

Effects of Graphene Oxide Exposure on Germination and Seedling Growth of Rice and Wheat

Cunbin Gao, Guanlin Zhang, Yuzhen Liu*

School of Geography and Environment, Shandong Normal University, Jinan Shandong
Email: 1551947244@qq.com, *yzhliu320@126.com

Received: Aug. 22nd, 2019; accepted: Sep. 5th, 2019; published: Sep. 12th, 2019

Abstract

Graphene oxide (GO), as an emerging material, will inevitably enter the environment during production and use with its wide application in the fields of industry, medicine and commerce, and has a series of effects on plants and ecological environment. In order to clarify the plant effect and potential ecological risk of GO and its mechanism of action, this experiment takes two main food crops in China, rice and wheat, as research objects, and observes the growth and physiological changes of seeds and seedlings under GO stress at different concentrations (100, 200, 300, 400, 500 mg/L⁻¹). The results showed that low concentration (100, 200 mg·L⁻¹) GO stress had no significant effect on rice and wheat germination after 5 days of stress treatment. High concentration of GO stress inhibited rice and wheat germination, and showed dose-effect relationship. At the stage of stress treatment for 15 days, for rice, low concentration (100 mg·L⁻¹) GO stress promoted rhizome elongation; high concentration inhibited rhizome elongation, and different concentrations of GO stress inhibited wheat rhizome elongation. But both electrolyte leakage rates increase with increasing GO concentration. Oxidative stress was observed in both plants after detection of antioxidant enzymes (CAT, POD, SOD) and malondialdehyde (MDA). It is speculated that the effects of GO on rice and wheat is achieved mainly through regulating the water content of plants and oxidative stress, and the results provide experimental data and practical reference for the plant effect and mechanism of GO.

Keywords

Graphene Oxide, Rice, Wheat, Phytotoxicity, Ecological Risk

氧化石墨烯暴露对水稻和小麦发芽及幼苗生长的影响

高存斌, 张冠琳, 刘玉真*

*通讯作者。

山东师范大学地理与环境学院, 山东 济南
Email: 1551947244@qq.com, yzhliu320@126.com

收稿日期: 2019年8月22日; 录用日期: 2019年9月5日; 发布日期: 2019年9月12日

摘要

氧化石墨烯(GO)作为新兴材料, 随着其在工业、医学、商业等领域的广泛应用, 在生产和应用的过程中将不可避免地进入环境, 对植物及生态环境产生一系列影响。为明确GO的植物效应及潜在的生态风险与其作用机制, 本实验以我国两种主要粮食作物——水稻、小麦为研究对象, 观察种子和幼苗在不同浓度(0、100、200、300、400、500 mg·L⁻¹) GO胁迫下的生长生理变化。结果表明, 胁迫处理5 d后, 低浓度(100、200 mg·L⁻¹) GO胁迫对水稻和小麦发芽无显著影响, 高浓度GO胁迫抑制水稻和小麦发芽, 且表现出剂量效应关系; 在幼苗生长阶段, 胁迫处理15 d后, 对于水稻, 低浓度(100 mg·L⁻¹) GO胁迫促进根茎伸长, 高浓度对根茎伸长起到抑制作用, 不同浓度GO胁迫则均抑制小麦根茎伸长, 但二者电解质泄漏率均随GO浓度提高而增加; 经检测抗氧化系统酶(CAT、POD、SOD)和丙二醛(MDA)后发现两种植物均出现了氧化应激现象, 推测GO对水稻和小麦的影响可能主要通过调节植物体内水分含量以及氧化应激作用来实现, 该结果为GO的植物效应与作用机制提供了实验数据与实践参考。

关键词

氧化石墨烯, 水稻, 小麦, 植物毒性, 生态风险

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

碳纳米材料(CNMs)是当今世界热点材料, 一直处于纳米技术领域的研究前沿, 其拥有的高比表面积、良好导电导热性、高机械强度等诸多优良特性, 吸引了国内外大批学者研究探索[1]。其中, 石墨烯是应用广泛、具有代表性的碳纳米材料之一, 被认为是石墨形式的基本构件。石墨烯是由紧密堆积的蜂窝状二维碳原子形成的片层[1], 有着“新材料之王”的美誉, 因其优良特性在电子能源、光学材料、超导材料、生物医学等领域均有着广泛应用[2] [3] [4]。根据测算, 碳纳米材料市场份额呈逐年递增态势, 复合增长可率达到 20.1%, 预计 2020 年将达到 56.4 亿美元[5], 我国国务院所颁布的《中国制造 2025》行动纲领中亦指出要关注颠覆性新材料对传统材料的影响, 做好石墨烯等战略前沿材料提前布局和研制, 可见未来石墨烯的生产量和使用量将会达到新的高潮。

GO 在生产、使用及回收过程中不可避免的进入环境中, 并通过一系列物理化学作用固定在环境中, 对植物产生一系列的影响。目前国内外科学家已经在多种环境介质中检测出碳纳米材料, Carboni A 等[6]对阿姆斯特丹市土壤进行采样检测后发现, 近 50% 样本中有 CNMs 检出, 且在人口密集区、工业区周边和下风向区域的土样中检出了更高的浓度。Kolosnjaj-Tabi J 等[7]检测柴油机排气发现, 尾气中含有大量碳纳米材料, 且指出 CNMs 在空气中浓度随柴油车占比升高而提升。目前国内外学者对 GO 研究主要集中于其生产和应用方面, 对于其对植物影响效应研究较少, 研究结果较为复杂多样, 且尚未得出统一、

明确的结论。国内外学者发现, GO 及其相关材料可对植物表现出促进作用和抑制作用, 在低浓度下会提高种子发芽率[8]、缩短发芽时间[9]、促进植物根茎伸长[10]、促进植物吸水[11]以及提高酶系统活力[12]等; 而在高浓度暴露条件下, GO 往往对植物产生出抑制作用, 表现为抑制植物萌发生长[13]、降低植物生物量[14]及诱发氧化应激[15]等。目前研究得到的 GO 植物效应作用机制有机械切割[16]、氧化应激[17]、遗传损伤[18]、遮蔽效应[19]等, 仍有待进一步的深入探索。

