

六种固氮蓝藻提取液· 对玉米的促长作用和提取液成分比较*

刘 玉

(中山大学环境科学研究所, 广州 510275)

沈银武 黎尚豪

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提 要

本文用六种固氮蓝藻的提取液处理玉米种子, 同时对其提取液氨基酸组成和碳水化合物与维生素 B₁₂ 的含量进行了分析。结果表明固氮鱼腥藻 HB 686 (*Anabaena azotica* HB 686)、球孢鱼腥藻 HB 1017 (*A. sphaerica* HB 1017)、多变鱼腥藻 HB 1058 (*A. variabilis* HB 1058) 和小单枝藻 HB TT (*Tolyphothrix tenuis* HB TT) 的提取液中氨基酸、碳水化合物和维生素 B₁₂ 的含量高于鱼腥藻 SP. HB 1042 (*Anabaena* sp. HB 1042) 和繁育管链藻 HB 38 (*Aulosira fertilissima* HB 38)。同时, 促进玉米种子萌发和幼苗生长的效果前四种藻较好, 后两种则较差。

关键词 固氮蓝藻, 促长物质, 玉米萌发

固氮蓝藻是自然界中广泛分布的一种光自养植物。可通过光合作用固定碳素合成碳水化合物, 又可通过固氮酶的固氮作用合成氨。它含有多种促长物质, 可促进作物生长。关于蓝藻的促长物质早就引起了国内外研究者的关注, Venkataraman 和 Neelakantan 发现栖藓筒孢藻 (*Cylindrospermum muscicola*) 细胞组分对水稻生长有促进作用^[1]; Gupta 和 Kushwaham 发现坑形席藻 (*Phormidium foveolarum*) 的提取液对水稻、小麦、玉米等种子的发芽和生长有促长作用, 能提高产量^[2-4]。许多研究者的试验都证明固氮蓝藻的提取液对农作物种子的萌发具有一定的促进效果^[1-9]。这种促长效果是由于藻细胞中存在多种促长物质。藻类促长物质的性质及其对作物的萌发、生长、最终提高产量的影响引起了许多科学家们的极大兴趣。Gupta 等^[6]率先进行了研究, Fogg 综合报道了蓝藻促长物质的研究结果^[10]。1965 年中国科学院水生生物研究所在进行水稻秧田施放固氮蓝藻后, 发现秧苗生长茁壮, 叶色翠绿, 黎尚豪认为此结果并非由于蓝藻的固氮增加了肥料, 他提出了固氮蓝藻含有刺激植物生长的活性物质的假设。通过一系列实验室盆栽试验, 结果

* 本研究在中国科学院水生生物研究所进行, 得到了该所朱运芝、沈根文同志的支持, 作者一并致谢。
1993 年 7 月 24 日收到; 1996 年 3 月 17 日修回。

证明用提取液浸泡作物种子均有明显效果,他们的研究发现固氮蓝藻的促长物质是细胞的代谢产物,存在于细胞内,通过代谢也可以少量排出到细胞外,这种物质是耐热的水溶性物质,所以利用固氮蓝藻提取液处理种子可提高发芽率,促进根系发达,提高作物产量等结果^[11—13]。关于固氮蓝藻所含促长物质的分离提纯等工作还未深入进行,而且不同种类的藻在促长物含量上也存在着差异。本文采用了生物检测的方法对六种固氮蓝藻的提取液进行了分析,试图选出作用最佳的藻种或最佳的藻种组合,为进一步研究固氮蓝藻促长物质及在生产上的应用提供必要的依据。

1 材料和方法

1.1 藻种与培养 实验用的六种固氮蓝藻分别是:固氮鱼腥藻(*Anabaena azotica* HB 686)、球孢鱼腥藻(*A. sphaerica* HB 1042)、多变鱼腥藻(*A. variabilis* HB 1058)、鱼腥藻sp. (*Anabaena sp.* HB 1042)、小单枝藻(*Tolyphothrix* HB TT)、繁育管链藻(*Aulosira fertilissima* HB 38)。以上藻种由中国科学院水生生物研究所藻类室生态组提供。上述六种藻采用水生“111”无氮培养液^[14]培养,PH 7.0,光强 1200 lx,温度 34±1℃,静止培养6d 收获,在恒温箱 45—50℃条件下脱水干燥。

