

# 玉龙雪山自然保护区寒温性针阔混交林腐殖质层和土壤表层线虫群落结构差异

王文婷<sup>1,2</sup> 夏尚文<sup>2</sup> 肖海峰<sup>3</sup> 刘胜杰<sup>2</sup> 杨效东<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院大学, 北京 100049; <sup>2</sup>中国科学院西双版纳热带植物园, 热带森林生态学重点实验室, 云南勐腊 666303; <sup>3</sup>湘南学院, 湖南郴州 423099)

**摘要** 采用高通量测序的方法,对位于云南省丽江玉龙雪山自然保护区 20 hm<sup>2</sup>寒温性针阔混交林中腐殖质层和土壤表层(0~10 cm)线虫群落结构的差异进行了研究。共获取测序序列 5744582 条,注释后获得 44 科线虫。腐殖质层线虫有 37 科,其中垫刃科(18.1%)为优势类群,营养类群以食细菌、食真菌和植食性线虫为主;土壤表层线虫有 41 科,单齿科(45.4%)为优势类群,捕食性线虫具有最高的相对多度。虽然在操作分类单元(OTU)水平上两个生境线虫群落的  $\alpha$  多样性(Shannon、Simpson 和 Chao1 指数)无显著性差异,但在科水平上,腐殖质层线虫群落的  $\alpha$  多样性指数显著低于土壤表层;两个生境的  $\beta$  多样性有较大差异,其中腐殖质层 Cody 指数低于土壤表层,而 Sorensen 非相似性指数相反。非度量多维标度(NMDS)分析表明,土壤表层线虫群落内部结构差异大于腐殖质层。

**关键词** 土壤线虫; 土壤表层; 腐殖质层; 群落结构; 高通量测序

**Difference of soil nematode communities between the humus and soil surface layer in the cold temperate coniferous and broadleaved mixed forest of Yulong Snow Mountain Nature Reserve, Yunnan, China.** WANG Wen-ting<sup>1,2</sup>, XIA Shang-wen<sup>2</sup>, XIAO Hai-feng<sup>3</sup>, LIU Sheng-jie<sup>2</sup>, YANG Xiao-dong<sup>2\*</sup> (<sup>1</sup>University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; <sup>2</sup>Key Laboratory of Tropical Forest Ecology, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla 666303, Yunnan, China; <sup>3</sup>Xiangnan University, Chenzhou 423099, Hunan, China).

**Abstract:** A high-throughput sequencing approach was used to differentiate the nematode communities in the humus and soil surface layer (0-10 cm) in 20 hm<sup>2</sup> plot located in the cold temperate coniferous and broadleaved mixed forest of Yulong Snow Mountain Nature Reserve, Lijiang, Yunnan. A total of 5744582 sequences were obtained, which were further annotated to 44 nematode families. In the humus layer, 37 families were recorded, with Tylenchidae (18.1%) being the most dominant family. For trophic groups, bacterivorous, fungivorous and herbivorous were predominant. The soil surface layer had 41 families, with Mononchidae (45.4%) being the most dominant family. The relative abundance of predatory nematode was highest in the soil surface layer. There was no significant difference in the  $\alpha$  diversity indices (Shannon, Simpson and Chao1 index) of nematode communities at the OTU level between two habitats. At the family level, however,  $\alpha$  diversity of nematode community in the humus layer was significantly lower than in soil surface layer.  $\beta$  diversity of the nematode community was significantly different in the two habitats, with lower Cody index but high Sorensen non-similarity index in the humus habitat. Results of non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis showed that the internal structure difference of nematode community in the soil surface layer was higher than that in the humus layer.

**Key words:** soil nematode; soil surface layer; humus layer; community structure; high-throughput sequencing.

本文由中国科学院 135 项目(2017XTBG-T01)和中国科学院东南亚生物多样性中心项目(Y4ZK111B01)资助 This work was supported by the Chinese Academy of Sciences 135 Program (2017XTBG-T01) and the Program of Southeast Asia Biodiversity Research Center, Chinese Academy of Sciences (Y4ZK111B01).

2019-09-17 Received, 2019-12-24 Accepted.

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: yangxd@xtbg.ac.cn

种类丰富的土壤线虫是陆地生态系统中数量最多和食性功能最完整的土壤后生动物类群<sup>[1]</sup>,广泛存在于碎屑食物网的Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ营养级,并与土壤微生物相互作用构成完整的微食物网<sup>[2]</sup>,对生态系统的养分循环和物质转化具有重要的驱动和调控作用。其群落组成和功能群结构也常被用于评估土壤质量和生态功能的优劣。土壤线虫具备多样化的生活史策略,包括从r-对策向K-对策过渡的5个类群,可以在短时间内对环境变化作出响应而被视为环境指示生物<sup>[3]</sup>。近年来,土壤线虫的多样性分布及生态功能研究受到越来越多的重视,进而得到了长足的发展<sup>[4-5]</sup>。

以往关于土壤线虫群落多样性的研究多基于形态分类展开,需依赖于鉴定者丰富的分类学基础和经验,加上样本中普遍存在高丰度的幼虫,给线虫多样性评估和生态功能的研究带来了较大的困难。随着分子生物学技术的发展,高通量测序技术逐渐被应用于线虫多样性和群落结构的探究<sup>[6-9]</sup>。如薛蓓等<sup>[10]</sup>使用 Illumina Miseq 测序技术,探讨了西藏北部高寒草甸的土壤线虫群落多样性,并在目水平上解析了线虫群落的相对丰度和结构; Powers 等<sup>[11]</sup>采用 18S rRNA 对线虫遗传多样性进行了分析; Moroenyane 等<sup>[12]</sup>通过  $\beta$ MNTD 指数分析了线虫群落构建的确定性过程。研究表明,采用线虫特异性扩增引物对 NF1 和 18Sr2b 扩增线虫 18S rRNA 上一段大小约 400 bp 的 DNA 片段,可将线虫鉴定率从 90% 提升至 97%,并且该引物对于各功能类群的线虫片段扩增具有普适性<sup>[13]</sup>,能将测序聚类结果注释到不同食性类群和生活史策略进行线虫群落结构分析,但具体的研究案例较为少见。

