

# 接种不同 AM 真菌对滇重楼幼苗功能基因表达的影响

张 华<sup>1</sup>,杜慧慧<sup>1</sup>,郭冬琴<sup>1</sup>,杨 敏<sup>2</sup>,汪茂佳<sup>1</sup>,周 浓<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>重庆三峡学院生物与食品工程学院 三峡库区地道药材绿色种植与深加工重庆市工程实验室,重庆 404120;

<sup>2</sup>大理大学药学与化学学院,大理 671000

**摘 要:**为探究接种不同外源性丛枝菌根(Arbuscular mycorrhizae, AM)真菌对滇重楼幼苗基因表达的影响,本研究以灭菌土壤为生长基质,将滇重楼(*Paris polyphylla* var. *yunnanensis*)新鲜种子与 28 种 AM 真菌于室温盆栽条件下共培养,采用实时荧光定量 PCR 的方法检测鲨烯环氧酶基因(*Squalene epoxidase*, *SE*)、共生受体类似激酶基因(*Symbiosis-receptor-like kinase*, *SYMRK*)、产生钙离子振荡的通道蛋白基因(*Doesn't making fections 1*, *DMI1*)、钙/钙调依赖性蛋白激酶基因(*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase*, *CCaMK*)4 个功能基因在滇重楼幼苗的差异表达情况。结果表明:28 株 AM 菌株可不同程度的影响 *SE*、*SYMRK*、*DMI1*、*CCaMK* 4 个功能基因的表达,其中薄壁两性囊霉(*Ambispora leptoticha*, *Ale*)和崔氏原囊霉(*Archaeospora trappei*, *Atr*)可以显著增加 4 个功能基因的表达量。隐类球囊霉(*Paraglomus occultum*, *Po*)和透明盾巨孢囊霉(*Scutellospora pellucida*, *Spe*)可以增加 *SE*、*SYMRK* 的表达,细凹无梗囊霉(*Acaulospora scrobiculata*, *Asc*),亮色盾巨孢囊霉(*Racocetra fulgida*, *Rfu*),哥伦比亚内养囊霉(*Entrophospora colombiana*, *Ec*),明球囊霉(*Rhizophagus clarus*, *Rcl*),根内球囊霉(*Rhizophagus intraradices*, *Rin*)可以增加 *DMI1* 的表达。综上所述,接种的 28 株 AM 真菌菌株中 *Ale* 和 *Atr* 能显著的提高 4 种功能基因的表达,结合前期与滇重楼无菌播种幼苗进行共生培养分析 AM 真菌对种子萌发及幼苗化学成分的影响,推测这两株菌可能作为培育滇重楼菌根化苗的理想菌株,人工接种 AM 真菌可为保护和提高滇重楼开辟了一条新的途径。

**关键词:**滇重楼;AM 真菌;基因表达

中图分类号:R282.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)2-0318-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.2.022

## Effects of inoculation with different AM fungi on functional gene expression in seedlings of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*

ZHANG Hua<sup>1</sup>, DU Hui-hui<sup>1</sup>, GUO Dong-qin<sup>1</sup>, YANG min<sup>2</sup>, WANG Mao-jia<sup>1</sup>, ZHOU Nong<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Food and Biology Engineering, The Chongqing Engineering Laboratory for Green Cultivation and Deep Processing of the Three Gorges Reservoir Area's Medicinal Herbs, Municipal Development and Reform Commission, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404120, China;

<sup>2</sup>College of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali 671000, China

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the expression of function gene in the seedling of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* inoculated by different foreign arbuscular mycorrhizal (AM) fungi species. With sterilized soil as the growth of the substrate, the fresh seeds of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* were co-cultured with 28 AM fungi species under the condition of pot culture at room temperature. The differential expression of four functional genes including *Squalene epoxidase* (*SE*), *Symbiosisreceptor-like kinase* (*SYMRK*), *Doesn't making fections 1* (*DMI1*), *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase* (*CCaMK*), were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The results showed that the 28 strains of AM strains could affect the expression of four functional genes *SE*, *SYMRK*, *DMI1* and *CCaMK* in different extent. *Ambispora leptoticha* (*Ale*) and *Archaeospora trappei* (*Atr*) can significantly increase the expression of the four functional genes. *Paraglomus occultum*, (*Po*) and *Scutellospora pellucida* (*Spe*) can increase the expression of *SE*, *SYMRK*; *Acaulospora scrobiculata* (*Asc*), *Racocetra fulgida* (*Rfu*), *Entrophospora colombiana* (*Ec*), *Rhizophagus clarus* (*Rcl*) and *Rhizophagus intraradices* (*Rin*)

