

不同采样策略影响土壤捕食线虫真菌物种多样性检测结果

周发平^{1,2}, 杨耀权^{1,2}, 张发^{1,2}, 李娜^{*1,2,3}, 杨晓燕^{1,2,3,4}

1 大理大学东喜玛拉雅研究院, 云南 大理 671003

2 云南省高校洱河流域保护与可持续发展研究重点实验室, 云南 大理 671003

3 三江并流区域生物多样性保护与利用云南省创新团队, 云南 大理 671003

4 中国三江并流区域生物多样性协同创新中心, 云南 大理 671003

周发平, 杨耀权, 张发, 李娜, 杨晓燕. 不同采样策略影响土壤捕食线虫真菌物种多样性检测结果[J]. 微生物学通报, 2022, 49(9): 3591-3603

Zhou Faping, Yang Yaoquan, Zhang Fa, Li Na, Yang Xiaoyan. Sampling strategy influences the detection results of the diversity of soil nematode-trapping fungi species[J]. Microbiology China, 2022, 49(9): 3591-3603

摘要:【背景】土壤微生物多样性是土壤学领域的研究前沿和热点, 而科学的土壤样品采集策略是保证研究结果真实性的重要保障。【目的】探究不同采样策略对土壤捕食线虫真菌(nematode-trapping fungi, NTF)纯培养检测结果的影响。【方法】对3个不同生境样方的土壤进行不同样点数(3点、5点、9点和13点)、不同样点空间排布(一字型、V型、W型、三角型和梅花型)的土壤混合及不混合采样, 以单孢子分离法纯化NTF, 结合形态和分子技术鉴定物种, 分析比较不同样点数、不同样点空间排布的土壤混合及不混合采样策略下NTF的 α 多样性及检出菌株数的差异。【结果】在单点采样、分别纯化、合并分析各点检测数据策略下, NTF的 α 多样性和检出菌株数随着合并样点数的增加而增高, 5个点或9个点的不同整合数据间差异较小, 检测结果相对较稳定。在土壤混合采样策略下, 超过5个点土样混合不利于NTF的检测。【结论】土壤样品采集策略影响NTF纯培养结果。在单点采样、数据合并分析策略下, 5点或9点采样法相对更好; 土壤混合采样策略下, 5点采样混合法相对更科学和可行。

关键词: 采样策略; 纯培养; 捕食线虫真菌; α 多样性

基金项目: 国家自然科学基金(U1602262, 31760126)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (U1602262, 31760126)

*Corresponding author: E-mail: lin@eastern-himalaya.cn

Received: 2021-11-03; Accepted: 2022-03-20; Published online: 2022-04-14

Sampling strategy influences the detection results of the diversity of soil nematode-trapping fungi species

ZHOU Faping^{1,2}, YANG Yaoquan^{1,2}, ZHANG Fa^{1,2}, LI Na^{*1,2,3}, YANG Xiaoyan^{1,2,3,4}

1 Institute of Eastern-Himalaya Biodiversity Research, Dali University, Dali 671003, Yunnan, China

2 The Key Laboratory of Yunnan State Education Department on Er'hai Lake Basin Protection and the Sustainable Development Research, Dali 671003, Yunnan, China

3 The Provincial Innovation Team of Biodiversity Conservation and Utility of the Three Parallel Rivers Region, Dali 671003, Yunnan, China

4 Collaborative Innovation Center for Biodiversity and Conservation in the Three Parallel Rivers Region of China, Dali 671003, Yunnan, China

Abstract: **[Background]** Soil microbial diversity has become the research frontier and hot spot in soil science, and science-based soil sampling is the prerequisite for accurate research result. **[Objective]** To explore the influence of sampling strategy on the detection result of soil nematode-trapping fungi (NTF) and to seek for scientific soil sampling method. **[Methods]** Soils were collected from different number of sampling sites (3, 5, 9 and 13) which were indifferent arrangements (straight line, V-shaped, W-shaped, triangle-like, and plum blossom-like) in 3 habitats and they were either mixed or unmixed for detection. NTF were purified by single spore isolation. The species were identified based on morphological observation and molecular techniques, and the difference in species diversity and species number of NTF among soils collected with different methods was analyzed. **[Results]** In the case of single-site sampling, separate purification, and integrated analysis, the α diversity and the number of detected strains rose with the increase in the integrated sampling sites. The difference in the integrated data of 5 and 9 sites was small and the detection results were relatively stable. In the instance of mixing of soil from different sites and then purification, the mixing of soil from more than 5 sites was not conducive to the detection of NTF. **[Conclusion]** Soil sampling strategy affects pure culture results of NTF. In the case of single-site sampling, separate purification, and integrated data analysis, the 5-site or 9-site sampling is optimal. As for the strategy of soil mixing first and then purification, the 5-site sampling is relatively scientific and feasible.

Keywords: sampling strategy; pure culture; nematode-trapping fungi; alpha diversity

土壤微生物在维持地球生态环境平衡中起着举足轻重的作用。土壤占地球表面积的 29.2%，而每克土壤中含有上万个微生物物种^[1]，无论是物质循环还是土壤肥力的形成与提高，均与土壤微生物密不可分^[2]。因此，土壤微生物已经成为现代土壤科学领域的研究前沿和热点。由于土壤微生物群落会随着环境因子的改变而快速做出响应，即便是同一个区域内相同类型的土壤，其微生物组成也会存在明显差异^[3]，因

此，要全面、准确地了解土壤微生物分布、群落、结构和功能并发掘更多新物种，需要更科学的样品采集策略。

目前对土壤微生物研究最常用的土壤采样方法有对角线法^[4]、梅花形法^[5]、蛇形法^[6]和随机法^[7]，这些采样策略都是前人总结而来，但一直无学者探讨这几种采样策略对土壤微生物研究结果的影响，直到近年来学者们才开始注重这一方面的研究^[8-9]。由于各学者在采样过程

中使用的采样策略不同,以及在采样过程中的主观选择和不恰当的采样策略,造成许多研究结果难以重复及研究结论的不相吻合^[10]。有研究发现土样采集方法是造成土壤微生物研究误差的重要因素之一,采样策略造成的误差大于样品在处理、分析过程中的误差,即采样造成的误差在结果分析中占有很大比例^[11]。增加采样数量和密度可减少上述问题,但这又极大地增加了经费、工作时长、工作量等方面的负担。因此,迫切需要针对土壤微生物研究进行系统的样品采集设计实验,以制定科学的样品采集策略,从而保障土壤微生物研究结果的科学性和代表性。

