



鲍婷婷,孙莉琼,李晓帆,等. 4种根际促生菌对菘蓝生长与生理的影响[J]. 南京农业大学学报,2024,47(5):854-863.

BAO Tingting,SUN Liqiong,LI Xiaofan,et al. Effects of four plant growth-promoting rhizobacteria on growth and physiology of *Isatis indigotica* [J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2024,47(5):854-863.

4种根际促生菌对菘蓝生长与生理的影响

鲍婷婷¹,孙莉琼¹,李晓帆²,李宇峰³,唐晓清^{1*},王康才¹

(1.南京农业大学园艺学院,江苏南京 210095;2.苏州聚鑫堂生物科技有限公司,江苏常熟 215500;
3.苏州启帆农业科技有限公司,江苏常熟 215500)

摘要:[目的]本文旨在研究4种不同根际促生菌对菘蓝根际环境改变、生长及生理的影响,为菘蓝绿色生产提供理论参考。[方法]采用4种根际促生菌(肠杆菌 GS-22、芽胞杆菌 GS-27、鞘氨醇杆菌 GS-72 和不动杆菌 GS-103)单施的方法开展盆栽试验,测定土壤理化指标、菘蓝生长指标、光合指标、营养物质与相关酶活性以及活性成分等,评价根际促生菌对菘蓝的促生效果。[结果]4种根际促生菌对土壤理化性质有不同程度影响,GS-22 和 GS-72 能够提高土壤全氮含量,GS-22 和 GS-103 显著提高土壤速效磷含量,各处理土壤有机质含量均显著提高。接种根际促生菌,土壤脲酶、土壤碱性磷酸酶和土壤蔗糖酶活性较不接种土壤根际菌(CK)的增幅分别为 33.78%~73.70%、49.51%~83.93% 和 8.10%~186.26%。4种根际促生菌促进菘蓝生长,增加株高、主根直径、干重、鲜重等,其中 GS-22 对菘蓝生长性状影响最显著。根际促生菌对菘蓝生理也有显著影响,各处理菘蓝硝酸还原酶、蔗糖合成酶、酸性磷酸酶活性较 CK 分别增加 53.81%~125.19%、57.64%~76.54% 和 7.87%~22.78%。4种根际菌有利于菘蓝营养物质(可溶性糖、游离氨基酸)与活性成分(总黄酮、靛蓝、靛玉红)的积累,其中 GS-22 与 GS-27 处理均可提高总黄酮、靛蓝和靛玉红的含量。[结论]菘蓝根际促生菌 GS-22、GS-27、GS-72 和 GS-103 具促生能力,能够改良土壤环境,对菘蓝的生长与生理过程有促进作用,其中 GS-27 的综合效果最佳。所筛选的菌株可为开发菘蓝专用微生物菌肥、实现药材增产增效提供策略。

关键词:菘蓝;根际促生菌;根际环境;促生能力;生长;生理

中图分类号:S154.3;S567.2

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)05-0854-10

Effects of four plant growth-promoting rhizobacteria on growth and physiology of *Isatis indigotica*

BAO Tingting¹,SUN Liqiong¹,LI Xiaofan²,LI Yufeng³,TANG Xiaoqing^{1*},WANG Kangcai¹

(1.College of Horticulture,Nanjing Agricultural University,Nanjing 210095,China;

2.Suzhou Juxintang Biotechnology Limited Company,Changshu 215500,China;

3.Suzhou Qifan Agricultural Technology Limited Company,Changshu 215500,China)

Abstract:[Objectives]The paper aimed to study the effects of four kinds of different plant growth-promoting rhizobacteria(PGPR) on the rhizosphere environment change, growth and physiology of *Isatis indigotica*, in order to provide theoretical reference for the production of *I. indigotica*. [Methods]The four kinds of PGPR, which were named *Enterobacter* sp. GS-22, *Bacillus* sp. GS-27, *Sphingobacterium* sp. GS-72 and *Acinetobacter* sp. GS-103,were applied in pot experiment. In order to evaluate the growth promotion effect of PGPR on *I. indigotica*, the relevant indicators were determined, including soil physical and chemical properties, growth traits, photosynthetic parameters,nutrient and related enzyme activities,active components,and so on. [Results]The four kinds of PGPR had different effects on soil physicochemical properties. GS-22 and GS-72 could increase soil total nitrogen content,GS-22 and GS-103 significantly increased soil available phosphorus content,and soil organic matter content in all treatment groups significantly increased. Compared with not inoculated with soil rhizosphere bacteria(CK),the activities of soil urease,soil alkaline phosphatase and soil sucrose increased by 33.78%~73.70%,49.51%~83.93% and 8.10%~186.26%,respectively. Four rhizosphere bacteria promoted the growth of *I. indigotica*, and increased plant height,taproot diameter,dry weight,fresh weight,and so on,and GS-22 had the most significant effect on the growth traits of *I. indigotica*. PGPR also had significant effects on physiology of *I. indigotica*. The activities of nitrate reductase,sucrose synthetase and acid phosphatase increased by 53.81%~125.19%,57.64%~76.54% and 7.87%~22.78% compared with CK, respectively. Four rhizosphere bacteria were beneficial to the accumulation of nutrients,like soluble sugars,free amino acids,and active components,like total flavonoids,indigo and indirubin of *I. indigotica*,in which GS-22 and GS-27 especially increased the contents of

收稿日期:2023-09-28

基金项目:园艺作物资源与保存研究项目(KYZZ2022004);中药全产业链创新研究项目(KYCXJC2022001);横向合作-中药材种植技术与基地建设指导项目(20231020)

*通信作者:唐晓清,教授,主要从事药用植物代谢与品质评价研究,E-mail:xqtang@njau.edu.cn。

total flavonoids, indigo and indirubin. [Conclusions] The rhizosphere bacteria GS-22, GS-27, GS-72 and GS-103 had the ability to promote plant growth in *I. indigotica*, improve the soil environment, and promote the growth and physiological processes of *I. indigotica*. Among them, GS-27 had the best comprehensive capability. The screened strains provided strategies for developing specialized microbial fertilizer for *I. indigotica* and achieving increased yield and efficiency of Chinese herbs.

Keywords: *Isatis indigotica*; plant growth-promoting rhizobacteria; rhizosphere environment; growth promoting ability; growth; physiology

随着我国医药行业的磅礴发展,在中药农业人工栽培规模化发展的同时,化肥、农药的不科学使用,使环境、药材品质等面临威胁与挑战,“绿色、生态、高质量”已成为当前中药农业的发展目标^[1]。微生物肥料是含特定微生物活体的制品,具备提高作物产量和品质、促进农业可持续发展等优势,可作为化肥的有效替代物^[2]。当前我国测试中心微生物肥料登记产品中适用的中药材包括人参、三七、当归、丹参等,使用菌种包括枯草芽胞杆菌、地衣芽胞杆菌、解淀粉芽胞杆菌等^[3],而适用于白菜、黄瓜等普通农作物的种类与数量远多于中药材,因此开发微生物菌肥应用于中药材生产具有重要价值。

