

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20190601002

刘玲, 许婷婷, 赵薪程, 等. 羧基化多壁碳纳米管与镉复合干扰蚕豆幼苗生理特性的研究[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(6): 252-261

Liu L, Xu T T, Zhao X C, et al. Study on the disturbance of physiological characteristics in *Vicia faba* L. seedlings exposed to combination of carboxylated multi-walled carbon nanotubes and cadmium [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(6): 252-261 (in Chinese)

羧基化多壁碳纳米管与镉复合干扰蚕豆幼苗生理特性的研究

刘玲^{1,2}, 许婷婷¹, 赵薪程¹, 刘海燕¹, 戴慧芳¹, 杨俊文¹, 汪承润^{1,*}

1. 淮南师范学院生物工程学院, 淮南 232038

2. 资源与环境生物技术安徽普通高校重点实验室, 淮南 232038

收稿日期: 2019-06-01 录用日期: 2019-08-20

摘要: 为探究羧基化多壁碳纳米管(MWCNTs-COOH)复合镉(Cd)对蚕豆幼苗的毒性效应, 利用水培实验研究了 MWCNTs-COOH(0、1.5、3.0、6.0 和 12.0 mg·L⁻¹)与 Cd(10 μmol·L⁻¹)单一、复合胁迫下蚕豆幼苗生理的变化。结果表明, MWCNTs-COOH 单一处理, 随着其浓度的增加, 根系活力呈下降趋势, 当浓度达到 12.0 mg·L⁻¹时, 与对照相比下降 35.7%; 低浓度的 MWCNTs-COOH 促使叶绿素含量增加, 且 1.5 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH 显著诱导叶中过氧化物酶(POD)活性升高; 6.0 ~ 12.0 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH 促进叶·O₂产生速率加快, 超氧化物歧化酶(SOD)活性升高, 叶中红褐色斑点增多; MWCNTs-COOH 浓度为 12.0 mg·L⁻¹时, 根·O₂产生速率显著加快, SOD 活性下降, 根细胞染色加深, 死亡加剧。MWCNTs-COOH 与 Cd 复合后, 当 MWCNTs-COOH 低于 6.0 mg·L⁻¹, 与 MWCNTs-COOH 单一处理组比较, 根系活力未见明显变化; 增至 6.0 mg·L⁻¹后, 根系活力降低至 10 μmol·L⁻¹ Cd 单独处理组之下。所有复合处理组根和叶丙二醛(MDA)含量皆高于对应的 MWCNTs-COOH 单一处理, 6.0 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH 复合 Cd 诱导根和叶 POD 活性增加, 而 12.0 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH 与 Cd 共同作用使叶中红褐色斑点加深且所占叶面积加大, 达到 64.02%, H₂O₂ 含量急剧增加, 根尖细胞受损并部分脱落。因此, 高浓度的 MWCNTs-COOH 能够加剧 Cd 对蚕豆幼苗的氧化胁迫。

关键词: 羧基化多壁碳纳米管; 镉; 蚕豆幼苗; 毒性效应

文章编号: 1673-5897(2020)6-252-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Study on the Disturbance of Physiological Characteristics in *Vicia faba* L. Seedlings Exposed to Combination of Carboxylated Multi-Walled Carbon Nanotubes and Cadmium

Liu Ling^{1,2}, Xu Tingting¹, Zhao Xincheng¹, Liu Haiyan¹, Dai Huifang¹, Yang Junwen¹, Wang Chengrun^{1,*}

1. School of Biological Engineering, Huainan Normal University, Huainan 232038, China

2. Key Laboratory of Bioresource and Environmental Biotechnology of Anhui Higher Education Institutes, Huainan 232038, China

Received 1 June 2019 accepted 20 August 2019

Abstract: In order to explore the joint toxic effects of carboxylated multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs-

基金项目: 安徽省教育厅重点项目(KJ2018A0472); 安徽省重大专项项目(18030701189); 安徽省自然科学基金资助项目(1608085QC50)

第一作者: 刘玲(1967—), 女, 博士, 副教授, 研究方向为植物生态学及逆境生理学, E-mail: lliuu494@sina.com

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: chengrunwang@163.com

COOH) and cadmium (Cd) on *Vicia faba* seedlings, the physiological changes of the seedlings hydroponically cultured in solution of MWCNTs-COOH (0, 1.5, 3.0, 6.0, and 12.0 mg·L⁻¹), Cd (10 μmol·L⁻¹) alone or their combination were investigated in present experiments. The results showed that root activities tended to decrease with the increase of the single treatment concentration of MWCNTs-COOH. The root activity decreased by 35.7% at 12.0 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH in comparison to that of the control. In addition, low concentrations of MWCNTs-COOH promoted the production of chlorophyll, and peroxidase (POD) activity was significantly elevated at 1.5 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH compared with the control in the leaves. Moreover, ·O₂⁻ production rates, superoxide dismutase (SOD) activities and reddish-brown spots were increased with the increase of MWCNTs-COOH concentration from 6.0 to 12.0 mg·L⁻¹ in the leaves. In roots, at 12.0 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH, the ·O₂⁻ was significantly produced, and the SOD activity was obviously declined compared with the control. Additionally, the dead cells in stained roots increased under the treatment. Under the combination of MWCNTs-COOH and Cd, no obvious changes were observed in the root activities at the concentrations of MWCNTs-COOH lower than 6.0 mg·L⁻¹, compared with the single MWCNTs treatments with the corresponding concentrations. When the MWCNTs-COOH increased up to 6.0 mg·L⁻¹, the root activities decreased below that of 10 μmol·L⁻¹ Cd single treatment. Malondialdehyde (MDA) contents increased to be more than the corresponding treatment of MWCNTs-COOH in the roots or leaves under the combined treatments. POD activity was boosted in all the roots or leaves under the joint treatment by 6.0 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH and 10 μmol·L⁻¹ Cd. Particularly, the reddish-brown spots were expanded to 64.02%, and hydrogen peroxide production was markedly accumulated in the leaves, while the root tip cells were damaged and partially fell off the roots under the combination of 12.0 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH and 10 μmol·L⁻¹ Cd. Thus, it can be concluded that higher concentrations of MWCNTs-COOH (no less than 6.0 mg·L⁻¹) may exacerbate the oxidative stress in *V. faba* seedlings exposed to Cd in culture solution.

