

象草叶片花青素含量与叶际细菌群落的相关性分析

刘俊杰¹, 黄圆圆¹, 雷 琥¹, 葛良法^{1,2*}

1. 华南农业大学林学与风景园林学院草业科学教研室/广东省草业工程技术研究中心, 广东广州 510642; 2. 农业农村部国家大豆改良中心广东分中心, 广东广州 510642

摘 要: 花青素又称为花色素, 是植物黄酮类次生代谢产物。大量研究表明, 花青素在调控植物的抗逆反应中起着重要作用, 但花青素是否影响植物的叶际细菌仍未知。为探究叶片花青素与叶际细菌间的相关性, 本研究以花青素含量高的紫色象草 (*Pennisetum purpureum* cv. Purple, Purple) 及花青素含量低的矮象草 (*P. purpureum* cv. Mott, Mott) 为研究材料, 通过对叶片花青素含量进行定量分析, 利用 16S rRNA 高通量测序对其叶际细菌群落结构及相对丰度进行分析, 比较紫色象草和矮象草叶际细菌群落结构的差异性。结果表明: 紫色象草叶片的花青素含量是矮象草的近 20 倍。紫色象草和矮象草的叶际细菌 α 多样性无显著差异, 但是 β 多样性差异较大。操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU) 水平的相对丰度主成分分析结果表明, 紫色象草和矮象草的叶际细菌群落组成呈显著差异。与矮象草相比, 紫色象草叶内生变形菌门 (Proteobacteria) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes) 的相对丰度更高。在叶表附生微生物中, 紫色象草中的异常球菌-栖热菌门 (Deinococcus-Thermus) 相对丰度更高, 而矮象草的拟杆菌门和厚壁菌门 (Firmicutes) 相对丰度更高。OTU 水平的微生物群落组成分析 (analysis of composition of microbiomes, ANCOM)、属水平的相对丰度差异分析及其与花青素含量的相关性分析结果显示, 2 种象草叶表面的甲基杆菌属 (*Methylobacterium*)、*Unclassified_Methylobacteriaceae* 和异常球菌属 (*Deinococcus*) 的相对丰度与其花青素含量呈正相关, 且紫色象草中的相对丰度显著高于矮象草。综上, 紫色象草和矮象草叶表面附生细菌群落存在显著差异。本研究探索了不同花青素含量象草叶际细菌群落的差异性, 为研究紫色象草的优异饲用价值提供新思路, 为解析植物次生代谢物与叶际微生物的关系提供理论依据。

关键词: 象草; 花青素; 16S rRNA; 叶际微生物; 细菌群落

中图分类号: S543 文献标志码: A

Correlation Analysis Between Anthocyanins Content in *Pennisetum purpureum* Leaves and Phyllosphere Bacterial Community

LIU Junjie¹, HUANG Yuanyuan¹, LEI Xiao¹, GE Liangfa^{1,2*}

1. Department of Grassland Science, College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University / Guangdong Engineering Research Center for Grassland Science, Guangzhou, Guangdong 510642, China; 2. Guangdong Subcenter of National Center for Soybean Improvement, Guangzhou, Guangdong 510642, China

Abstract: Anthocyanins, also called anthocyanins, are a group of plant secondary metabolites of flavonoid derivatives. Anthocyanins play an important role in mediating plant stress responses. However, whether anthocyanins are also involved in regulating phyllosphere bacterial communities remains unknown. To evaluate the differences of phyllosphere bacterial communities in plants with different anthocyanin contents, this study analyzed the phyllosphere bacterial communities of two cultivars of elephant grass with contrasting anthocyanins content, *Pennisetum purpureum* cv. Purple (Purple) with a high amount of anthocyanins and *P. purpureum* cv. Mott (Mott) with relatively low anthocyanins. The anthocyanins content determination results showed that the anthocyanins content in Purple leaves was nearly 20 times of that in Mott leaves. High throughput sequencing of 16S rRNA and analysis of the microbiome community indicated that

收稿日期 2022-10-31; 修回日期 2023-02-06

基金项目 广州市重点研发计划项目 (No. 202103000066)。

作者简介 刘俊杰 (1997—), 男, 博士研究生, 研究方向: 草基因功能研究与育种; *通信作者 (Corresponding author): 葛良法 (GE Liangfa), E-mail: lge@scau.edu.cn。

though alpha diversity was not significantly changed, the bacterial communities of Purple was significantly different from that of Mott. In Purple, the relative abundance of endophytic Proteobacteria and Bacteroidetes, and epiphytic *Deinococcus-Thermus* were significantly increased, whereas epiphytic Bacteroidetes and Firmicutes were significantly decreased. The composition of microbiomes (ANCOM) at the OTU level, the relative abundance analysis at the genus level and correlation analysis between epiphytes and anthocyanins showed that the relative abundance of *Methylobacterium*, *Unclassified Methylobacteriaceae* and *Deinococcus*, which showed a significant positive correlation with anthocyanins content, were significantly increased in the episphere of Purple. In summary, the phyllosphere bacterial communities were significantly different between Purple and Mott. The findings from this work would provide new insights into the understanding of the superior forage value of *P. purpureum* cv. Purple, and lay a foundation to further investigate the mechanism of how plant secondary metabolism products regulate phyllosphere microorganisms.

