

不同浓度镉对白菜幼苗生长受害与蛋白质组变化关系分析

江帆, 黄海泉, 尹凤英, 王振英, 彭永康

(天津师范大学细胞遗传与分子调控天津市重点实验室, 天津 300387)

摘要: 镉是一种主要的环境污染物, 它可以通过在作物体内的积累而进入人类的食物中, 但是, 对于 Cd^{2+} 的生理效应与毒害机理的了解并不十分清楚, 而从蛋白质组角度分析 Cd^{2+} 害机理文献更少。本文以中国白菜为研究材料, 采用室内培养方法, 研究了 10、30、50、100、1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉浓度处理对白菜幼苗生长受害及与蛋白质组变化的关系。结果表明, 低浓度镉 (10、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对幼苗生长无明显有害影响, 但在 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉浓度下, 幼苗高度、胚根长度、鲜重、干重均显著下降, 证明 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 是白菜忍耐镉害的临界浓度。实验同时发现, 随着镉处理浓度的提高, 幼苗生长受害加重, 叶绿素含量变化也得出类似的结果。2D-PAGE 技术分析则表明, 经 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理后的胚根、胚轴、叶片蛋白质组产生明显变化, 胚根中诱导出 13 个新的蛋白质斑点, 7 个蛋白质斑点消失, 胚轴中有 11 个蛋白质斑点消失; 叶片中诱导出 17 个新的蛋白质斑点, 7 个蛋白质斑点消失。很明显, 白菜对镉的胁迫反应涉及到多个蛋白质(酶)的参与。

关键词: 镉; 临界剂量; 蛋白质组; 双向凝胶电泳; 白菜

中图分类号: X503.231 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2008)06-2345-06

Relationships Between Seedling Growth Damages and Proteome Changes in Chinese Cabbage Treated with Different Concentrations of Cd^{2+}

JIANG Fan, HUANG Hai-quan, YIN Feng-ying, WANG Zhen-ying, PENG Yong-kang

(Tianjin Key Lab of Cytogenetical and Molecular Regulation, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China)

Abstract: Cd^{2+} is a major environmental pollutant that enters human food via accumulation in crops, but the biological effects of this metal, the mechanism of its toxicity are not yet clearly understood, and little information is known about stress-elicited changes in plants at the proteome level. In present study, we used Chinese cabbage as experimental materials, investigated the effects of Cd^{2+} on growth and proteome changes of seedlings treated with 10~1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. We also analyzed the relationship of seedling growth inhibition and proteome changes. The results indicated that 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} did not inhibit the seedling growth, but the severe toxicity damages were observed in seedlings treated with 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} , with seedling height, root length, fresh weight and dry weight decreasing. The results showed that 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ was the threshold concentration of Chinese cabbage seedlings tolerance to Cd^{2+} . Seedling growth inhibition increased with an increase in the concentration of Cd^{2+} from 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ to 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Similar experimental results were observed in chlorophyll content changes of seedlings treated with different concentrations of Cd^{2+} . Using two-dimensional gel electrophoresis, several protein changes were observed in seedlings treated with 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} , 13 new protein spots were induced and 7 protein spots were lost in root, 11 protein spots were lost in hypocotyls and 17 new protein spots were induced, 7 protein spots were lost in leaves, indicating that several proteins(enzymes) were involved in the response of Chinese cabbage to Cd^{2+} stress.

