

· 研究报告 ·

钾营养状况介导的油菜叶片生长及其对叶际微生物的影响

宋毅, 陈航航, 崔鑫, 陆志峰, 廖世鹏, 张洋洋, 李小坤, 丛日环, 任涛*, 鲁剑巍

华中农业大学资源与环境学院/农业农村部(长江中下游)耕地保育重点实验室/华中农业大学微量元素研究中心, 武汉 430070

摘要 为探究钾营养介导下的油菜(*Brassica napus*)叶片生长对叶际微生物群落的影响, 利用田间试验, 设置0、30和180 kg K₂O·hm⁻² 3个钾肥用量, 分别定义为K0 (钾缺乏)、K30 (钾不足)和K180 (钾充足) 3个钾营养水平。在苗期, 分别选取典型叶片测定其表型参数, 并利用16S-RNA基因高通量测序测定油菜叶际微生物群落组成。结果表明, 不同钾肥用量显著影响油菜叶片的钾含量, 与K0相比, K30和K180处理钾含量分别提高66.7%和158.3%。不同钾营养状况下, 油菜叶片结构和组分存在明显差异, 叶片钾含量与叶面积及叶片可溶性糖、蔗糖、果糖和淀粉的含量呈显著正相关, 而与叶片气孔密度呈显著负相关。钾肥施用显著影响油菜叶际微生物的多样性, 与K0处理相比, 施钾处理叶际微生物群落多样性指数显著升高, 而K30和K180处理间无明显差异, 但在群落的β多样性中, K30处理表现出更大的离散性。缺钾增加了油菜叶际变形菌门(Proteobacteria)的相对丰度, 使得黄单胞菌科(Xanthomonadaceae)细菌显著富集。施用钾肥后细菌共现网络变简单, 但促进了高丰度物种与其它物种的相互作用。通过联合分析油菜叶表型性状与叶际细菌群落, 发现叶片糖组分(可溶性糖、蔗糖、果糖和淀粉)、干物质重以及叶面积是影响叶际细菌群落以及优势物种的关键因素。综上所述, 施钾影响油菜叶片的物质组成, 调控油菜叶际微生物群落结构, 充足的钾营造的叶片微生物组“稳态”可能是钾营养增强作物生物胁迫抗性的潜在途径。

关键词 钾营养, 油菜, 叶际微生物, 气孔密度, 蔗糖

宋毅, 陈航航, 崔鑫, 陆志峰, 廖世鹏, 张洋洋, 李小坤, 丛日环, 任涛, 鲁剑巍 (2024). 钾营养状况介导的油菜叶片生长及其对叶际微生物的影响. 植物学报 59, 54–65.

叶际微生物是定殖在植物地上部包括叶、茎、花和果实等表面和内部的多类型微生物(细菌、真菌、酵母和藻类等)的统称(Sohrabi et al., 2023), 在植物生态系统中具有重要功能, 如促进植物生长和养分吸收、提高植物对生物/非生物胁迫的抗性以及降解农药(Furnkranz et al., 2008; 姜丹, 2009; Qi et al., 2021; Niu et al., 2022)。目前的研究认为, 叶际微生物群落的定殖以及组成通常受宿主所处外界环境的影响, 包括地理位置、土壤类型和季节气候等非生物因素, 以及昆虫取食和病原菌入侵等生物因素(Laforest-Lapointe et al., 2016; Ritpitakphong et al., 2016; Wagner et al., 2016; Chaudhry et al., 2021)。此外, 植物宿主本身的特性也是决定叶际微生物定殖的重要因素(Li et al., 2021)。Hunter等(2010)对比了26种

基因型莴苣(*Lactuca sativa*)的形态特征及化学性质, 发现叶片形态特征相差较大的材料, 叶际微生物的多样性也差异较大, 叶片可溶性糖、蜡质、水分和钙离子含量均会对叶际微生物的多样性产生影响。叶片糖浓度与叶际细菌密度呈显著正相关(Mercier and Lindow, 2000)。除物质组成外, 叶片的功能性状(包括叶脉密度、比叶重、叶片厚度、质外体空间、气孔的数量和开闭状态以及蜡质组成等)同样会影响叶际微生物的定殖和群落结构(Reisberg et al., 2013; 王凯悦等, 2018; González-Teuber et al., 2021; Mo et al., 2021)。因此, 有研究提出宿主与环境互动, 共同调控植物叶际微生物组成(Wagner et al., 2016)。

在农业生态系统中, 农业管理活动直接影响作物生长发育状态, 改变作物生长环境, 进而影响叶际微

收稿日期: 2023-06-11; 接受日期: 2023-11-02

基金项目: 国家自然科学基金(No.32072680)、国家重点研发计划(No.2022YFD2301405)和中央高校基本科研业务费专项基金(No.26620-21ZH001)

* 通讯作者。E-mail: rentao@mail.hzau.edu.cn

生物群落组成和功能。刘姗(2021)研究发现, 农业管理中的人为活动提高了生态系统中植物叶际微生物多样性。施肥是农业管理措施中的重要环节, 能够降低水稻(*Oryza sativa*)和菠菜(*Spinacia oleracea*)等叶际微生物多样性以及丰富度(Venkatachalam et al., 2016; Darlison et al., 2019)。也有研究发现, 不同施肥处理下大麦(*Hordeum vulgare*)、小麦(*Triticum aestivum*)以及玉米(*Zea mays*)叶际微生物组成差异较小(Xiong et al., 2021b)。整体而言, 关于施肥对叶际微生物影响的认识明显不足。

钾是植物生长发育所需的大量营养元素之一, 对于植物形态建成和物质组成有重要作用(Hou et al., 2019; 胡文诗, 2021)。同时, 钾在植物抵抗生物胁迫中也发挥积极作用。Zhang等(2020)研究表明, 施钾显著降低油菜(*Brassica napus*)菌核病发病率。叶际微生物群落稳态与叶片健康密切相关, 而施钾提高作物对生物胁迫的抗性是否与施钾影响叶际微生物群落结构有关? 基于上述问题, 本研究以油菜为研究对象, 通过分析不同钾营养状况(钾亏缺、钾不足以及钾充足)下油菜叶片表型性状, 结合叶际微生物高通量测序技术, 探究钾营养状况如何介导叶片表型变化从而影响叶际微生物组成, 以期通过施肥调控作物叶际微生物组成提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验点概况

试验于2022年10–12月在湖北省武汉市华中农业大学校内基地(114°21'21" E, 30°28'10" N)进行, 0–20 cm 耕层土壤理化性状为pH5.71, 有机质32.1 g·kg⁻¹, 全氮0.88 g·kg⁻¹, 有效磷15.2 mg·kg⁻¹, 速效钾49.1 mg·kg⁻¹, 有效硼0.48 mg·kg⁻¹, 属于钾素缺乏土壤(Ren et al., 2013)。试验点前茬作物为苏丹草(*Sorghum sudanense* (Piper) Stapf)。

1.2 试验设计

试验采用单因素设计, 设置3种钾肥用量(分别为0、30和180 kg K₂O·hm⁻²)。根据土壤供钾能力、油菜叶片钾含量及表型性状, 我们分别定义K0、K30和K180三个钾肥施用水平下油菜叶片钾营养状况为钾缺乏、钾不足和钾充足。每个处理设4次重复, 每个处理小

区面积为20 m²。

各处理氮、磷和硼肥用量相同, 分别为180 kg N·hm⁻²、90 kg P₂O₅·hm⁻²和9 kg Na₂B₄O₇·10H₂O·hm⁻²。供试肥料品种分别为尿素(含N 46%)、过磷酸钙(含P₂O₅ 12%)、氯化钾(含K₂O 60%)和硼砂(含B 11%)。氮肥按基肥:越冬肥:薹肥比例为6:2:2 (v/v/v), 分3次施用, 其它肥料均为一次性基施。