收稿日期:2018-03-24

接受日期:2018-10-09

基金项目:国家自然科学基金(81260622);重庆市基础与前沿研究计划(cstc2016jcyjA0555);重庆市教委科学技术研究项目(KJ1601007)

\* 通信作者 Tel:86-23-58576130; E-mail:erhaizn@126.com

can increase the expression of *DMI1*. In conclusion, the expression of four functional genes was significantly increased by Ale and Atr in 28 strains of AM fungi. There was obvious influence that the seed germination and seedling chemical constituents of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* inoculated by different foreign arbuscular mycorrhizal fungi species in our previous study. It is presumed that these two strains (Ale and Atr) are expected to serve as the ideal strains for the mycorrhizal seedlings cultivation of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. Artificial inoculation of AM fungi can open up a new way for the protection and improvement of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*.

**Key words:** *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*; arbuscular mycorrhizal fungi; gene expression

滇重楼 (*Paris polyphylla* var. *yunnanensis*) 作为国家二级濒危药用植物,在我国西部药用植物中占主要地位,其多以云南、四川、重庆、贵州、广西等省市最为丰富<sup>[1-3]</sup>。随着市场需求的不断扩大,而滇重楼自然繁殖率较低、生长周期较长,以及人们的肆意乱挖乱采,严重破坏了其生存环境,使得滇重楼的野生资源蕴藏量急剧下降。

丛枝菌根 (Arbuscular mycorrhizal, AM) 真菌可以促进宿主对土壤营养物质的吸收、促进植物移栽成活率、提高植物抗病能力、产量和品质、调节植物种群和群落结构以及维持生态系统稳定性<sup>[4,5]</sup>。药用植物的次生代谢产物是特定的基因型和特定的生境共同作用的产物<sup>[6]</sup>。重楼中含有丰富的三萜皂苷类等次级代谢化合物<sup>[7]</sup>。研究表明,鲨烯环氧酶基因 (*Squalene epoxidase*, *SE*) 在调控碳流流向初级代谢或次级代谢中起到关键作用,是植物甾醇、三萜类化合物生物合成的关键酶<sup>[8]</sup>,其微小的改变即可引起下游产物的大幅变化<sup>[9]</sup>。此外,AM 菌根共生早期信号途径中涉及关键的基因包括共生受体样蛋白激酶基因 (*Symbiosisreceptor-like kinase*, *SYMRK*),

产生钙离子振荡的通道蛋白基因 (*Doesn't making ffections 1*, *DMI1*) 和钙/钙调依赖性蛋白激酶基因 (*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase*, *CCaMK*), 这些基因所编码的蛋白对于植物识别和应答 AM 真菌早期信号途径中是必需的<sup>[10-12]</sup>。与其他药用植物相比,滇重楼的遗传背景信息较少,研究 AM 菌根共生影响其相关产物基因表达对于获取和利用药用植物有效活性成分具有重要的意义。前期研究发现,接种 AM 真菌能提高滇重楼根茎中甾体皂苷的含量<sup>[13]</sup>。因此本研究拟采用实时荧光定量 PCR 技术分析上述 4 种功能基因的表达水平,研究不同 AM 真菌对这四个基因的表达效果的影响,以期寻找优势 AM 真菌,对于更好地保护和利用滇重楼资源具有理论和现实意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试 AM 真菌

