



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109169284 B

(45) 授权公告日 2021.01.05

(21) 申请号 201811178636.X

G06F 17/12 (2006.01)

(22) 申请日 2018.10.10

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 107027626 A, 2017.08.11

申请公布号 CN 109169284 A

CN 107449858 A, 2017.12.08

(43) 申请公布日 2019.01.11

审查员 陈仕高

(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 方蕾

邓智先 王世杰 刘从强

(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)

权利要求书2页 说明书9页

(54) 发明名称

一种预测混合氮源下组培苗同化铵盐份额及培养基中铵盐最适浓度的方法

(57) 摘要

本发明公开一种预测混合氮源下组培苗同化铵盐份额及培养基中铵盐最适浓度的方法。将组培苗分别培养在铵盐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;测定不同铵盐浓度下两种混合氮源培养下组培苗叶片稳定氮同位素值;计算不同铵盐浓度的组培苗铵盐利用份额,构建不同铵盐浓度的组培苗铵盐利用份额随铵盐浓度变化的关系模型,获取模型的参数,将被考察的培养基中的铵盐浓度值代入模型,求出被考察的培养基中组培苗同化铵盐份额,并将0.741作为组培苗同化铵盐份额代入模型,求出待测混合氮源下组培苗培养基中铵盐最适浓度。

1. 一种预测混合氮源下组培苗同化铵盐份额及培养基中铵盐最适浓度的方法,其特征在于:包含以下步骤:

第一,将待测组培苗通过调节培养基的激素比例使其处于增殖阶段,形成无根的组培苗;

第二,通过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为待考察的硝酸盐浓度的培养基;

第三,取带有1个单芽的待测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,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,通过测定用于配置植物组织培养的培养基中的铵盐的稳定氮同位素比值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{A}}$ ,选出其稳定氮同位素比值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{A}}$ 与 $\delta^{15}\text{N}_{01}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{02}$ 均大于10‰的铵盐;

第六,将稳定氮同位素值为 $\delta^{15}\text{N}_{01}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{02}$ 的硝酸盐分别与上述铵盐配置成待考察的硝酸盐浓度下、不同铵盐浓度的两组混合氮源培养基;

第七,同样,将带有1个单芽的待测组培苗,分别同时培养在上述两组混合氮源培养基上;

第八,同样,待组培苗培养5周后,测定在上述两组混合氮源培养基上培养的组培苗不同铵盐浓度下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基培养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基培养下的组培苗叶片稳定氮同位素值记为 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}2\text{mix}}$ ;

第九,利用 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}1}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}2}$ 以及同一铵盐浓度下的 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}1\text{mix}}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}2\text{mix}}$ ,分别计算待考察的硝酸盐浓度下不同铵盐浓度的组培苗利用硝酸盐份额 $f_b$ ;

第十,依据待测硝酸盐浓度下不同铵盐浓度下组培苗利用硝酸盐的份额 $f_b$ ;计算待测硝酸盐浓度下不同铵盐浓度的组培苗铵盐利用份额 $f_a$ ;

第十一,以酶动力学的米氏方程建立不同铵盐浓度的组培苗铵盐利用份额 $f_a$ 随铵盐浓度变化的关系模型;这里的米氏方程的表达式为: $f_a = \frac{f_{\text{max}} c_a}{K_f + c_a}$ ,这里的 $f_a$ 为不同铵盐浓度的组培苗铵盐利用份额, $c_a$ 为培养基中铵盐浓度, $f_{\text{max}}$ 和 $K_f$ 值为米氏方程的常数;

第十二,依据上述模型的 $f_{\text{max}}$ 和 $K_f$ 值,并将被考察的培养基中的铵盐浓度值作为 $c_a$ 代入 $f_a = \frac{f_{\text{max}} c_a}{K_f + c_a}$ ,求出被考察的培养基中组培苗同化铵盐份额;

