



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107114238 B

(45)授权公告日 2019.09.27

(21)申请号 201710237330.6

(22)申请日 2017.04.12

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107114238 A

(43)申请公布日 2017.09.01

(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 吴沿胜 饶森  
苏跃 方蕾 李环 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.

A01H 4/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 102365925 A,2012.03.07,  
许振柱等.植物氮代谢及其环境调节研究进  
展.《应用生态学报》.2004,第15卷(第3期),第  
511-516页.

审查员 冷千里

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种定量和预测组培苗硝酸盐代谢能力及  
氮同位素分馏值的方法

(57)摘要

本发明公开了一种定量和预测组培苗硝酸盐代谢能力及氮同位素分馏值的方法。通过植物组织培养技术获取被考察植物的无性系组培苗；分别将无性系组培苗接种在不同的硝酸盐浓度的培养基中进行培养；测定硝酸盐药品和组培苗叶片的稳定氮同位素值；计算不同硝酸盐浓度下组培苗稳定氮同位素的分馏值，判断组培苗硝酸盐的代谢能力；计算出各硝酸浓度下的组培苗同位素同化比；以酶动力学的米氏方程建立组培苗稳定氮同位素同化比与硝酸盐浓度的关系模型；依据模型计算不同硝酸盐浓度下组培苗的稳定氮同位素同化比；通过组培苗稳定氮同位素同化比，估算出组培苗叶片稳定氮同位素值，进而估算组培苗叶片的稳定氮同位素分馏值；通过稳定氮同位素分馏值判断对应硝酸盐浓度下的硝酸盐代谢能力，从而有效管理培养基硝酸盐的供应量。

1. 一种定量和预测组培苗硝酸盐代谢能力及氮同位素分馏值的方法,其特征在于:包含以下步骤:

第一,通过组织培养获得被考察植物的无性系组培苗;

第二,配置不同硝酸盐浓度的培养基,测定用于配置前述培养基的硝酸盐药品的稳定氮同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{substrate}}$ ;

第三,分别将无性系组培苗接种在上述不同硝酸盐浓度的培养基中进行培养;

第四,分别取出经过上述培养的无性系组培苗的叶片,测定组培苗叶片的稳定氮同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{foliar}}$ ;

第五,根据测定的叶片稳定同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{foliar}}$ ,计算出各硝酸盐浓度梯度下组培苗叶片稳定氮同位素分馏值 $\Delta^{15}\text{N}$ ;

第六,根据测定的叶片稳定同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{foliar}}$ ,计算出各硝酸浓度梯度下的组培苗同位素同化比 $P_s$ 和硝酸盐代谢能力 $\text{NSC}$ ;

第七,以酶动力学的米氏方程建立稳定氮同位素同化比与硝酸盐浓度的关系模型;

第八,依据上述模型求出被考察的培养基中组培苗的稳定氮同位素同化比;

第九,依据被考察的培养基中组培苗的稳定氮同位素同化比 $P_s$ ,确定被考察的培养基中组培苗的硝酸盐代谢能力 $\text{NSC}$ ;

第十,根据被考察的培养基中组培苗的稳定氮同位素同化比 $P_s$ ,估算出不同硝酸盐浓度下的 $\Delta^{15}\text{N}$ ;在第五步骤中,组培苗叶片稳定氮同位素分馏值 $\Delta^{15}\text{N}$ , $\Delta^{15}\text{N}=\delta^{15}\text{N}_{\text{substrate}}-\delta^{15}\text{N}_{\text{foliar}}$ ;在第六步骤中,组培苗稳定氮同位素同化比 $P_s$ 为组培苗叶片稳定氮同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{foliar}}$ 与硝酸盐的稳定氮同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{substrate}}$ 的比值,稳定氮同位素同化比 $P_s$ 等于硝酸盐代谢能力 $\text{NSC}$ ;在第七步骤中,米氏方程的表达式为:
$$\frac{1}{P_s} = \frac{1}{P_{s_{\max}}} + \frac{1}{c} \frac{K_m}{P_{s_{\max}}}$$
 这里的 $P_s$ 为组培