供试油菜(*Brassica napus* L.)品种为华油杂9号, 采用育苗移栽的方式进行试验。于10月1日播种, 育苗6周后选取具有4–5片叶且长势均一的油菜幼苗移栽至试验田, 移栽密度为1.125×10⁵株·hm⁻²。试验区外围设置保护区, 保护区内也种植移栽油菜, 在试验过程中, 所有田间管理(包括除草剂施用和病虫害防治等)均采用当地的常规栽培管理方法。

1.3 叶片样品采集与预处理

在油菜移栽45天后进行叶片取样。此时不同钾营养状况下的油菜叶片已出现明显差异(图1)。参考Copeland等(2015)的方法, 在每个小区内随机选取8–10株代表性植株, 使用无菌剪刀剪取植株中下部有明显差异的叶片并迅速装入无菌袋中, 放在冰上迅速运回实验室进行后续实验。带回实验室的叶片分为2份, 一份使用液氮速冻并于–80°C冰箱保存, 以备叶际微生物DNA提取以及叶片活性蛋白测定, 另一份进行叶表型性状测定。

1.4 叶片表型性状测定

(1) 叶片结构参数

将带回实验室的叶片每个处理选择5片测量其结构参

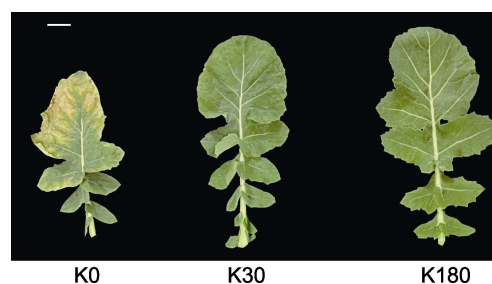


图1 不同钾肥施用情况下油菜苗期叶片表型特征
K0: 0 kg K₂O·hm⁻²; K30: 30 kg K₂O·hm⁻²; K180: 180 kg K₂O·hm⁻²。Bar=5 cm

Figure 1 Phenotypic characteristics of oilseed rape seedling leaves under different K fertilizer applications
Bar=5 cm

数。将叶片平铺在坐标纸上,拍照后用Image-pro软件测量单叶面积。拍照结束后将叶片一分为二,取1份叶片用透明指甲油均匀涂抹在不同处理的同一位置,待晾干后用镊子将指甲油形成的薄膜剥离,置于40倍光学显微镜下观察计数,计算气孔密度(朱新广, 2021)。取面积已知的叶片,在105°C下杀青30分钟,60°C烘干至恒重,称重并记录叶片干重,叶片干重除以叶片面积即得到比叶重。另一份叶片用于蜡质含量测定,参考高扬(2014)的方法。将面积为S的叶片用纯水轻柔地冲洗干净,晾干,然后置于洁净的50 mL烧杯中,加入20 mL氯仿浸泡30秒,取出后用10 mL氯仿冲洗叶片残余蜡质,将烧杯静置过夜后使用200 μ L氯仿重新溶解,并用移液枪转移至已知重量(W1)的PCR管中,静置过夜后称重(W2),蜡质含量=(W1-W2)/2S。

(2) 叶片生化组分

将上述烘干样品磨成粉末,按照申长卫(2017)的方法使用蒽酮比色法对叶片可溶性糖、蔗糖、果糖和淀粉含量进行测定。在-80°C下保存样品,按照邹琦(1995)的方法,使用考马斯亮蓝法测定叶片总活性蛋白含量。

(3) 叶片钾含量测定

将烘干样磨成粉末,采用H₂SO₄-H₂O₂联合消煮,用火焰光度计法测定叶片钾含量(鲍士旦, 2000)。

1.5 叶际微生物组DNA提取以及16S RNA基因高通量测序

在液氮中将-80°C冰箱中保存的样品研磨成粉末,根据the E.Z.N.A.® soil DNA Kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, U.S.)说明书进行油菜叶际微生物群落总基因组DNA抽提,并通过1.5%琼脂糖凝胶电泳进行质量检测。由于植物叶绿体和线粒体16S RNA编码序列与细菌基因序列的相似性极高,因此通过槽式PCR来降低植物宿主污染序列(Jiang et al., 2021)。简而言之,对细菌16S RNA基因V5-V7区进行2轮PCR扩增。第1轮扩增使用引物799F (5'-AACMGG-ATTAGATACCKG-3')和1392R (5'-ACGGGCGG-TGTGTRC-3')在以下反应程序中进行PCR: 95°C预变性3分钟; 95°C变性30秒, 55°C退火30秒, 72°C延伸45秒, 扩增27个循环; 最后72°C延伸10分钟。然后使用第1轮PCR产物进行第2轮扩增,使用引物799F (5'-AACMGGATAGATACCKG-3')和1193R (5'-AC-

GTCATCCCCCTTCC-3')在以下反应程序中进行: 95°C预变性3分钟; 95°C变性30秒, 55°C退火30秒, 72°C延伸45秒, 扩增13个循环; 最后72°C延伸10分钟。使用2%琼脂糖凝胶电泳分离获得目标PCR产物,并使用AxyPrep DNA凝胶提取试剂盒(Axygen Biosciences, Union City, USA)进一步纯化,将纯化产物送至美吉生物有限公司,利用Illumina公司的NovaSeq PE250平台进行高通量测序。

1.6 数据统计与生物信息学分析

使用fastp和FLASH软件进行质控和拼接。基于默认参数,使用USEARCH中的unoise3进行快速降噪并生成ASV (Amplicon Sequence Variant)丰度表。基于Sliva 16S rRNA基因数据库(v 138),使用Vsearch分类器对ASVs进行物种分类注释。去除注释得到的叶绿体和线粒体序列,并将物种丰度转化为物种相对丰度,进行下游群落分析。Alpha多样性使用vegan包计算多样性指数,使用R包EasyStat进行检验和作图。NMDS (non-metric multidimensional scaling)多样性排序分析,使用R包phyloseq进行数据分析,使用ggplot2进行绘图。韦恩图基于ASV分类水平使用R包ggven绘制。群落差异检测使用R包vegan中的adonis进行多元置换方差分析。物种组成分析挑选前10个丰度最高的物种进行分析,其它物种合并,并定义为others,使用R包ggplot2进行绘图。基于科分类水平使用R包ggtern进行三元图绘制。基于Spearman相关性 $|r|>0.6$ 、 $P<0.05$ 挑选物种进行相关性网络图分析,使用Gephi-0.9.2软件绘制网络图以及计算网络属性。叶表型性状参数三角矩阵相关图,使用R包corr.test计算相关关系。微生物群落和叶表型性状参数使用mantel检验。使用R包vegan进行RDA (Redundancy Analysis)分析和VPA (Variance Partition Analysis)分析。其余测定结果均使用Microsoft Excel 2016软件进行处理,利用SPSS 18.0软件进行统计分析,采用Origin Pro 8.5软件作图。

2 结果与讨论

2.1 不同钾肥用量对油菜叶片生长的影响

油菜叶片钾含量明显受到钾肥用量的影响,且随着钾肥用量的增加,叶片钾含量显著提高(表1)。与不施钾

处理(K0)相比, K30和K180处理叶片钾含量分别提高66.7%和158.3%。钾肥的施用也显著影响油菜叶片的表型(表1)。与不施钾处理(K0)相比, 施钾后油菜叶片干重和叶面积平均增加90.6%和66.1%, 而气孔密度则随着钾肥用量的增加显著降低。除上述叶片结构指标外, 与不施钾(K0)相比, 施钾后叶片可溶性淀粉、可溶性总糖、蔗糖和果糖含量分别平均增加7.0%、9.2%、4.1%和7.3%。

