

一种定量测定水稻根系氧化力的新方法^①

傅友强, 吴道铭, 申守营, 李 玥, 沈 宏*

(华南农业大学资源环境学院, 广州 510642)

摘 要: 根系氧化力大小与根表铁膜数量密切相关, 铁膜以 Fe^{3+} 形态为主。本文根据水稻根表铁膜数量, 探讨了一种测定水稻根系氧化力的新方法。首先, 在水稻根系所在溶液中加入定量硫酸亚铁(Fe^{2+}), 处理 1 天后, 水稻根系将一部分 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+} , 剩余 Fe^{2+} 用 H_2O_2 滴定, 得滴定值 A。然后, 用 H_2O_2 滴定没有种植水稻的硫酸亚铁溶液, 得滴定值 B。根据不种植与种植水稻 H_2O_2 的消耗量, 滴定值之差(B-A), 即为水稻根系氧化力。该方法要求 Fe^{2+} 浓度大于 0.8 mmol/L, 过氧化氢消耗量与 Fe^{2+} 浓度成正比($R^2 = 0.999\ 2$)。测定过程中, 应先加显色剂邻菲罗啉, 然后加入磷酸。该方法在不损伤水稻根系情况下可定量测定水稻根系氧化力。

关键词: 根系氧化力; 铁膜; H_2O_2 ; Fe^{2+} ; 水稻

中图分类号: X173

根表铁膜是植物适应水生环境的重要机制。其主要成分是铁氧化胶膜, 属于两性胶体。铁膜能够通过吸附和共沉淀等作用影响根际某些毒害元素的化学行为和生物有效性, 从而减少根系对这些元素的吸收, 减少其在植物体内累积^[1-2]。有研究表明, 植物根系氧化作用和根际 Fe^{2+} 浓度是根表铁膜形成的两个重要条件^[3-4]。在根表铁膜形成过程中可能发生以下反应: $4\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 + 10\text{H}_2\text{O} = 4\text{Fe}(\text{OH})_3 + 8\text{H}^+$ ^[5]。其中的 O_2 主要由根系提供, 其量多少与根系氧化力有关。因此, 根表铁膜形成过程中会氧化 Fe^{2+} , 被氧化 Fe^{2+} 的量与该过程中根系氧化力呈正相关。根系氧化力包括根系氧化酶、根系分泌的氧化性物质、氧气和根际氧化性微生物等^[6-9]。张西科等人^[10]的结果表明, 根系氧化力强的水稻根系, 其根表铁膜较多。然而, 如何利用根表形成铁膜定量分析根系氧化力未曾有过报道。

目前大多数研究工作者采用 α -萘胺氧化法测定根系氧化力。但是该方法不能原位测定根系氧化力, 主要原因有 3 点: ①根际土壤中并不存在 α -萘胺这种物质; ② α -萘胺氧化法操作复杂, 费时, 氧化反应速度很慢, 经常需要在实验室内振荡 3~6 h, 无法表示实际根系氧化力; ③根系的非代谢吸收、吸附物质对 α -萘胺的氧化, 以及由于其自身氧化引起的误差很难消除。樊明究^[11]提出二价铁氧化力测定法测定根系氧化力, 其原

理是水稻根系分泌的氧能使 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+} , 使溶液 Eh 值提高, 测定溶液 Eh 值变化大小可以粗略判断根系氧化力的强弱。但这种方法只考虑了溶液中氧化还原电位的变化, 而实际上, 水稻根系分泌的氧化性物质能将 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+} 在根表形成红棕色的铁膜, 同时, 水稻对铁的吸收也会影响 Eh 值的变化。

水稻在一定量 Fe^{2+} 的溶液中生长后形成铁膜。理论上, 有一部分 Fe^{2+} 已被氧化, 而另一部分仍以 Fe^{2+} 形式存在于溶液中。未被氧化的 Fe^{2+} 可以用 H_2O_2 滴定测定。没有水稻生长的溶液 H_2O_2 滴定用量与生长水稻形成铁膜后 H_2O_2 滴定用量的差值, 可定义为水稻根系氧化力。因此, 本文提出一种利用根表形成铁膜原位测定根系氧化力的新方法。该方法不仅能测定水培条件下、可控条件的水稻根系氧化力, 而且可根据上述测定原理推而广之, 测定稻田的广泛条件下水稻根系氧化力。本文介绍了根表铁膜形成过程氧化力定量测定方法及测定的影响因素, 为水稻等水生植物根系氧化力的定量测定提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为天优 998 水稻品种, 种子经 10% H_2O_2 消毒 10 min, 用水洗净后于 30℃ 的培养箱中催芽。

