

镉胁迫下外源钙对白菜氧化应激和 NO 含量的影响

林 啸¹, 高素萍^{2*}, 雷 霆¹, 王成聪¹, 张开会¹

(1.四川农业大学风景园林学院, 成都 611130; 2.四川农业大学园林研究所, 成都 611130)

摘 要:为了解镉胁迫下外源钙对白菜生理响应的调控机制,通过水培实验研究了在 Cd(100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)胁迫下 Ca(5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)对白菜(*Brassica pekinensis*)叶片钙离子和镉离子含量、ROS 和 MDA 含量、抗氧化酶活性、还原性谷胱甘肽和内源 NO 含量变化的影响,并使用 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的三氟拉嗪(TFP)研究了 Ca^{2+} -CaM 信号在其中的转导功能。结果表明:(1)Cd 胁迫降低了白菜叶片的 Ca 含量,而外源 Ca 增加了 Ca 含量并降低 Cd 含量,但 TFP 对叶片 Ca、Cd 含量无明显影响;(2)Cd 诱导白菜叶片 ROS 爆发,引起质膜过氧化,并抑制了 SOD 活性,提高了 APX、CAT 和 POD 活性及 GSH 含量,增加了叶片过氧化压力,施加外源钙后降低了这种压力,而 TFP 的加入却降低了这种缓解作用;(3)Cd 抑制了叶片 NO 含量,补充外源钙后提高了 NO 含量,而 TFP 降低了外源钙对 NO 的上调。研究可知,外源钙能降低白菜叶片 Cd 含量,增强 Ca 含量,并通过 Ca^{2+} -CaM 信号途径调节抗氧化酶和 GSH 含量,维持叶片 ROS 平衡,提高叶片内源 NO 的表达,从而增强白菜 Cd 的耐性。

关键词:镉胁迫;钙调素;抗氧化酶;活性氧;一氧化氮

中图分类号:X171.5 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2014)09-1699-07 doi:10.11654/jaes.2014.09.005

Effects of Exogenous Calcium on Oxidative Responses and Nitric Oxide in Chinese Cabbage (*Brassica pekinensis*) Under Cadmium Stress

LIN Xiao¹, GAO Su-ping^{2*}, LEI Ting¹, WANG Cheng-cong¹, ZHANG Kai-hui¹

(1.Landscape Architecture College of Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 2.Institute of Landscape Architecture of Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract:Calcium can alleviate heavy metal stresses in plants. A hydroponic experiment was conducted to investigate the physiological mechanisms of Chinese cabbage (*Brassica pekinensis*) responses to cadmium (Cd) stress under exogenous calcium (Ca). Concentrations of Ca and Cd ions, reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), glutathione, and endogenous nitric oxide (NO) as well as antioxidant enzymatic activities in cabbage leaves were determined. Meanwhile, the transduction function of Ca^{2+} -CaM influenced by Trifluoperazine (TFP, 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) was also investigated. Cadmium stress decreased Ca concentrations in cabbage leaves, while exogenous Ca addition increased Ca but decreased Cd concentrations in the leaves. However, TFP had no significant effects on the concentrations of Ca and Cd. Cadmium induced ROS outburst in cabbage leaves, resulting in the peroxidation of plasmalemma and also suppressed superoxide dismutase (SOD) activity. However Cd increased the activities of ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), and peroxidase (POD) and the concentration of glutathione (GSH), causing an escalated peroxide pressure in cabbage leaves. Exogenous Ca addition alleviated Cd induced pressure, but such alleviating effect was weakened by TFP addition. Nitric oxide concentrations in cabbage leaves were reduced by Cd but increased by exogenous Ca. This boosting effect of Ca was depressed by TFP addition. These results suggest that exogenous Ca reduces the Cd stress in cabbage leaves through decreasing Cd uptake and increasing antioxidant capability by Ca^{2+} -CaM signal pathway.

Keywords:cadmium stress; calmodulin; antioxidant enzymes; reactive oxygen species; nitric oxide

收稿日期:2014-04-28

基金项目:四川省科技计划项目(2012FZ0083)

作者简介:林 啸(1990—),女,硕士研究生,主要从事植物生理生态研究。E-mail:linxiao_1990@yeah.net

* 通信作者:高素萍 E-mail:gao_suping@yahoo.com

镉(Cadmium, Cd)是农田重金属污染的主要元素之一,具有毒性高、易迁移的特点^[1]。镉诱导植物体活性氧(Reactive oxygen, ROS)的迅速积累或蛋白质、核酸等生物大分子变性,损伤植物光合作用和营养代谢^[2-3],同时还能通过食物链危害人体健康^[4]。因此,如何缓解或解除植物中镉毒害已经成为国内外研究的热点。

