

^{15}N 示踪技术在大豆研究领域的应用概况

于佰双

(黑龙江省农科院大豆研究所)

构成生物体的基本元素之一——氮素,有六种同位素(见表1)在大豆研究中最重要的是 ^{13}N 和 ^{15}N , ^{13}N 是放射性同位素,半衰期仅10.05分钟,只能进行2小时内的实验,且价格极为昂贵,所用设备复杂,不宜大量使用,通常是用稳定性同位素 ^{15}N 进行实验研究, ^{15}N 的天然丰度为0.3663%。

1 ^{15}N 研究法的建立

稳定性同位素 ^{15}N 是1929年Naude首先发现的,之后不到十年,于1938年Schoenheimer等人利用 ^{15}N 首次研究了动物的氮代谢,1939年Viehevg等人又利用 ^{15}N 研究了植物的氮代谢,同年Riffenhelg等人建立了 ^{15}N 生物样品的质谱分析法。1943年Norman等人首次在农业上应用 ^{15}N 研究了大豆对氮的吸收利用。1950年Bartholomery等将 ^{15}N 第一次应用于田间试验。美国原子能委员会的Ames实验室首次成功地制备出贫化 ^{15}N ,并开始应用贫化 ^{15}N 。1972年美国伊利诺大学首次在田间条件下大规模地应用贫化 ^{15}N 研究氮的平衡问题。近年来,随着氮的同位素分离方法、探测仪器和示踪方法的进展,现在它已成为土壤和植物氮素研究的一种重要手段。

2 ^{15}N 示踪技术在大豆研究中的应用

2.1 ^{15}N 示踪技术在大豆固氮研究方面的应用

在大豆固氮研究方面,无论是进行生物学、生化化学、农学、生态学,还是非生物学研究,测定氮气还原的最直接可靠的方法是同位素示踪法,稳定性同位素 ^{15}N 一直被认为是最有效而实用的工具。 ^{15}N 示踪法的灵敏度较常规凯氏定氮法高千倍,且不需校正因子,还可用来校正非直接测定法(如乙炔还原法、放氢测定法等)。

进行短时间固氮实验,如测定固氮酶活性、固氮能力等,可用密封容器抽去其中空气后,导入 $^{15}\text{N}_2$ (为节约 $^{15}\text{N}_2$,一般所用 $p\text{N}_2$ 为0.1~0.3大气压)^[1]。在较长时间实验中,装置比较复杂,因为要解决以下几个问题:①密闭箱内需有适宜的温度和湿度,从土壤中蒸发出来的水分必须回到土壤中去;②为维持原始空气的压力和组成,必须将光合作用所产生的氧移去;③必须保持适量的二氧化碳;④必须探索准确测定密封箱内气体的分析法。Ross等设计了一种可供豆科植物生长80多天的密封容器,高50厘米,内径15厘米的有机玻璃圆筒,上下用橡皮垫圈密封,筒的上部装冷却水管,由外面通入5~10℃冷却水,使土壤蒸发的水汽冷凝返回土壤中去,多余的氧气通过氢气后点火,使之变成水去除, CO_2 用 $p\text{CO}_2$ 电极测定,定时补充,用一筒外磁铁带动的小型风扇使筒内空气均匀分布。这种设备比较复杂,但能解决上述四个问题。

应用 ^{15}N 的丰度视实验不同而异,如固氮酶量少,反应时间短,要用高丰度的 ^{15}N ,一般大于90%。对于固氮微生物或豆科植物等,用丰度为30%的 ^{15}N 就足够了,三天以上的实验可用

10%丰度的 ^{15}N 。

在田间实验中,也可用同位素稀释法,即将含 ^{15}N 的肥料施入土壤中使大豆植株吸收,用非豆科植物或不结瘤大豆作对照,大豆根瘤菌固定大气中的 N_2 后,将植株及菌体内的 ^{15}N 稀释,而对照作物因不能固氮仍保持原有的 ^{15}N 丰度,可用以校正。

