

植物内生细菌的侵染定殖规律研究进展

路国兵 张瑶 冀宪领 牟志美 高绘菊 吴绪东

(山东农业大学林学院, 泰安 271018)

摘 要: 详细综述了植物内生细菌的侵染定殖过程,即吸附、侵入、定殖三个阶段。着重阐述了对植物内生细菌的定殖检测方法,包括抗生素标记法、免疫学方法、基因标记法及特异性寡核苷酸片段标记法等。另外,对植物内生细菌的来源及定殖影响因子也进行了系统讨论,并对未来植物内生细菌定殖研究前景作了展望。

关键词: 内生细菌 侵染定殖 来源 检测方法 影响因子

Recent Advance on the Approaching and Colonization of Endophytic Bacteria

Lu Guobing Zhang Yao J Xianling Mu Zhimei Gao Huiju Wu Xvdong

(College of Forestry, Shandong Agricultural University, Taian 271018)

Abstract: This paper reviews the infection and colonization process of endophytic bacteria in detail, namely three stages (adsorption, incursion and colonization), with particular reference to the colonization detected methods, such as labelled means of antibiotic, the technique about immunology, marker gene and the characteristic oligonucleotide segment tag etc. In addition, the origin and colonial impact factor of endophytic bacteria are systematically discussed, with expectation in the future studies on the colonization of endophytic bacteria

Key words: Endophytic bacteria Infection and colonization Origin The method of detection Impact factor

植物内生细菌的早期研究主要是论证健康植物体内是否存在微生物,随着越来越多的微生物(特别是细菌)从植物的根、茎、叶等组织中分离出来,人们才意识到从这些植物中分离的微生物可能与植物存在某种相互关系^[1]。因此,有关内生细菌的分类、生理、生态学等研究也逐步开展起来^[2]。

内生细菌作为植物微生物生态系统的组成成员,由于其定殖于植物组织内部与表生细菌相比具有更加良好的生态环境,植物内部组织为其提供一个更加安全稳定的生存环境,避开不利的环境如温度、渗透势、紫外线等^[3];另外,内生细菌不仅仅将植物体作为其栖息场所,而且对寄主植物有促生、防病、内生固氮等多方面的有益生物学作用^[4-7],研究还发现,植物内生细菌是良好的外源基因载体^[7-8],已有利用内生细菌为载体成功向植物体内转入外源

杀虫和防病基因的报道。总之,植物内生细菌与植物体之间渐渐形成了一种和谐联合的互利共栖关系^[8]。

对于植物内生细菌与植物和谐联合作用的研究,其核心的问题在于揭示内生细菌对植物侵染、定殖的机制。尤其是对可用作生防菌的内生细菌而言,明确其侵染定殖规律对于相关菌剂的开发与应用是至关重要的。

1 植物内生细菌的来源

植物内生细菌的来源可能有多种途径,不同植物、不同内生细菌,其来源可能不同。有的细菌来自于植物体表或根际土壤,暂时栖息于植物体内;有的细菌可随种子或无性繁殖材料在植物各世代之间传播,成为后代植物内生细菌的主要来源^[9]。植物内生细菌也可能是植物体内固有的,内生细菌的

收稿日期: 2006-12-11

作者简介: 路国兵(1983-),男,山东,硕士研究生, Tel: 0538-8241315, E-mail: hywang@sdau.edu.cn

通讯作者: 牟志美,女,教授,博士生导师, Tel: 0538-8249561, E-mail: zmeimu@sdau.edu.cn

某些选择机制使它们有能力优先定殖于植物体内。许多内生细菌属于兼性内生, 它们不仅存在于植物内部, 也常见于土壤, 许多研究者认为, 根际土壤是植物内生细菌的主要来源, 目前这一观点得到了大多数人的支持^[9, 10]。

