

方亦午,顾建锋,熊 武,等. 基于 18S、28S 宏条形码高通量测序和形态学方法的土壤线虫群落多样性比较[J]. 江苏农业科学,2022,50(6):202-210.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.06.033

基于 18S、28S 宏条形码高通量测序和形态学方法的土壤线虫群落多样性比较

方亦午¹, 顾建锋¹, 熊 武², 马欣欣¹, 吕晓玲¹, 陈先锋¹

(1. 宁波海关技术中心/宁波检验检疫科学技术研究院,浙江宁波 315100; 2. 江苏省固体有机废弃物资源化高技术研究重点实验室/国家有机类肥料工程技术研究中心/江苏省有机固体废弃物资源化协同创新中心/南京农业大学资源与环境科学学院,江苏南京 210095)

摘要:为探究不同靶标位点的高通量测序方法以及形态学鉴定方法对土壤线虫群落分析的影响,选取线虫群落复杂程度高的日本进境罗汉松根际土壤样品,设置 18S、28S、形态学鉴定 3 个处理,比较不同线虫群落分析方法对土壤线虫群落分析的差异。结果表明,线虫群落中属的数量分析,18S 组、28S 组高于形态学鉴定组;除捕食和杂食性线虫的相对丰度在 3 组间无显著性差异外,食细菌线虫、食真菌线虫以及植物寄生线虫的相对丰度在 3 组间均有一定差异。各线虫指数中,除多样性指数在 3 组间无显著性差异外,均匀度指数、线虫成熟度指数、植物线虫指数、富集指数、结构指数、基础指数、线虫通道比率在 3 组间均有较大差异。高通量测序方法形态学鉴定结果存在一定的相关性,结合多基因位点的宏条形码高通量测序方法以及形态学鉴定方法,可作为研究土壤线虫群落组分的新策略。

关键词:土壤线虫;线虫群落;高通量测序;形态学鉴定;线虫指数

中图分类号:S432.4⁺5

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2022)06-0202-09

线虫作为土壤微生态环境的调节者,处于土壤食物网的中心位置^[1-2],对土壤中营养物质的转化和释放、土壤微生物的调节和土壤理化性质的改善均有重要作用。有关线虫作为指示生物的研究,主要集中在生态系统的土壤健康状况评价、生态系统演替或受干扰的程度^[3-4]。Bongers 依据线虫的生活史特征,将线虫划分为 r-对策者向 k-对策者过渡的 5 个 c-p(colonizer-persister)类群^[5],后续学者不断对各个类群的 c-p 值进行完善,该数值作为线虫特有的生态指数在各类生态分析中占有特殊地位。Ferris 等在营养类群基础上结合线虫生活史特征提出了线虫功能团多样性的概念,更加有效地揭示了线虫群落的变化^[6]。根据线虫的营养类群将其划分为食真菌性、食细菌性、捕食性、杂食性、植食性 5 大类,再结合功能团予以细分,不仅考虑到了线虫群落中的物种组成,同时也考虑了线虫生活史,将线虫物种多样性与系统演替状态联系在一

起,为深入研究土壤线虫群落生态学功能和作用提供了新途径。

然而不论是生态因子涉及的 c-p 值的划分,还是营养类群的划分,均依赖于对各类线虫准确的种属鉴定。目前对于土壤线虫的鉴定主要依赖形态学的鉴定方法。然而线虫种类众多,有学者估计线虫种类已逾 100 万种^[7];同时线虫体型微小,需要在显微镜下进行鉴定,费时费力;加之线虫鉴定人员须具有较丰富的线虫分类学知识,因此鉴定的难度可想而知。随着传统线虫分类学研究人员的减少^[8]以及分子生物学鉴定技术的崛起,尤其是第 2 代高通量测序[宏条形码(metabarcoding)技术]在细菌、真菌乃至原生动植物群落生态分析中的广泛应用^[9-10],线虫群落分析领域陆续有少量采用宏条形码技术的研究出现,这些研究广泛应用了 18S 基因作为测序位点进行分析^[11-13]。18S 作为常用的条形码基因在属阶元的区分中有较好的分辨率,但在这些研究中和形态学数据结果表现出较大差异,低估了群落中线虫的多样性^[11,14]。位于 rDNA 上 28S 基因上的 D2/D3 区作为条形码基因在线虫种阶元的区分有较好的分辨率^[15],也是潜在可以广泛使用的宏条形码基因位点。因此,本研究将以 18S 上广泛使用的引物对 NF1/18Sr2b 以及 28S D2/D3 位点上的引物对 D3A/D3B,对宏条形码高通量测序分析

收稿日期:2021-05-24

基金项目:浙江省自然科学基金(编号:LY19C140003);宁波市自然科学基金(编号:2019A610405)。

作者简介:方亦午(1990—),男,浙江舟山人,博士,农艺师,主要从事线虫研究。E-mail: fywsdctm@126.com。

通信作者:顾建锋,博士,研究员,主要从事线虫研究。E-mail: jeffgu00@qq.com。

和形态学鉴定方法做比较,研究不同方法分析线虫群落多样性的差别,探索线虫群落多样性研究的新方法。

1 材料与方法

1.1 样本收集和线虫形态学分类计数

2020 年从日本进境罗汉松植株所携带的土壤上取样品 15 份,采用改良贝曼漏斗法进行分离^[16],先向漏斗中注入适量自来水(以能恰好浸透样品为宜),取罗汉松植株根部介质,用双层纱布包好,缓慢置于漏斗中,25 ℃ 恒温培养箱内黑暗静置 48 h 后,用凹面皿接取线虫悬浮液 20 mL。所获线虫于 40 倍显微镜下进行计数,随机挑选 100 条于 100 ~ 400 倍显微镜下根据线虫头部、尾部、食道等特征进行鉴定至属水平,重复 3 次,不足 100 条线虫的样本则全部鉴定。根据线虫研究相关网站(<http://nemaplex.ucdavis.edu/Ecology/EcologyMenu.htm>)上的食性分类,将所获线虫划分为 5 个营养类群:食细菌线虫(Ba)、食真菌线虫(Fu)、植食性线虫(Pp)、杂食性线虫(Om)、捕食性线虫(Pr)。最终选取 1 份富含土壤线虫常见属且属数量大于 10 的土壤样品进行高通量测序及后续分析。

