

## Summary of Doctoral Thesis

Enrollment year: 2016 / 10

UGAS Specialty: Environmental Resource Management

Name SEIDEL FELIX

Title	Seasonal nutrient dynamics of four typical tree species in the mountainous regions of the Japan Sea Coast
-------	---

### *Background and Objectives*

Nitrogen (N) and phosphorous (P) are driving elements in ecosystem development as they are important plant nutrients playing an essential part in the photosynthetic apparatus determining and limiting plant growth. N and P cycles are linked in the soil, where microorganisms and plants produce enzymes mineralizing organically bound nutrients. Species are competing for these resources and developed different mechanisms to uptake, store and recycle N and P to promote survival at different phenological stages. In general, before leaf senescence, N and P are reabsorbed from leaves and stored in the tree woody tissues with soil uptaken N and P during winter. After reabsorption is concluded, leaves will be abscised and litter quality will influence soil N and P composition. In spring, stored N and P are remobilized to support shoot growth. Yet, there is a need for quantifying the extent of N and P reabsorption and the contribution to whole-tree storage of each plant tissue as it is species dependent. To meet plant demand for N and P, many tree species formed a symbiosis with soil fungi that pass nutrients on to the host plants with ectomycorrhizal fungi playing a key role. However, for many tree species the fungal communities have not been identified. Analysing the effect of fungi on the host tree species and the movement of nutrients within hosts' plant tissues would provide insights into the mechanisms controlling plant nutrient cycling. The most common approach to study N cycling is through stable isotope analysis ( $\delta^{15}\text{N}$ ). However, the actual transport of N remains a black box. By quantifying free amino acids content, we are able to open this box and identify the compounds transporting N. Unfortunately, tracking movement of P is more elaborate, as P is transported by proteins and only occurs in one stable isotopic composition in nature. Measuring P content instead of proteins would be more economical and may shed light on the P cycling of tree species. A detailed species dependent understanding of soil nutritional status, fungal community composition, nutrient uptake with the help of soil fungi, reabsorption, storage and remobilization along all phenological in major plant tissues at whole-tree level is necessary to improve our understanding of N and P cycling in adult trees in order to improve forest management practices.

### *Materials and methods*

We measured total and available N and P content, N isotope ratio and 19 free amino acids content in fine roots, coarse roots, sapwood, leaves and litter and analysed soil fungi community composition in four tree species typical of the cold-temperate forest zone in Japan: *Cryptomeria japonica* (n=9), *Larix kaempferi* (n=8), *Fagus crenata* (n=9) and *Robinia pseudoacacia* (n=5). Plant tissues were sampled in four phenological stages (shoot growth, green leaf, pre- and post-abscission stage) and values upscaled to whole-tree level.

### *Results*

All tree species resorbed N and P in significant amounts from leaves. N was mainly stored in coarse roots during the pre-abscission stage and during the post-abscission stage in lower amounts in sapwood. P was stored in significant amounts in sapwood of *Robinia pseudoacacia* during the post-abscission period while all other species P was stored in insignificant amounts in coarse roots and/or sapwood. Growth of all plants was limited by N.

*Cryptomeria japonica* seemed followed a nutrient conserving strategy as revealed by its N and P resorption and storage, making it more tolerant towards nutrient availability changes than the other species. Additionally to coarse roots and sapwood, N was stored in remaining leaves during the post-abscission stage, with younger leaves having a significantly higher N content than older leaves. Changes in isotopic composition of remaining winter leaves exposed that soil uptaken N was stored during winter in all plant tissues. In addition, free amino acids movement could explain internal N movement. In contrast, P seemed to be stored exclusively in roots and sapwood, as P was reabsorbed from abscised and remaining living leaves. The fungal communities of these plots were characterized by a diverse fungal community with an absence of ectomycorrhizal fungi. 51 % of the fungal taxa remained unknown stressing the need for studies focusing on soil fungal identification to improve our understanding of this tree species nutrient cycling.

