Vol. 24, No. 7 Jul., 2004

茶树根际微生物研究

孙海新,刘训理*

(山东农业大学林学院,泰安 271018)

摘要:利用选择性培养基,对土壤肥力肥沃、中等、贫瘠茶园的茶树根际细菌、真菌和放线菌进行了分离。根据菌体形态及培养特征、生理生化指标、DNA 的 G+Cmol% 值等,对根际细菌进行了鉴定和分类。研究了不同肥力、不同茶龄的茶园根际细菌的数量和类群的变化;根际真菌的数量变化;根际放线菌的数量变化。主要结果为:土壤肥沃的茶园根际细菌的数量最多,土壤贫瘠的茶园数量最少;相同土壤肥力的茶园,10 年生茶园根际细菌的数量最多,4 年生的次之,20 年生的最少。根际真菌的数量,土壤肥沃茶园的较少,中等和贫瘠茶园的较多。根际放线菌的数量,20 年生茶园的明显高于 4 年生和 10 年生茶园的,而且,土壤贫瘠茶园的数量较多。从 9 种不同类型茶园中分离获得的纯化细菌经鉴定分别属于 20 个属,中等肥力的茶园最适于多数细菌的生长与繁殖,类群最为丰富,但类群的优势度低于另外两种土壤;不同茶龄的茶园随着茶龄的增加,肥沃茶园和中等茶园的根际中有较多的细菌类群定殖,但 20a 茶龄的类群较少;贫瘠茶园类群的优势度最大。 关键词:茶树;根际微生物;多样性

Microbes studies of tea rhizosphere

SUN Hai-Xin, LIU Xun-Li* (Forestry College, Shandong Agriculture University, Taian, 271018 China). Acta Ecologica Sinica, 2004,24(7):1353~1357.

Abstract: Rhizosphere bacteria, fungi and actinomyces were isolated from rich, normal, and poor soil samples from various types of tea plantations and their population densities and species distributions were studied. The results indicated that rich tea plantation soils had higher rhizosphere microbe population densities than poor tea plantation soils. In the tea plantations of similar fertility, the population density of rhizosphere bacteria varied with cultivation age of the plantations, following a pattern of 10 year>4 year>20 year. The population density of rhizosphere fungi in rich tea plantations was more than that in normal and poor tea plantations. The population density of actinomyces in 20-year tea plantations was significantly higher than that in 4-or 10-year tea plantations; and moreover, poor tea plantation soils had the greatest population density of actinomyces. Bacteria isolated from various tea plantations were classified into 20 genera.

Results from rhizosphere microbe identification and diversity analysis indicated that in rich soil, the diversity index, the richness index, and the domination index of rhizosphere bacteria varied with cultivation age of the plantations, following a pattern of 10 year>4 year>20 year; however, the evenness index varied with cultivation age of the plantations, following a pattern of 20 year>4 year>10 year. In the normal tea plantations, the diversity index and the richness index varied with cultivation age of the plantations, following a pattern of 10 year>4 year>20 year; while both the domination index and the evenness index showed a pattern of 20 years>4 year>10 year. In poor tea plantation soils, the diversity index, richness index and evenness index gradually diminished with the increase of the cultivation age while the domination index increased gradually with the increase of the cultivation age. In 4-year tea plantations, normal soils had the highest diversity index, rich soils the second, and poor soils the smallest; rich and normal soils had similar richness indexes, and both were higher than that in poor soils; the evenness index gradually increased as the soil fertility decreased; the domination index was the largest in poor soils,

基金项目:山东省科技攻关计划资助项目(02201010102)

收稿日期:2003-10-25;修订日期:2004-05-10

作者简介:孙海新(1978~),男,硕士生,主要从事植物根际促生细菌研究。

* 通讯作者 Author for correspondence

Foundation item: the Committee of Science and Technology of Shandong Province (No. 02201010102)

Received date: 2003-10-25; Accepted date: 2004-05-10

Biography: S 石a 数据 laster candidate, mainly engaged in research of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria.

