

镉胁迫对长春花质膜过氧化、ATP 酶及 5'-核苷酸酶活性的影响

刘柿良¹, 杨容子^{1*}, 潘远智^{1**}, 丁继军¹, 何 杨¹, 王 力¹, 雷 波²

(1.四川农业大学风景园林学院, 四川 成都 611130; 2.四川农业大学林学院, 四川 雅安 625014)

摘 要:长春花(*Catharanthus roseus*)是我国广泛栽培兼具园林绿化和抗癌药源等重要价值的多年生草本花卉植物。为了解镉胁迫下长春花植物体内活性氧清除及其质膜 ATP 相关酶调控的机理,采用盆栽试验研究了不同镉浓度(0、5、10、25、50、100 mg·kg⁻¹)处理下长春花质膜过氧化、ATP 酶及镉富集特性的影响。结果表明:中、低浓度 Cd(≤10 mg·kg⁻¹)胁迫下,长春花的丙二醛(MDA)和 H₂O₂ 含量、超氧阴离子自由基(O₂⁻)产生速率及抗氧化酶活性与对照没有显著差异。高浓度 Cd(≥25 mg·kg⁻¹)胁迫下,地上部 MDA、H₂O₂ 含量和 O₂⁻产生速率较对照显著升高,且地下部高于地上部;高浓度 Cd 处理使地上部过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)活性、还原型谷胱甘肽(GSH)含量及地下部 POD、SOD 活性显著上升,但地下部 CAT 活性和 GSH 含量无明显变化。随着 Cd 处理浓度升高,地上部 H⁺-ATPase 活性逐渐降低,地下部 H⁺-ATPase、地上部和地下部 Ca²⁺-ATPase 与 5'-AMPase 活性均先升后降,在高浓度处理下显著降低。同时,长春花对 Cd 有较强的富集能力,根系的富集能力高于地上部。

关键词:长春花;镉胁迫;质膜氧化;ATP 酶;5'-核苷酸酶;抗氧化系统

中图分类号:Q945.78 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2013)05-0916-09 **doi:**10.11654/jaes.2013.05-006

Effects of Cadmium on Lipid Peroxidation, ATPase and 5'-AMPase Activity of Cytomembrane in *Catharanthus roseus* Tissues

LIU Shi-liang¹, YANG Rong-jie^{1*}, PAN Yuan-zhi^{1**}, DING Ji-jun¹, HE Yang¹, WANG Li¹, LEI Bo²

(1.Landscape Architecture College of Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 2.Forestry College of Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: *Catharanthus roseus* is a perennial herb, which has been widely used in landscaping and in extracting anticancer drug of raw material in China. In order to understand the effects of cadmium on the regulatory mechanism of active oxygen scavenging and cytomembrane ATPase in *C. roseus* tissues, the lipid peroxidation, ATPase activity of cytomembrane and cadmium accumulation characteristics were measured in *C. roseus* tissues with different treatments including six cadmium concentrations (0, 5, 10, 25, 50 mg·kg⁻¹ and 100 mg·kg⁻¹ in soils), employing the method of pot experiment. The results indicated that the malondialdehyde (MDA) content, H₂O₂ content, superoxide (O₂⁻) production rate and the activities of antioxidative enzymes in *C. roseus* tissues were not significantly influenced by lower Cd stress (≤10 mg·kg⁻¹), while the accumulation of MDA, H₂O₂ and O₂⁻ both in shoots and roots of this herb were improved significantly under 25~100 mg·kg⁻¹ cadmium treatment. Moreover, these indices in shoots were higher than those in roots. In addition, high levels of cadmium significantly increased the activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and peroxidase (POD), and the content of glutathione (GSH) in shoots, as well as the activities of POD and SOD in roots, but did not give strong effects on CAT activity and GSH content in roots. Correspondingly, H⁺-ATPase activity in the shoot decreased with the increases of cadmium concentrations, while H⁺-ATPase activity in the root, the activities of Ca²⁺-ATPase and 5'-AMPase both in the shoot and root increased with the increase of cadmium concentrations and thereafter decreased. However, the highest cadmium concentration in this experiment inhibited the activities of ATPase and 5'-AMPase in this

收稿日期:2012-12-13

基金项目:四川农业大学“211 工程”双支计划项目

作者简介:刘柿良(1986—),四川南充人,硕士研究生,主要从事植物生理生态及园林植物培育方向的研究。E-mail:liushiliang9@163.com

* 为同等贡献作者

** 通信作者:潘远智 E-mail:scpyzls@163.com

plant tissues significantly. In particular, *C. roseus* has higher capacity in cadmium accumulation, and the capacity of root was higher than that of aboveground tissues.

Keywords: *C. roseus*; cadmium stress; lipid peroxidation; ATPase; 5'-AMPase; antioxidative system

工业“三废”排放量日益增加,农业中化肥和农药大量施用^[1]以及含 Cd 产品的广泛使用,已使 Cd 污染成为当今普遍关注的问题。Cd 是植物非必需元素,较小浓度即可产生较大的危害。细胞质膜作为植物细胞与环境的交流界面,是重金属进入植物体引起胁迫响应的原初部位^[2]。研究表明:Cd 胁迫能诱导质膜过氧化、积累活性氧(ROS)、影响抗氧化物质等;或改变膜组成和流动性,干扰电荷平衡和 H⁺流动^[3]。P 型 ATP 酶是质膜上由 ATP 驱动可被磷酸化的阳离子泵,家族成员含多个参与重金属离子跨膜转移有关的结合域^[4],在离子运输(H⁺-ATPase、Na⁺/K⁺-ATPase)、信号转导(Ca²⁺-ATPase)等方面有重要作用^[5]。同时,5'-核苷酸酶与质膜营养和能量代谢直接相关,为 ATP 代谢和细胞间物质运输及交换提供动力^[6]。虽然关于 Cd 对植物质膜过氧化和 ATPase 的影响已有不少报道,但各异的结果导致尚无统一认识。对重金属的耐性在不同植物间研究很难得到一致结果,而用同一植物不同部位对重金属的敏感性比较研究可避免物种差异带来的影响^[2],但该类研究在花卉植物中鲜见报道。