本实验选用我国最为主要的两种粮食作物——水稻和小麦作为研究对象, 通过对发芽率、根茎长度、电解质泄漏率、抗氧化系统酶等一系列指标的观测, 探究 GO 对两种粮食作物生长情况、细胞毒性和氧化应激作用的影响, 为探究 GO 对植物影响效应及机制提供实验数据和科学依据。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

GO 购于苏州碳丰石墨烯科技有限公司, 外观为黑褐色粉末状, 平均厚度 3.4~7 nm; 片层直径 10~50 μm ; 层数 6~10 层; 比表面积 100~300 m^2/g ; 纯度 > 95%; 水稻品种为“糯优二号”, 购自四川隆平高科种业有限公司; 小麦品种为“山农 28 号”, 购自淄博禾丰种子有限公司; 抗氧化系统酶 SOD、CAT、POD 的活性及过氧化产物 MDA 的测定试剂盒购于南京建成研究所。

2.2. GO 的表征

国内外研究表明, 不同尺寸、结构的 GO 所表现出的毒性有很大差别, 因此在实验前需要对其进行表征。用扫描电子显微镜(SEM)观察 GO 的形貌; 将 GO 粉末压实制成试片, 用 X 射线衍射仪(XRD)表征分析 GO 的晶体结构。

2.3. GO 悬浮液的配制

称取一定量 GO, 加入到 Hoagland 营养液中, 分别配成浓度为 0, 100, 200, 300, 400, 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 GO 悬浮液, 超声分散(100 W, 40 kHz) 30 min。

2.4. 水稻、小麦种子及幼苗污染暴露实验

2.4.1. 种子发芽实验

挑选颗粒饱满、品相良好的水稻、小麦种子, 分别在 10% 双氧水中浸泡 30 min 消毒, 经去离子水反复冲洗后, 浸种催芽 2 h。选取露白一致的水稻、小麦种子各 15 粒, 分别置于铺有滤纸的培养皿中, 加入不同浓度(0, 100, 200, 300, 400, 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) GO 悬浮液, 每种处理设置 3 个平行, 放入培养箱中发芽, 温度 $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, 相对空气湿度 70%。5 d 后观察记录种子发芽数, 规定当芽长超过种子长度一半时认为种子完成发芽, 发芽率 = 正常发芽种子数/供试种子数 $\times 100\%$ 。

2.4.2. 幼苗暴露培养

挑选颗粒饱满、品相良好的水稻、小麦种子, 消毒催芽后置于铺有滤纸的培养皿, 加入 Hoagland 营养液 5 mL, 放入培养箱中培养 5 d, 培养条件与发芽实验相同。第 6 d 开始进行暴露培养实验, 选取长势良好且相似的幼苗, 将每个培养皿中的幼苗数统一为 10 株, 加入不同浓度(0, 100, 200, 300, 400, 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) GO 悬浮液 10 mL, 每种处理设置 3 个平行。培养条件为光照 16 h, 温度 $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 70%; 黑暗 8 h, 温度为 $18^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度为 75%。为保持暴露浓度恒定, 每 3 d 换一次 GO 悬浮液, 继续培养 10 d 后完成水稻、小麦的幼苗暴露实验。

15 d 后幼苗暴露培养结束, 取新鲜幼苗用去离子水冲洗, 吸水纸吸干后用毫米刻度尺测量幼苗根长、

茎长,称量幼苗根鲜重;取幼苗根系组织置于离心管中,加入 10 mL 去离子水,放入恒温摇床振荡 4 h (25°C , $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$)后取出,用电导计测定溶液的电导率。将溶液倒回,置于高压灭菌锅中, 120°C 下灭菌 20 min。灭菌后再用电导计测定水溶液的电导率,电导率单位为 $\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$,离子泄漏率计算公式为:离子泄漏率 = 灭菌前电导率/灭菌后电导率 $\times 100\%$;取幼苗新鲜的地上部组织,用去离子水冲洗,吸水纸擦干后,按植物组织质量和生理盐水体积为 1:9 的比例加入生理盐水,转移至离心管中,冷冻离心 10 min ($3500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$),即配成 10%的组织匀浆液;将组织匀浆液冷冻离心 20 min ($4000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$)后,采用南京建成公司试剂盒测定 SOD、POD、CAT 酶活性及 MDA 含量,各项生理指标的测定过程严格按照试剂盒说明进行。

2.5. 数据处理

实验结果均通过平均值 \pm 标准差的形式来表示。采用 spss 软件,选取 $p = 0.05$ 来对 GO 的植物毒性实验结果进行单因素方差分析并用 Duncan 法进行显著性检验。实验数据采用 Origin 软件进行绘图。

3. 结果

3.1. GO 的表征

通过 SEM 扫描,我们得到 GO 形状和尺寸相关信息,如图 1 所示,GO 外表为不规则颗粒状,由一层层氧化石墨烯层片堆叠而成,层数约 6~10 层,直径约 10~50 μm ,同时可以观查到 GO 表面呈现不规则状,具有锋利边缘。

