

水稻离体叶片吸收亚硒酸盐的生理特性*

张联合^{1,2} 赵 巍¹ 郁飞燕¹ 李友军¹ 苗艳芳¹

(1 河南科技大学农学院, 河南洛阳 471003)

(2 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)

PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SELENITE UPTAKE BY EXCISED
LEAVES OF RICEZhang Lianhe^{1,2} Zhao Wei¹ Yu Feiyan¹ Li Youjun¹ Miao Yanfang¹

(1 Agricultural Faculty, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China)

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

关键词 水稻离体叶片;亚硒酸盐;吸收;生理特性

中图分类号 Q945.1 文献标识码 A

硒在人体内具有抗氧化、提高免疫力和预防癌症等多种重要的生理功能^[1-2]。人体硒主要通过食物链来源于植物性食物^[3]。水稻是我国主要粮食作物之一,在稻米中,硒主要以硒代蛋氨酸和甲基硒代半胱氨酸形式存在,而这两种形式的有机硒对人体健康的有效性远大于无机硒^[4-5]。因此利用稻米中良好硒源为人体补硒是一条高效、低廉、简单和易行的途径。

我国稻米硒含量总体水平较低,并且变异幅度大^[5]。根据从农产品市场搜集到的 523 份精米样品调查结果显示,我国精米硒含量在 2 ~ 1370 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 之间,其中一半样品硒含量低于 65 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ^[5]。我国稻米硒含量偏低主要与土壤硒水平低有关。因此需要向低硒土壤施硒或叶面喷硒以提高稻米硒含量。受土壤类型、氧化还原电位、土壤 pH、微生物活动等多种因素影响,硒施入土壤后有效性大大降低,并且土壤施硒成本较高。因此,生产上主要利用叶面喷施亚硒酸盐的方式提高稻米硒含量。

研究表明,水稻叶面喷施亚硒酸盐能大幅度提高稻米硒含量^[6]。然而直到目前,人们对水稻叶片吸收亚硒酸盐的生理特性仍不完全清楚,因此不可避免地导致生产上存在叶面喷硒效率低、稻米硒含

量不稳定等问题。本研究通过探讨供硒水平、供硒时间、光照、温度、pH、不同阴离子等对水稻叶片吸收亚硒酸盐的影响,期望基本明确水稻叶片吸收亚硒酸盐的生理特性,进而为提高叶面喷施亚硒酸盐效率和控制稻米硒含量,生产出硒含量在安全范围内的稻米提供理论指导。此外,研究水稻叶片吸收亚硒酸盐的生理特性,也为在其他作物上提高亚硒酸盐喷施效率提供借鉴。

1 材料与amp;方法

1.1 水稻幼苗的培养

挑选大小均匀、籽粒饱满、无病斑和机械损伤的水稻种子(秀水 48),用 2% 的次氯酸钠消毒 15 min 后用蒸馏水反复冲洗干净,然后在蒸馏水中浸泡 24 h。取出后放在铺有数层吸水纸,上覆一层滤纸的培养皿中催芽。待水稻胚根长到 2 ~ 3 cm 时移到网纱上,最初在 1/2 木村营养液培养,3 d 后换为全量营养液。待水稻幼苗培养 7 d 后,挑选生长健壮、大小均匀的幼苗,分别移到 18 L 的长方形容器中培养,幼苗固定在 24 孔的聚乙烯塑料培植板上。每孔植入 5 株水稻幼苗,全量营养液培养,每隔 3 d

* 河南科技大学学校人才基金(编号:09001107)、河南科技大学学校基金(编号:13560036)和土壤与农业可持续发展国家重点实验室开放基金(编号:0751010012)资助

