

红花檵木异常叶色现象与叶片内生细菌的相关性

霍雯雯^{1,2}, 侯嘉怡^{1,2}, 高敏^{1,2}, 夏伟^{1,2}, 李炎林^{1,2}, 于晓英^{1,2}, 许璐^{2*}

(1. 湖南农业大学 园艺学院, 长沙 410128; 2. 湖南省中亚热带优质花木繁育与利用工程技术中心, 长沙 410128)

摘要: 为探讨红花檵木叶片内生细菌与其季节性异常叶色现象的相关性, 该文采用平板分离培养法和 16S rDNA 序列特征分析法从红花檵木五类异常叶色和正常红色叶片*中分离鉴定内生细菌, 分析不同叶色叶片的细菌多样性、群落结构和功能菌水平差异。结果表明: (1) 五类异常叶色叶片内生细菌生物量更高, 分离的 906 株细菌经鉴定分类为 26 属 40 种。(2) 小叶类型叶片内生细菌种类最多且群落结构均匀, 而红黄类型的结果与其相反。(3) 异常叶色叶片与正常红色叶片的菌群比较发现, 不仅其优势属、种差异明显, 且在异常叶色叶片中富集大量甲基杆菌属和假单胞杆菌属细菌, 尤其是栖稻假单胞菌明显增多。(4) 异常叶色叶片(小叶、红斑和红黄类型)中富集了具有溶磷、固氮、产 IAA、耐盐功能的细菌, 其中有四株兼具以上四种功能, 这种富集功能菌的行为极有可能与异常叶色现象有关。该文揭示了红花檵木异常叶色现象与特定内生细菌菌群富集密切相关, 为红花檵木异常叶色的形成机理研究提供线索, 对红花檵木优质高效栽培有重要应用价值。

关键词: 红花檵木, 异常叶色, 内生细菌, 细菌多样性, 群落结构

Correlation between abnormal leaf color phenomenon and endophytic bacteria of *Loropetalum chinense* var. *rubrum*

HUO Wenwen^{1,2}, HOU Jiayi^{1,2}, GAO Min^{1,2}, XIA Wei^{1,2}, LI Yanlin^{1,2},
YU Xiaoying^{1,2}, XU Lu^{1,2*}

(1. College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Hunan Mid-Subtropical Quality Plant Breeding and Utilization Engineering Technology Research Center, Changsha 410128, China)

Abstract: In this study, we sought to investigate the correlation between endophytic bacteria colonizing the leaves of *Loropetalum chinense* var. *rubrum* and the seasonal abnormal leaf coloration characteristic of this plant. Hence, we performed plate isolation and culturing and subsequent 16S rDNA sequence analysis to isolate and identify endophytic bacteria from leaves with five abnormal colors and normal red-colored leaves of *L. chinense* var. *rubrum*; we also analyzed differences in bacterial diversity, community structure, and functional levels among differently colored leaves. The results were as follows: (1) Compared with the normal red-colored leaves, we detected higher biomasses of endophytic bacteria in the five types of abnormally colored leaves. Among the isolated bacteria, 16S rDNA sequence

基金项目: 湖南省林业厅生态产业类花卉苗木产业发展项目(2130221); 湖南省教育厅重点项目(22A0155); 湖南省林业科技创新资金项目杰出青年培养项目(XLKJ202205); 长沙市自然科学基金(kq2202227)。

第一作者: 霍雯雯(1997-), 硕士研究生, 主要从事观赏植物资源与应用研究, (E-mail)2452644152@qq.com。

***通信作者:** 许璐, 博士, 副教授, 主要从事观赏植物资源与应用研究, (E-mail)xulu@hunau.edu.cn。

alignment and phylo-genetic tree analysis revealed the presence of 906 bacterial strains classified into 26 genera and 40 species. (2) While the smaller leaves were colonized by the largest number of endophytic bacterial species with a relatively uniform community structure, the opposite was true for bacteria isolated from the red- and yellow-pigmented leaves. (3) Comparison of the bacterial community data for abnormally colored leaves and those with the normal red color revealed that not only were there significant differences with respect to the dominant genera and species but also an enrichment of numerous bacterial species in the genera *Methylobacterium* and *Pseudomonas* in the five types of abnormally colored leaves. Particularly, we detected significantly larger numbers of *Pseudomonas oryzae*. (4) We established that abnormally colored leaves (smaller, red spotted, and the red and yellow types) were characterized by an enrichment of bacteria with phosphorus solubilization, nitrogen fixation, IAA production, and salt tolerance functions, among which, four strains were found to have all four of these functions. Accordingly, we speculate that the abnormal leaf coloration of *L. chinense* var. *rubrum* is closely associated with the activities of these enriched functional bacteria. Our findings in this study indicate that the abnormal leaf coloration of *L. chinense* var. *rubrum* is closely associated with the enrichment of specific endophytic bacterial communities, which can thus provide clues for elucidating the mechanisms underlying the development of abnormal leaf pigmentation in this plant. Moreover, this may have important application value for the efficient cultivation of high-quality *L. chinense* var. *rubrum*.

Key words: *Loropetalum chinense* var. *Rubrum*, abnormal leaf color, endophytic bacteria, bacterial diversity, community structure.

红花檵木 (*Loropetalum chinense* var. *rubrum*) 又称红檵木、红桤木等, 是金缕梅科 (Hamamelidaceae) 檵木属 (*Loropetalum*) 木本植物, 湖南省著名的乡土彩叶植物, 具有良好的观赏、生态环境保护及药用价值 (郭佩瑶等, 2022)。近年来, 红花檵木异常叶色叶片现象逐渐受到国内学者关注, 张艺帆等 (2022) 发现红花檵木季节性异常叶色叶片现象对植物本身并无伤害只是在夏秋季节叶片出现较为明显的异常叶色叶片现象, 而在冬春季节异常叶色叶片现象逐渐减少甚至消失。相关研究人员认为红花檵木异常叶色叶片现象是由植物病毒导致的, 但其并未明确该现象发生的具体原因 (王燕和朱发仁, 2007)。王慧 (2023) 对许璐等 (2021) 定义的小叶、红黄相间、黄绿相间、完全黄化、红斑类型叶片五种典型红花檵木异常叶片类型的诱因研究发现, 红花檵木异常叶色现象并非是由细菌性病害、真菌性病害或缺素症引起的。但目前, 国内外对红花檵木的研究集中在栽培育种、生理特性、化学成分等方面, 对红花檵木异常叶色叶片现象的研究仅关注在其表型、光合特性和病害等方面 (许璐等, 2021; 张艺帆等, 2022), 尚无红花檵木内生细菌的多样性研究, 也未有关于频发的异常叶色现象与叶片内生细菌及其群落的相关性探索。

植物内生菌是寄生于植物体内不会对植物产生明显病害或暂时对植物没有伤害作用的微生物, 其在适宜的植物内环境中内生菌的多样性丰富、优势度低、细菌种类分布均匀 (Stone et al., 2000; 江曙等, 2008; 顾美英等, 2021; 孟磊等, 2023)。此外, 其与宿主植物之间存在的共生关系不仅能提高植物的抗逆能力、防治病害还具有促生、固氮、生物修复等作用 (Wani et al., 2015; Daniel et al., 2016; Bak & Gaj, 2016)。相关研究发现细菌侵入、细菌类群变化、细菌性病害等会导致植物局部或全株出现色泽异常现象, 在柑橘、水稻植物中也发现