Keywords: cadmium; threshold concentration; proteome; two-dimensional gel electrophoresis; Chinese cabbage

收稿日期: 2007-12-05

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目 (02010)

作者简介: 江帆 (1983—), 女, 天津人, 硕士, 主要从事分子与细胞生物学方面的研究。E-mail: cat46601128@yahoo.com.cn

联系人: 彭永康 E-mail: pykcell@yahoo.com.cn; 王振英 E-mail: wzyccell@yahoo.com.cn

镉是造成我国农田污染最严重的重金属之一。由于工业废水的排放、人类活动如化肥和去污剂的大量使用,造成农田中镉的大量积累。据最近报道,我国含镉的农业土壤已达 20 万 $\text{hm}^{2[1]}$,每年有 14.6 亿 kg 的农产品被镉污染^[2]。农田中含有镉,可以导致作物幼苗生长受抑甚至死亡^[3-6]。镉可以直接进入食物链,影响人类健康。很多研究者对高镉水平下,作物适应与忍耐的生理、生化与分子生物学机理作了研究,已取得很多有价值的研究结果。如 Hart 等^[7]、Kavita 和 Dubey^[8]、Rivera-Becerril 等^[9]对硬粒小麦、3 个豌豆栽培种在不同镉浓度下植物体内的吸收、累积规律作了分析。Zhou 等^[10]以 *Alternanthera philoxeroides* 为材料,在高浓度镉条件下植物的超微结构损害作了研究。许多研究结果表明,当作物受到镉害后,体内的一系列代谢如蛋白质合成、光合作用等均会受到严重抑制^[10-19]。尽管上述研究已经较为详细地探讨了作物对镉适应、忍耐的生理、生化机理,但专门从生物化学角度探讨作物镉害机理较少见报道。许多研究仅涉及某几个特异蛋白,而作物遇到镉害时,体内正常代谢受干扰或抑制后会涉及到多个蛋白质(酶)的变化。近年来,蛋白质分析技术上的突破,特别是蛋白质组学技术的出现,使我们在研究植物的某一特定组织或在某一特定环境胁迫下,植物体内蛋白质组份变化时,可以获得更大量、更全面的实验结果。因此,从蛋白质网络即蛋白质组角度研究镉害机理,结果更为可靠。青麻叶是深受天津人民喜爱的大白菜栽培种,品质优良、营养丰富,栽培面积为全市蔬菜之首。但近 10 年来,由于农田受镉等重金属污染,品质变劣,产量下降。本研究以青麻叶为材料,利用不同浓度镉处理后幼苗生长受害与蛋白质组变化的关系作了分析,这可能对作物镉害机理研究、镉害早期预测、减少蔬菜生产损失有一定帮助。

1 材料与方法

1.1 植物材料与培养

白菜品种青麻叶(绿营 75 号)种子用 0.1% HgCl_2 表面消毒 5 min,用自来水冲洗 2 次,浸泡过夜,然后在带有湿润滤纸的培养皿中黑暗条件 23 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 3 d,将经黑暗中培养 3 d 的白菜幼苗放入光照培养箱内,然后将幼苗分别放入含有 10、30、50、100、500、1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CdCl_2 中处理 72 h。幼苗高度、胚根长度、鲜重、干重和叶绿素含量的测定均取材于镉处理 72 h 的幼苗,干重的测定是将处理 3 d 的幼苗在

72 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干 48 h。所得数据为 3 次实验研究结果的平均数,并均经过统计学分析^[20]。叶绿素含量的测定利用 80%丙酮法,计算公式参照文献[21]。

1.2 蛋白质制备与双向凝胶电泳

1.2.1 蛋白质制备

取对照和处理组的胚根、胚轴和叶片各 0.5 g,在含有 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的裂解缓冲液 [含有 9.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 脲素、2%NP40、pH3~10 两性电解质(用于分离等电点在 3~10 的范围内的两性离子)1.6%、pH5~7 两性电解质(用于分离等电点在 5~7 的范围内的两性离子)0.4%、5% β -巯基乙醇]中匀浆,将匀浆在 1 500 g 下冷冻离心 10 min,取上清液,用 Hadlaczký^[22]提供的方法测定蛋白质含量。

