

不同微生物菌剂组合处理对芳樟生长和精油积累的影响

黄秋良¹, 杨先吉¹, 罗佳佳¹, 刘酉琳¹, 袁宗胜², 张国防^{1,①}

(1. 福建农林大学林学院, 福建 福州 350002; 2. 闽江学院海洋研究院, 福建 福州 350108)

摘要: 以芳樟 (*Cinnamomum camphora* var. *linaloolifera* Fujita) 195 号无性系 1 年生扦插苗为研究对象, 采用四元二次回归正交旋转组合设计 (1/2 实施) 对褐球固氮菌 (*Azotobacter chroococum* Beijerinck)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus magaterium* de Bary)、胶冻样芽孢杆菌 (*B. mucilaginosus* Krassilnikov) 和枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis* Cohn) 不同施用量 (在 5.5 kg 盆栽土中分别施用 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 和 6×10^9 CFU 微生物菌剂) 组合处理下芳樟叶和枝的鲜质量及其比值、精油含量及精油产量进行了比较, 以 4 种微生物菌剂的施用量为自变量 (X)、精油产量为因变量 (Y) 进行了回归方程拟合分析和显著性检验, 并对影响芳樟精油产量的微生物菌剂进行了单因子效应分析。结果表明: 与对照组 (未施用微生物菌剂) 相比, 多数处理组的枝精油含量升高, 23 个处理组的其余 5 个指标均升高, 并且多数处理组的上述指标显著升高。获得的回归方程为 $Y = 0.686 + 0.064X_1 - 0.116X_2 + 0.200X_3 - 0.122X_4 + 0.002X_1^2 + 0.036X_2^2 + 0.106X_3^2 - 0.032X_4^2 + 0.024X_1X_2 + 0.116X_1X_3 - 0.086X_1X_4$, 其显著性检验 P 值为 0.001 8。单因子效应分析结果表明: 芳樟精油产量与褐球固氮菌施用量 (X_1) 和胶冻样芽孢杆菌施用量 (X_3) 呈正相关, 与巨大芽孢杆菌施用量 (X_2) 和枯草芽孢杆菌施用量 (X_4) 呈负相关。在供试处理组中, T3 组 (褐球固氮菌、巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌在 5.5 kg 盆栽土中的施用量分别为 5×10^9 、 3×10^9 、 5×10^9 和 3×10^9 CFU) 的精油产量最高 (1.56 g), 最接近根据上述回归方程计算的精油最高产量 (1.72 g)。研究结果显示: 微生物菌剂能够有效促进芳樟生长和精油积累 (1/2 实施)。

关键词: 芳樟; 微生物菌剂; 鲜质量; 精油; 四元二次回归正交旋转组合设计 (1/2 实施)

中图分类号: Q948.12⁺2.3; S792.23 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2020)02-0038-08

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2020.02.05

Effects of different combination treatments of microbial agents on growth and essential oil accumulation of *Cinnamomum camphora* var. *linaloolifera* HUANG Qiuliang¹, YANG Xianji¹, LUO Jiajia¹, LIU Youlin¹, YUAN Zongsheng², ZHANG Guofang^{1,①} (1. College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Institute of Oceanography, Minjiang University, Fuzhou 350108, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2020, 29(2): 38-45

Abstract: Taking one-year-old cutting seedlings of No. 195 clone of *Cinnamomum camphora* var. *linaloolifera* Fujita as research objects, leaf and branch fresh masses and their ratio, essential oil content, and essential oil yield of *C. camphora* var. *linaloolifera* were compared under combination treatments with different application amounts (applying 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , and 6×10^9 CFU microbial agents in 5.5 kg potting soil, respectively) of *Azotobacter chroococum* Beijerinck, *Bacillus magaterium* de Bary, *B. mucilaginosus* Krassilnikov, and *B. subtilis* Cohn by quadratic regression orthogonal rotational combination design with four factors (1/2 implementation), regression equation fitting analysis and significance test were performed by taking application amount of four microbial agents as independent variable (X) and essential oil yield as dependent variable (Y), and the single factor effect analysis on microbial agents affecting essential oil yield of *C. camphora* var. *linaloolifera* was performed. The results show that compared with the control group (without applying microbial agents), essential oil content in

收稿日期: 2019-07-15

基金项目: 福州市市政府资助项目 (KH180062A); 校级创新资助项目 (KFA17069A; KFA17304A; 118-71201802404)

作者简介: 黄秋良 (1989—), 男, 福建漳州人, 硕士, 工程师, 主要从事森林培育方面研究。

①通信作者 E-mail: fjzgfzgf@126.com

branch of most treatment groups increases, other five indexes of twenty-three treatment groups all increase, and above indexes of most treatment groups increase significantly. The obtained regression equation is $Y=0.686+0.064X_1-0.116X_2+0.200X_3-0.122X_4+0.002X_1^2+0.036X_2^2+0.106X_3^2-0.032X_4^2+0.024X_1X_2+0.116X_1X_3-0.086X_1X_4$, its significance test P value is 0.001 8. The result of single factor effect analysis shows that there are positive correlations of essential oil yield of *C. camphora* var. *linaloolifera* with application amount of *A. chroococum* (X_1) and that of *B. mucilaginosus* (X_3), and negative correlations with application amount of *B. magaterium* (X_2) and that of *B. subtilis* (X_4). Among test treatment groups, the essential oil yield of T3 group (the application amounts of *A. chroococum*, *B. magaterium*, *B. mucilaginosus*, and *B. subtilis* in 5.5 kg potting soil are 5×10^9 , 3×10^9 , 5×10^9 , and 3×10^9 CFU, respectively) is the highest (1.56 g), which is the closest to the highest yield (1.72 g) of essential oil calculated by above regression equation. It is suggested that microbial agents can effectively promote growth and essential oil accumulation of *C. camphora* var. *linaloolifera*.

