DOI：10.11766/trxb202507260360 **CSTR：32215.14.trxb202507260360**

马尚飞，龚鑫，上官华媛，姚海凤，孙新. 18S-rRNA 基因引物选择对城市土壤真核生物多样性评估的影响比较：以宁波市为例[J]. 土壤学报，2026，63（5）：1706–1720.

MA Shangfei，GONG Xin，SHANGGUAN Huayuan，YAO Haifeng，SUN Xin. Comparison of the Influence of 18S-rRNA Gene Primer Selection on the Assessment of Eukaryotic Biodiversity in Urban Soil：A Case Study of Ningbo City[J]. Acta Pedologica Sinica，2026，63（5）：1706–1720.

18S-rRNA 基因引物选择对城市土壤真核生物多样性评估的影响比较：以宁波市为例*

马尚飞[1, 2]，龚　鑫[1]，上官华媛[1]，姚海凤[1, 4]，孙　新[1, 3, 4†]

（1. 区域与城市生态安全全国重点实验室，宁波观测研究站，福建省流域生态重点实验室，中国科学院城市环境研究所，厦门 361021；2. 河北大学生命科学学院，河北保定 071000；3. 宁波（北仑）中科海西产业技术创新中心，浙江省城市环境过程与污染控制重点实验室，浙江宁波 315830；4. 中国科学院大学，北京 100049）

摘　要：土壤真核生物是生态系统健康的关键指示生物，其多样性和群落结构的变化可有效反映土壤质量演变。在基于高通量测序的真核生物多样性研究中，扩增引物的选择直接影响检测类群的序列数，从而决定生物多样性评估的准确性。本研究以宁波市 7 种典型城市土地利用类型的土壤为研究对象，针对两对广泛使用的 18S-rRNA 基因 V4 区引物（NF1F_18Sr2bR、TAReuk454FWD1F_TAReukREV3R）进行扩增，并分析扩增子序列变体（ASVs）、操作分类单元（OTUs）两种生物信息学方法的差异，系统比较不同引物对土壤真核生物群落组成和多样性评估的影响。结果表明，在进行土壤真核生物多样性研究时，NF1F_18Sr2bR 引物扩增的真核生物比例显著高于 TAReuk454FWD1F_TAReukREV3R。引物对土壤真核生物类群具有偏好性，在 ASVs 水平上，NF1F_18Sr2bR 引物偏好原生生物、线虫、节肢动物以及环节动物。在 OTUs 水平上，TAReuk454FWD1F_TAReukREV3R 引物偏好原生生物和节肢动物；NF1F_18Sr2bR 引物则偏好真菌、线虫和环节动物。其中，NF1F_18Sr2bR 引物更适合用于稀有种的检测，其偏向扩增的真菌、线虫、环节动物的稀有种分别占各自总序列数的 12.09%、38.31%、58.33%。TAReuk454FWD1F_TAReukREV3R 更适合用于共有种的检测，其测得不同用地之间的共有 OTUs 达到了 804 条，高于另一条引物。引物和分析方法共同决定了 α 多样性评估的差异，但其不能决定 β 多样性的变化以及环境因子对群落结构的影响。在 α 多样性方面，两条引物在 ASVs 水平上计算的 α 多样性在不同用地之间的差异均多于 OTUs；在 β 多样性方面，OTUs 水平上对群落多样性的解释度高于 ASVs 水平。本研究揭示了引物选择对土壤真核生物多样性评估的关键影响，未来需根据目标类群和研究目的合理选择引物及分析方法，以确保群落结构和多样性评估的准确性。

关键词：城市土壤；18S-rRNA；不同引物扩增；真核生物；多样性评估

中图分类号：Q152/Q157　　**文献标志码：**A

Comparison of the Influence of 18S-rRNA Gene Primer Selection on the Assessment of Eukaryotic Biodiversity in Urban Soil: A Case Study of Ningbo City

MA Shangfei [1, 2], GONG Xin[1], SHANGGUAN Huayuan[1], YAO Haifeng[1, 4], SUN Xin [1, 3, 4†]

* 国家自然科学基金项目（32361143523）和国家重点研发计划项目（2023YFF1304600）资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China（No. 32361143523）and the National Key Research and Development Program of China（No. 2023YFF1304600）

† 通讯作者 Corresponding author，E-mail：xsun@iue.ac.cn

作者简介：马尚飞（2000—），男，硕士研究生，研究方向为土壤真核生物。E-mail：sfma@iue.ac.cn

收稿日期：2025–07–26；收到修改稿日期：2026–01–15；网络首发日期（www.cnki.net）：2026–04–20

(1. *State Key Laboratory of Regional and Urban Ecology*, *Ningbo Observation and Research Station*, *Fujian Key Laboratory of Watershed Ecology*, *Institute of Urban Environment*, *Chinese Academy of Sciences*, *Xiamen* 361021, *China*; 2. *School of Life Science*, *Hebei University*, *Baoding*, *Hebei* 071000, *China*; 3. *Zhejiang Key Laboratory of Urban Environmental Processes and Pollution Control*, *CAS Haixi Industrial Technology Innovation Center in Beilun, Ningbo*, *zhejiang* 315830, *China*; 4. *University of Chinese Academy of Sciences*, *Beijing* 100049, *China*)

Abstract: 【Objective】Soil eukaryotes are key indicator organisms for soil health in ecosystems, and changes in their diversity and community structure can effectively reflect the evolution of soil quality. In high-throughput sequencing-based studies on eukaryotic diversity, the selection of amplification primers directly affects the number of sequences of detected taxa, thereby determining the accuracy of biodiversity assessment. However, the impact of primer selection on the assessment of soil eukaryotic diversity remains timidly explored.【Method】This study focused on soils from seven typical urban land use types in Ningbo City. Amplification was only conducted for two pairs of widely used 18S-rRNA gene V4 region primers (NF1F_18Sr2bR, TAReuk454FWD1F_TAReukREV3R). The study systematically compared the effects of different primers on the assessment of soil eukaryotic community composition and diversity, and analyzed the differences between two bioinformatic methods: Amplicon sequence variants (ASVs) and operational taxonomic units (OTUs).【Result】That the proportion of amplification in eukaryotes for the NF1F_18Sr2bR primer was significantly higher than that of TAReuk454FWD1F_TAReukREV3R. Different primers exhibited a preference for specific soil eukaryotic taxonomic groups. Specifically, at the ASVs level, the NF1F_18Sr2bR primer preferred fungi, protozoa, nematoda, arthropoda, and annelida; at the OTUs level, the TAReuk454FWD1F_TAReukREV3R primer preferred protozoa and arthropoda, while the NF1F_18Sr2bR primer preferred nematoda, and annelida. Among the primers, NF1F_18Sr2bR was more appropriate for detecting rare species. The rare species of fungi, nematoda, and annelida amplified by this primer accounted for 12.09%, 38.31%, and 58.33% of their total sequences, respectively. In contrast, TAReuk454FWD1F_TAReukREV3R was more suitable for detecting shared species, as it detected 804 shared species OTUs across different land use types, which was higher than that detected by the other primer. Both primer selection and analytical methods collectively determine the differences in α-diversity assessment, but they do not determine the variations in β-diversity or the effects of environmental factors on community structure. In terms of α-diversity, for both primer pairs, the differences in α-diversity among different land uses were greater at the ASV level than at the OTU level. With respect to β-diversity, the explanatory power of the OTUs level for community diversity was higher than that of the ASVs level.【Conclusion】This study revealed the critical impact of primer selection on the assessment of soil eukaryotic diversity. In future studies, primers and analytical methods should be selected appropriately based on target taxa and research objectives to ensure the accuracy of community structure and diversity assessment.

Key words: Urban soil; 18S-rRNA; Different primers amplification; Eukaryotes; Diversity assessment

土壤是地球上最为复杂且高度动态的生态系统之一[1]，为数百万种生物提供栖息地，其中蕴藏着极其丰富的真核生物群落。这些真核生物在土壤物质循环与能量流动中发挥着关键作用[2-3]。分子技术的快速发展为土壤生物多样性研究提供了革命性工具，这些技术实现了对土壤中复杂生物群落的精细解析，而环境 DNA（eDNA）技术的应用则极大拓展了该领域的研究深度和广度，尽管土壤生物多样性研究技术日趋成熟，但长期以来，研究焦点主要集中于微生物领域[4]。近年来，研究视野逐渐拓展至土壤真核生物，然而，相关研究大多局限于特定的生物类群，如线虫[5]、环节动物[6]或原生生物[7]，对于整体真核生物多样性的研究尚不足。值得注意的是，不仅不同类群的研究采用不同的引物策略，即便是针对同一类群，不同研究也常使用相异的引物组合。更关键的是，即使是那些旨在评估整体真核生物多样性的研究，也因缺乏标准化的引物选择而面临结果可比性差的问题。例如，Köninger 等[8]应用 Euk575F_Euk895R 探究了欧洲大陆不同土地利用下的真核群落，Aslani 等[9]则在全球尺度研究中仅使用了 1389f_1510r 引物，刘卫东等[10]发现 V4（F/R）对海洋微型和微微型藻类多样性检测更为高效，这种普遍存在的引物选择的差异严重阻碍了不同研究结果的整合与比较。因此，系统性地筛选高效且具有广泛覆盖能力的引物，对于实现土壤真核生物多样性评估至关重要。

