

冻融末期亚高山/高山森林土壤有机层细菌多样性

王 奥 张 健 杨万勤 吴福忠 刘 利 谭 波

(四川农业大学林业生态工程重点实验室)

摘要:为了解季节性融冻末期亚高山/高山森林生态系统土壤有机层细菌多样性特征,应用 DGGE 方法研究了川西亚高山/高山地区 4 个典型森林群落(冷杉原始林、冷杉次生林、20 年生粗枝云杉人工林、15 年生粗枝云杉人工林)土壤冻融末期土壤有机层(OL)和矿质土壤层(MS)的细菌多样性。采用化学裂解法提取土壤有机层和矿质土壤层样品总 DNA 获得了很好的效果,纯化后的总 DNA 经降落式 PCR 扩增得到高特异性 16S rDNA V3 区片段。样品 PCR 扩增产物经 DGGE 分离得到大量条带,不同样品间分离所得条带的强度和位置均有差异,表明研究样地在冻融末期具有一定的细菌群落多样性。并且 OL 细菌群落结构的相似性、Shannon-Wiener 物种丰富度指数和 Simpson 物种优势度指数随其土壤层次和森林类型的变化而变化,表明冻融末期强烈的环境变化极大地影响了土壤细菌群落结构。另外,将研究地 4 个样点土壤有机层细菌 10 个特有条带进行克隆和序列测定,结果显示了耐低温、温度敏感和非敏感优势细菌群落。这些结果表明:冻融末期温度驱动的环境变化深刻影响了亚高山/高山森林 OL 细菌群落多样性。

关键词:亚高山/高山森林;土壤有机层;细菌多样性;DGGE

中图分类号:S714.3 文献标志码:A 文章编号:1000-1522(2010)04-0144-06

WANG Ao; ZHANG Jian; YANG Wan-qin; WU Fu-zhong; LIU Li; TAN Bo. **Bacterial diversity in organic soil layers of subalpine and alpine forests at the end of freeze-thaw periods.** *Journal of Beijing Forestry University*(2010)32(4) 144-150 [Ch, 26 ref.] Sichuan Provincial Key Laboratory of Ecological Forestry Engineering, Sichuan Agriculture University, Ya'an, 625014, P. R. China.

With the use of a denature gradient gel electrophoresis (DGGE) method, we investigated the bacterial diversity in both organic soil (OL) and mineral soil (MS) layers at the end of freeze-thaw periods in four typical forests, i. e. a primary fir (*Abies faxoniana*) forest, a secondary fir forest, a 20-year-old spruce (*Picea asperata*) plantation and a 15-year-old spruce plantation in the subalpine and alpine regions of western Sichuan Province. The bacterial DNA of the soil was extracted after chemical breakage. High specific V3 fragments of 16S rDNA were obtained from purified DNA by a touch-down PCR technique. A large number of bands were observed on the DGGE gel, with different intensities and distances among samples, indicating high bacterial diversity of the OL in the four forests after a seasonal freeze-thaw period. Species similarity, Shannon-Wiener richness and Simpson dominance indices of bacterial communities in the OL varied greatly with soil thickness and elevation. These three indices varied only slightly in the MS. As well, low-temperature resistance, temperature sensitive and non-temperature sensitive bacterial clones were observed based on the clones and DNA sequence analyses for 10 specific bands. These results suggested that the changes in the environment driven by temperature variation had strong effects on the diversity of bacterial communities of the OL at the end of the freeze-thaw period, which provides sufficient evidence for the understanding of soil ecological processes during

收稿日期:2009-10-23

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)、“十一五”国家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项目(07ZQ026-022)、四川高等学校科技创新重大培育计划项目(2007ZZ024、09ZZ023)。

第一作者:王奥, 博士生。主要研究方向:土壤生态学。电话:0835-2882132 Email:wangaocn@yahoo.com 地址:625014 四川省雅安市新康路 46 号四川农业大学林业生态工程重点实验室。

责任作者:杨万勤, 教授, 博士生导师。主要研究方向:土壤生态学。电话:0835-2882132 Email:scyangwq@163.com 地址:同上。
本刊网址: <http://www.bjfujournal.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

freeze-thaw seasons.

