

刘海涛, 王曦, 刘玲, 高彦花, 母丹平, 陈玉笛. 羧基化多壁碳纳米管、混合盐及其复合胁迫对水稻幼苗生理特性的影响[J]. 植物科学学报, 2019, 37(4): 540~550

Liu HT, Wang X, Liu L, Gao YH, Mu DP, Chen YD. Effects of carboxylated multi-walled carbon nanotubes, mixed salt, and their combination on physiological characteristics of *Oryza sativa* seedlings[J]. *Plant Science Journal*, 2019, 37(4): 540~550

## 羧基化多壁碳纳米管、混合盐及其复合胁迫对水稻幼苗生理特性的影响

刘海涛<sup>1,2\*</sup>, 王曦<sup>3</sup>, 刘玲<sup>1</sup>, 高彦花<sup>1</sup>, 母丹平<sup>1</sup>, 陈玉笛<sup>1</sup>

(1. 淮南师范学院生物工程学院, 安徽淮南 232038; 2. 资源与环境生物技术安徽普通高校重点实验室, 安徽淮南 232038; 3. 淮南市政园林管理局, 安徽淮南 232001)

**摘要:** 将水稻(*Oryza sativa* L.)幼苗悬浮培养于含有羧基化多壁碳纳米管MWCNTs-COOH(0、2.5、5.0、10.0 mg/L)、50 mmol/L混合盐(1NaCl:9Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:9NaHCO<sub>3</sub>:1Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)，以及MWCNTs-COOH+混合盐的复合溶液中，10 d后检测叶片生理生化指标变化，研究MWCNTs-COOH复合盐碱胁迫对水稻幼苗的毒性及生态风险。结果显示，与对照组相比，MWCNTs-COOH单一组诱导下水稻叶片O<sub>2</sub><sup>-</sup>和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的产生不明显，而混合盐组和混合盐+MWCNTs-COOH复合组均诱导了O<sub>2</sub><sup>-</sup>和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产物的大量累积。MWCNTs-COOH与混合盐复合后，加剧了O<sub>2</sub><sup>-</sup>和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的累积，并有明显的浓度效应。活性氧(ROS)作为信号分子在一定程度上诱导了各处理组部分抗氧化酶(SOD、CAT、POD、APX)活性的升高；与混合盐组相比，低浓度混合盐+MWCNTs-COOH复合组中叶绿素a和胡萝卜素含量呈一定程度的升高；MWCNTs-COOH与混合盐复合后，抑制了叶片中可溶性糖(SS)和脯氨酸(Pro)的合成，致使相对电导率(REC)和丙二醛(MDA)含量显著升高。上述抗氧化酶活性及叶绿素a和胡萝卜素含量的升高对缓解水稻叶片氧化损伤、维持正常的光合电子传递及对过剩光能的热耗散是有益的，是水稻幼苗重要的防御机制。本研究表明MWCNTs-COOH单一处理在一定程度上诱导了水稻叶片的氧化胁迫和应激响应，与混合盐复合后加剧了叶片的氧化胁迫和应激损伤。

**关键词:** 水稻；羧基化多壁碳纳米管；盐碱胁迫；氧化损伤；抗氧化酶；渗透调节；叶绿体色素

**中图分类号:** Q945.78

**文献标识码:** A

**文章编号:** 2095-0837(2019)04-0540-11

**DOI:** 10.11913/PSJ.2095-0837.2019.40540

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



## Effects of carboxylated multi-walled carbon nanotubes, mixed salt, and their combination on physiological characteristics of *Oryza sativa* seedlings

Liu Hai-Tao<sup>1,2\*</sup>, Wang Xi<sup>3</sup>, Liu Ling<sup>1</sup>, Gao Yan-Hua<sup>1</sup>, Mu Dan-Ping<sup>1</sup>, Chen Yu-Di<sup>1</sup>

(1. School of Biological Engineering, Huainan Normal University, Huainan, Anhui 232038, China; 2. Key Laboratory of Bioresource and Environmental Biotechnology of Anhui Higher Education Institutes, Huainan, Anhui 232038, China; 3. Huainan Municipal Gardening Administration Bureau, Huainan, Anhui 232001, China)

**Abstract:** Rice (*Oryza sativa* L.) seedlings were hydroponically cultivated in different concentrations

收稿日期: 2019-01-08, 退修日期: 2019-01-21。

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(1608085QC50); 安徽省高校优秀青年人才支持计划(gxyq2019078); 安徽省高校优秀中青年骨干人才国内外访学研修重点项目(gxfxZD2016202); 淮南市科技计划项目(2018A29); 淮南师范学院博士基金项目(51306)。

This work was supported by grants from the Natural Science Foundation of Anhui Province (1608085QC50), Program for Outstanding Young Talents in the University of Anhui Province (gxyq2019078), Domestic or Foreign Visiting and Studying Key Program of the Young and Middle-Aged Backbone Teachers for Higher Education Institutions from the Education Bureau of Anhui Province (gxfxZD2016202), Science and Technology Program of Huainan City(2018A29), and Science Research Foundation for Doctors of Huainan Normal University (51306).

作者简介: 刘海涛(1983-), 男, 讲师, 博士, 研究方向为污染生态学与植物逆境生理(E-mail: forest\_lau@163.com)。

\* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: forest\_lau@163.com)。

of carboxylated multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs-COOH) (0, 2.5, 5.0, and 10.0 mg/L), 50 mmol/L mixed salt (1NaCl : 9Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 9NaHCO<sub>3</sub> : 1Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), and mixed salt + MWCNTs-COOH for 10 d, respectively. Several physiological and biochemical parameters were then determined to investigate the phytotoxicity and ecotoxicological risks of MWCNTs-COOH and joint exposure with mixed salt on the seedling leaves. Results showed that reactive oxygen species (ROS), including superoxide radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), were induced non-significantly by single MWCNTs-COOH treatment compared with the control. However, O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were overproduced in the mixed salt treatment group and in the combined treatment group. Mixed salt combined with MWCNTs-COOH aggravated the accumulation of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, with obvious concentration effects. As signaling molecules, ROS enhanced, at least to some extent, the total activities of antioxidant enzymes (i. e., SOD, CAT, POD, and APX) in the different treatment groups. The contents of chlorophyll-a and carotene somewhat increased under low concentration combined treatment compared with mixed salt treatment. After combination with mixed salt, the synthesis of soluble sugar and proline were inhibited, whereas the relative electrical conductivity and production of malondialdehyde (MDA) were significantly enhanced. The increased activity of antioxidant enzymes and production of chlorophyll-a and carotene are likely crucial defense mechanisms, which are beneficial for the alleviation of oxidative stress and damage, as well as for the maintenance of photosynthetic electron transport and thermal dissipation of excessive light energy in *O. sativa* seedlings. This study demonstrated that single MWCNTs-COOH treatment caused a certain level of oxidative stress and defense response in the leaves of *O. sativa* seedlings; furthermore, combined MWCNTs-COOH and mixed salt treatment aggravated oxidative stress and damage.

