



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102365925 B

(45) 授权公告日 2013.02.27

(21) 申请号 201010611142.3

(22) 申请日 2010.12.29

(73) 专利权人 中国科学院地球化学研究所  
地址 550002 贵州省贵阳市观水路 46 号

(72) 发明人 吴沿友 刘莹 梁铮 邢德科  
徐莹 刘丛强 王宝利

(74) 专利代理机构 贵阳中新专利商标事务所  
52100

代理人 吴无惧

(51) Int. Cl.

A01G 31/00(2006.01)

A01G 7/00(2006.01)

审查员 蔺国强

权利要求书 1 页 说明书 4 页

(54) 发明名称

一种植物利用硝酸盐能力的测定方法

(57) 摘要

本发明公开了一种植物利用硝酸盐能力的测定方法,它包括以下步骤,第一,用稳定氮同位素组成  $\delta^{15}\text{N}$  的硝态氮和铵态氮来配制营养液;第二,将被考察的植物用上述营养液进行水培;第三,分别测定被考察植物第三完全展开叶的净光合速率、叶片氮的含量以及第三完全展开叶的  $\delta^{15}\text{N}$  值;第四,将上述步骤测定的被考察植物叶片的  $\delta^{15}\text{N}$  值,来自铵态氮端元的植物叶片  $\delta^{15}\text{N}$  值以及来自硝态氮端元的植物叶片  $\delta^{15}\text{N}$  值带入二端元模型,计算出被考察植物利用的硝酸盐占无机氮源比例份额;第五,利用被考察植物第三完全展开叶的净光合速率、叶片氮的含量与植物利用的硝酸盐占无机氮源比例份额,求出该植物利用硝酸盐的能力。

1. 一种植物利用硝酸盐能力的测定方法,其特征在於:它包括以下步骤,第一,用稳定氮同位素组成  $\delta^{15}\text{N}$  的硝态氮和铵态氮来配制营养液;第二,将被考察的植物用上述营养液进行水培;第三,分别测定被考察植物第三完全展开叶的净光合速率、叶片氮的含量以及第三完全展开叶的  $\delta^{15}\text{N}$  值;第四,将上述步骤测定的被考察植物叶片的  $\delta^{15}\text{N}$  值,来自铵态氮端元的植物叶片  $\delta^{15}\text{N}$  值以及来自硝态氮端元的植物叶片  $\delta^{15}\text{N}$  值带入二端元模型  $\delta_T = \delta_A - f_B \delta_A + f_B \delta_B$ , 计算出被考察植物利用的硝酸盐占无机氮源比例份额;这里  $\delta_T$  为被考察植物叶片的  $\delta^{15}\text{N}$  值; $\delta_A$  为来自铵态氮端元的植物叶片  $\delta^{15}\text{N}$  值,也即植物仅利用铵态氮时植物叶片  $\delta^{15}\text{N}$  值; $\delta_B$  为来自硝态氮端元的植物叶片  $\delta^{15}\text{N}$  值,也即植物仅利用硝态氮时植物叶片  $\delta^{15}\text{N}$  值; $f_B$  为植物利用的硝酸盐占无机氮源比例份额;第五,利用被考察植物第三完全展开叶的净光合速率、叶片氮的含量与植物利用的硝酸盐占无机氮源比例份额,利用公式  $\text{NRUC} = 90\text{CnPn}f_B$  求出该植物利用硝酸盐的能力 NRUC;这里 Pn、Cn 分别为被考察植物第三完全展开叶的净光合速率、叶片氮的含量。

2. 根据权利要求 1 所述的植物利用硝酸盐能力的测定方法,其特征在於:第一步骤中的“用  $\delta^{15}\text{N}$  的硝态氮和铵态氮来配制营养液”,是选择用于配营养液的化学试剂,测定培养液所用的硝酸盐和铵盐的  $\delta^{15}\text{N}$  值,用  $\delta^{15}\text{N}$  差异超过 10% 的硝态氮和铵态氮来配制营养液。

