124－132
2010 年 4 月

草 业 学 报
ACTA PRATACULTURAE SINICA

第 19 卷 第 2 期
Vol. 19, No. 2

东祁连山高寒草地土壤可培养真菌多样性分析

张俊忠，陈秀蓉*，杨成德，薛莉

（甘肃农业大学草业学院 草业生态系统教育部重点实验室 中－美草地畜牧业可持续发展研究中心，甘肃 兰州 730070）

摘要：为了解东祁连山高寒草地土壤可培养真菌的多样性，选择有代表性的 4 类草地类型（珠芽蓼草地、禾草草地、沼泽草地、嵩草草地），运用稀释平板法和基于 ITS rDNA 基因序列的系统发育分析对其土壤中可培养真菌多样性进行研究，同时应用生态学评价方法进行分析。用 PDA 培养基、PSA 培养基、玉米粉琼脂培养基和马丁氏－孟加拉红培养基从土壤样品中分离得到 76 株真菌，通过形态观察选取 30 株有代表性的菌株进行基于 ITS rRNA 基因序列的系统发育多样性分析。结果表明，鉴定所得菌株可分为 22 个属的 26 个种，绝大多数属于半知菌亚门和接合菌亚门真菌；物种的丰富度（*S*）、Shannon－Wiener 多样性指数（*H*）、Simpson 优势度（*D*）和 Pielou 均匀度指数（*J*）变化范围分别为 15～18，2.47～2.81，0.89～0.93，0.91～0.97；青霉属（*Penicillium*）真菌为珠芽蓼草地、沼泽草地和嵩草草地的优势菌，镰孢菌属（*Fusarium*）真菌为禾草草地的优势菌，柔菌属真菌（*Doratomyces*）为沼泽草地的优势菌，被孢霉属（*Mortierella*）、柔菌属、小球腔菌属（*Leptosphaeria*）、毛霉属（*Mucor*）、木霉属（*Trichoderma*）、地丝菌属（*Geomyces*）和镰孢属为 4 类草地的常见属。另外，4 类草地都有大于 10％的分离菌种暂时无法确定其分类地位，极可能是新种；东祁连山高寒草地土壤真菌多样性丰富，其多样性和草地类型的特异性有着密切的关系，东祁连山高寒草地有着丰富的土壤真菌资源，存在潜在的开发价值。

关键词：东祁连山；高寒草地；土壤真菌；多样性指标；ITS rDNA 鉴定

中图分类号：S812.2；Q949.32　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1004-5759(2010)02-0124-09

* 在草原生态系统中，微生物在土壤中的分布与活动，既反映了土壤各因素对微生物的影响和作用，同时由于微生物的生物化学活性，也能动地影响着土壤肥力、草地植物生长发育与土壤改良状况，揭示土壤发育的现状和趋向[1,2]。土壤真菌是土壤微生物中主要的成员，在纤维素、半纤维素、木质素、果胶、还原氮、溶解磷等的分解中起重要作用，直接影响到土壤有机质的数量和组成[3,4]。祁连山地处欧亚大陆中心，位于青藏、蒙新、黄土三大高原的交汇地带，由于地理位置特殊，气候条件独特，冰川、河流、森林和草地等自然资源丰富，形成了复杂的生态系统。近些年来该地区亚高山草地植被受持续干旱的影响，地上植被和土壤在不同程度上发生了变化，而探讨植被－土壤－微生物体系在全球变化以及人为干扰下的生物地球化学变化特征对人类深入研究自然系统变化具有重要意义[5]。随着人们对东祁连山高寒草地生态恢复问题的重视，正日益强调对植物多样性的研究和保护工作。然而，仅仅研究地上部分的植物显然难以解释生态系统的整体作用机制。土壤中的微生物以其丰富的生物多样性使它们成为生态系统中最活跃且具有决定性影响的组分之一，它们通过分解土壤有机质、同化无机营养，驱动土壤养分的循环，并影响地面植物的生长发育和多样性[6-8]。当今环境情况及地质史对物种空间分布的相对影响进行定量分析成为微生物生态学上的一个重大的挑战[9,10]。真菌作为土壤微生物的重要组成部分，在整个草地生态系统的结构和功能上占有十分重要的地位[11]，因此，研究其数量是在更深层次上揭示草地生态系统能量流动和物质循环过程的重要环节。本试验在东祁连山高寒草地选择 4 类样地，研究土壤真菌群落的种类、数量组成和生态分布等，并对该区的真菌群落进行多样性比较与分析，旨在揭示该区域草地土壤环境中真菌群落的基本特征、分布状况及物种多样性等，以期为东祁连山高寒草地的有效保护和综合开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 区域概况