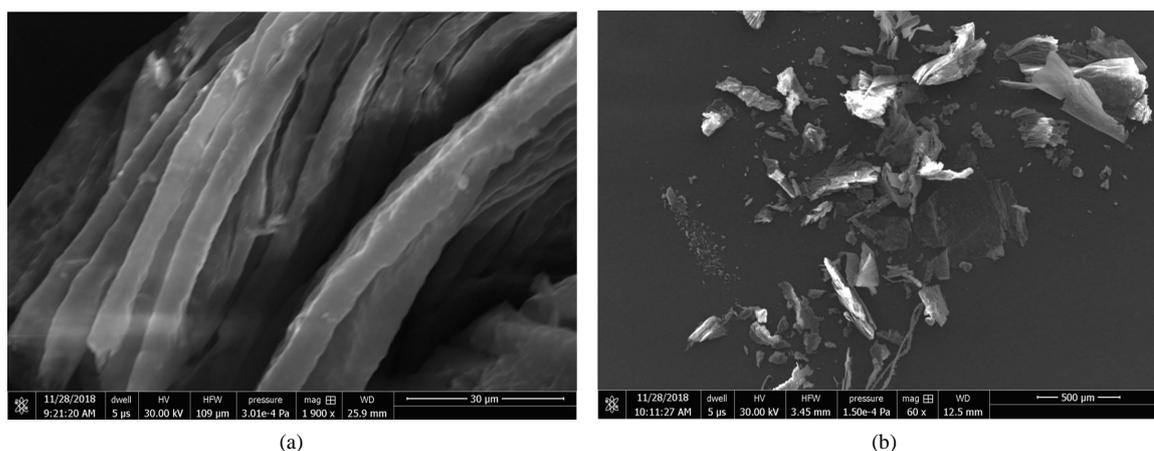


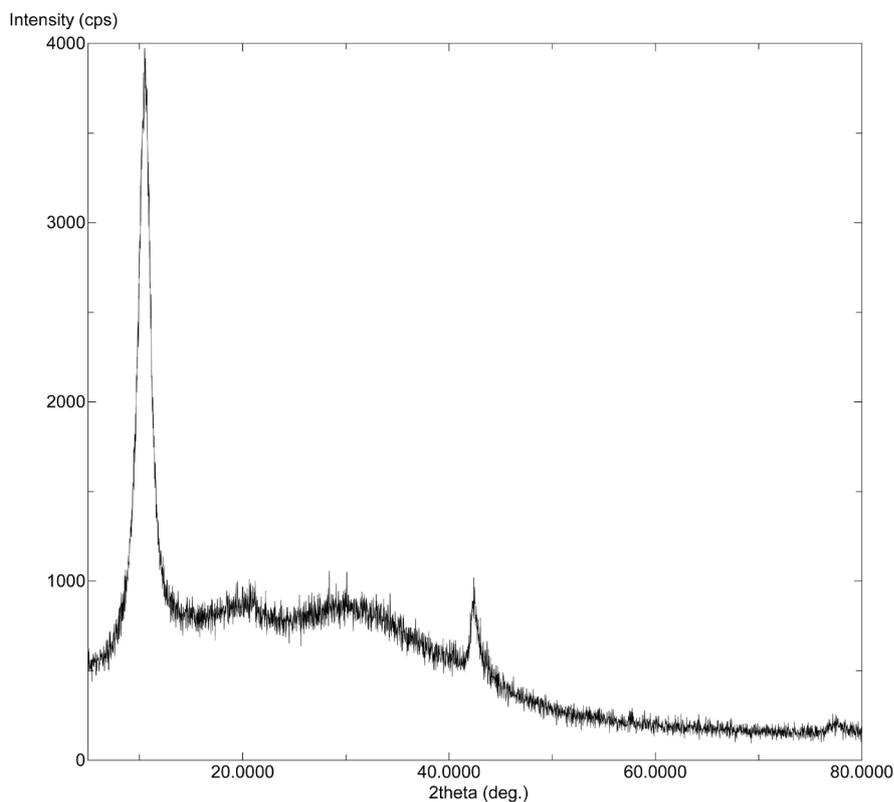
Figure 1. GO shape diagram under SEM

图 1. SEM 下的 GO 形态图

通过 X 射线衍射,我们得到 GO 的 X 射线衍射谱图,如图 2 所示,GO 约在 $2\theta = 12^{\circ}$ 附近出现明显的特征峰,该特征峰具有高强度、低宽度的特征,峰形较为尖锐,通过布拉格方程 $2d\sin\theta = n\lambda$ 可计算出 GO 层间距约为 $d = 0.925\text{ nm}$,符合 GO 一般性结构特征。

3.2. GO 对水稻和小麦发芽率的影响

如图 3 所示,种子萌发 5 d 后,与对照组相比,低浓度 GO 处理对水稻和小麦发芽率并无显著影响,而高浓度 GO 处理显著降低水稻和小麦种子的发芽率($p < 0.05$)。300~500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 GO 显著抑制水稻发芽($p < 0.05$),平均抑制率为 18.18%。与水稻相比,400 和 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 GO 对小麦发芽的抑制率分别为 23.86% 和 31.58%,不同的是 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 GO 也显著抑制小麦的萌发($p < 0.05$),抑制率为 18.42%。由此可见,小麦比水稻种子的耐受性更强。实验过程中,GO 暴露下水稻和小麦的萌发并未出现提前或延迟现象。