*Larix kaempferi* was the least N and P demanding tree species and highly N and P proficient. The movement of N could not be traced by  $\delta^{15}\text{N}$ , as no fractionation was found, while free amino acids proved to be valuable to unveil N transport compounds. This species was more efficient in recycling P than N and significant amounts of soil P were uptaken during times of P storage. This species was associated with a diverse fungal community and an abundance of ectomycorrhizal fungi supporting the tree species nutrient uptake.

*Fagus crenata* had high N and P contents in plant tissues, which were most efficiently recycled. This species was rather N than P efficient as leaves N : P ratio shifted from N to P limited conditions during time of leaf abscission. We found three phases of N storage revealed by  $\delta^{15}\text{N}$  fractionation during leaf senescence: (1) reabsorption of leaf  $^{15}\text{N}$ -depleted N to coarse roots, followed by (2) reabsorption of leaf  $^{15}\text{N}$ -enriched N to sapwood and (3) soil  $^{15}\text{N}$ -depleted N uptake stored in coarse roots. Further, changes in free amino acids partially explained  $\delta^{15}\text{N}$  fractionation in

plant tissues. This tree species showed the lowest fungal species richness and diversity as well as a high reliance on ectomycorrhizal fungi suggesting a high specialization making this tree species more vulnerable to environmental changes.

Leguminous *Robinia pseudoacacia* was independent from soil N uptake and richer in N and P in all plant tissues with the lowest N and P reabsorption efficiency and proficiency displaying a nutrient exploitative strategy. Nevertheless, this species was N limited during the shoot growth stage shifting gradually towards N and P co-limitation during the green leaf and pre-abscission stage. The N : P ratio of litter demonstrated the dependence of this species on conserving P rather than N. Leaf reabsorbed P exceeded the storage capability of roots and sapwood, thus other plant tissues must act as an additional P storage. This tree species fungal community was very homogeneous with a high abundance of saprotrophs.

### Conclusion

This study revealed new insights into the nutrient cycling of four tree species and proved that a combination of measurements of N, P,  $\delta^{15}\text{N}$ , and free amino acids on whole-tree level along four phenological stages with fungal community analysis is a valuable approach to improve our understanding of each tree species nutrient cycling. By linking the movement of free amino acids with N stable isotope measurements, we might have found a powerful tool to track intra-plant N movement and transformation more reliably in trees species that show significant variation in isotopic composition in plant tissues among the phenological stages. The most beneficial timing of fertilization to promote tree growth and thus C fixation from the atmosphere could be inferred from the data and was species and nutrient dependent. Based on these results we recommend the planting of *Cryptomeria japonica* in order to reduce atmospheric C as *Cryptomeria japonica* seemed to bind C more efficiently in forest soils than any other tree species. *Robinia pseudoacacia* showed similar C sequestration capabilities as *Cryptomeria japonica*, but as it is an invasive species and reduces biodiversity considerably, we do not recommend planting it. Additionally, *Cryptomeria japonica* seemed to be the most promising tree species to cope with changes in nutrient supply caused by anthropogenic influences and global change. The next steps are to identify the large number of unknown fungal species found in this study, especially for *Cryptomeria japonica* and further, analysing interactions between mycorrhizal fungi community structure with host plants internal nutrient status, in order to shed light on this symbiosis.

