DOI: 10.5846/stxb201801050034

卢慧,赵珩,盛玉钰,丛微,王秀磊,李迪强,张于光.基于高通量测序的两种高寒草甸土壤原核生物群落特征研究.生态学报,2018,38(22): - . Lu H, Zhao H, Sheng Y Y, Cong W, Wang X L, Li D Q, Zhang Y G.Soil prokaryotic community characteristics in two alpine meadow types based on high-throughput sequencing techniques.Acta Ecologica Sinica,2018,38(22): - .

基于高通量测序的两种高寒草甸土壤原核生物群落特 征研究

卢 慧^{1,2},赵 珩¹,盛玉钰²,丛 微²,王秀磊²,李迪强²,张于光^{2,*}

1 中央民族大学生命与环境科学学院,北京 100081

2 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所,国家林业局森林生态环境重点实验室,北京 100091

摘要:土壤微生物在生态系统中具有重要的生态功能,研究青藏高原高寒草甸的土壤原核生物群落组成及其主要影响因子,对 揭示青藏高原独特的微生物地理区系和预测全球环境变化的影响有重要意义。本文利用 Illumina Miseq 高通量测序技术,结合 分子生态网络,对青藏高原高寒沼泽化草甸和高寒草甸的土壤原核生物的群落组成特征进行了分析。结果共检测到 23 145 个 OTUs,可分为 2 个古细菌类群和 33 个已知的细菌类群;其中变形菌门、酸杆菌门、放线菌门和拟杆菌门为土壤的优势菌群,相 对丰度累计超过 79%;高寒草甸原核生物的多样性高于高寒沼泽化草甸,两种草甸类型原核生物群落特征具有显著差异性(P< 0.001)。分子生态网络分析表明,高寒草甸网络具有较长的平均路径距离和较高的模块性,使其比高寒沼泽化草甸网络更能抵 抗外界环境变化,在应对气候变化时具有更高的稳定性;典范对应分析(CCA)和分子生态网络的分析结果均表明,土壤 pH 值 是影响土壤原核生物群落特征的主要影响因子。综上所述,土壤微生物群落的组成变化对于评估其对全球气候变化的响应具 有重要的指示作用,土壤原核生物群落特征在不同的高寒草甸土壤中具有显著差异,了解其变化规律和影响因子,能为高寒草 甸生态系统的适应性管理和应对气候变化提供理论依据。

关键词:青藏高原;高通量测序;原核生物群落;高寒草甸

Soil prokaryotic community characteristics in two alpine meadow types based on high-throughput sequencing techniques

LU Hui ^{1,2}, ZHAO Heng ¹, SHENG Yuyu ², CONG Wei ², WANG Xiulei ², LI Diqiang ², ZHANG Yuguang ^{2,*} 1 College of Life and Environment Sciences, Minzu University of China, Beijing 100081, China

2 Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, and the Key Laboratory of Forest Ecology and Environment of State Forestry Administration, Beijing 100091, China

Abstract: Microorganisms have important ecological functions in ecosystems. Studying the soil prokaryotic community composition of an alpine meadow in the Qinghai-Tibet Plateau and its key influencing factors would provide valuable information for revealing the special microbial flora of a unique geographical environment, and be useful for predicting global climate changes. In this study, the soil prokaryotic community compositions of an alpine swamp meadow and alpine meadow in the Qinghai-Tibet Plateau were analyzed using an Illumina Miseq high-throughput sequencing technique. A total of 23 145 prokaryotic OTUs were detected, phylogenetically derived from 2 archaeal and 33 known bacterial phyla. Soil advantage categories included Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, and Bacteroidetes, accounting for > 79% of the all phyla in the two meadow types. The prokaryotic diversity was higher in the alpine meadow than in the alpine swamp

收稿日期:2018-01-05; 网络出版日期:2018-00-00

基金项目:国家自然科学基金(31370145, 31670614);国家科技部自然保护区生物保本资源共享子平台项目(2005DKA21404)

^{*} 通讯作者 Corresponding author.E-mail: yugzhang@ sina.com.cn

meadow. The two meadow types had significantly different soil prokaryotic community characteristics (P < 0.001). Based on a molecular ecological network analysis, we found that the alpine meadow network had a longer average path distance and modularity than the alpine swamp meadow network, making it more resilient to environment changes with a higher stability in response to climate change. The results of the Canonical Correspondence Analysis (CCA) and molecular ecological network analysis showed that soil pH was the main factor affecting soil prokaryotic community structure. In conclusion, the composition of the soil microbial community is an important indicator for evaluating environmental responses to global climate change. Soil prokaryotic community characteristics have significant differences in different alpine meadow soils. Understanding the variation and influencing factors could provide a theoretical basis for adaptive management and response to climate change in alpine meadow ecosystems.