2.2 油菜叶片钾含量与叶片表型性状的相关性

叶片钾含量与叶片表型性状的相关性分析结果表明, 油菜叶片钾含量与叶面积、可溶性糖含量、蔗糖含量、果糖含量以及淀粉含量呈显著正相关, 相关系数分别为0.61、0.89、0.83、0.87以及0.78; 与叶片气孔密度呈显著负相关, 相关系数为-0.67。此外, 油菜叶片糖组分间也存在显著正相关关系, 叶片可溶性糖含量与蔗糖含量、果糖含量的相关系数分别为0.92以及0.98, 叶片果糖含量与蔗糖含量的相关系数为0.92 (图2)。

2.3 不同钾营养状况下油菜叶际微生物群落多样性

对不同施钾处理下的油菜叶际微生物进行高通量测序, 测序结果经质控过滤后共获得1 417 754条reads, 平均每个样本118 146条reads。以97%的一致性将序列聚类成ASV, 并对ASV序列进行物种注释, 去除注释得到的油菜叶绿体和线粒体reads序列后, 共得到1 352 607条reads, 占总测序量的95.4%, 共得到2 701个ASV。

基于测序结果, 分别计算不同钾营养状况下油菜叶际微生物群落多样性指数Pielou_evenness、Richness以及Shannon (图3A)。结果表明, 施钾显著提高

了油菜叶际微生物群落的丰富度(richness)和均一性(pieliou_evenness), 与不施钾处理(K0)相比, 钾营养不足(K30)和钾充足处理(K180)的 α 多样性显著提高。使用NMDS降维分析和Anosim相似性分析(图3B)进一步明确不同钾营养状况下油菜叶际微生物群落的差异性和相似性。结果表明, 不同钾营养状况下油菜叶际微生物群落间存在显著差异($R^2=0.676$, $P=0.004$), 并且不施钾处理(K0)与K30和K180处理间明显不同。此外, 钾营养不足处理(K30)群落间的离散度大于钾充足(K180)以及钾缺乏处理(K0)。

Venn图结果显示, K0处理下油菜叶际微生物群落中ASV数量最少, 而K180处理下ASV数量最多, 随着钾肥用量的增加ASV数量亦增加, 且特有ASV数量也随钾用量的增加而增加(图3C)。

2.4 不同钾营养状况下叶际微生物组成

油菜叶际微生物物种组成结果表明, 油菜叶际优势物种为变形菌门、放线菌门、厚壁菌门以及拟杆菌门等(图4A)。其中, 在K0处理下变形菌门显著富集, 平均相对丰度达97.4%, 远高于K30处理下的36.0%以及K180处理下的31.7%。进一步使用三元图分析科分类水平下的叶际微生物组成(图4B), 结果发现, 黄单胞菌科在K0处理中富集, 而很少出现在K30和K180处理中; 诺卡氏菌科在K30和K180中显著富集。

2.5 不同钾营养状况下油菜叶际微生物共现网络差异

不同钾营养状况下油菜叶际微生物共现网络结果(图5; 表2)显示, 随着钾肥用量的增加, 油菜叶际微生物网络节点数增加, 而网络图密度降低。网络边在施钾后

表1 不同钾营养状况下油菜叶片表型及生化参数

Table 1 The phenotypic traits and biochemical parameters of oilseed rape leaves with different K nutrient status

Treatments	K content (%)	Dry matter weight (g)	Leaf area (cm ²)	Specific leaf weight (mg·cm ⁻²)	Waxy content (μg·cm ⁻²)	Stomatal density (numbers·cm ⁻²)	Active protein content (%)	Soluble sugar content (%)	Saccharose content (%)	Fructose content (%)	Starch content (%)
K0	0.35 c	1.09 b	335 b	4.2 a	223 ab	1630 a	14.6 a	8.9 c	4.3 b	5.1 c	16.3 b
K30	0.61 b	1.33 b	382 b	4.4 a	306 a	1449 a	14.5 a	15.9 b	7.3 a	10.9 b	20.6 b
K180	0.92 a	1.86 a	508 a	4.4 a	188 b	970 b	16.3 a	20.3 a	9.4 a	14.2 a	25.9 a

不同小写字母表示不同钾营养状况间差异达显著水平($P<0.05$)。K0、K30和K180同图1。

Different lowercase letters indicate significant differences between different K nutrient status ($P<0.05$). K0, K30, and K180 are the same as shown in Figure 1.

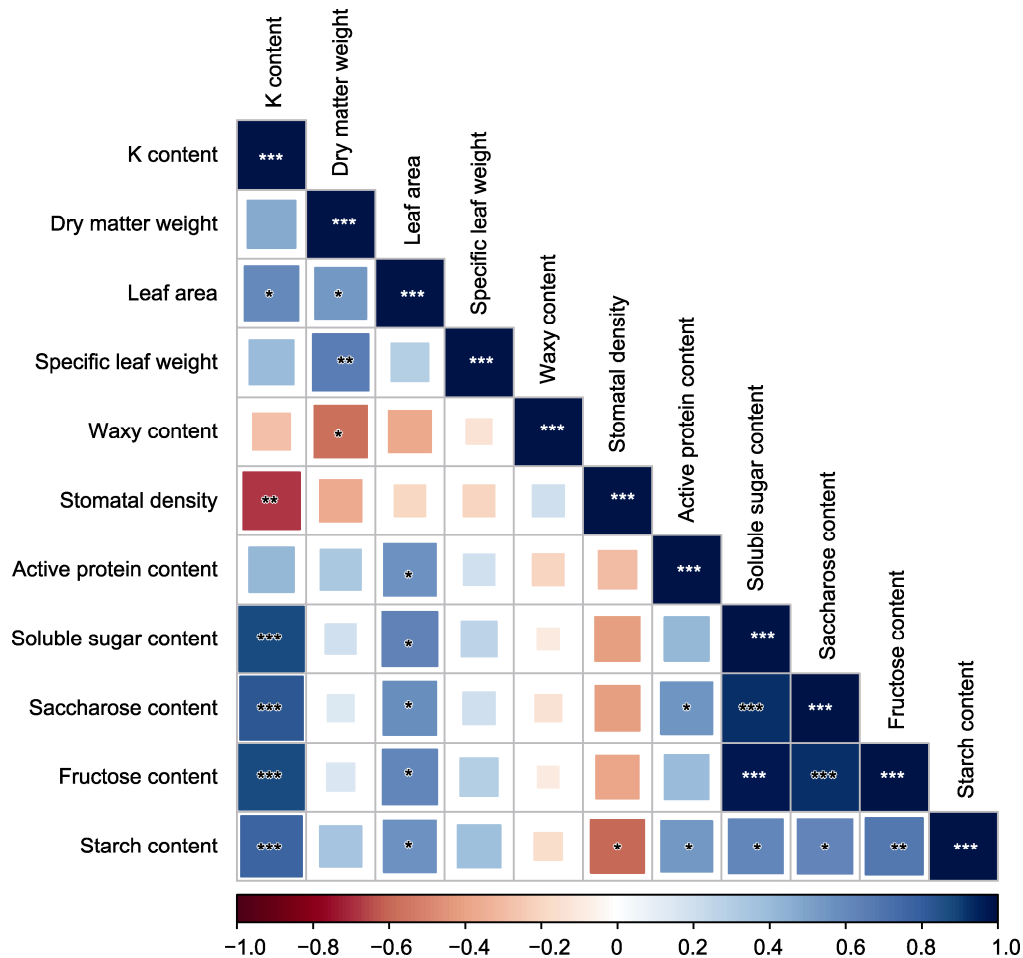


图2 不同钾营养状况下油菜叶片表型与生化参数的相关性分析
*、**和***分别表示在0.05、0.01和0.001水平上差异显著。

Figure 2 Correlation between leaf phenotypic traits and biochemical parameters under different K nutrient status
*, ** and *** indicate significant differences at 0.05, 0.01 and 0.001 levels, respectively.