Keywords: *Pennisetum purpureum*; anthocyanins; 16S rRNA; phyllosphere microorganisms; bacterial community

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.05.020

定殖于叶际 (phyllosphere, 植物地上部分) 的细菌和真菌等微生物被称为叶际微生物 (phyllosphere microorganisms), 其中以细菌的丰度最大^[1-4]。依据定殖位置的不同, 可将叶际微生物分为两类, 一类是附生在植物表面的微生物, 称为附生微生物 (epiphytes); 另一类是定殖于植物内部的微生物, 称为内生微生物 (endophytes)^[5]。研究表明, 附生微生物的丰度和丰富度远大于内生微生物, 而内生微生物与植物细胞的关系较附生微生物更密切^[6]。叶际微生物主要来源于土壤, 部分来源于空气^[7-9]。对于微生物来说, 叶际并不是一个稳定的环境, 其组成受环境因素的影响, 这些因素包括气候、土壤类型、地理位置、温度、光照和湿度等^[10-12]。此外, 宿主植物的基因型、年龄以及宿主植物内部的次生代谢物也会对叶际微生物群有较大影响^[13-15]。

多项研究表明, 植物叶片内部的次生代谢产物和有机挥发物会影响叶际微生物群落的构成^[15-18]。黄酮类化合物——花青素是植物体内重要的水溶性次生代谢产物, 影响植物果实、花朵和叶片的颜色^[19]。花青素具有参与植物体内非生物胁迫和生物胁迫抗逆反应, 减轻植物受环境、病害的伤害等功能^[20-21]。此外, 花青素还具有抗氧化、抗癌、软化血管和降低血糖等多种功效, 具有极高的药用价值, 已广泛应用于医药领域^[22]。目前对花青素合成及调控的分子机制已有较为深入的研究^[19, 22], 但植物中的花青素对植物叶际微生物群落是否产生影响有待进一步研究。

象草 (*Pennisetum purpureum*) 是狼尾草属多年生草本植物, 广泛种植于热带亚热带地区^[23]。象草具有产量高、生长速度快等特性, 常用作饲料、青贮饲料、生物乙醇和纸张的原料以及生态

修复等^[23]。紫色象草 (*P. purpureum* cv. Purple) 叶片为紫色, 其叶片较矮象草 (*P. purpureum* cv. Mott) 富含多种花青素^[24]。因花青素的诸多优点, 紫色象草被视为比绿色象草更佳的饲用品种^[25-26]。

本研究采用 16S rRNA 高通量测序技术对紫色象草和矮象草的叶际细菌群落进行比较分析, 从细菌多样性、群落结构等方面对比紫色象草和矮象草叶际细菌群落, 探究不同花青素含量的象草叶际细菌的差异性, 为花青素与植物叶际微生物群落相互作用的研究和实际利用提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为摩特矮象草 (*P. purpureum* cv. Mott, Mott) 和紫色象草 (*P. purpureum* cv. Purple, Purple), 种植于广东省广州市华南农业大学草业科学系引种园 (23°10'N, 113°22'E), 2 种象草种植距离约为 4 m。

1.2 方法

1.2.1 象草叶片花青素含量测定 用 0.1% 盐酸-甲醇溶液配制矢车菊素-3-O-葡萄糖苷 (Sigma-Aldrich, #52976) 的标准溶液, 浓度分别为 20.0、12.5、10.0、5.0、2.5 mg/L。使用分光光度计 Nano-Photometer NP80 (implen) 测 530 nm 处吸光度, 得出标准曲线。

称取 1 g 象草叶片用于花青素浓度测定。低温破碎叶片组织后, 加入 10 mL 0.1% 盐酸-甲醇溶液, 震荡后超声 5 min, 4 °C 避光保存过夜。5000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 加入 5 mL 氯仿及 5 mL ddH₂O, 摇匀后 5000 r/min 离心 10 min, 取上层红色液体, 测 530 nm 处 OD 值, 依据标准曲线计算样品花青素浓度。

1.2.2 象草叶际微生物取样 于2022年6月在华南农业大学草业科学系引种园采集象草样本,选取长势一致的象草作为试验材料,每株象草作为一个独立生物学重复,每种材料设置5~7个生物学重复。将所取叶片组织浸没于无菌磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)中,室温震荡洗涤20 min,收集液体并重复1次。取出植物组织,加入无菌PBS,超声洗涤10 min,收集上述洗涤液,于0.22 μm 滤膜过滤,滤膜保存于 -80°C ,用于提取叶表面附生微生物DNA。剩余植物组织使用5%次氯酸钠溶液浸泡5 min,无菌水漂洗3次后储存于 -80°C ,用于提取叶内生微生物总DNA。

1.2.3 扩增子文库构建及测序 选用 FastDNA[®] SPIN Kit for soil (MP Biomedicals) 试剂盒提取样本DNA。使用引物799F(5'-AACMGGATTAGATACCKG-3')、1193R(5'-ACGTCATCCCCACCTTCC-3')和1392R(5'-ACGGGCGGTGTGTRC-3')对细菌16S rDNA V5~V7区域进行巢式扩增。第一轮PCR扩增使用引物799F和1392R,程序为:经95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min 预变性后,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s;55 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s进行27个循环扩增,,然后72 $^{\circ}\text{C}$ 稳定延伸10 min。第一轮扩增产物使用AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences) 回收纯化后作为第二轮PCR反应的模板。第二轮PCR使用引物799F和1193R,除循环数变更为13外,其余程序同第一轮PCR。PCR反应体系为:5 $\times$ TransStart FastPfu 缓冲液4 μL ,2.5 mmol/L dNTPs 2 μL ,上游引物(5 $\mu\text{mol/L}$)0.8 μL ,下游引物(5 $\mu\text{mol/L}$)0.8 μL ,TransStart FastPfu DNA 聚合酶0.4 μL ,模板DNA 10 ng,用ddH₂O补足至20 μL ,每个样本3个重复。将同一样本的PCR产物混合后使用2%琼脂糖凝胶纯化回收PCR产物。纯化后的PCR产物使用2%琼脂糖凝胶电泳进行质量检测,并检测DNA浓度。PCR产物质量及浓度合格后,使用NEXTFLEX Rapid DNA-Seq Kit 进行建库,利用Illumina公司的Miseq PE300平台进行测序。