1.2.2 双向聚丙烯酰胺凝胶电泳

根据 O'Farrel 等^[23]提供的方法进行双向电泳分析,第一向为 3%聚丙烯酰胺凝胶,凝胶中含有 0.98 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 脲素,2%NP40,能分离蛋白质等电点(IEF)范围在 3~10、5~7 的两性电解质、ddH₂O、TEMED、APS。一向凝胶先分别在 200 V 15 min、300 V 30 min、400 V 下 60 min 进行预等电聚焦。待测蛋白质样品溶解在样品缓冲液(内含 ddH₂O、Tris-HCl pH6.8、甘油、SDS、 β -巯基乙醇、溴酚兰)中,每管蛋白质样品上样量为 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (含 4~6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),在 400 V 下电泳 14~16 h。等电聚焦结束后,将凝胶从凝胶管内取出,放入平衡缓冲液(含有 6 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH6.8、 β -巯基乙醇、10%甘油、2%SDS)中平衡 20 min。第二向为 Laemmli^[24]提供 12.5%SDS-PAGE。所得结果均经 3 次重复,用 Wary 等^[25]介绍的方法进行银染。凝胶通过 GS800 色谱扫描取得图像,用 PDQUEST 软件进行对照组和处理组差异蛋白质斑点鉴别。

2 结果与分析

2.1 幼苗生长特性

表 1 是大白菜幼苗经不同浓度镉处理 3 d 后所检测到的生长受害结果,可见随镉处理浓度提高,幼苗生长受害加深现象非常明显,如幼苗高度从对照的 $(4.14\pm0.34)\text{cm}$ 逐步降低,最后在镉浓度为 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时低至 $(0.27\pm0.06)\text{cm}$ 、胚根长度从 $(2.63\pm0.37)\text{cm}$ 逐步降低至 $(0.10\pm0.00)\text{cm}$ 。鲜重从 $(2.54\pm0.08)\text{g}\cdot100$ 个幼苗⁻¹ 逐步降低至 $(0.10\pm0.00)\text{g}\cdot100$ 个幼苗⁻¹,干重从 $(0.24\pm0.01)\text{g}\cdot100$ 个幼苗⁻¹ 逐步降低至 $(0.03\pm0.00)\text{g}\cdot100$ 个幼苗⁻¹。

2.2 叶绿素含量变化

表 1 不同浓度镉处理对白菜幼苗生长的影响

Table 1 Effects of different concentrations of Cd²⁺ on seedling growth in Chinese cabbages

Cd ²⁺ 浓度 Cd ²⁺ concentration/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	幼苗高度 Seedlings height/cm	胚根长度 Root length/cm	鲜重 100 个幼苗 Fresh weight/g100 individuals	干重 100 个幼苗 Dry weight/g100 individuals
0	4.14±0.34	2.63±0.37	2.54±0.08	0.24±0.01
10	4.11±0.28	2.55±0.19	2.19±0.03*	0.23±0.01
30	4.08±0.47	2.31±0.21*	2.27±0.05*	0.20±0.01*
50	1.36±0.12**	1.70±0.11**	0.96±0.14**	0.17±0.01**
100	0.84±0.05**	0.81±0.10**	0.90±0.01**	0.13±0.01**
500	0.33±0.05**	0.33±0.03**	0.29±0.05**	0.05±0.01**
1 000	0.27±0.06**	0.10±0.00**	0.10±0.00**	0.03±0.00**

注：* 和 ** 分别表示差异分别达 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 显著水平。
Note: *and**indicate significant differences compared with the control at $P<0.05$ and $P<0.01$ respectively.

图 1 是白菜经不同浓度镉处理后,幼苗叶绿素含量变化。可以明显看到,叶绿素含量的减少与镉处理的浓度相一致,随着镉处理浓度的增加,叶绿素含量减少。已有很多工作证明,镉可以影响植物正常的光合作用,这可能与叶绿素含量的减少有关。

