

川西亚高山/高山森林土壤微生物 对季节性冻融的响应*

张丽¹ 杨万勤^{1**} 吴福忠¹ 徐振锋¹ 谭波¹ 刘洋¹ 王奥² 何伟¹

¹四川农业大学生态林业研究所, 林业生态工程重点实验室 成都 611130

²遵义市产品质量检验检测院 遵义 563000

摘要 通过研究川西亚高山/高山森林矿质土壤层微生物群落丰度和结构在季节性冻融期间的变化, 可为深入认识亚高山/高山森林冬季土壤生态过程提供理论依据. 于2009年8月至2010年8月, 在植物生长季节、土壤冻结阶段(包括土壤冻结期和土壤深冻期)和土壤融化阶段(包括土壤融冻期和土壤融化后期), 采用变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)和实时定量PCR技术同步研究不同海拔冷杉次生林(3 023 m)、天然混交林(3 298 m)和岷江冷杉原始林(3 582 m)矿质土壤层微生物类群的变化特征. 结果显示, 随着土壤冻结的开始, 土壤细菌数量显著降低($P < 0.05$), 而在随后的融化过程中又显著升高; 土壤真菌数量具有和细菌数量相似的变化趋势, 在融化阶段显著升高; 土壤古菌数量在土壤冻结阶段得到升高, 表现出与细菌数量相反的变化趋势. 并且, Shannon-Wiener指数(H')随森林类群的变化而变化, 在土壤冻结阶段, 细菌 H' 主要表现为3 582 m处 $<$ 3 298 m处 $<$ 3 023 m处, 古菌 H' 表现为3 298 m处 $<$ 3 023 m处 $<$ 3 582 m处, 真菌 H' 表现为3 023 m处 $<$ 3 582 m处 $<$ 3 298 m处; 而在土壤融化阶段3种菌落的 H' 均表现为3 582 m处 $<$ 3 023 m处 $<$ 3 298 m处. 综上, 季节性冻融期间强烈的环境变化极大地影响了土壤微生物群落的数量和结构, 但不同微生物类群在不同海拔表现出一定的差异. 图3 表1 参53

关键词 季节性冻融; 微生物数量; 微生物群落结构; 亚高山/高山森林; DGGE; 实时定量PCR

CLC S718.8

Soil microbe responses to seasonal freeze-thaw in the subalpine/alpine forests of western Sichuan*

ZHANG Li¹, YANG Wanqin^{1**}, WU Fuzhong¹, XU Zhenfeng¹, TAN Bo¹, LIU Yang¹, WANG Ao² & HE Wei¹

¹Key Laboratory of Forestry Ecological Engineering, Institute of Ecology & Forestry, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

²Institute of Product Quality Inspection & Testing of Zunyi, Zunyi 563000, China

Abstract Soil microbes are very sensitive to environmental changes. However, little information is available on soil microbial community during the seasonal freeze-thaw in the alpine forests. This paper aimed to determine the variations of the abundance and structure of microbial community in mineral soil (MS) at different altitudes over a freeze-thaw season in the typical subalpine/alpine forests of western Sichuan of China. PCR-DGGE and Real-time qPCR were used to measure the structure and abundance of soil microbial community, respectively, in three typical forests along an altitude gradient (3 023, 3 298 and 3 582 m). The results showed bacterial and fungal rDNA copy numbers decreased from growing season to freezing stage and then increased in the thawing stage. The archaeal rDNA copy numbers increased in the freezing stage. Similarly, the diversity of microbial community varied with seasonal freeze-thaw processes. Shannon-Wiener richness varied greatly with the elevation, with the bacterial H' of 3 582 m $<$ 3 298 m $<$ 3 023 m, archaeal H' of 3 298 m $<$ 3 023 m $<$ 3 582 m and fungal H' of 3 023 m $<$ 3 582 m $<$ 3 298 m during the soil freezing stage. In the soil thawing stage, the three microbial H' was 3 582 m $<$ 3 023 m $<$ 3 298 m. Our results suggested that the abundance and structure of soil microbial community in the coniferous forests varied by season. This may have important implications to understanding the winter time ecological process in soils.

Keywords seasonal freeze-thaw; microbial abundance; microbial community structure; subalpine/alpine forest; DGGE; Real-time PCR

收稿日期 Received: 2014-10-15 接受日期 Accepted: 2015-01-12

*国家自然科学基金项目(31170423, 31270498)、国家科技支撑计划课题(2011BAC09B05)、教育部博士点基金项目(20105103110002)和四川省杰出青年学术与技术带头人培育项目(2012JQ0059和2012JQ0008)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (31170423, 31270498), the National Key Technologies R & D Program of China (2011BAC09B05), the Ph.D. Programs Foundation of Ministry of Education of China (20105103110002), and the Cultivation Program of Sichuan Youth Sci-tech Foundation (2012JQ0059, 2012JQ0008)

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

土壤微生物群落是陆地生态系统中不可或缺的重要组成部分,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^[1-3]。温度是控制土壤微生物活性的一个重要环境因子^[4],温度引起的土壤冻融是高寒生态系统普遍存在的自然现象^[5]。前人研究认为,土壤冻结虽然导致土壤微生物大量死亡^[6-8],但土壤冻结后仍存在相当数量的微生物类群^[9-10],并参与到凋落物的分解中^[11-12],对下一个生长季节的植物生长与发育产生影响。海拔变化会导致冬季温度、降水及冻融特征等环境因子连续变化^[7,13],可能作用于土壤微生物活性,并进一步影响冬季土壤养分循环。已有的研究更加关注生长季节土壤微生物活性及其相关生态学过程^[14-15]。这不仅限制了冬季土壤生态过程的深入认识,也不利于进一步探讨高寒森林非生长季节与生长季节的生态联系。

