

DOI: 10.11766/trxb201301110023

# 植物标志物在森林土壤碳循环研究中的应用\*

万晓华<sup>1,2</sup> 黄志群<sup>1,2†</sup>

(1 湿润亚热带山地生态国家重点实验室培育基地,福州 350007)

(2 福建师范大学地理科学学院,福州 350007)

**摘要** 森林土壤有机质的稳定机制对于森林长期碳吸存研究具有重要意义。土壤中难分解的生物大分子构成了土壤稳定性有机质库。稳定性土壤碳库主要来自于植物、动物、真菌和细菌,每一种土壤有机质的来源均有具体的天然生物标志物(biomarker)。本文回顾了近 20 年来植物标志物在土壤碳循环研究中的进展,概述了植物标志物在推断土壤有机质的植物来源以及有机质的分解程度方面的应用,并介绍了植物标志物的稳定性同位素分析在定量估算土壤有机质周转时间上的应用。本文还详细介绍了土壤中植物标志物的化学分析方法,为今后我国应用植物标志物开展土壤有机质研究提供参考。

**关键词** 植物生物标志物;木质素;脂类物质;土壤有机质;碳同位素;气相色谱-质谱联用仪

**中图分类号** S714.3 **文献标识码** A

森林土壤的碳输入主要来源于植被光合作用固定大气中的二氧化碳(CO<sub>2</sub>),通过植物残体、根系和根系分泌物进入土壤。森林土壤碳的另外一个主要来源是土壤微生物。一般认为土壤微生物、植物残体、根系和根系分泌物占森林土壤碳来源的 99% 以上,而土壤微生物仅贡献了 1% ~ 5% 的土壤有机碳<sup>[1]</sup>。植物残体、根系和根系分泌物的主要成分为多糖、木质素、单宁和蛋白类物质,这些物质分解后,只有 10% ~ 20% 的生物量被转化为稳定的土壤有机碳(周转时间为几年至几十年),这当中的 1% 会储存在土壤有机质中超过几千年,而其余的均以 CO<sub>2</sub> 的形式返回到大气中<sup>[2]</sup>。森林土壤长期碳吸存的关键则取决于这部分稳定的土壤有机碳库<sup>[3-4]</sup>。目前,人们对这些来自于植物的化学物质是以怎样的形式以及如何进入稳定的土壤有机碳库还不甚了解<sup>[5]</sup>。植物凋落物(根、叶和其他木质残体)一旦进入土壤,凋落物的解剖形态特征随着分解的进行很快消失,因此很难辨认;而一些难分解的生物大分子(如木质素、单宁和脂类化合物等)却被保留在土壤当中,这些难分解生物大分子具有植物特有的分子结构特征,因此被称为生物标志物

(biomarker)<sup>[6]</sup>。在地球化学领域中,生物标志物分析方法广泛应用于分析河床沉积物中有机质的来源与组成<sup>[7-8]</sup>,追踪陆地碳源在河流和湖泊中的分解与转化过程<sup>[2,9]</sup>等。在最近几十年中,生物标志物分析方法已经逐渐被应用到土壤碳循环研究中,用于推断不同土壤有机质的来源及其分解与转化过程等<sup>[10-12]</sup>。

## 1 植物标志物可推断不同土壤有机质组分的来源

### 1.1 植物标志物可推断来自不同植物部位的难分解大分子对森林土壤的贡献

角质素(Cutins)和木栓质(Suberins)均是植物组织中难分解的脂类物质。角质素是植物叶片角质层的主要成分,具有保持植物自身水分的作用,同时也能保护植物叶片不受外界侵袭<sup>[13]</sup>。角质素化合物是非晶态大分子生物共聚酯,主要由羧酸(*n*-alkanoic acids)组成,还包括中链羟基烷酸(mid-chain ω-hydroxyalkanoic acids)和 C<sub>16</sub> 单/双羟基酸,

\* 福建师范大学“闽江学者”启动经费、教育部新世纪优秀人才支持计划(DB-168)、福建省杰出青年基金项目(2060203)资助

† 通讯作者, E-mail: zhiqunhuang@hotmail.com

作者简介:万晓华(1986—),女,河北石家庄人,硕士研究生,主要从事森林碳循环研究。E-mail: xiaohuawan2012@foxmail.com

收稿日期:2013-01-11;收到修改稿日期:2013-05-06

并含有酯结合的环氧基团<sup>[3]</sup>。木栓质化合物主要来自于植物的根系和树皮<sup>[14]</sup>,主要由脂肪族聚酯、长链羟基羧酸(链长度 $\geq C_{20}$ )以及多酚类化合物组成<sup>[13-15]</sup>。由于角质素和木栓质类物质含有特殊的化学结构,因而很难被土壤微生物分解和矿化。因此,这两种脂类物质是土壤有机碳库中重要的生物标志物<sup>[12]</sup>,通过分析这些生物标志物在土壤中的相对丰度,能够有助于理清来源于植物叶片和根系有机质的输入情况<sup>[16]</sup>。例如,Huang等<sup>[17]</sup>利用核磁共振、稳定性同位素技术与生物标志物(角质素和木栓质类物质)相结合,分析了不同森林采伐剩余物处理方式(包括移除凋落物层、全树收获和树干采伐)对二代辐射松(*Pinus radiata*)人工林土壤有机碳的影响。他们发现树干采伐样地土壤中增加的较为稳定的烷链碳和芳香碳来自于植物针叶表层的角质素。树干采伐较之于全树采伐,针叶保留数量较多,这些难分解的角质素通过淋溶等方式进入土壤重组有机质中。与全树采伐和凋落物层移除这两种采伐方式相比,树干采伐增加的这些烷链碳和芳香碳,改善了土壤碳稳定性,有助于长期土壤碳吸存。Crow等<sup>[18]</sup>利用植物残体的移除和交换实验(Detritus Input Removal and Transfer)分析土壤有机质中生物标志物(角质素、木栓质和木质素类物质)的丰度。他们发现在落叶林中,来源于植物根系的脂类物质对土壤碳库的贡献较大;而在针叶林中,来自于针叶的脂类化合物却被优先保留在土壤当中。在森林土壤中,用木栓质来推断有机质来源于植物哪一部位时需要注意,木栓质不仅存在于植物的根系中,也存在于植物的树皮组织中<sup>[19]</sup>。针对这一点,Hamer等<sup>[20]</sup>研究发现 $C_{22}$ 二酸主要来源于森林植物的根系,可以作为植物根系的生物标志物。许多研究认为, $C_{16}$ 和 $C_{18}$ 羟基羧酸是角质素特有的成分,但是Otto等<sup>[19]</sup>研究发现在少量木栓质中也含有这两个分子化合物。Hamer等<sup>[20]</sup>研究也发现欧洲蕨(*Pteridium arachnoideum*)叶片中 $C_{16}$ 羟基羧酸分子化合物浓度是其地下根系的46倍,而 $C_{18}$ 羟基羧酸仅在叶片中有发现;在狗尾草(*Setaria sphacelata*)中却出现了相反的结果,狗尾草根系 $C_{16}$ 羟基羧酸分子浓度是其植物叶的14倍,而 $C_{18}$ 羟基羧酸仅存在于根系中。这些研究结果表明,在实地研究中,需要根据研究区域具体的优势植物物种的生物标志物来推断土壤有机质的来源。