Keywords: MWCNTs-COOH; Cd; *Vicia faba* seedlings; toxic effect

碳纳米管(CNTs)是一种具有特殊结构的量子材料^[1],具有吸附性能好、催化能力强和热稳定性高等优良特性^[2]。依据其所含石墨烯片的层数可分为单壁碳纳米管(SWCNTs)和多壁碳纳米管(MWCNTs)。相对于SWCNTs,MWCNTs易于生产且成本较低,已逐渐成为化学、食品和生物等领域中的研究重点。但由于MWCNTs表面缺少活性基团,在范德华力的作用下极易团聚或缠绕,很难在溶剂中实现均匀分散^[3],限制了其功能的发挥。因此,在MWCNTs表面引入—COOH等亲水基团来提高其溶解性和分散性已经成为了CNTs走向实用化的关键^[4]。在生产和使用过程中MWCNTs不可避免地会释放到环境中,改性的MWCNTs进入环境后引发的毒性效应对人类潜在的健康风险已引起学术界的广泛关注^[5-6]。目前,关于碳纳米材料的研究主要集中在动物和微生物,例如,CNTs能够造成大型蚤的死亡^[7]、抑制蝌蚪的生长^[8]和使小鼠出现DNA氧化损伤^[9]等;同时,CNTs具有抗菌活性,能够阻碍细菌微生物膜的形成,与细菌直接接触会造成细菌的死亡^[10]。

对植物而言,MWCNTs不仅可以抑制植物生长、降低植物组织生物量^[11-12],还能够促进种子的萌发以及植物的生长发育^[13-14]。

重金属镉(Cd)是生物非必需金属元素,也是生物毒性最强的重金属元素之一^[15-17],广泛存在于自然界中。由于工业冶炼及电池、含Cd涂料等的生产和使用,加之其排放到水体中难降解、易富集^[18],使得Cd污染不仅影响了植物生长,而且通过食物链严重影响人类健康^[19-20]。CNTs因具有巨大的比表面积和丰富的孔隙结构,使其表现出对金属离子有优异的吸附性能^[21],当CNTs达到一定浓度时,会复合重金属使毒性作用增强,对植物的生理产生胁迫作用。然而,国内外有关改性MWCNTs复合重金属离子对植物生理影响的研究报道甚少^[22]。因此,本研究以蚕豆幼苗为实验对象,选用Cd作为典型的重金属,研究蚕豆幼苗暴露于不同浓度的羧基化多壁碳纳米管(MWCNTs-COOH)及其复合Cd污染溶液后,其幼苗生理各项指标的变化,以期MWCNTs-COOH的安全使用及其对环境的污染评价提供理论参考。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 羧基化多壁碳纳米管表征

MWCNTs-COOH (外径 8 ~ 15 nm, 长度 0.5 ~ 2 μm , 纯度 > 95%) 购自中科时代纳米成都有机化学有限公司。采用场发射扫描电子显微镜 (Gemini SEM 300, 德国 ZEISS 公司) 表征 MWCNTs-COOH 表面形貌 (图 1)。

1.2 实验材料

蚕豆 (*Vicia faba* L.) 种子为淮南当地常见品种 (青皮豆), 购于淮南圆和种子公司。

1.3 实验设计

挑选颗粒饱满的蚕豆种子, 用 0.1% 次氯酸钠溶液浸没 10 min 后在 Milli-Q 水中充分漂洗, 室温用 Milli-Q 水浸泡 24 h 进行催芽处理, 待蚕豆出芽后播种于湿润的石英砂中, 筛选根尖长 2 cm 左右的幼苗并移入装有 1/4 Hoagland 营养液的培养盒中, 待幼苗长出第 2 片真叶后, 接受如下处理: CK、 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH (T1)、 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH (T2)、 $6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH (T3)、 $12.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH (T4)、Cd (T5)、Cd + $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH (T6)、Cd + $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH (T7)、Cd + $6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH (T8)、Cd + $12.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH (T9), Cd 为分析纯 CdCl_2 , 所有含 Cd 培养液中 Cd 含量均为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Hoagland 营养液为所有处理基本培养液, pH 为

6.5 ~ 6.8, 每个处理重复 3 次 (3 个培养盒各培养 48 株幼苗), 每 3 天更换一次处理液, 用加氧泵进行连续通气。待幼苗长出第 5 片叶后 (图 2), 剪取倒三叶开展实验。

1.4 实验方法

1.4.1 叶绿素含量和根系活力测定

叶绿素含量的测定: 参照胡秉芬等^[23]的方法, 准确称取 0.5 g 倒四叶于研钵中, 加入 80% 丙酮 25 mL 进行研磨, 然后将研磨好的匀浆滤入 50 mL 容量瓶

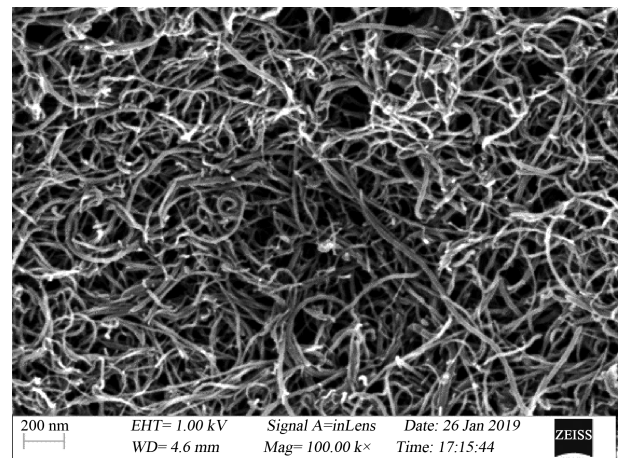


图 1 羧基化多壁碳纳米管 (MWCNTs-COOH) 扫描电镜图 (SEM)

Fig. 1 The scanning electron microscope (SEM) image of carboxylated multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs-COOH)



图 2 单一 MWCNTs-COOH 处理组及与 Cd 复合处理组的蚕豆生长状况

注: CK、T1、T2、T3、T4、T5、T6、T7、T8 和 T9 为对照组、 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH 组、 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH 组、 $6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH 组、 $12.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH 组、Cd 处理组、Cd + $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH 组、Cd + $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH 组、Cd + $6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH 组、Cd + $12.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH 组, 所有含 Cd 处理组中 Cd 含量均为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

Fig. 2 Growth status of *Vicia faba* under single MWCNTs-COOH and MWCNTs-COOH combined with Cd treatments

