

# 亚虫草属内生真菌 LrRF8 促进石蒜中生物碱积累的机制探究

吴颖<sup>1</sup>, 汪仁<sup>1,2</sup>, 周佳宇<sup>1,2,①</sup>, 江曙<sup>1,①</sup>

[1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023;

2. 江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园) 江苏省植物资源保护与利用重点实验室, 江苏 南京 210014]

**摘要:** 通过构建单一内生真菌-石蒜 [*Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb.] 无菌组培苗互作体系, 探究亚虫草属 (*Metacordyceps* Sung) 内生真菌 LrRF8 对石蒜叶、鳞茎、根干质量及 NO、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、IAA、SA、GA 积累及石蒜科生物碱合成关键基因表达的影响, 探究 LrRF8 促进石蒜中生物碱积累的机制。结果表明: 与对照(未接菌)组相比, 接种 LrRF8 显著提高了叶和鳞茎中加兰他敏及根中水仙环素、石蒜碱和加兰他敏的含量。进一步研究发现, 接种 LrRF8 能够诱导石蒜不同组织中 NO 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的差异迸发, 其诱导效果在根中最显著; 同时, 接种 LrRF8 引起了 IAA、SA、GA 在石蒜不同组织中的差异积累, 主要促进了叶中 GA 及根中 IAA 和 SA 的积累。此外, 接种 LrRF8 7 d 显著提高了石蒜叶、鳞茎中 PAL 和 OMT 及根中 PAL 的相对表达量, 接种 LrRF8 14 d 显著提高了叶中 PAL 和 CYP96T1, 鳞茎中 PAL 及根中 PAL、TYDC、CYP96T1 的相对表达量。从整株看, 施加外源信号分子和植物激素能够提高石蒜中生物碱的积累, 并且外源施加 SNP 提高了石蒜中 CYP96T1 的相对表达量, 外源施加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 提高了 TYDC、OMT 和 CYP96T1 的相对表达量, 外源施加 IAA 提高了 TYDC 的相对表达量, 外源施加 SA 提高了 PAL 和 CYP96T1 的相对表达量, 外源施加 GA 提高了 OMT 和 CYP96T1 的相对表达量。综上所述, 相较于盆栽体系, 本研究构建的单一内生真菌-石蒜无菌组培苗互作体系排除了环境微生物的干扰, 证实接种 LrRF8 有利于促进石蒜中生物碱的积累, 其中 NO 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及 IAA、SA 和 GA 信号在基因表达层面发挥重要调控作用。

**关键词:** 内生真菌 LrRF8; 石蒜科生物碱; NO; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 植物激素; 基因表达

中图分类号: Q948.12<sup>+</sup>2.3; S567.23 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2025)03-0024-11

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2025.03.03

**Exploration of mechanism of endophytic fungus *Metacordyceps* LrRF8 in promoting the accumulation of alkaloids in *Lycoris radiata*** WU Ying<sup>1</sup>, WANG Ren<sup>1,2</sup>, ZHOU Jiayu<sup>1,2,①</sup>, JIANG Shu<sup>1,①</sup> [1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Jiangsu Key Laboratory for Conservation and Utilization of Plant Resources, Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences (Nanjing Botanical Garden Mem. Sun Yat-Sen), Nanjing 210014, China], *J. Plant Resour. & Environ.*, 2025, 34(3): 24-34

**Abstract:** The effects of endophytic fungus *Metacordyceps* Sung LrRF8 on dry mass of leaves, bulbs, and roots of *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb., accumulation of NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, IAA, SA, and GA, and expression of key genes involved in Amaryllidaceae alkaloid biosynthesis were investigated by establishing a interaction system of single endophytic fungus-sterile tissue-cultured *L. radiata* seedlings, and the mechanism by which LrRF8 promotes alkaloid accumulation in *L. radiata* was elucidated. The results show that compared with the control (non-inoculation) group, LrRF8 inoculation significantly increases

收稿日期: 2024-11-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(32071531; 32471619); 中央财政林业科技推广示范项目(苏[2024]TG11)

作者简介: 吴颖(2000—), 男, 苗族, 湖南湘西人, 硕士研究生, 主要从事药用植物与微生物互作方面的研究。

①通信作者 E-mail: nj\_zhoujiayu@126.com; jiangshu2020@126.com

引用格式: 吴颖, 汪仁, 周佳宇, 等. 亚虫草属内生真菌 LrRF8 促进石蒜中生物碱积累的机制探究[J]. 植物资源与环境学报, 2025, 34(3): 24-34.

the contents of galanthamine in leaves and bulbs and narciclasine, lycorine, and galanthamine in roots. Further studies reveal that LrRF8 inoculation can induce differential bursts of NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in different tissues of *L. radiata*, with the most significant induction effect in roots; meanwhile, LrRF8 inoculation causes differential accumulation of IAA, SA, and GA in different tissues of *L. radiata*, primarily promotes GA accumulation in leaves and IAA and SA accumulation in roots. Additionally, LrRF8 inoculation for 7 d significantly increases the relative expression of *PAL* and *OMT* in leaves and bulbs, and *PAL* in roots of *L. radiata*; LrRF8 inoculation for 14 d significantly increases the relative expression of *PAL* and *CYP96T1* in leaves, *PAL* in bulbs, and *PAL*, *TYDC* and *CYP96T1* in roots. In the whole seedling, exogenous application of signaling molecules and plant hormones can promote alkaloid accumulation in *L. radiata*, the exogenous application of SNP increases the relative expression of *CYP96T1*, exogenous application of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> upregulates those of *TYDC*, *OMT*, and *CYP96T1*, exogenous application of IAA elevates that of *TYDC*, exogenous application of SA enhances those of *PAL* and *CYP96T1*, and exogenous application of GA promotes those of *OMT* and *CYP96T1*. In conclusion, compared with pot culture systems, the single endophytic fungus-sterile tissue-cultured *L. radiata* seedlings interaction system established in this study eliminates the interference from environmental microorganisms and demonstrates that LrRF8 inoculation promotes alkaloid accumulation in *L. radiata*, among which NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and IAA, SA and GA signals play crucial regulatory roles at gene expression level.

**Key words:** endophytic fungus LrRF8; Amaryllidaceae alkaloids; NO; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; plant hormone; gene expression

石蒜科(Amaryllidaceae)植物主要分布在热带和亚热带地区<sup>[1]</sup>,国内主要分布在江苏、浙江、安徽一带<sup>[2]</sup>。石蒜科生物碱是石蒜科植物特有的次生代谢物,具有多种药用活性。例如:加兰他敏作为长效的、选择性的、可逆的乙酰胆碱酯酶抑制剂,已被用于阿尔茨海默病的临床治疗;石蒜碱具有抑菌、消炎等活性;水仙环素具有抗肿瘤等活性<sup>[3]</sup>。由于石蒜科生物碱结构复杂,化学合成难度大、成本高<sup>[4]</sup>,目前主要依靠从石蒜科植物体内提取获得<sup>[5]</sup>。石蒜[*Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb.]生长速度快、生物量积累多,是中国加兰他敏等生物碱提取的主要植物资源之一。然而,石蒜科生物碱在植物体内含量很低<sup>[6]</sup>,如加兰他敏在石蒜体内的含量不足植物干质量的0.1%<sup>[7]</sup>,极大地限制了这些药用活性成分的提取与纯化,因此,亟需开发可以促进石蒜中生物碱积累的有效策略,促进其进一步开发与应用。

内生菌是指其生命周期中至少有一段时间定殖于植物体内而不会引起植物病症的一大类微生物<sup>[8]</sup>。作者所在课题组的前期研究表明:在盆栽实验条件下,分离自石蒜根部的亚虫草属(*Metacordyceps* Sung)内生真菌 LrRF8 能够有效促进石蒜中多种生物碱的积累<sup>[8]</sup>,但其促进机制尚不明晰。有研究报道孔球孢霉属(*Gilmaniella* G. L. Barron)内生真菌 AL12 通过激活茅苍术[*Atractylodes*