目前，大多数研究土壤真核生物群落多样性的方法是基于18S-rRNA基因的扩增子测序分析[11-12]。该方法因其靶标基因在真核生物中广泛存在且具有高度保守性，成为研究土壤真核生物的理想选择。然而，在这些研究中，研究方法的选择对结果准确性至关重要，其中引物设计直接影响扩增效果，而数据分析方法扩增子序列变体（ASVs）/操作分类单元（OTUs）则决定分辨率水平。常用的18S-rRNA基因特定区域的引物包括 EF4-EF3[13]、TAReuk454FWD1F_TAReukREV3R[14] 、 NF1F_18Sr2bR[15] 、1380f/1510r[16]、rbcL-F/rbcL-R[17]等。研究表明，不同引物对真核生物类群的扩增偏好性存在一定差异。例如，Smit 等[18]发现 EF4-EF3 引物对担子菌门（Basidiomycota）具有偏好性，而 TAReuk454FWD1F_TAReukREV3R 和 E572F_E1009R 引物更倾向于扩增原生生物；Ficetola 等[19]的研究表明，NF1F_18Sr2bR 引物对线虫（Nematoda）具有较高的物种覆盖率；Sun 等[20]研究发现，3NDf/C_1132rmod 引物较 NF1F_18Sr2bR 引物更适合扩增线虫；Yu 等[21]发现 ITS3_ITS4 引物较其他引物更加适合扩增森林中的真菌多样性。因此，对于土壤真核生物多样性研究中的引物选择，仍无统一定论。在数据分析过程中，目前通常采用两种主要的代表性序列获取方法：OTUs 和 ASVs。OTUs 是基于序列97%的相似度阈值进行聚类得到的序列簇。该方法通过将相似序列归并为同一单元，降低数据复杂度，减少计算需求，但可能掩盖细微的遗传变异。相比之下，ASVs 方法不依赖聚类，而是将测序数据中的每个独特序列视为独立的变体，从而提高了分辨率和分析灵敏度，但是这样可能导致群落 α 多样性被高估。目前已经有研究比较了 ASVs 与 OTUs 对细菌群落的差异，例如，Nearing 等[22]发现 OTUs 方法相较于 ASVs 可能高估细菌群落的丰富度。然而，ASVs 与 OTUs 在土壤真核生物群落分析中的适用性差异仍不明确，值得进一步探究。

针对上述研究背景，本研究以宁波市为例，选取土壤真核生物 18S-rRNA 区域的 2 种常用引物（NF1F_18Sr2bR、TAReuk454FWD1F_TAReukREV3R）对 7 种用地类型（森林、农田、公园、居民区、工业区、绿化带、医院）的土壤样本开展扩增子测序。通过系统比较 ASVs 和 OTUs 两种分析方法，本研究探讨以下科学问题：（1）在土壤真核生物多样性检测中，不同引物在扩增序列数目方面是否存在显著差异？（2）ASVs 和 OTUs 在评估真核生物群落组成时是否具有显著的差异？（3）在评估真核生物群落组成及不同用地类型中土壤真核生物多样性格局时，不同引物是否会导致评估结果出现显著差异？本研究的结果将为现有的真核生物多样性分析方法提供理论基础，为理解土壤真核生物多样性、评估其在土壤退化与污染修复过程中的生态系统功能以及生物多样性保护策略的制定提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样本采集

本研究选取浙江省宁波市（28°51′—30°33′N，120°55′—122°16′E）为研究区。该地区属于亚热带季风气候，四季分明，年平均降水量约为 1 440 mm[23]。宁波市地形地貌多样，土壤类型存在显著的空间异质性。本研究选取七种主要用地类型进行土壤采样，包括森林（Forest）、农田（Farmland）、公园（Park）、居民区（Residential area）、工业区（Industrial area）、绿化带（Greenbelt）及医院（Hospital）。本次采样总共设置 46 个采样点，其中涵盖城郊（森林 8 个、农田 4 个）与城市地区（公园 8 个、居民区 8 个、工业区 6 个、绿化带 8 个、医院 4 个）。采样方案设计如下：在每个采样点随机选取 20 m × 20 m 的样方，在每个样方中，使用土钻（直径 5.5 cm，深度 10 cm）收集 9 个土芯后，充分混匀形成复合样品。复合样品分为两部分：一部分样品运输至实验室，随后保存在–20 ℃，用于土壤真核生物 DNA 的提取；另一部分样品放置在实验室中自然风干，用于土壤理化指标测定。

1.2 土壤 DNA 提取和 PCR 测序

称取 0.5 g 土壤，使用土壤 DNA 试剂盒（MP Biomedicals，Solon，OH，美国）提取 DNA，利用 NanoDrop ND-2000 分光光度计（Thermo Fisher Scientific，Wilmington，美国）测量已提取 DNA 的纯度及浓度，并将其稀释至 1 ng·μL^{-1}。利用高通量二代测序技术对真核生物 18S-rRNA 的 V4 区进行分析，扩增的引物组分别为 NF1F_18Sr2bR[11] 和 TAReuk454FWD1F_TAReukREV3R[14]。反应体系：0.5 × TransStart FastPfu 缓冲液 4 μL，2.5 mmol·L^{-1}

dNTPs 2 μL，上游引物（5 μmol·L^{-1}）0.8 μL，下游引物（5 μmol·L^{-1}）0.8 μL，TransStart FastPfu DNA 聚合酶 0.4 μL，模板 DNA 10 ng，反应体系补足 20 μL。扩增程序如下：在 95 ℃环境下预变性 3 min，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s，进行 27 个循环，最后在 72 ℃进行稳定延伸 10 min，扩增结束后将反应管转至 4 ℃保存。PCR 的产物从 2%的琼脂糖凝胶中提取，随后使用 AxyPrep DNA 凝胶提取试剂盒（AxyPrep Biosciences，Calif，美国）纯化，使用 TruSeg®DNA PCR-Free 样品制备试剂盒（Illumina，San Diego，美国）制备测序文库，根据制造商的说明使用 Quantus™ 荧光计（Promega，美国）进行文库质控，使用 Qubit 荧光计或 Nanodrop 等设备进行文库浓度和纯度的测量，质量合格后将该文库放在 Illumina MiSeq PE300 平台上进行测序。

1.3　生物信息学分析

使用 FLASH 1.2.10[24]合并末端配对的原始测序读段（reads），使用微生物生态学定量洞察 2（QIIME 2）软件包处理测序数据。扩增子序列变体（ASVs）的获取是利用分裂扩增子去噪算法 2（DADA2）流程对原始序列进行高质量的过滤、去噪和嵌合体检测，最终生成 ASV 特征表及对应的 ASV 代表序列，而操作分类单元 OTUs 则是在 97%的相似性阈值下使用 UPARSE 7.0.1090 进行聚类，最终生成 OTU 特征表及对应的 OTU 代表序列，二者均选用了相同的数据库与注释方法（PR2 数据库，classify-sklearn 分类器），移除了在所有样本中总出现频率小于 10 的 ASV/OTU，以所有样本的最低测序深度进行抽平，消除不同样本测序深度差异的干扰，以确保两种分析方法的结果具备横向可比性。去除了在界水平上未分类的真核生物的序列，将剩余的序列作为总体真核生物。

1.4　统计分析

后续分析均在抽平后的 ASV/OTU 丰度表上进行，并使用 R.4.4.1 进行数据分析，所有图片均使用“*ggplot2*”包进行绘制。采用 R 中的“vegan”包对测序数据进行稀疏曲线分析，以评估测序深度对样本物种丰度（abundance）估计的充分性。为解析不同用地类型样本间土壤真核生物类群的共有种，采用 UpSetR 包构建 UpSet 图，以多维集合可视化方式展示不同引物扩增下的土壤真核生物 OTU/ASV 水平的交集分布特征。运用 Richness 指数代表 α 多样性指数[25]，采用 Shapiro-Wilk 检验法验证正态性分布结果，发现并非所有类群的数据均遵循正态分布。因此，对比不同用地之间的 α 多样性差异采用非参数的 Kruskal-Wallis 检验[26]，若差异显著，则使用 Dunn's Kruskal-Wallis 进行多重比较，采用 Bonferroni 法对多重比较的 *P* 值进行矫正[27]。稀有种定义为仅出现在低于 10%的样本中的物种，比例为各物种稀有种数目占各物种总序列数目的百分比。主坐标分析（PCoA）是基于布雷-柯蒂斯距离（Bray-Curtis distances）去评估不同绿地之间真核生物的群落结构差异，进一步使用函数“adnois2”进行置换多元方差分析（PERMANOVA）分析[28]，随后利用冗余分析（RDA）和典范对应分析（CCA）研究不同引物扩增的真核生物类群分的布格局，并且识别主要的理化因子。