Note: CK, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8 and T9 represent control group, $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH group, $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH group, $6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH group, $12.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH group, Cd treatment group, Cd + $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH group, Cd + $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH group, Cd + $6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH group, Cd + $12.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH group; in all the treatment groups containing Cd, Cd content are all $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

中,用80%丙酮洗净研钵和滤纸,洗液并入容量瓶中定容至50 mL,利用分光光度计(T6新世纪,北京普析通用仪器有限责任公司)测 OD_{649} 和 OD_{665} , 计算叶绿素含量。

根系活力的测定:采用氯化三苯基四氮唑(TTC)还原法^[24]。准确称取根系样品0.5 g于烧杯中,加入5 mL 0.4% TTC溶液和5 mL 磷酸缓冲液的混合溶液,充分浸没,在37℃黑暗条件下处理1.5 h,加入2 mL的 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硫酸终止反应;取出根并将其剪碎,加入3 mL 乙酸乙酯,研磨后将红色提取液转移到容量瓶中并定容至10 mL,测 OD_{485} , 计算还原量。

1.4.2 氧化损伤的测定

根和叶超氧自由基($\cdot\text{O}_2^-$)含量的测定:参照盐酸羟胺氧化法^[25]。分别称取蚕豆根、叶1 g于研钵中,加入3 mL $65\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸钾缓冲液后充分研磨, $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,取上清液定容至3 mL;在试管中依次加入0.5 mL $65\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸钾缓冲液、0.1 mL $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸羟胺,摇匀,25℃保温10 min,再加入0.5 mL 提取液,摇匀,25℃保温20 min,再依次加入1 mL $58\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磺胺、1 mL $7\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ α -萘胺,混合后快速摇匀,25℃保温20 min,加入等体积色素萃取液三氯甲烷,于 $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心3 min,取粉红色水相测定 OD_{530} 。

根和叶丙二醛(MDA)含量的测定:参照硫代巴比妥酸(TBA)显色法^[26]。准确称取根、叶0.5 g,加入5 mL 三氯乙酸(TCA)进行充分研磨,匀浆液以 $4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,吸取2 mL MDA提取液,加入2 mL $6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ TBA溶液,置于沸水中煮沸15 min,迅速冷却并离心,利用分光光度计测 OD_{532} 和 OD_{450} 。

叶片 H_2O_2 定位:取不同处理的蚕豆叶片,放入适量二氨基联苯胺(DAB)溶液中进行暗处理6 h,期间要经常振荡,确保叶片浸在溶液中。之后光处理1 h至红棕色斑点出现为止,用蒸馏水冲洗叶片并加入适量脱色液(75%无水乙醇+5%甘油+20%水),在80℃水浴中进行脱色,直到脱色完全,观察并拍照^[27]。

根细胞死亡检测:取不同处理的蚕豆根尖,置于0.25% (m/V)伊文思蓝溶液染色5 min^[28],用蒸馏水冲洗3次后迅速放入50%的FAA固定液(38%甲醛5 mL,乙酸5 mL,70%乙醇90 mL)中,经乙醇逐级脱水,二甲苯逐级脱乙醇,石蜡逐级脱二甲苯后,进行石蜡包埋^[29]。采用旋转切片机(HM 315, MICROM,德国)切片,片厚4 μm ,制成临时装片,利用光学显微镜(CX23LED RFS1C,奥林巴斯广州工业有

限公司,中国)观察。

1.4.3 SOD 和 POD 活性的测定

超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)测定分别参照氮蓝四唑光还原法和愈创木酚比色法^[30-31]。

SOD活性测定:6 mL 反应混合液含3.5 mL 磷酸缓冲液、0.5 mL 甲硫氨酸、0.5 mL 氮蓝四唑、0.5 mL 乙二胺四乙酸二钠(Na_2EDTA)、0.4 mL 蒸馏水、0.5 mL 核黄素和100 μL 酶液。以不照光的对照管做空白,分别测定其他各管的吸光度。

POD活性测定:以一只加入3 mL 反应混合液(50 mL pH 6.0 磷酸缓冲液+28 μL 愈创木酚+19 μL 30%过氧化氢)、1 mL $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 的比色皿作为对照,其余比色皿中各加入3 mL 反应混合液、1 mL 酶液,立即开启秒表计时并在分光光度计470 nm 波长下测量OD值。

1.5 数据分析

采用Excel 2016、SPSS 13.0 软件进行数据统计和单因素方差分析,Duncan 法进行多重比较,利用Origin 7.5 软件对数据分析结果作图,利用AutoCAD 2019 对受损叶片面积进行统计。

2 结果(Results)

2.1 MWCNTs-COOH 复合 Cd 对蚕豆幼苗叶绿素含量和根系活力的影响

由图3可知,MWCNTs-COOH 单一处理蚕豆幼苗,呈现出随着MWCNTs-COOH 浓度的增加,叶绿素含量先升高后降低的趋势,当MWCNTs-COOH 浓度为 $3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,叶绿素含量达到最大值 $1.29\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$;而根系活力随MWCNTs-COOH 浓度的增加呈下降趋势,其中, $12.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH 单一处理导致根系活力显著下降($P<0.05$)。蚕豆幼苗在MWCNTs-COOH 与 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 共同影响下,随MWCNTs-COOH 处理浓度的增加叶绿素含量呈降低趋势,但是复合处理间差异不显著($P>0.05$);所有复合处理组根系活力皆低于对应的MWCNTs-COOH 单一处理,与单一Cd处理相比, $6.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH 复合Cd处理使根系活力显著下降($P<0.05$);MWCNTs-COOH 复合Cd处理组的叶绿素含量整体低于MWCNTs-COOH 单一处理组。

2.2 MWCNTs-COOH 复合 Cd 对蚕豆幼苗的氧化损伤

2.2.1 $\cdot\text{O}_2^-$ 产生速率的变化

由图4可知,MWCNTs-COOH 单一处理下,蚕豆幼苗根和叶 $\cdot\text{O}_2^-$ 产生速率均高于对照,其中, $6.0\text{ mg}\cdot$

