韓國林學會誌 90(1) : 83 - 89. 2001
Jour. Korean For. Soc. 90(1) : 83 - 89. 2001

培養器內에서 모래밭버섯菌의 Cd 蓄積과 耐性에 關한 研究[1*]

韓心熙[2*] · 李景俊[2] · 玄正悟[2]

A Study on the Cd Accumulation and Tolerance of *Pisolithus Tinctorius in Vitro*[1*]

Sim Hee Han[2*], Kyung Joon Lee[2] and Jung Oh Hyun[2]

要 約

본 연구는 외생균근균 중 중금속에 대한 내성이 우수한 것으로 알려져 있는 모래밭버섯균의 Cd 축적과 내성 특성을 밝히고자 수행하였다. 모래밭버섯균은 1997년 전남 무안의 곰솔림에서 분리한 것으로 MMN 배지에 $CdSO_4 \cdot 5H_2O$을 0, 0.2, 0.5, 2, 10μg/mℓ로 첨가하여 기내에서 배양하였다. 배양을 시작한 후 일주일 간격으로 24일 동안 생장량과 내성지수를 측정하였으며, 40일 후에는 균사를 수확하여 Cd 함량, superoxide dismutase(SOD) 활성, glutathione reductase(GR) 활성을 측정하였다. 기내 배양된 모래밭버섯균은 Cd 2μg/mℓ 처리에서 생장이 감소하였으며, Cd 10μg/mℓ의 처리에서는 생장이 거의 정지하였다. 대조구와 Cd 처리구의 생장량 비로 결정된 모래밭버섯균의 내성지수는 Cd 처리 농도가 증가함에 따라 점차 감소하는 경향을 나타냈으나 Cd 0.5μg/mℓ와 Cd 2μg/mℓ 처리구에서는 14일 경과 후 다시 증가하였다. 모래밭버섯균의 균사내 Cd 농도는 Cd 처리 농도 증가에 따라 증가하였으며, 특히 Cd 10μg/mℓ 처리의 균사내 Cd 농도는 854μg/g으로, Cd 0.5μg/mℓ 처리구의 균사내 농도 12.3μg/g 보다 70배 높았다. 모래밭버섯균의 SOD 활성은 Cd 농도별 처리간에 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 GR 활성은 Cd 0.5μg/mℓ 처리구에서 대조구보다 높았으며 Cd 2μg/mℓ에서는 대조구보다 낮았다. 결론적으로 모래밭버섯균은 Cd의 흡수가 뛰어나며, Cd에 대한 내성은 비교적 저농도에서 항산화효소의 합성 증가와 같은 독성 제거 기작을 통하여 나타난다고 판단된다. 따라서 모래밭버섯균은 저농도로 오염된 중금속 오염지의 식생 복원에 이용이 가능하다고 본다.

ABSTRACT

This study was conducted to test the Cd accumulation and Cd-tolerance of *Pisolithus tinctorius(Pt)*. *Pt* was isolated from *Pinus thunbergii* forest in Muan, Chonnam Province in 1997. *Pt* was cultured on MMN medium supplemented with $CdSO_4 \cdot 5H_2O$ at the final concentration of 0, 0.2, 0.5, 2, and 10μg/mℓ for 40 days. Growth rate and tolerance index of the fungus were measured every week, while Cd concentration, superoxide dismutase(SOD), and glutathione reductase(GR) of the fungus were analyzed at the end of the culturing. *Pt* showed growth reduction *in vitro* at 2μg/mℓ Cd in the medium and almost stopped growth at 10μg/mℓ Cd. Tolerance index of *Pt* decreased with increasing Cd concentration. Cd concentration of *Pt* was the highest at 10μg/mℓ Cd. Activities of SOD did not show significant difference between Cd concentrations, but GR of *Pt* increased at 0.5μg/mℓ Cd, and decreased at 2μg/mℓ Cd. Consequently *Pt* could be called Cd accumulator with a tolerance mechanism to Cd. Their tolerance to Cd were expressed through the higher production of antioxidants such as GR. *Pt* may be used for revegetation and decontamination of soil polluted by heavy metals.

