



•研究报告•

# 宁南山区不同植被恢复方式下土壤线虫群落特征： 形态学鉴定与高通量测序法比较

王楠<sup>1,2</sup>, 黄菁华<sup>1,3\*</sup>, 霍娜<sup>1,2</sup>, 杨盼盼<sup>3,4</sup>, 张欣玥<sup>1,5</sup>, 赵世伟<sup>1,2,3</sup>

1. 西北农林科技大学黄土高原土壤侵蚀与旱地农业国家重点实验室, 陕西杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学资源环境学院, 陕西杨凌 712100; 3. 中国科学院水利部水土保持研究所, 陕西杨凌 712100; 4. 中国科学院大学, 北京 100049; 5. 西北农林科技大学林学院, 陕西杨凌 712100

**摘要:** 线虫是土壤食物网的重要组分, 也是土壤健康与生态系统恢复的重要指示生物, 因此准确测定线虫群落特征是发挥其生态指示作用的基础。传统线虫学研究多采用形态学鉴定方法, 但高通量测序技术近年来也逐渐受到重视。然而, 关于这两种方法的对比研究目前仍比较缺乏。本研究同时采用形态学鉴定和高通量测序法, 在黄土高原宁夏南部山区, 对不同植被恢复方式下(农田、自然恢复草地、柠条(*Caragana korshinskii*)人工林地和苜蓿人工草地)土壤线虫的数量、群落格局和生态指数进行了测定和比较。结果表明: (1)高通量测序仅提供线虫类群的相对多度, 而形态学鉴定法能够测定土壤线虫的绝对多度, 后者测定结果表明3种植被恢复样地, 特别是自然恢复草地和柠条人工林地, 较农田具有更高的土壤线虫多度; (2)高通量测序法检获的线虫类群数(3纲4目26科42属)高于形态学鉴定法的测定结果(2纲3目18科27属), 但两种方法仅检获15个共有线虫属, 前者检测到的植物寄生线虫属数(22属)较后者(7属)显著增加, 而食细菌线虫和杂食-捕食线虫则相反; (3)在两种方法下, 相比农田, 3种植被恢复样地尤其是自然恢复草地和柠条人工林地, 其食微线虫的相对多度均显著下降, 而植物寄生线虫和杂食-捕食线虫的相对多度大幅上升, 这也导致线虫成熟度指数(MI)和植物寄生线虫指数(PPD)的提高及瓦斯乐卡指数(WI)的显著下降; (4)相比形态学鉴定法, 高通量测序法能检测到更丰富多样的植物寄生线虫, 在该方法下土壤线虫群落的组成、结构和生态指数在植被恢复样地与农田之间的差异也更为显著。综上所述, 采用形态学鉴定和高通量测序法测定的不同植被恢复方式下的线虫群落特征具有显著差异。

**关键词:** 形态学鉴定; 高通量测序; 土壤线虫; 群落结构; 植被恢复

王楠, 黄菁华, 霍娜, 杨盼盼, 张欣玥, 赵世伟 (2021) 宁南山区不同植被恢复方式下土壤线虫群落特征: 形态学鉴定与高通量测序法比较. 生物多样性, 29, 1513–1529. doi: 10.17520/biods.2021124.

Wang N, Huang JH, Huo N, Yang PP, Zhang XY, Zhao SW (2021) Characteristics of soil nematode community under different vegetation restoration approaches in the mountainous region of southern Ningxia: A comparative study based on morphological identification and high-throughput sequencing methods. Biodiversity Science, 29, 1513–1529. doi: 10.17520/biods.2021124.

## Characteristics of soil nematode community under different vegetation restoration approaches in the mountainous region of southern Ningxia: A comparative study based on morphological identification and high-throughput sequencing methods

Nan Wang<sup>1,2</sup>, Jinghua Huang<sup>1,3\*</sup>, Na Huo<sup>1,2</sup>, Panpan Yang<sup>3,4</sup>, Xinyue Zhang<sup>1,5</sup>, Shiwei Zhao<sup>1,2,3</sup>

1 State Key Laboratory of Soil Erosion and Dryland Farming on Loess Plateau, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100

2 College of Natural Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100

3 Institute of Soil and Water Conservation, Chinese Academy of Sciences & Ministry of Water Resources, Yangling, Shaanxi 712100

4 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049

5 College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100

收稿日期: 2021-04-02; 接受日期: 2021-06-03

基金项目: 国家自然科学基金(31500449)、陕西省自然科学基金基础研究计划(2020JQ-435)和陕西省引进博士经费(A279021836)

\* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: jhuang@nwfufu.edu.cn

<https://www.biodiversity-science.net>

**ABSTRACT**

**Aims:** Nematodes are considered as an important part of the soil food web, and their community characteristics are an effective indicator of soil health and ecosystem restoration. The accurate measurement of soil nematode communities is necessary to better understand their ecological function. Historically, comparisons in nematode morphology has been used to understand nematode community characteristics. In recent years, the use of high-throughput sequencing (HTS) methods has become more popular. However, relatively little is known about how these two methods compare when analyzing soil nematode communities.

**Methods:** Here, we used morphological identification and HTS methods to simultaneously analyze soil nematode abundance, community composition and structure, and ecological indexes, under different vegetation restoration approaches (cropland, naturally restored grassland, *Caragana korshinskii* plantation and *Medicago sativa* artificial grassland) in the mountain area of southern Ningxia in the Loess Plateau region.

**Results:** We found that morphological identification is a more accurate method to determine the absolute abundance of soil nematodes, while HTS can only obtain relative abundance data. In our study, the morphological method showed higher abundance of soil nematodes in the sites under vegetation restoration, especially in the naturally restored grassland and *C. korshinskii* plantation. The HTS method, on the other hand, detected more nematode genera (42 genera belonging to 3 classes, 4 orders, and 26 families) than morphological method (27 genera belonging to 2 classes, 3 orders, and 18 families). However, only 15 genera were simultaneously identified with both methods, because the HTS method detected more plant-parasitic nematode genera (22) but fewer genera of bacterial-feeding nematodes and omnivores-predators than the morphological method. One major result indicated by both methods showed that the relative abundance of microbial-feeding nematodes greatly decreased, while those of plant parasites and omnivores-predators substantially increased, in all the sites under vegetation restoration when compared with nematodes in the farmland. This was especially the case in the naturally restored grassland and *C. korshinskii* plantation, accompanied with the increases of maturity index (*MI*) and plant-parasitic index (*PPI*) and a decrease in the Wasilewska index (*WI*). When compared with the morphological method, the HTS method could detect more abundant and diverse plant parasites. Therefore, more significant differences were found in the composition, structure and ecological indexes of soil nematode communities when the HTS method was applied.

**Conclusion:** Overall, the characteristics of soil nematode communities and their response patterns to vegetation restoration highly depended on the applied methodology, which greatly influences the understanding and evaluation of how vegetation restoration impacts the soil ecosystem.

**Key words:** morphological identification; high-throughput sequencing; soil nematodes; community structure; vegetation restoration

黄土高原是世界上水土流失最严重、生态环境最脆弱的地区之一，也是我国生物多样性保护和生态恢复的重点区域(Shi & Shao, 2000; 程积民等, 2014)。自20世纪90年代以来，以退耕还林还草为代表的植被恢复措施在黄土高原开始全面实施，显著提高了该地区的植被覆盖度，并在保持水土、遏制土地退化和保护生物多样性等方面发挥着重要的作用(常庆瑞等, 1999; Zhang, 2005; 胡婵娟和郭雷, 2012; 刘国彬等, 2017)。科研工作者针对植被恢复的生态环境效应也开展了一系列研究，探索植被恢复对地上植物群落、土壤理化性质及微生物群落的影响(安韶山和黄懿梅, 2006; Fu et al, 2010; 程积民等, 2014; 翟辉等, 2016)。然而，在黄土高原地区，较少有研究关注在土壤食物网中占据重要地位的线虫群落对植被恢复的响应，这限制了我们对植被恢复下土壤生物多样性，以及土壤食物网结构和功

能变化的认识。

线虫是土壤中种类和数量最丰富的动物类群之一，它们广泛存在于各类生境中，占据土壤食物网多个营养级的关键位置，直接参与有机质分解和养分循环等土壤生态过程(Yeates, 1981; 李琪等, 2007)，对植物生长和土壤生态功能有着重要影响(吴纪华等, 2007; Zhang et al, 2013; 邵元虎等, 2015; 张晓珂等, 2018)。同时，线虫对环境变化响应灵敏，其群落组成和结构特征与土壤食物网的结构与功能密切相关，并能提供有关土壤生态过程的独特信息，因此已被广泛作为指示土壤生态系统健康与恢复状况的生物学指标(Niles & Freckman, 1998; Bongers & Ferris, 1999; Yeates, 2003; 陈云峰等, 2014)。已有研究表明，植被恢复能够显著提高土壤线虫数量，改善线虫群落的组成、结构和多样性(李辉信等, 2002)，而不同植被恢复措施下土壤线虫群

落的变化格局能够有效反映植被恢复水平及其生态环境效应的差异(张伟东等, 2010; Guan et al, 2015), 为指导不同地区植被恢复与管理提供依据。

迄今为止, 已有研究主要采用传统的形态学鉴定方法对线虫群落的组成、结构和多样性进行分析, 通常是利用浅盘或漏斗分离以及蔗糖漂浮离心等方法将土壤样本中的线虫分离提取出来, 再依据其形态学特征在显微镜下进行计数和鉴定(Mao et al, 2004)。这种方法需要鉴定者具备专业的分类学知识和相关工作经验, 且工作量巨大, 费时费力(Geisen et al, 2018)。近年来, 随着分子生物学技术的发展, 高通量测序因其测序量大、灵敏度高和用时短等优势开始成为解析微生物群落的重要工具, 并逐渐应用于线虫研究中(Oliveira et al, 2004; 田雪亮等, 2012; Du et al, 2020; Gao et al, 2021)。国外学者采用高通量测序技术, 先后对热带雨林、北极苔原、荒地以及沿海沙丘的入侵植物等不同植被类型下的线虫群落特征进行了分析(Powers et al, 2009; Kerfahi et al, 2016; Moroenyane et al, 2016; Fitoussi et al, 2016)。在我国, 李树战等(2015)、薛蓓等(2019)和王文婷等(2020)也分别对湖南杉木(*Cunninghamia lanceolata*)人工林、藏北高寒草甸和云南寒温性针阔混交林的土壤线虫群落进行了高通量测序分析。这些研究普遍使用PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio)、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)或E.Z.N.A Soil DNA (Omega)等试剂盒, 提取土壤总DNA (李树战等, 2015; 侯磊等, 2019; 薛蓓等, 2019)或分离浓缩的线虫悬液DNA (Fitoussi et al, 2016; Kerfahi et al, 2016; Moroenyane et al, 2016; Gao et al, 2021), 采用真核生物通用引物(例如3NDF和1132rmodR, 或NF1-F和18Sr2b-R等)对18S rDNA的V4可变区段进行扩增, 扩增产物纯化后进行高通量测序。与形态学鉴定法相比, 高通量测序法能够检测到更多的线虫物种, 但局限于以相对多度表征物种数量, 同时普遍存在物种注释率低(王文婷等, 2020), 以及线虫多样性被高估等问题(Kunin et al, 2010)。因此, 形态学鉴定和高通量测序在分析土壤线虫群落方面各有优势与不足, 结合两种方法对其测定结果进行比较和分析, 将有助于改进土壤线虫群落测定方法, 为后续线虫研究提供指导。

