

镉胁迫对巴西蘑菇镉亚细胞分布和非蛋白巯基的影响

周宇, 张聪慧, 翁伯琦, 陈华, 刘朋虎

引用本文:

周宇, 张聪慧, 翁伯琦, 陈华, 刘朋虎. 镉胁迫对巴西蘑菇镉亚细胞分布和非蛋白巯基的影响[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(6): 1193–1201.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-1173>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

镉胁迫对姬松茸菌丝生理指标与镉吸收的影响

刘朋虎, 陈华, 李波, 王义祥, 翁伯琦

农业环境科学学报. 2020, 39(8): 1675–1682 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0469>

姬松茸菌株J1与J77镉富集差异及生理响应机制

刘朋虎, 李波, 江枝和, 王义祥, 翁伯琦

农业环境科学学报. 2017, 36(5): 863–868 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-0073>

硅对镉胁迫条件下两个水稻品种镉亚细胞分布、非蛋白巯基物质含量的影响

李江遐, 张军, 马友华, 蔡慢弟, 高飞

农业环境科学学报. 2018, 37(6): 1066–1071 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-0928>

生菜对镉胁迫的生理响应及体内镉的累积分布

贾月慧, 韩莹琰, 刘杰, 高凡, 梁琼, 俞萍, 刘超杰, 张鑫, 苏博伟

农业环境科学学报. 2018, 37(8): 1610–1618 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0033>

磷镉交互作用对白骨壤幼苗体内镉的亚细胞分布和生理特性的影响

王岚, 戴闽玥, 严重玲

农业环境科学学报. 2018, 37(4): 640–646 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-1193>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

周宇, 张聪慧, 翁伯琦, 等. 镉胁迫对巴西蘑菇镉亚细胞分布和非蛋白巯基的影响[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(6): 1193–1201.

ZHOU Y, ZHANG C H, WENG B Q, et al. Effects of cadmium stress on cadmium subcellular distribution and non-protein thiol of *Agaricus brasiliensis*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2022, 41(6): 1193–1201.

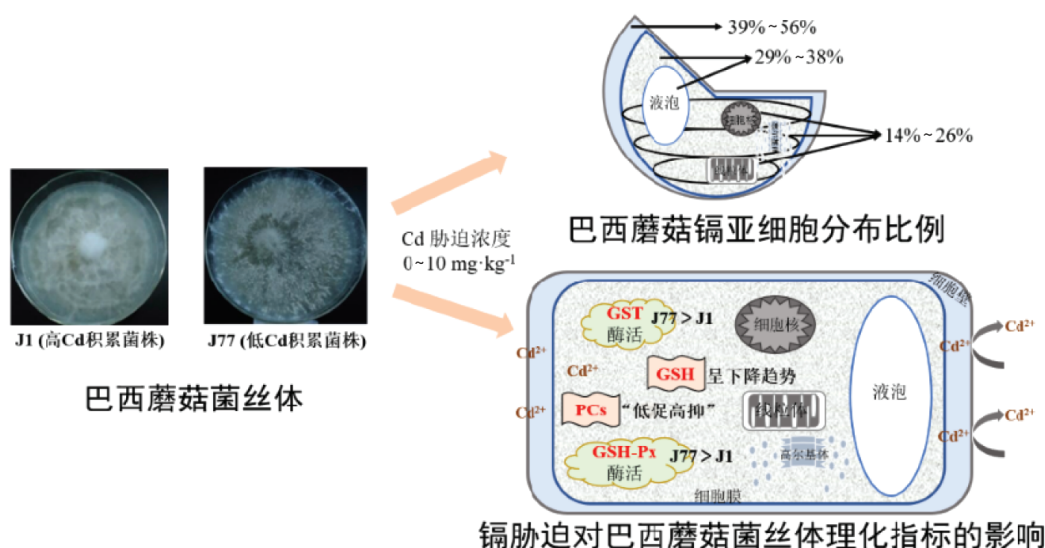


开放科学 OSID

镉胁迫对巴西蘑菇镉亚细胞分布和非蛋白巯基的影响

周宇^{1,3}, 张聪慧^{1,3}, 翁伯琦², 陈华², 刘朋虎^{3*}

(1. 福建农林大学园艺学院, 福州 350002; 2. 福建省农业科学院农业生态研究所, 福州 350013; 3. 福建农林大学国家菌草工程技术研究中心, 福州 350002)



摘 要: 本研究以不同浓度镉胁迫下的巴西蘑菇菌株J1(高Cd积累菌株)和J77(低Cd积累菌株)为实验材料,通过差速离心和酶联免疫法(ELISA),研究了菌丝生长、镉亚细胞分布、细胞内镉螯合相关的小分子非蛋白巯基化合物含量的变化以及小分子非蛋白巯基化合物代谢酶的活性,从细胞水平及酶学活性方面揭示了不同镉积累菌株对镉胁迫的响应机制。结果显示:随着外源添加镉浓度增加,2个菌株菌丝生长均受到抑制,出现大量气生菌丝,且J77气生菌丝多于J1;J1和J77菌丝中镉的分布规律均为细胞壁>细胞液>细胞器,表明细胞壁具有固持Cd²⁺的作用;菌株J77中谷胱甘肽硫转移酶(GST)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性均高于J1;J77和J1中植物螯合肽(PCs)和非蛋白巯基(NPT)含量变化趋势一致,表现出“低促高抑”;相关性分析显示,镉胁迫与GSH-Px活性呈正相关关系,NPT含量与PCs含量呈极显著正相关。巴西蘑菇菌丝体镉解毒机制包括细胞壁沉积和重金属分区,非蛋白巯基物质的合成,不同菌株对镉胁迫响应存在差异。

关键词: 巴西蘑菇; 镉; 亚细胞分布; 非蛋白巯基化合物

中图分类号: X172 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2022)06-1193-09 doi:10.11654/jaes.2021-1173

收稿日期: 2021-10-12 录用日期: 2021-12-15

作者简介: 周宇(1997—),男,贵州兴义人,硕士研究生,从事食用菌育种与循环农业研究。E-mail: 1964707578@qq.com

*通信作者: 刘朋虎 E-mail: phliu1982@163.com

基金项目: 福建省科技厅农业引导性(重点)项目(2020N0007); 中央引导地方科技发展专项(2020L3030); 福建农林大学学科交叉融合项目(XKJC-712021030); 福建农林大学科技发展基金(CXZX2017565)

