

季节性冻结初期川西亚高山/高山森林 土壤细菌多样性

刘 利, 吴福忠, 杨万勤*, 王 奥, 谭 波, 余 胜

(四川农业大学林学院, 四川雅安 625014)

摘要: 高山/亚高山显著的季节性冻结过程可能对土壤细菌多样性产生重要影响。为了解季节性冻结初期土壤完全冻结前后川西亚高山/高山森林群落土壤细菌多样性变化特征, 于 2008 年 11 月 5 日(土壤冻结前期)—11 月 25 日(土壤完全冻结期)期间, 采用 PCR-DGGE 技术同步研究了原始冷杉(*Abies faxoniana*)林(PF)、针阔混交林(MF)和次生冷杉林(SF)的土壤细菌群落多样性变化特征。土壤完全冻结后, 3 个森林群落仍然具有较高的土壤细菌多样性。3 个森林的土壤细菌类群总数在土壤冻结前表现为 MF > SF > PF, 但在土壤完全冻结后表现为 PF > MF > SF。土壤冻结明显降低了土壤细菌多样性, 但提高了土壤细菌群落的优势度。冻结作用对土壤细菌群落的影响随着土壤深度增加而降低, 随着海拔升高而降低。这些结果表明季节性冻结过程对亚高山/高山森林土壤细菌多样性有着显著的影响, 这对深入认识冬季土壤生态过程具有重要意义。

关键词: 季节性冻结; 亚高山/高山森林; 土壤微生物多样性; DGGE

Soil bacterial diversity in the subalpine/alpine forests of western Sichuan at the early stage of freeze-thaw season

LIU Li, WU Fuzhong, YANG Wanqin*, WANG Ao, TAN Bo, YU Sheng

Faculty of Forestry, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

Abstract: Significant seasonal soil freezing and thawing could influence greatly on soil bacterial diversity in the alpine/subalpine forest. To understand the characteristics and dynamics of soil bacterial diversity in the alpine and subalpine forests of western Sichuan during one onset of soil freezing, a field experiment was conducted to investigate the soil bacterial diversity by PCR-DGGE in the primary fir (*Abies faxoniana*) forest, fir and birch (*Betula albosinensis*) mixed forest and secondary fir (*A. faxoniana*) forest, which were three representative forests in the subalpine and alpine forest region in western Sichuan. Soil samples were collected on Nov. 5 and on Nov. 25, 2008, which was defined as the onset of freezing based on the simultaneous monitoring of soil temperature. Relative rich soil bacterial groups were still observed in the three sampled forests after soil freezing. The ranked order of soil bacterial groups was MF > SF > PF before soil freezing, while the ranked order was PF > MF > SF after soil freezing. Soil freezing decreased soil bacterial group and diversity, but increased soil bacterial dominance. However, the impact degree of soil freezing declined with the increase of soil depth and elevation. The results suggested that seasonal freezing had obvious effects on soil bacterial diversity in these subalpine/alpine forests. Meanwhile, the results also implied that the dynamics of soil bacterial community during the onset of freezing was of ecological significance to understand the wintertime ecological process in soils.

Key Words: seasonal freezing; subalpine/alpine forest; soil microbial diversity; DGGE

基金项目: 国家自然科学基金项目(30771702, 30471378); 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-07-0592); 国家“十一五”重大科技支撑计划课题(2006BAC01A11); 四川省杰出青年学科带头人培养基金(07ZQ026-022)

收稿日期: 2009-09-17; 修订日期: 2009-11-09

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: scyangwq@163.com

季节性冻结是全球中高纬度和高海拔地区普遍存在的自然现象^[1]。同时,作为高寒生态系统最基本的成分,土壤微生物在凋落物分解、C/N 矿化、腐殖质形成等过程中具有十分重要的作用,并受到温度、水分、营养有效性等非生物因素的综合调控^[2-4]。尽管越来越多的研究表明,冬季土壤完全冻结后土壤仍然具有相当数量的微生物类群^[5-6],并影响下一个生长季节的植物生长与发育,但普遍认为,土壤冻结导致微生物休眠甚至大量死亡,因而已有的研究更加关注生长季节内的土壤微生物群落特征^[7-10],极少关注土壤冻结过程中的土壤微生物多样性变化。这限制了对高寒地区冬季土壤生态学的认识,也不利于理解以全球变暖为主要特征的全球气候变化背景下的土壤生态过程。

