

硅/砷比对水稻剑叶和根系中砷亚细胞分布的影响

孙宇¹, 张敏¹, 薛培英^{1,2}, 郑坤¹, 王建广¹, 刘文菊^{1,2,*}

¹河北农业大学资源与环境科学学院, 河北保定071000; ²河北省农田生态环境重点实验室, 河北保定071000

摘要: 以水稻品种'Italica carolina'为试验材料, 分别生长在含有As^{III}和As^V介质中3 d, 采用营养液培养方法和亚细胞组分分级技术, 研究了不同硅/砷比对水稻剑叶和根中砷亚细胞分布特征的影响。结果显示, 水稻无论生长在As^{III}或As^V条件下, 根系和剑叶亚细胞不同组分中砷含量顺序为: 胞液>细胞壁>细胞器。从水稻根中砷的亚细胞分布来看, As^{III}培养条件下加硅明显降低了根系砷在亚细胞组分中的分布, 且硅/砷比10:1时根细胞器和胞液中砷的含量最低; 而在As^V培养条件下, 仅硅/砷比200:1处理显著降低了根系胞液组分中的砷含量($P<0.05$)。从水稻剑叶中砷的亚细胞分布来看, As^{III}培养条件下硅/砷比10:1显著降低了胞液和细胞壁中的砷含量($P<0.05$)且达到了最低值, 而细胞器中砷含量在硅/砷比1:1时达到最低; As^V培养条件下, 不同硅/砷比并没有明显影响砷在剑叶中的亚细胞分布。

关键词: 水稻; 砷; 亚细胞分布; 硅/砷比

水稻是硅的超积累植物, 其吸收硅的能力很强, 体内SiO₂含量占地上部干物重的10%~15% (龚金龙等2012)。一般而言, 水稻生长在淹水条件下, 其土壤溶液中砷的主要存在形态为As^{III} (王钊2013), 在pH 2~9的情况下, 以中性分子存在的As^{III}其化学性质与硅酸相似, 可通过硅酸的转运水通道蛋白进入根系, 进而向维管束迁移 (Ma等2008)。砷进入植物体后在根细胞的不同部位分布, 细胞对元素的区域化是生物体隔离、积累和耐受重金属的一种重要机制, 其中重金属的亚细胞分布可以表征其细胞的区隔化, 因此亚细胞分布可为植物对重金属的解毒和生物富集机制提供必要信息 (Liu和Kottke 2004)。现有研究植物重金属亚细胞分布的方法较多, 如差速离心法、扫描电镜-能谱法、透射电镜-能谱法、同步辐射X射线荧光法或精细结构谱、荧光探针染色法等 (胡鹏杰等2014)。国内外对砷在超富集植物-蜈蚣草中砷的亚细胞分布展开了大量研究, 砷主要以As^{III}的形式富集在蜈蚣草的羽叶中 (Lombi等2002; Wang等2002; Zhang等2002; Pickering等2006), Lombi等 (2002) 和 Pickering等 (2006) 的研究发现砷主要分布在蜈蚣草羽叶的液泡中, 之后的研究证实液泡膜上存在砷的转运通道PvACR3使砷从介质中被转运到液泡中, 且发挥其解毒作用 (Indriolo等2010)。液泡的区隔化作用可能是蜈蚣草能够超富集砷的关键因素之一 (申红玲等2014)。近年来, 砷在非超富集植物中亚细胞分布也取得了较大进展, Raab等 (2005) 研究显示砷在非超富集植物中主要以PCs络合态储存在液泡中。Moore等 (2011) 采用NanoSIMS

首次证实非超富集植物水稻中As主要富集在根细胞的液泡。无论是超富集植物还是非超富集植物, 液泡对砷的隔离作用是均是植物的一种解毒机制, 可以减少砷的离子浓度和有效性, 减弱其毒性 (Petra等2006; Zhao等2009)。然而与砷在液泡中的分布不同, 硅主要分布在水稻的细胞壁中 (Moore等2011)。而硅是否能通过水稻中砷亚细胞分布来影响其对砷的累积量是当前迫切需要研究的内容。

我国土壤有效硅含量变化范围为15.7~725.5 mg·kg⁻¹, 且稻田土壤的有效硅含量低于旱地 (马朝红等2009)。土壤中砷的环境背景值为11.2 mg·kg⁻¹, 稻田砷含量由于遭受到不同程度的人为砷污染而远远超出了砷的背景值 (廖晓勇等2003), 部分污染稻田砷含量为300~800 mg·kg⁻¹ (Liao等2005; 陈同斌1995; 王莹2011)。已有研究表明, 向营养液和土壤中施加硅可显著抑制水稻对砷的吸收和转运 (Guo等2005; Liu等2014; Li等2009), 且土壤中硅的有效性与水稻中砷的累积量呈显著的负相关 (Bogdan和Schenk 2008; Khan等2010)。生长介质中不同硅/砷比显著影响了水稻对砷的吸收和转运 (孙宇等2015), 土壤溶液中Si/As在100:1左右时显著降低了水稻秸秆和籽粒中砷的累积量 (Liu等2014; Li等2009), 当Si/As低于10:1时, 外源硅显著降低了秸秆中砷的累积量, 虽然籽粒中砷累积量有所降低,

收稿 2016-03-21 修定 2016-05-30

资助 国家自然科学基金(41471398)和河北省高等学校创新团队领军人才培养计划(LJRC016)。

* 通讯作者(E-mail: liuwj@hebau.edu.cn)。

但差异不显著(王莹2011; 王钊2013)。基于此, 本文以水稻品种‘*Italica carolina*’为研究对象, 通过生物模拟方法研究在生长介质中供应As^{III}和As^V的条件下, 不同硅/砷比对水稻根系及剑叶(对籽粒砷累积贡献较大器官: 根系和剑叶)亚细胞组分中砷含量的影响。试验采用亚细胞分级方法分离亚细胞组分, 通过对硅、砷相互作用的深入研究, 揭示硅/砷比对水稻中砷的亚细胞分布特征影响及降低砷吸收的可能机制, 为合理施用硅肥降低农作物可食部位砷的累积提供理论依据。