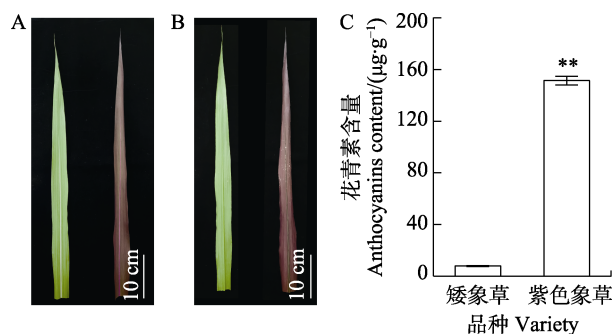
1.2.4 生物信息学分析 测序所得原始数据使用QIIME2-2022.2平台进行质量过滤和分类学分析^[27]。利用DADA2软件去除引物,对序列进行质量过滤和校正,鉴别出操作分类单元(operational taxonomic units, OTU)的代表序列,生成OTU表^[28]。

每个OTU的代表序列使用Greengenes(13_8)数据库进行分类学注释。依据OTU表,使用QIIME2软件计算出样本 α 多样性的Shannon多样性指数和Faith系统发育多样性指数;使用QIIME2软件构建样本间的Bray-Curtis距离矩阵,基于该矩阵进行主成分分析(PCoA),并使用非加权组平均法(UPGMA)对样本进行聚类分析。通过置换多元方差分析(permutational multivariate analysis of variance, PERMANOVA)计算微生物群落结构的差异以及微生物群落组成分析(analysis of composition of microbiomes, ANCOM)探究样本间OTU的差异^[29-30]。利用OriginPro 2022b软件中的Welch's t 检验分析属水平相对丰度的差异,通过Spearman相关性分析检验属水平相对丰度与花青素含量的相关性,并绘制柱状图。

2 结果与分析

2.1 象草花青素含量定量分析

紫色象草与矮象草的叶型相似,但颜色差异很大。由于花青素的积累,紫色象草的叶片正面和背面均为紫色,而矮象草叶片整体为绿色(图1A,图1B)。为进一步探究2种象草叶片花青素含量的差异,分别对2种象草叶片的花青素含量进行定量分析。结果表明,紫色象草叶片中的花青素含量为 $(150.15 \pm 3.41) \mu\text{g/g}$,矮象草为 $(7.80 \pm 0.29) \mu\text{g/g}$,2种象草叶片花青素含量呈极显著差异($P < 0.001$),紫色象草叶片中的花青素含量是矮象草的近20倍(图1C)。



A: 叶片正面; B: 叶片背面; 左侧为矮象草, 右侧为紫色象草。

C: 叶片花青素含量, **表示差异极显著 ($P < 0.001$)。

A: The front leaves; B: The back of leaves; On the left is

P. purpureum cv. Mott, on the right is *P. purpureum* cv. Purple.

C: Anthocyanins content of leaves. ** indicates extremely significant difference ($P < 0.001$).

图1 象草叶片表型及花青素含量

Fig. 1 Phenotype and anthocyanins content of elephant grass leaf

2.2 象草叶际细菌 α 多样性分析

采用 16S rRNA 测序技术对 2 种象草叶片表面附生细菌及叶片内生细菌群落进行分析，共得到 2 994 242 条 reads，经分析得到 26 门、45 纲、76 目、120 科、155 属和 881 个 OTU。Shannon

指数是反映物种丰富度和均匀度的一个均匀指标；Faith 系统发育多样性指数反映群落的丰富度。本研究利用这 2 个指数在 OTU 水平分别对两类样本进行 α 多样性分析。结果表明，紫色象草和矮象草同一区室的 α 多样性均无显著差异（图 2）。

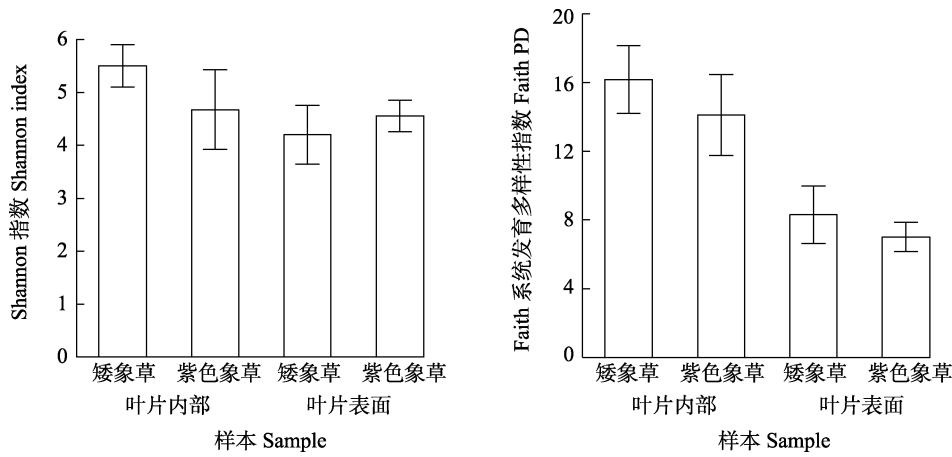
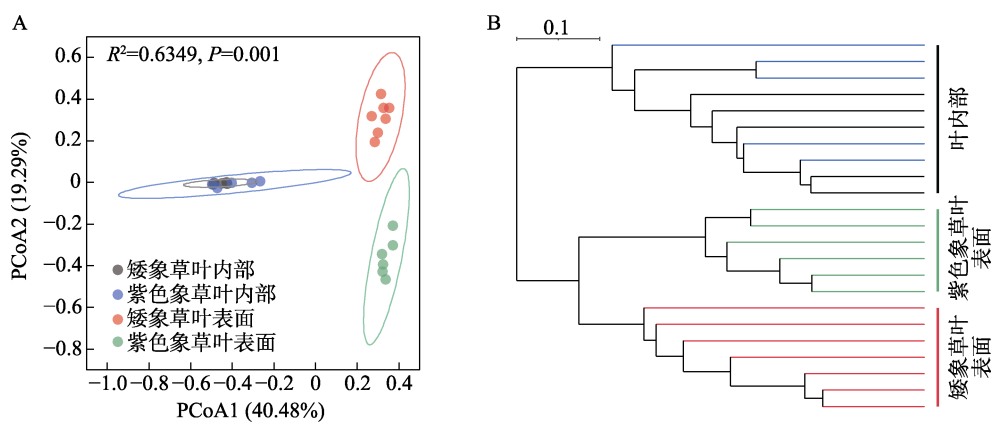


