

促生细菌的分离及复配菌剂对甘肃贝母产量的影响

赵疆¹, 梁世军², 杨涛^{1,3*}, 武小龙², 祁鹏年⁴, 王世伟⁴, 王治业^{1,3}

(1. 甘肃省科学院生物研究所, 兰州 730000;

2. 华亭市中药材产业发展服务中心, 甘肃 华亭 744100;

3. 甘肃省微生物资源开发利用重点实验室, 兰州 730000;

4. 甘肃绿能农业科技股份有限公司, 甘肃 武威 733000)

[摘要] 目的:研究叶片喷施厚壁菌门芽孢杆菌属复合菌剂(T1),假单孢菌属和根瘤菌属复合菌剂(T2)两类复配促生菌剂对甘肃贝母生理特征与生长的影响,以期对甘肃贝母生态种植开发功能性微生物菌剂奠定基础。方法:采用常规方法分离鉴定出甘肃贝母内生细菌;对3年生甘肃贝母叶面喷施T1和T2,并测定产量;试剂盒法测定植物和微生物相关酶活性及生理生化指标;液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)检测植物和微生物相关激素含量。结果:从甘肃贝母中分离到的内生细菌分属于厚壁菌门、变形菌门、放线菌门;T2处理的超氧化物歧化酶(SOD),过氧化物酶(POD)活性及生长素含量显著高于T1处理,T1处理的嗜铁素、水杨酸、赤霉素含量显著高于T2处理;T1和T2处理较空白组(CK)提高了贝母叶片内源赤霉素、细胞分裂素、生长素含量,茉莉酸、脱落酸差异无统计学意义,T1处理促进了贝母叶片内源水杨酸的积累,T2处理差异无统计学意义;T1和T2处理较CK提高了贝母叶片SOD,POD,过氧化氢酶(CAT)活性,降低了丙二醛含量,T2处理促进了贝母叶片过氧化氢的积累,T1处理差异无统计学意义;T1和T2处理较CK提高了贝母叶绿素、根际土铁平均含量及百株重。结论:T1,T2处理都有促进增产的作用,具体机制有所区别,T1优于T2处理。

[关键词] 甘肃贝母;芽孢杆菌属;假单孢菌属;促生作用

[中图分类号] R931;R28;Q93;O657.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)24-0163-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211512

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211025.1127.002.html>

[网络出版日期] 2021-10-25 15:13

Isolation of Growth-Promoting Bacteria and Effect of Compound Bacteria on Yield of *Fritillaria przewalskii*

ZHAO Jiang¹, LIANG Shi-jun², YANG Tao^{1,3*}, WU Xiao-long², QI Peng-nian⁴, WANG Shi-wei⁴,
WANG Zhi-ye^{1,3}

(1. Institute of Biology, Gansu Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

2. Huating Traditional Chinese Medicine Industry Development Service Center, Huating 744100, China;

3. Key Laboratory of Microbial Resources Exploitation and Application, Lanzhou 730000, China;

4. Gansu Lvneng Agricultural Technology Co. Ltd., Wuwei 733000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of anti-microbial compound (T1) from *Bacillus* (Phylum Firmicutes) and anti-microbial compound (T2) from *Pseudomonas* and *Rhizobium*, two growth-promoting agents, on the physiological characteristics and growth of *Fritillaria przewalskii*, in order to lay a foundation for the development of functional microbial agents and the promotion of ecological planting. **Method:** The endophytic bacteria of *F. przewalskii* were isolated and identified using conventional methods. The leaves of

[收稿日期] 20210819(012)

[基金项目] 甘肃省科学院应用研究与开发项目(2019JK-04);甘肃省科学院创新团队建设项目(2019CX004-01)

[第一作者] 赵疆, 硕士, 研究实习员, 从事中药材生物技术及微生态研究, Tel: 0931-4563768, E-mail: 599185757zj@sina.com

[通信作者] * 杨涛, 硕士, 副研究员, 从事中药材微生态及生物技术研究, Tel: 0931-4563768, E-mail: yangtao8383@163.com

three-year-old *F. przewalskii* were sprayed with T1 and T2, followed by yield determination. The enzyme activities and physiological and biochemical indexes in the plant and microorganisms were measured using the corresponding assay kits, and the contents of related hormones by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). **Result:** The isolated endophytic bacteria were classified into Firmicutes, Proteobacteria, and Actinomycetes. The activities of superoxide dismutase(SOD) and peroxidase(POD) and auxin content after T2 treatment were significantly higher than those after T1 treatment, while the contents of siderophore, salicylic acid, and gibberellin were lower. Compared with the blank (CK) group, T1 and T2 increased the contents of endogenous gibberellin, cytokinin, and auxin in *F. przewalskii* leaves, but did not significantly change jasmonic acid and abscisic acid. T1 promoted the accumulation of endogenous salicylic acid in *F. przewalskii* leaves, but there was no significant change after T2 treatment. Compared with CK, T1 and T2 enhanced the activities of SOD, POD, and catalase (CAT) and decreased the content of malondialdehyde. T2 promoted the accumulation of hydrogen peroxide in *F. przewalskii* leaves, but no significant difference was observed after T1 treatment. Compared with CK, both T1 and T2 increased chlorophyll, average iron content in rhizosphere soil, and 100-plant weight. **Conclusion:** T1 and T2 treatments help to increase the yield, and their specific mechanisms differ from each other. T1 exhibits better effect than T2.

