

满江红鱼腥藻对红萍耐热性的影响

林 沧¹ 渡边岩²

(¹ 福建省农业科学院红萍中心, 福州 350013; ² 国际水稻所, 菲律宾)

摘要: 本文首次报道满江红鱼腥藻对满江红耐热性的影响, 在适宜的温度范围内, 培养于含氮培养液的无藻满江红比共生满江红生长差。满江红的耐热性主要取决于蕨, 部分取决于共生藻。不同种满江红的共生藻作用可能有所不同。小叶满江红的鱼腥藻的抗热性优于细绿萍的鱼腥藻, 改变满江红种间蕨—藻的组合方式, 将在一定程度上影响新的蕨—藻组合体的抗热能力。这一发现为萍藻共生关系的研究以及红萍育种工作开辟新的途径。

关键词: 红萍; 满江红鱼腥藻; 红萍耐热性

Effects of *Anabaena Azollae* on the Tolerance of *Azolla* to High Temperature

Lin Cang¹ and I. Watanabe²

(¹ *Azolla Research Center, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013; ² International Rice Research Institute, Los Baffos, Laguna, Philippines*)

Abstract: The effects of *Anabaena azollae* on the heat tolerance of *Azolla* were conducted. Under optimum temperature regime *anabaena*-free *Azolla* grown in nitrogen-containing medium produced less biomass compared with *Azolla*-*Anabaena* association. It implied that *Anabaena* in the association was not only supply nitrogen to *Azolla* but also provided something else which was required for *Azolla* growth. At 37°C/29°C (day/night) *Azolla filiculoides* grew poor than the corresponding *Anabaena*-free *Azolla* grown in nitrogen-containing medium while *Azolla filiculoides* with the *Anabaena* from *Azolla microphylla* (Af 135), a newly reconstituting *Azolla*, was able to grow much better than the *Azolla* with homologous *Anabaena*. However, *Azolla microphylla* with the *Anabaena* from *Azolla filiculoides* grew and fixed nitrogen less than original one. the growth of *Azolla microphylla* was much better than *Azolla filiculoides* with the *Anabaena* from *Azolla microphylla*. Therefore, the tolerance of *Azolla* to high temperature is determined by both host-fern and symbiont-*Anabaena*.

Key Words: *Azolla*; *Anabaena azollae*; High temperature tolerance

红萍 (*Azolla*) 是一种小型水生蕨类, 其叶腔内共生着固氮的满江红鱼腥藻 (*Anabaena Azollae*)。红萍是稻田的优质绿肥^[1,2,6], 也是很好的饲料和饵料。弄清红萍耐热性是取决于蕨或是共生藻, 或两者兼有, 则是培育耐热性强的红萍新品种的前提之一, 由于研究材料的限制, 至今未见有关的报道。近年来, 我们采用去顶孢子果培育出生长正常的无藻萍^[5], 并利用囊群盖移植的方法成功地实现萍藻重组^[3], 从而为弄清这个问题提供了可能。本文首次报道满

江红鱼腥藻对萍藻共生体耐热性的影响。这一发现将为萍藻共生关系的研究以及红萍育种开辟新的途径。

表1 参试红萍

Tab. 1. *Azolla* strains & characters of their*Anabaena* symbiosis

品种名称 Species or strains	含藻否 With or without <i>Anabaena</i>	蕨的来源 Source of fern	藻的来源 Source of <i>Anabaena</i>
细绿萍 <i>Azolla filiculoides</i>			
Af 134	+	Af 134	Af 134
Af 135(Afma)	+	Af 134	Am 431
Af 136	-	Af 134	-
Af 137(Affa)	+	Af 134	Af 134
小叶萍 <i>Azolla microphylla</i>			
Am 431	+	Am 431	Am 431
Am 432(Amma)	+	Am 431	Am 431
Am 433(Amfa)	+	Am 431	Af 134
Am 434	-	Am 431	-

注: Af=细绿萍的蕨 Am=小叶萍的蕨

fa=细绿萍的藻 ma=小叶萍的藻

Affa=细绿萍的蕨和细绿萍的藻重组而成的重组细绿萍

Amma=小叶萍的蕨和小叶萍的藻重组而成的重组小叶萍

Afma=由细绿萍的蕨和小叶萍的藻重组而成的重组细绿萍

Amfa=由小叶萍的蕨和细绿萍的藻重组而成的重组小叶萍

Af= *Azolla filiculoides*; Am= *Azolla microphylla*;fa= *Anabaena* from *A. filiculoides* (*A. fil.*);ma= *Anabaena* from *Azolla microphylla* (*A. micro.*);Affa= *Azolla filiculoides* with *Anabaena* from *A. fil.*Amma= *Azolla microphylla* with *Anabaena* from *A. micro.*Afma= *Azolla filiculoides* with *Anabaena* from *A. micro.*Amfa= *Azolla microphylla* with *Anabaena* from *A. fil.*