材料与方 法

1 植物培养

供试水稻(*Oryza sativa* L.)品种为‘*Italica carolina*’(来源于英国洛桑研究所)。种子用30% H₂O₂消毒15 min, 然后用自来水、蒸馏水和超纯水逐一冲洗3~5次, 洗净为止。之后在湿润且酸泡过的干净石英砂中催芽并培育21 d, 长至3叶后移至PVC罐中进行营养液培养。

供试营养液采用1/2Kimura水稻专用营养液配方: 5 mmol·L⁻¹ NH₄NO₃、2 mmol·L⁻¹ K₂SO₄、4 mmol·L⁻¹ CaCl₂、1.5 mmol·L⁻¹ MgSO₄·7H₂O、1.3 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄、10 μmol·L⁻¹ H₃BO₄、1.0 μmol·L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O、50 μmol·L⁻¹ Fe^{II}-EDTA、1.0 μmol·L⁻¹ CuSO₄·5H₂O、5.0 μmol·L⁻¹ MnSO₄·H₂O、0.5 μmol·L⁻¹ Na₂MoO₄·2H₂O、0.2 μmol·L⁻¹ CoSO₄·7H₂O。营养液每周换2次, 用0.18 mol·L⁻¹ KOH和4.02 mol·L⁻¹ HCl将溶液的pH值调至5.5。

2 试验处理

本研究设As^{III}和As^V两个砷形态的培养条件, 砷浓度为10 μmol·L⁻¹。两种形态的砷分别由NaAsO₂和Na₃AsO₄·12H₂O提供。硅/砷比设为1:1、10:1、200:1, 另设不施硅对照(CK)。硅以K₂SiO₃的形式加入, 水稻在营养液中预培养至抽穗期开始进行不同硅/砷比的处理。选择生长均匀的水稻植株, 将其移栽于配置好的含有不同砷、硅浓度的营养液中处理3 d。用海绵将水稻固定在100 mL离心管上, 每管50 mL处理液, 在处理的3 d内, 每天补充20 mL左右相应硅/砷处理液, 以补充因叶片蒸腾和根系吸收而减少的溶液。每管1株, 每个处理4次重复。生长期间每天将处理的水稻植株随机摆放。

植物光照培养箱保持14/10 h光照/黑暗循环, 温度维持在25~28°C, 光照强度约280 μmol·m⁻²·s⁻¹。

3 水稻剑叶与根系的亚细胞组分分离

将采集的水稻剑叶和根用自来水冲洗干净, 再用蒸馏水冲洗3次, 最后用超纯水淋洗, 淋洗过程中保证根系和剑叶组织的完整性, 擦干后称取0.2500 g鲜样, 用铝箔纸包好编号后置于液氮中冷冻。参照Hans (1980)及Pathore等(1972)建立的高等植物亚细胞分级方法, 采用4°C预冷的匀浆液将植物样在瓷研钵中冷冻状态下研磨。匀浆液组成为: 250 mmol·L⁻¹蔗糖、50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl缓冲液(pH 7.8)、1 mmol·L⁻¹二硫赤藓糖醇。匀浆液的pH为7.8, 体积为4.5 mL。具体步骤如下: 将研磨好的匀浆液及植物组织的混合液转入5 mL离心管中, 在4°C的高速冷冻离心机中于500×g离心10 min, 下部沉淀、底层碎片为细胞壁组分, 将上清液全部转入另一个5 mL离心管中, 在20 000×g离心45 min, 底层碎片为细胞器组分, 上层清液为胞液组分(周卫等1999)。所有分离过程温度均要控制在4°C。

4 样品分析与数据处理

4.1 样品分析

将分离提取的亚细胞组分进行高压密闭消解。吸取2 mL胞液组分, 置于聚四氟乙烯内胆中, 添加3 mL优级纯浓硝酸放置过夜, 而细胞壁和细胞器组分则全部转移至聚四氟乙烯内胆中, 添加5 mL优级纯浓硝酸放置过夜, 次日装入外胆后并放入不锈钢外套中, 旋紧密封, 置于烘箱中消解。具体的消解程序如下: 升温到100°C, 在此温度下保持1 h后继续升温至140°C, 保持4 h, 关闭烘箱使其自然冷却至室温。闷罐冷却后取出内胆放置在加热板上140°C赶酸至剩于约1 mL左右液体, 冷却, 用转移至10 mL比色管中超纯水定容待测。每批加标准物质(GBW07603灌木枝叶)和空白。空白和标准样品进行以上同样操作, 以确保消煮前处理及测定的准确度。消解液和营养液中的As用原子荧光分光光度计(AFS 2202E, 北京海光分析仪器公司)测定(王莹2011)。

