

费菜内生细菌对其根部活性成分积累的影响及转录组分析

蒋侄丽, 傅海兰, 王艺璇, 李艳婷, 刘明杰, 吴 宣, 蒋继宏, 李露丹^①

[江苏师范大学生命科学学院 江苏省药食植物生物技术国家重点实验室(培育), 江苏 徐州 221116]

摘要: 为了研究费菜内生细菌对其根部活性成分积累的潜在机制, 利用前期从野生费菜 [*Phedimus aizoon* (Linn.)[†] Hart] 中分离得到的 3 株具有促生潜力的内生细菌, 以株龄 1 a 费菜扦插苗为实验材料, 测定目标菌株回接后费菜根部活性成分含量, 分析目标菌株接种后费菜中差异表达基因, 并对与促生和活性成分合成相关的差异表达基因进行实时荧光定量逆转录 PCR (qRT-PCR) 分析。结果显示: 与未接菌处理相比, 接种内生细菌菌株 Pwx052、Pwx053 和 Pwx056 处理费菜根部总黄酮、总多糖和总三萜的含量极显著 ($p < 0.01$) 升高, 但仅接种菌株 Pwx053 处理的三七皂苷含量极显著升高。根据分子鉴定结果, 初步鉴定菌株 Pwx053 为天蓝黄链霉菌 (*Streptomyces coelicoflavus*)。转录组分析结果显示: 接种菌株 Pwx053 的费菜转录组中上调差异表达基因富集的通路与植物防御反应、活性成分合成、细胞发育等有关。qRT-PCR 分析结果显示: 接种菌株 Pwx053 处理费菜根部与活性成分合成相关的 *CM3*、*HMGL* 等差异表达基因的表达呈上调趋势。上述研究结果表明: 菌株 Pwx053 处理费菜后引起植物防御反应, 并上调与活性成分合成相关基因表达, 从而促进费菜活性成分的积累, 说明菌株 Pwx053 具有开发为微生物菌肥的潜力。

关键词: 费菜; 内生细菌; 活性成分; 转录组

中图分类号: Q948.12⁺2.3; R282 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2024)05-0033-12

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2024.05.04

Effects of endophytic bacteria from *Phedimus aizoon* on the accumulation of active components in the roots of *P. aizoon* and transcriptome analysis JIANG Zhili, FU Hailan, WANG Yixuan, LI Yanting, LIU Mingjie, WU Xuan, JIANG Jihong, LI Ludan^① (Key Laboratory of Biotechnology for Medi-edible Plant of Jiangsu Province, School of Life Sciences, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221116, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2024, 33(5): 33-44

Abstract: To investigate the potential mechanisms of endophytic bacteria from *Phedimus aizoon* (Linn.)[†] Hart on the accumulation of active components in the roots of *P. aizoon*, three endophytic bacterial isolates with growth-promoting potential, which were previously isolated from wild *P. aizoon*, were utilized, and one-year-old cutting seedlings of *P. aizoon* were taken as the experimental material. The contents of active components in the roots of *P. aizoon* were measured after re-inoculation of the target bacterial isolate, differentially expressed genes in *P. aizoon* after inoculation of the target isolate were analyzed, and real-time fluorescent quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) was performed for differentially expressed genes related to growth promotion and active component synthesis. The results show that compared with uninoculated treatment, the contents of flavonoids, polysaccharides, and triterpenes in the roots of *P. aizoon* inoculated with endophytic bacterial isolates Pwx052, Pwx053, and

收稿日期: 2024-03-27

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(32101519); 江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20210919); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KYCX24_3020)

作者简介: 蒋侄丽(1998—), 女, 贵州遵义人, 硕士研究生, 主要从事植物与微生物互作方面的研究。

^①通信作者 E-mail: lil@jnu.edu.cn

引用格式: 蒋侄丽, 傅海兰, 王艺璇, 等. 费菜内生细菌对其根部活性成分积累的影响及转录组分析[J]. 植物资源与环境学报, 2024, 33(5): 33-44.

Pwx056 are extremely significantly ($p < 0.01$) increased, but only the content of notoginsenoside inoculated with isolate Pwx053 is extremely significantly increased. Based on the result of molecular identification, isolate Pwx053 is preliminarily identified as *Streptomyces coelicoflavus*. The transcriptome analysis result shows that the enriched pathways of up-regulated differentially expressed genes in the transcriptome of *P. aizoon* inoculated with isolate Pwx053 are related to plant defense response, active component synthesis, cell development, etc. The qRT-PCR analysis result shows that the expression of differentially expressed genes related to active component synthesis, such as *CM3* and *HMGL*, exhibits an up-regulation tendency in the roots of *P. aizoon* inoculated with isolate Pwx053. It is suggested that treatment of *P. aizoon* with isolate Pwx053 triggers plant defense response and up-regulates the expression of genes related to active component synthesis, thereby promoting the accumulation of active components in *P. aizoon*, indicating that isolate Pwx053 has the potential to be developed as microbial fertilizer.

Key words: *Phedimus aizoon* (Linn.)'t Hart; endophytic bacterium; active component; transcriptome

费菜 [*Phedimus aizoon* (Linn.)'t Hart] 又名景天三七、土三七, 为景天科 (Crassulaceae) 费菜属 (*Phedimus* Raf.) 药食两用的多年生草本植物, 具有“高原人参”和“雪山仙草”的美誉^[1]。费菜因其耐旱、耐寒、耐盐碱、适应性强而易于栽培, 广泛种植于四川、陕西、宁夏、青海等地^[2]。费菜味甘、微酸, 性平, 归心、肝经, 具有散瘀止血、宁心安神、解毒之功效^[3], 主要用于吐血、紫斑、外伤出血、跌打损伤、心悸失眠等病症^[4]。

费菜中主要有黄酮类、萜类、生物碱类、酚酸类等化学成分^[5-8]。其中, 黄酮类是费菜的主要活性成分。目前已有 48 种结构明确的黄酮类化合物从费菜中分离出来, 分为黄酮醇、异黄酮、黄酮、黄烷酮醇和黄烷-3-醇^[9]。费菜中酚酸类化合物主要为没食子酸、没食子酸甲酯和对羟基苯甲酸等^[10], 不同产地和药用部位中没食子酸、没食子酸甲酯和对羟基苯甲酸的含量及比例不同^[7]。费菜中生物碱类化合物主要为消旋甲基异石榴皮碱、左旋景天宁和消旋景天胺等^[11]。目前从费菜中分离出的萜类化合物主要为齐墩果酸、熊果酸和熊果苷^[12]。因此, 费菜具有极高的药用价值和经济价值, 其需求量不断增大, 但由于野生药源缺乏^[13], 人工培育费菜成为满足市场需求的主要途径。然而, 人工培育的费菜中有效成分积累量少、品质较差的问题仍待解决。

植物内生细菌可以入侵活的植物组织但不会引起疾病症状^[14], 并且能在正常和胁迫环境下通过改善植物营养吸收以及调节生长相关的植物激素使宿主植物直接受益^[15-16]。Schmidt 等^[17]分离了奇岗芒 (*Miscanthus × giganteus* J. M. Greef, Deuter ex Hodk., Renvoize) 的内生菌, 并在实验室、温室和田间筛选这些内生菌对该宿主的生长促进特性, 发现分离出的所

