

伯克氏菌对水稻种子萌发及初生幼苗耐镉性的影响

陆仲烟, 宋正国, 郭军康, 张长波, 沈 跃, 刘仲齐 *

(农业部环境保护科研监测所, 天津 300191)

摘 要: 在无茵条件下研究了伯克氏菌对镉胁迫下水稻种子萌发及初生幼苗耐镉性的影响。结果表明:伯克氏菌 D54 能在含 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cd}$ 的培养基中正常生长, 显示出极强的耐镉能力。在 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的镉胁迫下, 接种伯克氏菌能显著提高水稻种子的萌发率, 但在其他镉处理下, 接种伯克氏菌对种子萌发无显著影响。接种伯克氏菌对水稻种子的发芽指数没有影响, 但在 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cd}$ 处理下, 接种伯克氏菌能显著提高水稻种子的活力指数和初生幼苗的根长、根表面积、根尖总数和耐性系数。接种伯克氏菌对初生幼苗的芽鲜重无影响, 但能显著提高根鲜重。在 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的高浓度镉处理下, 接种伯克氏菌对根系生长没有影响。

关键词: 植物促生菌; 水稻; 镉; 种子萌发; 伯克氏菌; 耐性系数

中图分类号: X172

文献标志码: A

文章编号: 2095-6819(2013)06-0087-04

Effects of *Burkholderia* on Rice Seed Germination and Cd-tolerance of Rice Seedlings

LU Zhong-yan, SONG Zheng-guo, GUO Jun-kang, ZHANG Chang-bo, SHEN Yue, LIU Zhong-qi*

(Agro-environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture, Tianjin 300191, China)

Abstract: We studied the effect of *Burkholderia sp.*D54 on rice seed germination and Cd-tolerance of rice seedlings under gnotobiotic Cd stress. The results showed that *Burkholderia sp.*D54 could grow normally under $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd stress. Inoculation of *Burkholderia sp.*D54 significantly increased rice seed germination rate under $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd stress, but it had no effect on germination index of any Cd treatment. Inoculation with *Burkholderia sp.*D54 could significantly improve vigour index of rice seeds and total root length, surface area, tip numbers and tolerance index of rice seedlings under $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd stress. Inoculation of *Burkholderia sp.*D54 could promote the growth of rice roots, but had no effect on the shoot. There were no significant difference of root length, surface area, tip numbers between inoculated and uninoculated one under $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd stress.

Keywords: PGPR; rice; cadmium; seed germination; *Burkholderia sp.*D54; tolerance index

镉污染已经成为我国最严峻的土壤污染问题之一, 并因其毒性大、污染范围广而备受关注^[1]。镉是植物生长发育的非必需元素, 在体内积累到一定程度就会影响植物的生理代谢过程, 抑制作物生长, 最终导致产量降低, 甚至颗粒无收^[2-4]。由于传统的物理、化学修复方法成本很高, 而且容易造成二次污染, 新兴的生物修复技术尚未成熟, 仍处在探索完善阶段^[5]。在镉污染稻区寻求一种有效的途径来提高水稻的耐镉能力,

并降低籽粒对镉的积累, 使稻米镉含量低于国家标准是解决镉污染稻区稻米安全生产的一种有效方法。

根系促生菌(PGPR)是指生活于植物根系, 并能直接或间接促进植物生长的微生物^[6]。PGPR 能通过产生生长素、铁载体、ACC 脱氨酶和增加根系溶磷量等途径来促进植物生长, 提高植物抗病性和抗逆性^[7]。陈佛保等^[8]研究了芽孢杆菌对缓解水稻锌胁迫的作用, 结果发现: 在水稻受 $600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的锌胁迫条件下, 接种芽孢杆菌 DBM 仍能有效缓解锌毒害, 显著促进水稻生长, 加菌处理比不加菌对照的地上部和根部干重分别高出 97.8% 和 77.2%, 锌含量分别降低了 15.1% 和 19.9%。耐镉促生菌在提高水稻耐镉能力和促进产量形成中具有很大的发展潜力和应用价值。

本研究通过接种耐镉促生菌伯克氏菌 D54 于水

收稿日期: 2013-07-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(41071217); “十二五”农村领域国家科技计划课题: 城郊障碍农田土壤修复关键技术研究(2012AA101404-5); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项

作者简介: 陆仲烟(1988—), 男, 广西百色人, 硕士研究生, 主要从事土壤生态与修复的研究。E-mail: luzhongyan666@sina.com

* 通信作者: 刘仲齐 E-mail: liuzhongqi508@163.com

稻生长环境中,研究了耐镉促生菌对水稻种子萌发的影响,并分析了初生幼苗的根系形态,揭示耐镉促生菌对水稻初生幼苗耐镉性的影响,为耐镉促生菌的应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

