

同步辐射 X 射线荧光 (SRXRF) 法分析水稻籽粒 铁锌的原位微区分布*

郝虎林¹ 冯英¹ 黄宇营² 田生科¹ 卢玲丽¹ 杨肖娥^{1;1)} 魏幼璋¹

1 (环境修复与生态健康教育部重点实验室 浙江大学环境与资源学院 杭州 310029)

2 (中国科学院高能物理研究所 北京 100049)

摘要 采用同步辐射 X 射线荧光 (SRXRF) 法分析了不同水稻品种籽粒铁锌及其它 5 种植物必需营养元素的分布特点, 以及各元素分布之间的相互关系. 结果表明, 铁锌在水稻品种 IR68144 (精米铁含量 21mg/kg, 锌含量 53mg/kg) 与 IR64 (精米铁含量 11.2mg/kg, 锌含量 23 mg/kg) 籽粒不同部位分布具有很大的差异. 铁/锌高富集品种 IR68144 籽粒横切面上任意位置都可以检测到铁锌, 但低富集品种 IR64 的籽粒中检测不到铁锌. IR68144 的稻壳铁锌含量比 IR64 低 3.5 倍, 而种皮和胚乳中铁锌含量却明显高于 IR64. 铁锌含量在两个品种的不同部位分布存在极显著差异, 而且与硫、钙、锰 3 种元素也表现出显著或极显著相关. 本研究结果对于进一步研究水稻籽粒铁锌积累机制提供科学依据.

关键词 同步辐射 X 射线荧光 (SRXRF) 水稻 籽粒微区分布 铁 锌

1 引言

铁、锌是各种生物体必需的微量营养元素, 在体内发挥着重要的生理功能, 分别被誉为人体的“建筑材料”与“智慧元素”^[1, 2]. 然而, 有数据表明, 人体铁、锌等微量元素缺乏症有逐年加剧的趋势, 已严重地威胁着人类健康与生活质量^[3, 4]. 据统计, 全世界超过 35 亿人口面临微量营养元素缺乏问题^[5], 尤其是青少年、孕产妇和老年人, 缺铁性贫血多达 14.8 亿, 5 岁以下儿童缺铁率高达 35%^[6]; 并且 90% 营养缺乏人群生活在发展中国家^[7]. 长期以来, 营养学家们强调利用医学措施如在食品添加或保健品等来强化人体的微量营养元素, 虽然这种途径治病效果明显, 但不能解决微量元素营养不良的根本性问题, 且投资大、费用高, 需要年复一年的投资, 对经济落后的、食品加工业不发达的国家和地区收效甚微. 人类所有营养最初来源是农业产品, 因此通过农业措施生物强作物可食部铁锌含量和生物有效性是行之有效方法, 不仅投资少、

见效快, 而且覆盖面大 (尤其是贫穷地区), 能提供多种元素, 达到平衡营养^[8-11]. 水稻是我国的重要粮食作物之一, 与小麦等不同, 稻米在的食品加工过程中强化微量元素较难做到, 因此, 开展水稻籽粒中铁锌富集及生物有效性评价与调控研究, 对改进我国居民铁锌营养、增强人类健康, 保障经济、社会的可持续发展. 具有重大理论与实践意义.

传统上, 研究水稻籽粒微量元素含量都采用化学分析方法, 不能原位了解铁锌在籽粒中的分布情况, 更不能为研究籽粒铁锌的运输和累积提供科学依据, 而且还具有速度慢、易污染的缺点. 同步辐射 X 射线荧光 (SRXRF) 分析方法具有高灵敏度的特点, 可以大幅度降低元素检测下限, 在研究超积累植物中的元素微区分布已经得到成功应用. 本研究首次在水稻上应用该方法分析不同基因型水稻籽粒的铁锌含量分布及其与其它营养元素的关系, 有助于探明水稻籽粒铁锌积累和调控机制, 通过遗传育种和农艺措施改变籽粒铁锌含量, 彻底解决人体微量营养元素缺乏问题.