Key words: *Cinnamomum camphora* var. *linaloolifera* Fujita; microbial agent; fresh mass; essential oil; quadratic regression orthogonal rotational combination design with four factors (1/2 implementation)

芳樟醇($C_{10}H_{18}O$)为无色液体,具有铃兰香气,被大量用于香化工业、医药、国防、化工和香料等行业^[1-2]。天然芳樟醇具有独特的风味和旋光特征,是化学合成的芳樟醇无法匹及的,天然芳樟醇的市场需求量较大、价格较高,为目前国际市场上非常紧缺的商品^[2-3]。芳樟(*Cinnamomum camphora* var. *linaloolifera* Fujita)是樟树 [*Cinnamomum camphora* (Linn.) Presl]的一个生化变种,富含芳樟醇^[4]。提高芳樟精油含量是发展高产量和高品质芳樟油料林的重要基础。

微生物菌剂又称微生物菌肥,简称菌肥,对植物生长发育有利,其中的大量微生物可分解土壤中的有机物或无机元素,或者分泌细胞激动素和生长类激素等代谢产物,从而促进植物生长^[5];这些微生物还可通过分泌代谢物质直接或间接影响宿主植物的代谢途径,进而影响宿主的生理特性和生长发育^[6-7]。另外,微生物菌剂还是新型农业的理想肥料,既能提高作物的产量和品质,又能节约化肥使用成本、减少环境污染、减轻病害^[8-9]。目前,关于芳樟微生物菌剂的施肥试验主要集中在复合施肥方面^[9-13],但复合微生物菌剂的成分较复杂,无法准确判断单一微生物菌剂对芳樟生长和精油含量的影响,并且,各微生物菌剂对芳樟生长和精油含量影响的互作效应也不清楚。有效解决上述问题就能明确利于芳樟生长和精油高产的最佳微生物菌剂施用量,对于芳樟精油产业发展具有重要意义。

鉴于此,作者采用四元二次回归正交旋转组合设计(1/2实施)对不同水平褐球固氮菌(*Azotobacter chroococum* Beijerinck)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus*

magaterium de Bary)、胶冻样芽孢杆菌(*B. mucilaginosus* Krassilnikov)和枯草芽孢杆菌(*B. subtilis* Cohn)组合处理下芳樟叶和枝的鲜质量及其比值、精油含量及精油产量进行了比较研究,以4种微生物菌剂的施用量为自变量(X)、精油产量为因变量(Y)进行了回归方程拟合分析和显著性检验,并对影响芳樟精油产量的微生物菌剂进行了单因子效应分析,以期确定适宜芳樟精油生产的最佳微生物菌剂组合方案,为合理开发和有效利用微生物菌剂提高芳樟精油产量提供参考资料。

1 试验地概况和研究方法

1.1 试验地概况

试验地设在福建农林大学妙峰山苗圃地育苗大棚(自然光照)内,具体地理坐标为东经 $118^{\circ}08'$ ~ $120^{\circ}31'$ 、北纬 $25^{\circ}15'$ ~ $26^{\circ}29'$,属亚热带海洋性气候,气候温和,雨量充沛。

1.2 材料

选取永安种苗中心苗圃内长势均匀的芳樟 195 号无性系 1 年生扦插苗(平均苗高 25.22 cm,平均地径 3.03 mm)作为研究对象。供试微生物菌剂包括褐球固氮菌、巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌,均来自沧州旺发生物技术研究所。以苗圃地旁的黄心土为盆栽土,土壤的有机质、全氮、全磷和全钾含量分别为 0.02、0.13、0.41 和 $47.96 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,水解氮、速效磷和速效钾含量分别为 15.10、8.89 和 $35.14 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;将质量体积分数 0.6% KMnO_4 溶液均匀喷洒到盆栽土中,用塑料薄膜密封后曝晒 8 d,待用。

1.3 研究方法

1.3.1 实验设计 采用四元二次回归正交旋转组合设计(1/2 实施)^[14]进行实验。使用上口径 38.5 cm、下口径 30.0 cm、高 30.0 cm 的栽培盆栽种芳樟植株,每盆的盆栽土为 5.5 kg。供试 4 种微生物菌剂的每

盆施用量均设置 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 和 6×10^9 CFU 5 个水平,共 23 个处理组,依次编号 T1 至 T23,以无菌水作为空白对照。每个处理组的微生物菌剂组合详见表 1。每盆栽种 1 株芳樟植株,每组各 10 盆,并设置 3 个生物学重复。

表 1 微生物菌剂的四元二次回归正交旋转组合设计(1/2 实施)

Table 1 Quadratic regression orthogonal rotational combination design with four factors (1/2 implementation) of microbial agents

