

不同因素对水稻离体根吸收四价硒影响

张联合^{1,2}, 施卫明^{1*}, 王校常¹

(1 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008;

2 河南科技大学, 河南洛阳 471003)

摘要: 研究结果显示, pH 对水稻离体根吸收 4 价硒 (Se) 有显著影响, 这与不同 pH 下 4 价 Se 的存在形式有关。进一步研究表明, 低温抑制 4 价 Se 吸收和一定浓度的 NaCl 促进 4 价 Se 吸收, 可能在于低温和 NaCl 影响到根内代谢而间接影响 4 价 Se 吸收, 而 P 抑制 4 价 Se 吸收可能与二者拥有共同吸附位点有关。

关键词: 四价硒; 离体根; 吸收; 影响

中图分类号: S1; S511

硒 (Se) 是人和动物必需的微量元素, 在医学上被用于癌症预防^[1-2]和减轻艾滋病的某些症状^[3]。许多研究表明, 克山病、大骨节病的发病率与环境中 Se 含量有很好的相关性^[4]。目前 Se 对健康的影响已成为全球性的环境健康问题^[5]。人体内的 Se 主要是通过食物链从饮食中获得的。水稻是我国主要粮食作物, 全国稻米 Se 含量平均为 32.27 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 低的仅有 15.60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[6], 远远不能满足人体健康的需求。因此通过提高稻米 Se 含量进行饮食补 Se 是非常理想的有效方式。

在稻田淹水条件下, 土壤溶液中的 6 价 Se 被还原为 4 价 Se^[4], 这是水稻可以吸收利用的主要 Se 形态。研究表明, 4 价 Se 不能通过 S 转运体转运到根内^[7-9], 一般推测可能是以被动吸收的方式进入植株体内^[8-11], 因此 4 价 Se 吸收的具体机制仍需进一步研究。本研究通过改变外界溶液条件, 探索对 4 价 Se 吸收的影响, 期望以此为线索, 逐渐揭开 4 价 Se 吸收的机制, 从而找出影响 4 价 Se 吸收的关键因素, 进一步运用分子生物学技术和手段进行基因改良, 通过增强根系 Se 吸收能力来提高稻米 Se 含量。

1 实验材料与方法

1.1 水稻植株培养

健康种子经 2% 次氯酸钠消毒后在蒸馏水中浸泡一昼夜, 然后在 35℃ 恒温箱中培养催芽, 待胚根

长至 2~3 cm 时转移到尼龙网上在人工光照生长室内水培。每天光照时间为 14 h, 光照强度为 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 白天温度 24℃, 夜晚 18℃, 相对湿度为 67%。刚开始用 1/4 木村营养液^[12]培养, 两天后换成 1/2 木村营养液培养 3~5 天, 然后再换入全量营养液培养, 以后每天用稀 HCl 和稀 NaOH 调节营养液 pH 至 5.5, 每隔 3 天换 1 次培养液。待生长 15~20 天后, 将根从茎基部剪下, 进行离体根吸收试验。

1.2 离体根吸收实验

1.2.1 pH 对 4 价 Se 吸收影响 将大约 0.3 g 鲜重的离体根放入含 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ KH_2PO_4 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 和 MgCl_2 , pH 为 5.5 的无 S 营养液中 30 min 后, 迅速移到含有 5 mmol/L MES (二吗啡啉乙磺酸), 0.5 mmol/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 和 500 $\mu\text{g}/\text{L}$ Na_2SeO_3 的吸收液中, pH 分别调为 5、7 和 8, 吸收 3 h 后用冰冷的含 S 溶液清洗, 清洗溶液含 5 mmol/L MES, 0.5 mmol/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 和 K_2SO_4 , pH 为 5.5, 然后在其中浸泡 15 min, 取出后用纸吸干备用。

1.2.2 NaCl 对 4 价 Se 吸收影响 参照上述方法, 将离体根从无 S 营养液迅速移到吸收液中, 吸收液含有 5 mmol/L MES, 0.5 mmol/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 500 $\mu\text{g}/\text{L}$ Na_2SeO_3 和浓度分别为 0、1、3 和 5 mmol/L NaCl 溶液中, pH 为 5.5。吸收 3 h 后进行如上清洗处理。取出后用纸吸干备用。

