

# 镉及其与钙组合对褐脉少花龙葵毛状根生长、抗氧化酶活性和吸收镉的影响

施和平<sup>1,2</sup>, 曾宝强<sup>2</sup>, 王云灵<sup>1</sup>, 陈利华<sup>2</sup>

1 华南师范大学生命科学学院 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州 510631

2 香港教育学院科学与环境学系, 香港新界

**摘要:** 为了探讨利用褐脉少花龙葵毛状根来修复重金属镉(Cd) 污染的可能性, 采用溶液培养法研究了 Cd 单独及其与钙(Ca) 组合对褐脉少花龙葵毛状根生长、抗氧化酶超氧化物歧化酶(SOD) 和过氧化物酶(POD) 活性及对 Cd 吸收的影响。结果表明, Cd ≤ 50 μmol/L 时能促进毛状根生长, 而高于 100 μmol/L Cd 则抑制毛状根生长, 使其侧根根尖变褐和变短, 数目减少。与对照相比, 不同浓度 Cd 培养的毛状根可溶性蛋白含量和 SOD 活性先升高后逐渐下降; 其丙二醛(MDA) 含量显著提高; 100 μmol/L Cd 使毛状根 POD 活性逐渐升高, 但 300 μmol/L Cd 则使毛状根 POD 活性逐渐降低。与对照 (仅添加 100 μmol/L 或 300 μmol/L Cd 的毛状根) 相比, Cd 和 10~30 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 组合培养使毛状根可溶性蛋白含量和 MDA 含量降低; 但提高其 SOD 活性; 而 100 μmol/L Cd 和 10~30 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 结合培养的毛状根 POD 活性均比对照低; 而 300 μmol/L Cd 和 10~30 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 结合培养的毛状根 POD 活性则均比对照提高。原子吸收分光光度法测定结果表明, 毛状根吸收和吸附的重金属 Cd 含量随着培养基中 Cd 浓度的升高而增加。但外源加入 10~30 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 能减少毛状根对 Cd 的吸收, 并调节其抗氧化酶 SOD 和 POD 活性, 降低其膜脂过氧化水平而解除重金属 Cd 对毛状根生长的抑制或毒害。

**关键词:** 镉, 褐脉少花龙葵, 毛状根, 抗氧化酶, 丙二醛 (MDA), 氯化钙, 吸收

## Effect of cadmium, alone or in combination with CaCl<sub>2</sub>, on the growth, antioxidative enzyme activity and cadmium absorption of *Solanum nigrum* L. var *pauciflorum* hairy roots

Heping Shi<sup>1,2</sup>, Eric Pokeung Tsang<sup>2</sup>, Yunling Wang<sup>1</sup>, and Andrew Leewah Chan<sup>2</sup>

1 Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

2 Department of Science and Environmental Studies, the Hong Kong Institute of Education, New Territories, Hong Kong, China

**Abstract:** To study if *Solanum nigrum* hairy roots can be used for phytoremediation of Cd contamination, we investigated the effects of cadmium (Cd) alone, and in combination with different concentrations of CaCl<sub>2</sub>, on growth, activities of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) and Cd absorption by hairy roots of *S. nigrum* L. var *pauciflorum*. The results showed that

**Received:** September 21, 2009; **Accepted:** December 17, 2009

**Supported by:** Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 031510), Hong Kong Croucher Foundation.

**Corresponding author:** Heping Shi. Tel:+86-20-85214793; E-mail: shihp@scnu.edu.cn

广东省自然科学基金项目 (No. 031510), 香港裘槎基金资助。

Cd concentrations of lower than 50  $\mu\text{mol/L}$  enhanced the growth of hairy roots, while higher than 100  $\mu\text{mol/L}$  inhibited growth and decreased the number of branched roots, also causing the root tips to become brown and shorter in length. In comparison with a control, the soluble protein content, the activities of SOD and POD in hairy roots cultures showed a trend of first increased and then gradually decreased, while the malondialdehyde (MDA) content significantly increased, when increasing the Cd concentrations. Cd concentration of 100  $\mu\text{mol/L}$  or 300  $\mu\text{mol/L}$  in combination with 10–30 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  resulted in a decreased content of soluble protein and MDA in the hairy roots, but an enhanced SOD activity. The increased POD activities were observed when cultured in 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd and 10–30 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  but decreased when cultured in 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd and 10–30 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ . Atomic Absorption Spectrometry determination showed that the Cd absorbed and adsorbed by the hairy roots increased along with the increase of Cd concentration. The exogenous addition of 10–30 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  could reduce the toxicity of Cd. This was achieved on one hand by reducing the absorption of Cd, on the other hand by decreasing the lipid peroxidation through regulating the activities of antioxidant enzymes SOD and POD in the hairy roots.

**Keywords:** cadmium, hairy roots, antioxidative enzyme, malondialdehyde (MDA), calcium, absorption

镉(Cd) 虽不是植物生长必需的微量元素,但由于其移动性强、极易通过食物链危及人体健康,对人和动物具有致癌、致畸、致突变的作用<sup>[1]</sup>,是目前土壤和水体环境中最受关注的毒性最强的重金属元素之一。因而,如何治理和控制重金属 Cd 污染,寻找降低 Cd 毒害或修复被 Cd 污染环境的有效方法,一直是国内外环境科学研究的热点与难点。根是植物吸收矿质离子的最主要器官。有研究表明,利用植物尤其是重金属蓄积植物的根系对土壤和水体中某种重金属污染元素具有特殊的吸收富集和转化能力,不失为治理重金属污染、实现生态修复的高效而廉价的有效方法之一<sup>[2]</sup>。与对照根(自然根)相比,由发根农杆菌 *Agrobacterium rhizogenes* 感染植物细胞遗传转化后产生的毛状根,具有产生分枝侧根能力很强、可快速自主生长、根系极发达及具有很大的吸收面积等特点;近年相继有人利用可离体自主快速生长的毛状根来吸收重金属离子 Ni 和 Cd<sup>[3]</sup>,或根滤重金属铀以修复被放射性金属元素铀污染的环境<sup>[4]</sup>,以及利用毛状根迅速吸收和转化废水中的酚及氯酚类污染物<sup>[5-6]</sup>。但到目前为止,国内外利用发根农杆菌遗传转化产生的毛状根或其再生植株来开展对重金属污染物修复的研究还刚刚起步,未见有关重金属 Cd 对褐脉少花龙葵 *Solanum nigrum* L. var. *pauciflorum* 毛状根生长或毒害影响及其吸收 Cd 影响的报道。钙(Ca) 是植物生长发育必需的大量元素。已有研究表明, Ca 可以与 Cd 竞争植物根系上吸收位点,降低植物含 Cd 量<sup>[7]</sup>;而外源 Ca 可以增强植物对许多非生物逆境的适应性,减轻

逆境对植物所造成的伤害<sup>[8-9]</sup>;但到目前为止,未见有关 Cd 和 Ca 结合对毛状根生长或毒害影响的系统研究报道。

本研究以发根农杆菌遗传转化产生的可在无激素培养基上自主生长的褐脉少花龙葵毛状根为材料,来探讨重金属离子 Cd 及其与 Ca 组合对褐脉少花龙葵毛状根生长、抗氧化酶活性以及 Cd 吸收的影响;为今后开展利用生长迅速的具发达根系的褐脉少花龙葵毛状根再生植株来净化被重金属 Cd 污染的水体和土壤环境提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

采用由含农杆菌野生 Ri 质粒的发根农杆菌 ATCC15834 遗传转化褐脉少花龙葵 *S. nigrum* L. var. *pauciflorum* 叶片外植体所产生的、能在 MS 培养基<sup>[10]</sup>上自主快速生长并已继代培养的毛状根,其诱导和继代培养见吴晓凤等<sup>[11]</sup>的方法。

### 1.2 培养基及培养条件

在探讨重金属 Cd 对褐脉少花龙葵毛状根生长影响时,采用添加不同浓度 Cd(以  $\text{CdCl}_2$  的形式加入)的液体 MS 培养基,其中 Cd 浓度分别为 50  $\mu\text{mol/L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$ 、200  $\mu\text{mol/L}$  和 300  $\mu\text{mol/L}$ 。而在探讨 Ca 和 Cd 组合对毛状根抗氧化酶活性或 Cd 吸收的影响时,分别采用 50  $\mu\text{mol/L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$ 、300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 及 100  $\mu\text{mol/L}$ 、300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 10、20、30 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  钙组合的液体 MS 培养基进行培养。每瓶中分装 50 mL 经 121 $^{\circ}\text{C}$  高温湿热灭菌后的培养基,定量接

