

## Ciclo annuale di crescita di *Azolla filiculoides* Lam. a Napoli (Italia) e sue implicazioni applicative

MARIA ROSARIA BARONE LUMAGA, PAOLO CAPUTO, GESUALDO SINISCALCO GIGLIANO

Dipartimento di Biologia Vegetale, Facoltà di Scienze, Università di Napoli  
Via Foria 223, 80139 Napoli, Italia

### Summary

The symbiosis between the aquatic fern *Azolla* Lam. and the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena azollae* Strasb. is used as a biofertilizer in tropical and subtropical areas. The *Azolla* use is problematic in most temperate areas where the fern suffers the winter season.

The annual cycle of growth and nitrogenase activity of *A. filiculoides* Lam. and its symbiont were examined at Naples, a Mediterranean locality of South Italy. *A. filiculoides* showed to overcome winters also in case of intense colds. From the spring to the fall, *A. filiculoides* showed doubling times of its fresh and dry weight of 3-9 days and nitrogenase activity was 70-100 nmoles of  $C_2H_4/h/mg$  d.w. These data appear of applicative interest because they are similar to those obtained for *Azolla* species used in some temperate areas as a biofertilizer.

Observations on the *A. filiculoides* growth during a year show that the best period for collecting the fern in relation to its use as both a green manure and as a dry fertilizer is from April to October. Nevertheless, *A. filiculoides* exponential growth data observed from April to July suggest that the use of the fern as a green manure in this period is strongly advisable. Until October, the fern tends to suffer from transplants; thus, its best use is as a dry fertilizer.

Despite of what occurs in many other temperate areas, *A. filiculoides* produces reproductive structures at Naples every year. Internal structures of microsporocarps and megasporocarps and phases of *Anabaena azollae* life cycle inside both *A. filiculoides* leaflets and sporocarps were observed.

### INTRODUZIONE

*Azolla* Lam. (Azollaceae) è un genere di piccole felci d'acqua che vivono in simbiosi con *Anabaena azollae* Strasb. (Nostocaceae), un cianobatterio azotofissatore.

---

Key words: *Azolla filiculoides*, *Anabaena azollae*, Life cycle, Biofertilizer

*Azolla* è ampiamente diffuso ai tropici e ai subtropici ma è presente anche nelle zone temperate, dove *A. filiculoides* Lam. rappresenta la specie più diffusa per la sua capacità di resistere a temperature relativamente basse (LUMPKIN and PLUCKNETT, 1982; WATANABE and BERJA, 1983; BOZZINI *et al.*, 1984).

Il rapporto simbiotico che s'instaura tra *Azolla* e *Anabaena azollae* crea un sistema altamente produttivo utilizzato come biofertilizzante per secoli in modo empirico dai risicoltori cinesi ed attualmente con criteri scientifici nelle risaie di vaste aree del sud-est asiatico, del Vietnam, dell'India, ecc.; la felce è usata anche come foraggio, sia allo stato fresco che secco, e come manto galleggiante nelle risaie per sopprimere la crescita di infestanti e di insetti parassiti (LUMPKIN and PLUCKNETT, 1982; MOORE, 1969; WATANABE, 1982).

La maggior parte degli studi e delle applicazioni pratiche di *Azolla* sono stati condotti nelle aree tropicali e subtropicali, dove la felce ha lunghi periodi di crescita vegetativa (LUMPKIN and PLUCKNETT, 1982; WATANABE, 1982). Scarse sono invece le ricerche e le applicazioni in aree temperate dove la crescita vegetativa di *Azolla* è circoscritta al periodo primavera-estate e dove gli inverni relativamente freddi possono danneggiare la felce minacciandone anche la sopravvivenza. Dati riportati per alcune località della California (TALLEY and RAINS, 1980; RAINS and TALLEY, 1978) e dell'Italia centrale e settentrionale (MARGHERI *et al.*, 1984; VINCENZINI *et al.*, 1985) mostrano comunque che *A. filiculoides* può presentare utili applicazioni come biofertilizzante anche in aree temperate. Tali dati, pertanto, fanno supporre che una ancor più proficua utilizzazione possa prospettarsi per *A. filiculoides* coltivata in zone mediterranee.

Nel presente lavoro è stato esaminato il ciclo annuale di un ceppo di *A. filiculoides* naturalizzato a Napoli (Orto Botanico), una località del Sud Italia con clima mediterraneo. Questo studio ha il fine di stabilire i rapporti intercorrenti tra le condizioni ambientali stagionali di una zona mediterranea e le fasi di crescita della felce e del suo simbiote *Anabaena azollae*.

#### MATERIALE E METODI

Il ceppo di *Azolla filiculoides* esaminato vive all'aperto in vasche di varie dimensioni (5-10 m<sup>2</sup>) dell'Orto Botanico di Napoli.

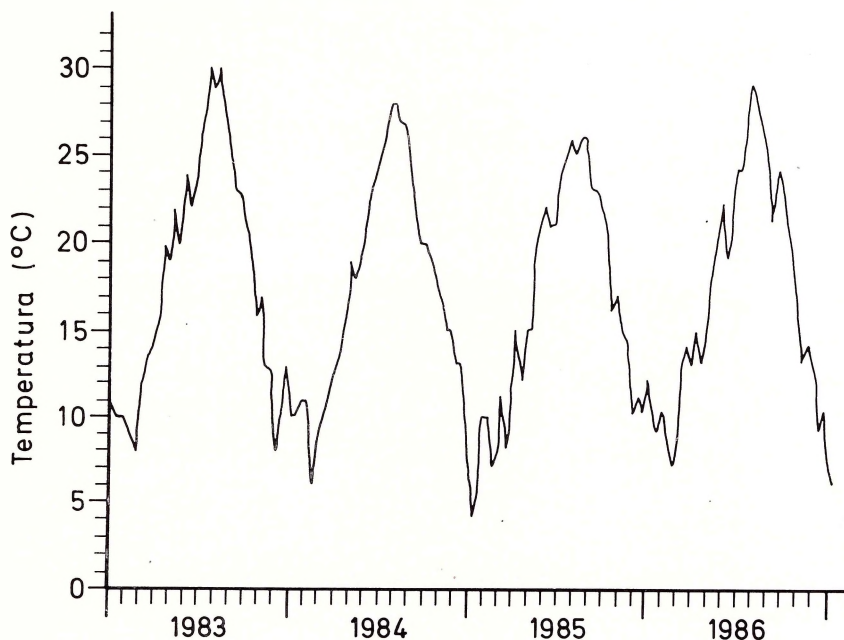


Fig. 1 — Temperature medie rilevate a Napoli (Italia) nel quadriennio 1983-1986.

