

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.2018.60868

赛闹汪青, 达梦婷, 曹佳鑫, 石珍珍, 贾凌云, 孙坤, 冯汉青. 硝基苯酚胁迫下外源褪黑素对水稻幼苗生长及生理特性的影响[J]. 植物科学学报, 2018, 36(6): 868-878

Sainao WQ, Da MT, Cao JX, Shi ZZ, Jia LY, Sun K, Feng HQ. Effects of exogenous melatonin on the growth and physiological characteristics of *Oryza sativa* L. seedlings under nitrophenol stress[J]. *Plant Science Journal*, 2018, 36(6): 868-878

硝基苯酚胁迫下外源褪黑素对水稻 幼苗生长及生理特性的影响

赛闹汪青, 达梦婷, 曹佳鑫, 石珍珍, 贾凌云, 孙坤, 冯汉青*

(西北师范大学生命科学学院, 兰州 730070)

摘要:采用液体培养实验方法,研究硝基苯酚胁迫对水稻(*Oryza sativa* L.)幼苗生长、抗氧化特性、光系统Ⅱ(PSⅡ)光合特性的影响,以及添加外源褪黑素对缓解硝基苯酚胁迫的作用。结果显示,随着硝基苯酚胁迫浓度的升高,水稻幼苗株高、根长、地下部干重、地上部干重、全株干重和叶片PSⅡ实际光化学效率[Y(Ⅱ)]、光化学淬灭系数(qP)、PSⅡ电子传递速率(ETR)、叶绿素含量均有所下降,而叶片非光化学淬灭系数(qN、NPQ)上升;同时,根系活性氧[过氧化氢(H₂O₂)和超氧阴离子(O₂⁻)]积累量、抗氧化酶[超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)]活性,以及渗透调节物质(可溶性蛋白和可溶性糖)含量呈先升高后降低的趋势。在非硝基苯酚胁迫下,与对照组相比,添加外源褪黑素显著提高了幼苗地下部干重、根系可溶性糖含量和SOD活性、叶片PSⅡ光化学效率和叶绿素含量。与单独添加硝基苯酚处理相比,硝基苯酚+褪黑素复合处理显著缓解了硝基苯酚胁迫对幼苗生长、叶片PSⅡ光化学效率和叶绿素合成的抑制作用;降低了根系活性氧水平、抗氧化酶活性和渗透调节物质含量。研究结果表明添加外源褪黑素能够显著缓解硝基苯酚胁迫对水稻幼苗生长、根系活性氧水平、抗氧化酶活性、叶片PSⅡ光化学效率及叶绿素合成的不良影响,提高水稻幼苗对硝基苯酚胁迫的适应性。

关键词:硝基苯酚; 水稻幼苗; 褪黑素; 缓解

中图分类号: Q945.78

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2018)06-0868-11

Effects of exogenous melatonin on the growth and physiological characteristics of *Oryza sativa* L. seedlings under nitrophenol stress

Sainao Wang-Qing, Da Meng-Ting, Cao Jia-Xing, Shi Zhen-Zhen, Jia Ling-Yun, Sun Kun, Feng Han-Qing*

(College of Life Sciences, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: We investigated the effects of nitrophenol stress on the growth, antioxidant properties, and PSⅡ photosynthetic characteristics of *Oryza sativa* L. seedlings, as well as the alleviative effects of exogenous melatonin on nitrophenol stress, through liquid culture experiments. Results showed that with the increase in nitrophenol concentration, the plant

收稿日期: 2018-06-19, 退修日期: 2018-07-11。

基金项目: 国家自然科学基金(31870246, 31560070); 甘肃省高等学校科研项目(2015A-007); 甘肃省重点研发计划项目(18YF1NA051); 甘肃省高校基本科研业务费; 西北师范大学青年创新团队项目。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China(31870246, 31560070), University Scientific Research Project of Gansu Province (2015A-007), Key Research and Development Project of Gansu Province (18YF1NA051), Fundamental Research Funds for the Gansu Universities of Gansu Provincial Department of Finance, and Youth Innovation Team of Northwest Normal University.

作者简介: 赛闹汪青(1993-), 男, 硕士研究生, 研究方向为逆境植物生理生态(E-mail: 1953083707@qq.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: fenghanq@nwnu.edu.cn)。

height, root length, below-ground part dry weight, above-ground part dry weight, plant dry weight, effective photochemical quantum yield of PSⅡ ($Y(Ⅱ)$), photochemical quenching coefficient (qP), non-cyclic electron-transport through PSⅡ (ETR), and chlorophyll content of leaves all decreased. Conversely, the non-photochemical quenching coefficient (qN , NPQ) of the leaves increased with increasing nitrophenol concentration. Simultaneously, the accumulation of reactive oxygen species (ROS) (including hydrogen peroxide and superoxide anion radicals (H_2O_2 and O_2^-)), activity of antioxidant enzymes (including superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT), and ascorbate peroxidase (APX)), and content of the osmotic regulator (soluble protein and sugar) of roots first increased then decreased with increasing nitrophenol concentration. Without nitrophenol stress, the below-ground part dry weight, soluble sugar content, and SOD activity of the roots, PSⅡ photochemical efficiency, and chlorophyll content of the leaves all significantly increased under exogenous melatonin treatment compared with the control. In comparison with nitrophenol treatment, the combination of nitrophenol and melatonin treatment significantly alleviated the inhibition of nitrophenol stress on seedling growth, PSⅡ photochemical efficiency, and chlorophyll synthesis, and reduced ROS levels, antioxidant enzyme activities, and osmotic regulator content in roots. Thus, the addition of exogenous melatonin can significantly alleviate the adverse effects of nitrophenol stress on *O. sativa* L. seedlings.

Key words: Nitrophenol; *Oryza sativa* seedlings; Melatonin; Alleviation

随着近代工业尤其是有机化工、石油化工、农药工业等迅速发展,由化学物质引起的环境污染问题日益严重^[1]。硝基苯酚 (nitrophenol, NP; 分子式为 $NO_2C_6H_4OH$, 有邻、间、对 3 种异构体) 作为化工、染料和医药等领域废水中的主要有机污染物之一,逐步进入环境并形成新型污染^[2, 3]。同时,农业生产长期施用大量农药、化肥以及污水灌溉,使得粮食生产面临着巨大的生态安全问题;其中硫磷及氧硫磷等有机磷农药组分在微生物的水解作用和光催化作用下可以生成硝基苯酚类化合物^[4]。由于硝基苯酚具有一定的生物毒性且难以被生物降解,因此被列为我国水环境优先控制的 68 种污染物之一,也是美国环境保护局 (US Environmental Protection Agency, EPA) 水环境 129 种重点控制的污染物之一^[5]。据报道,我国硝基苯酚年产量高于 10 万吨,排放含酚废水高达 30 ~ 40 万吨;钱塘江流域、淮河流域江苏段、辽河流域沈阳段等的水稻种植区存在不同程度的硝基苯酚污染,其最大检出率分别达 4.550 μg/L、5.05 μg/L 和 8.929 μg/L。美国 EPA 规定,硝基苯酚类化合物在自然水体中的最大浓度应小于 10 μg/L^[1, 6]。水稻是消耗水分最多的粮食作物,而水是有机污染物迁移的主要载