川西亚高山/高山森林位于青藏高原东缘,是我国第二大林区的主体和全球气候变化的敏感地带,在区域气候调节、水源涵养、水土保持和生物多样性保育等方面具有不可替代的作用和地位^[11-12]。每年 11 月至翌年 4 月伴随气候的季节性变化表现出明显的季节性冻结特征,冻融或冻结时间长达 5—6 个月,仅有少数研究关注到季节性冻融期的森林生态系统过程^[13-15]。季节性冻结初期不仅是温度变化的转折点,而且是该区森林凋落物形成的高峰期和雪被形成的关键期^[16],这些明显的变化可能直接影响到土壤微生物群落结构,进而可能对凋落物分解、有机物腐殖化、养分循环、土壤结构产生强烈的影响,但相关过程并未受到应有的重视,限制了对全球气候条件下的高寒森林冬季土壤生态过程变化的理解。因此,以川西亚高山/高山地区分布面积最大的冷杉(*Abies faxoniana*)原始林、红桦(*Betula albosinensis*) + 冷杉混交林、冷杉次生林为研究对象,采用 PCR-DGGE 的方法研究土壤冻结初期土壤完全冻结前后土壤细菌种群多样性变化特征,探讨土壤细菌群落结构对冻结过程的响应,以期为深入认识亚高山/高山森林冬季土壤生态学过程提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 研究区域及样地概况

研究区域位于四川省理县毕棚沟(E102°53′—102°57′, N31°14′—31°19′),地处青藏高原东缘与四川盆地的过渡带。年降雨量约 850mm,年平均气温 2—4℃,最高气温 23℃,最低温度为 -18℃。季节性土壤冻融期长达 5—6 月,初冻和初融期间具有明显的冻融循环。研究区域的主要森林植被随海拔分异为岷江冷杉(*Abies faxoniana*)原始林、岷江冷杉和红桦(*Betula albosinensis*)混交林、岷江冷杉次生林^[17],土壤为雏形土和新成土。林下灌木主要有箭竹(*Fargesia spathacea*)、高山杜鹃(*Rhododendron delavayi*)、3 颗针(*Berberis sargentiana*)、花楸(*Sorbus rufopilosa*)、沙棘(*Hippophae rhamnoides*)、扁刺蔷薇(*Rosa weginzowii*)等;草本主要有蟹甲草(*Cacalia* spp)、冷蕨(*Cystopteris montana*)、苔草科和莎草科多属等。选取 3 个具有代表性的森林群落(岷江冷杉原始林、岷江冷杉和红桦混交林、岷江冷杉次生林),分别设置 1 个 30m × 30m 的定位研究样地。样地基本概况见表 1。

1.2 样品采集

根据基础调查和历年当地气象资料显示,研究区每年 11 月初至翌年 4 月中旬为土壤的季节性冻结期。2008 年 11 月 1 日分别在固定样地内 5cm 处埋设一个纽扣式温度记录器(iButton DS1923-F5, Maxim Com. USA),设定为每小时记录 1 次数据,3 个样地在 2008 年 11 月温度每小时的变化特征如图 1 所示。

于 2008 年 11 月 5 日(土壤冻结初期)和 11 月 25 日(完全冻结期)采集土壤样品。鉴于亚高山森林土壤凋落物厚、发育缓慢、土壤结构单一等特点,在定位样地随机选取 5 个 1m × 1m 的均质样方,按照冯瑞芳等对有机层的划分标准,分半分解层(fragmented litter layer, FL)、完全分解层(humified litter layer, HL)和矿质层(mineral soil, MS)采集土样^[18]。除去样品中的石砾、石块、根系后,混匀装入已灭菌的封口聚乙烯袋,尽快带回实验室 -20℃ 保存备用。

1.3 土壤总 DNA 的提取与纯化

参照 Zhou 的方法提取土壤微生物总 DNA^[19]。取 5.0 g 样品,加入 13.5mL 提取缓冲液(100mmol·L⁻¹ Tris-HCl [pH 8.0], 100mmol·L⁻¹ sodium EDTA [pH8.0], 100mmol·L⁻¹ sodium phosphate [pH8.0], 1.5 mol·L⁻¹ NaCl, 1% CTAB)和 50μL 蛋白酶 K(20mg·mL⁻¹),混合均匀,在 37℃、225r/min 振荡 30min 后,加入

表 1 样地基本特征

Table 1 Characteristic of sample area

样地 Plot	海拔/m Altitude	坡向/(°) Aspect	坡度/(°) Slope	植被 Vegetation	土壤 Soil characteristics
冷杉原始林(PF) Primitive forest	3582	NE45	34	乔木层以岷江冷杉 <i>Abies faxoniana</i> 为主, 树龄约 120a, 林下植物主要为高山杜鹃 <i>Rhododendron delavayi</i> 和 三颗针 <i>Berberis sargentiana</i>	土壤为雏形土, 土层浅薄, 土体为 A-C 结构; 有机层厚 (15 ± 2) cm, 有机碳 5.79 g·kg ⁻¹ , 全氮 1.94 g·kg ⁻¹ , 全磷 3.45 g·kg ⁻¹ , pH6.2
天然混交林(MF) Mixed forest	3298	NE42	31	乔木层以 岷江 冷杉 和 红 桦 <i>Betula albosinensis</i> 为主, 树龄约 80a, 林下植物主要为箭竹 <i>Fargesia spathacea</i>	土壤为雏形土, 土层浅薄, 土体为 A-C 结构; 有机层厚 (12 ± 2) cm, 有机碳含量 5.88 g·kg ⁻¹ , 全氮 3.44 g·kg ⁻¹ , 全磷 7.72 g·kg ⁻¹ , pH6.6
冷杉次生林(SF) Secondary forest	3023	NE38	24	乔木层以岷江冷杉次生林为主, 树龄约 70a, 林下植物主要为箭竹	土壤为雏形土, 土层浅薄, 土体为 A-C 结构; 有机层厚 (12 ± 2) cm, 有机碳含量 5.59 g·kg ⁻¹ , 全氮 2.86 g·kg ⁻¹ , 全磷 3.92 g·kg ⁻¹ , pH6.5