国际原子能机构于1988~1993年度开展了科研协调项目“应用同位素与核技术加强亚洲热带及亚热带豆类作物的固氮能力,提高食用豆类的产量”的研究,黑龙江省农科院大豆研究所承担的内容是:“应用 ^{15}N 同位素稀释法筛选高固氮高产大豆品种”。具体实验方法是:在大豆出苗二周后,于田间试验微区内每平方米施入5克丰度为10.1% ^{15}N 标记的硫酸铵(施于植株根侧)。大豆生理成熟期采集植株地上部分,烘干、粉碎,按凯氏法用浓硫酸消化。取一半消化样品(约2~5毫克氮),用蒸汽蒸馏,释出的氨用硫酸收集,并通过加热浓缩至2毫升,浓缩液在抽真空的雷顿伯格管中与 NaOBr 反应,产生 N_2 后,用菲尼根-玛特质谱公司生产的 Δ 型质谱仪测定样本 ^{15}N 丰度。固氮率用下式计算:

$$\% \text{Ndfa} = (1 - \frac{\%^{15}\text{Na.e.F}}{\%^{15}\text{Na.e.NF}}) \times 100$$

上式中 $\% \text{Ndfa}$ 表示样本固氮率, $^{15}\text{Na.e.F}$ 表示固氮作物 ^{15}N 原子百分超, $^{15}\text{Na.e.NF}$ 表示非固氮作物 ^{15}N 原子百分超。

二年试验结果表明,不同大豆品种(系)固氮率存在显著差异。在40余个大豆品种(系)中,筛选出以下几个高固氮材料:哈88-1005,哈88-2096,哈89-1454,合丰35,黑农26,黑农37,垦农四号。它们的固氮率达到60~70%。其中的四个品种为既高产又高固氮材料,已在生产上大面积推广应用,黑农26曾获得国家发明二等奖,另外三个大豆品系继续参加区域试验,鉴定其它性状,也可作为高固氮亲本在杂交育种中应用。

日本的赤尾腾一郎等人(1981)应用 ^{15}N 示踪法研究了大豆氮素的固定量,结果表明,子粒肥大期的固氮率约为荚伸长期的三倍,在子粒肥大期的10天内所吸收的氮全量的70%有赖于固定氮素^[2]。

2.2 ^{15}N 示踪技术在大豆氮素营养与施肥方面的研究应用

加藤忠司等人(1981)^[3],应用 ^{15}N 示踪技术研究了大豆对氮素的吸收、分配及运转。结果表明,作为基肥施用的氨态氮的吸收率相当低,只有27%,然而开花前追肥的吸收率却达68%。硝态氮的吸收率以始花期追肥者最高达91%,其后减少,硝态氮的吸收率无论在任何追肥时期都比氨态氮要高。追施的氮肥在收获期有85%分配到子实中。这说明运转到子实的化合态氮量是由吸收率决定的,而追施氮素分配到子实的最有效时期是从开花前到始花期。试验还表明,积累在豆株各部位的氮素随着子实的膨大而进行再分配。从荚伸长期到子实肥大期,叶柄的氮素首先开始运转。在子实肥大期,其他部位的氮素也开始运转。有资料认为,为了提高大豆产量,增加子实肥大期的氮素积累量是非常重要的。氮素积累最高的部位是叶部。因此,促使叶内积累的氮素更有效地运转是十分重要的。田中伸幸等(1980)^[4]对大豆施用 ^{15}N 标记的硫酸(每10亩2.5克氮)作基肥,区分来自肥料、根瘤及土壤的氮素。结果表明,来自肥料氮占大豆吸收的全部氮素的5%左右,说明大豆基肥的施氮量是不够的。来自根瘤的氮素占总吸收量的47~58%。这说明大豆吸收氮素的1/3~1/2是由根瘤固氮供给的。来自土壤的氮占大豆吸收氮素的37~48%。由此可见,来自土壤的氮素作为大豆氮素的供给源,和根瘤一样,占有重要的地位,尤其在创高产时,仅靠来自根瘤供应的氮素是不够的,产量越高,由土壤分担的氮素供应量便越大。

