

NO对铅胁迫下玉米根尖细胞的影响

武佳叶 郝瑞芝 曹媛 汪晓峰 宋涵 荆艳萍*

(北京林业大学生物科学与技术学院, 林木育种国家工程实验室,
林木花卉遗传育种教育部重点实验室, 北京 100083)

摘要 NO是很多植物对各种生物和非生物胁迫应答过程中一种关键的信号分子。该文以玉米根为材料, 研究了铅(Pb)胁迫对玉米根的影响, 并通过添加外源NO(SNP)和NO清除剂(cPTIO)探究NO在玉米根尖细胞应答Pb胁迫过程中的作用。结果表明: 一定浓度的Pb能抑制玉米根生长, 引起根尖细胞活力下降, 在Pb胁迫的玉米根尖细胞中可以检测到TUNEL阳性信号, 表明Pb可以导致玉米根尖细胞程序性死亡(PCD), 该过程伴随细胞中NO、ROS含量的升高。SNP能增强Pb引起的玉米根尖细胞中H₂O₂和O₂⁻·的积累, 而cPTIO作用则相反, 能降低Pb引起的玉米根尖细胞中ROS的积累并缓解细胞程序性死亡。上述结果说明, 在玉米根尖细胞中, Pb诱导产生的NO促进了活性氧积累, 在玉米根应答Pb胁迫过程中作为信号分子起重要作用。

关键词 Pb胁迫; 细胞程序性死亡(PCD); 一氧化氮(NO); 活性氧(ROS)

Influence of the Nitric Oxide on Root Tip Cells of Maize under Pb Stress

Wu Jiaye, Hao Ruizhi, Cao Yuan, Wang Xiaofeng, Song Han, Jing Yanping*

(College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University/National Engineering Laboratory for Tree Breeding, NDRC/Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants of Ministry of Education, Beijing 100083, China)

Abstract Nitric oxide (NO) is a key signal molecule involved in multiple plant responses to diverse biotic and abiotic stresses including lead. The root tip cells of maize (*Zea mays* L.) were used in this study to explore the effect of Pb and the endogenous nitric oxide (NO)/reactive oxygen species (ROS) concentration of cells under Pb stress. The role of NO on Pb tolerance in root tip cells of maize was investigated through supplement NO by sodium nitroprusside (SNP) or NO-specific scavenger 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide (cPTIO). In this work, different dosages of Pb inhibited root growth and caused decreased cell viability in maize. Positive TUNEL signals were also detected, suggesting that Pb induced programmed cell death in maize root tip cells. Pb toxicity was accompanied by an increase in NO and ROS levels. The elimination of NO by cPTIO led to a decrease of ROS and also an attenuation of Pb-induced root cell PCD. The supplement of NO by SNP led to an increase of H₂O₂ and O₂⁻· and also enhanced the inhibitory effect of lead on maize root growth, whereas the cPTIO alleviated this toxicity by reduced H₂O₂ and O₂⁻· concentration. The results showed that Pb-induced NO promoted an increase in ROS accumulation and contributed to PCD and inhibition of root growth in maize.

Key words Pb stress; programmed cell death(PCD); nitric oxide(NO); reactive oxygen species(ROS)

收稿日期: 2012-12-05 接受日期: 2013-01-15

林业公益性行业科研专项(批准号: 201104024)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-62338105, E-mail: ypjing@bjfu.edu.cn

Received: December 5, 2012 Accepted: January 15, 2013

This work was supported by the Special Project for Public-welfare Industry of Chinese Forestry (Grant No. 201104024)

*Corresponding author. Tel: +86-10-62338105, E-mail: ypjing@bjfu.edu.cn

网络出版时间: 2013-03-25 14:54 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130325.1454.002.html

重金属是全球环境污染的重要污染源。工业、农业、国防及各种各样的市政活动造成环境特别是土壤中大量有毒重金属污染物的积累^[1]。铅是最难控制的污染物之一,是一种生物体非必需元素,很难被降解。在铅污染的区域,它会在生物体内累积,影响植物根的生长^[2],破坏抗氧化系统和光合系统等^[3-5],而且还可以通过动物或者植物进入食物链,对人类健康造成重大威胁^[6]。

关于铅对植物体的毒害机理,目前尚不清楚。有研究表明,铅胁迫导致水稻根尖细胞中活性氧积累,活性氧与钙依赖蛋白激酶共同在铅诱导的水稻根尖细胞死亡过程中发挥作用^[7]。近年来,NO作为一种信号分子,被发现在很多植物应答各种生物和非生物胁迫过程中起关键作用^[8]。NO参与影响了重金属镉、砷以及锌的毒害作用^[9-11]。但关于NO在铅胁迫过程中的影响尚不清楚。本研究以玉米根尖细胞为材料,研究了铅胁迫对其产生的影响,以及信号分子NO在其中所起的作用,以期能为植物铅胁迫下的应答机制提供线索,为抗铅植物的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料培养与处理