本研究以黄土高原植被恢复的重点区域——

宁夏南部山区作为研究区域, 以该地区典型植被恢复方式下的土壤线虫群落为研究对象, 同时采用形态学鉴定和高通量测序两种方法分析线虫的数量、群落组成和结构, 以及生态指数, 并进行比较, 旨在探明两种分析方法下土壤线虫群落特征的差异及其对不同植被恢复方式的响应格局, 以准确评估宁南山区植被恢复的生态环境效应, 为指导该地区的植被恢复和生物多样性保护, 以及进一步促进线虫的生态指示作用研究提供理论依据和方法支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究区概况

研究区位于黄土高原西部、宁夏回族自治区南部的固原市原州区河川乡上黄村地区(106°27′–106°29′ E, 35°60′–36°02′ N), 该区域山峦起伏, 海拔1,534–1,822 m。气候为半干旱中温带向暖温带过渡季风气候, 年均气温7.1℃, 年均降水量约420 mm, 主要集中在7–9月, 干燥度指数1.5–2.0, 无霜期150 d。土壤主要类型为黄土母质发育的黄绵土, 由于其独特的疏松且具垂直节理的特性, 极易遭受侵蚀, 水土流失严重。自20世纪80年代起, 该地区实施了大面积的退耕还林还草工程, 将坡耕地通过自然或人工植被恢复方式转换为林地或草地。这促使该地区植被覆盖度显著提高, 生态环境逐渐得到改善, 主要的植被类型包括以柠条(*Caragana korshinskii*)为主的人工灌木林, 以紫花苜蓿(*Medicago sativa*)为主的人工草地和通过自然植被恢复形成的自然恢复草地(由长芒草(*Stipa bungeana*)、百里香(*Thymus mongolicus*)、冰草(*Agropyron cristatum*)、星毛委陵菜(*Potentilla acaulis*)等植物组成), 主要农作物以玉米(*Zea mays*)为主。

### 1.2 样品采集

在对研究区进行野外植被调查的基础上, 选择地形条件和恢复时间相近的3种典型植被恢复方式下的区域(自然恢复草地、人工苜蓿草地、人工柠条灌木林地)作为研究样地, 并以农田(种植玉米, 耕种 > 20年)作为对照。样地基本概况如表1所示。于2019年8月(植物生长季)进行采样。在每个样地中设置3个10 m × 10 m的采样小区, 小区间及其与样地边界的距离均大于20 m。在每个采样小区内, 按“S”形路线均匀设置12个取样点, 去除土壤表面凋落物



表1 宁南山区不同植被类型样地概况

Table 1 Descriptions of the sampling sites under different vegetation types in the mountainous area of southern Ningxia

样地 Sampling site	植被特征 Vegetation characteristics	恢复年限 Restoration year	经度 Longitude	纬度 Latitude	海拔 Altitude (m)	坡向 Aspect	坡度 Slope degree (°)
农田 Cropland (CL)	玉米 Corn	>20	106°27'54" E	36°0'42" N	1,530	西偏北14° W14°N	7
自然恢复草地 Natural grassland (NR)	长芒草 <i>Stipa bungeana</i> 百里香 <i>Thymus mongolicus</i> 冰草 <i>Agropyron cristatum</i>	24	106°28'12" E	36°0'35" N	1,673	西偏北12° W12°N	24
柠条人工林地 <i>Caragana korshinskii</i> plantation (CK)	柠条 <i>Caragana korshinskii</i> 长芒草 <i>Stipa bungeana</i> 冰草 <i>Agropyron cristatum</i>	24	106°28'12" E	36°0'40" N	1,670	西偏北22° W22°N	23
苜蓿人工草地 <i>Medicago sativa</i> grassland (MS)	紫花苜蓿 <i>Medicago sativa</i> 长芒草 <i>Stipa bungeana</i>	12	106°28'02" E	36°0'46" N	1,591	西偏北16° W16°N	15

表2 宁南山区不同植被类型样地土壤理化性质

Table 2 Soil physical and chemical properties in the sampling sites under different vegetation types in the mountainous area of southern Ningxia

样地 Sampling site	pH	土壤含水量 SM (%)	有机碳 SOC (g/kg)	全氮 TN (g/kg)	速效磷 Olsen-P (mg/kg)	铵态氮 NH <sub>4</sub> -N (mg/kg)	硝态氮 NO <sub>3</sub> -N (mg/kg)
农田 Cropland (CL)	8.24 <sup>a</sup>	6.40 <sup>a</sup>	7.34 <sup>b</sup>	0.80 <sup>c</sup>	45.58 <sup>a</sup>	0.73 <sup>ab</sup>	1.76 <sup>a</sup>
自然恢复草地 Natural grassland (NR)	8.02 <sup>b</sup>	5.55 <sup>a</sup>	15.90 <sup>a</sup>	1.42 <sup>a</sup>	5.20 <sup>b</sup>	1.46 <sup>a</sup>	2.70 <sup>a</sup>
柠条人工林地 <i>Caragana korshinskii</i> plantation (CK)	8.00 <sup>b</sup>	6.02 <sup>a</sup>	17.47 <sup>a</sup>	1.32 <sup>ab</sup>	5.73 <sup>b</sup>	0.62 <sup>ab</sup>	2.25 <sup>a</sup>
苜蓿人工草地 <i>Medicago sativa</i> grassland (MS)	8.26 <sup>a</sup>	6.37 <sup>a</sup>	8.11 <sup>b</sup>	0.97 <sup>bc</sup>	7.40 <sup>b</sup>	0.40 <sup>b</sup>	1.20 <sup>a</sup>

同列不同小写字母表示样地间差异显著( $P < 0.05$ )。SM, Soil moisture; SOC, Soil organic carbon; TN, Total nitrogen; Olsen-P, Available phosphorus. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference at the 0.05 level.

层后, 用土钻(直径5 cm)采集0–10 cm土壤样品混合均匀, 采用四分法留取1 kg左右土样, 去除可见根系、石块后用无菌塑封袋密封, 置于冰盒冷藏并迅速带回实验室。采集的土壤样品过5 mm筛后分为2份, 1份置于冰箱(4℃)内冷藏, 用于形态鉴定法下分离和提取土壤线虫; 1份在–20℃冷冻保存, 用于土壤线虫的高通量测序分析。各样地土壤样品的基本理化性质如表2所示。

### 1.3 土壤线虫DNA提取、PCR扩增和高通量测序

采用PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, USA)试剂盒对不同样地的土壤样品总DNA进行提取, 利用1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组DNA质量和浓度。采用引物3NDF (5'-GGCAAGTCTGGTGCCAG-3')和1132-rmodR (5'-TCCGTC AATTYCTTTAAGT-3')扩增18S rDNA的V4可变区(Geisen et al, 2018)。PCR反应体系(总体积为25 μL): 12.5 μL KAPA 2G Robust Hot Start Ready Mix、1 μL 正向引物(5 μM)、1 μL反向引物(5 μM)、5 μL DNA (加入的DNA总量为30 ng), 最后加入5.5 μL dd H<sub>2</sub>O。反应参数: 95℃预变性5

min; 95℃变性45 s, 55℃退火50 s, 72℃延伸45 s, 28个循环; 72℃延伸10 min。PCR产物使用1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增目的条带的大小, 并用Agencourt AMPure XP核酸纯化试剂盒(Beckman Coulter, Kraemer Boulevard Brea, CA, USA)纯化。PCR产物用于构建线虫多样性测序文库, 在北京奥维森基因科技有限公司使用Illumina Miseq PE300高通量测序平台进行Paired-end测序。

下机数据经过QIIME (v1.8.0)软件根据Barcode序列拆分样本, 使用Pear (v0.9.6)软件对数据进行过滤、拼接。去除打分值低于20、含有模糊碱基和引物错配的序列。拼接时最小overlap设置为10 bp, 错配率为0.1。使用Vsearch (v2.7.1)软件denovo方法去除短序列和嵌合体序列。使用Vsearch (v2.7.1)软件uparse算法对优质序列进行OTU (operational taxonomic units)聚类, 相似性阈值为97%。使用Blast算法与NCBI的SRA数据库进行比对, 设置1e-5的阈值, 得到每个OTU对应的物种分类信息。

### 1.4 土壤线虫形态学分离鉴定方法

采用浅盘-蔗糖离心浮选连续提取法分离提取

100 g鲜土中的线虫(Liu et al, 2008), 经过温和热杀死法和TAF固定液固定后, 倒入标本瓶。在解剖镜下进行线虫计数, 并换算为100 g干土中线虫的数量。随机抽取100条线虫在生物显微镜下进行形态学分类鉴定, 根据每条线虫的形态特征, 参照尹文英等(1998)和Bongers (1988)鉴定至属的水平, 并根据不同属线虫头部形态特征和取食生境划分为不同的营养类群(植物寄生线虫、食细菌线虫、食真菌线虫、杂食-捕食线虫), 根据线虫的生活史策略赋予相应的c-p值(1-5) (从c-p值为1的r-对策者到c-p值为5的K-对策者) (Bongers, 1990)。

### 1.5 土壤线虫生态指数

Margalef丰富度指数(Yeates & William, 1997):

$$SR = (S - 1) / \ln N \quad (1)$$

Shannon多样性指数(Shannon, 1951):

$$H' = -\sum P_i \ln P_i \quad (2)$$

Simpson指数(Simpson, 1949):

$$\lambda = \sum P_i^2 \quad (3)$$

Pielou均匀度指数(Neher, 2001):

$$J' = H' / \ln S \quad (4)$$

其中,  $N$ 为鉴定的线虫个体数目(形态鉴定法)或隶属于线虫动物门的序列数(高通量测序法);  $S$ 为鉴定的分类单元的数目;  $P_i$ 为第*i*个分类单元中个体数(或序列数)占线虫总个体数量(或总序列数)的比例。

成熟度指数(Bongers, 1990):

$$MI = \sum v_i f_i \quad (5)$$

其中,  $v_i$ 为自由生活线虫的生活史c-p值,  $f_i$ 为某一科/属*i*在自由生活线虫(不包括植物寄生线虫)总数(或总序列数)中所占的比例, 能反映土壤生态系统稳定性和受干扰影响的程度。

植物寄生线虫指数(Bongers, 1990):

$$PPI = \sum v_i f_i \quad (6)$$

其中,  $f_i$ 为第*i*类植物寄生线虫在线虫群落总数(或总序列数)中所占的比例。

瓦斯乐卡指数(Wasilewska, 1994):

$$WI = (B + F) / P \quad (7)$$

该指数能够指示土壤的健康状况。

线虫通路比值(Yeates, 2003):

$$NCR = B / (B + F) \quad (8)$$

该指数可反映土壤中有有机质分解途径。在WI和NCR指数的计算公式中,  $B$ 和 $F$ 分别是食细菌和食真菌线

虫数量(或序列数),  $P$ 为植物寄生线虫数量(或序列数)。

### 1.6 数据分析

采用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析。采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)比较不同植被类型下土壤线虫群落特征的差异( $P < 0.05$ ), 平均值多重比较采用LSD法。采用Pearson相关分析研究两种测定方法下共有线虫属的相对多度在所有样地中的相关关系。采用CANOCO for Windows 5.0软件对线虫群落进行主成分分析, 解释不同植被类型下土壤线虫群落组成的差异。

