

酸性土壤条件下纳米氧化锌长期暴露对蕹菜生长和叶绿素荧光参数的影响

傅一挺,吉莉,陈延松*

(合肥师范学院生命科学学院,安徽 合肥 230601)

摘要:为了探明酸性土壤条件下纳米氧化锌(nano-ZnO)长期暴露对蕹菜的生理生态效应,通过盆栽实验,设置7个浓度系列的 nano-ZnO,70 d后测定相对叶绿素含量、生长参数和叶绿素荧光参数。结果显示,随 nano-ZnO 浓度升高,蕹菜相对叶绿素含量和生长参数先缓慢增加后显著下降。nano-ZnO 对蕹菜生物量在根部和冠部间的分配无显著影响。相对叶绿素含量与 nano-ZnO 浓度呈显著负相关($r = -0.879$, $p < 0.001$)。在 nano-ZnO 质量比为 160 mg/kg 时,光合有效辐射 $190 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 诱导的激发能过剩,但过剩激发能可通过热耗散保护机制消耗,以避免发生光损伤。酸性土壤条件下,弱光诱导的蕹菜叶绿素荧光参数对 nano-ZnO 长期暴露不敏感,但蕹菜的生物量累积易受 nano-ZnO 长期暴露的影响。

关键词:长期暴露;相对叶绿素含量;生物量;光合能力;纳米氧化锌

中图分类号:X835

文献标志码:B

文章编号:1674-6732(2020)05-0139-06

Long-term Impact of Nano-ZnO Exposure to Growth of *Ipomoea Aquatica* Forsk and It's Chlorophyll Fluorescence Indices under Acidic Soil Conditions

FU Yi-ting, JI Li, CHEN Yan-song*

(College of Life Sciences, Hefei Normal University, Hefei, Anhui 230601, China)

Abstract: In this study, a pot experiment with contaminated acidic soil by seven levels of nano-ZnO for 70 days (the whole vegetative growth phase) was performed to explore the physiological and ecological effects of nano-ZnO long-term exposure to *Ipomoea aquatica* Forsk. The relative chlorophyll content, growth characteristics, and chlorophyll fluorescence parameters were determined. The results showed that the relative chlorophyll content and growth parameters slowly increased and then decreased significantly. There was no significant impact of nano-ZnO on the biomass distribution between root and shoot of the plant. Relative chlorophyll content negatively correlated with nano-ZnO concentration ($r = -0.879$, $p < 0.001$). Excitation energy induced by a certain light intensity of $190 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ in leaf of *I. aquatic* treated by 160 mg/kg nano-ZnO was excessive, but the excess excitation can be consumed through thermal dissipation with a self-adjustment mechanism to avoid light injury. Under acidic soil conditions, Chlorophyll fluorescence indices induced by low light in leaf of *I. aquatic* were insensitive to nano-ZnO long-term exposure, but nano-ZnO long-term exposure significantly affect the biomass accumulation of *I. aquatic*.

Key words: Long-term exposure; Relative chlorophyll content; Biomass; Photosynthetic capacity; Nano-ZnO

20世纪80年代以来,纳米材料因其独特的物理、化学、生物性能,被广泛应用于光电、能源、医药、生物等领域中。近年来,随着纳米科技的迅速发展,它一方面促进了世界经济发展并对人类生活产生了重要影响;但另一方面,纳米材料尤其是金属纳米材料^[1-2]对动物、植物、微生物乃至人类的

毒性也越来越多地被人们关注。

金属纳米材料在其生产、运输、使用过程中易被释放到大气、土壤或水环境中,进而对生命有机体产生影响^[3]。实践研究表明,金属纳米材料对植物的生态毒性已成为一个倍受关注的全新领域。然而,不同金属纳米材料对不同植物产生毒性的机

收稿日期:2020-03-25;修订日期:2020-06-15

基金项目:安徽省自然科学基金资助项目(1608085MC62);安徽省省级质量工程大规模在线开放课程(MOOC)示范项目(2018mooc252);2019年度安徽省教育科学研究基金资助项目(JK19119)。