土壤线虫多样性分布格局和群落构建过程一直是生态学研究热点,已往大多数研究主要针对土壤层(0~10 或 0~15cm)开展。研究发现,线虫有 62% 的遗传多样性存在于凋落物层和附生植物层,而非土壤层<sup>[11]</sup>; Van den Hoogen 等<sup>[14]</sup>基于模型对全球尺度的土壤线虫多度、功能类群和生物量进行了研究,认为仅采集土壤层的线虫样本将会低估线虫生物量,尤其在腐殖质积累较多的亚热带和温带森林生态系统,需要考虑采集不同层次的样品。

云南丽江玉龙雪山省级自然保护区位于青藏高原地区,是我国三大特有物种分化中心之一,具有丰富的寒温性针叶林种类和独特的生物类群,林下富集有较高生物量的腐殖质,是开展土壤线虫多样性分布格局研究的重要和理想地区。目前,相关学者

针对不同海拔梯度垂直气候带和不同演替阶段的寒温性针叶林中开展了土壤线虫群落多样性研究<sup>[15-16]</sup>,而对该森林生态系统中腐殖质层和土壤表层线虫群落结构差异的原位配对比较尚未见报道。本研究通过野外分层取样,使用高通量测序技术,探究寒温性针阔混交林中腐殖质层和土壤表层线虫群落结构差异,为进一步拓展线虫群落结构研究提供基础数据。

## 1 研究区域与研究方法

### 1.1 研究区域概况

研究地点位于云南省丽江玉龙雪山自然保护区(27°08' N, 100°13' E)。该地区年均温 5.5 °C, 极端高温 18.8 °C, 极端低温 -11.8 °C, 年降水量 1587.5 mm, 年蒸发量 966.1 mm, 相对湿度 82%, 平均海拔 3284 m, 地带性植被类型属寒温性针阔混交林和针叶林。调查林地内共有木本植物 69 种, 隶属 30 科 47 属。川滇冷杉(*Abies forrestii*)、丽江云杉(*Picea likiangensis*)、帽斗栎(*Quercus guajavifolia*)、吴茱萸五加(*Gamblea ciliata*)、篦齿槭(*Acer pectinatum*)、短梗稠李(*Padus brachypoda*)、西康花楸(*Sorbus prattii*)、桦叶荚蒾(*Viburnum betulifolium*)和云南杜鹃(*Rhododendron yunnanense*)为群落优势种和建群种;灌木层假小檗(*Berberis fallax*)是样地内个体数较多的物种, 占总个体数的 59.5%;土壤类型为山地暗棕壤和草甸暗棕壤, pH 值 5.5~8.0<sup>[17]</sup>。

### 1.2 土壤线虫采集和分离

本研究依托位于丽江云杉坪的中国科学院昆明植物研究所高山站 20 hm<sup>2</sup>大样地进行调查。在样地内设置 5 条样带, 每条样带间距离为 100 m, 在每条样带上选取 13 个采样点, 每个样点间隔大于 30 m(保证各样点土壤线虫群落无空间自相关性, 即每个样本具有独立性)。2016 年 10 月 16—20 日, 原位配对采集腐殖质层和土壤表层(0~10 cm)样品。除去地表凋落物, 腐殖质层用高 7 cm、直径 25 cm 的环形框圈存, 直接收集框内腐殖质于自封袋中作为腐殖质层样品, 之后使用直径 5 cm、高 10 cm 的土壤环刀在取样框内取 3 个土样, 并混合为 1 个土壤样品, 腐殖质层和土壤表层共计 130 份样品。将采集的腐殖质和土壤样品带回实验室, 每份腐殖质和土壤样品分别轻柔混匀后各称取 100 g, 采用浅盘法分离线虫<sup>[18]</sup>, 并将其置于 -80 °C 冰箱保存。2017 年 1 月 3—10 日提取全部样品中的土壤线虫 DNA 并进行 PCR 扩增。

### 1.3 土壤线虫 DNA 提取、PCR 扩增和高通量测序

使用 PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, USA) 试剂盒提取土壤线虫 DNA。在通用引物 NF1 (GGTGGTGCATGCCCGT-TCTTAGTT) 和 18S<sub>r</sub>2b (TACAAAGGGCAGGGACG-TAAT) 的 5' 端加上适合 HiSeq2500 PE250 测序的 index 序列, 使用 Eppendorf Pro S 型基因扩增仪和 Premix Taq 高保真试剂进行线虫 18S rRNA 上一段大小约 400 bp 片段的 PCR 扩增。采用 25  $\mu$ L 反应体系: 12.5  $\mu$ L Premix 溶液, 0.5  $\mu$ L 18S r2b, 0.5  $\mu$ L NF1, 0.5  $\mu$ L 模板 DNA, 11  $\mu$ L 超纯水。扩增程序: 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s; 55  $^{\circ}$ C 退火 30 s; 72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s; 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 设置电压 110 V, 用 2% 琼脂糖凝胶进行扩增产物电泳的检测。样品送北京诺禾致源科技股份有限公司采用 Illumina HiSeq PE250 测序平台进行双端测序。

