

## 硝酸钾缓解氯化钠胁迫蓝藻 *Anabaena* 7120 固氮的生理基础

陈 因 方大惟

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032)

**摘要** 营养液中添加适量  $KNO_3$  可在一定程度上缓解  $NaCl$  对鱼腥藻固氮活性的抑制作用。暗处理或加光合抑制剂时,  $KNO_3$  对  $NaCl$  胁迫的缓解作用便消失。供给外源蔗糖、提高  $CO_2$  浓度、同时供给  $CO_2$  和  $N_2$  时,  $KNO_3$  对缓解  $NaCl$  胁迫的作用则增高。同时供给  $O_2$  和  $H_2$  对  $KNO_3$  的缓解作用增高影响较小, 而在厌氧 ( $Ar$  或  $N_2$  中) 或单加氧下,  $KNO_3$  的缓解效应则明显减弱或消失。

**关键词** 鱼腥藻;  $NaCl$  胁迫; 固氮; 硝酸钾; 缓解效应

### PHYSIOLOGICAL BASIS OF MITIGATIVE EFFECT OF $KNO_3$ ON $NaCl$ STRESS IN NITROGEN FIXATION OF BLUE-GREEN ALGAE *ANABAENA* 7120

Chen Yin Fang Dawei

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

**Abstract** The  $NaCl$ -induced inhibition of nitrogen-fixing activity of blue-green algae *Anabaena* 7120 was removed to a certain degree by the introduction of appropriate  $KNO_3$  into the culture medium. When the preincubation of algae cells was done in dark before experiment for 24 hours or in the presence of photosynthetic inhibitors, such as DNP or CCCP, the beneficial effect of  $KNO_3$  on the nitrogen-fixing activity of *Anabaena* treated with  $NaCl$  stress weakened or disappeared. In the addition of  $O_2$  together with  $H_2$  the mitigative effect of  $KNO_3$  on nitrogen-fixing activity of *Anabaena* was reinforced under  $NaCl$  stress. But a marked inaction in nitrogen-fixing activity of *Anabaena* occurred under  $NaCl$  stress when  $O_2$  was introduced into the test system alone. When algae cells treated with  $NaCl$  stress were incubated in the aerobic condition (in air) the beneficial action of  $KNO_3$  was higher than that in anaerobic condition (in  $Ar$ ). The  $KNO_3$ -supported nitrogen-fixing activity of *Anabaena* was more evident under  $NaCl$  stress in the presence of the exogenous sucrose or  $CO_2$ . The mitigative effect of  $KNO_3$  on nitrogen-fixing activity of *Anabaena* was accelerated under  $NaCl$  stress in the addition of  $N_2$  together with  $CO_2$ , while it was

depressed by adding  $N_2$  alone.

**Key words** *Anabaena*; NaCl stress; Nitrogen fixation;  $KNO_3$ ; Mitigative effect

氯化钠对蓝藻固氮的胁迫, 既制约固氮酶活性, 又影响固氮酶的特性, 其胁迫程度除随蓝藻体内能量供应、合成固氮酶蛋白的物质基础、脯氨酸积累, 以及某些生理环境优劣而异之外<sup>[1-4]</sup>, 还可以通过增施某些矿物盐的方法而加以调节, 例如在介质中加入适量的  $CaCl_2$  或  $NH_4Cl$  时, 氯化钠对蓝藻固氮的胁迫便会像高等植物受氯化钠胁迫时一样<sup>[5-7]</sup>, 而有一定程度的缓解<sup>[8]</sup>。另外, 有人观察到, 在高等植物中, 硝酸钾有缓解氯化钠对小麦幼苗胁迫的作用<sup>[9]</sup>。但硝酸钾对氯化钠胁迫下的蓝藻 *Anabaena* 固氮是否也有此种效应呢? 其作用的生理基础如何? 尚未见报道。为此, 本文对此问题进行了一些探讨。

