

· 研究论文 ·

不同熟期玉米叶片衰老特性及其对叶际细菌的影响

杨文丽^{1, 2, 3†}, 李钊^{3†}, 刘志铭², 张志华³, 杨今胜², 吕艳杰^{1, 2*}, 王永军^{1, 2*}

¹吉林农业大学农学院, 长春 130118; ²吉林省农业科学院农业资源与环境研究所/农业农村部作物生理生态与耕作重点实验室, 长春 130033; ³吉林大学植物科学学院/吉林省植物遗传改良工程实验室, 长春 130062

摘要 叶片作为植物的光合器官, 其衰老进程对于产量形成有重要影响, 但关于叶片衰老与叶际微生物之间的关系研究较少。为探讨玉米(*Zea mays*)叶片衰老过程对叶际细菌群落的影响, 以东北春玉米区3个不同熟期玉米品种(早熟品种黑科玉17 (H17)、中熟品种中单111 (Z111)和晚熟品种沈玉21 (S21))为试验材料, 从早熟品种开花期开始对3个玉米品种穗位叶进行5次取样, 测定衰老生理指标, 同时基于高通量测序技术测定叶际内源和外源细菌的群落组成。结果表明, 在生育后期, 中熟和晚熟品种的叶片含水量及过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)活性显著高于早熟品种。在门水平, 蓝菌门(Cyanobacteria)是中熟和晚熟的特有菌门; 在属水平, 玉米叶片内外源共有细菌鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、甲基杆菌属(*Methylobacterium*)和异常球菌属(*Deinococcus*)相对丰度在IV和V时期显著降低, 而内源细菌链霉菌属(*Streptomyces*)和外源细菌P3OB-42属则在衰老后期显著富集, 且3个品种变化趋势相似, 相对丰度差异显著。内外源细菌相对丰度存在显著差异, 前5位的外源细菌占60%以上, 而对内源细菌而言, 前5位仅占30%以上。叶片可溶性糖含量、光合色素含量和SOD活性与叶际细菌群落结构和丰富度显著相关。综上, 中熟和晚熟品种能有效延长叶片持绿期, 维持生育后期叶片生理活性, 延缓衰老。衰老对内源细菌群落组成和多样性的影响显著大于外源细菌, 不同熟期品种间存在显著分异的菌属, 且叶片可溶性糖含量、光合色素含量和SOD活性是影响叶际细菌群落以及优势物种的关键因子。

关键词 玉米, 熟期, 叶片衰老, 叶际细菌, 群落组成

杨文丽, 李钊, 刘志铭, 张志华, 杨今胜, 吕艳杰, 王永军 (2024). 不同熟期玉米叶片衰老特性及其对叶际细菌的影响. 植物学报 59, 1024–1040.

玉米(*Zea mays*)在保障国家粮食安全中具有重要作用(王永军等, 2019), 而叶片作为玉米的主要光合器官, 其开花后的衰老进程对于产量形成具有重要影响。在相同的气候和土壤肥力条件下, 不同熟期类型玉米的衰老特性也表现出明显差异(童淑媛等, 2009)。开花期玉米由营养生长与生殖生长并行转入生殖生长阶段, 茎叶等营养器官基本停止生长, 进入衰老阶段, 伴随着各种生理生化指标的变化, 以及营养物质(如氮、碳和糖)重新分配利用(王平, 2015)。此阶段最明显的外观表现是叶色由绿变黄、继而脱落, 在生理水平上表现为叶绿素降解和光合酶活性下降, 植物光合能力下降(李兆伟, 2014)。此外, 衰老使植物体

内活性氧积累, 启动膜脂的过氧化作用, 导致膜被损伤和破坏, 引起膜脂过氧化产物丙二醛(MDA)含量增加。超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)是活性氧清除系统的重要保护酶, 能防止膜脂过氧化, 减轻损伤, 延缓植物衰老(宋慧等, 2010; Hu et al., 2010)。

叶片不仅通过光合作用为植物生长提供所需碳水化合物, 也是一个独立的微环境域, 其上寄居着大量微生物, 包括细菌和真菌等, 这些微生物称为叶际微生物(Lindow and Brandl, 2003; Vorholt, 2012)。叶际微生物可通过与寄主植物的互作调控植物生理代谢, 包括改变宿主微环境、促进植物生长(Rastogi et al., 2013; Bulgarelli et al., 2013)、生物固氮(Murty, 1983;

收稿日期: 2024-03-09; 接受日期: 2024-05-27

基金项目: 吉林省科技发展计划(No.20220508096RC)、国家重点研发计划(No.2023YFD2301703)、现代农业产业技术体系(No.CARS-02-19)和国家自然科学基金(No.U23A6001-01)

† 共同第一作者

* 通讯作者。E-mail: lvyanjie_1977@163.com; yjwang2004@126.com

Fürnkranz et al., 2008)、防御病害和降解环境污染物(Yutthammo et al., 2010)等。植物发育阶段对植物微生物组组装具有重要影响(Zhang et al., 2018; Xiong et al., 2021)。在植物衰老过程中, 叶片内环境如营养成分(碳、可溶性蛋白和可溶性糖)含量、含水量、叶绿素含量和酶活性等发生变化, 影响叶际微生物的群落组成和丰富度(Hunter et al., 2010; Naveed et al., 2014; 宋毅等, 2024)。侯乾(2020)发现, 生育后期微生物菌群发生显著变化。绿弯菌门(*Chloroflexi*)在开花期迅速积累, 酸杆菌门(*Actinobacteria*)参与土壤碳循环并能够降解复杂的植物衍生多糖, 在马铃薯(*Solanum tuberosum*)收获期相对丰度显著增高(颜朗等, 2020)。Zhang等(2018)发现, 水稻(*Oryza sativa*)分蘖期后, 硝化螺旋菌丰度显著增高, 表明水稻可能积极招募这些细菌调节氮循环, 维持生育后期的生理活性。

前人研究表明, 光合细菌能够提高光合色素含量(苏品等, 2021)以及植物体内的抗氧化酶(POD和SOD)活性, 避免植物体内活性氧过量引起损伤(赵国盛等, 2018), 从而延缓衰老。此外, 一些固氮菌可通过生物固氮、促进养分吸收和产生植物激素等方式促进植物生长, 提高作物产量(Canfield et al., 2010)。因此, 叶际微生物既可以从宿主植株叶片中获取生存所必需的能量和营养物质, 又可以通过自身代谢产物或信号物质影响植株的生长发育。

早熟品种的生长周期较短, 适应性更强; 而晚熟品种生育后期叶片持绿时间长, 有利于延长光合有效持续期, 提高全生育期光能利用率和作物产量(Borrel et al., 2000)。不同熟期类型玉米叶片衰老形态具有明显差异, 但这些差异是否影响微生物的群落结构, 且内外源微生物间是否有差异尚未见报道。本研究以早熟、中熟和晚熟3个玉米品种为试验材料, 选择5个取样点测量叶片生理指标, 同时采集叶际细菌。采用高通量测序技术对叶际内外源细菌进行测序, 探究品种和生育期与玉米叶际细菌群落结构的关系, 并将叶际细菌与叶片生理生化指标进行相关性分析, 为深入理解不同熟期类型玉米叶际细菌与叶片衰老之间的关系提供新思路。

1 材料与方法

1.1 试验设计与叶片采集

试验于2022年在吉林省农业科学院公主岭试验站

(124°49'E, 43°31'N, 海拔201 m)开展, 该地属温带大陆性季风气候, 年均日照时数2 867小时, 全年活动积温2 885°C, 年均无霜期146天。该区域种植制度为一年一熟, 土壤类型为黑土。供试品种为早熟玉米品种黑科玉17 (*Zea mays* L. cv. 'H17'), 活动积温约1 900°C; 中熟品种中单111 (Z111), 活动积温约2 650°C; 晚熟品种沈玉21 (S21), 活动积温3 000°C左右。采取常规垄作种植, 种植密度为60 000株·hm⁻², 于5月15日播种, 9月30日收获。从早熟品种黑科玉17吐丝期开始对各品种取样, 后每隔20天取样, 共取5次, 即I (0天, 此时H17为吐丝期, Z111和S21雄穗完全抽出)、II (7天, 此时Z111和S21为吐丝期, H17处于吐丝末期)、III (27天, 此时Z111和S21为乳熟期, H17处于蜡熟期)、IV (47天, 此时Z111和S21为凹陷期, H17处于成熟期)和V (67天, 此时Z111和S21处于成熟期, H17植株茎叶脱水严重, 全部变黄)。取样前佩戴口罩及一次性无菌手套, 不同小区间更换一次性手套, 并使用乙醇棉球对剪刀进行消毒。每个小区随机选取5株玉米, 剪取长度约30 cm的穗位叶中部叶片。将采集到的样品用液氮运输, 并立即对样品内、外源微生物进行分离, 之后放入-80°C冰箱冷冻保存。

1.2 叶片生理生化指标测定

(1) 抗氧化酶活性

称取0.2 g叶片材料, 置于预冷的研钵中, 用液氮冷冻粉碎, 研磨时加0.05 mol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH7.8)和少量石英砂冰浴研磨至匀浆(研磨时, 先加入2 mL磷酸缓冲液, 研磨至匀浆后用1 mL磷酸缓冲液冲洗3次), 移至离心管中, 于4°C下5 000 xg离心30分钟, 上清液即为所需酶液。超氧化物歧化酶(SOD)活性用氮蓝四唑法测定(陈建勋和王晓峰, 2015), 过氧化物酶(POD)活性用愈创木酚显色法测定(Hernández et al., 2000); 叶片膜脂过氧化产物丙二醛(MDA)含量用硫代巴比妥酸法测定(Velikova et al., 2000)。

(2) 可溶性蛋白含量

采用考马斯亮蓝G-250法(张志良和瞿伟菁, 2003)测定可溶性蛋白(soluble protein)。以标准牛血清蛋白为标准样品。

(3) 可溶性糖含量

采用蒽酮比色法测定可溶性糖(soluble sugar)含量

(张志良和瞿伟菁, 2003), 用蔗糖含量制作标准曲线。

(4) 全碳

将叶片在70°C下烘干至恒重, 称量干重, 计算相对含水量。将烘干的叶片磨碎过筛(100目), 用碳氮分析仪(Elementar-TOC & Water Analysis, Germany)测定叶片全碳(total carbon, TC)。

(5) 叶片含水量

先称量叶片鲜重, 然后烘干至恒重, 称量叶片干重, 计算相对含水量。

(6) 叶绿素含量

用7 mm打孔器打10片圆叶, 用95%乙醇溶液黑暗下提取48小时, 采用分光光度计测定其在665、649和470 nm下的吸光值(OD值), 根据公式计算叶绿素a(chlorophyll a)、叶绿素b(chlorophyll b)和类胡萝卜素(carotenoids)含量。

1.3 叶片指数及衰老变化特征分析

在玉米开花期, 选取每个品种长势一致的植株5株, 做好标记, 每10天测量标定植株展开叶的叶长(L)和叶宽(W)。

单叶叶面积(LA) ($\text{cm}^2 \cdot \text{株}^{-1}$) = $L \times W \times 0.75$;

叶面积指数(leaf area index, LAI) = (LA × 整株叶片数 × 单位土地面积内的株数) / 单位土地面积。

叶片衰老性状参数: 用曲线方程 $y = ae^{b-cx} / (1 + e^{b-cx})$ 描述叶片衰老的变化过程, 其中y为某一时刻的相对绿叶面积(relative green leaf area, RGLA) (%), x为抽丝后天数, 参数a为RGLA的理论初始值, b与叶片衰老的启动有关, c与叶片衰老的速度有关。成熟期相对绿叶面积(relative green leaf area at maturity, RGLAM) (%) = 成熟期绿叶面积 / 吐丝期绿叶面积; RGLA最大衰减速率 $V_{\max} = c/4$; 出现最大绿叶衰减速率的时间 $T_{\max} = b/c$ 。

