

内生菌 *Phialocephala fortinii* 影响大花红景天代谢的 差异途径及基因表达

王梦亮¹, 高小音^{1,2}, 崔晋龙^{1*}, 王俊宏¹

(山西大学 1. 应用化学研究所, 2. 生物技术研究所, 山西 太原 030006)

摘要: 药用植物发育和代谢受到多种因素的影响, 而内生真菌对植物的影响是近年来才得以重视并逐步成为热点。为探索内生真菌 *Phialocephala fortinii* 对大花红景天基因及代谢途径的影响, 本实验通过 RNA 转录组测序筛选差异表达基因; 并用 Real-time PCR 对基因表达进行验证, 利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法分析脂代谢、信号转导和环境适应性等重要代谢途径差异基因的相对表达量。结果表明, 验证结果与测序结果一致, 内生真菌 *P. fortinii* 能够促进大花红景天脂代谢途径中的差异基因表达量; 它对信号转导途径中相关基因表达的影响不同, 但控制 Notch 信号通路途径的基因表达量显著提高, 为对照组的 34 倍; 对适应性代谢途径差异基因表达上调, 进而促进红景天环境适应能力。研究结果旨在为揭示内生真菌与红景天的互动机制、红景天道地性形成原因、内生真菌功能的开发等提供分子基础数据。

关键词: 福廷瓶头霉; RNA-Seq; 内参基因; 实时荧光定量 PCR; 植物-真菌互作

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 12-2122-07

Differential pathway and gene expressions of endophytic *Phialocephala fortinii* inoculated on *Rhodiola crenulata*

WANG Meng-liang¹, GAO Xiao-yin^{1,2}, CUI Jin-long^{1*}, WANG Jun-hong¹

(1. Institute of Applied Chemistry, 2. Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: The development and metabolism of medicinal plant is affected by many factors, among which the effect from endophytic fungi has been noticed recently and has become one of hot fields. In order to explore the effect of endophytic fungi on gene expression in *R. crenulata*, RNA-sequencing was used to find genes involved in metabolic pathways, and the differential genes were verified by real-time fluorescent quantitative PCR. The method of $2^{-\Delta\Delta Ct}$ was used to analyze the relative expression levels of genes in related metabolic pathways, which was used to verify the result of transcriptomics sequencing. The results showed that the endophytic fungus, *P. fortinii*, could up-regulate the gene expression in lipid metabolic pathway of *R. crenulata*. In signal transduction pathway, the genes were influenced at different level but the gene expressions were significantly increased under control of Notch signaling pathway, which was 34 times of that in control. The gene expressions of environmental adaption pathway were up-regulated in *R. crenulata* after inoculation of *P. fortinii*. This study could provide help for further understanding on mechanism of plant-fungus interaction, root cause of geoherbism of medicinal plant and exploring bio-function of endophytic fungi.

收稿日期: 2018-08-03; 修回日期: 2018-09-26.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31270383, 31670328); 山西省自然科学基金资助项目 (2014011029-1); 山西省“1331 工程”重点实验室-功能分子化学 (晋教科[2017]14 号).

*通讯作者 Tel: 86-351-7016101, E-mail: CJL717@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0709

Key words: *Phialocephala fortinii*; RNA-Seq; internal reference genes; real-time fluorescent quantitative PCR; plant-fungus interaction

基因表达变化能直接或间接地影响药用植物代谢通路, 从而影响药用植物活性成分的积累^[1]。然而, 药用植物基因表达受到多种因素的影响。其中, 内生真菌被认为是植物生长发育和代谢过程中不可或缺的组成部分, 可通过横向基因转移、诱导效应、生物转化等途径改变宿主基因表达和代谢途径, 对植物的生长、发育产生影响^[2]。近年来, 陆续发现内生真菌在改变植物次生代谢产物的合成^[3]、促进生长^[4]、提高植物产量^[5]和增强植物抵抗胁迫的能力^[6]等方面具有重要作用。因此, 内生真菌与植物的互作关系, 已成为药用植物品质研究的前沿领域^[7,8]。