*lancea* (Thunb.) DC.]体内一氧化氮(NO)、过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、水杨酸(SA)等信号级联,增加萜类合成关键基因的表达,增加倍半萜类物质的积累<sup>[9-10]</sup>;深绿木霉(*Trichoderma atroviride* Bissett) D15 通过激活 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、SA 等信号级联,促进丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)中丹参酮的积累<sup>[11]</sup>;南方红豆杉[*Taxus chinensis* (Pilg.) Rehder]内生真菌 *Pseudodidymocyrtis lobarzellae* Flakus 的发酵上清液通过诱导多种激素信号的交联,如 SA、赤霉素(GA)等,促进宿主植物中紫杉醇的合成<sup>[12]</sup>。此外,GA 也被报道增加丹参中迷迭香酸、丹酚酸的积累<sup>[13]</sup>。值得注意的是,吡啶-3-乙酸(IAA)等生长素除了在植物生长发育中发挥功能外,也能够参与调节植物的次生代谢,如外源添加生长素能够增加人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)中人参皂苷产量<sup>[14]</sup>,以及桑树(*Morus alba* Linn.)中芦丁含量<sup>[15]</sup>,其可能是通过影响生长素转运蛋白 PIN 及 PIN-LIKES,进而间接地促进植物次生代谢<sup>[16]</sup>。本课题组前期研究发现,多株分离自忽地笑[*Lycoris aurea* (L'Hér.) Herb.]的内生真菌在诱导石蒜中生物碱合成的同时,显著提高了 SA 信号通路关键基因 *PR1* 的表达,进一步促进了石蒜生物碱合成关键基因的表达,包括苯丙氨酸解氨酶(PAL)、酪氨酸脱羧酶(TYDC)、4'-O-甲基转移酶(OMT)及细胞色素 P450 酶(CYP96T1)编码基因的表达<sup>[17]</sup>。由上述研究结果

可知,内生真菌能够诱导植物体内的信号级联,如活性氧的迸发、激素信号的激活等,诱发宿主植物代谢的重编程,增加次生代谢相关基因的表达,促进活性物质的合成与积累<sup>[18]</sup>。因此,NO、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、IAA、SA、GA等信号分子及植物激素可能参与了 LrRF8 诱导的石蒜中生物碱的合成,需要进一步研究。

鉴于此,本研究基于前期盆栽实验筛选到的亚虫草属内生真菌 LrRF8 能够有效促进石蒜中生物碱的积累,构建了单一内生真菌-石蒜无菌组培苗互作体系,有效排除环境中微生物的干扰,检测 LrRF8 对石蒜 NO、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、IAA、SA、GA 等积累及石蒜科生物碱合成关键基因表达的影响,以期揭示该菌株促进石蒜中生物碱积累的机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 石蒜无菌组培苗的繁育 供试石蒜无菌组培苗来自课题组已建立的石蒜无菌植物组织培养快繁体系<sup>[19]</sup>,具有相同的基因背景。在含 6.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-苄氨基嘌呤(6-BA)、0.5 mg · L<sup>-1</sup> 萘乙酸(NAA)的 MS 培养基中诱导小鳞茎的生成<sup>[20]</sup>,待 4~5 个小鳞茎形成时,使用灭菌手术刀将单个小鳞茎分开,单个小鳞茎移栽至不含激素的 50 mL MS 培养基中诱导形成完整植株,使用 2 月龄的植株进行实验。培养条件为光照度 3 400 lx,光照时间 12 h · d<sup>-1</sup>,昼温和夜温分别为 25 和 18 °C。

1.1.2 内生真菌的活化与接种 于 2020 年秋季在南京中山植物园的石蒜种植园(北纬 32°03′、东经 118°50′)内采集健康石蒜植株 20 株(株龄约 10 a),经表面灭菌后,进行内生真菌分离<sup>[8]</sup>。内生真菌菌株 LrRF8 分离自石蒜根系,经 ITS 序列扩增与比对后,鉴定为亚虫草属<sup>[8]</sup>。LrRF8 于体积分数 20%甘油中保藏在 -80 °C 下,真菌活化时,吸取 200 μL 菌液涂布于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基<sup>[21]</sup>上,于 30 °C 暗培养至单菌落(直径约 1 mm)形成,挑取单菌落,转接至新鲜 PDA 培养基上,于 30 °C 继续暗培养 7 d 后,使用打孔器取最外围单枚菌片(直径 4 mm),菌丝面朝下、紧贴石蒜鳞茎,接种于 MS 培养基表面。对照组(未接种)植株在相同位置接种单枚 PDA 培养基圆片(直径 4 mm)。

使用 2 月龄的石蒜无菌组培苗接种 LrRF8,接种

28 d 后,取对照组和接菌组植株各 5 株,烘干后分别称量叶、鳞茎、根干质量,并检测各组织中水仙环素、石蒜碱、加兰他敏的含量<sup>[17]</sup>;接种 7 d 后,取对照组和接菌组植株各 5 株,分别检测叶、鳞茎、根中 NO、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、IAA、SA、GA 的含量<sup>[22]</sup>;接种 7 和 14 d 后,取对照组和接菌组植株各 7 株,分别检测叶、鳞茎、根中石蒜科生物碱合成关键基因 *PAL*、*TYDC*、*OMT*、*CYP96T1* 的相对表达量。外源信号分子和激素处理 28 d 后,取对照组和处理组植株各 5 株,称量叶、鳞茎、根干质量,并检测各组织中 3 种生物碱的含量,进一步明确信号分子和激素对石蒜干质量和生物碱积累的影响;外源信号分子和激素处理 7 d 后,取对照组和处理组植株各 5 株,分别检测叶、鳞茎、根中生物碱合成关键基因 *PAL*、*TYDC*、*OMT*、*CYP96T1* 的相对表达量。最后验证 LrRF8 灭活菌丝处理 28 d 对石蒜中 3 种生物碱含量的影响。

### 1.2 方法

1.2.1 石蒜科生物碱的提取与检测 分别收获对照组和接菌组植株,使用灭菌手术刀将植株分为叶、鳞茎、根,于 55 °C 烘干至恒质量,使用万分之一电子天平称量各组织干质量。将植物组织研磨成粉末,称取 1 g 粉末,加入 5 mL 甲醇,4 °C 提取 24 h,每 8 h 超声水浴(室温、70 kHz)1 次,每次 30 min,共处理 3 次。于室温、8 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min 获得上清液,过孔径 0.22 μm 滤膜。使用高效液相色谱(HPLC)法<sup>[17]</sup>检测水仙环素、石蒜碱、加兰他敏的含量。

1.2.2 NO 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量测定 按照“1.2.1”中的方法将植株分为叶、鳞茎、根,称取 0.1 g 新鲜植物组织,加入 500 μL 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲液(pH 7.0 至 pH 7.4),使用冷冻研磨仪(0 °C、50 Hz,上海净信实业发展有限公司)研磨 30 s 获得组织匀浆,于 4 °C、12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min,获得上清液。使用一氧化氮(NO)测定试剂盒和过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)分别测定各组织中的 NO 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量。

1.2.3 植物激素的提取与检测 分别收获对照组和接菌组植株,按照“1.2.1”中的方法将植株分为叶、鳞茎、根,称取 1 g 新鲜植物组织,加入 10 mL 甲醇,使用冷冻研磨仪研磨 30 s 获得组织匀浆,于 4 °C 提取 24 h,每 8 h 超声水浴(室温、70 kHz)1 次,每次 30 min,共处理 3 次。之后,按照“1.2.2”中的方法获得上清液,过孔径 0.22 μm 滤膜后,参考 Chen 等<sup>[23]</sup>的

方法稍作修改,使用 LC-20AT 高效液相色谱仪〔岛津(上海)实验器材有限公司〕检测 IAA、SA、GA 含量。具体方法:流动相为体积分数 0.1% 甲酸-水溶液(A)和乙腈(B);梯度洗脱体系为 0~30 min、10%~30% B,流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 35 ℃,进样量 20 μL。IAA、SA、GA 的检测波长分别为 280、300、250 nm。