lower in rich soils, and the lowest in normal soils. In 10-year tea plantations, both the diversity index and the richness index were the highest in normal soils, lower in rich soils, and the lowest in poor soils; the evenness index gradually increased as the soil fertility increased; the domination index was the highest in poor soils, lower in rich soils, and the lowest in normal soils. In 20-years tea plantations, the diversity index and the evenness index were the highest in normal soils, lower in rich soils, and the lowest in poor soils; the richness indexes in rich and normal soils were similar, and both were higher than that in poor soils; the domination index was the highest in poor soils, lower in rich soils, and the lowest in normal soils. These results showed that both soil fertility and cultivation age have impacts on bacteria distribution in the plant rhizosphere. The normal soils provide suitable growth micro-environments for most bacterial genera, implied by the largest number of bacterial genera and the lowest domination index. In poor soils, relatively few bacterial genera can colonize due to the lack of nutrition, leading to a high domination index. The cultivation age may have a significant impact on the colonization and growth of bacteria in poor soils.

Key words: tea; rhizosphere microbes; species diversity

文章编号:1000-0933(2004)07-1353-05 中图分类号:Q938 文献标识码:A

茶叶是我国出口创汇的重要产品,进入 20 世纪 80 年代以来,由于化肥和化学农药等的大量施用,在增加其产量、提高经济效益的同时,也导致了对环境的污染、对非靶标生物的影响和土质的下降。近年来,越来越多的研究表明植物根系和根际微生物的生理活动对土壤性状、植物养分吸收、植物生长发育都具有明显的影响[1~3],根际微生物种群与植株的健康状况也有关系[4],通过改善根际微生态环境来促进植物的生长以及从根际微环境中筛选具有良好促生和抗菌作用的有益菌群,日益受到人们的重视[5-6]。日照是山东省主要茶叶生产区,研究此地区的根际微生物消长规律,可为当地的茶叶生产提供有益参考。本试验对不同肥力不同茶龄的茶树根际微生物种群进行了定量及定性分析,现将结果报告如下。

1 样地概况与研究方法

1.1 样地概况

日照市位于东经 $118^{\circ}35' \sim 119^{\circ}39'$ 、北纬 $35^{\circ}04' \sim 36^{\circ}02'$ 之间,地处中国沿海中断,山东半岛南翼,东临黄海,属暖温带湿润季风气候,光照充足,雨量充沛。境内山地丘陵土壤呈微酸性,属黄棕壤土。

1.2 研究方法

1.2.1 土壤样品采集与主要有效成分含量测定 土壤样品采自山东省日照市不同肥力的 4 年生、10 年生、20 年生的茶园根际土壤,茶树品种均为黄山群体种。每种茶园 5 点采样,分别将根系连同根际土壤一同放入无菌袋采回,具体参照文献[7]。

土样主要有效成分速效氮、速效磷、速效钾和有机质的含量测定,分别用碱解法、钼蓝比色法、火焰光度法和重铬酸钾容量法-外加热法。根据有效成分的含量,将土样分为肥沃、中等和贫瘠3个等级,结果如表1。

表 1 供试土壤主要有效成分含量测定结果

Table 1 The detection result primary effective components of selected soil

土壤肥力 Soil fertility	速效氮(mg/kg) Quick-acting nitrogen	速效磷(mg/kg) Quick-acting phosphorus	速效钾(mg/kg) Quick-acting potassium	有机质(%) Soil organic matter
肥沃 Fertile soil	206.33	61.49	194.79	0.8590
中等 Medium soil	122.98	29.18	121.89	0.9059
贫瘠 Infertile soil	54.66	16.78	61.36	0.8053

1.2.2 根际微生物的分离培养 细菌的分离采用牛肉膏蛋白胨培养基,放线菌的分离采用高氏一号培养基,真菌的分离采用马丁氏培养基。

微生物分离采用适温条件下平板梯度稀释培养法,记数后取不同茶园类型的 3 个重复的平均值,方法参照文献[4-7]。

- 1.2.3 菌株的鉴定 主要鉴定指标包括菌体形态和菌落特征培养观察、生理生化指标测定,具体方法参照文献[8]。
- 1. 2. 4 根际微生物的多样性测度 参照文献 [9],选用 Shannom-Wiener 指数 (H)、丰富度指数 (S) 和 Pielou 指数 (J) 讨论根际 环境的微生物多样性特征。

