

研究报告

西藏接合菌物种多样性初探

李政宏¹ 普布次仁¹ 吕美林^{2,3} 旺姆^{1*} 刘小勇^{2*}

(1. 西藏农牧学院 西藏 林芝 860000)

(2. 中国科学院微生物研究所 北京 100101)

(3. 中国科学院大学 北京 100049)

摘要:【背景】接合菌在自然界广泛分布,在工业、食品、医药、生物防治等方面扮演着重要的角色,部分接合菌为有害菌。西藏地区接合菌只有少数零星的报道,其系统调查研究几乎还是空白,大量潜在的物种需要分离、鉴定、认识、保藏和开发。【目的】了解西藏地区的接合菌物种多样性和生物资源现状,为该地区有害接合菌的控制和有益接合菌的开发利用奠定基础。【方法】对西藏全境7个地区19个代表县的701个样品采用平板稀释分离法得到单菌落,然后进行形态和分子(SSU、ITS和LSU rDNA)鉴定,并在此基础上进行生物多样性以及优势和稀有属种分析。【结果】得到西藏接合菌10属26种,包括5个西藏已知种和21个西藏新记录种;其中4个为中国新记录种,分别是:类变形被孢霉(*Mortierella amoeboides*)、球孢高山被孢霉(*M. globalpina*)、灰褐毛霉(*Mucor brunneogriseus*)、暗色毛霉(*M. fuscus*)。西藏接合菌的多样性指数分析表明,不同地区间的物种数量和组成存在显著差异,排在前4位的分别是波密县、米林县、当雄县和八宿县。属种分析显示,西藏接合菌的2个优势属为被孢霉属(*Mortierella*)和毛霉属(*Mucor*);3个优势种为高山被孢霉(*Mortierella alpina*)、冻土毛霉(*Mucor hiemalis*)、匍枝根霉(*Rhizopus stolonifer*);常见属8个,分别是犁头霉属(*Absidia*)、放射毛霉属(*Actinomucor*)、小克银汉霉属(*Cunninghamella*)、根毛霉属(*Rhizomucor*)、根霉属(*Rhizopus*)、共头霉属(*Syncephalastrum*)、伞形霉属(*Umbelopsis*)和接霉属(*Zygorhynchus*);常见种9个,稀有种14个。【结论】西藏地区接合菌资源丰富,各地区生物多样性差异显著,稀有物种占一半以上的比例提示西藏自然环境保护的重要性。

关键词: 接合菌门, 新记录, 生物多样性, 遗传多样性, 西藏

Foundation items: National Project on Scientific Groundwork, Ministry of Science and Technology (2012FY111600); National Natural Science Foundation of China (31370068, 31670019)

***Corresponding authors:** E-mail: WANG Mu: wangmutb@163.com; LIU Xiao-Yong: liuxiaoyong@im.ac.cn

Received: August 03, 2017; **Accepted:** November 28, 2017; **Published online** (www.cnki.net): January 24, 2018

基金项目: 科技部基础性工作专项(2012FY111600); 国家自然科学基金(31370068, 31670019)

***通信作者:** E-mail: 旺姆: wangmutb@163.com; 刘小勇: liuxiaoyong@im.ac.cn

收稿日期: 2017-08-03; **接受日期:** 2017-11-28; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-01-24

Species diversity of zygomycotan fungi in the Tibet Autonomous Region

LI Zheng-Hong¹ PUBU Ci-Ren¹ LYU Mei-Lin^{2,3} WANG Mu^{1*} LIU Xiao-Yong^{2*}

(1. Tibet Agriculture and Animal Husbandry University, Linzhi, Tibet 860000, China)

(2. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: [Background] Zygomycotan fungi are widely distributed in nature. While some members are harmful, more zygomycotan fungi play an important role in industry, food, medicine, biological control, and so on. They have just been reported sporadically in the Tibet and lack a systematic survey. A large number of potential species need to be isolated, identified, understood, preserved and exploited. **[Objective]** To understand the species diversity of zygomycotan fungi in the Tibet, and lay a foundation for the control of harmful zygomycotan fungi and the utilization of beneficial ones in this area. **[Methods]** Zygomycotan fungi isolated with plate dilute method from 701 samples in 19 representative counties all over the seven prefectures of Tibet, were identified morphologically and molecularly, with SSU, ITS and LSU rDNA as markers. Based on these data, the biodiversity, dominant and rare taxa of Tibetan zygomycotan fungi were analyzed. **[Results]** Tibetan zygomycotan fungi obtained here were classified into 10 genera and 26 species. Among these species, five have been reported in the Tibet, while 21 species are new to Tibet; Four species are even new to China, which are *Mortierella amoeboides*, *M. globalpina*, *Mucor brunneogriseus* and *M. fuscus*. The diversity index analysis of Tibetan zygomycotan fungi showed significant differences in the number and composition of species among regions. The most diverse four counties are Bome, Mainling, Dangxung and Baxoi. Analyses of species and genera revealed two dominant zygomycotan genera in the Tibet, *Mortierella* and *Mucor*, as well as three dominant species *Mortierella alpina*, *Mucor hiemalis*, and *Rhizopus stolonifer*. Eight common genera are *Absidia*, *Actinomucor*, *Cunninghamella*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Syncephalastrum*, *Umbelopsis* and *Zygorhynchus*. Common and rare species are 9 and 14, respectively. **[Conclusion]** The zygomycotan fungi in the Tibet are rich and significantly different in biodiversity among regions. Rare species account for more than half, implying the importance of protecting the natural environment of Tibet.

