

甘露醇对氯化钠胁迫下蓝藻 *Anabaena* 7120 固氮活性的增强效应

陈 因 方大惟

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032)

摘要 营养液中添加外源的甘露醇后, 蓝藻 *Anabaena* 7120 固氮受 NaCl 胁迫的程度减弱。在光合作用不能进行或受到削弱、能量供应受阻(暗或添加抑制剂)、厌氧环境(Ar 或 N₂)和分子氧条件下, 甘露醇的良好作用减小或消失。改善能源和碳架供应, 增强氢的利用或满足合成固氮酶蛋白所需物质需求(提高 CO₂ 浓度, 同时供应 H₂ 和 O₂ 或 N₂ 和 CO₂)时, 甘露醇缓解 NaCl 胁迫蓝藻固氮的程度明显增大。外源蔗糖对甘露醇的上述缓解效应无促进作用。

关键词 鱼腥藻; 甘露醇; 固氮; 氯化钠胁迫

ENHANCING EFFECT OF MANNITOL ON NITROGEN-FIXING ACTIVITY OF BLUE-GREEN ALGAE *ANABAENA* 7120 UNDER NaCl STRESS

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 mannitol into the test system. 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 enhancing effect of mannitol on the nitrogen-fixing activity of *Anabaena* 7120 suppressed by NaCl weakened or disappeared. In the addition of O₂ together with H₂ the enhancing effect of mannitol on nitrogen-fixing activity of *Anabaena* 7120 was reinforced under NaCl stress. A marked inaction in nitrogen-fixing activity of *Anabaena* 7120 occurred under NaCl stress when O₂ was introduced into the test system alone. When algae cells inactivated by NaCl were incubated in the aerobic condition the accelerated action of mannitol upon the nitrogen-fixing activity was higher than that in anaerobic condition. The mannitol-supported nitrogen-fixing activity of *Anabaena* 7120 under NaCl stress was accelerated in the addition of N₂ together with CO₂ or addition of CO₂ alone, while it was depressed by adding N₂ alone.

Key words *Anabaena*; Mannitol; Nitrogen fixation; NaCl stress

根据多年的研究结果,人们对逆境胁迫植物的机制,即认为各种逆境因素所导致的植物体内活性氧代谢系统失调和活性氧量增加,以及活性氧清除剂(如SOD, CAT, POX, GR, VtF, CAR, GSH...等)的结构被破坏,活性或含量降低,引发膜脂过氧化作用增强,从而造成生物膜结构与功能的破坏乃是植物蒙受伤害的原因,基本上已取得了一致的认识^[1-8]。逆境因素对高等植物的此种胁迫机制,看来对逆境条件下生长的低等植物或称为蓝细菌的蓝藻可能也有相似之处。我们在前文中曾经揭示,为高等植物所没有的固氮蓝藻的固氮功能受到盐渍、高低温、氧和渗透的胁迫规律及其对内外在生理条件的反应彼此十分相似^[9-12]。为了进一步阐明这个问题,本文对被视作为活性氧清除剂的甘露醇与氯化钠胁迫下蓝藻固氮的关系及其生理基础作了一些探讨。有关这方面的问题尚未见有报道。

1 材料与方法

按前文方法^[13]培养和收集的蓝藻 *Anabaena* 7120 藻体反复以重蒸馏水洗涤和离心(3000×g, 10min)后,再以营养液悬浮,所获得的藻悬浮液分成两组,一组加入 1×10^{-4} mol/L的甘露醇,一组不加甘露醇作为对照,各重复3次,均放到温度为28-30℃和光照度为4000lx的荧光灯下培养24h后,取出再转放到8-10ml并加有 7.5×10^{-2} mol/L NaCl的无氮营养液的血清瓶中,根据实验方案,有的还要加入一些物质或进行处理(具体处理见本文实验结果部分),以不加NaCl为对照,每个处理重复3次。盖上橡皮塞,抽气后按9:1的比例注入Ar和C₂H₂,放到30℃水浴中照光震荡保温,反应中止后以气相层析仪测定固氮活性。其它指标亦按前文方法^[13]测定。