多样性指数 H 的计算公式为: $H=-\sum Pi \ln Pi$

式中,Pi=N万f方数据 $oldsymbol{n}$ 据。的单菌落数量,N为土样的总单菌落数量。

S 为属i 所在土样中属的数目。

均匀度指数 J 的计算公式为:

$$J = -\sum_{i} P_{i} \ln P_{i} / \ln S$$

采用 Simpson 优势度指数测定群落内不同物种所起的作用和所占的地位,其公式为: $D=\sum Pi^2$

2 结果与分析

2.1 不同茶园根际细菌的数量变化

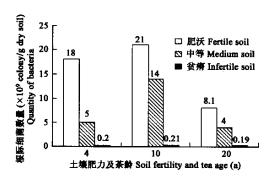
不同土壤不同茶龄的茶树根际细菌的数量比较结果如图 1 所示。可以看出,茶树根际细菌的数量随着土壤肥力及茶龄变化 表现出比较明显的差异。相同茶龄的茶园,肥力肥沃的茶园根际 细菌数量最多,中等茶园次之,贫瘠茶园根际细菌数量最少:相 同土壤肥力的茶园,10年生茶树根际细菌数量最多,4年生茶树 根际细菌数量次之,20年生茶树根际细菌数量最少。

2.2 不同茶园根际细菌的类群及多样性特征

20

7

茶树根际土壤中分离细菌菌株的鉴定结果如表 2 所示。可 以看出,根际细菌以革兰氏阴性杆菌为主,分别属于芽孢杆菌属 (Bacillus)、假单胞菌属(Pseudomonas)、氮单胞杆菌属(Azomon-



不同茶园根际细菌数量差异

as)、克雷伯氏菌属(Klebsiella)、土壤杆菌属(Agrobacterium)、欧 Fig. 1 Quantitative difference of bacteria in different tea 文氏菌属(Erwinia)、微球菌属(Micrococcus)、固氮菌属(Azoto- rhizosphere

bacter)、葡萄球菌属(Stophylococcus Rosenback)、拜叶林克氏菌

属(Beijerinckia)、德克斯氏菌属(Derxia)、节杆菌属(Arthrobacter)等。

表 2 不同茶园根际细菌分离及鉴定结果

Table 2. The isolation and identification result of bacteria in different tea rhizophere

肥沃程度	茶龄(a)	单菌落数	属及单菌落数
Soil fertility	Tea age	Colony number	The genera and its respectively colony number
肥沃 Fertile soil	4	13	氮单胞菌属 Azomonas(1)、假单胞菌属 Pseudomonas(4)、固氮菌属 Azotobacter(2)、肠杆菌属 Enterobacter(1)、土壤单胞菌属 Agromonas(1)、微球菌属 Micrococcus(1)、芽孢杆菌属 Bacillus(2)、土壤杆菌属 Agrobacterium(1)
	10	21	假单胞菌属 Pseudomonas(7)、固氮菌属 Azotobacter(1)、欧文氏菌 Erwinia(1)、拜叶林克氏菌属 Beijerinckia(2)、芽孢杆菌属 Bacillus(3)、土壤杆菌属 Agrobacterium(1)、克雷伯氏菌属 Klebsiella(2)、葡萄球菌属 Staphylococcus(2)、德克斯氏菌属 Derxia(2)
	20	9	氮单胞菌属 Azomonas(1)、假单胞菌属 Pseudomonas(2)、土壤单胞菌属 Agromonas(1)、 微球菌属 Micrococcus(1)、芽孢杆菌属 Bacillus(2)、土壤杆菌属 Agrobacterium(1)、纤维 单胞菌属 Cellulomonas(1)
中等 Medium soil	4	12	氮单胞菌属 Azomonas(3)、假单胞菌属 Pseudomonas(1)、拜叶林克氏菌属 Beijerinckia (1)、微球菌属 Micrococcus(1)、芽孢杆菌属 Bacillus(2)、德克斯氏菌属 Derxia(1)、纤维 单胞菌属 Cellulomonas(2)、ト啉单胞菌属 Porphromonas(1)
	10	21	假单胞菌属 Pseudomonas(3)、固氮菌属 Azotobacter(2)、欧文氏菌 Erwinia(1)、拜叶林克氏菌属 Beijerinckia(2)、微球菌属 Micrococcus(1)、芽孢杆菌属 Bacillus(5)、土壤杆菌属 Agrobacterium(1)、克雷伯氏菌属 Klebsiella(1)、葡萄球菌属 Staphylococcus(2)、德克斯氏菌属 Derxia(2)、节杆菌属 Arthrobacter(1)
	20	8	肠杆菌属 Enterobacter(1)、微球菌属 Micrococcus(1)、芽孢杆菌属 Bacillus(1)、芽孢八叠球菌属 Sporosarcina(2)、壤霉菌属 Agromyces(1)、黄色杆菌属 Flavobacterium(1)、明串球菌属 Leuconostoc(1)
贫瘠 Infertile soil	4	6	假单胞菌属 Pseudomonas(2)、固氮菌属 Azotobacter(1)、土壤单胞菌属 Agromonas(1)、 芽孢杆菌属 Bacillus(1)、节杆菌属 Arthrobacter(1)
	10	5	假单胞菌属 Pseudomonas(1)、假单胞菌属 Pseudomonas(1)、欧文氏菌 Erwinia(1)、芽孢杆菌属 Bacillus(2)
	20	7	微球菌属 Micrococcus(2)、芽孢杆菌属 Bacillus(3)、土壤杆菌属 Agrobacterium(1)、壤霉

