

植物内生菌的研究进展

胡桂萍^{1,2}, 郑雪芳², 尤民生¹, 刘波²

(1 福建省农林大学应用生态研究所, 福建 福州 350002;

2 福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福建 福州 350003)

摘要: 植物内生菌生物学特性、动力学规律、群落生态组成, 目前已成为国内外学者研究的热点。随着其研究领域的不断拓宽和研究方法的不断深入, 植物内生菌在科研、农业生物防治、医疗卫生等领域中的应用越来越广泛。本文介绍了植物内生菌的发现过程和定义, 概述了其生物多样性、动力学、研究方法、在农业和医药上的应用等方面的研究进展, 并探讨了该研究领域中存在的一些问题。

关键词: 植物内生菌; 生物多样性; 研究进展

中图分类号: Q 949.32

文献标识码: A

Recent advances in research on endophytes

HU Gui-ping^{1,2}, ZHENG Xue-fang², YOUNG Min-sheng¹, LIU Bo²

(1. Institute of Applied Ecology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China;

2. Agricultural Biological Resource Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China)

Abstract: In recent years, the biological characteristics, kinetic factors and community ecology of endophytes have become the popular topics for bio-research. With the extension of the field of study and development of new methodologies, endophytic research has reached the areas of biological prevention and medical applications. This article describes the discovery and definition of endophytes, and discusses the future development and existing problems of endophytic research from the view points of biodiversity, dynamics, research methodology, as well as the agricultural and medical applications.

Key words: Endophyte; biodiversity; methodology; application; prospect

植物内生菌是植物微生态系统的重要组成部分, 在长期的协同进化过程中, 与植物形成了互惠互利的关系。植物内生菌能够产生活性物质, 可作为生物防治资源、外源基因的载体和新药的来源, 在农业、医疗卫生领域有着巨大的应用潜力。2006年我国学者利用植物内生菌技术培育出优质高产水稻, 显示了植物内生菌是一类非常重要的资源。虽然经过几十年的研究, 但是目前植物内生菌的研究仍处于起步阶段, 对其开发和应用刚刚展开。本文对植物内生菌的发现过程、定义、生物多样性、动力学规律、研究方法及应用方面进行概括, 为植物内生菌深入研究提供理论参考。

1 植物内生菌的发现过程和定义

植物体内普遍存在着内生菌, 由于其生活在没有外在感染症状的健康植物组织内部, 因此植物内生菌的存在和作用长期以来未被发现。直到20世纪30年代, 由于牲畜食了感染内生真菌的牧草, 给畜牧业造成重大损失, 才开始对植物内生菌有了初步认识。内生菌一词“endophyte”最早是由德国科学家DeBarry于1886年提出。1986年, Carroll将植物内生菌定义为生活在地上部分、活的植物组织内不引起明显症状的微生物。1991年, Petrini提出植物内生菌是指生活史的一定阶段生

收稿日期: 2009-12-15 初稿; 2010-03-17 修改稿

作者简介: 胡桂萍 (1985-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 有害生物的检验检疫 (E-mail: hugp_2007@163.com)

通讯作者: 尤民生 (1954-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 昆虫生态及害虫综合治理 (E-mail: msyou@fjau.edu.cn)

刘波 (1957-), 博士, 研究员, 研究方向: 微生物生物技术与农业生物药物 (E-mail: fzliubo@163.com)

基金项目: 国家863项目 (2006AA100101; 2006AA10A211); 福建省财政专项 (STIF-Y03); “十一五”国家科技支撑计划 (2007BAD89B13-8)

活在活体植物组织内不引起植物明显病害的微生物。1992年,Kleopper等认为植物内生菌是指能够定殖在植物细胞间隙或细胞内,并与寄主植物建立和谐联合关系的一类微生物,并首次提出了“植物内生细菌”的概念,他认为能在植物体内定殖的致病菌和菌根菌不属于内生菌。

目前,植物内生菌较被公认的定义是指那些在其生活史的一定阶段或者全部阶段生活于健康植物的各种组织和器官内部的真菌或者细菌,被感染的宿主植物(至少是暂时)不表现出外在症状,是一个生态学概念,而非分类学单位。

2 植物内生菌的研究现状

2.1 植物内生菌的生物多样性

植物内生菌的生物多样性主要包括寄主植物种类多样性、内生菌在寄主植物不同部位分布多样性和内生菌自身种类多样性。研究发现植物内生菌广泛存在,地球上300 000种植物中都有内生菌的存在^[1]。农业上对内生菌研究较多的植物有水稻、小麦、棉花、高粱、牧草、马铃薯、玉米、甘蔗、甜菜、黄瓜、柠檬等^[2]。研究发现植物内生菌几乎存在于植物的所有组织中,不仅存在于植物的根、

茎、叶、花、果、胚、种子中,在植物的根瘤中也分离到了内生菌。

植物内生菌的种类也十分繁多,主要包括内生细菌、内生真菌和内生放线菌三大类。目前已报道在各种农作物及经济作物中发现的植物内生细菌已超过129种,分属于54个属,主要为假单胞菌属(*Pseudomonas*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、土壤杆菌属(*Aerobacterium*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、泛菌属(*Pantoea*)、甲基杆菌属(*Methylobacterium*)等。植物内生真菌主要在药用植物、羊茅属植物、热带树木中研究较多,现在发现的内生真菌主要为子囊菌类(*Ascomycet*)及其无性型,包括核菌纲(*Pyrenomyetes*)、盘菌纲(*Discomyetes*)和腔菌纲(*Loculoascomyetes*)等。植物内生放线菌主要在红树林、热带多年生树木及一些药用作物中研究较多,主要为链霉菌属(*Streptomyces*)、链轮丝菌属(*Streptoverticillum*)、游动放线菌属(*Antinoplanes*)、诺氏卡菌属(*Nocardia*)、小单胞菌属(*Micromono sp. ora*)。以下列举了近10年研究过的内生细菌、内生真菌和内生放线菌及其寄主(表1、2、3)。