1.2.4 外源信号分子及激素处理 硝普钠(SNP)可作为 NO 供体,被植物吸收后能够释放 NO<sup>[24]</sup>。根据接种 LrRF8 诱导石蒜中 NO、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、IAA、SA、GA 含量的测定结果,使用体积分数 0.002% 二甲基亚砜(DMSO)作为溶剂分别配制 8 mg·mL<sup>-1</sup> SNP、8 mg·mL<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、0.05 mg·L<sup>-1</sup> IAA、0.005 mg·L<sup>-1</sup> SA、0.5 mg·L<sup>-1</sup> GA 溶液,孔径 0.22 μm 无菌滤膜过滤除菌后备用。分别吸取 1 mL 各外源信号分子或激素溶液喷洒在 2 月龄的石蒜无菌组培苗上<sup>[25]</sup>,按照“1.2.1”的方法称量干质量,并检测 3 种生物碱含量。以上述无菌滤膜过滤后的体积分数 0.002% DMSO 处理的石蒜植株作为对照。

1.2.5 总 RNA 提取及生物碱合成关键基因表达分析 按照“1.2.1”中的方法将植株分为叶、鳞茎、根,液氮速冻,于 -80 ℃ 保存。使用 RNAprep Pure 植物总 RNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取总 RNA,使用 NanoDrop™ 1000 微量分光光度计(上海赛默飞世尔科技有限公司)对 RNA 进行定量,取 1 μg 总 RNA 用 DNA 酶处理后反转录成 cDNA,使用 SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒(北京宝日医生物技术有限公司)进行 qRT-PCR 反应。以 *TIP41* 作为内参基因,使用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法<sup>[26]</sup>计算生物碱合成关键基因的相对表达量。具体引物<sup>[17]</sup>信息见表 1。

1.2.6 LrRF8 灭活菌丝制备及石蒜植株的转接 挑取活化的 LrRF8 单菌落至马铃薯葡萄糖液体(PDB)培养基中,150 r·min<sup>-1</sup>、30 ℃ 暗培养 7 d 后,经 2 层无菌纱布过滤,收集菌丝体,无菌水清洗 3 次,经 SCIENTZ-10N 冷冻干燥机(-80 ℃、0.95 kW,宁波新芝生物科技股份有限公司)冷冻干燥后,研磨成细粉,即菌丝冻干粉。每个培养瓶(350 mL)中加入 50 mL 含 0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA、30 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖、10 g·L<sup>-1</sup> 琼脂的 MS 培养基及 10 mg 菌丝冻干粉,混匀,121 ℃ 高温高压灭活 20 min 后冷却,待用。每瓶中转接 1 株 2 月龄的石蒜无菌组培苗,培养 28 d 后收获,按照“1.2.1”中的方法检测各组织中 3 种生物碱含量。以不添加菌丝冻干粉的培养基为对照。

表 1 石蒜中生物碱合成关键基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of key genes for alkaloid synthesis in *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb.

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')
<i>LrPAL</i> _Fw	GTGATGTTGTTGTTGAGGAGCCGA
<i>LrPAL</i> _Rev	TAGGAGACCAAGCAAGGAGGTGC
<i>LrTYDC</i> _Fw	ACCATCGTCTCTGTTTCATCTGTC
<i>LrTYDC</i> _Rev	TTGCTTCTCTCATTCTCATCCGTA
<i>LrOMT</i> _Fw	GGGAGGTGACTGAGAAACATGAAT
<i>LrOMT</i> _Rev	CCAAAGCGGTTGTGAGCAGAGAAT
<i>LrCYP96T1</i> _Fw	GAAAGGCGACCTCTACAAGGTGTT
<i>LrCYP96T1</i> _Rev	CTGCTGAATCGACTATAGGAATCA
<i>LrTIP41</i> _Fw	AATGTGCAAGCAGGGCTAGTAA
<i>LrTIP41</i> _Rev	GCAACCATCCAAAGTTAACTGCT

### 1.3 数据统计和分析

利用 EXCEL 2016 软件进行数据统计,利用 Graphpad Prism 9.0.0 软件对数据进行 Mann-Whitney 非参数检验。

## 2 结果和分析

### 2.1 接种 LrRF8 对石蒜干质量和生物碱积累的影响

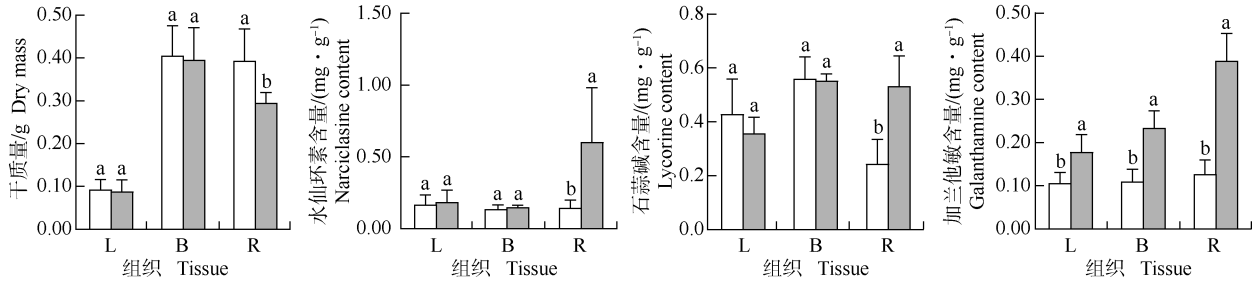
接种 LrRF8 对石蒜叶、鳞茎、根干质量及水仙环素、石蒜碱、加兰他敏含量的影响见图 1。结果显示:与对照(未接菌)组相比,接种 LrRF8 对石蒜叶和鳞茎的干质量无显著影响,显著降低了根干质量。与对照组相比,接种 LrRF8 显著提高了叶和鳞茎中加兰他敏及根中水仙环素、石蒜碱、加兰他敏的含量。

### 2.2 接种 LrRF8 对石蒜中 NO、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及激素含量的影响

接种 LrRF8 对石蒜叶、鳞茎、根中 NO、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、IAA、SA 和 GA 含量的影响见图 2。结果显示:与对照(未接菌)组相比,接种 LrRF8 显著提高了石蒜叶和根中 NO 含量以及根中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量。与对照组相比,接种 LrRF8 显著提高了根中 IAA 和 SA 含量以及叶中 GA 含量,却显著降低了根中 GA 含量。

### 2.3 外源信号分子及激素对石蒜干质量和生物碱积累的影响

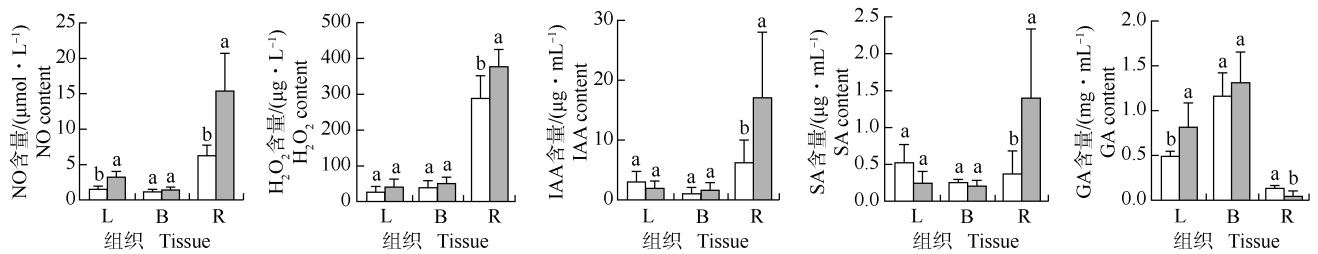
2.3.1 外源信号分子对干质量和生物碱积累的影响 8 mg·mL<sup>-1</sup> SNP、8 mg·mL<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对石蒜叶、鳞茎、根干质量及水仙环素、石蒜碱、加兰他敏含量的影响见图 3。结果显示:与对照组(体积分数 0.002% DMSO 处理)相比,8 mg·mL<sup>-1</sup> SNP 处理显著提高了



□: 对照 (未接种) The control (non-inoculation); ■: 接种 LrRF8 Inoculated with LrRF8. L: 叶 Leaf; B: 鳞茎 Bulb; R: 根 Root. 同一图中柱子上方不同小写字母表示同一组织的对照组与接种组间差异显著 ( $P < 0.05$ ) Different lowercases above the bars in the same graph indicate the significant differences ( $P < 0.05$ ) between the control group and inoculation group of the same tissue.