3. 根据权利要求 1 所述的植物利用硝酸盐能力的测定方法,其特征在於:第三步骤中的“分别测定被考察植物第三完全展开叶的净光合速率、叶片氮的含量以及第三完全展开叶的  $\delta^{15}\text{N}$  值”,是待植株生长有 5 片以上真叶后,分别测定被考察植物第三完全展开叶的净光合速率 Pn、叶片氮的含量 Cn 以及第三完全展开叶的  $\delta^{15}\text{N}$  值。

4. 根据权利要求 1 所述的植物利用硝酸盐能力的测定方法,其特征在於:第四步骤中的“将上述步骤测定的被考察植物叶片的  $\delta^{15}\text{N}$  值,来自铵态氮端元的植物叶片  $\delta^{15}\text{N}$  值以及来自硝态氮端元的植物叶片  $\delta^{15}\text{N}$  值带入二端元模型,计算出被考察植物利用的硝酸盐占无机氮源比例份额”,是将第三步骤测定的被考察植物叶片的  $\delta^{15}\text{N}$  值作为  $\delta_T$ , 配制培养液的铵态氮试剂  $\delta^{15}\text{N}$  值加上 -3.5‰ 为  $\delta_A$ , 配制培养液的硝态氮试剂  $\delta^{15}\text{N}$  值加上 -0.9‰ 为  $\delta_B$ , 带入二端元模型  $\delta_T = \delta_A - f_B \delta_A + f_B \delta_B$ , 计算出被考察植物利用的硝酸盐占无机氮源比例份额  $f_B$ 。

## 一种植物利用硝酸盐能力的测定方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种植物利用硝酸盐能力的测定方法,属于作物栽培和生态环境治理领域。

### 背景技术

[0002] 植物不仅能利用铵态氮作为无机氮源还可以利用硝酸盐作无机氮源。多数植物可以吸收硝态氮和铵态氮两种氮源,但有些植物对不同类型的无机氮源呈现不同的喜好,人们因此将植物分为喜铵植物和喜硝植物。又根据喜硝的专一性把喜硝植物又分为兼性喜硝植物和专性喜硝植物。同一植物对不同氮源的反应不同,不同植物对同一氮源反应也有所不同。不同的环境有利于植物对不同类型氮源吸收利用。在酸性土壤上生长的植物偏好吸收利用铵态氮,在碱性土壤上生长的植物偏好吸收利用硝态氮。对喀斯特地区来说,植物的利用硝酸盐的能力大小对植物的生长发育非常重要。喀斯特地区土壤的主要特征是高钙、高 pH、高重碳酸根离子以及高硝酸盐,这样的环境使  $\text{NH}_4^+$  去质子化而容易生成氨气挥发进入大气,造成土壤中铵态氮的大量丢失,因此只有具有较强的硝酸盐利用能力的植物,才能获取足够的无机氮供植物生长发育之需。植物利用硝酸盐的能力甚至可以作为喀斯特适生植物的一个评价标准。对筛选喀斯特适生植物,利用生物方法来治理和恢复脆弱的喀斯特生态环境具有重要的作用。

[0003] 目前,评价植物利用硝酸盐的能力是通过测定植物对硝酸盐的吸收以及测定植物硝酸还原能力来确定。但是测定植物对硝酸盐吸收或测定植物硝酸还原能力方法比较繁琐,且测定的结果不稳定,只能定性反映植物即时的利用硝酸盐能力。植物在一段生育期内的硝酸盐的利用能力,通过测定植物对硝酸盐吸收或测定植物硝酸还原能力是无能为力的。因此,必须寻找一种方法来定量测定植物利用硝酸盐的能力。

[0004] 稳定氮同位素的强烈分馏特征是识别植物体无机氮来源的基础。自然界中氮元素有两种稳定同位素: $^{14}\text{N}$ 和 $^{15}\text{N}$ ,它们的天然平均丰度分别为 99.64%和 0.36%。稳定氮同位素组成通常用  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) 表示,自然界中  $\delta^{15}\text{N}$  的变化为  $-50\text{‰} \sim +50\text{‰}$ 。稳定氮同位素的强烈分馏特征有利于我们识别植物体无机氮来源。质量平衡原理以及同位素混合模型和化学计量学方法,是我们定量识别植物体内无机氮来源的基础,因此,本发明利用同位素技术来测定植物利用硝酸盐的能力。