## 1.2 植物标志物可推断来自不同植物类型的难分解大分子对森林土壤的贡献

木质素是导管植物中含量最丰富的生物大分子之一<sup>[21]</sup>,与其他植物大分子不同,例如纤维素在土壤中很容易被矿化,而木质素分解相对缓慢,能够在土壤中被保留下来,成为土壤稳定性碳库的一个重要组成成分<sup>[22]</sup>。在土壤木质素中,有几个生物标志物尤其令人感兴趣。这些生物标志物包括:香兰基(Vanillyls)(包括香草醛、香草乙酮和香草酸)、丁香基(Syringyls)(包括丁香醛、丁香酮和丁香酸)和肉桂基(Cinnamyls)(包括香豆酸和阿魏酸)<sup>[19,23]</sup>。在主要植被类型中,这些木质素单体的组成具有显著特点(图1)。裸子植物的木质组织中仅含有香兰基,而被子植物的木质组织中含有大约等量的香兰基和丁香基<sup>[23-24]</sup>;裸子植物和被子植物的非木本组织(如针叶、草本植物和被子植物叶片)中均含有肉桂基。因此,丁香基与香兰基比值(S/V)和肉桂基与香兰基比值(C/V)常被用作推断来源于不同植物类型的难分解大分子对土壤碳库的贡献<sup>[25-26]</sup>。例如,Otto和Simpson等<sup>[11]</sup>研究了草地(*Agropyron smithii*)、欧洲山杨(*Populus tremula*)(被子植物)和黑松(*Pinus contorta*)(裸子植物)三种植被类型的新鲜植物组织、凋落叶和土壤有机质的木质素组成。他们发现黑松林针叶中的S/V为0,缺少丁香基类化合物,导致其下的土壤中具有较低的S/V(0.1~0.3);草地和欧洲山杨土壤与植物样品中的S/V变化范围为0.6~1.1,表明其木质素主要来源于被子植物。Huang等<sup>[27]</sup>通过分析土壤有机质中香兰基、丁香基、肉桂基类化合物的相对丰度,来推断新西兰草地(以草本植物为主)上营造桉树(*Eucalyptus nitens*)(被子植物)、辐射松和柏树(*Cupressus macrocarpa*)(裸子植物)林后土壤有机质的变化。他们发现,在造林后第5年,土壤轻组碳的下降主要是草本植物碳供应的下降;而第10年,辐射松人工林土壤中轻组碳的恢复主要来自于辐射松细根,而桉树人工林土壤中轻组碳的恢复这要来自于桉树细根和叶片。然而,这三种木质素单体的分解速率不同,肉桂基和丁香基分解相对较快,而香兰基分解相对缓慢<sup>[28-29]</sup>,因此,对于植被空间异质性较大的生态系统或森林转换后长期的实验研究而言,单单用S/V和C/V来推断有机质中木质素的植物来源难免会出现错误的结果<sup>[30-32]</sup>。Tarep等<sup>[33]</sup>根据木质素酚类化合物组成定义了一个新的植被变化指数——木质素酚类植被指数<sup>①</sup>(Lignin phenol

vegetation index, LPVI), 用来推断泥炭和土壤中木质素的植物来源。他们认为, 这个指数能够敏感地观测到陆地植被变化和环境变化; 而且被子植物和裸子植物的木本、非木本组织的 LPVI 为非重叠数据, 与其他木质素参数 (如 S/V、C/V) 相比, LPVI 能够更好的分辨出泥炭和土壤有机质中复杂混合物的植物来源。Otto 和 Simpson<sup>[11]</sup> 研究发现, 草地和欧洲山杨土壤与植被样品的 LPVI 值变化范围为 237 ~ 2608, 与 Tarep 报道的被子植物非木本组织 LPVI 值 (378 ~ 2782) 一致; 黑松林土壤和植被样品的 LPVI 值为 2 ~ 41, 与裸子植物非木本组织的 LPVI 值 (12 ~ 27) 一致。虽然, LPVI 能够准确地区分复杂有机质中木质素的植物来源, 但是, 对于 LPVI 的适用性和准确性还需要更多的实地研究来进行验证。

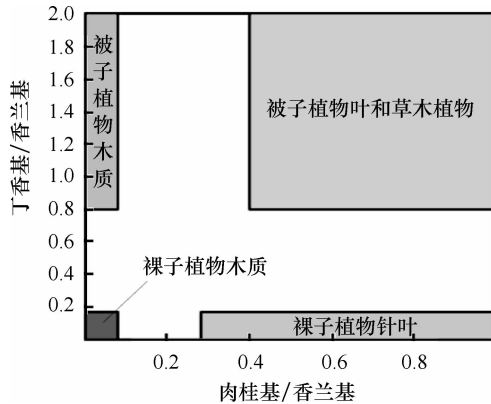


图1 不同植物种类及其组织中来源于木质素的香兰基、丁香基和肉桂基类化合物的相对比例 (参考文献 [11, 23])

g.1 Relative ratios of syringyl to vanillyl and cinnamyl to vanillyl monomers derived from lignin in different types of plants and plant tissues (Reference [11, 23])

