

产 ALA 光合细菌对陈化大豆种子幼苗建成若干指标的影响

黄霞, 马欢乐, 李皖豫, 李富伟, 李金钱, 张德超, 郑泽辉, 崔战利

(黑龙江八一农垦大学 生命科学技术学院 黑龙江 大庆 163319)

摘要: 为了降低 ALA 的生产和应用成本, 在实验室条件下评估了产 ALA 光合细菌的培养液与低浓度商品 ALA 的溶液对陈化 1 年的大豆种子出苗和幼苗建成的若干生物学指标的影响。结果表明: 供试产 ALA 光合细菌的培养液的上清液(ALA 含量约为 $0.1 \sim 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、菌体悬浮液处理对陈化大豆种子萌发后幼苗株高和根系生长有显著促进作用, 但对陈大豆种子的出苗率和幼苗下胚轴粗、鲜重、干重没有显著促进作用, 而 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ALA 溶液可显著提高陈大豆种子的出苗率、下胚轴粗、幼苗鲜重, $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ALA 可显著提高幼苗株高、下胚轴粗和干重。光合细菌的分泌物和胞外代谢产物对陈大豆种子萌发后幼苗的株高和根系生长有明显的促进作用。

关键词: 陈化的大豆种子; 光合细菌; 5-氨基乙酰丙酸(ALA); 出苗率; 幼苗

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2016.04.0626

Effect of Photosynthetic Bacteria Producing 5-aminolevulinic Acid(ALA) on the Several Index of Seedling Establishment of the Aged Soybean Seed

HUANG Xia, MA Huan-le, LI Wan-yu, LI Fu-wei, LI Jin-qian, ZHANG De-chao, ZHENG Ze-hui, CUI Zhan-li

(College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agriculture University, Daqing 163319, China)

Abstract: In order to reduce the cost of production and application of 5-aminolevulinic Acid(ALA), the effects of culture containing 5-aminolevulinic acid(ALA) secreted by strains of photosynthetic bacteria and synthetic ALA(positive control) on the germination rate of aged soybean seed and the several biology index of soybean seedlings establishment were assessed under laboratory. The results showed that culture of photosynthetic bacteria in particular the culture supernatant(ALA containing approximately $0.1 - 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) gave significantly better seedling height and root growth than other treatments, but they didn't significantly improve germination rate, seedling hypocotyl diameter, fresh weight and dry weight. $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ALA increased germination rate significantly, hypocotyls diameter and seedling fresh weight, and $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ALA increased shoots height, hypocotyls diameter and dry weight significantly.

Keywords: Aging soybean seeds; Photosynthetic bacteria; 5-aminolevulinic acid; Germination; Seedling

5-氨基乙酰丙酸(ALA)广泛存在于细菌、真菌、动物及植物的活细胞中, 是一种不参与蛋白质合成的氨基酸类代谢中间产物^[1], 是血红素、细胞色素和叶绿素等的四吡咯化合物的一个重要的生物合成前体^[2]。在农林业生产中, 高浓度 ALA 是无污染的天然除草剂^[1], 而低浓度的 ALA 被用作植物生长调节剂, 外源 ALA 无论是浸种、浸泡根系、土施还是叶面喷施, 对植株整体都会产生生理效应, 可大幅提高多种作物的产量并改善果品品质, 明显增强植物的抗寒性、耐盐性和耐弱光性^[2-5], 主要机制是影响抗氧化防御系统和光合电子传递^[6]。ALA 是在环境胁迫条件下的潜在的植物生长调节剂^[2], 具有广阔的应用前景, 但商品 ALA 在生产上大面积应用过于昂贵。

