

文 · 献 · 综 · 述

植物内生细菌研究进展

胡 萌

(中华人民共和国日照出入境检验检疫局, 山东 日照 276826)

RECENT ADVANCES ON ENDO PHYTE RESEARCH

HU Meng

(Rizhao Entry - Exit Inspection and Quarantine Bureau of P. R. C., Rizhao 276862, China)

Key words: Endophyte; biology roles mechanism; application prospective

摘要:内生细菌是植物病害生物防治的天然资源菌,是植物微生态系统的重要组成部分,具有广阔的理论研究价值和开发应用前景。本文从植物内生细菌的概念、生物学作用及其机制等方面对近年来植物内生细菌的研究现状进行了综述,并展望其开发与应用前景。

关键词:内生细菌;生物学作用;机制;应用前景

中图分类号: S 432.4

文献标识码: A

文章编号: 1000 - 2324(2008)01 - 0148 - 04

1 植物内生细菌的概念及其发展

1866 a DeBary首先提出了内生菌 (Endo - phyte)的概念,认为凡是在植物体内的微生物均为内生菌。Kleopfer等^[4]则指出,植物内生菌是指能够定殖在植物细胞间隙或细胞内,并与宿主植物建立和谐联合关系的一类微生物。Petrini^[5]和 Wilson^[6]重新定义内生菌,他们认为一生或至少一生中的某个阶段能进入活体植物组织内,并在植物组织内不引起明显组织变化的真菌或细菌均为内生菌,所以,在生活史中某一阶段能营表生生活的表生菌、对宿主暂时没有伤害的潜伏性病原菌 (Latent pathogens)和菌根菌等均应属于内生菌的范畴。这一定义被大多数研究者所接受。“植物内生细菌”(Endophytic Bacteria)的概念则由克洛珀于 1992 a首次提出。

目前,植物内生细菌的研究主要涉及生态学和植物病理学两个方面的研究。前者侧重于将植物内生细菌看成是植物微生态系统中的正常群落;后者则侧重于研究植物内生细菌是否属于植物病害感染源。随着植物微生态学与植物病理学的不断交叉发展,很多学者将两个方面结合起来,从整个植物生态系统的全局出发来研究植物内生细菌与植物宿主组织之间的关系,使植物内生细菌的研究得到了全新的发展。

2 植物内生细菌的分离、鉴定与分类

植物内生细菌分离与鉴定的方法一般都依赖于传统的平板培养方法,该方法简便、经济,也容易普及,其主要缺点是无法分离得到不可培养的内生细菌,因而不能准确判断内生细菌的数量与种类。20世纪 80年代以来,一些先进的技术手段如抗利福平、氨节青霉素、卡那霉素等抗菌素标记法^[7],免疫技术结合电子显微镜技术^[9]和分子生物学方面的技术^[10]被用于内生细菌的检测。目前采用较多的是抗利福平标记法,此方法比较简便,但定量不准确且易出现抗抗生素屏蔽现象。现在大量微生物的基因序列被测定并输入国际基因数据库,通过对未知微生物 16S rDNA序列进行测定和比较分析可以快速有效地鉴定分类^[11]。该方法既可定性又可定量,但是所用成本较高,花费时间较长。

目前在各种农作物及果树等经济作物中发现的内生细菌已超过 120种 (隶属于 54个属),大多为土壤微生物种类,其中假单胞菌属 (Pseudomonas)、芽孢杆菌属 (Bacillus)、肠杆菌属 (Enterobacter)以及土壤杆菌属 (Agrobacterium)为最常见的属^[12]。国内对植物内生细菌的研究起步较晚,分离得到的主要有芽孢杆菌属 (Bacillus)、黄单胞菌属 (Xanthomonas)、假单

收稿日期: 2007 - 03 - 17

作者简介: 胡萌 (1980 -),男,助工,主要从事植物检疫和食品药物残留检测工作。

孢菌属 (*Pseudomonas*)、欧文氏菌属 (*Erwinia*)及短小杆菌属 (*Curtobacterium*),其中属于芽孢杆菌属的菌株数在多种植物中均为最多。

