

双子叶植物根系 Fe^{3+} 还原酶活性的 2,2'-联吡啶比色测定法^①

许良政

张福锁 李春俭

(广东梅州农业学校,梅州 514011)

(中国农业大学植物营养系,北京 100094)

摘要 对影响2,2'-联吡啶比色法测定双子叶植物根细胞原生质膜上 Fe^{3+} 还原酶活性的有关因素进行了比较研究,确定了适宜的测试条件。结果表明,2,2'-联吡啶比色法测定的最大吸收波长为253.3nm,根系与反应液的适宜反应时间为2小时。反应过程中是否通气以及反应后放置时间均不影响最大吸收峰处的测定值。与黑暗相比,在光照下进行反应可明显提高还原酶活性。

关键词 2,2'-联吡啶比色法 双子叶植物 $\text{Fe}(\text{III})$ -还原酶活性

自从Chaney等^[1]证明植物必须先通过根系将生长介质中的 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} 才能够吸收,以及Marschner等人^[2]进一步确定缺铁条件下双子叶植物根表 Fe^{3+} 还原酶活性明显增加以来,植物根系对 Fe^{3+} 的还原能力已成为衡量植物从土壤或其它生长介质中获取铁的能力及研究植物,尤其是双子叶植物缺铁反应机理^[3~7]与筛选铁高效基因型植物^[8,9]的一个有效的生理生化指标,在研究植物铁营养领域的理论与实践方面具有重要作用。2,2'-联吡啶比色法是测定双子叶植物根表 Fe^{3+} 还原酶活性的常用方法,但目前国内外对这一方法的使用无统一标准,对影响测定结果的有关因素也缺乏系统研究。本文以黄瓜为材料对2,2'-联吡啶测定方法及有关影响因素进行了比较研究。

1 材料与方法

1.1 植物培养

选取饱满一致的黄瓜(*Cucumis sativus* L. cv. 新泰密刺)种子用3% H_2O_2 消毒30分钟,冲洗后在饱和 CaSO_4 溶液中浸泡16小时,再经冲洗后在湿润的滤纸上于20℃条件下暗处催芽。2天后移入石英砂中育苗。两片子叶完全展开后挑选生长均一的幼苗用蒸馏水冲洗并移栽于pH6.2的1/2全营培养液中,每盆6株,以电动气泵连续通气。营养液组成为(mol/L): K_2SO_4 7.5×10^{-4} ; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 2×10^{-3} ; MgSO_4 6.5×10^{-4} ; K_2HP_4 2.5×10^{-4} ; KCl 1×10^{-3} ; H_3BO_3 1×10^{-4} ; MnSO_4 1×10^{-4} ; CuSO_4 5×10^{-7} ; ZnSO_4 1×10^{-4} ; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 5×10^{-5} ; FeEDTA 1×10^{-4} 。移栽4天后换为全营养液培养。

待幼苗长至一叶一心时设无Fe和加Fe(对照,含有 1×10^{-4} mol/L FeEDTA)2个处理,每隔2天更换一次营养液。植物生长在光照培养室中(25℃/20℃,14小时光照,光强 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)。

1.2 Fe^{3+} 还原酶活性的测定

1.2.1 原理与方法 2,2'-联吡啶与 $\text{Fe}(\text{III})$ 的结合很弱,却是 $\text{Fe}(\text{II})$ 的强螯合剂。当把植物根系置于含有一定浓度 $\text{Fe}(\text{III})$ 和2,2'-联吡啶的反应液中时,溶液中的 $\text{Fe}(\text{III})$ 会被根系还原为 $\text{Fe}(\text{II})$ 并与2,2'-联吡啶形成 $\text{Fe}(\text{II})$ -联吡啶复合物,呈现红色。根表 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原酶的活性越强,反应液颜色越深。据此经比色可测定根表细胞原生质膜上 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原酶活性的大小。

①国家自然科学基金资助项目

收稿日期:1997-01-14

反应液的组成如下(mol/L): $\text{Fe(III)EDTA } 1 \times 10^{-4}$; $2,2'$ -联吡啶 4×10^{-4} ; $\text{K}_2\text{SO}_4 \ 7.5 \times 10^{-4}$; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \ 2 \times 10^{-3}$; $\text{MgSO}_4 \ 6.5 \times 10^{-4}$; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \ 2.5 \times 10^{-4}$; $\text{KCl } 1 \times 10^{-3}$; $\text{H}_3\text{BO}_3 \ 1 \times 10^{-4}$; $\text{MnSO}_4 \ 1 \times 10^{-6}$; $\text{CuSO}_4 \ 5 \times 10^{-7}$; $\text{ZnSO}_4 \ 1 \times 10^{-6}$; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \ 5 \times 10^{-8}$ 。

