

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(6):835-842; 4 June 2011
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicroen>

连作花生田根际土壤优势微生物的分离和鉴定

颜艳伟¹, 张红¹, 刘露¹, 咸洪泉^{1*}, 崔德杰^{2*}

青岛农业大学,¹ 生命科学学院,² 资源与环境学院, 青岛 266109

摘要:【目的】从不同连作年限的花生田根际土壤中分离优势微生物并进行鉴定,为研究花生连作后优势微生物的变化奠定基础。【方法】采用土壤稀释分离法从不同连作年限花生根际土壤中分离优势细菌、真菌和放线菌,结合菌株形态特征、培养性状、生理生化特征及 16S rDNA 序列分析对细菌、放线菌进行鉴定,通过形态特征、培养特征和分子鉴定方法对优势真菌进行鉴定。【结果】从连作花生田根际土壤中分离鉴定出 7 种优势细菌、7 种优势真菌和 7 种优势放线菌。7 种优势细菌分别为 *Leifsonia xyli*、氯酚节杆菌 (*Arthrobacter chlorophenolicus*)、黄色微杆菌 (*Microbacterium flavescens*)、鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas* sp.)、巴斯德菌属 (*Pasteurella* sp.)、简单芽孢杆菌 (*Bacillus simplex*) 和巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)。7 种优势真菌分别为枝状枝孢菌 (*Cladosporium cladosporioides*)、产紫青霉 (*Penicillium purpurogenum*)、哈茨木霉有性型 (*Hypocrea lixii*)、*Exophiala pisciphila*、微紫青霉 (*Penicillium janthinellum*)、曲霉 (*Aspergillus* sp.) 和大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*)。7 种优势放线菌分别为紫红链霉菌 (*Streptomyces violaceoruber*)、华丽黄链霉菌 (*Streptomyces flaveus*)、*Streptomyces panaciterrae*、不产色链霉菌 (*Streptomyces achromogenes*)、假浅灰链霉菌 (*Streptomyces pseudogriseolus*)、纤维素链霉菌 (*Streptomyces cellulosa*) 和金色链霉菌 (*Streptomyces aureus*)。【结论】本研究是第一次系统的从连作花生根际土中分离鉴定优势微生物,种植花生后根际土壤中优势微生物的种类发生了明显变化,但变化没有规律。

关键词: 花生, 连作障碍, 细菌, 真菌, 放线菌

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 06-0835-08

连作障碍指在同一土壤中连续栽培同种或同科的作物时,即使在正常的栽培管理措施下,也会发生长势变弱、产量和品质下降的趋势^[1]。而花生为连作障碍较严重的作物,花生连作荚腐病、白绢病、枯萎病和菌核病等病害加重,荚果产量降低,质量下降,生产成本增加^[2]。花生连作一般减产 10% 以上,连作年限愈长,减产愈重^[3]。人们从不同的角度对作物连作的障碍因素进行了分析^[4-9],认为连

作引起土壤微生物区系发生了较大的变化。有关连作后土壤中微生物的变化,大部分是从数量变化上来分析,目前为止尚未见有关对连作后土壤中优势微生物进行分离鉴定的报道。

本研究以严重发生连作障碍的山东莱西不同连作年限的花生根际土壤为研究对象,从中分离出优势细菌、真菌和放线菌,并对其进行鉴定,研究连作后根际土壤中优势微生物种类的变化,进而研究其

基金项目:山东省科技发展计划项目(2009GG10009035)

* 通信作者。咸洪泉, Tel: +86-532-86080482, E-mail: xianli0517@yahoo.com.cn; 崔德杰, E-mail: cuidejie@163.com

作者简介:颜艳伟(1986-),女,山东泗水人,硕士研究生,主要从事农业微生物研究。E-mail: yywt1@126.com

收稿日期:2010-12-07;修回日期:2011-03-01

对花生连作障碍的影响。为从微生物方面解释花生发生连作障碍的原因提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土样来源和样土的采集:2008 - 2009 年于花生收获期从莱西市分别选择未种过花生(0 年)、种植 1 年花生(1 年)、连作 2 年花生(2 年)、连作 4 年花生(4 年)、连作 7 年花生(7 年)的典型地块。每块地 5 点取样,用取样铲采集 0 - 20 cm 深度土层的植物根系周围土壤,随即装入无菌塑料袋中。取样时抖落掉大土块,附着在根表面的土壤收集后晾干研碎作为根际土壤样品。