Key Words: Qinghai-Tibetan Plateau; high-throughput sequencing; prokaryotic community; alpine meadow

土壤微生物参与了生态系统的各种重要的生态功能,是评价生态系统各种地下生态与生物地球化学循环 过程对环境变化的响应的一个重要指标^[1],近年来,已有研究报导了不同环境下土壤微生物的群落组成,有 学者认为微生物群落的控制因子会随着研究尺度的不同而发生改变^[2]。Zhang 等^[3]发现土壤微生物群落的 分布受到纬度梯度的影响,而更多的研究认为微生物多样性沿海拔梯度的变化不同^[4-5],pH^[6]、土壤养分^[7]、 土壤温度^[8]或其他因子也可能是影响微生物群落组成的主要因子。

气候变化对各种生物都会产生很大影响^[9]。由于高海拔和极端的气候条件,青藏高原是生态脆弱地区, 极易受到环境干扰^[4]。高寒沼泽化草甸是青藏高原高寒草甸草地的重要组成部分,是一种草甸与沼泽之间 的过渡植被类型,面积为 4.9×10⁴ km²,是青藏高原分布面积较广的草地生态系统之一^[10]。受到气候暖干化 的影响,多年冻土出现退化,使得土壤表层含水量下降,植物群落随之发生变化,从而由高寒沼泽化草甸演替 为高寒草甸^[11]。有学者认为,植物演替会对土壤微生物的群落结构产生显著影响,甚至还会在很大程度上影 响到土壤碳、氮含量的动态变化^[12]。因此,作为青藏高原独有的高寒草甸生态系统,研究气候变化对土壤原 核生物的影响及其响应是十分必要的,对研究该区域独特的微生物地理区系和预测全球环境变化的影响有重 要意义。

近年来,关于高寒生态系统的研究多集中于植被覆盖度^[13]、植物群落结构^[14]、植物第一性生产力^[15-16]、 土壤碳循环或氮循环^[17-18]等方面,而对草甸生态系统土壤微生物的研究还处于起步阶段。随着分子生物学 的发展,高通量测序技术作为研究微生物群落组成的有效手段,已被广泛应用于微生物学的研究领域中,它可 以通过对从土壤中提取的微生物总 DNA 进行测序和比较分析,快速的对微生物进行有效鉴定^[19]。目前,由 于受到研究技术和分析方法的局限,大部分的微生物多样性研究都集中在物种的多样性和丰富度等方面,没 有考虑微生物物种或种群间的相互作用,而分子生态网络(Molecular Ecological Networks)分析方法^[20]的构建 为预测微生物群落组成和多样性对各种环境变化的可能响应提供了新的机遇。本研究以青藏高原三江源地 区高寒沼泽化草甸和高寒草甸的土壤样品为研究对象,通过 Illumina Miseq 高通量测序和分子生态网络相结 合,分析不同高寒草甸类型土壤原核生物群落组成和分子生态网络特征,并探讨影响原核生物群落组成的主 要环境影响因子。

1 研究方法

1.1 取样方法

选择青海省三江源地区的高寒沼泽化草甸(Alpine swamp meadow,简称 ASM,34°22′15″N,97°56′57″E,海 拔 4480 m)和高寒草甸(Alpine meadow,简称 AM,35°24′28″N,99°21′6″E,海拔 4140 m)为研究对象,各设立一 块样地。每块样地的坡度、坡向、人为干扰情况尽可能一致。为了在考虑空间异质性的同时降低实际地形的 取样难度,我们采样时对巢式取样的方法进行了简化,进行了"L"形取样^[21]。即在每块样地设立 1 个 200 m× 200 m 的网格,以网格内任意一个角为起点,在水平和垂直方向上距离分别为 10,20,50,100 和 200 m 处设置 1 m×1 m 的样方,每块样地内设立 10 个 1 m×1 m 样方,共 20 个样方。在每个 1 m×1 m 的样方内采用对角线 取样法采集土壤样品,取样深度为 0—10 cm,混合后过筛,分成 2 份,1 份低温保存用于土壤理化性质分析, 1 份-80℃保存用于 DNA 提取。同时记录采样地点经纬度、地形等。