图 2 叶际细菌群落的 α 多样性指数
Fig. 2 Alpha diversity index of phyllosphere bacterial communities

2.3 象草叶际细菌 β 多样性分析

为进一步探究花青素对象草叶际细菌群落结构的影响，根据 OTU 水平的相对丰度，对紫色象草和矮象草的叶际细菌群落进行主成分分析（图 3A）。主成分 1 解释度为 40.48%，主成分 2 解释度为 19.29%，总解释度为 59.77%。其中，叶表面附生细菌样本和叶内生细菌样本在 X 轴（主成分 1）出现分离。进一步分析 2 种象草的叶际细菌群落发现，2 种象草叶片内部细菌样本距离较近，而叶片表面附生细菌样本在 Y 轴（主成分 2）出现分离，紫色象草和矮象草样品明显分开。使

用非加权组平均法（unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA）对叶际细菌样本进行聚类分析也得出相似结果：所有样本可以聚类为 3 个分支，分支 1 包含所有叶片内部细菌样本，分支 2 为紫色象草表面细菌样本，分支 3 为矮象草表面细菌样本（图 3B）。此外，通过置换多元方差分析（permutational multivariate analysis of variance, PERMANOVA）发现，2 种象草叶片表面附生细菌样本的差异较叶片内生细菌更显著（表 1）。以上结果显示，紫色象草和矮象草叶表细菌群落存在较大差异。



A: 基于 Bray-Curtis 的主成分分析，圆圈表示样本 95%置信区间；B: 基于 UPGMA 的聚类分析。
A: Principal component analysis (PCoA) based on Bray-Curtis, the circle indicates the 95% confidence interval of the sample;
B: Cluster analysis based on UPGMA.

图 3 象草叶际细菌 β 多样性分析

Fig. 3 Beta diversity analysis of elephant grass phyllosphere bacteria

表 1 PERMANOVA 评估花青素含量对
细菌群落结构的影响

Tab. 1 Effects of anthocyanins on bacterial community
structure assessed by PERMANOVA

区室 Compartment	配对比较 Pairwise comparison	<i>F</i>	决定系数 <i>R</i> ²	<i>P</i>
叶内部	Purple vs Mott	2.422 480	0.232 428	0.011*
叶表面	Purple vs Mott	9.974 927	0.475 564	0.002**

注：*表示差异显著 ($P<0.05$)；**表示差异极显著 ($P<0.01$)。
Note: * indicates significant difference ($P<0.05$); ** indicates
extremely significant difference ($P<0.01$).

2.4 象草叶际细菌组成分析

为解析象草叶际细菌组成，在细菌门水平上
对不同样本进行相对丰度分析（图 4，表 2）。结果
显示，叶片内部细菌的优势菌门（占比≥1%）为变
形菌门（Proteobacteria）、拟杆菌门（Bacteroidetes）
和厚壁菌门（Firmicutes）；叶片表面细菌的优势菌
门除上述 3 种外，还包括放线菌门（Actinobacteria）
和异常球菌-栖热菌门（Deinococcus-Thermus）。紫

色象草叶片表面变形菌门和异常球菌-栖热菌门
的相对丰度显著大于矮象草，而拟杆菌门相对丰
度则显著小于矮象草。以上结果表明，紫色象草
和矮象草叶际微生物优势菌门及其相对丰度存在
差异。

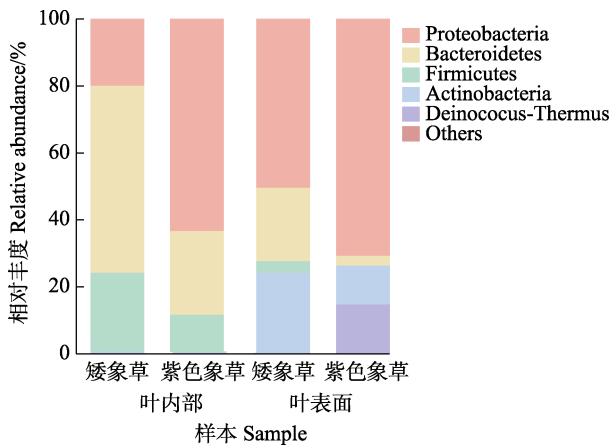


图 4 2 种象草叶际细菌在门水平的相对丰度

Fig. 4 Relative abundance of phyllosphere bacteria
of elephant grass at phyla level

表 2 2 种象草叶际优势菌门的相对丰度

Tab. 2 Relative abundance of phyllosphere dominant bacteria at phyla level between two cultivars of elephant grass %

门 Phylum	叶内部 Endosphere		叶表面 Episphere	
	矮象草 Mott	紫色象草 Purple	矮象草 Mott	紫色象草 Purple
变形菌门 Proteobacteria	19.86	60.22*	49.43	68.21
拟杆菌门 Bacteroidetes	54.07	26.27*	20.10	2.91*
厚壁菌门 Firmicutes	21.80	11.22	4.63	0.09*
放线菌门 Actinobacteria	0.72	0.53	25.72	12.50
异常球菌-栖热菌门 Deinococcus-Thermus	0	0.05	0.10	16.10*

注：*表示差异显著 ($P<0.05$)。
Note: * indicates significant difference ($P<0.05$).