当前对于微生物的研究方法主要有两种:

(1) 纯培养法,即通过人为创造适宜微生物的生存条件(培养基和培养条件)来选择性筛选微生物;(2) 免培养法,即通过对样品进行遗传物质测序,将所得序列导入数据库进行比对,然后对所得结果进行比较分析。孙万龙等^[8]和 Li 等^[9]采用免培养法中的宏基因组技术对土壤微生物研究的样品采集策略进行了研究,发现随着样方内样品采集数量的增加,操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)数也在不断增加,当样品数达到 9 后,所检测到的 OTU 数趋于稳定。纯培养法作为挖掘、研究、开发和利

用微生物资源的基础,在推动微生物资源开发利用等方面的作用不可替代^[12],因此,从纯培养角度探究小尺度下不同土壤抽样和数据分析方法的科学性也非常必要。

捕食线虫真菌(nematode-trapping fungi, NTF)是一类在全球范围内广泛分布的真菌,既可营腐生生活,也可捕食生境中的线虫,是不同生境中线虫种群数量的重要平衡因子^[13]。该类真菌种群较小(共 3 属 103 种)^[14-19],相对易于分离、纯化和鉴定,便于开展土壤微生物采样策略的研究。本研究在苍山洱海国家级自然保护区内的 3 个样方中,以不同的采样策略采集样品后分离纯化 NTF,对比分析不同采样策略对 NTF 检测结果的影响,以期土壤微生物研究提供采样策略参考。

1 材料与方法

1.1 研究样地概况

研究样地 1 和样地 2 地位于苍山洱海国家级自然保护区,样地 3 位于洱海西岸大理大学实验教学基地。苍山洱海国家级保护区属于横断山系,这里气候类型多样,生境异质性强,生物多样性极其丰富。3 个样地中的 NTF 资源丰富^[20-22],具体样地信息见表 1。

表 1 采样地信息

Table 1 Sampling information

样地编号 Sample No.	样地位置 Place	样方编号 Quadrat No.	生境 Habitat	海拔 Elevation (m)	经度 Longitude	纬度 Latitude
样地 1 Plot 1	苍山 Cangshan mountain	样方 1 Quadrat 1	云南松 <i>Pinus yunnanensis</i>	2 214	25°38'E	100°9'N
样地 2 Plot 2	苍山 Cangshan mountain	样方 2 Quadrat 2	樱花林 Cherry blossom forest	2 210	25°67'E	100°15'N
样地 3 Plot 3	大理大学实验教学基地 Dali University practice teaching base	样方 3 Quadrat 3	农田 Farmland	2 004	25°68'E	100°17'N

1.2 样方布设和土壤样品采集策略

分别在3个样地内各随机选取1个10 m×10 m样方,在每个样方内按图1系统地布设13个样点,每个样点采集0–20 cm深度的土壤样品200 g左右,共13份样品,记录样品信息后立即带回实验室,按下述策略分别进行NTF检测。

(1) 单点样品采集策略:分别对3个样方内采集的13个样品进行NTF检测(图1A)。

(2) 单点样品检测、数据合并分析策略:将单点样品检测数据按图1所示进行数据合并分析(图1B)。

(3) 单点样品混合采样策略:将3个样方内13个样点的土样先按图1所示分别进行样品混

合,每个样方内分别获得16份混合土壤样品,对混合样品中的NTF进行分离纯化(图1B)。

1.3 主要试剂和仪器及培养基

琼脂糖、美兰染色剂、TAE缓冲液、溴乙锭、β-巯基乙醇和真菌DNA提取试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司;氯仿,利安隆博华(天津)医药化学有限公司;苯酚,北京索莱宝科技有限公司。

连续变倍体视显微镜,重庆奥特光学仪器有限公司;生化培养箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;立式自动压力灭菌锅,致微(厦门)仪器有限公司;奥林巴斯微分干涉显微镜,奥林巴斯工业有限公司;台式高速小型