Key words subalpine-alpine forest; organic soil layer; bacterial diversity; DGGE

微生物多样性在森林生态系统土壤形成、地力维持以及物质循环和能量流动等方面具有十分重要且不可替代的作用,但易受环境变化的影响^[1-4]。温度引起的土壤冻融变化常常是影响高纬度和高海拔地区最为显著的环境变化,可能是影响微生物群落结构的重要原因^[5]。已有研究表明,冻结期和非冻结期的微生物群落结构具有显著的差异^[6]。由于细菌具有相对较强的抗寒性,被认为是冻结期微生物群落的主体^[6]。随着温度的升高、冻结土壤融化以及冻结末期频繁的水热动态可能改变细菌群落结构。更为重要的是,漫长冬季的冻融过程通过破坏凋落物、土壤团粒的物理结构以及杀死其他微生物等为冻融末期细菌群落提供了丰富可利用的底物^[7]。这些过程意味着冻融末期细菌群落可能对养分循环、能量流动等生态学过程有着关键的作用,并直接作用于即将开始的植物生长,但一直缺乏相关的研究。

川西亚高山/高山森林位于青藏高原东缘和长江上游地区^[8],在水源涵养、水土保持、生物多样性保育、全球碳循环等方面具有十分重要的作用和地位^[4,9]。受地形地貌、低温和频繁山地灾害的影响,该区土壤发育经常受阻,土层薄弱,但具有较厚的有机层^[10],其在维持生态系统的结构和功能中具有十分重要的作用^[11]。然而,迄今的研究并没有关注到该区长达5个多月的季节性冻融末期土壤有机层动态变化特征,更没有注意到对冻融末期生态系统过

程起到关键作用的细菌群落结构。因此,以该区4个典型森林群落为研究对象,采用变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)方法同步研究土壤有机层(Organic soil layer, OL)冻融末期的细菌多样性,了解季节性融冻末期亚高山/高山典型森林土壤OL细菌多样性特征,以期为深入理解亚高山/高山森林生态系统过程提供基础数据。

1 研究区概况与研究方法

1.1 研究区概况

研究区域位于四川省理县毕棚沟(102°53'~102°57'E, 31°14'~31°19'N),地处青藏高原东缘和长江上游,年降雨量约850 mm,年平均气温2~4℃,最高气温23℃,最低气温-18℃,土壤冻结时间长达5~6月。主要植被类型为针阔混交林和针叶林,主要森林树种包括岷江柏(*Cupressus chenegiana*)、落叶松(*Larix potaninii*)、岷江冷杉(*Abies faxoniana*)、紫果云杉(*Picea purpuea*)、川西云杉(*P. likangensis* var. *balfouriana*)、红桦(*Betula albo-sinensis*)、白桦(*B. platyphylla*)、领春木(*Euptelea pleiospermum*)、珙桐(*Davidia involucrata*)、连香树(*Cercidiphyllum japonicum*)等。选择4个典型样地分别为冷杉原始林(F1)、冷杉次生林(F2)、20年生粗枝云杉人工林(F3)和15年生粗枝云杉人工林(F4),样地基本特征如表1所示。

表1 研究样地的植物组成和土壤基本特征
Tab.1 Vegetation and soil characteristics in the plots

样地	海拔/m	植被	土壤基本特征
F1	3 600	乔木层植物为冷杉、高山落叶松,林下植物稀少,以高山杜鹃(<i>Rhododendron delavayi</i>)和小檗(<i>Berberis</i> spp.)为主,地被物为苔藓和地衣	土壤为雏形土,土体为A-C结构,枯枝落叶层约15 cm,土层浅薄,腐殖质层约10~15 cm,微酸性
F2	3 300	冷杉、红桦,林下植物以箭竹(<i>Fargesia spathacea</i>)为主	土壤为雏形土,土体为A-C结构,枯枝落叶层约12 cm,土层浅薄,腐殖质层约15~18 cm,微酸性
F3	3 000	粗枝云杉(<i>Picea asperata</i>)为主,林下植物以小檗为主,地被物以禾草(<i>Agrostis</i>)类、莎草(<i>Cyperes</i>)类植物为主	冲积土,土体为A-B-C结构,枯枝落叶层约5 cm,腐殖质层约20 cm,微酸性
F4	2 700	粗枝云杉为主,林下植物以高山柳(<i>Salix</i> spp.)为主,地被物以禾草类、莎草类植物为主	淋溶土,土体为A-B-C结构,枯枝落叶层约2 cm,腐殖质层约15 cm,酸性

1.2 样品采集

2008年3月分别在固定样地内5 cm处处理一个纽扣式温度记录器(iButton DS1923-F5, Maxim Com. USA),设定为每小时记录一次数据,4个样地在2008年3月15日—4月15日融冻末期详细记录

了每小时的温度变化特征(图1)。

于2008年4月10日冻融末期,在4个样地随机挖取5个土壤剖面,按半分解层(freshly litter layer, FL)、分解层(humified litter layer, HL)和矿质土壤层(mineral soil layer, MS)分别采集样品^[12]。