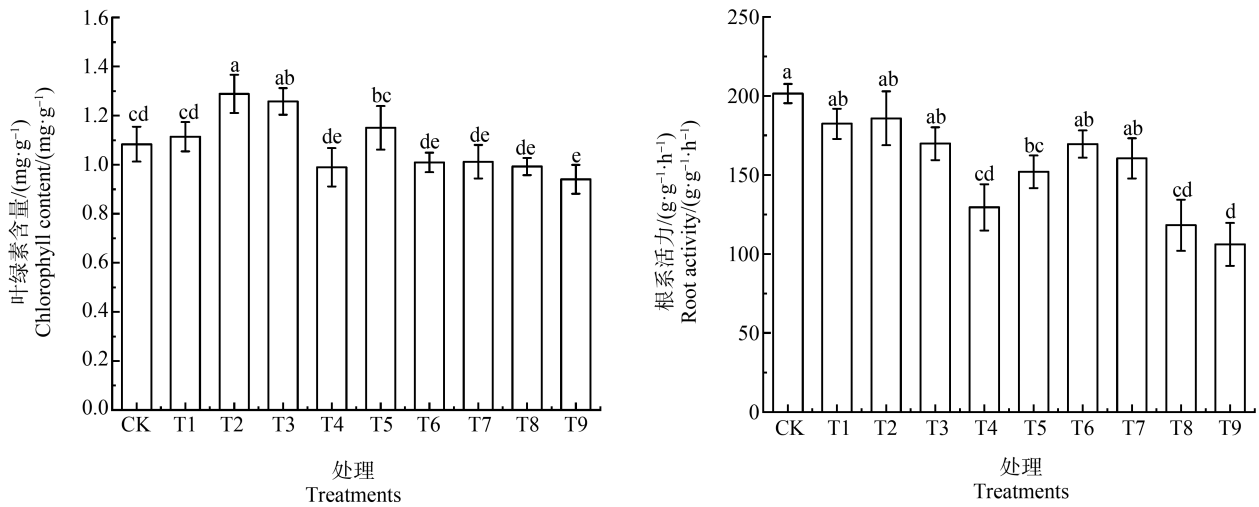


图3 单一 MWCNTs-COOH 处理组及与 Cd 复合处理组中蚕豆叶绿素含量和根系活力变化

注:不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$);下同。

Fig. 3 Changes of chlorophyll content and root activity of *Vicia faba* under single MWCNTs-COOH and MWCNTs-COOH combined with Cd treatments

Notes: The different lowercase letters in the figure indicate significant differences among different treatments at ($P<0.05$) levels; the same below.

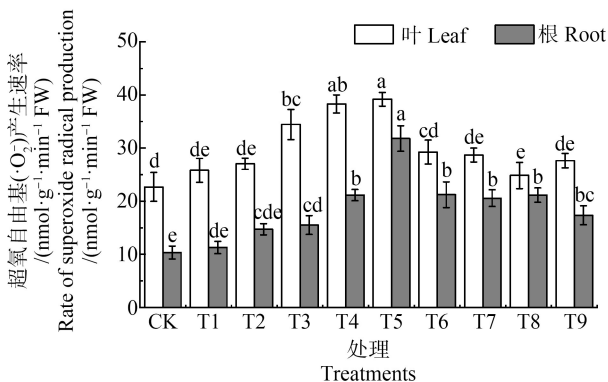


图4 蚕豆叶片和根系中超氧自由基($\cdot\text{O}_2^-$)产生速率的变化

Fig. 4 Changes of superoxide radical ($\cdot\text{O}_2^-$) production rates in leaves and roots of *Vicia faba*

L^{-1} 和 $12.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH 单一处理诱导叶、根 $\cdot\text{O}_2^-$ 产生速率显著加快($P<0.05$);与 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd 处理相比,MWCNTs-COOH 复合 Cd 处理使叶 $\cdot\text{O}_2^-$ 产生速率呈先下降后上升趋势,根 $\cdot\text{O}_2^-$ 产生速率呈下降趋势,但根、叶各处理组之间均无显著差异($P>0.05$)。经一系列梯度处理后,在相同处理下,叶 $\cdot\text{O}_2^-$ 产生速率比对应组的根高。

2.2.2 叶片 H_2O_2 定位及根尖细胞染色

由图 5 和表 1 可知,MWCNTs-COOH 单一处理诱导蚕豆幼苗叶中红褐色斑点增多, $6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH 单一处理显著诱导叶片氧化损伤

($P<0.05$),而根尖细胞染色在 MWCNTs-COOH 浓度为 $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时急剧加深;MWCNTs-COOH 与 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd 共同胁迫下,叶中红褐色斑点和根尖细胞颜色变化呈现相同趋势(先浅后深);当 MWCNTs-COOH 浓度为 $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,叶中红褐色斑点最深且所占叶面积最大,达到 64.2%,而根尖结构不完整,染色较浅。

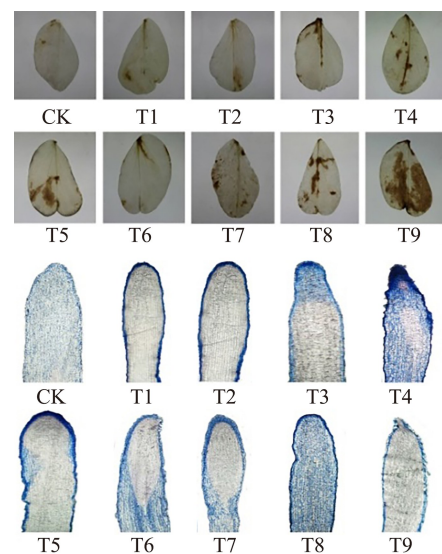


图5 蚕豆叶片过氧化氢(H_2O_2)定位及根尖细胞染色

Fig. 5 Leaf hydrogen peroxide (H_2O_2) localization and root tip cell staining of *Vicia faba*

2.2.3 MDA 含量的变化

由表 2 可知,MWCNTs-COOH 单一处理蚕豆幼苗,根和叶 MDA 含量皆高于对照,但各处理组之间差异不显著($P>0.05$);与 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 复合后, $3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH 诱导根和叶 MDA 含量下降且均低于 Cd 处理, $6.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH 复合 Cd 处理下,根 MDA 含量显著上升($P<0.05$);所有复合处理组根和叶 MDA 含量皆高于对应的 MWCNTs-COOH 单一处理。