3 植物内生细菌的生物学作用及其机制

内生细菌长期生活在植物体内的特殊环境中并与宿主协同进化,一方面植物体为其提供生长必需的能量和营养;另一方面,内生细菌又可通过自身的代谢产物或借助于信号传导作用对植物体产生影响。内生细菌在植物体内常会表现出群体聚集生长行为,这些聚集体主要包括:聚集团 (aggregates)、微菌落 (microcolonies)、共质体 (symp lasmata)、生物薄膜 (biofilms)等类型,内生细菌所表现出的生物学作用不是单体细胞所能具备的,而是群体的作用。近年来人们对内生细菌群体所表现的生物学作用日益重视,特别是对生物薄膜的研究发展迅速。研究进一步发现,许多普通细菌如枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)等都可以形成生物薄膜结构。内生细菌所形成的这些聚集体在生防中都表现出独特的作用。

3.1 促生作用

感染内生细菌的植物一般具有比未感染内生细菌的植物生长快的特点。内生细菌能产生促植物生长物质如植物生长素、赤霉素以及细胞激动素等,直接促进植物生长^[13]。

内生细菌促进植物生长的机制包括:内生细菌可以通过生物固氮^[14]或产生植物激素直接促进植物生长。植物生长激素类主要有 IAA、吲哚乙腈等,如产酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella oxytoca*)所产生的生长激素对水稻植株的生长和发育起着重要的调节作用^[15]。从墨西哥分离的 18 株重氮营养醋杆菌 (*Acetobacter diazotrophicus*)都有产生生长素的能力,表明重氮营养醋杆菌在与植物相互作用过程中不仅能固氮,而且还可通过生长素的调节作用促进植物生长。诱导宿主植物产生植物激素、改善植物对矿物质的利用率、改变宿主植物对霜冻等有害环境条件及对有害病原生物的敏感性等间接促进植物生长。何红等在研究内生枯草芽孢杆菌 BS-1 和 BS-2 菌株对辣椒和白菜促生作用机制中发现,用菌株培养液浸种后,导致植株体内生长素 (IAA)、赤霉素 (GA3)、玉米素 (ZR4)等植物内源激素含量的增加,以及脱落酸 (ABA)含量的下降,是菌株促进植株生长的主要机制。蔡学清等^[16]在研究内生枯草芽孢杆菌 BS-2 菌株对水稻苗生长效应中也发现,该菌能提高水稻叶绿素的含量,促进其生长,还能提高其保护酶活性,从而提高水稻的抗逆性。

3.2 生防作用

内生细菌的生防作用,研究报道最多的是对植物土传病害的抑制作用。现已从棉花、水稻、玉米、油菜、马铃薯等多种作物体内分离筛选到对棉花黄萎病、棉花枯萎病、水稻白叶枯病、油菜黄萎病、马铃薯软腐病等常见真菌和细菌病害具有良好抑制效果的内生细菌。张颖^[17]等对利用小麦内生细菌防治小麦全蚀病 (wheat take - wall)作了初步研究。目前,内生细菌防治植物线虫的研究还不多。所报道的荧光假单胞菌 89B - 61 (*Pseudomonas fluorescens* 89 - 61) Ibj 孢囊假单胞菌 N884 (*Brevundimonas vesicularis* N884)^[19]、粘质沙雷氏菌 90 - 13 (*Serratia marcescens* 90 - 13)^[19]、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)^[20]的代谢物都能防治南方根结线虫 (*Meloidogyne incognita*)。

内生细菌作为生防因子具有以下优点:内生细菌与病菌可以直接相互作用;内生细菌占有有利于生防的生态位;内生细菌可以经受住植物防卫反应的作用;内生细菌可以作为外源基因的载体。因此,内生细菌的存在可以促进植物对恶劣环境的适应,加强系统的生态平衡,保证宿主植物的健康生长。