December-03-2018 09:15:50 Page-1

Figure 2. X-ray diffraction spectrum of GO

图 2. GO 的 X 射线衍射谱图

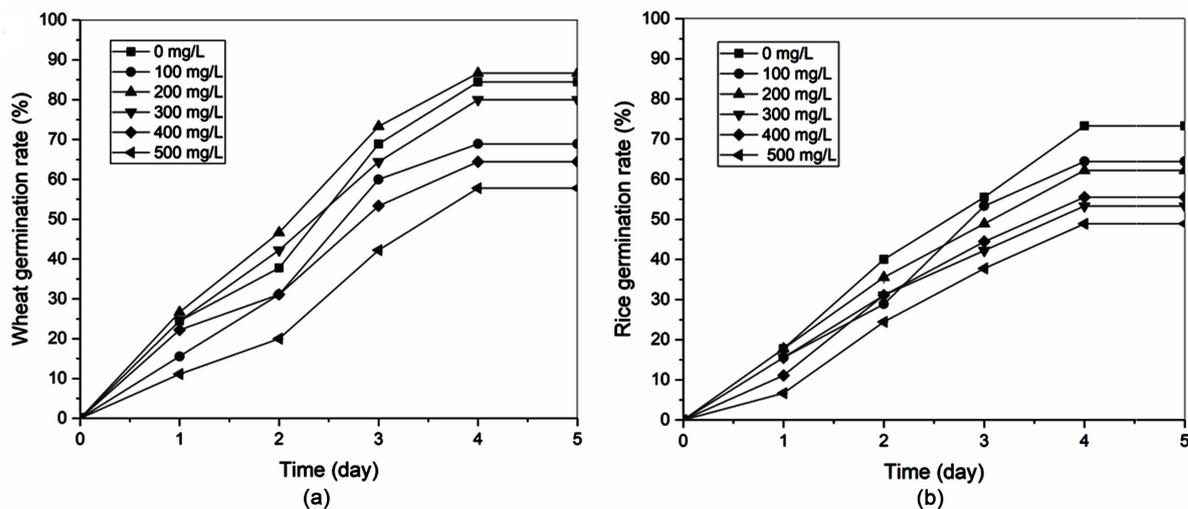


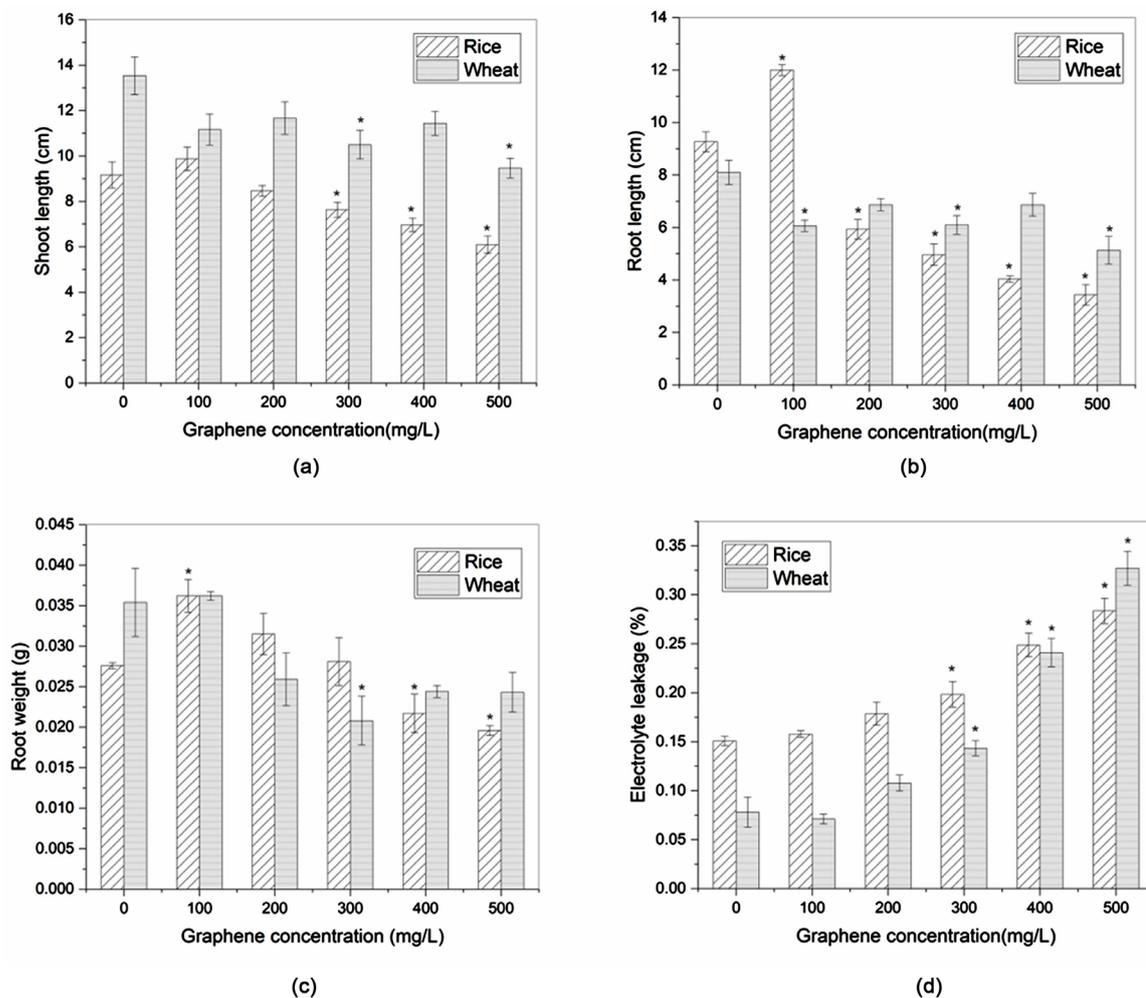
Figure 3. Effect of GO on germination rate of rice and wheat

图 3. GO 对水稻和小麦发芽率的影响

3.3. GO 对水稻和小麦根长和茎长的影响

由图 4 可知, 与对照组相比, 经 15 d 处理后, $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 GO 对水稻幼苗根和茎的伸长起促进作用, 其中根的促进效果显著 ($p < 0.05$), 伸长率为 29.50%。而随浓度的升高, 水稻幼苗的根长和茎长呈明

显的降低趋势($p < 0.05$)。对于小麦而言,不同浓度的 GO 对其根和茎的生长均有抑制作用,浓度为 300 和 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,小麦根长和茎长受到显著抑制,根长分别降低 24.69% 和 36.63%,茎长降低 22.41% 和 30.05%。



注: *表示 $p < 0.05$ 。

Figure 4. Effect of GO on root and stem length and ion leakage rate of rice and wheat