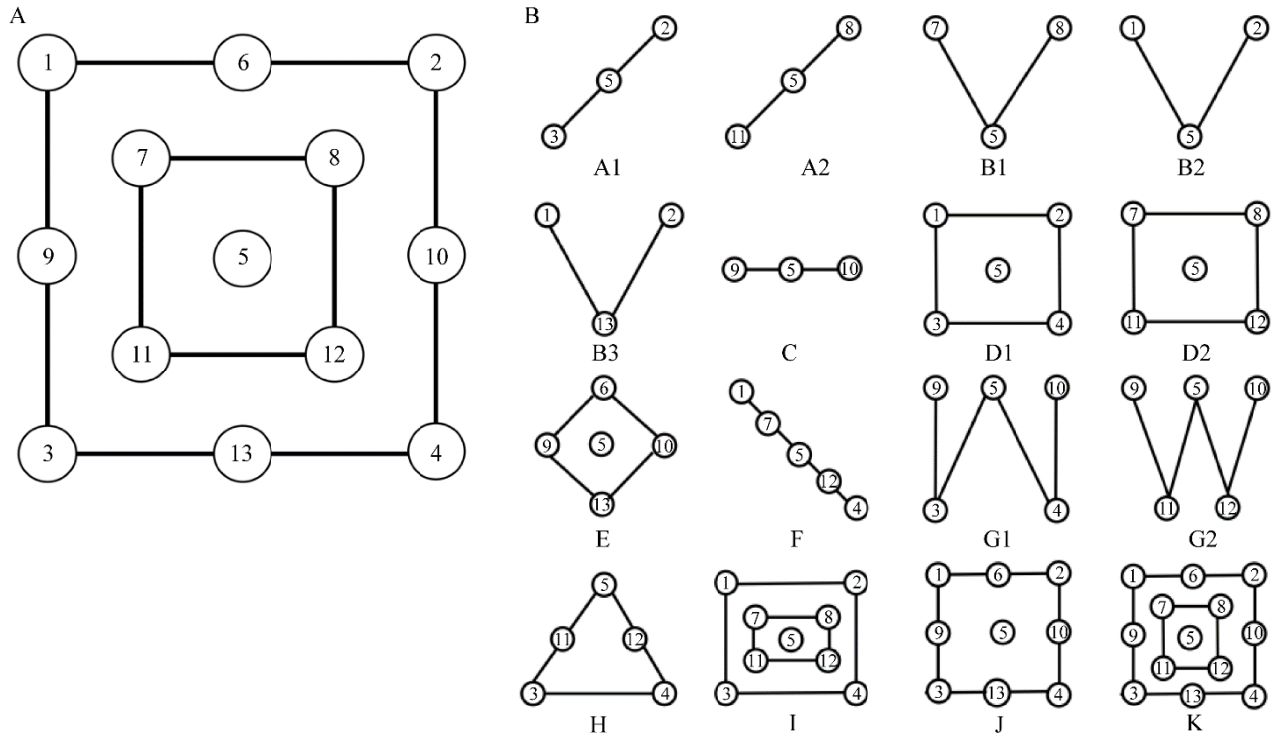


图1 每个样方的样点布设和各采样策略的具体实施情况 A: 样点布设图和单点样品采样策略; B: 单点样品检测、数据合并分析策略和单点样品混合采样策略

Figure 1 Sample points in a quadrat and specific implementation of each sampling strategies. A: Sample point layout and the single point sample sampling strategy; B: The single point sample detection, data combination analysis strategy and single point sample mixed sampling strategy.

离心机, 权铭经贸公司; 琼脂糖凝胶电泳仪, Bio-Rad 公司; 超净工作台, 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司。

按照文献[23]配制玉米琼脂培养基(corn agar medium, CMA)和马铃薯琼脂培养基(potato dextrose agar medium, PDA), 按照文献[14]配制麦片培养基。

1.4 诱饵线虫的制备

参照贝尔曼漏斗法^[15], 用无菌水分离培养于麦片培养基中的全齿复活线虫(*Panagrellus redivivus*), 并调节浓度至 5 000 条/mL 备用。

1.5 NTF 的分离纯化

采用诱饵平板法^[15]对土壤样品中的 NTF 进行分离纯化: 用无菌牙签将土样散布在 90 mm×90 mm 的 CMA 培养基上, 加入约 5 000 条诱饵线虫以促进 NTF 的萌发, 每份土样设置 3 个重复, 室温培养 4 周后用体视显微镜观察和寻找 NTF 的分生孢子, 用无菌牙签挑取 NTF 的分生孢子转接至 60 mm 的 CMA 平板上, 置于 28 °C 恒温箱中培养 7 d。重复此操作, 直至获得纯培养物。

1.6 NTF 的鉴定

1.6.1 形态学鉴定

采用粘片法^[15]和插片法^[24]制作 NTF 临时装片, 用奥林巴斯微分干涉显微镜拍取分生孢子、孢子梗和厚垣孢子等形态特征图片; 采用观察室法^[15]诱导 NTF 产生捕食器官, 用体视显微镜观察确定捕食器官类型。参照参考文献[15]和《中国真菌志》(三十三卷)^[25]进行形态学鉴定。

1.6.2 分子生物学鉴定

通过核糖体 RNA 上的非转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列相似性比对进行分子生物学鉴定。(1) DNA 提取: 使用 PDA 培养

基富集 NTF 菌丝, 使用真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取真菌基因组 DNA; (2) ITS 序列的 PCR 扩增: 以真菌通用引物 ITS4 和 ITS5^[26]对 ITS 序列进行扩增。PCR 反应体系(50 μL): 10×PCR Buffer 5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 5 μL, dNTPs (10 mmol/L) 1 μL, *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.5 μL, 上游引物(10 μmol/L) 1.5 μL, 下游引物(10 μmol/L) 1.5 μL, DNA 模板 2 μL, 无菌超纯水 33.5 μL。PCR 反应条件: 94 °C 4 min; 94 °C 45 s, 54 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。(3) PCR 产物检测及测序: 采用琼脂糖凝胶电泳法对 PCR 扩增产物进行检测, 具体操作参照《分子克隆实验指南》^[27]进行, PCR 产物委托上海铂尚生物技术有限公司用扩增引物进行双向测序。(4) DNA 序列相似性比对: 用 SeqMan 软件^[28]对所测得的 ITS 序列进行核实和拼接, 最后将所得序列导入 NCBI 中用 BLAST 工具^[29]进行相似性比较, 相似性达到 98%及以上的菌株, 结合形态鉴定结果确定物种。

1.7 数据处理

应用 3 个样方的 13 个单样点检测数据绘制物种累积曲线。计算单点数据不同点合并分析策略和土壤不同混合方式采样策略下每个物种的检出率、Shannon-Wiener 指数和 Simpson 指数。

(1) 物种检出率(occurrence frequency, *OF*)=某个物种出现的样品数/样品数×100%;

(2) Shannon-Wiener 指数(*H'*): $H' = -\sum_{i=1}^s P_i \ln P_i$,

其中 $P_i = \frac{N_i}{N}$, N_i 为第 i 种的数量; N 为所有种的数量; P_i 为第 i 个种占总物种数的比例; S 为采样点的物种总数;

(3) Simpson 指数: $D = 1 - \sum_{i=1}^s P_i^2$, P_i 为第 i 个物种在所有物种中所占比例。

2 结果与分析

2.1 各样方内 NTF 物种检出数和多样性指数

3 个样方中共分离出 3 属 17 种 251 株菌。从样方 1 (云南松) 检出 71 株, 其中亚隔指孢属 (*Dactylellina*) 40 株、节丛孢属 (*Arthrobotrys*) 30 株、小德氏霉孢属 (*Drechslerella*) 1 株, 显示 *Dactylellina* 为优势属, 优势种为椭圆亚隔指孢 (*Dac. ellipsospora*) ($OF=35.63\%$); 样方 2 (樱花林) 检出 109 株, 其中 *Arthrobotrys* 107 株、*Dactylellina* 2 株, 表明 *Arthrobotrys* 为优势属, 优势种为少孢节丛孢 (*A. oligospora*) ($OF=57.47\%$); 样方 3 (农田) 检出 71 株, 其中 *Arthrobotrys* 63 株、*Dactylellina* 8 株, 表明 *Arthrobotrys* 为优势属, 优势种为 *A. oligospora* ($OF=47.13\%$); 3 个样方的多样性指数 H' 分别为 1.19、1.80 和 1.12 (表 2)。