光合细菌(简称 PSB)是地球上出现最早, 具有

原始光能合成体系, 在厌氧条件下进行不放氧光合作用的细菌总称^[7], 普遍存在于自然界的土壤、水田、沼泽、湖泊、江海中。已有研究表明, 光合细菌发酵液中含有多种生理活性物质, 如多种维生素(尤其是 B 族维生素), 多种植物激素(如 IAA、GA₃、ABA、乙烯、细胞分裂素) 和核酸、水杨酸、多种氨基酸(如 ALA) 以及单细胞蛋白质等, 已被用作动物饲料和微生物肥料。张德咏等^[8]发现辣椒、茄子和番茄种子经适当稀释的光合细菌菌液处理后, 可以提高其成苗率以及使幼苗根系更加发达。钱森和等^[9]也发现适当稀释的光合细菌可促进玉米种子的萌发。光合细菌这些独特的生理功能和菌体丰富的营养以及其无毒、无致病性等特点为其成为一种新型种子引发剂奠定了基础。一些光合细菌是产胞外 ALA 浓度较高生物^[7]。ALA 是胞外水溶性

收稿日期: 2016-03-28

基金项目: 2014 年黑龙江八一农垦大学大学生创新创业训练计划项目。

第一作者简介: 黄霞(1994-), 女, 主要从事生物技术研究。E-mail: 1336764422@qq.com。

通讯作者: 崔战利(1964-), 女, 硕士, 教授, 主要从事微生物学的教学与研究。E-mail: zhanlic@aliyun.com。

物质,将高产 ALA 的光合细菌直接用于农业生产,可免去提取工艺和其对环境的二次污染,降低 ALA 的生产和应用成本,而这方面的研究国内还未见报道。

本研究采用活力和萌发能力降低的自然老化种子为试验材料,以富集和分离筛选的产 ALA 的光合细菌的培养物和低浓度 ALA 溶液作为解除老化种子质量恶化的种子引发剂,比较它们对陈化的大豆种子出苗和幼苗建成的若干生物学指标的影响。旨在在不进行 ALA 的提取以降低其生产和应用成本前提下,利用产 ALA 光合细菌培养物直接作为种子引发剂解除老化种子质量恶化,为种子和幼苗安全度过环境胁迫提供参考措施,更为特殊情况下陈种子的利用提供有效方法。

1 材料与方法

1.1 材料

陈化一年的丰收 25 大豆种子。

产 ALA 光合细菌由本课题组从 49 个不同来源的土壤和水样中分离筛选并提供。

培养基配方(1 L): 乙酸钠 2 g、丙酸钠 1 g、氯化铵 1 g、磷酸二氢钾 1 g、酵母膏 0.3 g、微量元素母液 10 mL。

5-氨基乙酰丙酸(简称 ALA) 纯度为 98%, 购自 Sigma 公司。

光合细菌的培养: 将光合细菌菌种 10 mL 加入已灭菌的装有 100 mL 培养基的 100 mL 血清瓶中, 培养基 pH7.2, 用灭菌的橡胶塞封口, 在恒温培养箱(28±3℃、3 000 lx) 中光照培养 7 d, 培养液的 OD₆₀₀ = 1.423, 约含光合细菌 5×10⁹ cfu·mL⁻¹。按照 Mariet 等^[10] 和刘秀艳等^[11] 方法测定光合细菌培养液 ALA 含量约为 0.1~0.2 mg·L⁻¹。

光合细菌上清液和菌体悬液制备: 将光合细菌培养液 10 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 取上清液至锥形瓶中保存待用, 即为光合细菌培养液的上清液, 菌体用与培养液等体积的蒸馏水悬浮, 如此循环操作 3 次, 得菌体悬浮液保存待用。

1.2 试验设计

1.2.1 大豆种子的处理 选取 6 个塑料盒(15 cm×8 cm×5 cm) 并将盒盖进行简单修剪, 使盒盖能够正好放入盒子, 在盒内扣放 1 个培养皿底, 将盒盖置于培养皿底上, 并将 2 层灭过菌的纱布置于处理过的盒盖上, 以防止大豆种子直接与溶液接触发生过度吸胀, 将挑选的籽粒饱满、无破损的大豆种子 160