除木质素酚类物质外, 脂类物质中的一些羧酸和萜类化合物 (Terpenoid) 也可作为指示不同植物来源的生物标志物。土壤中具有 20 至 30 个碳的长链羧酸主要来自于植物, 而  $C_3$  和  $C_4$  植物中长链羧

酸 (如  $n - C_{22}$ 、 $n - C_{24}$ 、 $n - C_{26}$ ) 具有不同的分布模式<sup>[34]</sup>, 因此, 此类长链羧酸可作为推断土壤有机质中来源于不同植物类型的生物标志物。例如, Wiesenberg 等<sup>[35]</sup> 研究发现  $C_4$  植物中  $n - C_{24}$  羧酸所占比例大于 40%, 为主要成分, 而  $C_3$  植物在生长季节, 茎、叶和根含有丰富的  $n - C_{22}$  和  $n - C_{26}$  羧酸; 该作者还发现了一个羧酸比例 (Carboxylic acids ratio, CAR), 即  $CAR = n - C_{24} / (n - C_{22} + n - C_{26})$ , 能够区分出  $C_3$  植物 ( $< 0.67$ ) 和  $C_4$  植物 ( $> 0.67$ ) 对土壤有机质的贡献, 并且还可以通过这个羧酸比例估算出  $C_3$  和  $C_4$  植物有机质进入土壤后的周转速率<sup>[36]</sup>。此外, 脂类化合物中的三萜类化合物: 齐墩果烷 (Oleanane)、乌苏烷 (Ursane) 和羽扇烷 (Lupane), 是被子植物的特征性大分子, 可以作为被子植物的生物标志物<sup>[37]</sup>; 软木三萜酮 (Friedelin)、白檀酮 ( $\alpha$ -amyrenone,  $\beta$ -amyrenone) 和羽扇豆酮 (Lupenone) 是常绿植物树皮中含量丰富的脂类化合物, 而二萜酸 (Diterpenoid acids) 是针叶植物中所特有的生物大分子<sup>[37]</sup>, 可以作为针叶植物的生物标志物。

## 2 植物标志物可推断不同土壤有机质组分的分解程度

植物标志物不仅可以推断土壤有机质的来源, 还能够提供不同土壤有机质组分分解程度的信息。有机质在土壤中会经历一系列的降解过程<sup>[10]</sup>。植物类固醇 (Steroid) 物质的降解过程与土壤类型和环境条件 (温度和水分) 有关<sup>[38]</sup>。一般植物类固醇物质包括谷甾醇 ( $\beta$ -sitosterol)、豆甾醇 (Stigmasterol) 和豆甾烷醇 (Stigmastanol)<sup>[10]</sup>, 这些物质一旦进入土壤, 有的被保留下来, 有的被生物降解。根据保留下来的生物标志物丰度与降解产物之间的比值, 就可以推断出土壤有机质中植物类固醇物质的分解程度<sup>[10]</sup>。类似的, 根据不同脂类物质在土壤中被保留下来的生物标志物丰度与降解产物之间的比值, 也可以推断出环境因素改变对这类土壤有机质分解过程的影响<sup>[39]</sup>。例如, 角质素类化合物中含有双键或多于一个羟基的羧酸, 与  $\omega$ -羟基羧酸相比,

①  $LPVI = [ \{ S(S+1)/(V+1) + 1 \} \times \{ C(C+1)/(V+1) + 1 \} ]$ , 其中 V 为香兰基, S 为丁香基, C 为肉桂基。V、S 和 C 单位均为各自占三者总和 (V + S + C) 的百分比

更容易被分解。因此,  $\omega - C_{16}/\sum C_{16}$ <sup>①</sup> 和  $\omega - C_{18}/\sum C_{18}$ <sup>②</sup> 常被用来分别指示角质素和木栓质类物质的分解程度, 这两个比值随角质素或木栓质类物质分解过程的进行呈现出增加的趋势<sup>[40]</sup>。例如, Goni 和 Hedges<sup>[40]</sup> 发现被子植物样品的  $\omega - C_{16}/\sum C_{16}$  值为 0 ~ 0.2, 而对应的土壤中  $\omega - C_{16}/\sum C_{16}$  值为 0.3 ~ 0.6。Otto 和 Simpson<sup>[16]</sup> 也发现凋落叶的  $\omega - C_{16}/\sum C_{16}$  和  $\omega - C_{18}/\sum C_{18}$  值均小于土壤, 且这两个比值随着土壤剖面深度的加深而增加, 表明凋落叶进入土壤后经历了一系列的降解过程。

植物和土壤中的铜氧化产物主要包括木质素单体、二聚的酚类化合物和苯酸 (benzoic acids)<sup>[11]</sup>。室内研究证明, 在白腐菌 (white-rot fungi) 分解木质组织过程中, 铜氧化产物的数量呈现下降的趋势。例如, Otto 和 Simpson<sup>[11]</sup> 研究发现, 植物组织中木质素酚类化合物含量 ( $\text{mg g}^{-1} \text{C}$ ) 通常高于土壤中的含量, 而且土壤有机层中酚类化合物含量高于矿质层, 表明随着土壤剖面深度的加深木质素分解程度增加。白腐菌和褐腐真菌 (brown-rot fungi) 是木质素的主要分解者, 在分解过程中会改变木质素的化合物组成<sup>[23-24]</sup>。有研究发现, 在木质组织被降解过程中, S/V 和 C/V 比值呈现出降低的趋势<sup>[26,41]</sup>。这主要是由于丁香基和肉桂基化合物的分解速率高于香兰基, 在土壤中丁香基和肉桂基被优先分解, 而香兰基相对富集造成的<sup>[28]</sup>。然而, 如前所述, S/V 和 C/V 在不同植物种类和植物组织中差异较大, 因此, 利用这两个比值的变化来推断木质素的分解程度时, 需要考虑地上植被类型的组成。此外, 由于酸是醛氧化分解的产物, 木质素酚类化合物中丁香基 ( $(\text{Ad}/\text{Al})_s$ ) 和香兰基 ( $(\text{Ad}/\text{Al})_v$ ) 单体的酚酸分子与它们各自对应的醛比值均随木质素分解过程的进行呈现出增加的趋势<sup>[42-43]</sup>, 因此, 通过这两个比值也可以推断出土壤中木质素的分解程度<sup>[8,44]</sup>。例如, Hedges 等<sup>[41]</sup> 通过室内控制实验发现, 白腐菌在降解木质组织过程中,  $(\text{Ad}/\text{Al})_v$  比值从 0.15 增加至 0.5。Crow 等<sup>[18]</sup> 研究发现, 黑樱桃 (*Prunus serotina* Ehrh.) 和糖枫 (*Acer saccharum* Marsh.) 叶片在衰老期间,  $(\text{Ad}/\text{Al})_s$  和  $(\text{Ad}/\text{Al})_v$  比值均呈现增加的趋势; 而且叶凋落物的  $(\text{Ad}/\text{Al})_v$  比

