

红萍的基础理论研究

黄毅斌 林永辉 应朝阳 翁伯琦 主编

中国农业科学技术出版社

红萍的基础理论研究

黄毅斌 林永辉 应朝阳 翁伯琦 主编

中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

红萍的基础理论研究 / 黄毅斌等主编. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2017. 10

ISBN 978 - 7 - 5116 - 2509 - 0

I. ①红… II. ①黄… III. ①蕨类植物 - 研究 IV. ①Q949. 36

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 023902 号

责任编辑 李 雪 徐定娜

责任校对 贾海霞

出版者 中国农业科学技术出版社
北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电 话 (010) 82105169 (编辑室) (010) 82109702 (发行部)
(010) 82109709 (读者服务部)

传 真 (010) 82109707

网 址 [http://www. castp. cn](http://www.castp.cn)

经 销 者 各地新华书店

印 刷 者 北京科信印刷有限公司

开 本 787mm × 1 092mm 1/16

印 张 29.25

字 数 750 千字

版 次 2017 年 10 月第 1 版 2017 年 10 月第 1 次印刷

定 价 68.00 元

《红萍的基础理论研究》

编 委 会

主 任：刘中柱 唐龙飞 翁伯琦

副 主 任：黄毅斌 刘明香 应朝阳 王义祥

主 编：黄毅斌 林永辉 应朝阳 翁伯琦

参编人员：郭燕玲 李振武 刘 晖 陈 斌 徐国忠

郑向丽 王俊宏 刘明香 王义祥 姚宇红

黄秀声 陈敏健 冯德庆 陆 烝 林忠宁

陈钟佃 韩海东 陈志彤 钟珍梅 罗旭辉

王成已 陈 恩 李春燕 杨有泉 李艳春

序

——红萍研究 30 年

20 世纪中后期,为解决世界人口增长的粮食供应问题,投入大量化学肥料以提高粮食产量成为当时农业生产的主要选择。据国际粮农组织统计,1976—1977 年,发展中国家仅生产全世界化肥总量的 21%,而实际消耗世界化肥总量的 31% (FAO, 1978)。以合成氨生产工艺为主的氮肥工业是高能耗的产业,高能耗带来的高成本给化肥工业带来巨大压力。20 世纪 70 年代中期,世界上发生了第一次石油危机,欧、美许多氮肥厂因不堪重负而纷纷关闭。同时,随着国际环保运动的兴起,人类开始意识到“石油化工”农业虽然能为世界带来粮食的增长,但也造成大气污染、土壤酸化、地力衰退、农产品品质下降等负面影响。20 世纪,为解决农业生产对能源的过度消耗和环境污染的巨大压力,国际上再次兴起生物固氮的研究高潮,推崇有机农业的潮流逐步兴起。基于中国、越南等亚洲国家在稻作生产中应用红萍作为有机肥的悠久历史,科学家把解决水稻生产中的氮肥出路寄托于具有生物固氮能力的红萍,从而兴起国际红萍的研究高潮。1978 年 9 月 18—21 日,联合国粮农组织 (FAO) 邀请 28 位相关国家的科学家,在菲律宾国际水稻研究所 (IRRI) 召开“国际氮和水稻学术讨论会”,福建省农业科学院的刘中柱研究员作为中国科学家应邀参会并做“红萍在中国水稻生产中的应用”的专题报告,引起了国际学术界对中国红萍研究的关注。

一、成立福建省农业科学院红萍研究中心

刘中柱同志 1978 年参加“国际氮与水稻学术讨论会”后,与时任农牧渔业部何康部长、中国农业科学院卢良恕院长以及国内外红萍专家商讨成立红萍研究的专业机构,并向福建省农业科学院党委提议成立福建省农业科学院红萍研究中心,经过研究,同意向上级有关部门提出申请。

福建省农业委员会于 1983 年 3 月 8 日批复 (闽农委〔1983〕018 号文件《关于合办红萍固氮研究中心报告的批复》),同意福建省农业科学院与农牧渔业部联合共建红萍固氮研究中心。福建省编制委员会也于 1983 年 10 月 29 日作了批复 (闽编〔1983〕047 号文件《关于省农业科学院〈关于请审批红萍固氮研究中心人员编制的请示报告〉的批复》),同意成立红萍固氮研究中心,正式人员编制为 25 人。1983 年 12 月 15 日,红萍固氮研究中心在福建省农业科学院位于福州市新店镇埔垵村的研究基地正式破土动工兴建,1984 年 10 月底竣工。建成的红萍固氮研究中心占地面积为 4 亩^①,建有实验楼、温室、网室、人工气候

