

DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).202006048](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).202006048)

叶际微生物及与植物互作的研究进展*

杨 宽, 王慧玲, 叶坤浩, 王 佩, 孟广云, 罗 成, 郭力维**

(云南农业大学, 云南生物资源保护与利用国家重点实验室, 云南 昆明 650201)

摘要: 植物叶际存在着丰富而多样的微生物群体, 植物为叶际微生物提供了必要的生活场所和营养物质, 叶际微生物影响着植物的生长发育和代谢活动, 宿主植物和叶际微生物之间互相影响, 双方处在一个动态平衡的过程当中。随着叶际微生物功能的不断发掘, 其与植物的相互关系研究也越来越多, 为了更好地了解和应用叶际微生物, 结合近年来的相关研究文献, 本研究对叶际微生物的分离鉴定方法、叶际微生物的来源和构成以及叶际微生物与植物的互作关系进行综述, 有助于对叶际微生物进行全面了解, 并讨论了今后的研究重点和方向, 为今后叶际微生物的研究提供参考。

关键词: 叶际微生物; 分离鉴定; 菌群构成; 互作

中图分类号: Q 93

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X (2021) 01-0155-10

Advances in Research on Phyllosphere Microorganisms and Their Interaction with Plants

YANG Kuan, WANG Huiling, YE Kunhao, WANG Pei,

MENG Guangyun, LUO Cheng, GUO Liwei

(State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Yunnan Biological Resources,

Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: There are abundant and diverse microbial communities in the phyllosphere of plants. Plants provide necessary living places and nutrients for the phyllosphere microorganisms, while the phyllosphere microorganisms affect the growth, development and metabolism of plants; both are in a process of dynamic balance. With the continuous exploration of the functions of phyllosphere microorganisms, more and more studies on the relationship between phyllosphere microorganisms and plants have been carried out. In order to better understand and apply the phyllosphere microorganisms, and combined with the relevant literature in recent years, this paper summarized the isolation and identification methods of the phyllosphere microorganisms, the sources and components of the phyllosphere microorganisms, and the interaction between the phyllosphere microorganisms and plants, which is helpful for a comprehensive understanding of the phyllosphere microorganisms. The research direction and emphasis of the phyllosphere microorganisms were discussed, providing a reference for future research.

Keywords: phyllosphere microorganisms; isolation and identification; microbial community composition; interaction

收稿日期: 2020-06-29

修回日期: 2020-09-02

网络首发时间: 2020-12-08 17:00:30

*基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0201107); 现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-21)。

作者简介: 杨宽 (1991—), 男, 河南南阳人, 在读博士研究生, 主要从事植物与病原菌互作研究。

E-mail: yangkuande@163.com

**通信作者 Corresponding author: 郭力维 (1987—), 女, 云南盈江人, 博士, 讲师, 主要从事植物与病原菌互作研究。E-mail: g87112w12@163.com

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.s.20201204.1654.002.html>



叶际 (phyllosphere) 于 1955 年由 LAST 首次提出, 他认为: 和植物的根和根际类似, 植物的叶子也有“叶际”^[1]; 而后 RUINEN 将叶际定义为“作为微生物生长环境的叶子外表面”, 叶际的概念逐渐被人接受^[2]。1981 年英国学者 BLAKEMAN 首次提出了叶面微生物的概念, 他指出: 附生或寄生在植物叶片表面的微生物称为“叶面微生物 (phylloplane microorganism)”^[3], 自此研究植物叶面上的微生物有了专业的术语, 并受到了研究者的广泛关注, 众多学者对叶面微生物的种类、分布和功能等特点做了深入研究^[4-6]。除了叶面上的微生物, 植物的地上部分, 包括茎、花、果等组织表面也包含大量的微生物。随着研究的深入, LINDOW 等^[7-8]对叶际的概念作了进一步的阐释, 他们将微生物定殖的植物地上部分称为叶际 (phyllosphere), 而生活在叶际的“居民”称为附生微生物 (epiphytes), 并首次提出了叶际微生物学 (phyllosphere microbiology)。对于叶际微生物的研究, 众多学者集中在植物组织表面的生境, 且以叶面为主, 所以近年来某些学者直接将叶际定义为“提供适合某些微生物生存环境的整个植物地上部分外表面”^[9-10]。据估计, 全球植物地上部分总表面积约为 10^9 km^2 (大部分为叶表面)^[11], 同时在植物叶际生长着大量的微生物, 包括细菌、酵母菌、丝状真菌、古细菌和藻类等^[7, 12], 其中以细菌的丰度最高, 平均每平方厘米叶片表面约有 $10^6 \sim 10^7$ 个细菌细胞^[11], 这些生活在叶际上的微生物称为叶际微生物 (phyllosphere microorganisms)。

对于叶际微生物来说, 叶际环境是一个非常苛刻且不稳定的生境, 生活在叶表的微生物经常要面临水分和营养物质的不足, 以及剧烈变化的强光、高温和高紫外线等的影响。除了要应对环境变化, 叶际微生物还会遇到植物或其他微生物产生的抗菌物质, 同时也会受到植物防御反应的影响^[13-15]。经过层层“筛选”, 最终能够适应叶际环境的微生物生存了下来, 并在与植物长期的“互动交流”过程中逐渐形成了正面、负面或共生的关系。叶际微生物是一个非常庞大且多样性丰富的群体, 主要以细菌群落为主^[10]。叶际细菌群体通常比根际或土壤中的种类要少, 与土壤中的固氮菌一样, 叶际细菌中的固氮菌也可以通过固氮作用在养分循环中发挥关键作用, 如促进植物

生长等^[16]。除了可以促进植物生长, 某些叶际微生物还可以通过养分竞争和拮抗作用等机制来抑制植物病原菌的生长, 相反叶部植物病原菌的积累也会使植物发病^[17-18]。因此, 叶际微生物、叶际环境和宿主植物三者所构成的微生态平衡对植物的健康生长具有重要意义, 这也使得叶际微生物与宿主植物间的互作关系成为当今的研究热点之一。潘建刚等^[19]在 2011 年综述了叶际微生物的研究方法、生物多样性、生态功能和生态效应等, 但随着分子技术的发展, 目前关于叶际微生物的研究方法已经引入了高通量测序等技术方法; 高爽等^[20]概述了叶际微生物的组成以及与外界环境的互作关系。为了更好地了解和应用叶际微生物, 基于前人的研究基础, 本研究主要针对叶际微生物的分离鉴定方法、群落特征以及和宿主的互作关系等几个方面综述国内外的最新研究进展, 展望叶际微生物的研究方向和应用前景。