图 1 接种 LrRF8 对石蒜各组织干质量及生物碱含量的影响

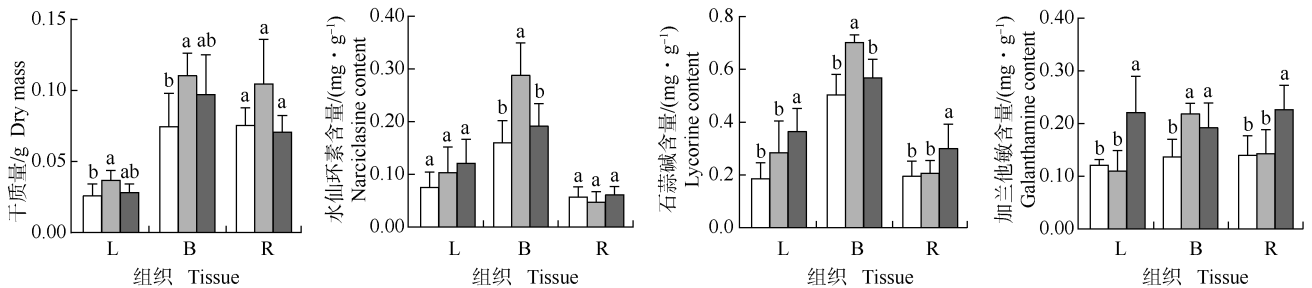
Fig. 1 Effects of inoculation with LrRF8 on dry mass and alkaloid content in each tissue of *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb.



□: 对照 (未接种) The control (non-inoculation); ■: 接种 LrRF8 Inoculated with LrRF8. L: 叶 Leaf; B: 鳞茎 Bulb; R: 根 Root. 同一图中柱子上方不同小写字母表示同一组织的对照组与接种组间差异显著 ( $P < 0.05$ ) Different lowercases above the bars in the same graph indicate the significant differences ( $P < 0.05$ ) between the control group and inoculation group of the same tissue.

图 2 接种 LrRF8 对石蒜各组织中 NO、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及激素含量的影响

Fig. 2 Effects of inoculation with LrRF8 on NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and hormone contents in each tissue of *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb.



□: 对照 (体积分数 0.002% DMSO 处理) The control (volume fraction of 0.002% DMSO treatment); ■: SNP 处理 SNP treatment ( $8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ); ■: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment ( $8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). L: 叶 Leaf; B: 鳞茎 Bulb; R: 根 Root. 同一图中柱子上方不同小写字母表示同一组织不同处理间差异显著 ( $P < 0.05$ ) Different lowercases above the bars in the same graph indicate the significant differences ( $P < 0.05$ ) between different treatment groups of the same tissue.

图 3 外源 SNP 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对石蒜各组织干质量及生物碱含量的影响

Fig. 3 Effects of exogenous SNP and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on dry mass and alkaloid content in each tissue of *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb.

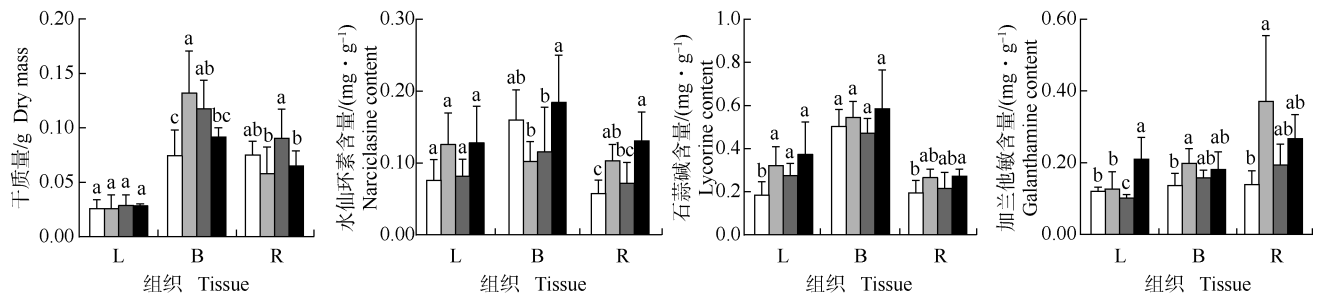
石蒜叶、鳞茎干质量,  $8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$  处理对叶、鳞茎、根干质量无显著影响。与对照组相比,  $8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ SNP}$  处理显著提高了鳞茎中水仙环素、石蒜碱、加兰他敏含量;  $8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$  处理显著提高了叶、根中石蒜碱及叶、鳞茎、根中加兰他敏含量。

2.3.2 外源植物激素对干质量和生物碱积累的影响  
 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ IAA}$ 、 $0.005 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ SA}$ 、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ GA}$  对石蒜叶、鳞茎、根干质量及水仙环素、石蒜碱、加兰他敏含量的影响见图 4。结果显示: 与对照组相比,  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ IAA}$ 、 $0.005 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ SA}$  处理均显著提高

了石蒜鳞茎干质量, 0.5 mg · L<sup>-1</sup> GA 对叶、鳞茎、根干质量无显著影响。与对照组相比, 0.05 mg · L<sup>-1</sup> IAA 处理显著提高了根中水仙环素、叶中石蒜碱及鳞茎和根中加兰他敏含量; 0.005 mg · L<sup>-1</sup> SA 处理显著提高了叶中石蒜碱含量; 0.5 mg · L<sup>-1</sup> GA 处理显著提高了叶中石蒜碱和加兰他敏及根中水仙环素和石蒜碱含量。

### 2.4 接种 LrRF8 对石蒜中生物碱合成关键基因表达的影响

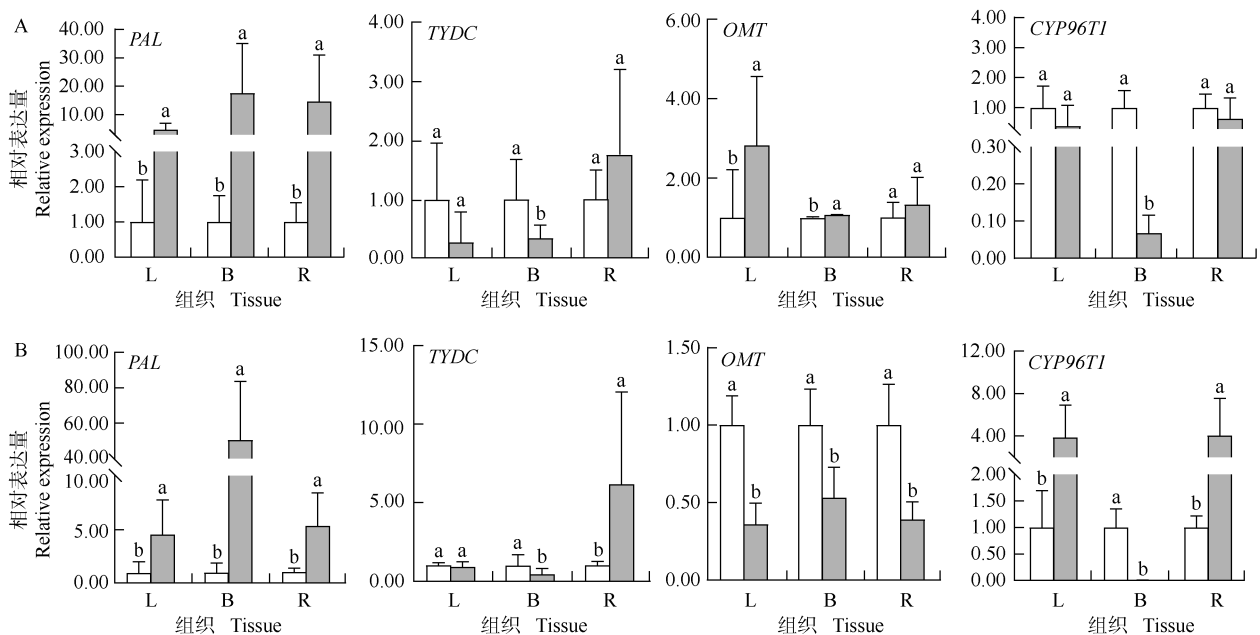
接种 LrRF8 对石蒜叶、鳞茎、根中生物碱合成关键基因 *PAL*、*TYDC*、*OMT*、*CYP96T1* 的相对表达量见图 5。结果显示: 与对照组 (未接种) 相比, 接种 LrRF8 7 d 显著提高了石蒜叶、鳞茎中 *PAL* 和 *OMT* 及根中 *PAL* 的相对表达量; 接种 LrRF8 14 d 显著提高