### 1.4 数据处理

测序原始数据使用 FastQC 进行质量控制, 用 Usearch 进行双端序列合并, 过滤序列, 去除长度小于 100 bp 和 Q 值小于 20 的片段, 切除引物及 Index 序列, 使用 Uparse 算法按照 97% 的相似性聚类为可操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU), 得到用于物种分类的 OTU, 之后进行 otutab\_rare 稀释化处理, 使样本含有相同的 reads 数, 制作 OTU 表; 将 OTU 在 SILVA 真核生物数据库 (<https://www.arb-silva.de/>) 进行注释, 从而得到线虫科水平信息。将线虫科信息在 <https://animaldiversity.org/>、<https://www.uniprot.org/taxonomy/> 和 <http://nema-plex.ucdavis.edu/Ecology/EcophysiologyParms/> 数据库中进行匹配, 查询并获取线虫群落的食性分类信息和成熟指数 cp 值。

采用 Usearch (命令: usearch -alpha\_div otutable.txt -output alpha.txt) 进行 OTU 水平的  $\alpha$  多样性指数 (Shannon、Simpson、丰富度和 Chao1) 计算; 使用 R (3.6.1) 软件 Vegan 程序包的 diversity 函数计算科水平和功能类群多样性指数 (Shannon 指数、稀释化过程的 Unbiased Simpson 指数和丰富度)。计算公式为:

Shannon 指数:

$$H = - \sum_{i=1}^S P_i \log_2 P_i$$

Simpson 指数:

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

相对多度 =  $N_i/N$

式中:  $S$  为科数目;  $P_i$  为科  $i$  的个体数占群落中总个体数的比例;  $N_i$  为科  $i$  的个体数;  $N$  为群落中全部科的个体数; 丰富度为群落中 OTU 数目或科数目。

采用 Excel 2016 软件对原始数据进行整理和预处理。线虫群落的各指数变量在 R 软件中进行 Shapiro.test 正态性检验, 若变量符合正态性分布则进行 t 检验, 反之进行 Wilcoxon 非参数检验。对 Simpson 指数和 Chao1 指数进行自然对数转换, 以满足绘图数据正态分布。

使用 R 语言 Vegan 包进行  $\beta$  多样性分析, 即基于二元属性数据计算线虫群落的 Cody 指数和 Sorensen 指数。Cody 指数反映群落间物种更替的速率, 数值越大, 物种更替速率越快; Sorensen 指数表征群落非相似性<sup>[19]</sup>。其计算公式为:

Cody 指数:  $\beta_c = (b+c)/2$

Sorensen 指数:  $\beta_{sor} = a/(a+b+c)$

式中:  $a$  为 2 种生境的共有科数目;  $b$  为沿不同采样点之间的生境梯度所失去的科数目;  $c$  指沿不同采样点之间生境梯度所增加的科数目。

利用非度量多维标度 (non-metric multidimensional scaling, NMDS) 进行群落排序分析, 生成线虫群落属性空间定位图, 不同样点间的差异程度通过距离体现, 绘图用 R 语言 ggplot2 和 ggveagn 完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 基于 OTU 水平的线虫群落 $\alpha$ 多样性比较

测序序列双端拼接后共得到 5474582 条序列, 腐殖质层和土壤表层分别占 42.2% 和 57.8%, 用 Usearch 聚类 OTU 分析后, 腐殖质层和土壤表层 OTU 数目分别为 595 和 539 (表 1)。

基于 OTU 水平, 对腐殖质层和土壤表层的线虫群落  $\alpha$  多样性指数进行计算和统计分析, Wilcoxon 非参数检验和 t 检验结果显示, 腐殖质层和土壤表层线虫群落的 Shannon 指数、Simpson 指数、Chao1 指数和相对多度差异均不显著 (图 1)。

表 1 腐殖质层和土壤表层线虫群落 OTU 的基本信息  
Table 1 OTU basic information of nematode community in humus and soil surface layer

土层 Soil layer	测序条数 Reads	OTUs	注释线虫数 Nematodes noted	注释率 Noted rate (%)	科 Family
HL	3163103	595	268	45.0	37
SL	2311479	539	274	50.8	41

HL: 腐殖质层 Humus layer; SL: 土壤表层 Soil surface layer (0~10 cm). 下同 The same below.

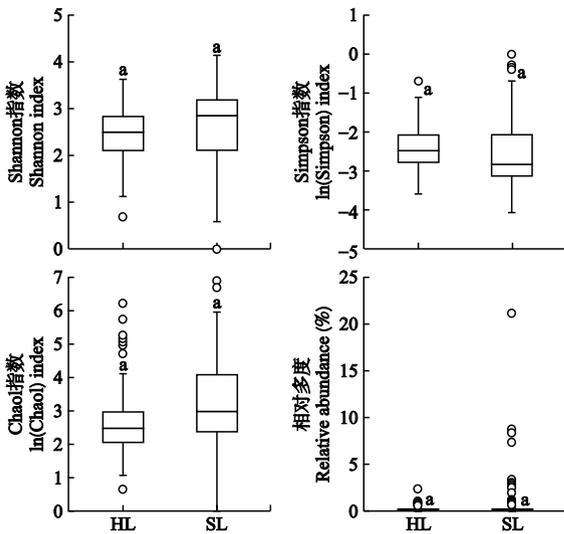


图1 OTU水平腐殖质层和土壤表层线虫群落 $\alpha$ 多样性指数和相对多度

Fig.1  $\alpha$  diversity index and relative abundance of nematode communities in humus and soil surface layer at OTU level.

HL: 腐殖质层 Humus layer; SL: 土壤表层 Soil surface layer (0~10 cm). 不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ) Different letters meant significant difference at 0.05 level. 下同 The same below.