[**Keywords**] *Fritillaria przewalskii*; *Bacillus*; *Pseudomonas*; growth-promoting effect

甘肃贝母是百合科贝母属多年生草本植物,为药材川贝母基源植物之一,被列入“国家重点保护野生植物”名录。野生资源主要分布于甘肃武都、岷县、榆中等地海拔2 800~4 400 m的灌木丛或草丛中,由于价格高昂,导致过度采挖,野生资源锐减。贝母种植要求土层肥沃、疏松,气候寒凉、湿润的环境条件,喜氮却忌施化学氮肥,忌高温、强光直射。种子存在双重休眠,腐烂病严重,导致种苗繁育困难;易受环境胁迫影响,导致叶片退绿,影响光合作用和生长,因此,尚未实现大规模人工种植。针对上述问题已有相关报道:在低温条件下,100 mg·L⁻¹赤霉素处理可以将甘肃贝母鳞茎休眠期由40 d提前至30 d^[1];叶面喷施90 μmol·L⁻¹纳米铁或0.86 mmol·L⁻¹褪黑素可提高驯化栽培条件下甘肃贝母抗逆性和产量,其百株重较空白组提高了35.4%~48.8%^[2];喷施15 mmol·L⁻¹ CaCl₂可延迟甘肃贝母倒苗期、增强苗期抗逆性、提高鳞茎产量^[3]。虽然上述处理有效促进了贝母的生长和产量的提升,但激素、化学肥料在生态农业、有机农业等高端农业产品中属于禁用农资,开发其替代产品对生态种植具有重要指导意义。

植物促生细菌指生存在植物根际、叶围、种围及内生于植物中,具有促进植物生长、防治病害发生、增强非生物胁迫抗性作用的细菌^[4],是有机等高端农产品生产允许使用的主要农资之一。厚壁菌门的芽孢杆菌属 *Bacillus* 和变形菌门的假单胞菌属 *Pseudomonas* 促生细菌是近年来研究报道较多的

优势代表性菌种,兼具促生和抗病的功能,其促生机制多样,如固氮、解磷、解钾、活铁,产生生长素、赤霉素或其类似物,产生超氧化物歧化酶(SOD),过氧化物酶(POD),漆酶等抗胁迫相关酶系,清除活性氧、多酚等抑制生长的物质^[5-6]。枯草芽孢杆菌 MA-2 和荧光假单胞菌 MA-4 复合菌剂喷施天竺葵,可显著提高产量^[7];芽孢杆菌属的 *Bacillus* sp. KTS-1-1 喷施太子参,能促进植物抗氧化酶系活性增强、增加赤霉素、细胞分裂素、生长素含量,从而促进生长^[8];枯草芽孢杆菌 B-25 喷施伊贝母,产量提高了16.8%^[9];类芽孢杆菌属的 *Paenibacillus polymyxa* 菌剂可以有效降低人参根腐病发病率,提高产量和品质^[10];枯草芽孢杆菌 XG-2 和贝莱斯芽孢杆菌 XG-3 能促进当归生物量积累,增加丁烯基苯酚含量^[11];从南方红豆杉根际分离出的荧光假单胞菌 CLW17 有较强的溶磷能力,对南方红豆杉苗期生长有明显促进作用^[12];芽孢杆菌属菌株 VBs 和假单胞菌属菌株 VPs 可促进长春花植株生长,提高其抗癌活性成分生物碱的含量^[13]。目前,有关促生细菌对药用植物影响的研究多数基于单一或两种菌复合,受到定植等因素的影响,大田应用效果稳定性不高,开发多种菌组成的复合微生物菌剂是较好解决办法。本项目拟分离甘肃贝母内生菌,检测相关功能,参考相关文献报道的促生细菌及其作用机制,结合甘肃贝母相关习性及存在的问题,分类复配分别形成以厚壁菌门芽孢杆菌属和变形菌门假单胞菌属菌种为主的复合制剂,研究不同种类优势菌种对贝母

生理生化 and 产量的影响,为生态种植技术和产品的开发奠定基础。

1 材料

T100型聚合酶链式反应(PCR)扩增仪(美国伯乐公司),Heraeus Multifuge X1R型超高速冷冻离心机(美国Thermo公司),AL204型1/1万电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司),TU-1950型双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),DC-B型智能箱式高温炉(北京独创科技有限公司)。

细菌基因组DNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司,批号20190528);*Taq* DNA聚合酶(Takara 生物技术有限公司,批号20190416);SOD,过氧化氢酶(CAT),POD,过氧化氢(H_2O_2),丙二醛(MDA),叶绿素,土壤铁检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为20190419,20190517,20190618,20190507,20190428,20190623,20190411);CAS检测液所需试剂铬天青(分析纯,山东浩中化工有限公司,批号20180115), $FeCl_3$ (分析纯,廊坊鹏彩精细化工有限公司,批号20190326),十六烷基三甲基溴化铵(CTAB,化学纯,北京酷来搏生物科技有限公司,批号20190314);磷酸二氢钾、硫酸镁、氯化钠、碳酸钙、硫酸钙、琼脂(分析纯,天津金汇太亚化学试剂有限公司,批号分别为20190211,20190106,20180625,20180715,20190702,20190325);刚果红(分析纯,上海源叶生物科技有限公司,批号20190506)。