Project supported: The Agricultural Guiding Key Project of Fujian Science and Technology Department (2020N0007); The Special Project of the Central Government to Guide the Local Science and Technology Development (2020L3030); The Interdisciplinary Integration Project of Fujian Agriculture and Forestry University (XKJC-712021030); The Science and Technology Development Fund of Fujian Agriculture and Forestry University (CXZX2017565)

Effects of cadmium stress on cadmium subcellular distribution and non-protein thiol of *Agaricus brasiliensis*ZHOU Yu^{1,3}, ZHANG Conghui^{1,3}, WENG Boqi², CHEN Hua², LIU Penghu^{3*}

(1. College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Agricultural Ecology Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China; 3. National Engineering Research Center of Juncao Technology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: In this study, *Agaricus brasiliensis* strains J1 (high Cd-accumulating strain) and J77 (low Cd-accumulating strain) under different concentrations of Cd stress were used as research materials. Using differential centrifugation and an enzyme-linked immunosorbent assay, we investigated the mycelial growth, Cd subcellular distribution, change in the content of small-molecule non-protein thiol (NPT) compounds, and activity of small-molecule NPT compound-metabolizing enzymes that were related to intracellular Cd chelation, which revealed the response mechanisms of different Cd accumulating strains to Cd stress at the cellular level and enzymatic activity. The results showed that as the concentration of external Cd increased, the growth of the hyphae of the two strains was inhibited, and many aerial hyphae appeared. There were more aerial hyphae of J77 than that of J1. The distribution of Cd in the hyphae of J1 and J77 followed the order of cell wall > cell sap > organelles, which indicated that the cell wall could hold Cd²⁺. The activities of glutathione S-transferase and glutathione peroxidase (GSH-Px) in strain J77 were higher than those in J1. The changes in the phytochelatin (PC) and NPT contents in J77 and J1 were consistent, and showed "stimulation at low Cd concentrations and inhibition at high Cd concentrations". Correlation analysis showed that Cd stress was positively correlated with the GSH-Px content, and the NPT content was significantly positively correlated with the PC content. The Cd detoxification mechanism of *A. brasiliensis* mycelium included cell wall deposition, heavy metal partitioning, and synthesis of NPT substances. Different strains exhibit different response patterns to Cd stress.

Keywords: *Agaricus brasiliensis*; cadmium; subcellular distribution; non-protein thiols compound

巴西蘑菇(*Agaricus brasiliensis*)又称姬松茸、小松口蘑、巴氏蘑菇等,属于担子菌门、伞菌纲、伞菌科、蘑菇属,是一种中温偏高的腐生菌。由于其具有丰富的营养价值和药用价值,深受广大消费者的喜爱。镉(Cd)具有生物毒性强、迁移速度快、易被菌丝体吸收富集的特点,是食用菌重金属污染的重要类型之一^[1]。相对于其他食用菌,巴西蘑菇对镉具有更强的富集性^[2],镉超标时有发生,严重影响巴西蘑菇的食用价值和出口创汇。因此,采取措施保障巴西蘑菇绿色安全生产已成为目前研究热点之一。前人对食用菌镉耐性和镉解毒机制开展了较多研究,已在低镉积累菌株筛选、镉富集机制、镉解毒机制、抑制消减杂交技术、转录组等方面取得一定成果,对食用菌镉污染防控提供了借鉴^[3-6],但目前巴西蘑菇镉富集机制研究仍不全面。

食用菌对镉的富集过程主要体现在两个方面,一是生物吸附作用,即细胞外多聚物和细胞壁上多糖等有机物,通过共价、静电或分子引力的作用将Cd²⁺吸附在菌丝表面;二是主动吸收作用,Cd²⁺进入细胞质后与氨基酸、金属硫蛋白、含巯基小分子等物质结合,形成特殊的镉螯合物,减轻镉对细胞的毒害作用^[3,7]。李三暑等^[8]通过酶解法和差速离心法对巴西蘑菇细胞进行亚细胞分离试验,发现细胞壁对镉具有较强的

截留作用,阻碍大部分镉进入细胞质和液泡内。刘高翔^[9]的研究也表明,巴西蘑菇子实体中细胞壁是镉主要的富集场所,巴西蘑菇还可作为一种新型的生物吸附剂,用以吸附水溶液中Cd²⁺。据研究,巴西蘑菇不同菌株对镉的吸收积累存在很大差异^[2]。不同菌株及外源镉浓度是否影响镉的亚细胞分布还未见报道。

谷胱甘肽(Glutathione, GSH)、植物螯合肽(Phytochelatins, PCs)和半胱氨酸(Cysteine, Cys)等小分子化合物,作为植物体内的非蛋白巯基(Non-protein thiols, NPT)化合物能与Cd²⁺螯合,形成PC-Cd、GSH-Cd和CdS微晶体等复合物存在于细胞质或运输到液泡中,从而减缓镉对植物体的毒害或增强植物对镉的耐性^[10-12]。此外,与GSH代谢密切相关的解毒酶——谷胱甘肽硫转移酶(Glutathione S-transferase, GST)和谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione Peroxidase, GSH-Px)在镉解毒过程中也发挥了重要作用^[13]。GSH在GST的催化下可与细胞内的Cd²⁺络合形成复合物,将有毒物质转移到液泡内,以达到缓解镉毒害的作用^[14-16]。WANG等^[6]研究发现,镉胁迫下巴西蘑菇菌丝体的GST和GSH-Px与所有其他抗氧化酶一样,在诱导金属硫蛋白合成之前起到保护作用,提供对镉胁迫的第一道防线。然而,目前尚不清楚巴西蘑菇菌丝体镉的吸收积累是否与小分子巯基化合物有关。

课题组前期以巴西蘑菇主栽品种J1为出发菌株,采用 ^{60}Co 诱变技术获得镉富集显著降低的低镉菌株J77^[17]。本研究利用低镉菌株J77及对照菌株J1作为试验材料,对不同浓度镉胁迫下2个菌株菌丝中镉亚细胞分布,以及镉整合相关的小分子非蛋白巯基化合物含量变化进行研究,从细胞水平和相关酶活指标探讨不同浓度镉胁迫下2个菌株的响应差异,以期为巴西蘑菇耐镉机制提供科学依据,同时为低镉巴西蘑菇新品种选育奠定一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株为巴西蘑菇J1和J77,菌株保藏于国家菌草工程技术研究中心菌种保种室。

