

镉对满江红 (*Azolla imbricata*) - 鱼腥藻 (*Anabaena azollae*) 共生体氮代谢的影响

戴灵鹏^{1,*}, 熊治廷², 马海虎¹

(1. 温州大学生命与环境科学学院, 温州 325027; 2. 武汉大学资源与环境科学学院, 武汉 430079)

摘要: 在实验室条件下, 研究了不同浓度 (0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 mg/L) 的 Cd 对满江红-鱼腥藻共生体异型胞频率, 固氮酶、谷氨酰氨合成酶活性以及铵态氮、游离氨基酸、可溶性蛋白、总氮含量的影响。结果表明, 在整个实验期间, 0.01 mg/L Cd 处理对上述指标均没产生显著影响, 说明满江红-鱼腥藻共生体对 Cd 具有较强的耐性。当培养液中 Cd 浓度 ≥ 0.05 mg/L 时, 随溶液中 Cd 浓度的增加和处理时间的推移, 异型胞频率、固氮酶活性、谷氨酰氨合成酶活性、可溶性蛋白含量和总氮含量逐渐下降, 而铵态氮含量在处理初期显著降低, 随后迅速增加, 游离氨基酸含量则逐渐增加。研究结果表明高浓度的 Cd 处理导致满江红-鱼腥藻共生体氮代谢的紊乱, 最终造成氮素积累量的下降。

关键词: 镉; 满江红-鱼腥藻共生体; 氮代谢; 毒害效应

文章编号: 1000-0933 (2009) 03-1629-07 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effects of cadmium on nitrogen metabolism in *Azolla imbricata*-*Anabaena azollae* symbiosis

DAI Ling-Peng^{1,*}, XIONG Zhi-Ting², MA Hai-Hu¹

1 School of Life and Environmental Science, Wenzhou University, Wenzhou 325027, China

2 School of Resource and Environmental Science, Wuhan University, Wuhan 430079, China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(3): 1629 ~ 1635.

Abstract: Effects of cadmium concentrations (0, 0.01, 0.05, 0.1 and 0.5 mg/L) on heterocyst frequency, nitrogenase and glutamine synthetase activities as well as ammonium nitrogen, free amino acid, soluble protein and total nitrogen contents in *Azolla imbricata*-*Anabaena azollae* symbiosis cultured in the growth medium were investigated under laboratory conditions. The results showed that the above mentioned parameters did not change significantly in *A. imbricata*-*A. azollae* symbiosis treated with 0.01 mg/L Cd during 7 days treatment, indicating that *A. imbricata*-*A. azollae* symbiosis have a high tolerance to Cd. When Cd concentration was above 0.05 mg/L, heterocyst frequency, the activities of nitrogenase and glutamine synthetase as well as the contents of soluble protein and total nitrogen decreased considerably with both increase in Cd concentration in the growth medium and duration of Cd treatment. At the same time, the ammonium content decreased in the early period of experiment, then increased rapidly, whereas free amino acid content increased gradually. These results suggested that higher cadmium treatment caused the disorder of nitrogen metabolism and reduced the accumulation of nitrogen in *A. imbricata*-*A. azollae* symbiosis.

Key Words: Cd; *A. imbricata*-*A. azollae* symbiosis; nitrogen metabolism; toxic effect

氮素是植物生长所必需的大量营养元素, 是许多生物大分子, 如蛋白质、核酸、叶绿素和酶的构成成分,

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30800159)

收稿日期: 2007-07-06; 修订日期: 2008-11-03

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: lpdai@wzu.edu.cn

直接影响植物的生长发育、品质和产量^[1]。生物固氮能将大气中的分子态氮还原成氨,为植物提供廉价、可再生氮素,降低或代替化肥的使用,在农业生产和环境保护中发挥着重要作用^[2]。但生物固氮是一个非常复杂的生物过程,常受干旱、盐度、重金属、低温等环境因素的影响^[3]。