了引起植株叶色变化的细菌微生物（谢志奎等，2021；陈苗苗和陈列忠，2022）。因此，初步推断红花檵木异常叶色变化现象或与内生细菌生存环境或菌群变化有关，红花檵木叶片可能是在其独特的生理响应下导致叶片内环境发生变化，内环境的变化又引起了叶片内生细菌多样性、优势度、种类分布等的改变，而细菌群落的改变又反作用于植物的生长发育而引起了其表型变化（Hou et al., 2020）。因此，明确红花檵木正常红色叶片和异常叶色叶片的微生物群落及多样性差异，有助于证明叶内细菌群落变化是因为叶色异常的“逆境”引起微生物变化的共同进化的结果，还是诱导叶片异常叶色形成的诱因，且从中还可筛选获得更多的优良菌种资源。

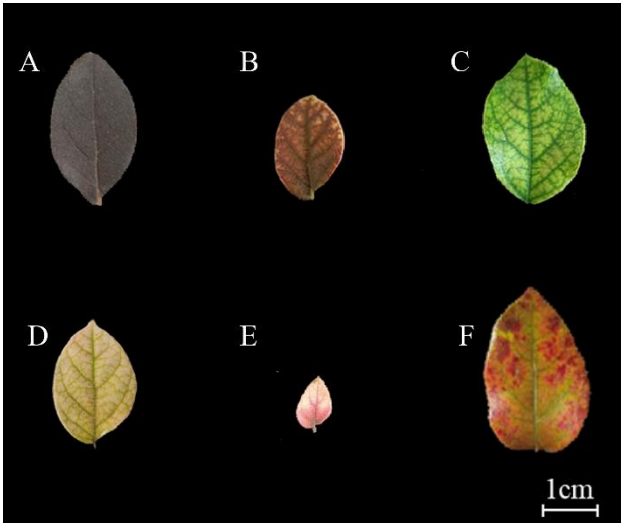
因此，本研究以红花檵木异常叶色和正常红色叶片为研究对象，采用平板分离培养法和16S rDNA 序列分析法分离鉴定内生细菌，通过多样性分析、群落结构分析和功能细菌测定筛选结果比较不同叶色叶片的差异性，深入探讨以下问题：（1）红花檵木叶片的内生细菌多样性及群落结构特征；（2）红花檵木各叶色类型叶片的内生细菌种类及结构差异性；（3）红花檵木异常叶色现象下的叶片功能菌群转变。从而获悉与红花檵木呈现异常叶色现象密切相关的微生物，为进一步明确红花檵木异常叶色的形成机制奠定基础，并从叶片富集的内生细菌中发现功能菌，为后期的促生栽培提供宝贵菌种资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

于湖南农业大学花卉基地发生异常叶色现象较多的区域和其它未出现叶色异常叶色现象的区域进行红花檵木‘大叶红’品种五种异常叶色叶片和正常红色叶片的采集，植物材料如图 1 所示。



A. 红花檵木正常红色叶片(ZC)； B. 红黄相间类型叶片(HH)； C. 黄绿相间类型叶片(HL)； D. 完全黄化类型叶片(QH)； E. 小叶类型叶片(XY)； F. 红斑类型叶片(HB)。

A. normal red leaf of *L. var. rubrum* (ZC); B. red and yellow leaf (HH); C. green and yellow leaf (HL); D. completely yellowed leaf (QH); E. smaller leaf (XY); F. red spotted leaf (HB).

图 1 红花檵木异常叶色叶片与正常红色叶片

Fig.1 Abnormal leaf color and normal red leaf of *Loropetalum chinense* var. *Rubrum*

1.1.2培养基

内生细菌分离培养基：R₂A、NA培养基（Reasoner & Geldreich, 1985; 郝士海, 1992）。溶磷功能筛选鉴定培养基：溶磷培养基（solarbio）。固氮功能筛选鉴定培养基：Ashby无氮培养基（solarbio）。产IAA（Indole-3-acetic acid）筛选鉴定培养基：King氏培养基（林国钦等, 2022），其中Salkowski比色液：0.5mol·L⁻¹ FeCl₃ 1.5 mL，H₂SO₄ 30 mL，蒸馏水50 mL。

1.2 方法

1.2.1叶片内生菌分离

分别称取 1 g 红花檵木正常红色和异常叶色叶片，自来水冲洗干净，75%乙醇浸泡 30 s，0.1% HgCl₂ 消毒处理 8 min，最后用无菌水冲洗 5 次，将最后一次冲洗过叶片的无菌水作为空白对照涂布于灭菌的培养基上，后期观察是否有细菌长出以确保分离获得的为内生细菌。将消毒后的六种类型叶片充分研磨进行不同浓度梯度（10⁻¹ ~ 10⁻⁵）稀释后分别吸取 100 μL 均匀涂布于 R₂A 和 NA 平板培养基上，每个处理重复 3 次，28℃恒温培养 7 d 后，记录稀释平板上菌落形态特征（大小、颜色、表面状态等），根据菌落形态选取能形成单菌落且菌落数最多的稀释梯度处理组计算生物量，挑取该稀释梯度培养的菌落纯化 3 次获得单菌落后转接至 R₂A、NA 试管斜面培养基中培养并编号，形成大量菌落后于 4℃保存用于后续细菌的分子鉴定确定其分类地位。编号格式为“培养基类型+叶片类型+组内菌种序号”。

1.2.2内生细菌总DNA提取与鉴定

采用煮沸法（Perez-Montano et al., 2014）提取菌株的基因组 DNA，利用 16S 通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-GGT-TACCTTGTACGACTT-3')扩增 16S rDNA 基因序列。PCR 反应体系：2×Phanta Max Buffer 25 μL，dNTP Mix(10 mM) 1 μL，dd H₂O 18 μL，primer F(10 mM) 2 μL，primer R(10 mM) 2 μL，模板 DNA 1 μL，Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 1 μL；反应程序：预变性 95 °C 3 min，变性 95 °C 15 s，退火 53 °C 15 s，延伸 72 °C 1 min，彻底延伸 72 °C 5 min，共计 35 个循环。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后，将条带清晰的 PCR 扩增产物送至擎科生物科技有限公司测序，测得的细菌 16S rDNA 序列提交到 EZBioCloud(<https://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>)比对确定其分类地位，并将测序结果上传至 GenBank 核酸序列数据库得到登录号。利用 MEGA6.0 软件对其进行系统发育分析，采用邻接法（Neighbor-joining）构建系统发育树，模型为 K2P(Kimura 2 parameter)，Bootstrap 置信值估算重复数设定为 1 000 次。

1.2.3多样性分析

利用 Shannon-Wiener(*H*)、Simpson(*D*)多样性指数及群落组成结构分析群落结构特征（许晴等, 2011）。

计算公式如下：

$$H = - \sum_{i=1}^S P_i \ln P_i \quad D = 1 - \sum_{i=1}^S P_i^2$$

式中：*S* 为总物种数；*P_i* 为第 *i* 个物种的比例；ln 为 *P_i* 的自然对数。

1.2.4内生菌功能研究

(1) 供试菌株：红花檵木异常叶色和正常红色叶片中分离并挑选出的 40 株鉴定结果为不同种的内生细菌。

(2) 功能测定：溶磷功能测定方法参照赵龙飞等（2015）；固氮功能测定方法参照罗义等（2023）；产 IAA 功能测定方法参照 Patten & Glick（2002）；耐盐功能测定是将菌株活化后接种至添加不同质量分数 NaCl（0.5%、3%、6%、9%、12%、15%）的 NA 培养基上，于 30 °C 培养 8 d，3 次重复，记录菌株生长情况。