处理组 Treatment group	在 5.5 kg 盆栽土中的施用量/CFU ¹⁾ Application amount in 5.5 kg potting soil ¹⁾				处理组 Treatment group	在 5.5 kg 盆栽土中的施用量/CFU ¹⁾ Application amount in 5.5 kg potting soil ¹⁾			
	X_1	X_2	X_3	X_4		X_1	X_2	X_3	X_4
CK	0	0	0	0	T12	4×10^9	6×10^9	4×10^9	4×10^9
T1	5×10^9	5×10^9	5×10^9	5×10^9	T13	4×10^9	4×10^9	2×10^9	4×10^9
T2	5×10^9	5×10^9	3×10^9	3×10^9	T14	4×10^9	4×10^9	6×10^9	4×10^9
T3	5×10^9	3×10^9	5×10^9	3×10^9	T15	4×10^9	4×10^9	4×10^9	2×10^9
T4	5×10^9	3×10^9	3×10^9	5×10^9	T16	4×10^9	4×10^9	4×10^9	6×10^9
T5	3×10^9	5×10^9	5×10^9	3×10^9	T17	4×10^9	4×10^9	4×10^9	4×10^9
T6	3×10^9	5×10^9	3×10^9	5×10^9	T18	4×10^9	4×10^9	4×10^9	4×10^9
T7	3×10^9	3×10^9	5×10^9	5×10^9	T19	4×10^9	4×10^9	4×10^9	4×10^9
T8	3×10^9	3×10^9	3×10^9	3×10^9	T20	4×10^9	4×10^9	4×10^9	4×10^9
T9	2×10^9	4×10^9	4×10^9	4×10^9	T21	4×10^9	4×10^9	4×10^9	4×10^9
T10	6×10^9	4×10^9	4×10^9	4×10^9	T22	4×10^9	4×10^9	4×10^9	4×10^9
T11	4×10^9	2×10^9	4×10^9	4×10^9	T23	4×10^9	4×10^9	4×10^9	4×10^9

¹⁾ X_1 : 褐球固氮菌 *Azotobacter chroococum* Beijerinck; X_2 : 巨大芽孢杆菌 *Bacillus magaterium* de Bary; X_3 : 胶冻样芽孢杆菌 *B. mucilaginosus* Krassilnikov; X_4 : 枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* Cohn.

1.3.2 接种方法 将 4 种微生物菌剂分别用无菌水稀释成 1×10^8 CFU · mL⁻¹ 菌悬液,于 2015 年 10 月 5 日,采用一次性灌根接种法按照上述实验设计方案施用。实验期间,每周浇水 1~2 次,采取日常管理确保植株正常生长。于 2016 年 6 月 6 日结束实验。

1.3.3 叶和枝鲜质量测定 实验结束后,分别收集各组全部地上部分,将叶和枝分开,擦净后,采用电子天平(精度 0.01 g)称量叶和枝的鲜质量,将叶和枝分别装入自封袋中置于 4 °C 冰箱中保存、备用,根据称量结果计算叶鲜质量与枝鲜质量的比值。

1.3.4 精油提取 采用密闭循环式水蒸气蒸馏冷凝法^[15]分别提取叶和枝的精油,并分别计算叶和枝的精油含量^[4],根据公式“精油产量 = 叶精油含量 × 叶鲜质量 + 枝精油含量 × 枝鲜质量”计算精油产量。

1.4 数据处理及统计分析

采用 EXCEL 2017 软件进行数据统计分析;以 4 种微生物菌剂的施用量为自变量(X)、精油产量为因变量(Y)进行回归方程拟合分析,并采用 DPS 7.05 软件对获得的回归方程进行显著性检验,对影响芳樟精油产量的微生物菌剂进行单因子效应分析。

2 结果和分析

2.1 不同微生物菌剂组合处理对芳樟生长的影响

不同微生物菌剂组合处理对芳樟叶和枝的鲜质量及其比值的影响见表 2。由表 2 可以看出:与 CK 组(对照组,未施用微生物菌剂)相比,23 个处理组的叶和枝鲜质量及其比值均不同程度升高。供试处理组的叶鲜质量为 23.02~62.50 g,较 CK 组升高了 38.34%~275.60%;枝鲜质量为 8.93~26.71 g,较 CK 组升高了 10.66%~230.98%;叶鲜质量与枝鲜质量的比值为 1.96~3.04,较 CK 组升高了 3.16%~60.00%。除 T6 组(褐球固氮菌、巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌在 5.5 kg 盆栽土中的施用量分别为 3×10^9 、 5×10^9 、 3×10^9 和 5×10^9 CFU)和 T9 组(褐球固氮菌、巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌在 5.5 kg 盆栽土中的施用量分别为 2×10^9 、 4×10^9 、 4×10^9 和 4×10^9 CFU)外,其余 21 个处理组的叶鲜质量均显著($P < 0.05$)高于 CK 组;除 T4 组(褐球固氮菌、巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和枯草芽

孢杆菌在 5.5 kg 盆栽土中的施用量分别为 5×10^9 、 3×10^9 、 3×10^9 和 5×10^9 CFU)、T5 组(褐球固氮菌、巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌在 5.5 kg 盆栽土中的施用量分别为 3×10^9 、 5×10^9 、 5×10^9 和 3×10^9 CFU)、T6 组、T13 组(褐球固氮菌、巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌在 5.5 kg 盆栽土中的施用量分别为 4×10^9 、 4×10^9 、 2×10^9 和 4×10^9 CFU)和 T16 组(褐球固氮菌、巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌在 5.5 kg 盆栽土中的施用量分别为 4×10^9 、 4×10^9 、 4×10^9 和 6×10^9 CFU)外,其余 18 个处理组的枝鲜质量均显著高于 CK 组;T1 组(褐球固氮菌、巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌在 5.5 kg 盆栽土中的施用量分别为 5×10^9 、 5×10^9 、 5×10^9 和 5×10^9 CFU)、T2 组(褐球固氮菌、巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌在