表1 常见植物内生细菌种类及其在宿主植物中的存在部位

Table 1 Common endophytic bacteria and their colonizing sites in hosts

寄主植物	存在部位	内生细菌	寄主植物	存在部位	内生细菌
水稻 ^[3-5]	种子	<i>Acidovorax</i> sp.			<i>Paenibacillus</i> sp.
		<i>Bacillus pumilus</i>			<i>Acidovorax Pantoea</i>
		<i>Bacillus subtilis</i>			<i>Stenotrophomonas</i> sp.
		<i>Methylbacterium aquaticum</i>			<i>Rhizobium</i> sp.
		<i>Micrococcus luteus</i>			<i>Bacillus</i> sp.
		<i>Paenibacillus amylolyticus</i>			<i>Curtobacterium</i> sp.
		<i>Pantoea ananatis</i>			<i>Methylbacterium</i> sp.
		<i>Sphingomonas melonis</i>			<i>Sphingomonas</i> sp.
		<i>Sphingomonas yabuuchiae</i>			<i>Xanthomonas</i> sp.
		<i>Xanthomonas translucens</i>			<i>Micrococcus</i> sp.
茎秆		<i>Aerobacterium vitis</i>	种子		<i>Ochrobactrum oryzae</i> sp. <i>Nov</i>
		<i>Azorhizobium caulinodans</i>			<i>Ochrobactrum gallinaceum</i>
		<i>Azospirillum</i> sp.			
		<i>Bacillus megaterium</i>			
		<i>Bacillus subtilis</i>			
根、茎、叶		<i>Pseudomonas epacia</i>	玉米 ^[6]		<i>Bacillus</i> sp.
		<i>Klebsiella</i> sp.			<i>Xanthomonas</i> sp.
		<i>Azoarcus</i> sp.			<i>Pseudomonas</i> sp.
		<i>Serratia marcescens</i>			<i>Erwinia</i> sp.
		<i>Methylbacterium</i> sp.			<i>Curtobacterium</i> sp.
		<i>Herbaspirillum seropedicae</i>			

续表 1

寄主植物	存在部位	内生细菌	寄主植物	存在部位	内生细菌
甜菜 ^[7]	叶、根	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Bacillus flexus</i> <i>Pseudomonas fulva</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Paenibacillus Polymyxa</i> <i>Chryseobacterium indologene</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Alternaria alternata</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Pythium aphanidermatum</i> <i>Penicillium expansum</i> <i>Plectosphaerella cucumerina</i> <i>Phoma betae</i> <i>Streptomyces griseofuscus</i> <i>Streptomyces globisporus</i>	龙眼 ^[18] 茄子 ^[19] 甘草 ^[20] 烟草 ^[21] 药科植物和 农作物 ^[22]	果实 茎 茎、根、叶 根、茎、叶 茎、根	<i>Enterobacter sp.</i> <i>Pectobacterium sp.</i> <i>Kluyvera sp.</i> <i>Salmonella sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Erwinia sp.</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Pantoea sp.</i> <i>Serratia sp.</i> <i>Brevibacillus brevis</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>
茜草 ^[8]	根、茎	<i>Bacillus subtilis</i>	椒麻 ^[23]	树枝	<i>Bacillus pumilus</i> <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Methylbacterium sp.</i> <i>Nocardia sp.</i> <i>Pantoea agglomerans</i> <i>Xanthomonas campesiris</i>
		<i>Pseudomonas sp.</i>			
		<i>Agrobacterium radiobacter</i>			
		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>			
		<i>Flavobacterium resinovorans</i>			
		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>			
		<i>Bacillus sp.</i>			
马铃薯 ^[9]	块茎	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>			
		<i>Enterobacter sp.</i>			
		<i>Rahnella sp.</i>			
		<i>Rhodanobacter sp.</i>			
		<i>Pseudomonas sp.</i>			
		<i>Stenotrophomonas sp.</i>			
		<i>Xanthomonas sp.</i>			
马铃薯 ^[10]	块茎	<i>Phyllobacterium sp.</i>	茄科作物 ^[24]	根、茎、叶	<i>Pseudomonas sp.</i> <i>Pantoea sp.</i> <i>Agrobacterium sp.</i> <i>Aeromonas sp.</i> <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
		<i>Enterobacter asburiae</i>			
		<i>Pantoea agglomerans</i>			
		<i>Derxia sp.</i>			
		<i>Bacillus sp.</i>			
		<i>Planococcus sp.</i>			
		<i>Enterobacter sp.</i>			
油菜 ^[11]	种子		黄瓜 ^[25]	种子、苗	<i>Bacillus sp.</i> <i>Agrobacterium sp.</i> <i>Xanthomonas sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Erwinia sp.</i> <i>Curtobacterium sp.</i>
玉米 ^[12]	茎、根	<i>Pseudomonas syringae</i>	甜菜 ^[26]	根、茎	<i>Burkholderia sp.</i> <i>Pantoea sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Microbacterium sp.</i> <i>Burkholderia cepacia</i>
		<i>Xanthomonas sp.</i>			
		<i>Bacillus sp.</i>			
		<i>Bacillus sp.</i>			
		<i>Bacillus sp.</i>			
		<i>Bacillus sp.</i>			
		<i>Bacillus sp.</i>			
香蕉 ^[13]	根、假茎、叶	<i>Agrobacterium sp.</i>	大豆 ^[27]	根	<i>Bacillus Vallismortis</i> <i>Bacillus atrophaeus</i> <i>Bacillus mojavensis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus weihenstephanensis</i> <i>Bacillus mycoides</i> <i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Bacillus carboniphilus</i> <i>Bacillus psychrosacharolyticus</i> <i>Bacillus marinus</i>
		<i>Alcaligenes sp.</i>			
		<i>Burkholderia sp.</i>			
魔芋 ^[14]	茎	<i>Bacillus subtilis</i>			
		<i>Pseudomonas putida</i>			
番木瓜 ^[15]	果实				

