

钙对蓝藻固氮受氯化钠胁迫的缓解效应及其与生理条件的关系

陈因 方大惟

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032)

摘要

氯化钠胁迫导致蓝藻固氮活性的下降, 可因加入适当浓度的氯化钠而有一定程度的缓解。在光合作用受抑(暗处理或添加光合抑制剂)、厌氧(Ar 或 N₂ 中)和有分子氧的情况下, 此种缓解作用减弱。光合作用、需氧代谢(通气)和羟化反应(同时供给氢和氧)正常进行以及碳架(添加外源蔗糖或提高 CO₂ 浓度)供应良好时, 钙对氯化钠胁迫的缓解效应增大。改善合成固氮酶的物质基础供应(同时供应 CO₂ 和 N₂) 对此也有一定的正效应。

关键词: 鱼腥藻; 钙的缓解作用; 固氮; 氯化钠胁迫; 生理条件

制约环境胁迫蓝藻固氮的因子很多。我们在前文中已阐明, 高温、盐渍和渗透胁迫导致蓝藻固氮作用减弱的程度, 常取决于蓝藻体内能量、固氮酶蛋白合成所需物质基础供应和脯氨酸的积累水平, 以及诸多生理条件的合适与否^[2-7]。为了消除或减轻盐渍对作物的伤害, 通常采用钙盐浸种或在介质中加入适量钙盐的方法, 获得了一定的效果, 如减轻或缓解盐胁迫对大麦和黑小麦生长的抑制^[4], 提高了出苗率; 增加银合欢(*Leucaena leucocephala*)的植株高度及叶片和根瘤数目, 提高固氮能力^[11], 从而促进了生长。但是, 钙对 NaCl 胁迫下的蓝藻固氮是否也有此效用, 尚未见报道。如能对这方面作出阐明, 则不仅能加深对逆境胁迫下蓝藻(甚至是其它固氮生物)固氮作用及其调节机制的认识, 而且对生产实践中克服逆境影响, 提高生物固氮效率, 增加肥效, 也具有一定的意义。

材料和方法

实验材料为鱼腥藻 *Anabaena* 7120。按前文方法^[1]培养和收集。取生长 5-7d 的藻液, 经 5000xg 和重蒸馏水数度离心洗涤并重新悬浮后, 分别放到盛有以 Allen-Arnon 无营养液配制的, NaCl 浓度为 7.5×10^{-2} mol/L 的溶液(对照为正常营养液, 其中 NaCl 浓度为 5×10^{-3} mol/L)的 8-10ml 血清瓶中, 同时加入不同浓度的 CaCl₂ 溶液。根据实验方案有时还要加入一些物质, 或进行处理。然后盖上橡皮塞, 抽气, 再按 9:1 的比例注入 Ar 和 C₂H₂, 转放到 30 °C 水浴中照光震荡, 反应终止后以气相层析仪测定固氮活性。其它指标的测定也按前文^[1]进行。

实验结果

一、钙对蓝藻固氮受 NaCl 胁迫的缓解效应

和前文结果^[3-9]一样, 蓝藻固氮活性随着营养液中 NaCl 浓度增高而下降。如果适当提高营养

液中的 CaCl_2 浓度, 则受 NaCl 胁迫的蓝藻固氮活性虽然不能完全恢复到正常水平, 但比不加 CaCl_2 的有明显的提高(表 1)。这显示 CaCl_2 有缓解 NaCl 对蓝藻固氮胁迫的作用。不过, 在我们所使用的 NaCl 和 CaCl_2 浓度范围内, 当两者浓度过高时, 此种缓解效应即不明显, 或甚至消失(表 1)。

表 1 氯化钙对氯化钠胁迫下蓝藻固氮活性的影响

Table 1 The effect of CaCl_2 on nitrogen-fixing activity of *Anabaena* under NaCl stress

NaCl (mol/L)	CaCl ₂ (mol/L)	固氮活性 Nitrogen-fixing activity		
		nmol C ₂ H ₄ h ⁻¹ ml ⁻¹ algal suspension	(%)	
5 × 10 ⁻³	0	185.3	100.0	
	5 × 10 ⁻²	156.2	84.3	
5 × 10 ⁻²	1 × 10 ⁻⁵	166.4	89.8	
	2.5 × 10 ⁻⁵	175.4	94.7	
	5 × 10 ⁻⁴	161.9	87.4	
	1.5 × 10 ⁻³	152.5	82.2	
	2.5 × 10 ⁻³	136.2	73.5	
	1 × 10 ⁻¹	0	100.2	54.1
	1 × 10 ⁻¹	1 × 10 ⁻⁵	111.7	60.3
1 × 10 ⁻¹	2.5 × 10 ⁻⁵	131.1	70.8	
	5 × 10 ⁻⁴	92.7	50.0	
	1.5 × 10 ⁻³	77.7	41.9	
	2.5 × 10 ⁻³	73.3	39.6	