1.2 培养基

复壮培养基:马铃薯230 g、蔗糖20 g、磷酸二氢钾2 g、硫酸镁0.5 g、VB₁10 mg、琼脂20 g,加蒸馏水定容至1 L,pH值为7。

液体培养基:不加琼脂,其他同复壮培养基。

固体培养基:同复壮培养基。

1.3 试验设计

试验设0、2、4、6、8、10 mg·kg⁻¹ 6个梯度处理;将含镉母液(500 mg·L⁻¹)配制好备用,按试验设计将不同浓度镉溶液加入培养基中。供试药品为分析纯氯化镉(CdCl₂·2.5H₂O)。

1.4 镉胁迫下巴西蘑菇菌丝培养

固体培养基(平板)培养:将配制好的镉母液按照试验设计分别加到固体培养基中,在超净台里将J1和J77菌种接到固体培养基中,利用打孔器打孔接种,每一个平板接1块大小均一的菌丝体,各处理组设置3个生物学重复,每个生物学重复5次,于25℃恒温培养箱中培养10 d备用。

液体培养基(静置)培养:将配制好的镉母液,按照试验设计分别加入规格为250 mL的锥形瓶中,每瓶液体培养基为100 mL,取一块复壮好的平板,利用打孔器打孔接种,每一个培养瓶接3块大小均一的菌丝体,每个处理设置3个生物学重复,每个生物学重复10次,于25℃恒温培养箱中静置培养20 d,灭菌水逐一清洗后,过滤和收集菌丝,用液氮速冻保存于-80℃备用。

1.5 分析测定项目

1.5.1 测定菌丝生长速度

利用十字交叉法测定10 d菌丝生长速度,观察

菌丝形态和长势,并记录菌丝长势和菌丝色泽情况。

1.5.2 菌丝体亚细胞组分分离

每个处理称取5 g新鲜菌丝体进行亚细胞组分分离,取适量溶壁酶(lywallzyme,购于广东省微生物研究所)配制成20 g·L⁻¹酶液。按1:10(m:V)往菌丝体加入酶液,30℃、80 r·min⁻¹酶解3 h。将酶解后的溶液转入50 mL离心管中,采用差速离心法进行细胞壁、细胞器和细胞液的分离。首先在4℃、1 600 r·min⁻¹离心15 min,所得沉淀为细胞壁组分(F1),上层液备用;此后在4℃、18 000 r·min⁻¹离心45 min,上层液为细胞液组分(F3),所得沉淀为细胞器组分(F2)。

1.5.3 菌丝体镉含量测定

将分离好的细胞组分置于50 mL小锥形瓶中,加入10 mL HNO₃-HClO₄(9:1)混合溶液,封口膜封口过夜,每个处理重复3次。第2天置于石墨烯电热板上加热,缓慢升温至215℃继续消煮。直到锥形瓶中的液体由浑浊变为清澈透明,消煮结束。将消煮好的液体淋洗到10 mL离心管内保存。用型号为PinAAcle 900T的火焰原子吸收光谱仪进行镉含量测定^[18]。

1.5.4 理化指标测定

使用双抗体夹心法测定GST活性、GSH-Px活性、NPT含量和GSH含量,试剂盒购于上海通蔚生物科技有限公司。利用差减法计算PCs的含量,即PCs=NPT-GSH^[19]。

1.6 数据分析

试验数据采用Excel 2019软件进行数据处理;采用SPSS 19.0软件中Duncan多重性方法比较分析同一菌株不同处理间的差异性,皮尔逊方法进行相关性分析,数据均为3个重复的平均值±标准偏差;采用Origin 2019软件绘图。

2 结果与分析

2.1 镉胁迫对J1和J77菌丝生长情况的影响

不同浓度的外源镉胁迫对巴西蘑菇菌丝生长影响如表1所示,随着镉浓度的增加,J1和J77菌丝生长均受到抑制,由粗壮稀疏逐渐变为纤细浓密,出现气生菌丝,且J77气生菌丝均多于J1(图1)。当镉浓度为8~10 mg·kg⁻¹时,J77菌丝生长速度高于J1。随外源施加镉浓度增加,菌丝与培养基的接触面减小,这可能是菌丝抵御镉胁迫带来的毒害所产生的一种应激反应。从菌丝色泽来看,随外源施加镉浓度增加,J1和J77菌丝均由洁白变为微黄(培养10 d统计的结果),待镉胁迫下菌丝长满培养基表面时,菌丝均由微

表1 镉胁迫对J1和J77菌丝生长的影响

Table 1 The effect of Cd stress on the growth of J1 and J77 hyphae

外源施加镉浓度 Cd concentration/(mg·kg ⁻¹)	生长速度 Growth rate/(mm·d ⁻¹)		菌丝长势 Mycelial growth vigor		色泽 Color	
	J1	J77	J1	J77	J1	J77
0	0.80±0.03a	0.73±0.02a	粗壮稀疏	粗壮稀疏	洁白	洁白
2	0.69±0.04b	0.63±0.02b	较粗壮稀疏	较纤细浓密	较洁白	洁白
4	0.62±0.02bc	0.57±0.02c	纤细浓密	较纤细浓密	较洁白	洁白
6	0.56±0.03cd	0.54±0.01cd	较纤细浓密	纤细浓密	微黄	浅微黄
8	0.51±0.02de	0.54±0.02cd	纤细浓密	纤细浓密	微黄	微黄
10	0.44±0.04e	0.51±0.03d	纤细浓密	纤细浓密	微黄	微黄

注:表中数据是平均值±标准差;不同小写字母表示同一品种不同处理浓度之间差异显著(P<0.05)。下同。

Note: Data are presented as mean ± standard deviation. Different lowercase letters indicate significant differences between different treatment concentrations of the same variety (P<0.05). The same below.