菘蓝(*Isatis indigotica* Fort.)为2年生十字花科植物,叶、根均可作药用,干燥叶入药为大青叶,有清热解毒、凉血消斑功效;干燥根入药为板蓝根,有清热解毒、凉血利咽功效^[4]。菘蓝含有吲哚类、喹啉酮类、喹啉类生物碱与木脂素类、黄酮类等活性成分,具抗菌、抗病毒、抗炎等现代药理活性作用^[5]。氮肥长期施用过多会导致作物产量与品质下降、土壤酸化等,对环境生态与经济发展造成不利影响^[6]。适量施用氮肥可增加菘蓝根冠比与板蓝根产量,但随着施氮量的增加,土壤表层硝态氮含量相应增加,会导致环境污染风险增大^[7]。减量施氮不利于菘蓝生长和外形品质,但利于活性成分积累与有效经济产量的提高^[8-9]。

根际促生菌(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)指存在于植物根际、根表或根皮质细胞间,对植物的生长有间接或直接促进作用的细菌,可根据其作用的不同,开发为生物肥料、植物刺激剂以及生物农药等^[10]。当前应用于菘蓝栽培的微生物肥料仅查询到沼泽红假单胞菌液体微生物肥料^[11]。因此,本研究从绿色生态出发,选择从道地产区分离的菘蓝根际促生微生物,探究根际促生菌对菘蓝根际环境的影响,同时研究其对菘蓝生长与活性成分积累的影响,以期微生物菌肥在菘蓝的绿色、生态、高质量栽培应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料与仪器

目标根际微生物分离自甘肃民乐产区菘蓝根际土壤。样品采集地土壤的基本理化性质:pH7.96,全氮 $2.46\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,速效磷 $1.70\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,有机质 $5.81\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。供试植物材料源自甘肃产区,经南京农业大学唐晓清教授鉴定为十字花科植物菘蓝(*Isatis indigotica*)的角果。

主要仪器:光合仪LI-6400购自美国LI-COR公司;杜马斯定氮仪NDA702购自意大利VELP公司;超高效液相色谱仪Agilent 1290型购自美国安捷伦公司。

1.2 试验设计

将目标根际促生菌接种至LB液体培养基中, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $160\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养3 d, $4\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,无菌水重悬菌体至 $10^8\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$,即得单一菌悬液。

于2022年6月24日播种菘蓝,基质为土壤、营养土和蛭石(体积比为5:3:2),供试盆栽土壤取自南京农业大学白马教学科研基地,播种前自然风干2周。共设置5个处理,分别为不接种土壤根际菌(CK),接种菌株GS-22、GS-27、GS-72、GS-103处理。每个处理10盆,每盆定植4株,分别于8月15日、9月15日、10月15日根灌菌悬液,每株10 mL,CK施等量无菌水。自播种至采收不另外施营养液与肥料。

1.3 测定项目及方法

1.3.1 菌株筛选与鉴定 使用Ashby培养基分析固氮能力^[12],PKO培养基分析溶磷能力^[13],亚历山大硅酸盐培养基分析解钾能力^[14],King's培养基分析产IAA能力^[15],MSA-CAS平板与MKB培养基分析产铁载体能力^[16-17]。使用MEGA 11.0软件中的邻接法构建系统发育树^[18]。

1.3.2 土壤理化性质 土壤pH值测定采用水浸提电位法^[19];有机质(SOM)含量测定采用重铬酸钾外加热法;土壤全氮(TN)含量测定采用干烧法;土壤速效磷(AP)含量测定采用 NaHCO_3 浸提-钼锑抗分光光度法^[20]。

1.3.3 土壤水解酶活性 使用索莱宝试剂盒测定土壤蔗糖酶(S-SC)、土壤脲酶(S-UE)、土壤碱性磷酸酶(S-AKP)活性。

1.3.4 生长指标 12月上旬采收菘蓝,测量其株高(基部至顶端叶尖的长度)、主根长、主根直径、地上部与地下部鲜重。置于105℃烘箱中杀青15min后60℃烘干至恒重。称量地上部与地下部干重,计算根冠比(根冠比=地下部干重/地上部干重)。烘干叶片粉碎后过孔径180μm筛,用于活性成分的测定^[21]。

1.3.5 光合参数与叶绿素含量测定 选择菘蓝由内至外第3轮功能叶,于采收前选择天气晴朗的上午08:30—11:00,用LI-6400型光合仪测定叶片净光合速率(P_n)、气孔导度(G_s)、胞间CO₂浓度(C_i)和蒸腾速率(T_r),测定光照强度为1000μmol·m⁻²·s⁻¹。以95%(体积分数)乙醇为提取剂,测定菘蓝的叶绿素a、叶绿素b含量及叶绿素总含量^[22]。

1.3.6 菘蓝叶营养代谢关键酶活测定 使用索莱宝试剂盒检测菘蓝叶片蔗糖合成酶(SS)、硝酸还原酶(NR)活性,使用上海源叶生物试剂盒检测酸性磷酸酶(ACP)活性。

1.3.7 菘蓝叶片可溶性糖和游离氨基酸含量测定 采用蒽酮比色法测定可溶性糖含量,采用茚三酮比色法测定游离氨基酸含量^[22]。

1.3.8 菘蓝总黄酮、靛蓝和靛玉红含量测定 采用分光光度法测定总黄酮含量;靛蓝和靛玉红定量分析参考《中华人民共和国药典》^[4],分别以靛蓝、靛玉红的色谱峰面积(Y)与含量(X ,μg·mL⁻¹)绘制标准曲线,计算回归方程。靛蓝与靛玉红的回归方程分别为 $Y_1 = 34\ 035X_1 + 4\ 666.5$ ($R^2 = 0.999\ 4$, $n = 3$, 线性范围为0~30μg·mL⁻¹)与 $Y_2 = 40\ 554X_2 - 1\ 253.6$ ($R^2 = 0.999\ 9$, $n = 3$, 线性范围为0~10μg·mL⁻¹)。

1.4 数据处理

采用Excel 2019和SPSS 20.0软件进行数据分析与图表绘制。采用Duncan's新复极差法进行差异显著性分析,差异显著水平为0.05。采用Origin 2021软件绘图。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定及促生特性

经16S rRNA鉴定,供试菌株分别为肠杆菌GS-22、芽胞杆菌GS-27、鞘氨醇杆菌GS-72和不动杆菌GS-103(菌株序列已提交至NCBI,登录号为OR350928—OR350931),上述菌株的系统发育树见图1。

由表1可见:4株目标菌株均具有固氮能力。其中,GS-22兼具溶无机磷能力,发酵液磷质量浓度为10.87mg·mL⁻¹;具产IAA能力,发酵液IAA质量浓度为67.41μg·mL⁻¹;具产铁载体能力,产铁载体能力中等(++)。GS-27兼具解钾能力;具产IAA能力,发酵液IAA质量浓度为10.60μg·mL⁻¹。GS-72与GS-27体外促生特性相似,产IAA能力较GS-27高,发酵液IAA质量浓度为29.68μg·mL⁻¹。GS-103兼具解钾和产铁载体能力,产载体能力较强(+++)。

表1 目标菌株的体外促生能力

Table 1 *In vitro* promoting capacity of the target strains

菌株 Strain	固氮 Nitrogen fixation	解钾 Potassium dissolution	溶磷/(mg·L ⁻¹) Phosphorus dissolution	产IAA/(μg·L ⁻¹) IAA production	产铁载体 Fe ³⁺ production
GS-22	+	-	10.87	67.41	++
GS-27	+	+	-	10.60	-
GS-72	+	+	-	29.68	-
GS-103	+	+	-	-	+++

注:除产铁载体“+”表示能力大小(“+”数量越多表示产铁载体能力越强)外,其余促生能力项目“+”表示阳性反应;“-”表示阴性反应。In addition to the iron-producing carrier “+” indicates the size of the capacity (the more the number of “+” indicates the stronger the iron-producing carrier capacity), the remaining growth promoting capacity items “+” indicates positive reaction, “-” indicates negative reaction.