种毛状根后, 于黑暗条件下、 $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、 $100\text{ r/min}$  的摇床中振荡培养。

### 1.3 Cd 对褐脉少花龙葵毛状根生长的影响

选取生长旺盛的褐脉少花龙葵毛状根, 用无菌水清洗后, 剪切成  $4\sim 5\text{ cm}$  且具根尖的根段, 放入配制好的含有不同浓度 Cd 的 MS 液体培养基中进行定量接种暗培养, 在为期 15 d 的培养过程中观察毛状根的生长变化及进行生物量的测定。每隔 3 d 随机抽取不同浓度处理的毛状根培养物各 3 瓶, 用自来水冲洗培养物上的残留液体培养基, 然后再用蒸馏水冲洗并用吸水纸吸干水分后进行毛状根生物量(鲜重和干重) 测量。

### 1.4 毛状根中可溶性蛋白含量、POD、SOD 活性及 MDA 含量的测定

为了探讨不同浓度 Cd 单独及其与 Ca 组合对毛状根过氧化物酶(POD) 和超氧化物歧化酶(SOD) 及丙二醛(MDA) 含量的影响, 取毛状根定量接种到仅添加  $50$ 、 $100$ 、 $300\ \mu\text{mol/L}$  Cd 及  $100\ \mu\text{mol/L}$ 、 $300\ \mu\text{mol/L}$  Cd 与  $10\sim 30\text{ mmol/L}$   $\text{CaCl}_2$  组合的液体培养基中进行培养, 并分别在培养后 3、6、9、12、15 d 取样进行测定。其中, 毛状根培养物可溶性蛋白含量的测定参照 Bradford 的方法<sup>[12]</sup>, 用考马斯亮蓝 G-250 进行染色及进行紫外分光光度法测定。其培养过程中其 SOD 活性变化的测定基本按照 Beauchamp 和 Fridovich 的测定方法<sup>[13]</sup>, 以抑制 NBT 光还原 50% 所需要的酶量为一个酶活性单位; 其 POD 活性的测定按照张志良等<sup>[14]</sup>的愈创木酚法进行, 以制备酶提取液所用的磷酸缓冲液作空白对照, 用每分钟  $OD_{470}$  值变化值表示酶活性的大小, 即以“ $OD_{470}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ”蛋白表示。MDA 含量的测定按 Heath 和 Packer 的方法<sup>[15]</sup>。实验重复测定 3 次, 取平均值。

### 1.5 褐脉少花龙葵毛状根 Cd 含量的测定

毛状根在培养 2~3 d 后, 分别移入含  $100$ 、 $300\ \mu\text{mol/L}$  Cd 和 (或)  $10$ 、 $20$ 、 $30\text{ mmol/L}$   $\text{CaCl}_2$  组合的液体培养基中, 培养 10 d 后, 取出毛状根, 用去离子水洗 1 遍后, 再用约  $50\text{ mL}$   $20\text{ mmol/L}$  EDTA 液洗 2~3 次, 收集 EDTA 洗涤液, 经浓缩、常规消化后供测定毛状根吸附的 Cd 含量用; 残余的培养基

经滤纸过滤后用去离子水定容至  $50\text{ mL}$  后, 经常规消化后供测定培养基残存的 Cd 含量用。毛状根样品置于  $60^{\circ}\text{C}\sim 70^{\circ}\text{C}$  下烘干, 精密称取粉碎过的毛状根样品于  $100\text{ mL}$  锥形瓶中, 加混酸( $V_{\text{HNO}_3}:V_{\text{HClO}_4}=4:1$ )  $15\text{ mL}$  消化, 电炉上加热烘干后, 1%  $\text{HNO}_3$  定容, 供测定毛状根吸收的 Cd 含量。各样品的 Cd 含量采用原子吸收分光光度计法测定。其测定条件为: 波长  $228.8\text{ nm}$ , 灯电流  $7\text{ mA}$ , 狭缝宽度  $113\text{ nm}$ , 干燥  $110^{\circ}\text{C}$ ,  $30\text{ s}$ , 灰化  $500^{\circ}\text{C}$ 。实验重复测定 3 次, 取平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 重金属 Cd 及其与 Ca 组合对毛状根生长及形态的影响

褐脉少花龙葵毛状根接种至 MS 液体培养基中培养 1~2 d 后, 可观察到从毛状根根段开始产生新的乳白色侧根, 且根段不断伸长; 同时发现, 随着培养时间延长, 毛状根的颜色逐渐由白色变为浅黄色; 培养 15 d 后, 对照 (不加 Cd 的 MS 培养基) 培养的褐脉少花龙葵毛状根仍生长旺盛, 并产生大量分枝侧根。与对照相比,  $50\ \mu\text{mol/L}$  Cd 培养的褐脉少花龙葵毛状根未见到任何生长抑制或毒害症状; 且根尖不变褐、不坏死, 培养 15 d 时, 其生物量约比对照增高 12.8%。但  $100\ \mu\text{mol/L}$  Cd 培养的毛状根生长开始受抑制, 其侧根根尖缩短且部分变褐, 但其主根形态正常, 不变褐; 而添加  $200\ \mu\text{mol/L}$  Cd 培养 10 d 后, 毛状根侧根根尖略膨大, 短突而小, 部分变褐, 但主根形态仍正常; 而在添加  $300\ \mu\text{mol/L}$  Cd 的培养基中培养 10 d 后, 毛状根侧根变得更短缩(长度不足  $5\text{ mm}$ ), 大部分侧根根尖呈褐色, 并部分坏死, 并可从培养基中观察到坏死脱落的根尖碎片, 培养基出现浑浊, 颜色呈浅灰褐色, 部分主根及其起始根段也变褐, 培养至 15 d 时, 其生物量干重约比对照降低 33.2%。这表明, 高浓度 Cd 抑制褐脉少花龙葵毛状根的生长, 并出现明显的毒害症状。

与仅添加  $100\ \mu\text{mol/L}$  Cd 培养的褐脉少花龙葵毛状根相比,  $100\ \mu\text{mol/L}$  Cd+ $10\text{ mmol/L}$  Ca 培养的毛状根根尖不变褐, 其根段更伸长, 根的颜色和形态也与在不含 Cd 的无激素 MS 培养基类似。而当毛

状根在 MS+100  $\mu\text{mol/L}$  Cd+20 mmol/L Ca 中培养 10 d 后, 其生长情况比 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd+10 mmol/L Ca 都好, 根正常伸长, 且生长旺盛, 未见根尖褐化和变短。而与仅添加 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养的毛状根相比, 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd+10 mmol/L Ca 培养的毛状根生长虽也受抑制, 小部分根段也变褐, 但褐变程度和根生长受抑制程度明显比仅添加相同浓度 Cd 轻。而当毛状根在 MS+300  $\mu\text{mol/L}$  Cd+20 mmol/L Ca 和 MS+300  $\mu\text{mol/L}$  Cd+30 mmol/L Ca 中培养时, 其生长情况也明显比单独添加 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养要好得多, 不仅根系能产生较多

分枝侧根, 根生长正常, 呈浅黄色, 而且不变褐, 其液体培养基也不变成灰褐色和变浑浊 (图 1)。该结果表明, 低浓度 Cd 对毛状根的生长影响小, 甚至促进生长, 但高浓度 Cd 则抑制其生长, 且浓度愈高抑制程度愈强, 甚至产生毒害; 而外源添加 10~30 mmol/L Ca 则可解除高浓度镉对毛状根生长的抑制和毒害。