二、钙的缓解效应与固氮所需能量的关系

CaCl_2 对受 NaCl 胁迫的蓝藻固氮的缓解效应大小, 明显取决于固氮所需能量和还原力的来源及其供应情况。以下的实验表明:

1、在作为蓝藻固氮主要能量和还原力来源的光合作用不能进行或受抑制的条件下, 如添加光合抑制剂或进行暗处理时, 钙对 NaCl 胁迫蓝藻固氮的缓解作用则小或消失(表 2、3)。这说明, 为了增强钙的缓解效应, 设法提高光合作用是重要的。

表 2 光合抑制剂存在时氯化钙对氯化钠胁迫下蓝藻固氮活性的影响

Table 2 The effect of CaCl_2 on nitrogen-fixing activity of *Anabaena* under NaCl stress in presence of photosynthetic inhibitors

NaCl (mol/L)	CaCl ₂ (2.5 × 10 ⁻⁵ mol/L)	抑制剂 Inhibitor (1 × 10 ⁻⁴ mol/L)	相对固氮活性 (%) Relative nitrogen-fixing activity
5 × 10 ⁻³	-	-	100.0
7.5 × 10 ⁻²	-	-	55.7
7.5 × 10 ⁻²	+	-	65.7
7.5 × 10 ⁻²	+	DNP	19.4
7.5 × 10 ⁻²	+	CCCP	24.1

+ 加入, added; - 不加入, no addition. 下列各表与此相同, The same in following tables.

表3 光或暗下氯化钙对氯化钠胁迫下蓝藻固氮活性的影响

Table 3 The effect of CaCl_2 on nitrogen-fixing activity of *Anabaena* under NaCl stress in the light or the dark

NaCl (mol/L)	CaCl_2 (2.5×10^{-5} mol/L)	相对固氮活性 (%) Relative nitrogen-fixing activity
Light		
5×10^{-3}	-	100.0
7.5×10^{-2}	-	58.8
7.5×10^{-2}	+	82.0
Dark		
7.5×10^{-2}	-	5.5
7.5×10^{-2}	+	5.8

2、蓝藻 *Anabaena* 7120 是需氧的固氮生物，有氧吸收代谢中产生的能量在钙缓解 NaCl 胁迫蓝藻固氮中也有良好作用。厌氧(Ar中)下，加钙没有缓解作用(表4)。

表4 厌氧情况下氯化钙对受氯化钠胁迫蓝藻固氮活性的影响

Table 4 The effect of CaCl_2 on nitrogen-fixing activity of *Anabaena* under NaCl stress and anaerobic condition

NaCl (mol/L)	CaCl_2 (2.5×10^{-5} mol/L)	相对固氮活性 (%) Relative nitrogen-fixing activity	
		空气中 In air	氮气中 In Ar
5×10^{-3}	-	100.0	
7.5×10^{-2}	-	57.6	27.0
7.5×10^{-2}	+	73.9	26.9

表5 氢和氧加合时氯化钙对氯化钠胁迫下蓝藻固氮活性的影响

Table 5 The effect of CaCl_2 on nitrogen-fixing activity of *Anabaena* in addition of H_2 together with O_2 under NaCl stress

NaCl (mol/L)	CaCl_2 (2.5×10^{-5} mol/L)	H_2 (20%)	O_2 (20%)	相对固氮活性 (%) Relative nitrogen-fixing activity
5×10^{-3}	-	-	-	100.0
7.5×10^{-2}	-	-	-	53.9
7.5×10^{-2}	-	-	+	17.4
7.5×10^{-2}	+	-	+	17.6
7.5×10^{-2}	-	+	+	73.8
7.5×10^{-2}	+	+	+	86.1

3、通过羟化反应利用氢获取的能量虽然是补充性的，但在钙缓解 NaCl 胁迫蓝藻固氮中同样

有促进作用。同时供给 H_2 和 O_2 时, 钙的缓解效应明显增大, 而单加 O_2 的固氮活性则减小(表 5)。

三、碳源和分子氮在钙缓解效应中的作用

钙缓解 NaCl 胁迫蓝藻固氮效应的强弱也受作为还原剂库源、或合成固氮酶蛋白质基础的碳源和分子氮的制约。这表现在:

1、 N_2 中, 钙缓解 NaCl 胁迫蓝藻固氮的效应受到削弱, CO_2 存在时则有所增强(表 6、7)。

表 6 CO_2 和 N_2 加合时氯化钙对氯化钠胁迫下蓝藻固氮活性的影响

Table 6 The effect of $CaCl_2$ on nitrogen-fixing activity of *Anabaena* preincubated in addition of CO_2 with N_2 under NaCl stress

