

DOI: 10.5846/stxb201804030759

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): - .

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): - .

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

薛 蓓, 侯 磊, 薛会英*

西藏农牧学院, 林芝 860000

摘要: 为了研究藏北高寒草甸土壤线虫多样性, 于 2017 年 8 月, 采用 Illumina MiSeq 测序技术, 研究了西藏北部高寒草甸 0—25 cm 范围内不同深度土层的土壤线虫群落组成与结构特征。结果表明: 5 个不同深度共获得 OTU 990 个, 隶属于 3 个纲, 7 个目, 25 个科, 30 个属, 刺嘴纲 Enoplea 为共有优势土壤线虫群落; 对样品进行 Alpha 多样性评价, 计算 Chao 1 指数、Shannon 指数和 Ace 指数, 发现 5—10 cm 的土壤样品群落有较高的丰富度; 属水平 Heatmap 图分析可知 20—25、15—20、0—5、5—10、10—15 cm 土壤线虫群落的组成相似性有一个递增的趋势。与不同深度藏北高山嵩草(盛长期)线虫群落结构相关性较大的土壤化学指标是 K^+ 、含水率、有机质和 Zn^{2+} 。研究发现不同深度土壤线虫种类及丰度存在一定的差异, 可为研究藏北高寒草地土壤线虫群落特点提供依据。

关键词: 土壤线虫; 生物多样性; 群落结构; 高通量测序; 西藏

Research on the characteristics of soil nematode communities in alpine meadow in northern Tibet by using high-throughput sequencing

XUE Bei, HOU Lei, XUE Huiying*

Tibet Agriculture and Animal Husbandry University, Nyingchi 860000, China

Abstract: The goal of this study was to examine the diversity of soil nematodes in the alpine meadows of northern Tibet. In August 2017, the changes in soil nematode communities at different soil depths were analyzed using high-throughput sequencing to reveal the community composition and structural characteristics. A total of 990 operational taxonomic units were extracted from five samples and were sorted into 3 classes, 7 orders, 25 families, and 30 genera. Enoplea was dominant in the different samples at the class level. The Chao1 index, Shannon index, and Ace index were used to evaluate the alpha diversity of the samples, and the results showed that the 5—10 cm soil layer had a relatively high abundance. A heatmap analysis showed the composition similarity of the community was 20—25 cm < 15—20 cm < 0—5 cm < 5—10 cm < 10—15 cm. A redundancy analysis of the soil nematode phyla and the chemical parameters in the soil showed that K^+ , soil water content, organic matter, and Zn^{2+} were the most related to the soil nematode community structure. Differences were noted in the species and abundance of soil nematodes at the different depths, which provides a basis for studying the characteristics of soil nematode communities in the alpine grasslands in northern Tibet.

Key Words: soil nematodes; biological diversity; community structure; high-throughput sequencing; Tibet

基金项目: 国家自然科学基金(31660155); 西藏特色农牧资源研发协同创新中心高原生态项目

收稿日期: 2018-04-30; 网络出版日期: 2018-00-00

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: 472425717@qq.com

土壤线虫是土壤动物中的优势类群,被认为是地球上数量最大的多细胞生物^[1-2]。土壤线虫有多种食性,其功能(营养)结构是土壤物质循环和能量流动的重要决定因素之一,同时也能够提供土壤腐屑食物网机能方面的信息,土壤线虫在草地生态系统中往往被看作是主要的消费者,与草地生产力密切相关^[3-7]。

传统的形态学分离鉴定土壤线虫需要借助显微镜分辨,而且鉴定人员需要进行专业的培训,耗时耗力^[8],例如从单个样品中分离鉴定 100—150 个土壤线虫需要专业研究人员花费 1 h 以上^[9]。21 世纪以来,新一代高通量测序技术的发展日新月异,可直接测序 16S rRNA 基因的 PCR 产物,每次分析获得的基因序列数以百万甚至亿万计,不仅通量高,而且能够同时分析上百个不同的样品,是解析复杂环境中微生物群落物种组成和相对丰度的重要工具^[10-11]。

目前,高通量技术在线虫研究中得到了一定的应用^[12],如国外学者对热带雨林和北极地区的线虫多样性^[13]、地中海灌木丛线虫多样性^[14]的研究以土壤活线虫作为一种生物指标,研究分析外来植物在沿海沙丘生态系统中的侵袭作用^[15]、热带和温带雨林的线虫空间和生态模式^[16]和热带雨林生物多样性^[17]等。国内如冯陈晨等对骆驼刺副柔线虫转录组进行高通量测序及分析^[18]。

本文通过 Illumina MiSeq 测序技术,在 97% 的相似水平下对所测得序列进行 OUT 聚类 and 生物信息学分析,研究藏北高寒草甸不同土壤深度线虫群落结构特征,目的是全面了解高寒草甸不同深度土壤线虫群落多样性,为进一步研究不同植被不同气候变化下土壤线虫群落特点提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验地概况