1.2 土壤线虫高通量测序分析

1.2.1 DNA 抽提和 PCR 扩增 根据 DNeasy® Blood & DNA kit (QIAGEN, GA, U. S.) 说明书将 1 份完成形态学鉴定的线虫群落(分离到的所有线虫群落)进行总 DNA 抽提,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的提取质量,使用 Nano Drop 2000 测定 DNA 的浓度和纯度;分别使用 NF1 (5' - GGTGGTG CATGGCCGTTCTTAGTT - 3')、18Sr2b (5' - TACAA AGGGCAGGGACGTAAT - 3') 以及 D3A (5' - GACC CGTCTTGAAACACGGA - 3')、D3B (5' - GGTGGTG CATGGCCGTTCTTAGTT - 3') 2 对引物对同一样品的 18S rRNA 基因和 28S rRNA 基因 D3 区进行 PCR (PCR 仪:ABI GeneAmp® 9700 型) 扩增。扩增程序设置分别为 94 ℃ 预变性 10 min; 94 ℃ 变性 1 min, 58 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 72 ℃ 稳定延伸 10 min。95 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 1 min, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 2 min, 35 个循环; 72 ℃ 稳定延伸 10 min。最后将产物置于 4 ℃ 保存。

PCR 反应体系: 5 × Trans Start Fast Pfu 缓冲液 4 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL, 上游引物 (5 μmol/L) 0.8 μL, 下游引物 (5 μmol/L) 0.8 μL, Trans Start

Fast Pfu DNA 聚合酶 0.4 μL, 模板 DNA 10 ng, 加水补足至 20 μL。每个样本设 4 次重复。

1.2.2 Illumina Miseq 测序 将同一样本的 PCR 产物混合后使用 2% 琼脂糖凝胶回收 PCR 产物, 利用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA) 对回收产物进行纯化, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并用 Quantus® Fluorometer (Promega, USA) 对回收产物进行检测定量。使用 NEXTFLEX Rapid DNA - Seq Kit 进行建库: (1) 接头链接; (2) 使用磁珠筛选去除接头自连片段; (3) 利用 PCR 扩增进行文库模板的富集; (4) 磁珠回收 PCR 产物得到最终的文库。利用 Illumina 公司的 Nova Seq PE250 平台进行测序(上海美吉生物医药科技有限公司)。

1.2.3 数据处理 使用 fastp^[17] (<https://github.com/OpenGene/fastp>, version 0.20.0) 软件对原始测序序列进行质控, 使用 Flash^[18] (<http://www.cbcb.umd.edu/software/flash>, version 1.2.7) 软件进行拼接: (1) 过滤 reads 尾部质量值 20 以下的碱基, 设置 50 bp 的窗口, 如果窗口内的平均质量值低于 20, 则从窗口开始截去后端碱基, 过滤质控后 50 bp 以下的 reads, 去除含 N 碱基的 reads; (2) 根据 PE reads 之间的覆盖关系, 将成对 reads 拼接 (merge) 成 1 条序列, 最小 overlap 长度为 10 bp; (3) 拼接序列的 overlap 区允许的最大错配比率为 0.2, 筛选不符合序列; (4) 根据序列首尾两端的 barcode 和引物区分样品, 并调整序列方向, barcode 允许的错配数为 0, 最大引物错配数为 2。

使用 UPARSE^[19] 软件 (<http://drive5.com/uparse>), 根据 97%^[19-20] 的相似度对序列进行操作分类单元 (OTU) 聚类并剔除嵌合体。下载 GenBank 中所有线虫的 18S 以及 28S 序列数据, 采用本地 Blast^[21] 对每条序列进行比对, 根据结果数据中的得分数值最高的比对结果对物种分类注释。上述操作均在 QIIME 2 平台下进行^[22]。

本试验中用到的指标包括: 自由生活线虫成熟度指数 (maturity index, MI): $MI = \sum c - p_i \times p_i$, 式中 $c - p_i$ 为非植物线虫分类单元被赋予的 $c - p$ 值, p_i 为第 i 个分类单元中个体数量占线虫总个体数量的比例; 植物线虫成熟度指数 (plant - parasite index, PPI): $PPI = \sum c - p_i \times p_i$, 式中 $c - p_i$ 为植物线虫分类单元被赋予的 $c - p$ 值, p_i 为第 i 个分类单元中个体数量占线虫总个体数量的比例。各属线虫的 $c -$

p 值参考网站 (http:// nemaplex. ucdavis. edu/ Ecology/Ecology Menu. html) 上的数据。

多样性指数 H' (Shannon - Wiener index): $H' = -\sum p_i \times \ln p_i$ 。均匀度指数 J' (Evenness): $J' = H' / \ln S$, 式中 S 为样本中线虫属的总数。线虫通道比率 (nematode channel ratio, NCR): $NCR = \text{食细菌线虫数量} / \text{食微生物 (食细菌 + 食真菌) 线虫数量之比}$ 。

多样性指数结构指数 (structure index, SI): $SI = s / (s + b) \times 100$; 基础指数 (basal index, BI): $BI = b / (s + b) \times 100$; 富集指数 (enrichment index, EI): $EI = e / (e + b) \times 100$ 。式中, b (basal) 代表食物网中的基础成分: $b = (Ba_2 + Fu_2) \times W_2$, 式中 Ba_2 和 Fu_2 分别代表食细菌和食真菌线虫中 $c-p$ 值为 2 的个体数量占线虫总个体数量的比例, $W_2 = 0.8$; e (enrichment) 代表食物网中的富集成分: $e = Ba_1 \times W_1 + Fu_2 \times W_2$, 式中 Ba_1 代表食细菌和食真菌线虫中 $c-p$ 值为 1 的个体数量占线虫总个体数量的比例, $W_1 = 3.2$; s (structure) 代表食物网中的结构成分: $s = Ba_n \times W_n + Pr_n \times W_n + Fu_n \times W_n + Om_n \times W_n$, 式中 Ba_n 、 Pr_n 、 Fu_n 、 Om_n 分别代表食细菌、捕食性、食真菌、杂食性线虫中 $c-p$ 值为 3~5 的个体数量占线虫总个体数量的比例, W_n 的取值如下: $W_3 = 1.8$, $W_4 = 3.2$, $W_5 = 5.0$ 。试验数据采用 Excel 2010 进行计算处理, 采用 SPSS 19.0 软件进行方差分析, 显著性检验采用邓肯氏 (Duncan's) 法, 不同字母表示在 0.05 水平上具有显著性差异。使用 R 语言工具进行微生物多样性数据统计及绘制样品属水平的群落结构柱形图, 采用 Mothur 绘制维恩图^[23]。

