

满江红的微量元素与固氮酶活性*

魏幼璋 杨玉爱 孙羲

(浙江农业大学)

摘 要

本试验测定了本地满江红、日本满江红、东德细满江红、菲律宾细满江红等组织中的营养元素含量,其值均很高。这说明在水培条件下满江红富集养分的能力很强。

本试验还测定了满江红的固氮酶活性,发现固氮酶活性与钼含量的相关性极显著 ($r = 0.991^{**}$)。同时固氮酶活性与铜含量的相关性也显著 ($r = 0.958^*$)。

本文还计算了这几种满江红的生长速率和固氮量,综合营养元素的含量,固氮酶活性,生长速率和固氮量诸因素,可以再次肯定在适温条件下,细满江红是优于本地满江红的,其中日本满江红及东德细满江红在生产上选种时可优先考虑。

本文还计算了东德细满江红组织中各营养元素含量间的关系。这为满江红试验的营养液配方及生产上对满江红的合理施肥提供了参考数据。

满江红是一种优良的水生绿肥,它的养殖和利用在我国已有悠久的历史。目前国内对满江红的研究已较为深入,有关的论文已发表了几千篇。随着能源危机的加剧以及各种肥料需要量的日益增大,满江红作为一种生物能源正引起广大科学工作者的兴趣。

目前有关满江红的文献,报道得较多的是对它生理、生态、环境条件和固氮能力方面的研究^[2-3],而对于满江红的成分分析,特别是微量元素方面的分析测定报道甚少。Moor^[12]和 Lumpkin^[10]曾有这方面的工作报道。但他们分析测定的项目较少,而且测定的方法有些方面也有待探讨。

微量元素在植物体内含量虽少,但它们在植物体内往往是酶或辅酶的组成部分^[3]。要了解满江红固氮酶活性与微量元素含量之间的关系,应对满江红的微量元素含量作仔细的分析。本试验首先对本地满江红 (*Azolla imbricata*)、日本满江红 (*Azolla Japonica*)、东德细满江红 [*Azolla filiculoides* (E. G.)]、菲律宾细满江红 [*Azolla filiculoides* (Ph.)]等四种满江红的 Mo、Mn、Cu、Co、B、Zn、Fe 等七种微量元素的含量进行了测定。同时还测定了它们的固氮酶活性。讨论了固氮酶活性与钼的含量以及铜的含量之间的关系。此外在综合这几种满江红的营养元素含量、固氮酶活性、生长速率和固氮量诸因素的基础上,来寻求较好的萍种。本试验还测定了满江红 N、P、Si、Ca 等四种大量营养元素的含量。并以我国南方各省养殖得较多的东德细满江红为例,计算分析了满江红各营养元素之间的相互关系。

* 本文系魏幼璋的硕士论文。

一、材料与方 法

(一) 种 萍 的 来 源 及 处 理

供试验用的种萍,本地满江红 (*Azolla imbricata*)、日本满江红 (*Azolla Japonica*)、东德细满江红 [*Azolla filiculoides* (E.G.)]、菲律宾细满江红 [*Azolla filiculoides* (Ph.)]¹⁾,均为刚经越夏的萍体。种萍取回后用蒸馏水洗净,再用无离子水洗涤数遍。并在绿色塑料盆中用无离子水饥饿培养 48 小时,然后分放于若干塑料盆中,移入玻璃房中养殖。

(二) 水 培 过 程

1. 营养液的配制 参考“改进的浙农 6302 无氮培养液”及“IRRI 无氮培养液”稍加修改。(单位:毫克/升)

KH_2PO_4	41.6,	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	41.6
KCl	22.8,	CaCl ₂	15.86
EDTA-Na ₂	3.7,	$\text{FeC}_2\text{H}_3\text{O}_6$	3.2
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.3,	H_3BO_3	0.3
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.3,	ZnSO ₄	0.01
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.01,	$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.000015

营养液 pH 值为 5.6。

(注:试剂均称取较大量,先配制成浓溶液,然后再稀释到上述浓度。)