钙(Calcium, Ca)作为耦联胞外信号与胞内生理反应的第二信使,能通过与钙调素(Calmodulin, CaM)结合而激活一系列的靶酶和非酶蛋白,从而调节胞内的生理生化反应,如活性氧动态平衡^[5]、激素合成^[6]、一氧化氮(Nitric oxide, NO)合成^[7]和某些功能蛋白^[8]表达。ROS和NO作为植物感知逆境的信号分子,参与植物对多种逆境的响应。过去已发现在低温^[5]、高温^[8]、机械刺激^[7]等胁迫下, Ca^{2+} 能通过CaM调控ROS和NO信号,提高植物抗逆性。虽然有研究发现外源钙能缓解重金属如Cd^[9]、Pn^[10]等胁迫,提高植物耐受性,但有关Cd胁迫下, Ca^{2+} -CaM信号与ROS、NO分子的相互关系仍值得探讨。白菜(*Brassica pekinensis*)作为我国乃至全球最重要的蔬菜作物之一,其营养元素含量、光合能力及干重会受到Cd污染的影响而减低,其产量和品质难以得到保障^[11],因而研究如何缓解或解除白菜的镉毒害显得尤为重要和迫切。为此,本研究以白菜为研究对象,探讨Cd胁迫下外源Ca对白菜氧化应激及内源NO含量的影响,同时施用CaM拮抗剂三氟拉嗪TFP(可导致 Ca^{2+} -CaM信号功能发生障碍)抑制叶片CaM活性,以揭示Cd胁迫下, CaM对外源Ca调节ROS和内源NO的介导作用,为发展绿色食品和无公害蔬菜提供理论依据,同时也为植物修复Cd污染土壤提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料与试验设计

试验于2013年10月—12月在四川农业大学人居环境研究室进行。选取饱满、大小一致的白菜种子经0.1% HgCl_2 消毒7 min后,用蒸馏水冲洗数次至无汞残留,播种于铺有湿润滤纸的培养皿中催芽72 h,然后将发芽整齐的种子置于装满去离子水的容器中水培。待幼苗长至两叶一心时,选取生长健壮、长势一致的幼苗移入新的容器中,换用1/4 Hoagland (pH 6.0)培养液水培,每天换1次营养液,7 d后取长势一致的白菜幼苗进行处理。

试验设置6个处理(表1),每处理3个重复。将溶液最终pH调为6.0,每天定时更换1次培养液,并

对T4和T5两处理喷洒浸湿叶片 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ TFP溶液3次。整个过程植物置于GZ-450-CSII智能人工气候箱内培养,温度为 $(25 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ /(20 ± 0.1) $^\circ\text{C}$ (昼/夜),光照强度 $120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光周期14 h,湿度70%~80%。7 d后取白菜植株测定各项指标。

表1 试验设计

Table 1 Experimental design

编号 Number	处理 Treatment
CK	1/4 Hoagland 培养液
T1	1/4 Hoagland+ $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CdCl_2 培养液
T2	1/4 Hoagland+ $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 培养液
T3	1/4 Hoagland+ $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CdCl_2 + $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
T4	$0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ TFP 浸湿叶片+T2 培养液
T5	$0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ TFP 浸湿叶片+T3 培养液

1.2 测定项目与方法

实施处理7 d后,开始各项指标的测定。采用打孔法随机从每个处理植株真叶上取3个样本,进行生理指标的平行测定。

1.2.1 离子元素含量测定

取叶片干样研磨,过1 mm筛,称取0.2 g的样品粉末溶解在 HNO_3 - HClO_4 (5:1)溶液中进行消解。采用电感耦合等离子体-原子发射光谱仪Iris Advantage ICP-AES(美国Lee man公司)测定Cd和Ca含量。

1.2.2 生理指标的测定

超氧阴离子(O_2^-)含量采用羟胺氧化反应测定^[12];过氧化氢(H_2O_2)含量采用碘量法测定^[13];丙二醛(Malondialdehyde, MDA)采用硫代巴比妥酸法测定^[14];超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)采用氮蓝四唑光还原法测定^[14];过氧化物酶(Peroxidase, POD)采用愈创木酚法测定^[14];过氧化氢酶(Catalase, CAT)采用紫外吸收法测定^[14];抗坏血酸过氧化物酶(Ascorbate peroxidase, APX)采用过氧化氢还原法测定^[14];还原型谷胱甘肽(Glutathione, GSH)采用试剂盒(苏州科铭生物技术有限公司提供)测定,标准曲线为 $y=0.0015x$ 。

1.2.3 NO荧光成像

参照Xu等^[15]的方法,将处理7 d后的白菜真叶切片成约 10 mm^2 ,用 $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NO荧光探针4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2DA)在 37°C 培养箱中黑暗孵化30 min,取出后用 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HEPES-NaOH(pH 7.5)缓冲液清洗,然后用激光扫描共焦显微镜尼康A1观测(495 nm激发波长,515 nm发射波

长)。

1.3 数据统计分析

数据用 SPSS 17.0 软件进行方差分析(ANOVA), Duncan 法检验差异显著性($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 不同处理对白菜叶片 Cd 和 Ca 含量的影响