## 2 结果

### 2.1 土壤线虫群落多度

通过形态学分类鉴定方法, 从4种植被类型样地中共分离提取土壤线虫7,168条, 平均密度为597条/100 g干土。不同样地间的土壤线虫数量差异极显著( $P < 0.001$ ), 具体表现为: 自然恢复草地 > 柠条人工林地 > 苜蓿人工草地 > 农田(图1), 其中自然恢复草地和柠条人工林地中土壤线虫数量无显著差异, 但显著高于苜蓿人工草地( $P < 0.05$ ), 而农田土壤线虫数量极显著低于3种植被恢复样地( $P < 0.001$ ) (图1)。

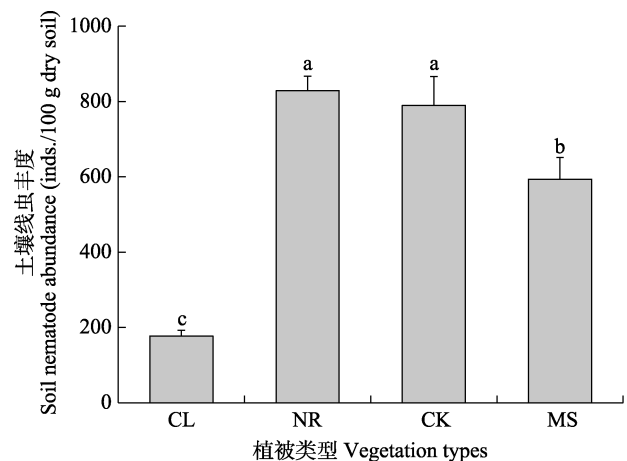


图1 形态学鉴定法下宁南山区不同植被类型样地土壤线虫数量(平均值 + 标准误)。CL: 农田; NR: 自然恢复草地; CK: 柠条人工林地; MS: 苜蓿人工草地。

Fig. 1 Total abundance of soil nematodes in the sampling sites under different vegetation types in the mountainous region of southern Ningxia determined by morphological identification method (mean + SE). CL, Cropland; NR, Natural grassland; CK, *Caragana korshinskii* plantation; MS, *Medicago sativa* grassland.

采用高通量测序技术无法测定土壤线虫的绝对多度, 仅能比较所测得的线虫序列数量。在所有样地中, 经过高通量测序共获得优质序列372,152条, 其中隶属于线虫动物门的优质序列6,507条, 共包含84个OTU (表3)。不同样地土壤样品序列数由高到低依次为柠条人工林地(CK)、自然恢复草地(NR)、农田(CL)、苜蓿人工草地(MS) (表3), 这与形态学鉴定结果略有不同。所有样地的土壤样品覆盖率均大于98%, 表明土壤样品测序深度达较高水平, 测序结果可以反映土壤中生物的真实情况。然而, 测序结果显示, 所有样地的样品中均存在着超过55%的序列无法识别, 表明可能存在着相当比例的未被识别的线虫物种, 这一定程度影响了线虫群落分析的准确性。

## 2.2 土壤线虫群落的组成和结构

### 2.2.1 形态学鉴定法

采用形态鉴定法分离提取的线虫隶属于2纲3目18科27属, 其中有15属在高通量测序法下也被检

测到(表4)。在所有样地中, 优势属(相对多度 > 10%)和常见属(相对多度 > 1%)的数量占线虫总数的比例均达到了95%以上, 而每个样地中有4–6个稀有线虫属(相对多度 < 1%)。不同植被类型下土壤线虫群落的组成存在明显差异。线虫属数为柠条人工林地 > 自然恢复草地 > 农田 > 苜蓿人工草地(表4)。农田中线虫优势属为真滑刃属(*Aphelenchus*)、头叶属(*Cephalobus*)和茎属(*Ditylenchus*), 其个体数量分别占总数的25.4%、19.5%和13.5%; 自然恢复草地中线虫优势属为矮化属(*Tylenchorhynchus*)和丽突属(*Acrobeles*), 分别占线虫总数的21.1%和11.5%; 柠条人工林地中线虫优势属为矮化属, 其数量占总数的16.2%; 苜蓿人工草地中优势属为头叶属、盘旋属(*Rotylenchus*)、茎属和垫咽属(*Tylencholaimus*), 占比依次为22.6%、18.9%、16.8%和12.7% (表4)。对4种样地的土壤线虫群落组成进行主成分分析, 前两轴分别解释了35.9%和19.7%的变异信息(累计达55.6%) (图2A)。结果表明土壤线虫群落在属水平上

表3 高通量测序法下宁南山区不同植被类型样地土壤线虫测序信息

Table 3 Sequence information of soil nematodes in the sampling sites under different vegetation types in the mountainous region of southern Ningxia determined by high-throughput sequencing method

样地 Sampling site	序列数 Sequence number	OTU数目 Number of OTUs	不能识别OTU比例 Proportion of unidentified OTUs (%)	覆盖率 Coverage (%)
农田 Cropland (CL)	447 <sup>ab</sup>	26	59.82	98.23 <sup>a</sup>
自然恢复草地 Natural grassland (NR)	633 <sup>ab</sup>	38	59.12	98.44 <sup>a</sup>
柠条人工林地 <i>Caragana korshinskii</i> plantation (CK)	938 <sup>a</sup>	48	57.53	98.24 <sup>a</sup>
苜蓿人工草地 <i>Medicago sativa</i> grassland (MS)	151 <sup>b</sup>	42	57.40	98.02 <sup>a</sup>

同列不同小写字母表示样地间差异显著( $P < 0.05$ )。Different lowercase letters in the same column indicate significant difference at the 0.05 level.

表4 基于形态学鉴定法和高通量测序法测定的宁南山区不同植被类型样地中土壤线虫属的相对多度

Table 4 Relative abundance of soil nematode genera in the sampling sites under different vegetation types in the mountainous region of southern Ningxia based on morphological identification and high-throughput sequencing

线虫属 Nematode genus	营养类群 Trophic group	c-p值 c-p value	相对多度 Relative abundance (%)							
			农田 (CL)		自然恢复草地 (NR)		柠条人工林地 (CK)		苜蓿人工草地 (MS)	
			I	II	I	II	I	II	I	II
头叶属 <i>Cephalobus</i>	BF	2	19.5	22.0	0.6	2.7	7.6	5.4	22.6	5.8
拟丽突属 <i>Acrobeloides</i>	BF	2	0.3	11.4	–	1.9	2.5	4.2	0.3	5.0
管咽属 <i>Aulolaimus</i>	BF	3	–	–	–	–	–	–	–	0.8
中杆属 <i>Mesorhabditis</i>	BF	1	–	5.1	–	–	–	–	–	–
三等齿属 <i>Pelodera</i>	BF	1	–	4.6	–	–	–	–	–	–
无咽属 <i>Alaimus</i>	BF	4	–	1.6	–	–	–	–	–	–
丽突属 <i>Acrobeles</i>	BF	2	1.7	–	11.5	–	8.3	–	6.1	–
鹿角唇属 <i>Cervidellus</i>	BF	2	2.4	–	4.1	–	6.0	–	0.6	–
板唇属 <i>Chiloplacus</i>	BF	2	–	–	1.9	–	0.3	–	–	–
真头叶属 <i>Eucephalobus</i>	BF	2	5.6	–	3.5	–	2.2	–	2.9	–

表4 (续) Table 4 (continued)

线虫属 Nematode genus	营养类群 Trophic group	c-p值 c-p value	相对多度 Relative abundance (%)							
			农田 (CL)		自然恢复草地 (NR)		柠条人工林地 (CK)		苜蓿人工草地 (MS)	
			I	II	I	II	I	II	I	II
小杆属 <i>Rhabditis</i>	BF	1	6.0	–	–	–	0.3	–	–	–
茎属 <i>Ditylenchus</i>	PP	2	13.5	11.4	4.5	0.1	7.0	0.2	16.8	2.1
垫刃属 <i>Tylenchus</i>	PP	2	0.3	–	6.0	–	2.2	<0.1	1.3	–
螺旋属 <i>Helicotylenchus</i>	PP	3	1.2	–	1.9	–	2.2	0.1	–	2.5
短体属 <i>Pratylenchus</i>	PP	3	1.9	–	1.6	–	0.3	–	1.0	1.2
矮化属 <i>Tylenchorhynchus</i>	PP	3	3.9	–	21.1	–	16.2	0.4	4.5	0.4
剑属 <i>Xiphinema</i>	PP	5	0.3	–	0.3	1.2	1.3	2.0	–	0.7
盘旋属 <i>Rotylenchus</i>	PP	3	3.4	–	4.4	<0.1	4.8	–	18.9	–
针属 <i>Paratylenchus</i>	PP	2	–	<0.1	–	61.5	–	39.9	–	34.4
细小线虫属 <i>Gracilacus</i>	PP	2	–	–	–	0.2	–	0.1	–	0.2
根结线虫属 <i>Meloidogyne</i>	PP	3	–	–	–	–	–	0.4	–	–
细纹垫刃属 <i>Lelenchus</i>	PP	2	–	0.3	–	–	–	–	–	0.8
新平滑垫刃属 <i>Neopsilenchus</i>	PP	2	–	–	–	–	–	0.2	–	0.2
伞滑刃属 <i>Bursaphelenchus</i>	PP	2	–	–	–	–	–	0.2	–	0.7
米卡垫刃属 <i>Miculenchus</i>	PP	2	–	–	–	–	–	0.2	–	–
轮线虫属 <i>Criconemoides</i>	PP	3	–	–	–	10.2	–	13.6	–	4.5
大默林属 <i>Amplimerlinius</i>	PP	3	–	–	–	11.0	–	0.4	–	0.4
裸矛属 <i>Psilenchus</i>	PP	2	–	–	–	–	–	–	–	1.2
突腔唇属 <i>Ecphyadophora</i>	PP	2	–	–	–	0.1	–	–	–	–
叉针属 <i>Boleodorus</i>	PP	2	–	0.6	–	0.1	–	0.1	–	0.4
剑尾垫刃属 <i>Malenchus</i>	PP	2	–	0.8	–	–	–	–	–	–
巴兹尔属 <i>Basiria</i>	PP	2	–	–	–	–	–	–	–	1.1
牙咽属 <i>Dorylaimellus</i>	PP	5	–	–	–	–	–	–	–	0.2
垫咽属 <i>Tylencholaimus</i>	FF	4	4.1	–	9.6	0.2	6.3	0.5	12.7	0.4
滑刃属 <i>Aphelenchoides</i>	FF	2	0.6	–	1.0	0.2	–	0.4	–	0.8
真滑刃属 <i>Aphelenchus</i>	FF	2	25.4	8.8	6.1	0.2	6.0	3.3	3.2	9.5
艾普鲁斯属 <i>Aprutides</i>	FF	2	–	–	–	0.1	–	–	–	–
瘤咽属 <i>Tylencholaimellus</i>	FF	4	–	28.0	–	0.8	–	1.4	–	11.2
丝尾垫刃属 <i>Filenchus</i>	FF	2	–	1.8	–	–	–	–	–	–
孔咽属 <i>Aporcelaimellus</i>	OP	5	2.0	0.1	1.6	0.7	3.8	1.1	2.9	4.3
前矛线属 <i>Prodorylaimus</i>	OP	5	–	–	0.3	0.2	–	0.1	–	–
<i>Allodorylaimus</i>	OP	4	–	3.4	–	0.8	–	0.8	–	1.5
中矛线属 <i>Mesodorylaimus</i>	OP	5	–	–	–	3.3	–	9.8	–	–
独壁齿属 <i>Campydora</i>	OP	4	–	–	–	4.1	–	14.4	–	8.3
真矛线属 <i>Eudorylaimus</i>	OP	4	–	–	–	–	1.9	–	1.0	–
高知属 <i>Kochinema</i>	OP	4	–	–	1.9	–	1.3	–	0.3	–
微矛线属 <i>Microdorylaimus</i>	OP	4	–	–	–	–	0.6	–	–	–
缢咽属 <i>Paraxonchium</i>	OP	5	1.0	–	–	–	0.3	–	–	–
索努斯属 <i>Thonus</i>	OP	4	4.7	–	3.5	–	7.9	–	2.2	–
盘咽属 <i>Discolaimus</i>	OP	5	–	–	0.3	0.4	0.3	0.8	0.3	1.6
<i>Paractinolaimus</i>	OP	5	–	<0.1	–	–	–	–	–	–
狭咽属 <i>Discolaimium</i>	OP	5	1.9	–	7.6	0.4	5.4	0.8	2.2	1.6
<i>Paravulvus</i>	OP	5	0.3	–	6.7	–	4.8	–	0.3	–
属数 Genera number			21	16	22	23	25	27	19	28