2 结果与分析

2.1 不同鉴定方法间线虫群落结构差异

由表 1 可知, 通过形态学鉴定和高通量测序发现样本中共有线虫 48 个属 (其中, 3 个鉴定到科, 1 个鉴定到目)。形态学鉴定发现线虫 16 个属; 18S 位点高通量测序比对得到线虫 27 个属; 28S 位点高通量测序比对得到线虫 27 个属。从图 1 可以看出, 形态学鉴定和 18S 位点测序共有线虫 9 个属, 形态学鉴定和 28S 位点测序共有线虫 7 个属, 18S 位点测序和 28S 位点测序共有线虫 12 个属, 3 种鉴定方式共有线虫仅 6 个属。

18S 位点测序得到的特有线虫属为 12 个, 除去在方差分析中无显著差异且相对丰度小于 1% 的假丽突属 (*Pseudacrobeles*)、原链环属 (*Prodesmodora*)、

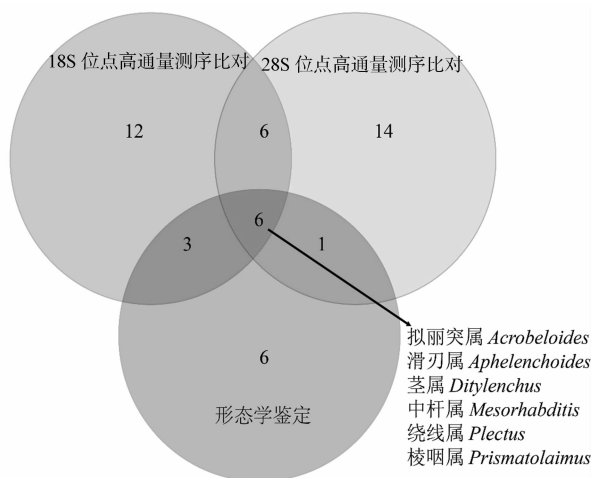


图1 基于属水平丰度的不同鉴定方式间线虫群落韦恩图

Funaria、垫咽属 (*Tylencholaimus*)、托布利属 (*Tobrilus*)、矛线目 (*Dorylaimida*) 共 6 个属 (目), 特有属为杆咽属 (*Rhabdolaimus*)、细齿属 (*Leptonchus*)、微咽属 (*Microdorylaimus*)、咽针属 (*Laimydorus*)、垫刃科 (*Tylenchidae*)、居中属 (*Geocenamus*) 6 个属 (科), 其中除细齿属 (*Leptonchus*) (23.72%) 外, 其他 5 个属的相对丰度均小于 1%。28S 位点测序得到的特有线虫属有 14 个, 除去在方差分析中无显著差异且相对丰度小于 1% 的伪丽突属 (*Nothacrobeles*)、链环科 (*Desmodoridae*)、膜皮属 (*Diphtherophora*)、*Koerneria*、皱槽属 (*Rhyssocolpus*)、狭咽属 (*Discolaimus*)、丝尾属 (*Oxydirus*) 7 个属, 特有属为鹿角唇属 (*Cervidellus*)、大杯咽属 (*Metacyatholaimus*)、小孔咽属 (*Aporcelaimellus*)、抱囊线虫属 (*Heterodera*)、缢咽属 (*Axonchium*)、剑线虫属 (*Xiphinema*)、小长针属 (*Longidorella*) 7 个属, 其中除大杯咽属 (*Metacyatholaimus*) (10.25%)、剑线虫属 (*Xiphinema*) (7.06%)、小孔咽属 (*Aporcelaimellus*) (5.24%)、鹿角唇属 (*Cervidellus*) (1.56%) 外, 其他 3 个属的相对丰度均小于 1%。形态学鉴定得到的特有线虫属为威尔斯属 (*Wilsonema*)、无咽属 (*Alaimus*)、真滑刃属 (*Aphelenchus*)、三孔属 (*Tripyla*)、毛刺属 (*Trichodorus*)、单齿属 (*Monochus*) 6 个属, 其中除威尔斯属 (*Wilsonema*) (5.64%)、真滑刃属 (*Aphelenchus*) (1.03%)、三孔属 (*Tripyla*) (5.66%)、毛刺属 (*Trichodorus*) (1.68%) 外, 其他 2 个属的相对丰度均小于 1%。