L'acqua delle vasche viene rinnovata in media ogni tre mesi. Le osservazioni riportate sono state effettuate nel periodo 1983-1986. Nelle Figg. 1 e 2 riportiamo i dati climatici di questo periodo.

#### *Osservazioni morfologiche*

L'osservazione delle fronde di *Azolla filiculoides* e degli sporocarpi fu effettuata facendo uso di un binocolare. Per l'osservazione delle strutture interne degli sporocarpi e per seguire il ciclo del ficobionte fu utilizzato un microscopio ottico.

Per la microscopia ottica le fronde e gli sporocarpi sono stati fissati in FAA (etanolo : ac. acetico : formaldeide 40%) (18:1:1), disidratati in serie di etanolo, infiltrati in serie di etanolo: toluene, inclusi in Paraplast-plus. Le sezioni furono effettuate con un microtomo Jung (spessore 16  $\mu\text{m}$ ) e colorate con

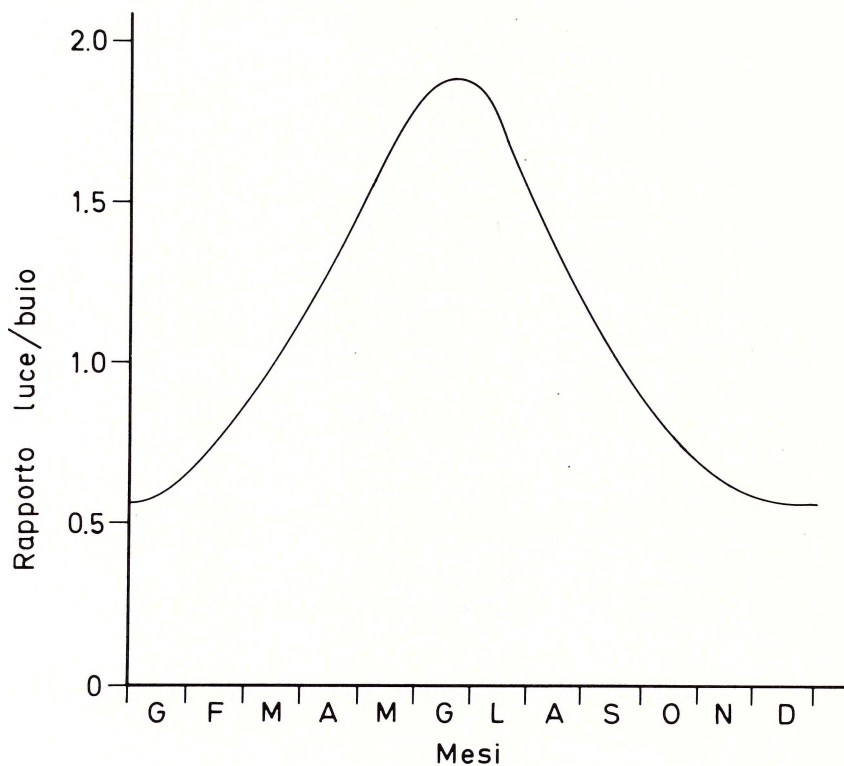


Fig. 2 — Rapporto tra ore di luce e ore di buio a Napoli (40° 51' N), Italia.

Safranina/Chlorazole black E. I ficobionti sono stati osservati a fresco dopo frammentazione di alcune fronde e fuoriuscita delle colonie algali dalle cavità che le ospitano. Per la misura delle dimensioni delle cellule vegetative e delle eterocisti si è fatto uso di un oculare micrometrico. La frequenza eterocistica è stata calcolata su filamenti algali presentanti almeno trenta cellule vegetative. I filamenti sono stati esaminati dopo frammentazione dell'intera fronda.

#### *Misure di crescita e di attività nitrogenasica*

I valori di crescita della felce sono stati ottenuti utilizzando la seguente formula:  $TR = t \log_2[\log(PtPo^{-1})]^{-1}$ , dove TR

= Tempo di Raddoppio (in giorni),  $t$  = durata dell'esperimento (in giorni),  $P_t$  = Peso finale (fresco o secco),  $P_o$  = Peso iniziale (fresco o secco). Il peso fresco iniziale è quello relativo a circa cento piante. Il peso secco iniziale veniva ottenuto indirettamente. A tal riguardo, tre lotti di felci fresche, il cui peso era pari ciascuno al peso fresco iniziale, venivano pesati dopo essere stati portati a secco in stufa a  $105^{\circ}\text{C}$ . La media risultante dalle tre pesate veniva considerata come peso secco iniziale. Le prove di crescita sono state condotte in una vasca suddivisa in due sezioni da uno sbarramento. In una sezione, svuotata delle felci originarie, veniva immesso il lotto di cui si seguiva la crescita. Le prove di crescita avevano la durata di tre settimane.

L'attività nitrogenasica è stata misurata con la tecnica della riduzione dell'acetilene (HARDY *et al.*, 1968). Il materiale è stato preparato ed incubato come riportato da MORETTI e SINISCALCO GIGLIANO (in stampa). I valori di frequenza eterocistica ed attività nitrogenasica rappresentano la media dei valori rilevati nei quattro anni di sperimentazione.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### *Andamento della crescita nel periodo invernale*

*Azolla filiculoides* ha superato tutti gli inverni del periodo esaminato senza danni, anche se la sua crescita è stata praticamente nulla in questa stagione. Le sue fronde presentano dimensioni ridotte (0,5-1,0 cm) (Tab. 1) e la quantità di piantine corrisponde al 5-15% della densità di felci che si ha nel periodo di massima crescita vegetativa. Le radici appaiono corte (1 cm) e sottili. Nei periodi di freddo più intenso, la pagina superiore delle fronde assume una colorazione rosso mattone. Come riportato da ASHTON (1974), tale colorazione è indice di stress ed è dovuta alla formazione di antocianine.

L'esame dei ficobionti mostra cellule vegetative di  $6 \times 9$   $\mu\text{m}$ , eterocisti di  $9 \times 11$   $\mu\text{m}$  e frequenza eterocistica del 2-5% (Tab. 1). L'attività nitrogenasica è pari a 5-20 nmoli di etilene/h/mg di peso secco di *Azolla* (Tab. 1).

