

宛氏拟青霉提取物增强水稻抗低温胁迫的最佳施用水平

王晓琪¹, 姚媛媛¹, 陈宝成¹, 张民^{1,2*}, 刘之广^{1*}, 马金昭¹, 王庆彬^{1,3}

(1 土壤资源高效利用国家工程实验室/山东农业大学资源与环境学院, 山东泰安 271018; 2 养分资源高效开发与综合利用国家重点实验室/金正大生态工程集团股份有限公司, 山东临沂 276000;
3 山东蓬勃生物科技有限公司, 山东泰安 271018)

摘要:【目的】施用生物刺激素是可持续农业中缓解作物低温胁迫的重要措施。本文主要研究了本课题组从野生沙棘内生菌提取的一种新型生物刺激素(宛氏拟青霉提取物)增强水稻抗低温胁迫的最佳施用浓度和生物学机制。【方法】通过室内培养,于野生沙棘体内分离出宛氏拟青霉(*Paecilomyces variotii*)菌株,菌株再经发酵和提纯获得供试生物刺激素 PVE (*Paecilomyces variotii* extracts)。以水稻为试验材料设置了萌发和液培试验,试验设 0、0.05、0.10、0.20、0.50 和 1.00 $\mu\text{g/L}$ 6 个 PVE 施用水平,研究了低温(15℃)胁迫下不同浓度 PVE 对水稻种子萌发、幼苗生长、根系发育、光合特性和氧化损伤的影响。【结果】1) 施用 PVE 的各处理提前打破了种子休眠,种子发芽率在第 5 天和第 6 天较 CK 分别提高 66.7%~106.7% 和 28.2%~47.8%。2) PVE 在 0.05~0.50 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围较 CK 显著增加地上部生物量 7.9%~20.4%,提高了根系重量 12.5%~28.1%。3) PVE 在 0.10 $\mu\text{g/L}$ 浓度条件下,较 CK 显著提高水稻总根长、根表面积、根体积和根平均直径 48.0%、36.6%、36.2% 和 35.2%。4) PVE 在 0.05~0.50 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围较 CK 显著提高水稻叶片光合速率 5.1%~34.4%,并提高了叶片气孔导度和蒸腾速率。5) PVE 在 0.10 $\mu\text{g/L}$ 浓度条件下较 CK 显著提高叶片 SOD、CAT 和 POD 活性 46.9%、9.6% 和 18.4%,提高根系 SOD、CAT 和 POD 活性 28.0%、12.7% 和 16.4%,并显著降低叶片和根系中 MDA 含量 22.0% 和 29.8%。6) PVE 在 0.05~0.50 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内均具有缓解低温胁迫的能力,以 0.10 $\mu\text{g/L}$ 为最佳施用浓度。当超过 0.10 $\mu\text{g/L}$, PVE 对低温胁迫的缓解能力随着施用浓度的提升反而减弱。【结论】PVE 在 0.10 $\mu\text{g/L}$ 的浓度下可提高叶片光合能力和减少细胞氧化损伤,增加根系吸收养分的面积,显著缓解低温对水稻幼苗的胁迫。建议 PVE 的施用水平为 0.10 $\mu\text{g/L}$ 。

关键词: 宛氏拟青霉提取物; 水稻; 低温胁迫; 发芽率; 根系形态; 光合能力; 氧化损伤

Optimum levels of *Paecilomyces variotii* extracts in regulating resistance of rice seedlings to low temperature stress

WANG Xiao-qi¹, YAO Yuan-yuan¹, CHEN Bao-cheng¹, ZHANG Min^{1,2*}, LIU Zhi-guang^{1*},
MA Jin-zhao¹, WANG Qing-bin^{1,3}

(1 National Engineering Laboratory for Efficient Utilization of Soil and Fertilizer Resources/College of Resources and Environment, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China; 2 State Key Laboratory of Nutrition Resources Integrated Utilization/Kingenta Ecological Engineering Group Co., Linshu, Shandong 276000, China;
3 Pengbo Biology Technology Ltd. Co., Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: 【Objectives】Biostimulants are capable of alleviating abiotic stress, especially low temperature stress, and have been widely used in agriculture production. We extracted and testified a new type of biostimulant from the endophytic fungus in wild sea buckthorn. The proper dosage for the best effect was studied for rice seedlings against low temperature stress. 【Methods】The tested *Paecilomyces variotii* extracts (PVE) was obtained through fermentation and purification of the strain *Paecilomyces variotii*. Germination and hydroponic

收稿日期: 2018-12-12 接受日期: 2019-03-04

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFD0200706, 2017YFD0200705); 山东省重大科技创新工程项目(2017CXGC0306)。

联系方式: 王晓琪 E-mail: wangxiaoqiyy@163.com

* 通信作者 张民 E-mail: minzhang-2002@163.com; 刘之广 E-mail: liuzhiguang8235126@126.com

pot experiments were conducted using rice as tested materials. The rice seeds were germinated and grown in nutrient solution under low temperature stress (15 °C). The treated PVE dosages in the nutrient solution were 0, 0.05, 0.10, 0.20, 0.50 and 1.00 µg/L, respectively. The seed germination rate, activities of antioxidant enzymes (SOD, POD and CAT), indices of photosynthetic and growth of rice seedlings were measured.