**Key words:** *Oryza sativa*; Carboxylated multi-walled carbon nanotubes; Saline-alkali stress; Oxidative damage; Antioxidant enzymes; Osmotic adjustment; Chloroplast pigment

作物生长发育过程中会受到多种非生物逆境胁迫的影响, 土壤盐渍化是农业生产中常见的逆境胁迫之一<sup>[1]</sup>。当土壤表层或亚表层中水溶性盐类超过0.1% (或在富含石膏的情况下超过0.2%) 就属于盐碱化土壤。据联合国教科文组织(United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, UNESCO) 和粮农组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) 不完全统计, 全世界盐碱地面积约为 $9.54 \times 10^8 \text{ hm}^2$ , 土壤的盐渍化严重制约了现代农业的发展<sup>[2]</sup>。目前, 中国各类盐碱地面积已达 $9.91 \times 10^7 \text{ hm}^2$ <sup>[3]</sup>, 且由于工业污染的影响、化肥的大量使用及灌溉方式的不合理, 次生盐渍化土地面积还在不断增加。中国的耕地面积为 $1.35 \times 10^8 \text{ hm}^2$ <sup>[4]</sup>, 而盐碱地中具有农业利用潜力的面积约为 $1.33 \times 10^7 \text{ hm}^2$ , 占我国耕地面积的近10%<sup>[5]</sup>。因此, 如能合理有效地利用盐碱地, 扩大农作物种植面积, 不仅可以增加粮

食产量, 对生态环境的改善也会起到积极作用。以往的研究表明, 水稻的耐盐碱性较强, 多数水稻品种可耐受0.2%的含盐量, “海水稻”甚至在含盐量为0.6%的情况下仍能正常生长, 种植水稻是改良盐碱地的有效措施<sup>[6, 7]</sup>。在盐碱地中种植水稻可达到“以水洗盐”、“以稻治碱”的效果, 加快盐碱土的脱盐与有机质的累积, 从而实现对盐碱土的改良利用<sup>[5, 8]</sup>。

碳纳米管(CNTs)是当前广泛应用的新型工程纳米材料<sup>[9]</sup>。通常, 根据CNTs所含石墨烯片的层数可将其分为单壁碳纳米管(SWCNTs)和多壁碳纳米管(MWCNTs)。相对于SWCNTs, MWCNTs更容易制取且用途更为广泛。在CNTs开发、生产和应用的过程中, 不可忽视的是其环境释放问题及潜在的环境和生态风险<sup>[10]</sup>。已有研究表明, CNTs释放进入环境后会诱发植物的毒性效应, 如Awad等<sup>[11]</sup>评估了砷、铅和CNTs对大白菜(*Brassica* <http://www.plantscience.cn>)

*rapa* L. ssp. *pekinensis*)的毒性,结果发现CNTs的毒性最强,且CNTs主要聚集在大白菜的根和叶片中;Sohn等<sup>[12]</sup>以小球藻(*Chlorella vulgaris* M. Beijerinck)和羊角月牙藻(*Raphidocelis subcapitata* (Korshikov.) Nygaard)为测试对象研究了SWCNTs的急性水生生物毒性,结果发现小球藻和羊角月牙藻的半数效应浓度分别为30.96 mg/L和29.99 mg/L,在此浓度条件下,供试藻类的生长被严重抑制;Tan等<sup>[13]</sup>研究了MWCNTs对水稻(*Oryza sativa* L.)悬浮细胞的毒性效应,结果表明在培养基中加入MWCNTs后,水稻细胞的活性急剧降低、活性氧(ROS)大量产生。在CNTs的环境释放过程中,其不可避免的会进入到盐碱地中去,使本身已很脆弱的生态环境面临更加复杂和严峻的挑战。在盐碱地的生物修复过程中,植物是关键的组成部分<sup>[14]</sup>。已有证据表明,碳纳米材料可以进入植物细胞,植物对CNTs存在潜在的生物累积效应<sup>[11, 15, 16]</sup>。Ghosh等<sup>[15]</sup>研究了MWCNTs对洋葱(*Allium cepa* L.)的影响,发现MWCNTs可进入洋葱根部细胞,显著地改变了洋葱根部的形态,破坏了根部细胞膜的完整性,削弱了线粒体的功能,并导致严重的DNA损伤;Hao等<sup>[16]</sup>研究了CNTs对水稻幼苗的植物毒性,发现CNTs可降低水稻内源激素的合成,抑制植株的生长发育,穿透水稻根部细胞壁和细胞膜进入根细胞内部,抑制根部细胞对氮元素的吸收并增加碳氮比。因此,在利用水稻对盐碱地进行改良时,释放进入环境中的CNTs亦会进入盐碱地中,在CNTs与盐碱胁迫复合的环境中,外源CNTs侵入是否会影响盐碱胁迫本身对水稻植株的离子毒害、渗透胁迫等作用是一个值得深入探讨的问题。然而,目前国内外有关CNTs复合盐碱胁迫对植物(包括水稻)毒性及生态风险性研究评价还鲜见报道。鉴于此,本研究以水稻幼苗作为实验对象,选取混合盐(1NaCl:9Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:9NaHCO<sub>3</sub>:1Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)作为典型盐碱条件,探究水稻幼苗暴露于MWCNTs-COOH、混合盐、混合盐+MWCNTs-COOH 3种水培溶液一定时间后其叶片组织活性氧(ROS)、抗氧化酶活性、叶绿体色素、可溶性糖(SS)、脯氨酸(Pro)、相对电导率(REC)以及丙二醛(MDA)等生理生化指标的变化,以期为早期诊断和科学评价MWCNTs-COOH与盐碱复合后的生态风险提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 MWCNTs-COOH 属性的表征

MWCNTs-COOH(纯度w>95%;羧基质量分数w为2.56%;内径范围3~5 nm;外径范围8~15 nm;长度0.5~50 μm;比表面积233 m<sup>2</sup>/g;灰分w<1.5%;电导率>100 s/m)购自中国科学院成都有机化学研究所。使用前对其进行6次间歇式超声萃取处理(30 s/2 min),并利用透射电子显微镜(TEM)(JEM-100CX,日本)对样品进行表征。在透射电子显微镜下MWCNTs-COOH呈管状结构,直径为(8.97±1.25) nm(图1)。

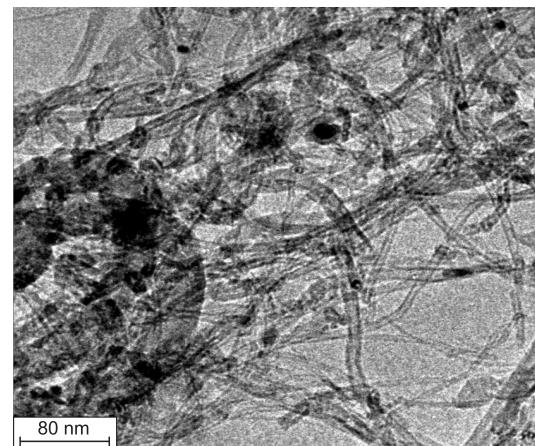


图1 MWCNTs-COOH 的透射电镜图  
Fig. 1 TEM image of MWCNTs-COOH

### 1.2 水稻幼苗的培养与处理

以水稻(*Oryza sativa* L.)Y两优9826(国审稻20170026)种子为材料,该杂交种具有生育期适宜、高产稳定、抗病性较强、米质优良、适应性广等特点。种子用φ=0.1%次氯酸钠溶液浸种10 min后用Milli-Q水充分漂洗,30℃左右的温水浸种36 h,再转移至26℃人工气候培养箱内催芽。种子萌发后筛选芽长5 mm左右的幼苗,悬浮培养于水稻专用营养液中<sup>[17]</sup>,待幼苗长至3叶1心时进行处理。实验设置8个处理组:对照组(CK,营养液)、2.5 mg/L MWCNTs-COOH(以下简称2.5)、5.0 mg/L MWCNTs-COOH(以下简称5.0)、10.0 mg/L MWCNTs-COOH(以下简称10.0)、50 mmol/L混合盐(1NaCl:9Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:9NaHCO<sub>3</sub>:1Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,以下简称混合盐)、混合盐+2.5 mg/L MWCNTs-COOH(以下简称混合盐+2.5)、混合盐+5.0 mg/L MWCNTs-COOH