降低，而模块化系数随着钾肥用量的增加而增加。对网络节点的度和相对丰度进行拟合(图5)，发现K0处理随着节点相对丰度的增加，节点度呈现降低趋势；K30和K180处理随着节点相对丰度的增加，节点度出现增加趋势。

2.6 不同钾营养状况下油菜叶表型性状差异对叶际微生物的影响

Mantel test结果表明，油菜叶际微生物结构与叶片可溶性糖、蔗糖、果糖以及淀粉含量呈显著相关(图6A)。使用冗余分析(redundancy analysis)探究叶际微生物群落对叶片表型性状的响应，结果发现，K0处理的叶际微生物结构与叶片气孔密度存在强正相关关系，而

与蔗糖和淀粉含量等呈负相关，施钾后结果则相反(图6B)。进一步分析油菜叶际微生物科级水平相对丰度前20的物种与叶片表型性状的相关关系，结果表明，在钾缺乏处理(K0)中显著富集的黄单胞菌科与叶片蔗糖和淀粉含量呈显著负相关，而在K30和K180处理中显著富集的卡诺氏菌科与叶片干重呈显著正相关(图6C)。同时，叶片干重、气孔密度、蔗糖含量和淀粉含量与油菜叶际优势微生物的相关性较高。最后，通过VPA分析表明，叶片组分对于叶际微生物群落的影响大于叶片结构，叶片结构参数对于叶际微生物群落结构的解释度为6.5%，而叶片组分参数对叶际微生物群落结构的解释度为37.5%，两者共同的解释度为0.2% (图6D)。

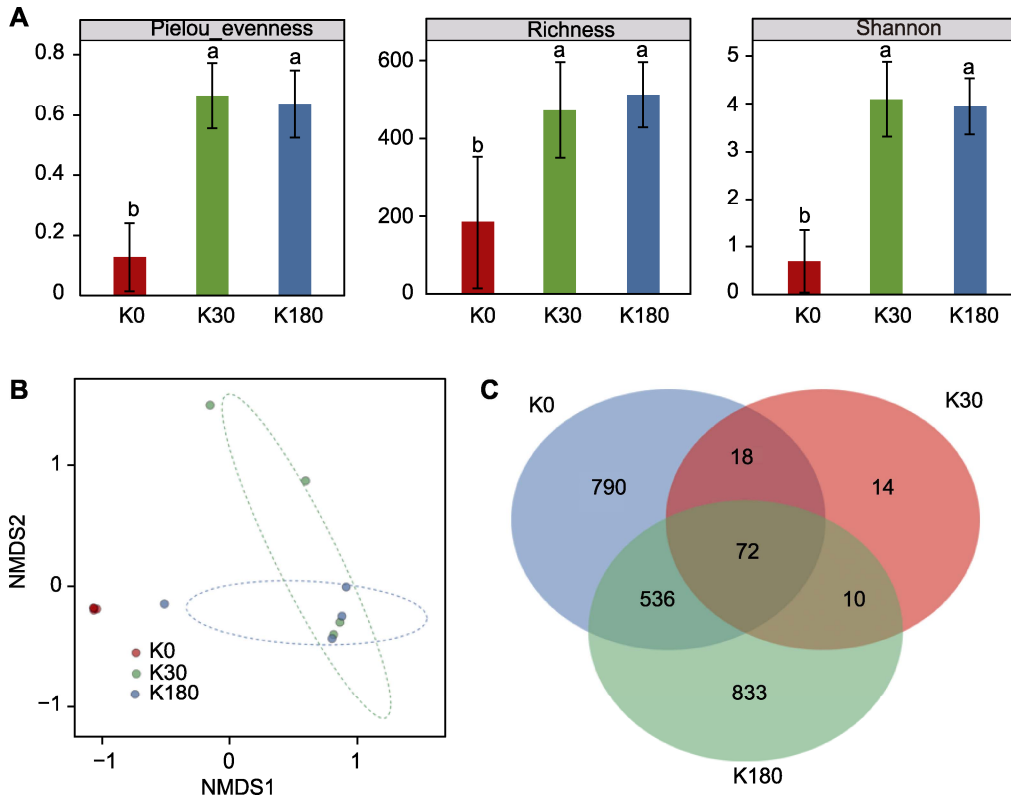


图3 不同钾营养状况下油菜叶际细菌群落多样性

(A) 叶际细菌群落Pielou_evenness、Richness和Shannon多样性指数(不同小写字母表示各处理间差异显著($P < 0.05$)); (B) 叶际细菌群落β多样性; (C) 叶际微生物Amplicon Sequence Variants (ASVs)分布。NMDS: 距离值秩次信息评估; K0、K30和K180同图1。

Figure 3 Diversity of phyllospheric bacterial communities in oilseed rape under different K nutrient status

(A) Pielou_evenness, Richness and Shannon diversity indices of phyllospheric bacterial communities (different lowercase letters indicate significant differences among treatments ($P < 0.05$)); (B) β-diversity of phyllospheric bacterial communities; (C) Distribution of phyllospheric microbial communities Amplicon Sequence Variants (ASVs). NMDS: Evaluation of rank information for distance values; K0, K30, and K180 are the same as shown in Figure 1.

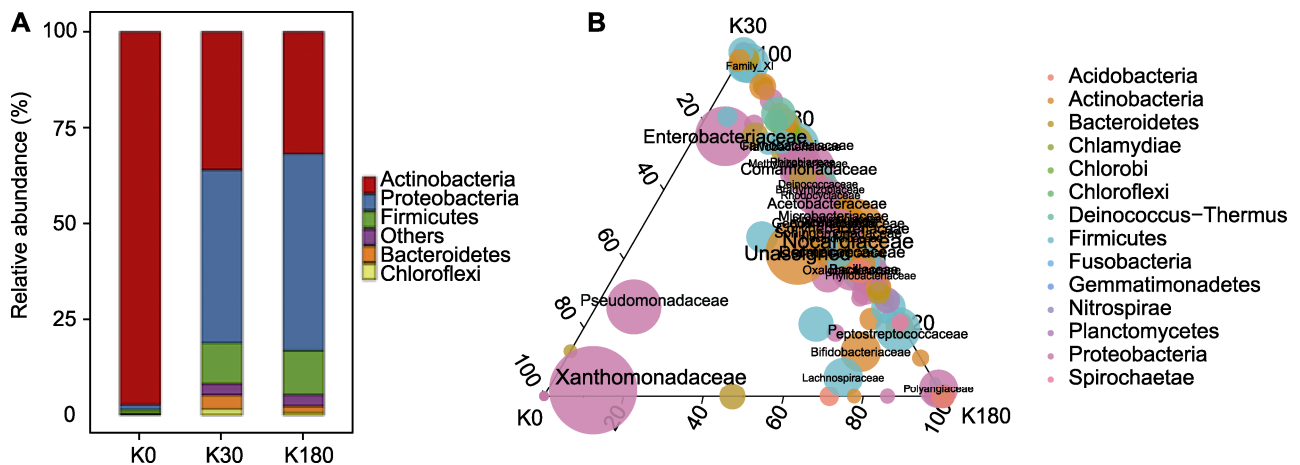


图4 不同钾营养状况下油菜叶际微生物组成

(A) 门级水平的油菜叶际微生物组成; (B) 不同钾营养状况下科分类水平的物种分布(圆圈和字体大小以相对丰度映射,以门级水平着色)。K0、K30和K180同图1。

Figure 4 Phyllospheric microbial composition in leaves of oilseed rape under different K nutrient status **(A)** Phyllospheric microbial composition of oilseed rape at phylum level; **(B)** Distribution of species at the taxonomic level of families under different K nutrient status (circles and font sizes are mapped based on relative abundance, colored by phylum taxonomic level). K0, K30, and K180 are the same as shown in Figure 1.