苗同位素同化比, $c$ 为培养基中硝酸盐浓度, $P_{s_{\max}}$ 和 $K_m$ 值为米氏方程的常数;在第九步骤中,被考察的培养基中组培苗的硝酸盐代谢能力 $\text{NSC}$ 与组培苗的稳定氮同位素同化比 $P_s$ 相同,即 $\text{NSC}=P_s$ ;在第十步骤中,估算出不同硝酸盐浓度下的 $\Delta^{15}\text{N}$ 的公式为: $\Delta^{15}\text{N}=\delta^{15}\text{N}_{\text{substrate}}-P_s \times \delta^{15}\text{N}_{\text{substrate}}$ 。

2. 根据权利要求1所述的一种定量和预测组培苗硝酸盐代谢能力及氮同位素分馏值的方法,其特征在于:在第三步骤中,分别将带有1个单芽的无性系组培苗接种在上述不同硝酸盐浓度的培养基中,培养时间超过4周。

3. 根据权利要求1所述的一种定量和预测组培苗硝酸盐代谢能力及氮同位素分馏值的方法,其特征在于:在第四步骤中,分别取出100mg以上的上述经过4周以上培养的无性系组培苗的叶片,测定组培苗叶片的稳定氮同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{foliar}}$ 。

4. 根据权利要求1所述的一种定量和预测组培苗硝酸盐代谢能力及氮同位素分馏值的方法,其特征在于:在第八步骤中,依据米氏方程模型中的 $P_{s_{\max}}$ 和 $K_m$ 值,并将被考察的培养基中的硝酸盐浓度值作为 $c$ 代入上述米氏方程模型求出被考察的培养基中组培苗的稳定氮同位素同化比。

## 一种定量和预测组培苗硝酸盐代谢能力及氮同位素分馏值的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及到一种定量和预测组培苗硝酸盐代谢能力及氮同位素分馏值的方法，属于植物生物技术领域。

### 技术背景

[0002] 硝酸盐是植物组织培养过程中一种很重要的氮源，硝酸盐在植物的生长发育过程中起着重要作用。此外，硝酸盐具有营养和生理调节功能。硝酸盐可以作为大多数植物种类组织培养的唯一氮源。

[0003] 硝酸盐的代谢主要发生在叶片和根部。然而，在植物组织培养的增殖阶段，由于组培苗没有根的生成。因此，硝酸盐主要在叶片进行代谢。此外，在硝酸盐代谢过程中起着重要作用的硝酸还原酶是一种底物诱导酶，硝酸还原酶的活力受到硝酸盐供应的影响。因此，利用组培苗研究植物硝酸盐代谢能力大小具有很大的优势。定量和预测组培苗硝酸盐代谢能力可为植物组培培养基的选择以及施肥提供科学依据。

[0004] 传统的植物硝酸盐代谢能力测定是通过测定植物硝酸还原酶的活力来获得的。但是，传统测定硝酸还原酶的方法较为复杂，且操作繁琐。而且所需样品材料较多，这对组织培养的植物来说，叶片材料的供应存在较大难度。而目前发展起来的稳定氮同位素技术圆满解决组培苗叶片材料不足的缺陷。用于稳定氮同位素测定所需的烘干叶片量仅为50 $\mu$ g氮，较少的取样，不影响组培苗后续的培养，为组培苗的在线动态监测提供了条件。植物在代谢硝酸盐的过程中存在氮同位素的分馏现象。在高的硝酸盐代谢情况下，稳定氮同位素的分馏较小。这是因为细胞质中的大部分氮源都被代谢，而仅有少量的氮源流回培养基质中。因此，我们可通过植物叶片的稳定氮同位素分馏值来判断硝酸盐的代谢能力。同位素分馏值 ( $\Delta^{15}\text{N}$ ) 是产物的稳定氮同位素值与底物稳定氮同位素值的差值，即  $\Delta^{15}\text{N} = \delta^{15}\text{N}_{\text{substrate}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{product}}$ 。但是，水培或大田种植条件下的植物，由于硝酸盐的代谢发生在根部和叶片。因此叶片的稳定氮同位素值是根部和叶片代谢硝酸盐的结果，通过叶片的稳定氮同位素分馏值将不能定量揭示硝酸盐代谢能力的大小。然而，在组织培养的整个增殖阶段，由于组培苗没有根的生成，因此，硝酸盐的代谢就仅发生在叶片。组培苗叶片的稳定氮同位素分馏值就可判断硝酸盐的代谢能力。