## 2.2 重金属 Cd 及其与 Ca 组合对褐脉少花龙葵毛状根可溶性蛋白含量的影响

图 2 为培养基中 Cd 浓度对褐脉少花龙葵毛状根可溶性蛋白含量的影响。由图 2 可见, 在培养过程中, 对照的可溶性蛋白含量随着培养时间的延长而

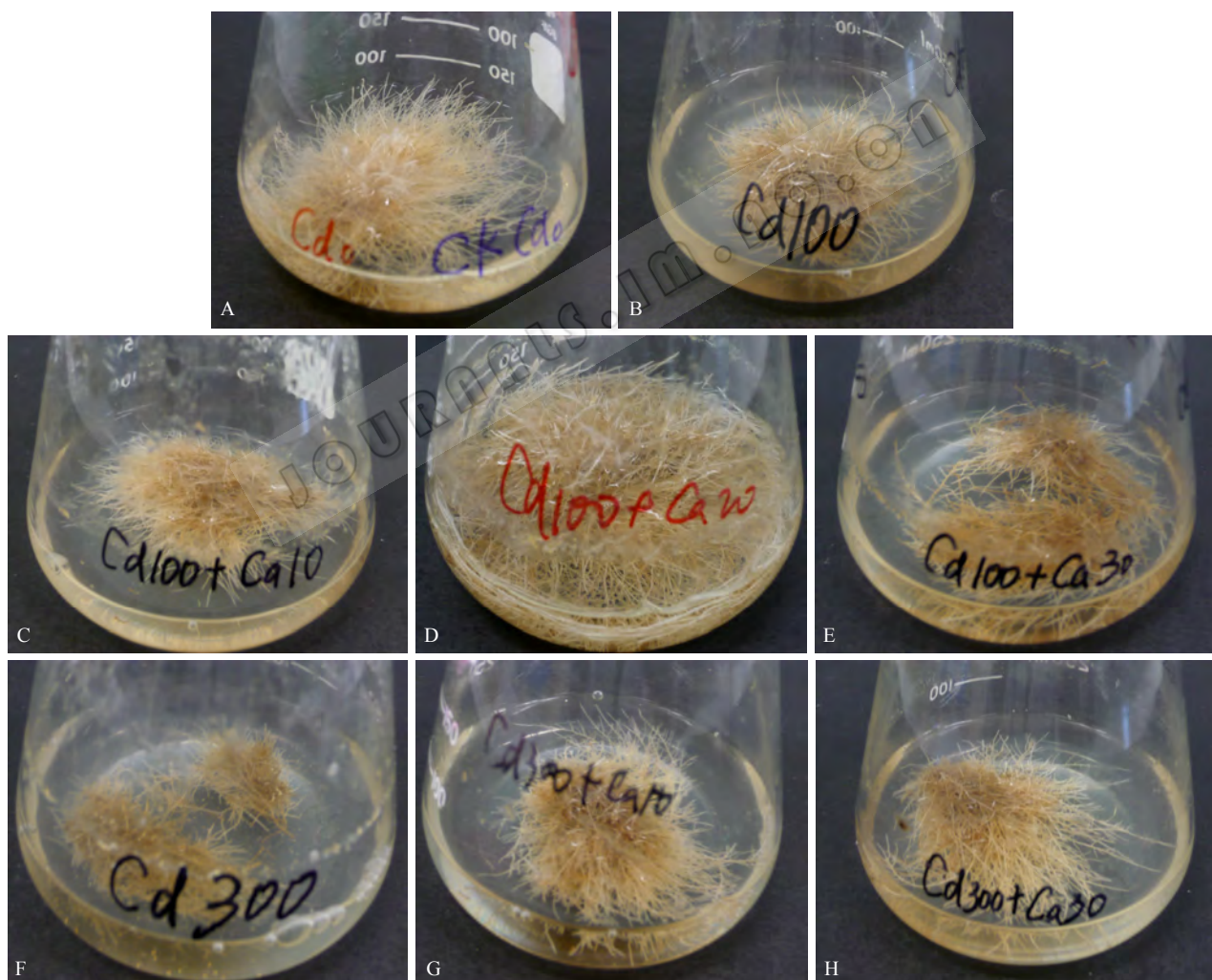


图 1 Cd 单独及其与 Ca 组合对褐脉少花龙葵毛状根生长形态的影响

Fig. 1 Effect of Cd alone and in combination with 10–30 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  on the growth and morphology of *S. nigrum* L. var *pauciflorum* hairy roots. A–H: Hairy roots cultured in medium with 100  $\mu\text{mol/L}$  or 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd and in combination with 10–30 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  for 15 days. (A) 0  $\mu\text{mol/L}$  Cd. (B) 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd. (C) 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd + 10 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ . (D) 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd + 20 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ . (E) 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd + 30 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ . (F) 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd. (G) 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd + 10 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ . (H) 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd + 30 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ .

逐渐下降。与对照相比,不同浓度 Cd 培养的褐脉少花龙葵毛状根可溶性蛋白含量均比对照提高,其中,50  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养的毛状根可溶性蛋白含量呈先升高后逐渐下降的变化趋势,并与培养基中的 Cd 浓度成正比;而当毛状根在 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 中培养时,仅在培养后 3~12 d 期间,其可溶性蛋白含量比同期对照提高,且随着培养时间延长而逐渐下降;其中,以培养 3 d 的毛状根可溶性蛋白含量最高,达到 129.72 mg/g DW, 约比同期对照提高约 69%;但培养至 15 d 时,其毛状根可溶性蛋白含量仅为培养 3 d 的 5.3%。这表明,在培养过程中添加 50~300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 可促进褐脉少花龙葵毛状根可溶性蛋白的产生,但随着 Cd 胁迫时间的延长,毛状根的蛋白质合成受阻或合成能力逐渐下降。

图 3 和图 4 分别为 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 或 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 10~30 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  组合对褐脉少花龙葵毛状根可溶性蛋白含量的影响。从图 3 可见,与仅添加 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养的毛状根相比,100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和不同浓度 Ca 组合培养的毛状根可溶性蛋白含量也呈先升高后逐渐下降的趋势,但其含量均比同期仅添加相同浓度 Cd 的毛状根降低。而从图 4 可见,仅添加 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养的毛状根可溶性蛋白含量在培养过程中随培养时间延长而逐渐下降;与之相比,300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和不同浓度 Ca 组合培养的毛状根可溶性蛋白含量也呈先升高后逐渐下降的趋势,而且,其可溶性蛋白含量均比同期仅添加相同浓度

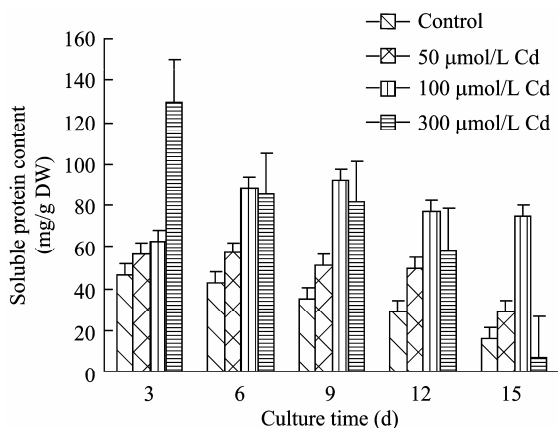


图 2 Cd 浓度对褐脉少花龙葵毛状根可溶性蛋白含量的影响

Fig. 2 Effect of Cd concentrations on soluble protein content in hairy roots of *S. nigrum* L. var *pauciflorum*.

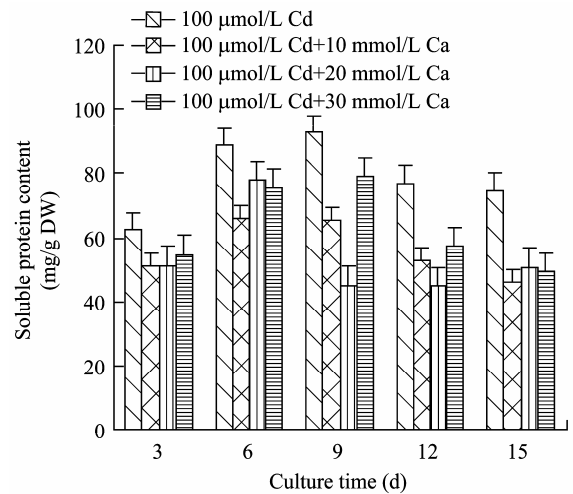


图 3 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 10~30 mmol/L Ca 组合对毛状根可溶性蛋白含量的影响

Fig. 3 Effect of 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd in combination with 10~30 mmol/L Ca on the soluble protein content in hairy roots of *S. nigrum* var *pauciflorum*.