5.5 kg 盆栽土中的施用量分别为 5×10^9 、 5×10^9 、 3×10^9 和 3×10^9 CFU)、T3 组(褐球固氮菌、巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌在 5.5 kg 盆栽土中的施用量分别为 5×10^9 、 3×10^9 、 5×10^9 和 3×10^9 CFU)、T4 组、T5 组、T6 组、T7 组(褐球固氮菌、巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌在 5.5 kg 盆栽土中的施用量分别为 3×10^9 、 3×10^9 、 5×10^9 和 5×10^9 CFU)、T10 组(褐球固氮菌、巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌在 5.5 kg 盆栽土中的施用量分别为 6×10^9 、 4×10^9 、 4×10^9 和 4×10^9 CFU)、T13 组、T14 组(褐球固氮菌、巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌在 5.5 kg 盆栽土中的施用量分别为 4×10^9 、 4×10^9 、 6×10^9 和 4×10^9 CFU)、T16 组和 T23 组(褐球固氮菌、巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌在 5.5 kg 盆栽土中的施用量分别为

表 2 不同微生物菌剂组合处理对芳樟叶和枝的鲜质量及其比值的影响 ($\bar{X} \pm SE$)¹⁾

Table 2 Effects of different combination treatments of microbial agents on leaf and branch fresh masses and their ratio of *Cinnamomum camphora* var. *linaloolifera* Fujita ($\bar{X} \pm SE$)¹⁾

处理组 Treatment group	在 5.5 kg 盆栽土中的施用量/CFU ²⁾ Application amount in 5.5 kg potting soil ²⁾				叶鲜质量/g Leaf fresh mass	枝鲜质量/g Branch fresh mass	叶鲜质量与枝鲜质量的比值 Ratio of leaf fresh mass to branch fresh mass
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄			
CK	0	0	0	0	16.64±1.66l	8.07±1.03l	1.90±0.03i
T1	5×10 ⁹	5×10 ⁹	5×10 ⁹	5×10 ⁹	36.18±3.76cdefg	13.65±0.47fghij	2.65±0.19bc
T2	5×10 ⁹	5×10 ⁹	3×10 ⁹	3×10 ⁹	41.97±3.58bc	17.07±0.38defg	2.46±0.11cd
T3	5×10 ⁹	3×10 ⁹	5×10 ⁹	3×10 ⁹	62.50±3.29a	26.71±2.05a	2.34±0.02def
T4	5×10 ⁹	3×10 ⁹	3×10 ⁹	5×10 ⁹	28.46±1.79fghijk	9.35±1.09kl	3.04±0.04a
T5	3×10 ⁹	5×10 ⁹	5×10 ⁹	3×10 ⁹	25.25±2.69ijk	11.27±0.59ijkl	2.24±0.04defgh
T6	3×10 ⁹	5×10 ⁹	3×10 ⁹	5×10 ⁹	23.02±1.14kl	8.93±1.03kl	2.58±0.10bc
T7	3×10 ⁹	3×10 ⁹	5×10 ⁹	5×10 ⁹	37.31±1.33cdef	15.26±0.54defgh	2.44±0.08cde
T8	3×10 ⁹	3×10 ⁹	3×10 ⁹	3×10 ⁹	48.92±2.14b	22.77±1.31b	2.15±0.03fghi
T9	2×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	24.44±2.17jkl	12.23±0.87hijk	2.00±0.03hi
T10	6×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	40.75±1.99cd	18.22±1.89de	2.24±0.09defgh
T11	4×10 ⁹	2×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	34.01±1.61cdefghi	17.31±0.87def	1.96±0.07i
T12	4×10 ⁹	6×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	27.85±1.61ghijk	13.24±0.99ghij	2.10±0.07fghi
T13	4×10 ⁹	4×10 ⁹	2×10 ⁹	4×10 ⁹	27.65±3.86hijk	10.50±1.01jkl	2.63±0.04bc
T14	4×10 ⁹	4×10 ⁹	6×10 ⁹	4×10 ⁹	60.18±3.83a	21.84±1.61bc	2.76±0.04b
T15	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	2×10 ⁹	29.20±3.97fghijk	13.84±0.97fghij	2.11±0.09fghi
T16	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	6×10 ⁹	25.02±4.19ijk	10.94±1.01ijkl	2.29±0.10defg
T17	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	38.65±3.58cde	17.85±1.30de	2.16±0.05fghi
T18	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	32.32±1.43defghij	15.16±1.32defgh	2.13±0.11fghi
T19	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	30.86±0.96efghijk	14.65±1.64efghi	2.10±0.03fghi
T20	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	28.05±3.30ghijk	12.70±0.76hijk	2.21±0.05efghi
T21	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	39.46±2.18cde	18.63±0.82cd	2.12±0.02fghi
T22	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	29.69±2.31fghijk	13.83±1.38fghij	2.15±0.02fghi
T23	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	36.85±1.62cdefg	15.22±1.18defgh	2.42±0.09cde

¹⁾ 同列中不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases in the same column indicate the significant ($P < 0.05$) difference.

²⁾ X₁: 褐球固氮菌 *Azotobacter chroococcum* Beijerinck; X₂: 巨大芽孢杆菌 *Bacillus magaterium* de Bary; X₃: 胶冻样芽孢杆菌 *B. mucilaginosus* Krassilnikov; X₄: 枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* Cohn.

