体特异性 ELISA 免疫检测方法的建立[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(2): 460-466.
- [2] 刘菊梅,栗利曼,沈渭寿,等. 黄河包头段灌区玉米重金属污染及人群健康风险评价[J]. 南方农业学报, 2015, 46(9): 1591-1595.
- [3] 樊佳奇,牛来春,庞 磊. 云南地区不同园林植物对土壤重金属的吸收富集特征[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(7): 467-472.
- [4] BELL T H, JOLY S, PITRE F E, et al. Increasing phytoremediation efficiency and reliability using novel omics approaches[J]. Trends in Biotechnology, 2014, 32(5): 271-280.
- [5] 张晓东,热沙来提·买买提,刘志刚. 荠菜对土壤重金属镉(Cd)和铅(Pb)的修复效应[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(4): 477-481.
- [6] MA Y, OLIVEIRA R S, NAI F, et al. The hyperaccumulator *Sedum plumbizincicola* harbors metal-resistant endophytic bacteria that improve its phytoextraction capacity in multi-metal contaminated soil[J]. Journal of Environmental Management, 2015, 156: 62-69.
- [7] RAJKUMAR M, AE N, PRASAD M N V, et al. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction[J]. Trends in Biotechnology, 2010, 28(3): 142-149.
- [8] STONE J K, BACON C W, WHITE J F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined[J]. Microbial Endophytes, 2000, 3: 29-33.
- [9] RAJKUMAR M, SANDHYA S, PRASAD M N V, et al. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation[J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(6): 1562-1574.
- [10] LI H Y, WEI D Q, SHEN M, et al. Endophytes and their role in phytoremediation[J]. Fungal Diversity, 2012, 54(1): 11-18.
- [11] 王吉秀,祖艳群,陈海燕,等. 表面活性剂对小花南芥(*Arabis alpina* L. var. *Parviflora* Franch) 累积铅锌的促进作用[J]. 生态环境学报, 2010, 19(8): 1923-1929.
- [12] 吴双桃,吴晓芙,胡曰利,等. 铅锌冶炼厂土壤污染及重金属富集植物的研究[J]. 生态环境, 2004, 13(2): 156-157.
- [13] LI H Y, LI D W, HE C M, et al. Diversity and heavy metal tolerance of endophytic fungi from six dominant plant species in a Pb-Zn mine wasteland in China[J]. Fungal Ecology, 2012, 5(3): 309-315.
- [14] CRAVEN K D. Population studies of native grass-endophyte sym-