红景天 (*Rhodiola crenulata*) 属于景天科红景天属的多年生草本或亚灌木药用植物。其中, 主要品种为大红花景天, 生长于青藏高原, 被誉为“高原人参”, 并作为红景天唯一的基源植物被历届《中国药典》所收录, 主要具有抗氧化、抗辐射、抗缺氧等药理活性^[6]。本研究是将前期发现的活性内生真菌 *P. fortinii* 接种于大花红景天, 从转录组水平探索该菌对大花红景天代谢途径中基因表达变化及互作机制, 为真菌-植物互作发育和代谢机制提供依据。

材料与方法

材料 红景天组培苗: 由本课题组建立的大花红景天组培苗体系进行转接^[9], 稳定生长约一周后用于菌-苗互作实验。

供试菌株 分离自长白红景天根部的内生真菌, 经筛选, 具有促进大花红景天关键酶和次生代谢产物积累的作用^[6,10]。经鉴定, 隶属于福廷瓶头霉 *Phialocephala fortinii*^[11], GenBank 库登记编号为 KJ542299, 保藏于山西大学应用化学研究所^[6]。

试剂与仪器 柱式 RNA 抽提纯化试剂盒 (上海生物工程股份有限公司); 反转录试剂盒 GoScript™ Reverse Transcription Mix 和实时荧光定量 PCR 试剂盒 GoTaq® qPCRMaster Mix (北京赛奥生物技术有限公司); BIO-RAD CFX96™ Real-Time system (Bio-rad, USA)。

内生真菌与红景天组培苗共生培养 无菌条件下, 打取直径为 0.5 cm 的 *P. fortinii* 菌饼 3 块, 均匀接种于组培苗周围, 培养条件见文献^[9]。以菌-苗紧密接触生长开始计时^[12], 培养 10 天, 采集互作组培苗,

设置无菌组培苗作为对照 (CK), 试验样品全部设置 3 个重复。将采集的样品在液氮中速冻 30 min 后, 保存于 -80 °C 冰箱, 用于 RNA 的提取。

总 RNA 提取、cDNA 合成及转录组测序 取约 25 mg 冻存样品 (处理组和对照组) 加入液氮迅速研磨成粉状, 采用柱式 RNA 抽提纯化试剂盒提取总 RNA, 利用超微量分光光度计 (Thermo Scientific NanoDrop Lite, 美国) 和 1% 琼脂糖凝胶电泳对 RNA 质量进行检测。cDNA 第一链的合成按照反转录试剂盒 GoScript™ Reverse Transcription Mix 试剂盒说明书要求进行。之后将构建好的 cDNA 文库送往上海派森诺生物科技股份有限公司进行无参转录组测序, 测序平台为 Illumina Nextseq 500。

引物的合成及验证 利用 Primer Premier 5 软件 (Premier 公司, 加拿大) 设计差异基因引物, 包括鞘脂类 δ -4-脱氢酶基因 (*DEGS*)、病程相关蛋白 1 基因 (*PR1*)、生长素响应蛋白 IAA 基因 (*IAA*)、乙烯响应转录因子 1 基因 (*ERF1*)、生长素转运载体基因 (*AUX1*)、病程相关蛋白 2 基因 (*PR2*)、含 SNW 结构域蛋白 1 基因 (*SNW1/SKIP*)、磷脂酰丝氨酸脱羧酶基因 (*PISD*) 和酰基甘油脂肪酶基因 (*MGLL*) 的引物 (表 1), 然后通过琼脂糖凝胶电泳分析引物的特异性, 验证其引物能否进行特异性扩增。

qRT-PCR 分析 单个内参基因表达不稳定, 而常常采用多个内参基因进行 qRT-PCR 校正, 以得到更为准确的结果^[13], 本研究以植物螯合肽合成酶基因 (*PCS*) (GenBank No. AJ548472.1) 和甘油醛磷酸脱氢酶基因 (*GAPDH*) (GenBank No. HQ156465) 作为内参基因, 设计引物 F1: 5'-TGAGGTGGCGACTG ATAACC-3', R1: 5'-GGGAGAACCCTCCGGTACAA-3'; F2: 5'-GCACGCCAATCCAGAACAAG-3', R2: 5'-TGGGCGTGATATCTCCTCGT-3'。