体,因此水稻最易受到有机污染物的危害,特别是在工业发达地区,工业有机物污染已成为影响水稻生产安全的主要限制因素之一^[7];同时,由于水稻苗期生长状况对后期的生长及产量影响重大,因而提高水稻苗期对硝基苯酚类有机污染物的耐受性,以及如何缓解该污染物对水稻幼苗的毒害作用是一个亟待解决的问题。

褪黑素 (melatonin, MT) 是一种色氨酸吲哚类衍生物,广泛存在于动植物中^[8]。研究表明,添加外源褪黑素能促进植物侧根的生长、延缓叶片衰老^[9, 10]。此外,褪黑素可通过参与活性氧的清除、刺激抗氧化酶活性、提高线粒体氧化磷酸化效率和降低电子渗漏,以及增强其他抗氧化作用等途径,增强植物对干旱、盐害、重金属、高温、冷害等多种逆境的抗性^[11, 12]。孙莎莎等^[13]研究发现,不同浓度外源褪黑素处理均能缓解羟基苯甲酸对黄瓜胚根的抑制作用,并能显著提高羟基苯甲酸胁迫下黄瓜胚根中超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD)、过氧化氢酶 (CAT) 和抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 活性,降低胚根中超氧阴离子 (O_2^-) 产生速率、过氧化氢 (H_2O_2) 含量和膜脂质过氧化程度。这说明外源褪黑素的添加能够有效缓解有机物对植物体的胁迫作用。然而,有关褪黑素能否有效缓解

硝基苯酚类污染物对植物体的危害以及缓解该危害的机制研究, 目前还未见报道。褪黑素廉价易得, 在抗有机物污染方面具有潜在的应用前景。

因此, 我们以水稻为材料, 研究硝基苯酚胁迫对水稻幼苗生长、抗氧化特性和叶片 PSⅡ光合特性的影响, 以及添加外源褪黑素对缓解水稻幼苗受硝基苯酚胁迫的影响, 以期丰富硝基苯酚类化合物对水稻幼苗作用机理研究、拓展褪黑素在缓解硝基苯酚类有机物对水稻苗期的毒害作用方面的应用, 为水稻苗期预防有机物污染研究提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 植物材料及处理方法

水稻‘金优 957’种子购于湖北华之夏种子有限公司。选取健康饱满的种子, 用 2% 次氯酸钠消毒 10 min、蒸馏水冲洗 30 min, 然后置于铺有多层纱布(用蒸馏水浸湿)的培养皿中, 于 25℃下萌发。待种子露白后(胚根长度为种子长度的 2 倍左右), 选取萌发一致的种子移栽到置有 Hoagland 的烧杯(100 mL)内, 每个烧杯种植 12 株。培养室昼夜温度变化为 27~23℃, 光照强度为 $(150 \pm 5) \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 光照周期为 12 h 光照/12 h 黑暗, 空气湿度 45%。每周更换 1 次营养液, 其余时间补充蒸馏水以保持培养介质水肥充足。待幼苗生长 20 d 时进行以下处理。

(1) 硝基苯酚处理: 分别用 0、70、140、280、560 $\mu\text{mol/L}$ 的硝基苯酚处理水稻幼苗, 于培养室培养 5 d 后, 测定水稻幼苗生理指标; 不同实验组各处理 6 株水稻幼苗。硝基苯酚处理前用少量无水乙醇助溶(对照组加等量无水乙醇), 然后加蒸馏水配制成实验所需浓度。

(2) 设置 4 个处理: 0(CK)、100 $\mu\text{mol/L}$ 褪黑素(MT)、280 $\mu\text{mol/L}$ 硝基苯酚(NP)、280 $\mu\text{mol/L}$ 硝基苯酚 + 100 $\mu\text{mol/L}$ 褪黑素(NP+MT)。不同实验组各处理 6 株水稻幼苗, 分别处理 5 d 后测定水稻幼苗生理指标。褪黑素浓度基于预实验确定, 处理前用无水乙醇助溶 MT 或 NP(对照组加等量无水乙醇), 然后加蒸馏水配制成实验所需浓度。

1.2 生长指标测定

取不同处理组植株, 用蒸馏水反复冲洗 3 次, 然后用滤纸吸干水分。不同处理组植株拍照记录,

用 Image J 软件测量根长及株高。然后将鲜植株置于烘箱 105℃杀青 20 min, 75℃烘干至恒重, 称其地上部(茎和叶混合)干重、地下部干重(根系)及全株干重(根茎叶混合)^[14]。

1.3 根系可溶性蛋白和可溶性糖含量测定

采用考马斯亮蓝 G-250 染色法^[15]测定可溶性蛋白含量; 硫酸蒽酮比色法^[16]测定可溶性糖含量。

1.4 根系活性氧水平和抗氧化酶活性测定

根系活性氧(ROS)包括: 过氧化氢(H_2O_2)和超氧阴离子(O_2^-)。采用过氧化氢试剂盒(南京建成)测定 H_2O_2 含量; 参照 Achary 等^[17]的方法测定 O_2^- 含量。抗氧化酶活性包括: 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)。采用氮蓝四唑法测定 SOD 活性; 愈创木酚法测定 POD 活性; 紫外分光光度法测定 APX 和 CAT 活性^[18]。

1.5 叶绿素荧光参数和叶绿素含量的测定

参照 Demmig-Adams 等^[19] 和 Donnini 等^[20]的方法, 采用叶绿素荧光成像仪(PAM-2500 Waltz, Germany)测定叶绿素荧光参数。叶绿素荧光参数包括: $Y(\text{II})$ [PSⅡ实际光化学量子效率, 反映 PSⅡ反应中心的原初光能捕获效率]、 qP (光化学淬灭系数, 反映 PSⅡ反应中心的开放程度和电子传递活性)、 ETR (PSⅡ的相对电子传递速率)、 qN 和 NPQ (非光化学淬灭系数, 表征 PSⅡ反应中心吸收过量光能后的热耗散能力及光合机构的损伤程度)。

取剪碎的水稻幼苗叶片, 加入 3 mL 80% (V/V) 的丙酮, 于 4℃冰箱密闭遮光放置 24 h 以上, 待叶片完全变白, 于 663 nm 和 645 nm 下测定吸光值, 计算叶绿素浓度, 再换算成质量^[21]。

1.6 数据分析

以上测定均取 3 次独立实验结果的平均值, 数据用平均值 \pm 标准差(SD)表示。使用 Origin 9.0 软件对数据进行双总体 t 检验。差异显著性以 $P < 0.05$ 表示。