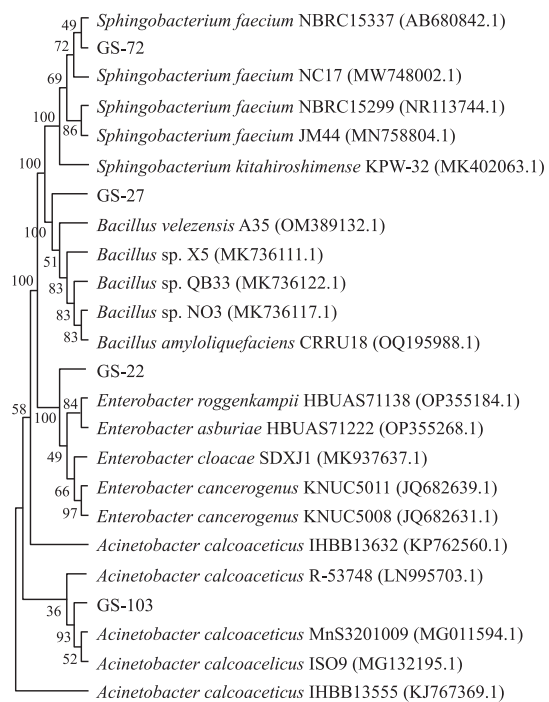


图1 目标菌株的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the target strains

2.2 根际促生菌 (PGPR) 对土壤理化性质的影响

菘蓝 PGPR 能够改善土壤理化性质,增强土壤肥力(图 2)。土壤 pH 值为 7.63~7.68,各处理间无显著差异($P>0.05$)。速效磷(AP)、全氮(TN)、有机质(SOM)含量与土壤肥力呈正相关。GS-103 和 GS-22 处理显著增加 AP 含量($P<0.05$),分别增加 40.72%、25.21%,GS-27 和 GS-72 处理 AP 含量低于 CK。GS-22 和 GS-72 处理 TN 含量较 CK 分别增加 15.84%、13.58%,其余 2 个处理与 CK 间无显著差异,TN 含量从高到低的处理依次为 GS-27、CK、GS-103 处理。经 PGPR 处理的 SOM 均不同程度增加($P<0.05$),其中 GS-22 处理为 CK 的 1.97 倍,GS-27、GS-103、GS-72 处理分别为 CK 的 1.72、1.16、1.62 倍。

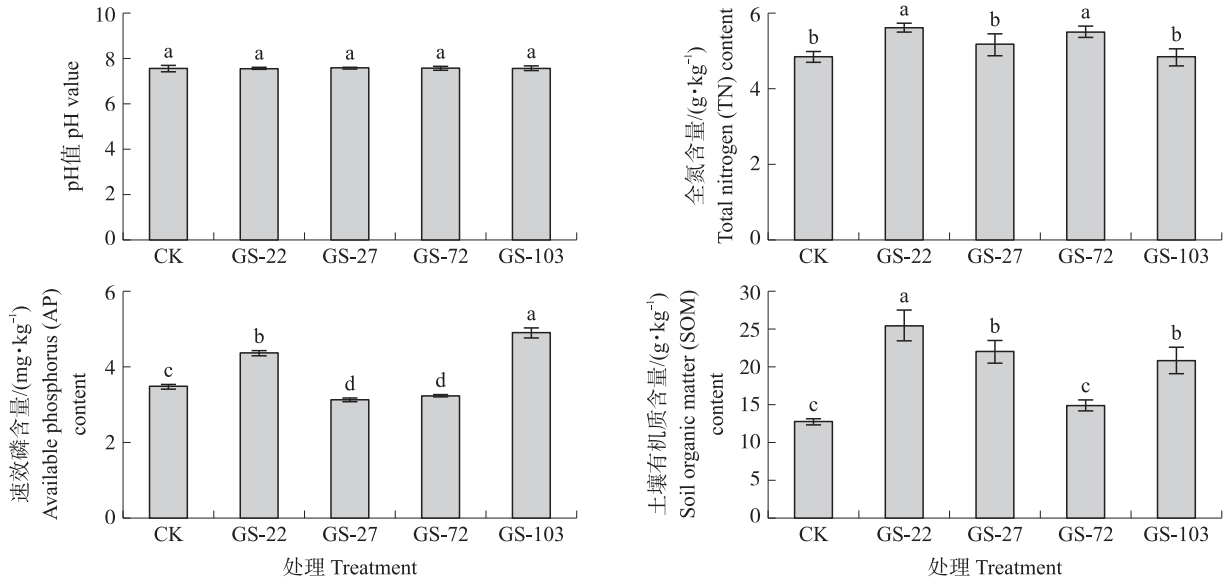


图 2 接种根际促生菌 (PGPR) 对土壤理化性质的影响

Fig. 2 Effect of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on soil physicochemical properties

CK:不接种土壤根际菌 No inoculation with soil rhizobacteria;GS-22:接种肠杆菌 GS-22 处理 Inoculation with *Enterobacter* sp. GS-22 treatment;GS-27:接种芽胞杆菌 GS-27 处理 Inoculation with *Bacillus* sp. GS-27 treatment;GS-72:接种鞘氨醇杆菌 GS-72 处理 Inoculation with *Sphingobacterium* sp. GS-72 treatment;GS-103:接种不动杆菌 GS-103 处理 Inoculation with *Acinetobacter* sp. GS-103 treatment.

不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。下同。Different lowercase letters indicate significant difference among treatments($P<0.05$). The same as follows.

2.3 PGPR 对土壤水解酶活性的影响

接种 PGPR 均能显著提高 3 种土壤酶活性(图 3)。其中,土壤脲酶(S-UE)活性从大到小的处理依次为 GS-22、GS-27、GS-103、GS-72 处理,较 CK 分别增加 73.70%、50.92%、49.83%、33.78%。GS-27、GS-103、GS-72、GS-22 处理的土壤碱性磷酸酶(S-AKP)活性分别为 CK 的 1.84、1.70、1.65、1.49 倍。各处理土壤蔗糖酶(S-SC)活性均显著高于 CK,其中 GS-22 和 GS-27 处理对 S-SC 活性的影响较大,分别为 CK 的 2.86、2.58 倍。