## 1 材料和方法

实验材料为蓝藻 *Anabaena* 7120, 按前文方法<sup>[10]</sup>培养和收集。收集的藻体以  $5 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$  pH7.2 的磷酸缓冲液反复洗涤, 离心数次后一半转放到含有  $7.5 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$  NaCl 的 Allen-Arnon 无氮营养液中作 NaCl 胁迫处理, 另一半放到原来培养藻的同一种营养液中(其中含有  $5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$  NaCl)作为对照。处理和对照又分成两组, 一组加入不同浓度的硝酸钾, 有时根据实验方案还要加入处理物质(详细处理见正文)。另一组不加硝酸钾作为对照。两组各重复 3 次, 每批实验先后重复 4-5 趟。然后均同时放到 4000lx 荧光灯和  $30^\circ\text{C}$  下培养 24h 后再按前文方法<sup>[10]</sup>收集。处理和测定固氮活性和其它指标。

## 2 实验结果

与营养液中添加适当浓度的  $CaCl_2$  一样<sup>[8]</sup>,  $KNO_3$  也可以缓解 NaCl 对蓝藻 *Anabaena* 固氮的胁迫, 其缓解效应的大小以蓝藻的内外在生理条件而异。

### 2.1 硝酸钾的浓度

$KNO_3$  对蓝藻 *Anabaena* 固氮盐胁迫的缓解效应有一个适宜的浓度。表 1 结果显示, 低浓度 ( $0.1 \text{ mol/L}$ )  $KNO_3$  下, 蓝藻 *Anabaena* 固氮受 NaCl 胁迫的程度较小, 当  $KNO_3$  浓度增高时, 此种缓解 NaCl 胁迫效应便减弱, 当达到  $0.5 \text{ mol/L}$  时则会加剧 NaCl 对固氮的胁迫。这跟前文中低浓度  $NH_4Cl$  对受 NaCl 胁迫的蓝藻 *Anabaena* 固氮有一定程度缓解的结果<sup>[11]</sup>是一致的。

表 1 硝酸钾对 NaCl 胁迫下蓝藻 *Anabaena* 固氮活性的影响

Table 1 The effect of  $KNO_3$  on nitrogen-fixing activity of *Anabaena* 7120 under NaCl stress

$KNO_3$ (mol/L)	对照 Control ( $3.5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ NaCl)		处理 Treatment ( $7.5 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ NaCl)	
	nmol $C_2H_2$ $h^{-1} ml^{-1}$ algal suspension	%	nmol $C_2H_2$ $h^{-1} ml^{-1}$ algal suspension	%
0	174.4	100.0	69.1	100.0
0.1	194.5	111.5	100.4	145.2
0.5	135.5	77.7	62.4	93.7
1.0	121.9	69.9	51.1	73.9

## 2.2 能源状况

$KNO_3$  对蓝藻 *Anabaena* 固氮盐胁迫的缓解效应因能量水平及其来源而异。

从蓝藻 *Anabaena* 固氮的主要能源—光能来说, 在添加光合抑制剂光合作用受抑, 或进行暗处理光合作用不能进行的情况下,  $KNO_3$  对蓝藻 *Anabaena* 固氮盐胁迫的缓解作用明显消失(表 2, 3)。

在 NaCl 胁迫下, 通过需光(Hattori reaction)之外的需氧途径(Knallgas reaction)利用氮作为蓝藻 *Anabaena* 固氮的额外能源在  $KNO_3$  缓解固氮盐胁迫作用中虽然也有较好作用, 但不如光能明显(表 4)。这间接显示, NaCl 胁迫下,  $KNO_3$  缓解 NaCl 胁迫的作用主要与光合形成的能量有关。

表 2 光合抑制剂存在时硝酸钾对 NaCl 胁迫下蓝藻 *Anabaena* 固氮活性的影响

Table 2 The effect of  $KNO_3$  on nitrogen-fixing activity of *Anabaena* 7120 in the presence of photosynthetic inhibitors under NaCl stress

NaCl (mol/L)	抑制剂 Inhibitors ( $1 \times 10^{-4}$ mol/L)	相对固氮活性 Relative nitrogen-fixing activity (%)	
		- $KNO_3$	+ $KNO_3$ (0.1mol/L)
$3.5 \times 10^{-3}$	—	100.0	112.3
	DNP	49.4	51.8
	CCCP	56.5	57.4
$7.5 \times 10^{-2}$	—	41.3	61.7
	DNP	5.4	6.8
	CCCP	19.5	21.1

“—” No added.

