

纳米铜对小油菜(*Brassica chinensis* L.)种子发芽和幼苗生理生化特性的影响

付宇童, 孙彤, 王林, 徐应明, 梁学峰, 孙约兵

引用本文:

付宇童, 孙彤, 王林, 等. 纳米铜对小油菜(*Brassica chinensis* L.)种子发芽和幼苗生理生化特性的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2020, 39(11): 2524–2531.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0189>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

头孢菌素C对蔬菜种子萌发的毒理效应

周睫雅, 任爱玲, 刘宏博, 吴昊, 马双, 崔思嘉, 王旭明, 田书磊

农业环境科学学报. 2020, 39(10): 2429–2436 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0427>

铀对蚕豆幼苗光合特性和呼吸代谢的毒害机理

刘泽伟, 赖金龙, 李俊柯, 丁峰, 张宇, 罗学刚

农业环境科学学报. 2020, 39(9): 1916–1924 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0390>

屎肠球菌胞外多糖对镉胁迫下水稻种子萌发及幼苗生长的影响

罗晟, 赵泽文, 任新宇, 魏宏宇, 马雅静, 潘起涛, 李荣同, 龚国胜, 程新

农业环境科学学报. 2020, 39(9): 1888–1899 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0181>

镉胁迫对桑树生理指标及富集转运特征的影响

耿丽莎, 杨再福, 许志楠, 舒文君, 朱彤

农业环境科学学报. 2020, 39(8): 1667–1674 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0030>

碳纳米管与非暴露对水稻发芽及幼苗生长的影响

钟建丹, 陈红春, 罗春燕, 李科岑, 向均钧, 王莉淋, 邓仕槐

农业环境科学学报. 2018, 37(10): 2110–2117 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0059>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

付宇童, 孙彤, 王林, 等. 纳米铜对小油菜(*Brassica chinensis* L.)种子发芽和幼苗生理生化特性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(11): 2524–2531.

FU Yu-tong, SUN Tong, WANG Lin, et al. Effects of copper nanoparticles on seed germination and physiological and biochemical characteristics of *Brassica chinensis* L.[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020, 39(11): 2524–2531.



开放科学 OSID

纳米铜对小油菜(*Brassica chinensis* L.)种子发芽和幼苗生理生化特性的影响

付宇童^{1,2}, 孙彤^{1,2}, 王林², 徐应明², 梁学峰², 孙约兵^{2*}

(1. 东北农业大学资源与环境学院, 哈尔滨 150030; 2. 农业农村部环境保护科研监测所, 农业农村部产地环境污染防控重点实验室/天津市农业环境与农产品安全重点实验室, 天津 300191)

摘要:通过纸床培养, 探究了不同剂量(1、2、4、6、8、10 mg·L⁻¹)纳米铜(Copper nanoparticles, Cu NPs)对小油菜(*Brassica chinensis* L.)种子发芽、幼苗Cu含量、根细胞微观特征以及幼苗生理生化特性的影响。结果表明, 不同浓度Cu NPs处理对种子发芽率无显著影响($P>0.05$), 小油菜根和茎伸长量均随Cu NPs浓度增加先升高后降低, 当Cu NPs添加量为2~10 mg·L⁻¹时小油菜根伸长抑制率为10.7%~59.9%, 而当Cu NPs ≥ 4 mg·L⁻¹时小油菜茎长显著低于对照组($P<0.05$), 降低了4.8%~15.8%。幼苗体内Cu含量随着Cu NPs浓度的增加而升高。通过透射电子显微镜可以看出, 添加10 mg·L⁻¹ Cu NPs使根细胞出现比较普遍的质壁分离现象。与对照组比较, Cu NPs处理后小油菜幼苗体内超氧化物歧化酶活性降低了4.5%~64.0%(1 mg·L⁻¹除外), 过氧化物酶降低幅度达到4.4%~59.3%, 而不同浓度Cu NPs处理对小油菜幼苗体内过氧化氢酶活性影响不显著($P>0.05$), 因此, 小油菜生理生化特性对不同剂量Cu NPs响应不同。

关键词: 纳米铜; 抑制率; Cu含量; 发芽; 酶活性

中图分类号: S565.4 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2020)11-2524-08 doi:10.11654/jaes.2020-0189

Effects of copper nanoparticles on seed germination and physiological and biochemical characteristics of *Brassica chinensis* L.

FU Yu-tong^{1,2}, SUN Tong^{1,2}, WANG Lin², XU Ying-ming², LIANG Xue-feng², SUN Yue-bing^{2*}

(1. College of Resources and Environment, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Key Laboratory of Original Agro-Environmental Pollution Prevention and Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Tianjin Key Laboratory of Agro-Environment and Agro-Product Safety, Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Tianjin 300191, China)

Abstract: A paper-bed culture experiment was conducted to investigate the effects of different dosages (1, 2, 4, 6, 8 mg·L⁻¹, and 10 mg·L⁻¹) of copper nanoparticles (Cu NPs) on *Brassica chinensis* L., including seed germination, Cu content in seedlings, the microscopic characteristics of root cells, and physio-chemical characteristics. The results showed that Cu NPs had no significant effect on the seed germination rate ($P>0.05$). The root and shoot elongation of *Brassica chinensis* L. increased first and then decreased with the increase of Cu NPs content. The inhibition rate of *Brassica chinensis* L. root elongation was 10.7%~59.9% under the treatment of 2~10 mg·L⁻¹ Cu NPs. The inhibition rate of *Brassica chinensis* L. shoots was significantly decreased when the amount of Cu NPs reached 4 mg·L⁻¹, exhibiting a 4.8%~15.8% reduction in contrast with the control. The Cu content in *Brassica chinensis* L. seedlings increased with the increase of Cu NPs concentration. Transmission electron microscopy showed that the addition of 10 mg·L⁻¹ Cu NPs resulted in a common wall separation of

