

# 川西亚高山针叶林主要树种对土壤中不同形态氮素的吸收差异

邹婷婷<sup>1,2</sup> 张子良<sup>1,2</sup> 李娜<sup>1</sup> 袁远爽<sup>1,2</sup> 郑东辉<sup>1,2</sup> 刘庆<sup>1</sup> 尹华军<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院成都生物研究所, 中国科学院山地生态恢复与生物资源利用重点实验室, 生态恢复与生物多样性保育四川省重点实验室, 成都 610041;

<sup>2</sup>中国科学院大学, 北京 100049; <sup>3</sup>西华师范大学环境科学与工程学院, 四川南充 637000

**摘要** 在陆地生态系统中, 植物对土壤有机氮(主要指氨基酸)的获取是一个普遍的生态学现象, 然而植物对土壤有机氮的吸收速率及土壤有机氮在植物养分供应中所占比例仍不清楚。为探究土壤无机氮和有机氮对西南高寒森林植物氮源的贡献效应, 以川西亚高山针叶林两个主要树种云杉(*Picea asperata*)和红桦(*Betula albo-sinensis*)的幼苗为研究对象, 采用稳定同位素标记法对K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub>、<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl和(U-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>/<sup>15</sup>N)甘氨酸3种氮素进行示踪, 分析了两个树种对无机氮(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N和NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N)和有机氮(甘氨酸)的吸收速率及其差异。结果显示: (1)云杉和红桦幼苗在施加同位素标记物2 h后, 两种幼苗细根的<sup>13</sup>C和<sup>15</sup>N均出现明显的富集现象, 表明两种树种幼苗均能吸收甘氨酸。(2)与甘氨酸和NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N相比, 云杉和红桦幼苗对NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N有显著的偏好吸收, 其吸收速率为NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N和甘氨酸吸收速率的5–10倍。(3)两个树种的幼苗对甘氨酸也有较高的吸收速率, 其吸收速率高于对NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N的吸收速率, 表明土壤有机氮(如氨基酸)也是亚高山针叶林植物养分获取的重要氮源。

**关键词** 有机氮; 无机氮; 氨基酸; 稳定同位素标记; 亚高山针叶林

**引用格式:** 邹婷婷, 张子良, 李娜, 袁远爽, 郑东辉, 刘庆, 尹华军 (2017). 川西亚高山针叶林主要树种对土壤中不同形态氮素的吸收差异. 植物生态学报, 41, 1051–1059. doi: 10.17521/cjpe.2017.0165

## Differential uptakes of different forms of soil nitrogen among major tree species in subalpine coniferous forests of western Sichuan, China

ZOU Ting-Ting<sup>1,2</sup>, ZHANG Zi-Liang<sup>1,2</sup>, LI Na<sup>1</sup>, YUAN Yuan-Shuang<sup>1,2</sup>, ZHENG Dong-Hui<sup>1,2</sup>, LIU Qin<sup>1</sup>, and YIN Hua-Jun<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Key Laboratory of Mountain Ecological Restoration and Bioresource Utilization of Chinese Academy of Sciences, and Ecological Restoration and Biodiversity Conservation Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu 610041, China; <sup>2</sup>University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; and <sup>3</sup>College of Environmental Science and Engineering, China West Normal University, Nanchong, Sichuan 637000, China

### Abstract

**Aims** Although acquisition of soil organic nitrogen (N)(mainly amino acids) by plants is a widespread ecological phenomenon in many terrestrial ecosystems, the rate of organic N uptake and their contributions to plant nutrient supply are poorly understood. Our objective was to determine the relative contributions of inorganic N (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N) and organic N (amino acids) to plant N uptake in a high-frigid forest ecosystem.

**Methods** The differences in the uptake rate of three different forms of N (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N and glycine) were quantified by exposing seedlings of two dominant tree species (*Picea asperata* and *Betula albo-sinensis*) in subalpine coniferous forests of western Sichuan, China, to trace quantities of K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub>, <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl and (U-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>/<sup>15</sup>N) glycine.

**Important findings** Both <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N were significantly enriched in fine roots 2 h after tracer application, indicating the occurrence of glycine uptake in *P. asperata* and *B. albo-sinensis* seedlings. The seedlings of two tree species had a significant preference for NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N compared with glycine and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N, and the uptake rate of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N was 5 to 10 times greater than that of glycine and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N. The roots of seedlings in the two species took up glycine more rapidly than NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N, implying that soil organic N (i.e., amino acids) could be an important N source for the two species in subalpine coniferous forests. The results of this study are of great theoretical significance for understanding N utilization strategies and nutrient regulation processes in plants of the high-frigid forest ecosystems.

收稿日期Received: 2017-06-20 接受日期Accepted: 2017-09-29

\* 通信作者Author for correspondence (E-mail: yinhj@cib.ac.cn)

**Key words** organic nitrogen; inorganic nitrogen; amino acid; stable isotope labeling; subalpine coniferous forest

**Citation:** Zou TT, Zhang ZL, Li N, Yuan YS, Zheng DH, Liu Q, Yin HJ (2017). Differential uptakes of different forms of soil nitrogen among major tree species in subalpine coniferous forests of western Sichuan, China. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 41, 1051–1059. doi: 10.17521/cjpe.2017.0165

氮(N)是植物需求量最大的一种矿质营养元素,是植物体内核酸、蛋白质、酶等物质的主要组成成分,同时也是陆地生态系统植物生长发育的主要限制因子(Jones *et al.*, 2005),对陆地生态系统净初级生产力和功能具有极其重要的作用(Elser *et al.*, 2007)。土壤中的N有多种赋存形态和性质,主要可分为无机N (以 $\text{NH}_4^+$ -N和 $\text{NO}_3^-$ -N为主)和有机N (如氨基酸、酰胺、尿素等)两大类。土壤无机N是土壤N的主要组成部分,占土壤总N的90%以上(李合生, 2002)。传统的矿质营养学说通常认为植物只能吸收无机N (如 $\text{NH}_4^+$ -N和 $\text{NO}_3^-$ -N),有机N必须被分解为无机N后才能被植物吸收。然而,随着同位素技术的广泛运用和不断发展,越来越多的研究表明:许多植物(包括菌根植物和一些无菌根植物)能够直接吸收利用土壤中的多种氨基酸、简单蛋白质等小分子和大分子有机N化合物(Bennett & Prescott, 2004; Miller *et al.*, 2007; Rothstein, 2014)。在一些常年低温、N矿化受到强烈限制的地区,植物对有机N的吸收速率甚至超过无机N,此现象引发了人们对有机N在陆地生态系统营养流动与N循环模型的重新思考 and 评价(Gallet-Budynek *et al.*, 2009)。

