

内生菌及多组学技术在三叶青产业化中的研究进展与展望

江悦娟*, 闫甜妹, 段晨, 邵寒雨
金华职业技术大学, 浙江金华, 中国
*通讯作者

【摘要】三叶青 (*Tetrastigma hemsleyanum*) 作为新“浙八味”中药材之一, 因其较强的抗肿瘤、抗病毒、免疫调节等药理活性而市场需求量不断增加。然而, 栽培技术不成熟导致产量与品质同步提升难题, 严重制约其产业化进程。植物内生菌作为宿主共生微生物, 可通过多种途径调控药用植物生长发育, 为解决三叶青产业瓶颈提供了新途径。本文简述了三叶青产业化发展现状与难题, 阐明了药用植物内生菌促进宿主生长及品质的作用、三叶青内生菌相关研究进展以及多组学技术在“植物-内生菌”互作中的应用价值, 最后展望未来发展方向, 为三叶青高产优质栽培及产业化升级提供理论参考。

【关键词】三叶青内生菌多样性; 产业化; 产量与品质; 多组学

【基金项目】金华市科技计划项目 (编号: 2026-2-010); 金华市科技计划项目 (编号: 2024-3-040); 金华职业技术大学 2025-2026 学年校大学生科技创新活动计划 (新苗人才计划) 项目 (编号: 2025A031)

1. 引言

三叶青 (*Tetrastigma hemsleyanum*) 又名三叶崖爬藤、金钱吊葫芦、蛇腹子等, 是葡萄科崖爬藤属一种多年生常绿藤本植物 [1], 主要分布于我国浙江、江西、福建、湖北、四川等长江以南地区 [2]。三叶青始载于清代吴其濬的植物学专著《植物名实图考》, 《中药志》《中药大辞典》《全国中草药汇编》《浙江省中药炮制规范》均有收载 [3], 因具有较强的抗肿瘤、抗病毒、免疫调节等药理活性, 自 2018 年起被浙江省确定为新“浙八味”中药材之一 [4-7]。

2. 三叶青产业化发展现状与难题

自 2018 年入选新“浙八味”以来, 三叶青市场需求持续增长, 在浙江、广西等地已形成规模化种植基地, 成为山区经济发展的重要增长点。广西喀斯特地貌区通过“三叶青+构树”立体种植模式, 不仅实现亩均年收益超 1.8 万元, 还显著提升石漠化地区植被覆盖率 [8]。浙江遂昌采用林下袋式生态栽培技术, 使三叶青鲜块茎亩产逼近 150 公斤, 带动 300 余户农户增收 [9]。尽管三叶青人工种植已取得初步成效, 但产业发展仍面临严峻挑战。野生三叶青需 3-5 年生长才能形成良好药性, 过度采挖已导致其成为濒危物种, 而人工种植存在栽培技术不成熟、种质资源混杂等问题。核心制约因素集中表现为产量与品质难以同步提升: 一方面, 传统种

植模式下三叶青块根产量不稳定, 且对环境适应性较差; 另一方面, 药材有效成分含量差异显著, 导致产品质量良莠不齐, 药效难以保证 [10]。武汉植物园的基因组研究揭示, 三叶青基因组大小约 2.19Gb, 其中 73.43% 为重复序列, 其黄酮类等活性成分合成基因的扩张与表达差异是不同产区品质分化的重要遗传基础, 而当前栽培技术尚未实现对这些关键性状的有效调控 [11]。目前, 三叶青全产业链开发仍处于初级阶段, 部分产区存在“丰产不增收”现象, 因此, 亟需探索新的研究途径, 深入研究三叶青内生菌与其产量和品质的关系, 从而为三叶青的产业化发展提供理论依据。

3. 内生菌对药用植物生长及品质的调控作用

植物内生菌 (Endophyte) 是一类生活在健康植物组织内部而不引起植物发生明显症状改变的微生物 [12]。Holobiome 理论认为, 植物的能力是所有共生微生物及其宿主植物的集体基因, 即全基因组的结果, 甚至认为微生物组是植物的器官 [13]。共生微生物包括细菌和真菌, 分为附生 (与植物表面相互作用) 和内生关系, 很大一部分由内生菌组成, 其在植物生长、发育和环境适应等方面发挥着关键作用 [14]。在宿主植物体内, 内生菌通过产生种类繁多的生物活性物质来调节宿主植物的生理代谢, 从而提高宿主对各种生物胁迫和非生物胁迫的抵抗能力 [15]。