【 Results 】 Comparing with no PVE (CK), the germination rates of rice seeds in PVE treatments were increased by 66.7%–106.7% on the 5th day, and by 28.2%–47.8% on the 6th day; the aboveground biomass increased by 7.9%–20.4% and the root weights by 12.5%–28.1% in the concentration range of 0.05–0.50 µg/L; the total root length, root surface area, root volume and average root diameter were increased by 48.0%, 36.6%, 36.2% and 35.2% under PVE concentration of 0.10 µg/L, respectively. Within the PVE concentrations of 0.05–0.50 µg/L, the photosynthetic rate of rice leaves was significantly increased from 5.1% to 34.4%, and the stomatal conductance and transpiration rate of leaves were increased as well. Under PVE concentration of 0.10 µg/L, the SOD, CAT and POD activities in leaves were increased by 46.9%, 9.6% and 18.4%, and those in roots were increased by 28.0%, 12.7% and 16.4%; the MDA contents in leaves and roots were reduced by 22.0% and 29.8%, respectively. The PVE could alleviate low temperature stress in the range of 0.05–0.50 µg/L, with the best effect in concentration of 0.10 µg/L. **【 Conclusions 】** PVE could alleviate the low temperature stress of rice seedlings by increasing nutrient uptake area of roots, leaf photosynthetic capacity and reducing cellular oxidative damage at 0.10 µg/L concentration. The appropriate dosage of PVE is 0.10 µg/L.

Key words: *Paecilomyces variotii* extracts; rice; low temperature stress; germination rate; root morphology; photosynthetic capacity; oxidative damage

水稻是对温度极为敏感的喜温性作物^[1], 随着全球极端性的低温冷害事件频频发生^[2], 低温冷害成为制约水稻生产的重要因素^[3]。每年全球水稻因冷害减产 5%~10%, 严重时甚至可达到 20%~40%^[4]。当环境温度低于 15 °C 时, 水稻的生理代谢就会受到影响^[5]。短时间内冷害会导致水稻生长迟缓, 若低温持续时间过长, 秧苗会出现腐烂甚至死亡^[6]。冷害不仅会对水稻造成明显的外部损伤, 还会对一系列的生理和代谢过程造成不可逆的伤害^[7], 如破坏细胞膜透性^[8]、抑制叶绿素合成^[9]、造成电解质泄漏^[10], 降低叶片光合能力等^[11]。水稻二叶期胚乳中的养分消耗殆尽, 是水稻抗性最弱的时期, 极易遭受冷害, 最终影响水稻产量^[12]。我国北方水稻通常在 5 月份进行育秧, 此时地下水温度低、昼夜温差大。因此, 提高低温条件下水稻幼苗的耐寒能力对促进水稻成苗和秧苗生长有重要作用。目前水稻生产中应对突发的低温气候, 通常以喷施抗冷药剂等外源物质的方式来提高水稻的抗低温能力从而防御冷害的发生^[13]。但我国对于抗寒外源物质的研究较为缓慢, 因此急需一种稳定、高效的外源物质用于提高水稻的耐寒能力。

生物刺激素在 2012 年被欧洲生物刺激素工业理事会 (EBIC) 定义为: 一种施用于植物表面或根际后能够刺激植物增强养分吸收能力, 提高养分利用效率, 提高作物品质以及降低非生物胁迫的外源添加

物质或微生物^[14]。全球生物刺激素市场在 2013 至 2018 年间以每年 12.5% 的速度迅速增长, 至 2018 年生物刺激素的销售额已达 22.41 亿美元^[15]。随着生物刺激素在农业中的应用不断增多, 生物刺激素的增效方式和作用机理也逐渐被认知。孙磊等^[16]通过不同浓度的低聚壳聚糖对水稻幼苗进行处理, 证明低聚壳聚糖能够保护类囊体膜系统, 缓解低温对光合系统的破坏, 从而增强了水稻幼苗对低温的耐受性。张水勤等^[17]研究发现腐植酸能够固持活化土壤和肥料中的养分, 刺激植物根系伸长, 加速对养分的吸收, 并显著缓解逆境胁迫。邓如福等^[18]发现海藻糖能够降低低温胁迫下水稻幼苗细胞电解质渗漏速率, 并提高了植株体内淀粉酶活性和可溶性糖含量, 在维持细胞膜结构稳定的同时能够对寒害进行修复。国内外的大量研究也表明, 蛋白质水解物和特定的氨基酸, 包括脯氨酸、甜菜碱等还能够诱导植物防御反应, 提高植物对极端温度的耐受性^[15]。因此, 生物刺激素的施用不仅能够促进作物生长、氮素代谢以及养分累积, 更是可持续农业中缓解冷害的重要手段和希望^[19]。沙棘 (*Hippophae rhamnoides* L.) 是我国用于水土保持和荒漠治理的重要经济树种, 其根系发达、抗逆性强, 能够提高土壤氮储量, 增加土壤水稳性团聚体含量^[20-21]。试验通过野生沙棘内生菌发酵提取了一种新型生物刺激素 PVE (*Paecilomyces*

variotii extracts), 继而通过发芽试验和液培试验研究了低温胁迫下 PVE 对水稻种子萌发、幼苗生长、光合作用和抗氧化损伤能力的影响, 为探寻该生物刺激素的最适施用浓度及应用于农业生产提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2018 年 7 月在山东省泰安市山东农业大学国家工程实验室进行。

供试生物刺激素的制备方法为^[22]: 将冲洗干净后的野生沙棘根系切成小段, 经 75% 的酒精和 10% 的巴氏消毒液浸洗后, 用无菌水冲洗干净。在超净台上将根切割成 0.5 cm 长的小段后接种于孟加拉红平板培养基, 28℃ 下培养 5 天。此时切割过的根系边缘会长出菌丝, 菌丝经反复分离纯化后即得沙棘内生菌菌株(宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii*)。

将宛氏拟青霉菌株(保藏号 CGMCCNO.10114)接种到平板 PDA 培养基上于 25℃ 下培养 6 天。随后转接于装有 50 mL 种子培养液的 250 mL 三角烧瓶内并在 28℃、120 rpm 的全自动摇床上培养 3 天, 再以 10% 量接种入装有 150 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中, 继续在相同条件下培养 5 天后终止发酵, 放置于 4℃ 冰箱中保存。将培养得到的菌丝体洗净后在 60℃ 下烘干称重, 经高速粉碎机粉碎, 乙醇浸提 3 次, 磁力搅拌器混匀后超声波震荡 1 h, 真空抽滤所得滤液即为宛氏拟青霉菌株的提取物 PVE。其成分包含分子量 140~2507 Da 的小分子寡糖、氨基酸、嘧啶核苷、糖蛋白和多肽等物质。