表2 寒温性针阔混交林线虫群落的食性、cp值和相对多度

Table 2 Feeding type, cp value and relative abundance of each nematode family in cold temperate mixed coniferous and broadleaved forest (mean $\pm$ SE)

科 Family	食性类群 Trophic group	cp	相对多度 Relative abundance (%)		科 Family	食性类群 Trophic group	cp	相对多度 Relative abundance (%)	
			腐殖质层 Humus layer	土壤表层 Soil surface layer				腐殖质层 Humus layer	土壤表层 Soil surface layer
			无咽科 Alaimidae	Bac				4	5.18 $\pm$ 0.07
Allantonematidae	Fun	4	1.55 $\pm$ 0.04	0.17 $\pm$ 0.03	长针科 Longidoridae	Her	5	0.26 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.02
Alloionematidae	Bac	1	0.00 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.02	Meloidoderitidae	Her	3	1.04 $\pm$ 0.03	0.17 $\pm$ 0.04
倒齿科 Anatonchidae	Pre	4	0.00 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.02	单宫科 Monhysteridae	Bac	2	3.37 $\pm$ 0.06	0.24 $\pm$ 0.04
鳃形科 Anguinidae	Her	2	3.63 $\pm$ 0.06	0.59 $\pm$ 0.06	单齿科 Mononchidae	Pre	4	5.18 $\pm$ 0.06	45.35 $\pm$ 14.48
滑刃科 Aphelenchidae	Fun	2	3.63 $\pm$ 0.06	0.63 $\pm$ 0.06	穿咽科 Nygolaimidae	Pre	5	1.55 $\pm$ 0.04	0.35 $\pm$ 0.05
类滑刃科 Aphelenchoididae	Fun	2	0.00 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.02	齿咽科 Odontolaimidae	Bac	3	0.52 $\pm$ 0.03	1.46 $\pm$ 0.57
孔咽科 Aporcelaimidae	Omn	5	0.00 $\pm$ 0.00	0.07 $\pm$ 0.02	盆咽科 Panagrolaimidae	Bac	1	0.26 $\pm$ 0.02	0.00 $\pm$ 0.00
Aulolaimidae	Omn	4	0.00 $\pm$ 0.00	0.07 $\pm$ 0.02	绕线科 Plectidae	Bac	2	4.66 $\pm$ 0.06	0.52 $\pm$ 0.06
轴咽科 Axonolaimidae	Bac	3	1.55 $\pm$ 0.05	0.31 $\pm$ 0.04	短体科 Pratylenchidae	Her	3	0.52 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.03
巴氏科 Bastianiidae	Bac	3	0.52 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.02	棱咽科 Pristomatolaimidae	Bac	3	1.04 $\pm$ 0.03	5.36 $\pm$ 1.93
头叶科 Cephalobidae	Bac	2	5.44 $\pm$ 0.09	0.80 $\pm$ 0.08	圣城科 Qudsianematidae	Omn	4	4.15 $\pm$ 0.07	6.27 $\pm$ 2.08
色矛科 Chromadoridae	Bac	3	5.96 $\pm$ 0.09	1.43 $\pm$ 0.17	小杆科 Rhabditidae	Bac	1	7.77 $\pm$ 0.08	5.54 $\pm$ 1.21
环科 Criconematidae	Her	3	1.81 $\pm$ 0.04	5.29 $\pm$ 1.69	Steinernematidae	Bac	1	1.30 $\pm$ 0.03	0.42 $\pm$ 0.08
膜皮科 Diphtherophoridae	Fun	3	2.07 $\pm$ 0.05	1.53 $\pm$ 0.40	Telotylenchidae	Her	3	0.26 $\pm$ 0.02	0.00 $\pm$ 0.00
Discolaimidae	Pre	5	0.00 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.03	畸头科 Teratocephalidae	Bac	3	4.66 $\pm$ 0.06	0.84 $\pm$ 0.12
锥科 Dolichodoridae	Her	3	0.78 $\pm$ 0.03	1.04 $\pm$ 0.40	毛刺科 Trichodoridae	Her	4	0.00 $\pm$ 0.00	0.14 $\pm$ 0.03
矛线科 Dorylaimidae	Her	5	6.22 $\pm$ 0.09	1.85 $\pm$ 0.23	三孔科 Tripylidae	Pre	3	2.33 $\pm$ 0.05	12.47 $\pm$ 4.60
Heteroderidae	Her	3	1.30 $\pm$ 0.03	0.38 $\pm$ 0.05	垫刃科 Tylenchidae	Her	2	18.13 $\pm$ 0.17	3.66 $\pm$ 0.28
纽带科 Hoplolaimidae	Her	3	0.52 $\pm$ 0.02	0.56 $\pm$ 0.14	Tylenchorhynchidae	Her	3	0.26 $\pm$ 0.02	0.17 $\pm$ 0.04
烙线科 Ironidae	Pre	4	0.26 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.03	剑科 Xiphinematidae	Her	5	0.26 $\pm$ 0.02	0.17 $\pm$ 0.04
Linhomoeidae	Bac	3	0.00 $\pm$ 0.00	0.07 $\pm$ 0.02	阿利科 Xyalidae	Bac	2	1.04 $\pm$ 0.03	0.10 $\pm$ 0.03

Bac: 食细菌线虫 Bacterivorous nematodes; Fun: 食真菌线虫 Fungivorous nematodes; Her: 植食性线虫 Herbivorous nematodes; Omn: 杂食性线虫 Omnivorous nematodes; Pre: 捕食性线虫 Predatory nematodes. 下同 The same below.