满江红属(*Azolla*)是广泛分布、个体较小的水生蕨类植物,在其叶腔中共生的蓝绿藻-鱼腥藻(*Anabaena azollae*)具有很强的固氮能力。因其繁殖快,生物固氮效率高,腐熟快速,肥效显著,管理容易,可与水稻间作,以及与水稻的生长环境相似,长期以来在中国及东南亚许多国家作为稻田的绿肥使用^[2]。Cd 是稻田最主要的重金属污染物,国内外对于 Cd 对水稻的毒害效应及其控制技术进行了大量研究^[4~6]。重金属对满江红属植物具有较强的毒性^[7~9],但 Cd 对满江红-鱼腥藻固氮酶活性及其氮代谢的影响至今未见报道。

本文以满江红[*Azolla imbricata* (Roxb.) Nakai]为材料,研究了 Cd 对满江红-鱼腥藻共生体异型胞频率、固氮酶活性、铵态氮、游离氨基酸、可溶性蛋白、总氮和谷氨酰氨合成酶活性的影响,旨在评价 Cd 对满江红-鱼腥藻共生体氮代谢的毒害效应,为进一步探索满江红-鱼腥藻对 Cd 污染稻田的供氮情况及合理利用满江红-鱼腥藻提供科学依据和参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料和培养

满江红采自温州市郊的稻田。将植物材料用自来水冲洗数次,蒸馏水冲洗 3 次,然后放入稀释 2/5 倍、不含硝酸氮的 Hoagland 培养液中预培养 15d,即用氯化盐代替培养液中硝酸盐,因为满江红叶片共生腔内的鱼腥藻能通过固氮作用将分子氮转化为可被利用的氨以供满江红使用^[10,11]。培养温度约 $(24 \pm 4)^\circ\text{C}$,光照为室内自然光加荧光灯,光照强度约 $100\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光暗周期为 14h:10h。在试验前一天,挑选生长健壮、无虫噬、大小相近、成熟的满江红,先用蒸馏水冲洗,然后放入盛有适量蒸馏水的容器中备用。

1.2 试验设计

在各装有 1000ml 上述培养液的塑料盆(体积 1500cm^3 ,水面面积 150cm^2)中,分别按 0(对照),0.01,0.05,0.1,0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 加入分析纯 CdCl_2 配成 Cd 处理系列浓度,每处理共需 12 盆(3 个重复 $\times$ 4 批收获)。每个盆中随机放入 6g 备用的满江红,放入前用吸水纸吸干表面水并称鲜重,试验条件与材料培养条件相同。培养过程中每隔 2d 更换培养液 1 次,以维持溶液中 Cd 和营养成分浓度的稳定。分别在处理 1,3,5,7d 后收获 1 批满江红,测定鱼腥藻异型胞频率和固氮酶活性后,将其放入 $5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液中浸泡 10min,以去掉吸附在满江红上的 Cd,再用 2 次蒸馏水冲洗干净并剪去满江红的不定根。将满江红用吸水纸吸干、以 0.5g 为单位称取 4 次,液氮速冻,然后转移至 -80°C 低温冰箱中保存,用于铵态氮、游离氨基酸、可溶性蛋白含量和谷氨酰氨合成酶活性的测定。剩余的满江红用吸水纸吸干,在 70°C 下烘干 48h 并称干重,用于总氮含量的测定。

1.3 鱼腥藻异型胞频率的测定

鱼腥藻的分离按照 Peters 和 Mayne^[12]的方法,在放大 400 倍的 Nikon 生物显微镜(E200)下计数每 200 个鱼腥藻丝状体细胞中异型胞的数量,异型胞频率表示为异型胞占总鱼腥藻丝状体细胞的百分率(%)。

1.4 生理生化指标测定方法

固氮酶活性采用乙炔还原法测定^[13],活性以还原生成的乙烯的 $\text{nmol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ 表示。铵态氮含量按照 Chien 和 Kao^[14]的方法测定。游离氨基酸含量采用茚三酮比色法测定^[15]。可溶性蛋白质含量采用考马斯亮蓝 G-250 法测定^[16],以牛血清白蛋白为标准蛋白。总氮含量采用 $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ 消煮,奈氏比色法测定^[17],谷氨酰胺合成酶活性参考 Zhang 等^[18]的方法测定,以 γ -谷氨酰基氧肟酸作为标准物质,活性以 37°C 下生成的 γ -谷氨酰基氧肟的 $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min} \cdot \text{protein})$ 表示。