4.2 数据处理

采用Microsoft Office Excel 2007和数据分析软件SPSS13.0对试验数据进行相关性分析、显著性检验以及多重比较。

实验结果

1 硅/砷比对水稻根系中砷亚细胞分布特征的影响

1.1 硅/砷比对水稻根系亚细胞组分中砷含量的影响

水稻从介质中吸收不同价态的砷, 其中一部分砷积累在水稻根中, 另一部分则由根转运至地上部, 在此首先探讨不同硅/砷比对水稻根系亚细胞组分中砷分布的影响。

首先分析水稻在含有As^{III}培养液中不同硅/砷比对根亚细胞组分中砷含量的影响(表1)。As^{III}培养的水稻, 根系胞液中砷含量在1.3~4.6 mg·kg⁻¹之间, 细胞壁中砷含量在0.4~1.0 mg·kg⁻¹之间, 细胞器砷含量在0.1~0.4 mg·kg⁻¹范围内, 胞液中砷含量明显高于细胞壁和细胞器, 其高低顺序为: 胞液>细胞壁>细胞器。从胞液组分的砷含量来看, 添加硅可显著降低水稻胞液对砷的累积作用, 但不同硅/砷比处理之间砷含量没有显著变化。随着硅砷比的增加, 硅/砷比1:1、10:1、200:1处理的水稻根胞液中砷含量分别显著低于对照约68%、74%和69%; 其次, 细胞壁中砷含量随着硅/砷比的增加与胞液中变化趋势大体相同, 硅/砷比1:1、10:1、200:1时细胞壁中砷含量均显著低于对照约60%、57%和60%, 且不同硅/砷比处理下砷含量没有显著差异; 细胞器砷含量水平明显低于胞液与细胞壁, 随着硅砷比的增加, 硅/砷比1:1、10:1、200:1分别低于对照约28%、60%和43%, 硅/砷比10:1时细胞器中砷含量显著低于1:1约45%, 而与硅/砷比200:1相比则没有显著差异。即不同硅/砷比之间仅当硅/砷比10:1时细胞器中砷含量显著降低。

在As^V培养条件下, 根胞液中砷含量在6.9~18.3 mg·kg⁻¹之间, 细胞壁砷含量范围是1.9~2.5 mg·kg⁻¹, 细胞器砷含量水平更少, 仅在0.3~0.6 mg·kg⁻¹之间。与As^{III}培养相比, As^V培养条件下水稻根胞液砷含量大约为As^{III}的5倍左右, 细胞壁与细胞器砷含量比As^{III}培养低2倍左右。亚细胞组分砷含量的顺序为: 胞液>细胞壁>细胞器。由表1可知, 胞液砷含量随着硅/砷比的增加逐渐降低, 在硅/砷比1:1与10:1时胞液砷含量与对照相比分别下降3%和18%, 下降幅度较小, 没有显著变化, 当硅/砷比增加至200:1时, 与对照相比砷含量显著下降62%, 且分别显著低于硅/砷比1:1与10:1约61%和54%; 与As^{III}培养不同的是, 加硅对于As^V培养的水稻细胞壁砷含量没有显著影响, 硅/砷比200:1时细胞壁砷含量分别低于硅/砷比1:1与10:1约17%和22%, 且均不显著; 与As^{III}培养情况相似, As^V培养条件下细胞器砷含量水平依然很低, 不同的是随着硅/砷比的增加细胞器砷含量先增加后降低, 且增加和降低水平显著, 细胞器砷含量在对照处理中达到最低, 约为0.3 mg·kg⁻¹, 细胞器砷含量在硅/砷比1:1时达到最高, 显著高于对照约96%, 在硅/砷比10:1与200:1时细胞器砷含量分别比对照提高27%和18%, 而与硅/砷比1:1相比, 分别显著降低了36%和40%。

总之, 水稻无论生长在As^{III}或As^V条件下, 根中砷的亚细胞分布特征为: 胞液>细胞壁>细胞器。就As^{III}培养条件而言, 加硅明显降低了根中砷的亚细胞分布, 且硅/砷比10:1时根细胞器和胞液中砷的含量最低, 其他硅/砷比处理对根中砷的亚细胞分布没有显著影响。而在As^V培养条件下, 只有硅/

表1 水稻根系中砷的亚细胞分布

Table 1 Subcellular distribution of As in rice roots

培养条件	Si/As	As含量/mg·kg ⁻¹		
		胞液	细胞壁	细胞器
As ^{III}	CK	4.5927±0.0012 ^A	1.0602±0.0013 ^A	0.3549±0.0293 ^A
	1:1	1.4567±0.2723 ^B	0.4279±0.1384 ^B	0.2539±0.0354 ^B
	10:1	1.2147±0.2280 ^B	0.4533±0.0798 ^B	0.1398±0.0207 ^C
	200:1	1.4059±0.3986 ^B	0.4265±0.0564 ^B	0.1991±0.0216 ^{BC}
As ^V	CK	18.3465±0.3611 ^A	2.4467±0.3552 ^A	0.3112±0.0220 ^C
	1:1	17.7999±2.5188 ^A	2.3213±0.2662 ^A	0.6115±0.0092 ^A
	10:1	15.0593±1.8363 ^A	2.4811±0.3303 ^A	0.3940±0.0013 ^B
	200:1	6.9039±1.8341 ^B	1.9291±0.3939 ^A	0.3678±0.0081 ^B

