

研究报告

金属胁迫下灵芝寡肽转运蛋白基因家族的转录表达

何茂兰 沈柯宇 秦澎 向泉桔*

(四川农业大学资源学院微生物系 四川 成都 611130)

摘要:【目的】寡肽转运蛋白(Oligopeptide transporters, OPTs)通过细胞质膜,将细胞外环境中的物质转入细胞内,从而参与各种生理活动。植物中 OPTs 蛋白参与金属运输和分配,从而促进植物对金属的利用和适应,但真菌中 OPTs 是否参与这一过程的相关报道较少。探究 OPTs 是否在灵芝对金属的适应过程中发挥作用。【方法】以灵芝荣保 1 号为材料,利用平板实验分析不同浓度的 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Se^{4+} 对菌丝体生长和生物量的影响,并采用实时荧光定量 PCR 分析不同金属离子胁迫下,两个培养阶段(15 d 和 30 d)灵芝寡肽转运蛋白基因(OPTs)的转录表达水平。【结果】 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Se^{4+} 三个金属离子在实验使用的浓度范围内抑制灵芝菌丝体的生长量和生物量,且在相同处理条件下的生长量与生物量的变化趋势相同。荧光定量 PCR 结果显示,除未检测到转录本的 3 个基因(OPT7、OPT8 和 OPT9),其余 10 个基因均表现出了差异性表达模式。在培养前期(15 d),有 6 个寡肽转运蛋白基因(OPT1、OPT3-6 和 OPT10)的相对表达量在 Cu^{2+} 的胁迫下发生上调,而在 Fe^{2+} 和 Se^{4+} 的胁迫下,所有的 OPTs 基因的表达量均被下调。在培养后期(30 d), Se^{4+} 胁迫下的 OPTs 基因的表达量仍旧被下调,而 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 的胁迫下表达量均显著上调。【结论】金属能够在不同的程度上影响灵芝的生长量和生物量,同时寡肽转运蛋白基因对这些金属胁迫在转录水平上做出了响应,表明寡肽转运蛋白基因可能在灵芝对金属的适应过程中发挥作用。

关键词: 生长量, 生物量, 寡肽转运蛋白基因, 金属胁迫

Transcriptional analysis of oligopeptide transporter gene family under metal stress of *Ganoderma lucidum*

HE Mao-Lan SHEN Ke-Yu QIN Peng XIANG Quan-Ju*

(Department of Microbiology, College of Resources, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

Abstract: [Objective] Substrates in the environment can be transported into the cell by oligopeptide transporters (OPTs), and then contribute to various biological processes. OPTs proteins are involved in metal transports and distributions in plants, which can promote the plants to use and adapt various metals. However, if OPTs from fungi participates in this process is still unknown. To explore if OPTs

Foundation item: Education Office of Sichuan Province (No. 15ZA0013)

*Corresponding author: Tel: 86-28-86290982; E-mail: xiangquanju@163.com

Received: March 23, 2017; Accepted: May 19, 2017; Published online (www.cnki.net): May 31, 2017
基金项目: 四川省教育厅重点项目(No. 15ZA0013)

*通讯作者: Tel: 86-28-86290982; E-mail: xiangquanju@163.com

收稿日期: 2017-03-23; 接受日期: 2017-05-19; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-05-31

play a role in the adaptation process of *Ganoderma lucidum* to metals. **[Methods]** Mycelium growth and biomass of *G. lucidum* (No. 1 Rongbao) were tested in the presence of different concentrations of Cu^{2+} , Se^{4+} and Fe^{2+} . The specific or differential expression profiles of *OPTs* were analyzed by real-time quantitative PCR (RT-PCR) from the samples cultured for 15 d and 30 d. **[Results]** Growth and biomass were inhibited under all metal concentrations of Cu^{2+} , Fe^{2+} and Se^{4+} . The results of RT-PCR showed that, except three genes (*OPT7*, *OPT8* and *OPT9*), whose transcripts were not detected, the other 10 *OPT* genes have differential expression profiles. At the early culture stage (15 d), the relative expression levels of 6 *OPT* genes (*OPT1*, *OPT3-6* and *OPT10*) were up-regulated under Cu^{2+} stress, but the expression levels of all *OPTs* gene were down-regulated under Fe^{2+} and Se^{4+} treatments. At the later culture stage (30 d), the relative expression levels of all *OPTs* gene were down-regulated under Se^{4+} stress, but the expression levels were significantly up-regulated under Cu^{2+} and Fe^{2+} treatments. **[Conclusion]** These results indicate that these metals can affect the growth and biomass of *G. lucidum*, while the oligopeptide transporter genes responded to metal stress at transcriptional levels, suggesting that *OPT* genes may function in the metal adaption processes in *G. lucidum*.