1.3 数据分析

采用 Microsoft Excel 2016、SPSS 21.0 和 GraphPad Prism 8 软件进行数据统计分析和绘图。

2 结果与分析

2.1 红花檵木叶内生细菌的数量及分布特点

内生细菌生物量如表 1 所示，六类红花檵木叶内生细菌在 R₂A 分离培养基中分离到的生物量范围大于 NA 培养基，因此以 R₂A 分离培养基培养获得的菌群生物量为参考依据计算细菌数量。由表 1 可知，红花檵木内生细菌在 R₂A 分离培养基中的生物量范围为 3.50×10²~1.60×10⁴ CFU·g⁻¹。ZC 叶片内生细菌生物量均低于其它的异常叶色叶片，其中 HH 的菌群生物量最大，达 1.60×10⁴ CFU·g⁻¹。

表 1 红花檵木各类叶色叶片内生细菌生物量

Table 1 Biomass of endophytic bacteria in various types of leaves of *Loropetalum chinense* var. *rubrum*

叶片类型 Leaf type	内生细菌生物量 Endophytic bacteria biomass (CFU·g ⁻¹)	
	以 R ₂ A 培养基计算 Calculated using R ₂ A medium	以 NA 培养基计算 Calculated using NA medium
ZC	350.00±144.91c	200.00±117.04c
HH	16000.00±1154.70a	333.00±41.80c
HL	5000.00±375.28b	367.00±75.03c
XY	1900.00±461.88c	1130.00±350.00a
QH	500.00±5.77c	700.00±101.49b
HB	3730.00±75.06b	533.00±171.62bc

注：表中数据为平均数±标准差（n=3）。不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。
Note: Data in the table are mean ± standard deviation (n=3). Different lowercase letters indicate significant differences (P<0.05).

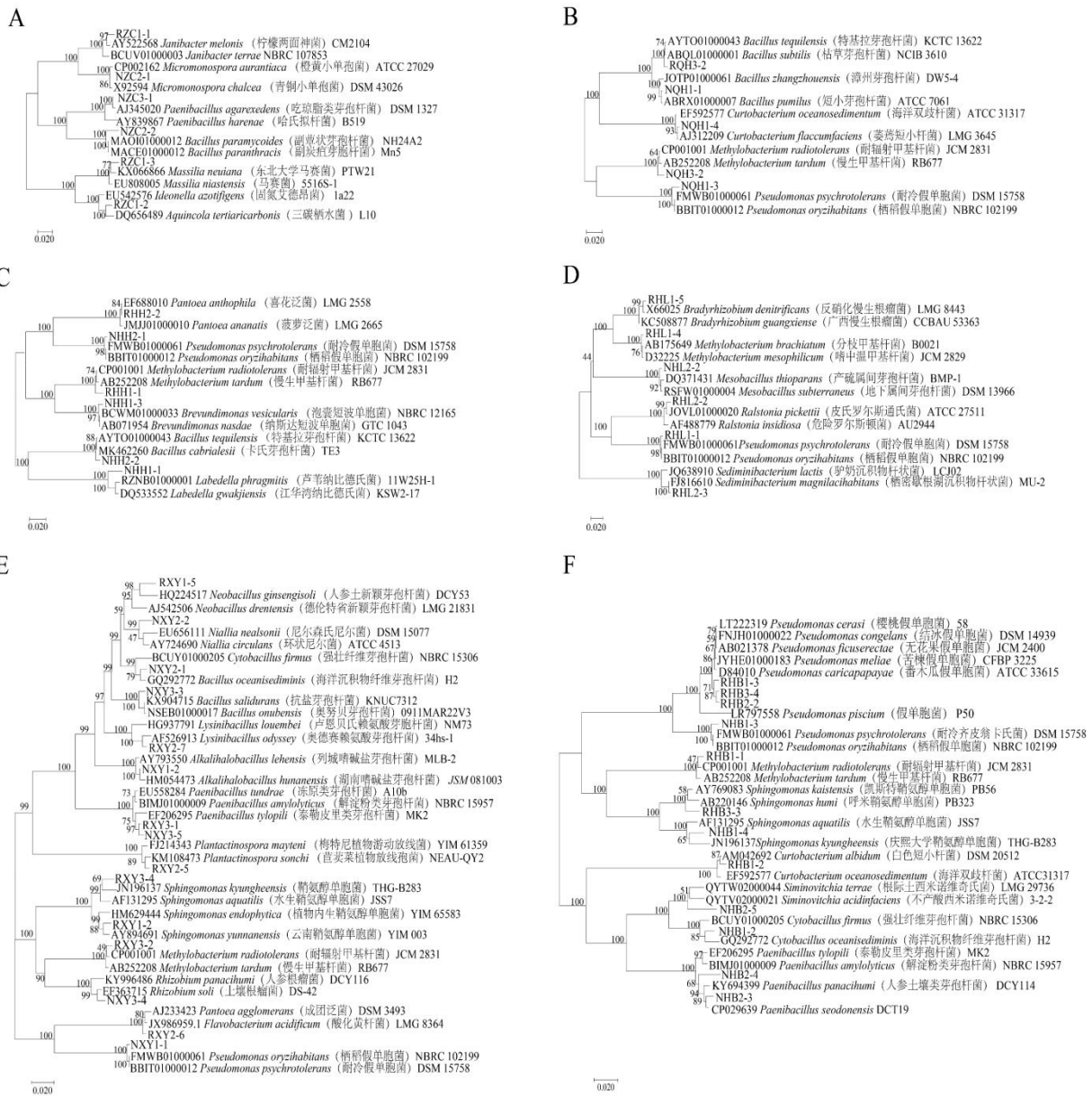
2.2 红花檵木叶片内生细菌的分子生物学鉴定

结合红花檵木异常叶色与正常红色叶片的内生细菌菌落形态特征初步归类后，采用 16S rDNA 序列分析法进行同源性比对分析，并构建系统发育树（图 2）。结果显示，共从红花檵木各类型叶片中分离获得 906 株细菌（表 2），内生细菌数量依次为：HH>HL>HB>XY>QH>ZC。此外，经鉴定从正常红色、红黄和黄绿三种类型叶片中分离到的细菌鉴定归类均为 6 属、6 种；小叶类型叶片的内生细菌鉴定归类为 13 属、15 种；完全黄化类型叶片的内生细菌鉴定归类为 4 属、5 种；红斑类型的叶片内生细菌归类为 7 属、12 种。

表 2 红花檵木各类叶色叶片内生细菌分离数量

Table 2 Number of endophytic bacteria in various types of leaves of *Loropetalum chinense* var. *rubrum*

叶片类型 Leaf type	细菌数量 (株) Bacteria number (Strain)
ZC	11
HH	490
HL	161
XY	91
QH	24
HB	129



A. ZC叶片内生细菌系统发育树；**B.** QH叶片内生细菌系统发育树；**C.** HH叶片内生细菌系统发育树；**D.** HL叶片内生细菌系统发育树；**E.** XY叶片内生细菌系统发育树；**F.** HB类型叶片内生细菌系统发育树。

A. Phylogenetic tree of endophytic bacteria in ZC leaf; B. Phylogenetic tree of endophytic bacteria in QH leaf; C. Phylogenetic tree of endophytic bacteria in HH leaf; D. Phylogenetic tree of endophytic bacteria in HL leaf; E. Phylogenetic tree of endophytic bacteria in XY leaf; F. Phylogenetic tree of endophytic bacteria in HB leaf.