实验样地设置在西藏大学-中国科学院青藏高原研究所那曲生态环境综合观测研究站内(31°31'38"—31°32'02"N, 92°04'03"—92°04'16"E),采样区域土壤为高山草甸土,其地被植物主要优势种及亚优势种有高山嵩草(*Kobresia pygmaea*)、矮火绒草(*Leontopodium nanum*)、矮生嵩草(*K. humilis*)、二裂委陵菜(*Potentilla bifurca*)、钉柱委陵菜(*P. saundersiana*)、乳白香青(*Anaphallis lactea*)等^[19]。

1.2 样品采集

2017 年 8 月,在实验场地内设置 3 个六边形样地(3 个重复),样地面积均为 2.5 m×2.5 m,每个六边形样地间距大于 100 m。2017 年 8 月,采用三点采样法,分别采集 0—5、5—10、10—15、15—20、20—25 cm 5 个深度的土层原状土样,装入无菌采样袋中,放入冰盒内,于 12 h 内带回实验室置于-80℃冰箱内保藏备用。将样品按照不同深度进行样品编号,0—5 cm 的土壤样品编号为 ZBCD1,5—10 cm 的土壤样品编号为 ZBCD2,10—15 cm 的土壤样品编号为 ZBCD3,15—20 cm 的土壤样品编号为 ZBCD4,20—25 cm 的土壤样品编号为 ZBCD5。各样品含水率等理化性质见表 1。

表 1 试验地土壤基本理化性质

Table 1 The basic physical and chemical properties of experimental soil

样本编号 Sample\Info	含水率 Soil water content/%	pH	Cu/ (mg/kg)	Zn/ (mg/kg)	N/%	P/%	K/%	有机质 Organic matter/%
ZBCD1	10.48±5.55a	7.08±0.10e	49.45±6.67a	51.39±16.11c	0.23±0.06a	0.04±0.01a	0.15±0.06a	7.04±4.18a
ZBCD2	9.54±3.24b	7.17±0.09d	41.64±4.54e	52.35±11.26b	0.19±0.06b	0.02±0.02a	0.10±0.01a	6.29±0.73b
ZBCD3	6.88±1.75d	7.28±0.11c	42.29±3.73d	51.24±1.33d	0.18±0.05b	0.03±0.01a	0.09±0.03a	4.72±2.98c
ZBCD4	6.24±2.02e	7.34±0.07b	45.98±6.22b	52.83±18.08a	0.15±0.02b	0.03±0.01a	0.09±0.02a	2.35±0.30d
ZBCD5	7.40±0.11c	7.40±0.11a	45.73±3.66c	42.06±4.17e	0.12±0.03b	0.02±0.00a	0.12±0.02a	1.67±0.48e

ZBCD:藏北草地的汉语拼音首字母缩写;同列数据小写字母不同表示土层间差异显著($P<0.05$)

1.3 DNA 抽提和 PCR 扩增

根据 E.Z.N.A.® soil 试剂盒 (Omega Bio-tek, Norcross, GA, U.S.) 说明书进行总 DNA 抽提, DNA 浓度和纯

度利用 NanoDrop2000 进行检测,利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量;参考文献[10],采用 NF15'-GGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTT-3'和 18Sr2bR 5'-TACAAAGGGCAGGGACGTAAT-3'引物,参考文献[20]进行 PCR 扩增。

1.4 Illumina Miseq 测序

委托上海美吉生物医药科技有限公司利用 Illumina 公司的 Miseq PE300 平台进行测序。

1.5 数据处理及分析

在上海美吉生物医药科技有限公司云平台上进行在线分析(www.i-sanger.com)。其他数据处理采用 SPSS20 软件。测序数据比对数据库为 NCBI(NT)。

2 结果与分析

2.1 测序数据统计及 OTU 组成分析

测序数据统计如表 2,从表 2 可以看出通过对藏北草甸土壤不同深度各样品中线虫基因测序,5 个样品总计测得原始序列条数为(182612±4463)条,质控序列总数为(182164±977)条,共产生 990 个 OTU。其中 ZBCD2(5—10 cm)样品中的 OTU 最多,达到了 214 个 OTU,ZBCD3(10—15 cm)样品中的 OTU 最少,仅为 157 个。

表 2 样品间测序数据统计
Table 2 Sequence data statistics of samples in different fermentation processes

样本编号 Sample\Info	原始序列数 Original seq_num	质控序列数 Quality control seq_num	OTU 数量 Number of operational taxonomic units
ZBCD1	40410±5127a	40299±5152a	214
ZBCD2	36759±5976d	36683±5971c	234
ZBCD3	35885±4510e	35813±4538d	157
ZBCD4	38856±3139b	38779±3106b	198
ZBCD5	33459±5097e	33369±5134e	187
合计 Total	185369±4463	184943±3977	990