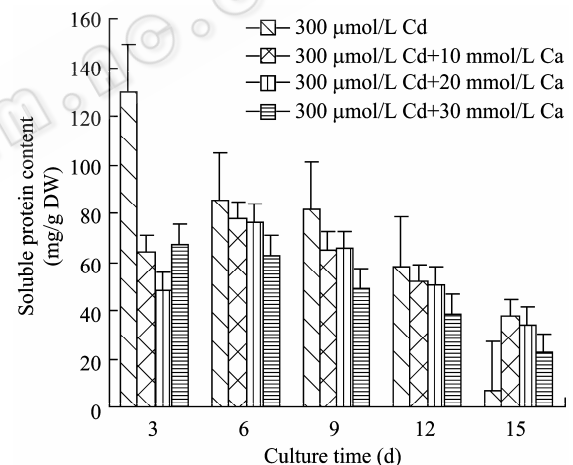


图 4 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 10~30 mmol/L Ca 组合对褐脉少花龙葵毛状根可溶性蛋白含量的影响

Fig. 4 Effect of Cd 300  $\mu\text{mol/L}$  in combination with 10~30 mmol/L Ca on the soluble protein content in hairy roots of *S. nigrum* L. var *pauciflorum*.

Cd 培养的毛状根降低。培养至 15 d 时,300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 10、20 和 30 mmol/L Ca 结合培养的毛状根可溶性蛋白含量分别约为其培养 3 d 的 58.86%、70.01% 和 33.17%; 而仅加 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养 15 d 的毛状根可溶性蛋白含量仅为其培养 3 d 的 5.30%。这表明,随着 Cd 胁迫时间的延长,Ca 可能通过抑制蛋白水解酶活性或保护了蛋白酶系统的活性,通过延缓可溶性蛋白含量的下降来影响重金属 Cd 对褐脉少花龙葵毛状根生长或毒害的影响。

### 2.3 重金属 Cd 及其与 Ca 组合对褐脉少花龙葵毛状根 POD 活性的影响

植物体内的 SOD 和 POD 是活性氧自由基清除系统中重要的保护酶之一，其活性的提高是使细胞免受毒害的调节反应，但其调节能力有一定限度。从图 5 可见，对照（不加 Cd 培养的毛状根）的 POD 活性在培养过程中呈现先升高后逐渐下降的趋势。与对照相比，低浓度 50  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养的毛状根 POD 活性随着培养时间的延长而逐渐下降，且其 POD 活性均比同期对照降低；而与对照和低浓度 50  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养不同的是，100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养的毛状根 POD 活性随着培养时间的延长而逐渐升高，培养至 15 d 时，其 POD 活性达到最高；分别约为同期对照和 50  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养的毛状根 POD 活性的 4.47 倍和 8.15 倍；然而，当毛状根在 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 中培养时，其 POD 活性则随着培养时间的延长而逐渐降低，且其含量比对照和 50  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 都低。这表明，在一定浓度范围内，褐脉少花龙葵毛状根可通过提高其抗氧化酶 POD 活性来抵御 Cd 胁迫引起的对其生长的抑制或毒害；但当 Cd 浓度大于 300  $\mu\text{mol/L}$ ，褐脉少花龙葵毛状根的 POD 活性反而降低，并对毛状根生长产生毒害。

图 6 和图 7 分别为 Cd 及其 10~30 mmol/L Ca 组合对褐脉少花龙葵毛状根 POD 活性影响的测定结果。从图 6 可见，仅添加 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养的毛状根 POD 活性随着培养时间的延长而逐渐升高；与之

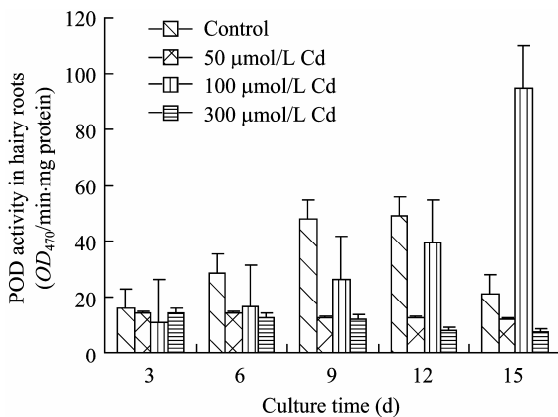


图 5 培养基 Cd 浓度对褐脉少花龙葵毛状根 POD 活性的影响

Fig. 5 Effect of Cd concentrations on POD activities in hairy roots of *S. nigrum* L. var *pauciflorum*.

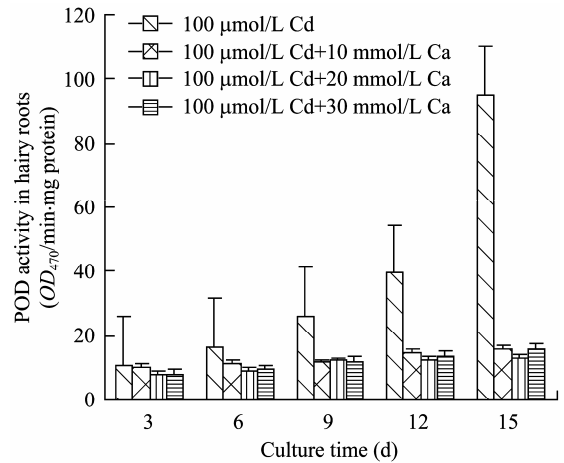


图 6 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 与 10~30 mmol/L Ca 组合对褐脉少花龙葵毛状根 POD 活性的影响

Fig. 6 Effect of 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd in combination with 10~30 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  on POD activities in hairy roots of *S. nigrum* L. var *pauciflorum*.

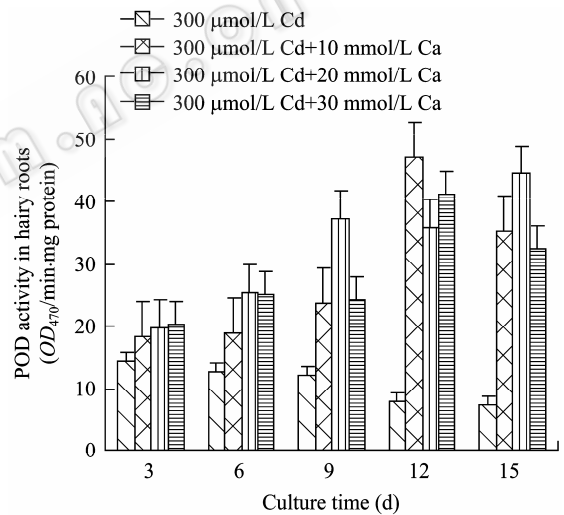


图 7 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 与 10~30 mmol/L Ca 组合对褐脉少花龙葵毛状根 POD 活性的影响

Fig. 7 Effect of 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd in combination with 10~30 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  on POD activities in hairy roots of *S. nigrum* L. var *pauciflorum*.

相比，在整个培养过程中，100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 10、20、30 mmol/L Ca 结合培养的毛状根 POD 活性均比仅添加 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养的毛状根低。而与 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 10、20 和 30 mmol/L Ca 结合培养的褐脉少花龙葵毛状根相比，300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 10、20 和 30 mmol/L Ca 结合培养的毛状根 POD 活性均比对应的仅添加 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养的毛状根提高 (图 7)。这表明，外源 Ca 对褐脉少花龙葵毛状根 POD 活性的影响效果与所用的 Cd 浓度高低有关，当毛状根在高浓度



Cd 中培养时,外源添加 Ca 可通过调高其 POD 活性,从而拮抗或减轻重金属 Cd 对褐脉少花龙葵毛状根生长的抑制或毒害。

#### 2.4 重金属 Cd 及其与 Ca 组合对褐脉少花龙葵毛状根 SOD 活性的影响

图 8 为 Cd 浓度对褐脉少花龙葵毛状根 SOD 活性影响的测定结果。从图 8 可见,与对照 (不加 Cd 培养的毛状根) 相似,当毛状根在不同浓度 Cd 的液体培养基中培养时,其 SOD 活性先逐渐升高,然后逐渐下降;其中,在 3~9 d 的培养期间,50  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养的毛状根 SOD 活性均比同期对照高,但培养 9 d 后其 SOD 活性则比对照降低;而 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养的褐脉少花龙葵毛状根 SOD 活性仅在培养后 3~6 d 内比对照高;之后,随着培养时间的延长,其 SOD 活性也随之降低,并与其 Cd 浓度成反比。