1.1.2 主要试剂和仪器:PCR 试剂、PMD18-T 载体购自大连宝生物;柱式 DNA 胶回收试剂盒购自上海生工生物工程有限公司;Goldview 核酸染料,购于北京赛百盛生物工程有限公司;PCR 仪,德国 Eppendorf 公司;HWS-250 型恒温恒湿培养箱,上海森信实验仪器有限公司。

1.2 优势微生物的分离方法

土壤自然风干后过 20 目筛,采用土壤稀释分离法^[10]制备 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 的土壤悬浮液。每个土样 3 次重复。根据所分离的微生物,取不同浓度的土壤悬浮液(真菌取 10^{-3} 、 10^{-4} ,放线菌取 10^{-4} 、 10^{-5} ,细菌取 10^{-5} 、 10^{-6}),摇匀后吸取 0.2 mL 加入到预先倒好的平板中。真菌用马丁氏琼脂平板,临用前加入 0.03% 链霉素稀释液 100 mL,使每 mL 培养基中含链霉素 30 μ g;放线菌用高氏一号琼脂平板,苯酚浓度为 0.03%;细菌用牛肉膏蛋白胨平板。用灭菌的涂布器涂抹均匀。每处理重复 3 次,28 $^{\circ}$ C 培养,分别计数细菌、真菌和放线菌的菌落数,统计每克土中细菌、真菌和放线菌的总数。

根据平板内菌落的形态、大小、色泽和生长速度等特点,从每个样品尽可能多的挑取单菌落划线纯化。依据菌落培养性状和形态特征对菌株进行归类并统计数量。确定优势菌,进行编号保存,待进一步鉴定。优势菌定义为:在最高稀释度上,菌落数占总菌落数的比例为 10% 以上的菌称之为优势菌^[11]。每个样品中最多的菌落数达不到 10% 的,取菌落数最多的前两种作为该样品的优势菌。

微生物的数量计算方法:

$$\text{菌数/克土} = \frac{5 \times \text{平均菌落数} \times \text{稀释倍数} \times 100}{10}$$

1.3 优势菌的鉴定

1.3.1 优势细菌的鉴定:将分离到的优势细菌接种到牛肉膏蛋白胨培养基上,28 $^{\circ}$ C 培养,观察 18 - 24 h 菌龄的菌落形态。细菌的形态特征、培养特性及生理生化实验均按照参考文献[12]进行。

提取各菌株基因组 DNA,采用通用引物 27f/1492r 进行 PCR 扩增 16SrRNA 基因^[13]。PCR 反应程序如下:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 1 min,53 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 2 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物送至北京诺赛基因公司测序。测序结果在 NCBI 网站上用 BLAST 软件与 GenBank 核酸数据库中相关种属的 16S rDNA 序列进行同源性比较。

1.3.2 优势真菌的鉴定:将分离到的优势真菌接种到马铃薯培养基(PDA)上,26 $^{\circ}$ C 培养 7 天后,描述菌落质地、形状、大小、隆起形状和颜色等,同时在光学显微镜(10 \times 40 倍)下观察菌株的分生孢子和分生孢子梗形态并拍照。参照有关资料进行形态学鉴定^[14-18]。

提取优势真菌的 DNA,采用真菌核糖体 18S rDNA 的通用引物 ITS1 和 ITS4 进行 PCR 扩增。回收扩增产物,送至北京诺赛基因公司测序。测序结果在 NCBI 网站上用 BLAST 软件与 GenBank 核酸数据库中相关种属的 DNA 序列进行同源性比较。

1.3.3 优势放线菌的鉴定:将分离到的优势放线菌接种到高氏一号培养基、PDA、伊莫松培养基(EM)、柠檬酸铁培养基、葡萄糖酵母膏培养基和柴纳斯琼脂培养基上,28 $^{\circ}$ C 插片培养 7 - 10 d,观察菌丝体的颜色及可溶性色素,同时取片,用石碳酸复红染色,显微镜下观察菌体的形态特征^[19]。

参照《放线菌的分类和鉴定》^[20]和《常见细菌系统鉴定手册》^[12]的相关内容进行生理生化鉴定。分子鉴定同 1.3.1 优势细菌的分子鉴定。

2 结果

2.1 不同连作年限根际土壤微生物群落变化

对连作花生田根际土壤中微生物的分离计数结果见表 1。从表 1 可以看出不同连作年限根际土壤中细菌、放线菌和真菌的数量有明显变化,0 - 4 年真菌的数量随连作年限的增加而增加,细菌的数量