萌发试验中供试方板的规格为 10 cm × 10 cm; 液培装置由硬质 PVC 管改良组装制成, 高 12.5 cm, 直径 9.5 cm, 底部完全封闭, 顶部设计为直径 10.5 cm 的盖子, 并在盖子上钻出 4 个直径 1.5 cm 的圆孔。水稻种子通过海绵固定于圆孔中。

供试水稻品种为“圣稻 13”, 生育期为 156 天, 属于中晚熟常规粳稻。

1.2 试验方法及设计

发芽试验: 试验共设 6 个处理, 3 次重复。选取大小均一的水稻种子, 于 5% 的 NaClO 溶液中浸泡 10 min 消毒后用无菌水洗净。消毒后的水稻种子分别在含 PVE 0、0.05、0.10、0.20、0.50 和 1.00 μg/L 的水溶液中浸种 24 h。浸种结束后用无菌水冲洗、擦干, 将种子整齐排放于底部铺有两层滤纸的方板中, 每个方板点种 50 粒, 每天定时补水保持方

板重量恒定。所有方板均在 15℃ 的恒温培养箱内培养, 种子发芽后每天统计发芽率直至全部发芽。

液培试验: 选取大小均一的水稻种子, 用 5% NaClO 溶液消毒洗净后, 均匀撒播于装有细沙的长方形塑料盒中, 定时补水培养至两叶一心期。此时将水稻幼苗转移至装有 1/20 国际水稻研究所标准营养液(IRRI)的液培装置中, 营养液包括 PVE 处理浓度分别为 0、0.05、0.10、0.20、0.50 和 1.00 μg/L, 于 15℃ 恒温培养箱中培养, 每两天更换一次营养液, 并随着水稻幼苗的生长逐步提高营养液浓度(各处理 PVE 浓度不变), 每个处理重复 3 次。10 天后进行样品采集与相关指标的测定。

1.3 样品采集及测定方法

生物量, 将叶片与根系用蒸馏水洗净后, 置于烘箱中 105℃ 杀青 1 h, 然后在 75℃ 下烘干至恒重。根系形态, 采用 LA-S 植物根系分析系统(杭州万深)扫描并拍摄; 叶片光合速率(Pn), 用 LI-6400XT 便携式光合仪(LI-COR, 美国)测定, 样品测定的时间为 9:00—11:00; 植株叶片 SPAD 值, 用 SPAD-502 叶绿素仪(Minolta, 日本)测定; 叶绿素含量, 用 95% 乙醇浸提, 紫外分光光度计测定 665、649 和 470 nm 处的光吸收值^[23]。超氧化物歧化酶(SOD)活性, 用氮蓝四唑(NBT)光化学还原法测定^[24]; 过氧化物酶(POD)活性, 采用愈创木酚法测定^[24]; 过氧化氢酶(CAT)活性, 采用过氧化氢紫外吸收法测定^[24]; 丙二醛(MDA)含量, 用硫代巴比妥酸(TBA)法测定^[24];

1.4 数据分析方法

发芽率(%) = 发芽数/50 × 100, 其中芽长超过种身长度的 1/2 记为有效发芽。

根冠比(%) = 地下部分干重/地上部分干重 × 100。

水稻根系扫描数据采用万深 LA-S 根系分析系统分析, 其余数据通过 Excel 2016 和 SAS 8.2 软件进行处理和统计分析, 采用 ANOVA 方差分析及 Duncan's Multiple Range Test 方法比较不同处理间在 $P < 0.05$ 水平的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 不同 PVE 浓度对水稻种子萌发的影响

低温会抑制水稻种子的萌发, 各处理水稻种子直至第 5 天才开始发芽(图 1)。施用 PVE 的处理在第 5 天和第 6 天种子发芽率较 CK 分别提高 66.7%~106.7% 和 28.2%~47.8%。至第 7 天, 只有 0.05 与

0.10 $\mu\text{g/L}$ 处理种子发芽率高于 CK, 其余浓度处理与 CK 无明显差异。第 8 天所有处理种子发芽基本结束, 各处理水稻平均发芽率均在 88% 以上, 且所有处理间种子发芽率无明显差异。提前发芽是打破种子休眠、缩短水稻生育期的重要手段, 综合来看, PVE 对低温胁迫下种子发芽率没有影响, 但能够促进种子提前发芽。

2.2 不同 PVE 浓度对水稻幼苗地上部分生物量、根重及根冠比的影响

图 2 表明, PVE 在 0.05~0.50 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内可显著提高水稻地上部分生物量 7.9%~20.4%, 增加水稻根系重量 12.5%~28.1%, 提高水稻幼苗的根冠比 4.2%~6.6%, 以 0.10 $\mu\text{g/L}$ 促生作用最大。当