Keywords: Zygomycota, New records, Biodiversity, Genetic diversity, Tibet

接合菌在自然界广泛腐生于土壤、动物粪便、动植物残体、水果、花、蘑菇和谷粒, 部分类群可寄生或共生于植物和动物, 甚至其他真菌(包括其他接合菌)。接合菌类真菌在工业、食品业、医药业和农业生物防治等方面扮演着重要的角色^[1-4]。部分接合菌是不可忽视的有害菌, 会导致人和牲畜患接合菌病^[5-7]。根据“生命目录”的记载, 目前全世界报道过且现存的接合菌总计 1 334 种(<http://www.catalogueoflife.org/>), 我国大约 333 种(参考郑儒永和刘小勇编著的《壶菌、接合菌、球囊霉》, 正在排版中), 而西藏零星报道过的接合菌总计 20 种, 其系统调查研究几乎还是空白, 大量

潜在的物种需要分离、鉴定、认识和开发^[8]。本研究对采集自西藏各地区代表县的样品进行菌种分离、形态鉴定和分子验证, 然后进行生物多样性统计分析, 从而了解西藏地区的接合菌物种多样性和生物资源现状, 为该地区有害接合菌的控制和有益接合菌的开发利用奠定科学基础。

1 材料与方法

1.1 样品来源

2012–2015 年总计采集 701 个样品, 包括土壤、动物粪便、花、叶、果实等。采集自西藏所有 7 个地区或地级市的 19 个县: 拉萨市(当雄县、

墨竹工卡县)、那曲地区(班戈县、比如县、双湖县)、昌都市(八宿县、察雅县、江达县)、山南市(浪卡子县、曲松县)、日喀则市(定结县、亚东县)、阿里地区(措勤县、普兰县)和林芝市(波密县、工布江达县、林芝县、米林县、墨脱县)(表 1)。

表 1 采样各县经纬度

Table 1 Latitude and longitude of sampling counties

地区 Area	经度 Longitude	纬度 Latitude
当雄县 Dangxung	E91°06'4.18"	N30°28'29.12"
墨竹工卡县 Maizhokunggar	E91°43'50.53"	N29°50'6.56"
班戈县 Baingoin	E90°0'35.85"	N31°24'32.05"
比如县 Biru	E93°40'46.70"	N31°29'50.17"
双湖县 Shuanghu	E88°50'15.51"	N33°12'50.74"
八宿县 Baxoi	E96°55'4.21"	N30°03'15.41"
察雅县 Chagyab	E97°34'7.51"	N30°40'14.02"
江达县 Jomda	E98°13'6.35"	N31°30'58.11"
浪卡子县 Nagarze	E90°23'52.72"	N28°58'8.83"
曲松县 Qusum	E92°12'13.46"	N29°03'49.95"
定结县 Dinggye	E87°45'57.14"	N28°23'27.56"
亚东县 Yadong	E88°54'25.53"	N27°29'11.41"
措勤县 Coqen	E85°09'34.18"	N31°01'4.21"
普兰县 Purang	E81°10'34.45"	N30°17'43.57"
波密县 Bome	E95°46'3.27"	N29°51'32.35"
工布江达县 Gongbujiangda	E93°14'45.88"	N29°53'10.74"
林芝县 Linzhi	E94°21'39.94"	N29°38'17.66"
米林县 Mainling	E94°12'48.55"	N29°13'2.98"
墨脱县 Medog	E95°19'59.51"	N29°19'34.97"

1.2 主要试剂和仪器

Goldview I 型核酸染料, 北京索莱宝科技有限公司; 2×*EsTaq* Master Mix、康为世纪(CWBIO)新型植物基因组 DNA 提取试剂盒, 康为世纪生物科技有限公司。

磁力搅拌机, 艾卡(广州)仪器设备有限公司; 电子天平, 奥豪斯仪器(上海)有限公司; 生化培养箱, 宁波海曙赛福实验仪器厂; 实体显微镜, 株式会社尼康(Nikon Corporation); 电泳仪, 北京东林昌盛生物科技有限公司; 凝胶成像仪, 北京君意东方电泳设备有限公司; 蔡司正置显微镜, 卡尔·蔡司公司(Carl Zeiss AG); 基因扩增仪, 杭州柏恒科技有限公司。

1.3 培养基

PDA (g/L): 马铃薯 200.00, 葡萄糖 20.00, 琼脂 15.00。0.1% PDA (g/L): 马铃薯 0.20, 葡萄糖 0.02, 琼脂 15.00。MEA (g/L): 麦芽提取物 20.00, 琼脂 15.00。0.1% MEA (g/L): 麦芽提取物 0.02, 琼脂 15.00。

1.4 物种鉴定

1.4.1 菌株分离和形态鉴定

菌株分离采用稀释平板法^[9]。从采集于同一县的所有样品中分别取出 5 g, 放入大烧杯中人工混匀。从混匀的样品中称取 5 g, 加入 500 mL 的无菌蒸馏水, 室温下以 200 r/min 的转速在磁力搅拌机上剧烈搅拌 10 min, 吸取 200 μL 悬浮液滴在表面干燥的 9 cm 平皿 PDA、0.1% PDA、MEA、0.1% MEA 培养基上, 用玻璃珠涂布。倒置于 5、25 和 45 °C 的生化培养箱中进行培养。培养 2 d 后在实体显微镜下观察, 将可见菌落切块转移至相应培养基的 6 cm 平皿中于相应温度进一步培养。菌落成熟后, 挑取菌丝制作玻片, 在正置显微镜下进行形态观察, 综合菌落、孢囊梗、囊托、孢子囊、囊轴以及孢囊孢子等形态特征数据, 依据接合菌权威专著进行初步的形态学分类鉴定^[10-13]。