有内生菌都产生植物激素, 一些内生细菌还产生铁载体、溶解磷, 并在体外表表现出 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC) 脱氨酶活性, 促进宿主生长。Marag 等^[18]从玉米 (*Zea mays* Linn.) 中分离并筛选出的 31 个内生细菌菌株具有溶解磷、钾、锌, 生物固氮, 以及产生激素、铁载体、ACC 脱氨酶和氰化氢 (HCN) 等植物生长促进特性。内生细菌还可以通过产生水解酶、抗生素和限制病原体营养来防御病虫害, 间接促进植物生长^[19]。Islam 等^[20]从银杏 (*Ginkgo biloba* Linn.)、美国红豆杉 (*Taxus brevifolia* Nutt.)、赤松 (*Pinus densiflora* Siebold et Zucc.)、垂柳 (*Salix babylonica* Linn.) 等植物的不同部分分离出的 27 种内生细菌可以产生水杨酸 (SA), 其中菌株 EB-44 具有较好的抵抗烟草野火病的能力。内生细菌还能够产生与其宿主植物相同或相似的活性成分, 或增加宿主植物中活性成分的积累^[20-21]。Ptak 等^[22]从夏雪片莲 (*Leucjum aestivum* Linn.) 中分离出的新型内生细菌 *Paenibacillus lautus* 可产生 10 种石蒜科 (Amaryllidaceae) 生物碱。Song 等^[23]从人参 (*Panax ginseng* C. A. Mey.) 根部分离出的内生细菌菌株 LB 5-3 能够促进人参皂苷在不定根中的积累。

转录组分析在破译基因组结构和功能, 识别细胞、生理、生化和生物系统的遗传网络以及建立应对疾病、病原体和环境挑战的分子生物标志物方面发挥着重要作用^[24]。此外, 转录组分析在揭示植物中活性成分积累与基因表达的关系中也具有重要作用^[25-26]。Zhou 等^[27]通过转录组测序分析了羊蹄躅 [*Rhododendron molle* (Blume) G. Don] 中参与活性成分合成的差异表达基因, 进一步揭示了羊蹄躅中萜类、木质酚和类黄酮的生物合成途径。Zhao 等^[25]通过分析转录组与代谢组揭示了油樟 [*Cinnamomum*

longepaniculatum (Gamble) N. Chao ex H. W. Li)中活性成分含量与基因表达之间的相关性较强。Dhiman等^[28]利用转录组测序技术揭示了药用植物甘松 [*Nardostachys jatamansi* (D. Don) DC.]的活性成分生物合成相关基因和途径。

随着药用植物与微生物的共生关系受到广泛关注,研究者认识到药用植物的生长和代谢会受到内生菌的强烈影响^[29]。内生细菌曾被报道对药用植物具有良好的促进生长和活性成分积累的作用^[30-31]。费菜作为药食同源植物,目前研究主要集中在化学成分的相关功能分析,涉及利用其内生菌促进其活性成分积累等研究较少^[32]。作者所在课题组前期从野生费菜中分离获得3株内生细菌,其中菌株Pwx056具有较强的固氮能力、产吲哚乙酸(IAA)能力、产铁载体能力、产ACC脱氢酶能力、产纤维素酶能力和产蛋白酶能力,菌株Pwx052和Pwx053除具有上述促生功能外还具有较强的解磷能力(未发表)。本研究进一步探究这3株内生细菌对费菜活性成分积累的影响,以期初步揭示这3株内生细菌促进费菜活性成分积累的分子机制,为探究费菜与内生细菌的互作关系以及开发绿色、高效的微生物菌肥奠定基础,并为其其他药用植物的优质化生产提供理论参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试株龄1a的费菜扦插苗种植于江苏师范大学生命科学学院温室,温度(25±2)℃、空气相对湿度50%、光照度2000 lx、光照时间12 h·d⁻¹,菌种来源于作者所在课题组前期从野生费菜中分离获得的内生细菌菌株Pwx052、Pwx053和Pwx056。

1.2 方法

1.2.1 菌悬液和实验植株的制备 将菌株纯培养物接种到高氏一号液体培养基中,于(28±2)℃、200 r·min⁻¹条件下培养5 d活化菌株,按体积比1:100将已活化好的菌液转接于高氏一号液体培养基中,于(28±2)℃、200 r·min⁻¹条件下培养5 d,于室温、12000 r·min⁻¹离心4 min收集菌体,弃上清液,用无菌水洗涤,再按上述离心条件离心,重复2次,收集菌体,最后用无菌水将离心所得菌体重悬,于波长600 nm下调节吸光度至0.5,备用。

将体积比5:1的泥炭土和蛭石混合基质湿热灭

菌,选择大小、粗细基本一致的费菜植株,剪成株高约20 cm的实验植株,栽种到装有2 L上述混合基质的花盆(直径16 cm、高16 cm)中,每盆种植3株植株,适应生长14 d后,在每株费菜植株根部接种1 mL供试菌液,接种等体积无菌水作为对照(CK),每组7个重复,于温室中培养,培养条件与“1.1”中一致。接种菌液后每2 d各组补充相同体积的无菌水,在接种菌液后第7天取出植株全株,去除地上部,根部于-80℃冰箱保存,用于活性成分含量的测定。

1.2.2 活性成分含量测定

1.2.2.1 总黄酮含量的测定 参考蒋继宏等^[33]的方法测定总黄酮含量。取费菜新鲜根部样品,洗净剪碎后用液氮充分研磨,称取2 g粉末,按照质量体积比1:25加入体积分数80%乙醇,混匀后超声提取(35℃,240 W,15 min),然后加入1 mL质量体积分数5% NaNO₂,静置6 min后,加入1 mL质量体积分数10% Al(NO₃)₃,混匀后静置6 min,再加入8 mL 1 mol·L⁻¹ NaOH,用去离子水定容至50 mL,混匀后于波长510 nm下检测吸光度。

将芦丁标准品(上海源叶生物科技有限公司,纯度大于或等于98%)于50℃烘干至恒质量,用甲醇配制0.24 mg·mL⁻¹芦丁标准品溶液;分别取0.0、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 mL芦丁标准品溶液于25 mL容量瓶,各加入6.0 mL去离子水,然后加入1 mL质量体积分数5% NaNO₂,静置6 min后,加入1 mL质量体积分数10% Al(NO₃)₃,混匀后静置6 min,再加入8 mL 1 mol·L⁻¹ NaOH,于波长510 nm下检测吸光度,绘制标准曲线 $y = 0.0132x + 0.0020$ ($R^2 = 0.9991$)。

1.2.2.2 总多糖含量的测定 参考张艳俊等^[34]的方法,改良后进行总多糖含量测定。取费菜新鲜根部样品,洗净后于50℃烘干至恒质量,研磨后按质量体积比1:50加入去离子水,混匀后超声提取(50℃,240 W,40 min),滤纸过滤后取1 mL滤液,加入2 mL体积分数5%苯酚溶液后,立即滴加7 mL浓H₂SO₄,混匀,室温静置5 min,于40℃水浴加热20 min,取出冷却至室温,于波长490 nm下检测吸光度。

称取烘干(50℃)至恒质量的葡萄糖标准品(上海源叶生物科技有限公司,纯度大于或等于98%),用去离子水配制0.2202 mg·mL⁻¹葡萄糖标准品储备液。分别吸取2.0、4.0、6.0、8.0、10.0和12.0 mL葡萄糖标准品储备液,用去离子水定容至25 mL,分别

吸取 1.0 mL 各浓度储备液,加入 2 mL 体积分数 5% 苯酚溶液后,立即滴加 7 mL 浓 H_2SO_4 ,混匀,室温静置 5 min,于 40 °C 水浴加热 20 min,取出冷却至室温,于波长 490 nm 下检测吸光度,绘制标准曲线 $y = 7.099 9x + 0.008 8 (R^2 = 0.994 3)$ 。

