

## 甘露醇对渗透胁迫下的鱼腥藻 (*Anabaena*) 固氮活性的增效作用

陈 因 方大惟

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032)

**摘要** 外源甘露醇可在一定程度上增强鱼腥藻 *Anabaena* sp. 7120 固氮的抗渗透胁迫能力。厌氧 (Ar 中)、能量供应受阻 (暗处理、添加 ATP 形成的抑制剂)、合成固氮酶蛋白所需物质供应不足 (单加 N<sub>2</sub> 不加 CO<sub>2</sub>) 以及分子氧下, 甘露醇的有益作用减小或消失, 反之 (正常光照、通气环境、提高 CO<sub>2</sub> 浓度, 同时供应 H<sub>2</sub> 和 O<sub>2</sub> 或 CO<sub>2</sub> 和 N<sub>2</sub>) 则这一作用增大。渗透胁迫下, 外源蔗糖对甘露醇支持蓝藻固氮的作用不明显。

**关键词** 鱼腥藻; 甘露醇; 渗透胁迫; 固氮

**分类号** Q936

## ENHANCING EFFECT OF MANNITOL ON NITROGEN FIXATION ACTIVITY IN *ANABAENA* UNDER OSMOTIC STRESS

Chen Yin Fang Dawei

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

**Abstract** The experiments showed that the osmotic stress-induced inhibition of nitrogen fixation activity was mitigated to some extent by the introduction of mannitol into culture solution in *Anabaena* sp. strain 7120. It was shown that under dark condition or in the presence of photosynthetic inhibitors, such as DNP or CCCP, the beneficial effect of mannitol on nitrogen fixation activity was weakened or diminished in *Anabaena*. Higher nitrogen fixation activity was observed in experiments with mannitol by adding O<sub>2</sub> together with H<sub>2</sub>, but the activity was depressed by adding O<sub>2</sub> alone. When *Anabaena* cells submitted to osmotic stress were incubated in aerobic condition (in air) the beneficial effect of mannitol was higher than that in anaerobic condition (in Ar or N<sub>2</sub>). Beneficial effect of mannitol on nitrogen fixation activity of *Anabaena* was obviously strengthened by preincubation with 5% CO<sub>2</sub> or with 5% CO<sub>2</sub> plus 40% N<sub>2</sub>, but it was abated by adding N<sub>2</sub> only. The mannitol-supported nitrogen fixation activity in *Anabaena* was less evident in the presence of exogenous sucrose.

**Key words** *Anabaena*; Mannitol; Osmotic stress; Nitrogen-fixation activity

前人和我们对各种逆境因素(如高低温、NaCl和渗透胁迫)与鱼腥藻固氮(包括去铵抑制)的关系曾多次作过报道<sup>[1-6]</sup>。这些资料显示,不同逆境因素影响鱼腥藻固氮的方式和途径虽然彼此有异,但受影响的鱼腥藻在固氮功能上的生理变化有许多相似之处,这与Bhagwat等人在不同逆境因素胁迫下固氮鱼腥藻体内诱导形成共性胁迫蛋白的结果<sup>[7]</sup>相呼应。也就是说,各种逆境因素对鱼腥藻固氮的胁迫作用在结构和功能变化上是一致而相互协调的。为了进一步揭示逆境胁迫下鱼腥藻固氮的生理机制,参照高等植物的逆境生理研究中形成的认识,即(1)植物体内活性氧代谢失调而引发的生物膜结构与功能的破坏是植物蒙受逆境伤害的原因;(2)一系列酶和非酶性活性氧清除系统可以保护植物免受逆境伤害,在这两种看法<sup>[8-13]</sup>的启示下,我们曾观察到,被视为活性氧清除剂的甘露醇可在一定程度上削弱NaCl对鱼腥藻固氮的胁迫<sup>[4]</sup>。至于渗透胁迫下甘露醇对鱼腥藻固氮是否有益,其作用的生理基础和调节机制如何?尚未见报道。为此,我们在以往工作基础上对此问题作了一些探讨。