## 2.2 基于科水平的线虫群落 $\alpha$ 多样性比较

将所获取的线虫 OTU 在 SILVA 真核生物数据库进行注释得到线虫的分类学信息,共记录 44 个科(表 2),其中腐殖质层和土壤表层中注释结果为线虫但未能归类到具体科信息(Unknown)的分别占 3.8%和 5.6%。

腐殖质层得到线虫 37 科,其中垫刃科(Tylenchidae, 18.1%)为优势类群,特有科 3 个:细咽科(Leptolaimidae)、盆咽科(Panagrolaimidae)和端垫刃科(Telotylenchidae)。

土壤表层发现线虫共 41 科,其中单齿科(Mononchidae, 45.4%)为优势类群,特有科 8 个:Alloionematidae、倒齿科(Anatonchidae)、类滑刃科(Aphelenchoididae)、孔咽科(Aporcelaimidae)、Aulolaimidae、盘甲科(Discolaimidae)、Linhomoeidae 和毛刺科(Trichodoridae)。

在科水平上对腐殖质层和土壤表层的线虫群落 Shannon 指数、Simpson 指数、丰富度和相对多度进行显著性检验,结果显示,土壤表层的线虫群落多样

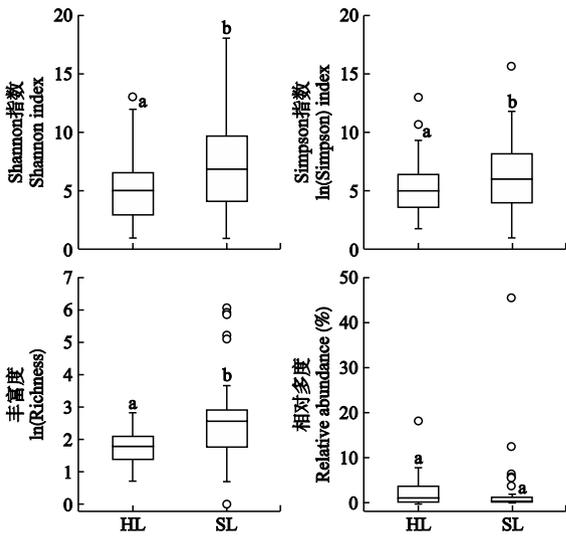


图2 科水平腐殖质层和土壤表层线虫群落  $\alpha$  多样性指数和相对多度

**Fig.2**  $\alpha$  diversity index and relative abundance of nematode communities in humus and soil surface layers at family level.

性指数均显著高于腐殖质层,但其相对多度呈现低于腐殖质层的趋势(图2)。

### 2.3 基于营养类群的线虫群落 $\alpha$ 多样性和相对多度比较

根据线虫食性不同在科水平进行线虫功能群归类,计算功能类群  $\alpha$  多样性指数,并对腐殖质层和土壤表层不同食性线虫的 Shannon 指数和 Simpson 指数进行显著性差异检验。结果表明:1)食细菌、食真菌和杂食性线虫在腐殖质层和土壤表层的多样性指数无显著性差异;2)土壤表层的植食性线虫和捕食性线虫的 Shannon 指数和 Simpson 指数均显著高于腐殖质层(图3)。

腐殖质层中相对多度最高的为食细菌线虫(44.0%),其次是植食性线虫(35.2%),食真菌、捕食性及杂食性线虫的相对多度均小于10%。土壤表层中捕食性线虫(58.5%)是主要优势类群,其次是食细菌线虫(18.5%)和植食性线虫(14.2%),杂食性和食真菌线虫相对多度均小于10%(图4)。

### 2.4 腐殖质层和土壤表层线虫群落的 $\beta$ 多样性

采用 Cody 指数和 Sorensen 非相似性指数对腐殖质层和土壤表层线虫群落的  $\beta$  多样性进行比较,结果表明,腐殖质层线虫群落的 Cody 指数显著低于土壤表层,而 Sorensen 非相似性指数高于土壤表层(图5)。

进一步采用 NMDS 对线虫群落结构进行分析,

结果表明,腐殖质层和土壤表层的线虫群落结构无明显差异,但腐殖质层线虫群落的变异程度小于土壤表层,土壤表层线虫群落结构更为发散(图6)。

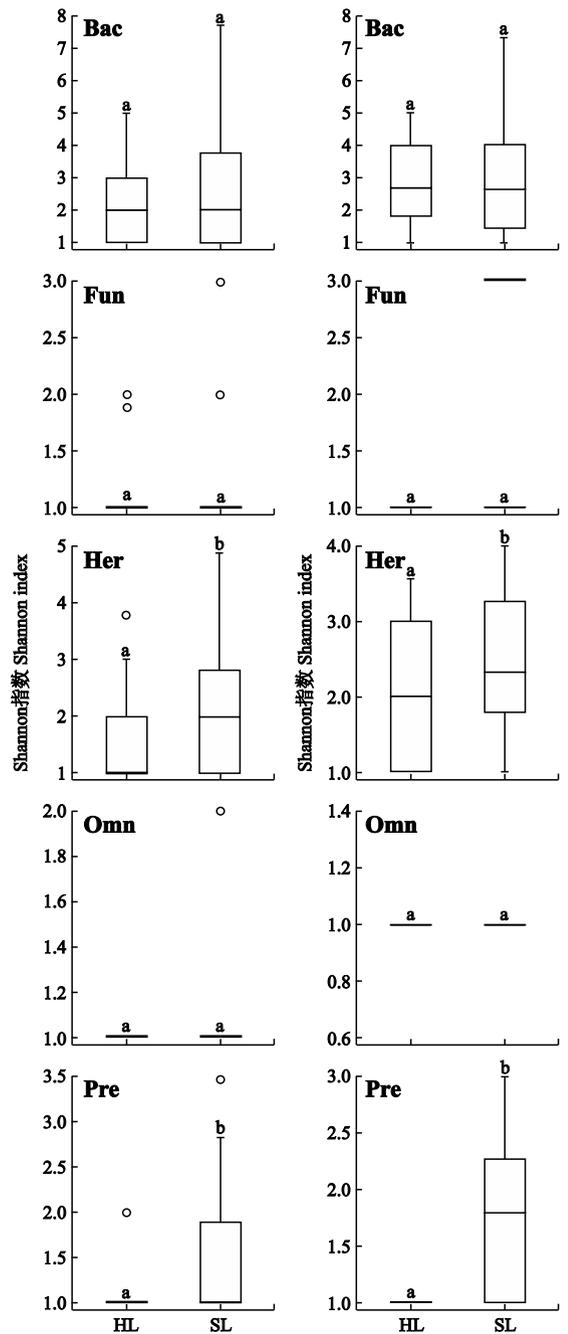


图3 基于营养类群比较腐殖质层和土壤表层线虫群落的  $\alpha$  多样性

**Fig.3** Comparison of  $\alpha$  diversity index and relative abundance of nematode communities in humus and soil surface layers based on trophic group.