2　结　果

2.1　两对引物扩增的 ASVs 和 OTUs 数量及分布

TAReuk454FWD1F_TAReukREV3R 引物得到的平均 ASVs 和 OTUs 数量（567 和 1120）多于 NF1F_18Sr2bR（427 和 741）（表 1）。两对引物扩增的 ASVs 与 OTUs 均达到了满足统计分析需求的测序深度（图 1）。在 ASVs 水平上，NF1F_18Sr2bR 引物扩增的原生生物（43.8%）、线虫（5.8%）、节肢动物（3.2%）以及环节动物（0.9%）比例均高于 TAReuk454FWD1F_TAReukREV3R 引物所扩增的真核生物类群；在 OTUs 水平上，TAReuk454FWD1F_TAReukREV3R 引物扩增的原生生物（67.4%）比例高于 NF1F_18Sr2bR 引物，而 NF1F_18Sr2bR 引物扩增的其他类群比例高于 TAReuk454FWD1F_TAReukREV3R 引物（表 1）。

2.2　基于两对引物扩增 ASVs 和 OTUs 数据计算的稀有种占比及不同用地土壤真核生物群落交集特征

两对引物扩增的 OTUs 序列在计算稀有物种方面有显著的优势，绝大多数 OTUs 序列计算的土壤真核生物稀有率超过了 10%，远高于 ASVs（表 2）。引物对不同真核生物稀有种有显著的偏向性，在 ASVs 水平上，NF1F_18Sr2bR 引物扩增的真菌、原

表 1 不同引物扩增的真菌、原生生物、线虫、节肢动物、环节动物的平均扩增子序列变体（ASVs）数目和平均操作分类单元（OTUs）数目以及它们占总体真核生物的比例

Table 1 The average number of amplicon sequence variants（ASVs），average number of operational taxonomic units（OTUs），and their respective proportions of the total eukaryotic community for fungi，protozoa nematoda，arthropoda and annelida amplified by different primer sets

	NF1F_18Sr2bR（MAs）	TAReuk454FWD1F_TAReukREV3R（MAs）	NF1F_18Sr2bR（MOs）	TAReuk454FWD1F_TAReukRER（MOs）
真菌 Fungi	184±7（43%）b	296±11（52%）a	289±7（39%）a	189±6（17%）b
原生生物 Protozoa	187±10（44%）a	162±13（28.6%）b	334±10（45%）b	755±18（67%）a
线虫 Nematoda	25±1（6%）a	15±1.32（2.6%）b	31±1（4%）b	41±1（4%）a
节肢动物 Arthropoda	14±1（3%）b	18±2（3%）a	20±1（3%）b	29±2（3%）a
环节动物 Annelida	4±0.3（1%）a	1±0.2（0.2%）b	3±0.3（0.4%）b	7±0.5（1%）a
总体真核生物 Total eukaryotes	427±14b	567±20a	742±15b	1 120±23a

注：数据为平均值±标准误差（n= 64）；括号内数据为单类真核生物平均 ASVs 数目和平均 OTUs 数目占总体真核生物的比例；同行不同小写字母表示不同引物相同分析方法的显著性差异。MAs：平均 ASVs，MOs：平均 OTUs。下同。Note：Data are presented as mean ± standard error(n = 64); values in parentheses represent the proportions of the mean number of ASVs and mean number of OTUs of individual eukaryotic taxa relative to the total eukaryotes. Different lowercase letters within the same row indicate significant differences among different primers under the same analytical method. MAs：Mean ASVs，MOs：Mean OTUs. The same below.

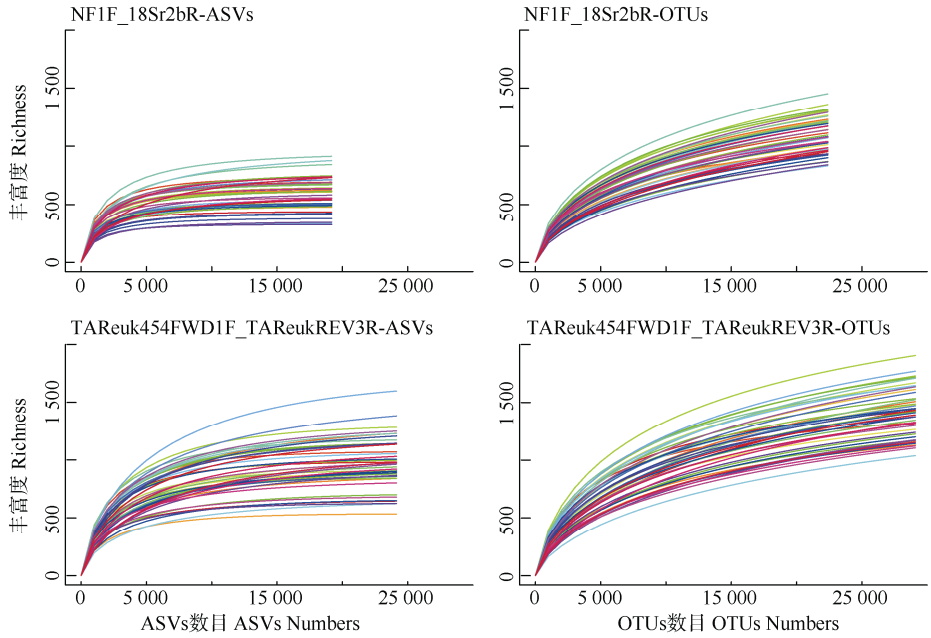


图 1 不同引物扩增的 ASVs 与 OTUs 稀疏曲线，不同颜色线条代表不同样本丰富度

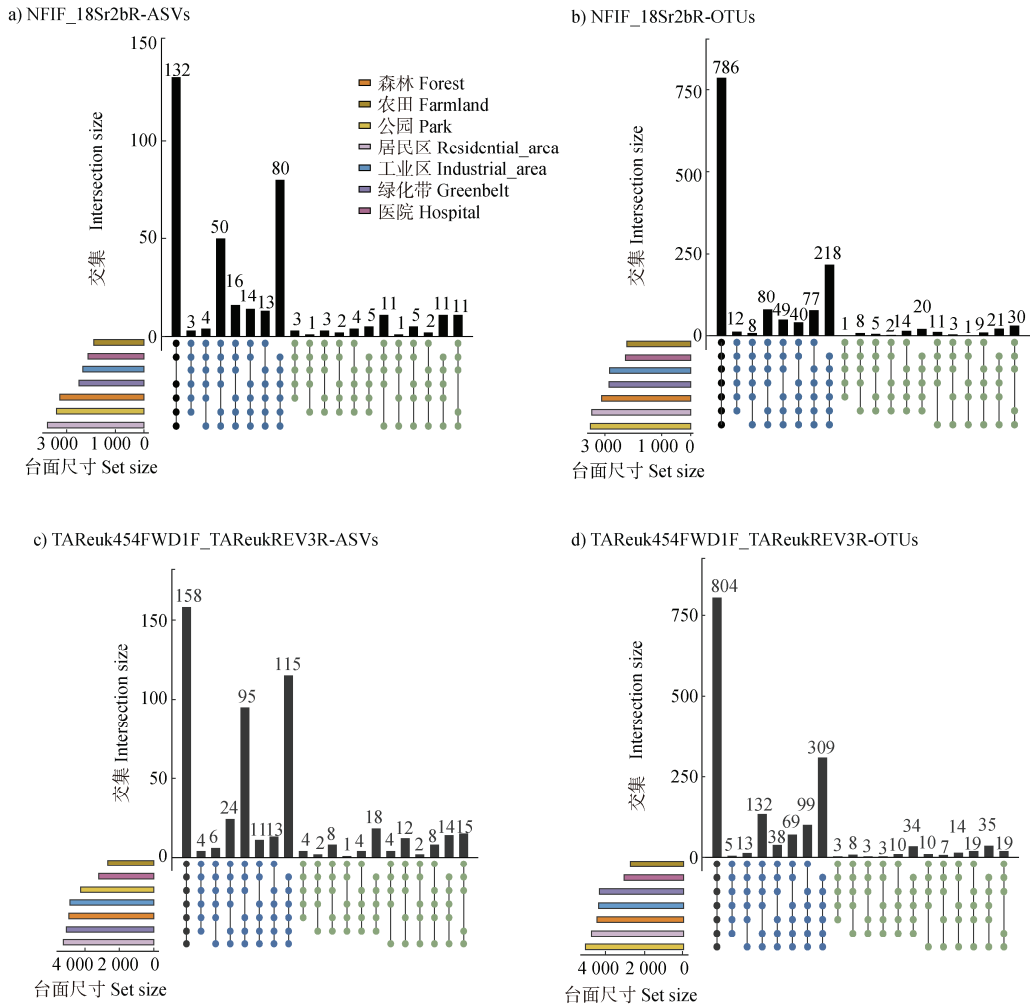
Fig. 1 Rarefaction curves of asvs and otus amplified by different primers，lines of different colors represent the richness of different samples

生生物、线虫、节肢动物、环节动物的稀有种占比分别为 7.81%、3.62%、10.59%、10.66%、20%，显著高于 TAReuk454FWD1F_TAReukREV3R 引物；在 OTUs 水平上，NF1F_18Sr2bR 引物扩增的真菌、线虫和环节动物分别为 12.09%、38.31%、58.33%，显著高于 TAReuk454FWD1F_TAReukREV3R 引物，两条引物扩增的 OTUs 在不同用地之间检测出来的土壤真核生物共有种显著高于通过 ASVs 检测得到的土壤真核生物（图 2）。TAReuk454FWD1F_TAReukREV3R 引物扩增土壤真核生物序列，经 DADA2 去噪获得的扩增子序列变体（ASV）在不同用地类型间的共有单元数为 158 个；经 UPARSE

表 2　不同引物扩增的真菌、原生生物、线虫、节肢动物、环节动物以及总体稀有真核生物的稀有种数目及其占各自类群数目的比例

Table 2　Number of rare species of fungi，protozoa，nematoda，arthropoda，annelida，and total rare eukaryotes amplified by different primers，and their proportion relative to the number of their respective groups.