1.2 土壤理化性质和植物多样性测定

在每个样方中,调查植物种类、多度、高度、盖度等指标,计算重要值。物种多样性的测定采用物种丰富度 指数和香农多样性指数来表征。

土壤有机碳(SOC)用重铬酸钾氧化-分光光度法测定,pH值用酸度计法测定,土壤湿度、全磷(TP)、全氮(TN)、铵态氮(NH₄⁺-N)和硝态氮(NO₃⁻-N)采用常规方法测定,碱解氮(AN)用碱解-扩散法测定,速效磷(AP)用盐酸和硫酸溶液浸提,等离子发射光谱法测定^[22]。

1.3 高通量测序

土壤 DNA 的提取主要参考 Zhou^[23] 的方法进行。利用土壤基因组 DNA 提取试剂盒(MP Biomedical, Carlsbad, CA)先粗提土壤样品 DNA,然后利用 0.5%的低熔点的琼脂糖凝胶对样品 DNA 进行纯化,利用 NanoDrop ND-1000 分光光度计(Nanodrop Inc)检测样品 DNA 纯度,若 A_{260nm/280nm}>1.80, A_{260nm/230nm}>1.70 则表 明样品 DNA 符合要求。最后,利用 FlUOstar Optima(BMG Labtechm Jena, Germany)方法对纯化后的 DNA 进行定量。

以样品 DNA 为模板,根据 16S rRNA 的 V4 高变区设计引物,其正向引物为5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3'(515F),反向引物为5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'(806R)^[24],在PCR 反应体系中进行扩增。PCR 反应体系参照 Ding 等^[8]的方法。将600 µL 的混合液放入 Illumina Miseq (Illumina,San Diego,CA)平台(2×150 个序列读长)进行测序。

原始序列根据 Barcode 区分不同的样本序列,利用 FLASH 算法^[25]处理原始序列的前末端和后末端,将测得的序列进行比对分析,去掉低质量、较短序列和无法比对到 16S rRNA 数据库的序列以保证数据的可靠性。 根据 UCLUST 方法^[26],将样点序列以≥97%的相似性划分为 1 个分类操作单元(Operational Taxonomic Unit, OTU),采用 RDP classifier 将代表性 OTU 的序列信息比对至相对应的物种信息^[27],最后对所获得的 OTU 数据进行处理分析。所有的数据分析在美国俄克拉荷马大学环境基因组研究所的网站平台完成(http://zhoulab5.rccc.ou.edu:8080)。

1.4 分子生态网络构建

分子生态网络是基于随机矩阵理论^[20],通过在线平台 MENA 进行构建和数据分析(http://ieg2.ou.edu/ mena/),用于研究微生物网络互作关系。为确保 OTU 相互关系的准确性,在构建网络时,去除同一样地 10 个 平行样品中出现次数低于 70%的 OTUs。网络构建时,将基于随机矩阵理论,自动生成阈值。每个网络基于快 速模块优化的方法形成不同的模块。本研究中,不同网络的拓扑性质通过不同的指数如平均联系数、平均聚 集系数、平均路径距离、连通性和模块性^[20]来进行表征。网络节点功能通过模块内连接度(*Zi*)和模块间连接 度(*Pi*)这 2 个指标来进行划分,将节点划分为 4 大类型:模块枢纽(*Zi* >2.5 且 *Pi* <0.62)、网络枢纽(*Zi* > 2.5 且 *Pi* >0.62)、外围节点(*Zi* <2.5 且 *Pi* <0.62)和连接节点(*Zi* <2.5 且 *Pi* >0.62)^[8]。此外,将环境因子当成 网络节点,与原核生物 OTUs 一起构建网络,用来研究原核生物网络中的关键影响因子。