# 博士論文要約 (Summary)

2016 年 10 月入学

連合農学研究科 連合農学研究科 専攻

氏 名 SEIDEL FELIX

タイトル	日本海沿岸における山岳地域で典型的な樹種 4 種の季節的栄養動態
研究背景と目的	<p>窒素 (N) とリン (P) は最も重要な植物栄養素であり、生態系の発展における推進力であり、植物生長を決定し制限する光合成機構において重要な役割を果たしている。N と P のサイクルは、微生物や植物が有機的に土壌中の栄養をミネラル化する酵素とリンクしている。樹種は、生物季節的に異なるステージにおいて生き残りを促進するため、それら栄養源のために競争し、N や P の取込・貯蔵・再利用のための異なるメカニズムを発達させている。一般的に、葉の老化の前に、N と P は葉から再吸収され、冬の間土壌から吸収された N と P と共に木質組織に貯蔵される。再吸収が終了すると、葉は器官脱離し、落ち葉は土壌の N と P の組成に影響する。そして春には、貯蔵された N と P は芽の成長を支えるために移動する。しかし、それらは種依存であるため、それぞれの植物組織への N および P の再吸収の程度や、木全体の貯蔵への寄与を定量化する必要がある。植物の N と P の要求を満たすために、多くの樹種が寄宿主植物に栄養を運んでくれる土壌菌類と共生しており、このような外生菌根菌が重要な役割を果たしている。しかし、多くの樹種において菌群落は同定されていない。菌を通して土壌からの栄養素の取り込みや、寄宿主植物組織内の栄養素の移動を追跡することは、植物栄養素の循環を制御するメカニズムへの洞察をもたらすであろう。N サイクルを知るために、最も一般的な方法は、安定同位体分析 (<math>\delta^{15}\text{N}</math>) である。しかし、N の実際の輸送はどのように起こっているのかいまだに分かっていな</p>

い。遊離アミノ酸を定量することで、N の実際の輸送のメカニズムを明らかにし、N を輸送する成分の同定することが可能となった。一方で、P はタンパク質で輸送され、自然界に存在する 1 つの安定同位体のもとでしか起こらないために、P の動きを追跡することは複雑であった。タンパク質に代わりに、P 含量を測定することは、経済的であり、樹種での P サイクル解明に寄与するかもしれない。土壌の栄養状態、菌群集組成、土壌菌による栄養素の取込、再吸収、貯蔵、再移動など生物季節的変動に伴って、樹木全体レベルでの主要植物組織での種別の詳細な理解が、成木での N と P サイクルを理解するため、森林管理を改善するために不可欠である。

### 材料と方法

我々は細い根（直径 2 mm 未満）、太い根（直径 2 mm 以上）、辺材、葉および落葉中の総および利用可能な N と P 含有量、N 同位体比およびアミノ酸含有量測定、土壌菌群集組成分析を日本の冷温地帯に見られる 4 つの典型的な樹種：スギ（*Cryptomeria japonica*, D. Don, n=9）、カラマツ（*Larix kaempferi*, Sarg, n=8）、ブナ（*Fagus crenata*, Blume, n=9）、黒ニセアカシア（*Robinia pseudoacacia*, L, n=5）を用いて分析した。植物組織は、4 つの生物季節的段階（シュート生長、新緑、落葉前後のステージ）でサンプリングされ、実測値を樹木全体の値としてアップスケールした。

### 結果

すべての樹種がそれぞれの葉から、かなりの量の N と P を吸収したことを発見した。N は、落葉前のステージ中で主に太い根に、落葉後ステージ中で辺材に少量が貯蔵された。P は落葉後の期間で、黒アカシアでは辺材中に多くの量が貯蔵されていたが、他のすべての種では太い根およびまたは辺材にわずかな量が貯蔵されていた。全ての植物の成長は、N によって制限されていた。スギは、N と P の吸収と貯蔵によって明らかにされたように、他の種より栄養素利用可能率の変動に対して耐性があり、栄養保持する戦略を持っているようであった。根および辺材に加えて、この種では落葉後にも残っている葉に N を貯蔵

しており、老葉に比べ、若葉で有意に高い N を含量していた。冬期に残っている葉における同位体組成の変化から、この樹種が全ての植物組織で土壌から吸収した N を貯蔵していることが分かった。さらに、遊離アミノ酸の移動から、N の内部移動を説明することができた。対照的に、P は落葉する葉と、残っている葉から再吸収されていたために、根および辺材に独占的に貯蔵されているようであった。これらのサンプリングプロットにおける菌群落は、外生菌根菌が存在しない多様な菌群集を特徴としていた。菌類分類群の 51% はいまだに未知であり、この樹種の栄養素循環に関する理解を深めるためには、土壌菌類の同定に焦点を当てた研究の必要性を強調された。