值低于矿质土壤, 反映出凋落叶进入土壤后, 其木质素大分子被氧化, 逐步被分解。Huang 等<sup>[45]</sup> 通过研究长期施氮肥后辐射松人工林土壤木质素中  $(\text{Ad}/\text{Al})_s$  和  $(\text{Ad}/\text{Al})_v$  比值变化, 发现长期施氮肥样地中,  $(\text{Ad}/\text{Al})_s$  和  $(\text{Ad}/\text{Al})_v$  比值均高于不施肥样地, 得出施氮肥能够加快土壤木质素分解的结论。Thevenot 等<sup>[43]</sup> 通过综述研究发现,  $(\text{Ad}/\text{Al})_v$  变化范围为 0.16 ~ 4.36,  $(\text{Ad}/\text{Al})_s$  变化范围为 0.22 ~ 4.67; 森林土壤中这两个比值 (0.3 ~ 4.5) 的变异性高于草地和耕地土壤 (0.2 ~ 1.0), 主要是因为森林中土壤特性 (矿质组成、pH、土壤温度和含水量等) 和气候条件均具有较高的空间异质性, 能够有效地促进微生物群落对木质素进行降解。

### 3 植物标志物的稳定同位素分析

碳具有 3 种天然同位素 ( $^{12}\text{C}$ 、 $^{13}\text{C}$  和  $^{14}\text{C}$ ), 其中  $^{12}\text{C}$  和  $^{13}\text{C}$  是稳定性同位素,  $^{14}\text{C}$  是放射性同位素。植物在光合作用过程中会对  $^{13}\text{C}$  产生歧视 (discrimination), 形成的植物组织的  $\delta^{13}\text{C}$  值变化范围为:  $\text{C}_3$  植物:  $-32\text{‰} \sim -22\text{‰}$  (平均为  $-27\text{‰}$ ), 而  $\text{C}_4$  植物的  $\delta^{13}\text{C}$  值变化范围为  $-17\text{‰} \sim -9\text{‰}$  (平均为  $-13\text{‰}$ )<sup>[46]</sup>。不同植物种类 ( $\text{C}_3$  或  $\text{C}_4$ ) 具有不同的  $\delta^{13}\text{C}$  值<sup>[47]</sup>。植物标志物与特定化合物组分的稳定性同位素分析 (Compound specific isotopic analysis, CSIA) 不仅可以追踪土壤有机质的生物来源, 还可以推断出植被类型变化 (如  $\text{C}_3$  植物转变为  $\text{C}_4$  植物) 后土壤有机质的周转速率及其动态变化等<sup>[6]</sup>。例如, Hofmann 等<sup>[48]</sup> 通过对种植小麦 ( $\text{C}_3$  植物) 转变为种植玉米 ( $\text{C}_4$  植物) 后土壤木质素组分进行 CSIA 分析, 发现连续种植玉米 18 年后, 来源于  $\text{C}_3$  植物的木质素仍有 2/3 保留在土壤当中, 而来源于玉米输入的木质素平均只有 10% 保留在土壤当中。Dignac 等<sup>[49]</sup> 也利用  $^{13}\text{C}$  天然同位素标记法研究发现, 小麦地转变为玉米地 9 年后土壤总有机质  $^{13}\text{C}$  丰度增加了 1.4‰; 输入的新碳占土壤总有机质的 9%, 占木质素的 47%。输入到土壤中的新碳主要来源于地上、地下凋落物分解和根系分泌

①  $\omega - C_{16}$  指的是 16-羟基十六酸 ( $\omega$ -hydroxyhexadecanoic acid);  $\sum C_{16}$  是下列羟基酸之和: ① 16-羟基十六酸, ② 十六碳二酸 (hexadecane-1, 16-dioic acid), ③ 7 或 8 羟基十六碳二酸 (7- or 8-hydroxyhexadecane-1, 16-dioic acid), ④ 10, 16 二羟基十六酸 (10, 16-dihydroxyhexadecanoic acid)

②  $\omega - C_{18}$  指的是 18-羟基十八酸;  $\sum C_{18}$  是下列羟基酸之和: ① 18-羟基十八酸, ② 十八碳二酸 (hexadecane-1, 18-dioic acid), ③ 7 或 8 羟基十八碳二酸 (7- or 8-hydroxyhexadecane-1, 18-dioic acid), ④ 10, 18 二羟基十八酸 (10, 18-dihydroxyhexadecanoic acid)