	NF1F_18Sr2bR（ASVs）	TAReuk454FWD1F_TAReukREV3（ASVs）	NF1F_18Sr2bR（OTUs）	TAReuk454FWD1F_TAReukREV3R（OTUs）
真菌 Fungi	253（8%）	194（4%）	179（12%）	118（9%）
原生生物 Protozoa	108（4%）	58（1%）	120（7%）	309（7%）
线虫 Nematoda	50（11%）	29（6%）	95（38%）	70（19%）
节肢动物 Arthropoda	34（11%）	43（8%）	28（14%）	50（16%）
环节动物 Annelida	10（20%）	1（3.85%）	7（58%）	10（38%）
总体稀有真核生物 Total rare eukaryotes	512（7%）	462（5%）	437（11 %）	664（10%）



注：柱状图上面的数字代表不同用地之间的共有数目，相同点颜色代表对应用地之间的交互作用。Note：The numbers above the bar charts indicate the shared counts between different land use types，and nodes of the same color represent the interactions between the corresponding land use types.

图 2　不同引物扩增的 ASVs 与 OTUs 在不同用地之间的重叠

Fig. 2　Overlap of ASVs and OTUs amplified by different primers among different land use types

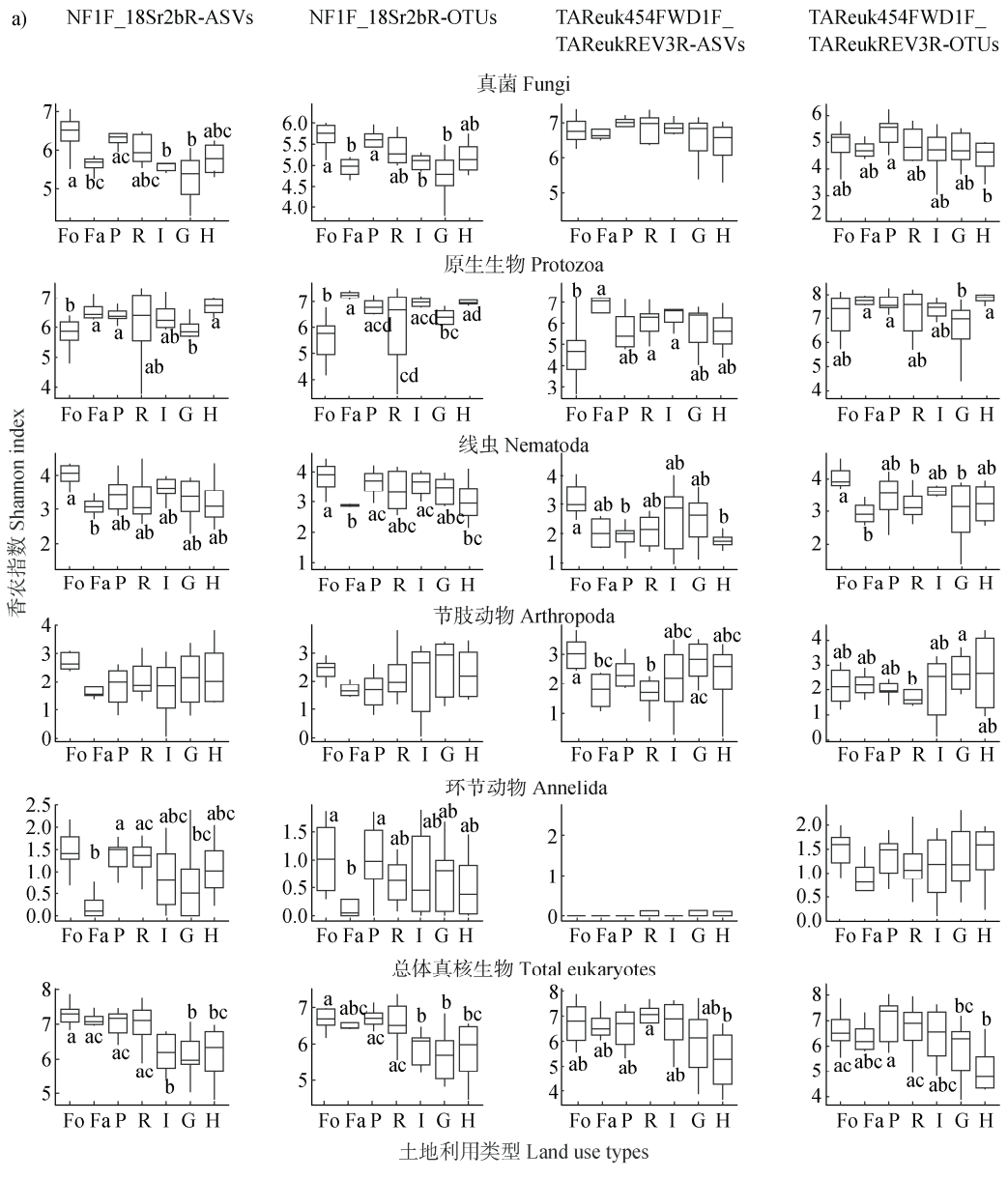
7.0.1090 聚类（97% 相似性阈值）获得的操作分类单元（OTU）共有单元数为 804 个，均高于 NF1F_18Sr2bR 引物。