Bac: 食细菌线虫 Bacterivorous nematodes; Fun: 食真菌线虫 Fungivorous nematodes; Her: 植食性线虫 Herbivorous nematodes; Omn: 杂食性线虫 Omnivorous nematodes; Pre: 捕食性线虫 Predatory nematodes. 下同 The same below.

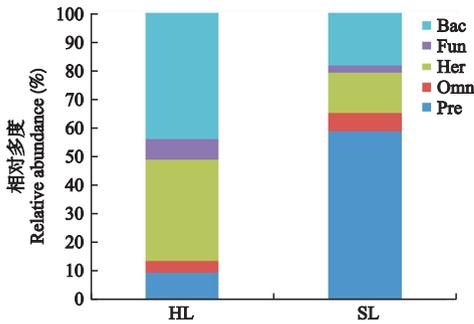


图4 寒温性针阔混交林腐殖质层和土壤表层不同食性线虫的相对多度比较

Fig. 4 Comparison on relative abundance of different feeding nematodes in humus and soil surface layers in cold temperate coniferous broadleaved mixed forest.

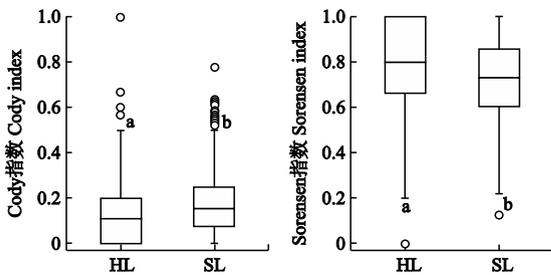


图5 寒温性针阔混交林腐殖质层和土壤表层线虫群落的 $\beta$ 多样性比较

Fig. 5 Comparison on nematode communities  $\beta$  diversity between humus and soil surface layers in cold temperate coniferous broadleaved mixed forest.

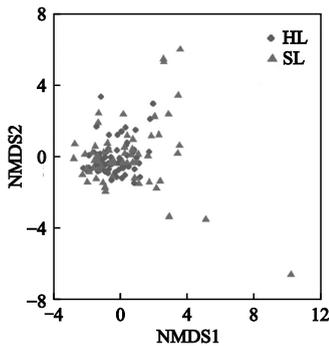


图6 寒温性针阔混交林腐殖质层和土壤表层线虫群落的非度量多维标度(NMDS)分析

Fig. 6 Non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis of nematode community between humus and soil surface layers in cold temperate coniferous broadleaved mixed forest.

### 3 讨论

#### 3.1 寒温性针阔混交林线虫群落组成

云南丽江玉龙雪山自然保护区寒温性针阔混交林腐殖质层和土壤表层线虫的多样性较为丰富,从

测序的 5474582 条序列中注释得到线虫 44 科,其中腐殖质层和土壤表层的特有类群分别为 3 和 8 科。从线虫群落的营养结构来看,腐殖质层优势类群以 r 对策的食细菌线虫 (44.0%) 和植食性线虫 (35.2%) 为主,土壤表层则以 K 对策的捕食性线虫 (58.5%) 为主,其中单齿科捕食性线虫 Mononchidae 占有绝对优势 (45.4%)。这与其他研究发现土壤中食细菌和食真菌线虫占据优势的结果不一致<sup>[10-16]</sup>。K 对策的捕食性线虫对食物资源条件依赖性较小而偏向留在土壤表层“大本营”,如单齿科捕食性线虫类群 Mononchidae 作为典型的 K 对策者,对环境条件而非食物的变化更敏感<sup>[20-21]</sup>。

总体来看,丽江寒温性针阔混交林中腐殖质层线虫相对多度高于土壤表层,可能与腐殖质层土壤有机碳含量较高有关<sup>[14]</sup>。大多数研究显示,凋落物和腐殖质层中食细菌线虫占有较高的相对多度 (39.2%~83.7%)<sup>[22]</sup>;Ou 等<sup>[23]</sup>对稻田、玉米田、休耕地和林地不同土层深度的线虫群落调查表明,线虫总数随土壤深度增加呈逐渐下降的趋势。这与本研究结果相一致。腐殖质层丰厚的微生物资源利于 r 对策的线虫定居,从而使得食细菌、食真菌和植食性线虫从土壤表层向腐殖质层聚集,呈现明显的表聚性,腐殖质层成为它们的主要聚集生境<sup>[24]</sup>。如研究发现,沙质森林中的土壤表面积累了未分解的松针凋落物,为食细菌线虫的大量定殖提供了条件。植食性线虫的丰度倾向于表层比底部多,因森林地面上有丰富的草本和灌木植物而使得植食性线虫占主导地位<sup>[20]</sup>。

此外,腐殖质层中食真菌线虫相对多度高于土壤表层,可从土壤 pH 和真菌在有机质分解时 K 对策线虫的特性来解释。在针叶林地区,土壤 pH 值趋于酸性,同时进入土壤的有机物富含木质素,氮含量低,更利于真菌产生菌丝体<sup>[25-26]</sup>。本研究区域土壤表层 pH 值为 5.5~8,而腐殖质层富含腐殖酸、胡敏酸等酸性物质,更利于真菌菌丝体的生长,有利于食真菌线虫的繁殖。