2 结果与分析

2.1 硝基苯酚胁迫对水稻幼苗生长和根系渗透调节物质含量的影响

研究结果显示(表 1), 与对照相比, 70 $\mu\text{mol/L}$

L 硝基苯酚胁迫 5 d 后, 水稻幼苗株高、根长、地上部干重和地下部干重均有一定降低, 但影响不显著; 随着硝基苯酚浓度的升高, 水稻幼苗株高、根长、地上部干重、地下部干重显著下降。70 ~ 140 $\mu\text{mol/L}$ 硝基苯酚胁迫 5 d 后, 水稻幼苗全株干重与对照相比差异不显著, 而当硝基苯酚胁迫浓度达 280 ~ 560 $\mu\text{mol/L}$ 时, 水稻幼苗全株干重与对照相比下降显著。280 $\mu\text{mol/L}$ 硝基苯酚胁迫 5 d 后, 幼苗株高、根长、地上部干重、地下部干重和全株干重与对照相比, 分别下降了 37.4%、25.7%、24.5%、27.3% 和 15.9%。此外, 水稻幼苗株高下降程度比根长的下降更明显, 而地下部干重与地上部干重无明显差异。

可溶性糖和可溶性蛋白是植物体内重要的渗透调节物质, 一定程度上反映了植物的抗逆性^[22]。与对照组相比, 70 ~ 280 $\mu\text{mol/L}$ 硝基苯酚处理 5 d 后, 水稻幼苗根系可溶性蛋白和可溶性糖含量显著增加, 且在 280 $\mu\text{mol/L}$ 硝基苯酚处理后达到最大值, 分别是对照的 1.4 倍和 3.1 倍。而 560 $\mu\text{mol/L}$ 硝基苯酚处理 5 d 后, 可溶性蛋白含

量显著下降且低于对照, 可溶性糖含量也下降至对照水平(表 1)。

2.2 硝基苯酚胁迫对水稻幼苗根系活性氧水平和抗氧化酶活性的影响

前人研究表明, 有机污染物胁迫可诱导 O_2^- 及 H_2O_2 的代谢失衡和过量积累, 导致活性氧清除酶(SOD、POD、CAT 和 APX 等)功能紊乱, 不能有效地消除细胞内的活性氧, 进而影响植株的生长^[23]。本研究结果显示(表 2), 与对照组相比, 70 ~ 280 $\mu\text{mol/L}$ 硝基苯酚处理 5 d 后, 水稻幼苗根系 O_2^- 和 H_2O_2 含量、SOD 和 CAT 活性逐渐升高, 且在 280 $\mu\text{mol/L}$ 硝基苯酚处理下, O_2^- 和 H_2O_2 含量、SOD 和 CAT 活性达最大值, 分别为对照的 1.3 倍、5.7 倍、2.4 倍和 2.9 倍; 而 560 $\mu\text{mol/L}$ 硝基苯酚处理 5 d 后, O_2^- 含量和 CAT 活性降低至对照水平, H_2O_2 含量和 SOD 活性虽有一定程度的降低但仍高于对照。与对照组相比, 水稻幼苗根系 POD 和 APX 活性随硝基苯酚胁迫浓度的增加逐渐升高, 且在 560 $\mu\text{mol/L}$ 硝基苯酚胁迫 5 d 后达到最大值, 分别为对照的 1.7 倍和 4.1 倍。

表 1 硝基苯酚胁迫对水稻幼苗生长和根系渗透调节物质含量的影响

Table 1 Effects of nitrophenol stress on the growth and root osmotic regulator content of *Oryza sativa* seedlings

硝基苯酚浓度 Nitrophenol concentration ($\mu\text{mol/L}$)	株高 Height (mm)	根长 Root length (mm)	地上部干重 Above-ground part dry weight (g)	地下部干重 Below-ground part dry weight (g)	全株干重 Plant dry weight (g)	可溶性蛋白含量 Soluble protein content (mg/g FW)	可溶性糖含量 Soluble sugar content (mg/g FW)
0	142.233 ± 9.899a	88.181 ± 12.310a	0.049 ± 0.0016a	0.022 ± 0.0019a	0.063 ± 0.0015a	135.55 ± 4.582d	23.603 ± 1.550d
70	134.999 ± 11.833ab	83.450 ± 11.707ab	0.045 ± 0.0022ab	0.021 ± 0.0015a	0.061 ± 0.0021a	157.05 ± 3.968c	26.452 ± 3.067c
140	122.705 ± 17.187b	75.929 ± 8.557b	0.042 ± 0.0010b	0.018 ± 0.0011b	0.059 ± 0.0017a	176.05 ± 2.291b	42.087 ± 5.740b
280	89.086 ± 7.791c	65.491 ± 4.629c	0.037 ± 0.0017c	0.016 ± 0.0005c	0.053 ± 0.0011b	186.05 ± 3.122a	73.996 ± 4.777a
560	54.839 ± 4.256d	61.879 ± 6.268c	0.021 ± 0.0014d	0.012 ± 0.0016d	0.035 ± 0.0044c	69.55 ± 0.866e	24.827 ± 1.945d

注: 数值为 3 次独立实验的平均值 ± 标准差, 同列数据后不同字母表示各处理间差异显著($P < 0.05$)。同上。

Notes: Each value represents the mean ± SD of three independent experiments, different letters after the same column data indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$). Same below.

表 2 硝基苯酚胁迫对水稻幼苗根系活性氧水平和抗氧化酶活性的影响

Table 2 Effects of nitrophenol stress on reactive oxygen species (ROS) levels and antioxidant enzyme activities of *O. sativa* seedling roots

硝基苯酚浓度 Nitrophenol concentration ($\mu\text{mol/L}$)	O_2^- 含量 O_2^- content ($\mu\text{mol/g FW}$)	H_2O_2 含量 H_2O_2 content ($\mu\text{mol/g FW}$)	SOD 活性 SOD activity ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{FW} \cdot \text{min}^{-1}$)	POD 活性 POD activity ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{FW} \cdot \text{min}^{-1}$)	CAT 活性 CAT activity ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{FW} \cdot \text{min}^{-1}$)	APX 活性 APX activity ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{FW} \cdot \text{min}^{-1}$)
0	52.266 ± 2.444c	0.943 ± 0.251d	0.141 ± 0.022c	47.483 ± 0.613d	0.022 ± 0.0028d	0.101 ± 0.021d
70	60.480 ± 1.280b	1.865 ± 0.384c	0.259 ± 0.023b	47.583 ± 0.991d	0.043 ± 0.0028c	0.178 ± 0.031c
140	64.960 ± 3.461a	2.201 ± 0.251c	0.291 ± 0.008b	53.150 ± 0.826c	0.058 ± 0.0014b	0.220 ± 0.037c
280	65.706 ± 3.024a	5.387 ± 0.290a	0.336 ± 0.011a	60.233 ± 1.163b	0.063 ± 0.0014a	0.304 ± 0.047b
560	53.866 ± 0.184c	3.458 ± 0.251b	0.285 ± 0.016b	81.216 ± 0.765a	0.025 ± 0.0028d	0.411 ± 0.036a