(以下简称混合盐 + 5.0)、混合盐 + 10.0 mg/L MWCNTs-COOH(以下简称混合盐 + 10.0)。制备 MWCNTs-COOH 和混合盐母液, 用水稻专用营养液稀释母液, 制备上述各实验处理组溶液, Zeta 电位控制在( $-10.92 \pm 1.09$ ) mV。每处理组准备 4 个水槽(长  $\times$  宽  $\times$  高 = 40 cm  $\times$  30 cm  $\times$  15 cm), 每个水槽悬浮培养 18 株幼苗。培养条件为: 白天 15 h, 28°C, 光照强度 300  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ; 夜晚 9 h, 20°C, 相对湿度为 60% ~ 70%。各处理组每 3 d 更换 1 次溶液, 幼苗处理 10 d 后取适量等位叶片进行各生理生化指标测定。

### 1.3 指标测定与方法

#### 1.3.1 超氧阴离子( $\text{O}_2^-$ )产生速率和过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )含量测定

$\text{O}_2^-$ 产生速率参考 Tian 等<sup>[18]</sup>的方法。 $\text{H}_2\text{O}_2$ 含量测定采用  $\text{TiCl}_4$  沉淀法<sup>[19]</sup>。

#### 1.3.2 四种抗氧化酶活性测定

超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用 Giannopolitis 等<sup>[20, 21]</sup>的方法, 以 1 h 内 SOD 酶抑制氮蓝四唑(NBT)光还原相对百分率为 50%时所需的酶液量作为 1 个酶活力单位(U)。过氧化氢酶(CAT)活性测定采用 Aebi<sup>[22]</sup>的方法, 以 1 min 内  $\text{OD}_{240}$  变化 0.1 所需的酶液量作为 1 个酶活力单位(U)。过氧化物酶(POD)活性测定采用李合生等<sup>[23]</sup>的方法, 以 1 s 内  $\text{OD}_{470}$  变化 0.01 所需的酶液量作为 1 个酶活力单位(U)。抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性测定采用张以顺等<sup>[24]</sup>的方法, 以 1 s 内  $\text{OD}_{290}$  变化 0.01

所需的酶液量作为 1 个酶活力单位(U)。

#### 1.3.3 叶绿体色素含量测定

叶绿体色素含量测定采用分光光度法<sup>[24]</sup>。利用 95% 乙醇提取色素, 分别测定 665、649、470 nm 处的 OD 值, 计算叶绿素 a、叶绿素 b 和胡萝卜素含量。

#### 1.3.4 可溶性糖(SS)和脯氨酸(Pro)含量测定

采用蒽酮比色法测定 SS 含量<sup>[23]</sup>, 酸性茚三酮显色法测定游离 Pro 含量<sup>[23]</sup>。

#### 1.3.5 细胞质膜透性和膜脂过氧化产物测定

细胞质膜透性测定采用相对电导率法<sup>[25]</sup>。MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法<sup>[26]</sup>。

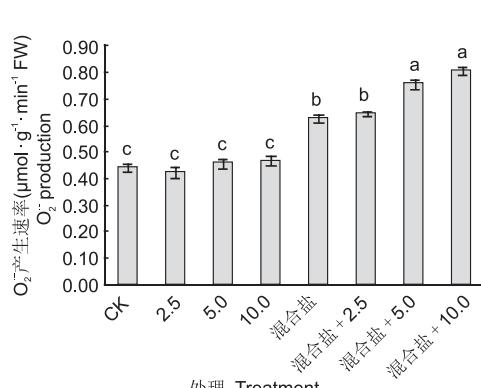
### 1.4 数据分析

采用 SPSS 19.0 统计分析软件进行数据处理与分析, 用单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行数据间的差异显著性检验, 若差异显著( $P < 0.05$ ), 采用 LSD 法进行多重比较。用 Excel 2010 软件作图。

## 2 结果与分析

#### 2.1 $\text{O}_2^-$ 产生速率和 $\text{H}_2\text{O}_2$ 含量的变化

水稻幼苗的实验结果显示(图 2), 与对照相比, MWCNTs-COOH 单一组  $\text{O}_2^-$  离子产生速率呈先略微降低后升高的趋势, 但各处理组间差异不显著( $P > 0.05$ );  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量呈增加趋势, 其中 5.0 ~ 10.0 mg/L MWCNTs-COOH 单一组的  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量积累显著( $P < 0.05$ )。



CK 为对照; 2.5、5.0、10.0 分别表示 2.5、5.0、10.0 mg/L MWCNTs-COOH; 混合盐表示 50 mmol/L 混合盐。图中不同小写字母表示各处理间在  $P < 0.05$  水平上差异显著。下同。

CK, 2.5, 5.0, and 10.0 represent control, 2.5, 5.0, and 10.0 mg/L MWCNTs-COOH, respectively; Complex saline: 50 mmol/L. Different lowercase letters indicate significant differences among different treatments at  $P < 0.05$ . Same below.

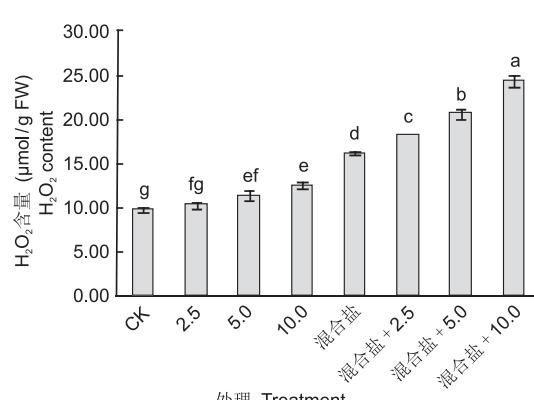


图 2 水稻叶片组织超氧自由基( $\text{O}_2^-$ )产生速率和过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )含量变化

Fig. 2 Changes in  $\text{O}_2^-$  production and  $\text{H}_2\text{O}_2$  content in leaves of *Oryza sativa*

© Plant Science Journal

<http://www.plantscience.cn>

与混合盐处理组相比, 混合盐 + MWCNTs-COOH 复合组的  $O_2^-$  离子产生速率和  $H_2O_2$  含量始终呈增加趋势, 其中 5.0 ~ 10.0 mg/L 混合盐 + MWCNTs-COOH 组  $O_2^-$  离子产生速率显著升高 ( $P < 0.05$ ) ; 2.5 ~ 10.0 mg/L 混合盐 + MWCNTs-COOH 组  $H_2O_2$  含量积累显著 ( $P < 0.05$ )。

混合盐 + MWCNTs-COOH 复合组与 MWCNTs-COOH 单一组相比,  $O_2^-$  离子产生速率和  $H_2O_2$  含量在各浓度 MWCNTs-COOH 条件下均高于单一组, 且差异显著 ( $P < 0.05$ )。

## 2.2 四种抗氧化酶活性的变化

抗氧化酶活性实验结果显示(图3), 与对照组相比, MWCNTs-COOH 单一组 SOD 酶活性呈略微降低趋势, CAT 酶活性呈先降低后升高的趋势, 各单一组 SOD 和 CAT 酶活性与对照组间均无显著差异 ( $P > 0.05$ ) ; POD 和 APX 酶活性呈先降低后升高再降低的趋势, 其中, 2.5 mg/L 和 10.0 mg/L MWCNTs-COOH 单一组 POD 和 APX 酶活性显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )。