1.4 叶际微生物DNA提取

参考马玉颖和褚海燕(2021)以及熊超等(2021)的提取方法分离并收集内外源微生物细胞。将10–15 g叶片放入含150 mL无菌缓冲液(0.1 mol·L⁻¹磷酸钾缓冲液, 含0.1%甘油和0.15% Tween 80, pH7.0)的250 mL无菌玻璃瓶中。在40 kHz下超声1分钟, 然后在每分钟200转的摇床上振荡4分钟, 对微生物细胞进行收集, 该过程重复2–3次。接着将含有微生物细胞的缓冲液

用0.22 μm滤膜过滤, 收集外源微生物细胞。最后, 在超净工作台上用无菌剪刀将滤膜剪碎后使用PowerSoil DNA提取试剂盒, 按照说明书进行DNA提取。将去除表面大部分微生物细胞后的植物叶片用无菌水洗净, 然后进行消毒。主要步骤: 先放入70%乙醇中浸泡5分钟, 再放入5.25%次氯酸钠溶液中浸泡5分钟, 然后放入70%乙醇中浸泡30秒, 最后用无菌水清洗至少5次, 避免乙醇残留。使用无菌研钵在液氮中研磨叶片至粉末状, 称取0.4 g样品, 使用PowerSoil DNA提取试剂盒按照说明书提取DNA。

1.5 16S rRNA基因的高通量测序

借助Illumina Miseq测序平台对150个样品内源细菌16S rRNA基因的V5–V7区进行测序, 扩增细菌引物为799F: 5'-AACMGGATTAGATACCCKG-3', 1193R: 5'-ACGTCACCCACCTTCC-3'; 对外源细菌16S rRNA基因的V3–V4区进行测序, 扩增细菌引物序列为338F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3', 806R: 5'-GGA-CTCHVGGGTWCTAAT-3'。扩增程序: 98°C2分钟; 98°C15秒, 55°C30秒, 72°C30秒, 25–30个循环; 72°C5分钟。PCR反应体系: 5 μL 5× buffer缓冲液, 5 μL 5× GC buffer, 2 μL dNTP (2.5 μmol·L⁻¹), 1 μL上游引物(10 μmol·L⁻¹), 1 μL下游引物(10 μmol·L⁻¹), 2 μL DNA模板, 0.25 μL Q5DNA聚合酶, 用ddH₂O补足至25 μL。PCR扩增产物用2%琼脂糖凝胶电泳进行检测, 再将PCR扩增回收产物进行荧光定量PCR检测。根据检测结果, 按照测序量需求对各样本的纯化产物以相应比例混合, 进行上机前纯化和测序分析。

1.6 数据统计分析

采用SPSS 20.0软件对叶片生理生化指标和多样性指数进行单因素方差检验。采用Graphpad prism 8作图。首先使用QIIME2 dada2和Vsearch软件对原始序列进行质控、去噪和拼接。利用Greengenes数据库(Release 13.8, <http://greengenes.secondgenome.com/>), 使用Vsearch分类器对扩增子序列变体(amplicon sequence variant, ASV)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。使用R软件包的VennDiagram包和plotrix包绘制ASV分类水平的维恩图; 使用QIIME2软件计算Alpha多样性指数, 采

用Graphpad prism 8作图。使用R脚本进行样本群落组成差异的主坐标分析(principal co-ordinate analysis, PCoA)和作图。根据Pearson相关系数绘制热图, 以确定微生物群落结构与叶片生理生化指标间的关系。

2 结果与分析

2.1 不同熟期玉米品种叶片衰老特性

中熟和晚熟品种的单株叶面积高于早熟品种(图1A), 叶面积指数随着时间的推移呈下降趋势(图1C)。3个品种的衰老特性分析表明, 中熟品种Z111和晚熟品种S21的RGLAM与早熟品种H17相比分别提高0.97倍和1.28倍(表1)。早熟品种叶片衰老启动时间(T_s)和相对绿叶面积最大衰减速率出现的时间(T_{max})最早, 分别为10.88天和51.2天, 而中熟品种和晚熟品种分别为11.20天和54天、12.30天和57.8天; 并且相对绿叶面积的平均衰老速率(V_m)和最大衰减速率(V_{max})均大于中熟和晚熟品种, 分别比中熟品种高23.30%和10.75%, 比晚熟品种高34.45%和25.61%。生育后期, 熟期越晚的品种穗位叶绿叶面积持续期越长(图1B)。

2.2 不同熟期玉米品种叶片生理生化指标分析

比较不同品种及生育期玉米叶片理化指标的变化。结果表明, 随着生育期的推进, 光合色素含量和含水量总体呈下降趋势(图2)。早熟品种(H17)的POD和SOD活性持续下降, 中熟(Z111)和晚熟(S21)品种呈现先增高后降低趋势, POD活性在IV时期最大, SOD活性在II时期达到最高点。MDA含量在III时期后呈上升趋势, 且各时期间差异显著。叶片可溶性蛋白含量先升高后降低, 在III时期达到最大值, 之后显著下降。可溶性糖含量总体呈上升趋势。叶片含水量呈逐渐下降趋势, 早熟品种在III时期, 中熟和晚熟在IV时期含水量显著降低。TC随着生育期推进呈逐渐下降趋势, 早熟品种各时期间差异显著, 中熟和晚熟品种各生育期间无显著差异。

对同一发育时期的不同品种进行比较, 发现在IV和V时期, 中熟(Z111)和晚熟(S21)品种的叶绿素a含量较早熟品种(H17)分别高9.07%和11.01%; 叶绿素b含量较早熟品种(H17)分别高16.36%和15.35%。晚熟品种(S21)类胡萝卜素含量在生育后期显著高于早

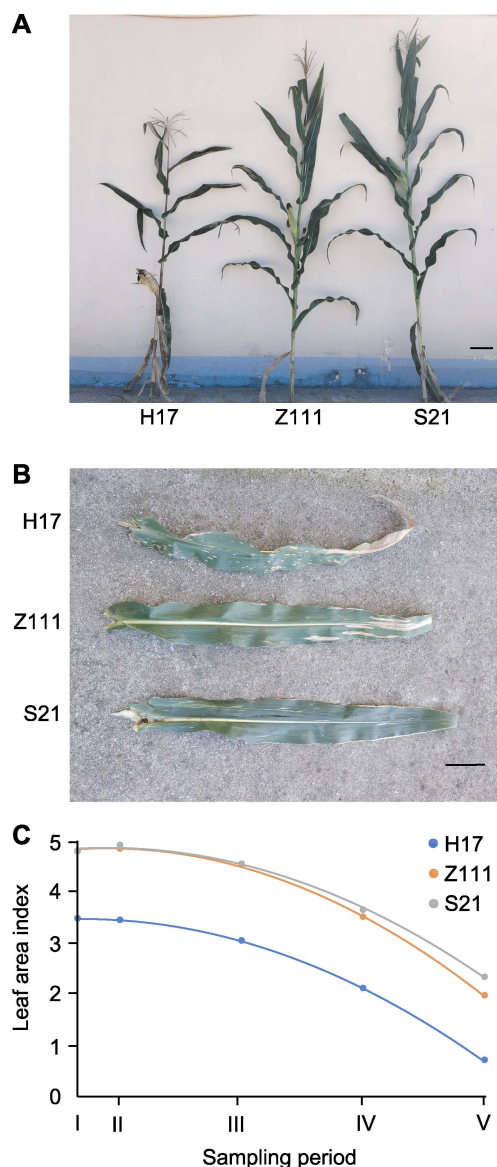


图1 三个玉米品种叶片在不同取样时间的表型 (A) IV取样时间点的玉米整株(bar=20 cm); (B) IV取样时间点的穗位叶(bar=10 cm); (C) 不同时期叶面积指数的变化

Figure 1 Leaf phenotype of three maize varieties at different sampling times

(A) Whole maize plant at the sampling time point IV (bar=20 cm); (B) Ear leaf at the sampling time point IV (bar=10 cm); (C) Changes in leaf area index at different sampling period

熟品种(H17)和中熟品种(Z111)。SOD和POD活性各品种大小排序为Z111>S21>H17, 其中中熟品种(Z111)的SOD和POD活性较早熟品种(H17)分别高80.39%和89.72%; 晚熟品种(S21)的SOD和POD活性较早熟品种(H17)分别高33.13%和58.04%。在IV

表1 三个玉米品种的叶片衰老特性

Table 1 Leaf senescence characteristics of three maize varieties

Hybrids	Senescence equation	Fit coefficient (R^2)	Senescence traits parameter				
			RGLAM (%)	V_m (%)	V_{max} (%)	T_s (days)	T_{max} (days)
H17	$y=e^{4.2169-0.0823x}/(1+e^{4.2169-0.0823x})$	0.9918	20.60	1.19	2.06	10.88	51.2
Z111	$y=e^{4.0155-0.0744x}/(1+e^{4.0155-0.0744x})$	0.9935	40.69	0.89	1.86	11.20	54.0
S21	$y=e^{3.7835-0.0655x}/(1+e^{3.7835-0.0655x})$	0.9954	47.61	0.78	1.64	12.30	57.8

RGLAM: 成熟期相对绿叶面积; V_m : 平均衰老速率; V_{max} : 最大衰减速率; T_s : 衰老启动时间; T_{max} : 最大衰减速率出现时间

RGLAM: Relative green leaf area at maturity; V_m : Average senescence rate; V_{max} : Maximum attenuation rate; T_s : Senescence initiation time; T_{max} : The time at which the maximum decay rate occurs