目前,东南景天(*Sedum alfredii*)、龙葵(*Solanum nigrum*)和滇苦菜(*Picris divaricata*)等超富集植物在 Cd 污染土壤的修复中已广泛应用,但大部分超富集植物生长缓慢、重金属迁移量较小且景观价值不高,不适宜城市大面积污染土壤的修复^[7]。园林地被植物特别是花卉植物具有个体小、种类多、生长快等特点,生长一段时间后可以被整株移出,不会造成土壤二次污染,若能从繁多的花卉资源中筛选出对修复污染土壤有重要作用的植物,将为植物修复开辟新途径。长春花(*Catharanthus roseus*)是我国广泛栽培的多年生花卉植物,不仅可用作城市节约型园林绿化,而且因其体内含有 100 多种具抗癌活性的生物碱,已成为国际上研究和应用最多的抗癌植物药源^[8]。目前对长春花的研究主要集中在生物半合成^[8-9]、盐分胁迫^[10]及 Cd 对离体细胞作用^[11]等方面,而关于 Cd 胁迫对其质膜影响的研究还未见报道。因此,本研究以长春花(*C. roseus*)为材料,采用盆栽试验研究 Cd 胁迫对长春花质膜过氧化、ATPase 及 5'-AMPase 活性的影响,掌握植物对重金属 Cd 胁迫的富集特性、ROS 清除和质膜 ATPase 调控机理,以期为在地被花卉植物中筛

选出 Cd 污染的修复植物提供理论依据,为长春花用于修复城市 Cd 污染土壤提供借鉴和科学参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试长春花(*C. roseus*)为夹竹桃科长春花属植物,幼苗由成都市郫县静菊花木服务有限公司提供。供试土壤于成都市温江区周边采集未开垦的自然土壤(不含腐叶根),采样范围为土壤表层 0~20 cm。发酵土由温江区花木交易中心提供。

1.2 试验方法

2011 年 4—5 月,将采集的供试土壤自然风干、捣碎、剔除杂物,研磨,过 5 mm 筛,按照 1:1 比例将发酵土和自然土壤均匀混合成种植土,并用适量多菌灵消毒,堆积静置于四川农业大学成都校区实验基地大棚内 45 d。透光率为 80%,大棚内外温度接近,为(25±3)℃,相对湿度为 78%。然后将种植土(干土)按照每盆 8 kg 的标准装入带托盘塑料花盆(下口径 20 cm,上口径 30 cm,深为 25 cm)中备用。种植用土基本理化性质为:pH 值 6.5,有机碳(C)38.75 g·kg⁻¹,全氮(N)0.73 g·kg⁻¹,全磷(P)0.52 g·kg⁻¹,全钾(K)3.28 g·kg⁻¹,总 Cd 为 0.475 mg·kg⁻¹。

2011 年 6 月 4 日,将装有种植土的塑料花盆置于上述实验大棚内,用清水(不含 Cd 等干扰物质)控制土壤含水量为田间持水量的 60%。2011 年 6 月 20 日,选取生长健壮且长势一致的盆栽长春花幼苗(三叶期实生苗,苗高约为 8 cm),除去原有土,剪除损伤的烂根、叶(操作时不损伤根系),再用清水小心冲洗,每盆栽植 3 株,种植深度 1.5~2 cm。养护管理期间,每天观察植物生长情况,视盆内土壤干湿浇水,并将溢出的水倒回盆内,使土壤湿度基本一致。拔掉杂草,将其放回盆中,减少水分与养分的流失。为避免其他物质影响结果,试验中不喷施农药与追施化肥。

植物恢复生长后,于 2011 年 7 月 22 日开始 Cd 胁迫处理。根据国家土壤环境质量和四川盆地重金属污染发展概况^[1],试验以不添加 Cd 作为对照(CK),Cd 处理水平为:5[T1]、10[T2]、25[T3]、50[T4]、100[T5] mg·kg⁻¹ 干土,每处理 5 次重复,共 30 盆,90 株。按预先设置重金属含量水平于每盆中添加 CdCl₂·2.5H₂O,

添加方法为以分析纯 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 与蒸馏水配制成约 300 mL 溶液均匀施入相应塑料盆中(渗出液反复回收浇灌)。试验期间,视天气情况每组相同浇水到田间持水量,并进行精细管理,防止病虫害。

2011 年 9 月 23 日上午 9:00—11:00 收获不同处理水平下的长春花植株,根系用自来水和蒸馏水洗净。将样品分为地上部(Shoot)与地下部(根系,Root),并迅速固定于液氮中以备指标测定。

1.3 测定方法

1.3.1 MDA 含量和 ROS 产生量测定

H_2O_2 含量参照 Patterson 等^[12]方法测定; O_2^- 产生速率测定采用王爱国和罗广华^[13]的方法;丙二醛(Malondialdehyde,MDA)含量采用硫代巴比妥酸比色法测定^[14]。

1.3.2 抗氧化酶活性和抗氧化物质测定

称取鲜样 0.5 g 剪碎,加 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 值 7.8 PBS(内含 1% PVP)5.0 mL 及少量石英砂,于冰浴中研磨提取,15 000 $\times g$ 、4℃ 下离心 15 min,上清液定容至 10 mL,上清液为酶提取液,用于 CAT、POD、SOD 活性测定。CAT 活性采用紫外吸收法,POD 活性测定采用愈创木酚法,SOD 活性测定采用氮蓝四唑(NBT)光化还原法,测定过程参照李合生等^[15]的方法。还原型谷胱甘肽(Glutathione,GSH)含量参照 Nagalakshmi 和 Prasad^[16]的方法,采用巯基试剂 DTNB 测定。

1.3.3 质膜 ATPase 和 5'-AMPase 活性测定

质膜分离参照 Wang 等^[17]的方法并略作改动。取 2.0 g 鲜样加入 2 倍(W/V)体积预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)[Hepes-Tris $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,pH7.6,甘露醇 $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,EGTA $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,乙二胺四乙酸(EDTA) $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,KCl $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,苯甲基磺酰氟(PMSF) $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,1.5% 聚乙烯吡咯烷酮(PVP),0.5%牛血清蛋白(BSA),抗氧化剂(BHT) $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,二硫苏糖醇(DTT) $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$],冰浴研磨。研磨液经 4 层纱布过滤,滤液 13 000 $\times g$ 离心 30 min,取上清液 60 000 $\times g$ 离心 30 min,弃上清液,沉淀悬浮于 1.0 mL 悬浮 PBS(Hepes-Tris $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,pH 7.6,甘露醇 $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,EDTA $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,DTT $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)中,置于不连续梯度蔗糖(45%、36% 和 22%)中,经 70 000 $\times g$ 离心 2 h,36% 和 45% 间带溶液为质膜微囊,取出测定 ATPase 活性。质膜 H^+ -ATPase 活性测定采用 Wang 和 Sze^[17]的方法;质膜 Ca^{2+} -ATPase 活性测定参照廖颖等^[18]的方法。5'-核苷酸酶(5'-AMPase)的提取及其活性测定按照潘杰等^[19]的方法。

1.3.4 植株不同部位镉含量测定

将地上部和地下部(根系)鲜样分别于 105℃ 下杀青 30 min,75℃ 下烘干。称取 0.25 g 烘干且磨碎的样品于 100 mL 三角瓶中,加入 10 mL 体积分数 5:1 的 HNO_3 - HClO_4 ,200~220℃ 消煮至澄清^[20],用去离子水定容后采用原子吸收分光光度计(AAS,HITACHI I-Z5000)测定。重复 3 次。