选取饱满、大小均一的玉米(*Zea mays* L.)种子,用5%的次氯酸钠浸泡5 min进行表面杀菌,用蒸馏水洗净数次,置于放有湿润纱布的培养皿中,于28 °C恒温培养箱中培养萌发。选取萌发3天后长势一致的种子(根长约1.5 cm),分别以不同浓度的Pb(NO₃)₂ (0, 100, 500, 1 000 μmol/L)胁迫处理。

1.2 生长量测定

玉米种子萌发3天后,选取萌发长势一致的种子,进行根长的测定与记录,然后按1.1所述方法处理,在28 °C恒温培养箱中培养,分别在24 h、72 h时再次测量根长,计算出净生长量。采用SPSS 13.0软件统计分析,进行*t*检验(**P*<0.05, ***P*<0.01,下同)。每个浓度处理10个根,重复3次。

1.3 细胞活力的测定

细胞活力的测定参照Baker等^[12]的方法,用Evans blue染色,使用分光光度计进行定量检测。按1.1所述方法处理24 h,剪取尖端1 cm的部分,用0.25%(w/v) Evans blue水溶液在室温下染色15 min,蒸馏水冲洗三次,每次10 min。将根尖浸泡于N,N-二甲基甲酰胺(Sigma, USA)中,室温浸泡1 h。然后

用分光光度计(Unico UV-2100, USA)检测600 nm处的吸光值。用SPSS 13.0软件统计分析。每种处理10个根,重复3次。

1.4 原位末端转移酶标记技术(TUNEL)检测

收集处理后的玉米根尖,石蜡包埋,切片(10 μm)后使用TUNEL试剂盒(DeadEnd™ Colorimetric Apoptosis Detection System, Promega, USA)进行检测。参照说明书操作,阳性对照加入DNase I处理,阴性对照不加入rTDT缓冲液。100%甘油封片剂封片保存,指甲油封片,光学显微镜(Olympus BX51, Japan)观察拍照,每种处理15个根,用ImageJ软件和SPSS 13.0软件进行统计分析。

1.5 一氧化氮(NO)和活性氧(ROS)检测

用1 000 μmol/L Pb、1 000 μmol/L Pb+200 μmol/L cPTIO(碧云天生物技术研究所,江苏)分别处理萌发的玉米24 h后,收集根尖,分别用20 μmol/L DAF-FM DA(碧云天生物技术研究所)和20 μmol/L DCFH-DA(碧云天生物技术研究所)在37 °C孵育30 min, PBS(pH7.4)洗涤3次,488 nm波长激发,荧光显微镜(Olympus BX61, Japan)下分别观察NO和ROS的积累并拍照,每种处理至少选取15个根进行实验,用ImageJ软件和SPSS 13.0软件进行统计分析。

1.6 过氧化氢(H₂O₂)检测

用1 000 μmol/L Pb、1 000 μmol/L Pb+5 μmol/L SNP(碧云天生物技术研究所)、1 000 μmol/L Pb+20 μmol/L SNP、1 000 μmol/L Pb+100 μmol/L SNP、1 000 μmol/L Pb+200 μmol/L cPTIO分别处理萌发的玉米24 h后,收集根尖,按照过氧化氢检测试剂盒(碧云天生物技术研究所)说明操作。用酶标仪(Tecan Infinite M200, Switzerland)测定560 nm处的吸光值。根据标准曲线计算样品H₂O₂浓度。每组重复3次。

1.7 超氧阴离子(O₂⁻·)检测

用1 000 μmol/L Pb、1 000 μmol/L Pb+5 μmol/L SNP、1 000 μmol/L Pb+20 μmol/L SNP、1 000 μmol/L Pb+100 μmol/L SNP、1 000 μmol/L Pb+200 μmol/L cPTIO分别处理萌发的玉米24 h后,参照Xu等^[11]的方法,剪取根尖0.5 cm的部分,置于5 mL 2 mmol/L NBT(20 mmol/L PBS溶解)中染色20 min,吸去染色液用去离子水终止反应,取出根尖快速液氮研磨,加入1 mL 2 mol/L KOH-DMSO(1:1.16, V/V),12 000 r/min离心10 min,收集上清液,用酶标仪测定630 nm处的吸光值。根据标准曲线计算样品O₂⁻·浓度。每种处理10个根,重复3次。