川西亚高山/高山森林位于青藏高原东缘、长江上游地区,是我国西部林区的主体,在调节区域气候、水源涵养、水土保持和生物多样性保护等方面具有不可替代的作用和地位^[16]。相对于同纬度低海拔森林,该区域表现出明显的季节性冻结特征,土壤冻结时间长达5-6个月^[16],且由于气温降低常常是沿海拔自上而下的,因而季节性冻融特征也随海拔垂直分异连续变化^[17],这为研究中低纬度高海拔森林冬季土壤生态过程提供了理想的天然平台。前人的研究发现,该区域冬季仍存在一定活性的土壤微生物,土壤生态过程相对活跃^[18-20],而相对于土壤有机层直接应力的外界环境变化,矿质土壤层受环境的影响可能相对较小,季节性冻融期间土壤生态过程可能更为活跃,对维持生态系统结构和功能具有重要作用。因此,本研究以该区3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)和实时定量PCR(Real-time quantitative PCR, qPCR)的方法研究海拔梯度上不同关键时期矿质土壤层微生物群落结构及数量变化特征,以期为深入认识低纬度高海拔森林冬季土壤生态过程提供基础数据。

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自然保护区(E102°53′-102°57′, N31°14′-31°19′, 2 458-4 619 m a.s.l.),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℃(7月),最低气温-18℃(1月),土壤冻结时间长达5-6月。研究区域的主要森林植被类型为针叶林和针阔混交林,主要森林树种包括岷江冷杉(*Abies faxoniana*)、川西云杉(*Picea likiangensis* var. *balfouriana*)和红桦(*Betula albo-sinensis*)。林下灌木主要为箭竹(*Fargesia spathacea*)、高山杜鹃(*Rhododendron delavayi*)和三颗针(*Berberis julianae*)等;草本主要有蟹甲草(*Cacalia* spp.)、冷蕨(*Cystopteris montana*)、苔草属(*Carex* spp.)和莎草属(*Cyperus* spp.)等。研究区域土壤为雏形土^[21]。在研究区域内沿海拔跨度约300 m选取3个具有代表性的森林群落(3 023 m: 冷杉次生林; 3 298 m: 天然混交林; 3 582 m: 岷江冷杉原始林)作为研究样地。

1.2 样品采集

2009年8月1日分别在固定样地内土壤15 cm处埋设纽扣式温度记录器(DS1923-F5#, Maxim/Dallas semiconductor Inc., USA)连续监测土壤温度,设定为每60 min记录一次数据。3个样地在2009年8月至2010年7月温度变化特征如图1所示。

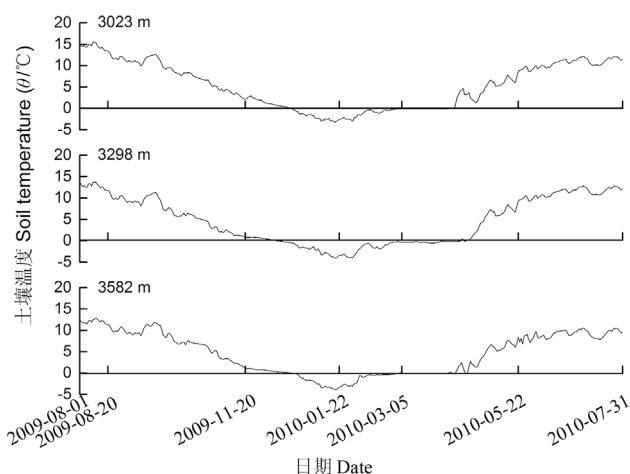


图1 不同海拔森林日均土壤温度动态变化(2009.08.01-2010.07.31)。3023 m: 冷杉次生林; 3298 m: 天然混交林; 3582 m: 岷江冷杉原始林。

Fig. 1 Dynamics of daily mean soil temperature in three forests at different altitudes from Aug. 1 2009 to Jul. 31 2010. 3023 m: Secondary fir forest; 3298 m: Fir-birch mixed forest; 3582 m: Primary conifer forest.

于2009年生长季节及2009-2010年季节性冻融期间采集土壤样品。基于前期监测^[22-23]及本次试验检测结果,具体采样时间分别为:植物生长季(8月20日, Growing season, GS)、土壤冻结阶段(11月20日, Freezing period, FP; 1月22日, Deeply frozen period, FPD)和土壤融化阶段(3月5日, Thawing period, TP; 5月22日, Later thawing period, TPL)。在样地内随机选取5个5 m × 5 m的均质样方,采集土壤矿质土壤层(15-30 cm)样品。每个海拔在不同采样季节多点采集样品后分别混合,除去可见的石块、根系后,装入无菌样品袋低温保存,即时运回实验室-20℃保存备用。

1.3 DNA提取纯化及rDNA基因的扩增

参照前人的研究方法^[24-25],对土壤总DNA进行提取与纯化。

细菌和古菌16S rDNA区的引物分别为341f、534r^[26]和Arch349F、Arch806R、Arch516F^[26-27],真菌ITS区域rDNA的引物为NS1、GCFung^[28-29],其中341f、Arch516F和GCFung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。