2.5 象草叶际细菌差异 OTU 及差异属分析

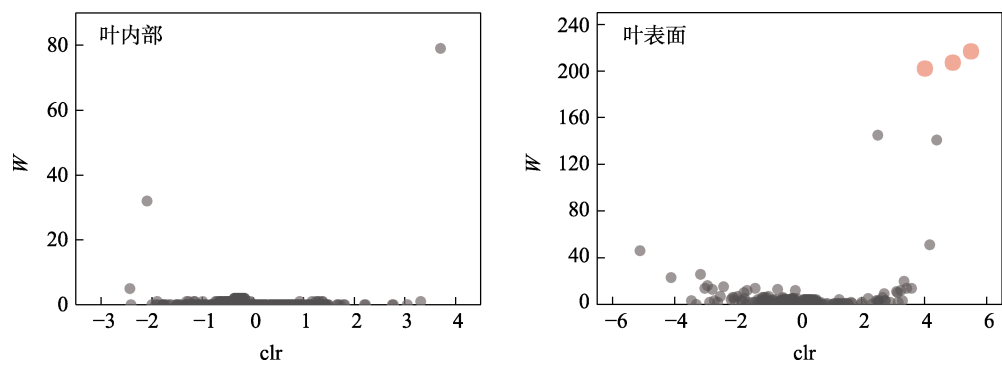
对紫色象草和矮象草的 OTU 相对丰度进行
组间差异分析（图 5）。图中横轴 *clr* 统计量表示
差异量的大小，当其为正值时，表示紫色象草中
该 OTU 的相对丰度高于矮象草，负值则相反；纵
轴 *W* 统计量表示显著度。在 2 种象草叶片内部细
菌群落中未发现相对丰度差异显著的 OTU，而在
叶片表面细菌群落中发现 3 个相对丰度显著差异
的 OTU，紫色象草 OTU7（甲基杆菌属 *Methylo-*
bacterium）、OTU8（异常球菌属 *Deinococcus*）和
OTU69（*Unclassified_Methylobacteriaceae*）的相
对丰度均高于矮象草（表 3）。在细菌属水平上，
紫色象草表面细菌群落中的甲基杆菌属、异常球
菌和 *Unclassified_Methylobacteriaceae* 的相对丰

度显著高于矮象草。同时，Spearman 相关性分析
得出，象草表面甲基杆菌属、异常球菌和 *Unc-*
lassified_Methylobacteriaceae 的相对丰度与花青
素含量呈正相关（图 6，表 4）。

3 讨论

3.1 紫色象草和矮象草叶片花青素含量差异
显著

花青素是植物的重要次生代谢物，是影响植
物颜色的关键色素之一^[22]。多项研究表明，花青
素参与植物抗逆反应，能提高植物耐逆境胁迫能
力^[31-32]。目前，学界对于花青素的生物合成通路
以及调控网络已有较为清晰的认识，已发现多种
转录因子参与花青素合成的调控，如 MYB 家族、



每个点代表独立的 OTU，红色点表示差异显著的 OTUs。
Each point represents an individual OTU, and red dots indicate significant different OTUs.

图 5 2 种象草叶际微生物差异 OTU

Fig. 5 Significantly different OTUs between two cultivars of elephant grass

表 3 2 种象草叶表面附生细菌群落差异 OTU
Tab. 3 Different OTUs in episphere bacteria communities between two cultivars of elephant grass

OTU 名称 OTU name	属 Genus	W 值 W Value	相对丰度 Relative abundance/%	
			矮象草 Mott	紫色象草 Purple
OTU7	甲基杆菌属 <i>Methylobacterium</i>	217	0.16	15.60***
OTU8	异常球菌属 <i>Deinococcus</i>	207	0.10	15.22*
OTU69	Unclassified_ <i>Methylobacteriaceae</i>	2002	0	1.40**

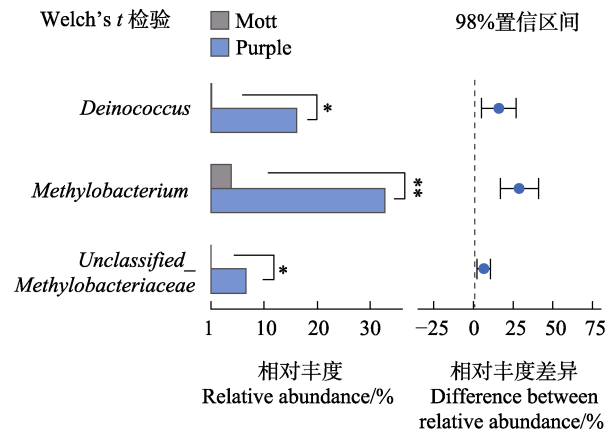
注：*表示差异显著 ($P<0.05$)；**、***表示差异极显著 ($P<0.01$, $P<0.001$)。
Note: * indicates significant difference ($P<0.05$); **, *** indicates extremely significant difference ($P<0.01$, $P<0.001$).

表 4 2 种象草叶表面附生细菌属水平的相对丰度与花青素含量的相关性分析
Tab. 4 Correlation analysis between the relative abundance of episphere bacteria communities at the genus level and the content of anthocyanins

属 Genus	Sperman 相关系数 Sperman correlation coefficient	P
甲基杆菌属 <i>Methylobacterium</i>	0.6343	0.019 90
异常球菌属 <i>Deinococcus</i>	0.6770	0.011 04
Unclassified_ <i>Methylobacteriaceae</i>	0.8440	0.000 29

bHLH 家族和 WD 蛋白等。多项研究解析了作物中影响花青素合成的关键调控因子^[33-35]，如蒺藜苜蓿中过表达 *LAP1* 基因可促进花青素在叶片中的积累^[36]；玉米中 *ZmR1* 基因的序列变异及表达水平影响了花青素在整个植株上的积累^[37]；白色葡萄中 *VvmybA1* 基因启动子区域存在反转座子插入，导致花色素苷合成基因转录受阻，影响了浆果着色，从而使果实呈现白色^[38]。