2 实验结果

2.1 甘露醇对NaCl胁迫蓝藻固氮的缓解效应

被视作为活性氧清除剂的甘露醇有增强蓝藻固氮中抗NaCl胁迫能力的作用。表1结果显示,NaCl胁迫下的蓝藻固氮活性下降,添加外源的甘露醇后,除未受NaCl胁迫而添加高浓度的甘露醇(1×10^{-2} mol/L)处理,其固氮活性增加极微之外,其它浓度处理的固氮活性均显著增加。如果将受NaCl胁迫处理和未加入NaCl处理的蓝藻与各自的对照进行比较,则可以看到,在添加 1×10^{-2} mol/L, 1×10^{-3} mol/L和 1×10^{-4} mol/L甘露醇的情况下,受NaCl胁迫蓝藻的相对固氮活性分别为108.0%, 138.4%和147.4%,而未受NaCl胁迫的蓝藻则分别为102.3%, 124.8%和128.4%,甘露醇对NaCl胁迫处理的良好效用比未经NaCl处理的大。甘露醇的此种缓解NaCl胁迫固氮的效应,对研究逆境条件下蓝藻,及其它固氮生物固氮调节机制以及提高固氮效率都有很大的意义。

表1 甘露醇对氯化钠胁迫下蓝藻固氮活性的影响

Table 1 Effect of mannitol on nitrogen-fixing activity of *Anabaena* under NaCl stress

甘露醇 Mannitol (mol/L)	NaCl (mol/L)	固氮活性 Nitrogen-fixing activity		甘露醇 Mannitol (mol/L)	NaCl (mol/L)	固氮活性 Nitrogen-fixing activity	
		nmol C ₂ H ₂ h ⁻¹ ml ⁻¹ algal suspension	% -NaCl +NaCl			nmol C ₂ H ₂ h ⁻¹ ml ⁻¹ algal suspension	% -NaCl +NaCl
0	-	281.5	100.0	1×10^{-3}	-	351.3	124.8
0	+	183.5	100.0	1×10^{-3}	+	253.9	138.4
1×10^{-2}	-	288.1	102.3	1×10^{-4}	-	361.4	128.4
1×10^{-2}	+	198.2	108.0	1×10^{-4}	+	270.5	147.4

2.2 能源在甘露醇缓解 NaCl 胁迫蓝藻固氮中的作用

甘露醇缓解 NaCl 胁迫蓝藻固氮的效用大小受固氮所需能量的水平和能量的来源制约。以下的实验表明:

1. 光下甘露醇的良好作用显著, 暗处或加入抑制剂 DNP 或 CCCP 后, 光合作用不能进行和 ATP 形成受阻时, 甘露醇的效用极微或消失(表 2,3)。显示光合过程中产生的能量对甘露醇缓解 NaCl 胁迫固氮的效应很重要。

表 2 光下和暗处甘露醇对受氯化钠胁迫蓝藻固氮活性的影响
Table 2 Effect of mannitol on nitrogen-fixing activity of *Anabaena* driven by NaCl stress in light or dark

甘露醇 Mannitol (1×10^{-4} mol/L)	NaCl (7.5×10^{-2} mol/L)	相对固氮活性 (%) Relative nitrogen- fixing activity	甘露醇 Mannitol (1×10^{-4} mol/L)	NaCl (7.5×10^{-2} mol/L)	相对固氮活性 (%) Relative nitrogen- fixing activity
光 Light			暗 Dark		
-	-	100.0	-	-	8.4
-	+	64.3	-	+	4.1
+	-	118.6	+	-	8.6
+	+	94.5	+	+	4.4

表 3 光合抑制剂存在时甘露醇对受氯化钠胁迫蓝藻固氮活性的影响
Table 3 Effect of mannitol on nitrogen-fixing activity of *Anabaena* driven by NaCl stress in presence of photosynthetic inhibitors

甘露醇 Mannitol (1×10^{-4} mol/L)	NaCl (7.5×10^{-2} mol/L)	抑制剂 Inhibitor (1×10^{-4} mol/L)	相对固氮活性 (%) Relative nitrogen- fixing activity	甘露醇 Mannitol (1×10^{-4} mol/L)	NaCl (7.5×10^{-2} mol/L)	抑制剂 Inhibitor (1×10^{-4} mol/L)	相对固氮活性 (%) Relative nitrogen- fixing activity
-	-	-	100.0	+	-	-	121.4
-	+	-	62.8	+	+	-	99.4
-	-	DNP	46.5	+	-	DNP	49.8
-	+	DNP	30.4	+	+	DNP	32.7
-	-	CCCP	37.0	+	-	CCCP	39.6
-	+	CCCP	19.2	+	+	CCCP	22.3

2. 通过羟化反应增强氢的利用, 可以削弱氧对蓝藻固氮的抑制, 并在一定程度上增强甘露醇对 NaCl 胁迫蓝藻固氮的缓解效应(表 4)。

表 4 氢和氧合时甘露醇对受氯化钠胁迫蓝藻固氮活性的影响
Table 4 Effect of mannitol on nitrogen-fixing activity of *Anabaena* driven by NaCl stress in addition of H₂ together with O₂