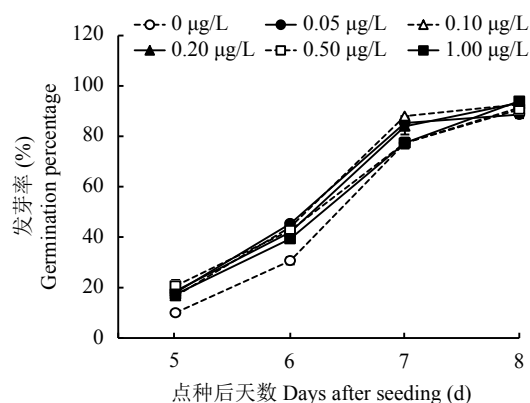


图 1 不同 PVE 浓度处理水稻种子发芽率

Fig. 1 Germination rate of rice under different PVE concentrations

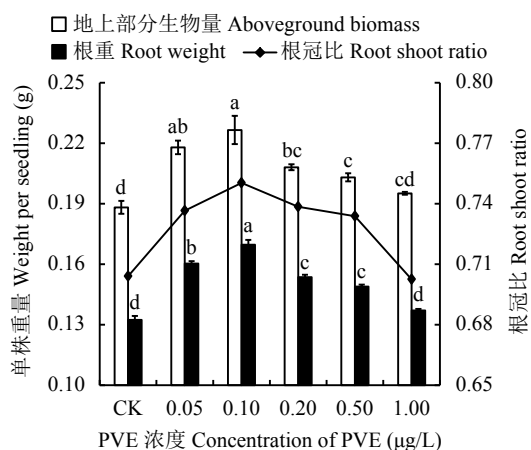


图 2 不同 PVE 浓度处理水稻地上部分生物量、根重及根冠比

Fig. 2 Aboveground biomass, root weight and root shoot ratio of rice under different PVE concentrations

[注 (Note): 柱上不同字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)
Different letters above the bars indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$).]

PVE 的施用浓度达 1.00 $\mu\text{g/L}$ 时, 水稻地上部分生物量、根重和根冠比均与 CK 无显著差异。

对 0~0.20 $\mu\text{g/L}$ 范围内 PVE 浓度 (x) 与水稻幼苗地上部分和根系总重 (y) 进行相关性分析 (图 3), 得到关系为 $y = -5.5358x^2 + 1.2568x + 0.324$ ($R^2 = 0.9855$) 的函数方程。从中可以看出在 PVE 浓度 (x) = 0.1173 $\mu\text{g/L}$ 时, 水稻幼苗总重 (y) 可取得最大值, 高于这个浓度, PVE 的促生效果开始下降, 过高的浓度可能还会抑制水稻幼苗的生长。

2.3 不同 PVE 浓度对水稻根系形态和生长发育的影响

PVE 在低浓度条件下能够缓解低温胁迫, 改善水稻根系生长状况 (表 1)。与对照相比, 0.05 $\mu\text{g/L}$ 处理水稻根系总长度、投影面积、面积、根表面积、根体积和根系平均直径分别显著提高 38.0%、46.5%、47.1%、34.5%、31.0% 和 31.5%; 0.10 $\mu\text{g/L}$ 处理根系各项指标分别显著提高 48.0%、48.5%、41.8%、36.6%、36.2% 和 35.2%。0.05 和 0.10 $\mu\text{g/L}$ 的 PVE 促进了根系生长与伸长, 而发达的根系能够提高水稻幼苗对水分和养分的吸收能力, 进而缓解低温对水稻幼苗的胁迫。超过 0.20 $\mu\text{g/L}$, PVE 的有益作用下降, 并显著低于 0.05 与 0.10 $\mu\text{g/L}$ 处理。

2.4 不同 PVE 浓度对水稻叶片 SPAD 值及叶绿素含量的影响

叶绿素是植物光合作用中起核心作用的色素, 其含量是反映叶片光合能力强弱的重要指标。SPAD 值与叶绿素含量有良好的相关性, 通过测定不同处理水稻叶片 SPAD 值 (图 4), 发现 0.05、0.10 和 0.20 $\mu\text{g/L}$ 处理叶片 SPAD 值较 CK 分别显著提升 38.2%、40.9% 和 28.7%, 其中 0.10 $\mu\text{g/L}$ 处理

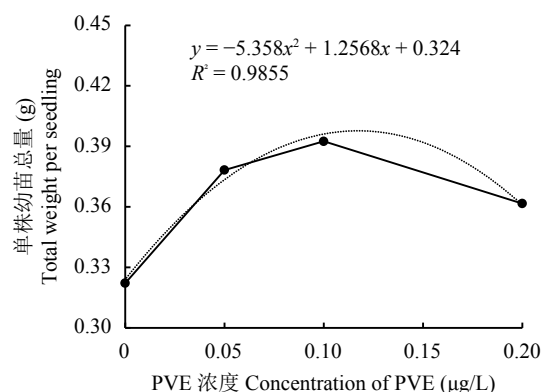


图 3 水稻幼苗总重随 PVE 浓度的变化

Fig. 3 The variation of total weight of rice seedlings with increased PVE concentrations

表 1 不同 PVE 浓度处理水稻根系形态

Table 1 Root morphology of rice under different PVE concentrations

PVE 浓度 (μg/L)	总长度 (mm)	投影面积 (mm ²)	面积 (mm ²)	表面积 (mm ²)	根体积 (mm ³)	平均直径 (mm)
PVE concentration	Total length	Projection area	Area	Surface area	Root volume	Average diameter
0 (CK)	192.5 c	12.8 d	10.9 c	44.9 c	1.22 d	0.36 c
0.05	265.6 ab	18.8 a	16.0 a	60.4 a	1.59 a	0.47 a
0.10	285.0 a	19.1 a	15.4 a	61.3 a	1.66 a	0.49 a
0.20	243.0 b	16.6 b	13.7 b	55.3 b	1.47 b	0.42 b
0.50	217.1 c	15.8 b	13.2 b	50.5 b	1.36 c	0.39 bc
1.00	208.4 c	14.7 c	13.1 b	45.1 c	1.31 cd	0.36 c

注 (Note): 同列数值后不同字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$) Values followed by different letters in a column indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$).

