

一种简易的¹⁴CO₂标记植物单叶光合作用方法研究

龚月桦^{1,2}, 李守桂¹, 刘欣睿¹, 吕金印²

(1. 宜宾学院农林与食品工程学部, 宜宾 644000;
2. 西北农林科技大学生命科学学院, 杨凌 712100)

摘要: ¹⁴CO₂标记是研究植物光合作用及有机物运输分配常用的方法, 但现有单叶¹⁴CO₂标记方法部分比较复杂, 部分资料过于简单, 实用性不强。为了深入细致研究光合产物运输分配的源流库关系, 需要对叶片进行¹⁴CO₂饲喂。本研究利用连通器的原理, 建立一种简便易行的¹⁴CO₂制备收集和单叶饲喂¹⁴CO₂的方法, 可为植物单叶光合作用研究提供支持。

关键词: ¹⁴CO₂; 制备; 收集; 饲喂

中图分类号: TL99; Q945.11; Q945.18

文献标志码: A

文章编号: 1000-7512(2025)02-0191-04

doi: [10.7538/tws.2022.youxian.112](https://doi.org/10.7538/tws.2022.youxian.112)

Simple and Convenient Method for Preparing and Collecting ¹⁴CO₂ and Feeding to Single Leaf of Plant

GONG Yuehua^{1,2}, LI Shougui¹, LIU Xinrui¹, LÜ Jinyin²

(1. Faculty of Agriculture, Forestry and Food Engineering, Yibin University, Yibin 644000, China;
2. College of Life Science, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: ¹⁴CO₂ labeling is a method commonly used in the study of transport and distribution of photoassimilate in plant. In order to study the source-flow-sink relationship of photosynthate transport and distribution, ¹⁴CO₂ labeling of single leaf is required. Some of the methods of single-leaf ¹⁴CO₂ labeling reported in the existing literature are complicated and some of the date are too simple, they are not practical. Therefore, through years of practice, we have established a simple and feasible method for preparing and collecting ¹⁴CO₂ and feeding single leaf using the principle of the connector, which provides necessary support for the study of plant photosynthesis.

Key words: ¹⁴CO₂; preparation; collection; feeding

在对植物光合同化物运输分配的研究中, 经常用到¹⁴CO₂标记的方法^[1], 可对较大枝条、全株、一个小群体进行¹⁴CO₂标记。采用小烧杯或小瓶子内装Ba¹⁴CO₃做反应器, 置于植物

旁边, 用较大的透明塑料袋或有机玻璃罩将要标记的植物全部罩住密封。用注射器将乳酸或高氯酸注入容器内使其与碳酸钡反应释放出¹⁴CO₂, 植物便可以光合同化¹⁴CO₂, 并进行运输

分配^[2-3]。

然而,目前这种全株标记的方法仅大致了解光合产物的分配,并不细致,为深入细致研究光合产物运输分配的源流库关系,需要对单独一个叶片进行¹⁴CO₂饲喂,追踪¹⁴C的去向。已有单叶¹⁴CO₂标记的研究操作步骤复杂^[4],部分资料过于简单^[5-6],实用性不强,仅给叶片套上塑料袋密封并用注射器注入一定体积的¹⁴CO₂^[5-6],如何制备和吸取¹⁴CO₂气体不明确,未解决多次抽取反应瓶中¹⁴CO₂造成浓度降低而导致误差增加的问题,现有的文献未提及如何保证每个植株每个叶片饲喂的¹⁴CO₂量相同。

因此,本研究根据前期工作^[7-9],设计了一套简便易行的植物单叶¹⁴CO₂标记方法,旨在提高植物¹⁴CO₂单叶标记方法的简便性和精确性,通过分析小麦不同器官中¹⁴C强度变化,为确定小麦光合同化物运输分配研究提供技术支持。

1 材料与试剂

1.1 主要材料

3个玻璃瓶(A为10~100 mL小瓶、B和D为250~500 mL大瓶,以不同形状表示以示区别)、玻璃烧杯(500 mL)1个、玻璃注射器3个(分别为1 mL或5 mL小注射器、10 mL~20 mL中等注射器、100 mL大注射器)、橡皮塞和聚乙烯塑料输液管若干,以及无色透明聚乙烯塑料袋(体积约100 mL)若干。

1.2 主要试剂

Ba¹⁴CO₃(约6.52 mg): Amersham Biosciences UK Limited公司,放射性标记比活度为276 μCi/mg。

每个叶片标记的总活度约为40 μCi^[4],即1.48×10⁶ Bq。整个实验需要标记45株植物,至少需要6.66×10⁷ Bq的¹⁴C放射性同位素,因此在实验中Ba¹⁴CO₃实际称取量略大于此值,以保证示踪气体的浓度和数量。