Key words : *antioxidant, superoxide dismutase, glutathione reductase, revegetation, decontamination*

[1] 接受 2000年 11月 28日 Received on November 28, 2000.
審査完了 2001年 1月 8日 Accepted on January 8, 2001.
[2] 서울大學校 農生大 山林資源學科 Dept. of Forest Resources, Seoul Nat'l Univ. Suwon 441-744, Korea.
* 본 연구는 1997년 농림기술관리센터에서 지원된 농특 첨단기술 과제로 수행된 연구의 일부임
* 연락저자 E-mail : inyasio@hanmail.net

緖 論

균근균은 균사의 표면적이 크며, 중금속 이온과의 친화도가 높은 기질과 접촉하고 있기때문에 토양에 존재하는 중금속 흡수능력이 우수하다(Wondratschek and Röder, 1993). 그러나 중금속 함량이 높은 토양에서는 균근의 형성이 저해된다(Jones and Hutchinson, 1986). 균근균에서 나타나는 중금속 독성은 효소, 필수 양료와 이온 수송의 방해, 세포내에 존재하는 필수 이온의 치환, 구조 변형, 효소의 불활성화, 세포막의 파괴 등이 있다(Ochiai, 1987). 직접적인 중금속 독성은 활성이 있는 중금속과 세포 구성물간의 접촉으로부터 시작되며, 독성 중금속에 대한 초기 세포막의 손상은 외부 물질의 세포내 침투 증가와 세포내 이동성 이온들, 특히 K^+의 손실을 가져온다(Laurence 등, 1989). 중금속 독성의 간접적인 기작은 자유기의 발생과 관련되는데, 자유기는 생물학적인 거대분자들을 파괴하는 연쇄 반응에 참여한다(Gadd, 1993).

독성 중금속으로 오염된 토양에서 살아가는 균류는 형태적인 변화를 포함한 생화학적, 유전적인 적응과 체내로 흡수된 중금속의 독성을 완화시키는 방법을 이용해서 살아가며, 일부 호기성 미생물들에는 superoxide dismutase(SOD)와 같은 보호효소가 존재하여, 대사과정에서 자유기를 제거한다(Greco 등, 1990; Galiazzo 등, 1991). 생물체내에서 중금속 독성을 해독하는 마지막 과정은 glutathione reductase(GR)에 의해서 조절된다(Carlberg and Mannervik, 1985). 즉 GR은 GSH(환원형)와 GSSG(산화형)의 비를 높게 유지함으로써 식물체를 보호하는 중요한 역할을 담당한다(Foyer 등, 1997).

균근균의 중금속에 대한 내성 기작은 metallothioneins 이나 γ-glutamyl peptides의 합성을 통해 중금속과 직접 반응하여 중금속 독성으로부터 살아남는 저항성 기작과 내부적인 특성 또는 환경적인 변화를 통해서 중금속 독성으로부터 살아남는 기피성 기작으로 나누어진다(Morselt 등, 1986; Howe 등, 1997). 이러한 균근균의 중금속 내성 특성은 토양 오염지에서의 식생복원과 중금속의 정화에 균근균을 효과적으로 이용할 수 있는 것으로 보고되었다(Tam, 1995).

따라서 본 연구는 향후 중금속 오염지의 식생복원과 중금속 정화에 균근균을 이용하기 위하여 균근균 중 중금속에 대한 내성이 우수한 것으로 알려져 있는 모래밭버섯균의 Cd 축적과 내성 특성을 밝히고자 수행하였다.

材料 및 方法

1. 對象菌種과 培養條件

외생균근균인 모래밭버섯균(*Pisolithus tinctorius*)은 Marx(1975)에 의하여 중금속으로 오염된 미국의 탄광 폐석지에서 생장이 우수한 균종으로 밝혀진 바 있다.

본 연구에서 사용한 균은 1997년 전남 무안의 곰솔림에서 분리한 것으로 전남대학교 임학과에서 분양을 받아 서울대학교 산림자원학과 수목생리학 연구실에서 계대배양하여 보관해 오던 것을 사용하였다.