Nel gennaio del 1985 (Fig. 1) una gelata della durata di tre giorni determinò il congelamento dell'acqua delle vasche del-

	Lunghezza delle fronde (cm)	Tempo di raddoppio (gg)	ARA (nMoli/h/mg)	Frequenza eterocistica (%)
Inverno	0,5-1,0	—	5-20	2-5
Primavera inoltrata	3,0	3	80-100	20-25
Inizio Estate	3,0	3	80-100	20-25
Estate inoltrata	3,0	5-7	70-100	10-25
Inizio Autunno	2,5-3,0	4-5	70-90	5-15

Tab. 1 — Dati morfologici, valori di crescita e di attività nitrogenasica (ARA) di *A. filiculoides* di Napoli (Italia) esaminata nelle varie stagioni del periodo 1983-1986.

l'Orto Botanico. Le piantine di *A. filiculoides* rimasero intrappolate nelle lastre di ghiaccio formatesi. Alla fine della gelata una parte delle felci riuscì a sopravvivere. Nella primavera successiva si ebbe un abbondante sviluppo di sporocarpî su queste piantine. Non è da escludere che ciò sia stato determinato dalla gelata della stagione invernale precedente. È noto infatti che situazioni di stress possono indurre la sporificazione in *Azolla* (LUMPKIN and PLUCKNETT, 1982).

#### *Andamento della crescita nel periodo primaverile-estivo*

Coi primi caldi primaverili, o a volte coi primi caldi che si hanno alla fine della stagione invernale, le piantine di *A. filiculoides* cominciano a subire profonde modificazioni.

La crescita, bloccata nel periodo invernale, ha una graduale ripresa divenendo man mano più intensa in rapporto all'aumentare della temperatura, dell'intensità luminosa e del fotoperiodo. Con lo stabilizzarsi di giornate relativamente calde e con forte irraggiamento (piena primavera) l'aumento in biomassa delle piantine è evidentissimo e di tipo esponenziale. Il massimo sviluppo comunque si ha in primavera inoltrata - inizio estate. In tale periodo il tempo di raddoppio di *A. filiculoides*, sia come

peso fresco che secco, raggiunge i 3 giorni e in questo momento le fronde presentano la massima dimensione (fino a 3 cm) (Tab. 1); la loro colorazione è di un verde intenso e le radici raggiungono i 10 cm di lunghezza (TAV. I figg. 1 e 2).

Le colonie di *Anabaena azollae* si infittiscono di filamenti (TAV. II fig. 1). Le dimensioni delle cellule vegetative e delle eterocisti non subiscono rilevanti cambiamenti rispetto al periodo invernale, ma la frequenza eterocistica può raggiungere il 20-25% (Tab. 1). Misure di attività nitrogenasica in questo periodo mostrano valori di 80-100 nmoli di etilene/h/mg di peso secco di *Azolla* (Tab. 1).

In questa fase di crescita *A. filiculoides* non sembra risentire dello shock da trapianto. Nel caso di trasferimenti delle felci abbiamo notato che il nuovo manto di ricoprimento si riforma in tempi molto brevi.

Una riduzione della crescita nella fase di massimo sviluppo può aversi per la sovrapposizione delle fronde che si ammassano nello spazio delle vasche divenuto insufficiente.

La crescita di *A. filiculoides* in estate avanzata segue andamenti che sono influenzati dai valori delle temperature medie di ciascuna estate. Da osservazioni stagionali condotte nel periodo 1983-1986 e in vari anni precedenti, è risultato che la intensa crescita vegetativa raggiunta all'inizio dell'estate tende a ridursi (tempi di raddoppio della biomassa e del peso secco di 5-7 giorni) (Tab. 1). La frequenza eterocistica e l'attività nitrogenasica rimangono in linea di massima le stesse rilevate all'inizio dell'estate (Tab. 1). In estati particolarmente calde, tipo quelle del periodo in esame, la riduzione della crescita è stata più pronunciata (tempo di raddoppio del peso fresco e secco di 6-9 giorni). Si sono avuti anche la riduzione dei valori della frequenza eterocistica (10-20%), la riduzione dell'attività nitrogenasica (70-90 nmoli di etilene/h/mg di peso secco di *Azolla*) e la comparsa di alcuni sintomi da stress, quali una leggera riduzione del numero e delle dimensioni delle fronde e la tendenza alla colorazione rosso mattone dovuta alle antocianine.

In questo periodo abbiamo esaminato i filamenti di *Anabaena azollae* all'interno delle foglioline di *A. filiculoides* (TAV. II fig. 2). Le colonie algali si ritrovano in cavità che si creano per invaginazione dei lobi dorsali delle foglioline in formazione (KONAR and KAPOOR, 1972, 1974). Nella sequenza delle foto della

TAV. III, sono riportate sezioni di una fogliolina di *A. filiculoides* mostranti alcuni stadi della formazione di una cavità.

Gli sporocarpi appaiono ogni anno all'inizio dell'estate (fine giugno - inizio luglio). Microsporocarpi e megasporocarpi si formano all'ascella delle foglioline delle fronde (TAV. IV, fig. 1). I microsporocarpi sono di forma sferica (1 mm di diametro) e sono singoli o in gruppi di due; i megasporocarpi, anch'essi singoli o in gruppi di due, affiancano i microsporocarpi e appaiono coniformi e più piccoli ( $0,2 \times 0,4$  mm).

I microsporocarpi, schiacciati e osservati al binoculare o al M.O., mostrano 40-80 microsporangii (TAV. IV, figg. 2 e 3) avvolti da un indusio e contenenti ciascuno solitamente 4 massule (TAV. IV, fig. 4). Le massule, le strutture periplasmodiali che contengono le microspore, sono rivestite da glochidi (TAV. IV, fig. 4), appendici uncinatae che permettono l'attacco delle massule ai megasporocarpi. I glochidi vengono utilizzati nella sistematica del genere per distinguere le sezioni *Euazolla* e *Rhizosperma* (SVENSON, 1944; KONAR and KAPOOR, 1974; MOORE, 1969). La sezione *Euazolla* presenta *A. filiculoides* e *A. caroliniana* Wildenow, i cui glochidi sono monosettati e *A. mexicana* Presl. e *A. microp-hylla* Kaulfuss, i cui glochidi appaiono plurisettati. Nella TAV. V, fig. 1, è mostrata una sezione di un microsporocarpo con all'interno i microsporangii. Nella TAV. V, fig. 2, è mostrata una porzione di un microsporocarpo in cui, oltre ad un microsporangio con le massule, è possibile notare la presenza di *Anabaena azollae* nella zona sottostante l'indusio. Ulteriori osservazioni, non riportate nel presente lavoro, parrebbero dimostrare che *A. azollae* non sia presente sotto forma di filamenti; a nostro avviso, quindi, potrebbe essere rappresentata da acineti. DUNHAM and FOWLER (1987), che hanno osservato al SEM sezioni di microsporocarpi di *A. filiculoides*, definirono tali cellule di *A. azollae* « resting cells ».