□: 对照 (体积分数 0.002% DMSO 处理) The control (volume fraction of 0.002% DMSO treatment); ▨: IAA 处理 IAA treatment (0.05 mg · L<sup>-1</sup>); ▩: SA 处理 SA treatment (0.005 mg · L<sup>-1</sup>); ■: GA 处理 GA treatment (0.5 mg · L<sup>-1</sup>). L: 叶 Leaf; B: 鳞茎 Bulb; R: 根 Root. 同一图中柱子上方不同小写字母表示同一组织不同处理间差异显著 ( $P < 0.05$ ) Different lowercases above the bars in the same graph indicate the significant differences ( $P < 0.05$ ) between different treatment groups of the same tissue.

图 4 外源 IAA、SA、GA 对石蒜各组织干质量及生物碱含量的影响

Fig. 4 Effects of exogenous IAA, SA, and GA on dry mass and alkaloid content in each tissue of *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb.



□: 对照 (未接种) The control (non-inoculation); ▨: 接种 LrRF8 Inoculated with LrRF8. L: 叶 Leaf; B: 鳞茎 Bulb; R: 根 Root. 同一图中柱子上方不同小写字母表示同一组织的对照组与接种组间差异显著 ( $P < 0.05$ ) Different lowercases above the bars in the same graph indicate the significant differences ( $P < 0.05$ ) between the control group and inoculation group of the same tissue.

A: 接种 7 d Inoculation for 7 d; B: 接种 14 d Inoculation for 14 d.

图 5 接种 LrRF8 对石蒜各组织中生物碱合成关键基因表达的影响

Fig. 5 Effect of inoculation with LrRF8 on expression of key genes of alkaloid synthesis in each tissue of *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb.

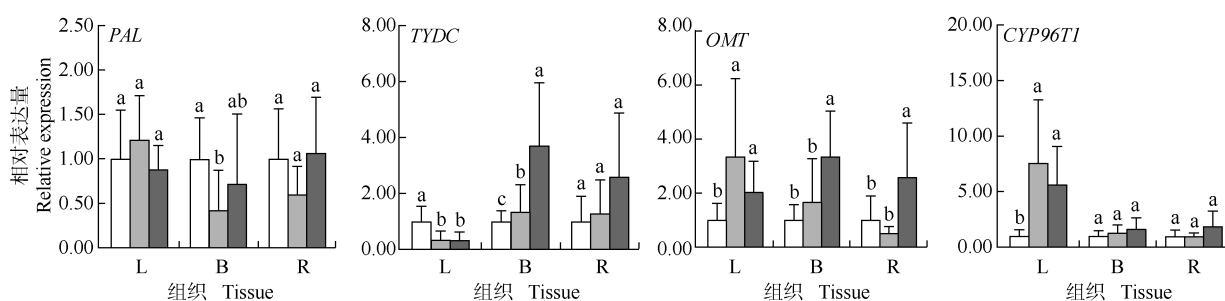
了叶中 *PAL* 和 *CYP96T1*, 鳞茎中 *PAL* 及根中 *PAL*、*TYDC*、*CYP96T1* 的相对表达量。

## 2.5 外源信号分子及激素对石蒜中生物碱合成关键基因表达的影响

### 2.5.1 外源信号分子对生物碱合成关键基因表达的影响

8 mg · mL<sup>-1</sup> SNP、8 mg · mL<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对石蒜叶、鳞茎、根中生物碱合成关键基因相对表达量的影响见

图 6。结果表明:与对照组(体积分数 0.002% DMSO 处理)相比,8 mg · mL<sup>-1</sup> SNP 处理后显著提高了石蒜叶中 *OMT* 和 *CYP96T1* 及鳞茎中 *TYDC* 的相对表达量,8 mg · mL<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后显著提高了叶中 *OMT* 和 *CYP96T1*、鳞茎中 *TYDC* 和 *OMT* 及根中 *OMT* 的相对表达量。



□: 对照(体积分数 0.002% DMSO 处理) The control (volume fraction of 0.002% DMSO treatment); ■: SNP 处理 SNP treatment (8 mg · mL<sup>-1</sup>); ■: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment (8 mg · mL<sup>-1</sup>). L: 叶 Leaf; B: 鳞茎 Bulb; R: 根 Root. 同一图中柱子不同小写字母表示同一组织不同处理间差异显著( $P < 0.05$ ) Different lowercases above the bars in the same graph indicate the significant differences ( $P < 0.05$ ) between different treatment groups of the same tissue.

图 6 外源 SNP 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对石蒜各组织中生物碱合成关键基因表达的影响

Fig. 6 Effects of exogenous SNP and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on expression of key genes of alkaloid synthesis in each tissue of *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb.

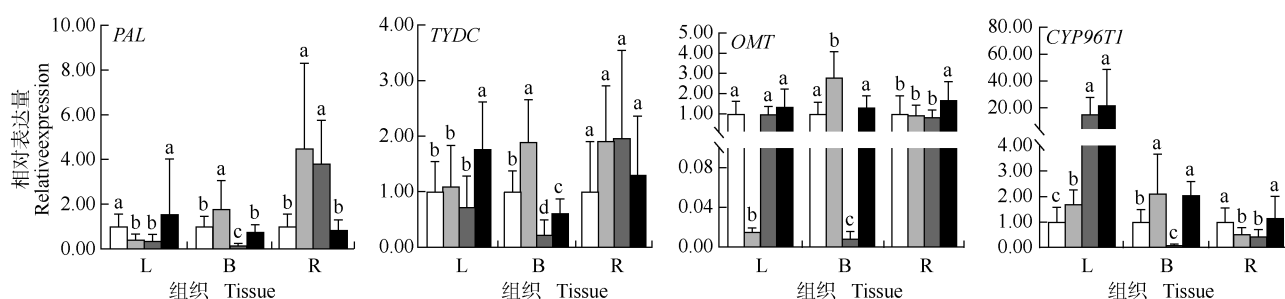
### 2.5.2 外源激素对生物碱合成关键基因表达的影响

0.05 mg · L<sup>-1</sup> IAA、0.005 mg · L<sup>-1</sup> SA、0.5 mg · L<sup>-1</sup> GA 对石蒜叶、鳞茎、根中生物碱合成关键基因相对表达量的影响见图 7。结果表明:与对照组相比,0.05 mg · L<sup>-1</sup> IAA 处理后显著促进了石蒜叶中 *CYP96T1*, 鳞茎中 *PAL*、*TYDC*、*OMT*、*CYP96T1*, 及根中 *PAL* 的相对表达量;0.005 mg · L<sup>-1</sup> SA 处理后显著提高了叶中 *CYP96T1* 和根中 *PAL* 的相对表达量;

0.5 mg · L<sup>-1</sup> GA 处理后显著提高了叶中 *TYDC* 和 *CYP96T1*、鳞茎中 *CYP96T1* 及根中 *OMT* 的相对表达量。