收稿日期: 2020-02-24 录用日期: 2020-06-30

作者简介: 付宇童(1996—), 女, 黑龙江哈尔滨人, 硕士研究生, 研究方向为环境毒理学。E-mail: 2111516068@qq.com

*通信作者: 孙约兵 E-mail: sunyuebing@aepi.org.cn

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31971525); 中国农业科学院基本科研业务费专项院级统筹项目(Y2020PT03)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China(31971525); The Basic Funds for Research and Development of Chinese Academy of Agriculture Sciences(Y2020PT03)

root cells. Compared with the control group, the activity of superoxide dismutase decreased by 4.5%~64.0% under the treatments of Cu NPs (except for 1 mg·L⁻¹ Cu NPs); the peroxidase activity was inhibited by 4.4%~59.3%. However, catalase activity had no significant differences among the addition of Cu NPs ($P>0.05$). Therefore, the physiological and biochemical characteristics of *Brassica chinensis* L. vary in response to the doses of Cu NPs.

Keywords: copper nanoparticles; inhibition rate; Cu content; germination; enzyme activity

铜纳米颗粒(Copper nanoparticles, Cu NPs)具有较高的导热性、导电性及抗微生物特性,被广泛应用于陶瓷、抗菌剂、润滑油和涂料等许多工业产品中^[1]。在其生产、运输、使用及处置过程中将不可避免地进入土壤中,并被植物吸收进入食物链,因此关注Cu NPs释放到环境中对生态系统及人类健康的潜在影响是十分必要的。李芳芳等^[2]研究发现,粒径为10~30 nm Cu粉使肋骨条藻中叶绿素含量降低,0.1 mg·L⁻¹ Cu NPs对肋骨条藻细胞生长抑制率达50%。范功端等^[3]证明了0.3~1.3 mg·L⁻¹ Cu NPs会显著抑制斜生栅藻生长,降低叶绿素含量,2.0~3.3 mg·L⁻¹ Cu NPs使斜生栅藻几乎停止生长且出现细胞破裂现象。Lee等^[4]观察到Cu NPs对绿豆和小麦幼苗的生长造成负面影响,且绿豆比小麦更为敏感。Tamez等^[5]研究表明,Cu NPs会抑制西葫芦生长,200 mg·kg⁻¹ Cu NPs使植物根组织抗坏血酸酶活性降低80%。Zhang等^[6]研究发现1 mg·L⁻¹ Cu NPs会激发小麦体内参与脯氨酸代谢的相关基因表达。Apodaca等^[7]发现50~100 mg·L⁻¹ Cu NPs处理会改变食用豆营养价值。上述研究表明,Cu NPs对植物的影响因其本身性质、浓度及植物物种等的不同,表现出的毒性效应各有差异。

小油菜(*Brassica chinensis* L.)是我国种植面积和范围最广的蔬菜品种之一,有关其对Cu NPs毒性响应的研究较少。本文选择小油菜为研究对象,探究Cu NPs对小油菜种子发芽率、根茎伸长情况,以及幼苗超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)、过氧化物酶(Peroxidase, POD)活性的影响,分析了Cu NPs在小油菜幼苗体内的吸收累积,利用透射电子显微镜观察根部的形态结构变化,以期对Cu NPs的安全评价提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试小油菜种子购自广州长合种子有限公司,发芽率为95%。Cu NPs粒径为10~30 nm,纯度≥99.9%,比表面积为6.99 m²·g⁻¹,利用透射电子显微镜(JEM-2010,日本)对Cu NPs进行表征,见图1。

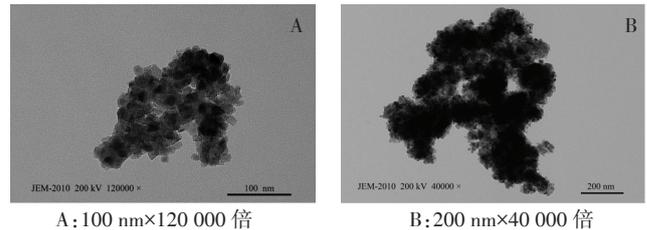


图1 Cu NPs透射电镜图

Figure 1 Transmission electron microscope(TEM) of Cu NPs

1.2 试验设计

1.2.1 Cu NPs悬浮液的制备

将Cu NPs粉末加入超纯水中,超声(100 W, 40 kHz)1 h,使Cu NPs粉末可以均匀分散于超纯水中形成悬浮溶液备用,将超声后的悬浮液置于磁力搅拌器上搅拌,使之成为均匀的悬浊液^[8]。

1.2.2 预试验

设置4个Cu NPs浓度梯度:0、2、20、200 mg·L⁻¹,每个处理3个重复,培养4 d后,测量种子发芽数量(种子露白即被认为发芽)、根长和茎长(以胚轴与根之间的过渡点区分根长和茎长),并计算Cu NPs对种子根抑制率分别为10%和50%时的浓度值,即IC₁₀和IC₅₀^[8]。

$$\text{抑制率}=(A-B)/A \times 100\%$$

式中:A为对照组小油菜种子根伸长或茎伸长,cm;B为各浓度Cu NPs处理下小油菜种子根伸长或茎伸长,cm。

预试验结果以浓度-抑制率绘制曲线,进行回归分析,并根据回归方程计算Cu NPs对根伸长及茎伸长抑制率为10%和50%的浓度值,即IC₁₀和IC₅₀。

回归方程依据 $y=A \times \ln(x)+B$ 或 $y=Cx^3+D$,其中A、B、C、D为曲线常数。

1.2.3 正式试验

根据预试验结果,在Cu NPs对小油菜根伸长抑制率10%~50%范围内,设置浓度为0、1、2、4、6、8 mg·L⁻¹和10 mg·L⁻¹,取各浓度的Cu NPs悬浊液6 mL置于铺有一层滤纸、内径为12 cm的无菌培养皿中,每个处理均设8个重复。分别接入小油菜种子各20粒,盖好培养皿,置于25℃恒温恒湿培养箱中培养4 d^[8]。