2. 培养方法 将经过饥饿培养的种萍各 15 克,分别放入直径 500 毫米,高 155 毫米的绿色塑料盆内。每盆盛有营养液 1500 毫升。所有种萍试验均重复四次。培养时间自 1980 年 9 月 25 日至 10 月 10 日。

3. 培养环境 全部培养过程在玻璃房中进行。试验进行前,玻璃房用甲醛消毒。培养过程中的气温为 27.8℃,水温为 23.4℃,相对湿度为 60%,照度为 1400Lux (气温、水温、相对湿度、照度均为每天 8:00 及 14:00 测定的平均值。其中照度数值较低,这是因为在培养过程中,最初几天是阴雨天。另外玻璃房西边有树遮阴)。

(三) 满江红各种成分的测定

各种成分分析前,样品的前处理如杀青、烘干、灰化等以及分析用的器皿、药品、水等均按照一般微量元素分析的要求。试验中用凯氏定氮法测定氮;用钼钒黄比色法测定磷;用硫氰酸钾比色法测定钼;用姜黄素法测定硼;用过锰酸盐比色法测定锰;用联吡啶法测定铁。其中比色法均用 721 分光光度计进行比色测定。另外还用 WFD-Y₂ 型原子吸收分光光度计测定锌。用 Q-24 型中型石英光谱仪测定了钙、硅、铜、钴²⁾。

(四) 满江红固氮酶活性的测定

应用 102-G 型气相色谱仪,用乙炔还原法测定满江红的固氮酶活性^{11,12)}。先将一克鲜萍放入 100 毫升的注射器内。在注射器内注入 20 毫升营养液、26 毫升 Ar、10 毫升 O₂、4 毫升 C₂H₂。培养 8 小时后在气相色谱仪上测定。在 8 小时培养过程中的平均气温为 27℃,水温为 26℃,相对湿度为 79%,照度为 3500Lux。

(五) 东德细满江红各种营养元素间相关性的计算

相关的计算采用 CJ-709 型计算机。其规格为内存容量 32K;字长 48 位。计算语言是 ALGOL60。

1) 由浙江省农科院土肥所绿萍组提供。

2) 光谱分析由张桂兰同志分析,谨此致谢。

表1 满江红大量营养元素含量(%)

Table 1 Contents of macronutrients in plants of *Azolla*

种 种 Species	N		P		Si		Ca	
	范 围 Range	平均 值 Average value	范 围 Range	平均 值 Average value	范 围 Range	平均 值 Average value	范 围 Range	平均 值 Average value
本地满江红	2.47—2.54	2.50	1.06—1.18	1.10	0.24—0.42	0.34	0.67—0.84	0.74
日本满江红	4.05—4.17	4.11	0.93—1.08	1.00	0.37—0.64	0.59	0.56—0.65	0.60
东德细满江红	3.80—4.01	3.93	0.98—1.19	1.08	0.32—0.55	0.45	0.61—1.12	0.80
菲律宾细满江红	3.14—3.28	3.19	0.88—1.03	0.95	0.43—0.73	0.56	0.86—1.31	1.09

注: Si 尚未被确定为满江红的必需营养元素,但由于它在砷体内的含量较高,此外它与其它一些元素的相关性也较高,故暂且也列于此表。

表2 满江红微量营养元素含量(ppm)

Table 2 Contents of micronutrients in plants of *Azolla*

种 种 Species	Mo		Mn		Cu		Co		B		Zn		Fe	
	范 围 Range	平均 值 Average value	范 围 Range	平均 值 Average value	范 围 Range	平均 值 Average value	范 围 Range	平均 值 Average value	范 围 Range	平均 值 Average value	范 围 Range	平均 值 Average value	范 围 Range	平均 值 Average value
本地满江红	63.8—75.7	71.4	99.7—117.4	108.7	18.8—20.6	19.5	1.43—1.61	1.53	27.8—33.7	30.7	200.8—260.2	230.5	416.7—485.6	463.8
日本满江红	167.0—178.9	173.2	156.2—173.4	161.4	22.7—29.6	25.6	1.04—1.56	1.26	31.7—39.2	33.2	242.7—248.6	245.7	456.8—546.9	495.7
东德细满江红	129.1—183.6	157.1	147.1—178.0	157.3	22.8—33.4	27.9	1.30—1.79	1.47	30.7—35.9	33.6	551.1—623.5	581.3	331.4—660.2	527.3
菲律宾细满江红	130.4—162.7	139.9	210.6—237.5	229.6	24.3—29.6	26.8	1.24—1.37	1.31	44.8—49.3	47.7	197.8—291.9	244.9	558.6—579.6	571.7