4×10^9 、 4×10^9 、 4×10^9 和 4×10^9 CFU)的叶鲜质量与枝鲜质量的比值显著高于CK组。

2.2 不同微生物菌剂组合处理对芳樟精油积累的影响

不同微生物菌剂组合处理对芳樟叶和枝的精油含量及精油产量的影响见表3。由表3可以看出:与CK组(对照组,未施用微生物菌剂)相比,23个处理组的叶精油含量和精油产量均不同程度升高;除T2组(褐球固氮菌、巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌在5.5 kg盆栽土中的施用量分别为 5×10^9 、 5×10^9 、 3×10^9 和 3×10^9 CFU)、T4组(褐球固氮菌、巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌在5.5 kg盆栽土中的施用量分别为 5×10^9 、 3×10^9 、 3×10^9 和 5×10^9 CFU)、T7组(褐球固氮菌、巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌在5.5 kg盆栽土中的施用量分别为 3×10^9 、 3×10^9 、 5×10^9 和 5×10^9

CFU)和T9组(褐球固氮菌、巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌在5.5 kg盆栽土中的施用量分别为 2×10^9 、 4×10^9 、 4×10^9 和 4×10^9 CFU)外,其余19个处理组的枝精油含量也均不同程度升高。供试处理组的叶精油含量为1.63%~2.37%,较CK组升高了1.24%~47.20%;精油产量为0.44~1.56 g,较CK组升高了51.72%~437.93%。除T10组(褐球固氮菌、巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌在5.5 kg盆栽土中的施用量分别为 6×10^9 、 4×10^9 、 4×10^9 和 4×10^9 CFU)外,其余22个处理组的叶精油含量均显著高于CK组;除T2组、T4组、T7组、T9组、T10组和T13组(褐球固氮菌、巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌在5.5 kg盆栽土中的施用量分别为 4×10^9 、 4×10^9 、 2×10^9 和 4×10^9 CFU)外,其余17个处理组的枝精油含量均显著高于CK组;除T6组(褐球固氮菌、巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌

表3 不同微生物菌剂组合处理对芳樟叶和枝的精油含量及精油产量的影响($\bar{X}\pm SE$)¹⁾

Table 3 Effects of different combination treatments of microbial agents on essential oil content in leaf and branch and essential oil yield of *Cinnamomum camphora* var. *linaloolifera* Fujita ($\bar{X}\pm SE$)¹⁾

处理组 Treatment group	在5.5 kg盆栽土中的施用量/CFU ²⁾ Application amount in 5.5 kg potting soil ²⁾				叶精油含量/% Essential oil content in leaf	枝精油含量/% Essential oil content in branch	精油产量/g Essential oil yield
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄			
CK	0	0	0	0	1.61±0.01j	0.26±0.01ij	0.29±0.03k
T1	5×10 ⁹	5×10 ⁹	5×10 ⁹	5×10 ⁹	2.01±0.01de	0.47±0.01c	0.79±0.08cde
T2	5×10 ⁹	5×10 ⁹	3×10 ⁹	3×10 ⁹	1.72±0.01gh	0.21±0.02j	0.76±0.06def
T3	5×10 ⁹	3×10 ⁹	5×10 ⁹	3×10 ⁹	2.26±0.03a	0.57±0.02b	1.56±0.07a
T4	5×10 ⁹	3×10 ⁹	3×10 ⁹	5×10 ⁹	1.70±0.01hi	0.24±0.02j	0.51±0.03hij
T5	3×10 ⁹	5×10 ⁹	5×10 ⁹	3×10 ⁹	2.37±0.03a	0.74±0.05a	0.68±0.06defgh
T6	3×10 ⁹	5×10 ⁹	3×10 ⁹	5×10 ⁹	1.72±0.02gh	0.44±0.01cd	0.44±0.03jk
T7	3×10 ⁹	3×10 ⁹	5×10 ⁹	5×10 ⁹	2.25±0.05b	0.22±0.01j	0.87±0.01cd
T8	3×10 ⁹	3×10 ⁹	3×10 ⁹	3×10 ⁹	1.69±0.02hi	0.59±0.02b	0.96±0.04c
T9	2×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	2.36±0.04a	0.23±0.01j	0.60±0.05efghij
T10	6×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	1.63±0.01hij	0.31±0.02ghi	0.72±0.04defg
T11	4×10 ⁹	2×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	2.31±0.05ab	0.43±0.01cd	0.86±0.03cd
T12	4×10 ⁹	6×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	2.09±0.01cd	0.55±0.02b	0.66±0.03efghi
T13	4×10 ⁹	4×10 ⁹	2×10 ⁹	4×10 ⁹	1.72±0.02gh	0.30±0.03ghi	0.51±0.08hij
T14	4×10 ⁹	4×10 ⁹	6×10 ⁹	4×10 ⁹	2.15±0.06c	0.47±0.03c	1.33±0.14b
T15	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	2×10 ⁹	2.09±0.03cd	0.34±0.02fgh	0.66±0.09efghi
T16	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	6×10 ⁹	1.72±0.01gh	0.36±0.03efg	0.47±0.08ij
T17	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	2.04±0.01d	0.36±0.02efg	0.85±0.07cd
T18	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	1.83±0.01f	0.41±0.01cde	0.65±0.03efghi
T19	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	1.83±0.03f	0.40±0.02def	0.62±0.02efghij
T20	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	1.83±0.03f	0.41±0.01cde	0.56±0.06ghij
T21	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	1.81±0.01fg	0.39±0.02def	0.79±0.06cdef
T22	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	1.83±0.02f	0.38±0.02def	0.59±0.05efghij
T23	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹	1.95±0.03e	0.43±0.01cd	0.78±0.02cdef

¹⁾ 同列中不同小写字母表示差异显著($P<0.05$) Different lowercases in the same column indicate the significant ($P<0.05$) difference.

