



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107449858 B

(45)授权公告日 2020.03.24

(21)申请号 201710397367.5

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2017.05.31

G01N 33/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

审查员 高自强

申请公布号 CN 107449858 A

(43)申请公布日 2017.12.08

(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

权利要求书2页 说明书8页

(54)发明名称

一种测定植物铵态氮利用效率的方法

(57)摘要

本发明公开一种测定植物铵态氮利用效率的方法。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和叶片的碳氮摩尔比；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和叶片的碳氮摩尔比；计算组培苗利用硝酸盐的份额，据此计算在混合氮源培养下组培苗利用铵态氮的碳氮摩尔比，也即为组培苗铵态氮利用效率或待测植物铵态氮利用效率。

1. 一种测定植物铵态氮利用效率的方法,其特征在于:

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;

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 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N1}}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N2}}$ ;同时测定其中任意一种硝酸盐作为唯一氮源的培养基培养下的组培苗叶片的碳氮含量,计算其氮碳摩尔比,记为n;

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 $\delta^{15}\text{N}_{01}$ 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;

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;

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 $\delta^{15}\text{N}_{01}$ 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 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}}$ ,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 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}$ ,同时测定其中任一种混合氮源培养下组培苗叶片的碳氮含量,计算其氮碳摩尔比,记为m;

第八,依据 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N1}}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N2}}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}$ ,可算出组培苗利用硝酸盐的份额 $F_{\text{nit}}$ ,即待测植物利用硝酸盐的份额;在第八步骤中,计算组培苗利用硝酸盐的份额 $F_{\text{nit}}$ 的方法为: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:

$$F_{\text{nit}} = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}}{\delta^{15}\text{N}_{\text{N1}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{N2}}};$$

第九,依据 $F_{\text{nit}}$ 计算在混合氮源培养下组培苗铵态氮的利用份额 $F_{\text{a}}$ ;

第十,依据 $F_{\text{nit}}$ 、m和n计算在混合氮源培养下组培苗利用铵态氮的碳氮摩尔比P;组培苗利用铵态氮的碳氮摩尔比P也即为组培苗铵态氮利用效率,即为植物铵态氮利用效率AUE。

2. 根据权利要求1所述的一种测定植物铵态氮利用效率的方法,其特征在于:在第四步骤中,计算任意一种硝酸盐作为唯一氮源的培养基培养下的组培苗叶片氮碳摩尔比n的方法为:将任意一种硝酸盐作为唯一氮源的培养基培养下的组培苗的氮含量与碳含量比值乘以0.857,则为任意一种硝酸盐作为唯一氮源的培养基培养下的组培苗叶片氮碳摩尔比n;这里的氮含量与碳含量均为叶片干重的质量百分比。

3. 根据权利要求1所述的一种测定植物铵态氮利用效率的方法,其特征在于:在第七步骤中,计算混合氮源培养下组培苗叶片氮碳摩尔比m的方法为:同样是将混合氮源培养下组培苗叶片的氮含量与碳含量比值乘以0.857,则为混合氮源培养下组培苗叶片氮碳摩尔比m;这里的氮含量与碳含量均为叶片干重的质量百分比。

4. 根据权利要求1所述的一种测定植物铵态氮利用效率的方法,其特征在于:在第九步

骤中,混合氮源培养下组培苗铵态氮的利用份额 $F_a$ 的计算方法为:

$$F_a = 1 - F_{nit}$$

5. 根据权利要求1所述的一种测定植物铵态氮利用效率的方法,其特征在于:在第十步骤中,组培苗利用铵态氮的碳氮摩尔比 $P$ ,计算公式为:

$$P = \frac{1 - F_{nit}}{m - n F_{nit}}$$

## 一种测定植物铵态氮利用效率的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种测定植物铵态氮利用效率的方法,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所必需的营养元素,是构成蛋白质、核酸、酶、叶绿素等的重要组成成分。因此,土壤氮含量被认为是土壤生产力的重要限制因素。植物从土壤中吸收利用的氮主要是硝态氮和铵态氮。而植物在吸收硝态氮时,必须把硝态氮还原后才能被植物同化,通常每还原1分子硝态氮需要花费15分子ATP,而铵态氮可以直接被植物同化,同化1分子铵态氮仅需5分子ATP。

