

# 萍藻重组研究Ⅱ、应用孢子果技术 获得萍藻重组成功

郑德英 林 沧 刘中柱 唐龙飞

(福建省农业科学院红萍研究中心)

## 提 要

应用去除藻体细胞的老熟或萌动的大孢子果直接加入同种或异种红萍大孢子果的鱼腥藻，取得了重新组合，其成功率达10%。重新组合的萍藻，第一步经显微镜观察、固氮酶活性测定，结果表明，重新组合的大孢子果萌发出来的红萍体内具有鱼腥藻；第二步采用单克隆抗体检测验证，确认为萍藻重组成功，其组合为细绿无藻萍×小叶萍鱼腥藻、细绿无藻萍×墨西哥萍鱼腥藻、小叶无藻萍×细绿萍鱼腥藻、细绿无藻萍×细绿萍鱼腥藻。小叶无藻萍×小叶萍鱼腥藻。

本试验经历了两个阶段，一为无藻萍的获得，已作过报道<sup>[1]</sup>；二为萍藻重组。本文报道第二部分。

萍藻重组试验是生物技术在红萍理论研究和红萍育种实践的具体应用和系统工程。本试验从1979年至1986年在我院土肥所和红萍中心实验室里进行。

## 一、材料与方法

### (一) 材料

细绿萍 (*Azolla filiculoides*)、小叶萍 (*Azolla microphylla*)、墨西哥萍 (*Azolla mexicana*) 及其他成熟的红萍大小孢子果。

### (二) 方法

以本种的大小孢子果混养，取得受精的大孢子果。按细绿无藻萍×小叶萍鱼腥藻、(“×”表示重组，以下同) 细绿无藻萍×墨西哥萍鱼腥藻、小叶无藻萍×细绿萍鱼腥藻、细绿无藻萍×细绿萍鱼腥藻、小叶无藻萍×小叶萍鱼腥藻的组合方式，把细绿萍、小叶萍孢子果置于解剖镜下，用小刀切去漏斗状膜和囊群盖，分别以小叶萍、墨西哥萍、细绿萍孢子果的囊群盖小心接上，并留有不移接的作为对照。之后置于20~28℃下培养。待幼苗长出3~4片叶时，移入含有50ppm硝酸铵的6302培养液<sup>[6]</sup>，当孢子苗长达7~8片叶后就可转至土培，土壤应以高压消毒为宜。

1. 陆培基同志为本试验提供部分孢子果，程由铨、郑琦等同志协助单克隆抗体测定，特此一并致谢。

2. 本文于1989年5月30日收到。

### (三) 检验技术

1. 显微镜观察, 2. 固氮酶活性测定, 采用乙炔乙烯还原法。3. 红萍鱼腥藻的单克隆抗体鉴定<sup>[4,5]</sup>, 以红萍体内鱼腥藻与单克隆抗体C16直接荧光标记物(C16-FITC)的反应检测。

## 二、试验结果

### (一) 萍藻重组试验

采用受精的细绿萍大孢子果, 去掉其囊群盖里的鱼腥藻细胞, 然后移接上小叶萍、墨西哥萍或细绿萍大孢子果鱼腥藻, 促使小叶萍鱼腥藻、墨西哥萍鱼腥藻或细绿萍鱼腥藻与细绿无藻萍重新共生, 结果获得成功。同样, 以去掉藻细胞的小叶萍大孢子果移接上细绿萍大孢子果或小叶萍大孢子果的鱼腥藻, 也取得重组的成功(表1、4)。同、异种藻重新组合的移接, 都培育出重新共生的萍体。重组机率为10%。

但必须强调, 萍藻重组机率与孢子果不同成熟度有密切的关系。不同成熟度的孢子果, 其重组机率也不同(表2)。采用果顶和基部棕褐色深, 黄带明显的黄熟大孢子果作重组试验, 虽然能萌动出苗, 但是有藻的重组萍几乎没有(表3)。取浮漂已露出的成熟大孢子果进行重组试验, 尽管重组的机率很低, 但还能得到重组的有藻萍(表4)。如果取浮漂已张开的萌动大孢子果重组, 结果表明, 其出苗整齐, 重组后有藻萍的比率有所提高(表5)。综上, 以浮漂张开的萌动大孢子果作材料, 取得的效果最好, 而以老熟的大孢子果作试验材料效果也好。后两种是本试验技术的关键所在。