RT-PCR 反应采用实时荧光定量 PCR 试剂盒 GoTaq® qPCRMaster Mix, 在 BIO-RAD CFX96™ 荧光定量 PCR 仪上进行实验。反应总体积为 20 μ L: GoTaq® qPCRMaster Mix (2 \times) 10 μ L、上下游引物 (10 μ mol·L⁻¹) 各 0.6 μ L、模板 1 μ L、Nuclease-Free Water 7.8 μ L。扩增程序采用 3 步法 (95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 15 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 45 个循环; 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 95 °C 15 s)。

Table 1 Amplification primers with Q-PCR for differential genes of metabolic pathway in *R. crenulata* inoculated with *P. fortinii*

Genetic code	Gene name	Gene symbol	Primer (5'–3')	Amplicon size/bp
c3416_g1_i1	Sphingolipid delta-4 desaturase	<i>DEGS</i>	F: ACCAA TACTC CGATT CCA R: GTCAT CCCAA CCTCC TTA	224
c67561_g1_i1	Pathogenesis-related protein 1	<i>PR1</i>	F: GCGAC TTGGA TGTGC TAA R: GACGA AACTG AACT ACTCT GC	125
c74401_g1_i1	Auxin-responsive protein IAA	<i>IAA</i>	F: CTGGA TGCTT GTAGG AGA R: AAGTC GGTGA TTTGT TGA	174
c76552_g2_i1	Ethylene-responsive transcription factor 1	<i>ERF1</i>	F: CTTTC GGTTC TTCCA ATT R: CACCT CGGTA CGACT TCT	201
c78146_g1_i1	Auxin influx carrier	<i>AUX1</i>	F: CACCA AGGTT TGTAG GGAGC R: AAGGC ATTAG CCGTA GCG	238
c83837_g1_i2	Pathogenesis-related protein 2	<i>PR2</i>	F: TCATT TGAAC TGACG ACGAA R: TGTGC TAAGG TGAGG TGC	129
c89485_g1_i1	SNW domain-containing protein 1	<i>SNWI/SKIP</i>	F: CTATT GCGAG ACAAG GACA R: ACATT CACAT TCCTC GGTTT	211
c106081_g1_i1	Phosphatidylserine decarboxylase	<i>PISD</i>	F: CTTCT ACCGC ACCCT AAA R: TTCCC TTGAC TTGTT CCA	131
c139123_g1_i1	Acylglycerol lipase	<i>MGLL</i>	F: CTATA ATTCT GGCAT CGG R: AGACT GTCAC GGAAC TGG	120

数据处理 通过内参基因进行归一化比较, 首先利用 Excel 2016 软件计算对照组和处理组样品中目的基因和内参基因的相对表达量, 选用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法^[14]计算处理组基因相对表达量, 生物学重复 3 次, 取平均值; 运用 SPSS 软件单因素分析 (One Way ANOVA) 数据差异性, 进行差异性分析显著性差异 ($P < 0.05$) 和极显著性差异 ($P < 0.01$)。

结果与分析

1 总 RNA 的质量检测

通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳对样品总 RNA 进行检测发现 28S rRNA 和 18S rRNA 条带清晰且无弥散现象, 表明 RNA 的完整性良好 (图 1); 经过 NanoDrop 检测发现 OD 260/280 接近 2.0 左右 (表 2), 说明 RNA 的纯度较高, 达到后续实验要求。

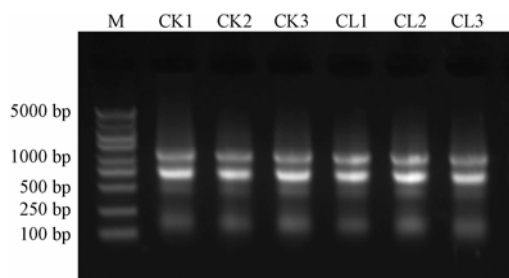


Figure 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA extracted from *R. crenulata*. M, CK and CL represent maker, control group and treatment group, respectively

