DOI: 10.5846/stxb201412122475
宋飏,黄原.DNA 复合条形码在太白山土壤动物多样性研究中的应用.生态学报,2016,36(14): - .
Song Y, Huang Y.The application of DNA metabarcoding in the study of soil animal diversity in Taibai Mountain.Acta Ecologica Sinica,2016,36(14): - .

DNA 复合条形码在太白山土壤动物多样性研究中的应用

宋 飏,黄 原*
陕西师范大学生命科学学院,西安 710062

摘要:DNA 复合条形码技术(metabarcoding)将 DNA 条形码与高通量测序技术相结合,快速便捷地鉴定群落混合样本中的物种,成为监测群落中物种组成和丰富度的可靠方法。本文采用这一方法分析了秦岭太白山 5 种不同生境的中小型土壤动物多样性,共得到土壤动物 3 门 9 纲 28 目 199 科。群落组成分析显示生境的变化对土壤动物群落组成有一定的影响。α 多样性分析显示土壤动物群落丰富度指数最高的生境为针叶林,最低的为农田;土壤动物群落多样性指数最高的生境为针叶林,最低的为落叶小叶林。群落相似性分析显示高山草甸、针叶林和农田三种生境的土壤动物群落组成相似性较高,落叶小叶林和落叶阔叶林的土壤动物群落组成与这三种生境的差异较大,落叶小叶林与落叶阔叶林的土壤动物群落组成差异也较大。

关键词:DNA 复合条形码;太白山;土壤动物;生物多样性

The application of DNA metabarcoding in the study of soil animal diversity in Taibai Mountain

SONG Yang, HUANG Yuan*
College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, *China*

Abstract: Abstract: DNA metabarcoding which couples DNA barcoding with high-throughput sequencing technology enables quick and easy identification of species in a multiple sample, and has become a reliable method for surveying species composition and richness of a community. Taibai Mountain is the main peak of the Qinling Mountains. It is a well-preserved natural ecological system, and is a key area of biodiversity protection in China. Surveys on the diversity of soil meso-microanimals in Taibai Mountain will enrich the data of soil fauna composition and provide scientific basis for biodiversity protection in China. In this paper, we used the metabarcoding approach to analyze the diversity of soil meso-microanimals in 5 different habitats of Taibai Mountain in the Qinling Mountains. These habitats include alpine meadow, coniferous forest, deciduous small-leaved forest, deciduous broad-leaved forest, and farmland. We set 3 plots of 10 m × 10 m in each habitat, and 3 soil samples were collected randomly from each plot, the sampling depth was 0—15cm under ground. A Tullgren funnel was used to separate soil animals from soil samples. Soil animals from the same plot were transferred to 1.5-mL centrifuge tubes and the total DNA was extracted. The universal primers for the fraction of 18S rRNA and COI genes were used to amplify specific barcoding sequences. Sequencing of PCR amplicons was performed on a MiSeq Illumina sequencing platform. Raw data was analyzed using the Qiime and Mothur software to obtain the OTUs list and species list. Ecological analysis was performed using software R. A total of 199 families from 28 orders, 9 classes, and 3 phyla for soil animals were observed. Community composition analysis showed that habitat changes have some effect on the

基金项目:直翅目昆虫的比较及进化线粒体转录组学研究(31172076);基于转录组数据的直翅目昆虫谱系基因组学研究(31372192)
收稿日期:2014-12-12; **网络出版日期**:2015-00-00

* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: yuanh@snnu.edu.cn

soil animal community composition. Alpha diversity analysis showed that the highest community richness index for soil animals is the coniferous forest and the lowest is the farmland; in addition, the highest community diversity index for soil animals is the coniferous forest and the lowest is the deciduous small-leaved forest. The community similarity analysis showed that the soil animal community composition in alpine meadow, coniferous forest, and farmland has a high similarity. The soil animal community composition in deciduous small-leaved forest and deciduous broad-leaved forest greatly differed from that in alpine meadow, coniferous forest, and farmland. The difference between the soil animal community composition in deciduous small-leaved forest and deciduous broad-leaved forest also differed greatly. The results of cluster analysis was in conformity with the community similarity analysis.

Key Words: DNA metabarcoding; Taibai Mountain; soil animals; biodiversity

DNA 复合条形码技术(metabarcoding)是一种结合了 DNA 条形码技术和高通量测序技术的快速鉴定混合样本中物种的方法[1-3]。DNA 条形码技术通过一段短的 DNA 序列来鉴定物种,由 Hebert 等人于 2003 年提出[4]。传统的 Sanger 测序只能对单一的 DNA 分子进行测序,而高通量测序技术可以分别对混合 DNA 中的每一条 DNA 分子进行测序。两种技术的结合运用可以获得混合样本中大量的含有分类学信息的 DNA 片段的序列,然后将这些序列与合适的数据库比对即可确定其代表的类群。随着高通量测序技术的持续发展与分析软件的不断完善,在分析生物多样性时,DNA 复合条形码技术可以作为代替传统方法的一个选择[2-3]。