* Harvestplus-China 和教育部长江学者奖励计划共同资助

1) E-mail: xyang581@yahoo.com

2 实验

2.1 实验材料的制备

所用的实验材料为籽粒铁/锌高富集品种IR68144(铁含量20.4mg/kg, 锌含量53.0mg/kg)和籽粒铁/锌低富集品种IR64(籽粒铁含量11.2mg/kg, 锌含量23.0mg/kg), 将选好的水稻籽粒用去离子水浸泡24h吸胀, 而后在 -16°C 的条件下用重蒸水进行冰包埋, 待籽粒被完全包埋后再持续冰冻1—2min切片. 切片安排在籽粒中部, 厚度为 $40\mu\text{m}$, 将完整的切片黏附于聚乙烯薄膜框上, 在 -16°C 的条件下自然干燥. 干燥后的水稻籽粒切片样品备用. 水稻籽粒切片及扫描点坐标的示意图见图3.

2.2 SRXRF 扫描

水稻籽粒切片的扫描在北京正负电子对撞机的4WIB同步辐射X射线荧光分析实验站上进行. 测定时贮存环的电子能量为2.2GeV, 束流强度为88.4—102.8mA. 将载有水稻籽粒切片的塑料载板固定在微机程控三维样品移动平台上进行XRF扫描, 移动平台步进精度为 $0.25\mu\text{m}/\text{步}$. 调节水平和垂直两个狭缝, 将入射白光的光斑限为 $20\times 20\mu\text{m}$, 样品与入射光束成 45° , 样品与探测器的距离为6.0cm. 通过光学显微镜准确定位扫描点的位置, 沿切片的稻壳一端向另一端的方向上扫描, 稻壳和种皮区域的步长为 $20\mu\text{m}$, 胚乳区域 $200\mu\text{m}$. 每个扫描点测量时间为100s. 测量的荧光信号输入多道能谱仪, 得到同步辐射X射线微束激发样品的能谱图(图1).

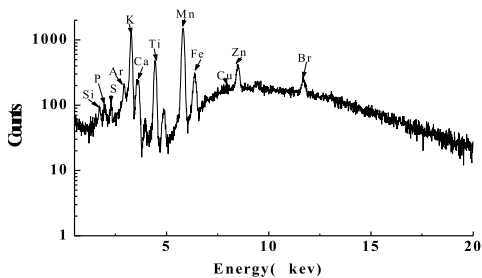


图1 水稻IR68144籽粒切片种皮部位的典型激发能谱

2.3 图谱解析及数据处理

用AXIL软件对获得的XRF数据进行解谱, 得到样品XRF谱线中各元素特征峰的峰面积. 在测量过程中记录同步辐射束流的变化, 用于校正入射束流衰减所造成的影响^[12]. 采用能谱的Compton峰对各元素的特征峰面积进行归一, 得到各元素的相对含量^[13].

多元素的相关分析采用SPSS 10.0软件进行.

3 结果与讨论

3.1 不同基因型水稻籽粒横切面铁锌含量的分布特点

通过对两个不同基因型的水稻籽粒横切片进行SRXRF扫描, 两个品种的扫描位置见图3. 结果发现, 在IR68144水稻籽粒的各个部位都可以检测到铁和锌, 而在IR64的内部胚乳层检测不到铁和锌, 两个品种的不同扫描点的铁和锌含量与变化趋势差异明显(见图2(a,b)), 富集品种在种皮和胚乳层显示出两个分布峰, 而低富集品种主要分布在颖壳和种皮区, 在胚乳区分布较少或检测不到. 铁、锌含量变化与其它营养元素变化趋势相一致, 经相关性检验, 相关系数为0.9471(IR64)和0.8895(IR68144), 都呈极显著相关(见表1和2). 这启示水稻籽粒在铁锌两种营养元素积累上存在共同调节机制, 与将大豆的球蛋白基因ferritin转入水稻中, 其转基因稻米的铁锌含量同时得