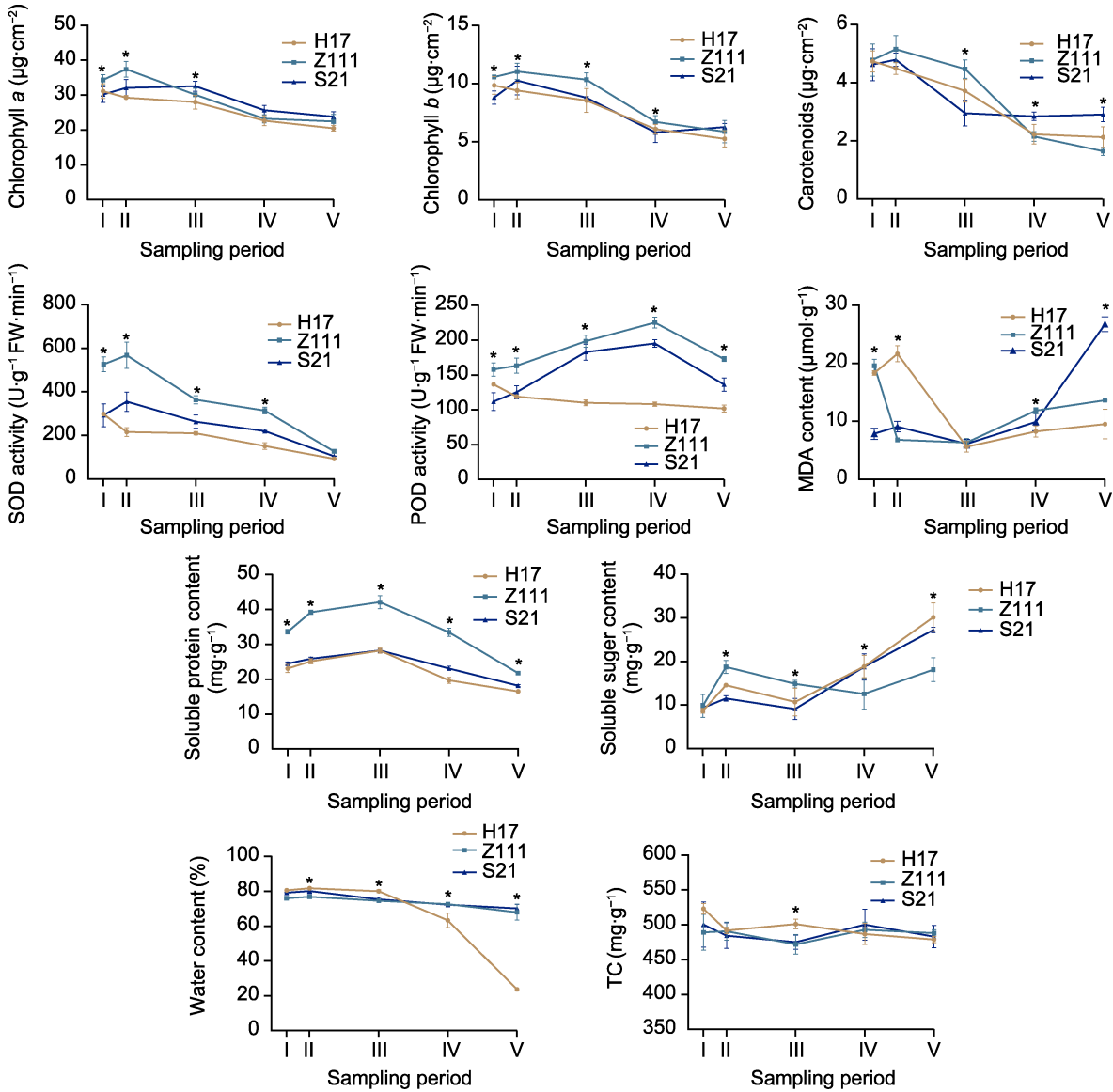


图2 三个不同玉米品种叶片生理生化指标分析

SOD: 超氧化物歧化酶; POD: 过氧化物酶; MDA: 丙二醛; TC: 全碳。* 表示在同一取样时期3个品种间差异显著($P < 0.05$)。

Figure 2 Analysis of leaf physiological and biochemical indexes of three maize varieties

SOD: Superoxide dismutase; POD: Peroxidase; MDA: Malondialdehyde; TC: Total carbon. * indicate significant differences among the three varieties at the same sampling period ($P < 0.05$).

和V时期, 中熟(Z111)和晚熟(S21)品种的可溶性蛋白含量较早熟品种(H17)分别高52.53%和13.97%, 叶片含水量较早熟品种(H17)分别高61.64%和63.71%。在生育后期, 中熟和晚熟品种叶片含水量、POD和SOD活性显著高于早熟品种, 活性氧清除能力增强, 维持了生育后期叶片的生理活性。此外, 3个玉米品种在IV时期叶片表型差异明显(图1B), 表明3个品种衰老变化差异显著。

2.3 不同熟期玉米品种叶片在不同发育时期微生物的变化规律

对玉米5个发育时期叶片微生物进行高通量测序, 测序结果经质控过滤后, 共获得内源细菌6 414 176条reads, 经reads拼接过滤后共得到4 894 791条高质量序列(clean tags), 每个样本中clean tags数为36 151–122 887; 获得外源细菌5 185 741条reads, 经reads拼接过滤后共得到4 068 900条高质量序列, 每个样本中clean tags数为43 531–67 952。

获得内源细菌共4 466个扩增子序列变体ASV, 外源细菌7 121个ASV。不同样品在不同发育时期内源和外源细菌ASV总数都不相同(图3A, B), 总体呈先上升后下降的趋势。在III时期, 3个品种内源细菌ASV数量(465、820和731)和外源细菌ASV数量(899、785和742)均达到最大。将3个品种5个时期共有ASV进行韦恩分析, 表明3个品种内源细菌共有ASV为17个(图3C), 外源细菌共有ASV为76个(图3D), 外源细菌共有ASV数量显著高于内源细菌。

基于测序结果, 分别计算不同熟期玉米品种在不同发育时期叶际细菌群落多样性指数Chao 1和Shannon (图3E–H)。结果表明衰老后期玉米叶际细菌群落的丰度降低。与III时期相比, IV时期内源和外源细菌群落的丰富度和多样性均显著降低。通过PCoA分析进一步明确不同熟期玉米品种在不同生育期叶际细菌群落的差异性和相似性。不同熟期玉米品种在不同生育期的叶际细菌群落间存在显著差异(附图1, 附图2)。随着衰老进程的推进, 同一品种各发育时期明显不同; 在同一时期下, 3个品种间外源细菌群落的离散度大于内源细菌。上述结果表明, 本研究中玉米的生长发育阶段是影响叶际细菌群落组成的主要因素。

2.4 不同熟期玉米品种叶片在不同发育时期的微生物群落组成

基于Pearson相关系数分析不同玉米品种各生长时期叶片微生物组间的相关性(图4)。结果表明, 随着生育期的推进, 叶片外源细菌群落结构在III时期开始稳定, 且各时期相关性较高, 而内源细菌各时期间差异较大, 特别是V时期与其它时期的菌群相关性均较低, 且各时期间的相关性低于外源细菌, 3个品种在各时期相关系数有差异, 但变化趋势相似。这表明不同生育期对玉米细菌群落结构的影响大于品种间差异, 且对内源细菌的影响大于外源细菌。

为进一步探究不同熟期玉米品种在不同生育时期特定微生物群落组成的变化, 我们比较了3个品种及5个生育时期的细菌门和属水平相对丰度(图5)。一些优势菌属在IV或V时期变化显著; 在门水平上, 细菌优势菌门为放线菌门(Actinobacteria, 3.63%–69.60%)、变形菌门(Proteobacteria, 16.94%–79.89%)和拟杆菌门(Bacteroidetes, 0.01%–15.96%), 其丰度占总体菌门丰度的90%以上。其中, 在外源细菌中, 栖热菌门(Thermus)在H17中显著富集, Deinococcus-Thermus和蓝菌门(Cyanobacteria)在Z111和S21中显著富集(图5A, B)。

在属水平上, 3个品种内源细菌优势菌属为鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*, 0.03%–34.61%)、甲基杆菌属(*Methylobacterium*, 0.00%–25.95%)、异常球菌属(*Deinococcus*, 0.00%–14.19%)、角质杆菌属(*Cutibacterium*, 2.61%–55.31%)和假单胞菌属(*Pseudomonas*, 1.83%–23.39%), 其丰度占总体内源细菌丰度的32.51%–83.21% (图5C)。外源细菌优势菌属为鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*, 8.07%–35.01%)、甲基杆菌属(*Methylobacterium*, 16.02%–58.83%)、异常球菌属(*Deinococcus*, 5.44%–37.47%)、薄层菌属(*Hymenobacter*, 2.59%–26.35%)和微杆菌属(*Microbacterium*, 2.52%–10.57%), 其丰度占总体外源细菌丰度的63.35%–93.61% (图5D)。鞘氨醇单胞菌属、甲基杆菌属和异常球菌属为内、外源细菌共有优势属, 在各时期间差异显著, 3个品种在I、II和III时期细菌相对丰度显著大于IV和V时期。内外源细菌也有特异菌属, 特别是后期更为显著, 在V时期, 3个品种内源细菌链霉菌属(*Streptomyces*, 20.04%–32.05%)显著增加(图5E); 在IV和V时期, 3

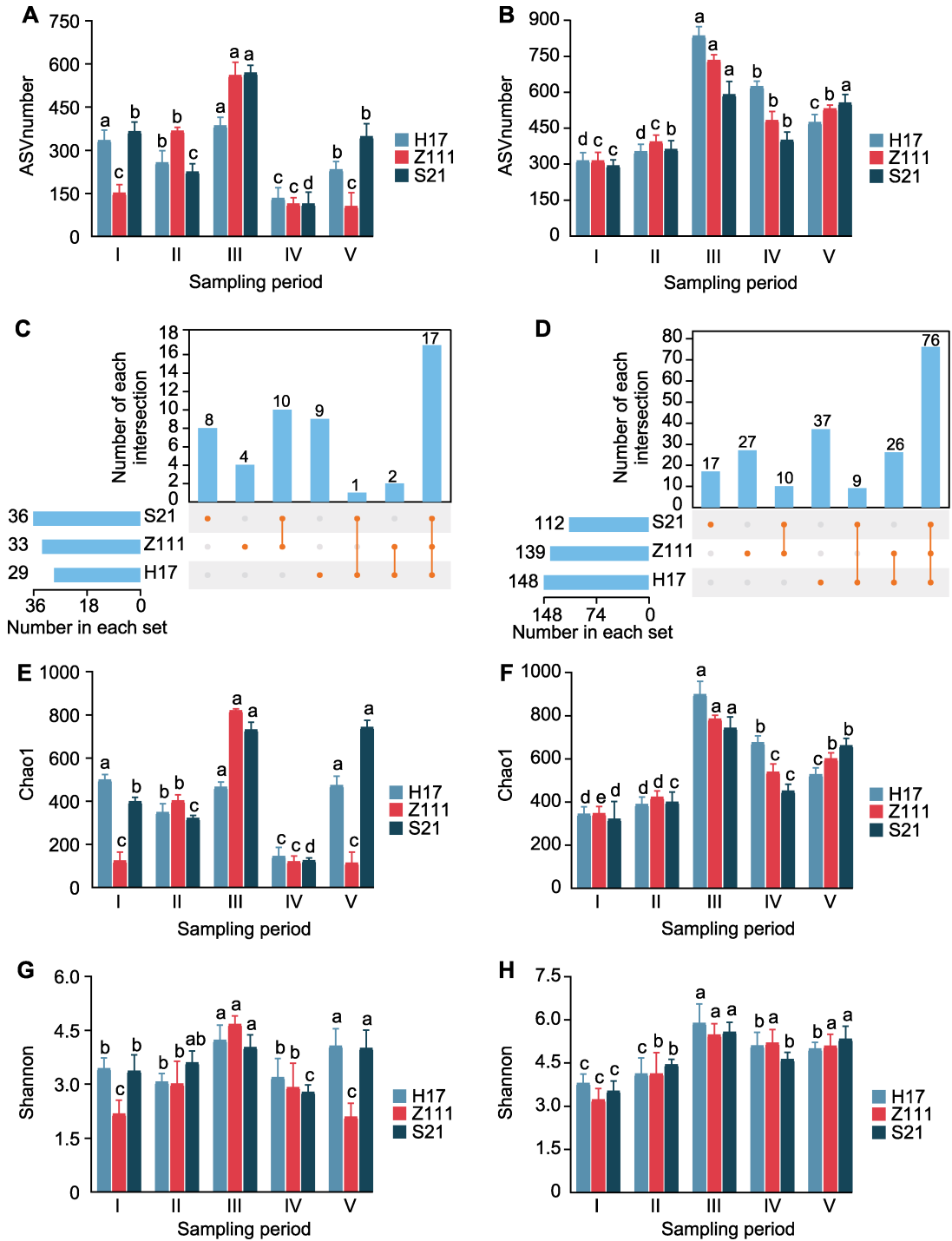


图3 三个玉米品种叶片在不同发育时期叶际微生物的变化

(A) 不同样品中内源细菌扩增子序列变体(ASVs)总数; (B) 不同样品中外源细菌ASVs总数; (C) 不同样品中内源细菌共有ASVs; (D) 不同样品中外源细菌共有ASVs; (E) 不同样品中内源细菌群落Chao1多样性指数; (F) 不同样品中外源细菌群落Chao1多样性指数; (G) 不同样品中内源细菌群落Shannon多样性指数; (H) 不同样品中外源细菌群落Shannon多样性指数。不同小写字母表示同一品种不同发育时期期间差异显著($P < 0.05$)。

Figure 3 Changes of leaf microorganisms of three maize varieties in different development periods

(A) Total number of endogenous bacterial amplicon sequence variants (ASVs) in different samples; (B) Total number of exoge-

nous bacterial ASVs in different samples; (C) Endogenous bacterial shared ASVs in different samples; (D) Exogenous bacterial shared ASVs in different samples; (E) Chao1 diversity index of endogenous bacterial communities in different samples; (F) Chao1 diversity index of exogenous bacterial communities in different samples; (G) Shannon's diversity index of endogenous bacterial communities in different samples; (H) Shannon's diversity index of exogenous bacterial communities in different samples. Different lowercase letters indicate significant differences among different development periods of the same species ($P < 0.05$).