DNA 复合条形码技术已普遍使用于微生物群落的研究,并且正越来越多的应用到动植物多样性研究中[1,5]。在土壤动物方面:Douglas 等人构建了 7 个节肢动物群落,通过对这些节肢动物群落的 DNA 复合条形码研究证明了该方法可以精确估计群落内的系统发育多样性和群落间的差异性[2];Bienert 等人对 2 个不同地点的土壤样品进行了研究,发现这一方法能很好地区分这 2 个地点的蚯蚓群落组成,并且与使用传统方法得到的结果一致[6];Yang 等人对基于该技术分析土壤小型动物多样性的三种数据处理流程进行了分析比较,结果表明三种流程的处理结果基本一致[7];魏攀利用该技术对小五台山国家级自然保护区一平方米草地中无脊椎动物多样性进行了研究,共调查得到 125 种无脊椎动物[8];Yang 等人使用该方法对采自土壤和落叶层的样本与采自地上的样本进行了比较,结果表明,在研究生物多样性格局时,两类样本可以得到相似的生态学信息[9]。此外,还有许多关于土壤线虫的研究[10-12]。

目前,科学界已经认识到土壤是地球上生物多样性最丰富的生境之一[13]。虽然土壤生物多样性的研究已有很长时间,但是,关于土壤生物多样性本身的很多基础科学问题仍然不清楚。从某种意义上说,对土壤生物多样性的研究还处于初期阶段[14]。

我国对土壤动物的研究主要集中在东北、亚热带地区、热带雨林地区以及新疆地区,对于中西部地区的土壤动物研究还很少[15-16]。太白山为秦岭主峰,位于动物古北界与东洋界的交汇和过渡地带,处在中国——日本和中国——喜马拉雅 2 个植物亚区的分界线上,也是华北、华中和横断山脉 3 个植物区系的交汇处,自然植被带完整,生态系统复杂多样,生物资源丰富,在海拔 3400m 以上存有完整的第四纪古冰川遗迹,是一个保存完好的自然生态系统,是我国生物多样性保护的关键区域[17]。

本文选取 18S 核糖体小亚基 RNA(18S rRNA)基因和细胞色素 C 氧化酶亚基 I(COI)基因的部分序列作为分子标记,应用 DNA 复合条形码技术对秦岭太白山地区 5 种不同生境(高山草甸,针叶林,落叶小叶林,落叶阔叶林,农田)的中小型土壤动物多样进行研究,并讨论该方法目前应用于中小型土壤动物研究的优缺,为进一步探讨秦岭中小型土壤动物多样性格局以及秦岭生物多样性保护提供科学依据。

1 研究方法

1.1 样本的采集和分离

于 2014 年 6 月上旬在太白山自然保护区及周围选取高山草甸、针叶林、落叶小叶林、落叶阔叶林和农田

5 种生境进行取样。每种生境选取 10m×10m 的 3 个样方,在每个样方内随机采取 3 份土样,采样深度为 0—15cm。将土样带回实验室,用 Tullgren 漏斗进行分离(40W 白炽灯分离 48 小时)。将收集到的土壤动物保存在 100%乙醇中,用于总 DNA 的提取。样地详细信息见表 1。

表 1　样地详细信息

Table 1　Detailed information of sample plots

生境 Habitat	采样地点 Sampling position	海拔 Elevation/m	备注 Remark
高山草甸 Alpine meadow	33.95785°N, 107.76079°E	3604	高山草甸
	33.95935°N, 107.76438°E	3598	高山草甸
	33.96813°N, 107.77204°E	3602	高山草甸
针叶林 Coniferous forest	33.97859°N, 107.76949°E	3334	太白红杉林
	33.98616°N, 107.75208°E	3066	巴山冷杉林
	33.99572°N, 107.73326°E	2904	巴山冷杉林
落叶小叶林	34.01117°N, 107.72562°E	2726	糙皮桦林
Deciduous small-leaved forest	34.01562°N, 107.71668°E	2742	糙皮桦林
	34.01762°N, 107.70982°E	2517	红桦林
落叶阔叶林	34.08043°N, 107.69726°E	1326	锐齿栎林
Deciduous broad-leaved forest	过仙桥附近 *	-	锐齿栎林
	34.08844°N, 107.68707°E	1171	栓皮栎林
农田 Farmland	34.88408°N, 107.68707°E	1171	玉米地
	34.04218°N, 107.34136°E	1169	秦艽田
	34.09689°N, 107.65855°E	856	麦田

* 采样时该地点 GPS 无法定位

1.2　总 DNA 提取

将一个样方分离到的所有土壤动物混合放入一个 1.5mL 离心管,使用血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)进行总 DNA 提取,得到 15 份总 DNA。将每种生境的 3 份总 DNA 进行等浓度混合,得到用于后续 PCR 的 5 份总 DNA。