基金项目: 国家自然科学基金项目(30771294, 31071847), 高校博士点基金项目(20104404110016)和广东省高层次人才项目(2010-412)资助。

* 通讯作者(hshen@scau.edu.cn)

作者简介: 傅友强(1984—), 男, 湖南新化人, 博士研究生, 主要从事水稻根际营养与环境胁迫研究。E-mail: fyq040430@163.com

将出芽后的种子稍浸入含有 1/4 水稻营养液的纱网中培养。于 3 叶期时移栽于 10 L 完全营养液的塑料箱中培养 21 天, 营养液每 3 天更换一次, pH 为 5.5。

完全营养液配方是在 Yoshida 等^[12]的基础上稍做修改。即: NH_4NO_3 0.429 mmol/L、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 mmol/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.667 mmol/L、 KH_2PO_4 1 mmol/L、 K_2SO_4 0.513 mmol/L; $\text{Fe}(\text{III})$ -EDTA 50 $\mu\text{mol/L}$ 、 MnSO_4 9.1 $\mu\text{mol/L}$ 、 ZnSO_4 0.15 $\mu\text{mol/L}$ 、 CuSO_4 0.16 $\mu\text{mol/L}$ 、 $(\text{NH}_4)_4\text{MoO}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.52 $\mu\text{mol/L}$ 、 H_3BO_3 19 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.2 方法

1.2.1 H_2O_2 滴定 Fe^{2+} 过程中的影响因素 (1) 为探讨不同 Fe^{2+} 浓度对测定的影响, 设计 6 个 Fe^{2+} 浓度处理, 在 0.5 mmol/L CaSO_4 溶液中进行, Fe^{2+} 浓度分别为 0.1、0.3、0.5、0.8、1.2、1.6 mmol/L, 分别加入 2 滴邻菲罗啉显色剂, 1 ml 磷酸掩蔽剂, 然后用 0.1 mmol/L H_2O_2 滴定, 滴定终点标志: 粉红色变为无色。

(2) 为探讨不同营养元素对测定的影响, 设计了以下处理。在 0.5 mmol/L CaSO_4 溶液中, 且 Fe^{2+} 浓度为 1.6 mmol/L 时, 分别添加 N、P、K、Ca、Mg、Cl、Zn、Mn、Cu、B、Mo 元素及微量元素混合液等 12 个处理。加入 2 滴邻菲罗啉显色剂, 1 ml 磷酸掩蔽剂, 然后用 0.1 mmol/L H_2O_2 滴定, 滴定终点标志: 粉红色变为无色。

(3) 为探讨磷酸对测定的影响, 设计以下 2 个处理, 在 0.5 mmol/L CaSO_4 溶液中, 且 Fe^{2+} 浓度为 1.6 mmol/L 时, 加入 2 滴邻菲罗啉显色剂, 处理 1: 加 1 ml 磷酸掩蔽剂; 处理 2: 不加磷酸。然后分别用 0.1 mmol/L H_2O_2 滴定, 滴定终点标志: 粉红色变为无色。

(4) 为探讨磷酸和邻菲罗啉加入顺序对测定的影响, 设计以下 2 个处理, 在 0.5 mmol/L CaSO_4 溶液中, 且 Fe^{2+} 浓度为 1.6 mmol/L 时, 处理 1: 先加 2 滴邻菲罗啉后加 1 ml 磷酸; 处理 2: 先加 1 ml 磷酸后加 2 滴邻菲罗啉, 然后分别用 0.1 mmol/L H_2O_2 滴定, 滴定终点标志: 粉红色变为无色。

