万方知库
Eco-Environmental
Knowledge Web

环境科学

ENVIRONMENTAL SCIENCE

ISSN 0250-3301 CODEN HCKHDV
HUANJING KEXUE

■ 主办 中国科学院生态环境研究中心
■ 出版 科学出版社

2020
Vol.41 No.9
第41卷 第9期

环境科学
(HUANJING KEXUE)
ENVIRONMENTAL SCIENCE
第41卷 第9期
2020年9月15日

目 次

Eco-Environmental Knowledge Web
环 境 科 学
Environmental Science
第41卷第9期 2020年9月
Vol.41, No.9 Sep., 2020

贵州茂兰喀斯特森林不同演替下土壤真核微生物多样性

王显[1], 龙健[1*], 李娟[2], 刘灵飞[1], 廖洪凯[1], 李宜蓉[1], 杨睿[1]
(1. 贵州师范大学贵州省山地环境信息系统与生态环境保护重点实验室, 贵阳 550001; 2. 贵州师范大学地理与环境科学学院, 贵阳 550001)

摘要: 真核微生物是茂兰喀斯特森林土壤微生物中的重要组成部分,在生态系统物质循环和能量流动中扮演着重要角色. 为了解茂兰喀斯特森林不同演替阶段下土壤真核微生物群落组成及其多样性,利用 18S rDNA 高通量测序技术研究了原生林(YSL)、灌木林(GML)、灌木丛(GMC)和草地(CD)这 4 种演替阶段下土壤真核微生物群落多样性. 结果表明,在不同分类水平下,不同演替阶段土壤真核微生物群落组成相似. α 多样性指数存在显著差异, Shannon 指数与 Simpson 指数在不同演替阶段表现为:YSL > GMC > GML > CD. NMDS 分析表明不同演替阶段土壤真核微生物群落结构存在差异; LEfSe 分析表明,YSL 中差异指示种数量高于 GML、GML 和 CD. 本研究结果为研究不同演替阶段下土壤真核微生物提供了理论基础.

关键词:茂兰喀斯特森林; 不同演替; 18S rDNA; 真核微生物; 多样性
中图分类号: X172 **文献标识码**: A **文章编号**: 0250-3301(2020)09-4314-08 **DOI**: 10.13227/j.hjkx.202001010

Diversity of Soil Eukaryotic Microbes in Different Succession Stages in Maolan Karst Forest of Guizhou

WANG Xian[1], LONG Jian[1*], LI Juan[2], LIU Ling-fei[1], LIAO Hong-kai[1], LI Yi-rong[1], YANG Rui[1]
(1. Guizhou Provincial Key Laboratory for Information System of Mountainous Areas and Protection of Ecological Environmen, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China; 2. School of Geography and Environmental Science, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

Abstract: As an indispensable part of the Maolan karst forest soil microorganisms, eukaryotic microbes play an important role in ecosystem material and energy flow. To investigate the composition and diversity of soil eukaryotic microbial communities under different succession stages in the Maolan karst forest, we explored the diversity and composition of soil eukaryotic microbes under four succession stages of primary forests (YSL), shrub forests (GML), bushes (GMC), and grassland (CD) via high-throughput sequencing (HTS) of the 18S rDNA. The results showed that the composition of soil eukaryotic microbial communities was similar in different succession stages under different classification levels. There was a significant difference in α diversity, Shannon, and Simpson's indices at different stages of succession as follows: YSL > GMC > GML > CD. The non-metric multidimensional scaling analysis showed that there were differences in the soil eukaryotic microbial community structure at different succession stages. The linear discriminant analysis effect size (LEfSe) analysis showed that the number of differential indicator species in YSL was higher than in GML, GML, and CD. The results of our study provide a theoretical basis for further research on soil eukaryotic microorganisms in different succession stages.

Key words: Maolan karst forest; succession stage; 18S rDNA; eukaryotic microbes; diversity

喀斯特生态环境作为我国西南山区的一个独特生态环境系统,维持着丰富的微生物多样性. 茂兰喀斯特森林是目前世界上同纬度地区喀斯特原生性森林分布面积最大的地区[1],具有重要的研究价值,但是人类社会的发展逐渐破坏了原生林的原始性,导致新的演替出现,改变地上植被群落的分布组成,从而引起地上生态系统和地下生态系统的物质循环发生改变[2]. Stone 等[3]的研究认为植被类型是土壤微生物多样性的主要驱动者,植被多样性越高,土壤微生物的营养来源越丰富,微生物的种类就越多. 近年来,针对茂兰喀斯特森林的研究主要集中在土壤肥力[4]、石漠化过程[5]和土壤微生物活性[6]等方面,但是有关茂兰喀斯特森林土壤真核微生物的研究甚少,目前,尚未见到对该地区不同植被演替阶段土壤真核微生物群落结构及多样性方面的研究报道.