图 9 和图 10 为 Cd 及其与 10~30 mmol/L Ca 组合对毛状根 SOD 活性影响的测量结果。从图 9 可见,当褐脉少花龙葵毛状根在 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 10、20 和 30 mmol/L Ca 中培养时,其 SOD 活性均比同期仅添加 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养的对照毛状根提高;而从图 10 可见,当毛状根在 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 10、20 和 30 mmol/L Ca 中培养时,其 SOD 活性均较对应的仅添加 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养的毛状根不同程度提高。SOD 作为一种重要的防御酶,其活性的维持和提高是植物耐受 Cd 胁迫的物质基础之一。该结果

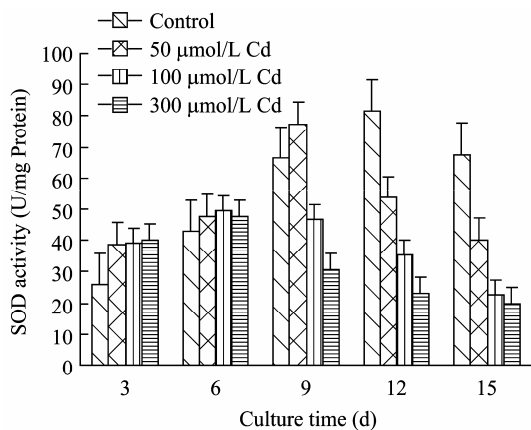


图 8 重金属 Cd 浓度对褐脉少花龙葵毛状根 SOD 活性的影响

Fig. 8 Effect of Cd concentration on SOD activities in hairy roots of *S. nigrum* L. var *pauciflorum*.

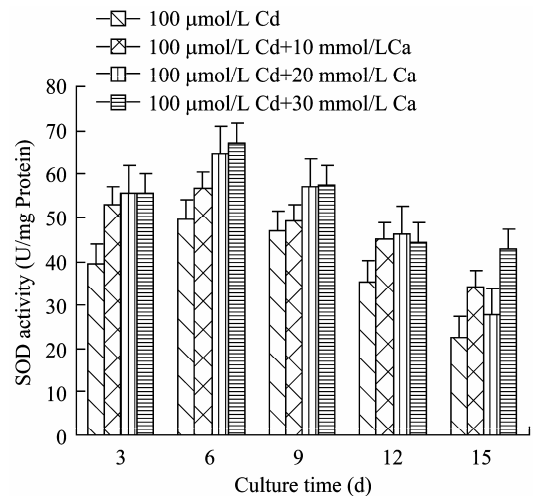


图 9 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 与 10~30 mmol/L Ca 组合对褐脉少花龙葵毛状根 SOD 活性的影响

Fig. 9 Effect of 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd in combination with 10~30 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  on SOD activities in hairy roots of *S. nigrum* L. var *pauciflorum*.

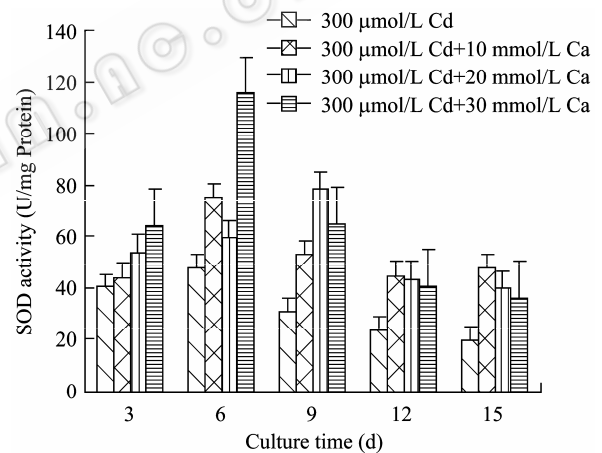


图 10 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 与 10~30 mmol/L Ca 组合对毛状根褐脉少花龙葵 SOD 活性的影响

Fig. 10 Effect of 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd in combination with 10~30 mmol/L Ca on SOD activities in hairy roots of *S. nigrum* L. var *pauciflorum*.

表明,褐脉少花龙葵毛状根对 Cd 胁迫具有一定的耐受能力,而外源添加一定浓度的 Ca 可通过提高毛状根的 SOD 活性,来减轻或缓解重金属 Cd 对褐脉少花龙葵毛状根生长的抑制或毒害。

#### 2.5 重金属 Cd 及其与 Ca 组合对褐脉少花龙葵毛状根 MDA 含量的影响

膜脂过氧化产物 MDA 含量是细胞膜受伤程度的重要指标之一。从图 11 可见,无论褐脉少花龙葵毛状根是在低浓度 50  $\mu\text{mol/L}$  Cd,还是在高浓度 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 下培养,其 MDA

含量均比同期对照 (不加 Cd 处理) 显著提高, 其中, 以在 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 中培养 9 d 的毛状根 MDA 含量最高, 约为同期对照 MDA 含量的 2.73 倍。这表明, 重金属 Cd 对褐脉少花龙葵毛状根生长的抑制或毒害可能与其对膜脂过氧化的促进有关。

图 12 和图 13 为 Cd 浓度 100  $\mu\text{mol/L}$  和 300  $\mu\text{mol/L}$  与 10、20、30 mmol/L Ca 组合对褐脉少花龙葵毛状根 MDA 含量影响的测量结果。从图 12 和图 13 可见, 无论是与仅添加 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 还是添加 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养的毛状根相比, 100  $\mu\text{mol/L}$  或 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd

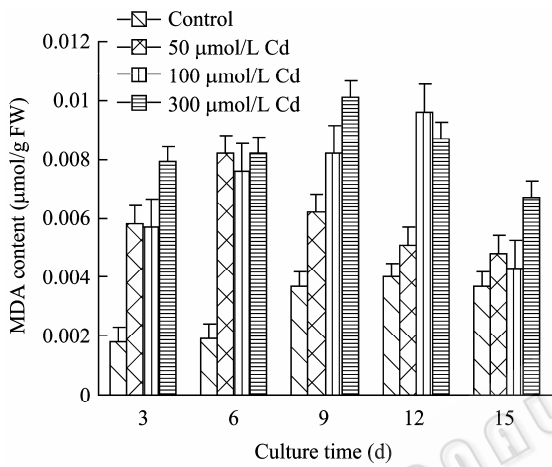


图 11 重金属 Cd 浓度对褐脉少花龙葵毛状根 MDA 含量的影响

Fig. 11 Effect of Cd concentration on the MDA content in hairy roots of *S. nigrum* L. var *pauciflorum*.

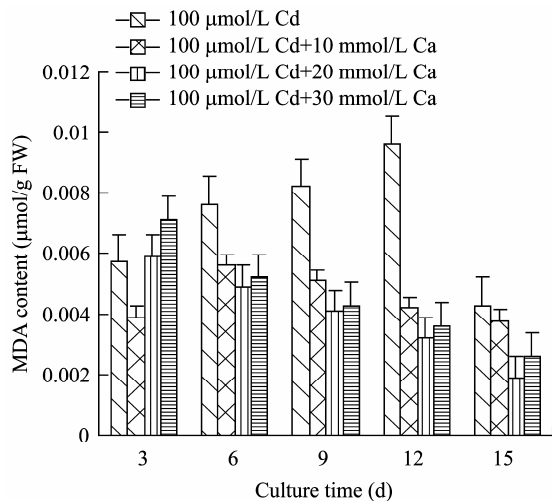


图 12 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 与 10~30 mmol/L Ca 组合对褐脉少花龙葵毛状根 MDA 含量的影响

Fig. 12 Effect of 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd in combination with 10~30 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  on the MDA content in hairy roots of *S. nigrum* L. var *pauciflorum*.