尽管植物可直接吸收有机N已被普遍认识和接受,但目前关于植物与N关系的研究更多聚焦于无机N的产生、周转和调控机理等方面(Pastor *et al.*, 1984; Binkley *et al.*, 1986; Lajtha, 1994; 陆景陵, 2003),而对植物吸收有机N的特征了解甚少,使得土壤中无机N源和有机N源对植物N养分贡献大小及其生态重要性结论不一致(Näsholm *et al.*, 2009)。比如,一些证据表明植物偏好有机N而不是无机N,或者对两者具有相同的吸收量,尤其是在低温、N受限制的极地、高山和北方生态系统(Chapin *et al.*, 1993; Näsholm *et al.*, 1998; Ohlund & Näsholm, 2001)。然而,一些研究表明土壤无机N仍是植物最主要的N源(Finzi & Berthrong, 2005; Persson *et al.*, 2006)。造成这种差异的原因可能与植物种类及其所处的生长环境、土壤性质有关(Wei *et al.*, 2014)。因此,需要深入开展不同生态系统土壤有机N和无机N对植物N源的贡献大小及其生态反馈效应的研究,

以便更好地认识森林生态系统N循环过程与调控机制。

川西亚高山针叶林是青藏高原东部高寒林区的重要组成部分,其表现为低温、短生长季、高有机质、高有机N、低矿化速率和低养分有效性等一系列特征(尹华军等, 2008; Zhang *et al.*, 2017),这使得亚高山森林成为研究生态系统N养分来源与N素吸收利用的典型类型和重要区域。因此,本研究选取川西亚高山针叶林两个代表性树种——云杉(*Picea asperata*)幼苗和红桦(*Betula albo-sinensis*)幼苗为研究对象,采用稳定同位素标记法,研究两个树种对无机N ( $\text{NH}_4^+$ -N和 $\text{NO}_3^-$ -N)和有机N (氨基酸)的吸收速率与差异,旨在: (1)弄清川西亚高山针叶林生态系统植物能否直接吸收利用有机N作为植物N源? (2)在此基础上,进一步比较该区植物对土壤中3种N素( $\text{NH}_4^+$ -N、 $\text{NO}_3^-$ -N和氨基酸)的吸收差异,以揭示不同N源对该区植物N养分吸收的相对贡献。本研究结果可为更好地认识川西亚高山针叶林土壤N循环与养分获取策略提供一定的理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究区概况

本研究地位于四川省理县境内杂谷脑镇胆扎木沟(31.41° N, 103.21° E, 海拔约2 300 m),该区位于青藏高原东缘,四川省西北部,阿坝藏族羌族自治州东南缘,地质结构属于龙门山断裂带中段,山峦起伏,地形复杂。该区气候类型属于山地季风气候,夏季温凉多雨,冬季寒冷干燥,1月平均气温-8 °C, 7月平均气温12.6 °C,年平均气温4.8–6.9 °C,无霜期115–150天, >10 °C年有效积温1 400–2 500 °C,年降水量700–900 mm,年干燥度0.59–1.18。生长季长度大概为6个月,从4月下旬到10月下旬。冬季大概有4个月为冰雪覆盖期,最大雪被厚度约为30 cm。土壤类型主要为山地棕壤(Nan *et al.*, 2013)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 试验设计

2016年4月,分别选择株高、基径和生长状况一致的4年生云杉幼苗和红桦幼苗(由米亚罗原301林

场苗圃提供)移栽于胆扎木沟试验地, 进行一段时间适应和驯化。移栽前云杉幼苗株高、基径和移栽密度分别为50.2 cm、8.88 mm和36株·m<sup>-2</sup>, 而红桦幼苗株高、基径和移栽密度分别为154.7 cm、10.52 mm和20株·m<sup>-2</sup>。供试土壤来自样地附近的亚高山人工林表层土, 过5 mm筛混匀后采用客土法将40 cm深土壤全部换作实验土。供试土壤初始理化性质为土壤pH值5.85, 容重0.91 g·cm<sup>-3</sup>, 全N含量3.66 g·kg<sup>-1</sup>, 有机碳含量62.70 g·kg<sup>-1</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N含量14.5 μg·g<sup>-1</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N含量0.90 μg·g<sup>-1</sup>, 氨基酸态N含量2.70 μg·g<sup>-1</sup>。采用随机区组设计, 每个树种样地设6个5 m × 5 m的区组, 区组间设2 m的隔离带; 每个区组随机分成4个标记物小区(对照(纯水)、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N和甘氨酸), 每个树种每个处理设6个重复, 各小区之间设0.5 m的隔离带。2016年8月, 采用丰度为99%的双标记(U-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>/<sup>15</sup>N)甘氨酸、K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub>和<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl作为标记物进行标记。

本试验采用根际土壤溶液采样器(Rhizon, Wageningen, The Netherlands)(图1)代替传统的针管注射同位素溶液。本采样器长10 cm, 具有均匀分布的0.15 μm的微气孔, 可将添加的同位素溶液均匀地注射到土壤不同部位, 从而更有利于细根吸收。在半径2.5 cm的滤纸上均匀地划分5个小孔, 然后将滤纸覆盖在土壤上, 注射时根据每个小孔的位置将采样器插入土壤中, 并注射4 mL同位素溶液, 即每个重复注射20 mL标记物溶液。每个重复土壤中添加的(U-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>/<sup>15</sup>N)甘氨酸、K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub>和<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl总<sup>15</sup>N含量分别为0.22、1.41和0.08 μg·g<sup>-1</sup>, 分别占3种土壤本底N源的8.15%、9.72%和8.89%, 保证了3种N的施加



图1 根际土壤溶液采样器示意图。

Fig. 1 Illustration of a soil solution sampler in rhizosphere.