第十三,依据上述模型的 $f_{\text{max}}$ 和 $K_f$ 值,并将 $f_a = 0.741$ 代入 $f_a = \frac{f_{\text{max}} c_a}{K_f + c_a}$ ,求出培养基中的铵盐浓度值 $c_a$ ,此时的 $c_a$ 即为待测混合氮源下组培苗培养基中铵盐最适浓度;在第九步骤中,计算在待考察的硝酸盐浓度下某一特定铵盐浓度的培苗利用硝酸盐的份额 $f_b$ 的方法为:将 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}1}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}2}$ 以及该铵盐浓度下的 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}1\text{mix}}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}2\text{mix}}$ 代入方程: $f_b = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{N}1\text{mix}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{N}2\text{mix}}}{\delta^{15}\text{N}_{\text{N}1} - \delta^{15}\text{N}_{\text{N}2}}$ ;在第十步骤中,计算待考察硝酸盐浓度下某一特定铵盐浓度的组培苗铵盐利用份额 $f_a$ 的公式

是： $f_a = 1 - f_b$ ；在第十一步骤中，将不同铵盐浓度 $c_a$ 与对应的铵盐浓度下的组培苗铵盐利用份额 $f_a$ 的数据，用米氏方程 $f_a = \frac{f_{\max} c_a}{K_f + c_a}$ 来拟合，获取待考察硝酸盐浓度下待测组培苗的米氏方程的常数 $f_{\max}$ 和 $K_f$ 值；在第十三步骤中，将 $f_a = 0.741$ 代入 $f_a = \frac{f_{\max} c_a}{K_f + c_a}$ ，得到公式 $c_a = \frac{0.741 K_f}{f_{\max} - 0.741}$ ，计算得出 $c_a$ 即为待测混合氮源下组培苗培养基中铵盐最适浓度。

## 一种预测混合氮源下组培苗同化铵盐份额及培养基中铵盐最适浓度的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种预测混合氮源下组培苗同化铵盐份额及培养基中铵盐最适浓度的方法,属于生物技术领域。

### 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。由硝酸盐同化成氨基酸质子和电子是平衡的,而由铵盐同化成氨基酸需要消耗2个电子,这就需要2个质子去平衡它,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,但是,由于铵盐代谢质子电子不平衡,因而大多数植物在铵盐作为单独氮源培养时或过高的铵氮含量通常长势不好,生长发育受到抑制。而硝酸盐和适量的铵盐共同存在时,植物生长发育最好。因此,在植物组织培养的培养基的配置时,需要合理确定硝酸盐和铵盐的比例和用量。

[0003] 在硝酸盐和铵盐共存下,不同的氮源在不同的浓度和配比下,利用份额是不同的,前期用稳定氮同位素技术可以获取植物对不同氮源利用的各自份额,但是,这种方法只能获取有限的实验配置下植物利用铵盐份额,难以获取众多不同配置下植物铵盐利用份额信息。

[0004] 由于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,虽然植物的铵盐利用份额很高,但此时也会发生铵的无效循环,并最终导致毒害和物质能量的浪费,污染环境。因此,预测不同氮源配置下的植物利用铵盐的份额,确定混合氮源下组培苗培养基中铵盐最适浓度,为组培苗培养基的氮源配置提供理论和技术支撑。

### 发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是:提供一种预测混合氮源下组培苗同化铵盐份额及培养基中铵盐最适浓度的方法,可以以较少的实验快速获取硝酸盐一定、任一铵盐浓度下的组培苗同化不同无机氮源的信息,以弥补不同氮源配置下的组培苗无机氮同化效果不能预测的空白,为培养基的最优设计提供理论和技术支撑。本发明的技术方案:

[0006] 它包含以下步骤:

[0007] 第一,将待测组培苗通过调节培养基的激素比例使其处于增殖阶段,形成无根的一组培苗;

[0008] 第二,通过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为待考察的硝酸盐浓度的培养基;

[0009] 第三,取带有1个单芽的待测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,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,通过测定用于配置植物组织培养的培养基中的铵盐的稳定氮同位素比值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{A}}$ ,选出其稳定氮同位素比值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{A}}$ 与 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N01}}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N02}}$ 均大于10‰的铵盐;