2 植物内生细菌的侵染定殖过程研究

内生细菌进入宿主植物体内包括三个阶段, 即其对植物的吸附、侵入和定殖^[11]。

2.1 吸附

内生细菌对宿主植物的表面吸附是一个主动过程, 是内生细菌侵入宿主植物的第一步。尽管被认为吸附力最强的菌株不一定有着最强的侵入和定殖能力, 但由于植物组织对菌体的吸附是具有选择性的, 同时也就体现出内生菌与宿主植物相互作用的专一性和特异性^[11]。内生细菌与宿主植物组织表面的亲和机制如何, 可能会影响到内生细菌侵染植物的效率^[11], 可能是影响内生细菌共生特异性的因素。冯永君等认为用吸附等温线和吸附速率曲线可以确立菌体在植物根表面的吸附系数和单层吸满吸附量, 吸附系数和单层吸满吸附量可作为内生细菌侵染和定殖的能力指数判断内生细菌与宿主植物的亲和性^[17]。

2.2 侵入

一般认为, 植物内生细菌侵入植物体的方式和途径是多种多样的。许多学者认为内生细菌是通过自然孔口和伤口等进入植物体: 自然孔口通常包括植物叶上气孔、水孔以及茎上的皮孔、蜜腺、胚根和次生根发生处等; 伤口则包括根在土壤中伸展时造成的持续不断的擦伤口, 以及雨水或冰雹和收割多年生植物等造成的机械损伤等^[12]。内生细菌也可以从根部侵入植物体内, 到达根皮层后, 利用某些酶类或物理作用通过皮层间隙向纵深进入, 在内皮层细胞壁未加厚的位置侵入中柱, 随后进入导管, 借着蒸腾作用向植物的其它部位扩展^[13]。内生细菌还可以通过分泌细胞壁降解酶类如纤维素酶、果胶酶降解细胞组织主动进入植物, 内生细菌进入植物体定殖后不再产生细胞壁降解酶类, 但对于内生菌如何产生和调节细胞壁降解酶尚未清楚。有些内生细菌进到植物体后, 可以通过维管束系统进入种子, 或通过禾谷类花粉通道、成熟种子的种脐、种皮的

裂缝开口、种皮背部索状细胞和种脊进入种子^[14]。有些内生细菌进到植物体后可以通过次生根进入分生组织, 通过叶表吐水孔的水液进入叶内。另外, 植物内生细菌还可以由根际真菌的携带达到侵染和重新分布的目的。

综上所述, 内生细菌侵入植物体的方式及途径会因植物组织不同、内生细菌的种类不同而存在差异, 侵入及分布机制可能与其它细菌相互作用有关, 或与定位点的内部环境有关。

2.3 定殖

内生细菌一旦进入植物体内就寻找适于自己生存的植物组织定殖下来, 而不是在整个植物体内的各组织间到处扩散^[15]。研究表明植物内生细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、薄壁细胞、液胞等的间隙、细胞壁、细胞质中等^[15-17]。

植物体本身可以看作是一个复杂的微生态系统。在这个系统中, 多种微生物能与植物形成营养和竞争的生态环境, 在这个生态环境中, 各种不同的微生物之间能建立一种动态的平衡体系。该体系包括准备侵染的植物体外的外围微生物, 也包括正在溶透植物组织和已经定殖的内生菌。不同的内生细菌占据不同的生态位, 为满足自己的营养需要, 他们相互之间存在着种间竞争, 也有可能形成营养代谢链^[18]; 有些内生细菌定殖于植物体的活体细胞内, 与宿主之间即有营养交流, 同时也引起的植物体的生理反应^[2]。因此, 内生菌在定殖的全过程中, 内生细菌之间, 内生菌与宿主植物之间形成充满和谐与竞争的微生态系统, 并且在长期系统发育过程中共进化^[2, 3, 19]。

大多数植物内生细菌具有一定的运动性, 运动性对一些细菌的定殖是十分重要的, 特别是定殖作用发生在一些特定部位时更是如此。另外, 运动性的另一个作用是使植物内生细菌可以及时躲开来自于外环境的生存压力如紫外线和干旱等^[20]。内生细菌的运动可分为两种: 定向运动和自由运动, 前者有利于植物内生细菌吸收营养物质, 后者则有利于内生细菌开辟更为广阔的生存空间。