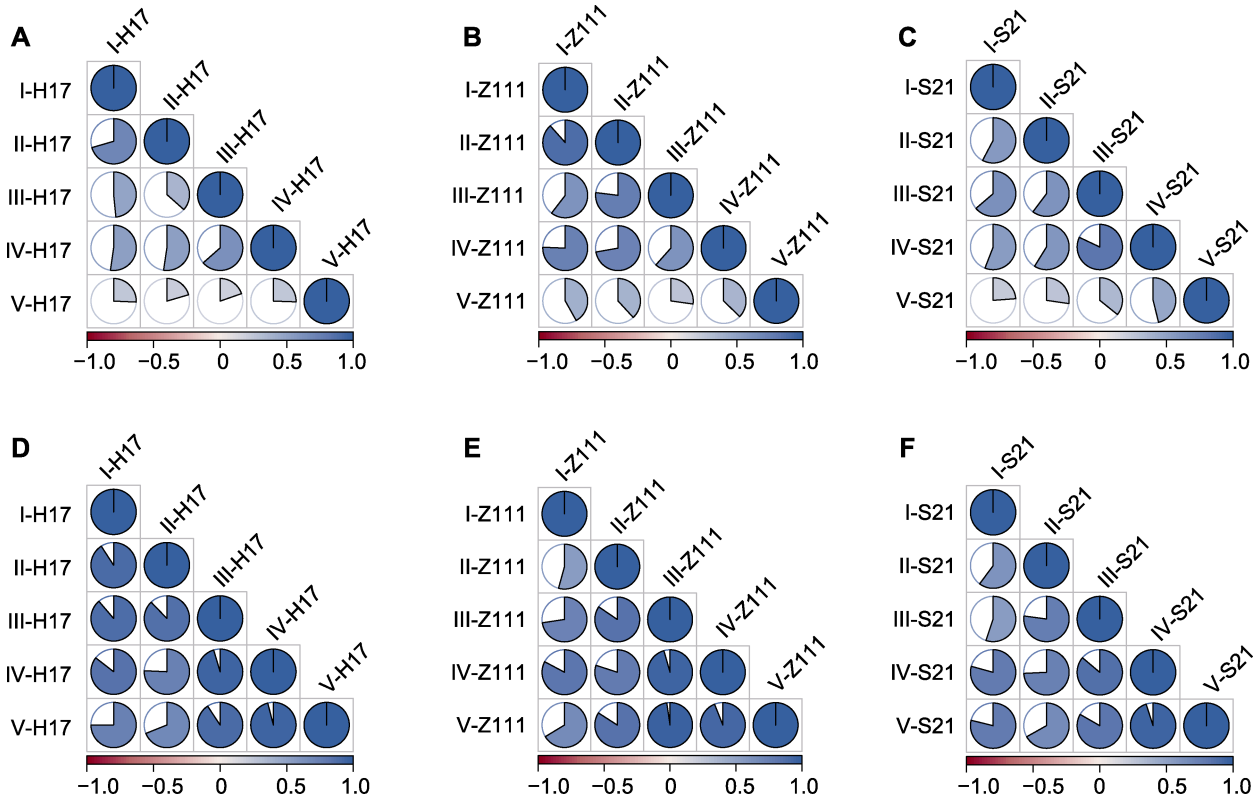


图4 不同熟期品种玉米在不同发育时间点叶际微生物群落间的相关性
(A)–(C) 三个玉米品种叶际内源细菌群落的相关性; (D)–(F) 三个玉米品种叶际外源细菌群落的相关性。饼状图和颜色代表Pearson相关系数值。

Figure 4 Correlation among leaf microbial communities of three maize varieties at different development time points
(A)–(C) Correlation of endogenous bacterial communities in leaves of three maize varieties; (D)–(F) Correlation of exogenous bacterial communities in leaves of three maize varieties. Pie charts and colors represent Pearson correlation coefficient values.

个品种外源细菌 *P3OB-42* 均显著增加(图5F)。

2.5 不同熟期玉米品种叶片在不同发育时期的微生物共现网络差异

不同熟期玉米在不同生育期叶际细菌共现网络结果(表2, 表3; 附图3, 附图4)显示, 相对于III时期, 内源细菌在V时期和外源细菌在IV和V时期, 玉米叶片内、外源细菌网络总节点数、总连线数和密度显著降低, 表明衰老后期玉米的网络规模相对较小, 其网络结构比较简单, 生态关联性弱。其中, 外源细菌的共现网

络比内源细菌复杂, 说明种群间联系更为密切。平均路径长度是影响物种间物质、信息和能量传递效率的重要参数, 平均路径越短, 传递效率越高。本研究构建的生态网络中, V时期玉米叶片内、外源细菌的平均网络路径长度变短, 表明衰老后期玉米叶片对外界环境的敏感性和响应速度提高。

在分子生态网络中, 连接强度是衡量物种对微生物群落稳定性贡献程度的重要指标, 连接强度在网络中表现最高的被定义为核心节点(Eiler et al., 2012), 又被认为是关键物种。玉米叶片内、外源细菌在属水

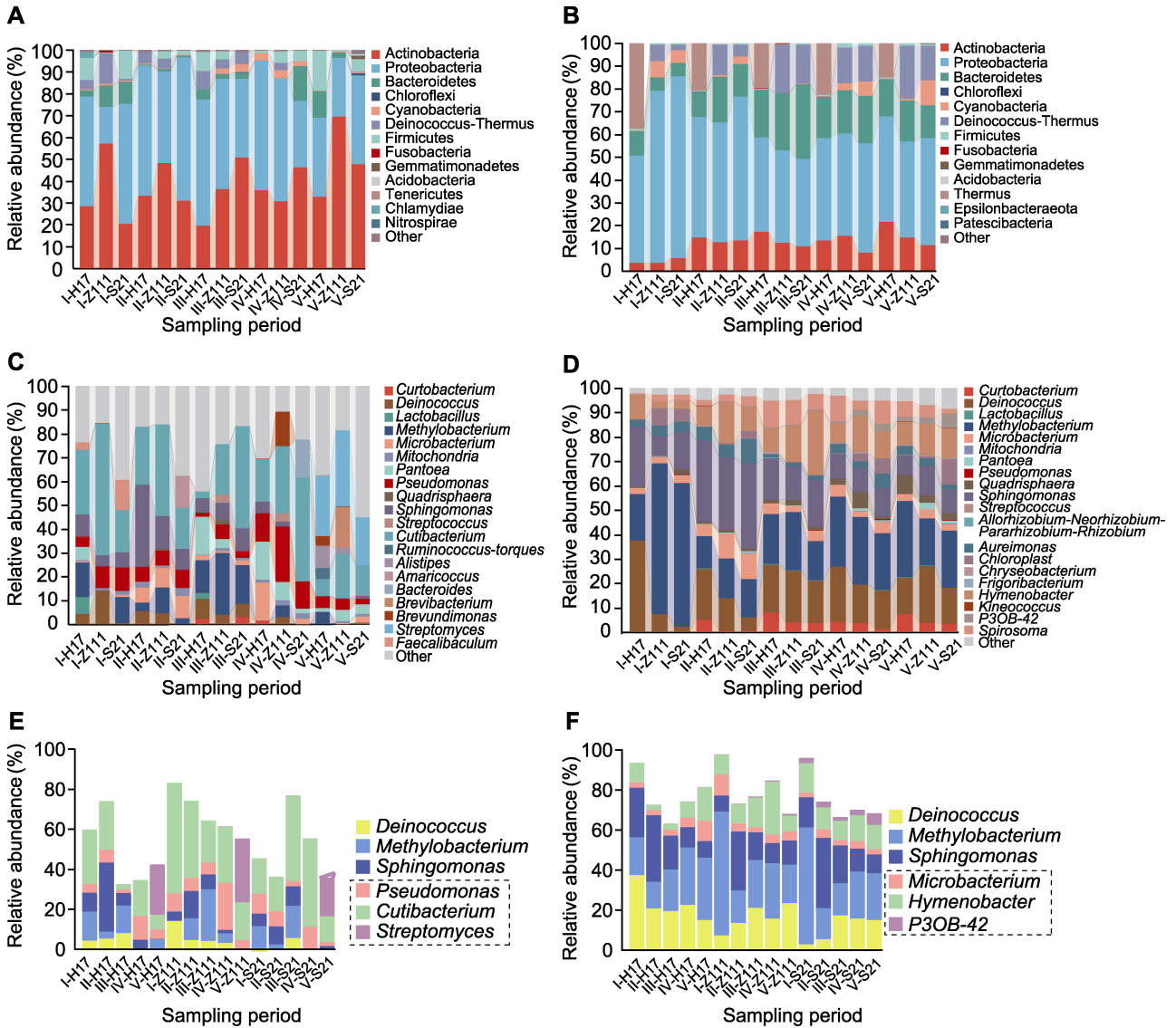


图5 三个玉米品种叶片微生物群落组成

(A) 内源细菌门水平群落组成; (B) 外源细菌门水平群落组成; (C) 内源细菌属水平群落组成; (D) 外源细菌属水平群落组成; (E) 内源细菌属水平优势群落组成(虚线框内表示特异优势菌属, 虚线框外表示与外源细菌共有的优势菌属); (F) 外源细菌属水平优势群落组成(虚线框内表示特异优势菌属, 虚线框外表示与内源细菌共有的优势菌属)。

Figure 5 Leaf microbial community composition of 3 maize varieties at different maturity stages

(A) The community composition of endogenous bacteria at the phylum level; (B) The community composition of exogenous bacteria at the phylum level; (C) The community composition of endogenous bacteria at the genus level; (D) The community composition of exogenous bacteria at the genus level; (E) Composition of horizontally dominant communities of endogenous bacterial genera (the dashed box indicate specific dominant genera, and outside the dashed box indicate dominant genera shared with exogenous bacteria); (F) Composition of horizontally dominant communities of exogenous bacterial genera (the dashed box indicate specific dominant genera, and outside the dashed box indicate dominant genera shared with endogenous bacteria).