水稻品种:湘 24,购于湖南农丰种业有限公司;伯克氏菌 D54,中国农业部环境保护科研监测所生态毒理与环境修复中心提供。

1.2 伯克氏菌生长曲线的测定

分别设置 0、50、100、300、500、1 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的镉浓度处理,每个处理重复 3 次,测定伯克氏菌的生长曲线。取培养液保存的菌液 2 mL 加入 200 mL 的改良 SMN 液体培养基中,在 38 $^{\circ}\text{C}$ 的摇床上以 150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的转速培养 72 h,作为种子液。取 2 mL 种子液接入 100 mL 无菌及含各浓度镉的改良 SMN 液体培养基中,在 38 $^{\circ}\text{C}$ 、150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下振荡培养 128 h。每 8 h 取样测定菌液在波长 660 nm 下的 OD 值。以时间为横坐标,OD 值为纵坐标绘制菌株在不同镉浓度下的生长曲线。培养基的组成为:甘露醇,1%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2%; 蛋白胨,0.2%; K_2HPO_4 ,0.05%; MgSO_4 ,0.05%; NaCl ,0.01%; FeSO_4 ,0.005%; MnSO_4 ,0.005%;pH 值,7.0。

1.3 发芽实验

分别设置①无菌水(CK),② 1×10^8 $\text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的菌液(B),③ $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{Cd}$ (Cd_1),④ $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{Cd}+1\times 10^8$ $\text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的菌液(Cd_1+B),⑤ $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{Cd}$ (Cd_2),⑥ $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{Cd}+1\times 10^8$ $\text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的菌液(Cd_2+B),⑦ $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{Cd}$ (Cd_3),⑧ $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{Cd}+1\times 10^8$ $\text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的菌液

(Cd_3+B)8 个处理,采用完全随机设计,随机排列,重复 3 次。选取饱满均一的水稻种子在 5% NaClO 溶液中浸泡 15 min 后,用无菌水洗净,浸种催芽 24 h 后,转入盛有 10 mL 无菌水或含菌液或含各浓度镉的溶液的铺有双层滤纸的培养皿中,每皿 50 粒。在培养箱中以光照 16 h,黑暗 8 h,28 $^{\circ}\text{C}$ 的条件连续培养 7 d。期间喷洒无菌水使滤纸保持湿润。

1.4 测定指标与方法

发芽期间每日记录发芽的种子数,第 7 d 结束后,每皿分别随机取 5 株用根系扫描仪(EPSON STD 1600,WinRhizo system V.4.0b)进行扫描,测定幼苗的总根长、表面积、体积和根尖数。再随机取 10 株分别测定幼苗的根鲜质量和芽鲜质量,计算各处理下水稻种子的发芽率、发芽指数、活力指数和耐性系数。

发芽率(G)=(发芽种子数/供试种子数) $\times 100\%$

发芽指数(GI)= $\sum(Gt/Dt)$ (Gt 为 t d 的发芽数, Dt 为发芽日数)

活力指数(VI)= $S\times GI$ (S 为幼苗总根长)^[9]

耐性系数(TI)= RLm/RLc (RLm 为各处理中根系的长度, RLc 为对照的根系长度)^[10]

1.5 数据分析

所得数据采用 Excel 和 SAS8.0 进行统计分析,单方面分类的方差分析(one-way ANOVA),Duncan's multiple-range test 多重比较检验显著性差异($P\leq 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 镉胁迫对伯克氏菌生长的影响