^① 1 亩 $\approx$ 666.7m², 1hm² = 15 亩,全书同。

室、养殖池等工程。

1985年3月31日—4月5日,“红萍固氮研究中心落成典礼暨国际红萍利用学术讨论会”在福建省农业科学院红萍固氮研究中心隆重举行。福建省政府黄长溪副省长主持“红萍固氮研究中心落成典礼暨国际红萍应用学术讨论会”开幕式,联合国粮农组织亚太地区办公室主任邓特(Dr. Dent)致开幕词。出席会议的有联合国粮农组织(FAO)、国际原子能机构(IAEA)、国际水稻研究所(IRRI)、国际肥料发展中心(IFDC)和澳大利亚国际农业研究中心(ACIAR)5个国际组织以及来自亚、美、欧、非和大洋洲的15个国家的官员、专家、学者33人。国内农业生产、科研和高等院校等有关单位的专家58人,其中有国际水稻研究所副所长格林兰博士(Dr. Grinland)、国际水稻研究所土壤微生物系主任渡边岩博士(Dr. Iwao Watanabe)、氮肥专家克拉西威尔博士(Dr. Craswell)、中国农业科学院任志副院长、农牧渔业部科技司徐广华总农艺师、中国农学会秘书长方粹农研究员等著名专家。开幕式后,在新建成的红萍研究中心大楼五层学术会议厅召开了为期6d的“国际红萍应用学术讨论会”。大会提交论文28篇、墙报27篇,包括红萍分类学、形态学、萍藻共生体生理学、多目的用途的红萍利用、红萍利用的农经研究等诸多领域。国际水稻研究所于1987年出版了这次“国际红萍应用学术讨论会”论文集(*Azolla Utilization—Proceedings of the Workshop on Azolla Use, Fuzhou, Fujian, China*)。红萍固氮研究中心的建立,有力地推动了国内外红萍研究与应用的发展。

红萍固氮研究中心组建时,人员主要来自福建省农业科学院土壤肥料研究所绿肥研究室(从事红萍应用研究)与新技术研究室(从事生物固氮和同位素示踪研究),还从院外调进农业机械制造的人员。当时,红萍固氮研究中心打破传统的研究室设置,直接由中心主任管理课题组,实行组间人员的相对固定和灵活的调配方式,目的在于需要时能集中力量研究大的项目或课题,便于课题组的分工、合作和管理。红萍固氮研究中心设立的主要课题组有:红萍育种研究课题组、同位素示踪课题组、红萍保种课题组(红萍品种资源圃)、单克隆抗体课题组、稻萍鱼课题组和球肥深施机课题组等。红萍固氮研究中心成立时有高级研究人员6人,中级、初级研究人员各8人,研究人员的平均年龄是当时院属研究所中最小的。

红萍固氮研究中心成立初期的研究工作重点是与国际同类研究接轨,研究项目集中于红萍固氮生理、萍—藻关系、红萍富钾、单克隆抗体技术、红萍杂交育种和红萍的肥、饲、饵料应用;涉及的学科包括植物生理生化、作物栽培学、肥料学、土壤学、免疫生物学、微生物学和分子生物学。另外,在稻萍鱼共生体系研究中接触到水产养殖学。1989年8月,国际土壤肥力与水稻可持续农业协作网(INSURF)决定,将红萍分网的领导中心设在福建省农业科学院红萍固氮研究中心。

红萍固氮研究中心成立后,在时任福建省农业科学院院长、红萍固氮研究中心主任的刘中柱研究员的带领下,在国际上首次实现人工萍—藻共生体的建立、首次将单克隆抗体技术应用于植物源性的满江红体内鱼腥藻的鉴定、首次采用人工干预手段培育出红萍杂交新品种、首次阐明红萍富钾的生理学特性。创立了稻—萍—鱼高产共生生态农业模式,通过“调控稻田人工生物圈及其新耕作体系”的研究与实践,提出“高产、低耗、低污染”的农业发展理念。红萍固氮研究中心在成立后的10多年中,取得12项省、部级三等奖以上科研成果、5项发明专利;召开了两次国际学术讨论会、承办了两个国际红萍和INSURF培训班;与国际水稻研究所、澳大利亚国际农业研究中心、国际肥料发展中心、比利时鲁汶大

学、日本三重大学等知名科研院所、学校开展国际协作研究；红萍固氮研究中心选送了8人出国参加学术交流和技术培训，国内外科技交流活动十分频繁。红萍固氮研究中心的研究成果和培育的红萍品系在东南亚以及我国南北方的广大地域得到推广与应用，极大地促进了国内外红萍的研究和应用。

（一）国内外学术交流日益广泛

1979年，刘中柱参加由中国农业科学院组织的访问团到国际水稻所访问，并在“水稻与氮国际学术讨论会”上宣读了《红萍在中国的养殖与利用》论文，引起渡边岩等国际红萍知名专家的重视，由此打开红萍研究、土壤肥料等学科与国际交流的渠道。随后召开两次国际学术讨论会（1985年3月召开国际红萍学术讨论会；1987年11月召开国际蓝藻固氮学术讨论会）；1987年6月5—19日、1988年6月19日至7月4日，红萍研究中心与国际水稻研究所合作在福建举办两个国际红萍和INSFFER培训班，是当时福建省对外科技交流最早、最活跃的科研单位之一；期间，还召开了4次全国红萍协作组会议，对促进红萍在北方的应用起到推动作用。通过和国际水稻研究所、澳大利亚国际农业研究中心、美国相关研究机构之间合作研究和国际合作项目，派送中心内研究人员参加攻读国际水稻所、菲律宾大学研究生学位、INSFFER培训班等提高了学术水平。