#### 3.2 线虫群落 $\alpha$ 多样性

线虫群落的一个重要特征是它们的多样性具有垂直分布差异,了解该特征有助于进一步理解土壤线虫群落结构及其功能<sup>[27]</sup>。丽江寒温性针阔混交林腐殖质层和土壤表层线虫群落 $\alpha$ 多样性的研究表明:虽然在 OTU 水平上腐殖质层和土壤表层线虫群落 $\alpha$ 多样性无显著性差异,但在科水平,土壤表层线虫群落 $\alpha$ 多样性显著高于腐殖质层。同

时,基于线虫营养类群的结果也显示土壤表层植食性和捕食性线虫的 Shannon 指数和 Simpson 指数均显著高于腐殖质层。本研究结果支持了 Kitagami 等<sup>[20]</sup>在针叶林的研究,即基于 OTU 水平的土壤线虫群落多样性指数  $H$  和  $1/D$  在土壤 0~10 cm 和 10~20 cm 之间没有显著性差异的格局。土壤线虫具有典型的土层垂直分布特征,通常受生境中生物、物理和化学因素的影响<sup>[28-29]</sup>。随着土壤深度的增加,线虫丰度逐渐减少,包括属和营养类群的组成和分布具有较大的变化<sup>[27-30]</sup>,而土壤表面的有机层(凋落物和腐殖质层)包含各种植物残体和丰富的微生物,导致线虫群落物种丰度较高<sup>[31]</sup>。

### 3.3 线虫群落 $\beta$ 多样性

$\beta$  多样性是指沿着环境梯度的变化物种替代的程度,表征群落内或者群落间环境异质性的程度及其对物种多样性的影响<sup>[32]</sup>。本研究显示,腐殖质层线虫群落 Cody 指数显著高于土壤表层,表明其物种更替速率快于土壤表层;而土壤表层 Sorensen 指数显著高于腐殖质层,说明土壤表层线虫群落结构非相似性高于腐殖质层。这可能与土壤层较腐殖质层有更高异质性的特征有关。NMDS 分析结果显示,线虫群落的非相似性并未体现在腐殖质层和土壤表层之间,而体现在土壤表层线虫群落结构内部差异大于腐殖质层线虫群落结构内部差异。这可能是由于土壤表层较腐殖质层具有更高的异质性所决定。另外,因腐殖质层有更为新鲜的有机物质如植物残体等,同时也涵养更多的细菌类群(细菌在激发效应中是  $r$  对策者),使得植食性和食细菌线虫这种  $r$  对策的生物类群因对食物资源的需求而上行取食,发生表聚现象。

综上所述,本研究通过高通量测序技术在 97% 的相似水平下对所测得线虫序列进行 OTU 聚类 and 生态学分析,获得土壤线虫多样性在腐殖质层和土壤表层不同生境的分布情况。从技术层面上是可以提供相对快速的评估,为今后研究不同植被以及不同气候条件下的土壤线虫群落结构和多样性特征提供了方法上的有力支持。高通量测序技术在线虫生态学中的应用,使得开展线虫动物在大空间尺度的生物地理分布格局研究成为可能,对于高丰度但不具备成熟形态特征的线虫幼虫以及隐种(外形相似,具备不同的生态和行为功能)的鉴定有所助益,而且系统发育信息也会被揭示。目前该技术有待加强之处为:需要完善测序序列注释的数据库,进一步结合 PCR 荧光定量和同位素示踪技术量化土壤线

虫在碎屑食物网的功能与调控过程。另一方面,本研究结果对进一步了解寒温性针阔混交林线虫多样性及其在腐殖质层和土壤表层的分布差异提供了数据积累。

### 参考文献

- [1] Bardgett RD, Van der Putten WH. Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature*, 2014, **515**: 505-511
- [2] 陈云峰, 韩雪梅, 李钰飞, 等. 线虫区系分析指示土壤食物网结构和功能研究进展. *生态学报*, 2014, **34** (5): 1072-1084 [Chen Y-F, Han X-M, Li Y-F, et al. Approach of nematode fauna analysis indicate the structure and function of soil food web. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, **34**(5): 1072-1084]
- [3] Neher DA. Role of nematodes in soil health and their use as indicators. *Journal of Nematology*, 2001, **33**: 161-168
- [4] Song D, Pan K, Tariq A, et al. Large-scale patterns of distribution and diversity of terrestrial nematodes. *Applied Soil Ecology*, 2017, **114**: 161-169
- [5] 张晓珂, 梁文举, 李琪. 我国土壤线虫生态学研究进展和展望. *生物多样性*, 2018, **26**(10): 1060-1073 [Zhang X-K, Liang W-J, Li Q. Recent progress and future directions of soil nematode ecology in China. *Biodiversity Science*, 2018, **26**(10): 1060-1073]
- [6] Floyd R, Abebe E, Papert A, et al. Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular Ecology*, 2002, **11**: 839-850
- [7] Foucher ALJL, Bongers T, Noble LR, et al. Assessment of nematode biodiversity using dgge of 18S rDNA following extraction of nematodes from soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, **36**: 2027-2032
- [8] Blaxter ML, Ley PD, Garey JR, et al. A molecular evolutionary framework for the phylum nematoda. *Nature*, 1998, **392**: 71-75
- [9] Oliveira CMG, Hübschen J, Brown DJF, et al. Phylogenetic relationships among *Xiphinema* and *Xiphidiorus* nematode species from Brazil inferred from 18S rDNA sequences. *Journal of Nematology*, 2004, **36**: 153-159
- [10] 薛蓓, 侯磊, 薛会英. 基于高通量测序分析西藏北部高寒草甸不同深度土壤线虫群落分布特征. *生态学报*, 2019, **39**(11): 1-7 [Xue B, Hou L, Xue H-Y. Research on the characteristics of soil nematode communities in alpine meadow in northern Tibet by using high-throughput sequencing. *Acta Ecologica Sinica*, 2019, **39** (11): 4088-4095]
- [11] Powers TO, Neher DA, Mullin P, et al. Tropical nematode diversity: Vertical stratification of nematode communities in a Costa Rican humid lowland rainforest. *Molecular Ecology*, 2009, **18**: 985-996
- [12] Moroenyane I, Dong K, Singh D, et al. Deterministic processes dominate nematode community structure in the Fynbos Mediterranean heathland of South Africa. *Evolutionary Ecology*, 2016, **30**: 685-701