注: 表1与表2所分析材料是满江红整株(包括: 枝、叶、根), 计算以干物质为基础。

二、结果与讨论

(一) 满江红各种营养元素的含量

从表 1 及表 2 可以清楚地看出, 满江红不仅含有 N、P 等大量元素, 而且有作物所需要的多种微量元素。在本试验营养液培养的条件下, 测定的结果表明, 满江红各种营养元素的含量是很高的。这说明满江红从溶液中富集养份的能力是强的。

(二) 满江红固氮酶活性与微量元素含量的关系

从表 3 可以看出几种满江红在同样培养条件下, 固氮酶的活性是很不相同的。其中日本满江红最高, 东德细满江红次之, 菲律宾细满江红再次之, 墨西哥满江红第四, 本地满江红最低。这种现象决不是偶然的, 如果把固氮酶活性与某些微量元素的含量联系起来分析, 可以发现一定的规律。人们知道, 钼是固氮酶、硝酸还原酶、黄嘌呤氧化酶、亚硫酸氧化酶、醛氧化酶的成份, 并且已经证明钼主要存在于固氮酶和硝酸还原酶中^[11]。其中硝酸还原酶是一种诱导酶, 当底物不存在硝酸盐时, 就不可能形成硝酸还原酶。在本试验中, 满江红是培养在无氮营养液中, 因而无硝酸盐存在。而且满江红由于与蓝藻共生, 所以是一种固氮能力较强的植物, 因此在满江红组织中钼主要应存在于固氮酶中。近年来, 在各种固氮生物中都分离得到了性质相似的固氮酶, 而且已经确定每一个固氮酶分子中, 铁钼蛋白上含有 2 个钼原子。既然钼主要存在于满江红的固氮酶中, 并且固氮酶分子中钼原子的数目已经确定, 那么可以推想满江红中钼的含量与固氮酶活性之间应该有正相关。统计分析本试验的结果发现, 这几种满江红在相同生长条件下, 固氮酶活性与它们钼元素的含量有极显著的相关性(图 1)。

表 3 满江红钼及铜的含量与固氮酶活性

Table 3 Contents of molybdenum and copper in relation to the activity of nitrogenase in *Azolla*

萍种 Species	含钼量 y_1 ($\mu\text{m}/100$ 克鲜物质) Mo content ($\mu\text{m}/100\text{g}$ fresh matter)	含铜量 y_2 ($\mu\text{m}/100$ 克鲜物质) Cu content ($\mu\text{m}/100\text{g}$ fresh matter)	固氮酶活性 x ($\mu\text{mC}_2\text{H}_4/1$ 克鲜物质/8 小时) Activity of nitrogenase ($\mu\text{m C}_2\text{H}_4/\text{lg}$ fresh matter/8h.)
本地满江红	2.827	1.163	2.291
日本满江红	7.404	1.653	4.078
东德细满江红	6.385	1.711	3.889
菲律宾细满江红	5.397	1.563	3.251
墨西哥满江红	4.677	未测	3.070

注: 1. 由于萍种来源较少, 墨西哥满江红 (*Azolla mexicana*) 仅测定了固氮酶活性及钼的含量; 2. 这里讨论钼的含量及铜的含量与固氮酶活性的关系, 出于生理学的目的考虑, 养分含量以 $\mu\text{m}/100$ 克鲜物质表示更合适^[11a]。