物,而角质素和木栓质类物质分别来自于植物叶片角质层和植物根系、树皮组织,因此,角质素和木栓质生物标志物常被用作追踪植物碳源在土壤中的动态变化<sup>[40,50]</sup>。例如,Mendez-Millan等<sup>[51]</sup>研究发现小麦和玉米茎组织中角质素标志物(mid-chain  $\omega$ -hydroxy acids)的 $\delta^{13}\text{C}$ 值分别为 $-35.8\text{‰}$ 和 $-18.9\text{‰}$ ,叶组织中角质素标志物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值分别为 $-35.1\text{‰}$ 和 $-17.1\text{‰}$ ;小麦根系组织木栓质标志物(diacids)的 $\delta^{13}\text{C}$ 值与叶组织中该标志物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值相似,为 $-35.1\text{‰}$ ,玉米根系组织中该木栓质标志物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值为 $-16.4\text{‰}$ 。Mendez-Millan等<sup>[52]</sup>还进一步研究了深层土壤中角质素和木栓质的 $^{13}\text{C}$ 丰度以及对土壤有机质的贡献。他们发现种植小麦转变为种植玉米9年后,由于玉米根系密度较大、细根周转较快,根系分泌物较多,使得耕作层之下的深层土壤中脂肪酸聚酯(来源于木栓质)的浓度有显著增加。由于植物根茎标志物的 $^{13}\text{C}$ 丰度在土壤剖面中是变化的,因此,作者强调在研究深层土壤有机质的周转时,需要考虑特定生物标志物的变化周期,以便准确地估算深层土壤有机质的周转时间。

脂类物质和木质素酚类物质是土壤有机质的主要组成成分<sup>[19]</sup>,通过对这些植物标志物进行稳定性同位素分析,还可能计算出这部分有机质的周转时间。例如,Feng等<sup>[53]</sup>在美国杜克森林(Duke Forest)中通过特定化合物组分的稳定性同位素分析方法研究了火炬松(*Pinus taeda* L.)林表层土壤中主要水解脂类物质(羟基脂肪酸、二元缩酸和长链脂肪酸)的碳同位素组成和周转时间。他们发现,土壤中这些脂类化合物的 $^{13}\text{C}$ 丰度较其他土壤有机质低 $2\text{‰} \sim 7\text{‰}$ ;在一个稳态条件下,这些脂类化合物的周转时间为 $32 \sim 34$  a,较其他土壤有机质的周转时间要长,但是较原来预期的难分解土壤有机质组分的周转时间要短得多。也有研究通过碱性氧化铜提取木质素并进行稳定性同位素分析发现,木质素中香兰基、丁香基和肉桂基化合物单体的周转时间为 $7 \sim 33$  a(平均为 $18.2 \pm 6.9$  a)<sup>[28-29,49]</sup>,较其他木质素化合物单体周转要快。因此,他们推测土壤中木质素可能存在两个转换的库:一个是迅速降解的库,周转时间约为 $0.5$  a;一个是受物理保护的库,降解比较缓慢,周转时间平均为 $20$  a<sup>[6,54-55]</sup>。利用稳定性同位素示踪技术来推算不同土壤有机质组分的周转速率是一种有效的手段。

## 4 土壤中植物标志物的分析方法

土壤中植物标志物的定性和定量主要采用湿化学法结合色谱-质谱联用仪(GC/MS)进行分析,而对于热稳定的化合物,例如木质素类大分子,也可以采用裂解/色谱-质谱联用仪(Py-GC/MS)进行分析。裂解/色谱-质谱联用仪的优点是可直接用土壤或植物的绝干粉末进行分析,减少了溶剂提取过程;缺点是,裂解产生大量化学物质,增加了解谱的工作量。下面对这两种方法进行简要介绍。

### 4.1 湿化学法结合气相色谱-质谱联用仪(GC/MS)

这个方法主要包括从土壤中提取生物标志物和GC/MS定性和定量两个步骤<sup>[10,16-17]</sup>。土壤有机质主要包括游离脂(来源于角质素、木栓质和植物蜡类的脂类物质)、酯结合的脂类物质和来源于木质素的酚类物质<sup>[19]</sup>。游离脂的提取首先是加入一定量的重蒸水溶解土壤中的水溶性极性化合物,然后离心,收集上层清液;将离心后的土壤剩余物进行冷冻干燥去除残余水分,分别用甲醇溶液、二氯甲烷/甲醇混合溶液(1:1, v/v)和二氯甲烷溶液超声提取,合并三次提取的溶液用玻璃纤维(Whatman GF/A)过滤,通过旋转蒸发进行浓缩后,移入2 ml玻璃瓶中并在氮气下吹干。吹干后的剩余物质,即为提取的游离脂,然后再用GC/MS进行分析。剩余的土壤样品(非浸提物质)风干后储存在 $-20\text{℃}$ 冰箱中供碱水解,提取酯结合的脂类物质。

碱水解的主要过程是将土壤样品放入密度为 $0.02 \text{ mol L}^{-1}$ 甲醇化的氢氧化钾溶液中,循环加热回流3 h,待冷却后,加入密度为 $6 \text{ mol L}^{-1}$ 的稀盐酸将经过甲醇化氢氧化钾的土壤样品的pH调为1.0,离心后上清液用玻璃纤维(Fisher P5,  $5 \sim 10 \mu\text{m}$ )过滤,然后用重蒸水多次清洗剩余土壤样品,清洗液和上清液合并,然后储存在 $4\text{℃}$ 冰箱中。土壤剩余物中再加入二氯甲烷/甲醇混合溶液(1:1, v/v),用超声波提取两次,两次的提取液与前面的清洗液和上清液合并后过滤,通过旋转蒸发去除有机溶剂后,加入50 ml重蒸水,然后再加入乙醚进行萃取,这样就分离出酯结合的脂类物质。然后再加入无水硫酸钠( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )去除水分,旋转蒸发进行超浓缩后,转移至2 ml玻璃瓶中,在氮气下吹干。吹干后的剩余物质,即为萃取的酯结合的脂类物质<sup>[16,19]</sup>。剩余的土壤样品风干后储存在 $-20\text{℃}$ 冰箱中做进一

步的铜氧化,并提取木质素。

铜氧化过程主要是将土壤样品,加入氧化铜(CuO)进行氧化,并释放木质素酚类化合物<sup>[11, 24, 43]</sup>。具体过程是,在聚四氟乙烯容器中,加入风干后的土壤样品、氧化铜、六水合硫酸亚铁铵 $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ 和密度为 $2 \text{ mol L}^{-1}$ 氢氧化钠(NaOH)溶液,然后将聚四氟乙烯容器在氮气下封闭并加热( $170^\circ\text{C}$ )2.5 h。待冷却后,将土壤、氧化铜、六水合硫酸亚铁铵和氢氧化钠溶液转移至离心管中离心,过滤出上清液。然后在剩余物中加入10 ml 重蒸水进行清洗,并收集清洗液。将所有的上清液转移至离心管中,用密度为 $6 \text{ mol L}^{-1}$ 的稀盐酸将pH调为1.0,罩上黑布(防止肉桂基发生反应)在室温下静置1 h。最后将上清液转移至分液漏斗中,用乙醚溶液进行萃取,在萃取的乙醚溶液中加入无水硫酸钠去除残留水分,旋转蒸发进行超浓缩后,在氮气下吹干,即为萃取的木质素物质。