根际细菌的多样性、丰富度、均匀度及优势度指数见表 3,由表可见,肥沃茶园的多样性指数、丰富度指数、优势度指数以 10a 茶龄的**更大为数据**的次之、20a 茶龄的最小,均匀度指数以 20a 茶龄的最大、4a 茶龄的次之,10a 茶龄的最小;中等肥力茶

菌属 Agromyces(1)

园的多样性指数、丰富度指数以 10a 茶龄的最大、4a 茶龄的次之、20a 茶龄的最小,均匀度指数和优势度指数以 20a 茶龄的最 大、4a 茶龄的次之、10a 茶龄的最小:贫瘠茶园的多样性指数、丰富度指数和均匀度指数均随着 4a、10a、20a 三种茶龄的变化依 次减小,而优势度指数依次增大;4a 茶龄不同肥沃程度的茶园的多样性指数,以中等茶园的最大,肥沃茶园的次之,贫瘠茶园的 最小,丰富度指数肥沃和中等茶园的相同,贫瘠茶园的较低,均匀度指数随着肥沃程度的减低依次增大,优势度指数以贫瘠茶园 的最大,肥沃茶园的次之,中等茶园的最小;10a 茶龄的多样性指数、丰富度指数,以中等茶园的最大,肥沃茶园的次之,贫瘠茶 园的最小,均匀度指数随着土壤肥沃程度的降低依次增大,优势度指数以贫瘠茶园的最大,肥沃茶园的次之,中等茶园的最小; 20a 茶龄的多样性指数、均匀度指数以中等肥力茶园的最大、肥沃茶园的次之、贫瘠茶园的最小,丰富度指数肥沃茶园和中等茶 园的相同,贫瘠茶园的较小,优势度指数以贫瘠茶园的最大、肥沃茶园的次之、中等茶园的最小。上述结果说明,土壤的肥沃程度 和茶龄对根际细菌类群的分布都有影响,总体来看,在土壤肥沃程度中等的条件下,最适于多数细菌的生长与繁殖,类群最为 四中等 肥沃

丰富,但类群的优势度低于另外两种土壤;不同茶龄的茶园随着 茶龄的增连作条件下土壤生态环境的变化有关[2,3],贫瘠茶园由 于营养物质的缺乏,茶龄对于细菌生长和繁殖的影响更大,只有 少量生活力较强的类群可以定殖,因此类群的优势度也较大。

2.3 不同茶园根际真菌的数量变化

不同茶园根际真菌数量差异见图 2。可以看出,相同茶龄的 茶树根际真菌数量以肥力肥沃的茶园数量最少,中等和贫瘠茶 园根际真菌数量较多,这可能由于根际细菌的营养竞争和本试 验选择的肥沃茶园,氮肥用量较大,而真菌生长所需基质(纤维 素等)并不多所致:相同肥力土壤的茶园,3 种茶龄根际真菌数量 Fig.2 Quantitative difference of fungi in differentt tea rhizophere