1.4 变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)

采用Dcode system(Bio-Rad laboratories, Hercules, CA)对PCR产物进行电泳分离。DGGE凝胶的浓度分别为:细菌10%、古菌10%和真菌6%。变性剂梯度分别为:细菌35%-65%、古菌30%-60%和真菌20%-55%。在100 V、60℃下分别

电泳16 h(细菌), 15 h(古菌)和12 h(真菌)。电泳结束后硝酸银染色^[30], 由GS-800光密度仪(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)成像。

1.5 DGGE条带分析

采用Quantity One 4.62软件对条带图谱进行分析。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, 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(C)来评价样品中微生物的多样性^[31-33]。

$$H = -\sum_{i=1}^S P_i \ln P_i \quad C = \sum_{i=1}^n P_i^2$$

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($S \geq n$), 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。

1.6 实时定量PCR

用于细菌和古菌16S rDNA基因扩增的引物分别为Eub338/Eub518^[26-34]和Arch349F/Arch806R^[27], 真菌ITS区域rDNA基因扩增的引物为5.8S/ITS1f^[35-36]。PCR反应在型号为CFX96(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)的仪器上运行。总反应体系为15 μ L, 其中包括7.5 μ L SsoFast™ EvaGreen Supermix(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA), 0.4 mg mL⁻¹牛血清蛋白, 200 nmol/L的引物及1 μ L DNA(1-10 ng)模板。

参照Wang的方法^[37], 对rDNA基因进行克隆, 同时绘制标准曲线。PCR反应效率和标准曲线的相关系数分别为: 细菌104.1%和 $r^2 = 0.995$, 古菌95.5%和 $r^2 = 1.000$, 真菌95.1%和 $r^2 = 0.997$ 。

qPCR反应在型号为CFX96(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)的仪器上运行。细菌和古菌16S rDNA基因扩增的引物分别为Eub338/Eub518^[26, 34]和Arch349F/Arch806R^[27], 真菌ITS区域rDNA基因扩增的引物为5.8S/ITS1f^[35-36]。每个土样重复3次, 并在扩增反应完成后, 加入熔解曲线分析以检验扩增产物的特异性(65-95 $^{\circ}$ C之间, 每秒上升0.5 $^{\circ}$ C并停留5 s后读数)。

1.7 统计分析

定量PCR扩增所得的不同微生物基因拷贝数经对数转换后进行统计分析, 数据分析采用SPSS18.0中的单因素方差分析(One-way ANOVA)和最小显著差异法(LSD)检验计算显著性差异($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 DGGE图谱分析

PCR扩增得到的rDNA片段经DGGE分离得到大量的条带, 且分离良好, 说明不同海拔森林群落土壤矿质层都具有比较丰富的微生物多样性(图2)。但不同样品DGGE分离所得条带的强度和迁移位置存在一定的差异, 说明同一海拔森林群落不同采样时期的土壤微生物类群和相对数量存在差异。

表1所示为不同海拔森林群落中土壤微生物群落不同关键时期的多样性指数。土壤细菌群落的多样性指数具有明

显的季节动态, 在冻结期有最低的 H 和最高的 C 。除3 023 m森林群落的细菌 H 在融化期有一个明显的降低外, 不同森林群落中细菌 H 在不同关键时期的变化是一致的, 表现为3 582 m处 $<$ 3 298 m处 $<$ 3 023 m处。3 023 m和3 582 m森林群落中, 古菌 H 在深冻期达到最高, 3 298 m森林群落古菌 H 在生长季节达到最高。不同关键时期的古菌 H 在不同森林群落间具有差异, 土壤冻结阶段主要表现为3 298 m处 $<$ 3 023 m处 $<$ 3 582 m处, 而土壤融化期阶段表现为3 582 m处 $<$ 3 023 m处 $<$ 3 298 m处。真菌群落的 H 在深冻期和融化后期最高, 在生长季节和冻结期相对较低。和古菌 H 类似, 不同森林群落间真菌 H 在冻结阶段和融化阶段表现出一致的变化趋势, 土壤冻结阶段主要表现为3 023 m处 $<$ 3 582 m处 $<$ 3 298 m处, 而土壤融化阶段则表现为3 582 m处 $<$ 3 023 m处 $<$ 3 298 m处。相比之下, C 显示出与 H 相反的趋势。

表1 不同海拔森林土壤微生物群落多样性指数

Table 1 Diversity indexes of soil microbial community in different forests

群落 Target group	样地 Sampling forest	指数 Index	采样时间 Sampling period				
			GS	FP	FPD	TP	TPL
细菌 Bacterial	3023 m	H	3.65	3.40	3.41	3.36	3.40
		C	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04
	3298 m	H	3.29	3.16	3.46	3.58	3.43
		C	0.04	0.05	0.03	0.03	0.03
	3582 m	H	3.03	2.88	3.09	3.21	3.52
		C	0.05	0.06	0.05	0.04	0.03
古菌 Archaeal	3023 m	H	1.56	1.92	2.17	1.75	2.03
		C	0.22	0.15	0.12	0.18	0.14
	3298 m	H	2.36	1.77	1.76	1.79	2.06
		C	0.10	0.17	0.18	0.17	0.13
	3582 m	H	1.10	2.10	2.66	1.74	1.09
		C	0.33	0.13	0.07	0.18	0.34
真菌 Fungal	3023 m	H	2.55	2.37	2.95	2.99	3.17
		C	0.08	0.10	0.06	0.05	0.04
	3298 m	H	2.90	2.88	3.05	2.52	3.47
		C	0.06	0.06	0.05	0.08	0.03
	3582 m	H	2.16	2.63	2.98	2.17	2.98
		C	0.12	0.07	0.05	0.12	0.05