2.2 鉴定方法对土壤线虫营养结构的影响

高通量测序方法和传统形态学鉴定方法所得

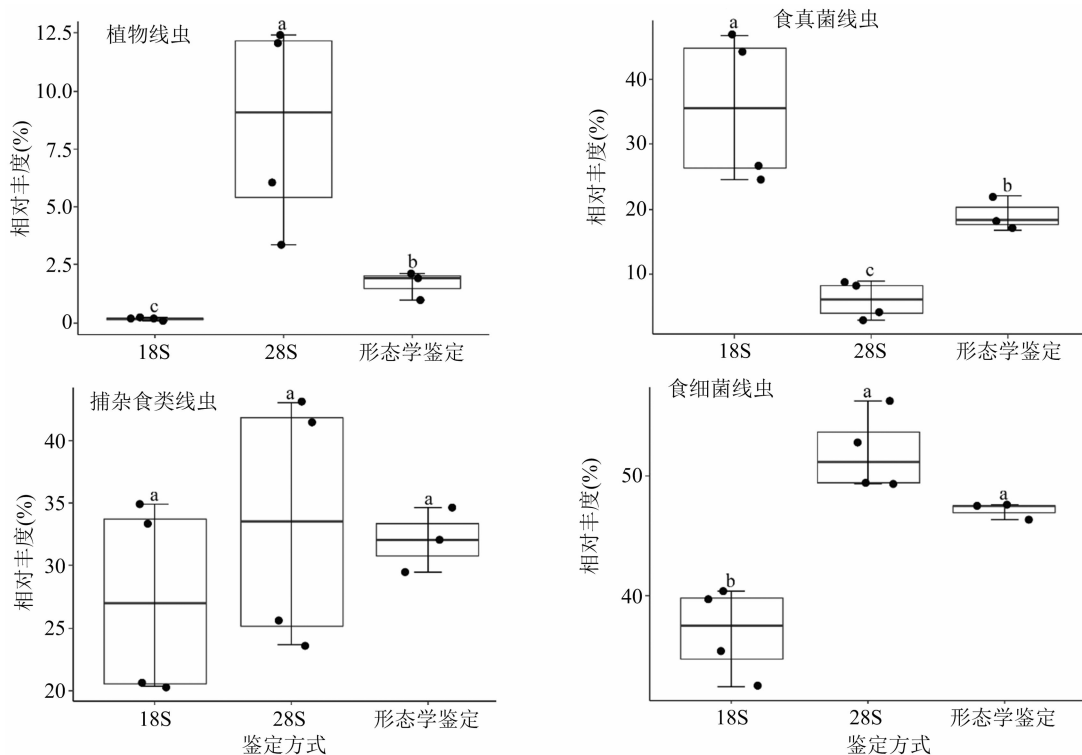
表 1 不同鉴定方式间土壤线虫属的相对丰度比较

属名	营养类群	相对丰度(%)		
		18S 位点高通量测序比对	28S 位点高通量测序比对	形态学鉴定
中杆属(<i>Mesorhabditis</i>)	Ba1	0.96 ± 0.72b	18.66 ± 10.76a	11.70 ± 0.16ab
三等齿属(<i>Pelodera</i>)	Ba1	0.30 ± 0.40a	0.04 ± 0.04a	0 ± 0a
异咽属(<i>Poikilolaimus</i>)	Ba1	0.51 ± 0.17a	0.57 ± 0.17a	0 ± 0b
小杆属(<i>Rhabditis</i>)	Ba1	10.00 ± 2.94a	10.65 ± 4.44a	0 ± 0b
拟丽突属(<i>Acrobeloides</i>)	Ba2	12.57 ± 1.31ab	9.93 ± 2.05b	14.76 ± 1.99a
丽突属(<i>Acrobeles</i>)	Ba2	2.04 ± 0.10b	0 ± 0c	6.07 ± 2.24a
威尔斯属(<i>Wilsonema</i>)	Ba2	0 ± 0b	0 ± 0b	5.64 ± 2.39a
绕线虫属(<i>Plectus</i>)	Ba2	4.81 ± 1.24a	4.44 ± 1.41a	3.64 ± 1.43a
假丽突属(<i>Pseudacrobeles</i>)	Ba2	0.09 ± 0.11a	0 ± 0a	0 ± 0a
鹿角唇属(<i>Cervidellus</i>)	Ba2	0 ± 0b	1.56 ± 0.29a	0 ± 0b
伪丽突属(<i>Nothacrobeles</i>)	Ba2	0 ± 0a	0.17 ± 0.20a	0 ± 0a
棱咽属(<i>Prismatolaimus</i>)	Ba3	5.41 ± 0.53a	5.93 ± 1.47a	4.67 ± 0.40a
原链环属(<i>Prodesmodora</i>)	Ba3	0.06 ± 0.06a	0 ± 0a	0 ± 0a
杆咽属(<i>Rhabdolaimus</i>)	Ba3	0.18 ± 0.10a	0 ± 0b	0 ± 0b
链环科(<i>Desmodoridae</i>)	Ba3	0 ± 0a	0.04 ± 0.05a	0 ± 0a
无咽属(<i>Alaimus</i>)	Ba4	0 ± 0b	0 ± 0b	0.65 ± 0.57a
滑刃属(<i>Aphelenchoides</i>)	Fu2	8.53 ± 0.75b	5.17 ± 1.85b	14.10 ± 2.52a
茎线虫属(<i>Ditylenchus</i>)	Fu2	1.21 ± 0.46b	0.01 ± 0.01c	4.00 ± 0.90a
真滑刃属(<i>Aphelenchus</i>)	Fu2	0 ± 0b	0 ± 0b	1.03 ± 1.06a
膜皮属(<i>Diphtherophora</i>)	Fu3	0 ± 0a	0.89 ± 1.04a	0 ± 0a
<i>Funaria</i>	Fu4	0.99 ± 1.17a	0 ± 0a	0 ± 0a
细齿属(<i>Leptonchus</i>)	Fu4	23.98 ± 11.57a	0 ± 0b	0 ± 0b
垫咽属(<i>Tylencholaimus</i>)	Fu4	0.86 ± 0.94a	0 ± 0a	0 ± 0a
<i>Oigolaimella</i>	Om1	0.43 ± 0.13ab	0.91 ± 0.52a	0 ± 0b
<i>Koerneria</i>	Om1	0 ± 0a	0.10 ± 0.13a	0 ± 0a
大杯咽属(<i>Metacyatholaimus</i>)	Om3	0 ± 0b	10.25 ± 4.32a	0 ± 0b
矛线科(<i>Dorylaimidae</i>)	Om4	0 ± 0b	0 ± 0b	1.00 ± 0.04a
中矛线属(<i>Mesodorylaimus</i>)	Om4	0.68 ± 0.08a	0.02 ± 0.01b	0 ± 0b
微咽属(<i>Microdorylaimus</i>)	Om4	0.86 ± 0.33a	0 ± 0b	0 ± 0b
皱槽属(<i>Rhysocolpus</i>)	Om4	0 ± 0a	0.10 ± 0.12a	0 ± 0a
咽针属(<i>Laimydorus</i>)	Om5	0.81 ± 0.75a	0 ± 0b	0 ± 0b
小孔咽属(<i>Aporcelaimellus</i>)	Om5	0 ± 0b	5.24 ± 1.43a	0 ± 0b
三孔属(<i>Tripyla</i>)	Pr3	0 ± 0b	0 ± 0b	5.66 ± 1.37a
垫刃科(<i>Tylenchidae</i>)	Pp2	0.13 ± 0.06a	0 ± 0b	0 ± 0b
居中属(<i>Geocenamus</i>)	Pp3	0.03 ± 0.02a	0 ± 0b	0 ± 0b
孢囊线虫属(<i>Heterodera</i>)	Pp3	0 ± 0b	0.05 ± 0.02a	0 ± 0b
毛刺属(<i>Trichodorus</i>)	Pp4	0 ± 0b	0 ± 0b	1.68 ± 0.60a
小长针属(<i>Longidorella</i>)	Pp4	0 ± 0b	0.46 ± 0.19a	0 ± 0b
缢咽属(<i>Axonchium</i>)	Pp5	0 ± 0b	0.92 ± 0.26a	0 ± 0b
剑线虫属(<i>Xiphinema</i>)	Pp5	0 ± 0b	7.06 ± 4.37a	0 ± 0b
长尾属(<i>Seinura</i>)	Pr2	0 ± 0b	0.29 ± 0.24b	1.68 ± 0.60a
异色矛属(<i>Achromadora</i>)	Pr3	9.09 ± 3.20b	0 ± 0c	23.06 ± 1.46a
<i>Trischistoma</i>	Pr3	14.29 ± 6.22a	16.24 ± 5.74a	0 ± 0b
托布利属(<i>Tobrilus</i>)	Pr3	0.90 ± 1.04a	0 ± 0a	0 ± 0a
单齿属(<i>Monochus</i>)	Pr4	0 ± 0b	0 ± 0b	0.65 ± 0.57a
狭咽属(<i>Discolaimus</i>)	Pr5	0 ± 0a	0.13 ± 0.16a	0 ± 0a
丝尾属(<i>Oxydirus</i>)	Pr5	0 ± 0a	0.19 ± 0.22a	0 ± 0a
矛线目(<i>Dorylaimida</i>)	Om4	0.27 ± 0.32a	0 ± 0a	0 ± 0a