表2 常见植物内生真菌及其宿主植物
Table 2 Endophytic fungi and their host plants

寄主植物	内生真菌	寄主植物	内生真菌
银杏 ^[28]	<i>Chaetomium</i> sp.	兰科植物 ^[37]	<i>Trichosporiella</i> sp. <i>Gliomastix</i> <i>morum</i> <i>Catenularia apiculata</i>
高羊茅 ^[29]	<i>Neotyphodium coenophialum</i>	胡桃木 ^[38]	<i>Coniothyrium vitivora</i> <i>Mitura</i>
甘草 ^[30]	<i>Penicillium</i> sp. <i>Fusarium</i> sp.	小连翘 ^[39]	<i>Cephalosporium</i> sp. <i>Rhizoctonia</i> sp. <i>Alternaria</i> sp. <i>Cephalosporium</i> sp. <i>Guignardia</i> sp. <i>Penicillium</i> sp.
臂形草 ^[31]	<i>Acremonium</i> sp. <i>Acremonium Blastomyces</i> <i>Botryosphaeria</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp. <i>Colletotrichum</i> sp. <i>Cordyceps</i> sp. <i>Diaporthe</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Geotrichum</i> sp. <i>Gibberella</i> sp. <i>Gliocladium</i> sp. <i>Lasiodiplodia</i> sp. <i>Monilochetes</i> sp. <i>Nectria</i> sp. <i>Pestalotiopsis</i> sp. <i>Phomopsis</i> sp. <i>Pleurotus</i> sp. <i>Pseudofusarium</i> sp. <i>Rhizophagus</i> sp. <i>Syncephalastrum</i> sp. <i>Trichoderma</i> sp. <i>Verticillium</i> sp. <i>Xylaria</i> sp.	蛇足石杉 ^[40]	<i>Diaporthes</i> sp. <i>Trichoderma</i> sp. <i>Phoma</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Verticillium</i> sp. <i>Phacodium</i> sp. <i>Paecilomyces</i> sp. <i>Colletotrichum</i> sp. <i>Mycelia sterilia</i> <i>Chaetomium</i> sp.
可可树 ^[32]	<i>Monilia</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Ovulariopsis</i> sp. <i>Chrysosporium</i> sp. <i>Monilia</i> sp.	云南美登木 ^[41]	<i>Mycoctonus</i> sp. <i>Penicillium</i> sp. <i>Cladosporium edgeworthiae</i> <i>Colletotrichum</i> sp. <i>Epicoccum</i> sp. <i>Fusarium oxydorum</i> <i>Pleospora orae</i> sp. <i>Rhinochadiella</i> sp.
沙棘 ^[33]	<i>Chaetomium</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp. <i>Pestalotia</i> sp. <i>Basidiotropomyces</i> sp. <i>Acremonium</i> sp. <i>Cephalosporium</i> sp.	龙血树和白木香 ^[42]	<i>Embellisia</i> sp. <i>Embellisia</i> sp. <i>Rhizoctonia</i> sp. <i>Sclerotium</i> sp. <i>Pestalotiopsis</i> sp. <i>Acremoniell</i> sp. <i>Chaetomium</i> sp. <i>Coniothyrium</i> sp. <i>Coryneum</i> sp. <i>Alternaria</i> sp.
白木香 ^[34]	<i>Acremonium</i> sp.	麦冬 ^[46]	<i>Fusarium</i> sp. <i>Colletotrichum</i> sp. <i>Alternaria</i> sp.
滑桃树 ^[35]	<i>Fusarium</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp. <i>Alternaria</i> sp.	柑橘 ^[47]	<i>Penicillium</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp.
芸香科 ^[36]	<i>Drechslera</i> sp. <i>Rhizoctonia</i> sp. <i>Curvularia</i> sp. <i>Nigrospora</i> sp. <i>Stenella</i> sp.	喜树 ^[48]	<i>Mycelia sterilia</i>

2.2 植物内生菌的动力学研究

植物内生菌的动力学主要指内生菌在植物体内的定殖、分布和运动。内生菌一旦进入植物体内就寻找适合自己生存的组织定殖下来，而不是在各组织间到处扩散。Posada 和 Vega^[55]认为植物内生细菌主要定殖在细胞间隙。刘忠梅等^[56]采用链霉素和利福平抗性标记 B946 菌株发现 B946 向茎基部

和叶内转移。植物内生菌可以定殖于植物的根毛、叶片、维管组织、木质部的表皮细胞、细胞间隙、细胞质中等。内生菌可以很容易地穿过植物皮层进入木质部导管中，随着植物的生长可以将内生菌运送到植物上部营养器官或繁殖器官中。而有些内生菌定殖在植物种子内，成为“种生内生菌”，成为下一代植物新植株内生菌的重要来源。

表 3 常见植物内生放线菌及其寄主植物

Table 3 Endophytic actinomycetes and their host plants

寄主植物	内生放线菌
红树林 ^[49]	<i>Micromonospora</i> sp.
	<i>Streptomyces</i> sp.
	<i>Streptoverticillium</i> sp.
	<i>Rhodococcus</i> sp.
	<i>Micropolyphora</i> sp.
	<i>Actinoplanes</i> sp.
红树林 ^[50]	<i>Streptomyces</i> sp.
	<i>Streptoverticillium</i> sp.
	<i>Rhodoco</i> sp.
玉米 ^[51]	<i>Microbispora</i> sp.
内生放线菌	<i>Streptosporangium</i> sp.
	<i>Endophyte actinomycete</i>
老鼠簕 ^[52]	<i>Micromonospora</i> sp.
	<i>Verrucosipora</i> sp.
	<i>Streptomyces</i> sp.
木槿 ^[53]	<i>Micromonospora</i> sp.
	<i>Verrucosipora</i> sp.
小麦、大葱、油菜 ^[54]	<i>Micromonospora</i> sp.

