



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107027626 B

(45)授权公告日 2019.06.11

(21)申请号 201710237317.0

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2017.04.12

A01H 4/00(2006.01)

G06F 17/11(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107027626 A

审查员 姜岚

(43)申请公布日 2017.08.11

(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

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种定量组培苗硝酸盐利用效率的方法

(57)摘要

本发明公开一种定量组培苗硝酸盐利用效率的方法。通过组织培养获得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;计算出各硝酸浓度梯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;对模型求导,得出组培苗硝酸盐利用效率方程;依据上述组培苗硝酸盐利用效率方程,确定组培苗硝酸盐利用效率和硝酸盐最大利用效率;本方法需要材料和步骤少,计算方法简单,可在线动态监测;监测结果可为有效管理培养基硝酸盐的供应量。

1. 一种定量组培苗硝酸盐利用效率的方法,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 $\delta^{15}\text{N}_{\text{substrate}}$;

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,根据测定的组培苗叶片稳定同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{foliar}}$,计算出各硝酸浓度梯度下的组培苗同位素同化比 N_s ;

第六,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;

第七,对上述模型求导,得出组培苗硝酸盐利用效率方程;

第八,依据上述组培苗硝酸盐利用效率方程,确定被考察的组培苗的硝酸盐最大利用效率 NUE_{max} ;

第九,将被考察的培养基中硝酸盐浓度作为 C 代入组培苗硝酸盐利用效率方程中,可求出在被考察的硝酸盐浓度下的组培苗硝酸盐利用效率 NUE ;在第六步骤中,米氏方程的表达式为:

$N_s = \frac{N_{s\text{max}}C}{K_m + C}$,这里的 N_s 为组培苗同位素同化比, C 为培养基中硝酸盐浓度, $N_{s\text{max}}$ 和 K_m 值为米氏方程的常数;

在第七步骤中,组培苗硝酸盐利用效率方程为 $\text{NUE} = N_s' = \frac{N_{s\text{max}}K_m}{(K_m + C)^2}$;

这里的 NUE 为组培苗硝酸盐利用效率, N_s' 为 N_s 对 C 的求导;在第八步骤中,被考察的组培苗的硝酸盐最大利用效率 NUE_{max} 为 $C=0$ 时的 NUE , $\text{NUE}_{\text{max}} = \frac{N_{s\text{max}}}{K_m}$ 。

2. 根据权利要求1所述的一种定量组培苗硝酸盐利用效率的方法,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所述的一种定量组培苗硝酸盐利用效率的方法,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所述的一种定量组培苗硝酸盐利用效率的方法,其特征在于:在第五步骤中,组培苗稳定氮同位素同化比 N_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。

一种定量组培苗硝酸盐利用效率的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及到一种定量组培苗硝酸盐利用效率的方法,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。硝酸盐因具有营养和生理调节功能,所以硝酸盐在植物的生长发育过程中起着重要作用。此外,硝酸盐还可作为大多数植物种类组织培养的唯一氮源。

[0003] 培养基中硝酸盐的浓度一般都是几十毫摩尔。然而,有很多文献报道培养基中的硝酸盐用量实际上是严重过量,即大部分添加的硝酸盐没有被植物利用。因此,判断组培苗硝酸盐的利用效率就显得尤为重要。组培苗硝酸盐的利用效率的判断为组培苗硝酸盐的供应提供了理论支持。

[0004] 传统测定培养基硝酸盐利用效率的方法是通过测定培养基硝酸盐的消耗量同时结合组培苗的生物量来判断。传统培养基硝酸盐的测定不仅实验操作复杂,难以进行大批量培养基硝酸盐的测定,而且因为培养基中琼脂的存在,所以实验误差较大。因此,简单、快速、方便进行大规模组培苗硝酸盐利用率的判断方法就显得非常重要。

发明内容:

[0005] 本发明要解决的技术问题是:提供了一种组培苗硝酸盐利用率的定量方法。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;对模型求导,可得出组培苗在不同硝酸盐浓度下单位硝酸盐被利用的信息;由此可确定组培苗硝酸盐利用效率和硝酸盐最大利用效率。

[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,根据测定的组培苗叶片稳定同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{foliar}}$,计算出各硝酸浓度梯度下的组培苗同位素同化比 N_s ,组培苗稳定氮同位素同化比 N_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;

[0013] 第六,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;米氏方程的表达式为:
$$N_s = \frac{N_{s\max}C}{K_m+C}$$
这里的 N_s 为组培苗同位素同化比, C 为培养基中硝酸盐浓度, $N_{s\max}$ 和 K_m 值为米氏方程的常数;

[0014] 第七,对上述模型 $Ns = \frac{Ns_{\max}C}{Km+C}$ 求导,得出组培苗硝酸盐利用效率方程

$NUE = Ns' = \frac{Ns_{\max}Km}{(Km+C)^2}$; 这里的NUE为组培苗硝酸盐利用效率, Ns' 为 Ns 对 C 的求导;

[0015] 第八,依据上述组培苗硝酸盐利用效率方程,确定被考察的组培苗的硝酸盐最大利用效率 NUE_{\max} , 也即 $C=0$ 时的 NUE , $NUE_{\max} = \frac{Ns_{\max}}{Km}$;

[0016] 第九,将被考察的培养基中硝酸盐浓度作为 C 代入组培苗硝酸盐利用效率方程 $NUE = \frac{Ns_{\max}Km}{(Km+C)^2}$ 中,可求出在被考察的硝酸盐浓度下的组培苗硝酸盐利用效率 NUE 。

[0017] 本发明的优点:

[0018] 1) 通过稳定氮同位素技术定量组培苗硝酸盐利用效率,需要材料少,为组培苗在线监测技术的实施提供保证。

[0019] 2) 可以进行不同硝酸盐浓度下组培苗硝酸盐利用效率的比较。

[0020] 3) 可以用硝酸盐最大利用效率来比较不同组培苗硝酸盐利用效率。

[0021] 4) 本方法采用的步骤少,计算方法简单。

[0022] 发明原理:

[0023] 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。

[0024] 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氮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: $Ns = \frac{Ns_{\max}C}{Km+C}$, Ns 为组培苗同位素同化比, C 为培养基中硝酸盐浓度, Ns_{\max} 和 Km 值为米氏方程的常数。

[0025] 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 Ns_{\max} 和 Km 。通过对 $Ns = \frac{Ns_{\max}C}{Km+C}$ 求导,得出组

培苗硝酸盐利用效率方程 $NUE = Ns' = \frac{Ns_{\max}Km}{(Km+C)^2}$; 这里的 NUE 为组培苗硝酸盐利用效率, Ns' 为 Ns 对 C 的求导;依据上述组培苗硝酸盐利用效率方程,确定被考察的组培苗的硝酸盐最大利用效率 NUE_{\max} , 也即 $C=0$ 时的 NUE , $NUE_{\max} = \frac{Ns_{\max}}{Km}$; 将被考察的培养基中硝酸盐浓度作为 C 代

入组培苗硝酸盐利用效率方程 $NUE = \frac{Ns_{\max}Km}{(Km+C)^2}$ 中,可求出在被考察的硝酸盐浓度下的组培

苗硝酸盐利用效率NUE。

具体实施方式

[0026] 本发明的实施例：

[0027] 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。

[0028] 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 $\delta^{15}\text{N}_{\text{substrate}}$ ；

[0029] 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；

[0030] 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 $\delta^{15}\text{N}_{\text{foliar}}$ ；

[0031] 第五步骤，根据测定的组培苗叶片稳定同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{foliar}}$ ，计算出各硝酸浓度梯度下的组培苗同位素同化比 N_s ，组培苗稳定氮同位素同化比 N_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；

[0032] 第六步骤，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；米氏方程的表达式为： $N_s = \frac{N_{s\max}C}{K_m+C}$ ，这里的 N_s 为组培苗同位素同化比， C 为培养基中硝酸盐浓度， $N_{s\max}$ 和 K_m 值为米氏方程的常数；

[0033] 第七步骤，对上述模型 $N_s = \frac{N_{s\max}C}{K_m+C}$ 求导，得出组培苗硝酸盐利用效率方程 $NUE = N_s' = \frac{N_{s\max}K_m}{(K_m+C)^2}$ ，这里的NUE为组培苗硝酸盐利用效率， N_s' 为 N_s 对 C 的求导；

[0034] 第八步骤，依据上述组培苗硝酸盐利用效率方程，确定被考察的组培苗的硝酸盐最大利用效率 NUE_{\max} ，也即 $C=0$ 时的NUE， $NUE_{\max} = \frac{N_{s\max}}{K_m}$ ；

[0035] 第九步骤，将被考察的培养基中硝酸盐浓度作为 C 代入组培苗硝酸盐利用效率方程 $NUE = \frac{N_{s\max}K_m}{(K_m+C)^2}$ 中，可求出在被考察的硝酸盐浓度下的组培苗硝酸盐利用效率NUE。

[0036] 本发明的实施效果如下：

[0037] 培养材料：无性系诸葛菜组培苗

[0038] 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： $50\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，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 $\delta^{15}\text{N}$ 如表1所示。从表1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和稳定氮同位素同化比 P_s 。计算结果同样放在表1中。

[0039] 表1不同硝酸盐浓度下诸葛菜叶片的稳定氮同位素值和稳定氮同位素同化比 N_s

[0040]

硝酸盐浓度 (mM)	$\delta^{15}\text{N}_{\text{foliar}}$ (‰)	Ns
10	5.23	0.65
20	5.81	0.72
40	6.09	0.75
80	6.28	0.78
120	6.84	0.85

[0041] 从表1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。

[0042] 以酶动力学的米氏方程 $Ns = \frac{Ns_{\max}C}{K_m+C}$, 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 $Ns_{\max}=0.8312$, $K_m=2.9828$ ($R=0.9377$, $P=0.0185$)。因此, $Ns = \frac{Ns_{\max}C}{K_m+C}$ 可写成 $Ns = \frac{0.8312 C}{2.9828+C}$ 。对 $Ns = \frac{0.8312 C}{2.9828+C}$ 求导, 得组培苗硝酸盐利用效率方程 $NUE = Ns' = \frac{Ns_{\max}K_m}{(K_m+C)^2}$ 。

[0043] 将 $C=0$, 代入 $NUE = Ns' = \frac{Ns_{\max}K_m}{(K_m+C)^2}$ 中, 可以计算诸葛菜组培苗的硝酸盐最大利用效率 NUE_{\max} 为 0.2787mM^{-1} 。

[0044] 分别将不同硝酸盐浓度 C 代入 $NUE = Ns' = \frac{Ns_{\max}K_m}{(K_m+C)^2}$ 中, 可求出不同硝酸盐浓度下诸葛菜组培苗硝酸盐利用效率如表2所示:

[0045] 表2被考察的不同硝酸盐浓度下诸葛菜组培苗硝酸盐利用效率 NUE

[0046]

硝酸盐浓度 C (mM)	NUE (mM^{-1})
5	0.038906
10	0.014709
15	0.007667

[0047]

20	0.004694
30	0.002279
40	0.001342
60	0.000625
80	0.00036
100	0.000234
120	0.000164

[0048] 从表中可以看出,随着培养基中硝酸盐浓度的增大,诸葛菜组培苗硝酸盐利用效率越低,这与实际情况是相符的。