모래밭버섯균의 중금속 내성과 축적 능력을 평가하기 위하여, MMN(Modified Melin-Norkrans) 배지(Marx, 1969)에 $CdSO_4 \cdot 5H_2O$을 0, 0.2, 0.5, 2, 10㎍/㎖의 농도로 첨가하였다. 각 처리별 배지에는 MMN 배지에 계대배양해 두었던 균주에서 생장이 왕성한 가장자리 부분만을 3mm×3mm 크기로 절단하고, 직경 9cm의 Petri dish내 MMN 배지의 중앙부에 치상하였다. 균 치상 후에 24℃에서 24일간 배양하였으며, 각 처리당 10반복으로 실시하였다. 중금속 농도와 항산화물질 측정을 위한 균사는 100ml의 삼각 플라스크내 액체 MMN 배지 50ml에 3mm×3mm 크기의 균사조각을 넣고, 24℃에서 40일간 배양하였다.

2. 生長量과와 耐性指數

모래밭버섯균의 균사 생장량은 치상 후 1주일 간격으로 중심에서부터 네 방향을 측정하고, 균총(colony area)을 계산하여 측정하였다. 내성지수는 대조구와 각 중금속 처리구의 생장량 비를 이용하여 Colpaert and Van Assche(1987)의 방법에 따라 계산하였다.

내성지수(Tolerance Index : TI)

$$= \frac{\text{처리구의 생장량}}{\text{대조구의 생장량}} \times 100$$

3. 菌絲內 Cd 濃度

MMN 액체배지에서 40일간 배양된 균사는 증류수로 세척하여 건조한 후 분말로 만들었다. 균사 분말 0.1g에 15ml의 분해액(HNO_3 : $HClO_4$:

H_2SO_4 = 10 : 4 : 1)을 첨가한 후, 220℃의 가열판상에서 가열 분해하고, 분해액이 무색 투명할 때 분해가 종료된 것으로 하였다. 분해가 완료된 시료는 가열판상에서 내려 냉각시킨 후 증류수 50ml로 완전히 용해시키고, 42번 여과지로 여과한 후 유도 결합 프라즈마 발광 분석장치(inductively coupled plasma spectrometer : ICPS)를 이용하여 균사 내의 Cd 농도를 측정하였다(農林水産技術協議事務局, 1972).

4. Superoxide dismutase(SOD) 活性

SOD 활성의 측정은 nitro blue tetrazolium (NBT)-xanthine oxidase 법에 따라 수행하였다(김종평 등, 1991). MMN 액체 배지에서 40일간 배양된 균사를 증류수로 세척한 후 물기를 완전히 제거하였다. 균사 0.1g에 1.5ml의 완충액을 넣고 균질화시켰다. 완충액은 3.72mg의 EDTA(ethylenediamine tetraacetic acid)와 1g의 PVP(polyvinylpyrrolidone)을 50mM KH_2PO_4(pH 7.8) 100ml에 용해시켜 제조하였다. 균질화된 시료는 20,000×g에서 15분 동안 원심분리한 후 상등액은 완충액을 이용하여 15배로 희석하였다. 0.3ml의 상등액을 200μM의 NBT 0.6ml와 53μM의 xanthine 1.8ml로 구성된 반응액에 첨가하였다.

반응은 60μg/ml의 xanthine oxidase 0.3ml를 반응 혼합물에 첨가하면서 시작되도록 하였다. 환원 속도는 Unicam UV Series spectrophotometer (ATI, USA)를 이용하여 530nm에서 120초 동안의 흡광도의 증가를 측정하여 결정하였다. SOD 활성은 Asada 등(1974)에 따라 V/v-1의 식에 의해서 계산하였다. V와 v는 각각 SOD가 없을 때와 있을 때, NBT의 환원 속도를 나타낸다.