1.5 统计分析

采用 Excel 和 SPSS 18.0 软件利用对数据进行初步统计和差异性检验;微生物多样性通过香农指数和辛 普森指数来表征,并计算微生物的物种丰富度;用除趋势对应分析(Detrended correspondence analysis,DCA)对 土壤微生物群落特征进行排序;用典范对应分析(Canonical correspondence analysis,CCA)研究群落分布格局 与环境因子的关系;DCA 和 CCA 均使用生物统计学软件 R 软件中的 Vegan 软件包^[8]进行统计分析。不相似 性检验均利用在线网站(http://ieg.ou.edu/microarray/)进行分析。采用 SigmaPlot 12.5 软件作图。分子生态

网络采用 Cytoscape 3.0 软件进行可视化。

2 结果

2.1 两种高寒草甸的环境因子特征

对样地进行植物调查和植物指标计算,结果表明,ASM(高寒沼泽化草甸)样地的优势种为藏嵩草 (Kobresia tibetica)和矮嵩草(Kobresia humilis);AM(高寒草甸)样地的优势种是矮嵩草和高山嵩草(Kobresia pygmaea)。AM 样地的植物多样性高于 ASM,而植物丰富度低于 ASM(表1)。

在土壤理化性质中, ASM 样地的土壤湿度显著高于 AM 样地, pH 值显著低于高寒草甸(p < 0.01) (表1)。大部分的土壤养分含量如 SOC、TN、AN 和 NH⁺₄-N 在 ASM 样地更高, 而 TP、AP 和 NO⁻₃-N 在 AM 样地 中明显较低(P < 0.05)。

Table 1	Table 1 Summary of environmental parameters in two meadow types			
环境因子 Environmental parameters	ASM	AM	Р	
海拔 Altitude/m	4480	4140	_	
土壤湿度 Soil moisture content/%	38.57±8.01	29.01±4.48	0.004	
pН	6.62±0.31	7.38±0.13	0.001	
SOC/(g/kg)	68.33±17.91	59.95±10.74	0.220	
TN/(g/kg)	5.68±1.33	5.48±0.65	0.680	
TP/(mg/kg)	608.95±50.23	651.92±123.79	0.329	
AN/(mg/kg)	484.33±121.97	408.38 ± 66.50	0.106	
AP/(mg/kg)	18.16±2.84	42.90±20.07	0.004	
$NH_4^+-N/(mg/kg)$	12.14±9.05	6.67±2.04	0.092	
$NO_{3}^{-}-N/(mg/kg)$	43.40±6.58	53.55 ± 9.36	0.012	
植物香农指数 Shannon-Wiener index of plant	7.88±2.67	8.15±2.21	0.810	
植物物种丰富度 Species richness of plant	16.40 ± 1.51	14.70 ± 2.31	0.067	

表 1	两种草甸类型土壤的环境因子比较	

ASM:高寒沼泽化草甸, Alpine swamp meadow; AM:高寒草甸, Alpine meadow; SOC: Soil organic carbon,土壤有机碳; TN:全氮, Total nitrogen; TP:全磷, Total phosphorus; AN:碱解氮, Alkalize nitrogen; AP:速效磷, Rapid available phosphorus; NH⁺₄-N: 铵态氮, Ammonium nitrogen; NO⁻₃-N: 硝态氮, Nitrate nitrogen. 表中数据表示平均值±标准差, P 值为独立样本 T 检验的结果

2.2 土壤原核生物的多样性比较

利用 Illumina Miseq 平台对土壤样品进行高通量测序,按照 15000 序列重新抽样,基于 97%的相似性定位 物种水平,共获得 23 145 个 OTUs,其中,ASM 样地检测到 15555 个 OTUs,AM 样地共检测到 16225 个 OTUs。 香农和辛普森多样性指数均显示,AM 样地的原核生物多样性显著高于 ASM 样地 (*P* < 0.1)(表 2)。

Table 2 Diversity of prokaryotic community in two meadow types				
指标 Indices	ASM	AM	Р	
香农指数 Shannon-Wiener index	7.37±0.15	7.49±0.15	0.095	
辛普森指数 Simpson index	581.54 ± 126.38	730.89±119.32	0.014	
物种丰富度 Species richness	3972.40±363.21	4189.40±388.13	0.213	