1.2 生长速度 用叶绿素 a 的方表示生长速度,叶绿素 a 用丙酮提取^[15],按公式计算出生长速率^[16]。

1.3 提取液制备与配制 取藻粉 5 份,加蒸馏水至 100ml,混合均匀,置于恒温水浴中,加热并不断搅拌,使温度缓缓上升至 90℃,维持 5min,冷却后,加蒸馏水至 500ml,即配制成 1% 浓度的固氮蓝藻提取液。将提取液离心,取上清液作为玉米浸种液。

1.4 玉米萌发试验 供试玉米种子为豫农 704,种子用 0.1% HgCl₂ 灭菌 5min,然后分别放入不同的 1% 藻提取液中浸泡 24h,以蒸馏水浸泡的种子为对照,浸种液与种子的比例为 1:1(体积 / 重量)。其后用蒸馏水冲洗,晾干后将种子播种于 12×12cm 的培养器中,每培养器中播种 30 粒,每一处理重复 3 次,在室内进行萌发实验。以发芽势(%)、发芽率(%)、三叶植株百分数(%)、株高(cm)、叶面积(m²)和根干重(mg)六个数值为萌发实验中的指标。

1.5 提取液的化学成分分析 采用日立 835-50 型氨基酸自动分析仪测定提取液中的氨基酸含量。碳水化合物的定量分析用酚-硫酸法测定^[17];用薄层层析法作碳水化合物的定性分析^[18]。生物测试法分析维生素 B₁₂^[19—21]。

2 结果

2.1 生长速度的比较

将六种作为提取促长物质的固氮蓝藻在同一条件下进行培养,观察其生长情况,每 24h 测定一次叶绿素 a 的含量,并计算它们的生长速率(μ)和增代时间(h)。表 1 表明所试六种固氮蓝藻在 72h 以前的生长速度都较快。不同种类之间则以 HB 1042, HB 38, HB 1058 和 HB TT 生长较快。

2.2 不同固氮蓝藻提取液对玉米促长作用的比较

表 2 表明六种固氮蓝藻提取液处理玉米种子后与对照相比都有一定的促进作用。所

表1 六种固氮蓝藻的生长速度比较

Tab.1 The growth rate and generation time of six strains of the nitrogen-fixing blue-green algae

时间 (h)	HB 686		HB 1042		HB 1017		HB 1058		HB TT		HB 38	
	(u)	(h)	(u)	(h)	(u)	(h)	(u)	(h)	(u)	(h)	(u)	(h)
24	0.0175	39.6	0.0641	10.8	0.0093	74.5	0.0382	18.1	0.0238	21.1	0.0545	12.7
48	0.0335	20.7	0.0475	14.6	0.0176	39.4	0.0255	27.2	0.0767	26.0	0.0458	15.1
72	0.0220	31.5	0.0332	20.9	0.0160	43.3	0.0255	27.2	0.0285	24.3	0.0286	24.2
96	0.0175	39.6	0.0227	30.5	0.0141	49.2	0.0191	36.3	0.0164	42.3	0.0248	27.9
120	0.0139	49.7	0.0085	81.5	0.0137	50.6	0.0181	38.29	0.0187	37.6	0.0212	32.7

测定的六个素质指标之和($\sum X$)可以看出: 小单歧藻(HB TT)效果最显著, 其次是固氮鱼腥藻(HB 686)、球孢鱼腥藻(HB 1017)和多变鱼腥藻(HB 1058); 鱼腥藻 sp. (HB 1042)和繁育管链藻(HB 38)略高于对照(表2)。

表2 不同藻提取液对玉米种子的影响

Tab.2 Effects of different extracts of algae on seed of Maize

处 理 Treatment	发芽率 Germina- tion rate (%)	三叶植株 The three- leaved stage (%)	株 高 Height (cm)	叶面积 Area of blades (cm) ²	根干重 roots weight (mg)	素质和 Quality $(\sum X)$
CK	86.7	73.4	10.9	10.0	31.6	295.3
HB TT	97.8	87.2	11.1	11.0	33.2	330.7
HB 686	97.2	81.7	11.0	20.9	33.1	325.5
HB 1017	95.0	83.3	11.0	10.8	32.4	322.4
HB 1058	94.4	82.1	11.2	10.8	33.3	329.0
HB 1042	90.0	73.9	10.9	9.7	31.2	300.7
HB 38	91.1	75.1	10.0	9.6	30.9	296.7