内生菌在植株内的分布与寄主植物和部位有相关性。植株不同，其体内内生菌群落结构有差异。马冠华等^[57] 分离了烟草、甜玉米、棉花和水稻 4 种植物根、茎、叶的内生细菌发现，烟草根、茎、叶中的内生细菌量趋势与甜玉米和棉花相同，根最多，茎次之，叶最少；而与水稻的根最多，叶次之，茎最少的趋势不同。Rosenblueth 和 Martines^[58] 研究认为内生菌在植株体内的分布通常下部组织多于上部组织，越往植株顶部，内生菌越少。植株中内生菌群落结构组成不仅与植株类型、植物器官、生长环境、生育期有关，还与品种有关。高增贵等^[59] 研究发现内生细菌在不同玉米品种和不同生育期存在程度不同，品种的遗传背景与其内生细菌的种类和数量显著相关。Conn 和 Franco^[60] 发现土壤类型对小麦内生菌的种群结构组成起决定作用。植物内生菌具有一定的运动性，运动不仅有利于定殖作用，而且可以使内生菌及时避开来自于外环境的生存压力。蔡学清等^[61] 研究了辣椒内生细菌 BS-1 和 BS-2 在辣椒、白菜体内的定殖动态，发现 BS-1 和 BS-2 在辣椒体内通过维管束（木质部）进行传导。Compant 等^[62] 发现内生菌 *Burkholderia* 在葡萄 *Vitis vinifera* 地上部分是通过蒸腾系统进行系统性传播。安千里等^[63] 用共聚焦激光扫描显微镜观测 GFP 标记的内生固氮菌 *Klebsiella oxytoca* SA 2 侵染水稻根时，

发现 SA 2 主要从侧根皮层进入内皮层和维管束。

3 植物内生菌研究方法进展

3.1 植物内生菌的检测

检测内生菌在植物体内的定殖动态变化最常规的方法是抗药性标记法，通过目标细菌的自发突变或诱变，筛选出抗高浓度抗生素的突变体，再以此标记株进行回收检测。常用的抗生素有利福平、链霉素等。蔡学清^[61] 利用双抗标记成功检测到枯草芽孢杆菌 BS-2 和 BS-1 在辣椒体内的定殖动态。吴蔼民等^[64] 用抗利福平标记法，对来自棉花的内生菌 73a 在不同抗性棉花品种体内的定殖消长动态进行了研究。除了抗药性标记法外，还有免疫学方法，如酶联免疫吸附法（ELISA）、荧光抗体技术、Western 印迹法、基因标记法、特异性寡核苷酸片段标记法等也在植物内生菌的检测中广泛应用。Ramos 等^[65] 运用 gfp 和 gusA 基因联合标记的方法研究了 *Azospirillum brasilense* 在小麦根部的定殖情况。近年来尤其是 GFP 的应用，使植物内生菌的检测更加快捷，由于宿主植物生活环境多样性以及内生菌与宿主植物关系的复杂性，有关内生菌在植物内定殖和分布的情况目前都是采用多种研究技术同时分析。

3.2 植物内生菌多样性研究

传统植物内生菌的多样性研究是采用先分离获纯培养后，通过形态学、生理生化特性对分离物进行鉴定，得到其多样性信息。Hironobu 和 Hisao^[66] 对从水稻各个组织中分离到的 30 株细菌，进行 SSU rRNA 序列分析，显示这 30 株内生细菌属于这 6 大类 (*Bacillus pumilus*、*Curtobacterium* sp.、*Methyllobacterium aquaticum*、*Sphingomonas yabuuchiae*、*Sphingomonas melonis*、*Pantoea ananatis*)。但是 99% 的微生物都是非可培养的，这种方法得到的信息具有很大的局限性。同时分离培养工作量大，鉴定过程繁琐复杂，因此建立快速、简单、能够更好反映微生物群落结构的方法变得十分迫切。

近年来，新兴的技术如 DGGE、T-RFLP 等，大大弥补了传统培养方法的不足，为检测植物内生细菌种群多样性提供了更有效的手段。2009 年 Janpen 等^[67] 通过变性梯度凝胶电泳（DGGE）和传统的培养方法相结合，分析了栽培稻中内生细菌的群落结构多样性。2002 年 Sessitsch 等^[68] 用 T-RFLP 和 DGGE 技术相结合，分析了不同马铃薯品种内生细菌的多样性。2004 年 Vanessa 等^[69] 使

用 16S rDNA-T-RFLP 技术分析小麦根围光化细菌的群落结构。Zhao 等^[70] 同时采用 16S rDNA-PCR-DGGE 方法和传统的平板分离方法, 研究了烟草叶片内生细菌的多样性, 序列分析结果表明 DGGE 图谱中的一些条带的序列能和培养分离中的一些细菌相吻合, 另通过 DGGE 分析还发现了一些培养方法中尚未出现的内生细菌。Zheng 等^[71] 用 PCR-DGGE 结合电镜发现绿萍 *Azolla microphylla* 的内生细菌中以芽孢杆菌和蓝细菌为主要类群。