NaCl (mol/L)	$CaCl_2$ (2.5×10^{-5} mol/L)	CO_2 (5%)	N_2 (40%)	相对固氮活性 (%) Relative nitrogen-fixing activity
5×10^{-3}	-	-	-	100.0
7.5×10^{-2}	-	-	-	58.7
7.5×10^{-2}	+	-	-	62.2
7.5×10^{-2}	-	-	+	28.2
7.5×10^{-2}	+	-	+	21.3
7.5×10^{-2}	-	+	+	123.1
7.5×10^{-2}	+	+	+	130.3

表 7 氯化钙对氯化钠胁迫下预经二氧化碳保温蓝藻固氮活性的影响

Table 7 The effect of $CaCl_2$ on nitrogen-fixing activity of *Anabaena* preincubated in CO_2 under NaCl stress

NaCl (mol/L)	$CaCl_2$ (2.5×10^{-5} mol/L)	相对固氮活性 (%) Relative nitrogen-fixing activity	
		CO_2 预保温 (5%) Preincubated in CO_2	不加 CO_2 预保温 Preincubated in air
5×10^{-3}	-		100.0
7.5×10^{-2}	-	207.3	51.7
7.5×10^{-2}	+	310.3	64.3

2、蔗糖也影响钙对 NaCl 胁迫蓝藻固氮的缓解效应。在 NaCl 胁迫下, 同时添加钙盐和外源蔗糖后, 钙的缓解效应进一步增强(表 8)。

讨论

根据高等植物中的研究结果, 已经确认钙对盐胁迫下的植物有如下作用: (1) 缓解

表8 外源蔗糖存在时氯化钙对氯化钠胁迫下蓝藻固氮活性的影响

Table 8 The effect of CaCl_2 on nitrogen-fixing activity of *Anabaena* in presence of exogenous sucrose under NaCl stress

NaCl (mol/L)	CaCl_2 (2.5×10^{-5} mol/L)	蔗糖 Sucrose (0.5%)	相对固氮活性 (%) Relative nitrogen-fixing activity
5×10^{-3}	-	-	100.0
7.5×10^{-2}	-	-	57.4
7.5×10^{-2}	+	-	67.5
7.5×10^{-2}	-	+	100.6
7.5×10^{-2}	+	+	127.0

盐对植物生长的抑制,可以增加豆科植物(如银合欢)叶片和根瘤数目^[11]; (2)提高某些酶(如大麦种子中的 α -淀粉酶和银合欢的固氮酶)活性,使种子萌发加快,固氮效率提高; (3)降低植物组织和器官(如甜橙幼苗的叶)中 Na^+ 和 Cl^- 的含量,从而促进生长^[15]; (4)从细胞水平来说,能防止质膜损伤和渗漏,增加膜的透性^[9,11],从而避免由于盐胁迫下 Na^+ 对内膜系统上 Ca^{++} 的取代所引起伤害^[12,13]。还有人认为,在盐胁迫下,植物正常生长所需的钙量会变得不足,增加钙可以拮抗对植物生长有害的元素^[10],从而降低盐胁迫导致的伤害程度。对盐胁迫下的蓝藻固氮来说,我们虽然未对上述看法逐一作出检测,但本文在营养液中维持一定浓度的钙可以削弱NaCl对蓝藻固氮胁迫的结果表明,钙对NaCl胁迫的缓解作用还可以延伸到作为蓝藻整体生理生化活动中一部分的固氮过程。这对研究逆境条件下蓝藻和其它固氮生物的固氮作用及其调节机制也是一种启迪。

钙对NaCl胁迫下蓝藻固氮作用缓解效应的大小,除了取决于钙本身的浓度(钙浓度低时其效用不显著,过高则抑制固氮)以外,蓝藻所处的生理环境和状态亦很重要。本文结果显示,内在状态与蓝藻通过各种途径获取的能量和还原力水平有关。例如添加光合抑制剂或进行暗处理致使光合作用受抑制或不能进行。给以厌氧处理阻断需氧呼吸的进行、或终止通过呼吸途径吸氢的羟化反应时,钙的缓解效应均明显减弱,反之则增强。就外界条件而言,固氮酶蛋白合成中所需的物质供应,以及与蓝藻生理活动顺利进行有关的生理条件(如提高空气中 CO_2 浓度、 CO_2 和 N_2 配合施用、良好的通气状况等)得到保证或改善时,钙的缓解效应更加明显,反之,不仅不能促进,甚至会产生协同性抑制。这些说明,研究钙缓解NaCl对蓝藻固氮胁迫时,应注意内外在生理条件的影响。