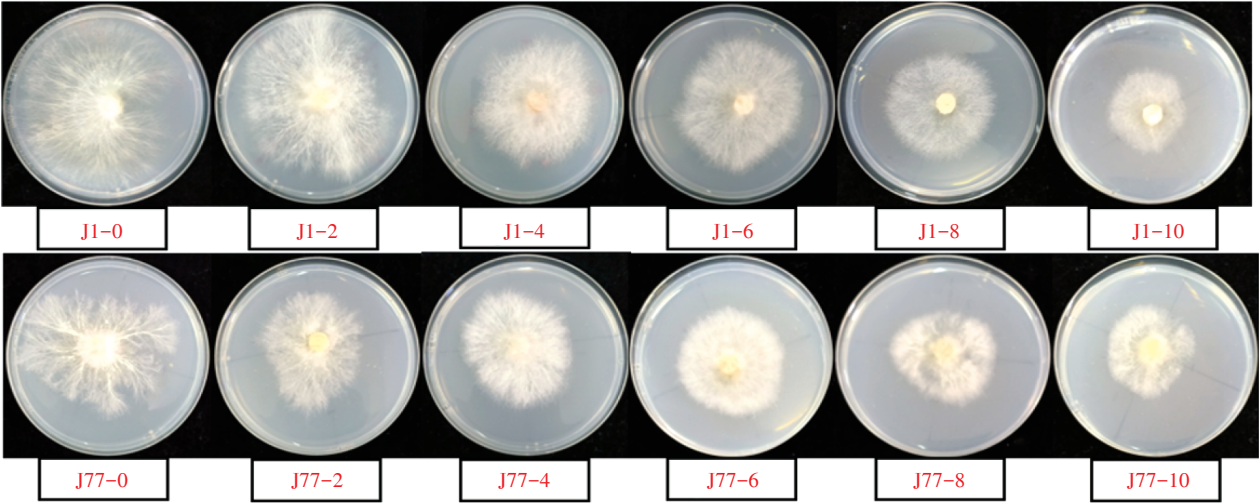


图1 镉胁迫对J1和J77菌丝生长的影响

Figure 1 The effect of Cd stress on the growth of J1 and J77 hyphae

黄色转为黑色直至死亡。

2.2 镉胁迫下J1和J77菌丝体中Cd的亚细胞分布

不同浓度的镉胁迫下J1和J77菌丝体内镉的亚细胞分布结果如表2所示。相同镉胁迫水平下,J1和J77亚细胞镉积累量均表现出细胞壁>细胞液>细胞器的规律,细胞壁镉含量均显著高于各细胞器和细胞液,大量镉积累在细胞壁。随着外源施加镉浓度的增加,J1和J77菌株各细胞器组分中的镉含量均呈上升趋势。当外源施加镉浓度达到10 mg·kg⁻¹时,J1细胞壁、细胞器和细胞液镉含量分别是J77菌株的2.6、1.7倍和2.2倍,说明J1和J77镉积累量具有一定的差异性。从各细胞器组分分配率上看(图2),随着镉胁迫浓度增加,2个菌株细胞壁镉含量占比均表现出先升后降的趋势;2个菌株细胞器镉含量占比均表现出下降趋势,2个菌株对照组均显著高于各处理组;而2个菌株细胞液中镉含量占比表现较为稳定,J1和J77菌

株分别占总量的30%~42%和29%~36%。此外,从分配率来看亚细胞镉积累量也表现为细胞壁>细胞液>细胞器。因此,我们可以推测细胞壁具有固持Cd²⁺的作用,这可能是巴西蘑菇菌丝体抵御镉毒害的重要机制之一。

2.3 镉胁迫对J1和J77菌丝体GST和GSH-Px活性的影响

镉胁迫对J1和J77菌株GST活性的影响见图3。随着外源施加镉浓度的增加,J1和J77菌株GST活性整体波动不明显,J77菌株GST活性均高于J1菌株。J77菌株在2~10 mg·kg⁻¹之间GST活性整体低于对照组。J77菌株在镉0、2、4、6、8、10 mg·kg⁻¹与J1对应浓度相比,GST活性分别增加了41.64%、17.73%、31.40%、24.03%、28.30%、23.78%。因此,可以推测出低镉菌株J77会产生更多GST,以此来抵御镉毒害。

图4是J1和J77菌株GSH-Px活性的变化趋势,

表2 巴西蘑菇J1和J77菌丝中镉的亚细胞分布

Table 2 The subcellular distribution of Cd in the hyphae of *A. brasiliensis* J1 and J77

外源施加镉浓度 Cd concentration/(mg·kg ⁻¹)	细胞壁 Cell wall(F1)		细胞器 Organelle(F2)		细胞液 Cell sap(F3)	
	J1	J77	J1	J77	J1	J77
0	0.52±0.01a	0.46±0.00b	0.35±0.01d	0.27±0.01e	0.47±0.02b	0.39±0.02c
2	2.67±0.05a	2.34±0.12b	1.06±0.01d	1.00±0.03d	2.27±0.04b	1.91±0.15c
4	10.46±0.05a	6.66±0.33c	3.61±0.47e	2.51±0.01f	8.03±0.13b	4.47±0.01d
6	17.13±0.32a	10.24±0.16c	6.86±0.19d	2.97±0.07f	14.91±0.04b	5.71±0.59e
8	44.03±0.30a	15.66±0.24c	10.91±0.04d	5.87±0.06f	23.71±0.02b	8.72±0.30e
10	54.04±0.78a	20.67±0.84c	15.46±0.35d	9.24±0.18f	30.24±0.37b	13.61±0.02e

注:表中数据是平均值±标准差;不同小写字母表示同行各处理之间差异显著($P<0.05$)。

Note: The data in the table are the average value ± standard deviation; different lowercase letters indicate significant difference between the same treatment concentration of different varieties ($P<0.05$).