[0003] 植物的氮同化和碳同化在植物体内是同步进行的,而氮同化消耗的能量来自植物的光合作用。由于植物同化铵态氮比同化硝态氮更省能量,因此,植物同化铵态氮的量较多时将会更省能量,从而提高碳的同化效率。然而,在铵浓度过高时,植物就会出现铵的无效循环,此时就会发生能量的浪费。因此,在进行植物的有效氮管理时,必须要考虑到植物利用铵态氮的效率。

[0004] 植物利用铵态氮的效率可以表征为植物每利用1摩尔的铵态氮获得的有机碳的摩尔数。然而,植物通常是同时吸收硝态氮和铵态氮,因此,植物叶片氮含量中来自铵态氮的份额就很难测定。因此,很难通过常规方法测定植物铵态氮的利用效率。

[0005] 植物叶片的氮含量是植物同化硝态氮和铵态氮的结果,叶片碳含量是碳同化的结果,由于植物的碳氮同化是同步进行的。因此,叶片的氮含量和碳含量的比值,也即同化单位摩尔数的碳需要氮的摩尔数,由于叶片氮含量是来自硝态氮和铵态氮。因此,知道植物在硝态氮培养下的叶片氮碳摩尔比和硝态氮和铵态氮共同培养下的叶片氮碳摩尔比,同时知道植物在硝态氮和铵态氮培养下利用硝态氮和铵态氮的份额,就可以计算出植物利用铵态氮的氮碳摩尔比,植物利用铵态氮的氮碳摩尔比的倒数即为植物利用铵态氮的碳氮摩尔比,即植物利用铵态氮的碳同化效率,植物利用铵态氮的碳同化效率即可表征为植物利用铵态氮的效率。然而,在野外种植或水培种植的植物,硝态氮和铵态氮的氮同化既发生在叶片又发生在根部,因此,很难判断叶片氮含量中来自硝态氮和铵态氮的份额,也就不能计算出植物利用铵态氮的碳同化效率。

### 发明内容

[0006] 本发明要解决的技术问题是:提供一种测定植物铵态氮利用效率的方法,克服现有技术只能得出平均的植物氮素利用效率而难以区分植物利用何种氮源的效率的技术壁垒。

[0007] 本发明的技术方案: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,这样硝态氮和铵态氮的同化就仅发生在叶片。因此,测定组培苗在硝态氮作为单独氮源培养下的叶片碳氮含量(叶片干重的质量百分比),就可计算出组培苗在硝态氮培养下叶片的氮碳摩尔比;测定组培苗在硝态氮

和铵态氮培养下叶片的碳氮含量(叶片干重的质量百分比),就可计算出硝态氮和铵态氮培养下组培苗叶片的氮碳摩尔比。

[0008] 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。因此可以通过双向稳定氮同位素技术来计算组培苗利用硝态氮和铵态氮的份额,然后根据组培苗在硝态氮培养下叶片的氮碳摩尔比,在硝态氮和铵态氮共同培养下的叶片氮碳摩尔比,就可以计算得到组培苗利用铵态氮的氮碳摩尔比,从而得到组培苗利用铵态氮的碳同化效率,即组培苗利用铵态氮的效率。根据组培苗在不同氮条件下的铵态氮利用效率,即可对植物进行有效的氮管理。

[0009] 一种测定植物铵态氮利用效率的方法,它包含以下步骤:

[0010] 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;

[0011] 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;

[0012] 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;

[0013] 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 $\delta^{15}\text{N}_{N1}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{N2}$ ;同时测定其中任意一种硝酸盐作为唯一氮源的培养基培养下的组培苗叶片的碳氮含量,计算其氮碳摩尔比,记为n;

[0014] 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 $\delta^{15}\text{N}_A$ 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;

[0015] 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;

[0016] 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 $\delta^{15}\text{N}_{01}$ 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 $\delta^{15}\text{N}_{N1\text{mix}}$ ,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下的组培苗叶片稳定氮同位素值记为 $\delta^{15}\text{N}_{N2\text{mix}}$ ,同时测定其中任一种混合氮源培养下组培苗叶片的碳氮含量,计算其氮碳摩尔比,记为m;

[0017] 第八,将 $\delta^{15}\text{N}_{N1}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{N2}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{N1\text{mix}}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{N2\text{mix}}$ 代入方程:  $F_{\text{nit}} = \frac{\delta^{15}\text{N}_{N1\text{mix}} - \delta^{15}\text{N}_{N2\text{mix}}}{\delta^{15}\text{N}_{N1} - \delta^{15}\text{N}_{N2}}$ ;即可算