1.5mL 20% SDS,65℃水浴 2h;13 000 ×g 离心 10min, 将上清液移入新的离心管,将沉淀重复抽提 2 次。收集 3 次抽提的上清液于同一管中, 然后加入等体积的酚: 氯仿: 异戊醇(25:24:1) 轻轻混匀,13 000 ×g 离心 10min,将上层水相移入新的离心管,加入 0.6 倍体积的异丙醇沉淀,16 000 ×g 条件下离心 10 min,弃上清液, 沉淀用 75% 乙醇清洗 2 次,室温风干。风干后加入 50 μL 0.5 ×TE 溶液,即得到样品 DNA 粗提取液。用 Gel Extration kit (Omega, USA) 回收粗 DNA。纯化的总 DNA 用 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.4 细菌 16S rDNA V3 区的 PCR 扩增

以纯化后的基因组 DNA 为模板,针对 16S rDNA 基因中 V3 保守区选择特异性引物 314f (5'-CCTACGG-GAGGCAGCCAG-3') 和 518r (5'-TTACCGCGGCTGCT-GG-3');341f 的 5' 端的 GC 发夹结构为: (CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCCC)^[20]。经 PCR 扩增后可得的产物长度约 200bp。扩增条件为:94℃预变性 5 min;94℃变性 50s,55℃退火 60 s,72℃延伸 50 s,共 35 个循环,最后 72℃延伸 15min。

1.5 变性梯度凝胶电泳(DGGE)

使用 Dcode 突变检测系统 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)对带 GC 发夹的 PCR 产物进行分析。根据 Muyzer 和 Smalla 的方法进行优化^[20]。聚丙烯酰胺变性梯度凝胶浓度为 10%,变性梯度为 35% 至 65%,以 1 ×TAE (40mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 40mmol·L⁻¹ CH₃COOH, 1mmol·L⁻¹ EDTA, pH = 7.2) 作为电泳缓冲液。每孔上样量为 35uL,电压 100V,60℃下电泳 16h。电泳结束后硝酸银染色,最后由 GS- 800 光密度仪 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)成像。

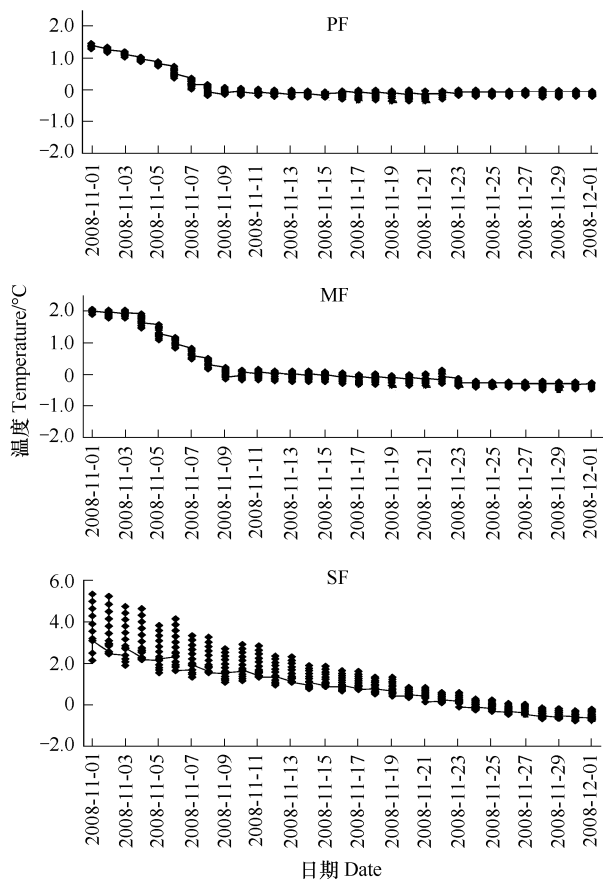


图 1 川西亚高山/高山初冻期不同林型土壤温度动态变化

Fig. 1 Soil temperature dynamic of the study forests in western Sichuan from Nov.1 to Dec.1, 2008

PF: 冷杉原始林, MF: 天然混交林, SF: 冷杉次生林

1.6 DGGE 条带分析

所得图像用 Bio-Rad Quantity One 4.41 软件处理,对样品条带的迁移位置、数量、灰度进行定量分析。根据各个条带在 DGGE 图谱中的表现用 UPGMA(Unweighted pair group method using arithmetic averages)进行聚类分析,并采用 Shannon-Wiener 多样性指数(H)、Pielou 均匀度指数(J)、Simpson 优势度指数(C)等指标比较各个样品多样性^[21-23] :

$$H = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$
$$J = H/H_{\max} = H/\ln S$$
$$C = \sum (P_i)^2$$

