

玉米根系活力 TTC 测定法的改良

白宝璋 金锦子* 白 崧 黄丽萍**

(吉林农业大学农学系, 长春 130118)

Improvement of TTC Method Determining Root Activity in Corn

Bai Baozhang Jin Jinzhi Huang Liping Bai Song

(Agronomy department, Jilin Agricultural University, Changchun, 130118)

Abstract: Root activity is a physiological index that is often needed determining it in studying growth and development of corn plant. This paper compared 3 extractive methods of TTC method determining root activity in corn plants. The results showed that soaking method by methyl alcohol is a method of exact result and simplifying process.

Key Words: Corn root activity; TTC determining method; Soaking method by methyl alcohol.

摘要 根系活力是研究玉米生长发育时常常需要测定的一项生理指标。本文比较了玉米根系活力 TTC 测定法的三种提取方法。结果表明, 甲醇浸泡法, 简便易行, 结果准确。

关键词 玉米 根系活力 TTC 测定法 甲醇浸泡法

根不仅是植物吸收水分和盐类的主要器官, 而且是多种物质(如氨基酸、植物激素、生物碱等)的同化、转化或合成的重要器官。因此, 根系的生长发育状况和根系的活力强弱将直接影响植物个体的生命活动。所谓根系活力就是泛指根的吸收与合成的能力, 这是一项常常需要测定的生理指标。

测定根系活力的方法很多。例如: 甲烯蓝法⁽¹⁾、 α -萘胺法⁽²⁾、TTC 法⁽³⁾等。相比之下, TTC 法结果准确、重现性好。据文献资料介绍, TTC 最先被用于种子生活力的测定⁽⁴⁾, 并且国际种子协会把 TTC 染色图形法确定为测定种子生活力的标准方法⁽⁵⁾, 多年来一直得到广泛应用。日本学者内田与省见(1966)把 TTC 用于判断水稻根的健全性上, 并加以定量化⁽⁶⁾; 我国学者在这方面也做了一些工作。宋学之等(1981)用 TTC 法测定林木种子脱氢酶的活性, 张雄(1982)对 TTC 法测定根系活力的取样做了必要的改

进⁽⁸⁾; G. Dey 等(1982)在研究向日葵的根系活力时不用乙酸乙酯研磨法提取 TTF, 而是利用 2-甲氧乙醇浸泡法提取 TTF⁽⁹⁾, 并得到了较好的效果。

笔者在前人工作的基础上, 利用常用的几种有机溶剂(由于未买到 2-甲氧乙醇, 故未做)浸泡已被 TTC 溶液显色的玉米根尖切段, 发现甲醇与二甲基亚砷提取 TTF 的效果很好, 并以乙酸乙酯研磨法提取 TTF 作为标准, 与之比较。

1 测定原理与仪器试剂

1.1 原理

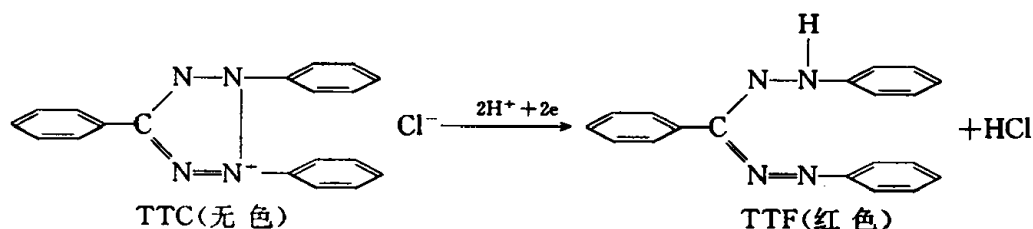
TTC 是氯化三苯基四氮唑(2, 3, 5-Triphenyl Tetrazolium Chloride)的英文名称缩写, 又名“红四氮唑”。分子式为 $C_{12}H_{11}$

