



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107153091 B

(45)授权公告日 2019.09.27

(21)申请号 201710397351.4

(22)申请日 2017.05.31

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107153091 A

(43)申请公布日 2017.09.12

(73)专利权人 中国科学院地球化学研究所

地址 550081 贵州省贵阳市观山湖区林城西路99号

(72)发明人 吴沿友 张开艳 饶森 李环

方蕾 吴沿胜 赵丽华 刘丛强
王世杰

(74)专利代理机构 贵阳中新专利商标事务所

52100

代理人 刘艳

(51)Int.Cl.

G01N 27/62(2006.01)

(56)对比文件

W0 2012141783 A1,2012.10.18,

CN 101726532 A,2010.06.09,

刘贤赵等.陆生植物氮同位素组成与气候环境变化研究进展.《地球科学进展》.2014,第29卷(第2期),

PETER HO\$ GBERG等.Nitrogen isotope fractionation during nitrogen uptake by ectomycorrhizal and non-mycorrhizal Pinus sylvestris.《New Phytol》.1999,

N.A.D.Waser等.Nitrogen isotope fractionation during the uptake and assimilation of nitrate, nitrite, ammonium, and urea by a marine diatom.《Limnol.Oceanogr》.2013,

审查员 任晓峰

权利要求书1页 说明书9页

(54)发明名称

植物同化铵盐的无机氮同位素分馏值的测定方法

(57)摘要

本发明公开一种植物同化铵盐的无机氮同位素分馏值的测定方法。将无性系组培苗分别培养在稳定氮同位素值不同的两种硝酸盐作为唯一氮源的培养基中;待组培苗经过5周培养后,测定上述两种硝酸盐培养下的组培苗叶片的稳定氮同位素值;同样,另取无性系组培苗,将其培养在铵盐分别与两种稳定氮同位素值不同的硝酸盐组成的混合氮源的培养基上;测定两种混合氮源培养下组培苗叶片稳定氮同位素值;计算组培苗利用硝酸盐的份额,据此,再计算出在混合氮源培养下组培苗同化铵盐发生氮同位素分馏后的稳定氮同位素值;最终获取组培苗同化铵盐发生的稳定氮同位素分馏值,也即是待测植物同化铵盐发生的稳定氮同位素分馏值。

1. 一种植物同化铵盐的无机氮同位素分馏值的测定方法,其特征在于:包含以下步骤:

第一,通过植物组织培养技术获得同一基因型的无性系组培苗,通过调节培养基的激素比例使组培苗处于增殖阶段,形成无根的无性系组培苗;

第二,通过同位素质谱仪测定用于配置植物组织培养的培养基中的硝酸盐的稳定氮同位素比值,筛选出稳定氮同位素值差值大于10‰的两种硝酸盐,其稳定氮同位素值分别为 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}01}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}02}$;分别将这两种硝酸盐作为唯一氮源配置培养基;

第三,将上述无性系组培苗分别培养在上述稳定氮同位素值不同的两种硝酸盐作为唯一氮源的培养基中;

第四,待组培苗经过5周培养后,分别测定上述两种硝酸盐作为唯一氮源的培养基培养下的组培苗叶片的稳定氮同位素值,其叶片稳定氮同位素值分别记为 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}1}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}2}$;

第五,选用铵盐配置植物组织培养的培养基,保证其稳定氮同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{A}}$ 与 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}01}$ 或 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}02}$ 的差值均大于10‰;然后将铵盐分别与上述稳定氮同位素值不同的两种硝酸盐组成混合氮源,配置两种不同的混合氮源培养基;

第六,另取无性系组培苗,将其分别培养在上述两种不同的混合氮源培养基上;

第七,同样,组培苗经过5周培养后,测定上述两种混合氮源培养下组培苗叶片稳定氮同位素值,铵盐与稳定氮同位素值为 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}01}$ 的硝酸盐组成的混合氮源培养下的组培苗叶片稳定氮同位素值记为 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}1\text{mix}}$,铵盐与稳定氮同位素值为 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}02}$ 的硝酸盐组成的混合氮源培养下的组培苗叶片稳定氮同位素值记为 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}2\text{mix}}$;

第八,利用 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}1}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}2}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}1\text{mix}}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}2\text{mix}}$ 计算组培苗利用硝酸盐的份额 f_b ,也即待测植物利用硝酸盐的份额;

第九,利用 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}1}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}2}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}1\text{mix}}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}2\text{mix}}$ 以及组培苗利用硝酸盐的份额 f_b ,求出在混合氮源培养下组培苗同化铵盐发生氮同位素分馏后的稳定氮同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}}$;

第十,依据 $\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{A}}$ 求出组培苗同化铵盐发生的稳定氮同位素分馏值 $\Delta^{15}\text{N}_{\text{A}}$,即待测植物同化铵盐发生的稳定氮同位素分馏值。

2. 根据权利要求1所述的一种测定植物同化铵盐的无机氮同位素分馏值的方法,其特征在于:在第八步骤中,计算组培苗利用硝酸盐的份额 f_b 的方法为:将 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}1}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}2}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}1\text{mix}}$

