

## 缺铁条件下菜豆植株茎生长素(IAA) 与根系 $Fe^{3+}$ 还原酶活性的关系

陈正钢<sup>①</sup> 李春俭 张福锁 毛达如

(中国农业大学资源与环境学院)

**摘要** 研究了营养液培养条件下,对缺铁菜豆植株进行去顶、涂抹生长素极性运输抑制剂 CFM 或生长素类物质萘乙酸(NAA)等处理后,其根系还原酶活性的变化情况;同时对缺铁菜豆茎尖可扩散型 IAA 和茎尖内源生长素进行了测定。结果表明,缺铁菜豆根系  $Fe^{3+}$  还原酶活性在处理第 4 天有所增加,第 6、8 天显著提高。缺铁同时去顶或涂抹 CFM 处理可抑制缺铁菜豆根系  $Fe^{3+}$  还原酶活性,而涂抹 NAA 则可较明显地提高去顶后缺铁菜豆植株根系  $Fe^{3+}$  还原酶活性。在缺铁处理后不同天数对缺铁菜豆进行去顶处理,在第 7 天其根系  $Fe^{3+}$  还原酶活性表现为:在 0~2 日进行处理的植株其根系还原酶活性完全受到抑制;在 4~6 天处理的植株去顶的抑制作用逐渐减弱。从处理后第 1 天起,缺铁处理植株茎尖内源生长素含量就显著高于对照,在第 2 天略有降低,随后在第 4、6 天又迅速增加。缺铁处理植株茎尖可扩散型 IAA 含量也经过同样变化过程,只是变化幅度相对较大。因此,从时间进程上看,缺铁菜豆茎尖生长素合成、运输的变化情况及人为进行缺铁菜豆植株生长素运输的改变与其根系  $Fe^{3+}$  还原酶活性变化的关系,更加确定地反映出茎尖所合成的生长素可能在调控缺铁菜豆根系  $Fe^{3+}$  还原酶活性方面发挥作用。

**关键词** 菜豆; 缺铁;  $Fe^{3+}$  还原酶活性; 内源 IAA; 可扩散性 IAA

**分类号** Q945.12

## Relations between Auxin(IAA) in Shoot Apex and Root $Fe^{3+}$ Reductase Activity of Bean Plants under Iron Starvation

Chen Zhenggang Li Chunjian Zhang Fusuo Mao Daru

(College of Resource and Environmental Sciences, CAU)

**Abstract** With nutrient solution culture, the ferric reductase activity in root of iron-deficient bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants was investigated. The plants were treated either by decapitation, or smearing with CFM, an inhibitor of auxin polar transport, or with naphthalene acetic acid (NAA), an auxin-like substance. Furthermore, the diffusible IAA and endogenous auxin in shoot apex of iron-deficient bean plants were determined as well. The results showed that, on the 4th day after treatment, the root ferric reductase activity of iron-deficient bean plants without treatment increased slightly, and was enhanced significantly on the 6th and 8th day; and was inhibited by both decapitation and smearing with CFM. The promotion effect of smearing NAA against the suppress effect of decapitation was observed. On the 7th day after iron-deficiency, the root ferric reductase activity of decapitated bean plants on different days after iron-deficient treatment was inhibited completely by decapita-

收稿日期: 1998-03-30

<sup>①</sup>陈正钢,北京朝阳区惠新里高原街 4 号北京市农业技术推广站,100101

tion on the days 0~2, and less inhibition effects were demonstrated gradually by the decapitation on the days 4~6. Since the first day of the iron-deficient treatment, the amount of endogenous IAA in the shoot apex was significantly higher than that of the control plants, decreased slightly on the 2nd day, and increased rapidly again on the 4th and 6th day. And the amount of diffusible IAA in shoot apex of iron-deficient plants was varied in the same pattern. Based on these observations, it is suggested that auxin synthesized in shoot apex play a role in the regulation of the ferric reductase activity in iron-deficient bean plant the roots.

