

应用¹⁵N 标记技术研究栓皮栎氮素的吸收

顾盛俊, 周丕生, 康宏樟

(上海交通大学 农业与生物学院, 上海 200240)

摘要: 应用¹⁵N 示踪技术,对盆栽栓皮栎进行外源氮素标记,并分析 2 年内栓皮栎叶片氮含量变化及外源氮素间的比例关系,揭示氮素去向,对木本植物氮利用进行深入研究。结果表明,栓皮栎叶片施用硝酸铵后 4 周内氮含量达到最高,之后生长期内氮含量会随着生长时间增加而显著下降,并可根据原产地分别建立回归方程;标记后第 20 周叶片¹⁵N 平均丰度达(7.89±1.35)%;栓皮栎对外源氮素有较高的利用率,施入肥料后第 4 周即趋于平衡,第 16 周达到峰值,平均肥料氮比例(Ndff%)为(7.77±0.69)%,在第 56 周的新叶中仍达(5.46±0.79)%,2 个生长期同期的 Ndff% 无显著差异。不同产地栓皮栎的氮吸收利用规律较一致;原产安徽的栓皮栎在外源氮素利用率及氮吸收量两方面均表现良好。

关键词: ¹⁵N 标记; 栓皮栎; 氮素

中图分类号: S 792.189

文献标识码: A

Study on Nitrogen Assimilation of *Quercus variabilis* with ¹⁵N Labeling

GU Sheng-jun, ZHOU Pi-sheng, KANG Hong-zhang

(School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: The ¹⁵N trace technology was employed to study the nitrogen assimilation in *Quercus variabilis* leaves within 2 years. The change of nitrogen content and exogenous nitrogen proportion in leaves was analyzed to reveal the transference of nitrogen in woody plant. The results showed that the nitrogen content of *Quercus variabilis* leaves reached the highest level in the 4th week after being labeled, and then decreased significantly as time passed in the whole year, which could be portrayed by regression equations based on the origin, respectively. The average ¹⁵N abundance in leaves was (7.89±1.35)% in the 20th week after being labeled. *Quercus variabilis* has efficient utilization of exogenous nitrogen that the assimilation had been in balance since the 4th week after being fertilized and reached peak in the 16th week. The average percentage of nitrogen from the fertilizer(Ndff%) was (7.77±0.69)% in the 16th week, and still remained (5.46±0.79)% in the 56th week. The Ndff% in the second year remained as same as the corresponding period in the first year. *Quercus variabilis* from different origins showed similar rule in nitrogen assimilation. The species from Anhui performed well in both exogenous nitrogen utilization and nitrogen content increase.

Key words: ¹⁵N; *Quercus variabilis* Bl.; nitrogen

收稿日期: 2015-07-21

基金项目: 国家自然科学基金(31270491)

作者简介: 顾盛俊(1990-), 男, 硕士生, 研究方向: 土壤、植物氮素营养;

周丕生(1958-)为本文通讯作者, 男, 硕士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 土壤、植物氮素营养, E-mail: psz58@126.com

同位素示踪技术具有准确和便利的特点,广泛应用于生物领域,尤其是 ^{15}N 标记,在揭示小麦、玉米、水稻等农作物氮素利用的机制研究上起到了重要作用^[1-4],此外在莴苣、郁金香等园艺植物也有应用^[5-6],但是国内农业方面对于 ^{15}N 标记的研究,主要集中于土壤氮素转移和一年生植物上,分析不同植物、品种在不同环境下的各个发育时期各器官对氮素的利用情况差异,关注提高肥料利用率、降低成本、减少污染等问题;木本多年生植物的研究主要是果树不同器官在各个物候时期氮素转移^[7-9]。另一方面,近年来林地的生态作用越发受到重视,树木固氮、减少氮污染成为新的研究方向;其中栓皮栎(*Quercus variabilis* Bl.)作为暖温带地带性植被的主要组成树种,在近30年内受到了国内外关注,是有代表性的研究对象^[10-12]。本文应用 ^{15}N 示踪技术,对盆栽栓皮栎进行外源氮素标记,并分析2年内栓皮栎叶片氮素变化及与外源氮素之间的比例关系,对于了解氮素去向,对木本植物氮利用进行深入研究具有一定价值。