和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}2\text{mix}}$ 代入方程: $f_b = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{N}1\text{mix}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{N}2\text{mix}}}{\delta^{15}\text{N}_{\text{N}1} - \delta^{15}\text{N}_{\text{N}2}}$ 。

3. 根据权利要求1所述的一种测定植物同化铵盐的无机氮同位素分馏值的方法,其特征在于:在第九步骤中,计算组培苗同化铵盐发生氮同位素分馏后的稳定氮同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}}$

的方法为:将组培苗利用硝酸盐的份额 f_b 代入方程: $\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}} = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{N}1\text{mix}} - f_b \delta^{15}\text{N}_{\text{N}1}}{1 - f_b}$ 或

$\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}} = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{N}2\text{mix}} - f_b \delta^{15}\text{N}_{\text{N}2}}{1 - f_b}$,求出在混合氮源培养下组培苗同化铵盐发生氮同位素分馏后的

稳定氮同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}}$ 。

4. 根据权利要求1所述的一种测定植物同化铵盐的无机氮同位素分馏值的方法,其特征在于:在第十步骤中,依据组培苗同化铵盐发生的稳定氮同位素分馏值 $\Delta^{15}\text{N}_{\text{A}}$ 的方程: $\Delta^{15}\text{N}_{\text{A}} = \delta^{15}\text{N}_{\text{A}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}}$,计算 $\Delta^{15}\text{N}_{\text{A}}$ 。

植物同化铵盐的无机氮同位素分馏值的测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及植物同化铵盐的无机氮同位素分馏值的测定方法,属于作物生产技术领域。

技术背景

[0002] 氮是植物生长发育过程中的必需元素,是构成蛋白质、核酸、酶、叶绿素等的重要组成部分。大多数植物吸收利用的无机氮主要是硝酸盐和铵盐。植物吸收硝酸盐需要经过还原后才能被植物同化,而铵盐可直接被植物同化。通常每还原1分子硝酸盐需要花费15分子ATP,而同化1分子铵盐仅需5分子ATP。因此,从植物的能量花费角度考虑,植物吸收利用铵盐会比较节省能量。然而大多数植物在铵盐作为单独氮源培养时通常长势不好,生长发育受到抑制。而硝酸盐和铵盐共同存在时,植物生长发育最好。因此,在对植物进行氮管理时,需要合理确定硝酸盐和铵盐的用量。在硝酸盐和铵盐共存下,使植物利用较多的铵盐是比较明智的策略。植物利用铵盐份额与铵盐的供应有关,铵盐供应越多,植物利用铵盐的份额就越大。但是铵盐浓度过高时,虽然植物的铵盐份额很高,但此时就发生铵的无效循环,并最终导致能量的浪费。而硝酸盐和铵盐供应下,植物同化铵盐的能力较强,且利用铵盐份额也就较高,无疑是很优的状态。

[0003] 植物在同化硝酸盐和铵盐时都会发生稳定氮同位素分馏,通常情况下,植物的氮同化能力越强,发生的稳定氮同位素分馏值就越小。因此,可以通过稳定氮同位素分馏值来确定植物的氮同化能力。然而,在野外种植或水培种植植物的硝酸盐和铵盐的氮同化既发生在叶片又发生在根部,因此很难通过测定叶片或根部的稳定氮同位素值来判断植物同化铵盐的能力。

[0004] 稳定氮同位素技术目前已广泛应用到生态学等领域,稳定氮同位素被用作氮源的指示剂来研究生物圈的氮循环。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是:提供一种测定植物同化铵盐的无机氮同位素分馏值的方法,以填补或因在单铵下无法生长的植物或在混合氮源下生长的植物的同化铵盐的无机氮同位素分馏值测定的空白。本发明的技术方案:

[0006] 它包含以下步骤:

[0007] 第一,通过植物组织培养技术获得同一基因型的无性系组培苗,通过调节培养基的激素比例使组培苗处于增殖阶段,形成无根的无性系组培苗;

[0008] 第二,通过同位素质谱仪测定用于配置植物组织培养的培养基中的硝酸盐的稳定氮同位素比值,筛选出稳定氮同位素值差值大于10‰的两种硝酸盐,其稳定氮同位素值分别为 $\delta^{15}\text{N}_{01}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{02}$;分别将这两种硝酸盐作为唯一氮源配置培养基;

[0009] 第三,将上述无性系组培苗分别培养在上述稳定氮同位素值不同的两种硝酸盐作为唯一氮源的培养基中;

[0010] 第四,待组培苗经过5周培养后,分别测定上述两种硝酸盐作为唯一氮源的培养基培养下的组培苗叶片的稳定氮同位素值,其叶片稳定氮同位素值分别记为 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N1}}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N2}}$;

[0011] 第五,选用铵盐配置植物组织培养的培养基,保证其稳定氮同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{A}}$ 与 $\delta^{15}\text{N}_{\text{O1}}$ 或 $\delta^{15}\text{N}_{\text{O2}}$ 的差值均大于10‰;然后将铵盐分别与上述稳定氮同位素值不同的两种硝酸盐组成混合氮源,配置两种不同的混合氮源培养基;