### 发明内容：

[0005] 本发明要解决的技术问题是：提供了一种定量和预测组培苗硝酸盐代谢能力的方法，同时，以酶动力学的米氏方程为模型构建组培苗稳定氮同位素同化比与硝酸盐供应的关系，求解得到组培苗在对应硝酸盐浓度下的稳定氮同位素同化比，通过稳定氮同位素同化比计算出对应硝酸盐浓度下的叶片的稳定氮同位素值，从而估算出对应硝酸盐浓度下组培苗叶片的稳定氮同位素分馏值 ( $\Delta^{15}\text{N}$ )。通过估算出的同位素分馏值，即可考察不同硝酸盐供应下的硝酸盐代谢能力，从而有效管理培养基硝酸盐的供应量。

[0006] 本发明的技术方案：

[0007] 它包含以下步骤：

[0008] 第一，通过组织培养获得被考察植物的无性系组培苗；

[0009] 第二，配置不同硝酸盐浓度的培养基，测定用于配置上述培养基的硝酸盐药品的稳定氮同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{substrate}}$ ；

[0010] 第三，分别将带有1个单芽的无性系组培苗接种在上述不同硝酸盐浓度的培养基中，培养4周以上；

[0011] 第四，分别取出100mg以上的上述经过4周以上培养的无性系组培苗的叶片，测定组培苗叶片的稳定氮同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{foliar}}$ ；

[0012] 第五，根据测定的叶片稳定同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{foliar}}$ ，计算出各硝酸盐浓度梯度下稳定氮同位素分馏值 $\Delta^{15}\text{N}$ ，即 $\Delta^{15}\text{N} = \delta^{15}\text{N}_{\text{substrate}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{foliar}}$ ；

[0013] 第六，根据测定的叶片稳定同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{foliar}}$ ，计算出各硝酸浓度梯度下的组培苗同位素同化比 $P_s$ 和硝酸盐代谢能力 $\text{NSC}$ ，稳定氮同位素同化比 $P_s$ 等于硝酸盐代谢能力 $\text{NSC}$ ，它们都是组培苗叶片稳定氮同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{foliar}}$ 与硝酸盐的稳定氮同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{substrate}}$ 的比值；

[0014] 第七，以酶动力学的米氏方程建立稳定氮同位素同化比与硝酸盐浓度的关系模型；这里的米氏方程的表达式为： $\frac{1}{P_s} = \frac{1}{P_{s\max}} + \frac{1}{c} \frac{K_m}{P_{s\max}}$ ，这里的 $P_s$ 为组培苗同位素同化比， $c$ 为培养基中硝酸盐浓度， $P_{s\max}$ 和 $K_m$ 值为米氏方程的常数；

[0015] 第八，依据上述模型的 $P_{s\max}$ 和 $K_m$ 值，并将被考察的培养基中的硝酸盐浓度值作为 $c$ 代入上述模型求出被考察的培养基中组培苗的稳定氮同位素同化比；