Keywords: Growth quantity, Biomass, Oligopeptide transporter gene, Metal stress

随着工业的快速发展及“三废”的大量排放、不合理的施肥和农药的使用,重金属污染的土壤和栽培基质(木屑、秸秆等)对食药菌人工栽培的影响越来越大^[1-2]。与绿色植物相比,食用菌能够吸附和累积高浓度的金属,具有较高的修复金属污染环境的潜力,可以作为一种新兴的生物吸附剂,在污染环境的治理方面发挥重要作用。

食用菌耐受和吸附金属的机理复杂多样,其对金属的耐受主要通过细胞外多聚物的防御(如吸附、沉淀等)、细胞膜的选择通透性以及细胞内蛋白的解毒,而对金属的富集则主要表现为细胞表面的生物吸附以及食用菌在生长代谢过程中对金属的需求^[3-4]。寡肽转运蛋白(Oligopeptide transport protein, OPT)是一类广泛存在于原核和真核生物中的转运蛋白,通常以基因家族的形式存在。OPT蛋白的功能多样,可以转运胞外环境的物质进入胞内,如可以转运环境中的寡肽至细胞体内作为营养物质,同时也可以协助金属离子的转运及有毒金属离子的解毒^[5]。OPT蛋白在金属胁迫下的研究较多地在植物中开展,如拟南芥 *AtOPT* 协助保持金属在其体内的平衡,同时在种子发育过程中参与铁离子的转运^[6];芥菜中 OPT 蛋白 *BjGT1* 可以转运谷胱甘肽,并参与调控重金属解毒过程^[7],水稻中

OsOPT7 基因的表达在缺铁状态下特异性上调,表明其参与水稻铁离子的转运^[8]。真菌,尤其是食药菌,作为一种对金属耐受性和吸附能力均较高的生物,OPT 蛋白在金属胁迫方面的报道相对较少。根据已有的真菌基因组数据库可以发现,OPT 基因在真菌中大量存在,如在白假丝酵母中有 8 个编码 OPT 蛋白的基因^[9],黄孢原毛平革菌中有 14 个编码 OPT 蛋白的基因^[10],大量 OPT 基因的存在,表明其在这些生物体内可能发挥重要的作用。

灵芝是一种名贵的食药菌,具有免疫调节、抗肿瘤、抗病毒等功效^[11],已大范围实现人工栽培。作为一种覆土食用菌,其生长极易受到土壤和栽培基质中金属的污染,从而影响灵芝正常的生长发育。对灵芝基因组序列分析,发现其存在 13 个编码 OPT 蛋白的基因。课题组在前期的研究中发现,灵芝 OPT 基因的转录表达水平受到重金属铅和镉的影响^[12]。为了进一步了解不同金属胁迫下,灵芝 OPT 蛋白可能发挥的生理作用,本研究以灵芝荣保 1 号为材料,初步探讨 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Se^{4+} 三种金属对灵芝生长量、生物量及 *OPTs* 基因转录表达水平的影响,为进一步阐明 OPT 蛋白在灵芝生长发育过程中的具体作用提供基础。

1 材料与方法

1.1 菌种、主要试剂和仪器

灵芝(*Ganoderma lucidum*)荣保1号,由四川农业大学微生物系保存。

Pb(NO₃)₂、CdCl₂·2½H₂O、CuSO₄·5H₂O、FeSO₄·7H₂O、Na₂SeO₃,成都科龙化工试剂厂;葡萄糖,西陇科学股份有限公司;琼脂粉,上海伊卡生物技术有限公司;所有试剂均为分析纯。FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;SYBR Green Master Mix,南京诺唯赞生物科技有限公司。

DHP-9082 电热恒温培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;GI54DWS 高压蒸汽灭菌锅,创博环球北京科技有限公司;AIRTECH 超净工作台,苏州净化设备有限公司;iQ5 荧光定量 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司。

1.2 金属离子标准液与培养基

CuSO₄·5H₂O、FeSO₄·7H₂O 和 Na₂SeO₃ 配置成 50 g/L 的母液,其中 CuSO₄·5H₂O 母液 1×10⁵ Pa 灭菌 30 min,FeSO₄·7H₂O 和 Na₂SeO₃ 用 0.22 μm 滤膜过滤除菌。

PDA 固体培养基和 PDB 液体培养基用于菌株的常规保存和培养。灵芝对金属耐受性实验培养基的制备如下:吸取适量金属离子母液到灭菌后的 PDA 固体培养基中,制成平板,待冷却后,铺上一层无菌玻璃纸。其中 Cu²⁺的终浓度设置为 0、20、100、200、400 和 800 mg/kg,Fe²⁺和 Se⁴⁺的终浓度设置为 0、50、200、400、600 和 1 000 mg/kg。

为了分析 *OPT* 基因在这 3 种金属胁迫下的转录表达水平,根据平板实验的结果,设置 Cu²⁺浓度为 100 mg/kg,Fe²⁺和 Se⁴⁺浓度为 200 mg/kg,进行液体发酵培养。并分别在培养 15 d 和 30 d 取样,液氮速冻。

1.3 培养方法

用灭菌打孔器打孔新鲜活化的灵芝平板一块(直径 $D=1$ cm),接种到加了不同金属浓度的 PDA 平板中间,30 °C 恒温静置培养 7 d,测定菌丝生

长速度及生物量。每个处理设置 3 个重复。

接种三块菌块(直径 $D=1$ cm)至加入了相应金属浓度的 PDB 液体发酵培养基中,30 °C 恒温静置培养,分别于 15 d 和 30 d 收集样品,用于 RNA 提取,每个条件设置 3 个重复。