植物内生菌可为植物提供有益物质, 其以间接或者直接的方式促进宿主植物生长, 其中包括固氮、解钾、溶磷、分泌植物激素、铁载体合成等[12,16,17]。Li 等[18]在盆栽实验中发现, 具有固氮、合成 IAA、解磷和解钾能力的芽孢杆菌菌株能够促进甘草和小麦的生长。Ou 等[19]发现桑树内生菌能促进宿主对铁和磷的吸收, 增加宿主生物量和茎、根的长度。内生菌本身具有的固氮、溶磷、解钾能力可减少肥料的消耗, 其自身分泌的植物激素可以直接促进植物生长发育, 提高植物对环境的适应性。此外, 植物内生菌也可以通过影响药用植物的化学成分来影响药材的品质。谢泽碧等[20]报道, 内生真菌可显著增加两面针的生物碱含量, 具有提高宿主品质的效应。同样, 吴思佳等[21]利用内生真菌 *Epichloë bromicola* SH09 能有效促进丹参生长发育和活性成分积累, 有助于提高药用植物丹参的品质。三叶青的药用价值核心在于黄酮类、多糖等活性成分, 而内生菌可能通过调控黄酮类化合物合成途径影响品质[22]。浙江农林大学吴学谦团队创新的“灵芝+三叶青”林下轮作模式, 利用微生物与植物的互作效应实现“1+1>2”的产业价值[23], 间接证实内生菌在三叶青种植中的潜在应用价值。此外, 内生菌的促生功能可减少化肥施用, 契合三叶青生态种植需求, 对提升药材安全性具有重要意义。内生菌与宿主植物之间的互作在长时间的自然选择中逐渐形成一个稳定的内联系, 其互作关系也为人类对于生物防治、生物修复和生态发展等提供了新思路。

4. 三叶青内生菌多样性研究进展

目前关于三叶青内生菌的研究虽较为有限, 但已初步揭示其群落多样性特征。夏瑾华等[24]发现怀玉山三叶青块根的优势内生真菌群落为子囊菌门 (Ascomycota) 和担子菌门 (Basidiomycota)。宋亚玲[25]从三叶青多年生块根中共分离到 31 株内生真菌, 分别是镰刀菌属、根盘菌属、炭疽菌属、青霉属、小不整球壳属等, 其中某些菌株可诱导三叶青黄酮含量的升高, 进而提升三叶青品质。王蕾臻[26]利用三叶青块根中分离获得的一株内生真菌, 将内生真菌 TH15 基因组序列与 KEGG 数据库比对, 发现其存在 48 个代谢通路, 包括与蛋白的信号通路、遗传信息的复制与修复、与氨基酸代谢、辅酶和维生素的代谢以及与萜类化合物和聚酮

类化合物的代谢有关等, 且其活性成分能促进三叶青组培苗的生长。向太和、洪春桃等[27,28]的研究也证实, 三叶青块根分离的内生菌具有显著促生和品质提升功效。当前三叶青内生菌研究仍存在明显不足: 其一, 研究对象主要集中于内生真菌, 对内生细菌、放线菌等类群的关注较少, 而这类微生物在养分活化、胁迫抗性等方面具有独特功能[29]; 其二, 研究深度有限, 研究仅限于内生真菌的多样性及代谢组分分析来验证内生菌与宿主之间的关系, 其三, 缺乏对不同产区、不同生长阶段三叶青内生菌群落动态变化的研究, 难以明确核心功能菌群的筛选标准。这些局限性导致内生菌资源尚未能有效转化为三叶青高产优质栽培技术。

5. 多组学技术在“植物-内生菌”互作研究中的应用

代谢组学 (Metabolomics) 通过分析生物体内小分子代谢物的种类和含量变化, 揭示生命体生理状态差异, 已成为解析药用植物品质形成机制的重要工具。Yang 等[30]利用非靶向代谢组学技术进行研究, 发现不同贮藏年限的柑桔皮存在显著差异, 共鉴定出 47 种不同的化合物, 主要包括黄酮类化合物、羟基肉桂酸、氨基酸和脂肪酸。武汉植物园团队通过 LC-MS 技术对三叶青不同组织进行检测, 共鉴定出 941 种化合物, 其中黄酮类达 148 种, 并发现浙江产区三叶青块根的次生代谢产物含量显著高于西南产区, 为品质相关代谢物的筛选提供了依据[11]。转录组学 (Transcriptomics) 是研究特定环境、特定时期群体细胞在某功能状态下转录的所有 RNA 的类型及其拷贝数, 而互作转录组学 (Dual RNA-seq) 技术可同时检测宿主与微生物的基因表达变化, 为解析互作机制提供直接证据。Zhang 等[31]通过该技术探究内生细菌菌株促进宿主植物生长的机制, 发现成熟酶 K、TPR 样超家族蛋白、LOB 结构域蛋白等可能参与了内生菌 SB001 对拟南芥的促生作用, 此外, 在内生菌中也发现了与植物相互作用过程中的主要促进因子。武汉植物园团队结合基因组和转录组数据, 重构了苯丙烷-黄酮类合成途径, 发现 PAL、CHS、CHI 等关键酶基因的串联重复扩张及其高表达, 是黄酮类物质积累的重要分子基础[11]。单一组学技术难以全面解析植物-内生菌互作的复杂机制, 而多组学联合分析可实现优势互补, 基因组学提供遗传背景信息,