将多点采集的样品分层混合,低温保存运回实验室

立即分析。

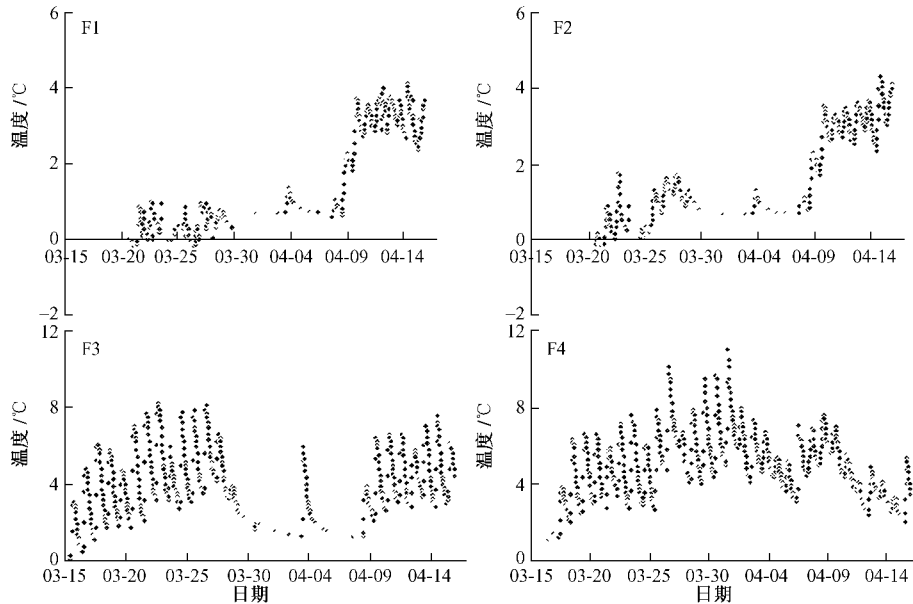


图 1 川西亚高山/高山冻融末期不同林型土壤温度动态变化

Fig. 1 Soil temperature dynamics of subalpine-alpine forests in western Sichuan Province

1.3 土壤总 DNA 的提取及细菌 16S rDNA V3 区扩增

采用 Zhou 等^[13]提取方法:取 5.0 g OL 或 MS 样品,加入 13.5 mL 提取缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 100 mmol/L Na EDTA (pH8.0), 100 mmol/L 磷酸钠 (pH8.0), 1.5 mol/L NaCl, 1% CTAB), 50 μ L 蛋白酶 K (20 mg/mL)。在 37 $^{\circ}$ C、225 r/min 振荡 30 min;加入 1.5 mL 20% SDS 65 $^{\circ}$ C 水浴 2 h;然后经 V(氯仿):V(异戊醇) = 24:1 抽提,0.6 倍异丙醇沉淀,即得到样品总 DNA,用 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

细菌 16S rDNA V3 区的引物对为 341f 和 534r,扩增产物长度约 200 bp,其中 341f 的 5'端含有 1 个约 40 bp 的 GC 夹子。经过琼脂糖凝胶电泳回收纯化后的总 DNA 10 ~ 100 ng 作模板,在 Bio-Rad iCycle PCR 仪中进行 PCR 扩增反应。反应条件为:预变性 94 $^{\circ}$ C、5 min;前 20 个循环为 94 $^{\circ}$ C、1 min, 65 ~ 55 $^{\circ}$ C、1 min 和 72 $^{\circ}$ C、1 min(每个循环后退火温度下降 0.5 $^{\circ}$ C),后 10 个循环为 94 $^{\circ}$ C、1 min, 55 $^{\circ}$ C、1 min 和 72 $^{\circ}$ C、1 min;最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min^[14-15]。产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,所用 rTaq 酶等购于北京天根(TIANGEN)公司。

1.4 变性梯度凝胶电泳

采用 Dcode system (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA)对 PCR 产物进行电泳分离。变性剂浓度为 35% ~ 65% 在 100 V 60 $^{\circ}$ C 下电泳 16 h。电泳结束后用硝酸银染色^[16],由 GS-800 光密度仪成像,采用 Quantity One 4.62 软件对条带图谱进行分析。