1 叶际微生物的分离鉴定

1.1 叶际微生物的分离

对叶际微生物进行科学研究, 首先需要对叶际微生物进行有效的分离, 并且针对植物的不同部位需要应用不同的分离方法。针对叶表面的微生物, 目前用得较多的是洗脱法, 主要运用洗脱液结合超声波和摇床震荡的方法将叶表微生物进行分离^[21]。对于叶内的微生物, 用得较多的则是匀浆法, 首先将叶表面进行消毒处理, 除去叶表微生物, 用缓冲液进行研磨匀浆, 之后进行涂平板分离或提取 DNA 进行下一步的测序鉴定^[22]。对于洗脱液的选择, 主要有磷酸缓冲液、TE 缓冲液和无菌生理盐水等, 不同洗脱液对于不同植物叶际微生物的洗脱效果没有统一的结论, 但不同植物的不同部位、不同生长期和采样量则对微生物的洗脱有很大影响^[23-25]。周育等^[23]以菜豆叶子为试验材料, 比较了不同洗脱液 (无菌水和磷酸缓冲液) 对叶际微生物的提取效果, 发现 2 种洗脱液的洗脱效果没有显著差别, 并且在一定生长期叶际微生物数量会随着叶龄的增大而增多。

1.2 叶际微生物的鉴定

传统的鉴定方法包括使用显微技术观察叶际微生物的显微特征进行分类^[26], 或使用选择性培养基以及纯培养的方法通过菌落形态特征或多种生理生化性状进行鉴定^[27-29]。但这些方法通常具

有鉴定模糊和分类不精准的问题,并且对实验人员的经验性要求很高。随着分子生物学技术的发展以及微生物DNA条形码的发现,越来越多的研究人员选择使用分子生物学的方法对微生物进行鉴定,最简单的是利用真菌ITS序列和细菌16S rRNA基因序列对分离获得的纯培养物进行鉴定^[30]。随着环境微生物研究的逐渐深入,发现自然环境中大多数微生物是不可培养的,能够人工分离并获得纯培养的只占很小一部分^[31],大概只有0.1%~3%的环境细菌被认为是可培养的^[32],所以通过传统的分离鉴定方法无法展示叶际微生物群落的全貌。为了研究环境微生物多样性,人们基于现代生化技术和分子生物学技术发明了磷酸脂肪酸(phospholipid fatty acid, PLFA)谱图分析技术、末端限制性酶切片段长度多态性(terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)分析技术、变性梯度凝胶电泳(denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)技术和高通量测序(high-throughput sequencing)技术等。

PLFA谱图分析技术是基于脂肪酸可作为生物标记物而发展起来的分析技术,通过分析微生物细胞膜上磷酸脂肪酸的组分来鉴定微生物的种属^[33]。LV等^[34]通过PLFA技术探究了外源添加细菌信号分子N-(3-oxohexanoyl) homoserine lactone对烟叶叶际细菌群落的影响,发现当用1 mmol/L处理后,革兰氏阳性菌(GP)的比例增加,当用10 mmol/L处理后,其比例有所下降。谷立坤等^[35]利用PLFA非培养方法解析了北京地区甘薯叶际细菌的群落结构,结果发现所有检测样品中,革兰氏阳性细菌生物量均高于革兰氏阴性细菌生物量,甘薯叶际细菌群落结构受到时空因素和甘薯生理特性的影响,不同地点和不同生长季节甘薯叶际细菌群落结构有较大差异。PLFA分析技术适合用于检测环境中微生物群落的整体动态变化。

T-RFLP分析技术是一种全面、分辨率高、重现性良好的分子指纹图谱技术,它结合了PCR技术、荧光标记技术、DNA限制性酶切技术和DNA序列自动分析技术,适合对来自土壤、水体和叶际等环境的微生物多样性进行研究^[36]。PEÑUELAS等^[37]运用T-RFLP技术研究了地中海森林优势树种冬青栎(*Quercus ilex*)叶际细菌和真菌的丰富度、多样性和均匀度的变化,结果表

明:气候变化会显著改变叶际微生物的丰度和组成。T-RFLP技术可以反映环境样品中微生物丰富度和均匀度随时间的变化,微生物丰富度和均匀度可以反映环境选择压力。

DGGE技术是由FISCHER和LERMAN在1979年发明并将其运用在医学上基因点突变的检测技术^[38]。1993年MUZYER等^[39]首次将DGGE技术应用于微生物生态学研究。由于DGGE具有可靠性强、重现性高和方便快捷等特点,广泛应用于医学微生物^[40]、食品微生物^[41]、环境土壤微生物^[42]和根际微生物^[43]等的研究。IZHAKI等^[44]通过DGGE技术对3种植物(巴旦杏、葡萄柚和粉蓝烟草)的叶际细菌组成进行了研究,发现叶际细菌组成差异种间大于种内,且葡萄柚具有最高的叶际细菌多样性和丰富度,表明植物种类是影响叶表细菌群落组成的主要因素。

高通量测序技术又称下一代测序(next generation sequencing, NGS)或二代测序技术,是相对于传统的一代桑格测序(Sanger sequencing)而言的。高通量测序技术可以1次对几十万到几百万条碱基序列进行测序,具有通量高、信息量大和操作简便等特点,可以为测序对象提供丰富的遗传学信息。对于研究环境微生物多样性而言,高通量测序可以提供更加全面和精准的微生物分类信息,加上近年来测序成本越来越低,更多的研究人员选择高通量测序技术来研究叶际微生物的多样性。LAFORÉST-LAPOINTE等^[45]基于16S rRNA基因高通量测序研究了加拿大魁北克温带森林中5种主要树种叶际细菌群落的组成和影响因素,发现树种的木材密度、叶片含氮量以及气候变量(夏季平均气温和降水量)与叶际细菌群落结构密切相关,并证明了寄主种类是影响温带树木叶际细菌群落构成最重要的因素。孙泓等^[46]运用高通量测序技术对不同生境中桂花和夹竹桃叶际细菌的群落结构进行了探究,结果表明:来自3处生境的2种植物叶际细菌多样性无显著差异,植物种类、生境及二者的交互作用可以显著影响叶际细菌群落结构。

2 叶际微生物的多样性

2.1 叶际微生物的来源

叶际微生物的最初来源是多样的。研究表明:叶际上的丝状真菌、酵母菌和细菌等可以通

过昆虫、空气、种子甚至是动物体传播到达植物叶子表面^[47-48]。来自一年生植物的种子以及上一代植物残体中的微生物也可能是下一代植物叶际微生物的重要来源,因为来自种子和植物残体上的微生物是已经适应了叶际环境而存活下来的^[49]。有学者研究表明:种子或根部的微生物可以进入根内部成为根内生菌,然后通过植物的脉管系统转移到植物的地上部分,从而成为叶内生菌^[50],同时生活在叶子表面的微生物也可以直接进入叶子内部成为叶内生菌,叶面微生物和叶内生菌都是叶际微生物的一部分^[51]。叶际微生物的来源是多方面的,总体来源于周围环境和上一代的“垂直遗传”。

2.2 叶际微生物的构成

叶际微生物的组成种类复杂多样,目前已经发现的有细菌、酵母菌、丝状真菌、藻类、线虫和一些原生动物等,总体以细菌的数量和种类最多^[7]。IZHAKI 等^[44]在葡萄柚叶片上鉴定出 32 种叶际细菌;刘利玲等^[21]在青杨叶片上鉴定出 35 科 50 属叶际细菌和 25 科 44 属叶际真菌。叶际微生物的组成是菌群竞争、气候选择和寄主选择后的综合结果。