1.4 菌丝体生长量与生物量的测定

生长量的测定:平板固体培养 7 d,测定培养基上菌落的直径,垂直方向测定两次后取平均值。

生物量的测定:平板固体培养 7 d,将菌膜从玻璃纸上剥下,50 °C 烘干至恒重后称重。

1.5 总 RNA 提取、cDNA 合成和 qRT-PCR

分别取培养 15 d 和 30 d 的菌丝体,液氮速冻研磨,利用 TRIzol 法提取总 RNA^[13],通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测所提 RNA 的完整性。使用 FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒合成第一链 cDNA。具体步骤如下,首先去除 gDNA,反应体系为(10 μL):Total RNA 2 μL,5×gDNA buffer 2 μL,RNase-Free Water 6 μL。将体系置于 42 °C,孵育 3 min 后冰上放置。配置反转录体系(10 μL):10×Fast RT Buffer 2 μL,RT Enzyme Mix 1 μL,FQ-RT Primer Mix 2 μL,RNase-Free Water 5 μL。将配置好的反转录体系加入 gDNA 去除体系中,42 °C 孵育 15 min,95 °C 孵育 3 min 之后放于冰上,得到 cDNA。将 cDNA 放置-20 °C 保存。

以 cDNA 为模板,使用 SYBR Green Master Mix 试剂盒对 *OPT* 基因进行 RT-PCR 分析,RT-PCR 在 Bio-Rad 公司的 iQ5 荧光定量 PCR 仪上进行。荧光定量 PCR 反应体系为(20 μL):2×Green Master Mix 10 μL,10 μmol/L Forward 和 Reverse 引物各 0.2 μL,50×Rox Reference Dye1 0.4 μL,1 500 ng 模板 cDNA 2 μL,加入 ddH₂O 补充至 20 μL。反应程序为:95 °C 5 min;95 °C 10 s,60 °C 30 s,40 个循环,通过溶解曲线分析引物的特异性。以灵芝 RPL4 为内参基因^[14],*OPTs* 和内参基因引物序列参照文献[12]。寡肽转运蛋白基因的相对表达量的计算方法为 $Y = 10^{-(\Delta C_t/3)} \times 100$,其中 ΔC_t 是 *OPTs* 基因与内参基因 C_q 值的差异^[15-17]。

1.6 数据分析方法

用 Excel 进行平均值和标准值的计算, SPSS 进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Se^{4+} 对灵芝菌丝生长的影响

在 PDA 培养基中添加不同浓度的金属离子, 培养 7 d 后, 灵芝菌丝体生长情况如图 1 所示。虽然三种金属离子对灵芝菌丝体生长的影响存在区别, 但总的趋势均是抑制的, 其中 Cu^{2+} 和 Se^{4+} 两种金属随浓度增加, 灵芝菌丝体生长量逐渐减少, 抑制作用逐渐加强, 当 Se^{4+} 的浓度达到 1 000 mg/kg 时, 菌丝几乎不生长, 可能为菌丝生长致死浓度。 Fe^{2+} 对灵芝菌丝生长的影响表现出不规律的现象, 低浓度(50–200 mg/kg)处理下, Fe^{2+} 含量的增加, 灵芝菌丝体的生长量受到抑制, 当浓度逐渐升高(200–600 mg/kg)时, 这种抑制作用不断减弱, 但随着浓度的进一步升高, 抑制作用又不断加强。

2.2 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Se^{4+} 对灵芝菌丝体生物量的影响

不同金属及其浓度下灵芝菌丝生物量如图 2 所示, 总的来说生物量变化的趋势和菌丝生长速度的变化趋势一致。 Fe^{2+} 在研究中使用的浓度范围, 其生物量呈波动变化的趋势, 当浓度为 200 mg/kg 时, 生物量最小。 Cu^{2+} 和 Se^{4+} 两种金属处理下, 随着金属含量的增加, 抑制作用逐渐加强, 菌丝体的生物量逐渐减少, 当 Se^{4+} 的浓度达到 1 000 mg/kg 时, 菌丝无法生长, 生物量为 0。

2.3 Cu^{2+} 、 Se^{4+} 和 Fe^{2+} 三种金属胁迫下灵芝 *OPTs* 基因的转录表达

采用实时荧光定量 PCR 分析灵芝中 *OPT* 基因家族在三种金属胁迫下的转录表达情况。结果显示除未检测到转录本的 3 个 *OPT* 基因(*OPT7*、*OPT8* 和 *OPT9*), 其余 10 个基因都出现了差异性表达模式(图 3)。

培养 15 d 的样品中, 在 Cu^{2+} 的胁迫下, 6 个寡肽转运蛋白基因(*OPT1*、*OPT3*、*OPT4*、*OPT5*、*OPT6* 和 *OPT10*)的相对表达量较对照组明显上调, 其中 *OPT6* 较对照上调约 591.3 倍, 其余 4 个寡肽转运