甘露醇 Mannitol (1×10^{-4} mol/L)	NaCl (7.5×10^{-2} mol/L)	O ₂ (20%)	H ₂ (20%)	相对固氮活性 (%) Relative nitrogen- fixing activity	甘露醇 Mannitol (1×10^{-4} mol/L)	NaCl (7.5×10^{-2} mol/L)	O ₂ (20%)	H ₂ (20%)	相对固氮活性 (%) Relative nitrogen- fixing activity
-	-	-	-	100.0	+	-	-	-	116.2
-	+	-	-	61.6	+	+	-	-	94.5
-	-	+	-	62.7	+	-	+	-	67.8
-	+	+	-	36.4	+	+	+	-	41.5
-	-	+	+	108.4	+	-	+	+	129.5
-	+	+	+	83.8	+	+	+	+	104.9

3. 通气条件下由氧化磷酸化提供的能量是甘露醇缓解 NaCl 胁迫蓝藻固氮的另一种能量来源。厌氧(Ar 或 N₂ 中)环境下, 甘露醇的有益作用极微或近乎消失(表 5, 6)。表明由厌氧酵解产生的能量对蓝藻固氮中抗逆境胁迫以及甘露醇缓解 NaCl 胁迫并不重要。

表 5 通气和厌氧下甘露醇对受氯化钠胁迫蓝藻固氮活性的影响

Table 5 Effect of mannitol on nitrogen-fixing activity of *Anabaena* driven by NaCl stress under aerobic (air) or anaerobic (Ar) conditions

甘露醇 (1×10 ⁻⁴ mol/L)	Mannitol (1×10 ⁻⁴ mol/L)	NaCl (7.5×10 ⁻² mol/L)	相对固氮活性(%) Relative nitrogen- fixing activity	甘露醇 (1×10 ⁻⁴ mol/L)	Mannitol (1×10 ⁻⁴ mol/L)	NaCl (7.5×10 ⁻² mol/L)	相对固氮活性(%) Relative nitrogen- fixing activity
空气中 In air				氩中 In Ar			
-	-	-	100.0	-	-	-	68.6
-	-	+	58.4	-	-	+	35.7
+	+	-	117.2	+	+	-	71.2
+	+	+	97.3	+	+	+	37.9

2.3 甘露醇缓解 NaCl 胁迫蓝藻固氮与分子氮及碳源的关系

在 NaCl 胁迫下, 实验前 24h 以分子氮注入反应系统中, 蓝藻在 NaCl 胁迫下的固氮能力明显下降, 而预先注入 CO₂ 的固氮活性则成倍地提高, 并且分子氮对固氮的抑制得到一定程度的缓和, 添加甘露醇对未加入 CO₂ 处理的并无增强效应, 而对加入 CO₂ 的则有一定促进固氮的良好作用(表 6)。外源蔗糖可以增强蓝藻的固氮作用及其抗 NaCl 胁迫的能力, 但此时添加甘露醇与注入 CO₂ 的不同, 加入甘露醇对加入蔗糖的 NaCl 胁迫下蓝藻固氮作用并不表现出缓解效应(表 6)。这显示, 甘露醇对 NaCl 胁迫固氮的缓解效应是随碳源类别而异的。

表 6 N₂ 和 CO₂ 加合以及蔗糖存在时甘露醇对受氯化钠胁迫蓝藻固氮活性的影响

Table 6 Effect of mannitol on nitrogen-fixing activity of *Anabaena* driven by NaCl stress in addition of N₂ together with CO₂ or in presence of sucrose

甘露醇 (1×10 ⁻⁴ mol/L)	NaCl (7.5×10 ⁻² mol/L)	CO ₂ (5%)	N ₂ (40%)	蔗糖 (0.5%)	相对固氮活性(%) Relative nitrogen- fixing activity	甘露醇 (1×10 ⁻⁴ mol/L)	NaCl (7.5×10 ⁻² mol/L)	CO ₂ (5%)	N ₂ (40%)	蔗糖 (0.5%)	相对固氮活性(%) Relative nitrogen- fixing activity
-	-	-	-	-	100.0	+	-	-	-	-	128.8
-	+	-	-	-	53.5	+	+	-	-	-	94.0
-	-	-	+	-	58.0	+	-	-	+	-	65.7
-	+	-	+	-	49.5	+	+	-	+	-	54.3
-	-	+	-	-	356.1	+	-	+	-	-	395.3
-	+	+	-	-	304.1	+	+	+	-	-	339.7
-	-	+	+	-	344.2	+	-	+	+	-	379.3
-	+	+	+	-	251.9	+	+	+	+	-	320.1
-	-	-	-	+	150.4	+	-	-	-	+	151.7
-	+	-	-	+	127.4	+	+	-	-	+	128.9