叶际细菌在叶际环境中的数量非常庞大,平均每平方厘米叶片表面可以定殖 $10^6 \sim 10^7$ 个细菌细胞,占据了叶际微生物群落中的主要地位^[11]。一直以来,有关叶际微生物的研究大多集中在叶际细菌的研究^[27, 52]。叶面上的细菌通常不以单细胞的形式存在,而是趋向于聚集在一起“生活”,并且喜欢聚集在叶面的褶皱凹陷处,这可能与水分的利用有关^[53]。叶际细菌群落比根际和土壤中的细菌多样性要低,这主要是由于叶子寿命通常较短,叶际环境条件恶劣,而植物的根际则被土壤包围,生活在土壤中的微生物可以存活多年^[11]。植物叶片上叶际细菌群落的构成受植物种类、气候条件和植株生理状态所影响。LAFOREST-LAPOINTE 等^[45]探究了影响树木叶面细菌群落组成的不同驱动因素,对不同地点的 5 种不同树种在不同时间点的叶片样品进行高通量测序鉴定其叶面细菌微生物,并且对不同驱动因素进行评估量化,结果表明:影响叶际细菌组成的因素中寄主种类占 27%,地理位置占 11%,取样时间占 1%。JACKSON 等^[54]研究了广玉兰叶面细菌群落的年际和季节变化,结果表明:所有样品的

叶际微生物菌群均以 α -变形菌 (Alphaproteobacteria) 为主,另外属于广玉兰叶际微生物主要组成部分的拟杆菌门 (Bacteroidetes)、酸杆菌门 (Acidobacteria) 和放线杆菌门 (Actinobacteria) 中的某些代表菌种在不同时间点采集的样品中的丰度具有显著性差异,说明广玉兰叶际微生物群落组成具有季节性变化。在众多的叶际细菌类群中, α -变形菌 (Alphaproteobacteria) 和 γ -变形菌 (Gammaproteobacteria) 是一类很具有代表性的类群,在叶际环境中扮演着许多重要的生态“角色”^[54-55]。另外,属于变形菌门 (Proteobacteria) 的微生物菌群还具有丰富的代谢多样性,在叶际细菌群体中具有甲基营养、硝化、固氮和不产氧光合作用等多种功能^[56-58]。除了变形菌门 (Proteobacteria), 拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和放线菌门 (Actinobacteria) 的微生物都在叶际环境中执行着不同的生态功能,同时这 2 个群体在根际环境中也具有很好的代表性^[59-60]。叶际细菌群体中还包括放线菌门微生物,放线菌是原核生物中的一个类群,为革兰氏阳性细菌,在叶际环境中充当着植物病原体、固氮共生菌、真菌拮抗菌以及分解者等不同的“角色”,其中某些放线菌可以作为植物病原菌的拮抗菌运用到农作物的抗病过程^[61]。叶际细菌是叶际微生物的主要组成部分,其未知的生态功能和应用价值还值得进一步的探索。

叶际微生物中的真菌类群主要由酵母菌和丝状真菌两大类群构成^[62]。在健康的植物叶片上,酵母菌是主要的叶面附生真菌,每克叶片的酵母菌培养数量可以达到 $10 \sim 10^{10}$ CFU^[48]。虽然细菌是最丰富的叶际微生物,但酵母菌以及类酵母菌,如出芽短梗霉 (*Aureobasidium pullulans*) 等在叶际环境中也非常“活跃”^[62]。在温带、热带和地中海等不同气候特征生存的植物叶际中都发现存在酵母菌,这些酵母菌的种类分属担子菌和子囊菌两大类群^[63-66]。其中多数植物叶际酵母菌以担子菌为主,并以隐球酵母属 (*Cryptococcus*)、红酵母属 (*Rhodotorula*) 和掷孢酵母属 (*Sporobolomyces*) 数量最多^[65, 67-68]。属于子囊菌的酵母在叶际环境中发现的种类有汉逊德巴利酵母 (*Debaryomyces hansenii*)、葡萄汁有孢汉逊酵母 (*Hanseniaspora uvarum*)、*Kazachstania barnettii*、美极梅奇酵母 (*Metschnikowia pulcherima*)、*Metschnikowia reukaufii*、膜璞毕赤酵母 (*Pichia membranifaciens*)、

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和几种假丝酵母等^[66, 69]。除了对维管植物叶际酵母类群的研究外,有学者还对苔藓植物叶际酵母类群进行了研究。KACHALKIN 等^[70]对泥炭藓叶际上的酵母群落进行了研究,结果发现:泥炭藓和维管植物叶片上形成的附生酵母群落组成存在显著差异,泥炭藓叶际中红酵母丰度较低,而出现这种差异的原因主要是由不同植物的生长环境造成的。叶际酵母群落组成会随着季节变化而改变。GLUSHAKOVA 等^[69]测定了 25 种植物在整个生长期叶片和花朵上的附生酵母菌数量,结果发现:叶表酵母菌数量随着季节的变化而变化,且在春季和夏季有所增加。

叶际丝状真菌 (filamentous fungus) 群体因为包含很多植物病原菌而受到研究者的广泛关注^[71]。丝状真菌在叶际的种群数量可以达到 $10^2 \sim 10^8$ CFU/g, 在健康叶片上主要以休眠孢子而不是以活性菌丝体的形式存在^[48]。具有侵染活性的丝状真菌必须在快速剧烈波动的温度、湿度和光照的叶际环境中存活下来,需要躲避各种直接和间接的物理破坏,等到条件成熟便可对植物进行侵染^[72]。在植物叶际环境中,丝状真菌多样性非常丰富,包括枝孢菌属 (*Cladosporium*)、链格孢菌属 (*Alternaria*)、镰刀菌属 (*Fusarium*)、青霉属 (*Penicillium*)、枝顶孢属 (*Acremonium*)、炭疽菌属 (*Colletotrichum*)、毛霉属 (*Mucor*) 和曲霉属 (*Aspergillus*) 等多种致病和非致病真菌的存在^[18, 73]。在植株生长的各个阶段,叶际环境中都存在着致病和非致病丝状真菌。AHMED 等^[18]研究了橄榄不同物候期 (5、6、10 和 12 月) 叶、花和果实的真菌多样性,结果表明:叶片的真菌多样性水平最高,属于病原菌的炭疽菌属 (*Colletotrichum*) 真菌在成熟的果实中丰度最高,其他病原菌包括镰刀菌属 (*Fusarium*) 和链格孢菌属 (*Alternaria*) 真菌的检出率则相对较低。另外,叶际丝状真菌群落对于陆地生态系统中植物残体的分解转化也起到了很大作用^[74]。