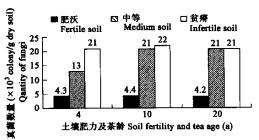


图 2 不同茶园根际真菌的数量差异

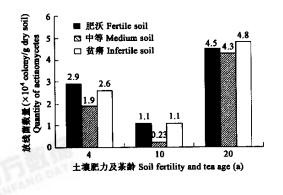
差别不如根际细菌明显,一般不超过一个数量级,说明根际真菌形成稳定的根际群落后,受树龄及土壤肥力影响较小。

不同茶园根际放线菌的数量变化

表 3 不同茶园根际细菌的多样性、丰富度、均匀度及优势度指数

Table 3 The diversity index, Richness index, evenness index and domination index in different tea rhizosphe

domination index in different tea rinzosphere								
肥沃程度 Soil fertility	茶龄(a) Tea age	Н	S	J	D	_		
肥沃 Fertile soil	4	1.9251	8	0.9258	0.1716	_		
	10	1.9749	9	0.8988	0.1746			
	20	1.8892	7	0.9708	0.1605			
中等 Medium soil	4	1.9700	8	0.9518	0.1528			
	10	2.2403	11	0.9343	0.1247			
	20	1.9062	7	0.9796	0.1562			
贫瘠 Infertile soil	4	1.5607	5	0.9697	0.2222			
	10	1.3322	4	0.9610	0.2800			
	20	1.2770	4	0.92119	0.3061			



不同茶园根际放线菌的数量差异

Quantitative difference of actinomycetes in different tea rhizosphere

不同茶园根际放线菌的数量差异见图 3。20 年生的茶园根际放线菌的数量,明显多于 4 年生和 10 年生茶园的数量:各个茶 龄贫瘠土壤根际放线菌的数量都维持了一个较高的水平。这与贫瘠土壤保水性较差,容易形成干旱环境,有利于放线菌的生长 繁殖有关,也可能随着茶龄的增加,茶树根际土壤积累了较多的难分解有机物,从而有利于根际放线菌的生长、繁殖。

3 讨论

植物根际是生物和物理特性受到根系影响的紧密环绕根的区域,在这一区域内,微生物种群丰富,研究和利用这一丰富的 微生物资源库,正不断受到人们的重视[10~14],国内外对茶树根际微生物的研究均有报道[15~18],研究一定区域内的茶树根际微 生物种群消长规律具有一定的现实意义。本试验对茶树根际细菌进行了较为系统的研究,由于工作量较大,对根际真菌和放线 菌的研究,只探讨了其数量的变化,未对种群进行鉴定分析,此项工作有待进一步完善。此外,在研究根际细菌的过程中,还分离 到多株对茶树主要病原真菌具有较强抗生作用的菌株,并对其进行了鉴定和抗菌物质研究。

References:

万方数据

Liu J J, Chen H B, Tian C M. Soil Properties of Rhizosphere Microecosystem in Main Kinds of Trees in Huoditang Forest Region of