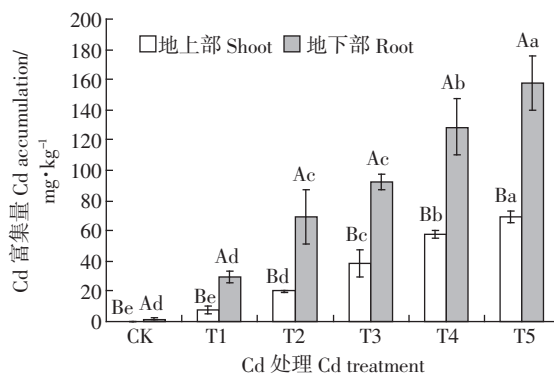
1.4 数据分析

数据采用 SPSS 17.0 软件统计分析,单因素方差检验(One-way ANOVA)和最小显著性差异法(LSD)检验,Microsoft Excel 2003 制表作图。显著性水平设定为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 Cd 胁迫对长春花镉富集量的影响

富集量是植物吸收重金属的总量,植物不同部位对重金属的富集能力存在差异。图 1 显示,随着 Cd 浓度增加,地上部和地下部 Cd 富集量显著升高($P<0.05$)。与对照(CK)相比,T1 处理使地上部和地下部 Cd 富集量升高不明显($P>0.05$),较 CK 仅提高了 1.36 和 1.59 倍;地上部和地下部 Cd 富集量随着 Cd 胁迫浓度的增加而逐渐增大;在 T5 处理时,地上部和地下部 Cd 富集量分别达到 68.76、157.43 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,较 CK



CK、T1、T2、T3、T4、T5 处理 Cd 浓度分别为 0.5、10、25、50、100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 干土。不同大写字母表示相同浓度 Cd 处理下地上部和地下部间差异显著($P<0.05$);不同小写字母表示地上部、地下部在不同浓度 Cd 处理之间差异显著($P<0.05$)。下同
CK, T1, T2, T3, T4, T5, Cd concentration is 0.5, 10, 25, 50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ dry soil, respectively. Different capital letters indicate significant differences in shoots and roots under the same Cd concentration treatments ($P<0.05$); Different small letters indicate significant differences among different Cd concentration treatments in shoots and roots ($P<0.05$).

The same below

图 1 不同 Cd 浓度处理对长春花镉富集量的影响

Figure 1 Effects of cadmium accumulation of *C. roseus* under different Cd concentration treatments

升高 122.79 倍和 84.64 倍。Cd 胁迫使根系 Cd 富集量显著高于地上部($P<0.05$),表明长春花根系具有较强的 Cd 富集能力。

富集率是指植物各部位重金属富集量占整株富集量的百分比。由图 2 可知,长春花地下部 Cd 富集率高于地上部,占整个植株 Cd 富集的 69%~79%。同时,低浓度 Cd 胁迫(T1、T2)时,地上部 Cd 富集量低于较高浓度 Cd 胁迫(T3、T4、T5)。

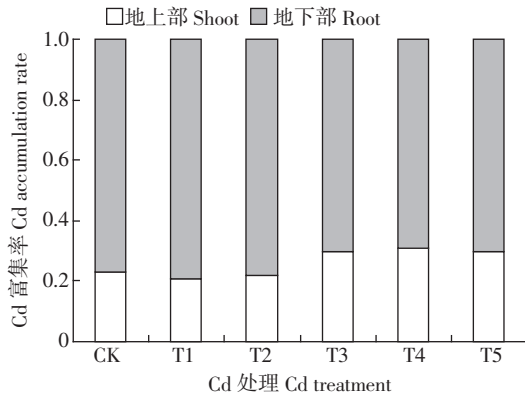


图 2 不同 Cd 浓度处理对长春花镉富集率的影响

Figure 2 Effects of cadmium accumulation rate of *C. roseus* under different Cd concentration treatments

2.2 Cd 胁迫对长春花质膜过氧化的影响

2.2.1 Cd 胁迫对长春花 MDA 积累量的影响

Cd 胁迫对地上部和地下部 MDA 含量影响显著(图 3)。T1 处理下,地上部和地下部 MDA 含量无明显影响;T2 处理下,地上部和地下部分别是 CK 处理的 1.60 倍和 1.55 倍,地下部无明显变化。高浓度 Cd 处理(T3、T4、T5)显著提升了地上部和地下部 MDA 含量,分别是 CK 的 2.22~3.75 倍和 2.31~3.55 倍。Cd

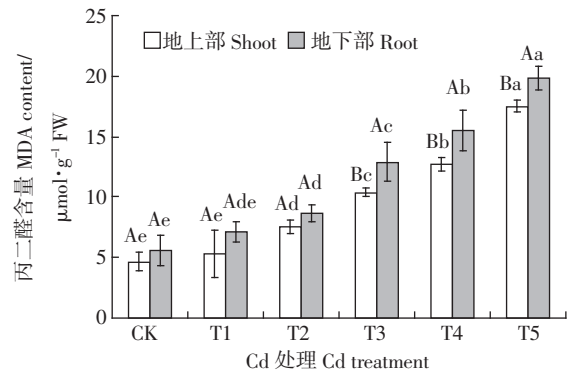


图 3 不同 Cd 浓度处理对长春花 MDA 积累量的影响

Figure 3 Effects of malondialdehyde(MDA) content of *C. roseus* under different Cd concentration treatments

胁迫下,地下部 MDA 含量高于地上部,且在高浓度处理下差异显著。相关性分析表明,长春花地上部和地下部 MDA 含量随着 Cd 处理浓度的增加而增加,呈极显著正相关($P<0.01$;表 1、表 2)。

2.2.2 Cd 胁迫对长春花 ROS 产生量的影响

图 4 显示,Cd 胁迫对长春花 H_2O_2 含量和 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率影响显著,并随着 Cd 胁迫浓度增加而增大。Cd 浓度 $\leq 10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,地上部和地下部 H_2O_2 含量未受到明显影响。但当 Cd 浓度 $\geq 25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, H_2O_2 含量迅速上升,T5 处理下地上部和地下部分别为 CK 的 3.87 倍和 3.85 倍。T1~T4 处理,地下部略高于地上部,T5 处理则相反,但两者间差异均不显著。同时,T1 处理对地上部和地下部 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率也无明显影响,Cd 浓度 $\geq 10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时显著上升。除 T3 处理外,地下部 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率均略高于地上部,但两者间显著差异。长春花地上部和地下部 H_2O_2 含量和 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率与 Cd 胁迫浓度、MDA 含量呈极显著正相关($P<0.01$;表 1、表 2)。