1.4.2 菌种纯化方法

对形态鉴定为接合菌的菌株采用单孢法进行

纯化。挑取孢子囊,放入含 1 mL 无菌水的试管中,剧烈振荡使孢囊壁消解或破裂释放出孢囊孢子,振荡混匀制成孢子悬浮液。吸取 100 μL 孢子悬浮液,移入新的含 900 μL 无菌水的试管中稀释。连续稀释到 10^{-3} – 10^{-6} 倍,各吸取 100 μL 的孢子悬浮液,滴入含有抗生素(50 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素, 50 $\mu\text{g/mL}$ 硫酸链霉素)的 PDA 培养皿中,用 3 mm 玻璃珠旋转涂布均匀,室温倒置培养 12 h,选取各个单菌落之间能够有效分离的稀释倍数,即合适稀释倍数进行正式分离培养。本研究的合适稀释倍数为 10^{-5} 倍,正式培养 12 h 后,每隔 3 h 在体视显微镜下观察培养皿中孢子萌发情况,寻找萌发的单个孢子并标记位置。切取单孢菌落的培养块,转至 PDA 冷冻管中继续培养成熟,加 10% 无菌甘油于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保藏备用。

1.4.3 菌体 DNA 提取

采用康为世纪(CWBIO)新型植物基因组 DNA 提取试剂盒,参考其产品使用说明提取细胞总 DNA。菌体接种于 MEA 固体培养基上,室温下培养 7–10 d 后,用刀片轻轻刮取培养基表面的菌丝,置于灭菌的离心管中,加入少量的石英砂研磨。研磨后加入 Buffer LP1 400 μL 和 RNase A 6 μL 振荡 1 min,室温下放置 10 min 充分裂解。加入 Buffer LP2 130 μL ,振荡 1 min 混匀。12 000 r/min 离心 5 min,将上清液转移至新的离心管中。再加入 Buffer LP3 750 μL ,充分混匀。将上述所得悬浮液全部加入到已装有收集管的吸附柱中,若一次不能加完溶液,可分多次转入。12 000 r/min 离心 1 min,倒掉收集管中的废液,将吸附柱重新放回收集管中。向吸附柱中加入 Buffer GW 500 μL ,12 000 r/min 离心 1 min 进行清洗,倒掉收集管中的废液,将吸附柱重新放回收集管中。重复清洗步骤一次。12 000 r/min 离心 2 min,倒掉收集管中的废液。吸附柱在室温下放置 10 min 以彻底晾干。将吸附柱放于一个新的离心管中,向吸附膜中间部位滴加 Buffer GE 或无菌水 100 μL ,室温下放置 5 min,12 000 r/min 离心 1 min,收集 DNA 溶液,

于–20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4.4 核糖体 DNA 的 PCR 扩增及测序

通用引物对采用 NS5 (5'-AACTTAAAGGAAT TGACGGAAG-3')和 LR5 (5'-TCCTGAGGGAAACT TCG-3')^[14],该引物对扩增的 DNA 片段包括核糖体 DNA 小亚基(SSU rDNA)的 3'端部分序列、内转录间隔区(ITS rDNA)全部序列以及大亚基(LSU rDNA) 5'端部分序列。25 μL 的 PCR 反应体系: 2 \times Master Mix 12.5 μL ,上、下游引物(5 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL ,稀释 10 倍的 DNA 模板 3 μL ,无菌水 7.5 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 33 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

取 3 μL 的 PCR 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳,电泳缓冲液为 1 \times TAE,电泳后在凝胶成像紫外光下检测。电泳检测合格的 PCR 产物样品由上海美吉生物医药科技有限公司北京分公司和北京六合华大科技股份有限公司进行测序。为了双向测序能够有较多的重叠区域,测序引物除 NS5 和 LR5 之外,在区间内增加两个引物,分别为 ITS4 (5'-TTCT CCGCTTATTGATATGC-3')和 ITS5 (5'-GGAAGTAA AAGTCGTAACAAGG-3')^[14]。

1.4.5 分子鉴定和系统发育分析

利用软件 Geneious 8.1 (<http://www.geneious.com>)对测序结果进行自动拼接和人工校正^[15],然后在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中进行 BLAST 比对,以序列覆盖度 90% 和相似性 97% 作为参考阈值。以草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)为外群,使用 PAUP 4.0b10 软件采用邻接法(Neighbour-Joining method)构建系统发育树^[16-17],最后用自举法(Bootstrap)重复 1 000 次对系统发育树上的分支进行统计学检验。

1.5 多样性分析

依据接合菌各菌株的形态和分子鉴定结果,以县为单位,按菌株数、物种数和属数从多到少进行统计,最后综合以上数据,通过香农(Shannon)多样性指数(H')、辛普森(Simpson's)多样性指数(D)和均匀度指数(E)分析西藏地区接合菌生物多样性^[18]。

$$H' = -\sum P_i \ln P_i;$$

$$D = 1 - \sum P_i^2;$$

$$P_i = N_i/N;$$

$$E = H'/\ln S$$

P_i 表示第 i 种的多度比例, N_i 表示第 i 种的菌株数量, N 表示菌株数的总和, S 为群落中的总物种数。

1.6 优势属种和稀有属种分析

优势属种和稀有属种分析主要按照吴雪梅^[19]的标准进行, 属内物种数量占有属整体物种数量的百分比 $\geq 10\%$ 的为优势属, $1\% - 10\%$ 为常见属, $\leq 1\%$ 为稀有属; 物种内菌株数量占有物种整体菌株数量的百分比 $\geq 10\%$ 的为优势种, $1\% - 10\%$ 为常见种, $\leq 1\%$ 为稀有种。