1 材料与方法

1.1 试验材料 试验所用的无藻萍采用去顶孢子果方法获得^[5]。正常含藻的细绿萍 (*Azolla filiculoides*)，小叶萍 (*Azolla microphylla*) 均来自孢子苗。经过萍藻交换的重组萍系采用囊群盖移植的方法获得^[3]。重组萍包括品种内和种间重组。品种内的重组萍有①Affa 即 Af137 (细绿萍)，②Amma 即 Am432 (小叶萍)。种间的重组萍有: ①Afma (Af135, Af138) 系有细绿萍的蕨体与小叶萍的鱼腥藻重组而成; Amfa (Am433) 系小叶萍的蕨体与细绿萍的藻重组而成 (详见表 1)。所有参试材料均经两周预培，生长正常。试验用直径 10 cm 的开口棕色玻瓶，每瓶放萍量 0.75 g，即 95 g/m²，450 ml 培养液。有藻萍的培养液为国际水稻所通用的无氮液^[9]，而无藻萍则培养在加入 80 ppm 硝酸铵的同种培养液中。

1.2 试验的方法 试验的全过程在人工气候箱内进行，每天光照 12 hr，光强 15000 lx，相对湿度 75%。为弄清萍藻共生体中萍与藻各自对温度的反应，试验分两组进行。

第一组试验旨在弄清共生体中蕨对温度

的反应。参试的材料有耐热性强的小叶萍和耐热性差的细绿萍以及它们不含鱼腥藻的无藻萍。为克服高温抑制共生藻的固氮酶的活性，从而引起萍体的氮饥饿，将含藻萍分成加氮 (在培养液中加入 80 ppm 硝酸铵) 和不加氮处理。这一组共 6 个处理，每处理 3 个重复，每一重复均放鲜萍 0.75g。处理温度为 26°C/18°C (日/夜) 和 37°C/29°C (日/夜)。每一温度处理历时 4 周，每周换 1 次培养液，在换液的同时，测定各处理的生物量以及固氮酶活性。第二组处理，旨在弄清鱼腥藻对共生体耐热性的影响。参试材料除与第一组相同外，还加上重组萍，处理的温度为昼温 37°C，夜温 29°C，历时 4 周，其它同第一组。

1.3 检测内容与方法

1.3.1 生物量的测定：萍体经洗净后，置铺在有多层吸水纸的铁丝网上，半小时后称重，每

周一次，4次收获量的总和即总的生物量。

1.3.2 固氮酶活性测定：采用乙炔还原法，即取0.5g鲜萍，置于含5ml培养液的50ml三角瓶中，橡皮塞密封。用乙炔置换瓶中20%空气。样品在25℃，光15000lx下反应30min，抽取气体。气体样品的分析，采用带有离子检测计的日产HITACHI164T型气相色谱仪检测，色谱仪用Porapak N柱，柱温60℃，氮为载气，每分钟流速30mL，注入的气体样品量为1mL。

1.3.3 萍体含氮量的测定：用凯氏定氮法。

2 结果与讨论

一般认为，一种植物的抗热性是由该种植物的基因控制的。不同种植物在抗热性上的差异可归因于基因型的不同。然而红萍是蕨-藻共生体，蕨体或是藻体的抗热能力将在多大程度上影响共生体的抗热性呢？现把试验结果分析如下：

2.1 蕨体对共生体抗热性的影响 表2表明，在适宜红萍生长的温度范围内（28℃/18℃），不同萍种及相应的无藻萍，在生物量、萍体含氮量方面表现出相同的趋势。就生物量而言，不同处理的顺序是：无氮培养液中的有藻萍>有氮培养液中的有藻萍>有氮培养液中的无藻萍；就萍体含氮量而言，顺序是：有氮培养液中的有藻萍>无氮培养液中的有藻萍>有氮培养液中的无藻萍。总的的趋势是不论细绿萍或是小叶萍，其有藻萍的生物量与萍体含氮量均高于其相应的无藻萍。