不同大写字母表示同种砷形态下不同硅/砷比处理亚细胞组分中砷浓度之间差异显著($P<0.05$), 以下相同。

砷比200:1处理显著降低了根系胞液和细胞器组分中的砷含量($P<0.05$)。

1.2 硅/砷比对水稻根系中砷亚细胞分布的影响

图1-A和B分别表示在 As^{III} 与 As^V 培养条件下,

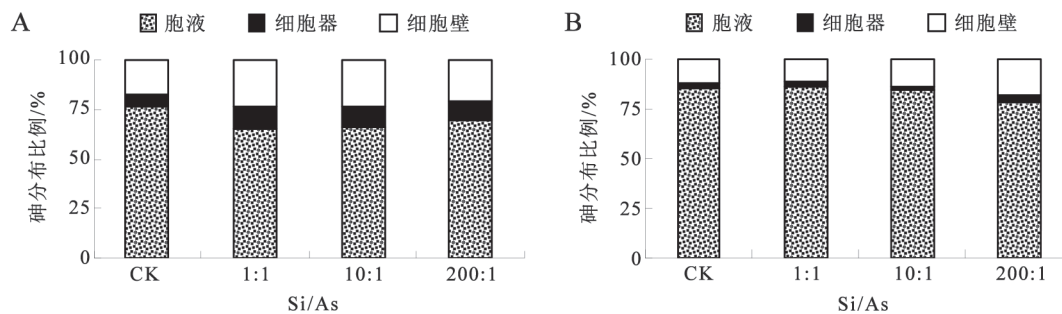


图1 As^{III} (A)和 As^V (B)培养条件下水稻根系中砷在亚细胞组分中的分布比例

Fig.1 The percentage of As in different subcellular fractions of rice root in As^{III} (A) and As^V (B) treatment

而细胞器和细胞壁中砷的分配比例仅为6%~11%和18%~24%,由此可见,砷亚细胞分布特征为:胞液>细胞壁>细胞器,液泡中固定了大部分的砷。在对照中胞液中砷的分布比例为76%,细胞器与细胞壁两者之和为24%;当硅/砷比为1:1和10:1时,胞液中砷的比例下降,虽然细胞壁与细胞器中砷的分布比例增加,但由于硅抑制了根胞液组分对砷的富集,因此使得根中砷含量降低;而当硅/砷比200:1时胞液砷相对分布比例恢复到70%,因此在硅/砷比200:1时,根中砷含量略高于硅/砷比10:1。

从 As^V 培养的水稻情况来看,胞液中砷的相对分布比例进一步增大,数据显示胞液砷的分布比例为78%~86%,而细胞器和细胞壁中砷的分配比例仅为2%~4%和11%~18%。在对照中胞液中砷的分布比例为85%,细胞器与细胞壁两者之和为15%,硅/砷比1:1和10:1时,胞液中砷的相对比例与对照相比没有显著变化;当硅/砷比200:1时胞液中砷的相对比例下降到78%,细胞器中砷的相对比例达到了4%,细胞壁中砷的相对比例达到最大值约17%。对于 As^V 培养的水稻而言,仅硅/砷比200:1时抑制了胞液对砷的累积。

2 硅/砷比对水稻剑叶中砷亚细胞分布特征的影响

2.1 硅/砷比对水稻剑叶亚细胞组分中砷含量的影响

As^{III} 培养条件的水稻剑叶,胞液中砷含量在0.08~0.13 $mg \cdot kg^{-1}$ 之间,细胞壁中砷含量在0.04~0.06 $mg \cdot kg^{-1}$ 之间,细胞器中砷含量在0.02 $mg \cdot kg^{-1}$

左右,所以从砷含量水平来看三种组分砷含量顺序为:胞液>细胞壁>细胞器。从数值上可发现,水稻剑叶砷含量明显少于根部,因此砷大部分被固定在根部,只有小部分被转运至地上部。由表2可知,添加硅显著降低了剑叶胞液中砷含量,随着硅/砷比的增加胞液中砷含量逐渐降低,硅/砷比1:1、10:1和200:1时胞液中砷含量比对照分别显著下降了22%、37%和33%,且硅/砷比10:1和200:1时胞液中砷含量分别显著低于硅/砷比1:1约18%和14%;细胞壁中砷含量随着硅/砷比的增加变化趋势与胞液基本一致,在硅/砷比10:1和200:1时细胞壁中砷含量显著降低,分别比硅/砷比1:1时显著降低27%和15%;相比之下,细胞器中砷含量变化趋势与两者不同,硅/砷比1:1时细胞器中砷含量显著低于对照,但三个硅/砷比处理间细胞器中砷含量没有显著差异。

As^V 培养条件下,随着硅/砷比增加,胞液中砷含量变化的趋势是先降低后上升,但不同硅/砷比处理间砷含量没有显著差异;细胞壁、细胞器在不同硅/砷比处理下砷含量略有下降,但没有显著差异,即 As^V 培养的水稻,不同的硅/砷比对水稻剑叶细胞壁、细胞器中砷含量没有显著影响。

总之,水稻无论生长在 As^{III} 或 As^V 条件下,剑叶中砷的亚细胞分布特征为:胞液>细胞壁>细胞器。 As^{III} 培养条件下硅/砷比10:1显著降低了胞液和细胞壁中的砷含量($P<0.05$),且达到了最低值,

表2 水稻剑叶中砷的亚细胞分布
Table 2 Subcellular distribution of As in rice flag leaves

培养条件	Si/As	As含量/mg·kg ⁻¹		
		胞液	细胞壁	细胞器
As ^{III}	CK	0.1284±0.0025 ^A	0.0561±0.0018 ^A	0.0252±0.0013 ^A
	1:1	0.1000±0.0009 ^B	0.0554±0.0001 ^A	0.0220±0.0007 ^B
	10:1	0.0813±0.0019 ^C	0.0405±0.0027 ^B	0.0223±0.0002 ^{AB}
	200:1	0.0857±0.0014 ^C	0.0470±0.0042 ^{AB}	0.0228±0.0007 ^{AB}
As ^V	CK	0.2329±0.0206 ^A	0.1234±0.0207 ^A	0.0218±0.0008 ^A
	1:1	0.1818±0.0019 ^A	0.0983±0.0067 ^A	0.0218±0.0007 ^A
	10:1	0.1828±0.0076 ^A	0.1090±0.0036 ^A	0.0225±0.0010 ^A
	200:1	0.1921±0.0180 ^A	0.1176±0.0147 ^A	0.0228±0.0003 ^A