量不超过土壤中该形态N库的10%, 从而有效地避免了同位素N添加诱导的施肥效应(Gallet-Budynek *et al.*, 2009)。

对照(纯水)、K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub>、<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl和(U-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>/<sup>15</sup>N)甘氨酸4种溶液注射到土壤中后, 分别在注射后的2、6、12、24和48 h取样, 以分析植物对不同形态N吸收的时间动态变化。具体操作流程如下: 标记完成后在相应的取样时间内利用土钻取出土芯, 分别过2 mm筛, 挑出其中的细根, 先在纯水中漂洗3 min, 然后用0.5 mmol·L<sup>-1</sup>的CaCl<sub>2</sub>溶液冲洗3 min以去除附着在根系表面的<sup>15</sup>N, 然后将洗净的根系置于液氮冷冻, 防止根内的氨基酸进一步代谢。将液氮冷冻保存的细根样品和冷藏的土壤样品一同带回实验室。细根样品于60 °C烘干, 液氮下研磨, 分别测定两种植物幼苗细根中<sup>15</sup>N自然丰度值(δ<sup>15</sup>N)、<sup>13</sup>C自然丰度值(δ<sup>13</sup>C)、细根样品含N量(% N)和细根样品含C量(% C)。为进一步检验N同位素添加是否诱导了施肥效应, 我们将土壤样品带回实验室测定试验结束后3种形态N的含量。结果显示, 云杉幼苗样地在同位素试验后NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、氨基酸和NH<sub>4</sub><sup>+</sup>含量分别比实验前增加3%、-3.2%和1.8%; 红桦幼苗样地在同位素试验后NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、氨基酸和NH<sub>4</sub><sup>+</sup>含量分别比实验前增加8%、-3.2%和-2.8%, 表明添加的N并未引起土壤的施肥效应。

### 1.2.2 指标测定

δ<sup>15</sup>N、δ<sup>13</sup>C、% N和% C利用稳定同位素质谱仪-元素分析仪(IRMS-EA, Elementar, Manchester, UK)测定; 土壤NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N采用靛酚蓝比色法测定; NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N采用双波长紫外分光光度法测定; 氨基酸态N采用邻苯二甲醛-β-巯基乙醇荧光法(荧光OPAME法)测定(Warren & Taranto, 2010)。土壤pH值采用水土比为2.5:1的酸度计测定。

### 1.2.3 数据计算

在同位素标记物无丢失的前提下, 根据外源添加N浓度、细根样品中<sup>15</sup>N丰度值以及% N计算植物根系对土壤不同形态N的吸收速率(McKane *et al.*, 2002), 公式如下:

$$N_{\text{uptake}} = U^{15\text{N}} \times \frac{C_{\text{available}}}{C^{15\text{N label}}} \quad (1)$$

$$U^{15\text{N}} = \frac{U_{\text{N}} \times \text{atom} - ^{15}\text{N excess}}{T} \quad (2)$$

其中 $N_{\text{uptake}}$ 代表单位时间单位根质量对不同形态N的吸收量( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ );  $U_{\text{N}}$ 代表单位时间单位根质量对 $^{15}\text{N}$ 的吸收量( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ );  $C_{\text{available}}$ 代表土壤中每种形态N的浓度( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ );  $C_{\text{N label}}$ 代表 $^{15}\text{N}$ 添加的浓度( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ );  $U_{\text{N}}$ 代表根系N含量( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ );  $\text{atom-}^{15}\text{N excess}$ 代表根系中 $^{15}\text{N}$ 的原子百分超(某核素的丰度与其自然丰度之差, 又称富集度, %);  $T$ 代表从标记至取样的时间(h)。

#### 1.2.4 数据分析

所有数据和统计分析均利用Excel 2003和SPSS 19.0 (SPSS, Chicago, USA)统计软件完成, 所有的图均利用Origin 8软件完成。 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 、 $^{13}\text{C}:^{15}\text{N}$ 和植物对3种N素吸收速率指标采用单因素方差分析, 其差异性检验采用最小二乘法(LSD)检验法, 显著性水平为 $p < 0.05$ 。

## 2 结果和分析

### 2.1 云杉和红桦幼苗细根中 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 的差异

( $\text{U-}^{13}\text{C}_2/^{15}\text{N}$ )甘氨酸标记2 h后, 云杉和红桦幼苗细根 $\delta^{13}\text{C}$ 表现出明显的富集现象, 在各取样时间点均显著高于对照( $p < 0.05$ ), 但两树种表现出不同的时间动态变化规律。(U- $^{13}\text{C}_2/^{15}\text{N}$ )甘氨酸标记12 h后, 云杉幼苗细根 $\delta^{13}\text{C}$ 达到最大值, 并显著高于对照、2 h和6 h时细根中 $\delta^{13}\text{C}$  ( $p < 0.05$ ), 而红桦幼苗细根 $\delta^{13}\text{C}$ 在各取样时间点无显著差别(图2)。

与对照处理相比, 添加3种 $^{15}\text{N}$ 标记的N化合物后, 两树种幼苗细根表现出明显的 $^{15}\text{N}$ 富集现象,

各取样时间点 $\delta^{15}\text{N}$ 值均显著高于对照( $p < 0.05$ )。云杉幼苗细根中 $^{15}\text{NO}_3^-$ -N、( $\text{U-}^{13}\text{C}_2/^{15}\text{N}$ )甘氨酸和 $^{15}\text{NH}_4^+$ -N 3种处理下 $\delta^{15}\text{N}$ 值随时间增加, 总体表现出逐渐升高的趋势, 分别在处理48 h、24 h和48 h时达到最大值。类似地, 红桦幼苗细根中 $\delta^{15}\text{N}$ 值在 $^{15}\text{NO}_3^-$ -N、( $\text{U-}^{13}\text{C}_2/^{15}\text{N}$ )甘氨酸和 $^{15}\text{NH}_4^+$ -N 3种处理下也随时间增加逐渐升高, 分别在处理48 h、24 h和12 h时达到最大值(图3)。