同列数据小写字母不同表示土层间差异显著(P<0.05)

以多样性指数为 sobs(表征实际观测到的物种数目)做稀释曲线如图 1。从图 1 可知,5 个样品的稀释曲线均基本趋于平缓,说明所得序列可基本反映真实环境中土壤线虫群落结构。

不同区组土壤线虫群落 OTU 韦恩图如图 2,共同含有的 OTU 统计结果见表 2。从图 2 可知,5 个样本中共同含 135 个 OTU,其中 ZBCD1(0—5 cm)独有 23 个 OTU,ZBCD2(5—10 cm)独有 21 个 OTU,ZBCD3(10—15 cm)独有 11 个 OTU,ZBCD4(15—20 cm)独有 25 个 OTU,ZBCD5(20—25 cm)独有 28 个 OTU,分别占总各自 OTU 总数的 14.56%、13.46%、7.53%、15.63%和 17.18%。

2.3 样品间 Alpha 多样性分析

各样品中的 Alpha 多样性指标如表 3。由表 3 可以看出,不同深度线虫群落样品间 Alpha 多样性统计中的 Chao1 指数、Ace 指数差异显著(P<0.05);Shannon 指数在 ZBCD1 和 ZBCD5 间差异不显著(P>0.05),而这两组样本和其他三组之间 Shannon 指数差异显著(P<0.05)。Shannon 值最高的 ZBCD2(5—10 cm)样品除了具有较高的群落多样性以外,其 Chao1 指数和 Ace 指数分别为 285.27±17.71 和 294.47±30.96,具有较高的群落丰富度。

2.4 纲水平各样本土壤线虫群落分布图

纲水平各样本土壤线虫群落分布图如图 3。从图 3 可知,在 ZBCD1、ZBCD2、ZBCD3、ZBCD4、ZBCD5 中刺嘴纲(Enoplea)是优势土壤线虫群落,分别占到各样本线虫群落的 72.13%、80.51%、76.79%、54.72%和 77.90%;其次为色矛纲(Chromadore),在 ZBCD1、ZBCD2、ZBCD3、ZBCD4、ZBCD5 中分别占到各样本线虫群落的 17.54%、12.04%、12.62%、28.13%和 16.92%,位于第 3 位的是在未分类的线虫纲(unclassified_p_

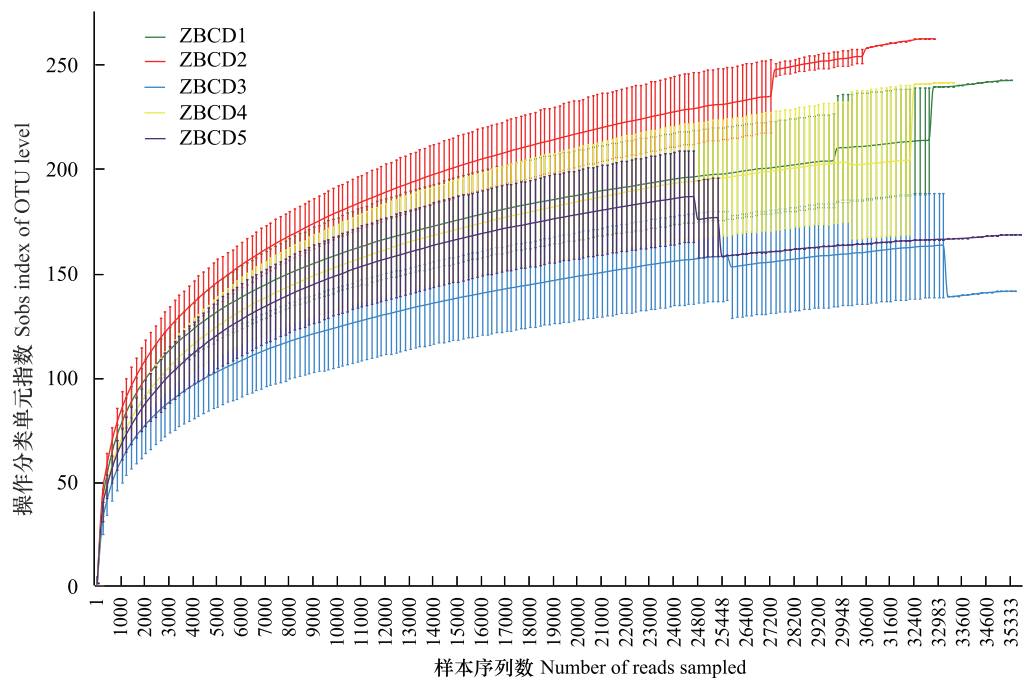


图 1 不同区组土壤线虫测序的稀释曲线

Fig.1 Rarefaction curves of soil nematodes communities in different soil compartments