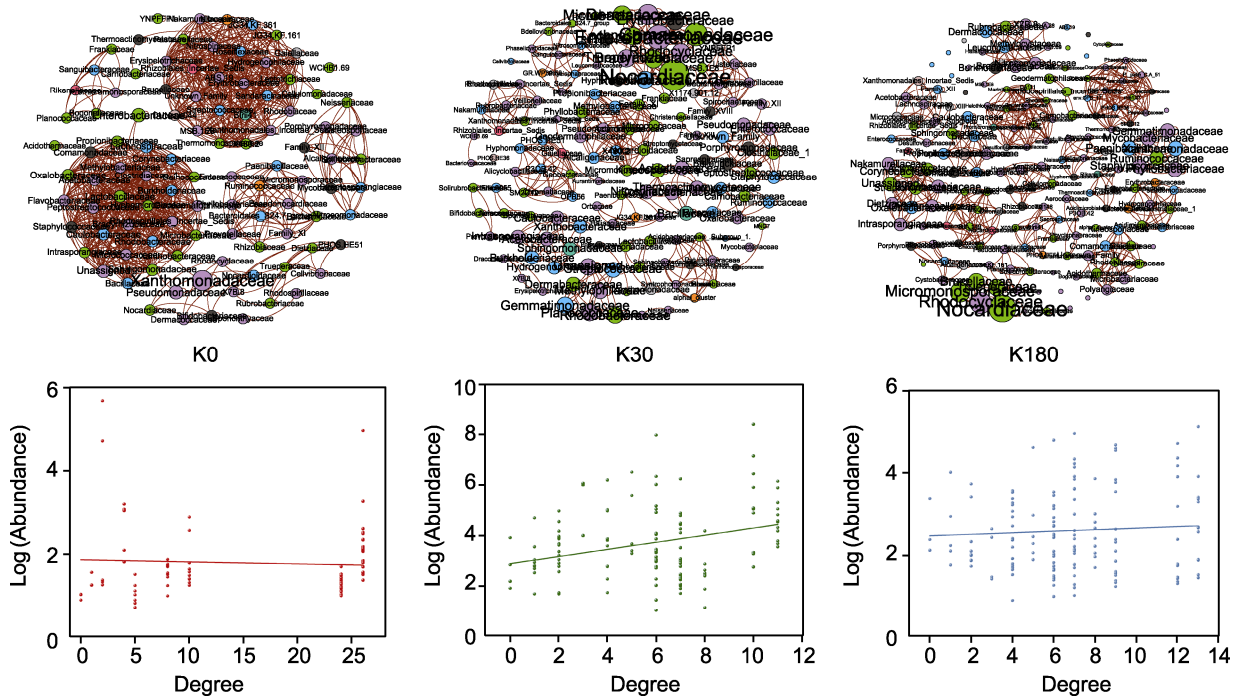


图5 不同钾营养状况下叶际微生物共现网络以及节点和节点相对丰度关系 K0、K30和K180同图1。

Figure 5 Phyllospheric microbial co-occurrence network and node and node relative abundance relationships for different K nutrient status K0, K30, and K180 are the same as shown in Figure 1.

表2 不同钾营养状况下叶际微生物共现网络属性参数

Table 2 Phyllospheric microbial co-occurrence network parameters for different K nutrient status

Treatments	Nodes	Edges	Network density	Modularity
K0	100	789	0.159	0.650
K30	138	390	0.041	0.912
K180	174	536	0.036	0.915

K0、K30和K180同图1。

K0, K30, and K180 are the same as shown in Figure 1.

2.7 讨论与结论

2.7.1 不同钾营养状况下油菜叶际微生物群落结构差异

施肥是集约化农业生产中最重要的栽培管理措施。合理施肥能明显改善植物的生长状态，提高作物产量，

但关于施肥对叶际微生物影响的认识却非常有限 (Zhu et al., 2022a)。施氮肥降低了水稻叶表面细菌的多样性和丰富度(Venkatachalam et al., 2016)。长期施肥下高粱(*Sorghum bicolor*)对叶内细菌和根内生菌的抗性更强(Sun et al., 2021)，而过量施肥会增加叶内潜在植物真菌病原菌的相对丰度(Xiong et al., 2020a)。与此类似，另有一项研究发现，添加氮肥降低了欧美黑杨(*Populus euramericana*)叶际微生物群落的 α 多样性(Tao et al., 2022)。由此可见，目前的研究多以施用氮肥对叶际微生物的影响为主，并且表现为施氮降低叶际微生物的多样性。本研究表明，与不施钾处理相比，施钾处理后叶际微生物多样性显著提高，而在K30和K180处理间无显著差异。

本研究中，不施钾处理油菜叶片表现出典型的缺钾症状(图1)，出现明显的焦枯黄化表型，此时植物体

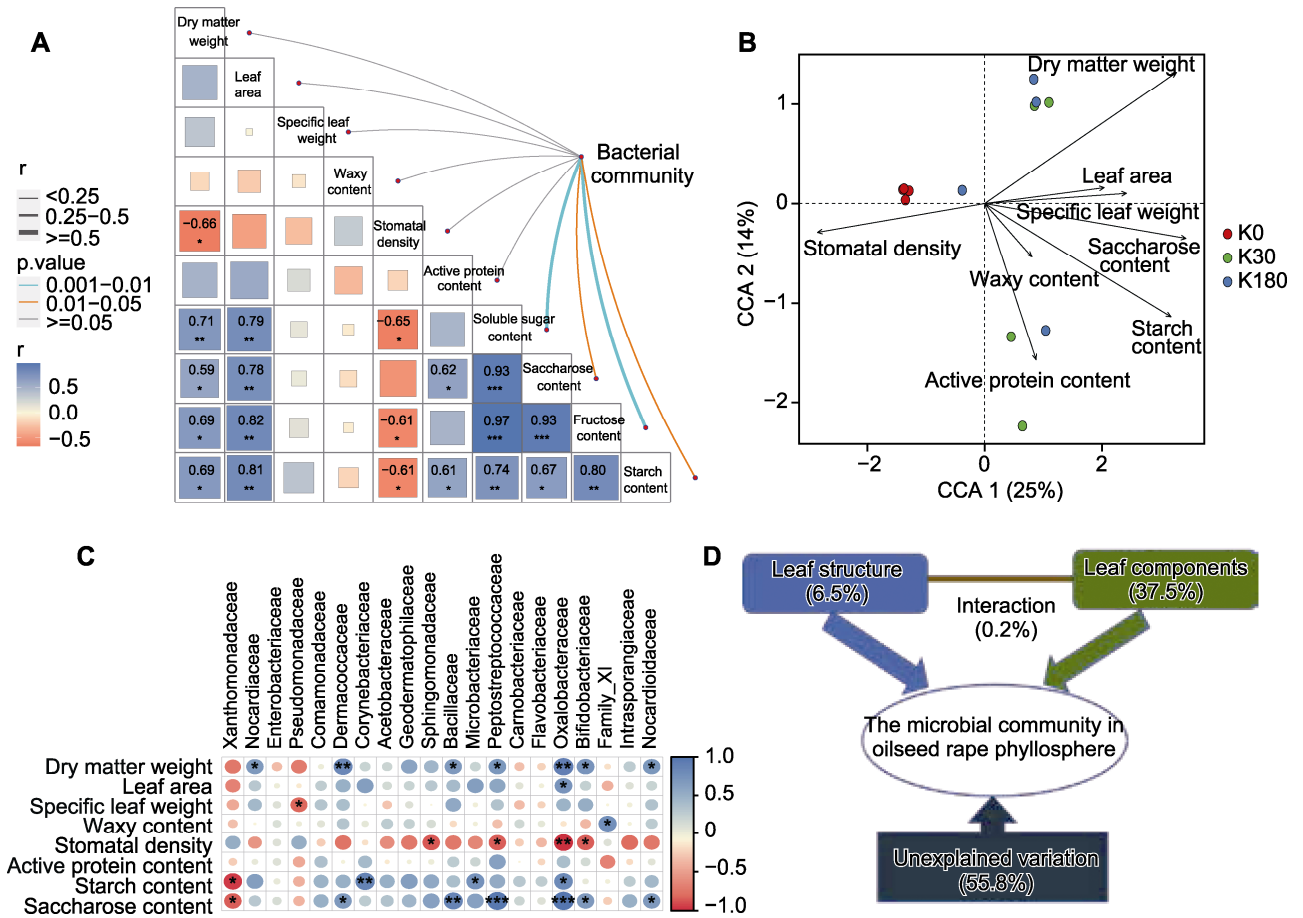


图6 不同钾营养状况下油菜叶片性状与叶际微生物组成的关系
(A) 叶片表型营养与叶际微生物群落结构的mental相关关系(* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$); **(B)** 不同钾营养状况下的RDA分析;
(C) 优势物种与叶表型性状的相关性分析; **(D)** 叶片结构和叶片组分对油菜叶际微生物群落变化的相对贡献。CCA: 影响叶际微生物群落变化的最主要成分; K0、K30和K180同图1。