4 植物内生菌的应用

4.1 在农业生产上的应用

研究表明植物内生菌与病原菌具有相同的生态位, 在植物体内相互竞争空间、营养, 使病原菌得不到正常的营养供给而消亡, 从而增强宿主抵御病害的能力。另外植物内生菌可以分泌抗生素、毒素等代谢物质, 这些代谢物质能够诱导植物产生系统抗性 (ISR)。因此, 对植物施用植物内生菌产生的抗菌剂、抗虫剂, 来增强植物的抗逆性, 起到生物防治效果, 既减少了化学农药对环境的污染, 又保证了植物的产量品质。吴蔼民等^[72] 报道了内生菌 73a 和 Ala 对棉花黄萎病的田间防效及增产作用。田宏先等^[73] 报道了马铃薯组织内生菌对马铃薯茎基腐病的田间防治及增产作用。Hinton 等^[74] 通过试验证明, 玉米内生阴沟杆菌作为种子保护剂, 能有效防治玉米病害。夏正俊等^[75] 已从棉株分离并用抗生素标记证明内生细菌对棉花枯萎病具有良好的防效。植物内生菌次生代谢物能够产生植物生长激素类物质或促进植物对营养物质的吸收来刺激植物生长。如张集慧等^[76] 从兰科药用植物中分离出 5 种内生真菌, 并从这些真菌发酵液和菌丝体中分别提取出 5 种植物激素, 如赤霉素、吲哚乙酸、脱落酸等, 它们对兰花的生长发育有较好的促进作用。植物内生菌的次生代谢产物也具有杀虫特性。Daisy 等^[77] 发现植物内生菌 (*Muscodorum vitigenus*) 产生的一些毒素, 导致昆虫拒食, 体重减轻, 生长发育受抑制, 死亡率增加等, 具有很好的杀虫作用。禾本科植物内生菌产生的有机胺类、吡咯里西啶类、双吡咯烷类、吲哚双萜类等 4 大类多达 10 种的生物碱, 对线虫和大多数食草昆虫具有较强的毒性^[78]。

4.2 在医药上的应用

研究表明植物内生菌代谢产物有抗肿瘤、抗菌、抗病毒等作用。Gary 和 Strobel 等^[79] 从欧洲

红豆杉中分离到内生真菌 *Acremonium* sp. 能产生一系列抗真菌、抗癌的肽类活性物质, 其中白灰制菌素 (leucinostatin) 能很好地抑制人类的一些肿瘤细胞。Strobel 研究小组^[80] 从卫矛科著名药用植物雷公藤中分离到的内生真菌 *Cryptosporiopsis cf quercina*, 能产生一种新型环肽抗生素 cryptocandin, 对癣菌及白色念珠菌等人类病原真菌具有强烈抑杀作用, 其 MIC 与临床应用的抗真菌药两性霉素 B (amphotericin B) 相当, 具良好开发前景。Castillo 等^[81] 发现 *K. nigriscans* 的一株内生链霉菌能够产生一类活性多肽 Munumbicins, 这类多肽不仅具有广谱的抗菌活性, 而且对有耐药性的病原菌、寄生虫有很好的抑制作用。利用植物内生菌的次生代谢物质开发新的药物将是今后医药方面的研究方向之一。

4.3 作为外源基因载体

由于内生菌在植物体内的适应性, 一些研究者以内生菌为受体构建植物内生防病或杀虫工程菌, 再将其引入植物体内, 使植物起到与转基因防病杀虫植物相同或类似的作用, 从而达到生物防治的目的。2000 年 Dowring 等^[82] 在从苹果苗中分离出内生菌 *Pseudomonas fluorescens* 中转入抗病 chiA 基因, 再把这种携带的 chiA 基因的内生菌接种到豆苗中, 可以防治豆苗病原真菌 *Rhizoctonia solani*, 同时还在甘蔗内生菌中转入抗虫基因 cry-1AC7 基因, 回接甘蔗, 可以防治甘蔗钻心虫 *Eldana saccharina*。美国 CGI 公司以内生细菌—木质棒形杆菌犬齿亚种 (*Clavibacter xyli* subsp. *cyndontis*) 为载体, 将 BT 杀虫基因整合到染色体上构建杀虫工程细菌, 这种杀虫工程菌从 1988 年开始已在美国 4 个州 12 个玉米杂交品种上进行大田试验, 可使虫害损失率减轻 26%~72%。

另外发现植物内生菌有降解环境污染物的功能, 如从珠江入海口红树中分离到的内生菌, 有清除工业废水中的有害物质, 起到净化海水的作用。而 Barac 等^[83] 研究表明某些内生菌能够降解甲苯, 并且能使其宿主植物产生对甲苯的抗性, 这就为利用微生物接种植物进行环境修复提供了可能^[84]。植物内生菌为环境污染治理注入了新的血液, 但其相关研究才刚刚开始, 有待于进一步深入。

5 问题与讨论

虽然内生菌的研究已经开展了多年, 但是对于内生菌的界定还很模糊。一些人认为内生菌主要是指其生活史的某一阶段生活在植物组织内, 使植株

不发病或者暂时不表现出症状的一类微生物，不包括致病菌，它们的存在并未使植物的表型特征和功能有任何改变的微生物。然而由于环境等原因，有很多致病菌被弱化了，其能在植物体内大量存在但不使植物发病，这些弱致的致病菌在植物内已经占据了生态位，与寄主建立了一定的协作关系，已从外源菌转变为植物内生菌。另外，有许多内生菌在与植物协同进化过程中，能够分泌大量的植物生长激素类物质、抗生素物质等，来促进植物生长或者诱导植物产生抗性，在一定程度上讲，内生菌改变了寄主植物的表型特征和功能。因此，笔者认为健康的植株经过严格的表面消毒，通过组织分离培养或者分子等其他方法得到的微生物，都属于内生菌的范围，包括对宿主暂时没有伤害的潜伏性的病原菌和促生内生菌、拮抗菌等。

在植物内生菌生物学特性研究上，由于内生菌生活在植物这一特定的生境内，植物不同、环境不同，其生活的环境和营养条件也不同，现在没有一种理想的培养方法可以检测到所有的植物内生菌，寻找一种切实可行的植物内生菌检测方法对于植物内生菌生物学和生态学研究尤为重要。

而对于植物内生菌群落多样性研究，由于研究条件和技术方法的限制，目前研究甚少，结论都不是很全面，但是 DGGE 等微生物免培养研究方法在植物内生菌多样性研究中的成功运用，开辟了植物内生菌多样性研究新思路。通过借鉴土壤微生物多样性研究思路与方法，如 DGGE、磷脂脂肪酸法 (PLFAs) 等，来分析植物内生菌群落结构多样性，将是未来内生菌多样性研究的新方法。