2 结果与分析

2.1 西藏接合菌物种鉴定

研究共获得 871 株接合菌, 基于形态观察进行初步鉴定, 选取了各属种代表性菌种共 367 株测定 SSU、ITS、LSU rDNA 序列, 于 GenBank 中进行 BLAST 相似性搜索。形态和分子结合鉴定出 10 属: 犁头霉属(*Absidia*)、放射毛霉属(*Actinomucor*)、小克银汉霉属(*Cunninghamella*)、被孢霉属(*Mortierella*)、毛霉属(*Mucor*)、根毛霉属(*Rhizomucor*)、根霉属(*Rhizopus*)、共头霉属(*Syncephalastrum*)、伞形霉属(*Umbelopsis*)、接霉属(*Zygorhynchus*)。

在物种等级上鉴定出 26 种, 其中 5 个种曾经在西藏有过报道, 21 个物种是西藏新记录。西藏有报道过的 5 个物种分别是: 雅致放射毛霉(*Actinomucor elegans*)、卷枝毛霉(*Mucor circinelloides*)、总状毛霉(*M. racemosus*)、多变根毛霉(*Rhizomucor variabilis*)和葡萄酒色伞形霉(*Umbelopsis vinacea*)。西藏新记录的 21 个种分别是: 灰绿犁头霉(*Absidia glauca*)、绮丽小克银汉霉(*Cunninghamella elegans*)、高山被孢霉(*Mortierella alpina*)、类变形被孢霉(*M. amoeboides*)、长形被孢霉(*M. elongata*)、球孢高山被孢霉(*M. globalpina*)、无色被孢霉(*M. hyalina*)、英杜被孢霉(*M. indohii*)、

詹金氏被孢霉(*M. jenkinsii*)、沃尔夫被孢霉(*M. wolfii*)、灰褐毛霉(*Mucor brunneogriseus*)、易脆毛霉(*M. fragilis*)、暗色毛霉(*M. fuscus*)、冻土毛霉(*M. hiemalis*)、铅色毛霉(*M. plumbeus*)、刺状毛霉(*M. spinosus*)、少根根霉(*Rhizopus arrhizus*)、匍枝根霉(*R. stolonifer*)、总状共头霉(*Syncephalastrum racemosum*)、长白山伞形霉(*Umbelopsis changbaiensis*)和莫氏接霉(*Zygorhynchus moelleri*)。

在 21 个西藏新记录中有 4 个种在中国属首次记载, 即中国新记录, 分别是: 类变形被孢霉(*Mortierella amoeboides*)、球孢高山被孢霉(*M. globalpina*)、灰褐毛霉(*Mucor brunneogriseus*)和暗色毛霉(*M. fuscus*)。

2.2 各县接合菌多样性指数

各县之间的接合菌组成存在差异, 将分离纯化所获得的 871 株接合菌以县为单位, 按菌株数从多到少进行统计(表 2)。排在前 4 位的分别是八宿县(119 株)、林芝县(116 株)、波密县(110 株)和当雄县(110 株)。排在最后 4 位的分别是江达县(4 株)、比如县(4 株)、班戈县(2 株)和定结县(2 株)。

在物种水平上从多到少依次为(图 1): 波密县、八宿县、当雄县、墨脱县、林芝县、工布江达县、米林县、浪卡子县、墨竹工卡县、措勤县、曲松县、亚东县、普兰县、双湖县、江达县、比如县、定结县、班戈县、察雅县。

与物种排序相比, 在属水平上次序稍有不同(图 1), 比如工布江达县(6 属)由物种水平的并列第 5 位上升到属水平的并列第 1 位, 米林县(5 属)由物种水平的并列第 5 位上升到属水平的并列第 2 位, 普兰县(4 属)由物种水平的并列第 7 位上升到属水平的并列第 3 位。

综合以上菌株、物种和属级数据, 西藏地区各代表县的接合菌多样性香农指数、辛普森指数以及均匀度指数见表 3。多样性指数排在前 4 位的分别是波密县、米林县、当雄县和八宿县。由于班戈县、察雅县和定结县获得的菌种单一, 菌株数量少, 因此无法计算其多样性指数。