表 3 光和暗中硝酸钾对 NaCl 胁迫下蓝藻 *Anabaena* 固氮活性的影响

Table 3 The effect of  $KNO_3$  on nitrogen-fixing activity of *Anabaena* under NaCl stress in the light or dark

	NaCl (mol/L)	相对固氮活性 Relative nitrogen-fixing activity (%)	
		- $KNO_3$	+ $KNO_3$ (0.1mol/L)
光 light	$3.5 \times 10^{-3}$	100.0	111.3
	$7.5 \times 10^{-2}$	45.0	65.1
暗 dark	$3.5 \times 10^{-3}$	7.5	7.4
	$7.5 \times 10^{-2}$	1.9	1.7

表 4 氢和氧加合时硝酸钾对 NaCl 胁迫下蓝藻 *Anabaena* 固氮活性的影响

Table 4 The effect of  $KNO_3$  on nitrogen-fixing activity of *Anabaena* in the addition of  $H_2$  together with  $O_2$  under NaCl stress

NaCl (mol/L)	$H_2$ (20%)	$O_2$ (20%)	相对固氮活性 Relative nitrogen-fixing activity (%)	
			- $KNO_3$	+ $KNO_3$ (0.1mol/L)
$3.5 \times 10^{-3}$	—	—	100.0	112.6
	+	+	50.3	68.8
	+	+	118.4	138.2
$7.5 \times 10^{-2}$	—	—	46.1	66.3
	—	+	28.8	30.2
	+	+	91.1	98.3

“+” added; “—” no added. The same in following tables.

有氧呼吸代谢中产生的能量虽然不是蓝藻固氮的主要能源, 但缺少空气氧, 蓝藻的正常生命活动则不能进行, 固氮也会受到影响。这在  $\text{KNO}_3$  缓解蓝藻 *Anabaena* 固氮盐胁迫过程中亦有相似的结果, 厌氧(Ar 或  $\text{N}_2$  中)下  $\text{KNO}_3$  的上述对 NaCl 胁迫的缓解作用几近消失(表 5,6)。

表 5 厌氧下硝酸钾对 NaCl 胁迫下蓝藻 *Anabaena* 固氮活性的影响Table 5 The effect of  $\text{KNO}_3$  on nitrogen-fixing activity of *Anabaena* under NaCl stress and anaerobic condition

	NaCl (mol/L)	相对固氮活性 Relative nitrogen-fixing activity(%)	
		- $\text{KNO}_3$	+ $\text{KNO}_3$ (0.1mol/L)
空气中	$3.5 \times 10^{-3}$	100.0	110.9
In air	$7.5 \times 10^{-2}$	63.6	80.5
氩气中	$3.5 \times 10^{-3}$	80.3	84.8
In Ar	$7.5 \times 10^{-2}$	47.3	48.2

表 6  $\text{CO}_2$  和  $\text{N}_2$  加合或单加  $\text{CO}_2$  时硝酸钾对 NaCl 胁迫下蓝藻 *Anabaena* 固氮活性的影响Table 6 The effect of  $\text{KNO}_3$  on nitrogen-fixing activity of *Anabaena* in the addition of  $\text{CO}_2$  together with  $\text{N}_2$  or addition of  $\text{CO}_2$  alone under NaCl stress

NaCl (mol/L)	$\text{CO}_2$ (5%)	$\text{N}_2$ (40%)	相对固氮活性 Relative nitrogen-fixing activity(%)	
			- $\text{KNO}_3$	+ $\text{KNO}_3$ (0.1mol/L)
$3.5 \times 10^{-3}$	-	-	100.0	120.2
	+	-	347.3	520.8
	-	+	60.2	62.2
	+	+	258.9	367.2
$7.5 \times 10^{-2}$	-	-	37.2	54.2
	+	-	207.5	387.5
	-	+	8.4	9.2
	+	+	116.2	218.7