1.3　PCR 及测序

PCR 反应体系为 25μL,包括 2×Taq PCR StarMix with Loading Dye 12.5μL,灭菌超纯水 9.5μL,正向引物(10μM)1.0μL,反向引物(10μM)1.0μL,总 DNA 1.0μL。

18S rRNA 基因部分序列(大约 350bp)的扩增使用正向引物#3:5′-GYGGTGCATGGCCGTTSKTRGTT-3′和反向引物#5_RC:5′- GTGTGYACAAAGGBCAGGGAC-3′[18]。为了同时对多个样本进行测序,在每个样本的正向引物 5′端加上了 7bp 的 barcode 序列,用于后续分析中区分序列来自哪个样本。PCR 的循环程序为:95℃ 10min;10 个循环:95℃ 10s,57℃ 30s(每个循环降低 0.5℃),72℃ 60s;30 个循环:95℃ 10s,55℃ 30s,75℃ 60s;最后在 72℃下延长 5min。

COI 基因部分序列(大约 313bp)的扩增使用正向引物 mlCOIintF:5′-GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC-3′[19]和反向引物 jgHCO2198:5′-TANACYTCNGGRTGNCCRAARAAYCA-3′[20](用 N 替换了原序列中的 I)。同样在每个样本的正向引物 5′端加上了 7bp 的 barcode 序列。PCR 的循环程序为:16 个循环:95℃ 10s,62℃ 30s(每个循环降低 1℃),72℃ 60s;25 个循环:95℃ 10s,46℃ 30s,72℃ 30s;最后在 72℃下延长 5min。

每份总 DNA 扩增 3 次,然后将 3 份 PCR 产物等浓度混合。PCR 产物的测序使用 Illumina MiSeq 平台,采用 250PE 测序策略,由上海派森诺生物科技有限公司完成。

1.4　数据处理

1.4.1　原始数据处理

步长为 1 的 5bp 窗口从序列起始位置开始滑动,要求窗口中碱基平均质量≥Q20,低于该值则截断序列。

然后使用 FLASH(http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/)对通过质量过滤的序列进行拼接。使用 Qiime[21] 对拼接后的序列进一步过滤,舍弃含有 N 碱基、长度<150bp、barcode 有错配和引物错配碱基数>1 的序列。使用 mothur[22] 去除嵌合体序列,得到用于后续分析的序列。

1.4.2 OTU 聚类及注释

使用 Qiime 将序列按相似度 0.97 聚类为 OTU(Operational Taxonomic Unit)[23],选取每个 OTU 最长的序列作为代表序列。将 18S rRNA 基因和 COI 基因的 OTU 代表序列分别与 Silva[24] 数据库(115 版)和 BOLD[25] 数据库(截止到 Release 5.00-v1)进行比对,获得每个 OTU 的分类学信息。使用两个标记的 OTU 列表生成物种列表,然后合并,删去不属于土壤动物的类群。使用 Excel 绘制目水平上的群落组成百分比堆积图。使用 R 软件 VennDiagram 程序包绘制 Venn 图。

1.4.3 α 多样性分析

使用 R 软件 vegan 程序包对各样本的 Chao1 丰富度指数,ACE 丰富度指数,Shannon-Wiener 多样性指数和 Simpson 多样性指数进行计算。

1.4.4 群落相似性分析

使用 R 软件 vegan 程序包对各样本之间的 Bray-Curtis 距离进行计算,然后使用 ape 程序包基于 Bray-Curtis 距离对样本进行主坐标分析(Principal Coordinates Analysis; PCoA)。

1.4.5 聚类分析

根据物种列表,使用 R 软件 pheatmap 程序包将科水平上的分类信息进行聚类分析并绘制 Heatmap 图。

2 结果

2.1 原始数据处理与 OTU 聚类

经最初的质量过滤与拼接后得到 611959 序列,其中 18S rRNA 基因 309167 条,COI 基因 302792 条。经 Qiime 与 mothur 进一步过滤后得到用于后续分析的序列,共 437313 条,其中 18S rRNA 基因 211436 条,COI 基因 225877 条。合格序列聚类后,18S rRNA 基因共得到 1653 个 OTU,COI 基因共得到 2138 个 OTU。

2.2 种类组成

本文的土壤动物分类参照《中国土壤动物检索图鉴》[26]。调查共鉴定到土壤动物 3 门 9 纲 28 目 199 科,其中 18S rRNA 基因鉴定到 2 门 8 纲 23 目 101 科,COI 基因鉴定到 3 门 7 纲 16 目 128 科,两者共同鉴定到 2 门 6 纲 12 目 31 科。高山草甸包含 21 目 136 科,针叶林包含 20 目 141 科,落叶小叶林包含 21 目 122 科,落叶阔叶林包含 21 目 138 科,农田包含 23 目 132 科。各样本所包含的类群及各类群在各样本中所含序列条数见附表。