转录组学揭示基因表达调控规律, 代谢组学反映最终生理表型差异。Chen 等[32]对金线兰和同属植物台湾银线兰叶进行 LC-MS 和转录组学联合分析, 发现两者之间在类黄酮、生物碱和萜类物质上的差异, DEGs 主要涉及苯丙烷生物合成。所有这些研究表明, 这种“基因型-表型-代谢型”的跨组学研究模式, 已成为解析“植物-微生物”互作机制的核心技术体系, 可为三叶青内生菌功能菌株的筛选、调控通路的解析提供精准技术支撑。

6. 研究展望与未来方向

未来应结合可培养与免培养技术(如高通量测序、宏基因组学), 系统分析不同产区、不同生长阶段三叶青的内生菌群落结构, 明确与产量和品质相关的核心功能菌群; 通过体外功能验证(如促生、抗逆、活性成分合成促进试验)与盆栽、田间试验相结合, 筛选高效功能菌株; 利用基因组学技术解析功能菌株的代谢潜力, 明确其促生和品质调控相关基因, 为菌株改良提供靶点。运用互作转录组学、代谢组学及蛋白质组学等多组学技术, 系统分析三叶青与内生菌互作过程中双方的基因表达变化、代谢物交换及信号传导路径。此外, 可基于功能菌株的筛选结果, 开发三叶青专用微生物菌剂, 明确菌剂的最佳施用时期、剂量和方式; 结合林下生态栽培等模式, 构建“内生菌-栽培技术”一体化的优质高产种植体系; 探索内生菌与施肥、水分管理等农艺措施的协同效应, 减少化肥农药施用, 实现三叶青的绿色生产; 通过田间示范推广, 验证技术的可行性和经济效益, 推动科技成果转化。

参考文献

- [1]Shu JH, Zhao YL, Zhou YH, et al. Optimization of *tetrastigma hemsleyanum* extraction process based on GA-BPNN model and analysis of its antioxidant effect[J]. *Heliyon*, 2023, 9(10): e20200-e20200.
- [2]Huang YQ, Hu HL, Yue E, et al. Role of plant metabolites in the formation of bacterial communities in the rhizosphere of *Tetrastigma hemsleyanum*[J]. *Frontiers in microbiology*, 2023, 14: 1292896.
- [3]丁富娟, 李慧芬, 崔伟亮等. 三叶青名实考辨[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(9): 208-212.
- [4]Sun Y, Hui QR, Chen R, et al. Apoptosis in human hepatoma HepG2 cells induced by the phenolics of *Tetrastigma hemsleyanum* leaves and their antitumor effects in H22 tumor-bearing mice[J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 40: 349-364.
- [5]Xiong Y, Wu XW, Rao LQ. *Tetrastigma hemsleyanum* (Sanyeqing) root tuber extracts induces apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2015, 165: 46-53.
- [6]Hu WY, Zheng YJ, Xia PG, et al. The research progresses and future prospects of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg: A valuable Chinese herbal medicine[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 271: 113836.
- [7]Ji T, Ji WW, Wang J, et al. A comprehensive review on traditional uses, chemical compositions, pharmacology properties and toxicology of *Tetrastigma hemsleyanum*[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 264: 113247-113247.
- [8]周峰, 韦记青, 蒋运生等. 喀斯特石漠化地区药用植物生态种植技术研究[J]. *广西植物*, 2022, 42(10): 1673-1681.
- [9]程樟福, 黄文斌, 张水良等. 遂昌县混交林下套种三叶青种植模式研究[J]. *林业科技*, 2019, 44(5): 21-23.
- [10]Hu WY, Jiang MD, Liang ZS, et al. The stereoscopic planting mode improved the quality and yield of *Tetrastigma hemsleyanum*[J]. *South African Journal of Botany*, 2023, 157: 44-52.
- [11]Zhu SS, Zhang XY, Ren CQ, et al. Chromosome-level reference genome of *Tetrastigma hemsleyanum* (Vitaceae) provides insights into genomic evolution and the biosynthesis of phenylpropanoids and flavonoids[J]. *The Plant Journal*, 2023, 114(4): 805-823.
- [12]Jiang YJ, Li QH, Mao WQ, et al. Endophytic bacterial community of *Stellera chamaejasme* L. and its role in improving host plants' competitiveness in grasslands[J]. *Environmental microbiology*, 2022, 24(8): 3322-3333.
- [13]Vandenkoornhuyse P, Quaiser A, Duhamel M, et al. The importance of the microbiome of the plant holobiont[J]. *The New Phytologist*, 2015, 206(4): 1196-1206.