† 作者简介:张联合(1970—),河南扶沟人,博士,副教授,主要从事植物营养生理研究

收稿日期:2011-02-18;收到修改稿日期:2011-07-22

更换,以保持营养水平。每天用 1.0 mmol L^{-1} NaOH 和 1.0 mmol L^{-1} HCl 将营养液 pH 调为 5.5。水稻幼苗在人工光照生长室内培养。每天光照时间为 14 h,光照强度为 $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$,光照温度为 24°C ,黑暗温度为 18°C ,相对湿度为 67%。待水稻幼苗生长 21d 后,将充分展开的第 5 片叶从叶基部剪下,用于叶片吸收亚硒酸盐试验。

1.2 不同亚硒酸盐处理水平对水稻叶片吸收硒影响试验

分别取 4 片新剪下的水稻叶片,放入 100 ml 含 $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ CaCl_2 , pH 5.0 的无硒溶液中,30 min 后取出,分别放入 pH 5.0,含有 5.0 mmol L^{-1} MES, 0.5 mmol L^{-1} $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 和依次为 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、7.0 和 $8.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ Na_2SeO_3 的一系列吸收液中(加少量吐温 -20)^[7]。叶片在溶液中吸收 3 h 后取出,用蒸馏水反复冲洗,用吸水纸吸干后在 80°C 下杀青,然后在 60°C 下烘 72 h 至恒重。

1.3 不同亚硒酸盐处理时间对水稻叶片吸收硒影响试验

分别取 4 片新剪下的水稻叶片,放入 100 ml 含 $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ CaCl_2 , pH 5.0 的无硒溶液中,30 min 后取出,分别放入含有 5.0 mmol L^{-1} MES, 0.5 mmol L^{-1} $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 和 $2.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ Na_2SeO_3 , pH 5.0 溶液中(加少量吐温 -20),分别在吸收 1、2、3、4、5 和 6 h 后取出,按本文 1.2 节所述方法清洗、吸干和烘干备用。

1.4 不同 pH 对水稻叶片吸收亚硒酸盐影响试验

分别取 4 片新剪下的水稻叶片,放入 100 ml 含 $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ CaCl_2 , pH 5.0 的无硒溶液中,30 min 后取出,分别放入不同 pH (3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0),含有 5.0 mmol L^{-1} MES, 0.5 mmol L^{-1} $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 和 $2.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ Na_2SeO_3 的一系列溶液中(加少量吐温 -20),吸收 3 h 后取出,按本文 1.2 节所述方法清洗、吸干和烘干备用。

1.5 不同阴离子对水稻叶片吸收亚硒酸盐影响试验

分别取 4 片新剪下的水稻叶片,放入 100 ml 含 $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ CaCl_2 , pH 5.0 的无硒溶液中,30 min 后取出,放入分别含有 5 mmol L^{-1} NO_3^- , 5 mmol L^{-1} H_2PO_4^- , 5 mmol L^{-1} HPO_4^{2-} , 5 mmol L^{-1} MoO_4^{2-} 和 5 mmol L^{-1} SO_4^{2-} (溶液中阳离子为 Na^+), 5.0 mmol L^{-1} MES, 0.5 mmol L^{-1} $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 和 $2.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ Na_2SeO_3 , pH 5.0 的一系列溶液中(加有少量吐

温 -20),吸收 3 h 后取出,按本文 1.2 节所述方法清洗、吸干和烘干备用。

1.6 叶位对水稻叶片吸收亚硒酸盐影响试验

分别取新剪下的第 3、4、5 和 6 片水稻叶片,放入 100 ml 含 $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ CaCl_2 , pH 5.0 的无硒溶液中,30 min 后取出,分别放入 5.0 mmol L^{-1} MES, 0.5 mmol L^{-1} $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 和 $2.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ Na_2SeO_3 , pH 5.0 溶液中(加有少量吐温 -20),吸收 3 h 后取出,按本文 1.2 节所述方法清洗、吸干和烘干备用。