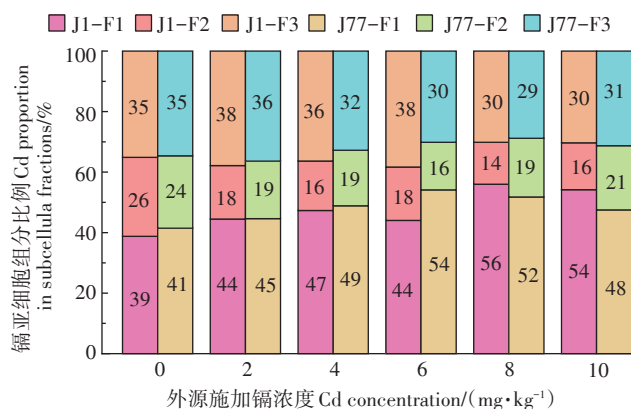
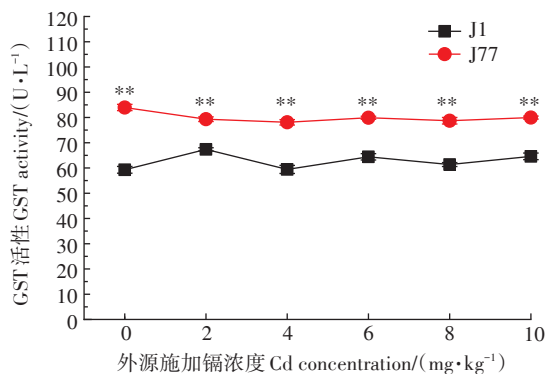


图2 巴西蘑菇J1和J77菌丝中Cd的亚细胞组分分配比例

Figure 2 The distribution ratio of Cd subcellular components in the hyphae of *A. brasiliensis* J1 and J77

*和**分别表示两菌株各处理之间差异显著水平 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 。下同

* and ** indicate significant differences between the treatment of the two strains at $P<0.05$ and $P<0.01$. The same below

图3 镉胁迫对GST活性的影响

Figure 3 The effect of Cd stress on GST activity

J1菌株随着外源施加镉浓度的增加,GSH-Px活性呈上升趋势。J77菌株在0~10 mg·kg⁻¹范围内GSH-Px活性稍有波动,但总体趋于平稳,在10 mg·kg⁻¹时

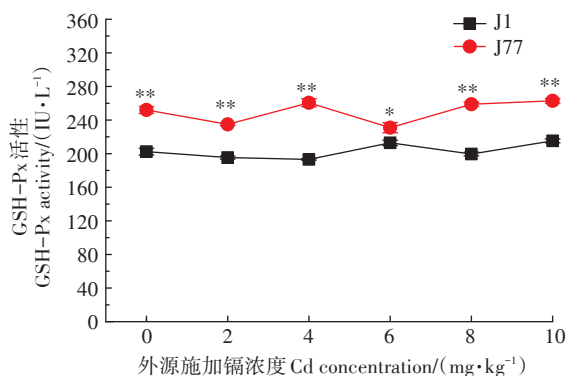


图4 镉胁迫对GSH-Px活性的影响

Figure 4 The effect of Cd stress on GSH-Px activity

GSH-Px活性最大,达262.91 IU·L⁻¹。在4 mg·kg⁻¹时,J77菌株GSH-Px活性与J1菌株相比,增加了34.91%。整体而言,J77菌株GSH-Px活性均高于J1菌株。

2.4 镉胁迫对J1和J77菌株体NPT、GSH和PCs含量的影响

镉胁迫下J1和J77菌株NPT含量变化见图5,随外源施加镉浓度的提高,J1和J77的NPT含量出现先升后降的趋势。2菌株NPT含量均在镉浓度为2 mg·kg⁻¹时达到最大值,与其对照相比,J1菌株和J77菌株的NPT含量分别增加了17.27%和44.86%。在镉浓度高于2 mg·kg⁻¹时,J1菌株和J77菌株的NPT含量均呈下降趋势,且J77菌株的NPT含量均高于J1菌株。

由图6所示,随着外源施加镉浓度的增加,J1和J77中GSH含量降低。J1菌株在镉浓度为4 mg·kg⁻¹时,GSH含量最低,对照组GSH含量相比下降了20.84%;而J77菌株在镉浓度为2 mg·kg⁻¹时,GSH含量最低,与对照组相比下降了11.19%。添加镉浓度为0 mg·kg⁻¹时,菌株J1 GSH含量高于J77,这可能是J1生长状况优于J77的原因;镉浓度为2~10 mg·kg⁻¹

时,各处理间J77 GSH含量始终高于菌株J1,说明J77菌株在镉胁迫下产生更多GSH以减少镉毒害。

由图7所示,J1和J77菌株PCs含量的变化与NPT含量的变化趋势一致,均出现先升后降的规律。J1菌株和J77菌株的NPT含量在 $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时达到最大值,分别为 $36.05\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $40.51\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$,相比于对照组分别提高了1.1倍和2.6倍。在 $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 后,巴西蘑菇J1菌株和J77菌株的PCs含量均显著下降,最后趋于平稳。随着外源施加镉浓度的增加,菌株J1和J77菌丝体内PCs含量的增加伴随着GSH含量的减少,说明镉胁迫下会使GSH与PCs的生物合成受阻,导致细胞代谢紊乱。

2.5 镉胁迫与小分子巯基含量及代谢酶活的相关性

如表3所示,对菌株J1进行相关性分析发现,GST活性与PCs含量呈极显著正相关关系($P<0.01$);NPT含量与PCs含量也呈极显著正相关关系($P<0.01$);镉胁迫与GSH-Px活性呈显著正相关关系($P<0.05$);镉胁迫与GST活性呈正相关关系,而与NPT、GSH和PCs含量之间呈负相关关系,但相关性均不显著($P>0.05$)。对菌株J77进行相关性分析发现,NPT

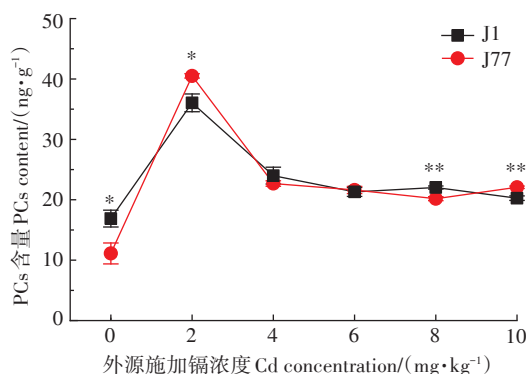


图7 镉胁迫对PCs含量的影响

Figure 7 The effect of Cd stress on PCs content

含量与PCs含量呈极显著正相关关系($P<0.01$);镉胁迫与GSH-Px活性呈正相关关系;镉胁迫与GST活性及NPT、GSH和PCs含量之间呈负相关关系,但相关性均不显著($P>0.05$)。