5. Glutathione reductase(GR) 活性

GR의 활성은 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)를 이용하여 측정하였다(Smith 등, 1988). MMN 액체 배지에서 40일간 배양된 균사는 증류수를 이용하여 세척한 후 물기를 완전히 제거하였다. 균사 0.1g에 5%(w/v) 5-sulfosalicylic acid와 6.3mM DTPA(diethylene triamine pentaacetic acid)로 제조된 추출액 1.5ml를 첨가 후 균질화시키고, 15,000×g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 이용하였다. 완충액은 143mM sodium phosphate (pH 7.5)와 5mM Na_2EDTA로 제조하였으며, 완충액속에 NADPH와 DTNB를 각각 2mM과 6mM이 되게 녹인 후, 2mM NADPH 700μℓ, 6mM DTNB 100μℓ, 증류수 175μℓ를 1.5ml 튜브에 담고 잘 섞은 후 30℃에서 15분간 유지하였다. 여기에 20mM GSSG(glutathione oxidized) 0.1ml와 25μℓ의 시료를 첨가하여 반응시켰으며, Unicam UV Series spectrophotometer(ATI, USA)를 이용하여 412nm에서 5분간 증가된 흡광도를 측정하여 기록하였다

6. 統計 分析

통계분석은 SAS System for Windows Version 6.12(SAS Institute Inc. USA)를 이용하였다. 각 처리구의 측정치는 SAS의 GLM 절차를 이용하여 분산분석을 실시하고 처리평균간 비교는 Duncan의 다중검정을 이용하였다.

結果 및 考察

1. Cd 處理 濃度에 따른 生長量 變化

Figure 1은 Cd이 첨가된 배지에서의 모래밭버섯균의 생장량을 나타낸 것이다. 모래밭버섯균은 Cd 0.2μg/mℓ와 0.5μg/mℓ에서는 정상적인 생장을 나타냈으나, Cd 2μg/mℓ 이상에서는 생장량이 감소하였고, Cd 10μg/mℓ 이상에서는 생장이 거의 정지하였다. 모래밭버섯균은 대부분의 중금속에서 생장이 감소하는 현상을 나타내는데, Pb 10μg/mℓ에서는 생장이 완전히 정지하며(McCreight and Schroeder, 1982), Cu 200μg/mℓ에서는 생장이 지연된다(이경준 등, 1998). Darlington and Rauser(1988)은 주름우단버섯(*Paxillus involutus*)의 균사 생장은 Cd에 의해서 세포의 신장이 저해되어 민감한

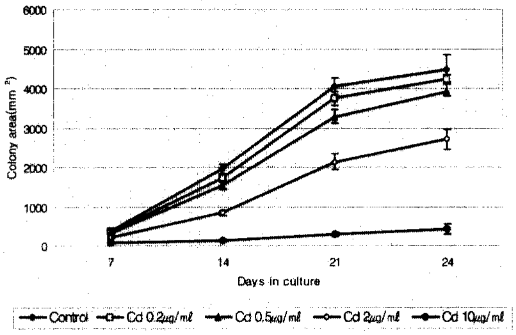

Figure 1. Growth patterns of *Pisolithus tinctorius* on MMN supplemented with different concentrations of Cd.

반응을 나타내며 방사방향으로의 균사 생장 속도는 생체량보다 더 많이 감소한다고 하였다.

본 연구에 이용된 모래밭버섯균은 비교적 넓은 지역에 분포하며, 척박지, 토양 온도가 높은 곳, pH가 낮은 곳, 수분이 부족한 곳 등에서 잘 적응하고, 중금속 오염지에서도 매우 빠른 생장을 보이는 것으로 알려져 있다(Trappe, 1977). 즉 Cd 오염 농도가 10㎍/g이하인 것으로 알려진 국내 오염 토양에서는 모래밭버섯균의 생장이 크게 영향을 받지 않을 것으로 판단된다.