粒在纱布上均匀摊成一层, 分别在 6 个塑料盒中倒入 5 mg·L⁻¹ ALA 溶液、1 mg·L⁻¹ ALA 溶液、光合细菌菌体悬浮液、光合细菌上清液、未接种的无菌培养基和蒸馏水各 250 mL, 作为 6 个处理。为使种子能够充分吸胀, 将用不同溶液润湿好的纱布分别置于相应处理的种子表面, 在室温下吸胀 36 h, 每隔 12 h 观察种子吸胀情况。

1.2.2 播种 于 2015 年 1 月 1 日播种。播种前, 将沙土用直径为 3 mm 的筛子筛理, 按照每个处理所需的沙土量将试验所用沙土总量均匀分成 6 份, 每份沙土分别加入 1 500 mL 蒸馏水和 60 mL 相应处理液。每份沙土再分成 6 等份, 作为 6 次重复, 分别装入 6 个塑料盒。在沙土上均匀分散摆放已用相对应处理液吸胀的大豆种子 25 粒, 均匀覆盖上水湿润的沙土约 2.0 cm 厚, 并于(22±3)℃ 室温、自然光照条件下进行培养。每天观察, 根据沙土的干湿程度, 在需要时分别均匀喷洒等量的清水。

1.2.3 调查项目与方法 培养期间, 每天记录大豆种子的出苗数, 计算出苗率; 培养 14 d 后, 进行大豆幼苗株高、下胚轴粗、根长、侧根数、根体积、鲜重和干重各项指标的调查。各处理的每个重复均随机取 10 株幼苗, 小心清洗和分离。幼苗株高、根长用直尺量取, 下胚轴粗用游标卡尺量取, 为幼苗根到子叶之间最粗处的直径, 侧根数用数取法获得, 根体积按照施天生等^[12] 方法测定, 鲜重和干重按照冷益丰等^[13] 方法测定。

1.3 数据分析

使用 SPSS Statistics 19.0 软件对试验数据进行分析, 比较均值, 采用 Tukey HSD 法进行多重比较检验。

2 结果与分析

2.1 不同处理对大豆种子的出苗率的影响

大豆播种第二天极少数种子出现破土现象, 第三天 5 mg·L⁻¹ ALA 处理的发芽率显著高于其它处理, 上清液处理的发芽率显著高于培养基, 其它处理间的发芽率差异不显著。第四天 5 mg·L⁻¹ ALA 处理的发芽率显著高于上清液和培养基处理, 1 mg·L⁻¹ ALA 处理显著高于培养基处理, 其它处理间差异不显著。第五天 5 mg·L⁻¹ ALA 处理的发芽率显著高于除 1 mg·L⁻¹ ALA 外的其它处理, 1 mg·L⁻¹ ALA 处理的发芽率显著高于培养基处理, 其它处理间差异不显著。第六天以后大豆种子出苗率稳定不变。

表1 不同处理下陈化一年的大豆种子的出苗率

Table 1 Germination rate of soybean seed aging one year under different treatments(%)

	水 Water	上清液 Supernatant	ALA		菌体悬浮液 Cell suspension	培养基 Medium
			5 mg·L ⁻¹	1 mg·L ⁻¹		
第三天 The third day	38.7 ± 3.5 bc	45.3 ± 2.7 b	61.3 ± 2.7 a	38.7 ± 3.5 bc	40.0 ± 4.6 bc	25.3 ± 2.7 c
第四天 The fourth day	52.0 ± 6.0 abc	49.3 ± 2.7 bc	69.3 ± 4.8 a	57.3 ± 2.7 ab	50.7 ± 3.5 abc	34.7 ± 2.7 c
第五天 The fifth day	62.7 ± 3.5 bc	58.7 ± 2.7 bc	78.7 ± 3.5 a	72.0 ± 2.3 ab	64.0 ± 2.3 bc	56.0 ± 2.3 c

同一行中小写字母不相同表示具有显著差异($P \leq 0.05$),小写字母相同表示无显著差异($P > 0.05$)。下同。

Different lowercase letters in each row followed means significant difference by the Tukey HSD's method at $P \leq 0.05$ level. The same below.