2.2 单点采样策略下各样方内样点 NTF 物种组成和物种累积曲线

对每个样方不混合土壤采样下获得的 13 份土壤样品的物种进行分析, 各样方内多数样点的物种检出情况均存在差异 (图 2)。

利用 R 语言分别对 3 个样方内的 13 个样点进行随机排布, 计算每个样点检出的物种累积情况。从物种累积曲线来看, 随着样点数的增加曲线的斜率逐渐平缓, 说明采样样点数已经足够, 13 个样点能够较好地获得每种生境中的 NTF 物种丰富度 (图 3)。

2.3 单点数据合并分析策略下不同样点组合后的 NTF α 多样性和检出菌株数

土壤样品不混合的情况下, 按图 1 所示不同采样方式将相应样点的物种和检出菌株数的数据合并分析, 即得到 16 种不同采样方式下的物种丰富度和检出菌株数。结果显示, 3 点的不同空间排布之间物种检出和检出株数差异都

表 2 各样方中 NTF 物种检出株数

Table 2 Number of strains NTF in each quadrat

种名	样方 1	样方 2	样方 3
Species	Quadrat 1	Quadrat 2	Quadrat 3
少孢节丛孢	1	50	41
<i>Arthrobotrys oligospora</i>			
多孢节丛孢	—	2	1
<i>Arthrobotrys superba</i>			
弯孢节丛孢	29	7	—
<i>Arthrobotrys musiformis</i>			
囊孢节丛孢	—	5	—
<i>Arthrobotrys cystosporia</i>			
圆锥节丛孢	—	11	21
<i>Arthrobotrys conoides</i>			
奇妙节丛孢	—	7	—
<i>Arthrobotrys thaumasia</i>			
秀丽节丛孢	—	18	—
<i>Arthrobotrys oudemansii</i>			
厚皮节丛孢	—	1	—
<i>Arthrobotrys eudermata</i>			
小舟节丛孢	—	2	—
<i>Arthrobotrys microscaphoides</i>			
长梗节丛孢	—	3	—
<i>Arthrobotrys longiphora</i>			
祥云节丛孢	—	1	—
<i>Arthrobotrys xiangyunensis</i>			
空环小德氏霉孢	1	—	—
<i>Drechslerella coelobrochum</i>			
坚黏孢亚隔指孢	—	1	1
<i>Dactylellina haptotyta</i>			
椭圆亚隔指孢	31	1	3
<i>Dactylellina ellipsospora</i>			
细颈亚隔指孢	3	—	—
<i>Dactylellina parvicolla</i>			
掘氏亚隔指孢	6	—	3
<i>Dactylellina drechsleri</i>			
宽松环亚隔指孢	—	—	1
<i>Dactylellina lysipaga</i>			
H'	1.19	1.80	1.12

注: —: 未检出

Note: —: Not detected.

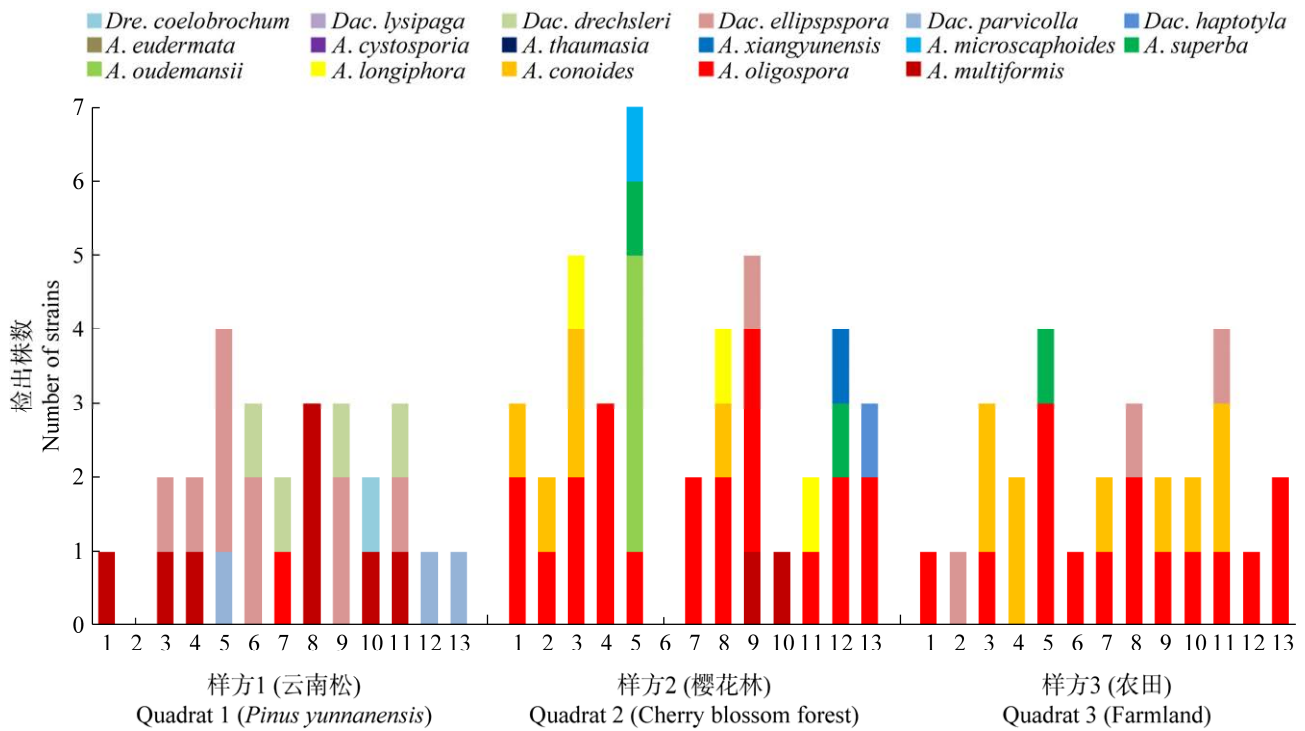


图 2 3 个样方内每个样点的 NTF 物种组成 1-13 代表样方内的 13 个点

Figure 2 NTF species composition of every sample point within three quadrats. 1-13 represent 13 points within quadrat.