暴露培养结束时,测定各处理组种子的发芽数量、根茎伸长量、根茎抑制率、Cu含量、抗氧化酶活性以及根细胞微观形态。

1.3 测定方法

选取小油菜幼苗根部鲜样固定于2.5%(质量分数)戊二醛固定液中,经 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液清洗,乙醇逐级脱水,环氧丙烷置换,进行树脂浸透包埋,在烘箱中聚合。将包埋块置于超薄切片机(Leica ultracut R,德国)上进行切片,染色后通过透射电子显微镜(JEM-1230,日本)观察并拍照^[9]。

抗氧化酶活性的测定方法参考文献[10]。称取0.1 g植物鲜样加入 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液冰上匀浆, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $8\ 000 \text{ g}$ 离心10 min,上清液即为粗酶液。POD活性测定采用愈创木酚法,CAT活性测定采用高锰酸钾滴定法,SOD活性测定采用氮蓝四唑光化还原法。

收集小油菜幼苗后,蒸馏水清洗3遍,杀青,置于 $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下烘干至恒质量、粉碎。称取植物样品于消煮管中,加入8 mL HNO_3 加盖静置12 h,放入消解炉(DigiBlock ED54,中国)中消解, $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 消解1.5 h, $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 消解1.5 h, $150 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 消解3 h,去塞, $180 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 消解至管内液体余1 mL后取出,加超纯水定容至50 mL,加塞摇匀,Cu含量采用电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS,美国)进行测定^[11]。

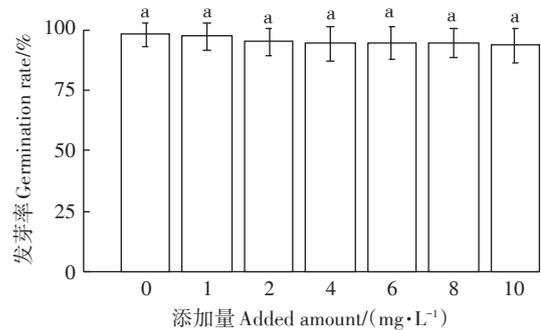
1.4 数据分析

利用Excel 2010对试验数据进行统计,使用DPS数据处理系统的单因素方差分析(One-way ANOVA)和多重比较分析(LSD法)对不同处理间差异显著性进行比较($P < 0.05$),数据以平均值和标准差表示,并采用Origin 2018进行绘图。

2 结果与讨论

2.1 不同剂量Cu NPs对小油菜种子发芽的影响

本试验中,不同剂量Cu NPs处理下的小油菜种子发芽率与对照(超纯水)相比降低了0.7%~4.3%,各处理发芽率均无显著差异($P > 0.05$)(图2),Cu NPs对小油菜种子发芽率的抑制率方程为 $y = -2.3 \ln x + 98.0$ ($R^2 = 0.923$)。这与Stampoulis等^[12]、向垒等^[8]研究结果一致。Stampoulis等^[12]研究发现, $1\ 000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu NPs处理不会对西葫芦种子发芽造成影响。向垒等^[8]研究表明 $0.2 \sim 8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 纳米氧化铜不会对白菜种子发芽率造成影响。这是由于种子发芽过程中主要由胚内进行养分供应,所选用的小油菜种子有种皮,具有选



不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)。下同
The different lowercase letters indicate significant differences among treatments ($P < 0.05$). The same below

图2 Cu NPs对种子发芽的影响

Figure 2 Effects of Cu NPs on seed germination

择透过性,其在保护胚胎免受有害外部因素的影响中起着非常重要的作用,可以降低外界污染对种子的毒害作用,只有受到极严重的污染时,种子发芽率才会受到明显影响^[13]。

较低浓度的Cu NPs会对小油菜的根伸长造成明显影响(图3A),当Cu NPs添加量为 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,小油菜根伸长量与对照组相比增加了3.3%,不存在显著性差异($P > 0.05$)。Pradhan等^[14]研究表明, $0.05 \sim 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu NPs会促进绿豆根、茎伸长。陈晓华等^[15]研究结果说明,Cu属于过渡金属,是植物生长的必要微量元素,低浓度下可作为酶的辅助因子促进藻类的光合作用,从而促进其生长。当Cu NPs添加量为2、4、6、8、 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,小油菜的根伸长量受到抑制,分别降低了10.7%、14.7%、49.5%、50.8%、59.9%,当Cu NPs的添加量为 $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,抑制率达到50.0%(图3B)。范功端等^[3]指出 $0.3 \sim 1.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu NPs培养条件下斜生栅藻的生长被抑制,处理组细胞密度总体上显著低于对照组($P < 0.05$), $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu NPs完全抑制斜生栅藻、四列藻和椭圆小球藻的生长。Kouhi等^[16]研究发现纳米锌会抑制6种高等植物物种(萝卜、甘蓝型油菜、多花黑麦草、紫花苜蓿、玉米和黄瓜)的根系生长。Hussain等^[17]研究了 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu NPs对苦艾蒿生长发育的影响,结果表明在处理7 d后苦艾蒿根长受到抑制。