ZBCD:藏北草地的汉语拼音首字母简写

Nematoda),在 ZBCD4 中相对含量最高,为 17.15%。

2.5 目水平上不同区组土壤线虫相对丰度

目水平各样本土壤线虫群落分布图如图 4。从图 4 可知,在 5 个样本中属于土壤线虫的群落目分别是矛线目(Dorylaimida)、垫刃目(Tylenchida)、未分类的线虫目(unclassified_p_Nematoda)、三矛目(Triplonchida)、小杆目(Rhabdtida)、刺嘴目(Enoplida)和疏毛目(Araeolaimida)这 7 个目。其中矛线目(Dorylaimida)在 5 个样本中含量均较高,其在 ZBCD2 中的相对丰度最高,含量为 79.49%,其在 ZBCD4 中的相对丰度最低,含量为 48.13%;刺嘴目(Enoplida)在 ZBCD4 中的相对丰度较高,含量分别为 22.72%;三矛目(Triplonchida)在 ZBCD4 和 ZBCD5 中相对丰度较高,含量分别为 6.59%和 7.83%。

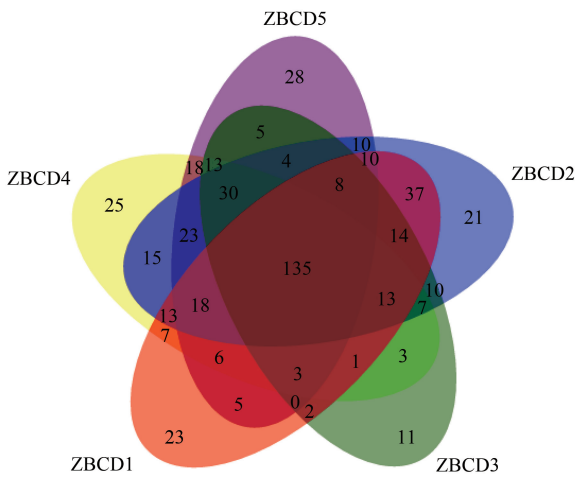


图 2 不同区组土壤线虫群落 OTU 韦恩图

Fig.2 OTU Venn diagram of soil nematodes communities in different soil compartments

表 3 样品间 Alpha 多样性统计

Table 3 Alpha diversity in different sample

样本编号 Sample\Info	Chao1 指数 Chao1 index	Shannon 指数 Shannon index	Ace 指数 Ace index
ZBCD1	253.27±20.22b	2.81±0.04b	247.87±23.38c
ZBCD2	285.27±17.71a	2.99±0.10a	294.47±30.96a
ZBCD3	237.94±13.18c	2.24±0.40d	257.15±1.24b
ZBCD4	220.47±47.52e	2.69±0.38c	222.97±45.13d
ZBCD5	221.68±34.50d	2.81±0.37b	221.38±27.50e

ZBCD:藏北草地的汉语拼音首字母简写;同列数据小写字母不同表示土层间差异显著($P<0.05$)