**Key words** bean (*Phaseolus vulgaris* L.); iron deficiency;  $\text{Fe}^{3+}$  reductase activity; endogenous IAA; diffusible IAA

铁是植物正常生理代谢所必需的微量营养元素之一,在缺铁胁迫条件下,许多种高等植物都能产生一系列生理和形态方面的适应性反应。比如双子叶植物,根系会发生根尖膨大、根毛增多及形成根表转移细胞等形态上的变化及根系质子分泌、酚类物质释放和根系  $\text{Fe}^{3+}$  还原酶活性的增加等生理反应,以增加对铁的还原吸收能力<sup>[2]</sup>。人们掌握了缺铁条件下植物表现出的以上特异适应性反应,并开始研究有关植物缺铁条件下适应性反应的调控。但由于不同研究者使用研究材料的不同,目前有关这方面的研究形成了不同的观点,同时也缺乏系统性,主要集中在缺铁适应性反应的调节部位和调节物质 2 方面。

较早期的研究者<sup>[3~5]</sup>利用不同的材料研究均认为,根系本身可以直接调节其对缺铁胁迫的适应性反应,不需地上部的参与。近来大多数观点则趋于支持地上部对缺铁胁迫适应性反应的调控<sup>[6~10]</sup>,均用不同的材料证明地上部对此过程进行调控。调控物质的性质决定调控所在的部位。Bienfait 等<sup>[11,12]</sup>认为根系  $\text{Fe}^{3+}$  还原酶在转录水平受根中 *fer* 基因的调控,FER 蛋白活性的调节依赖于胞外铁供应水平。Romera 等<sup>[13,14]</sup>虽然没有明确指出缺铁适应性反应的调控部位,但他们所做的一系列实验,均是在营养液中加入影响乙烯合成和作用物质,从而说明乙烯具有调控植物缺铁胁迫的作用。Maas 等<sup>[7]</sup>通过分析比较缺铁和正常供铁菜豆、蓖麻韧皮部汁液中铁的浓度,推测虽然缺铁发生在生长介质中,但感受部位却是地上部,植物通过改变韧皮部中铁的浓度来调节根系的适应反应。除此之外,支持地上部调控的大多数研究者均认为,地上部所合成的生长素在调控根系缺铁胁迫反中发挥作用。Landsberg<sup>[15]</sup>通过对缺铁向日葵进行去除茎尖及黄化幼叶的实验,Zhang<sup>[10]</sup>则通过对缺铁菜豆分别进行去顶和茎部涂抹生长素极性运输抑制剂 BHN 的实验,发现以上处理均有效地抑制了缺铁根系铁还原酶活性,从而证明了这一观点。

本研究以菜豆为材料进一步揭示缺铁植株内源生长素与根系  $\text{Fe}^{3+}$  还原酶活性的关系。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试植物培养

本试验选用菜豆 (*Phaseolus vulgaris* L. 美国供给者),种子先用 5%  $\text{H}_2\text{O}_2$  表面消毒 30 min,洗净后用饱和  $\text{CaSO}_4$  浸种 5 h,使种子充分吸胀。再于 28℃ 恒温箱中催芽,然后将长出胚根的种子播种于洗净后并用饱和  $\text{CaSO}_4$  湿润的石英砂中,覆以黑色塑料薄膜,置于 25℃ 下生长。待子叶长出石英砂后,揭去薄膜,菜豆继续长至下胚轴已伸直但真叶尚未展开时,将幼苗