随连作年限的增加而减少,这与封海胜等^[4,21]的研究结果一致,只是连作7年后真菌的数量有所下降,细菌的数量又有所增加;与0年相比,种植花生后根

际土中放线菌的数量减少,但没有明显的规律。细菌、真菌和放线菌的数量变化情况还需进一步研究。

表1 不同连作年限根际土中细菌、放线菌和真菌的数量变化

Table 1 Bacteria, actinomycete and fungi's quality change in rhizosphere of different continuous cropping age

| Continuous cropping year (a) | Bacteria | | Actinomycete | | Fungi | |
|------------------------------|------------------------------|------------------|---------------------------------|------------------|--------------------------|------------------|
| | Bacteria number (cfu/g·soil) | Less than 0 year | Actinomycete number (cfu/gsoil) | Less than 0 year | Fungi number (cfu/gsoil) | More than 0 year |
| 0 | 3×10^7 | - | 4.32×10^6 | - | 1.5×10^5 | - |
| 1 | 1.17×10^7 | 61% | 2.31×10^6 | 46.53% | 1.96×10^5 | 30.66% |
| 2 | 0.87×10^7 | 71% | 2.39×10^6 | 44.68% | 2.31×10^5 | 54% |
| 4 | 0.86×10^7 | 71.33% | 1.56×10^6 | 63.89% | 2.5×10^5 | 66.67% |
| 7 | 1.03×10^7 | 65.67% | 2.42×10^6 | 43.98% | 1.8×10^5 | 20% |

2.2 优势细菌、真菌和放线菌的分离结果

从不同连作年限花生根际土壤中共分离出细菌1278株,真菌2094株,放线菌2152株。按照优势菌的标准从中进一步分离优势菌株。优势细菌11株,编号为X1-X11;优势真菌8株,编号为F01、F19、F117、F21、F41、F43、F72和F724;优势放线菌9株,编号为S01、S011、S11、S13、S21、S22、S41、S44和S72。0年优势微生物为X1、X2、X3、F01、F43、S01、S011,种植1年花生根际土优势微生物为X4、X5、F19、F43、S11、S13,种植2年花生根际土优势微生物为X6、X7、F117、F21、S21、S22,种植4年花生根际土优势微生物为X8、X9、F41、F43、S41、S44,种植7年花生根际土优势微生物为X10、X11、F72、F724、S21、S72。

2.3 优势细菌、真菌和放线菌的鉴定结果

2.3.1 优势细菌的分类鉴定:对各优势细菌培养,进行革兰氏染色及各项生理生化测定后,结果表明:X3、X7、X8这3株菌为革兰氏阴性,其余8株菌革兰氏阳性,菌体均为杆状或短杆状;菌株X1、X9、X10有芽孢,具有芽孢杆菌属的典型特征,如菌体杆状、革兰氏染色阳性、有芽孢、接触酶阳性等;菌株X2无芽孢、氧化酶延迟、接触酶阳性、产吡啶;菌株X3无芽孢、杆菌、氧化酶阴性、接触酶阳性、明胶液化、不水解淀粉;菌株X4和X11的生理生化特征一样,两者均为无芽孢革兰氏阳性菌、氧化酶、接触酶阳性、硝酸盐还原、不产吡啶、甲基红、V.P.阴性等,有可能是同一种菌;菌株X5无芽孢、氧化酶延迟、接触酶阳性、甲基红、V.P.阴性、不产吡啶、水解淀粉、硝酸盐还原;菌株X6无芽孢、菌落黄色、不透

明、接触酶阳性;菌株X7无芽孢、水解淀粉、明胶液化、V.P.阳性、不产H₂S、硝酸盐还原;菌株X8无芽孢、杆状、菌体排列单生或成对、葡萄糖发酵、氧化酶、接触酶阳性、不液化明胶等。

11株优势细菌的16S rDNA序列长度为1453-1516 bp。将序列提交到GenBank,菌株X7-X11登录号为HQ530510-HQ530514,菌株X1-X6登录号为HQ530515-HQ530520。在GenBank中进行BLAST比对,结合菌株形态特征和生理生化特征,菌株鉴定结果如下,菌株X1属于芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.),菌株X2为耐盐节杆菌(*Arthrobacter pascens*),菌株X3为丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*),菌株X4和X11为同一种菌,是*Leifsonia xyli*,菌株X5为氯酚节杆菌(*Arthrobacter chlorophenolicus*),菌株X6为黄色微杆菌(*Microbacterium flavescens*),菌株X7属于鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas* sp.),菌株X8属于巴斯德菌属(*Pasteurella* sp.),菌株X9为简单芽孢杆菌(*Bacillus simplex*),菌株X10为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。