1 材料与方法

1.1 氮元素标记

选取来自北京、安徽、江西3个不同纬度地区的5年生栓皮栎各30盆,株高约为1.6~1.7 m,中位数1.66 m,每盆盆栽土重8 kg,在上海进行温室盆栽试验。于2013年4月,栓皮栎长新叶时进行氮素标记:用丰度为99.17%的 $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ (上海化工研究院提供)配制浓度为51.235 mg/L(0.62 mol/L)的溶液,然后在每盆栓皮栎土壤用玻璃棒打2个深度约为20 cm的孔,插入玻璃管,共转移20 mL上述溶液加入孔中,每盆栓皮栎中施加的 ^{15}N 总量为25 mmol。

1.2 取样

在标记氮后第4、8、12、16、20、56、64周,以及未标记的空白植株在第4周进行取样,取样时在30盆标记的植物中随机挑选出5株,选择健壮枝条上的成熟叶片的第4片小叶,每株取1张叶片,混合5张叶片作为一个样品。

取好的样品用纸擦去叶面浮尘,然后在105℃下杀青30 min后,在80℃下烘至恒重,随后研磨至粉状并通过80目分样筛,保存于干燥器中。

1.3 分析方法

盆栽土基本指标包括pH、EC、有效磷、速效钾、

有机质、全氮,测试方法依次为:水浸提土壤,pH计测pH,电导率仪测试EC; NaHCO_3 浸提,钼锑抗比色法测试有效磷; $\text{NH}_4\text{CH}_2\text{COOH}$ 浸提,火焰光度计法测速效钾;重铬酸钾氧化-外加热法测试有机质;半微量凯氏法测定全氮含量。植物样品用元素分析同位素质谱联用仪(型号:Vario EL III/Isoprime)测试 ^{15}N 丰度及氮含量。

^{15}N 标记研究的植物氮源来自于土壤和肥料两部分,其中源于肥料的氮素比例以Ndff%表示,可通过测定植物样品中 ^{15}N 的元素丰度,进而计算样品与标记物的原子百分超比值计算。

供试土壤基本理化性质为:pH值 8.18 ± 0.09 、EC 0.229 ± 0.021 mS/cm、有效磷 34.83 ± 1.03 mg/kg、速效钾 323.8 ± 7.9 mg/kg、有机质含量 26.61 ± 0.52 g/kg、全氮含量 1.68 ± 0.05 g/kg。

2 结果与分析

2.1 氮素含量变化

施入硝酸铵后,4周内氮含量明显上升,并达到年生长期最大值,3个地区平均氮含量 22.96 ± 2.26 g/kg,高出空白氮含量 19.59 ± 1.95 g/kg约17.17%,随后逐月下降,第20周达最小值,平均氮含量 17.46 ± 0.95 g/kg;标记后同一生长期(前20周),氮含量与时间呈极显著负相关,相关系数 0.772^{**} ($\alpha=0.01$),并可建立一元线性回归方程: $Y=24.497-0.344X$,($R^2=0.596$, $\alpha=0.01$);因而时间是同一生长期内栓皮栎叶片氮含量下降的主要因素。第2个生长期氮含量相比于第1年的同一时期,江西品种没有显著差异;安徽品种第56周和第4周无明显差异,第64周水平显著低于第12周;北京品种第56周水平显著低于第4周,第64周和第12周无明显差异(图1)。综合来看3个地区第4周和第56周含量分别为 22.96 ± 2.26 g/kg和 22.10 ± 2.58 g/kg,无显著差异,可见栓皮栎对氮素有着较高的利用率。

除了时间,产地也是影响氮含量的极显著的因素。其中原产江西的栓皮栎氮含量极显著低于北京和安徽($\alpha=0.01$),但后者则没有明显差异($P>0.1$)。3个地区氮含量下降速率也不同:其中北京最快,第8、16、20周氮含量显著下降;其次是安徽,前8周无显著差异,从第12周开始显著下降;下降最慢的是江西,整体呈下降趋势,但相邻8周的氮含量差异均不显著,直至第16周才显著低于第4周水