（二）基础研究成效显著

攻克了几个世界性难题，如满江红鱼腥藻—无藻满江红重建共生体、满江红鱼腥藻单克隆抗体建立与应用、红萍有性杂交育种研究、红萍富钾生理研究、萍—藻关系的电镜观察等基础研究居世界领先水平，在国际性刊物、国际会议论文集上发表后受到同行的高度评价。其中，较有影响力的文章有：《无藻满江红和满江红鱼腥藻重建共生体》（《中国科学》，B辑，1988）；《满江红鱼腥藻单克隆抗体的制备与应用研究》（《中国科学》，B辑，1989）；《满江红有性杂交研究及其鉴定》（《作物学报》，1994）；《稻田高效、低耗、低污染的持续农业模式研究》（《中国农业科学》，2000）；《不同光照条件下4种满江红（*Azolla*）品系体内多酚氧化酶活性的变化》（《植物生理学报》，1999）；《红萍富钾生理的研究—II. 萍体钾对水稻生产的有效性》（《中国农业科学》，1986）；《满江红大孢子果萌发与成苗期间蕨—藻共生关系的电镜观察》（《植物学报》，1990）；《稻—萍—鱼体系对稻田土壤环境的影响》（《中国生态农业学报》，2001）等。

在国际上，某些科研机构也出版专册或论文集宣传红萍研究中心取得的科研成果或技术。例如，1987年，国际水稻研究所出版了在红萍研究中心召开的“国际红萍应用学术讨论会”的论文集 *Azolla Utilization - Proceedings of the Workshop on Azolla Use, Fuzhou, Fujian, China*。1988年，联合国粮农组织亚太地区办公室专门为稻萍鱼耕作体系出版了英文刊物《亚太地区的有机循环农业：稻—萍—鱼耕作制度》（*Organic Recycling in Asia and the Pacific: The Rice - Azolla - Fish System*），旨在普及中国的红萍研究与应用成果。

（三）应用研究与示范推广不断加强

最先在国内外实践了稻萍鱼生态农业模式技术及红萍作为生物氮、钾肥的利用、立体农业研究等，这些工作不但在全国引起极大反响，而且对东南亚乃至世界农业耕作制的走向也

起到示范作用。

(四) 获得大批高等级的成果奖

红萍研究中心自成立以来,先后获得国家丰收二等奖、农业部科技进步一、二等奖及福建省科技进步二三等奖共 11 项,成为福建省农业科学院当时成果多产的研究所之一。

(五) 争取了大量研究经费与科研设施

红萍研究中心当时拥有的质谱仪、大型人工气候箱(3 台)、植物培养箱、低温冷冻切片、-60℃ 冰箱、倒置显微镜、荧光显微镜、超净工作台、分光光度计、气相色谱仪和二氧化碳分析仪等仪器价值超过 200 万元,可以从事植物培养、生理生化测定、土壤肥料、金属离子分析以及植物显微观察等方面的分析与研究,这些仪器绝大部分是从国际合作项目中获得的。很明显,红萍研究中心在与国内外科技交流合作活动中提升了综合实力。

二、红萍种质资源的征集保存与育种研究

(一) 红萍资源的征集与分布

红萍研究中心自 1978 年开始收集红萍资源,共征集国内外红萍资源和人工育种材料 568 份,其中有分布世界各地的地方红萍资源,也有人工萍—藻共生体、有性杂交后代以及辐射育种后代等。目前仍保存有 505 个红萍品系,是世界上保存红萍种质资源最多的研究机构。红萍资源的征集渠道主要通过国内外知名机构(国际水稻研究所、比利时鲁汶大学、澳大利亚国际农业研究中心、日本三重大学、中国农业大学、温州亚热带作物研究所等)、国内不同气候带标本取样以及出国、出差旅途携带等方式征集。

已收集到的红萍种质资源分布的北界为亚洲的地区在北纬近 40° 的北京房山;美洲地区在北纬 43° 左右的美国威斯康星州的麦迪逊;欧洲地区在北纬 53° 左右的德国西弗里亚群岛。红萍分布的南界为大洋洲地区在南纬 45°31' 的新西兰的昆士敦;非洲地区在南纬 37°15' 大西洋中的特里斯坦—达库尼亚群岛;美洲地区在南纬 35° 左右乌拉圭的蒙得维的亚。

(二) 红萍资源保存方法

由于相当一部分红萍资源在自然条件下不产生生殖器官或无齐全的雌雄生殖器官,加上人工诱导结孢的技术尚未突破,因此,红萍资源保存的主要对象是营养体。将分布在世界上不同生态环境的红萍集中到同一个地方保存,部分红萍品系因对环境的不适应而死亡。另外,红萍萍体浮生于水面,个体小,常因暴雨溅落、动物侵扰和人为操作的疏忽容易造成资源的混杂。因此确保红萍的存活和防止混杂是红萍资源保存的关键。

茎尖保存:将消毒过的茎尖(0.5~1 mm)置于无菌液体培养基中培养,30~45 d 更换一次培养基,待茎尖长成完整萍体时,移入半固体培养基上保存,每半年更换一次培养基。保存过程中保持温度 20℃ 左右、光照 4 000~7 000 Lux。茎尖保存以确保红萍品系的纯度,保持遗传性稳定,同时不受自然条件、病虫害、杂菌和杂藻的影响。茎尖保存占用空间少,可长期连续保存,也适于作试验材料。缺点是每一萍种或品系的保存数量较少,需定期更换