2. Cd 處理 濃度에 따른 耐性指數

Cd 처리 농도에 따른 모래밭버섯균의 내성지수는 일주일 간격으로 대조구와 Cd 처리구의 생장량 비로 결정하였는데, Figure 2에서 보는 바와 같이 Cd 처리 농도에 따라 차이가 있었다. Cd에 대한 내성은 Cd 처리 농도가 증가함에 따라 점차 감소하는 경향을 나타냈으며, 모든 Cd 처리구에서 배양이 시작된 지 14일째에 가장 낮은 내성지수를 나타냈다. 14일 지난 후 비교적 저농도인 2㎍/㎖ Cd 처리구에서는 내성이 증가되는 경향을 나타냈으나, Cd 10㎍/㎖에서는 증가되지 않았다. 이것은 균사의 초기 생장이 Cd에 의해 저해를 받다가 어느 정도 적응기간이 지난 후에는 생장이 지속적으로 이루어지고 있음을 나타낸다.

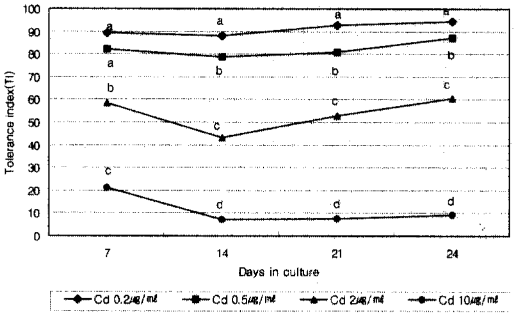

Figure 2. Tolerance indices of *Pisolithus tinctorius* at different concentrations of Cd. The different letters within the same date indicate significant difference at $p \leq 0.05$.

균근균의 중금속 내성 연구는 독성 중금속 농도에 따른 외생균근균들의 민감도를 결정하기 위해 종종 이용되는데, 이러한 연구 결과들은 중금속에 대한 내성이 종간에 차이가 있음을 보여준다. 이와 관련된 연구 중 Jones and Hutchinson(1988)은 볏짚어리알버섯(*Scleroderma flavidum*)이 *Lactarius rufus*보다 Cu와 Ni에 대해 덜 민감하고, Colpaert and Van Assche(1992)는 광대버섯(*Amanita muscaria*)이 다른 외생균근균보다 Cd에 덜 민감하다고 하였다.

3. 모래밭버섯菌의 菌絲內 Cd 蓄積 濃度

Figure 3은 40일 동안 기내에서 배양된 모래밭버섯균의 Cd 처리 농도에 따른 균사내 Cd 함량을 표시한 것이다. 모래밭버섯균은 Cd 처리 농도 증가에 따라 Cd 축적 농도가 증가하였다. 특히 Cd 10㎍/㎖에서는 854㎍/g으로 매우 높은 농도를 나타냈는데, 이러한 결과는 모래밭버섯균의 생장을 감소시키고 내성을 상실시킨 것으로 보인다. 즉 생장이 감소하기 시작한 Cd 2㎍/㎖와 Cd 10㎍/㎖에서의 균사내 축적 농도는 생장이 정상적으로 이루어졌던 Cd 0.5㎍/㎖에서의 축적 농도인 12.3㎍/g보다 각각 5배와 70배 높았기 때문이다.

대부분의 균류는 고등식물보다 더 많은 양의 중금속을 축적할 수 있는데, 이것은 큰 균사의 표면적을 가진 고등 균류의 특이한 해부학적, 생리학적 특성 때문이다(Wondratschek and Röder, 1993). 이러한 균사는 넓은 지역으로 퍼져 나갈 수 있으며, 토양과의 접촉 면적을 증가시켜 중금속의 흡수를 촉진시킬 수 있다(Gadd, 1993). 또한 Cd 독성이 증가함에 따라 균사체의 밀도가 증가하는데, 밀도가 높은 균사체는 밀도가 낮은 균사체보다 Cd에 덜 노출되며, 단위 토양 용적당 Cd을 더 많이 보유할 수 있다(Darlington and Rauser, 1988). 사마귀버섯(*Telephora terrestris*)도 균사의 응집을 통하여 중금속에 대한 노출 정도를 감소시키며, 고등식물로의 Cd 흡수을 감소시킬 수 있다(Colpaert and Van Assche, 1992).