平上连接强度分析结果表明, *Actinobacteria*、*Proteobacteria*、*Bacteroidetes*、*Deinococcus-Thermus* 和 *Cyanobacteria* 是主要的关键细菌门, 占所有关键细

菌门的90%以上(附图3, 附图4)。在属水平, *Sphingomonas*、*Methylobacterium*、*Deinococcus*、*Cutibacterium*、*Pseudomonas* 和 *Streptomyces* 等是内源细菌

表2 三个玉米品种在不同时期(I-V)内源细菌共现网络属性参数**Table 2** Properties of endogenous bacterial co-occurrence network attributes in three maize varieties at different periods (I-V)

Samples	Nodes	Edges	Density	Average path length
I-H17	14	20	0.235	1.812
I-Z111	19	27	0.171	2.417
I-S21	19	32	0.222	2.625
II-H17	22	40	0.253	2.633
II-Z111	18	31	0.298	2.252
II-S21	21	34	0.258	2.717
III-H17	25	46	0.275	2.771
III-Z111	29	41	0.329	2.256
III-S21	27	37	0.278	2.820
IV-H17	21	38	0.202	2.157
IV-Z111	22	30	0.125	2.160
IV-S21	22	34	0.184	2.638
V-H17	15	22	0.195	1.447
V-Z111	18	28	0.185	1.707
V-S21	19	33	0.122	1.612

表3 三个玉米品种在不同时期(I-V)外源细菌共现网络属性参数**Table 3** Properties of exogenous bacterial co-occurrence network attributes in three maize varieties at different periods (I-V)

Samples	Nodes	Edges	Density	Average path length
I-H17	63	184	0.039	2.466
I-Z111	65	160	0.040	2.937
I-S21	53	130	0.037	2.445
II-H17	77	212	0.045	2.101
II-Z111	84	289	0.048	1.993
II-S21	89	371	0.056	2.161
III-H17	150	632	0.056	3.481
III-Z111	138	599	0.065	3.483
III-S21	136	605	0.067	3.300
IV-H17	120	321	0.051	3.139
IV-Z111	95	144	0.037	2.676
IV-S21	81	125	0.049	2.743
V-H17	85	127	0.033	2.559
V-Z111	92	127	0.031	2.595
V-S21	74	117	0.040	2.632

的关键菌属。*Sphingomonas*、*Methylobacterium*、*Deinococcus*、*Pseudomonas*、*Hymenobacter*、*Microrobacterium*和*Pantoea*等是外源细菌的关键菌属;其中*P3OB-42*是IV和V时期的特有关键菌属菌(附图4)。

2.6 不同熟期玉米品种叶片在不同发育时期生理生化指标与叶际细菌的关系

叶片细菌多样性与叶片生理生化指标的相关性分析表明,内源细菌和外源细菌的Chao1指数与Shannon指数均呈极显著正相关,内源细菌的Chao1指数与叶绿素a和叶绿素b含量呈显著正相关(图6A)。外源细菌的Chao1指数与MDA含量呈显著负相关;Shannon指数与SOD活性、MDA含量和类胡萝卜素含量呈显著负相关。同时,通过Mantel test分析发现,玉米内源细菌群落结构与可溶性糖含量和光合色素含量显著相关;外源细菌群落结构与SOD活性和光合色素含量显著相关(图6B)。

进一步分析玉米叶片细菌属分类水平相对丰度前20的菌属与叶片生理生化指标的相关关系(图6C, D),结果表明内源细菌*Cutibacterium*与POD和SOD活性呈显著正相关;*Deinococcus*与SOD活性以及可溶性蛋白和光合色素含量呈显著正相关,与可溶性糖含量呈显著负相关;*Methylobacterium*与可溶性蛋白和叶绿素b含量呈显著正相关;*Sphingomonas*与光合色素含量呈显著正相关;*Streptococcus*与POD活性和可溶性蛋白含量呈显著正相关;*torques-group*和*Alistipes*与可溶性糖含量呈显著正相关,与含水量呈显著负相关;*Quadrisphaera*与可溶性蛋白含量呈显著正相关;*Lactobacillus*与TC含量呈显著正相关。*Sphingomonas*与光合色素含量呈显著正相关。外源细菌*Curtobacterium*和*Frigoribacterium*与SOD活性和光合色素含量呈显著负相关;*Hymenobacter*与POD活性呈显著正相关;*P3OB-42*与可溶性糖含量呈显著正相关,与光合色素含量呈显著负相关;*Pantoea*与类胡萝卜素含量呈显著负相关;*Quadrisphaera*与可溶性糖含量呈显著正相关,与含水量和光合色素呈显著负相关;*Streptococcus*与POD活性呈显著负相关;*Spirosoma*与SOD活性和MDA含量呈显著负相关;*Kineococcus*与POD、SOD活性、含水量、可溶性蛋白和光合色素含量呈显著负相关,与可溶性糖含量呈显著正相关。

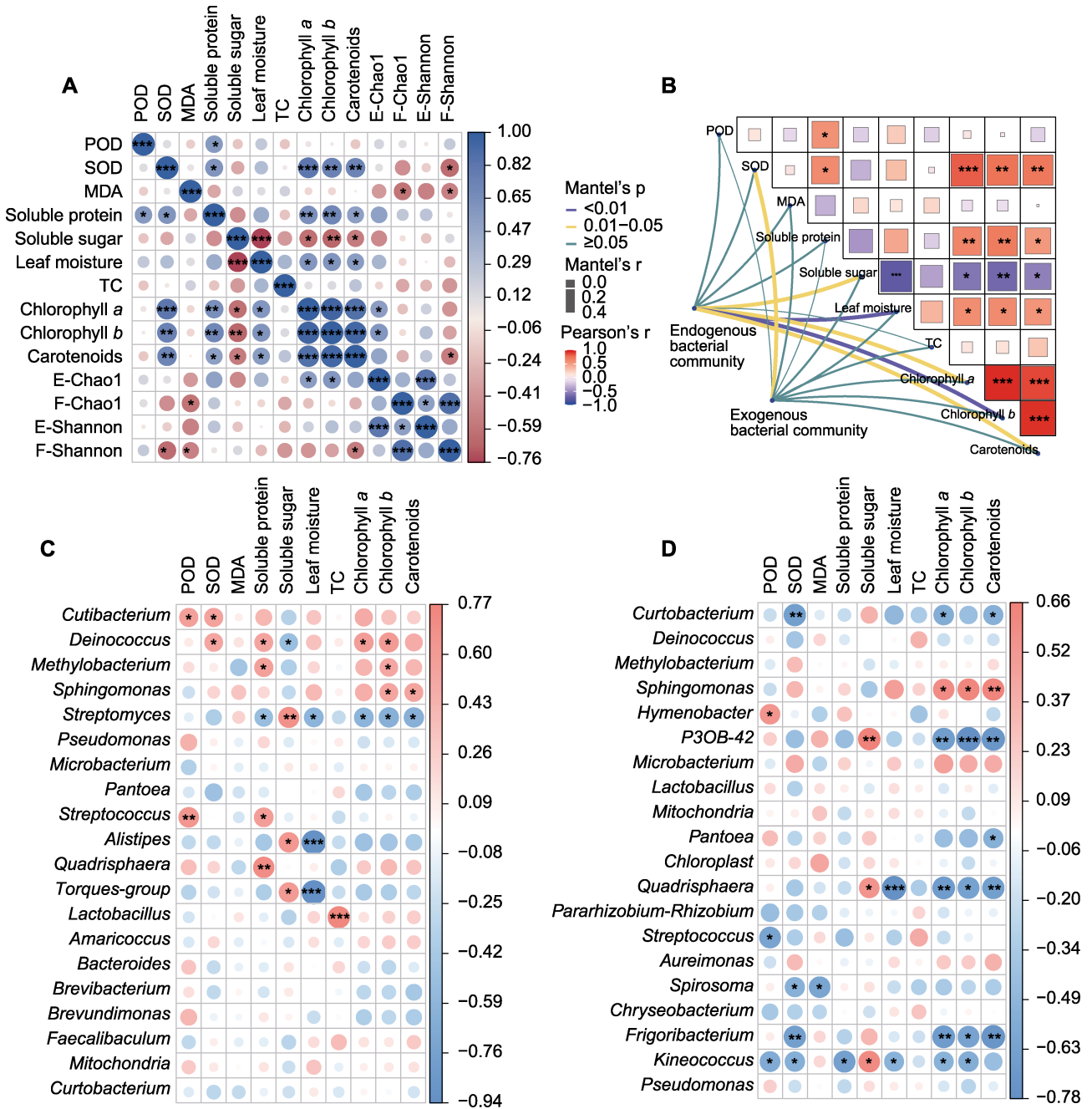


图6 三个玉米品种在不同生育期叶片理化性质与叶际微生物的关系

(A) 叶片理化性质与细菌多样性的相关性(E: 内源; F: 外源); (B) 叶片理化性质与叶片内源和外源细菌群落结构的Mantel相关关系; (C) 内源细菌优势物种与叶片理化性质的相关性分析; (D) 外源细菌优势物种与叶片理化性质的相关性分析。POD、SOD、MDA和TC同图2。*、**和***分别表示在0.05、0.01和0.001水平上差异显著。

Figure 6 Relationships between leaf physicochemical properties and phyllosphere microorganisms of three maize varieties at different reproductive stages

(A) Correlation between leaf physicochemical properties and bacterial diversity (E: Endogenous; F: Exogenous); (B) Mantel correlation between leaf physicochemical properties and leaf endogenous and exogenous bacterial community structure; (C) Correlation analysis between endogenous bacterial dominant species and leaf physicochemical properties; (D) Correlation analysis between exogenous bacterial dominant species and leaf physicochemical properties. POD, SOD, MDA and TC are the same as shown in Figure 2. *, **, and *** indicate significant differences at 0.05, 0.01, and 0.001 levels, respectively.

3 讨论与结论

3.1 不同熟期玉米品种叶片衰老特性

叶片是绿色植物进行光合作用的主要器官, 衰老导致光合效率降低(Rogers, 2017), 并伴随各种生理生化指标的变化, 以及营养物质(如氮和糖)的重新分配利用, 在生理水平上表现为叶绿素和蛋白质等含量下降, 膜脂过氧化加剧, 光合磷酸化能力降低等。叶片功能早衰严重影响作物结实率(段俊等, 1997)。国内外许多学者认为, 可通过延迟玉米叶片衰老、维持叶片绿色和延长叶片光合时间等途径来提高和延长花后群体光合速率(刘开昌等, 2003)。本研究表明, 玉米在III时期之后进入速衰阶段, 各项生理指标发生显著变化。而中熟和晚熟品种能维持后期较高的叶片生理活性和抗氧化能力, 延长叶片持绿期, 延缓衰老。可溶性蛋白是植物氮素的主要存在形式, 前期其含量增加为籽粒碳、氮化合物积累奠定基础, III时期后进入灌浆阶段, 因向籽粒运输含氮化合物, 导致叶片可溶性蛋白含量呈下降趋势(王惠贞等, 2014)。SOD和POD是活性氧清除系统的重要保护酶, 能有效阻止体内超氧阴离子自由基(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)、羟基自由基($\cdot OH$)及单线态氧(1O_2)等积累, 防止膜脂过氧化, 减轻损伤, 延缓植物衰老(宋慧等, 2010; Hu et al., 2010)。本研究发现, 生育后期, 中熟(Z111)和晚熟(S21)品种的抗氧化酶活性显著大于早熟品种(H17), 说明中熟和晚熟品种能通过清除活性氧减轻膜脂过氧化以延缓衰老。在生育后期, 叶片叶绿素a和b含量为晚熟(S21)>中熟(Z111)>早熟(H17), 叶片类胡萝卜素含量为晚熟(S21)也显著高于中熟和早熟品种, 表明晚熟品种可能通过延长叶片持绿期, 维持后期较高的光合色素进而延缓衰老。可溶性糖作为光合作用的产物, 是植物非结构性碳的重要组分, 衰老期植物体内的一部分淀粉分解成可溶性糖, 以增大细胞的渗透压而维持水分。在生育后期, 早熟品种(H17)的可溶性糖含量最高, 而含水量显著降低, 表明早熟品种(H17)可能通过增加可溶性糖含量来抵抗干旱胁迫。