研究样地处于祁连山东端，甘肃省天祝县金强河地区。地理坐标为北纬 37°11′～37°18′、东经 102°23′～

* 收稿日期：2009-11-25；改回日期：2010-01-05

基金项目：国家自然基金项目（30471232），甘肃省中青年基金（3YS41-A25-009）和甘肃省“555”人才工程资助。

作者简介：张俊忠（1978-），男，甘肃靖远人，博士。E-mail：zhangjunz@st.gsau.edu.cn

* 通讯作者。E-mail：chenxiurong@gsau.edu.cn

102°78′，海拔 2 700～3 300 m。气候寒冷潮湿，空气稀薄，太阳辐射强。年均温 0.1℃，1 月 18.3℃，7 月 12.7℃，>0℃年积温 1 380℃；水热同期，年日照时间 2 600 h；无绝对无霜期，无四季之分，仅分冷热 2 季，冷季长达 7 个月，植物生长季为 120～140 d，年降水量 416 mm，多为地形雨，集中于 7－9 月；10 月底至第 2 年 4 月为降雪期；年蒸发量 1 592 mm；区内土层较薄，厚 40～80 cm；含水量 16.09%～36.25%；pH 值 7.647～8.363；容重 0.682～1.120 g/cm^3；有机质含量高，为 10%～16%。

1.2　样点的选择与样品的采集

试验地设在甘肃农业大学草原生态试验站前金杆沟山麓两侧，选取有代表性的 4 类草地，即珠芽蓼草地（*Polygonum* grassland）、禾草草地（grass grassland）、沼泽草地（swamp grassland）和嵩草草地（*Kobresia* grassland）。于 2008 年 7 月中旬采用土壤剖面法和混合多点取样法采取 0～20 cm 表层土，均匀混合后装入无菌封口聚乙烯袋，带回室内即分离土壤真菌[12]，样地概况见表 1。

1.3　土壤真菌的分离培养及形态鉴定

于 2008 年 7 月 18 日，选用马铃薯葡萄糖培养基（PDA 培养基）、马铃薯蔗糖培养基（PSA 培养基）、玉米粉琼脂培养基和马丁氏－孟加拉红培养基[13,14]，采用稀释平板涂布法[15]以稀释度为 10^{-2} 的土壤稀释液接种分离土壤中的真菌，每一处理设 3 个重复，接种后置 25℃温箱内培养 5 d 后，对分离菌株进行统计、编号、纯化保存。将纯化菌株接种 PDA 平板上，每隔 24 h 观察菌落形态、颜色、培养基颜色；用载片培养法[16]观察产孢结构及分生孢子形态，主要参照《中国真菌志》等文献[17-22]。

表 1　样地概况

Table 1　Basic status of the sampling sites

草地类型 Grassland types	海拔 Altitude	地理坐标 Geographic coordinate	土壤类型 Soil types	pH 值 pH value	利用类型 Use types	植被状况 Vegetation condition
珠芽蓼草地 *Polygonum* grassland	2 970	37°13.742′ 102°78.057′	山地草甸土 Mountain meadow soil	0～10 cm，7.673 10～20 cm，8.010	冬季牧场 Winter pasture	以珠芽蓼、球花蒿为优势种，嵩草属、菊科和禾草较多，物种丰富，草地盖度为 94.3% *Polygonum* and *Kobresia qiuhua* are the dominant plant，*Kobresia*，Compositae and grass comprise many species，which have abundant species，vegetation coverage is 94.3%
禾草草地 Grass grassland	3 000	37°18.664′ 102°77.249′	山地栗钙土 Chestnut soil	0～10 cm，8.010 10～20 cm，8.113	冬季牧场 Winter pasture	以嵩草、禾草为优势植物，异叶青兰较多，草地盖度为 95.3% *Kobresia* and grass are the dominant plant，and *Dracocephalum heterophalum* is common plant，vegetation coverage is 95.3%
沼泽草地 Swamp grassland	2 860	37°11.856′ 102°47.322′	山地草甸土 Mountain meadow soil	0～10 cm，8.113 10～20 cm，8.363	开放牧场 Opening pasture	以菊科和蓼科植物为优势种，车前、委陵菜和禾草较多，物种丰富，草地盖度在 90%以上 Compositae and Polygonaceae are the dominant plant，*Plantago*，*Potentilla chinensis* and grass are common plant，vegetation coverage is higher than 90%
嵩草草地 *Kobresia* grassland	2 910	37°11.396′ 102°46.826′	山地黑钙土 Mountain chernozem	0～10 cm，7.647 10～20 cm，7.920	冬季牧场 Winter pasture	以矮嵩草为优势种，韭和赖草较多，草地盖度在 90%以上 *Kobresia humilis* is dominant plant，*Allium tuberosum* and *Leymus* are common plant，vegetation coverage is higher than 90%

1.4 ITS(internal transcribed spacer)序列分析

1.4.1 菌丝体的培养收集及基因组 DNA 的提取 将筛选出的供试菌株转接在 PDA 平板上活化培养 3 d,用打孔器截取直径 5 mm 菌丝块接种至装有 PS 培养基的三角瓶中,在 25℃条件下,150 r/min 摇床震荡培养 5～8 d,4 层无菌纱布过滤后,用无菌的生理盐水洗 2 次,再用无菌的吸水纸吸干水分,－20℃冰箱保存备用。真菌基因组 DNA 的提取采用 Biospin Fungus Genomic DNA Extraction Kit(北京博大泰克公司生产)。