[0012] 第六,同样,另取无性系组培苗,将其分别培养在上述两种不同的混合氮源培养基上;

[0013] 第七,同样,组培苗经过5周培养后,测定上述两种混合氮源培养下组培苗叶片稳定氮同位素值,铵盐与稳定氮同位素值为 $\delta^{15}\text{N}_{\text{O1}}$ 的硝酸盐组成的混合氮源培养下的组培苗叶片稳定氮同位素值记为 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}}$,铵盐与稳定氮同位素值为 $\delta^{15}\text{N}_{\text{O2}}$ 的硝酸盐组成的混合氮源培养下的组培苗叶片稳定氮同位素值记为 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}$;

[0014] 第八,将 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N1}}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N2}}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}$ 代入方程: $f_b = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}}{\delta^{15}\text{N}_{\text{N1}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{N2}}}$;即可算出组培苗利用硝酸盐的份额 f_b ,也即待测植物利用硝酸盐的份额;

[0015] 第九,将组培苗利用硝酸盐的份额 f_b 代入方程: $\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}} = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}} - f_b \delta^{15}\text{N}_{\text{N1}}}{1 - f_b}$ 或 $\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}} = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}} - f_b \delta^{15}\text{N}_{\text{N2}}}{1 - f_b}$,求出在混合氮源培养下组培苗同化铵盐发生氮同位素分馏后的稳定氮同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}}$;

[0016] 第十,依据 $\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{A}}$ 求出组培苗同化铵盐发生的稳定氮同位素分馏值 $\Delta^{15}\text{N}_{\text{A}}$, $\Delta^{15}\text{N}_{\text{A}} = \delta^{15}\text{N}_{\text{A}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}}$; $\Delta^{15}\text{N}_{\text{A}}$ 也即是待测植物同化铵盐发生的稳定氮同位素分馏值。

[0017] 本发明优点

[0018] 1) 本发明可以测定或因在单铵下无法生长的植物或在混合氮源下生长的植物的同化铵盐的无机氮同位素分馏值。

[0019] 2) 本发明通过双向稳定氮同位素标记培养技术,在测定植物同化铵盐的无机氮分馏值的同时也测定出植物硝酸盐和铵盐的利用份额,根据植物同化铵盐的无机氮同位素分馏值及铵盐利用份额,可以评价不同条件下的铵氮同化能力,以便有效管理植物的氮肥使用,避免氮源的浪费和氮肥过多施用对环境的危害。

[0020] 3) 本方法为优质组培苗的培养基筛选提供了技术支持,即选择组培苗铵盐利用份额较高,同时同化铵盐发生稳定氮同位素分馏值较小的培养基。

[0021] 4) 本方法利用同一基因型的无性系组培苗开展培养实验,测定的同位素误差小,因此测定的结果更为可靠。

[0022] 5) 本方法采用的步骤少,计算简单。

[0023] 在植物组织培养的增殖阶段,可以通过调节细胞分裂素和生长素的浓度比例来确保组培苗在整个增殖阶段不产生根,这样硝酸盐和铵盐的同化就仅发生在叶片。因此,就可通过测定叶片稳定氮同位素值来确定组培苗同化铵盐发生的无机氮同位素分馏值,在结合组培苗铵盐的利用份额,就可为植物的有效氮管理提供指导依据。本发明测定组培苗的硝酸盐和铵盐的利用份额是通过双向氮同位素标记培养法。首先用两种稳定氮同位素差值大于10‰的硝酸盐同时培养组培苗,然后,在分别用这两种硝酸盐与同一种铵盐同时培养组

育苗,保证铵盐的稳定氮同位素值与这两种硝酸盐的稳定氮同位素值差值均大于10‰。最后就可求得组培苗分别利用硝酸盐和铵盐的份额。知道组培苗利用硝酸盐和铵盐的份额后,也就可确定组培苗同化铵盐发生的稳定氮同位素分馏值。

[0024] 发明原理

[0025] 稳定氮同位素技术目前已被广泛用着氮源的指示剂来研究生物圈的氮循环。自然界中氮元素的两种稳定氮同位素为 ^{14}N 和 ^{15}N ,稳定氮同位素值通常用 $\delta^{15}\text{N}$ (‰)表示,自然界中 $\delta^{15}\text{N}$ 的变化为 $-10\text{‰}\sim+20\text{‰}$ 。培养在不同氮源下的植物的叶片氮同位素值能很好地反映氮源的稳定氮同位素值的特征。因此,通过质量平衡原理和同位素混合模型就可定量判别植物体内不同的无机氮源。

[0026] 组培苗在同化硝酸盐和铵盐时都会存在一定的氮同位素分馏。在混合氮源条件下培养的组培苗叶片的稳定氮同位素值是同化硝酸盐和铵盐发生氮同位素分馏后的稳定氮同位素值混合的结果。因此,要计算出硝酸盐和铵盐的利用份额,就得准确知道混合氮源培养下组培苗同化硝酸盐和铵盐发生氮同位素分馏后的稳定氮同位素值。由于铵盐作为单独氮源时,有些组培苗不能正常生长,例如十字花科植物的组培苗。因此,选用两种稳定氮同位素值差值大于10‰的硝酸盐作为单独氮源同时培养组培苗。测定组培苗分别在这两种稳定氮同位素值不同的硝酸盐培养下的组培苗叶片稳定氮同位素值。然后,将筛选出的铵盐分别和两种稳定氮同位素值不同的硝酸盐组成混合氮源同时培养组培苗,铵盐的稳定氮同位素值与两种硝酸盐的稳定氮同位素值的差值均大于10‰。分别测定两种混合氮源培养下组培苗叶片的稳定氮同位素值。最后通过两端元混合模型来计算出组培苗分别利用硝酸盐和铵盐的份额。