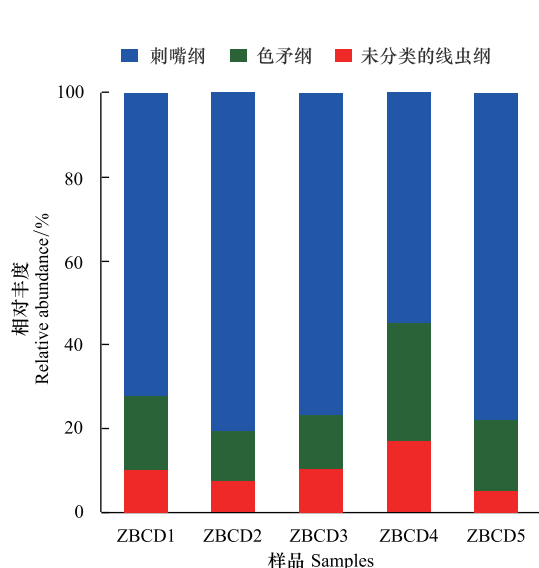


图3 纲水平上不同区组土壤线虫分布图

Fig.3 Frequency of Class level in soil nematode communities from samples

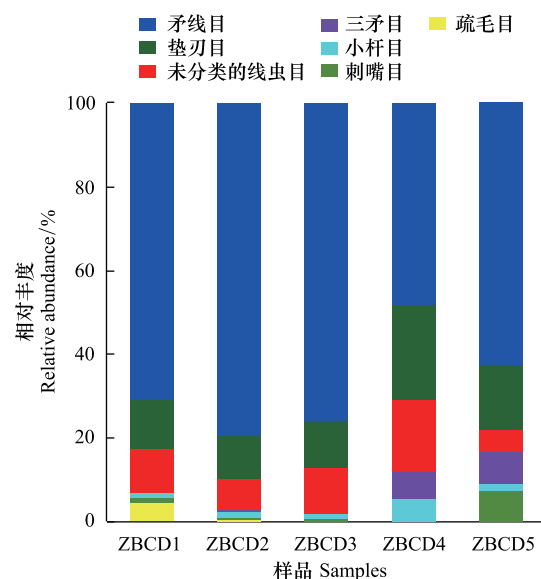


图4 目水平上不同区组土壤线虫差异检验柱形图

Fig.4 Frequency of Order level in soil nematode communities from samples

2.6 聚类分析

属水平的各样本土壤线虫群落 TOP50 热图分析见图 5。从图 5 样品间属水平的聚类关系可知,ZBCD2 和 ZBCD3 群落组成是最相似的,ZBCD5、ZBCD4、ZBCD1、ZBCD2 和 ZBCD3 群落的组成相似性有一个递增的趋势。热图中共显示 30 个土壤线虫属,分别为 *Melenchus* (剑尾垫刃属)、*Meloidoderita* (无对应中文)、*Ecphyadophora* (突腔唇属)、*Prismatolaimus* (棱咽属)、*Tylenchus* (垫刃属)、*Clavicaudoides* (无对应中文)、*Tylencholaimus* (垫咽属)、*unclassified_p_Nematoda* (未分类的线虫属)、*Acrobeloides* (拟丽突属)、*Paravulvus* (无对应中文)、*Aphelenchus* (滑刃属)、*Odontolaimus* (齿咽属)、*Hoplolaimus* (纽带属)、*Paratrichodorus* (拟毛刺属)、*Filenchus* (丝尾垫刃属)、*Alaimus* (无咽属)、*Aphelenchoides* (类滑刃属)、*Merlinius* (默林属)、*Dorylaimellus* (牙咽属)、*Meloidogyna* (根结线虫属)、*Pratylenchus* (短体属)、*Longidorus* (长针属)、*Acrobeles* (丽突属)、*Aglenchus* (野外垫刃属)、*Cylindrolaimus* (筒咽属)、*Ditylenchus* (茎属)、*Belonolaimus* (刺属)、*Proleptonchus* (原细齿属)、*Ecumenicus* (通俗属)、*Rhabdolaimus* (杆咽属)。*Tylencholaimus* (垫咽属) 在 5 个样本中相对含量较高,ZBCD5 共检测到 30 个属,ZBCD1、ZBCD2、ZBCD3 和 ZBCD4 分别共检测到 23、24、19、22 个属。

2.7 线虫群落与土壤化学指标的关系

图 6 为不同深度藏北草甸土壤门水平微生物群落与土壤化学指标(表 1)关系,第一主轴和第二主轴对土壤线虫群落相对丰度方差的解释比例分别为 38.64%和 17.18%,两者共解释 55.82%的方差变化。第一主轴上, $K(K^+)$ 和 HSL(含水率)是主要的影响因子,相关系数分别-0.81 和-0.97,差异显著($P<0.05$)。第二主轴上,YJZ(有机质)和 $Zn(Zn^{2+})$ 是主要的影响因子,相关系数分别为-0.92 和-0.91,差异不显著($P>0.05$)。综上,与不同深度藏北草甸土土壤门水平微生物群落相关性较大的土壤化学指标是 K^+ 、含水率、有机质和 Zn^{2+} 。 K^+ 与线虫门(Nematoda)有较强正相关性,与子囊菌门(Ascomycota)、环节动物门(Annelida)、拟杆菌门(Phragmoplastophyta)和担子菌门(Basidiomycota)负相关;含水率与线虫门(Nematoda)、拟杆菌门(Phragmoplastophyta)和担子菌门(Basidiomycota)正相关,与子囊菌门(Ascomycota)和环节动物门(Annelida)负相关;有机质与线虫门(Nematoda)、拟杆菌门(Phragmoplastophyta)和担子菌门(Basidiomycota)、子囊菌门(Ascomycota)正相关,与环节动物门(Annelida)负相关; Zn^{2+} 与拟杆菌门(Phragmoplastophyta)和担子菌门(Basidiomycota)、子囊菌门(Ascomycota)正相关,与环节动物门(Annelida)无相关性,与线虫门(Nematoda)负