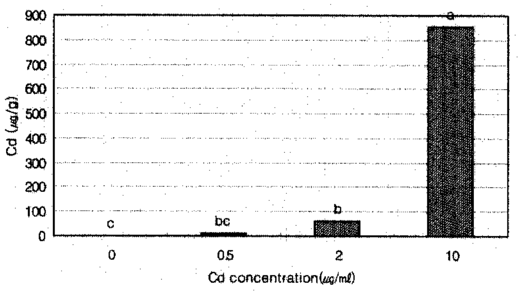

Figure 3. Cd concentration in fungal mycelium of *Pisolithus tinctorius in vitro* at different concentrations of Cd at the end of 40 days culturing. The different letters indicate significant difference at $p \leq 0.05$.

4. Cd 處理 濃度에 따른 superoxide dismutase (SOD) 活性의 變化

Figure 4는 Cd이 첨가된 모래밭버섯균의 SOD 활성 변화를 나타낸 것이다. 모래밭버섯균의 SOD 활성은 대조구, Cd 0.5μg/mℓ, Cd 2μg/mℓ처리에서 각각 348.0unit/g, 463.4unit/g, 326.0unit/g를 나타냈으나, Cd 처리 농도간 차이가 없었다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 생장이 정상적으로 나타나는 Cd 0.5μg/mℓ에서는 내성을 유지하는데 SOD가 기여한 것으로 보이나, 생장이 감소되어 독성이 나타나는 Cd 2μg/mℓ에서는 SOD 활성의 감소로 내성을 상실하였다고 볼 수 있다. SOD와 관련된 균류의 연구는 매우 부족한 편이며, Greco 등(1990)은 Cu로 처리된 *Saccharomyces cerevisiae*에서 SOD의 활성에 관한 연구에서 일부 호기성 미생물들이 자유기를 제거하기 위해 superoxide dismutase (SOD)와 같은 항산화효소의 합성을 증가시킨다고 보고하였다.

그러나 본 연구에서 SOD 활성이 뚜렷하게 차이를 보이지 않은 것은 처리간 변이가 컸기 때문인 것으로 판단되는데, 비교적 저농도인 Cd 처리구에서는 SOD 활성이 증가하지만 고농도 Cd 처리에서는 Cd의 독성으로 SOD 활성이 감소한 것으로 판단된다. 이와 같은 예는 Eickhoff 등(1995)의 연구 결과에서 찾아 볼 수 있는데, Cd과 Pb이 처리된 배지에서 세균성 병원균(*Proteus mirabilis*)의 SOD 합성이 50% 정도 감소되었다고 보고된 바 있다.

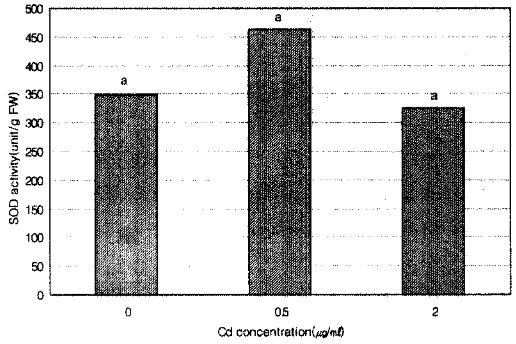

Figure 4. Superoxide dismutase activity in fungal mycelium of *Pisolithus tinctorius in vitro* at different concentrations of Cd. The same letter indicates no significant difference at $p \leq 0.05$.

5. Cd 處理 濃度에 따른 glutathione reductase (GR) 活性의 變化

모래밭버섯균의 GR 활성은 Figure 5에서와 같이 Cd 처리 농도에 따라 뚜렷한 차이를 보여 주었다. 모래밭버섯균의 GR 활성은 Cd 0.5μg/mℓ에서 12.6nmol/min/g을 나타내어 대조구의 12.1nmol/min/g과 유사하였으나, Cd 2μg/mℓ에서는 대조구보다 감소한 11.1nmol/min/g을 나타냈다.