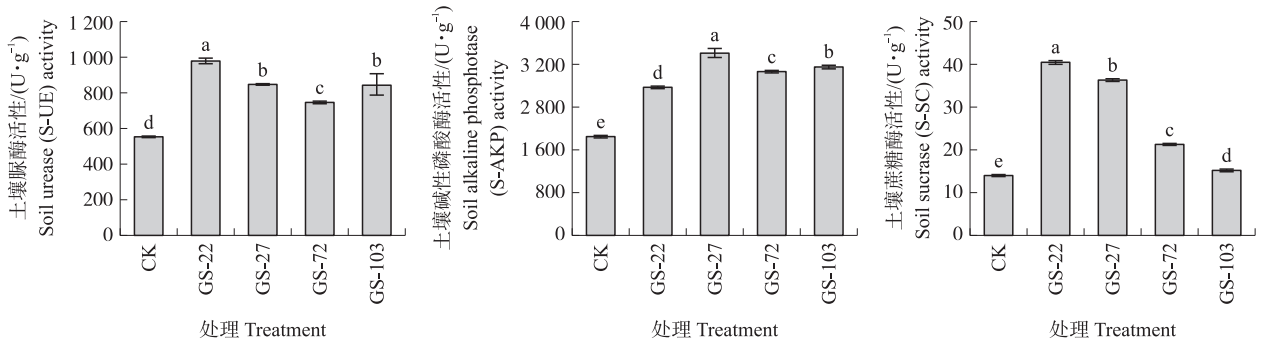


图 3 接种 PGPR 对土壤酶活性的影响

Fig. 3 Effect of PGPR inoculation on soil enzyme activity

2.4 PGPR 对菘蓝生长指标的影响

PGPR 对菘蓝生长性状有显著促进作用(表 2)。其中,GS-22 处理对菘蓝株高、主根直径与主根长的促进作用最显著,较 CK 分别增加 28.79%、71.57%、74.85%,其他处理株高、主根直径、主根长也均高于 CK。

表2 不同处理下菘蓝生长性状差异

Table 2 Differences of growth characters of *Isatis indigotica* under different treatments

处理 Treatment	株高/cm Plant height	主根直径/mm Main root diameter	主根长/cm Main root length
CK	14.10±0.23 ^d	7.07±0.18 ^c	13.68±0.78 ^d
GS-22	18.16±0.21 ^a	12.13±0.40 ^a	23.92±2.11 ^a
GS-27	17.58±0.31 ^b	8.59±0.27 ^b	16.10±1.30 ^c
GS-72	14.43±0.14 ^d	8.53±0.16 ^b	19.40±0.67 ^b
GS-103	16.43±0.47 ^c	8.59±0.11 ^b	22.90±1.77 ^a

接种 PGPR 有利于菘蓝生物量的积累(表3)。GS-22 处理的菘蓝地上部与地下部鲜重、地上部与地下部干重以及单株鲜重、干重均高于其余处理,分别为 CK 的 3.14、1.90、2.85、2.23、2.31、2.37 倍。GS-103 处理根冠比显著高于其他处理,表明 GS-103 处理显著促进菘蓝地下部分生长,而 GS-22 处理则显著促进菘蓝地上部分生长。

表3 不同处理下单株菘蓝生物量积累差异

Table 3 Biomass accumulation difference of individual *I. indigotica* under different treatments

处理 Treatment	地上部鲜重/g Shoot fresh weight	地下部鲜重/g Root fresh weight	单株鲜重/g Fresh weight per plant	地上部干重/g Shoot dry weigh	地下部干重/g Root dry weight	单株干重/g Dry weight per plant	根冠比 Root-shoot ratio
CK	7.61±0.89 ^d	15.67±1.92 ^b	23.28±2.77 ^c	1.13±0.13 ^c	3.75±0.5 ^c	4.88±0.27 ^d	3.32±0.21 ^b
GS-22	23.97±3.30 ^a	29.8±3.31 ^a	53.77±4.18 ^a	3.22±0.44 ^a	8.36±0.61 ^a	11.58±1.39 ^a	2.60±0.36 ^c
GS-27	15.34±1.47 ^b	16.65±2.76 ^b	31.99±3.75 ^b	2.34±0.19 ^b	5.5±0.18 ^b	7.84±0.15 ^b	2.36±0.32 ^c
GS-72	10.46±0.21 ^c	15.97±1.63 ^b	26.43±1.47 ^c	1.30±0.18 ^c	4.77±0.17 ^{bc}	6.07±0.34 ^{cd}	3.65±0.54 ^b
GS-103	13.42±0.78 ^b	17.43±1.49 ^b	30.85±1.42 ^b	1.32±0.21 ^c	5.7±0.38 ^b	7.02±0.46 ^{bc}	4.43±0.78 ^a

2.5 PGPR 对菘蓝叶片光合参数与叶绿素含量的影响

PGPR 能够增强菘蓝的光合作用(表4)。各处理的 P_n 、 G_s 、 T_r 均显著高于 CK,且 GS-22 处理的 P_n 、 G_s 、 T_r 显著高于其余菌株处理;除 GS-103 处理 C_i 高于 CK 外,其余处理均显著低于 CK,且 GS-22 处理最低。

表4 不同处理下菘蓝光合参数差异

Table 4 Differences of photosynthetic parameters of *I. indigotica* under different treatments

处理 Treatment	$P_n/(\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1})$	$G_s/(\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1})$	$C_i/(\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1})$	$T_r/(\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1})$
CK	8.45±0.19 ^d	0.15±0.02 ^c	326.17±1.91 ^b	1.47±0.01 ^d
GS-22	14.60±0.36 ^a	0.27±0.03 ^a	285.47±7.48 ^d	2.50±0.20 ^a
GS-27	9.69±0.04 ^c	0.24±0.01 ^b	293.57±14.16 ^d	1.79±0.02 ^c
GS-72	10.57±0.33 ^b	0.22±0.01 ^b	313.56±2.01 ^c	1.86±0.11 ^c
GS-103	10.47±0.21 ^b	0.21±0.02 ^b	335.64±2.61 ^a	2.03±0.07 ^b

PGPR 有利于菘蓝合成叶绿素(图4)。各处理叶片叶绿素 a (Chla)、叶绿素 b (Chlb)、叶绿素总含量(Chla+b)均高于 CK。GS-27、GS-72 处理增幅显著大于其余处理,叶绿素 a 含量较 CK 增加 57.50%、55.00%,叶绿素 b 含量增加 48.38%、35.48%,叶绿素总含量增加 53.52%、46.48%。

2.6 PGPR 对菘蓝叶片营养代谢关键酶活性的影响

菘蓝 PGPR 显著提高菘蓝叶片硝酸还原酶(NR)、酸性磷酸酶(ACP)、蔗糖合成酶(SS)活性(图5)。各处理 NR 活性均显著高于 CK,酶活性从大到小的处理依次为 GS-27、GS-22、GS-72、

GS-103 处理,分别为 CK 的 2.38、2.25、1.83、1.54 倍。经 4 株 PGPR 处理的 ACP 活性显著高于 CK,处理间无显著差异,GS-22、GS-103、GS-27、GS-72 处理分别比 CK 增加 76.54%、75.76%、69.31%、57.64%。除 GS-27 处理外,其余菌株处理 SS 活性高于 CK,其中 GS-22 处理增幅最大,为 22.77%。

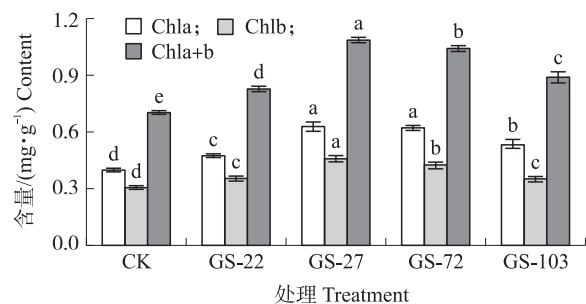


图4 接种 PGPR 对菘蓝叶片叶绿素含量的影响

Fig. 4 Effect of PGPR inoculation on the chlorophyll content of *I. indigotica* leaves