而细胞器中砷含量在硅/砷比1:1时达到最低。As^V培养条件下,不同硅/砷比并没有明显影响砷在剑叶中的亚细胞分布。

2.2 硅/砷比对水稻剑叶中砷亚细胞分布的影响

图2-A和B分别表示在As^{III}与As^V培养条件下,不同硅/砷比下剑叶各亚细胞组分砷含量的相对分布比例。数据显示,在As^{III}培养条件下,砷相对比例最大的是胞液约为52%~61%,而细胞器和细胞壁中砷的分配比例为12%~16%和27%~33%,由此可见,砷亚细胞分布特征为:胞液>细胞壁>细胞器,剑叶的胞液仍然是积累砷的关键部位。对照中胞液砷相对分布比例为61%,细胞壁与细胞器之和为

39%,随着硅/砷比的增大,胞液中砷的相对比例逐渐下降,在硅/砷比200:1时,胞液的砷相对分布比例达到最低,约为52%,而不同硅/砷比处理对水稻剑叶的细胞壁和细胞器中砷的相对比例均没有显著影响。

在As^V培养条件下,砷相对分布比例最大的是胞液约为57%~63%,而细胞器和细胞壁中砷的分配比例为6%~7%和31%~35%,因此,砷亚细胞分布特征为:胞液>细胞壁>细胞器。不同硅/砷比处理对水稻剑叶的不同亚细胞组分中砷的相对分布比例没有显著影响,在硅/砷比10:1时胞液中砷相对分布比例达到最低,约为57%。

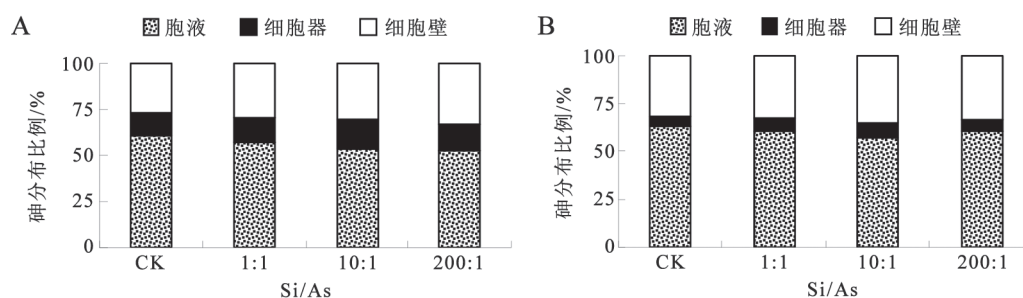


图2 As^{III} (A)和As^V (B)培养条件下水稻剑叶中砷在亚细胞组分中的分布比例

Fig.2 The percentage of As in different subcellular fractions of rice flag leaves in As^{III} (A) and As^V (B) treatment

讨 论

在本研究中,As在水稻根系与剑叶亚细胞组分中的平均分布比例为:胞液>细胞壁>细胞器,硅/砷比对As的亚细胞分布没有显著影响。前人在研究Cd、As等元素在不同植物亚细胞分布时发现: Cd在小麦根亚细胞中的分布比例依次为胞液>细

胞残渣>细胞器>微粒体(李丹丹等2010); Cd在小白菜亚细胞中的分布比例为胞液>细胞壁>细胞器(宋阿琳等2011); As在蜈蚣草亚细胞中的分布比例为胞液>细胞壁>细胞器(陈同斌等2005),说明胞液(大部分成分为液泡的胞液)在植物体解毒的过程中起着重要的作用。通过比较重金属元素在超富集植物与非超富集植物亚细胞分布情况发现,胞

液是富集这些元素的关键部位(赵方杰2014)。前期研究表明, As^{III} 培养条件下硅/砷比10:1显著抑制了水稻对砷的吸收(孙宇等2015)。本研究发现, As^{III} 培养条件下, 当硅/砷比10:1时根和剑叶胞液中的砷含量显著降低, 说明胞液对砷的累积可能在一定程度上决定着水稻体内砷含量。因此, 通过控制土壤溶液中的硅/砷比来抑制水稻根系胞液组分对砷的富集, 可以有效降低水稻对砷的吸收。而 As^{V} 培养条件下, 硅/砷比200:1时根系胞液中砷含量显著降低, 但不同硅/砷比没有显著影响水稻剑叶中砷含量, 可能是由于 As^{V} 与磷竞争相同的转运系统被植物根系吸收(Rosen 2002), 因此硅并没有影响水稻对 As^{V} 的吸收和转运。 As^{V} 被水稻根系吸收后, 一部分直接向地上部转运, 这是导致剑叶中砷含量不受硅/砷比影响的原因之一; 另一部分被砷酸盐还原酶AR (arsenate reductase)快速还原成 As^{III} 并外排到介质中, 因此在短期培养内营养液中剩余的硅与外排的 As^{III} 形成固定的硅/砷比, 并降低了水稻根系胞液对砷的吸收和累积。

植物细胞壁是阻止重金属进入细胞的一道重要屏障, 细胞壁对金属离子的解毒机制分为两种, 一种是重金属在进入细胞前首先吸附在细胞壁上, 当细胞壁达到饱和时才会进入细胞膜(杨居荣和黄翌1994), 称为细胞壁的“区隔机制”; 另外一种则是在高浓度重金属离子胁迫下, 植物通过改变细胞壁中各种化学成分的含量, 从而改变细胞壁对该离子的结合量, 达到解毒目的, 称为细胞壁的“适应机制”(张旭红等2008)。植物体内的硅大多以某种形状的结构体在细胞壁、细胞间及某些细胞内沉淀(高超等2015), 植物对重金属胁迫的耐性之一, 表现为重金属在植物体内以结合到细胞壁、进入液泡、与有机酸或蛋白质络合等形式存在(Ni和Wei 2003)。在本研究中, 加硅后仅 As^{III} 培养条件下细胞壁中砷含量显著降低, 由此推断, 加硅后细胞壁中砷含量降低可能是由于水稻根系细胞壁组分沉淀了大量的硅, 由于硅和砷可能共用相同的载体蛋白, 因此导致硅酸可以竞争性地抑制 As^{III} 的吸收(段桂兰等2007), 降低细胞壁砷含量。