1.5 统计分析

实验结果以平均数 $\pm$ 标准偏差($\text{Mean} \pm \text{SD}$)来表示,用 SPSS12.0 统计软件对试验数据进行单因素方差分析和最小显著差法(LSD)显著性检验,不同字母表示处理间差异显著($p < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 Cd 对鱼腥藻异型胞频率的影响

由表 1 可知,在不同浓度的 Cd 处理下,鱼腥藻异型胞频率表现出显著的不同。在整个实验期间,0.01mg/L Cd 处理与对照组相比无显著差异。在 0.05mg/L Cd 处理 7d 后,异型胞频率含量与对照组存在显著差异。在 0.1mg/L Cd 处理 5d 后,异型胞频率含量显著低于对照组。异型胞频率在 0.5mg/L Cd 浓度处理 7d 后达到最低,仅为对照组的 57.94%。

表 1 Cd 对鱼腥藻异型胞频率和固氮酶活性的影响

Table 1 Effect of Cd concentrations on heterocyst frequency and nitrogenase activity in *A. azolla*.

项目 Item	Cd 处理 Cd Treatment (mg/L)	处理时间 Treatment time (d)			
		1	3	5	7
异型胞频率	0	18.17 ± 1.04 ^a	17.67 ± 2.08 ^a	18.17 ± 1.61 ^a	17.83 ± 1.04 ^a
Heterocyst	0.01	17.50 ± 1.32 ^a	17.33 ± 0.58 ^a	17.67 ± 1.15 ^{ab}	17.17 ± 1.04 ^{ab}
frequency (%)	0.05	17.00 ± 0.50 ^a	17.67 ± 0.57 ^a	17.17 ± 1.04 ^{ab}	15.17 ± 0.76 ^b
	0.1	17.50 ± 0.87 ^a	17.17 ± 0.76 ^a	15.47 ± 1.36 ^b	12.50 ± 1.32 ^c
	0.5	17.67 ± 2.5 ^a	15.83 ± 2.93 ^a	14.33 ± 1.53 ^{bc}	10.33 ± 1.53 ^d
固氮酶活性	0	24.31 ± 1.61 ^a	24.69 ± 2.06 ^a	24.25 ± 2.07 ^a	24.72 ± 1.70 ^a
Nitrogenase	0.01	24.37 ± 2.21 ^a	24.58 ± 1.07 ^a	23.45 ± 1.35 ^a	23.91 ± 2.09 ^a
activity (nmol/(g·min))	0.05	24.70 ± 1.59 ^a	23.37 ± 0.94 ^{ab}	21.56 ± 1.50 ^a	20.29 ± 0.92 ^b
	0.1	22.39 ± 0.54 ^{ab}	19.75 ± 2.75 ^{bc}	17.62 ± 2.42 ^b	14.53 ± 1.09 ^c
	0.5	19.99 ± 1.84 ^b	17.83 ± 3.60 ^c	13.92 ± 2.10 ^c	10.98 ± 1.14 ^d

表中数值为 3 个重复的平均值 ± 标准差,同一列数据不同字母代表差异显著 ($p < 0.05$),下同 Data represent mean ± SD ($n = 3$), data in the same column with different letters show significant difference ($p < 0.05$), the same below

2.2 Cd 对鱼腥藻固氮酶活性的影响

从表 1 还可以看出,Cd 对鱼腥藻固氮酶活性也产生显著的影响。与对照比较,0.01mg/L Cd 处理的固氮酶活性在整个试验期间没有显著变化。在 0.05mg/L Cd 处理 7d 后,固氮酶活性含量与对照组存在显著差异。在 0.1mg/L Cd 处理 3d 后,固氮酶活性含量显著低于对照组。在 0.5mg/L Cd 浓度处理下,固氮酶活性在整个处理期间均显著低于对照,7d 后达到最低,仅为对照组的 44.42%。总的来说,固氮酶活性随溶液中 Cd 浓度的增加和处理时间的推移而逐渐减少。

2.3 Cd 对满江红-鱼腥藻共生体铵态氮含量的影响

如图 1 所示,在 0.01mg/L Cd 处理下,满江红-鱼腥藻共生体铵态氮含量在整个实验期间几乎保持稳定。在 0.05mg/L Cd 处理 7d 后,铵态氮含量与对照组存在显著差异。0.5mg/L Cd 处理下的铵态氮含量在 3d 后显著下降到最低值,为对照的 0.83 倍,然后逐渐上升,7d 后,其含量为对照的 1.17 倍。