1.5 DGGE 图谱及条带序列分析

DGGE 凝胶上的每一个条带都代表一个单独的序列类型或系统发育类型^[17]。根据条带的出现或消失来建立二元矩阵,经 NTSYS 软件计算得出 Jaccard 系数,并采用 UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic averages)方法进行聚类分析。通过条带的相对位置和相对强度计算 Shannon-Wiener 指数(H)和 Simpson 指数(D)^[18]来评价样品中微生物的多样性。

$$H = - \sum_{i=1}^s P_i \ln P_i$$

$$D = \sum_{i=1}^n P_i^2$$

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

将 DGGE 凝胶中切割的优势条带再次进行 PCR 扩增、DGGE 纯化、验证后,用不含 GC 夹子的引物扩增后送上海英骏生物技术有限公司进行序列测定。得到的序列提交至 GenBank 并进行 BLAST 分析,采用 Clustal X 软件包进行聚类分析,用 MEGA 4.0 软件包以邻接法 (neighbor-join method, NJ) 构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 总 DNA 及 PCR 产物

提取得到的部分样品总 DNA 凝胶电泳图,电泳采用 Ferment λ DNA (*Hind* III 和 *Eco*I) Marker,其最

大片段为 21 kb(图 2a)。16S rDNA V3 区 PCR 扩增产物,采用 TIANGEN D 2000 DNA Marker,最小片段为 100 bp(图 2b)。

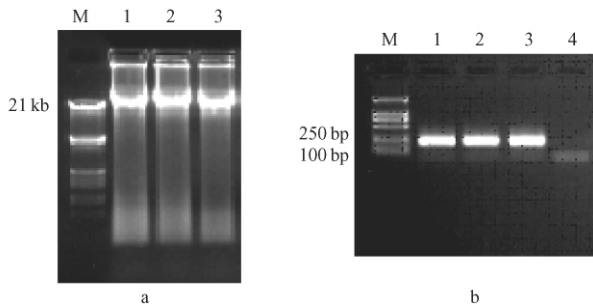


图 2 3 种样品的总 DNA(a) 及 16S rDNA V3 区 PCR 产物电泳图(b)

Fig.2 Agarose electrophoresis of total DNA (a) and V3 region fragment of 16S rDNA of 3 types of samples

注: 1. FL; 2. HL; 3. MS; 4. 空白; M. (a) λDNA (*Hind* III digest) marker; (b) TIANGEN D2 000 marker.

采用经典化学裂解方法提取得到的总 DNA 片段大小集中 (>21 kb), 无明显剪切作用。采用的分子量标准为 TIANGEN D 2 000 DNA Marker, 16S rDNA V3 区片段琼脂糖凝胶电泳图, 可以看出, 采用降落式 PCR (Touch-down PCR) 扩增的产物片段大小均一, 特异性高, 阴性对照无扩增产物, 适合进行 DGGE 分析(图 2b)。

2.2 细菌群落 DGGE 图谱和相似度

经 PCR 扩增得到的 16S rDNA V3 区片段在 DGGE 凝胶上得到良好的分离, 样品 PCR 扩增产物经 DGGE 分离得到大量条带, 不同样品间分离所得条带的强度和迁移位置都有所不同(图 3)。凝胶图像经 Quantity One 4.62 分析得出: F4 条带平均数量为 65, FL > HL > MS; F3 为 71, HL > FL > MS; F2 为 67, HL > MS > FL; F1 为 58, MS > HL > FL。

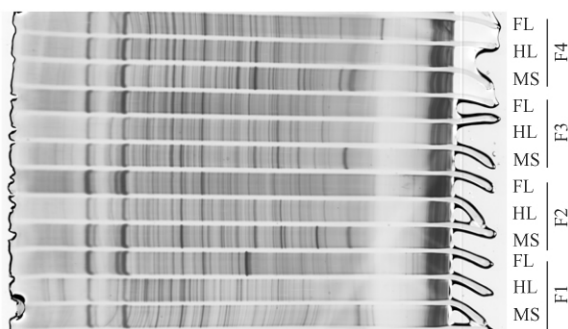


图 3 样品中细菌 16S rDNA V3 区片段的 DGGE 图谱

Fig.3 DGGE pattern of bacterial 16S rDNA V3 region of samples

通过 UPGMA 方法对样品 DGGE 图谱进行聚类

分析显示, FL 和 HL 以及 FL 和 MS 之间的细菌群落相似度以 F3 最大, F1 最小, HL 和 MS 的细菌群落相似度以 F1 最小。F3 和 F4 的 OL (FL 和 HL) 细菌群落相似度大, 而 F1 和 F2 中 OL 内细菌群落相似度小(图 4)。