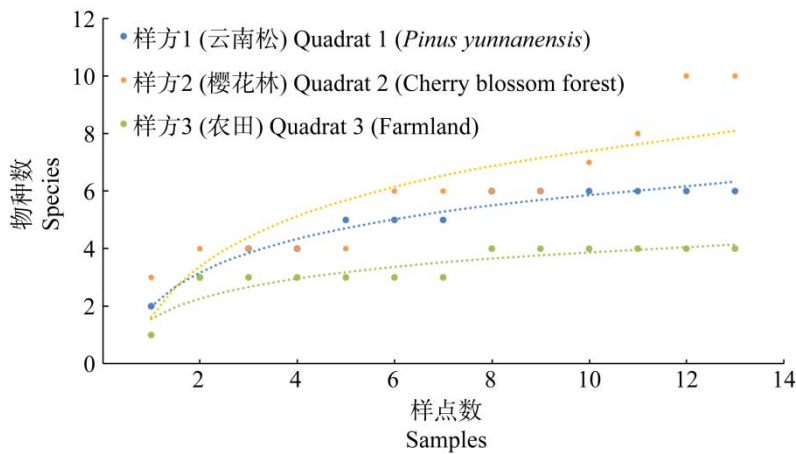


图 3 每个样方中的 NTF 物种累积曲线

Figure 3 Species accumulation curves of NTF in each quadrats.

明显, 在样方 1 (云南松) 中物种相差为 4 种、株数相差为 8 株(图 4A), 在样方 2 (樱花林) 中物种相差为 2 种、株数相差为 9 株(图 4B), 在样方 3 (农田) 中物种相差为 3 种、株数相差为 7 株

(图 4C); 5 点和 9 点在物种检出和检出株数都比较稳定, 变化不大。

综合 3 个样方来看, 随着样点数的增加, 3 个样方内的 α 多样性和检出株数都呈增加的

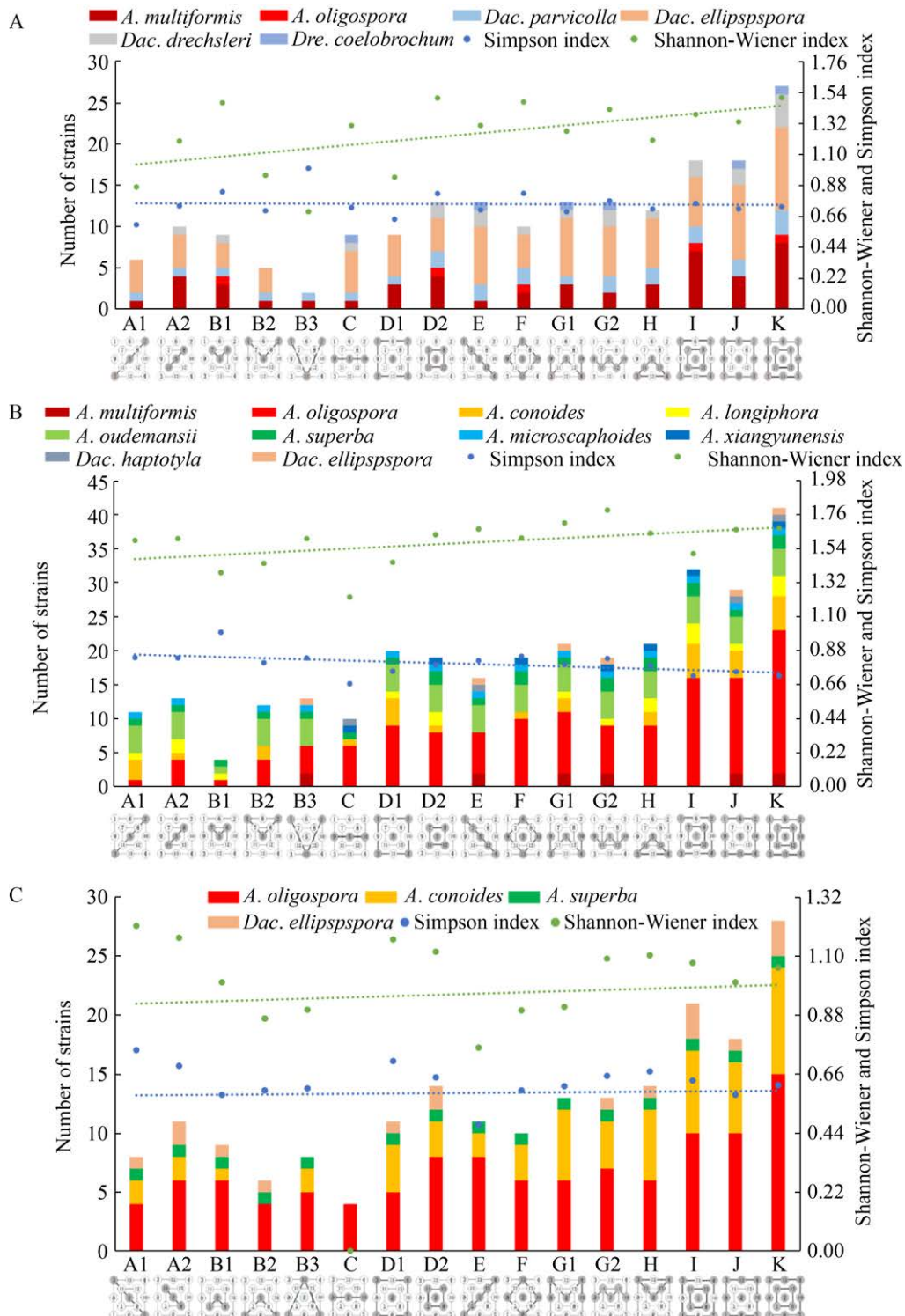


图 4 单点数据合并分析样方 1 (A)、样方 2 (B)和样方 3 (C)不同采样策略下的 NTF α 多样性和物种检出菌株数

Figure 4 Single-point data consolidation analysis, NTF α diversity and the number of detected plants of species under different sampling strategies of quadrat 1 (A), quadrat 2 (B) and quadrat 3 (C).