Table 2 Quality detection of total RNA extracted from *R. crenulata*

Group	RNA concentration/ $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	A_{260}/A_{280}
Control	2.032	2.05
Treatment	2.157	1.97

2 内生真菌 *P. fortinii* 与大花红景天互作的转录组测序

转录组测序结果表明, 相比于对照, 真菌 *P. fortinii* 对大花红景天的 3 200 个基因表达产生了影响, 其中上调基因 3 048 个, 下调基因 152 个 (图 2)。其中, 经过 KEGG 数据库富集分析表明, 影响较大且最为重要的为脂代谢 (lipid metabolism)、信号转导 (signal transduction) 和环境适应 (environmental adaption) 3 条代谢途径。因此本实验选取这 3 个途径中部分影响较大的基因为研究对象, 所研究基因如下: 鞘脂类 δ -4-脱氢酶基因 (*DEGS*)、病程相关蛋白 1 基因 (*PR1*)、生长素响应蛋白 IAA 基因 (*IAA*)、乙烯响应转录因子 1 基因 (*ERF1*)、生长素转运载体基因 (*AUX1*)、病程相关蛋白 2 基因 (*PR2*)、含 SNW 结构域蛋白 1 基因 (*SNWI/SKIP*)、磷脂酰丝氨酸脱羧酶基因 (*PISD*) 和酰基甘油酯脂肪酶基因 (*MGLL*) 9 个基因 (图 3)。

3 引物特异性分析

扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 条带大小与期望值相一致, 不存在其他非特异性扩增条带。进一步通过分析参与各代谢途径中基因的熔解曲线 (图 4), 发现都只产生单一熔解峰, 且各重复样品之间曲线重复性良好, 说明引物满足实验要求。

4 红景天代谢途径中基因的表达分析

4.1 内生真菌对大花红景天脂代谢中基因表达的影响

内生真菌 *P. fortinii* 与大花红景天组培苗互作后, 红景天脂代谢基因表达的变化见图 5, 参与脂代谢差异基因的表达量均表现出升高, 其中参与甘油磷脂代谢的基因 *PISD* 与对照相比, 其相对表达量明显提

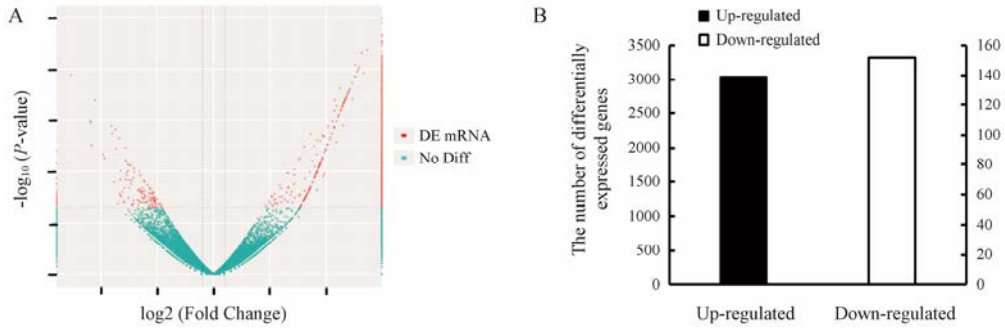


Figure 2 The differentially expressed genes through transcriptome sequencing. A: The volcanic map of differential expression genes; B: The number of up-regulated and down-regulated genes of *R. crenulata* inoculated with *P. fortinii* compared to CK