注:同行数据后不同小写字母表示各鉴定方式间的相对丰度差异显著($P < 0.05$)。

结果中,土壤线虫结构存在一定差异(图 2)。食细菌线虫(bacterivores)在 28S 组中相对丰度最高,为 52.00%,高于形态学鉴定组的 47.14% 和 18S 组的 36.92% ($P < 0.05$),但后两组间差异不显著($P > 0.05$)。食真菌线虫(fungivores)则在 18S 组中相对丰度最高,为 35.58%,显著高于形态学鉴定组的 19.13% 和 28S 组的 6.07% ($P < 0.05$),同时,后两

组间的差异依旧显著($P < 0.05$)。植物寄生线虫(plant-parasites)在 28S 组中相对丰度最高,为 8.48%,显著高于形态学鉴定组的 1.68% 和 18S 组的 0.17% ($P < 0.05$),且后两组差异显著。捕食和杂食性线虫(predators and omnivores)的相对丰度在 18S 组、28S 组、形态学鉴定组之间无显著性差异($P > 0.05$),分别为 27.33%、33.46%、32.06%。



图中不同小写字母表示各鉴定方式间差异显著($P < 0.05$)。图 3 同

图2 不同鉴定方式间各食性线虫的相对丰度比较

2.3 不同鉴定方式对土壤线虫群落多样性的影响

由图 3 可知,各处理间的线虫群落多样性指数存在较大差异。均匀度指数在形态学鉴定组中均值最大,为 0.85,显著高于 18S 组的 0.73 和 28S 组的 0.75 ($P < 0.05$),但 18S 组和 28S 组间无显著差异。多样性指数 H' 在 18S 组、28S 组、形态学鉴定组之间无显著差异,分别为 2.32、2.35、2.31。线虫成熟度指数在 18S 组中为 2.76,显著高于 28S 组的 2.21 和形态学鉴定组的 2.26 ($P < 0.05$)。植物线虫指数在 3 组间均存在显著差异,28S 组中均值最高,为 4.93,与形态学鉴定组的 4.00 和 18S 组的 2.22 差异显著 ($P < 0.05$),且后两组间差异依旧显著 ($P < 0.05$)。富集指数在 3 组间均存在显著差异,最大为 28S 组的 84.96,显著高于 18S 组的 65.91 和形态学鉴定组的 57.27 ($P < 0.05$),且后两组间差异依旧显著 ($P < 0.05$)。结构指数在 18S 组

中数值最高,为 86.11,和 28S 组的 83.58 差异不显著,但两者显著高于形态学鉴定组的 63.46 ($P < 0.05$)。基础指数在 3 组间同样差异显著,数值最高的为形态学鉴定组的 24.50,显著高于 18S 组的 10.90 和 28S 组的 8.31 ($P < 0.05$),且后两组间差异显著 ($P < 0.05$)。线虫通道比率在 3 组间依旧差异显著,均值最高的为 28S 组的 0.90,显著高于形态学鉴定组的 0.71 和 18S 组的 0.52 ($P < 0.05$),且后两组间差异显著 ($P < 0.05$)。

采用主坐标分析法(PCoA)对线虫属水平相对丰度作 β 多样性分析。横坐标 PCoA1 可以解释 72.68% 的差异来源,PCoA2 可以解释 18.57% 的差异来源,总共可解释 91.25% 的差异来源。结果显示 18S 组、28S 组、形态学鉴定组 3 种鉴定方式之间差异明显(图 4)。