[0027] 两端元的同位素混合模型表示为:

$$[0028] \quad \delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}} = f_b \delta^{15}\text{N}_{\text{N1}} + f_a \delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}} \quad (1)$$

$$[0029] \quad \delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}} = f_b \delta^{15}\text{N}_{\text{N2}} + f_a \delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}} \quad (2)$$

$$[0030] \quad f_a = 1 - f_b \quad (3)$$

[0031] 这里的 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N1}}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N2}}$ 分别为组培苗在稳定氮同位素值差值大于10‰的两种硝酸盐培养下的叶片稳定氮同位素值, $\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}}$ 为混合氮源培养下组培苗同化铵盐发生氮同位素分馏后的稳定氮同位素值。 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}}$ 是稳定氮同位素值为 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N01}}$ 的硝酸盐与铵盐组成混合氮源培养下的组培苗叶片的稳定氮同位素值。 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}$ 是稳定氮同位素值为 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N02}}$ 的硝酸盐与铵盐组成混合氮源培养下的组培苗叶片的稳定氮同位素值。 f_b 为硝酸盐的利用份额, f_a 为铵盐的利用份额。

[0032] 联立方程(1)(2)和(3),求解得到:

$$[0033] \quad f_b = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}}{\delta^{15}\text{N}_{\text{N1}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{N2}}} \quad (4)$$

$$[0034] \quad \delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}} = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}} - f_b \delta^{15}\text{N}_{\text{N1}}}{1 - f_b} = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}} - f_b \delta^{15}\text{N}_{\text{N2}}}{1 - f_b} \quad (5)$$

[0035] 而植物组培苗在混合氮源培养下同化铵盐发生的稳定氮同位素分馏值($\Delta^{15}\text{N}_\text{A}$)即为 $\delta^{15}\text{N}_\text{A}$ 与 $\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}}$ 的差值,具体表述如方程(6)所示:

$$[0036] \quad \Delta^{15}\text{N}_\text{A} = \delta^{15}\text{N}_\text{A} - \delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}} \quad (6)$$

[0037] 根据计算得到的硝酸盐和铵盐利用份额,同时结合各培养条件下组培苗同化铵盐

发生的稳定氮同位素分馏值,就可筛选出合适的培养基。

[0038] 最后,根据不同氮条件下组培苗同化铵盐的无机氮同位素分馏值及铵盐利用份额,就可对植物进行有效的氮管理。

具体实施方式

[0039] 本发明的实施例:它包括以下步骤:

[0040] 第一步骤,通过植物组织培养技术获得同一基因型的无性系组培苗,通过调节培养基的激素比例使组培苗处于增殖阶段,形成无根的无性系组培苗;

[0041] 第二步骤:通过同位素质谱仪测定用于配置植物组织培养的培养基中的硝酸盐的稳定氮同位素比值,筛选出两种稳定氮同位素值差值大于10‰的两种硝酸盐,其稳定氮同位素值分别为 $\delta^{15}\text{N}_{01}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{02}$;分别将这两种稳定氮同位素值不同的硝酸盐作为唯一氮源配置合适浓度的培养基;

[0042] 第三步骤,将上述无性系组培苗分别培养在上述两种稳定氮同位素值不同的硝酸盐作为唯一氮源的培养基中;

[0043] 第四步骤,待组培苗经过5周培养后,分别测定上述两种硝酸盐作为唯一氮源的培养基培养下的组培苗叶片的稳定氮同位素值,其叶片稳定氮同位素值分别记为 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}1}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}2}$;

[0044] 第五步骤,选用稳定氮同位素值合适的用于配置植物组织培养的培养基的铵盐,保证其稳定氮同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{A}}$ 与 $\delta^{15}\text{N}_{01}$ 或 $\delta^{15}\text{N}_{02}$ 的差值均大于10‰;然后将铵盐分别与上述稳定氮同位素值不同的两种硝酸盐组成混合氮源,配置两种不同的混合氮源培养基;

[0045] 第六步骤,同样,另取无性系组培苗,将其分别培养在上述两种不同的混合氮源培养基上;

[0046] 第七步骤,同样,组培苗经过5周培养后,测定上述两种混合氮源培养下组培苗叶片稳定氮同位素值,铵盐与稳定氮同位素值为 $\delta^{15}\text{N}_{01}$ 的硝酸盐组成的混合氮源培养下的组培苗叶片稳定氮同位素值记为 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}1\text{mix}}$,铵盐与稳定氮同位素值为 $\delta^{15}\text{N}_{02}$ 的硝酸盐组成的混合氮源培养下的组培苗叶片稳定氮同位素值记为 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}2\text{mix}}$;