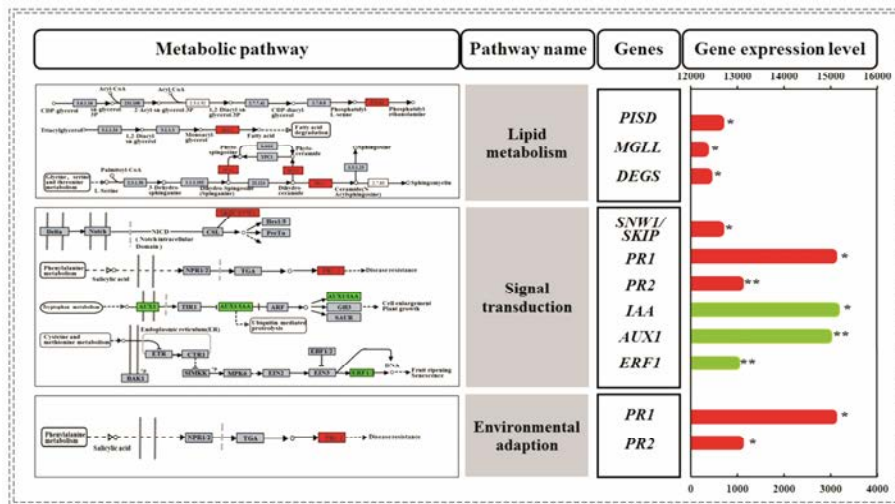


Figure 3 Differential gene expression and pathway in *R. crenulata* inoculated with *P. fortinii* based on RNA-seq and Q-PCR. Red and green mark was up-regulated and down-regulated genes and their relative quantity based on CK, respectively. In gene expression level illustration: The bars of *PR1* and *PR2* refer to left-X-axis; the bars of *PISD*, *MGLL*, *DEGS*, *SNW1/SKIP*, *IAA*, *AUX1* and *ERF1* refer to right-Y-axis

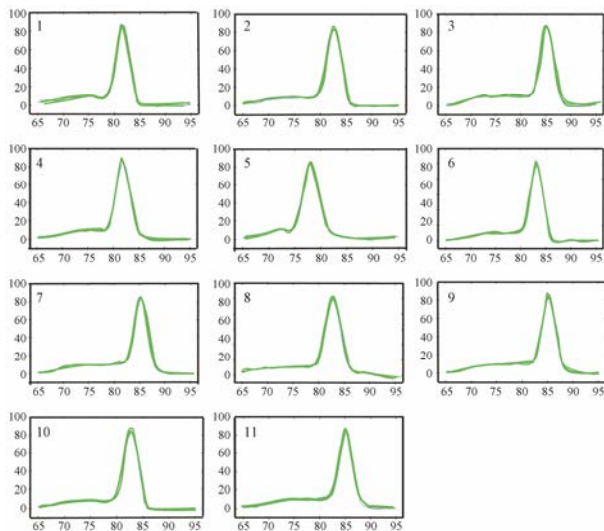


Figure 4 Melting curves of genes in metabolic pathways and reference genes in *R. crenulata* inoculated with *P. fortinii*. 1–2: Reference genes (1: *PCs*; 2: *GAPDH*); 3–11: Target genes (3: *DEGS*; 4: *PR1*; 5: *IAA*; 6: *ERF1*; 7: *AUX1*; 8: *PR2*; 9: *SNW1*; 10: *PISD*; 11: *MGLL*). Y-axis and X-axis are $-d(RFU)/dT$ and temperature, respectively

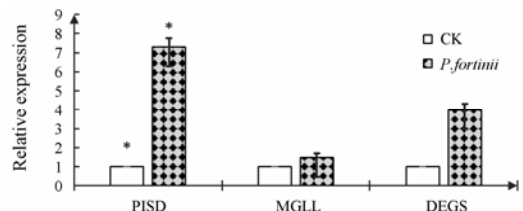


Figure 5 Effect of endophytic fungi on gene expression of *R. crenulata* in the lipid metabolic pathway. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs control. *PISD* is involved in the metabolism of glycerophospholipids; *MGLL* is involved in glyceride metabolism; *DEGS* is involved in sphingolipid metabolism

高, 达到对照组的 7.2 倍 ($P < 0.05$), 而涉及甘油酯代谢和鞘脂类代谢的基因 *MGLL* 和 *DEGS*, 其表达量也有所提高。结果表明, 内生真菌能够促进宿主红景天脂代谢途径中基因表达。

4.2 内生真菌对大花红景天在信号转导途径中基因表达的影响 由图6可知, 内生真菌 *P. fortinii* 显著提高了红景天中参与 Notch 信号通路途径基因的表达量, 即达到对照组的 34 倍 ($P < 0.05$)。参与植物激素信号