趋势;当采样点数最高时,即13个样点(K)时 α 多样性和检出株数最高,其次为9个样点(I、J)和5个样点(D1、D2、E、F、G1、G2、H)(图4)。

2.4 土壤样品混合采样策略下不同样点组合的 NTF α 多样性和检出菌株数

土壤混合采样时,随着样点数增加,各样方 α 多样性和检出菌株数变化未呈现线性增加规律,甚至有降低的趋势。相同样点数的不同空间排布的采样方式之间差别也较大,具体为:3点的不同空间排布之间物种检出和检出株数差异都明显,在样方1(云南松)中物种相差2种、株数相差为4株(图5A),在样方2(樱花林)中物种相差5种、株数差异为7株(图5B),在样方3(农田)中物种相差2种、株数相差2株(图5C);9点的不同空间排布之间物种检出和检出株数差异也都明显,在样方1(云南松)中物种相差2种、株数相差1株(图5A),在样方2(樱花林)中物种相差1种、株数相差1株(图5B),在样方3(农田)中物种相差为0、株数相差1株(图5C);无论是在哪个样方中,5点在物种检出和检出株数都比较稳定,变化不大。

综合3个样方来看,当样点为5时, α 多样性和检出株数相对较高且较稳定(图5)。

3 讨论

本研究探索了不同土壤采样策略对NTF纯培养检测结果的影响。在选取的3个不同生境中,NTF物种多样性存在差异,但对不同采样策略显示出较一致的响应,说明本研究的结果具有普适性。(1)在单点采样的数据合并分析策略下,3个样方中心的5号样点的物种检出数和检出率都相对较好,但尚不具有较好的代表性;在将不同样点纯培养数据合并后,呈现的结果均为合并的样点越多, α 多样性和检出菌

株数越高且在5个点或9个点的数据整合模式下,各组合模式间的检测结果差异较小, α 多样性和检出菌株数相对较稳定。(2)在土壤样品混合策略下,把多个样点土样混合之后, α 多样性和检出菌株数在3点和5点混合策略下有所增加,5点的 α 多样性和检出株数相对更高;但随着更多样点土壤的混合,在稀释效应的影响下, α 多样性和检出菌株数不再增加甚至有所减少。

微生物纯培养法和免培养法是物种检测的主要方法。纯培养法可以直接获得物种,并在物种层面开展研究,但纯培养法要获得更多物种就需要加大采样量,这也极大地增加了研究的难度。免培养法(16S rRNA基因克隆、PCR-DGGE、T-RFLP及宏基因组分析等)不受微生物分离培养条件的限制,可以方便、快速地得到土壤样品中的微生物信息,所以目前的研究普遍采用免培养法开展土壤微生物的研究。孙万龙等^[8]和Li等^[9]研究发现,在宏基因组视角下,5点和7点或5点和9点土样混合采样策略对绝大部分土壤微生物的优势物种分析已经足够,要获得更多物种信息则需要加大测序深度。从本研究中土壤混合采样策略的NTF纯培养检测结果来看,超过5点的样品混合法反而会使 α 多样性和检出菌株数降低。考虑到免培养法更受成本的限制,在使用免培养法研究土壤微生物时,用5点混合法进行样方内的土壤样品采集,应更具科学性和可行性。

本研究在3个10 m×10 m样方内采用不同的采样策略得到的NTF纯培养结果不同,说明在较小空间尺度下,采样策略会影响土壤NTF的检测结果。在1 m×1 m和10 m×10 m样方内,采用不同采样策略也同样影响免培养分析法的土壤微生物研究结果^[8-9]。这说明,在小空间尺