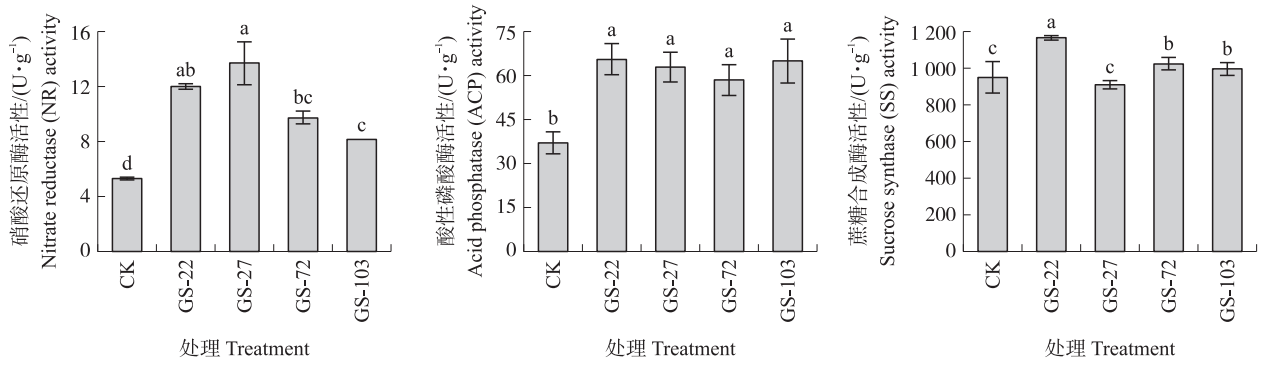


图 5 接种 PGPR 对菘蓝叶片关键酶活性的影响

Fig. 5 Effect of PGPR inoculation on key enzyme activities of *I. indigotica* leaves

2.7 PGPR 对菘蓝叶片可溶性糖和游离氨基酸的影响

PGPR 有利于菘蓝营养物质的积累(图 6)。GS-72 处理叶片可溶性糖含量显著高于其他处理,为 CK 的 2.92 倍,GS-103、GS-27 处理与 CK 差异显著。除 GS-103 处理外,其余处理游离氨基酸与 CK 有显著差异,GS-22、GS-27、GS-72 处理比 CK 增加 32.22%、26.07%、20.85%。

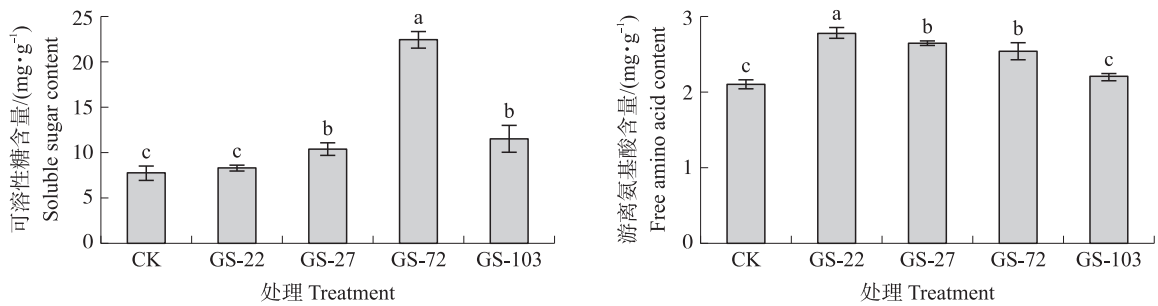


图 6 不同处理下菘蓝叶片营养物质积累差异

Fig. 6 Differences of nutrient accumulation in *I. indigotica* leaves under different treatments

2.8 PGPR 对菘蓝叶片总黄酮、靛蓝和靛玉红的影响

PGPR 对菘蓝活性物质的合成有不同程度影响(图 7)。各处理总黄酮含量均显著高于 CK,其中 GS-27 处理含量最高,GS-27、GS-22、GS-72、GS-103 处理比 CK 增加 26.74%、22.67%、15.70%、13.95%。GS-27 处理与 CK 的靛蓝含量具有显著差异,增幅最大,为 34.65%;GS-27、GS-103 处理与 CK 相比靛蓝含量无显著差异,分别增加 26.27%、22.50%;GS-72 处理较 CK 减少 5.74%,且差异显著。接种 PGPR 均提高了菘蓝叶片靛玉红含量,其中 GS-22、GS-27、GS-72 处理与 CK 差异显著,GS-22 与 GS-72 处理无显著差异;GS-103 处理较 CK 增加 5.00%,但二者无显著差异。

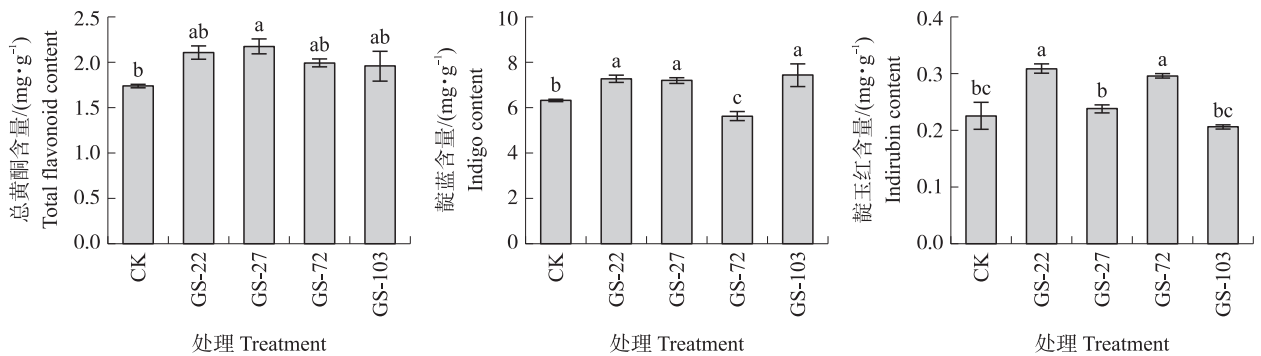


图 7 接种 PGPR 对菘蓝叶片活性成分含量的影响

Fig. 7 Effect of PGPR inoculation on the contents of active ingredients in *I. indigotica* leaves

2.9 各指标相关性分析与综合分析

从图 8 可见:土壤 pH 值与各指标相关性系数均较小;TN 含量与靛玉红、游离氨基酸含量呈显著正相关;SOM 含量与株高、地上部鲜重和干重、单株干重呈显著正相关;AP 含量与主根长相关性大于其余指

标;S-UE活性与株高、地上部鲜重、地下部和单株干重、 G_s 、 T_r 、ACP活性呈显著正相关;S-SC活性与地上部干重、NR活性、游离氨基酸含量、总黄酮含量呈显著正相关;S-AKP活性与叶绿素a含量、ACP活性呈显著正相关。