2.3 硝基苯酚胁迫对水稻幼苗叶绿素荧光参数和叶绿素含量的影响

叶绿素荧光的变化能够灵敏地反映环境胁迫对植物的影响^[24]。本研究结果显示(表3), 70 μmol/L 硝基苯酚胁迫5 d后, 水稻幼苗叶片Y(II)、qP、ETR与对照相比无显著差异, 而qN和NPQ显著上升, 叶绿素含量显著下降。随硝基苯酚胁迫浓度进一步提高, 各叶绿素荧光参数和叶绿素含量显著下降。280 μmol/L 硝基苯酚胁迫5 d后, Y(II)、qP、ETR及叶绿素含量与对照相比, 分别下降了22.6%、24.6%、35.2%、27.1%, 而qN和NPQ比对照分别提高了1.3倍和2.0倍。表明硝基苯酚胁迫抑制了水稻幼苗PSⅡ光化学效率与叶绿素的合成。

2.4 硝基苯酚胁迫下褪黑素对水稻幼苗生长和根系渗透调节物质含量的影响

从以上研究结果可见, 280 μmol/L 硝基苯酚胁迫5 d, 可显著抑制水稻幼苗的生长, 引起根系活性氧过量积累、抗氧化酶活性和渗透调节物质含量上升、叶片PSⅡ光化学效率和叶绿素含量降低。因此, 我们进一步以此浓度为基础, 研究单一硝基苯酚处理5 d、硝基苯酚+褪黑素复合处理5 d对水稻幼苗生长和生理特性的影响。结果显示, 在不添加硝基苯酚(NP)、只添加褪黑素(MT)处理下, 水稻幼苗地下部干重和根系可溶性糖含量显著提高, 分别比对照组提高了1.2倍和1.4倍(图1: D, G); 而株高、根长、地上部干重、全株干重、根系可溶性蛋白含量虽与对照组相比差异不显著, 但也有一定程度的提高(图1: A~C, E~F)。

与单独添加NP处理相比, NP+MT复合处理使幼苗株高、根长、地下部干重、地上部干重、全株干重分别提高了1.3倍、1.1倍、1.9倍、1.3倍和1.4倍(图1: A~E), 而根系可溶性蛋白和可溶性糖含量则分别下降了20.7%和20.5%(图1: F~G)。

2.5 硝基苯酚胁迫下褪黑素对水稻幼苗根系活性氧水平和抗氧化酶活性的影响

研究结果显示, 在不添加NP、只添加MT处理下, 对水稻幼苗根系O₂⁻和H₂O₂含量及POD、CAT、APX活性均没有显著影响(图2: A~B, D~F), 但SOD活性比对照提高了1.4倍(图2: C)。与单独添加NP处理相比, NP+MT复合处理使水稻幼苗根系O₂⁻和H₂O₂含量、SOD、POD、CAT、APX活性分别下降了23.9%、39.4%、13.5%、13.7%、18.5%、52.4%(图2: A~F)。

2.6 硝基苯酚胁迫下褪黑素对水稻幼苗叶绿素荧光参数和叶绿素含量的影响

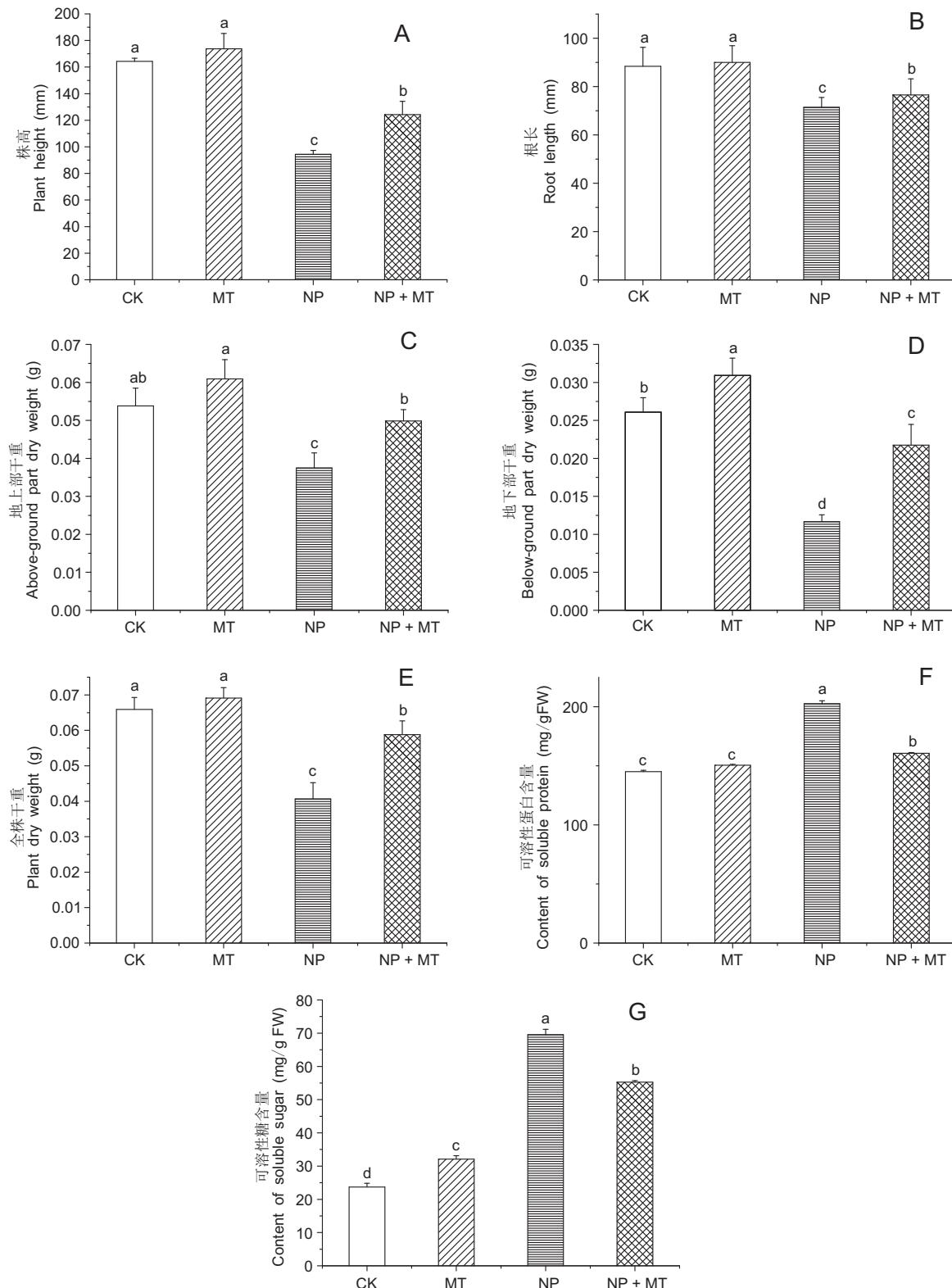
研究结果显示, 在不添加NP、只添加MT处理下, 水稻幼苗叶片Y(II)、ETR和叶绿素含量显著提高, 比对照分别提高了1.1倍、1.2倍和1.1倍(图3: A, C, F), 而qN和NPQ则显著降低, 分别比对照下降了20.2%和30.6%(图3: D~E); qP与对照相比无显著差异(图3: B)。与单一添加NP处理相比, NP+MT复合处理使水稻幼苗叶片的Y(II)、qP、ETR、叶绿素含量分别提高了1.3倍、1.2倍、1.2倍、1.3倍(图3: A~C, F), 而qN和NPQ则分别降低了13.6%和38.5%(图3: D~E)。