如图 1 所示,菌株在各浓度的镉胁迫下都能生长,显示出极强的耐镉能力。当镉胁迫浓度在 500

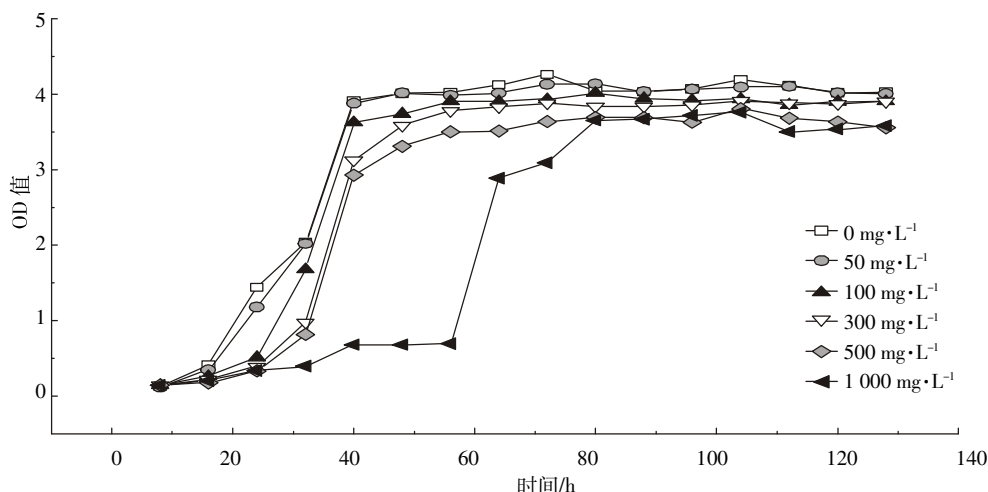


图 1 不同浓度镉胁迫下伯克氏菌的生长曲线

mg·L⁻¹ 以下时, 菌株进入各生育期的时间基本一致。进入稳定期后, 50 mg·L⁻¹ 的镉浓度处理的 OD 值与对照基本一致。从 100 mg·L⁻¹ 的镉处理开始随着镉浓度的提高, OD 值逐渐降低。但其降幅不大, 表明高浓度镉胁迫虽对菌株的生长有所抑制, 但作用不明显。在 1 000 mg·L⁻¹ 的镉胁迫下, 菌株进入对数期和稳定期的时间延缓, 生长相对滞后, 进入稳定期后其细胞浓度也较低。表明只有在极高的镉胁迫下, 伯克氏菌 D54 的生长才会受到抑制。

2.2 伯克氏菌对水稻种子萌发的影响

如表 1 所示, 随着镉处理浓度的提高, 种子的萌发率、发芽指数、活力指数和初生幼苗的根鲜重和芽鲜重都降低。在 10 mg·L⁻¹ 的镉胁迫下, 水稻种子的萌发率与对照无显著差异。当镉胁迫浓度提高到 50 mg·L⁻¹ 和 100 mg·L⁻¹ 时, 水稻种子的萌发才明显受到抑制。在 50 mg·L⁻¹ 的镉胁迫下, 接种伯克氏菌能显著提高水稻种子的萌发率($P\leq0.05$), 但在其他镉处理下, 接种伯克氏菌对种子萌发的影响不显著。接种伯克氏菌对水稻种子的发芽指数无影响。在 10 mg·L⁻¹ 的镉胁迫下, 接种伯克氏菌处理的活力指数显著提高, 但在其他浓度镉处理下, 接菌与不接菌处理的活力指数无显著差异。在 0、10、50 mg·L⁻¹ 的镉胁迫下, 接菌处理能显著提高初生幼苗的根鲜重, 但在 100 mg·L⁻¹ 的镉胁迫下, 接菌处理与不接菌处理的根鲜重无显著差异。在各浓度的镉胁迫下, 芽鲜重都无显著差异。接菌处理的芽鲜重较相同浓度镉处理的不接菌对照有所提高, 但其差异不显著。

2.3 伯克氏菌对镉胁迫下水稻初生幼苗根系形态的影响

如表 2 所示, 随着镉处理浓度的提高, 水稻初生幼苗的总根长、表面积和根尖数都有所降低。在 10 mg·L⁻¹ 的镉胁迫下, 初生幼苗的总根长、表面积、根尖

数都显著高于相同浓度镉胁迫下的不加菌对照($P\leq0.05$)。在其他浓度镉处理下, 接菌处理的总根长、表面积、体积、根尖数比相同镉处理下的不加菌对照都有所增加, 但其差异不显著。与其他形态指标相比, 镉胁迫对根系体积的影响较小, 当镉胁迫浓度在 100 mg·L⁻¹ 时, 才表现出明显的抑制作用。

2.4 伯克氏菌对镉胁迫下水稻初生幼苗耐镉性的影响

如图 2 所示, 随着镉处理浓度的提高, 水稻初生幼苗的耐性系数显著降低。在 0 mg·L⁻¹ 和 10 mg·L⁻¹ 的镉浓度下, 接菌处理的耐性系数显著高于不接菌处理($P\leq0.05$)。在 50 mg·L⁻¹ 的镉胁迫下, 接菌处理的耐性系数较不接菌处理有所提高, 但其差异不显著。在 100 mg·L⁻¹ 的镉胁迫下, 接菌处理的耐性系数与不接菌处理无显著差异。