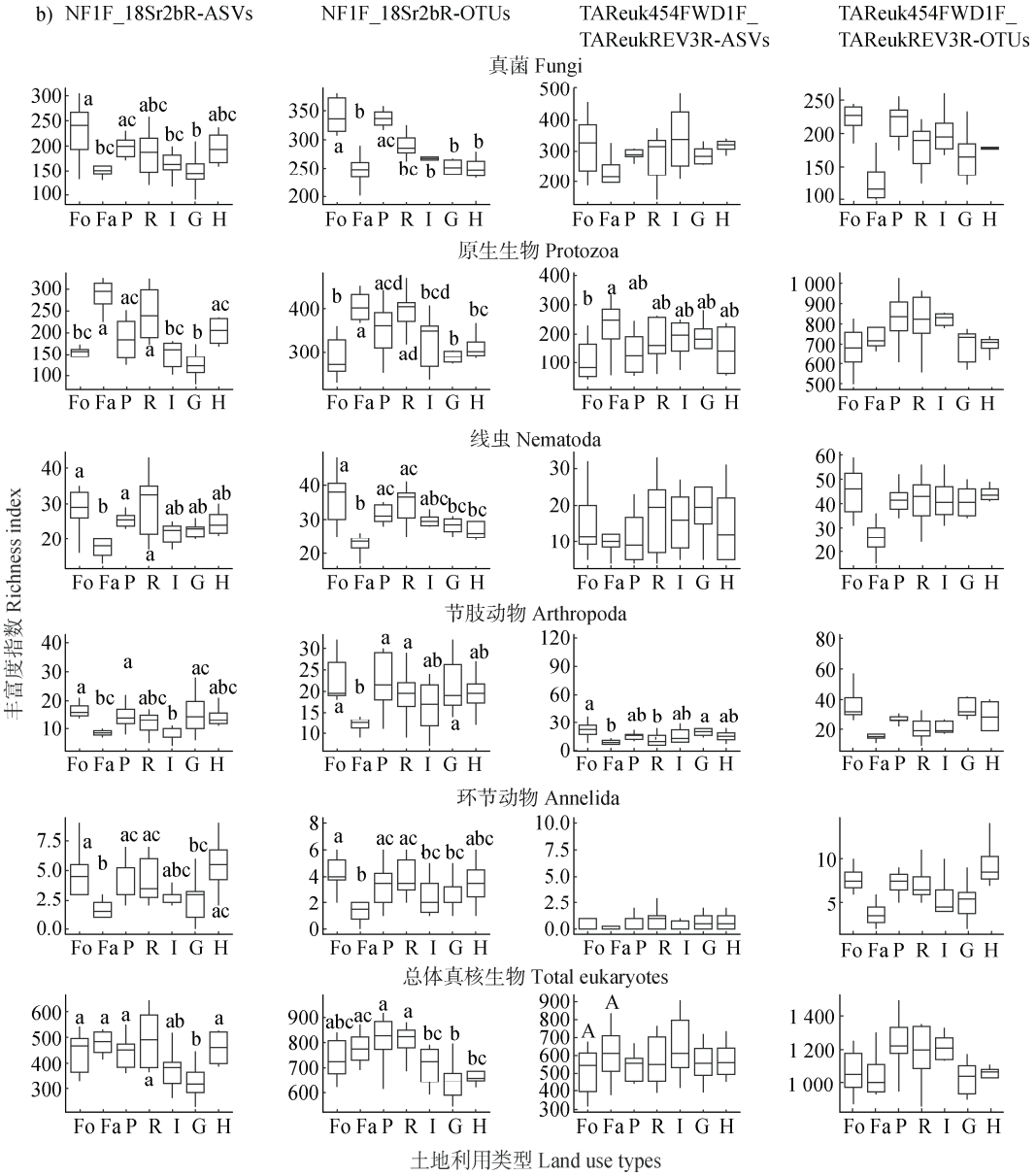
2.3 基于两对引物扩增的 ASVs 和 OTUs 数据计算的 α 多样性指数

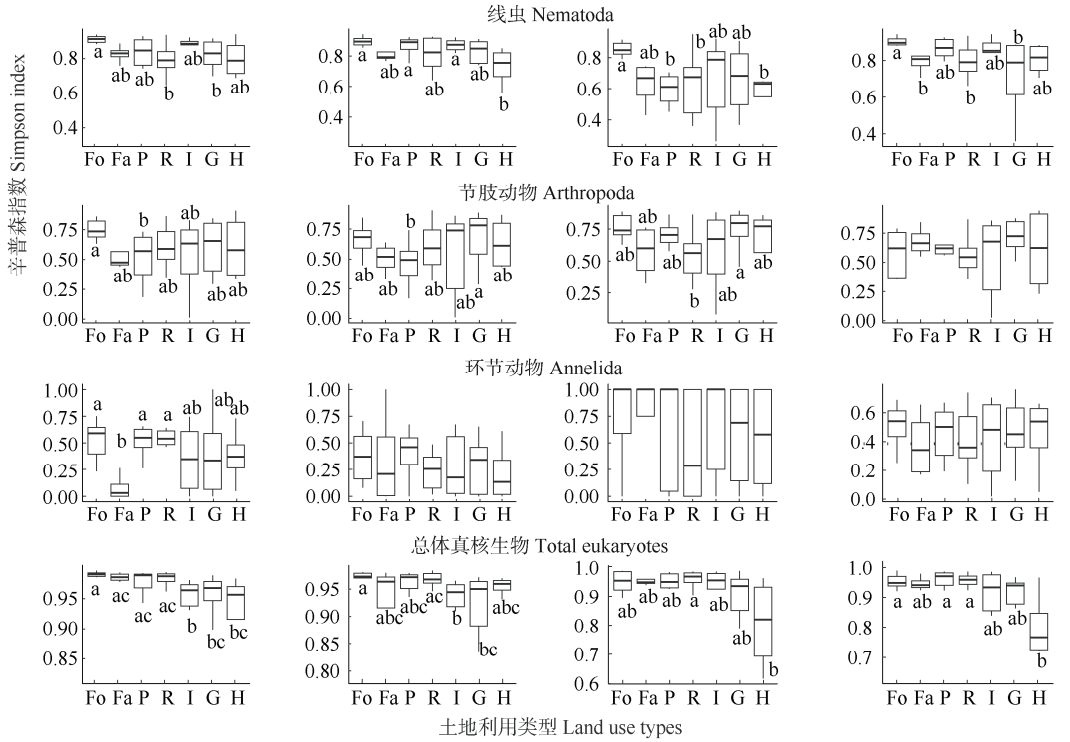
研究结果显示，分析水平与不同引物共同影响了不同土地利用类型间真核生物 α 多样性格局的差异。基于两对引物扩增所得 ASVs 与 OTUs 数据计算得到的香农（Shannon）指数，可测得相同生物类群在不同用地之间的差异（图 3b）；对于丰富度（Richness）、辛普森（Simpson）和均匀度（Pielou）指数（图 3a～图 3c），在 ASVs 水平上测得的物种在不同用地之间的差异大于在 OTUs 水平上所测得的差异。NF1F_18Sr2bR 引物可测得更多的用地差异（图 3）

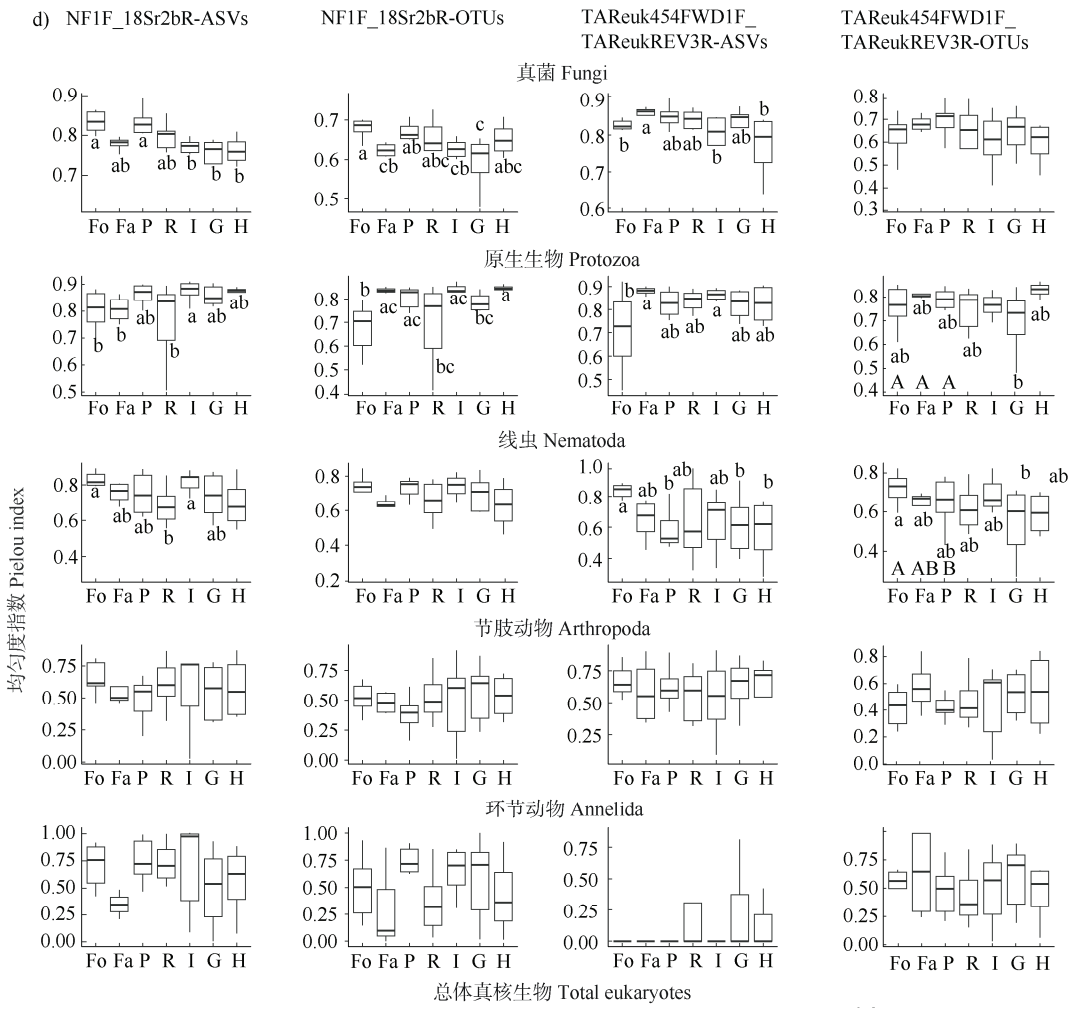
2.4 基于两对引物扩增的 ASVs 和 OTUs 数据进行 β 多样性检验以及环境因子对 β 多样性的影响

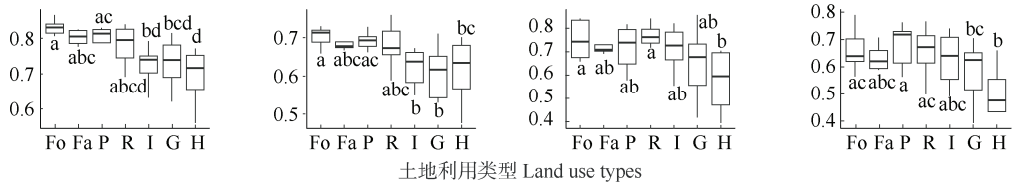
不同引物对的选择以及不同分析方法对真核生物 β 多样性无显著影响，三种分析均为 OTUs 较 ASVs 具有更高的解释度（图 4，图 5）。在主成分分析中，几乎所有的分析均显示真核生物在不同土地利用类型之间具有显著差异，且主要表现为森林与农田的差异。在冗余分析与典范对应分析中，ASVs 水平上以典范对应分析为主，OTUs 水平上以冗余分析为主，并且引物与分析方法并不影响环境因子对真核生物多样性的影响。




b) NF1F_18Sr2bR-ASVs
NF1F_18Sr2bR-OTUs
TAReuk454FWD1F_ TAReukREV3R-ASVs
TAReuk454FWD1F_ TAReukREV3R-OTUs
真菌 Fungi
原生生物 Protozoa
线虫 Nematoda
节肢动物 Arthropoda
环节动物 Annelida
总体真核生物 Total eukaryotes
丰富度指数 Richness index
Fo Fa P R I G H
土地利用类型 Land use types
c) NF1F_18Sr2bR-ASVs
NF1F_18Sr2bR-OTUs
TAReuk454FWD1F_ TAReukREV3R-ASVs
TAReuk454FWD1F_ TAReukREV3R-OTUs
真菌 Fungi
原生生物 Protozoa
线虫 Nematoda


线虫 Nematoda
节肢动物 Arthropoda
环节动物 Annelida
总体真核生物 Total eukaryotes
辛普森指数 Simpson index
Fo Fa P R I G H


d) NF1F_18Sr2bR-ASVs
NF1F_18Sr2bR-OTUs
TAReuk454FWD1F_ TAReukREV3R-ASVs
TAReuk454FWD1F_ TAReukREV3R-OTUs
真菌 Fungi
原生生物 Protozoa
线虫 Nematoda
节肢动物 Arthropoda
环节动物 Annelida
总体真核生物 Total eukaryotes
均匀度指数 Pielou index
Fo Fa P R I G H



注：采用邓肯（Dunn）检验用于多重比较：不同小写字母代表土地利用类型间的差异显著性（P<0.05）。 Fo：森林；Fa：农田；P：公园；R：居民区；I：工业区；G：绿化带；H：医院。Note：. The Dunn test was used for multiple comparisons：lowercase letters indicate significant differences among land use types. Fo：Forest；Fa：Farmland；P：Park；R：Residential_area；I：Industtrial_area；G：Greenbelt；H：Hospital.