1.2.2.3 总三萜含量的测定 参考蒋继宏等^[33]的方法测定总三萜含量。取费菜新鲜根部样品,清洗剪碎后用液氮充分研磨,称取 0.2 g 粉末于 50 mL 离心管,加入 10 mL 无水甲醇,超声提取(35 °C, 240 W, 2 h)后静置过夜;吸取提取液 0.1 mL 于 50 mL 离心管中,加入 0.2 mL 香草醛-冰乙酸标准品溶液和 0.8 mL 高氯酸溶液,混匀后于 70 °C 水浴加热 15 min;冷却至室温,再吸取 0.2 mL,加入冰乙酸 5.0 mL,于波长 545 nm 下检测吸光度。

称取熊果酸标准品(上海源叶生物科技有限公司,纯度大于或等于 98%),用甲醇配制 0.2 mg · mL⁻¹ 熊果酸标准品溶液;称取香草醛标准品(上海源叶生物科技有限公司,纯度大于或等于 98%),配制 0.05 g · mL⁻¹ 香草醛-冰乙酸标准品溶液;分别吸取 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 熊果酸标准品溶液,加入 0.2 mL 香草醛-冰乙酸标准品溶液和 0.8 mL 高氯酸溶液,混匀后于 70 °C 水浴加热 15 min,冷却至室温,再加入 5.0 mL 冰乙酸,于波长 545 nm 下检测吸光度,绘制标准曲线 $y = 3.971 8x + 0.044 3 (R^2 = 0.992 6)$ 。

1.2.2.4 三七皂苷含量的测定 参考 Wu 等^[35]的方法改良后进行三七皂苷含量测定。取费菜新鲜根部样品,于 50 °C 烘干至恒质量后研磨至粉末,按质量体积比 1 : 15 加入无水甲醇,浸泡 12 h,超声提取(60 °C, 240 W, 1 h)后静置过夜;吸取全部溶液于离心管,置于通风橱晾干,然后加入 2 mL 无水甲醇充分溶解后,于室温、12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,去渣后置于通风橱晾干。使用 U3000 液相色谱仪(美国 Thermo Fisher 公司)进行 HPLC 检测。色谱柱: Kromasil M05CLA25 100-5-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)(瑞典 Akzo Nobel 公司)。流动相:乙腈(A)-去离子水(B)二元梯度洗脱,洗脱程序:0~35 min,体积分数 83% A; 35~55 min,体积分数 74% A; 55~70 min,体积分数 74% A; 70~100 min,体积分数 69% A。检测波长 203 nm,柱温 20 °C,流速 1 mL · min⁻¹,进样体积 20 μL。

1.2.3 菌株的分子鉴定及费菜转录组学分析 根据

费菜活性成分检测结果,选择促进其活性成分积累最显著的菌株进行分子鉴定,并对接种该菌株后的费菜进行转录组测序分析。

1.2.3.1 菌株的分子鉴定 使用南京诺唯赞生物科技股份有限公司生产的试剂盒 FastPure Bacteria DNA Isolation Mini Kit 提取菌株的基因组 DNA。采用 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')、1492R(5'-GGTACCTTGTACGACTT-3') 引物扩增细菌 16S rRNA 片段,16S rRNA 基因 PCR 反应体系总体积 25.0 μL,包括 12.5 μL 2×Taq Master Mix、1.0 μL 27F 引物、1.0 μL 1492R 引物、2.5 μL DNA、8.0 μL ddH₂O。PCR 反应程序:95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 15 s、60 °C 退火 15 s、72 °C 延伸 2.5 min,30 个循环;72 °C 延伸 5 min。PCR 扩增产物交由生工生物工程(上海)股份有限公司测序。使用 NCBI 数据库(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行 BLAST 序列比对。根据序列比对结果,随机选择 10 株与菌株 Pwx053 同属、同种以及外类群的菌株,基于 16S rRNA 进行聚类分析,利用 Mega 11 软件、采用最大似然法构建系统发育树,自展值设置为 1 000。

1.2.3.2 样品制备、测序、组装及差异表达基因分析 对生长状态基本一致的株龄 1 a 的费菜扦插苗进行接菌处理,方法同“1.2.1”,分别于接种菌株后 0(CK)、6、24 h 取费菜根部样品,每组样品 3 个重复,取样后送北京百迈客生物科技有限公司,采用 Illumina NovaSeq 高通量测序平台对 cDNA 文库进行测序。获得高质量的测序数据之后,利用 Trinity 软件(<https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/wiki>)进行数据组装。统计 clean read 数、GC 含量和 Q30 碱基百分比(clean data 质量值大于或等于 30 的碱基所占的百分比)。同时评估 mRNA 片段化的随机性、mRNA 的降解情况,确保测序文库的质量。利用 DESeq2 软件(<http://bioconductor.org/packages/stats/bioc/DESeq2/>)分析接种菌株后不同时间之间的基因表达差异。按照同时满足“差异倍数(FC) ≥ 2、错误发现率(FDR) ≤ 0.01”的要求筛选差异表达基因。差异表达基因的功能注释信息通过 GO 数据库(<http://www.geneontology.org/>)和 KEGG 数据库(<http://www.genome.jp/kegg/>)获得。KEGG 数据库中,q 值小于 0.05 表示差异表达基因显著富集。

1.2.3.3 实时荧光定量逆转录 PCR(qRT-PCR)分析 选取与促生及活性成分积累相关的差异表达基

因进行 qRT-PCR 分析,内参基因为 *Actin*。引物设计由 NCBI 网站中 Primer-BLAST 完成,然后交由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表 1。使用北京艾德莱生物科技有限公司生产的 EASYspin Universal Plant RNA Kit 试剂盒提取接菌处理 0 和 24 h 的费菜根部的 RNA。

表 1 用于费菜差异表达基因 qRT-PCR 的引物序列
Table 1 Primer sequences used for qRT-PCR of differentially expressed genes in *Pheidium aizoon* (Linn.)'t Hart

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')
<i>Actin</i> -F	GAAGCCCAGTCCAAAAGAGGTATCC
<i>Actin</i> -R	ACATGGCAGGCACATTGAAAAGTCTC
<i>CDF1</i> -F	CATTTGCTGTGCTCGCTTGT
<i>CDF1</i> -R	TGGGGTTGTTTACCGTCCAG
<i>LHY</i> -F	AGGCTTACCACCTCCGTACT
<i>LHY</i> -R	TTGCGTGTGTTGTTTCTCCC
<i>UPP</i> -F	AGGCGAGCAGAGGTATTTGG
<i>UPP</i> -R	GCAGACTTGAACATGCCACC
<i>CM3</i> -F	AAGCGGAGACATTCGGACAA
<i>CM3</i> -R	AAGCGGCATGACCCATTCTT
<i>PLS</i> -F	AGCTAGGGCCTTGGCATTCTT
<i>PLS</i> -R	AAACTCTTGGAGGGGGATG
<i>HMGL</i> -F	CCTTAGTGTGTCGCCTCCAA
<i>HMGL</i> -R	ACTCGGGGATGGGGAGTTAT
<i>ARF</i> -F	TGCAGAAATGTGGAGCGAGTT
<i>ARF</i> -R	GCAACCTTTTCATTGGCGGT
<i>gapN</i> -F	AGCCGCTCCATGACCTTGT
<i>gapN</i> -R	TACTCCGAGGGGAATGGAA

使用南京诺唯赞生物科技股份有限公司生产的试剂盒 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR,以各组材料的 RNA 为模板进行逆转录。逆转录反应体系总体积 20.0 μL ,包括 2.8 μg 模板 RNA、4.0 μL 4 \times gDNA wiper Mix,加 ddH₂O 至 16.0 μL ,用移液枪轻轻吹打混匀后于 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 2 min,然后加入 4.0 μL 5 \times HiScript II Select qRT SuperMix II,移液枪轻轻吹打

混匀后于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 15 min,85 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 5 s。

