

铜对大球盖菇抗氧化系统的影响

张琪林¹, 王 红²

(1.运城学院生命科学系, 山西 运城 044000; 2.运城学院生化实验中心, 山西 运城 044000)

摘 要:为了了解大球盖菇对铜胁迫的耐受和应答,进一步研究铜对大球盖菇的毒害机理及避免大球盖菇铜污染提供参考,通过液体培养试验研究了不同浓度铜(Cu)(0、50、100、200、400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对大球盖菇可溶性糖、脯氨酸含量影响和过氧化物酶、过氧化氢酶活性影响。结果表明,随着基质 Cu^{2+} 浓度增加,菌丝体内的可溶性总糖和脯氨酸含量显著降低,当 Cu^{2+} 浓度达到 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,其含量分别下降至对照组的 24.03% 和 33.91%。过氧化物酶和过氧化氢酶活性呈先增加、后降低趋势,活性最大时的铜离子浓度分别是 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。大球盖菇在铜胁迫下可溶性糖和脯氨酸含量没有像高等植物那样随铜浓度升高而先升高后下降的现象,过氧化物酶和过氧化氢酶活性的变化趋势与植物相同,但活性最高对应的铜浓度比植物偏低,二者说明大球盖菇对铜胁迫敏感,在栽培时应注意环境及基质的铜污染程度不能高于 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

关键词:大球盖菇;铜;抗氧化系统

中图分类号:Q945.78 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2010)11-2076-04

Effects of Copper(II) Stress on Antioxidant System in *Stropharia rugoso-annulata*

ZHANG Qi-lin¹, WANG Hong²

(1.Department of Life Science,Yuncheng University, Yuncheng 044000, China; 2.Centre of Biological and Chemical Experiment,Yuncheng University, Yuncheng 044000, China)

Abstract: The study will benefit the research for harm theory with Cu^{2+} poison to *Stropharia rugoso-annulata*. The effect of different Cu^{2+} concentration(0,50,100,200,400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on the content of soluble sugar,proline,the activities of POD and CAT of *Stropharia rugoso-annulata* in liquid culture medium was researched. The result showed that the total soluble sugar and proline decreased with increasing of Cu^{2+} concentration. At 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of Cu^{2+} , the proline and total soluble sugar greatly decreased, being 24.03% and 33.91% of CK. The activities of POD and CAT increased firstly then decreased, and reached the peak when Cu^{2+} concentration was 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ respectively. The content of soluble sugar and proline in *Stropharia rugoso-annulata* did not increase at first then decrease with increasing of Cu^{2+} concentration as did in a plant,but the activities of POD and CAT in *Stropharia rugoso-annulata* changed similarly to that in a plant,but $[\text{Cu}^{2+}]$ was lower than in a plant when the activities of POD and CAT reached the highest. These results implied that *Stropharia rugoso-annulata* was highly sensitive to Cu^{2+} . Therefore, Cu^{2+} concentration in environment or culture medium could not be higher than 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Keywords: *Stropharia rugoso-annulata*; copper; antioxidant system

铜是生物必需的微量营养元素,作为多种酶的辅基参与许多生理代谢过程,但过量又有害。铜具有富集性,过量的铜不仅影响植物的生长发育,导致植物体的铜毒害,而且通过食物链的富集作用直接或间接危害人类的健康和生命^[1]。现代工、农业的发展,如工业废水废渣的超标排放、含铜农药的频繁施用等,使

环境尤其是土壤中铜的含量越来越高,植物的铜毒害问题日益严重^[2-3]。铜可以直接诱发活性氧(ROS)产生,包括超氧阴离子、 H_2O_2 、羟基自由基等。这些自由基毒性很强,可以氧化细胞内的生物大分子,使细胞受害甚至死亡^[4]。重金属胁迫可以启动抗氧化酶系统,清除过量 H_2O_2 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$,从而防止氧化伤害或毒性更强的羟基自由基的形成^[5]。虽然人们广泛关注铜胁迫引起的抗氧化酶及膜系氧化指标的变化,有关植物的研究报道很多^[6-12],但有关铜胁迫对食用菌影响的研究还未见报道。重金属污染已经波及到利用农副产品