2 实验方法

2.1 ¹⁴CO₂气体的制备和收集

示踪气体¹⁴CO₂制备和收集过程示于图1,首先测量出A瓶体积,根据实验需要计算放射性碳酸钡需要量,称取¹⁴C-碳酸钡,然后称取1~2倍的非放射性标记的碳酸钡作为载体,一起加入A瓶中,根据化学方程式BaCO₃+2HClO₄→

Ba(ClO₄)₂+CO₂+H₂O计算所需高氯酸量及生成的¹⁴CO₂体积;其次,将B瓶装满水后用输液管a和b分别连接A瓶和烧杯C;最后,用10~20 mL的注射器吸取过量高氯酸注入A瓶,高氯酸和碳酸钡反应产生CO₂和¹⁴CO₂气体沿着a输液管进入B瓶。B瓶中的水会沿b输液管进入C烧杯。摇匀A瓶,使高氯酸和碳酸钡充分反应完全后,再用100 mL大注射器向A瓶注满水,将A瓶中所有的气体排到B瓶中,此时B瓶下部是水,上部是CO₂和¹⁴CO₂气体,总体积为A瓶的体积+CO₂体积+¹⁴CO₂体积。

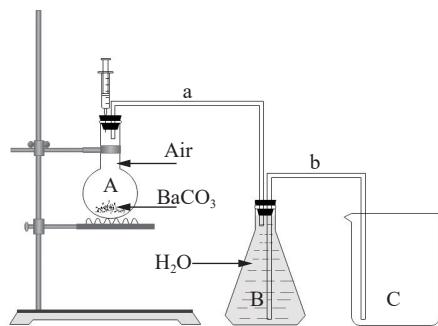


图1 ¹⁴CO₂的制备和收集示意图

Fig.1 Schematic diagram of preparation and collection of ¹⁴CO₂

2.2 ¹⁴CO₂单叶标记方法

根据需标记的叶片大小、形状和数目,准备已知体积的无色透明聚乙烯塑料袋作为叶室,根据实验所需放射性强度和叶室体积确定注入的混合气体体积。由于多数植物光合作用的CO₂饱和点约为0.1%,根据叶室体积确定注射CO₂浓度的上限。将D瓶装满水,塞上橡皮塞,抹上凡士林密封,用输液管与B瓶连通,另插一输液管在D瓶口橡皮塞上与大气连通(图2),用1 mL微量注射器从B瓶中抽取一定体积的混合气体,此时等体积的水会从D瓶流入B瓶,确保B瓶中CO₂和¹⁴CO₂浓度不会改变。

将已知体积的塑料袋鼓满气后套住叶片,抹凡士林密封并用曲别针固定在叶柄上,形成简易叶室,将注射器中的混合气体注入塑料袋叶室内(图3),针头取出后迅速用透明胶带将针孔封上。植株放在阳光下光合作用20~30 min后,用100 mL大注射器将叶室内气体抽出,注入碱液中回收剩余的¹⁴CO₂,重复操作多次,确保将¹⁴CO₂彻底回收。

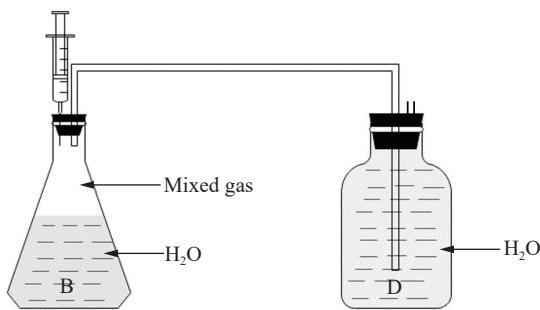


图2 抽取¹⁴CO₂的示意图
Fig.2 Schematic diagram of ¹⁴CO₂ extraction

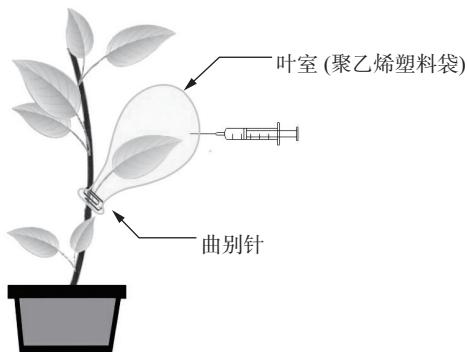


图3 单叶¹⁴CO₂饲喂的示意图
Fig.3 Schematic diagram of ¹⁴CO₂ fed to a single leaf

2.3 采样及测定

在晴天上午9~10时对45株开花后10 d的小麦旗叶进行¹⁴CO₂标记,分别在标记后4、10、24、48 h和收获时取样,每次取样9株,将植株分为茎鞘、叶片、籽粒、穗轴等四部分,分别烘干称重,研磨成粉,称取30~80 mg样品粉末,提取可溶性糖和淀粉,用LS6500液体闪烁计数器测定¹⁴C-可溶性糖和¹⁴C-淀粉的放射性比活度,每样品重复3次,¹⁴C-可溶性糖和¹⁴C-淀粉相加得到样品的总放射性比活度^[7-8]。根据各部位的干重计算出各部位¹⁴C放射性的活度,然后