图 2 基于 16S rDNA 序列构建的内生细菌系统发育树

Fig.2 Phylogenetic trees of endophytic bacteria based on 16S rDNA sequences

2.3 不同叶色类型叶片的内生细菌多样性及群落组成结构分析

内生细菌多样性指数统计结果如表3所示，六类红花檵木叶内生细菌的Shannon-Wiener、Simpson指数范围分别为0.39~1.79和0.02~0.81。从代表群落丰富度的Shannon-Wiener指数来看，异常叶色叶片中XY的Shannon-Wiener指数显著高于其它类型叶片，且与ZC叶片存在显著差异，表明其细菌丰富度最高。从代表群落集中程度的Simpson指数来看，ZC叶片数值最高为0.81，表明其细菌群落集中，HH的Simpson指数最低，其细菌群落失衡。

内生细菌群落结构如图3A、3B所示，红花檵木正常红色与异常叶色叶片内生细菌相对丰度在属、种水平下均有一定差异。红花檵木ZC、HH、HL、XY、QH、HB六种类型叶片的优势属存在差别，HH组仅有一个优势菌属，甲基杆菌属（*Methylobacterium*）（98.4%）；而ZC、HL、XY、QH、HB五组的优势菌属有多个，各组中内生细菌相对丰度最高的属分别为马赛菌属（*Massilia*）（27.3%）、沉积物杆状菌属（*Sediminibacterium*）（49.1%）、甲基杆菌属（52.8%）、芽孢杆菌属（*Bacillus*）（70.8%）、短小杆菌属（*Curtobacterium*）（56.6%）；ZC组与异常叶色的5组比较发现，甲基杆菌属、假单胞菌属为红花檵木异常叶色叶片共有属。优势菌种数量各组也有差异，HH组仅有耐辐射甲基杆菌（*Methylobacterium radiotolerans*）一种优势菌，XY组为两种，耐辐射甲基杆菌（*M. radiotolerans*）和栖稻假单胞菌（*Pseudomonas oryzihabitans*）；ZC、HL、QH、HB组优势菌为3种及以上，各组相对丰度最高的种分别为马赛菌（*Massilia neuiana*）（27.3%）、沉积物杆状菌（*Sediminibacterium magnilacihabitans*）（40.1%）、枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）（37.5%）、白色短小杆菌（*Curtobacterium albidum*）（56.6%）；对比各组菌种组成发现，栖稻假单胞菌（*Pseudomonas oryzihabitans*）为红花檵木5组异常叶色叶片共有种，且在正常红色组（ZC）中未分离到。

结合细菌多样性指数和群落结构分布情况可知，Shannon-Wiener、Simpson指数较高的ZC和XY内生细菌多样性较丰富且群落结构分布较均匀，而Shannon-Wiener、Simpson指数最低的HH内生细菌多样化程度低且群落结构分布较失衡。

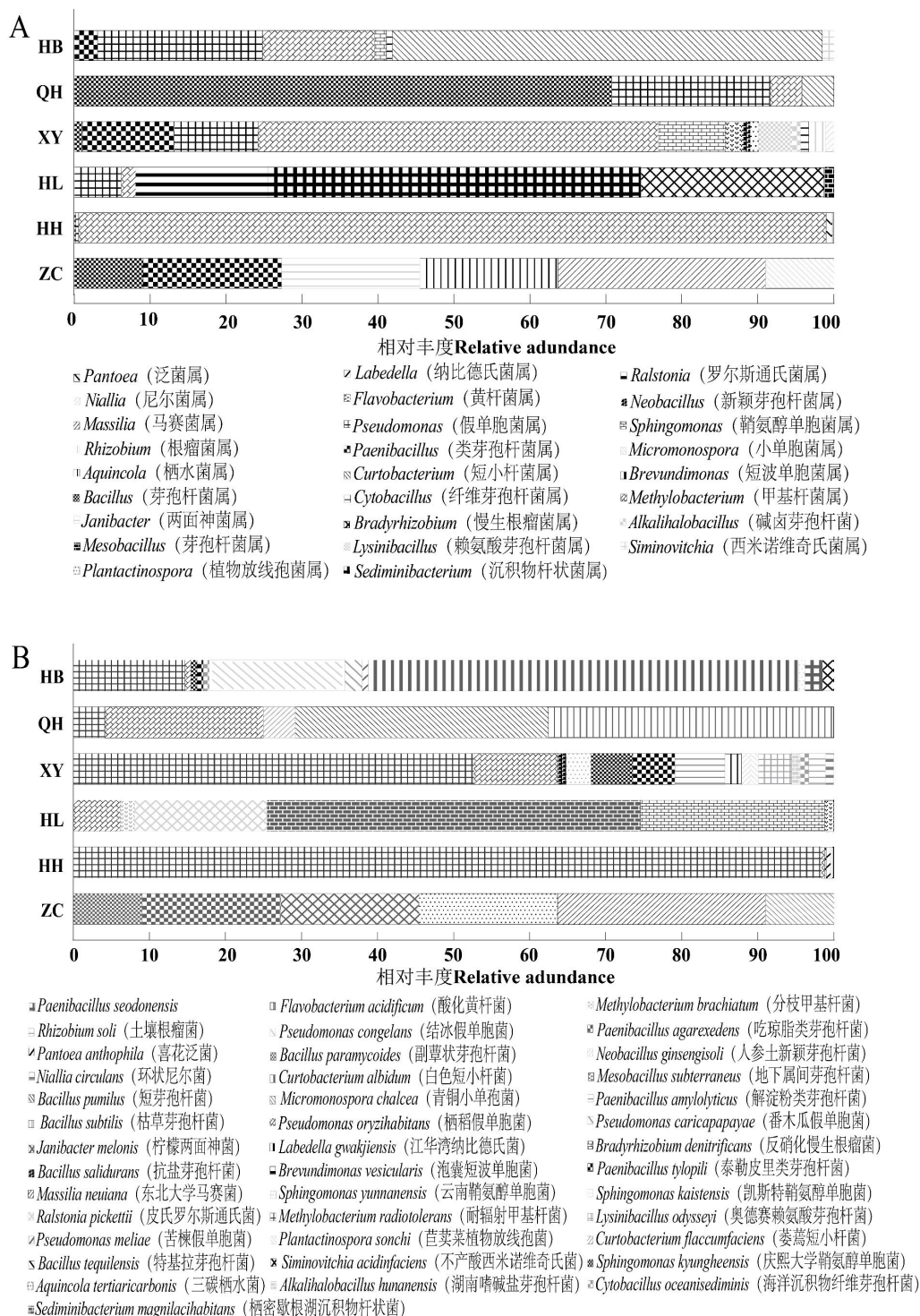
表 3 不同类型叶片中细菌多样性指数计算

Table 3 Calculation of bacterial diversity index in different types of leaves

叶片类型 Leaf type	Shannon-Wiener 指数 Shannon-Wiener index	Simpson 指数 Simpson index
ZC	1.41±0.17b	0.81±0.01a
HH	0.39±0.17c	0.02±0.01b
HL	1.30±0.12b	0.67±0.21a
XY	1.79±0.03a	0.69±0.11a
QH	1.35±0.01b	0.70±0.01a
HB	1.38±0.01b	0.62±0.05a

注：表中数据为平均数±标准差（n=3）。不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。

Note: Data in the table are mean ± standard deviation (n=3). Different lowercase letters indicate significant differences (P<0.05).



A. 属分类水平的红花檵木叶内生细菌群落结构；**B.** 种分类水平的红花檵木叶内生细菌群落结构。

A. The community structure of endophytic bacteria in the leaves of *L. chinense* var. *rubrum* at the genus classification level; **B.** The community structure of endophytic bacteria in the leaves of *L. chinense* var. *rubrum* at the species classification level.