Cu NPs对小油菜茎伸长量的影响整体呈现先促进后抑制的趋势(图4A),Cu NPs添加量为 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,小油菜茎伸长量增加了2.2%,但与未添加Cu NPs处理组没有显著性差异($P > 0.05$); $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu NPs对小油菜茎伸长有促进作用,较对照显著增加了9.1%;而当Cu NPs浓度 $\geq 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,会对小油菜茎伸长量

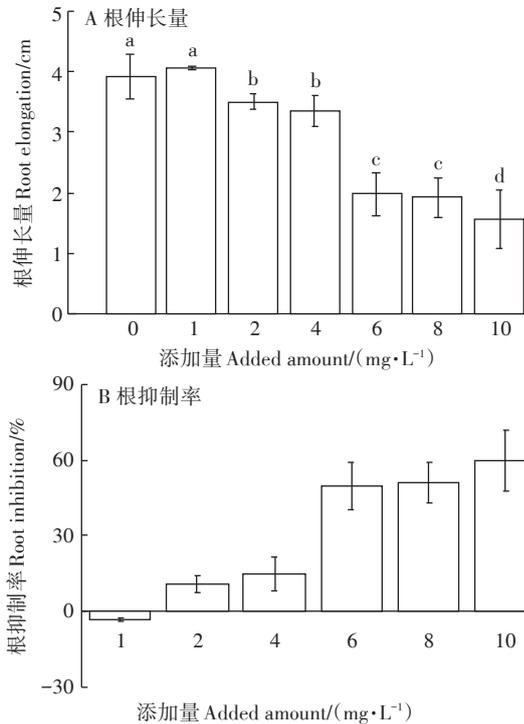


图3 Cu NPs 处理对根伸长的影响

Figure 3 Effects of Cu NPs on root elongation

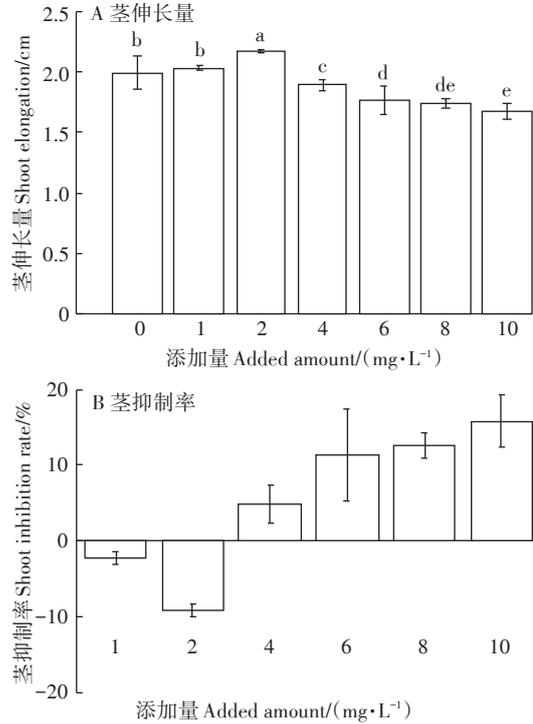


图4 Cu NPs 对茎伸长的影响

Figure 4 Effect of Cu NPs on shoot elongation

造成显著抑制作用($P<0.05$),与对照相比,小油菜茎伸长量降低4.8%~15.8%(图4B)。Saharan等^[18]研究也发现,添加0.08~0.12 mg·L⁻¹Cu NPs会促进番茄茎伸长量增加,但是随着添加量的增加促进作用不断降低。王磊等^[19]研究了Cu离子对莴苣柱高的影响,结果表明5 mg·L⁻¹Cu离子处理下莴苣株高产生抑制作用,但不显著($P>0.05$)。

研究发现,小油菜根的伸长与Cu NPs的暴露之间存在一定的剂量-效应关系,但是小油菜茎伸长没有显示出相同的结果,小油菜根部受到污染物的伤害比其他部位要明显。这可能是由于小油菜种子发芽后,根是面对污染物的第一目标组织,根系会直接与污染源进行接触且对Cu的吸收能力较强,重金属进入到小油菜根部会抑制根尖细胞有丝分裂,抑制根系正常发育^[20]。Cu被小油菜根部吸收后存在滞留作用,阻碍了Cu离子向茎、叶部位的运输,这也是植物抵御重金属胁迫的方式之一,因此毒性症状会更多地出现在根中而不是枝条中^[21]。纳米颗粒的毒性可能归因于两种不同的作用,一是基于化学成分的化学毒性,也就是释放的金属离子;二是颗粒的表面、大小、形状引起的应力或刺激。虽然Rajak等^[22]研究结果显示Cu NPs溶解释放的Cu离子含量较低,但正如Kouhi等^[16]在评价纳米氧化锌对植物毒性效应时所提

到的,探究金属纳米颗粒对植物的毒性作用时,必须要考虑金属离子的毒性。研究结果表明,Cu NPs会比纳米氧化锌表现出更强的毒性,推测Cu NPs之所以会对小油菜根部造成更大程度的损伤,可能是由于选择的Cu NPs粒径更小,更容易透过细胞壁达到质膜,对小油菜根部的细胞组织造成破坏^[13]。