[0012] 第六,将稳定氮同位素值为 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N01}}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N02}}$ 的硝酸盐分别与上述铵盐配置成待考察的硝酸盐浓度下、不同铵盐浓度的两组混合氮源培养基;

[0013] 第七,同样,将带有1个单芽的待测组培苗,分别同时培养在上述两组混合氮源培养基上;

[0014] 第八,同样,待组培苗培养5周后,测定在上述两组混合氮源培养基上培养的组培苗不同铵盐浓度下叶片稳定氮同位素值,铵盐与稳定氮同位素值为 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N01}}$ 的硝酸盐组成的混合氮源培养基培养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 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N02}}$ 的硝酸盐组成的混合氮源培养基培养下的组培苗叶片稳定氮同位素值记为 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}$ ;

[0015] 第九,利用 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N1}}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N2}}$ 以及同一铵盐浓度下的 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}$ ,分别计算待考察的硝酸盐浓度下不同铵盐浓度的组培苗利用硝酸盐份额 $f_b$ ;计算在待考察的硝酸盐浓度下某一特定铵盐浓度的培苗利用硝酸盐的份额 $f_b$ 的方法为:将 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N1}}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N2}}$ 以及该铵盐浓度下的 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}$ 代入方程: $f_b = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}}{\delta^{15}\text{N}_{\text{N1}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{N2}}}$ ;

[0016] 第十,依据待测硝酸盐浓度下不同铵盐浓度下组培苗利用硝酸盐的份额 $f_b$ ;计算待测硝酸盐浓度下不同铵盐浓度的组培苗铵盐利用份额 $f_a$ ;计算待考察硝酸盐浓度下某一特定铵盐浓度的组培苗铵盐利用份额 $f_a$ 的公式是: $f_a = 1 - f_b$ ;

[0017] 第十一,将不同铵盐浓度 $c_a$ 与对应的铵盐浓度下的组培苗铵盐利用份额 $f_a$ 的数据,用米氏方程 $f_a = \frac{f_{\text{max}} c_a}{K_f + c_a}$ 来拟合不同铵盐浓度的组培苗铵盐利用份额 $f_a$ 随铵盐浓度变化的关系模型,获取待考察硝酸盐浓度下待测组培苗的米氏方程的常数;这里的 $f_a$ 为不同铵盐浓度的组培苗铵盐利用份额, $c_a$ 为培养基中铵盐浓度, $f_{\text{max}}$ 和 $K_f$ 值为米氏方程的常数;

[0018] 第十二,依据上述模型的 $f_{\text{max}}$ 和 $K_f$ 值,并将被考察的培养基中的铵盐浓度值作为 $c_a$ 代入 $f_a = \frac{f_{\text{max}} c_a}{K_f + c_a}$ ,求出被考察的培养基中组培苗同化铵盐份额。

[0019] 第十三,依据上述模型的 $f_{\text{max}}$ 和 $K_f$ 值,并将 $f_a = 0.741$ 代入 $f_a = \frac{f_{\text{max}} c_a}{K_f + c_a}$ ,得到公式

$c_a = \frac{0.741 K_f}{f_{\text{max}} - 0.741}$ ,计算得出培养基中的铵盐浓度值 $c_a$ ,此时的 $c_a$ 即为待测混合氮源下组培苗培养基中铵盐最适浓度。

[0020] 本发明优点

[0021] 1) 本发明可以测定在混合氮源培养下组培苗同化铵盐的信息,包括理论上最大份额和对铵氮的相对亲和力。

[0022] 2) 本发明通过双向稳定氮同位素标记培养技术,可以获取不同氮源配置下不同无

机氮源对组培苗生长的贡献,可以评价不同氮源配置下组培苗的铵氮同化能力,为优质组培苗的培养基筛选提供了技术支持。

[0023] 3) 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,同时,由于是采用多组数据模型计算,比有限点的实测结果产生的误差小,因此获得的结果更为可靠。