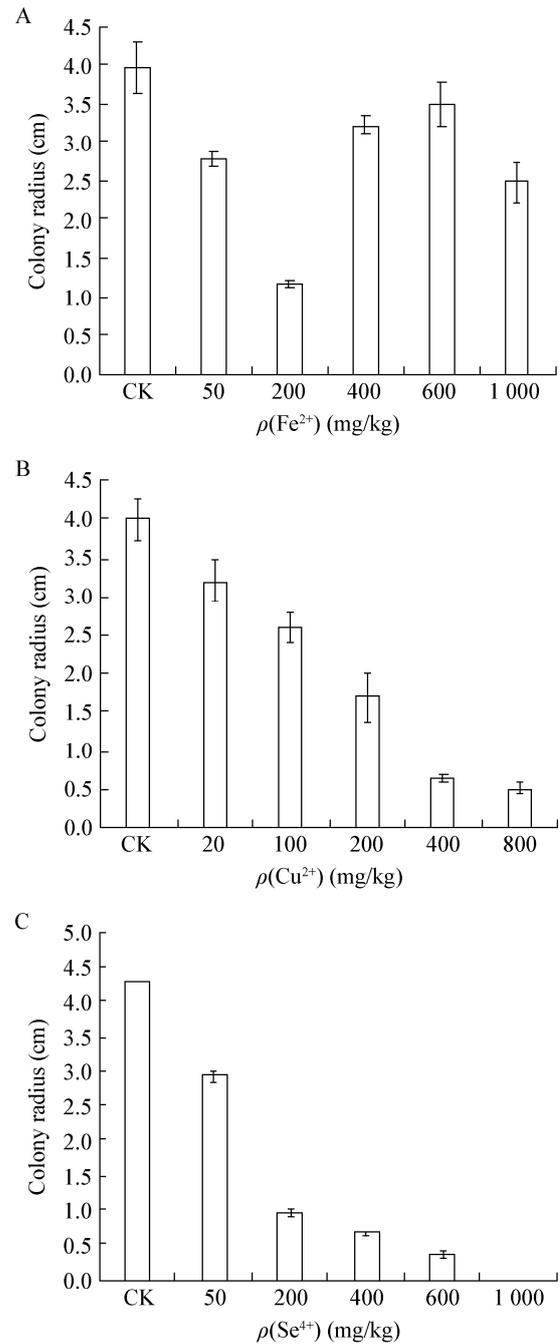


图 1 $\rho(\text{Fe}^{2+})$ 、 $\rho(\text{Cu}^{2+})$ 和 $\rho(\text{Se}^{4+})$ 对灵芝菌丝生长的影响
Figure 1 Effects of $\rho(\text{Fe}^{2+})$, $\rho(\text{Cu}^{2+})$ and $\rho(\text{Se}^{4+})$ on the growth of *G. lucidum*

注: A: 不同浓度的 Fe^{2+} 对灵芝菌丝体生长量的影响; B: 不同浓度的 Cu^{2+} 对灵芝菌丝体生长量的影响; C: 不同浓度的 Se^{4+} 对灵芝菌丝体生长量的影响。

Note: A: Effects of different concentrations of Fe^{2+} on the growth of *G. lucidum*; B: Effects of different concentrations of Cu^{2+} on the growth of *G. lucidum*; C: Effects of different concentrations of Se^{4+} on the growth of *G. lucidum*.