3 讨论

伯克氏菌 D54 能产生生长素、ACC 脱氨酶、铁载体和具有溶磷能力等植物促生菌的基本特性, 能显著提高番茄、美洲商陆和籽粒苋的生物量和对重金属的耐性^[11-12]。当植物遭受重金属胁迫时, 植物最先感应的是根系器官, 通过根系生长发育和代谢来适应逆境胁迫^[13]。研究表明, 在镉胁迫下, 根系较长的植物对重金

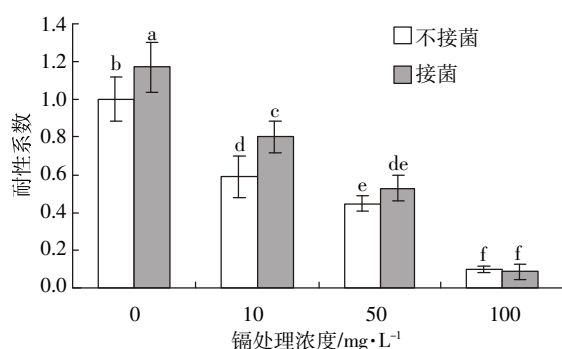
表 2 各浓度镉胁迫下接种伯克氏菌对初生幼苗根系形态的影响

处理	总根长/cm	表面积/cm ²	体积/cm ³	根尖数
CK	21.9±2.63b	4.35±0.34ab	0.069±0.003a	68.7±25.68a
B	25.5±2.92a	4.85±0.4a	0.074±0.01a	81.27±18.84a
Cd ₁	12.86±2.29d	3.14±0.35c	0.06±0.005a	34.6±13.01c
Cd ₁ +B	17.47±1.66c	4±0.25b	0.073±0.009a	47.47±8.42b
Cd ₂	9.75±0.89e	2.79±0.28c	0.066±0.017a	20.8±3.82d
Cd ₂ +B	11.60±1.63de	3.05±0.52c	0.064±0.009a	23.67±4.17d
Cd ₃	2.22±0.45f	1.04±0.17d	0.039±0.005b	5.07±0.31e
Cd ₃ +B	2.25±0.89f	1.07±0.27d	0.04±0.007b	6.2±3.29e

表 1 各浓度镉胁迫下接种伯克氏菌对水稻种子萌发的影响

处理	萌发率/%	发芽指数	活力指数	根鲜重/mg	芽鲜重/mg
CK	0.95±0.036ab	15.77±0.33ab	345.243±41.02b	13.63±2.66b	13.03±1.85ab
B	0.98±0.006a	15.99±0.19a	407.85±47.56a	17.56±1.49a	16.3±2.69a
Cd ₁	0.9±0.015b	14.9±0.5bc	192.4±40.89d	10.13±1.46c	11.73±1.68b
Cd ₁ +B	0.93±0.04ab	14.57±0.38cd	254.59±26.76c	12.66±2.84b	13.33±0.81ab
Cd ₂	0.64±0.04d	13.69±0.5de	133.37±12.39e	4.34±1.11d	10.67±1.47b
Cd ₂ +B	0.81±0.042c	13.36±0.5e	154.6±20.15de	8.47±0.67c	14.17±2.25ab
Cd ₃	0.29±0.04e	5.15±0.50f	11.47±3.08f	0.90±0.11e	11.05±2.04b
Cd ₃ +B	0.29±0.06e	5.14±1.05f	11.98±6.51f	1.1±0.2e	11.21±0.97b

注: 同一列数据中不同字母表示差异显著($P\leq0.05$)。下同。



图中不同字母表示各处理间差异显著($P \leq 0.05$)

图2 各浓度镉胁迫下,接种伯克氏菌对水稻初生幼苗耐镉性的影响

属表现出较强的耐性,镉胁迫下各处理根长和对照根长的比值能很好地指示植物对镉的耐受性^[10,14]。本试验中,在 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的镉胁迫下,接种伯克氏菌能显著提高水稻种子的活力指数和初生幼苗的根系鲜重、根系总长、表面积、根尖数和耐性系数,但在高浓度的镉胁迫下,接种伯克氏菌对根系的生长没有促进作用。这可能是因为高浓度的镉胁迫已经对水稻种子和初生幼苗造成了不可逆的损伤,使菌株的促生效果不明显。本实验整个过程都是在无菌条件下完成,根系总长度、根表面积和根尖数的提高可能是伯克氏菌产生的植物激素的促进作用。