与混合盐处理组相比, 混合盐 + MWCNTs-

COOH 复合组 SOD、CAT 和 APX 酶活性均呈先升高后降低的趋势, 其中, 2.5 mg/L 混合盐 + MWCNTs-COOH 组 SOD 酶活性显著高于混合盐处理组 ( $P < 0.05$ ) , 2.5 ~ 5.0 mg/L 混合盐 + MWCNTs-COOH 组 CAT 酶活性显著高于混合盐处理组 ( $P < 0.05$ ) , 5.0 ~ 10.0 mg/L 混合盐 + MWCNTs-COOH 组 APX 酶活性显著低于混合盐处理组 ( $P < 0.05$ )。POD 酶活性呈降低趋势, 其中, 5.0 ~ 10.0 mg/L 混合盐 + MWCNTs-COOH 组 POD 酶活性显著低于混合盐处理组 ( $P < 0.05$ )。

混合盐+MWCNTs-COOH 复合组与 MWCNTs-COOH 单一组相比, SOD 和 POD 酶活性在各浓度 MWCNTs-COOH 条件下均高于单一组, 且差异显著 ( $P < 0.05$ ) ; CAT 酶活性在各浓度混合盐 + MWCNTs-COOH 条件下均低于单一组, 且差异显著 ( $P < 0.05$ ) ; APX 酶活性在 2.5 mg/L 混合盐 + MWCNTs-COOH 组中显著高于同浓度单一组 ( $P < 0.05$ ), 在 5.0 ~ 10.0 mg/L 混合盐 + MWCNTs-COOH 组中显著低于同浓度单一组 ( $P < 0.05$ )。

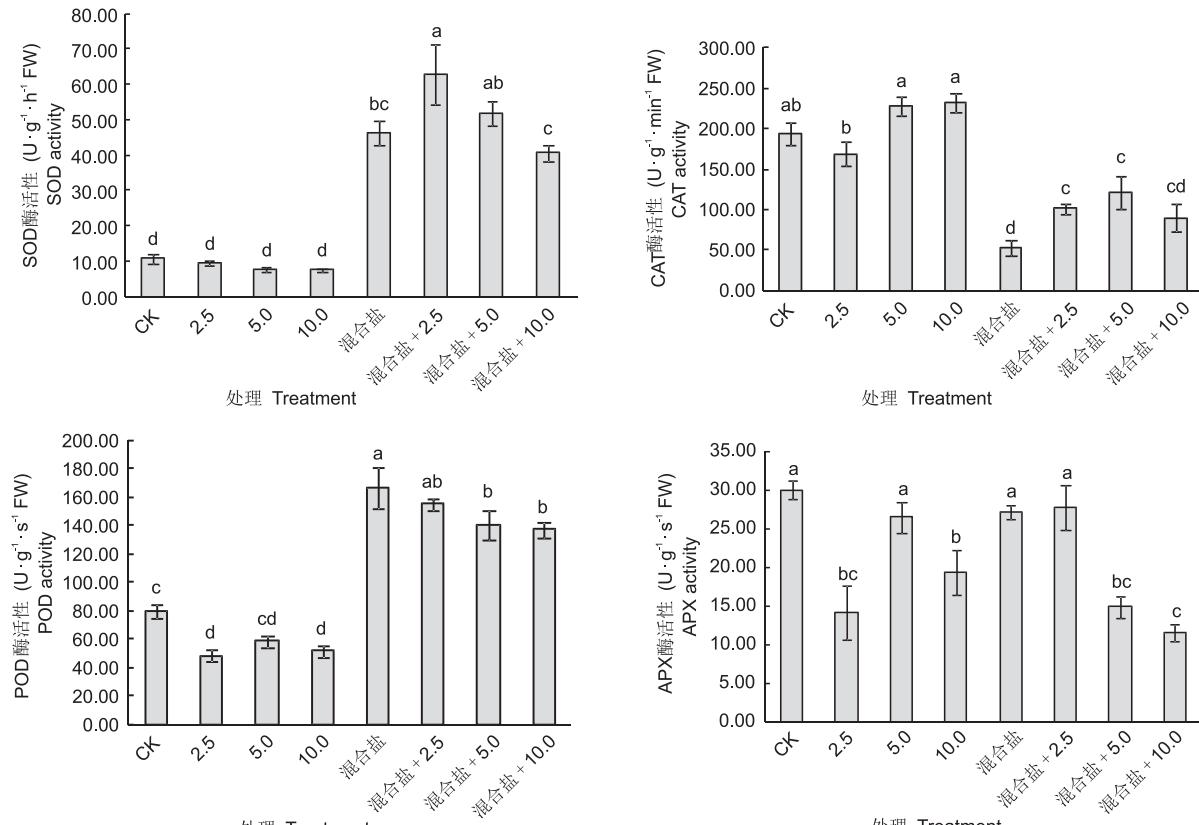


图3 水稻叶片组织 SOD、CAT、POD 和 APX 酶活力变化

Fig. 3 Changes in SOD, CAT, POD, and APX enzyme activity in leaves of *Oryza sativa*

## 2.3 叶绿体色素含量的变化

色素含量实验结果显示(图4),与对照组相比,MWCNTs-COOH单一组各种色素(叶绿素a、叶绿素b、胡萝卜素)含量均呈降低趋势,但各色素含量的降低幅度不尽相同。其中,10.0 mg/L MWCNTs-COOH单一组叶绿素a含量显著降低( $P < 0.05$ )。

与混合盐处理组相比,混合盐+MWCNTs-COOH复合组各种色素(叶绿素a、叶绿素b、胡萝卜素)含量呈先增加后降低的趋势。其中,2.5 mg/L混合盐+MWCNTs-COOH组的叶绿素a和胡萝卜素含量显著上升( $P < 0.05$ )。

混合盐+MWCNTs-COOH复合组与MWCNTs-COOH单一组相比,10.0 mg/L混合盐+MWCNTs-COOH组的叶绿素a和胡萝卜素含量显著降低( $P < 0.05$ )。

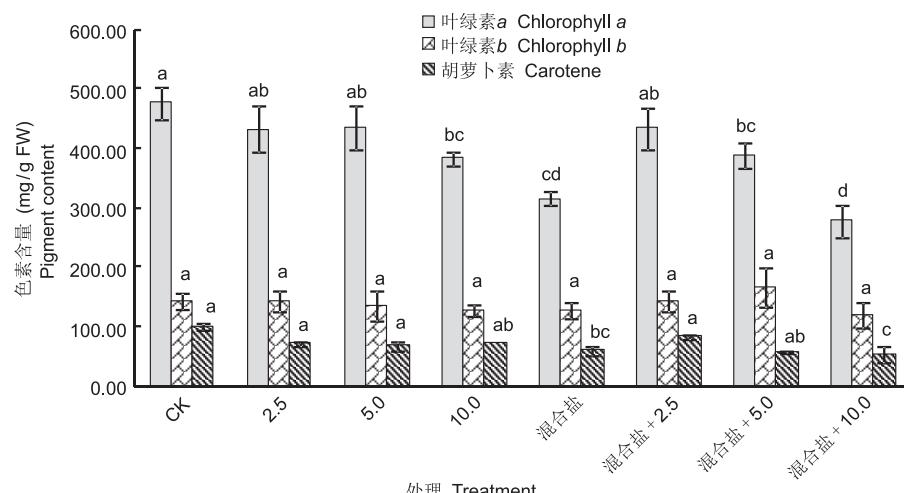


图4 水稻叶片组织色素含量变化

Fig. 4 Changes in chloroplast pigment content in leaves of *Oryza sativa*

## 2.4 SS 和 Pro 含量的变化

实验结果显示(图5),与对照组相比,MWCNTs-COOH单一组SS含量呈先降低后升高的趋势;Pro含量呈先升高后降低再升高的趋势。SS和Pro含量在各单一组与对照组之间均无显著差异( $P > 0.05$ )。

与混合盐处理组相比,混合盐+MWCNTs-COOH复合组的SS和Pro含量均呈降低趋势,其中,10.0 mg/L混合盐+MWCNTs-COOH组的SS含量显著降低( $P < 0.05$ ),2.5~10.0 mg/L混合盐+MWCNTs-COOH组的Pro含量显著降低( $P < 0.05$ )。