### 2.2 云杉和红桦幼苗对3种N素吸收速率的差异

云杉幼苗对 $\text{NO}_3^-$ -N的吸收速率显著高于对甘氨酸和 $\text{NH}_4^+$ -N的吸收速率( $p < 0.05$ )(图4)。云杉幼苗对 $\text{NO}_3^-$ -N、甘氨酸和 $\text{NH}_4^+$ -N的平均吸收速率分别为0.447、0.055和0.035  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , 云杉幼苗对 $\text{NO}_3^-$ -N的平均吸收速率分别是甘氨酸和 $\text{NH}_4^+$ -N平均吸收速率的8.08和12.77倍; 类似地, 红桦幼苗对 $\text{NO}_3^-$ -N的吸收速率显著高于对甘氨酸和 $\text{NH}_4^+$ -N的吸收速率( $p < 0.05$ )。红桦幼苗对 $\text{NO}_3^-$ -N的平均吸收速率(0.485  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )分别是对甘氨酸(0.085  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )和 $\text{NH}_4^+$ -N (0.070  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )平均吸收速率的5.74和6.95倍。

### 2.3 云杉和红桦幼苗根系中 $^{13}\text{C}$ 和 $^{15}\text{N}$ 的单位摩尔原子百分超比值的差异

在注射双标记甘氨酸后, 云杉和红桦幼苗细根中 $^{13}\text{C}$ 和 $^{15}\text{N}$ 的单位摩尔原子百分超比值( $^{13}\text{C}:^{15}\text{N}$ )随时间延长而表现出下降趋势。两种幼苗在处理6 h时 $^{13}\text{C}:^{15}\text{N}$ 分别为1.851和1.946, 接近甘氨酸自身 $^{13}\text{C}$ 和 $^{15}\text{N}$ 摩尔百分超比2.0这一恒定值(图5), 表明该时间

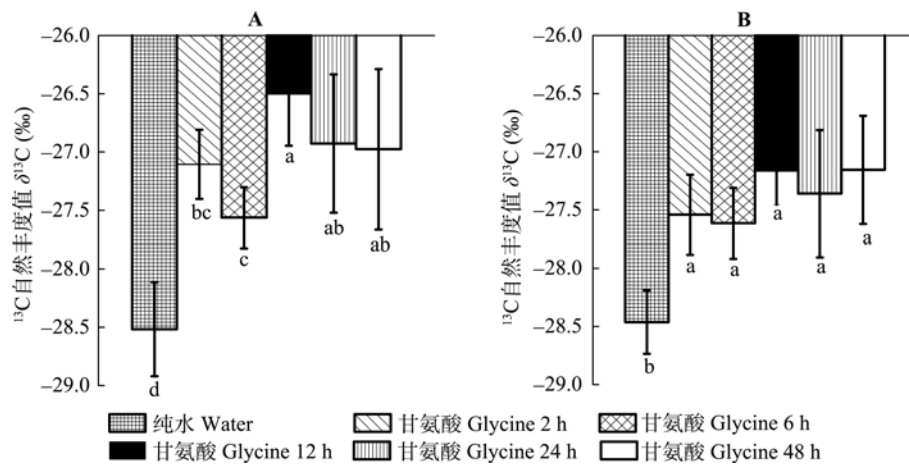
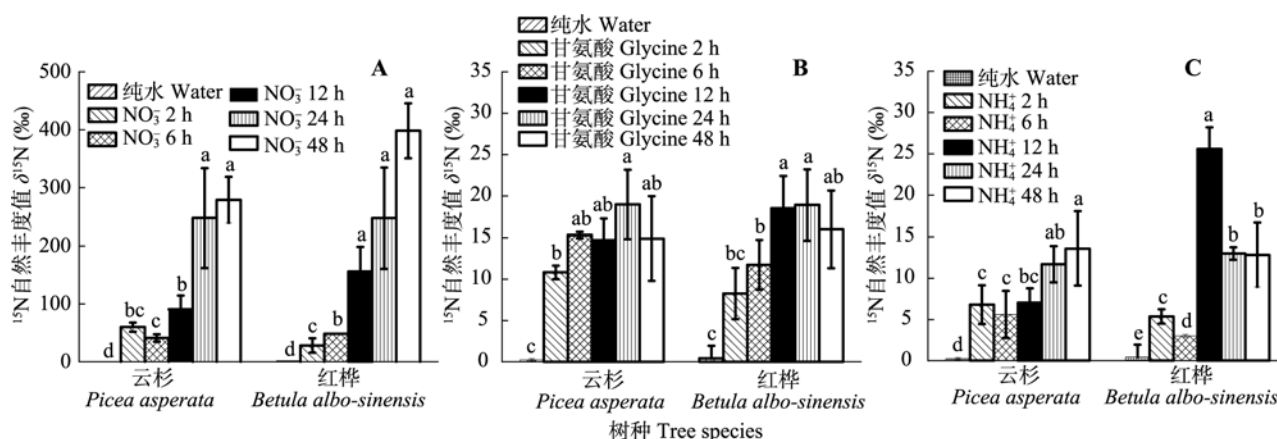


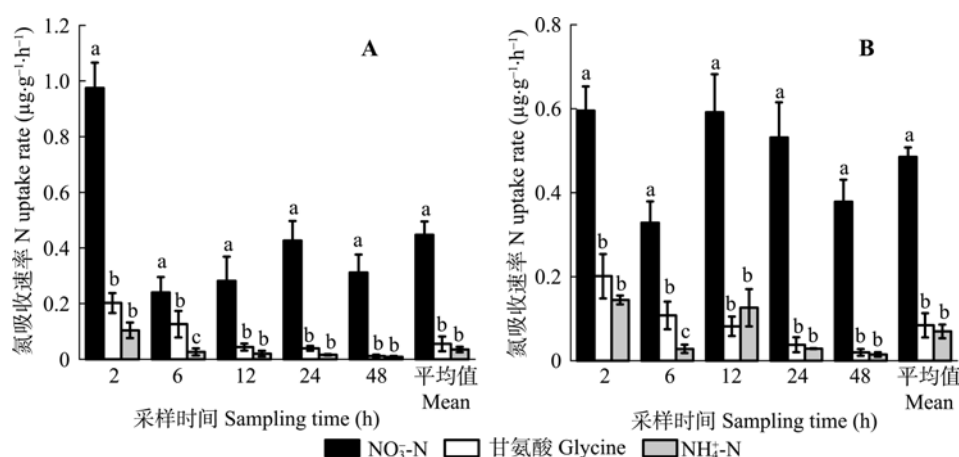
图2 不同采样时间云杉(A)和红桦(B)幼苗细根中 $^{13}\text{C}$ 自然丰度值( $\delta^{13}\text{C}$ )的动态变化(平均值 $\pm$ 标准偏差,  $n = 6$ )。柱状图中不同小写字母表示同一树种 $\delta^{13}\text{C}$ 在不同取样时间差异显著( $p < 0.05$ )。