表3 硝基苯酚胁迫对水稻幼苗叶绿素荧光参数和叶绿素含量的影响
Table 3 Effects of nitrophenol stress on chlorophyll fluorescence parameters and chlorophyll content in *O. sativa* seedling leaves

硝基苯酚浓度 Nitrophenol concentration (μmol/L)	叶绿素荧光参数 Chlorophyll fluorescence parameters					叶绿素含量 Chlorophyll content (mg/g FW)
	Y(II)	qP	ETR	qN	NPQ	
0	0.361 ± 0.006a	0.747 ± 0.037a	24.012 ± 0.428a	0.498 ± 0.019c	0.097 ± 0.004d	2.980 ± 0.114a
70	0.365 ± 0.011a	0.739 ± 0.033a	24.308 ± 0.765a	0.534 ± 0.004b	0.124 ± 0.008c	2.504 ± 0.129b
140	0.317 ± 0.005b	0.605 ± 0.036b	18.679 ± 1.034b	0.610 ± 0.054a	0.189 ± 0.022b	2.208 ± 0.158c
280	0.251 ± 0.008c	0.431 ± 0.045c	16.619 ± 0.320c	0.634 ± 0.035a	0.192 ± 0.011b	1.809 ± 0.053d
560	0.156 ± 0.025d	0.399 ± 0.028c	11.527 ± 0.493d	0.672 ± 0.016a	0.225 ± 0.016a	1.529 ± 0.111e

注: Y(II): PSⅡ实际光化学量子效; qP: 光化学淬灭系数、ETR: PSⅡ电子传递速率; qN 和 NPQ: 非光化学淬灭系数。下同。

Notes: Y(II): Effective photochemical quantum yield of PSⅡ; qP: Photochemical quenching coefficient; ETR: Rate of non-cyclic electron-transport through PSⅡ; qN and NPQ: Non-photochemical quenching coefficient. Same below.



数值为3次独立实验的平均值±标准差, 不同字母表示各处理数值间差异显著($P < 0.05$)。CK: 对照组; MT: 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 褪黑素处理; NP: 280 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 硝基苯酚胁迫处理; NP + MT: 280 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 硝基苯酚 + 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 褪黑素复合处理。下同。

Each value represents the mean ± SD of three independent experiments, different letters indicate significant differences between the processed values ($P < 0.05$). CK is the control; MT is the 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ melatonin treatment; NP is the 280 $\mu\text{mol}/\text{L}$ nitrophenol treatment; NP + MT is the combination of 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ melatonin and 280 $\mu\text{mol}/\text{L}$ nitrophenol treatment. Same below.

图1 硝基苯酚胁迫下外源褪黑素对水稻幼苗生长和根系渗透调节物质含量的影响

Fig. 1 Effects of exogenous melatonin on the growth and root osmotic regulation content of *O. sativa* seedlings under nitrophenol stress

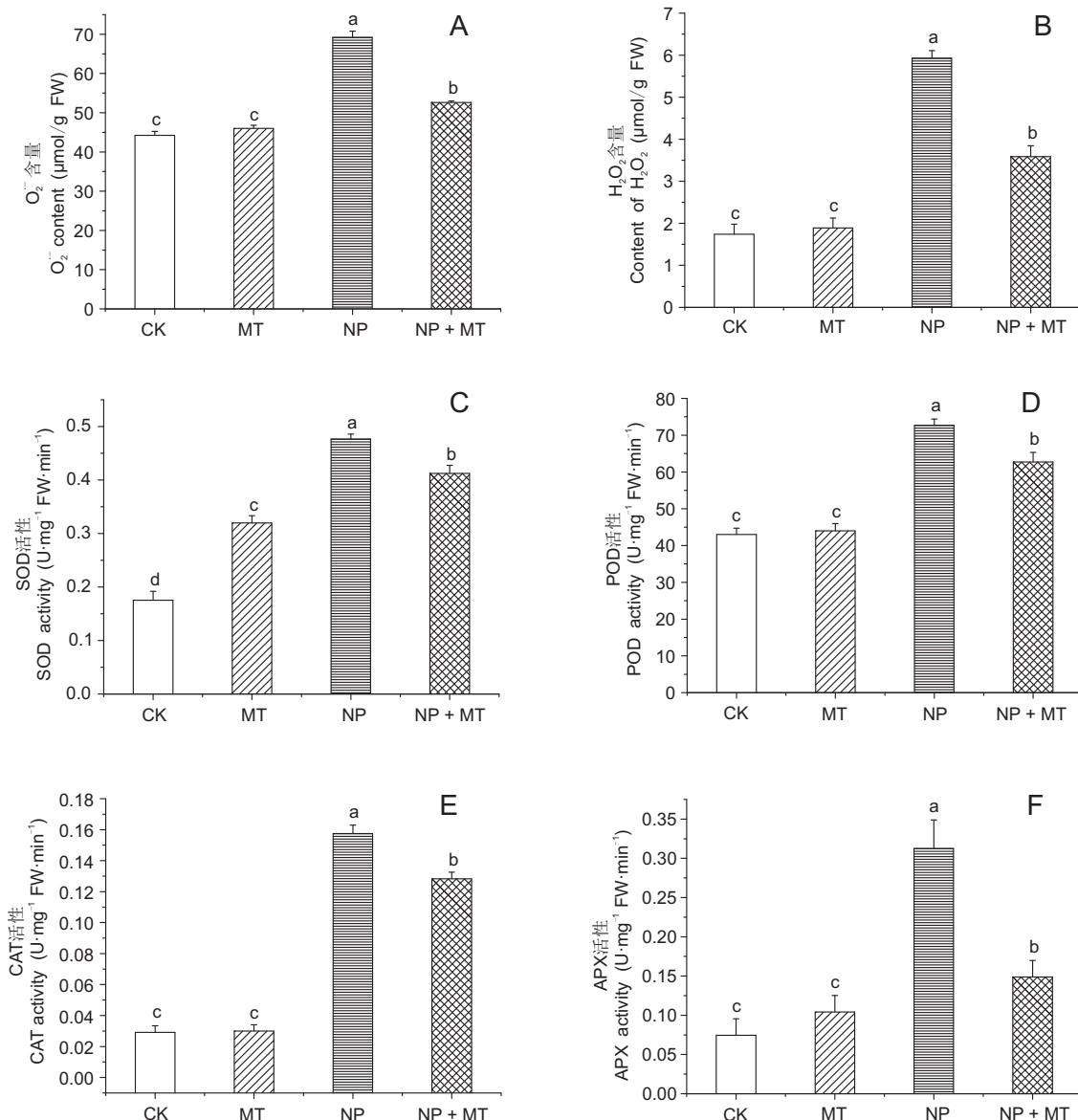


图2 硝基苯酚胁迫下褪黑素对水稻幼苗根系活性氧水平和抗氧化酶活性的影响
 Fig. 2 Effects of exogenous melatonin on ROS levels and antioxidant enzyme activities of *O. sativa* seedling roots under nitrophenol stress