图 3　采用两种不同引物（NF1F_18Sr2bR 和 TAReuk454FWD1F_TAReukREV3R）以及基于 ASVs 和 OTUs 方法分析真菌、原生生物、线虫、节肢动物、环节动物以及总体真核生物在不同土地利用类型之间的 α 多样性差异

Fig. 3　Differences α diversity in fungi、protozoa、nematoda、arthropoda、annelida and total eukaryotes among different land use types using two distinct primer pairs（NF1F_18Sr2bR and TAReuk454FWD1F_TAReukREV3R）based on the ASVs and OTUs methods

3　讨　论

3.1　不同引物的扩增特异性

不同引物会影响 ASVs 和 OTUs 的比例及其分布，这导致利用一种引物研究整体的真核生物具有偏差，因此，在进行序列研究时应当整合多种引物。NF1F_18Sr2bR 引物组合在真核生物序列的扩增比例上显著优于 TAReuk454FWD1F_TAReukREV3R，且对真菌、线虫及环节动物的稀有种检测率显著高于后者（表 2），这可能与 NF1F_18Sr2bR 引物本身靶标基因的分子特征密切相关。它们的 18S-rRNA 基因通常具有较高的拷贝数[29]，在 PCR 扩增中可通过模板量优势降低稀有种漏检风险；同时，该引物靶向可能含有真菌特异性鸟嘌呤-胞嘧啶碱基（G-C）富集模体和线虫的保守序列，其序列特异性结合能力可抑制非目标类群的竞争扩增，从而提升目标类群的检测灵敏度。对于原生生物而言，其 18S-rRNA 基因的高变异性可与 TAReuk454FWD1F_TAReukREV3R 引物的简并设计形成一定的互补，从而为复杂环境中原生生物多样性的精准评估提供了关键技术支撑。

3.2　不同生物学方法的物种分辨率

在不同分辨率水平上，ASVs 的数量普遍高于 OTUs（表 1）。这与 de Santiago 等[30]的结果相反，他们发现 OTUs 聚类会夸大实际产生的 OTUs 数目，使其产生的量较 ASVs 高 20 倍。而 ASVs 数目大于 OTUs 可能是因为 ASV 具有较高的分辨率，可识别更多变异序列，而 OTUs 方法可能会合并相似的序列，导致特征序列数目减少。但是 OTUs 在稀有种检测率和共有种的检测中表现出显著优势（表 1），这与 Callahan 等[31]的结果相反，他们认为在 18S-rRNA 测序中 ASVs 在检测稀有类群方面具有显著优势，而 Joos 等[32]发现真菌稀有率在 OTUs 水平上显著高于 ASVs。这种现象可能是由数据集大小和不同算法类型共同决定的，相较于 UPARSE 聚类而言，DADA2 算法通常序列质量控制标准更高，错误矫正流程更严谨，因此产生的假阳性更少[33]。而 UPARSE 聚类通过设定相似性阈值（如 97%）整合低丰度序列，许多未经正常比对的序列被计入体系，这可能会导致假阳性更高，掩盖稀有种的真实变异，从而导致稀有率和共有种数目提高。除此之外，Siegwald 等[34]曾指出，低复杂度数据集的分析通常颇具挑战性，这可能是因为此类数据集包含更多低丰度类群，而 OTUs 的核心算法对这类低丰度序列的捕获能力更强，更容易检测到这些低丰度类群的序列信息，最终导致 OTUs 方法测得的群落稀有率结果高于 ASVs 方法。

3.3　不同引物选择对城市土壤真核生物多样性评估的影响

不同引物和不同分析方法的选择会显著影响土壤真核生物类群的 α 多样性格局（图 3），这与 Oliverio 等[35]的观点相同，他们发现 ASVs 较 OTUs 能更好地解析真核生物地理分布格局，尽管如此，OTUs 的分析结果仍然能一定程度上为 ASVs 提供有用的参考。NF1F_18Sr2bR 引物可测得更多的用地

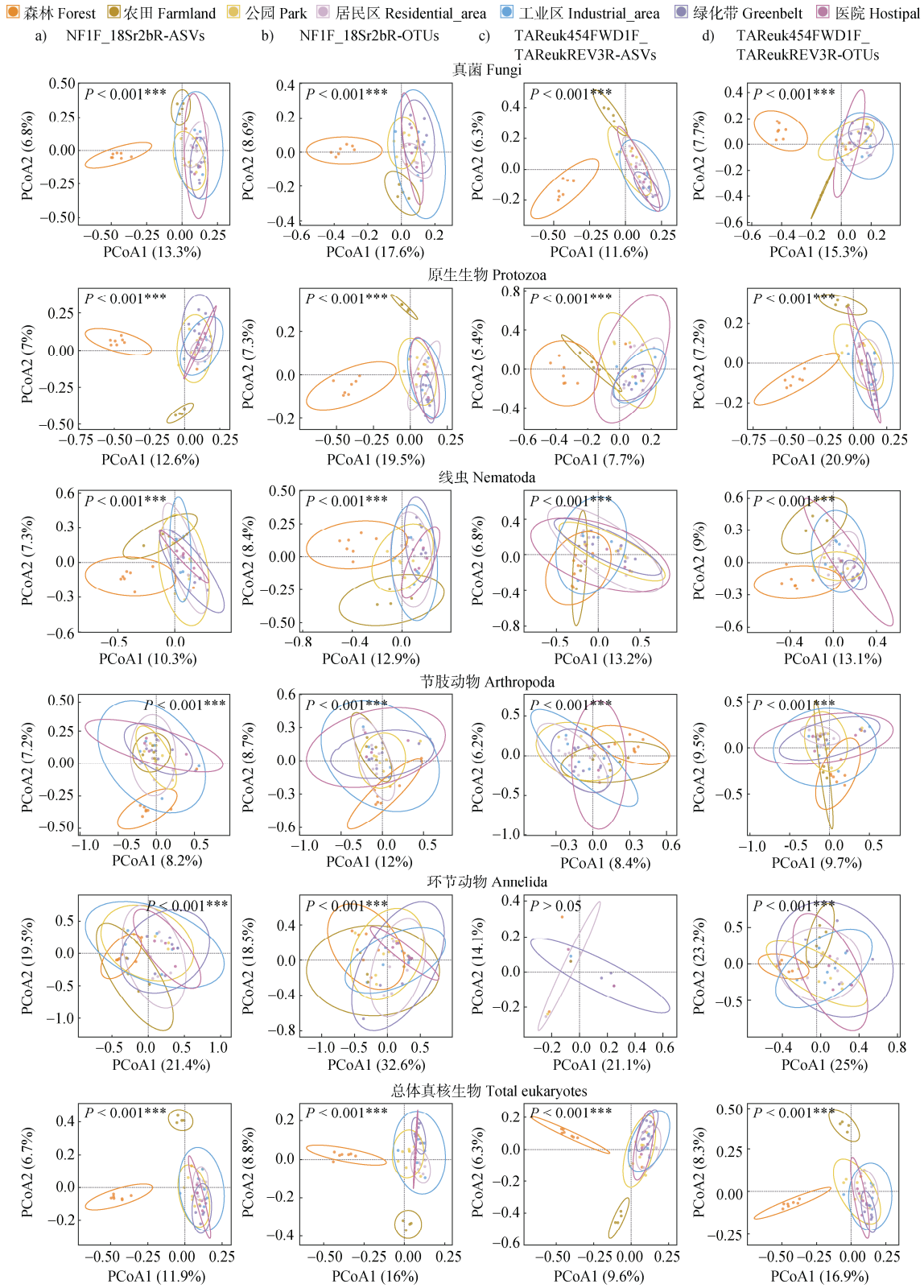
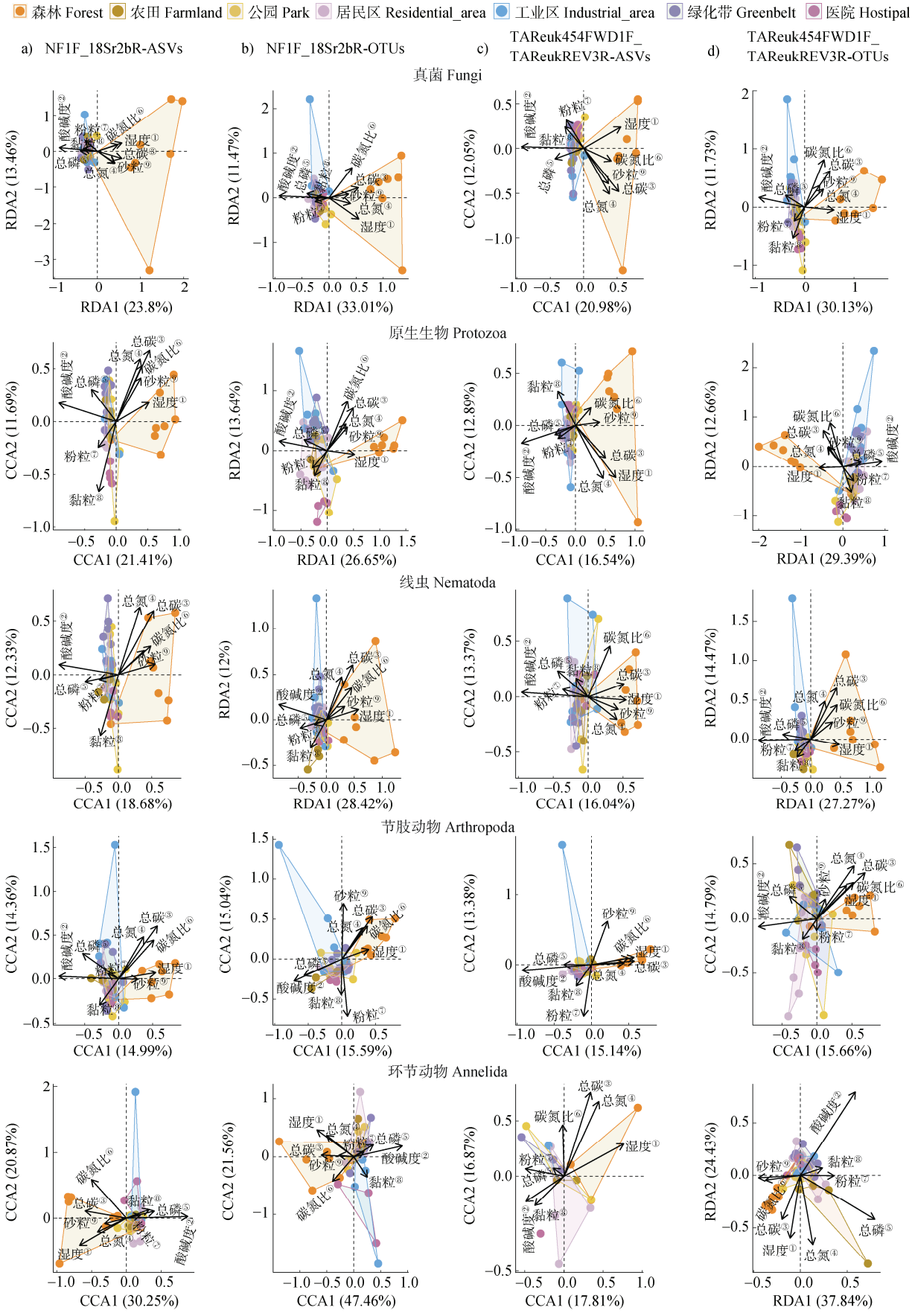
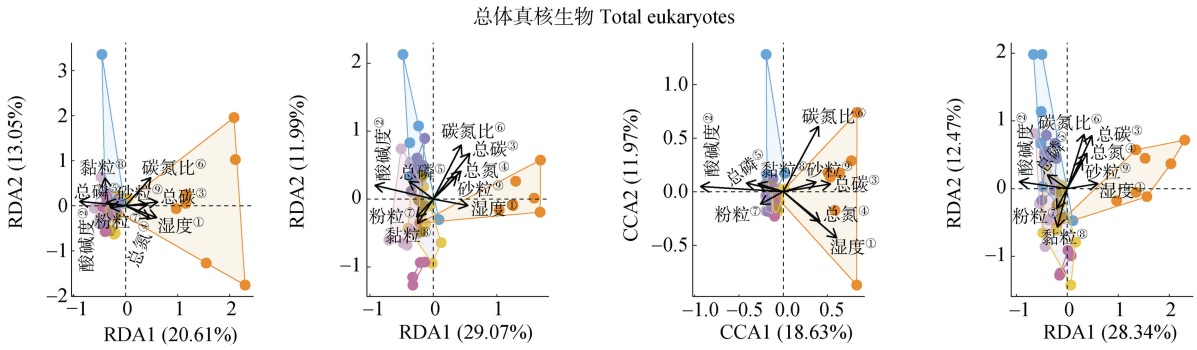