转导途径的 5 个基因中, *PR1* 和 *PR2* 的相对表达量与对照组相比, 分别提高了 3.8 倍和 0.96 倍, 而其余 3 个基因 *AUX1*、*IAA* 和 *ERF1* 表达量均呈现下降趋势。结果表明, 内生真菌能够调节植物细胞的分化, 并且诱导激素调节的变化, 从而促进植物的生长和发育。

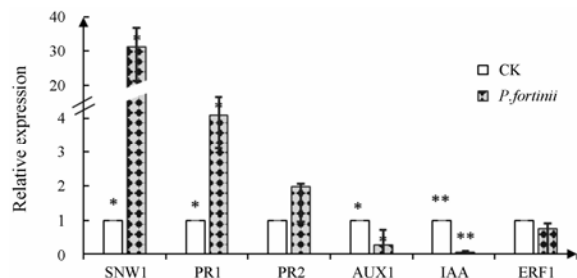


Figure 6 Effect of endophytic fungi on gene expression in signal transduction pathway of *R. crenulata*. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control. *SNW1* is involved in the Notch signaling pathway which regulates the differentiation and development of cells, tissues and organs through the interaction between adjacent cells, and *PR1*, *PR2*, *AUX1*, *IAA* and *ERF1* participant in plant hormone signaling pathway

4.3 内生真菌对大花红景天在环境适应中基因表达的影响 由图 7 可知, 活性内生真菌能够促进宿主植物红景天对环境的适应, 其中基因 *PR1* 的相对表达量明显提高, 为对照组的 4.8 倍, 且具有显著性差异 ($P < 0.05$), 而 *PR2* 的表达量虽然呈现升高, 但与对照相比仅提高了 0.96 倍, 且两个基因均参与真菌与植物互作。研究表明, 内生真菌 *P. fortinii* 能够增强其宿主植物对生物胁迫的耐受性和对微生物的抗性。

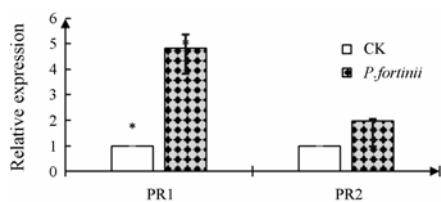


Figure 7 Effect of endophytic fungi on the gene expression in environmental adaptation pathway of *R. crenulata*. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs control. *PR1* and *PR2* are involved in plant-fungus interaction

讨论

大花红景天是《神农本草经》、《四部药典》和《本草纲目》等医书中列为上品的高山药用植物, 具滋补、延缓衰老、抗疲劳等方面的药理功能^[15]。近年来, 为了提高大花红景天的品质, 许多学者在基因调控^[16]、活性成分的合成途径^[17]及次级代谢产物调控^[18]等方面进行了广泛的研究。但是, 影响大花红景

天品质的因素尚不完全明确, 影响代谢途径中的基因表达及次级代谢物合成的机制尚不清楚。研究表明, *P. fortinii* 能与植物根形成黑色有隔菌丝结构, 促进毛棉杜鹃幼苗磷、氮元素的吸收和生长^[11]。研究发现, *P. fortinii* 具有促进大花红景天生长、提高红景天苷等活性成分积累以及促进红景天苷合成途径中关键酶基因表达等的生物活性^[6, 9, 19]。通过转录组测序表明, 内生真菌对宿主植物脂代谢、信号转导途径、环境适应性等途径中基因表达产生重要影响, 这对挖掘 *P. fortinii* 生物功能, 揭示该菌与红景天互作的分子机制, 对深入认识红景天道地性形成因素提供重要的补充。