实验还得出满江红组织中铜的含量与固氮酶活性之间也有显著的相关性(图 2)。

目前关于铜与生物固氮之间关系的研究在豆科作物的有关试验中已有报道, 但在满江红的研究中尚未见有试验报道。分析本试验的结果, 这可能与一些氧化酶有关。因为氧化酶中铜的含量较高, 氧化酶又与呼吸作用直接有关。虽然氧化酶不像固氮酶那样直

接参与氮的固定,但是由于它的作用而产生的 ATP 是保证固氮作用正常进行的能量来源。因此,满江红中铜的含量与固氮酶活性也有一定的关系。

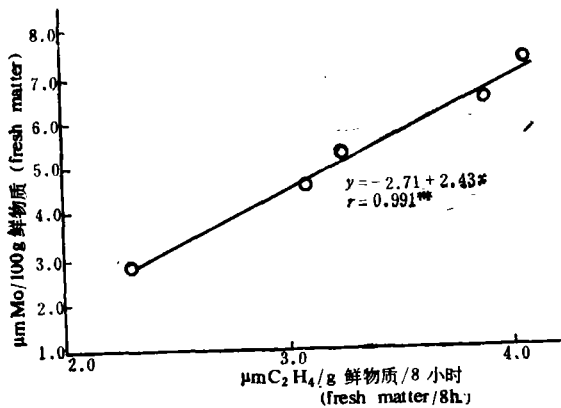


图1 满江红含钼量与固氮酶活性的关系

Fig. 1 The correlation between content of molybdenum in *Azolla* and activity of nitrogenase

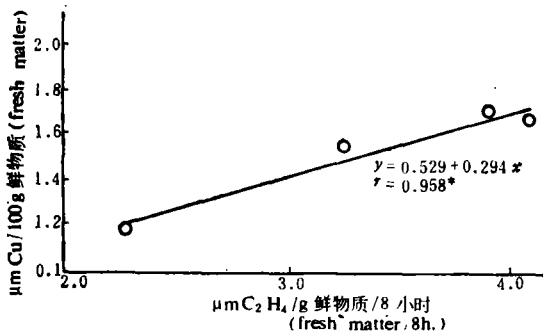


图2 满江红含铜量与固氮酶活性的关系

Fig. 2 The correlation between content of copper in *Azolla* and activity of nitrogenase

一种满江红如东德细满江红重复之间的差异则不显著 ($F_{0.01} = 1.64$, $F_{0.05} = 3.86$)。这说明种间差异是主要的。所以在生产上选种时,根据本试验的结果,日本满江红与东德满江红可优先考虑。

(四) 满江红组织中营养元素的相互关系

植物对各种营养元素的需要是有一定比例的。植物体内营养元素的含量在一定程度上能反映植物某一阶段的营养状况。为了研究满江红所需营养元素之间的关系,我们用近年来我国南方各省广泛养殖的东德细满江红为材料,测定了一些必需营养元素的含量对所得分析数据用电子计算机计算它们的相关系数(表5,表6)。

表6中左列的 r 值均达到显著水平。氮与钼;氮与铁有显著的正相关,这是可以理解的,因为钼是固氮酶的成分,而铁不仅是固氮酶中铁蛋白及铁钼蛋白的成分,而且还是固氮所必需的铁氧还蛋白等物质的成份。因此在正常范围内提高钼或铁的水平可以增加固

应该指出,固氮酶活性与其它酶的活性一样,它是一种生物活性指标。它的大小与测定时的条件如照度、温度、相对湿度等都是密切相关的。因此固氮酶活性与钼及铜的含量之间的相关系数及回归方程也应该是在一定测定条件下才是适用的。

(三) 满江红的生长速度和固氮量

从表4可以看出,从生长速度来说,菲律宾细满江红最快,东德细满江红次之,日本满江红再次之,本地满江红最差,但从固氮量来看,日本满江红最高,东德细满江红次之,菲律宾细满江红又次之,本地满江红最低。综合以上四个表的试验结果,即从各种满江红的营养元素含量、固氮酶活性、生长速度和固氮量等几个方面全面衡量,在适温条件下,细满江红是优于本地满江红的。例如就钼的含量来看,经统计分析细满江红与本地满江红都有极显著的差异,且日本满江红与菲律宾细满江红也有显著差异。但某一种