### 2.3 碳源的供应

碳源也是制约  $\text{KNO}_3$  缓解蓝藻 *Anabaena* 固氮盐胁迫程度大小的因素。供给  $\text{CO}_2$  能明显提高  $\text{KNO}_3$  对蓝藻 *Anabaena* 固氮盐胁迫的缓解效应, 同时供应  $\text{CO}_2$  和  $\text{N}_2$  则可能由于合成固氮酶蛋白的物质基础增加; 也可能由于分子氮存在会导致厌氧环境或与  $\text{C}_2\text{H}_4$  还原竞争电子, 而对  $\text{KNO}_3$  缓解 NaCl 胁迫效应表现出一定的良好作用(表 6)。此外, 作为还原剂库或碳架源的碳水化合物也能影响  $\text{KNO}_3$  缓解蓝藻 *Anabaena* 固氮盐胁迫的作用。表 7 表明, 在 NaCl 胁迫下, 添加外源蔗糖时,  $\text{KNO}_3$  缓解蓝藻 *Anabaena* 固氮盐胁迫的效应有一定程度的增强。

表 7 外源蔗糖存在时硝酸钾对 NaCl 胁迫下蓝藻 *Anabaena* 固氮活性的影响Table 7 The effect of  $\text{KNO}_3$  on nitrogen-fixing activity of *Anabaena* in the presence of exogenous sucrose under NaCl stress

NaCl (mol/L)	蔗糖 Sucrose (0.5%)	相对固氮活性 Relative nitrogen-fixing activity(%)	
		- $\text{KNO}_3$	+ $\text{KNO}_3$ (0.1mol/L)
$3.5 \times 10^{-3}$	-	100.0	110.5
	+	133.1	165.1
$7.5 \times 10^{-2}$	-	41.2	54.0
	+	76.5	88.9

### 3 讨论

研究逆境胁迫下蓝藻(其它固氮生物亦是如此)的固氮作用也和高等植物或微生物生理代谢一样,除了要揭示逆境胁迫生物机体的机制及其调节之外,还应寻找或排除逆境胁迫的措施和途径。我们在前文和本文中施用适量浓度  $\text{CaCl}_2$ <sup>[6]</sup>、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ <sup>[2]</sup> 和  $\text{KNO}_3$  可削弱或缓解  $\text{NaCl}$  对蓝藻 *Anabaena* 固氮胁迫的结果显示了两点:(1) 盐胁迫对蓝藻 *Anabaena* 固氮的危害并不是绝对的,可以通过生理条件或措施的改善而得到一定程度的缓解;(2) 探讨包括  $\text{NaCl}$  在内的逆境因素胁迫生物体的生理生化乃至分子生物学机制固然重要,但研究减轻或消除逆境胁迫的措施和途径也很重要,两者是相辅相成的。

目前人们对硝酸盐增强植物或微生物抗盐胁迫能力的解释大致有二:(1)  $\text{NO}_3^-$  可竞争性地抑制  $\text{Cl}^-$  的吸收,植物根部及地上部  $\text{Cl}^-$  含量下降,植株干重增加,因而  $\text{NaCl}$  对生物体的胁迫得到缓解<sup>[10,11]</sup>;(2)  $\text{NO}_3^-$  抑制了  $\text{Cl}^-$  从质膜和液胞膜上的  $\text{Cl}^-$  通道通过,于是生物体受到  $\text{NaCl}$  胁迫的程度便减轻<sup>[12]</sup>。联系本文结果,我们认为,硝酸盐对蓝藻 *Anabaena* 固氮盐胁迫能否起到缓解效应与制约固氮的能量及其来源也有联系。其中通过需氧途径利用氢作为能源或有氧呼吸获取的能量对硝酸盐的缓解盐胁迫效应并不明显,而光合受抑时,硝酸盐缓解  $\text{NaCl}$  胁迫的效应便消失。这显示,在  $\text{NaCl}$  胁迫下,硝酸盐的缓解  $\text{NaCl}$  胁迫的作用,除了牵涉到  $\text{Cl}^-$  和  $\text{NO}_3^-$  之间的关系之外,似乎还要建立在能量供应,特别是光合作用顺利进行的基础上,其间机制值得深入探讨。