使用南京诺唯赞生物科技股份有限公司生产的试剂盒 ChamQ SYBR qPCR Master Mix Q341,按照 ABI StepOne Plus 程序进行 qRT-PCR。qRT-PCR 反应体系总体积 20.0 μL ,包括 10.0 μL 2 \times ChamQ SYBR qPCR Master Mix、0.6 μL 正向引物、0.6 μL 反向引物、2.0 μL 模板 cDNA、6.8 μL ddH₂O。qRT-PCR 反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,共 40 个循环。重复实验 3 次。采用 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 法^[36]计算相对表达量。

1.3 数据处理和分析

利用 EXCEL 2016 软件对相关数据进行统计和整理;利用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和差异显著性分析(*t* 检验)。

2 结果和分析

2.1 费菜根部活性成分含量分析

接种费菜内生细菌的费菜根部活性成分含量见表 2。

2.1.1 总黄酮含量 由表 2 可见:接种菌株 Pwx052、Pwx053 和 Pwx056 处理组费菜根部的总黄酮含量分别为 21.24、29.57 和 23.56 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,极显著($p < 0.01$)高于对照(CK)组(16.78 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$),分别为 CK 组的 1.3、1.8 和 1.4 倍。

2.1.2 总多糖含量 由表 2 还可见:接种菌株 Pwx052、Pwx053 和 Pwx056 处理组费菜根部的总多糖含量分别为 59.93、48.91 和 41.42 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,极显著高于 CK 组(31.92 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$),分别较 CK 组升高了 88%、53% 和 30%。

2.1.3 总三萜含量 由表 2 还可见:接种菌株

表 2 接种费菜内生细菌的费菜根部活性成分含量($\bar{X} \pm SD$)

Table 2 The contents of active components in the roots of *Pheidium aizoon* (Linn.)'t Hart inoculated with endophytic bacteria from *P. aizoon* ($\bar{X} \pm SD$)

内生细菌 Endophytic bacterium	含量/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) ¹⁾ Content ¹⁾			
	总黄酮 Flavonoids	总多糖 Polysaccharides	总三萜 Triterpenes	三七皂苷 Notoginsenoside
对照 The control (CK)	16.78 \pm 0.68	31.92 \pm 1.14	21.93 \pm 0.78	1.85 \pm 0.54
Pwx052	21.24 \pm 0.39 **	59.93 \pm 2.01 **	33.15 \pm 3.87 **	1.01 \pm 0.10
Pwx053	29.57 \pm 0.68 **	48.91 \pm 2.41 **	46.67 \pm 4.57 **	3.40 \pm 0.10 **
Pwx056	23.56 \pm 0.68 **	41.42 \pm 1.26 **	35.42 \pm 0.64 **	2.18 \pm 0.41

¹⁾ **: 接种费菜内生细菌处理与对照间差异极显著($p < 0.01$) The differences between treatments inoculated with endophytic bacteria from *Pheidium aizoon* (Linn.)'t Hart and the control is extremely significant ($p < 0.01$).

Pwx052、Pwx053 和 Pwx056 处理组费菜根部的总三萜含量分别为 33.15、46.67 和 35.42 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 极显著高于 CK 组 (21.93 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$), 分别为 CK 组的 1.5、2.1 和 1.6 倍。

2.1.4 三七皂苷含量 由表 2 还可见: 接种菌株 Pwx052、Pwx053 和 Pwx056 处理组费菜根部的三七皂苷含量分别为 1.01、3.40 和 2.18 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 其中, 接种菌株 Pwx053 处理组的三七皂苷含量较 CK 组 (1.85 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 极显著升高, 增幅为 84%; 接种菌株 Pwx056 处理组的三七皂苷含量较 CK 组升高了 18%, 但差异不显著; 接种菌株 Pwx052 处理组的三七皂苷含量较 CK 组有所下降。

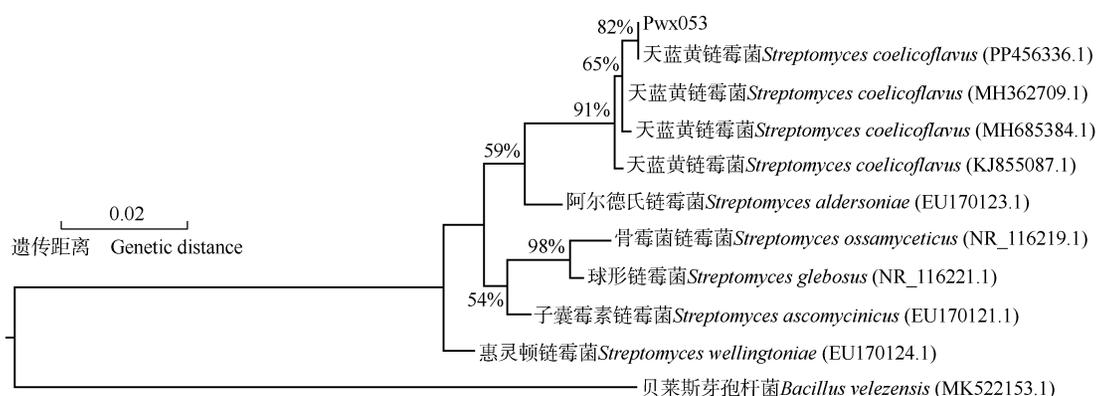
上述分析结果显示: 接种菌株 Pwx053 后, 费菜根部的总黄酮、总多糖、总三萜和三七皂苷含量均极

显著升高, 因此对菌株 Pwx053 进行进一步的研究。

2.2 菌株 Pwx053 的分子鉴定及费菜转录组学分析

2.2.1 菌株 Pwx053 的分子鉴定 根据序列比对结果, 菌株 Pwx053 与天蓝黄链霉菌 (*Streptomyces coelicoflavus*) 的相似性为 99.86%。系统发育树分析结果 (图 1) 显示: 菌株 Pwx053 与天蓝黄链霉菌聚为一支, 并获得较高支持度 (91%)。初步鉴定菌株 Pwx053 为天蓝黄链霉菌。

2.2.2 测序与组装结果 经过测序质量控制, 从接种费菜内生细菌菌株 Pwx053 的费菜转录组中获得的 clean data 的 GC 含量在 45.77% ~ 47.37% 之间, Q30 碱基百分比均不低于 93.76% (表 3)。mRNA 片段化随机性较高, 样品无严重降解现象, 可满足后续分析研究的要求。



分支节点处的数值为支持度 (仅显示大于 50% 的数值) The values at the branch nodes are support values (only values greater than 50% are shown). 括号中编号为各菌株在 GenBank 中的登录号 Nos. in the brackets are the accession numbers of each strain in GenBank.

图 1 基于 16S rRNA 的费菜内生细菌菌株 Pwx053 与其他 10 株菌株的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of endophytic bacterial isolate Pwx053 from *Pheidimus aizoon* (Linn.) 't Hart and other ten bacterial strains based on 16S rRNA

表 3 接种费菜内生细菌菌株 Pwx053 的费菜转录组数据统计结果
Table 3 Statistical results of transcriptome data of *Pheidimus aizoon* (Linn.) 't Hart inoculated with endophytic bacterial isolate Pwx053 from *P. aizoon*

编号 No.	接种时间/h Inoculation time	Clean read 数 Number of clean reads	GC 含量/% GC content	Q30 碱基百分比/% Percentage of Q30 base
1	0	22 810 388	46.10	94.54
2	0	20 573 125	45.92	94.69
3	0	20 813 828	45.77	94.34
4	6	23 476 469	47.37	94.23
5	6	26 330 405	46.97	94.54
6	6	22 160 427	45.95	94.23
7	24	20 176 594	45.78	94.33
8	24	21 982 865	46.45	93.76
9	24	26 441 827	45.77	93.83