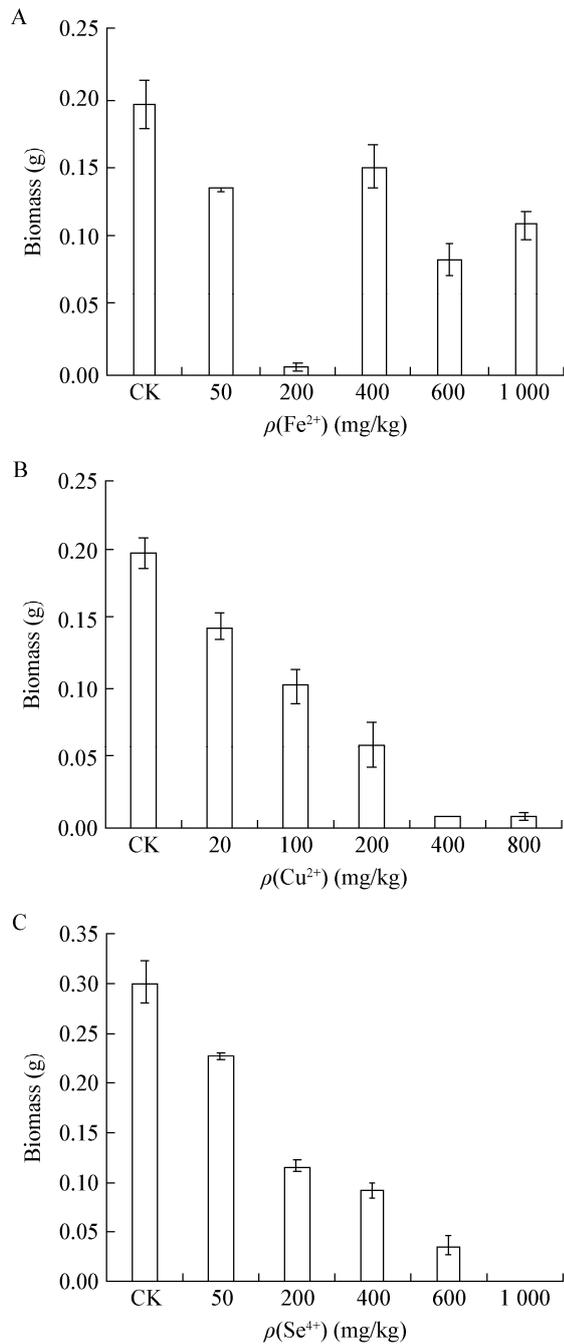


图2 $\rho(\text{Fe}^{2+})$ 、 $\rho(\text{Cu}^{2+})$ 和 $\rho(\text{Se}^{4+})$ 对灵芝菌丝体生物量的影响
Figure 2 Effects of $\rho(\text{Fe}^{2+})$, $\rho(\text{Cu}^{2+})$ and $\rho(\text{Se}^{4+})$ on the biomass of *G. lucidum*

注：A：不同浓度的 Fe^{2+} 对灵芝菌丝体生物量的影响；B：不同浓度的 Cu^{2+} 对灵芝菌丝体生物量的影响；C：不同浓度的 Se^{4+} 对灵芝菌丝体生物量的影响。

Note: A: Effects of different concentrations of Fe^{2+} on the biomass of *G. lucidum*; B: Effects of different concentrations of Cu^{2+} on the biomass of *G. lucidum*; C: Effects of different concentrations of Se^{4+} on the biomass of *G. lucidum*.

蛋白基因(*OPT2*、*OPT11*、*OPT12*和*OPT13*)转录表达量下调,其中*OPT11*较对照下调约2.68倍。在 Se^{4+} 的胁迫下,10个寡肽转运蛋白基因的相对表达量均下调,其中*OPT10*较对照下调约42.9倍。在 Fe^{2+} 的胁迫下,除*OPT4*和*OPT5*的相对表达量上调外,其余基因的表达量均下调,其中*OPT2*较对照下调约7.95倍。

培养30d的样品中,所检测到的*OPT*基因的相对表达量在 Cu^{2+} 胁迫下均发生上调,与培养15d的样品一样,*OPT6*的表达量最高,较对照上调约537.30倍。 Se^{4+} 胁迫处理下,4个寡肽转运蛋白基因(*OPT1*、*OPT5*、*OPT6*和*OPT10*)的相对表达量发生小幅度上调,上调幅度最大的*OPT6*仅比对照上调约3.67倍,其余6个寡肽转运蛋白基因(*OPT2*、*OPT3*、*OPT4*、*OPT11*、*OPT12*和*OPT13*)的相对表达量均下调,其中*OPT13*较对照下调约108.59倍。在 Fe^{2+} 的作用下,所检测的*OPT*基因的相对表达量均发生上调,其中上调幅度最小的为*OPT4*(约14倍),上调幅度最大的为*OPT3*(约3400倍)。在培养初期(15d),*OPT3*转录表达水平对 Fe^{2+} 未发生变化,但随着培养时间的延长(30d),其转录表达水平发生巨大的上调,表明*OPT3*在灵芝对金属 Fe^{2+} 的胁迫中发挥重要作用。

3 讨论

在食药用菌培养基中添加一定浓度的钙、铁、锌、镁、铜、锰等金属离子有利于其菌丝体的生长,但其机制的研究报道较少^[18-19]。谢宝贵等^[20]认为金属的添加量趋向于无穷大时,食药用菌对金属的累积量会趋于一个极限值。当金属达到一定浓度后,会刺激启动细胞内的所有防御机制,但细胞内仍然有游离状态的金属离子的存在,会产生毒害作用,从而破坏细胞的物质和能量基础。因此,中低浓度的金属会促进菌丝生长,而较高浓度则抑制菌丝生长,甚至死亡^[21]。在液体发酵培养中根据不同菌株的特性适量添加微量元素,可以促进菌丝体的生长^[22]。叶盛权等通过在灵芝液体发酵培养基中添加0.2%的 Fe^{2+} ,大大的增加了其生物量和