植物内生菌具有拮抗性和致病性双重特性，因此在内生菌开发利用方面，除了开展内生菌在病虫害防治方面的开发和应用外，还要考虑其病理学上的特性。同时植物内生菌本身是一个生物活体，田间环境和植物体微生态环境中的许多因子都会影响内生菌防病功能的发挥，因此在利用植物内生菌进行大田防病时，必须考虑其生态学、病理学和形态学等方面的影响。

总的来说，植物内生菌的生境特殊性决定了其既有理论研究的广度和深度，又有广泛的应用潜力，是个潜力巨大、尚待开发的微生物新资源。随着分子生物学、生物化学和微生态学的发展，对内生菌的研究将更深入，内生菌在农业、医疗等方面将发挥更大的作用。

参考文献：

- [1] STROBEL G, DAISY B, CASTILLO U, et al. Natural products from endophytic microorganisms [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67: 257– 268.
- [2] 姜怡, 杨颖, 陈华红, 等. 植物内生菌资源 [J]. 微生物学通报, 2005, 32 (6): 146– 147.
- [3] MANO H F, TANAKA A, WATANABE H, et al. Culturable surface and endophytic bacterial flora of the maturing seeds of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field [J]. *Microbes Environ*, 2006, 21: 86– 100.
- [4] ELVIRA R M, VUURDE J W L. Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions [J]. *Can J Microbiol*, 2000, 46 (11): 1036– 1041.
- [5] ANILK, TRIPATHI, SUBHASH C, et al. *Ochrobactrum oryzae* sp nov, an endophytic bacterial species isolated from deep-water rice in India [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, 56: 1677– 1680.
- [6] 罗明, 芦云, 张祥林. 棉花内生细菌的分离及生防益菌的筛选 [J]. 新疆农业科学, 2004, 41 (5): 277– 282.
- [7] SHI Y W, LOU K, LI C. Isolation, quantity distribution and characterization of endophytic microorganisms within sugar beet [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2009, 8 (5): 835– 840.
- [8] 周涛, 肖亚中, 李妍妍, 等. 茜草内生菌的分离鉴定及其抗菌活性物质研究 [J]. 生物学杂志, 2007, 24 (2): 9– 12.
- [9] GARBEVA P, OVERBEEK L S, VUURDE J W, et al. Analysis of Endophytic Bacterial Communities of Potato by Plating and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA Based PCR Fragments [J]. *Microb Ecol*, 2001, 41 (4): 369– 383.
- [10] ZAREEN K, SHARON L. Characterization of bacterial endophytes of sweet potato plants [J]. *Plant and Soil*, 2009 (2): 1573– 1536.
- [11] ASIS C A, ADACH K. Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea* agglomerans and nondiazotroph *Enterobacter* *asburiae* from sweetpotato stem in Japan [J]. *Applied Microbiology*, 2004, 1 (38): 19– 23.
- [12] 陈小静, 冯定胜, 赵明, 等. 四种华重楼内生细菌的初步研究 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2005, 42 (4): 827– 830.
- [13] 张志元, 罗永兰, 官春云. 油菜种子内生菌的检测及杀菌消毒处理方法 [J]. 湖北农业科学, 2005 (1): 52– 55.
- [14] BRESSAN W, BORGES M T. Delivery methods for introducing endophytic bacteria into maize [J]. *BioControl*, 2004, 3 (49): 315– 322.
- [15] 付业勤, 蔡吉苗, 刘先宝, 等. 香蕉内生细菌分离、活性评价及数量分布 [J]. 热带作物学报, 2007, 4 (28): 78– 84.
- [16] 周盈, 陈琳, 柴鑫莉, 等. 魔芋内生拮抗细菌的分离及其抗菌物质特性研究 [J]. 微生物学报, 2007, 47 (6): 1076– 1079.
- [17] 石晶盈, 刘爱媛, 冯淑杰, 等. 番木瓜内生细菌 MG-Y2 的鉴定及其生防作用 [J]. 果树学报, 2007, 24 (6): 810– 814.
- [18] 朱育菁, 王秋红, 陈璐, 等. 龙眼内生菌的分离与脂肪酸鉴定 [J]. 亚热带植物科学, 2008, 37 (4): 22– 25.