通过除趋势对应分析(DCA)对原核生物群落组成进行排序,从图 1 中可以看出,两种草甸类型的原核生物群落能基本分开。进一步进行不相似性检验(包括 MRPP、Adonis 和 Anosim),结果显示两种草甸类型原核 生物群落组成差异显著 (*P* < 0.001,表 3)。

2.3 土壤原核生物的群落组成差异

检测到的 OTUs 可划分为 33 个细菌门类和 2 个古 菌门类。其中,变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)和拟杆菌门 (Bacteroidetes)是优势门类(图 2),它们在 ASM 样地中 的相对丰度分别为 34.8%、24.7%、11.6%和 8.7%,在 AM 样地中的相对丰度分别为 32.1%、23.1%、19.5% 和 6.5%(图 2)。其中,变形菌门、酸杆菌门和拟杆菌门的 在 ASM 样地中相对丰度较高,而放线菌门在 AM 样地 中相对丰度较高。

2.4 原核生物的分子生态网络结构分析

基于 RMT 算法,利用高通量测序数据构建分子生态网络,比较两种草甸类型土壤原核生物网络联系上的差异,研究它们之间的网络互作关系,网络的拓扑性质见表4。构建的两种草甸类型的网络具有相同的阈值(0.890),且均体现了网络的无尺度特征、小世界特征以及模块化特征。ASM 的网络包含 739 个节点和 986 个连接数,而 AM 网络包含 860 个节点和 884 个连接数(表4)。比较两个网络的拓扑性质,ASM 具有较高的连通性和平均聚集系数,而 AM 具有较长的平均距离和较高的模块性。

模块枢纽和连接节点是网络联系中的两大重要节 点。从图 3 可以看出, ASM 含有 6 个模块枢纽, 其中, 4 个模块枢纽属于变形菌门, 1 个属于绿弯菌门以及 1 个 属于浮霉菌门。而 AM 含有 5 个模块枢纽, 2 个属于放 线菌门, 1 个为变形菌门, 1 个为疣微菌门以及 1 个为 芽单胞菌门。ASM 含有 5 个连接节点, 而 AM 中不含连 接节点。

2.5 影响土壤原核生物群落组成的环境因素

采用典范对应分析(CCA)来探究与土壤原核生物 群落组成相关的环境因子。基于 VIF 检验,选择 7 个对 原核生物有显著作用的环境因子(土壤湿度、植物丰富 度、pH 值、AN、AP、SOC、NO₃-N)结合 OTUs 数据矩阵来 构建 CCA 模型(P < 0.05)。根据各环境因子在第一轴 的投影量显示,pH 值可能是影响原核生物群落组成的 主要因子,其次为土壤湿度(图 4)。

通过构建网络的方法进一步进行分析,比较原核生物群落组成与环境因子的联系紧密程度,结果显示,土壤 pH 值在所检测的环境因子中具有最高的连接数目, 再次表明了 pH 值在高寒草甸原核生物群落组成上产 生了极其重要的作用(图 5)。



图 1 土壤原核生物群落组成的除趋势对应分析(DCA)

Fig.1 Detrended correspondence analysis of soil prokaryotic community composition

ASM:高寒沼泽化草甸, Alpine swamp meadow; AM:高寒草甸, Alpine meadow

表 3 两种高寒草甸类型土壤原核生物群落组成差异性分析 Table 3 Dissimilarity test of prokaryotic community composition between two meadow types

不相似性检验 Dissimilarity test	$\delta/R/R^2$	Р
MRPP	δ=0.609	< 0.001
Anosim	R=0.588	< 0.001
Adonis	$R^2 = 0.183$	< 0.001





Fig. 2 Relative abundance in the major phyla of prokaryotic community composition

变形菌门, Proteobacteria;酸杆菌门, Acidobacteria;放线菌门, Actinobacteria;拟杆菌门, Bacteroidetes;疣微菌门, Verrucomicrobia; 浮霉菌门, Planctomycetes;厚壁菌门, Firmicutes;绿弯菌门, Chloroflexi;其他, Others;泉古菌门, Crenarchaeota;芽单胞菌 门, Gemmatimonadetes