3.2 不同熟期玉米品种叶片在不同生育时期叶际细菌群落变化与生理生化指标的关系

植物叶片内、外源微生物群落在促进植物生长和健康中发挥重要作用(Ren et al., 2015)。大量研究表明,

生境、生育期、植被类型和宿主植物基因型与微生物互作等影响微生物群落结构(Redford et al., 2010; Vorholt, 2012)。本研究通过二代测序分析了玉米叶片内、外源细菌群落结构, 发现品种和生育期均能对植物的细菌群落结构产生影响。

本研究中, 生育后期玉米叶片出现明显的焦枯黄化特征, 极大影响微生物定殖。生育后期玉米叶片细菌鞘氨醇单胞菌属、甲基杆菌属和异常球菌属等有益微生物的相对丰度显著降低。甲基杆菌属和鞘氨醇单胞菌属是最常见的能够进行光合作用的细菌(Su et al., 2017; Luo et al., 2019; Cheng et al., 2022)。光合细菌通过含有细菌叶绿素的光合反应中心进行光合作用。鞘氨醇单胞菌属适应性强, 主要次级代谢产物为威兰胶和类胡萝卜素(刘辉等, 2023), 可分解复杂有机物(芳香化合物)(张科等, 2020), 降解大气中的有机污染物(Kolvenbach and Corvini, 2012), 帮助植物抵抗细菌病原体。本研究发现, 鞘氨醇单胞菌属与叶绿素和类胡萝卜素含量呈显著正相关。另外, V时期晚熟品种S21类胡萝卜素含量和内源鞘氨醇单胞菌属相对丰度均显著高于早熟和中熟品种, 暗示鞘氨醇单胞菌属的存在可能增加叶片类胡萝卜素的含量。异常球菌属的热稳定性高, 含有多种抗氧化酶, 具有超强的抗氧化保护机制, 对电离辐射、紫外线、长期干燥和氧化损伤等具有超强抗性, 可提高作物的抗旱能力和对盐胁迫的耐受性(Morano et al., 2012; 刘盈盈等, 2015)。在V时期, 中熟品种Z111外源异常球菌属相对丰度较高, 而SOD活性较低, 暗示异常球菌属的存在可能提高了叶片的抗氧化能力。叶片衰老导致活性氧积累, 叶绿素降解和光合酶活性下降, 植物光合能力下降, 有益微生物相对丰度减少。链霉菌属能够产生抗生素、抗真菌药、酶(几丁质酶、葡聚糖酶和蛋白酶)和其它生物活性代谢物(Chen et al., 2018), 这些代谢物能防治真菌病害, 还能产生吲哚乙酸(IAA)等活性物质, 促进植物生长发育(Goudjal et al., 2013)。本研究中, V时期3个品种链霉菌属丰度显著升高, 暗示其对维持叶际细菌的稳态具有重要作用(图7)。

微生物群落多样性分析表明, 与III时期相比, IV和V时期, 内源细菌群落的丰富度和多样性, 以及外源细菌的丰富度均显著降低。通过网络分析, 同样发现衰老后期玉米的网络规模相对较小, 其网络结构比较简单, 生态关联性弱。此时的叶际细菌群落可

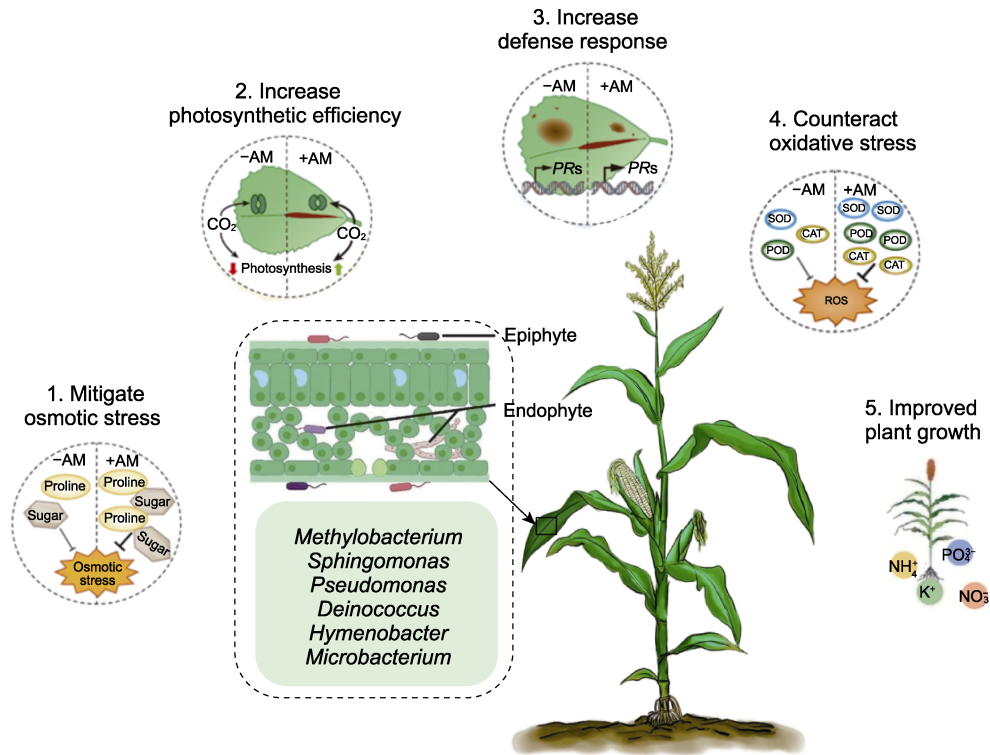


图7 细菌优势物种与叶片互作延缓衰老
ROS: 活性氧

Figure 7 Bacterial dominant species interact with leaves to delay senescence
ROS: Reactive oxygen species

能处于相对不稳定状态(Arnault et al., 2023), 这极大地增加了病原菌入侵的机会, 最终可能导致植株病害发生。生育后期叶际细菌的物种组成和多样性明显降低, 且叶片内源细菌的下降程度远大于外源细菌。在第V期, 6种外源细菌仍占68%以上, 而这些细菌与抗氧化和光合色素合成有关, 说明在生育后期, 玉米叶片招募更多的外源有益细菌抵抗衰老。

近年来, 微生物作为生物肥料与生物农药, 逐步被商品化并运用于农业生产实践。对于作物高效栽培而言, 微生物肥料与生物农药具有低成本、环保、高效改良土壤和增加作物产量的优点, 在国家农业绿色发展战略中具有重要作用(周萌等, 2023)。植物叶片作为主要的光合器官, 叶际微生物对于维持叶片的正常生理功能具有重要作用, 其变化与生育期、植被类型、宿主植物基因型和微生物互作等因素密切相关。本研究表明, 在玉米吐丝后20–27天微生物群落丰度和生理指标达到一个较高水平, 之后开始下降。在生

育阶段甲基杆菌属、鞘脂单胞菌属、异常球菌属及链霉菌属作为优势菌属发挥重要作用, 但其作用机理尚不明确, 还需要进行功能验证。在此基础上, 未来的玉米生产中, 在功能菌群变化的拐点时间喷施相应的微生物菌剂, 维持叶际微生物的稳态, 从而延长叶片功能期, 提高光合效率, 增强抗逆性, 进而实现增产目标。

作者贡献声明

杨文丽: 完成实验, 分析数据, 撰写论文; 李钊: 共同设计研究框架, 指导实验操作和数据分析, 帮助修改论文; 刘志铭: 指导实验操作, 提供技术支持; 张志华和杨今胜: 指导修改论文; 王永军和吕艳杰: 指导论文选题, 提供资金支持, 审阅论文。

参考文献

Arnault G, Mony C, Vandenkoornhuyse P (2023). Plant

- microbiota dysbiosis and the Anna Karenina Principle. *Trends Plant Sci* **28**, 18–30.
- Borrell AK, Hammer GL, Henzell RG** (2000). Does maintaining green leaf area in sorghum improve yield under drought? II. Dry matter production and yield. *Crop Sci* **40**, 1037–1048.
- Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, van Themaat EVL, Schulze-Lefert P** (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu Rev Plant Biol* **64**, 807–838.
- Canfield DE, Glazer AN, Falkowski PG** (2010). The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. *Science* **330**, 192–196.
- Chen JX, Wang XF** (2015). *Experimental Guide to Plant Physiology*. Guangzhou: South China University of Technology Press. pp. 72–73. (in Chinese)
- 陈建勋, 王晓峰** (2015). *植物生理学实验指导*. 广州: 华南理工大学出版社. pp. 72–73.
- Chen YF, Zhou DB, Qi DF, Gao ZF, Xie JH, Luo YP** (2018). Growth promotion and disease suppression ability of a *Streptomyces* sp. CB-75 from banana rhizosphere soil. *Front Microbiol* **8**, 2704.
- Cheng JE, Su P, Zhang ZH, Zheng LM, Wang ZY, Hamid MR, Dia JP, Du XH, Chen LJ, Zhai ZY, Kong XT, Liu Y, Zhang DY** (2022). Metagenomic analysis of the dynamical conversion of photosynthetic bacterial communities in different crop fields over different growth periods. *PLoS One* **17**, e0262517.
- Duan J, Liang CY, Huang YW** (1997). Studies on leaf senescence of hybrid rice at flowering and grain formation stage. *Acta Phytophysiol Sin* **23**, 139–144. (in Chinese)
- 段俊, 梁承邨, 黄毓文** (1997). 杂交水稻开花结实期间叶片衰老. *植物生理学报* **23**, 139–144.
- Eiler A, Heinrich F, Bertilsson S** (2012). Coherent dynamics and association networks among lake bacterioplankton taxa. *ISME J* **6**, 330–342.
- 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.
- Goudjal Y, Toumatia O, Sabaou N, Barakate M, Mathieu F, Zitouni A** (2013). Endophytic actinomycetes from spontaneous plants of Algerian Sahara: indole-3-acetic acid production and tomato plants growth promoting activity. *World J Microbiol Biotechnol* **29**, 1821–1829.
- Hernández JA, Jiménez A, Mullineaux P, Sevilla F** (2000). Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell Environ* **23**, 853–862.
- Hou Q** (2020). The Rhizosphere Microbial Diversity During the Growth Period of Continuous Cropping Potato and the Effect of Fertilization. Master's thesis. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. pp. 13–17. (in Chinese)
- 侯乾** (2020). 连作马铃薯全生育期根际微生物多样性研究及施肥对其的影响. 硕士论文. 北京: 中国农业科学院. pp. 13–17.
- Hu TT, Yuan LN, Wang JF, Kang SZ, Li FS** (2010). Antioxidation responses of maize roots and leaves to partial root-zone irrigation. *Agric Water Manage* **98**, 164–171.
- 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 Microbiol* **76**, 8117–8125.
- Kolvenbach BA, Corvini PFX** (2012). The degradation of alkylphenols by *Sphingomonas* sp. strain TTNP3—a review on seven years of research. *New Biotechnol* **30**, 88–95.
- Li ZW** (2014). The Expression Alteration of Various Genes Related to Sugar Metabolism in Senescing Leaves and Its Antioxidation Modulation for *es/* Mutant. PhD dissertation. Hangzhou: Zhejiang University. pp. 17–25. (in Chinese)
- 李兆伟** (2014). 水稻叶片早衰突变体的糖代谢基因表达与抗氧化生理调控. 博士论文. 杭州: 浙江大学. pp. 17–25.
- Lindow SE, Brandl MT** (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Appl Environ Microbiol* **69**, 1875–1883.
- Liu H, Wei LL, Zhu LF, Wei H, Bai YX, Liu XL, Li SB** (2023). Research progress of *Sphingomonas*. *Microbiol China* **50**, 2738–2752. (in Chinese)
- 刘辉, 韦璐璐, 朱龙发, 韦豪, 白云霞, 刘小玲, 李树波** (2023). 鞘氨醇单胞菌的研究进展. *微生物学通报* **50**, 2738–2752.
- Liu KC, Wang QC, Zhang HS, Feng K** (2003). Advance in research of physiological mechanism and genetic traits of stay-green of maize. *Shandong Agric Sci* **35**(2), 48–51. (in Chinese)
- 刘开昌, 王庆成, 张海松, 冯凯** (2003). 玉米叶片保绿性生理机理及遗传特性研究进展. *山东农业科学* **35**(2), 48–51.
- Liu YY, Zhang C, Jiang SJ, Zhou ZF, Chen M, Zhang W, Wang J** (2015). Functional analysis of *drB0118* gene in response to abiotic stress in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiol China* **42**, 1474–1481. (in Chinese)