测定时,取一定体积的上述反应液放入洁净的50mL三角瓶中,为防止光对反应液的影响,三角瓶用黑塑料布或锡箔纸包严。将待测植株的根系放入饱和 CaSO_4 溶液中浸泡5分钟,用去离子水冲洗干净后将根系浸没在三角瓶的反应液中。一定时间后取出待测植株,吸干根表残液并称量鲜重。反应液用分光光度计在一定波长下比色,读取OD值,按下列公式计算还原力:

$$\text{还原力} (\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{t})) = \frac{\text{OD}}{\text{FW} \times 8650} \times 10^6$$

式中8650为 $\text{Fe(II)}-2,2'$ -联吡啶的摩尔吸光系数($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$);FW为根鲜重;还原力单位中的t为反应时间。

1.2.2 试验内容 最大吸收光谱的确定:用岛津UV-2201紫外可见分光光度计扫描反应液的吸收光谱。

比较不同反应时间、反应结束后不同放置时间、反应时光照及通气条件对还原酶活性测定值的影响:反应时间设1、2和4小时。在另一试验中反应2小时并放置0、3、6和16小时后进行比色测定,以比较反应后不同放置时间对测定值的影响。反应时分设光照和黑暗2处理,暗处理在暗箱中进行,暗箱中温度与光照下一致。在反应过程中设通气和不通气2个处理。光照、通气对还原酶活性的影响均在反应2小时后立即测定,4次重复。每个三角瓶中加入反应液40mL,每瓶放2株幼苗。

2 试验结果

2.1 最大吸收光谱

取反应2小时的反应液,用岛津UV-2201紫外可见分光光度计扫描,测得反应液的最大吸收波长为523.3nm(图1)。下面各项比色均在523.3nm波长处进行。

2.2 不同反应和显色时间对还原酶活性测定值的影响

不同反应时间对缺铁和供铁植株的反应液测定值有一定程度影响(图2)。在供铁条件下,反应1小时与2小时的测定结果相近,但反应4小时的测定结果分别是前者的3和3.6倍。缺铁条件下还原酶活性的测定值随反应时间延长而升高,但并不随反应时间的倍增而倍增。比较不同反应时间后缺铁与供铁植株根系的还原酶活性,反应2小时的差异最明显,缺铁植株的还原酶活性约是供铁植株的18倍,而反应1、4小时后分别为12倍和7倍。

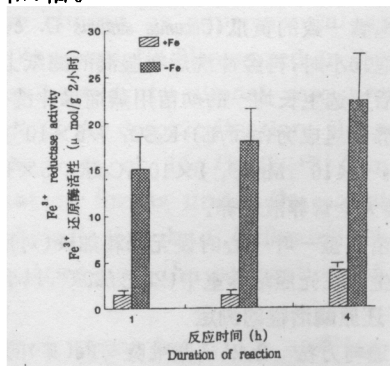
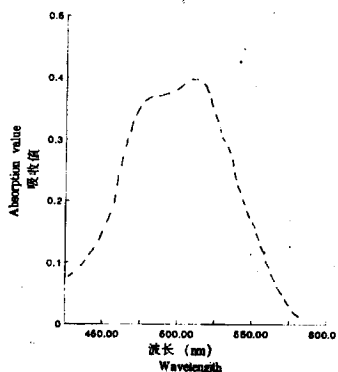


图1 $\text{Fe(II)}-2,2'$ -联吡啶溶液的吸收光谱

图2 不同反应时间对黄瓜根表 Fe^{3+} 还原酶活性测定值的影响

Fig.1 Absorption-spectrum of $\text{Fe(II)}-2,2'$ -bipyridyl solution

Fig.2 Effect of different duration for roots of cucumber plants in $2,2'$ -bipyridyl solution on measuring results for Fe^{3+} reductase activity

反应2小时后立即测定或将反应液分别放置3、6和16小时,然后分别对各反应液进行比色测定,发现反应后放置时间的长短对测定值没有影响。

2.3 光照和反应液通气状况对还原酶活性的影响

在光照和黑暗条件下缺铁和供铁植株分别在反应液中反应2小时,然后进行比色测定。结果表明,光下反应的测定值显著高于暗处反应的测定值,缺铁和供铁条件下分别高出23.1%与26.4%(图3)。

无论是缺铁还是供铁植株,在反应过程中是否通气对还原酶活性均无影响。

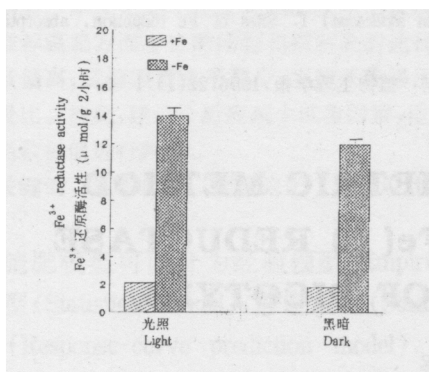


图3 反应期间光照或黑暗对黄瓜根表 Fe^{3+} 还原酶活性的影响

Fig.4 Effect of illumination during reaction on Fe^{3+} reductase activity in roots of cucumber plants