(5) 为探讨 Fe^{2+} 浓度和 H_2O_2 滴定量的相关性, 设计 7 个 Fe^{2+} 浓度处理, 在 0.5 mmol/L CaSO_4 溶液中进行, 从 10 mmol/L 的 Fe^{2+} 溶液中分别吸 0、1、2、5、8、10、20 ml 于三角瓶中, 加入 2 滴邻菲罗啉显色剂, 1 ml 磷酸掩蔽剂, 然后用 10 mmol/L H_2O_2 滴定, 滴定终点标志: 粉红色变为无色。

1.2.2 水稻根系氧化力的测定 选取长势一致的水稻幼苗分成二部分: 一部分正常营养液处理, 另一部分缺磷营养液处理。分别处理 2 天后, 将水稻

幼苗转移到含有 1.6 mmol/L FeSO_4 的营养液中, 处理时间为 1 天。为了排除空气中氧气对 FeSO_4 的影响, 采用没有水稻生长的包含有 1.6 mmol/L FeSO_4 的营养液做为空白对照。当 FeSO_4 处理 1 天后, 分别从营养杯中吸取 25 ml 待测液放入三角瓶中, 加入 2 滴邻菲罗啉显色剂, 后面加入 1 ml 磷酸掩蔽剂, 最后用 0.1 mmol/L H_2O_2 滴定, 滴定终点标志: 粉红色变为无色。空白对照 H_2O_2 的滴定用量与处理样品 H_2O_2 的滴定用量的差值为根系氧化力, 用 (H_2O_2 $\mu\text{mol/g FW}$) 表示。

DCB-Fe 表征根表铁膜浓度, 在一定程度上能反映根系氧化力(即 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+}), 本研究测定 DCB-Fe 浓度的目的是为了进一步验证建立的新方法的可靠性。水稻根表 DCB-Fe 采用 DCB 法提取^[13], 即处理 24 h 后的水稻根系用去离子水冲洗干净, 放入 150 ml 三角瓶中, 加入 0.3 mol/L $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 40 ml、1 mol/L NaHCO_3 5 ml 及 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 3 g, 在 25℃ 280 r/min 的摇床上振动 3 h, 溶液转移至 100 ml 容量瓶中定容。DCB 浸提液中的铁用原子吸收分光光度计(型号: Z-5300)测定。水稻根表 DCB-Fe 数量(厚度)采用 g/kg(根干重)表示。

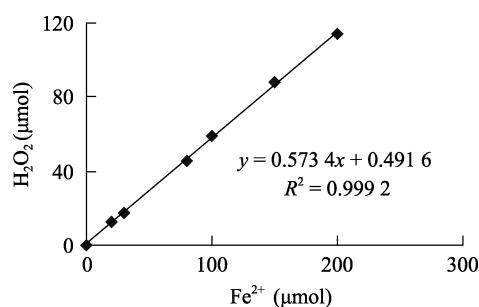
1.2.3 数据处理 采用 Excel2003 和 SPSS12.0 软件进行数据处理和统计分析。

2 结果与讨论

2.1 H_2O_2 滴定 Fe^{2+} 过程中的影响因素

2.1.1 Fe^{2+} 浓度的影响 实验发现只有当待测溶液中 Fe^{2+} 浓度大于或等于 0.8 mmol/L 时, H_2O_2 滴定才能达到滴定终点(待测液由粉红色变为无色); Fe^{2+} 浓度小于或等于 0.5 mmol/L, 无论消耗多少 H_2O_2 , 都不能达到滴定终点。低浓度的 Fe^{2+} 会发生 Fenton 反应, 对 H_2O_2 起催化作用, 而无 Fe^{2+} 的氧化, 显示粉红的 Fe^{2+} -邻菲罗啉络合物颜色。较高 Fe^{2+} 浓度时, H_2O_2 发生无效分解, 将 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} ^[14-15], 显示终点颜色。因此, 用 H_2O_2 滴定 Fe^{2+} 时, Fe^{2+} 浓度应大于或等于 0.8 mmol/L。图 1 显示了 H_2O_2 的滴定量与 Fe^{2+} 浓度的相关关系, 可见在 Fe^{2+} 浓度为 0.8 ~ 10 mmol/L 时, 二者呈明显的线性相关, 其相关系数 $R^2 = 0.9992$ 。