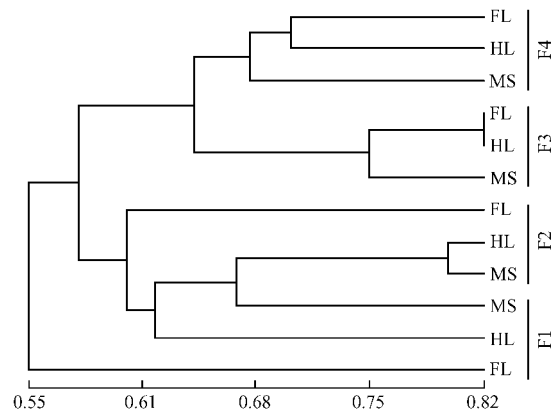


图 4 DGGE 条带的聚类分析图

Fig.4 Cluster analysis based on DGGE bands

2.3 土壤细菌多样性

土壤有机层中 FL 的 Shannon-Wiener 指数为: F3 > F4 > F2 > F1; HL 为 F3 > F2 > F4 > F1。然而 Simpson 指数 FL 为 F1 > F2 > F3 > F4; HL 为 F1 > F4 > F2 > F3。各森林群落间 MS 层细菌多样性指数差异相对较小(图 5)。

2.4 土壤细菌的优势类群

FL 层和 HL 层的样品 16S rDNA V3 区片段经过 DGGE 分离、软件识别, 最后确定了 10 个优势条带, 分别为 Band1 ~ Band10, 如表 2 所示。其中 F1、F3 和 F4 都有 1 个特有条带。将 10 个条带进行克隆和序列测定后, 提交至 GenBank, 序列号为 FJ379575-FJ379584。将所得的序列在 NCBI 网站进行 Blast 分析, 结果表明: 除 Band1 以外, 其余 9 个序列与已知序列的相似度均高于或等于 97%, GenBank 相似序列都来自土壤环境(表 2)。Band5、Band10 为 F4 处 FL 层特有条带, Band8 是 F1 处的特有且最为优势的条带。其余条带同时存在于至少两个森林群落土壤样品中。

Band1 系统发生关系最近的是未经鉴定的细菌克隆, 同源性为 96%。其余都为已鉴定的物种。但和 Band2、3、4、8 同源性最高的序列却分属于厚壁菌门 (Firmicutes), 变形细菌门 (Proteobacteria) 和酸杆菌门 (Acidobacteria), 且同源性都为 100%。Band6、10 与绿弯菌门 (Chloroflexi), Band7 与蓝细菌 (Cyanobacterium) 和脱铁杆菌目 (Deferribacterales) 同源性高。Band5、9 都与变形细菌门 (Proteobacteria) 同源性高(表 2)。

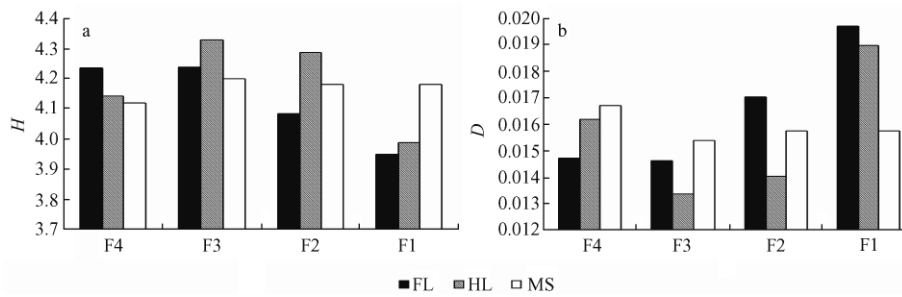


图 5 不同森林土壤有机层细菌群落 Shannon-Wiener 指数 (a) 和 Simpson 指数 (b) 的变化

Fig. 5 Changes of Shannon-Wiener index (a) and Simpson index (b) in organic soil layers of different forests

表 2 不同森林土壤半分解层 (FL)、分解层 (HL) 优势菌群特征

Tab. 2 Characteristics of dominant bacteria in soil FL and HL layers of different forests

条带编号	森林群落	最相似的物种 (16S rRNA Acc. No)	同源性 / %
Band1	F1、F2	Unidentified Bacterium clone EF606040	96
Band2	F2、F3	Uncultured Firmicutes bacterium EF664019	100
		Uncultured Proteobacterium EU299664	100
		Uncultured Actinobacterium EF664912	100
Band3	F2、F3	Uncultured Firmicutes bacterium EU298246	100
Band4	F2、F3、F4	Uncultured Firmicutes bacterium EU300522	100
		Uncultured Actinobacterium EU300624	100
Band5	F4	Uncultured Bacterium AJ009455	98
Band6	F1、F2、F3、F4	Uncultured Chloroflexi bacterium EU297607	97
Band7	F1、F2、F3	Uncultured Cyanobacterium EF662441	98
		Uncultured Deferribacterales bacterium AM501723	98
		Uncultured Firmicutes bacterium EU300092	98
Band8	F1	Uncultured Proteobacterium EF663945	98
		Uncultured Acidobacteria bacterium EU122927	98
Band9	F1、F2、F3、F4	Uncultured Proteobacterium EU299390	97
Band10	F4	Uncultured Chloroflexi bacterium AY922012	100