1.7 光照对水稻叶片吸收亚硒酸盐影响试验

分别取 4 片新剪下的水稻叶片,放入 100 ml 含 $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ CaCl_2 , pH 5.0 的无硒溶液中,30 min 后取出,分别在黑暗和光照强度为 $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 光照条件下,在含有 5.0 mmol L^{-1} MES, 0.5 mmol L^{-1} $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 和 $2.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ Na_2SeO_3 , pH 5.5 溶液中(加有少量吐温 -20)吸收 3 h,取出后按本文 1.2 节所述方法清洗、吸干和烘干备用。

1.8 样品分析测定

所用玻璃器皿预先在 10% HCl 中浸泡 24 h 以清除硒污染。将烘干水稻叶片样品称重后放入 100 ml 消化管中,接着向各消化管加入 5 ml 混合酸 ($\text{HNO}_3:\text{HCl} = 4:1$; v/v), 25°C 下放置过夜,然后在 $150 \sim 165^\circ\text{C}$ 下在消化炉中完全消化。冷却后,向每个消化管加入 6 mol L^{-1} HCl 2.5 ml,将消化液加热至 100°C 以还原 SeO_4^{6+} ,直至加热不再冒棕色烟和溶液变清为止。冷却后,用重蒸水将消化液稀释至 25 ml,然后用原子荧光光谱法测定。测定条件: PMT 电压 280 V; HCl 全阴极电流 80 mA; 载气流量 300 ml min^{-1} ; 进样体积 1.0 ml,原子化器高度 7 mm; 原子化器为室温,采样泵速 100 r min^{-1} ,采样时间 18 s; 停泵时间 5 s。分析中所用试剂均为优级纯。茶叶标样 GBW07605 (GSV-4) ($\text{Se } 0.072 \text{ mg kg}^{-1}$) 和空白与被测样品同时消化。Se 回收率在 89% ~ 93%^[8]。

1.9 数据处理

上述所有试验至少重复 3 次。所有数据至少是 3 次重复的平均值。

2 结 果

2.1 不同亚硒酸盐处理水平对水稻叶片吸收硒影响

水稻叶片在 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、7.0 和 $8.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ Na_2SeO_3 的一系列溶液中吸收 3 h 后测

定叶片硒含量。结果显示(图 1),在 $0 \sim 8.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ Na_2SeO_3 的供硒范围内,随着亚硒酸盐处理水平的提高,水稻叶片吸收硒速率直线上升,与溶液中硒水平呈现良好的线形关系($R^2 = 0.97$)。可见,水稻叶片吸收亚硒酸盐与根系不同,未呈现吸收饱和趋势^[8-9]。

2.2 不同亚硒酸盐处理时间对水稻叶片吸收硒影响

水稻叶片在 $2.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ Na_2SeO_3 溶液中分别吸收 1、2、3、4、5、6、7 和 8 h 后测定叶片硒含量。结果显示(图 2),在 8 h 供硒时间范围内,随着硒处理时间延长,水稻叶片吸收硒数量直线上升,与吸收时间呈良好的线形关系($R^2 = 0.97$),没有出现吸收饱和现象。

2.3 不同 pH 对水稻叶片吸收亚硒酸盐影响

水稻叶片分别在 pH 为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0 的一系列 $2.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ Na_2SeO_3 溶液中吸收 3 h 后测定叶片硒含量。pH 对水稻叶片吸收亚硒

酸盐速率呈现较大程度的影响(图 3)。在 pH 3.0~5.0 范围内,随着 pH 升高,亚硒酸盐吸收速率急剧下降。pH 5.0 时叶片吸收速率达到最低点。pH 3.0 和 pH 4.0 时水稻叶片吸收硒速率分别是 pH 5.0 时的 15 倍和 3.9 倍,在 pH 5.0~8.0 范围内,水稻叶片吸收亚硒酸盐速率略有提高。pH 7.0 和 pH 8.0 时水稻叶片吸收硒速率分别是 pH 5.0 时的 1.2 倍和 1.6 倍。pH 对水稻叶片吸收亚硒酸盐的影响与根系相似^[9]。