[0047] 第八步骤,将 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}1}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}2}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}1\text{mix}}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}2\text{mix}}$ 代入方程: $f_{\text{b}} = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{N}1\text{mix}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{N}2\text{mix}}}{\delta^{15}\text{N}_{\text{N}1} - \delta^{15}\text{N}_{\text{N}2}}$;即可算出组培苗利用硝酸盐的份额 f_{b} ,也即待测植物利用硝酸盐的份额;

[0048] 第九步骤,将组培苗利用硝酸盐的份额 f_{b} 代入方程: $\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}} = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{N}1\text{mix}} - f_{\text{b}} \delta^{15}\text{N}_{\text{N}1}}{1 - f_{\text{b}}}$ 或

$\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}} = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{N}2\text{mix}} - f_{\text{b}} \delta^{15}\text{N}_{\text{N}2}}{1 - f_{\text{b}}}$,求出在混合氮源培养下组培苗同化铵盐发生氮同位素分馏后的稳定氮同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}}$;

[0049] 第十步骤,依据 $\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{A}}$ 求出组培苗同化铵盐发生的稳定氮同位素分馏值 $\Delta^{15}\text{N}_{\text{A}}$, $\Delta^{15}\text{N}_{\text{A}} = \delta^{15}\text{N}_{\text{A}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}}$; $\Delta^{15}\text{N}_{\text{A}}$ 也即是待测植物同化铵盐发生的稳定氮同位素分馏值。

[0050] 实施例:诸葛菜同化铵盐的无机氮同位素分馏值

[0051] 培养材料:无性系诸葛菜组培苗

[0052] 培养基配方为:MS+6-BA2.0mg/L+NAA0.1mg/L,30g/L蔗糖,琼脂:7.5g/L,pH值:

5.8, 培养室温度: $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 。光周期: 12h/d, 光照强度: $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 两种硝酸盐的稳定氮同位素值分别为: $\delta^{15}\text{N}_{\text{O1}} = 8.08\%$, $\delta^{15}\text{N}_{\text{O2}} = 22.67\%$ 。铵盐的稳定氮同位素值为: $\delta^{15}\text{N}_{\text{A}} = -2.64\%$ 。分别用 $\delta^{15}\text{N}_{\text{O1}}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{O2}}$ 的硝酸盐配置浓度为 10mM、20mM 和 40mM 的培养基, 诸葛菜组培苗在上述培养基中培养 5 周后, 分别测定其叶片的稳定氮同位素值。由于诸葛菜组培苗在用 $\delta^{15}\text{N}_{\text{O1}}$ 的硝酸盐配置浓度为 10mM、20mM 和 40mM 的培养基培养下的叶片稳定氮同位素值差异不显著, 且在用 $\delta^{15}\text{N}_{\text{O2}}$ 的硝酸盐配置浓度为 10mM、20mM 和 40mM 的培养基培养下的叶片稳定氮同位素值也差异不显著。因此, 在稳定氮同位素值为 $\delta^{15}\text{N}_{\text{O1}}$ 的硝酸盐培养下的诸葛菜组培苗叶片稳定氮同位素值 $\delta^{15}\text{N}_1$ 即假定为在硝酸盐浓度为 10mM、20mM 和 40mM 培养下的诸葛菜组培苗叶片的稳定氮同位素值的平均值, 即 $\delta^{15}\text{N}_1 = 5.71\%$ ($n=9$), 同理得 $\delta^{15}\text{N}_2 = 17.02\%$ ($n=9$)。

[0053] 实验 1 无机氮浓度梯度 (硝酸盐浓度是铵盐浓度的 2 倍) 下诸葛菜组培苗的硝酸盐和铵盐利用份额

[0054] 实施效果如下:

[0055] 按照本发明的方法, 将铵盐分别与稳定氮同位素值为 $\delta^{15}\text{N}_{\text{O1}}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{O2}}$ 的硝酸盐组成混合氮源, 配置混合氮源的浓度梯度为低氮、中氮、对照和高氮的培养基。将无性系诸葛菜组培苗分别培养在上述四种无机氮浓度梯度下, 经过 5 周培养后, 诸葛菜组培苗在稳定氮同位素值为 $\delta^{15}\text{N}_{\text{O1}}$ 的硝酸盐与铵盐组成混合氮源培养下的叶片稳定氮同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}}$ 和在稳定氮同位素值为 $\delta^{15}\text{N}_{\text{O2}}$ 的硝酸盐与铵盐组成混合氮源培养下的叶片稳定氮同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}$ 如表 1 所示:

[0056] 表 1 无机氮浓度梯度下诸葛菜组培苗叶片稳定氮同位素值

[0057]

Treatments	NaNO_3 (mM)	NH_4Cl (mM)	$\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}}(\text{‰})$	$\delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}(\text{‰})$
低氮	13.3	6.67	0.44	6.60
中氮	26.6	13.3	-0.13	3.65
对照	40.0	20.0	-1.42	1.78
高氮	53.3	26.67	-0.69	4.44