对各样本做 Venn 图(图 1)可得,各样本在科水平共有的类群数为 84,在高山草甸、针叶林、落叶小叶林、落叶阔叶林、农田各自总类群数中所占比例分别为 61.76%、59.57%、68.85%、60.87%、63.64%。高山草甸独有的类群数为 9,占其总类群数 6.62%;针叶林独有的类群数为 13,占其总类群数 9.22%;落叶小叶林独有的类群数为 7,占其总类群数 5.74%;落叶阔叶林独有的类

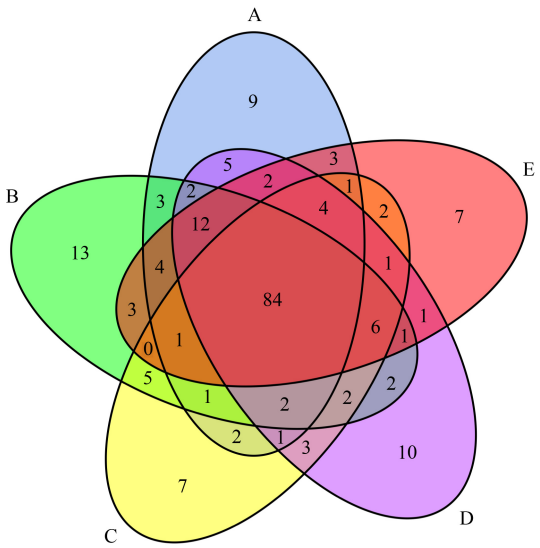

图 1 各样本在科水平的 Venn 图

Fig.1 Venn diagram for families of samples

A 为高山草甸 represents alpine meadow, B 为针叶林 represents coniferous forest, C 为落叶小叶林 represents deciduous small-leaved forest, D 为落叶阔叶林 represents deciduous broad-leaved forest, E 为农田 represents farmland

群数为 10,占其总类群数 7.25%;农田独有的类群数为 7,占其总类群数 5.30%。

如图 2 所示,在目水平上,真螨目、弹尾目和蜘蛛目的丰度在各个样本中都较高,其中蜘蛛目在落叶小叶林中所占比例达 64.62%。鳞翅目在高山草甸、针叶林和农田中的丰度较高,而在落叶小叶林和阔叶林中丰度较低。半翅目在高山草甸、针叶林和落叶小叶林中丰度较高,而在落叶阔叶林和农田中丰度较低。双尾目在落叶阔叶林中所占比例达 61.04%,而在其他生境中含量较低。条马陆目在针叶林中含量较高,鞘翅目在农田中含量较高。其余类群在各生境中含量均较低。

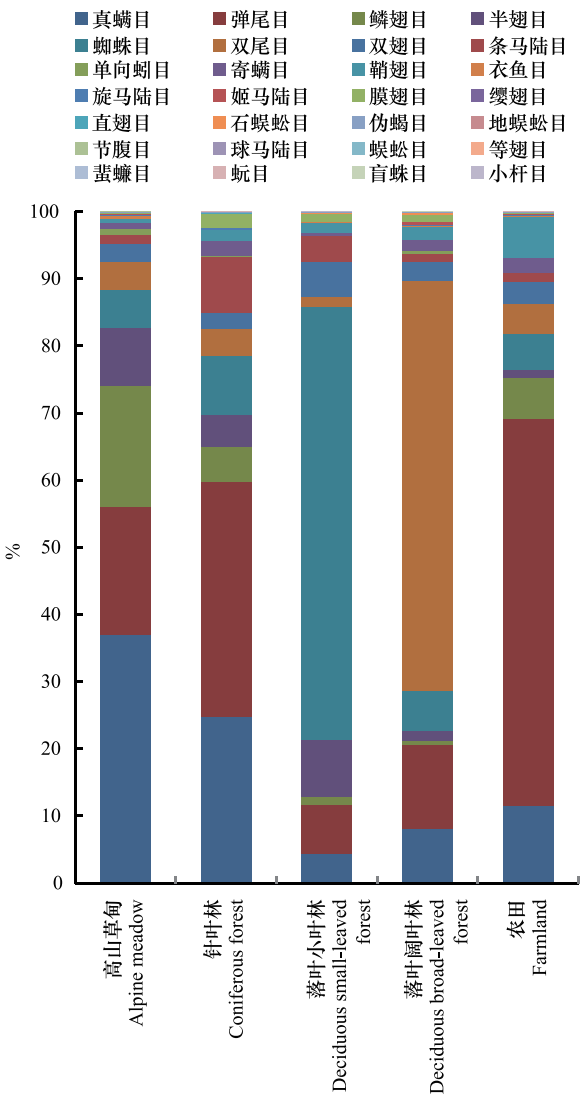

图 2　目水平上各类群的序列丰度在各样本中所占的百分比

Fig.2　Percentage of sequence aboundance of taxa for order in each sanple

2.3　α 多样性分析

各生境的土壤动物群落 Chao1 丰富度指数为:针叶林>落叶小叶林>落叶阔叶林>高山草甸>农田;ACE 丰富度指数为:针叶林>落叶阔叶林>高山草甸>落叶小叶林>农田;Shannon-Wiener 多样性指数为:针叶林>高山草甸>农田>落叶阔叶林>落叶小叶林;Simpson 多样性指数为:针叶林>高山草甸>农田>落叶阔叶林>落叶小叶林。各生境多样性指数见表 2