I表示形态学鉴定法, II表示高通量测序法, “–”表示该方法下不存在对应的线虫属。BF: 食细菌线虫; PP: 植物寄生线虫; FF: 食真菌线虫; OP: 杂食-捕食线虫。CL, Cropland; NR, Natural grassland; CK, *Caragana korshinskii* plantation; MS, *Medicago sativa* grassland. I and II represent morphological identification method and high-throughput sequencing method, respectively. “–” indicates that the nematode genus was not found. BF, Bacterial-feeding nematodes; PP, Plant parasites; FF, Fungal-feeding nematodes; OP, Omnivores-Predators.



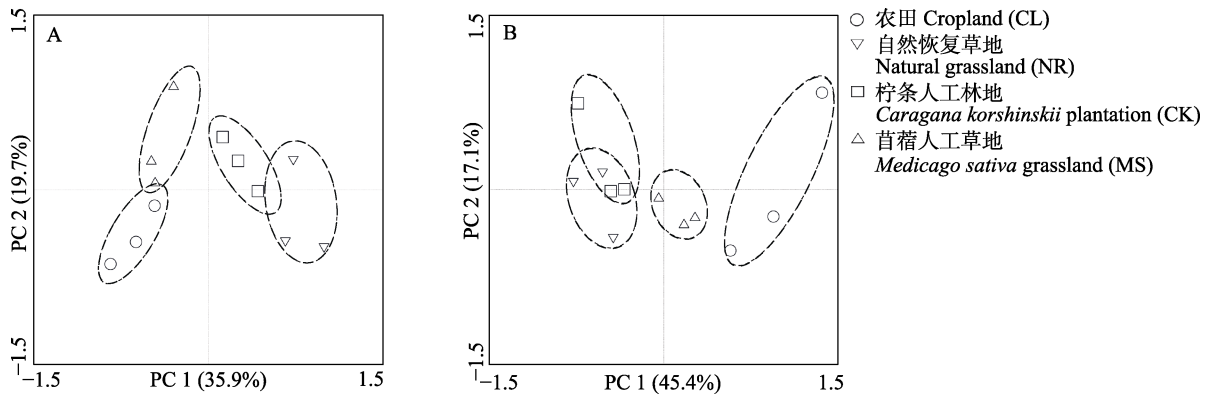


图2 宁南山区不同植被类型下土壤线虫群落的主成分分析。A: 形态学鉴定法; B: 高通量测序法。

Fig. 2 Principal component analysis of soil nematode communities in the sampling sites under different vegetation types in the mountainous region of southern Ningxia. A, Morphological identification method; B, High-throughput sequencing method.

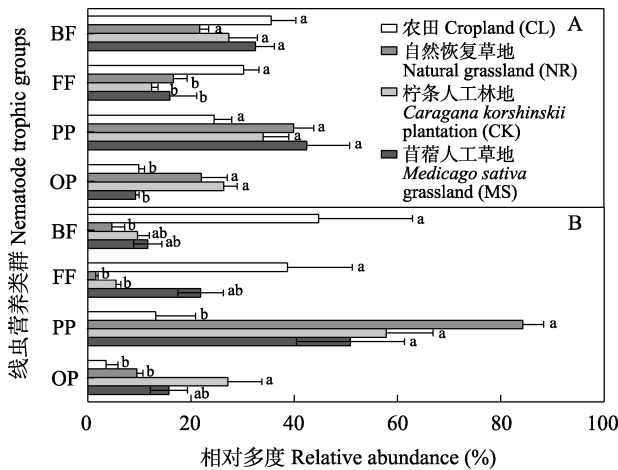


图3 宁南山区不同植被类型样地中土壤线虫各营养类群的相对多度(平均值 + 标准误)。A: 形态学鉴定法; B: 高通量测序法。BF: 食细菌线虫; FF: 食真菌线虫; PP: 植物寄生线虫; OP: 杂食-捕食线虫。不同小写字母表示样地间差异显著( $P < 0.05$ )。

Fig. 3 Relative abundance (mean + SE) of soil nematode trophic groups in the sampling sites under different vegetation types in the mountainous region of southern Ningxia. A, Morphological identification method; B, High-throughput sequencing method. BF, Bacterial-feeding nematodes; FF, Fungal-feeding nematodes; PP, Plant parasites; OP, Omnivores-Predators. Different lowercase letters indicate significant difference at the 0.05 level.

的组成格局具有明显差异,与苜蓿人工草地相比,自然恢复草地与柠条人工林地的线虫群落组成与农田土壤线虫群落组成差异更为显著(图2A)。

在4种植被类型样地中,采用形态鉴定法共得到食细菌线虫7属,食真菌线虫3属,植物寄生线虫7属,杂食-捕食线虫10属,其数量分别占线虫总数的29.36%、18.35%、35.24%和17.05% (表4)。不

同植被恢复方式对线虫群落营养类群结构存在显著影响(图3A)。食细菌和植物寄生线虫的相对多度在4种植被类型样地间差异均不显著( $P > 0.05$ ),但食细菌线虫相对多度在农田土壤中最大(35.5%),并按苜蓿人工草地、柠条人工林地和自然恢复草地的顺序呈递减趋势;而对于植物寄生线虫,在农田土壤中其相对多度(24.5%)则显著低于其他样地(图3A)。与植物寄生线虫相反,食真菌线虫在农田土壤中的相对多度(30.1%)显著高于其他样地( $P < 0.05$ ) (图3A)。杂食-捕食线虫在自然恢复草地(21.9%)和柠条人工林地(26.3%)中相对多度显著高于苜蓿人工草地(9.2%)和农田(9.9%) ( $P < 0.05$ ) (图3A)。

### 2.2.2 高通量测序

在4种不同植被类型样地中,采用高通量测序法共检测到线虫42属,包含84个OTU,隶属于3纲4目26科,显著高于形态学鉴定结果(表3,表4)。Pearson相关分析结果表明,在两种不同的分析方法下,15个共有线虫属在所有样地中的相对多度没有表现出任何的相关关系(表5)。

与形态学鉴定结果不同,高通量测序结果中3种植被恢复样地中的线虫属数均高于对照农田样地(16属),且以苜蓿人工草地(28属)和柠条人工林地(27属)中的线虫属数更多。不同样地的线虫优势属也发生显著改变(表4)。在农田土壤中,瘤咽属(*Tylencholaimellus*)、头叶属、拟丽突属(*Acrobeloides*)和茎属为优势线虫属,总体比例为72.8%。对于植被恢复样地,针属(*Paratylenchus*)在自然恢复草地、柠条人工林地和苜蓿人工草地中均为优势线虫属,其相对多度分别为61.5%、39.9%和34.4% (表4)。自然



**表5 形态学鉴定法和高通量测序法下共有线虫属相对多度的相关性分析**

Table 5 Pearson correlation analysis between the relative abundance of all nematode genera that were identified by both morphological identification method and high-throughput sequencing method

线虫属 Nematode genus	营养类群 Trophic group	<i>r</i>	<i>P</i>
头叶属 <i>Cephalobus</i>	BF	0.455	0.14
拟丽突属 <i>Acrobeloides</i>	BF	-0.007	0.98
茎属 <i>Ditylenchus</i>	PP	0.061	0.85
垫刃属 <i>Tylenchus</i>	PP	-0.168	0.60
螺旋属 <i>Helicotylenchus</i>	PP	-0.305	0.34
短体属 <i>Pratylenchus</i>	PP	-0.080	0.80
盘旋属 <i>Rotylenchus</i>	PP	-0.183	0.57
矮化属 <i>Tylenchorhynchus</i>	PP	-0.062	0.85
剑属 <i>Xiphinema</i>	PP	0.202	0.53
滑刃属 <i>Aphelenchoides</i>	FF	-0.196	0.54
真滑刃属 <i>Aphelenchus</i>	FF	0.266	0.40
垫咽属 <i>Tylencholaimus</i>	FF	-0.144	0.66
孔咽属 <i>Aporcelaimellus</i>	OP	0.020	0.95
前矛线属 <i>Prodorylaimus</i>	OP	0.291	0.36
盘咽属 <i>Discolaimus</i>	OP	-0.292	0.36

表格中营养类群(BF、PP、FF和OP)含义见表4。The meanings of trophic groups (BF, PP, FF and OP) see Table 4.

恢复草地中优势线虫属还包括大默林属(*Amplimerlinius*)和轮线虫属(*Criconemoides*), 相对多度分别为11.0%和10.2%, 而柠条人工林地中的优势属还包括独壁齿属(*Campydora*)和轮线虫属, 相对多度分别为14.4%和13.6%, 苜蓿人工草地中的优势属还包括瘤咽属, 相对多度为11.2% (表4)。此外, 与形态学方法相比, 高通量测序法在检测稀有线虫属(相对多度< 1%)方面表现出更大的优势, 在农田中检测到6个稀有属, 在植被恢复样地中检测到12-17个稀有属, 其中部分线虫属的相对多度甚至小于0.1% (表4)。

基于属水平上的线虫群落组成, 对所有样地的土壤线虫群落进行主成分分析结果表明, 第一轴和第二轴的变异信息解释率分别为45.4%和17.1% (累计达62.5%) (图2B), 略高于形态学鉴定得出的结果。3种植被恢复样地的土壤线虫群落组成格局均与农田具有显著差异, 而自然恢复草地与柠条人工林地的线虫群落组成相似性较高, 且与农田的差异更显著, 这与形态学鉴定法所得到的分析结果相似。

高通量测序结果表明, 所有样地中共包括食细菌线虫6属, 食真菌线虫6属, 植物寄生线虫22属,

杂食-捕食线虫8属, 其相对多度分别为14.02%、12.63%、62.39%和10.96% (表4)。植被类型对土壤线虫群落营养类群结构有重要影响(图3B)。对于食细菌和食真菌线虫, 其相对多度均表现为农田土壤显著高于植被恢复土壤(自然恢复草地 < 柠条人工林地 < 苜蓿人工草地) ( $P < 0.05$ ), 而植物寄生线虫则呈现相反的趋势, 植被恢复显著提高了土壤中植物寄生线虫的相对多度, 但在自然恢复草地、柠条人工林地、苜蓿人工草地中依次呈递减趋势, 杂食-捕食线虫则在柠条人工林地中显著高于其他样地(图3B)。