* 金锦子现在延边农学院农学系工作。

** 黄丽萍现在白城师专生物系工作。

N_2Cl , 分子量为 334.82。TTC 是标准的氧化还原色素(还原前的电位为 -80mV), 溶于水后为无色的溶液。当它与种胚、幼根、花粉等活细胞接触时, 作为氢的受体被还原型脱

氢辅酶($\text{NADH} + \text{H}^+$ 或 $\text{NADPH} + \text{H}^+$)中的氢还原。由无色的 TTC 还原成红色的 TTF。其反应式如下:



反应过程中生成的 TTF 不溶于水, 但能溶于某些有机溶剂, 而且, 所生成的红色在空气中不能自动氧化, 其颜色深浅与根系活力成正相关。

1.2 仪器

烧杯、镊子、单面刀片、培养皿、移液管、具塞刻度试管、恒温培养箱、72-1 型分光光度计。

1.3 试剂

1.3.1 0.4% TTC 溶液 称取 0.4g TTC 装入小烧杯中, 加入少许 95% 乙醇使其溶解, 然后用蒸馏水稀释至 100ml。配好的溶液应避免光保存, 如若变红时则不能使用, 需重新配制。

1.3.2 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 贮备液 A— $0.2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 溶液 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 27.8g 配成 1000ml), 贮备液 B— $0.2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 溶液 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.65g 或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.7g 配成 1000ml); 然后, 取贮备液 A 39.0ml 和贮备液 B 61.0ml, 混合后再稀释至 200ml 即可。

1.3.3 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$ 溶液 用移液管量取比重为 1.84 的浓 H_2SO_4 (98%) 5.4ml, 稀释至 100ml。

1.3.4 成品试剂 甲醇、乙酸乙酯、二甲基亚砜、保险粉 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)。

2 测试方法

2.1 材料

供试玉米品种为本育 9。选取籽粒大小

和饱满度基本一致的玉米种子, 加水吸胀 8~10h, 插入内垫双层湿润滤纸的培养皿内, 上覆滤纸后加盖, 于 $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 下温箱中催芽, 加速胚根生长。当胚根长度达到 1.5~2.0cm 时, 即可作为实验材料。

2.2 方法

2.2.1 显色 当已萌发玉米种子的胚根长度达到 1.5~2.0cm 时, 选取长度、粗度基本一致的根, 用单面刀片切下 0.0~1.0cm 的根尖 100 条装入 50ml 烧杯内, 依次加入 0.4% TTC 溶液和 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 各 5ml, 充分混合, 并使根尖切段完全浸入上述反应液中, 置于 37°C 的温箱内保温培养 1h, 以使根尖切段显色(红色)。注意: 为避免取样误差, 在切取根尖时只取主根, 而不取侧根。

2.2.2 提取 保温显色时间一到, 立即向小烧杯内加入 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$ 溶液 2ml 以终止反应。取出根尖切段, 用滤纸将其表面吸干, 然后, 按照下述三种方法提取 TTF。

2.2.2.1 乙酸乙酯研磨法: 将已显色的根尖切段放入研钵内, 加 3~4ml 乙酸乙酯及少许石英砂研磨至匀浆, 将提取的红色 TTF 溶液过滤至刻度试管内, 残渣用 2~3ml 乙酸乙酯冲洗, 反复 3~4 次, 直至洗液完全不带红色时为止; 把每次的洗液均合并于刻度试管内, 最后用乙酸乙酯定容至 20ml。