混合盐+MWCNTs-COOH复合组与MWCNTs-COOH单一组相比,SS和Pro含量在各浓度MWCNTs-COOH条件下均高于单一组,且差异显著( $P < 0.05$ )。

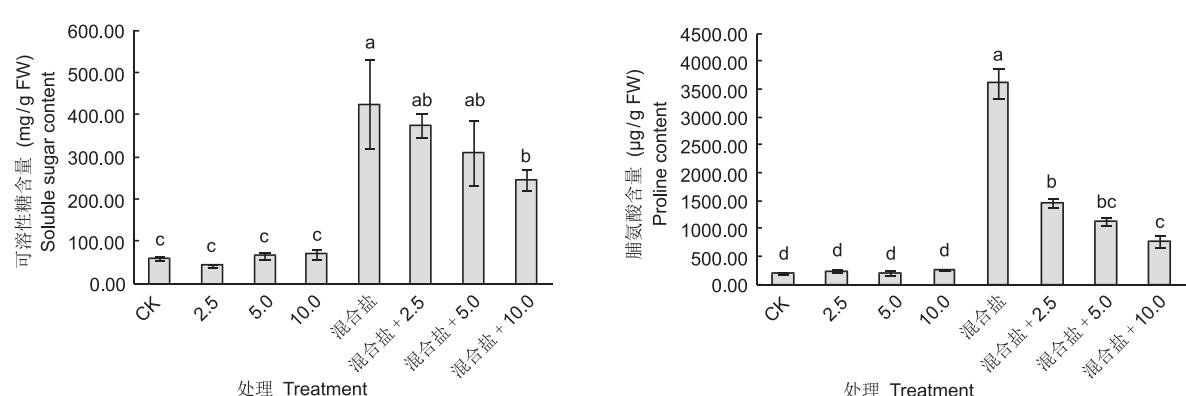


图5 水稻叶片组织中可溶性糖(SS)和脯氨酸(Pro)含量变化

Fig. 5 Changes in soluble sugar and proline content in leaves of *Oryza sativa*

## 2.5 REC 和 MDA 含量的变化

实验结果显示(图6),与对照组相比,MWCNTs-COOH单一组的REC呈升高趋势,其中,5.0~10.0 mg/L MWCNTs-COOH单一组的REC显著升高( $P < 0.05$ );MDA含量呈先略微降低后升高的趋势,但各处理组之间无显著差异( $P > 0.05$ )。

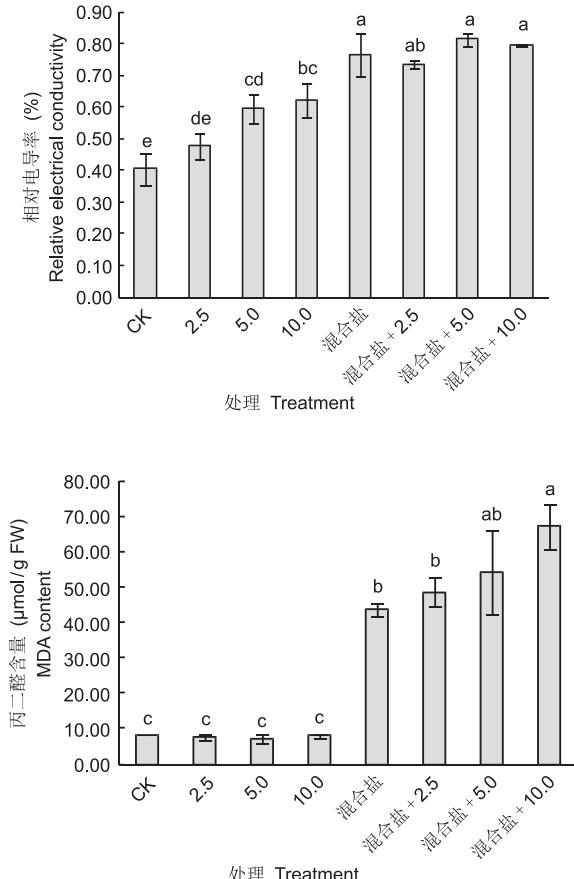


图6 水稻叶片组织中相对电导率(REC)和丙二醛(MDA)含量变化

Fig. 6 Changes in relative electrical conductivity and MDA content in leaves of *Oryza sativa*

与混合盐处理组相比,混合盐+MWCNTs-COOH复合组的REC呈先略微降低再升高的趋势,但各处理组间无显著差异( $P > 0.05$ );MDA含量始终呈升高趋势,其中,10.0 mg/L混合盐+MWCNTs-COOH组的MDA含量显著升高( $P < 0.05$ )。

混合盐+MWCNTs-COOH复合组与MWCNTs-COOH单一组相比,REC和MDA含量在各浓度MWCNTs-COOH条件下均高于单一组,且差异显著( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

### 3.1 MWCNTs-COOH、混合盐及其复合胁迫对水稻幼苗O<sub>2</sub><sup>-</sup>产生速率和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量的影响

植物通过各种途径产生O<sub>2</sub><sup>-</sup>和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,他们性质活跃,有很强的氧化能力,称为活性氧(ROS)。高浓度的ROS对生物大分子具有攻击作用,可氧化蛋白质和质膜,破坏细胞的结构和功能,严重时导致细胞死亡<sup>[27, 28]</sup>。本研究中,MWCNTs-COOH单一组诱导O<sub>2</sub><sup>-</sup>和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产生和累积程度不甚明显的原因可能与供试植物为水稻有关,因水稻本身的耐盐碱性较强<sup>[6, 7]</sup>,且正常培养的水稻营养液中Na<sup>+</sup>含量也有限,即使由于MWCNTs-COOH的加入,使水稻体内的Na<sup>+</sup>含量增多,可能也不足以诱发ROS的大量产生与累积。至于混合盐组及混合盐+MWCNTs-COOH复合组均能诱导O<sub>2</sub><sup>-</sup>和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的大量产生和累积,且在混合盐+MWCNTs-COOH组中MWCNTs-COOH浓度越高,O<sub>2</sub><sup>-</sup>产生速率和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的累积量也越大。究其原因,一方面与MWCNTs-COOH本身具有一定的毒性效应有关,其与混合盐复合后可能产生了交互协同作用,导致胁迫程度加剧<sup>[29]</sup>;另一方面可能是由于MWCNTs-COOH进入水稻幼苗叶片后而导致营养元素失衡及Na<sup>+</sup>大量富集有关,或者说是Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>进出失衡所致。ROS的大量产生和累积必然会加剧水稻叶片组织的氧化胁迫与应激损伤,最终诱发程序性细胞死亡(Programmed cell death, PCD)<sup>[27]</sup>。以往学者的研究亦证实,MWCNTs-COOH的积聚可致使植物体内营养元素失衡、Na<sup>+</sup>富集、ROS产生和累积并导致氧化损伤等不利影响<sup>[13, 15, 16, 30, 31]</sup>。

### 3.2 MWCNTs-COOH、混合盐及其复合胁迫对水稻幼苗4种抗氧化酶活性的影响

ROS可作为信号分子发挥积极作用,响应各种胁迫并激活信号转导过程,诱导植物的防御反应,增强植物的抗逆性<sup>[32]</sup>。如ROS可诱导植物抗氧化酶活性升高,以清除过量的ROS自由基,减轻或清除活性氧的伤害<sup>[33]</sup>。参与ROS清除反应的酶促抗氧化系统通常主要包括SOD、CAT、POD和APX等。本研究中,MWCNTs-COOH单一组诱导抗氧化酶活性升高不明显,这表明单一MWCNTs-COOH处理并未造成水稻幼苗叶片氧化应激