表 1 蚕豆叶片氧化损伤面积
Table 1 The oxidative damaged area of *Vicia faba* leaves

处理 Treatments	叶片受损 面积/cm ² Area of leaves damaged/cm ²	叶片面积/cm ² Leaf area/cm ²	叶片受损面积 百分比/% Percentage of damaged leaf area/%
CK	0.19±0.04 f	7.65±1.13 de	2.48
T1	0.29±0.20 ef	7.69±0.92 cde	3.77
T2	0.56±0.09 de	9.59±0.71 a	5.84
T3	1.05±0.16 c	9.45±1.45 ab	11.11
T4	1.10±0.18 c	8.79±0.79 abc	12.51
T5	1.56±0.10 b	9.26±1.26 ab	16.85
T6	0.52±0.12 def	9.37±1.37 ab	5.55
T7	0.66±0.16 d	7.11±0.62 e	9.28
T8	1.80±0.12 b	8.36±1.36 bcd	21.53
T9	5.73±0.43 a	8.95±0.95 abc	64.02

表 2 蚕豆叶片和根系中丙二醛(MDA)含量变化
Table 2 Changes of malondialdehyde (MDA) content in leaves and roots of *Vicia faba*
(nmol·g⁻¹ FW)

处理 Treatments	叶 Leaf	根 Root
CK	14.08±1.67 e	29.26±3.38 c
T1	15.73±1.67 de	30.69±4.17 bc
T2	14.25±2.11 e	31.45±2.32 bc
T3	16.11±1.43 de	32.23±4.15 bc
T4	17.64±0.35 cd	33.76±5.03 ab
T5	18.89±0.53 ab	35.01±2.26 a
T6	19.09±0.21 ab	33.07±3.01 ab
T7	18.15±0.13 bc	31.56±5.19 bc
T8	19.50±1.57 ab	35.64±6.72 a
T9	20.78±0.92 a	36.28±4.29 a

2.3 MWCNTs-COOH 复合 Cd 对蚕豆幼苗 2 种抗氧化酶活性的影响

由图 6 可知,MWCNTs-COOH 单一处理蚕豆幼苗后,根和叶 SOD 及 POD 活性较对照均上升,其中, $6.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH 诱导根和叶 SOD 活性显著升高($P<0.05$),根 SOD 活性达到最大值 $150.21\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$,而叶 SOD 活性在 MWCNTs-COOH 浓度为 $12.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到最大;当 MWCNTs-COOH 浓度在 $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $12.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,叶和根 POD 活性达到最大,分别为 $152.78\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 和 $379.02\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。不同浓度梯度的 MWCNTs-COOH 与 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 复合胁迫下,叶 SOD 与根 POD 活性均呈先下降后上升趋势,各处理组叶 SOD 活性之间差异不显著($P>0.05$),而 $6.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH 复合 Cd 诱导根 POD 活性显著升高($P<0.05$),与此同时,复合 Cd 处理组均使根 POD 活性低于 Cd 单一处理;SOD 活性皆低于对应 MWCNTs-COOH 单一处理;叶 SOD 活性总体上比根 SOD 活性高,而叶 POD 活性则低于根的。

3 讨论(Discussion)

3.1 MWCNTs-COOH 复合 Cd 对蚕豆幼苗叶绿素含量和根系活力的影响

叶绿素是植物吸收太阳光能进行光合作用的重要物质,其含量的高低直接影响植物光合作用的水平,而根系活力的高低直接影响着植物地上部分的生长发育^[32-33]。因此,两者都是植物响应逆境胁迫的重要生理体现。杨祥宇^[34]研究了黄瓜和芦苇等湿地植物叶绿素含量在纳米二氧化钛胁迫下的变化,实验结果表明, $1\sim 50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 纳米二氧化钛能不同程度地提高叶绿素含量。Begum 等^[35]利用未改性 MWCNTs 处理水稻等幼苗,结果表明, $0\sim 200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MWCNTs 处理下,根系活力呈上升趋势。本研究中,蚕豆幼苗在 $1.5\sim 6.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH 单一处理下叶绿素含量升高,但根系活力皆低于对照。与前人研究对比,蚕豆幼苗对 MWCNTs-COOH 的耐受范围低于纳米二氧化钛处理下的芦苇及 MWCNTs 处理下的水稻等植物。原因是 MWCNTs-COOH 是改性的纳米材料,能够穿透植物根部细胞壁,对植物的毒害大于未改性的 MWCNTs^[22]。此外,植物种类的不同也会使其对纳米材料的耐受浓度范围产生差异。当 MWCNTs-COOH 与 Cd 共同胁迫蚕豆幼苗时, $1.5\sim 3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH 反而促进根系活力的增加,原因是 MWCNTs-COOH

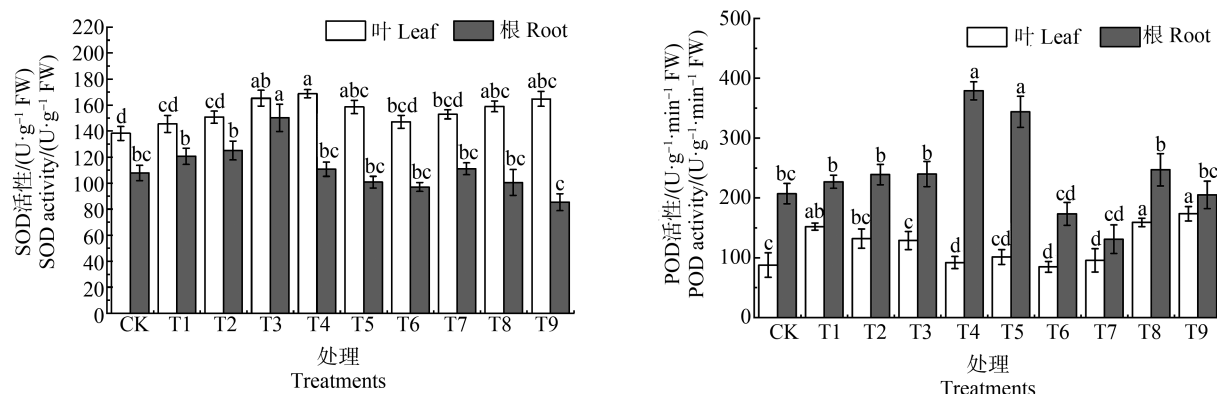


图6 蚕豆叶片和根系中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)活性变化

Fig. 6 Changes of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) activities in leaf and root system of *Vicia faba*