[0058] 注: $n=3$ 。

[0059] 从表 1 可以看出, 在铵盐分别与两种稳定氮同位素值不同的硝酸盐组成的混合氮源浓度梯度下, 诸葛菜组培苗叶片的稳定氮同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}$ 均随着混合氮源浓度的增加而逐渐降低, 但在高氮浓度梯度下出现回升。根据表 1 的 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}$, 结合

$\delta^{15}\text{N}_1$ 和 $\delta^{15}\text{N}_2$, 利用方程 $f_b = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}}{\delta^{15}\text{N}_{\text{N1}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{N2}}}$ 就可以计算出混合氮源培养下诸葛菜组培苗利用硝酸盐和铵盐的份额, 得到硝酸盐和铵盐的利用份额后, 根据方程

$\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}} = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}} - f_b \delta^{15}\text{N}_{\text{N1}}}{1 - f_b}$ 或 $\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}} = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}} - f_b \delta^{15}\text{N}_{\text{N2}}}{1 - f_b}$, 还可计算得到混合氮源培养下诸葛菜组培苗同化铵盐发生稳定氮同位素分馏后的稳定氮同位素值 ($\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}}$), 其结果如表 2 所示:

[0060] 表 2 无机氮浓度梯度下诸葛菜组培苗的硝酸盐利用份额 (f_b), 铵盐利用份额 ($f_a = 1 - f_b$) 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}}$

[0061]

Treatments	f_b	f_a	$\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}} (\text{‰})$
低氮	0.54	0.46	-5.86
中氮	0.33	0.67	-3.06
对照	0.28	0.72	-4.23
高氮	0.45	0.55	-6.00

[0062] 注:n=3。

[0063] 从表2可以看出,随着混合氮源浓度的增加,诸葛菜组培苗利用硝酸盐的份额逐渐降低,但在高氮时硝酸盐的利用份额呈现回升趋势,而铵盐的利用份额随着混合氮浓度的增加不断增大,在高氮时铵盐的利用份额出现下降趋势。诸葛菜组培苗同化铵盐发生氮同位素分馏后的稳定氮同位素值在中氮处理下最大。

[0064] 此外,知道诸葛菜组培苗在混合氮源培养下同化铵盐发生氮同位素分馏后的稳定氮同位素值,我们就可以确定诸葛菜组培苗同化铵盐发生的稳定氮同位素分馏值,通过方程 $\Delta^{15}\text{N}_\text{A} = \delta^{15}\text{N}_\text{A} - \delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}}$ 即可求得诸葛菜组培苗同化铵盐发生的氮同位素分馏值 ($\Delta^{15}\text{N}_\text{A}$), 计算结果如表3所示:

[0065] 表3无机氮浓度梯度下诸葛菜组培苗同化铵盐发生的稳定氮同位素分馏值 $\Delta^{15}\text{N}_\text{A}$

[0066]

Treatments	$\Delta^{15}\text{N}_\text{A} (\text{‰})$
低氮	3.22
中氮	0.42
对照	1.59
高氮	3.36

[0067] 注:n=3。

[0068] 从表3可知,诸葛菜组培苗在低氮和高氮两个处理下同化铵盐发生的氮同位素分馏值较大,而在中氮处理下同化铵盐发生的氮同位素分馏值最小。通常情况下,植物的氮同化能力越强,发生的稳定氮同位素分馏值就越小。因此,在中氮处理下,诸葛菜组培苗同化铵盐的能力最强。

[0069] 实验2铵盐浓度恒定,硝酸盐浓度处理下诸葛菜组培苗的硝酸盐和铵盐利用份额

[0070] 实施效果如下:

[0071] 按照本发明的方法,将铵盐分别与稳定氮同位素值为 $\delta^{15}\text{N}_{01}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{02}$ 的硝酸盐组成混合氮源,在配置培养基时,保证培养基的铵盐浓度都为20mM,然后设置硝酸盐的浓度分别为5mM、10mM、20mM和40mM。这样培养基的氮浓度就分别是25mM、30mM、40mM和60mM。将无性系诸葛菜组培苗分别培养在上述四种混合氮源浓度梯度下,经过5周培养后,分别测定在 $\delta^{15}\text{N}_{01}$ 的硝酸盐与铵盐组成混合氮源培养下的诸葛菜组培苗叶片稳定氮同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}}$ 和在稳定氮同位素值为 $\delta^{15}\text{N}_{02}$ 的硝酸盐与铵盐组成混合氮源培养下的诸葛菜组培苗叶片稳定氮同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}$ 。测定结果如表4所示:

[0072] 表4硝酸盐处理下诸葛菜组培苗叶片的稳定氮同位素值

[0073]

参数	NO ₃ -N (mM) (+ 20mM NH ₄ -N)			
	5	10	20	40
$\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}}$ (‰)	-5.43	-3.08	-2.27	-0.90
$\delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}$ (‰)	-2.90	0.52	1.08	2.57