2.2 小油菜幼苗Cu含量和根细胞微观特征的变化

不同浓度Cu NPs处理下小油菜幼苗中Cu含量见图5。整体上小油菜幼苗Cu含量随Cu NPs添加量增加而增加($y=1.8x^3+8.7, R^2=0.850$)。与对照相比,当Cu NPs浓度 ≤ 2 mg·L⁻¹时幼苗体内Cu含量增加不显著($P>0.05$),而当Cu NPs浓度 ≥ 4 mg·L⁻¹时小油菜幼苗体内Cu含量显著增加($P<0.05$)。这是由于随着Cu NPs添加量的增加,其在水中的溶解量也会增加,导致更多的Cu离子进入小油菜体内^[23]。

根据前文研究结果,选择10 mg·L⁻¹Cu NPs处理下的小油菜根系部位进行植株包埋超薄切片处理,观察Cu NPs对根系细胞的穿透效应(图6)。从图中可以观察到添加10 mg·L⁻¹Cu NPs使细胞出现比较普遍质壁分离现象,这可能是由于Cu NPs的添加对植物细胞造成损伤,ROS作为副产物攻击蛋白质、核酸、脂质等,引起细胞氧化应激。秦世玉^[24]的研究出现了类似结果,谢华^[25]也在研究中发现重金属胁迫会使植物

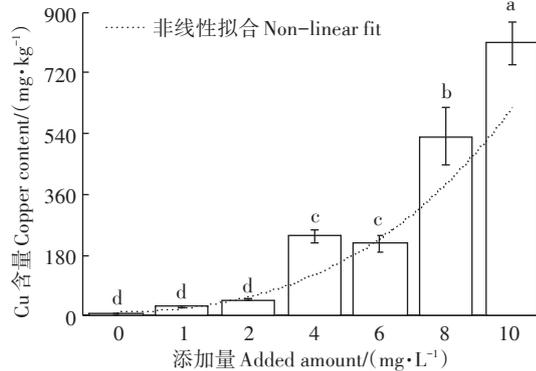
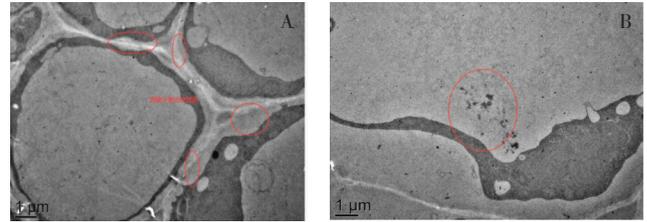


图5 不同Cu NPs处理下小油菜幼苗体内Cu含量的变化
Figure 5 Cu content in the seedling of *Brassica chinensis* L. under the treatments of Cu NPs

细胞出现质壁分离趋向解体的现象。同时在小油菜根部细胞中,观察到高电子密度的沉积物,与Cu NPs进行形态对比,推测可能是Cu NPs通过运输作用进入到细胞中^[26]。纳米颗粒可以通过共质体和质外体两条途径进入植物组织。与共质体相比,质外体的阻力较小,大多数在植物中的分布位点主要是细胞壁和细胞间隙,说明质外体途径可能是主要运输方式^[27]。对植物来说,细胞壁是纳米颗粒进入细胞中的一大障碍。理论上纳米材料的粒径只有小于细胞壁孔径才能进入到细胞中。也有研究表明纳米氧化铜及纳米氧化锌等会被细胞内化,纳米氧化锌会诱导细胞壁产生较大的孔,然后通过这些孔进入到植物组织中^[28]。在玉米根细胞中观察到含有纳米氧化铜的包内体,推测纳米颗粒还可以通过胞吞作用进行跨膜运输^[29-30]。

2.3 Cu NPs对小油菜幼苗酶活性的影响

植物体内SOD、CAT、POD等保护酶系统具有清除活性氧自由基的功能,以减轻活性氧对植物的伤害^[24]。当植物受到外界胁迫时,SOD是植物防御机制的一道重要防线。如图7A所示,当Cu NPs添加量为 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,SOD活性达到最高,显著高于对照和其他处理($P < 0.05$);当Cu NPs添加量为 $2 \sim 6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,SOD活性变化较对照相比变化不显著($P > 0.05$);当Cu NPs添加量 $\geq 8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,与对照相比SOD活性被显著抑制($P < 0.05$),降低了 $50.6\% \sim 64.0\%$ 。Hussain等^[17]研究表明Cu NPs会使苦艾蒿SOD活性下降。崔静等^[31]的研究也得到类似结果,证明金鱼藻暴露于 $0 \sim 8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu NPs后其SOD活性呈现先升高后降低的变化趋势。Nair等^[32]研究发现, $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 纳米氧化铜会降低鹰嘴豆茎中Cu-Zn SOD的基因表达,而Antonio等^[33]结果显示Cu NPs会增加番茄叶片SOD活性。由



A:红圈为细胞壁,B:红圈为高电子密度的沉积物
A: The red circles mean the cell wall;
B: The red circle is the high electron density sediment

图6 根部细胞的扫描电镜图

Figure 6 Transmission electron microscope(TEM) of root cell

于Cu是SOD合成的必要微量元素,低浓度($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Cu NPs处理促进了SOD的表达,SOD活性增加。还可能是由于重金属对植物的毒害作用增加了细胞中活性氧的含量,当污染程度较低时植物体内SOD会被激活,从而消除多余的活性氧来保持植物体内平衡^[32]。而随Cu NPs浓度增加,SOD已经不能消除其产生的毒害作用,或者是由于酶本身是一种蛋白质,Cu NPs会对蛋白质造成损伤,使SOD受到抑制。