²⁾ X₁: 褐球固氮菌 *Azotobacter chroococum* Beijerinck; X₂: 巨大芽孢杆菌 *Bacillus magaterium* de Bary; X₃: 胶冻样芽孢杆菌 *B. mucilaginosus* Krassilnikov; X₄: 枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* Cohn.

菌和枯草芽孢杆菌在 5.5 kg 盆栽土中的施用量分别为 3×10^9 、 5×10^9 、 3×10^9 和 5×10^9 CFU) 外,其余 22 个处理组的精油产量均显著高于 CK 组。

2.3 芳樟精油产量与微生物菌剂施用量的回归方程拟合分析及显著性检验

根据上述实验结果对芳樟精油产量 (Y) 与各微生物菌剂施用量 (褐球固氮菌、巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌施用量分别为 X_1 、 X_2 、 X_3

和 X_4) 进行回归方程拟合分析,获得的回归方程为 $Y = 0.686 + 0.064X_1 - 0.116X_2 + 0.200X_3 - 0.122X_4 + 0.002X_1^2 + 0.036X_2^2 + 0.106X_3^2 - 0.032X_4^2 + 0.024X_1X_2 + 0.116X_1X_3 - 0.086X_1X_4$ 。

上述回归方程的显著性检验结果见表 4。由表 4 可以看出:在 α 值为 0.05 水平上, F 值为 6.748 8, P 值为 0.001 8,说明供试 4 种微生物菌剂的施用量与芳樟精油产量存在显著的回归关系。

表 4 芳樟精油产量与微生物菌剂施用量回归方程的显著性检验

Table 4 Significance test of regression equation of essential oil yield of *Cinnamomum camphora* var. *linaloolifera* Fujita with application amount of microbial agents

变异来源 ¹⁾ Source of variation ¹⁾	平方和 Sum of square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
一次效应 Primary effect					
X_1	0.040 5	1	0.040 5	2.184 6	0.167 5
X_2	0.133 5	1	0.133 5	7.204 0	0.021 3
X_3	0.396 0	1	0.396 0	21.370 7	0.000 7
X_4	0.148 4	1	0.148 4	8.011 4	0.016 4
二次效应 Secondary effect					
X_1^2	0.000 1	1	0.000 1	0.002 4	0.961 6
X_2^2	0.014 6	1	0.014 6	0.788 6	0.393 5
X_3^2	0.130 5	1	0.130 5	7.043 3	0.022 4
X_4^2	0.011 5	1	0.011 5	0.623 4	0.446 5
互作效应 Interaction effect					
X_1X_2	0.003 3	1	0.003 3	0.177 1	0.682 0
X_1X_3	0.078 6	1	0.078 6	4.243 7	0.063 9
X_1X_4	0.043 3	1	0.043 3	2.336 0	0.154 6
回归 Regression	1.375 5	11	0.125 0	6.748 8	0.001 8
剩余 Surplus	0.203 8	11	0.018 5		
总和 Total	1.579 3	22			

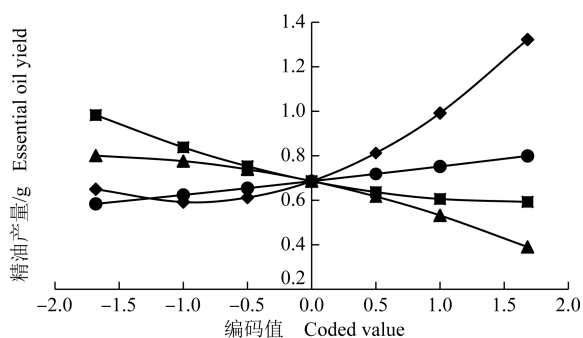
¹⁾ X_1 : 褐球固氮菌 *Azotobacter chroococum* Beijerinck; X_2 : 巨大芽孢杆菌 *Bacillus magaterium* de Bary; X_3 : 胶冻样芽孢杆菌 *B. mucilaginosus* Krassilnikov; X_4 : 枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* Cohn.

由表 4 还可以看出:巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌施用量对芳樟精油产量影响的一次效应的 P 值分别为 0.021 3、0.000 7 和 0.016 4,说明巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌施用量对芳樟精油产量影响的一次效应分别达到显著、极显著和显著水平;而褐球固氮菌施用量对芳樟精油产量影响的一次效应的 P 值为 0.167 5,说明褐球固氮菌施用量对芳樟精油产量影响的一次效应未达到显著水平。褐球固氮菌、巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌施用量对芳樟精油产量影响的二次效应的 P 值分别为 0.961 6、0.393 5、0.022 4

和 0.446 5,说明只有胶冻样芽孢杆菌施用量对芳樟精油产量影响的二次效应达到显著水平,其余 3 种微生物菌剂施用量对芳樟精油产量影响的二次效应均未达到显著水平。4 种微生物菌剂施用量对芳樟精油产量影响的互作效应的 P 值均大于 0.05,说明供试 4 种微生物菌剂对芳樟精油产量影响的互作效应均未达到显著水平。

根据上述回归方程,芳樟精油的最高产量可达 1.72 g,与之对应的褐球固氮菌、巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌在 5.5 kg 盆栽土中的施用量分别为 2×10^9 、 2×10^9 、 6×10^9 和 2×10^9 CFU。