2.4 Cd 对满江红-鱼腥藻共生体游离氨基酸含量的影响

从图 2 可以看出,满江红-鱼腥藻共生体的游离氨基酸含量随 Cd 处理浓度的增加和处理时间的推移而逐渐上升。在 0.01mg/L Cd 处理下,游离氨基酸含量与对照组没有显著差异,但显著低于其他浓度的 Cd 处

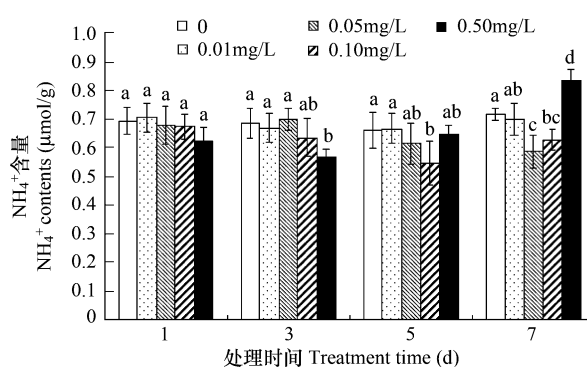


图 1 Cd 对满江红-鱼腥藻共生体铵态氮含量的影响

Fig.1 Effect of Cd concentrations on the ammonium contents in *A. imbricata*-*A. azollae* symbiosis

理。0.05mg/L Cd 处理 7 后,游离氨基酸含量与对照组存在显著差异。在 0.1mg/L Cd 处理 5d 后,游离氨基酸含量显著高于对照组。0.5mg/L Cd 浓度处理 3d 后游离氨基酸含量显著上升,第 7 天达到最大值,为

对照组的 1.85 倍。

2.5 Cd 对满江红-鱼腥藻共生体可溶性蛋白质含量的影响

由图 3 可知,不同浓度 Cd 处理的可溶性蛋白质含量表现出显著的不同。与对照比较,0.01、0.05 mg/L Cd 处理的满江红-鱼腥藻共生体可溶性蛋白质含量在试验期间有所下降,但未达显著水平。0.1、0.5 mg/L Cd 处理的可溶性蛋白质含量在试验的整个过程中均随时间的推移而显著下降。可溶性蛋白质含量在 0.5 mg/L Cd 浓度处理 7d 后达到最小值,仅为对照组的 52.07%。

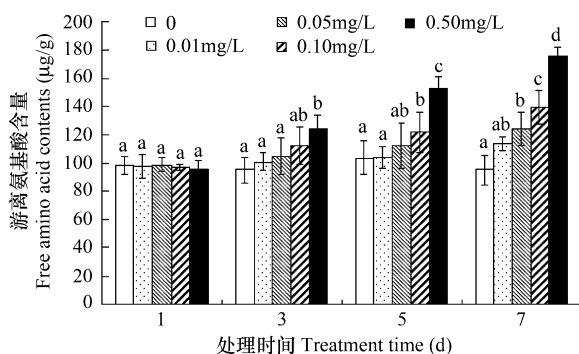


图 2 Cd 对满江红-鱼腥藻共生体游离氨基酸含量的影响

Fig. 2 Effect of Cd concentrations on the free amino acid contents in *A. imbricata*-*A. azollae* symbiosis

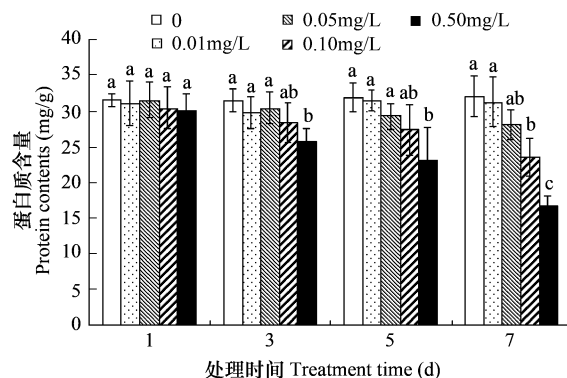


图 3 Cd 对满江红-鱼腥藻共生体可溶性蛋白质含量的影响

Fig. 3 Effect of Cd concentrations on the protein contents in *A. imbricata*-*A. azollae* symbiosis