- bioses provide clues for the roles of host jumps and hybridization in driving their evolution[J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21(11): 2562-2564.
- [15] ZHOU L, LI C, ZHANG X, et al. Effects of cold shocked *Epichloë* infected *Festuca sinensis* on ergot alkaloid accumulation[J]. *Fungal Ecology*, 2015, 14: 99-104.
- [16] BARNETT H L, HUNTER B B. Illustrated genera of imperfect fungi[M]. 3rd ed. New York: Macmillan Publishing Company, 1972.
- [17] ELLIS M B. Dematiaceous hyphomycetes[M]. UK: International Mycological Institute, 1971.
- [18] SUTTON B C. The coelomycetes, fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata, Brian C. Sutton[M]. England: Commonwealth Mycological Institute, 1980.
- [19] LI Y, WANG H, WANG H, et al. Heavy metal pollution in vegetables grown in the vicinity of a multi-metal mining area in Gejiu, China: total concentrations, speciation analysis, and health risk[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2014, 21(21): 12569-12582.
- [20] SHEN M, LIU L, LI D W, et al. The effect of endophytic *Peyronellaea* from heavy metal-contaminated and uncontaminated sites on maize growth, heavy metal absorption and accumulation[J]. *Fungal Ecology*, 2013, 6(6): 539-545.
- [21] IRAM S, ZAMAN A, IQBAL Z, et al. Heavy metal tolerance of fungus isolated from soil contaminated with sewage and industrial wastewater[J]. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2013, 22: 691-697.
- [22] EZZOUHRI L, CASTRO E, MOYA M, et al. Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2009, 3(2): 35-48.
- [23] YUAN Z, ZHANG C, LIN F, et al. Identity, diversity, and molecular phylogeny of the endophytic mycobiota in the roots of rare wild rice (*Oryza granulate*) from a nature reserve in Yunnan, China[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(5): 1642-1652.
- [24] SPELLERBERG I F, FEDOR P J. A tribute to Claude Shannon (1916-2001) and a plea for more rigorous use of species richness, species diversity and the 'Shannon-Wiener' Index[J]. *Global Ecology and Biogeography*, 2003, 12(3): 177-179.
- [25] 埃塞林顿, 曲仲湘, 陈昌笃. 环境和植物生态学[M]. 北京: 科学出版社, 1989: 170-276.
- [26] 鲍恩, 仙舟, 中柱, 等. 元素的环境化学[M]. 北京: 科学出版社, 1986: 71-207.
- [27] ARNOLD A E, LUTZONI F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? [J]. *Ecology*, 2007, 88(3): 541-549.
- [28] HASHIZUME Y, FUKUDA K, SAHASHI N. Effects of summer temperature on fungal endophyte assemblages in Japanese beech (*Fagus crenata*) leaves in pure beech stands[J]. *Botany*, 2010, 88(3): 266-274.
- [29] NOVAS M V, COLLANTES M, CABRAL D. Environmental effects on grass-endophyte associations in the harsh conditions of south Patagonia[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 61(1): 164-173.
- [30] XING X, GUO S. Fungal endophyte communities in four *Rhizophoraceae mangrove* species on the south coast of China[J]. *Ecological Research*, 2011, 26(2): 403-409.
- [31] BEZERRA J D P, SANTOS M G S, BARBOSA R N, et al. Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in Brazilian tropical dry forest: a first study[J]. *Symbiosis*, 2013, 60(2): 53-63.
- [32] 周启武. 疯草内生真菌多样性及检测方法研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013.
- [33] 周雯娜, 吴远双, 初龙, 等. 云南大围山四种苔藓植物内生真菌多样性[J]. *微生物学报*, 2015, 6: 764-771.
- [34] PAULUS B C, KANOWSKI J, GADEK P A, et al. Diversity and distribution of saprobic microfungi in leaf litter of an Australian tropical rainforest[J]. *Mycological Research*, 2006, 110(12): 1441-1454.
- [35] ROSA L H, VIEIRA M L A, SANTIAGO I F, et al. Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (*Caryophyllaceae*) in Antarctica[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 73(1): 178-189.
- [36] GILLER K E, WITTER E, MCGRATH S P. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1998, 30(10): 1389-1414.
- [37] 邢奕, 司艳晓, 洪晨, 等. 铁矿区重金属污染对土壤微生物群落变化的影响[J]. *环境科学研究*, 2013, 26(11): 1201-1211.
- [38] TURNER T R, JAMES E K, POOLE P S. The plant microbiome[J]. *Genome Biology*, 2013, 14(6): 209-218.
- [39] 邵士成, 吴少华, 陈有为, 等. 云南元江印楝植物内生真菌的种类组成[J]. *生物多样性*, 2008, 16(1): 63-67.
- [40] 郑毅, 伍斌, 余志祥, 等. 攀枝花苏铁植物内生真菌多样性的初步研究[J]. *生命科学研究*, 2013, 17(5): 406-411.
- [41] PHAOPONGTHAI J, WIYAKRUTTA S, MEKSURIYEN D, et al. Azole-synergistic anti-candidal activity of altenusin, a biphenyl metabolite of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Terminalia chebula* Retz[J]. *Journal of Microbiology*, 2013, 51(6): 821-828.
- [42] KHAN A R, ULLAH I, WAQAS M, et al. Plant growth-promoting potential of endophytic fungi isolated from *Solanum nigrum* leaves[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 31(9): 1461-1466.
- [43] LARENA I, TORRES R, DE CAL A, et al. Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia* spp.) of peaches by field applications of *Epicoccum nigrum* [J]. *Biological Control*, 2005, 32(2): 305-310.
- [44] 李扬. 黑附球菌 XF<sub>1</sub>菌株对马铃薯晚疫病的生防作用[D].

- 保定:河北农业大学, 2010.
- [45] LLEDÓ S, RODRIGO S, POBLACIONES M J, et al. Biomass yield, nutritive value and accumulation of minerals in *Trifolium subterraneum* L. as affected by fungal endophytes[J]. Plant and Soil, 2015, DOI: 10.1007/s11104-015-2596-0.
- [46] BABU A G, SHIM J, BANG K S, et al. Trichoderma virens PDR-28: a heavy metal-tolerant and plant growth-promoting fungus for remediation and bioenergy crop production on mine tailing soil [J]. Journal of Environmental Management, 2014, 132: 129-134.
- [47] ZAFAR S, AQIL F, AHMAD I. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil [J]. Bioresource Technology, 2007, 98 ( 13 ): 2557-2561.
- [48] 隆美容. 耐重金属铜丝状真菌的分离、鉴定及特性研究[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2013.
- [49] AN H, LIU Y, ZHAO X, et al. Characterization of cadmium-resistant endophytic fungi from *Salix variegata* Franch. in Three Gorges Reservoir Region, China [J]. Microbiological Research, 2015, 176: 29-37.
- [50] XU R, LI T, CUI H, 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 south-west China[J]. Applied Soil Ecology, 2015, 93: 11-18.
- [51] BABA A, DENIZ O, OZCAN H, et al. Geochemical and radionuclide profile of Tuzla geothermal field, Turkey[J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2008, 145(1-3): 361-374.
- [52] BRITO E M S, VILLEGAS-NEGRETE N, SOTELO-GONZÁLEZ I A, et al. Microbial diversity in *Los azufres* geothermal field (Michoacán, Mexico) and isolation of representative sulfate and sulfur reducers[J]. Extremophiles, 2014, 18(2): 385-398.

(责任编辑:张震林)