2.4 不同阴离子对水稻叶片吸收亚硒酸盐影响

不同类型阴离子与亚硒酸盐离子电性相同,可能会不同程度地抑制水稻叶片对亚硒酸盐离子的吸收。图 4 显示了不同类型阴离子对水稻叶片吸收亚硒酸盐速率的影响。与对照相比,水稻叶片吸收亚硒酸盐分别被 H_2PO_4^- 、 HPO_4^{2-} 、 MoO_4^{2-} 和 NO_3^- 抑制了 33%、33%、33% 和 42%,而 Na_2SO_4 对亚硒酸盐吸收影响较小。

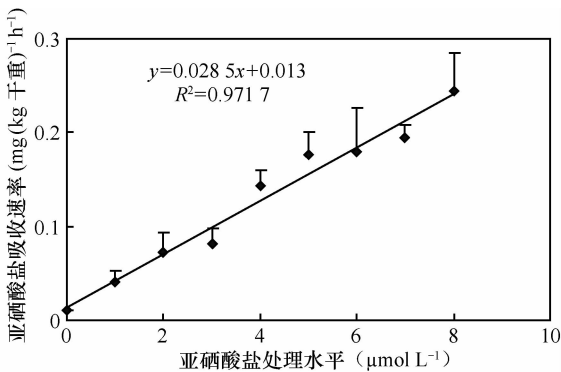


图 1 硒酸盐处理水平对水稻叶片吸收亚硒酸盐速率的影响

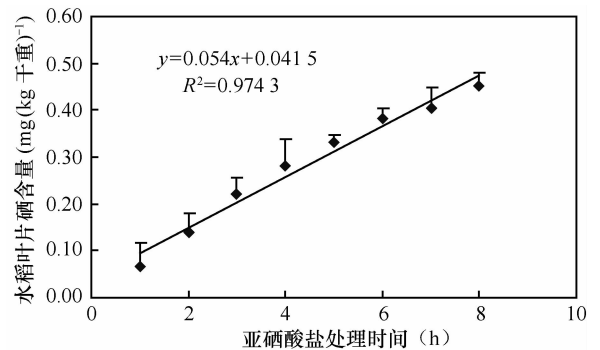


图 2 硒酸盐处理时间对水稻叶片吸收亚硒酸盐影响

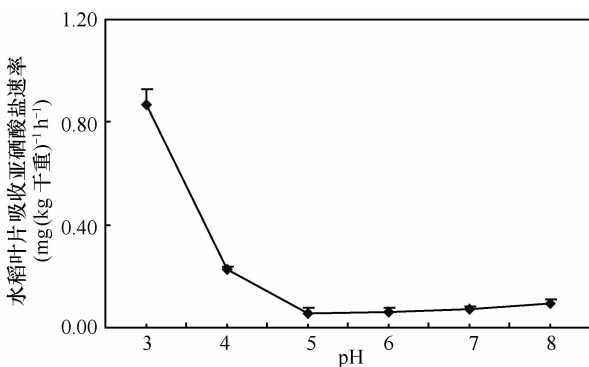


图 3 pH 对水稻叶片吸收亚硒酸盐速率影响

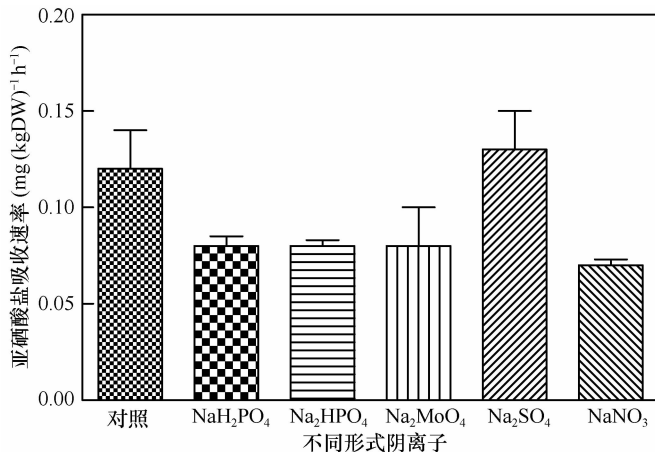


图 4 不同形式阴离子对水稻叶片吸收亚硒酸盐影响

2.5 水稻不同叶位叶片对吸收亚硒酸盐影响