表1 异种萍藻重组试验结果

组	合	孢子果数 (粒)	总苗数 (朵)	有藻苗 (朵)	镜检	单克隆抗体检测
小叶无藻萍 × 细绿萍鱼腥藻		68	47	1	有藻	细绿萍鱼腥藻
小叶无藻萍 × 细绿萍鱼腥藻		78	41	1	有藻	细绿萍鱼腥藻
对 照		30	15	15	有藻	小叶萍鱼腥藻
细绿无藻萍 × 小叶萍鱼腥藻		65	16	1	有藻	小叶萍鱼腥藻
细绿无藻萍 × 墨西哥萍鱼腥藻		80	25	1	有藻	墨西哥萍鱼腥藻
对 照		30	7	7	有藻	细绿萍鱼腥藻

表2 孢子果不同成熟度对萍藻重组的影响

孢子果成熟度	试验次数		孢子苗数	
	总试验数	有藻试验数	总出苗数	有藻苗
浮漂未露、黄带明显(黄熟孢子果)	11	0	164	0
浮漂已露、囊群盖与孢子果拉开距离(老熟孢子果)	26	4	777	7
浮漂张开(萌动孢子果)	12	7	546	39

表3 黄熟大孢子果重组试验萌发情况

组	合	大孢子果 (粒)	总苗数 (朵)	有藻苗 (朵)
细绿无藻萍×墨西哥萍鱼腥藻		80	13	/
细绿无藻萍×小叶萍鱼腥藻		50	11	/
细绿无藻萍×莆田萍鱼腥藻		15	1	/
细绿萍		30	5	5
小叶无藻萍×细绿萍鱼腥藻		50	6	/
小叶萍		33	18	18
墨西哥无藻萍×小叶萍鱼腥藻		62	13	/
墨西哥萍		42	7	7

表4 老熟的大孢子果重组试验情况

组	合	大孢子果数 (粒)	总苗数 (朵)	有藻苗 (朵)
小叶无藻萍×细绿萍鱼腥藻		80	58	1
小叶无藻萍×细绿萍鱼腥藻		68	47	1
小叶无藻萍×小叶萍鱼腥藻		30	15	15
细绿无藻萍×小叶萍鱼腥藻		65	16	1
细绿无藻萍×小叶萍鱼腥藻		60	13	/
细绿无藻萍×细绿萍鱼腥藻		30	7	7

表5 萌动的大孢子果重组试验结果

组	合	大孢子果 (粒)	培养日期 (月、日)	出苗日期 (月、日)	总苗数 (朵)	有藻苗 (朵)
小叶无藻萍×细绿萍鱼腥藻		71	10.21	10.27~11.18	55	/
小叶无藻萍×细绿萍鱼腥藻		75	10.22	10.30~11.10	48	6
小叶无藻萍×细绿萍鱼腥藻		69	10.23	11.4~11.10	63	10
小无叶藻萍×细绿萍鱼腥藻		78	10.24	11.7~11.10	62	5
小叶无藻萍×小叶萍鱼腥藻		50	10.28	11.5~11.18	26	26

表6 不同处理的红萍固氮酶活性比较

序 数	项 目	处 理	固氮酶活性 (毫微克分子乙烯/克·鲜重·小时)
178	萍藻重组	小叶无藻萍×绿细萍鱼腥藻	393.85
157	萍藻重组	细绿无藻萍×小叶萍鱼腥藻	1114.13
164	无藻萍	小叶无藻萍	0
149	无藻萍	细绿无藻萍	0
CK <sub>1</sub>	正常红萍	小叶萍	942.60
CK <sub>2</sub>	正常红萍	细绿萍	500.50

## (二) 重组苗的鉴定

重组试验后萌发的幼苗，有为数甚少的有藻共生苗，还有无藻共生的幼苗，所以重组后萌发的幼苗需要进行严密的检测。

1. 立体解剖镜下初析。当重组苗生长到7~8片叶后，可把小苗放在立体解镜下观察，假如重组后有藻，那么在小苗叶片的共生腔位置呈现出浓绿一团，可以与叶腔以外的部位明显区别开来。如果重组失败，藻没有进入萍体内，亦即重组后出现无藻萍，那么，在小苗叶片的共生腔处没有明显的色译或较透亮，整个叶片颜色一致。

表7 萍藻重组试验各处理红萍鱼腥藻单克隆抗体G<sub>16</sub>-FITC反应情况

序 数	实 验 处 理	各处理藻与G <sub>16</sub> -FITC反应				
		10月7日	10月29日	11月7日	11月29日	12月17日
172	小叶无藻萍×细绿萍鱼腥藻			+	+	+
178	小叶无藻萍×细绿萍鱼腥藻			+	+	+
157	细绿无藻萍×小叶萍鱼腥藻		-		-	-
160	小叶无藻萍×小叶萍鱼腥藻		-	-		-
159	细绿无藻萍×细绿萍鱼腥藻		+	+		+
CK <sub>1</sub>	正常小叶萍鱼腥藻	-	-	-	-	-
CK <sub>2</sub>	正常细绿萍鱼腥藻	+	+	+	+	+