### 2.3 土壤线虫生态指数

基于形态学鉴定和高通量测序法分析土壤线虫群落的多样性特征, 发现两种方法所测得的线虫群落多样性指数有显著差异, 在不同植被类型样地间的变化规律也有所不同(表6)。形态学鉴定法的结果表明, 线虫群落Shannon多样性指数( $H'$ )和Pielou均匀度指数( $J'$ )均为柠条人工林地 > 自然恢复草地 > 农田 > 苜蓿人工草地, Simpson优势度指数( $\lambda'$ )则表现出相反的趋势(表6), 这表明柠条人工林地和自然恢复草地显著提高了土壤线虫群落多样性。成熟度指数( $MI$ )在不同植被类型样地间差异显著, 而Margalef丰富度指数( $SR$ )、植物寄生线虫指数( $PPI$ )、瓦斯乐卡指数( $WI$ )和线虫通路指数( $NCR$ )均在样地间无显著差异(表6)。 $SR$ 指数在农田中最高, 在柠条人工林地、自然恢复草地和苜蓿人工草地中依次降低(表6)。 $MI$ 和 $PPI$ 指数在柠条人工林地和自然恢复草地中最高, 其次为苜蓿人工草地, 而在农田中最低, 而 $WI$ 指数呈相反趋势, 在植被恢复土壤中则均低于农田, 特别是在自然恢复草地中(表6)。所有样地的 $NCR$ 指数均大于0.5, 这说明4种样地的土壤食细菌线虫数量高于食真菌线虫, 特别是在3种植被恢复样地中, 其 $NCR$ 指数均高于农田(表6)。

高通量测序分析结果表明, 在所有样地中, 土壤线虫群落的 $H'$ 和 $J'$ 指数均低于形态学鉴定法的分析结果, 并且在植被恢复后无显著变化甚至在自然恢复草地中有所下降(表6), 而 $\lambda'$ 指数则相反, 其数值高于形态学鉴定的分析结果, 并在自然恢复草地中最高(表6)。 $SR$ 指数在植被恢复土壤中较农田土壤显著提高, 其变化趋势为柠条人工林地 > 苜蓿人工草地 > 自然恢复草地 > 农田(表6), 表明植被恢复显著提高了土壤线虫群落丰富度。 $MI$ 指数在自

表6 形态鉴定法和高通量测序法下宁夏南山区不同植被类型样地中土壤线虫生态指数

Table 6 Soil nematode ecological indexes in the sampling sites under different vegetation types in the mountainous region of southern Ningxia determined by morphological identification and high-throughput sequencing methods

	<i>H'</i>	$\lambda$	<i>J'</i>	<i>SR</i>	<i>MI</i>	<i>PPI</i>	<i>WI</i>	<i>NCR</i>
<b>形态学鉴定法 Morphological identification method</b>								
农田 Cropland (CL)	2.24 <sup>bc</sup>	0.15 <sup>ab</sup>	0.81 <sup>bc</sup>	2.97 <sup>a</sup>	2.38 <sup>c</sup>	2.43 <sup>a</sup>	2.90 <sup>a</sup>	0.54 <sup>a</sup>
自然恢复草地 Natural grassland (NR)	2.48 <sup>ab</sup>	0.12 <sup>b</sup>	0.86 <sup>ab</sup>	2.53 <sup>a</sup>	3.10 <sup>a</sup>	2.75 <sup>a</sup>	0.98 <sup>a</sup>	0.57 <sup>a</sup>
柠条人工林地 <i>Caragana korshinskii</i> plantation (CK)	2.68 <sup>a</sup>	0.09 <sup>b</sup>	0.90 <sup>a</sup>	2.81 <sup>a</sup>	3.07 <sup>a</sup>	2.80 <sup>a</sup>	1.33 <sup>a</sup>	0.66 <sup>a</sup>
苜蓿人工草地 <i>Medicago sativa</i> grassland (MS)	2.05 <sup>c</sup>	0.19 <sup>a</sup>	0.76 <sup>c</sup>	2.20 <sup>a</sup>	2.73 <sup>b</sup>	2.51 <sup>a</sup>	1.53 <sup>a</sup>	0.69 <sup>a</sup>
<b>高通量测序 High-throughput sequencing</b>								
农田 Cropland (CL)	1.54 <sup>a</sup>	0.28 <sup>a</sup>	0.60 <sup>a</sup>	2.21 <sup>b</sup>	2.76 <sup>a</sup>	2.00 <sup>a</sup>	4.58 <sup>a</sup>	0.49 <sup>a</sup>
自然恢复草地 Natural grassland (NR)	0.95 <sup>a</sup>	0.46 <sup>a</sup>	0.30 <sup>b</sup>	3.67 <sup>ab</sup>	3.71 <sup>a</sup>	2.29 <sup>a</sup>	0.08 <sup>b</sup>	0.67 <sup>a</sup>
柠条人工林地 <i>Caragana korshinskii</i> plantation (CK)	1.45 <sup>a</sup>	0.30 <sup>a</sup>	0.42 <sup>ab</sup>	5.04 <sup>a</sup>	3.55 <sup>a</sup>	2.44 <sup>a</sup>	0.31 <sup>b</sup>	0.63 <sup>a</sup>
苜蓿人工草地 <i>Medicago sativa</i> grassland (MS)	1.79 <sup>a</sup>	0.24 <sup>a</sup>	0.56 <sup>ab</sup>	4.62 <sup>a</sup>	3.39 <sup>a</sup>	2.27 <sup>a</sup>	0.90 <sup>b</sup>	0.34 <sup>a</sup>

在同一测定方法下, 同列不同小写字母表示样地间差异显著( $P < 0.05$ )。 *H'*: Shannon多样性指数;  $\lambda$ : Simpson优势度指数; *J'*: Pielou均匀度指数; *SR*: Margalef丰富度指数; *MI*: 成熟度指数; *PPI*: 植物寄生线虫指数; *WI*: 瓦斯乐卡指数; *NCR*: 线虫通路比值。

Under the same method, different lowercase letters in the same column indicate significant difference at the 0.05 level. *H'*, Shannon diversity index;  $\lambda$ , Simpson dominance index; *J'*, Pielou evenness index; *SR*, Margalef richness index; *MI*, Maturity index; *PPI*, Plant parasites index; *WI*, Wasilewska index; *NCR*, Nematode channel ratio.

然恢复草地和柠条人工林地中最高, 其次为苜蓿人工草地, 而在农田中最低, 而*PPI*指数也在3种植被恢复样地中均较农田有所提高(表6)。 *WI*指数同样在自然恢复草地和柠条人工林地中最高, 而在农田中最低, 但在所有植被恢复样地中均小于1 (表6)。 *NCR*指数在自然恢复草地和柠条人工林地中高于农田并大于0.5, 而在苜蓿人工草地中明显降低并小于0.5, 说明苜蓿人工草地中食真菌线虫数量高于食细菌线虫, 表明真菌通道的相对重要性在苜蓿人工草地中可能比其他植被类型高, 这与形态分类鉴定所得到的结果并不一致(表6)。

### 3 讨论

线虫广泛存在于土壤生态系统, 是土壤食物网的重要组成部分, 直接参与土壤的物质循环和能量流动, 对土壤生态系统结构和功能具有重要的指示和调控作用, 在恢复生态学领域受到广泛关注(Yeates, 1979, 1981; Niles & Freckman, 1998; Bongers & Ferris, 1999)。我国对于土壤线虫的研究起步较晚, 于20世纪90年代末才陆续展开报道, 且已有研究多基于传统的形态学方法(胡锋等, 1999; 李辉信等, 2002; 张伟东等, 2010; 朱柏菁等, 2019)。21世纪以来, 分子生物学的快速发展使得高通量测序技术逐渐被应用于线虫群落的相关研究(Powers et al, 2009; Kerfahi et al, 2016; 薛蓓等, 2019)。由于该技术具备

耗时少、灵敏度高特点(吴鹏等, 2019), 因而对于物种多样性的检测相比于形态学方法更为高效。迄今为止, 已有研究多采用单一的形态学鉴定或高通量测序方法对线虫群落进行分析(薛蓓等, 2019; 王宇彤和牛克昌, 2020)。近年来, 关于两种方法的对比研究也开始受到关注(Geisen et al, 2018; Griffiths et al, 2018; Du et al, 2020; Gao et al, 2021), 已有研究表明, 形态学鉴定与高通量测序法在分析土壤线虫群落方面各有优势与不足, 因此有必要在不同区域和生态系统中开展更多的研究, 分析和比较不同方法测定结果的差异, 以促进标准化土壤线虫群落测定方法的建立。

本研究同时采用形态学鉴定和高通量测序两种方法, 对宁南山区典型植被恢复方式下土壤线虫群落进行了对比分析。研究表明, 采用不同分析方法所测得的土壤线虫群落, 在线虫多度、群落组成和结构, 以及多样性和生态功能指数等方面均有所不同, 并且在不同植被类型样地间的变化趋势也有明显的差异, 这说明不同的分析方法对于准确测定线虫群落特征, 探索不同植被恢复方式下土壤线虫群落的响应格局及其生态学意义具有重要影响(Geisen et al, 2018; Griffiths et al, 2018)。

#### 3.1 基于形态学鉴定与高通量测序法的土壤线虫多度比较

在线虫多度方面, 形态学鉴定法能够更为准确

地测定土壤中线虫的绝对多度,在4种样地中共分离线虫7,168条,平均密度为597条/100 g干土。尽管高通量测序具有覆盖面广、灵敏度高的技术优势(Oliveira et al, 2004; 吴鹏等, 2019),却局限于以相对多度表征不同物种的数量特征,无法准确评估土壤线虫绝对多度的增加或减少(Vandeputte et al, 2017)。虽然通过比较隶属于线虫动物门的总序列条数,能一定程度上了解线虫多度的变化规律(黄平等, 2017),但在本研究中,所有样地均存在着超过55%的序列无法识别,而其中可能有相当比例的未被识别线虫物种,因此会导致土壤中的线虫多度被低估,这与目前线虫基因数据库还不够完善有关。

对比两种方法的分析结果,在不同植被类型样地中,土壤线虫的绝对密度或序列条数的变化规律略有不同,但柠条人工林和自然恢复草地中的线虫数量和序列条数均高于苜蓿草地和农田。已有研究表明,土壤线虫多度是反映土壤资源总体有效性的有效指标(李辉信等, 2002; Neher, 2010)。在本研究中,土壤线虫多度也与有机碳、全氮和无机氮含量的变化趋势相一致(表2),这可能是因为人工林和自然恢复的草地植被比人工草地能更加有效地促进地上植物生物量和物种多样性的提高(莫保儒等, 2010; 张笑培等, 2011),因而显著改善了输入土壤的资源数量及质量(李辉信等, 2002; Wang et al, 2015),为土壤线虫提供了更为丰富多样的食物资源(王跃棠等, 2018)。此外,苜蓿生长过程中会不断累积自毒化感物质,导致根系受损、植株退化,因此可能会抑制土壤线虫数量的增长(李彦斌等, 2007)。