表 4 满江红的增长率和固氮量
Table 4 The rate of growth and nitrogen-fixing capacity of *Azolla*

萍种 Species	培养时间(天) Culture period (days)	移栽量 (鲜重,克) Transplant (F. W.)	收获量 (g) Harvest		生长值 P Growth value P	日增长率 R Rate of growth per day R	收获物全 N 量 (mg) Total N in crops	收获物含 N 量 D (mg N/g D. W.) N content of crops	固氮量 R × D (mg N/g D. W./day) N-fixing capacity
			鲜重 F. W.	干重 D. W.					
本地满江红	15	15.0	138	5.24	9.17	0.159	131	25.0	3.98
日本满江红	15	15.0	155	6.30	10.3	0.168	259	41.4	6.91
东德细满江红	15	15.0	157	6.08	10.5	0.170	239	39.3	6.67
菲律宾细满江红	15	15.0	185	6.92	12.3	0.182	221	31.9	5.81

注: 表格形式及计算方法均参照参考文献[13]: $R = 10 \frac{lgP}{t} - 1$ 。

表 5 东德细满江红必需营养元素的含量
Table 5 Content of essential elements in *Azolla filiculoides* (E. G.)

编号 No.	N (%)	P (%)	Si (%)	Ca (%)	Mo (ppm)	Mn (ppm)	Cu (ppm)	B (ppm)	Co (ppm)	Zn (ppm)	Fe (ppm)
1	3.8	1.2	0.3	0.6	129.1	147.2	23.2	30.7	1.3	551.1	331.4
2	3.9	1.0	0.6	1.1	148.9	158.5	22.3	35.6	1.8	623.5	528.5
3	4.0	1.1	0.5	0.8	170.5	147.7	33.4	32.8	1.5	556.8	539.8
4	4.0	1.1	0.4	0.7	183.6	178.0	32.4	35.9	1.3	600.6	660.2

注: 表中编号表示塑料盆在温室中的不同位置。

表 6 东德细满江红元素间的相关性

Table 6 Correlation coefficients for elements in *Azolla filiculoides* (E. G.)

	r 值		r 值
N 与 Mo	0.966	Cu 与 Mo	0.894
N 与 Fe	0.975	Fe 与 Mn	0.790
P 与 Ca	-0.964	P 与 Zn	-0.712
P 与 Si	-0.980	Ca 与 B	0.619
Ca 与 Co	0.964	N 与 Cu	0.788

氮能力,从而增加满江红的含氮量。磷与硅有显著的负相关,这是因为磷与硅都是以阴离子形态进入根系,由于它们化学性质相似而引起相互拮抗。钙与磷和钙与钴分别有显著的负相关和正相关,这方面的材料未见报道,其原因有待进一步研究。

表 6 右列中所示的 r 值虽未达到显著水平,但尚有较好的相关性,这在其它作物的研究中已有不少报道。例如 Mehlich^[7]报道了大豆中的铁与锰的关系; Jones 等^[9]报道了烟草等作物中钙与硼的关系; Boawn 等^[8]报道了马铃薯的磷与锌的关系。本试验的结果,其趋势与这些报道是一致的。表 5 及表 6 所列的结果为满江红试验的营养液配方及生产上对满江红的合理施肥提供了参考数据。