式中, n 表示每个样品中检测到的条带数, S 表示 DGGE 检测到的不同条带的总和($S \geq n_{\max}$), P_i 表示样品中各个条带的强度占样品总强度的百分含量。

2 结果

2.1 土壤细菌种群 16S rDNA 的 PCR 扩增和 DGGE 图谱分析

从样品中提取高质量的 DNA 和良好的 PCR 扩增是进行后续分析的基础。以 16S rDNA V3 区特异性引物扩增后,经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,PCR 产物约为 200bp(图 2)。变性梯度凝胶电泳图谱如图 3 所示,3 个典型亚高山森林土壤有机层样品经 PCR 扩增得到的 V3 区产物在 DGGE 凝胶上得到良好的分离,各条带的强度和迁移率各不相同。

表 2 所示为在冻结前后 3 个森林群落土壤样品所获得的细菌条带数及其变化特征。如表所示,土壤完全冻结前,3 个森林群落 3 个土壤层次土壤细菌条带总数表现为:MF > SF > PF。尽管 SF 群落中 FL 土壤细菌条带数明显大于 HL 和 MS,但 MF 和 PF 中,3 个土层间的细菌条带数差异并不显著。土壤完全冻结后,3 个森林群落土壤细菌总条带数表现为:PF > MF > SF。SF 森林群落中,MS 土壤细菌条带数明显大于 FL 和 HL,而 MF 和 PF 中,3 个土层间的细菌条带数差异并不显著。3 个森林群落的土壤样品在冻结后仍然具有较高的细菌条带数,但均表现出明显的减少趋势。3 个森林群落土壤细菌条带数的下降率均随着土壤层次的增加而降低。3 个层次的平均下降率表现为:SF > MF > PF。

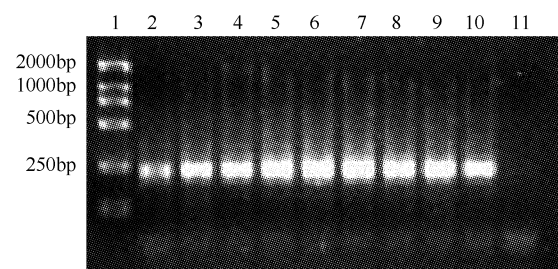


图 2 16S rDNA V3 区扩增产物琼脂糖凝胶图

Fig. 2 Aarose electrophoresis of V3 region fragment of 16S ribosome DNA

Lane1 为 Takara DL2,000 DNA Marker; Lane2-10 依次为冷杉原始林,天然混交林和冷杉次生林的 FL、HL、MS 层样品; Lane11 为 PCR 反应的阴性对照

表 2 土壤冻结前后 3 种森林群落不同土壤层次土壤微生物条带数的差异

Table 2 Difference of acquired DGGE bands of soil microorganisms in different soil layers of three sampling forests between before and after soil freezing in 2008

样地 Forest type	土壤层次 Soil layer	2008-11-05	2008-11-25	下降率 Decline rate/%
冷杉原始林 Primitive forest	FL	21	15	28.6
	HL	22	18	18.2
	MS	18	16	11.1
	总计	61	49	19.7
天然混交林 Mixed forest	FL	27	16	40.7
	HL	25	15	40.0
	MS	24	16	33.3
	总计	76	47	38.2
冷杉次生林 Secondary forest	FL	31	12	61.3
	HL	18	11	38.9
	MS	20	15	25.0
	总计	69	38	44.9

土壤完全冻结后,3 个森林群落不同层次土壤细菌的 Shannon-Weiner 指数均明显减小(表 3)。虽然 MF 群落 3 个土层的土壤细菌 Pielou 指数在冻结后也表现出减小的趋势,但其他两个群落中的 Pielou 指数在冻结前后无显著差异。相反,PF 和 MF 群落土壤细菌的 Simpson 指数在土壤冻结后明显增加。