[0024] 4) 本方法可以以较少的实验快速获取组培苗同化不同无机氮源的信息,可以预测不同氮源配置下的组培苗无机氮同化效果。

[0025] 5) 本方法采用的步骤少,计算简单。

[0026] 发明原理

[0027] 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 $^{14}\text{N}$ 和 $^{15}\text{N}$ ,稳定氮同位素值通常用 $\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$ 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。

[0028] 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。

[0029] 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 $10\text{‰}$ 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培苗,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 $10\text{‰}$ ,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。

[0030] 两端元的同位素混合模型表示为:

$$[0031] \quad \delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}} = f_b \delta^{15}\text{N}_{\text{N1}} + f_a \delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}} \quad (1)$$

$$[0032] \quad \delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}} = f_b \delta^{15}\text{N}_{\text{N2}} + f_a \delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}} \quad (2)$$

$$[0033] \quad f_a = 1 - f_b \quad (3)$$

[0034] 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 $10\text{‰}$ 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 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N1}}$ 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 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N2}}$ 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。

[0035] 联立方程(1)(2)和(3),求解得到:

$$[0036] \quad f_b = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}}{\delta^{15}\text{N}_{\text{N1}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{N2}}} \quad (4)$$

[0037] 大家知道,表示酶促反应的起始速度与底物浓度关系的米氏方程为:

$$[0038] \quad V = \frac{V_{\max} S}{K_m + S} \quad (5)$$

[0039] 其中:V为反应速率; $V_{\max}$ 为最大反应速率; $K_m$ 为米氏常数,即当反应速率为最大反应速率 $V_{\max}$ 一半时的底物浓度,S为底物浓度。

[0040] 同样,米氏方程也可用于描述将不同铵盐浓度 $c_a$ 与对应的铵盐浓度下的组培苗铵盐利用份额 $f_a$ 之间的关系,它们同样可以用直角双曲线方程来表示,如(6):

$$[0041] \quad f_a = \frac{f_{\max} c_a}{K_f + c_a} \quad (6)$$

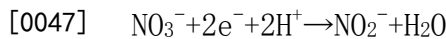
[0042] 这里的 $f_a$ 为不同铵盐浓度的组培苗铵盐利用份额, $c_a$ 为培养基中铵盐浓度, $f_{\max}$ 和 $K_f$ 值为米氏方程的常数。

[0043] 将不同铵盐浓度 $c_a$ 与对应的铵盐浓度下的组培苗铵盐利用份额 $f_a$ 的数据,用米氏方程 $f_a = \frac{f_{\max} c_a}{K_f + c_a}$ 来拟合,可获取米氏方程的常数 $f_{\max}$ 和 $K_f$ 值。

[0044] 依据 $f_{\max}$ 和 $K_f$ 值,可获取任一铵盐浓度下的组培苗同化铵盐的份额。

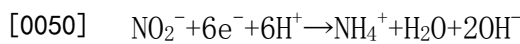
[0045] 叶绿体中硝酸盐同化成氨基酸基本步骤为:

[0046] (1) 硝酸盐还原



[0048] 电子供体为NADH

[0049] (2) 亚硝酸盐还原

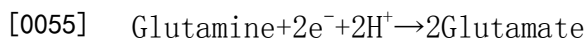


[0051] 电子供体为铁氧还蛋白(reduced Ferredoxin)

[0052] (3) Glutamine合成



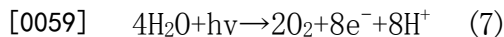
[0054] (4) Glutamate合成



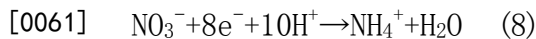
[0056] 电子供体为铁氧还蛋白(reduced Ferredoxin)

[0057] 因此,从硝酸盐到铵需要15ATP;铵同化成氨基酸需要5ATP。

[0058] 由于在叶绿体中水的光解,产生质子和电子。如(7)式:



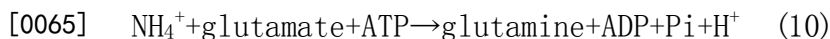
[0060] 硝酸盐需要10个质子和8个电子还原成铵,如(8)式:



[0062] 因此(7)式与(8)式合并为:



[0064] 铵同化成氨基酸需要两个质子;



[0067] 因此(10)式与(11)式合并为:



[0069] 再将(7)、(9)式与(12)式合并,得:

[0070]  $4\text{H}_2\text{O} + 2\text{NO}_3^- + 22\text{-oxoglutarate} + 2\text{ATP} + \text{h}\nu \rightarrow 5\text{O}_2 + 2\text{glutamate} + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i$  (13)

[0071] 由(12)和(13)可以看出,由硝酸盐同化成氨基酸质子和电子是平衡的,而由铵盐同化成氨基酸需要消耗2个电子,这就需要2个质子去平衡它,而驱动2个质子去平衡2个电子需要2个ATP。因此,从能量需要上可以看出,同化一摩尔铵成氨基酸需要7摩尔ATP,同化一摩尔硝酸盐成氨基酸需要20摩尔ATP。因此,从化学计量关系和成本最低的角度来说,铵盐占的份额应为20/27,即0.741,高于这个份额,就会导致质子电子不平衡形成铵盐毒害。

[0072] 依据米氏方程  $f_a = \frac{f_{\max} c_a}{K_f + c_a}$  的  $f_{\max}$  和  $K_f$  值,并将  $f_a = 0.741$  代入  $f_a = \frac{f_{\max} c_a}{K_f + c_a}$ , 得到公式

$c_a = \frac{0.741K_f}{f_{\max} - 0.741}$ , 可计算得出培养基中的铵盐浓度值  $c_a$ , 此时的  $c_a$  即为待测混合氮源下组培苗

培养基中铵盐最适浓度,高于这个浓度即有铵盐毒害的可能,低于这个浓度,又没有充分发挥铵盐同化需能少的优势。

### 具体实施方式

[0073] 本发明的实施例,它包括以下步骤:

[0074] 第一步骤,将待测组培苗通过调节培养基的激素比例使其处于增殖阶段,形成无根的组培苗;

[0075] 第二步骤,通过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为待考察的硝酸盐浓度的培养基;

[0076] 第三步骤,取带有1个单芽的待测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;

[0077] 第四步骤,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  $\delta^{15}\text{N}_{N1}$  和  $\delta^{15}\text{N}_{N2}$ ;

[0078] 第五步骤,通过测定用于配置植物组织培养的培养基中的铵盐的稳定氮同位素比值  $\delta^{15}\text{N}_A$ , 选出其稳定氮同位素比值  $\delta^{15}\text{N}_A$  与  $\delta^{15}\text{N}_{01}$  和  $\delta^{15}\text{N}_{02}$  均大于10‰的铵盐;

[0079] 第六步骤,将稳定氮同位素值为  $\delta^{15}\text{N}_{01}$  和  $\delta^{15}\text{N}_{02}$  的硝酸盐分别与上述铵盐配置成待考察的硝酸盐浓度下、不同铵盐浓度的两组混合氮源培养基;

[0080] 第七步骤,同样,将带有1个单芽的待测组培苗,分别同时培养在上述两组混合氮源培养基上;

[0081] 第八步骤,同样,待组培苗培养5周后,测定在上述两组混合氮源培养基上培养的组培苗不同铵盐浓度下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基培养的组培苗叶片稳定氮同位素值记为  $\delta^{15}\text{N}_{N1\text{mix}}$ , 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基培养下的组培苗叶片稳定氮同位素值记为  $\delta^{15}\text{N}_{N2\text{mix}}$ ;

[0082] 第九步骤,利用  $\delta^{15}\text{N}_{N1}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{N2}$  以及同一铵盐浓度下的  $\delta^{15}\text{N}_{N1\text{mix}}$  和  $\delta^{15}\text{N}_{N2\text{mix}}$ , 分别计算待考察的硝酸盐浓度下不同铵盐浓度的组培苗利用硝酸盐份额  $f_b$ ; 计算在待考察的硝酸盐浓度下某一特定铵盐浓度的培苗利用硝酸盐的份额  $f_b$  的方法为: 将  $\delta^{15}\text{N}_{N1}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{N2}$  以及该铵盐