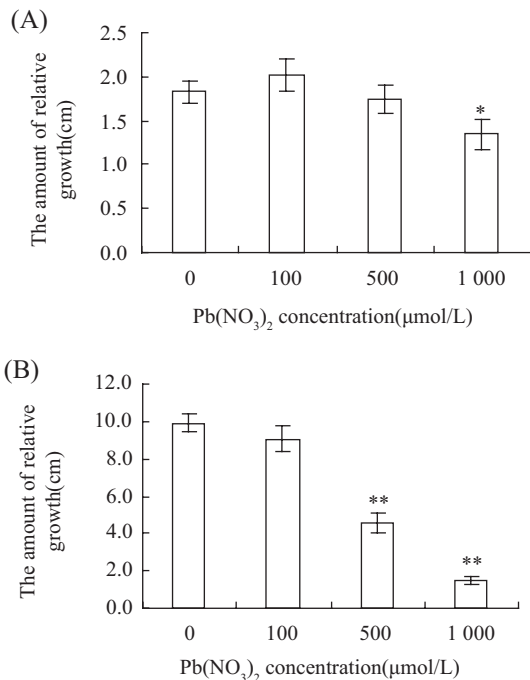
2 结果

2.1 Pb胁迫对玉米根与根尖细胞的影响

不同浓度的 $Pb(NO_3)_2$ (0, 100, 500, 1 000 $\mu mol/L$) 处理24 h和72 h后, 玉米根的生长量如图1所示, 除100 $\mu mol/L$ Pb胁迫24 h外, Pb对玉米根的生长均表现为抑制作用, 并且随着浓度的升高与处理时间的延长, Pb的抑制作用增强, 当浓度为1 000 $\mu mol/L$ 时, Pb胁迫24 h抑制作用显著($P<0.05$), 72 h抑制作用极

显著($P<0.01$)。

采用Evans blue染色法对Pb处理24 h后的玉米根尖细胞进行检测, 结果如图2所示, 随着Pb浓度的增加, D_{600} 增大, 说明Evans blue染色的细胞增多即玉米根尖细胞活力降低。当Pb浓度达到500 $\mu mol/L$ 和1 000 $\mu mol/L$ 时, 根尖细胞活力下降极显著, 表明Pb导致了玉米根尖细胞活力下降, 继而抑制了玉米根的生长。

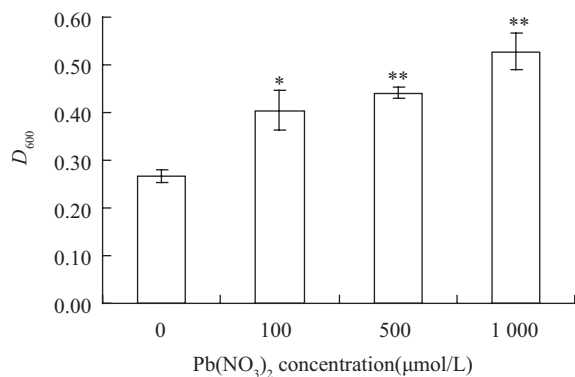


A、B分别为 $Pb(NO_3)_2$ 处理24 h、72 h后根的相对生长量。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A,B: effect of different concentrations of $Pb(NO_3)_2$ on the amount of relative growth of maize roots after 24 h or 72 h. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图1 不同浓度 $Pb(NO_3)_2$ 处理对玉米根生长的影响

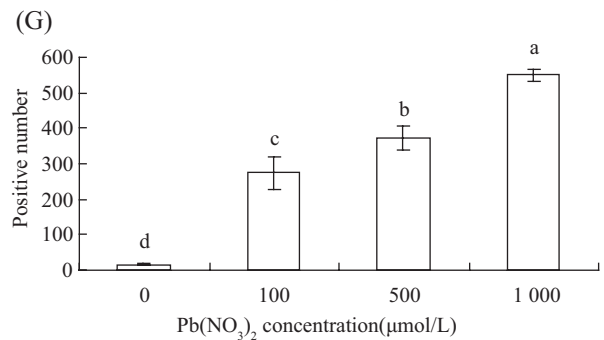
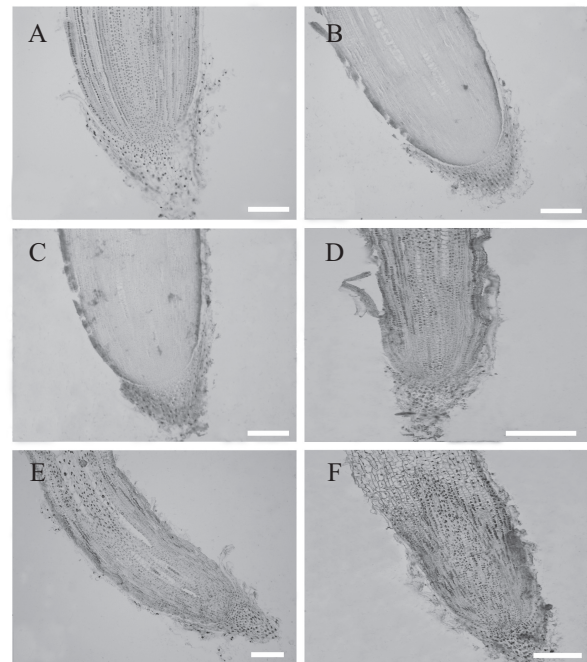
Fig.1 Effects of $Pb(NO_3)_2$ on maize root growth



* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图2 不同浓度 $Pb(NO_3)_2$ 对玉米根尖细胞活力的影响

Fig.2 Effects of $Pb(NO_3)_2$ on the viability of maize root cells



A: 阳性对照, 加入DNase I使DNA片段化; B: 阴性对照, 不加脱氧核糖核酸末端转移酶(rTdT); C-F: 0, 100, 500, 1 000 $\mu mol/L$ $Pb(NO_3)_2$ 处理24 h; G: 对不同浓度 $Pb(NO_3)_2$ 处理24 h后TUNEL检测结果的统计分析。标尺=200 μm 。不同字母表示差异具有显著性。

A: positive control, to which DNase I was added to fragment DNA; B: negative control, to which terminal deoxynucleotidyl transferase (rTdT) was not added, hence no DNA fragments can be detected; C: root cells untreated with $Pb(NO_3)_2$ showed no TUNEL signals. D-F: root cells treated with different concentrations of $Pb(NO_3)_2$ (100, 500, 1 000 $\mu mol/L$) showed TUNEL-positive signals. G: quantitative analysis of TUNEL positive cells. Bar=200 μm . Different alphabets show significant difference.

图3 玉米根尖细胞的TUNEL检测

Fig.3 Detection of DNA fragmentation by TUNEL

为了探究Pb诱导的玉米根尖细胞活力的下降是否通过了细胞程序性死亡途径,利用TUNEL试剂盒对不同浓度Pb处理24 h后的玉米根尖进行了检测。如图3所示,在对照无Pb处理的细胞中没有检测到明显的TUNEL阳性信号(图3C),随着Pb浓度的增加,玉米根尖细胞中阳性信号逐渐增加(图3D-3F),当Pb浓度达到1 000 $\mu\text{mol/L}$ 时,多数细胞核内都有阳性信号,表明细胞发生了程序性死亡(图3F)。对不同浓度Pb胁迫下玉米根中TUNEL阳性细胞进行统计分析(图3G),发现随着Pb浓度的增大,玉米根尖发生程序性死亡的细胞增加。