收稿日期:2010-04-06

基金项目:山西省高校科技研究开发项目(200611043)

作者简介:张琪林(1961—),男,山西运城人,学士,副教授,研究方向为微生物生理。E-mail:sxyzql@163.com

作为培养料的食用菌,且食用菌富集重金属的能力较强,远远超过绿色植物^[13-15]。我们以大球盖菇为试验材料,研究了铜胁迫对其过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性及游离脯氨酸、可溶性糖含量等生理生化指标的影响,旨在了解大球盖菇对铜胁迫的耐受和应答,为大球盖菇的栽培及生产绿色产品提供依据,也为进一步研究铜对食用菌的毒害机理及食用菌重金属污染的早期诊断提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试菌种

引自河南省清丰县食用菌技术推广中心,所用化学试剂均为分析纯。

1.2 不同浓度铜离子的胁迫

向综合 PDA 液体培养基中加入 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CuSO_4 母液,使培养基中 Cu^{2+} 浓度分别为 0、50、100、200、 $400 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,接种后,在 $25 \sim 28 \text{ } ^\circ\text{C}$ 条件下, $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 7 d。

1.3 可溶性总糖的测定

可溶性糖的提取:取菌丝在 $110 \text{ } ^\circ\text{C}$ 烘箱烘 15 min,然后调至 $70 \text{ } ^\circ\text{C}$ 过夜,干菌丝磨碎后称取 50 mg 样品置于 10 mL 刻度离心管内,加入 4 mL 80%酒精,于 $80 \text{ } ^\circ\text{C}$ 水浴且不断搅拌 40 min,以 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,收集上清液,其残渣加 2 mL 80%酒精重复提 2 次,合并上清液,加 10 mg 活性炭, $80 \text{ } ^\circ\text{C}$ 脱色 30 min,定容至 10 mL,过滤后取滤液测定。可溶性总糖的测定采用蒽酮比色法^[16]。

1.4 脯氨酸含量测定

脯氨酸提取:取菌丝 0.5 g 放入研钵中,加入 3% 磺基水杨酸溶液 2 mL 研磨后移入大试管中,再加入 3% 磺基水杨酸溶液 3 mL,加盖,于沸水浴中浸提 10 min,取出试管冷却至室温,取上清液测定。脯氨酸含量测定采用比色法^[17]。

1.5 过氧化物酶与过氧化氢酶活性测定

酶液制备:称取菌丝 1 g,加 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 5 mL,于研钵中研磨成匀浆,以 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,收集上清液低温保存,所得残渣用 5 mL KH_2PO_4 溶液再提取一次,合并两次上清液作为待测酶液。过氧化物酶(POD)活性测定采用愈创木酚法^[16]。过氧化氢酶(CAT)活性测定采用紫外分光光度法^[18]。

1.6 数据处理

采用 DPS V3.01 专业版数据处理设计软件对试验数据进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 铜对大球盖菇胞内可溶性总糖和脯氨酸含量的影响

从表 1 可以看出,随着培养基中 Cu^{2+} 浓度的增加菌丝体胞内可溶性总糖的含量逐渐降低,在试验浓度范围内, Cu^{2+} 浓度为 $400 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时降至最低值,仅为对照组的 24.03%。多重比较分析表明,不同 Cu^{2+} 浓度影响下可溶性总糖含量在 1% 显著水平上呈现极显著差异。方差分析结果 F 值为 541.311**,表明不同浓度 Cu^{2+} 影响下胞内可溶性总糖含量差异达 1% 的极显著水平。

随着培养基中 Cu^{2+} 浓度的增加,菌丝体胞内脯氨酸的含量逐渐降低。在试验浓度范围内 $400 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时降至最低值,仅为对照组的 33.91%。多重比较分析表明,不同浓度 Cu^{2+} 影响下脯氨酸含量在 1% 显著水平上呈现极显著差异。方差分析结果 F 值为 2 347.275**,表明不同浓度 Cu^{2+} 影响下胞内脯氨酸含量差异达 1% 的极显著水平。