将叶片、籽粒、茎鞘和穗轴的¹⁴C放射性活度相加就得全株¹⁴C放射性总活度,某部位¹⁴C放射性活度除以全株总的¹⁴C放射性活度表示¹⁴C在某器官中的分配率。

3 结果与讨论

3.1 ¹⁴CO₂气体生产量及浓度

称取0.0071 g Ba¹⁴CO₃和0.0074 g的非放射性BaCO₃, BaCO₃的摩尔质量197, Ba¹⁴CO₃的摩尔质量199, 二氧化碳的摩尔体积为22.4 L, 根据化学方式计算产生CO₂气体为1.64 mL。反应瓶A体积为10.6 mL, 得到混合气体总体积大约12.24 mL, 其中二氧化碳的相对浓度为13.4%。

3.2 确定注入叶室混合气体的体积

根据CO₂浓度上限, 确定每个叶室约注射混合气体0.27 mL可以达到实验所需要放射强度 1.5984×10^6 Bq, 其值与预计的每个叶片标记 1.48×10^6 Bq比较接近。

3.3 单叶¹⁴CO₂饲喂的测定结果

表1结果显示, 开花后10 h小麦体内¹⁴C的放射性总活度约58 500~61 800 Bq, 表明此方法饲喂¹⁴CO₂给植物叶片效果良好。饲喂后24 h, 叶片中滞留¹⁴C为43.67%, 表明大部分光合产物已经输出, 同时约48.7%的¹⁴C输入了籽粒。48 h后, 叶片仍有40%的¹⁴C滞留, 籽粒中¹⁴C则少量增加, 可以确定开花后旗叶同化的¹⁴C的转运周期是24 h。收获时, 约65%的¹⁴C分配在籽粒中, 表明开花后小麦叶片同化的碳主要转运至籽粒, 对籽粒的贡献较大。通过示踪实验, 能够较精确示踪不同器官中¹⁴C强度变化, 可以分析获得¹⁴C在源端装载和库端卸出的动态。

表1 小麦旗叶花后标记¹⁴CO₂的分配规律

Table 1 Distribution of ¹⁴CO₂ fed to flag leaves of wheat after anthesis

标记后时间/h	全株 ¹⁴ C总活度/Bq (100%)	旗叶中 ¹⁴ C的活度/Bq (87.5%)	茎鞘中 ¹⁴ C的活度/Bq (6.8%)	穗轴中 ¹⁴ C的活度/Bq (1.3%)	籽粒中 ¹⁴ C的活度/Bq (4.4%)
4	60 839.5±57.9	53 234.6±24.7	4 137.1±12.5	790.9±6.8	2 676.9±13.9
10	61 784.5±49.8	44 958.9±18.6	6 679.6±11.8	1 242.0±9.3	8 904.0±10.1
24	60 594.9±54.3	26 462.9±20.1	3 455.6±11.9	1 133.7±7.8	29 542.7±14.5
48	61 149.5±58.5	24 476.9±20.8	1 014.8±5.6	2 005.1±10.2	33 652.7±21.9
收获	58 479.0±55.7	17 765.9±16.3	1 193.0±7.5	994.1±8.2	38 526.0±23.7
	(100%)	(30.38%)	(2.04%)	(1.70%)	(65.88%)

注:括号内某器官放射性活度除以全株总放射性活度得到的百分比,表示¹⁴C在某器官的分配率。

4 讨论

常规的¹⁴CO₂饲喂法是直接给叶室内放置反应瓶,注入酸使之与¹⁴BaCO₃反应,释放的¹⁴CO₂直接被植物吸收,方法简单使用广泛,适用于全株或小群体标记或单叶标记的植株数目较少而且枝条较壮叶室较大^[2-3]。然而,全株或小群体饲喂¹⁴CO₂的方法一般需要几小时,而碳水化合物一边合成一边输出,而且同时多个器官都会吸收同化¹⁴CO₂,不能精确研究¹⁴C源端装载和库端输出的动态情况,适合于标记一段时间以后(比如成熟期)了解¹⁴C的分配率。精确的研究需要进行单叶标记,若每个叶片的叶室都放置反应瓶,因每个叶片所需的¹⁴CO₂量少,反应使用的碳酸钡数量较少,操作难度大。此外,如果单个叶片较小或者柔弱,叶室较小,在里面放置反应瓶较为困难。