2.2.2.2 甲醇浸泡法: 将已显色的根尖切段装入具塞刻度试管中, 加入 20ml 甲醇, 使根尖切段完全浸入甲醇中, 然后将试管置于 30

~40℃的保温箱中,使根尖切段完全变白为止(4~6h)。

2.2.2.3 二甲基亚砷浸泡法:其方法同(2)。不同的是,所加提取试剂为二甲基亚砷。

2.2.3 比色 上述提取液可用 72-1 型分光光度计比色测定。波长 485nm,分别以乙酸乙酯、甲醇和二甲基亚砷作对照(调零点),记录 OD(光密度)值。

2.2.4 标准曲线绘制 取 0.4%TTC 溶液 0.4ml,加乙酸乙酯 19.6ml 和少量保险粉,充分摇动,所生成的红色 TTF 溶液作为已知母液,取 6 只试管,按照表 1 所给数据配制系列浓度溶液。用 72-1 型分光光度计比色,以甲醇作对照,波长 485nm,记录 OD 值。并以 OD 值为纵坐标,以 TTF 的 μg 数为横坐标,绘制出以甲醇为溶剂的标准曲线。用同样方法再分别绘制出乙酸乙酯和二甲基亚砷为

溶剂的标准曲线(图 1)。

2.2.5 结果计算 按照公式 $A = \frac{\text{cm}}{nt}$ 计算。式中: A——根系活力 ($\text{TTF}\mu\text{g} \cdot \text{根}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), n——根尖切段数, C——在标准,曲线上查得的 TTF(μg), t——显色时间(h), m——提取液稀释倍数。

3 结果与分析

3.1 TTF 的吸收光谱

利用乙酸乙酯、甲醇和二甲基亚砷作为溶剂的 TTF 溶液,在波长为 400~600nm 的光波范围内,每隔 5nm 测定一次 OD 值,并分别绘成三种提取液的吸收光谱曲线(图 2)。从图 2 可以看出,各种溶剂的吸收光谱几乎完全一致,而且最大吸收峰均在 485nm,这与张雄^[8]等人的测定结果一致。因此,可以利用分光光度法进行比色测定,比色的波长为 485nm。

表 1 TTF 系列浓度溶液的配制

每管 TTF (μg) 试剂 (ml)	20	40	80	120	160	200
母液	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
甲 醇	19.5	19.0	18.0	17.0	16.0	15.0

表 2 不同溶剂测得的玉米幼苗根系活力($\text{TTF}\mu\text{g} \cdot \text{根}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)

	乙酸乙酯研磨 法(标准法)	甲 醇 浸泡法	二甲基亚 砷浸泡法
根系活力	1.836	1.896	1.870
占标准法的 %	100.00	103.24	101.85

3.2 根系活力的比较

用乙酸乙酯、甲醇和二甲基亚砷三种溶剂提取 TTF 所测得的玉米幼苗的根系活力列于表 2。从表中数据可以看出,浸泡法的效果好于研磨法,其中甲醇浸法最好。乙酸乙酯研磨法是一种被广泛采用的经典方法,但由于操作过程较烦琐,花费时间较长(尤其是待测样品较多时显得尤为突出),而且因研磨和过滤易造成误差,使得测定结果偏低。二甲基