本试验所用 AM 真菌通过美国国际丛枝菌根真菌种质资源保藏中心 (INVAM) 购得相应 AM 真菌纯净菌剂,接种菌剂为带有孢子、菌丝的栽培基质 (见表 1)。

表 1 不同处理组及其接种 AM 真菌

Table 1 Different treatment groups and the inoculated AM fungi

处理组 Group	AM fungi	AM 真菌	处理组 Group	AM fungi	AM 真菌
Ga	<i>Gigaspora albida</i>	微白巨孢囊霉	Rcl	<i>Rhizophagus clarus</i>	明球囊霉
Gd	<i>G. decipiens</i>	易误巨孢囊霉	Rin	<i>R. intraradices</i>	根内球囊霉
Gg	<i>G. gigantean</i>	巨大巨孢囊霉	Afo	<i>Acaulospora foreata</i>	孔窝无梗囊霉
Gm	<i>G. margarita</i>	球状巨孢囊霉	Ako	<i>A. koskei</i>	何氏无梗囊霉
Gr	<i>G. rosea</i>	玫瑰红巨孢囊霉	Asc	<i>A. scrobiculata</i>	细凹无梗囊霉
Sca	<i>Scutellospora calospora</i>	美丽盾巨孢囊霉	Asp	<i>A. spinosa</i>	刺无梗囊霉
Sdi	<i>S. dipurpurascens</i>	双紫盾巨孢囊霉	De	<i>Diversispora eburnea</i>	象牙白多孢囊霉
Spe	<i>S. pellucida</i>	透明盾巨孢囊霉	Ds	<i>D. spurca</i>	沾屑多孢囊霉
Dh	<i>Dentiscutata heterogama</i>	异配盾孢囊霉	Ec	<i>Entrophospora colombiana</i>	哥伦比亚内养囊霉
Reo	<i>Racocetra coralloidea</i>	瑚状盾巨孢囊霉	Pb	<i>Paraglomus brasilianum</i>	巴西类球囊霉
Rfu	<i>R. fulgida</i>	亮色盾巨孢囊霉	Po	<i>P. occultum</i>	隐类球囊霉

续表 1 (Continued Tab. 1)

处理组 Group	AM fungi	AM 真菌	处理组 Group	AM fungi	AM 真菌
Sde	<i>Septoglomus deserticola</i>	沙荒球囊霉	Ale	<i>Ambispora leptoticha</i>	薄壁两性囊霉
Svi	<i>S. viscosum</i>	黏质球囊霉	Atr	<i>Archaeospora trappei</i>	崔氏原囊霉
Fm	<i>Funneliformis mosseae</i>	摩西球囊霉	CK	CK groups	对照组
Cc	<i>Claroideoglomus claroideum</i>	近明球囊霉			

## 1.2 滇重楼种子

滇重楼的新鲜种子于 2012 年 10 月 18 日采自大理州农业科学推广研究院种植基地的滇重楼健壮植株,常温下河沙贮存 4 个月,并经重庆三峡学院生物与食品工程学院周浓教授鉴定为百合科植物滇重楼 *P. polyphylla* var. *yunnanensis* 的成熟种子,种子采用单株保存、保证种质资源的稳定性和均一性。

## 1.3 试剂与仪器

SGTriEx 高纯总 RNA 提取试剂盒 (# R1002), Thermo First cDNA Synthesis Kit (# Q1010), 2 × SG PCR MasterMix (# Q1009), 2 × SG Green qPCR Mix (with ROX) (# Q1002) (SinoGene 公司, 中国); DNase I, RNase-free (Fermentas 公司, 加拿大); 3K15 型冷冻离心机 (Sigma 公司, 美国); JY-SPFT 型电泳槽和 JY300C 型电泳仪和 JY04S-3C 型凝胶成像系统 (北京君意东方电泳设备有限公司, 中国); Bio-photometer 型分光光度计 (Eppendorf 公司, 德国), StepOnePLUS 型定量 PCR (Applied Biosystems 公司, 美国)。

## 1.4 实验设计

栽培基质为重庆三峡学院百安校区的菜园土与河沙的混合物 (体积比 3:1, 过 2 mm 筛, 121 °C 高压灭菌锅内灭菌 2 h)。采用温室盆栽方法, 设 AM (接种 28 种 AM 真菌) 组和 CK (对照) 组共 29 种处理。每处理 6 个重复, 每盆栽种滇重楼 15 株。将栽培袋

用 10% 次氯酸钠溶液消毒 15 min 后, 并用流水清洗干净。

## 1.5 总 RNA 提取、反转录 cDNA

在同一接种框内, 采用 5 点法取重楼 1 年生幼苗, 每个点取 5 ~ 10 株混合为一个样品, 平行 3 份, 快速洗净泥土, 用液氮速冻, 存放于 -80 °C 冰箱。按照 SGTriEx 高纯总 RNA 提取试剂盒说明书提取 29 组样品。利用 1% 琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测总 RNA 的浓度和纯度。经 Thermo First cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒反转录为 cDNA 后, 以适量的 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR 反应。