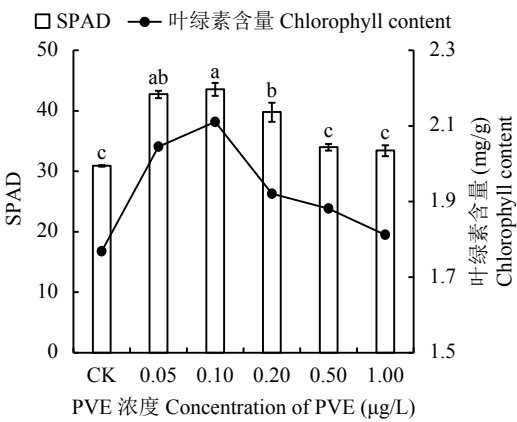


图 4 不同 PVE 浓度处理水稻叶片 SPAD 值及叶绿素含量

Fig. 4 SPAD value and chlorophyll content of rice leaves under different PVE concentrations

[注 (Note): 柱上不同字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$) Different letters above the bars indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$).]

SPAD 值最高。但随着 PVE 施用浓度的进一步提高, 叶片 SPAD 值逐渐降低, 0.20、0.50 和 1.00 μg/L 处理叶片 SPAD 值较 0.10 μg/L 处理分别降低了 8.7%、22.0% 和 23.3%, 且 0.50 与 1.00 μg/L 处理叶片 SPAD 值与 CK 已无显著差异。水稻叶片中的叶绿素含量与 SPAD 值呈现的规律相一致, 0.05、0.10 和 0.20 μg/L 处理叶绿素含量较 CK 提高了 15.6%、19.3% 和 8.6%, 0.50 和 1.00 μg/L 处理叶片叶绿素含量较 0.10 μg/L 处理分别显著降低 10.8% 和 14.2%, 并与 CK 叶绿素含量差异不显著。因此, 叶绿素合成对 PVE 施用浓度存在明显响应, 0.10 μg/L PVE 是促进叶绿素合成的最佳浓度。

2.5 不同 PVE 浓度对水稻叶片光合特性的影响

光合作用是水稻捕捉太阳能并进行养分累积的基础, 叶片的光合能力直接决定了植物生产力的高

低, 是植物光合作用的重要反映。PVE 在 0.05~0.50 μg/L 浓度范围内水稻叶片光合速率较 CK 显著提高 5.1%~34.4% (表 2), 且 0.05 和 0.10 μg/L 处理叶片光合速率显著高于 0.20、0.50 和 1.00 μg/L 处理。光合速率的提高需要消耗更多的 CO₂, 胞间 CO₂ 浓度会随光合效率的提高而降低, PVE 在 0.05~0.50 μg/L 浓度范围内胞间 CO₂ 浓度较 CK 显著降低 9.3%~18.3%。研究同时发现 PVE 能够促进叶片气体交换, 与 CK 相比, 所有施用 PVE 的处理叶片气孔导度显著增加 7.9%~16.2%。蒸腾作用是植物进行水分与养分吸收运移的主要动力, 0.05、0.10、0.20 和 0.50 μg/L 处理较 CK 分别提高了叶片蒸腾速率 63.5%、63.5%、41.0% 和 34.0%, 从而提高了水稻对水分/养分吸收和运移的能力。综合水稻叶片光合参数, PVE 在 0.10 μg/L 浓度下具有最佳施用效果, 但随着浓度的进一步提高施用效果逐渐下降, 至 1.00 μg/L 时叶片光合速率和蒸腾速率与 CK 已无显著差异。

2.6 不同 PVE 浓度对水稻叶片及根系抗逆酶活性和丙二醛含量的影响

SOD 和 CAT 是最有效的催化清除活性氧反应的酶。施用 PVE 的各处理叶片 SOD 活性较 CK 显著增加 22.2%~46.9%, 但根系中只有 0.10 μg/L 处理 SOD 活性显著高于 CK28.0% (表 3)。0.10 μg/L 处理叶片和根系 CAT 活性还较 CK 显著提高 9.5% 和 12.5%, 但不同 PVE 施用浓度对叶片 POD 活性, 根系 SOD、CAT 和 POD 活性影响不显著。活性氧会加速多聚不饱和脂肪酸降解产生 MDA, 对植物造成二次伤害。与 CK 相比, 0.05 μg/L 处理显著降低叶片和根系中 MDA 含量 16.6% 和 24.6%, 0.10 μg/L 处理显著降低叶片和根系中 MDA 含量 22.0% 和

表 2 不同 PVE 浓度处理水稻叶片的光合特性

Table 2 Photosynthetic characteristics of rice leaves under different PVE concentrations

PVE 浓度 (μg/L) PVE concentration	光合速率[μmol/(m ² ·s)] Photosynthetic rate	气孔导度 Gs [mol/(m ² ·s)]	胞间 CO ₂ 浓度 Ci (μmol/mol)	蒸腾速率 Tr [mmol/(m ² ·s)]
0 (CK)	12.5 d	0.3886 c	170.6 a	5.2 c
0.05	16.3 a	0.4428 a	146.1 b	8.5 a
0.10	16.8 a	0.4514 a	139.4 c	8.5 a
0.20	14.4 c	0.4464 a	148.2 b	7.3 b
0.50	13.1 c	0.4253 b	154.8 b	6.9 b
1.00	12.7 d	0.4191 b	155.3 b	5.9 bc

注 (Note) : 同列数值后不同字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$) Values followed by different letters in a column indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$).