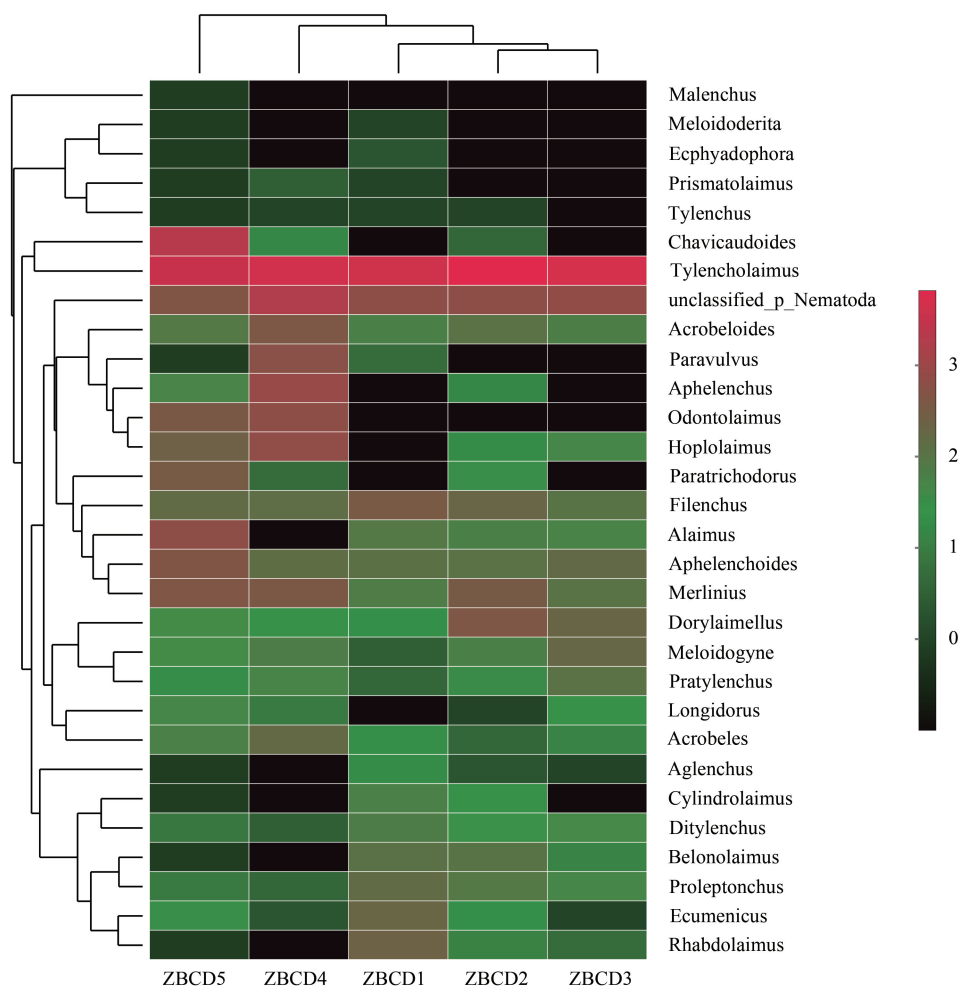


图5 不同样品间的土壤线虫 heatmap 图

Fig.5 Heatmap of the soil nematodes in different samples

Melenchus:剑尾垫刃属、*Meloidoderita*:无对应中文、*Ecphyadophora*:突腔唇属、*Prismatolaimus*:棱咽属、*Tylenchus*:垫刃属、*Clavicaudoides*:无对应中文、*Tylencholaimus*:垫咽属、*unclassified_p_Nematoda*:未分类的线虫属、*Acrobeloides*:拟丽突属、*Paravulvulus*:无对应中文、*Aphelenchus*:滑刃属、*Odontolaimus*:齿咽属、*Hoplolaimus*:纽带属、*Paratrichodorus*:拟毛刺属、*Filenchus*:丝尾垫刃属、*Alaimus*:无咽属、*Aphelenchoides*:类滑刃属、*Merlinius*:默林属、*Dorylaimellus*:牙咽属、*Meloidogyne*:根结线虫属、*Pratylenchus*:短体属、*Longidorus*:长针属、*Acrobeles*:丽突属、*Aglenchus*:野外垫刃属、*Cylindrolaimus*:筒咽属、*Ditylenchus*:茎属、*Belonolaimus*:刺属、*Proleptonchus*:原细齿属、*Ecumenicus*:通俗属、*Rhabdolaimus*:杆咽属

相关。

3 讨论与结论

研究区域地处青藏高原冻土带,其草地植被的植物区系、形态、生理生化都具有典型的高原特点。冻土能敏感地反映气候变化,季节性冻土则因周期性的冻融交替,显著地影响着土壤生物的种群和群落特征^[21]。本研究通过 Illumina MiSeq 测序技术鉴定到的藏北高寒草甸(盛长期)(高山嵩草群落)土壤线虫类群属数高于通过传统鉴定手段得(藏北高山嵩草群落)到 2 纲 6 目^[21],运用该技术研究藏北高山嵩草线虫群落还未见文献报道。

(1)高通量测序结果表明藏北高山嵩草(盛长期)5 个土壤样品中的(990±58)个 OTU 分属于 1 个门,3 个纲,7 个目,25 个科,30 个属。刺嘴纲(*Enoplea*)、色矛纲(*Chromadorea*)是藏北高山嵩草平均相对丰度最高的纲,其中刺嘴纲(*Enoplea*)在 ZBCD2(5—10 cm)中相对含量最高,达到 80.51%,色矛纲(*Chromadorea*)在