水稻种子的萌发率不易受镉影响,只有遭受很高浓度的重金属胁迫时,萌发率才会明显受到抑制,镉胁迫对芽鲜重的抑制作用也较弱,接种伯克氏菌对其影响也较小。在较低浓度镉胁迫下,接种伯克氏菌显著促进了根系生长,使种子的活力指数也显著提高。在种子萌发时期,种子的生根易受镉的抑制,当镉浓度提高到 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 后,根系几乎没有生长。Madhaiyan 等^[15]研究发现,在无菌条件下,接种甲基杆菌 CBMB20 和伯克氏菌 CBMB40 都能显著提高番茄种子在镍和镉胁迫下的生根能力,接菌后番茄对重金属的耐性系数也显著提高。接种伯克氏菌能在一定程度上缓解根系受镉的毒害,可能是因为菌株本身对镉的吸附作用,使环境中的镉浓度降低,也可能是菌株产生的铁载体降低了根系对镉的吸收^[16-17]。

4 结论

镉胁迫对水稻种子的萌发影响较小,只有在极高浓度胁迫下,才会表明出明显的抑制作用;初生水稻幼苗的根系对镉极其敏感;接种伯克氏菌 D54 对水稻种子的萌发率和发芽指数没有影响,但在低浓度的镉胁迫下,接种伯克氏菌 D54 能提高水稻种子萌发

的活力指数,对水稻初生幼苗的生根具有较好的促进作用,提高水稻初生幼苗的耐镉能力。

参考文献:

- [1] 陈志良,莫大伦,仇荣亮.镉污染对生物有机体的危害及防治对策[J]. 环境保护科学,2001,27(4):37-39.
- [2] Seregin I V, Ivanov V B. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants[J]. *Russian J of Plant Physiology*, 2001,48: 523-544.
- [3] Dalcorsio G, Farinati S, Maistri S, et al. How plants cope with cadmium: staking all on metabolism and gene expression[J]. *J Integr Plant Biol*, 2008, 50: 1268-1280.
- [4] Schützendübel A, Schwanz P, Teichmann T, et al. Cadmium-induced changes in anti-oxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scot spine roots[J]. *Plant Physiol*, 2001, 127: 887-898.
- [5] 梁家妮,马友华,周静.土壤重金属污染现状与修复技术研究[J]. 农业环境与发展,2009(4):45-49.
- [6] Kloepper J W, Leong T, Teintze M, et al. Enhanced plant growth by siderophones produced by plant growth-promoting rhizobacteria [J]. *Nature*, 1980, 286(1):885-886.
- [7] 康贻均,程洁.植物根系促生菌作用机制研究进展[J]. 应用生态学报,2010,21(1):232-238.
- [8] 陈佛保,柏珩,林庆祺,等.植物根际促生菌(PGPR)对缓解水稻受土壤镉胁迫的作用[J]. 农业环境科学学报,2012,31(1):67-74.
- [9] 何俊瑜,任艳芳,周国强,等.不同水稻品种种子萌发期耐镉性的研究[J]. 华北农学报,2010,25(3):108-112.
- [10] Wilkins D A. The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root growth[J]. *New Phytol*,1978, 80: 623-633.
- [11] Guo Junkang, Tang Shirong, Ju Xuhai, et al. Effects of inoculation of a plant growth promoting rhizobacterium *Burkholderia sp.* D54 on plant growth and metal uptake by a hyperaccumulator *Sedum alfredii* hance grown on multiple metal contaminated soil[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2011, 27(1): 2835-2844.
- [12] 廖上强,郭军康,王芳丽,等.美洲商陆和籽粒苋对接种伯克氏菌的生理生化响应及其对富集镉的影响[J]. 环境科学学报,2012,32(1):213-223.
- [13] 何俊瑜,任艳芳,王阳阳,等.不同耐性水稻幼苗根系对镉胁迫的形态及生理响应[J]. 生态学报,2011,31(2):522-528.
- [14] Di Toppi L S, Gabbrielli R. Response to cadmium in higher plants [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 1999, 41(2): 105-130.
- [15] Madhaiyan M, Poonguzhali S, Tongmin Sa. Metal tolerating methylo-trophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato(*Lycopersicon esculentum* L.)[J]. *Chemosphere*, 2007,69(1): 220-228.
- [16] Zaidi S, Musarrat J. Characterization and nickel sorption kinetics of a new metal hyper-accumulator *Bacillus* sp.[J]. *J Environ Sci Health A*, 2004,39(1):681-691.
- [17] Kuffner M, Puschenreiter M, Wieshammer G, et al. Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows [J]. *Plant and Soil*,2008,304(1):35-44.