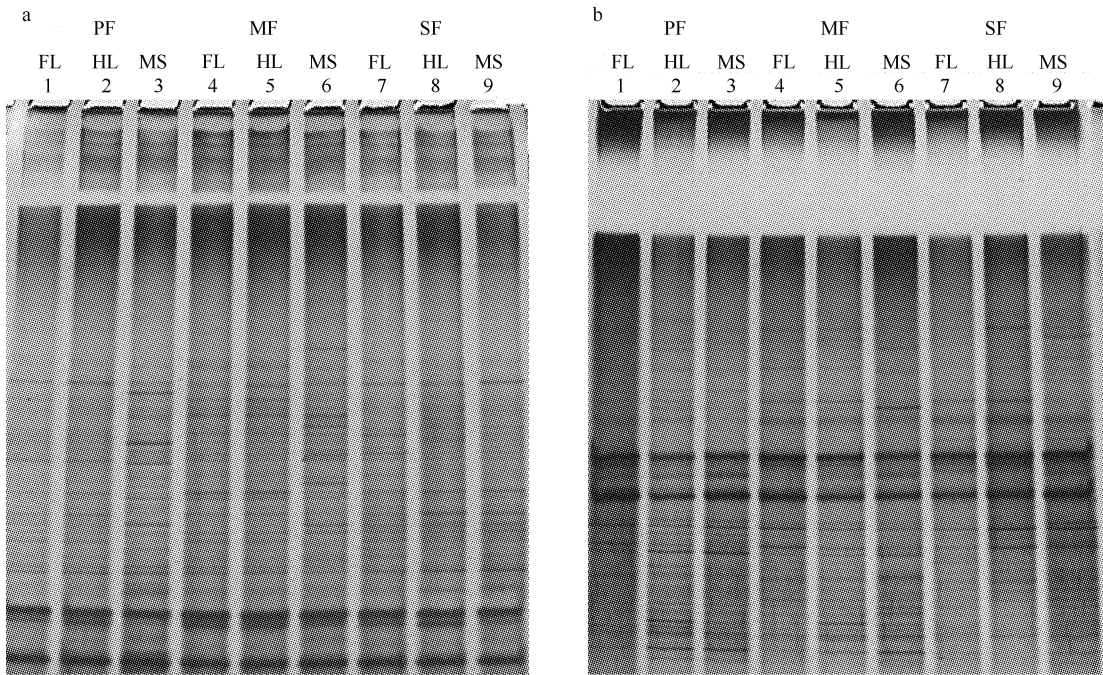


图 3 样品细菌 16S rDNA 的 DGGE 图谱

Fig. 3 DGGE pattern of bacterial 16S rDNA with samples collected in Nov.5 (a) and Nov.25 (b), 2008

(a) 为 11 月 5 日采集的样品,(b) 为 11 月 25 日采集的样品, M 为 100bp DNA Maker, 1—9 依次为冷杉原始林(PF), 天然混交林(MF)和冷杉次生林(SF)的样品,半分解层(FL),完全分解层(HL),矿物质层(MS)

表 3 土壤冻结前后 3 种森林群落不同土壤层次土壤微生物的 Shannon-Weiner 指数,Pielou 指数和 Simpson 指数的差异

Table 3 Difference of the Shannon-Weiner index (H'), Pielou index (J) and Simpson index (C) of soil microorganisms in different soil layers of three sampling forests between before and after soil freezing in 2008

样地 Forest type	土壤层次 Soil layer	H'		J		C	
		2008-11-05	2008-11-25	2008-11-05	2008-11-25	2008-11-05	2008-11-25
原始冷杉林 Primary forest (PF)	FL	2.92	2.59	0.75	0.74	0.060	0.078
	HL	2.95	2.71	0.75	0.78	0.061	0.077
	MS	2.81	2.56	0.72	0.73	0.064	0.092
天然混交林 Mixed forest (MF)	FL	2.72	2.64	0.89	0.75	0.027	0.082
	HL	3.07	2.62	0.78	0.75	0.052	0.078
	MS	3.05	2.66	0.78	0.76	0.052	0.076
冷杉次生林 Secondary forest (SF)	FL	2.69	2.39	0.69	0.68	0.156	0.103
	HL	2.77	2.18	0.71	0.70	0.070	0.135
	MS	2.59	2.05	0.52	0.54	0.278	0.083

FL: 半分解层; HL: 完全分解层; MS: 矿物质土层

2.2 细菌群落相似度

根据图谱中每个样品不同条带的强度和迁移率,按照 UPGMA 算法对每个样品的条带图谱进行细菌群落相似性聚类分析(图 4)。从图 4 可见,土壤冻结前期,土壤细菌群落结构在 PF 群落的 FL 和 HL 层,MF 群落的 HL 和 MS 层,SF 群落的 HL 和 MS 层之间的相似性均达到 0.8 以上。土壤完全冻结后,除 PF 群落的 HL 和 MS 层,MF 群落 FL 和 HL 层土壤细菌群落结构样品相似度达到 0.85 外,其余土壤细菌群落结构间的相似度