从石英砂中取出,且将根洗净移入 pH6.2 的 1/2 营养液中,1 d 后换为全营养液。营养液组成如下 ( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $\text{K}_2\text{SO}_4$   $7.5\times 10^{-4}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $2.5\times 10^{-4}$ ,  $\text{KCl}$   $1.0\times 10^{-3}$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 5\text{H}_2\text{O}$   $2.0\times 10^{-3}$ ,  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $6.5\times 10^{-4}$ ,  $\text{Fe}(\text{II})\text{-EDTA}$   $1.0\times 10^{-4}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$   $1.0\times 10^{-5}$ ,  $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$   $1.0\times 10^{-6}$ ,  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$   $5.0\times 10^{-7}$ ,  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $1.0\times 10^{-6}$ ,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$   $5.0\times 10^{-8}$ 。

植株移植于 2 L 黑色塑料盆中,每盆 6 株,生长在人工培养室里,室内昼/夜温度为 25/18℃,光强为  $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,光照时间 14h/d,营养液用电动气泵连续通气,每 3 d 更换 1 次营养液。

## 1.2 实验设计

菜豆幼苗在完全营养液中生长约 1 周,此时第 1 片三出叶已完全展开,分别进行以下处理:

实验 1 ①+Fe(供铁  $\text{Fe-EDTA}$   $1.0\times 10^{-4}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ );②-Fe(缺铁);③缺铁去顶(切去茎尖,并及时去掉侧芽);④缺铁、初生叶以下的茎上环状涂抹含有 Chlorfurenolmeter(CFM)的羊毛脂(5.5g 羊毛脂含 CFM 10 mg);⑤缺铁去顶后,在切口处涂以含 NAA 的羊毛脂(5.5g 羊毛脂含 NAA 37 mg)。

实验 2 ①+Fe;②-Fe;③缺铁同时去顶;④缺铁后第 2 天去顶;⑤缺铁后第 4 天去顶;⑥缺铁后第 6 天去顶。

## 1.3 根系 $\text{Fe}^{3+}$ 还原酶活性的测定

用改进的 Bienfait 等人<sup>[15]</sup>的方法进行测定时,先将植株根系在饱和  $\text{CaSO}_4$  溶液中浸泡 5 min 后,用去离子水冲洗 3 次,将每 1 处理的 2 株植物根系置于 50 mL 含有  $0.1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Fe}(\text{III})\text{-EDTA}$  和  $0.4\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  2,2-联吡啶的缺铁营养液中,每个处理重复 3 次。在光照下连续通气,反应 2 h。2,2-联吡啶与  $\text{Fe}(\text{III})$  作用较弱,却是  $\text{Fe}(\text{II})$  的强螯合剂,2,2-联吡啶与  $\text{Fe}(\text{II})$  螯合形成的  $\text{Fe}(\text{II})\text{-联吡啶}$  复合物呈现红色,根据此原理便可测定根系细胞原生质膜对  $\text{Fe}(\text{III})$  的还原为,反应结束后将反应液在 520 nm 处比色(空白为未加植株的混合液,  $\text{Fe}(\text{II})\text{-联吡啶}$  的摩尔吸光系数为  $8\ 650\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ )。

## 1.4 可扩散型 IAA 的收集、分离及纯化<sup>[16]</sup>

收集:将每个留有 1 cm 茎的茎尖分别插入 2.5 ml 浓度为  $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的磷酸缓冲液中(pH6.2),在温度 25℃、相对湿度 100% 的黑暗条件下收集 8 h(14:00~22:00),然后将同一处理的 3 个茎尖所收集的溶液合并作为一个处理的 1 次重复,每处理含 3 次重复,置于 -20℃ 的冰箱中保存。

分离纯化:将小瓶中的收集液在室温下融化后调 pH 至 3.0,收集液加入活化后的 C18 柱(以 8 mL 含乙酸  $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 100% 甲醇及 8 mL 浓度为  $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的乙酸进行活化),然后依次用 4 mL 浓度为  $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  乙酸,4 mL 含  $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  乙酸的 20% 的甲酸及 40% 甲醇洗脱,收集 40% 的甲醇洗脱液即为纯化的扩散型 IAA 提取液。