水稻不同叶位叶片由于发育时间和发育程度不同,可能存在叶片吸收亚硒酸盐速率差异。图5显示了水稻第3、4、5和6片叶对亚硒酸盐吸收速率的影响。与第3片叶相比,第4、5和6片叶吸收亚硒酸盐速率分别提高了30%、87%和70%。第3和4片叶为成熟老叶,第5片叶为充分伸展叶片,而第6片叶为正在伸展叶片,可见,充分伸展和正在伸展叶片吸收亚硒酸盐速率高于成熟老叶。

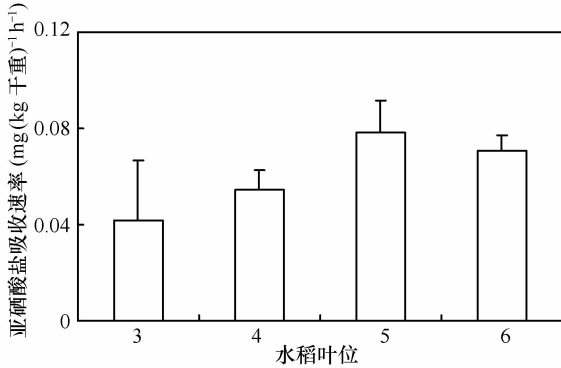


图5 不同水稻叶位叶片对亚硒酸盐吸收速率影响

2.6 温度和光照对水稻叶片吸收亚硒酸盐影响

光照影响叶片气孔开闭,而温度影响气孔开度,此外,温度还能影响叶片角质层透性^[9]。因此,光照和温度能在一定程度上影响到叶片对亚硒酸盐的吸收。图6A、图6B分别显示了光照和温度对亚硒酸盐吸收的影响。与黑暗处理相比,在25℃条

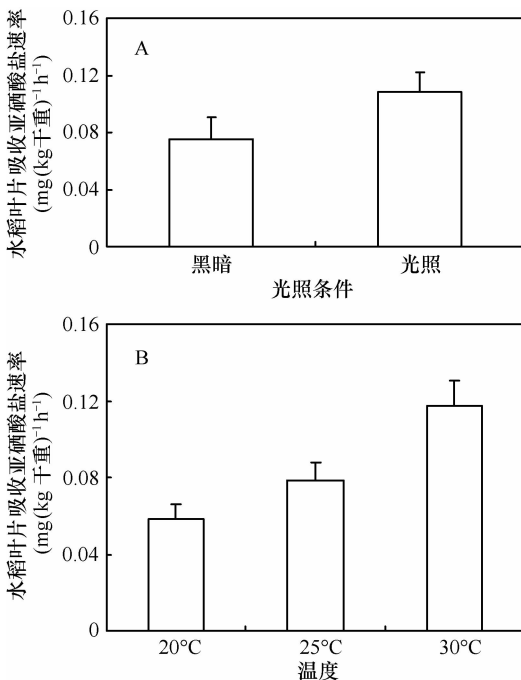


图6 温度和光照对水稻叶片吸收亚硒酸盐影响

件下,光照条件下叶面吸收速率提高了16%。温度对水稻叶片吸收亚硒酸盐影响显示,与对照(25℃)相比,30℃时亚硒酸盐吸收速率提高了49%,20℃时降低了35%。可见温度对亚硒酸盐吸收有较大程度的影响,而光照对水稻叶片吸收亚硒酸盐影响程度较小。