2. 压片镜检 取小苗叶片压碎后以显微镜观察，可以看出重组后有无藻的共生，不过，这样容易导致小苗枯死，白费一株幼苗。

3. 固氮酶活性测定 将提供测定的红萍制样，以气相色谱仪日本岛津GC-7A测定其固氮酶活性。结果表明，重组后有藻共生的萍体，都有固氮酶活性，而无藻共生的萍体则没有固氮酶活性（表6）。

4. 红萍鱼腥藻的单克隆抗体检测 以上镜检，仅能观察重组后有无藻的共生，真正鉴别是否为重组藻，尚需用单克隆抗体检测。经过多次反复检测，证实了重组试验是成功的，所接入的藻已安然无恙地共生在新的萍体叶腔中（表7）。

## 三、讨 论

### (一) 应用有性繁殖器官——孢子果进行萍藻重组的方法是可行的

关于萍藻共生关系，前人有过许多论述。Smith<sup>[6]</sup>对红萍同化叶切片观察，认为鱼腥藻是从红萍幼叶共生腔下方的缺口进入共生腔内。Hill<sup>[6]</sup>观察，认为萍与藻的发育是一致的，随着萍体叶片的生长分化，出现了共生腔，藻细胞跟着进入共生腔内。由于红萍茎尖培养获得无藻萍成功<sup>[1,2,7,10]</sup>，自然导致人们设想应用离体鱼腥藻与无藻萍进行重组，而获得

较高固氮能力的萍种。白克智等<sup>[2]</sup>曾报道，分离培养的纯离体鱼腥藻注入无藻萍叶腔，几天后从萍体叶腔切片中可见有鱼腥藻，但是藻与萍均死亡。我们也将无藻萍培养在有离体鱼腥藻的环境里，采用减压渗入接藻法强迫离体红萍鱼腥藻重新到达无藻萍茎尖部位，经过试验，取得了同种萍藻重组的成功。<sup>[3]</sup>但其他种间萍藻交换未获得满意的结果。

另一方面，据报道<sup>[8,9]</sup>和我们的观察，红萍大孢子果的囊群盖内聚集着鱼腥藻的厚垣孢子，厚垣孢子与红萍同时萌发，生长，随着大孢子的萌发，叶子的发育腔孔边缘的细胞团合，红萍鱼腥藻也随着封闭在腔内。我们掌握在红萍大孢子果萌发之前，也就是即将萌发的萍体与藻细胞两者生理状态最活跃时期，而藻细胞尚未进入幼叶拱形包裹的空间内——生长点顶端或红萍叶腔下方缺口时，彻底去除藻体细胞，有目的地接入另一种红萍藻体细胞，促进无藻的孢子果刚萌发出来的萍体接受了另加的藻体细胞，重新建立共生关系。试验表明，要取得成功，要累积经验，选择合适的受体（萍）与供体（鱼腥藻），有足够的数量并具有侵染活性的外源鱼腥藻，并掌握好短暂的时期。

### （二）、关于萍藻重组后的鉴定问题

从镜析、固氮酶活性测定等验证手段，一般只能识别萍体里是否有鱼腥藻的共生，而不同种红萍其鱼腥藻形态虽有不同，但作为分类鉴定尚不可靠，单克隆抗体检测才是一种最新的可靠方法。

红萍鱼腥藻单克隆抗体是一种利用淋巴细胞杂交瘤单克隆抗体技术，探索红萍体内鱼腥藻细胞表面抗原结构，它具有灵敏度高，特异性强和重复性好的特点。从萍藻重组研究多次检测结果表明，鱼腥藻的抗原性均保持稳定，它是一种准确、迅速的监测技术，也是当前最有效的检测特异抗原的手段，它为红萍鱼腥藻的分类提供可靠的科学依据。

### （三）萍藻重组方法的科学价值和实践意义

前人对萍藻共生关系曾做过大量工作，均系描述性和机理方面；而种内、种间萍藻重组成功，这除了我们已发表一部分外<sup>[3,11]</sup>，在国内外还未见其他报道。萍藻重组为研究萍藻共生关系提供了有效途径，它干预了红萍的最重要性状——固氮能力，步入遗传育种学范畴。