## 1.5 内源生长素取样和样品处理

取各处理的茎尖及根尖 1 g 左右,每处理含 3 次重复,液氮冷冻后即放入 -20℃ 的冰箱中保存。处理样品时,用分析天平准确称取待测样品,加入 5 mL 80% 甲醇(内含  $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  BHT,二叔丁基对甲苯酚)在冰浴下研磨匀浆,于 4℃ 下过液浸提,之后在 4℃ 下 20 000 g 离心 15 min,取上清液,并过 C18 柱进一步纯化,然后用真空离心机将样品蒸干,再用 pH7.5 的样品稀释液定容。

可扩散型 IAA 及内源 IAA 均用 ELISA 法进行测定<sup>[17]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 去顶、涂 CFM 或 NAA 对缺铁菜豆根系 $Fe^{3+}$ 还原酶活性的影响

图 1 表明,缺铁处理第 4 天菜豆植株根系  $Fe^{3+}$  还原酶活性有所提高,到第 6 天已基本达到最高值,而缺铁同时进行去顶处理植株根系  $Fe^{3+}$  还原酶活性却很低,与根系正常供铁植株相当。根系缺铁但未去顶,而是在初生叶以下的茎部环状涂抹生长素极性运输抑制剂 CFM(2-chloro-9-hydroxy fluorene carboxylic acid-(9)-methylester)的处理,其根系还原酶活也受到很大程度的抑制;在根系缺铁的同时切去其茎尖(去顶)后即在切口处涂以 NAA,其植株根系还原酶活性较除缺铁处理以外的前几种处理有明显的提高。

在根系缺铁的同时,或之后的第 2,4,6 天进行去顶处理,第 7 天分别测定各处理根系还原酶活性。由图 2 可见,缺铁同时去顶及第 2 天去顶,其植株根系的  $Fe^{3+}$  还原酶活性与对照(+Fe)一样,但在第 4 天进行去顶的植株根系  $Fe^{3+}$  还原酶活性显著提高;第 6 天去顶的植株其还原酶活性与缺铁植株接近。

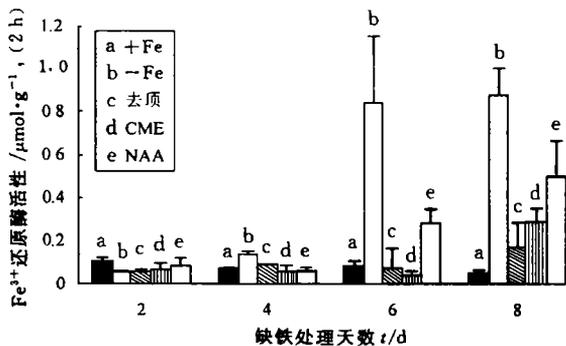


图 1 去顶、涂 CFM 及 NAA 处理对缺铁菜豆根系  $Fe^{3+}$  还原酶活性的影响

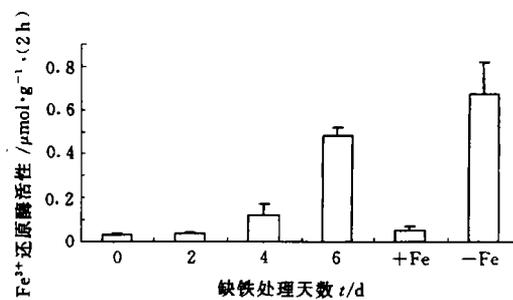


图 2 缺铁菜豆不同时间去顶对根系  $Fe^{3+}$  还原酶活性的影响

### 2.2 缺铁处理对菜豆植株茎尖内源 IAA 及可扩散型 IAA 含量的影响

图 3 为缺铁处理后,茎尖内源 IAA 含量的变化情况。可见缺铁处理植株茎尖部 IAA 的含量始终高于对照植株,第 1 天就有较大量的 IAA 合成,到第 2 天稍降低,以后合成量逐渐显著增加。