平。3 个地区可分别建立氮含量与标记后周数的一元线性回归方程,江西: $Y=21.455-0.235X(R^2=0.670, \alpha=0.01)$;安徽: $Y=25.032-0.327X(R^2=0.876, \alpha=0.01)$;北京: $Y=27.004-0.471X(R^2=$

$0.883, \alpha=0.01)$ 。

双因素方差分析还表明:时间与产地之间存在显著的交互作用($\alpha=0.05$),推测是栓皮栎在不同地域适应的温度敏感性差异造成的。

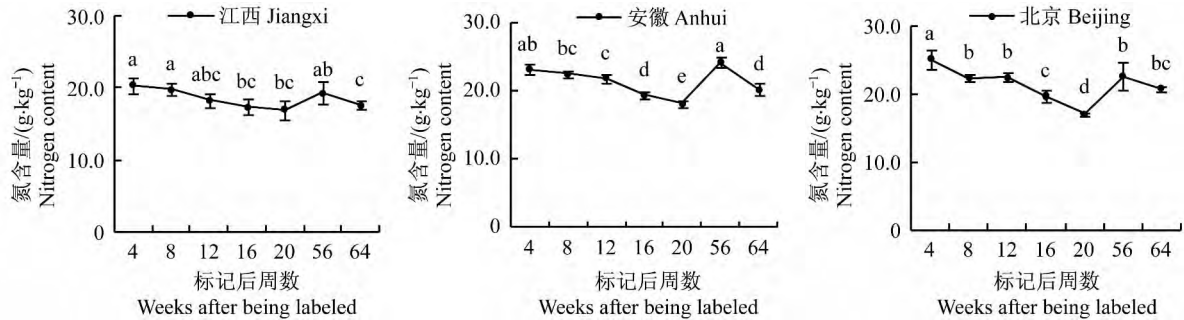


图 1 栓皮栎叶片氮含量随时间变化

Fig. 1 The nitrogen content change of *Quercus variabilis* leaves by time

2.2 ¹⁵N 的丰度变化

前 12 周丰度无显著变化,然后升高,在第 16、20 周达到丰度最大值(图 2)。江西、安徽、北京品种在第 16 周时平均丰度依次为(8.30±1.05)%,(8.58±0.95)%,(7.30±1.87)%;第 20 周时平均丰度依次为(8.77±2.26)%,(8.57±0.84)%,

(6.34±0.90)%。3 个地区第 2 个生长期叶片的¹⁵N 的丰度均与前一生长期同期无显著差异。因而通过在肥料中添加¹⁵N 源,收获含¹⁵N 的植物材料作为次级标记物时,在标记第 4 周后,3 处均可收获叶片,以标记后 16~20 周为最佳收获期,且第 2 生长期仍可收获次级标记物。