GS: 生长季节; FP: 土壤冻结期; FPD: 土壤深冻期; TP: 土壤融冻期; TPL: 土壤融化后期; 3023 m: 冷杉次生林; 3298 m: 天然混交林; 3582 m: 岷江冷杉原始林; H : Shannon-Wiener指数; C : Simpson指数。

GS: Growing season; FP: Freezing period; FPD: Deeply frozen period; TP: Thawing period; TPL: Later thawing period; 3023 m: Secondary fir forest; 3298 m: Fir-birch mixed forest; 3582 m: Primary conifer forest; H : Shannon-Wiener index; C : Simpson index.

2.2 微生物rDNA基因的丰度

qPCR结果显示, 细菌和古菌16S rDNA及真菌ITS区域rDNA基因在土壤矿质层均得到检测, 不同海拔森林群落细菌、古菌和真菌数量均表现出相似的变化规律, 在季节性冻融不同阶段有显著差异($P < 0.05$)(图3)。

随土壤冻结和融化过程的先后进行, 不同海拔森林群落土壤细菌数量均表现为先降低后升高。从生长季到冻结阶段, 土壤细菌数量均显著降低, 在深冻期达到最低; 而后随气温升高和土壤融化过程的进行, 土壤细菌数量显著上升。土壤古菌在3 298 m群落中表现出与细菌类似的变化规律, 但随着冻融交替的进行, 3 023 m和3 582 m群落中的古菌数量却表现为先升高后降低的趋势, 在深冻期达到最高, 均与多