表 4 两种草甸类型的原核生物网络关系的拓扑性质

Table 4 Topological properties of prokaryotic networks in two meadow types

拓扑性质 Topological properties	ASM	AM	拓扑性质 Topological properties	ASM	AM
阈值 Threshold	0.890	0.890	平均聚集系数 Average clustering coefficient	0.152	0.118
节点数 Total nodes	739	860	平均路径距离 Average path distance	7.785	9.911
连接数 Total links	968	884	连通性 Connectedness	0.309	0.158
平均连接度 Average degree	2.620	2.056	模块性 Modularity	0.805	0.931







图 4 原核生物群落与环境因子间的典范对应分析 (CCA) Fig. 4 Canonical correspondence analysis of prokaryotic community with environmental factors





 Fig.5 Network interactions between environmental factors and prokaryotic taxonomic community OTUs

 绿色的点表示与 pH 直接连接的 OTUs,蓝色的点表示与 pH 间接连接的 OTUs

3 讨论与结论

Illumina MiSeq 高通量测序技术的发展提供了一个强大的、高效的平台,可以帮助我们迅速和有效地确定

微生物的群落结构组成^[18]。近年来,越来越多的学者关注于土壤微生物优势菌群的研究,有学者认为,微生物群落的整体组成在不同生境中的差异可能较大,但优势菌群基本相似,如 Shen 等^[28]通过高通量测序技术对长白山地区土壤微生物的研究发现,变形菌门、酸杆菌门和疣微菌门是微生物主要类群,相对丰度分别为23.1%、20.8%和17.29%。Zhang等^[7]对高寒草甸演替过程中微生物群落变化进行了研究,结果表明酸杆菌门、变形菌门、放线菌门和浮霉菌门是优势菌群。本研究结果表明,两种草甸类型的原核生物多样性有显著差异,而变形菌门、放线菌门和拟杆菌门的是两种高寒草甸类型中相对丰度最高的重要细菌类群,在两个样地中相对丰度累计均超过79%。可以看出,土壤微生物优势菌群在不同土地类型和不同海拔梯度都具有一定的相似性,这可能是由于这些微生物类群种类最多、分布广,且个体小、扩散性强,易形成随机性和广泛性的分布特点^[29],除此之外,微生物生境特异性低,适应环境能力强可能也是一个重要因素^[30]。

分子生态网络作为一种功能强大的工具,可以提供不同物种之间复杂的生态相互作用的重要信息,并揭示微生物结构网络拓扑结构的变化^[31]。ASM 网络较短的平均路径距离和较高的连通性表明其土壤原核生物之间的相互作用比 AM 网络更复杂、更紧密。然而,较短的平均路径距离意味着局部的干扰可能会更快地传达到整个网络^[2,32],而紧密连接的群落可能对干扰更加敏感^[2],这意味着具有较长路径距离的 AM 网络较ASM 网络更加稳定。ASM 网络的模块枢纽种类较为单一,大部分 OTUs 属于变形菌门,而群落组成的单一化可能导致其联系较为紧密,对外界的抵抗能力反而较弱^[33]。此外,模块性的比较结果也证实了这一点。网络模块性作为网络系统对抗外界变化的抗性指征^[8],在 AM 样地中较高,在 ASM 样地中较低,说明 AM 网络在应对外界环境变化时将具有更高的抗性。

土壤 pH 值通常是影响微生物多样性的重要因子之一^[6],它与土壤微生物群落结构和组成有着极为紧密的关系,这种相互关系在在不同空间尺度的研究中都有报道,如 Shen 等^[6]发现土壤 pH 值是控制土壤微生物 多样性和群落组成的关键性因子,并指出 pH 值对微生物的分布普遍存在影响;张于光等^[34]认为 pH 值不仅 是影响土壤微生物群落结构的主要因素,而且影响了微生物的海拔分布格局。土壤 pH 值是一个复杂的环境 参数,有学者认为,土壤 pH 值之所以能对微生物的群落结构产生重要影响,可能与土壤 pH 值能够对土壤其 他因子的变化产生间接的影响有关^[35]。本研究中,CCA 和分子生态网络的分析结果均表明,pH 值是影响高 寒草甸土壤原核生物群落特征的主要因子。