2.6 Cd 对满江红-鱼腥藻共生体总氮含量的影响

由图 4 可知,Cd 对满江红-鱼腥藻共生体总氮量的影响与可溶性蛋白氮含量的变化趋势基本一致,随溶液中 Cd 浓度的增加和处理时间的推移,满江红总氮含量逐渐下降。在 0.01mg/L Cd 处理下,总氮含量与对照组无显著差异。在 0.05mg/L Cd 处理 7d 后,总氮含量与对照组存在显著差异。0.1mg/L Cd 处理 5d 后,总氮含量显著减少。0.5mg/L Cd 浓度处理 7d 后达到最低值,仅为对照组的 45.48%。

2.7 Cd 对满江红-鱼腥藻共生体谷氨酰胺合成酶活性 (GS) 的影响

如图 5 所示,与对照比较,0.01mg/L Cd 处理的谷氨酰胺合成酶活性在整个试验期间没有显著变化,但是它与高浓度处理之间存在显著的差异。在 0.05mg/L Cd 处理 7d 后,谷氨酰胺合成酶活性与对照组存在显著差异。在 0.1mg/L Cd 处理 5d 后,谷氨酰胺合成酶活性显著低于对照组。谷氨酰胺合成酶活性在 0.5mg/L Cd 浓度处理 1d 时与对照无显著差异,其余时间均显著低于对照,7d 后达到最低,仅为对照组的 42.53%。总的来说,谷氨酰胺合成酶活性随 Cd 处理浓度的增加和处理时间的推移而逐渐下降。

3 讨论

植物通过两条途径来获取所需要的氮:一条途径是植物体直接吸收无机态氮(如硝态氮、铵态氮)和有机态氮(如尿素)等;另一条途径是生物固氮,即固氮生物通过固氮酶在常温常压下将分子氮转化形成可被利用的氨,因此固氮酶活性的高低对固氮生物氮代谢的强弱及氮素含量的高低起关键性作用。在本试验条件下,高浓度的 Cd 处理(≥ 0.05 mg/L)降低了鱼腥藻异型胞频率和固氮酶活性(表 1)。Arora 等^[8]在研究细叶满江红、小叶满江红、羽叶满江红对 Cr 的净化作用时也发现,当 Cr 的处理浓度 ≥ 10 mg/L 时,它们体内的固氮酶活

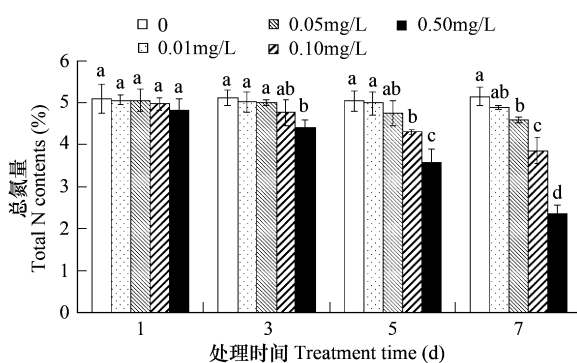


图 4 Cd 对满江红-鱼腥藻共生体总氮含量的影响

Fig. 4 Effect of Cd concentrations on the total nitrogen contents in *A. imbricata*-*A. azollae* symbiosis

性在 7d 后受到严重的抑制。Vandna 等^[19]的研究表明,40mmol/L NaCl 处理使羽叶满江红-鱼腥藻共生体固氮酶活性下降 39%,100mmol/L NaCl 处理使固氮酶的活性下降 70%。其机理是盐胁迫会诱导氧自由基的产生,引起过氧化伤害,破坏膜的结构,增加膜的通透性,使异型胞失去保护固氮酶活性的作用,从而导致固氮酶失活^[20]。此外,Balestrasse 等^[23]报道,高浓度的 Cd 处理能改变豆科植物根瘤的超微结构,减少根瘤内固氮细菌的数量,并造成过氧化伤害,从而使固氮酶活性下降,最终影响植物对氮素的固定和同化。尽管 Cd 是非氧化还原活性的重金属,但 Cd 胁迫能导致植物体内活性氧的累积^[21]。前期研究也证实,随 Cd 处理浓度的增加,满江红体内自由基大量积累,从而造成过氧化损伤^[22]。因此,Cd 胁迫引起过氧化伤害和鱼腥藻异型胞频率下降是抑制固氮酶活性的主要原因。