作者简介:傅一挺(1997—),女,在读硕士研究生,研究方向为植物生理生态学。

* 通讯作者:陈延松 E-mail:ottffss7531_cn@126.com

理不同,这主要取决于它们本身的理化性质、受试植物和环境介质^[4-6]。

纳米氧化锌(nano-ZnO)具有优良的吸收紫外线、抗菌消毒等特点,是一种应用范围很广的金属纳米材料。研究表明,nano-ZnO 对细菌^[7]、藻类^[8]、动物^[8]、植物^[9]等均具有急性或慢性生态毒性。nano-ZnO 对植物的毒性一方面来自纳米颗粒本身,另一方面则来自释放出的锌离子,尤其是在酸性条件下,超过 60% 的 nano-ZnO 会释放出锌离子至溶液中^[5]。植物体中浓度过高的锌离子会对植物的生理生态特性及其生长产生影响^[10]。然而,目前有关 nano-ZnO 的植物毒性研究主要是基于水培条件下完成的^[5,9,11-12],更缺乏酸性条件下植物对长期暴露的胁迫响应。现以蕹菜(*Ipomoea aquatica* Forsk.)为受试植物,通过土培盆栽实验,探究弱酸性条件下 nano-ZnO 长期胁迫对蕹菜的生理生态效应。研究结果将拓宽对 nano-ZnO 与植物相互关系的认识,也可为 nano-ZnO 的生态风险评估提供参考。

1 实验部分

1.1 实验材料

蕹菜种子 300 g/袋(北京大禾龙腾国际种子有限公司,约 10 000 粒); nano-ZnO[上海阿拉丁工业公司,纯度为 99.9%,颗粒粒径为(30 ± 10) nm];栽培盆(盆口直径 16.0 cm,盆底直径 12.5 cm,盆高 17.0 cm)。

弱酸性土壤配制:将购自市场的酸性营养土与林下 0~15 cm 表层土按体积比 1:1 充分混匀,自然晾干后待用。经检测,主要物质质量比为有机质 58.16 g/kg,总氮 3.26 g/kg,总磷 2.20 g/kg,总钾 13.12 g/kg,pH 值 = 6.05。

1.2 样品处理

1.2.1 土壤处理

将干燥后的混合土壤去除杂质,均为 8 组,每组分别按锌质量比 0,5,10,20,40,80,160 mg/kg 施加 nano-ZnO,充分搅拌 10~15 min,混匀后等份装盆,每组操作重复 5 次。

1.2.2 种子萌发与幼苗栽培处理

选取饱满且大小均匀的健康蕹菜种子 200 粒,用 50~60 °C 的温水浸种 30 min 后,于清水中浸种 20 h,取出洗净,置于室温下湿润的纱布上催芽。待种子胚根突破种皮,随机取其中 140 粒,种入上

述经过 nano-ZnO 处理的土壤中。每盆均匀播种 4 粒种子,播种完后用封口膜包裹密封栽培盆盆口,再置于人工气候室中培养。幼苗建成后,每天浇水以保持土壤湿润。人工气候室条件设定为光照 12 h,温度 30 °C,光照强度为 200 μmol/(m² · s);黑暗 12 h,温度 25 °C,相对湿度(55 ± 5)%。

整个培养实验时间为 2017 年 11 月 19 日—2018 年 1 月 26 日。在培养阶段的最后一周内进行叶绿素相对含量、形态学指标、生物量以及叶绿素荧光诱导动力学参数等实验指标测量。各项指标均以每盆 4 株植物的平均值为一个重复观测值, n = 5。

1.3 测定方法

形态学指标的测定:使用直尺测定株高,计数法记录叶片数目。

叶绿素相对含量(SPAD)的测定:采用 SPAD - 502 Plus(Minolta Japan, Konica)叶绿素计测量。以植物形态学上端第一片完全展开的叶片为测量单元测量时,选择叶片中间位置为测量点并避开明显的叶脉,取 3 次读数平均值。

生物量的测定:待上述实验结束,小心地将所有植株挖出并做好标记,先用自来水清洗掉根部土壤,再用双蒸水清洗 3 次,分成冠部和根部,置于 65 °C 烘箱中烘干 48 h 至恒重,使用万分之一电子天平测量冠部干重和根部干重并计算总干重和根冠比。

