

铜胁迫对平菇膜脂过氧化和抗氧化酶活性的影响

卢娇娇¹,孔维丽²,袁瑞奇²,韩玉娥²,康源春²,申进文¹,张玉亭²,孔维威^{2*}
(1. 河南农业大学 生命科学学院,河南 郑州 450002;
2. 河南省农业科学院 植物营养与资源环境研究所,河南 郑州 450002)

摘要:为了探明平菇对铜胁迫的响应机制,研究了铜胁迫(0~3 000 μmol/L)对平菇菌丝膜脂过氧化和抗氧化酶活性的影响。结果表明,铜胁迫使菌丝硫代巴比妥酸反应物(TBARS)含量升高且具有明显的时间效应和浓度效应。不同抗氧化酶对铜胁迫的响应不同。铜胁迫使菌丝SOD活性和POD活性呈一直上升趋势,而CAT活性则呈现先下降后上升再下降的趋势。
关键词:铜胁迫;平菇;膜脂过氧化;抗氧化酶
中图分类号:S646.1⁺4 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-3268(2015)04-0114-04

Effect of Copper Stress on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes Activity in *Pleurotus ostreatus*

LU Jiaojiao¹,KONG Weili²,YUAN Ruiqi²,HAN Yu'e²,KANG Yuanchun²,
SHEN Jinwen¹,ZHANG Yuting²,KONG Weiwei^{2*}

(1. College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. Institute of Plant Nutrition, Agricultural Resources and Environmental Science, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity were studied to explore the response mechanism of mycelia to copper stress in *Pleurotus ostreatus*. The results showed that copper stress induced lipid peroxidation and changed thiobarbituric acid reactive substance(TBARS) content of mycelia with a time- and concentration-dependent manner. Copper stress had different effects on different antioxidant enzymes. The activities of SOD and POD of mycelia enhanced continuously when it was exposed to copper stress, while the activity of CAT first decreased and then increased, and finally decreased.
Key words: copper stress; *Pleurotus ostreatus*; lipid peroxidation; antioxidant enzyme

平菇富含多糖、蛋白质、矿物质等营养物质,具有增强机体免疫、抗肿瘤、抗病毒、抗衰老、降血糖、降血脂、促进生长发育等多种营养保健功能,而且味道鲜美,物美价廉,受到广大消费者的青睐。据统计,2013年全国食用菌总产量达3 169.68万t,其中平菇产量为594.83万t,占总产量的18.77%,为我国第二大品种,仅次于香菇。

铜是食用菌生长所必须的微量元素之一,在食用菌生长发育中起着重要作用^[1]。铜对食用菌菌丝和子实体生长发育的影响具有显著的浓度效应,适量铜可以使菌丝生长加快,菌丝粗壮、洁白,子实体提前成熟,产量和生物学效率提高^[2-4]。此外,食用菌对铜具有明显的富集特性^[5-6]。国内关于铜富集特性的研究多集中在对野生和市场上食用菌产品

收稿日期:2015-01-05
基金项目:国家自然科学基金项目(31201670);河南省现代农业产业技术体系项目(S2010-03-G04);河南省农业科学院自主创新基金项目(2013JC20);河南省科技成果转化计划项目(142201610017)
作者简介:卢娇娇(1989-),女,河南济源人,在读硕士研究生,研究方向:食用菌生理。E-mail:lujiaojiao10@126.com
* 通讯作者:孔维威(1981-),男,河南商丘人,副研究员,博士,主要从事食用菌生理研究。E-mail:kongweiwei888@126.com

重金属含量(包含铜在内)的测定和评价方面^[7],有关平菇对铜的响应机制则研究较少。鉴于此,研究了铜对平菇菌丝膜脂过氧化及抗氧化酶活性的影响,以期为进一步研究平菇菌丝对铜的响应和调控机制提供一定的参考。