缺铁处理植株茎尖向下极性运输的 IAA(可扩散型 IAA)主要在第 2 天以前有较大的运输量,以后的几天中,运输量与根系正常供铁植株相当或有降低(图 4)。

## 3 讨论

缺铁处理的同时切去菜豆植株的茎尖,其根系  $Fe^{3+}$  还原酶活性的增加受到明显抑制(图 1),说明植株茎尖具有调节缺铁适应性反应的作用。这就支持了 Langsberg<sup>[6]</sup>和 Mass 等<sup>[7]</sup>的

观点。同时也说明可能是茎尖中的物质参与了调节。但图2的结果表明,菜豆植株缺铁后并非只有茎尖存在时根系才能发生  $\text{Fe}^{3+}$  还原酶活性的提高。在缺铁第4天以后进行去顶处理,根系  $\text{Fe}^{3+}$  还原酶活性有所提高即是反映茎尖中的调节物质已开始发挥作用,这就说明只有在一定时间内(至少2d以上)根系获得足够强的信号后才能启动其调节反应。

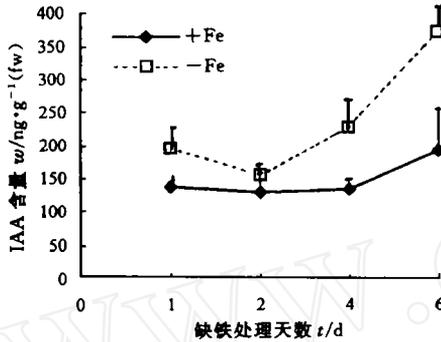


图3 缺铁处理对菜豆茎尖内源 IAA 含量的影响

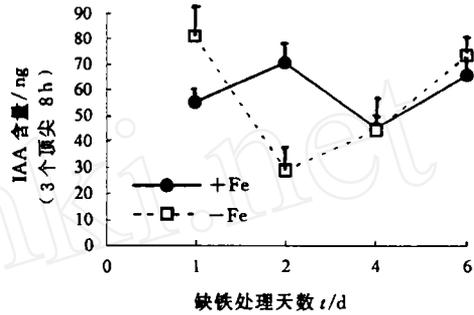


图4 缺铁处理对菜豆茎尖可扩散型 IAA 含量的影响

植物的茎尖和幼叶是 IAA 的主要合成部位<sup>[18]</sup>, IAA 合成后向下极性运输至作用部位并调节某些生长发育和代谢活动<sup>[19]</sup>。CFM 是一种有效的 IAA 极性运输抑制剂, 用它环状涂抹植株茎基部, 能较有效地抑制 IAA 由茎尖向下运输至根系<sup>[20]</sup>。同样方法处理缺铁植株, 缺铁适应性反应即被抑制(图1), 其最直接的原因就是由茎尖合成的 IAA 无法向下运输到根系。NAA(naphthalene acetic acid)是 IAA 的作用类似物。植株根系缺铁同时再将其茎尖切掉, 在切口处涂 NAA, 它有部分代替内源 IAA 的作用, 实验结果说明了这一点。以上均间接地证明了来自地上部茎尖的 IAA 是调节缺铁植物根系还原酶性的信号物质, 与 Langsberg<sup>[6]</sup>的结论相同。

对缺铁菜豆茎尖的内源 IAA 及可扩散型 IAA 测结果表明, 与对照相比, 处理第1天后缺铁处理的茎尖就已开始合成了大量的 IAA。同时, 由茎尖向下极性运输 IAA 的量也已开始显著增加。这说明, 尽管菜豆对缺铁的适应性反应在缺铁处理后的第5, 6天才能明显表现出来<sup>[21]</sup>, 但茎尖早在24 h 以内对此就作出了反应。无论茎尖的 IAA 合成量还是向下运输的量到第2天都有降低, 此后随着茎尖合成 IAA 量的逐渐增加, 由茎尖向下极性运输的量也快速增加, 目前尚无法弄清, 在第2天出现 IAA 合成及运输的波动是否对菜豆植株的缺铁适应性反应具有意义, 但根据不同时间对缺铁菜豆进行去顶实验的结果, 缺铁后约2天的这段时间是菜豆植株能正常在根系产生缺铁适应性反应较关键的时期。