- [14]Yan L, Zhu J, Zhao XX, et al. Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(8): 3327-3340.
- [15]Li HY, Wei DQ, Shen M, et al. Endophytes and their role in phytoremediation[J]. Fungal diversity, 2012, 54(1): 11-18.
- [16]Glick BR. The enhancement of plant growth by free-living bacteria[J]. Canadian journal of microbiology, 1995, 41(2): 109-117.
- [17]Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, et al. Endophytic Bacteria and Their Potential Applications[J]. Critical reviews in plant sciences, 2002, 21(6): 583-606.
- [18]Li L, Mohamad OA, Ma JB, et al. Synergistic plant-microbe interactions between endophytic bacterial communities and the medicinal plant *Glycyrrhiza uralensis* F[J]. Antonie van leeuwenhoek, 2018, 111(10): 1735-1748.
- [19]Ou T, Zhang M, Gao HY, et al. Study on the Potential for Stimulating Mulberry Growth and Drought Tolerance of Plant Growth-Promoting Fungi[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(4): 4090.
- [20]谢泽碧, 梁子宁, 李斌.内生真菌 Y118 对促进两面针生长和品质提升的效应[J]. 西南农业学报, 2023, 36 (3) : 568-574.
- [21]吴思佳, 谢星光, 杨阳等.内生真菌 SH09 对丹参生长和活性成分积累的影响[J]. 药学实践杂志, 2022, 40 (3) : 213-217, 269.
- [22]林婧, 纪明妹, 黄泽豪等.三叶青的化学成分及其体外抗肿瘤活性研究[J].中国药理学杂志, 2015, 50 (8) : 658-663.
- [23]浙江农林大学.三叶青种苗繁育及林下仿生套种技术集成与示范[R].杭州: 浙江农林大学, 2022.
- [24]夏瑾华, 刘彩艳, 刘佳仪等.怀玉山三叶青两个栽培种块根内生菌、根际微生物群落分布及其化感物质的比较分析[J].山东农业科学, 2022, 54 (07) : 93-103.
- [25]宋亚玲.三叶青扩展蛋白基因的克隆和块根内生真菌的分离鉴定及其分析[D].杭州师范大学, 2016.
- [26]王蕾臻.基于基因组和代谢组学研究内生真菌调控三叶青根系生长的机理[D].杭州师范大学, 2021.
- [27]向太和, 宋亚玲, 武盼等.一种从三叶青块根中分离的小不整球菌 EF01 及其应用 [P] , 2017.4 , 中国 , CN201611095440.5.
- [28]洪春桃, 章建红, 沈登锋等.一种三叶青块根内生菌及其应用[P], 2022.5, 中国, CN202210085425.1.
- [29]吴学谦, 徐娟, 许海顺等.三叶青内生真菌多样性及其促生作用研究[J].浙江农林大学学报, 2021, 38 (3) : 512-520.
- [30]Yang M, Jiang ZD, Wen MC, et al. Chemical Variation of Chenpi (Citrus Peels) and Corresponding Correlated Bioactive Compounds by LC-MS Metabolomics and Multibioassay Analysis[J]. Frontiers in nutrition, 2022, 9, 825381.
- [31]Zhang DN, Xu HL, Gao JY, et al. Endophytic *Bacillus altitudinis* Strain Uses Different Novelty Molecular Pathways to Enhance Plant Growth[J]. Frontiers in microbiology, 2021, 12, 692313.
- [32]Chen Y, Yao LM, Pan WY, et al. An integrated analysis of metabolomic and transcriptomic profiles reveals flavonoid metabolic differences between *Anoectochilus roxburghii* and *Anoectochilus formosanus*[J]. Process Biochemistry, 2021, 100: 188-198.