Nella TAV. VI, figg. 1-4, sono rappresentate sezioni di un megasporocarpo. Sono in esse visibili i tre organi di galleggiamento (le strutture che contribuiranno a riportare a galla il megasporocarpo dopo il suo deposito sul fondo dell'acqua dove ha luogo la fecondazione). Gli organi di galleggiamento, come i glochidi, sono strutture di interesse sistematico. Le specie della sezione *Euazolla* presentano tre organi di galleggiamento, le specie di *Rhizosperma* ne presentano nove (SVENSON, 1944; MOORE,



1969). Nella TAV. VI, figg. 1-3, sono visibili acineti di *A. azollae* nello spazio compreso tra la porzione apicale dell'indusio e gli organi di galleggiamento.

In piena estate gli sporocarpi maturi si distaccano dalle fronde e si depositano sul fondo dell'acqua dove avverrà la fecondazione.

#### *Andamento della crescita nel periodo autunnale*

Alla fine dell'estate e fino al principio dell'autunno (inizi di ottobre), *A. filiculoides* mostra nuovamente alti valori di crescita (tempo di raddoppio della biomassa e del peso secco di 4-5 giorni) (Tab. 1). La crescita in questo periodo è leggermente variabile, dipendentemente dall'andamento stagionale dei valori della temperatura. Le dimensioni delle fronde si riducono leggermente; la frequenza eterocistica si abbassa in modo sensibile, l'attività nitrogenasica è simile a quella del periodo estivo (Tab. 1).

Negli anni 1984 e 1985 si è avuta una nuova sporificazione alla fine di settembre.

In autunno avanzato, con la riduzione delle ore di luce, dell'intensità luminosa e della temperatura, la crescita di *A. filiculoides* tende gradualmente a diminuire e la frequenza eterocistica dei ficobionti a ridursi.

#### *Significato applicativo delle osservazioni riportate*

*Azolla filiculoides* di Napoli presenta cicli stagionali di crescita che si ripetono con fasi costanti nel corso degli anni.

Nel periodo invernale la crescita è bloccata, ma non si ha mai la scomparsa della felce. La resistenza al freddo, e addirittura a gelate, seppure di breve durata, può assicurare la sopravvivenza e l'utilizzazione della felce come biofertilizzante per anni. Tale comportamento di *A. filiculoides* appare di grande interesse pratico se si considera che il calcolo dei costi di mantenimento di *Azolla* durante la stagione invernale in aree temperate ha portato spesso a ritenere svantaggiosa la sua utilizzazione come biofertilizzante (KIKUCHI *et al.*, 1984; LUMPKIN and PLUCKNETT, 1982; WA-

TANABE, 1982). Per un periodo abbastanza lungo dell'anno, che varia da un minimo di sei ad un massimo di nove mesi, *A. filiculoides* presenta crescita vegetativa con valori di tempo di raddoppio compresi nell'intervallo di 3-9 giorni (peso fresco o secco) e valori di attività nitrogenasica compresi nell'intervallo di 70-100nmoli di etilene/h/mg di peso secco (Tab. 1). Questi dati sono simili a quelli ottenuti per ceppi di *A. filiculoides* coltivati in aree temperate dove la felce ha mostrato la sua utilità come biofertilizzante (LUMPKIN and PLUCKNETT, 1982; WATANABE, 1982; TALLEY and RAINS, 1980; RAINS and TALLEY, 1978; VINCENZINI *et al.*, 1985).

I valori della crescita di *A. filiculoides* di Napoli misurati sulla base del peso fresco e secco sono sempre risultati coincidenti.

Tale comportamento sarebbe indice di un equilibrio metabolico e fisiologico che contribuisce a rendere *A. filiculoides* di Napoli particolarmente resistente alle basse temperature (MORETTI, comunicazione personale). Tale interpretazione si basa su osservazioni condotte su ceppi di varie specie di *Azolla* coltivati a Napoli (GRILLI CAIOLA e MORETTI, 1985; MORETTI and SINISCALCO GIGLIANO, in stampa). I ceppi che presentano valori differenti di crescita, sulla base del peso fresco e del peso secco, hanno allo stesso tempo difficoltà a superare la stagione invernale.

L'esame dell'andamento della crescita di *A. filiculoides* a Napoli nel corso dell'anno permette ulteriori considerazioni dal significato applicativo. Per vari mesi dell'anno (da aprile ad ottobre) è possibile procedere alla raccolta di felci da introdurre in colture agricole dove *A. filiculoides* può essere utilizzata come concime verde o come fertilizzante secco. I dati sopra presentati sembrano suggerire che per la utilizzazione come concime verde è preferibile procedere alla raccolta nel periodo aprile-luglio, quando la crescita è più intensa e di tipo esponenziale. In tale periodo inoltre la felce non sembra risentire dello shock da trapianto ed è capace di formare manti di ricoprimento sulle superfici acquatiche in breve tempo. Nel periodo settembre-ottobre la crescita è ancora alta, ma la felce appare più sensibile ad eventuali trasferimenti. Potrà comunque essere raccolta per la sua utilizzazione come fertilizzante secco.

Un'ultima considerazione riguarda la sporificazione di *A. filiculoides* a Napoli. In contrasto con quanto avviene in molte altre

aree temperate (LUMPKIN and PLUCKNETT, 1982), *A. filiculoides* di Napoli forma ogni anno, e a volte per due volte all'anno, microsporocarpi e megasporocarpi. Una sporificazione frequente, con la connessa riproduzione sessuata, è sicuramente vantaggiosa al fine dell'aumento della variabilità genetica della specie.

Nel prossimo futuro, sia per verificare l'adattabilità a climi temperati di ibridi interspecifici, sia per condurre ricerche sulla conservazione del germoplasma, sulla gametogenesi e sull'embriogenesi ci proponiamo di intraprendere l'isolamento di strutture riproduttive di *A. filiculoides*, sulla base di metodi già messi a punto per *A. mexicana* da TOIA *et al.*, (1987).

#### RIASSUNTO

La simbiosi azotofissatrice tra la felce acquatica *Azolla* Lam. e il cianobatterio azotofissatore *Anabaena azollae* Strasb. viene utilizzata come biofertilizzante nelle aree tropicali e subtropicali. Scarse sono invece le applicazioni di *Azolla* nelle aree temperate, dove la felce ha difficoltà a superare i freddi invernali.

A Napoli (Italia), una località mediterranea in cui gli inverni sono solitamente miti, sono stati esaminati il ciclo annuale di crescita e l'attività nitrogenasica di un ceppo di *Azolla filiculoides* Lam. e del suo ficobionte. È risultato che *A. filiculoides* riesce a superare le stagioni invernali, anche in caso di freddi intensi.