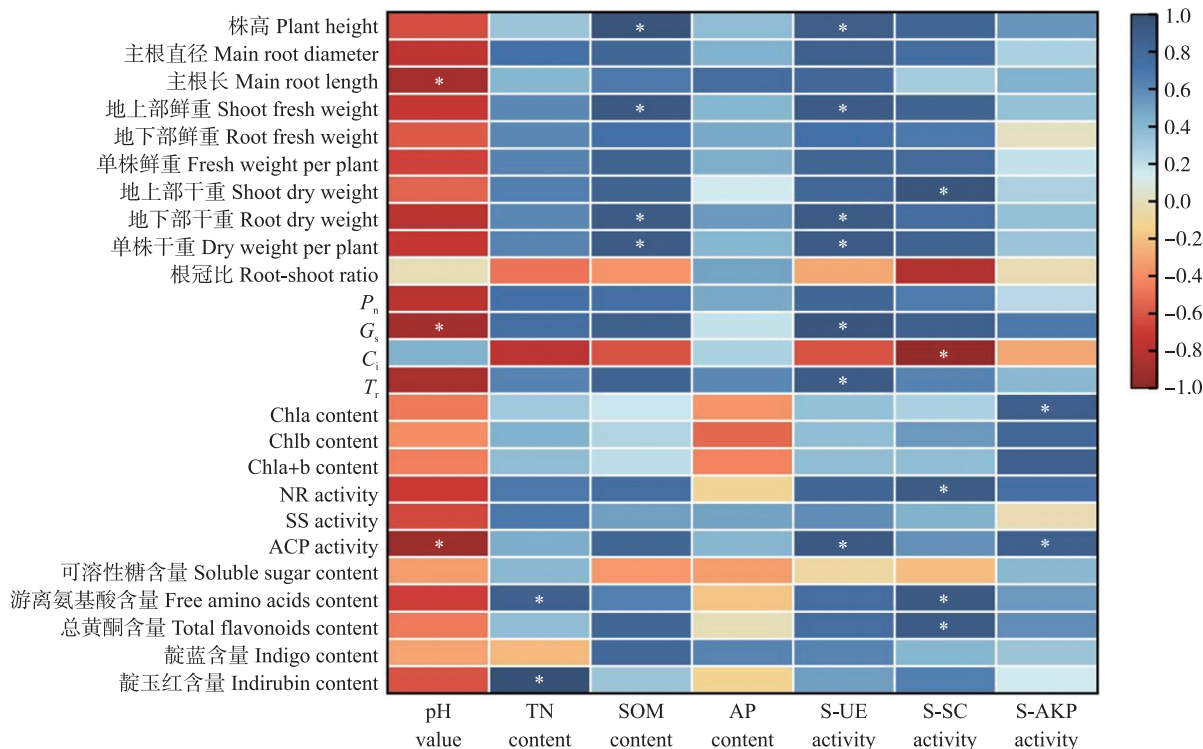


图8 各指标相关性分析

Fig. 8 Correlation analysis of each indicator

* $P < 0.05$.

采用主成分分析,将数据标准化,计算各组综合得分(表5),以筛选最优处理。将菘蓝生长指标与活性指标进行得分计算,在筛选出的14个成分中,前3个成分的特征值较高(图9),贡献率分别为57.84%、18.77%、11.73%,前3个主成分累计解释全部方差的88.34%,表示提取的3个主成分能够代表菘蓝生长与生理生化指标信息的88.34%。各处理综合得分从大到小依次为GS-27(0.74)、GS-22(0.61)、GS-103(-0.08)、GS-72(-0.10)、CK(-1.17)。综合来看,菘蓝根际PGPR对促进菘蓝生长与活性成分合成等有促进作用,其中GS-27处理的综合效果最佳。

表5 不同处理综合得分分析

Table 5 Analysis of combined scores for different treatments

处理 Treatment	因子1 Factor 1	因子2 Factor 2	因子3 Factor 3	得分 Score	排名 Ranking
CK	-1.64	-0.64	0.28	-1.17	5
GS-22	0.23	1.75	0.71	0.61	2
GS-27	1.38	-1.07	0.47	0.74	1
GS-72	0.17	0.21	-1.93	-0.10	4
GS-103	-0.14	-0.25	0.47	-0.08	3

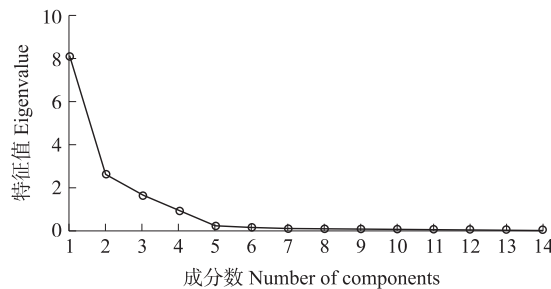


图9 主成分分析的碎石图

Fig. 9 Gravel diagram of principal component analysis

3 讨论与结论

植物微生物组由根际微生物组、叶际微生物组与内生微生物组构成^[23]。作为“植物的第二基因组”,根际微生物是实现农业绿色发展的关键调控范畴^[24]。根际环境是将植物-土壤-微生物紧密结合的重要媒介,根际环境的理化指标等变化,可作为PGPR促生能力的表征指标。土壤酶活性的高低与土壤碳、氮、磷、钾营养等土壤性质相关^[25]。Wu等^[26]将复合木霉菌菌剂施用于黄连,可提高S-UE和S-CAT活性,且能降低根腐病的发病率;施用含雷氏普罗威登斯菌、斋戒小陌生菌、乙酸酐不动杆菌和黏质沙雷氏菌的复

合 PGPR 接种剂增加了苜蓿根际 AK、AN、AOC 和 AN 含量^[27]。接种解淀粉芽胞杆菌,土壤中 S-UE、S-AKP、S-SC 活性以及土壤氮、磷、钾含量均高于阿耶波多氏芽胞杆菌处理^[28]。本研究中,各处理 SOM 含量均较 CK 显著增加,且各处理根系生长状态均优于 CK,有机质增加的主要驱动因素是根系分解产物还是微生物代谢产物有待进一步验证^[29-31]。与土壤基本养分指标的变化不同,筛选出的 4 株 PGPR 与 CK 相比,提高 S-UE、S-AKP、S-SC 活性的效果显著,表明上述菌株积极参与了土壤的碳、氮循环。本试验中,4 株 PGPR 均具有固氮能力,但其对于增加土壤氮含量未见显著作用,可能是固氮菌所固定的氮素主要用于自身繁殖而非供给植物所用^[32]。

研究表明,产 ACC 脱氨酶的促生菌促进重瓣百合现蕾前叶绿素含量增加,对株高、花苞数、花期等均有积极作用^[33]。Xiong 等^[34]发现弯曲芽胞杆菌 KLBMP 4941 能促进盐胁迫下补血草叶绿素合成、提高抗氧化酶活性、调节 Na^+/K^+ 平衡帮助宿主植物减少盐胁迫损伤等。从欧洲李根际分离的 PGPR 能够显著促进番茄生长,提高叶绿素、脯氨酸含量与 NR 活性等^[35]。本研究中,筛选的 PGPR 均有促进菘蓝叶绿素合成的功能,与 P_n 变化一致,表明 PGPR 能够增强菘蓝的光合作用。肠杆菌 GS-22 对菘蓝生长性状的影响显著,鞘氨醇杆菌 GS-72 处理菘蓝可溶性糖含量远高于其他处理。植物 NR 活性高低是氮代谢强弱的关键,ACP 能够促进磷的高效利用,SS 在蔗糖分解与淀粉合成等环节具有重要作用。本研究中,各处理菘蓝叶片的 NR、ACP、SS 活性均高于 CK,表明 PGPR 能够促进菘蓝的氮、磷、钾代谢,这与杨婷婷等^[36]的研究结果相一致。各处理均提高了土壤、植株代谢相关酶活性,各菌株具备的固氮、溶磷、解钾等体外促生能力在植株内部得到了印证,初步证实其积极参与了环境与植物的营养代谢环节,对菘蓝的生长与生理过程有重要影响。