由系统发育分析结果可以得出,各森林群落土壤 FL 层中的优势菌群可以分为 6 类:Band2、3、4、8 为一类,Band6、10 为一类,其余各自为一类。2 700 m FL 层的优势种群是以 Group 6 所代表的细菌为主,3 000 和 3 300 m 样地是 Group 1,3 600 m 是 Band8 所代表的一类细菌为主(图 6)。

3 结论与讨论

冻融末期土壤有机层细菌群落结构对于深入了解高山/亚高山森林群落生长季节前期生态学过程具有重要意义。通过 PCR-DGGE 方法对典型亚高山/高山森林土壤有机层群落多样性的研究表明,冻融末期土壤有机层具有相对丰富的细菌群落类型,并随着森林群落和土壤层次的变化而变化。这表明冻融末期丰富的细菌种群参与并可能主导了这一时期土壤的营养循环、能量流动等过程,为即将来临的植物生长季节提供重要的物质基础,而且也暗示着冻融末期温度驱动的环境变化(如海拔梯度上水热差异)对土壤细菌群落结构具有重要的影响。

首先,从样品中提取高质量的总 DNA 以及良好的 PCR 扩增是后续分析的基础。Frostegard 等^[19]研

究发现,不同的 DNA 提取方法会影响微生物群落分析,相关研究也认为总 DNA 的提取方法应因样品而异^[20-21]。物理裂解为主的 Bead-beating 方法是极具代表性的提取方法,但往往会造成大量片段的断裂^[22]。本研究采用经典化学裂解方法提取得到的总 DNA 片段大小集中(>21 kb),无明显剪切作用。可见,对于川西亚高山/高山森林土壤样品,采用化学裂解方法能够有效提取细菌 DNA。其次, DGGE 凝胶中每一个条带代表了一种或一类微生物,因而能够直观反映微生物物种的多样性,而条带强度和位置的不同反映出样品中细菌群落的结构及不同样品间的差异^[17]。本研究中,PCR 扩增得到的 16S rDNA V3 区片段在 DGGE 凝胶上得到良好的分离,样品 PCR 扩增产物经 DGGE 分离得到大量条带,不同样品间分离所得条带的强度和位置都有所不同,这充分表明了冻融末期较高的细菌多样性及其对环境变化的响应。从凝胶图像经 Quantity One 4.62 分析也可以得出相同的结论。一般地,温度常常是限制高山/亚高山森林土壤细菌群落生长的主要因子。虽然研究期间 F3 和 F4 森林群落土壤温度显著大于 F1 和 F2(图 1),但各森林群落条带平