3 叶际微生物与宿主植物的互作

3.1 宿主植物对叶际微生物的影响

植物叶际微生物群体复杂多样,不同植物叶际微生物组成有所不同,除了受环境因子的影响外,还受到植物本身植株生理特性的影响,当

然,植物的基因型才是决定叶际微生物群落组成的核心因素。植物种类形态、叶的位置和高度以及叶龄等都会影响叶际微生物的种群变化^[75]。微生物细胞或孢子到达植物叶片表面,最先接触的是叶片角质层。叶片角质层对于植物的生长具有多种功能,如减少水和溶质的损失、具有反射光的作用而降低叶片的温度波动、具有斥水性和阻止病原体入侵等,其中斥水性在防止微生物向叶表面迁移方面尤为重要^[76];同时角质层限制叶片养分流失的功能对叶面附生微生物种群的生长也有很大影响^[77]。叶际微生物在叶片表面的分布并不均匀,叶际细菌倾向于聚集在叶表面表皮细胞壁连接处、气孔、毛状体基部和水孔附近,另外植物组织的伤口附近和花粉也会吸引大量微生物聚集^[75, 78-79]。YADAV 等^[80]通过对 8 种多年生树木叶际细菌群落的检测,评估了不同叶片特征对叶际细菌种群大小的影响,结果表明:叶表细菌种群大小与分泌型和非分泌型腺毛密度呈正相关,与叶片厚度、叶肉厚度和叶背表皮厚度呈负相关。

植物叶片的植物化学物质和有机挥发物影响叶际微生物群落的构成。RUPPEL 等^[81]研究了 4 种不同植物 (芥菜、油菜、菊苣和菠菜) 中不同浓度硫代葡萄糖苷和类胡萝卜素与叶际细菌种群大小的关系,结果表明:不同植物的次生代谢产物浓度和组成、细菌种群大小和微生物群落组成等方面存在显著差异,且 4 种植物叶际细菌种群密度与 β -胡萝卜素浓度呈正相关,与 2-苯乙基硫代葡萄糖苷浓度呈负相关。植物叶片在生长过程中会产生很多挥发性有机化合物 (volatile organic compounds, VOCs), 这些化合物具有不同的功能,有的具有抗菌作用,有的可以作为碳源被微生物利用,因此,植物 VOCs 的排放对决定植物叶际微生物群落特征方面起着重要作用。叶片 VOCs 包括小分子的二氧化碳和丙酮,也包括萜类和一些醛类、醇类等,还有一些大分子如长链烃和倍半萜类等^[9]。有研究表明:叶际细菌中的某些种类如扭托甲基杆菌 (*Methylobacterium extorquens*) 和酵母菌博伊丁假丝酵母 (*Candida boydii*) 可以利用甲醇之类的 VOCs 作为生长底物^[82-83]。具有甲基营养代谢方式的微生物在叶际定殖过程中具有一定的选择优势,因为可以利用植物 VOCs 作为底物的微生物能够优先生长在可

以大量排放这种 VOCs 的植物叶际。在植物叶片 VOCs 的主要成分中,如萜类、苯丙酸类和苯环类等化合物具有抗菌活性,还有一些醛类,如苯甲醛、乙醛和肉桂醛也具有抑制微生物生长的特性,这些 VOCs 都会影响微生物在叶际的定殖^[84-86]。JUNKER 等^[87]研究了肥皂草 (*Saponaria officinalis*) 和百脉根 (*Lotus corniculatus*) 花瓣和叶片表面细菌群落组成,结果表明:同一植株花瓣上细菌多样性要远低于叶片,主要原因是由于花瓣上释放更多的抗菌挥发物质所致。

作为一类和植物紧密联系的微生物群体,叶际微生物菌群平衡和植物的健康息息相关。最新研究表明:植物可以通过调节叶际微生物菌群平衡来保证自身健康。CHEN 等^[88]通过 16S rRNA 基因扩增子测序检测了拟南芥健康植株 (野生型, Col-0) 和发病植株 (突变体, *mfec*) 叶片总微生物组和叶内微生物组,结果表明:健康叶片和发病叶片叶内微生物丰度和多样性有显著差异,发病叶片内微生物多样性降低,变形菌门 (Proteobacteria) 细菌群体过度增殖,抑制了厚壁菌门 (Firmicute) 细菌群体,而健康植株可以通过 pattern-triggered immunity (PTI) 途径和 MIN7 囊泡转运途径以及 *CAD1* 基因共同调节叶内生微生物丰富度和多样性,防止菌群失调,维持植物健康。

3.2 叶际微生物对宿主植物的影响

叶际微生物的研究最早是从叶际病原微生物开始的^[4]。叶际病原微生物可以直接侵入植物叶片组织导致植物发病^[72],某些叶际微生物也可以通过一定作用间接使植物发病,如:冰核活性细菌 (ice-nucleation active bacteria) 可以诱发植物产生冻害^[89]。冻害是植物的一种非生物疾病,冰核活性细菌是一类能在 -5~-2 °C 条件下催化诱发植物体内水分产生冰核而引起霜冻的细菌,冰核细菌可以提高植物的受冻温度,是诱发植物产生冻害的关键因素^[90-91]。随着人们对叶际微生物的深入研究,发现叶际微生物不仅可以导致植物发病,某些微生物还具有固氮、促进植物生长和抗病的作用^[92]。氮素对于所有生物来说都是必不可少的,生物固氮占氮素向陆地生态系统自然输入的 97% 以上,叶际微生物群体中的固氮菌已被广泛报道^[93]。固氮微生物在叶片中可以促进植物的生长,提高植物含氮量。GIRI 等^[94]从叶际中分离到一批固氮细菌,选择 2 株固氮菌 AN1 和 TK2

施加到玉米植株的叶面层上,结果发现植物的生长量和全氮含量显著提高,平均增产 30%~37%,接近于化肥处理。FÜRNKRANZ 等^[58]研究了哥斯达黎加不同环境条件不同雨林植物的叶片氮固定效率,并对 3 种植物固氮细菌群落进行了鉴定,结果表明:氮素固定效率因植物种类、生长地点 (不同的小气候条件) 和光照而不同,其中 *Carludivica drudei* 和 *Costus laevis* 的叶片相关固氮细菌群落主要由蓝细菌组成,而 *Grias coliflora* 叶片上还有 γ -变形菌。研究叶际固氮菌的群落特征和活动规律,并运用到农作物的增产增收,对于农业有机生产具有重要意义。叶际微生物可以合成产生植物激素,如生长素 (indole-3-acetic acid, IAA) 和细胞分裂素^[92-93]。此外,叶际微生物也可以产生 VOCs 对寄主植物产生影响。一些叶际微生物产生的 VOCs 可以促进植物生长和提高抗逆性,一些非致病微生物释放的 VOCs 还可以阻止真菌和细菌病原体侵染植物等^[95]。D'ALESSANDRO 等^[96]研究了玉米中 1 种主要细菌 VOCs——2,3-丁二醇 (2,3-BD) 的来源和作用,结果显示:2,3-BD 来源于玉米幼苗中的 1 种内生细菌——产气杆菌 (*Enterobacter aerogenes*),并且 2,3-BD 可以增加玉米对病原菌的抗性。另外,叶际微生物还可以通过诱导植物防御反应来改变植物 VOCs 的排放。TOOME 等^[97]用柳叶锈菌侵染柳叶研究病原体对柳叶挥发性有机化合物释放模式的影响,与对照相比,受锈菌感染叶片的倍半萜和脂氧合酶产物 (LOX) 释放量分别增加 175 倍和 10 倍。叶际微生物与宿主植物的健康生长息息相关,某些叶部病原菌可以导致植物发病,而叶片上非致病微生物的多样性则可以对植物抵御病害起到保护作用^[98]。