GC/MS分析过程主要包括:所有的提取物用 $500 \mu\text{l}$ 二氯甲烷/甲醇溶液(1:1, v/v)溶解,并取出 $100 \mu\text{l}$ 溶解液在氮气下吹干,通过与 $90 \mu\text{l}$ 三氟乙酰胺(*N, O*-bis-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide, BSTFA)和 $10 \mu\text{l}$ 氮苯(pyridine)在 $70^\circ\text{C}$ 下反应3 h,转换为三甲基硅烷基(trimethylsilyl, TMS)衍生物。待冷却后,加入 $100 \mu\text{l}$ 正己烷稀释,然后用GC/MS分析。GC的运行条件为:初始温度为 $65^\circ\text{C}$ 保持2 h,然后以每分钟 $6^\circ\text{C}$ 的速度上升至 $300^\circ\text{C}$ ,达到 $300^\circ\text{C}$ 后保持20 min,载气为氦气。样品注射比例为1:2,注射温度设置为 $280^\circ\text{C}$ ,质谱仪的电子碰撞模式(electron impact mode, EI)为70 eV电离能量,扫描范围为50~650 Da。单个化合物的鉴定可以通过参阅其他文献、美国国家标准技术研究所(NIST)和Wiley MS数据库中的质谱库来确定<sup>[27, 53]</sup>。定量一般采用全氘化的二十四碳烷( $\text{C}_{24}\text{D}_{50}$ )来作为游离脂和酯结合脂类物质的内标准物,香草酸则常作为铜氧化产物的内标准物。

#### 4.2 土壤木质素的裂解/气相色谱-质谱分析(Py-GC/MS)

裂解/气相色谱-质谱分析主要用CDS 1000热解探针结合Perkin Elmer Clarus 500 GC/MS系统进行。土壤样品密封在石英管中,在分析之前,所有样品静置预热2 min至 $310^\circ\text{C}$ ,使样品适应热传输线路的温度,但是与总脂萃取方法相比,这样做会导致许多游离脂在分析之前即被热提取。然后再将样品在 $610^\circ\text{C}$ 下热解15 s,气相色谱-质谱联用仪

用CP-Sil 5CB MS色谱柱( $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 320 \mu\text{m}$ )来运行,GC加热程序为:初始温度为 $40^\circ\text{C}$ 运行1.8 min,然后以每分钟 $4^\circ\text{C}$ 的速度加热至 $310^\circ\text{C}$ ,保持20 min,然后进行测定分析。热解色谱图中的化合物,通过它们的质谱和保留时间来鉴定。化合物鉴定完毕后,用Turbo-Mass 5.2.0软件来执行总离子流图谱(Total ion current, TIC)的峰集成,通过单个化合物与集成后所有化合物总和之间的比例,来确定单个化合物的相对丰度<sup>[56]</sup>。为了以更准确的方式评估组成成分的变化并辅助解释关键的化合物,数据必须经过多元统计分析,特别是趋势对应分析。

## 5 结 语

土壤有机质是土壤固相部分的重要组成部分,尽管土壤有机质的含量只占土壤总量的很小一部分,但它对土壤形成、土壤肥力、环境保护及农林业可持续发展等方面均起着极其重要的作用。土壤有机质的组成相当复杂,一般情况下,包括碳水化合物、木质素、蛋白质和脂类物质等。不同有机质组分的分解速度对土壤环境变化的响应差异很大,而植物标志物类似于土壤有机质的指纹图谱,木质素和脂类物质的化合物来源于特定的植物组织或植物种类,通过分析这些植物标志物能够推断土壤有机质的植物来源,追踪土壤有机质的周转和降解过程。对土壤中这些植物标志物的丰度进行分析,并结合分析这些生物标志物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值,还可能计算出这部分土壤有机质的平均周转时间,因此对于了解土壤碳循环过程和机理具有特别重要的意义。最近几年来,随着化学分析技术的不断进步与普及,原来在地球化学方面应用较为广泛的植物标志物方法在陆地生态系统土壤碳循环过程和土壤微生物方面的研究应用也逐渐开展。然而分析植物标志物的方法还存在不足,比如分析过程较为繁琐,需要较为专业的质谱解谱能力才能准确地估算植物标志物的丰度,这些不足还有待于在未来的研究中进一步探索和改进。

## 参 考 文 献

- [1] Kramer C, Gleixner G. Variable use of plant-and soil-derived carbon by microorganisms in agricultural soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 2006, 38(11): 3267-3278
- [2] Hedges J I, Oades J M. Comparative organic geochemistries of soils and marine sediments. *Organic Geochemistry*, 1997, 27