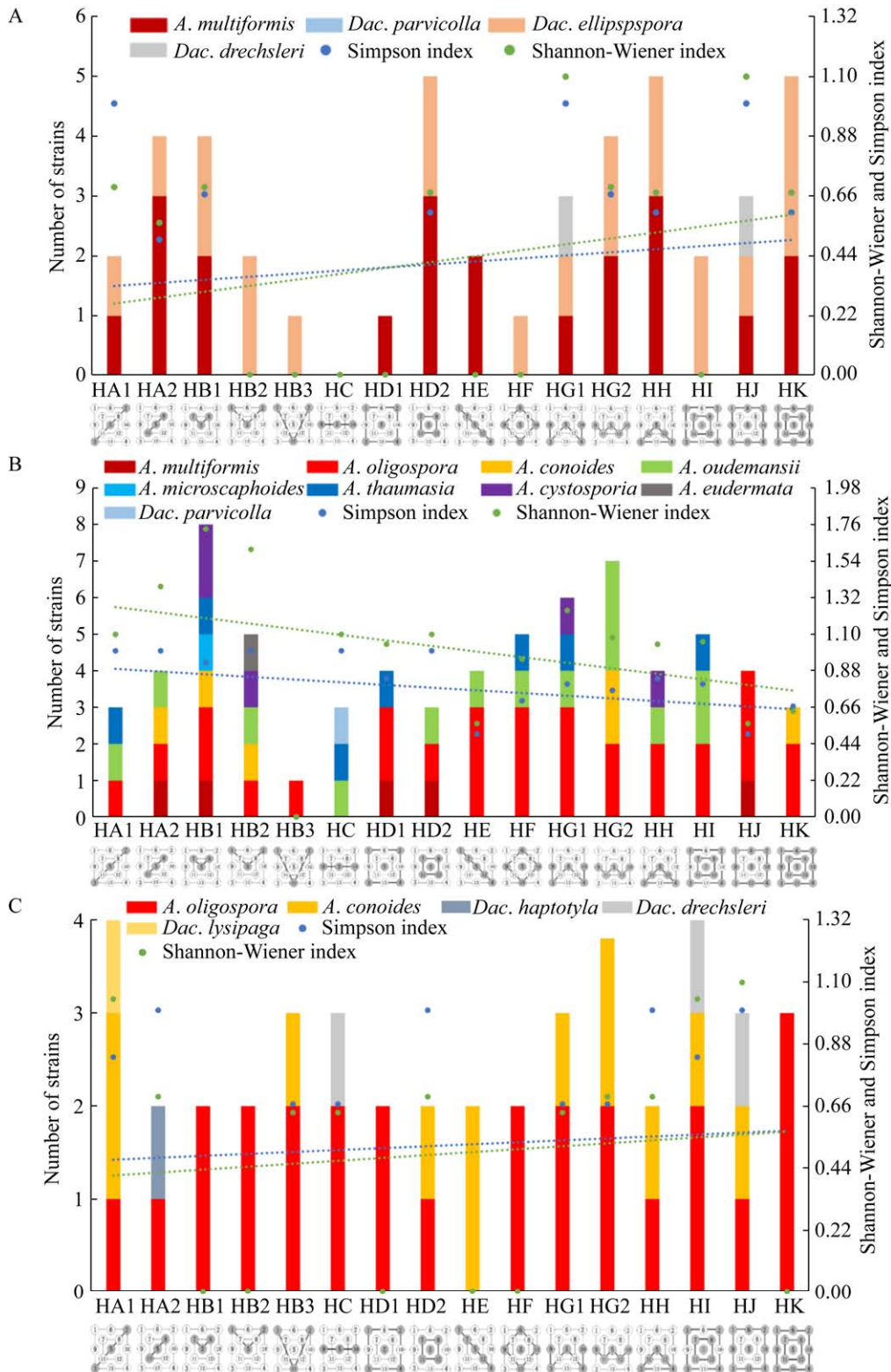


图5 混合土壤样品样方1(A)、样方2(B)和样方3(C)不同采样方式下的NTF α 多样性和各物种检出株数
 Figure 5 Mixed soil samples, NTF α diversity and the number of detected plants of each species under different sampling methods of quadrat 1 (A), quadrat 2 (B) and quadrat 3 (C).

度下也存在土壤微域异质性, 这种微域异质性可明显影响土壤中微生物的群落结构, 进而影响物种检测结果, 在土壤样品采集时应充分考虑土壤微域异质性。同时, 有研究发现在较大空间尺度下的采样策略会对 NTF 的海拔分布格局研究结果产生影响^[30]。因此, 在土壤微生物的研究中, 为了获得更接近微生物群落数据的真实值, 未来的土壤微生物学研究无论是采用纯培养法还是免培养法, 无论在较大尺度还是较小尺度下都需要重视采样策略的科学性和有效性。

4 结论

不同土壤采样策略下的 NTF 纯培养检测结果存在差异。在单点采样、分别纯化、数据合并分析策略下, 5 点或 9 点采样法相对更好; 土壤混合采样策略下, 5 点采样混合法相对更科学。在使用免培养法研究土壤微生物时, 用 5 点混合法进行样方内的土壤样品采集, 应更具科学性和可操作性。未来的土壤微生物学研究无论是采用纯培养法还是免培养法, 无论在较大尺度还是较小尺度下都需要重视采样策略的科学性和有效性。

致谢: 感谢云岭滇金丝猴云南省野外观测研究站和第二次青藏高原综合科学考察研究团队提供的帮助。

REFERENCES

- [1] 王永强. 广州山地森林土壤微生物多样性对不同干扰梯度的响应[D]. 广州: 华南农业大学硕士学位论文, 2017
Wang YQ. Responses of soil microbial diversity to different disturbance gradients in mountain forests in Guangzhou[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China Agricultural University, 2017 (in Chinese)
- [2] 李为, 余龙江, 周蓬蓬, 杨娟, 章程, 袁道先. 西南岩溶区土壤微生物生态作用的初步研究: 以桂林丫吉村岩溶试验场为例[J]. 水土保持学报, 2004, 18(3): 112-114, 132
Li W, Yu LJ, Zhou PP, Yang J, Zhang C, Yuan DX. Preliminary study on soil microbial ecological effect in karst areas of southwest China: a case of the Yaji karst experimental site[J]. Journal of Soil Water Conservation, 2004, 18(3): 112-114, 132 (in Chinese)
- [3] 黄雪菊. 典型干旱河谷土壤质量空间异质性研究[D]. 成都: 四川大学硕士学位论文, 2005
Huang XJ. Spatial variability of soil quality in the dry valley along a river's length of the Hengduan mountains[D]. Chengdu: Master's Thesis of Sichuan University, 2005 (in Chinese)
- [4] Wang S, Wang XB, Han XG, Deng Y. Higher precipitation strengthens the microbial interactions in semi-arid grassland soils[J]. Global Ecology and Biogeography, 2018, 27(5): 570-580
- [5] 赵志祥, 罗坤, 陈国华, 杨宇红, 茆振川, 刘二明, 谢丙炎. 结合宏基因组末端随机测序和 16S rDNA 技术分析温室黄瓜根围土壤细菌多样性[J]. 生态学报, 2010, 30(14): 3849-3857
Zhao ZX, Luo K, Chen GH, Yang YH, Mao ZC, Liu EM, Xie BY. Analysis of bacterial diversity in rhizosphere of cucumber in greenhouse by the methods of metagenomic end-random sequencing and 16S rDNA technology[J]. Acta Ecologica Sinica, 2010, 30(14): 3849-3857 (in Chinese)
- [6] 王奇赞, 徐秋芳, 姜培坤, 秦华. 天目山毛竹入侵阔叶林后土壤细菌群落 16S rDNA V3 区片段 PCR 的 DGGE 分析[J]. 土壤学报, 2009, 46(4): 662-669
Wang QZ, Xu QF, Jiang PK, Qin H. Dgge analysis of PCR of 16S rDNA V3 fragments of soil bacteria community in soil under natural broadleaf forest invaded by phyllostachy pubescens in Tianmu mountain nature reserve[J]. Acta Pedologica Sinica, 2009, 46(4): 662-669 (in Chinese)
- [7] Wang JM, Zhang TH, Li LP, Li JW, Feng YM, Lu Q. The patterns and drivers of bacterial and fungal β -diversity in a typical dryland ecosystem of northwest China[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2126
- [8] 孙万龙, 陈苏铭, 刘雪华, 王科朴, 杨云锋. 不同土壤采样设计下土壤表层微生物 α 多样性的差异分析[J]. 微生物学通报, 2020, 47(6): 1699-1708