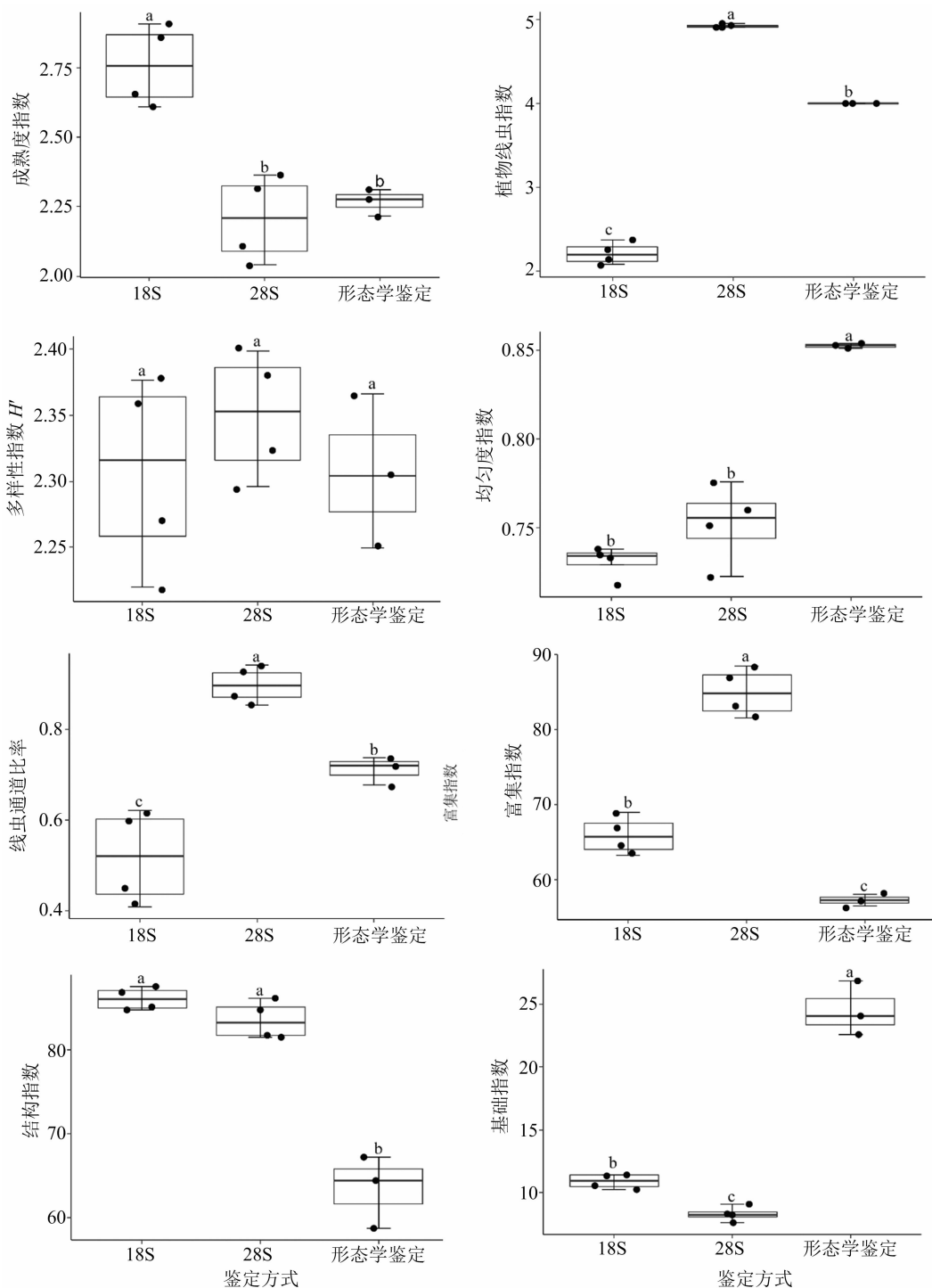


图3 不同鉴定方式间的线虫指数比较

3 讨论

3.1 18S 和 28S 组的鉴定准确性比较

在线虫门的分子系统发育研究中,18S 常被用作区分属阶元的条码基因^[15,24],在高通量测序法对线虫进行多样性研究的工作中得到了相对广泛的使用^[11-12,25]。本研究加入了线虫 28S 核糖体上

D3A/D3B 作为宏条形码扩增靶标进行高通量测序鉴定,但最终的种类鉴定结果和同为宏条形码鉴定方法的 18S 组有一定的差异。但从比对结果看,造成这些差异的主要原因在于部分属在 Genbank 中并非同时具有 2 个位点的分子生物学信息,造成了比对结果的差异。例如,在本研究中相对丰富较高的异色矛属(*Achromadora*)在 18S 组中相对丰度较高,

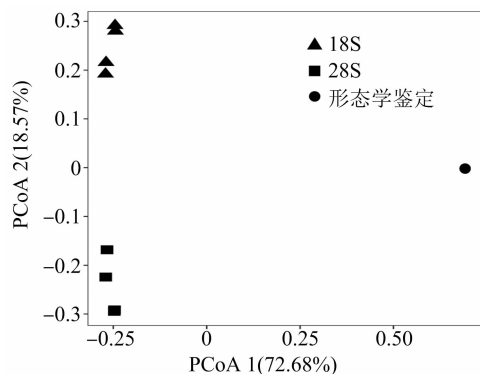


图4 基于线虫群落相对丰度的PCoA分析

为 9.09%,而在 28S 组中却为 0,而 28S 组中有 1 个从形态学和分子生物上都与异色矛属极为近似的大杯咽属 (*Metacyatholaimus*),该属和异色矛属 (*Achromadora*)同为色矛总科 (*Chromadoroidea*)下 2 个相似的属。两者的主要形态学的区别在于雌虫生殖管和消化道的相对位置以及是否有雄虫^[26],异色矛属 (*Achromadora*)存在于水生境和土壤生境中,大杯咽属 (*Metacyatholaimus*)通常为水生或海洋类群^[27]。通过对 28S 组结果中鉴定为大杯咽属 (*Metacyatholaimus*)的 OTU 序列进行手动比对后发现,该序列与大杯咽属 (*Metacyatholaimus*)的序列相似度仅为 96.4%,且 GenBank 中尚缺少异色矛属 (*Achromadora*)的 28S 分子数据,存在误判的可能。异色矛属 (*Achromadora*)在形态学鉴定组中具有相当的数量 (23.06%),但并未发现大杯咽属 (*Metacyatholaimus*),这一误判的可能性在形态学鉴定结果中也可得到印证。另一属细齿属 (*Leptonchus*)在 18S 组中相对丰度极高,达 23.98%,甚至为 18S 组中相对丰度最高的类群,但该属在 28S 组中相对丰度却为 0。该属为矛线亚目下垫咽总科 (*Tylencholaimoidea*)细齿科 (*Leptonchidae*),目前细齿科 (*Leptonchidae*)整个科的成员在 GenBank 中仅有 18S 序列数据而无 28S 序列数据,因此推断 28S 组中同为矛线亚目成员的剑线虫属 (*Xiphinema*)和小孔咽属 (*Aporcelaimellus*)可能为缺少高相似度比对结果造成的误判。通过对这 2 个属的 OTUs 进行手动比对后发现,这 2 个属的 OTUs 序列与剑线虫属 (*Xiphinema*)、小孔咽属 (*Aporcelaimellus*)的序列相似度仅为 91.1%、91.7%,同时这 2 个属的 OTUs 和垫咽总科 (*Tylencholaimoidea*)下成员垫咽属 (*Tylencholaimus*)的序列相似度也可达 90%,所以通过 28S 序列比对无法保证这些 OTUs 鉴定的准确度,从形态学鉴定

组也可推断出这 2 个属可能存在误判。剑线虫属 (*Xiphinema*)体型较大,在体视镜下形态学鉴定特征明显,齿针细长,导环为双环,而小孔咽属 (*Aporcelaimellus*)虽体型差异不大,但口针粗短强壮,形态特征差异明显,不易在形态学鉴定中发生疏漏。综上可知,这 2 个属应为 GenBank 中 28S 序列数据不足造成的误判。除上述情况外,18S 组、28S 组在其他属的鉴定结果总体较为一致。