3 讨论

巴西蘑菇菌丝对镉有很强的富集能力,但其作用机制仍不清楚。本研究基于课题组前期对巴西蘑菇富镉机制的研究,即在不同浓度镉胁迫下,分别探究了镉对巴西蘑菇菌丝生长特性、矿物质元素吸收以及几种重要的抗氧化酶活力的影响,初步揭示了巴西蘑菇富镉的作用机制^[2,20-22]。解析重金属在细胞不同部位的积累,对深入研究富集机制和金属耐性机制至关重要。本研究对不同浓度镉胁迫下J1和J77菌丝开展了亚细胞分布研究,有助于确定重金属镉对不同细胞部位的富集影响。本研究发现,J1和J77中镉亚细胞积累规律为细胞壁>细胞液>细胞器,细胞壁是主要的储存场所,在2个菌株中所占相对比例约为39%~56%。这与李三暑等^[8]以巴西蘑菇为试验材料进行亚细胞分布试验结果一致,即镉主要富集在细胞壁。此外,有研究表明,双孢蘑菇子实体中细胞质是大多数重金属的主要贮存部位,双孢蘑菇子实体中镉在细胞质占比为44%~93%,在细胞壁中占比为6.1%~47%,而在混合膜组分中最低^[23]。本研究表明,不同食用菌菌株之间亚细胞镉积累具有一定差异性,且细胞壁对镉的吸附作用可降低镉对菌丝体的毒害。

不同浓度镉胁迫时,GST活性和GSH-Px活性均表现出菌株J77高于J1,这可能是造成两种菌株镉富集差异显著的原因之一。李冬琴等^[24]发现,随着镉胁迫时间的延长,水稻镉高富集品种欣荣优2045和镉低富集品种优I2009 GST活性均出现先升后降的规

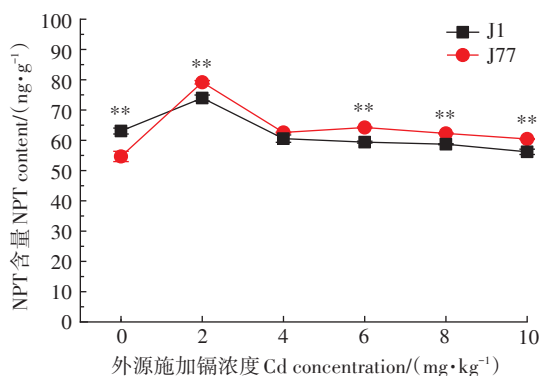


图5 镉胁迫对NPT含量的影响

Figure 5 The effect of Cd stress on NPT content

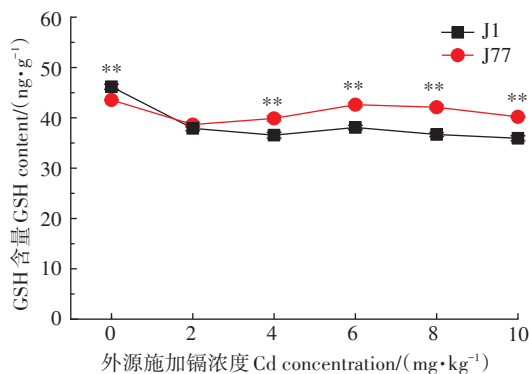


图6 镉胁迫对GSH含量的影响

Figure 6 The effect of Cd stress on GSH content

表3 不同指标相关性分析

Table 3 Correlation analysis of different indicators

指标 Index	镉胁迫 Cd stress		GST活性 GST activity		GSH-Px活性 GSH-Px activity		NPT含量 NPT content		GSH含量 GSH content		PCs含量 PCs content	
	J1	J77	J1	J77	J1	J77	J1	J77	J1	J77	J1	J77
镉胁迫 Cd stress	1											
GST活性 GST activity	0.206	-0.458	1									
GSH-Px活性 GSH-Px activity	0.543*	0.357	0.249	-0.003	1							
NPT含量 NPT content	-0.683	-0.131	0.412	-0.444	-0.535	-0.548	1					
GSH含量 GSH content	-0.738	-0.309	-0.393	0.449	-0.075	-0.160	0.206	-0.539	1			
PCs含量 PCs content	-0.222	-0.041	0.615**	-0.484	-0.463	-0.432	0.827**	0.981**	-0.380	-0.693	1	

注:*和**分别表示在 $P<0.05$ 水平显著相关和 $P<0.01$ 水平极显著相关。

Note: * and ** indicate significant correlation at $P<0.05$ and extremely significant correlation at $P<0.01$, respectively.

律。而在本研究中GST活性受镉胁迫影响不明显,但镉低富集菌株J77 GST活性始终高于菌株J1,说明镉胁迫下不同菌株间和不同抗性材料间GST活性差异较大,从而表现出巴西蘑菇抗氧化能力的强弱。GSH-Px是抗氧化酶体系中的重要成员,可催化谷胱甘肽(GSH)转化为氧化型谷胱甘肽(GSSG),将有毒的过氧化物还原成无毒的羟基化合物,同时也可以促进 H_2O_2 的分解,从而保护细胞膜的结构及功能不受损害。张亚茹等^[25]利用镉胁迫大球盖菇菌丝体,发现随着外源施加镉浓度的提高,GSH-Px活性呈现出先升后降的规律。刘赛等^[26]报道茶树GSH-Px编码基因*CsGPX1*对非生物胁迫具有一定的抵抗能力。而在本研究中,GSH-Px活性在两个不同抗性的菌株中,表现出较强的波动性。通过比较镉胁迫下两个菌株的GST和GSH-Px活性发现,同一浓度胁迫下J77菌株高于J1菌株,说明不同镉积累型菌株对镉胁迫的应答机制存在一定的基因型差异,这可能与两个品种GST酶和GSH-Px酶的组成、表达和功能不同有关^[27-28]。

COLLIN-HANSEN等^[29]通过高效液相色谱-质谱仪首次证实了牛肝菌中含有植物螯合肽物质,研究还发现复杂的PCs物质与GSH含量降低有关。PCs和GSH均含巯基物质(-SH),会与 Cd^{2+} 形成螯合物,减少了细胞质中游离 Cd^{2+} 的浓度,这些螯合物在转运蛋白的作用下转运到胞外,或将其运输到液泡中区室化隔离^[14,30]。有研究表明,在镉和锌胁迫下,丛枝菌根真菌通过增加总NPT的产生量来缓解氧化应激^[31]。HUANG等^[32]的研究也表明丛枝菌根真菌产生的NPT具有防御镉的毒害作用。此外,在甘蔗、水稻、棉花等植物上也表现出NPT、GSH和PCs能提高植物对镉的耐受能力,通过氧化应激反应缓解镉带来的毒害作