## 1 材料与方方法

鱼腥藻即鱼腥蓝细菌(cyanobacterium) *Anabaena* sp. 7120以改良的Allen-Arnon无氮培养基于4000 lx 荧光灯和30℃培养5-7 d,然后按前文方法<sup>[15]</sup>收集藻体,经用5 μmol/L的磷酸缓冲液(pH7.2)洗涤,离心数次,藻体沉淀再以同一种营养液悬浮。同一批藻体分成两组,一组加入100 μmol/L的甘露醇,另一组不加甘露醇作为对照,同时置于前述光温条件下继续培养24 h后,分别转放到8-10 ml并盛有以营养液配成浓度为25%的聚乙二醇(PEG6000)的血清瓶中。根据实验方案加有PEG者还要加入一些物质或进行其它处理(具体处理可参见正文)。以不加PEG的为对照。每个处理均重复3次。再盖上橡皮塞,抽气充Ar后按9:1的配比注入Ar和C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>,转放到30℃水浴中照光震荡保温,反应终止后以气相色谱仪测定固氮活性。其它指标测定亦按前文方法<sup>[15]</sup>进行。

## 2 实验结果

### 2.1 甘露醇促进渗透胁迫下鱼腥藻的固氮

在渗透脱水剂PEG的影响下,鱼腥藻的固氮活性急剧下降,添加外源甘露醇后,PEG对鱼腥藻固氮的胁迫明显减弱。同是在PEG胁迫的条件下,添加甘露醇的固氮活性比不添加的高出约2.8倍(表1)。这与我们曾观察到的甘露醇可缓解NaCl对鱼腥藻固氮胁迫的结果<sup>[4]</sup>是一致的。这显示了NaCl和渗透胁迫影响鱼腥藻固氮以及甘露醇缓解两者对固氮的胁迫在机制上的相似性。

表1 甘露醇对渗透胁迫下鱼腥藻固氮活性的影响

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

甘露醇 Mannitol (100 μmol/L)	PEG (25%)	固氮活性 Nitrogen-fixing activity	
		μmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> h <sup>-1</sup> ml <sup>-1</sup>	%
-	-	266.4	100.0
-	+	95.3	35.8
+	-	349.5	131.2
+	+	265.9	99.8

### 2.2 甘露醇增强鱼腥藻固氮与能量的关系

在渗透胁迫下,加入甘露醇能否增强鱼腥藻的固氮或其效应的大小,明显地取决于固氮所需能量的来源和供应水平,其规律与NaCl胁迫下

的鱼腥藻基本相似。这表现在:

1. 当光合作用不能进行(暗中)或受抑(添加磷酸化解联剂 DNP 或 CCCP, ATP 不能形成)时, 即固氮的主要能源受阻的条件下, 甘露醇缓解渗透胁迫固氮的效应减小或几乎完全消失(表 2, 图 1)。

表 2 光或暗下甘露醇对渗透胁迫下鱼腥藻固氮活性的影响

Table 2 Effect of mannitol on nitrogen-fixing activity of *Anabaena* under osmotic stress in light or dark

甘露醇 Mannitol (100 μmol/L)	PEG (25%)	相对固氮活性 Relative N fixing activity (%)
光 Light		
-	-	100.0
-	+	32.1
+	-	135.1
+	+	98.1
暗 Dark		
-	-	6.1
-	+	2.1
+	-	6.8
+	+	2.2

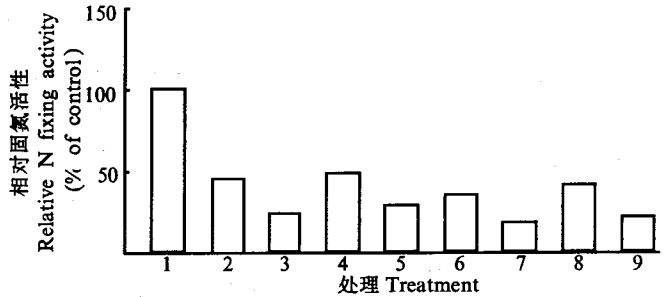


图 1 光合抑制剂存在时甘露醇对渗透胁迫下鱼腥藻固氮活性的影响

Fig. 1 Effect of mannitol on nitrogen-fixing activity of *Anabaena* under osmotic stress in the presence of inhibitors