## 2.6 LrRF8 灭活菌丝对石蒜中生物碱积累的影响

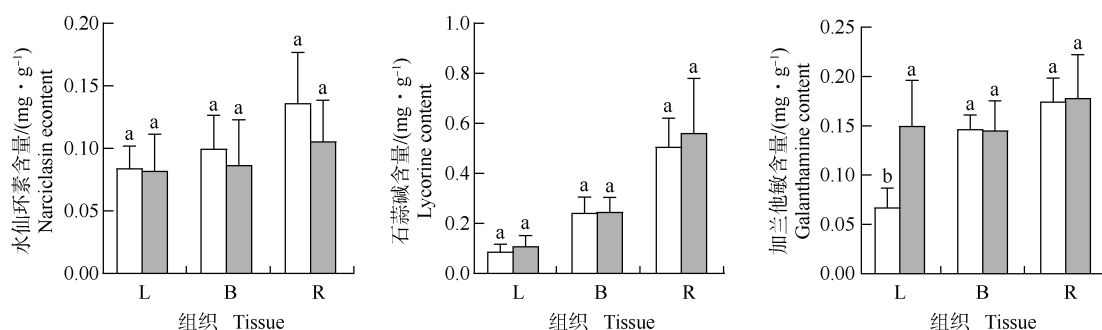
LrRF8 灭活菌丝对石蒜中水仙环素、石蒜碱、加兰他敏含量的影响见图 8。结果显示:与对照组(未添加菌丝冻干粉)相比,LrRF8 灭活菌丝仅显著提高了石蒜叶中加兰他敏含量,对其他组织中 3 种生物碱含量均无显著影响。



□: 对照(体积分数 0.002% DMSO 处理) The control (volume fraction of 0.002% DMSO treatment); ■: IAA 处理 IAA treatment (0.05 mg · L<sup>-1</sup>); ■: SA 处理 SA treatment (0.005 mg · L<sup>-1</sup>); ■: GA 处理 GA treatment (0.5 mg · L<sup>-1</sup>). L: 叶 Leaf; B: 鳞茎 Bulb; R: 根 Root. 同一图中柱子不同小写字母表示同一组织不同处理间差异显著( $P < 0.05$ ) Different lowercases above the bars in the same graph indicate the significant differences ( $P < 0.05$ ) between different treatment groups of the same tissue.

图 7 外源 IAA、SA、GA 对石蒜各组织中生物碱合成关键基因表达的影响

Fig. 7 Effects of exogenous IAA, SA, and GA on expression of key genes of alkaloid synthesis in each tissue of *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb.



□: 对照(未添加菌丝冻干粉)The control (without freeze-dried powder of hypha); ■: LrRF8 灭活菌丝处理 Treatment with LrRF8 inactivated hypha. L: 叶 Leaf; B: 鳞茎 Bulb; R: 根 Root. 同一图中柱子不同小写字母表示同一组织的对照组与灭活菌丝处理组间差异显著 ( $P < 0.05$ ) Different lowercases above the bars in the same graph indicate the significant differences ( $P < 0.05$ ) between the control group and inactivated hypha treatment group of the same tissue.

图8 LrRF8 灭活菌丝对石蒜各组织中生物碱含量的影响

Fig. 8 Effect of LrRF8 inactivated hypha on alkaloid content in each tissue of *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb.

### 3 讨论和结论

石蒜科植物在江苏、安徽等地大面积栽培,开发有效策略提高植株中石蒜科生物碱等药用活性成分的积累,对其进一步开发与应用具有重要意义。本研究结果显示:与对照(未接菌)组相比,单独接种 LrRF8 显著提高了石蒜叶和鳞茎中加兰他敏及根中水仙环素、石蒜碱、加兰他敏的含量;进一步机制研究表明:接种 LrRF8 显著提高了石蒜叶中 NO 和 GA 及根中 NO、 $H_2O_2$ 、IAA 和 SA 含量;此外,  $8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  SNP 处理显著提高了鳞茎中水仙环素、石蒜碱、加兰他敏含量,  $8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$   $H_2O_2$  处理显著提高了叶和根中石蒜碱及叶、鳞茎、根中加兰他敏含量,  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA 处理显著提高了根中水仙环素、叶中石蒜碱及鳞茎和根中加兰他敏含量,  $0.005 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  SA 处理显著提高了叶中石蒜碱含量,  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  GA 处理显著提高了叶中石蒜碱和加兰他敏及根中水仙环素和石蒜碱含量。从整株看,外源施加 SNP 提高了石蒜中 *CYP96T1* 的相对表达量,外源施加  $H_2O_2$  提高了 *TYDC*、*OMT* 和 *CYP96T1* 的相对表达量,外源施加 IAA 提高了 *TYDC* 的相对表达量,外源施加 SA 提高了 *PAL* 和 *CYP96T1* 的相对表达量,外源施加 GA 提高了 *OMT* 和 *CYP96T1* 的相对表达量。相较于盆栽体系,本研究构建的单一内生真菌-石蒜无菌组培苗互作体系排除了环境微生物的干扰,证实接种 LrRF8 有利于促进石蒜中生物碱的积累。

NO 作为一种兼具水溶性和脂溶性的小分子气

体信号,在真菌诱导的植物次生代谢物合成与积累过程中发挥关键作用,如促进紫杉醇、青蒿素等药用活性成分的生物合成<sup>[27]</sup>。活性氧(ROS)是一类由氧衍生的高反应活性信号分子,主要包括  $H_2O_2$ 、超氧阴离子( $O_2^-$ )以及羟自由基( $\cdot OH$ )等。已有研究结果表明:NO 与 ROS 信号在植物与微生物互作过程中存在紧密的协同关系<sup>[28]</sup>,NO 能够通过诱导  $Ca^{2+}$  内流引发  $H_2O_2$  的迸发<sup>[11,29]</sup>,而后者能够诱导植物体内 SA、茉莉酸(JA)、乙烯(ET)等激素含量的提高<sup>[9]</sup>,进一步激活转录因子,启动植物次生代谢物的生物合成。例如:小克银汉霉属(*Cunninghamella* Matr.)内生真菌 AL4 通过激活  $H_2O_2$  和 NO 信号,促进茅苍术中挥发油的积累<sup>[30]</sup>;孔球孢霉属内生真菌 AL12 首先诱导 NO 信号,随后依次增加茅苍术中  $H_2O_2$  和激素的含量,从而提高萜类合成关键基因 *HMGR* 及 *DXR* 的表达,促进挥发油的积累<sup>[9-10]</sup>。本研究发现,接种 LrRF8 可显著诱导石蒜根中  $H_2O_2$  的积累,促进根中水仙环素、石蒜碱、加兰他敏的合成;外源施加  $H_2O_2$  能够提高石蒜根中石蒜碱、加兰他敏含量,表明  $H_2O_2$  在 LrRF8 促进石蒜生物碱合成过程中发挥调节功能。接种 LrRF8 可诱导石蒜叶和根中 NO 的迸发及叶中加兰他敏及根中水仙环素、石蒜碱、加兰他敏含量的显著增加;然而,外源施加 SNP 时,在叶和根中未观察到生物碱含量增加,反而在鳞茎中检测到水仙环素、石蒜碱、加兰他敏含量显著增加。上述结果表明:内生真菌激活的持续、局部信号,与外源信号分子诱导的快速、整体响应存在差异。内生真菌诱发的局部信号仅促进生物碱在其定殖部位的积累,而外源信号

诱导的生物碱合成更可能发生在具有高合成能力的器官,之后转运至高积累器官(如鳞茎)长期积累<sup>[31]</sup>。从整株看,接种 LrRF8 明显增加了石蒜中 NO 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的含量,同时,促进了水仙环素、石蒜碱和加兰他敏的积累,暗示 NO 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 信号可能在 LrRF8 促进石蒜生物碱积累的过程中发挥调控作用;而外源施加 SNP 及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能够诱导石蒜中水仙环素、石蒜碱和加兰他敏的积累;此外,接种 LrRF8 7 d 显著提高了石蒜叶、鳞茎中 PAL 和 OMT 及根中 PAL 的相对表达量,接种 LrRF8 14 d 显著提高了叶中 PAL 和 CYP96T1,鳞茎中 PAL 及根中 PAL、TYDC、CYP96T1 的相对表达量。外源施加 SNP 显著提高了石蒜叶中 OMT、CYP96T1 及鳞茎中 TYDC 的相对表达量,外源施加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显著提高了石蒜叶中 OMT、CYP96T1,鳞茎中 TYDC、OMT 及根中 OMT 的相对表达量。上述结果表明:LrRF8 促进石蒜生物碱合成过程中 NO 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 信号在基因表达层面发挥重要调控作用。