### 发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是,提供一种植物利用硝酸盐能力的测定方法,用于定量评估植物利用硝酸盐的能力,以填补现有技术的空白。

[0006] 本发明采取以下技术方案:它包括以下步骤,第一,用稳定氮同位素组成  $\delta^{15}\text{N}$  的硝态氮和铵态氮来配制营养液;第二、将被考察的植物用上述营养液进行水培;第三,分别测定被考察植物第三完全展开叶的净光合速率、叶片氮的含量以及第三完全展开叶的  $\delta^{15}\text{N}$  值;第四,将上述步骤测定的被考察植物叶片的  $\delta^{15}\text{N}$  值,来自铵态氮端元的植物叶片  $\delta^{15}\text{N}$

值以及来自硝态氮端元的植物叶片  $\delta^{15}\text{N}$  值带入二端元模型,计算出被考察植物利用的硝酸盐占无机氮源比例份额;第五,利用被考察植物第三完全展开叶的净光合速率、叶片氮的含量与植物利用的硝酸盐占无机氮源比例份额,求出该植物利用硝酸盐的能力。

[0007] 第一步骤中的“用  $\delta^{15}\text{N}$  的硝态氮和铵态氮来配制营养液”,是选择用于配营养液的化学试剂,测定培养液所用的硝酸盐和铵盐的  $\delta^{15}\text{N}$  值,用  $\delta^{15}\text{N}$  差异达到 10‰的硝态氮和铵态氮来配制营养液。

[0008] 第三步骤中的“分别测定被考察植物第三完全展开叶的净光合速率、叶片氮的含量以及第三完全展开叶的  $\delta^{15}\text{N}$  值”,是待植株生长有 5 片以上真叶后,分别测定被考察植物第三完全展开叶的净光合速率  $P_n$ 、叶片氮的含量  $C_n$  以及第三完全展开叶的  $\delta^{15}\text{N}$  值。

[0009] 第四步骤中的“将上述步骤测定的被考察植物叶片的  $\delta^{15}\text{N}$  值,来自铵态氮端元的植物叶片  $\delta^{15}\text{N}$  值以及来自硝态氮端元的植物叶片  $\delta^{15}\text{N}$  值带入二端元模型,计算出被考察植物利用的硝酸盐占无机氮源比例份额”,是将第三步骤测定的被考察植物叶片的  $\delta^{15}\text{N}$  值作为  $\delta_T$ ,配制培养液的铵态氮试剂  $\delta^{15}\text{N}$  值加上 -3.5‰为  $\delta_A$ ,配制培养液的硝态氮试剂  $\delta^{15}\text{N}$  值加上 -0.9‰为  $\delta_B$ ,带入二端元模型  $\delta_T = \delta_A - f_B \delta_A + f_B \delta_B$ ,计算出被考察植物利用的硝酸盐占无机氮源比例份额  $f_B$ 。

[0010] 第五步骤中的“利用被考察植物第三完全展开叶的净光合速率、叶片氮的含量与植物利用的硝酸盐占无机氮源比例份额,求出该植物利用硝酸盐的能力”,是将被考察植物第三完全展开叶的净光合速率  $P_n$ 、叶片氮的含量  $C_n$  与  $f_B$  带入公式  $\text{NRUC} = 90C_nP_n f_B$  中,求出该植物利用硝酸盐的能力 NRUC。