如表 2 所示,添加外源钙显著降低植物对镉的吸收。单独施加 Cd(T1)后叶片中 Cd 含量最高,Ca 含量降低了 48.31%,与 CK 差异显著($P<0.05$),表明 Cd 会抑制 Ca 吸收;而 T1 培养液中加入外源 Ca 后(T3),叶片中 Ca 含量增加了 65.21%,Cd 含量却降低了 38.96%,皆与 T1 差异显著($P<0.05$),说明外源 Ca 能抑制 Cd 吸收增加 Ca 吸收。分别在 T3 与单一钙处理(T2)中加入 CaM 拮抗剂三氟拉嗪 TFP 后,Ca、Cd 在叶片中的含量均没有显著变化,表明抑制叶片 CaM 活性后并不影响白菜对 Cd 和 Ca 的吸收。

表 2 镉胁迫下外源钙和 TFP 对白菜叶片 Ca 和 Cd 含量影响
Table 2 Effects of exogenous calcium and TFP on contents of Ca and Cd in Chinese cabbage leaves under Cd stress

处理 Treatment	Cd 含量 Cd content/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$	Ca 含量 Ca content/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$
CK	0	$0.89\pm 0.02\text{b}$
T1	$48.00\pm 2.00\text{a}$	$0.46\pm 0.23\text{d}$
T2	0	$1.20\pm 0.87\text{a}$
T3	$29.30\pm 1.49\text{b}$	$0.76\pm 0.32\text{c}$
T4	0	$1.13\pm 0.14\text{a}$
T5	$27.03\pm 2.01\text{b}$	$0.69\pm 0.21\text{c}$

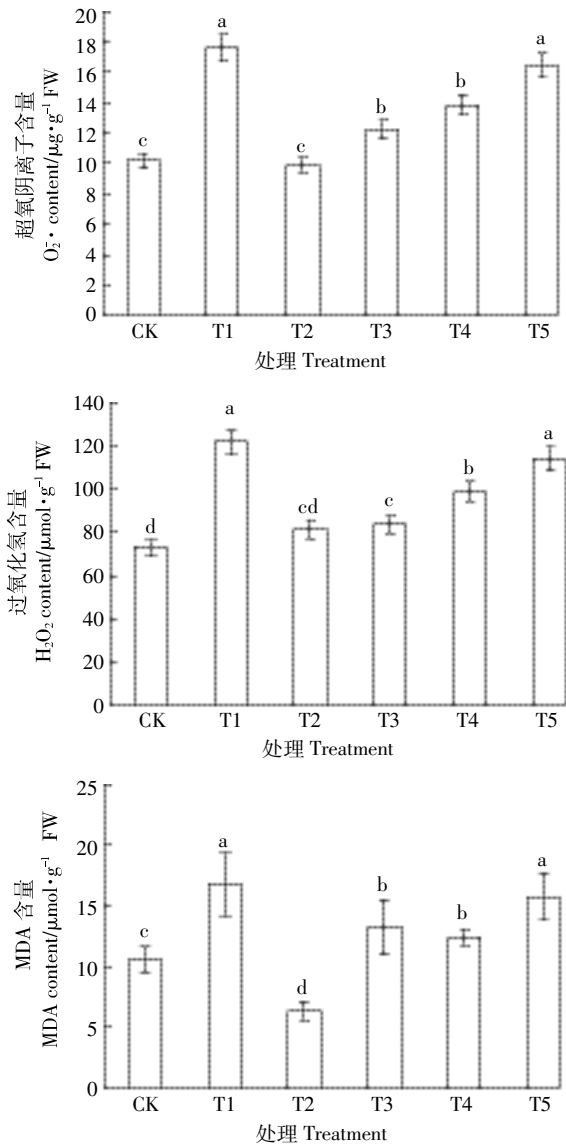
注:表中数据均为平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD; $n=3$),不同小写字母表示不同处理组间的差异显著($P<0.05$)。

Note: Data are mean $\pm$ standard deviation (Mean $\pm$ SD; $n=3$). Means with different letters indicate significant differences between treatment ($P<0.05$).

2.2 外源钙缓解镉诱导的白菜叶片活性氧爆发和脂膜过氧化

如图 1 所示,添加外源钙显著降低植物的氧化压力。与 CK 相比,单施 Cd(T1)诱导白菜叶片 H_2O_2 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 MDA 的含量分别升高了 66.9%、73.51% 和 58.65%,与 CK 差异显著($P<0.05$),说明 Cd 诱导了叶片 ROS 爆发和脂膜过氧化;而在 T1 中补充外源 Ca (T3) 后, H_2O_2 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 MDA 含量分别下降了 31.33%、30.61%和 20.66%,与 T1 相比差异达显著水平($P<0.05$),说明外源 Ca 能够降低 ROS 的蓄积量,缓解 Cd 诱导的氧化压力。T3 中使用 TFP 浸湿叶片后(T5), H_2O_2 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 MDA 含量又分别回升了 36.63%、34.12%