图 4. GO 对水稻和小麦根、茎长度和离子泄漏率的影响

3.4. GO 对水稻和小麦根鲜重的影响

由图 4 可知,与对照组相比,经 15 d 处理后,低浓度 GO 处理促进水稻和小麦根鲜重的增加,其中 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 GO 对水稻促进效果显著($p < 0.05$),促进率为 31.03%,对小麦表现出略微促进效果但效果不显著($p > 0.05$),促进率为 2.48%。而高浓度处理对二者起到抑制作用,在浓度为 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时抑制率分别达到 29.11% 和 41.19% ($p > 0.05$)。

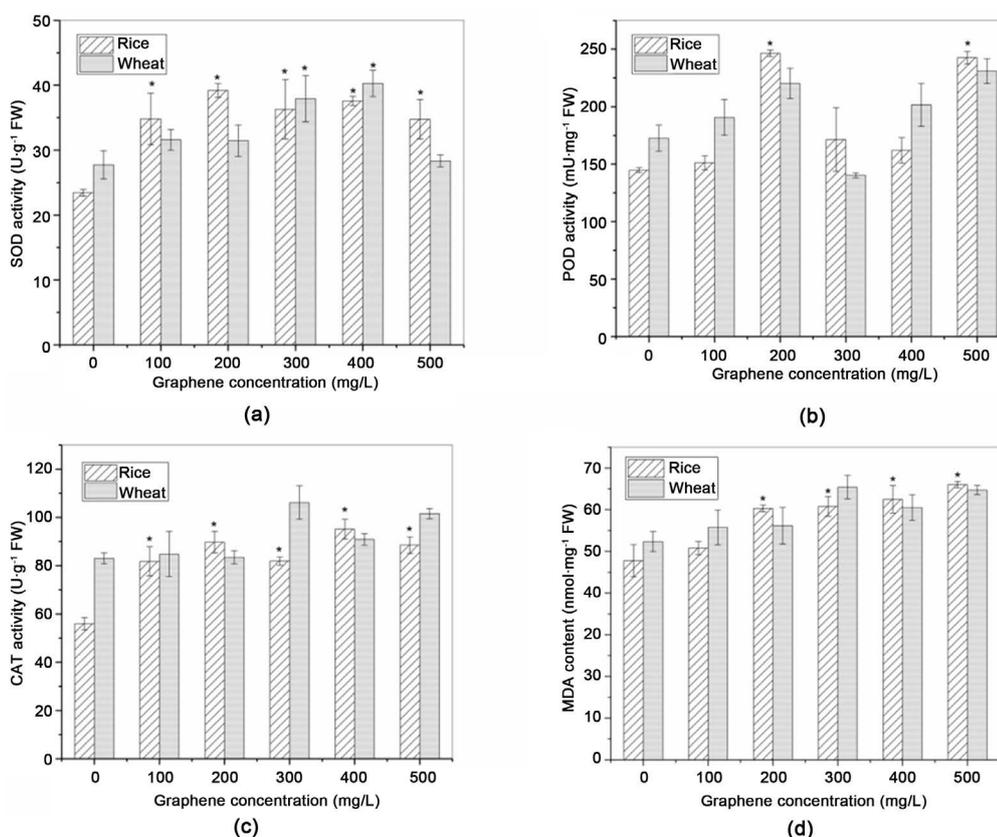
3.5. GO 对水稻和小麦根系离子泄漏率的影响

由图 4 可知,与对照组相比,GO 处理使水稻幼苗根离子泄露率均升高,且浓度越高,离子泄露率越大。300, 400 和 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO 暴露时水稻幼苗根离子泄露率显著升高,分别为 19.83%、24.88% 和 28.35%;

在根离子泄露率这一指标上, 100 mg·L⁻¹ GO 暴露时小麦反而略微降低, 为 7.11%, 其他浓度 GO 暴露时的变化趋势与水稻相一致。在 300, 400 和 500 mg·L⁻¹ GO 暴露时小麦幼苗根离子泄露率显著升高, 分别为 14.33%、24.10%、32.70%。

3.6. GO 对水稻和小麦抗氧化酶活性的影响

由图 5 可知, 总体观之, 水稻、小麦抗氧化酶 SOD、POD、CAT 酶活性随 GO 浓度的增加整体呈上升趋势, 抗氧化酶被激活, 且水稻的激活程度更为明显, 小麦 POD、CAT 酶活性与对照组差异不显著。由图 5 可知, 经 GO 处理 15 d 后, SOD 活性均高于对照组, 且随 GO 浓度的增加呈先升高后降低的趋势, 水稻在 200 mg·L⁻¹ GO 处理时受到明显激活, 为对照组的 1.67 倍; 小麦在 300 mg·L⁻¹ GO 处理时受到明显激活, 为对照组的 1.37 倍, 且均表现出显著性差异($p < 0.05$)。由图 5 可知, 随着 GO 浓度的增大, 水稻和小麦 POD 酶活性先上升后下降而后上升。当 GO 浓度为 200 mg·L⁻¹ 时, 水稻 POD 酶活性显著升高 ($p < 0.05$), 增长率为 70%; 随处理浓度的增大, POD 酶活性反而下降但仍比对照组高, 当处理浓度增大到 500 mg·L⁻¹ 时, POD 酶活性又显著升高($p < 0.05$)。相比之下, 小麦 POD 酶活性的变化趋势虽与水稻一致, 但与对照组相比, 其酶活性升高或降低并不显著($p < 0.05$), 说明水稻 POD 对 GO 更为敏感。由图 5 可知, 随着 GO 浓度的增大, 小麦 CAT 酶活性呈上升趋势, 但并不显著。与小麦相比, GO 暴露条件下, 水稻 CAT 酶被明显激活($p < 0.05$), GO 为 400 mg·L⁻¹ 时, 酶活性最高达到 95.15 U·g⁻¹ FW, 为对照组 1.70 倍。