In primavera, estate ed autunno *A. filiculoides* ha tempi di raddoppio del peso fresco e del peso secco di 3-9 giorni e attività nitrogenasica pari a 70-100 nmoli di etilene/h/mg di peso secco. Tali valori appaiono potenzialmente molto interessanti ai fini applicativi della felce. Essi sono simili a quelli risultati per specie di *Azolla* che vengono utilizzate come biofertilizzante in alcune aree temperate.

L'esame dell'andamento della crescita di *A. filiculoides* nel corso dell'anno mostra che è utile la raccolta delle felce nel periodo aprile-ottobre al fine della sua utilizzazione in agricoltura sia come concime verde sia come fertilizzante secco. Appare comunque preferibile utilizzare la felce come concime verde nel periodo aprile-luglio, quando la crescita di *A. filiculoides* è più intensa e di tipo esponenziale. Nel periodo settembre-ottobre i valori di crescita sono ancora alti, ma la felce si dimostra sensibile ad eventuali trasferimenti. Pertanto in tale periodo è utilizzabile ancora solo come fertilizzante secco.

In contrasto con quanto avviene in molte altre aree temperate, a Napoli *A. filiculoides* sporifica ogni anno. Sono stati esaminati le strutture interne dei microsporocarpi e megasporocarpi e stadi del ciclo vitale di *Anabaena azollae* all'interno delle foglioline e degli sporocarpi di *A. filiculoides*.

BIBLIOGRAFIA

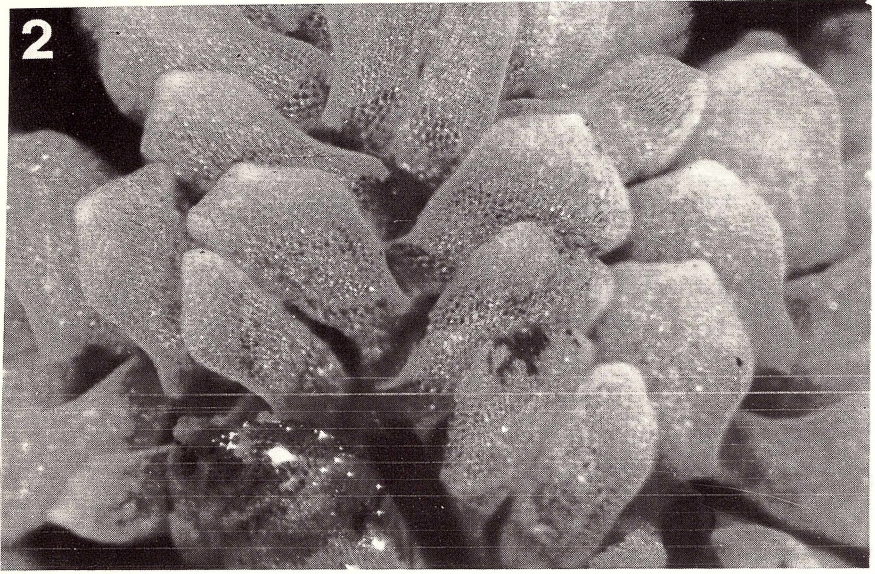
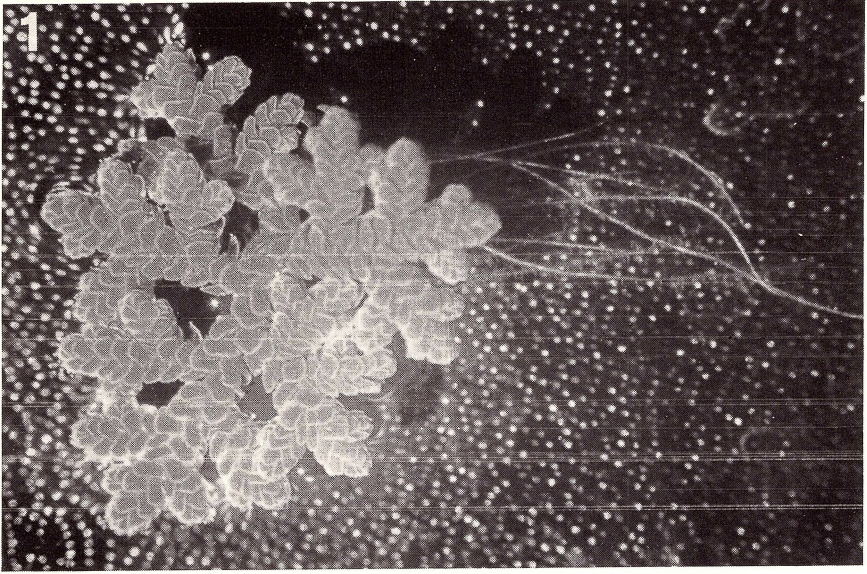
- ASHTON P. J., 1974. The effects of environmental factors on the growth of *Azolla filiculoides* Lam. In: The Orange River Progress Report (Inst. for Environmental Sciences). University of the O. F. S. Bloemfontein, South Africa, pp.: 123-138.
- BOZZINI A., DE LUCA P., MORETTI A., SABATO S. and SINISCALCO GIGLIANO G., 1984. Comparative study of six species of *Azolla* in connection with their utilization as a green manure for rice. In: Silver W. S. e Schroder E. C. (ed.). Practical application of *Azolla* for rice production. Nijhoff M. e Junk W. Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster. Proc. of an International Workshop, Mayaguez, Puerto Rico, 1982, pp: 125-131.
- DUNHAM D. G. and FOWLER K., 1987. Megaspore germination, embryo development and maintenance of the symbiotic association in *Azolla filiculoides* Lam. Botanical Journal of the Linnean Society, **95**: 43-53.
- GRILLI CAIOLA M. e MORETTI A., 1985. Il sistema *Azolla-Anabaena*. In: Nuti M. P. Impiego degli azotofissatori in agricoltura. C.N.R., I.P.R.A., Roma, Monografia 7, pp.: 53-69.
- HARDY R. W. I., HOLSTEN R. D., JACKSON E. K. and BURNS R. C., 1968. The acetylene-ethylene assay for N<sub>2</sub>-fixation: laboratory and field evaluation. Plant Physiol., **43**: 1185-1207.
- KIKUCHI M., WATANABE I. and HAWS L. D., 1984. Economic evaluation of *Azolla* use in rice production. Organic matter and rice. Int. Rice Res. Inst., Los Banos, Philippines, pp.: 569-592.
- KONAR R. N. and KAPOOR R. K., 1972. Anatomical studies on *Azolla pinnata*. Phytomorphology, **22**: 211-223.
- KONAR R. N. and KAPOOR R. K., 1974. Embryology of *Azolla pinnata*. Phytomorphology, **24**: 228-261.
- LUMPKIN T. A. and PLUCKNETT D. L., 1982. *Azolla* as a green manure: use and management in crop production. Westview Tropical Agriculture, Westview Press, Boulder, Colorado.
- MARGHERI M. C., TOMASELLI L. and FILPI C., 1984. Research on the mass culture of *Azolla caroliniana* and *A. filiculoides* in Italy. In: Silver W. S. e Schroder E. C. (ed.). Practical application of *Azolla* for rice production. Nijhoff M. e Junk Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster. Proc. of an International Workshop, Mayaguez, Puerto Rico, 1982, pp.: 212-213.
- MOORE A. W., 1969. *Azolla*: Biology and agronomic significance. Bot. Rev. **35**: 17-35.
- MORETTI A. and SINISCALCO GIGLIANO G. Influence of light and pH on growth and nitrogenase activity on temperate grown *Azolla*. Biology and Fertility of Soils, in stampa.
- RAINS D. W. and TALLEY S. N., 1978. Use of *Azolla* as a source of nitrogen for temperate zone rice culture. In: Proc. Second Rev. Meeting I.N.P.U.T.S. Project, East West Center Resource Systems Institute, Honolulu, Hawaii, USA, pp.: 167-174.