和 18.43%,与 T3 相比差异都达到了显著水平($P<0.05$),说明 CaM 介导了 Ca^{2+} 的缓解作用;而单施外源钙处理(T2)中使用 TFP 浸湿叶片后(T4), H_2O_2 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 MDA 含量也上升,与 T2 差异显著($P<0.05$),说明 Cd 胁迫不是 CaM 介导 Ca^{2+} 调节氧化压力的诱导因素。



不同小写字母表示在不同处理之间差异显著($P<0.05$),下同

Bars with different small letters indicate significant

differences between treatments at 0.05 level. The same below

图 1 镉胁迫下外源钙和 TFP 对白菜叶片 ROS 和 MDA 含量影响

Figure 1 Effects of exogenous Ca and TFP on contents of ROS and MDA in Chinese cabbage leaves under Cd stress

2.3 外源钙调节镉胁迫下白菜叶片抗氧化酶活性和还原型谷胱甘肽含量

如图 2、图 3 所示,添加外源钙显著缓解镉对植物抗氧化系统的调节。单独施加 Cd(T1)降低了 SOD

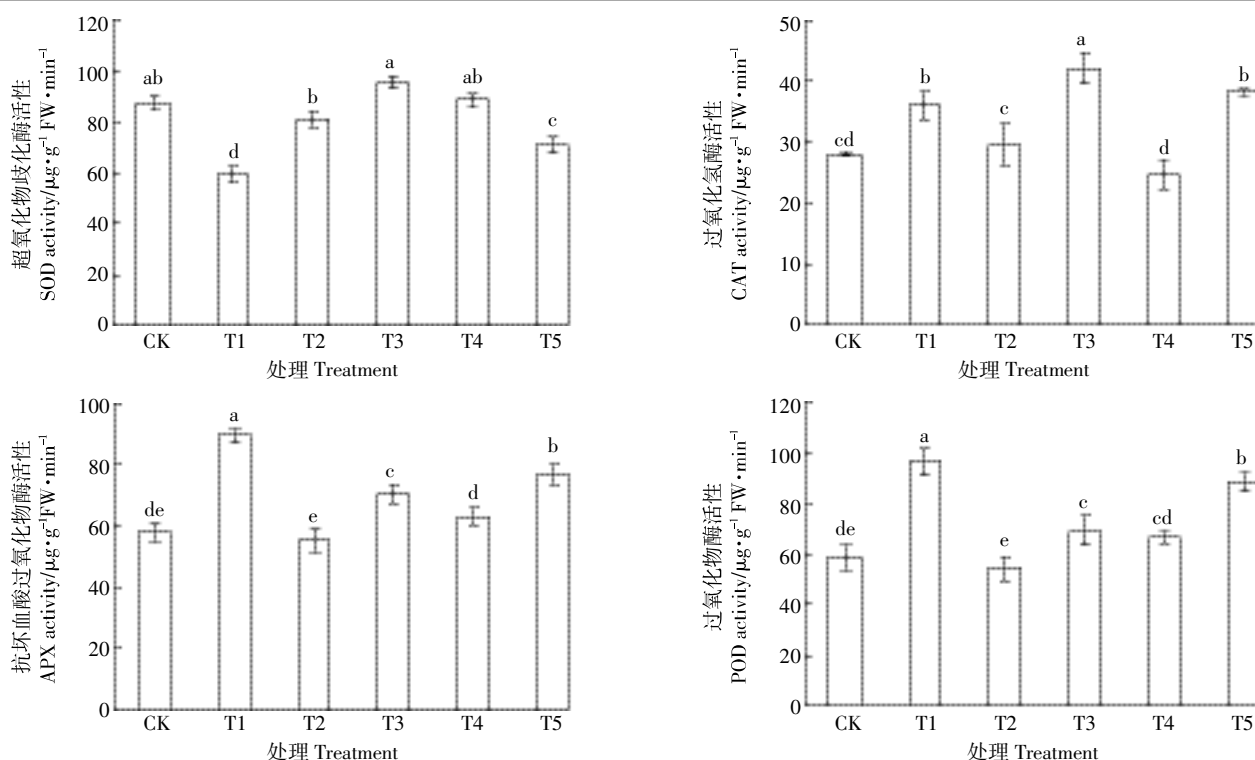


图2 镉胁迫下外源钙和TFP对白菜叶片抗氧化酶活性影响

Figure 2 Effects of exogenous Ca and TFP on antioxidant enzyme activities in Chinese cabbage leaves under Cd stress

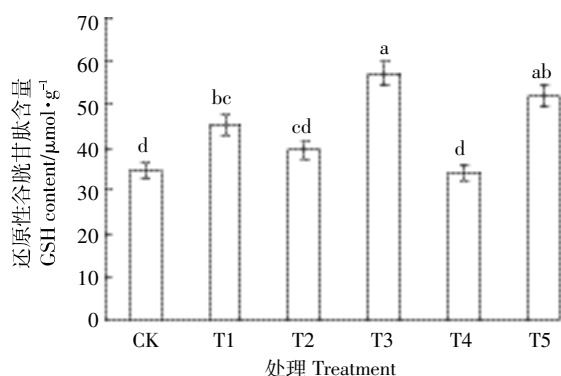


图3 镉胁迫下外源钙和TFP对白菜叶片GSH含量影响

Figure 3 Effects of exogenous Ca and TFP on contents of GSH in Chinese cabbage leaves under Cd stress