1 材料和方法

1.1 材料

平菇菌株为亚光 1 号,由河南省农业科学院植物营养与资源环境研究所食用菌研究开发中心菌种库保存。

1.2 方法

1.2.1 菌丝培养 应用 PDA(马铃薯-葡萄糖-琼脂)培养基,25℃ 固体平板培养 10 d 进行菌种的活化,活化后的菌种(5 mm 打孔器取 10 块)置于含 PD(马铃薯-葡萄糖)液体培养基的三角瓶中(容量为 250 mL,加 100 mL 液体培养基)培养,培养温度 25℃,恒温摇床上 150 r/min 振荡培养 6 d。

1.2.2 铜处理 在培养好菌丝的三角瓶中直接加入不同体积的 100 mmol/L 硫酸铜溶液,使铜离子浓度分别为 0(对照)、500、1 000、1 500、2 000、2 500、3 000 $\mu\text{mol/L}$,然后继续置于 25℃ 下培养,分别于 0、6、12、24、48、72 h 取样,具体操作为将菌丝用 4 层纱布过滤,然后置于 10 mL 离心管中于 4℃ 下 10 000 $\text{g} \times 10 \text{ min}$,菌丝用液氮速冻后存于 -80℃ 备用。

1.2.3 硫代巴比妥酸反应物(TBARS)含量的测定 TBARS 含量的测定采用 Kong 等^[8]的方法。

1.2.4 酶活性测定 取各处理菌丝 1 g,液氮研磨成粉末,加入 2 mL 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7.0)。经 12 000 $\text{g} \times 4^\circ\text{C}$ 离心 20 min 后,上清液(即为粗酶液)用于酶活性测定。超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用氮蓝四唑(NBT)法^[9],过氧化物氢酶(CAT)活性测定参照 Aebi^[10]的方法,过氧化物酶(POD)活性测定参照 Velikova 等^[11]的方法。

1.2.5 统计分析 重复 3 次,数据用平均值 \pm SD 来表示。显著性比较采用 Student's *t*-test ($P < 0.05$)和 Duncan's 测验($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 铜胁迫对平菇菌丝膜脂过氧化的影响

生物胁迫和非生物胁迫均诱导氧化胁迫和脂质过氧化^[12-13]。TBARS 含量是脂质过氧化的一个指标,常常被用来表明细胞膜的氧化胁迫水平^[14]。不同浓度铜胁迫(处理 24 h)下,菌丝中 TBARS 含量

总体呈上升趋势(图 1)。铜浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$ 时, TBARS 含量明显上升,在 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最大,是对照的 1.7 倍。用 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的铜连续处理 72 h,菌丝中 TBARS 含量具有明显的时间效应(图 2),处理 6 h 即显著升高,处理 24 h 即达到最大,48 h 后则下降。

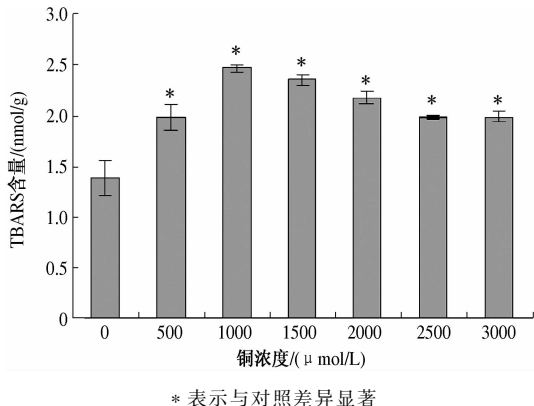


图 1 不同浓度铜胁迫对菌丝 TBARS 含量的影响

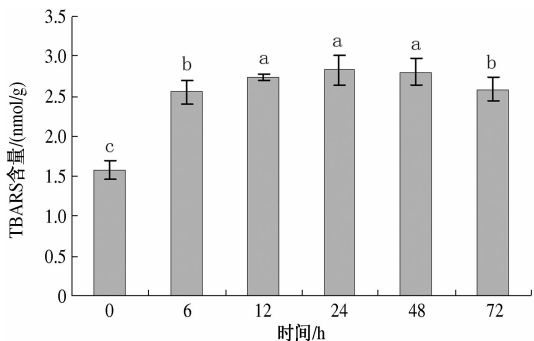


图 2 不同铜处理时间对菌丝 TBARS 含量的影响

2.2 铜胁迫对平菇菌丝抗氧化酶活性的影响

在细胞中,SOD 是防卫反应中第 1 个酶,迅速将 O_2^- 转化成 O_2 和 H_2O_2 ^[15]。由图 3 可知,铜胁迫 72 h 内,菌丝 SOD 活性呈上升趋势。处理 72 h 的 SOD 活性是对照(0 h)的 3.2 倍。说明铜胁迫显著促进了菌丝 SOD 活性的升高。