## 1.6 实时荧光定量 PCR

以适量的 cDNA 为模板, 在荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems Step One PLUS) 上分析滇重楼甾体皂苷合成关键酶: 鲨烯环氧酶 (SE); 滇重楼与 AM 真菌共生相关基因: 共生受体样蛋白激酶 (SYMRK), 钙/钙调依赖性蛋白激酶 (CCaMK) 以及离子通道 (ion channel) 蛋白 (DMI1) 4 个功能基因的相对表达量, 以 Actin 为内参, 所用基因的引物见表 2。采用比较 Ct 方法计算, 每处理组重复 3 次。

荧光定量 PCR 的反应体系为 15 μL: 2 × SG Green qPCR Mix 7.5 μL, 上下游引物各 0.25 μL, cDNA 2 μL, nuclease-free water 6 μL。PCR 反应条件: 95 °C 10 min, 95 °C 20 s, 60 °C 30 s, cycle 40, 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 95 °C 15 s。

表 2 所用基因的引物

Table 2 The primer sequences in this study

基因名称 Gene name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	产物长度 Product length	熔解温度 Temp. (°C)
SE	ATGTCCTGGTCAGAAGGTG AGTTATCTCCAAGTCGATCACTT	105	58
CCaMK	CGCTGCCCTATGACCGTG GCCGTGCCCGTTGGCGTC	108	59
DMI1	ATCAGCCAAGGATGACTTGCC ATGACTTGCCGATGATGCTC	103	58
SYMRK	ACCCTGGCATAAAAGGGC CTGATGAAGAGGCTGCATTGG	104	57
Actin	TCCATCATGAAGTGTGATGT AGTGATCTCCTTGCTCATACT	114	59

## 1.7 数据处理

使用 GraphPad Prism 6 软件作图及进行多样本间的单因素方差分析,  $P < 0.05$  为显著性差异,  $P < 0.01$  为极显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 滇重楼幼苗总 RNA 浓度与纯度分析

所提取的 28 种 AM 真菌处理组和 CK 组滇重楼幼苗的总 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳和 Biopho-

tometer 分光光度计检测。完整的 RNA 是有 28SrRNA 和 18SrRNA 及 5SrRNA 3 条带。如图 1 所示, 18SrRNA 和 28SrRNA 的电泳条带完整和清晰, 含量大约 2:1, 说明获得的总 RNA 没有发生降解。分光光度计检测发现, 所有的总 RNA 的吸光光谱曲线平滑,  $OD_{260}/OD_{280}$  的比值在 1.88 ~ 2.1 之间, 浓度最高为 337.8 ng/ $\mu$ L。因此, 所获得的滇重楼幼苗的总 RNA 能够用于后续的实验。

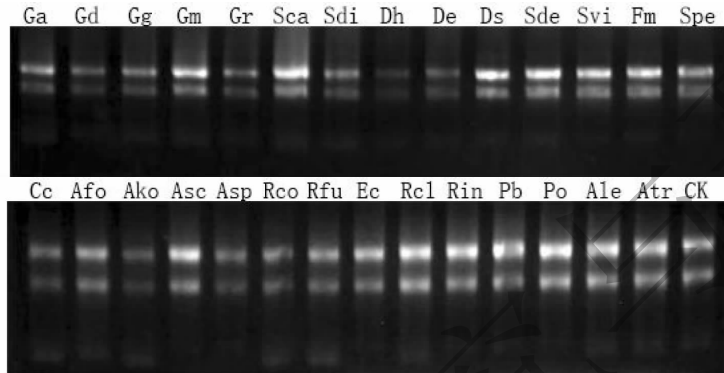


图 1 不同 AM 真菌处理组和 CK 组滇重楼幼苗总 RNA 电泳图

Fig. 1 The total RNA electrophoretogram of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* is inoculated by different foreign arbuscular mycorrhizal fungi species

### 2.2 接种不同 AM 真菌 SE 在滇重楼幼苗中表达差异

通过荧光定量 PCR 结果分析发现, Po 组, Ale 组和 Atr 组能极显著地提高 SE 基因在滇重楼幼苗中的表达量, 其  $P < 0.01$  (如图 2 所示), 而其余各组并不能提高该基因的表达量。鲨烯环氧酶(SE)的活性决定了环氧化鲨烯生物合成的效率, 也会影响以环氧化鲨烯为前体的甾体皂苷等化合物的生物合成。根据本课题组前期研究发现, 滇重楼的幼苗根