铵态氮是植物氮代谢中的一个重要的中心介质,在生物固氮、硝态氮的同化、氨基酸去氨基及光呼吸等过程中产生^[24,25]。本研究结果表明,与对照相比,0.1、0.5mg/L Cd 处理的满江红体内铵态氮含量在实验期间出现先下降后上升(图 1)。这可能由两方面原因造成,一是在处理前期,固氮酶活性的下降导致其合成产物铵态氮含量的下降;二是在处理后期,铵态氮含量的上升可能是谷氨酰胺合成酶(GS)的活性下降引起(图 5)。GS 是植物体内铵态氮同化的关键酶之一^[14,25],GS 活性的降低使满江红体内的铵态氮不能被同化,造成铵态氮的累积。Chien 等^[25]也认为,Cd 胁迫导致水稻离体叶片铵态氮的积累由 GS 酶活性降低引起,而 GS 酶活性的下降是 Cd 引起细胞膜脂质过氧化的结果。此外,高浓度的铵态氮对植物具有毒害作用,能引起植物的衰老,从而导致作物减产^[14,25]。因此,铵态氮的积累说明高浓度的 Cd 处理对满江红产生了毒害作用。

氨基酸既是铵态氮进一步同化的产物,也是蛋白质合成的前体^[15,24]。本研究发现,随着培养液中 Cd 浓度的增加和处理时间的推移,游离氨基酸含量随之增加(图 2),这与 Cd 处理大豆^[26]与番茄^[27]所得的结果一致。Cd 胁迫能抑制植物对水分的吸收和运输,引起植物体内水势降低,导致植物体内水分不平衡^[28]。渗透调节是植物适应逆境的主要生理调节机制,而游离氨基酸的积累能提高植物细胞的渗透压,使植物避免失水^[29]。因此,游离氨基酸含量的增加可能是满江红对 Cd 胁迫的一种生理适应。

可溶性蛋白含量随溶液中 Cd 浓度的增加和处理时间的推移而逐渐减少(图 3)。Cd 处理导致蛋白质含量下降有两方面的原因:一是 Cd 加强了原有蛋白质分解,如 Cd 胁迫中产生的自由基能通过活性氧反应直接引起蛋白质分解或通过增加蛋白水解酶活性间接引起蛋白质分解^[30];二是 Cd 抑制了新蛋白质合成^[29]。

满江红作为生物肥料的效率取决于其总氮含量,因为绝大多数通过生物固氮途径固定的氮素只有在满江红腐解后才能被水稻吸收和利用^[2]。Ventura^[31]也发现,不论种类,总氮含量高的满江红比总氮含量低的满江红可提供更多被水稻利用的氮。本研究发现,总氮含量随溶液中 Cd 浓度的增加和处理时间的推移而逐渐减少(图 4),进一步说明高浓度的 Cd 处理已对满江红-鱼腥藻共生体产生毒害作用,降低了该共生体对氮素的固定和累积。

总的来说,当 Cd 处理浓度为国家地表水环境质量标准 V 类水(0.01mg/L)时,共生体氮代谢活动不受影响,说明满江红-鱼腥藻共生体对 Cd 胁迫有较高的耐性。当 Cd 处理浓度达国家污水综合排放标准(0.1mg/L)时,满江红-鱼腥藻共生体氮代谢紊乱、失调,导致氮素含量下降,可能不利于满江红-鱼腥藻共生体对稻田的正常供氮。

References:

- [1] Ghisi R, Trentin A R, Masi A, Ferretti M. Carbon and nitrogen metabolism in barley plants exposed to UV-B radiation. *Physiologia Plantarum*,