2.3 化学组分分析

2.3.1 氨基酸组成与含量 六种固氮蓝藻提取液中氨基酸分析结果表明固氮鱼腥藻(HB 686)的各种氨基酸的含量都较高, 其次是球孢鱼腥藻(HB 1017)、小单歧藻(HB TT)和多变鱼腥藻(HB 1058), 鱼腥藻 sp. (HB 1042)和繁育管链藻(HB 38)氨基酸的含量则相对较低(表3)。

谷氨酸和天冬氨酸是藻提取液中两种主要氨基酸。表3可以看出这两种氨基酸之和在固氮鱼腥藻(HB 686)中最高, 球孢鱼腥藻(HB 1017)、小单歧藻(HB TT)和多变鱼腥藻(HB 1058)次之, 鱼腥藻 sp. (HB 1042)和繁育管链藻(HB 38)较低。关于氨基酸的促长作用已有实验证明胱氨酸、酪氨酸及苯丙氨酸具有促进根生长的作用^[1], 所试六种

表3 六种固氮蓝藻提取液中氨基酸含量的比较(aa mg / g,千重)

Tab.3 Comparison of amino acid composition in six strains of nitrogen-fixing blue-green algae.

氨基酸 Amino acid	HB686	HB1017	HB1058	HB TT	HB1042	HB38
天冬氨酸(Asp)	22.55	12.50	7.97	12.48	4.13	4.45
苏氨酸(Thr)	12.87	5.28	6.11	6.60	2.89	2.91
丝氨酸(Ser)	8.46	4.21	4.85	4.93	1.69	2.27
谷氨酸(Glu)	25.09	14.97	11.86	15.28	5.51	5.27
甘氨酸(Gly)	10.29	5.51	4.69	6.12	2.90	2.30
丙氨酸(Ala)	11.53	8.96	5.10	7.43	2.73	2.99
胱氨酸(Cys)	1.80	1.73	1.62	1.81	1.62	1.63
缬氨酸(Val)	13.49	7.38	6.66	8.29	3.93	4.42
蛋氨酸(Met)	0.82	0.68	1.54	0.80	1.73	1.37
异亮氨酸(Ile)	9.83	4.91	4.17	5.56	2.34	2.20
亮氨酸(Leu)	9.83	6.80	5.20	7.01	3.01	2.81
酪氨酸(Try)	5.42	4.03	3.46	4.06	1.69	1.40
苯丙氨酸(Phe)	5.18	3.80	3.26	4.46	2.31	3.23
赖氨酸(Lys)	9.04	6.26	3.83	4.79	2.06	1.72
组氨酸(His)	1.85	0.69	1.20	1.07	N	0.48
精氨酸(Arg)	9.25	9.40	3.33	4.08	1.63	2.01
脯氨酸(Pro)	8.11	3.90	N	5.81	N	N
色氨酸(Trp)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
总 和(total)	167.55	100.91	74.85	100.58	39.81	41.96

N:未检测出。 nd:未测。

固氮蓝藻提取液中这三种氨基酸相加仍然是HB 686 的含量最高, HB TT、HB 1017、HB 1058 次之 HB 1042 和 HB 38 较低。此结果与本文的玉米种子萌发实验相吻合。

2.3.2 碳水化合物组成与含量 碳水化合物是细胞组分中含量很高的一类化合物, 可以参与许多代谢反应, 为植物生长所必不可少。但是, 碳水化合物是否可促进植物生长, 至今尚无定论。表4 中表明了所试六种藻提取液中碳水化合物的含量。同时对HB TT、HB 686、HB 1017 和 HB 1058 进行了定性分析(表5), 从表5 可看出只有几种糖类为四种藻所共有, 而且尚有多种未知组分。至于糖类对植物是否有促长作用或在促长中起什么作用, 尚需进一步研究。

表4 不同固氮蓝藻提取液中碳水化合物含量的比较

Tab.4 Comparison of carbohydrate in different nitrogen-fixing blue-green algae.