- (7/8): 319—361
- [ 3 ] Lorenz K, Lal R, Preston C M, et al. Strengthening the soil organic carbon pool by increasing contributions from recalcitrant aliphatic bio (macro) molecules. *Geoderma*, 2007, 142(1): 1—10
- [ 4 ] Neff J C, Townsend A R, Gleixner G, et al. Variable effects of nitrogen additions on the stability and turnover of soil carbon. *Nature*, 2002, 419(31): 915—917
- [ 5 ] Hedges J I, Eglinton G, Hatcher P G, et al. The molecularly-uncharacterized component of nonliving organic matter in natural environments. *Organic Geochemistry*, 2000, 31 ( 10 ): 945—958
- [ 6 ] Amelung W, Brodowski S, Sandhage-Hofmann A, et al. Chapter 6 Combining biomarker with stable isotope analyses for assessing the transformation and turnover of soil organic matter. *Advances in Agronomy*, 2008, 100: 155—250
- [ 7 ] Hedges J I, Parker P L. Land-derived organic matter in surface sediments from the Gulf of Mexico. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1976, 40(9): 1019—1029
- [ 8 ] Goñi M A, Yunker M B, Macdonald R W, et al. Distribution and sources of organic biomarkers in arctic sediments from the Mackenzie River and Beaufort Shelf. *Marine Chemistry*, 2000, 71(1): 23—51
- [ 9 ] Laskov C, Amelung W, Peiffer S. Organic matter preservation in the sediment of an acidic mining lake. *Environmental Science and Technology*, 2002, 36(20): 4218—4223
- [ 10 ] Otto A, Simpson M J. Degradation and preservation of vascular plant-derived biomarkers in grassland and forest soils from Western Canada. *Biogeochemistry*, 2005, 74(3): 377—409
- [ 11 ] Otto A, Simpson M J. Evaluation of CuO oxidation parameters for determining the source and stage of lignin degradation in soil. *Biogeochemistry*, 2006, 80(2): 121—142
- [ 12 ] Feng X, Simpson A J, Wilson K P, et al. Increased cuticular carbon sequestration and lignin oxidation in response to soil warming. *Nature Geoscience*, 2008, 1(12): 836—839
- [ 13 ] Kolattukudy P E, Espelie K E. Chemistry, biochemistry, and function of suberin and associated waxes//Rowe J W. Natural products of woody plants I Berlin; Springer, 1989, 304—367
- [ 14 ] Riederer M, Matzke K, Ziegler F, et al. Occurrence, distribution and fate of the lipid plant biopolymers cutin and suberin in temperate forest soils. *Organic Geochemistry*, 1993, 20(7): 1063—1076
- [ 15 ] Bernards M A, Razem F A. The poly (phenolic) domain of potato suberin: A non-lignin cell wall bio-polymer. *Phytochemistry*, 2001, 57(7): 1115—1122
- [ 16 ] Otto A, Simpson M J. Sources and composition of hydrolysable aliphatic lipids and phenols in soils from western Canada. *Organic Geochemistry*, 2006, 37(4): 385—407
- [ 17 ] Huang Z Q, Clinton P W, Davis M R. Post-harvest residue management effects on recalcitrant carbon pools and plant biomarkers within the soil heavy fraction in *Pinus radiata* plantations. *Soil Biology & Biochemistry*, 2011, 43(2): 404—412
- [ 18 ] Crow S E, Lajtha K, Filley T R, et al. Sources of plant-derived carbon and stability of organic matter in soil: implications for global change. *Global Change Biology*, 2009, 15 ( 8 ): 2003—2019
- [ 19 ] Otto A, Shunthirasingham C, Simpson M J. A comparison of plant and microbial biomarkers in grassland soils from the Prairie Ecozone of Canada. *Organic Geochemistry*, 2005, 36 ( 3 ): 425—448
- [ 20 ] Hamer U, Rumpel C, Dignac M F. Cutin and suberin biomarkers as tracers for the turnover of shoot and root derived organic matter along a chronosequence of Ecuadorian pasture soils. *European Journal of Soil Science*, 2012, 63(6): 808—819
- [ 21 ] Gleixner G, Poirier N, Bol R, et al. Molecular dynamics of organic matter in a cultivated soil. *Organic Geochemistry*, 2002, 33(3): 357—366
- [ 22 ] Berg B, Matzner E. Effect of N deposition on decomposition of plant litter and soil organic matter in forest systems. *Environmental Reviews*, 1997, 5(1): 1—25
- [ 23 ] Hedges J I, Mann D C. The characterization of plant tissues by their lignin oxidation products. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1979, 43(11): 1803—1807
- [ 24 ] Hedges J I, Ertel J R. Characterization of lignin by gas capillary chromatography of cupric oxide oxidation products. *Analytical Chemistry*, 1982, 54(2): 174—178
- [ 25 ] Ertel J R, Hedges J I. The lignin component of humic substances: Distribution among soil and sedimentary humic, fulvic, and base-insoluble fractions. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1984, 48(10): 2065—2074
- [ 26 ] Goñi M A, Ruitenberg K C, Eglinton T I. A reassessment of the sources and importance of land-derived organic matter in surface sediments from the Gulf of Mexico. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1998, 62(18): 3055—3075
- [ 27 ] Huang Z H, Davis M R, Condon L M, et al. Soil carbon pools, plant biomarkers and mean carbon residence time after afforestation of grassland with three tree species. *Soil Biology & Biochemistry*, 2011, 43(6): 1341—1349
- [ 28 ] Bahri H, Dignac M F, Rumpel C, et al. Lignin turnover kinetics in an agricultural soil is monomer specific. *Soil Biology & Biochemistry*, 2006, 38(7): 1977—1988
- [ 29 ] Heim A, Schmidt M. Lignin turnover in arable soil and grassland analysed with two different labelling approaches. *European Journal of Soil Science*, 2007, 58(3): 599—608
- [ 30 ] Wilson J, Valiela I, Swain T. Sources and concentrations of vascular plant material in sediments of Buzzards Bay, Massachusetts, USA. *Marine Biology*, 1985, 90(1): 129—137
- [ 31 ] Hu F S, Hedges J I, Gordon E S, et al. Lignin biomarkers and pollen in postglacial sediments of an Alaskan lake. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1999, 63(9): 1421—1430
- [ 32 ] Dittmar T, Lara R J. Molecular evidence for lignin degradation in sulfate-reducing mangrove sediments ( Amazonia, Brazil ). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2001, 65(9): 1417—1428
- [ 33 ] Tareq S M, Tanaka N, Ohta K. Biomarker signature in tropical wetland: lignin phenol vegetation index (LPVI) and its implications for reconstructing the paleoenvironment. *Science of the To-*