表 2 西藏接合菌多样性分析
Table 2 Diversity analyses of Tibetan zygomycotan fungi

物种 Species	八宿县 Baxoi	林芝县 Linzhi	波密县 Bome	当雄县 Dangxiong	墨竹工卡县 Maizhokunggar	曲松县 Qusum	亚东县 Yadong	双湖县 Shuanghu	措勤县 Coqen	浪卡子县 Nagarze	墨脱县 Medog	工布江达县 Gongbujiangda	米林县 Mainling	普兰县 Purang	察雅县 Chagyab	比如县 Biru	江达县 Jianda	班戈县 Bangoin	定结县 Dinggye
匏枝根霉 <i>Rhizopus stolonifer</i>	7	25	6	21	16	21	59	21	23	7	1	2	1	4	8	3	2	2	2
高山被孢霉 <i>Mortierella alpina</i>	2	-*	16	9	-	44	-	40	-	17	-	11	-	3	-	-	1	-	-
冻土毛霉 <i>Mucor hiemalis</i>	21	5	29	48	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
总状毛霉 <i>Mucor racemosus</i>	5	18	14	3	32	-	-	-	-	-	2	-	4	4	-	-	1	-	-
无色被孢霉 <i>Mortierella hyclina</i>	42	-	1	-	-	-	-	-	-	-	16	-	-	-	-	-	-	-	-
易脆毛霉 <i>Mucor fragilis</i>	39	-	3	-	-	12	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
卷枝毛霉 <i>Mucor circinelloides</i>	-	8	7	4	10	-	-	1	8	2	1	5	4	-	-	-	-	-	-
少根根霉 <i>Rhizopus arrhizus</i>	-	-	3	-	29	-	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
雅致放射毛霉 <i>Actinomyces elegans</i>	-	-	3	3	1	-	-	-	12	-	-	1	3	4	-	-	-	-	-
暗色毛霉 <i>Mucor fuscus</i>	-	-	-	21	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
铅色毛霉 <i>Mucor plumbeus</i>	1	-	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
长形被孢霉 <i>Mortierella elongata</i>	-	1	1	-	-	-	-	-	-	1	8	-	-	-	-	1	-	-	-
詹金氏被孢霉 <i>Mortierella jenkinsii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-
绮丽小克银汉霉 <i>Cunninghamella elegans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-
无根根霉 <i>Rhizopus arrhizus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(待续)

(续表 2)																	
总状共头霉	1	58	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Syncephalastrum</i>																	
<i>racemosum</i>																	
葡萄酒伞枝泡囊霉	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>Umbelopsis vinacea</i>																	
莫氏接霉	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>Zygorhynchus</i>																	
<i>moelleri</i>																	
灰绿犁头霉	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Actinomucor glauca</i>																	
类变形被孢霉	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mortierella</i>																	
<i>amoeboides</i>																	
球孢高山被孢霉	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>Mortierella</i>																	
<i>globipina</i>																	
英杜被孢霉	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mortierella indolii</i>																	
沃尔夫被孢霉	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mortierella wolffii</i>																	
灰褐毛霉	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mucor</i>																	
<i>brunneogriseus</i>																	
刺状毛霉	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mucor spinosus</i>																	
多变根毛霉	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhizomucor variabilis</i>																	
长白伞枝泡囊霉	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Umbelopsis</i>																	
<i>changbaiensis</i>																	
合计	119	116	110	110	110	88	78	65	62	45	33	31	21	16	8	4	2
Total																	

注：-：在该县未发现此物种的菌株。
Note: -: No strains of this species found in this county.

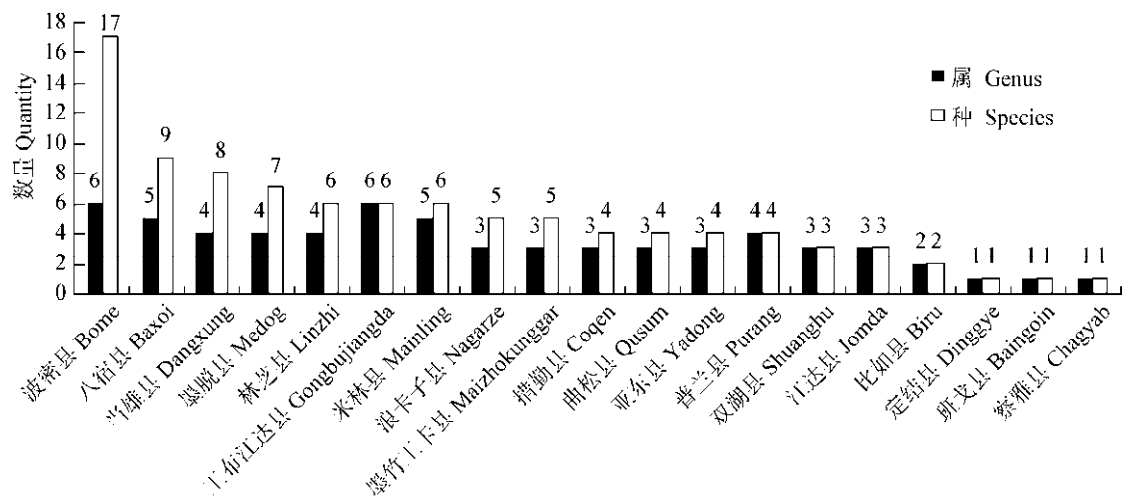


图 1 西藏各县属种数量统计
Figure 1 Statistics of genera and species in different counties of Tibet

2.3 优势属与常见属

西藏接合菌优势属(表 4)包括被孢霉属(*Mortierella*, 30.8%)与毛霉属(*Mucor*, 30.8%), 两属物种累计占总种数的 61.6%; 其余为常见属, 包括根霉属(*Rhizopus*, 7.8%)、伞形霉属(*Umbelopsis*, 7.8%)、犁头霉属(*Absidia*, 3.8%)、放射毛霉属(*Actinomucor*, 3.8%)、小克银汉霉属(*Cunninghamella*, 3.8%)、根毛霉属(*Rhizomucor*, 3.8%)、共头霉属(*Syncephalastrum*, 3.8%)和接霉属(*Zygorhynchus*, 3.8%)。