CAT是一种广泛存在于植物体内的抗氧化酶。植物中CAT主要与抗逆性及氧化衰老等生理过程有关,植株中过氧化氢有双重作用,一方面适量的过氧化氢可以作为诱导一系列防御机制的信号,另一方面过量过氧化氢会导致过氧化损伤,对植物组织造成损伤^[34]。CAT作为调节植物内氧化还原动态平衡的重要酶,在植物抗毒害作用方面起着重要作用。本研究中,不同剂量Cu NPs处理下小油菜幼苗CAT活性变化不明显($P > 0.05$) (图7B)。与对照相比, $1 \sim 6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu NPs处理下小油菜幼苗CAT活性增加 $1.6\% \sim 8.8\%$,这可能是因为Cu NPs污染下,CAT有协助SOD一起抵御自由基氧化的功能^[35]。而当Cu NPs浓度 $\geq 8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时小油菜幼苗CAT活性降低了 $4.7\% \sim 5.9\%$,这与Trujillo-Reyes等^[35]的结论类似。Nair等^[36]研究表明纳米氧化铜没有对绿豌豆茎中CAT基因表达造成显著影响($P > 0.05$)。Hong等^[37]研究了Cu NPs对莴苣和苜蓿的毒性效应,显示CAT活性总体上随Cu NPs浓度增加均呈现出先增高后降低的趋势。这是由于外界毒性较低的情况下,CAT抵抗外界环境的胁迫作用导致活性增加,但是当污染物添加浓度增加时,过量的Cu可能通过Cu离子代替铁离子的活性中心而导致CAT失活^[32]。但Hernández-Hernández等^[38]研究发现, 10 mg Cu NPs及壳聚糖共同作用下番茄CAT活性会提高 111% ,这可能是壳聚糖包封的Cu NPs颗粒毒性较高,而试验选用Cu NPs粉末,可能由于选

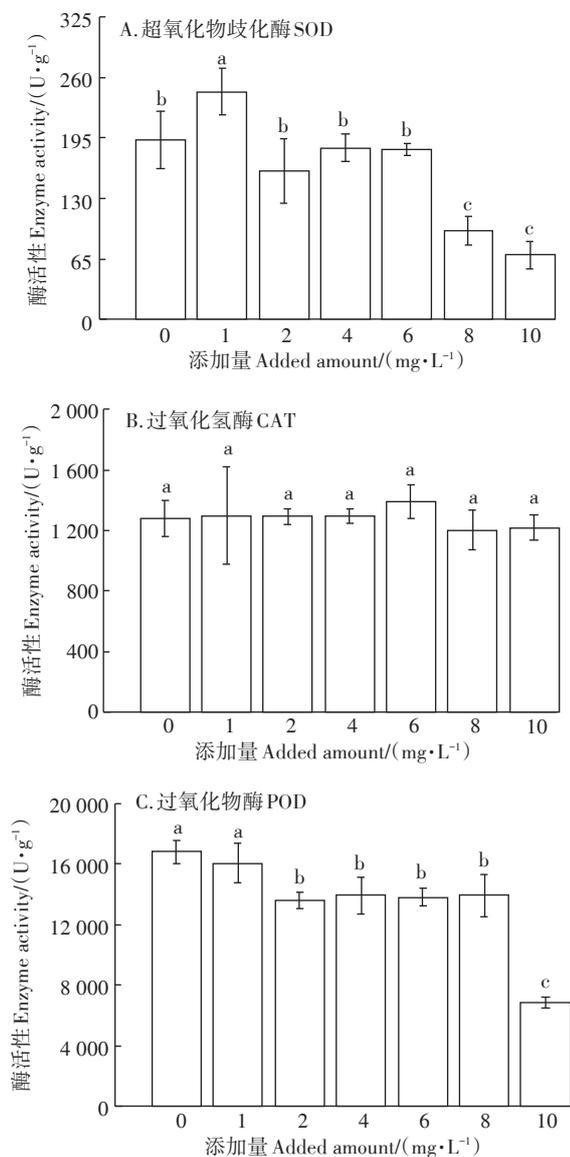


图7 不同Cu NPs处理下幼苗酶活性的变化

Figure 7 The enzyme activity of seedlings under different Cu NPs treatments

取浓度较小、毒性较低没有显著激活CAT基因表达。在植物中,活性氧作为副产物,分布在不同细胞区室中的各种代谢途径中,在生理稳态条件下,这些分子通常被限于特定区室中的不同抗氧化防御成分清除。CAT主要在光呼吸和脂肪酸的 β -氧化过程中参与清除过氧化氢^[15]。CAT没有表现出SOD类似的变化趋势,可能由于本试验采取室内暗培养,小油菜幼苗没有进行光呼吸等过程。

POD是在植物逆境条件下酶促防御反应系统的关键酶之一,它与SOD、CAT相互协调配合,使植物体内保持正常的动态平衡^[39]。Cu NPs对小油菜幼苗POD酶活性造成不同程度的抑制作用(图7C)。与

对照相比,小油菜幼苗POD降低了4.4%~59.3%。当Cu NPs浓度 $\geq 2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,小油菜幼苗POD活性显著受到抑制($P < 0.05$),当Cu NPs添加量为 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,幼苗POD活性最低。POD是植物体内普遍存在的一种酶,其对环境污染反应十分灵敏。解凯琳等^[40]的研究表明,重金属胁迫会对植物表现出强烈的毒性,抑制植物的生理生化过程。POD活性的显著变化表明Cu NPs引起的氧化胁迫超出了小油菜幼苗的抗氧化能力。植物体内ROS的产生速率大于清除速率,活性氧无法及时被清除导致大量积累,对植物的细胞膜、细胞器造成伤害,进而使保护酶活性不断降低。小油菜体内POD活性未显示出与CAT活性相似的变化趋势,这可能与过氧化氢直接转化为过氧化物的量有限相关^[12]。