叶绿素荧光参数的测定:采用 Junior - PAM (Walz, Germany)基础型调制荧光仪测定。首先,将测量对象置于暗环境中适应 30 min 后,测定最大量子产量(Fv/Fm)。然后使用人工光源自动测量 15 次,光照强度为 190 μmol/(m² · s)下的叶绿素荧光诱导动力学参数,主要包括电子传递效率(ETR)、光化学淬灭系数(qL)、非光化学淬灭系数(NPQ)、光系统 II(Phtosynthetic system II, PSII)实际量子产量(Φ_{PSII})、光诱导的非光化学淬灭(Φ_{NPQ})和非光诱导的非光化学淬灭(Φ_{NO})。取最后 3 次读数的平均值。

1.4 数据分析

所有数据均以(平均数 ± 标准误差)表示。基于 IBM SPSS statistics 23.0 软件包(IBM, Chicago, USA),使用单因素方差分析及 Duncan 多重比较检测不同处理间叶绿素相对含量、生长参数和叶绿素荧光诱导动力学参数的差异性,显著性水平为 0.05。使用 Origin 8.5 进行作图(Origin Lab, USA)。

2 结果与讨论

2.1 nano-ZnO 胁迫对蕹菜叶绿素相对含量 (SPAD) 的影响

图1为土壤中 nano-ZnO 对蕹菜 SPAD 的影响,其中, $n = 5$, 柱顶部小写字母不同表示有显著差异, $\alpha = 0.05$, 下同。由图1可见, 土壤中 nano-ZnO 质量比在 $0 \sim 20 \text{ mg/kg}$ 范围内, 蕩菜 SPAD 基本相同, 随着土壤中 nano-ZnO 质量比继续升高 ($> 20 \text{ mg/kg}$), SPAD 则迅速持续下降。当土壤中 nano-ZnO 质量比达到 160 mg/kg 时, 蕩菜 SPAD 仅为 17.977, 相较于对照组显著减少了 55.63% ($F = 18.619, p = 0.000$)。

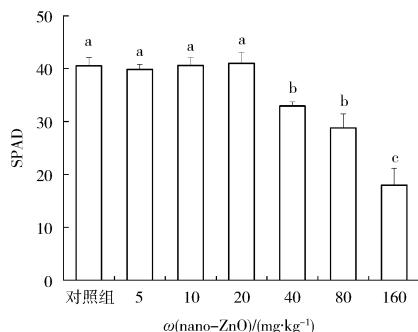


图1 土壤中 nano-ZnO 对蕹菜 SPAD 的影响

2.2 nano-ZnO 胁迫对蕹菜生长参数的影响

2.2.1 对生物量和根冠比的影响

图2(a)(b)(c)(d)为土壤中 nano-ZnO 对蕹

菜生物量、根冠比、叶片数量和植株高度的影响,由图2(a)可见,随着土壤中 nano-ZnO 质量比的增加,蕹菜的冠部生物量、根部生物量、总生物量均呈先增大后减小的趋势。当 nano-ZnO 质量比为 20 mg/kg 时, 冠部生物量、根部生物量、总生物量均达到最大值, 分别为 $0.299, 0.149, 0.447 \text{ g}$, 较对照组分别增加了 $30.10\%, 28.57\%, 42.36\%$, 但未达到显著性水平。随着 nano-ZnO 质量比进一步升高, 3个指标值均逐渐减小。当 nano-ZnO 质量比为 160 mg/kg 时, 冠部生物量 ($F = 2.454, p = 0.049$)、根部生物量 ($F = 2.780, p = 0.030$)、总生物量 ($F = 2.600, p = 0.039$) 分别减少至 $0.165, 0.064, 0.229 \text{ g}$, 与对照组相比减少了 $21.05\%, 39.05\%, 27.07\%$, 也未达到显著水平, 但与最高值组相比则差异显著。由图2(b)可见, 不同 nano-ZnO 胁迫处理之间根冠比无显著差异 ($F = 0.689, p = 0.660$)。

2.2.2 对叶片数量和植株高度的影响

从图2(c)和(d)可以看出, 随着 nano-ZnO 质量比的增加, 蕩菜叶片数量和植株高度也均表现为先增加后减小的趋势。但是只有叶片数量的增加达到了显著水平 ($F = 3.136, p = 0.018$), 而植株高度的增加并未达到显著水平 ($F = 2.137, p = 0.080$)。当 nano-ZnO 质量比为 160 mg/kg 时, 叶片数量和植株高度均降至最低值, 分别为 12.200 枚和 10.220 cm , 均显著低于最高值组; 但与对照组相比, 分别降低了 6.01% 和 10.82%, 并未达到显著性水平。