2.4 优势种、常见种与稀有种

西藏接合菌(表 5)的优势种 3 个, 包括匍枝根霉、高山被孢霉及冻土毛霉, 分布于 33 个县, 其小计菌株数占西藏所有菌株数的百分比为 55.30%。常见种 9 个, 包括总状毛霉、无色被孢霉、易脆毛霉、卷枝毛霉、少根毛霉、美丽放射毛霉、暗色毛霉、铅色毛霉及长形被孢霉, 分布于 45 个县, 其小计菌株数占西藏所有菌株数的百分比为 42.51%。稀有种包括 14 个, 分别是詹金氏被孢霉、莫氏接霉、葡萄酒伞形霉、总状共头霉、刺状毛霉、多变根毛霉、灰褐毛霉、灰绿犁头霉、类变形被孢霉、绮丽小克银汉霉、球孢高山被孢霉、

沃尔夫被孢霉、英杜被孢霉及长白山伞形霉, 分布于 16 个县, 其小计菌株数占西藏所有菌株数的百分比为 2.19%。

3 讨论与结论

3.1 西藏接合菌物种多样性分析

西藏远离海洋, 地域辽阔, 海拔差异大, 地形复杂, 植被多样, 孕育着丰富的自然资源, 包括种类繁多的真菌资源^[8]。物种多样性是群落的重要特征, 反映群落的丰富程度, 同时也是群落环境演变、种群入侵与扩散、竞争作用等生态过程共同作用的结果。本次西藏 19 个代表县接合菌多样性初步分析结果表明, 受海拔、气候和植被等因素的影响, 各县之间接合菌物种丰度截然不同(表 2)。其中, 波密县物种丰度最高, 可能与海拔低、受印度洋暖流影响而形成典型的高原温暖半湿润气候和丰富的植物资源等因素有关; 但同样受印度洋暖流影响且海拔更低的墨脱县的物种丰度却不高, 可能是与分离源数量较少有关, 今后需要增加采集样品的数量; 定结县海拔较高, 达 4 500 m, 属于半干旱气候, 植物资源单调可能影响接合菌物种丰度, 在本研究中是物种丰度最少的地区。

表 3 多样性指数表

Table 3 Diversity index

地区 Area	香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index	均匀度指数 Pielou index
波密县 Bome	2.181	0.847	0.770
米林县 Mainling	1.667	0.797	0.931
当雄县 Dangxung	1.559	0.727	0.750
八宿县 Baxoi	1.528	0.731	0.696
普兰县 Purang	1.379	0.747	0.995
墨脱县 Medog	1.377	0.656	0.708
林芝县 Linzhi	1.350	0.691	0.754
墨竹工卡县 Maizhokunggar	1.342	0.713	0.834
工布江达县 Gongbujiangda	1.339	0.653	0.747
浪卡子县 Nagarze	1.256	0.652	0.781
措勤县 Coqen	1.141	0.634	0.823
江达县 Jomda	1.040	0.625	0.946
曲松县 Qusum	1.020	0.585	0.736
双湖县 Shuanghu	0.716	0.469	0.652
比如县 Biru	0.562	0.375	0.811
亚东县 Yadong	0.401	0.173	0.289
班戈县 Baingoin	0.000	0.000	—
察雅县 Chagyab	0.000	0.000	—
定结县 Dinggye	0.000	0.000	—

Note: —: No data.

在本次研究中,波密县的香农多样性指数和辛普森多样性指数最高(2.181、0.847),其次是米林县(1.667、0.797),说明波密县和米林县的物种多样性高,不止一个居群。而班戈县、察雅县和定结县的香农多样性指数与辛普森指数均为零,说明这 3 个

表 4 西藏接合菌属内物种数量

Table 4 Species number within genera of Tibetan zygomycotan fungi

类别 Category	属名 Genus	种数 Species number	占总比 Percentage (%)
优势属 Dominant genera	毛霉属 <i>Mucor</i>	8	30.8
	被孢霉属 <i>Mortierella</i>	8	30.8
常见属 Common genera	根霉属 <i>Rhizopus</i>	2	7.8
	伞形霉属 <i>Umbelopsis</i>	2	7.8
	犁头霉属 <i>Absidia</i>	1	3.8
	放射毛霉属 <i>Actinomucor</i>	1	3.8
	小克银汉霉属 <i>Cunninghamella</i>	1	3.8
	根毛霉属 <i>Rhizomucor</i>	1	3.8
	共头霉属 <i>Syncephalastrum</i>	1	3.8
	接霉属 <i>Zygorhynchus</i>	1	3.8

县的群落中只有一个物种一个居群存在。多样性指数高的波密县和米林县都属于藏东南植被茂盛的地区,而多样性指数为零的班戈县、察雅县和定结县均属于藏西北高海拔植被较为单一的地区,这一研究结果符合已经报道过的西藏生物多样性由东向西随降雨量和气温的变化而降低、沿藏东南到藏西北海拔梯度随草地寒旱程度的逐步加剧生物物种丰度总体上趋于显著下降的基本趋势^[20-21]。

均匀度代表一个群落或生境中全部物种个体的分配状况,从群落演替的方面来说,均匀度指数越高,群落越稳定。在本次研究中,普兰县的均匀度指数最高,为 0.995,初步说明普兰县的生物群落稳定性最高;其次是江达县和米林县,分别为 0.946、0.931;均匀度指数最低的是亚东县,仅为 0.289,说明亚东县的生物群落稳定性较低。由于本次只是初步探索性研究,取样的随机性较大,得出的结论也仅仅是初步的,还需要更为严谨地取样策略和深入全面的研究才能得到关于西藏各地区生物群落稳定性的相关结论。