### 3.2 基于形态学鉴定与高通量测序法的土壤线虫群落组成和结构比较

一般而言,传统的形态学鉴定方法通常是将线虫分类鉴定至属水平,若要进一步鉴定至物种水平,需要耗费大量的时间,而高通量测序技术则可检测到OTU水平上的线虫群落组成,因而能够提供更加丰富的线虫群落信息。与已有研究结果相似(Geisen et al, 2018),我们发现,在不同生物学分类水平上,高通量测序技术检测到的线虫类群数均高于形态学鉴定法。在4种样地中,采用形态学鉴定法共鉴定出线虫2纲3目18科27属,而高通量测序法鉴定出84个线虫OTU单元,隶属于3纲4目26科42属。这可能是由于采用形态鉴定法时,对线虫进行分离提取的

过程会造成部分线虫的损失。例如,已有报道指出,浅盘法对行动不太活跃的一线虫提取效率不高,而蔗糖离心法则会导致部分线虫在提取过程中虫体被破坏(Jenkins, 1964)。同时,为提高实验效率,形态学鉴定法通常只对从土样中分离提取的一部分线虫(随机选取至少100条线虫)进行鉴定,导致测得的线虫类群数低于实际数值(Geisen et al, 2018)。与形态学方法不同,高通量测序法能够对土壤样品中所包含的整个线虫群落的基因组进行提取和测序,因而能检测到更多的线虫类群(黄平等, 2017)。此外,高通量测序法在鉴定稀有线虫类群方面具有更加明显的优势。在每个样地中高通量测序法较形态学鉴定法都能检测到更多的稀有线虫属,其中部分稀有属的相对多度甚至低于0.1%。

然而,尽管高通量测序法能够检测到更多的线虫属,但采用形态学方法鉴定出的部分线虫属,并未包含在高通量测序的检测结果中,例如属于食细菌线虫的丽突属、鹿角唇属(*Cervidellus*)、板唇属(*Chiloplacus*)、真头叶属(*Eucephalobus*)和小杆属(*Rhabditis*),以及杂食-捕食线虫真矛线属(*Eudorylaimus*)、微矛线属(*Microdorylaimus*)、缢咽属(*Paraxonchium*)、索努斯属(*Thonus*)、狭咽属(*Discolaimium*)和*Paravulvulus*属线虫。这导致相较于形态学鉴定法,高通量测序法检测出的食细菌线虫和杂食-捕食线虫的属数与相对多度均有所下降。相反地,高通量测序法共测得植物寄生线虫22属,相对多度为62.39%,显著高于形态学方法的测定结果(7属, 35.24%)。这些研究结果表明,两种分析方法在检测不同营养类群线虫属时可能各具优势。高通量测序法提取DNA所用土壤量远低于形态学鉴定法,测序过程中还可能在线虫DNA提取不完全和PCR扩增偏向性等因素,导致其对部分线虫类群检测率偏低(von Wintzingerode et al, 1997; Darby et al, 2013; Geisen et al, 2018)。此外,本研究中每个样地采集的混合土样重复数量偏少,所测得的线虫群落特征可能会受到土壤异质性的强烈影响。因此,在未来研究中有必要增加试验重复数,以提高测定结果的代表性和准确性。同时,结合形态学鉴定和高通量测序两种方法,有助于涵盖更多的土壤线虫类群,更为准确地评估土壤生物多样性。

在不同植被类型样地间,土壤线虫群落的组成和结构发生显著改变,这在两种方法的分析结果中



都有所体现。PCA分析结果指出,无论采用何种方法,在农田土壤与植被恢复样地之间,土壤线虫群落组成格局存在明显差异。从农田到植被恢复样地,土壤线虫群落中的优势属从食真菌和食细菌线虫变为植物寄生线虫。与之相对应,线虫群落的营养类群结构也发生显著改变,其中食微线虫(食细菌线虫、食真菌线虫)比例明显降低,而植物寄生线虫比例大幅度升高。食微线虫(食细菌线虫、食真菌线虫)是农田中的优势类群,这在许多研究中都得到了证实(Sohlenius & Sohlenius, 1980; 张晓珂等, 2018; 耿德洲等, 2020)。植被恢复促进了植物的生长和物种多样性的增加,导致土壤中的根系资源的数量和质量显著上升,为植物寄生线虫提供了更加充足和多样化的食物来源(耿德洲等, 2020),同时也进一步增强了土壤中线虫微生境的异质性(王跃棠等, 2018),使土壤食物网结构更为复杂,生态系统稳定性增强,因而指示食物网复杂性的杂食-捕食线虫比例也有所上升(Kardol et al, 2005)。两种分析方法均检测到柠条人工林中杂食-捕食线虫的相对多度最高,这表明该植被恢复方式下土壤食物网结构化程度高,生态系统最为稳定成熟(Kardol et al, 2005)

值得注意的是,尽管形态学鉴定法和高通量测序法对线虫群落格局的分析结果有一定的相似之处,但不同的分析方法下样地间线虫群落的变化趋势还是有着显著差异。在属水平上,两种分析方法检测到了15个共有线虫属,但在两种方法之间这些属的相对多度未表现出任何的显著相关关系(表5)。在3种植被恢复样地中,优势线虫属也随分析方法的不同而发生了改变,其中高通量测序法下植物寄生性针属线虫在群落中占据绝对优势(相对多度34.4%–61.5%),但在形态学鉴定法下该属并未被检测到。此外,高通量测序较形态学鉴定法能检测到更多的植物寄生类稀有线虫属,特别是在植被恢复样地中。这些结果说明,高通量测序法在植被恢复样地中能够检测到更为丰富和多样的植物寄生线虫类群,导致这些样地中植物寄生线虫的比例较农田均有大幅度增加,而这种变化趋势在形态学鉴定法下并不显著。植物寄生线虫是一类重要的地下植食者,它们对植物的取食能够改变植物的生长状况和群落组成,其数量和组成的变化对植被恢复的过程、方向和效应可能有着重要的影响(Wurst et al,

2010)。因此,采用高通量测序法有助于更深入全面地探索不同植被恢复方式下植物寄生线虫的变化规律及其所起的作用(Oliveira et al, 2004),而这可能是影响黄土高原地区植被可持续发展的重要因素。

然而,与形态学鉴定法相比,高通量测序法在植被恢复样地中检测到的食细菌线虫的属数和相对多度较农田的下降幅度极为显著,尤其是自然恢复草地,而该样地中食真菌和杂食-捕食线虫的相对多度也明显低于形态学鉴定法的分析结果,这无疑与其较高的植物寄生线虫相对多度有关。因此,仅采用高通量测序法对土壤线虫群落进行测定,有可能会限制我们对植被恢复中土壤食物网的结构复杂性和功能多样性的认识,导致植物能量通道在土壤食物网中的重要性被过分高估。

### 3.3 基于形态学鉴定与高通量测序法的土壤线虫生态指数比较

线虫群落生态指数是反映土壤生物多样性以及食物网结构与功能的重要参数(Ferris et al, 2001; 邵元虎和傅声雷, 2007; 张晓珂等, 2018)。本研究发现在两种分析方法下不同植被恢复样地间多项线虫生态指数的变化趋势发生了显著改变,而这会在很大程度上影响我们对植被恢复的生态环境效应进行评价。

已有研究表明,植被恢复通过改善进入土壤的资源数量和质量(胡婵娟和郭雷, 2012),能够显著提高土壤线虫多样性(张伟东等, 2010; Guan et al, 2015)。本研究中,形态学鉴定法的分析结果也得到了相似的结论,即与农田相比,柠条人工林和自然恢复草地显著提高了土壤线虫Shannon多样性指数和Pielou均匀度指数,降低了Simpson优势度指数,特别是柠条人工林的作用更为显著,这也再次证实了人工林和自然恢复草地对输入土壤的资源具有显著改善作用(吴东辉等, 2007; 王跃棠等, 2018)。然而,在高通量测序法下,3种植被恢复样地的线虫 $H'$ 和 $J'$ 并未得到显著提高,甚至较农田水平有所下降,而 $\lambda$ 则相反。显而易见,这是由于高通量测序法下,植被恢复样地中个别植物寄生线虫(针属线虫)占据绝对优势,导致线虫多样性显著下降。此外,形态学鉴定结果显示土壤线虫Margalef丰富度指数在不同样地间无显著差异,但在高通量测序法下 $SR$ 在植被恢复后有了显著的提高,特别是在柠条人工林中,这主要与高通量测序能在植被恢复样地中检



测到更多的植物寄生线虫属有关。我们的研究结果表明, 采用不同的线虫群落分析方法会导致土壤线虫多样性对植被恢复的响应格局发生改变, 其中形态学鉴定法能够更好反映不同植被恢复方式对土壤线虫多样性的影响, 而高通量测序法则在指示线虫丰富度上更具优势。

成熟度指数(MI)是指示土壤食物网稳定性和生态系统成熟度的重要参数(Bongers, 1990)。形态学鉴定和高通量测序结果均表明, MI在不同样地间排列顺序为自然恢复草地和柠条人工林地 > 苜蓿人工草地 > 农田, 这再次证实了自然恢复草地与人工林不仅能够有效促进地上植物群落的恢复(莫保儒等, 2010; 张笑培等, 2011), 还促使土壤生态系统向更加成熟稳定的方向发展(Bongers, 1990)。在两种分析方法下, 3种植被恢复样地中植物寄生线虫指数也较农田有一定上升, 这表明植被恢复在改善地上植物群落生长状况的同时(胡婵娟和郭雷, 2012), 也会导致来自地下植食者的危害增加(Bongers et al, 1997), 当这种危害达到一定程度时, 有可能会对植被的生长和恢复造成负面影响(杜晓芳等, 2018)。相应地, 在两种分析方法下, 植被恢复也都显著降低了瓦斯乐卡指数(WI), 特别是在自然恢复草地中, 这表明土壤食物网依赖根系资源的程度显著增加, 而对微生物资源的依赖程度下降, 土壤健康状况受到影响(Wasilewska, 1994), 这种影响在高通量测序法下更为显著。线虫通路指数(NCR)能够一定程度上反映土壤中有机质的分解途径的变化, 形态学鉴定结果表明不同植被类型的土壤线虫NCR指数均大于0.5, 这说明所有样地的土壤食细菌线虫数量均高于食真菌线虫。然而高通量测序法检测到苜蓿人工草地的食真菌线虫相对多度较高, 因此NCR指数小于0.5并明显低于其他样地, 表明苜蓿人工草地中真菌通道在有机质分解中的相对重要性可能比其他植被类型更高, 这更符合已有的研究结果, 即丛枝菌根真菌能够与豆科植物形成共生体, 导致真菌数量增加(黄艳飞等, 2019), 为食真菌线虫提供了更多的食物资源(Cesarz et al, 2015), 因而提高了真菌通道的重要性。

#### 4 结论

本研究同时采用形态学鉴定与高通量测序两种方法, 对比分析了宁南山区不同植被恢复方式下

土壤线虫的数量、群落组成和结构, 以及生态指数特征。两种分析方法的测定结果均表明, 在柠条人工林地和自然恢复草地中, 土壤线虫数量相较于农田显著增加, 群落中食细菌和食真菌线虫的相对多度显著下降, 而植物寄生线虫和杂食-捕食线虫的相对多度大幅度上升, 这也导致线虫成熟度指数和植物寄生线虫指数明显提高, 而瓦斯乐卡指数有所下降。两种分析方法在测定线虫群落的不同特征方面各具优势。形态学鉴定能够更好地提供土壤线虫的绝对多度的相关信息, 而高通量测序法仅能测定不同线虫类群的相对多度。高通量测序法较形态学鉴定法能检测到更多的线虫类群数, 但相比形态学鉴定法, 高通量测序法在植被恢复样地中检获的植物寄生线虫属数和相对多度显著增加, 而对食细菌线虫和杂食-捕食线虫的检测效率偏低, 使得土壤线虫群落组成、结构和生态指数(特别是WI指数)在植被恢复样地与农田之间的差异更为显著, 这可能与该方法提取DNA所用的土壤量偏少, 以及线虫DNA提取不完全和PCR扩增偏向性等有关。总之, 高通量测序法有助于更好地探索植被恢复过程中植物寄生线虫的变化, 但同时也可能会低估其他线虫营养类群的作用, 使植物寄生线虫对土壤生物多样性与生态系统健康状况的影响被过度放大, 因此需谨慎解释其分析结果, 并有必要增加采样频度和试验重复数以提高测定结果的代表性和准确性。在未来, 仍需开展更多的方法对比研究并建立标准化的线虫群落分析方法, 为发挥线虫的生态指示作用, 探索和评价植被恢复对土壤生态系统的影响提供方法支持。

#### ORCID

黄菁华  <https://orcid.org/0000-0002-2996-8862>

#### 参考文献

- An SS, Huang YM (2006) Study on the ameliorate benefits of *Caragana korshinskii* shrubwood to soil properties in loess hilly area. *Scientia Silvae Sinicae*, 42(1), 70-74. (in Chinese with English abstract) [安韶山, 黄懿梅 (2006) 黄土丘陵区柠条林改良土壤作用的研究. *林业科学*, 42(1), 70-74.]
- Bongers T (1988) *Nematodes of Netherland*. Stichting Uitgeverij Van de Koninklijke Nederlandse Natuurhistorische Vereniging, Utrecht.
- Bongers T (1990) The maturity index: An ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition. *Oecologia*, 83, 14-19.