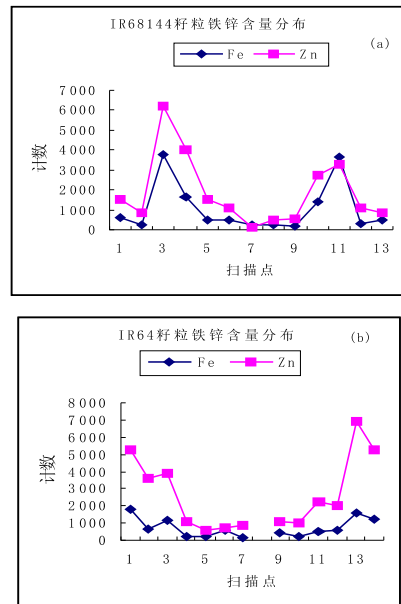


图2 (a) IR68144籽粒铁锌含量分布; (b) IR64籽粒铁锌含量分布

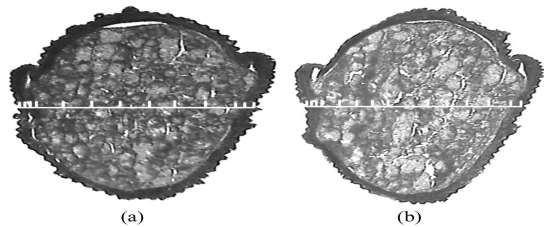


图3 (a) IR68144扫描点坐标的示意图; (b) IR64扫描点坐标的示意图

以增加有类似现象^[14]. 这一结果为通过遗传育种途径提高水稻籽粒铁锌含量提供科学依据. 从图2(a,b)可知, 在水稻籽粒的每一个扫描点上锌的含量基本上都高于铁, 这与用化学分析水稻籽粒的颖壳、稻糠和精米的铁锌含量结果相一致. 也与国际水稻所用去糠机在不同时间段分析稻米的铁锌含量分布的结果相似. 整个铁分布存在从种皮向内部胚乳层逐渐降低的趋势, 说明在籽粒发育成熟过程中, 铁锌元素是从籽粒的表层逐渐向内部转运的过程, 不同基因型水稻内部铁锌含量上存在的差异, 可能是铁锌向内部运输也受相应的基因调控.

3.2 不同基因型水稻籽粒各组织部位铁锌分配差异

已有报道, 不同基因型水稻籽粒的铁锌含量存在着显著差异. 仅在939份国际水稻所的水稻遗传材料中, 其品种间差异极为显著. 精米中铁含量变幅为7.5—24.4mg/kg, 锌含量为13.5—58.4mg/kg^[15]. 本研究采用两种代表水稻品种IR68144为高富集品种, 其精米中铁含量为20.4mg/kg, 锌含量为53.0mg/kg; 和籽粒铁锌低富集品种IR64, 其精米中铁含量为11.2mg/kg, 锌含量为23.0mg/kg. 采用同步辐射X射线荧光分析方法, 按照扫描点分布的不同籽粒部位, 把扫描结果分成了3个区域, 即稻壳、种皮和胚乳, 进而对两个品种籽粒的不同组织间铁锌含量差异进行分析, 其结果见图4(a,b). 在铁和锌的含量上, IR64的稻壳高于IR68144, 而在种皮和胚乳中的铁锌含量低于IR68144. IR64各组织的铁锌含量高低顺序为稻壳、种皮、胚乳; 而IR68144各组织的铁锌含量高低顺序却是种皮、胚乳、颖壳. 说明铁锌含量高的水稻品种IR68144的铁和锌主要分布在籽粒可食部位, 而铁锌含量低的品种IR64的铁锌营养元素主要分布在稻壳当中. 这一结果在某种程度上揭示了不同基因型水稻铁锌在籽粒中积累规律, 即籽粒铁锌高含量的品种可能铁锌主要积累在可食部位, 而低的品种则积累在非可食的颖壳当中, 其机理有待于进一步阐明.