表 5 西藏接合菌种内菌株数及其分布地区

Table 5 Strain number and distribution of Tibetan zygomycotan fungi

类别 Category	物种 Species	株数 Strain number	占比 Percentage (%)	分布县数 County number
优势种 Dominant species	匍枝根霉 <i>Rhizopus stolonifer</i>	231	26.61	19
	高山被孢霉 <i>Mortierella alpin</i>	143	16.47	9
	冻土毛霉 <i>Mucor hiemalis</i>	106	12.21	5
常见种 Common species	总状毛霉 <i>Mucor racemosus</i>	83	9.56	9
	无色被孢霉 <i>Mortierella hyalina</i>	59	6.80	3
	易脆毛霉 <i>Mucor fragilis</i>	56	6.45	4
	卷枝毛霉 <i>Mucor circinelloides</i>	50	5.76	10
	少根毛霉 <i>Rhizopus arrhizus</i>	38	4.38	3
	雅致放射毛霉 <i>Actinomucor elegans</i>	27	3.11	7
	暗色毛霉 <i>Mucor fuscus</i>	22	2.53	2
	铅色毛霉 <i>Mucor plumbeus</i>	22	2.53	2
	长形被孢霉 <i>Mortierella elongata</i>	12	1.38	5
稀有种 Rare species	詹金氏被孢霉 <i>Mortierella jenkinsii</i>	3	0.35	1
	莫氏接霉	2	0.23	1
	<i>Zygorhynchus moelleri</i>			
	葡萄酒色伞形霉	2	0.23	2
	<i>Umbelopsis vinacea</i>			
	总状共头霉	2	0.23	2
	<i>Syncephalastrum racemosum</i>			
	刺状毛霉 <i>Mucor spinosus</i>	1	0.12	1
	多变根毛霉 <i>Rhizomucor variabilis</i>	1	0.12	1
	灰褐毛霉 <i>Mucor brunneogriseus</i>	1	0.12	1
	灰绿犁头霉 <i>Absidia glauca</i>	1	0.12	1
	类变形被孢霉 <i>Mortierella amoeboides</i>	1	0.12	1
	绮丽小克银汉霉 <i>Cunninghamella elegans</i>	1	0.12	1
	球孢高山被孢霉 <i>Mortierella globalpina</i>	1	0.12	1
	沃尔夫被孢霉 <i>Mortierella wolfii</i>	1	0.12	1
	英杜被孢霉 <i>Mortierella indohii</i>	1	0.12	1
	长白山伞形霉 <i>Umbelopsis changbaiensis</i>	1	0.12	1

3.2 稀有类群

通过对所得西藏接合菌各物种内的菌株数量及其分布地区的统计分析,明确了 3 个优势种、9 个常见种和 14 个稀有种(表 5)。多数稀有种都是只在 1 个县仅发现 1 株,分布范围和生存数量都极其有限,在西藏脆弱的自然环境中很容易陷入濒危或灭绝,从这个角度考虑,应对全球气候变化和过度放牧、保护已经相当脆弱的西藏生态环境是件十分紧迫和重要的任务^[22-23]。稀有物种占比超过 50% (14/26)这一事实也提示我们,应该加大对西藏生物资源的调查、保藏和保护力度,在本研究的基础上应该加大后续全面的普查工作,争取发现更多的稀有物种,保藏稀有物种的更多的菌株。

本研究分离到了西藏已报道过的多变根毛霉(*Rhizomucor variabilis*)、卷枝毛霉(*Mucor circinelloides*)、总状毛霉(*Mucor racemosus*)^[24]和葡萄酒色伞形霉(*Umbelopsis vinacea*)^[25],但卵孢两型毛霉(*Ambomucor ovalisporus*)^[7]、矮伞形霉(*Umbelopsis nana*)^[26]、灰色小克银汉霉(*Cunninghemella bertholletiae*)^[27]等种则没有被分离到。本次未分离到的 3 个种,很有可能不是广泛分布,推测也属于稀有物种。

致谢:感谢中国科学院微生物研究所真菌学国家重点实验室郭良栋课题组的郑勇副研究员在数据分析方面给予的帮助,感谢密歇根大学 William Davis 博士对英文内容的修订。