3 讨论

与早期测定根系 Fe^{3+} 还原酶活性的BPDS (bathophenanthroline-disulfonic acid)比色法^[10]相比,2,2'-联吡啶比色法也很专一、灵敏,而且更加经济。但由于不同反应时间会影响还原酶活性的测定值(图2),所以规范测定还原酶活性的反应时间很有必要。对于一些植物或品种(如大豆“哈83”^[11])来说,反应1小时后根系还原酶活性的测定值并不很高,但随反应时间的延长而继续增加,因而需适当延长反应时间。另一方面反应时间过长不仅延长了试验时间,而且会由于根系分泌物的作用使部分 $\text{Fe}(\text{III})$ 被还原,干扰最终的测定结果;也可能会因长时间蒸腾失水使反应液的体积减小而影响测定结果。考虑到这些因素,并根据反应2小时后缺铁和供铁植株还原酶活性差异最显著的结果(图2),反应时间定为2小时比较合适。

反应结束后将反应液放置0~16小时范围内对测定结果基本没有影响,证明反应液的颜色并不随反应后放置时间的延长而加深。所以为节省试验时间,在反应结束后可立即进行比色测定。

光照可显著影响根表 Fe^{3+} 还原酶活性的测定结果(图3),表明根系还原酶对光照较为敏感,可能与能量的供应有关。

在反应2小时的情况下通气对还原酶活性的测定值没有影响,可能是因为反应液中的自然含氧量已能满足根表细胞原生质膜 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原酶的需要。这一结果也为快速简便,特别是在野外测定还原酶活性提供了依据。

参考文献

- 1 Chaney RL, Brown JC and Tiffin LO. Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans. *Plant Physiol.*, 1972, 50:208~213.
- 2 Marschner H, Romheld V, Kissel M. Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *J. Plant Nutr.*, 1986, 9:695~713.
- 3 Moog PR and Bruggemann W. Iron reductase systems on the plant plasma membrane. *Plant and Soil*, 1994, 165:241~

- 260.
- 4 Olsen RA and Brown JC. Factors related to iron uptake by dicotyledonous and mono-cotyledonous plants I. pH and reductants. J. Plant Nutr., 1980, 2:629~660.
 - 5 Olsen RA, Bennett JH, Blume et al. Chemical aspects of the Fe-stress response mechanism in tomatoes. J. Plant Nutr., 1981, 3:905~921.
 - 6 Romheld V, Marschner H. Mechanism of iron uptake by peanut I. Fe(III) reduction, chelate splitting, and release of phenolics. Plant Physiol., 1983, 71:949~954.
 - 7 Rubinstein B, Stern AT, Stout RG. Redox activity of oat root cells. Plant Physiol., 1984, 76:386~391.
 - 8 张福锁, 刘书娟, 毛达如等. 苹果抗缺铁基因型差异的生理生化指标研究. 园艺学报, 1995, 22(1):1~6.
 - 9 Brown JC. Mechanism of iron uptake by plants. Plant Cell and Environ., 1978, 1:249~257.
 - 10 Brown JC and Ambler JE. Iron-stress response in tomato (*Lycopersicon esculentum*) I. Sites of Fe reduction, absorption and transport. Physiol. Plant, 1974, 31:221~224.
 - 11 刘书娟, 张福锁, 毛达如. 缺铁敏感度不同的大豆品种缺铁的适应机制. 植物生理学报, 1996, 22(1):1~5.

2,2'-BIPYRIDYL-COLORIMETRIC METHOD FOR MEASUREMENT OF Fe(III) REDUCTASE ACTIVITY IN ROOTS OF DICOTYLS

Xu Liangzheng

(Meizhou Agricultural College, Meizhou Guangdong 514011)

Zhang Fusuo Li Chunjian

(Dept. of Plant Nutrition, CAU, Beijing 100094)

Abstract The effects of several key factors on measuring Fe^{3+} reductase activity in roots of dicotyledonous plants using 2,2'-bipyridyl-colorimetric method were studied in nutrient solution culture under the controlled conditions. The results showed that the highest peak of absorption spectrum was 253.3nm, the appropriate reaction time of roots in reactive solution was 2 hours. In comparison with darkness the Fe^{3+} reductase activity was increased significantly under light during the reaction. But aeration during the reaction (2hr.) and either immediate or still stay of reactive solution for different times (0,3,6,16hr.) after the reaction until colorimetric analysis didn't influence the final measuring results.

Key words Dicotyls Fe^{3+} reductase activity 2,2'-bipyridyl colorimetric method