1.4.2 目的 DNA 的 PCR 扩增及 ITS 片段的测序 ITS rDNA 的 PCR 扩增采用真菌的通用引物,正向引物 ITS1: TCC GTA GGT GAA CCT GCG C,反向引物 ITS4: TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC,由上海生工生物技术公司合成。扩增体系为:10×PCR Buffer 5.0 μL,Taq DNA 聚合酶(2 U/μL) 1.2 μL,ITS1(10 mmol/L) 2.0 μL,ITS4(10 mmol/L) 2.0 μL,dNTP(10 mmol/L) 3.0 μL,DNA 模板(10 ng/μL) 2.0 μL(以加 2.0 μL ddH_2O 为阴性对照),ddH_2O 34.8 μL,总体积 50 μL。扩增程序:94℃预变性 3 min,94℃变性 30 s,55℃退火 45 s,72℃延伸 1 min,30 个循环,最后 72℃延伸 8 min。1.2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。ITS rDNA 扩增产物经 DNA 片段快速胶回收试剂盒(北京博大泰克公司生产)回收纯化后,由上海生工生物技术公司完成测序工作。

1.4.3 ITS rDNA 序列系统树的构建 经测序所得菌株完整的 ITS 序列(包括 5.8S rDNA),提交到 GenBank 数据库中进行相似性分析,并与 GenBank 的相似序列用 Clustal X(1.81)进行多重序列比对(multiple alignment),再用 MEGA (4.0)的 Neighbor－Joining 算法构建系统进化树[23,24]。

1.5 土壤真菌的多样性测度[25-29]

根据鉴定的土壤真菌和各测度指数的特点及取样数据的类型,应用生态学评价方法,选用物种的丰富度指数:$S=N$;Shannon－Wiener 多样性指数:$H=-\sum_{i=1}^{s}P_i\ln P_i$;Pielou 均匀度指数:$J=-\sum_{i=1}^{s}P_i\ln P_i/\ln S$;Simpson 优势度:$D=1-\sum_{i=1}^{s}P_i^2$。式中 N_i 为第 i 属的菌株数,P_i 是第 i 属的多度比例,由 $P_i=N_i/N$ 求出,$N=\sum_{i=1}^{s}N_i$,为样地全部属数之和。

2 结果与分析

2.1 土壤真菌的分布

4 类草地土壤真菌总量的平均值为 5.16×10^4 cfu/g(表 2),其中嵩草草地真菌数最多为 5.89×10^4 cfu/g,禾草草地数量最少为 4.38×10^4 cfu/g,二者相差 1.51×10^4 cfu/g。根据庞雄飞和尤民生[30]的优势属划分原则,即某物种占整体物种的百分比≥10%为优势属,1%～10%为常见属,≤1%为稀有属。可以得出:青霉属为珠芽蓼草地、沼泽草地、嵩草草地的优势菌群,所占比例分别为 14.28%,21.78%和 12.78%;镰孢菌为禾草草地的优势菌群,所占比例为 10.57%;柔菌属为沼泽草地的优势菌群,所占比例为 10.89%;被孢霉属、柔菌属、小球腔菌属、毛霉属、木霉属、地丝菌属和镰孢属为 4 类草地的常见属,这是因为它们对环境适应能力强,对土壤有机质、环境温湿度等要求较低,其分布受地区、土壤和植被的限制较小;枝孢属、轮枝菌属、盘多毛孢属、曲霉属、暗球腔菌属,出现在 3 类草地中;弯颈霉属、白僵菌属、肉座菌属、虫草属、丛赤壳属、生赤壳属、交链孢属和帚霉属出现在 2 类草地中;亚隔孢壳属只出现在沼泽草地中,说明其对环境有特定要求,需要进一步深入研究探明两者之间的关系。4 类草地土壤真菌的群落数量、种类组成和空间分布存在较大的差异,说明土壤真菌的分布与其草地类型的特异性有着密切的关系。此外,各类样地都有 10%以上的真菌暂时无法确定其分类地位,极有可能是新种,其鉴定工作在进一步进行之中。