3 结论

(1)Cu NPs对小油菜种子发芽率影响不显著($P > 0.05$),但对根、茎伸长量造成抑制效应。

(2)小油菜幼苗体内Cu含量随Cu NPs添加量增加而升高, $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu NPs处理下小油菜根部细胞出现质壁分离现象,显示对植物细胞造成一定的损伤。

(3)不同剂量Cu NPs处理下,小油菜幼苗SOD活性呈现先升高后下降趋势,POD活性显著受到抑制,而CAT活性无显著变化($P > 0.05$)。

参考文献:

- [1] 董春法. 化学还原法制备单分散纳米银与纳米铜的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2014.
DONG Chun-fa. Synthesis of monodispersed silver and copper nanoparticles via chemical reduction methods[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2014.
- [2] 李芳芳, 潘容, 张偲, 等. 纳米铜粉对中肋骨条藻的毒性效应[J]. 中国环境科学, 2015, 35(9):2874-2880.
LI Fang-fang, PAN Rong, ZHANG Cai, et al. Inhibition effects of copper nanoparticles on the growth of *Skeletonema costatum*[J]. *China Environmental Science*, 2015, 35(9):2874-2880.
- [3] 范功端, 陈薇, 郑小梅, 等. 纳米材料对藻细胞毒性效应及致毒机理[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(2):23-33.
FAN Gong-duan, CHEN Wei, ZHENG Xiao-mei, et al. The cytotoxic effects of nanomaterials on algae and its mechanisms[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2018, 13(2):23-33.
- [4] Lee W M, An Y G, Yoon H, et al. Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): Plant agar test for water-insoluble nanoparticles[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2008, 27

- (9):1915-1921.
- [5] Tamez C, Hernandez-Molina M, Hernandez-Viezcas J A, et al. Uptake, transport, and effects of nano-copper exposure in zucchini (*Cucurbita pepo*) [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 665:100-106.
- [6] Zhang Z Y, Ke M J, Qu Q, et al. Impact of copper nanoparticles and ionic copper exposure on wheat (*Triticum aestivum* L.) root morphology and antioxidant response [J]. *Environmental Pollution*, 2018, 239:689-697.
- [7] Apodaca S A, Tan W, Dominguez O E, et al. Physiological and biochemical effects of nanoparticulate copper, bulk copper, copper chloride, and kinetin in kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) plants [J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 599-600:2085-2094.
- [8] 向垒, 莫测辉, 卢锡洪, 等. 纳米氧化铜对白菜种子发芽的毒害作用研究 [J]. *农业环境科学学报*, 2011, 30(9):1830-1835.
XIANG Lei, MO Ce-hui, LU Xi-hong, et al. Toxicity of copper oxide nanoparticles to the seed germination of Chinese cabbage [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(9):1830-1835.
- [9] 李璇. 纳米零价铁在土壤中的迁移转化及其对花生幼苗生长的影响 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2015.
LI Xuan. Transformation of NZVI in soil and its effect on seeding development of peanut [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2015.
- [10] 孔四新. 冬凌草对重金属铅的反应及其调控 [D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
KONG Si-xin. Response of *Isodon rubescens* (Hemsl.) Hara to Pb stress and its regulation [D]. Beijing: China Agricultural University, 2015.
- [11] 张琦, 杨洋, 涂鹏飞, 等. 氮肥对油菜在不同土壤中吸收积累Cd的影响 [J]. *农业资源与环境学报*, 2019, 36(1):47-56.
ZHANG Qi, YANG Yang, TU Peng-fei, et al. Effect of nitrogen fertilizer on Cd uptake by rape in different soil [J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2019, 36(1):47-56.
- [12] Stampoulis D, Sinha S K, White J C. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants [J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(24):9473-9479.
- [13] Lin D H, Xing B S. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth [J]. *Environmental Pollution*, 2007, 150(2):243-250.
- [14] Pradhan S, Patra P, Mitra S, et al. Copper nanoparticle (CuNP) nanochain arrays with a reduced toxicity response: A biophysical and biochemical outlook on *Vigna radiata* [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2015, 63(10):2606-2617.
- [15] 陈晓华, 张偲, 谭丽菊, 等. 人工纳米材料对海洋微藻的毒性研究进展 [J]. *海洋科学*, 2017, 41(6):134-143.
CHEN Xiao-hua, ZHANG Cai, TAN Li-ju, et al. Research progress in toxicity of nanomaterials manufactured on microalgae [J]. *Marine Sciences*, 2017, 41(6):134-143.
- [16] Kouhi S M M, Lahouti M, Ganjeal A, et al. Comparative phytotoxicity of ZnO nanoparticles, ZnO microparticles, and Zn²⁺ on rapeseed (*Brassica napus* L.): Investigating a wide range of concentrations [J]. *Toxicological & Environmental Chemistry Reviews*, 2014, 96(6):861-868.
- [17] Hussain M, Raja N Q, Mashwani Z, et al. In vitro seed germination and biochemical profiling of *Artemisia absinthium* exposed to various metallic nanoparticles [J]. *Biotech*, 2017, 7(2):101-109.
- [18] Saharan V, Sharma G, Yadav M, et al. Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu-chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 75:346-353.
- [19] 王磊, 张菲, 王从彦, 等. Cu、Cd污染背景下加拿大一枝黄花叶水提液对莴苣种子萌发和生长的生态毒理效应 [J]. *生态毒理学报*, 2015, 10(4):203-209.
WANG Lei, ZHANG Fei, WANG Cong-yan, et al. Insights into the ecotoxicological effects of leaf aqueous extract of soft-dago canadensis on seed germination and growth of *Lactuca sativa* under Cu and Cd pollution [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2015, 10(4):203-209.
- [20] Adrees M, Ali S, Rizwan M, et al. The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: A review [J]. *Environmental Science & Pollution Research*, 2015, 22(11):8148-8162.
- [21] Sun L J, Yang J J, Fang H X, et al. Mechanism study of sulfur fertilization mediating copper translocation and biotransformation in rice (*Oryza sativa* L.) plants [J]. *Environmental Pollution*, 2017, 227:426-434.
- [22] Rajak J, Bawaskar M, Rathod D, et al. Interaction of copper nanoparticles and an endophytic growth promoter *Piriformospora indica* with *Cajanus cajan* [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, 97(13):4562-4570.
- [23] 姚婧, 王友保, 安雷, 等. Cu污染对高羊茅与黑麦草种子萌发及幼苗生长的影响 [J]. *土壤通报*, 2009, 40(2):410-414.
YAO Jing, WANG You-bao, AN Lei, et al. Effects of Cu on germination and seedling growth of *Festuca arundinacea* L. and *Lolium perenne* L. [J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2009, 40(2):410-414.
- [24] 秦世玉. 甘蓝型油菜镉高低积累品种的筛选及其生理分子机制研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
QIN Shi-yu. Screening of high/low molybdenum accumulation *Brassica napus* cultivars and research on the physiological and molecular mechanisms [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016.
- [25] 谢华. 砷超富集植物的超微结构、形态特征及其植物修复效果 [D]. 南宁: 广西大学, 2004.
XIE Hua. Ultrastructure, morphological character and phytoremediation efficiency of arsenic hyperaccumulators [D]. Nanning: Guangxi University, 2004.
- [26] Shi J Y, Peng C, Yang Y Q, et al. Phytotoxicity and accumulation of copper oxide nanoparticles to the Cu-tolerant plant *Elsholtzia splendens* [J]. *Nanotoxicology*, 2014, 8(2):179-188.
- [27] Peng C, Duan D, Xu C, et al. Translocation and biotransformation of CuO nanoparticles in rice (*Oryza sativa* L.) plants [J]. *Environmental Pollution*, 2015, 197:99-107.
- [28] Wang Z, Xie X, Zhao J, et al. Xylem- and phloem-based transport of CuO nanoparticles in maize (*Zea mays* L.) [J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(8):4434-4441.
- [29] Navarro E, Baun A, Behra R, et al. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi [J]. *Ecotoxicology*, 2008, 17(5):372-386.
- [30] 张海, 彭程, 杨建军, 等. 金属型纳米颗粒对植物的生态毒理效应