土壤是一个复杂的环境,蕴含着大量的微生物,研究表明 1 g 土壤中就包含有几千种微生物[7],其中包括原核微生物与真核微生物,真核微生物主要包括原生生物与真菌[8,9]. 目前对微生物多样性的研究往往偏向于原核微生物,如 Fierer 等[10]对细菌群落多样性与地理环境的研究; DeLong 等[11]对北美州近海岸地表水环境中古菌分布的研究. 而对真

收稿日期: 2020-01-02; **修订日期**: 2020-04-02
基金项目: 国家自然科学基金项目(41661045); 贵州省科技厅科技平台及人才团队计划项目(黔科合平台人才[2018]5609); 贵州师范大学 2017 年度学术新苗培养及创新探索专项(黔科合平台人才[2017]5726-55); 贵州省喀斯特生态环境保护与治理人才基地项目; 贵州省百层次创新人才项目(黔科合平台人才[2020]6010); 贵州省科学技术基金重点项目(黔科合基础[2020]1Z036)
作者简介: 王显(1996~),男,硕士研究生,主要研究方向为土壤食物网结构,E-mail: wx1996ll@163.com
* 通信作者,E-mail: longjian22@163.com

核微生物的研究相对较少，先前的研究表明，植被演替对细菌、真菌的分布有着极大的影响[12,13]. 白丽等[14]在对黄土高原草地次生演替的研究中发现，随着植被演替的进行，细菌微生物多样性整体出现显著增加的趋势；还有研究在对森林、草地和农田土壤中真核微生物的分布研究中发现，森林土壤中真核微生物的丰富度要远远高于灌木林和草地土壤[15]. 真核微生物是土壤生态系统中的重要组成部分，其作为消费者、分解者在生物地球化学循环中扮演着不可或缺的重要角色[16~18]，是土壤肥力的一个重要要素[19]. 真核微生物多样性组成不仅影响植物与土壤环境之间的关系，还对地上植被的生长有着重要意义[20~22].

随着分子生物学技术的迅速发展，高通量测序技术在真核微生物多样性的研究也日渐增多. 目前，无论是陆地生态系统还是海洋生态系统中都有不少应用[23,24]. Mahé 等[25]利用高通量技术研究了热带雨林中土壤原生生物的多样性，发现 Parasites 是热带雨林中最多样化的原生生物. 秦文韬等[26]研究了城市污水处理系统中真核微生物群落特征，揭示了在 Supergroup 分类水平和 Division 分类水平下真核微生物的差异性分布. 因此，本文以茂兰喀斯特森林为研究对象，利用 18S rDNA 测序手段结合生态学方法对茂兰喀斯特森林不同演替过程中土壤真核微生物群落组成及多样性进行分析，通过对茂兰喀斯特森林土壤真核微生物群落的认识，以期为进一步研究茂兰自然保护区森林生态系统提供理论依据.

1　材料与方法

1.1　研究区域概况及土样采集

茂兰喀斯特森林位于贵州省荔波县南部，与广西木论国家级自然保护区毗邻，地理位置为25°09′20″～25°20′50″N，107°52′10″～108°45′40″E. 森林覆盖率达87.3%，平均海拔 500～800 m，年平均气温 18.3℃，年平均相对湿度为 70% 左右，属中亚热带季风湿润气候. 土壤以黑色石灰土为主，土层浅薄且不连续，土壤富钙和富盐基化，pH 值在 6.5～8.0 之间，有机质含量高，被誉为典型的喀斯特生境[27].

于 2019 年 10 月下旬，在茂兰自然保护区及周边选择原生林（YSL）、灌木林（GML）、灌木丛（GMC）和草地（CD）这 4 种演替阶段类型土壤进行采集，每种类型选取 10 m×10 m 的 3 个样方，在每个样方内随机采取 3 份土样，采土深度为 0～5 cm，共 12 个土样. 现场采集的土样分为两份：一份取约 20 g 装入无菌采样袋，放入含生物冰袋的泡沫箱内，用于 18S rDNA 测序；另一份取约 1 kg 带回实验室储存于 4℃冰箱备用.

1.2　土样总 DNA 的提取与检测

DNA 提取及质量控制：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 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量.

1.3　土壤真核微生物 18S rDNA 的扩增和文库的构建

根据文献[28,29]，用 547F（5′-CCAGCASCYGCGGTAATTCC-5′）和 952R（5′-ACTTTCGTTCTTGATYRA-3′）引物对 V4 可变区进行 PCR 扩增，本研究的文库构建采用两步 PCR 扩增的方法，首先采用特异引物扩增目的片段，将目的片段进行胶回收，而后将回收产物作为模板进行二次 PCR 扩增. 目的是将 Illumina 平台测序所需的接头、测序引物和 barcode 添加到目的片段的两端.

第一步扩增反应体系：5xBuffer 10 μL，10 mmol·L^{-1} dNTP 1 μL，DNA 酶 1 U，DNA 模板 5～50 ng，10 μmol·L^{-1} 正向、反向引物各 1 μL，补水至 50 μL. PCR 扩增条件：94℃预变性 2 min，94℃变性 30 s，55℃退火 30 s，72℃延伸 30 s，共 33 个循环，72℃延伸 5 min. 冷却至 10℃.

第二步扩增反应体系：5xBuffer 8 μL，10 mmol·L^{-1} dNTP 1 μL，DNA 酶 0.8 U，DNA 模板 5 μL，10 μmol·L^{-1} 正向、反向引物各 1 μL，补水至 50 μL. PCR 扩增条件：94℃预变性 2 min，94℃变性 30 s，56℃退火 30 s，72℃延伸 30 s，共 33 个循环，72℃延伸 5 min，冷却至 10℃.

同时每个样品做 3 个技术重复，将同一样品 PCR 产物混合后经 2% 琼脂糖凝胶回收 PCR 产物、割胶纯化、浓度检测等操作后. 根据 Illumina MiSeq 平台标准操作规程将纯化后的扩增片段构建 PE2×300 的文库.（上海美吉生物医药科技有限公司）.