Fig. 2 Dynamics of natural  $^{13}\text{C}$  abundance ( $\delta^{13}\text{C}$ ) in fine roots of *Picea asperata* (A) and *Betula albo-sinensis* seedlings (B) at different sampling times (mean  $\pm$  SD,  $n = 6$ ). Different lowercase letters indicate significant differences in the  $\delta^{13}\text{C}$  value among sampling times within species ( $p < 0.05$ ).



**图3** 不同采样时间云杉和红桦幼苗细根中 $^{15}\text{N}$ 自然丰度值( $\delta^{15}\text{N}$ )动态变化(平均值 $\pm$ 标准偏差,  $n = 6$ )。A,  $^{15}\text{NO}_3^-$ -N处理下的 $\delta^{15}\text{N}$ 。B,  $(\text{U-}^{13}\text{C}_2/^{15}\text{N})$ 甘氨酸(Glycine)处理下的 $\delta^{15}\text{N}$ 。C,  $^{15}\text{NH}_4^+$ -N处理下的 $\delta^{15}\text{N}$ 。柱状图中不同小写字母表示同一树种 $\delta^{15}\text{N}$ 在不同取样时间差异显著( $p < 0.05$ )。

**Fig. 3** Dynamics of natural  $^{15}\text{N}$  abundance ( $\delta^{15}\text{N}$ ) in fine roots of *Picea asperata* and *Betula albo-sinensis* seedlings at different sampling times (mean  $\pm$  SD,  $n = 6$ ). A,  $\delta^{15}\text{N}$  under  $^{15}\text{NO}_3^-$ -N labeling treatment. B,  $\delta^{15}\text{N}$  under glycine labeling treatment. C,  $\delta^{15}\text{N}$  for  $^{15}\text{NH}_4^+$ -N labeling treatment. Different lowercase letters indicate significant differences in the  $\delta^{15}\text{N}$  value among sampling times within species ( $p < 0.05$ ).



**图4** 不同采样时间点云杉(A)和红桦(B)幼苗对3种不同形态N素( $\text{NO}_3^-$ -N、甘氨酸和 $\text{NH}_4^+$ -N)的吸收速率差异(平均值 $\pm$ 标准偏差,  $n = 6$ )。柱状图中不同小写字母表示同一时间不同形态N吸收速率差异显著( $p < 0.05$ )。

**Fig. 4** Differences in the mass-specific uptake rate for  $\text{NO}_3^-$ -N, glycine and  $\text{NH}_4^+$ -N in *Picea asperata* (A) and *Betula albo-sinensis* seedlings (B) at different sampling times (mean  $\pm$  SD,  $n = 6$ ). Different lowercase letters indicate significant differences in the uptake rate of different N forms at given sampling time ( $p < 0.05$ ).

点接近于氨基酸未转化而被两种植物根系直接吸收的临界点。

### 3 讨论

#### 3.1 同位素标记法的有效性分析

N是森林生态系统植物生产力和群落稳定性的最主要限制因素(Burton *et al.*, 2007), 有关植物对土壤N的吸收和利用策略研究一直备受关注。目前, 人们对植物N吸收和利用的认识主要依赖于无菌栽培技术、 $^{15}\text{N}$ 示踪技术和 $^{13}\text{C}/^{14}\text{C}$ 示踪技术的应用。在本研究中, 我们主要采用 $^{13}\text{C}$ 和 $^{15}\text{N}$ 双标记氨基酸技术

来原位示踪植物对有机N的吸收, 通过此方法, 若能在植物组织中同时检测到 $^{13}\text{C}$ 和 $^{15}\text{N}$ 的富集, 且表明两者有相关性, 说明氨基酸以完整的形态被直接吸收(Näsholm *et al.*, 1998)。通过研究发现, 在添加双标记物2 h后, 云杉和红桦幼苗根系中 $^{13}\text{C}$ 和 $^{15}\text{N}$ 均表现出明显的富集现象(图2, 图3), 强有力地证明了两种植物均能够直接吸收土壤中的氨基酸。此外, 该方法有效应用的另外一个重要前提是加入同位素N后不会对土壤产生施肥效应。在试验前我们基于样地3种N源含量, 所添加的3种同位素N含量均未超过土壤中各形态N背景浓度的10%。同时在试验

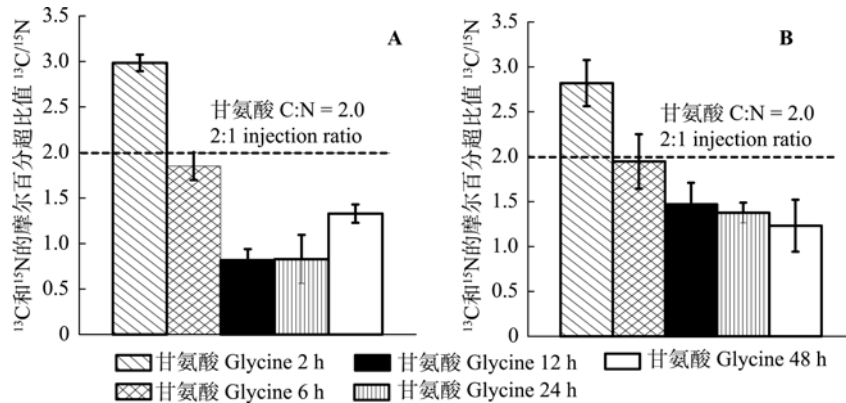


图5 云杉(A)和红桦(B)幼苗根系中 $^{13}\text{C}$ 和 $^{15}\text{N}$ 的单位摩尔原子百分超比值的差异(平均值 $\pm$ 标准偏差, 6个重复)。虚线代表注射的双标记甘氨酸C:N原始值为2.0。

**Fig. 5** Differences in the molar ratio of excess  $^{13}\text{C}$  to excess  $^{15}\text{N}$  derived from double-labelled ( $\text{U-}^{13}\text{C}_2/^{15}\text{N}$ ) glycine in fine roots of *Picea asperata* (A) and *Betula albo-sinensis* seedlings (B). Horizontal line represents the 2:1 injection ratio of C:N administered with the doubly labeled glycine treatment.