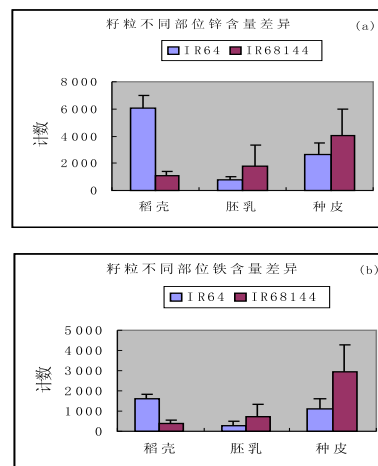


图 4 (a) 籽粒部位锌含量差异; (b) 籽粒部位铁含量差异

3.3 不同基因型水稻籽粒中铁锌与其它营养元素相关性分析

储存在籽粒中的铁锌常常与一些有机化合物结合起来, 不但导致不同基因型水稻籽粒的铁锌含量的差异, 而且影响籽粒铁锌的生物有效性. Glahn等人采用了Caco-2细胞系体外检测技术, 表明水稻籽粒铁生物有效性存在着明显的基因型差异, 且与Fe含量没有必然的正相关, 但其机理仍不清楚^[16]. 很可能与不同品种影响铁吸收的增强剂或抑制剂含量及铁在籽粒中形态有关. 本研究利用同步辐射X射线荧光定位分析了不同水稻籽粒铁锌与其它5种营养元素的相关性, 结果见表1和表2. 在IR64籽粒中, 除铜以外, 铁、锌、硫、钾、钙和锰都显著相关或极显著相关; 在IR68144籽粒中, 铁只与锌、钙、锰呈极显著相关, 与其它元素不相关, 而锌则是除铜以外, 与其它元素呈显著相关或极显著相关. 两个品种籽粒的铁、锌、钙、锰元素相关性最好, 说明这4种元素进入籽粒可能存在着共同的调节机制. 铁与非金属硫在品种间的相关差异, 可能是造成不同品种间生物有效性差异的一个因素. 有待于继续深入研究.

表 1 IR64 水稻籽粒各种元素相关性

	Fe	Zn	S	K	Ca	Mn	Cu
Fe	1.0000						
Zn	0.9471**	1.0000					
S	0.6320*	0.7435**	1.0000				
K	0.7042**	0.7849**	0.7382**	1.0000			
Ca	0.7855**	0.8994**	0.6423**	0.7998**	1.0000		
Mn	0.8746**	0.9499**	0.8680**	0.7444**	0.8491**	1.0000	
Cu	0.3054	0.2403	0.1697	0.3027	0.1543	0.1479	1.0000

表 2 IR68144 水稻籽粒各种元素相关性

	Fe	Zn	S	K	Ca	Mn	Cu
Fe	1.0000						
Zn	0.8895**	1.0000					
S	0.4367	0.7025**	1.0000				
K	0.242148	0.5281*	0.7128**	1.0000			
Ca	0.7508**	0.7445**	0.3159	0.1928	1.0000		
Mn	0.8308**	0.8641**	0.4676	0.0874	0.7564**	1.0000	
Cu	-0.0457	0.2850	0.6511*	0.8195**	-0.0064	-0.1402	1.0000

4 结论

(1) 本研究首次采用同步辐射 X 射线荧光分析方法研究水稻籽粒的铁锌分布问题, 取得了可靠的数据. 开创了少污染、快速研究作物铁锌的元素微区分布及其相对含量的新途径. 为深入研究微量元素在籽粒中的富积机制提供了科学依据.

(2) 不同基因型水稻籽粒中铁锌分布存在明显差异, 高铁锌含量的 IR68144 的中央胚乳层都可以检测到铁锌, 而在 IR64 的中央胚乳层检测不到铁锌; 两个品种籽粒横切面的铁锌含量分布存在显著差异.

(3) 铁锌含量在两个品种籽粒不同组织间也存在显著差异. 在铁和锌的含量上, IR64 的颖壳高于 IR68144, 而在种皮和胚乳中的铁锌含量低于

IR68144. IR64 各组织的铁锌含量高低顺序为稻壳 > 种皮 > 胚乳; 而 IR68144 各组织的铁锌含量高低顺序却是种皮 > 胚乳 > 稻壳. 说明铁锌含量高的水稻品种 IR68144 的铁和锌主要分布在籽粒可食部位, 而铁锌含量低的品种 IR64 的铁锌营养元素主要分布在稻壳当中.