因此,要提高大豆产量,在采取使固氮能力强的根瘤菌侵入结瘤和使根瘤活性持续到生育后期的管理措施的同时,用堆肥等有机肥来增加地力,也是不可缺少的。

柳尺启等(1985)^[5]应用¹⁵N 示踪技术研究固定氮和施肥氮在花期以后对大豆结荚、鼓粒的作用以及在植株体内运转的机制时指出,开花初期同化的 N₂-¹⁵N 基本上不向子粒运转,而结荚期和鼓粒期同化的 N₂-¹⁵N,50%以上运转到子粒。开花期和结荚初期吸收的 NO₃⁻-¹⁵N,其中 40~50%运转到子粒,鼓粒初期吸收 NO₃⁻-¹⁵N,其运转到子粒中的比例仅占 25%,运转到叶片中的比例较大。揭示了鼓粒期固定氮主要供给子粒,施肥氮主要供给营养器官。

2.3 ¹⁵N 示踪技术在大豆生理生化方面的研究应用

结有根瘤的大豆植株既能利用根系吸收的化合态氮,又能利用根瘤固定的气态氮。为阐明固定氮的生理作用,并与硝态氮的吸收利用进行比较,K. Kumazawa 等人(1978)应用¹⁵N 示踪技术研究了这两种来源的氮化合物的同化作物和运转情况。一部分大豆植株给以标记氮气和非标记硝酸盐,另一部分则给以非标记氮气和标记硝酸盐,根系引入标记物后,分离出根瘤、根和茎中的氨、硝酸盐、氨基酸、酰胺和尿囊素,然后用¹⁵N 分析仪测定这些化合物中的¹⁵N 含量。处理八小时后,供以¹⁵N₂ 的根瘤中、谷氨酰胺、丙氨酸、丝氨酸和 γ-氨基丁酸¹⁵N 含量较高;而供以¹⁵NO₃⁻ 的根系,则以天门冬氨酸的¹⁵N 含量为最高。在供给标记氮气的大豆植株的茎中尿囊素的¹⁵N 含量为最高,其中来自标记氮气的¹⁵N 与来自标记硝酸盐的¹⁵N 之比率较其他化合物大 5~10 倍。表明根瘤中尿囊素的合成十分活跃,也说明尿囊素对于氮素由根瘤输送到大豆植株地上部分具有重要作用。大山卓尔进一步证实了这一结论,并测知尿囊素主要通过茎的木质部向地上部器官转移。大山等人还发现¹⁵N₂ 的固定发生在根瘤的类菌体中,¹⁵NO₃⁻ 的吸收发生在根尖,固定吸收后都转化成氨,¹⁵N₂ 被固定转化成氨后,大部分转移到寄主细胞质中,在细胞质的谷氨酰合成酶(GS)的催化作用下,生成谷氨酰胺,再经谷氨酸合成酶(GOGAT)催化,生成谷氨酸,之后再转化成丙氨酸、丝氨酸、甘氨酸、尿囊素等,沿 GS/GOGAT 同化途径代谢,而有一部分固定¹⁵N₂ 生成的氨没有进入细胞质,在类菌体内被谷氨酸脱氢酶和丙氨酸脱氢酶催化生成谷氨酸和丙氨酸,这就对根瘤固氮的初期同化过程、途径及部位有了较明确的了解。

总之,近年来国内外学者应用¹⁵N 示踪技术在大豆研究领域取得了显著成绩,尤其在大豆固氮机理研究、氮素代谢和科学施肥等方面,¹⁵N 示踪技术已经得到广泛应用,随着示踪方法的不断改进和质谱仪的更新与发展,¹⁵N 示踪技术必将成为大豆研究领域的一种重要手段。

表 氮的各种同位素

质量数	天然丰度(%)	半衰期	质量数	天然丰度(%)	半衰期
12	—	0.0125 秒	15	0.366	—
13	—	10.05 分	16	—	7.36 秒
14	99.636	—	17	—	4.14 秒

参 考 文 献

1 尤崇杓. 固氮研究中的¹⁵N 示踪法. 原子能农业译丛, 1980(2): 14
2 赤尾麟一郎等. 大豆氮素固定量的测定. 原子能农业译丛, 1984(1): 25~27
3 加藤忠司等. 大豆对氨态氮和硝态氮的吸收利用. 日本土壤肥科学会杂志, 1983, 54: 25~29
4 田中伸幸等. 大豆吸收氮素不同来源的试算. 农业技术, 1983(38): 23~24
5 柳尺启等. 关于大豆根瘤固氮动态的研究. 日本土壤肥科学杂志, 1986(57): 371~376