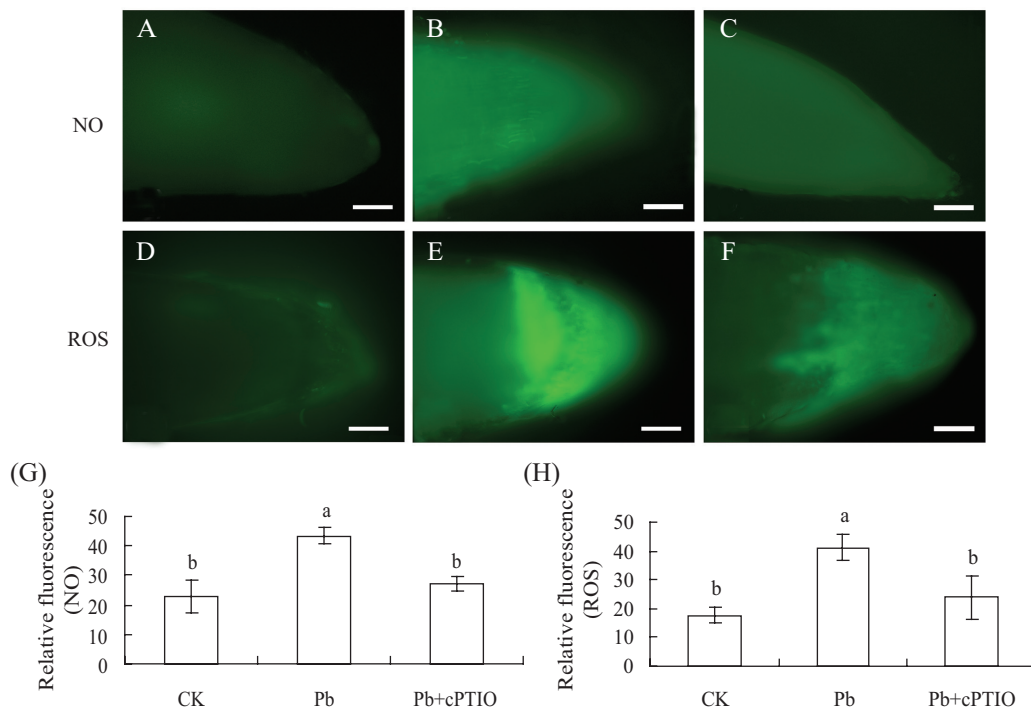
2.2 Pb胁迫过程中玉米根尖细胞NO和ROS的积累及NO清除剂的作用

许多研究表明,在细胞死亡过程中会伴随活性氧的产生,而NO作为一个信号分子,也被发现是植物应对镉、锌等重金属胁迫的关键信号分子^[11,13]。利用DAF-FM DA和DCFH-DA荧光探针对Pb胁迫下的玉米根尖进行染色,以确定Pb胁迫过程中是否也伴随有NO和ROS的积累。结果如图4所示,Pb胁迫

24 h后,细胞中可以检测到NO的荧光(图4B),而对照组细胞中始终没有明显的NO产生(图4A)。同样,在Pb胁迫24 h后,相比于未经Pb处理的对照组(图4D),可以在根尖细胞内检测到ROS的升高(图4E)。

NO和ROS可以相互作用和影响。为探究NO对Pb胁迫下玉米根尖细胞的影响,在Pb处理的同时,加入NO清除剂(cPTIO),与单独Pb处理相比(图4B),处理24 h后的玉米根尖细胞内NO荧光强度有所下降(图4C)。同时,细胞内ROS的含量与未加cPTIO相比(图4E),也有明显的下降(图4F)。不同处理条件下玉米根尖细胞中NO和ROS的积累统计如图4G、图4H,cPTIO不仅清除了部分Pb胁迫诱导产生的NO,同时也使Pb胁迫诱导产生的ROS减少,表明Pb诱导产生的NO可能增加了ROS的积累。

通过TUNEL试剂盒进一步检测了NO清除剂对于Pb胁迫下玉米根尖细胞程序性死亡的影响,发现当以200 $\mu\text{mol/L}$ cPTIO与1 000 $\mu\text{mol/L}$ Pb共同处理玉米根时,与单独1 000 $\mu\text{mol/L}$ Pb胁迫相比(图5B),协同处理24 h后玉米根尖细胞程序性死亡的程度明



A, D分别为对照组,未经 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 处理的玉米根尖NO、ROS荧光染色;B、E分别为 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (1 000 $\mu\text{mol/L}$)处理玉米根24 h后细胞内的NO、ROS荧光染色结果;C、F分别为 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (1 000 $\mu\text{mol/L}$)与cPTIO(200 $\mu\text{mol/L}$)共同处理玉米根24 h后细胞内的NO、ROS荧光染色结果;G、H分别为NO、ROS荧光的分析统计。标尺=200 μm 。a、b表示差异具有显著性。

A,D: the production of NO and ROS in root untreated with $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$; B,E: the production of NO and ROS after 24 h of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (1 000 $\mu\text{mol/L}$) treatments; C,F: the production of NO and ROS after 24 h of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (1 000 $\mu\text{mol/L}$) treatments in the presence of cPTIO (200 $\mu\text{mol/L}$); G: average relative NO fluorescence signal; H: average relative ROS fluorescence signal. Bar=200 μm . a and b show significant difference.

图4 玉米根 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫下NO和ROS的积累及NO清除剂的影响

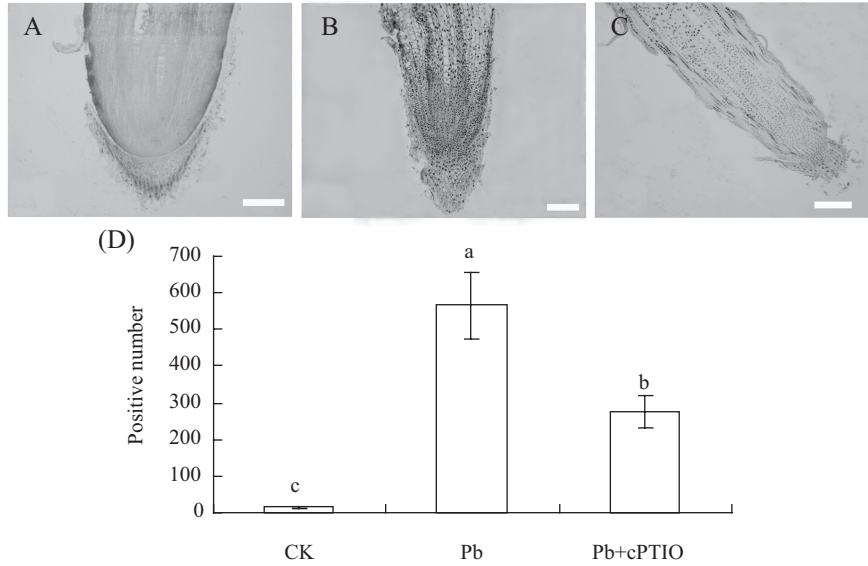
Fig.4 Pb-induced NO and ROS production in maize root tips and the effects of NO scavenger