- Bongers T, Ferris H (1999) Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. *Trends in Ecology & Evolution*, 14, 224–228.
- Bongers T, van der Meulen H, Korthals G (1997) Inverse relationship between the nematode maturity index and plant parasite index under enriched nutrient conditions. *Applied Soil Ecology*, 6, 195–199.
- Cesarz S, Reich PB, Scheu S, Ruess L, Schaefer M, Eisenhauer N (2015) Nematode functional guilds, not trophic groups, reflect shifts in soil food webs and processes in response to interacting global change factors. *Pedobiologia*, 58, 23–32.
- Chang QR, An SS, Liu J, Wang B, Wei YS (1999) Study on benefits of recovering vegetation to prevent land deterioration on Loess Plateau. *Journal of Soil Erosion and Soil and Water Conservation*, 5, 6–9. (in Chinese with English abstract) [常庆瑞, 安韶山, 刘京, 王斌, 魏永胜 (1999) 黄土高原恢复植被防止土地退化效益研究. *土壤侵蚀与水土保持学报*, 5, 6–9.]
- Chen YF, Han XM, Li YF, Hu C (2014) Approach of nematode fauna analysis indicate the structure and function of soil food web. *Acta Ecologica Sinica*, 34, 1072–1084. (in Chinese with English abstract) [陈云峰, 韩雪梅, 李钰飞, 胡诚 (2014) 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*, 34, 1072–1084.]
- Cheng JM, Jing ZB, Jin JW, Gao Y (2014) Restoration and utilization mechanism of degraded grassland in the semi-arid region of Loess Plateau. *Scientia Sinica Vitae*, 44, 267–279. (in Chinese with English abstract) [程积民, 井赵斌, 金晶炜, 高阳 (2014) 黄土高原半干旱区退化草地恢复与利用过程研究. *中国科学: 生命科学*, 44, 267–279.]
- Darby BJ, Todd TC, Herman MA (2013) High-throughput amplicon sequencing of rRNA genes requires a copy number correction to accurately reflect the effects of management practices on soil nematode community structure. *Molecular Ecology*, 22, 5456–5471.
- Du XF, Li YB, Han X, Ahmad W, Li Q (2020) Using high-throughput sequencing quantitatively to investigate soil nematode community composition in a steppe-forest ecotone. *Applied Soil Ecology*, 152, 103562.
- Du XF, Li YB, Liu F, Su XL, Li Q (2018) Structure and ecological functions of soil micro-food web. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 29, 403–411. (in Chinese with English abstract) [杜晓芳, 李英滨, 刘芳, 宿晓琳, 李琪 (2018) 土壤微食物网结构与生态功能. *应用生态学报*, 29, 403–411.]
- Ferris H, Bongers T, de Goede RGM (2001) A framework for soil food web diagnostics: Extension of the nematode faunal analysis concept. *Applied Soil Ecology*, 18, 13–29.
- Fitoussi N, Pen-Mouratov S, Steinberger Y (2016) Soil free-living nematodes as bio-indicators for assaying the invasive effect of the alien plant *Heterotheca subaxillaris* in a coastal dune ecosystem. *Applied Soil Ecology*, 102, 1–9.
- Fu XL, Shao MA, Wei XR, Horton R (2010) Soil organic carbon and total nitrogen as affected by vegetation types in Northern Loess Plateau of China. *Geoderma*, 155, 31–35.
- Gao DD, Moreira-Grez B, Wang KL, Zhang W, Xiao SS, Wang WL, Chen HS, Zhao J (2021) Effects of ecosystem disturbance on nematode communities in calcareous and red soils: Comparison of taxonomic methods. *Soil Biology and Biochemistry*, 155, 108162.
- Geisen S, Snoek LB, ten Hooven FC, Hooven FT, Duyts H, Kostenko O, Bloem J, Martens H, Quist CW, Helder JA, van der Putten WH (2018) Integrating quantitative morphological and qualitative molecular methods to analyse soil nematode community responses to plant range expansion. *Methods in Ecology and Evolution*, 9, 1366–1378.
- Geng DZ, Huang JH, Huo N, Wang N, Yang PP, Zhao SW (2020) Characteristics of soil microbial and nematode communities under artificial *Medicago sativa* grasslands with different cultivation years in semi-arid region of Loess Plateau, Northwest China. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 31, 1365–1377. (in Chinese with English abstract) [耿德洲, 黄菁华, 霍娜, 王楠, 杨盼盼, 赵世伟 (2020) 黄土高原半干旱区不同种植年限紫花苜蓿人工草地土壤微生物和线虫群落特征. *应用生态学报*, 31, 1365–1377.]
- Griffiths BS, de Groot GA, Laros I, Stone D, Geisen S (2018) The need for standardisation: Exemplified by a description of the diversity, community structure and ecological indices of soil nematodes. *Ecological Indicators*, 87, 43–46.
- Guan PT, Zhang XK, Liang WJ, Jun NN (2015) Variation of soil nematode community composition with increasing sand-fixation year of *Caragana microphylla*: Bioindication for desertification restoration. *Ecological Engineering*, 81, 93–101.
- Hou L, Xue B, Xue HY (2019) Study on soil nematode community of Northern Tibetan alpine meadow under simulated warming condition by high-throughput sequencing method. *Acta Agraria Sinica*, 27, 443–451. (in Chinese with English abstract) [侯磊, 薛蓓, 薛会英 (2019) 利用高通量测序法对模拟增温条件下藏北高寒草甸土壤线虫群落的研究. *草地学报*, 27, 443–451.]
- Hu CJ, Guo L (2012) Advances in the research of ecological effects of vegetation restoration. *Ecology and Environmental Sciences*, 21, 1640–1646. (in Chinese with English abstract) [胡婵娟, 郭雷 (2012) 植被恢复的生态效应研究进展. *生态环境学报*, 21, 1640–1646.]
- Hu F, Li HX, Xie LQ, Wu SM (1999) Interactions of bacterivorous nematode and bacteria and their effects on mineralization immobilization of nitrogen and phosphorus. *Acta Ecologica Sinica*, 19, 914–920. (in Chinese with English abstract) [胡锋, 李辉信, 谢涟琪, 吴珊眉 (1999) 土壤食细菌线虫与细菌的相互作用及其对N、P矿化生物固定的影响及机理. *生态学报*, 19, 914–920.]
- Huang PP, Zhao F, Xu KD (2017) Assessment of ciliate diversity in marine sediment on the basis of morphology and

- 18S rDNA and cDNA high-throughput sequencing. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 48, 285–296. (in Chinese with English abstract) [黄平平, 赵峰, 徐奎栋 (2017) 基于形态学与核糖体DNA及其cDNA高通量测序的海洋沉积物中纤毛虫多样性比较. *海洋与湖沼*, 48, 285–296.]
- Huang YF, Wu QL, Wan Q, Shu B (2019) Research progress of arbuscular mycorrhizal fungi. *Modern Agriculture*, (12), 9–12. (in Chinese) [黄艳飞, 吴庆丽, 万群, 舒彬 (2019) 丛枝菌根真菌的研究进展. *现代农业*, (12), 9–12.]
- Jenkins WR (1964) A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter*, 48, 692.
- Kardol P, Bezemer TM, van der Wal A, van der Putten WH (2005) Successional trajectories of soil nematode and plant communities in a chronosequence of ex-arable lands. *Biological Conservation*, 126, 317–327.
- Kerfahi D, Tripathi BM, Porazinska DL, Park J, Go R, Adams JM (2016) Do tropical rain forest soils have greater nematode diversity than High Arctic tundra? A metagenetic comparison of Malaysia and Svalbard. *Global Ecology and Biogeography*, 25, 716–728.
- Kunin V, Engelbrektson A, Ochman H, Hugenholtz P (2010) Wrinkles in the rare biosphere: Pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environmental Microbiology*, 12, 118–123.
- Li HX, Liu MQ, Hu F, Chen XY, He YQ (2002) Nematode abundance under different vegetations restored on degraded red soil. *Acta Ecologica Sinica*, 22, 1882–1889. (in Chinese with English abstract) [李辉信, 刘满强, 胡锋, 陈小云, 何圆球 (2002) 不同植被恢复方式下红壤线虫数量特征. *生态学报*, 22, 1882–1889.]
- Li Q, Liang WJ, Jiang Y (2007) Present situation and prospect of soil nematode diversity in farmland ecosystems. *Biodiversity Science*, 15, 134–141. (in Chinese with English abstract) [李琪, 梁文举, 姜勇 (2007) 农田土壤线虫多样性研究现状及展望. *生物多样性*, 15, 134–141.]
- Li SZ, Wang SJ, Liu JA, Wu Y, He YH, Li H (2015) Research on soil nematode community structure and diversity of different *Cunninghamia lanceolata* plantations. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 35(10), 101–108. (in Chinese with English abstract) [李树战, 王圣洁, 刘君昂, 吴毅, 何苑峰, 李河 (2015) 不同杉木人工林土壤线虫群落结构及多样性研究. *中南林业科技大学学报*, 35(10), 101–108.]
- Li YB, Liu JG, Gu DY (2007) Allelopathic autotoxicity of plants and its application in agriculture. *Journal of Agro-Environment Science*, 26, 347–350. (in Chinese with English abstract) [李彦斌, 刘建国, 谷冬艳 (2007) 植物化感自毒作用及其在农业中的应用. *农业环境科学学报*, 26, 347–350.]
- Liu GB, Shanguan ZP, Yao WY, Yang QK, Zhao MJ, Dang XH, Guo MH, Wang GL, Wang B (2017) Ecological effects of soil conservation in Loess Plateau. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 32, 11–19. (in Chinese with English abstract) [刘国彬, 上官周平, 姚文艺, 杨勤科, 赵敏娟, 党小虎, 郭明航, 王国梁, 王兵 (2017) 黄土高原生态工程的生态成效. *中国科学院院刊*, 32, 11–19.]
- Liu MQ, Chen XY, Qin JT, Wang D, Griffiths B, Hu F (2008) A sequential extraction procedure reveals that water management affects soil nematode communities in paddy fields. *Applied Soil Ecology*, 40, 250–259.
- Mao XF, Li HX, Chen XY, Hu F (2004) Extraction efficiency of soil nematodes by different methods. *Chinese Journal of Ecology*, 23, 149–151.
- Mo BR, Cai GJ, Zhao TN, Yu HB, Zou TF, Chai CS, Wang ZT (2010) Plant diversity and species composition on the process of vegetation restoration in semiarid loss hilly and gully at Gansu areas. *Pratacultural Science*, 27, 48–53. (in Chinese with English abstract) [莫保儒, 蔡国军, 赵廷宁, 于洪波, 邹天福, 柴春山, 王子婷 (2010) 黄土丘陵沟壑区植被恢复过程中物种组成及多样性. *草业科学*, 27, 48–53.]
- Moroenyane I, Dong K, Singh D, Chimphango SBM, Adams JM (2016) Deterministic processes dominate nematode community structure in the Fynbos Mediterranean heathland of South Africa. *Evolutionary Ecology*, 30, 685–701.
- Neher DA (2001) Role of nematodes in soil health and their use as indicators. *Journal of Nematology*, 33, 161–168.
- Neher DA (2010) Ecology of plant and free-living nematodes in natural and agricultural soil. *Annual Review of Phytopathology*, 48, 371–394.
- Niles RK, Freckman DW (1998) From the ground up: Nematode ecology in bioassessment and ecosystem health. In: *Plant–Nematode Interactions* (eds Barker KR, Pederson GA, Windham GL), pp. 65–85. American Society of Agronomy, Madison.
- Oliveira CMG, Hübschen J, Brown DJF, Ferraz LCCB, Neilson R (2004) Phylogenetic relationships among *Xiphinema* and *Xiphidorus* nematode species from Brazil inferred from 18S rDNA sequences. *Journal of Nematology*, 36, 153–159.
- Powers TO, Neher DA, Mullin P, Esquivel A, Giblin-Davis RM, Kanzaki N, Stock SP, Mora MM, Uribe-Lorio L (2009) Tropical nematode diversity: Vertical stratification of nematode communities in a Costa Rican humid lowland rainforest. *Molecular Ecology*, 18, 985–996.
- Shannon CE (1951) The mathematical theory of communication. *Bell Labs Technical Journal*, 3, 31–32.
- Shao YH, Fu SL (2007) The diversity and functions of soil nematodes. *Biodiversity Science*, 15, 116–123. (in Chinese with English abstract) [邵元虎, 傅声雷 (2007) 试论土壤线虫多样性在生态系统中的作用. *生物多样性*, 15, 116–123.]
- Shao YH, Zhang WX, Liu SJ, Wang XL, Fu SL (2015) Diversity and function of soil fauna. *Acta Ecologica Sinica*, 35, 6614–6625. (in Chinese with English abstract) [邵元虎,