1.4　序列生物信息学分析

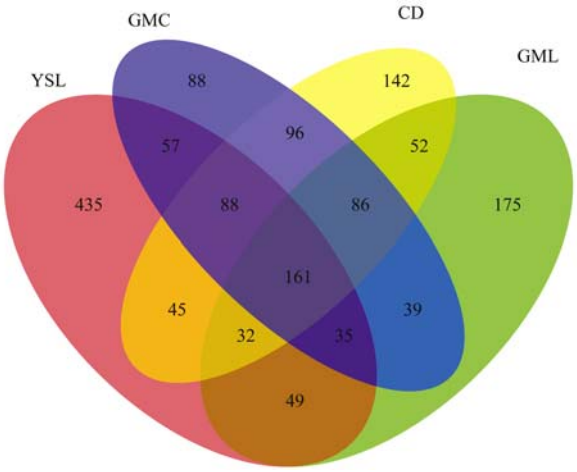
通过 VSEARCH 2.14.1[30]进行双端合并并且除引物，去冗余；基于 USEARCH10[31]的 UNOISE3[32]进行聚类生成 OTU；基于 SILVA 128[33]去除嵌合体；PR2 数据库[34]注释的置信值为 0.6. 同时，对 OTU 进行丰度、α 多样性和 Venn 图等分析；利用 R 语言 ggplot2 包、vegan 包进行 NMDS 分析及物种分布扇形图；利用 Python2.0 软件进行 LEfSe 分析（LDA Effect Size）.

2　结果与分析

2.1　不同演替阶段真核微生物 OTU 分布

对土壤真核微生物 18S rDNA 的 V4 高变区

PCR 扩增，进行 Illumina MiSeq 测序，4 种演替阶段土壤样品共获得 192 157 条优化序列，基于 USEARCH 10 的 UNOISE3 进行聚类分析，结果共获得1 580个 OTU. 4 种演替阶段土壤真核微生物 OTU 分布如图 1 所示，4 种演替阶段下 1580 个 OTU 中共有的 OTU 个数为 161，占总 OTU 数量的 10.18%. 4 种演替阶段下 OTU 个数分别为：902、629、652 和 702. 其中，YSL 中特有的 OTU 为 435 个，占总 OTU 数量的 27.53%；GML 中特有的 OTU 为 175 个，占总 OTU 数量的 11.08%；GMC 中特有的 OTU 为 88 个，占总 OTU 数量的 5.57%；CD 中特有的 OTU 为 142 个，占总 OTU 数量的 8.99%. 以上结果表明 4 种演替阶段土壤中真核微生物的群落结构存在一定差异.



YSL 表示原生林；GML 表示灌木林；
GMC 表示灌木丛；CD 表示草地，下同

图 1 不同演替阶段下真核微生物 OTU 维恩图

Fig. 1 OTU Venn of eukaryotic microbes in different stages of succession

2.2 不同演替阶段真核微生物群落 α 多样性

ACE 指数和 Chao1 指数是两种用于估计群落中含 OTU 数目的微生物多样性指数的方法，在生态学中常用来估计物种的总数. 由表 1 可知，ACE 指数和 Chao1 指数由大至小表现为 YSL > GMC > GML > CD. 表明原生林中真核微生物群落丰富度大于灌木林和草地；Shannon 指数可以估算样本中微生物多样性，Shannon 指数由大至小表现为 YSL > GMC > GML > CD，表明原生林中真核微生物群落多样性大于灌木林和草地.

表 1 不同演替阶段下真核微生物群落 α 多样性指数[1)]

Table 1 The α diversity indices of eukaryotic microbial community in different stages of succession

演替阶段	Chao1 指数	Simpson 指数	Shannon 指数	均匀度	ACE 指数
原生林	419.82 ± 41.91	0.05 ± 0.02	6.32 ± 0.64	0.73 ± 0.06	412.52 ± 43.22
灌木林	282.22 ± 54.13	0.21 ± 0.03	3.92 ± 0.29	0.49 ± 0.02	278.25 ± 54.51
灌木丛	305.41 ± 74.04	0.15 ± 0.06	4.43 ± 0.87	0.54 ± 0.09	297.25 ± 73.62
草地	251.12 ± 41.07	0.37 ± 0.20	3.32 ± 1.42	0.04 ± 0.16	250.21 ± 41.25

1) 数值表示均值 ± 标准误

2.3 不同演替阶段真核微生物群物种组成

本研究从 Supergroup 和 Division 两个水平对 1 580个 OTU 进行了物种分析. 图 2(a) 展示了在 Supergroup 水平下，1 580 个 OTU 分属于 8 个 Supergroup. 其中，Opisthokonta 的相对丰度最高，为 45.03%；Alveolata 次之，为 14.52%；图 2(b) 展示了在 Division 水平下，3 794 个 OTU 分属于 19 个 Division. 其中，相对丰度大于 1% 的有 12 个，它们的累积相对丰度已高达 99%. 具体地，62.62% 的 OTU 属于 Fungi、Cercozoa 和 Streptophyta，其中，相对丰度最高的是 Fungi 为 43.06%，其次是 Cercozoa 和 Streptophyta，相对丰度分别为 13.92% 和 5.62%，还有 14.48% 的 OTU 属于未被培养的物种.

4 种演替阶段 Division 水平下[图 2(c)]. 原生林土壤中真核微生物主要群落为 Fungi、Apicomplexa、Streptophyta 和 Cercozoa，其相对丰度占 58.97%；灌木林土壤中真核微生物主要群落为 Fungi、Cercozoa 和 Chlorophyta，其相对丰度为 83.51%；灌木丛土壤中真核微生物主要群落为 Fungi 和 Cercozoa，其相对丰度为 41.41%；草地土壤中真核微生物主要群落为 Fungi 和 Cercozoa. 其相对丰度为 77.89%. 以上结果表明，Fungi 是 4 种植被演替阶段土壤中的优势种群，且在草地演替阶段中相对丰度最高(达到了群落结构的 68.73%)，在原生林演替阶段中最低(达到了群落结构的 17.90%).