显著减轻(图5C)。图5D为不同处理条件下玉米根尖TUNEL阳性细胞的统计结果。

2.3 NO对Pb胁迫下玉米根尖细胞ROS的影响

为了进一步确定NO对Pb胁迫下玉米根尖细胞中

ROS的影响, 在外源添加NO清除剂以及NO供体的情况下对玉米根尖细胞中 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 含量进行了测定。结果如图6所示: 1 000 $\mu\text{mol/L}$ Pb处理24 h后, 玉米根尖细胞中 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 的含量均明显比对照组升高, 不同

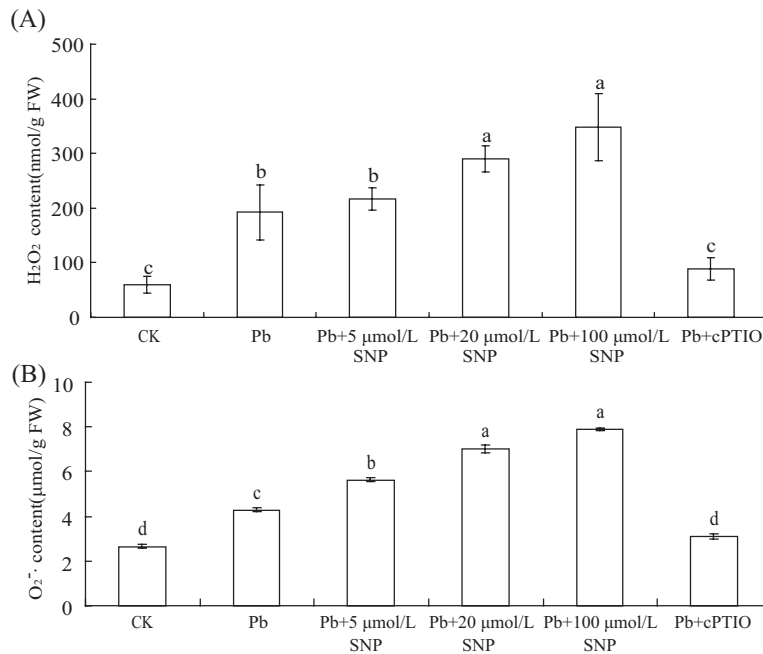


A: 对照组; B: $Pb(NO_3)_2$ (1 000 $\mu\text{mol/L}$)处理24 h; C: $Pb(NO_3)_2$ (1 000 $\mu\text{mol/L}$)+cPTIO(200 $\mu\text{mol/L}$)处理24 h; D: 不同处理条件下TUNEL阳性细胞统计分析。标尺=200 μm 。a、b表示差异具有显著性。

A: control; B: PCD detection of maize root tip cells after exposure for 24 h to $Pb(NO_3)_2$ (1 000 $\mu\text{mol/L}$); C: PCD detection of maize root tip cells after exposure for 24 h to $Pb(NO_3)_2$ (1 000 $\mu\text{mol/L}$)+cPTIO (200 $\mu\text{mol/L}$); D: quantitative analysis of TUNEL positive cells. Bar=200 μm . a and b show significant difference.

图5 NO清除剂对 $Pb(NO_3)_2$ 胁迫诱导的玉米根尖细胞程序性死亡的影响

Fig.5 The effects of NO scavenger on Pb-induced programmed cell death in maize root tips

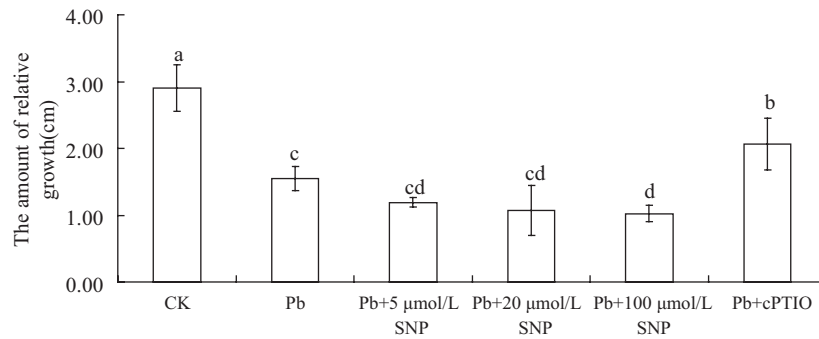


不同字母表示差异具有显著性。

Different alphabets show significant difference.