关于内生细菌的生防机制,主要包括:产生抗菌物质。这类物质包括抗生素类、水解酶类等。抗生素类物质主要有:脂多肽 (Lipopeptide)、藤黄绿脓菌素 (pyoluterin)、吡咯菌素 (pyrolnitrin)、乙酰藤黄酚 (PhI)、吩嗪羧酸 (PCA)、HCN 和一类丁酰内酯 (butyrolactones)等。Bacillus strains 产生的脂多肽 (Lipopeptide)对植物根部病害有明显的抑制作用^[21]。何红等^[22]在辣椒中分离的内生枯草芽孢杆菌,能分泌出环脂抗菌多肽,该物质对植物炭疽病菌和番茄青枯病菌等多种植物病原真菌和病原细菌有较强的抑制作用。水解酶类主要有几丁质酶 (chitinase)和葡聚糖酶 (glucanase)等,通过降解真菌的细胞壁或其它致病因子如毒素等起到防治效果。用于防治棉花黄萎病的内生细菌可能产生蛋白酶降解毒素或产生抑制物抑制致病因子^[23]。生态位和营养竞争。内生细菌进入宿主植物的途径和方式与病原菌基本相似^[24]。内生细菌进入植物体时,可以优先占据病原菌的入侵位点,与病原菌竞争营养物质,使病原菌得不到正常的营养供给而死亡,并可在入侵部位分泌产生抗菌物质,阻止病原菌的侵入。如某些根际定殖内生细菌产生嗜铁素类物质与病原菌竞争铁元素,抑制病菌生长。诱导系统抗性 (Induce Systematic Resistance, ISR)。内生细菌可诱导宿主植物产生 ISR,这种抗性与系统获得抗性 (Systematic Acquired Resistance, SAR)有所不同,它只有植物在受到病菌侵袭时才能诱导表达,而且表达后对宿主细胞不产生任何不良影响。一般认为 ISR 的抗性与植保素水平的提高和酚类物质的积累有关。高增贵等^[25]在研究拮抗内生细菌 B20 - 006 对玉米主要防御酶系影响的研究中发现,内生细菌 B20 - 006 除具有直接抗菌外,还可以诱导玉米各种防御酶系活性的提高,对玉米纹枯病有很强的防效。

3.3 在非豆科植物中内生固氮作用

研究表明,很多植物内生细菌可以从空气中吸收氮气,并将其固定为化合态氮。有效的发挥非豆科植物内生细菌的共生固氮作用,在一定程度上可以取代或减少化肥的使用。固氮内生细菌可划分为兼性和专性两种固氮内生细菌。前者在根表、根内以及土壤中均表现出活跃的生存状态;后者在根内、茎叶等部位中定殖,在植物体外存活困难。目前已从甘蔗、牧草、禾谷类植物(水稻、玉米、小麦、高粱等)等非豆科植物中分离到多种具有固氮作用的内生细菌,主要有:巴西固氮螺菌(*Azospirillum brasilense*)、生脂固氮螺菌(*A. lipofenum*)、无乳固氮螺菌(*A. amazonense*)、伊拉克固氮螺菌(*A. irakense*)、织片草螺菌(*Herbaspirillum seropedicae*)、红苍白草螺菌(*H. rubrisubalbicans*)、重氮营养醋杆菌(*Acetobacter diazotrophicus*)、固氮弧菌(*A. zoaFucus* spp.)和伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia* spp.)等^[26]。杨海莲等^[27]从水稻一个品种(越富)中就分离到 9 个属 14 个种的内生细菌具有固氮活性。Azevedo 等^[28]认为,与几乎所有植物体内含有内生细菌相似,有可能几乎所有植物中也含有内生固氮作用细菌。冯永君^[29]等从水稻中分离到一种重要的内生细菌——固氮成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)。研究还发现,内生细菌产成的生物薄膜内能形成缺氧区,满足了固氮酶发挥催化活性所需要的低氧环境,有利于发挥固氮作用。

3.4 可作为外源基因的载体

将防病杀虫基因导入植物内生细菌以构建植物内生防病或杀虫工程菌,再利用工程菌的内生作用,将外源杀虫防病基因携入植物体内,使植物起到与转基因防病杀虫植物相同或相似的作用,可提高植物的抗病虫能力,而植物本身的基因不会发生改变。如 Maffee 等应用来自棉花的非病原性内生细菌作为 Bt 杀虫基因载体来防治棉花蚜虫(*Heliothis virescens*)和玉米茎蛀虫(*Elasmopalpus lignosellus*);刘云霞等^[30]用水稻体内生优势细菌巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)为受体,构建了具有防水稻二化螟活性的工程菌;Downing 等^[31]将 *chiA* 基因转入分离自苹果苗的内生细菌荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)中,再将带 *chiA* 基因的内生细菌,通过根尖导入豆科植物(*Phaseolus vulgaris*)中,对豆苗立枯病(*Rhizoctonia solani*)等表现出良好的生防作用。