GR은 산화된 glutathione(GSSG)을 glutathione (GSH)으로 환원시키는 과정을 촉매하는 효소이며, glutathione redox cycle를 위해서 반드시 필요한 효소로 세포내에서 GSH의 농도를 적당하게 유지하는 역할을 담당한다(Dolphin, 1989). 본 연구에서의 GR 활성도 SOD의 활성과 마찬가지로, 비교적 저농도에서는 GR 활성의 증가를 통해 GSH의 생산을 촉진함으로써 Cd에 대한 독성을 완화시키는 것으로 보이나, 고농도에서는 Cd에 의해 GR 활성이 감소하여(Schickler and Caspi, 1999) Figure 2와 같이 내성을 상실한 것으로 판단된다.

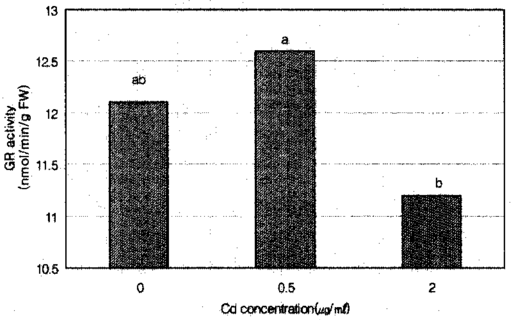

Figure 5. Glutathione reductase activity in fungal mycelium of *Pisolithus tinctorius in vitro* at different concentrations of Cd. The different letters indicate significant difference at $p \leq 0.05$.

結 論

본 연구는 외생균근균 중 중금속에 대한 내성이 우수한 것으로 알려져 있는 모래밭버섯균의 Cd의 축적과 내성 특성을 밝히고자 실시하였다.

모래밭버섯균의 생장은 Cd 처리 농도가 증가함에 따라 점차 감소하여 Cd 10μg/mℓ 처리구에서 거의 정지하였다. 모래밭버섯균의 내성은 Cd 처리 농도가 증가함에 따라 점차 감소하였으나, 2μg/mℓ 이하의 Cd 처리구에서는 14일이 지난 후 내성이

증가되는 경향을 보였다. 모래밭버섯균의 Cd 축적은 Cd 처리 농도가 증가함에 따라 급격하게 증가하였다.

Cd이 첨가된 모래밭버섯균의 SOD 활성은 처리간 큰 차이를 보여 주지 않았다. 그러나 GR의 활성은 Cd 0.5㎍/㎖ 처리구에서 증가한 반면, Cd 2㎍/㎖ 처리구에서는 오히려 감소하는 경향을 보였다.

결론적으로 모래밭버섯균은 Cd의 흡수가 뛰어나며 Cd에 대한 내성을 소유한 균류로서, 모래밭버섯균의 Cd에 대한 내성은 비교적 저농도에서 항산화효소의 합성 증가와 같은 독성 제거 기작을 통하여 증가되므로 저농도로 오염된 중금속 오염지에서의 식생 복원에 이용가능하다고 본다.