药用植物可通过根系分泌物招募有益微生物以应对各类胁迫,而微生物又能够进一步影响植物的次生代谢水平^[37]。研究表明,从丹参根际分离的假单胞菌和泛菌能够促进丹参酚酸类物质的合成^[38];李钦等^[39]研究表明施用复合微生物肥料降低了当归药材水分、总灰分以及酸不溶性灰分含量,提高浸出物、阿魏酸松柏酯、藁本内酯等含量;Yilmaz 等^[40]发现丛枝菌根真菌 AMF 与 PGPR 对罗勒生长性状、产量与精油含量等指标均有较好促进作用。本研究中,各处理总黄酮含量均高于 CK,GS-22 与 CK 靛蓝含量差异显著,GS-22、GS-27、GS-72 有利于菘蓝靛玉红含量增加,与促生菌对活性成分影响的趋势一致。靛玉红为大青叶品质评价的指标成分,相关性分析显示靛玉红含量与 TN、S-UE 活性显著相关,表明 GS-22、GS-27 和 GS-72 积极参与了土壤以及菘蓝植株的氮循环;GS-72 处理靛蓝含量与 GS-103 处理靛玉红含量略有降低,其可能作用于其他次生代谢环节而非生物碱合成过程。微生物影响植物的生长与代谢过程,这些过程同样能够影响微生物群落的组成与功能。药用植物的类型、生长时期、代谢产物类型多样,其根际群落亦具备多样性,释放到土壤中的代谢产物改变根际环境,进而影响微生物的丰度与群落功能等^[41]。

综上所述,本研究从甘肃产区的菘蓝根际分离、筛选的 PGPR(肠杆菌 GS-22、芽胞杆菌 GS-27、鞘氨醇杆菌 GS-72 和不动杆菌 GS-103)具有固氮、溶磷、产 IAA 等促生能力,对根际土壤的理化性质与土壤酶活性等有影响,能够促进菘蓝的生长与生理过程,对菘蓝活性成分积累亦有不同程度影响。下一步可在分子层面深入挖掘微生物促进菘蓝生长的机制以及在其初生与次生代谢环节中发挥的作用,同时可开展 PGPR 对菘蓝抗逆性的研究。

参考文献 References:

- [1] 王红阳,康传志,王月枫,等. 药用植物微生物组的研究现状及展望[J]. 中国中药杂志,2022,47(20):5397-5405.
Wang H Y, Kang C Z, Wang Y F, et al. Medicinal plant microbiome: advances and prospects[J]. Chinese Journal of Chinese Materia Medica, 2022,47(20):5397-5405(in Chinese with English abstract).
- [2] Wambacq E, Alloul A, Grunert O, et al. Aerobes and phototrophs as microbial organic fertilizers: exploring mineralization, fertilization and plant protection features[J]. PLoS One, 2022, 17(2): e0262497.
- [3] 黄钦,尉广飞,常瑞雪,等. 微生物肥料发展现状及其在中药材种植中的应用[J]. 中国现代中药,2022,24(1):153-159.
Huang Q, Wei G F, Chang R X, et al. Status quo of microbial fertilizer and application in Chinese medicinal herb cultivation[J]. Modern Chinese Medicine, 2022,24(1):153-159(in Chinese with English abstract).
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020.
National Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China[M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020(in Chinese).
- [5] 杨立国,王琪,苏都那布其,等. 菘蓝属植物化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国现代应用药学,2021,38(16):2039-2048.

- Yang L G, Wang Q, Sudunabuqi, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Isatis*[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2021, 38(16):2039–2048(in Chinese with English abstract).
- [6] Guo J H, Liu X J, Zhang Y, et al. Significant acidification in major Chinese croplands[J]. Science, 2010, 327(5968):1008–1010.
- [7] 温春秀, 翟彩霞, 刘灵娣, 等. 氮肥对菘蓝生长及氮素吸收的影响[J]. 西北农业学报, 2013, 22(5):131–135.
Wen C X, Zhai C X, Liu L D, et al. Effects of N fertilization on growth and N content of *Isatis indigotica*[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2013, 22(5):131–135(in Chinese with English abstract).
- [8] 曹艺雯, 屈仁军, 王磊, 等. 减量施氮对菘蓝生长及药材质量的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2019, 25(5):765–772.
Cao Y W, Qu R J, Wang L, et al. Effect of nitrogen reduction on growth and quality of *Isatis indigotica* Fort.[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizers, 2019, 25(5):765–772(in Chinese with English abstract).
- [9] 关佳莉, 王刚, 张梦蕊, 等. 不同氮素供应水平对菘蓝生长及药材质量的影响[J]. 核农学报, 2019, 33(10):2077–2085.
Guan J L, Wang G, Zhang M R, et al. Effect of different nitrogen supply levels on the growth of *Isatis indigotica* Fort. and quality of medicinal materials[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2019, 33(10):2077–2085(in Chinese with English abstract).
- [10] Bhattacharyya P N, Jha D K. Plant growth-promoting rhizobacteria(PGPR): emergence in agriculture[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(4):1327–1350.
- [11] 中华人民共和国农业农村部微生物肥料和食用菌菌种质量监督检验测试中心. 登记产品[EB/OL]. [2023-09-01] <http://www.biofertilizer95.cn/zhdjcpml>.
Quality Supervision and Testing Center for Microbial Fertilizers and Edible Fungus Strains, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, the People's Republic of China. Registered products[EB/OL]. [2023-09-01] <http://www.Biofertilizer95.cn/zhdjcpml>(in Chinese).
- [12] 高沙尔·卡依尔哈力, 热子亚·麦麦吐逊, 祖丽皮亚·玉努斯. 地锦草内生细菌多样性、拮抗及促生特性测定[J]. 微生物学通报, 2021, 48(2):392–406.
Gaoshaer·Kayierhali, Raziye·Memettursun, Zulfiya·Yunus. Endophytic bacteria from *Euphorbia humifusa*: diversity, antagonism and growth-promoting activities[J]. Microbiology China, 2021, 48(2):392–406(in Chinese with English abstract).
- [13] 漫静, 唐波, 邓波, 等. 羊草根际促生菌的分离筛选及促生作用研究[J]. 草业学报, 2021, 30(1):59–71.
Man J, Tang B, Deng B, et al. Isolation, screening and beneficial effects of plant growth-promoting rhizobacteria(PGPR) in the rhizosphere of *Leymus chinensis*[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2021, 30(1):59–71(in Chinese with English abstract).
- [14] 吴红艳, 于淼, 冯健, 等. 土壤中解钾菌 K02 的筛选、鉴定及培养条件优化[J]. 微生物学杂志, 2020, 40(4):60–65.
Wu H Y, Yu M, Feng J, et al. Screening, identification and culture condition optimization of potassium-soluble bacteria K02 in soil[J]. Journal of Microbiology, 2020, 40(4):60–65(in Chinese with English abstract).
- [15] Glickmann E, Dessaux Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(2):793–796.
- [16] 陈绍兴, 赵翔, 沈萍, 等. 高灵敏假单胞菌铁载体的平板检测方法[J]. 微生物学通报, 2006, 33(3):122–127.
Chen S X, Zhao X, Shen P, et al. High-sensitive detection method for siderophores from *Pseudomonas*[J]. Microbiology, 2006, 33(3):122–127(in Chinese with English abstract).
- [17] 王亚军, 冯炬威, 李雅倩, 等. 高产铁载体菌 *Burkholderia vietnamiensis* YQ9 促生特性研究及其对重金属胁迫条件下种子萌发的影响[J]. 环境科学学报, 2022, 42(2):430–437.
Wang Y J, Feng J W, Li Y Q, et al. Studies on growth-promoting properties of an efficient siderophore producing bacterium, *Burkholderia vietnamiensis* YQ9, and its effects on seed germination under heavy metal stress[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2022, 42(2):430–437(in Chinese with English abstract).
- [18] Ramaloko W T, Osei Sekyere J. Phylogenomics, epigenomics, virulome and mobilome of Gram-negative bacteria co-resistant to carbapenems and polymyxins: a One Health systematic review and meta-analyses[J]. Environmental Microbiology, 2022, 24(3):1518–1542.
- [19] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
Lu R K. Methods of Soil Agrochemical Analysis[M]. Beijing: China Agriculture Sciencetech Press, 2000(in Chinese).
- [20] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2000.
Bao S D. Soil and Agricultural Chemistry Analysis[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2000(in Chinese).
- [21] 曹艺雯. 减量施氮对菘蓝生长、生理的影响及代谢组学研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2020.
Cao Y W. Effect of nitrogen reduction on growth, physiology of *Isatis indigotica* fortune and metabolomics analysis[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2020(in Chinese with English abstract).
- [22] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 2006.
Wang X K. Principles and Techniques of Plant Physiological Biochemical Experiment[M]. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press, 2006(in Chinese).
- [23] Trivedi P, Leach J E, Tringe S G, et al. Plant-microbiome interactions: from community assembly to plant health[J]. Nature Reviews Microbiology, 2020, 18(11):607–621.
- [24] 张瑞福. 根际微生物: 农业绿色发展中大有所为的植物第二基因组[J]. 生物技术通报, 2020, 36(9):1–2.
Zhang R F. Rhizosphere microorganism: the second genome of plants with great potential in agricultural green development[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(9):1–2(in Chinese).