培养基。

温室保存：温室为空调玻璃房，室内温度控制在 20 ~ 25℃，相对湿度保持 85% ~ 90%。晴天利用自然光照，阴雨天气补充人工光照。红萍置于瓷钵中土培培养，土壤选用经高压消毒的中性或微酸性壤土；定期进行施肥、加水、分萍等管理。野外征集的红萍移入玻璃房之前，首先应放入隔离室进行无土培养。当确认红萍品系不带害虫、杂萍、杂螺后，才能移入资源圃。温室中的红萍品系周年保持在较适宜的条件下生长，避免了恶劣气候条件和害虫及其他生物的侵扰，确保了红萍品系的存活率和纯度。

网室保存：在盛红萍的搪瓷盆周壁两侧离盆口平面 3 cm 处各打一个直径 1 cm 的小孔，小孔处安放倒 U 型管，这种装置能让高于孔口的水流出而保持萍体不外溢。将经高压消毒的土壤放入盆内，约为容量的 1/5，加水后即可放萍。盆口加盖透明塑料网罩，形成一个隔离空间，既防止害虫的侵入，又能防止混杂。此后定期管理，分萍时注意防止混杂。这种在自然条件下保存红萍的方法，也方便进行红萍形态和适应性观察。

(三) 育种研究

杂交育种：魏文雄等选用小叶萍为母本 (*A. microphylla* 4018)、细绿萍 (*A. filiculoides*) 为父本进行有性杂交，筛选出 4 株种性较好的杂交株系 (榕萍 1 ~ 4 号)，1991 年经品种审定后正式定名为榕萍 1 号。并采用脂酶同功酶谱生化分析、表皮毛细胞数及小孢子果泡腔块钩毛横隔数等形态学鉴别及其他生理指标的测定，证实了所获得的红萍杂交苗的可靠性。榕萍 1 ~ 4 号在福建、湖南、浙江、东北三省以及内蒙古自治区 (简称内蒙古) 等省区推广面积达 5 万 hm^2 ，提高农作物单位面积产量和培肥地力效益明显，同时并被国际水稻所、巴西、印度等 8 个国家引种。

辐射育种：郑伟文、林永辉等利用 Co^{60} - γ 射线对红萍孢子果及茎尖材料进行了 1 000 ~ 1 500 伦琴剂量的照射，取得了一批小叶萍、重组萍的变异株系，其中以小叶萍辐照的突变株 088 萍表现最好，它具有耐热性强、耐盐及耐低磷等特点。在福建省的气候条件下能自然越夏，在 0.6% 盐浓度的营养液中能继续生长，能在 0.3 mg/kg P_2O_5 溶液中连续生长 3 周仍不出现缺磷症状。该品种作为国际土壤肥力与水稻可持续农业协作网红萍分网的供试品种，被引种到印度尼西亚等东南亚国家应用，在当地表现优异。

回交育种：郑德英等以杂交萍品系榕萍 1 号 (*A. microphylla* $\times$ *A. filiculoides*) 为父本，以原母本小叶萍 (*A. microphylla* 4018) 为母本进行杂交，对杂交后代苗进行了大量的实验室生长速率、极端最高温、最低温测试以及田间对比实验，获得回交满江红新品种——回交萍 3 号 (MH3 - 1)。应用酯酶同功酶鉴定、杂交后代小孢子果泡腔块钩毛横隔数比较等方法确定 MH3 - 1 为真杂种，其耐热性和抗盐性均比父母本及其他满江红品种高，并且品质好、繁殖速率高，适用于在我国南方晚季稻田和滨海盐土应用。在高盐胁迫下 (NaCl 浓度 0.8% ~ 1.0%)，回交萍 3 号较其他萍种增速快、受害轻的生理基础是胞内 SOD、POD 酶活性较其他萍种有大幅增高的趋势。该品种 1994 年通过福建省新品种委员会的审定。

三、红萍的基础研究

(一) 单克隆抗体研究

程由铨等分别用卡州萍、墨西哥萍、羽叶萍和洋州萍的鱼腥藻免疫 BALB 小白鼠的脾细胞与鼠骨髓瘤 SP2/O 细胞融合,成功地建立了 13 个分泌对红萍鱼腥藻特异性抗体 (MCAb) 的杂交瘤细胞株。红萍鱼腥藻单克隆抗体的建立,解决了长期以来国内外专家争论的不同种红萍,其鱼腥藻是否相同的问题。红萍鱼腥藻的细胞表面抗原不因宿主父本的改变而发生改变。试验结果表明,在红萍鱼腥藻中至少有 4 个亚群。Me3、P1、P3 和 P5 单克隆抗体可以区分红萍鱼腥藻和其他固氮蓝藻;C16 除了可明确区分九胞亚属红萍和三胞亚属红萍鱼腥藻外,还可把三胞亚属红萍鱼腥藻分为 2 个亚群;P2 可把九胞亚属的两种红萍鱼腥藻区分开。同时还证明,用细胞抗原结构作为红萍分类、鉴定的依据是可靠准确的,而用单克隆抗体技术检测鱼腥藻的表面抗原则具有快速、灵敏的优点。