活性,提高了CAT、APX、POD活性和GSH含量,与CK差异显著($P<0.05$);而在该处理中补充外源Ca(T3)后,SOD、CAT活性和GSH含量分别上升了61.97%、16.73%和26.36%,APX和POD活性分别降低了21.48%和28.24%,皆与T1差异显著($P<0.05$),说明外源Ca能调节Cd胁迫下的抗氧化酶活性和GSH含量;T3中使用TFP浸湿叶片后(T5),SOD、CAT活性分别回降25.98%、9.2%,APX、POD活性分别回升9.12%和27.18%,都与T3差异显著($P<0.05$),

且原本被Ca上调的GSH含量也下降9.03%,接近T1水平,说明CaM介导了 Ca^{2+} 对抗氧化酶和GSH的调节过程;而单一钙处理(T2)中使用TFP后(T4),APX、POD和CAT活性与T2的差异也达到显著水平($P<0.05$),说明无论有无Cd胁迫存在,CaM都参与了抗氧化酶的调节过程。

2.4 外源钙提高镉胁迫下白菜叶片内源NO含量

如图4所示,添加外源钙显著缓解镉对植物内源NO的毒害。单一Cd处理(T1)显著抑制了NO的绿色荧光,而Cd培养液中添加外源Ca处理后(T3)荧光强度显著上升,说明外源Ca缓解了Cd对NO的抑制作用;T3中加入TFP抑制叶片CaM后(T5),NO荧光强度与T3相比明显减弱,说明CaM介导了 Ca^{2+} 对NO表达的促进作用;但CK中补充外源Ca后(T2),NO荧光并没有明显变化,而T2中抑制叶片CaM后(T4),NO荧光强度与T2相比也显著减弱,说明无论是否存在Cd胁迫情况, Ca^{2+} -CaM信号途径都参与了NO的产生。

3 讨论

Ca作为信号分子,参与了植物对外界的多种胁迫响应^[7-10]。王巧玲等^[16]研究发现外源Ca可以促进Cd

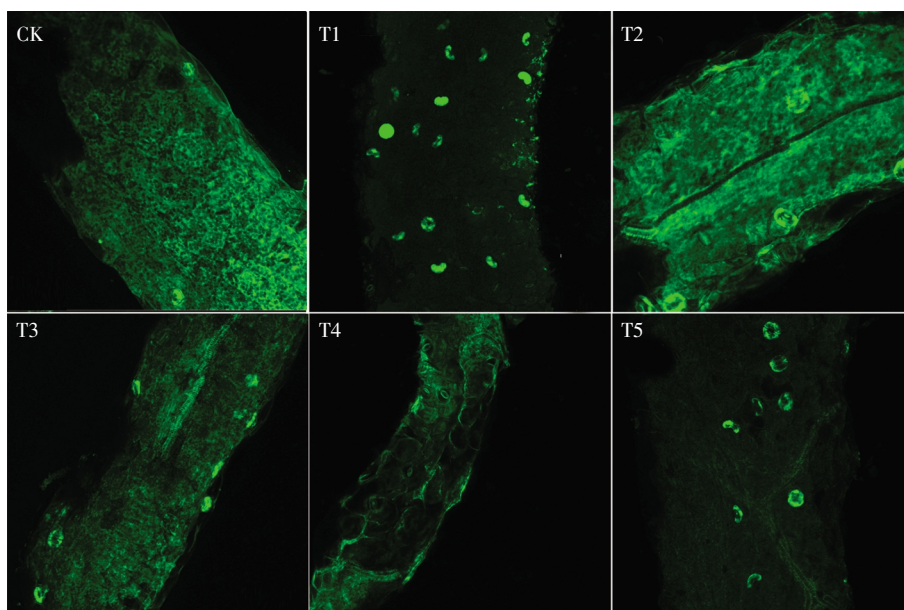


图 4 镉胁迫下外源钙和 TFP 对白菜叶片内源 NO 荧光成像的影响

Figure 4 Effects of exogenous Ca and TFP on endogenous NO fluorescence imaging in Chinese cabbage leaves under Cd stress

胁迫下毛葱的生长及矿质元素吸收,刘丽莉^[17]和高芳^[9]等研究表明外源 Ca 能降低 Cd 胁迫下油菜、花生的氧化应激。本研究结果与前人一致,证明施加外源 Ca 对白菜 Cd 污染有一定解毒作用,可降低叶片中 Cd 积累,缓解氧化应激并促进 NO 合成,同时还证明 CaM 介导了 Cd 胁迫下外源 Ca 对白菜叶片氧化应激和 NO 分子的调控作用。