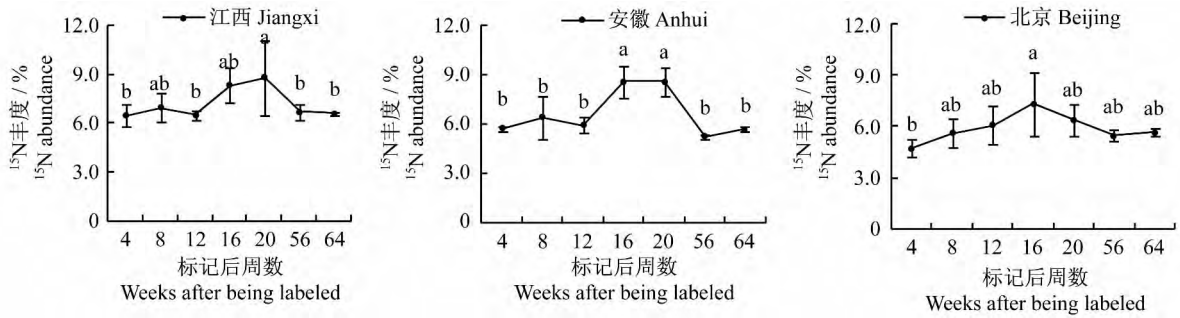


图 2 栓皮栎叶片¹⁵N 的丰度随时间变化

Fig. 2 The ¹⁵N abundance change of *Quercus variabilis* leaves by time

2.3 Ndff%变化

肥料氮比例(Ndff%)表示叶片中源于标记材料的氮占叶片总氮的质量比,由于标记材料的元素丰度 99.17%很高,而¹⁵N 的自然丰度又远远小于标记材料和标记后叶片的丰度,使得 Ndff%在数值上与¹⁵N 丰度很接近。由图 3 可知:3 个地区标记前 4 周 Ndff%均已经趋于稳定,前 12 周处于同一水平($\alpha=0.05$),说明第 4 周栓皮栎对标记氮已充分吸收;而第 16 周及第 20 周均显著高于前 12 周,很可能是高温胁迫造成叶片枯落和新叶生长,促使氮素再分配,叶片¹⁵N 丰度增加;另外,各地第 4、12、56、64 周(2 个生长期的同一时期)叶片中 Ndff%均无显著差异,说明栓皮栎对氮源充分利用,回流作用明

显,落叶不会造成氮素的显著损失。3 处产地的栓皮栎 Ndff%均显示相同的变化规律。

双因素方差分析还表明:时间与原产地都是影响 Ndff%的极显著因素($\alpha=0.01$)且无交互作用($P>0.1$);3 个地区中,江西栓皮栎叶片 Ndff%在第 20 周达最大值(8.49±2.27)%,高于原产于安徽(8.30±0.85)%和北京(6.02±0.91)%的栓皮栎叶片同期水平;安徽栓皮栎叶片在第 16、20 周达最大值;北京栓皮栎叶片在第 16 周达最大值,第 20 周降回到第 12 周的水平;总体上看,原产江西、安徽、北京的栓皮栎叶片 Ndff%依次显著降低,其中江西极显著高于北京($\alpha=0.01$),说明原产低纬度地区栓皮栎对氮源利用效率更高。