[0016] 第九，依据被考察的培养基中组培苗的稳定氮同位素同化比 $P_s$ ，确定被考察的培养基中组培苗的硝酸盐代谢能力 $\text{NSC}$ ，也即 $\text{NSC} = P_s$ ；

[0017] 第十，根据被考察的培养基中组培苗的稳定氮同位素同化比 $P_s$ ，估算出不同硝酸盐浓度下的 $\Delta^{15}\text{N}$ ，公式为： $\Delta^{15}\text{N} = \delta^{15}\text{N}_{\text{substrate}} - P_s \times \delta^{15}\text{N}_{\text{substrate}}$ 。

[0018] 本发明的优点：

[0019] 1) 通过稳定氮同位素技术定量组培苗硝酸盐代谢的能力，需要材料少，为组培苗在线监测技术的实施提供保证。

[0020] 2) 可以进行不同硝酸盐浓度下组培苗氮同位素分馏值的估算。

[0021] 3) 可以比较不同植物的硝酸盐代谢能力。

[0022] 4) 本方法采用的步骤少，计算方法简单。

[0023] 发明原理：

[0024] 植物的硝酸盐代谢通常发生在根部和叶片。但是，由于组培苗在增殖阶段独特的生长状态，即组培苗在整个增殖阶段没有根的生成。因此，组培苗硝酸盐的代谢仅发生在叶片。而硝酸盐的代谢过程中存在稳定氮同位素的分馏。因此，就可通过叶片的稳定氮同位素分馏值来确定组培苗的硝酸盐代谢能力。硝酸盐的代谢能力与组培苗的氮同位素分馏值成负相关关系。因此，硝酸盐代谢能力越强，组培苗的叶片氮同位素分馏就越小；反之，同位素分馏就越大。

[0025] 同位素分馏越小时，组培苗叶片的同位素同化比就越大。即叶片的稳定氮同位素

值就越接近硝酸盐的稳定氮同位素值。同位素分馏越大,组培苗叶片的同位素同化比就越小。而在组培苗叶片硝酸盐代谢过程中起关键作用的硝酸还原酶是硝酸盐诱导酶。因为叶片的稳定氮同位素分馏值与叶片的硝酸盐代谢成负相关。所以叶片的稳定氮同位素同化比与硝酸盐的代谢能力就呈现正相关关系。因此,通过米氏方程即可构建组培苗稳定同位素同化比与硝酸盐浓度的关系。这里的米氏方程的表达式为:  $\frac{1}{P_s} = \frac{1}{P_{s_{max}}} + \frac{1}{c} \frac{K_m}{P_{s_{max}}}$ , 这里的 $P_s$ 为组培苗同位素同化比, $c$ 为培养基中硝酸盐浓度, $P_{s_{max}}$ 和 $K_m$ 值为米氏方程的常数。

[0026] 组培苗叶片的稳定氮同位素分馏值虽然可以用来判断硝酸盐代谢能力的大小。但是,这需要测定对应硝酸盐浓度下的组培苗叶片稳定氮同位素值,从而计算组培苗叶片氮同位素分馏值来判断硝酸盐的同化能力。每个对应硝酸盐浓度下稳定氮同位素值的测定将导致经济成本的增加。通过测定不同硝酸盐浓度下组培苗叶片的稳定氮同位素值,计算得到各硝酸盐浓度下的稳定氮同位素同化比,将各硝酸盐浓度下组培苗叶片的稳定氮同位素同化比与对应硝酸盐浓度进行米氏方程曲线拟合,从而求解得到 $P_{s_{max}}$ 和 $K_m$ 。通过计算得到 $P_{s_{max}}$ 和 $K_m$ 值,即可计算在被考察的硝酸盐浓度下的组培苗稳定氮同位素同化比。从而估算出对应硝酸盐浓度下的叶片稳定氮同位素值,进而估算在被考察的硝酸盐浓度下的组培苗叶片的稳定氮同位素分馏值。最终判断在被考察的硝酸盐浓度下的组培苗的硝酸盐代谢能力。组培苗稳定氮同位素分馏值的估算为管理培养基的硝酸盐提供了技术支撑。