Figure 6 Relationship between leaf traits and phyllospheric microbial composition in oilseed rape under different K nutrient status
(A) Mental relationship between leaf phenotypic nutrition and phyllospheric microbial community structure (* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$); **(B)** RDA analysis under different potassium nutrient conditions; **(C)** Correlation analysis between dominant species and leaf phenotypic traits; **(D)** Relative contributions of leaf structure and leaf fractions to phyllospheric microbial community changes in oilseed rape. CCA: The most important components affect changes in the phyllospheric microbial community; K0, K30, and K180 are the same as shown in Figure 1.

内免疫系统或代谢活动可能已经出现紊乱,极大地增加了叶片被病原菌或腐生微生物定殖的可能(Gong and Xin, 2021)。从物种组成结果(图4)中也可以看出,与K30和K180处理相比,缺钾处理(K0)中黄单胞菌科显著富集。最近的研究表明,在黄单胞菌科中发现了一种新型的钾离子运输系统,能提高对环境变化的适应性,这使得黄单胞菌在缺钾处理中更容易定殖(Zhu et al., 2022b)。而对于植物个体而言,缺乏钾元素限制了糖在木质部的装载,造成糖的积累。有研究发现,黄单胞菌能够上调植物的SWEETs基因,促进

糖从源到库的转运,这在一定程度上缓解了钾胁迫的症状(Breia et al., 2021)。

黄单胞菌属是一种常见的植物病原菌,能导致油菜和柑橘(*Citrus reticulata*)等作物出现坏死斑点(龙海等, 2010),这也印证了不施钾处理时病原菌更容易定殖。同时,与施钾处理相比,不施钾处理叶际微生物的物种数和物种多样性也明显降低,某一类物种(黄单胞菌科)显著富集,成为叶际微生物组失调特征(Chen et al., 2020)。补充钾之后(K30),虽然其叶表型仍与钾充足(K180)处理有明显不同,但油菜叶际微

生物群落组成有较高的相似度,单一物种富集的失调现象消失,证明钾营养可以增强植物对生物胁迫的抗性(Zhang et al., 2020)。主坐标分析结果中,钾不足处理(K30)群落的离散度高于钾亏缺(K0)和钾充足处理(K180),此时的叶际微生物群落可能处于相对不稳定状态(Arnault et al., 2023),极大地增加了病原菌入侵的机会,最终可能导致植株发生病害。结合不同钾营养状况下的RDA分析结果(图6B),在K0处理中,微生物群落与叶片气孔密度和叶面积等叶片结构相关,也表明在K0处理中可能是叶片结构引起了叶际微生物的多样性降低。而网络分析结果(图5)也表明,在K0处理中相对丰度越高的物种与越少的物种存在相关关系,表明高丰度物种对群落结构影响减小,可能是一种失调的表现。而施钾肥后则出现相反的趋势,说明施钾肥后的优势物种依赖于群落中其它物种的合作与竞争,是群落稳态的表现(Röttjers and Faust, 2018)。综上,在钾不足的情况下,油菜叶片的物理组成以及生物化学组成出现明显差异,使得叶际病原菌的感染机会增加,叶际微生物组稳态失调,从而导致叶际微生物多样性下降。

2.7.2 钾营养介导的油菜叶片表型性状对叶际微生物的影响

钾是植物必需营养元素之一,参与植物细胞渗透调节、酶活反应以及同化物运输等生理过程,对于植物形态构成和物质形成至关重要(Kumar et al., 2020)。钾缺乏后油菜叶肉细胞变小且排列紧密,细胞空隙缩小,导致叶面积减小,同时缺钾又导致叶片净光合能力下降,最终影响光合产物的形成,叶片干物质积累降低(胡文诗, 2021)。缺钾后,叶片比叶重呈降低趋势,这可能是缺钾后叶片整个表皮和叶肉组织的细胞干质量密度(ρ_{cell})、栅栏细胞叶肉层数(NCL_{pa})以及海绵细胞的体积(CV_{sp})发生变化造成的(Lu et al., 2020)。干物质和比叶重则代表叶片资源的数量(吴一苓等, 2022),干物质越大、比叶重越大则叶片能源物质增多,微生物可利用资源增加,可能直接影响叶际微生物定殖(González-Teuber et al., 2021)。钾离子通过进出保卫细胞调控气孔开闭,对植物气孔行为以及形态产生影响(Kumar et al., 2020)。缺钾后,油菜叶面积减小可能是由于细胞体积以及细胞间空隙减小,而对于细胞数量的变化目前尚不明确。因此,气

孔数量不改变,而叶面积降低可能导致气孔密度增加(陆志峰等, 2016),这与桉树(*Eucalyptus grandis*) (Waqas et al., 2021)中的结果类似。气孔是沟通叶表面和叶内部的重要器官,同时也是叶片水分和小分子有机物逸散的通道(王宏亮等, 2018)。有研究表明,叶表面微生物多聚集在气孔附近(De Costa et al., 2006)。不同钾营养状况下,油菜叶片密度明显不同。我们的结果表明,气孔密度影响钾缺乏时叶际微生物的群落组成。因此,进一步研究钾元素介导下的气孔运动、气孔形貌以及气孔免疫是理解钾元素影响叶际微生物变化的关键机制。

此外,钾在植物体内具有高度的流动性,能偶联蔗糖转运蛋白进行光合同化产物的运输(de Bang et al., 2021)。我们发现,缺钾后叶片可溶性糖、蔗糖、果糖以及淀粉的含量均呈降低趋势,这可能是由于田间的特殊环境造成的。本试验取样时间在12月,此时湖北武汉地区昼夜温差较大,施钾后油菜叶片的同化物合成能力远高于缺钾叶片,而耗能的呼吸作用也在夜晚受到低温抑制(苏静等, 2022),这可能导致施钾叶片光合同化物积累量大于缺钾处理。叶片内小分子有机物质是叶际微生物的直接能量来源(Wilson and Lindow, 1994; Ryffel et al., 2016)。在我们的研究中,不同钾营养状况下叶片糖组分和含量存在明显差异。因此,深入解析钾对叶片小分子有机物的影响,挖掘其对叶际微生物群落组成的调控机制具有重要意义。

不同钾营养状况下油菜叶片表型性状表现出明显差异。叶面积及叶片可溶性糖、蔗糖、果糖和淀粉的含量随叶片钾含量增加而增加,而气孔密度则相反。不同钾营养状况下油菜叶际微生物群落结构显著不同,总体表现为钾亏缺时,叶际微生物种类和多样性降低,引起黄单胞菌科富集,优势物种在群落内的相互作用降低。联合油菜叶表型性状与叶际微生物群落的研究结果,表明油菜叶片物质组成可能通过影响叶际微生物能量来源调节群落组成,是不同钾营养状况下油菜叶际微生物群落结构的主要驱动因素。施钾营造的叶际微生物“稳态”可能是钾营养增强作物生物胁迫抗性的潜在机制。