可有效吸附环境中的重金属离子^[36],使部分 Cd 被附着在 MWCNTs-COOH 上,减弱了 Cd 对植物根系的损伤。

3.2 MWCNTs-COOH 复合 Cd 对蚕豆幼苗的氧化损伤

3.2.1 对 $\cdot\text{O}_2^-$ 产生速率和叶片 H_2O_2 含量的影响

植物在生长过程中会受到多种胁迫,其中,纳米材料与重金属胁迫会产生对植物细胞有害的活性氧(ROS),ROS 中包含的 $\cdot\text{O}_2^-$ 和 H_2O_2 具有很强的氧化能力,且性质活泼,对细胞的结构和功能会产生很大的影响^[37-38]。有研究表明,MWCNTs 的集聚导致了 ROS 的迅速积累,是引起植物氧化损伤的根本原因^[39-41]。本研究中,MWCNTs-COOH 单一处理以及与 Cd 复合处理均诱导了蚕豆幼苗根和叶 $\cdot\text{O}_2^-$ 产生速率的增加和 H_2O_2 含量的积累; $\cdot\text{O}_2^-$ 产生速率随 MWCNTs-COOH 单一处理浓度的增大而逐渐增加,且浓度越大,增加越显著,与刘雪琴^[42]利用纳米 ZnO 处理玉米的研究结果相似。

3.2.2 对根尖的影响

植物在受到胁迫时,根尖细胞会出现不同程度的损伤,损伤程度越大,表明其受到的胁迫越严重。伊文思蓝能够与蛋白结合形成伊文思蓝蛋白复合物,但不能透过正常细胞膜;当细胞受损后,其进入细胞并结合蛋白,使细胞染成蓝色^[28]。因此,可以根据细胞染色程度来判断根尖的受损情况。在 MWCNTs-COOH 单一处理下,根尖细胞染色程度随 MWCNTs-COOH 浓度的增加而逐渐加深,尤其当浓度达到 $12.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,根尖细胞染色最深,受损最严重。 $12.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH 复合 Cd 后,蚕豆幼苗随时间的增长出现根部腐烂现象,导致部分

细胞脱落,根尖细胞染色变浅,该现象与邱清华等^[43]利用白菜等十字花科植物在 Pb 胁迫下的实验结果相同,表明蚕豆根尖在高浓度 MWCNTs-COOH 与 Cd 共同胁迫下细胞受到严重毒害。

3.2.3 对 MDA 含量的影响

ROS 能够诱导膜脂过氧化作用,引起细胞膜变性,从而导致细胞损伤,严重时造成细胞死亡^[44]。因此,MDA 作为膜脂过氧化的产物,其含量越高表明细胞膜受 $\cdot\text{O}_2^-$ 毒害越严重^[45]。钟建丹等^[46]研究了 MWCNTs 单一和复合菲处理下水稻幼苗氧化损伤的情况,结果显示, $60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MWCNTs 单一处理使水稻幼苗出现轻微程度的氧化损伤, $1.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 菲与 $60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MWCNT 同时暴露下的水稻幼苗 MDA 积累情况与对照相比,根 MDA 含量变化不明显,但是叶 MDA 含量显著上升。而本研究中 MWCNTs-COOH 单一处理与复合处理均诱导了蚕豆幼苗 MDA 含量升高, $6.0\sim 12.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH 与 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 复合胁迫下,根 MDA 含量显著升高。这可能是因为高浓度 MWCNTs-COOH 单一或与 Cd 复合加强了细胞膜脂过氧化作用。

3.3 MWCNTs-COOH 复合 Cd 对蚕豆幼苗 SOD 和 POD 活性的影响

植物拥有完整的抗氧化防御系统,当体内产生的 ROS 过多时,通常会上调体内一系列抗氧化酶来消除或减弱 ROS 对其的危害。如 SOD 是阻止细胞损伤最有效的抗氧化酶,对 $\cdot\text{O}_2^-$ 有强烈的清除作用,它可以将 $\cdot\text{O}_2^-$ 转化为 H_2O_2 和 O_2 ^[47];而 POD 则可以将 H_2O_2 转化为 H_2O 和 O_2 ,阻止 H_2O_2 对膜脂的攻击^[48]。郭敏等^[49]研究了水稻幼苗 SOD 活性在不同

浓度 MWCNTs 胁迫下的变化情况,实验结果表明,水稻幼苗 SOD 活性只有在高浓度($100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) MWCNTs 处理下显著上升,与本实验中蚕豆幼苗根 POD 活性在 $12\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH 处理下得到的结果一致。本研究中,低浓度 MWCNTs-COOH 单一处理蚕豆幼苗,使得根和叶 SOD 活性、根 POD 活性升高但是不显著, $12.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH 复合 Cd 处理根后,SOD 与 POD 活性均下降,与罗潇宇等^[50]研究 MWCNTs-COOH 对蛋白核小球藻的细胞总抗氧化能力的结果一致,表明蚕豆幼苗对低浓度 MWCNTs-COOH 表现出一定的耐性,高浓度 MWCNTs-COOH 复合 Cd 促使 ROS 过量累积,超出了抗氧化酶防御系统的清除能力,从而抑制了酶活性。

本研究结果表明,低浓度 MWCNTs-COOH 对植物生理代谢有一定的促进作用,并能吸附一定量的 Cd,减弱 Cd 对植物的毒害作用。高浓度 MWCNTs-COOH 单一与复合 Cd 处理会对植物产生胁迫,加重植物氧化损伤程度。因此,值得警示的是:持续向环境中释放 MWCNTs-COOH,可能会引起植物毒性,加剧因复合重金属 Cd 而带来的生态风险。

通讯作者简介:汪承润(1966—),男,博士,教授,主要研究方向为生态毒理学。

参考文献 (References):