脂代谢是生物体生命活动的主要代谢途径之一, 内生真菌促进红景天脂代谢途径中基因的表达, 可能与内生真菌的次级代谢有关, 内生真菌可通过产生多样化化合物, 作为植物代谢物前体或直接成为其组成部分, 或被宿主吸收利用, 进而影响宿主生长的发育和代谢^[20, 21]。① 鞘脂不仅是生物膜结构的重要组成部分, 也是重要的生物活性分子, 鞘脂及其衍生物是许多细胞活动进程中重要的动力调节器, 参与了许多重要的信号转导过程, 进而使细胞产生各种不同的生物学功能。研究发现鞘脂 δ -4-去饱和酶 (*DEGS*) 基因表达量提高, 这有助于促进不饱和鞘脂类不饱和脂肪酸分子的合成; 对生物膜稳定性、细胞信号、逆境反应、病原性防御和程序性细胞死亡进程中仍然发挥着重要作用^[22]。② 磷脂酰丝氨酸是细胞膜的活性物质, 具有延缓衰老的作用, 磷脂酰丝氨酸脱羧酶 (*PISD*) 能够将磷脂酰丝氨酸脱羧形成磷脂酰乙醇胺。研究发现 *PISD* 基因表达提高, 增强脱羧作用, 从而降低宿主抗衰老的功能。③ 酰基甘油脂肪酶 (*MGLL*) 是一类促进脂肪分解成甘油和脂肪酸的水解酶, 其基因表达量提高, 进一步能够促进甘油和脂肪酸的合成, 为宿主植物的生命活动提供能量等。

植物信号转导途径能够控制相关基因表达和引起特定的生理生化反应^[20], 研究发现内生真菌与红景天互作后, 参与 Notch 信号通路的基因 *SNW1/SKIP* 相对表达量显著提高, 表明内生真菌 *P. fortinii* 可能通过调节宿主细胞、组织等的分化, 从而来促进植物的生长发育^[23]; 激素调节是维持植物体稳态的调节方式, 本研究发现控制激素调节的基因表达量变化不一致, 生长素响应蛋白基因 (*IAA*)、生长素转运载体基因 (*AUX1*) 和乙烯响应转录因子基因 (*ERF1*) 降低, 表明活性菌与植物互作一定时间后, 生长素的合成和转运能力降低, 从而可能会进一步影响植物

的生长。

目前已有研究发现内生真菌能够提高宿主植物的抗性以及增强植物对环境的适应能力^[24]。但是, 此研究发现病程相关蛋白基因 (*PR1* 和 *PR2*) 表达量提高, 说明活性内生真菌在一定程度上可能转换为病原菌, 从而能够引起宿主植物的防御反应^[25], 进一步增强其植物的适应能力。本研究表明 *P. fortinii* 增强了宿主植物在环境适应方面的能力, 这可能是由于植物的防御和应激反应引起的。

尽管该研究从分子水平揭示了部分重要代谢途径的基因表达情况, 但是内生真菌影响红景天代谢的途径及基因还需要进一步研究。基因表达的调控不仅受到多时空因素的影响, 而且会呈现出多种复杂的影响结果。总之, 对于这类问题系统、深入的研究, 将为全面开发利用大花红景天生内真菌资源、寻找提高红景天品质的方法提供新途径。