2.3.2 优势真菌的鉴定:优势真菌在PDA培养基上的菌落形态和菌体形态:菌株F01菌落中心平坦,边缘整齐,圆形,质地絮状兼绒状;菌丝鸚鵡绿色,背面橙黄色,7 d菌落直径:42 mm,分生孢子梗发生于气生菌丝,顶端明显膨大,帚状枝双轮生,梗颈明显,孢子球形;菌株F19菌落圆形,边缘不整齐,菌丝稀疏,淡褐色,初期形成同心圆,有褶皱,后期菌落上覆盖黑绿色的孢子层,背面有裂缝,淡棕色,生长慢,7 d菌落直径:33 mm,分生孢子梗不分枝,分隔处不缢缩,分生孢子顶生或侧生,形成分枝的孢子链,孢

子椭圆形,淡褐色;菌株 F117 菌落圆形,初期菌落黄色致密,边缘白色,后期菌落酱紫色,有红褐色渗出液,背面红褐色,未发现孢子;菌株 F21 菌落圆形黑色致密,生长慢,7 d 菌落直径:15 mm,凸起,背面黑色,分生孢子梗短,分枝少,分生孢子串生,圆筒形;菌株 F41 菌落圆形黄色致密,后期从中间开始变红,而后整个菌落变红,有红褐色渗出液,背面初期中间红褐色,后期整个背面红褐色,7 d 菌落直径:36 mm,分生孢子梗发生于基质或气生菌丝,帚状枝规则大且显著叉开,主要是双轮生,孢子卵圆形;菌株 F43 菌落圆形,致密,菌丝白色,初期菌落白色,后期边缘淡灰色,背面黄色渐变为灰色,7 d 菌落直径:44 mm,分生孢子梗发生于基质,顶端膨大,帚状枝双轮生,偶有单生,披针形,分生孢子椭圆形;菌株 F72 菌落圆形,较密,初期菌丝灰白色,后期覆盖绿色孢子层,背面淡棕色,7 d 菌落直径:70 mm,分生孢子梗发生于气生菌丝,分生孢子半球形,顶囊近球形,分生孢子球形;菌株 F724 菌落圆形,平坦,菌丝较疏,灰白色,生长较长时间菌丝变褐色,菌落中心渐变为黑色,背面中间黑色。7 d 菌落直径:

49 mm,分生孢子长卵圆形,单胞无色,极少分隔,分生孢子梗轮枝状,每轮有 3 - 4 分枝,梗基部无色透明。

进一步用分子生物学方法鉴定,扩增获得的 ITS 序列长度为 551 - 666 bp。将序列提交到 GenBank,获得菌株登录号。菌株 F01、F19、F117、F21、F41、F43、F72、F724 的登录号依次为 HQ839772、HQ839776、HQ596947、HQ839778、HQ839780、HQ839781、HQ839783、HQ839784。将测序结果在 GenBank 中进行 BLAST 比对,结合形态特征,确定菌株 F01 为嗜松青霉 (*Penicillium pinophilum*), F19 为枝状枝孢菌 (*Cladosporium cladosporioides*), F117 为哈茨木霉有性型 (*Hypocrea lixii*), F21 为外瓶霉 (*Exophiala pisciphila*), F41 为微紫青霉 (*Penicillium janthinellum*), F43 为产紫青霉 (*Penicillium purpurogenum*), F72 属于曲霉属 (*Aspergillus* sp.), F724 为大两轮枝菌 (*Verticillium dahliae*)。

