

Attività nitrogenasica nella simbiosi
Azolla filiculoides* - *Anabaena azollae
in funzione della temperatura.

Azolla filiculoides è una Pterydophyta acquatica galleggiante originaria dell'America settentrionale, oggi diffusa in tutto il mondo. La sua presenza è stata riportata in Sud Africa (ASHTON & WALMSLEY 1976), in Sud America, in Europa, in Australia (MOORE 1969). Essa vive sugli specchi d'acqua mossi ma non turbolenti, formando dei tappeti a volte densissimi; in quest'ultimo caso *A. filiculoides* è stata considerata come « malerba » oppure come « concime verde » o « foraggio ».

Studi effettuati sull'ecologia di *Azolla filiculoides* hanno dimostrato che questa felce vive a temperature variabili da 5° a 45°C, con optimum a 27°C; che sopporta pH variabili da 3 ad 11; che la sua crescita è inibita da una illuminazione superiore ai 60.000 lux e quindi essa predilige i luoghi leggermente ombreggiati (ASHTON & WALMSLEY 1976).

Come è noto, la caratteristica del genere è la presenza, in particolari cavità delle foglie, di un'alga azzurra simbiote, *Anabaena azollae*. Quest'alga azzurra che non è stata mai trovata libera in natura, può essere coltivata in coltura axenica: il primo ad isolarla fu Schaeede (SCHAEDE 1947). Essa è filamentosa e presenta numerose eterocisti, per cui può fissare l'azoto atmosferico, che poi cederebbe alla felce secondo un meccanismo non ancora del tutto chiarito.

Attualmente è sempre più usato il metodo della riduzione dell'acetilene per le misure dell'attività nitrogenasica in molti organismi che ne sono capaci, sia isolatamente che in simbiosi (STEWART et al., 1967).

Peters & Mayne (PETERS & MAYNE, 1974) misurarono con questo metodo l'attività nitrogenasica dell'associazione *A. filiculoides* - *Anabaena azollae* in varie condizioni e riportarono che essa in anaerobiosi è maggiore del 40%, che in assenza di azoto minerale è maggiore del 30% e che è costante al variare dell'intensità luminosa da 500 a 2200 ft.c.

Peters, Toia & Lough (PETERS *et al.* 1977) effettuarono prove sperimentali sia sull'associazione *Azolla filiculoides* - *Anabaena azollae* sia sull'alga in coltura axenica, trovando un'analogia di comportamento per quanto riguarda l'attività nitrogenasica.

Finora nessun Autore ha studiato l'influenza della temperatura sull'attività nitrogenasica della simbiosi. Noi abbiamo voluto verificare quali erano le temperature estreme e quale la temperatura ottimale per l'attività nitrogenasica, vista la diffusione dell'*Azolla filiculoides* a quasi tutte le latitudini.

MATERIALI E METODI

Sono state utilizzate piante di *Azolla filiculoides* viventi nelle vasche dell'Orto Botanico di Napoli. Le piante sono state lavate in acqua corrente per 30' e sono state poste in beute da 100 ml, contenenti 50 ml di acqua prelevata dalle stesse vasche. In ogni beuta erano posti 10 esemplari di *Azolla* nello stesso stadio di sviluppo e delle stesse dimensioni.

Le beute venivano tappate ed in esse veniva fatta gorgogliare per trenta minuti una miscela di argon, ossigeno, acetilene ed anidride carbonica in percentuale del 70; 19,95; 10 e 0,05% rispettivamente, utilizzando due bombole, fornite dalla SIO, e contenenti l'una acetilene e l'altra argon, ossigeno ed anidride carbonica. Dopo il gorgogliamento le beute erano chiuse ermeticamente e poste in termostato per due ore ad una illuminazione di 10 Watt/m² (YSI 65A Radiometer).

Le prove erano effettuate alle seguenti temperature: 5°, 10°, 15°, 20°, 30°, 40°C.

Dopo l'esposizione alla luce, la miscela di gas veniva iniettata al gascromatografo PYE UNICAM, per determinare l'etilene prodotta. Le condizioni operative erano le seguenti: colonna in vetro da 1,5 x 4 mm con riempimento di silica gel 100-120 mesh; temperatura colonna 75°C; temperatura injector 100°C; temperatura detector 100°C; velocità carrier (N₂) 30 ml/min.