紫色象草是叶片高花青素含量的象草品种。本研究发现，紫色象草叶片中的花青素含量是矮象草叶片中花青素含量的近 20 倍。研究表明，2 种象草花青素种类不同，紫色象草花青素多为天竺葵素和锦葵色素的衍生物，矮象草花青素多为矢车菊素的衍生物^[24]。目前对于紫色象草叶片高花青素含量的遗传机理已有一定的解析。紫色象草叶片中花青素合成基因表达水平较绿色叶片的矮象草显著上调，多个调控花青素合成的转录因子的序列具有多态性，其表达水平与矮象草差异显著^[24]，这些重要基因的多态性及差异表达可能是导致紫色象草叶片花青素高积累的重要原因。



*表示差异显著 ($P<0.05$)；**表示差异极显著 ($P<0.01$)。
* indicates significant difference ($P<0.05$); ** indicates extremely significant difference ($P<0.01$).

图 6 2 种象草叶表面附生细菌群落属水平的相对丰度
Fig. 6 Relative abundance of episphere bacteria communities at genus level between two cultivars of elephant grass

3.2 紫色象草和矮象草叶表面附生细菌群落存在差异

植物的次生代谢物可影响其叶际微生物群落结构^[15-18]。为探究不同花青素含量植物叶际微生物群落的差异性,本研究选取 2 个不同花青素含量的象草品种(紫色象草和绿色叶片的矮象草),通过对 2 个品种叶际细菌进行 α 多样性分析、 β 多样性分析、OTU 相对丰度分析以及细菌群落组成分析,比较紫色象草和矮象草叶际细菌结构。2 种象草叶际细菌高通量测序结果表明,紫色象草与矮象草叶际细菌群落的优势菌门及其相对丰度均存在差异。PCoA 分析、样本聚类分析以及 PERMANOVA 分析结果表明,紫色象草和矮象草表面的附生细菌群落出现显著分离,提示叶片表面附生细菌群落可能与花青素含量及种类相关。此外,花青素可改变叶片对光的吸收^[39]。因此,推测紫色象草叶片中的花青素可能通过影响叶片中光线的透过率,改变叶片背部的光线强度,进而影响叶面附生细菌的群落结构。

3.3 紫色象草叶片表面甲基杆菌和异常球菌富集

本研究在叶片附生细菌中发现 3 个 OTUs 的相对丰度差异显著,这些 OTUs 分别来自甲基杆菌属(*Methylobacterium*)、异常球菌属(*Deinococcus*)和 *Unclassified_Methylobacteriaceae*,其中甲基杆菌属从属于甲基杆菌科。研究发现,紫色象草叶表面甲基杆菌属的相对丰度较矮象草显著提升,进一步分析发现,甲基杆菌属的相对丰度与花青素含量呈正相关。研究表明,根际和叶际的甲基杆菌可以提高作物的产量、增强植物的抗逆性^[40-41]。紫色象草适应性强,产草量高^[26],其叶表面附生的甲基杆菌相对丰度的增加,可能促进紫色象草的生长,进一步提高紫色象草的产量和抗逆性,这也为植物与叶际微生物的相互作用提供一定的证据。异常球菌属具有抗辐射、抗氧化等特性^[42]。已有研究报道,银杏叶片中异常球菌属的相对丰度与叶片中类黄酮物质的浓度具有正相关效应,体外培养异常球菌属细菌时添加黄酮类化合物可提高其增殖速度^[17]。异常球菌属的细菌具有蔗糖-4-葡萄糖基转移酶(amylosucrase),以槲皮素(quercetin,一种黄酮类化合物)为底物,可以生成多种槲皮素糖苷(quercetin glucosides),提示异常球菌属细菌可有效利用黄酮类化合物^[43]。本研究中,异常球菌属的相对丰度在富含花

青素的紫色象草叶片表面上更高,表明其相对丰度与花青素浓度相关,为黄酮类化合物促进异常球菌属细菌增殖提供了新证据。

3.4 花青素对微生物与宿主相互关系的影响

研究表明,与绿色象草相比,使用高花青素含量的紫色象草喂养动物可提高动物的产量^[25]。此外,在饲料中添加红酒多酚物质可改变动物的肠道菌群结构^[44],肠道内菌群结构会影响宿主的健康状况^[45]。本研究发现,叶际细菌群落结构与叶片花青素含量存在联系,提示多酚物质可能对细菌产生影响,改变其群落结构,为解析紫色象草对动物生长的促进作用提供了新的研究方向。

4 结论

研究表明,紫色象草叶际细菌群落结构与矮象草存在显著差异,表明象草叶片中的花青素含量和象草叶际细菌群落结构相关。在紫色象草叶片表面,能促进植物生长的甲基杆菌属以及抗辐射、抗氧化的异常球菌属的相对丰度更高,表明花青素含量的提升可能促进这类对宿主有积极作用的细菌的生长,进而辅助植物的抗逆反应。本研究从细菌菌落结构的角度解析了象草叶片中的花青素与叶际细菌菌落结构的相关性,为解析紫色象草的优良生产性能及饲用价值提供了新思路。

参考文献

- [1] KOSKELLA B. The phyllosphere[J]. *Current Biology*, 2020, 30(19): 1143-1149.
- [2] GONG T, XIN X. Phyllosphere microbiota: community dynamics and its interaction with plant hosts[J]. *Journal Integrative Plant Biology*, 2021, 63(2): 297-304.
- [3] VORHOLT J A. Microbial life in the phyllosphere[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10(12): 828-840.
- [4] 杨宽,王慧玲,叶坤浩,王佩,孟广云,罗成,郭力维. 叶际微生物及与植物互作的研究进展[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2021, 36(1): 155-164.
YANG K, WANG H L, YE K H, WANG P, MENG G Y, LUO C, GUO L W. Advances in research on phyllosphere microorganisms and their interaction with plants[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 2021, 36(1): 155-164. (in Chinese)
- [5] CHEN T, NOMURA K, WANG X, SOHRABI R, XU J, YAO L, PAASCH B C, MA L, KREMER J, CHENG Y, ZHANG L, WANG L, WANG N, WANG E, XIN X F, HE S Y. A plant genetic network for preventing dysbiosis in the