3 讨论

幼苗生长抑制常作为评价环境污染物对植物生长影响的重要指标。王泽港等^[25]研究发现, 氯苯和萘胁迫可显著抑制水稻幼苗株高、根长、根数生长; 且氯苯和萘胁迫对水稻幼苗的伤害主要表现为对根系的损伤, 从而影响根系对养分的吸收, 进而影响地上部的生长。刘星邑^[26]研究表明, 硝基苯酚胁迫可抑制拟南芥根系生长并降低叶片数, 且对根系生长发育影响尤为显著。本研究结果显示, 随硝基苯酚胁迫浓度的增加, 水稻幼苗株高、根长、

地上部干重、地下部干重和全株干重逐渐降低, 但株高受抑制程度大于根长, 地上部干重与地下部干重受抑程度无明显差异(表1)。推测这可能是由于硝基苯酚在水稻幼苗体内的移动性较高, 使得水稻幼苗地上部受硝基苯酚生理胁迫浓度高于根系, 且株高与根长对硝基苯酚胁迫的敏感度高于地上与地下部干重所致。

可溶性糖和可溶性蛋白是植物体内两种重要的渗透调节物质, 当植物受到环境胁迫时, 可以通过提高可溶性糖和可溶性蛋白浓度来保护细胞免受伤害, 维持正常的生理代谢^[22]。在本实验中,

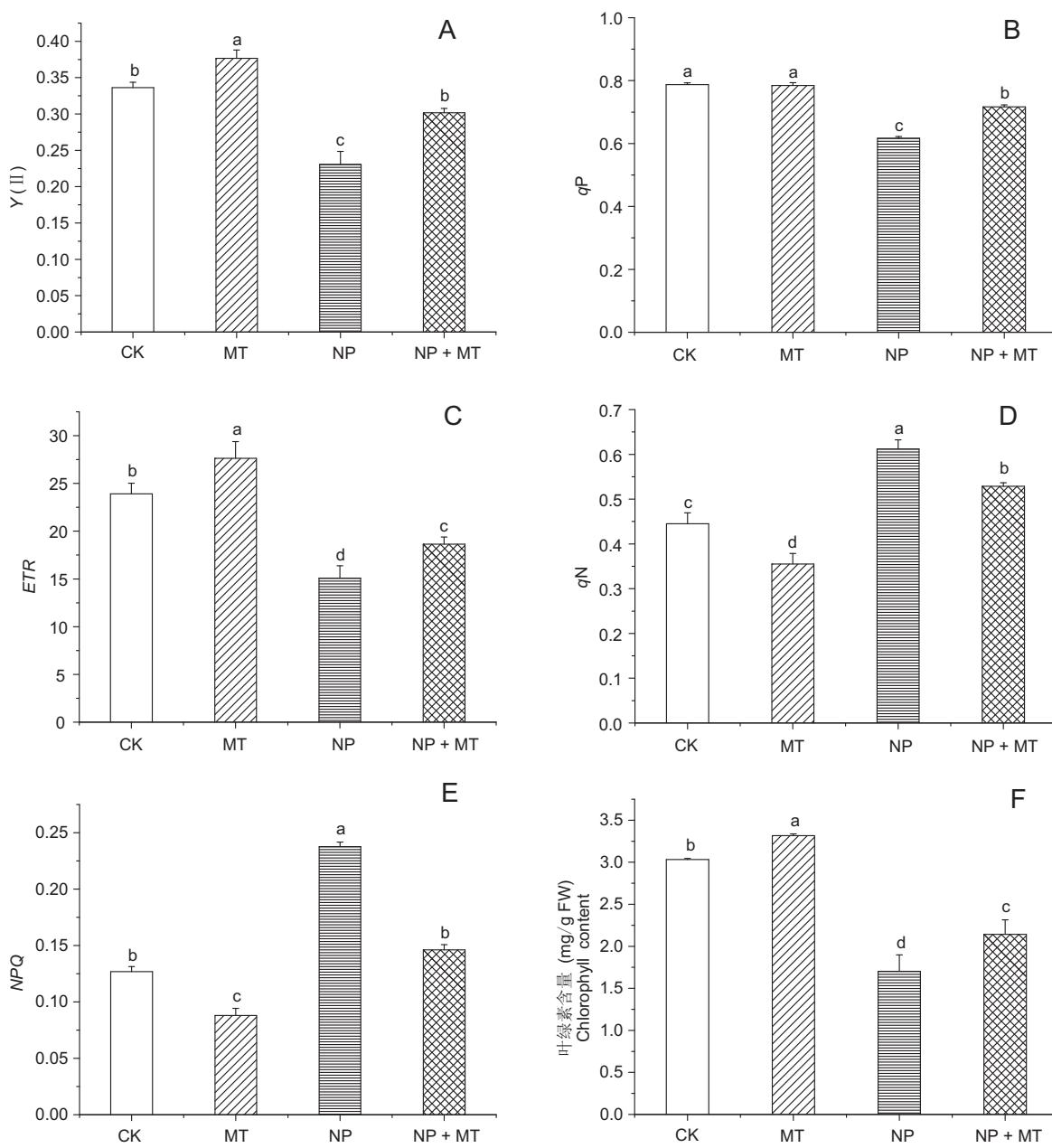


图3 硝基苯酚胁迫下褪黑素对水稻幼苗叶绿素荧光参数和叶绿素含量的影响

Fig. 3 Effects of exogenous melatonin on chlorophyll fluorescence parameters and chlorophyll content of *O. sativa* seedlings under nitrophenol stress

水稻幼苗经 70 ~ 280 $\mu\text{mol/L}$ 硝基苯酚处理后, 根系可溶性蛋白和可溶性糖含量增加, 且在 280 $\mu\text{mol/L}$ 硝基苯酚处理后达到最大值, 表明 70 ~ 280 $\mu\text{mol/L}$ 硝基苯酚可使水稻幼根细胞渗透和细胞保水力增强, 从而提高水稻幼根的抗性能力; 而 560 $\mu\text{mol/L}$ 硝基苯酚处理后, 可溶性蛋白和可溶性糖含量低于对照或与对照持平, 推测这可能与蛋白质和糖的合成受到抑制有关(表1)。

环境胁迫会诱导植物体内活性氧过量积累, 引

起氧化胁迫, 导致抗氧化防御系统功能紊乱, 膜系统受损, 最终使植物组织受到破坏^[27]。SOD、POD、CAT 和 APX 作为植物体内有效清除活性氧的关键酶, 能够有效地清除植物体内的自由基和过氧化物^[27]。在本实验中, 70 ~ 280 $\mu\text{mol/L}$ 硝基苯酚处理下, SOD、CAT 活性逐渐提高, 且在 280 $\mu\text{mol/L}$ 硝基苯酚胁迫处理下活性达最大值, 之后随硝基苯酚处理浓度的进一步增加, SOD、CAT 活性下降, 这与 O_2^- 和 H_2O_2 的变化趋势一致;