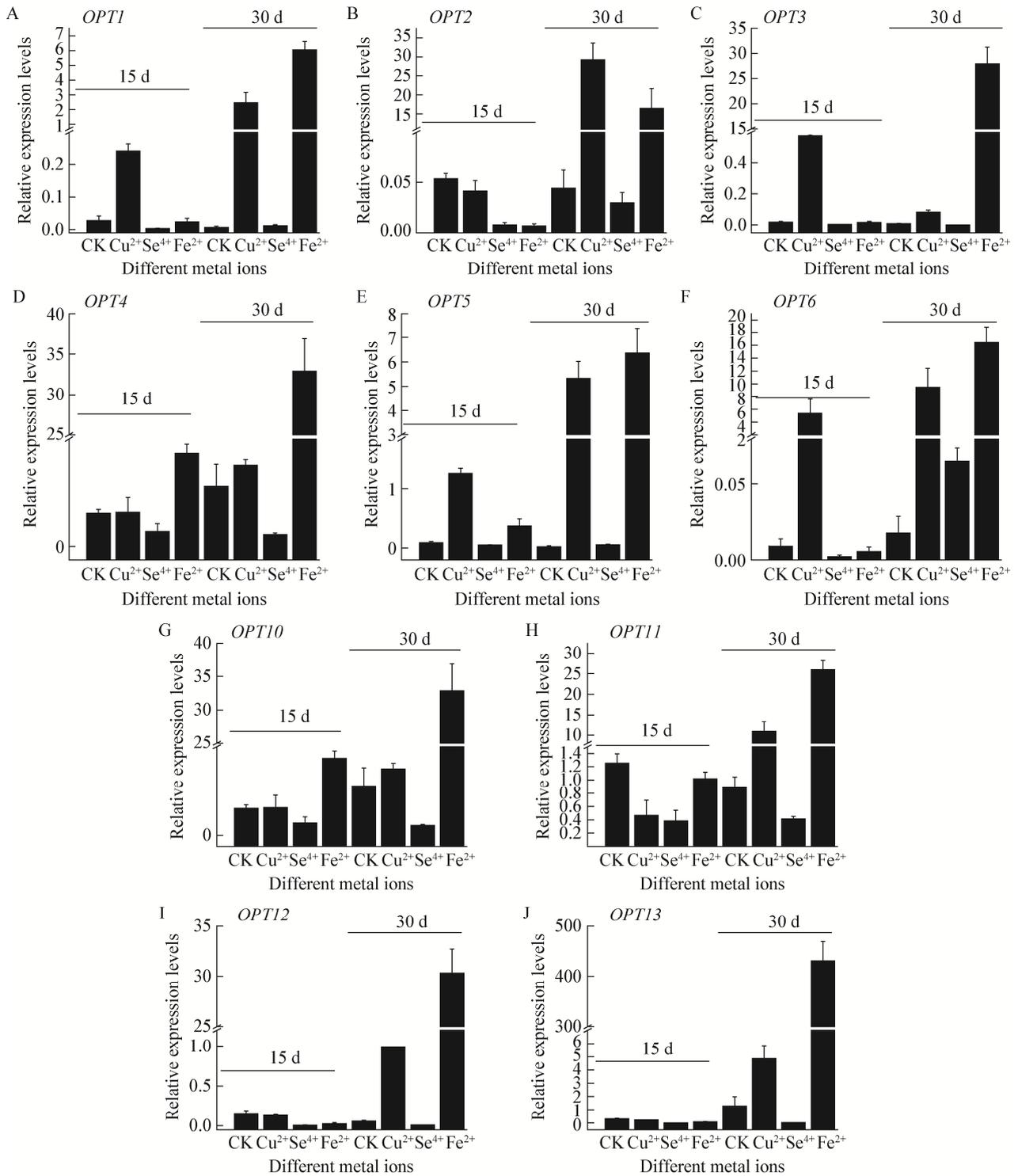


图 3 *OPTs* 在不同金属胁迫下不同培养阶段的相对表达量

Figure 3 Relative expression levels of *OPTs* under different metal treatments and culture stages

注：A、B、C、D、E、F、G、H、I、J 分别代表 10 个寡肽转运蛋白基因(*OPT1*、*OPT2*、*OPT3*、*OPT4*、*OPT5*、*OPT6*、*OPT10*、*OPT11*、*OPT12*、*OPT13*)在不同金属离子(Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Se^{4+})及两个培养阶段(15 d、30 d)的转录表达水平。

Note: A, B, C, D, E, F, G, H, I, and J represent the transcriptional expression levels of *OPTs* in different metal ion (Fe^{2+} , Cu^{2+} and Se^{4+}) stresses and two culture stages (15 d, 30 d).

多糖含量^[23], 张晓柠分析了灵芝 S3 在不同金属及其不同浓度处理下, 对其菌丝生长的影响, 结果显示, 当 Cu^{2+} 浓度达到 150 mg/kg 时, 其菌丝生长受到抑制^[21]。在本研究中, 不同浓度 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Se^{4+} 处理下的灵芝菌丝生长量和生物量均低于对照组, 这可能是由于不同灵芝菌株对金属种类和浓度的敏感性存在差异性, 导致本研究中所设置的金属浓度超过对实验菌株生长量和生物量的促进浓度范围。