- tal Environment, 2004, 324(1): 91—103
- [34] Dinel H, Schnitzer M, Mehuys G R. Soil lipids: Origin, nature, content, decomposition, and effect on soil physical properties// Bollag J M, Stotzy G. Soil biochemistry. New York, USA: Marcel Dekker, 1990: 397—429
- [35] Wiesenberg G L B, Schwarzbauer J, Schmidt M W I. Extractable lipid contents and colour in particle-size separates and bulk arable soils. European Journal of Soil Science, 2006, 57(5): 634—643
- [36] Wiesenberg G L B, Schwarzbauer J, Schmidt M W I, et al. Source and turnover of organic matter in agricultural soils derived from *n*-alkane/*n*-carboxylic acid compositions and C-isotope signatures. Organic Geochemistry, 2004, 35(11/12): 1371—1393
- [37] Otto A, Simoneit B R T. Chemosystematics and diagenesis of terpenoids in fossil conifer species and sediment from the Eocene Zeitz formation, Saxony, Germany. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2001, 65(20): 3505—3527
- [38] Simpson M J, Simpson A J. The chemical ecology of soil organic matter molecular constituents. Journal of Chemical Ecology, 2012, 38(6): 768—784
- [39] Derenne S, Largeau C. A review of some important families of refractory macromolecules: Composition, origin, and fate in soils and sediments. Soil Science, 2001, 166(11): 833—847
- [40] Goñi M A, Hedges J I. Potential applications of cutin-derived CuO reaction products for discriminating vascular plant sources in natural environments. Geochimica et Cosmochimica Acta, 1990, 54(11): 3073—3081
- [41] Hedges J I, Blanchette R A, Weliky K, et al. Effects of fungal degradation on the CuO oxidation products of lignin: A controlled laboratory study. Geochimica et Cosmochimica Acta, 1988, 52(11): 2717—2726
- [42] Clemente J S, Simpson A J, Simpson M J. Association of specific organic matter compounds in size fractions of soils under different environmental controls. Organic Geochemistry, 2011, 42(10): 1169—1180
- [43] Thevenot M, Dignac M F, Rumpel C. Fate of lignins in soils: A review. Soil Biology & Biochemistry, 2010, 42(8): 1200—1211
- [44] Amelung W, Flach K W, Zech W. Lignin in particle-size fractions of native grassland soils as influenced by climate. Soil Science Society of America Journal 1999, 63(5): 1222—1228
- [45] Huang Z Q, Clinton P W, Baisden W T, et al. Long-term nitrogen additions increased surface soil carbon concentration in a forest plantation despite elevated decomposition. Soil Biology & Biochemistry, 2011, 43(2): 302—307
- [46] Balesdent J, Mariotti A, Boutton T, et al. Measurement of soil organic matter turnover using  $^{13}\text{C}$  natural abundance// Boutton TW, Yamasaki S. Mass spectrometry of soils. New York, USA: Marcel Dekker, 1996: 83—111
- [47] Bender M M. Variations in the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios of plants in relation to the pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation. Phytochemistry, 1971, 10(6): 1239—1244
- [48] Hofmann A, Heim A, Christensen B T, et al. Lignin dynamics in two  $^{13}\text{C}$  - labelled arable soils during 18 years. European Journal of Soil Science, 2009, 60(2): 250—257
- [49] Dignac M F, Bahri H, Rumpel C, et al. Carbon-13 natural abundance as a tool to study the dynamics of lignin monomers in soil: An appraisal at the Clouseaux experimental field (France). Geoderma, 2005, 128(1): 3—17
- [50] Almendros G, Dorado J, Sanz J, et al. Compounds released by sequential chemolysis from cuticular remains of the Cretaceous Gymnosperm *Squamastrobis tigrensis* (Patagonia, the Argentine). Organic Geochemistry, 1999, 30(7): 623—634
- [51] Mendez-Millan M, Dignac M F, Rumpel C, et al. Can cutin and suberin biomarkers be used to trace shoot and root-derived organic matter? A molecular and isotopic approach. Biogeochemistry, 2011, 106(1): 23—38
- [52] Mendez-Millan M, Dignac M F, Rumpel C, et al. Contribution of maize root derived C to soil organic carbon throughout an agricultural soil profile assessed by compound specific  $^{13}\text{C}$  analysis. Organic Geochemistry, 2012, 42(12): 1502—1511
- [53] Feng X, Xu Y, Jaffé R, et al. Turnover rates of hydrolysable aliphatic lipids in Duke Forest soils determined by compound specific  $^{13}\text{C}$  isotopic analysis. Organic Geochemistry, 2010, 41(6): 573—579
- [54] Rasse D P, Dignac M F, Bahri H, et al. Lignin turnover in an agricultural field: From plant residues to soil-protected fractions. European Journal of Soil Science, 2006, 57(4): 530—538
- [55] Glaser B. Compound-specific stable-isotope ( $\delta^{13}\text{C}$ ) analysis in soil science. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 2005, 168(5): 633—648
- [56] Vancampenhout K, Wouters K, Caus A, et al. Fingerprinting of soil organic matter as a proxy for assessing climate and vegetation changes in last interglacial palaeosols (Veldwezelt, Belgium). Quaternary Research, 2008, 69(1): 145—162



## APPLICATION OF PLANT BIOMARKERS TO STUDYING CARBON CYCLING IN FOREST SOIL SYSTEMS

Wan Xiaohua<sup>1,2</sup> Huang Zhiqun<sup>1,2\*</sup>

(1 Key Laboratory of Humid Subtropical Eco-geographical Process of the Ministry of Education, Fuzhou 350007, China)

(2 College of Geographical Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China)

**Abstract** Soil organic matter (SOM) plays a vital role in long-term carbon sequestration in forest soil systems. A stable SOM pool consists of various recalcitrant biopolymers which mainly come from plants, animals, fungi and bacteria. These plant-or microbe-derived organic matters in the soil have their own source-specific natural biomarkers. A review is presented here of the advancement in the research on application of plant biomarkers to the study on soil carbon recycling in the past two decades, briefing on application of plant biomarkers to determination of plant sources and decomposition degree of SOM, and introducing application of stable isotopes of plant biomarkers to quantitatively estimating cycling time of SOM. Besides, the review also introduces in detail methods for chemical analysis of plant biomarkers in the soil. Therefore, the review may serve as reference for future studies on application of plant biomarkers to researches on SOM in China.

**Key words** Plant biomarkers; Lignin; Lipids; Soil organic matter;  $\delta^{13}\text{C}$ ; GC/MS

(责任编辑:陈德明)