对影响芳樟精油产量的微生物菌剂进行单因子效应分析,结果见图1。由图1可以看出:芳樟精油产量(Y)与褐球固氮菌施用量(X_1)和胶冻样芽孢杆菌施用量(X_3)呈正相关,获得的回归方程分别为 $Y=0.686+0.064X_1+0.002X_1^2$ 和 $Y=0.686+0.200X_3+0.106X_3^2$,其与巨大芽孢杆菌施用量(X_2)和枯草芽孢杆菌施用量(X_4)呈负相关,获得的回归方程分别为 $Y=0.686-0.116X_2+0.036X_2^2$ 和 $Y=0.686-0.122X_4-0.032X_4^2$,说明随着褐球固氮菌施用量和胶冻样芽孢杆菌施用量的增加,芳樟精油产量越来越高;而随着巨大芽孢杆菌施用量和枯草芽孢杆菌施用量的增加,芳樟精油产量越来越低。



—●—: 褐球固氮菌 *Azotobacter chroococum* Beijerinck (X_1); —■—: 巨大芽孢杆菌 *Bacillus magaterium* de Bary (X_2); —◆—: 胶冻样芽孢杆菌 *B. mucilaginosus* Krassilnikov (X_3); —▲—: 枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* Cohn (X_4)。

图1 影响芳樟精油产量的微生物菌剂的单因子效应分析
Fig. 1 Single factor effect analysis on microbial agents affecting essential oil yield of *C. camphora* var. *linaloolifera* Fujita

3 讨论和结论

芳樟精油的形成、积累和转化过程非常复杂,受到遗传和环境因子的综合影响^[4,16-18]。通常情况下,芳樟无性系的精油含量稳定且变异较小^[19],但不同栽培方式可影响芳樟的生长和精油合成^[20],从而影响芳樟精油的含量。于静波等^[21]发现,不同氮、磷、钾施肥处理能够影响1年生芳樟的叶精油含量及精油主要成分芳樟醇的含量;曾进等^[22]发现,不同肥料(化肥)对芳樟各项生长和抗性生理指标的影响各异;袁宗胜等^[13]发现,芳樟内生菌可促进其植株生长,提高其体内保护酶活性,从而改善植株对不良环境条件的反应。

研究发现,微生物对植物精油的影响主要有3个

方面:1)微生物庞大的菌丝网络增加了植物根系的吸收面积^[23],其代谢分泌物提高了土壤中难溶且不易被植物吸收的矿质元素的活性,有利于植物根系对矿质元素的吸收,进而促进植物生长^[11,24];2)微生物直接或间接影响植物代谢关键组织的合成和蛋白质催化反应,致使植物次生代谢产物发生改变^[25],利于精油成分积累^[26-27];3)微生物能够产生与宿主相同的次生代谢产物,从而影响宿主的次生代谢产物含量^[28]。褐球固氮菌可将空气中的气态氮转化成能够被植物直接利用的氨态氮^[29];胶冻样芽孢杆菌具有解钾、解磷和固氮等多种作用,可提高植物的产量和品质^[30];巨大芽孢杆菌是一种植物根系促生细菌,可降解土壤中不能被植物利用的磷和钾^[31-32];枯草芽孢杆菌既能够抑制植物病原菌,又能够促进植物生长^[33-34]。本研究结果表明:在上述4种微生物菌剂的组合处理下,芳樟的叶和枝鲜质量及其比值、精油含量及精油产量总体上均较对照组(未施用微生物菌剂)升高,说明供试4种微生物菌剂组合处理不但有利于芳樟生长,而且能够促进其精油积累。

统计结果表明:T3组(褐球固氮菌、巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌在5.5 kg盆栽土中的施用量分别为 5×10^9 、 3×10^9 、 5×10^9 和 3×10^9 CFU)的芳樟精油产量最高(1.56 g),其叶和枝的鲜质量也最高,总体上显著高于其余各组,并且,其精油产量最接近根据回归方程计算的精油最高产量(1.72 g),据此认为T3组为供试的最优处理组。

然而,关于微生物菌剂影响芳樟精油积累和合成的代谢途径尚不清楚,可在施用微生物菌剂时对其进行荧光标记或分子标记,从而检测微生物菌剂对芳樟的生活史及代谢过程的影响途径,并验证各微生物菌剂的功能。同时,还可通过共生培养芳樟及促进其精油积累的内生细菌和内生真菌获得更优良的高精油产量的芳樟品种^[35]。

参考文献:

- [1] 林翔云. 芳樟叶提取物在化妆品中的应用[J]. 中国化妆品, 2016(11): 92-95.
- [2] 张国防. 樟树精油主成分变异与选择的研究[D]. 福州: 福建农林大学林学院, 2006: 11-12.
- [3] 陈仕凯. 纯种芳香樟基地建设的可行性探讨[J]. 安徽农学通报, 2009, 15(18): 133-135.
- [4] 张国防, 冯娟, 于静波, 等. 不同化学型芳樟叶精油及主成分含量的时间变化规律[J]. 植物资源与环境学报, 2012, 21(4): 82-86.