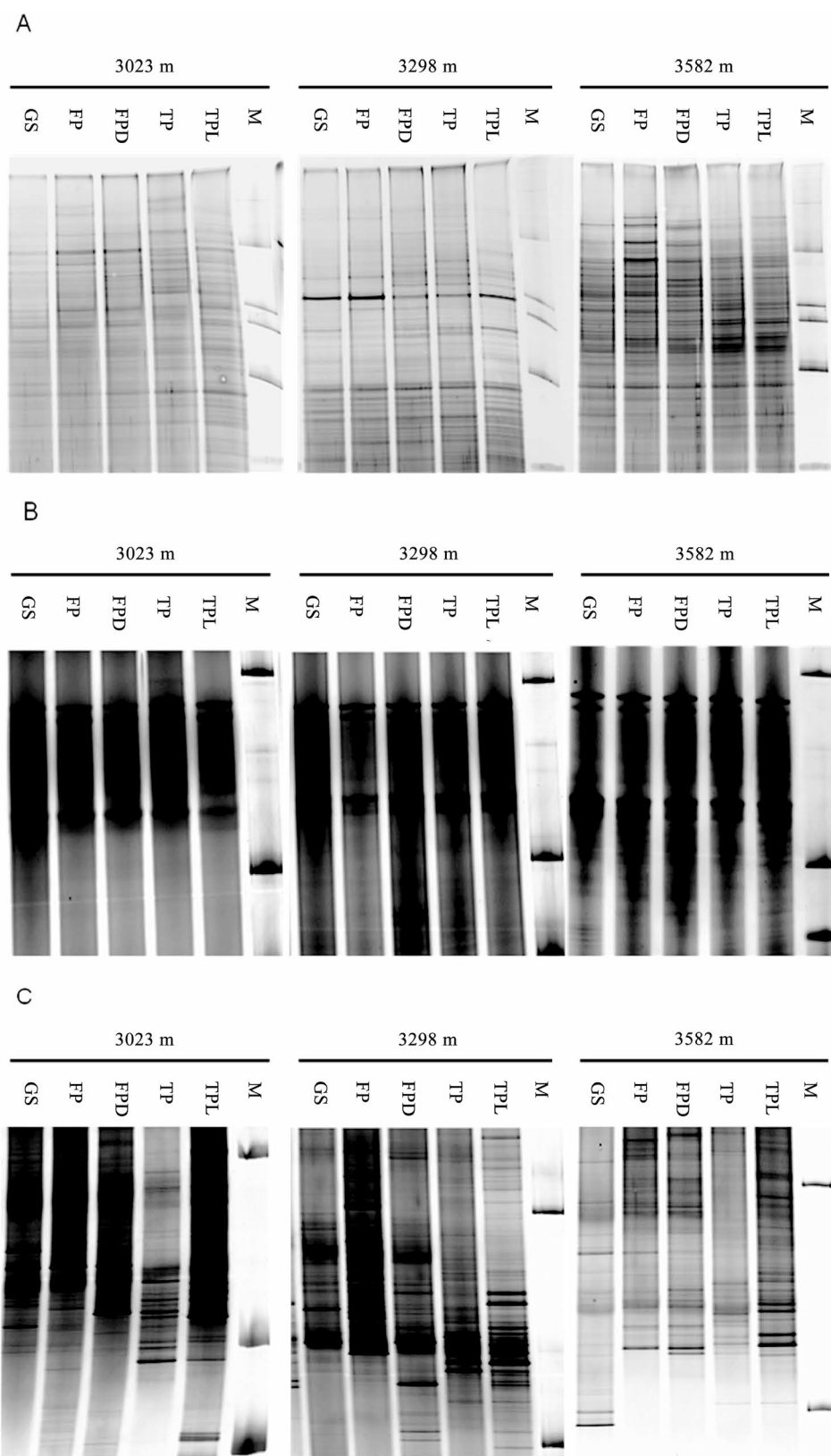


图2 不同海拔森林群落中土壤细菌 (A)、古菌 (B) 和真菌 (C) rDNA片段DGGE图谱。GS: 生长季节; FP: 土壤冻结期; FPD: 土壤深冻期; TP: 土壤融冻期; TPL: 土壤融化后期; M: 对照。3023 m: 冷杉次生林; 3298 m: 天然混交林; 3582 m: 岷江冷杉原始林。

Fig. 2 DGGE profiles of PCR-amplified bacterial (A), archaeal (B) 16S rDNA and fungal (C) ITS region rDNA fragments of microbial communities at different altitudes. GS: Growing season; FP: Freezing period; FPD: Deeply frozen period; TP: Thawing period; TPL: Later thawing period; M: Marker; 3023 m: Secondary fir forest; 3298 m: Fir-birch mixed forest; 3582 m: Primary conifer forest.

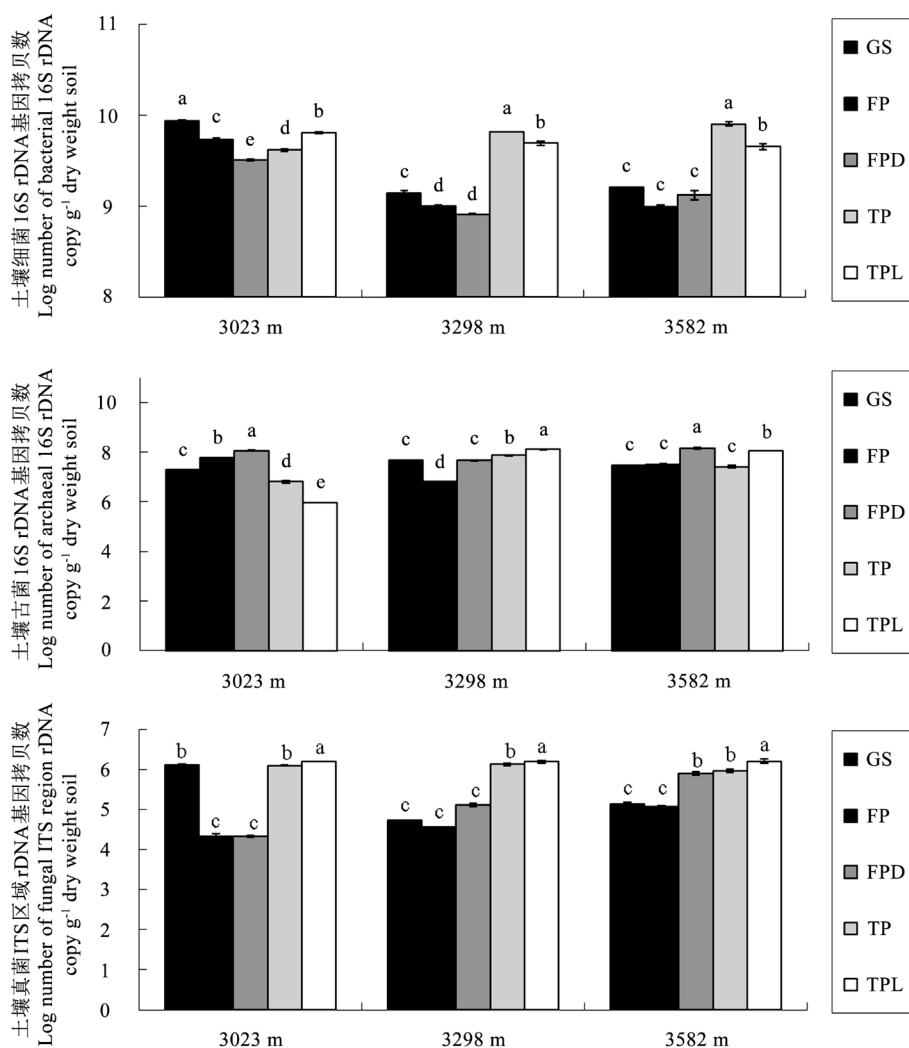


图3 不同海拔森林群落中土壤微生物rDNA基因的丰度 (平均值±标准差, $N = 5$)。GS: 生长季节; FP: 土壤冻结期; FPD: 土壤深冻期; TP: 土壤融冻期; TPL: 土壤融化后期。3023 m: 冷杉次生林; 3298 m: 天然混交林; 3582 m: 岷江冷杉原始林。不同小写字母表示差异达0.05水平。

Fig. 3 Abundance of soil microbiology rDNA gene in different forest communities (mean ± SD, $N = 5$). GS: Growing season; FP: Freezing period; FPD: Deeply frozen period; TP: Thawing period; TPL: Later thawing period; M: Marker; 3023 m: Secondary fir forest; 3298 m: Fir-birch mixed forest; 3582 m: Primary conifer forest.