寡肽转运蛋白的功能多样, 可以协助胞外物质向胞内转运, 参与金属耐受性和解毒等, 从而发挥各种生理作用, 其转录表达受培养条件、生长阶段等因素的影响^[24-25]。本研究通过实时荧光定量 PCR 分析灵芝中 13 个寡肽转运蛋白基因在 3 种金属胁迫下的转录表达差异, 结果显示, 始终没有检测到 3 个寡肽转运蛋白基因(*OPT7*、*OPT8* 和 *OPT9*) 在转录水平上的表达, 表明这 3 个基因可能是假基因, 也可能需要在特定的条件下才会被诱导表达。其余 10 个基因在金属离子胁迫下, 在两个培养阶段(15 d 和 30 d) 出现差异性的表达模式。在培养前期(15 d), 金属 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 的胁迫下, 部分寡肽转运蛋白基因的转录表达上调, 而 Se^{4+} 抑制了所有基因的表达; 随着培养时间的延长(30 d), Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 上调了所有 *OPT* 基因的表达, 而 Se^{4+} 仅促进了少部分 *OPT* 基因的表达。培养后期, Fe^{2+} 胁迫下除 *OPT2*, 其余 9 个 *OPT* 基因的上调幅度均大于 Cu^{2+} 胁迫下的上调幅度, 其中 *OPT3* 上调量最大, 是其他寡肽转运蛋白基因上调量的 2.43–230.21 倍。在多种植物中, 如拟南芥^[6]、水稻^[8] 和玉米^[26], 已经证实 *OPT* 蛋白参与 Fe^{2+} 转运和分配, 而 *OPT* 蛋白在金属 Cu^{2+} 的转运和分配中的作用目前还未见报道。本研究中, *OPT* 基因在 Cu^{2+} 胁迫下, 随着培养时间的延长(30 d) 其转录表达水平均发生上调, 表明其在 Cu^{2+} 的转运和分配中可能发挥重要作用。这些研究结果表明随着金属胁迫时间的延长, 灵芝中大多数的 *OPT* 基因均在转录水平上做出了响应, 暗示 *OPT* 蛋白在灵芝适应金属胁迫过

程中发挥重要的作用。

4 结论

外界条件, 如金属离子会不同程度影响食用菌的生长状况, 本研究中 3 种金属离子在不同浓度下对灵芝的生长速度和生物量均存在影响。同时, 灵芝中寡肽转运蛋白基因的转录表达受培养基中金属的影响, 这种影响随着金属离子的不同及培养阶段的不同而存在差异, 表明寡肽转运蛋白参与了灵芝对金属的适应性。培养后期, 在 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 胁迫下, 灵芝 *OPT* 基因的转录表达水平发生较大的变化, 其具体作用机制值得深入探讨, 尤其是 Fe^{2+} 胁迫下 *OPT3* (转录表达上调约 3 400 倍) 以及 *OPT* 在 Cu^{2+} 胁迫下的具体作用值得进一步研究。

参考文献

- [1] Zang J, Luo JC, Huang KX. Studies on screening of the strains for production of *Ganoderma lucidum* polysaccharide by submerged fermentation and optimizing the culture conditions[J]. Modern Food Science and Technology, 2007, 23(9): 39-41 (in Chinese)
臧晋, 罗建成, 黄开勋. 灵芝液体培养菌株的选择及其发酵条件优化[J]. 现代食品科技, 2007, 23(9): 39-41
- [2] Ma XK, Ling WL, Fam H. Heavy metal ions affecting the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi with heavy-metal resistance[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(23): 9817-9827
- [3] Zhu HL, Ban LT, Xu XP. Study progress on the tolerating and accumulating mechanism of edible mushrooms on heavy metals[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(13): 8056-8057 (in Chinese)
朱华玲, 班立桐, 徐晓萍. 食用菌对重金属耐受和富集机理的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(13): 8056-8057
- [4] Radulescu C, Stihl C, Busuioac G, et al. Evaluation of essential elements and heavy metal levels in fruiting bodies of wild mushrooms and their substrate by EDXRF spectrometry and FAA spectrometry[J]. Romanian Biotechnological Letters, 2010, 15(4): 5444-5456
- [5] Wang ZS, Xiang QJ, Wang GJ, et al. Study of *Phanerochaete chrysosporium* oligopeptide transporter gene family[A]// Chinese Genetics Society Meeting[C]. Urumqi: Genetic Institute of Xinjiang Uygur Autonomous Region, 2011 (in Chinese)
王中山, 向泉桔, 王广珺, 等. 黄孢原毛平革菌寡肽转运蛋白基因家族的研究[A]// 中国的遗传学研究——遗传学进步推动中国西部经济与社会发展——2011中国遗传学会大会论文摘要汇编[C]. 乌鲁木齐: 新疆维吾尔自治区遗传学会, 2011
- [6] Stacey MG, Patel A, McClain WE, et al. The arabidopsis *AtOPT3* protein functions in metal homeostasis and movement