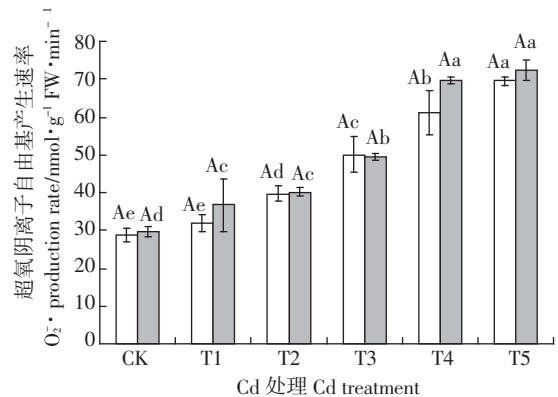
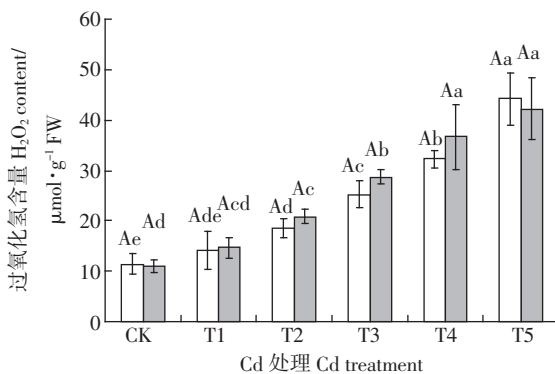


图 4 不同 Cd 浓度处理对长春花 ROS 产生量的影响

Figure 4 Effects of reactive oxygen species(ROS) generation of *C. roseus* under different Cd concentration treatments

表 1 长春花地上部 ROS、抗氧化酶物质和 Cd 处理浓度间的相关性(n=18)

Table 1 Correlations between reactive oxygen species, antioxidant enzymes substance and Cd concentration in shoots of *C. roseus* (n=18)

	O ₂ ^{·-} 产生速率 O ₂ ^{·-} production rate	MDA 含量 MDA content	H ₂ O ₂ 含量 H ₂ O ₂ content	CAT 活性 CAT activity	POD 活性 POD activity	SOD 活性 SOD activity	GSH 含量 GSH content	Cd 处理浓度 Cd concentration
O ₂ ^{·-} 产生速率 O ₂ ^{·-} production rate	1							
MDA 含量 MDA content	0.961**	1						
H ₂ O ₂ 含量 H ₂ O ₂ content	0.935**	0.957**	1					
CAT 活性 CAT activity	0.255 ^{ns}	0.180 ^{ns}	0.148 ^{ns}	1				
POD 活性 POD activity	0.791**	0.711**	0.674**	0.643**	1			
SOD 活性 SOD activity	0.923**	0.910**	0.882**	0.241 ^{ns}	0.693**	1		
GSH 含量 GSH content	-0.723**	-0.769**	-0.754**	-0.034 ^{ns}	-0.537**	-0.731**	1	
Cd 处理浓度 Cd concentration	0.925**	0.961**	0.956**	0.010 ^{ns}	0.590**	0.865**	-0.762**	1

注:表中结果根据长春花在 6 个 Cd 胁迫处理水平的数据计算。*,*P*<0.05(双侧)**,*P*<0.01(双侧);ns,*P*>0.05。下同。

Note: Results in the table are calculated based on data of six Cd concentration treatment levels of *C. roseus*. *,*P*<0.05 (bilateral); **, *P*<0.01 (bilateral); ns, *P*>0.05. The same below.

表 2 长春花地下部 ROS、抗氧化酶物质和 Cd 处理浓度间的相关性(n=18)

Table 2 Correlations between reactive oxygen species, antioxidant enzymes substance and Cd concentration in roots of *C. roseus* (n=18)

	O ₂ ^{·-} 产生速率 O ₂ ^{·-} production rate	MDA 含量 MDA content	H ₂ O ₂ 含量 H ₂ O ₂ content	CAT 活性 CAT activity	POD 活性 POD activity	SOD 活性 SOD activity	GSH 含量 GSH content	Cd 处理浓度 Cd concentration
O ₂ ^{·-} 产生速率 O ₂ ^{·-} production rate	1							
MDA 含量 MDA content	0.934**	1						
H ₂ O ₂ 含量 H ₂ O ₂ content	0.916**	0.932**	1					
CAT 活性 CAT activity	0.877**	0.882**	0.847**	1				
POD 活性 POD activity	0.577*	0.578*	0.614**	0.658**	1			
SOD 活性 SOD activity	0.913**	0.932**	0.900**	0.863**	0.658**	1		
GSH 含量 GSH content	-0.457 ^{ns}	-0.455 ^{ns}	-0.408 ^{ns}	-0.533*	-0.410 ^{ns}	-0.357 ^{ns}	1	
Cd 处理浓度 Cd concentration	0.909**	0.941**	0.891**	0.816**	0.388 ^{ns}	0.854**	-0.460 ^{ns}	1

2.3 Cd 胁迫对长春花抗氧化酶活性和抗氧化物质含量的影响

Cd 胁迫长春花地上部和地下部 CAT、POD、SOD 活性和 GSH 含量影响显著,如表 3。随着 Cd 胁迫浓度的增加,地上部 CAT 活性先升后降,T4 处理达到最大,较 CK 升高了 31%;地下部 CAT 活性随着 Cd 浓度增加逐渐增大。当 Cd 浓度 ≤10 mg·kg⁻¹ 时,地上部和地下部 CAT 活性变化不大;但当 Cd 浓度 ≥25 mg·kg⁻¹ 时,地上部 CAT 活性在 T3、T4 和 T5 处理间差异显著,地下部 CAT 活性在 3 个处理间无显著差异。同时,不同浓度 Cd 胁迫下,地上部 CAT 活性显著高于地下部。与 CAT 活性相反,地上部 POD 活性随 Cd 胁迫加深呈逐渐增大的趋势,而地下部先升后降。较低浓度 Cd 胁迫(T1、T2)下,地上部和地下部 POD 活性无明显变化,高浓度处理显著影响了 POD 活性。SOD 是抗氧化系统中的重要酶,Cd 胁迫显著升高了地上部和地下部的 SOD 活性。与 CK 处理相比,T1、T2 处理下地上部 SOD 活性显著升高,地下部 SOD 活

性升高不明显;T3、T4 处理下,地上部 SOD 活性分别是 CK 的 1.82 倍和 1.89 倍,地下部 SOD 活性分别是 CK 的 2.75 倍和 2.97 倍。T5 处理下,地上部和地下部 SOD 较 CK 分别提高了 127% 和 246%,且地下部为地上部的 1.30 倍。随着 Cd 胁迫的加剧,地上部 GSH 含量逐渐降低,地下部先升后降再升。Cd 胁迫下,地下部 GSH 含量显著高于地上部。相关性分析表明(表 1、表 2),Cd 处理浓度与地上部 POD、SOD 活性极显著正相关(*P*<0.01),与 GSH 含量极显著负相关,与 CAT 活性无显著相关性(*P*>0.05)。Cd 处理浓度与地下部 CAT、SOD 活性极显著正相关,与 GSH 含量极显著负相关,与 POD 活性无显著相关性。