表 3 不同 PVE 浓度处理水稻叶片及根系抗逆酶活性及丙二醛含量

Table 3 Stress-resistance enzyme activity and MDA content in rice leaves and roots under different PVE concentrations

部位 Organ	PVE 浓度 (μg/L) PVE concentration	MDA (μmol/g, FW)	SOD (U/g, FW)	CAT [U/(g·min), FW]	POD [U/(g·min), FW]
叶片 Leaf	0 (CK)	60.9 a	197.0 d	7.60 bc	311.4 b
	0.05	50.8 b	262.8 b	8.09 ab	341.6 ab
	0.10	47.5 b	289.4 a	8.33 a	368.9 a
	0.20	54.3 ab	275.5 ab	7.75 abc	333.2 ab
	0.50	56.1 ab	261.0 bc	7.75 abc	344.6 ab
	1.00	59.3 a	240.7 c	7.46 c	331.4 ab
根系 Root	0 (CK)	30.2 a	153.8 b	2.52 b	270.8 b
	0.05	22.8 b	195.4 ab	2.89 a	316.9 a
	0.10	21.2 b	196.9 a	2.84 a	315.4 a
	0.20	22.5 b	196.3 ab	2.85 a	284.4 ab
	0.50	24.3 b	181.4 ab	2.75 ab	299.3 ab
	1.00	28.1 a	179.4 ab	2.80 ab	288.1 ab

注 (Note) : 同列数值后不同字母表示相同部位不同PVE浓度处理间差异显著 ($P < 0.05$) Values followed by different letters in a column indicate significant difference among treatments for the same organ ($P < 0.05$).

29.8%。综合来看,低浓度的 PVE 能够提高抗逆酶活性,降低 MDA 含量,从而减少细胞损伤,提高水稻耐低温能力。

3 讨论

水稻遭受冷害时会发生光能转化效率降低^[25]、叶绿素合成受到抑制^[9]、丙二醛等代谢产物含量升高等生理变化^[5],并伴随着种子发芽率降低^[26]、幼苗生长缓慢等现象。因此增强作物对养分的吸收能力、保证作物体内生理生化及代谢反应的正常运行是生物刺激素调控胁迫耐受性的关键^[27]。研究者发现生物刺

激素能够调控植物代谢中的光合作用进程^[28],并通过增加根系与土壤/营养液的接触与吸收面积促进植物对养分的吸收^[17, 29]。类似试验结果也出现于本试验中,相较于 CK, PVE 在 0.05~0.50 μg/L 浓度范围内使水稻叶片的光合速率和蒸腾速率分别显著提升 5.1%~34.4% 和 34.0%~63.5%,同时水稻根系更加发达,根系总长度、根表面积、根体积和根平均直径等指标也均显著提高,从而通过增加养分运输的动力以及根系与养分的接触面积两个途径提高了水稻幼苗对水分和养分的吸收能力。低温胁迫会导致水稻细胞内氧代谢失衡,由此产生的活性氧簇会引

发膜脂过氧化并造成膜系统损伤^[30-31], 并进一步加速多聚不饱和脂肪酸降解产生 MDA, 从而对植物造成二次伤害^[32]。朱云林等^[12]和黄凤莲等^[13]证实生物刺激素具有增强水稻幼苗体内抗氧化酶活性的能力。本试验条件下, 施用 PVE 后水稻幼苗体内 SOD 和 POD 活性显著上升, 保障了酶系统保护机制的正常运行, PVE 进一步降低了叶片和根系中 MDA 含量 16.6%~22.0% 和 24.6%~29.8%。因此, PVE 通过增加根系养分吸收面积、提高叶片光合能力和减少细胞氧化损伤途径共同作用提高了对水稻幼苗对低温胁迫的耐受性。但与其他研究者的研究结果不同, 供试 PVE 在 0.05~0.10 $\mu\text{g/L}$ 的浓度下就能起到缓解低温胁迫的作用。而在其他研究报道中, 生物刺激素因其来源和组分不同, 其促进或抑制生长的浓度存在较大差异, 但大致施用范围在 50~1000 mg/L 。PVE 的最适抗逆浓度仅为常规生物刺激素的 1/500000, 甚至更低, 因此可以认为 PVE 是一种高效的生物刺激素。

供试宛氏拟青霉来源于野生沙棘根系, 并在一定的施用量下显著提高了水稻幼苗叶片和根系的重量, 这可能是由于菌株提取物中的活性成分诱导植物产生了如生长素等多种内源激素, 从而促进了水稻根系的生长和组织的分化, 并在低温胁迫下通过影响内源激素水平的形式达到了稳定蛋白质并保护膜系统的作用^[33]。但本试验条件下随着 PVE 施用浓度的提高, PVE 缓解低温胁迫的能力反而逐渐减弱。且使用函数模型对 0~0.20 $\mu\text{g/L}$ 范围内 PVE 浓度与水稻幼苗总重间的相互关系进行模拟时发现, 随着 PVE 浓度的增加, 水稻幼苗总重呈先增加后降低的趋势, 低浓度的 PVE 增加了水稻幼苗干物质累积, 但随着施用浓度的增加水稻幼苗的生长反而受到抑制。Selvi 等^[34]的研究也得出类似结果, 过量的生物刺激素往往伴随着强烈的抑制作用。因此 PVE 在高浓度条件下可能干扰了水稻其他生理途径并抑制了水稻的生长, 从而掩盖了其对水稻抵御低温胁迫的正面作用。

二叶期的水稻对低温环境极为敏感, 也是抗性最弱的时期, 持续低温会导致叶片黄化失绿, 产生死苗、烂秧等症状^[12], 而随着水稻的生长, 根系对水分及养分的吸收能力会逐渐增强, 对低温的耐受性也会逐渐提高, PVE 在水稻幼苗上施用后有较好的抗逆作用, 推测该生物刺激素在水稻的整个生育时期内都有较好的施用效果。但在生物刺激素实际推广和应用的过程中, Ertani 等^[35]发现生物刺激素对施