引 用 文 獻

1. 김종평·한창균·정 진. 1991. 식물의 냉해에 대한 생체방어기구로서 항산화성 효소의 유도 : (I) 저온 처리 중 pyruvate의 세포내 축적과 상온환원후 항산소성 효소의 활성화. 한국농화학회지 34 (2) : 162-167.
2. 이경준·한심희·조덕현·윤석용. 1998. 기내에서 4종 외생균근균의 Cu, Zn, Pb에 의한 생장 저해와 내성. 서울대학교 수목원 연구보고 18 : 72-86.
3. 農林水産技術協議事務局. 1972. 土壤および作物體の分析法(3). 日本土肥誌 43 : 349-356.
4. Asada, K., M. Takahashi and M. Nagate. 1974. Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. Agricultural and Biological Chemistry 38 (2) : 471-473.
5. Carlberg, C. and B. Mannervik. 1985. Glutathione reductase. Methods in Enzymology 113 : 484-495.
6. Colpaert, J.V. and J.A. Van Assche. 1987. Heavy metal tolerance in some ectomycorrhizal fungi. Functional Ecology 1 : 415-421.
7. Colpaert, J.V. and J.A. Van Assche. 1992. Znic toxicity in ectomycorrhizal *Pinus sylvestris*. Plant and Soil 143 : 201-211.
8. Darlington, A.B. and W.E. Rauser. 1988. Cadmium alters the growth of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* : A new growth model accounts for changes in branching Canadian Journal of Botany 66 : 225-229.
9. Dolphin, D., R. Poulson and O. Avramovic. Eds. 1989. Glutathione : chemical, biochemical and medical aspects. Vols A & B, J. Wiley and Sons.
10. Eickhoff, J., E. Potts, J. Valtos and E.C. Niederhoffer. 1995. Heavy metal effects on *Proteus mirabilis* superoxide dismutase production. FEMS Microbiology Letters 132 : 271-276.
11. Foyer, C.H., H. Lopez-Delgado, J.F. Dat and I.M. Scott. 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. Physiologia Plantarum 100 : 241-254.
12. Gadd, G.M. 1992. Metals and microorganisms : A problem of definition. FEMS Microbiology Letters 100 : 197-294.
13. Gadd, G.M. 1993. Interactions of fungi with toxic metals. The New Phytologist 124 : 25-60.
14. Galiazzo, F., M.R. Ciriolo, M.T. Carri, P. Civitareale, L. Marmocchi, F. Marmocchi and G. Rotilio. 1991. Activation and induction by copper of Cu/Zn superoxide dismutase in *Saccharomyces cerevisiae*. European Journal of Biochemistry 196 : 545-549.
15. Greco, M.A., D.I. Hrab, W. Magner and D. J. Kosman. 1990. Cu, Zn superoxide dismutase and copper deprivation and toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology 172 (1) : 317-325.
16. Howe, R., R.L. Evans and S.W. Ketteridge. 1997. Copper-binding proteins in ectomycorrhizal fungi. The New Phytologist 135 : 123-131.
17. Jones, M.D. and T.C. Hutchinson. 1986. The effect of mycorrhizal infection on the response of *Betula papyrifera* to nickel and copper. The New Phytologist 102 : 429-442.
18. Jones, M.D. and T.C. Hutchinson. 1988. Nickel toxicity in mycorrhizal birch seedlings infected with *Lactarius rufus* or *Sclerderma flavidum*. The New Phytologist 108 : 451-459.
19. Laurence, O.S., J.J. Cooney and G.M. Gadd. 1989. Toxicity of organotins towards the marine yeast *Debaryomyces hansenii*. Microbial

Ecology 17 : 275-285.
20. Marx, D.H. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic and soil bacteria. Phytopathology 59 : 153-163.
21. Marx, D.H. 1975. Mycorrhiza and establishment of trees on strip-mined land. Ohio Journal of Science 75 : 288-297.
22. Morselt, A.F.W., W.T.M. Smits and T. Limonard. 1986. Histochemical demonstration of heavy metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. Plant and Soil 96 : 417-420.
23. Ochiai, E.I. 1987. General Principles of Biochemistry of the Elements. Plenum Press, New York. pp. 461.
24. Schickler, H. and H. Caspi. 1999. Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. Physiologia Plantarum 105 : 39-44.
25. Smith, I.K., T.L. Vierheller and C.A. Thorne. 1988. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithibis (2-nitrobenzoic acid). Analytical Biochemistry 175 : 408-413.
26. Tam, P.C.F. 1995. Heavy metal tolerance by ectomycorrhizal fungi and amelioration by *Pisolithus tinctorius*. Mycorrhiza 5 : 181-187.
27. Trappe, J.M. 1977. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. Annual Review of Phytopathology 15 : 203-222.
28. Wondratschek, I. and U. Röder. 1993. Monitoring of heavy metals in soils by higher fungi. pp. 345-363. In B. Markert ed. Plant as biomonitors; Indicators for heavy metals in the terrestrial environment. Weinheim, New York, Basel, Cambridge. VCH.