甘肃贝母采自甘肃省陇南市文县,海拔高度2500 m,由甘肃省科学院生物研究所杨晖研究员根据《中国植物志》^[14]鉴定为甘肃贝母 *Fritillaria przewalskii*。甘肃贝母种苗繁殖于兰州市和平镇生物苑基地自动化控制温室,海拔1800 m。

2 方法

2.1 甘肃贝母内生细菌的分离鉴定 将原生地采摘的健康甘肃贝母叶片用自来水流水冲洗10 min,滤纸吸干表面水分,0.2%的升汞表面消毒10 min,无菌水冲洗3~4遍,以最后冲洗的无菌水100 μ L涂布于TSA平板作为对照。将表面消毒处理后的贝母叶片取1 g放置于200 $^{\circ}C$ 高温干热灭菌处理过的研钵中,加入灭菌的生理盐水10 mL,充分研磨。将研磨后的原液10倍梯度稀释至 1×10^{-4} ,分别吸取上述液体100 μ L,每个浓度梯度重复3次,涂布于TSA平板,28 $^{\circ}C$ 恒温培养2 d,从平板上挑取不同培养性状的单菌落,继续在TSA平板上划线纯化4~6代,

4 $^{\circ}C$ 低温保存菌种。

细菌基因组DNA提取试剂盒提取分离菌的基因组DNA,进行16s rDNA扩增。引物为16S-27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',20 bp),16S-1492R(5'-TACCTTGTTACGACTT-3',16 bp)。PCR反应体系(25 μ L):10 \times PCR缓冲液2.5 μ L,dNTP(2.5 mmol \cdot L $^{-1}$)1.5 μ L,上下游引物(10 μ mol \cdot L $^{-1}$)各1.5 μ L,*Taq* DNA聚合酶(5 U \cdot μ L $^{-1}$)1 μ L,模板1 μ L,ddH $_2$ O 16 μ L。PCR反应条件为预变性95 $^{\circ}C$ 5 min;变性92 $^{\circ}C$ 1 min,退火50 $^{\circ}C$ 1 min,延伸72 $^{\circ}C$ 2 min,共40个循环;延伸72 $^{\circ}C$ 10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后,送北京擎科新业生物技术有限公司测序。测序结果提交美国国家生物信息中心(NCBI)数据库BLAST比对,结合《伯杰氏细菌分类手册》相关描述进行鉴定。

2.2 分离得到细菌的功能指标检测

2.2.1 固氮活性检测 固氮活性定性检测,挑取少量的分离菌接种于阿须贝培养基(磷酸二氢钾0.2 g \cdot L $^{-1}$,硫酸镁0.2 g \cdot L $^{-1}$,氯化钠0.2 g \cdot L $^{-1}$,碳酸钙5.0 g \cdot L $^{-1}$,甘露醇10.0 g \cdot L $^{-1}$,硫酸钙0.1 g \cdot L $^{-1}$,琼脂15.0 g \cdot L $^{-1}$,加入0.5%的刚果红5 mL \cdot L $^{-1}$)中,28 $^{\circ}C$ 黑暗培养7 d,观察菌落生长情况。

2.2.2 抗氧化酶活性检测 分离到的细菌接种到20 mL PDB培养基中,振荡培养(30 $^{\circ}C$,180 r \cdot min $^{-1}$)24 h;在1.5 mL离心管内加入试剂盒中相应酶的提取液1 mL,并加入待测菌液100 μ L,冰浴超声波破碎细菌(功率200 W,频率80 kHz),超声3 s,间隔10 s,重复30次;将超声过的菌液离心10 min(4 $^{\circ}C$,5000 r \cdot min $^{-1}$,离心半径9.5 cm,下同),吸取上清至新的离心管中,置于冰上待测;按照相应测定试剂盒所述方法分别测定酶活性,计算结果除以相应的待测菌液浊度,标准化为单位浊度的待测菌液的酶活性。

2.2.3 嗜铁素相对含量测定 根据文献[15]报道的方法测定嗜铁素相对含量。将菌液接种于20 mL PDB培养基中,30 $^{\circ}C$,180 r \cdot min $^{-1}$ 振荡培养48 h,5000 r \cdot min $^{-1}$ 离心10 min,将上清液和CAS检测液以1:1的体积比均匀混合,置于37 $^{\circ}C$ 黑暗孵育60 min,测量混合物在630 nm处的吸光度 A ,并根据下列公式计算出嗜铁素相对含量 $= (Ar - As) / Ar \times 100\%$, Ar 是参比物(空白培养基与CAS检测液混合)在630 nm下的吸光度 A ; As 是样品吸光度(上清液与CAS检测液混合)。计算结果除以相应的待测菌液浊度,标准化为单位浊度的待测菌液的嗜铁素

含量。

2.2.4 激素含量检测 将分离到的细菌接种到50 mL PDB培养基中,30 °C,180 r·min⁻¹振荡培养2 d,将菌液超声处理(功率200 W,频率80 kHz,超声3 s,间隔10 s,重复30次),4 °C,5 000 r·min⁻¹离心10 min,0.22 μm滤膜过滤收集上清液,将上清液送南京集思慧远生物科技有限公司通过液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)测定水杨酸、赤霉素、生长素等激素含量,计算结果除以相应的待测菌液浊度(A_{600}),标准化为单位浊度的待测菌液的激素含量。