用剂量和施用方式要求严格, 且由于其中的多种生物活性成分共同作用而难以阐明作用机理, 因此难以实现稳定的商业化。PVE 同样会因施用剂量低、施用阈值窄而极易出现施用不均、施用量过大等问题。为此, 后续研究工作中需增加低浓度 PVE 处理的数量, 便于更好地通过函数分析水稻的各项指标与 PVE 施用量的关系; 探寻 PVE 抑制水稻生长的阈值及更科学的稀释方法, 以便更合理地指导农业生产; 增设恢复试验、正常温度对照, 延长试验时间从水稻种植至收获, 系统研究水稻在整个生命周期中的生理生化反应和养分吸收能力对 PVE 的响应。此外, 针对不同作物, PVE 的施用量和作用机制也需进一步探讨。

4 结论

15℃ 低温胁迫条件下, PVE 能够打破水稻种子休眠。PVE 处理浓度为 0.10 $\mu\text{g/L}$ 时, 可显著增加水稻幼苗根系重量, 提升叶片光合速率, 提高叶片和根系抗氧化酶活性, 并显著降低叶片和根系 MDA 含量, 最终提高水稻地上部分生物量。

参 考 文 献:

- [1] 马树庆, 刘晓航, 邓奎才, 等. 幼穗形成期低温对水稻结实的影响[J]. 应用生态学报, 2018, 29(1): 125-132.
Ma S Q, Liu X H, Deng K C, *et al.* Impact of low temperature in young ear formation stage on rice seed setting[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2018, 29(1): 125-132.
- [2] Mariani L, Parisi S G, Cola G. Space and time behavior of climatic hazard of low temperature for single rice crop in the mid latitude[J]. International Journal of Climatology, 2010, 29(12): 1862-1871.
- [3] 王艳华, 任传友, 韩亚东, 等. 东北地区活动积温和极端持续低温的时空分布特征及其对粮食产量的影响[J]. 农业环境科学学报, 2011, 30(9): 1742-1748.
Wang Y H, Ren C Y, Han Y D, *et al.* The tempo-spatial patterns of active accumulated and consecutive extreme low temperature and their impacts on grain crop yield in northeast China[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2011, 30(9): 1742-1748.
- [4] Oliver S N, Van Dongen J T, Alfred S C, *et al.* Cold-induced repression of the rice anther-specific cell wall invertase gene OSINV4, is correlated with sucrose accumulation and pollen sterility[J]. Plant Cell and Environment, 2005, 28(12): 1534-1551.
- [5] Zhang Q, Chen Q, Wang S, *et al.* Rice and cold stress: methods for its evaluation and summary of cold tolerance-related quantitative trait loci[J]. Rice, 2014, 7(1): 1-12.
- [6] 王春萍, 雷开荣, 李正国, 等. 低温胁迫对水稻幼苗不同叶龄叶片叶绿素荧光特性的影响[J]. 植物资源与环境学报, 2012, 21(3): 38-43.
Wang C P, Lei K R, Li Z G, *et al.* Effect of chilling stress on chlorophyll fluorescence characteristics of seedling leaves with