浓度下的  $\delta^{15}\text{N}_{N1\text{mix}}$  和  $\delta^{15}\text{N}_{N2\text{mix}}$  代入方程:  $f_b = \frac{\delta^{15}\text{N}_{N1\text{mix}} - \delta^{15}\text{N}_{N2\text{mix}}}{\delta^{15}\text{N}_{N1} - \delta^{15}\text{N}_{N2}}$ ;



[0083] 第十步骤,依据待测硝酸盐浓度下不同铵盐浓度下组培苗利用硝酸盐的份额 $f_b$ ;计算待测硝酸盐浓度下不同铵盐浓度的组培苗铵盐利用份额 $f_a$ ;计算待考察硝酸盐浓度下某一特定铵盐浓度的组培苗铵盐利用份额 $f_a$ 的公式是: $f_a=1-f_b$ ;

[0084] 第十一步骤,将不同铵盐浓度 $c_a$ 与对应的铵盐浓度下的组培苗铵盐利用份额 $f_a$ 的数据,用米氏方程 $f_a = \frac{f_{\max} c_a}{K_f + c_a}$ 来拟合不同铵盐浓度的组培苗铵盐利用份额 $f_a$ 随铵盐浓度变化的关系模型,获取待考察硝酸盐浓度下待测组培苗的米氏方程的常数;这里的 $f_a$ 为不同铵盐浓度的组培苗铵盐利用份额, $c_a$ 为培养基中铵盐浓度, $f_{\max}$ 和 $K_f$ 值为米氏方程的常数;

[0085] 第十二步骤,依据上述模型的 $f_{\max}$ 和 $K_f$ 值,并将被考察的培养基中的铵盐浓度值作为 $c_a$ 代入 $f_a = \frac{f_{\max} c_a}{K_f + c_a}$ ,求出被考察的培养基中组培苗同化铵盐份额。

[0086] 第十三步骤,依据上述模型的 $f_{\max}$ 和 $K_f$ 值,并将 $f_a=0.741$ 代入 $f_a = \frac{f_{\max} c_a}{K_f + c_a}$ ,得到公式

$c_a = \frac{0.741K_f}{f_{\max}-0.741}$ ,计算得出培养基中的铵盐浓度值 $c_a$ ,此时的 $c_a$ 即为待测混合氮源下组培苗培

养基中铵盐最适浓度。

[0087] 实施例1:硝酸盐浓度为20mM时不同铵盐浓度下诸葛菜组培苗同化铵盐份额的估算及组培苗培养基中铵盐最适浓度的确定

[0088] 培养材料:无性系诸葛菜组培苗

[0089] 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: $\delta^{15}\text{N}_{01}=8.08\%$ , $\delta^{15}\text{N}_{02}=22.67\%$ 。铵盐的稳定氮同位素值为: $\delta^{15}\text{N}_A=-2.64\%$ 。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0mM、0.5mM、1mM、2.5mM、5mM、10mM和40mM。这样培养基的氮浓度就分别是20mM、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七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1所示:

[0090] 表1铵盐处理下诸葛菜组培苗叶片的稳定氮同位素值

参数	NH <sub>4</sub> -N (mM) (+ 20mM NO <sub>3</sub> -N)						
	0	0.5	1	2.5	5	10	40
[0091] $\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}}/\delta^{15}\text{N}_1$ (‰)	5.81	4.59	4.58	3.19	0.06	-0.49	-3.54
$\delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}/\delta^{15}\text{N}_2$ (‰)	17.19	14.75	14.37	11.70	4.37	2.48	-2.12

[0092] 注:培养基中的硝酸盐都为20mM。 $n=3$ 。

[0093] 从表1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 $\delta^{15}\text{N}_1=5.81\%$  ( $n=3$ );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1的 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N1}}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N2}}$ 以及 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}}$ 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,其结果如表2所示:

[0094] 表2铵盐处理下诸葛菜组培苗的硝酸盐利用份额( $f_b$ )和铵盐利用份额( $f_a=1-f_b$ )