当需要标记的植株较多时,若能将¹⁴CO₂气体一次全部制备收集好,以后每次从中抽取出一定量气体对单个植株进行饲喂,比用多个反应瓶多次制备¹⁴CO₂方便。用一个反应瓶反应并收集气体,然后每次从中直接抽取等量混合气体进行饲喂,方法相对简单^[4-6],但会造成误差。假设只用A瓶进行反应,其体积为16 mL,原本里面空气也就是16 mL,假如反应产生的二氧化碳气体是4 mL,则气体总量增加为20 mL,但瓶子体积只有16 mL,所以瓶内压力增大混合气体浓度也大,每mL混合气体的浓度(分压)约为20/16=1.25。假如每次吸走0.5 mL气体,第一次吸取的气体实际量是1.25×0.5=0.625 mL;剩余气体依然会充满整个瓶子,则其浓度(分压)则为(20-0.625)/16=1.211,因此第二次吸取0.5 mL时实际吸走的气体量是1.211×0.5=0.6055 mL。依次类推,以后吸取的气体会越来越少。导致后面的植株饲喂的¹⁴CO₂量越来越少,因此造成误差。

在本研究中,使用连通器的原理,用排水法收集¹⁴CO₂,虽然所需用品稍微多和方法稍微复杂,但简化了传统方法^[4],所需材料易得,并同时解决2个问题,一是可一次性制备好所有需要的气体,二是每次吸走一定量的气体后,剩余气体的压强和浓度不变,确保每次标记使用的¹⁴CO₂量相同。本方法准确性和便利性均较好,能为植物单叶光合作用的研究提供有力的支持。

参考文献:

- [1] 丁寒,吕金印.基于文献计量学的同位素示踪技术研究现状分析[J].同位素,2023,36(2): 127-136.
Ding Han, Lyu Jinyin. Analysis of isotope tracer technology based on bibliometrics[J]. Journal of Isotopes, 2023, 36(2): 127-136 (in Chinese).
- [2] 王新鼎,郑弘.蚕豆籽粒内的¹⁴C同化物的运转和卸出动态[J].植物生理学报,1992,18(4): 329-336.
Wang Xinding, Zheng Hong. Translocation and unloading of ¹⁴C-assimilates in broad bean seed[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 1992, 18(4): 329-336 (in Chinese).
- [3] 高俊凤.植物生理学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2006: 111-112.
- [4] 于凤义,张萍,周洪杰,等.玉米籽粒建成过程中功能叶片¹⁴C同化物运转与分配特性研究[J].核农学报,1993,7(4): 227-230.
Yu Fengyi, Zhang Ping, Zhou Hongjie, et al. Transportation and distribution of ¹⁴C-assimilate from functional leaves in the development of grains of maize[J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 1993, 7(4): 227-230 (in Chinese).
- [5] Jia S, Lv J, Jiang S, et al. Response of wheat ear photosynthesis and photosynthate carbon distribution to water deficit[J]. Photosynthetica, 2015, 53(1): 95-109.
- [6] Li X, Tang Y, Zhou C, et al. Contributions of glume and awn to photosynthesis, ¹⁴C assimilates and grain weight in wheat ears under drought stress[J]. Heliyon, 2023, 9(10): e21136.
- [7] Gong Y H, Zhang J, Gao J F, et al. Slow export of photoassimilate from stay-green leaves during late grain-filling stage in hybrid winter wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. Journal of Agronomy and Crop Science, 2005, 191(4): 292-299.
- [8] 龚月桦,杨俊峰,王俊儒,等.覆膜对小麦¹⁴C储备物在灌浆期转运分配的影响[J].中国农业科学,2007,40(2): 258-263.
Gong Yuehua, Yang Junfeng, Wang Junru, et al. Effect of film-mulching on the remobilization and distribution of ¹⁴C-reserves in wheat grain-filling stage[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2007, 40(2): 258-263 (in Chinese).
- [9] 李涛,龚月桦,吕金印,等.不同基因型小麦¹⁴C储备物在花后的转运与分配规律[J].核农学报,2010,24(1): 149-153.
Li Tao, Gong Yuehua, Lu Jinyin, et al. Transportation and distribution of ¹⁴C-reserves on different genotype wheat varieties after anthesis[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2010, 24(1): 149-153 (in Chinese).