- 刘盈盈, 张陈, 江世杰, 周正富, 陈明, 张维, 王劲 (2015). 非生物胁迫下耐辐射异常球菌 *drB0118* 基因功能分析. *微生物学通报* **42**, 1474–1481.
- Luo LY, Wang P, Zhai ZY, Su P, Tan XQ, Zhang DY, Zhang Z, Liu Y (2019). The effects of *Rhodopseudomonas palustris* PSB06 and CGA009 with different agricultural applications on rice growth and rhizosphere bacterial communities. *AMB Express* **9**, 173.
- Ma YY, Chu HY (2021). Field sampling and sample storage of wheat-associated microbiomes. Bio-101 e2003668. doi: 10.21769/BioProtoc. 2003668. (in Chinese)
- 马玉颖, 褚海燕 (2021). 小麦相关微生物的野外采样与样品保存. Bio-101 e2003668. doi: 10.21769/BioProtoc. 2003668.
- Morano KA, Grant CM, Moye-Rowley WS (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **190**, 1157–1195.
- Murty MG (1983). Nitrogen fixation (acetylene reduction) in the phyllosphere of some economically important plants. *Plant Soil* **73**, 151–153.
- Naveed M, Mitter B, Reichenauer TG, Wieczorek K, Sesitsch A (2014). Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by *Burkholderia phytofirmans* PsJN and *Enterobacter* sp. FD17. *Environ Exp Bot* **97**, 30–39.
- Rastogi G, Coaker GL, Leveau JHJ (2013). New insights into the structure and function of phyllosphere microbiota through high-throughput molecular approaches. *FEMS Microbiol Lett* **348**, 1–10.
- Redford AJ, Bowers RM, Knight R, Linhart Y, Fierer N (2010). The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. *Environ Microbiol* **12**, 2885–2893.
- Ren GD, Zhu CW, Alam MS, Tokida T, Sakai H, Nakamura H, Usui Y, Zhu JG, Hasegawa T, Jia ZJ (2015). Response of soil, leaf endosphere and phyllosphere bacterial communities to elevated CO₂ and soil temperature in a rice paddy. *Plant Soil* **392**, 27–44.
- Rogers HJ (2017). Leaf senescence. *Encycl Appl Plant Sci (Second Ed)* **1**, 308–314.
- Song H, Feng BL, Gao XL, Gao JF, Wang PK, Chai Y, Zhang PP (2010). Leaf senescence and reactive oxygen metabolism in different adzuki bean cultivars (lines). *Acta Agron Sin* **36**, 347–353. (in Chinese)
- 宋慧, 冯佰利, 高小丽, 高金锋, 王鹏科, 柴岩, 张盼盼 (2010). 不同小豆品种(系)叶片衰老与活性氧代谢. *作物学报* **36**, 347–353.
- 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. (in Chinese)
- 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.
- Su P, Tan XQ, Li CG, Zhang DY, Cheng J, Zhang SB, Zhou XG, Yan QP, Peng J, Zhang Z, Liu Y, Lu XY (2017). Photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas palustris* GJ-22 induces systemic resistance against viruses. *Microb Biotechnol* **10**, 612–624.
- Su P, Zhang DY, Zhang Z, Chen A, Cheng JE, Zeng J, Tan SY, Dai JP, Liu Y (2021). Dissection on the agronomical functions of photosynthetic bacteria. *Chin J Biol Control* **37**, 30–37. (in Chinese)
- 苏品, 张德咏, 张卓, 陈昂, 程菊娥, 曾军, 谭石勇, 戴建平, 刘勇 (2021). 光合细菌的农用微生物功能解读. *中国生物防治学报* **37**, 30–37.
- Tong SY, Song FB, Xu HW (2009). Differences of morphological senescence of leaves in various maize varieties during mature period of seed. *Acta Agric Boreali-Sin* **24**, 11–15. (in Chinese)
- 童淑媛, 宋凤斌, 徐洪文 (2009). 不同品种玉米籽粒成熟期间叶片形态衰老的差异. *华北农学报* **24**, 11–15.
- Velikova V, Yordanov I, Edreva A (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci* **151**, 59–66.
- Vorholt JA (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nat Rev Microbiol* **10**, 828–840.
- Wang HZ, Zhao HL, Feng YX, Jiang L, Ning DK, Xie LY, Lin ED (2014). Response of soluble substances content in flag leaves during late growth stage and plant productivity of rice to elevated CO₂ in North China. *Acta Agron Sin* **40**, 320–328. (in Chinese)
- 王惠贞, 赵洪亮, 冯永祥, 姜乐, 宁大可, 谢立勇, 林而达 (2014). 北方水稻生育后期剑叶可溶性物质含量及植株生产力对CO₂浓度增高的响应. *作物学报* **40**, 320–328.
- Wang P (2015). Regulation of Leaf Senescence by Exogenous Melatonin and Functional Analysis of Related Autophagy Genes in *Malus*. PhD dissertation. Yangling: Northwest A&F University. pp. 16–23. (in Chinese)
- 王平 (2015). 外源褪黑素对苹果叶片衰老的调控及相关自噬基因的功能分析. 博士论文. 杨凌: 西北农林科技大学.

pp. 16–23.

- Wang YJ, Lü YJ, Liu HT, Bian SF, Wang LC** (2019). Integrated management of high-yielding and high nutrient efficient spring maize in Northeast China. *Sci Agric Sin* **52**, 3533–3535. (in Chinese)
- 王永军, 吕艳杰, 刘慧涛, 边少锋, 王立春 (2019). 东北春玉米高产与养分高效综合管理. *中国农业科学* **52**, 3533–3535.
- Xiong C, He JZ, Zhang LM** (2021). DNA extraction, amplification and source-tracking analysis for plant microbiomes. Bio-101 e2003695. doi: 10.21769/BioProtoc. 2003695. (in Chinese)
- 熊超, 贺纪正, 张丽梅 (2021). 植物微生物组DNA提取扩增及溯源分析. Bio-101 e2003695. doi: 10.21769/Bio-Protoc. 2003695.
- Xiong C, Singh BK, He JZ, Han YL, Li PP, Wan LH, Meng GZ, Liu SY, Wang JT, Wu CF, Ge AH, Zhang LM** (2021). Plant developmental stage drives the differentiation in ecological role of the maize microbiome. *Microbiome* **9**, 171.
- Yan L, Zhang YZ, Qing Y, Fang ZR, Lai XJ** (2020). Community rhythms of rhizosphere microbiome during the whole life cycle of potato. *Acta Microbiol Sin* **60**, 246–260. (in Chinese)
- 颜朗, 张义正, 清源, 方志荣, 赖先军 (2020). 马铃薯全生育期内根际微生物组变化规律. *微生物学报* **60**, 246–260.
- Yutthammo C, Thongthammachat N, Pinphanichakarn P, Luepromchai E** (2010). Diversity and activity of PAH-degrading bacteria in the phyllosphere of ornamental plants. *Microb Ecol* **59**, 357–368.
- Zhang JY, Zhang N, Liu YX, Zhang XN, Hu B, Qin Y, Xu HR, Wang H, Guo XX, Qian JM, Wang W, Zhang PF, Jin T, Chu CC, Bai Y** (2018). Root microbiota shift in rice correlates with resident time in the field and developmental stage. *Sci China Life Sci* **61**, 613–621.
- Zhang K, Li Z, Zheng Y, Ma HX, Liu MH, Ding HJ, Wang Y, Liu L, Xia XC** (2020). Biodiversity of culturable moderate halophilic bacteria of rock salt in Yexian county, Henan province. *Microbiol China* **47**, 3987–3997. (in Chinese)
- 张科, 李臻, 郑瑶, 麻红星, 刘梦含, 丁慧杰, 王瑜, 刘丽, 夏西超 (2020). 河南叶县岩盐可培养中度嗜盐菌的多样性. *微生物学通报* **47**, 3987–3997.
- Zhang ZL, Qu WJ** (2003). The Experimental Guide for Plant Physiology, 3rd edn. Beijing: Higher Education Press. pp. 67–159. (in Chinese)
- 张志良, 瞿伟菁 (2003). 植物生理学实验指导(第3版). 北京: 高等教育出版社. pp. 67–159.
- Zhao GS, Zhang DY, Liu Y, Su P** (2018). Application prospect of photosynthetic bacteria in inducing plant system resistance. *Guizhou Agric Sci* **46**(11), 53–56. (in Chinese)
- 赵国盛, 张德咏, 刘勇, 苏品 (2018). 光合细菌在植物诱导系统抗性中的应用前景. *贵州农业科学* **46**(11), 53–56.
- Zhou M, Zhang JJ, Luo Y** (2023). The mechanism, current status and prospects of microbial fertilizers. *Chin Agric Sci Bull* **39**(33), 68–75. (in Chinese)
- 周萌, 张嘉俊, 罗洋 (2023). 微生物肥料的作用机理、现状及展望. *中国农学通报* **39** (33), 68–75.

附图 1 基于 Bray-Curtis 距离的内源细菌群落的主坐标分析(PCoA)

Appendix figure 1 Principal coordinate analysis (PCoA) of endogenous bacterial communities based on Bray-Curtis distance

附图 2 基于 Bray-Curtis 距离的外源细菌群落的主坐标分析(PCoA)

Appendix figure 2 Principal coordinate analysis (PCoA) of exogenous bacterial communities based on Bray-Curtis distance

附图 3 三个玉米品种内源细菌在 5 个时间点(I–V)的共现网络分析

Appendix figure 3 Co-occurrence network analysis of endogenous bacteria in three maize varieties at five time points (I–V)

附图 4 三个玉米品种外源细菌在 5 个时间点(I–V)的共现网络分析

Appendix figure 4 Co-occurrence network analysis of exogenous bacteria in three maize varieties at five time points (I–V)

<https://www.chinbullbotany.com/fileup/1674-3466/PDF/24-037-1.pdf>

Senescence Characteristics of Maize Leaves at Different Maturity Stages and Their Effect on Phyllosphere Bacteria

Wenli Yang^{1, 2, 3†}, Zhao Li^{3†}, Zhiming Liu², Zhihua Zhang³, Jinsheng Yang²
Yanjie Lü^{1, 2*}, Yongjun Wang^{1, 2*}

¹College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; ²Key Laboratory of Crop Physiology, Ecology and Tillage, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Institute of Agricultural Resources and Environment, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China; ³Jilin Plant Genetic Improvement Engineering Laboratory/School of Plant Science, Jilin University, Changchun 130062, China