2.2 ITS 序列的系统发育树的构建及分析

对分离纯化后的全部菌株通过菌落特征和显微形态观察,最终从全部菌株中选取有代表性的菌株进行 ITS rDNA 序列的测定,用 Blast 搜索软件从 GenBank、欧洲分子生物学实验室(EMBL)和日本 DNA 序列资料库(DDBJ)等公共数据库中进行相似性搜索,并调出相关典型菌株的有效序列,用相关软件进行序列比对、相似性计算、进化距离矩阵计算、聚类分析和系统进化树构建等系统发育分析(图 1)。将测序菌株的基因序列提交 NCBI 进行注册,注册号、代表菌株和最相似菌株的发育关系见表 3,30 株分离菌株的 ITS rDNA 序列长度为 514～641

bp 不等，分别与 22 个已知属的 26 种已知菌的序列同源性都在 96%以上，所得真菌绝大多数属于半知菌亚门和接合菌亚门真菌。

2.3　土壤真菌多样性的变化

东祁连山高寒草地不同植被类型土壤真菌多样性的分析是用量化的指标来反映真菌区系结构状态及其生态。物种丰富度(S)是衡量物种多样性的最直接也是最重要的尺度；Shannon－Wienner 指数为变化的指数，物种数量越多，分布越均匀，其数值越大；Simpson 指数表示该群落优势度的统计量，其值越大表明群落的优势种越明显，它随一个或几个物种优势度的增加而增加；而 Pielou 指数(J)定义为群落的实测多样性 H' 与最大多样性 H' max(即在给定物种数 S 下的完全均匀群落的多样性)之比率。群落组成的数量及空间分布的不同，形成群落的结构格局。物种丰富度(S)，Shannon－Wiener 指数(H)，Simpson(D)和 Pielou 指数(J)指数在 4 类草地中反映出基本一致的多样性趋势，其变化范围分别为 15～18，2.47～2.81，0.89～0.93，0.91～0.97，各草地之间的多样性指数波动平缓，除 Pielou 指数外其他指数均以嵩草草地较高，沼泽草地较低，这说明嵩草草地相对其他草地土壤真菌种类、数量和优势度体现的较为明显。

表 2　真菌各属数量及所占比例

Table 2　Quantity and percentages of fungi　　干土 Dry soil

分类地位 Taxonomic status	珠芽蓼草地 *Polygonum* grassland		禾草草地 Grass grassland		沼泽草地 Swamp grassland		嵩草草地 *Kobresia* grassland	
	数量 Quantity ($\times10^4$ cfu/g)	所占比例 Percentage (%)	数量 Quantity ($\times10^4$ cfu/g)	所占比例 Percentage (%)	数量 Quantity ($\times10^4$ cfu/g)	所占比例 Percentage (%)	数量 Quantity ($\times10^4$ cfu/g)	所占比例 Percentage (%)
被孢霉属 *Mortierella*	0.34	5.88	0.25	5.76	0.36	7.92	0.22	3.75
柔菌属 *Doratomyces*	0.24	4.20	0.33	7.69	0.49	10.89	0.26	4.51
小球腔 *Leptosphaeria*	0.34	5.88	0.16	3.84	0.13	2.97	0.22	3.75
枝孢属 *Cladosporium*	0.29	5.40	0	0	0.13	2.97	0.26	4.51
轮枝菌属 *Verticillium*	0.29	5.04	0.21	4.80	0	0	0.31	5.26
毛霉属 *Mucor*	0.44	7.56	0.33	7.69	0.26	5.94	0.35	6.01
弯颈霉 *Tolypocladium*	0	0	0.25	5.76	0	0	0.39	6.76
白僵菌属 *Beauveria*	0.29	5.40	0	0	0.08	1.98	0	0
肉座菌属 *Hypocrea*	0	0	0.12	2.88	0	0	0.22	3.75
盘多毛孢 *Truncatella*	0.34	5.88	0	0	0.13	2.97	0.22	3.75
虫草属 *Cordyceps*	0.19	3.36	0	0	0.18	1.98	0	0
木霉属 *Trichoderma*	0.34	5.88	0.08	1.92	0.26	5.94	0.39	6.76
从赤壳属 *Nectria*	0	0	0.16	3.84	0	0	0.13	2.25
亚隔孢壳属 *Didymella*	0	0	0	0	0.13	2.97	0	0
生赤壳属 *Bionectria*	0.24	4.20	0	0	0	0	0.26	4.51
交链孢属 *Alternaria*	0	0	0.25	5.76	0.13	2.97	0	0
青霉属 *Penicillium*	0.83	14.28	0.33	7.69	0.98	21.78	0.75	12.78
地丝菌属 *Geomyces*	0.14	2.52	0.33	7.69	0.17	3.96	0.31	5.26
镰孢菌属 *Fusarium*	0.44	7.56	0.46	10.57	0.26	5.94	0.26	4.51
帚霉属 *Scopulariopsis*	0	0	0	0	0.13	2.97	0.17	3.00
曲霉属 *Aspergillus*	0.34	5.88	0.21	4.80	0	0	0.26	4.51
暗球腔菌属 *Phaeosphaeria*	0.09	1.68	0.25	5.76	0	0	0.08	1.50
其他菌属 Other genera	0.58	10.08	0.58	13.46	0.71	15.81	0.75	12.78
真菌总数 Total fungi	5.84	100	4.38	100	4.53	100	5.89	100

表 3 分离菌株与亲缘关系最近菌株的系统发育关系

Table 3 Phylogenetic relation to nearnest neighbors of strains isolated from alpine grassland soil