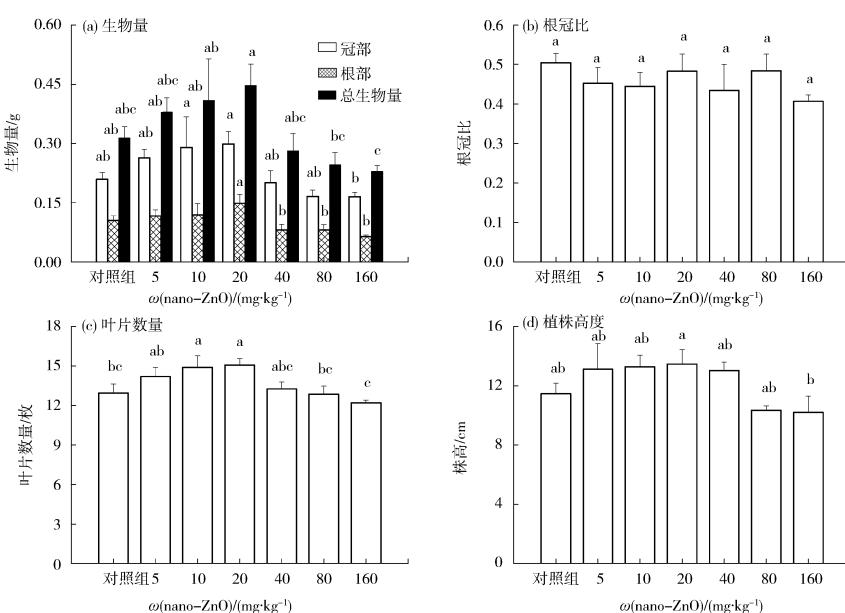


图2 土壤中 nano-ZnO 对蕹菜生物量、根冠比、叶片数量和植株高度的影响

2.3 nano-ZnO 胁迫对蕹菜叶绿素荧光诱导动力学参数的影响

图3(a)(b)(c)(d)为土壤中 nano-ZnO 对蕹菜 Fv/Fm、ETR、qL 和 NPQ 的影响,由图3可见,Fv/Fm 与 ETR 变化趋势基本一致。当土壤中 nano-ZnO 质量比介于 0~80 mg/kg 时,不同处理间的 Fv/Fm 与 ETR 有极小幅度的先增后减变化且未达到显著性水平;与对照组相比,当质量比达到 160 mg/kg 时,Fv/Fm ($F = 3.325, p = 0.013$) 与

ETR ($F = 4.001, p = 0.005$) 则显著降低至 0.716 和 30.723, 分别下降了 8.32% 和 23.63%, 见图3(a)(b)。当土壤中 nano-ZnO 质量比介于 0~80 mg/kg 时,不同处理间的 qL 无显著变化 ($p > 0.05$), NPQ 差异也不显著 ($p > 0.05$);与对照组相比,当质量比达到 160 mg/kg 时,qL ($F = 3.732, p = 0.034$) 和 NPQ ($F = 4.281, p = 0.015$) 则分别增加了 28.37% 和 90.56%。