- Qinling, Journal of Soil Erosion and Soil and Water Conservation, 1998, 4(3):52~56.
- [2] Zhang S X, Gao Z Q. Continuous cropping bastacle and rhizosphere microecology II. Root exudates and phenolic acids. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2000, 11(1):152~156.
- [3] Zhang S X, Gao Z Q, Liu H L. Continuous cropping bastacle and rhizosphere microecology III. Soil phenolic acid and their biological effect. Chinese Journal of Applied Ecology, 2000, 11(5):741~744.
- [4] Xu C L, Yang X P, Liu H L, et al. Studies on Microecology of Hami melon Rhizosphere and Root system. Chinese Journal of Microecology, 1997, 9(1):45~47.
- [5] Lin M, Ping S Z, You C B. Effects of Inoculation with Alcaligenes faecalis on Proton Efflus of Rice Roots and Microecology in Rhizosphere. Acta Phytophysiologica Sinica, 1992, 18(3);233~238.
- [6] Xu F H, Cui Z L, Liu Y C, et al. Effect of protective applied nitrogen on alleviation to rhizosphere microecology limiting factor by soybean follows soybean or follows next crops. Biltechnology, 1998, 8(3):41~44.
- [7] Zhou D Q. Handbook of Experimental of Microecology. Shanghai; Shanghai Science and Technology Press, 1996.
- [8] Dong X Z, et al. Manual of Determinative Bacteriology. Beijing: Science Press, 2001.
- [9] Plant species diversity of grassland plant communities in permafrost regions of northern Qinghai-Tibet Plateau. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, **24**(1):149~155.
- [10] Johansen J E, Binnerup S J. Contribution of Cytophaga-like Bacteria to the Potential of Turnover of Carbon, Nitrogen, and Phosphorus by Bacteria in the Rhizosphere of Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Microbial Ecology*, 2002, (3):298~306.
- [11] Kalyan K Mondal, Prem Dureja, Jeevan Prakash Verma. Management of Xanthomonas camprestris pv. malvacearum-Induced Blight of Cotton Through Phenolics of Cotton Rhizobacterium. Current Microbiology, 2001, 43(5):0336~0339.
- [12] Sindhu S S, Gupta S K, Dadarwal K R. Antagonistic effect of Pseudomonas spp. on pathogenic fungi and enhancement of growth of green gram (Vigna radiata). *Biology and Fertility of Soils*, 1999, **29**(1):62~68.
- [13] Gupta C, Dubey R, Maheshwari D. Plant growth enhancement and suppression of Macrophomina phaseolina causing charcoal rot of peanut by fluorescent Pseudomonas. *Biology and Fertility of Soils*, 2002, **35**(6):399~405.
- [14] Jens Frankowski, Matteo Lorito, Felice Scala, et al. Purification and properties of two chitinolytic enzymes of Serratia plymuthica HRO-C48. Archives of Microbiology, 2001, 176(6):421~426.
- [15] Tian Y H, Wei J. Dynamic state of bacteria and enzyme activity in rhizosphere of tea different varieties. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2001, 14(4):63~66.
- [16] Liang Y R, Lu J L, Liu Z S. Isolation and Preliminary Identification of Aluminum resistant Micro Organisms from the Rhizospheric Soil of Tea Plant. *Journal of Tea Science*, 1999, 19(2):110~114.
- [17] TianY H. Study on composition and diversity of N-fixing bacteria in the rhizosphere of tea plants with various plant-age. Fujian Tea, 2000, (3):19~23.
- [18] Anita Pandey, Lok Man S Palni. The rhizosphere effect of tea on soil microbes in a Himalayan monsoonal location. *Biology and Fertility of Soils*, 1996, 21(3):131~137.

参考文献:

- [1] 刘建军,陈海滨,田呈明,等. 秦岭火地塘林区主要树种根际微生态系统土壤性状研究. 土壤侵蚀与水土保持学报,1998,4(3):52~56.
- [2] 张淑香,高子勤.连作障碍与根际微生态研究 Ⅱ.根系分泌物与酚酸物质.应用生态学报,2000,**11**(1);152~156.
- [3] 张淑香,高子勤,刘海玲.连作障碍与根际微生态研究 Ⅲ.土壤酚酸物质及其生物学效应.应用生态学报,2000,11(5):741∼744.
- 「4] 徐长伦,杨新平,王志方,等.哈密瓜根系与根际微生态分析研究.中国微生态学杂志,1997,9(1), $45\sim47$.
- [5] 林敏,平淑珍,尤崇杓.粪产碱菌对水稻根质子分泌作用及根际微生态的影响.植物生理学报,1992,18(3):233~238.
- [6] 徐凤花,催占利,刘永春,等. 保护性施氮在缓解大豆重(迎)茬根际微生态障碍中的效应. 生物技术, $1998,8(3):41\sim44$.
- [7] 周德庆. 微生物学试验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1996.
- [8] 东秀珠,蔡妙英,等.常见细菌系统鉴定手册.北京:科学出版社.2001.
- 「9] 郭正刚,王根绪,沈禹颖,等.青藏高原北部多年冻土区草地植物多样性,生态学报,2004,**24**(1): $149 \sim 155$.
- [15] 田永辉,魏杰.不同无性系茶树品种的根际细菌及酶活性动态研究.西南农业学报,2001,14(4): $63\sim66$.
- [16] 梁月荣,陆建良,刘祖生. 茶树根际土壤抗酸铝微生物的分离与初步鉴定. 茶叶科学, 1999, 19(2), $110 \sim 114$.
- [17] 田永辉. 不同树龄茶树根际固氮菌组成及多样性研究. 福建茶叶,2000,(3):19~23.