- 张卫信, 刘胜杰, 王晓丽, 傅声雷 (2015) 土壤动物多样性及其生态功能. 生态学报, 35, 6614–6625.]
- Shi H, Shao MA (2000) Soil and water loss from the Loess Plateau in China. *Journal of Arid Environments*, 45, 9–20.
- Simpson EH (1949) Measurement of diversity. *Nature*, 163, 688.
- Sohlenius B, Sohlenius B (1980) Abundance, biomass and contribution to energy flow by soil nematodes in terrestrial ecosystems. *Oikos*, 34, 186–194.
- Tian XL, Liu QL, Lang JF, Lu NH (2012) Application of molecular ecological techniques on the study of diversity of soil nematode. *Guangdong Agricultural Sciences*, 39(8), 145–147, 151. (in Chinese with English abstract) [田雪亮, 刘起丽, 郎剑锋, 陆宁海 (2012) 分子生态技术在土壤线虫多样性研究中的应用. 广东农业科学, 39(8), 145–147, 151.]
- Vandeputte D, Kathagen G, D'hoë K, Vieira-Silva S, Valles-Colomer M, Sabino J, Wang J, Tito RY, De Commer L, Darzi Y, Vermeire S, Falony G, Raes J (2017) Quantitative microbiome profiling links gut community variation to microbial load. *Nature*, 551, 507–511.
- von Wintzingerode F, Göbel UB, Stackebrandt E (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: Pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 21, 213–229.
- Wang WT, Xia SW, Xiao HF, Liu SJ, Yang XD (2020) 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*, 31, 761–768. (in Chinese with English abstract) [王文婷, 夏尚文, 肖海峰, 刘胜杰, 杨效东 (2020) 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, 31, 761–768.]
- Wang YT, Mei XF, Xie LN, Zhang GG, Li QF, Ma CC (2018) Study on soil nematode community characteristics associated with *Caragana microphylla* shrubs in desert steppe. *Acta Agrestia Sinica*, 26, 1305–1312. (in Chinese with English abstract) [王跃棠, 梅续芳, 解李娜, 张国刚, 李清芳, 马成仓 (2018) 荒漠草原小叶锦鸡儿灌丛土壤线虫群落研究. 草地学报, 26, 1305–1312.]
- Wang YT, Niu KC (2020) Effect of soil environment on functional diversity of soil nematodes in Tibetan alpine meadows. *Biodiversity Science*, 28, 707–717. (in Chinese with English abstract) [王宇彤, 牛克昌 (2020) 青藏高原高寒草甸土壤环境对线虫功能多样性的影响. 生物多样性, 28, 707–717.]
- Wang ZQ, Guo SL, Sun QQ, Li NN, Jiang JS, Wang R, Zhang YJ, Liu QF, Wu DF, Li RJ, Du LL, Zhao M (2015) Soil organic carbon sequestration potential of artificial and natural vegetation in the hilly regions of Loess Plateau. *Ecological Engineering*, 82, 547–554.
- Wasilewska L (1994) The effect of age of meadows on succession and diversity in soil nematode communities. *Pedobiologia*, 38, 1–11.
- Wu DH, Yin WY, Yan RQ (2007) Effects of vegetation recovery practices on the characteristics of soil nematode communities on seriously degraded grasslands in Songnen Plain. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 18, 2783–2790. (in Chinese with English abstract) [吴东辉, 尹文英, 阎日青 (2007) 植被恢复方式对松嫩草原重度退化草地土壤线虫群落特征的影响. 应用生态学报, 18, 2783–2790.]
- Wu JH, Song CY, Chen JK (2007) Effect of microbivorous nematodes on plant growth and soil nutrient cycling: A review. *Biodiversity Science*, 15, 124–133. (in Chinese with English abstract) [吴纪华, 宋慈玉, 陈家宽 (2007) 食微线虫对植物生长及土壤养分循环的影响. 生物多样性, 15, 124–133.]
- Wu P, Shi XJ, Lü XL, Gao Y, Li HT, Zhang JH (2019) Distribution of benthic eukaryote communities in intertidal zone of mangrove in the Beilun Estuary by high-throughput sequencing analysis. *Journal of Applied Oceanography*, 38, 232–238. (in Chinese with English abstract) [吴鹏, 时小军, 吕向立, 高阳, 李海涛, 张敬怀 (2019) 高通量测序分析北仑河口红树林潮间带底栖真核生物分布. 应用海洋学报, 38, 232–238.]
- Wurst S, Wagenaar R, Biere A, van der Putten WH (2010) Microorganisms and nematodes increase levels of secondary metabolites in roots and root exudates of *Plantago lanceolata*. *Plant and Soil*, 329, 117–126.
- Xue B, Hou L, Xue HY (2019) Research on the characteristics of soil nematode communities in alpine meadow in northern Tibet by using high-throughput sequencing. *Acta Ecologica Sinica*, 39, 4088–4095. (in Chinese with English abstract) [薛蓓, 侯磊, 薛会英 (2019) 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, 39, 4088–4095.]
- Yeates GW (1979) Soil nematodes in terrestrial ecosystems. *Journal of Nematology*, 11, 213–229.
- Yeates GW (1981) Nematode populations in relation to soil environmental factors: A review. *Pedobiologia*, 22, 312–338.
- Yeates GW (2003) Nematodes as soil indicators: Functional and biodiversity aspects. *Biology and Fertility of Soils*, 37, 199–210.
- Yeates GW, William GL (1997) Burning in a New Zealand snow-tussock grassland: Effects on vegetation and soil fauna. *New Zealand Journal of Ecology*, 21, 73–79.
- Yin WY, Hu SH, Shen YF (1998) Pictorial Keys to Soil Animals of China. Science Press, Beijing. (in Chinese) [尹文英, 胡圣豪, 沈韞芬 (1998) 中国土壤动物检索图鉴. 科学出版社, 北京.]
- Zhai H, Zhang H, Zhang C, Zhou X (2016) Soil microbial functional diversity in different types of stands in the hilly-gully regions of Loess Plateau. *Scientia Silvae Sinicae*,



- 52(12), 84–91. (in Chinese with English abstract) [翟辉, 张海, 张超, 周旭 (2016) 黄土崩状丘陵区不同类型林分土壤微生物功能多样性. 林业科学, 52(12), 84–91.]
- Zhang JT (2005) Succession analysis of plant communities in abandoned croplands in the eastern Loess Plateau of China. *Journal of Arid Environments*, 63, 458–474.
- Zhang SX, Li Q, Lü Y, Zhang XP, Liang WJ (2013) Contributions of soil biota to C sequestration varied with aggregate fractions under different tillage systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 62, 147–156.
- Zhang WD, Shang YF, Wang XF (2010) The response of soil nematode community to vegetation restoration in Shimenshan in Dalian. *Acta Ecologica Sinica*, 30, 878–886. (in Chinese with English abstract) [张伟东, 尚艳芳, 王雪峰 (2010) 土壤线虫群落对大连石门山森林植被恢复的响应. 生态学报, 30, 878–886.]
- Zhang XK, Liang WJ, Li Q (2018) Recent progress and future directions of soil nematode ecology in China. *Biodiversity Science*, 26, 1060–1073. (in Chinese with English abstract) [张晓珂, 梁文举, 李琪 (2018) 我国土壤线虫生态学研究进展和展望. 生物多样性, 26, 1060–1073.]
- Zhang XP, Yang GH, Wang HZ, Zong J, Yang SJ (2011) Species diversity and community characteristics of different vegetations during restoration in the gully region of Loess Plateau. *Journal of Northwest Forestry University*, 26, 22–25, 219. (in Chinese with English abstract) [张笑培, 杨改河, 王和洲, 宗洁, 杨慎骄 (2011) 黄土沟壑区不同植被恢复群落特征及多样性研究. 西北林学院学报, 26, 22–25, 219.]
- Zhu BJ, Xue JR, Xia R, Jin MM, Wu Y, Tian SY, Chen XY, Liu MQ, Hu F (2019) Effect of soil nematode functional guilds on plant growth and aboveground herbivores. *Biodiversity Science*, 27, 409–418. (in Chinese with English abstract) [朱柏菁, 薛敬荣, 夏蓉, 靳苗苗, 吴攸, 田善义, 陈小云, 刘满强, 胡锋 (2019) 不同土壤线虫功能团对水稻生长及地上部植食者的影响. 生物多样性, 27, 409–418.]

(责任编辑: 傅声雷 责任编辑: 闫文杰)