REFERENCES

- [1] Wang WP, Chen DR, Du YM. Research progress of fungal chitosan[J]. Chemistry & Bioengineering, 2012, 29(1): 7-12 (in Chinese)
王伟平, 陈德容, 杜予民. 真菌壳聚糖的研究进展[J]. 化学与生物工程, 2012, 29(1): 7-12
- [2] Ran CX, Kan JQ. Research of fungus selection on whole-soybean Sufu fermentation[J]. China Condiment, 2015, 40(8): 1-4,14 (in Chinese)
冉春霞, 阚建全. 全豆腐乳发酵菌种选择的试验研究[J]. 中国调味品, 2015, 40(8): 1-4,14
- [3] Lyu SS, Hou YH, Yan MJ, et al. Recent progress in mutagenesis strategies and high-yielding mechanism for enzyme production in industrial fungi[J]. China Biotechnology, 2016, 36(3): 111-119 (in Chinese)
吕珊珊, 侯运华, 闫孟节, 等. 工业真菌高效产酶突变技术与高产机制[J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(3): 111-119
- [4] Xu CQ. On the application of biological control technology in plant protection[J]. Farm Machinery, 2016(3): 104-105,107 (in Chinese)
徐彩琴. 浅谈生物防治技术在植物保护中的应用[J]. 农业机械, 2016(3): 104-105,107
- [5] He D, Guo L, Wang L. The status quo of zoonotic fungal disease[J]. Chinese Journal of Mycology, 2007, 2(6): 370-373 (in Chinese)
贺丹, 郭亮, 王丽. 人兽共患真菌病的现状[J]. 中国真菌学杂志, 2007, 2(6): 370-373
- [6] Li YY, Wang P, Pi JJ. Review on healthy young people suffering from *Mucor* in lung: one case[J]. Journal of Clinical Pulmonary Medicine, 2016, 21(5): 965-966 (in Chinese)
李月越, 王萍, 邱建军. 健康青年患肺毛霉菌 1 例及文献复习[J]. 临床肺科杂志, 2016, 21(5): 965-966
- [7] Lyu HL, Li C, Li Y, et al. Retrospective analysis of primary cutaneous mucormycosis in China: a review of 32 cases[J]. Chinese Journal of Mycology, 2016, 11(2): 103-107 (in Chinese)
吕红莉, 李澄, 李燕, 等. 中国原发性皮肤毛霉菌病 32 例回顾性分析[J]. 中国真菌学杂志, 2016, 11(2): 103-107
- [8] Pubu CR, Wang M, Liu XY. A review of investigation of fungi in Tibet[J]. Mycosystema, 2016, 35(9): 1025-1047 (in Chinese)
普布次仁, 旺姆, 刘小勇. 西藏真菌资源调查概况[J]. 菌物学报, 2016, 35(9): 1025-1047
- [9] Warcup JH. The soil-plate method for isolation of fungi from soil[J]. Nature, 1950, 166(4211): 117-118
- [10] Gams W. A key to the species of *Mortierella*[J]. Persoonia, 1977, 9(3): 381-391
- [11] Schipper MAA. On certain species of *Mucor* with a key to all accepted species[J]. Studies in Mycology, 1978, 17: 1-52
- [12] O'Donnell KL. Zygomycetes in Culture[M]. Athens, Georgia: Department of Botany, University of Georgia, 1979
- [13] Zheng RY, Chen GQ, Huang H, et al. A monograph of *Rhizopus*[J]. Sydowia, 2008, 59(2): 273-372
- [14] White TJ, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[A]//Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, et al. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications[M]. New York: Academic Press, 1990: 315-322
- [15] Kearse M, Moir R, Wilson A, et al. Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data[J]. Bioinformatics, 2012, 28(12): 1647-1649
- [16] Zhang LN, Rong CH, He Y, et al. A bird's eye view of the algorithms and software packages for reconstructing phylogenetic trees[J]. Zoological Research, 2013, 34(6): 640-650 (in Chinese)

- 张丽娜, 荣昌鹤, 何远, 等. 常用系统发育树构建算法和软件鸟瞰[J]. 动物学研究, 2013, 34(6): 640-650
- [17] Swofford DL. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)[M]. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2002
- [18] Ma KP, Liu YM. Measurement of biotic community diversity I α diversity (Part 2)[J]. Chinese Biodiversity, 1994, 2(4): 231-239 (in Chinese)
马克平, 刘玉明. 生物群落多样性的测度方法 I α 多样性的测度方法(下)[J]. 生物多样性, 1994, 2(4): 231-239
- [19] Wu XM. Studies on diversity of freshwater fungi in Wuyiling Wetland Nature Reserve[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Forestry University, 2010 (in Chinese)
吴雪梅. 乌伊岭湿地水生真菌多样性的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文, 2010
- [20] Cai XB, Peng YL. Geographical distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in the grassland ecosystems of the Tibetan plateau[J]. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(10): 2807-2818 (in Chinese)
蔡晓布, 彭岳林. 西藏高原草地生态系统丛枝菌根真菌的地理分布[J]. 生态学报, 2016, 36(10): 2807-2818
- [21] Zhu GL, Li J, Wei XH, et al. Longitudinal patterns of productivity and plant diversity in Tibetan alpine grasslands[J]. Journal of Natural Resources, 2017, 32(2): 210-222 (in Chinese)
- 朱桂丽, 李杰, 魏学红, 等. 青藏高寒草地植被生产力与生物多样性的经度格局[J]. 自然资源学报, 2017, 32(2): 210-222
- [22] Schaller G. China steps up conservation work in ecological protection on Tibet[J]. Resource Recycling, 2013(3): 70-72 (in Chinese)
乔治·夏勒. 中国正加快西藏生态保护步伐[J]. 资源再生, 2013(3): 70-72
- [23] Zhu LP. Tibetan modernization must stick to the environmental bottom line[J]. Social Outlook, 2011(9): 40-42 (in Chinese)
朱立平. 西藏现代化必须坚守环境底线[J]. 社会观察, 2011(9): 40-42
- [24] Guo XF, Wang YG, Liu S, et al. Isolation and identification of fungus from the Tibetan highland barley wine yeast[J]. Journal of Tibet University, 2014, 29(2): 37-43 (in Chinese)
郭小芳, 王燕鸽, 刘帅, 等. 西藏青稞酒曲中真菌的分离与鉴定[J]. 西藏大学学报: 自然科学版, 2014, 29(2): 37-43
- [25] Wang YN, Liu XY, Zheng RY. Four new species records of *Umbelopsis* (Mucoromycotina) from China[J]. Journal of Mycology, 2013, 2013: 970216. DOI: 10.1155/2013/970216
- [26] Liu XY, Zheng RY. New taxa of *Ambomucor* (Mucorales, Mucoromycotina) from China[J]. Mycotaxon, 2015, 130(1): 165-171
- [27] Zheng RY, Chen GQ. A monograph of *Cunninghamella*[J]. Mycotaxon, 2001, 80: 1-75