茎中以重楼皂苷 VII 含量最高, 其次是重楼皂苷 VI 和重楼皂苷 II, 重楼皂苷 I 的含量最低; 并且发现 Po 组, Ale 组和 Atr 组的重楼皂苷 VII 和重楼皂苷 VI 均能高于 CK 组<sup>[14]</sup>。与本实验的结果一致, Po 组, Ale 组和 Atr 组中 SE 基因的表达量与 CK 组呈显著性上升。推测 SE 基因被 Po, Ale 和 Atr 诱导而高表达时重楼皂苷的含量也会增加。因此, 不同的 AM 真菌能够影响滇重楼幼苗中 SE 基因的表达差异, 从而影响重楼皂苷成分的合成, 最终影响滇重楼的品质。

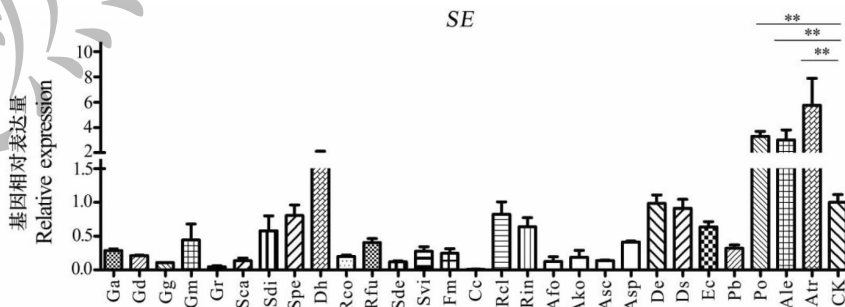


图 2 接种不同 AM 真菌 SE 在滇重楼幼苗中的相对表达量

Fig. 2 The relative expression levels of SE in the rhizome of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* inoculated by different foreign arbuscular mycorrhizal fungi species

注: 数据经独立样本的 T 检验 \* 和 \*\* 分别表示  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$  的差异显著水平,  $n = 3$ , 下同。

Note: Data were analyzed by Independent-sample T test, \* and \*\* indicate significant differences at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively,  $n = 3$ .

### 2.3 接种不同 AM 真菌 *SYMRK* 在滇重楼幼苗中表达差异

在接种 28 株 AM 真菌处理后的滇重楼幼苗中, *SYMRK* 基因的表达出现明显的差异, 其中除了 Spe 组, Ale 组和 Atr 组能够提高该基因在滇重楼幼苗的表达情况。Spe 组中 *SYMRK* 基因的表达量显著上升 ( $P < 0.05$ ), Ale 组和 Atr 组能诱导 *SYMRK* 基因

高量表达, 且呈极显著的趋势 ( $P < 0.01$ ), 而其余的 AM 真菌的处理组中均不能增加 *SYMRK* 基因的表达量, 如图 3 所示。前期研究发现, Spe 组、Ale 组和 Atr 组能够不同程度的侵染滇重楼并形成菌根。因此, 加入 Spe、Ale 和 Atr 能够增加滇重楼幼苗菌根生活力, 并能够与滇重楼幼苗根系形成良好的互惠共生的关系, 促进其幼苗的生长发育。

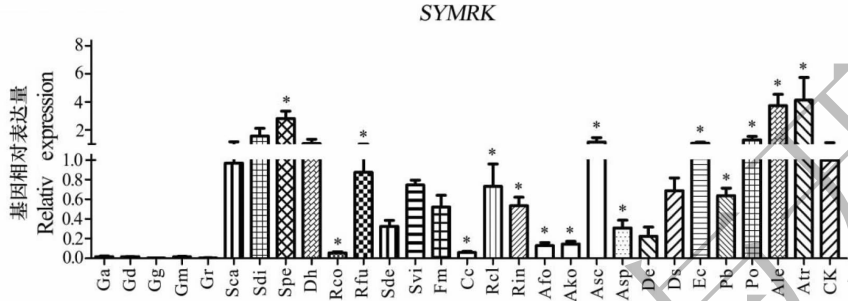


图 3 接种不同 AM 真菌 *SYMRK* 在滇重楼幼苗中的相对表达量

Fig. 3 The relative expression levels of *SYMRK* in the rhizome of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* inoculated by different foreign arbuscular mycorrhizal fungi species

注: 数据经独立样本的 T 检验 \* 和 \*\* 分别表示  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$  的差异显著水平,  $n = 3$ , 下同。

Note: Data were analyzed by Independent-sample T test, \* and \*\* indicate significant differences at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively,  $n = 3$ .