2.3 试验设计 从分离的细菌微生物中,通过查阅文献,挑选出已报道的促生细菌,设厚壁菌门芽孢杆菌属4C5,5C5,5C1和AL1复配(T1),变形菌门假单胞菌属CBS5,CBS7,CBSB和根瘤菌属4R4复配(T2)及空白(无菌PDB培养液,CK)3个处理。不同菌株在28 °C,200 r·min⁻¹条件下用PDB培养基震荡培养2 d,调至相同 A ,等比例复配,用无菌水调至 1×10^8 CFU·mL⁻¹,不同小区喷施量体积相等。

试验采用单因素完全随机设计,设3个处理,每处理重复3次,在兰州市和平镇生物苑基地自动化控制温室进行,基肥为有机肥(0.3 kg·m⁻²,有机质≥45%,总养分(N+P₂O₅+K₂O)≥5%)。以3年生甘肃贝母为试验对象,叶片喷施不同的微生物复合菌剂,每2周喷施一次,共4次。第4次喷施后一周,每小区随机选取20株甘肃贝母,采摘叶片混合,採挖鳞茎抖落根际土混合,测定相关数据。7月中下旬倒苗后,挖取贝母鳞茎,流水清洗,除去不定根,测定百株重。

2.4 甘肃贝母叶片激素含量测定 第4次处理后1周,采摘不同处理后的植株同样位置的叶片,送北京密码子生物科技有限公司,通过LC-MS法测定水杨酸、茉莉酸、脱落酸、赤霉素、细胞分裂素、生长素含量。

2.5 甘肃贝母叶片活性氧相关指标测定 第4次处理后1周,采摘不同处理的叶片,按照相应试剂盒所述方法分别测定丙二醛、过氧化氢含量及SOD, CAT, POD活性。

2.6 甘肃贝母叶绿素及根际土铁含量测定 第4次处理后1周,采摘不同处理的叶片,按照试剂盒所述方法测定叶绿素含量;采集根际土,按照试剂盒所述方法测定全铁含量。

2.7 统计分析 使用SPSS 22.0软件进行单因素方差分析、相关性分析、主成分分析。Origin 9作图。

3 结果与分析

3.1 甘肃贝母促生细菌分离鉴定与功能分析 共分离出内生细菌20株,分布在厚壁菌门、变形菌门、放线菌门3个门。菌种鉴定后,选取文献报道较多的优势促生细菌,芽孢杆菌属、假单胞菌属、根瘤菌属相关菌株进行功能分析。菌株信息见表1。

表1 甘肃贝母分离出的促生菌株信息

Table 1 Strain information of *Fritillaria przewalskii* isolate

菌株编号	拉丁名	中文名	NCBI登录号
4C5	<i>Bacillus velezensis</i>	贝莱斯芽孢杆菌	MW989745
5C5	<i>B. amyloliquefaciens</i>	解淀粉芽孢杆菌	MW981362
5C1	<i>B. subtilis</i>	枯草芽孢杆菌	MW981361
AL1	<i>Brevibacterium frigiditolerans</i>	耐寒短杆菌	MW981363
CBS5	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	荧光假单胞菌	MW981369
CBS7	<i>P. alcaligenes</i>	产碱假单胞菌	MW981370
4R4	<i>Rhizobium</i> sp.	根瘤菌	MW981360
CBSB	<i>P. extremaustralis</i>	嗜冷假单胞菌	MW981371

CBS7不固氮,其余菌株都有固氮活性;各菌株都具有SOD和POD活性,表明能够清除活性氧,因分离自叶片,所以对环境温度变化、紫外线等具有一定的耐受性,适应能力强;除4R4外,其余菌株都含有一定量嗜铁素,嗜铁素能够将难溶性铁活化为可溶性铁,提高铁的利用率,抑制病原菌吸收铁,有效阻止病原微生物的繁殖,起到促生、抗病的作用^[16-17];所有菌株都分泌水杨酸、生长素,表明其具有抗病、促生作用;4C5,5C5,CBS5,4R4不产生赤霉素,其余均产生,见表2。综上所述,本研究选取的菌株可以作为促生细菌,用于复合微生物菌剂的复配。

T1, T2复配菌剂相关指标见表3, T2的SOD, POD活性及生长素含量明显高于T1($P < 0.05$),分别增加了368%, 12.7%, 33.3%,表明T2复合菌剂适应能力更强;T1的嗜铁素、水杨酸、赤霉素含量明显高于T2($P < 0.05$),分别增加了110%, 51.5%, 16.5%,表明T1复合菌剂抗病、促生能力更强。

3.2 不同处理对甘肃贝母生长的影响

3.2.1 对叶片内源激素的影响 不同处理的甘肃贝母叶片内源激素含量见表4。相较于CK, T1和T2处理甘肃贝母赤霉素、细胞分裂素、生长素含量、赤霉素/脱落酸显著升高($P < 0.01$), T1处理甘肃贝母水杨酸显著升高, T2处理差异无统计学意义;不同处理甘肃贝母茉莉酸和脱落酸含量差异均无统计