细胞器是植物细胞生命活动的主要场所, 砷在该部位积累量越低, 细胞正常代谢受到砷的破坏就越少。在本研究中, 无论根系还是剑叶, 不加

硅时 As^{III} 培养条件下的水稻细胞器中砷含量略高于 As^{V} 培养条件, 而加硅后 As^{III} 培养条件的水稻细胞器中砷含量均低于 As^{V} 培养条件, 相比之下可知暴露于 As^{III} 中的水稻之所以容易受到砷的毒害是由于砷更多的累积在细胞器中, 破坏细胞的正常代谢, 因此, 通过控制施硅量来降低砷对水稻的毒害作用也具有重要意义。在本研究中, As^{III} 培养条件下, 硅/砷比10:1时显著降低了水稻根的细胞器中砷含量, 从维持细胞生命活性的角度来说, 硅/砷比10:1即为最佳施硅量。

前期试验通过对不同砷污染程度的土壤中添加一定的硅研究了土壤溶液中硅/砷比对水稻各器官砷含量的影响。研究发现土壤溶液中硅/砷比为10:1时水稻茎叶、谷壳和籽粒中砷含量均显著下降36%~63%, 而在自然土和轻度污染土中由于土壤砷含量较低, 硅/砷比为200:1~600:1时, 各个部位低于对照约15%~37%。因此在砷污染土中, 硅/砷比10:1时水稻中砷含量降低幅度更大, 效果明显好于大量施硅。

水稻无论生长在 As^{III} 或 As^{V} 条件下, 根系和剑叶中砷的亚细胞分布特征为: 胞液>细胞壁>细胞器。水稻中砷的亚细胞分布在不同砷形态处理下硅/砷比对其影响不同: 在 As^{III} 培养条件下, 加硅明显降低了根系中砷的亚细胞分布, 且硅/砷比10:1时根细胞器和胞液中砷的含量显著降低; 剑叶胞液和细胞壁中的砷含量也在硅/砷比10:1时显著降低($P<0.05$), 且达到了最低值, 而细胞器中砷含量在硅/砷比1:1时达到最低。在 As^{V} 培养条件下, 仅硅/砷比200:1时显著降低了根胞液和细胞器组分中的砷含量($P<0.05$), 不同硅/砷比并没有明显影响砷在剑叶中的亚细胞分布。

参考文献

- Bleeker PM, Hakvoort HW, Blik M, Souer E, Schat H (2006). Enhanced arsenate reduction by a CDC25-like tyrosine phosphatase explains increased phytochelatin accumulation in arsenate-tolerant *Holcus lanatus*. *Plant J*, 45: 917–929
- Bogdan K, Schenk MK (2008). Arsenic in rice (*Oryza sativa* L.) related to dynamics of arsenic and silicic acid in paddy soils. *Environ Sci Technol*, 42 (21): 7885–7890
- Chen TB (1995). Effect of application of pig manure on growth and yield of rice (*Oryza sativa* L.) grown on arsenic paddy soil. *Eco Agric Res*, 3 (3): 17–20 (in Chinese with English abstract) [陈同斌(1995). 砷毒田中有机肥对水稻生长和产量的影响. 生态农