病原真菌被报道能够劫持植物 IAA 信号,促进 IAA-Asp 共轭物积累,增强植物易感性<sup>[32]</sup>。本研究中,接种 LrRF8 显著增加石蒜根中 IAA 含量的同时,显著降低根干质量,而根中水仙环素、石蒜碱和加兰他敏含量显著增加,暗示 LrRF8 可能通过诱导 IAA 的积累,增加石蒜对其的敏感性,诱导更强的防御响应,包括 NO、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 SA 的显著积累。而外源 IAA 的施加对石蒜叶中石蒜碱、鳞茎和根中加兰他敏及根中水仙环素积累的有益影响则可能是由于 IAA 显著促进了石蒜鳞茎干质量,植物生长的增强能够为次生代谢物的合成提供更多的前体与能量<sup>[33]</sup>;外源施加 IAA 显著促进石蒜鳞茎中 PAL 和 TYDC 的表达进一步支持了这一结论,PAL 编码的苯丙氨酸氨裂解酶催化 L-苯丙氨酸生成反式肉桂酸,TYDC 编码的酪氨酸脱羧酶催化 L-酪氨酸生成酪胺,反式肉桂酸与酪胺是石蒜科生物碱合成的重要前体物质,因此,PAL 和 TYDC 是连接氨基酸代谢和生物碱合成网络的关键基因,其表达上调有利于更多的氨基酸进入石蒜科生物碱合成途径,为生物碱合成提供丰富的物质基础,有利于生物碱的合成与积累<sup>[34]</sup>。研究报道 GA 能够抑制生长素转运蛋白 PIN 的活性,从而减少 IAA 的跨细胞运输<sup>[32]</sup>,接种 LrRF8 后石蒜根中 GA 含量显著降低有利于 IAA 的积累,可能与根中 IAA 含量的显著增加有关。GA 通过调节植物细胞伸长或分裂参与多种发育过程,例如增加薯蓣(*Dioscorea opposita*

Turcz.) 块茎和球芽的产量等<sup>[35]</sup>,因此,石蒜根中 GA 含量的显著降低及 IAA 含量显著增加引起的植物易感性可能共同导致石蒜根干质量的显著降低。此外,多个研究报道 GA 能够有效促进植物次生代谢物的合成,如通过增加 PAL 编码的苯丙氨酸氨裂解酶活性,提高紫锥菊(*Echinacea purpurea* Linn.) 毛状根中菊苣酸、咖啡酰酒石酸和绿原酸的积累<sup>[36]</sup>。这与本研究在石蒜叶中观察到的结果类似:接种 LrRF8 显著增加了石蒜叶中 GA 含量、PAL 表达及加兰他敏积累,而外源施加 GA 也显著提高了叶中加兰他敏含量。

近年来多个研究结果显示 SA 参与调控多种药用植物次生代谢物的合成<sup>[37]</sup>。例如:SA 能够促进银杏萜内酯的积累<sup>[38]</sup>,显著提高葛根(*Pueraria candollei* var. *mirifica* A Shaw. et Suvat.) 中大豆苷元、黄芪甲苷、染料木苷及葛根素等活性成分的含量<sup>[39]</sup>;苜蓿疫霉(*Phytophthora boehmeriae* Sawada) PB90 的蛋白诱导子通过 SA 信号促进银杏(*Ginkgo biloba* Linn.) 细胞中黄酮苷的合成<sup>[40]</sup>。本研究中,接种 LrRF8 可显著诱导石蒜根中 SA 的积累及水仙环素、石蒜碱和加兰他敏的合成。尽管外源施加 SA 能够显著提高叶中 CYP96T1 和根中 PAL 的相对表达量及叶中石蒜碱的积累,但对根中生物碱含量没有显著影响。由于 SA 信号一般位于信号网络的下游且与 JA 等信号存在相互拮抗<sup>[9]</sup>,外源施加 SA 可能无法像内生真菌接种一样激活多种信号,导致缺少其他信号的协同作用,甚至抑制了其他信号通路,因此,无法全面激活水仙环素、石蒜碱、加兰他敏同时合成所需的信号网络。值得注意的是,本研究观察到的外源单一信号分子或激素施加诱导石蒜中生物碱合成的效果与内生真菌诱导的复合信号存在差异,体现了信号网络在植物次生代谢调控中的重要作用。例如:SNP、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 SA 共同处理比 SA 单独处理能够更显著地提高丹参悬浮细胞系中丹酚酸 B 的积累<sup>[41]</sup>。由于内生真菌在植物体内的定殖是一个动态且复杂的过程,除本研究所检测的信号分子与植物激素之外,可能还有其他信号分子或激素参与其中。这些尚未明确的信号分子可能有助于阐明 LrRF8 促进石蒜鳞茎中加兰他敏积累的机制。后续实验将进一步探讨其他可能参与的信号分子或激素,如 Ca<sup>2+</sup>、JA、ET 等在 LrRF8 促进生物碱积累过程中的具体作用,以深入完善其调控网络。

综上所述,本研究初步揭示了 NO、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、IAA、SA 及 GA 信号在亚虫草属内生真菌 LrRF8 促进生物碱积累中的调控作用。后续研究将结合转录组测序等手段进一步揭示 NO、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、IAA、SA 及 GA 信号间的上下游关系,明确亚虫草属内生真菌 LrRF8 促进石蒜生物碱积累的信号级联,为该菌株在石蒜栽培中提高水仙环素、石蒜碱及加兰他敏的产量提供理论基础。