图3 红花檵木叶片内生细菌群落结构

Fig. 3 Endophytic bacterial community structure in leaves of *Loropetalum chinense* var. *rubrum*

2.4 红花檵木内生细菌的功能分析

2.4.1溶磷能力测定

将40株红花檵木叶片内生细菌经过溶磷能力测定，结果显示有7株菌（见表4）可在无机磷培养基上形成透明圈（图4），具有溶磷能力，XY叶片中的栖稻假单胞菌NXY1-1溶磷能力最强，且从异常叶色类型HH、XY叶片中分离的溶磷细菌的溶磷能力均高于ZC中的菌株。

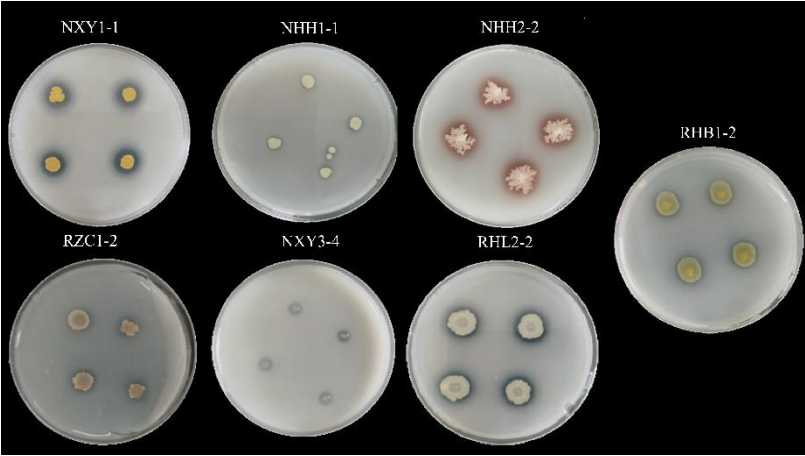


图4 红花檵木叶片内生溶磷细菌能力测定结果

Fig. 4 Results of endophytic phosphorus solubilizing bacteria in leaves of *Loropetalum chinense* var. *rubrum*

表4 红花檵木叶片内生溶磷细菌能力水平

Table 4 Ability level of endophytic phosphorus solubilizing bacteria in leaves of *Loropetalum chinense* var. *rubrum*

菌株编号（菌种名） Strain number (Strain name)	溶磷圈直径（D）/菌落直径（d） Diameter of halo/ Diameter of colony
RZC1-2 (<i>Aquicola tertiaricarbonis</i>)	1.29±0.07bc
NHH1-1 (<i>Labedella gwakjiensis</i>)	1.45±0.19b
NHH2-2 (<i>Bacillus tequilensis</i>)	1.38±0.08bc
RHL2-2 (<i>Ralstonia pickettii</i>)	1.24±0.07c
NXY1-1 (<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>)	1.81±0.19a
NXY3-4 (<i>Rhizobium soli</i>)	1.42±0.07b
RHB1-2 (<i>Curtobacterium albidum</i>)	1.22±0.05c

注：表中数据为平均数±标准差（n=4）。不同小写字母表示差异显著（ $P<0.05$ ）。

Note: Data in the table are mean ± standard deviation (n=4). Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

2.4.2产IAA能力测定

红花檵木叶片内生细菌具产 IAA 能力的菌株如图 5 所示（IAA 产量为 $0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 8 株细菌未在图中标识），共有 9 株低产菌（IAA 产量低于 $17\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ）、5 株中产菌（IAA 产量 $17\sim 80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ）、26 株高产菌（IAA 产量大于 $80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ）。其中，XY、HH 叶片细菌的产 IAA 能力范围均大于 ZC 和其它 3 类异常叶色叶片细菌，高产菌种 RXY2-6(*Flavobacterium acidificum*)、RHH2-2 (*Pantoea anthophila*)、NXY1-1 (*Pseudomonas oryzihabitans*) 均分离自异常叶色叶片细菌。此外，高产菌也大多来自于异常叶色叶片内生细菌的优势菌株，表明异常叶色叶片中富集了大量促生长的产 IAA 功能菌。

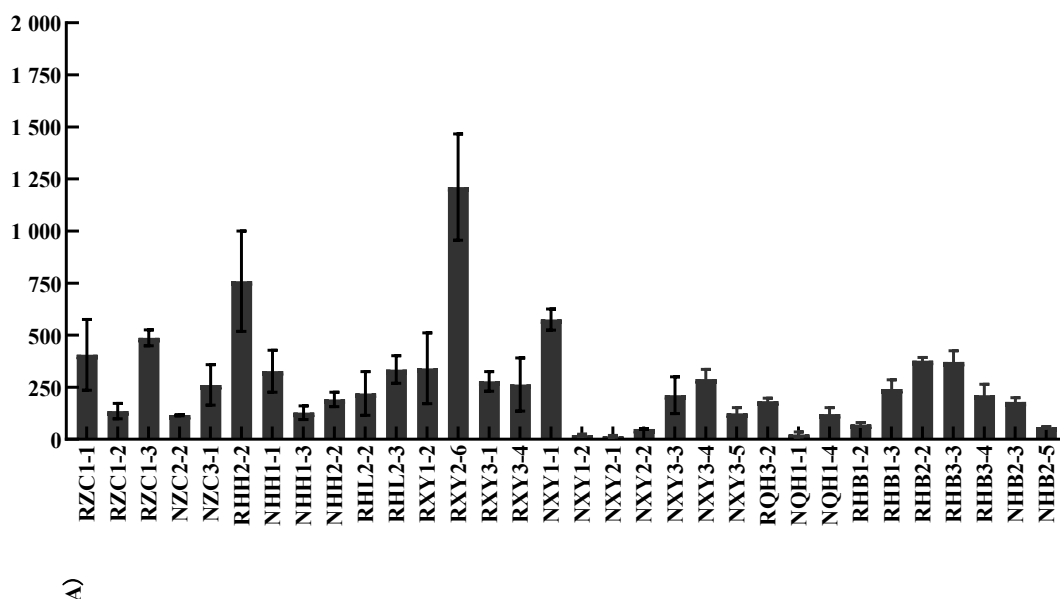


图5 红花檵木叶片内生细菌的产 IAA 能力水平分析

Fig.5 Analysis of IAA production ability of endophytic bacteria in leaves of *Loropetalum chinense* var. *rubrum*

2.4.3固氮能力测定

细菌固氮能力测定见表5，结果显示，具固氮能力的细菌大都来自于异常叶色叶片细菌的优势菌，占比达50%。其中异常叶色XY、HB类型叶片中具固氮能力的细菌较其它类型叶片多，占比分别达17.5%、10%，表明多样性丰富的异常叶色叶片细菌的固氮能力强于正常红色叶片。

2.4.4耐盐能力测定

细菌耐盐能力测定结果如表5所示，40株内生细菌均可在含0.5%NaCl的低盐环境下生长，但随着盐浓度升高可生长的菌株数量减少。异常叶色叶片内生细菌直至到15%NaCl的高盐环境下不能生长，而正常红色叶片内生细菌在9%~15%高盐浓度下均不能生长，表明异常叶色叶片内生细菌的耐盐能力强于正常红色叶片的内生细菌。

表5 红花檵木叶片内生细菌的固氮和耐盐能力测定

Table.5 Determination of nitrogen fixation and salt tolerance of endophytic bacteria in the leaves of *Loropetalum chinense* var. *rubrum*