出组培苗利用硝酸盐的份额 $F_{\text{nit}}$ ,也即待测植物利用硝酸盐的份额;

[0018] 第九,依据 $F_{\text{nit}}$ 计算在混合氮源培养下组培苗铵态氮的利用份额 $F_a$ , $F_a = 1 - F_{\text{nit}}$ ;

[0019] 第十,依据 $F_{\text{nit}}$ 、m和n计算在混合氮源培养下组培苗利用铵态氮的碳氮摩尔比P,组培苗利用铵态氮的碳氮摩尔比P,计算公式为:  $P = \frac{1 - F_{\text{nit}}}{m - n F_{\text{nit}}}$ ;组培苗利用铵态氮的碳氮摩尔比

P也即为组培苗铵态氮利用效率,也即为植物铵态氮利用效率AUE。

[0020] 本发明优点

[0021] 1) 本发明可以测定出植物铵态氮利用效率测定,克服现有技术只能得出平均的植物氮素利用效率而难以区分植物利用何种氮源的效率的技术壁垒。

[0022] 2) 本发明通过双向稳定氮同位素标记培养技术,在测定植物铵态氮利用效率的同时也测定出植物硝态氮和铵态氮的利用份额,根据植物铵态氮利用效率及铵盐利用份额,可以评价不同条件下的铵氮同化效率,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。

[0023] 3) 本方法为优质组培苗的培养基筛选提供了技术支持,即选择组培苗铵态氮利用效率高的培养基。

[0024] 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。

[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 $\delta^{15}\text{N}$ (‰)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应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] 组培苗在同化硝态氮和铵态氮时都会存在一定的氮同位素分馏。因此,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态氮和铵态氮发生氮同位素分馏后的稳定氮同位素值混合的结果。因此,要计算出硝态氮和铵态氮的利用份额,就得准确知道混合氮源培养下组培苗同化硝态氮和铵态氮发生氮同位素分馏后的稳定氮同位素值。由于铵态氮作为单独氮源时,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 $10\text{‰}$ 的硝态氮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态氮培养下的组培苗叶片稳定氮同位素值。然后,将筛选出的铵态氮分别和两种稳定氮同位素值不同的硝态氮组成混合氮源同时培养组培苗,铵态氮的稳定氮同位素值与两种硝态氮的稳定氮同位素值的差值均大于 $10\text{‰}$ 。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态氮和铵态氮的份额。

[0029] 两端元的同位素混合模型表示为:

$$[0030] \quad \delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}} = F_{\text{nit}}\delta^{15}\text{N}_{\text{N1}} + F_{\text{a}}\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}} \quad (1)$$

$$[0031] \quad \delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}} = F_{\text{nit}}\delta^{15}\text{N}_{\text{N2}} + F_{\text{a}}\delta^{15}\text{N}_{\text{A-T}} \quad (2)$$

$$[0032] \quad F_{\text{a}} = 1 - F_{\text{nit}} \quad (3)$$

[0033] 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。 $F_{\text{nit}}$ 为硝酸盐(硝态氮)的利用份额, $F_{\text{a}}$ 为铵盐(铵态氮)的利用份额。

[0034] 联立方程(1)(2)和(3),求解得到:

$$[0035] \quad F_{\text{nit}} = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}}{\delta^{15}\text{N}_{\text{N1}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{N2}}} \quad (4)$$

[0036] 知道组培苗在混合氮源培养下利用硝态氮和铵态氮的份额后,要计算组培苗利用铵态氮的碳同化效率,就得计算出组培苗在混合氮源培养下的叶片的氮碳摩尔比和在硝态氮作为唯一氮源培养下的组培苗叶片的氮碳摩尔比。在其中任意一种硝酸盐作为唯一氮源的培养基培养下的组培苗叶片氮碳摩尔比记为n,在其中任意一种混合氮源培养下组培苗叶片的氮碳摩尔比记为m。组培苗叶片的氮碳摩尔比可通过元素分析仪测定叶片的氮和碳含量(叶片干重的质量百分比),然后通过计算得到。在混合氮源培养下,组培苗叶片的氮碳摩尔比即为:

$$[0037] \quad m = nF_{\text{nit}} + y F_a \quad (5)$$

[0038] y为混合氮源下组培苗利用铵态氮的氮碳摩尔比。在混合氮源培养下,组培苗利用铵态氮的碳氮摩尔比P就为y的倒数,即组培苗利用铵态氮的碳同化效率即为:

$$[0039] \quad P = \frac{1}{y} = \frac{1 - F_{\text{nit}}}{m - n F_{\text{nit}}} \quad (6)$$