- of iron to developing seeds[J]. *Plant Physiology*, 2007, 146(2): 589-601
- [7] Bogs J, Bourbonloux A, Cagnac O, et al. Functional characterization and expression analysis of a glutathione transporter, *BjGT1*, from *Brassica juncea*: evidence for regulation by heavy metal exposure[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2003, 26(10): 1703-1711
- [8] Bashir K, Ishimaru Y, Itai RN, et al. Iron deficiency regulated *OsOPT7* is essential for iron homeostasis in rice[J]. *Plant Molecular Biology*, 2015, 88(1/2): 165-176
- [9] Reuß O, Morschhäuser JM. A family of oligopeptide transporters is required for growth of *Candida albicans* on proteins[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 60(3): 795-812
- [10] Xiang QJ, Wang ZS, Zhang YZ, et al. An oligopeptide transporter gene family in *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Gene*, 2013, 522(2): 133-141
- [11] Tang QJ, Luo X, Liu YF, et al. Study on separation and purification low molecular weight of *Ganoderma lucidum* polysaccharide and in vitro immune activity[C]. International Symposium on Ganoderma Research, 2011 (in Chinese)
唐庆九, 罗玺, 刘艳芳, 等. 低分子量灵芝多糖的分离纯化及体外免疫活性研究[C]. 2011国际灵芝研究学术会议论文集, 2011
- [12] Xiang QJ, Shen KY, Yu XM, et al. Analysis of the oligopeptide transporter gene family in *Ganoderma lucidum*: structure, phylogeny, and expression patterns[J]. *Genome*, 2017, 60(4): 293-302
- [13] Meng L, Feldman L. A rapid TRIzol-based two-step method for DNA-free RNA extraction from *Arabidopsis* siliques and dry seeds[J]. *Biotechnology Journal*, 2010, 5(2): 183-186
- [14] Xu J, Xu ZC, Zhu YJ, et al. Identification and evaluation of reference genes for qRT-PCR normalization in *Ganoderma lucidum*[J]. *Current Microbiology*, 2014, 68(1): 120-126
- [15] Chen AQ, He SE, Li FF, et al. Analyses of the sucrose synthase gene family in cotton: structure, phylogeny and expression patterns[J]. *BMC Plant Biology*, 2012, 12(1): 85
- [16] Liu ZL, Palmquist DE, Ma MG, et al. Application of a master equation for quantitative mRNA analysis using qRT-PCR[J]. *Journal of Biotechnology*, 2009, 143(1): 10-16
- [17] Chen AQ, Chen X, Wang HM, et al. Genome-wide investigation and expression analysis suggest diverse roles and genetic redundancy of *Pht1* family genes in response to Pi deficiency in tomato[J]. *BMC Plant Biology*, 2014, 14(1): 61
- [18] Tang LH. Study of mechanism with light-induced brown film formation in *Lentinula edodes*[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation of Shanghai Jiao Tong University, 2014 (in Chinese)
唐利华. 光诱导香菇菌丝转色形成机理的研究[D]. 上海: 上海交通大学博士学位论文, 2014
- [19] Hu XG, Liu WM, Liu J, et al. The influence of Zn and La on the *Grifola frondosa*'s mass production in liquid culture[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2005(1): 79-80 (in Chinese)
胡祥国, 刘伟民, 刘姜, 等. Zn、La对灰树花液体培养菌丝产量的影响[J]. *食品工业科技*, 2005(1): 79-80
- [20] Xie BG, Liu JY. Effects of heavy metals of Pb, Cd, Hg and As on the growth of three edible fungus[J]. *Edible Fungi of China*, 2005, 24(2): 35-38 (in Chinese)
谢宝贵, 刘洁玉. 重金属在三种食用菌中的累积及对其生长的影响[J]. *中国食用菌*, 2005, 24(2): 35-38
- [21] Zhang XN. Studies on the effects of four heavy-metals bioaccumulation in *Ganoderma lucidum*[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2007 (in Chinese)
张晓柠. 灵芝对四种重金属富集作用的研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2007
- [22] Cai AQ, Zhang PC. Effect of calcium, iron and manganese on mycelial biomass production by *Ganoderma lucidum* and *ganoderma tsugae* grown in submerged culture[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2011, 18(4): 40-42 (in Chinese)
蔡爱群, 张鹏财. 钙、铁和锰对两种灵芝液体培养菌丝体生物量的影响[J]. *食用菌学报*, 2011, 18(4): 40-42
- [23] Ye SQ, Wu H, Yu YG, et al. Research for different metal ion in *Ganoderma lucidum* polysaccharides fermentation[J]. *Food Research and Development*, 2011, 32(1): 106-108 (in Chinese)
叶盛权, 吴晖, 余以刚, 等. 不同金属离子对灵芝多糖液态发酵的影响[J]. *食品研究与开发*, 2011, 32(1): 106-108
- [24] Hartmann T, Cairns TC, Olbermann P, et al. Oligopeptide transport and regulation of extracellular proteolysis are required for growth of *Aspergillus fumigatus* on complex substrates but not for virulence[J]. *Molecular Microbiology*, 2011, 82(4): 917-935
- [25] Hu YT, Ming F, Chen WW, et al. *TcOPT3*, a member of oligopeptide transporters from the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, is a novel Fe/Zn/Cd/Cu transporter[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38535
- [26] Yen MR, Tseng YH, Saier MH Jr. Maize Yellow Stripe1, an iron-phytosiderophore uptake transporter, is a member of the oligopeptide transporter (*OPT*) family[J]. *Microbiology*, 2001, 147(11): 2881-2883