表 1 Cu^{2+} 浓度对菌丝胞内可溶性糖和脯氨酸含量的影响及显著性分析

Table 1 Effect and prominence analysis of Cu^{2+} concentration to content on soluble sugar and proline

浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ concentration	样品数 sample number	可溶性糖 soluble sugar 均值 $\pm$ 标准差 mean $\pm$ standard deviation	脯氨酸 proline 均值 $\pm$ 标准差 mean $\pm$ standard deviation
CK	3	1.983 $\pm$ 0.061A	5.260 $\pm$ 0.046A
50	3	1.520 $\pm$ 0.046B	4.717 $\pm$ 0.050B
100	3	0.923 $\pm$ 0.041C	3.343 $\pm$ 0.056C
200	3	0.793 $\pm$ 0.043D	2.507 $\pm$ 0.070D
400	3	0.477 $\pm$ 0.041E	1.783 $\pm$ 0.031E

注:均值单位 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 干重;标准差后的大写字母表示 1% 显著水平。

2.2 铜对大球盖菇胞内过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性的影响

由表 2 可知,在试验浓度范围内,随着培养基中 Cu^{2+} 浓度的增加菌丝体胞内 POD 的活性先是呈增加趋势,在 $200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 达到最大值,为对照组的 2.283 倍,后呈降低趋势。多重比较分析表明, $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度胁迫下,POD 活性在 1% 显著水平上无显著差异,但与其他浓度处理组均存在 1% 极显著差异。方差分析结果 F 值为 173.065**,不同浓度 Cu^{2+} 处理大球盖菇 POD 活性差异均达 1% 的极显著水平。

菌丝体胞内 CAT 的活性呈现相似的变化趋势,随着培养基中 Cu^{2+} 浓度的增加,菌丝体胞内 CAT 的

活性先上升,在 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 达到最大值,大约为对照组的 2.902 倍,随后下降。多重比较分析表明,在不同浓度 Cu^{2+} 影响下,大球盖菇菌丝体内 CAT 活性差异达 1% 极显著差异。方差分析结果 F 值为 3 206.93**,不同浓度 Cu^{2+} 处理大球盖菇,其胞内 CAT 的活性差异达 1% 的极显著水平。

表 2 Cu^{2+} 浓度对菌丝胞内 POD 和 CAT 活性的影响及显著性分析

Table 2 Effect and prominence analysis of Cu^{2+} concentration to activity on POD and CAT

浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ concentration	样品数 sample number	POD 均值 $\pm$ 标准差 mean $\pm$ standard deviation	CAT 均值 $\pm$ 标准差 mean $\pm$ standard deviation
CK	3	0.046 $\pm$ 0.001D	0.128 $\pm$ 0.001E
50	3	0.061 $\pm$ 0.001C	0.219 $\pm$ 0.002C
100	3	0.066 $\pm$ 0.001C	0.372 $\pm$ 0.001A
200	3	0.105 $\pm$ 0.007A	0.341 $\pm$ 0.001B
400	3	0.090 $\pm$ 0.001B	0.197 $\pm$ 0.006D

注:均值单位 $\Delta\text{OD}_{470}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ 鲜重;标准差后的大写字母表示 1% 显著水平。

3 讨论

3.1 铜胁迫下大球盖菇可溶性总糖和脯氨酸含量的变化

在本试验 Cu^{2+} 胁迫浓度范围内,随着 Cu^{2+} 浓度增加,大球盖菇菌丝体内可溶性总糖含量和脯氨酸含量均呈现下降的趋势。且不同处理间差异极显著,说明重金属 Cu^{2+} 的浓度对大球盖菇可溶性总糖和脯氨酸含量的影响比较明显。 $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu^{2+} 处理的大球盖菇菌丝体内可溶性总糖含量和脯氨酸含量最低,分别为对照组的 24.034% 和 33.91%。大球盖菇在铜胁迫下可溶性糖和脯氨酸含量没有像植物那样随铜浓度升高而先升高后下降,我们认为其原因可能是:(1)大球盖菇与铜相关的代谢或抗性生理与植物不同;(2)大球盖菇对铜的耐受力比植物要低, $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铜浓度就达到了胁迫严重程度,即导致二者含量升高的浓度小于 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。真正原因有待进一步探讨,但不论是什么,都说明大球盖菇对铜胁迫敏感,在栽培时应注意环境及基质的铜污染程度。一则为大球盖菇提供优良的生长环境,二则避免生成铜污染的大球盖菇。