(二) 萍-藻重组研究

林沧等发现,采用切除大孢子果顶端的囊群盖和漏斗状膜的方法可以彻底清除大孢子果内所含的鱼腥藻源,由这种去顶孢子果萌发的幼苗将发育成为无藻萍。在此基础上,他们寻找到合适的重组时期将带异源或同源鱼腥藻的囊群盖移接到去顶孢子果上,实现了萍藻交换,成功地获得了重组的共生体,建立起新的蕨藻共生体,经用特异性强、灵敏度高的红萍体内鱼腥藻单克隆抗体检测,以及扫描电子显微镜观察证明这种重建的萍藻共生体内的鱼腥藻确系人工外源引入的红萍体内鱼腥藻藻种。这是世界上第一例有确切证据、萍藻重建共生体试验成功的报道。由于红萍体内鱼腥藻的转换,使重组体的某些生理特性产生变化。试验表明,将抗热小叶萍的体内鱼腥藻重组到抗寒的蕨状萍后,该重组萍提高了抗热的性能。另外,重组萍吸收外离子的能力也有了显著的变化。采用萍藻重建共生体方法育成的新种 (Afma 1035) 已成为红萍育种上的新材料,并被引种到国际水稻所、比利时鲁汶大学及日本三重大学生物系等国外科研单位。

(三) 萍藻关系研究

红萍为水生蕨类植物,其叶腔中含有固氮的鱼腥藻。红萍鱼腥藻在红萍的整个生命周期中总是与宿主在一起,这种共生体在植物—固氮微生物共生体系中具有独特意义。在满江红结孢期间,鱼腥藻进入孢子果并定居其中,实现了共生固氮关系的世代延续。郑伟文等利用电镜观察到小叶萍的一种特化的表皮毛—腺毛参与了鱼腥藻对幼孢子果的侵染,当宿主孢子囊的原基出现在茎尖分生组织的基部时,在茎尖区域的鱼腥藻即在特化的表皮毛 (又称腺毛) 的“诱导”下开始了对孢子果原基的侵染,随着进一步发育,环绕于幼孢子囊的囊群盖迅速生长并围合成一个顶端开启的腔口 (简称果腔),鱼腥藻藻丝即通过果腔顶端的开口进入并定居于腔内,侵染红萍的鱼腥藻营养细胞在进入孢子果腔后分化为厚垣孢子。

(四) 适应性生理

红萍的生长、繁殖、固氮性能与外界环境条件密切相关。陈炳煊等研究表明：①红萍最适生长的温度是水温 20 ~ 28℃，这时生长最快，固氮能力最强。②红萍最适生长的湿度是相对湿度 80% ~ 90%。高湿抑制了蒸腾，影响代谢，引起萍根脱落，吸收受阻，生长衰弱，随着时间推移，红萍逐渐死亡。③光强低于 8 000 Llux，红萍生长显著减缓。④培养液中 NH_4^+ 浓度达 50 mg/kg 时，红萍固氮酶活性就受到抑制。当 NH_4 浓度达 120 mg/kg 时，红萍基本上丧失了固氮能力。

四、红萍的固氮与富钾研究

(一) 红萍固氮研究

刘中柱等利用同位素 ^{15}N 示踪技术测算出红萍的年固氮量为 41.5 ~ 102.8 kg N/hm²，红萍向水中的排氮量为同期固氮量的 3% 左右，红萍排出的氮能迅速被水稻吸收利用，这对于水稻生产意义重大。同时设计了光、温、湿可调控的测定装置，进行红萍固氮的田间定位测定，并在不同季节进行不同萍种固氮活性的昼夜测定。结果表明，红萍的固氮活性有明显的昼夜变化，其活性峰大多出现在 12 ~ 14 时，这与自生蓝藻的固氮活性的昼夜变化有相似之处。不同的是红萍夜间仍有固氮（固氮量约为全天量的 1/3），而自生蓝藻夜间基本停止固氮。上述结果表明红萍的固氮作用随着光照等外界条件的变化而变化，固氮活性高低与当时光合作用强弱密切相关。

①不同季节红萍的固氮活性均不相同，在福州地区春秋季节较高，冬季次之，夏季较低。②不同季节日固氮活性峰出现的时间不尽相同，红萍在无太阳光照的夜间仍有固氮作用，其固氮量因季节、气候而有变化，但大体为全日固氮量的 1/3。③不同萍种的固氮活性在不同季节有显著差异（以溪萍绿、卡州萍、细绿萍为例），春季以溪萍绿、卡州萍较高，细绿萍则较低；夏季则卡州萍，细绿萍濒于死亡，基本不固氮，溪萍绿固氮活性很低；秋季以细绿萍、溪萍绿较高，卡州萍较低；冬季仍细绿萍为较高，卡州萍次之，溪萍绿最低；但各品种一年的日平均固氮量没有显著差异。④光照、温度与红萍的固氮活性有密切相关（以溪萍绿、卡州萍、细绿萍为例），自然光强 46 000 ~ 58 000 Lux，温度 20 ~ 30℃，对 3 个萍种都是适宜的。细绿萍、溪萍绿对光照、温度的变化较为敏感，卡州萍无论在一年四季间或昼夜间的固氮活性变幅均较小。⑤湿度对红萍固氮活性有显著的影响，在适宜的光照、温度下，湿度成了红萍固氮很重要的限制因子；而在温度过高或偏低，红萍生长受阻的情况下，湿度的效应不明显。显然不论温度是否适宜，空气湿度 80% ~ 90% 是红萍固氮最佳的湿度范围，而空气湿度达到 100% 时，尽管温度、光照适宜，固氮活性仍受到限制。