2.2.3 差异表达基因分析 接种费菜内生细菌菌株 Pwx053 的费菜转录组差异表达基因数见表 4。由表 4 可见: 与接种 0 h 相比, 接种 6 h 筛选到 128 个差异

表 4 接种费菜内生细菌菌株 Pwx053 的费菜转录组差异表达基因数
Table 4 Number of differentially expressed genes in the transcriptome of *Pheidimus aizoon* (Linn.) 't Hart inoculated with endophytic bacterial isolate Pwx053 from *P. aizoon*

差异表达基因集 Differentially expressed gene set	差异表达基因数 Number of differentially expressed genes		
	上调 Up-regulated	下调 Down-regulated	总计 Total
0 h vs 6 h	64	64	128
0 h vs 24 h	34	51	85
6 h vs 24 h	107	143	250

表达基因,其中,64 个基因表达上调,64 个基因表达下调;与接菌 0 h 相比,接菌 24 h 筛选到 85 个差异表达基因,其中,34 个基因表达上调,51 个基因表达下调;与接菌 6 h 相比,接菌 24 h 筛选到 250 个差异表达基因,其中,107 个基因表达上调,143 个基因表达下调。

2.2.4 差异表达基因 GO 功能富集分析 接种费菜内生细菌菌株 Pwx053 的费菜转录组差异表达基因的 GO 功能富集分析结果见表 5。结果显示:与接菌 0 h 相比,接菌 6 h 费菜转录组中有 106 个差异表达基因在 GO 数据库中成功注释;与接菌 0 h 相比,接菌 24 h 费菜转录组中有 60 个差异表达基因在 GO 数据库中成功注释;与接菌 6 h 相比,接菌 24 h 费菜转录组中有 178 个差异表达基因在 GO 数据库中成功注释。接种费菜内生细菌菌株 Pwx053 的费菜转录组基因注释到的 GO 功能分为生物过程 (biological process)、细胞组分 (cellular component) 和分子功能 (molecular function) 3 大类。与接菌 0 h 相比,接菌 6 和 24 h 费菜转录组中差异表达基因,以及与接菌 6 h 相比,接菌 24 h 费菜转录组中差异表达基因主要聚集于生物过程大类中的代谢过程 (metabolic process)

和细胞过程 (cellular process)、细胞组分大类中的细胞 (cell) 和细胞部分 (cell part) 以及分子功能大类中的连接 (binding) 和催化活性 (catalytic activity)。

2.2.5 差异表达基因 KEGG 富集分析 对接种费菜内生细菌菌株 Pwx053 的费菜转录组中上调差异表达基因显著富集的前 20 个 KEGG 代谢通路进行进一步分析,结果 (表 6) 显示:与接菌 0 h 相比,接菌 6 h 费菜转录组上调差异表达基因富集的通路主要为碳代谢 (carbon metabolism)、剪接体 (spliceosome)、内质网中的蛋白质加工 (protein processing in endoplasmic reticulum)、氨基糖和核苷酸糖代谢 (amino sugar and nucleotide sugar metabolism)、MAPK 信号通路-植物 (MAPK signaling pathway-plant)、半乳糖代谢 (galactose metabolism)、乙醛酸和二羧酸代谢 (glyoxylate and dicarboxylate metabolism) 以及过氧化物酶体 (peroxisome) 等通路。与接菌 0 h 相比,接菌 24 h 上调差异表达基因主要富集在氨基糖和核苷酸糖代谢、MAPK 信号通路-植物等通路。与接菌 6 h 相比,接菌 24 h 上调差异表达基因主要富集在昼夜节律-植物 (circadian rhythm-plant)、半乳糖代谢 (galactose metabolism)、内吞作用 (endocytosis) 等通路。

表 5 接种费菜内生细菌菌株 Pwx053 的费菜转录组差异表达基因的 GO 功能富集分析结果

Table 5 GO functional enrichment analysis results of differentially expressed genes in the transcriptome of *Phedimus aizoon* (Linn.) 't Hart inoculated with endophytic bacterial isolate Pwx053 from *P. aizoon*

GO 功能注释 GO functional annotation	GO 功能注释 ID GO functional annotation ID	差异表达基因数 ¹⁾ Number of differentially expressed genes ¹⁾		
		0 h vs 6 h	0 h vs 24 h	6 h vs 24 h
		生物过程 Biological process	GO:0008152	
生殖 Reproduction	GO:0000003	1	1	5
代谢过程 Metabolic process	GO:0008152	31	27	76
细胞过程 Cellular process	GO:0009987	33	23	63
生殖过程 Reproductive process	GO:0022414	1	1	5
信号 Signaling	GO:0023052	3	3	6
多细胞生物过程 Multicellular organismal process	GO:0032501	3	3	9
发育过程 Developmental process	GO:0032502	7	2	8
生长 Growth	GO:0040007	1	1	1
单生物过程 Single-organism process	GO:0044699	28	19	49
节律过程 Rhythmic process	GO:0048511	8	—	6
应激反应 Response to stimulus	GO:0050896	16	10	30
定位 Localization	GO:0051179	15	6	20
生物调节 Biological regulation	GO:0065007	32	11	40
细胞组分的组织或生物合成 Cellular component organization or biogenesis	GO:0071840	8	3	8
解毒作用 Detoxification	GO:0098754	2	—	2
多生物过程 Multi-organism process	GO:0051704	—	1	5
运动 Locomotion	GO:0051179	—	—	3

续表5 Table 5 (Continued)

GO 功能注释 GO functional annotation	GO 功能注释 ID GO functional annotation ID	差异表达基因数 ¹⁾ Number of differentially expressed genes ¹⁾		
		0 h vs 6 h	0 h vs 24 h	6 h vs 24 h
细胞组分 Cellular component	GO:0005575			
胞外区 Extracellular region	GO:0005576	2	5	4
细胞 Cell	GO:0005623	48	16	55
膜 Membrane	GO:0016020	27	16	46
膜封闭腔 Membrane-enclosed lumen	GO:0031974	1	—	—
大分子复合物 Macromolecular complex	GO:0032991	4	3	8
细胞器 Organelle	GO:0043226	41	15	46
其他生物体 Other organism	GO:0044215	3	—	2
其他生物体部分 Other organism part	GO:0044217	3	—	2
细胞器部分 Organelle part	GO:0044422	10	7	13
膜部分 Membrane part	GO:0044425	25	13	42
细胞部分 Cell part	GO:0044464	48	16	55
超分子复合物 Supramolecular complex	GO:0099080	2	—	1
细胞连接 Cell junction	GO:0030054	—	3	3
胞外区部分 Extracellular region part	GO:0044421	—	2	3
共质体 Symplast	GO:0055044	—	3	3
分子功能 Molecular function	GO:0003674			
核酸结合转录因子活性 Nucleic acid binding transcription factor activity	GO:0001071	11	2	11
催化活性 Catalytic activity	GO:0003824	33	26	73
转运活性 Transporter activity	GO:0005215	12	4	16
连接 Binding	GO:0005488	58	24	84
电子载体活性 Electron carrier activity	GO:0009055	1	1	4
抗氧化活性 Antioxidant activity	GO:0016209	2	—	2
分子功能调节 Molecular function regulator	GO:0098772	2	3	9
信号传感器活性 Signal transducer activity	GO:0004871	—	1	2
营养储存库活性 Nutrient reservoir activity	GO:0045735	—	9	8
分子传感器活性 Molecular transducer activity	GO:0060089	—	1	2
结构分子活性 Structural molecule activity	GO:0005198	—	—	2

¹⁾ —: 无差异表达基因富集 There is no enrichment of differentially expressed genes.