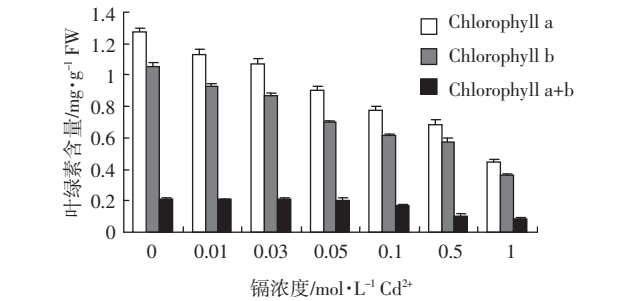


图 1 白菜经 10~1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理后幼苗叶绿素含量变化
Figure 1 Changes of chlorophyll contents in seedlings treated with 10~1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd²⁺ in cabbage

2.3 蛋白质组变化

在用不同浓度镉处理白菜幼苗时发现,50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度对白菜幼苗生长受害明显出现,为此,对该浓度下处理 72 h 的幼苗胚根、胚轴和叶片中蛋白质组的变化作了检测,发现胚根中,有 13 个新蛋白质斑点被诱导产生。它们是斑点 1 (16kDa/pI8.6)、斑点 2 (16kDa/pI7.5)、斑点 3 (18kDa/pI7.5)、斑点 4 (17kDa/pI7.4)、斑点 5 (28kDa/pI8.4)、斑点 6 (29kDa/pI7.4)、斑点 7 (26kDa/pI6.6)、斑点 8 (23kDa/pI5.5)、斑点 9 (27kDa/pI5.4)、斑点 10 (23kDa/pI5.4)、斑点 11 (31kDa/pI7.3)、斑点 12 (66kDa/pI8.3) 和斑点 13 (97kDa/pI5.5)。有 5 个蛋白质斑点的表达量增加,它们是斑点 19 (51kDa/pI8.3)、斑点 20 (53kDa/pI8.1)、斑点 21 (80kDa/pI8.1)、斑点 22 (16kDa/pI6.6) 和斑点 23

(17kDa/pI7.4)。斑点 24 (17kDa/pI6.3) 和斑点 25 (18kDa/pI6.4) 的表达量明显减少。有 7 个蛋白质斑点消失,它们是斑点 14 (14kDa/pI5.4)、斑点 15 (16kDa/pI5.5)、斑点 16 (16kDa/pI5.6)、斑点 17 (15kDa/pI5.8)、斑点 18 (18kDa/pI5.7)、斑点 26 (70kDa/pI8.4) 和斑点 27 (70kDa/pI8.6)。

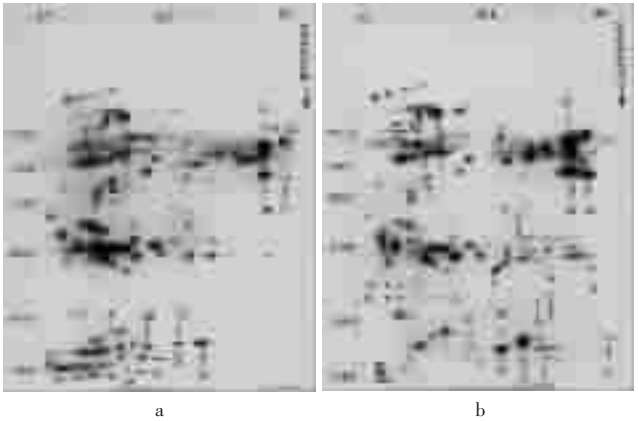


图 2 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd²⁺ 处理 72 h 后白菜胚根对照组 (a) 和处理组 (b) 总蛋白 2D-PAGE 银染图

Figure 2 Silver-stained two-dimensional electrophoresis profiles of total protein in cabbage roots treated by 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd²⁺ (b) and the control (a) after 72 h