分离菌株编号(登录号) Number of strain (accession number)	片段长度 Fragment length (bp)	参考物种(登录号) Reference taxa (accession number)	序列相似性 Similarity (%)
26 (FJ623269)	574	短柄帚霉 *Scopulariopsis brevicaulis* (AB369902)	98
103 (FJ025172)	637	青霉 *Penicillium dipodomyicola* (DQ339570)	99
72 (FJ025202)	540	青霉 *Penicillium* sp. (EU497955)	99
51 (FJ025215)	544	聚多曲霉 *Aspergillus sydowii* (EF652473)	99
83 (FJ025212)	554	灰白青霉 *Penicillium canescens* (DQ658168)	99
50 (FJ623271)	580	暗球腔菌 *Phaeosphaeria avenaria* (PAU77359)	98
47 (FJ025207)	548	链格孢 *Alternaria alternata* (EU594567)	99
95 (FJ025183)	557	小球腔菌 *Leptosphaeria* sp. (DQ093683)	97
16 (FJ025180)	556	小球腔菌 *Leptosphaeria* sp. (DQ093683)	98
44 (FJ025190)	514	亚隔孢壳 *Didymella phacae* (EU167570)	99
108 (FJ025146)	536	枝孢霉 *Cladosporium* sp. (AY251072)	99
10 (FJ025216)	579	矛束霉 *Doratomyces* sp. (EU301641)	97
31 (FJ025218)	579	矛束霉 *Doratomyces* sp. (EU301641)	98
68 (FJ025201)	543	生赤壳 *Bionectria ochroleuca* (AB369487)	99
22 (FJ623268)	610	木霉 *Trichoderma oblongisporum* (DQ083020)	99
25 (FJ025199)	586	肉座菌 *Hypocrea semiorbis* (EF596944)	98
17 (FJ025173)	639	柱孢弯颈霉 *Tolypocladium cylindrosporum* (AB208110)	99
85 (FJ025179)	499	柱孢弯颈霉 *Tolypocladium cylindrosporum* (DQ449656)	99
F6 (EF611091)	533	镰孢菌 *Fusarium* sp. (DQ657854)	99
F10 (EF611087)	521	木贼镰孢 *Fusarium equiseti* (AY147362)	99
F11 (EF611086)	540	尖镰孢 *Fusarium oxysporum* (DQ452447)	99
18 (FJ025196)	531	球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* (AY532008)	99
23 (FJ025197)	617	冻土毛霉 *Mucor hiemalis* (AY243950)	99
24 (FJ025198)	622	冻土毛霉 *Mucor hiemalis* (EU326196)	99
69 (FJ025144)	653	高山被孢霉 *Mortierella alpina* (AJ271629)	98
91 (FJ025154)	640	被孢霉目 Mortierellales (EF126342)	99
52 (FJ025167)	636	高山被孢霉 *Mortierella alpina* (EF652473)	99
64 (FJ025168)	641	被孢霉 *Mortierella* sp. (EU240119)	98
78 (FJ025145)	631	被孢霉科 Mortierellaceae (DQ317354)	99
87 (FJ025213)	630	被孢霉科 Mortierellaceae (DQ317354)	98

3 讨论与结论

本研究首次对东祁连山高寒草地不同植被类型土壤可培养真菌群落结构特征开展较为系统的研究，得到了大量的微生物资源，为日后通过对这些微生物各种生理代谢特性检测，进而开发成其他产品奠定了基础，结果也表明该地区土壤真菌多样性较丰富，其多样性、草地类型的特异性有着密切的关系，其主要原因是与丰富的地上植物种类组成、植物残体、根系分泌物、土壤物理性状和化学性质等生态因子有关。由于土壤植被类型的不同，其土壤的理化性质、养分状况也随之改变，这种改变必然会引起土壤真菌的种类和数量发生变化。研究结果表明土壤微生物通过相互竞争、协调、驱动养分循环等作用影响着植物多样性[31]，而真菌则作为土壤微生物的重要部分将地上部分与地下部分紧密地联系起来。刘增文等[32]、潘好芹等[33]研究表明土壤真菌分布受海拔及植被类型的影响较大。姚贤民等[34]的研究发现土壤真菌区系与植被类型密切相关。此外，也有研究表明，影响土壤真菌数

量和多样性的主要因素是土壤 pH、土壤有机物含量及水分[35]。大量研究表明，植物通过影响土壤环境，进而影响土壤微生物群落结构和多样性，土壤微生物多样性与覆盖于土壤上的植物群落多样性呈正相关。