Peters（1981）曾报道，在含氮培养液中，有藻萍生长优于无藻萍^[7]。由于他采用的无藻萍是用抗菌素处理有藻萍而获得的，所以它把无藻萍生长较差归因于抗菌素的作用。本试验所用的无藻萍来源于孢子果，生长正常，它与其相应的共生体的差别仅仅是鱼腥藻的有无。对这一现象我们的解释是：在含80ppm硝酸盐培养液中生长的有藻萍，除了通过根系吸收外，相当一部分氮素来自共生藻的固氮作用，其结合态氮的来源显然比无藻萍更为丰裕。这从萍体的含氮量的差异上得到反映（表2）。另一方面，我们推测，共生藻除了向宿主提供结合态氮外，还可能向宿主提供某种蕨体必须而本身又无法合成的物质。从表2还可以看出，在培养液中加入80ppm硝酸铵后，鱼腥藻的固氮活性受到抑制，这一结果与Ito与Watanabe（1983）的报道是一致的^[4]。在日温37℃、夜温29℃、即日均温33℃的情况下，不同萍种的生物量、萍体含氮量与固氮酶活性比在适宜温度（26℃/18℃）条件下有不同程度的下降，耐热性差的细绿萍各处理下降尤其明显，而耐热性较强的小叶萍则表现出相对优势。从表2可以看出，生长在无氮培养液中的细绿萍两周后基本停止生长，在试验结束时，固氮酶活性几乎全部丧失，萍体含氮量仅有1.8%。而在同样条件下生长的小叶萍仍继续增殖，萍体含氮量达4.2%。无藻的小叶萍的生物量是无藻的细绿萍的1.38—1.45倍。

红萍体内共生藻在不同温度下固氮酶活性的高低，在一定程度上反映了该种藻抗热能力^[8]。本试验表明，在高温条件下，两种共生藻的固氮酶活性发生很大变化，细绿萍中鱼腥藻的固氮酶活性为零，而小叶萍中鱼腥藻则仍有固氮酶活性。

由此看出，蕨是决定共生体抗热性的重要因素。小叶萍（即小叶萍的蕨-藻共生体）抗热性所以优于细绿萍，是由于小叶萍的蕨体本身的抗热性优于细绿萍的蕨体。

表 2 温度对红萍生长固氮酶活性及其含氮量的影响

Tab. 2. Effects of temperature on the growth, acetylene reduction

activity and nitrogen content of *Azolla*

处 理 Treatments	放萍量 Inoculum	鲜 重 (g/m ²) Fresh weight		固氮酶活性* ARA 微克分子乙炔 每克鲜萍每小时 micro-moles C ₂ H ₄ g. F. W. h.	N %
		14 天 14days	28 天 28days		
26℃/18℃ (日/夜) (day/night)					
<i>Af</i> 134—N	95	805	1830	4.6	5.18
<i>Af</i> 134+N	95	760	1705	1.9	6.18
<i>Af</i> 136+N	95	770	1430	0	4.10
<i>Am</i> 431—N	95	940	2100	4.1	5.41
<i>Am</i> 431+N	95	900	2070	3.2	6.35
<i>Am</i> 434+N	95	710	1300	0	4.28
37℃/29℃ (日/夜) (day/night)					
<i>Af</i> 134—N	95	420	440	0	1.82
<i>Af</i> 134+N	95	560	880	0	4.46
<i>Af</i> 136+N	95	480	820	0	4.50
<i>Am</i> 431—N	95	800	1380	0.38	4.20
<i>Am</i> 431+N	95	815	1330	0.24	4.59
<i>Am</i> 434+N	95	680	1135	0	4.41

注: *Af* 134、*Am* 431 为有藻细绿萍和小叶萍; *Af* 136、*Am* 434 为无藻萍。 * 固氮酶活性测定是在培养的第 28 天时进行。Note: *Af* 134 and *Am* 431 are the symbiotic *A. filiculoides* and *A. microphylla* respectively. *Af* 136 and *Am* 434 are *Anabaena*-free *Azolla*. * ARA was measured at 28 days.