2.4 不同演替阶段下真核微生物 NMDS 分析

基于 Bray-Curtis 建立样品间的非相似性矩阵，采用非度量多维尺度分析(non-metric multidimensional scaling，NMDS)得到不同演替阶段下的土壤真核微生物群落结构组成. 结果如图 3 所示，根据植被演替阶段可以划分为 4 个聚集区，来自 YSL、GML、GMC 和 CD 这 4 个演替阶段中的真核微生物群落各自聚为一类，表明 4 种演替阶段下的真核微生物群落结构存在差异，相异性分析非参数检验方法 ADONIS、ANOSIM 的结果也为 4 种不同

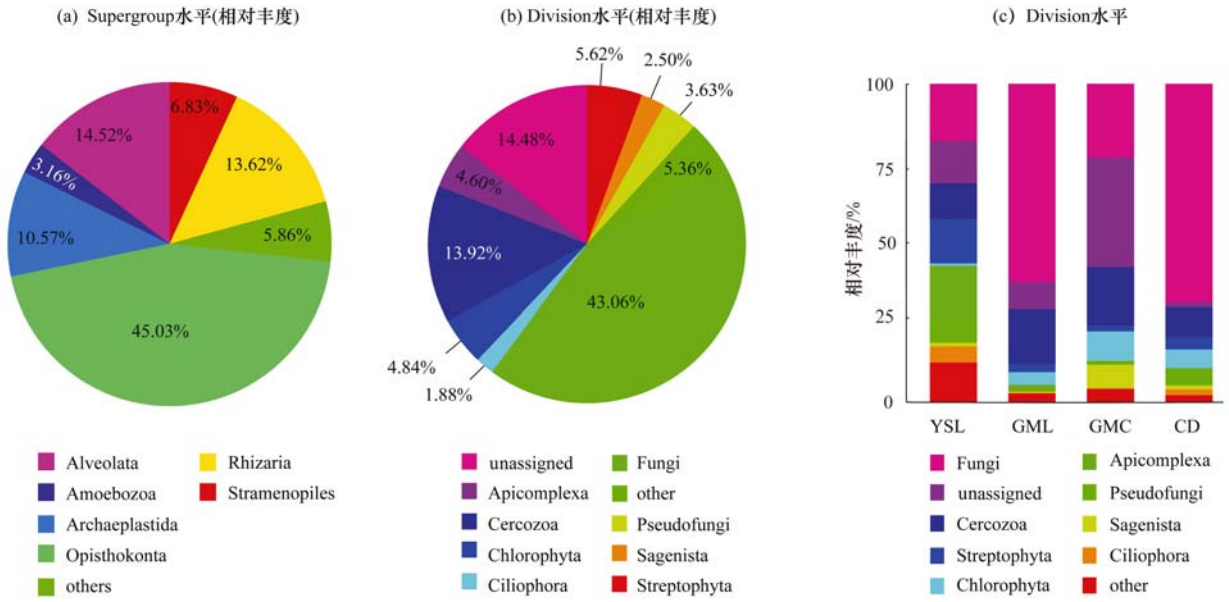


图 2　不同水平下不同演替阶段真核微生物群落组成

Fig. 2　Composition of eukaryotic microbial community in different stages of vegetation succession at different levels

植被演替下土壤真核微生物群落结构存在差异提供了佐证($P<0.05$). Stress(胁强系数)<0.2 时,说明 NMDS 可以准确反映样品间的差异程度. 综合分析发现,YSL 与 CD 距离最远,说明其土壤真核微生物群落组成结构差异最大,GMC 与 CD 距离最近,说明其土壤真核微生物群落组成结构最相似. 总体来说,各样地两两之间距离不同,各样地土壤真核微生物群落组成结构均不同,同时两两之间差异大小也不相同.