- SVENSON H. K., 1944. The New World species of *Azolla*. Amer. Fern J., **34**: 69-85.
- TALLEY S. N. and RAINS D. W., 1980. *Azolla filiculoides* Lam. as a fallow-season green manure for rice in a temperate climate. Agron. J. **72**: 11-18.
- TOIA R. E., JR, BUZBY K. M. and PETERS G. A., 1987. Sporocarps of *Azolla mexicana* Presl I. Isolation and Purification of megasporocarps and microsporangia. New Phytol. **106**: 271-279.
- VINCENZINI M., MARGHERI M. C. and SILI C., 1985. Outdoor mass culture of *Azolla* spp.: yields and efficiencies of nitrogen fixation. Plant and Soil, **86**: 57-67.
- WATANABE I., 1982. *Azolla-Anabaena* symbiosis: its physiology and use in tropical agriculture. In: Dommergues Y. R., Diem H. G. (ed.). Microbiology of tropical soils and plant productivity. Nijhoff M., Junk W. Publishers, The Hague, Boston, London pp.: 169-185.
- WATANABE I. and BERJA N. S., 1983. The growth of four species of *Azolla* as affected by temperature. Aquat. Bot. **15**: 175-185.

#### TAVOLA I

Fig. 1 — Una fronda di *A. filiculoides* di Napoli come appare all'inizio dell'estate. (× 3).

Fig. 2 — Alcune foglioline di una fronda di *A. filiculoides* di Napoli osservate al binoculare. (× 9).

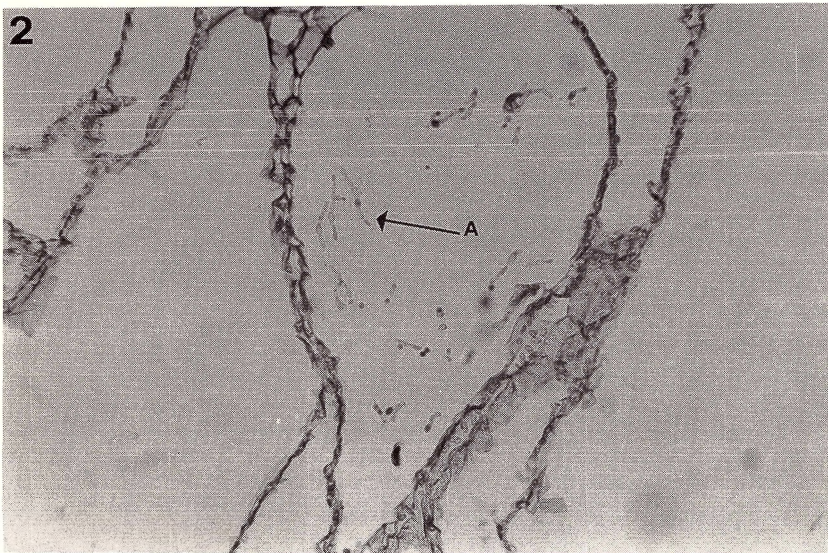
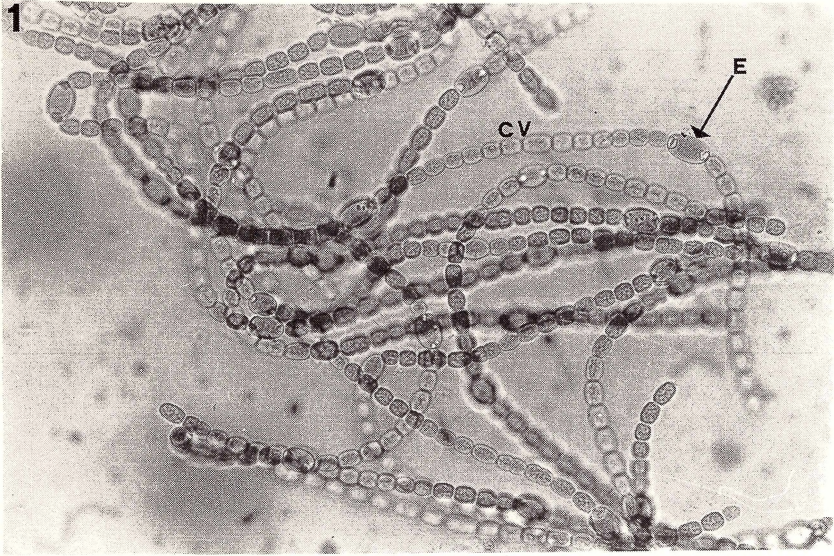


## TAVOLA II

Fig. 1 — Filamenti di *Anabaena azollae* osservati alla fine della primavera. CV: cellula vegetativa; E: eterociste. ( $\times 670$ ).