微生物成功定殖植物叶际成为叶际微生物,必须通过宿主植物的“重重考验”,而一旦成功定殖,某些具有致病能力的微生物则会导致植物发病。宿主植物为叶际微生物提供了广阔的生活场所和营养物质,同时某些叶际微生物也可以通过固氮作用和分泌 VOCs 等途径促进植物生长。宿主植物和叶际微生物之间相互影响,双方处在一个动态平衡的过程,如何维持这种平衡以及深层机理则是研究宿主植物和叶际微生物互作的一个重要方向。

4 讨论

相对于根际微生物,叶际微生物的研究起步较晚,研究的广度和深度暂不如根际微生物,但叶际微生物对于植物的健康生长发育同等重要。相对于大部分植物来说,叶际部分所占植物个体的比例较根际大得多,所以对于叶际微生物的研究,既有挑战也有机遇。植物叶际包含叶表和叶内,叶表微生物群体数量比叶内微生物群体数量大,但叶内微生物和宿主植物的互作更加紧密。叶际微生物具有固氮、硝化和分解等作用,这对于全球森林生态系统、草原生态系统和农业生态系统等不同生态系统的稳定和有序运转具有重要意义,所以研究叶际微生物需要和生态学等多种学科相结合。叶际微生物中大部分为不可培养群体,虽然新一代测序技术基本可以展现叶际微生物的全貌,但想要探索叶际微生物的更多功能并进一步运用到生产实践,则需依靠基础的微生物培养技术来实现,所以要想分离到更多的叶际微生物,需要探索更有效的分离方法和培养技术。叶际微生物群体多样性和植物的基因型密切相关,植物可以依赖自身免疫系统来维持叶际微生物的平衡,也许未来可以通过改造植物某些基因来调控叶际微生物组成的稳态或对其进行优化,提高有益微生物数量和抑制病原微生物。随着分子生物学技术的发展,运用最新的研究技术如宏基因组、转录组学和蛋白质组学等可以更深层的揭示植物和叶际微生物之间的分子互作机制。最后,和人类关系最密切的是将叶际微生物运用到农业生产上,目前已经明确部分叶际微生物具有固氮、促进植物生长和抗病等功能,如何将其应用到农业生产实践是研究叶际微生物的重要方向。

[参考文献]

- [1] LAST F T. Seasonal incidence of *Sporobolomyces* on cereal leaves[J]. Transactions of the British Mycological Society, 1955, 38(3): 221. DOI: [10.1016/S0007-1536\(55\)80069-1](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(55)80069-1).
- [2] RUINEN J. The phyllosphere[J]. Plant & Soil, 1965, 22(2): 375. DOI: [10.1007/BF01422435](https://doi.org/10.1007/BF01422435).
- [3] BLACKEMAN J P. Microbial ecology of the phylloplane[M]. London: Academic Press, 1981.
- [4] BLAKEMAN J P, FOKKEMA N J. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane[J]. Annual Review of Phytopathology, 1982, 20(1): 167. DOI: [10.1146/annurev.py.20.090182.001123](https://doi.org/10.1146/annurev.py.20.090182.001123).
- [5] KUMAR R N, MISHRA R R. Effect of pollen on the saprophytic and pathogenic mycoflora of the phylloplane of paddy[J]. Acta Botanica Indica, 1991, 19(1): 131.
- [6] BAKKER G R, FRAMPTON C M, JASPERS M V, et al. Assessment of phylloplane microorganism populations in Canterbury apple orchards[J]. New Zealand Plant Protection, 2002, 55: 129. DOI: [10.30843/nzpp.2002.55.3941](https://doi.org/10.30843/nzpp.2002.55.3941).
- [7] LINDOW S E, BRANDL M T. Microbiology of the phyllosphere[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(4): 1875. DOI: [10.1007/BF02887579](https://doi.org/10.1007/BF02887579).
- [8] LINDOW S E, LEVEAU J H J. Phyllosphere microbiology[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2002, 13(3): 238. DOI: [10.1016/S0958-1669\(02\)00313-0](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00313-0).
- [9] FARRÉ-ARMENGOL G, FILELLA I, LLUSIA J, et al. Bidirectional Interaction between phyllospheric microbiotas and plant volatile emissions[J]. Trends in Plant Science, 2016, 21(10): 854. DOI: [10.1016/j.tplants.2016.06.005](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.06.005).
- [10] STONE B W, WEINGARTEN E A, JACKSON C R. The role of the phyllosphere microbiome in plant health and function[J]. Annual Plant Reviews online, 2018, 1(2): 1. DOI: [10.1002/9781119312994.apr0614](https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0614).
- [11] JULIA A V. Microbial life in the phyllosphere[J]. Nature Reviews Microbiology, 2012, 10(12): 828. DOI: [10.1038/nrmicro2910](https://doi.org/10.1038/nrmicro2910).
- [12] BERLEC A. Novel techniques and findings in the study of plant microbiota: search for plant probiotics[J]. Plant Science, 2012, 193/194: 96. DOI: [10.1016/j.plantsci.2012.05.010](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.05.010).
- [13] REISBERG E E, ULRICH H, MARKUS R, et al. Distinct phyllosphere bacterial communities on *Arabidopsis* wax mutant leaves[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e78613. DOI: [10.1371/journal.pone.0078613](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078613).
- [14] REMUS-EMSERMANN M N P, TECON R, KOWALCHUK G A, et al. Variation in local carrying capacity and the individual fate of bacterial colonizers in the phyllosphere[J]. The ISME Journal, 2012, 6(4): 756. DOI: [10.1038/ismej.2011.209](https://doi.org/10.1038/ismej.2011.209).
- [15] FRANÇOISE B, IVAN C. Pivotal roles of phyllosphere microorganisms at the interface between plant functioning and atmospheric trace gas dynamics[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 486. DOI: [10.3389/fmicb.2015.00486](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00486).
- [16] FREIBERG E. Microclimatic parameters influencing nitrogen fixation in the phyllosphere in a Costa Rican pre-montane rain forest[J]. Oecologia, 1998, 117(1/2): 9. DOI: [10.1007/s004420050625](https://doi.org/10.1007/s004420050625).
- [17] KISHORE G K, PANDE S, PODILE A R. Biological control of late leaf spot of peanut (*Arachis hypogaea*) with chitinolytic bacteria[J]. Phytopathology, 2005, 95(10): 1157. DOI: [10.1094/PHYTO-95-1157](https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1157).
- [18] AHMED A, MARIA G L D N, SANTA O C, et al. Metabarcoding analysis of fungal diversity in the phyllosphere and carposphere of olive (*Olea europaea*)[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0131069. DOI: [10.1371/journal.pone.0131069](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131069).