从二次水稻新品种的飞跃，都是以育种方法上创新来开始的。相信，应用有性繁殖器官——孢子果进行萍藻重组方法的建立，今后将使固氮性能高、抗逆性能强的萍种层出不穷，前景广阔。

## 四、结 论

1. 在雌雄混养的红萍大孢子果上切除其漏斗状膜和囊群盖，可以彻底清除大孢子果内所含的鱼腥藻，在无外源鱼腥藻感染的情况下，能获得纯净的无藻萍。
2. 应用去除漏斗状膜和囊群盖的红萍大孢子果，直接加入同种或异种红萍大孢子果鱼腥藻，可以取得重新组合的成功，其方法是可靠的。重组成功率为10%。

- 3.老熟与萌动的大孢子果是应用孢子果技术取得萍藻重组的关键所在。
- 4.重新组合的萍藻——细绿无藻萍×小叶萍鱼腥藻、细绿无藻萍×墨西哥萍鱼腥藻、小叶无藻萍×细绿萍鱼腥藻，细绿无藻萍×细绿萍鱼腥藻、小叶无藻萍×小叶萍鱼腥藻，经单克隆抗体等验证，确认多是萍藻的重新组合。
- 5.应用孢子果技术取得萍藻重组的方法，将为红萍育种提供新的途径，也将以萍藻共生机理更好地造福于人类。

### 参 考 文 献

- 1.郑德英等，1987，萍藻重组研究 I、无藻萍的获得及其验证技术研究。福建省农科院学报，2(2)：42~47
- 2.白克智等，1979。无藻满江红(*Azolla*)和满江红鱼腥藻(*Anabaena Azollae*)的分离与纯化培养。科学通报，24(14)：664~666
- 3.Liu Chung-chu. et al. 1981. The potential of *Azolla* As a Nitrogen source for paddy soil. Current perspective in Nitrogen Fixation, Australia Acad.sci. 501
- 4.刘中柱等，1986。红萍鱼腥藻单克隆抗体的研究。福建省农科院学报，1(2)：1~7
- 5.唐龙飞等，1988。单克隆抗体荧光标记物C<sub>16</sub>-FITC对萍藻重组体的鉴定。福建农业科技(2)27~28
- 6.陈扬春编著，1985。满江红。科学出版社出版，93~99
- 7.郑德英、陈扬春，1980。茎尖培养获得无藻萍。福建农业科技(4)：31~32
- 8.生物学系固氮生物研究组，1977，红萍的孢子果和有性繁殖。广东师院学报，(1)：3~7
- 9.何国藩等，1982。对红萍成熟大孢子果的电镜扫描与研讨。中国农业科学，(1)：28~30
- 10.廖嘉信等，1979。甘薯无病毒苗培育及病毒检定。中华农业研究，28(3)：139~144
- 11.林伦等，1988。无藻满江红(*Anabaena-free Azolla*)和满江红鱼腥藻(*Anabaena azollae*)重建共生体，中国科学B辑(7)：700~708

# THE RECOMBINATION BETWEEN ANABAENA-FREE AZOLLA WITH ANABAENA AZOLLAES Ⅱ. THE ACHIEVEMENT OF RECOMBINATIONS BETWEEN ANABAENA-FREE AZOLLA AND ANABAENA AZOLLAES BY USING SPOROCARP TECHNIQUE

Zheng Deying, Lin Cang,  
Liu Chungchu, Tang Longfei  
(*Azolla Research Centre,*  
*Fujian Academy of Agricultural Sciences*)

## ABSTRACT

The recombination were achieved by directly putting anabaena azollae from megasporocarp of same or different Azolla species into the mature or germinating megasporocarp which had been eliminated anabaena cells and the recombination rate is 10%. The recombined Azolla was firstly examined under microscope and tested the nitrogenase activity analysis as showing that Anabaena azollae existed in recombined Azolla frond which developed from megasporocarp previously eliminated anabaena cells. Secondly, the analysis by monoclonal antibody also proved the success in recombination and confirmed the newreestablished partners are: Anabaena-free *A. filiculoides* × Anabaena azollae from *A. microphylla*; Anabaena-free *A. filiculoides* × Anabaena azollae from *A. mexicana*, and Anabaeza-free *A. microphyllaes* × Anabaena azollae from *A. Filiculoides* and Anabaeza-free *A. filiculoides* × Anabaena azollae from *A. filiculoides*; Anabaena-free *A. microphylla* × Anabaena azollae from *A. microphylla* respectively.