References

- [1] Gu L, Zhang ZY, Quan H, et al. Integrated analysis of transcriptomic and metabolomic data reveals critical metabolic pathways involved in rotenoid biosynthesis in the medicinal plant *Mirabilis himalaica* [J]. *Mol Genet Genomics*, 2018, 293: 635–647.
- [2] Gluck-Thaler E, Slot JC. Dimensions of horizontal gene transfer in eukaryotic microbial pathogens [J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11: e1005156.
- [3] Zhai X, Jia M, Chen L, et al. The regulatory mechanism of fungal elicitor-induced secondary metabolite biosynthesis in medical plants [J]. *Crit Rev Microbiol*, 2017, 43: 238–261.
- [4] Khan AL, Waqas M, Lee IJ. Resilience of *Penicillium resinanum* LK6 and exogenous gibberellin in improving *Capsicum annuum* growth under abiotic stresses [J]. *J Plant Res*, 2015, 128: 259–268.
- [5] Krell V, Unger S, Jakobs-Schoenwandt D, et al. Endophytic *Metarhizium brunneum* mitigates nutrient deficits in potato and improves plant productivity and vitality [J]. *Fungal Ecol*, 2018, 34: 43–49.
- [6] Wang ML, Wang YN, Cui JL, et al. Effect of endophytic fungus on expression of key enzyme genes in pathway of salidroside biosynthesis in *Rhodiola crenulata* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 1920–1925.
- [7] Hamilton CE, Faeth SH, Dowling TE. Distribution of hybrid fungal symbionts and environmental stress [J]. *Microb Ecol*, 2009, 58, 408–413.
- [8] Cui JL, Guo SX, Xiao PG. Interaction between endophytes and host plant and the role of endophytes in genuineness analysis of medicinal plant [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 214–221.
- [9] Wang ML, Zhong NS, Guo TT, et al. Effects of plant growth substances on callus induction and shoot regeneration of *Rhodiola crenulata* Hook. f. et Thoms [J]. *Acta Phytophysiol Sin (植物生理学报)*, 2014, 50: 192–196.
- [10] Wang ML, Jiao J, Xing J, et al. Effects of endophytic fungi ZPRa-R-1 on the key signal molecules and the main secondary metabolites in *Rhodiola crenulata* [J]. *Bull Bot Res (植物研究)*, 2016, 36: 416–420.
- [11] Liu YJ, Xu T, Yuan Y, et al. Symbiotic effect and responses to adding phosphorus to *Rhododendron moulmianense* seedling after inoculated with *Phialocephala fortinii* [J]. *J Anhui Agric Sci (安徽农业科学)*, 2015, 43: 225–228.
- [12] Cui JL, Ren XL, Wang ML. RAPD marker analysis of *Rhodiola crenulata* interacted with endophytic fungi ZPRs-R-11 [J]. *J Microbiol (微生物学杂志)*, 2017, 37: 8–12.
- [13] Su XJ, Fan BG, Yuan LC, et al. Selection and validation of reference genes for quantitative RT-PCR analysis of gene expression in *Populus trichocarpa* [J]. *Bull Bot (植物学报)*, 2013, 48: 507–518.
- [14] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method [J]. *Nat Protoc*, 2008, 3: 1101–1108.
- [15] Cui JL, Ren XL, Wang ML. rDNA-ITS sequence analysis and genetic relationship of *Rhodiola* spp. from two major producing areas [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2015, 35: 1704–1708.
- [16] Zhang JX, Ma LQ, Yu HS, et al. A tyrosine decarboxylase catalyzes the initial reaction of the salidroside biosynthesis pathway in *Rhodiola sachalinensis* [J]. *Plant Cell Rep*, 2011, 30: 1443–1453.
- [17] Ma LQ, Liu CM, Yu HS, et al. Salidroside biosynthesis pathway: the initial reaction and glycosylation of tyrosol [J]. *Chin J Biotechnol (生物工程学报)*, 2012, 28: 282–294.
- [18] Liu J. A multi-evaluation method is recommended to study the content of active ingredients in *Rhodiola rosea* from different habitats [J]. *Clin J Chin Med (中医临床研究)*, 2017, 9: 28–31.
- [19] Cui JL, Wang YN, Jiao J, et al. Fungal endophyte-induced salidroside and tyrosol biosynthesis combined with signal cross-talk and the mechanism of enzyme gene expression in *Rhodiola crenulata* [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 12540.
- [20] Shen L, Li LY, Zhang XJ, et al. A new indole derivative from endophyte *Myrothecium roridum* IFB-E091 in *Artemisia annua* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 1305–1308.

- [21] Hassan S, Mathesius U. The role of flavonoids in root-rhizosphere signaling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63: 3429–3444.
- [22] Zhou LY, Wang JQ, Bu DP, et al. Advanced research of effect of polyunsaturated fatty acids on cell membrane function [J]. *Biotechnol Bull (生物技术通报)*, 2009, 19: 22–26.
- [23] Redman RS, Kim YO, Woodward CJDA, et al. Increased fitness of rice plants to abiotic stress *via* habitat adapted symbiosis: a strategy for mitigating impacts of climate change [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e14823.
- [24] Wang W, Feng Y, Aimaiti Y, et al. TGF signaling controls intrahepatic bile duct development may through regulating the Jagged1-Notch-Sox9 signaling axis [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233: 5780–5791.
- [25] Vanessa R, Markus S. Analysis of the *Phialocephala subalpina* transcriptome during colonization of its host plant *Picea abies* [J]. *PLoS One*, 2016, 11: e0150591.