2.1.2 不同元素的影响 实验发现待测液中加入 Cl、Mo 及有 Mo 的微量元素混合液均出现粉红色, 继续滴定 H_2O_2 , 颜色不褪色, 无法达到滴定终点; 而其他处理滴定 H_2O_2 能够达到滴定终点。可见, Cl、Mo 对 H_2O_2 滴定起干扰作用。有研究表明, Cl^- 能与 Fe^{2+} 形成 FeCl^+ 、 FeCl_2^+ 等, 减少 H_2O_2 对 Fe^{2+} 的氧

图 1 Fe^{2+} 和 H_2O_2 的线性关系Fig. 1 Linear relationship between H_2O_2 and Fe^{2+} content

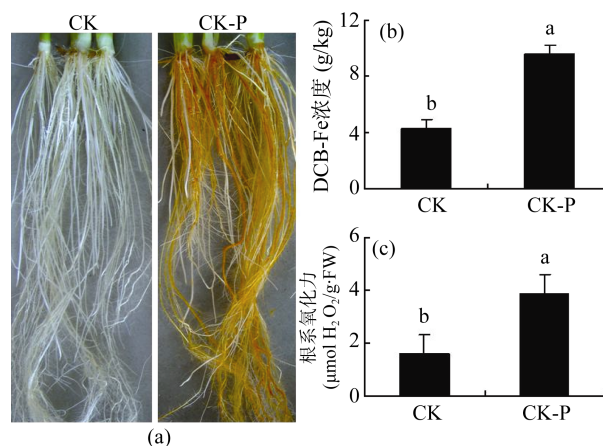
化, 从而对 H_2O_2 滴定起干扰作用^[16]。而钼酸铵在酸性条件下与 H_2O_2 形成稳定的过氧钼酸化合物而无 Fe^{2+} 的氧化^[17]。侯风亮等^[18-19]研究表明, 在溶液中加入 H_2SO_4 和柠檬酸能有效地掩蔽 Cl 和 Mo 。

2.1.3 磷酸的影响 实验发现不加磷酸, 滴定终点为黄色。因为用 H_2O_2 滴定时, Fe^{2+} 被氧化为 Fe^{3+} , 没有掩蔽剂磷酸的络合, 将显示 Fe^{3+} 的颜色, 即黄色。加磷酸的作用主要是掩蔽 Fe^{3+} 的颜色, 生成无色 $\text{Fe}(\text{HPO}_4)^+$ 配离子^[20-21]。所以, 滴定前必须加磷酸。

2.1.4 磷酸与邻菲罗啉加入顺序的影响 实验发现如果先加磷酸, 后加邻菲罗啉, 溶液无色, 可能因为先加入的磷酸与 Fe^{2+} 生成配合物阴离子, 阻止了 Fe^{2+} 与邻菲罗啉的络合。所以必须先加邻菲罗啉后加磷酸才能出现 Fe^{2+} 与邻菲罗啉络合的颜色, 粉红色。

2.2 根表铁膜(DCB-Fe)与水稻根系氧化力的关系

从图 2a 可知, 正常磷处理水稻根系为白色, 而缺磷处理根表形成大量红棕色铁膜(灰度图中, 根系表面的阴影部分)。红棕色铁膜主要为结晶态或无定形态 Fe^{3+} 等氧化物或氢氧化物^[4]。利用 DCB 法浸提根表铁沉淀发现, 缺磷处理根表 DCB-Fe 比对照处理增加了 124%(图 2b)。但是, 正常磷处理根表也存在一定数量的 DCB-Fe, 根表 DCB-Fe 主要以 Fe^{3+} 形态存在, 占根表 DCB-Fe 含量的 85% 以上^[22]。因此, 根表 DCB-Fe 可以粗略地反映水稻根系将 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+} 的能力, 即水稻根系氧化力。但水稻根系氧化力对 Fe^{2+} 的氧化去向包括根表 DCB-Fe、脱落的 DCB-Fe、植株吸收的 Fe^{3+} 、微生物吸收的 Fe^{3+} 等。因此, 单纯的 DCB-Fe 并不能准确表征根系氧化力。根系氧化力包括氧化酶、氧化性物质、氧气等^[4,7-8]。为了更准确地探求根系氧化力, 本文用根系分泌的 H_2O_2 多少表示根系的氧化力。从图 2c 结果可知, 缺磷处理水稻根系氧化力比正常磷处理增加了 147%。与图 2b 缺磷处理根表 DCB-Fe 比正常磷处理多的结果相一致。