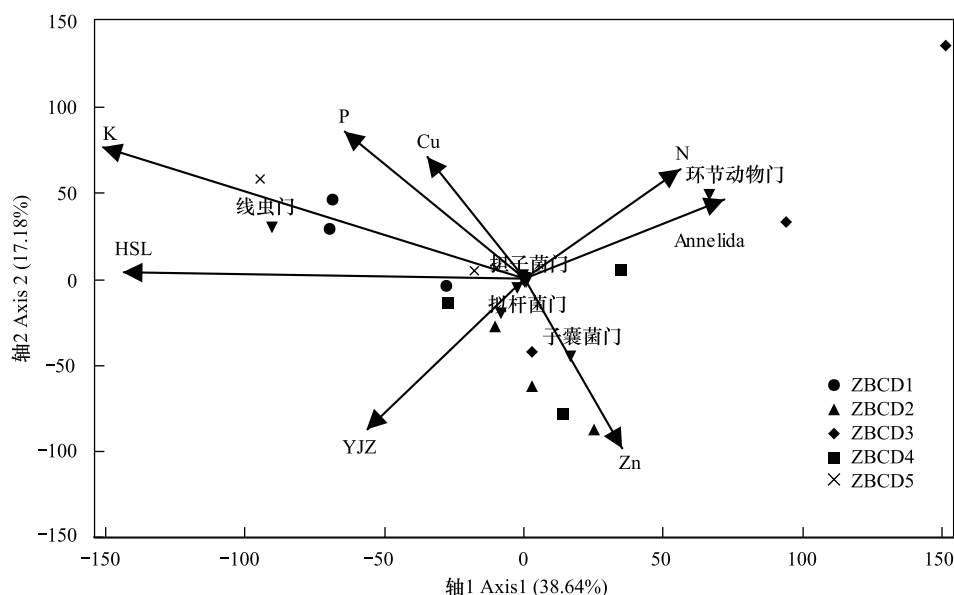


图 6 门分类水平土壤线虫群落与土壤化学指标的冗余分析

Fig.6 Redundancy analysis of soil nematode phyla and chemical parameters

ZBCD4(15—20 cm)中对含量最高,达到 28.13%。从 0—25 cm 的 5 份土壤样本中共同含有 135 个 OTU,其中 ZBCD5(20—25 cm)独有 28 个,高于 5—20 cm 4 个样本中独有的 OUT 数。

(2)不同深度藏北高山嵩草(盛长期)线虫群落结构相关性较大的土壤化学指标是 K^+ 、含水率、有机质和 Zn^{2+} 。其中 K^+ 、含水率、有机质与线虫门(Nematoda)有较强正相关性,而 Zn^{2+} 与线虫门(Nematoda)的呈现较强负相关性。而线虫中食细菌性线虫和食真菌性线虫所占比例较大,通过分析土壤中拟杆菌门(Phragmoplastophyta)和担子菌门(Basidiomycota)呈现一定的负相关。

藏北地区地处青藏高原腹地,气候干寒,是全球气候变化的敏感地带,是藏北地区面积最大、最重要的生态系统,其间广泛分布的高寒草甸类草地具有典型的区域代表性,其中高山嵩草群落作为最具代表的植被类型,其区系、形态、生理生化能较好的反映气候环境变化^[3-7]。本研究通过当下热门的微生物生态学研究技术—高通量测序技术(High-throughput sequencing)研究土壤线虫。传统的土壤线虫研究方法是基于线虫的直接分离鉴定来分析环境中的线虫的群落结构及其生态关系的,但传统的形态学分离鉴定土壤线虫需要借助显微镜分辨,而且鉴定人员需要进行专业的培训,耗时耗力,传统的分离鉴定手段一直难以让人们全面了解环境中线虫的群落结构及生态关系。21 世纪以来,DNA 测序技术取得革命性突破,新一代高通量测序 16S rRNA 基因极有可能成为一种常规手段分析土壤微生物的物种多样性变化规律,成为土壤质量评价的常规方法。高通量测序法具有分析样本量多、单个样品序列通量高的优点,高通量测序能够较为全面和准确的反映土壤微生物群落结构^[10,22]。

本文是以本课题组在藏北高寒草甸开展了数年的土壤线虫群落研究为基础,采用 NF15'-GGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTT-3'和 18S r2bR 5'-TACAAAGGGCAGGACGTAAT-3'引物通过 Illumina MiSeq 测序技术,在 97%的相似水平下对所测得序列进行 OUT 聚类 and 生物信息学,以获得土壤线虫群落在不同深度的分布情况,并试图将所获得的结果与环境条件(水分含量、化学性质等)进行相关性分析,发现不同深度土壤线虫种类及丰度存在一定的差异,为下一步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方法上的有力支持。

参考文献 (References):

- [1] 宋敏,井水水. 中国北方半干旱草原土壤线虫群落多样性调查. 河南大学学报:自然科学版, 2015, 45(5): 581-586.