2.3.3 优势放线菌的鉴定:放线菌在六种培养基上的培养特征如表 2 所示。菌株的生理生化特征如表 3 所示。

表 2 放线菌的培养特征

Table 2 Cultural characteristics of actinomycetes

| Strain | Features | Medium | | | | | |
|--------|--------------------|------------------------|--------------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------------|---------------|
| | | PDA | Gause 1 cultural medium. | EM | Ferric citrate | Glucose yeast extract medium | Tresners |
| S01 | growing station | well | well | weak | bad | well | well |
| | aerial mycelium | grayish white | Reddish-brown | Little, gray | without | grayish white | white |
| | substrate mycelium | Chestnut brown | Reddish-brown | brown | Light brown | Reddish brown | brown |
| | soluble pigment | Chinnameon light brown | brown | without | without | brown | without |
| S011 | growing station | well | well | weak | bad | well | well |
| | aerial mycelium | Snow white | white | without | Little, white with blue | White to blue | Snow white |
| | substrate mycelium | indigo | blue | Dark blue | indigo | indigo | blue |
| S11 | soluble pigment | blue | indigo | blue | indigo | indigo | indigo |
| | growing station | well | well | well | bad | well | well |
| | aerial mycelium | Pink gray | Pink to grayish white | Little, grayish white | without | Gray camel | gray |
| S13 | substrate mycelium | Red brown | Red brown to blue | orange | colorless | Light brown to dark brown | orange |
| | soluble pigment | Spring plum red | Grayish blue | Light brown without | without | without | without |
| | growing station | well | well | bad | weak | well | well |
| S13 | aerial mycelium | Pink gray | Pink white | Little, grayish white | without | Cuttlefish ash | Grayish white |
| | substrate mycelium | brown | apricot | brown | colorless | Light red brown | brown |
| | soluble pigment | brown | without | without | without | without | Light brown |

续表 2

| Strain | Medium | | | | | | |
|--------|--------------------|---------------|--------------------------|--------------|----------------|------------------------------|----------------|
| | Features | PDA | Gause 1 cultural medium. | EM | Ferric citrate | Glucose yeast extract medium | Tresners |
| S21 | growing station | worse | well | bad | bad | worse | well |
| | aerial mycelium | Without | creamy white | without | without | without | without |
| | substrate mycelium | Bluish white | Creamy white | Cream yellow | colorless | colorless | brown |
| | soluble pigment | without | without | without | without | without | Dark brown |
| S22 | growing station | well | well | bad | weak | well | well |
| | aerial mycelium | Grayish white | white | without | without | without | without |
| | substrate mycelium | brown | Jade pink | Light brown | colorless | colorless | brown |
| | soluble pigment | gray | Light pink | without | without | without | without |
| S41 | growing station | well | well | bad | weak | well | well |
| | aerial mycelium | gray | gray | without | without | Mouse gray | gray |
| | substrate mycelium | Light yellow | Pink with gray | brown | colorless | yellow | brown |
| | soluble pigment | Cream yellow | Light pale red | without | without | without | Light green |
| S44 | growing station | well | well | bad | weak | well | well |
| | aerial mycelium | gray | Ivory white | without | without | Grayish white | Grayish white |
| | substrate mycelium | Light brown | Cream yellow | Light brown | colorless | orange | Gray with pink |
| | soluble pigment | Light orange | Light brown | without | without | without | without |
| S72 | growing station | well | well | bad | weak | well | well |
| | aerial mycelium | Gray with red | Light yellow | Little, gray | without | Dark gray | gray |
| | substrate mycelium | brown | Yolk yellow | Light brown | colorless | Coffee brown | apricot |
| | soluble pigment | brown | Light yellow | without | without | without | Light yellow |

表 3 放线菌的生理生化特征

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of actinomycetes

| Strain | S01 | S011 | S11 | S13 | S21 | S22 | S41 | S44 | S72 |
|-----------------------------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| starch hydrolysis | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| gelatin liquefaction | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| H ₂ S production | + | - | - | - | - | + | - | - | - |
| nitrate reduction | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| melanin production | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| cellulose degradation | + | + | + | + | + | - | + | + | + |
| milk solidification | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| milk peptonization | - | + | + | + | + | + | - | - | + |
| glucose | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| arabinose | + | + | + | - | + | - | + | + | + |
| fructose | + | + | + | + | + | - | + | + | + |
| maltose | + | + | + | + | + | - | + | + | + |
| rhamnose | + | + | + | + | + | - | + | + | + |
| raffinose | + | + | + | - | - | - | - | + | + |
| inositol | + | + | + | - | + | + | + | + | + |
| sucrose | - | - | - | + | - | - | - | + | - |
| mannitol | + | + | + | - | + | + | + | + | + |
| xylose | + | + | + | - | + | + | + | + | + |