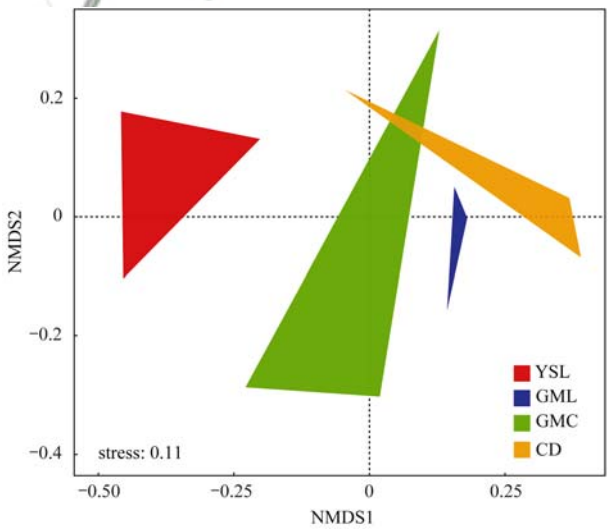


图 3　基于 NMDS 的不同演替阶段下真核微生物群落结构分析

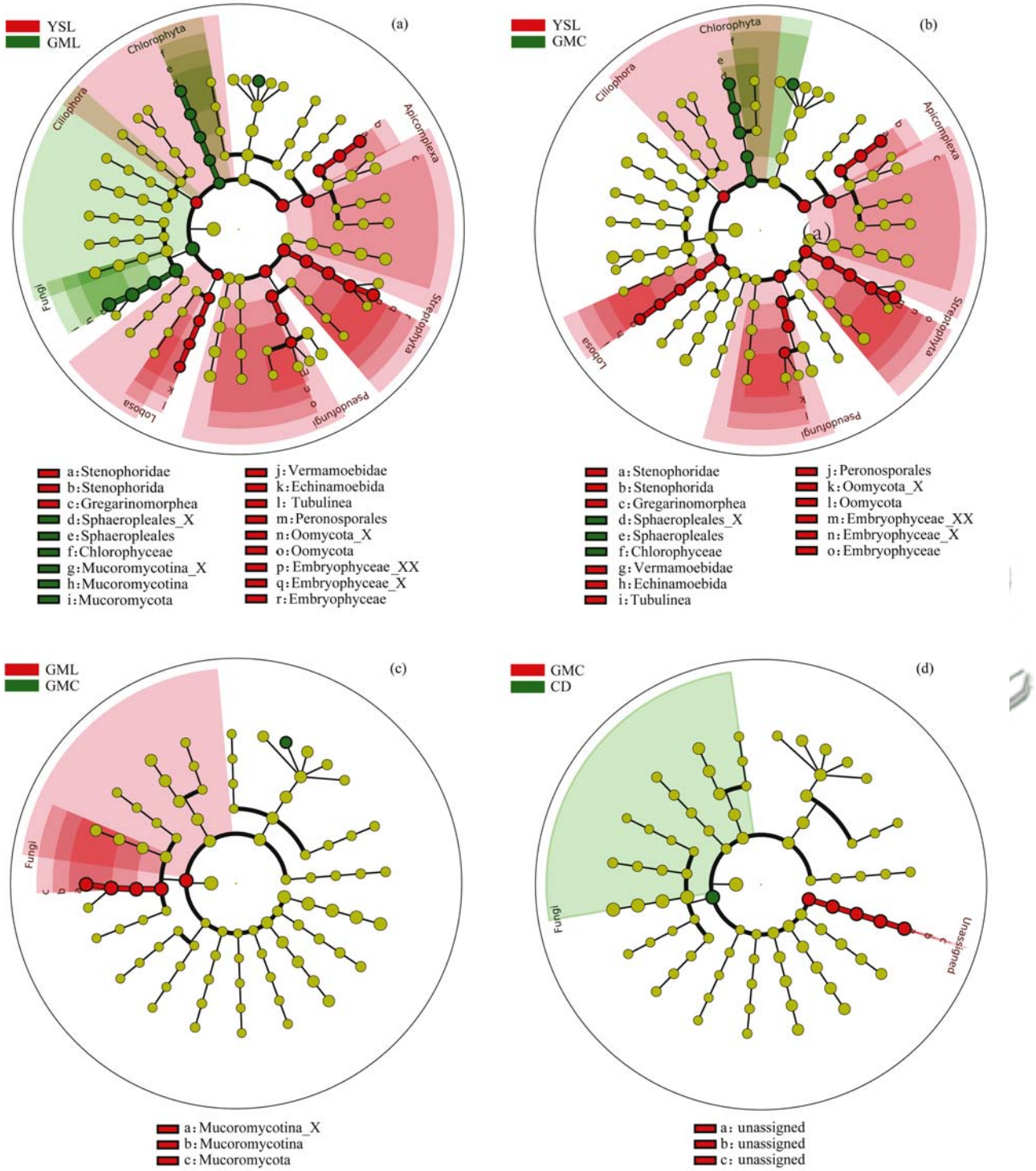
Fig. 3　Structure analysis using NMDS of eukaryotic microbial community in different stages of succession

2.5　不同演替阶段真核微生物群落差异性分析

4 个样地 LEfSe 分析进化如图 4 所示,在真核微生物属水平上作 LEfSe 分析,仅展示得分值 >2.0 的物种. 原生林与灌木林中共发现 31 个差异种,其中原生林 20 个,灌木林 11 个; 原生林与灌木丛中共发现 26 个差异种,其中原生林 20 个,灌木丛 6 个; 灌木林与灌木丛中共发现 6 个差异种,其中灌木林 5 个,灌木丛 1 个; 灌木丛与草地中共发现 6 个差异种,其中灌木丛 5 个,草地 1 个. 原生林中的差异种主要有 Stenophoridae(科)、Stenophorida(目)、Gregarinomorphea(纲)、Tubulinea(纲)、Peronosporales(科)、Oomycota(纲)和 Embryophyceae(纲); 灌木林中的差异种主要有 *Mortierella*(属)、Fungi(门)、Sphaeropleales(科)、Chlorophyceae(科)和 Mucoromycotina(目); 灌木丛中的差异种主要有 Chlorophyta(门)、Chlorophyceae(科)和 Sphaeropleales(科); 草地的差异种主要有 Fungi(门).

3　讨论

目前,对茂兰喀斯特自然保护区动植物群落结构和土壤理化性质等方面已有比较深入的研究[35,36],而针对真核微生物的研究主要集中在海洋真核微生物[37~39],而对土壤真核微生物的研究较少. 本研究发现 Shannon 和 Chao1 指数在不同植被演替阶段土壤中存在差异,最低的是草地土壤,最高的是原生林土壤. 这表明随着正向演替的进行,土壤微生物多样性在不断增加,这一结果可能是因为:①原生林土壤养分肥沃,为微生物的生存提供了较好的环境[40]. 并且随着演替的进行,植被逐渐趋于成熟阶段,植物生产力与凋落物的增加提高了土壤有机质含量[41],研究表明有机质含量的差异是影响微生物多样性的主要因素[42],而原生林土壤有机质往



(a)表示原生林与灌木林之间的差异指示种;(b)表示原生林与灌木丛之间的差异指示种;(c)表示灌木林与灌木丛之间的差异指示种;(d)表示灌木丛与草地之间的差异指示种;图中小写字母(a~r)代表真核生物从门到属水平的差异指示种

图4 不同演替阶段下真核微生物群落 LEfSe 分析

Fig. 4 LEfSe analysis of eukaryotic microbial community in different stages of succession

往高于草地,因此原生林土壤物种多样性较草地土壤高.②原生林植被类型的丰富和多样性导致了土壤微生物利用资源异质性增加,从而增加了土壤生物[43]. Jangid 等[44]的研究发现,随着演替的进行,演替后期土壤微生物群落多样性指数会高于早期演替阶段,这与本研究结果一致. 同样地,De Quadros 等[45]的研究发现,原生林微生物群落多样性略高于草地土壤微生物多样性. NMDS 分析表明,原生林、灌木林、灌木丛和草地演替阶段下土壤真核微生物群落可以明显区分,这与 Zhao 等[28]的研究结果相一致. 其原因可能是随着植被演替的进行,植被类型也会随之改变,这种改变会影响凋落物的数量和组成,进而对土壤微生物的分布和组成产生间接影响[46~48].