3 植物内生细菌定殖影响因子研究

3.1 内生细菌的性状

内生细菌本身的生理学性状在一定程度上会决定其在环境中的种群活动和变化趋势。其营养型、繁殖速率及其一些细胞表面性质,如与植物凝集素的结合能力,纤毛、鞭毛、胞外多糖的有无等均能影响其在宿主体内的定殖^[24]。

3.2 寄主植物品种及类型

植物体围、体表及体内微生物的生存主要依靠植物的渗出物或分泌物、及体内物质^[3]。这些物质的产生除受环境影响外,更大程度上决定于植物的基因型。因此,植物的种类、品种和生长期对生防菌的定殖极具影响。Bell 等(1995)^[22]发现两个对根癌肿病具不同抗性的葡萄品种对内生细菌不表现选择性。Pillay 等^[23]报道,寄主植物基因型等影响到 *Paenibacillus* 菌株在番茄苗中的定殖量。

3.3 相关微生物

由于植物内部定殖的其它微生物的存在,内生细菌与其处于同一生存环境,它们之间必然存在竞争、拮抗或互利等关系,从而影响到内生细菌的定殖。有研究发现,一株系统定殖菌 *Enterobacter asburiae* JM22 和一株根际定殖菌 *Arthrobacter agilis* 共同应用时,二者的种群密度比单独应用时下降,这是两株菌对植物组织内有限的资源和物理空间相互竞争的结果^[24]。

3.4 植物寄生线虫

植物寄生线虫的存在会使内生细菌的数量提高^[25],主要是因为线虫造成的伤口成为细菌侵入的通道,伤口渗漏出的物质成了细菌的营养,从而促进了内生细菌的定殖。

除以上因素之外,土壤环境、土壤结构、含水量、土壤温度和土壤 pH 值等非生物因子均能影响内生菌的体内定殖^[26]。由于诸多因素的影响,在实验室表现良好的菌株在转入植物体内后往往表现不稳定。因此,准确回收检测内生菌是保证其发挥预期作用的首要关键。

4 植物内生细菌定殖检测方法研究

目前,由于宿主植物生活环境多样性以及内生细菌与宿主植物关系的复杂性,有关内生细菌在植物体内生命活动研究仍处于探索阶段,对内生细菌与宿主之间的营养代谢关系尚无定论。解决以上问题的关键在于对目标内生细菌进行定殖检测,对内

生细菌在植物体内的生存状态进行系统研究,揭示内生细菌在植物体内的定殖规律,阐明内生现象和内生机制。

目前,已有多种方法可对目标内生细菌进行定殖检测,且各有优缺点。

4.1 抗生素标记法

这是一种最常规的检测方法,即通过目标细菌的自发突变或人工诱变,筛选出抗高浓度抗生素的突变体,以此作为标记菌株进行回收检测。常用的抗生素有利福平(Rifampicin)、链霉素(Streptomycin)、四环素(tetracycline)、氨基青霉素、卡那霉素等^[27]。在抗生素标记中又以抗利福平标记为主,不易丧失其生防性状。该法优点为简便、快速、消耗低且结果可进行统计分析;不足之处在于精确性低、回收下限较高。曾有人质疑该法的可靠性,认为标记菌株施入环境后可能丢失抗生素抗性。Glandorf 等(1992)^[28]通过免疫检测验证了在大田条件下一定时期内利福平抗性可以作为菌株 WCS358 的稳定标记性状。吴蔼民等^[29]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。实践证明该法为简便实用的检测方法,被许多研究者所采用。

4.2 免疫学方法

即利用抗原与相应抗体发生特异性反应,用抗体去检测相应的抗原,以此同其它微生物相区别。方法有酶联免疫吸附法(ELISA),通过吸光度的测定进行定量检测,ELISA 法的灵敏度依赖于使用的抗体和选用的酶和底物^[10];或荧光抗体技术、Western 印迹法,将细菌细胞转移到硝酸纤维素滤膜上,再进行免疫荧光细胞染色(Immune Fluorescent Colony Staining, IFCS)后用荧光显微镜或共聚焦激光扫描显微镜直接观察目标菌存在的部位^[30];还可结合电镜技术,用免疫胶体金对目标菌标记,再用电镜观测免疫金染色的超薄切片^[30, 31],或用光镜观察免疫金染色的半薄切片和石蜡切片^[32]。另外,当同一生境中存在和目的菌株同种属的细菌时,可用菌株特异的抗体监测目的菌的分布。此法精确,可进行定量统计,应用范围广,对死细胞或活细胞、可培养或不可培养的细胞均能检测到,定位准确。