菌株编号（菌种名） Strain number (Strain name)	固氮能力 Nitrogen fixation	不同NaCl浓度 Different NaCl concentrations					
		0.5%	3%	6%	9%	12%	15%
RZC1-1 (<i>Janibacter melonis</i>)	-	+	+	+	-	-	-
RZC1-2 (<i>Aquicola tertiaricarbonis</i>)	+	+	-	-	-	-	-
RZC1-3 (<i>Massilia neuiana</i>)	-	+	+	+	-	-	-
NZC2-1 (<i>Micromonospora chalybeata</i>)	+	+	+	-	-	-	-
NZC2-2 (<i>Bacillus paramycoides</i>)	-	+	+	+	-	-	-
NZC3-1 (<i>Paenibacillus agarexodens</i>)	+	+	+	-	-	-	-
菌株编号（菌种名）	固氮能力	不同NaCl浓度					

Strain number (Strain name)	Nitrogen fixation	Different NaCl concentrations					
		0.5%	3%	6%	9%	12%	15%
RHH2-2 (<i>Pantoea anthophila</i>)	+	+	+	+	+	-	-
NHH1-1 (<i>Labedella gwakjiensis</i>)	-	+	+	-	-	-	-
NHH1-3 (<i>Brevundimonas vesicularis</i>)	-	+	+	-	-	-	-
NHH2-2 (<i>Bacillus tequilensis</i>)	+	+	+	+	+	+	-
RHL1-4 (<i>Methylobacterium brachiatum</i>)	+	+	-	-	-	-	-
RHL1-5 (<i>Bradyrhizobium denitrificans</i>)	-	+	-	-	-	-	-
RHL2-2 (<i>Ralstonia pickettii</i>)	+	+	-	-	-	-	-
RHL2-3 (<i>Sediminibacterium magnilacihabitans</i>)	-	+	+	+	-	-	-
NHL2-2 (<i>Mesobacillus subterraneus</i>)	-	+	+	+	+	-	-
RXY1-2 (<i>Sphingomonas yunnanensis</i>)	-	+	-	-	-	-	-
RXY1-5 (<i>Neobacillus ginsengisoli</i>)	-	+	-	-	-	-	-
RXY2-5 (<i>Plantactinospora sonchi</i>)	-	+	-	-	-	-	-
RXY2-6 (<i>Flavobacterium acidificum</i>)	+	+	+	+	+	-	-
RXY2-7 (<i>Lysinibacillus odysseyi</i>)	-	+	+	+	-	-	-
RXY3-1 (<i>Paenibacillus tylopili</i>)	+	+	+	+	-	-	-
RXY3-2 (<i>Methylobacterium radiotolerans</i>)	+	+	-	-	-	-	-
RXY3-4 (<i>Sphingomonas kyungheensis</i>)	-	+	-	-	-	-	-
NXY1-1 (<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>)	+	+	+	+	-	-	-
NXY1-2 (<i>Alkalihalobacillus hunanensis</i>)	-	+	+	+	+	+	-
NXY2-1 (<i>Cytobacillus oceanisediminis</i>)	-	+	+	+	+	+	-
NXY2-2 (<i>Niallia circulans</i>)	+	+	+	-	-	-	-
NXY3-3 (<i>Bacillus salidurans</i>)	-	+	+	+	+	-	-
NXY3-4 (<i>Rhizobium soli</i>)	+	+	+	-	-	-	-
NXY3-5 (<i>Paenibacillus amylolyticus</i>)	+	+	+	+	-	-	-
RQH3-2 (<i>Bacillus subtilis</i>)	+	+	+	+	+	+	-
NQH1-1 (<i>Bacillus pumilus</i>)	-	+	+	+	+	+	-

菌株编号（菌种名） Strain number (Strain name)	固氮能力 Nitrogen fixation	不同NaCl浓度 Different NaCl concentrations					
		0.5%	3%	6%	9%	12%	15%
NQH1-4 (<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>)	+	+	+	+	-	-	-
RHB1-2 (<i>Curtobacterium albidum</i>)	+	+	+	+	+	-	-
RHB1-3 (<i>Pseudomonas congelans</i>)	+	+	+	-	-	-	-
RHB2-2 (<i>Pseudomonas caricapapayae</i>)	+	+	+	+	+	-	-
RHB3-3 (<i>Sphingomonas kaistensis</i>)	-	+	+	-	-	-	-
RHB3-4 (<i>Pseudomonas meliae</i>)	+	+	+	-	-	-	-
NHB2-3 (<i>Paenibacillus seodonensis</i>)	-	+	-	-	-	-	-
NHB2-5 (<i>Siminovitchia acidifaciens</i>)	-	+	+	+	-	-	-

注：+表示有该功能特征；-表示无该功能特征

Note: + indicates the function is enabled; - indicates the function is not enabled.

3 讨论与结论

本研究对红花檵木五种典型异常叶色叶片和正常红色叶片内生细菌进行分离鉴定,分析各类型叶色叶片内生细菌多样性、群落结构组成及功能菌的差异性,结果显示不同叶色类型的内生细菌的分离数量、在种、属分类水平上的优势菌群、细菌多样性、群落结构组成及功能菌群的分布存在较大差异。研究数据显示红花檵木异常叶色叶片内生细菌数量均高于正常红色叶片,不止红花檵木叶片有这种规律,茶树、柑橘的健康和发病叶片中内生细菌数量的研究结果也均为发病叶片中更高,其发病叶片也都发生了叶色变化(陈百文, 2009; 高爽, 2017)。结合之前的研究报道可知,内生细菌数量与影响红花檵木叶片呈色的花青素含量表现为负相关(张艺帆等, 2022)。茶树叶片也与之类似,其叶片中的花青素含量与微生物数量呈负相关性(汪立群等, 2016),而其它植物果实中也有发现花青素含量与微生物数量有负相关性,并指出花青素含量高的叶片会抑制微生物生长(Rogez et al., 2012)。由此可知,红花檵木异常叶色叶片中花青素含量较少,其微生物的生长繁殖未受到抑制,从而导致其内生细菌数量均较高。

本研究获得的红花檵木正常红色叶片与异常叶色叶片内生细菌多样性数据显示,除小叶类型叶片以外,其它四类叶色异常叶片内生细菌多样性均低于正常红色叶片,而在山桐子和巨杉中也发现有类似结果,因感病而表型变化的叶片内生细菌多样性均低于健康叶片(岳雪华等, 2020; 周慧娜等, 2022)。与其它异常叶色叶片不同的是,小叶类型叶片不仅叶色有变化,叶片大小也明显缩小,综合前人研究结果可知红花檵木叶片和叶表的微生物会因光照、温度等外界因素的影响而发生叶色和内生微生物群落的变化(费芳等, 2008; 黄欣等, 2017; 杨宽等, 2021)。因小叶类型叶片急剧缩小导致其光合作用面积减少,而植物为保障有足够的光合能力来满足植物的正常生长发育需求,增强了植物与内生细菌的协同作用,通过丰富内生细菌的多样性和增加特定菌群数量的方式,借助微生物来提高植物适应环境的能力。