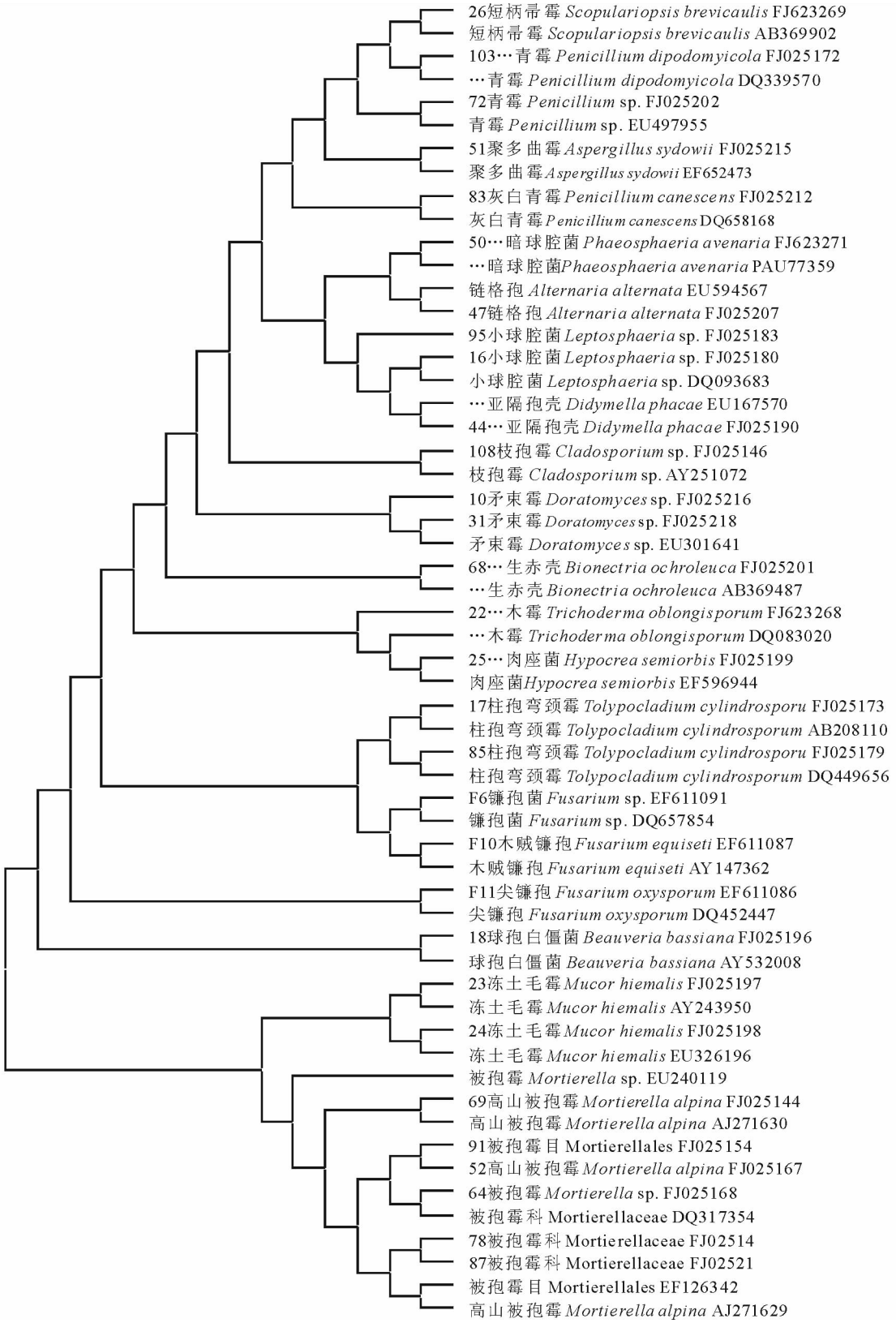

图 1　基于 ITS rDNA 的东祁连山高寒草地土壤真菌多样性系统发育分析

Fig. 1　Phylogenetic analysis of the alpine grassland of Eastern Qilian Mountains soil fungi diversity based on ITS rDNA sequences

表 4 整个群落及各样地土壤真菌多样性指数

Table 4 Soil fungi diversity of whole community and different samples

多样性指标 Diversity index	珠芽蓼草地 *Polygonum* grassland	禾草草地 Grass grassland	沼泽草地 Swamp grassland	嵩草草地 *Kobresia* grassland
物种丰富度 Species richness	16	15	15	18
多样性指数 Shannon－Wiener	2.72	2.67	2.47	2.81
优势度 Simpson	0.92	0.92	0.89	0.93
均匀度 Pielou	0.98	0.98	0.91	0.97

土壤微生物群落组成极其复杂，土壤中蕴藏着目前尚无法估量的微生物未知种群和资源[36,37]，分离物的数量直接影响对其多样性的研究。本研究在分离时尽管采用了 PDA 培养基、PSA 培养基、玉米粉琼脂培养基和马丁氏－孟加拉红培养基，力求最大限度地分离东祁连山高寒草地土壤中的真菌，但由于这种方法人为限定了一些培养条件，无法全面反映微生物生长的自然条件，造成某些微生物的富集生长，而另一些微生物缺失，导致部分真菌资源遗漏。传统培养法局限于从固体培养基上分离微生物，在琼脂平板上能生长的微生物只能占到土壤微生物总数的 0.1%或 1.0%到 10.0%，不能充分反映土壤微生物群落结构[38]。在培养条件上也主要针对好氧、中温菌进行培养，分离获得的菌株十分有限。因此进一步通过优化分离、培养技术并运用多相分类方法，才能获取环境中可培养真菌的更加全面的信息。