2.2 不同处理对大豆幼苗建成的几项生物学指标的影响

如表2所示,不同处理对大豆幼苗建成的几项重要指标的影响。上清液处理的大豆幼苗株高显著高于除1 mg·L⁻¹ ALA处理外其它处理;1 mg·L⁻¹ ALA、培养基处理显著高于菌体悬浮液和水处理;菌体悬浮液和水处理间差异不显著。

1和5 mg·L⁻¹ ALA处理的大豆幼苗下胚轴粗显著高于水和培养基处理,1 mg·L⁻¹ ALA、5 mg·L⁻¹ ALA、上清液和菌体悬浮液处理间无显著差异。

上清液处理的大豆幼苗根长显著高于除5 mg·L⁻¹ ALA处理外的其它处理,5 mg·L⁻¹ ALA处理与上清液、上清液与菌体悬浮液处理差异均不显著,菌体悬浮液处理显著高于水、培养基和1 mg·L⁻¹ ALA处理。

上清液处理的大豆幼苗根数显著高于除5 mg·L⁻¹ ALA处理外其它处理;5 mg·L⁻¹ ALA和菌体悬浮液处理显著高于培养基和水处理;5 mg·L⁻¹ ALA、菌体悬浮液、1 mg·L⁻¹ ALA处理间差异不显著;1 mg·L⁻¹ ALA、培养基、水处理间差异不显著。

上清液处理的根体积显著高于其它处理,水和5 mg·L⁻¹ ALA处理显著高于1 mg·L⁻¹ ALA和培养基处理,菌体悬浮液、水和5 mg·L⁻¹ ALA处理间差异不显著,菌体悬浮液处理显著高于1 mg·L⁻¹ ALA处理。

5 mg·L⁻¹ ALA处理的大豆幼苗鲜重显著高于其它处理,上清液处理显著高于菌体悬浮液处理,上清液处理、菌体悬浮液处理和除5 mg·L⁻¹ ALA外的其它处理间无显著差异。

1 mg·L⁻¹ ALA处理的大豆幼苗干重显著高于其它处理,除1 mg·L⁻¹ ALA处理外,其它处理间不存在显著差异。

综上所述,供试产ALA光合细菌培养液的上清液(ALA含量约为0.1~0.2 mg·L⁻¹)、菌体悬浮液处理对陈大豆种子萌发后幼苗的株高和根系生长有显著促进作用,但对大豆陈种子的出苗率和大豆幼苗下胚轴粗、鲜重、干重没有显著促进作用,而5 mg·L⁻¹的ALA溶液却可显著增加大豆陈种子的出苗率、幼苗下胚轴粗和鲜重,1 mg·L⁻¹ ALA可以显著提高大豆幼苗株高、下胚轴粗和干重。

表2 不同处理对大豆幼苗建成的若干指标的影响

Table 2 Effect of different treatments on the several biology index of seedling establishment