3.2 高通量测序 18S 组、28S 组和形态学鉴定组的鉴定准确性结果差异

从高通量测序的 18S 组、28S 组结果和形态学方法对试验土壤样本的鉴定结果看,三者存在着较大的差距。从 PCoA 分析结果亦不难看出,这 3 种方式之间存在较大差异。使用 18S 作为宏条形码靶标和形态学鉴定结果的差异性存在于各类生境中,产生差异的原因较为复杂。这些差异的产生可能与 DNA 的提取方式^[12,28]、引物的扩增效率^[12,29]、GenBank 中线虫数据库的完备程度以及准确程度^[30-31]、线虫核糖体多态性^[32]、幼虫形态鉴定不准确以及形态学鉴定难度等因素密切相关^[13,31]。从本研究中不难看出,采用 18S、28S 这 2 个靶标的 2 组高通量测序结果和形态学鉴定组均表现出较大差异。究其原因,这主要和形态学鉴定的准确程度、GenBank 中线虫数据库的完备程度及准确程度有关。例如,形态学鉴定组中的特有属三孔属 (*Tripyla*)是隶属于嘴刺目三孔科 (*Tripylidae*)下的一类体型较大线虫,头部具明显刚毛;三孔科 (*Tripylidae*)内的三孔亚属 (*Tripylina*)、小三孔属 (*Tripylella*)以及 *Trischistoma* 均为土壤生态中较为常见的线虫^[33]。由于这 3 个属在形态上非常近似,主要区别为头部外唇刚毛和头刚毛的排布。本研究在高通量测序 18S 组和 28S 组中均检测到了较高相对丰度的 *Trischistoma*。综上判断,形态学鉴定组中的特有属三孔属 (*Tripyla*)很可能鉴定错误。形态学鉴定组中的特有属威尔斯属 (*Wilsonema*)隶属于绕线虫目 (*Plectida*)绕线虫科 (*Plectidae*)下的一类头部具明显冠状突起的属,同时该属头冠的中侧突明显,可有效区别于其他近似属^[34]。但该属的分子序列和绕线科 (*Plectidae*)下的绕线属 (*Plectus*)、艾端属 (*Ereptonema*)相似度较高,尤其 18S 基因更是无法将这 3 个属区分^[35],虽然 28S 基因对区分这 3 个属有一定的分辨率,但是由于 GenBank 中缺少足够多的序列信息,所以目前也难以将这 3 个属有

效区分。在分析 28S 组中数据比对结果为绕线属 *Plectus* 的 OTU 发现,它们与艾端属(*Ereptonema*)、威尔斯属(*Wilsonema*)、绕线属(*Plectus*)的相似度均为 97.6%,存在误判的可能,加之本研究的样品中也有绕线属(*Plectus*)存在,所以无法确切推测这些 OTU 比对结果是否完全为误判。除此以外,高通量测序 18S 组、28S 组和形态学鉴定组的鉴定结果一致。

3.3 高通量测序组和形态学鉴定组的相对丰度比较

线虫作为生态因子广泛应用于各类土壤的生态评估中,其土壤线虫的生活史策略和营养类群的多样性生态指数是构成这一评估体系的核心组分。然而这 2 个核心组分又和线虫准确的种属鉴定密切相关。通过对上述鉴定结果的差异分析可以发现,大部分的鉴定差异对包括 MI、EI、SI、NCR、BI 在内的线虫生态指数无影响,如食细菌类群绕线科(Plectidae)下的绕线属(*Plectus*)、艾端属(*Ereptonema*)、威尔斯属(*Wilsonema*)的 $c-p$ 值均为 2,捕食类群大杯咽属(*Metacyatholaimus*)和异色矛属(*Achromadora*)的 $c-p$ 值均为 3,捕食类群三孔科(Tripylidae)下的三孔属(*Tripyla*)、三孔亚属(*Tripylina*)、小三孔属(*Tripylella*)和 *Trischistoma* 的 $c-p$ 值均为 3。但细齿属(*Leptonchus*)为食真菌类群, $c-p$ 值为 4,在 18S 组中相对丰度最高,达 23.98%,正是 18S 组中食真菌线虫类群的相对数量显著高于其他 2 组的主要差异来源,但在 28S 组中将细齿属(*Leptonchus*)比对鉴定为植物寄生类群剑线虫属(*Xiphinema*)(相对丰度为 7.06%, $c-p$ 值为 5)和杂食类群小孔咽属(*Aporcelaimellus*)(相对丰度为 5.24%, $c-p$ 值为 5),直接造成了 28S 组的 MI 显著低于 18S 组,而 PPI 却显著高于 18S 组。由此可见,保证正确的线虫鉴定是其中重要的一环。除此以外,各属线虫的数量是线虫生态因子评估中另一重要的组分,已有众多研究试图阐释线虫的绝对数量比和其扩增测序数量之间的关系^[11,14,36]。虽然两者之间可能存在一定程度的正相关,但在诸如矛线目这类体型较大的线虫,通过高通量测序所得到的序列占比远大于其实际数量占比,这可能与不同线虫的 DNA 含量、引物的扩增效率密切相关^[14],本研究中也获得了与之相似的结果。

4 结论

高通量测序分析方法在线虫生态中尚处于起

步阶段,但在本研究的土壤样本中,此方法定性鉴定属水平的线虫类群上的表现和形态学鉴定结果较为相近,通过结合 18S、28S 靶标可以使鉴定结果更加准确^[37],甚至可以辅助区分部分形态学难以鉴定的种类及一些线虫的幼虫,提高土壤线虫物种鉴定的精确程度。但若要进一步精确结果,仍需要不断完善线虫各位点基因靶标的 GenBank 数据库,这依旧需要线虫分类学以及土壤生态学者不懈推进。因此,研究多基因位点的宏条形码高通测序方法以及形态学鉴定方法,对土壤线虫群落组分进行研究,可以为土壤线虫生态方法研究提供新的启示。但如何有效关联形态学的定量结果和高通量测序的定量结果是一个尚待解决的课题^[38],仍需要长期的探索和研究。

参考文献:

- [1] Bongers T, Bongers M. Functional diversity of nematodes [J]. *Applied Soil Ecology*, 1998, 10(3): 239–251.
- [2] Bongers T, Ferris H. Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring [J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 1999, 14(6): 224–228.
- [3] Ettema C H. Soil nematode diversity: species coexistence and ecosystem function [J]. *Journal of Nematology*, 1998, 30(2): 159–169.
- [4] Yeates G W. Nematodes as soil indicators: functional and biodiversity aspects [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2003, 37(4): 199–210.
- [5] Bongers T. The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition [J]. *Oecologia*, 1990, 83(1): 14–19.
- [6] Ferris H, Bongers T, de Goede R G M. A framework for soil food web diagnostics: extension of the nematode faunal analysis concept [J]. *Applied Soil Ecology*, 2001, 18(1): 13–29.
- [7] Jr Poinar G O. The evolutionary history of nematodes: as revealed in stone, amber and mummies [M]. Copenhagen: Brill, 2011.
- [8] Ahmed M, Sapp M, Prior T, et al. Nematode taxonomy: from morphology to metabarcoding [J]. *Soil Discussions*, 2015, 2(2): 1175–1220.
- [9] Ritz K, Black H I J, Campbell C D, et al. Selecting biological indicators for monitoring soils: a framework for balancing scientific and technical opinion to assist policy development [J]. *Ecological Indicators*, 2009, 9(6): 1212–1221.
- [10] Geisen S. Thorough high-throughput sequencing analyses unravels huge diversities of soil parasitic protists [J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(6): 1669–1672.
- [11] Porazinska D L, Giblin-Davis R M, Faller L, et al. Evaluating high-throughput sequencing as a method for metagenomic analysis of nematode diversity [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2009, 9(6): 1439–1450.