3 讨论

水稻籽粒硒主要靠根系从土壤中吸收、再经根系和叶片转运而累积的。目前,农业生产上常常采用叶面喷施亚硒酸盐的方式提高稻米硒含量。水稻叶表有大量气孔,气孔表面虽有角质层,但无蜡质层覆盖,有利于养分透过^[10]。叶面气孔是养分进入叶内的主要途径之一^[11]。养分透过气孔部位角质层速度大于非气孔部位^[12]。光照是影响气孔开闭的重要因素,光照有利于叶片对矿质营养的吸收^[13]。本研究表明,与黑暗条件下相比,光照时叶面吸收亚硒酸盐速率仅有较小程度的提高。可见只有少量的亚硒酸盐通过气孔部位进入叶内。然而,提高溶液温度,水稻叶片吸收亚硒酸盐速率却出现较大程度的提高。温度对亚硒酸盐吸收的促进程度远远大于光照。温度不仅影响气孔开度,还能刺激叶片角质层透性的提高^[14]。可见,温度对亚硒酸盐吸收的促进作用在很大程度上不是依赖气孔开度的提高,而在于提高了角质层透性。因此,提高温度促进了角质层透性的提高,从而促进了较多的亚硒酸盐从气孔以外的其他部位进入水稻叶内。

质外连丝是原生质体表面透过细胞壁的非原生质通道^[13]。通常情况下,化学物质主要通过质外连丝进入叶内。由于叶片下表面质外连丝密度高,因此与叶片上表面相比具有较高的吸收效率^[15]。上述研究表明,随着外界溶液中硒浓度提高和吸收时间延长,叶片吸收亚硒酸盐持续增加,亚硒酸盐吸收与溶液硒处理水平和吸收时间始终为一条直线,没有呈现吸收饱和趋势。说明在pH 5.0条件下水稻叶片是以被动方式吸收溶液中亚硒酸盐的。质外连丝参与叶片对外源物质的吸收,如无机离子等通过质外连丝被运输到细胞内,但并未见以主动方式进入叶内的证据^[14]。因此,推测pH 5.0条件下亚硒酸盐是以被动方式通过质外连丝进入叶表细胞的。

pH是影响水稻叶片吸收亚硒酸盐的重要因

素。在较低 pH 条件下,水稻叶片具有较高的亚硒酸盐吸收速率,然而随着溶液 pH 升高,吸收速率大幅度下降。这与 pH 影响水稻根系吸收亚硒酸盐的变化趋势是一致的^[9]。pH 影响亚硒酸盐在溶液中的存在形式。在低 pH 条件下,溶液中存在一定数量的 H_2SeO_3 ,而在较高 pH 条件下,溶液中亚硒酸盐主要以 HSeO_3^- 或 SeO_3^{2-} 形式存在^[8-9]。可见,pH 影响亚硒酸盐吸收很可能与其在溶液中的存在形式有关。即在较低 pH 条件下,亚硒酸盐主要以 H_2SeO_3 形式进入水稻叶片表皮细胞内,而在较高 pH 条件下,亚硒酸盐主要以 HSeO_3^- 或 SeO_3^{2-} 形式进入水稻叶内。已有研究表明,在 pH 3.0 条件下,亚硒酸盐主要以 H_2SeO_3 形式通过水通道进入水稻根内^[7-8]。叶片细胞和根细胞质膜具有相同的运输机制^[16], H_2SeO_3 形式亚硒酸盐也有可能通过细胞膜上的水通道进入表皮细胞。此外,在叶片表皮细胞质膜的磷脂双分子层上,会瞬时形成一些亲水性小孔,这种小孔能加速极性分子的跨膜运输^[17]。因此, H_2SeO_3 形式亚硒酸盐也有可能通过这些亲水性小孔进入细胞质中。