用。而在本研究中,NPT、GSH和PCs含量均表现一定的规律性,随着施加镉浓度的增加,NPT和PCs含量在两个菌株中表现出先升后降的趋势,GSH含量随镉浓度提高均呈现下降趋势且含量都低于对照,表明镉胁迫下巴西蘑菇不同镉抗性品种巯基物质变化不尽相同。

众多研究表明,镉螯合与小分子非蛋白巯基化合物含量以及小分子非蛋白巯基化合物代谢酶活性有直接关系^[33-35]。通过对镉胁迫下细胞内镉螯合相关的小分子非蛋白巯基化合物含量变化以及小分子非蛋白巯基化合物代谢酶活力变化的相关性分析,研究结果表明,镉胁迫下菌株J1与GSH-Px活性呈显著正相关,菌株J77与GSH-Px活性呈正相关;菌株J1与GST活性呈正相关,菌株J77与GST活性呈负相关,说明在抵御巴西蘑菇镉毒害中GSH-Px活性比GST活性作用明显。两种菌株NPT含量与PCs含量均呈极显著正相关,孙伟华^[36]研究表明,随着镉胁迫浓度的增加,水稻根部PCs含量随之提高,说明PCs在抵抗镉毒害时发挥重要作用。由于与镉胁迫接触最密切的菌丝会以更高的NPT含量来消耗GSH,产生大量的PCs。因此在菌丝体内对镉具有更高耐受性可归因于PCs对镉的螯合能力增强。可见,在巴西蘑菇的解毒机制中PCs发挥了重要作用。

4 结论

(1)在镉胁迫下,巴西蘑菇2个菌株镉富集能力表现出J1为高富集菌株,J77为低富集菌株,不同镉积累菌株间镉亚细胞分布均表现为细胞壁>细胞液>细胞器,说明细胞壁是菌丝体主要储存镉的场所。

(2)在镉胁迫下,通过对菌株J77和J1中谷胱甘肽硫转移酶(GST)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)

活性以及相关性进行分析,GSH-Px在菌株J1中反应更强烈,可能是由于不同菌株间镉耐性不同导致。

(3)在镉胁迫下,菌株J77和J1中非蛋白巯基(NPT)和植物螯合肽(PCs)含量变化趋势一致,呈现出“低促高抑”趋势,相关性分析表明PCs在巴西蘑菇的解毒机制中发挥重要作用。

参考文献:

- [1] 张晶,余恩,白莉圆,等.食用菌富集重金属因素及其控制技术研究进展[J].食品工业科技,2019,40(17):347-354. ZHANG J, YU S, BAI L Y, et al. Research progress of factors accumulating heavy metals in edible fungi and their control techniques[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(17):347-354.
- [2] 刘朋虎,李波,江枝和,等.姬松茸菌株J1与J77镉富集差异及生理响应机制[J].农业环境科学学报,2017,36(5):863-868. LIU P H, LI B, JIANG Z H, et al. Comparison and physiological mechanisms of cadmium (Cd) accumulation by strain J1 and mutant J77 of *Agaricus brasiliensis*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2017, 36(5):863-868.
- [3] 刘高翔,杨美智子,刘洋铭,等.食用菌对镉的富集作用及其机理的研究概况[J].食品工业科技,2012,33(13):392-394. LIU G X, YANG M Z Z, LIU Y M, et al. The bioaccumulation characteristics and mechanisms of cadmium in edible mushrooms[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(13):392-394.
- [4] 刘朋虎,赖瑞联,陈华,等.镉对食用菌生长的影响及防控技术研究进展[J].生态环境学报,2019,28(2):419-428. LIU P H, LAI R L, CHEN H, et al. Effects of Cd on edible fungi growth and Cd pollution prevention and control techniques in mushroom production[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2019, 28(2):419-428.
- [5] LIU P H, HUANG Z X, LUO X H, et al. Comparative transcriptome analysis reveals candidate genes related to cadmium accumulation and tolerance in two almond mushroom (*Agaricus brasiliensis*) strains with contrasting cadmium tolerance[J]. *PLoS One*, 2020, 15(9):e239617.
- [6] WANG L, LI H, WEI H, et al. Identification of cadmium-induced *Agaricus blazei* genes through suppression subtractive hybridization[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2014, 63:84-90.
- [7] 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. ZHU H L, BAN L T, XU X P. 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.
- [8] 李三暑,雷锦桂,陈惠成.镉、磷、钙在姬松茸细胞内的积累和分布特征及其交互作用[J].食用菌学报,2001(4):24-27. LI S S, LEI J G, CHEN H C. Accumulation and distribution of cadmium phosphorus and calcium and their interaction in *Agaricus blazei* cells[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2001(4):24-27.
- [9] 刘高翔.姬松茸中镉的存在形态及其对镉吸附特性的研究[D].昆明:昆明理工大学,2013. LIU G X. Study on the existing forms of cadmium in *Agaricus blazei* Murrill and adsorption characteristics to cadmium[D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2013.