土壤微生物多样性受植被、土壤类型、温度、水分和土地利用方式等因素影响[49]. 本研究发现,在不同演替阶段中真核微生物组成相似,主要优势群落为 Fungi、Cercozoa 和 Streptophyta. Fungi 是 4 种演替阶段下的优势物种. 这与很多研究结果相似,如 Müller 等[50]在使用高通量测序对大西洋森林土壤真核微生物的研究中发现,Fungi 和 Metazoa 是最多的物种; Jing 等[49]通过对不同植被恢复类型土壤中真核微生物的研究也发现,Fungi 和 Metazoa 是主要的群落; 还有研究者认为土壤微生物会随着地上植被的演替发生变化,大量不同种类的植物凋落物提供了丰富的营养物质来源[51]. 植被组成的不同也会导致进入到土壤中的有机质、根系分泌物等发生变化,改变根系对土壤的营养物质输入,从而影响土壤真菌的群落组成和多样性分布[52,53]. 王韵等[54]的研究发现在整个植被演替的过程中,植被类型改变了土壤养分、微生物群落多样性等. 土壤养分越充足,越有利于土壤微生物的生长发育. LEfSe 分析还表明,4 种演替阶段土壤中真核微生物的差异种明显不同,原生林中真核微生物差异种最多,草地阶段差异种最少,表明随着正向演替的进行差异指示种数量在不断增加,这可能是因为原生林土壤有机质、总碳和总氮等理化因子较其他 3 种演替阶段而言土壤肥力较高[55],各种土壤理化因子的综合作用使得原生林演替阶段差异指示种数量最多.

4　结论

(1)不同分类水平下,不同演替阶段土壤真核微生物群落优势种群组成相似,在 Supergroup 水平上,群落优势种群主要由后鞭毛生物(Opisthokonta)、囊泡虫类(Alveolata)和有孔虫类(Rhizaria)组成.

(2) 不同演替阶段下土壤真核微生物多样性存在差异, Shannon 指数与 Simpson 指数在不同演替阶段表现为:YSL > GMC > GML > CD.

(3) 利用 NMDS 分析和 LEfSe 分析探讨茂兰喀斯特地区真核微生物群落分布,结果表明不同演替阶段下真核微生物群落结构存在差异.

参考文献:

[1] 吴求生, 龙健, 李娟, 等. 茂兰喀斯特森林小生境类型对土壤微生物群落组成的影响[J]. 生态学报, 2019, **39**(3): 1009-1018.
Wu Q S, Long J, Li J, *et al*. Effects of different microhabitat types on soil microbial community composition in the Maolan karst forest in southwest China[J]. Acta Ecologica Sinica, 2019, **39**(3): 1009-1018.

[2] 吴鹏, 陈骏, 崔迎春, 等. 茂兰喀斯特植被主要演替群落土壤有机碳研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2012, **32**(12): 1181-186.
Wu P, Chen J, Cui Y C, *et al*. Study of soil organic carbon of major successional communities in Maolan nature reserve of karst [J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2012, **32**(12): 181-186.

[3] Stone M M, Kan J J, Plante A F. Parent material and vegetation influence bacterial community structure and nitrogen functional genes along deep tropical soil profiles at the Luquillo Critical Zone observatory[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2015, **80**: 273-282.

[4] 黄宗胜, 符裕红, 喻理飞, 等. 喀斯特森林植被自然恢复中土壤团聚体有机碳含量与团聚体分形特征[J]. 林业科学研究, 2015, **28**(2): 277-283.
Huang Z S, Fu Y H, Yu L F, *et al*. Studies on organic carbon content and fractal features of soil aggregates with the process of natural restoration of karst forest vegetation[J]. Forest Research, 2015, **28**(2): 277-283.

[5] 刘方, 王世杰, 刘元生, 等. 喀斯特石漠化过程土壤质量变化及生态环境影响评价[J]. 生态学报, 2005, **25**(3): 639-644.
Liu F, Wang S J, Liu Y S, *et al*. Changes of soil quality in the process of karst rocky desertification and evaluation of impact on ecological environment [J]. Acta Ecologica Sinica, 2005, **25**(3): 639-644.

[6] 龙健, 李娟, 江新荣, 等. 贵州茂兰喀斯特森林土壤微生物活性的研究[J]. 土壤学报, 2004, **41**(4): 597-602.
Long J, Li J, Jiang X R, *et al*. Soil microbial activities in Maolan karst forest, Guizhou province [J]. Acta Pedologica Sinica, 2004, **41**(4): 597-602.

[7] Rappé MS, Giovannoni S J. The uncultured microbial Majority [J]. Annual Review of Microbiology, 2003, **57**: 369-394.

[8] Anderson R, Wylezich C, Glaubitz S, *et al*. Impact of protist grazing on a key bacterial group for biogeochemical cycling in Baltic Sea pelagic oxic/anoxic interfaces [J]. Environmental Microbiology, 2013, **15**(5): 1580-1594.