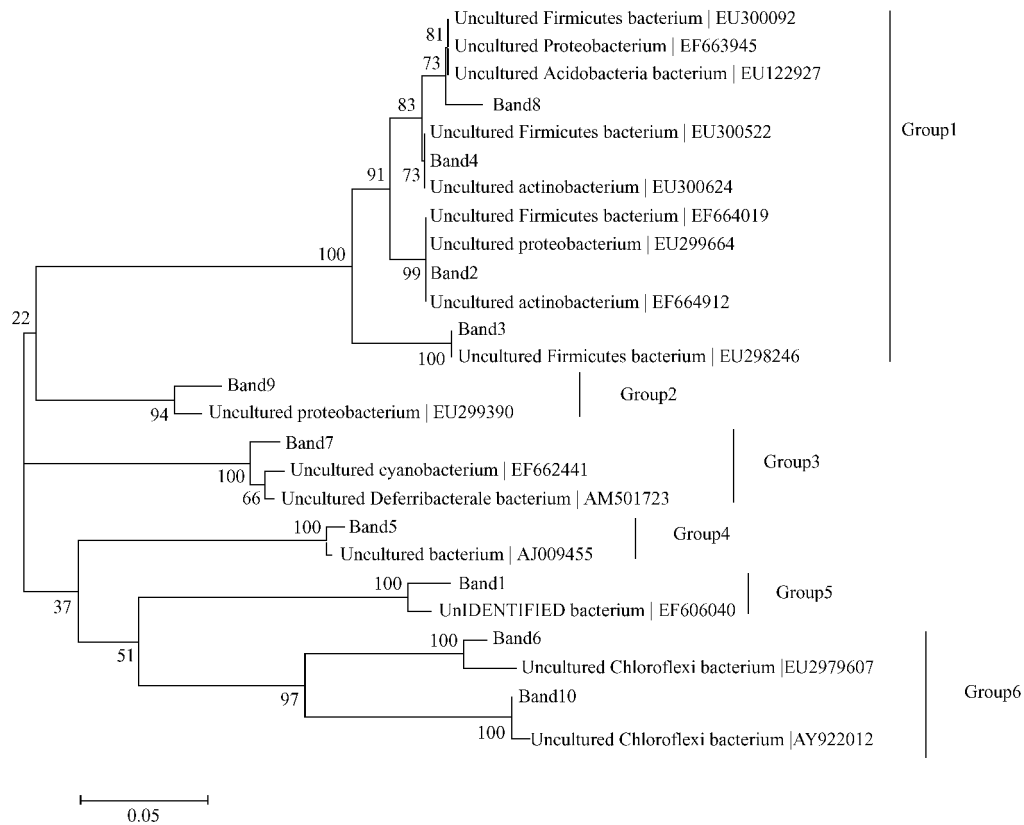


图 6 不同海拔森林土壤 HL、FL 优势菌系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of dominant bacteria in soil FL and HL layers of different forests

均数量差别相对较小。并且从条带数量的分布来看, F3 和 F4 森林群落 OL 条带数量均大于 MS, 而随着温度的增加, F2 表现为 HL > MS > FL, F1 表现为 MS > HL > FL。此外, UPGMA 方法对样品 DGGE 图谱进行聚类分析表明, F3 和 F4 的 OL (FL 和 HL) 内细菌群落相似度高, 而 F1 和 F2 中 OL 内细菌群落相似度差异大, 也进一步说明在土壤温度较低的森林系统中敏感的土壤细菌群落对环境变化有更强烈的响应, 而在土壤温度较高的森林系统中土壤对环境具有较强的缓冲能力。

多样性指数是反应森林群落土壤细菌多样性的直接指标。本项研究结果表明, FL 的 Shannon-Wiener 指数为: F3 > F4 > F2 > F1, HL 为 F3 > F2 > F4 > F1, 这与不同海拔梯度上温度的变化有关, 而 F4 由于造林时间较短, 在调查取样中发现 OL 层浅薄并不具有明显的分层, 因而呈现出不同的变化规律。同样地, 除 F4 外, 其他 3 个森林系统的细菌 Shannon-Wiener 指数均以 HL 高于 FL, 这是因为不同微生物在凋落物分解中的作用不同, 土壤真菌主要对凋落物进行破碎, 而土壤细菌则在最后的有机养分无机化中起主导作用^[23-24]。FL 以由菌丝和细根的中度到强度的成片段的凋落物构成, HL 则主要是由腐殖化的无定形凋落物构成, 可能含有更多可

供细菌利用的底物, 两个层次化学物质组成具有较大差异^[12], 因而 HL 表现出相对较高的相似指数。而 Simpson 指数的变化说明受低温的影响, 在高海拔地区仅适合耐寒性较强的微生物种群生存, 因而优势种群较为突出。然而, 除温度因子外, 植被也是影响微生物分布的重要因素, 通过凋落物效应和根际效应在很大程度上影响土壤微生物群落的分布^[12, 25-26]。高海拔森林长期受低温限制, 微生物的活性较低, 其凋落物分解速度也相对较慢, 具有较厚的有机层^[11], 也可能是导致不同海拔梯度上森林系统土壤微生物多样性变化的重要原因。

尽管 PCR 扩增选取的目的片段长度与获得的系统发育信息密切相关, 但通过系统发育分析, 得出了这些优势种群分属的类群, 为后续深入研究提供了基础。通过对 OL 样品 16S rDNA V3 区片段经过 DGGE 分离、软件识别, 对最后确定的 10 个优势条带进行克隆和序列测定。结果表明, Band1 系统发生关系最近的是未经鉴定的细菌克隆, Band8 所代表的酸杆菌门可能为对低温较为敏感的类群, 其仅见于 F1 和 F2 森林群落; 而 Band5 变形细菌门和 Band10 绿弯菌门可能为耐低温类群, 其仅见于 F4 森林群落; Band4 变形细菌门、Band6 绿弯菌门和 Band9 变形细菌门可能为对温度敏感性较低的类