2.4　群落相似性分析

Bray-Curtis 距离可以作为衡量群落间相似性的指标,Bray-Curtis 距离越小,表示两个样本的群落组成越相似。表 3 为各样本之间的 Bray-Curtis 距离。根据各样本之间的 Bray-Curtis 距离,可以做 PCoA 分析。样本的相似性越高,它们在 PCoA 图中的距离就越近。图 3 为根据各样本间的 Bray-Curtis 距离,选取贡献率最大的主坐标组合所做的 PCoA 图。图 3 显示土壤动物群落组成在高山草甸、针叶林、农田三种生境中的相似性较高,落叶小叶林和落叶阔叶林的土壤动物群落组成与这三种生境的相似性较低,落叶小叶林与落叶阔叶林之间的土壤动物群落组成相似性也较低。

表 2　各生境多样性指数

Table 2　Diversity index of each habitat

生境 Habitat	Chao1 指数 Chao1 index	ACE 指数 ACE index	Shannon-Wiener 指数 Shannon-Wiener index	Simpson 指数 Simpson index
高山草甸 Alpine meadow	151.33	157.90	2.63	0.87
针叶林 Coniferous forest	174.83	165.70	2.81	0.89
落叶小叶林 Deciduous small-leaved forest	162.60	149.29	1.67	0.57
落叶阔叶林 Deciduous broad-leaved forest	157.71	161.09	1.92	0.62
农田 Farmland	145.57	146.03	2.52	0.84

2.5　聚类分析

Heatmap 图可以直观地将数据值的大小以颜色的深浅表示出来,同时可根据需要将数据进行物种或样本

间的相似性聚类。图 4 为使用欧式距离和最长聚类法所作的 Heatmap 图,展现了科水平各类群在各样本中的丰度分布,同时也在科水平对各样本进行了聚类。可以看到,高山草甸与针叶林首先聚类,然后与农田聚类,然后与落叶阔叶林聚类,最后与落叶小叶林聚类。

表 3 各样本之间的 Bray-Curtis 距离

Table 3 Bray-Curtis distance between each sample

样本 Sample	高山草甸 Alpine meadow	针叶林 Coniferous forest	落叶小叶林 Deciduous small-leaved forest	落叶阔叶林 Deciduous broad-leaved forest
针叶林 Coniferous forest	0.4030			
落叶小叶林 Deciduous small-leaved forest	0.7639	0.6910		
落叶阔叶林 Deciduous broad-leaved forest	0.6550	0.6169	0.7784	
农田 Farmland	0.5268	0.4367	0.7602	0.6449

3 结论与讨论

从类群列表来看,两个分子标记鉴定到的类群没有完全重叠,两者共同鉴定到的类群只有 31 科。而 18S rRNA 基因单独鉴定到 70 科,COI 基因单独鉴定到 97 科,远大于它们共同鉴定到的类群数。即使是在目水平上,两者鉴定到的类群也有很大的区别。这是由于不同分子标记的通用引物在不同类群中的扩增能力不同与数据库的覆盖度不同造成的[18,19,27]。因此单独使用一种分子标记来鉴定样本中含有的类群会造成对类群数的低估,同时使用多种分子标记可以更全面的鉴定样本中所含类群[10,28]。考虑到数据库的可用性,对于后生动物来说,较好的分子标记有 COI、18S rRNA 和 28S rRNA 基因[18,25,29-30]。

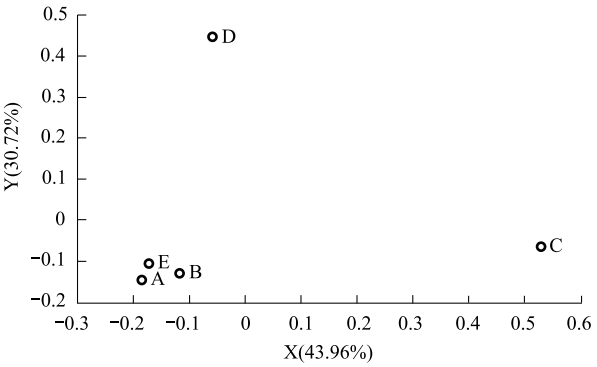

图 3 PCoA 分析

Fig.3 PCoA analysis

A 为高山草甸 represents alpine meadow, B 为针叶林 represents coniferous forest, C 为落叶小叶林 represents deciduous small-leaved forest, D 为落叶阔叶林 represents deciduous broad-leaved forest, E 为农田 represents farmland