测定 9 株优势放线菌的 16SrDNA 序列, 序列长度为 1488 - 1490 bp, 将序列提交到 GenBank, 获得登录号。菌株 S01、S011、S11、S13、S21、S22、S41、S44、S72 的登录号依次为 HQ850404、HQ850406、HQ850407、HQ850408、HQ850416、HQ850411、HQ850412、HQ850413、HQ850414。将序列在 GenBank 中 BLAST 比对, 结合放线菌株的培养特征、生理生化和碳源利用特征, 确定菌株 S01 为秋吉链霉菌 (*Streptomyces akiyoshiensis*), S011 为天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*), S11 为紫红链霉菌 (*Streptomyces violaceoruber*), S13 为华丽黄链霉菌 (*Streptomyces flaveus*), S21 为 *Streptomyces panaciterrae*, S22 为不产色链霉菌 (*Streptomyces achromogenes*), S41 为假浅灰链霉菌 (*Streptomyces pseudogriseolus*), S44 为纤维素链霉菌 (*Streptomyces cellulosa*), S72 为金色链霉菌 (*Streptomyces aureus*)。

3 讨论

本研究首次较系统的从连作花生根际土壤中分离鉴定优势微生物, 种植过花生及花生连作后土壤中优势细菌、真菌和放线菌种类发生明显变化。未种过花生根际土壤中优势细菌为 *Bacillus* sp.、*Arthrobacter pascens* 和 *Pseudomonas syringae*, 优势真菌为 *Penicillium pinophilum* 和 *Penicillium purpurogenum*, 优势放线菌为 *Streptomyces akiyoshiensis* 和 *Streptomyces coelicolor*; 种植 1 年花生根际土壤优势细菌为 *Leifsonia xyli* 和 *Arthrobacter chlorophenolicus*, 优势真菌为 *Cladosporium cladosporioides* 和 *Penicillium purpurogenum*, 优势放线菌为 *Streptomyces violaceoruber* 和 *Streptomyces flaveus*; 花生连作 2 年土壤中优势细菌为 *Microbacterium flavescens* 和 *Sphingomonas* sp., 优势真菌为 *Hypocrea lixi* 和 *Exophiala pisciphila*, 优势放线菌为 *Streptomyces panaciterrae* 和 *Streptomyces achromogenes*; 连作 4 年土壤中优势细菌为 *Pasteurella* sp. 和 *Bacillus simplex*, 优势真菌为 *Penicillium janthinellum* 和 *Penicillium purpurogenum*, 优势放线菌为 *Streptomyces pseudogriseolus* 和 *Streptomyces cellulosa*; 连作 7 年优势细菌为 *Bacillus megaterium* 和 *Leifsonia xyli*, 优势真菌为 *Aspergillus* sp. 和 *Verticillium dahliae*, 优势放线菌为 *Streptomyces*

panaciterrae 和 *Streptomyces aureus*。

实验发现花生连作后每份土样中的优势菌种类有明显变化, 但是没有变化规律。优势细菌中 *Leifsonia xyli* 是种植 1 年和连作 7 年花生根际土的优势菌; 优势真菌中 *Penicillium purpurogenum* 是种植 1 年花生和连作 4 年花生根际土壤的优势菌; 优势放线菌中, 只有 *Streptomyces panaciterrae* 同时是连作 2 年和连作 7 年花生根际土壤的优势菌。其它的优势菌虽然在不同连作年限土样中也能分离到, 但不是相应土壤的优势菌。

连作条件下花生根系分泌物的积累及其对土壤微生物的化感作用, 很可能是导致连作花生减产、品质下降的主要原因之一^[22]。酚酸和黄酮类物质是化感物质^[23], 不同连作年限花生土壤酚酸物质主要有对羟基苯甲酸、香草酸、香豆酸、香豆素和苯甲酸^[24]。*Arthrobacter chlorophenolicus* 能降解不同类型的有毒的酚类物质^[25], *Sphingomonas* sp. 的一个显著特征是降解多环或单环芳香族化合物如苯甲酸、水杨酸, 它能利用这些芳香族化合物为唯一碳源进行生长^[26]。*Arthrobacter chlorophenolicus* 和 *Sphingomonas* sp. 作为连作花生根际土样的优势细菌, 可能与化感物质在土壤中累积有关。