注: *表示 $p < 0.05$ 。

Figure 5. Effect of GO on SOD, POD, CAT and MDA in rice and wheat

图 5. GO 对水稻和小麦 SOD、POD、CAT 和 MDA 的影响

3.7. GO 对水稻和小麦 MDA 含量的影响

由图 5 可知, 与对照组相比, 小麦 MDA 含量略有增加, 与其抗氧化酶被激活的现象相一致, 但增加幅度并不明显。同样, 水稻 MDA 含量也增加, 不同的是水稻 MDA 含量的变化与 GO 的暴露呈现明显的浓度依赖性($p < 0.05$), 随 GO 浓度的升高, MDA 的含量显著升高, 500 mg·L⁻¹ 时最高, 比对照相比增加 23.64%。

4. 讨论

4.1. GO 对水稻和小麦生长情况的影响

种子萌发是植物生长的最幼嫩阶段, 对周围环境的变化较为敏感。本研究表明, 在种子萌发期内, 低浓度 GO 对水稻或小麦的发芽均无显著影响, 而高浓度 GO 则显著降低两者的发芽率, 发芽时间并未受显著影响。究其原因, 种子萌发受内部生理条件和外在环境条件的影响。种皮具有一定的屏障作用, 选择性渗透的种皮对种子胚胎的发育具有保护作用。此外, GO 具有团聚性, 但低浓度 GO 较为分散, 加之种皮的保护作用, 低浓度 GO 对种子的萌发并没有起到明显的作用。另一方面, 水分是种子萌发的必要条件, 种子萌发必须吸收足够的水分。而 GO 的团聚程度随浓度的升高而变大, 大颗粒 GO 团聚体黏附在种皮表面, 阻碍了种子对水分的吸收, 种子萌发受阻, 发芽率降低。

植物生长(根、茎长和生物量等)受阻是碳纳米材料植物毒性的最普遍症状。本实验结果表明, 随着 GO 浓度增加, 水稻幼苗根和茎的长度变化表现出先促进后抑制的特征, 而小麦根、茎的生长始终受到抑制, 且均呈现浓度依赖性。这与 Zhang 等[20]观察到的实验现象并不一致, Zhang 等发现低浓度(250 mg·L⁻¹) 石墨烯促进小麦根的伸长, 差异的原因可能是石墨烯与氧化石墨烯表面官能团具有差异导致的。不同植物对 GO 的耐受性不同, 如 Chen 等[21]将刺五加暴露于 0~100 mg·L⁻¹ GO 中, 经过 10 天的处理后发现, 低浓度 GO (<25 mg·L⁻¹) 对根系长度没有显著影响, 但较高浓度(≥25 mg·L⁻¹) 抑制根系生长, GO 的效应浓度整体低于本实验, 但其表现出的影响趋势与本实验中水稻的变化趋势相同, 均表现出了低浓度促进生长高浓度下抑制生长的特性, 同时从本实验结果来看, 水稻在较高浓度下根茎长度才表现出受到不利影响, 而小麦根茎长度则在低浓度下就表现出受到抑制作用, 因此可以发现, 水稻对 GO 耐受性要强于小麦, 在 GO 浓度不高的时候其生长水平能得到良好的保持。

随 GO 浓度增加, 水稻和小麦根部鲜重变化先增加后减少, 二者的电解质泄漏率与对照组相比均升高, 这与 Begum P 观察到的结果相一致[14], 在他进行甘蓝、番茄、红菠菜和莴苣的石墨烯暴露实验中, 四种植物在 500 mg·L⁻¹ 石墨烯胁迫下均表现出根和茎长度减少的现象, 同时测试电解质泄漏率发现, 所有经胁迫处理后的植物电解质泄漏率均大于对照组, 石墨烯造成细胞膜损伤, 导致细胞死亡。本实验认为这可以说明水稻和小麦的鲜重增加并非是细胞增殖的结果, 我们推测 GO 进入细胞后表现出植物毒性, 引起细胞破裂死亡, 但同时其可能改变了细胞膜通透性, 从而促进水分的吸收, 从而表现出鲜重的增加, 这种鲜重增加是不正常的、危险的, GO 的毒性作用使得植物失去了对水分的调控能力, 进一步加剧了植物体受到的毒性作用, Khodakovskaya M 等[8]也观测到类似现象, 在他进行的番茄碳纳米管暴露培养中, 采用热重法测水分发现, 暴露组相对于对照组多积累了 19.7% 的水分, 证明了碳纳米材料对种子的水分吸收具有促进作用。

4.2. 水稻和小麦对 GO 胁迫的生理响应

目前, 氧化应激被认为是 CNMs 植物毒性效应主要的机制之一。活性氧(ROS)对信号传导很重要, 正常情况下生物体内的抗氧化系统(包括抗氧化剂和抗氧化酶)能够及时清除细胞内多余 ROS, 并维持其

动态平衡[22]; CNMs 能够诱导 ROS 的产生, 当 ROS 大量累积超过生物体抵御能力时, ROS 无法被及时清除, 此时生物体内发生氧化应激反应, 导致脂质、蛋白质和核酸等生物大分子变性[23] [24]、线粒体损伤甚至细胞凋亡[17]。

生物经不断进化产生了由 SOD、POD 和 CAT 等酶共同构建的抗氧化系统, 用以抵御生命活动中遭遇的氧化逆境; MDA 是脂质过氧化的主要产物, 在植物生理研究中常通过测量 MDA 反映氧化损伤的程度。因此 SOD、POD 和 CAT 酶常作为植物环境胁迫下响应的指标。