	水 Water	上清液 Supernatant	ALA		菌体悬浮液 Cell suspension	培养基 Medium
			5 mg·L ⁻¹	1 mg·L ⁻¹		
地上高度 Shoots height/cm	11.19 ± 1.89 c	16.31 ± 2.46 a	12.75 ± 1.92 b	14.78 ± 1.80 ab	10.26 ± 0.79 c	14.62 ± 1.19 b
下胚轴粗 Hypocotyls diameter/mm	2.25 ± 0.06 b	2.35 ± 0.08 ab	2.42 ± 0.08 a	2.48 ± 0.06 a	2.30 ± 0.09 ab	2.24 ± 0.08 b
根长 Root length/cm	8.85 ± 0.51 c	11.57 ± 0.91 a	10.26 ± 0.81 ab	8.74 ± 0.55 c	10.08 ± 0.64 b	8.75 ± 0.55 c
根数 Number of root per plant	21 ± 3 c	32 ± 2 a	29 ± 2 ab	25 ± 2 bc	26 ± 2 b	21 ± 2 c
根体积 Root volume per plant	0.41 ± 0.05 b	0.49 ± 0.07 a	0.42 ± 0.20 b	0.29 ± 0.11 c	0.38 ± 0.11 bc	0.33 ± 0.14 c
鲜重 Fresh weight per plant	13.31 ± 0.13 bc	14.17 ± 0.32 b	14.54 ± 0.33 a	13.41 ± 0.26 bc	11.41 ± 0.44 c	13.51 ± 0.49 bc
干重 Dry weight per plant	1.25 ± 0.06 b	1.24 ± 0.04 b	1.39 ± 0.04 b	1.72 ± 0.03 a	1.36 ± 0.05 b	1.47 ± 0.02 b

3 讨 论

本研究中,供试产 ALA 光合细菌的培养物对陈大豆种子萌发后幼苗的株高和根系生长有显著促进作用,但对大豆陈种子的成苗率和大豆幼苗下胚轴粗、鲜重、干重没有显著促进作用,其原因可能与光合细菌培养物的上清液和菌体分开布置试验、某些促生长物质浓度因培养物未稀释而浓度较高以及培养物中仅含有 $0.1 \sim 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ALA 有关。Kanto 等^[14]用 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ALA 给老化水稻种子浸种种子的发芽能力和幼苗相对生长率比值与水引发相比显著 ($P \leq 0.05$) 提高,而本试验中 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ALA 溶液可显著提高大豆陈种子的成苗率、幼苗下胚轴粗和鲜重, $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ALA 可显著提高幼苗地上高度、幼苗下胚轴粗和干重。这个结果也间接地反映了供试光合细菌培养物中 ALA 含量可能不足以对幼苗某些指标起到促进作用, Nunkaew 等^[6]研究也表明 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 商业 ALA 预处理盐胁迫下的水稻种子幼苗干重也比沼泽红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas palustris*) TN114 突变株的 10 倍稀释培养物上清(含 $2.57 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ALA) 的高,认为光合细菌培养上清液可能有物质干扰 ALA 发挥作用。含 ALA 较低的供试光合细菌培养物能显著促进根系生长,而 1 和 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ALA 均无此功能,原因可能是光合细菌培养物其他活性物质或菌体起的作用,或者是偏高的 ALA 浓度可能无法起到这种作用。此推测还需要进一步研究。

4 结 论

本试验结果表明,供试光合细菌培养物的上清液较菌体悬液对陈大豆种子萌发后幼苗的株高和根系生长有更明显的促进作用,说明光合细菌的分泌物和胞外代谢产物的作用更明显,这与 Nunkaew 等^[7]的研究结果一致。因此,在以光合细菌为微生物肥料时,一方面,要对所用光合细菌菌种的多种生理活性物质的含量和功能进行深入研究和田间试验,有针对性地合理选用菌种;另一方面,产 ALA 光合细菌培养物中的上清液和菌体要一起施用,并保持菌体活性和保证合适的施用量,避免将培养液的上清液弃去而只留浓缩的菌体作微生物肥料,以保证光合细菌肥料能稳定、持续发挥作用。

参考文献

[1] Akram N A, Ashraf M. Regulation in plant stress tolerance by a potential plant growth regulator, 5-aminolevulinic acid[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2013, 32: 663-679.
[2] Hotta Y, Tanaka T, Takaoka H, et al. Promotive effects of 5-aminolevulinic acid on the yield of several crops [J]. Plant Growth Regulation, 1997, 22: 109-114.