图 4 采用两种不同引物（NF1F_18Sr2bR 和 TAReuk454FWD1F_TAReukREV3R）以及基于 ASVs 和 OTUs 方法分析的不同用地类型土壤中真菌、原生生物、线虫、节肢动物、环节动物以及总体真核生物的主坐标分析（PCoA）

Fig. 4 Principal component analysis (PCoA) of fungi、protozoa、nematoda、arthropoda、annelida and total eukaryotes in soils under different land use types, using two distinct primer pairs (NF1F_18Sr2bR and TAReuk454FWD1F_TAReukREV3R) and analyses based on the ASVs and OTUs methods


森林 Forest
农田 Farmland
公园 Park
居民区 Residential_area
工业区 Industrial_area
绿化带 Greenbelt
医院 Hostipal
a) NF1F_18Sr2bR-ASVs
b) NF1F_18Sr2bR-OTUs
c) TAReuk454FWD1F_ TAReukREV3R-ASVs
d) TAReuk454FWD1F_ TAReukREV3R-OTUs
真菌 Fungi
原生生物 Protozoa
线虫 Nematoda
节肢动物 Arthropoda
环节动物 Annelida
RDA1 (23.8%)
RDA2 (13.46%)
RDA1 (33.01%)
RDA2 (11.47%)
CCA1 (20.98%)
CCA2 (12.05%)
RDA1 (30.13%)
RDA2 (11.73%)
CCA1 (21.41%)
CCA2 (11.69%)
RDA1 (26.65%)
RDA2 (13.64%)
CCA1 (16.54%)
CCA2 (12.89%)
RDA1 (29.39%)
RDA2 (12.66%)
CCA1 (18.68%)
CCA2 (12.33%)
RDA1 (28.42%)
RDA2 (12%)
CCA1 (16.04%)
CCA2 (13.37%)
RDA1 (27.27%)
RDA2 (14.47%)
CCA1 (14.99%)
CCA2 (14.36%)
CCA1 (15.59%)
CCA2 (15.04%)
CCA1 (15.14%)
CCA2 (13.38%)
CCA1 (15.66%)
CCA2 (14.79%)
CCA1 (30.25%)
CCA2 (20.87%)
CCA1 (47.46%)
CCA2 (21.56%)
CCA1 (17.81%)
CCA2 (16.87%)
RDA1 (37.84%)
RDA2 (24.43%)



注：采用 Kruskal-Wallis 检验不同用地类型之间的差异(*P<0.05)；OTUs 与 ASVs 和环境因子一同呈现。Note：The Kruskal-Wallis test was used to determine differences among different land use types (*P<0.05)；OTUs，ASVs，and environmental factors are presented together. ①Moisture，② pH，③ Total carbon，④ Total nitrogen，⑤ Total phosphorus，⑥ Carbon nitrogen ratio，⑦ Silt，⑧ Clay，⑨ Sand.

图 5 采用两种不同引物（NF1F_18Sr2bR 和 TAReuk454FWD1F TAReukREV3R）以及基于 ASVs 和 OTUs 方法分析不同用地类型与环境因子对真菌、原生生物、线虫、节肢动物、环节动物以及总体真核生物群落的冗余分析（RDA）与典范对应分析（CCA）

Fig. 5 Redundancy analysis (RDA) and canonical correspondence analysis (CCA) of fungi、protozoa、nematoda、arthropoda、annelida and total eukaryotic communities in relation to different land use types and environmental factors，using two distinct primer pairs (NF1F_18Sr2bR and TAReuk454FWD1F_TAReukREV3R) and analyses based on the ASVs and OTUs methods

差异（图 1），这种偏差可能与其 PCR 循环次数设置不当、基因变异、引物自身产生二聚体等因素有关。例如，Schenk 等[36]发现基因变异会导致基因拷贝数发生改变，进而导致物种在注释过程中出现不可避免的偏差，从而导致某些点物种的改变。除此之外，引物扩增区域的结合是否紧密也是重要原因，如果与某一类群的模板序列结合不紧密，就会造成 PCR 过程中该类群的 OTUs/ASVs 数量被严重低估。因此，在进行多样性格局分析时，有必要整合多个分析方法的结果，并用多个不同引物进行交叉结果验证。β 多样性未被显著影响（图 4），这可能是因为 Bray-Curtis 系数作为一种相似性度量方法，具有合理的前提条件（如联合缺失的独立性），且易于捕捉重要的群落关系[37]，因此，基于该系数计算的 β 多样性结果始终保持一致性。OTUs 较 ASVs 解释度高（图 4，图 5）可能是由于 ASVs 会保留所有细微的变异，包括一些不代表真实物种分化的序列会因此而改变，而这些变化可能掩盖样本间群落结构的主要变化趋势，引物与生物学方法不会影响环境因子与群落多样性之间的相似性，在凋落物和真菌的研究中也得到了相同的结果[32, 38]，这说明可将两种引物结合起来作为交叉验证的工具，从而增强环境遗传研究中生态学结论的可靠性。

4 结 论

本研究选择了两对针对土壤真核生物的引物，通过扩增 18S-rRNA 基因的 V4 区域，对土壤真核生物（主要包括真菌、原生生物、线虫、节肢动物及环节动物）进行 α 与 β 多样性分析。结果表明，不同引物以及不同分类单元策略均会对真核生物 α 多样性检测产生显著影响。单一引物的特异性与覆盖范围存在固有局限，可能会遗漏某些真核生物的稀有种类，从而无法全面揭示土壤生态系统中的物种丰富度及群落变化。基于上述结论，未来在城市土壤生态研究与实践中，应针对特定目标类群设计高适配性的引物，构建科学规范的标准化检测技术体系，为生物多样性的精准保护提供坚实的技术支撑，进而有力保障城市土壤生态系统的健康稳定与可持续发展。

参考文献（References）

[1] da Gama J T. The role of soils in sustainability，climate change，and ecosystem services：Challenges and opportunities[J]. Ecologies，2023，4(3)：552—567.