2.4 Cd 胁迫对长春花质膜 ATPase 和 5'-AMPase 活性的影响

由图 5 可知,Cd 胁迫处理显著影响了长春花地上部和地下部质膜 ATPase 和 5'-AMPase 活性。随着 Cd 浓度增加,地上部质膜 H⁺-ATPase 逐渐降低,其他酶活性不同程度地先升后降。T1 处理下地上部和

表 3 不同 Cd 浓度处理对长春花抗氧化酶活性和抗氧化物质含量的影响

Table 3 Effects of activity of antioxidant enzymes (CAT, POD, SOD) and antioxidants (GSH) content of *C. roseus* under different Cd concentration treatments

植物器官 Plant organs	处理 Treatment	CAT 活性 CAT activity/ U·g ⁻¹ FW·min ⁻¹	POD 活性 POD activity/ U·g ⁻¹ FW·min ⁻¹	SOD 活性 SOD activity/ U·g ⁻¹ FW·min ⁻¹	GSH 含量 GSH content/ μmol·g ⁻¹ FW
地上部 Shoot	CK	69.36 ± 7.49Ac	181.43 ± 16.77Ad	50.30 ± 8.72Ad	2.16 ± 0.36Aa
	T1	77.46 ± 4.78Abc	191.56 ± 21.45Ad	66.51 ± 7.65Ac	2.09 ± 0.19Ba
	T2	79.96 ± 8.67Aabc	204.97 ± 23.62Ad	78.16 ± 9.18Ac	1.95 ± 0.05Ba
	T3	84.25 ± 6.50Aab	294.25 ± 26.51Ac	91.68 ± 4.96Ab	1.88 ± 0.34Aa
	T4	90.88 ± 3.80Aa	334.88 ± 27.50Ab	95.07 ± 6.94Bb	1.81 ± 0.10Ab
	T5	71.83 ± 4.56Ac	378.10 ± 17.53Aa	114.17 ± 5.34Ba	1.46 ± 0.02Bb
地下部 Root	CK	38.63 ± 4.54Bb	168.97 ± 13.14Ad	42.76 ± 7.92Ad	1.97 ± 0.04Bb
	T1	39.26 ± 5.42Bb	180.93 ± 6.25Ad	64.90 ± 14.53Ad	3.51 ± 0.44Aa
	T2	41.82 ± 5.61Bb	191.82 ± 7.11Ad	78.30 ± 8.25Ac	3.59 ± 0.46Aa
	T3	52.68 ± 3.02Ba	324.17 ± 22.65Ba	117.58 ± 18.95Ab	2.35 ± 0.59Ab
	T4	55.07 ± 3.52Ba	280.74 ± 19.57Bb	126.88 ± 16.98Aab	1.96 ± 0.06Ab
	T5	58.50 ± 1.74Ba	234.68 ± 23.80Bc	148.10 ± 9.86Aa	2.10 ± 0.10Ab

注:表中数值为平均值±标准偏差,不同大写字母表示相同浓度 Cd 处理下地上部和地下部间差异显著($P<0.05$);不同小写字母表示地上部、地下部在不同浓度 Cd 处理之间差异显著($P<0.05$)。

Note: Data are means ± SD in the table. Different capital letters indicate significant differences in shoots and roots under the same Cd concentration treatments ($P<0.05$); Different small letters indicate significant differences among different Cd concentration treatments in shoots and roots ($P<0.05$).

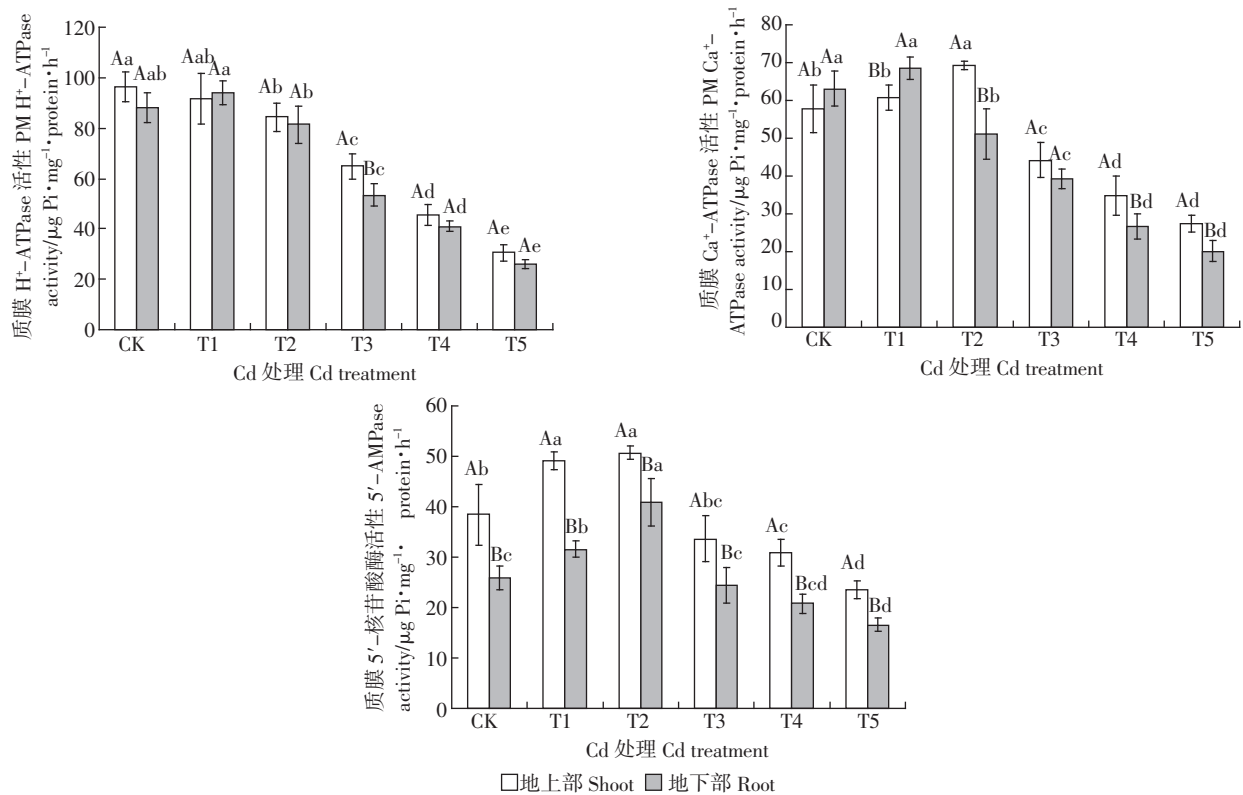


图 5 不同 Cd 浓度处理对长春花质膜 ATPase 和 5'-AMPase 活性的影响

Figure 5 Effects of plasma membrane ATPase and 5'-AMPase activity of *C. roseus* under different Cd concentration treatments