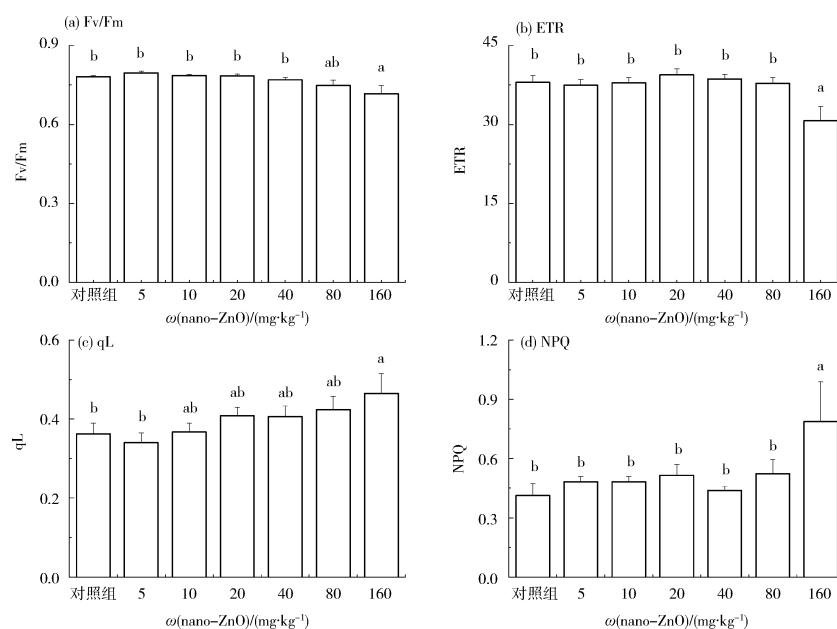


图3 土壤中 nano-ZnO 对蕹菜 Fv/Fm、ETR、qL、NPQ 的影响

图4(a)(b)(c)为土壤中 nano-ZnO 对蕹菜 Φ_{PSII} 、 Φ_{NO} 和 Φ_{NPQ} 的影响,由图4可见,当土壤中 nano-ZnO 质量比介于 0~80 mg/kg 时,不同处理间的 Φ_{PSII} 和 Φ_{NPQ} 无显著差异。与对照组相比,当土壤中 nano-ZnO 质量比达到 160 mg/kg 时, Φ_{PSII} 显

著降低至 0.385 ($F = 4.005, p = 0.005$),下降了 23.38%,见图4(a);相反的是 Φ_{NPQ} 显著升高至 0.260 ($F = 2.680, p = 0.035$),上升了 41.54%,见图4(c)。不同处理间非光诱导的非光化学猝灭(Φ_{NO})无显著差异 ($F = 0.945, p = 0.479$),见图4(b)。

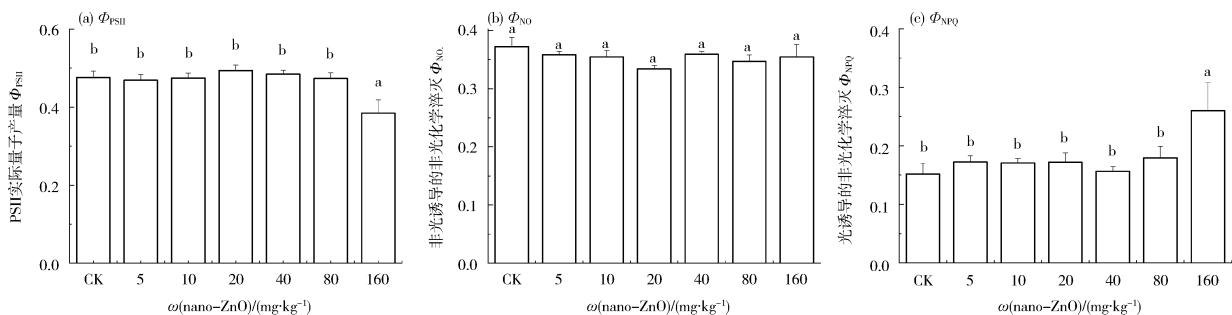


图4 土壤中 nano-ZnO 对蕹菜 Φ_{PSII} 、 Φ_{NO} 、 Φ_{NPQ} 的影响

2.4 nano-ZnO 质量比与蕹菜叶绿素相对含量、生长参数、叶绿素荧光参数的关系

表 1 为土壤中 nano-ZnO 质量比与蕹菜生长参数、叶绿素荧光参数的相关性,由表 1 可见,土壤中 nano-ZnO 质量比与蕹菜叶片叶绿素相对含量具有极显著负相关关系,且相关程度高($r = -0.879$,

$p = 0.000$);与总生物量、叶片数等生长参数也具有极显著负相关关系,但相关程度不高;与 Fv/Fm、ETR、 Φ_{PSII} 呈极显著负相关关系,与 NPQ、 Φ_{NPQ} 呈极显著正相关关系,与 qL 呈显著正相关关系,但相关程度均不高。

表 1 土壤中 nano-ZnO 质量比与蕹菜生长参数、叶绿素荧光参数的相关性($n = 35$)

	SPAD	总生物量	叶片数	Fv/Fm	ETR	Φ_{PSII}	qL	NPQ	Φ_{NPQ}
相关系数(r)	-0.879	-0.438	-0.435	-0.632	-0.579	-0.579	0.366	0.497	0.546
p 值	0.000	0.009	0.009	0.000	0.000	0.000	0.031	0.002	0.001