青藏高原草地生态系统在全球气候变化中扮演着重要角色,对全球气候变化十分敏感。本文通过对青藏 高原特有的代表性的植被类型高寒沼泽化草甸和高寒草甸进行研究,分析其地下原核生物在全球气候变化下 的响应,以期为高寒草甸生态系统的保护性管理和应对气候变化提供一定的理论依据。

参考文献(References):

- [1] 张于光,周慧,丛静,李迪强.高黎贡山天然阔叶林的土壤微生物功能基因多样性.科学通报,2014,59(22):2197-2204.
- [2] 丁军军. 神农架森林土壤微生物沿海拔分布格局及形成机制[D]. 北京: 清华大学, 2016.
- [3] Zhang Y G, Cong J, Lu H, Deng Y, Liu X, Zhou J Z, Li D Q. Soil bacterial endemism and potential functional redundancy in natural broadleaf forest along a latitudinal gradient. Scientific Reports, 2016, 6: 28819.
- [4] Yang Y F, Gao Y, Wang S P, Xu D P, Yu H, Wu L W, Lin Q Y, Hu Y G, Li X Z, He Z L, Deng Y, Zhou J Z. The microbial gene diversity along an elevation gradient of the Tibetan grassland. ISME Journal, 2014, 8(2): 430-440.
- [5] Zhang Y G, Cong J, Lu H, Li G L, Xue Y D, Deng Y, Li H, Zhou J Z, Li D Q. Soil bacterial diversity patterns and drivers along an elevational gradient on Shennongjia Mountain, China. Microbial Biotechnology, 2015, 8(4): 739-746.
- [6] Shen C C, Xiong J B, Zhang H Y, Feng Y Z, Lin X G, Li X Y, Liang W J, Chu H Y. Soil pH drives the spatial distribution of bacterial communities along elevation on Changbai Mountain. Soil Biology and Biochemistry, 2013, 57: 204-211.
- [7] Zhang Y G, Liu X, Cong J, Lu H, Sheng Y Y, Wang X L, Li D Q, Liu X D, Yin H Q, Zhou J Z, Deng Y. The microbially mediated soil organic carbon loss under degenerative succession in an alpine meadow. Molecular Ecology, 2017, 26(14): 3676-3686.
- [8] Ding J J, Zhang Y G, Deng Y, Cong J, Lu H, Sun X, Yang C Y, Yuan T, van Nostrand J D, Li D Q, Zhou J Z, Yang Y F. Integrated metagenomics and network analysis of soil microbial community of the forest timberline. Scientific Reports, 2015, 5: 7994.