(CK:对照, CK-P:缺磷处理 a:水稻根系图, b:水稻根系 DCB-Fe 浓度, c:水稻根系氧化力; 图中数据为平均值 $\pm$ SE(n=4), 处理间小写字母不同表示差异在 $P<0.05$ 水平显著)

图 2 根表铁膜(DCB-Fe)与水稻根系氧化力的关系

Fig. 2 Relationship between iron plaque on the roots surface and root oxidizing ability

3 结论

本文利用水稻根表能将 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+} 形成铁膜这一特性, 提出了一种测定水稻根系氧化力的新方法。即人为添加 Fe^{2+} , 让根系氧化力氧化部分 Fe^{2+} , 过剩的 Fe^{2+} 再利用 H_2O_2 滴定, 从而计算出根系氧化力。该方法要求 Fe^{2+} 浓度大于 0.8 mmol/L, 加入磷酸可以排除其他养分干扰离子, 显色过程为先加邻菲罗啉后加入磷酸。最后, 利用本方法分析了缺磷条件下水稻根系氧化力, 并结合根系 DCB-Fe 浓度, 发现缺磷条件下水稻根系氧化力和根系 DCB-Fe 浓度变化一致, 表明该方法在不损伤水稻根系情况下可以准确定量测定水稻根系氧化力。

参考文献:

- [1] Dong D, Nelson YM, Lion LW, Shuler ML, Ghiorse WC. Adsorption of Pb and Cd onto metal oxides and organic material in natural surface coatings as determined by selective extractions: New evidence for the importance of Mn and Fe oxides[J]. Water Research, 2000, 34(2): 427-436
- [2] Machado W, Guieiros BB, Lisboa-Filho SD. Trace metals in mangrove seedlings: role of iron plaque formation[J]. Wetlands Ecology and Management, 2005, 13(2): 199-206
- [3] Crowder A, Macfies SM. Seasonal deposition of ferric hydroxide plaque on roots of wetland plant[J]. Canadian Journal of Botany-revue Canadienne De Botanique, 1986, 64: 2 120-2 124
- [4] 傅友强, 于智卫, 蔡昆争, 沈宏. 水稻根表铁膜形成机制及其生态环境效应[J]. 植物营养与肥料学报, 2010, 16(6): 1 527-1 534