过去发现介质中较高浓度的 Cd 能引起植物对多种营养元素的吸收和转运能力下降^[18]。有学者认为 Cd 会与一些理化性质相似的金属离子(如 Fe、Cu、Ca 等)竞争转运蛋白,并从它们的吸收系统进入细胞^[19]。这可能是本次研究中 Cd 导致 Ca 在白菜叶片中含量下降的主要原因。而当大量补充外源 Ca 后提高了 Ca 含量,降低了 Cd 含量(表 2),与之前其他学者在豌豆、东南景天等植物中的研究结果类似^[20-21]。这可能是由于 Ca^{2+} 与 Cd^{2+} 竞争吸收运输位点,导致 Cd 吸收减少所致,同时,Ca 的存在也有利于根系细胞维持正常的渗透系统^[22],保证了矿质营养较少受到 Cd 的胁迫作用。过去发现根系中的钙调蛋白参与了植物根系对铅等重金属离子的吸收作用^[23],而本研究在抑制叶片 CaM 活性后,并没有明显改变叶片中 Cd 和 Ca 的含量。这可能是由于本试验与过去研究的处理方法不同造成的:以往研究是直接抑制根系中的 CaM 活性^[23],本试验只抑制了叶片中的 CaM 活性,而植物对 Cd 的吸收主要是依赖于根系转运蛋白,并在根压和蒸腾流

的动力下被转运到叶片中的,因而本试验中 Cd 和 Ca 含量并没有明显改变。

在逆境胁迫信号转导中,ROS 是植物细胞信号调控和转导的重要组成部分,可通过改变细胞氧化还原状态参与环境胁迫的应答。本研究发现 Cd 诱导了白菜叶片 ROS 和 MDA 大量积累(图 1),提高了植物的过氧化压力,说明 Cd 进入细胞会诱发 ROS 的形成,从而对细胞造成氧化伤害。大量研究表明,Ca 能调节 ROS 代谢,并参与植物体对多种生物或非生物胁迫的响应^[7-8],包括 Cd 胁迫^[24]。本研究结果也显示,外源 Ca 的添加减少了 Cd 胁迫下 $\text{O}_2\cdot$ 、 H_2O_2 和 MDA 的上升幅度(图 1),减轻了过氧化压力,表明 Cd 诱导的白菜叶片 ROS 过度产生及脂质过氧化可能与 Ca 缺乏有关。而 CaM 拮抗剂 TFP 的加入逆转了外源 Ca 的保护作用,可见 CaM 介导了外源 Ca 对 Cd 胁迫下白菜叶片 ROS 的调节。

抗氧化酶和抗氧化剂都是植物体内氧化防御的关键组分,它们能将有毒的 ROS 转化为无毒分子,使细胞内 ROS 维持在低水平,防止细胞受毒害。过去发现 Cd 诱导了玉米幼苗 SOD、CAT、APX 活性^[25]和水稻 GSH 含量提高^[26],但降低了互花米草 CAT 活性^[27]和豌豆 SOD 活性^[20],说明 Cd 对不同植物的抗氧化系统组分的影响可能不同。本研究发现,Cd 胁迫下白菜叶片 POD、CAT 和 APX 活性及 GSH 含量显著增高(图 2、图 3),而 SOD 活性受到严重抑制(图 2),添加外源

Ca则提高了Cd胁迫下SOD、CAT和GSH活性,降低了POD和APX活性(图2、图3),表明外源Ca对氧化伤害的缓解作用与抗氧化系统活性的诱导有关,说明Ca能在Cd胁迫下通过调节抗氧化系统缓解植物叶片氧化伤害。而当抑制叶片CaM活性后,Cd胁迫下外源Ca对抗氧化系统各组分的调节能力明显降低(图2、图3),表明 Ca^{2+} -CaM信号途径可能参与了外源Ca对抗氧化酶和GSH的调控。

NO是植物体内感知外界的信号分子,参与植物对多种逆境的响应^[18]。试验结果表明,Cd显著降低了白菜叶片NO的荧光强度(图4),这与过去在苜蓿(*Medicago truncatula*)^[15]中的研究结果相符,说明Cd会毒害植物体内NO信号转导。有研究发现NOS(NO合成酶)的活性依赖于Ca和CaM^[28],因此Cd导致的NO信号受阻可能与Ca缺乏有关。本研究在Cd胁迫下补充外源Ca后,提高了体内Ca含量(表2),显著增强了NO荧光强度(图4),印证了这一观点。而在Cd-Ca处理中加入TFP后,NO绿色荧光强度降低(图4),进一步证明了CaM参与了Ca对NO合成的调控。过去发现NO是一种能与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 反应并调节 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 在器官中积累的自由基^[28]。实验结果表明,在单一Cd胁迫下会同时出现NO含量下降与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 含量上升现象,而加入外源Ca后又同时出现NO含量上升与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 含量下降现象,说明Cd胁迫下 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 积累可能与NO含量减少有关。胞内Ca含量下降、ROS产生速率升高以及NO含量降低等都是细胞衰老的常见现象^[20],表明Cd胁迫可能会诱导白菜细胞的衰老程序。而补充外源Ca能抑制Cd诱导的细胞衰老,提高植物Cd耐性,且CaM参与了这一调控途径。