分离到的优势细菌和放线菌中没有对花生具有致病性的菌株, 分离到的优势真菌中大丽轮枝菌能够侵染花生, 对花生致病^[27]。另外从连作花生土样中分离到立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)、茄腐镰刀菌 (*Fusarium solani*)、雪霉镰刀菌 (*Microdochium nivale*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 和露湿漆斑菌 (*Myrothecium roridum*), 立枯丝核菌能引起花生立枯病, 镰刀菌引起花生果腐病和根腐病, 造成花生减产^[28-32], 黑曲霉引起花生冠腐病, 露湿漆斑菌也对花生具有致病性^[33]。虽然优势微生物中引起花生病害的菌株少, 但是连作后花生根际土壤中分布着多种对花生具有致病性的菌株, 这些病原菌, 不利于土壤中微生物种群的平衡, 而有利于植物根部病害的发生, 使花生产量降低, 引发连作障碍。

本实验对连作花生田根际土中的优势微生物进行研究, 优势微生物的种类变化没有明显的规律, 可能是因为所取土样不是同一地块的, 不同地块的理化性质和环境不同也会影响微生物的种类。土样处理过程中, 有晾干研碎这一步, 可能会导致许多不耐干旱细菌的死亡, 而对产芽孢菌几乎没有影响, 也会

影响测定结果。连作后花生根系分泌物积累,影响微生物的种类变化,以后会从根系分泌物方面进行进一步研究。

参考文献

- [1] 吴凤芝,赵凤艳,刘元英.设施蔬菜连作障碍原因综合分析及防治措施.东北农业大学学报(*Journal of Northeast Agricultural University*), 2000, 31(3): 241-247.
- [2] Lemon RG, Lee TA, Black M, Grichar WJ, Baughman T, Dotray P, Trostle C, McFarland M, Bauman P, Crumley C, Russell JS, Norman G (2001) Texas agricultural extension service fact sheet B-1514. Texas Agricultural Extension Service, Lubbock, TX.
- [3] 张思苏,封海胜,万书波,隋清卫,左学青.花生不同连作年限对植株生育的影响.花生学报(*Journal of Peanut Science*), 1992, (02):21-23.
- [4] 张思苏,封海胜,万书波,隋清卫,左学青.花生连作对土壤及根际微生物区系的影响.山东农业科学(*Shandong Agricultural Sciences*), 1993, 1:13-15.
- [5] 张思苏,封海胜,万书波,隋清卫,左学青.土壤微生物与连、轮作花生的相互效应研究.莱阳农学院学报(*Journal of Laiyang Agricultural College*), 1995, 12(2): 97-101.
- [6] 高子勤,张香.连作障碍与根际微生态研究.应用生态学报(*Chinese Journal of Applied Ecology*), 1998, 19(5):549-554.
- [7] 李仲强,谭周进,夏海.耕作制度对土壤微生物区系的影响.湖南农业科学(*Hunan Agricultural Sciences*), 2001, 2:24-25.
- [8] 孙秀山,封海胜,万书波,左学青.连作花生主要微生物类群与土壤酶活性变化及其交互作用.作物学报(*Acta Agronomica Sinica*), 2001, 27(5): 617-621.
- [9] 徐瑞富,王小龙.花生连作田土壤微生物群落动态与土壤养分关系研究.花生学报(*Journal of Peanut Science*), 2003, 32(3): 19-24.
- [10] 鲁素云.植物病害生物防治学.北京:北京农业大学出版社, 1993.
- [11] 李文建.肠道需氧优势菌群分离方法的建立及初步应用.中国微生物生态学报(*Chinese Journal of Microecology*), 1999, 11(5):315-316.
- [12] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册.北京:科学出版社, 2001: 330-336.
- [13] 徐亮.杨树内生细菌的分子鉴定及TasA基因的克隆与表达.山东农业大学硕士学位论文, 2009.
- [14] 齐祖同.中国真菌志(5卷).北京:科学出版社, 2003.
- [15] 张中义.中国真菌志(14卷).北京:科学出版社, 2003.
- [16] 孔华忠.真菌志(35卷).北京:科学出版社, 2003.
- [17] 戴芳澜.中国真菌总汇[M].北京:科学出版社, 1979.
- [18] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社, 1979.
- [19] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组.链霉菌鉴定手册.北京:科学出版社, 1975.
- [20] 阎逊初.放线菌的分类和鉴定.北京:科学出版社, 1992.
- [21] 徐瑞富,任永信.连作花生田土壤微生物群落动态与减产因素分析.农业系统科学与综合研究(*System Sciences and Comprehensive Studies in Agriculture*), 2003, 19(1):33-34.
- [22] 刘苹,江丽华,万书波等.花生根系分泌物对根腐镰刀菌和固氮菌的化感作用研究.中国农业科技导报(*Journal of Agricultural Science and Technology*), 2009, 11(4):107-111.
- [23] 王树起,韩晓增,乔云发.根系分泌物的化感作用及其对土壤微生物的影响.土壤通报(*Chinese Journal of Soil Science*), 2007, 38(6): 1219-1226.
- [24] 李培栋,王兴祥,李奕林等.连作花生土壤中酚酸类物质的检测及其对花生的化感作用.生态学报(*Acta Ecologica Sinica*). 2010, 30(8):2128-2134.
- [25] Westerberg K, Elvang AM, Stackebrandt E, Jansson JK *Arthrobacter chlorophenolicus* sp. nov., a new species capable of degrading high concentrations of 4-chlorophenol. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50, 2083-2092
- [26] Story SP, Kline EL, Hughes TA, Riley MB, Hayasaka SS. Degradation of aromatic Hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis* strain EPA505. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2004, 47: 168-176.
- [27] 韩绍辉.农杆菌介导的大丽轮枝菌的遗传转化.河北农业大学硕士学位论文, 2009.
- [28] Garcia R, Mitchel DJ (1975) Interaction of *Pythium myriotylum* with several fungi in ground pod rot. *Phytopathology*, 56: 1375-1381.
- [29] Walker ME, Csinos AS (1980) Effect of gypsum on yield, grade and incidence of pod rot in five peanut cultivars. *Peanut Science* 7: 109-113.
- [30] Porter DM, Smith DH, Rodrigues Kabana R (1990) Compendium of groundnut diseases. *American Phytopathological Society*, pp 1-5.