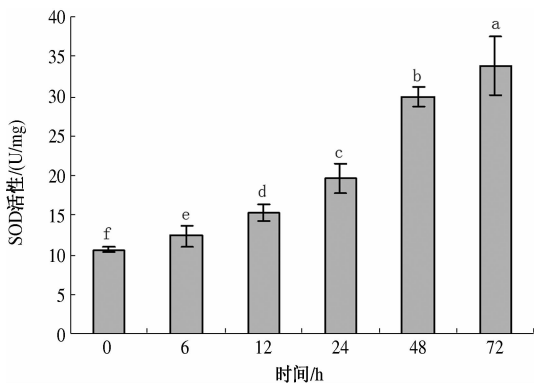


图 3 铜胁迫对菌丝 SOD 活性的影响

由图 4 可知,铜胁迫 72 h 内,菌丝 CAT 活性呈先下降后升高又下降的趋势。处理 0 ~ 12 h 内,菌丝 CAT 活性显著下降,12 h 后又显著升高,24 h 达到最大,此时 CAT 活性是对照(0 h)的 1.35 倍。48 h 后活性又下降,72 h 的活性仅为对照的 70%。

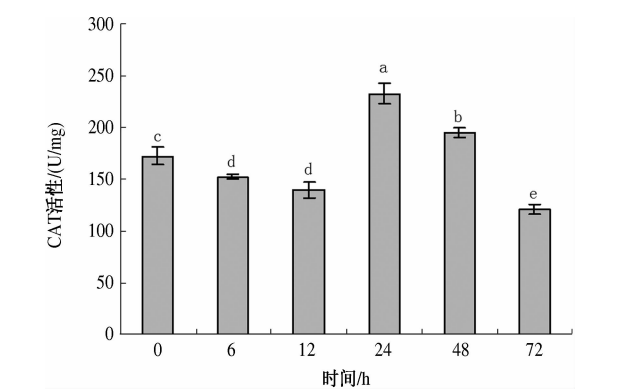


图 4 铜胁迫对菌丝 CAT 活性的影响

POD 也是催化 H₂O₂ 生成 O₂ 和 H₂O 的重要酶。由图 5 可知,铜胁迫处理 72 h 内,菌丝 POD 活性呈一直上升趋势。胁迫处理 6 h,POD 活性没有显著变化。12 h 后显著升高,72 h 达最大值,此时活性是对照(0 h)的 2.24 倍。说明铜胁迫显著诱导 POD 活性的增加。

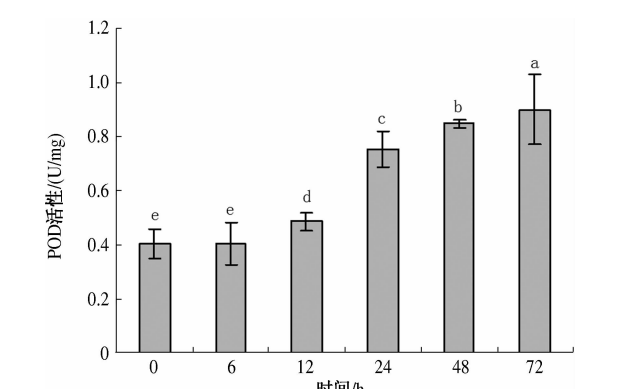


图 5 铜胁迫对菌丝 POD 活性的影响

3 结论与讨论

重金属胁迫常诱导大量的活性氧自由基产生,自由基能损伤主要的生物大分子(如 DNA 和蛋白质)及引起膜脂过氧化,而多种抗氧化防卫系统能够清除自由基,保护细胞免受氧化胁迫的伤害,这是生物耐受重金属胁迫的主要机制之一^[16]。