本研究显示, GO 胁迫下, 水稻和小麦的 SOD、POD 和 CAT 酶均被激活, 且随 GO 浓度增加, SOD 均呈现先上升后下降, POD 酶活性表现出先上升后下降而后上升的趋势, CAT 呈上升趋势; 三种酶产生差异的原因, 可能与其各自的作用机制有关。SOD、POD 可以将 ROS 还原为羟基, 在催化过程中生成的 H_2O_2 可由 CAT 分解, 避免氧化损伤。本实验结果表明, 小麦的激活程度不如水稻显著, CAT 的浓度效应并不显著。SOD、POD 产生波动变化的原因可能为在中低浓度 GO 胁迫下, 虽然 GO 进入细胞后通过膜损伤等作用引起 ROS 升高, 但由于 GO 浓度较低, 所表现出的毒性作用并不强烈, SOD、POD 可以正常抵御氧化应激, 表现出良好的剂量 - 效应关系, 当暴露于高浓度 GO 下, GO 已严重影响细胞, 干扰到细胞正常生命活动, 进而导致 SOD、POD 的转录和表达过程受抑制, SOD、POD 不足以抵御氧化应激现象, 导致细胞大量死亡, Ershova E S 等[25]也观察到碳纳米材料对 DNA 的损伤作用, 在进行 C60 衍生物对人胚肺成纤维细胞的毒性试验时发现, C60 可与使转录因子 NF- κ B 的活性增加, 并发现细胞 DNA 出现断裂现象; Ghosh M 等[26]在进行洋葱球茎的 MWCNTs 胁迫培养也发现, 经处理后的洋葱细胞内观察到 DNA 碎片和核间体 DNA 片段, 并通过随机扩增多态性 DNA 标记法实验测量基因组稳定性后得出 45% 的被测引物表现出基因组不稳定性, 因此我们可以发现, GO 在导致植物细胞产生氧化应激的同时, 还可能表现出了遗传毒性。

同时本实验中 MDA、CAT 总体表现出上升趋势, POD、CAT 浓度变化这表明两种植物在 GO 胁迫下均产生了氧化应激现象, 并表现出明显的剂量 - 效应关系。随 GO 浓度提高, 植物细胞内 ROS 含量持续上升, 细胞需要产生更多的 CAT 分解催化过程中产生的 H_2O_2 , 但随着 GO 随浓度提高表现出越来越强的毒性作用, 细胞受氧化损伤程度不断增加, 抗氧化系统不能有效清除过量 ROS, 脂质过氧化物 MDA 得到了不断地积累, 含量随浓度增加而升高。Jing Chen 等[27]研究碳纳米点对玉米的毒性作用后发现, 碳纳米点在高浓度下显著降低玉米根茎鲜重, 发现玉米细胞内 H_2O_2 含量和脂质过氧化程度显著提高 6.5 倍和 1.65 倍, SOD、CAT 活性大幅提高, 表现出氧化应激现象; Begum 等[18]曾进行过一系列 CNMs 植物胁迫实验用以探究 CNMs 的致毒机制, 通过拟南芥的石墨烯胁迫培养, 发现石墨烯胁迫下拟南芥体内 ROS 含量较对照组相比增加 3.3 倍, 产生氧化应激; 在他红菠菜多壁碳纳米管胁迫实验中发现, 15 d 内处理组 ROS 含量上升、生长抑制、细胞死亡等现象, 当向处理组加入抗坏血酸后, ROS 含量及生长抑制等不利现象得到缓解, 从而证明 CNMs 对植物细胞致毒机理为氧化应激作用[28]。

5. 结论

1) 低浓度 GO 胁迫会对水稻和小麦起到一定的促进作用, 具体表现为促进根茎伸长、促进鲜重增加以及促进植物吸水; 高浓度 GO 胁迫对二者表现为抑制作用, 且表现出明显剂量 - 浓度效应, 表现为发芽率降低、抑制根茎伸长以及促使细胞死亡等。

2) GO 胁迫对于植物的抑制作用体现为氧化应激, 随 GO 浓度升高, GO 引起细胞内 ROS 含量不断上升, 并同时破坏细胞内部抗氧化系统, 最终在高浓度 GO 暴露下植物细胞抗氧化系统彻底被破坏, ROS 大量积累, 最终导致细胞死亡。

3) 不同种类的植物对 GO 胁迫有着不同的耐受性, 在本实验中, 水稻在 GO 胁迫下的表现要强于小

麦, 其发芽率、电解质泄漏率等指标的变化幅度要小于小麦, 水稻细胞在 GO 胁迫下表现出较好的耐受力, 这也为我们在日后探究在 GO 污染场地种植高耐受作物或利用高耐受植物进行富集提供了新的思路。