### 2.4 接种不同 AM 真菌 *CCaMK* 在滇重楼幼苗中表达差异

根据荧光定量 PCR 结果分析发现, Ale 组 ( $P < 0.05$ ) 和 Atr 组 ( $P < 0.01$ ) 能够显著性的提高 *CCaMK* 基因的表达量, 而其余 AM 真菌组中该基因的表达量均出现不同程度的下降, 如图 4 所示。*CCaMK* 基因可解码  $Ca^{2+}$  信号, 从而引起共生体效

应因子的活性。在接种外源 AM 真菌的初级阶段, 真菌等微生物共生体能够引起  $Ca^{2+}$  的变化, 从而引起丛枝菌根和共生体系侵染植物根部的细胞信号转导, 引发一系列的生理变化。因此, *CCaMK* 在这些过程中扮演着非常关键的角色, 外源 Ale 和 Atr 可增加该基因的表达量, 且能够促进对滇重楼的侵染率, 推测能够在滇重楼的生长发育和品质发挥重要的作用。

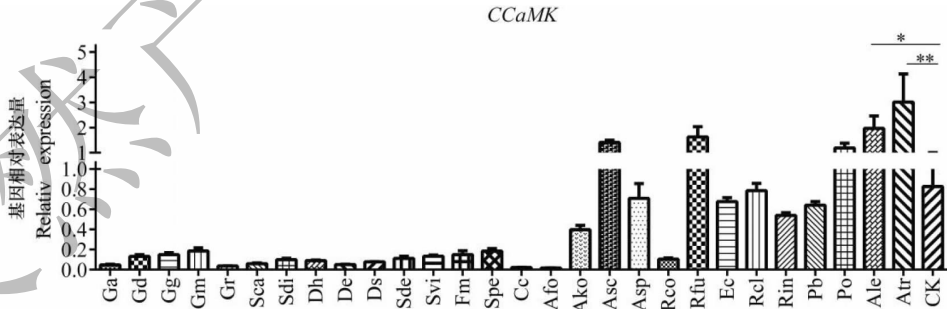


图 4 接种不同 AM 真菌 *CCaMK* 在滇重楼幼苗中的相对表达量

Fig. 4 The relative expression levels of *CCaMK* in the rhizome of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* inoculated by different foreign arbuscular mycorrhizal fungi species

注: 数据经独立样本的 T 检验 \* 和 \*\* 分别表示  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$  的差异显著水平,  $n = 3$ , 下同。

Note: Data were analyzed by Independent-sample T test, \* and \*\* indicate significant differences at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively,  $n = 3$ .

### 2.5 接种不同 AM 真菌 *DMI1* 在滇重楼幼苗中表达差异

离子通道蛋白基因 *DMI1* 能够编码阳离子通道

蛋白, 调节细胞核内外的离子流, 对共生信号的传导具有重要的作用。通过荧光定量 PCR 结果分析可知, Asc、Rfu、Ec、Rel、Rin、Ale 和 Atr 能够显著性的

增加 *DMI1* 的表达量,且有些组能够极显著的增加(图 5 所示)。说明接种不同 AM 真菌 *DMI1* 基因在

滇重楼幼苗中表达增加,从而能够介导植物与 AM 真菌和其他微生物之间的共生关系的建立。

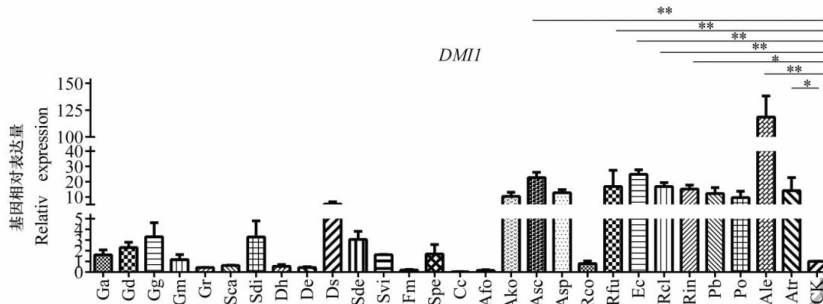


图 5 接种不同 AM 真菌 *DMI1* 在滇重楼幼苗中的相对表达量

Fig. 5 The relative expression levels of *DMI1* in the rhizome of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* inoculated by different foreign arbuscular mycorrhizal fungi species

注:数据经独立样本的 T 检验 \* 和 \*\* 分别表示  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$  的差异显著水平,  $n = 3$ , 下同。

Note: Data were analyzed by Independent-sample T test, \* and \*\* indicate significant differences at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively,  $n = 3$ .