L'etilene e l'acetilene erano individuati e dosati mediante le iniezioni di quantità note di entrambi i gas forniti dalla SIO.

Le quantità di etilene prodotte alle varie temperature erano espresse in nanomoli/mg peso secco/min.

Le prove sono state effettuate per tre volte nell'aprile 1978. È stato scelto il mese di aprile perché in quel periodo le piante di *Azolla* raggiungono nelle vasche dell'Orto Botanico un notevole sviluppo.

RISULTATI E DISCUSSIONE

In Fig. 1 è riportato il grafico dell'attività nitrogenasica della simbiosi *Azolla filiculoides* - *Anabaena azollae* in funzione della temperatura.

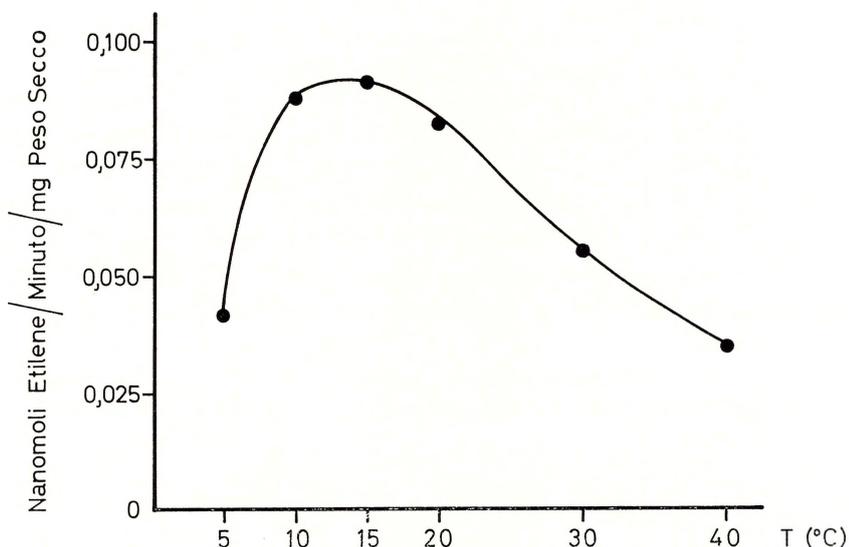


Fig. 1 — Attività nitrogenasica della simbiosi *Azolla filiculoides* - *Anabaena azollae* in funzione della temperatura.

Appare evidente che l'attività nitrogenasica è apprezzabile a tutte le temperature provate, con un optimum intorno a 15°C.

Le quantità di etilene prodotte sono di 0,09 nanomoli/mg peso secco/min all'optimum, 0,04 a 5°C e 0,03 a 40°C.

Il fatto che la fissazione dell' N_2 avvenga in un arco di temperature così ampio, coincide con l'euritermia della simbiosi felce-alga (ASHTON & WALMSLEY, 1976). Quello che colpisce è il fatto che l'optimum per la crescita della simbiosi è di ben 12°C superiore all'optimum dell'attività nitrogenasica.

In assenza di altri dati riguardo l'influenza della temperatura sull'attività nitrogenasica della simbiosi o dell'alga isolata, possiamo fare raffronti solo con dati analoghi che riguardano altre alghe azzurre. La cosa più interessante è che tutte le alghe azzurre studiate hanno optimum di attività nitrogenasiche notevolmente superiori a quella da noi trovata. FOGG & THAN-TUN (1960) riportano per *Anabaena cilindrica* un optimum a 30°C, quale che fosse l'intensità luminosa, con addirittura una attività nitrogenasica nulla a temperature inferiori ai 15°C. STEWART (1966) riporta un optimum di 25°C per alcune specie marine da lui studiate, ed un optimum di 35°C per *Westelliopsis prolifica*.

Queste considerazioni unitamente alla osservazione che le popolazioni di felci delle vasche dell'Orto Botanico di Napoli sono sopravvissute spesso a temperature vicinissime allo 0°C, inducono a credere che si possa trattare di fenomeni legati a particolari ecotipi. A tal fine sarebbe necessario e interessante approfondire lo studio sull'autoecologia delle nostre felci e possibilmente isolarne l'alga simbiote per studiarla meglio in coltura axenica.