图6 NO对 $Pb(NO_3)_2$ 胁迫下玉米根尖细胞 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 的影响

Fig.6 The effect of NO on H_2O_2 and $O_2^{\cdot-}$ production in maize roots exposed to $Pb(NO_3)_2$



不同字母表示差异具有显著性。

Different alphabets show significant difference.

图7 NO对Pb(NO₃)₂胁迫下玉米根生长的影响

Fig.7 The effect of NO on relative growth of maize roots under Pb(NO₃)₂ stress

浓度的NO供体(SNP)增加了Pb诱导的玉米根尖细胞中H₂O₂和O₂^{-·}的含量。低浓度SNP(5 μmol/L)使Pb诱导的玉米根尖细胞中O₂^{-·}含量显著增加, H₂O₂含量增加但不显著; 较高浓度的SNP(20 μmol/L和100 μmol/L)使Pb诱导的玉米根尖细胞中H₂O₂和O₂^{-·}含量均显著增加。而NO的清除(cPTIO)则显著降低了Pb诱导的玉米根尖细胞中H₂O₂和O₂^{-·}的积累。

通过对玉米根生长量的测量, 发现SNP增强了Pb对玉米根生长的抑制作用, 且SNP浓度达到100 μmol/L时, 抑制作用增强显著, 而NO的清除(cPTIO)则缓解了Pb对玉米根生长的抑制作用, 但此时玉米根生长量仍然小于未经Pb处理的对照组(图7)。

3 讨论

玉米根受100~1 000 μmol/L Pb胁迫后表现为生长抑制(图1), 细胞活力下降(图2), 表明Pb胁迫导致了玉米根尖细胞的死亡。细胞死亡的发生有两种可能的途径: 细胞坏死和细胞程序性死亡。研究认为在重金属胁迫植物细胞死亡的过程中两种途径都有发生^[14-15]。对100~1 000 μmol/L Pb胁迫后的玉米根尖细胞进行TUNEL检测, 均观察到了TUNEL阳性结果(图3), 说明一定浓度的Pb胁迫诱导了玉米根尖细胞的PCD, 降低了细胞活力, 引发了生长抑制。

NO和ROS是植物细胞应答胁迫反应中起关键作用的两种信号分子^[16]。研究表明, ROS升高是细胞死亡发生的必要条件^[17-18], 胁迫诱导ROS的增高, 又进而导致了细胞的PCD^[7,19]。许多证据表明, 信号分子NO在植物应答Cd、As等重金属胁迫过程中发挥了重要的作用^[10,13], 这些重金属诱导ROS增加的同时伴随有NO的合成^[20]。本研究中, 通过NO

和ROS特异性的荧光探针, 分别检测到了Pb胁迫下玉米根尖细胞中NO和ROS的积累(图4), 表明NO和ROS均参与了玉米根应答重金属Pb胁迫的过程。

许多研究认为, NO信号途径与ROS系统间存在明显的相互作用与影响, NO和ROS之间的相互作用是植物细胞死亡的真正原因^[17]。NO具有抗氧化性, 可以作为抗氧化剂通过清除活性氧, 保护植物避免活性氧造成的氧化损伤^[13,21]; 然而也有一些报道认为NO可能通过调节NADPH氧化酶(NOX)的活性和抗氧化酶活性, 使ROS积累^[11], 从而能够与ROS共同作用, 促进细胞的死亡^[22-23]。本研究中, NO清除剂不仅可以降低Pb胁迫下玉米根细胞中NO的积累, 而且可以明显降低ROS的含量(图4), 同时, 缓解了Pb胁迫诱导的玉米根尖细胞的程序性死亡(图5)。这与Zn胁迫诱导龙葵细胞程序性死亡的报道一致^[11]。ROS包括H₂O₂、O₂^{-·}和·OH等^[24], 在外源NO供体(SNP)以及NO清除剂(cPTIO)与Pb的协同处理中, 对玉米根尖H₂O₂和O₂^{-·}的含量进行了定量分析, 结果显示不同浓度的SNP均加速了Pb胁迫下H₂O₂和O₂^{-·}的积累, 且SNP的浓度越高, Pb胁迫下H₂O₂和O₂^{-·}的积累越多。cPTIO则抑制了铅胁迫下玉米根中H₂O₂和O₂^{-·}含量的增加(图6), Pb对玉米根生长的抑制作用在外源NO存在下大大增强, 而在NO清除剂存在时有所缓解(图7)。上述结果进一步说明Pb胁迫产生的NO可能是ROS积累的一个原因, 两者共同参与诱导了玉米根尖细胞程序性死亡, 继而抑制了玉米根生长。但关于NO如何促进了ROS的产生以及NO和ROS互作并引发细胞程序性死亡的机制仍需进一步深入研究。

参考文献 (References)