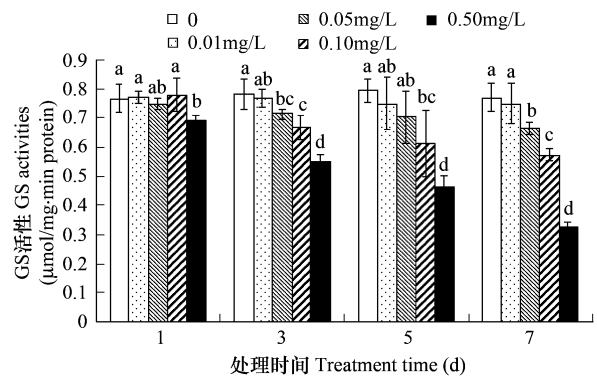


图 5 Cd 对满江红-鱼腥藻共生体谷氨酰胺合成酶活性的影响

Fig. 5 Effect of Cd concentrations on the glutamine synthetase activities in *A. imbricata*-*A. azollae* symbiosis

- 2002, 116 (2): 200—205.
- [2] Wagner G M. *Azolla*: a review of its biology and utilization. The Botanical Review, 1997, 63 (1): 1—26.
- [3] Marino D, Gonz lez E M, Arrese-Igor C. Drought effects on carbon and nitrogen metabolism of pea nodules can be mimicked by paraquat: evidence for the occurrence of two regulation pathways under oxidative stresses. Environmental and Experimental Botany, 2006, 57(3): 665—673.
- [4] Ji X H, Liang Y C, Lu Y H, Liao Y L, Nie J, Zheng S X, Li Z J. The effect of water management on the mechanism and rate of uptake and accumulation of cadmium by rice growing in polluted paddy soil. Acta Ecologica Sinica, 2007, 27 (9): 3930—3939.
- [5] Liu H J, Zhang J L, Christie P, Zhang F. Influence of iron plaque on uptake and accumulation of Cd by rice (*Oryza sativa* L.) seedlings grown in soil. Science of The Total Environment, 2008, 394(2-3): 361—368.
- [6] Rascio N, Dalla Vecchia F, La Rocca N, Barbato R, Pagliano C, Raviolo M, Gonnelli C, Gabbriellini R. Metal accumulation and damage in rice (cv. *Vialone nano*) seedlings exposed to cadmium. Environmental and Experimental Botany, 2008, 62 (3): 267—278.
- [7] Sela M, Telor E, Fritz E, Huttermann A. Localization and toxic effects of cadmium, copper, and uranium in *Azolla*. Plant Physiology, 1988, 88 (1): 30—36.
- [8] Arora A, Saxena S, Sharma D K. Tolerance and phytoaccumulation of Chromium by three *Azolla* species. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006, 22(2): 97—100.
- [9] Dai L P, Xiong Z T, Huang Yu, Li M J. Cadmium-Induced Changes in Pigments, Total Phenolics, and Phenylalanine Ammonia-lyase Activity in Fronds of *Azolla imbricata*. Environmental Toxicology, 2006, 21(5): 505—512.
- [10] Uheda E, Kitoh S, Shiomu N. Response of six *Azolla* species to transient high-temperature stress. Aquatic Botany, 1999, 64 (1): 87—92.
- [11] Mostafa E M, Hassan A M A. Effect of chilling on growth and nitrogen assimilation in *Azolla caroliniana*. Biologia Plantarum, 2006, 50 (4): 641—646.
- [12] Peters G A, Mayne B C. The *Azolla*, *Anabaena azollae* Relationship I. Initial Characterization of the Association. Plant Physiology, 1974, 53 (6): 813—819.
- [13] Peters G A, Mayne B C. The *Azolla*, *Anabaena azollae* Relationship II. Localization of Nitrogenase Activity as Assayed by Acetylene Reduction. Plant Physiology, 1974, 53(6): 820—824.
- [14] Chien H F, Kao C H. Accumulation of Ammonium in Rice Leaves in Response to Excess Cadmium. Plant Science, 2000, 156 (1): 111—115.
- [15] Xiong Z T, Liu C, Geng B. Phytotoxic effects of copper on nitrogen metabolism and plant growth in *Brassica pekinensis* Rupr. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2006, 64 (3): 273—280.
- [16] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248—254.
- [17] Bao S D. Soil Agricultural Chemistry Analysis. Beijing: China Agriculture Press, 2000. 264—267.
- [18] Zhang C F, Peng S B, Peng X X, Chave A Q, Bennett J. Response of Glutamine Synthetase Isoforms to Nitrogen Sources in Rice (*Oryza sativa* L.) Roots. Plant Science, 1997, 125 (2): 163—170.
- [19] Vandna R, Tiwari S P, Ashwani K R. Effect of NaCl on nitrogen fixation of unadapted and NaCl-adapted *Azolla pinnata* *Anabaena azollae*. Aquatic Botany, 2001, 71(2): 109—117.
- [20] Blumwald E, Mehlhorn R J, Packer L. Ionic osmoregulation during salt adaptation of the cyanobacterium *Synechococcus* 6311. Plant Physiology, 1983, 73 (2): 377—380.
- [21] Cho U, Seo N. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. Plant Science, 2005, 168 (1): 113—120.
- [22] Dai L P, Xiong Z T, Dong X J, Nan X Y. Antioxidant properties of anthocyanins in *Azolla imbricata* under cadmium stress. Acta Scientiae Circumstantiae, 2008, 28(10): 2089—2094.
- [23] Balestrasse K B, Gallego S M, Tomaro M L. Cadmium-induced senescence in nodules of soybean (*Glycine max* L.) Plants. Plant and Soil, 2004, 262(1-2): 373—381.
- [24] Mifflin B J, Lea P J. The Pathway of Nitrogen Assimilation in Plants. Phytochemistry, 1976, 15: 873—885.
- [25] Chien H F, Lin C C, Wang J W, Chen C T, Kao C H. Changes in ammonium ion content and glutamine synthetase activity in rice leaves caused by excess cadmium are a consequence of oxidative damage. Plant Growth Regulation, 2002, 36 (1): 41—47.
- [26] Gouia H, Suzuki A, Brulfert J, Ghorbal M H. Effects of cadmium on the co-ordination of nitrogen and carbon metabolism in bean seedlings. Journal of Plant Physiology, 2003, 160 (4): 367—376.