- 1: Control (-mannitol-PEG-inhibitor);
  - 2: -mannitol-PEG+DNP; 3: -mannitol+PEG+DNP;
  - 4: +mannitol-PEG+DNP; 5: +mannitol+PEG+DNP;
  - 6: -mannitol-PEG+CCCP; 7: -mannitol+PEG+CCCP;
  - 8: +mannitol-PEG+CCCP; 9: +mannitol+PEG+CCCP.
- DNP: 100 μmol/L; CCCP: 100 μmol/L; PEG: 25%;  
Mannitol: 100 μmol/L.

2. 通过需氧途径吸收氢, 满足固氮反应中能量或电子供体的需求, 对增强甘露醇在鱼腥藻固氮抗渗透胁迫中的作用也很重要。图 2 结果显示, 在纯氧下固氮受抑, 但在此条件或同时供应 H<sub>2</sub> 和 O<sub>2</sub> 时, 甘露醇对渗透胁迫固氮的缓解效应即有些增大。

3. 有氧呼吸代谢中形成的能量对于甘露醇能否起良好作用同样是必要的。在厌氧 (Ar) 条件下, 添加甘露醇与否, 鱼腥藻固氮的抗渗透胁迫能力没有什么差异, 反之, 在空气中, 甘露醇的效用增强(图 3)。这同时也说明, 由厌氧发酵形成的能量对甘露醇增强鱼腥藻固氮及其抗逆境胁迫能力是不十分重要的。

### 2.3 碳源和分子氮对甘露醇增强鱼腥藻固氮的作用

碳源和分子氮也影响甘露醇对渗透胁迫下鱼腥藻固氮的增强效果。表 3 的结果显示, (1) CO<sub>2</sub> 的作用特别明显。实验前 24 h 向固氮反应系统中注入 5% CO<sub>2</sub> 后, 鱼腥藻的固氮活性成倍地增高, 即使在渗透胁迫下, 其固氮活性也远比在正常条件下生长的鱼腥藻高, 添加甘露醇的则进一步增强; (2) 分子氮抑制鱼腥藻固氮, 渗透胁迫下受抑程度加剧。如果将分子氮和 CO<sub>2</sub> 同时注入固氮反应系统, 鱼腥藻的固氮活性及其抗渗透胁迫能力即有所增强; (3) 外源蔗糖对甘露醇的良好效应没有什么促进作用。这些结果说明外源碳水化合物对甘露醇缓解渗透胁迫鱼腥藻固氮的效应并不重要, 只有光合碳同化形成的碳水化合物对它才有促进作用。其次, 在渗透胁迫条件下, 适当控制鱼腥藻的碳氮源供应, 满足固氮反应和合成固氮酶蛋白的基质源或物质需求, 以增强固氮的酶促反应速率, 从而提高鱼腥藻的固氮效率和固氮的抗逆能力是重要的。

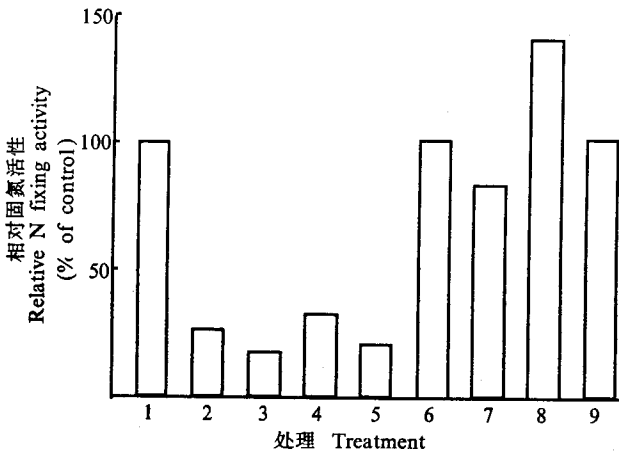


图2 氢和氧加合时甘露醇对渗透胁迫下鱼腥藻固氮活性的影响

Fig. 2 Effect of mannitol on nitrogen-fixing activity of *Anabaena* under osmotic stress in the addition of H<sub>2</sub> together with O<sub>2</sub>