本研究发现,铜胁迫诱导菌丝细胞脂质过氧化水平升高,且具有显著的浓度和时间效应。这与生物细胞对其他重金属比如汞^[17]的响应结果一致。

抗氧化酶系统主要是在 SOD 的作用下 O₂⁻ 将歧化成 H₂O₂ 和 O₂,而 CAT 和 POD 则进一步将

H₂O₂ 催化生成 H₂O,从而减少 O₂⁻ 和 H₂O₂ 的积累^[18]。本研究中,铜胁迫 72 h 内,SOD 活性一直升高,可能是由于铜胁迫导致的氧化胁迫诱导了 SOD 活性增加^[19],这有利于菌丝体提高清除 O₂⁻ 的能力^[20]。CAT 是分解 H₂O₂ 催化生成 H₂O 的重要酶。本研究中,铜胁迫 12 h 内,CAT 活性下降,可能是铜胁迫导致的 H₂O₂ 积累,抑制了 CAT 活性。12 h 后,CAT 活性显著升高,说明 CAT 响应了铜胁迫,而活性提高促进了清除 H₂O₂ 的能力。48 h 后又下降,表明其自我调控能力降低。POD 是广泛存在于各种动物、植物和微生物体内的一类氧化酶,催化由 H₂O₂ 参与的各种还原剂的氧化反应:RH₂ + H₂O₂ → H₂O + R^[21]。本研究中,铜胁迫 72 h 内,POD 活性一直上升,表明铜胁迫下菌丝内氧化胁迫程度提高,诱导了菌丝内 POD 活性的提高,使菌丝清除 H₂O₂ 的能力提高。

总之,铜胁迫下平菇菌丝内 TBARS 含量升高,膜脂过氧化程度加重。铜胁迫 72 h 内,SOD 和 POD 活性呈一直上升趋势,而 CAT 活性则先下降后升高再下降,说明不同抗氧化酶对铜胁迫的响应存在差异。

参考文献:

[1] Chang S T,Miles P G. Mushrooms: Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact [M]. 2nd ed. Florida: CRC Press, 2004.

[2] 刘养清,邓清仙. 硫酸铜在食用菌拌料中的应用研究 [J]. 食用菌, 1996(6): 7-8.

[3] 廖建良. 铜对金针菇生长的影响试验 [J]. 食用菌, 2001(4): 9.

[4] 全雪丽,石铁源,吴松权. 亚侧耳菌丝营养特性的研究 [J]. 食用菌, 2008(4): 9-10.

[5] 刘凤春,郭砚翠,王雅茹,等. 强化平菇营养初探 [J]. 中国食用菌, 1989(5): 11-12, 5.

[6] 李兆兰. 等离子光谱法测定菌丝体的微量元素含量 [J]. 食用菌, 1989(2): 7-8.

[7] 刘剑飞,胡留杰,廖敦秀,等. 食用菌生物修复重金属污染研究进展 [J]. 应用生态学报, 2011, 22(2): 543-548.

[8] Kong W W,Huang C Y,Chen Q, et al. Nitric oxide alleviates heat stress-induced oxidative damage in *Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis* [J]. Fungal Genetics and Biology, 2012, 49(1): 15-20.

[9] Beauchamp C,Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels [J]. Analytical Biochemistry, 1971, 44(1): 276-287.

似^[6,11-12]。试验还发现,贮藏 8 个月后,质量小的麻疯树种子及其组成部分的失质量率较高、尺寸缩小幅度较大、劣质种仁增加较多,发芽率和出苗率下降幅度也较大,其中<0.40 g/粒种子贮藏后的出苗率不足 5%。说明种内质量小的麻疯树种子劣变较快、不耐贮藏,这与种内花生种子的性状相似^[13]。其机制在于小粒种子的胚部占整个种子的比率较高,呼吸强度大大高于大粒种子,因此劣变的速度较快^[13]。可见,种内质量较小(<0.40 g/粒)的麻疯树种子不宜留存播种。

综上所述,种内质量较小的麻疯树种子的萌发能力较低、苗木性状较差,且不耐贮藏。因此,生产中可于麻疯树种子采收后及时用筛子或种子精选分级机将小粒种子分离出来作为它用,为获得稳定的出苗率、培育壮苗及减少播种浪费提供保障。

参考文献:

[1] 李建凡,陈剑成,宾耀梅,等. 不同种源麻疯树种子品质及苗期生长研究[J]. 广西林业科学,2012,41(2): 110-114.