而 APX 和 POD 活性随硝基苯酚胁迫浓度的增加逐渐升高并表现出一定的浓度效应关系(表2)。这表明 70~280 μmol/L 硝基苯酚胁迫诱导了水稻幼苗根系活性氧(O_2^- 和 H_2O_2)水平的提高并通过 SOD、POD、CAT、APX 活性的增加, 加快植物体内 O_2^- 和 H_2O_2 的去除, 从而保持水稻幼苗根系活性氧代谢平衡; 但当硝基苯酚浓度达 560 μmol/L 时, 可能加速了 O_2^- 和 H_2O_2 向毒性更强的·OH 转换, 导致 O_2^- 和 H_2O_2 含量降低, 并使植物体内主要清除活性氧(O_2^- 和 H_2O_2)的 SOD、CAT 酶活性随之下降; 而在 560 μmol/L 硝基苯酚胁迫下 APX 和 POD 活性进一步提高可能归因于其对硝基苯酚胁迫的敏感度低于 SOD 和 CAT^[23, 26]。

有机污染物对水稻幼苗生长的影响主要表现为对光合作用的抑制^[25]。PSⅡ作为逆境胁迫下光合机构受到损伤的原初位点之一, 其光化学水平的变化可以积极反映环境因素对植物体造成的影响^[28]。王泽港等^[7]研究指出, 随氯苯和萘胁迫浓度的增加, 水稻抽穗期光合电子传递量子效率(Φ_{PSII})、光化学淬灭系数(qP)、非光化学淬灭系数(qN)均呈下降趋势。而在本研究中, 随硝基苯酚胁迫浓度增加, 水稻幼苗叶片叶绿素荧光参数 $Y(II)$ 、 qP 、 ETR 逐渐下降, 而 qN 、 NPQ 逐渐升高(表3)。这表明硝基苯酚胁迫引起 PSⅡ光抑制, 导致 PSⅡ开放程度减小, 对光能的吸收和运行效率降低, PSⅡ接受和传递电子的能力下降, 同时用于光化学反应的光能比例减少, 而以热形式耗散掉的比例显著增加。叶绿素含量的变化在一定程度上反映植物光合能力的大小。已有研究表明, 有机污染物胁迫会导致植物体叶绿素含量下降^[7, 25, 29]。本研究也发现, 随硝基苯酚处理浓度增加, 叶绿素含量显著下降。此外, 由于 PSⅡ反应中心的原初电子供体是由 2 个叶绿素 a 分子组成的二聚体^[30], 故叶绿素荧光参数与叶绿素含量间存在一定的关系, 因此我们推测, 硝基苯酚胁迫使水稻幼苗叶片叶绿素结构破坏是导致叶片 PSⅡ光化学效率降低的主要原因之一。

硝基苯酚胁迫破坏了水稻幼苗的正常生长发育和代谢。与此相反, 褪黑素在适宜浓度范围内可促进植物体的生长发育, 比如能促进侧根生长, 提高植株干物质积累量^[13]; 此外, 褪黑素作为一种高亲脂性和部分亲水性的化合物, 较易通过生物膜并

通过影响细胞及组织内的一些氧化还原反应和抗氧化酶类, 与羟基自由基和过氧自由基发生反应, 从而清除自由基, 缓解环境胁迫对植物体的不良影响^[12, 31]。因此, 本实验通过单独添加硝基苯酚处理、硝基苯酚+褪黑素复合处理进一步研究其对水稻幼苗的影响。结果表明, 与对照相比, 添加外源褪黑素显著提高了幼苗地下部干重、根系可溶性糖含量、SOD 活性、叶片 PSⅡ光化学效率和叶绿素含量(图1: D, G; 图2: C; 图3: A, C~F)。这可能是由于褪黑素促进了根部呼吸, 提高了叶片光合作用所致。与单独添加硝基苯酚处理相比, 硝基苯酚+褪黑素复合处理显著促进了幼苗株高、根长、地下部干重、地上部干重、全株干重的增加; 提高了幼苗叶片 $Y(II)$ 、 qP 、 ETR 和叶绿素含量; 显著降低了叶片非光化学淬灭系数(qN 、 NPQ)、根系活性氧水平(H_2O_2 和 O_2^- 含量)、抗氧化酶(SOD、POD、CAT 和 APX)活性和渗透调节物质(可溶性蛋白与可溶性糖)含量(图1: A~G; 图2: A~F; 图3: A~F)。这可能是由于外源褪黑素的添加增强了水稻幼苗的蒸腾作用, 从而提高了根部对可溶化硝基苯酚的吸收; 同时促进了水稻幼苗体内过氧化物酶的活化、使植物根部和叶部相关去毒基因及缓解基因的表达量提高, 从而缓解了硝基苯酚对水稻幼苗的不良影响。因此, 外源褪黑素的添加可有效缓解硝基苯酚胁迫对水稻幼苗的毒害作用。

参考文献:

- [1] 刘维岗. 上流式厌氧污泥床反应器(UASB)处理硝基酚废水研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
- [2] Song W, Zheng Z, Rami AS, Zhou T, Hang D. Degradation and detoxification of aqueous nitrophenol solutions by electron beam irradiation[J]. Radia Phys & Chem, 2002, 65(4): 559~563.
- [3] 张鲜. 工业污水中硝基苯酚三种异构体含量的测定与去除方法研究[D]. 沈阳: 沈阳师范大学, 2013.
- [4] Sun SP, Lemley AT. P-nitrophenol degradation by a heterogeneous fenton-like reaction on nano-magnetite: Process optimization, kinetics, and degradation pathways [J]. J Mol Catal A-Chem, 2011, 349(1): 71~79.
- [5] 张逸, 于萍, 罗运柏, 李海港. 硝基苯酚类的快速吸附与降解[J]. 环境工程学报, 2012, 6(3): 787~792.
Zhang Y, Yu P, Luo YB, Li HX. Rapid adsorption and degradation of nitrophenol solution with activated carbon and Fenton's reagent [J]. Techniques and Equipment for