结束时, 通过土壤3种N素分析也表明, 两种幼苗样地在标记试验后土壤中的各种形态N含量与试验前均无显著差异。因此, 该方法的有效性在本研究中得到有效保证, 即本研究中两种幼苗根系对3种同位素标记物( $^{15}\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $^{15}\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和( $\text{U-}^{13}\text{C}_2/^{15}\text{N}$ )甘氨酸)吸收速率的差异能真实地反映其根系对土壤中不同形态N的吸收偏好。

### 3.2 亚高山针叶林树种对不同状态N吸收的偏好分析

一般认为, 植物吸收 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的过程比吸收 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的过程节省更多能量(Wang & Macko, 2011), 土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 进入植物根系后直接被转化为谷氨酸盐从而被植物进一步利用, 而植物在吸收 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的过程中必须通过消耗较多能量的硝酸盐还原途径才能被植物吸收利用(Templer & Dawson, 2004)。因此, 相对于 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ , 植物通常更偏好吸收土壤中的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$  (Finzi & Berthrong, 2005; Näsholm *et al.*, 2009)。然而, 本研究结果表明: 川西亚高山针叶林树种云杉和红桦更偏好吸收土壤 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 。具体而言, 与氨基酸和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 处理相比,  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 处理的植物细根表现出显著更高的 $\delta^{15}\text{N}$ 值和更快的吸收速率(图2, 图3)。此外, 云杉和红桦幼苗根系对 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的平均吸收速率为 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和氨基酸平均吸收速率的5–10倍(图4)。该研究结果与大部分前人研究认为的植物偏好吸收和利用土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的观点不一致。我们推测一个重要的原因可能与供试土壤有较高的 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量有关。前期研究发现, 植物对土壤N的吸收具有可塑性, 当土壤中各种N的有效性发生变化时, 植

物会调整自身对N的吸收偏好来维持甚至增加整体N的吸收(Ashton *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2015)。Breteler和Siegerist (1984)的研究表明土壤中高浓度的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 抑制植物根系对 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的吸收, 而当 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度低于 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 这种抑制作用将降至最小, 植物根系不再排斥 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ , 可将其作为N源。在本研究中, 土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度仅有 $0.75 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 因此其对植物吸收 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的抑制作用可忽略不计。Nordin等(2001)在研究北方森林植物N吸收过程中也发现植物对土壤中的不同形态N的偏好吸收与这些N素在土壤中的有效性呈正相关关系。因此, 我们认为本研究中植物对 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 表现出显著更高的吸收速率(图3), 可能在很大程度上归因于土壤中相对较高的 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度。 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 作为川西亚高山针叶林土壤中最主要的N形态(Xu *et al.*, 2010), 其被云杉和红桦幼苗偏好吸收也是亚高山森林植物长期适应该区域土壤环境的结果。另外,  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 在土壤中具有更高的可移动性也可导致植物对 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 表现出明显的偏好吸收现象(Warren, 2009; Li *et al.*, 2015)。比如,  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 在土壤溶液中的扩散系数比 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 高10–100倍(Gessler *et al.*, 1998), 因此前者能够通过土壤溶液更快地扩散到根系从而为植物提供更大的吸收几率。尽管植物对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的吸收消耗更少的能量, 但许多植物对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 具有较高的敏感性(Chen *et al.*, 2013)。与 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 相比,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 在植物体积累易产生毒性效应, 抑制 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 等阳离子的吸收, 从而不利于植物的生长(Britto & Kronzucker, 2002; Coskun *et al.*, 2013), 这可能也是植物偏好吸



收 $\text{NO}_3^-$ -N的原因之一。然而, 关于不同生态系统、不同树种对 $\text{NO}_3^-$ -N和 $\text{NH}_4^+$ -N的偏好吸收与利用的影响因素与调控机制并不清楚, 需要进一步开展深入的研究。

### 3.3 亚高山针叶林植物对氨基酸的吸收及其生态学意义

虽然本研究两种植物均偏好吸收土壤 $\text{NO}_3^-$ -N, 但研究也表明云杉和红桦幼苗均可直接吸收土壤中的氨基酸。两种幼苗根系对甘氨酸的平均吸收速率(分别为 $0.055\ 5\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 和 $0.084\ 5\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )均高于对 $\text{NH}_4^+$ -N的平均吸收速率(分别为 $0.035\ 5\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 和 $0.069\ 5\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ), 尽管两者的差异都不显著(图4), 表明有机N (如氨基酸)对亚高山针叶林生态系统植物N养分供给也具有重要的贡献。植物吸收土壤有机N (主要指氨基酸)的能力在许多生态系统中均有报道, 尤其是在常年低温、N矿化受到强烈限制的地区(如极地、苔原和北方森林等)(Nasholm *et al.*, 2009)。对森林生态系统而言, 植物的菌根侵染状况对其获取有机N具有十分重要的促进作用(Stribley & Read, 1980; 崔晓阳, 2007)。比如, 菌根真菌可以使植物获取有机N的能力大大增强, 菌丝容易穿入有机质正在分解的微环境, 进而与其他微生物直接竞争分解产物(Jones *et al.*, 2005)。前人研究表明几乎所有的川西亚高山针叶林树种均被外生菌根真菌高度侵染(宋富强等, 2006), 良好的菌根真菌有利于该区域植物对土壤氨基酸的吸收利用。如上文所述, 我们利用植物根系中 $^{13}\text{C}$ 和 $^{15}\text{N}$ 的单位摩尔原子百分超比值的回归方程斜率与同位素标记物(甘氨酸)中 $^{13}\text{C}$ 和 $^{15}\text{N}$ 的单位摩尔原子百分超比值(2.0)的差异来保守地推测被植物直接吸收利用的土壤氨基酸的百分率。当回归方程斜率为2.0时, 表明100%的氨基酸被植物根系直接吸收。据此, 本研究在注射双标记甘氨酸6 h后, 被云杉和红桦幼苗根系直接吸收利用的甘氨酸比例分别为91%和97% (图5)。这有力地证明了氨基酸可以被亚高山针叶林植物直接吸收利用, 同时也进一步印证了我们前期研究中得出的亚高山针叶林植物可以将土壤氨基酸作为一种重要的N源来维持森林生产力和群落稳定性的结论(Zhang *et al.*, 2017)。需要指出的是, 虽然越来越多的植物吸收有机N的现象和机制被揭示出来, 但不同研究方法、不同植物树种, 以及不同有机N源之间都可能存在很大的变异(Lipson &