1.2.3 低温对 4 价 Se 吸收影响 参照上述方法,

* 通讯作者

作者简介: 张联合 (1970—), 男, 河南扶沟人, 博士, 副教授, 主要从事植物营养生理研究。E-mail: zlianhe@eyou.com

将离体根从无 S 营养液迅速移到吸收液中, 吸收液含有 5 mmol/L MES, 0.5 mmol/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 和 500 $\mu\text{g/L}$ Na_2SeO_3 , pH 为 5.5。分别在 4 °C 和 25 °C 条件下吸收 3 h, 然后进行如上清洗处理。取出后用纸吸干备用。

1.2.4 P 对 4 价 Se 吸收影响 参照上述方法, 将离体根从无 S 营养液迅速移到吸收液中, 吸收液含有 5 mmol/L MES, 0.5 mmol/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 100 $\mu\text{g/L}$ Na_2SeO_3 和浓度分别为 0、1、3 和 5 mmol/L K_3PO_4 溶液中, pH 为 5.5。吸收 3 h 后进行如上清洗处理, 取出后用纸吸干备用。

1.2.5 细胞壁吸附 Se 清洗实验 参照上述方法, 将离体根从无 S 营养液迅速移到吸收液中, 吸收液含有 5 mmol/L MES, 0.5 mmol/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 5 μmol Na_2SeO_3 , pH 为 5.5。吸收 3 h 后分别用冰冷的水和 0.5 mmol/L K_3PO_4 清洗处理, 用纸吸干备用。

1.3 消化分析

所有用到的玻璃器皿提前用 10% HCl 浸泡清洗以减少 Se 污染。称取一定量磨碎的离体根样品于 100 ml 的消煮管中, 加入 5 ml 混合酸 (HNO_3 : $\text{HClO}_4 = 4:1$), 静置过夜, 然后在 150 ~ 165 °C 条件下完全消化, 冷却至 100 °C, 加入 2.5 ml 6 mol/L HCl, 继续加热至冒白烟为止^[13]。冷却后定容至 25 ml, 然后用原子荧光光谱法测定 Se 含量。以上所用酸都为优级纯试剂。

2 结果与讨论

2.1 pH 对 4 价 Se 吸收影响

图 1 显示 pH 在 5、6 和 7 时水稻离体根吸收 Se 差异。结果表明, pH 为 5 时水稻离体根 Se 吸收量最大, 分别是 pH 为 6 和 7 时的 1.95 和 2.95 倍, 差异达到极显著水平 ($P < 0.01$)。比较 pH 在 6 和 7

时的 Se 吸收量, 二者之间达到极显著差异 ($P < 0.01$)。可见 pH 对 4 价 Se 吸收有显著影响, 这与过去 Ulrich 等^[10]的研究结果一致。

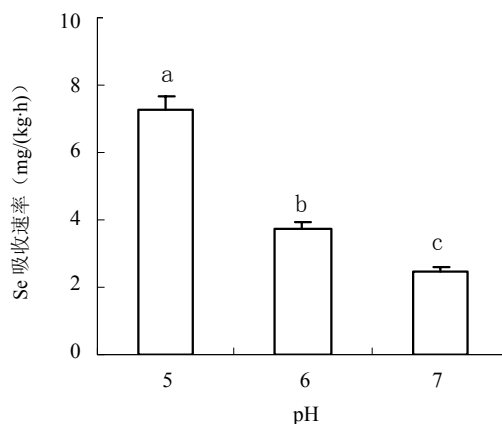


图 1 不同 pH 对水稻离体根 4 价 Se 吸收影响

Fig. 1 Effect of different pH on the uptake of selenite of excised rice roots

表 1 显示不同 pH 条件下 3 种 Se 形态在 Na_2SeO_3 溶液中的比例变化。可以发现, pH 在 5、6 和 7 时 4 价 Se 主要以 SeO_3^{2-} 和 HSeO_3^- 形式存在, 而 H_2SeO_3 形态的 Se 数量较少。pH 从 5 升到 7, SeO_3^{2-} 数量显著增加, 而 HSeO_3^- 数量显著减少, 但是 4 价 Se 吸收量显著降低 ($P < 0.01$)。pH 对 4 价 Se 吸收的影响可能是由于不同的 Se 形态在溶液中发生的数量变化引起的。我们进一步用水通道抑制剂 HgCl_2 和 AgNO_3 分别抑制 4 价 Se 吸收试验证明, 在低 pH 下, 4 价 Se 主要以 H_2SeO_3 形式通过水通道进入(数据未发表), 随着 pH 升高, H_2SeO_3 数量减少, Se 吸收量降低。因此, pH 对 4 价 Se 吸收的影响主要在于不同形态的 Se 在溶液中存在比例发生变化引起的。