- pone.0131069.
- [19] 潘建刚, 呼庆, 齐鸿雁, 等. 叶际微生物研究进展[J]. 生态学报, 2011, 31(2): 583. DOI: [10.3321/j.issn:0253-9829.2006.02.001](#).
 - [20] 高爽, 刘笑尘, 董铮, 等. 叶际微生物及其与外界互作研究进展[J]. 植物科学学报, 2016, 34(4): 654. DOI: [10.11913/PSJ.2095-0837.2016.40654](#).
 - [21] 刘利玲, 李会琳, 蒙振思, 等. 青杨雌雄株叶际微生物群落多样性和结构的差异[J]. 微生物学报, 2020, 60(3): 556. DOI: [10.13343/j.cnki.wsxb.20190230](#).
 - [22] 白飞荣, 刘洋, 曹艳花, 等. 西沙野生诺尼叶片内生菌的分离与初步鉴定[J]. 食品科学技术学报, 2015, 33(1): 32. DOI: [10.3969/j.issn.2095-6002.2015.01.006](#).
 - [23] 周育, 乔雄梧, 王静, 等. 植物叶际微生物提取方法研究[J]. 植物研究, 2006(2): 2233. DOI: [10.3969/j.issn.1673-5102.2006.02.024](#).
 - [24] KEMBEL S W, O'CONNOR T K, ARNOLD H K, et al. Relationships between phyllosphere bacterial communities and plant functional traits in a neotropical forest[J]. PNAS, 2014, 111(38): 13715. DOI: [10.1073/pnas.1216057111](#).
 - [25] 李娜, 胡亮, 王婷, 等. 乌头叶面微生物菌群变化特征及其与乌头霜霉病相关性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(5): 42. DOI: [10.13422/j.cnki.syfjx.2017050042](#).
 - [26] BERNSTEIN M E, CARROLL G C. Microbial populations on Douglas fir needle surfaces[J]. Microbial Ecology, 1977, 4(1): 41. DOI: [10.2307/4250508](#).
 - [27] DICKINSON C H, AUSTIN B, GOODFELLOW M. Quantitative and qualitative studies of phylloplane bacteria from *Lolium perenne*[J]. Journal of General Microbiology, 1975, 91(1): 157. DOI: [10.1099/00221287-91-1-157](#).
 - [28] 王芳, 赖泳红, 米静, 等. 不同陈化烟叶叶面高温微生物多样性[J]. 应用与环境生物学报, 2012, 18(3): 471. DOI: [10.3724/sp.j.1145.2012.00471](#).
 - [29] DE JAGER E S, WEHNER F C, KORSTEN L. Microbial ecology of the mango phylloplane[J]. Microbial Ecology, 2001, 42(2): 201. DOI: [10.1007/s002480000106](#).
 - [30] 施佳辉, 田飞, 唐蜀昆, 等. DNA条形码技术及其在微生物资源鉴别保护中的应用研究[J]. 微生物学杂志, 2018, 38(4): 77. DOI: [10.3969/j.issn.1005-7021.2018.04.011](#).
 - [31] AMANN R L, LUDWIG W, SCIILEIFER K. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiological Reviews, 1995, 59(1): 143. DOI: [10.1128/MMBR.59.1.143-169.1995](#).
 - [32] WAGNER M R A, AMANN R I, LEMMER H, et al. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1993, 59(5): 1520. DOI: [10.1128/AEM.59.5.1520-1525.1993](#).
 - [33] 李冬梅, 施雪华, 孙丽欣, 等. 磷脂脂肪酸谱图分析方法及其在环境微生物学领域的应用[J]. 科技导报, 2012, 30(2): 65. DOI: [10.3981/j.issn.1000-7857.2012.02.009](#).
 - [34] LV D, MA A Z, BAI Z H, et al. Response of leaf-associated bacterial communities to primary acyl-homoserine lactone in the tobacco phyllosphere[J]. Research in Microbiology, 2012, 163(2): 119. DOI: [10.1016/j.resmic.2011.11.001](#).
 - [35] 谷立坤, 白志辉, 于影, 等. 非培养方法解析北京地区甘薯叶际细菌的群落结构[J]. 生态学报, 2010, 30(7): 1789.
 - [36] 马琳, 张卫华, 刘淼. T-RFLP技术在土壤微生物群落多样性分析中的研究进展[J]. 农业与技术, 2017, 37(18): 244. DOI: [10.11974/nyyjs.20170932217](#).
 - [37] PEÑUELAS J, RICO L, OGAYA R, et al. Summer season and long-term drought increase the richness of bacteria and fungi in the foliar phyllosphere of *Quercus ilex* in a mixed Mediterranean forest[J]. Plant Biology, 2012, 14(4): 565. DOI: [10.1111/j.1438-8677.2011.00532.x](#).
 - [38] 张宝涛, 王立群, 伍宁丰, 等. PCR-DGGE技术及其在微生物生态学中的应用[J]. 生物信息学, 2006(3): 132. DOI: [10.3969/j.issn.1672-5565.2006.03.010](#).
 - [39] MUYZER G, DE WAAL E C, UITTERLINDEN A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis of polymerase chain reaction amplified gene encoding for 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695. DOI: [10.1080/15389588.2015.1013535](#).
 - [40] 方玲, 夏永军, 刘罡, 等. 舌苔细菌PCR-DGGE分析条件的建立与优化[J]. 中国微生态学杂志, 2019, 31(7): 793. DOI: [10.13381/j.cnki.cjm.201907010](#).
 - [41] 邹颖玲, 刘姝韵, 王桂瑛, 等. 基于PCR-DGGE技术分析宣威火腿中真菌群落结构[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(6): 269. DOI: [10.13995/j.cnki.11-1802/ts.022394](#).
 - [42] 陈章, 王强锋, 陈强, 等. 中江县丹参连作土壤细菌多样性研究[J]. 西南农业学报, 2019, 32(12): 2890. DOI: [10.16213/j.cnki.scjas.2019.12.028](#).
 - [43] 许自成, 王发展, 金伊楠, 等. 不同连作年限烤烟根际土壤真菌群落18S rDNA-PCR-DGGE分析[J]. 中国土壤与肥料, 2019(4): 39. DOI: [10.11838/sfsc.1673-6257.18384](#).
 - [44] IZHAKI I, FRIDMAN S, GERCHMAN Y, et al. Variability of bacterial community composition on leaves between and within plant species[J]. Current Microbiology, 2013, 66(3): 227. DOI: [10.1007/s00284-012-0261-x](#).
 - [45] LAFOREST-LAPOINTE I, MESSIER C, KEMBEL S W. Host species identity, site and time drive temperate tree phyllosphere bacterial community structure[J]. Microbiome, 2016, 4(1): 27. DOI: [10.1186/s40168-016-0174-1](#).
 - [46] 孙泓, 李慧, 詹亚光, 等. 不同生境中桂花和夹竹桃叶际细菌的群落结构[J]. 应用生态学报, 2018, 29(5): 1653. DOI: [10.13287/j.1001-9332.201805.036](#).
 - [47] MAIGNIEN L, DEFORCE E A, CHAFEE M E, et al. Ecological succession and stochastic variation in the assembly of *Arabidopsis thaliana* phyllosphere communities[J]. mBio, 2014, 5(1): e00682. DOI: [10.1128/mBio.00682-13](#).
 - [48] WHIPPS J M, HAND P, PINK D, et al. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant

- genotype[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 105(6): 1744. DOI: [10.1111/j.1365-2672.2008.03906.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03906.x).
- [49] MANCEAU C, KASEMPOUR M N. Endophytic versus epiphytic colonization of plants: what comes first?[M]// LINDOW S E, HECHT-POINAR E I, ELLIOT V J. Phyllosphere Microbiology. St. Paul: APS Press, 2002.
- [50] WULFF E G, VAN VUURDE J W L, HOCKENHULL J. The ability of the biological control agent *Bacillus subtilis*, strain BB, to colonise vegetable brassicas endophytically following seed inoculation[J]. Plant & Soil, 2003, 255(2): 463. DOI: [10.1023/A:1026026917355](https://doi.org/10.1023/A:1026026917355).
- [51] BEATTIE G A, LINDOW S E. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies[J]. Phytopathology, 1999, 89(5): 353. DOI: [10.1094/PHYTO.1999.89.5.353](https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.5.353).
- [52] NATACHA B, HORTON M W, JOY B, et al. Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56329. DOI: [10.1371/journal.pone.0056329](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056329).
- [53] 施雯, 张汉波. 叶面微环境和微生物群落[J]. 微生物学通报, 2007, 34(4): 761. DOI: [10.3969/j.issn.0253-2654.2007.04.034](https://doi.org/10.3969/j.issn.0253-2654.2007.04.034).
- [54] JACKSON C R, DENNEY W C. Annual and seasonal variation in the phyllosphere bacterial community associated with leaves of the Southern Magnolia (*Magnolia grandiflora*)[J]. Microbial Ecology, 2011, 61(1): 113. DOI: [10.1007/s00248-010-9742-2](https://doi.org/10.1007/s00248-010-9742-2).
- [55] RASTOGI G, SBODIO A, TECH J J, et al. Leaf microbiota in an agroecosystem: spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce[J]. The ISME Journal, 2012, 6(10): 1812. DOI: [10.1038/ismej.2012.32](https://doi.org/10.1038/ismej.2012.32).
- [56] ATAMNA-ISMAEEL N, FINKEL O, GLASER F, et al. Bacterial anoxygenic photosynthesis on plant leaf surfaces[J]. Environmental Microbiology Reports, 2012, 4(2): 209. DOI: [10.1111/j.1758-2229.2011.00323.x](https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00323.x).
- [57] WATANABE K, KOHZU A, SUDA W, et al. Microbial nitrification in throughfall of a Japanese cedar associated with archaea from the tree canopy[J]. Springerplus, 2016, 5(1): 1596. DOI: [10.1186/s40064-016-3286-y](https://doi.org/10.1186/s40064-016-3286-y).
- [58] FÜRNKRANZ, MICHAEL, WANEK W, RICHTER A, et al. Nitrogen fixation by phyllosphere bacteria associated with higher plants and their colonizing epiphytes of a tropical lowland rainforest of Costa Rica[J]. The ISME Journal, 2008, 2(5): 561. DOI: [10.1038/ismej.2008.14](https://doi.org/10.1038/ismej.2008.14).
- [59] LAUBER C L, HAMADY M, FIERER N, et al. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(15): 5111. DOI: [10.1128/AEM.00335-09](https://doi.org/10.1128/AEM.00335-09).
- [60] PHILIPPOT L, RAAIJMAKERS J M, LEMANCEAU P, et al. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere[J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11: 789. DOI: [10.1038/nrmicro3109](https://doi.org/10.1038/nrmicro3109).
- [61] PALANIYANDI S A, YANG S H, ZHANG L X, et al. Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(22): 9621. DOI: [10.1007/s00253-013-5206-1](https://doi.org/10.1007/s00253-013-5206-1).
- [62] ANDREWS J H, HARRIS R F. The ecology and biogeography of microorganisms of plant surfaces[J]. Annual Review of Phytopathology, 2000, 38: 145. DOI: [10.1146/annurev.phyto.38.1.145](https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.145).
- [63] GLUSHAKOVA A M, YURKOV A M, CHERNOV I Y. Massive isolation of anamorphous ascomycete yeasts *Candida oleophila* from plant phyllosphere[J]. Microbiology, 2007, 76(6): 799. DOI: [10.1134/S0026261707060215](https://doi.org/10.1134/S0026261707060215).
- [64] LANDELL M F, BILLODRE R, RAMOS J P, et al. *Candida aechmeae* sp. nov. and *Candida vrieseae* sp. nov. novel yeast species isolated from the phylloplane of bromeliads in Southern Brazil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(1): 244. DOI: [10.1099/ijs.0.011577-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.011577-0).
- [65] SLÁVIKOVÁ E, VADKERTIOVÁ R, VRÁNOVÁ D. Yeasts colonizing the leaves of fruit trees[J]. Annals of Microbiology, 2009, 59(3): 419. DOI: [10.1007/BF03175125](https://doi.org/10.1007/BF03175125).
- [66] LIMTONG S, KOOWADJANAKUL N. Yeasts from phylloplane and their capability to produce indole-3-acetic acid[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(12): 3323. DOI: [10.1007/s11274-012-1144-9](https://doi.org/10.1007/s11274-012-1144-9).
- [67] NAKASE T, LEE F L, AM-IN S, et al. *Sporobolomyces fushanensis* sp. nov., a new species of ballistoconidium-forming yeast in the *Microbotryum* lineage isolated from a plant in Taiwan[J]. Journal of General & Applied Microbiology, 2005, 51(1): 41. DOI: [10.2323/jgam.51.41](https://doi.org/10.2323/jgam.51.41).
- [68] 韦莹莹, 毛淑波, 屠康. 果蔬采后病害生物防治的研究进展[J]. 南京农业大学学报, 2012, 35(5): 183.
- [69] GLUSHAKOVA AM, CHERNOV IY. Seasonal dynamics of the structure of epiphytic yeast communities[J]. Microbiology, 2010, 79(6): 830. DOI: [10.1134/S0026261710060160](https://doi.org/10.1134/S0026261710060160).
- [70] KACHALKIN A V, GLUSHAKOVA A M, YURKOV A M, et al. Characterization of yeast groupings in the phyllosphere of *Sphagnum* mosses[J]. Microbiology, 2008, 77(4): 474. DOI: [10.1134/S0026261708040140](https://doi.org/10.1134/S0026261708040140).
- [71] KEEN N T. A century of plant pathology: a retrospective view on understanding host-parasite interactions[J]. Annual Review of Phytopathology, 2000, 38: 31. DOI: [10.1146/annurev.phyto.38.1.31](https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.31).
- [72] TIM L W, SARAH J G. Filamentous fungi on plant surfaces[M]//RIEDERER M, MÜLLER C. Annual plant reviews volume 23: biology of the plant cuticle. Oxford: Blackwell Publishing Ltd., 2006.
- [73] INÁCIO J, PEREIRA P, CARVALHO M, et al. Estimation and diversity of phylloplane mycobiota on selected plants in a Mediterranean-type ecosystem in Portugal[J]. Microbial Ecology, 2002, 44(4): 344. DOI: [10.1007/s00248-002-2022-z](https://doi.org/10.1007/s00248-002-2022-z).
- [74] VORÍŠKOVÁ J, BALDRIAN P. Fungal community on decomposing leaf litter undergoes rapid successional changes[J]. The ISME Journal, 2013, 7(3): 477. DOI: [10.1038/ismej.2012.32](https://doi.org/10.1038/ismej.2012.32).