- [25] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京:农业出版社,1986.
Guan S Y. Soil Enzyme and Its Research Method[M]. Beijing: Agriculture Press, 1986 (in Chinese).
- [26] Wu L X, Wang Y, Lü H, et al. Effects of a compound *Trichoderma* agent on *Coptis chinensis* growth, nutrients, enzyme activity, and microbial community of rhizosphere soil[J]. PeerJ, 2023, 11: e15652.
- [27] Chen Y H, Li S S, Liu N, et al. Effects of different types of microbial inoculants on available nitrogen and phosphorus, soil microbial community, and wheat growth in high-P soil[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2021, 28(18): 23036–23047.
- [28] 马婷玉, 付健, 明立伟, 等. 芽胞杆菌对玉米幼苗生长及土壤酶活性和养分含量的影响[J]. 玉米科学, 2022, 30(6): 85–92.
Ma T Y, Fu J, Ming L W, et al. Effects of *Bacillus* on maize seedling growth, soil enzyme activity and nutrient content [J]. Journal of Maize Sciences, 2022, 30(6): 85–92 (in Chinese with English abstract).
- [29] 何德鑫, 赵翔, 张雪静, 等. 大豆连作根际土壤微生物群落构建特征[J]. 沈阳农业大学学报, 2024, 55(1): 1–8.
He D X, Zhao X, Zhang X J, et al. Characteristics of microbial community construction in soybean continuous cropping rhizosphere soil [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2024, 55(1): 1–8 (in Chinese with English abstract).
- [30] Miltner A, Bombach P, Schmidt-Brücken B, et al. SOM genesis: microbial biomass as a significant source [J]. Biogeochemistry, 2012, 111(1): 41–55.
- [31] 刘耀辉, 李新华, 盛可银, 等. 溶磷菌 *Burkholderia* ZP-4 和 *Klebsiella* ZP-2 对土壤磷素的转化及细菌多样性的影响[J]. 土壤通报, 2022, 53(2): 472–481.
Liu Y H, Li X H, Sheng K Y, et al. Effect of phosphate-solubilizing bacteria *Burkholderia* ZP-4 and *Klebsiella* ZP-2 on soil phosphorus fraction and bacterial diversity [J]. Chinese Journal of Soil Science, 2022, 53(2): 472–481 (in Chinese with English abstract).
- [32] 陈意超, 孙晓莹, 解智杰, 等. 根际促生菌的筛选及其在尾矿改良中的应用[J]. 草业学报, 2022, 31(7): 50–63.
Chen Y C, Sun X Y, Xie Z J, et al. Screening of rhizosphere growth promoting bacteria and their application in tailings improvement [J]. Acta Prataculturae Sinica, 2022, 31(7): 50–63 (in Chinese with English abstract).
- [33] 刘婕, 徐俊, 张颖, 等. 含 ACC 脱氨酶的植物根际促生菌对重瓣百合生长及生理特性的影响[J]. 西南农业学报, 2022, 35(11): 2520–2526.
Liu J, Xu J, Zhang Y, et al. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase on growth and physiological characteristics of double-flower lily [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2022, 35(11): 2520–2526 (in Chinese with English abstract).
- [34] Xiong Y W, Li X W, Wang T T, et al. Root exudates-driven rhizosphere recruitment of the plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus flexus* KLBMP 4941 and its growth-promoting effect on the coastal halophyte *Limonium sinense* under salt stress [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020, 194: 110374.
- [35] Essalimi B, Esserti S, Rifai L A, et al. Enhancement of plant growth, acclimatization, salt stress tolerance and verticillium wilt disease resistance using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) associated with plum trees (*Prunus domestica*) [J]. Scientia Horticulturae, 2022, 291: 110621.
- [36] 杨婷婷, 谢显秋, 闫佳维, 等. 固氮菌 DX120E 复配菌剂对甘蔗的促生长效应[J/OL]. 分子植物育种. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230323.1721.013.html>.
Yang T T, Xie X Q, Yan J W, et al. Growth promoting effect of nitrogen-fixing bacteria DX120E complex on sugarcane [J/OL]. Molecular Plant Breeding. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230323.1721.013.html> (in Chinese with English abstract).
- [37] 周冬宇, 李杨, 邢咏梅, 等. 药用植物微生物组及其与药用植物次生代谢产物的关系[J]. 微生物学通报, 2022, 49(9): 3989–4003.
Zhou D Y, Li Y, Xing Y M, et al. Microbiome of medicinal plants and its effect on medicinal plant secondary metabolites: a review [J]. Microbiology China, 2022, 49(9): 3989–4003 (in Chinese with English abstract).
- [38] You H, Yang S J, Zhang L, et al. Promotion of phenolic compounds production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots by six strains of rhizosphere bacteria [J]. Engineering in Life Sciences, 2017, 18(3): 160–168.
- [39] 李钦, 王引权, 彭桐, 等. 施用复合微生物肥对当归药材品质的影响[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(9): 117–122.
Li Q, Wang Y Q, Peng T, et al. Effect of compound microbial fertilizer on quality of angelica medicinal materials [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2021, 49(9): 117–122 (in Chinese with English abstract).
- [40] Yilmaz A, Karik U. AMF and PGPR enhance yield and secondary metabolite profile of basil (*Ocimum basilicum* L.) [J]. Industrial Crops and Products, 2022, 176: 114327.
- [41] Qu Q, Zhang Z Y, Peijnenburg W J G M, et al. Rhizosphere microbiome assembly and its impact on plant growth [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(18): 5024–5038.