表 1 不同 pH 下溶液中 4 价 Se 形态比例

Table 1 Proportions of different forms of selenium in media different in pH

pH	SeO_3^{2-}	HSeO_3^-	H_2SeO_3
5	0.024302	0.9720972	0.0036
6	0.199941	0.799763	0.000296
7	0.714278	0.2857113	1.06E-05

注: 显示数据根据 H_2SeO_3 电离常数计算而来, $K_1 = 2.7 \times 10^{-3}$, $K_2 = 2.5 \times 10^{-7}$ 。

2.2 NaCl 对 4 价 Se 吸收影响

图 2 显示不同 NaCl 水平对水稻离体根 4 价 Se 吸收的影响。结果显示, 与 CK 相比, 1 mmol/L

NaCl 处理不能抑制 4 价 Se 的吸收, 当提高到 3 mmol/L 时, Se 吸收量为 CK 的 1.77 倍, 差异达到极显著水平 ($P < 0.01$)。原因之一可能在于 NaCl

降低溶液中水势，从而抑制水的吸收，促进了离子的吸收^[14]。另一方面，NaCl被水稻根系大量吸收后可能直接影响到根内某些代谢过程^[15]，这些过程需要额外能量，因而通过提高根系呼吸速率而获得较多的能量^[14]。可见NaCl促进4价Se的吸收可能是影响到根内代谢的结果。

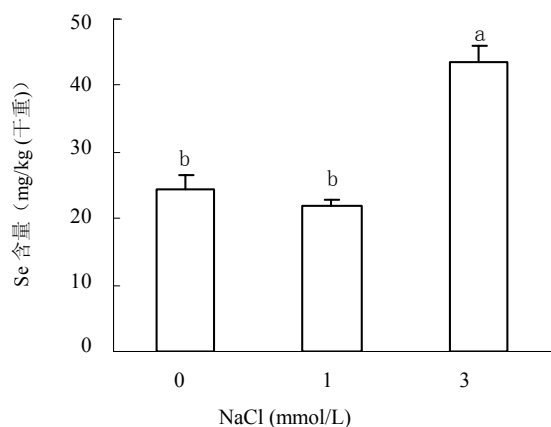


图2 不同NaCl水平对水稻离体根4价Se吸收影响

Fig. 2 Effect of NaCl level on plant uptake of selenite of excised rice roots

2.3 低温处理对4价Se吸收影响

图3显示，低温处理能够显著抑制水稻离体根4价Se的吸收，与25℃时Se吸收量相比，低温（4℃）抑制离体根Se吸收达到58%，呈极显著水平（ $P < 0.01$ ）。低温条件下根内多种酶活性降低，代谢减弱，可见低温可能因为抑制根内代谢而间接影响4价Se吸收。文献报道，4价Se被吸收后在根内能够迅速还原^[16-17]，最后在半胱氨酸合酶作用下和O-乙酰丝氨酸形成Se代半胱氨酸^[18-19]。因

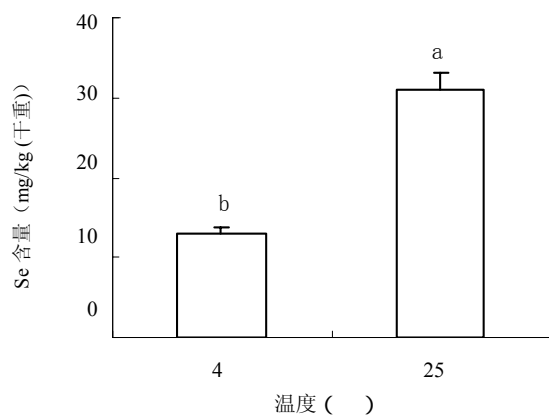


图3 低温对水稻离体根4价Se吸收影响

Fig. 3 Effect of low temperature on plant uptake of selenite of excised rice roots