胁迫的剧增, 这可能与水稻本身具备较强的耐盐碱性有关。MWCNTs-COOH 单一组抗氧化酶活性的变化规律与上述其 ROS 的变化规律基本一致。部分抗氧化酶活性在混合盐 + MWCNTs-COOH 复合组中不同程度的升高, 在一定程度上减少了 ROS 的积累, 缓解了氧化胁迫损伤; 但高浓度的混合盐 + MWCNTs-COOH 组中 4 种抗氧化酶活性均降至最低, 且 POD 和 APX 酶活性显著低于混合盐组 ( $P < 0.05$ ), 这表明随着 ROS 含量的不断增加, 氧化胁迫程度加剧, 过量的 ROS 累积超出了防御酶系统的清除能力, 抗氧化酶系统对 ROS 的清除体系或已失衡, 各种抗氧化酶活性已受到严重抑制或损伤。这与相关学者<sup>[30, 31]</sup>对蚕豆幼苗在 MWCNTs-COOH 复合 Pb + Cd 条件下抗氧化酶活性的研究结果相似。需要指出的是, 4 种抗氧化酶活性在相同胁迫条件下变化规律的差异表明其对 ROS 的清除能力及敏感性或耐受力的不同<sup>[34]</sup>。

### 3.3 MWCNTs-COOH、混合盐及其复合胁迫对水稻幼苗叶绿体色素含量的影响

高等植物中的叶绿体色素包括叶绿素(叶绿素 a、叶绿素 b)、类胡萝卜素(胡萝卜素、叶黄素)两大类。叶绿素作为最重要的光合色素, 在光能的捕获及传递过程中起着关键作用。如叶绿素 a 可以与 PS I、PS II 中的反应中心复合体结合, 在光能的捕获和电子传递中发挥重要作用; 叶绿素 b 存在于捕光色素复合体中, 只具有捕获并传递光能的作用<sup>[35]</sup>。类胡萝卜素是吸收光能的辅助色素, 可以将激发的光能传递给叶绿素 a, 但其更重要的作用是对过剩光能的热耗散, 以保护光合系统不受损伤<sup>[36]</sup>。植物在逆境或衰老等情况下, 由于叶绿素不稳定、易降解, 叶绿素的含量会降低; 而作为保护色素的类胡萝卜素含量相对稳定。本研究中, 无论是 MWCNTs-COOH 单一组抑或是混合盐 + MWCNTs-COOH 复合组, 叶绿素 a 均随 MWCNTs-COOH 浓度的升高大体呈降低趋势, 且 10.0 mg/L MWCNTs-COOH 单一组与对照组相比差异显著 ( $P < 0.05$ ), 10.0 mg/L 混合盐 + MWCNTs-COOH 组降至所有处理组中的最低。这表面上反应了叶绿素降解、含量降低, 更深层次则表明了光合电子传递效率的下降或者是光系统反应中心的损伤。叶绿体是产生 ROS 的主要细胞器之一, 正常情况下植物体内 ROS 的产生和清除处于动态平衡

状态, 但过强的环境胁迫会导致植物叶片中的碳同化受到抑制, 光合电子传递受阻, 引发 ROS 产生和清除机制的失衡, 从而导致细胞的氧化损伤。叶绿素 a 含量在高 MWCNTs-COOH 浓度条件下急剧降低, 恰恰反映其遭受严重的氧化胁迫, 这与上述 O<sub>2</sub><sup>-</sup>产生速率和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量在高浓度 MWCNTs-COOH 条件下大量产生和累积是相一致的。胡萝卜素含量在混合盐 + MWCNTs-COOH 复合组中与混合盐组相比呈现出先增加后降低的趋势, 这反映出混合盐胁迫条件下低浓度的 MWCNTs-COOH 可以一定程度上激活水稻幼苗的防御机制, 诱导胡萝卜素的合成, 这也与胡萝卜素本身具有对过剩光能热耗散的功能是密切相关的。

### 3.4 MWCNTs-COOH、混合盐及其复合胁迫对水稻幼苗 SS 和 Pro 含量的影响

盐胁迫对植物的伤害主要有两种, 即渗透胁迫与离子毒害。渗透胁迫条件下土壤溶液水势降低, 植株吸水困难, 从而造成水分亏缺和细胞离子浓度增大等效应, 引发植物代谢紊乱, 影响正常的生长发育<sup>[1, 2]</sup>。为了维持正常的细胞生理功能和渗透势, 植物体在长期的进化过程中形成了特定的渗透调节响应机制, 即通过大量合成渗透调节物质以平衡细胞代谢, 维持细胞内环境的稳定, 其中 SS 和 Pro 等即是植物在盐碱胁迫条件下产生的主要有机渗透调节物质<sup>[5, 34, 37]</sup>。本研究中, 单一 MWCNTs-COOH 处理对 SS 和 Pro 等渗透调节物质的合成未产生明显影响; 但在混合盐胁迫条件下, MWCNTs-COOH 的加入明显干扰了 SS 和 Pro 等渗透调节物质的合成, 随着 MWCNTs-COOH 浓度的增加, 混合盐 + MWCNTs-COOH 复合组的 SS 和 Pro 含量均呈降低趋势, 且其含量始终低于混合盐组。出现上述现象的原因可能是由于在混合盐胁迫条件下 MWCNTs-COOH 的加入加速破坏了细胞质膜的完整性, 导致细胞质膜选择透过性下降、甚至丧失, 从而使细胞内 Ca<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>等营养元素大量外渗, 而 Na<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>等大量积聚, 造成水分严重亏缺, 细胞内离子平衡失调, 代谢紊乱加剧, REC 的数据也佐证了这一点。需要指出的是, 水稻叶片在逆境胁迫条件下通过产生渗透调节物质以维持细胞内环境稳定的能力是有限的, 即 SS 和 Pro 对逆境胁迫的响应是具有变化敏感阈值的, 当外界胁迫条件极为严重时, 渗透调节物质代谢系统遭受严重伤

害，最终承受不住胁迫作用而死亡。这与祝一文等<sup>[38]</sup>在‘海稻86’耐盐碱生理机制及李子英等<sup>[39]</sup>在柳树幼苗耐盐碱胁迫研究中发现随着盐胁迫程度的加重，植物体内SS和Pro对盐胁迫的响应具有阈值效应的结果是一致的。

### 3.5 MWCNTs-COOH、混合盐及其复合胁迫对水稻幼苗REC和MDA含量的影响

REC和MDA含量是衡量细胞膜透性和细胞膜脂质过氧化强度的两个重要指标。一般认为膜透性增大的程度与逆境胁迫强度有关，REC越大，细胞膜的选择透过性越差<sup>[40]</sup>；而MDA是膜脂过氧化的最终分解产物之一，其含量的多少直接反映了膜系统的伤害程度<sup>[41]</sup>。本研究中，REC和MDA含量的变化趋势不尽相同。MWCNTs-COOH单一组的REC呈不断上升趋势，而MDA含量与对照相比基本无变化。可以认为，营养液中加入MWCNTs-COOH虽一定程度上导致水稻叶片细胞膜透性的增加，可能引发细胞内电解质的外渗及Na<sup>+</sup>积聚，抑或是K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>失衡，但由于供试植物水稻本身具备一定的耐盐碱能力，且正常水稻营养液中Na<sup>+</sup>数量有限，因而并未对细胞质膜造成明显的过氧化损伤。这与上述MWCNTs-COOH单一组的ROS及抗氧化酶的变化规律也是相耦合的。混合盐组和混合盐+MWCNTs-COOH复合组的REC始终维持在较高水平，且与对照组及MWCNTs-COOH单一组相比差异显著( $P < 0.05$ )，说明其膜透性显著增大，选择透过性显著降低，这必将严重影响细胞内部营养元素的平衡，引发K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>的大量外渗及Na<sup>+</sup>的大量富集、ROS大量产生和累积并导致氧化损伤等一系列不良后果。这与Be-gum等<sup>[42]</sup>研究发现7种常见农作物的幼苗在经含有MWCNTs的溶液培养15 d后，大部分种类植株体内的电解液发生大量外渗及细胞死亡的现象是相似的。同时，我们注意到与之对应的混合盐+MWCNTs-COOH复合组、混合盐组的MDA含量远高于MWCNTs-COOH单一组及对照组，且混合盐+MWCNTs-COOH复合组的MDA含量呈不断上升趋势，并始终高于混合盐组。这说明在水稻已经遭受一定程度盐碱胁迫的情况下，由于外源MWCNTs-COOH的加入，加速破坏了细胞中ROS产生与清除之间的平衡，导致ROS浓度的不断增加，加剧了氧化损伤程度及膜脂过氧化作用，并对