[0040] 根据计算得到的组培苗利用铵态氮的碳同化效率,即也即为组培苗铵态氮利用率,也即为植物铵态氮利用效率AUE。

### 具体实施方式

[0041] 本发明的实施例:

[0042] 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;

[0043] 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 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N01}}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N02}}$ ;分别将这两种硝酸盐作为唯一氮源配置合适浓度的培养基;

[0044] 第三步骤,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;

[0045] 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 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N1}}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N2}}$ ;同时测定其中任意一种硝酸盐作为唯一氮源的培养基培养下的组培苗叶片的碳氮含量(叶片干重的质量百分比),计算其氮碳摩尔比,记为n;

[0046] 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 $\delta^{15}\text{N}_A$ 与 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N01}}$ 或 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N02}}$ 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;

[0047] 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;

[0048] 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 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N01}}$ 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 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N02}}$ 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 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}$ ,同时测定其中任一种混合氮源

培养下组培苗叶片的碳氮含量(叶片干重的质量百分比),计算其氮碳摩尔比,记为 $m$ ;

[0049] 第八步骤,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:  $F_{\text{nit}} = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}}{\delta^{15}\text{N}_{\text{N1}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{N2}}}$ ; 即

可算出组培苗利用硝酸盐的份额 $F_{\text{nit}}$ ,也即待测植物利用硝酸盐的份额;

[0050] 第九步骤,依据 $F_{\text{nit}}$ 计算在混合氮源培养下组培苗铵态氮的利用份额 $F_a$ ,  $F_a = 1 - F_{\text{nit}}$ ;

[0051] 第十步骤,依据 $F_{\text{nit}}$ 、 $m$ 和 $n$ 计算在混合氮源培养下组培苗利用铵态氮的碳氮摩尔比 $P$ ,组培苗利用铵态氮的碳氮摩尔比 $P$ ,计算公式为:  $P = \frac{1 - F_{\text{nit}}}{m - n F_{\text{nit}}}$ ; 组培苗利用铵态氮的碳氮

摩尔比 $P$ 也即为组培苗铵态氮利用效率,也即为植物铵态氮利用效率AUE。

[0052] 实施例: 诸葛菜铵态氮利用效率的测定

[0053] 培养材料: 无性系诸葛菜组培苗

[0054] 培养基配方为: MS+6-BA 2.0mg/L+NAA 0.1mg/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:  $\delta^{15}\text{N}_{\text{N01}} = 22.67\%$ ,  $\delta^{15}\text{N}_{\text{N02}} = 8.08\%$ 。铵盐的稳定氮同位素值为:  $\delta^{15}\text{N}_A = -2.64\%$ 。分别用 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N01}}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N02}}$ 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 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N01}}$ 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 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N02}}$ 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 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N01}}$ 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 $\delta^{15}\text{N}_1 = 17.02\%$  ( $n=9$ ), 同理得 $\delta^{15}\text{N}_2 = 5.71\%$  ( $n=9$ )。在10mM、20mM和40mM稳定氮同位素值为 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N02}}$ 的硝酸盐培养下诸葛菜叶片的氮碳摩尔比( $n$ )分别为0.053mol/mol、0.050mol/mol和0.063mol/mol。

[0055] 实验1铵态氮浓度恒定, 硝态氮浓度处理下诸葛菜组培苗铵态氮利用效率

[0056] 实施效果如下:

[0057] 按照本发明的方法, 将铵态氮分别与稳定氮同位素值为 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N01}}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N02}}$ 的硝态氮组成混合氮源, 在配置培养基时, 保证培养基的铵态氮浓度都为20mM, 然后设置硝态氮的浓度分别为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 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N01}}$ 的硝态氮与铵态氮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 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N02}}$ 的硝态氮与铵态氮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 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}$ 。同时测定稳定氮同位素值为 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N02}}$ 的硝态氮与铵态氮组成混合氮源培养下的诸葛菜组培苗叶片的碳氮含量(叶片干重的质量百分比), 计算其氮碳摩尔比, 记为 $m$ , 上述结果如表1所示:

[0058] 表1硝态氮处理下诸葛菜组培苗叶片的稳定氮同位素值和氮碳摩尔比

| 参数  | NO <sub>3</sub> -N (mM) (+ 20mM NH <sub>4</sub> -N) |       |       |
|---|---|-------|-------|
|   | 10  | 20    | 40    |
| [0059] $\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}}$ (‰) | 0.52  | 1.08  | 2.57  |
| $\delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}$ (‰)        | -3.08   | -2.27 | -0.90 |
| <b>m (mol/mol)</b>                              | 0.174   | 0.138 | 0.142 |

[0060] 注:培养基中的铵盐都为20mM。n=3。

[0061] 从表1可知,在培养基中铵态氮浓度都为20mM的情况下,增加硝态氮的浓度,诸葛菜组培苗分别在铵态氮与两种稳定氮同位素值差距较大的硝态氮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,且都在最高硝态氮浓度下有最大稳定氮同位素值。而诸葛菜组培苗的叶片氮碳摩尔比则随着硝态氮浓度的增加呈现先下降,然后趋于不变的趋势。

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 $F_{\text{nit}} = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{N1mix}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{N2mix}}}{\delta^{15}\text{N}_{\text{N1}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{N2}}}$ 和方

程 $F_a = 1 - F_{\text{nit}}$ 就可以计算得到在混合氮源下诸葛菜组培苗利用硝态氮的份额 $F_{\text{nit}}$ 和利用铵态氮的份额 $F_a$ ,计算结果如表2所示:

[0062] 表2硝态氮处理下诸葛菜组培苗的硝态氮利用份额 ( $F_{\text{nit}}$ ) 和铵态氮利用份

[0063] 额 ( $F_a$ )

| 参数                      | NO <sub>3</sub> -N (mM) (+ 20mM NH <sub>4</sub> -N) |      |      |
|-------------------------|---|------|------|
|                         | 10  | 20   | 40   |
| [0064] $F_{\text{nit}}$ | 0.32  | 0.30 | 0.31 |
| $F_a$                   | 0.68  | 0.70 | 0.69 |

[0065] 注:培养基中的铵盐都为20mM。n=3。

[0066] 从表2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,诸葛菜组培苗利用铵态氮的份额无明显变化,但铵态氮的利用份额都是硝态氮利用份额的两倍以上。知道诸葛菜组培苗在混合氮源培养下利用硝态氮和铵态氮的份额后,再结合组培苗在硝态氮作为单独氮源培养下诸葛菜组培苗叶片的氮碳摩尔比和混合氮源培养下诸葛菜组

培苗叶片的氮碳摩尔比,通过方程 $P = \frac{1 - F_{\text{nit}}}{m - n F_{\text{nit}}}$ ,即可求得组培苗铵态氮的利用效率,计算结果如表3所示:

[0067] 表3硝态氮处理下诸葛菜组培苗铵态氮利用效率 (P)

| 参数                            | NO <sub>3</sub> -N (mM) (+ 20mM NH <sub>4</sub> -N) |      |      |
|-------------------------------|---|------|------|
|                               | 10  | 20   | 40   |
| [0068] <b>P/AUE (mol/mol)</b> | 4.33  | 5.69 | 5.63 |

[0069] 注:培养基中的铵盐都为20mM。n=3。

[0070] 从表3可知,诸葛菜组培苗铵态氮的利用效率随着硝酸盐浓度的增加先逐渐增加,

然后趋于不变。因此,在硝酸盐浓度添加到20mM时,组培苗铵态氮利用效率已达最大,继续增加硝酸盐的浓度到40mM,并没有增加组培苗铵态氮利用效率,反而增加硝酸盐的浪费。

[0071] 实验2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

[0072] 实施效果如下:

[0073] 按照本发明的方法,将铵盐分别与稳定氮同位素值为 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}01}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}02}$ 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 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}01}$ 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 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}1\text{mix}}$ 和在稳定氮同位素值为 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}02}$ 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 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}2\text{mix}}$ 。同时测定稳定氮同位素值为 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}02}$ 的硝态氮与铵态氮组成混合氮源培养下的诸葛菜组培苗叶片的碳氮含量(叶片干重的质量百分比),计算其氮碳摩尔比,记为m,上述结果如表4所示:

[0074] 表4铵盐处理下诸葛菜组培苗叶片的稳定氮同位素值和氮碳摩尔比

| 参数   | NH <sub>4</sub> -N (mM) (+ 20mM NO <sub>3</sub> -N) |       |       |       |       |       |
|--|---|-------|-------|-------|-------|-------|
|  | 0.5   | 1     | 2.5   | 5     | 10    | 40    |
| [0075] $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}1\text{mix}}$ (‰) | 14.75   | 14.37 | 11.70 | 4.37  | 2.48  | -2.12 |
| $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}2\text{mix}}$ (‰)        | 4.59  | 4.58  | 3.19  | 0.06  | -0.49 | -3.54 |
| m (mol/mol)  | 0.076   | 0.085 | 0.082 | 0.107 | 0.103 | 0.213 |

[0076] 注:培养基中的硝酸盐都为20mM.n=3。

[0077] 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,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。而诸葛菜组培苗的氮碳摩尔比则随着铵盐的增加而逐渐增大。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 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}01}$ 的硝酸盐培养下的叶片稳定氮同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}1}=17.19\text{‰}$  (n=3);在20mM稳定氮同位素值为 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}02}$ 的硝酸盐培养下的叶片稳定氮同位素值 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}2}=5.81\text{‰}$  (n=3)。因此,根据表4的 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}1\text{mix}}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}2\text{mix}}$ ,结合 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}1}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{N}2}$ ,利用

方程
$$F_{\text{nit}} = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{N}1\text{mix}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{N}2\text{mix}}}{\delta^{15}\text{N}_{\text{N}1} - \delta^{15}\text{N}_{\text{N}2}}$$
就可以计算得到在混合氮源下诸葛菜组培苗利用硝态氮和铵

态氮的份额,计算结果如表5所示:

[0078] 表5铵盐处理下诸葛菜组培苗的硝态氮利用份额( $F_{\text{nit}}$ )和铵态氮利用份额( $F_{\text{a}}$ )

| 参数                      | NH <sub>4</sub> -N (mM) (+ 20mM NO <sub>3</sub> -N) |      |      |      |      |      |
|-------------------------|---|------|------|------|------|------|
|                         | 0.5   | 1    | 2.5  | 5    | 10   | 40   |
| [0079] $F_{\text{nit}}$ | 0.89  | 0.86 | 0.75 | 0.38 | 0.26 | 0.12 |
| $F_{\text{a}}$          | 0.11  | 0.14 | 0.25 | 0.62 | 0.74 | 0.88 |

[0080] 注:培养基中的硝酸盐都为20mM.n=3。

[0081] 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。知道诸葛菜组培苗在混合

氮源培养下利用硝态氮和铵态氮的份额后,再结合组培苗在硝态氮作为单独氮源培养下诸葛菜组培苗叶片的氮碳摩尔比和混合氮源培养下诸葛菜组培苗叶片的氮碳摩尔比,通过方

程  $P = \frac{1-F_{nit}}{m-n F_{nit}}$ ,即可求得组培苗铵态氮的利用效率,计算结果如表6所示:

[0082] 表6铵盐处理下诸葛菜组培苗的硝态铵态氮利用效率 (P)

| [0083] 参数        | NH <sub>4</sub> -N (mM) (+ 20mM NO <sub>3</sub> -N) |      |      |      |      |      |
|------------------|---|------|------|------|------|------|
|                  | 0.5   | 1    | 2.5  | 5    | 10   | 40   |
| P/ AUE (mol/mol) | 3.49  | 3.33 | 5.62 | 7.05 | 8.22 | 4.25 |

[0084] 注:培养基中的硝酸盐都为20mM.n=3。

[0085] 从表6可知,诸葛菜组培苗铵态氮利用效率随着铵盐浓度的增加逐渐增大,但在最高铵盐浓度下出现下降。因此,在培养基中硝酸盐浓度恒定下,并不是铵盐的浓度越高,组培苗铵态氮利用效率就越高。

[0086] 综上所述,在进行培养基氮源优化时,需要考虑组培苗铵态氮利用效率。比较2个实验,我们发现在铵盐浓度恒定下,增加硝酸盐浓度的处理下,增加硝酸盐的浓度到20mM时,诸葛菜组培苗就获得了最大铵态氮利用效率。而在硝酸盐浓度恒定下,增加铵盐浓度的处理下,增加铵盐的浓度到10mM时,诸葛菜组培苗就获得了最大铵态氮利用效率,而在最高铵盐浓度下,诸葛菜组培苗铵态氮利用效率相对较低。因此,在进行植物的有效氮管理时,铵盐的使用浓度与植物铵态氮的利用效率应重点考虑。