[0074] 注:培养基中的铵盐都为20mM。n=3。

[0075] 从表4可知,在培养基中铵盐浓度都为20mM的情况下,增加硝酸盐的浓度,诸葛菜组培苗分别在铵盐与两种稳定氮同位素值差距较大的硝酸盐组成混合氮源培养下的叶片的稳定氮同位素值都在逐渐偏正,且都在最高硝酸盐浓度下有最大稳定氮同位素值。根据表4的 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}$,结合 $\delta^{15}\text{N}_1$ 和 $\delta^{15}\text{N}_2$,利用方程 $f_b = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}}{\delta^{15}\text{N}_{\text{N1}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{N2}}}$ 就可以计算得到在混合氮源下诸葛菜组培苗利用硝酸盐和铵盐的份额,得到硝酸盐和铵盐的利用份额后,根据方程 $\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}} = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}} - f_b \delta^{15}\text{N}_{\text{N1}}}{1 - f_b}$ 或 $\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}} = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}} - f_b \delta^{15}\text{N}_{\text{N2}}}{1 - f_b}$,还可计算得到混合氮源培养下诸葛菜组培苗同化铵盐发生稳定氮同位素分馏后的稳定氮同位素值($\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}}$),其结果如表5所示:

[0076] 表5硝酸盐处理下诸葛菜组培苗的硝酸盐利用份额(f_b),铵盐利用份额($f_a = 1 - f_b$)和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}}$

[0077]

参数	NO ₃ -N (mM) (+ 20mM NH ₄ -N)			
	5	10	20	40
f_b	0.22	0.32	0.30	0.31
f_a	0.78	0.68	0.70	0.69
$\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}}$ (‰)	-8.64	-7.18	-5.63	-3.83

[0078] 注:培养基中的铵盐都为20mM。n=3。

[0079] 从表5可以看出,在培养基中铵盐浓度都为20mM的情况下,硝酸盐的浓度从5mM增加10mM时诸葛菜组培苗硝酸盐的利用份额出现一个较大的增长,但后续继续增加硝酸盐的浓度并没有提升诸葛菜组培苗的硝酸盐利用份额。而在各处理下诸葛菜组培苗的铵盐利用份额均较高,铵盐的利用份额最小值都为0.68。而诸葛菜组培苗同化铵盐发生氮同位素分馏后的稳定氮同位素值则随着硝酸盐浓度的增加而逐渐增大。

[0080] 此外,知道诸葛菜组培苗在混合氮源下同化铵盐发生氮同位素分馏后的稳定氮同位素值,我们就可以确定诸葛菜组培苗同化铵盐发生的稳定氮同位素分馏值,通过方程 $\Delta^{15}\text{N}_A = \delta^{15}\text{N}_A - \delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}}$ 即可求得诸葛菜组培苗同化铵盐发生的氮同位素分馏值($\Delta^{15}\text{N}_A$),计算结果如表6所示:

[0081] 表6硝酸盐处理下诸葛菜组培苗同化铵盐发生的稳定氮同位素分馏值 $\Delta^{15}\text{N}_A$

[0082]

参数	NO ₃ -N (mM) (+ 20mM NH ₄ -N)			
	5	10	20	40
$\Delta^{15}\text{N}_A$ (‰)	6.00	4.54	2.99	1.19

[0083] 注:培养基中的铵盐都为20mM.n=3。

[0084] 从表6可知,诸葛菜组培苗同化铵盐发生的稳定氮同位素分馏值随着硝酸盐浓度的增加而逐渐减少。通常情况下,植物的氮同化能力越强,发生的稳定氮同位素分馏值就越小。因此,在最高硝酸盐浓度下,诸葛菜组培苗同化铵盐的能力最强。

[0085] 实验3硝酸盐浓度恒定,铵盐浓度处理下诸葛菜组培苗的硝酸盐和铵盐利用份额

[0086] 实施效果如下:

[0087] 按照本发明的方法,将铵盐分别与稳定氮同位素值为 $\delta^{15}\text{N}_{01}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{02}$ 的硝酸盐组成混合氮源,在配置培养基时,保证培养基的硝酸盐浓度都为20mM,然后设置铵盐的浓度分别为0.5mM、1mM、2.5mM、5mM、10mM和40mM。这样培养基的氮浓度就分别是20.5mM、21mM、22.5mM、25mM、30mM和60mM。将无性系诸葛菜组培苗分别培养在上述六种混合氮源浓度梯度下,经过5周培养后,分别测定诸葛菜组培苗在 $\delta^{15}\text{N}_{01}$ 的硝酸盐与铵盐组成混合氮源培养下的叶片稳定氮同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}}$ 和在稳定氮同位素值为 $\delta^{15}\text{N}_{02}$ 的硝酸盐与铵盐组成混合氮源培养下叶片稳定氮同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}$ 。测定结果如表7所示:

[0088] 表7铵盐处理下诸葛菜组培苗叶片的稳定氮同位素值

[0089]

参数	$\text{NH}_4\text{-N (mM) (+ 20mM NO}_3\text{-N)}$					
	0.5	1	2.5	5	10	40
$\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}} (\text{‰})$	4.59	4.58	3.19	0.06	-0.49	-3.54
$\delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}} (\text{‰})$	14.75	14.37	11.70	4.37	2.48	-2.12