- [12] Sapkota R, Nicolaisen M. High – throughput sequencing of nematode communities from total soil DNA extractions [J]. BMC Ecology, 2015, 15: 3.
- [13] Griffiths B S, de Groot G A, Laros I, et al. The need for standardisation; Exemplified by a description of the diversity, community structure and ecological indices of soil nematodes [J]. Ecological Indicators, 2018, 87: 43 – 46.
- [14] Geisen S, Snoek L B, ten Hooven F C, et al. Integrating quantitative morphological and qualitative molecular methods to analyse soil nematode community responses to plant range expansion [J]. Methods in Ecology and Evolution, 2018, 9(6): 1366 – 1378.
- [15] 林 宇, 王金成, 迟元凯, 等. 基于 GenBank 分析 28S (D2/D3)、18S 和 ITS 序列作为根结线虫条形码标记的适用性 [J]. 南京农业大学学报, 2013, 36(5): 71 – 76.
- [16] Baermann G. Eine eifache methode zur auffindung von anklyostomum (Nematoden) larven in Erdproben [J]. Geneeskundig Tijdschrift voor Nederlandsch Indie, 1917, 57: 131 – 137.
- [17] Chen S F, Zhou Y Q, Chen Y R, et al. Fastp: an ultra – fast all – in – one FASTQ preprocessor [J]. Bioinformatics, 2018, 34 (17): i884 – i890.
- [18] Magoc T, Salzberg S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. Bioinformatics, 2011, 27 (21): 2957 – 2963.
- [19] Edgar R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. Nature Methods, 2013, 10 (10): 996 – 998.
- [20] Stackebrandt E, Goebel B M. Taxonomic note: a place for DNA – DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1994, 44 (4): 846 – 849.
- [21] Altschul S F, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool [J]. Journal of Molecular Biology, 1990, 215 (3): 403 – 410.
- [22] Bolyen E, Rideout J R, Dillon M R, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 [J]. Nature Biotechnology, 2019, 37 (8): 852 – 857.
- [23] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, et al. Introducing mothur: open – source, platform – independent, community – supported software for describing and comparing microbial communities [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75 (23): 7537 – 7541.
- [24] Holterman M, van der Wurff A, van den Elsen S, et al. Phylum – wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown clades [J]. Molecular Biology and Evolution, 2006, 23 (9): 1792 – 1800.
- [25] Porazinska D L, Giblin – Davis R M, Esquivel A, et al. Ecometagenetics confirm high tropical rainforest nematode diversity [J]. Molecular Ecology, 2010, 19 (24): 5521 – 5530.
- [26] Eyualem – Abebe E A, Trautspurger W, Andr ssy I. Freshwater nematodes: ecology and taxonomy [M]. Wallingford: CABI, 2006.
- [27] Leduc D, Zhao Z Q. Phylogenetic relationships within the Cyatholaimidae (Nematoda: Chromadorida), the taxonomic significance of cuticle pore and pore – like structures, and a description of two new species [J]. Marine Biodiversity, 2018, 48 (1): 217 – 230.
- [28] Waeyenberge L, de Sutter N, Viaene N, et al. New insights into nematode DNA – metabarcoding as revealed by the characterization of artificial and spiked nematode communities [J]. Diversity, 2019, 11 (4): 52.
- [29] Ahmed M, Back M A, Prior T, et al. Metabarcoding of soil nematodes: the importance of taxonomic coverage and availability of reference sequences in choosing suitable marker (s) [J]. Metabarcoding and Metagenomics, 2019, 3: 77 – 99.
- [30] Cordier T, Forster D, Dufresne Y, et al. Supervised machine learning outperforms taxonomy – based environmental DNA metabarcoding applied to biomonitoring [J]. Molecular Ecology Resources, 2018, 18 (6): 1381 – 1391.
- [31] Schenk J, Kleinb lting N, Trautspurger W. Comparison of morphological, DNA barcoding, and metabarcoding characterizations of freshwater nematode communities [J]. Ecology and Evolution, 2020, 10 (6): 2885 – 2899.
- [32] Qing X E, Bik H, Yergaliyev T M, et al. Widespread prevalence but contrasting patterns of intragenomic rRNA polymorphisms in nematodes: Implications for phylogeny, species delimitation and life history inference [J]. Molecular Ecology Resources, 2020, 20 (1): 318 – 332.
- [33] Vera I C D P, Ferris H, Nadler S A. Soil inhabiting nematodes of the genera *Trischistoma*, *Tripylina* and *Tripyla* from M xico and the USA with descriptions of new species [J]. Journal of Nematode Morphology & Systematics, 2010, 13 (1): 29 – 49.
- [34] Holocachov O, Bostr m S. Identification of Plectida (Nematoda) [M]. EUMAINE, Gent and Nematology, UC Riverside, 2010.
- [35] Shokoohi E, Mehrabi – Nasab A, Abolafia J, et al. Study of the genus *Plectus* Bastian, 1865 (Nematoda: Plectidae) from Iran [J]. Biologia, 2013, 68 (6): 1142 – 1154.
- [36] 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 [J]. Molecular Ecology, 2013, 22 (21): 5456 – 5471.
- [37] Sikder M M, Vesterg rd M, Sapkota R, et al. Evaluation of metabarcoding primers for analysis of soil nematode communities [J]. Diversity, 2020, 12 (10): 388.
- [38] Peham T, Steiner F M, Schlick – Steiner B C, et al. Are we ready to detect nematode diversity by next generation sequencing? [J]. Ecology and Evolution, 2017, 7 (12): 4147 – 4151.