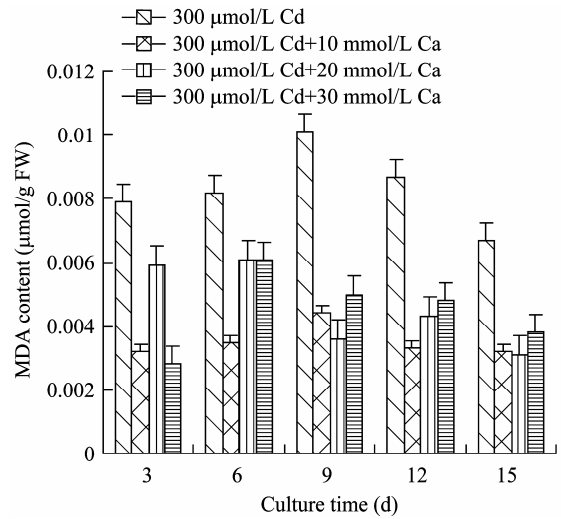


图 13 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 与 10~30 mmol/L Ca 组合对褐脉少花龙葵毛状根 MDA 含量的影响

Fig. 13 Effect of 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd in combination with 10~30 mmol/L Ca on the MDA content in hairy roots of *S. nigrum* L. var *pauciflorum*.

和 10~30 mmol/L Ca 组合培养的褐脉少花龙葵毛状根 MDA 含量都比仅添加对应浓度 Cd 培养的毛状根降低。可见, 外源加入 10~30 mmol/L Ca 可降低毛状根的 MDA 含量。这可能表明, 外源 Ca 可能通过降低细胞膜脂过氧化程度而对重金属 Cd 对毛状根生长的抑制或毒害产生拮抗作用或缓解效应。

### 2.6 重金属 $\text{Cd}^{2+}$ 及其与 $\text{Ca}^{2+}$ 组合对褐脉少花龙葵毛状根吸收 $\text{Cd}^{2+}$ 的影响

图 14 和图 15 为重金属  $\text{Cd}^{2+}$  和 10~30 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  结合对褐脉少花龙葵毛状根吸收  $\text{Cd}^{2+}$  的测定结果。从图 14 和图 15 可见, 当毛状根在含 100  $\mu\text{mol/L}$  和 300  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$  的溶液中培养时, 毛状根不仅能从培养基中吸收重金属  $\text{Cd}^{2+}$ , 而且, 还能吸附重金属  $\text{Cd}^{2+}$ ; 并且, 由毛状根吸收和吸附的重金属  $\text{Cd}^{2+}$  含量随着培养基中  $\text{Cd}^{2+}$  浓度的升高而增加; 培养 10 d 后, 毛状根所吸收和吸附的  $\text{Cd}^{2+}$  量分别占其总  $\text{Cd}^{2+}$  量的 76.45% 和 65.64%。而与对照 (仅添加 100  $\mu\text{mol/L}$  或 300  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$  培养的毛状根) 相比, 当毛状根在 100  $\mu\text{mol/L}$  或 300  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$  和 10~30 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  组合的培养基中培养时, 其培养基残存的  $\text{Cd}^{2+}$  含量均比对照高, 但褐脉少花龙葵毛状根吸收和吸附的  $\text{Cd}^{2+}$  含量均比其相应的对照低; 而且, 无论是毛状根吸收的  $\text{Cd}^{2+}$  含量, 还是毛状根表面吸附的



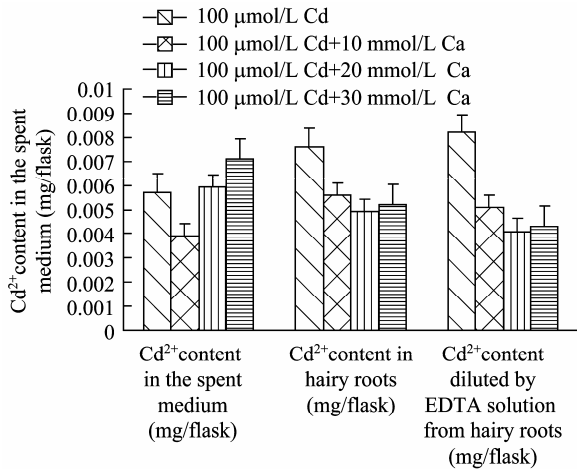


图 14 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$ 和 10–30  $\text{mmol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$ 结合对褐脉少花龙葵毛状根吸收重金属镉的影响

Fig. 14 Effect of 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$  in combination with 10–30  $\text{mmol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$  on absorption of Cd in hairy roots of *S. nigrum* L. var *pauciflorum*.

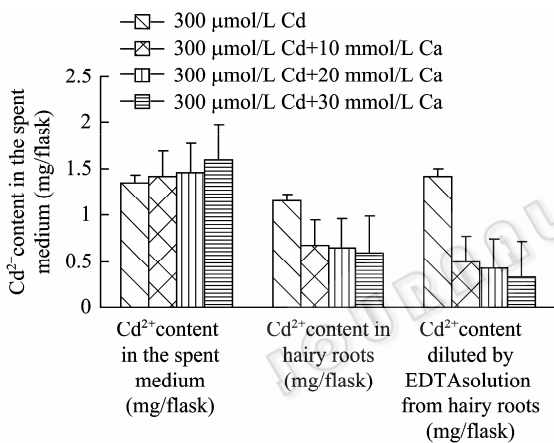


图 15 300  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$ 和 10–30  $\text{mmol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$ 结合对褐脉少花龙葵毛状根吸收重金属镉的影响

Fig. 15 Effect of 300  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$  in combination with 10–30  $\text{mmol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$  on absorption of Cd in hairy roots of *S. nigrum* L. var *pauciflorum*.

$\text{Cd}^{2+}$ 含量,均随着培养基中  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的增加而逐渐降低。这表明,毛状根具有较强的吸收和吸附重金属  $\text{Cd}^{2+}$ 的能力,而外加 10–30  $\text{mmol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$ 可降低毛状根对重金属  $\text{Cd}^{2+}$ 的吸收和吸附能力,从而可能拮抗或减弱高浓度  $\text{Cd}^{2+}$ 对毛状根生长的抑制或毒害。

### 3 讨论

不少研究表明, Cd 对植物生长、根的形态和侧根发生及其毒害的影响具有浓度剂量效应和因植物类型而异<sup>[16–17]</sup>。如低浓度 (0.1  $\text{mg/L}$ ) Cd 可促进小白

菜 *Brassica chinensis* L. 侧根的发育,而  $\geq 5$   $\text{mg/L}$  Cd 则可使小白菜根变短而粗,根毛缺乏,侧根分枝减少<sup>[16]</sup>;但受 Cd 毒害的玉米幼苗根尖膨大变黑,继而腐烂<sup>[17]</sup>。而龙葵 *Solanum nigrum* L. 是近年发现的 Cd 超积累植物<sup>[18]</sup>;有研究表明,低浓度 Cd ( $< 25$   $\mu\text{mol/L}$ ) 不会明显影响龙葵幼苗的生长,甚至还有一定的促进作用;而高浓度 Cd ( $> 50$   $\mu\text{mol/L}$ ) 则抑制其生长<sup>[19]</sup>;但对龙葵属的红果龙葵 *Solanum alatum* Moench 而言, 50  $\mu\text{mol/L}$  Cd 胁迫处理 6 d 就对其幼苗生长产生明显毒害<sup>[20]</sup>。然而,所有这些有关 Cd 对植物生长和毒害的研究大都是通过水培或沙培或盆栽的方法来研究 Cd 对完整植株生长的影响;少见有关 Cd 对细胞培养物如愈伤组织或毛状根生长影响的系统研究报道。Fornazier 等发现,低浓度 (0.01–0.1  $\text{mmol/L}$ )  $\text{CdCl}_2$  能明显促进甘蔗 *Saccharum officinarum* L. 愈伤组织的生长,但高浓度 (0.5–1  $\text{mmol/L}$ )  $\text{CdCl}_2$  则强烈抑制愈伤组织的生长<sup>[21]</sup>,而这与本实验的结果不一致。本研究发现,  $\text{Cd} \leq 50$   $\mu\text{mol/L}$  几乎不影响褐脉少花龙葵毛状根生长,甚至还能略促进生长;但高浓度 Cd ( $\geq 100$   $\mu\text{mol/L}$ ) 则开始抑制毛状根的生长,且浓度愈高抑制作用更明显,使毛状根侧根根尖变褐而短,数目减少;同时,该结果也表明,与龙葵属植株根相比,褐脉少花龙葵毛状根具有更高的 Cd 耐受能力。然而,在液体培养黄瓜毛状根时,  $\text{Cd} \leq 10$   $\text{mg/L}$  能促进黄瓜毛状根生长,并使根增粗;而  $\text{Cd} \geq 15$   $\text{mg/L}$  才抑制黄瓜毛状根生长,使根变得十分短而小,且使根尖膨大但不变褐,根表面变红<sup>[22]</sup>。作者认为,这种差异表明 Cd 对植物毛状根生长及毒害影响的程度不仅具有剂量效应,而且还因植物或毛状根类型而异。