- [2] Mikola J, Yeates G W, Barker G M, Wardle D A, Bonner K I. Effects of defoliation intensity on soil food-web properties in an experimental grassland community. *Oikos*, 2001, 92(2): 333-343.
- [3] 薛会英, 罗大庆, 王鸿源, 屈兴乐. 藏北高寒草甸土壤线虫群落对围封及自由放牧的响应. *土壤学报*, 2017, 54(2): 480-492.
- [4] 薛会英, 胡锋, 罗大庆. 藏北高寒草甸植物群落对土壤线虫群落的影响. *土壤学报*, 2013, 50(3): 507-516.
- [5] Cook R, Yeates G W. Nematode pests of grasslands and forage crops//Evans K, Trudgill D L, Webster J M, eds. *Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture*. Wallingford, UK: CAB International, 1993: 305-350.
- [6] 薛会英, 罗大庆. 藏东南急尖长苞冷杉林林隙土壤线虫群落特征. *应用生态学报*, 2013, 24(9): 2494-2502.
- [7] 薛会英, 罗大庆, 于宝政. 西藏色季拉山急尖长苞冷杉林土壤线虫群落特征. *应用生态学报*, 2012, 23(12): 3402-3408.
- [8] Geisen S, Snoek L B, ten Hooven F C, Duyts H, Kostenko O, Bloem J, Martens H, Quist C W, Helder J A, van der Putten W H. Integrating quantitative morphological and qualitative molecular methods to analyse soil nematode community responses to plant range expansion. *Methods in Ecology and Evolution*, 2018, 9(6): 1366-1378.
- [9] Griffiths B S, de Groot G A, Laros I, Stone D, Geisen S. The need for standardisation: exemplified by a description of the diversity, community structure and ecological indices of soil nematodes. *Ecological Indicators*, 2018, 87: 43-46.
- [10] 夏围围, 贾仲君. 高通量测序和 DGGE 分析土壤微生物群落的技术评价. *微生物学报*, 2014, 54(12): 1489-1499.
- [11] Rinke C, Schwientek P, Sczyrba A, Ivanova N N, Anderson I J, Cheng J F, Darling A, Malfatti S, Swan B K, Gies E A, Dodsworth J A, Hedlund B P, Tsiamis G, Sievert S M, Liu W T, Eisen J A, Hallam S J, Kyrpides N C, Stepanauskas R, Rubin E M, Hugenholtz P, Woyke T. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*, 2013, 499(7459): 431-437.
- [12] 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.
- [13] Kerfahi D, Tripathi B M, Porazinska D L, Park J, Go R, Adams J M. Do tropical rain forest soils have greater nematode diversity than High Arctic tundra? A metagenetic comparison of Malaysia and Svalbard. *Global Ecology and Biogeography*, 2016, 25(6): 716-728.
- [14] Moroenyane I, Dong K, Singh D, Chimphango S B M, Adams J M. Deterministic processes dominate nematode community structure in the Fynbos Mediterranean heathland of South Africa. *Evolutionary Ecology*, 2016, 30(4): 685-701.
- [15] Fitoussi N, Pen-Mouratov S, Steinberger Y. 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*, 2016, 102: 1-9.
- [16] Porazinska D L, Giblin-Davis R M, Powers T O, Thomas W K. Nematode spatial and ecological patterns from tropical and temperate rainforests. *PLoS One*, 2012, 7(9): e44641.
- [17] Porazinska D L, Giblin-Davis R M, Esquivel A, Powers T O, Sung W, Thomas W K. Ecometagenetics confirm high tropical rainforest nematode diversity. *Molecular Ecology*, 2010, 19(24): 5521-5530.
- [18] 冯陈晨, 王文龙, 呼和巴特尔. 骆驼斯氏副柔线虫转录组的高通量测序及分析. *中国兽医学报*, 2017, 37(4): 671-675.
- [19] 魏兴琥, 杨萍, 谢忠奎, 王亚军. 西藏那曲地区高山嵩草草地的分布与利用. *草地学报*, 2003, 11(1): 67-74.
- [20] 朱珣之, 李强, 李扬苹, 韩洪波, 马克平. 紫茎泽兰入侵对土壤细菌的群落组成和多样性的影响. *生物多样性*, 2015, 23(5): 665-672.
- [21] 薛会英, 胡锋, 罗大庆. 藏北高寒草甸植物群落对土壤线虫群落功能结构的影响. *生态学报*, 2013, 33(5): 1482-1494.
- [22] 郑燕, 贾仲君. 新一代高通量测序与稳定性同位素示踪 DNA/RNA 技术研究稻田红壤甲烷氧化的微生物过程. *微生物学报*, 2013, 53(2): 173-184.