本研究结果表明，东祁连山高寒草地不同草地类型土壤真菌的构成具有相似性，在 4 类草地中共鉴定出 22 个属的真菌，绝大多数属于半知菌亚门和接合菌亚门真菌，其中青霉属为珠芽蓼草地、沼泽草地、嵩草草地的优势菌群，镰孢菌为禾草草地的优势菌群，柔菌属为沼泽草地的优势菌群，被孢霉属、柔菌属、小球腔菌属、毛霉属、木霉属、地丝菌属和镰孢属为 4 类草地的常见种，各类草地都能分离到 15 个以上的属，另外，存在于东祁连山高寒草地的土壤真菌与其他地方土壤真菌种类相差不大，但是没有发现丝核真菌的存在，其内在机制和生产中的潜在意义有待进一步研究；不同植被类型草地土壤真菌的数量、种类、结构组成都存在着一定的差异，表明该地区土壤真菌多样性较丰富；物种丰富度（S）、Shannon－Wiener 多样性指数（H）、Simpson 优势度（D）和 Pielou 均匀度（J）在各类型草地中波动较为平缓，反映出基本一致的变化趋势，多样性指数的大小顺序为：嵩草草地＞禾草草地＞珠芽蓼草地＞沼泽草地，除 Pielou 指数外其他指数均以嵩草草地较高，沼泽草地较低，这是由于沼泽草地为开放牧场，受到的干扰因素较多，而其他草地都为围栏放牧草地，这说明围栏放牧对生物多样性的保护具有一定的意义，多样性指标表明各指数对东祁连山高寒草地土壤真菌多样性的测度具有一定的科学依据。另外，受采样时间和东祁连山高寒草地的分布状况限制，要全面了解东祁连山高寒草地土壤真菌的分布规律及其优势种群的分布特征与地上部分的植物群落的相互影响关系，还需更全面地设计采样方案和分析更多内容。

参考文献：

[1] 罗明，邱沃. 新疆平原荒漠盐渍草地土壤微生物生态分布的研究[J]. 中国草地，1995，5：29-33.

[2] 杨成德，龙瑞军，陈秀蓉，等. 东祁连山高寒草甸土壤微生物量及其与土壤物理因子相关性特征[J]. 草业学报，2007，16(4)：62-68.

[3] Hawksworth D L. The magnitude of fungal diversity：The 1.5 million species estimate revisited[J]. Mycological Research，2001，105：1422-1432.

[4] 韦红群，邓建珍，曹建华，等. 柱花草根系与根际微生物类群的研究[J]. 草业科学，2009，26(1)：69-73.

[5] 胡双熙. 祁连山东段山地土壤性质及垂直分布规律[J]. 地理科学，1994，14(1)：38-48.

[6] 夏北成，Zhou J Z，Tiedje J M. 植被对土壤微生物群落结构的影响[J]. 应用生态学报，1998，9(3)：296-300.

[7] Hortan T R，Bruns T D. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology：Peeking into the black-box[J]. Molecular Ecology，2001，10：1855-1871.

[8] Loranger-Merciris G，Barthes L，Gastine A，*et al*. Rapid effects of plant species diversity and identity on soil microbial com-

munities in experimental grassland ecosystems[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2006, 38: 2336-2343.

[9] Sugden A M. Ecology: Diversity and ecosystem resilience[J]. Science, 2000, 290: 233-235.

[10] Casey H, Alexander L, Maren N, *et al*. A constant flux of diverse thermophilic bacteria into the cold arctic seabed[J]. Science, 2009, 325: 1541-1544.

[11] 荣丽，李贤伟，朱天辉，等. 光皮桦细根与扁穗牛鞭草草根分解的土壤微生物数量及优势类群[J]. 草业学报，2009，18(4)：117-124.

[12] Nyman J A. Effect of crude oil and chemical additives on metabolic activity of mixed microbial populations in fresh marsh soils[J]. Microbial Ecology, 1999, 37(2): 152-162.

[13] 方中达. 植病研究方法(第三版)[M]. 北京：中国农业出版社，1998.

[14] 钱存柔，黄仪秀. 微生物学实验教程[M]. 北京：北京大学出版社，1999.

[15] 中国科学院南京土壤研究所. 土壤微生物研究方法[M]. 北京：科学出版社，1985.

[16] 祖若夫，胡宝龙，周德庆. 微生物实验教程[M]. 上海：复旦大学出版社，1993.

[17] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海：上海科技出版社，1979.

[18] 唐姆茨 K H [西德]，盖姆斯 W [荷兰]. 农业土壤真菌[M]. 北京：科学出版社，1979.

[19] 张中义，冷怀琼，张志铭，等. 植物病原真菌学[M]. 成都：四川科学技术出版社，1986.