- Environmental Pollution Control*, 2012, 6(3): 787–792.
- [6] 刘星邑, 温玉娟, 刘欢, 杨悦锁. 土壤中对硝基酚迁移转化和去除技术研究进展 [J]. 农业环境科学学报, 2017, 36(11): 2161–2170.
Liu XY, Wen YJ, Liu H, Yang YR. Research review of transport fate and techniques for removing P-nitrophenol from soil [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2017, 36(11): 2161–2170.
- [7] 王泽港, 骆剑峰, 高红明, 万定珍, 葛才林, 罗时石, 杨建昌. 1,2,4-三氯苯和萘对水稻抽穗期叶片光合特性的影响 [J]. 中国农业科学, 2005, 38(6): 1113–1119.
Wang ZX, Luo JF, Gao HM, Wai DZ, Ge CL, Luo SZ, Yang JC. Effects of 1,2,4-trichlorobenzene and naphthalene stress on photosynthetic characteristics of rice at heading period [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38(6): 1113–1119.
- [8] 徐向东, 孙艳, 郭晓芹, 孙波, 张坚. 高温胁迫下外源褪黑素对黄瓜幼苗光合作用及叶绿素荧光的影响 [J]. 核农学报, 2011, 25(1): 179–184.
Xu XD, Sun Y, Guo XQ, Sun B, Zhang J. Effect of exogenous melatonin on photosynthesis and chlorophyll fluorescence parameters in leaves of cucumber seedlings under high temperature stress [J]. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*, 2011, 25(1): 179–184.
- [9] Liang C, Zhang G, Li W. Melatonin delays leaf senescence and enhances salt stress tolerance [J]. *J Pineal Res*, 2015, 59(1): 91–101.
- [10] 刘仕翔, 黄益宗, 罗泽娇, 黄永春, 保琼莉. 外源褪黑素处理对镉胁迫下水稻种子萌发的影响 [J]. 农业资源与环境学报, 2016, 35(6): 1034–1041.
Liu SX, Huang YZ, Luo ZJ, Huang YC, Bao QL. Effects of exogenous melatonin on germination of rice seeds under Cd stresses [J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2016, 35(6): 1034–1041.
- [11] 徐芳, 周海鹏, 郭早霞, 于宏安, 袁玉川. 植物褪黑素及其抗逆性研究 [J]. 基因组学与应用生物学, 2013, 32(2): 260–266.
Xu F, Zhou HP, Guo ZX, Yu HA, Yuan YC. The melatonin and its resistance to stress in plants [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2013, 32(2): 260–266.
- [12] 张娜, 张海军, 杨荣超, 黄韫宇, 郭仰东. 褪黑素在植物中的功能研究进展 [J]. 中国农学通报, 2012, 28(9): 16–20.
Zhang N, Zhang HJ, Yang RC, Huang YY, Guo YD. The advances on functions study of melatonin in plants [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(9): 16–20.
- [13] 孙莎莎, 巩彪, 温丹, 王秀峰, 魏珉. 对羟基苯甲酸胁迫下褪黑素对黄瓜胚根生理生化特性的影响 [J]. 应用生态学报, 2016, 27(3): 897–903.
Sun SS, Gong B, Wen D, Wang XF, Wei M. Effect of exogenous melatonin on physiological and biochemical characteristics of cucumber radicles under p-hydroxybenzoic acid [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2016, 27(3): 897–903.
- [14] 王芳, 常盼盼, 陈永平, 彭云玲, 方永丰, 王汉宁. 外源 NO 对镉胁迫下玉米幼苗生长和生理特性的影响 [J]. 草业学报, 2013, 22(2): 178–186.
Wang F, Chang PP, Chen YP, Peng YL, Fang YF, Wang HN. Effect of exogenous nitric oxide on seedling growth and physiological characteristics of maize seedlings under cadmium stress [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2013, 22(2): 178–186.
- [15] 冯汉青, 杜变变, 王庆文, 王荣方, 贾凌云, 孙坤, 周田宝. 镉胁迫下活性炭对小麦幼根的保护作用 [J]. 生态学报, 2016, 36(10): 1962–2868.
Feng HQ, Du BB, Wang QW, Wang RF, Jia LY, Sun K, Zhou TB. The role of activated carbon in protecting the roots of wheat seedlings under cadmium [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2016, 36(10): 1962–2868.
- [16] Anjorin FB, Adejumo SA, Agboola L, Samuel YD. Proline, Soluble sugar, leaf starch and relative water contents of four maize varieties in response to different watering regimes [J]. *Cer Agr Mold*, 2016, 49(3): 51–62.
- [17] Achary VM, Jena S, Panda KK, Panda BB. Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2008, 70(2): 300–310.
- [18] Li XN, Yang YL, Jia LY, Chen H, Wei X. Zinc-induced oxidative damage, antioxidant enzyme response and proline metabolism in roots and leaves of wheat plants [J]. *Ecotox Environ Safe*, 2013, 89(11): 150–157.
- [19] Demmig-Adams B, Adams WW. Xanthophyll cycle and light stress in nature: uniform response to excess direct sunlight among higher plant species [J]. *Planta*, 1996, 198(3): 460–470.
- [20] Donnini S, Guidi L, Degl'Innocenti E, Zocchi G. Image changes in chlorophyll fluorescence of cucumber leaves in response to iron deficiency and resupply [J]. *J Soil Sci Plant Nut*, 2013, 176(5): 734–724.
- [21] Arnon DI. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris* [J]. *Plant Physiol*, 1949, 24(1): 1–15.
- [22] 杜晓, 申晓辉. 镉胁迫对珊瑚树和地中海荚蒾生理生化指标的影响 [J]. 生态学杂志, 2010, 29(5): 899–904.
Du X, Shen XH. Effects of cadmium stress on physiological and biochemical indices of *Viburnum odoratissimum* and *V. tinus* seedlings [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2010, 29(5): 899–904.
- [23] 刘宛, 孙铁珩, 李培军, 周启星, 梁文举, 台培东, 许华夏, 张海荣. 1,2,4-三氯苯胁迫对萌发大豆种子中活性氧的影响

- [J]. 生态学报, 2002, 13(12): 1655–1658.
- Liu W, Sun TH, Li PJ, Zhou QX, Liang WJ, Tai PD, Xu HX, Zhang HR. Effects of 1,2,4-trichlorobenzene stress on active oxygen in germinated soybean seeds[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2002, 13(12): 1655–1658.
- [24] Maxwell K, Johnson GN. Chlorophyll fluorescence — a practical guide[J]. *J Exp Bot*, 2000, 51(345): 659–668.
- [25] 王泽港, 葛才林, 万定珍, 郭志文, 罗时石, 杨建昌. 1,2,4-三氯苯和萘对水稻幼苗生长的影响[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(6): 1402–1407.
- Wang ZX, Ge CL, Wan DZ, Li ZW, Luo SZ, Yang JC. Effects of 1,2,4-trichlorobenzene and naphthalene on growth of rice seedling[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(6): 1402–1407.
- [26] 刘星邑. 对硝基酚的植物毒性及其微生物降解特性研究[D]. 沈阳: 沈阳大学, 2018.
- [27] 李璇, 岳红, 王升, 黄璐琦, 马炯, 郭兰萍. 影响植物抗氧化酶活性的因素及其研究热点和现状[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(7): 973–978.
- Li X, Yue H, Wang S, Huang LQ, Ma J, Guo LP. Research of different effects on activity of plant antioxidant enzymes[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2013, 38(7): 973–978.
- [28] Baker NR. A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis[J]. *Physiol Plantarum*, 1991, 81(4): 563–570.
- [29] 杜青平, 贾晓珊, 袁保红. 1,2,4-三氯苯对水稻种子萌发及幼苗生长的毒性机理[J]. 应用生态学报, 2006, 17(11): 2185–2188.
- Du QP, Jia XS, Yuan BH. Toxic effects of 1,2,4-trichlorobenzene on rice seed germination and seedling growth [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2006, 17(11): 2185–2188.
- [30] 张艳玲. 拟南芥 DEG 蛋白酶的胁迫响应分子机理研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2008.
- [31] Reiter RJ, Guerrero JM, Escames G, Pappolla MA, Acuña-Sastre D. Prophylactic actions of melatonin in oxidative neurotoxicity[J]. *Ann NY Acad Sci*, 1997, 825(2): 70–78.

(责任编辑: 张平)