[2] 栗宏林,张志翔,张鑫. 小桐子不同产地种子性状及苗期生长差异研究[J]. 干旱区资源与环境,2010,24(2):204-208.

[3] 万泉,黄勇,肖祥希,等. 麻疯树不同地理种源种子性状及苗期生长初报[J]. 福建林业科技,2006,33(4): 13-16,30.

[10] Aebi H. Catalase *in vitro* [J]. Methods in Enzymology, 1984,105:121-126.

[11] Velikova V, Yordanov I, Edreva A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines [J]. Plant Science,2000,151(1):59-66.

[12] Jamieson D J. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Yeast,1998,14:1511-1527.

[13] Kim I S, Moon H Y, Yun H S, *et al.* Heat shock causes oxidative stress and induces a variety of cell rescue proteins in *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377 [J]. Journal of Microbiology,2006,44:492-501.

[14] Heath R L, Packer K. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1968,125:189-198.

[15] Alscher R G, Erturk N, Heath L S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants [J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 53:

[4] 李贤忠,朱存福,胥辉,等. 4 种不同种源小桐子种子发芽试验[J]. 林业调查规划,2010,35(4):133-136.

[5] 韦剑锋,吴炫柯,韦巧云,等. 不同等级麻疯树种子性状、萌发及苗木差异研究[J]. 种子,2014,33(7): 90-94.

[6] 韦剑锋,韦冬萍,吴炫柯,等. 采后贮藏时间对麻疯树种子表现性状及萌发能力的影响[J]. 种子,2014,33(1):14-18.

[7] 杜吉到,陈德祥,韩毅强,等. 大豆种子分级播种对田间保苗及产量的影响[J]. 大豆科学,2010,29(5): 804-807.

[8] 齐文超,张念辉,董根忠,等. 玉米种子分级精选效果初探[J]. 河南科技大学学报:农学版,2004,24(1): 57-59.

[9] 樊瑞多,郭玲玲,顾会会. 种子分级精选对杂交玉米植株性状和产量及其构成的影响[J]. 安徽农业科学, 2013,41(4):1479,1483.

[10] 王俊,杨龙,李丹艳,等. 凋落物覆盖及掩埋对不同质量的藜蒴种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 生态环境,2008,17(5):1980-1985.

[11] 陈慕德,陈珺,林倩华,等. 不同贮藏方式对麻疯树种子生理特征的影响[J]. 漳州师范学院学报,2012(2):86-89.

[12] 韦小丽,周晓东. 不同贮藏条件对麻疯树种子生理生化及萌发的影响[J]. 种子,2011,30(1):33-37.

[13] 方玉梅,宋明. 种子活力研究进展[J]. 种子科技, 2006(2):33-40.

[16] Foyer C H, Lopez-Delgado H, Dat J F, *et al.* Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signaling [J]. Physiologia Plantarum,1997,100:241-254.

[17] Zhou Z S, Wang S J, Yang Z M. Biological detection and analysis of mercury toxicity to alfalfa (*Medicago sativa*) plants [J]. Chemosphere,2008,70:1500-1509.

[18] Alscher R G, Donahue J L, Cramer C L. Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells [J]. Physiologia Plantarum,1997,100:224-233.

[19] Luo Y, Li W M, Wang W. Trehalose: Protector of antioxidant enzymes or reactive oxygen species scavenger under heat stress [J]. Environmental and Experimental Botany, 2008,63(1/3):378-384.

[20] Mitter R, Vanderauwera S, Gollery M, *et al.* Reactive oxygen gene network of plants [J]. Trends in Plant Science,2004,9:14165-14170.

[21] 田国忠,李怀方,裴维蕃. 植物过氧化物酶研究进展 [J]. 武汉植物学研究,2001,19(4):332-344.

(上接第 116 页)