在胚轴中没有看到诱导出新蛋白质斑点,只有 5 个蛋白质斑点表达量明显增加(图 3),它们是斑点 12 (10kDa/pI7.5)、斑点 14 (78kDa/pI7.2)、斑点 15 (85kDa/pI7.9)、斑点 16 (66kDa/pI7.6) 和斑点 19 (36kDa/pI4.8)。有 11 个蛋白质斑点消失,它们是斑点 1 (10kDa/pI6.8)、斑点 2 (10kDa/pI6.6)、斑点 3 (12kDa/pI5.7)、斑点 4 (8kDa/pI5.8)、斑点 5 (8kDa/pI5.6)、斑点 6 (8kDa/pI5.4)、斑点 7 (8kDa/pI5.4)、斑点 8 (9kDa/pI5.6)、斑点 9 (13kDa/pI4.6)、斑点 10 (9kDa/pI4.7) 和斑

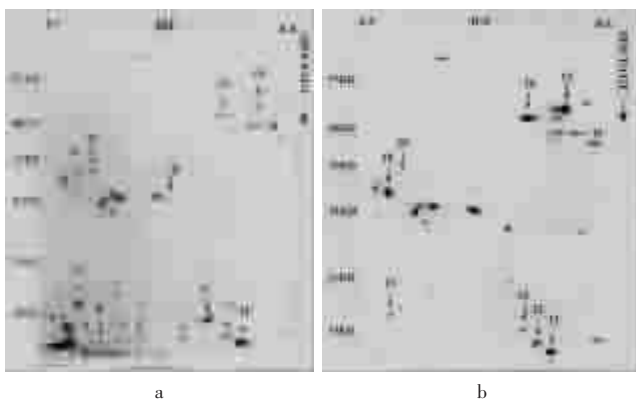


图 3 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cd}^{2+}$ 处理 72 h 后白菜胚轴对照组(a)和处理组(b)总蛋白 2D-PAGE 银染图

Figure 3 Silver-stained two-dimensional electrophoresis profiles of total protein in cabbage plumular axis treated by $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cd}^{2+}$ (b) and the control(a) after 72 h

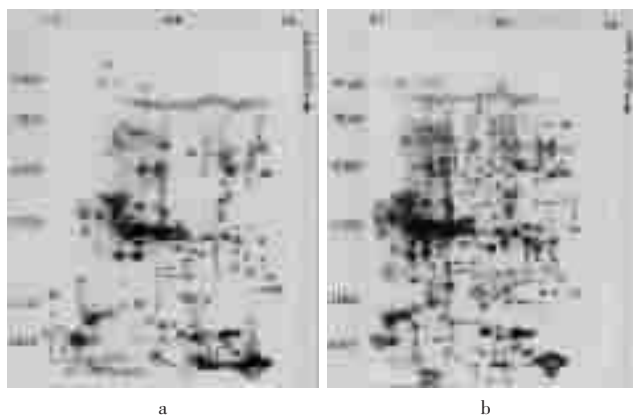


图 4 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cd}^{2+}$ 处理 72 h 后白菜叶片对照组(a)和处理组(b)总蛋白 2D-PAGE 银染图

Figure 4 Silver-stained two-dimensional electrophoresis profiles of total protein in cabbage leaves treated by $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cd}^{2+}$ (b) and the control(a) after 72 h

点 18(16kDa/pI5.1)。有 4 个蛋白质斑点表达量减少,它们是斑点 11(9kDa/pI7.8)、斑点 13(14kDa/pI7.1)、斑点 17(16kDa/pI4.8)和斑点 20(47kDa/pI5.4)。