钙可缓解NaCl胁迫蓝藻固氮的研究在生产实践中也是有意义的。从本文结果来看,盐渍胁迫导致蓝藻固氮活性降低,并非不可克服。为了提高盐渍地区蓝藻的固氮效率,除了通过技术措施改善固氮所需的生理环境之外,适当增施一些钙肥,以缓解和减轻盐渍对蓝藻生长及其固氮的危害,从而增加蓝藻(广义上还应包括其它固氮生物)向大田输送氮素的能力和提高了农作物产量。这是一个值得注意和考虑的途径。

参考文献

- 1 陈 因, 方大惟. 蓝藻 *Anabaena* 7120 固氮的光调节. 植物生理学报, 1983; 9: 51-58
- 2 陈 因, 方大惟. 短期高温对蓝藻 *Anabaena* 7120 固氮酶活性的影响. 核农学报, 1990; 4: 219-224
- 3 陈 因, 方大惟. 氯化钠影响下蓝藻 *Anabaena* 7120 的固氮活性和去铵阻抑. 核农学报, 1991; 5: 239-245
- 4 陈 因, 方大惟. 外源脯氨酸对受氯化钠胁迫蓝藻固氮活性的影响. 植物生理学通讯, 1992; 28: 254-258
- 5 陈 因, 方大惟. 外源脯氨酸对受短期高温胁迫蓝藻固氮活性的影响. 南京农业大学学报, 1993; 16: 42-46
- 6 陈 因, 方大惟. 去氯化钠胁迫后的蓝藻固氮去铵阻抑. 植物生理学通讯, 1993; 29: 22-26
- 7 陈 因, 方大惟. 渗透胁迫下蓝藻固氮的氧稳定性研究. 植物生理学通讯, 1994; 30(1): 18-21
- 8 章文华, 刘友良. 钙对大麦幼苗盐胁迫的缓解效应. 植物生理学通讯, 1992; 28: 176-179
- 9 杨根平, 高爱丽, 荆家海. 钙与渗透胁迫下大豆细胞透性的关系. 植物生理学通讯, 1993; 29: 179-181
- 10 Bernstein L. Effects of salinity and sodicity on plant growth. Ann Rev Phytopath, 1975; 13: 295-312
- 11 Hepler P K, Wagne R. Calcium and plant development. Ann Rev Plant Physiol, 1985; 36: 397-439
- 12 Lynch J, Cramer G R, Lauchli A. Salinity reduces membrane-associated calcium in corn root protoplasts. Plant Physiol, 1987; 83: 390-394
- 13 Lynch J, Lauchli A. Salinity affects intracellular calcium in corn root protoplasts. Plant Physiol, 1988; 87: 351-356
- 14 Norlyn J D, Emannel E. Variability in salt tolerance of four triticale lines at germination and emergence. Crop Sci, 1984; 24: 1090-1092
- 15 Zekri M, Parsons L R. Calcium influences growth and leaf mineral concentration of citrus under saline conditions. Hortsci, 1990; 25: 784-786

THE MITIGATIVE EFFECT OF CALCIUM ON NITROGEN FIXATION OF BLUE-GREEN ALGAE *ANABAENA* 7120 UNDER SODIUM CHLORIDE STRESS AND ITS RELATION TO PHYSIOLOGICAL CONDITIONS

Chen Yin Fang Dawei

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai 200032)

Abstract

The paper deals with the mitigative effect of calcium on NaCl stress upon nitrogen fixation of *Anabaena* 7120 under different physiological conditions. The following observations have been made:

1. The nitrogen-fixing activity of *Anabaena* under NaCl stress was mitigated with the increase of calcium chloride in culture solution. Over 5×10^{-4} mol/L CaCl_2 , there was a marked weakness in mitigative effect of calcium on nitrogen-fixing activity of *Anabaena* under NaCl stress.

2. Under dark condition or in the presence of photosynthetic inhibitors, such as DNP and CCCP, the mitigative effect of calcium on NaCl stress upon nitrogen fixation by *Anabaena* was diminished, but enhancing effect occurred when exogenous sucrose was added to the culture solution.

3. The mitigative effect of calcium on NaCl stress upon nitrogen fixation by *Anabaena* under anaerobic condition (in Ar or N_2) was lesser than that under aerobic condition.

4. The addition of H_2 together with O_2 could accelerated nitrogen-fixing activity of *Anabaena* under NaCl stress, while further depress was observed by adding oxygen alone.

5. The mitigative effect of calcium on NaCl stress upon nitrogen fixation by *Anabaena* was slightly enhanced to a certain degree by the preincubation of 5% CO_2 or of 5% CO_2 with 40% N_2 respectively, but was abated by the addition of N_2 alone.

The mitigative effect of calcium on NaCl stress upon nitrogen fixation by *Anabaena* and its regulatory mechanism were discussed.

Key words: *Anabaena*; Mitigative effect of calcium; Nitrogen fixation; NaCl stress; Physiological condition