- [5] 朱艳蕾. 银砂槐内生细菌分离、生理特性及促生抗逆作用研究[J]. 西安: 陕西师范大学生命科学院, 2018: 10-11.
- [6] CHAINTREUIL C, GIRAUD E, PRIN Y, et al. Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(12): 5437-5447.
- [7] 周佳宇, 戴传超, 陈 晏, 等. 植物促生微生物挥发性物质的生态功能研究进展[J]. 中国生态农业学报, 2013, 21(2): 141-148.
- [8] 谢东锋, 王国强, 谢 荣, 等. 不同微生物菌肥处理连作土壤对黄瓜生长及防御性酶的影响[J]. 福建农业学报, 2018, 33(7): 696-701.
- [9] 胡彩颜, 康丽华, 江业根, 等. 三个乡土树种苗期微生物菌肥施肥效应的研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2011, 31(12): 18-24.
- [10] 朱昌叁, 梁晓静, 李开祥, 等. 不同类型肥料对广林香樟无性系萌芽林生长和含油率的影响[J]. 广西林业科学, 2019, 48(3): 398-403.
- [11] 丁莉萍, 孙维红, 李朋飞. 复合菌剂对樟树苗移栽生长及圃地土壤的影响[J]. 生物技术进展, 2017, 7(3): 236-240.
- [12] 吴长榜, 何跃军. 接种 AM 菌剂对樟树幼苗生长效应的影响[J]. 贵州农业科学, 2011, 39(6): 161-165.
- [13] 袁宗胜, 刘 芳, 黄秋良, 等. 内生细菌对芳樟光合特性和几种酶活性的作用[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(8): 3559-3565.
- [14] 张思原, 黄慧玲, 周永升, 等. 二次回归正交旋转组合设计优化复合酶法提取甘蔗梢多酚工艺[J]. 南方农业学报, 2016, 47(3): 459-465.
- [15] 张国防, 陈存及. 福建樟树叶油的化学成分及其含量分析[J]. 植物资源与环境学报, 2006, 15(4): 69-70.
- [16] RIOS-ESTEPA R, LANG I, LEE J M, et al. Mathematical modeling-guided evaluation of biochemical, developmental, environmental, and genotypic determinants of essential oil composition and yield in peppermint leaves[J]. Plant Physiology, 2010, 152(4): 2105-2119.
- [17] GANJEWALA D, LUTHRA R. Essential oil biosynthesis and regulation in the genus *Cymbopogon* [J]. Natural Product Communications, 2010, 5(1): 163-172.
- [18] DAVIET L, SCHALK M. Biotechnology in plant essential oil production: progress and perspective in metabolic engineering of the terpene pathway[J]. Flavour and Fragrance Journal, 2010, 25(3): 123-127.
- [19] 张国防, 于静波, 冯 娟. 芳樟无性系叶精油及芳樟醇含量变异分析[J]. 植物资源与环境学报, 2012, 21(2): 117-118.
- [20] 陈晓明, 韦璐阳, 刘海龙, 等. 配方施肥对芳樟枝叶产量和含油率的影响研究[J]. 西部林业科学, 2012, 41(5): 68-72.
- [21] 于静波, 张国防, 李左荣, 等. 不同施肥处理对芳樟叶精油及其主成分芳樟醇相对含量的影响[J]. 植物资源与环境学报, 2013, 22(1): 76-81.
- [22] 曾 进, 何正和, 潘洋刘, 等. 不同施肥种类及用量对芳樟生长及抗性生理的影响[J]. 中南林业科技大学学报, 2018, 38(6): 50-55.
- [23] 陈梅梅, 陈保冬, 王新军, 等. 不同磷水平土壤接种丛枝菌根真菌对植物生长和养分吸收的影响[J]. 生态学报, 2009, 29(4): 1980-1986.
- [24] RANIERI A, CASTAGNA A, BALDAN B, et al. Iron deficiency differently affects peroxidase isoforms in sunflower[J]. Journal of Experimental Botany, 2001, 52(354): 25-35.
- [25] 冯 杭, 段枅钦, 杨利平, 等. 不同青枯病抗性的番茄品种内生细菌生理菌群数量研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(8): 1255-1261.
- [26] ZHOU J Y, LI X, ZHAO D, et al. Reactive oxygen species and hormone signaling cascades in endophytic bacterium induced essential oil accumulation in *Atractylodes lancea*[J]. Planta, 2016, 244(3): 699-712.
- [27] ZHOU J Y, YUAN J, LI X, et al. Endophytic bacterium-triggered reactive oxygen species directly increase oxygenous sesquiterpenoid content and diversity in *Atractylodes lancea* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(5): 1577-1585.
- [28] 邵玉娟, 莫琪琪, 赵 岩, 等. 微生物介导植物次生代谢产物累积及在药用植物作用机制中的研究进展[J]. 南方农业学报, 2019, 50(10): 2234-2240.
- [29] 梁 阔, 何为中, 谭宏伟, 等. 不同施氮水平下固氮菌剂对甘蔗的应用效果试验[J]. 热带农业科学, 2019, 39(5): 11-16.
- [30] 李馨园, 王守义, 王淑荣, 等. 根瘤菌配施胶质类芽孢杆菌对大豆叶绿素荧光特性、产量及品质的影响[J]. 大豆科学, 2014, 33(4): 541-544, 549.
- [31] 王金玲, 刘晓平, 赵凤艳, 等. 解磷巨大芽孢杆菌液体发酵培养条件的优化[J]. 中国农学通报, 2013, 29(15): 68-72.
- [32] 江丽华, 王 梅, 张文君, 等. 固氮、解磷、解钾混合菌株协同固定化技术[J]. 中国农学通报, 2010, 26(12): 18-21.
- [33] 孙中华, 赵铂锤, 陈仕红, 等. 枯草芽孢杆菌 B67 对黄瓜幼苗生长发育的影响[J]. 中国瓜菜, 2017, 30(2): 15-18.
- [34] 李瑞芳, 田洪源, 张慧茹, 等. 枯草芽孢杆菌 BS501a 代谢物生防效果与理化特性研究[J]. 河南农业大学学报, 2011, 45(6): 678-683.
- [35] LI C, SAROTTI A M, YANG B, et al. A new *N*-methoxy-pyridone from the co-cultivation of Hawaiian endophytic fungi *Camporesia sambuci* FT1061 and *Epicoccum sorghinum* FT1062[J]. Molecules, 2017, 22(7): 1166.

(责任编辑: 佟金凤)