在叶片中,诱导出 17 个新的蛋白质斑点(图 4),它们是斑点 1(23kDa/pI6.9)、斑点 2(20kDa/pI6.8)、斑点 3(33kDa/pI7.4)、斑点 4(28kDa/pI7.7)、斑点 5(22kDa/pI5.6)、斑点 6(24kDa/pI5.3)、斑点 7(36kDa/pI6.2)、斑点 8(32kDa/pI6.5)、斑点 9(50kDa/pI6.3)、斑点 10(58kDa/pI6.0)、斑点 11(72kDa/pI6.5)、斑点 12(46kDa/pI6.8)、斑点 13(48kDa/pI6.9)、斑点 14(66kDa/pI7.4)、斑点 20(12kDa/pI5.3)、斑点 37(8kDa/pI6.1)和斑点 38(43kDa/pI7.6)。有 10 个蛋白质斑点表达量增加,它们是斑点 27(26kDa/pI5.7)、斑点 28(25kDa/pI5.7)、斑点 29(23kDa/pI5.7)、斑点 30(27kDa/pI6.6)、斑点 31(28kDa/pI6.7)、斑点 32(28kDa/pI7.2)、斑点 33(27kDa/pI7.4)、斑点 34(26kDa/pI7.6)、斑点 35(22kDa/pI7.5)和斑点 36(22kDa/pI6.8)。有 7 个蛋白质斑点消失,它们是斑点 15(18kDa/pI4.6)、斑点 16(20kDa/pI5.2)、斑点 18(10kDa/pI5.4)、斑点 19(10kDa/pI4.6)、斑点 26(12kDa/pI7.0)、斑点 39(16kDa/pI6.8)和斑点 40(50kDa/pI6.8)。有 6 个蛋白质斑点表达量减少,它们是斑点 17(16kDa/pI6.0)、斑点 21(8kDa/pI5.5)、斑点 22(12kDa/pI6.3)、斑点 23(18kDa/pI6.5)、斑点 24(10kDa/pI7.0)和斑点 25(10kDa/pI7.3)。

3 讨论

很多研究表明,镉能够引起植物幼苗中蛋白质

的变化,如 Hsu 和 Kao^[12]研究 2 种对镉具不同抗性的水稻幼苗在 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 镉处理下的反应表明,在对镉敏感的幼苗中,蛋白质含量增加,而保护酶活性和总氨基酸含量减少;Romero-Puertas 等^[18]发现,镉可以引起核酮糖二磷酸羧化酶-加氧酶、谷胱甘肽还原酶、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶等多种蛋白质的氧化与修饰反应。Ueki 等^[19]鉴别了一种富含甘氨酸的蛋白 cdiGRP,这种蛋白质可以被低浓度的镉诱导产生,其功能是抑制植物病毒的运动。Fleming 等^[11]发现, $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 镉可以在植物体内诱导多种胁迫蛋白(sp)的合成,而 sp 合成的变化可以在植物生长受害之前被检测到,因此,可以作为检测镉害的早期有用生化指标;Kavita 等^[8]在用 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CdCl}_2$ 处理 20 d 的水稻幼苗中成功的分离出 18kDa 镉诱导蛋白复合体,他们进一步分析了这个蛋白复合体的性能,发现在水稻幼苗中,它可以帮助阻止过量的镉离子进入细胞内。Sanitadi 等^[26]和 Hall^[27]则发现,这些镉诱导产生的 sp 可以直接与镉离子结合,与植物对镉的抗性相关。Choi 等^[28]在经 $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 胁迫的拟南芥中克隆出编码 18kDa 蛋白质的 cDNA。上述研究结果表明,镉诱导蛋白是普遍存在于高等植物中的。这些研究为我们从生化水平上了解植物镉害的机理提供了基础。

本文以白菜幼苗为材料,分析了不同浓度镉对幼苗生长的伤害和胚根、胚轴、叶片中蛋白质组的变化,观察到一个明显的相关性。在低浓度镉($10, 30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)下处理白菜幼苗 72 h,对幼苗生长、苗高、胚根长以及鲜重与干重几乎不产生影响,此时,胚根、胚轴和