[2] Ouyang S，Pang G W，Yuan X T，et al. Assessment of soil quality and dominant influencing factors on the Loess

Plateau[J]. Acta Pedologica Sinica，2025，62（6）：1635—1650. [欧阳硕，庞国伟，袁笑甜，等. 黄土高原土壤质量评价及其主导影响因素[J]. 土壤学报，2025，62（6）：1635—1650.]

[3] Ma S F，Gong X，Shangguan H Y，et al. Effects of urbanization and different land use types on soil eukaryotic biodiversity[J]. Biodiversity Science，2025，33（3）：160—171. [马尚飞，龚鑫，上官华媛，等. 城市化过程中不同用地类型对土壤真核生物多样性的影响[J]. 生物多样性，2025，33（3）：160—171.]

[4] Runnel K，Lõhmus P，Küngas K，et al. Aerial eDNA contributes vital information for fungal biodiversity assessment[J]. Journal of Applied Ecology，2024，61（10）：2418—2429.

[5] QinG X，Zhang Y M，Sun S D，et al. Phylogenomic insights into the evolution and origin of nematoda[J]. Systematic Biology，2025，74（3），349—358.

[6] Kirse A，Bourlat S J，Langen K，et al. Unearthing the potential of soil eDNA metabarcoding—Towards best practice advice for invertebrate biodiversity assessment[J]. Frontiers in Ecology and Evolution，2021，9：630560.

[7] Pujari L，Qiao Q，Nilajkar S，et al. Vertical zonation and interaction patterns of heterotrophic protists in the Bay of Bengal and Eastern Indian Ocean[J]. Marine Pollution Bulletin，2026，223：119056.

[8] Köninger J，Ballabio C，Panagos P，et al. Ecosystem type drives soil eukaryotic diversity and composition in Europe[J]. Global Change Biology，2023，29（19）：5706—5719.

[9] Aslani F，Geisen S，Ning D L，et al. Towards revealing the global diversity and community assembly of soil eukaryotes[J]. Ecology Letters，2022，25（1）：65—76.

[10] Liu W D，Song L，Wu J. Optimization of high-throughput sequencing primers for nanophytoplankton and picophytoplankton in environmental samples[J]. A cta Ecologica Sinica，2017，37（12）：4208—4216. [刘卫东，宋伦，吴景. 环境样本中微型和微微型浮游植物高通量测序的引物优化[J]. 生态学报，2017，37（12）：4208—4216.]

[11] Gong X，Qiao Z H，Yao H F，et al. Urbanization simplifies soil nematode communities and coincides with decreased ecosystem stability[J]. Soil Biology & Biochemistry，2024，190：109297.

[12] Yue M，De H S，Ye H，et al. Response of soil protist communities to long-term grazing in desert steppe[J]. Acta Pedologica Sinica，2025，62（4）：1221—1232. [岳梅，德海山，叶贺，等. 荒漠草原土壤原生生物群落对长期放牧的响应[J]. 土壤学报，2025，62（4）：1221—1232.]

[13] van den Wyngaert S，Ganzert L，Seto K，et al. Seasonality of parasitic and saprotrophic zoosporic fungi：Linking sequence data to ecological traits[J]. The ISME Journal，2022，16（9）：2242—2254..

[14] Shangguan H Y，Geisen S，Li Z P，et al. Urban greenspaces shape soil protist communities in a location-specific manner[J]. Environmental Research，2024，240：117485.

[15] Tu C W，Zhang A J，Luo R Y，et al. Linking nematode trophic diversity to plantation identity and soil nutrient cycling[J]. Geoderma，2024，448：116945.

[16] Zhang Z，Li J，Li H J，et al. Environmental DNA metabarcoding reveals the influence of human activities on microeukaryotic plankton along the Chinese coastline[J]. Water Research，2023，233：119730.

[17] Trung K H，Ha D T T，My N D H，et al. Chloroplast analysis of genetic diversity of *Dolichandrone spathacea* collected in the central coastal regions [J]. Advanced Studies in Biology，2023，15（1）：37—45.

[18] Smit E，Leeflang P，Glandorf B，et al. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis[J]. Applied and Environmental Microbiology，1999，65（6）：2614—2621.

[19] Ficetola G F，Guerrieri A，Cantera I，et al. In silico assessment of 18S rDNA metabarcoding markers for the characterization of nematode communities[J]. PLoS One，2024，19（4）：e0298905.

[20] Sun Y X，Du X F，Li Y B，et al. Database and primer selections affect nematode community composition under different vegetations of Changbai Mountain[J]. Soil Ecology Letters，2023，5（1）：142—150.

[21] Yu Y J，Yang Q Y，Petropoulos E，et al. *ITS3*/ITS4 outperforms other ITS region and 18S rRNA gene primer sets for amplicon sequencing of soil fungi[J]. European Journal of Soil Science，2022，73（6）：e13329.

[22] Nearing J T，Douglas G M，Comeau A M，et al. Denoising the Denoisers：An independent evaluation of microbiome sequence error-correction approaches[J]. PeerJ，2018，6：e5364.

[23] Tu X P，Qian Y Z. Spatial and temporal characteristics of annual precipitation in Ningbo[J]. Meteorological Science and Technology，2006，34（3）：271—274. [涂小萍，钱燕珍. 宁波市年降水量时空变化特征[J].气象科技，2006，34（3）：271—274.]

[24] Vozenin M C，Bourhis J，Durante M. Towards clinical translation of FLASH radiotherapy[J]. Nature Reviews Clinical Oncology，2022，19（12）：791—803.

[25] Sharmin M，Power S A，Nguyen M，et al. Climate and socio-economic drivers of urban tree abundance，richness and composition in Australian cities[J]. Cities，2026，169：106532.

[26] Ostertagová E，Ostertag O，Kováč J. Methodology and application of the Kruskal-Wallis test[J]. Applied

Mechanics and Materials，2014，611：115—120.
[27] Kim T K. T test as a parametric statistic[J]. Korean Journal of Anesthesiology，2015，68（6）：540—546.
[28] Anderson M J. Permutational multivariate analysis of variance（PERMANOVA）[J]. Wiley Statsref：Statistics Reference Online，2014：1—15.
[29] Harris T W，Antoshechkin I，Bieri T，et al. WormBase：A comprehensive resource for nematode research[J]. Nucleic Acids Research，2010，38（Database issue）：D463—D467.
[30] de Santiago A，Pereira T J，Mincks S L，et al. Dataset complexity impacts both MOTU delimitation and biodiversity estimates in eukaryotic 18S rRNA metabarcoding studies[J]. Environmental DNA，2022，4（2）：363—384.
[31] Callahan B J，McMurdie P J，Holmes S P. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis[J]. The ISME Journal，2017，11（12）：2639—2643.
[32] Joos L，Beirinckx S，Haegeman A，et al. Daring to be differential：Metabarcoding analysis of soil and plant-related microbial communities using amplicon sequence variants and operational taxonomical units[J]. BMC Genomics，2020，21（1）：733.
[33] Amir A，McDonald D，Navas-Molina J A，et al. Deblur rapidly resolves single-nucleotide community sequence patterns[J]. mSystems，2017，2（2）：e00191—e00116.
[34] Siegwald L，Caboche S，Even G，et al. The impact of bioinformatics pipelines on microbiota studies：Does the analytical “microscope” affect the biological interpretation [J]. Microorganisms，2019，7（10）：393.
[35] Oliverio A M，Geisen S，Delgado-Baquerizo M，et al. The global-scale distributions of soil protists and their contributions to belowground systems[J]. Science Advances，2020，6（4）：eaax8787.
[36] Schenk J，Höss S，Brinke M，et al. Nematodes as bioindicators of polluted sediments using metabarcoding and microscopic taxonomy[J]. Environment International，2020，143：105922.
[37] Clarke K R，Somerfield P J，Chapman M G. On resemblance measures for ecological studies，including taxonomic dissimilarities and a zero-adjusted Bray–Curtis coefficient for denuded assemblages[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology，2006，330（1）：55—80.
[38] Glassman S I，Martiny J B H. Broadscale ecological patterns are robust to use of exact sequence variants versus operational taxonomic units[J]. mSphere，2018，3（4）：e00148—e00118.

（**责任编辑**：陈荣府）