品系 strains	HB686	HB1042	HB1017	HB1058	HB TT	HB38
碳水化合物(%)						
(Carbonhydrate)	14.08	4.86	23.53	12.95	39.15	3.97

2.3.3 维生素B₁₂的含量的比较 众所周知维生素B₁₂能促进作物根的生长。本研究对六种固氮蓝藻提取液中维生素B₁₂的含量进行了分析,结果表明小单歧藻(HB TT)、球孢鱼腥藻(HB 1017)、固氮鱼腥藻(HB 686)和多变鱼腥藻(HB 1058)的含量显著的高于鱼腥藻sp.(HB 1042)和繁育管链藻(HB 38)(图1)。这说明HB TT、HB 1017、HB 686 和 HB 1058 的促长作用大于 HB 1042 和 HB 38,同样维生素B₁₂的测定结果与玉米种子萌发实验是相符合的。

表5 不同固氮蓝藻提取液中碳水化合物的组成*

Tab.5 Composition of carbonhydrates in extracts of different nitrogen-fixing blue-green algae

RF × 100	HB 686	HB 1017	HB 1058	HB TT	碳水化合物 carbonhydrates
2.46				○	
4.32				+	草酸, 棉子糖, 龙胆三糖
5.52			+		松三糖
6.17				○	
6.79		○			
7.40				+	乳糖, 蜜二糖
8.64				+	葡萄糖醛酸, 海藻糖
9.31	○				
10.42			+		纤维二糖, 麦芽糖
13.49			+		
13.58				+	半乳糖醛酸, 乳糖
14.19		+			
15.52	○				
15.95			○		
17.28				+	肌醇, 环己六醇, 阿拉伯酸
19.01			○		
19.13		○			
20.98				○	
21.73	+				葡萄糖醛酸
26.54				+	
26.70	+				半乳糖
29.62		○			
31.05	○				
33.95				+	脱氧葡萄糖
34.16	+				
35.58			+		木糖醇, 山梨糖
38.27		○			
39.13	+				
39.26			+		脱氧半乳糖

续表 5

RF × 100	HB 686	HB 1017	HB 1058	HB TT	碳水化合物 carbohydrates
41.97				○	
46.91		+			
47.53				+	
47.82	+				
47.85			+		羟乙酸、赤藓糖
52.14			○		
52.46				○	
53.41	○				
54.37				+	
55.21			+		二羟丙酮、抗坏血酸
56.79				+	
59.00	+				甲基木糖、甘油醛、乙醛酸
61.72				○	
63.79	+				乙二醇、羟乙酸
66.25					
69.13				+	
69.56	+				乳 酸
70.55					
71.60		○			
73.91	○				
74.69				○	
75.46			○		
75.92		○			
81.98	○				
82.82			○		
83.95				○	
84.56		○			
86.50			○		
88.95			○		
91.30	○				
91.41			○		
92.59				○	
93.20		○			
95.67				○	

* ○: 为“未知”物。

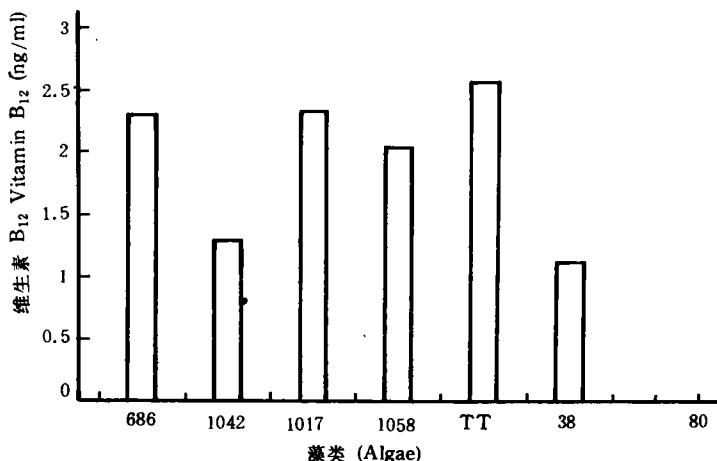


图1 几种固氮蓝藻提取液中维生素 B₁₂ 的含量比较

Fig.1 Comparison of vitamin B₁₂ in extracts of six strains of nitrogen-fixing blue-green algae.