### 具体实施方式

[0027] 本发明的实施例:

[0028] 第一步骤,通过植物组织培养技术获取被考察植物的无性系组培苗;通常一个生长良好的芽经过4代左右的培养即可获得大量优质的无性系组培苗;

[0029] 第二步骤,配置不同硝酸盐浓度的培养基,测定用于配置上述培养基的硝酸盐药品的稳定氮同位素值 $\delta^{15}N_{substrate}$ ;

[0030] 第三步骤,分别将带有1个单芽的无性系组培苗接种在上述不同硝酸盐浓度的培养基中,培养5周;

[0031] 第四步骤,分别取出100mg以上的上述经过5周培养的无性系组培苗的叶片,测定组培苗叶片的稳定氮同位素值 $\delta^{15}N_{foliar}$ ;

[0032] 第五步骤,根据测定的叶片稳定同位素值 $\delta^{15}N_{foliar}$ ,计算出各硝酸盐浓度梯度下组培苗稳定氮同位素分馏值 $\Delta^{15}N$ ,即 $\Delta^{15}N = \delta^{15}N_{substrate} - \delta^{15}N_{foliar}$ ;

[0033] 第六步骤,根据测定的叶片稳定同位素值 $\delta^{15}N_{foliar}$ ,计算出各硝酸浓度梯度下的组培苗同位素同化比 $P_s$ 和硝酸盐代谢能力NSC,稳定氮同位素同化比 $P_s$ 等于硝酸盐代谢能力NSC,它们都是组培苗叶片稳定氮同位素值 $\delta^{15}N_{foliar}$ 与硝酸盐的稳定氮同位素值 $\delta^{15}N_{substrate}$ 的比值;

[0034] 第七步骤,以酶动力学的米氏方程建立稳定氮同位素同化比与硝酸盐浓度的关系模型;这里的米氏方程的表达式为:  $\frac{1}{P_s} = \frac{1}{P_{s_{max}}} + \frac{1}{c} \frac{K_m}{P_{s_{max}}}$ , 这里的 $P_s$ 为组培苗同位素同化比, $c$ 为培养基中硝酸盐浓度, $P_{s_{max}}$ 和 $K_m$ 值为米氏方程的常数;

[0035] 第八步骤,依据上述模型的 $P_{s_{max}}$ 和 $K_m$ 值,并将被考察的培养基中的硝酸盐浓度值

作为c代入上述模型求出被考察的培养基中组培苗的稳定氮同位素同化比；

[0036] 第九步骤，依据被考察的培养基中组培苗的稳定氮同位素同化比 $P_s$ ，确定被考察的培养基中组培苗的硝酸盐代谢能力NSC，也即 $NSC = P_s$ ；

[0037] 第十步骤，根据被考察的培养基中组培苗的稳定氮同位素同化比 $P_s$ ，估算出不同硝酸盐浓度下的 $\Delta^{15}N$ ，公式为： $\Delta^{15}N = \delta^{15}N_{\text{substrate}} - P_s \times \delta^{15}N_{\text{substrate}}$ 。

[0038] 本发明的实施效果如下：

[0039] 培养材料：无性系诸葛菜组培苗

[0040] 培养基配方为：MS+6-BA 2.0mg/L+NAA0.1mg/L,30g/L蔗糖，琼脂：7.5g/L，pH值：5.8，培养温度： $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 。光周期：12h/d，光照强度： $50\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，硝酸盐的稳定氮同位素值为8.08‰，配置硝态氮的浓度为10mM,20mM,40mM,80mM和120mM，经过5周的培养后，无性系诸葛菜组培苗在不同硝酸盐浓度培养下的叶片氮同位素值 $\delta^{15}N$ 如表1所示：