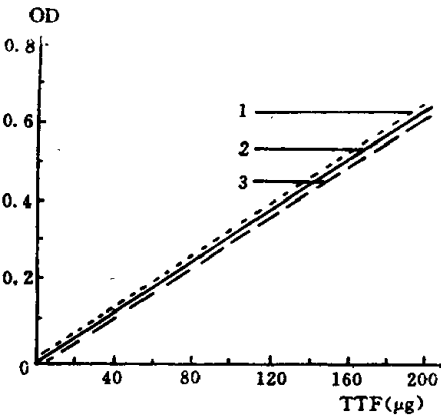


图 1 TTF 的标准曲线

1. 甲醇 2. 乙酸乙酯 3. 二甲基亚砷

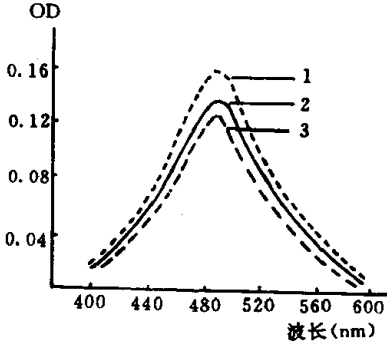


图 2 TTF 的吸收光谱

1. 甲醇 2. 乙酸乙酯 3. 二甲基亚砷

亚砷浸泡法虽然比乙酸乙酯研磨法好(提高1.85%),但由于在提取 TTF 时根组织被破坏,因而测定值的重现性不如甲醇浸泡法。而且,在室温必需不低于 16℃ 时才能使用,因为低于 16℃ 时二甲基亚砷出现结晶。此外,该种试剂价格较贵,气味难闻。所以,我们认为,本法不宜采用。而甲醇浸泡法提取 TTF 完全,基本上可以消除因操作过程而出现的误差,故测定值较高(比标准法提高3.24%)。同时,该法不但操作简便,而且重现性好。我们认为,本法值得采用。

3.3 提取时间对测定结果的影响

试验过程中,在甲醇浸泡组每隔 1h 对提取液进行比色,以便了解完全提取 TTF 的最佳时间范围,结果如图 3 所示。从图中曲线可以看出,自浸泡开始,随着时间的延长而 OD 值逐渐增加,至第 5 小时以后曲线不再上升。这表明 TTF 已被完全提取出来。就整个提取过程而言,开始浸泡的头 1 小时提取率最高,占全部 TTF 的 71.4%。

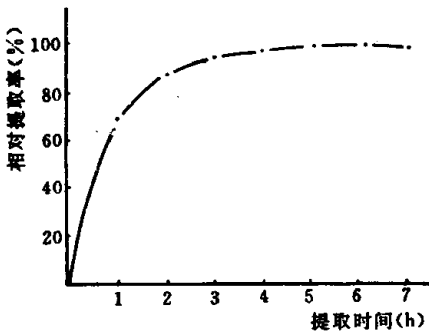


图 3 提取时间对 TTF 提取量的影响

4 小 结

4.1 在测定玉米根系活力时,如测苗期根系

活力可采用温箱催芽法;如测盆栽或田间的不同生育期的玉米根系活力,取样时不要把根弄断。并将根上附着的泥土洗净。

4.2 根的生命活动力最旺盛的部位是根尖,所以应该切取 0.0~0.5cm 或 0.0~1.0cm 的根尖切段作为试材为宜。同时,取样应该一致,或全取主根,或全取侧根,避免取样造成误差。

4.3 根系活力的表示方法,如切取根尖切段,以 $TTF \mu g \cdot \text{根}^{-1} \cdot h^{-1}$ 表示根系活力为好;如测盆植株的根系活力,难于切取根尖,以 $TTF \mu g \cdot g^{-1} FW \cdot h^{-1}$ 表示根系活力为宜。

4.4 选用 TTC 法测定玉米根系活力时,采用甲醇浸泡法提取 TTF 进行定量分析,溶剂易得,方法简便,重现性好。在 30~40℃ 保温箱内,提取时间应不少于 5h (其间如能摇动试管更好)。此法尤其适用大批量试材的测定。

参 考 文 献

- [1] 华东师范大学生物系生理教研组,《植物生理学实验指导》,人民教育出版社,1980,71—73
- [2] 上海师大生物系、上海市农业学校,《水稻栽培生理》,上海科学技术出版社,1978,303—308
- [3] 山东农学院、西北农学院,《植物生理学实验指导》,山东科学技术出版社,1980,187—190
- [4] D. F. 格雷勃(颜启译),《农业种子四氮唑测定手册》,1979
- [5] IISTA, Proc. Int. Seed Test. Assoc. 1968(31):1—62
- [6] 吉田武彦,根的活力测定法,《土壤肥料杂志》,1966,37(1):63—68
- [7] 宋学之等,《植物生理学通讯》,1981,(5):38—41
- [8] 张雄,《植物生理学通讯》,1982,(3):48—50
- [9] G. Dey et al., Indian Journal of Plant Physiology. 1982, 25(1):81—87