群,其在4个森林群落中均有发现。这些结果为进一步研究冻融末期以及冻结期高山/亚高山森林群落过程提供了必要的基础。

综上所述,化学裂解法能有效提取土壤有机层和矿质土壤层样品总DNA,总DNA经纯化和降落式PCR扩增得到高特异性的16S rDNA V3区片段。在亚高山/高山森林区,土壤冻融末期的土壤有机层具有较高的细菌多样性,且不同森林类型的细菌群落结构存在较大差异。受温度的影响,土壤温度较低的F1森林群落OL(FL和HL)的细菌物种多样性较低,但优势度较高。值得注意的是,尽管这些结果并没有说明冻融末期细菌群落对生态系统过程的具体贡献,但是这为深入认识和研究冻融末期以及冻结期细菌群落驱动的生态系统过程提供了重要基础数据,并为全球气候变化条件下细菌群落结构对温度变化的响应特征,进而改变系统结构和功能提供了很好的思路。

值得注意的是,其他相关测定方法如克隆文库虽然能更加全面地反映不同生境下土壤微生物生态,但是文库的构建及分析较为复杂、成本昂贵,不适合大量样品的研究;而DGGE技术以其快速、高通量的对微生物群落结构等进行研究而得到广泛使用。因此,二者的结合使用,可能很好地解决长期监测及深入研究的需要。

参 考 文 献

- [1] TAYLOR J P, WILSON B, MILLS M S, et al. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface and subsoils using various techniques [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2002, 34(3): 387-401.
- [2] YOUNG I M, CRAWFORD J W. Interactions and self-organization in the soil-microbe complex [J]. *Science*, 2004, 304: 1634-1637.
- [3] 姜成林,徐丽华.微生物多样性及其保育[J].生物多样性,1997,5(4):276-280.
- [4] 杨万勤,张健,胡庭兴.森林土壤生态学[M].成都:四川科学技术出版社,2006.
- [5] SCHADT C W, MARTIN A P, LIPSON D A, et al. Seasonal dynamics of previously unknown fungal lineages in tundra soils [J]. *Science*, 2003, 301: 1359-1361.
- [6] SCHIMEL J, BALSER T C, WALLENSTEIN M. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function [J]. *Ecology*, 2007, 88(6): 1386-1394.
- [7] SCHMIDT S K, LIPSON D A. Microbial growth under the snow: Implications for nutrient and allelochemical availability in temperate soils [J]. *Plant and Soil*, 2004, 259: 1-7.
- [8] 霍常富,程根伟,鲁旭阳,等.气候变化对贡嘎山森林原生演替影响的模拟研究[J].北京林业大学学报,2010,32(1):1-6.
- [9] 侯颖,王开运,张远彬,等.CO₂浓度和温度升高对川西亚高山红桦幼苗根系结构的影响[J].北京林业大学学报,2008,30(1):29-33.
- [10] 杨万勤,张健.土壤生态研究[M].成都:四川科学出版社,2008.
- [11] 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[J].应用与环境生物学报,2006,12(5):734-739.
- [12] 冯瑞芳,杨万勤,张健,等.模拟大气CO₂浓度和温度升高对亚高山冷杉(*Abies faxoniana*)林土壤酶活性的影响[J].生态学报,2007,27(10):4019-4026.
- [13] ZHOU J Z, BRUNS M A, TIEDJE J M. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2): 316-322.
- [14] DON R H, COX P T, WAINWRIGHT B J, et al. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification [J]. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19(14): 4008.
- [15] KOUSUKE I, MANABU F. Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 67(8): 3753-3755.
- [16] RADOJKOVICA D, KUSIC J. Silver staining of denaturing gradient gel electrophoresis gels [J]. *Clinical Chemistry*, 2000, 46: 883-884.
- [17] MUYZER G D E, WAAL E C, UITTERLINDEN A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695-700.
- [18] LUO H F, QI H Y, ZHANG H X. Assessment of the bacterial diversity in fenvalerate-treated soil [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2004, 20(5): 509-515.
- [19] FROSTEGARD A, COURTOIS S, RAMISSR V, et al. Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(12): 5409-5420.
- [20] KRESK M, WELLINGTON E M H. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 39(1): 1-16.
- [21] MARTIN-LAURENT F, PHILIPPOT L, HALLET S, et al. DNA extraction from soils: Old bias for new microbial diversity analysis methods [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(5): 2354-2359.
- [22] PICARD C, PONSONNET C, PAGET E, et al. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(9): 2717-2722.
- [23] 田兴军,立石贵浩.亚高山针叶林土壤动物和土壤微生物对针叶分解的作用[J].植物生态学报,2002,26(3):257-263.
- [24] 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[J].应用生态学报,2007,18(12):2889-2895.
- [25] 李璐滨,刘振静,庄彩云,等.应用DGGE技术分析青藏铁路沿线的土壤细菌种群多样性[J].生态学报,2008,27(5):751-755.
- [26] 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[J].生物多样性,2007,15(3):306-311.

(责任编辑 赵 勃)