- 1038/ismej.2012.116.
- [75] HUNTER P J, HAND P, PINK D, et al. Both leaf properties and microbe-microbe interactions influence within-species variation in bacterial population diversity and structure in the lettuce (*Lactuca* species) phyllosphere[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2010, 76(24): 8117. DOI: [10.1128/AEM.01321-10](https://doi.org/10.1128/AEM.01321-10).
- [76] BEATTIE G. Leaf surface waxes and the process of leaf colonization by microorganisms[M]//LINDOW S E, HECHT-POINAR E I, ELLIOT V J. Phyllosphere Microbiology. St. Paul: APS Press, 2002.
- [77] LEVEAU J H J, LINDOW S E. Appetite of an epiphyte: quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere[J]. PNAS, 2001, 98(6): 3446. DOI: [10.1073/pnas.061629598](https://doi.org/10.1073/pnas.061629598).
- [78] DAVIS C L, BRLANSKY R H. Use of immunogold labelling with scanning electron microscopy to identify phytopathogenic bacteria on leaf surfaces[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(10): 3052. DOI: [10.1128/AEM.57.10.3052-3055.1991](https://doi.org/10.1128/AEM.57.10.3052-3055.1991).
- [79] DIEM H G. Microorganisms of the leaf surface: estimation of the mycoflora of the barley phyllosphere[J]. Journal of General Microbiology, 1974, 80(1): 77. DOI: [10.1099/00221287-80-1-77](https://doi.org/10.1099/00221287-80-1-77).
- [80] YADAV R K P, KARAMANOLI K, VOKOU D. Bacterial colonization of the phyllosphere of Mediterranean perennial species as influenced by leaf structural and chemical features[J]. Microbial Ecology, 2005, 50(2): 185. DOI: [10.1007/s00248-004-0171-y](https://doi.org/10.1007/s00248-004-0171-y).
- [81] RUPPEL S, KRUMBEIN A, SCHREINER M. Composition of the phyllospheric microbial populations on vegetable plants with different glucosinolate and carotenoid compositions[J]. Microbial Ecology, 2008, 56(2): 364. DOI: [10.1007/s00248-007-9354-7](https://doi.org/10.1007/s00248-007-9354-7).
- [82] SY A, TIMMERS A C J, KNIEF C, et al. Methylophilic metabolism is advantageous for *Methylobacterium extorquens* during colonization of *Medicago truncatula* under competitive conditions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(11): 7245. DOI: [10.1128/AEM.71.11.7245-7252.2005](https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7245-7252.2005).
- [83] KOSUKE K, HIROYA Y, MASAHIRO O, et al. Yeast methylophilicity and autophagy in a methanol-oscillating environment on growing *Arabidopsis thaliana* leaves[J]. PLoS One, 2011, 6(9): e25257. DOI: [10.1371/journal.pone.0025257](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025257).
- [84] GAO Y, JIN Y J, LI H D, et al. Volatile organic compounds and their roles in bacteriostasis in five conifer species[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2005, 47(4): 499. DOI: [10.1111/j.1744-7909.2005.00081.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2005.00081.x).
- [85] ASHOUR H M. Antibacterial, antifungal, and anticancer activities of volatile oils and extracts from stems, leaves, and flowers of *Eucalyptus sideroxylon* and *Eucalyptus torquata*[J]. Cancer Biology & Therapy, 2008, 7(3): 399. DOI: [10.4161/cbt.7.3.5367](https://doi.org/10.4161/cbt.7.3.5367).
- [86] ROSSI P, BAO L, LUCIANI A, et al. (E)-methylisoeugenol and elemicin: antibacterial components of *Daucus carota* L. essential oil against *Campylobacter jejuni*[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2007, 55(18): 7332. DOI: [10.1021/jf070674u](https://doi.org/10.1021/jf070674u).
- [87] JUNKER R R, LOEWEL C, GROSS R, et al. Composition of epiphytic bacterial communities differs on petals and leaves[J]. Plant Biology, 2011, 13(6): 918. DOI: [10.1111/j.1438-8677.2011.00454.x](https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2011.00454.x).
- [88] CHEN T, NOMURA K, WANG X L, et al. A plant genetic network for preventing dysbiosis in the phyllosphere[J]. Nature, 2020, 580(7805). DOI: [10.1038/s41586-020-2185-0](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2185-0).
- [89] 岳思君, 王文举. 冰核活性细菌研究进展及其在防霜技术中的应用[J]. 农业科学研究, 2005, 26(2): 66. DOI: [10.3969/j.issn.1673-0747.2005.02.019](https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-0747.2005.02.019).
- [90] 康健, 王海华, 林超, 等. 不同季节龙葵叶面微生物与叶片冻害的关系[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2001, 27(3): 185. DOI: [10.3321/j.issn:1007-1032.2001.03.008](https://doi.org/10.3321/j.issn:1007-1032.2001.03.008).
- [91] 赵晨心. 冰核细菌分离鉴定及拮抗菌筛选[D]. 贵阳: 贵州大学, 2017.
- [92] ROMERO F M, MARINA M, PIECKENSTAIN F L. Novel components of leaf bacterial communities of field-grown tomato plants and their potential for plant growth promotion and biocontrol of tomato diseases[J]. Research in Microbiology, 2016, 167(3): 222. DOI: [10.1016/j.resmic.2015.11.001](https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.11.001).
- [93] HOLLAND M A. Nitrogen: give and take from phylloplane microbes[M]//POLACCO J C, TODD C D. Ecological aspects of nitrogen metabolism in plants. West Sussex: John Wiley & Sons, Inc., 2011.
- [94] GIRI S, PATI B R. A comparative study on phyllosphere nitrogen fixation by newly isolated *Corynebacterium* sp. & *Flavobacterium* sp. and their potentialities as biofertilizer[J]. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 2004, 51(1/2): 47. DOI: [10.1556/AMicr.51.2004.1-2.3](https://doi.org/10.1556/AMicr.51.2004.1-2.3).
- [95] BITAS V, KIM H S, BENNETT J W, et al. Sniffing on microbes: diverse roles of microbial volatile organic compounds in plant health[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2013, 26(8): 835. DOI: [10.1094/MPMI-10-12-0249-CR](https://doi.org/10.1094/MPMI-10-12-0249-CR).
- [96] D'ALESSANDRO M, ERB M, TON J, et al. Volatiles produced by soil-borne endophytic bacteria increase plant pathogen resistance and affect tritrophic interactions[J]. Plant Cell and Environment, 2013, 37(4): 813. DOI: [10.1111/pce.12220](https://doi.org/10.1111/pce.12220).
- [97] TOOME M, RANDJÄRV P, COPOLOVICI L, et al. Leaf rust induced volatile organic compounds signalling in willow during the infection[J]. Planta, 2010, 232(1): 235. DOI: [10.1007/s00425-010-1169-y](https://doi.org/10.1007/s00425-010-1169-y).
- [98] BALINT-KURTI P, SIMMONS S J, BLUM J E, et al. Maize leaf epiphytic bacteria diversity patterns are genetically correlated with resistance to fungal pathogen infection[J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 2010, 23(4): 473. DOI: [10.1094/MPMI-23-4-0473](https://doi.org/10.1094/MPMI-23-4-0473).

责任编辑: 何馨成