参 考 文 献

- [1] 上海植物生理研究所固氮研究室, 1974: 固氮研究中乙炔还原定量测定方法的简易化。植物学报, 第 16 卷 4 期, 382—384 页。
- [2] 刘中柱, 尤崇杓等, 1980: 红萍排氮过程初步探讨。中国农业科学, 第 4 期, 39—43 页。
- [3] 孙 羲, 1980: 农业化学。上海科学技术出版社, 第 130 页。
- [4] 曾 定, 1955: 满江红生长、繁殖及固氮能力的初步试验。厦门大学学报, 第 3 期, 124—138 页。
- [5] 温永煌、汤健民, 1978: 用乙炔还原法测定满江红的固氮活性。植物学报, 第 20 卷 3 期, 273—275 页。
- [6] Becking, J. H., 1979: Environmental requirements of *Azolla* for use in tropical rice production. Nitrogen and Rice, IRRI, 375.
- [7] Benton, J. and Jones, J. R., 1972: Plant tissue analysis for micronutrients. in "Micronutrients in Agriculture" (Mortvedt J. J. et al ed.), Soil Sci. Soc. Am., 335.
- [8] Boawn, L. C. and Leggett, G. E., 1964: Phosphorus and zinc concentration in Russet Burbank potato tissues in relation to development of zinc deficiency symptoms. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 28: 229.
- [9] Jones, H. E. and Scarseth, G. D., 1944: The calcium-boron balance in plants as related to boron needs. Soil Sci. 57: 15—24.
- [10] Lumpkin, T. A. and Plucknett, D. L., 1980. *Azolla*: Botany, physiology and use as a green manure. Economic Botany, 34(2): 111—153.
- [11] Mengel, K. and Kirkby, E. A., 1979: Principles of Plant Nutrition, a 23, b 477, c501.
- [12] Moor, A. W., 1969: *Azolla* biology and agronomic significance. Bot. Rev., 35: 17.
- [13] Yatazawa, M., Tomematsu, N., Hosoda, N. and Nunome, K., 1980: Nitrogen fixation in *Azolla-anabaen* symbiosis as affected by mineral nutrient status. Soil Sci. and Plant Nutr., 26 (3): 415—426.

MICRONUTRIENTS AND ACTIVITY OF NITROGENASE IN AZOLLA

Wei Youzhang, Yang Yuai and Sun Xi
(Zhejiang Agricultural University)

Summary

Materials used in the experiment were *Azolla imbricata*, *Azolla japonica*, *Azolla filiculoides* (E. G.) and *Azolla filiculoides* (Ph.), and they were cultured with nutrient solution in green house for 25 days after the samples being washed by and cultured in distilled water through ionexchange resins for 48 hours, and then their contents of nutrient elements including N, P, Si, Ca, Mo, Mn, Fe, Cu, Zn, Co and B were determined. Results obtained from the experiment showed that nutrient contents in the plants of *Azolla* were rather high as compared with the contents of their cultural solution, which indicates *Azolla* has a very high absorbability of nutrients. Meanwhile, the activity of nitrogenase was also determined by acetylene reduction method. The activities of nitrogenase in the plants were in the following order: *Azolla japonica* > *Azolla filiculoides* (E. G.) > *Azolla filiculoides* (Ph.) > *Azolla mixican* > *Azolla imbricata*. The results by statistical analysis showed that the activity of nitrogenase (x) was very significantly positively correlated with the content of molybdenum (Y_1) ($r=0.991$), and it was significantly positively correlated with the content of copper (Y_2) ($r=0.958$) in *Azolla* samples. Under the experimental conditions the respective regression equations are as follows: $Y_1 = -2.71 + 2.43X$; $Y_2 = 0.529 + 0.294X$.

The rate of growth and the nitrogen-fixing capacity of *Azolla* were also calculated. The rate of growth was in the order of: *Azolla filiculoides* (Ph.) > *Azolla filiculoides* (E. G.) > *Azolla japonica* > *Azolla imbricata*.

The order of nitrogen fixing capacity was as follows: *Azolla japonica* > *Azolla filiculoides* (E. G.) > *Azolla filiculoides* (Ph.) > *Azolla imbricata*. From the results mentioned above, it can be seen that *Azolla japonica* and *Azolla filiculoides* (E. G.) are better than others.

Azolla filiculoides (E. G.) was taken as an example for investigation of the correlation between essential nutrients in plant. It was found that there were positive correlations between N and Mo, N and Fe, Ca and Co, while there were negative correlations between P and Ca, P and Si. In addition, there were also significant correlations between Cu and Mo, Fe and Mn, P and Zn, Ca and B, N and Cu. These results may be provided for reference in the preparation of nutrient solution and the adequate application of fertilizers for *Azolla* in practice.