- different leaf ages of *Oryza sativa*[J]. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2012, 21(3): 38–43.
- [7] 王冰, 程宪国. 干旱、高盐及低温胁迫下植物生理及转录因子的应答调控[J]. *植物营养与肥料学报*, 2017, 23(6): 1565–1574.
- Wang B, Cheng X G. Physiological responses and regulatory pathways of transcription factors in plants under drought, high-salt, and low temperature stresses[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2017, 23(6): 1565–1574.
- [8] Król A, Amarowicz R, Weidner S. The effects of cold stress on the phenolic compounds and antioxidant capacity of grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2015, 189: 97–104.
- [9] Asada K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions[J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(2): 391–396.
- [10] Los D A, Murata N. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1666(1–2): 142–157.
- [11] 王国莉, 郭振飞. 低温对水稻不同耐冷品种幼苗光合速率和叶绿素荧光参数的影响[J]. *中国水稻科学*, 2005, 19(4): 381–383.
- Wang G L, Guo Z F. Effects of chilling stress on photosynthetic rate and the parameters of chlorophyll fluorescence in two rice varieties differing in sensitivity[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2005, 19(4): 381–383.
- [12] 朱云林, 顾大路, 王伟中, 等. 壳聚糖对水稻幼苗抗冷性的影响[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(8): 66–68.
- Zhu Y L, Gu D L, Wang W Z, *et al.* Effects of chitosan on cold resistance of rice seedlings[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2017, 45(8): 66–68.
- [13] 黄凤莲, 戴良英, 罗宽, 等. 药剂诱导水稻幼苗抗寒机制研究[J]. *作物学报*, 2000, 26(1): 92–97.
- Huang F L, Dai L Y, Luo K, *et al.* Mechanism studies on pharmaceutical induction for resistance to cold of rice seedlings[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2000, 26(1): 92–97.
- [14] Brown P, Saa S. Biostimulants in agriculture[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 1–3.
- [15] Calvo P, Nelson L, Kloepper J W. Agricultural uses of plant biostimulants[J]. *Plant and Soil*, 2014, 383(1–2): 3–41.
- [16] 孙磊, 陈国祥, 程嘉翎, 等. 低聚壳聚糖处理对低温胁迫下水稻幼苗类囊体膜特性的影响[J]. *南京师大学报(自然科学版)*, 2009, 32(2): 93–97.
- Sun L, Chen G X, Cheng J L, *et al.* Effects of chitosan treatment on thylakoid membrane characteristics in rice seedling under low temperature[J]. *Journal of Nanjing Normal University (Natural Science Edition)*, 2009, 32(2): 93–97.
- [17] 张水勤, 袁亮, 林治安, 等. 腐植酸促进植物生长的机理研究进展[J]. *植物营养与肥料学报*, 2017, 23(4): 1065–1076.
- Zhang S Q, Yuan L, Lin Z A, *et al.* Advances in humic acid for promoting plant growth and its mechanism[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2017, 23(4): 1065–1076.
- [18] 邓如福, 裴炎, 王瑜宁, 等. 海藻糖对水稻幼苗抗寒性研究[J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 1991, (3): 347–350.
- Deng R F, Pei Y, Wang Y N, *et al.* A study on trehalose treatment as related to chilling-resistance in rice seedlings[J]. *Journal of Southwest University (Natural Science Edition)*, 1991, (3): 347–350.
- [19] Nardi S, Pizzeghello D, Schiavon M, *et al.* Plant biostimulants: physiological responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism[J]. *Scientia Agricola*, 2016, 73(1): 18–23.
- [20] 王浩, 杨方社, 李怀恩, 等. 沙棘柔性坝对砒砂岩沟道泥沙粒径分布及有机质影响[J]. *水土保持学报*, 2017, 31(5): 158–163.
- Wang H, Yang F S, Li H E, *et al.* Effects of seabuckthorn flexible dam on sediment particle size distribution and organic matter in the soft sandstone gully[J]. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2017, 31(5): 158–163.
- [21] 刘文祥, 李勇, 于寒青. 草灌植被恢复提高坡地土壤水稳性团聚体和碳、氮含量的有效性: 退耕年限的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2016, 22(1): 164–170.
- Liu W X, Li Y, Yu H Q. Soil water stable aggregates and carbon and nitrogen storage enhanced by conversion of farmland to shrub and grass in China Loess Plateau: the influence of conversion cultivation time[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2016, 22(1): 164–170.
- [22] 山东蓬勃生物科技有限公司. 一种宛氏拟青霉菌株SJ1及其应用[P]. 中国专利: 201510059660.1, 2015-02-05.
- Shandong Pengbo Biology Technology LTD. Co.. Application for *Paecilomyces Variotii* of SJ1[P]. China Patent: 201510059660.1, 2015-02-05.
- [23] 武爱莲, 郭琨, 丁玉川, 等. *Bacillus amyloliquefaciens* Pb-4对穴盘育苗番茄生长及生理特性的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2018, 24(3): 841–848.
- Wu A L, Guo J, Ding Y C, *et al.* Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* Pb-4 on growth and physiological characteristics of tomato under the condition of plug seeding[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2018, 24(3): 841–848.
- [24] 张淑英, 褚贵新, 梁永超. 不同铵硝配比对低温胁迫棉花幼苗生长及抗氧化酶活性的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2017, 23(3): 721–729.
- Zhang S Y, Chu G X, Liang Y C. Impacts of different ammonium/nitrate ratios on the growth and antioxidant defense enzyme activities in cotton seedlings exposed to low-temperature stress[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2017, 23(3): 721–729.
- [25] Jeong S W, Choi S M, Lee D S, *et al.* Differential susceptibility of photosynthesis to light-chilling stress in rice (*Oryza sativa* L.) depends on the capacity for photochemical dissipation of light[J]. *Molecules and Cells*, 2002, 13(3): 419–428.
- [26] 江玲, 侯名语, 刘世家, 等. 水稻种子低温萌发生理机制的初步研究[J]. *中国农业科学*, 2005, 38(3): 480–485.
- Jiang L, Hou M Y, Liu S J, *et al.* Physiological mechanism of seed germination (*Oryza sativa* L) under low temperature[J]. *Scientia Agriculture Sinica*, 2005, 38(3): 480–485.
- [27] 徐国伟, 陆大克, 王贺正, 等. 干湿交替灌溉与施氮量对水稻叶片光合性状的耦合效应[J]. *植物营养与肥料学报*, 2017, 23(5): 1225–1237.
- Xu G W, Lu D K, Wang H Z, *et al.* Coupling effect of wetting and

- drying alternative irrigation and nitrogen application rate on photosynthetic characteristics of rice leaves[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2017, 23(5): 1225–1237.
- [28] 张运红, 孙克刚, 杜君, 等. 海藻寡糖增效尿素对水稻光合特性及碳代谢产物积累的影响[J]. *中国土壤与肥料*, 2016, (3): 54–59.
Zhang Y H, Sun K G, Du J, *et al.* Effects of alginate-derived oligosaccharides synergistic urea on the photosynthetic characteristics and accumulation of carbon metabolites in rice[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2016, (3): 54–59.
- [29] Eyheraguibel B, Silvestre J, Morard P. Effects of humic substances derived from organic waste enhancement on the growth and mineral nutrition of maize[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(10): 4206–4212.
- [30] Mittal D, Madhyastha D A, Grover A. Genome-Wide transcriptional profiles during temperature and oxidative stress reveal coordinated expression patterns and overlapping regulons in rice[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(7): e40899.
- [31] Bonnecarrère V, Borsani O, Díaz P, *et al.* Response to photooxidative stress induced by cold in japonica rice is genotype dependent[J]. *Plant Science*, 2011, 180(5): 726–732.
- [32] Pamplona R. Advanced lipoxidation end-products[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2011, 192(1): 14–20.
- [33] 秦娟娟, 闫淑珍, 刘佳. 植物内生细菌固体菌剂对辣椒的促生和防病作用[J]. *植物保护学报*, 2010, 37(4): 325–330.
Qin J J, Yan S Z, Liu J. The growth-promotion on pepper and control of *phytophthora capsici* by endophytic bacterium agents[J]. *Journal of Plant Protection*, 2010, 37(4): 325–330.
- [34] Selvi Y, Atli A, Besiroglu L, *et al.* A gain-of-function mutation in an Arabidopsis Toll Interleukin1 receptor-nucleotide binding site-leucine-rich repeat type R gene triggers defense responses and results in enhanced disease resistance[J]. *Plant Cell*, 2002, 14(12): 3149–3162.
- [35] Ertani A, Francioso O, Tugnoli V, *et al.* Effect of commercial lignosulfonate-humate on *Zea mays* L. metabolism[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(22): 11940–11948.