叶片中的蛋白质组也没有明显变化(结果未示出),但当在 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理时,幼苗生长严重受害(表 1),叶绿素含量下降明显,而幼苗 3 个组织内的蛋白质组也产生明显变化,有多个新的蛋白质被诱导产生,多个蛋白质消失。如在胚根中,有 13 个新的蛋白质组分产生,7 个组分消失,胚轴中,有 11 个蛋白质组分消失,叶片中,有 17 个蛋白质组分产生,7 个组分消失。很明显,植物对镉的胁迫反应涉及到多种蛋白质(酶)的参与。近几年来,国内外很多研究者,利用蛋白质组研究技术,探讨作物在遇不良环境条件后的抗性机理,取得很好的实验结果;Cui^[29]研究水稻幼苗的冷胁迫后叶片蛋白质组变化;Yan^[30]研究水稻耐盐的胚根蛋白质组;Riccard^[31]对玉米缺水和 Gh^[32]对水稻旱胁迫胚根蛋白质组的变化作了详细的研究,得出许多有价值的实验结果。在研究镉对植物胁迫反应时以往的研究仅检测到几个特异蛋白的变化,而本实验中,我们对白菜幼苗的临界镉害浓度 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 下根、胚轴、叶片的蛋白质组变化作了较深入的研究,发现在 3 种组织中,有 41 个新的蛋白质合成,14 个蛋白质消失。但由于本实验所作的双向电泳是用银染的方法,使质谱分析难以进行,因而,对这些新合成和消失的蛋白质组组份的归属难以鉴别,这是今后工作中应该注意的。然而,这一实验结果的取得,对于镉害机理研究提供了更全面的结果,可能对镉害的早期预测,减少作物损失有一定意义。

参考文献:

- [1] 李坤权, 刘建国, 陆小龙, 等. 水稻不同品种对镉吸收及分配的差异[J]. 农业环境科学学报, 2003, 22(5):529-532.
LI Kun-quan, LIU Jian-guo, LU Xiao-long, et al. Uptake and distribution of cadmium in different rice cultivars[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2003, 22(5):529-532.
- [2] 叶海波, 杨肖娥, 何 冰, 等. 东南景天对锌镉复合污染的反应及其对锌镉吸收和积累特性的研究[J]. 农业环境科学学报, 2003, 22(5):513-518.
YE Hai-bo, YANG Xiao-e, HE Bing, et al. Response of *Sedum Alfredii Hance* towards Cd/Zn complex-pollution and accumulation of the heavy metals[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2003, 22(5):513-518.
- [3] Das P, Samantarays, Rout G R. Studies on cadmium toxicity in plants: a review[J]. *Environ Pollut*, 1997, 98:29-36.
- [4] Clijsters H, Van Assche F. Inhibition of photosynthesis by metals[J]. *Photosyn Res*, 1985, 7:31-40.
- [5] Shan K, Dubey R S. Effects of cadmium on RNA level as well as activity and molecular forms of ribonuclease in growing rice seedlings [J]. *Plant Physiol. Biochem(Paris)*, 1995, 33:577-584.
- [6] Urwin P E, Groom Q J, Robin N J. Characterization of two cDNAs and identification of two proteins that accumulate in response to cadmium in Cadmium tolerant *Datura innoxia*(Mill)[J]. *Cells Expt Bot*, 1996, 47:1019-1024.
- [7] Hart J J, Welch R M, Norvell V A, et al. Characterization of cadmium binding, uptake and translocation in intact seedlings of bread and durum wheat cultivars[J]. *Plant Physiol*, 1998, 116:1413-1420.
- [8] Kavita S, Dubey R S. A 18kDa cadmium inducible protein complex: its isolation and characterization from rice (*Oryza Sativa* L.) seedlings[J]. *Plant Physiology*, 1998, 152:448-454.
- [9] Rivera-Becerril F, Calantzis C, Turnau K, et al. Cadmium accumulation and buffering of cadmium-induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *pisum sativum* L. Genotypes[J]. *Exp Bot*, 2002, 53:1177-1185.
- [10] Zhou H W, Shi G X, Xu P S. Effect of Cd^{2+} polluted water on the activities of antioxidant enzymes and ultrastructure in roots of *Alternanthera philoxeroides*[J]. *Plant Physiology Communications*, 2003, 39(3):211-213.
- [11] Fleming W J, Grossfeld R M, Siesko M M. Stress protein synthesis and peroxidase activity in a submersed aquatic macrophyte exposed to cadmium[J]. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 1997, 16(8):1755.
- [12] Hsu Y T, Kao C H. Changes in protein and amino acid contents in two cultivars of rice seedling with different apparent tolerance to cadmium [J]. *Plant Growth Regulation*, 2003, 40:147-155.
- [13] Keltjens W G, Van Beusichem. Phytochelatin as biomarkers for heavy metal stress in maize. (*Zea Mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.): Combined effects of copper and cadmium[J]. *Plant and Soil*, 1998, 203(1):119-126.
- [14] Kevresan S, Petrovic N, Popovic M, et al. Nitrogen and protein metabolism in young pea plants as affected by different concentrations of nickel, cadmium, lead and molybdenum[J]. *Plant Nutri*, 2001, 24(10):1633-1645.
- [15] Khudsar T, Mahmooduzzafar Ipiba M. Cadmium-Induced changes in leaf epidermis, photosynthetic rate and pigment concentrations in *Calligonum Capjan*[J]. *Biol Plant*, 2001, 44(1):59-64.
- [16] Lagriffoul A, Mocpiuot B, Mench M, et al. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea Mays* L.)[J]. *Plant and Soil*, 1998, 200(2):241-250.
- [17] Mühiling K H, Lauchli A. Effect of bioaccumulation of cadmium in biomass productivity, essential trace element, chlorophyll biosynthesis and macromolecules of wheat seedlings [J]. *Biological Trace Element Research*, 2003, 92(3):257-274.
- [18] Romero-Puertas M C, Palma J A, Gomeg M, et al. Cadmium cause the oxidative modification of protein in pea plants[J]. *Plant Cell & Environ*, 2002, 25(5):677-687.
- [19] Ueki S, Citovsky V. The systemic movement of a tobamovirus is inhibited by a cadmium-induced glycine-rich protein[J]. *Nature Cell Biology*, 2002, 4(7):78-87.
- [20] 莫惠栋. 农业实验设计(第二版)[M]. 上海: 上海科技出版社, 1992.
Mo H D. Agricultural experiment statistics[M]. (2nd edition) Shanghai: Science and Technology Press, 1992.