2.5 nano-ZnO 胁迫对蕹菜叶绿素相对含量和生物量累积的影响

Mg^{2+} 是高等植物叶片中合成叶绿素大分子的一个重要元素。叶片中低浓度 Zn^{2+} 并不会影响植物生长,反而对植物生长具有一定促进作用^[13-14]。然而,当叶片中 Zn^{2+} 浓度过高时,它便会取代 Mg^{2+} ,破坏叶绿素大分子,最终扰乱植物正常的光合作用和生物量累积^[10]。不同植物对 nano-ZnO 的生态响应不同。例如,在水培条件下,对于甜菊(*Stevia rebaudiana* Bertoni)而言,≤1 mg/L 的 nano-ZnO 质量浓度可对其生长产生促进作用,当 nano-ZnO 质量浓度 > 10 mg/L 时则会抑制甜菊生长^[9];对于水稻(*Oryza sativa* L.)而言,当 nano-ZnO 质量浓度 > 50 mg/L 时,才会显著抑制水稻叶片叶绿素合成,抑制其生长^[15]。本研究显示,土壤中 nano-ZnO 质量比与蕹菜叶片叶绿素相对含量呈极显著负相关关系,且相关程度高($r = -0.879$, $p = 0.000$)。然而,当其质量比 < 40 mg/kg 时,蕹菜叶片叶绿素相对含量首先呈现出缓慢增加趋势,与之相对应的是蕹菜根部生物量、冠部生物量、总生物量、植株叶片数量、植株高度也均表现出缓慢增加趋势,即土壤中低质量比氧化锌可促进蕹菜生长;当其质量比 > 40 mg/kg 时,蕹菜叶片叶绿素相对含量显著下降,并最终导致蕹菜根部生物量、冠部生物量、总生物量、叶片数量、植株高度均表现出下降趋势,即土壤中高浓度氧化锌对蕹菜生长具有抑制作用,这个现象和 nano-ZnO 在酸性条件下极易释放出 Zn^{2+} 有关^[5,16]。另外,土壤中 nano-ZnO 胁迫并未对蕹菜根冠比产生显著影响。

2.6 nano-ZnO 胁迫对蕹菜叶片光合能力的影响

Fv/Fm 反映了 PS II 反应中心内禀光能转换效

率和植物的潜在光合活性^[17]。对于绝大多数高等植物而言,非胁迫条件下它们的 Fv/Fm 波动幅度极小,即使在轻度胁迫逆境中,该参数的变化也不大,而只有在中度及以上胁迫条件下该参数才会明显下降^[18]。在 0 ~ 80 mg/kg 范围内,蕹菜叶片 Fv/Fm 对 nano-ZnO 的响应是一个很缓慢且幅度很小的先升后降的过程,只有当 nano-ZnO 质量比达到 160 mg/kg 时,Fv/Fm 才显著下降,这也和 ETR 显著降低的结果相一致。

qL 表示植物将分配给 PSII 反应中心的能量用于光合电子传递能力,间接反映植物对光能的转化能力。NPQ 表示植物将分配给 PSII 反应中心但不能用于光合电子传递的过剩能量以热能形式耗散的能力,是一种植物对光合机构的自我保护机制。 Φ_{NPQ} 和 Φ_{NO} 主要用于衡量非光化学猝灭途径的能量分配特性。 Φ_{PSII} 表示 PSII 反应中心部分关闭时的实际原初光能捕获效率。在不同光照条件下, Φ_{NPQ} 、 Φ_{NO} 、 Φ_{PSII} 三者间存在一个动态平衡状态,即 $\Phi_{\text{NPQ}} + \Phi_{\text{NO}} + \Phi_{\text{PSII}} = 1$ 。

研究表明,土壤中 nano-ZnO 质量比为 0 ~ 160 mg/kg 时,蕹菜叶片 qL 对其响应无明显规律。当土壤中 nano-ZnO 质量比达到 160 mg/kg 时,蕹菜叶片 NPQ、 Φ_{NPQ} 均显著升高,但 Φ_{NO} 无显著变化。说明该处理条件下,蕹菜植物体内 PSII 反应中心失活数量显著升高,植物体内的激发能量已过剩,但过剩的能量尚可通过热能耗散进行调节,以使反应中心免受光伤害。