- [31] Saleh OI (1997) Wilt, root rot and seed diseases of groundnut in El-Minia Governorate, Egypt. *Egypt Journal of Phytopathology*, 25: 1-18.
- [32] Kemeraït RC, Kucharek TA (1998) Characterization of soilborne fungal pathogens of peanut in Florida.

Phytopathology (Abstract) Publication No. P-0334-AMA.

- [33] 吴文平. 河北省丝孢菌研究 III、漆斑菌属 (*Myrothecium* Tode:Fr.) 的四个种. 河北省科学院学报 (*Journal of the Hebei Academy of Sciences*), 1991, (01)69-74.

Isolation and identification of dominant microorganisms in rhizosphere of continuous cropping with peanut

Yanwei Yan¹, Hong Zhang¹, Lu Liu¹, Hongquan Xian^{1*}, Dejie Cui^{2*}

¹College of Life Science, ²College of Resource and Environment, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China

Abstract: [**Objective**] We isolated and identified dominant microorganisms from the rhizosphere of continuous cropping with peanut, to study the relationship between dominant microorganisms and peanut continuous cropping. [**Methods**] By using dilution-plate method we isolated dominant bacteria, dominant fungi and actinomycetes from the rhizosphere of continuous cropping with peanut. Morphological specificity, culture shape, physiological-biochemical characteristic and partial 16S rDNA sequences were used to identify bacteria and actinomycetes. Morphology, growth on various media, and Internal Transcribed Spacer (ITS) rDNA sequences homology analysis were performed to identify dominant fungi. [**Results**] We isolated seven dominant bacteria strains, seven dominant fungi and seven dominant actinomycetes. Dominant bacteria were identified as *Leifsonia xyli*, *Arthrobacter chlorophenolicus*, *Microbacterium flavescens*, *Sphingomonas* sp., *Pasteurella* sp., *Bacillus simplex* and *Bacillus megaterium*. Dominant fungi were identified as *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium purpurogenum*, *Hypocrea lixii*, *Exophiala pisciphila*, *Penicillium janthinellum*, *Aspergillus* sp. and *Verticillium dahliae*. Dominant actinomycetes were identified as *Streptomyces violaceoruber*, *Streptomyces flavus*, *Streptomyces panaciterrae*, *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces pseudogriseolus*, *Streptomyces cellulosa* and *Streptomyces aureus*. [**Conclusion**] This study was the first time to isolate and identify dominant microorganisms from the rhizosphere of continuous cropping with peanut. The type of dominant microorganisms changed obviously after planting peanut, although the change was without regularity.

Keywords: peanut, continuous cropping, bacteria, identify

(本文责编:王晋芳)