### 3 结论

野生重楼资源缺乏,重楼块根生长缓慢,以及种植周期长和育苗存在问题等等,在很大程度上影响了重楼商品化种植和品质的提高<sup>[15]</sup>。因此,筛选滇重楼优势菌株,提高滇重楼的产量是亟待解决的首要问题。AM 真菌与植物之间具有一种普遍的共生现象,其中 80% 以上的陆生高等植物能与 AM 真菌形成共生体<sup>[16]</sup>,同时作为重要的药用植物根系与土壤菌根真菌的互惠共生体,可以显著提高药用植物的产量和品质<sup>[17,18]</sup>。已有研究表明,多种 AM 真菌均可以促进滇重楼成年植株根茎次生代谢产物的形成,且不同 AM 真菌对滇重楼根茎中不同甾体皂苷的影响不尽相同<sup>[18,19]</sup>。重楼的主要有效成分是甾体皂苷,鲨烯环氧化酶(SE)作为甲羟戊酸途径的关键酶之一,该基因有助于调控活性物质的合成从而提高产量。研究发现 SE 是控制人参皂苷的生物合成的关键酶之一<sup>[20]</sup>,本研究发现接种外源 AM 真菌(Ale 和 Atr)共培养的滇重楼幼苗可以提高 SE 的表达量,从而可以促进滇重楼的品质。

作为植物识别菌根真菌诱导而产生的特异分子的共生受体样蛋白激酶(SYMRK)是控制共生形成的关键组分。AM 真菌感染植物后会诱导共生基因的表达,而目前 SYMRK 在豆科植物中研究的较为清楚,但在非豆科植物尤其是药用植物中的功能分析研究较少,本研究以接种不同 AM 真菌对 SYMRK 在滇重楼幼苗中的表达差异性研究,为该基因在药用植物中的研究奠定了良好的理论基础。

本研究主要分析 4 种功能基因的表达差异,为

进一步研究重楼皂苷合成的代谢机制和利用次生代谢工程技术提高重楼的品质奠定了分子基础。后期可继续研究 4 个功能基因在接种外源 AM 真菌与滇重楼幼苗共培养后的不同组织中的差异表达情况,尽可能阐明滇重楼有效成分合成及调控机制。根据本课题组前期研究发现,接种本研究的 28 株 AM 真菌能够使滇重楼幼苗的化学成分发生变化,能够影响滇重楼幼苗菌根生活力、根茎生物量和重楼皂苷产量,结合本研究发现的 Ale 和 Atr 两种真菌能够显著提高 4 种功能基因的表达量。综上所述,建议滇重楼种子共生萌发时可接种薄壁两性囊霉 *Ambispora leptoticha*(Ale)和崔氏原囊霉 *Archaeospora trapei*(Atr),进一步提高滇重楼幼苗的成活率和提高产量,为滇重楼的药用价值奠定良好的基础。结合后续优势菌株的筛选,并与之进行组合回接,以期能提高滇重楼的生长发育和在恶劣环境中的存活能力,从而为滇重楼育苗生产上带来巨大的经济效益。

### 参考文献

- 1 Zhang CY, Zhao TZ. Strategy and its key technology for resource regeneration of plants in *Paris* L. [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2009, 40: 319-323.
- 2 Duan BZ, Huang LF, Xie CX, et al. Estimation on the potential distribution of *Paris Polyphylla* Smith Var. *yunnanensis* predicted by TCM-GIS [J]. Value Eng (价值工程), 2010, 29: 140-142.
- 3 Zhang ZW, Liu ZY, Chen YH, et al. Plant resources investigation of *Paris* L. in three gorge reservoir area of Chongqing city [J]. Res Dev Market (资源开发与市场), 2008, 24:

- 254-256.
- 4 Brundrett MC. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants; understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis [J]. *Plant Soil*, 2009, 320(1-2):37-77.
  - 5 Duncan DC. Arbuscular mycorrhizal fungi as (agro) ecosystem engineers[J]. *Plant Soil*, 2010, 333(1-2):1-5.
  - 6 Yin Y, GUAN HY, Zhang XN. Review on enzymes and genes related to the biosynthesis of steroidal saponins [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2016, 28:1332-1336.
  - 7 Wu X, Feng YF, Li YL. 3D-QSAR studies of triterpenoid saponins from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* as anticancer agents in human nasopharyngeal carcinoma epithelial cells [J]. *J Guangdong Pharma Univ* (广东药学院学报), 2015, 31:149-155.
  - 8 Liu Y, Tian YH, Meng XY, et al. Cloning of encoding squalene epoxidase gene and its expression in panax ginseng root tissue [J]. *J Jilin Agr Univ* (吉林农业大学学报), 2013, 35(1):40-45.
  - 9 Han JY, In JG, Kwon YS, et al. Regulation of ginsenoside and phytosterol biosynthesis by RNA interferences of squalene epoxidase gene in *Panax ginseng* [J]. *Phytochem*, 2010, 71(1):36-46.
  - 10 Hause B, Fester T. Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis [J]. *Planta*, 2005, 221:184-196.
  - 11 Harrison M. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2005, 59:19-42.
  - 12 Paszkowski U. A journey through signaling in arbuscular mycorrhizal symbioses 2006 [J]. *New Phytol*, 2006, 172:35-46.
  - 13 Zhou N, Duan BZ, Xia CL, et al. Research on changing regulation of ingredients in *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* at different growth [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2011, 17(5):70-73.
  - 14 Zhang J, Pan XJ, Zhou N, et al. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on endogenous hormones in *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2018, 49:1897-1906.
  - 15 Yuan MQ, Ding CB, Tao L, et al. Cloning and sequence analysis of cycloartenol synthase gene from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2012, 43:2250-2256.
  - 16 Newman EI, Reddell P. The distribution of mycorrhizas among families of vascular plants [J]. *New Phytol*, 1987, 106:745-751.
  - 17 Guo QS, Cheng LT, Liu ZY. Study on influence of arbuscular mycorrhizal fungi *Pinellia ternata* yield and chemical composition [J]. *China J Chin Mat Med* (中国中药杂志) 2010, 34:333-338.
  - 18 Zhou N, Ding B, Feng Y, et al. Effects of mycorrhizal colonization and medicine quality of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* inoculated by different foreign AM fungi species [J]. *China J Chin Mat Med* (中国中药杂志), 2015, 40:3158-3167.
  - 19 Zhou N, Zhang DQ, Sun Q, et al. Effects of fungal elicitors on the secondary metabolite steroidal saponin in *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2012, 47:1237-1242.
  - 20 Hu W, Liu Y, Tian YH, et al. Cloning expression of squalene epoxidase from *Panax ginseng* [J]. *J Northwest A&F Univ: Nat Sci* (西北农林科技大学学报: 自科版), 2012, 40:207-212.
- 
- (上接第 260 页)
- 16 Zhong YM, Feng YF, Guo J. Rapid identification of components from *Fructus citri Sarcodactylis* based on ultra-high performance liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26:1965-1970.
  - 17 Wei Y, Chen Z, Yang L, et al. Simultaneous determination of 5 components in *Fructus citri Sarcodactylis* from different habitats by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2017, 37:2180-2184.
  - 18 Zhong YM, Tian QL, Xiao HW, et al. Chemical constituents of *Fructu scitri Sarcodactylis* from different places [J]. *Cent South Pharm* (中南药学), 2014, 12(1):63-66.
  - 19 Cai XY, Zhang SD, Zeng J, et al. Evaluation of germplasm resources of gardeniae fructus based on principal component and hierarchical cluster analysis [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formul* (中国实验方剂学杂志), 2017, 23(14):30-37.
  - 20 Zhang T, Kang XJ, Yang Y, et al. Quality evaluation of *Linderae Radix* from different growing areas [J]. *Chin Tradit Patent Med* (中成药), 2017, 39:2113-2118.
  - 21 Li YJ, Fang ZQ. Application of clustering analysis in TCM research [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med: Nat Sci* (南京中医药大学学报: 自科版), 2001, 17:182-185.