3 讨论

固氮蓝藻作为一种生物肥源能提高农作物产量已被众多的研究者所证实。利用其提取液处理作物种子可以促进种子萌发, 提高产量。但是, 不同种类之间对作物促长的差异还未见有报道, 本研究以玉米为材料进行实验结果表明, 六种固氮蓝藻提取液对玉米种子的发芽率、发芽势、株高、叶面积和三叶植株的百分率都有促进作用, 其中以小单歧藻(HB TT)的促长效果最好, 其次是固氮鱼腥藻(HB 686)、球孢鱼腥藻(HB 1017)和多变鱼腥藻(HB 1058), 鱼腥藻 sp. (HB 1042)和繁育管链藻(HB 38)较差。这些结果与所分析的藻提取液促长物质(氨基酸、碳水化合物、维生素 B₁₂ 等)含量多少是相吻合的。

藻类中所含的促长物质种类很多, 据文献报道藻类的水溶性提取物比脂溶性提取物效果好^[22], 藻类提取液对作物起促长作用的物质主要是氨基酸、维生素 B₁₂。因此, 本文选用水提取液进行研究, 并对氨基酸、维生素 B₁₂ 和碳水化合物进行了分析。Venkatarama 和 Neelakantan, s. 的研究结果表明固氮蓝藻提取液中氨基酸对水稻幼苗根的促长主要是胱氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸起作用^[1]。作者所采用的六种固氮蓝藻中胱氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸的总含量以 HB 686、HB TT、HB 1017 和 HB 1058 为高, HB 1042 和 HB 38 这三种氨基酸的含量则较低。这和他们的研究结果是一致的。众所周知, 维生素 B₁₂ 是动植物的重要促长因子。我们分析固氮蓝藻提取液中维生素 B₁₂ 结果表明 HB TT、HB 1017、HB 686、HB 1058 的含量高于 HB 1042 和 HB 38, 因而对玉米种子的促长作用也是前四种藻的效果优于后两种藻。此结果与 Venkatarama 和 Neelakantan 用栖鲜筒孢藻提取液处理水稻种子的结果是相符合的。碳水化合物是细胞组分中含量很大的一类物质, 糖及糖类的衍生物可以活跃地参与许多代谢反应, 很可能存在有活性促长成分。作者对碳水化合物百分含量的定量分析得出 HB TT、HB 1017、HB 686 和 HB 1058 的含量高于 HB 1042 和 HB 38。对 HB TT、HB 1017、HB 686 和 HB 1058 的提取液进行定性分析看出可能存在的一些糖及糖的衍生物, 也存有许多

“未知物”，这些“未知物”中有无活性促长成分实为一广阔的研究领域。尽管未对这些“未知物”进行分析，但从已知的成分分析结果看，仍不难看出其中极可能存在一些具有促长活性的成分，如肌醇、维生素C等，碳水化合物有无促长活性，仍无实验证明，本研究中促进玉米萌发效果较好的藻株其碳水化合物的含量也相应较高，说明碳水化合物也可能具有促长成分，本文所分析的这些碳水化合物是否都有促进农作物生长的能力，还有待进一步研究。