[21] Arnon D L. Copper enzymes in isolated chloroplasts PPO in Beta vulgaris[J]. *Plant Physiol*, 1949, 24: 1–15.

[22] Hadlaczký G, Praznovský T, Bisztray G C. Structure of isolation protein-depleted chromosomes[J]. *Chromosoma*, 1982, 86: 643–659.

[23] O’Farrell P H. High resolution of two dimensional electrophoresis of proteins[J]. *Biochem*, 1975, 250: 4007–4021.

[24] Laemmli U K. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature (Lond)*, 1970, 227: 680–685.

[25] Wary W, Boulukas T, Wary V P, et al. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels[J]. *Ann Biochem*, 1981, 118: 197–203.

[26] Sanitadi T L, Gabbrelli R. Response to cadmium in higher plants[J]. *Environ Exp Bot*, 1999, 41: 105–130.

[27] Hall J L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance[J]. *Exp Bot*, 2002, 53: 1–11.

[28] Choi S Y, Beak E M, Lee S Y. A cDNA differentially expressed by cadmium stress in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol*, 1995, 108: 849–859.

[29] Cui Suxia, Huang Fang, Wang Jie, et al. A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings[J]. *Proteomics*, 2005, 5: 3162–3172.

[30] Yan Shunping, Tang Zhangcheng, Su Weiai, et al. Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root[J]. *Proteomics*, 2005, 5: 235–244.

[31] Frederique Riccardi, Pascale Gazeau, Dominique de Vienne, et al. Protein changes in response to progressive water deficit in Maize[J]. *Plant Physiol*, 1998, 117: 1253–1263.

[32] Gh Hosseini Salekdeh, Joel Siopongco, Leonard J Wade, et al. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery[J]. *Proteomics*, 2002, 2: 1131–1145.