3.2 铜胁迫下大球盖菇过氧化物酶和过氧化氢酶活性的变化

50 、 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu^{2+} 浓度胁迫下,菌丝体内 POD 活性无显著差异,而 CAT 活性却呈现极显著差异。但

这两个浓度处理组与其他处理组无论 POD 活性还是 CAT 活性均为极显著差异。POD 活性在 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu^{2+} 胁迫下达到最大值,为对照组的 2.283 倍。当 Cu^{2+} 浓度为 $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,POD 活性有下降的趋势。 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu^{2+} 胁迫下 CAT 活性最大,约为对照组的 2.902 倍,当大于这一浓度后,CAT 活性也有下降趋势。

与前人的研究结果^[1,7,12]相似,本研究表明在 $50\sim 400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu^{2+} 浓度范围内,菌丝体 POD 与 CAT 活性也都是先升高、后降低。大球盖菇在铜胁迫下过氧化物酶和过氧化氢酶活性的变化趋势与植物相同,说明抗氧化机制相似;活性最高的铜浓度比植物偏低,如小白菜 POD 在铜浓度 $270 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时活性最大,CAT 在铜浓度 $180 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时活性最大^[12],说明大球盖菇对铜胁迫敏感。

3.3 需要进一步研究的问题

本研究发现,大球盖菇对铜胁迫的响应在可溶性糖及脯氨酸含量变化、POD 及 CAT 活性变化方面与植物有相同又有不同,至于其他抗氧化物质如超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽还原酶(GR)等和活性氧毒害指标物质如丙二醛(MDA)等的变化趋势如何,以及对铜胁迫敏感的原因还有待进一步探讨。

4 结论

在本试验浓度范围内 Cu^{2+} 胁迫下,随着 Cu^{2+} 浓度增加,大球盖菇菌丝体内可溶性总糖含量和脯氨酸含量均呈现下降的趋势,没有像高等植物那样随铜浓度升高出现先升高后下降的现象。过氧化物酶和过氧化氢酶活性的变化趋势与植物相同,活性也都是先升高后降低,但活性最高对应的铜浓度比植物偏低。可见大球盖菇对铜胁迫敏感,耐受力差,栽培时应注意环境及基质的铜污染程度。一则为大球盖菇提供优良的生长环境,二则避免生产铜污染的大球盖菇。

参考文献:

- [1] 蔡琪敏,陈洁,张志祥,等.铜胁迫对两种苔藓植物生理生化的影响[J].浙江林业科技,2008,28(6):24-27.
CAI Qi-min, CHEN Jie, ZHANG Zhi-xiang, et al. Influence of copper stress on physiological and biochemical characteristics of bryophytes[J]. Journal of Zhejiang Forestry Science and Technology, 2008, 28(6):24-27.
- [2] 廖金凤.广东省南海市农业土壤中铜锌镍的环境容量[J].土壤与环境,1998,8(1):15-18.
LIAO Jin-feng. The environmental capacity of copper, zinc, nickel in a-