红花檵木异常叶色叶片内生细菌在种、属分类水平上的相对丰度值比正常红色叶片更高，内生细菌的群落结构也较正常红色叶片菌群失衡，且在叶片中富集了甲基杆菌属和假单胞杆菌属细菌，一种名为栖稻假单胞菌的相对丰度值明显增高。在紫荆泽兰（Zhou et al., 2010）和茶树（陈义勇等，2023）的相关研究中也发现，病叶内生细菌的群落结构和相对丰度值与健康叶片相比都有显著差异。红花檵木异常叶色叶片中分离到的假单胞菌属、甲基杆菌属细菌也可以引起其它植物叶片变色并出现病斑，在水稻中还发现栖稻假单胞菌可使谷粒出现浅褐色斑点或整个谷粒呈深棕色的现象（冯洁，2017；Hou et al., 2020），红花檵木的叶色变化可能也与这两类微生物有关。分析不同红花檵木叶片中获得的功能菌情况发现，异常叶色叶片中有大量功能菌富集，其溶磷、耐盐、固氮和产 IAA 的能力高于正常红色叶片中分离的功能菌，且有 4 株兼具以上四种功能。异常叶色叶片中富集的具溶磷和耐盐能力较高的菌属分别是假单胞菌属和芽孢杆菌属，这两个属细菌曾在小麦和柠条中分离获得并证实具有较强的溶磷和耐盐能力（Zumft, 1998；代金霞等，2012；鞠向阳，2014；Kushwaha et al., 2020）。从红花檵木叶片中分离获得了 26 株高产 IAA 细菌，其产 IAA 能力均高于了小麦、黄连等植物的内生细菌 IAA 分泌水平（Malik et al., 1997；向益青等，2023），最高产的 3 株细菌也均分离自异常叶色叶片中。由此可知，红花檵木叶片发生颜色变化的原因可能是红花檵木异常叶色叶片中富集有大量的微生物，叶片受某些特定微生物菌群的影响，其内生细菌数量、多样性、相对丰度及功能菌群的数量增加，使叶片形成了独特的菌群特征，但菌群的变化并未让红花檵木叶片内生细菌转化为致病菌使植物出现病害或死亡现象，只是使其叶片出现了表型变化，甚至富集的功能菌还起到了协助植物生长发育的作用。

综上所述，红花檵木叶片内生细菌较丰富，尤其是异常叶色叶片中富集了大量内生细菌和功能细菌，其叶片内生细菌数量、多样性、群落结构、功能菌群都发生了变化，且富集的优势菌群有可能使叶片叶色改变，这种富集特定菌群的行为极有可能与其异常叶色现象有关。本研究分离获得的大量内生细菌及功能菌资源可为今后进一步明确红花檵木叶异常色形成机制提供参考依据，并对红花檵木优质高效栽培有重要应用价值。

参考文献：

- BAK K, GAJ R. 2016. Effectt of differentiated phosphor us and potassium fertilization on maize grain yield and plant nutritional status at a critical growth stage[J]. J Elementtol, 21(2): 337-348.
- CHEN BW, 2009. Study on the control mechanism of the endophytic bacteria against *colletotorichum gloeosporioides* in tea plants. [D]. Fujian: Fujian Agricultural Forestry University: 1-66. [陈百文, 2009. 茶树内生细菌对茶炭疽病的防病机制研究[D]. 福建: 福建农林大学: 1-66.]
- CHEN MM, CHEN LZ, 2022. Study on plant bacterial diseases and its prevention and control measures[J]. Zhejiang Agric Sci, 63(8): 1798-1804. [陈苗苗, 陈列忠, 2022. 植物细菌性病害及其防治措施[J]. 浙江农业科学, 63 (8) : 1798-1804.]
- CHEN YY, ZHOU B, LI JL, et al., 2023. Blister blight lesions of tea (*Camellia sinensis* L. Kuntze) leaves: Microbial diversity analysis and identifiication of disease fungi[J]. Chin Agric Sci Bull, 39(6): 116-123.[陈义勇, 周波, 黎健龙, 等, 2023. 茶饼病病叶表面微生物多样性及病害

- 真菌的分离鉴定[J]. 中国农学通报, 39 (6) :116-123.]
- DAI JX, WANG YJ, WU XJ, et al., 2012. Stress resistance and genetic diversity of endophytic bacteria isolated from *Caragana* spp. root nodules. [J]. Chin J Appl Ecol, 23(2): 519-524.[代金霞, 王玉炯, 武雪娟, 等, 2012. 柠条根瘤内生细菌的抗逆性及遗传多样性[J]. 应用生态学报, 23 (2) : 519-524.]
- DANIEL BM, CHRISTINE V, YANG B, et al., 2016. The plant microbiota: systems-level insights and perspectives[J]. Ann Rev Genet, 50(1): 211-234.
- FEI F, WANG HY, TANG QR, 2008. Study on the impact of temperature on *Loropetalum Chinese* var. *rubrum* leaves color[J]. J Hunan Inst Sci Technol (Nat Sci Ed) 21(2): 88-90. [费芳, 王慧颖, 唐前瑞, 2008. 温度对红花檵木叶色的影响研究[J]. 湖南理工学院学报(自然科学版), 21 (2) : 88-90.]
- FENG J, 2017. Recent advances in taxonomy of plant pathogenic bacteria[J]. Sci Agric Sin, 50(12): 2305-2314.冯洁, 2017. [植物病原细菌分类最新进展[J]. 中国农业科学, 50 (12): 2305-2314.]
- GAO S, 2017. Associated diversity of phyllosphere bacterium with canker disease[D]. Changsha: Hunan Agricultural University: 1-62.[高爽, 2017. 柑橘叶表细菌种群结构与溃疡病的关联研究[D]. 长沙: 湖南农业大学: 1-62.]
- GU MY, GULINISHA SYM, ZHANG ZD, et al., 2021. Diversity and function analysis of endophytic bacterial community in different tissues of *Lycium ruthenicum* Murr. [J]. Acta Microbiol Sin, 61(1): 152-166. [顾美英, 古丽尼沙·沙依木, 张志东, 等, 2021. 黑果枸杞不同组织内生细菌群落多样性[J]. 微生物学报, 61 (1) : 152-166.]
- GUO PY, DENG SY, ZHANG YF, et al., 2022. Effect of different light quality on callus growth and flavonoids content of two *Loropetalum chinense* Plants [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 42(1): 118-126.[郭佩瑶, 邓斯颖, 张艺帆, 等, 2022. 不同光质对红花檵木愈伤组织生长及黄酮类物质含量的影响[J]. 西北植物学报, 42 (1) : 118-126.]
- 郝士海, 1992. 现代细菌学培养基和生化试验手册[M]. 北京: 中国科学技术出版社: 128.
- HOU YX, ZHANG YL, YU L, et al., 2020. First report of *Pseudomonas oryzae* causing rice panicle blight and grain discoloration in China[J]. Plant Dis, 104(11):3055-3056.
- HUANG X, WANG HX, LIN M, et al., 2017. Effects of light intensity on leaf-color expression of *Loropetalum Chinense* var. *rubrum*[J]. Hunan Agric Sci, 3(3): 13-15.[黄欣, 王华新, 林茂, 等, 2017. 不同光照处理对红花檵木叶色及色素含量的影响[J]. 湖南农业科学, 3 (3) : 13-15.]
- JIANG S, QIAN DW, DUAN JA, et al., 2008. Research on correlation between plant endophytes and geohelminthism[J]. Chin Trad Herb Drugs, 39(8): 1268-1272.[江曙, 钱大玮, 段金殿, 等, 2008. 植物内生菌与道地药材的相关性研究[J]. 中草药, 39 (8) : 1268-1272.]
- JU XY, 2014. Endophytic bacteria community of *Populus euphratica* Oliv and the strains improving the salt tolerance of wheat[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology: 1-90.[鞠向阳, 2014. 胡杨内生细菌的多样性和其中的植物耐盐促生菌[D]. 上海: 华东理工大学: 1-90.]
- KUSHWAHA P, KASHYAP P L, BHARDWAJ A K, et al., 2020. Bacterial endophyte mediated plant tolerance to salinity: growth responses and mechanisms of action[J]. World J Microbiol Biotechnol, 36(2): 1-16.
- LIN GQ, ZHANG T, ZUO J, et al., 2022. Isolation and Identification of IAA-producing endophytic bacteria and its growth-promoting effect on the growth of wheat[J]. Fujian Agric