尽管采样地点的海拔跨度高达 2500 米以上,生境类型发生了剧烈的变化,但从各样本群落组成来看,在目水平,真螨目、弹尾目和蜘蛛目在各生境中所占的比例都较大,在科水平,5 种生境的共有类群达 84 种,在各生境类群数中所占比例大多超过 60%(在针叶林中为 59.57%),这表明太白山中小型土壤动物中大多数类群为广布类群。另外,各生境均含有类群数低于 10%的特有类群,表明海拔与生境的变化会对太白山中小型土壤动物的群落组成造成一定的影响。这与以往的研究结果一致[31-33]。

在 α 多样性分析中,虽然 Chao1 指数与 ACE 指数同为丰富度指数,但它们的排序结果却有细微的差别,落叶小叶林中的土壤动物群落 Chao1 指数排在落叶阔叶林和高山草甸之前,而 ACE 指数却排在了落叶阔叶林和高山草甸之后。这是因为 ACE 指数的计算公式中加入了一个定义“优势”类群的阈值,这个阈值在 vegan 程序包中为类群包含 10 条序列,而 Chao1 指数并没有这个规则[34]。因此可以推断落叶小叶林土壤动物群落中包含较多的低丰度类群(所含序列数<10)。在 DNA 复合条形码技术中,Shannon-Wiener 和 Simpson 多样性指数是基于一个类群所含序列数计算的,而不是基于一个类群的个体数。Carew 等人[28]指出,在一个样本中,一个物种的序列数和个体数是正相关的,但序列的频率并不能完美的反映物种的频率。Piñol 等人[35]的研究也表明该技术的定量潜力有限,只有定性的研究是可靠的。因此,Shannon-Wiener 和 Simpson 多样性指数仅能作为一个参考,我们不能通过这两个指数很好的判断土壤动物群落的多样性。定量问题是目前该技术用于土壤动物研究的局限性。