表2 促生菌的生理生化指标 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Physiological and biochemical indexes of selected bacteria ($\bar{x} \pm s, n=3$)

菌株	固氮	SOD/U·mg ⁻¹	POD/U·mg ⁻¹	嗜铁素/%	水杨酸/μg·L ⁻¹	赤霉素/μg·L ⁻¹	生长素/μg·L ⁻¹
4C5	+	6.8±0.04 ^G	35.5±2.7 ^D	82.6±0.2 ^A	1.7±0.08 ^{CD}	-	22.5±0.8 ^D
5C5	++	25.8±0.3 ^D	43.7±1.9 ^C	3.2±0.1 ^E	6.5±0.06 ^A	-	47.3±1.1 ^B
5C1	++	13.7±0.2 ^F	32.1±2.9 ^D	74.1±0.2 ^B	1.5±0.1 ^D	6.8±0.1 ^A	13.4±1.08 ^F
AL1	++	18.8±0.3 ^E	56.2±0.9 ^B	45.5±4.6 ^C	2.5±0.06 ^B	6.3±0.2 ^B	8.6±1.1 ^G
CBS5	++	84.5±1.5 ^A	68.1±1.2 ^A	29.4±0.4 ^D	1.9±0.06 ^C	-	19.9±0.3 ^E
CBS7	-	37.2±4.1 ^C	25.8±2.8 ^E	74.8±0.1 ^B	1.7±0.09 ^{CD}	4.6±0.2 ^C	75.5±0.8 ^A
4R4	++	42.9±1.7 ^B	46.3±1.8 ^C	0.39±0.09 ^E	1.9±0.06 ^C	-	36.3±1.07 ^C
CBSB	++	44.1±2.5 ^B	48.2±2.7 ^C	1.2±0.2 ^E	0.25±0.15 ^E	3.3±0.1 ^D	3.5±0.4 ^H

注: +, 有此功能, ++, 功能较强, -, 无此功能。同一列不同大写字母代表LSD法多重比较 $P < 0.01$ 。

表3 复配菌生理生化指标 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Physiological and biochemical indexes of compound bacteria ($\bar{x} \pm s, n=3$)

检测指标	水杨酸/μg·L ⁻¹	赤霉素/μg·L ⁻¹	生长素/μg·L ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹	POD/U·mg ⁻¹	嗜铁素/%
T1	14.4±0.9 ^a	16.9±0.2 ^a	105±1.03 ^b	72.1±0.9 ^b	244±0.9 ^b	259±1.3 ^a
T2	9.5±0.7 ^b	14.5±0.8 ^b	140±0.7 ^a	338±0.9 ^a	275±0.6 ^a	123±1.01 ^b

注: 同一列小写字母代表LSD法多重比较 $P < 0.05$ 。

学意义。相较于T2, T1处理甘肃贝母水杨酸、赤霉素、细胞分裂素分别提高了51.7%, 32.4%, 250%, 生

长素含量下降了4.1%, 表明T1和T2都具有促生作用, T1强于T2。

表4 不同处理对甘肃贝母内源激素含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of different treatments on endogenous hormone content of *Fritillaria przewalskii* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

处理	水杨酸/μg·L ⁻¹	茉莉酸/μg·L ⁻¹	脱落酸/μg·L ⁻¹	赤霉素/μg·L ⁻¹	细胞分裂素/μg·L ⁻¹	生长素/μg·L ⁻¹	赤霉素/脱落酸
T1	25.5±0.9 ^A	0.16±0.01	1.9±0.1	147±0.1 ^A	7.7±0.1 ^A	52.2±0.2 ^B	77.5±0.1 ^A
T2	16.8±0.1 ^B	0.79±0.05	1.8±0.1	111±0.1 ^B	2.2±0.1 ^B	54.3±0.2 ^A	59.5±0.1 ^B
空白	16.5±0.8 ^B	0.86±0.1	2.5±0.8	20.1±0.9 ^C	1.2±0.2 ^C	18.3±0.2 ^C	12.8±0.1 ^C

注: 同一列不同大写字母代表LSD法多重比较 $P < 0.01$ (表5, 6同)。

3.2.2 对叶片活性氧相关指标的影响 相较于空白, T1和T2处理甘肃贝母的SOD, CAT, POD活性显著升高 ($P < 0.01$); T1处理甘肃贝母的SOD, POD活性相较于T2分别下降了19.9%, 41.7%, CAT活性相较于T2的2.4倍, 表明T1和T2处理都起到了很

好的胁迫保护作用。相较于空白, T2处理甘肃贝母过氧化氢含量显著升高, 增加了1.7倍, T1处理甘肃贝母差异无统计学意义; 丙二醛含量显著降低 ($P < 0.01$), 表明基于假单胞菌的复合菌剂T2具有诱导本底水平过氧化氢产生的作用。见表5。

表5 不同处理对甘肃贝母幼苗叶片(鲜重)活性氧相关指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effects of different treatments of *Fritillaria przewalskii* on related indexes of active oxygen in leaves ($\bar{x} \pm s, n=3$)