- Sun WL, Chen SM, Liu XH, Wang KP, Yang YF. Effect of soil sampling designs on soil microbial alpha diversity[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(6): 1699-1708 (in Chinese)
- [9] Li SZ, Deng Y, Du XF, Feng K, Wu YN, He Q, Wang ZJ, Liu YY, Wang DR, Peng X, et al. Sampling cores and sequencing depths affected the measurement of microbial diversity in soil quadrats[J]. *Science of The Total Environment*, 2021, 767: 144966
- [10] Dickie IA, Boyer S, Buckley HL, Duncan RP, Gardner PP, Hogg ID, Holdaway RJ, Lear G, Makiola A, Morales SE, et al. Towards robust and repeatable sampling methods in eDNA-based studies[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2018, 18(5): 940-952
- [11] Fortunati GU, Banfi C, Pasturenzi M. Soil sampling[J]. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 1994, 348(1): 86-100
- [12] 林先贵, 胡君利. 土壤微生物多样性的科学内涵及其生态服务功能[J]. *土壤学报*, 2008, 45(5): 892-900
Lin XG, Hu JL. Scientific connotation and ecological service function of soil microbial diversity[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2008, 45(5): 892-900 (in Chinese)
- [13] 莫明和, 黄英, 徐进, 张克勤. 捕食线虫真菌捕食器相关基因标记I: REMI 转化捕食线虫真菌及转化子特征分析[J]. *菌物学报*, 2004, 23(3): 366-374
Mo MH, Huang Y, Xu J, Zhang KQ. Tagging the genes involved in trapping-device in nematode-trapping fungi I: transformation of the nematode-trapping fungi and characteristic analysis of the transformants[J]. *Mycosystema*, 2004, 23(3): 366-374 (in Chinese)
- [14] Li JY, Qian WY, Qiao M, Bai YL, Yu ZF. A new *Drechslerella* species from Hainan, China[J]. *Mycotaxon*, 2013, 125(1): 183-188
- [15] Zhang KQ, Hyde KD. *Nematode-Trapping Fungi*[M]. Dordrecht, Netherlands: Berlin: Springer, 2014
- [16] Liu SR, Su HY, Su XJ, Zhang F, Liao GH, Yang XY. *Arthrobotrys xiangyunensis*, a novel nematode-trapping taxon from a hot-spring in Yunnan province, China[J]. *Phytotaxa*, 2014, 174(2): 89-96
- [17] Zhang F, Zhou XJ, Monkai J, Li FT, Liu SR, Yang XY, Wen X, Hyde KD. Two new species of nematode-trapping fungi (*Dactyloellina*, *Orbiliaceae*) from burned forest in Yunnan, China[J]. *Phytotaxa*, 2020, 452(1): 65-74
- [18] Zhang Y, Qiao M, Baral HO, Xu JP, Zhang KQ, Yu ZF. Morphological and molecular characterization of *Orbilium pseudopolybrocha* and *O. tonghaiensis*, two new species of *Orbiliaceae* from China[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70(4): 2664-2676
- [19] Quijada L, Baral HO, Beltrán-Tejera E, Pfister DH. *Orbilium jesu-laurae* (*Ascomycota*, *Orbiliomycetes*), a new species of neotropical nematode-trapping fungus from Puerto Rico, supported by morphology and molecular phylogenetics[J]. *Willdenowia*, 2020, 50(2): 241-251
- [20] 杨晓燕, 刘立盘, 苏锡钧, 叶远邦, 黄爱英, 苏鸿雁. 洱海捕食线虫真菌生物多样性研究[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(23): 14183-14184, 14207
Yang XY, Liu LP, Su XJ, Ye YB, Huang AY, Su HY. Study on the biological diversity of nematode-trapping fungi in Erhai Lake[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(23): 14183-14184, 14207 (in Chinese)
- [21] 周新娟, 邓巍, 滕曼, 刘硕然, 肖文, 杨晓燕. 火烧对苍山捕食线虫真菌群落结构的影响[J]. *大理大学学报*, 2018, 3(12): 82-86
Zhou XJ, Deng W, Teng M, Liu SR, Xiao W, Yang XY. Effects of fire on the structure of the nematode-trapping fungi community in Cangshan Mountain[J]. *Journal of Dali University*, 2018, 3(12): 82-86 (in Chinese)
- [22] 邓巍, 王家亮, 刘李蕾, 房以好, 刘硕然, 杨晓燕, 肖文. 坡向尺度差异对大理苍山捕食线虫真菌分布格局的影响[J]. *生态学报*, 2019, 39(17): 6452-6459
Deng W, Wang JL, Liu LL, Fang YH, Liu SR, Yang XY, Xiao W. Slope's scale effect on the distribution patterns of nematode trapping fungi from Cangshan Mountain, Dali[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2019, 39(17): 6452-6459 (in Chinese)
- [23] 李天飞, 张克勤, 刘杏忠. 食线虫菌物分类学[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2000
Li TF, Zhang KQ, Liu XZ. *Taxonomy of Nematophagous Fungi*[M]. Beijing: China Science and Technology Press, 2000 (in Chinese)
- [24] 刘雪峰, 张克勤. 捕食线虫菌物玻片标本制作方法[J]. *微生物学通报*, 2004, 31(1): 92-95

- Liu XF, Zhang KQ. Slide making methods for predacious nematode fungi[J]. *Microbiology China*, 2004, 31(1): 92-95 (in Chinese)
- [25] 张克勤, 莫明和. 中国真菌志. 第三十三卷, 节丛孢及相关属[M]. 北京: 科学出版社, 2006
- Zhang KQ, Mo MH. *Flora Fungorum Sinicorum* (Vol. 33): *Arthrobotrys* Et *Gengra* Cetera *Cognata*[M]. Beijing: Science Press, 2006 (in Chinese)
- [26] White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics[A]/PCR Protocols[M]. Amsterdam: Elsevier, 1990: 315-322
- [27] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. Huang PT, trans. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002 (in Chinese)
- [28] Burland TG. DNASTAR's lasergene sequence analysis software[J]. *Methods in Molecular Biology*: Clifton, N J, 2000, 132: 71-91
- [29] Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezukh Y, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: a better web interface[J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(Web Server): W5-W9
- [30] Deng W, Wang JL, Scott MB, Fang YH, Liu SR, Yang XY, Xiao W. Sampling methods affect nematode-trapping fungi biodiversity patterns across an elevational gradient[J]. *BMC Microbiology*, 2020, 20: 15