- Sci Technol, 53(4): 10-17. [林国钦, 张婷, 左杰, 等, 2022. 产IAA根内生菌的分离鉴定及对小麦促生效果[J]. 福建农业科技, 53 (4) : 10-17.]
- LUO Y, ZHANG LJ, HUANG W, et al., 2023. Identification of a uranium-resistant strain and its growth-promoting properties[J]. Biotechnol Bull, 39(5): 286-296. [罗义, 张丽娟, 黄伟, 等, 2023. 一株耐铀菌株的鉴定及其促生特性研究[J]. 生物技术通报, 39 (5) : 286-296.]
- MENG L, TANG ZD, XIE AQ, et al., 2023. Effect of single endophytic fungi and mixed endophytic fungi on growth and photosynthesis of *Cunninghamia lanceolata* seedlings[J]. J Sichuan Agric Univ, 41(2): 240-248. [孟磊, 汤智德, 谢安强, 等, 2023. 单一内生真菌与混合内生真菌对杉木幼苗生长及光合作用的影响[J]. 四川农业大学学报, 41 (2) : 240-248.]
- MALIK KA, BILAL R, MEHNAZ S, et al., 1997. Association of nitrogen-fixing, plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice[J]. Plant Soil, 14(12): 37-44.
- PATTEN C L, GLICK, B R, 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system[J]. Appl Environ Microbiol, 68(8): 3795-3801.
- PEREZ-MONTANO F, ALIAS-VILLEGAS C, BELLOGIN R. A, et al., 2014. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production[J]. Microbiol Res, 169(5-6): 325-336.
- REASONER DJ, GELDREICH EE, 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water[J]. Appl Environ Microbiol, 49(1): 1-7.
- ROGEZ H, AKWIE S N L T, MOURA F G, et al., 2012. Kinetic modeling of anthocyanin degradation and microorganism growth during postharvest storage of Acaia fruits[J]. J Food Sci, 77(12):1300-1306.
- STONE JK, BACON CW, WHITE JF, 2000. An over view of endophytic microbes: Endophytism defined. Microbial Endophytes[M]. New York: Marel Dekker: 29-33.
- WANG H, 2023. Analysis of inducement of abnormal mosaic phenomenon in *Loropetalum chinense* var. *rubrum*[D]. Changsha: Hunan Agricultural University: 1-71. [王慧, 2023. 红花檵木异常花叶现象诱因分析[D]. 长沙: 湖南农业大学: 1-71.]
- WANG LQ, YAN XM, GUO XS, et al., 2016. Diversity of endophytic microorganisms Zijuan and Yunkang 10 of *Camellia sinensis*[J]. J Anhui Agric Univ, 43(1): 1-5. [汪立群, 颜小梅, 郭小双, 等, 2016. 紫娟、云抗 10 号两个茶树品种内生菌多样性研究[J]. 安徽农业大学学报, 43 (1) : 1-5.]
- WANG Y, ZHU FR, et al., 2007. Mosaic of *Loropetalum chinense* var. *rubrum*—harm actualities and symptom[J]. For Pest Dis, 26(6): 19-20. [王燕, 朱发仁, 2007. 红檵木花叶病毒病研究—I 危害现状及其表现症状[J]. 中国森林病虫, 26 (6) :19-20.]
- WANI ZA, ASHRAF N, MOHIUDDIN, et al., 2015, Plant-endophyte symbiosis, an ecological perspective[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 99(7): 2955-65.
- XIANG YQ, LIAO HL, LI N, et al., 2023. Isolation, identification and functional verification of bacteria from seeds of *Coptis chinensis*[J]. Nat Prod Res Dev, 35(2): 191-199. [向益青, 廖海浪, 李娜, 等, 2023. 黄连种子内生细菌的分离鉴定及功能验证[J]. 天然产物研究与开发, 35 (2) : 191-199.]
- 谢志奎, 顾啸, 何伟杰, 等, 2021. 低带菌率常规水稻种子生产技术初探[J]. 上海农业科技, 0 (2) : 132-133.
- XU L, WANG H, JIANG WX, et al., 2021. Research progress on the diseases of *Loropetalum*

- chinense* var. *rubrum*[J]. Biotic Resour, 43(2): 119-126. [许璐, 王慧, 蒋文秀, 等, 2021. 红花檵木病害的研究进展[J]. 生物资源, 43 (2) : 119-126.]
- XU Q, ZHANG F, XU ZQ, et al., 2011. Some characteristics of Simpson index and the Shannon-Wiener index and their dilution effect[J]. Pratacul Sci, 28(4): 527-531. [许晴, 张放, 许中旗, 等, 2011. Simpson指数和Shannon-Wiener指数若干特征的分析及“稀释效应”[J]. 草业科学, 28 (4) : 527-531.]
- YANG K, WANG HL, YE HH, et al., 2021. Advances in research on phyllosphere microorganisms and their interaction with plants[J]. J Yunnan Agric Univ (Nat Sci), 36(1):155-164.[杨宽, 王慧玲, 叶坤浩, 等, 2021. 叶际微生物及与植物互作的研究进展[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 36 (1) : 155-164.]
- YUE XH, FAN SH, DU XK, et al., 2020. Comparison of microbial compositions and diversities between healthy and infected leaf surfaces of *Sequoiadendron giganteum*[J]. J Fujian Agric For Univ (Nat Sci Ed), 49(1): 10-17.[岳雪华, 范深厚, 杜雪柯, 等, 2020. 巨杉健康和感病叶片表面微生物组成和多样性比较[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 49 (1) : 10-17.]
- ZHANG YF, WANG H, HUO WW, et al., 2022. Analysis of seasonal mosaic leaf phenotype and photoynthetic physiological response of *Loropetalum chinense* var. *rubrum*[J]. Acta Agric Boreal Sin, 31(12): 1579-1588. [张艺帆, 王慧, 霍雯雯, 等, 2022. 红花檵木季节性花叶表型及其光合生理响应分析[J]. 西北农业学报, 31 (12) : 1579-1588.]
- ZHAO LF, XU YJ, CAO DJ, et al., 2015. Screening, resistance, phylogeny and growth promoting of phosphorus solubilizing bacteria isolated from soybean root nodules[J]. Acta Ecol Sin, 35(13): 4425-4435. [赵龙飞, 徐亚军, 曹冬建, 等, 2015. 溶磷性大豆根瘤内生菌的筛选、抗性及其系统发育和促生[J]. 生态学报, 35 (13) : 4425-4435.]
- ZHOU HN, ZHANG T, XU ZH, et al., 2022. Diversity, structure and function prediction of phyllospheric microorganism community in *Idesia polycarpa*[J]. Non-wood For Res, 40(4): 163-172. [周慧娜, 张涛, 徐自恒, 等, 2022. 山桐子叶际微生物群落多样性、结构及功能预测分析[J]. 经济林研究, 40 (4) : 163-172.]
- ZHOU ZX, JIANG H, YANG C, et al., 2010. Microbial community on healthy and diseased leaves of an invasive plant *Eupatorium adenophorum* in southwest China[J]. J Microbiol, 48(2): 139-145.
- ZUMFT W G, 1998. Cell biology and molecular basis of denitrification[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 61(4): 533-616.