处理	SOD/U·g ⁻¹	POD/U·g ⁻¹	CAT/U·g ⁻¹	过氧化氢/μmol·g ⁻¹	丙二醛/nmol·g ⁻¹
T1	497±1.5 ^B	893±1.4 ^B	2 748±3.1 ^A	6.1±0.5 ^B	2.8±0.04 ^C
T2	596±2.8 ^A	1 266±1.6 ^A	1 143±3.5 ^B	14.5±0.4 ^A	15.8±0.8 ^B
空白	402±2.6 ^C	186±1.1 ^C	9.04±1.9 ^C	5.3±0.5 ^B	46.4±0.1 ^A

3.2.3 对叶片叶绿素、根际土全铁含量及产量的影响 相较于CK, T1和T2处理甘肃贝母叶绿素、根际土全铁含量、平均百株重都显著升高 ($P < 0.01$), 叶绿素含量分别增加了87.1%, 10.5%, 根际土全铁含

量分别增加了24.1%, 15.8%, 产量分别增加了31.1%, 21.5%。T1处理甘肃贝母的根际土全铁含量、叶绿素含量和平均百株重显著高于T2 ($P < 0.01$)。见表6。

表6 不同处理对甘肃贝母叶片叶绿素、铁含量及百株重的影响
($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effects of different treatments of *Fritillaria przewalskii* on chlorophyll, iron content and average 100 plant weight ($\bar{x}\pm s, n=3$)

处理	叶绿素(鲜重)/mg·g ⁻¹	铁/mg·kg ⁻¹	平均百株重/g
T1	33.5±0.1 ^A	345±1.1 ^A	287±1.02 ^A
T2	19.8±0.1 ^B	322±1.3 ^B	266±1.05 ^B
CK	17.9±0.3 ^C	278±2.8 ^C	219±0.8 ^C

3.3 不同检测指标的相关性分析及主成分分析
相关性分析见表7。水杨酸与赤霉素,细胞分裂素,叶绿素,CAT,铁,平均百株重呈显著正相关;赤霉素与细胞分裂素,生长素,叶绿素,CAT,POD,铁,

平均百株重呈显著正相关;细胞分裂素与叶绿素,CAT,铁,平均百株重呈显著正相关;生长素与SOD,CAT,POD,铁,平均百株重呈显著正相关;叶绿素与CAT,铁、平均百株重呈显著正相关;H₂O₂与SOD,POD呈显著正相关;SOD与POD呈显著正相关;CAT,POD与铁、平均百株重呈显著正相关;铁与平均百株重呈显著正相关;除去茉莉酸、脱落酸,丙二醛与其他指标都呈显著负相关。与平均百株重呈显著性正相关的指标有水杨酸,赤霉素,细胞分裂素,生长素,叶绿素,CAT,POD,铁,表明生长相关指标、胁迫相关指标、矿质元素铁对贝母增产都有显著促进作用。