3 讨论

前面已经提及, 在高等植物的逆境生理研究中对以下两点基本上已取得了共识^[1-8]: (1) 逆境胁迫下植物体内活性氧代谢失调导致膜结构与功能的破坏是植物受害的原因; (2) 逆境胁迫过程中植物体内的酶促和非酶促性防御系统可以抑制活性氧和膜脂过氧化物的积累, 防止膜脂过氧化作

用的启动,从而保护细胞免受由于逆境胁迫引起的氧化伤害。本文虽未对有关指标进行检测,但观察到 NaCl 胁迫下被视作为活性氧清除剂的外源甘露醇可以增强蓝藻固氮,特别是增强在 NaCl 胁迫下的固氮,从而直接或间接揭示了两点:(1) NaCl 对蓝藻固氮的胁迫与活性氧代谢失调有一定的关系;(2) 增强蓝藻体内酶促或非酶促性防御系统的活动水平,是提高其在 NaCl 胁迫下固氮能力的一种内在生理因素。因此今后如何深入地开展这方面的研究,显然是值得考虑的。

能量供应和适宜的生理环境是甘露醇能否有效防止或减轻 NaCl 对蓝藻固氮胁迫的生理基础。本文结果揭示,如果光合作用以及与固氮所需的能量供应,或能量代谢和生理生化过程运转正常,甘露醇对 NaCl 胁迫蓝藻的缓解效应即明显增强,反之则缓解效应减小或消失。这体现了生理环境适宜时,甘露醇的缓解效应大和对蓝藻在 NaCl 胁迫下固氮能力增大的特点。从而表明,结合生理环境研究蓝藻体内甘露醇代谢,在 NaCl 胁迫下固氮作用之间的关系及其调节机制,尤为重要。

在 NaCl 胁迫下,蓝藻固氮可因加入能清除活性氧的甘露醇(其它清除剂也理应如此)而增强。这说明,研究甘露醇代谢和积累规律及其对固氮的作用机制,并可在此基础上进一步寻求缓解或减轻盐渍对蓝藻以至其它固氮生物生长和固氮的危害和提高固氮效率的途径。这从利用生物固氮为农业生产服务,增加农作物产量的实际应用来说,也是有意义的。

参考文献

- 1 王爱国,叶发辉,罗广华.活性氧对花生叶片大分子量 DNA 的损伤.植物生理学通讯,1993,29:260-262
- 2 王建华,刘鸿先,徐同.超氧化物歧化酶(SOD)在植物逆境和衰老生理中的作用.植物生理学通讯,1989,(1):1-7
- 3 林植芳,李双顺,林桂珠等.衰老叶片叶绿体中 H_2O_2 的积累与膜脂过氧化的关系.植物生理学报,1988,14:16-17
- 4 焦德茂.关于水稻的光抑制和育种问题.植物生理学通讯,1993,29:293-296
- 5 蒋明义,荆家海.植物体内羟自由基的产生及其与脂质过氧化作用启动的关系.植物生理学通讯,1993,29:300-305
- 6 Elstner E F. Oxygen activation and oxygen toxicity. Ann Rev Plant Physiol, 1982, 33:73-82
- 7 Klotz M G, Hoffman R, Novacky A. The critical role of the hydroxyl radical in microbial infection of plants. In: Dainty J, Demichelis M I, Marre E et al eds. Plant membrane transport: The current position. Amsterdam: Elsevier. 1989, 657-668.
- 8 Scandalios J G. Oxygen stress and superoxide dismutases. Plant Physiol, 1993, 101:7-16
- 9 陈因,方大惟.短期高温对蓝藻 *Anabaena* 7120 固氮活性的影响.核农学报,1990,4:219-224
- 10 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
- 11 陈因,方大惟.低温对氯化钠胁迫下蓝藻固氮活性的影响.热带亚热带植物学报,1993,1(1):47-52
- 12 陈因,方大惟.渗透胁迫下的蓝藻固氮作用.核农学报,1995,9:120-124
- 13 陈因,方大惟.蓝藻 *Anabaena* 7120 固氮的光调节.植物生理学报,1993,9:51-58