(二) 红萍富钾研究

刘中柱等发现，红萍具有富集水体中微量钾的功能，并对红萍的富钾生理进行了详细的研究。

红萍在水 - 土系统中的吸钾特点：水稻吸收水体中钾的峰值为 8 mg/L、临界浓度为 2

mg/L, 而红萍的峰值为 0.85 mg/L、临界浓度为 0.1 mg/L。红萍可以吸收并富集水稻无法利用的钾 (红萍含 K 1.99 ~ 2.56% DM)。

红萍对水体中钾的吸收: 土壤中钾的消耗主要通过作物的吸收和淋失, 以及水蚀造成的, 而钾的补给, 主要来自施肥和降雨 (包括灌溉)。雨水平均含钾量为 1 mg/kg, 如按年降雨量为 400 mm 计算, 则每 hm^2 可得到钾 7 kg; 灌溉水含钾量在 1 ~ 4.5 mg/kg, 如果一季水稻需灌水 1 000 mm, 那么每 hm^2 就会带入钾 10 ~ 45 kg。当外液浓度低于 8 mg/kg 时水稻吸收钾就明显降低, 1 mg/kg 时就成负值 (非杂交的普通籼稻负值更高, 在 4 mg/kg 左右)。如果在稻田养萍, 则红萍可以把这些稀薄钾迅速吸收并富集在体内, 一旦翻压入土中, 又可腐解释放出来集中供水稻利用。

萍体钾对水稻生产的有效性: 以萍体的钾作为稻田钾源, 其肥效完全可以达到甚至略优于施同等数量的化肥钾。表现为供钾迅速, 在早稻田只要提前 1 周翻压或以当季有效率为 80% 计算, 其前期肥效之迅速不亚于施化肥钾, 因而径流、淋洗损失少, 适合水稻各时期生长的需要, 以致大大提高稻株的含钾量, 改善对水稻的供钾状况。总之, 试验认为红萍是稻田良好的有潜力的钾源之一。

五、红萍的分类与鉴定

(一) 单克隆抗体鉴定

红萍鱼腥藻单克隆抗体的建立, 不仅使人们对红萍鱼腥藻表面抗原有了新的认识, 而且为红萍鱼腥藻分类提供重要手段, 它可作为一种准确、迅速的监测手段, 为萍藻重组、红萍孢子果杂交等红萍基础生物学研究提供可靠的科学依据。1986 年, 刘中柱、程由铨、唐龙飞等研究结果表明, 13 个 McAb 中, 11 个 McAb 对 7 种红萍鱼腥藻均发生反应, 1 个 McAb (C16) 只与三胞亚属红萍鱼腥藻发生反应, 而不与九胞亚属红萍鱼腥藻发生反应, 具有亚属特异性, McAb - P2 只识别九胞亚属中莆田羽叶萍鱼腥藻, 具有种的特异性。

(二) 同工酶鉴定

酶谱分析可用以探索个体或品种间的亲缘关系, 鉴别真假杂种。魏文雄等先通过 50 个满江红品系多批次的同工酶谱分析, 证明红萍的酯酶同工酶比较稳定, 尽管谱带数量和强度因季节而有变化, 但各自有一至几条主要的带比较稳定, 有代表性。研究结果表明, 采用酯酶同工酶谱能区分不同种类的红萍, 可用于杂交育种后代真伪鉴定。

(三) 扫描电镜鉴定

唐龙飞等利用扫描电子显微镜观察小叶萍和墨西哥萍杂交萍后代有性器官 (大孢子果孢囊外周壁、浮漂, 小孢子果泡胶块钩毛形态和横隔数) 后证实杂种后代有性繁殖器官形态特征呈父本、母本和过渡类型。可以利用杂种后代有性繁殖器官与亲本的关系鉴别真杂种。

(四) 分子标记鉴定

从红萍的萍—藻共生体中提取 DNA 进行的 RAPD 系统分析, 通常忽视了红萍样品的异

质性。陈坚等通过获得无藻的红萍，比较有藻萍、无藻萍和离体藻之间的 RAPD 指纹图谱，发现从有藻萍中提取 DNA 的扩增反应，来源于萍藻双方 DNA 的共同影响，依引物和植物样本的不同，共生双方对扩增产物的贡献结果不同，说明了用无藻萍进行 RAPD 检测的重要性。