Abstract Leaf, as a photosynthetic organ of crops, its senescence process has an important impact on yield formation, but the relationship between leaf senescence and phyllosphere microorganisms has been less studied. In order to explore the impact of the senescence process of maize leaves on the phyllosphere bacterial community, this study used three maize varieties of different maturity time (early-maturation variety Heike Yu 17 (H17), mid-maturation variety Zhongdan 111 (Z111), and late-maturation variety Shen Yu 21 (S21) in Northeast China as the experimental materials, and the leaves of the ear position of the three maize varieties were sampled five times starting from the blooming stage of early-maturation varieties, and the physiological indexes of senescence were determined. And at the same time, the community composition of endogenous and exogenous bacteria in/on the leaves was determined based on high-throughput sequencing technology. The results showed that at the late reproductive stage, leaf water content, POD and SOD activities were significantly higher in the mid- and late-maturation varieties than in the early-maturation varieties. At the phylum level, Cyanobacteria were endemic to mid- and late-maturation cultivars; at the genus level, the relative abundance of the endogenous shared bacteria *Sphingomonas*, *Methylobacterium*, and *Deinococcus* in maize leaves decreased significantly at later stages of maturation (IV and V). The relative abundance of endogenous bacteria *Streptomyces* and exogenous bacteria *P3OB-42* were significantly enriched in the late senescence period, with similar trends and significant differences in relative abundance among the three species. The relative abundance of endogenous and exogenous bacteria differed significantly, with the top 5 exogenous bacteria accounting for more than 60%, while for endogenous bacteria, the top 5 accounted for only more than 30%. Soluble sugar content, photosynthetic pigment content and SOD activity were significantly correlated with bacterial community structure and abundance. In conclusion, mid- and late-maturation varieties were effective in prolonging leaf greening period, maintaining late leaf physiological activity with delaying senescence. The effects of senescence on the composition and diversity of endogenous bacterial communities were significantly greater than those of exogenous bacteria, and there were significantly different genera among three maize varieties studied. Moreover, soluble sugar content, photosynthetic pigment content and SOD activity were the key factors affecting the phyllosphere bacterial communities as well as the dominant species.

Key words maize, ripening stage, leaf senescence, phyllosphere microbes, community composition

Yang WL, Li Z, Liu ZM, Zhang ZH, Yang JS, Lü YJ, Wang YJ (2024). Senescence characteristics of maize leaves at different maturity stages and their effect on phyllosphere bacteria. *Chin Bull Bot* **59**, 1024–1040.

* Authors for correspondence. E-mail: lvyanjie_1977@163.com; yjwang2004@126.com

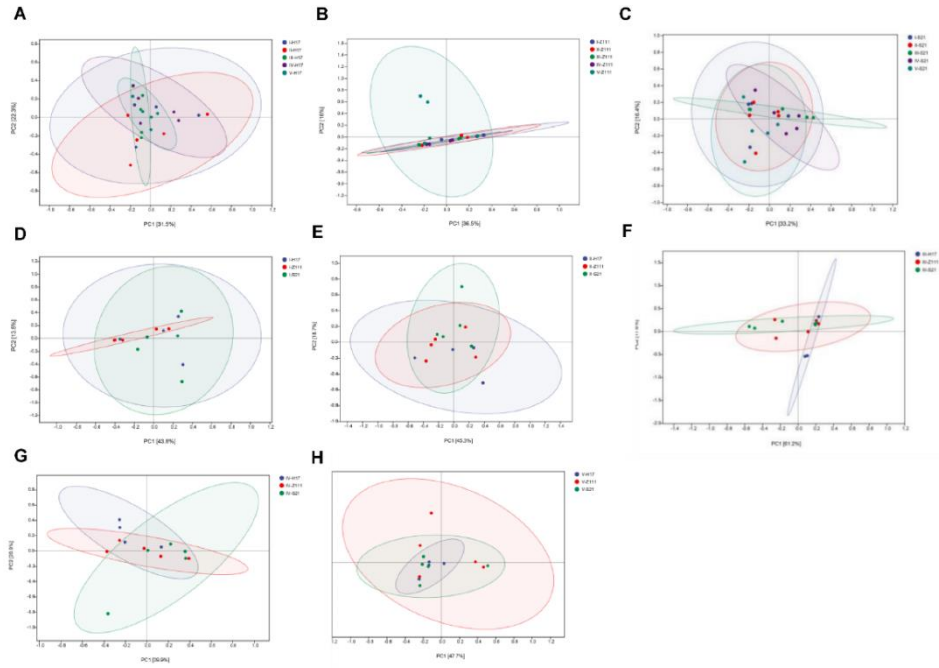
† These authors contributed equally to this paper

(责任编辑: 朱亚娜)

通讯作者简介

吕艳杰, 博士, 研究员, 主要从事玉米栽培生理研究。

王永军, 博士, 研究员, 主要研究方向为玉米生理生态。

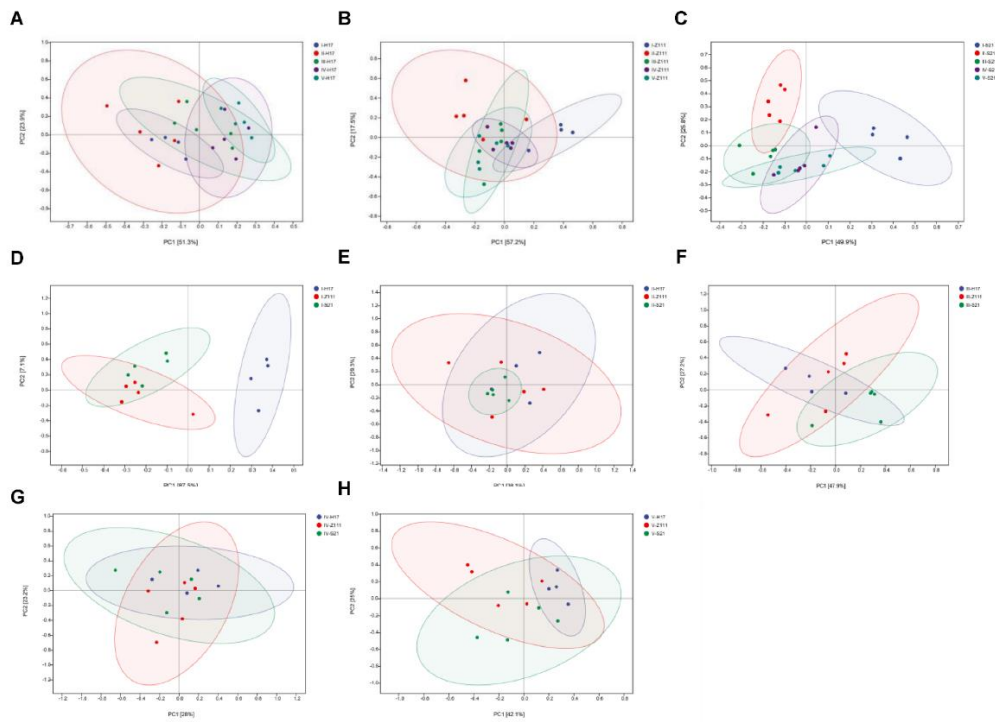


附图 1 基于 Bray-Curtis 距离的内源细菌群落的主坐标分析(PCoA)

(A-C) 生育期对内源细菌群落结构的影响; (D-H) 品种对内源细菌群落结构的影响。

Appendix figure 1 Principal coordinate analysis (PCoA) of endogenous bacterial communities based on Bray-Curtis distance

(A-C) Effect of fecundity on endogenous bacterial community structure; (D-H) Effect of species on endogenous bacterial community structure.

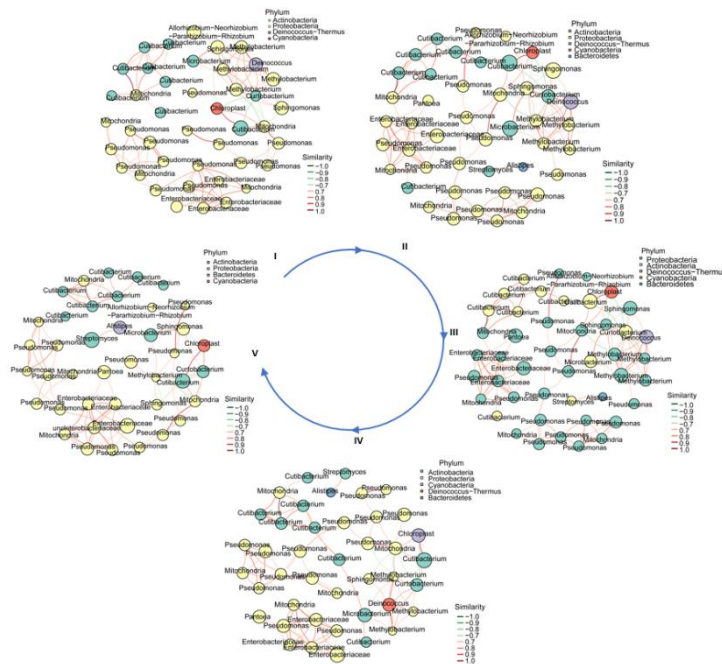


附图 2 基于 Bray-Curtis 距离的外源细菌群落的主坐标分析(PCoA)

(A-C) 生育期对外源细菌群落结构的影响; (D-H) 品种对外源细菌群落结构的影响。

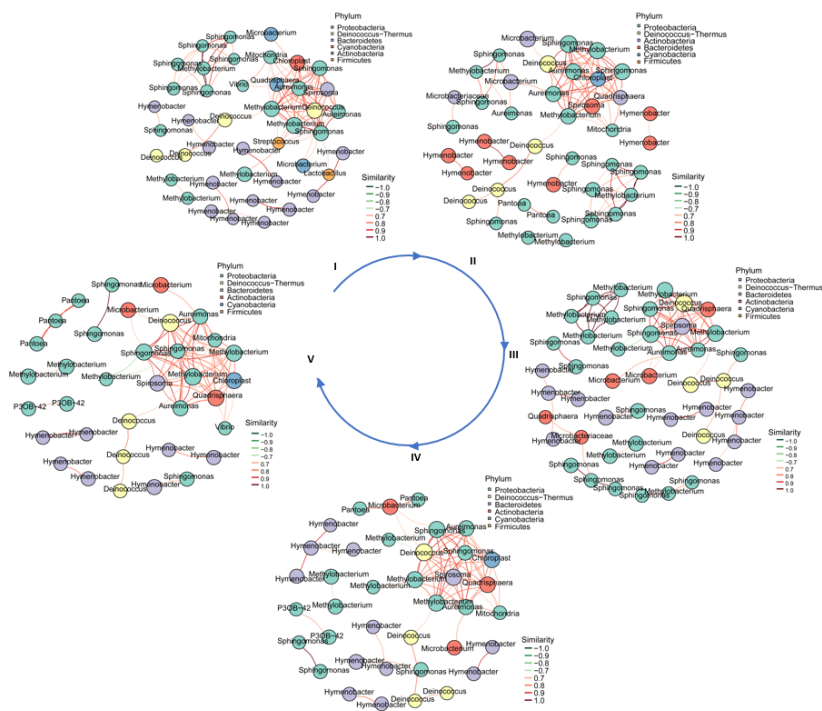
Appendix figure 2 Principal coordinate analysis (PCoA) of exogenous bacterial communities based on Bray-Curtis distance

(A-C) Effect of fertility stage on exogenous bacterial community structure; (D-H) Effect of variety on exogenous bacterial community structure.



附图 3 不同熟期玉米品种内源细菌在 5 个时间点(I-V)的共现网络分析

Appendix figure 3 Co-occurrence network analysis of endogenous bacteria in three types of maize varieties at five time points (I-V)



附图 4 不同成熟玉米品种外源细菌在 5 个时间点(I-V)的共现网络分析

Appendix figure 4 Co-occurrence network analysis of exogenous bacteria in three types of maize varieties at five time points (I-V)