- 研究进展[J]. 应用生态学报, 2013, 24(3):885-892.
- ZHANG Hai, PENG Cheng, YANG Jian-jun, et al. Eco-toxicological effect of metal-based nanoparticles on plants: Research progress[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2013, 24(3):885-892.
- [31] 崔静, 袁旭音, 刘泉, 等. 环境水体中纳米氧化铜对金鱼藻的毒性效应研究[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(5):910-915.
- CUI Jing, YUAN Xu-yin, LIU Quan, et al. Toxic effects of low concentration copper oxide nanoparticles on *Ceratophyllum demersum* in the aquatic environment[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 32(5):910-915.
- [32] Nair P M G, Chung I M. Changes in the growth, redox status and expression of oxidative stress related genes in chickpea (*Cicer arietinum* L.) in response to copper oxide nanoparticle exposure[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2015, 34(2):350-361.
- [33] Antonio J M, Hortensia O O, Fabián P L, et al. Cu nanoparticles absorbed on chitosan hydrogels positively alter morphological, production, and quality characteristics of tomato[J]. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 2016, 89:183-189.
- [34] Kim J S, Kuk E, Yu K N, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles[J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2007, 3(1):95-101.
- [35] Trujillo-Reyes J, Majumdar S, Botez C E, et al. Exposure studies of core-shell Fe/Fe₃O₄ and Cu/CuO NPs to lettuce (*Lactuca sativa*) plants: Are they a potential physiological and nutritional hazard?[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2014, 267:255-263.
- [36] Nair P M G, Chung I M. The responses of germinating seedlings of green peas to copper oxide nanoparticles[J]. *Biologia Plantarum*, 2015, 59(3):591-595.
- [37] Hong J, Rico C M, Zhao L, et al. Toxic effects of copper-based nanoparticles or compounds to lettuce (*Lactuca sativa*) and alfalfa (*Medicago sativa*) [J]. *Environmental Science Processes & Impacts*, 2015, 17(1):177-185.
- [38] Hernández-Hernández H, González-Morales S, Benavides-Mendoza A, et al. Effects of chitosan-PVA and Cu nanoparticles on the growth and antioxidant capacity of tomato under saline stress[J]. *Molecules*, 2018, 23(1):178-193.
- [39] 张琪林, 王红. 铜对大球盖菇抗氧化系统的影响[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(11):2076-2079.
- ZHANG Qi-lin, WANG Hong. Effects of copper(II) stress on antioxidant system in *Stropharia rugoso-annulata*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(11):2076-2079.
- [40] 解凯彬, 施国新, 陈国祥, 等. 汞污染对芡实、菱根部过氧化物酶活性的影响[J]. 武汉植物学研究, 2000, 18(1):70-72.
- XIE Kai-bin, SHI Guo-xin, CHEN Guo-xiang, et al. The effects of Hg²⁺ pollution on activity of peroxidase in roots of *Euryale ferox* Salisb and *Trapa bicornis* Osbeck[J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2000, 18(1):70-72.