Nasholm, 2001; 崔晓阳, 2007), 因此关于植物如何调控无机N和有机N的获取策略及其潜在机制仍不清楚, 有待于进一步深入研究。

## 4 结论

本研究获得的主要结论如下: (1)土壤 $\text{NO}_3^-$ -N是川西亚高山针叶林树种偏好吸收的最主要N源; (2)与已知的众多高寒生态系统植物能够吸收有机N一样, 亚高山针叶林的主要树种也具有较强的直接吸收利用土壤氨基酸的能力。需要说明的是, 本研究采用的试验对象仅为几年生幼苗, 由于幼苗不论是生长、形态还是生理等方面都与成株有很大差异, 其对土壤N的吸收偏好和利用策略可能与野外成熟树木有所差异, 因此, 未来应进一步深入开展植物对不同状态N素吸收的野外原位研究, 量化各种N素对植物总N吸收的贡献大小, 以便更加全面真实地揭示亚高山针叶林生态系统植物N素利用策略及其生态学意义。另外, 鉴于菌根真菌在植物N吸收过程中所起的重要作用, 目前关于植物N吸收方面的研究尚未区分植物根系本身和菌根真菌对N的吸收, 未来也应加强这方面的研究。

**基金项目** 国家重点研发计划项目(2017YFC050-5200)、中国科学院前沿科学重点研究项目(QYZD-B-SSW-SMC023)、国家自然科学基金(31670449)、四川省重点研发项目(2017SZ0038)和四川省青年科技基金(2016JQ0037)。

## 参考文献

- Ashton IW, Miller AE, Bowman WD, Suding KN (2010). Niche complementarity due to plasticity in resource use: Plant partitioning of chemical N forms. *Ecology*, 91, 3252–3260.
- Bennett JN, Prescott CE (2004). Organic and inorganic nitrogen nutrition of western red cedar, western hemlock and salal in mineral N-limited cedar-hemlock forests. *Oecologia*, 141, 468–476.
- Binkley D, Aber J, Pastor J, Nadelhoffer K (1986). Nitrogen availability in some Wisconsin forests: Comparisons of resin bags and on-site incubations. *Biology Fertility of Soils*, 2, 77–82.
- Breteler H, Siegerist M (1984). Effect of ammonium on nitrate utilization by root of dwarf bean. *Plant Physiology*, 75, 1099–1103.
- Britto DT, Kronzucker HJ (2002).  $\text{NH}_4^+$  toxicity in higher plants: A critical review. *Journal of Plant Physiology*, 159,