2.2 藻对共生体抗热性的影响 表 2 提供的试验结果也表明, 共生藻对共生体的抗热性有着一定的作用。如细绿萍在高温和无氮条件下, 因其鱼腥藻完全丧失固氮能力, 萍体含氮量仅有 1.82%, 而在培养液中加入 80ppm 硝酸铵的处理中, 萍体含氮量猛增到 4.46%, 生物量也翻了一番, 足见细绿萍在高温条件下生长不良与其共生藻不耐高温有关。相反, 小叶萍较耐高温则可能与其共生藻保持固氮能力也有某种关系。

第二组的试验结果(表 3)与第一组试验结果有相似之处, 即在高温条件下, 含同源鱼腥藻的细绿萍不论是对照母萍(*Af* 134), 还是重组萍(*Af* 137)生长都严重受阻, 在试验结束时, 固氮酶活性几乎等于零。这类重组萍含氮量也仅 2.00% 或更低。但同样是细绿萍, 如果用小叶萍的鱼腥藻进行重组得到的细绿萍(*Af* 135), 经过 1 个月的高温考验, 每克鲜萍每小时的固氮酶活性仍有 0.5 微克分子乙炔/小时, 生物量比同源鱼腥藻重组的细绿萍高 1 倍以上, 在细绿萍各处理中其生物量、固氮酶活性和体内含氮量是最高的, 由此可见, 小叶萍鱼腥藻对细绿萍蕨体的促进作用(表 3)。

与此相反, 同源鱼腥藻重组的小叶萍(*Am* 432)在高温条件下, 表现与其母萍相似, 虽生长受阻, 但仍可以增殖, 萍体含氮量正常。然而由于细绿萍的鱼腥藻与小叶萍的无藻萍重组的小叶萍(*Am* 433)在高温条件下生长严重受阻, 固氮酶活性几乎丧失, 其状与细绿萍相仿。看来, 这种差异很大程度上与体内鱼腥藻的不同有关。细绿萍的耐热能力由于引入小叶萍鱼

腥藻而得到了加强，而小叶萍的抗热性由于引入细绿萍的鱼腥藻而明显减弱。

表3 温度对红萍生长固氮酶活性及其含氮量的影响

Tab. 3. Effects of high temperature on the growth, acetylene reduction activity and nitrogen content of *Azolla*

处理 Treatments	放萍量 Inoculum	鲜重 (g/m ²)		固氮酶活性 ARA		N%	
		Fresh weight		微克分子乙烯 每克鲜萍·每小时			
		14天 14 days	28天 28 days	14天 14 days	28天 28 days		
细绿萍 <i>Azolla filiculoides</i>							
<i>Af</i> 134-N	95	283.3	339.8	...	0.01	1.71	
<i>Af</i> 134+N	95	315.9	589.6	0.01	0.01	4.98	
<i>Af</i> 135-N	95	315.9	749.5	1.2	0.53	5.09	
<i>Af</i> 135+N	95	369.6	719.5	0.88	0.33	5.69	
<i>Af</i> 137-N	95	292.5	339.9	0.01	0.01	2.03	
<i>Af</i> 137+N	95	354.2	558.9	0.01	0.01	4.49	
<i>Af</i> 136+N	95	310.1	638.7	0	0	4.8	
小叶萍 <i>Azolla microphylla</i>							
<i>Am</i> 431-N	95	772.2	1516.8	1.37	1.12	4.64	
<i>Am</i> 431+N	95	758.9	1360.8	0.84	0.58	5.00	
<i>Am</i> 432-N	95	859.3	1759.8	1.74	1.18	4.67	
<i>Am</i> 432+N	95	792.9	1458.2	0.59	0.55	4.72	
<i>Am</i> 433-N	95	490.5	504.2	...	0.01	1.28	
<i>Am</i> 433+N	95	678.9	983.9	0.01	0.01	3.63	
<i>Am</i> 434+N	95	665.6	924.1	0	0	4.19	

注: At 37°C/29°C (日/夜) (day/night)

上述事实表明, 红萍体内的鱼腥藻对共生体的抗热性有一定的作用, 不同萍种的共生藻抗热性可能不同, 小叶萍体内的鱼腥藻耐热性优于细绿萍体内的鱼腥藻。

那么, 蕨、藻双方对共生体抗热能力的影响以哪一方更重要? 或作用更大呢? 表3表明细绿萍 (*Af*135) 由于引入小叶萍鱼腥藻而得到改善, 但它在长期高温条件下, 仍不免受到严重伤害, 以致生物量与固氮酶活性明显低于小叶萍自身的重组萍 (*Am*432)。重组细绿萍 (*Af*135) 和重组小叶萍 (*Am*432), 体内均含有相同的小叶萍鱼腥藻。如果鱼腥藻在共生体的抗热性中起决定性的作用, 那么两者在高温条件下表现应当相似, 即生物量与固氮酶活性相近。但实际情况并非如此。如前所述, 小叶萍鱼腥藻在一定程度上改善了细绿萍的耐热性, 但终因其宿主的耐热性差而未能根本改观。换句话说, 决定共生体耐热性强弱的主要因素是蕨体而不是藻。导入耐热的鱼腥藻只能在一定程度上改善共生体的抗热能力, 但未能从根本上改变共生体对高温反应的基本属性。