均小于 0.8。

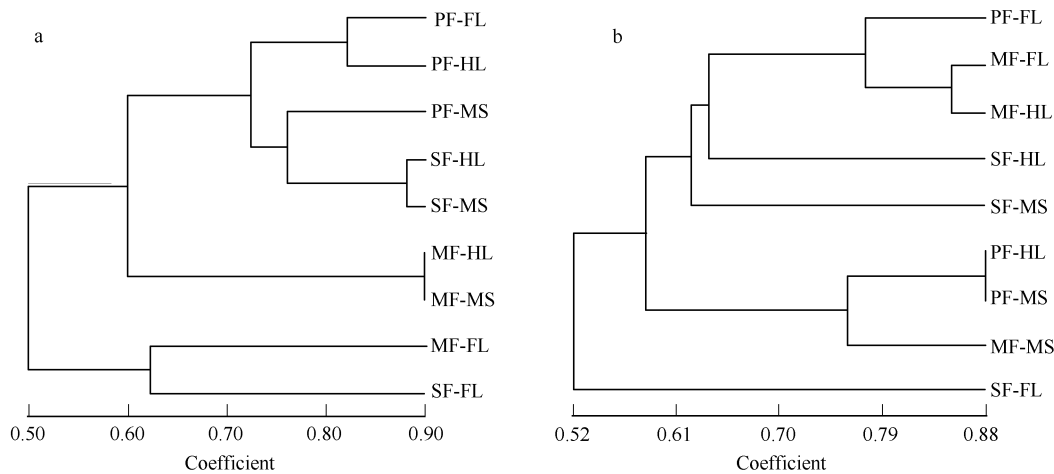


图 4 DGGE 条带的聚类分析, (a) 为 11 月 5 日采集的样品, (b) 为 11 月 25 日采集的样品

Fig. 4 Clustering analysis of DGGE pattern with samples collected in Nov. 5 (a) and Nov. 25 (b)

3 讨论

土壤冻结过程中微生物群落结构的变化是认识植物非生长季节土壤生态过程的重要方面^[24]。采用 PCR-DGGE 方法对典型亚高山/高山森林群落土壤细菌群落多样性的研究表明, 尽管土壤完全冻结后仍检测到相当数量的细菌类群, 但冻结作用明显降低了细菌类群的数目, 且冻结作用的影响程度随着森林群落类型和土壤层次的变化而变化。这不仅表明季节性冻结过程对土壤微生物群落特征具有深刻的影响, 进而影响土壤生态过程, 而且也意味着土壤完全冻结后, 仍然存在着一一定群落多样性的土壤微生物, 它们对于冬季土壤生态过程具有重要意义, 这些结果也与其他同类研究结论基本一致^[5-8]。

一般认为, 低温或者土壤冻结会直接导致土壤微生物的死亡或休眠^[25]。然而, 越来越多的研究表明冬季土壤完全冻结后仍然有部分微生物具有一定的活性^[26-27]。本项研究表明, 土壤完全冻结后, 川西亚高山 3 个典型森林群落的土壤细菌类群数量明显降低, 土壤冻结过程中温度的急剧下降改变了土壤细菌群落的结构。主要原因是: 一方面不耐低温的细菌类群可能在冻结过程中死亡, 另一方面耐受低温型的细菌类群得以存活, 并保持一定的活性^[28-30]。然而, 随着海拔梯度的升高, 温度、水分、森林群落类型、土壤有机质等因素也发生变化, 受这些环境因子的影响, 土壤细菌群落结构也必然表现出一定的变化趋势^[31]。土壤冻结前, 处于高海拔的 PF 群落明显表现出较低的土壤细菌类群数, 且表现出不显著的层次差异。而处于相对较低海拔的 SF 和 MF 群落不仅表现出相对较多的土壤细菌类群数目, 而且表现出明显的表聚性。但土壤冻结后, PF 群落土壤细菌总类群数显著大于其他两个群落, 并且 SF 群落中 FL 和 HL 层细菌类群数明显小于 MS 层。这些结果充分说明, 土壤温度随着海拔的升高逐渐降低, 处于海拔较高的 PF 群落对温度变化更为敏感, 由于土壤细菌某些类群经过长期的低温锻炼, 因而在冻结后仍能保持相对较高的土壤细菌群落多样性^[32]。相反, 处于海拔相对较低的 SF 群落由于相对较高的冻结前温度, 土壤冻结过程中温度的急剧下降可能直接降低处于表层 (HL 和 FL) 的细菌类群数量, 而表层土壤的冻结在一定程度上起到物理屏障的作用, 为下层微生物提供相对稳定的生境, 有利于下层少部分微生物的保存^[33], 因而处于下层的 MS 表现出土壤细菌类群数量相对较高的特征。另外, 土壤冻结过程中有机质从土壤有机层向矿质层的迁移, 因而增加土壤矿质层中 N 含量的增加, 有利于细菌耐寒类群的生命维持。这从“细菌类群数在土壤冻结后下降率随着土层的增加而降低, 平均下降率随森林群落海拔的增加而增加”也可以得出相似的结论。

多样性指数是反应森林群落土壤细菌多样性的直接指标。土壤冻结过程显著降低了川西高山/亚高山典型森林群落土壤细菌的多样性 (Shannon-Weiner 指数) 和 MF 群落的土壤细菌均匀度 (Pielou 指数), 但提高了

PF 和 MF 群落土壤细菌的优势度(Simpson 指数)。这些结果也可以充分证明冻结过程一方面导致部分细菌类群的消失,另一方面也表明土壤完全冻结后仍有部分耐受低温的细菌类群存在,因而表现出优势度较高而多样性较低的土壤细菌群落结构格局。这些耐受低温的微生物群落必将在漫长的冬季主导土壤生态过程,进而对下一个生长季节的植物萌发和生长具有重要的意义。同时,这些结果意味着,主导生长季节与非生长季节土壤生态过程的微生物类群可能存在差异。同样地,细菌群落的相似性聚类分析也支持了这个观点。由于不同的森林群落、不同的土壤层次受冻结作用的影响程度不一致,土壤完全冻结后各森林群落土壤层次之间的细菌群落相似性发生了相当大的变化。这种变化不仅表明冻结前后土壤细菌群落结构发生了改变,而且也表现出细菌群落受冻结作用影响而发生的动态变化。