Può infine essere interessante paragonare i valori di attività nitrogenasica da noi trovati, con quelli di altri autori, anche se ottenuti in condizioni sperimentali diverse dalle nostre. PETERS & MAYNE (1974) riportarono per *Azolla filiculoides* una produzione di circa 15.0 nanomoli/mg clorofilla/min a 23°C ad una intensità luminosa di 750 ft.c. Poiché, come riportano gli Autori, 1 g peso fresco della simbiosi equivale in media a 0,75 mg cloro-

filla, e poiché 1 g di peso fresco equivale a 70 mg peso secco, possiamo dedurre che le piante di Peters & Mayne producevano a 23°C circa 0,16 nanomoli/mg peso secco/min, quantità simili alle nostre. Va comunque ricordato che Peters & Mayne lavoravano su piante adattate in laboratorio.

BECKING (1976) ottenne per *Azolla pinnata*, con una miscela di gas simile alla nostra, una produzione di 0,88 nanomoli/mg peso secco/min, con una esposizione di 2 ore alla luce solare, a 28-39°C.

I nostri dati ci hanno indicato che l'associazione *Azolla filiculoides* - *Anabaena azollae* dell'Orto Botanico ha una fissazione di azoto atmosferico analoga a quella dimostrata da altri autori, con un optimum di temperatura a 15°C, valore basso riguardo all'attività nitrogenasica di altre alghe azzurre studiate.

RIASSUNTO

Gli Autori hanno studiato l'attività nitrogenasica in rapporto alla temperatura nella simbiosi *Azolla filiculoides*-*Anabaena azollae*, con il metodo dell'acetilene.

È stata dosata l'attività nitrogenasica da 5° a 40°C, risultato che conferma l'euritermia della simbiosi.

L'optimum riscontrato è a 15°C, mentre l'optimum di crescita della simbiosi è a 27°C.

L'optimum a 15°C qui segnalato è il più basso finora segnalato tra le alghe azzurre azoto-fissatrici.

SUMMARY

The Authors have studied the nitrogenasic activity in relation to the temperature in the symbiosis *Azolla filiculoides*-*Anabaena azollae*, by the acetylene method.

Nitrogenasic activity was found from 5° to 40°C, confirming the eurythermy of the symbiosis.

The optimum was at 15°C, contrasting with the optimum of growth which is at 27°C.

The value of optimum is the lowest until recorded between the nitrogen-fixing blue-green algae.

BIBLIOGRAFIA

- ASHTON P. F., R. D. WALMSLEY, 1976. *La fougère aquatique Azolla et son symbionte Anabaena*. *Endeavour*, 35: 39-43.
- BECKING J. H., 1976. *Nitrogen fixation in some natural ecosystems in Indonesia*. In P. S. NUTMAN, *Symbiotic nitrogen fixation in plants*. Cambridge University Press: 539-550.
- MOORE A. W., 1969. *Azolla: Biology and agronomic signifiance*. *Bot. Rev.*, 35 (1): 17-35.
- PETERS G. A., B. C. MAYNE, 1974 a *The Azolla-Anabaena azollae relationship. I. Initial characteritaton of association*. *Plant Physiol.*, 53: 813-819.
- , —, 1974 b. *The Azolla-Anabaena azollae relationship. II. Localisation of nitrogenase activity as assayed by acetylene reduction*. *Plant. Physiol.*, 53: 820-824.
- PETERS G. A., R. E. TOIA, S. M. LOUGH, 1977. *Azolla-Anabaena azollae relationship. V. ¹⁵N₂ fixation, acetylene reduction, and H₂ production*. *Plant Physiol.*, 59: 1021-1025.
- SCHAEDE R., 1947. *Untersuchungen über Azolla und ihre Symbiose mit Blaualgen*. *Planta*, 35: 319-330.
- STEWART W. D. P., 1966. *Nitrogen Fixation in Plants*. The Athlone Press, London.
- STEWART W. D. P., G. P. FITZGERALD, and R. H. BURRIS, 1967. *In situ studies on N₂ fixation using the acetylene reduction technique*. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 58: 2071-2078.