生物膜、蛋白质、DNA和RNA等造成氧化损伤，进而抑制水稻幼苗的生长和发育，最终导致植株死亡<sup>[33]</sup>。

需要指出的是CNTs诱导细胞产生ROS是其对植物细胞产生毒性的首要机制<sup>[43]</sup>，这也被大量实验研究所证实。但是，CNTs的生物毒性很大程度上取决于其本身的剂量、反应时间和植物种类。本研究中，MWCNTs-COOH单一处理对水稻幼苗的毒性效应不甚明显的主要原因可能是MWCNTs-COOH的剂量较低所致，以往研究中MWCNTs单一处理对水稻毒性产生氧化应激反应的CNTs浓度远高于本实验中的单一CNTs处理浓度<sup>[13]</sup>。实际上，相关研究已证实每年释放进入环境(土壤)中的CNTs量约为10 mg/kg，在高暴露环境中CNTs释放量则高达20 mg/kg<sup>[44]</sup>。本研究所设置的CNTs浓度更符合现实观测中所得到的实际CNTs环境(土壤)释放浓度，也更符合植物毒性研究是以污染物在现实环境中的累积浓度作为背景和依据的标准。

## 4 结论

综上所述，MWCNTs-COOH单一组在一定程度上诱导了水稻幼苗叶片组织中O<sub>2</sub><sup>-</sup>和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的产生和积累，而混合盐组和混合盐+MWCNTs-COOH复合组均诱导了水稻幼苗叶片组织中O<sub>2</sub><sup>-</sup>和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的大量产生和积累，且在混合盐+MWCNTs-COOH复合组中MWCNTs-COOH浓度越高，O<sub>2</sub><sup>-</sup>产生速率和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的累积量越大。ROS作为信号分子诱导了各处理组部分抗氧化酶活性的升高，在一定程度上减少了ROS的积累，缓解了氧化胁迫损伤。与混合盐组相比，混合盐+MWCNTs-COOH复合组中叶绿素a和胡萝卜素含量在低浓度MWCNTs-COOH条件下一定程度的升高，对维持水稻叶片正常的电子传递及对过剩光能的热耗散是有益的。MWCNTs-COOH与混合盐复合后抑制了SS和Pro等渗透调节物质的合成，诱导了ROS的大量产生和累积，导致REC和MDA含量的显著升高，加剧了水稻叶片组织的氧化胁迫与应激损伤。

## 参考文献：

- [1] Deinlein U, Stephan AB, Horie T, Luo W, Xu GH, Schröder JI. Plant salt-tolerance mechanisms [J]. *Trends Plant Sci*, 2014, 19(6): 371–379.

- [ 2 ] Zhu JK. Plant salt tolerance [ J ]. *Trends Plant Sci*, 2001, 6(2): 66–71.
- [ 3 ] 沈婧丽, 王彬, 田小萍, 许兴. 不同改良模式对盐碱地土壤理化性质及水稻产量的影响 [ J ]. 江苏农业学报, 2016, 32(2): 338–344.
- Shen JL, Wang B, Tian XP, Xu X. Effect of improvement modes on physic-chemical characteristics of saline-alkali soil and rice yield [ J ]. *Jiangsu Journal of Agriculture Sciences*, 2016, 32(2): 338–344.
- [ 4 ] 田富强. 产量红线与耕地红线耦合研究 [ J ]. 干旱区地理, 2017, 40(3): 640–646.
- Tian FQ. Coupling of yield red-line and cultivated land red-line [ J ]. *Arid Land Geography*, 2017, 40(3): 640–646.
- [ 5 ] 张婷婷, 杨美英, 王春红, 孙合美, 齐春艳, 侯立刚, 武志海. 盐胁迫下不同水稻品种渗透调节物质及相关基因的变化 [ J ]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, 44(4): 39–47.
- Zhang TT, Yang MY, Wang CH, Sun HM, Qi CY, Hou LG, Wu ZH. Changes in osmolytes and related genes of different rice varieties under saline-alkali stress [ J ]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2016, 44(4): 39–47.
- [ 6 ] 凌启鸿. 盐碱地种稻有关问题的讨论 [ J ]. 中国稻米, 2018, 24(4): 1–2.
- Ling QH. Discussion on the related problems of rice planting in saline-alkali soil [ J ]. *China Rice*, 2018, 24(4): 1–2.
- [ 7 ] Kibria MG, Hossain M, Murata Y, Hoque MD. Antioxidant defense mechanisms of salinity tolerance in rice genotypes [ J ]. *Rice Sci*, 2017, 24(3): 155–162.
- [ 8 ] 董起广, 何振嘉, 高红贝, 雷娜, 樊建琼. 沿黄地区盐碱地种植水稻土壤理化性质的比较 [ J ]. 植物资源与环境学报, 2017, 26(2): 110–112.
- Dong QG, He ZJ, Gao HB, Lei N, Fan JQ. Comparison on soil physicochemical properties of saline and alkaline land planted with *Oryza sativa* in the area along the Yellow River [ J ]. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2017, 26(2): 110–112.
- [ 9 ] De Volder MF, Tawfick SH, Baughman RH, Hart AJ. Carbon nanotubes: present and future commercial applications [ J ]. *Science*, 2013, 339(6119): 535–539.
- [ 10 ] Petersen EJ, Zhang L, Mattison NT, O' Carroll DM, Whelton AJ, Uddin N, et al. Potential release pathways, environmental fate, and ecological risks of carbon nanotubes [ J ]. *Environ Sci Technol*, 2011, 45(23): 9837–9856.
- [ 11 ] Awad YM, Vithanage M, Niazi NK, Rizwan M, Rinklebe J, Yang JE, et al. Potential toxicity of trace elements and nanomaterials to Chinese cabbage in arsenic- and lead-contaminated soil amended with biochars [ J/OL ]. *Environ Geochem Health*, 2017 [ 2018-12-20 ]. <https://doi.org/10.1007/s10653-017-9989-3>.
- 10.1007/s10653-017-9989-3. DOI: 10.1007/s10653-017-9989-3.
- [ 12 ] Sohn EK, Chung YS, Johari SA, Kim TG, Kim JK, Lee JH, et al. Acute toxicity comparison of single-walled carbon nanotubes in various freshwater organisms [ J ]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015(1): 1–7.
- [ 13 ] Tan XM, Lin C, Fugetsu B. Study on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on suspension rice cells [ J ]. *Carbon*, 2009, 47(15): 3479–3487.
- [ 14 ] 杨帆, 王志春, 马红媛, 杨福, 田春杰, 安丰华. 东北苏打盐碱地生态治理关键技术的研发与集成示范 [ J ]. 生态学报, 2016, 36(22): 7054–7058.
- Yang F, Wang ZC, Ma HY, Yang F, Tian CJ, An FH. Research and integrated demonstration of ecological amelioration techniques of saline-sodic land in northeast China [ J ]. *Acta Ecologica Sinica*, 2016, 36(22): 7054–7058.
- [ 15 ] Ghosh M, Bhadra S, Adegoke A, Bandyopadhyay M, Adegoke OA. MWCNT uptake in *Allium cepa* root cells induces cytotoxic and genotoxic responses and results in DNA hyper-methylation [ J ]. *Mutat Res*, 2015, 774: 49–58.
- [ 16 ] Hao Y, Ma CX, Zhang ZT, Song YH, Cao WD, Guo J, et al. Carbon nanomaterials alter plant physiology and soil bacterial community composition in a rice-soil-bacterial ecosystem [ J ]. *Environ Pollut*, 2018, 232: 123–136.
- [ 17 ] Yoshida S, Forno DA, Cock JH, Gomez KA. Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice [ M ]. 3th ed. Laguna: The International Rice Research Institute, 1976: 62.
- [ 18 ] Tian M, Gu Q, Zhu M. The involvement of hydrogen peroxide and antioxidant enzymes in the process of shoot organogenesis of strawberry callus [ J ]. *Plant Sci*, 2003, 165: 701–707.
- [ 19 ] Velikova V, Yordanov I, Edreva A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines [ J ]. *Plant Sci*, 2000, 151: 59–66.
- [ 20 ] Giannopolitis CN, Ries SK. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants [ J ]. *Plant Physiol*, 1977, 59(2): 309–314.
- [ 21 ] Giannopolitis CN, Ries SK. Superoxide dismutases: II. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings [ J ]. *Plant Physiol*, 1977, 59(2): 315–318.
- [ 22 ] Abe H. Catalase *in vitro* [ J ]. *Method Enzymol*, 1984, 105(13): 121–126.
- [ 23 ] 李合生, 孙群, 赵世杰, 章文华. 植物生理生化实验原理和技术 [ M ]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 164–165, 194–197, 258–260.
- [ 24 ] 张以顺, 黄霞, 陈云凤. 植物生理学实验教程 [ M ]. 北京: 高等教育出版社, 2009: 34–37, 135–136.