地下部 H⁺-ATPase、地下部 Ca²⁺-ATPase 活性与 CK 差异显著,地上部 Ca²⁺-ATPase、地上部和地下部 5'-AMPase 活性在 T2 处理下最高,分别为 CK 的 1.20、

1.32、1.56 倍。随着 Cd 胁迫浓度的增加,T3、T4、T5 处理下的地上部和地下部 ATPase 活性较 CK 显著降低;而地上部和地下部 5'-AMPase 活性在 T3 处理下

较 CK 降低不显著,地下部 5'-ATPase 活性在 T4 处理下较 CK 降低不显著。地上部 H⁺-ATPase 活性在 T3 处理下显著高于地下部,其他处理下无明显差异。地上部 Ca²⁺-ATPase 活性在 T2、T4、T5 处理下显著高于地下部。不同浓度 Cd 胁迫下,地上部质膜 5'-ATPase 活性显著高于地下部。

Cd 处理浓度与长春花质膜 H⁺-ATPase、Ca²⁺-ATPase 和 5'-ATPase 极显著负相关($P<0.01$;表 4)。相关性分析表明,地上部质膜 5'-ATPase 与 H⁺-ATPase、Ca²⁺-ATPase 极显著正相关($r=0.808^{**}$, $r=0.926^{**}$),H⁺-ATPase 与 Ca²⁺-ATPase 极显著正相关($r=0.889^{**}$);地下部质膜 5'-ATPase 与 H⁺-ATPase、Ca²⁺-ATPase 极显著正相关($r=0.763^{**}$, $r=0.601^{**}$),H⁺-ATPase 和 Ca²⁺-ATPase 极显著正相关($r=0.943^{**}$)。

表 4 Cd 处理浓度与长春花质膜 ATPase 和 5'-ATPase 活性的回归方程和相关性

Table 4 Regression equation and correlations between Cd concentration treatment and the activity of the plasma membrane ATPase and 5'-ATPase of *C. roseus*

植物器官 Plant organs	质膜酶 Plasma membrane enzyme	回归方程 Regression equation	决定系数(R^2) Correlation coefficient
地上部 Shoot	H ⁺ -ATPase	$y=-1.79x^2-1.36x+100.83$	0.936 ^{**}
	Ca ²⁺ -ATPase	$y=-2.21x^2+8.18x+53.90$	0.841 ^{**}
	5'-ATPase	$y=-1.91x^2+9.22x+34.46$	0.787 ^{**}
地下部 Root	H ⁺ -ATPase	$y=-1.85x^2-1.22x+96.45$	0.945 ^{**}
	Ca ²⁺ -ATPase	$y=-0.74x^2-4.86x+73.08$	0.940 ^{**}
	5'-ATPase	$y=-1.81x^2+9.90x+19.39$	0.686 ^{**}

注: x ,Cd 处理浓度; y ,质膜酶。*, $P<0.05$;**, $P<0.01$ 。

Note: x ,Cd treatment concentration; y ,Plasma membrane enzyme. *, $P<0.05$;**, $P<0.01$.

3 讨论

3.1 Cd 胁迫对长春花镉富集量的影响

重金属在植物体内一种是大部分累积在根系,另一种是把根系吸收的重金属大部分运输到地上部^[21]。一般而言,大多数带正电的重金属离子易与组织中带负电的化合物结合,使重金属富集在根系而较少转运至地上部。研究表明,长春花地上部和地下部 Cd 富集量随着 Cd 胁迫浓度的增加而增加,地下部 Cd 富集量显著高于地上部(图 1),表明根系累积 Cd 的能力大于地上部,可能是 Cd 阻碍了植物体内 ATP 酶的主动运输,随着 Cd 胁迫加剧,ATP 酶活性降低抑制了 Cd²⁺ 由根系向地上部的转运^[22]。这种将 Cd 富集于根系是植物阻止 Cd²⁺ 对光合作用及新陈代谢酶造成

伤害的生存策略^[23],不仅能减少对地上部的毒害以提高耐性,而且减轻了土壤 Cd 通过植物向生态系统迁移的风险^[21]。

3.2 Cd 胁迫对长春花质膜过氧化及抗氧化系统的影响

质膜作为植物细胞与外界环境的交流界面,首先接触到重金属并直接受到影响。活性氧过量积累导致质膜过氧化是重金属对植物伤害的重要机制^[24]。研究表明,重金属是质膜过氧化的诱变剂,浓度越高质膜 MDA 积累越多。因此,MDA 常作为植物 ROS 水平和细胞受损程度的判断指标。本研究中,Cd 处理浓度与长春花不同部位 MDA 含量呈极显著正相关(表 1、表 2),表明 MDA 积累与氧化速率相关。当 Cd 浓度 $\leq 10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,MDA 含量无明显增加(图 3),植物没有产生过多的 ROS,细胞受害程度较小。但 Cd 浓度 $\geq 25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,MDA 和 ROS 产生量显著升高(图 4),表明高浓度 Cd 胁迫加剧了体内自由基的量态,植物受到较严重的伤害。这是因为 Cd 与含 N 或 S 的基团和蛋白质具有很强的亲和性而形成二硫键,导致膜离子通道结构破坏^[25]。不同 Cd 浓度胁迫下,长春花地下部 MDA 含量高于地上部,与美人蕉(*Canna indica*)^[26]MDA 含量对 Cd 的响应类似,但与滇苦菜(*Picris divaricata*)^[24]相悖,可能与植物种类、胁迫浓度、胁迫时间以及镉富集部位有关。