已有的研究表明, Cd 对植物的毒害可能是通过损害生物体内的保护酶 POD 和 SOD 活性及蛋白质合成等变化表现出毒性<sup>[16,23]</sup>。例如秦天才等发现,低浓度 Cd 能促进植物蛋白质合成,但高浓度 Cd 则对蛋白质合成起破坏或抑制作用<sup>[16]</sup>。而在不同浓度  $\text{Cd}^{2+}$  污染下,水花生 *Alternanthera philoxeroides* L. 根中 SOD 和过氧化氢酶(CAT) 活性呈现先升后降的变化,但其 POD 活性和可溶性蛋白含量则呈现持续下降的变化趋势<sup>[23]</sup>;用不同浓度 Cd 培养的黄瓜

毛状根可溶性蛋白含量大都随着培养时间延长而逐渐下降,但其 SOD 和 POD 活性则逐渐升高<sup>[22]</sup>。然而在高浓度 Cd 培养时,油菜 *Brassica napus* L. cv Drakkar 植株的抗氧化酶 SOD 和 CAT 活性均急剧下降,而印度芥菜 *Brassica juncea* L. 植株中的抗氧化酶活性则保持恒定或几乎不变<sup>[24]</sup>;显然这与本实验的结果不完全一致。在本实验中,不同浓度 Cd 培养的褐脉少花龙葵毛状根可溶性蛋白含量和 SOD 活性呈先升高后下降的趋势,而 POD 活性则可因 Cd 浓度高低而异,其中,100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养时毛状根 POD 活性随着培养时间的延长而逐渐升高,而高浓度 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养时的 POD 活性则逐渐降低。然而,在白菜 *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino 水培时发现,低浓度 Cd 1 mg/L 虽对白菜生长无显著影响;但却显著增加植株的 POD 活性;而高浓度 10 mg/L Cd 则显著降低植株叶片 SOD、CAT 及 POD 活性<sup>[25]</sup>;此外,用含 0.6 mmol/L Cd 的营养液水培芦苇 *Phragmites australis* L. 时,其幼苗 SOD 和 POD 等抗氧化酶活性则较低浓度培养时显著降低<sup>[26]</sup>,而这些与本实验高浓度 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养毛状根的结果类似。然而,有相反报道表明,在超积累植物庭荠 *Alyssum maritimum* L. 中,高浓度 Cd 却可提高该植物的 SOD 活性<sup>[27]</sup>。这表明,Cd 对植物抗氧化保护酶活性的影响程度可能与所使用的 Cd 浓度、植物类型以及毛状根的生长特性等有关。

有关 Cd 促进植物细胞膜脂质过氧化已有不少报道<sup>[24,28]</sup>。如用 10~50  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养印度芥菜 *Brassica juncea* 和油菜 *B. napus* 时,10~50  $\mu\text{mol/L}$  Cd 胁迫仅使油菜植物细胞的脂质过氧化水平增加,而印度芥菜细胞的 MDA 含量则保持不变<sup>[24]</sup>。而扁桃 *Prunus dulcis* L. 幼苗在 0~150  $\mu\text{mol/L}$  Cd 水培时发现,无论是根还是叶中,高浓度 Cd 可通过提高脂质过氧化而对植株产生氧化损伤<sup>[28]</sup>。而在本实验中,不同浓度 Cd 培养的褐脉少花龙葵毛状根 MDA 含量均比同期对照显著提高,表明 Cd 可促进毛状根细胞膜脂质过氧化。然而,也有报道表明,在 Cd 处理的胡萝卜 *Daucus carota* L. 植株及其毛状根中并未出现明显的膜脂过氧化<sup>[29]</sup>。这显然与本实验的结果相反;而这种差异的产生表明 Cd 对植物细胞膜脂过氧化的

促进也可能因所使用的 Cd 浓度、植物种类和毛状根类型等而异。

Ca 是植物生长发育必需的元素。一些研究表明,在  $\text{Ca}^{2+}$  存在的条件下,  $\text{Cd}^{2+}$  的吸收被抑制或减弱<sup>[30-31]</sup>。而用  $\text{Cd}^{2+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  处理玉米种子时发现,  $\text{Ca}^{2+}$  能减少以至消除 Cd 对种子活力和幼苗生长的毒害作用<sup>[32]</sup>。但这些研究都是以完整植物为材料,少见有关  $\text{Ca}^{2+}$  和 Cd 结合对毛状根生长、抗氧化酶活性及其吸收 Cd 相互作用的研究报道。在本实验中,褐脉少花龙葵毛状根不仅能从培养基中吸收和吸附 Cd,而且,所吸收和吸附的  $\text{Cd}^{2+}$  含量随着培养基中  $\text{Cd}^{2+}$  浓度的升高而增加;但外源加入 10~30 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  后,毛状根吸收和吸附的  $\text{Cd}^{2+}$  含量则逐渐降低;表明  $\text{Ca}^{2+}$  可明显抑制毛状根对  $\text{Cd}^{2+}$  的吸收和吸附。此外还发现,与仅添加 Cd 培养相比,外加 10~30 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  不仅能通过离子拮抗而减少毛状根对  $\text{Cd}^{2+}$  的吸收,降低其 Cd 含量,而且可降低毛状根可溶性蛋白含量和 MDA 含量,提高其抗氧化酶 SOD 活性,降低其膜脂过氧化水平,从而解除或减轻重金属 Cd 对其生长的毒害。贺迪等<sup>[26]</sup>发现,在营养液中 Cd 浓度由 2  $\mu\text{mol/L}$  增加到 0.6 mmol/L 时,芦苇幼苗的 SOD、CAT 和 POD 等抗氧化酶活性显著降低,而加入 10 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  则可抑制 MDA 的产生,并刺激  $\text{Cd}^{2+}$  胁迫芦苇幼苗叶片 SOD 和 CAT 活性的增强,从而提高芦苇对 Cd 的抗性。而这与本实验的结果相似。这说明外源  $\text{Ca}^{2+}$  可以缓解过量  $\text{Cd}^{2+}$  胁迫引起的膜脂过氧化和刺激植物细胞抗氧化保护酶活性的提高,从而对 Cd 导致的毛状根生长的抑制或毒害产生拮抗或缓解效果。

有研究表明,外源 Ca 在逆境胁迫下的作用可能与  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM 的作用或与 Ca 在稳定细胞结构方面发挥的作用有关<sup>[9]</sup>。在研究 Cd 对萝卜 *Raphanus sativus* L. 种子萌发和幼苗生长时发现,  $\text{Ca}^{2+}$  可部分逆转 Cd 对种子生长和 Cd 吸收的抑制,而  $\text{Cd}^{2+}$  不仅可与  $\text{Ca}^{2+}$  竞争 CaM 的结合位点;还可抑制  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-依赖的磷酸二酯酶的活化,这表明 Cd 对种子萌发的毒害是通过  $\text{Cd}^{2+}$  对  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM 的影响而发挥作用<sup>[33]</sup>。而在本实验的结果中,外源供给 10~30 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  后,褐脉少花龙葵毛状根吸收和吸附的  $\text{Cd}^{2+}$  含

量虽比对照明显地降低, 且随着培养基中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度增加而降低; 但含有相当高含量 Cd 的毛状根仍能较好地正常生长。这表明外源加入足够  $\text{Ca}^{2+}$  并不能完全抑制毛状根对  $\text{Cd}^{2+}$  的吸收和吸附; 而这是否表明在 Cd-Ca 拮抗过程中, 外源 Ca 是否可能是通过 Ca-CaM 的介导而发挥作用? 或者说是否是通过维持细胞内 Ca 的低稳态水平而发挥其生理作用? 而重金属 Cd 毒害是否与通过影响  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM 的功能有关则待进一步研究。