此，低温有可能抑制根内4价Se代谢而影响到Se向细胞内移动，从而降低根系对4价Se吸收。

2.4 P对4价Se吸收影响

结果显示（图4），2和3 mmol/L K_3PO_4 可以明显抑制水稻离体根4价Se的吸收，分别达到显著（ $P < 0.05$ ）和极显著水平（ $P < 0.01$ ），而1 mmol/L K_3PO_4 对4价Se吸收没有明显影响。P抑制水稻根系对4价Se的吸收在文献上也有报道^[20]。清洗实验结果显示（图5），用冰冷的水清洗，根系Se含量降低到83%，而用冰冷的0.5 mmol/L K_3PO_4 清洗，根系Se含量降低到68%。可见与冰冷水清洗相比， K_3PO_4 能更多地清洗掉根表吸附的4价Se。此外，P也能将吸附在土壤上的4价Se置换出来而提高Se的有效性^[20]。因此，磷酸根与亚硒酸根离子可能存在共同吸附位点，P抑制4价Se吸收可能与此有关。

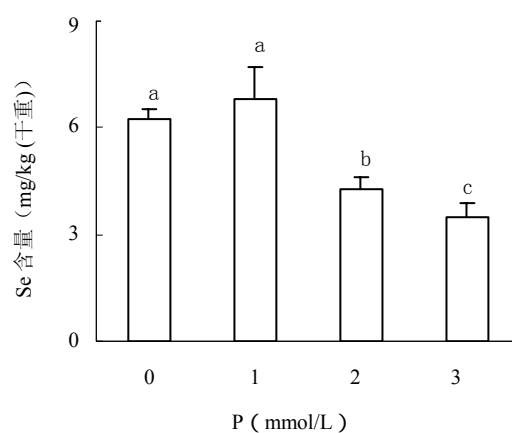


图4 不同P水平对水稻离体根4价Se吸收影响

Fig. 4 Effect of P level on plant uptake of selenite of excised rice roots

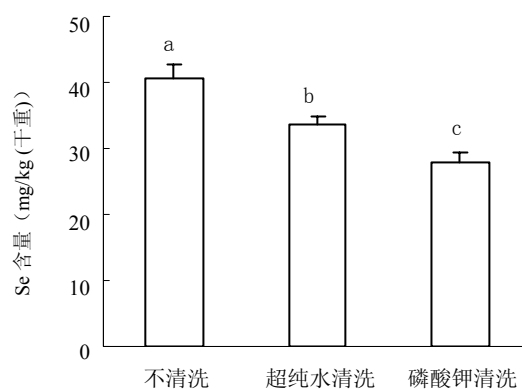


图5 水和 K_3PO_4 清洗根表吸附Se比较

Fig. 5 Comparison between water and K_3PO_4 in effect of cleaning up selenite absorbed on the surface of roots

3 结论

(1) pH 5 ~ 7 时水稻离体根主要吸收 HSeO_3^- 和 SeO_3^{2-} 形态的 Se, pH 影响 4 价 Se 吸收与 Se 形态的变化有关。

(2) 低温抑制 4 价 Se 吸收和一定浓度的 NaCl 促进 4 价 Se 吸收, 可能因为二者引起根内代谢变化而间接影响 4 价 Se 吸收。P 抑制 4 价 Se 的吸收, 有可能与磷酸根与亚硒酸根离子在根表上存在共同的吸附位点有关。

(3) 目前提高粮食作物或蔬菜 Se 含量主要采用土壤施 Se 或农作物叶面喷施 Se 的方式进行^[21]。而通过增强其根系吸收土壤 Se 能力的途径提高农产品中的 Se 含量研究较少。上述结果有助于进一步研究不同的水稻品种根系吸收 4 价 Se 的生理差异及其机制, 对于充分利用水稻自身的富 Se 潜力, 吸收利用土壤中更多的 4 价 Se 以提高稻米 Se 含量具有重要的实际意义。

参考文献:

- [1] Clark LC, Combs GF Jr, Turnbull BW, Slate EH, Chalker DK, Chow J, Davis LS, Glover RA, Graham GF, Gross EG. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinonoma of the skin: a randomized controlled trial. *Nutritional Prevention of Cancer Study Group. J. Am. Med. Assoc.*, 1996, 276: 1957-1963
- [2] Combs GF Jr, Clark LC, Turnbull BW. Reduction of cancer risk with oral supplement of selenium. *Biomed. Environ. Sci.*, 1997, 10: 227-234
- [3] Hori K, Hatfield D, Maldarelli F, Lee BJ, Clause KA. Selenium supplementation suppresses tumor necrosis factor alpha induced human immunodeficiency virus type 1 replication in vitro. *AIDS Res. Hum. Retrovir.*, 1997, 13: 1325-1332
- [4] Wang ZJ, Gao YX. Biogeochemical cycling of selenium in Chinese environments. *Applied Geochemistry*, 2001, 16: 1345-1351
- [5] 李永华, 王五一, 锥昆利, 杨林生. 大巴山区土壤中的硒和氟. *土壤学报*, 2004, 141 (1): 61-67
- [6] 王光亚. 食品成分表. 北京: 人民出版社, 1991: 2-3
- [7] Shrift A, Ulrich JM. Transport of selenate and selenite into *Astragalus* roots. *Plant Physiol.*, 1976, 44: 893-896
- [8] Asher CJ, Butler GW, Peterson PJ. Selenium transport in root systems of tomato. *J. Exp. Bot.*, 1977, 23: 279-291
- [9] Abrams MM, Shennan C, Zazoski J, Burau RG. Selenomethionine uptake by wheat seedlings. *Agron. J.*, 1990, 82: 1127-30
- [10] Ulrich JM, Shrift A. Selenium absorption by excised *Astragalus* roots. *Plant Physiol.*, 1968, 43: 14-20
- [11] Arvy MP. Selenate and selenite uptake and translocation in bean plants (*Phaseolus vulgaris*). *J. Exp. Bot.*, 1993, 44: 1083-1087
- [12] 薛应龙. 植物生理学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1985: 63
- [13] Murphy J, Cashman KD. Se content of a range of Irish foods. *Food Chemistry*, 2001, 74: 493-498
- [14] Mengel K, Kirkby EA. Principles of plant nutrition. 3 ed. Bern: International Potash Institute, 1982: 228-230
- [15] Hussain N, Ali A, Sarwar G, Mujeeb F, Tahir M. Mechanism of salt tolerance in rice. *Pedosphere*, 2003, 13 (3): 233-238
- [16] Gissel-Nielsen G. Uptake and translocation of ^{75}Se in *Zea mays* // *Isotopes and Radiation in Research on Soil-Plant Relationships*. International Atomic Energy Association, Vienna, Austria, 1979: 427-436
- [17] Zayed A, Lytle CM, Terry N. Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Planta*, 1998, 206: 284-292
- [18] Ng BH, Anderson JW. Synthesis of selenocysteine by cysteine synthases from selenium accumulator and non-accumulator plants. *Phytochemistry*, 1978, 17: 2069-2074
- [19] Terry N, Zayed AM, de Souza MP, Tarun AS. Selenium in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 2000, 51: 401-432
- [20] Liu Q, Wang DJ, Jiang XJ, Cao ZH. Effects of the interactions between selenium and phosphorus on the growth and selenium accumulation in rice (*Oryza Sativa*), *Environmental Geochemistry and Health*, 2004, 26: 325-330
- [21] 杜振宇, 史衍玺, 王清华. 土壤施硒对萝卜吸收转化硒及品质的影响. *土壤*, 2004, 36 (1): 56-60

Effects of Various Factors on Selenite Uptake of Excised Rice Roots

ZHANG Lian-he^{1,2}, SHI Wei-ming¹, WANG Xiao-chang¹

(¹ State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture (Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences), Nanjing 210008, China;

² Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China)

Abstract: An experiment was carried out on effects of various factors on selenite uptake of excised rice roots. Results indicated that pH affected selenite uptake of excised rice roots significantly, which, however, was linked to forms of selenite. Low temperature inhibited uptake of selenite, but NaCl of a certain concentration promoted the uptake because temperature and NaCl might have an indirect effect on uptake of selenite by affecting metabolisms of the roots. The inhibition of selenite uptake by phosphate might relate to sharing of common absorption sites on root surface with selenite.

Key words: Selenite, Excised roots, Uptake, Effect