doi: 10.17521/cjpe.2017.0165

- 567–584.
- Burton J, Chen CR, Xu ZH, Ghadiri H (2007). Soluble organic nitrogen pools in adjacent native and plantation forests of subtropical Australia. *Soil Biology & Biochemistry*, 39, 2723–2734.
- Chapin FS III, Moilanen L, Kielland K (1993). Preferential use of organic nitrogen for growth by a non-mycorrhizal arctic sedge. *Nature*, 361, 150–153.
- Chen G, Guo SW, Kronzucker HJ, Shi WM (2013). Nitrogen use efficiency (NUE) in rice links to  $\text{NH}_4^+$  toxicity and futile  $\text{NH}_4^+$  cycling in roots. *Plant and Soil*, 369, 351–363.
- Coskun D, Britto DT, Li MY, Becker A, Kronzucker HJ (2013). Rapid ammonia gas transport accounts for futile transmembrane cycling under  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  toxicity in plant roots. *Plant Physiology*, 163, 1859–1867.
- Cui XY (2007). Organic nitrogen use by plants and its significance in some natural ecosystems. *Acta Ecologica Sinica*, 27, 3500–3512. (in Chinese with English abstract) [崔晓阳 (2007). 植物对有机氮源的利用及其在自然生态系统中的意义. 生态学报, 27, 3500–3512.]
- Elser JJ, Bracken MES, Cleland EE, Gruner DS, Harpole WS (2007). Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 10, 1135–1142.
- Finzi AC, Berthrong ST (2005). The uptake of amino acids by microbes and trees in three cold-temperate forests. *Ecology*, 86, 3345–3353.
- Gallet-Budynek A, Brzostek E, Rodgers VL, Talbot JM, Hyzy S, Finzi AC (2009). Intact amino acid uptake by northern hardwood and conifer trees. *Ecosystem Ecology Original Paper*, 160, 129–138.
- Gessler A, Schneider S, von Sengbusch D, Weber P, Hanemann U, Huber C, Rothe A, Kreutzer K, Rennenberg H (1998). Field and laboratory experiments on net uptake of nitrate and ammonium by the roots of spruce (*Picea abies*) and beech (*Fagus sylvatica*) trees. *New Phytologist*, 138, 275–285.
- Jones DL, Healey JR, Willett VB, Farrar JF, Hodge A (2005). Dissolved organic nitrogen uptake by plants—An important N uptake pathway. *Soil Biology & Biochemistry*, 37, 413–423.
- Lajtha K (1994). Nutrient uptake in eastern deciduous tree seedlings. *Plant and Soil*, 160, 193–199.
- Li HS (2002). *Modern Plant Physiology*. Higher Education Press, Beijing. (in Chinese) [李合生 (2002). 现代植物生理学. 高等教育出版社, 北京.]
- Li YJ, Sun DD, Li DD, Xu ZF, Zhao CZ, Lin HH, Liu Q (2015). Effects of warming on ectomycorrhizal colonization and nitrogen nutrition of *Picea asperata* seedlings grown in two contrasting forest ecosystems. *Scientific Report*, 5, 17546. doi: 10.1038/srep17546.
- Lipson D, Nasholm T (2001). The unexpected versatility of plants: Organic nitrogen use and availability in terrestrial ecosystems. *Oecologia*, 128, 305–316.
- Lu JL (2003). *Plant Nutriology*. China Agricultural University Press, Beijing. (in Chinese) [陆景陵 (2003). 植物营养学. 中国农业大学出版社, 北京.]
- McKane RB, Johnson LC, Shaver GR, Nadelhoffer KJ, Rastetter EB, Fry B, Giblin AE, Kielland K, Kwiatkowski BL, Laundre JA, Murray G (2002). Resource-based niches provide a basis for plant species diversity and dominance in arctic tundra. *Nature*, 415, 68–71.
- Miller AE, Bowman WD, Suding KN (2007). Plant uptake of inorganic and organic nitrogen: Neighbor identity matters. *Ecology*, 88, 1832–1840.
- Nan HW, Liu Q, Chen JS, Cheng XY, Yin HJ, Yin CY, Zhao CZ (2013). Effects of nutrient heterogeneity and competition on root architecture of spruce seedlings: implications for an essential feature of root foraging. *PLOS ONE*, 8, e65650. doi: 10.1371/journal.pone.0065650.
- Näsholm T, Ekblad A, Nordin A, Giesler R, Hogberg M, Hogberg P (1998). Boreal forest plants take up organic nitrogen. *Nature*, 392, 914–916.
- Näsholm T, Kielland K, Ganeteg U (2009). Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytologist*, 182, 31–48.
- Nordin A, Hogberg P, Näsholm T (2001). Soil nitrogen form and plant nitrogen uptake along a boreal forest productivity gradient. *Oecologia*, 129, 125–132.
- Ohlund J, Näsholm T (2001). Growth of conifer seedlings on organic and inorganic nitrogen sources. *Tree Physiology*, 18, 1319–1326.
- Pastor J, Aber J, McLaugherty C, Melillo J (1984). Above-ground production and N and P cycling along a nitrogen mineralization gradient on Blackhawk Island, Wisconsin. *Ecology*, 65, 256–268.
- Persson J, Gardeström P, Näsholm T (2006). Uptake, metabolism and distribution of organic and inorganic nitrogen sources by *Pinus sylvestris*. *Journal of Experimental Botany*, 57, 2651–2659.
- Rothstein DE (2014). *In-situ* root uptake and soil transformations of glycine, glutamine and ammonium in two temperate deciduous forests of contrasting N availability. *Soil Biology & Biochemistry*, 75, 233–236.
- Song FQ, Tian XJ, Yang CL, He XB, Chen Bin, Zhu J, Hao JJ (2006). Ectomycorrhizal infection intensity of subalpine forest ecosystems in western Sichuan, China. *Acta Ecologica Sinica*, 26, 4171–4178. (in Chinese with English abstract) [宋福强, 田兴军, 杨昌林, 何兴兵, 陈彬, 朱静, 郝杰杰 (2006). 川西亚高山带森林生态系统外生菌根的形成. 生态学报, 26, 4171–4178.]
- Song MH, Zheng LL, Suding KN, Yin TF, Yu FH (2015). Plasticity in nitrogen form uptake and preference in response to long-term nitrogen fertilization. *Plant and Soil*, 394, 215–224.



- Stribley DP, Read DJ (1980). The biology of mycorrhizae in the Ericaceae VII. The relationship between mycorrhizal infection and the capacity to utilize simple and complex organic nitrogen sources. *New Phytologist*, 86, 365–371.
- Templer P, Dawson T (2004). Nitrogen uptake by four tree species of the Catskill Mountains, New York: Implications for forest N dynamics. *Plant and Soil*, 262, 251–261.
- Wang LX, Macko SA (2011). Constrained preferences in nitrogen uptake across plant species and environments. *Plant, Cell & Environment*, 34, 525–534.
- Warren CR (2009). Does nitrogen concentration affect relative uptake rates of nitrate, ammonium, and glycine? *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 172, 224–229.
- Warren CR, Taranto MT (2010). Temporal variation in pools of amino acids, inorganic and microbial N in a temperate grassland soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 42, 353–359.
- Wei LL, Chen CR, Yu S (2014). Uptake of organic nitrogen and preference for inorganic nitrogen by two Australian native Araucariaceae species. *Plant Ecology & Diversity*, 8, 259–264.
- Xu ZF, Hu R, Xiong P, Wan CA, Cao G, Liu Q (2010). Initial soil responses to experimental warming in two contrasting forest ecosystems, Eastern Tibetan Plateau, China: Nutrient availabilities, microbial properties and enzyme activities. *Applied Soil Ecology*, 46, 291–299.
- Yin HJ, Lai T, Chen XY, Jiang XM, Liu Q (2008). Warming effects on growth and physiology of seedlings of *Betula albo-sinensis* and *Abies faxoniana* under two contrasting light conditions in subalpine coniferous forest of western Sichuan, China. *Journal of Plant Ecology (Chinese Version)*, 32, 1072–1083. (in Chinese with English abstract) [尹华军, 赖挺, 程新颖, 蒋先敏, 刘庆 (2008). 增温对川西亚高山针叶林内不同光环境下红桦和岷江冷杉幼苗生长和生理的影响. *植物生态学报*, 32, 1072–1083.]
- Zhang ZL, Yuan YS, Zhao WQ, He HL, Li DD, He W, Liu Q, Yin HJ (2017). Seasonal variations in the soil amino acid pool and flux following the conversion of a natural forest to a pine plantation on the eastern Tibetan Plateau, China. *Soil Biology & Biochemistry*, 105, 1–11.

责任编辑: 白 娥 责任编辑: 王 葳



扫码向作者提问