对红萍三胞组 5 个种的 11 个无藻萍样本进行 RAPD 分析，由 9 个引物产生的 127 个 DNA 多态片段用于计算样本间的 Jaccard 相似系数和 UPGMA 树状聚类图。结果表明：3 个蕨状萍样本聚为一类（种内相似系数：0.456 ~ 0.702）；2 个墨西哥萍样本（相似系数：0.587）与 2 个小叶萍样本（相似系数：0.203）聚为一类；2 个卡洲萍 *A. Willd.* 样本聚为一类（相似系数：0.368）；但 2 个洋洲萍样本明显分开（相似系数：0.190），其中日本来源的洋洲萍与蕨状萍聚合（相似系数：0.206）。根据 RAPD 数据，结合三胞组红萍同工酶、有性杂交等证据，认为日本萍与大洋洲萍应属于两个种，蕨状萍是一个独立的种，而墨西哥萍与小叶萍间的遗传关系很近，不能分为不同的种，卡洲萍的分类地位尚不能确定。

陈坚等对红萍鱼腥藻的 RAPD 分析表明，由离体藻 RAPD 分子数据形成的红萍鱼腥藻类群组基本上与其宿主红萍的分类群相对应，但对应关系并非完全一致。例如，同是从圭亚那征集的墨西哥萍 2002 和墨西哥萍 2003 中分离的鱼腥藻之间的相似性并不大于它们与巴拉圭小叶萍 4018 鱼腥藻间的相似性，而通过无藻萍 RAPD 分析却发现，墨西哥萍 2002 和墨西哥萍 2003 萍体间的 RAPD 相似性远高于它们与 4018 萍体间的相似性，说明对红萍、藻 DNA 分别进行的 RAPD 分析所形成的类群组，本身就有一定的偏差。

六、红萍的抗逆性研究

（一）抗椎实螺

金桂英等进行了红萍抗椎实螺的研究，结果表明，椎实螺对各种红萍的喜好有显著的差异，其中以小叶萍和墨西哥萍受害最严重，尼罗萍、细绿萍和玉林萍次之；溪萍绿、杭州萍、陈梅萍受害较轻；而卡洲萍、曼谷萍受害最轻。可分为感螺型：小叶萍、墨西哥萍、尼罗萍；中等感螺型：细绿萍、玉林萍、溪萍绿、杭州萍、陈梅萍；抗螺型：卡洲萍。

（二）耐热性

林沧等进行了红萍鱼腥藻对红萍耐热性的影响研究，结果表明，红萍的耐热性主要取决于蕨，部分取决于共生藻。不同种满红萍的共生藻作用可能有所不同。小叶萍的鱼腥藻的抗热性优于蕨状萍的鱼腥藻，改变红萍种间蕨-藻的组合方式，将在一定程度上影响新的蕨-藻组合体的抗热能力。

（三）耐盐性

章宁等进行了红萍耐盐性的研究，结果表明，低盐浓度（0.2% NaCl）对红萍生长有促进作用，高盐浓度抑制红萍生长，红萍最高耐盐浓度为 0.8% NaCl。较耐盐的红萍有：杂交萍、细绿萍、小叶萍。

(四) 耐荫性

唐龙飞等进行了红萍耐荫性的研究,结果表明,光照影响各红萍品系的生长速率与抗霉腐病能力,随着光照强度减弱,各品系的生长速率和抗霉腐病能力都下降。在低光下,满江红各品系生物量与体内 PPO 活性的相关性显著 ($r=0.9560$)。低光下满江红各品系生长速率、抗霉腐病能力和体内 PPO 活性的从高到低依次为卡洲萍 3001、杂交萍 902426、小叶萍 4018 和回交萍 MH321。

在 30 年的发展历程中,福建农业科学院红萍研究中心于 1987 年经农牧渔业部批准成为国家红萍资源中心,2013 年获农业部批准成为国家红萍种质圃(福州),2003 年被科技部评为全国农林科研机构科技竞争力第 86 名,进入全国百强。

今年,是国家红萍资源中心成立 30 周年,本书汇编了红萍研究中心科研人员撰写的相关论文,以之纪念。感谢福建省农业学院农业生态研究所及原福建省农业科学院红萍研究中心全体同事为本书的编写所付出的心血,感谢林沧博士,郑伟文研究员为本书提供的原始图片和资料。本书的相关研究和出版得到福建省科技计划项目(2016R1016-1)、农业部作物种质资源保护和利用(红萍种质资源收集、编目与利用)项目、国家绿肥产业技术体系(CARS-22)、福建省农业科学院重点科技创新团队(STIT2017-1-9)、农业部福州农业环境科学观测实验站、国家红萍种质圃(福州)、福建省丘陵地区循环农业工程技术研究中心、福建山地草业工程技术研究中心的资助。另外,本书的出版还得到福建省农业科学院出版基金和福建省“百千万人才工程”人选培养资金的资助。在此,向给予本书顺利出版提供帮助的上级领导、同事和相关单位致以衷心的感谢!