- phyllosphere[J]. *Nature*, 2020, 580(7805): 653-657.
- [6] AGLER M T, RUHE J, KROLL S, MORHENN C, KIM S T, WEIGEL D, WALDOR M K. Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation[J]. *PLoS Biology*, 2016, 14(1): e1002352.
 - [7] JOHNSTON-MONJE D, MOUSA W K, LAZAROVITS G, RAIZADA M N. Impact of swapping soils on the endophytic bacterial communities of pre-domesticated, ancient and modern maize[J]. *BMC Plant Biology*, 2014, 14(1): 233.
 - [8] HARDOIM P R, HARDOIM C C P, OVERBEEK L S, ELSAS J D. Dynamics of seed-borne rice endophytes on early plant growth stages[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30438.
 - [9] MAIGNIEN L, DE FORCE E A, CHAFEE M E, EREN A M, SIMMONS S L. Ecological succession and stochastic variation in the assembly of *Arabidopsis thaliana* phyllosphere communities[J]. *mBio*, 2014, 5(1): e00682-13.
 - [10] REN G, ZHU C, ALAM M S, TOKIDA T, SAKAI H, NAKAMURA H, USUI Y, ZHU J, HASEGAWA T, JIA Z. Response of soil, leaf endosphere and phyllosphere bacterial communities to elevated CO₂ and soil temperature in a rice paddy[J]. *Plant and Soil*, 2015, 392(1/2): 27-44.
 - [11] LATZ M A C, KERRN M H, SØRENSEN H, COLLINGE D B, JENSEN B, BROWN J K M, MADSEN A M, JØRGENSEN H J L. Succession of the fungal endophytic microbiome of wheat is dependent on tissue-specific interactions between host genotype and environment[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 759: 143804.
 - [12] ALSANIUS B W, BERGSTRAND K J, HARTMANN R, GHARAIE S, WOHANKA W, DORAIS M, ROSBERG A K. Ornamental flowers in new light: Artificial lighting shapes the microbial phyllosphere community structure of greenhouse grown sunflowers (*Helianthus annuus* L.)[J]. *Scientia Horticulturae*, 2017, 216: 234-247.
 - [13] HORTON M W, BODENHAUSEN N, BEILSMITH K, MENG D, MUEGGE B D. Genome-wide association study of *Arabidopsis thaliana* leaf microbial community[J]. *Nature Communications*, 2014, 5(1): 5320.
 - [14] BERENS M L, WOLINSKA K W, SPAEPEN S, ZIEGLER J, NOBORI T. Balancing trade-offs between biotic and abiotic stress responses through leaf age-dependent variation in stress hormone cross-talk[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2019, 116(6): 2364-2373.
 - [15] 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): 364-372.
 - [16] HUANG M, SANCHEZ-MOREIRAS A M, ABEL C, SOHRABI R, LEE S, GERSHENZON J, THOLL D. The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (*E*)- β -caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen[J]. *New Phytologist*, 2012, 193(4): 997-1008.
 - [17] DENG Y, HUANG H, LEI F, FU S, ZOU K, ZHANG S, LIU X, JIANG L, LIU H, MIAO B, LIANG Y. Endophytic bacterial communities of *Ginkgo biloba* leaves during leaf developmental period[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 698703.
 - [18] SUN K, SUN H, QIU Z, LIU Q. Comparative analyses of phyllosphere bacterial communities and metabolomes in newly developed needles of *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook. at four stages of stand growth[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 717643.
 - [19] JAAKOLA L. New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits[J]. *Trends in Plant Science*, 2013, 18(9): 477-483.
 - [20] ONKOKESUNG N, REICHELT M, DOORN A, SCHUURINK R C, LOON J J A, DICKE M. Modulation of flavonoid metabolites in *Arabidopsis thaliana* through overexpression of the MYB75 transcription factor: role of kaempferol-3,7-dirhamnoside in resistance to the specialist insect herbivore *Pieris brassicae*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(8): 2203-2217.
 - [21] KOES R, VERWEIJ W, QUATTROCCHIO F. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways[J]. *Trends in Plant Science*, 2005, 10(5): 236-242.
 - [22] 贾赵东, 马佩勇, 边小峰, 杨清, 郭小丁, 谢一芝. 植物花青素合成代谢途径及其分子调控[J]. *西北植物学报*, 2014, 34(7): 1496-1506.
JIA Z D, MA P Y, BIAN X F, YANG Q, GUO X D, XIE Y Z. Biosynthesis metabolic pathway and molecular regulation of plants anthocyanin[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2014, 34(7): 1496-1506. (in Chinese)
 - [23] 温晓娜, 简有志, 解新明. 象草资源的综合开发利用[J]. *草业科学*, 2009, 26(9): 108-112.
WEN X N, JIAN Y Z, XIE X M. The comprehensive exploitation and utilization of *Pennisetum purpureum*[J]. *Pratacultural Science*, 2009, 26(9): 108-112. (in Chinese)
 - [24] ZHOU S, CHEN J, LAI Y, YIN G, CHEN P, PENNERMAN K K, YAN H, WU B, ZHANG H, YI X, WANG C, FU M, ZHANG X, HUANG L, MA X, PENG Y, YAN Y, NIE G, LIU L. Integrative analysis of metabolome and transcriptome reveals anthocyanins biosynthesis regulation in grass species *Pennisetum purpureum*[J]. *Industrial Crops & Products*, 2019, 138: 111470.
 - [25] 姚娜, 易显凤, 赖至强, 梁永良, 邓素媛, 赖大伟. 紫色象草对肉鹅生长性能及血清生化指标的影响[J]. *南方农业学报*, 2016, 47(12): 2163-2168.
YAO N, YI X F, LAI Z Q, LIANG Y L, DENG S Y, LAI D W. Effect of *Pennisetum purpureum* Schumab cv. Purple on