- [5] Jiang FY, Chen X, Luo AC. Iron plaque formation on wetland plants and its influence on phosphorus, calcium and metal uptake[J]. *Aquatic Ecology*, 2009, 43(4): 879–890
- [6] Weiss J, Emerson D, Backer S. Enumeration of Fe (II)-oxidizing and Fe (III)-reducing bacteria in the root zone of wetland plants: Implications for a rhizosphere iron cycle[J]. *Biogeochemistry*, 2003, 64(1): 77–96
- [7] Neubauer SC, Toledo-Duran GE, Emerson D. Returning to their roots: Iron-oxidizing bacteria enhance short-term plaque formation in the wetland-plant rhizosphere[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2007, 24: 65–73
- [8] 刘文菊, 胡莹, 朱永官, 高如泰, 赵全利. 磷饥饿诱导水稻根表铁膜形成机理初探[J]. *植物营养与肥料学报*, 2008, 14(1): 22–27
- [9] 赵锋, 王丹英, 徐春梅, 张卫建, 章秀福. 水稻氧营养的生理、生态机制及环境效应研究进展[J]. *中国水稻科学*, 2009, 23(4): 335–341
- [10] 张西科, 尹君, 刘文菊, 张福锁, 毛达如. 根系氧化能力不同的水稻品种磷锌营养状况的研究[J]. *植物营养与肥料学报*, 2002, 8(4): 54–57
- [11] 樊明宪. 测定水稻根系氧化力的一种新方法[J]. *湖北农学院学报*, 1982(2): 102
- [12] Yoshida S, Douglas A, Forno JC. Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice[M]. Los Banos: IRRI, Philippines, 1976, 57–65
- [13] Taylor GJ, Crowder AA. Use of the DCB technique for extraction of hydrous iron oxides from roots of wetland plant[J]. *American Journal of Botany*, 1983, 70(8): 1 254–1 257
- [14] 赵永红, 姜科. Fenton 试剂去除选矿废水中黄药的试验研究[J]. *江西理工大学学报*, 2009, 30(5): 33–36
- [15] Vilve M, Vilhunen S, Vepsäläinen M. Degradation of 1, 2-dichloroethane from wash water of ion-exchange resin using Fenton's oxidation. *Environmental Science and Pollution Research*, 2010, 17(4): 875–884
- [16] De Laat J, Le TG. Effects of chloride ions on the iron (III)-catalyzed decomposition of hydrogen peroxide and on the efficiency of the Fenton-like oxidation process[J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2006, 66(1/2): 137–146
- [17] 唐怀军, 霍海玲, 刘文杰, 叶立媛. 改进型过氧钼酸法制备无定形 MoO_3 薄膜[J]. *湖南大学学报(自然科学版)*, 2004, 31(5): 9–12
- [18] 侯风亮, 倪峰, 徐流杰, 李伟. 柠檬酸在 Sol-gel 制备 $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Mo}$ 混合粉体过程中的作用[J]. *材料热处理技术*, 2010, 39(24): 119–122
- [19] 慕志波, 朱丽华. 氯离子对 COD 测定影响的探讨[J]. *污染防治技术*, 2011, 24(5): 50–51
- [20] Meng H, Li GG, Liu YL. Hydrothermal synthesis and characterization of a new iron phosphate structure of ladder-like chains and coordination directly by an organo-nitrogen ligand: $[\text{Fe}(\text{phen})(\text{HPO}_4)(\text{H}_2\text{PO}_4)\text{center dot } 0.5\text{H}_2\text{O}]$ (phen=1, 10-phenanthroline) [J]. *Journal of Solid State Chemistry*, 2004, 177(12): 4 459–4 464
- [21] 刘薇, 王宏君, 赵建, 文悦, 文镜. 邻二氮菲- Fe^{2+} 法测定保健食品的抗氧化能力[J]. *食品科学*, 2010, 31(18): 333–337
- [22] 傅友强, 梁建平, 于智卫, 吴道铭, 蔡昆争, 沈宏. 不同铁形态对水稻根表铁膜及铁吸收的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2011, 17(5): 1 050–1 057

A Novel Method for Quantifying Oxidizing Capacity of Rice (*Oryza sativa* L.) Roots

FU You-qiang, WU Dao-ming, SHEN Shou-ying, LI Yue, SHEN Hong*

(College of Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Root oxidizing ability is the requisite for the formation of iron plaque on roots surface. Fe^{3+} is a major form in the iron plaque. Therefore, according to the quantity of iron plaque on roots surface, this paper explored a novel method for quantifying the oxidizing capacity of rice roots. First of all, added quantitative ferrous sulfate (Fe^{2+}) into the culture solution, rice roots would oxidized parts of Fe^{2+} to Fe^{3+} after 1 d, remaining Fe^{2+} in the culture solution was titrated with H_2O_2 , the titration value was A. Then, H_2O_2 titrated Fe^{2+} of culture solution without cultivation rice seedlings, the titration value was B. The difference of H_2O_2 titration value (B-A) was named Root oxidizing ability. This method required: Fe^{2+} concentration was more than 0.8 mmol/L, H_2O_2 consumption was proportional to Fe^{2+} ($R^2 = 0.999\ 2$). During the determining process, the culture solution was added 1, 10-Phenanthroline monohydrate as colour-display reagent firstly, then added phosphoric acid. This method could quantitatively determine oxidizing capacity of rice roots which were not damaged.

Key words: Root oxidizing ability, Iron plaque, H_2O_2 , Fe^{2+} , Rice