[20] 许志刚. 普通植物病理学(2 版)[M]. 北京：中国农业出版社，2000.

[21] 周与良，邢来君. 真菌学[M]. 北京：高等教育出版社，1986.

[22] 戴芳澜. 中国真菌总汇[M]. 北京：科学出版社，1979.

[23] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, *et al*. Clustal W and clustal X version 2.0[J]. Bioinformatics, 2007, 23(21): 2947-2948.

[24] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al*. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis(MEGA)software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24: 1596-1599.

[25] 沈法富，韩秀兰，范术丽. 转 Bt 基因抗虫棉根际微生物区系和细菌生理群多样性的变化[J]. 生态学报，2004，24(3)：432-437.

[26] 孙海新，刘训理. 茶树根际微生物研究[J]. 生态学报，2004，24(7)：1353-1357.

[27] 柳小妮，孙九林，张德罡，等. 东祁连山不同退化阶段高寒草甸群落结构与植物多样性特征研究[J]. 草业学报，2008，17(4)：1-11.

[28] 巨天珍，成源，常成虎，等. 天水小陇山红豆杉(*Taxus chinensis*(Pilg.)Rehd)林土壤真菌多样性及其与生态因子的相关性[J]. 环境科学研究，2008，21(1)：128-132.

[29] 左小安，赵哈林，赵学勇，等. 科尔沁沙地不同恢复年限退化植被的物种多样性[J]. 草业学报，2009，18(4)：9-16.

[30] 庞雄飞，尤民生. 昆虫群落生态学[M]. 北京：中国农业出版社，1996：77-103.

[31] Clay K, Holah J. Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields[J]. Science, 1999, 285: 1742-1744.

[32] 刘增文，段而军，高文俊，等. 秦岭山区人工林地枯落叶客置对土壤生物化学性质的影响[J]. 应用生态学报，2008，19(4)：704-710.

[33] 潘好芹，张天宇，黄悦华，等. 太白山土壤淡色丝孢真菌群落多样性及生态位[J]. 应用生态学报，2009，20(2)：363-369.

[34] 姚贤民，吕国忠，杨红，等. 长白山森林土壤真菌区系研究[J]. 菌物研究，2007，5(1)：43-46.

[35] Pan H Q, Yu J F, Wu Y M, *et al*. Diversity analysis of soil dematiaceous hyphomycetes from the Yellow River source area[J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2008, 9: 829-834.

[36] 张瑞福，崔中利，李顺鹏. 土壤微生物群落结构研究方法进展[J]. 土壤，2004，36(5)：476-480.

[37] 王岳坤，洪葵. 红树林土壤细菌群落 16S rDNA V3 片段 PCR 产物的 DGGE 分析[J]. 微生物学报，2005，45：201-204.

[38] Zelles L, Bai Q Y, Beck T, *et al*. Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1992, 24(4): 317-323.

A study on the diversity of soil cultured fungi in the alpine grassland of Eastern Qilian Mountains

ZHANG Jun-zhong, CHEN Xiu-rong, YANG Cheng-de, XUE Li

(Sion-U. S. Centers for Grazingland Ecosystem Sustainability, Key Laboratory of Grassland Ecosystem of MOE, College of Prataculture, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: In order to assess the diversity of soil cultured fungi in alpine grassland of Estern Qilian Mountains, 4 types alpine grasslands (*Polygonum* grassland, grass grassland, swamp grassland, *Kobresia* grassland) were selected to investigate their soil cultured fungi to understand their diversity by dilution plate technique and ITS rDNA sequence analysis, the soil cultured fungi were evaluted by economic efficiency analysis methods. 76 strains fungi were isolated by PDA, PSA, Maize Powder Media and Rose Bengal Medium. 30 typical strains were analyzed by ITS rDNA sequence analysis. The resulted showed, 30 strains belong to 22 genera, 26 species, most of them belong to imperfect fungi and zygomycetes. Species abundance (*S*), Shannon—Wiener index (*H*), Simpson dominance index (*D*) and Pielou evenness index (*J*) range were 15—18, 2.47—2.81, 0.89—0.93, 0.91—0.97, respectively. *Penicillium* spp. were dominant fungi in *Polygonum* grassland, swamp grassland and *Kobresia* grassland, *Fusarium* spp. were dominant fungi in grass grassland, *Doratomyces* spp. were dominant fungi in swamp grassland, *Mortierella*, *Doratomyces*, *Leptosphaeria*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Geomyces* and *Fusarium* were common genera in four types grassland. In addition, more than 10% fungi strains could not clarify the taxonomic status temporarily, which might be new species; The results indicate that the diversity of soil fungi were very abundant in the alpine grassland of Eastern Qilian Mountains, and there exist close corelation between fungal diversity and grassland types, finally, it is concluded that there have abundance soil fungi in the alpine grassland of Eastern Qilian Mountains, which were deserved for further study and having huge exploitation value.

Key words: Eastern Qilian Mountains; alpine grassland; soil fungi; diversity index; ITS rDNA sequence analysis