研究六种固氮蓝藻的生长速度、提取液成分及对玉米种子萌发结果可以看出，所试的六种固氮蓝藻的生长速度快慢与提取液中促长物质的含量并没有大的联系。但是，提取液中促长物质的含量则与种子萌发的效果有较大的联系。本研究结果可为固氮蓝藻促长物的提取与提取液在农业上的应用提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] Venkataraman G S. Neelakantan S. Effect of the cellular constituents of the nitrogen-fixing blue-green alga, *Cylindrospermum muscicola*, on the root growth of rice plants. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 1967, 13: 53—61.
- [2] Gupta A B. Shukla A C. The effect of algal extracts of *Phormidium* species on growth and development of rice seedlings. *Hydrobiologia*, 1969, 34: 77—84.
- [3] Kushwaham A S. Gupta A B. Effect of algal growth promoting substances of *Phormidium foveolarum* on seedlings of some varieties of wheat. *Hydrobiologia*, 1970, 35(2): 324—332.
- [4] Shukla A C. Gupta A B. Influence of algal growth promoting substances on growth, yield and protein content of rice plants. *Nature*, 1967, 213(5077): 744.
- [5] Gups A B, Shukla A C. The effect of algal hormones on the growth and development of rice seedlings. *L. J. Sci. Tech.*, 1964, 2(3): 204.
- [6] ———, Studies on the nature of algal growth promoting substances and their influence on growth, yield and protein content of rice plants *L. J. Sci. Tech.*, 1967, 5(2): 162—163.
- [7] Gupta A B. Agarwal V. Kushwaha A B. The effect of algal growth promoting substances on wheat. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1976, 37(B), IV: 349—355.
- [8] Watanabe A. Effect of nitrogen fixing blue-green algae on the growth of rice plants. *Nature*, London. 1956, 168: 748.
- [9] Watanabe A. On the effect of the atmospheric nitrogen-fixing blue-green algae on the yield of rice. *Bot. Mag. tokyo.*, 1956, 69: 870—921.
- [10] Fogg G E. Extracellular products of algae in freshwater. *Arch. Hydrobiol. Beih. ergebn. Limnol.* 1971, 5 (1—2): 1—25.
- [11] 沈银武、黎尚豪. 固氮蓝藻培养和应用的结果与展望. 水生生物学报, 1993, 17(4): 359—364.
- [12] 湖北省水生生物研究所五室蓝藻应用组. 固氮蓝藻对培育水稻壮秧的作用. 植物学报, 1977, 19(2): 132—137.
- [13] 王少梅等. 固氮蓝藻促长物质处理春小麦的研究. 水生生物学报, 1991, 15(1): 45—51.
- [14] 黎尚豪. 固氮蓝藻作为晚稻肥源的研究. 水生生物学报, 1981, 7(3): 417—423.
- [15] Arnon, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, 1949, 24: 1—15.
- [16] 邱国雄等译(Coombs, J. 著). 生物生产力和光合作用测定技术. 北京: 科学出版社, 1986, 196—199页.
- [17] Kochert, G. Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. In *Handbook of phycological methods, Physiological and biochemical methods*. Hellebust, J. A. & Craigie, J. S. (eds), Cambridge University Press, 1978, 95—107.
- [18] Haldorsen KM. Vanadium pentoxide in sulphuric acid, a general chromogenic spray reagent for carbohydrates. *J. Chromatog.* 1977, 134: 467—476.
- [19] Azumaga O. Masuro Y. Nitrogen-fixation microorganisms in paddy soils. VI. Vitamin B₁₂ activity in nitro-

- genfixing blue-green algae. 1960.
- [20] Carlucci A F. Bower P M. Vitamin B₁₂, thiamine and biotin contents of marine phytoplankton. *J. Phycol.*, 1972, **8**: 133—137.
- [21] Gupta, A. B. & Kusm, L. Effect of growth hormones on the germination of paddy seeds. *Hydrobiologia*, 1964, **24**: 430.

GROWTH PROMOTING EFFECT OF EXTRACTS FROM SIX STRAINS OF NITROGEN-FIXING BLUE-GREEN ALGAE ON MAIZE WITH AN ANALYSIS ON THE COMPOSITION OF EX- TRACTS

Liu Yu

(Institute of Environmental Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Shen Yinwu and Li Shanghao

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Science, Wuhan 430072)

Abstract

Extracts obtained from 6 strains of nitrogen-fixing blue-green algae were used to examine their effects on maize seed and their amino acids, carbohydrates and vitamin B₁₂ contents were analysed. All the extracts have positive effect on the germination and seedling growth of maize. Extracts from *Anabaena azotica* HB 686, *A. sphaerica* HB 1017, *A. variabilis* HB 1058 and *Tolyphothrix tenuis* HB TT showed better growth-promoting effect than from *Anabaena* sp. HB 1042 and *Aulosira fertilissima* HB 38. Correspondingly, contents of amino acids, carbohydrates and vitamin B₁₂ in extracts from the former 4 species are relatively higher than from the later 2 species.

Key words Nitrogen-fixing blue-green algae, Growth-Promoting substances, Germination of maize