[0011] 本发明的原理是:利用二端元模型  $\delta_T = \delta_A - f_B \delta_A + f_B \delta_B$  来计算  $f_B$ 。这里  $\delta_T$  为被考察植物叶片的  $\delta^{15}\text{N}$  值; $\delta_A$  为来自铵态氮端元的植物叶片  $\delta^{15}\text{N}$  值,也即植物仅利用铵态氮时植物叶片  $\delta^{15}\text{N}$  值; $\delta_B$  为来自硝态氮端元的植物叶片  $\delta^{15}\text{N}$  值,也即植物仅利用硝态氮时植物叶片  $\delta^{15}\text{N}$  值; $f_B$  为植物利用的硝酸盐占无机氮源比例份额。通过多次实验, $\delta_A$  值取铵态氮源  $\delta^{15}\text{N}$  值加上 -3.5‰, $\delta_B$  取硝态氮源  $\delta^{15}\text{N}$  值加上 -0.9‰。通过计算,可以求出  $f_B$ 。根据常规方法测得的植物叶片的净光合速率  $P_n$  ( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) 和含氮量  $C_n$  ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ),利用公式  $\text{NRUC} = 90C_nP_n f_B$  可测得该植物利用硝酸盐的能力 ( $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ),这里 NRUC 为植物利用硝酸盐的能力, $C_nP_n$  可表征为植物氮的代谢速率,90 是换算因子,它是陆生高等植物的光合产物换算成植株干重的干重换算因子 0.025 与时间秒(s) 换算成小时(h) 的时间换算因子 3600 的乘积。高等植物的平均碳含量为  $40,000\ \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ,因此净光合速率每  $1\ \mu\text{mol}(\text{CO}_2)\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  就相当于生成干物质的速率为  $0.025\ \text{mg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

[0012] 本发明的优点如下:

[0013] 1) 本方法不仅能定量测定植物利用硝酸盐的能力,还能方便地测定出该植物在不同的生长环境下的硝酸盐利用能力。

[0014] 2) 本方法所需植物材料少,因此占地也小。

[0015] 3) 本方法采用的步骤少,计算简单。

[0016] 4) 可以同时测定植物利用铵态氮的能力

[0017] 5) 本方法所测得的结果可直接为作物施肥的肥料种类的选择和施肥量提供依据。

## 具体实施方式

[0018] 本发明的实施例 :它包括以下步骤,

[0019] 第一步骤,选择用于配营养液的化学试剂,测定培养液所用的硝酸盐和铵盐的  $\delta^{15}\text{N}$  值,用  $\delta^{15}\text{N}$  差异超过 10‰ 的硝态氮和铵态氮来配制营养液。

[0020] 第二步骤,将被考察的植物进行水培,水培营养液用上述已知的  $\delta^{15}\text{N}$  差异超过 10‰ 的硝态氮和铵态氮来配制。

[0021] 第三步骤,待植株生长有 5 片以上真叶后,分别测定被考察植物第三完全展开叶的净光合速率(Pn)、叶片氮的含量(Cn)以及第三完全展开叶的  $\delta^{15}\text{N}$  值。

[0022] 第四步骤,将上面的被考察植物叶片的  $\delta^{15}\text{N}$  值作为  $\delta_T$ ,配制培养液的铵态氮试剂  $\delta^{15}\text{N}$  值加上 -3.5‰ 为  $\delta_A$ ,配制培养液的硝态氮试剂  $\delta^{15}\text{N}$  值加上 -0.9‰ 为  $\delta_B$ ,带入二端元模型  $\delta_T = \delta_A - f_B \delta_A + f_B \delta_B$ ,计算出被考察植物利用的硝酸盐占无机氮源比例份额  $f_B$ 。

[0023] 第五步骤,将被考察植物第三完全展开叶的净光合速率 Pn、叶片氮的含量 Cn 与  $f_B$  带入公式  $\text{NRUC} = 90\text{CnPn}f_B$  中,求出该植物利用硝酸盐的能力 NRUC。

[0024] 本发明的实施效果如下 :