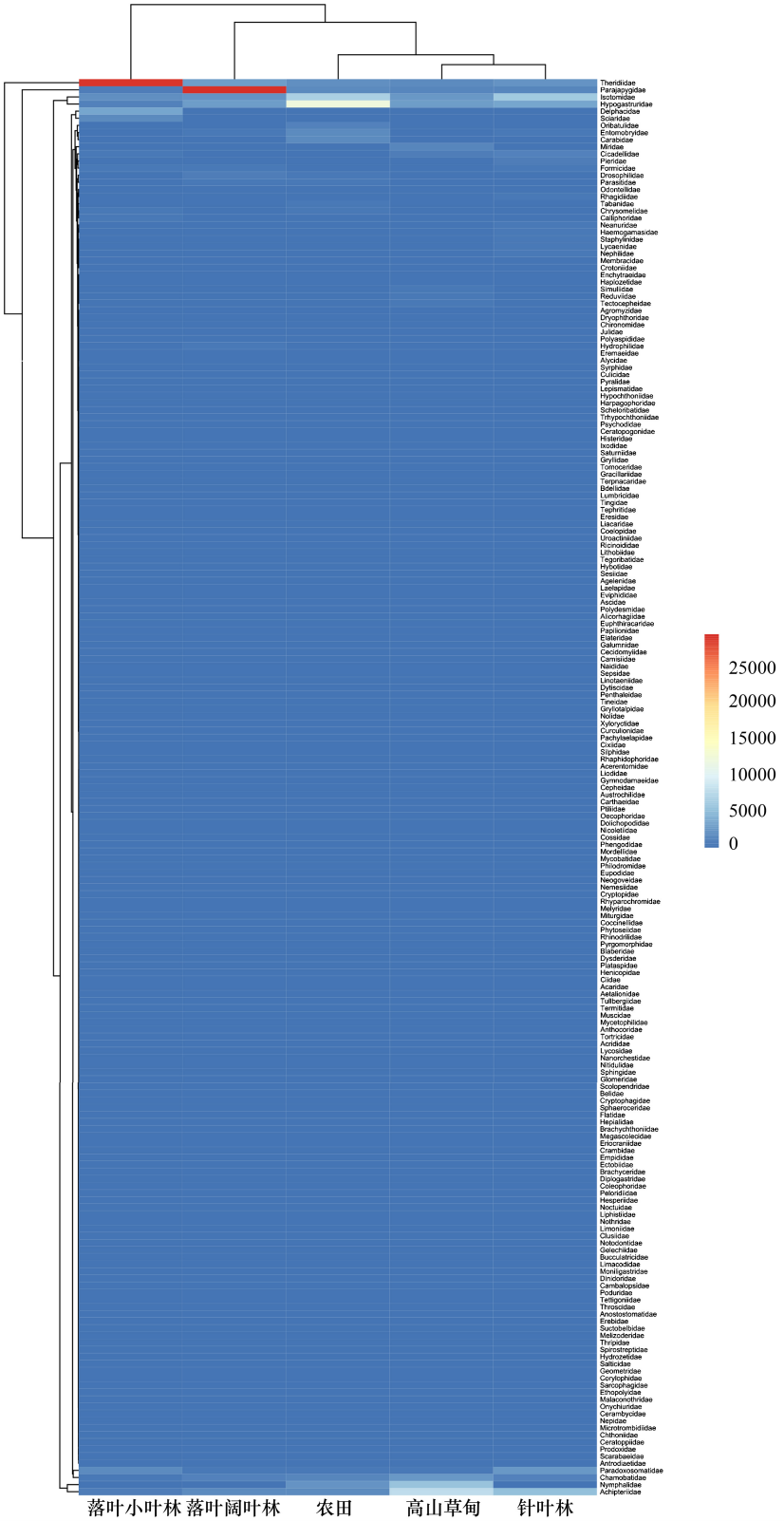

图 4　聚类分析 Heatmap 图

Fig.4　Heatmap of cluster analysis

A 为高山草甸 represents alpine meadow,B 为针叶林 represents coniferous forest,C 为落叶小叶林 represents deciduous small-leaved forest,D 为落叶阔叶林 represents deciduous broad-leaved forest,E 为农田 represents farmland

从各样本之间的 Bray-Curtis 距离与 PCoA 图来看,针叶林与高山草甸的土壤动物群落组成最为相似,针叶林与农田次之。针叶林、高山草甸与农田三者的土壤动物群落组成相似性较高,而落叶小叶林和落叶阔叶林的土壤动物群落组成与这三种生境的相似性都较低,落叶小叶林和落叶阔叶林的土壤动物群落组成相似性也较低。聚类分析得到了与 PCoA 分析相符的结果。这种相似性的形成可能与各生境中的气温和土壤的理化条件相关[32],有待后续的实验。

根据以往的土壤动物研究可知,在一次调查中会得到成千上万的土壤动物,且土壤动物包含的类群很多,鉴定这些土壤动物需要多人长时间作业。对于其它的环境样本,也存在同样的问题。而通过 DNA 复合条形码技术,则可以快速简便的完成大量样本的分类鉴定,与传统方法相比,省时省力,这也是该技术的优势所在。随着高通量测序技术的不断发展和分析方法的不断完善,DNA 复合条形码技术的高成本效益和全面性将使更容易的大尺度监测生物多样性趋势成为可能[36-37]。

参考文献(References):

[1] Coissac E, Riaz T, Puillandre N. Bioinformatic challenges for DNA metabarcoding of plants and animals. Molecular Ecology, 2012, 21(8): 1834-1847.

[2] Yu D W, Ji Y, Emerson B C, Wang X Y, Ye C X, Yang C Y, Ding Z L. Biodiversity soup: metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. Methods in Ecology and Evolution, 2012, 3(4): 613-623.

[3] Ji Y Q, Ashton L, Pedley S M, Edwards D P, Tang Y, Nakamura A, Kitching R, Dolman P M, Woodcock P, Edwards F A, Larsen T H, Hsu W W, Benedick S, Hamer K C, Wilcove D S, Bruce C, Wang X Y, Levi T, Lott M, Emerson B C, Yu D W. Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. Ecology Letters, 2013, 16(10): 1245-1257.

[4] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, deWaard J R. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 2003, 270(1512): 313-321.

[5] 马兰. DNA 微型条形码和复合条形码研究进展. 农业灾害研究, 2013, 3(6): 58-60, 63-63.

[6] Bienert F, De Danieli S, Miquel C, Coissac E, Poillot C, Brun J J, Taberlet P. Tracking earthworm communities from soil DNA. Molecular Ecology, 2012, 21(8): 2017-2030.

[7] Yang C X, Ji Y Q, Wang X Y, Yang C Y, Yu D W. Testing three pipelines for 18S rDNA-based metabarcoding of soil faunal diversity. Science China Life Sciences, 2013, 56(1): 73-81.

[8] 魏攀. 宏条形码研究小五台山国家自然保护区一平方米草地中无脊椎动物多样性[D]. 北京: 中国科学院大学, 2013.

[9] Yang C X, Wang X Y, Miller J A, Blécourt M D, Ji Y Q, Yang C Y, Harrison R D, Yu D W. Using metabarcoding to ask if easily collected soil and leaf-litter samples can be used as a general biodiversity indicator. Ecological Indicators, 2014, 46: 379-389.

[10] Porazinska D L, Giblin-Davis R M, Faller L, Farmerie W, Kanzaki N, Morris K, Powers T O, Tucker A E, Sung W, Thomas W K. Evaluating high-throughput sequencing as a method for metagenomic analysis of nematode diversity. Molecular Ecology Resources, 2009, 9(6): 1439-1450.

[11] Porazinska D L, Sung W, Giblin-Davis R M, Thomas W K. Reproducibility of read numbers in high-throughput sequencing analysis of nematode community composition and structure. Molecular Ecology Resources, 2010, 10(4): 666-676.