- [19] 蓝江林, 刘波, 朱育菁, 等. 茄子植物内生细菌群落结构与多样性 [J]. 生态环境学报, 2009, 18 (4): 1433– 1442.
- [20] 张敏, 沈德龙, 饶小莉, 等. 甘草内生细菌多样性研究 [J]. 微生物学通报, 2008, 35 (4): 524– 527.
- [21] 易有金, 尹华群, 罗宽, 等. 烟草内生短芽孢杆菌的分离鉴定及对烟草青枯病的防效 [J]. 植物病理学报, 2007, 37 (3): 301– 306.
- [22] CHANDRASHEKHARA, SATTHYANARAYANA N, SALIGRAMA A, et al. Endophytic Bacteria from Different Plant Origin Enhance Growth and Induce Downy Mildew Resistance in Pearl Millet [J]. Asian Journal of Plant Pathology, 2007, 1 (1): 1– 11.
- [23] 张洪涛, 徐田枚, 艾山江·阿布都拉, 等. 新疆有毒麻内生菌的分离及 AP- PCR 与 ERIC- PCR 分析 [J]. 中国微生物学杂志, 2007, 19 (3): 265– 267.
- [24] HOANG H L, DOMINIK D, SCHMIDT I T, et al. Native bacterial endophytes promote host growth in a species-specific manner; phytohormone manipulations do not result in common growth responses [J]. PLoS ONE, 2008, 3 (7): 1– 10.
- [25] 田雪亮, 单长卷. 黄瓜种子及幼苗内生细菌分离鉴定 [J]. 安徽农业科学, 2006, 34 (8): 1574– 1575.
- [26] RODRIGO M, ALINE A, PIZZIRANI K, et al. Diversity of Cultivated Endophytic Bacteria from Sugarcane: Genetic and Biochemical Characterization of Burkholderia cepacia Complex Isolates [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 22 (73): 7259– 7267.
- [27] LEE K D, BAI Y, SMITH D, et al. Isolation of Plant-Growth-Promoting Endophytic Bacteria from Bean Nodules [J]. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 2005, 1 (3): 232– 236.
- [28] 黄蓉, 肖炎农, 黄永兵, 等. 银杏内生真菌拮抗灰霉菌的初步研究 [J]. 江西农业学报, 2007, 19 (2): 60– 62.
- [29] PECETTI L, ROMANI M, CARRONI A M, et al. The effect of endophyte infection on persistence of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) populations in two climatically contrasting Italian locations [J]. Australian Journal of Agricultural Research, 2008, 58 (9): 893– 899.
- [30] 宋素琴, 欧提库尔·玛合木提, 张志东, 等. 新疆胀果甘草内生菌的分离和鉴定 [J]. 微生物学通报, 2007, 34 (5): 867– 870.
- [31] 郭志凯, 王蓉, 蔡吉苗, 等. 修臂形草内生真菌菌株 HND5 的分离、抗性评价及其初步鉴定 [J]. 热带作物学报, 2007, 28 (2): 92– 96.
- [32] MARCIANO R, RUBINI, RUTE T, et al. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis perniciosa*, causal agent of Witches' Broom Disease [J]. Int J Biol Sci, 2005, 1: 24– 33.
- [33] 李琦, 孙广宇. 沙棘内生菌的分离与初步鉴定 [J]. 中国农学通报, 2006, 22 (10): 300– 302.
- [34] 张秀环, 梅文莉, 戴好富. 白木香内生真菌枝顶孢属两菌株的挥发油成分 [J]. 微生物学通报, 2009, 1: 37– 40.
- [35] 杜芝芝, 宋成芝, 郁步竹, 等. 滑桃树内生真菌 *Fusarium* sp. 2TnP1– 2 次生代谢产物研究 [J]. 中国药物化学杂志, 2008, 6 (18): 452– 456.
- [36] GOND S K, VERMA V C, KUMAR A, et al. Study of endophytic fungal community from different parts of *Aegle marmelos* Correae (Rutaceae) from Varanasi (India) [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 10 (23): 1371– 1375.
- [37] 伍建榕, 韩素芬, 朱有勇, 等. 云南兰科植物菌根内生真菌种类研究 [J]. 西南林学院学报, 2006, 26 (3): 5– 10.
- [38] 翟梅枝, 高智辉, 徐文涛, 等. 核桃内生真菌 G8 菌株的分离鉴定及抑菌活性 [J]. 中南林业科技大学学报: 自然科学版, 2008, 4 (28): 92– 97.
- [39] 袁保红, 杜青平, 邓祖军. 小连翘内生真菌种群分布及其抗菌性研究 [J]. 广东药学院学报, 2007, 23 (3): 307– 311.
- [40] 龚玉霞, 蒋继宏, 陈凤美, 等. 蛇足石杉内生真菌的分离和抗植物病原真菌活性 [J]. 安徽师范大学学报: 自然科学版, 2007, 30 (6): 689– 692.
- [41] 王海坤. 美登木内生真菌的分离 [J]. 中国民族民间医药杂志, 2004 (6): 355– 359.
- [42] LI J G, SHUN X G. Endophytic fungi from *dracaena cambodiana* and *aquilaria sinensis* and their antimicrobial activity [J]. African Journal of Biotechnology, 2009, 8 (5): 731– 736.
- [43] 余永涛, 王建华, 赵清梅, 等. 甘肃棘豆中产苦马豆素内生真菌的分离与鉴定 [J]. 西北农林科技大学学报, 2009, 2 (37): 40– 46, 51.
- [44] 卢萍, DENNIS C, 赵萌莉, 等. 小花棘豆 (*Oxytropis glabra* DC.) 内生真菌的培养与鉴定 [J]. 生态学报, 2009, 1 (29): 53– 58.
- [45] 戴传超, 余伯阳, 赵玉婷, 等. 大戟科 4 种植物内生真菌分离与抑菌研究 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2006, 30 (1): 79– 83.
- [46] 陈宜涛, 丁立孝, 程东庆, 等. 麦冬内生真菌镰刀菌的分离鉴定 [J]. 莱阳农学院学报, 2006, 23 (1): 13– 16.
- [47] LARRAN S, ROLLAN C, ÁNGELES H, et al. Nota Corta: Endophytic fungi in healthy soybean leaves [J]. Invest Agr : Prod Prot, 2002, 17 (1): 1– 6.
- [48] 颜霞, 李希尧, 李伟国. 壳树内生真菌的分离及其代谢产物的初步研究 [J]. 西北农业学报, 2008, 17 (3): 315– 318.
- [49] 林鹏, 张瑜斌, 邓爱英, 等. 九龙江口红树林土壤微生物的类群及抗菌活性 [J]. 海洋学报, 2005, 27 (3): 133– 141.
- [50] 雷湘兰. 热带不同生态环境稀有放线菌分离、分类和活性初步测定 [D]. 华南热带农业大学, 2006, 455– 458, 463.
- [51] DEARAUJO J M, DASILVA A C, AZEVEDO J L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.) [J]. Braz Arch Biol Technol, 2000, 43: 447– 451.
- [52] 王蓉. 老鼠簕内生放线菌的分离鉴定活性评价及其类群分析 [D]. 海南大学, 2008, 24– 26.
- [53] 张利敏, 张利平. 木槿根瘤内生放线菌的分离及系统发育分析 [J]. 现代农业科学, 2009 (2): 5– 6.
- [54] 何宝花, 张利平, 张秀敏. 25 株植物内生放线菌的系统发育分析 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36 (12): 4882– 4883, 4908.