综上所述,川西高山/亚高山森林群落土壤细菌多样性受到季节性冻结作用的显著影响。尽管在土壤完全冻结后,森林群落土壤层次仍然具有一定的细菌多样性,但冻结过程显著降低了土壤细菌类群的丰富度及多样性,但一定程度上提高了土壤细菌的优势度。这种由土壤冻结作用驱动的细菌群落结构变化可能对认识冬季土壤生态过程具有重要意义,具体的机制及其作用过程还需深入探讨。虽然 DGGE 的方法仍为研究土壤微生物群落结构和多样性的快速、有效的通用方法,但仍存在不确定性^[35-37]。

References:

- [1] Yang Z N, Liu X R. Hydrology in Cold Region of China. Beijing: Science Press, 2000: 163-182.
- [2] Zhou J, Lei T. Review and prospects on methodology and affecting factors of soil microbial diversity. Biodiversity Science, 2007, 15(3): 306-311.
- [3] Cynthia L W, Robert L S. Decomposition rates of buried substrates increase with altitude in the forest-alpine tundra ecotone. Soil Biology & Biochemistry, 2007, 39: 68-75.
- [4] Yang W Q, Deng R J, Zhang J. Forest litter decomposition and its responses to climate change. Chinese Journal of Applied Ecology, 2007, 18(12): 2889-2895.
- [5] Morley C R, Trofymow J A, Coleman D C, Cambardella C. Effects of freeze-thaw stress on bacterial populations in soil microcosms. Microbial Ecology, 1983, 9: 329-340.
- [6] Brooks P D, Williams M W, Schmidt S K. Inorganic nitrogen and microbial biomass dynamics before and during spring snowmelt. Biogeochemistry, 1998, 43: 1-15.
- [7] Blaire S, Leveill R, Wayne H P, Lyle G W. Microbial ecology and biodiversity in permafrost. Extremophiles, 2006, 10: 259-267.
- [8] Elena V, Vera S, Michael G, Natalia M, Natalia Z, Anzhelika M, David G, Elizaveta R, Tatiana V. The deep cold biosphere: facts and hypothesis. FEMS Microbiology Reviews, 1997, 3-4: 277-290.
- [9] Gilichinsky D, Wagener S. Microbial life in permafrost: a historical review. Permafrost and Periglacial Processes, 1995, 6: 243-250.
- [10] Vera S S, Andrei L M, Elena V D, Elena A V, Galina I E. The structure of resting bacterial population in soil and subsoil permafrost. Astrobiology, 2004, 4: 345-358.
- [11] Feng X J, Leah L N, Myrna J S. Responses of soil organic matter and microorganisms to freeze thaw cycles. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 39(8): 2027-037.
- [12] Yang W Q, Wang K Y, Seppo K. Relationships between biodiversity and processes of coniferous forest ecosystem. Globesci, 2003, 25(5): 47-55.
- [13] Anthony C E, Riccardo S, Michele F. Changes in the seasonal snow cover of alpine regions and its effect on soil processes: A review. Quaternary International, 2007, 162/163: 172-181.
- [14] Deng R J, Yang W Q, Wu F Z. Effects of seasonal freezing-thawing on the enzyme activities in *Abies faxoniana* and *Betula platyphylla* litters. Chinese Journal of Applied Ecology, 2009, 20(5): 1020-1025.
- [15] Matzner E, Borken W. Do freeze-thaw events enhance C and N loss from soils of different ecosystem? A review. European Journal of Soil Science, 2008, 59: 274-284.
- [16] Joshua P S, Carol B, Jeffery M W. Increased snow depth affects microbial activity and nitrogen mineralization in two Arctic tundra communities. Soil Biology & Biochemistry, 2004, 36: 217-227.
- [17] Zhang Y D, Zhao C M, Liu S R. Woodland hydrological effects of spruce plantations and natural secondary series in sub-alpine region of western Sichuan. Journal of Natural Resources, 2004, 19(6): 761-768.
- [18] Feng R F, Yang W Q, Zhang J. Review on biochemical property in forest soil organic layer and its responses to climate change. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2006, 12(5): 734-739.
- [19] Zhou J Z, Mary A B, James M T. DNA recovery from soils of diverse composition. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62: 316-322.