从生理生化途径调节着手,创造一些可以提高固氮酶促反应速率的条件,以增强硝酸盐对盐胁迫下蓝藻 *Anabaena* 固氮的缓解效应,看来也值得注意。本文结果表明,增加与蓝藻 *Anabaena* 固氮有关的能量代谢和生理生化过程的还原剂或基质源(如供应外源蔗糖,提高  $\text{CO}_2$  浓度)以及合成固氮酶蛋白的物质基础和碳架供应水平(如同时供应  $\text{CO}_2$  和  $\text{N}_2$ ),硝酸盐缓解  $\text{NaCl}$  胁迫的效应则增强,蓝藻 *Anabaena* 固氮效率提高。这从研究逆境条件下蓝藻固氮的调节机制来说无疑是具有意义的。

在利用生物固氮作为农作物肥源的生产实践中,由于固氮作用会受铵氮阻抑,一般不主张施用氮肥。但是,从前文<sup>[1]</sup>和本文的结果来看,在正常或逆境胁迫的条件下, $\text{NH}_4\text{Cl}$  和  $\text{KNO}_3$  对蓝藻 *Anabaena* 固氮的阻抑有一个施用量的问题。两者浓度过高时,固氮受抑,浓度低时,非但不能促进固氮,而且可以部分地缓解盐对固氮的胁迫,即在一定程度上增大蓝藻 *Anabaena* 固氮的抗盐能力,从而给生产实践提供了一个潜在而又可能存在的应用前景。因此,为了提高蓝藻(其它固氮生物亦可能如此)的固氮效率和增进其肥效,应该参照盐胁迫蓝藻固氮的具体情况,在改善固氮所需的生理条件基础上,如果适当增施氮肥,那么,即使在盐胁迫下也可以收到一些增加蓝藻作为肥源的肥效,提高农作物产量的效果。这个问题显然值得考虑。

### 参考文献

- 1 陈因,方大惟. 氯化钠影响下蓝藻 *Anabaena* 7120 的固氮活性和去铁阻抑. 核农学报, 1991, 5:239-245

- 2 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
- 3 陈因, 方大惟. 去除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
- 4 陈因, 方大惟. 氯化钠胁迫下蓝藻 *Anabaena* 7120 对氧的敏感性和氢的保护作用. 核农学报, 1993, 7:237-242
- 5 章文华, 刘友良. 钙对小麦幼苗盐胁迫的缓解效应. 植物生理学通讯, 1992, 28:176-179
- 6 Glass A D M, Sidiqi M Y. Nitrat inhibition of chloride influx in barley implications for a proposed chloride homostat. Jour Expt Bot, 1985, 36:556-566
- 7 Hepler R K, Wayne R O. Calcium and plant development. Ann Rev Plant Physiol, 1985, 397-439
- 8 陈因, 方大惟. 钙对蓝藻固氮受氯化钠胁迫的缓解效应及其生理条件的关系. 热带亚热带植物学报, 1994, 2(4):88-94
- 9 陈因, 方大惟. 蓝藻 *Anabaena* 7120 固氮的光调节. 植物生理学报, 1983, 9:51-59
- 10 Bottacin A, Cacco G, Saccontani M. Nitrogen absorption and assimilation in NaCl-resistant and NaCl-susceptible millet genotypes (*Pennisetum americanum*). Canad Jour Bot, 1985, 63:517-520
- 11 Churchill K A, Heven S H. Anion-sensitive  $H^+$ -pumping ATPase of oat roots. Plant Physiol, 1984, 76:490-497
- 12 Typerman S D, Findlany G P. Current-voltage curves of single  $Cl^-$ -channels which coexist with two types of  $K^+$  channel in the tonoplast of *Chara-Corallina*. Jour Expt Bot, 1989, 40:105-117