(4) 两个品种籽粒间的铁、锌、钙、锰 4 种元素在籽粒分布上呈极显著正相关, 非金属元素硫与锌显著正相关. 但只有在低富集品种 IR64 中显示了铁与硫显著相关性.

作者感谢国际水稻所 Glenn Gregorio 提供了良好的水稻研究材料和北京正负电子对撞机国家实验室的支持.

参考文献(References)

- Hall J L, Williams L E. *J. Exp. Bot.*, 2003, **54**(393): 2601—2613
- Ramesh S A et al. *Plant Physiol.*, 2003, **133**(1): 126—34
- Holm P B, Kristiansen K N, Pedersen H B. *J. Plant Nutri.*, 2002, **132**: 514S—516S
- Welch R M, Graham R D. *J. Exp. Bot.*, 2004, **55**: 353—364
- Glahn R P et al. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**: 3586—3591
- WHO 1999 Malnutrition worldwide. Geneva, Switzerland: World Health Organization; <http://www.who.int/nut/malnutrition-worldwide.htm>:1—13
- CHEN S M (Ed). 2000 Tracking Human Nutrition of China in the Last 10 Years. Hygiene Acad, Press, Beijing, China
- Bouis H. *Nutri. Reviews*, 1996, **54**: 131—137
- Graham et al. *Advances in Agron.*, 2001, **70**: 77—142
- Welch R M. *Plant Soil.*, 2002, **247**: 83—90
- Welch R M, Graham R D. *J. Exp. Bot.*, 2004, **55**: 353—364
- WU Y R, CAO Z Y, XIAO Y A et al. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A.*, 1995, **359**: 291—294
- LIU N Q, LIU P S, WANG K J et al. *Biological Trace Element Research*. 2000, **76**: 279—284
- Vasconcelos M et al. *Plant Sci.*, 2003, **164**: 371—378
- Graham R D et al. *Field Crops Res.*, 1999, **60**: 57—80
- Glahn R P et al. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**: 3586—3591

In situ Analysis of Cellular Distribution of Iron and Zinc in Rice Grain Using SRXRF Method *

HAO Hu-Lin¹ FENG-Ying¹ HUANG Yu-Ying² TIAN Sheng-Ke¹ LU Ling-Li¹
YANG Xiao-E^{1;1)} WEI You-Zhang¹

¹ (MOE Key Lab of Environment Remediation and Ecol. Health,
College of Environment and Resource Sci., Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

² (Institute of High Energy Physics, CAS, Beijing 100049, China)

Abstract In this study, SRXRF method was used to analyze distribution of iron, zinc and other 5 nutrient elements in rice grain of Fe/Zn dense (IR68144) and non-dense (IR64) cultivars. The contents of iron and zinc in the dense cultivar IR68144 were 21 and 53mg/kg, respectively, while those in the non-dense cultivar IR64 being 11.2 and 23mg/kg, respectively. Iron and zinc can be detected in anywhere of the transverse section of IR 68144 grains, but cannot be detected in the center of IR64 grain. The contents of iron and zinc in seed hull of IR68144 were 3.5-fold lower than those in IR64, but higher content in endosperm cells of grain was found in IR 68144 than in IR64. Remarkable differences in the distribution of iron and zinc across rice grains section were noted between the two cultivars, however, the accumulation of Fe/Zn in rice grains was closely correlated with sulfur, calcium and manganese. The results obtained from this research can provide definite gist for further research on accumulation mechanism of iron and zinc in rice grains.

Key words synchronization radicalization X radial fluorescence(SRXRF), rice grain, distribution of elements, iron, zinc

*Supported by Harvestplus-China and Cheung Kong Scholars Programme from Ministry of Education

1) E-mail: xyang581@yahoo.com