- [27] Chaffei C, Pageau K, Suzuki A, Gouia H, Ghorbel M H, Masclaux-Daubresse C. Cadmium Toxicity Induced Changes in Nitrogen Management in *Lycopersicon esculentum* Leading to a Metabolic Safeguard Through an Amino Acid Storage Strategy. *Plant and Cell Physiology*, 2004, 45(11): 1681 — 1693.
- [28] Poschenrieder C H, Gonsé B, Barceló J. Influence of Cadmium on water relations, stomatal resistance and abscisic acid content in expanding bean leaves. *Plant Physiology*, 1989, 90(4): 1365 — 1371.
- [29] Qin T C, Wu Y S, Wang H X, Li Q R. Effect of cadmium, lead and their interactions on the physiological and ecological characteristics of root system of *Brassica chinensis*. *Acta Ecologica Sinica*, 1998, 18(3): 320 — 325.
- [30] Sun G W, Chen R Y, Liu H C, Chen Y D. Advances on Investigation of Effect of Cadmium on Photosynthesis and Nitrogen Metabolism of Plant. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2005, 21(9): 234 — 236.
- [31] Ventura W, Watanabe I. Green manure production of *Azolla microphylla* and *Sesbania rostrata* and their long-term effects on rice yields and soil fertility. *Biology and Fertilization of Soils*, 1993, 15(4): 241 — 248.

参考文献:

- [4] 纪雄辉, 梁永超, 鲁艳红, 廖育林, 聂军, 郑圣先, 李兆军. 污染稻田水分管理对水稻吸收积累镉的影响及其作用机理. *生态学报*, 2007, 27(9): 3930 ~ 3939.
- [17] 鲍士旦. 土壤农化分析. 北京: 中国农业出版社, 2000. 264 ~ 267.
- [22] 戴灵鹏, 熊治廷, 董新姣, 南旭阳. 满江红花青素在镉胁迫下的抗氧化作用. *环境科学学报*, 2008, 28(10): 2089 ~ 2094.
- [29] 秦天才, 吴玉树, 王焕校, 李启任. 镉、铅及其相互作用对小白菜根系生理生态效应的研究. *生态学报*, 1998, 18(3): 320 ~ 325.
- [30] 孙光闻, 陈日远, 刘厚诚, 陈玉娣. 镉对植物光合作用及氮代谢影响研究进展. *中国农学通报*, 2005, 21(9): 234 ~ 236.