- 1: Control (-mannitol-PEG-O<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>);
  - 2: -mannitol-PEG+O<sub>2</sub>; 3: -mannitol+PEG+O<sub>2</sub>;
  - 4: +mannitol-PEG+O<sub>2</sub>; 5: +mannitol+PEG+O<sub>2</sub>;
  - 6: -mannitol-PEG+O<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>; 7: -mannitol+PEG+O<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>;
  - 8: +mannitol-PEG+O<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>; 9: +mannitol+PEG+O<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>.
- H<sub>2</sub>: 20%; O<sub>2</sub>: 20%; PEG: 25%; Mannitol: 100 μmol/L

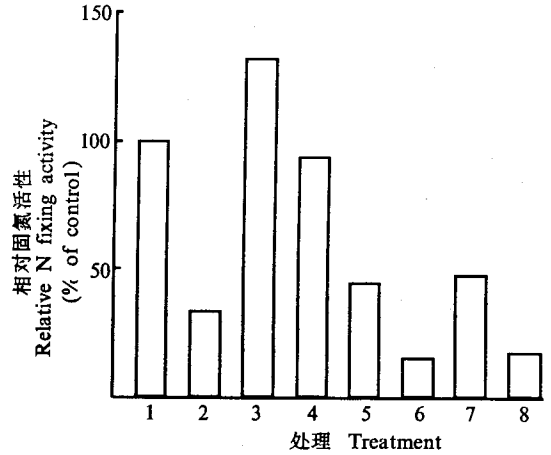


图3 厌氧情况下甘露醇对鱼腥藻固氮活性的影响

Fig. 3 Effect of mannitol on nitrogen-fixing activity of *Anabaena* under osmotic stress and anaerobic condition

- 1: In air-mannitol-PEG; 2: In air-mannitol+PEG;
  - 3: In air+mammitol-PEG; 4: In air+mammitol+PEG;
  - 5: In Ar-mannitol-PEG; 6: In Ar-mannitol+PEG;
  - 7: In Ar+mammitol-PEG; 8: In Ar+mammitol+PEG.
- PEG: 25%; Mannitol: 100 μmol/L

表3 CO<sub>2</sub>或CO<sub>2</sub>与N<sub>2</sub>加合以及蔗糖存在时甘露醇对渗透胁迫下鱼腥藻固氮活性的影响

Table 3 Effect of mannitol on nitrogen-fixing activity of *Anabaena* under osmotic stress in the addition of CO<sub>2</sub> or CO<sub>2</sub>+N<sub>2</sub> and in the presence of sucrose

甘露醇 Mannitol (100 μmol/L)	PEG (25%)	CO <sub>2</sub> (20%)	N <sub>2</sub> (40%)	蔗糖 Sucrose (0.5%)	相对固氮活性 Relative N fixing activity (%)
-	-	-	-	-	100.0
-	+	-	-	-	33.3
+	-	-	-	-	136.4
+	+	-	-	-	87.3
-	-	+	-	-	500.0
-	+	+	-	-	350.0
+	-	+	-	-	682.0
+	+	+	-	-	481.1
-	-	-	+	-	24.7
-	+	-	+	-	12.2
+	-	-	+	-	26.0
+	+	-	+	-	14.6
-	-	+	+	-	412.3
-	+	+	+	-	264.3
+	-	+	+	-	546.6
+	+	+	+	-	345.2
-	-	-	-	+	151.4
-	+	-	-	+	94.0
+	-	-	-	+	156.6
+	+	-	-	+	95.6