[9] Falkowski P G, Fenchel T, Delong E F. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles[J]. Science, 2008, **320**(5879): 1034-1039.

[10] Fierer N, Jackson R B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, **103**(3): 626-631.

[11] DeLong E F. Archaea in coastal marine environments [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, **89**(12): 5685-5689.

[12] Felske A, Wolterink A, Van Lis R, *et al*. Response of a soil bacterial community to grassland succession as monitored by 16S rRNA levels of the predominant ribotypes [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, **66**(9): 3998-4003.

[13] Nüsslein K, Tiedje J M. Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, **65**(8): 3622-3626.

[14] 白丽, 范席德, 王洁莹, 等. 黄土高原草地次生演替过程中微生物群落对植物群落的响应[J]. 生态环境学报, 2018, **27**(10): 1801-1808.
Bai L, Fan X D, Wang J Y, *et al*. Responses of microbial communities to plant communities during secondary succession of grassland in Loness Plateau [J]. Ecology and Environmental Sciences, 2018, **27**(10): 1801-1808.

[15] Seppey C V W, Singer D, Dumack K, *et al*. Distribution

patterns of soil microbial eukaryotes suggests widespread algivory by phagotrophic protists as an alternative pathway for nutrient cycling[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2017, **112**: 68-76.

[16] Caron D A, Countway P D, Jones A C, *et al*. Marine protistan diversity[J]. Annual Review of Marine Science, 2012, **4**(1): 467-493.

[17] Van Der Wal A, Geydan T D, Kuyper T W, *et al*. A thready affair: linking fungal diversity and community dynamics to terrestrial decomposition processes [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2013, **37**(4): 477-494.

[18] Worden A Z, Follows M J, Giovannoni S J, *et al*. Rethinking the marine carbon cycle: factoring in the multifarious lifestyles of microbes[J]. Science, 2015, **347**(6223): 1257594.

[19] Verni F, Gualtieri P. Feeding behaviour in ciliated protists[J]. Micron, 1997, **28**(6): 487-504.

[20] Bartelt-Ryser J, Joshi J, Schmid B, *et al*. Soil feedbacks of plant diversity on soil microbial communities and subsequent plant growth [J]. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics, 2005, **7**(1): 27-49.

[21] Tedersoo L, Bahram M, Cajthaml T, *et al*. Tree diversity and species identity effects on soil fungi, protists and animals are context dependent[J]. The ISME Journal, 2015, **10**(2): 346-362.

[22] Tedersoo L, Bahram M, Dickie I A. Does host plant richness explain diversity of ectomycorrhizal fungi? Re-evaluation of Gao *et al*. (2013) data sets reveals sampling effects[J]. Molecular Ecology, **23**(5): 992-995.

[23] Geisen S. Thorough high-throughput sequencing analyses unravels huge diversities of soil parasitic protists [J]. Environmental Microbiology, 2016, **18**(6): 1669-1672.

[24] Lepère C, Domaizon I, Hugoni M, *et al*. Diversity and dynamics of active small microbial eukaryotes in the anoxic zone of a freshwater meromictic lake (Pavin, France)[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, **7**: 130.

[25] Mahé F, De Vargas C, Bass D, *et al*. Parasites dominate hyperdiverse soil protist communities in Neotropical rainforests [J]. Nature Ecology & Evolution, 2017, **1**(4), doi: 10.1038/s41559-017-0091.

[26] 秦文韬, 张冰, 孙晨翔, 等. 城市污水处理系统真核微生物群落特性与地域性差异[J]. 环境科学, 2019, **40**(5): 2368-2374.
Qin W T, Zhang B, Sun C X, *et al*. Characteristics and regional heterogeneity of eukaryotic microbial community in wastewater treatment Plant[J]. Environmental Science, 2019, **40**(5) 2368-2374.

[27] 覃弦, 龙翠玲. 茂兰喀斯特森林不同演替阶段优势乔木种群结构与分布格局[J]. 贵州师范大学学报(自然科学版), 2016, **34**(6): 33-38.
Qin X, Long C L. Analysis on structure and distribution pattern of dominant arbor population at different succession stages of karst forest in Maolan natural reserve[J]. Journal of Guizhou Normal University(Natural Sciences), 2016, **34**(6): 33-38.

[28] Zhao H, Li XZ, Zhang ZM, *et al*. Drivers and assemblies of soil eukaryotic microbes among different soil habitat types in a semi-arid mountain in China[J]. PeerJ, 2018, **6**, doi: 10.7717/peerj.6042.

[29] Logares R, Audic S, Bass D, *et al*. Patterns of rare and abundant marine microbial eukaryotes [J]. Current Biology, 2014, **24**(8): 813-821.

[30] Rognes T, Flouri T, Nichols B, *et al*. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics[J]. PeerJ, 2016, **4**, doi: 10.7717/peerj.2584.

[31] Edgar R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. Bioinformatics, 2010, **26**(19): 2460-2461.

[32] Edgar R C. UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing[J]. BioRxiv, 2016, doi: 10.1101/003723.

[33] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, *et al*. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools [J]. Nucleic Acids Research, 2012, **41** (D1): D590-D596.

[34] Guillou L, Bachar D, Audic S, *et al*. The Protist ribosomal reference database (PR^2): a catalog of unicellular eukaryote Small Sub-Unit rRNA sequences with curated taxonomy [J]. Nucleic Acids Research, 2013, **41**(D1): D597-D604.