表6 接种费菜内生细菌菌株 Pwx053 的费菜转录组上调差异表达基因显著富集的前 20 个 KEGG 代谢通路

Table 6 The top 20 KEGG metabolic pathways significantly enriched by up-regulated differentially expressed genes in the transcriptome of *Pseudomonas aizoon* (Linn.)^t Hart inoculated with endophytic bacterial isolate Pwx053 from *P. aizoon*

KEGG 通路 KEGG pathway	KEGG 通路 ID KEGG pathway ID	差异表达基因数 ¹⁾ Number of differentially expressed genes ¹⁾		
		0 h vs 6 h	0 h vs 24 h	6 h vs 24 h
真核生物中的核糖体生物发生 Ribosome biogenesis in eukaryotes	ko03008	1	—	2
碳代谢 Carbon metabolism	ko01200	4	—	—
磷酸戊糖途径 Pentose phosphate pathway	ko00030	2	—	1
二萜类生物合成 Diterpenoid biosynthesis	ko00904	1	—	—
乙醛酸和二羧酸代谢 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	ko00630	2	—	1
植物-病原体互作 Plant-pathogen interaction	ko04626	—	1	—
卟啉和叶绿素代谢 Porphyrin and chlorophyll metabolism	ko00860	1	—	—
氨基糖和核苷酸糖代谢 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	ko00520	3	2	—
剪接体 Spliceosome	ko03040	4	—	—
MAPK 信号通路-植物 MAPK signaling pathway-plant	ko04016	3	2	—
鞘脂代谢 Sphingolipid metabolism	ko00600	1	—	—
色氨酸代谢 Tryptophan metabolism	ko00380	2	—	—

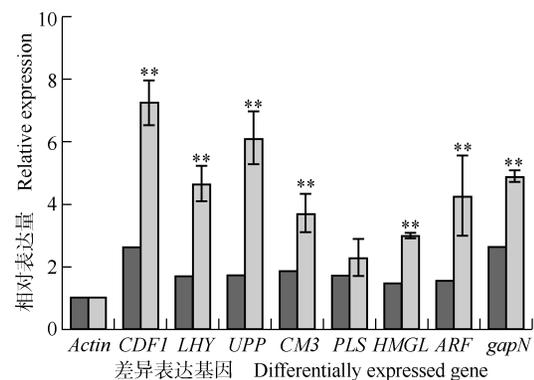
续表6 Table 6 (Continued)

KEGG 通路 KEGG pathway	KEGG 通路 ID KEGG pathway ID	差异表达基因数 ¹⁾ Number of differentially expressed genes ¹⁾		
		0 h vs 6 h	0 h vs 24 h	6 h vs 24 h
		果糖和甘露糖代谢 Fructose and mannose metabolism	ko00051	2
光合生物中的碳固定作用 Carbon fixation in photosynthetic organisms	ko00710	1	—	—
过氧化物酶体 Peroxisome	ko04146	2	—	1
糖酵解/糖异生 Glycolysis/gluconeogenesis	ko00010	2	—	—
氨基酸的生物合成 Biosynthesis of amino acids	ko01230	2	—	—
昼夜节律-植物 Circadian rhythm-plant	ko04712	2	—	8
氧化磷酸化 Oxidative phosphorylation	ko00190	—	—	2
内质网中的蛋白质加工 Protein processing in endoplasmic reticulum	ko04141	4	1	—
半乳糖代谢 Galactose metabolism	ko00052	3	—	3
内吞作用 Endocytosis	ko04144	2	—	3
氰基氨基酸代谢 Cyanoamino acid metabolism	ko00460	—	1	—
丙酮酸代谢 Pyruvate metabolism	ko00620	—	1	—
RNA 转运 RNA transport	ko03013	—	1	—
异喹啉生物碱生物合成 Isoquinoline alkaloid biosynthesis	ko00950	—	—	1
缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解 Valine, leucine and isoleucine degradation	ko00280	—	—	2
酪氨酸代谢 Tyrosine metabolism	ko00350	—	—	1
硒化合物代谢 Selenocompound metabolism	ko00450	—	—	1
ABC 转运蛋白 ABC transporters	ko02010	—	—	1
酮体的合成与降解 Synthesis and degradation of ketone bodies	ko00072	—	—	1
半胱氨酸和甲硫氨酸代谢 Cysteine and methionine metabolism	ko00270	—	—	2
丁酸代谢 Butanoate metabolism	ko00650	—	—	1
精氨酸和脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism	ko00330	—	—	1
甜菜素生物合成 Betalain biosynthesis	ko00965	—	—	1
氮代谢 Nitrogen metabolism	ko00910	—	—	1
吞噬体 Phagosome	ko04145	—	—	1

¹⁾—: 无差异表达基因富集 There is no enrichment of differentially expressed genes.

进一步分析结果显示:与接菌 0 h 相比,接菌 6 h 部分上调差异表达基因富集的通路 with 植物防御反应有关,如内质网中的蛋白质加工、乙醛酸和二羧酸代谢、过氧化物酶体等;而与接菌 0 和 6 h 相比,接菌 24 h 上调差异表达基因主要富集在活性成分合成、细胞发育等与植物生长发育有关的通路,如昼夜节律-植物、氨基糖和核苷酸糖代谢、半乳糖代谢等。

2.2.6 qRT-PCR 验证分析 选择参与促生和活性成分合成相关的 8 个费菜差异表达基因用于 qRT-PCR 实验,以验证其在接种费菜内生细菌菌株 Pwx053 24 h 的差异表达模式。结果(图 2)显示:qRT-PCR 与转录组测序的表达模式相似,表明 RNA-Seq 数据的可靠性较高。与促生和活性成分合成相关的 8 个差异表达基因均不同程度上调,表明菌株 Pwx053 促进费菜活性成分的积累可能与上述参与活性成分合成相关基因表达的上调有关。



■: RNA-Seq 差异倍数 RNA-Seq fold change; □: qRT-PCR.

** : 接菌处理 0 h 与 24 h 间费菜差异表达基因的相对表达量差异极显著 ($p < 0.01$) The differences in the relative expression of differentially expressed genes in *Phedimus aizoon* (Linn.) 't Hart between 0 h and 24 h after inoculation are extremely significant ($p < 0.01$).

图 2 接种费菜内生细菌菌株 Pwx053 24 h 费菜部分差异表达基因的 qRT-PCR 验证结果

Fig. 2 Verification results of qRT-PCR of some differentially expressed genes in *Phedimus aizoon* (Linn.) 't Hart inoculated with endophytic bacterial isolate Pwx053 from *P. aizoon* for 24 h

3 讨论和结论

近年来,利用植物内生菌促进植物活性成分积累成为研究热点。根据序列比对和基于16S rRNA的系统进化树分析结果,初步鉴定费菜内生细菌菌株Pwx053为隶属于链霉菌属(*Streptomyces*)的天蓝黄链霉菌。目前许多研究已证实链霉菌属细菌具有促生及促进植物活性成分积累等方面的功能。Kaewkla等^[37]从水稻(*Oryza sativa* Linn.)品种‘KDML 105’中分离的链霉菌属细菌*Streptomyces shenzhenensis* subsp. *oryzicola*具有固氮潜力、磷酸盐溶解潜力、产铁载体能力、产吲哚乙酸(IAA)能力、产纤维素酶能力以及产1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)脱氨酶能力。Maggini等^[38]发现接种松果菊[*Echinacea purpurea* (Linn.) Moench]内生细菌能够促进植物中挥发性化合物、苯丙类和生物碱等活性成分的合成。作者所在课题组前期也同样证明该属菌株Pwx053具有较强的解磷、固氮能力,同时具有产IAA能力、产铁载体能力、产ACC脱氨酶能力、产纤维素酶能力和产蛋白酶能力,进一步表明链霉菌属细菌具有一定的促生能力。本研究中,接种费菜内生细菌菌株Pwx053处理组费菜根部总黄酮、总多糖、总三萜和三七皂苷含量较未接菌处理组极显著($p < 0.01$)升高。推测菌株Pwx053能够分泌可直接接触并作用于植物的某些植物激素或者活性成分,进而促进植物活性成分的积累。许多植物受到外界刺激后能发生氧化应激反应,产生活性成分来进行防御^[39-41]。其中,过氧化物酶体参与生物应激反应^[42-44],能够通过清除活性氧来调节氧化还原平衡^[45]。除了过氧化物酶体通路外,内质网中的蛋白质加工以及乙醛酸和二羧酸代谢通路也与植物防御反应有关^[46]。根据转录组分析结果,与接种费菜内生细菌菌株Pwx053 0 h相比,接种该菌株6 h上调差异表达基因除了富集在剪接体、碳代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢、半乳糖代谢、MAPK信号通路-植物等通路外,还富集在过氧化物酶体、内质网中的蛋白质加工以及乙醛酸和二羧酸代谢通路,说明在接种菌株Pwx053后费菜可能产生氧化应激进行防御反应,进而提高了活性成分的含量。