### 3 讨论

前文曾报道<sup>[1-5]</sup>不同逆境因素对鱼腥藻固氮的胁迫作用都受能量、碳氮源和合成固氮酶蛋白的物质供应水平、固氮酶活性高低以及鱼腥藻对环境的适应能力制约,且在固氮的生理变化规律上彼此有许多相似之处。本文中外源甘露醇可以增强鱼腥藻固氮的抗渗透胁迫能力的结果表明,渗透胁迫也与NaCl抑制鱼腥藻固氮一样,可能是活性氧代谢失调造成,再次显示不同逆境因素对鱼腥藻固氮的胁迫之间有共同的调节机制。同时还进一步说明,从调节鱼腥藻(其它固氮生物也是如此)体内活性氧代谢角度着手,研究种种逆境因素(包括渗透胁迫)条件下甘露醇一类活性氧清除剂增强鱼腥藻固氮的生理生化机制及至分子基础,并比较其间的异同,进而阐明固氮及其调节机理,显然是重要的。

甘露醇能否提高鱼腥藻固氮的抗渗透胁迫能力,也取决于能量来源和水平以及生理代谢活动的强弱。本文结果揭示,在渗透胁迫下,甘露醇的有益作用只有在光合作用(光下)或是有氧呼吸代谢(空气中)正常进行的条件下方可表现出来。固氮反应系统中额外能量增加(如同时供应H<sub>2</sub>和O<sub>2</sub>以利羟化反应的进行,增强H<sub>2</sub>对固氮的支持)时,甘露醇解除或削弱渗透对固氮的胁迫效用即有所增强。改善合成固氮酶蛋白的物质供应(如提高CO<sub>2</sub>浓度或是同时供应CO<sub>2</sub>和N<sub>2</sub>)可以增强甘露醇对固氮的支持。反之,能量和合成固氮酶蛋白的物质供应不足(暗中、添加光合抑制剂、仅供给N<sub>2</sub>和Ar)时,甘露醇的有益作用即减弱甚至消失。因此,研究活性氧清除剂(包括甘露醇)缓解逆境因素对鱼腥藻等固氮生物固氮的胁迫及其调节机制时,应该注意制约清除剂效用发挥的内在生理代谢和外部环境的影响。

活性氧清除系统(包括酶性和非酶性)与提高植物(包括固氮微生物)抗逆境胁迫能力之间的关系,一直是人们关注的问题<sup>[8-13]</sup>。前文和本文中被视为活性氧清除剂之一的甘露醇可以提高鱼腥藻固氮的抗渗透和NaCl胁迫能力的结果显示,活性氧清除系统的生理效用还可以扩展到未被人们注意的逆境胁迫下的固氮过程。这说明,在研究活性氧清除剂增强固氮生物固氮机制的同时,寻求如何通过调节活性氧清除系统的生理代谢以达到减轻或消除逆境对固氮生物生长及其固氮过程的危害,从而增加固氮生物向大田输送氮素的肥效和农作物产量的途径,这也是生产实践中一个值得考虑的课题。

### 参考文献

- 1 陈因, 方大惟. 短期高温处理对蓝藻*Anabaena* 7120固氮活性的影响. 核农学报, 1990, 4:219-224
- 2 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
- 3 陈因, 方大惟. 低温对渗透胁迫下蓝藻固氮的影响. 植物生理学通讯, 1993, 30:174-177
- 4 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, 1:47-52
- 5 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
- 6 Thomas T S, Apte B, Reddy B R. Sodium metabolism in cyanobacterial nitrogen fixation and salt tolerance. In: Bothe H, Bruiju D, Newton W E eds. Nitrogen Fixation Hundred Years After. New York, Fischer Stuttgart, 1988, 195-201
- 7 Bhagwat A A, Apte S K. Comparative analysis of proteins induced by heat shock, salinity and osmotic stress in the nitrogen-fixing cyanobacterium, *Anabaena* sp. strain L-31. J Bact, 1989, 171:5187-5189
- 8 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