4 植物内生细菌应用前景及存在的问题

植物内生细菌在植物体内有稳定的生存空间,且能产生与宿主植物代谢相同或相似的生理活性物质,因而能有效地抑制病原菌的侵染或提高宿主植物的抗病性,因此,内生细菌作为一种生防资源,已成为近年来生防菌剂研制开发的热点^[32,33]。利用诱导植物产生诱导系统抗性在植物病害防治中具有广谱、高效、无残留等突出优势,对人畜安全,不破坏环境,已成为植物病害生物防治的一个重要发展方向和现代农药发展的新理念。植物内生细菌开发和应用的另一领域则是将其作为外源基因载体用于生物防治。Andrews^[34]首次将 Bt 基因构建于内生细菌木质棍状杆菌犬齿亚种(*Clavibacter xyli* subsp. *cyndontis*)中进行玉米螟虫生物防治并取得成功。研究还发现,植物内生细菌对土壤中的硝基芳香族和杂酚类等有机生物异源污染物以及镍、铬、锌等重金属污染物具有一定的降解作用。Siciliano 等人研究表明,植物与细菌联合可以促进根际污染物质的降解,从而减轻土壤污染物对植物的毒害作用^[35]。Vander 于 1998 年发现土壤中存在一些可以分解重金属的细菌,后来人们在植物体内也分离发现了对重金属具有一定抗性的内生菌株。植物内生细菌对污染物的降解作用及其在生产实践中的应用已成为植物内生细菌的又一研究热点。

虽然内生细菌对防治植物病害具有潜在的应用和开发价值,但目前要在农作物生产中用于防治病害,还存在一些问题,最大问题之一是防治效果不稳定,田间环境和植物体微生态环境中许多因子都会影响内生细菌防病作用的发挥。内生细菌作为植物病害的生物防治因子,必须考虑内生细菌的病理学作用,在正常条件或恶劣环境下对宿主植物是否致病以及内生细菌与植物建立的共生关系是否与其它微生物与植物建立的共生关系一致,相互作用如何等问题。此外还应该充分了解内生细菌的侵染、定殖、繁殖与传播的具体情况,在未完全了解该菌的病理学作用的情况下限制其传播是十分必要的。相信随着研究的不断深入,植物内生细菌在生态型农业中的应用前景将十分广阔。

参考文献

- [1] 杨海莲,孙晓璐,宋未.植物根际促生细菌和内生细菌的诱导抗病性的研究进展[J].植物病理学,2000,30(2):106—110
- [2] Sturz A V, Christie B R, Nowak J. Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2000, 19(1): 1—30
- [3] 郭良栋. 内生真菌研究进展[J]. 菌物系统, 2001, 20(1): 148—152
- [4] Kleopfer J W, Schipper B, Bakker P A H M. Proposed elimination Of the term endorhizosphere[J]. Phytopathol, 1992, 82: 726—727
- [5] Petrini O. Fungal endophytes of tree leaves[A]. In: Andrews J H, Hirano S S ed Microbial Ecology of Leaves[C]. New York: Springer Verlag, 1991. 179—197
- [6] Wilson D. Endophyte 2 the evolution of a term, and clarification of its use and definition[J]. Oikos, 1995, 73: 274—276