参数	$\text{NH}_4\text{-N (mM) (+ 20mM NO}_3\text{-N)}$						
	0	0.5	1	2.5	5	10	40
[0095] $f_b$	1.00	0.89	0.86	0.75	0.38	0.26	0.12
$f_a$	0.00	0.11	0.14	0.25	0.62	0.74	0.88

[0096] 注:培养基中的硝酸盐都为20mM。 $n=3$ 。

[0097] 从表2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。

[0098] 将表2中的不同铵盐浓度 $c_a$ 与对应的铵盐浓度下的组培苗铵盐利用份额 $f_a$ 的数据,用米氏方程 $f_a = \frac{f_{\max} c_a}{K_f + c_a}$ 来拟合不同铵盐浓度的组培苗铵盐利用份额 $f_a$ 随铵盐浓度变化的关系模型,可以得到方程: $f_a = \frac{1.03 c_a}{4.71 + c_a}$ ,  $n=7$ ,  $R^2=0.966$ ,  $P=0.0132$ 。这里 $f_{\max}=1.03$ 较接近1.00,属于测定误差所致;表明在诸葛菜中铵氮的最大利用份额可达到100% (1.00)。

[0099] 利用方程 $f_a = \frac{1.03 c_a}{4.71 + c_a}$ 预测铵盐的浓度为0.20mM、0.8mM、2.0mM、4.0mM、8.0mM、20.0mM和30.0mM时的组培苗铵盐利用份额 $f_a$ ,见表3。

[0100] 表3预测不同铵盐浓度下诸葛菜组培苗的硝酸盐利用份额( $f_b$ )和铵盐利用份额( $f_a=1-f_b$ )

参数	$\text{NH}_4\text{-N (mM) (+ 20mM NO}_3\text{-N)}$						
	0.2	0.8	2.0	4.0	8.0	20	30
[0101] $f_b$	0.96	0.85	0.69	0.53	0.35	0.17	0.11
$f_a$	0.04	0.15	0.31	0.47	0.65	0.83	0.89

[0102] 注:培养基中的硝酸盐都为20mM。 $n=3$ 。

[0103] 对比表2和表3发现,预测结果是可信的。

[0104] 将 $f_a=0.741$ 代入 $f_a = \frac{1.03 c_a}{4.71 + c_a}$ ,计算得 $c_a$ 为12.08mM,也即在20mM硝酸盐存在下,诸葛菜组培苗培养基中铵盐最适浓度为12.08mM。

[0105] 实施例2:硝酸盐浓度为20mM时不同铵盐浓度下油菜组培苗同化铵盐份额的估算及组培苗培养基中铵盐最适浓度的确定

[0106] 培养材料:无性系油菜组培苗

[0107] 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: $\delta^{15}\text{N}_{\text{O1}}=8.08\text{‰}$ , $\delta^{15}\text{N}_{\text{O2}}=22.67\text{‰}$ 。铵盐的稳定氮同位素值为: $\delta^{15}\text{N}_A=-2.64\text{‰}$ 。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,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0mM、0.5mM、1mM、2.5mM、5mM、10mM和40mM。这样培养基的氮浓度就分别是20mM、20.5mM、21mM、22.5mM、25mM、30mM和60mM。将无性系油菜组培苗分别培养在上述七种混合氮源浓度梯度下,经过5周培养后,分别测定油菜组培苗在 $\delta^{15}\text{N}_{01}$ 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1所示:

[0108] 表4铵盐处理下油菜组培苗叶片的稳定氮同位素值

参数	$\text{NH}_4\text{-N (mM) (+ 20mM NO}_3\text{-N)}$						
	0	0.5	1	2.5	5	10	40
$\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}}/\delta^{15}\text{N}_1$ (‰)	3.30	2.57	1.79	-0.47	-1.77	-2.07	-5.61
$\delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}/\delta^{15}\text{N}_2$ (‰)	15.53	13.48	11.06	7.47	3.57	2.28	-2.48