表7 甘肃贝母不同检测指标皮尔森相关性

Table 7 Correlation analysis of related indexes of *Fritillaria przewalskii*

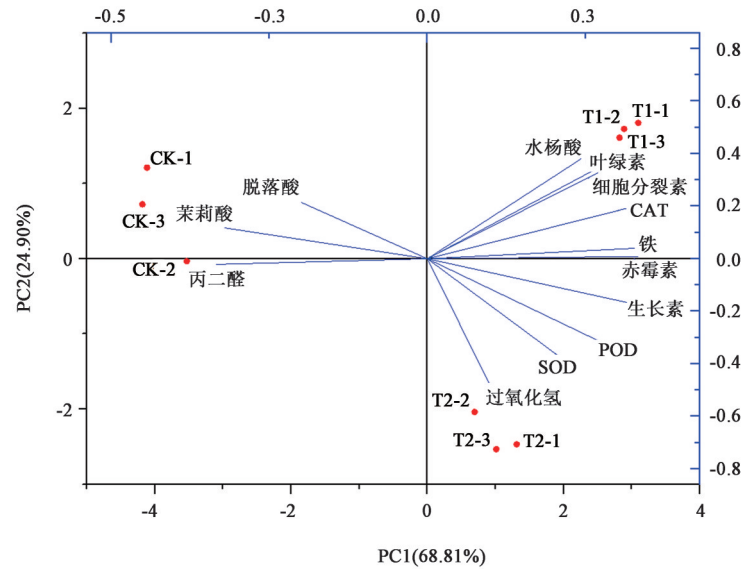
指标	水杨酸	茉莉酸	脱落酸	赤霉素	细胞分裂素	生长素	叶绿素	过氧化氢	丙二醛	SOD	CAT	POD	铁	平均百株重
水杨酸	1	-0.540	-0.156	0.734 ¹⁾	0.988 ²⁾	0.482	0.985 ²⁾	-0.408	-0.749 ¹⁾	0.003	0.916 ²⁾	0.210	0.759 ¹⁾	0.751 ¹⁾
茉莉酸	-0.540	1	0.117	-0.414	-0.536	-0.286	-0.537	0.165	0.418	0.186	-0.507	-0.171	-0.514	-0.430
脱落酸	-0.156	0.117	1	-0.547	-0.268	-0.581	-0.300	-0.464	0.573	-0.659	-0.434	-0.628	-0.501	-0.536
赤霉素	0.734 ¹⁾	-0.414	-0.547	1	0.812 ²⁾	0.946 ²⁾	0.790 ¹⁾	0.316	-0.997 ²⁾	0.609	0.941 ²⁾	0.803 ²⁾	0.975 ²⁾	0.999 ²⁾
细胞分裂素	0.988 ²⁾	-0.536	-0.268	0.812 ²⁾	1	0.581	0.997 ²⁾	-0.297	-0.828 ²⁾	0.118	0.961 ²⁾	0.316	0.828 ²⁾	0.826 ²⁾
生长素	0.482	-0.286	-0.581	0.946 ¹⁾	0.581	1	0.549	0.602	-0.931 ²⁾	0.781 ¹⁾	0.780 ¹⁾	0.946 ²⁾	0.908 ²⁾	0.938 ²⁾
叶绿素	0.985 ²⁾	-0.537	-0.300	0.790 ¹⁾	0.997 ²⁾	0.549	1	-0.326	-0.811 ²⁾	0.093	0.951 ²⁾	0.283	0.804 ²⁾	0.805 ²⁾
过氧化氢	-0.408	0.165	-0.464	0.316	-0.297	0.602	-0.326	1	-0.284	0.789 ¹⁾	-0.023	0.800 ²⁾	0.251	0.291
丙二醛	-0.749 ¹⁾	0.418	0.573	-0.997 ²⁾	-0.828 ²⁾	-0.931 ²⁾	-0.811 ²⁾	-0.284	1	-0.609	-0.950 ²⁾	-0.780 ¹⁾	-0.975 ²⁾	-0.998 ²⁾
SOD	0.003	0.186	-0.659	0.609	0.118	0.781 ¹⁾	0.093	0.789 ¹⁾	-0.609	1	0.360	0.854 ²⁾	0.573	0.600
CAT	0.916 ²⁾	-0.507	-0.434	0.941 ²⁾	0.961 ²⁾	0.780 ¹⁾	0.951 ²⁾	-0.023	-0.950 ²⁾	0.360	1	0.561	0.938 ²⁾	0.949 ²⁾
POD	0.210	-0.171	-0.628	0.803 ²⁾	0.316	0.946 ²⁾	0.283	0.800 ²⁾	-0.780 ¹⁾	0.854 ²⁾	0.561	1	0.754 ¹⁾	0.789 ¹⁾
铁	0.759 ¹⁾	-0.514	-0.501	0.975 ²⁾	0.828 ²⁾	0.908 ²⁾	0.804 ²⁾	0.251	-0.975 ²⁾	0.573	0.938 ²⁾	0.754 ¹⁾	1	0.981 ²⁾
平均百株重	0.751 ¹⁾	-0.430	-0.536	0.999 ²⁾	0.826 ²⁾	0.938 ²⁾	0.805 ²⁾	0.291	-0.998 ²⁾	0.600	0.949 ²⁾	0.789 ¹⁾	0.981 ²⁾	1

注:不同指标间相关性比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01。

主成分分析结果见图1。主成分1的载荷为68.8%,主成分2的载荷为24.9%。CAT,铁,生长素,赤霉素,丙二醛,茉莉酸对主成分1的贡献更大;过氧化氢,SOD对主成分2的贡献更大;其余指标对主成分1和2贡献相当。T1和T2与CK主要通过主成分1区分,增加CAT活性,提高铁、生长素、赤霉素含量,降低丙二醛、茉莉酸含量是其区别于CK的共同特点。T1主要影响水杨酸、叶绿素、细胞分裂素含量,T2主要影响过氧化氢含量,SOD活性。综合相关性分析、主成分分析可知,T1和T2通过其共同机理促进了贝母百株重的增加,T1提高了水杨酸、叶绿素、细胞分裂素含量,增产作用更强。

4 结论与讨论

本文研究了不同复配菌剂T1和T2对贝母内源激素、活性氧相关指标、叶绿素、土壤铁及产量的影响。结果表明T1和T2通过提高贝母叶片内源水杨酸、赤霉素、细胞分裂素、生长素、叶绿素、根际土铁含量,CAT和POD活性达到增产的作用。赤霉素、细胞分裂素、生长素是促生相关激素;叶绿素与光合作用密切相关;铁元素是植物的必需元素,植物缺铁会导致叶片变黄枯萎,叶绿素含量下降,直接影响光合作用和生长,分泌嗜铁素的菌对植物生长有促进作用^[18-20],本研究结果与此一致;SOD,POD,CAT等抗氧化酶系是重要的酶调节保护系统,在植



左下表述分组,右上表述不同成分

图1 甘肃贝母相关指标的主成分分析

Fig. 1 Principal component analysis of different indicators of *Fritillaria przewalskii*

物遭受外部环境胁迫时,增强其抗逆性并保护植物的正常生长^[21-22],甘肃贝母是高山荫生植物,对环境要求苛刻,年生育期3~4个月,增强其胁迫抗性对保证生长具有重要意义。

水杨酸是植物与微生物互作,系统获得性抗性(SAR)信号分子,不仅提高植物胁迫抗性,而且对产量也有一定的影响。研究表明,莲藕的膨大过程与内源吲哚乙酸和水杨酸呈显著的正相关^[23],外源添加 $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的水杨酸,促进了半夏块茎鲜重的增长^[24]。本研究T1和T2两种菌剂都可以产生水杨酸,叶面喷施后,T1处理甘肃贝母内源水杨酸含量显著高于T2和CK,表明T1菌剂和贝母产生了较强的互作,诱导内源水杨酸的产生。相关性分析和主成分分析表明,水杨酸和百株重存在显著的正相关关系,本研究结果与上述报道结果一致。