- [7] DeWeger L A, VanderBij A J, Dekkdr L C, *et al* Colonization of the rhizosphere of crop plants by plant - beneficial *Pseudomonas* [J]. FEMS Microbiol Ecol, 1995, 17 (4): 221—229
- [8] Ding L X, Li W Z, Song Z H, *et al* Screening ampicillin and kanamycin - resistant strains from peanut endophyte mutants induced with ultio - violet [J]. Journal of Laiyang Agricultural College, 1997, 14 (4): 235 - 239
- [9] Quad - Hullmann A, Kloepper J W. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter axburiae* JM22 in different plant species [J]. Can J Microbiol, 1996, 42: 1144—1156
- [10] Whitesides S K, Spotts R A. Frequency, distribution and characteristics of endophytic *Pseudomonas syringae* in pear trees [J]. Phytopathology, 1991, 81 (4): 453 - 457
- [11] Angela Sessitsch, Birgit Reiter, Ulrike Pfeifer, *et al* Cultivation - independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes—specific PCR of 16S rRNA genes [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2002, 39: 23—32
- [12] Sturz A V, Christie B R, Nowak J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production [J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2000, 19 (1): 1—30
- [13] 张集慧, 王春兰, 郭顺星, 等. 兰科药用植物的 5 种内生菌产生的植物激素 [J]. 中国医学科学院学报, 1999, 21 (6): 460 - 465
- [14] Adhikari T B, Joseph C M, *et al* Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice [J]. Can J Microbiol, 2001, 47: 916—924
- [15] Feng Y J, Song W. Endophytic bacteria [J]. Ziran zazhi, 2001, 23 (5): 249—252
- [16] 蔡学清, 林彩萍, 何红, 等. 内生枯草芽孢杆菌 BS - 2 对水稻苗生长的效应 [J]. 福建农林大学学报 (自然科学版), 2005, 34 (2): 189—194
- [17] 张颖, 王刚, 郭建伟, 等. 利用小麦内生细菌防治小麦全蚀病的初步研究 [J]. 植物病理学报, 2007, 37 (1): 105—108
- [18] 阎孟红, 蔡正求, 韩继刚, 等. 植物内生细菌在防治植物病害中应用的研究 [J]. 生物技术通报, 2004, (3): 9 - 12
- [19] Hallmann J, Rodriguez - Kobana R, Kloepper J W. Plant growth - promoting rhizobacteria - present status and future prospect [M]. Sapporo: Nakanishi Printing, 1997. 243 - 245
- [20] 丁国春, 付鹏, 李红梅, 等. 枯草芽孢杆菌 AR11 菌株对南方根结线虫的生物防治 [J]. 南京农业大学学报, 2005, 28 (2): 46 - 49
- [21] Buchenauer H. Biological control of soil - borne disease by rhizobacteria [J]. J. Plant Disease and Protection, 1995, 44: 40 - 50
- [22] 何红, 蔡学清, 关雄, 等. 内生菌 BS - 2 菌株的抗菌蛋白及其防病作用 [J]. 植物病理学报, 2003, 33 (4): 373 - 378
- [23] 夏正俊. 植物内生及根际土壤细菌诱导棉花对大丽轮枝菌抗性的研究 [J]. 中国生物防治, 1996, 12 (1): 7 - 10
- [24] 孔庆科, 丁爱云. 内生细菌作为生防因子的研究进展 [J]. 山东农业大学学报 (自然科学版), 2001, 32 (2): 256 - 260
- [25] 高增贵, 陈捷, 刘军华, 等. 拮抗内生细菌 B20 - 006 对玉米主要防御酶系的影响 [J]. 植物病理学报, 2007, 37 (1): 102 - 104
- [26] Baldani J I, Canuso L, *et al* Recent advances in BFN with non - legume plants [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1997, 29: 911 - 922
- [27] 杨海莲, 孙晓璐, 宋未, 等. 水稻内生联合固氮细菌的筛选、鉴定及其分布特性 [J]. 植物学报, 1999, 41 (9): 927 - 937
- [28] Azevedo J L, Walter M J, Jose O P, *et al* Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants [J]. EJB Electronic Journal of Biotechnology, 2000, 3 (1): 40 - 65
- [29] 冯永君, 何晴. 植物内生细菌的生物薄膜 (biofilm) [J]. 生命的化学, 2007, 27 (1): 87 - 89
- [30] 刘云霞, 张青文, 周明. Bt 杀虫基因向水稻内生细菌的转化研究 [J]. 农业生物技术学报, 1987, 5 (2): 188 - 193
- [31] Downing K J, Thomson J A. Introduction of the *Serratia marcescens* A gene into an endophytic *Pseudomonas fluorescens* for the biocontrol of phytopathogenic fungi [J]. Can J Microbiol, 2000, 46 (4): 363 - 369
- [32] Hinton D M, Bacon C W. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn [J]. Mycopathologia, 1995, 129: 117 - 125
- [33] 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
- [34] Andrews J H. Biological control in the phyllosphere [J]. Ann Rev. Phytopathol, 1992, 30: 630 - 635
- [35] Lodewyckx E. Endophytic bacteria and the potential applications [J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2002, 21: 583 - 587