- [55] POSADA F, VEGA FE. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (Theobromacacao) [J]. *Mycologia*, 2005, 97: 1195– 1200.
- [56] 刘忠梅, 王霞, 赵金焕, 等. 有益内生细菌 B946 在小麦体内的定殖规律 [J]. *中国生物防治*, 2005, 21 (2): 113– 116.
- [57] 马冠华, 肖崇刚. 烟草内生细菌种群动态研究 [J]. *微生物学杂志*, 2004, 24 (4): 7– 11.
- [58] ROSENBLUETH M, MARTINEZ R E. *Thizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization [J]. *Arch Microbiol*, 2004, 181: 337– 344.
- [59] 高增贵, 庄敬华, 陈捷, 等. 玉米根系内生细菌种群及动态分析 [J]. *生态学报*, 2004, 15 (8): 1344– 1348.
- [60] CONN V M, FRANCO C M M. Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 1787– 1794.
- [61] 蔡学清. 双抗标记法测定枯草芽孢杆菌 BS- 2 和 BS- 1 在辣椒体内的定殖动态 [J]. *福建农林大学学报*, 2003, 32 (1): 41– 45.
- [62] COMPANT S, REITER B, et al. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L by plant growth-promoting bacterium Burkholderiasp strain PsJN [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71: 1685– 1693.
- [63] 安千里, 杨学建, 董越梅, 等. 用共聚焦激光扫描显微镜观测 GFP 标记的内生固氮菌 *Klebsiella oxytoca* SA2 侵染水稻根 [J]. *植物学报*, 2001, 43 (6): 558– 564.
- [64] 吴蔼民, 顾本康, 等. 内生菌 73a 在不同抗性品种棉花体内的定殖和消长动态研究 [J]. *植物病理学报*, 2001, 31 (4): 289– 294.
- [65] RAMOS H J O, RONCATO L D B, SOUZA E M, et al. Monitoring azospirillum–wheat interactions using the gfp and gusA genes constitutively expressed from a new broad-host range vector [J]. *J Biotech*, 2002, 97: 243– 252.
- [66] HIRONOB M, HISAO M. Endophytic bacteria in the rice plant [J]. *Microbes Environ*, 2008, 2 (23): 109– 117.
- [67] JANPEN P, KIWAMU M, KAMONLUCK T, et al. The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L) [J]. *Applied Soil Ecology*, 2009, 42 (2): 141– 149.
- [68] REITER B, PFEIFER U, SCHWAB H, et al. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 1168– 2261.
- [69] ANESSA M C, CHRISTOPHER M, FRANCO M. Analysis of the Endophytic Actinobacterial Population in the Roots of Wheat (*Triticum aestivum* L) by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism and Sequencing of 16S rRNA Clones [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (3): 1787– 1794.
- [70] MINGQIN Z, BAOXING W, FUXIN L, et al. Analysis of bacterial communities on aging flue cured tobacco leaves by 16S rDNA PCR – DGGE technology [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 73: 1435– 1440.
- [71] SIPIING Z, BIN A C, XIONG G, et al. Diversity analysis of endophytic bacteria within *Azolla microphylla* using PCR– DGGE and electron microscopy [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2008, 16 (3): 508– 514.
- [72] 吴蔼民, 顾本康, 付正擎, 等. 内生菌对棉花黄萎病的田间防效及增产作用 [J]. *江苏农业科学*, 2000 (5): 38– 39.
- [73] 田宏先, 崔林, 孙振, 等. 内生菌对马铃薯环腐病的田间防效及增产作用 [J]. *山西农业科学*, 2002, 30 (1): 73– 75.
- [74] HINTON D M, BACON C W. *Enterobacter chuavae* is an endophytic symbiont of corn [J]. *Mycopathologia*, 1995, 129: 117– 125.
- [75] 夏正俊, 顾本康, 吴蔼民, 等. 棉株植物内生菌诱导棉花抗黄萎病过程中同功酶活性的变化 [J]. *江苏农业学报*, 1997, (13): 99– 101.
- [76] 张集慧, 王春兰, 郭顺星, 等. 兰科药用植物的 5 种内生真菌产生的植物激素 [J]. *中国医学科学院学报*, 1999, 21 (6): 460– 465.
- [77] DAISY B H, STROBEL G A, CASTILLO U, et al. Naphthalene, an insect repellent is produced by muscodor viti-genus, a novel endophytic fungus [J]. *Microbiology*, 2002, 148: 3737– 3741.
- [78] 李强, 刘军, 周东坡, 等. 植物内生菌的开发与研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2006 (3): 33– 37.
- [79] GARY A, STROBEL W, HESS M. Glucosylation of the peptide leucinostatin A, produced by an endophytic funfus of European yew, may protect the host from leucinostatin toxicity [J]. *Chemistry and Biology*, 1997, 4 (7): 529– 536.
- [80] STROBEL G A, MILLER R V, MILLER C, et al. Cryptocandin, a potent antineoplastic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina* [J]. *Microbiology*, 1999, 145: 1919– 1926.
- [81] CASTILLO U, GARY A S, FORD E J, et al. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by streptomyces NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans* [J]. *Microbiology*, 2002, 148: 675– 2685.
- [82] DOWING K J, THOMSON J A. Introduction of the *Serratia marcescens* chiA gene into an endophytic pseudomonas fluorescens for the biocontrol of phytopathogenic fungi [J]. *Can J Microbiol*, 2000, 46 (4): 363– 369.
- [83] SICILIANO S D, FORTIN N, MIHOC A. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67: 2469– 2475.
- [84] BARAE T, DANIEL V D L. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 583– 588.

(责任编辑: 柯文辉)