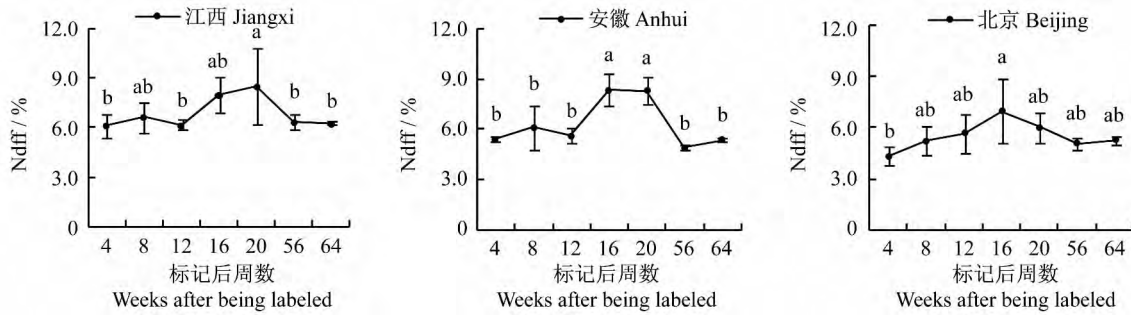


图 3 栓皮栎叶片 Ndff% 随时间变化

Fig. 3 The Ndff% change of *Quercus variabilis* leaves by time

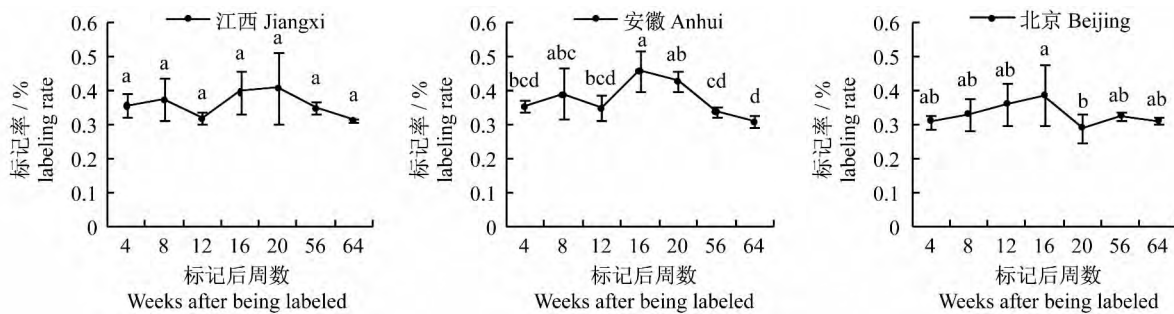
2.4 ^{15}N 标记率

由于栓皮栎叶片的总质量未知,因而不能计算出各时期的总标记率(硝酸铵氮元素中被用于叶片的总量所占比例),本文的标记率指是每克干叶片的氮素占标记肥料氮素的比例。

标记率表示每克干叶片中标记氮素物质数量与标记材料总量的数量比,反应植物对于氮的利用情况,所以与 Ndff% 总趋势一致,但局部存在差异。这是因为标记率还反映了样品本身的含氮量与标记总氮量的关系,且数量比避开了丰度引起的原子量差异的误差。

方差分析表明,北京栓皮栎叶片的标记率受时间影响显著,其余 2 个地区不同时期标记率无显著差异,此外原产地也是显著影响因素($\alpha=0.05$),但时间与产地间不存在明显的交互作用($P>0.1$) (图 4)。原产安徽(a)的栓皮栎叶片标记率显著高于江

西(b),但二者与北京(ab)无明显差异。与 Ndff% 变化不同主要是由于江西栓皮栎叶片氮含量低造成的,从整体趋势来看, ^{15}N 标记率和 Ndff% 走向相同,标记率曲线比 Ndff% 曲线更为扁平,随时间无大幅变化,始终保持在一个稳定的水平:江西品种在 2 年内标记率无明显变化;安徽品种在标记后第 16 周标记率显著上升,随后又迅速下降至之前的水平;北京品种前 16 周无明显差异,第 20 周较第 16 周显著下降,但与前 12 周无明显差异。因而可认为标记后前 12 周氮素就已趋平衡,在第 16 周达到最大利用率处,之后下降至原水平。值得一提的是,栓皮栎第 2 个生长期的新生叶中仍有着较高的标记率,是多年生植物与一年生的重要区别,未见在其他文献中报道。总而言之,虽然氮含量在同一生长期内显著变化,但是不同地区栓皮栎在标记率上表现出稳定性,受时间影响变化不大。

图 4 栓皮栎每克干叶片 ^{15}N 标记率随时间变化Fig. 4 The ^{15}N labeling rate change of *Quercus variabilis* leaves by time

3 小结

国内栓皮栎的研究主要集中在生物、生态学特性、资源分布与利用、林木培育等方面;对于生理方向的研究主要是营养元素、环境条件、凋落物、品种差异对植株生长的影响^[10-12];目前未见运用同位素

示踪法研究栓皮栎对外源氮素吸收的报道,且对于木本植物氮吸收的研究也较为少见。

研究发现,栓皮栎叶片施用硝酸铵后 4 周内氮素含量达到最高,之后同一生长期氮素含量会随着生长时间增加而显著下降,下降速度北京>安徽>江西,时间是这一过程主要的影响因子,并可根据不同产地建立回归模型;同时期的北京、安徽、江西

栓皮栎叶片氮含量依次降低;此外原产地及其交互作用也会影响栓皮栎的氮含量。杜启燃在栓皮栎幼苗对 CO₂ 增加和 N 增加的生理生态响应的研究中,也指出了施用外源氮素(尿素)会使栓皮栎叶片生物量、可溶性糖和非结构性碳水化合物显著增加^[12],与本研究观察到氮含量增加规律一致。