- [10] ADAMIS P D B, PANEK A D, ELEUTHRIO E C A. Vacuolar compartmentation of the cadmium-glutathione complex protects *Saccharomyces cerevisiae* from mutagenesis[J]. *Toxicology Letters*, 2007, 173(1):1-7.
- [11] GUO Y, MARSCHNER H. Uptake, distribution, and binding of cadmium and nickel in different plant species[J]. *Journal of Plant Nutrition*, 1995, 18(12):2691-2706.
- [12] ADAMIS P D B, GOMES D S, PINTO M L C C, et al. The role of glutathione transferases in cadmium stress[J]. *Toxicology Letters*, 2004, 154(1/2):81-88.
- [13] ZHANG C H, YING G E. Response of glutathione and glutathione S-transferase in rice seedlings exposed to cadmium stress[J]. *Rice Science*, 2008, 15(1):73-76.
- [14] FOYER C H, THEODOULOU F L, DELROT S. The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants[J]. *Trends in Plant Science*, 2001, 6(10):486-492.
- [15] MARRS, KATHLEEN A. The functions and regulation of glutathione S-Transferases in plants[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1996, 47(1):127-158.
- [16] JOZEFCEK M, REMANS T, VANGRONSVELD J, et al. Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(3):3145-3175.
- [17] 刘朋虎,江枝和,雷锦桂,等.⁶⁰Co与紫外复合诱变选育姬松茸新品种—福姬77[J].核农学报,2014,28(3):365-370. LIU P H, JIANG Z H, LEI J G, et al. Breeding of a new variety of *Agaricus blazei* 'Fuji 77' by ⁶⁰Co combining with UV mutagenesis[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2014, 28(3):365-370.
- [18] DASBASI T, SACMACI S, UELGEN A, et al. A solid phase extraction procedure for the determination of Cd(II) and Pb(II) ions in food and water samples by flame atomic absorption spectrometry[J]. *Food Chemistry*, 2015, 174(1):591-596.
- [19] 侯明,霍岩,张志专,等.土壤外源钒施加对玉米中钒积累、亚细胞分布和非蛋白巯基含量的影响[J].农业环境科学学报,2020,39(5):964-972. HOU M, HUO Y, ZHANG Z Z, et al. Effects of exogenous vanadium stress on vanadium accumulation and subcellular distribution, and non-protein thiol content in maize (*Zea mays* L.) crops[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020, 39(5):964-972.
- [20] 刘朋虎,陈华,李波,等.镉胁迫对姬松茸菌丝生理指标与镉吸收的影响[J].农业环境科学学报,2020,39(8):1675-1682. LIU P H, CHEN H, LI B, et al. Effects of cadmium stress on mycelium physiological indexes and cadmium absorption in *Agaricus brasiliensis*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020, 39(8):1675-1682.
- [21] 刘朋虎,李波,江枝和,等.镉对姬松茸农艺性状及矿物质元素吸收的影响[J].农业环境科学学报,2018,37(1):58-63. LIU P H, LI B, JIANG Z H, et al. Effects of cadmium (Cd) in different concentrations on agronomic traits and mineral elements absorption of *Agaricus brasiliensis*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37(1):58-63.
- [22] LIU L Y, CHEN H, YUAN J, et al. Effects of cadmium stress on physiological indexes and fruiting body nutritions of *Agaricus brasiliensis*

- [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1):8612–8653.
- [23] MUÑOZ A, CORONA F G, WROBEL K, et al. Subcellular distribution of aluminum, bismuth, cadmium, chromium, copper, iron, manganese, nickel, and lead in cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus*) [J]. *Biological Trace Element Research*, 2005, 106(3):265–277.
- [24] 李冬琴, 王丽丽, 李智鸣, 等. 镉胁迫对高低积累型水稻幼苗非蛋白巯基含量的影响[J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(12):2697–2704. LI D Q, WANG L L, LI Z M, et al. Effect of cadmium stress on non-protein thiols in the seedlings of high- and low-cadmium-accumulating rice cultivars[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2019, 38(12):2697–2704.
- [25] 张亚茹, 赵妍, 宋盼盼, 等. 镉胁迫对大球盖菇菌丝生长及抗氧化系统的影响[J]. 分子植物育种, 2021, 19(7):2372–2380. ZHANG Y R, ZHAO Y, SONG P P, et al. Effects of cadmium stress on growth and antioxidant system of *stropharia rugosoannulata* mycelia[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19(7):2372–2380.
- [26] 刘赛, 刘硕谦, 龙金花, 等. 茶树谷胱甘肽过氧化物酶编码基因 *CsGPX1* 功能分析[J]. 茶叶科学, 2019, 39(4):382–391. LIU S, LIU S Q, LONG J H, et al. Functional analysis of glutathione peroxidase encoding gene *CsGPX1* in *camellia sinensis*[J]. *Journal of Tea Science*, 2019, 39(4):382–391.
- [27] ARTHUR J R. The glutathione peroxidases[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2000, 57(13/14):1825–1835.
- [28] 齐增园, 陶鹏, 李必元, 等. 白菜谷胱甘肽过氧化物酶基因 *GPX* 的鉴定与分析[J]. 浙江农业学报, 2016, 28(1):64–69. QI Z Y, TAO P, LI B Y, et al. Identification and analysis of *GPX* genes in Chinese cabbage[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2016, 28(1):64–69.
- [29] COLLIN-HANSEN C, PEDERSEN S A, ANDERSEN R A, et al. First report of phytochelatin in a mushroom: Induction of phytochelatin by metal exposure in *Boletus edulis*[J]. *Mycologia*, 2007, 99(2):161–174.
- [30] LI T, DI Z, ISLAM E, et al. Rhizosphere characteristics of zinc hyper-accumulator *Sedum alfredii* involved in zinc accumulation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 185(2/3):818–823.
- [31] GARG N, KAUR H. Response of antioxidant enzymes, phytochelatin and glutathione production towards Cd and Zn stresses in *Cajanus cajan*(L.) Millsp. genotypes colonized by arbuscular mycorrhizal fungi [J]. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 2013, 199(2):118–133.
- [32] HUANG X, ZHU S, HO S H, et al. Arbuscular mycorrhizal fungus modulates the phytotoxicity of Cd via combined responses of enzymes, thiolic compounds, and essential elements in the roots of *Phragmites australis*[J]. *Chemosphere*, 2017, 187:221–229.
- [33] DIXIT V. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad)[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2001, 52(358):1101–1109.
- [34] KILILI K G, ATANASSOVA N, VARDANYAN A, et al. Differential roles of tau class glutathione S-transferases in oxidative stress[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(23):24540–24551.
- [35] WENG B, XIE X, WEISS D J, et al. *Kandelia obovata* (S., L.) Yong tolerance mechanisms to cadmium: Subcellular distribution, chemical forms and thiol pools[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2012, 64(11):2453–2460.
- [36] 孙伟华. 镉胁迫下水稻幼苗中植物螯合肽的鉴定及分析方法的研究[D]. 杭州: 中国农业科学院, 2017. SUN W H. Studies on structure identification and detection of phytochelatin in rice seedlings under cadmium stress[D]. Hangzhou: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017.

(责任编辑:叶飞)