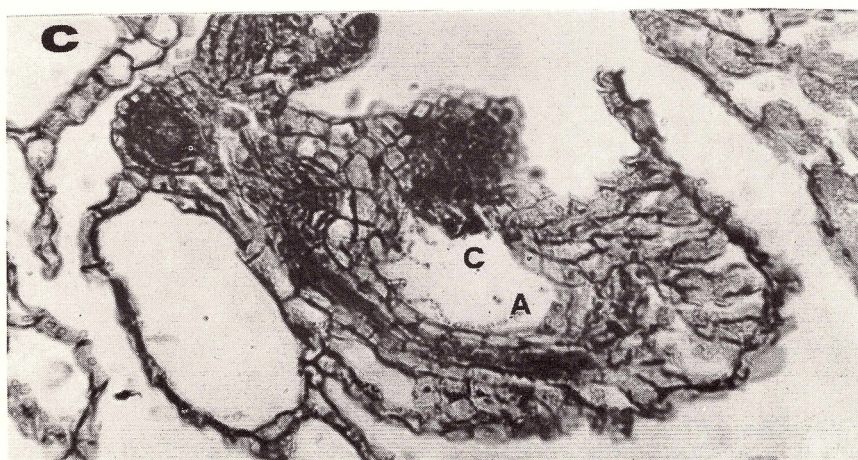
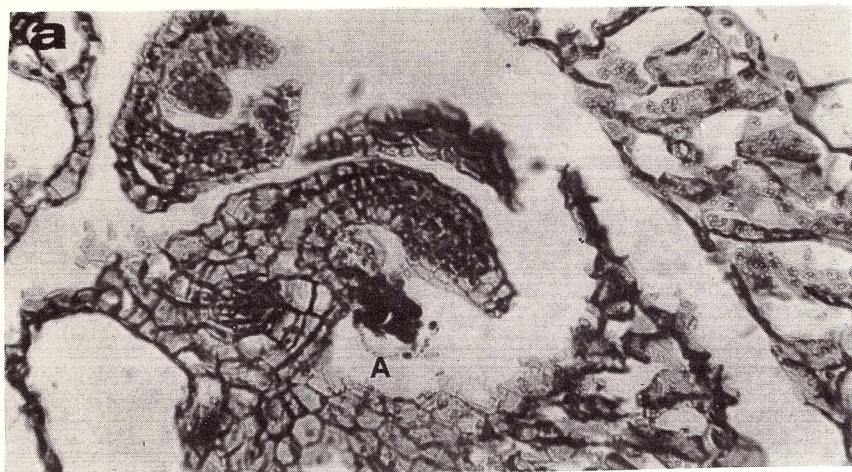
Fig. 2 — Sezione di una fogliolina di *A. filiculoides* di Napoli mostrante la cavità che ospita i ficobionti. Sono visibili filamenti di *A. azollae* (A). ( $\times 150$ ).





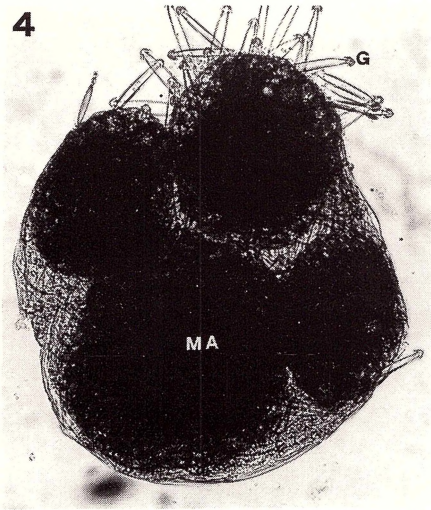
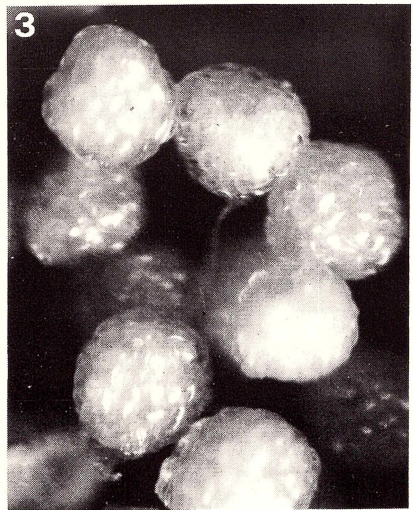
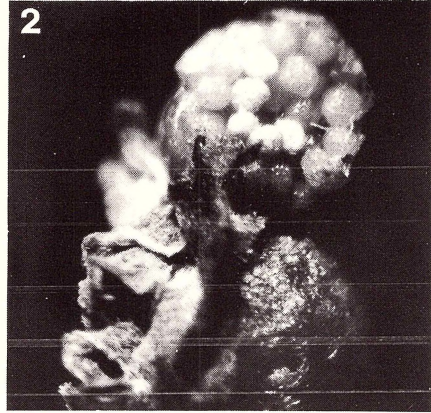
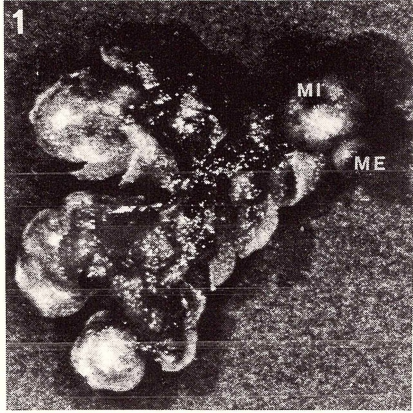
### TAVOLA III

Stadi di sviluppo di una fogliolina di *A. filiculoides* di Napoli. Parallelamente alla formazione della fogliolina si crea la cavità (C) che ospiterà i filamenti di *A. azollae* (A). Le tre fasi successive (a, b, c) sono state ottenute da tre sezioni seriate trasversali a partire dall'apice e procedendo verso la base di una fogliolina. Una fogliolina intera è osservabile nella TAV. I, fig. 2. ( $\times 210$ ).