カラマツは、N と P の要求が最も少ない樹種で、N と P の利用効率が高かった。 $\delta^{15}\text{N}$  が変化しなかったため N の移動を追跡することはできなかったが、遊離アミノ酸は N 輸送を明らかにするために有用であることが証明された。この種では、P 貯蔵期間中にかなりの土壌 P が取込されており、P サイクルの方が N サイクルよりも効率的であることが示された。この種は多様な菌群集および樹種の栄養摂取を支える豊富な外生菌根菌と関連していた。

ブナは、最も効率的に再利用が行われる植物組織において高い N および P 含有量を有していた。葉の N:P 比が落葉時に、N から P へ成長が限定される条件にシフトしたため、この種は P でなく、むしろ N で効率的であった。我々は、葉の老化中の  $\delta^{15}\text{N}$  分画によって、(1) 葉の  $^{15}\text{N}$  - 欠乏 N の太い根への N 再吸収、続いて (2) 辺材への  $^{15}\text{N}$  - 豊富 N の再吸収、および (3) 太い根に貯蔵された土壌  $^{15}\text{N}$  - 欠乏の N 吸収の 3 段階の窒素貯蔵を明らかにした。さらに、遊離アミノ酸量の変化は、植物組織における  $\delta^{15}\text{N}$  分画を部分的に説明した。この種は、菌種の豊富さ、多様性で最も低く、外生菌根菌への高い依存性を示し、環境の変化に対してより脆弱になることを示唆している。

黒ニセアカシアは、土壌からの N 吸収とは無関係で、すべての植物組織において N、P が豊富であり、N、P の再吸収と効率性は最も低く、栄養搾取戦略を示していた。しかし、この種はシュートの成長段階では N が制限されていたが、この N の制限は新緑期および落葉前では N および P が共に制限される状

態に徐々にシフトした。落葉の N : P 比から、この種が有意な量で N よりむしろ P を貯蔵することを示した。再吸収された葉の P は、根および辺材の貯蔵能力を超えたため、他の植物組織は追加の P 貯蔵として作用しなけりならなかった。この種の菌群集は非常に均質で、多くの腐栄養性を示した。

## 結論

本研究は、4 種の樹種に関して栄養サイクルの新たな洞察を明らかにし、菌群落分析と一緒に、4 つの生物季節的ステージに沿って木全体レベルでの N、P、 $\delta^{15}\text{N}$ 、遊離アミノ酸測定のリ組み合わせは、それぞれの樹種での栄養サイクルの理解を深めるために有効なアプローチであることを示した。遊離アミノ酸の動きと、N の安定同位体測定をリンクさせることで、樹種における植物内部の N の動きおよび輸送をより信頼性をもって追跡でき、生物季節的なステージの間で植物組織での安定同位体の変動を有意に示す優秀な方法を見つけ出せるかもしれない。樹木の成長を促進し、ゆえに大気からの炭素固定促進させるために、堆肥の最も最適なタイミングをデータから推定でき、それらは種と栄養依存性であった。スギは他の樹種よりもより効率的に炭素結合することから、大気中炭素を減らすためにスギを植樹することを、これらの結果に基づいて、我々は推奨する。黒ニセアカシアはスギと同等の炭素隔離能力を示したが、これらは外来種であり、かなりの多様性を減少させていることから、黒ニセアカシアの植樹は勧めない。さらに、スギは人為的影響や地球規模の変動による栄養供給の変化に対処するのに、最も適した種であるように思われた。次なる研究では、特にスギにおいて本研究で明らかになった多くの数の未知の菌種を同定し、共生に関してより深い理解を得るために、菌根菌群集構造と寄宿植物の内部栄養状態との相互座用を分析していくことを目標としている。