3 结论

弱酸性土壤环境条件下,低质量比 nano-ZnO (≤ 20 mg/kg) 长期暴露对蕹菜生长具有促进作

用,高质量比 nano-ZnO ($\geq 40 \text{ mg/kg}$)则具有抑制作用,但对其生物量分配均无显著影响。低质量比 nano-ZnO ($\leq 80 \text{ mg/kg}$)长期暴露对蕹菜叶片光合能力无显著影响,高质量比 nano-ZnO (160 mg/kg)长期暴露会导致蕹菜叶片光合能力显著下降。检测蕹菜受 nano-ZnO 长期暴露影响程度时,叶绿素相对含量和生物量指标优于弱光诱导的叶绿素荧光参数指标。

[参考文献]

- [1] NOWACK B. The behavior and effects of nanoparticles in the environment [J]. Environmental Pollution, 2009, 157 (4): 1063 – 1064.
- [2] RASTOGI A, ZIVCAK M, SYTAR O, et al. Impact of metal and metal oxide nanoparticles on plant: A critical review [J]. Frontiers in Chemistry, 2017(5): 78.
- [3] NOWACK B, BUCHELI T D. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment [J]. Environmental Pollution, 2007, 150(1): 5 – 22.
- [4] GOMEZ-GARAY A, PINTOS B, MANZANERA J A, et al. Uptake of CeO₂ nanoparticles and its effect on growth of *Medicago arborea* in vitro plantlets [J]. Biological Trace Element Research, 2014, 161(1): 143 – 150.
- [5] WATSON J L, FANG T, DIMKPA C O, et al. The phytotoxicity of ZnO nanoparticles on wheat varies with soil properties [J]. Biometals, 2015, 28(1): 101 – 112.
- [6] 文双喜,王毅力.水培实验中不同粒径纳米 TiO₂ 对金鱼藻种子发芽和植株生长和生理的影响 [J].生态毒理学报, 2018, 13(6): 268 – 277.
- [7] ADAMS L K, LYON D Y, ALVAREZI P J J. Comparative ecotoxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions [J]. Water Research, 2006, 40(19): 3527 – 3532.
- [8] 朱小山.几种人工纳米材料的生态毒理学研究[D].天津:南开大学, 2007.
- [9] JAVED R, USMAN M, YUCESAN B, et al. Effect of zinc oxide (ZnO) nanoparticles on physiology and steviol glycosides production in micropaginated shoots of *Stevia rebaudiana* Bertoni [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2017, 110: 94 – 99.
- [10] MUKHERJEE A, POKHREL S, BANDYOPADHYAY S, et al. A soil mediated phyto-toxicological study of iron doped zinc oxide nanoparticles (Fe@ZnO) in green peas (*Pisum sativum* L.) [J]. Chemical Engineering Journal, 2014, 258: 394 – 401.
- [11] SAXENA P H. Toxicity assessment of ZnO nanoparticles to freshwater microalgae *Coelastralla terrestris* [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2019, 26(26): 26991 – 27001.
- [12] MOUSAVI K S M, LAHOUTI M, GANJEALI 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, 2014, 96(6): 861 – 868.
- [13] WU P, CUI P X, FANG G D, et al. Biochar decreased the bioavailability of Zn to rice and wheat grains: Insights from microscopic to macroscopic scales [J]. Science of the Total Environment, 2018, 621: 160 – 167.
- [14] LIU X, WANG F, SHI Z, et al. Bioavailability of Zn in ZnO nanoparticle-spiked soil and the implications to maize plants [J]. Journal of Nanoparticle Research, 2015, 4(17): 1 – 11.
- [15] ZHANG W, LONG J, LI J, et al. Impact of ZnO nanoparticles on Cd toxicity and bioaccumulation in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Environmental Science & Pollution Research, 2019, 26(1): 1 – 10.
- [16] 张瑞昌,章海波,涂晨,等. pH、离子强度及电解质种类对纳米氧化锌聚集和溶解的影响 [J].环境化学, 2014, 33(11): 1821 – 1827.
- [17] 赵和丽,杨再强,王明田,等.高温高湿胁迫及恢复对番茄快速荧光诱导动力学的影响 [J].生态学杂志, 2019, 38(8): 2405 – 2413.
- [18] CHEN Y, WANG Z, SHEN Z, et al. Effects of oxytetracycline on growth and chlorophyll fluorescence in rape (*Brassica campestris* L.) [J]. Polish Journal of Environmental Studies, 2017, 26(3): 995 – 1001.