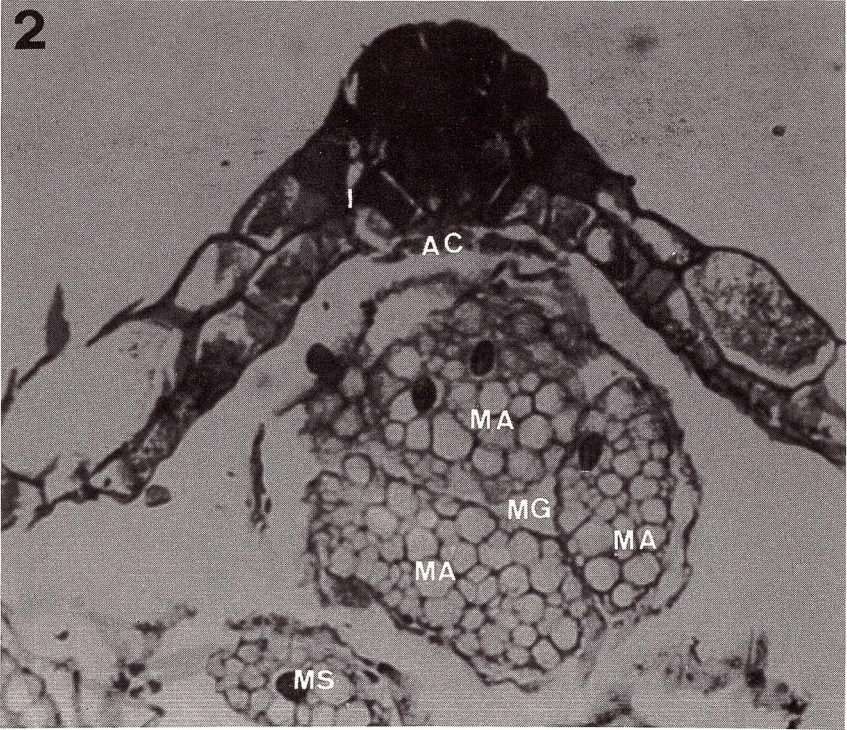
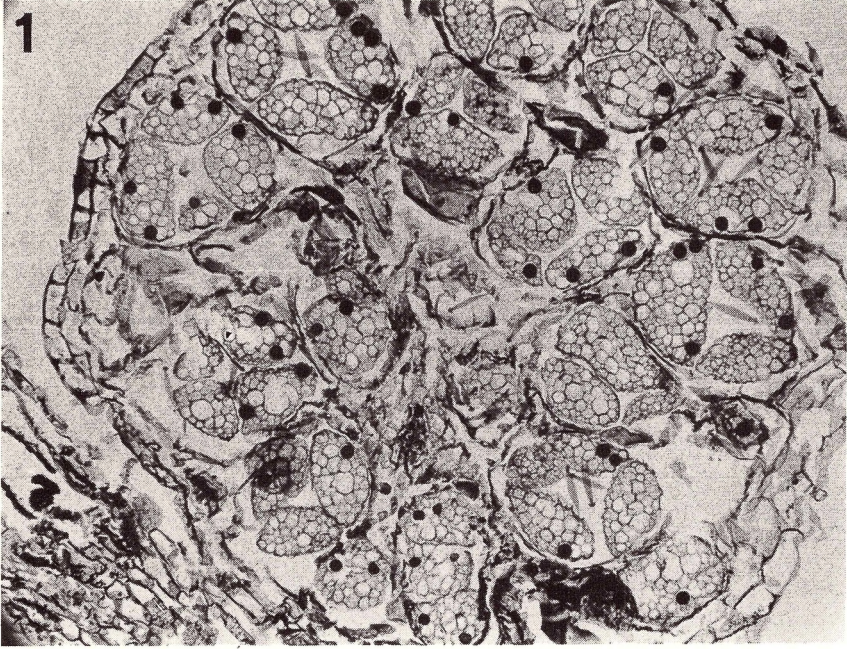
#### TAVOLA IV

- Fig. 1 — Rametto distaccato da una fronda di *A. filiculoides* di Napoli mostrante all'ascella delle foglioline un microsporocarpo (MI) ed un megasporocarpo (ME). ( $\times 35$ ).
- Fig. 2 — Due microsporocarpi di *A. filiculoides* di Napoli. Il microsporocarpo in alto è aperto e mostra all'interno i microsporangi. ( $\times 50$ ).
- Fig. 3 — Alcuni microsporangi osservati dopo la fuoriuscita da un microsporocarpo di *A. filiculoides* di Napoli. ( $\times 160$ ).
- Fig. 4 — Massule contenute in un microsporangio di *A. filiculoides* di Napoli. Ciascuna massula (MA) è circondata da glochidi mono-settati (G). ( $\times 400$ ).



#### TAVOLA V

- Fig. 1 — Sezione di un microsporocarpo contenente i microsporangii. ( $\times 110$ ).
- Fig. 2 — Particolare di una sezione di un microsporocarpo di *A. filiculoides* di Napoli. È visibile un microsporangio (MG) con le massulae (MA) contenenti le microspore (MS). Tra il microsporangio e la parte apicale dell'indusio (I) vi sono acineti di *A. azollae* (AC). ( $\times 270$ ).

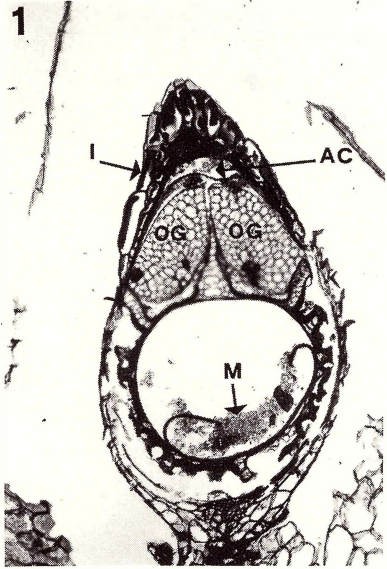


## TAVOLA VI

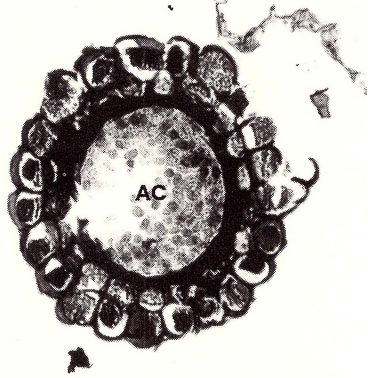
- Fig. 1 — Sezione longitudinale di un megasporocarpo attaccato ad una fronda di *A. filiculoides* di Napoli. Sono visibili l'indusio (I), la megaspora (M) e gli organi di galleggiamento (OG); la megaspora, subsferica a fresco, si è accartocciata durante la preparazione della sezione. Tra gli organi di galleggiamento e la parte apicale dell'indusio sono visibili acineti di *A. azollae* (AC). ( $\times 200$ ).
- Fig. 2 — Sezione trasversale di un megasporocarpo di *A. filiculoides* di Napoli. La sezione è stata effettuata a livello della zona con gli acineti *A. azollae* (AC) (vedi TAV. VI, fig. 1). ( $\times 350$ ).
- Fig. 3 — Porzione di una sezione longitudinale di un megasporocarpo di *A. filiculoides* di Napoli. Sono visibili gli organi di galleggiamento (OG), l'indusio (I) e acineti di *A. azollae* (AC). ( $\times 430$ ).
- Fig. 4 — Sezione trasversale di un megasporocarpo di *A. filiculoides* di Napoli. Sono visibili i tre organi di galleggiamento (OG) collegati tra di loro dalla columella (C) e avvolti dall'indusio (I). ( $\times 370$ ).



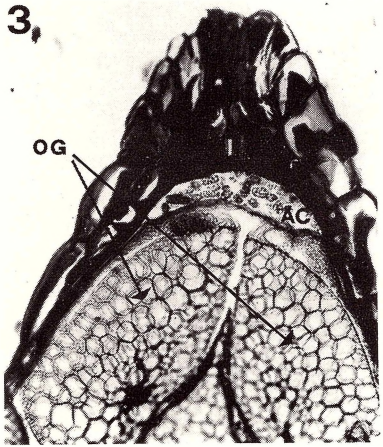
1



2



3



4