样性指数的变化规律一致。3个海拔森林群落中, 从生长季到冻结阶段, 土壤真菌数量有所降低, 在冻结阶段达到最低; 而后随土壤融化过程的进行, 土壤真菌数量均显著上升。

3 讨论与结论

了解土壤冻结过程中微生物群落结构和数量的变化是认识植物非生长季节土壤生态过程的重要方面^[1, 7, 38]。采用PCR-DGGE和Real-time PCR方法对典型亚高山/高山森林群落土壤微生物多样性和数量的研究表明, 土壤微生物在严酷的冬季仍维持着活性, 其结构和数量随冻融过程不断变化, 在土壤融化后期出现一个高峰。同时土壤微生物结构和数量随各海拔土壤温度的不同表现出一定的差异。结果表明, 低温环境能够维持的土壤微生物对冬季土壤生态系统过程具有重要的意义。

一般认为, 低温或土壤冻结将直接导致微生物死亡或休眠^[7], 但越来越多的研究表明冬季土壤完全冻结后仍存在相当数量的微生物并参与到冬季土壤生态过程中^[9-12]。本研究结果显示, 不同海拔森林群落在季节性冻融过程中都具有较高的土壤微生物数量(图2, 3)。随着环境温度的降低, 土壤细菌数量显著降低, 并在土壤冻结阶段降至最低, 而在随后的融化过程中又显著升高。这是因为土壤冻结过程直接杀死部分土壤细菌, 同时也限制了土壤水分和养分有效性, 进而导致大量细菌死亡^[39-41]; 而融冻期时, 先前冻结过程中固定的大量底物、升高的环境温度及水分有效性等又非常有利于土壤细菌的迅速增殖^[38, 42-44]。这说明, 作为土壤微生物的重要组成部分的土壤细菌对季节性冻融具有非常积极的响应。而3个海拔森林群落土壤古菌数量在土壤冻结阶段均得到了显著提高, 这可能是由于下层土壤中的古菌往往是极端环境微生物的主要构成, 多表现出对低温、寡营养等环

境的良好耐受能力^[45-47], 因而使矿质土壤层古菌的数量呈现出与细菌不同的变化趋势. 在亚高山森林土壤中, 真菌数量受季节性冻融影响的差异与不同森林群落冻融格局有关. 处于高海拔地区的岷江冷杉原始林(3 582 m)的土壤真菌在冻结阶段有一个显著性的提高, 而处于相对较低海拔的天然混交林(3 298 m)和冷杉次生林(3 023 m)则没有显著性变化. 由于真菌对环境变化的耐受能力可能更强^[48], 而一般来说, 随着海拔的升高温度会降低, 所以冬季往往表现出较高的真菌比例^[1, 49].

研究结果还进一步证实了温度引起的季节性冻融不但直接影响土壤微生物的数量, 还有可能影响其群落的结构和组成^[50-51]. 不同海拔森林群落土壤中都具有较高的土壤微生物多样性, 在各个关键时期均表现出与微生物数量一致的变化规律. 但不同海拔森林群落中各微生物在不同关键时期的分布特征具有一定的差异. 在3个海拔森林群落中, 处于低海拔的冷杉次生林(3 023 m)具有较高的环境温度, 更利于土壤细菌的存活, 因而在整个季节性冻融过程中都具有最高的细菌多样性. 古菌被认为是具有良好的适应能力^[47], 因而在岷江冷杉原始林(3 582 m)的土壤冻结过程中表现出较高的多样性. 而土壤真菌是凋落物和细根等的主要分解者, 其分布特征与不同海拔上植被群落组成密切联系^[52-53], 因此, 在土壤冻融过程中, 天然混交林(3 298 m)表现出更高的真菌多样性.

在亚高山/高山森林群落土壤中, 总的说来, 一方面土壤矿质土壤层仍然具有丰富的土壤微生物. 另一方面, 不同类群的微生物都对季节性冻融有明显的响应, 不但微生物数量发生变化、其群落组成也发生变化, 但不同物种间、不同森林群落间的变化规律略有不同. 这暗示了土壤微生物群落动态在土壤微生物量周转、养分循环等生态过程中的重要意义, 其研究结果也为深入理解冬季土壤生态过程提供了基础数据.

参考文献 [References]