- gricultural soil in Nanhai, Guangdong[J]. *Soil and Environmental Sciences*, 1998, 8(1):15-18.
- [3] Marschner H. Mineral nutrition of higher plants[M]. 2nd. London: Academic Press, 1995:333-347.
- [4] 王松华, 杨志敏, 徐朗莱. 植物铜素毒害及其抗性机制研究进展[J]. 生态环境, 2003, 12(3):336.
- WANG Song-hua, YANG Zhi-min, XU Lang-lai. Mechanisms of copper toxicity and resistance of plants[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2003, 12(3):336.
- [5] Patsikka E, Kairavuo M, Sersen F, et al. Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition in vivo by out competing iron and causing decrease in leaf chlorophyll[J]. *Plant Physiology*, 2002(129):1359-1367.
- [6] Abuzid M M. Copper pollution on plants and the uptake of heavy metals by corn seedlings[J]. *Moscow Univ Soil Sci Bull*, 1992, 47(3):37-39.
- [7] 柯世省, 朱建, 李丹丹, 等. 铜胁迫对苋菜幼苗生长和抗氧化酶活性的影响[J]. 浙江农业学报, 2008, 20(1):54-58.
- KE Shi-sheng, ZHU Jian, LI Dan-dan, et al. Effects of copper stress on growth and antioxidant enzymes activities of *Amaranthus tricolor* seedlings[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2008, 20(1):54-58.
- [8] 王萍萍, 唐咏, 吴阔, 等. Cu^{2+} 胁迫对苘麻抗氧化酶系及根尖细胞超微结构的影响[J]. 沈阳农业大学学报, 2007, 38(3):362-365.
- WANG Ping-ping, TANG Yong, WU Kuo, et al. Effects of Cu^{2+} stress on the antioxidant enzymes' systems and ultrastructure in the root tip cells of *Abutilon theophrasti*[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2007, 38(3):362-365.
- [9] 邱栋梁, 张国军, 余东, 等. Cu胁迫对柑桔叶片膜透性及酶活性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(3):1008-1013.
- QIU Dong-liang, ZHANG Guo-jun, YU Dong, et al. Effects of copper stress on permeability of plasma membrane and activity of enzyme in citrus leaves[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(3):1008-1013.
- [10] 徐磊, 林义章. 铜胁迫对小白菜品质相关指标的影响[J]. 中国农学通报, 2009, 25(14):161-163.
- XU Lei, LIN Yi-zhang. The change of *Brassica chinensis* L. quality indicators under the copper stress[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2009, 25(14):161-163.
- [11] 朱喜锋, 邹定辉, 简建波, 等. 龙须菜对重金属铜胁迫的生理响应[J]. 应用生态学报, 2009, 20(6):1438-1444.
- ZHU Xi-feng, ZOU Ding-hui, JIAN Jian-bo, et al. Physiological responses of *Gracilaria lemaneiformis* to copper stress[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2009, 20(6):1438-1444.
- [12] 林义章, 徐磊, 林碧英. Cu胁迫对小白菜保护酶系统及其他相关抗性指标的影响[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2007, 36(4):369-372.
- LIN Yi-zhang, XU Lei, LIN Bi-ying. Effects of copper stress on *Brassica chinensis* L. resistant enzyme system and other resistant indexes[J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2007, 36(4):369-372.
- [13] An X L, Zhou Q X. Bioaccumulation of heavy metal in macrofungi and its application in ecological remediation[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(8):1897-1902.
- [14] Michelot D, Siobud E, Dore J C, et al. Update on metal content profiles in mushrooms: Toxicological implications and tentative approach to the mechanisms of bioaccumulations[J]. *Toxicon*, 1998, 36(12):1997-2012.
- [15] Shi Q Q, Lin L, Chen Z C, et al. Studies on the accumulation of heavy metal and their effect on the growth and metabolism in edible fungi[J]. *Acta Mycologica Sinica*, 1991, 10(4):301-311.
- [16] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003:123-124, 127-128.
- ZHANG Zhi-liang, QU Wei-jing. Guidebook of phyto physiology experiments[M]. Beijing: Higher Education Press, 2003:123-124, 127-128.
- [17] 张殿中, 汪沛洪, 赵会贤. 测定小麦叶片游离脯氨酸含量的方法[J]. 植物生理学通讯, 1990(4):62-65.
- ZHANG Dian-zhong, WANG Pei-hong, ZHAO Hui-xian. Determination of the content of free proline in wheat leaves[J]. *Plant Physiology Communications*, 1990(4):62-65.
- [18] 王松华, 张华, 崔元戎, 等. 镉对灵芝菌丝抗氧化系统的影响[J]. 应用生态学报, 2008, 19(6):1355-1361.
- WANG Song-hua, ZHANG Hua, CUI Yuan-rong, et al. Effects of cadmium stress on the antioxidative system in *Ganoderma lucidum* mycelia[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2008, 19(6):1355-1361.
- [19] Drazkiewicz M, Ewicz M, Skorzynska Polit E, et al. Copper induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Biomaterials*, 2004(17):379-387.