[0090] 注:培养基中的硝酸盐都为20mM.n=3。

[0091] 从表7可知,在培养基中硝酸盐浓度都为20mM的情况下,增加铵盐的浓度,诸葛菜组培苗分别在铵盐与两种稳定氮同位素值差距较大的硝酸盐组成混合氮源培养下的叶片稳定氮同位素值都在逐渐减小,且都在最高铵盐浓度下有最小的稳定氮同位素值。由于培养基中硝酸盐的浓度都为20mM,而诸葛菜组培苗在20mM稳定氮同位素值为 $\delta^{15}\text{N}_{01}$ 的硝酸盐培养下的叶片稳定氮同位素值 $\delta^{15}\text{N}_1 = 5.81\text{‰}$ (n=3);在20mM稳定氮同位素值为 $\delta^{15}\text{N}_{02}$ 的硝酸盐培养下的叶片稳定氮同位素值 $\delta^{15}\text{N}_2 = 17.19\text{‰}$ (n=3)。因此,根据表7的 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}$,

利用方程 $f_b = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}}{\delta^{15}\text{N}_{\text{N1}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{N2}}}$ 就可以计算得到在混合氮源培养下诸葛菜组培苗利用硝酸盐和铵盐的份额,得到硝酸盐和铵盐的利用份额后,根据方程 $\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}} =$

$\frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}} - f_b \delta^{15}\text{N}_{\text{N1}}}{1 - f_b}$ 或 $\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}} = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}} - f_b \delta^{15}\text{N}_{\text{N2}}}{1 - f_b}$,还可计算得到混合氮源下诸葛菜组培苗同化

铵盐发生氮同位素分馏后的稳定氮同位素值($\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}}$),其结果如表8所示:

[0092] 表8铵盐处理下诸葛菜组培苗的硝酸盐利用份额(f_b),铵盐利用份额($f_a = 1 - f_b$)和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}}$

[0093]

参数	NH ₄ -N (mM) (+ 20mM NO ₃ -N)					
	0.5	1	2.5	5	10	40
f _b	0.89	0.86	0.75	0.38	0.26	0.12
f _a	0.11	0.14	0.25	0.62	0.74	0.88
δ ¹⁵ N _{A-T} (‰)	-5.57	-2.99	-4.58	-3.45	-2.71	-4.87

[0094] 注:培养基中的硝酸盐都为20mM.n=3。

[0095] 从表8可知,在培养基硝酸盐浓度都为20mM的情况下,增加铵盐的浓度使得诸葛菜组培苗铵盐的利用份额逐渐增大,而硝酸盐的利用份额则逐渐降低。铵盐的浓度从2.5mM增加到5mM时,诸葛菜组培苗的铵盐利用份额出现非常明显的增幅。而诸葛菜组培苗同化铵盐发生氮同位素分馏后的稳定氮同位素值在最低和最高铵盐浓度下较小,其它铵盐浓度下变化不大。

[0096] 此外,知道诸葛菜组培苗在混合氮源培养下同化铵盐发生氮同位素分馏后的稳定氮同位素值,我们就可以确定诸葛菜组培苗同化铵盐发生的稳定氮同位素分馏值,通过方程 $\Delta^{15}\text{N}_A = \delta^{15}\text{N}_A - \delta^{15}\text{N}_{A-T}$ 即可求得诸葛菜组培苗同化铵盐发生的氮同位素分馏值 ($\Delta^{15}\text{N}_A$), 计算结果如表9所示:

[0097] 表9硝酸盐处理下诸葛菜组培苗同化铵盐发生的稳定氮同位素分馏值 $\Delta^{15}\text{N}_A$

[0098]

参数	NH ₄ -N (mM) (+ 20mM NO ₃ -N)					
	0.5	1	2.5	5	10	40
Δ ¹⁵ N _A (‰)	2.93	0.35	1.94	0.81	0.07	2.23

[0099] 注:培养基中的硝酸盐都为20mM.n=3。

[0100] 从表9可知,诸葛菜组培苗同化铵盐发生的稳定氮同位素分馏值在最低和最高铵盐浓度下较大,而在10mM铵盐时,诸葛菜组培苗同化铵盐发生的稳定氮同位素值分馏值最小。通常情况下,植物的氮同化能力越强,发生的稳定氮同位素分馏值就越小。因此,在10mM铵盐时,诸葛菜组培苗的铵盐同化能力是最强的。

[0101] 综上所述,在进行培养基氮源优化时,既要考虑组培苗铵盐的利用份额,同时也要考虑组培苗铵盐的同化能力。比较3个实验,我们发现在无机氮浓度处理下,中氮处理条件下的铵盐利用份额和铵盐同化能力都较高;而在铵盐浓度恒定,增加硝酸盐浓度的处理下,诸葛菜组培苗在20mM铵盐和40mM硝酸盐处理下有较好的铵盐利用份额和铵盐同化能力;而在硝酸盐浓度恒定下,增加铵盐浓度的处理下,诸葛菜组培苗在20mM硝酸盐和10mM铵盐处理下有较好的铵盐利用份额和铵盐同化能力。因此,在进行植物的有效氮管理时,铵盐的使用浓度和利用份额的关系以及植物同化铵盐的无机氮同位素分馏值应重点考虑。