不同种类阴离子明显抑制水稻叶片对亚硒酸盐的吸收。可见,与根系相似,在水稻叶片中同样存在离子吸收过程中的抑制作用^[18]。这些阴离子的抑制作用可能因同性离子相斥引起的,也可能与这些阴离子和亚硒酸盐在吸收过程中存在着竞争性吸附位点有关。研究还发现,成熟叶片吸收亚硒酸盐速率显著低于新叶,推测主要与水稻幼叶具有较多的质外连丝有关以及与叶片不同发育阶段表皮气孔和角质层透性有关。

因此,根据水稻叶片吸收亚硒酸盐特点,在农业生产中,应采取合理的措施以提高亚硒酸盐的喷施效率,如选择气温较高的傍晚喷施,这样可以大大提高叶面吸收速率和延长叶面吸收时间;适当降低溶液 pH,较大程度地提高水稻叶片吸收速率;避免溶液中加入磷、铜、氮形式的阴离子,以消除这些离子对叶片吸收亚硒酸盐的不利影响。

参考文献

[1] Roetruck J T, Pope A L. Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 1973, 179 (73): 588—

590

- [2] Stadman T C. Selenium-dependent enzymes. *Annual Reviews Biochemistry*, 1980, 49: 93—110
- [3] Rayman M P. Food-chain selenium and human health: Emphasis on intake. *British Journal of Nutrition*, 2008, 100: 254—268
- [4] Rayman M P, Goenaga Infante H, Sargent M. Food-chain selenium and human health: Spotlight on speciation. *British Journal of Nutrition*, 2008, 100: 238—253
- [5] Zhu Y G, Pilon-Smits E A H, Zhao F J, et al. Selenium in higher plants: Understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation. *Trends in Plant Science*, 2009, 14 (8): 436—442
- [6] 周鑫斌, 施卫明, 杨林章. 叶面喷硒对水稻籽粒硒富集及分布的影响. *土壤学报*, 2007, 44(1): 73—77
- [7] Zhang L H., Shi W M, Wang X C. Difference in selenium accumulation in shoots of two rice cultivars. *Pedosphere*, 2006, 16 (5): 646—653.
- [8] Zhang L H, Shi W M, Wang X C. Difference in selenite absorption between high- and low-selenium rice cultivars and its mechanism. *Plant and Soil*, 2006, 282(1/2): 183—193
- [9] 张联合, 李友军, 郁飞燕, 等. pH 对水稻离体根系吸收亚硒酸盐生理机制的影响. *土壤学报*, 2010, 47(3): 523—528
- [10] 李燕婷, 李秀英, 肖艳, 等. 叶面肥的营养机理及应用研究进展. *中国农业科学*, 2009, 42(1): 162—172
- [11] Leece D R. Foliar absorption in *Prunus domestica* L. I. Nature and development of the surface wax barrier. *Australia Journal of Plant Physiology*, 1978, 5: 749—766
- [12] Schonherr J, Bukovac M J. Ion exchange properties of isolated tomato fruit cuticular membrane: Exchange capacity, nature of fixed charges and cation selectivity. *Planta*, 1970, 109: 73—93
- [13] Shim K, Titus J S, Splittstoesser W E. The utilization of post harvest urea sprays by senescing apple leaves. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 1972, 97: 592—596
- [14] Riederer M. Thermodynamics of the water permeability of plant cuticles: Characterization of the polar pathway. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(12): 2937—2942
- [15] Bondada B R, Tu S, Ma L Q. Absorption of frond-applied arsenic by the arsenic hyperaccumulating fern *Pteris vittata* L. , *Science of the Total Environment*, 2004, 332: 61—70
- [16] Wójcik P. Uptake of mineral nutrients from foliar fertilization. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 2004, 12: 201—218.
- [17] Leontiadou H, Mark A E, Marrink S J. Ion transport across transmembrane pores. *Biophysical Journal*, 2007, 92: 4209—4215
- [18] 张联合, 施卫明, 王校常. 不同因素对水稻离体根吸收四价硒影响. *土壤*, 2006, 38(4): 417—421