[35] 俞国松, 王世杰, 容丽, 等. 茂兰喀斯特森林主要演替群落的凋落物动态[J]. 植物生态学报, 2011, **35**(10): 1019-1028.
Yu G S, Wang S J, Rong L, *et al*. Litter dynamics of major successional communities in Maolan karst forest of China[J]. Chinese Journal of Plant Ecology, 2011, **35**(10): 1019-1028.

[36] 赵畅, 龙健, 李娟, 等. 茂兰喀斯特原生林不同坡向及分解层的凋落物现存量和养分特征[J]. 生态学杂志, 2018, **37**(2): 295-303.
Zhou C, Long J, Li J, *et al*. Litter stock and nutrient characteristics of decomposing litter layers in Maolan Karst primary forest in different slope directions[J]. Chinese Journal of Ecology, 2018, **37**(2): 295-303.

[37] Debroas D, Domaizon I, Humbert J F, *et al*. Overview of freshwater microbial eukaryotes diversity: a first analysis of publicly available metabarcoding data[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2017, **93**(4), doi: 10.1093/femsec/fix023.

[38] Leray M, Knowlton N. Censusing marine eukaryotic diversity in the twenty-first century[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2016, **371**(1702), doi: 10.1098/rstb. 2015.0331.

[39] Comeau A M, Lagunas M G, Scarcella K, *et al*. Nitrate Consumers in arctic marine eukaryotic communities: comparative diversities of 18S rRNA, 18S rRNA genes, and nitrate reductase genes [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, **85**(14), doi: 10.1128/AEM.00247-19.

[40] Moghimian N, Hosseini S M, Kooch Y, *et al*. Impacts of changes in land use/cover on soil microbial and enzyme activities [J]. Catena, 2017, **157**: 407-414.

[41] Kramer C, Gleixner G. Variable use of plant- and soil-derived carbon by microorganisms in agricultural soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2006, **38**(11): 3267-3278.

[42] 吴则焰, 林文雄, 陈志芳, 等. 武夷山国家自然保护区不同植被类型土壤微生物群落特征[J]. 应用生态学报, 2013, **24**(8): 2301-2309.
Wu Z Y, Lin W X, Chen Z F, *et al*. Characteristics of soil microbial community under different vegetation types in Wuyishan national nature reserve, East China [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2013, **24**(8): 2301-2309.

[43] Zhou X Q, Guo Z Y, Chen C R, *et al*. Soil microbial community structure and diversity are largely influenced by soil pH and nutrient quality in 78-year-old tree plantations [J]. Biogeosciences, 2017, **14**(8): 2101-2111.

[44] Jangid K, Williams M A, Franzluebbers A J, *et al*. Land-use history has a stronger impact on soil microbial community composition than aboveground vegetation and soil properties[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2011, **43**(10): 2184-2193.

[45] De Quadros P D, Zhalnina K, Davis-Richardson A G, *et al*. Coal mining practices reduce the microbial biomass, richness and diversity of soil[J]. Applied Soil Ecology, 2015, **98**: 195-203.

[46] Zou X M, Ruan H H, Fu Y, *et al*. Estimating soil labile organic carbon and potential turnover rates using a sequential fumigation-incubation procedure[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2005, **37**(10): 1923-1928.

[47] 刘爽, 王传宽. 五种温带森林土壤微生物生物量碳氮的时空格局[J]. 生态学报, 2010, **30**(12): 3135-3143.
Liu S, Wang C K. Spatio-temporal patterns of soil microbial biomass carbon and nitrogen in five temperate forest ecosystems [J]. Acta Ecologica Sinica, 2010, **30**(12): 3135-3143.

[48] 周桔, 雷霆. 土壤微生物多样性影响因素及研究方法的现状与展望[J]. 生物多样性, 2007, **15**(3): 306-311.
Zhou J, Lei T. Review and prospects on methodology and affecting factors of soil microbial diversity [J]. Biodiversity Science, 2007, **15**(3): 306-311.

[49] Jing Z B, Cheng J M, Jin J W, *et al*. Revegetation as an efficient means of improving the diversity and abundance of soil eukaryotes in the Loess Plateau of China [J]. Ecological Engineering, 2014, **70**: 169-174.

[50] Müller C A, De Mattos Pereira L, Lopes C, *et al*. Meiofaunal diversity in the Atlantic forest soil: a quest for nematodes in a native reserve using eukaryotic metabarcoding analysis [J]. Forest Ecology and Management, 2019, **453**: 117591.

[51] Martínez-García L B, Pugnaire F I. Arbuscular mycorrhizal fungi host preference and site effects in two plant species in a semiarid environment[J]. Applied Soil Ecology, 2011, **48**(3): 313-317.

[52] Daniel G F, Nilsson T, Singh A P. Degradation of lignocellulosics by unique tunnel-forming bacteria[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1987, **33**(10): 943-948.

[53] Kourtev P S, Ehrenfeld J G, Häggblom M. Exotic plant species alter the microbial community structure and function in the soil [J]. Ecology, 2002, **83**(11): 3152-3166.

[54] 王韵, 王克林, 邹冬生, 等. 广西喀斯特地区植被演替对土壤质量的影响[J]. 水土保持学报, 2007, **21**(6): 130-134.
Wang Y, Wang K L, Zou D L, *et al*. Effects of vegetation succession on soil quality in karst region of Guangxi, China[J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2007, **21**(6): 130-134.

[55] 赵畅. 茂兰喀斯特森林凋落物—土壤系统的养分动态变化及其相互影响机制[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2018.
Zhao C. Dynamic changes and mutual effects of litter-soil system in Maolan karst forest [D]. Guiyang: Guizhou Normal University, 2018.

HUANJING KEXUE Vol. 41 No. 9
Environmental Science (monthly) Sep. 15, 2020

CONTENTS