作者贡献声明

宋毅: 完成实验、撰写论文;程航航和崔鑫: 协助完

成实验; 陆志峰、李小坤、丛日环和鲁剑巍: 提供技术支持并修改文稿; 廖世鹏和张洋洋: 提供技术支持; 任涛: 构思设计实验并修改文稿。

参考文献

- 鲍士旦 (2000). 土壤农化分析(第3版). 北京: 中国农业出版社. pp. 103–109.
- 高扬 (2014). 小麦叶片表皮蜡质的测定及其对光合和农艺性状的效应分析. 硕士论文. 杨凌: 西北农林科技大学. pp. 22–23.
- 胡文诗 (2021). 钾营养调控冬油菜叶片光合面积和光合速率的机制. 博士论文. 武汉: 华中农业大学. pp. 34–53.
- 姜丹 (2009). 油菜叶际微生物多样性及其对敌敌畏的降解. 硕士论文. 石家庄: 河北科技大学. pp. 42–49.
- 刘姗 (2021). 叶际微生物地理分布格局特征及驱动机制. 硕士论文. 杭州: 浙江大学. pp. 31–46.
- 龙海, 李一农, 李芳荣, 徐浪 (2010). 植物病原菌黄单胞菌的分类研究进展. 植物保护 **36**(5), 11–16.
- 陆志峰, 鲁剑巍, 潘勇辉, 鲁飘飘, 李小坤, 丛日环, 任涛 (2016). 钾素调控植物光合作用的生理机制. 植物生理学报 **52**, 1773–1784.
- 申长卫 (2017). 施钾影响梨叶片和果实糖合成及分配的生理与分子机制. 博士论文. 南京: 南京农业大学. pp. 49–50.
- 苏静, 祝令成, 刘茜, 彭云静, 马百全, 马锋旺, 李明军 (2022). 果实糖代谢与含量调控的研究进展. 果树学报 **39**, 266–279.
- 王宏亮, 郭思义, 王棚涛, 宋纯鹏 (2018). 植物气孔发育机制研究进展. 植物学报 **53**, 164–174.
- 王凯悦, 陈芳泉, 邵惠芳, 韩丹, 许自成, 黄五星 (2018). 植物角质膜研究进展. 植物学报 **53**, 556–564.
- 吴一苓, 李芳兰, 胡慧 (2022). 叶脉结构与功能及其对叶片经济谱的影响. 植物学报 **57**, 388–398.
- 朱新广, 许大全 (2021). 光合作用研究技术. 上海: 上海科学技术出版社. pp. 176–188.
- 邹琦 (1995). 植物生理生化实验指导. 北京: 中国农业出版社. pp. 70–72.
- Arnault G, Mony C, Vandenkoornhuysen P (2023). Plant microbiota dysbiosis and the Anna Karenina principle. *Trends Plant Sci* **28**, 18–30.
- Breia R, Conde A, Badim H, Fortes AM, Gerós H, Granell A (2021). Plant SWEETs: from sugar transport to plant-pathogen interaction and more unexpected physiological roles. *Plant Physiol* **186**, 836–852.
- Chaudhry V, Runge P, Sengupta P, Doehlemann G, Parker JE, Kemen E (2021). Shaping the leaf microbiota: plant-microbe-microbe interactions. *J Exp Bot* **72**, 36–56.
- Chen T, Nomura K, Wang XL, Sohrabi R, Xu J, Yao LY, Paasch BC, Ma L, Kremer J, Cheng YT, Zhang L, Wang N, Wang ET, Xin XF, He SY (2020). A plant genetic network for preventing dysbiosis in the phyllosphere. *Nature* **580**, 653–657.
- Copeland JK, Yuan LJ, Layeghifard M, Wang PW, Guttman DS (2015). Seasonal community succession of the phyllosphere microbiome. *Mol Plant Microbe Interact* **28**, 274–285.
- Darlison J, Mogren L, Rosberg AK, Grudén M, Minet A, Liné C, Mieli M, Bengtsson T, Håkansson Å, Uhlíř E, Becher PG, Karlsson M, Alsanus BW (2019). Leaf mineral content govern microbial community structure in the phyllosphere of spinach (*Spinacia oleracea*) and rocket (*Diplotaxis tenuifolia*). *Sci Total Environ* **20**, 501–512.
- de Bang TC, Husted S, Laursen KH, Persson DP, Schjoerring JK (2021). The molecular-physiological functions of mineral macronutrients and their consequences for deficiency symptoms in plants. *New Phytol* **229**, 2446–2469.
- De Costa DM, Rathnayake RMPS, De Costa WAJM, Kumari WMD, Dissanayake DMN (2006). Variation of phyllosphere microflora of different rice varieties in Sri Lanka and its relationship to leaf anatomical and physiological characters. *J Agron Crop Sci* **192**, 209–220.
- Fürnkranz M, Wanek W, Richter A, Abell G, Rasche F, Sessitsch A (2008). Nitrogen fixation by phyllosphere bacteria associated with higher plants and their colonizing epiphytes of a tropical lowland rainforest of Costa Rica. *ISME J* **2**, 561–570.
- Gong TY, Xin XF (2021). Phyllosphere microbiota: community dynamics and its interaction with plant hosts. *J Integr Plant Biol* **63**, 297–304.
- González-Teuber M, Palma-Onetto V, Aguilera-Sammartino J, Mithöfer A (2021). Roles of leaf functional traits in fungal endophyte colonization: potential implications for host-pathogen interactions. *J Ecol* **109**, 3972–3987.
- Hou WF, Xue XX, Li XK, Khan MR, Yan JY, Ren T, Cong RH, Lu JW (2019). Interactive effects of nitrogen and potassium on: grain yield, nitrogen uptake and nitrogen use efficiency of rice in low potassium fertility soil in China. *Field Crops Res* **236**, 14–23.
- Hunter PJ, Hand P, Pink D, Whipps JM, Bending GD