- growth performance and serum biochemical parameters of meat geese[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2016, 47(12): 2163-2168. (in Chinese)
- [26] 易显凤, 赖至强, 姚娜, 蔡小艳, 韦锦益, 赖大伟, 梁永良. 紫色象草在我国南方地区的种植表现[J]. *南方农业学报*, 2015, 46(3): 523-527.
- YI X F, LAI Z Q, YAO N, CAI X Y, WEI J Y, LAI D W, LIANG Y L. Plant performance of *Pennisetum purpureum* Schumab cv. Purple in southern region of China[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2015, 46(3): 523-527. (in Chinese)
- [27] BOLYEN E, RIDEOUT J R, DILLON M R, BOKULICH N A, ABNET C C, AL-GHALITH G A, ALEXANDER H, ALM E J, ARUMUGAM M, ASNICAR F. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(8): 852-857.
- [28] CALLAHAN B J, MCMURDIE P J, ROSEN M J, HAN A W, JOHNSON A J A, HOLMES S P. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data[J]. *Nature Methods*, 2016, 13(7): 581-583.
- [29] ANDERSON M J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance[J]. *Austral Ecology*, 2001, 26(1): 32-46.
- [30] MANDAL S, VAN TREUREN W, WHITE R A, EGGESBØ M, KNIGHT R, PEDDADA S D. Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition[J]. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 2015, 26: 27663.
- [31] BALLARÉ C L. Stress under the sun: spotlight on ultraviolet-B responses[J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(4): 1725-1727.
- [32] YAN W, LI J, LIN X, WANG L, YANG X, XIA X, ZHANG Y, YANG S, LI H, DENG X, KE Q. Changes in plant anthocyanin levels in response to abiotic stresses: a meta-analysis[J]. *Plant Biotechnology Reports*, 2022, 16(5): 497-508.
- [33] CHEN L, HU B, QIN Y, HU G, ZHAO J. Advance of the negative regulation of anthocyanin biosynthesis by MYB transcription factors[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, 136: 178-187.
- [34] YAN H, PEI X, ZHANG H, LI X, ZHANG X, ZHAO M, CHIANG V L, SEDEROFF R R, ZHAO X. MYB-mediated regulation of anthocyanin biosynthesis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(6): 3103.
- [35] MA Y, MA X, GAO X, WU W, ZHOU B. Light induced regulation pathway of anthocyanin biosynthesis in plants[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(20): 11116.
- [36] PEEL G J, PANG Y, MODULO L V, DIXON R A. The LAP1 MYB transcription factor orchestrates anthocyanidin biosynthesis and glycosylation in *Medicago*[J]. *The Plant Journal*, 2009, 59(1): 136-149.
- [37] LUO M, LU B, SHI Y, ZHAO Y, WEI Z, ZHANG C, WANG Y, LIU H, SHI Y, YANG J, SONG W, LU X, FAN Y, FAN Y, XU L, WANG R, ZHAO J. A newly characterized allele of *ZmR1* increases anthocyanin content in whole maize plant and the regulation mechanism of different *ZmR1* alleles[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2022, 135(9): 3039-3055.
- [38] AZUMA A, KOBAYASHI S, MITANI N, SHIRAISHI M, YAMADA M, UENO T, KONO A, YAKUSHIJI H, KOSHITA Y. Genomic and genetic analysis of *Myb*-related genes that regulate anthocyanin biosynthesis in grape berry skin[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2009, 117(6): 1009-1019.
- [39] ZHENG X T, YU Z C, TANG J W, CAI M L, CHEN Y L, YANG C W, CHOW W S, PENG C L. The major photoprotective role of anthocyanins in leaves of *Arabidopsis thaliana* under long-term high light treatment: antioxidant or light attenuator?[J]. *Photosynthesis Research*, 2021, 149(1/2): 25-40.
- [40] IRVINE I C, BRIGHAM C A, SUDING K N, MARTINY J B H. The abundance of pink-pigmented facultative methylotrophs in the root zone of plant species in invaded coastal sage scrub habitat[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31026.
- [41] RAJA P, BALACHANDAR D, SUNDARAM S P. Genetic diversity and phylogeny of pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria isolated from the phyllosphere of tropical crop plants[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2008, 45(1): 45-53.
- [42] SAJJAD W, AHMAD M, KHAN S, ILYAS S, HASAN F, CELIK C, MCPHAIL K, SHAH A A. Radio-protective and antioxidative activities of astaxanthin from newly isolated radio-resistant bacterium *Deinococcus* sp. strain WMA-LM9[J]. *Annals of Microbiology*, 2017, 67(7): 443-455.
- [43] RHA C S, KIM H G, BAEK NI, BAEK N I, KIN D O, PARK C S. Amylosucrase from *Deinococcus geothermalis* can be modulated under different reaction conditions to produce novel quercetin 4'-O- α -D-isomaltoside[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2020, 141: 109648.
- [44] DOLARA P, LUCERI C, FILIPPO C D, FILIPPO C D, FEMI A P, GIOVANNELLI L, CADERMI G, CECCHINI C, SILVI S, ORPIANESI C, CRESCI A. Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats[J]. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2005, 591(1/2): 237-246.
- [45] HALL A B, TOLONEN A C, XAVIER R J. Human genetic variation and the gut microbiome in disease[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2017, 18(11): 690-699.