- [20] Muyzer G, De Wall E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rDNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59: 695-700.
- [21] Liu C R, Ma K P. Measurement of biotic community diversity. *Acta Ecologica Sinica*, 1997, 17(6): 601-610.
- [22] Ma K P, Liu Y M. Measurement of biotic community diversity: Measurement of $I\alpha$ diversity. *Chinese Biodiversity*, 1994, 2(4): 231-239.
- [23] Luo H F, Qi H Y, Zhang H X. Assessment of the bacterial diversity in fenvalerate-treated soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2004, 20: 509-515.
- [24] John L C, Myron J M, Peter M G, Lynn M C, Janet P H. Winter in northeastern North America: a critical period for ecological processes. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2005, 3: 314-322.
- [25] Wang K Y, Yang W Q, Hu T X. Processes of Subalpine Forest Ecosystems in the West of Sichuan. Chengdu: Sichuan Science & Technology Press, 2004: 266-269.
- [26] Gilichinsky D A, Wilson G S, Friedmann E I. Microbial populations in Antarctic Permafrost: biodiversity, state, age, and implication for astrobiology. *Astrobiology*, 2007, 7: 275-311.
- [27] Blaire S., Thomas D N, Eric M B. Development of a sensitive radiorespiration method for detecting microbial activity at subzero temperatures. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 71: 275-280.
- [28] Goodroad L L, Keeney D R. Nitrous oxide emissions and ammonification at low soil temperatures. *Canadian Journal of Soil Science*, 1984, 64: 187-194.
- [29] Ostroumov V E, Siegert C. Exobiological aspect of mass transfer in microzones of permafrost deposits. *Advance in Space Research*, 1996, 18: 79-86.
- [30] Burton S L, Beachamp E G. Profile nitrous oxide and carbon dioxide concentration in a soil subject to freezing. *Soil Science of America Journal*, 1994, 58: 115-122.
- [31] Zhang P, Guo H J, DAO Z L, Long B Y. A study on quantity and diversity of soil microorganisms in Gaoligong Mountains. *Biodiversity Science*, 1999, 7(4): 297-302.
- [32] Aviaja A H, Rodney A H, Karina M, Lars L J, Tommy K, James M T, Bente A L, Kai W F. Viability, diversity and composition of the bacterial community in a high Arctic permafrost soil from Spitsbergen, Northern Norway. *Environmental Microbiology*, 2007, 9: 2870-2884.
- [33] Yang S Z, Jin H J. Physiological and ecological effects of freezing and thawing processes on microorganisms in seasonally-froze ground and in permafrost. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(10): 5065-5073.
- [34] Schadt C W, Martin, A P, Lipson D A, Schmidt, S K. Seasonal dynamics of previously unknown fungal lineages in tundra soils. *Science*, 2003, 301: 1359-1361.
- [35] Hugenholtz P, Goebel B M, Pace N R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Bacteriology*, 1998, 180: 4765-4774.
- [36] Xing D F, Ren N Q. Common problems in the analyses of microbial community by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(2): 331-335.
- [37] Watanabe K, Kodama Y, Harayama S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. *Microbiology Methods*, 2001, 44: 253-262.

参考文献:

- [1] 杨针娘, 刘新仁, 主编. 中国寒区水文. 北京: 科学出版社, 2000: 163-182.
- [2] 周桔, 雷霆. 土壤微生物多样性影响因素及研究方法的现状与展望. *生物多样性*, 2007, 15(3): 306-311.
- [4] 杨万勤, 邓仁菊, 张健. 森林凋落物分解及其对全球气候变化的响应. *应用生态学报*, 2007, 18(12): 2889-2895.
- [12] 杨万勤, 王开运, Seppo Kellomäki. 生物多样性与针叶林生态系统过程的关系. *世界科技研究与发展*, 2003, 25(5): 47-55.
- [14] 邓仁菊, 杨万勤, 吴福忠. 季节性冻融对岷江冷杉和白桦凋落物酶活性的影响. *应用生态学报*, 2009, 20(5): 1020-1025.
- [17] 张远东, 赵常明, 刘世荣. 川西亚高山人工云杉林和自然恢复演替系列的林地水文效应. *自然资源学报*, 2004, 19(6): 761-768.
- [18] 冯瑞芳, 杨万勤, 张健. 森林土壤有机层生化特性及其对气候变化的响应研究进展. *应用与环境生物学报*, 2006, 12(5): 734-739.
- [21] 刘灿鉴, 马克平. 生物群落多样性的测度方法. *生态学报*, 1997, 17(6): 601-610.
- [22] 马克平, 刘玉明. 生物群落多样性的测度方法 $I\alpha$ 多样性的测度方法(下). *生物多样性*, 1994, 2(4): 231-239.
- [25] 王开运, 杨万勤, 胡庭兴. 川西亚高山森林生态系统过程研究. 成都: 四川科学技术出版社, 2004: 266-269.
- [31] 张萍, 郭辉军, 杨世雄, 刀志灵. 高黎贡山土壤微生物的数量和多样性. *生物多样性*, 1999, 7(4): 297-302.
- [33] 杨思忠, 金会军. 冻融作用对冻土区微生物生理和生态的影响. *生态学报*, 2008, 28(10): 5065-5073.
- [36] 邢德峰, 任南琪. 应用 DGGE 研究微生物群落时的常见问题分析. *微生物学报*, 2006, 46(2): 331-335.