[0110] 注:培养基中的硝酸盐都为20mM。 $n=3$ 。

[0111] 从表4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,油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,而油菜组培苗在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 $\delta^{15}\text{N}_1=3.30\text{‰}$  ( $n=3$ );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 $\delta^{15}\text{N}_2=15.53\text{‰}$  ( $n=3$ )。因此,根据表4的 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N1}}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N2}}$ 以及 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}}$ 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油菜组

培苗利用硝酸盐和铵盐的份额,其结果如表5所示:

[0112] 表5铵盐处理下油菜组培苗的硝酸盐利用份额( $f_b$ )和铵盐利用份额( $f_a=1-f_b$ )

参数	$\text{NH}_4\text{-N (mM) (+ 20mM NO}_3\text{-N)}$						
	0	0.5	1	2.5	5	10	40
$f_b$	1.00	0.89	0.76	0.65	0.44	0.36	0.26
$f_a$	0.00	0.11	0.24	0.35	0.56	0.64	0.74

[0114] 注:培养基中的硝酸盐都为20mM。 $n=3$ 。

[0115] 从表5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油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,油菜组培苗的铵盐利用份额出现非常明显的增幅。

[0116] 将表5中的不同铵盐浓度 $c_a$ 与对应的铵盐浓度下的油菜组培苗铵盐利用份额 $f_a$ 的数据,用米氏方程 $f_a = \frac{f_{\text{max}} c_a}{K_f + c_a}$ 来拟合不同铵盐浓度的组培苗铵盐利用份额 $f_a$ 随铵盐浓度变化的

的关系模型,可以得到方程: $f_a = \frac{0.802 c_a}{2.642 + c_a}$ ,  $n=7$ ,  $R^2=0.992$ ,  $P=0.0004$ 。

[0117] 利用方程 $f_a = \frac{0.802 c_a}{2.642 + c_a}$ 预测铵盐的浓度为0.20mM、0.8mM、2.0mM、4.0mM、8.0mM、20.0mM和30.0mM时的组培苗铵盐利用份额 $f_a$ ,见表6。

[0118] 表6预测不同铵盐浓度下油菜组培苗的硝酸盐利用份额( $f_b$ )和铵盐利用份额( $f_a$ )

=1-f<sub>b</sub>)

参数	NH <sub>4</sub> -N (mM) (+ 20mM NO <sub>3</sub> -N)						
	0.2	0.8	2.0	4.0	8.0	20	30
[0119] f <sub>b</sub>	0.94	0.81	0.65	0.52	0.40	0.29	0.26
f <sub>a</sub>	0.06	0.19	0.35	0.48	0.60	0.71	0.74

[0120] 注:培养基中的硝酸盐都为20mM。n=3。

[0121] 对比表5和表6发现,预测结果是可信的。

[0122] 将f<sub>a</sub>=0.741代入 $f_a = \frac{0.802 c_a}{2.642+c_a}$ ,计算得c<sub>a</sub>为32.09mM,也即在20mM硝酸盐存在下,油菜组培苗培养基中铵盐最适浓度为32.09mM。

[0123] 综上所述,无论是诸葛菜还是油菜,铵盐利用份额都是随铵盐浓度的增加而增加,铵盐浓度与铵盐利用份额的关系都符合米氏方程。对比两种植物还可以看出,对于低亲和力系统来说,诸葛菜对铵盐的相对亲和力小于油菜,反过来说,也就是诸葛菜对硝酸盐的相对亲和力高于油菜;再者,造成诸葛菜铵盐毒害的浓度远低于油菜;这些结果与诸葛菜和油菜的无机氮利用策略有较大的关系,诸葛菜是喀斯特适生植物的模式植物,它比油菜更适应于高硝低铵、低氮赋存的喀斯特环境,而油菜更适合高铵、高氮赋存的肥沃土壤环境。本发明的两个实施例可以印证油菜和诸葛菜在无机氮利用策略上的差异。另外,本发明所得的结果与我们前期得出的“诸葛菜在1/2MS的培养基中有最优的生长,油菜在4/3MS仍然有最优生长”的结果相符。