2.3 蕨-藻相互作用对共生体抗热性的影响 如前所述, 红萍是真核蕨类与原核蓝藻的共生体。这种共生体不是蕨藻之间的简单、机械的凑合, 而是一种有机的复合体。它们之间存在着许多迄今还未弄清的复杂的物质交换与能量代谢关系。因此, 共生体的抗热性除了取决于

蕨体与藻体外, 还可能与蕨藻双方的相互作用方式及其结果有关。有意思的是, 细绿萍的无藻萍引入了小叶萍的鱼腥藻后, 其体内的氮代谢似乎得到了改善, 反映在这种重组萍 (*Af135+N*) 在结合氮培养条件下的固氮酶活性、萍体含氮量和生物量均显著高于在同样条件下生长的细绿萍无藻萍 (*Af136+N*), 细绿萍重组萍 (*Af137+N*) 及其母萍 (*Af134+N*)。这似乎表明小叶萍的鱼腥藻与细绿萍的无藻萍有较强的亲和力。然而, 小叶萍的无藻萍引入细绿萍的内生藻后, 情况却有所不同。表3表明, *Am433+N* 的处理除了生物量略高于 *Am434+N* 的处理外, 其萍体含氮量却明显低于后者, 其共生藻(即引入的细绿萍共生藻)固氮活性也甚微, 对整个重组体的氮素要求几乎没有多少贡献。这似乎意味着, 小叶萍无藻萍引入细绿萍的共生藻后, 蕨藻双方在氮代谢方面还不如细绿萍无藻萍与小叶萍共生藻双方那么协调, 尤其在高温条件下, 由于细绿萍共生藻本身抗热性差, 未能象小叶萍共生藻那样发挥其固氮功能, 进而与宿主进行正常的物质交换。当然, 这些设想还需要作进一步研究加以肯定或否定。

综上所述, 我们认为蕨-藻共生体的红萍, 其抗热性强弱取决于蕨、藻双方。耐热性差的细绿萍其蕨体和内生藻的抗热能力均较差, 耐热性强的小叶萍, 其蕨和藻的抗热能力均较强。比较起来, 蕨体对共生体抗热能力的贡献可能大于藻体, 但抗热性较强的藻体对共生体的抗热性则有加强作用。所以要取得较理想的耐热萍种, 首先必需通过杂交育种, 培育出耐热性较强的蕨, 后再采用蕨、藻重组技术, 引入耐热性的藻。

参 考 文 献

- [1] 刘中柱, 魏文雄等. 1982. 红萍富钾生理研究. 1. 红萍对水体中钾的吸收. 中国农业科学, 4: 82—87
- [2] 刘中柱, 林沧等. 1979. 红萍若干生理特性初步研究. 中国农业科学, 2: 63—67
- [3] 林沧, 刘中柱等. 1988. 人工萍藻共生体的重建. 中国科学 B辑, 7: 700—808
- [4] Ito O. and I. Watanabe. 1983. The relationship between combined nitrogen uptakes and nitrogen fixation in *Azolla-Anabaena* Symbiosis. *New Phytol*, 95: 647—654
- [5] Lin Cang and I. Watanabe. 1988. A New method for obtaining Anabaena-free *Azolla*. *New Phytol*, 108: 341—344
- [6] Liu Chung-chu. 1979. Use of *Azolla* in rice production in China. In Nitrogen and Rice Research Institute: 375—394
- [7] Peters G. A. et al. 1981. Photosynthesis and nitrogen fixation in *Azolla-Anabaena* Symbiosis. In Current perspective in nitrogen fixation (Gibson H. A. and Newton W. E. eds.) Australian Acad. Sci. Canberra: 121—124
- [8] Tung H. F. and I. Watanabe. 1983. Differential response of *Azolla* anabaena associations to high temperature and minus phosphorus treatments. *New Phytol*, 93: 423—431
- [9] Watanabe I. et al. 1977 Utilization of the *Azolla-Anabaena* complex as a nitrogen fertilizer for rice. IRRI Res. paper series, International Rice Research Institute, 11: 1—6