4 结论

本研究表明,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd胁迫降低白菜叶片Ca含量,提高Cd含量,诱导质膜过氧化,干扰活性氧和一氧化氮代谢。施加5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 外源钙可以缓解Cd对白菜的毒害作用,其可能机理为:(1)增加白菜叶片中Ca含量并降低Cd含量;(2)通过 Ca^{2+} -CaM信号途径调控Cd胁迫下抗氧化酶(CAT、SOD、POD、APX)活性和抗氧化物质(GSH)含量,消除或平衡细胞中的活性氧水平;(3)通过 Ca^{2+} -CaM信号途径促进一氧化氮合成,保护Cd胁迫下的一氧化氮信号转导。

参考文献:

[1] 宋敏,徐文竞,彭向永,等. 外源脯氨酸对镉胁迫下小麦幼苗生长

的影响[J]. 应用生态学报, 2013, 24(1): 129-134.

SONG Min, XU Wen-jing, PENG Xiang-yong, et al. Effects of exogenous proline on the growth of wheat seedlings under cadmium stress[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2013, 24(1): 129-134.

[2] 黄辉,李升,郭娇丽. 镉胁迫对玉米幼苗抗氧化系统及光合作用的影响[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(2): 211-215.

HUANG Hui, LI Sheng, GUO Jiao-li. The influence of cadmium(Cd^{2+}) to the antioxidant system and photosynthesis of seedling of *Zea mays* L. [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(2): 211-215.

[3] 刘柿良,杨容子,潘远智,等. 外源NO对镉胁迫下长春花质膜过氧化ATP酶活性及光合特性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(12): 2360-2368.

LIU Shi-liang, YANG Rong-jie, PAN Yuan-zhi, et al. Effects of exogenous nitric oxide on photosynthetic characteristics, lipid peroxidation and ATPase activity of plasma membrane in *Catharanthus roseus* tissues under cadmium stress[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 32(12): 2360-2368.

[4] Davis R D. Cadmium: A complex environmental problem Part II [J]. *Experientia*, 1984, 40(2): 117-126.

[5] 荣俊冬,刘学琴,张迎辉. 低温胁迫下 Ca^{2+} -CaM信使系统对三尖杉幼苗保护酶活性的影响[J]. 西南林业大学学报, 2012, 32(5): 137-143.

RONG Jun-dong, LIU Xue-qin, ZHANG Ying-hui. Effects of Ca^{2+} -CaM messenger system on the protective enzyme activity of *Cephalotaxus fortunei* seedlings under low temperature stress[J]. *Journal of Southwest Forestry University*, 2012, 32(5): 137-143.

[6] 易籽林,李志英,徐立,等. 4种钙素调节剂对紫花擎天凤梨花芽分化及内源激素含量的影响[J]. 西北植物学报, 2010, 30(9): 1837-1843.

YI Zi-lin, LI Zhi-ying, XU Li, et al. Effects of 4 calcium regulators on the floral buds differentiation and contents of endogenous hormones of *Guzmania Amaranth* [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2010, 30(9): 1837-1843.

[7] 柯学,李忠光,刘娟,等. 机械刺激诱导的烟草悬浮细胞一氧化氮产生途径及其与 Ca^{2+} 和钙调素的关系[J]. 植物生理学报, 2011, 47(1): 85-90.

KE Xue, LI Zhong-guang, LIU Xian, et al. Pathways of mechanical stimulation-induced nitric oxide production and their relationship with Ca^{2+} and calmodulin in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) suspension culture cells[J]. *Plant Physiology Journal*, 2011, 47(1): 85-90.

[8] 李慧聪,李国良,郭秀林. 玉米热激转录因子基因ZmHSF-Like对逆境胁迫响应的信号途径[J]. 作物学报, 2014, 40(4): 622-628.

LI Hui-cong, LI Guo-liang, GUO Xiu-lin. Signal transduction pathway of ZmHSF-Like gene responding to different abiotic stresses[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2014, 40(4): 622-628.

[9] 高芳,张佳蕾,杨传婷,等. 钙对镉胁迫下花生生理特性、产量和品质的影响[J]. 应用生态学报, 2011, 22(11): 2907-2912.

GAO Fang, ZHANG Jia-lei, YANG Chuan-ting, et al. Effects of applying calcium on peanut physiological characteristics, its yield and kernel quality under cadmium stress[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2011, 22(11): 2907-2912.