[0041] 表1不同硝酸盐浓度下诸葛菜叶片的稳定氮同位素值

[0042]

硝酸盐浓度 (mM)	$\delta^{15}N_{\text{foliar}}$ (‰)
10	5.23
20	5.81
40	6.09
80	6.28
120	6.84

[0043] 从表可知，随着硝酸浓度的增加，诸葛菜组培苗叶片的稳定氮同位素值逐渐增大。根据表1诸葛菜叶片稳定氮同位素数据，分别计算出各硝酸盐浓度梯度下诸葛菜组培苗叶片的稳定氮同位素分馏值 $\Delta^{15}N$ 和稳定氮同位素同化比 $P_s$ 。计算结果如表2所示：

[0044] 表2不同硝酸盐浓度下诸葛菜组培苗叶片的稳定氮同位素分馏值、同化比及硝酸盐代谢能力

[0045]

硝酸盐浓度 (mM)	$\Delta^{15}N$ (‰)	$P_s/NSC$
10	2.85	0.65
20	2.27	0.72
40	1.99	0.75
80	1.80	0.78
120	1.24	0.85

[0046] 从表2可知，随着硝酸盐浓度增加，诸葛菜组培苗稳定氮同位素分馏值逐渐减小，稳定氮同位素同化比逐渐增大。表2数据说明随着硝酸盐浓度的增加，诸葛菜组培苗的硝酸盐代谢能力也逐渐增强。

[0047] 以酶动力学的米氏方程 $\frac{1}{P_s} = \frac{1}{P_{s_{\max}}} + \frac{1}{c} \frac{K_m}{P_{s_{\max}}}$ ，建立稳定氮同位素同化比与硝酸盐浓度的关系模型，求解得到 $P_{s_{\max}} = 0.8258$ ， $K_m = 2.8035$  ( $R = 0.9546$ ， $P = 0.0115$ )。因此，我们就可以计算诸葛菜组培苗在其它硝酸盐浓度下的稳定氮同位素同化比，例如5mM,15mM,30mM,60mM,和100mM浓度下的诸葛菜组培苗的稳定氮同位素同化比。通过米氏方程计算被考察的

不同硝酸盐浓度下的诸葛菜组培苗的稳定氮同位素同化比和硝酸盐代谢能力如表3所示：

[0048] 表3通过米氏方程计算得到的被考察的不同硝酸盐浓度下诸葛菜组培苗的稳定氮同位素同化比Ps和硝酸盐代谢能力NSC

[0049]

硝酸盐浓度 (mM)	Ps/NSC
5	0.53
15	0.70
30	0.76
60	0.79

[0050]

100	0.80
-----	------

[0051] 因为稳定氮同位素同化比是组培苗叶片稳定氮同位素值与硝酸盐稳定氮同位素值的比值,因此,通过硝酸盐的稳定氮同位素值,即可估算出不同硝酸盐浓度下组培苗叶片的稳定氮同位素值,从而估算出不同硝酸盐浓度下组培苗的稳定氮同位素分馏值,被考察的不同硝酸盐浓度下诸葛菜组培苗稳定氮同位素分馏值  $\Delta^{15}\text{N}$ 和叶片稳定氮同位素值  $\delta^{15}\text{N}_{\text{foliar}}$ 如表4所示:

[0052] 表4不同硝酸盐浓度下通过计算得到的诸葛菜组培苗同位素分馏值及叶片稳定氮同位素值

[0053]

硝酸盐浓度 (mM)	$\delta^{15}\text{N}_{\text{foliar}}$ (‰)	$\Delta^{15}\text{N}$ (‰)
5	4.28	3.80
15	5.66	2.42
30	6.14	1.94
60	6.38	1.70
100	6.46	1.62

[0054] 因此,通过计算得到的诸葛菜组培苗叶片稳定氮同位素分馏值,即可根据实际情况合理选择培养基硝酸盐浓度。