- 业研究, 3 (3): 17–20]
- Chen TB, Yan XL, Liao XY, Xiao XY, Huang ZC, Xie H, Zhai LM (2005). Subcellular and compartmentalization of arsenic in *Pteris vittata*. *Chin Sci Bull*, 50 (24): 2739–2744 (in Chinese with English abstract) [陈同斌, 阎秀兰, 廖晓勇, 肖细元, 黄泽春, 谢华, 翟丽梅(2005). 蜈蚣草中砷的亚细胞分布与区隔化作用. *科学通报*, 50 (24): 2739–2744]
- Duan GL, Wang LH, Chen Y, Xu YX, Meng XY, Zhu YG (2007). Health risk from consumption of rice with elevated arsenic and studies of arsenic metabolism in rice plants. *J Agro Environ Sci*, 26 (2): 430–435 (in Chinese with English abstract) [段桂兰, 王利红, 陈玉, 徐玉新, 孟祥燕, 朱永官(2007). 水稻砷污染健康风险与砷代谢机制的研究. *农业环境科学学报*, 26 (2): 430–435]
- Gao C, Li J, Han Y, Huang YC, Meng B (2015). Effects of different types of phosphate fertilizers on lead accumulation in rice. *Acta Sci Circum*, 35 (1): 288–293 (in Chinese with English abstract) [高超, 李军, 韩颖, 黄元财, 孟博(2015). 不同磷肥对水稻铅积累的影响及其机理. *环境科学学报*, 35 (1): 288–293]
- Gong JL, Zhang HC, Long HY, Hu YJ, Dai QG, Huo ZY, Xu K, Wei HY, Gao H (2012). Progress in research of nutrition functions and physiological mechanisms of silicon in rice. *Plant Physiol J*, 48 (1): 1–10 (in Chinese with English abstract) [龚金龙, 张洪程, 龙厚元, 胡雅杰, 戴其根, 霍中洋, 许轲, 魏海燕, 高辉(2012). 水稻中硅的营养功能及生理机制的研究进展. *植物生理学报*, 48 (1): 1–10]
- Guo W, Hou YL, Wang SG, Zhu YG (2005). Effect of silicate on the growth and arsenate uptake by rice (*Oryza sativa* L.) seedlings in solution culture. *Plant Soil*, 272 (1): 173–181
- Hans JW (1980). Subcellular distribution and chemical form of cadmium in bean plants. *Plant Physiol*, 46: 480–482
- Hu PJ, Li Z, Zhong DX, Zheng LN, Ju SY, Wu LH, Luo YM (2014). Research progress on the phytoextraction of heavy metal contaminated soils in China. *Plant Physiol J*, 50 (5): 577–584 (in Chinese with English abstract) [胡鹏杰, 李柱, 钟道旭, 郑蕾娜, 居述云, 吴龙华, 骆永明(2014). 我国土壤重金属污染植物吸取修复研究进展. *植物生理学报*, 50 (5): 577–584]
- Indriolo E, Na GN, Ellis D, Salt DE, Banks JA (2010). A vacuolar arsenite transporter necessary for arsenic tolerance in the arsenic hyperaccumulating fern *Pteris vittata* is missing in flowering plants. *Plant Cell*, 22 (22): 2045–2057
- Khan MA, Stroud JL, Zhu YG, Mcgrath SP, Zhao FJ (2010). Arsenic bioavailability to rice is elevated in Bangladeshi paddy soils. *Environ Sci Technol*, 44 (22): 8515–8521
- Li DD, Zhou DM, Wang P, Weng NY (2010). Uptake and subcellular distribution of cadmium in wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Asian J Ecotoxicol*, 5 (6): 857–861 (in Chinese with English abstract) [李丹丹, 周东美, 汪鹏, 翁南燕(2010). 小麦根对镉离子的吸收机制及镉的亚细胞分布. *生态毒理学报*, 5 (6): 857–861]
- Li RY, Stroud JL, Ma JF, Mcgrath SP, Zhao FJ (2009). Mitigation of arsenic accumulation in rice with water management and silicon fertilization. *Environ Sci Technol*, 43 (10): 3778–3783
- Liao XY, Chen TB, Xiao XY, Huang ZC, An ZZ, Mo LY, Li WX, Chen H, Zheng YM (2003). Spatial distributions of arsenic in contaminated paddy soils. *Geographical Res*, 22 (5): 635–643 (in Chinese with English abstract) [廖晓勇, 陈同斌, 肖细元, 黄泽春, 安志装, 莫良玉, 李文学, 陈煌, 郑袁明(2003). 污染水稻田中土壤含砷量的空间变异特征. *地理研究*, 22 (5): 635–643]
- Liao XY, Chen TB, Xie H, Liu YR (2005). Soil As contamination and its risk assessment in areas near the industrial districts of Chen zhou City, Southern China. *Environ Int*, 31 (6): 791–798
- Liu D, Kottke I (2004). Subcellular localization of copper in the root cells of *Allium sativum* by electron loss spectroscopy (EELS). *Bioresour Technol*, 94 (2): 153–158
- Liu WJ, McGrath SP, Zhao FJ (2014). Silicon has opposite effects on the accumulation of inorganic and methylated arsenic species in rice. *Plant Soil*, 376: 423–431
- Lombi E, Zhao FJ, Fuhrmann M, Ma LQ, Mcgrath SP (2002). Arsenic distribution and speciation in the fronds of the hyperaccumulator *Pteris vittata*. *New Phytol*, 156: 195–203
- Ma CH, Yang L, Hu SY (2009). Silicon supplying ability of soil and advances of silicon fertilizer research. *Hubei Agric Sci*, 48 (4): 987–989 (in Chinese with English abstract) [马朝红, 杨利, 胡时友(2009). 土壤供硅能力与硅肥应用研究进展. *湖北农业科学*, 48 (4): 987–989]
- Ma JF, Yamaji N, Mitani N, Xu XY, Su YH, McGrath SP, Zhao FJ (2008). Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105 (29): 9931–9935
- Moore KL, Schröder M, Wu ZC, Martin BGH, Hawes CR, McGrath SP, Hawkesford MJ, Ma JF, Zhao FJ, Grovenor CRM (2011). High-resolution secondary ion mass spectrometry reveals the contrasting subcellular distribution of arsenic and silicon in rice roots. *Plant Physiol*, 156 (2): 913–924
- Ni TH, Wei YZ (2003). Subcellular distribution of cadmium in mining ecotype sedum alfredii. *Acta Bot Sin*, 45 (8): 925–928
- Pathore VS, Bajat YP, Wittwer SH (1972). Subcellular localization of zinc and calcium in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) tissues. *Plant Physiol*, 49: 207–211
- Pickering IJ, Gumaelius L, Harris HH, Prince RC, Hirsch G, Banks JA, Salt DE, George GN (2006). Localizing the biochemical transformations of arsenate in a hyperaccumulating fern. *Environ Sci Technol*, 40 (16): 5010–5014
- Raab A, Schat H, Meharg AA, Feldmann J (2005). Uptake, translocation and transformation of arsenate and arsenite in sunflower (*Helianthus annuus*): formation of arsenic-phytochelatin complexes during exposure to high arsenic concentrations. *New Phytol*, 168 (3): 551–558
- Rosen BP (2002). Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett*, 52 (1): 86–92
- Shen HL, He ZY, Ma M (2014). Advance of the mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata* L. and applications for arsenic-remediation. *Plant Physiol J*, 50 (5): 591–598 (in Chinese with English abstract) [申红玲, 何振艳, 麻密(2014). 蜈蚣草砷超富集机制及其在砷污染修复中的应用. *植物生理学报*, 50 (5): 591–598]