### 参 考 文 献

- 1 Marschner H. Mineral nutrition of higher plants. London: Academic Press, 1995
- 2 Brown J C, Chaney R L, Ambler J E. A new tomato mutant inefficient in the transport of iron. *Physiol Plant*, 1971, 25: 18~53

- 3 Brown J C, Jolley V D. Strategy I and II mechanisms affecting iron availability to plants may be established too narrow or limited. *J Plant Nutr*, 1988,11(6~11):1077~1098
- 4 Romera F J, Alcantara E, Guardia M D, et al. Role of roots and shoots in the regulation of the Fe efficiency responses in sunflower and cucumber. *Physiologia Plantarum*, 1992,85:141~146
- 5 Landsberg E C. Regulation of iron-stress-response by whole-plant capacity. *J Plant Nutr*, 1984,7:609~621
- 6 Mass F M, van De Wetering D A M, van Beusichem M L. Characterization of phloem iron and its possible role in the regulation of Fe-efficiency reactions. *Plant Physiol*, 1988,87:167~171
- 7 Romheld V, Marschner H. Mobilization of iron in the rhizosphere of different plant species. *Adv Plant Nutr*, 1986,(2):155~204
- 8 Grusak M A, Pezeshgi S. Shoot-to-root signal transmission regulates root Fe(III) reductase activity in the dgl mutant of pea. *Plant Physiol*, 1996,110:329~334
- 9 Zhang Chengdong. Uptake, transport and remobilization of iron in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. Ph.D. Dissertation Inst. f. Pflanzenernährung, Univ. Hohenheim, D-70593 Stuttgart,1995
- 10 Bienfait H F, Weger L A De, Kramer D. Control of the development of iron-efficiency reactions in potato as a response to iron deficiency is located in the roots. *Plant Physiol*, 1987,83:244~247
- 11 Bienfait H F. Mechanisms in Fe-efficiency reactions of higher plants. *J Plant Nutr*, 1988,11:605~629
- 12 Romera F J, Alcántara E. Iron-deficiency stress responses in cucumber (*Cucumis sativus* L.) roots——A possible role for ethylene? *Plant Physiol*, 1994,105:1133~1138
- 13 Romera F J, Welch R M, Norvell W A. Iron requirement for and effects of promoters and inhibitors of ethylene action on stimulation of Fe(III)-chelate reductase in roots of strategy I species. *BioMetals*, 1996,9:45~50
- 14 Landsberg E C. Shoot-root interaction in the regulation of Fe-deficiency stress induced H<sup>+</sup> efflux from sunflower roots. *Plant nutrition colloq. A*. Scaife ed. Commonwealth Agricultural Bureaux, 1982,310~315
- 15 Bienfait H F, van den Briel W, Mesland-Mul N T. Free space iron pools in roots. *Plant Physiol*, 1985,78:596~600
- 16 李春俭. 可扩散型吲哚乙酸的测定. *植物生理学报*,1996,32(2):132~134
- 17 何钟佩. 农作物化学控制实验指导. 北京农业大学出版社,1993.
- 18 Phillips I D J. Apical dominance. *Ann Rev Plant Physiol*, 1975,26:341~367
- 19 Went F W. Growth, auxin and tropism in decapitated *Avena coleoptiles*. *Plant Physiol*, 1942,17:236~249
- 20 李春俭. 生长素极性运输抑制剂. *北京农业大学学报*,1995,21(增刊):89~93
- 21 Schmidt W. Iron stress-induced redox reactions bean roots. *Physiol Plant*, 1993,89:448~452