- [1] Guaglianoni W C, Florence C L, Bonatto F, et al. Novel nanoarchitected cobalt-doped TiO_2 and carbon nanotube arrays: Synthesis and photocurrent performance [J]. *Ceramics International*, 2019, 45(2): 2439-2445
- [2] Ninnora Meethal B, Ramanarayanan R, Swaminathan S. Surface modification of oxygen-deficient ZnO nanotubes by interstitially incorporated carbon: A superior photocatalytic platform for sustainable water and surface treatments [J]. *Applied Nanoscience*, 2018, 8(6): 1545-1555
- [3] 王婧雯, 张静静, 范同样. 碳纳米管表面处理及其在铜基复合材料中的应用[J]. *材料导报*, 2018, 32(17): 2932-2939, 2948
Wang J W, Zhang J J, Fan T X. Process in surface treatment of carbon nanotubes and its applications to copper matrix composites [J]. *Materials Review*, 2018, 32(17): 2932-2939, 2948 (in Chinese)
- [4] 陈晓, 陈佳辉, 陈日耀, 等. 功能化多壁碳纳米管负载铁离子改性双极膜的制备与表征[J]. *高分子材料科学与工程*, 2017, 33(4): 148-153
- Chen X, Chen J H, Chen R Y, et al. Preparation and characterization of bipolar membranes modified by functionalized multiwalled carbon nanotubes loaded with Fe^{3+} [J]. *Polymer Materials Science & Engineering*, 2017, 33(4): 148-153 (in Chinese)
- [5] Petersen E J, Zhang L W, Mattison N T, et al. Potential release pathways, environmental fate, and ecological risks of carbon nanotubes [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(23): 9837-9856
- [6] 贾建博, 江翠娟, 闫兵. 纳米材料在易感群体小鼠模型中的潜在毒性[J]. *科学通报*, 2017, 62(24): 2749-2757
Jia J B, Jiang C J, Yan B. Potential nanotoxicity in susceptible populations: Insight from investigation of mouse models [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2017, 62(24): 2749-2757 (in Chinese)
- [7] Edgington A J, Roberts A P, Taylor L M, et al. The influence of natural organic matter on the toxicity of multiwalled carbon nanotubes [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2010, 29(11): 2511-2518
- [8] Mouchet F, Landois P, Puech P, et al. Carbon nanotube ecotoxicity in amphibians: Assessment of multiwalled carbon nanotubes and comparison with double-walled carbon nanotubes [J]. *Nanomedicine*, 2010, 5(6): 963-974
- [9] Folkmann J K, Risom L, Jacobsen N R, et al. Oxidatively damaged DNA in rats exposed by oral gavage to C60 fullerenes and single-walled carbon nanotubes [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2009, 117(5): 703-708
- [10] Liu S, Wei L, Hao L, et al. Sharper and faster “nanodarts” kill more bacteria: A still of antibacterial activity of individually dispersed pristine single-walled carbon nanotube [J]. *ACS Nano*, 2009, 3(12): 3891-3902
- [11] Parvin B, Ikhtari R, Fugetsu B, et al. Phytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes assessed by selected plant species in the seedling stage [J]. *Applied Surface Science*, 2012, 262(13): 120-124
- [12] Begum P, Ikhtari R, Fugetsu B. Graphene phytotoxicity in the seedling stage of cabbage, tomato, red spinach, and lettuce [J]. *Carbon*, 2011, 49(12): 3907-3919
- [13] Khodakovskaya M, Dervishi E, Mahmood M, et al. Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth [J]. *ACS Nano*, 2009, 3(10): 3221-3227
- [14] Khodakovskaya M V, Dervishi E, Villagarcia H, et al. Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells [J]. *ACS Nano*, 2012, 6(3): 2128-2135
- [15] Hassan S E, Hijri M, St-Arnaud M. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on trace metal uptake by sunflower plants grown on cadmium contaminated soil [J]. *New Bi-*

- otechnology, 2013, 30(6): 780-787
- [16] Sato A, Takeda H, Wataru O, et al. Reduction of cadmium uptake in spinach (*Spinacia oleracea* L.) by soil amendment with animal waste compost [J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 181(1-3): 298-304
- [17] 刘俊, 廖柏寒, 曾清如, 等. 镉胁迫对豆科作物生理生态效应研究进展[J]. 生态毒理学报, 2010, 5(2): 295-301
- Liu J, Liao B H, Zeng Q R, et al. Advances on physiological and ecological effects of cadmium on legume crops [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2010, 5(2): 295-301 (in Chinese)
- [18] 王素娟. 水体重金属污染现状及其治理方法研究[J]. 中国化工贸易, 2015(19): 151
- [19] Gomez M R, Cerutti S, Sombra L L, et al. Determination of heavy metals for the quality control in Argentinian herbal medicines by ETAAS and ICP-OES [J]. Food and Chemical Toxicology, 2006, 45(6): 1060-1064
- [20] Gupta S K, Chabukdhara M, Singh J, et al. Evaluation and potential health hazard of selected metals in water, sediments, and fish from the Gomti River [J]. Human and Ecological Risk Assessment, 2015, 21(1): 227-240
- [21] Zhang X R, Song K H, Liu J F, et al. Sorption of triclosan by carbon nanotubes in dispersion: The importance of dispersing properties using different surfactants [J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2019, 562: 280-288
- [22] Wang C, Liu H, Chen J, et al. Carboxylated multi-walled carbon nanotubes aggravated biochemical and subcellular damages in leaves of broad bean (*Vicia faba* L.) seedlings under combined stress of lead and cadmium [J]. Journal of Hazardous Materials, 2014, 274(15): 404-412
- [23] 胡秉芬, 黄华梨, 季元祖, 等. 分光光度法测定叶绿素含量的提取液的适宜浓度[J]. 草业科学, 2018, 35(8): 1965-1974
- Hu B F, Huang H L, Ji Y Z, et al. Evaluation of the optimum concentration of chlorophyll extract for determination of chlorophyll content by spectrophotometry [J]. Practical Science, 2018, 35(8): 1965-1974 (in Chinese)
- [24] 张志勇, 卜晶晶, 王素芳, 等. 冠菌素对不同钾水平下 TTC 法测定的棉花根系活力的影响[J]. 植物生理学报, 2015, 51(5): 695-701
- Zhang Z Y, Bu J J, Wang S F, et al. Effect of coronatine on cotton root activity determined by TTC assay at different levels of potassium [J]. Plant Physiology Journal, 2015, 51(5): 695-701 (in Chinese)
- [25] 李忠光, 龚明. 植物中超氧阴离子自由基测定方法的改进[J]. 云南植物研究, 2005, 27(2): 211-216
- Li Z G, Gong M. Improvement of measurement method for superoxide anion radical in plant [J]. Acta Botanica Yunnanica, 2005, 27(2): 211-216 (in Chinese)
- [26] 丛国强, 尹成林, 何邦令, 等. 水分胁迫下内生真菌球毛壳 ND35 对冬小麦苗期生长和抗旱性的影响[J]. 生态学报, 2015, 35(18): 6120-6128
- Cong G Q, Yin C L, He B L, et al. Effect of the endophytic fungus *Chaetomium globosum* ND35 on the growth and resistance to drought of winter wheat at the seedling stage under water stress [J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(18): 6120-6128 (in Chinese)
- [27] Romero-Puertas M C, Rodriguez-Serrano M, Corpas F J, et al. Cadmium-induced subcellular accumulation of $\cdot\text{O}_2^-$ and H_2O_2 in pea leaves [J]. Plant, Cell and Environment, 2004, 27(9): 1122-1134
- [28] 刘楠, 林植芳. 用伊文思蓝染色法检测植物整体叶片的细胞活性[J]. 植物生理学报, 2011, 47(6): 570-574
- Liu N, Lin Z F. Use of Evans blue for testing cell viability of intact leaves of plant [J]. Plant Physiology Journal, 2011, 47(6): 570-574 (in Chinese)
- [29] Rong H, Wang C R, Yu X R, 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]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 161: 616-623
- [30] Jiang L, Ma L, Sui Y, et al. Effect of manure compost on the herbicide prometryne bioavailability to wheat plants [J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 184(1-3): 337-344
- [31] Zhou Z S, Wang S J, Yang Z M. Biological detection and analysis of mercury toxicity to alfalfa (*Medicago sativa*) plants [J]. Chemosphere, 2008, 70(8): 1500-1509
- [32] 张栋. 干旱胁迫对苹果光合作用和叶绿素荧光的影响及叶片衰老特性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011: 6-7
- Zhang D. Effects of drought stress on photosynthesis and fluorescence chlorophyll parameters of apple leaves and leaf senescence characteristics [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2011: 6-7 (in Chinese)
- [33] 李香玲, 冯跃华. 水稻根系生长特性及其与地上部分关系的研究进展[J]. 中国农学通报, 2015, 31(6): 1-6
- Li X L, Feng Y H. Research advance on relation of aerial part and root traits of rice [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2015, 31(6): 1-6 (in Chinese)
- [34] 杨祥宇. 纳米二氧化钛对人工湿地水处理系统的影响机制研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2018: 55-56
- Yang X Y. Impacts mechanism of titanium oxidation nanoparticles on functionalities of constructed wetlands [D]. Chongqing: Chongqing University, 2018: 55-56 (in Chi-