此外,栓皮栎对外源氮素有较高的利用率,外源氮素施入土壤后迅速得以利用,前4周内栓皮栎吸收就已趋近平衡,前12周内保持稳定,第16周达到利用率最高峰,而第2个生长期的新叶中仍然保留着高比例的前一生长期所吸收的氮,且该比例与前一生长期的同期无明显差异;标记率不随时间显著变化,因而在标记后第4周即可收获栓皮栎叶片作为次级标记物使用,以标记后16~20周为最佳收获期。

相比于草本植物,栓皮栎的 Ndff% 比例较低,橡胶幼苗、樱桃、苹果等木本植物也表现出类似的低比例,普遍低于 10%^[7,13-14]。樱桃和苹果叶片 Ndff% 低于 5%,较栓皮栎更低;橡胶幼苗叶片施肥后前4周比例与栓皮栎接近,之后不断升高,而栓皮栎的比例则呈现下降趋势,这可能有3方面的原因:首先,橡胶和栓皮栎在氮素吸收机制上可能存在差异;其次,橡胶实验材料为两蓬叶的幼苗,而栓皮栎是5年生的苗,不同发育阶段对于外源氮素吸收存在差异;最后,栓皮栎实验用盆栽土壤,有机质、氮含量较高,可能对肥料氮素吸收有一定干扰。因此二者在 Ndff% 上呈现不同规律。

不同产地栓皮栎在氮吸收利用上表现的规律是一致的,但各自有着突出之处:江西相比于安徽和北京的栓皮栎的氮含量较低,但在同化利用效率方面显著高于后两地;综合来看,原产安徽的栓皮栎在外源氮素利用率及氮吸收量上均表现良好。

参考文献:

[1] 茹德平,赵彩霞,李习军,等.用¹⁵N示踪技术研究高产

小麦、玉米的施氮规律[J].核农学报,2005,19(2):151-154.

[2] 沈其荣,徐国华.小麦和玉米叶面标记尿素¹⁵N的吸收和运输[J].土壤学报,2001,38(1):67-74.

[3] 晏娟,沈其荣,尹斌,等.应用¹⁵N示踪技术研究水稻对氮肥的吸收和分配[J].核农学报,2009,23(3):487-491,496.

[4] 叶利庭,宋文静,吕华军,等.不同氮效率水稻生育后期氮素积累转运特征[J].土壤学报,2010,47(2):303-310.

[5] 周丕生,王立德.¹⁵N标记有机无机氮在茼蒿设施土体系中的转化与分配[J].上海农学院学报,1995,13(2):117-123.

[6] 周丕生,裴蓓,史益敏,等.应用核素¹⁵N研究郁金香氮素的累积与分配[J].上海交通大学学报(农业科学版),2003,21(4):309-212.

[7] 赵凤霞.‘早大果’甜樱桃(*Prunus avium* L.)¹⁵N吸收、分配及利用特性研究[D].泰安:山东农业大学,2008.

[8] 张进,姜远茂,束怀瑞,等.不同施肥期沾化冬枣对¹⁵N的吸收、分配及利用特性[J].园艺学报,2005,32(2):288-291.

[9] 赵林,姜远茂,彭福田,等.嘎拉苹果对春施¹⁵N尿素的吸收、利用与分配特性[J].植物营养与肥料学报,2009,15(6):1439-1443.

[10] 吴明作.栓皮栎研究进展[J].陕西林业科技,1998(4):65-69.

[11] 周建云,林军,何景峰,等.栓皮栎研究进展与未来展望[J].西北林学院学报,2010,25(3):43-49.

[12] 杜启燃.不同种源栓皮栎幼苗对 CO₂ 增加和 N 增加的生理生态特性响应[D].武汉:华中农业大学,2013.

[13] 潘中耀.橡胶树幼苗对不同形态¹⁵N标记氮肥的吸收、分配和利用特性研究[D].海口:海南大学,2010.

[14] 张大鹏.不同滴灌施肥方案对苹果生长及¹⁵N吸收、分配和利用的影响[D].泰安:山东农业大学,2012.