本实验的结果表明, 褐脉少花龙葵毛状根具有很强的重金属 Cd 耐受能力; 而外源加入 Ca 可拮抗 Cd 对毛状根生长的抑制或毒害, 减少毛状根对 Cd 的吸收。为今后利用具发达根系的褐脉少花龙葵毛状根再生植株来对受重金属 Cd 污染的环境进行植物修复奠定了相关的前期工作基础和提供了可能性。

## REFERENCES

- [1] Wagner GJ. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Adv Agron*, 1993, **51**: 173–212.
- [2] Salt DE, Blaylock M, Kumar PBAN, *et al.* Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnol*, 1995, **13**: 468–474.
- [3] Boominathan R, Doran PM. Cadmium tolerance and antioxidative defense in hairy roots of the cadmium hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens*. *Biotechnol Bioeng*, 2003, **83**: 158–167.
- [4] Eapen S, Suseelan KN, Tivarekar S, *et al.* Potential for rhizofiltration of uranium using hairy root cultures of *Brassica juncea* and *Chenopodium amaranticolor*. *Environ Res*, 2003, **91**: 127–133.
- [5] Santos de Araujo S, Dec J, Bollag JM, *et al.* Uptake and transformation of phenol and chlorophenols by hairy root cultures of *Daucus carota*, *Ipomoea batatas* and *Solanum aviculare*. *Chemosphere*, 2006, **63**: 642–651.
- [6] Gonzalez PS, Capozucca CE, Tigier HA, *et al.* Phytoremediation of phenol from waste water by peroxidase of tomato hairy root cultures. *Enzy Microbial Technol*, 2006, **39**: 647–653.
- [7] Andersson A, Nillsson KO. Influence of lime and soil pH on Cd availability to plants. *Ambio*, 1974, **3**: 198–200.
- [8] Lu SY, Li YC, Guo ZF, *et al.* Enhancement of drought resistance of rice seedlings by calcium. *Chin J Rice Sci*, 1999, **13**(3): 161–164.
- [9] Li MR, Liu HX, Wang YR *et al.* Effect of calcium on the cold resistance of rice seedling. *Acta Phytophysiol Sin*, 1996, **22**(4): 379–384.
- [10] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*, 1962, **15**: 473–497.
- [11] Wu XF, Shi HP, Tsang PK Eric. Induction and *in vitro* culture of hairy roots of *Solanum nigrum* L. var pauciflorum Liou and its solasodine production. *J Mol Cell Biol*, 2008, **41**(3): 183–191.
- [12] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248–254.
- [13] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase, improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*, 1971, **44**: 276–287.
- [14] Zhang ZL, Zhai WJ. A Text-Manual for Plant Physiology. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press, 2003: 123–124.
- [15] Heath RL, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetic and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*, 1968, **125**: 189–198.
- [16] Qin TC, Wu YS, Wang HX, *et al.* Effect of cadmium, lead and their interactions on the physiological and ecological characteristics of root system of *Brassica chinensis*. *Acta Ecol Sin*, 1998, **18**(3): 320–325.
- [17] Kong XS, Guo XP, Zhang MX. Effect of cadmium stress on seedling growth and physiology chemistry of maize. *J Huazhong Agri Univ*, 1999, **18**(2): 111–113.
- [18] Wei SH, Zhou QX, Wang X, *et al.* A newly-found Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L.. *Chin Bull Sci*, 2004, **49**: 2568–2573.
- [19] Wang T, Guo Z, Ao YS. Effect of Cd stress on growth and

- Cd accumulation of *Solanum nigrum* L. seedlings. *J Shanghai Jiaotong Univ: Agri Sci*, 2009, **27**(3): 200–205.  
王涛, 郭智, 奥岩松. 镉对龙葵幼苗生长的影响及镉富集特征研究. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2009, **27**(3): 200–205.
- [20] Zeng XC, Xu YZ, Wang XQ, *et al.* Effects of cadmium stress on some physiological biochemical indexes of *Solanum alatum* Moench seedlings. *J Shenyang Agri Univ*, 2008, **39**(2): 240–242.  
曾秀存, 许耀照, 王晓琴, 等. 镉胁迫对红果龙葵幼苗生理生化的影响. 沈阳农业大学学报, 2008, **39**(2): 240–243.
- [21] Fornazier RF, Ferreira RR, Guilherme J, *et al.* Cadmium stress in sugar cane callus cultures: effect on antioxidant enzymes. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2002, **71**: 125–131.
- [22] Zhang Y, Shi HP, Tsang PK Eric. Influences of heavy metal Cd alone and in combination with Zn on the growth and activity of antioxidant enzymes of *Cucumis sativus* hairy roots. *Chin J Biotech*, 2009, **25**(1): 60–68.  
张艳, 施和平, 曾宝强. 重金属镉及其与锌组合对黄瓜毛状根生长及其抗氧化酶活性的影响. 生物工程学报, 2009, **25**(1): 60–68.
- [23] Zhou HW, Shi GX, Du KH, *et al.* Toxic effects of Cd<sup>2+</sup> pollution on the biochemical and physiological character and ultrastructure of *Alternanthera philoxeroides*. *Chin J Appl Ecol*, 2003, **14**(9): 1581–1584.  
周红卫, 施国新, 杜开和, 等. Cd<sup>2+</sup>污染对水花生生理生化及超微结构的影响. 应用生态学报, 2003, **14**(9): 1581–1584.
- [24] Nouairi I, Ammar WB, Youssef NB, *et al.* Antioxidant defense system in leaves of Indian mustard (*Brassica juncea*) and rape (*Brassica napus*) under cadmium stress. *Acta Physiol Plant*, 2009, **31**: 237–247.
- [25] Sun GW, Zhu ZJ, Fang XZ. Effects of different cadmium levels on the growth and antioxidant enzymes in *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino. *Acta Horticult Sin*, 2004, **31**(3): 378–380.  
孙光闻, 朱祝军, 方学智. 不同镉水平对白菜生长及抗氧化酶活性的影响. 园艺学报, 2004, **31**(3): 378–380.
- [26] He D, Liu YG, Huang YE, *et al.* Effects of calcium on chlorophyll and antioxidant enzymes in *Phragmites australis* under cadmium stress. *J Agro-Environ Sci*, 2007, **26**(1): 197–201.  
贺迪, 刘云国, 黄玉娥, 等. 钙对不同浓度镉胁迫下芦苇幼苗叶绿素及抗氧化酶系统的影响. 农业环境科学学报, 2007, **26**(1): 197–201.
- [27] Schickler H, Capsi H. Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. *Physiol Plant*, 1999, **105**: 39–44.
- [28] Elloumi N, Ben Abdallah F, Rhouma A, *et al.* Cadmium-induced growth inhibition and alteration of biochemical parameters in almond seedlings grown in solution culture. *Acta Physiol Plant*, 2007, **29**: 57–62.
- [29] Sanita di Toppi L, Lamberdi M, Pecchioni N, *et al.* Effects of cadmium stress on hairy root of *Dacus carota*. *J Plant Physiol*, 1999, **154**: 385–391.
- [30] Tripathi RD, Rai UN, Gupta M, *et al.* Cadmium transport in submerged macrophyte *Ceratophyllum demersum* L. in presence of various metabolic inhibitors and calcium channel blockers. *Chemosphere*, 1995, **31**(7): 3783–3791.
- [31] Xi YY, Guo DS, Song YX, *et al.* The effect of calcium, zinc on the contents of cadmium and lead in corn seedlings. *J Shanxi Univ: Nat Sci Ed*, 1994, **17**(1): 101–103.  
席玉英, 郭栋生, 宋玉仙, 等. 钙、锌对玉米幼苗吸收镉、铅的影响. 山西大学学报: 自然科学版, 1994, **17**(1): 101–103.
- [32] Song SQ, Jian WJ, Fu JR. Effect of Cd<sup>2+</sup> on seed vigor of *Zea mays* L. and antagonism of Ca<sup>2+</sup> to Cd<sup>2+</sup>. *Chin J Appl Environ Biol*, 1997, **2**(1): 1–5.  
宋松泉, 简伟军, 傅家瑞. Cd<sup>2+</sup>对玉米种子活力的影响及 Ca<sup>2+</sup>的拮抗作用. 应用与环境生物学报, 1997, **2**(1): 1–5.
- [33] Rivetta A, Negrini N, Cocucci M. Involvement of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin in Cd<sup>2+</sup> toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. *Plant Cell Environ*, 1997, **20**(5): 600–608.