- [10] 孟红梅, 寿晓晖, 李彩霞. Ca^{2+} 对 Pb^{2+} 胁迫下板蓝根种子萌发及幼苗生理特性的影响[J]. 西北农业学报, 2012, 21(5): 185–189.
MENG Hong-mei, SHOU Xiao-hui, LI Cai-xia. The effect of Ca^{2+} on *Radix isatidis* seed germination and seedling physiological characteristics under Pb^{2+} stress[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2012, 21(5): 185–189.
- [11] 方晓航, 曾晓雯, 于方明, 等. Cd胁迫对白菜生理特征及元素吸收的影响研究[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(1): 25–29.
FANG Xiao-hang, ZENG Xiao-wen, YU Fang-ming, et al. Physiological characteristic and uptake of Cd, nutritious elements in cabbage grown on Cd-contaminates solis[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(1): 25–29.
- [12] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.
GAO Jun-feng. The instruction of plant physiology experiment[M]. Beijing: Higher Education Press, 2006.
- [13] Patterson B D, MacRae E A, Ferguson I B. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium(IV)[J]. *Analytical Biochemistry*, 1984, 139(2): 487–492.
- [14] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
LI He-sheng. Theory and technique of plant physiological and biochemical experiments[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000.
- [15] Xu J, Wang W Y, Yin H X. Exogenous nitric oxide improves antioxidative capacity and reduces auxin degradation in roots of *Medicago truncatula* seedlings under cadmium stress[J]. *Plant Soil*, 2010, 326(1–2): 321–330.
- [16] 王巧玲, 邹金华, 刘东华, 等. 外源钙对毛葱耐镉胁迫能力的影响[J]. 生态学报, 2014, 34(5): 1165–1177.
WANG Qiao-ling, ZOU Jin-hua, LIU Dong-hua, et al. Effects of exogenous calcium(Ca) on tolerance of *Allium cepa* var. *agrogarum* L. to cadmium(Cd) stress[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(5): 1165–1177.
- [17] 刘丽莉, 冯 涛, 向言词, 等. 外源钙对镉胁迫下芥菜型油菜幼苗生长和生理特性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(5): 978–983.
LIU Li-li, FENG Tao, XIANG Yan-ci, et al. Effect of exogenous calcium on seedling growth and physiological characteristics of *Brassica juncea* under cadmium stress[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(5): 978–983.
- [18] Wang Q, Liang X, Dong Y, et al. Effects of exogenous nitric oxide on cadmium toxicity, element contents and antioxidative system in perennial ryegrass[J]. *Plant Growth Regulation*, 2013, 69(1): 11–20.
- [19] Clemens S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants[J]. *Biochimie*, 2006, 88(11): 1707–1719.
- [20] Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas M C, Pazmiño D M, et al. Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: Cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium[J]. *Plant Physiology*, 2009, 150(1): 229–243.
- [21] Tian S K, Lu L L, Zhang J, et al. Calcium protects roots of *Sedum alfredii* H. against cadmium-induced oxidative stress[J]. *Chemosphere*, 2011, 84(1): 63–69.
- [22] 安志装, 王校常, 施卫明, 等. 重金属与营养元素交互作用的植物生理效应[J]. 土壤与环境, 2002, 11(4): 392–396.
AN Zhi-zhuang, WANG Xiao-chang, SHI Wei-ming, et al. Plant physiological responses to the interactions between heavy metal and nutrients[J]. *Soil and Environmental Sciences*, 2002, 11(4): 392–396.
- [23] Arazí T, Sunkar R, Kaplan B, et al. A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni^{2+} tolerance and Pb^{2+} hypersensitivity in transgenic plants[J]. *The Plant Journal*, 1999, 20(2): 171–182.
- [24] Wang C Q, Song H. Calcium protects *Trifolium repens* L. seedlings against cadmium stress[J]. *Plant cell reports*, 2009, 28(9): 1341–1349.
- [25] 李海燕, 郭永成, 李刘洋, 等. 外源一氧化氮对镉胁迫下玉米幼苗根生长及氧化伤害的影响[J]. 西北植物学报, 2012, 32(8): 1599–1605.
LI Hai-yan, GUO Yong-cheng, LI Liu-yang, et al. Effects of exogenous nitric oxide on root growth and oxidative damage in maize seedlings under cadmium stress[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2012, 32(8): 1599–1605.
- [26] 刘侯俊, 李雪平, 韩晓日. 铁镉互作对水稻脂质过氧化及抗氧化酶活性的影响[J]. 应用生态学报, 2013, 24(8): 2179–2185.
LIU Hou-jun, LI Xue-ping, HAN Xiao-ri. Effects of Fe–Cd interaction on the lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities of rice[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2013, 24(8): 2179–2185.
- [27] 何真真, 柴民伟, 魏 远, 等. 氯化钙对互花米草镉积累及胁迫的影响[J]. 生态学杂志, 2013, 32(6): 1571–1577.
HE Zhen-zhen, CHAI Min-wei, WEI Yuan, et al. Effects of CaCl_2 on the Cd accumulation and stress of *Spartina alterniflora*[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2013, 32(6): 1571–1577.
- [28] Corpas F J, Barroso J B, Carreras A, et al. Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants[J]. *Plant Physiology*, 2004, 136(1): 2722–2733.