Cd 胁迫下,植物体内 ROS 的产生和清除失去平衡,导致 ROS 积累、质膜过氧化加剧^[27]。植物通过抗氧化酶系统(SOD、CAT、POD 等)与非酶物质(GSH、GR 等)来消除或减少 ROS 带来的伤害^[26]。SOD 能将 O₂[·]歧化为 H₂O₂,且能阻止 Fe³⁺重新受 O₂[·]作用还原生成 Fe²⁺而催化 Fenton 反应产生更多的·OH。因此,SOD 是植物体内第一个清除 ROS 的关键酶。重金属胁迫下 SOD 活性有两种变化情况:一是随胁迫浓度的增加而增加;二是随着胁迫浓度增加先升后降。试验发现,长春花地上部和地下部 SOD 活性表现为显著升高(表 3),且与 Cd 处理浓度极显著正相关,具有典型的“剂量-效应”关系^[24]。研究表明,SOD 以 Cu/Zn-SOD、Fe-SOD 和 Mn-SOD 3 种核编码酶存在于介质中,当受到 ROS 刺激时,能通过 -NH₂ 末端定位顺序运至细胞^[28],这可能是 SOD 活性增强的原因之一。Cd 浓度 $\leq 10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,SOD 活性无明显增加,表明低浓度 Cd 胁迫未对植物造成损伤,与 MDA 的变化具有一致性。但当 Cd 浓度 $\geq 25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,地下部 SOD 显著高于地上部,推测根系作为最先接触重金属离子的敏感器官,以提高 SOD 活性避免造成更大地

伤害。

POD 和 CAT 可催化 H_2O_2 形成 H_2O , 从而有效阻止 $\text{O}_2\cdot$ 和 H_2O_2 的积累。本研究中, 随着 Cd 胁迫浓度的增大, 地上部和地下部 POD、CAT 变化呈逐渐增大或先升后降。同时, Cd 处理浓度与地上部 CAT 无显著相关性, 与 POD 极显著正相关, 地下部 POD 活性反之。这表明 POD 在地上部对 H_2O_2 的催化作用中起主导作用, 地下部 CAT 较敏感。通常 CAT 活性在植物根系低于地上部^[29], 表明光合作用是 ROS 的主要来源, 而非叶组织内较少的叶绿体和过氧化物酶。研究中却发现长春花地上部 CAT 活性显著高于地下部, 这可能是 CAT2 基因表达产物特异性清除 H_2O_2 , 汤叶涛等^[24]的研究也支持该观点。众多研究表明, 植物对 Cd 胁迫的共同初期反应是 GSH 消减和 H_2O_2 积累^[30]。长春花地上部 GSH 含量随着 Cd 浓度增加而降低, 表明抗坏血酸-谷胱甘肽(ASA-GSH)循环可能是地上部消除 ROS 危害的主要途径。据报道, 植物体内的 Cd 能诱导 PCs(Phytochelations)合成, 而合成 PCs 的前体已证实主要是 GSH, 从而使 GSH 因合成 PCs 而迅速下降。

总体而言, Cd 处理浓度与地上部 SOD、POD、GSH 呈极显著相关, 与 CAT 无显著相关性(表 1); ROS 产生量较地下部分低(图 1、图 2), 表明 SOD、POD 和 GSH 在清除地上部 ROS 中起着重要作用, 或者通过减少 ROS 的产生量消除 ROS 的危害。这支持了 Møller^[31]提出的“避免或者减少 ROS 产生”和“ROS 产生后对其进行清除”观点。相应地, Cd 处理浓度与地下部 CAT、SOD、POD 显著正相关, 与 GSH 无显著相关性(表 2), 表明抗氧化酶在根系 ROS 的清除中作用显著。

3.3 Cd 胁迫对长春花质膜 ATPase 和 5'-AMPase 活性影响

质膜 H^+ -ATPase 活性变化与植物抗性强弱紧密相关, Ca^{2+} -ATPase 能通过主动运输对胞内 Ca^{2+} 平衡起微调作用。研究发现, 地上部 H^+ -ATPase 活性随着 Cd 浓度增加而降低, Cd 胁迫增强了细胞的呼吸强度, 细胞抵御 Cd^{2+} 毒害将 H^+ 等离子泵出细胞外维持低渗透势。地下部 H^+ -ATPase 在 Cd 浓度 $\leq 5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时略升高, 表明根尖组织需要较高的质子电化学势梯度以维持 Cd 胁迫下的离子平衡, 从而保证细胞对胁迫进行渗透调节; Cd 浓度 $\geq 10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时显著下降, 可能与胞内 Ca 调素(CaM)有关。Cd 胁迫造成胞内 Ca^{2+} 水平上升, 同时由于 CaM 含量下降导致质膜

Ca^{2+} -ATPase 活性下降(图 5), 高水平的 Ca^{2+} 无法有效泵出细胞, 于是通过信号传导降低质膜 H^+ -ATPase mRNA 转录水平, 导致活性下降^[5]。当 Cd 浓度 $\geq 10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 地上部 H^+ -ATPase 和 Ca^{2+} -ATPase 活性高于地下部, 表明高浓度 Cd 胁迫破坏了质膜, 损伤了根系主动吸收, 可能与根系活力相关^[27]。质膜 5'-AMPase 活性在一定程度上能够反映植物抗逆能力。Cd 浓度 $\leq 10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 质膜 5'-AMPase 活性升高, 有利于提高细胞膜的稳定性, 提高产生电化学梯度及溶质的次级跨膜转运速率, 增加抗重金属能力^[6]。当 Cd 浓度 $\geq 25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时 5'-AMPase 活性下降, 细胞内积累的大量 Cd^{2+} 严重影响了细胞正常的生理功能, 造成了不可逆的伤害, 与对芥蓝(*Brassica alboglabra*)的研究类似^[27]。同时, 地上部质膜 5'-AMPase 活性高于地下部, 这与在高浓度胁迫下地上部质膜 ATPase 高于地下部具有一致性, 表明 Cd 对根系主动吸收功能造成了损伤, 其机理有待进一步研究。

4 结论

(1) 长春花对 Cd 有较强的富集能力, 根系的富集能力高于地上部。

(2) 中、低浓度 Cd 处理($\leq 10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)未对长春花造成明显的质膜过氧化, 对质膜两种 ATPase 和 5'-AMPase 活性影响较小。

(3) 较高浓度 Cd 处理($\geq 25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)时长春花地上部与地下部均受到质膜过氧化胁迫, 但对氧化胁迫的响应方式不同; 同时, 对质膜 ATPase 和 5'-AMPase 的损伤加重。

一定程度上, 长春花对 Cd 胁迫具有较强的耐性, 为城市园林绿化和净化重金属污染土壤提供了可能, 在 Cd 污染土壤的修复中具有一定的应用潜力。

参考文献:

- [1] Wu F Z, Yang W Q, Zhang J, et al. Cadmium accumulation and growth responses of a poplar (*Populus deltoids* × *Populus nigra*) in cadmium contaminated purple soil and alluvial soil[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 177: 268–273.
- [2] Kudo H, Kudo H, Ambo H, et al. Cadmium sorption to plasma membrane isolated from barley roots is impeded by copper association onto membranes[J]. *Plant Science*, 2011, 180: 300–305.
- [3] Janicka-Russak M, Kabala K, Burzyński M. Different effect of cadmium and copper on H^+ -ATPase activity in plasma membrane vesicles from *Cucumis sativus* roots[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63: 4133–4142.
- [4] Nocito F F, Lancilli C, Dendena B, et al. Cadmium retention in rice roots