- [25] 赵世杰, 史国安, 董新纯. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2002: 130–131.
- [26] Li Y, Zhang SS, Jiang WS, Liu DH. Cadmium accumulation, activities of antioxidant enzyme, and malondialdehyde (MDA) content in *Pistia stratiotes* L. [J]. *Environ Sci Pollut R*, 2013, 20(2): 1117–1123.
- [27] 何光明, 邓兴旺. 死亡信号传递: 叶绿体与线粒体间信号交流调控植物程序性细胞死亡 [J]. 植物学报, 2018, 53(4): 441–444.  
He GM, Deng XW. Death signal transduction: chloroplast-to-mitochondrion communication regulates programmed cell death in plants [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2018, 53(4): 441–444.
- [28] Hossain MA, Bhattacharjee S, Armin SM, Qian PP, Xin W, Li HY, et al. Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6(420): 1–42.
- [29] 庄绪亮. 土壤复合污染的联合修复技术研究进展 [J]. 生态学报, 2007, 27(11): 4871–4876.  
Zhuang XL. New approaches for remediation of soils with multiple pollutants [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(11): 4871–4876.
- [30] Rong H, Wang CR, Yu XR, Fan JB, Jiang P, Wang YC, et al. Carboxylated multi-walled carbon nanotubes exacerbated oxidative damage in roots of *Vicia faba* L. seedlings under combined stress of lead and cadmium [J]. *Ecotox Environ Safe*, 2018, 161: 616–623.
- [31] Wang CR, Liu HT, Chen JY, Tian Y, Shi J, Li DD, et al. Carboxylated multi-walled carbon nanotubes aggravated biochemical and subcellular damages in leaves of broad bean (*Vicia faba* L.) seedling under combined stress of lead and cadmium [J]. *J Hazard Mater*, 2014, 274: 404–412.
- [32] Tripathy BC, Oelmüller R. Reactive oxygen species generation and signaling in plants [J]. *Plant Signal Behav*, 2012, 7(12): 1621–1633.
- [33] 李格, 孟小庆, 蔡敬, 董婷婷, 李宗芸, 朱明库. 活性氧在植物非生物胁迫响应中功能的研究进展 [J]. 植物生理学报, 2018, 54(6): 951–959.  
Li G, Meng XQ, Cai J, Dong TT, Li ZY, Zhu MK. Advance in the function of reactive oxygen species in plant responses to abiotic stresses [J]. *Plant Physiology Journal*, 2018, 54(6): 951–959.
- [34] 薛盈文, 黄寿光, 范博文, 石新颖, 阚虎飞, 刘鑫, 等. 低温和UV-B复合胁迫对小麦幼苗抗氧化酶和渗透调节物质的影响 [J]. 麦类作物学报, 2017, 37(6): 834–840.  
Xue YW, Huang SG, Fan BW, Shi XX, Kan HF, Liu X, et al. Effect of low temperature and UV-B on the antioxi-
- dant enzymes and osmotic substances in wheat seedlings [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2017, 37(6): 834–840.
- [35] Groce R. A close view of photosystem [J]. *Science*, 2015, 348(6238): 970–971.
- [36] Demmig-Adams B, Adams WW. Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation [J]. *New Phytol*, 2006, 172(1): 11–21.
- [37] Campos MKF, Carvalho K, Souza FS, Marur CJ, Pereira LFP, Filho JCB, Vieira LGF. Drought tolerance and antioxidant enzymatic in transgenic ‘Swingle’ citrumelo plants over-accumulating proline [J]. *Environ Exp Bot*, 2011, 72: 242–250.
- [38] 祝一文, 赵方贵, 成云峰, 雷传松, 刘新. ‘海稻86’耐盐碱胁迫生理机制的初步研究 [J]. 青岛农业大学学报(自然学科版), 2018, 35(1): 32–39.  
Zhu YW, Zhao FG, Cheng YF, Lei CS, Liu X. The preliminary study on alkali-salt tolerance of ‘sea rice 86’ and physiological mechanisms [J]. *Journal of Qingdao Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2018, 35(1): 32–39.
- [39] 李子英, 丛日春, 杨庆山, 周健. 盐碱胁迫对柳树幼苗生长和渗透调节物质含量的影响 [J]. 生态学报, 2017, 37(24): 8511–8517.  
Li ZY, Cong RC, Yang QS, Zhou J. Effects of saline-alkali stress on growth and osmotic adjustment substances in willow seedlings [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, 37(24): 8511–8517.
- [40] Kocheva KV, Georgiev GI, Kochev VK. An improvement of the dissusion model for assessment of drought stress in plant tissues [J]. *Physiol Plantarum*, 2014, 150: 88–94.
- [41] 陈少裕. 膜脂过氧化对植物细胞的伤害 [J]. 植物生理学通讯, 1991, 27(2): 84–90.  
Chen SY. Injury of membrane lipid peroxidation to plant cell [J]. *Plant Physiology Communications*, 1991, 27(2): 84–90.
- [42] Begum P, Ikhtiar R, Fugetsu B. Potential impact of multi-walled carbon nanotubes exposure to the seedling stage of selected plant species [J]. *Nanomaterials*, 2014, 4(2): 203–221.
- [43] Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel [J]. *Science*, 2006, 311(5761): 622–627.
- [44] Shan J, Ji R, Yu YJ, Xie ZB, Yan XY. Biochar, activated carbon, and carbon nanotubes have different effects on fate of <sup>14</sup>C-catechol and microbial community in soil [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 1–11.

(责任编辑: 张平)