#### 参考文献:

- [1] NAIR J J, BASTIDA J, CODINA C, et al. Alkaloids of the south African Amaryllidaceae: a review [J]. *Natural Product Communications*, 2013, 8(9): 1335–1350.
- [2] 庞磊. 石蒜属 (*Lycoris*) 种间系统发育关系及石蒜 (*L. radiata*) 的亲缘地理学研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2013: 4–5.
- [3] DING Y, QU D, ZHANG K M, et al. Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: a review[J]. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2017, 19(1): 53–100.
- [4] 王海明, 陈鹏, 唐萌. 加兰他敏类生物碱的不对称合成研究进展[J]. *有机化学*, 2014, 34: 852–854.
- [5] TAKOS A M, ROOK F. Towards a molecular understanding of the biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids in support of their expanding medical use [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14: 11713–11741.
- [6] SINGH A, DESCAGNÉ-PENIX I. Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloids[J]. *Plant Science Today*, 2014, 1(3): 114–120.
- [7] 孙长生, 朱虹, 彭志金. 石蒜属植物加兰他敏含量研究[J]. *现代中药研究与实践*, 2011, 25(6): 30–31.
- [8] ZHOU J Y, LIU Z L, WANG S F, et al. Fungal endophytes promote the accumulation of Amaryllidaceae alkaloids in *Lycoris radiata*[J]. *Environmental Microbiology*, 2020, 22(4): 1421–1434.
- [9] YUAN J, SUN K, DENG-WANG M Y, et al. The mechanism of ethylene signaling induced by endophytic fungus *Gilmaniella* sp. AL12 mediating sesquiterpenoids biosynthesis in *Atractylodes lancea* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 361.
- [10] YUAN J, ZHANG W, SUN K, et al. Comparative transcriptomics and proteomics of *Atractylodes lancea* in response to endophytic fungus *Gilmaniella* sp. AL12 reveals regulation in plant metabolism [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1208.
- [11] LU W L, XIE X G, AI H W, et al. Crosstalk between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Ca<sup>2+</sup> signaling is involved in root endophyte-enhanced tanshinone biosynthesis of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Microbiological Research*, 2024, 285: 127740.
- [12] CAO X Y, XU L X, WANG J Y, et al. Endophytic fungus *Pseudodidymocyrtis lobariellae* KL27 promotes taxol biosynthesis and accumulation in *Taxus chinensis* [J]. *BMC Plant Biology*, 2022, 22: 12.
- [13] LIANG Z S, MA Y N, XU T, et al. Effects of abscisic acid, gibberellin, ethylene and their interactions on production of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* Bunge hairy roots [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(9): e72806.
- [14] JEONG C S, MURTHY H N, HAHN E J, et al. Inoculum size and auxin concentration influence the growth of adventitious roots and accumulation of ginsenosides in suspension cultures of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2009, 31: 219–222.
- [15] LEE Y, LEE D-E, LEE H-S, et al. Influence of auxins, cytokinins, and nitrogen on production of rutin from callus and adventitious roots of the white mulberry tree (*Morus alba* L.) [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2011, 105: 9–19.
- [16] 梁浩, 孙海, 邵财, 等. 植物激素在人参皂苷生物合成中的作用及调控机制[J]. *吉林农业大学学报*, 2023, 45(6): 685–692.
- [17] WANG Z Y, YUAN J, WANG R, et al. Distinct fungal communities affecting opposite galanthamine accumulation patterns in two *Lycoris* species [J]. *Microbiological Research*, 2024: 127791.
- [18] ZHAI X, JIA M, CHEN L, et al. The regulatory mechanism of fungal elicitor-induced secondary metabolite biosynthesis in medical plants [J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2017, 43(2): 238–261.
- [19] ZHOU J Y, STRINGLIS I A, WEN J, et al. Interplay between Amaryllidaceae alkaloids, the bacteriome and phytopathogens in *Lycoris radiata* [J]. *New Phytologist*, 2024, 241(5): 2258–2274.
- [20] MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures [J]. *Physiologia Plantarum*, 1962, 15: 473–497.
- [21] 柯善文, 刁向玉, 陈翊可, 等. PDA 培养基中添加不同有机氮源物质对黑木耳退化菌种复壮效果的影响[J]. *山东农业科学*, 2024, 56(11): 121–126.
- [22] WANG Y, DAI C C, ZHAO Y W, et al. Fungal endophyte-induced volatile oil accumulation in *Atractylodes lancea* plantlets is mediated by nitric oxide, salicylic acid and hydrogen peroxide[J]. *Process Biochemistry*, 2011: 730–735.
- [23] CHEN Y P, DAN Z W, LI S Q. Measuring endogenous GA and IAA[J]. *Bio-Protocol*, 2022, 12(4): e4332.
- [24] ZHENG L P, ZHANG B, ZOU T, et al. Nitric oxide interacts with reactive oxygen species to regulate oligosaccharide-induced artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* hairy roots [J]. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2010, 4(9): 758–766.
- [25] WANG X M, YANG B, REN C G, et al. Involvement of abscisic acid and salicylic acid in signal cascade regulating bacterial endophyte-induced volatile oil biosynthesis in plantlets of *Atractylodes lancea* [J]. *Physiologia Plantarum*, 2015, 153(1): 30–42.
- [26] YUAN J S, REED A, CHEN F, et al. Statistical analysis of real-time PCR data[J]. *BMC Bioinformatics*, 2006, 7: 85.
- [27] KLESSIG D F, DURNER J, NOAD R, et al. Nitric oxide and

- salicylic acid signaling in plant defense [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, 97(16): 8849–8855.
- [28] SCHELER C, DURNER J, ASTIER J. Nitric oxide and reactive oxygen species in plant biotic interactions [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2013, 16: 534–539.
- [29] WRZACZEK M, BROSCHÉ M, KANGASJÄRVI J. ROS signaling loops-production, perception, regulation [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2013, 16: 575–582.
- [30] 方芳, 戴传超, 王宇. 一氧化氮和过氧化氢在内生真菌小克银汉霉属 AL4 诱导子促进茅苍术细胞挥发油积累中的作用 [J]. 生物工程学报, 2009, 25(10): 1490–1496.
- [31] WANG R, LIU Y, XU S, et al. An ATP-binding cassette transporter, LaABC11, contributes to alkaloid transport in *Lycoris aurea* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(21): 11458.
- [32] GONZÁLEZ-LAMOTHE R, EL OIRDI M, BRISSON N, et al. The conjugated auxin indole-3-acetic acid-aspartic acid promotes plant disease development [J]. The Plant Cell, 2012, 24(2): 762–777.
- [33] YUAN J, ZHOU J Y, LI X, et al. The primary mechanism of endophytic fungus *Gilmaniella* sp. AL12 promotion of plant growth and sesquiterpenoids accumulation in *Atractylodes lancea* [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2016, 125(3): 571–584.
- [34] DESGAGNÉ-PENIX I. Biosynthesis of alkaloids in Amaryllidaceae plants: a review [J]. Phytochemistry Reviews, 2021, 20(2): 409–431.
- [35] CHEN P L, YANG R X, BARTELS D, et al. Roles of abscisic acid and gibberellins in stem/root tuber development [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23: 4955.
- [36] ABBASI B-H, STILES A-R, SAXENA P-K, et al. Gibberellic acid increases secondary metabolite production in *Echinacea purpurea* hairy roots [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 168: 2057–2066.
- [37] SINGH A, DWIVEDI P. Methyl-jasmonate and salicylic acid as potent elicitors for secondary metabolite production in medicinal plants: a review [J]. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2018, 7(1): 750–757.
- [38] YE J B, MAO D, CHENG S Y, et al. Comparative transcriptome analysis reveals the potential stimulatory mechanism of terpene tritactone biosynthesis by exogenous salicylic acid in *Ginkgo biloba* [J]. Industrial Crops and Products, 2020, 145: 112104.
- [39] RANI D, BURANASUDJA V, KOBTRAKUL K, et al. Elicitation of *Pueraria candollei* var. *mirifica* suspension cells promises antioxidant potential, implying antiaging activity [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2021, 145: 29–41.
- [40] XU M J, DONG J F, WANG H Z, et al. Complementary action of jasmonic acid on salicylic acid in mediating fungal elicitor-induced flavonol glycoside accumulation of *Ginkgo biloba* cells [J]. Plant, Cell and Environment, 2009, 32(8): 960–967.
- [41] GUO H, DANG X, DONG J. Hydrogen peroxide and nitric oxide are involved in salicylic acid-induced salvianolic acid B production in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures [J]. Molecules, 2014, 19: 5913–5924.

(责任编辑: 郭严冬)

(上接第23页 Continued from page 23)

- [25] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method [J]. Methods, 2001, 25: 402–408.
- [26] 孙金辉. 马巨噬细胞表面分子 CD63 的表达及单克隆抗体的制备 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2019.
- [27] QIN S, LI W, ZENG J, et al. Rice tetraspanins express in specific domains of diverse tissues and regulate plant architecture and root growth [J]. The Plant Journal, 2024, 117(3): 892–908.
- [28] HEMLER M E. Tetraspanin functions and associated microdomains [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2005, 6: 801–811.
- [29] BOAVIDA L C, QIN P, BROZ M, et al. *Arabidopsis* tetraspanins are confined to discrete expression domains and cell types in reproductive tissues and form homo- and heterodimers when expressed in yeast [J]. Plant Physiology, 2013, 163(2): 696–712.
- [30] 裴延飞. 番茄 TYLCV 抗性相关 *TETRASPANIN3* 基因克隆与功能分析 [D]. 南京: 南京农业大学, 2015: 37.
- [31] WAADT R, SELLER C A, HSU P-K, et al. Plant hormone regulation of abiotic stress responses [J]. Nature Reviews. Molecular Cell Biology, 2022, 23(10): 680–694.
- [32] 于新海, 李濛, 周红昕. 植物非生物胁迫的研究进展 [J]. 农业与技术, 2016, 36(9): 51–53.
- [33] CNOPS G, NEYT P, RAES J, et al. The *TORNADO1* and *TORNADO2* genes function in several patterning processes during early leaf development in *Arabidopsis thaliana* [J]. The Plant Cell, 2006, 18(4): 852–866.

(责任编辑: 张明霞)