多糖是由多个单糖单元组成的天然大分子,费菜中的多糖主要由葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖组成^[47]。糖类的合成受到多个基因调控,合成还原糖所需的还

原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)是由非磷酸化甘油醛-3-磷酸脱氢酶催化而来,而*gapN*基因能够编码非磷酸化甘油醛-3-磷酸脱氢酶^[48-50],从而促进还原糖的合成。Yuan等^[51]研究了细茎石斛[*Dendrobium moniliforme* (Linn.) Sw.]转录组中参与多糖途径基因的组织特异性表达模式,确定了单基因*PLS*与糖类活性相关,在糖类的生物合成中具有重要作用。本研究中,与接种费菜内生细菌菌株Pwx053 0和6 h相比,接种该菌株24 h上调差异表达基因主要富集于昼夜节律-植物、半乳糖代谢以及氨基糖和核苷酸糖代谢等通路,且调控费菜多糖合成的相关基因*PLS*、*gapN*的表达均为上调趋势。黄酮类化合物是药用植物中重要的活性成分^[52]。植物中黄酮类化合物的合成需要芳香族氨基酸苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸等参与,*CM3*基因的表达,能够催化苯丙氨酸和酪氨酸等合成^[53],进而促进黄酮类化合物合成。丙二酰辅酶A是植物黄酮类化合物生物合成的组成部分^[54],由乙酰辅酶A转化而来,而*HMGL*基因参与支链氨基酸分解代谢,导致乙酰辅酶A的产生^[55],从而增加丙二酰辅酶A的含量,进而促进植物黄酮类化合物的生物合成。本研究与黄酮类物质合成相关基因*CM3*、*HMGL*的表达均上调,表明菌株Pwx053可能通过上调参与多糖、黄酮类化合物等活性成分合成途径中的相关基因来提高多糖和黄酮类化合物在费菜中的含量。此外,在转录组和qRT-PCR分析结果中,与叶绿体发育、叶绿素合成相关基因*UPP*^[56]、*CDF1*^[57]的表达也上调,表明菌株Pwx053可能影响费菜光合作用,对其活性成分积累起到促进作用。

综上所述,费菜内生细菌菌株Pwx053可有效促进费菜根部活性成分的积累,且与菌株Pwx052和Pwx056相比较,对三七皂苷积累的促进效果最为显著。此外,本研究基于转录组及qRT-PCR数据初步探讨了菌株Pwx053的对费菜活性成分积累的潜在分子机制,为后期研究和开发微生物菌肥提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 王立业,牛江秀,王真真,等.景天三七根、茎、花、叶中总黄酮含量测定[J].湖北农业科学,2021,60(23):131-135.
- [2] 任平,付博,刘晨,等.景天三七主要活性成分与土壤、气象因子的相关性[J].生态环境学报,2019,28(5):908-917.
- [3] 罗洁,王鸿飞,许凤,等.费菜不同组织总黄酮抗氧化与抑菌活性的研究[J].天然产物研究与开发,2018,30(11):

- 1957–1962, 1970.
- [4] 李丹, 罗方军, 雷国莲. 三七与景天三七化学成分的对比较研究[J]. 陕西中医学院学报, 2007, 30(1): 49–51.
- [5] QI X, LU X T, SUN X H, et al. The regulatory effect of total flavonoids of *Sedum aizoon* L. on oxidative stress in type 1 diabetic mice[J]. *Current Research in Food Science*, 2022, 5: 1140–1147.
- [6] 谭波, 何席呈, 李婷, 等. 景天三七化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2018, 27(17): 49–52.
- [7] 林珠灿, 黄安玉, 房英娟, 等. HPLC法同时测定景天三七中没食子酸、没食子酸甲酯和对羟基苯甲酸的含量[J]. 福建中医药大学学报, 2014, 24(2): 27–30.
- [8] 冉海霞, 杜江. 苗药土三七的研究进展[J]. 中国民族医药杂志, 2012, 18(7): 60–63.
- [9] WANG B L, GE Z K, QIU J R, et al. *Sedum aizoon* L.: a review of its history, traditional uses, nutritional value, botany, phytochemistry, pharmacology, toxicology, and quality control[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2024, 15: 1349032.
- [10] 杨艳俊, 杨秀东, 王亚红. 景天三七总酚酸的提取工艺及抗氧化性研究[J]. 吉林化工学院学报, 2020, 37(3): 33–37.
- [11] 李忠红, 胡浩彬, 陈剑, 等. HPLC-ESI-MS/MS法对景天三七成分的分析[J]. 中国天然药物, 2007, 5(6): 431–434.
- [12] LIN Z C, FANG Y J, HUANG A Y, et al. Chemical constituents from *Sedum aizoon* and their hemostatic activity [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2014, 52(11): 1429–1434.
- [13] 林登淞. 一种景天三七的组织培养技术: CN109258476A [P]. 2019-01-25.
- [14] TAULÉ C, VAZ-JAURI P, BATTISTONI F. Insights into the early stages of plant-endophytic bacteria interaction[J]. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 2021, 37(1): 13.
- [15] AFZAL I, SHINWARI Z K, SIKANDAR S, et al. Plant beneficial endophytic bacteria; mechanisms, diversity, host range and genetic determinants[J]. *Microbiological Research*, 2019, 221: 36–49.
- [16] SANTOYO G, MORENO-HAGELSIEB G, OROZCO-MOSQUEDA C, et al. Plant growth-promoting bacterial endophytes [J]. *Microbiological Research*, 2016, 183: 92–99.
- [17] SCHMIDT C S, MRNKA L, FRANTÍK T, et al. Plant growth promotion of *Miscanthus × giganteus* by endophytic bacteria and fungi on non-polluted and polluted soils [J]. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 2018, 34(3): 48.
- [18] MARAG P S, SUMAN A. Growth stage and tissue specific colonization of endophytic bacteria having plant growth promoting traits in hybrid and composite maize (*Zea mays* L.) [J]. *Microbiological Research*, 2018, 214: 101–113.
- [19] ALI M, ALI Q, SOHAIL M A, et al. Diversity and taxonomic distribution of endophytic bacterial community in the rice plant and its prospective [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(18): 10165.
- [20] ISLAM M N, ALI M S, CHOI S J, et al. Salicylic acid-producing endophytic bacteria increase nicotine accumulation and resistance against wildfire disease in tobacco plants [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(1): 31.
- [21] ZHOU J Y, SUN K, CHEN F, et al. Endophytic *Pseudomonas* induces metabolic flux changes that enhance medicinal sesquiterpenoid accumulation in *Atractylodes lancea* [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 130: 473–481.
- [22] PTAK A, MORAŃSKA E, WARCHOL M, et al. Endophytic bacteria from *in vitro* culture of *Leucopodium aestivum* L. a new source of galanthamine and elicitor of alkaloid biosynthesis [J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 13700.
- [23] SONG X L, WU H, YIN Z H, et al. Endophytic bacteria isolated from *Panax ginseng* improves ginsenoside accumulation in adventitious ginseng root culture [J]. *Molecules*, 2017, 22(6): 837.
- [24] JIANG Z H, ZHOU X, LI R, et al. Whole transcriptome analysis with sequencing: methods, challenges and potential solutions [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2015, 72(18): 3425–3439.
- [25] ZHAO X, YAN Y, ZHOU W H, et al. Transcriptome and metabolome reveal the accumulation of secondary metabolites in different varieties of *Cinnamomum longepaniculatum* [J]. *BMC Plant Biology*, 2022, 22(1): 243.
- [26] CHEN C H, ZHENG Y J, ZHONG Y D, et al. Transcriptome analysis and identification of genes related to terpenoid biosynthesis in *Cinnamomum camphora* [J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 550.
- [27] ZHOU G L, ZHU P. *De novo* transcriptome sequencing of *Rhododendron molle* and identification of genes involved in the biosynthesis of secondary metabolites [J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 414.
- [28] DHIMAN N, KUMAR A, KUMAR D, et al. *De novo* transcriptome analysis of the critically endangered alpine Himalayan herb *Nardostachys jatamansi* reveals the biosynthesis pathway genes of tissue-specific secondary metabolites [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 17186.
- [29] EK-RAMOS M J, GOMEZ-FLORES R, OROZCO-FLORES A A, et al. Bioactive products from plant-endophytic gram-positive bacteria [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 463.
- [30] WU W, CHEN W H, LIU S Y, et al. Beneficial relationships between endophytic bacteria and medicinal plants [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 646146.
- [31] LI J, WU H T, PU Q, et al. Complete genome of *Sphingomonas paucimobilis* ZJSH1, an endophytic bacterium from *Dendrobium officinale* with stress resistance and growth promotion potential [J]. *Archives of Microbiology*, 2023, 205(4): 132.
- [32] 徐冬梅, 贺忠群, 赵英鹏, 等. 低温胁迫下 AMF 对景天三七生长和生理特性的影响 [J]. 草业科学, 2016, 33(12): 2452–2464.
- [33] 蒋继宏, 李露丹, 曹小迎, 等. 一种景天三七内生天蓝黄链霉菌及其应用: CN116790397A [P]. 2023-09-22.
- [34] 杨艳俊, 耿水连, 吉慧杰, 等. 景天三七多糖超声提取工艺研