- nese)
- [35] Begum P, Ikhtiar R, Fugetsu B, et al. Phytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes assessed by selected plant species in the seedling stage [J]. *Applied Surface Science*, 2012, 262: 120-124
- [36] Wang H J, Zhou A L, Peng F, et al. Adsorption characteristic of acidified carbon nanotubes for heavy metal Pb(II) in aqueous solution [J]. *Materials Science and Engineering: A*, 2007, 466(1-2): 201-206
- [37] Noctor G, Reichheld J P, Foyer C H. ROS-related redox regulation and signaling in plants [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2018, 80: 3-12
- [38] Segal L M, Wilson R A. Reactive oxygen species metabolism and plant-fungal interactions [J]. *Fungal Genetics & Biology*, 2018, 110(110): 1-9
- [39] 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
- [40] Begum P, Fugetsu B. Phytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes on red spinach (*Amaranthus tricolor* L.) and the role of ascorbic acid as an antioxidant [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 243: 212-222
- [41] Tan X M, Lin C, Fugetsu B. Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on suspension rice cells [J]. *Carbon*, 2009, 47(15): 3479-3487
- [42] 刘雪琴. 纳米 ZnO/AM 真菌对玉米的生物效应及作用机理研究[D]. 重庆: 西南大学, 2015: 28-29
- Liu X Q. Biological effects of nano-ZnO and arbuscular mycorrhizal fungi on maize and its mechanism [D]. Chongqing: Southwest University, 2015: 28-29 (in Chinese)
- [43] 邱清华, 邓绍云, 黄娟, 等. 铅胁迫对十字花科种子萌发及幼苗生长的影响[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(18): 175-179
- Qiu Q H, Deng S Y, Huang J, et al. Study on the influence of lead stress on the mustard family's seed sprouting and seedling growing [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(18): 175-179 (in Chinese)
- [44] 张苗苗. Se^{4+} 对 Cd^{2+} 胁迫下蚕豆根生理生化特性的研究[D]. 成都: 四川师范大学, 2008: 27-29
- Zhang M M. The research on the physiological and chemical characteristic of *Vicia faba* cultivating in Se-Cd compounds [D]. Chengdu: Sichuan Normal University, 2008: 27-29 (in Chinese)
- [45] 俞萍, 高凡, 刘杰, 等. 镉对植物生长的影响和植物耐镉机制研究进展[J]. *中国农学通报*, 2017, 33(11): 89-95
- Yu P, Gao F, Liu J, et al. Effect of Cd on plant growth and its tolerance mechanism [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2017, 33(11): 89-95 (in Chinese)
- [46] 钟建丹, 陈红春, 罗春燕, 等. 碳纳米管与非暴露对水稻发芽及幼苗生长的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2018, 37(10): 2110-2117
- Zhong J D, Chen H C, Luo C Y, et al. Exposure to carbon nanotube and phenanthrene: Impact on germination and seedling growth of rice [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37(10): 2110-2117 (in Chinese)
- [47] Seppänen M, Turakainen M, Hartikainen H. Selenium effects on oxidative stress in potato [J]. *Plant Science*, 2003, 165(2): 311-319
- [48] 杨淑慎, 高俊凤. 活性氧、自由基与植物的衰老[J]. *西北植物学报*, 2001, 21(2): 215-220
- Yang S S, Gao J F. Influence of active oxygen and free radicals on plant senescence [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2001, 21(2): 215-220 (in Chinese)
- [49] 郭敏, 龚继来, 曾光明. 多壁碳纳米管对水稻幼苗的植物毒性研究[J]. *生态毒理学报*, 2016, 11(5): 94-102
- Guo M, Gong J L, Zeng G M. Comprehensive phytotoxicity assessment of multi-wall carbon nanotubes on rice seedlings [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2016, 11(5): 94-102 (in Chinese)
- [50] 罗潇宇, 任垠安, 高浩杰, 等. 羧基化多壁碳纳米管对蛋白核小球藻的生物学效应研究[J]. *生态毒理学报*, 2017, 12(5): 212-218
- Luo X Y, Ren Y A, Gao H J, et al. Effects of carboxylated multi-walled carbon nanotubes on the physiology of *Chlorella pyrenoidosa* [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2017, 12(5): 212-218 (in Chinese)