- (2010). Both leaf properties and microbe-microbe interactions influence within-species variation in bacterial population diversity and structure in the lettuce (*Lactuca species*) phyllosphere. *Appl Environ Microb* **76**, 8117–8125.
- Jiang M, Wang ZS, Li XN, Liu SQ, Song FB, Liu FL** (2021). Relationship between endophytic microbial diversity and grain quality in wheat exposed to multi-generational CO₂ elevation. *Sci Total Environ* **776**, 146029.
- Kumar P, Kumar T, Singh S, Tuteja N, Prasad R, Singh J** (2020). Potassium: a key modulator for cell homeostasis. *J Biotechnol* **324**, 198–210.
- Laforest-Lapointe I, Messier C, Kembel SW** (2016). Host species identity, site and time drive temperate tree phyllosphere bacterial community structure. *Microbiome* **4**, 27.
- Li Y, Zhang ZY, Liu WY, Ke MJ, Qu Q, Zhou ZG, Lu T, Qian HF** (2021). Phyllosphere bacterial assemblage is affected by plant genotypes and growth stages. *Microbiol Res* **248**, 126743.
- Lu ZF, Ren T, Li J, Hu WS, Zhang JL, Yan JY, Li XK, Cong RH, Guo SW, Lu JW** (2020). Nutrition-mediated cell and tissue-level anatomy triggers the covariation of leaf photosynthesis and leaf mass per area. *J Exp Bot* **71**, 6524–6537.
- Mercier J, Lindow SE** (2000). Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Appl Environ Microbiol* **66**, 369–374.
- Mo YY, Peng F, Gao XF, Xiao P, Logares R, Jeppesen E, Ren KX, Xue YY, Yang J** (2021). Low shifts in salinity determined assembly processes and network stability of microeukaryotic plankton communities in a subtropical urban reservoir. *Microbiome* **9**, 128.
- Niu SQ, Gao Y, Zi HX, Liu Y, Liu XM, Xiong XQ, Yao QQ, Qin ZW, Chen N, Guo L, Yang YZ, Qin P, Lin JZ, Zhu YH** (2022). The osmolyte-producing endophyte *Streptomyces albidoflavus* OsiLf-2 induces drought and salt tolerance in rice via a multi-level mechanism. *Crop J* **10**, 375–386.
- Qi SS, Bogdanov A, Cnockaert M, Acar T, Ranty-Roby S, Coenye T, Vandamme P, König GM, Crüseemann M, Carlier A** (2021). Induction of antibiotic specialized metabolism by co-culturing in a collection of phyllosphere bacteria. *Environ Microbiol* **23**, 2132–2151.
- Reisberg EE, Hildebrandt U, Riederer M, Hentschel U** (2013). Distinct phyllosphere bacterial communities on *Arabidopsis* wax mutant leaves. *PLoS One* **8**, e78613.
- Ren T, Lu JW, Li H, Zou J, Xu HL, Liu XW, Li XK** (2013). Potassium-fertilizer management in winter oilseed-rape production in China. *J Plant Nutr Soil Sci* **179**, 429–440.
- Ritpitakphong U, Falquet L, Vimoltust A, Berger A, Métraux JP, L'Haridon F** (2016). The microbiome of the leaf surface of *Arabidopsis* protects against a fungal pathogen. *New Phytol* **210**, 1033–1043.
- Röttjers L, Faust K** (2018). From hairballs to hypotheses—biological insights from microbial networks. *FEMS Microbiol Rev* **42**, 761–780.
- Ryffel F, Helfrich EJN, Kiefer P, Peyriga L, Portais JC, Piel J, Vorholt AJ** (2016). Metabolic footprint of epiphytic bacteria on *Arabidopsis thaliana* leaves. *ISME J* **10**, 632–643.
- Sohrabi R, Paasch BC, Liber JA, He SY** (2023). Phyllosphere microbiome. *Annu Rev Plant Biol* **74**, 539–568.
- Sun AQ, Jiao XY, Chen QL, Wu AL, Zheng Y, Lin YX, He JZ, Hu HW** (2021). Microbial communities in crop phyllosphere and root endosphere are more resistant than soil microbiota to fertilization. *Soil Biol Biochem* **153**, 108113.
- Tao SQ, Zhang YX, Tian CM, Duplessis S, Zhang NL** (2022). Elevated ozone concentration and nitrogen addition increase poplar rust severity by shifting the phyllosphere microbial community. *J Fungi* **8**, 523.
- Venkatachalam S, Ranjan K, Prasanna R, Ramakrishnan B, Thapa S, Kanchan A** (2016). Diversity and functional traits of culturable microbiome members, including cyanobacteria in the rice phyllosphere. *Plant Biol* **18**, 627–637.
- Wagner MR, Lundberg DS, Del Rio TG, Tringe SG, Dangl JL, Mitchell-Olds T** (2016). Host genotype and age shape the leaf and root microbiomes of a wild perennial plant. *Nat Commun* **7**, 12151.
- Waqas M, Yaning C, Iqbal H, Shareef M, Rehman HU, Bilal HM** (2021). Synergistic consequences of salinity and potassium deficiency in quinoa: linking with stomatal patterning, ionic relations and oxidative metabolism. *Plant Physiol Biochem* **159**, 17–27.
- Wilson M, Lindow SE** (1994). Coexistence among epiphytic bacterial populations mediated through nutritional resource partitioning. *Appl Environ Microbiol* **60**, 4468–4477.
- Xiong C, He JZ, Singh BK, Zhu YG, Wang JT, Li PP, Zhang QB, Han LL, Shen JP, Ge AH, Wu CF, Zhang LM** (2021a). Rare taxa maintain the stability of crop microbiomes and ecosystem functions. *Environ Microbiol* **23**, 1907–1924.
- Xiong C, Zhu YG, Wang JT, Singh B, Han LL, Shen JP, Li PP, Wang GB, Wu CF, Ge AH, Zhang LM, He JZ** (2021b). Host selection shapes crop microbiome assembly and network complexity. *New Phytol* **229**, 1091–1104.

Zhang JL, Li J, Geng GT, Hu WS, Ren T, Cong RH, Li XK, Lu JW (2020). Combined application of nitrogen and potassium reduces seed yield loss of oilseed rape caused by *Sclerotinia* stem rot disease. *Agron J* **112**, 5143–5157.

Zhu YG, Xiong C, Wei Z, Chen QL, Ma B, Zhou SYD, Tan JQ, Zhang LM, Cui HL, Duan GL (2022a). Impacts of

global change on the phyllosphere microbiome. *New Phytol* **234**, 1977–1986.

Zhu YX, Han Y, Liu GL, Bian ZR, Yan XY, Li YY, Long HA, Yu GS, Wang Y (2022b). Novel indole-mediated potassium ion import system confers a survival advantage to the Xanthomonadaceae family. *ISME J* **16**, 1717–1729.

Potassium Nutrient Status-mediated Leaf Growth of Oilseed Rape (*Brassica napus*) and Its Effect on Phyllosphere Microorganism

Yi Song, Hanghang Chen, Xin Cui, Zhifeng Lu, Shipeng Liao, Yangyang Zhang, Xiaokun Li
Rihuan Cong, Tao Ren^{*}, Jianwei Lu

Microelement Research Center, Huazhong Agricultural University/Key Laboratory of Arable Land Conservation (Middle and Lower Reaches of Yangtze River), Ministry of Agriculture and Rural Affairs/College of Resources and Environment, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract To investigate the effect of potassium (K) nutrition on leaf growth and phyllosphere microbial community in oilseed rape (*Brassica napus*), a field experiment with three K fertilizer application rates (0, 30, and 180 kg K₂O·hm⁻²), referred to as K0 (deficient K), K30 (insufficient K), and K180 (sufficient K), was conducted. Typical leaves were selected to measure the phenotypic parameters during the seedling stage. The composition of the phyllosphere microbial community was determined using high-throughput sequencing of the 16S RNA gene. The main findings revealed K fertilization significantly affected leaf K content. Compared to the K0 treatment, the K content increased by 66.7% and 158.3% for the K30 and K180 treatment, respectively. Significant differences in the structure and components of oilseed rape leaves were observed under different K nutritional conditions. Leaf K content exhibited a significant positive correlation with leaf area, and content of soluble sugar, sucrose, fructose, and starch, while it showed a significant negative correlation with leaf stomatal density. K fertilization had a remarkable impact on the diversity of phyllosphere microbial community. K fertilization led to a significant increase in the diversity index, while no significant difference was observed between the K30 and K180 treatments. However, the K30 treatment displayed greater dispersion in terms of community β-diversity compared to the K180 treatment. K deficiency increased the relative abundance of Proteobacteria, resulting in an obvious enrichment of Xanthomonadaceae. The application of K fertilizer simplified the bacterial co-occurrence network but increased the interaction between high-abundance species and other species. A comprehensive analysis of leaf phenotypic parameters and phyllosphere bacterial communities revealed that leaf sugar components (soluble sugar, sucrose, fructose, and starch), dry matter weight, and leaf area were the key factors influencing the phyllosphere bacterial communities and dominant species. In conclusion, K fertilizer application influenced the material compositions of oilseed rape leaves and regulated the microbial community structure. The establishment of "homeostasis" within phyllosphere microbial communities by maintaining sufficient leaf K nutrition status might serve as a potential pathway for enhancing crop biological stress resistance.

Key words K nutrition, oilseed rape (*Brassica napus*), phyllosphere microorganism, stomatal density, sucrose

Song Y, Chen HH, Cui X, Lu ZF, Liao SP, Zhang YY, Li XK, Cong RH, Ren T, Lu JW (2024). Potassium nutrient status-mediated leaf growth of oilseed rape (*Brassica napus*) and its effect on phyllosphere microorganism. *Chin Bull Bot* **59**, 54–65.

* Author for correspondence. E-mail: rentao@mail.hzau.edu.cn

(责任编辑: 朱亚娜)