- Song AL, Li P, Li ZJ, Liang YC (2011). Characterization of plant growth, cadmium uptake and its subcellular distribution in pakchoi exposed to cadmium stress. *Environ Chem*, 30 (6): 1075–1080 (in Chinese with English abstract) [宋阿琳, 李萍, 李兆君, 梁永超(2011). 镉胁迫下两种不同小白菜的生长镉吸收及其亚细胞分布特征. *环境化学*, 30 (6): 1075–1080]
- Sun Y, Xue PY, Chen M, Zheng K, Wang Y, Liu WJ (2015). Effects of different ratios of silicon to arsenic in growth medium on uptake and translocation of arsenic by two rice varieties. *J Soil Water Cons*, 29 (4): 148–152 (in Chinese with English abstract) [孙宇, 薛培英, 陈苗, 郑坤, 王洋, 刘文菊(2015). 生长介质中硅/砷比对水稻吸收和转运砷的影响研究. *水土保持学报*, 29 (4): 148–152]
- Wang J, Zhao FJ, Meharg A A, Raab A, Feldmann J, Mcgrath SP (2002). Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata*: uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation. *Plant Physiol*, 130 (3): 1552–1561
- Wang Y (2011). Study on arsenic behaviors in rhizosphere of rice and influence factors (Master's thesis). Baoding, Hebei: Agricultural University of Hebei (in Chinese with English abstract) [王莹(2011). 水稻根际砷的行为及其调控机制研究(硕士论文). 河北保定: 河北农业大学]
- Wang Z (2013). Dynamics and influence factors of arsenic species in the system of As-contaminated paddy soil rice plants (Master's thesis). Baoding, Hebei: Agricultural University of Hebei (in Chinese with English abstract) [王钊(2013). 砷污染土壤-水稻中砷形态的变化特征及其影响因素研究(硕士论文). 河北保定: 河北农业大学]
- Yang JR, Huang Y (1994). Mechanism of heavy metal tolerance of plants. *Chin J Ecol*, 13 (6): 20–26 (in Chinese with English abstract) [杨居荣, 黄翌(1994). 植物对重金属的耐性机理. *生态学杂志*, 13 (6): 20–26]
- Zhang WH, Cai Y, Tu C, Ma LQ (2002). Arsenic speciation and distribution in an arsenic hyperaccumulating plant. *Sci Total Environ*, 300 (1-3): 167–177
- Zhang XH, Gao YL, Lin AJ, Cui YJ, Zhu YG (2008). A review on the effects of cell wall on the resistance of plants to metal stress. *Asian J Ecotoxicol*, 3 (1): 9–14 (in Chinese with English abstract) [张旭红, 高艳玲, 林爱军, 崔玉静, 朱永官(2008). 植物根系细胞壁在提高植物抵抗金属离子毒性中的作用. *生态毒理学报*, 3 (1): 9–14]
- Zhao FJ (2014). Mechanisms of arsenic uptake by rice and mitigation strategies. *Plant Physiol J*, 50 (5): 569–576 (in Chinese with English abstract) [赵方杰(2014). 水稻砷的吸收机理及阻控对策. *植物生理学报*, 50 (5): 569–576]
- Zhao FJ, Ma JF, Meharg AA, Mcgrath SP (2009). Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytol*, 181 (4): 777–794
- Zhou W, Wang H, Lin B (1999). Effects of calcium supply on subcellular distribution of cadmium, chloroplast structure, RuBPC and PEPC activity in maize under cadmium stress. *J Plant Nutr Fert*, 5 (4): 335–340 (in Chinese with English abstract) [周卫, 汪洪, 林葆(1999). 镉胁迫下钙对镉在玉米细胞中分布及对叶绿体结构与酶活性的影响. *植物营养与肥料学报*, 5 (4): 335–340]

Subcellular distribution of arsenic in flag leaf and root of rice with different ratios of silicon to arsenic

SUN Yu¹, ZHANG Min¹, XUE Pei-Ying^{1,2}, ZHENG Kun¹, WANG Jian-Guang¹, LIU Wen-Ju^{1,2,*}

¹College of Resources and Environment Science, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000, China; ²Key Laboratory for Farmland Eco-Environment of Hebei Province, Baoding, Hebei 071000, China

Abstract: A hydroponic experiment was conducted to investigate subcellular distribution of arsenic (As) in flag leaf and root of rice ('Italica carolina') exposed to As^{III} and As^V solutions with different ratios of silicon (Si) to arsenic for 3 days. Results showed that regardless of whether As^{III} or As^V was supplied to rice, As concentrations in different fractions of root and flag leaf followed the same pattern: cytoplasmic supernatant>cell wall>organelle. When supplied with As^{III}, As concentrations in subcellular fractions of roots were significantly decreased by Si addition, with lowest concentrations of As in cytoplasmic supernatant and organelle fractions of roots with Si/As at 10:1. Whereas, when supplied with As^V, only at Si/As 200:1 dramatically reduced the As concentration in cytoplasmic supernatant of root ($P<0.05$). For the subcellular distribution of arsenic in rice flag leaves, when supplied with As^{III}, the As concentrations in cytoplasmic supernatant and cell wall reduced significantly with Si/As at 10:1 ($P<0.05$) and reached the minimum level, while lowest As concentration in organelle parts of leaves were found at Si/As 1:1. However, there was no significant effect on subcellular distribution of arsenic in flag leaves when As^V supplied in the nutrient solution.

Key words: rice; arsenic; subcellular distribution; ratio of silicon to arsenic

Received 2016-03-21 Accepted 2016-05-30

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 41471398) and Innovation Team and Leading Talent Cultivation Plan of Colleges and Universities in Hebei Province (Grant No. LJRC016).

*Corresponding author (E-mail: liuwj@hebau.edu.cn).