- Lipson DA, Schadt CW, Schmidt SK. Changes in soil microbial community structure and function in an alpine dry meadow following spring snow melt [J]. *Microbial Ecol*, 2002, **43**: 307-314
- Wardle DA, Bardgett RD, Klironomos JN, Setälä H, Van Der Putten WH, Wall DH. Ecological linkages between aboveground and belowground biota [J]. *Science*, 2004, **304**: 1629-1633
- 沈菊培, 贺纪正. 微生物介导的碳氮循环过程对全球气候变化的响应[J]. *生态学报*, 2011, **31** (11): 2957-2967 [Shen JP, He JZ. Responses of microbes-mediated carbon and nitrogen cycles to global climate change [J]. *Acta Ecol Sin*, 2011, **31** (11): 2957-2967]
- DeLuca T, Keeney D, McCarty G. Effect of freeze-thaw events on mineralization of soil nitrogen [J]. *Biol Fertil Soils*, 1992, **14**: 116-120
- Hentschel K, Borken W, Matzner E. Repeated freeze-thaw events affect leaching losses of nitrogen and dissolved organic matter in a forest soil [J]. *J Plant Nutr Soil Sci*, 2008, **171**: 699-706
- Sulkava P, Huhta V. Effects of hard frost and freeze-thaw cycles on decomposer communities and N mineralisation in boreal forest soil [J]. *Appl Soil Ecol*, 2003, **22**: 225-239
- Campbell JL, Mitchell MJ, Groffman PM, Christenson LM, Hardy JP. Winter in northeastern North America: a critical period for ecological processes [J]. *Front Ecol Environ*, 2005, **3**: 314-322
- Edwards KA, McCulloch J, Peter KG, Jefferies RL. Soil microbial and nutrient dynamics in a wet Arctic sedge meadow in late winter and early spring [J]. *Soil Biol Biochem*, 2006, **38**: 2843-2851
- Welker J, Fahnestock J, Jones M. Annual CO₂ flux in dry and moist arctic tundra: field responses to increases in summer temperatures and winter snow depth [J]. *Climatic Change*, 2000, **44**: 139-150
- Price PB, Sowers T. Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance, and survival [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 4631-4636
- Zhu J, He X, Wu F, Yang W, Tan B. Decomposition of *Abies faxoniana* litter varies with freeze-thaw stages and altitudes in subalpine/alpine forests of southwest China [J]. *Scand J For Res*, 2012, **27**: 586-596
- Zhu J, Yang W, He X. Temporal dynamics of abiotic and biotic factors on leaf litter of three plant species in relation to decomposition rate along a subalpine elevation gradient [J]. *PLoS ONE*, 2013, **8**: e62073
- Kreyling J. Winter climate change: a critical factor for temperate vegetation performance [J]. *Ecology*, 2010, **91**: 1939-1948
- Lipson DA, Schmidt SK, Monson RK. Links between microbial population dynamics and nitrogen availability in an alpine ecosystem [J]. *Ecology*, 1999, **80**: 1623-1631
- Xiao R, Chen B, Liu Y, Wang C, Gu J, Feng H, Du G, Ma X. Higher abundance of ammonia oxidizing archaea than ammonia oxidizing bacteria and their communities in Tibetan alpine meadow soils under long-term nitrogen fertilization [J]. *Geomicrobiol J*, 2014, **31**: 597-604
- 杨万勤, 冯瑞芳, 张健, 王开运. 中国西部3个亚高山森林土壤有机层和矿质层碳储量和生化特征[J]. *生态学报*, 2007, **27** (10): 4157-4165 [Yang WQ, Feng RF, Zhang J, Wang KY. Carbon stock and biochemical properties in the organic layer and mineral soil under three subalpine forests in Western China [J]. *Acta Ecol Sin*, 2007, **27** (10): 4157-4165]
- Tan B, Wu FZ, Yang WQ, Liu L, Yu S. Characteristics of soil animal community in the subalpine/alpine forests of western Sichuan during onset of freezing [J]. *Acta Ecol Sin*, 2010, **30**: 93-99
- 刘利, 吴福忠, 杨万勤, 王奥, 谭波, 余胜. 季节性冻结初期川西亚高山/高山森林土壤细菌多样性[J]. *生态学报*, 2010, **30** (20): 5687-5694 [Liu L, Wu FZ, Yang WQ, Wang A, Tan B, Yu S. Soil bacterial diversity in the subalpine/alpine forests of western Sichuan at the early stage of freeze-thaw season [J]. *Acta Ecol Sin*, 2010, **30** (20): 5687-5694]
- 王奥, 张健, 杨万勤, 吴福忠, 刘利, 谭波. 冻融末期亚高山/高山森林土壤有机层细菌多样性[J]. *北京林业大学学报*, 2010, **32** (4): 144-150 [Wang A, Zhang J, Yang WQ, Wu FZ, Liu L, Tan B. Bacterial diversity in organic soil layers of subalpine and alpine forests at the end of freeze-thaw periods [J]. *J Beijing For Univ*, 2010, **32** (4): 144-150]
- 谭波, 吴福忠, 杨万勤, 余胜, 杨玉莲, 王奥. 冻融末期川西亚高山/高山森林土壤水解酶活性特征[J]. *应用生态学报*, 2011, **22** (5): 1162-1168 [Tan B, Wu FZ, Yang WQ, Yu S, Yang YL, Wang A. Soil hydrolase characteristics in late soil-thawing period in subalpine/alpine forests of west Sichuan [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2011, **22** (5): 1162-1168]
- 龚子同, 张甘霖, 陈志诚. 土壤发生与系统分类[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 626 [Gong ZT, Zhang GL, Chen ZC. Pedogenesis and Soil Taxonomy [M]. Beijing: Science Press, 2007: 626]
- Wu F, Yang W, Zhang J, Deng R. Litter decomposition in two subalpine forests during the freeze-thaw season [J]. *Acta Oecol*, 2010, **36**: 135-140