基金项目

山东省自然科学基金(ZR2016DM09); 国家大学生创新训练计划项目(201810445087); 山东省高校科研项目(J15LH06)。

参考文献

- [1] Zhang, B.T., Zheng, X., Li, H.F. and Lin, J.-M. (2013) Application of Carbon-Based Nanomaterials in Sample Preparation: A Review. *Analytica Chimica Acta*, **784**, 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.03.054>
- [2] Wang, G., Shen, X., Yao, J. and Park, J. (2009) Graphene Nanosheets for Enhanced Lithium Storage in Lithium Ion Batteries. *Carbon*, **47**, 2049-2053. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2009.03.053>
- [3] 史冬梅, 何大方, 张雷. 石墨烯材料发展现状与趋势[J]. 科技中国, 2018(1): 3-6.
- [4] Novoselov, K.S., Fal'ko, V.I., Colombo, L., et al. (2012) A Roadmap for Graphene. *Nature*, **490**, 192-200. <https://doi.org/10.1038/nature11458>
- [5] Pikula, K.S., Zakharenko, A.M., Chaika, V.V., et al. (2018) Effects of Carbon and Silicon Nanotubes and Carbon Nanofibers on Marine Microalgae, *Heterosigma akashiwo*. *Environmental Research*, **166**, 473-480. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.06.005>
- [6] Carboni, A., Helmus, R., Emke, E., et al. (2016) Analysis of Fullerenes in Soils Samples Collected in the Netherlands. *Environmental Pollution*, **219**, 47-55. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.034>
- [7] Kolosnjaj-Tabi, J., Szwarc, H. and Moussa, F. (2017) Carbon Nanotubes: Culprit or Witness of Air Pollution. *Nano-Today*, **15**, 11-14. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2017.04.010>
- [8] Khodakovskaya, M., Dervishi, E., Mahmood, M., et al. (2012) Carbon Nanotubes Are Able To Penetrate Plant Seed Coat and Dramatically Affect Seed Germination and Plant Growth. *ACS Nano*, **6**, 3221-3227.
- [9] Hatami, M., Hadian, J. and Ghorbanpour, M. (2017) Mechanisms Underlying Toxicity and Stimulatory Role of Single-Walled Carbon Nanotubes in *Hyoscyamus niger* during Drought Stress Simulated by Polyethylene Glycol. *Journal of Hazardous Materials*, **324**, 306-320. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.10.064>
- [10] Mondal, A., Basu, R., Das, S. and Nandy, P. (2011) Beneficial Role of Carbon Nanotubes on Mustard Plant Growth: An Agricultural Prospect. *Journal of Nanoparticle Research*, **13**, 4519-4528. <https://doi.org/10.1007/s11051-011-0406-z>
- [11] Chittaranjan, K., Phullara, K., Manoj, R.K., et al. (2013) Nanobiotechnology Can Boost Crop Production and Quality: First Evidence from Increased Plant Biomass, Fruit Yield and Phytomedicine Content in Bitter Melon (*Momordica charantia*). *BMC Biotechnology*, **13**, 37. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-37>
- [12] Wang, X., Han, H., Liu, X., et al. (2012) Multi-Walled Carbon Nanotubes Can Enhance Root Elongation of Wheat (*Triticum aestivum*) Plants. *Journal of Nanoparticle Research*, **14**, 841. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-0841-5>
- [13] 袁刚强, 龚继来, 曾光明. 单壁碳纳米管材料对水稻幼苗的毒性效应[J]. 环境科学学报, 2015, 35(12): 4143-4149.
- [14] Begum, P., Ikhtari, R. and Fugetsu, B. (2011) Graphene Phytotoxicity in the Seedling Stage of Cabbage, Tomato, Red Spinach, and Lettuce. *Carbon*, **49**, 3907-3919. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2011.05.029>
- [15] Begum, P. and Fugetsu, B. (2013) Induction of Cell Death by Graphene in *Arabidopsis thaliana* (Columbia Ecotype) T87 Cell Suspensions. *Journal of Hazardous Materials*, **260**, 1032-1041. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.06.063>
- [16] Akhavan, O. and Ghaderi, E. (2010) Toxicity of Graphene and Graphene Oxide Nanowalls against Bacteria. *ACS Nano*, **4**, 5731-5736. <https://doi.org/10.1021/nn101390x>
- [17] Rong, H., Wang, C., Yu, X., et al. (2018) Carboxylated Multi-Walled Carbon Nanotubes Exacerbated Oxidative Damage in Roots of *Vicia faba* L. Seedlings under Combined Stress of Lead and Cadmium. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, **161**, 616-623. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.034>
- [18] Khodakovskaya, M.V., De Silva, K., Biris, A.S., Dervishi, E. and Villagarcia, H. (2012) Carbon Nanotubes Induce Growth Enhancement of Tobacco Cells. *ACS Nano*, **6**, 2128-2135. <https://doi.org/10.1021/nn204643g>
- [19] 牟凤伟. 不同类型的碳纳米管对斜生栅藻的毒性效应研究[D]: [硕士学位论文]. 长沙: 中南林业科技大学, 2013.
- [20] Zhang, P., Zhang, R., Fang, X., et al. (2016) Toxic Effects of Graphene on the Growth and Nutritional Levels of Wheat

- (*Triticum aestivum* L.): Short- and Long-Term Exposure Studies. *Journal of Hazardous Materials*, **317**, 543-551. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.06.019>
- [21] Cheng, F., Liu, Y.F., Lu, G.Y., *et al.* (2016) Graphene Oxide Modulates Root Growth of *Brassica napus* L. and Regulates ABA and IAA Concentration. *Journal of Plant Physiology*, **193**, 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.02.011>
- [22] Lai, J., An, D., Wang, Y., *et al.* (2017) Research Advances on Microbial Toxic Effects of Nanoscale Zero-Valent Iron. *Asian Journal of Ecotoxicology*, **12**, 129-137. (In Chinese)
- [23] Liang, J., Xia, X., Zaman, W.Q., *et al.* (2017) Bioaccumulation and Toxic Effects of Decabromodiphenyl Ether in the Presence of Nanoscale Zero-Valent Iron in an Earthworm-Soil System. *Chemosphere*, **169**, 78-88. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.012>
- [24] Singh, Z. (2016) Applications and Toxicity of Graphene Family Nanomaterials and Their Composites. *Nanotechnology Science & Applications*, **9**, 15-28. <https://doi.org/10.2147/NSA.S101818>
- [25] Ershova, E.S., Sergeeva, V.A., Chausheva, A.I., *et al.* (2016) Toxic and DNA Damaging Effects of a Functionalized Fullerene in Human Embryonic Lung Fibroblasts. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **805**, 46-57. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.05.004>
- [26] Ghosh, M., Bhadra, S., Adegoke, A., *et al.* (2015) MWCNT Uptake in *Allium cepa* Root Cells Induces Cytotoxic and Genotoxic Responses and Results in DNA Hyper-Methylation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **774**, 49-58. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.03.004>
- [27] Chen, J., Dou, R., Yang, Z., *et al.* (2016) The Effect and Fate of Water-Soluble Carbon Nanodots in Maize (*Zea mays* L.). *Nanotoxicology*, **10**, 818-828. <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1133864>
- [28] Begum, P. and Fugetsu, B. (2012) Phytotoxicity of Multiwalled Carbon Nanotubes on Red Spinach and Role of Ascorbic Acid. *Toxicology Letters*, **211**, S199. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.03.717>