[3] Korkmaz A, Korkmaz Y, Demirkran A R. Enhancing chilling stress tolerance of pepper seedlings by exogenous application of 5-aminolevulinic acid[J]. Environmental and Experimental Botany, 2010, 67: 495-501.
[4] Balestrasse K B, Tomaro M L, Batlle A, et al. The role of 5-aminolevulinic acid in the response to cold stress in soybean plants [J]. Phytochemistry, 2010, 71: 2038-2045.
[5] Yan F, Qu D, Zhao Y Y, et al. Effects of exogenous 5-aminolevulinic acid on PIP1 and NIP aquaporin gene expression in seedlings of cucumber cultivars subjected to salinity stress [J]. Genetics and Molecular Research, 2014, 13(2): 2563-2573.
[6] Nunkaew T, Kantachote D, Kanzakic H, et al. Effects of 5-aminolevulinic acid (ALA)-containing supernatants from selected *Rhodospseudomonas palustris* strains on rice growth under NaCl stress, with mediating effects on chlorophyll, photosynthetic electron transport and antioxidative enzymes [J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2014, 17(1): 19-26.
[7] Nunkaew T, Kantachote D, Nitoda T, et al. Selection of salt tolerant purple nonsulfur bacteria producing 5-aminolevulinic acid (ALA) and reducing methane emissions from microbial rice straw degradation [J]. Applied Soil Ecology, 2014, 86: 113-120.
[8] 张德咏, 刘勇. 光合细菌 PSB-1 对几种蔬菜种子发芽及成苗作用 [J]. 湖南农业科学, 2001(1): 31-32. (Zhang D Y, Liu Y. Effect of photosynthetic bacteria PSB-1 on vegetables' seed germination and seedling [J]. Hunan Agricultural Sciences, 2001(1): 31-32.)
[9] 钱森和, 杨超英, 魏明, 等. 光合细菌对玉米种子萌发及其部分生物学指标影响的研究 [J]. 吉林农业科学, 2012, 37(2): 34-37, 58. (Qian S H, Yang C Y, Wei M, et al. Effect of PSB on corn seeds' germination and some biological characteristics [J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 2012, 37(2): 34-37, 58.)
[10] van der Werf M J, Zeikus J G. 5-aminolevulinic acid production by *E. coli* containing the *Phodobacter sphaeroides hemA* gene [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1990, 62(10): 3560-3566.
[11] 刘秀艳, 徐向阳, 陈蔚青. 光合细菌产生 5-氨基乙酰丙酸 (ALA) 的研究 [J]. 浙江大学学报(理学版), 2002, 29(3): 337-340. (Liu X Y, Xu X Y, Chen W Q. Research on photosynthetic bacteria strain to biological formation of 5-aminolevulinic acid [J]. Journal of Zhejiang University (Science Edition), 2002, 29(3): 336-340.)
[12] 施天生, 王良江, 徐淑莹, 等. PP333 对水稻秧苗根系生长的调节及与地上部生长的相关 [J]. 杭州师范学院学报, 1991(6): 61-64. (Shi T S, Wang L J, Xu S Y, et al. Effect of PP333 on the growth of the root and its correlation with the growth of the above-ground shoot of rice seedlings [J]. Journal of Hangzhou Normal College, 1991(6): 61-64.)
[13] 冷益丰, 张彪, 赵久然, 等. 转基因玉米种子萌发期抗旱性鉴定 [J]. 干旱地区农业研究, 2013, 31(1): 177-182. (Leng Y F, Zhang B, Zhao J R, et al. Identification of drought resistance of transgenic maize during seed germination stage [J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2013, 31(1): 177-182.)
[14] Kanto U, Jutamanee K, Osotsapar Y, et al. Promotive effect of priming with 5-aminolevulinic acid on seed germination capacity, seedling growth and antioxidant enzyme activity in rice subjected to accelerated ageing treatment [J]. Plant Production Science, 2015, 18(4): 443-454.