综上所述,两种菌剂通过促进促生激素的积累,提高胁迫抗性,促进植物对铁元素的活化吸收,达到增产的作用,具体机理有所区别,T1优于T2。其促生作用分子机理及对根际微生物多样性的影响有待通过组学技术深入研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 师娥,李丽,师桂英,等. 外源 GA_3 、ABA处理对高寒地区甘肃贝母鳞茎休眠的促抑效应[J]. 草原与草坪,2021,41(1):41-48.
[2] 杨涛,赵疆,闫鹏勋,等. 纳米铁和褪黑素对驯化栽培条件下甘肃贝母产量和品质的影响[J]. 中国实验方

剂学杂志,2021,27(7):144-150.
[3] 王小琴,陈垣,郭凤霞,等. 外源钙对甘肃贝母倒苗特性和抗氧化酶活性的影响[J]. 西北植物学报,2017,37(9):1831-1838.
[4] EGAMBERDIEVA D, SHRIVASTAVA S, VARMA A. Plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and medicinal plants [M]. Berlin: Springer International Publishing, 2015.
[5] BHATTACHARYYA P N, JHA D K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2012, 28(4): 1327-1350.
[6] LUNA M F, GALAR M L, APREA J, et al. Colonization of sorghum and wheat by seed inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* [J]. Biotechnol Lett, 2010, 32(8): 1071-1076.
[7] MISHRAL R K, PRAKASH O, ALAM M, et al. Influence of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on the productivity of *Pelargonium graveolens* L. Herit[J]. Rec Res Sci Tech, 2010, 2(5): 53-57.
[8] 欧阳湖,任建国,焦松林,等. 促生菌 *Bacillus* sp. KTS-1-1 和/或氮磷钾复合肥对太子参生长及代谢的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2020(6): 262-271.
[9] 潘惠霞,程争鸣,齐晓玲,等. 伊贝母根际有益微生物对栽培产量的影响[J]. 干旱区地理, 2010, 33(6): 917-922.
[10] GAO Y G, LIU Q, ZANG P, et al. An endophytic bacterium isolated from *Panax ginseng* C. A. Meyer enhances growth, reduces morbidity, and stimulates

- ginsenoside biosynthesis [J]. *Phytochem Lett*, 2015, 11: 132-138.
- [11] FENG W M, LIU P, YAN H, et al. Impact of *Bacillus* on phthalides accumulation in *Angelica sinensis* (Oliv.) by stoichiometry and microbial diversity analysis[J]. *Front Microbiol*, 2021, 11(8): 3421.
- [12] 任嘉红, 刘辉, 吴晓蕙, 等. 南方红豆杉根际溶无机磷细菌的筛选、鉴定及其促生效果[J]. *微生物学报*, 2012, 52(3): 295-303.
- [13] KARTHIKEYAN B, JOE M M, JALEEL C A, et al. Effect of root inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on plant growth alkaloid content and nutrient control of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don[J]. *Nat Croat*, 2010, 19(1): 205-212.
- [14] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [15] 武雯雯, 薛林贵, 张璐, 等. 一株产嗜铁素耐镉菌的分离及其对黑麦草种子萌发的作用[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(6): 1895-1906.
- [16] 夏铁骑. 植物根际促生菌及其应用研究[J]. *济源职业技术学院学报*, 2008, 7(3): 7-11.
- [17] SRIDEVI M, MALLAIAH K V. Production of catechol-type of siderophores by rhizobium strains from *Sesbania sesban* (L.) Merr [J]. *Asian J Bio Science*, 2008, 3(1): 187-194.
- [18] QI W Z, ZHAO L. Study of the siderophore-producing *Trichoderma asperellum* Q1 on cucumber growth promotion under salt stress [J]. *J Basic Microb*, 2013, 53(4): 102-117.
- [19] SOUZA E M, BASSANI V L, SPEROTTO R, et al. Inoculation of new rhizobial isolates improve nutrient uptake and growth of bean (*Phaseolus vulgaris*) and arugula (*Eruca sativa*) [J]. *J Sci Food Agr*, 2016, 96(10): 3446-3453.
- [20] BARNAWAL D, BHARTI N, MAJI D, et al. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase containing rhizobacteria protect *Ocimum sanctum* plants during waterlogging stress via reduced ethylene generation [J]. *Plant Physiol Bioch*, 2012, 58(6): 227-235.
- [21] 耿贵, 王罡, 董寅壮, 等. 高铁胁迫对甜菜幼苗生长及保护系统的影响[J]. *中国农学通报*, 2021, 37(21): 20-27.
- [22] 赵英, 张佳佳, 吴敏, 等. 外源钙对盐胁迫下罗汉果幼苗生理效应的影响[J]. *四川师范大学学报: 自然科学版*, 2021, 44(4): 555-562.
- [23] 李良俊, 潘恩超, 许超, 等. 莲藕膨大过程中内源激素、水杨酸和多胺含量的变化[J]. *园艺学报*, 2006(5): 1106-1108.
- [24] 陶兴魁, 黄铭美, 薛建平, 等. 水杨酸刺激下半夏试管块茎悬浮培养及其生物碱的含量[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(18): 139-144.

[责任编辑 顾雪竹]