- [13] Porazinska DL, Giblin-Davis RM, Faller L, *et al.* Evaluating high-throughput sequencing as a method for metagenomic analysis of nematode diversity. *Molecular Ecology Resources*, 2009, **9**: 1439–1450
- [14] Van den Hoogen J, Geisen S, Routh D, *et al.* Soil nematode abundance and functional group composition at a global scale. *Nature*, 2019, **572**: 194–198
- [15] 谌亚, 杨万勤, 吴福忠, 等. 川西亚高山/高山森林土壤线虫多样性. *应用生态学报*, 2017, **28**(10): 3360–3368 [Chen Y, Yang W-Q, Wu F-Z, *et al.* Diversity of soil nematode communities in the subalpine and alpine forests of western Sichuan, China. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2017, **28**(10): 3360–3368]
- [16] 张荣芝, 刘兴良, 钟红梅, 等. 土壤线虫群落在贡嘎山东坡不同垂直气候带间的分布格局. *应用与环境生物学报*, 2016, **22**(6): 959–971 [Zhang R-Z, Liu X-L, Zhong H-M, *et al.* Distribution pattern of soil nematode communities along the vertical climate zones on the eastern slope of Gongga Mountain. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2016, **22**(6): 959–971]
- [17] 黄华, 陈智发, 刘德团, 等. 玉龙雪山寒温性云冷杉林动态监测样地的物种组成及群落结构. *生物多样性*, 2017, **25**(3): 255–264 [Huang H, Chen Z-F, Liu D-T, *et al.* Species composition and community structure of the Yulongxueshan (Jade Dragon Snow Mountains) forest dynamics plot in the cold temperate spruce-fir forest, Southwest China. *Biodiversity Science*, 2017, **25**(3): 255–264]
- [18] Viglierchio DR, Schmitt RV. On the methodology of nematode extraction from field samples; Comparison of methods for soil extraction. *Journal of Nematology*, 1983, **15**: 450–454
- [19] Baselga A, Orme CDL. Betapart: An R package for the study of beta diversity. *Methods in Ecology and Evolution*, 2012, **3**: 808–812
- [20] Bongers TJO. The maturity index: An ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition. *Oecologia*, 1990, **83**: 14–19
- [21] Ferris H, Bongers T, Goede RGM. A framework for soil food web diagnostics: Extension of the nematode faunal analysis concept. *Applied Soil Ecology*, 2001, **18**: 13–29
- [22] Kitagami Y, Kanzaki N, Matsuda Y. Distribution and community structure of soil nematodes in coastal Japanese pine forests were shaped by harsh environmental conditions. *Applied Soil Ecology*, 2017, **119**: 91–98
- [23] Ou W, Liang W, Jiang Y, *et al.* Vertical distribution of soil nematodes under different land use types in an aquatic brown soil. *Pedobiologia*, 2005, **49**: 139–148
- [24] Yeates GW, Stachowiak GW. Abundance, diversity, and resilience of nematode assemblages in forest soils. *Canadian Journal of Forest Research*, 2007, **37**: 216–225
- [25] Frostegård A, Bååth E. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biology and Fertility of Soils*, 1996, **22**: 59–65
- [26] Wardle DA. Communities and Ecosystems: Linking the aboveground and belowground components. *Austral Ecology*, 2010, **29**: 358–359
- [27] Lazarova SS, Goede RGM, Peneva VK, *et al.* Spatial patterns of variation in the composition and structure of nematode communities in relation to different microhabitats: A case study of *Quercus dalechampii* Ten. forest. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, **36**: 701–712
- [28] Liang W, Lavian I, Steinberger Y. Dynamics of nematode community composition in a potato field. *Pedobiologia*, 1999, **43**: 459–469
- [29] López-Fando C, Bello A. Variability in soil nematode populations due to tillage and crop rotation in semi-arid Mediterranean agrosystems. *Soil and Tillage Research*, 1995, **36**: 59–72
- [30] Yeates GW. Populations of nematode genera in soils under pasture. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 1980, **24**: 107–121
- [31] Long JR, Laudon H, Blume-Werry G, *et al.* Nematode community resistant to deep soil frost in boreal forest soils. *Pedobiologia*, 2016, **59**: 243–251
- [32] 陈圣宾, 欧阳志云, 徐卫华, 等. Beta多样性研究进展. *生物多样性*, 2010, **18**(4): 323–335 [Chen S-B, Ouyang Z-Y, Xu W-H, *et al.* A review of beta diversity studies. *Biodiversity Science*, 2010, **18**(4): 323–335]

作者简介 王文婷, 女, 1993年生, 硕士研究生。主要从事土壤线虫分子生态学研究。E-mail: wangwenting@xtbg.ac.cn

责任编辑 肖红

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



王文婷, 夏尚文, 肖海峰, 等. 玉龙雪山自然保护区寒温性针阔混交林腐殖质层和土壤表层线虫群落结构差异. *应用生态学报*, 2020, **31**(3): 761–768

Wang W-T, Xia S-W, Xiao H-F, *et al.* Difference of soil nematode communities between the humus and soil surface layer in the cold temperate coniferous and broadleaved mixed forest of Yulong Snow Mountain Nature Reserve, Yunnan, China. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2020, **31**(3): 761–768