- 1 Meagher BR, Heaton AC. Strategies for the engineered phyto-remediation of toxic element pollution: Mercury and arsenic. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2005; 32(11/12): 502-13.
- 2 Kozhevnikova AD, Seregin IV, Bystrova EI, Belyaeva AI, Kataeva MN, Ivanov VB. The Effects of lead, nickel, and strontium nitrates on cell division and elongation in maize roots. *Russ J Plant Physiol* 2009; 56(2): 268-77.
- 3 Kastori R, Plesnicar M, Sakac Z, Pankovic D, Arsenijevic-Maksimovic I. Effect of excess lead on sunflower growth and photosynthesis. *J Plant Nutr* 1998; 21(1): 75-85.
- 4 Verma S, Dubey RS. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci* 2003; 164(4): 645-55.
- 5 Lombardi L, Sebastiani L. Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: Growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. *Plant Sci* 2005; 168(3): 797-802.
- 6 张英, 周长民. 重金属铅污染对人体的危害. 辽宁化工(Zhang Ying, Zhou Changmin. Hazards of Pb Pollution to Health. Liaoning Chemical Industry) 2007; 36(6): 395-7.
- 7 Huang T, Huang H. ROS and CDPK-like kinase-mediated activation of MAP kinase in rice roots exposed to lead. *Chemosphere* 2008; 71(7): 1377-85.
- 8 史庆华, 赖齐贤, 朱祝军, 钱琼秋. 一氧化氮在植物中的生理功能. 细胞生物学杂志(Shi Qinghua, Lai Qixian, Zhu Zhujun, Qian Qionqiu. Physiological function of nitric oxide in higher plant. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2005; 27(1): 39-42.
- 9 Xiong J, Fu G, Tao L, Zhu C. Roles of nitric oxide in alleviating heavy metal toxicity in plants. *Arch Biochem Biophys* 2010; 497(1/2): 13-20.
- 10 Singh HP, Kaur S, Batish DR, Sharma VP, Sharma N, Kohli RK. Nitric oxide alleviates arsenic toxicity by reducing oxidative damage in the roots of *Oryza sativa*(rice). *Nitric Oxide* 2009; 20(4): 289-97.
- 11 Xu J, Yin H, Li Y, Liu X. Nitric oxide is associated with long-term zinc tolerance in *Solanum nigrum*. *Plant Physiol* 2010; 154(3): 1319-34.
- 12 Baker CJ, Mock NM. An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using Evans blue. *Plant Cell Tiss Org Cult* 1994; 39(1): 7-12.
- 13 Singh HP, Batish DR, Kaur G, Arora K, Kohli RK. Nitric oxide(as sodium nitroprusside) supplementation ameliorates Cd toxicity in hydroponically grown wheat roots. *Environ Exp Bot* 2008; 63(1/2/3): 158-67.
- 14 Behboodi BS, Samadi L. Detection of apoptotic bodies and oligonucleosomal DNA fragments in cadmium-treated root apical cells of *Allium cepa* Linnaeus. *Plant Sci* 2004; 167(3): 411-6.
- 15 Garnier L, Simonplais F, Thuleau P, Agnel J, Blein JP, Ranjeve R, et al. Cadmium affects tobacco cells by a series of three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity. *Plant Cell Environ* 2006; 29(10): 1956-69.
- 16 Wilkins KA, Bancroft J, Bosch M, Ings J, Smirnov N, Franklin-Tong VE. Reactive oxygen species and nitric oxide mediate actin reorganization and programmed cell death in the self-incompatibility response of *Papaver*. *Plant Physiol* 2011; 156(1): 404-16.
- 17 Zhao J. Interplay among nitric oxide and reactive oxygen species: A complex network determining cell survival or death. *Plant Signal Behav* 2007; 2(6): 544-7.
- 18 Breusegem FV, Dat JF. Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiol* 2006; 141(2): 384-90.
- 19 Duan Y, Zhang W, Li B, Wang Y, Li K, Sodmergen, et al. An endoplasmic reticulum response pathway mediates programmed cell death of root tip induced by water stress in *Arabidopsis*. *New Phytol* 2010; 186(3): 681-95.
- 20 Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants. *J Exp Bot* 2002; 53(372): 1237-47.
- 21 Laspina NV, Groppa MD, Tomaro ML, Benavides MP. Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. *Plant Sci* 2005; 69(2): 323-30.
- 22 de Pinto MC, Tommasi F, Gara LD. Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco Bright-Yellow 2 cells. *Plant Physiol* 2002; 130(2): 698-708.
- 23 Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(23): 13454-9.
- 24 Molassiotis A, Fotopoulos V. Oxidative and nitrosative signaling in plants: Two branches in the same tree? *Plant Signal Behav* 2011; 6(2): 210-4.