[0025] 用  $\delta^{15}\text{N}$  为 16.991‰ 的硝酸钾( $\text{KNO}_3$ )和  $\delta^{15}\text{N}$  为 -1.212‰ 的磷酸二氢铵( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ )配制营养液,营养液的配方为经过改良的 Hoagland 营养液。即将 Hoagland 营养液中的硝酸钙换成氯化钙,把钼酸铵换成钼酸钠。取诸葛菜、构树和桑树的种子播种到穴盘上。待萌发后,用上述改良的 Hoagland 营养液培养。 $\delta_A$  为 -4.712‰,  $\delta_B$  为 16.091‰。在营养液中加不同浓度(单位 : $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )的聚乙二醇(PEG 6000)处理构树和桑树,营养液的 pH 为 5.5;在营养液中加不同浓度的碳酸氢钠(单位 :mM)处理诸葛菜,营养液的 pH 为 8.2;待这些植物长到 5 片真叶后,分别测定这些植物第三完全展开叶的  $\delta^{15}\text{N}$  值,净光合速率(Pn)以及叶片氮的含量(Cn)。用本发明方法,得出各种植物在不同处理下的利用硝酸盐的能力,如表 1。

[0026] 表 1 几种植物不同处理下的硝酸盐利用能力的比较

[0027]

植物种类	处理物质/浓度	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	$\text{Pn}$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	$\text{Cn}$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	$f_g$	AMUC ( $\mu\text{g m}^{-2}\text{h}^{-1}$ )	NRUC ( $\mu\text{g m}^{-2}\text{h}^{-1}$ )
桑树	PEG/0	-2.41	6.3	25.5	0.11	12868	1590
桑树	PEG/5	-1.31	2.1	28.2	0.16	4477	853
桑树	PEG/10	-1.35	4.1	23.6	0.16	7315	1393
桑树	PEG/20	-1.51	1.0	29.4	0.15	2249	397
桑树	PEG/40	-2.64	0.7	25.6	0.10	1452	161
桑树	PEG/60	-1.53	0.1	24.3	0.15	186	33
构树	PEG/0	-1.25	2.8	24.3	0.17	5083	1041
构树	PEG/5	1.08	4.9	21.6	0.28	6858	2667
构树	PEG/10	1.08	3.9	23.9	0.28	6040	2349
构树	PEG/20	3.19	2.9	24.1	0.38	3900	2390
构树	PEG/40	2.33	3.5	24.0	0.34	4990	2570
构树	PEG/60	2.91	3.9	23.9	0.37	5285	3104
诸葛菜	$\text{NaHCO}_3/0$	12.73	3.9	21.3	0.84	1196	6280
诸葛菜	$\text{NaHCO}_3/0.5$	13.33	4.1	23.8	0.87	1142	7641
诸葛菜	$\text{NaHCO}_3/1$	14.04	5.1	22.2	0.90	1019	9171
诸葛菜	$\text{NaHCO}_3/2.5$	15.95	2.1	25.5	0.99	48	4771
诸葛菜	$\text{NaHCO}_3/5$	13.00	2.2	24.1	0.85	716	4056
诸葛菜	$\text{NaHCO}_3/10$	16.08	3.3	23.9	1.00	0	7098
备注	Pn 为植物第三完全展开叶的净光合速率, NRUC 为植物利用硝酸盐的能力。净光合速率的测定条件为光强 $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 胞间二氧化碳浓度为 $396 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ , 温度 $22-23^\circ\text{C}$ 。						

[0028] 从表 1 中可以看出, 诸葛菜和构树的 NRUC 明显地大于桑树的 NRUC。其中诸葛菜有 84% 以上的氮源来自于硝酸盐, 平均值为 90.8%, 而桑树有 84% 以上的氮源来自于铵态氮, 平均值为 86.2%。这与诸葛菜是喜硝植物、桑树是喜铵植物的事实是吻合的, 与构树和诸葛菜是喀斯特适生植物的事实也是吻合的。构树, 在受到 PEG 模拟干旱的条件下, 硝酸盐利用的能力大大增强, 整体氮的利用能力并未下降, 这对构树抗岩溶干旱有重要意义。而桑树在 PEG 模拟干旱严重的条件下, 氮的利用能力下降很快。诸葛菜在碱性环境下用较大的硝酸盐利用能力来获取氮素, 维持自己的生长发育, 这对喀斯特环境也具有重要的意义。这些结果也为这三种植物的施肥提供依据。其他方法如测定硝酸还原酶以及硝酸盐的吸收是难以达到这个效果的, 也不能同时测得植物利用铵态氮的能力。