[12] Darby B J, Todd T C, Herman M A. 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, 2013, 22(21): 5456-5471.

[13] Bardgett R D. The Biology of Soil: A Community and Ecosystem Approach. Oxford: Oxford University Press, 2005.

[14] 时雷雷, 傅声雷. 土壤生物多样性研究: 历史、现状与挑战. 科学通报, 2014, 59(6): 493-509.

[15] 马文明, 陈智华, 吴鹏飞. 我国土壤动物生态学研究进展. 安徽农业科学, 2008, 36(22): 9644-9645, 9698-9698.

[16] 吾玛尔·阿布力孜, 古丽布斯坦·努尔买买提, 阿布都肉苏力·吐孙, 木开热木·阿吉木, 吴松林. 新疆阜康绿洲不同生境土壤动物群落多样性及其季节动态. 生态学杂志, 2013, 32(6): 1412-1420.

[17] 李先敏, 余玲江. 太白山自然保护区的生物多样性及其威胁因素研究. 林业调查规划, 2005, 30(6): 6-9.

[18] Machida R J, Knowlton N. PCR primers for metazoan nuclear 18S and 28S ribosomal DNA sequences. PLoS ONE, 2012, 7(9): e46180.

[19] Leray M, Yang Y J, Meyer C P, Mills S C, Agudelo N, Ranwez V, Boehm J T, Machida R J. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: Application for characterizing coral reef fish gut contents. Frontiers in Zoology, 2013, 10: 34-34.

[20] Geller J, Meyer C, Parker M, Hawk H. Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. Molecular Ecology Resources, 2013, 13(5): 851-861.

[21] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman F D, Costello E K, Fierer N, Peña A G, Goodrich J K, Gordon J I, Huttley G A, Kelley S T, Knights D, Koenig J E, Ley R E, Lozupone C A, McDonald D, Muegge B D, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky J R, Turnbaugh P J, Walters W A, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nature Methods, 2010, 7(5): 335-336.

[22] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, Hall J R, Hartmann M, Hollister E B, Lesniewski R A, Oakley B B, Parks D H, Robinson C J, Sahl J W, Stres B, Thallinger G G, Horn D J V, Weber C F. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(23): 7537-7541.

[23] Blaxter M, Mann J, Chapman T, Thomas F, Whitton C, Floyd R, Abebe E. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2005, 360(1462): 1935-1943.

[24] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner F O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Research, 2013, 41(D1): D590-D596.

[25] Ratnasingham S, Hebert P D N. bold: The Barcode of Life Data System (http://www.barcodinglife.org). Molecular Ecology Notes, 2007, 7(3): 355-364.

[26] 尹文英. 中国土壤动物检索图鉴. 北京: 科学出版社, 1998.

[27] Aylagas E, Borja Á, Rodríguez-Ezpeleta N. Environmental status assessment using DNA metabarcoding: towards a genetics based marine biotic index (gAMBI). PLoS ONE, 9(3): e90529.

[28] Carew M E, Pettigrove1 V J, Metzeling L, Hoffmann A A. Environmental monitoring using next generation sequencing: rapid identification of macroinvertebrate bioindicator species. Frontiers in Zoology, 2013, 10: 45-45.

[29] Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs B M, Ludwig W, Peplies J, Glöckner F O. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. Nucleic Acids Research, 2007, 35(21): 7188-7196.

[30] Creer S, Fonseca V G, Porazinska D L, Giblin-Davis R M, Sung W, Power D M, Packer M, Carvalho G R, Blaxter M L, Lambshead P J, Thomas W K. Ultrasequencing of the meiofaunal biosphere: practice, pitfalls and promises. Molecular Ecology, 2010, 19(Supplement s1): 4-20.

[31] 尹文英. 中国土壤动物. 北京: 科学出版社, 2000.

[32] 白登忠, 谢寿安, 史睿杰, 成洪刚. 秦岭土壤环境变化对土壤动物群落的影响. 西北林学院学报, 2012, 27(6): 1-7.

[33] 阴环. 陕西长安光头山土壤动物群落多样性的研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2004.

[34] 李鑫. 苏打盐碱地桑树/大豆间作的土壤微生物多样性研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2012.

[35] Piñol J, Mir G, Gomez-Polo P, Agustí N. Universal and blocking primer mismatches limit the use of high-throughput DNA sequencing for the quantitative metabarcoding of arthropods. Molecular Ecology Resources, doi: 10.1111/1755-0998.12355.

[36] Wintle B A, Runge M C, Bekessy S A. Allocating monitoring effort in the face of unknown unknowns. Ecology Letters, 2010, 13(11): 1325-1337.

[37] Possingham H P, Wintle B A, Fuller R A, Joseph L N. The conservation return on investment from ecological monitoring // Lindenmayer D B, Gibbons P, eds. Biodiversity Monitoring in Australia. Melbourne: CISRO Publishing, 2012: 49-58.