- is influenced by cadmium availability, chelation and translocation[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2011, 34:994-1008.
- [5] Wdowikowska A, Klobus G. Plant P-type ATPases [J]. *Postepy Biochemistry*, 2011, 57:85-91.
- [6] Sgherri C L M, Maffei M, Navari-Izzo F. Antioxidative enzymes in wheat subjected to increasing water deficit and rewatering[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2000, 157:273-279.
- [7] 赵杨迪, 潘远智, 刘碧英. 玉竹对土壤 Cd Pb 的吸收和耐性研究[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(11):2087-2093.
- ZHAO Yang-di, PAN Yuan-zhi, LIU Bi-ying. Absorption and tolerance of *Polygonatum odoratum* to Cd and Pb in soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(11):2087-2093.
- [8] Mujib A, Ilah A, Aslam J, et al. Catharanthus roseus alkaloids: Application of biotechnology for improving yield[J]. *Plant Growth Regulation*, 2012, 68:111-127.
- [9] Olivia G, Audrey O, Gégory G, et al. A type-B response regulator drives the expression of the hydroxymethylbutenyl diphosphate synthase gene in periwinkle[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2012, 169:1571-1574.
- [10] Cartmill A D, Valdez-aguilar L A, Cartmill D L, et al. Arbuscular mycorrhizal colonization does not alleviate sodium chloride-salinity stress in Vinca[Catharanthus roseus(L.) G. Don][J]. *Journal of Plant Nutrition*, 2013, 36:164-178.
- [11] Zheng Z, Wu M. Cadmium treatment enhances the production of alkaloid secondary metabolites in *Catharanthus roseus*[J]. *Plant Science*, 2004, 166:507-514.
- [12] Patterson B D, MacRae E A, Ferguson I B. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium(IV)[J]. *Analytical Biochemistry*, 1984, 139:487-492.
- [13] 王爱国, 罗广华. 植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系[J]. 植物生理学通讯, 1990(6):55-57.
- WANG Ai-guo, LUO Guang-hua. Quantitative relation between the reaction of hydroxylamine and superoxide anion radicals in plants[J]. *Plant Physiology Communication*, 1990(6):55-57.
- [14] Cakmak I, Marschner H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves[J]. *Plant Physiology*, 1992, 98:1222-1227.
- [15] 李合生, 孙群, 赵世杰. 植物生理生化试验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000:125-128.
- LI He-sheng, SUN Qun, ZHAO Shi-jie. Theory and technique of plant physiological and biochemical experiments[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000:125-128.
- [16] Nagalakshmi N, Prasad M N V. Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus* [J]. *Plant Science*, 2001, 160:291-299.
- [17] Wang Y, Sze H. Similarities and differences between the tonoplast-type and the mitochondrial H⁺-ATPase of oat roots[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1985, 260:10434-10443.
- [18] 缪颖, 曹家树, 将有条, 等. 大白菜干烧心病发生过程中 Ca²⁺-ATPase 活性的变化[J]. 园艺学报, 1998, 25(1):51-55.
- MIAO Ying, CAO Jia-shu, JIANG You-tiao, et al. Changes of Ca²⁺-ATPase activity in inner leaves during the development of tipburn in Chinese cabbage[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 1998, 25(1):51-55.
- [19] 潘杰, 孙龙华, 简令成. 不同抗冷水稻质 5'-核苷酸酶活性的生化及细胞化学研究[J]. 科学通报, 1992, 28(7):653-656.
- PAN Jie, SUN Long-hua, JIAN Ling-cheng. Research on different cold rice plasma membrane 5'-nucleotidase activity of biochemical and cell chemical[J]. *Chinese Science Bulletin*, 1992, 28(7):653-656.
- [20] Zhao F, McGrath S P, Grosland A D. Comparison of three wet digestion methods for the determination of plant sulphur by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES)[J]. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 1994, 25:407-418.
- [21] 田小霞, 孟林, 毛培春, 等. 重金属 Cd Zn 对长穗偃麦草生理生化特性的影响及其积累能力研究[J]. 农业环境科学学报, 2012, 31(8):1483-1490.
- TIAN Xiao-xia, MENG Lin, MAO Pei-chun, et al. Effects of Cd and Zn on the physiological and biochemical characteristics and accumulation abilities of *Elytrigia clongata*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2012, 31(8):1483-1490.
- [22] 燕傲蕾, 吴亭亭, 王友保, 等. 三种观赏植物对重金属镉的耐性与积累特性[J]. 生态学报, 2010, 30(9):2491-2498.
- YAN Ao-lei, WU Ting-ting, WANG You-bao, et al. The characteristics of cadmium tolerance and accumulation in three kinds of ornamental plants[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(9):2491-2498.
- [23] Zurayk R, Sukkariyah B, Baalbaki R. Common hydrophytes as bioindicators of nickel, chromium and cadmium pollution[J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2001, 127:373-388.
- [24] 汤叶涛, 关丽捷, 仇荣亮, 等. 镉对超富集植物滇苦菜抗氧化系统的影响[J]. 生态学报, 2010, 30(2):324-332.
- TANG Ye-tao, GUAN Li-jie, QIU Rong-liang, et al. Antioxidative defense to cadmium in hyperaccumulator *Picris divaricata* V.[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(2):324-332.
- [25] Mishra S, Srivastava S, Tripathi R D, et al. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2006, 44:25-37.
- [26] 王业社, 刘可慧. 美人蕉(*Canna indica* Linn)镉胁迫的抗氧化机理[J]. 生态学报, 2009, 29(5):2710-2715.
- WANG Ye-she, LIU Ke-hui. Stress responses and resistance mechanism of *Canna indica* Linn to cadmium[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(5):2710-2715.
- [27] 郑爱珍. 镉胁迫对芥蓝根系膜过氧化及 ATPase 活性的影响[J]. 生态学报, 2012, 32(2):483-488.
- ZHENG Ai-zhen. Effects of cadmium on lipid peroxidation and ATPase activity of plasma membrane from Chinese kale (*Brassica al-boglabra* Bailey) roots[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(2):483-488.
- [28] Bernard A S, Giroud C, Ching H Y V, et al. Evaluation of the anti-oxidant properties of a SOD-mimic Mn-complex in activated macrophages [J]. *Dalton Transactions*, 2012, 41:6399-6403.
- [29] Shaw B P. Effects of mercury and cadmium on the activities of antioxidative enzymes in the seedlings of *Phaseolus aureus*[J]. *Biologia Plantarum*, 1995, 37:587-596.
- [30] Olmos E, Martínez-Solano J R, Piqueras A, et al. Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line)[J]. *Journal Experiment Botany*, 2003, 54:291-301.
- [31] Møller I M. Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 2001, 52:561-591.