- 究[J]. 吉林化工学院学报, 2014, 31(9): 17-20, 49.
- [35] WU J Y, LIN L D, CHAU F T. Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2001, 8(4): 347-352.
- [36] ZHAO F Z, MAREN N A, KOSENTKA P Z, et al. An optimized protocol for stepwise optimization of real-time RT-PCR analysis[J]. *Horticulture Research*, 2021, 8(1): 179.
- [37] KAEWKLA O, SUKPANO A S, SURIYACHADKUN C, et al. *Streptomyces spinosus* sp. nov. and *Streptomyces shenzhenensis* subsp. *oryzicola* subsp. nov. endophytic actinobacteria isolated from Jasmine rice and their genome mining for potential as antibiotic producers and plant growth promoters [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2022, 115(7): 871-888.
- [38] MAGGINI V, DE LEO M, MENGONI A, et al. Plant-endophytes interaction influences the secondary metabolism in *Echinacea purpurea* (L.) Moench; an *in vitro* model[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 16924.
- [39] ZHU J K. Abiotic stress signaling and responses in plants[J]. *Cell*, 2016, 167(2): 313-324.
- [40] 杨欣, 徐艳红, 魏建和, 等. 几种重要植物次生代谢防御反应物质的生物合成途径及分子调控机制研究进展[J]. *生物技术通讯*, 2013, 24(2): 285-289.
- [41] WANG J Y, ZHAO H Y, CHEN T, et al. Effect of *Burkholderia ambifaria* LK-P4 inoculation on the plant growth characteristics, metabolism, and pharmacological activity of *Anoectochilus roxburghii*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 1043042.
- [42] PALMA J M, CORPAS F J, DEL RÍO L A. Proteome of plant peroxisomes: new perspectives on the role of these organelles in cell biology[J]. *Proteomics*, 2009, 9(9): 2301-2312.
- [43] LI C S, QI Y T, ZHAO C Z, et al. Transcriptome profiling of the salt stress response in the leaves and roots of halophytic *Eutrema salsugineum*[J]. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12: 770742.
- [44] KIDWAI M, AHMAD I Z, CHAKRABARTY D. Class III peroxidase: an indispensable enzyme for biotic/abiotic stress tolerance and a potent candidate for crop improvement[J]. *Plant Cell Reports*, 2020, 39(11): 1381-1393.
- [45] MITTLER R, VANDERAUWERA S, GOLLERY M, et al. Reactive oxygen gene network of plants [J]. *Trends in Plant Science*, 2004, 9(10): 490-498.
- [46] CAI H Y, WANG H P, ZHOU L, et al. Time-series transcriptomic analysis of contrasting rice materials under heat stress reveals a faster response in the tolerant cultivar[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(11): 9408.
- [47] 曹玉标, 孙亮亮, 杨野, 等. 三七药渣中主要多糖成分的分 离纯化及其抗氧化活性研究[J]. *中草药*, 2023, 54(1): 100-111.
- [48] PIATTONI C V, RIUS S P, GOMEZ-CASATI D F, et al. Heterologous expression of non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Triticum aestivum* and *Arabidopsis thaliana*[J]. *Biochimie*, 2010, 92(7): 909-913.
- [49] RUMPHO M E, EDWARDS G E, LOESCHER W H. A pathway for photosynthetic carbon flow to mannitol in celery leaves: activity and localization of key enzymes[J]. *Plant Physiology*, 1983, 73(4): 869-873.
- [50] GAO Z F, LOESCHER W H. NADPH supply and mannitol biosynthesis. Characterization, cloning, and regulation of the non-reversible glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in celery leaves[J]. *Plant Physiology*, 2000, 124(1): 321-330.
- [51] YUAN Y D, ZHANG J C, KALLMAN J, et al. Polysaccharide biosynthetic pathway profiling and putative gene mining of *Dendrobium moniliforme* using RNA-Seq in different tissues [J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 521.
- [52] YUAN Y D, ZUO J J, ZHANG H Y, et al. Transcriptome and metabolome profiling unveil the accumulation of flavonoids in *Dendrobium officinale*[J]. *Genomics*, 2022, 114(3): 110324.
- [53] MOBLEY E M, KUNKEL B N, KEITH B. Identification, characterization and comparative analysis of a novel chorismate mutase gene in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Gene*, 1999, 240(1): 115-123.
- [54] CHEN H, KIM H U, WENG H, et al. Malonyl-CoA synthetase, encoded by *ACYL ACTIVATING ENZYME13*, is essential for growth and development of *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(6): 2247-2262.
- [55] HEMMERLIN A, HUCHELMANN A, TRITSCH D, et al. The specific molecular architecture of plant 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(44): 16186-16197.
- [56] MAINGUET S E, GAKIÈRE B, MAJIRA A, et al. Uracil salvage is necessary for early *Arabidopsis* development [J]. *The Plant Journal*, 2009, 60(2): 280-291.
- [57] LEE J Y, LEE H S, SONG J Y, et al. Cell growth defect factor1/CHAPERONE-LIKE PROTEIN OF POR1 plays a role in stabilization of light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2013, 25(10): 3944-3960.

(责任编辑: 张明霞)