- 23 谭波, 吴福忠, 杨万勤, 余胜, 刘利, 王奥, 杨玉莲. 川西亚高山/高山森林土壤氧化还原酶活性及其对季节性冻融的响应[J]. 生态学报, 2012, **32** (21): 6670-6678 [Tan B, Wu FZ, Yang WQ, Yu S, Liu L, Wang A, Yang YL. Activities of soil oxidoreductase and their response to seasonal freeze-thaw in the subalpine/alpine forests of western Sichuan [J]. *Acta Ecol Sin*, 2012, **32** (21): 6670-6678]
- 24 王奥, 吴福忠, 何振华, 徐振锋, 刘洋, 谭波, 杨万勤. 亚高山/高山森林土壤有机层氨氧化细菌和氨氧化古菌丰度特征[J]. 生态学报, 2012, **32** (14): 4371-4378 [Wang A, Wu FZ, He ZH, Xu ZF, Liu Y, Tan B, Yang WQ. Characteristics of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea abundance in soil organic layer under the subalpine/alpine forest [J]. *Acta Ecol Sin*, 2012, **32** (14): 4371-4378]
- 25 Griffiths RI, Whiteley AS, O'Donnell AG, Bailey MJ. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA-and rRNA-based microbial community composition [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 5488-5491
- 26 Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 695-700
- 27 Takai K, Horikoshi K. Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 5066-5072
- 28 White T, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]. San Diego, CA, USA: Academic Press, 1990: 315-322
- 29 May LA, Smiley B, Schmidt MG. Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage [J]. *Can J Microbiol*, 2001, **47**: 829-841
- 30 Radojkovic D, Kušić J. Silver staining of denaturing gradient gel electrophoresis gels [J]. *Clin Chem*, 2000, **46**: 883-884
- 31 Luo H, Qi H, Zhang H. Assessment of the bacterial diversity in fenvalerate-treated soil [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2004, **20**: 509-515
- 32 Trevors J, Kevan P, Tam L. Microbial diversity across a Canadian sub-Arctic, isostatically rebounding, soil transect [J]. *Polar Sci*, 2010, **4**: 81-91
- 33 Wu F, Yang W, Zhang J, Liu L, Wang A. Changes in soil microbial biomass and bacterial diversity during the transition from winter to growing season in the subalpine/alpine forests [J]. *Afr J Microbiol Res*, 2011, **5**: 5575-5583
- 34 Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing [M]. New York: John Wiley and Sons, 1991
- 35 Gardes M, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts [J]. *Molec Ecol*, 1993, **2**: 113-118
- 36 Vilgalys R, Hester M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species [J]. *J Bacteriol*, 1990, **172**: 4238-4246
- 37 Wang A, Wu FZ, Yang WQ, Wu ZC, Wang XX, Tan B. Abundance and composition dynamics of soil ammonia-oxidizing archaea in an alpine fir forest on the eastern Tibetan Plateau of China [J]. *Can J Microbiol*, 2012, **58**: 572-580
- 38 Sharma S, Szele Z, Schilling R, Munch JC, Schlöter M. Influence of freeze-thaw stress on the structure and function of microbial communities and denitrifying populations in soil [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**: 2148-2154
- 39 Walker VK, Palmer GR, Voordouw G. Freeze-thaw tolerance and clues to the winter survival of a soil community [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**: 1784-1792
- 40 Öquist MG, Sparrman T, Klemetsson L, Drotz SH, Grip H, Scheelecher J, Nilsson M. Water availability controls microbial temperature responses in frozen soil CO₂ production [J]. *Global Change Biol*, 2009, **15**: 2715-2722
- 41 Jefferies RL, Walker NA, Edwards KA, Dainty J. Is the decline of soil microbial biomass in late winter coupled to changes in the physical state of cold soils? [J]. *Soil Biol Biochem*, 2010, **42**: 129-135
- 42 Lipson DA, Schmidt SK. Seasonal changes in an alpine soil bacterial community in the Colorado rocky mountains [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**: 2867-2879
- 43 Lipson DA, Schmidt SK, Monson RK. Carbon availability and temperature control the post-snowmelt decline in alpine soil microbial biomass [J]. *Soil Biol Biochem*, 2000, **32**: 441-448
- 44 Grogan P, Michelsen A, Ambus P, Jonasson S. Freeze-thaw regime effects on carbon and nitrogen dynamics in sub-arctic heath tundra mesocosms [J]. *Soil Biol Biochem*, 2004, **36**: 641-654
- 45 Cavicchioli R, Thomas T, Curmi PMG. Cold stress response in Archaea [J]. *Extremophiles*, 2000, **4**: 321-331
- 46 DeLong EF. Oceans of archaea [J]. *ASM News-Am Soc Microbiol*, 2003, **69**: 503-503
- 47 Cavicchioli R. Cold-adapted archaea [J]. *Nat Rev Micro*, 2006, **4**: 331-343
- 48 Griffiths BS, Ritz K, Ebbelwhite N, Dobson G. Soil microbial community structure: Effects of substrate loading rates [J]. *Soil Biol Biochem*, 1999, **31**: 145-153
- 49 Schadt CW, Martin AP, Lipson DA, Schmidt SK. Seasonal dynamics of previously unknown fungal lineages in tundra soils [J]. *Science*, 2003, **301**: 1359-1361
- 50 Schimel JP, Mikan C. Changing microbial substrate use in Arctic tundra soils through a freeze-thaw cycle [J]. *Soil Biol Biochem*, 2005, **37**: 1411-1418
- 51 Männistö M, Tiirola M, Häggblom MM. Effect of freeze-thaw cycles on bacterial communities of Arctic Tundra soil [J]. *Microbial Ecol*, **58**: 621-631
- 52 Trinder CJ, Johnson D, Artz RRE. Litter type, but not plant cover, regulates initial litter decomposition and fungal community structure in a recolonising cutover peatland [J]. *Soil Biol Biochem*, 2009, **41**: 651-655
- 53 Fisk M, Fahey T, Sobieraj J, Staniec A, Crist T. Rhizosphere disturbance influences fungal colonization and community development on dead fine roots [J]. *Plant Soil*, 2011, **341**: 279-293