黄毅斌 唐龙飞

2017 年 7 月

目 录

第一章 红萍研究概况

红萍固氮及其利用	3
从“Azolla Event”论满江红在生态农业中的应用	11
亚洲若干国家的红萍研究和应用	19
从国际红萍研究动态看稻田养萍前景	21
红萍在稻田应用的前景	25
我国红萍研究与应用的若干进展	32
红萍在中国水稻生产上的利用	39
国际红萍学术讨论会在福州召开	54

第二章 红萍的分类与植物学研究

红萍的植物学知识	59
满江红属系统学研究的新进展	68
三胞亚属满江红及其种间杂种雄性器官的数量分类研究初报	74
满江红结孢习性的初步观察	79
小叶满江红与墨西哥满江红杂交后代有性器官(孢子果)形态学分析	84
红萍共生藻的体外培养	90
应用扫描电子显微镜观察满江红——满江红鱼腥藻共生体的超微结构	97
满江红-满江红鱼腥藻在营养生长期共生关系的扫描电镜观察	99
满江红孢子果形成期蕨—藻共生关系的电镜观察	106
满江红结孢期间鱼腥藻侵染孢子果的新观察	109
满江红大孢子果萌发与成苗期间蕨—藻共生关系的电镜观察	115
满江红腺毛细胞的超微结构	122
红萍体内伴生细菌的电镜观察	130
满江红体内细菌及其与宿主的相互作用	132
满江红细胞质遗传和变异的初步研究	134

第三章 红萍的生理生态特性研究

红萍若干生理特性初步研究	141
--------------	-----

红萍与外界环境的关系	150
满江红在不同培养条件下的生产性能及其与营养成分变化的关系	155
满江红属五种红萍耐荫性研究	164
巴拉圭小叶萍与斯里兰卡萍的种性观察	167
不同光照条件下 4 种满江红 (<i>Azolla</i>) 品系体内多酚氧化酶活性的变化	172
满江红鱼腥藻对红萍耐热性的影响	178
红萍抗热性的初步探讨	185
高温及盐胁迫对萍体电解质与脯氨酸的影响及其与抗逆性的关系	188
不同盐浓度对红萍生长及若干生理指标的影响	195
红萍盐害若干生理生化机理的探讨	200
在盐胁迫下红萍超氧化物歧化酶 SOD 及叶肉细胞亚显微结构的变化	205
氮素营养对红萍生理特性的影响 I. 硝态氮的作用	212
磁化水对红萍生长繁殖影响的试验	220

第四章 红萍种质资源与遗传多样性研究

国家红萍资源圃	223
满江红种质资源及其保存 (1980—1982)	224
红萍资源的征集与保存	227
红萍资源的征集与保存总结	229
基于 SQL Server 的红萍品种资源数据库系统构建	235
应用组织培养技术进行萍种保纯的探讨	240
满江红孢子果几种贮藏方法比较	241
满江红茎尖低温保存的初步研究	243
满江红茎尖组培苗外观形态及生理生化特性变化	249
满江红九胞亚属种雄性育性的初步调查研究	255
无藻萍的 RAPD 分析及其在三胞组满江红种间关系研究中的应用	260
满江红三胞亚属种间杂种 F1 代若干性状的遗传分析	271
7 种红萍的生物学特性研究与 ISSR 分子标记	278
满江红鱼腥藻遗传多样性的 RAPD 分析	285
满江红鱼腥藻与其宿主的遗传多样性和协同性的 RAPD 分析	289
红萍鱼腥藻 (<i>Anabaena azollae</i>) 单克隆抗体研制成功	295
间接荧光抗体试验区别红萍鱼腥藻细胞表面抗原	296
红萍鱼腥藻单克隆抗体的研究	299
满江红鱼腥藻单克隆抗体的制备和应用研究	305

第五章 红萍的共生固氮研究

固氮作用与环境条件	317
-----------	-----

红萍—鱼腥藻共生固氮研究进展·····	325
用乙炔还原法研究物候等因素对红萍固氮活性的影响·····	329
^{15}N 稀释法测定红萍固氮及其影响因素探讨·····	333
豆科植物根瘤菌和萍藻共生体系中 ^{15}N 的天然富集作用·····	337
三种红萍固氮活性的周期变化·····	341
红萍产孢率和固氮酶活性的观察·····	346
湿度对红萍固氮活性的影响·····	349
红萍排氮过程的初步探讨·····	354

第六章 红萍的富钾研究

红萍富钾生理的研究 I. 红萍对水体中钾的吸收·····	363
红萍富钾生理的研究 II. 萍体钾对水稻生产的有效性·····	369
红萍富钾生理的研究 III. 红萍对水体中钾的吸收·····	376
红萍富钾来源的示踪研究·····	380

第七章 萍藻重组研究

红萍茎尖培养获得无藻萍·····	389
以孢子果诱导无藻红萍·····	391
红萍共生蓝藻的分离培养和特性研究·····	393
满江红与无藻满江红的超微结构·····	398
无藻满江红 (<i>Anabena-free Azolla</i>) 和满江红鱼腥藻 (<i>Anabaen azollae</i>) 重建共生体·····	405
萍藻重组研究 I. 无藻萍的获得及其验证技术研究·····	415
萍藻重组研究 II. 应用孢子果技术获得萍藻重组成功·····	420
单克隆抗体荧光标记物 C_{16} -FITC 对萍藻重组体的鉴定·····	426
蔗糖密度梯度离心提取满江红体内鱼腥藻方法的研究·····	429

附 录

A new method for obtaining <i>Anabaena</i> - free <i>Azolla</i> ·····	437
Inoculation of cultured <i>Anabaena Azollae</i> and <i>Nostoc</i> to <i>Anabaena</i> - free <i>Azolla</i> ·····	443
Study on the Association Between <i>Anabaena Azollae</i> and <i>Azolla microphylla</i> During the Germination of Megasporocarps·····	444