- [9] Walther G R, Post E, Convey P, Menzel A, Parmesan C, Beebee T J C, Fromentin J M, Hoegh-Guldberg O, Bairlein F. Ecological responses to recent climate change. Nature, 2002, 416(6879): 389-395.
- [10] 王俊峰,吴青柏.青藏高原沼泽草甸区植被退化对浅层寒冻土壤环境的影响.兰州大学学报:自然科学版, 2011, 47(6): 39-45.
- [11] 郭正刚, 程国栋, 王根绪. 青藏高原北部高海拔地区嵩草草甸植物多样性分析. 冰川冻土, 2004, 26(1): 95-100.
- [12] Bardgett R D, Kandeler E, Tscherko D, Hobbs P J, Bezemer T M, Jones T H, Thompson L J. Below-Ground Microbial Community Development in a High Temperature World. Oikos, 1999, 85(2): 193-203.
- [13] Gao Q Z, Wan Y F, Xu H M, Li Y, Jiangcun W Z, Borjigidai A. Alpine grassland degradation index and its response to recent climate variability in Northern Tibet, China. Quaternary International, 2010, 226(1/2): 143-150.
- [14] 李娜, 王根绪, 杨燕, 高永恒, 柳林安, 刘光生. 短期增温对青藏高原高寒草甸植物群落结构和生物量的影响. 生态学报, 2011, 31(4): 895-905.
- [15] Gao Y H, Zhou X, Wang Q, Wang C Z, Zhan Z M, Chen L F, Yan J X, Qu R. Vegetation net primary productivity and its response to climate change during 2001-2008 in the Tibetan Plateau. Science of the Total Environment, 2013, 444: 356-362.
- [16] Chen B X, Zhang X Z, Tao J, Wu J S, Wang J S, Shi P L, Zhang Y J, Yu C Q. The impact of climate change and anthropogenic activities on alpine grassland over the Qinghai-Tibet Plateau. Agricultural and Forest Meteorology, 2014, 189-190: 11-18.
- [17] Peng F, Xue X, You Q G, Xu M H, Chen X, Guo J, Wang T. Intensified plant N and C pool with more available nitrogen under experimental warming in an alpine meadow ecosystem. Ecology and Evolution, 2016, 6(23): 8546-8555.
- [18] Li L, Zhu B, Chen C R, Zhang Z H, Wang Q B, He J S. Precipitation overrides warming in mediating soil nitrogen pools in an alpine grassland ecosystem on the Tibetan Plateau. Scientific Reports, 2016, 6: 31438.
- [19] 牛世全,龙洋,李海云,达文燕,胡山,李渭娟,朱学泰,孔维宝.应用 Illumina MiSeq 高通量测序技术分析河西走廊地区盐碱土壤微生物多样性.微生物学通报,2017,44(9):2067-2078.
- [20] Deng Y, Jiang Y H, Yang Y F, Yang Y F, He Z L, Luo F, Zhou J Z. Molecular ecological network analyses. BMC Bioinformatics, 2012, 13: 113.
- [21] 卢慧, 丛静, 刘晓, 王秀磊, 唐军, 李迪强, 张于光. 三江源区高寒草甸植物多样性的海拔分布格局. 草业学报, 2015, 24(7): 197-204.
- [22] 鲍士旦. 土壤农化分析. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [23] Zhou J Z, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(2): 316-322.
- [24] Caporaso J G, Lauber C L, Walters W A, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, Owens S M, Betley J, Fraser L, Bauer M, Gormley N, Gilbert J A, Smith G, Knight R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. ISME Journal, 2012, 6 (8): 1621-1624.
- [25] Magoč T, Salzberg S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [26] Edgar R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics, 2010, 26(19): 2460-2461.
- [27] Maidak B L, Cole J R, Lilburn T G, Parker Jr C T, Saxman P R, Farris R J, Garrity G M, Olsen G J, Schmidt T M, Tiedje J M. The RDP-II (Ribosomal Database Project). Nucleic Acids Research, 2001, 29(1): 173-174.
- [28] Shen C C, Shi Y, Ni Y Y, Deng Y, van Nostrand J D, He Z L, Zhou J Z, Chu H Y. Dramatic increases of soil microbial functional gene diversity at the treeline ecotone of Changbai Mountain. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1184.
- [29] 贺纪正, 葛源. 土壤微生物生物地理学研究进展. 生态学报, 2008, 28(11): 5571-5582.
- [30] Horner-Devine M C, Lage M, Hughes J B, Bohannan B J M. A taxa-area relationship for bacteria. Nature, 2004, 432(7018): 750-753.
- [31] Deng Y, He Z L, Xiong J B, Yu H, Xu M Y, Hobbie S E, Reich P B, Schadt C W, Kent A, Pendall E, Wallenstein M, Zhou J Z. Elevated carbon dioxide accelerates the spatial turnover of soil microbial communities. Global Change Biology, 2016, 22(2): 957-964.
- [32] Barabási A L, Oltvai Z N. Network biology: understanding the cell's functional organization. Nature Reviews Genetics, 2004, 5(2): 101-113.
- [33] Cornwell W K, Schwilk L D W, Ackerly D D. A trait-based test for habitat filtering: convex hull volume. Ecology, 2006, 87(6): 1465-1471.
- [34] 张于光, 宿秀江, 丛静, 陈展, 卢慧, 刘敏超, 李迪强. 神农架土壤微生物群落的海拔梯度变化. 林业科学, 2014, 50(9): 161-166.
- [35] Xiong J B, Liu Y Q, Lin X G, Zhang H Y, Zeng J, Hou J Z, Yang Y P, Yao T D, Knight R, Chu H Y. Geographic distance and pH drive bacterial distribution in alkaline lake sediments across Tibetan Plateau. Environmental Microbiology, 2012, 14(9): 2457-2466.