4.3 基因标记法

将外源基因即标记/报告基因引入到目标菌的染色体中,并在菌体中稳定遗传,通过检测基因表达产物来监测细菌的分布并区别于其它微生物。对比抗生素标记和免疫探针技术,利用报告基因标记技术跟踪检测内生菌对宿主植物的表面吸附、内部定殖以及由此而引起的植物体的生理反应更为直观,是研究植物组织和微生物相互作用的最为重要的手段^[33]。该技术所用的标记基因多是编码酶的基因: *lacZ* (编码大肠杆菌 *E.coli* 的 β -半乳糖苷酶)、*celB* (编码激烈热球菌 *Pyrococcus furiosus* 的 β -葡萄糖苷酶)、*gusA* (编码大肠杆菌的 β -葡萄糖醛酸糖苷酶)和 *luxAB* (编码细菌荧光素酶)等^[34, 35]。标记基因一般表达为: 菌体形成有色菌落 (如 *lacZY*, *GusA*), 产生荧光物质 (如 *luxAB*), 产生黑色素, 对重金属的抗性, 对除草剂的抗性等^[36]。

用标记基因检测宿主中微生物的一个突出问题是标记菌进入植物体内后,若标记基因转移,有可能产生不良后果。为此应将标记基因插入到目的菌的染色体上,然后再筛选出细菌代谢受插入此外源基因干扰最小的菌株供研究用。选择标记/报告基因时需考虑的主要因素有: 被检测样品有无因内源基因产物引起的背景干扰; 检测灵敏度是否高; 检测简便性如何; 检测用的底物通用性如何; 检测能否定量; 检测费用是否便宜; 外源基因的代谢产物是否干扰细菌代谢; 在自然生境中 (如田间) 的应用性如何等^[34]。

总之,该法较精确,检测下限低,对不能在固体培养基上生长的微生物也适用;但引入标记基因会增加细胞的代谢负荷,削弱内生菌的适应性和生物学作用,同时该法检测不到死细胞,存在一定局限性。

4.4 特异性寡核苷酸片段标记法

即用特异性的 DNA 或 RNA 序列作为核酸探针或者通过 PCR 技术检测内生定殖微生物。该法应用途径可以是菌落杂交法,即探针与生长在培养基上的 DNA 杂交^[37];也可以是直接检测法,探针与土壤或植物样品中提取的 DNA 杂交。例如利用各菌株 rRNA 含量的不同,通过荧光探针原位杂交所显示荧光信号的强弱即可估计细菌的生理活性^[38]。其中菌落杂交法只能检测活的细胞而直接检测法

既能检测在培养基上可以生长的细胞还能检测不可以生长的细胞。该法灵敏度高,活细胞或死细胞,能培养的与不能培养的细胞均能检测到。此外该法还具有可定量分析、特异性好等优点。

此外,利用同位素示踪法、组织染色法等同样可以进行检测,各种检测方法各有优缺点,可以相互结合使用,以提高定殖检测的精确度和可靠性。

5 植物内生细菌定殖研究前景展望

内生细菌在侵染植物时,植物就开始在细胞、组织和器官水平上表现出一系列复杂的生理反应。对微生物的行为和植物的生理反应进行仔细地细胞学观察,常常可以获得生理学和分子生物学研究的重要信息,为综合解释植物与内生细菌的相互联系提供依据。

基因标记技术方面, GFP 作为一种新型报告基因,性能稳定、其表达与受体细胞种属无关、检测方便,在研究启动子的活性、细胞蛋白转运、基因转移、蛋白质与蛋白质之间的相互作用以及细胞与细胞之间的作用方面应用相当广泛。在环境微生物标记方面, Ramos 等 (2002)^[39]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。C.Xi 等构建了含有 *gfp* 的一系列微型 Tn5 转座子,该转座子对革兰氏阴性菌有很强的接合作用,并用其标记了根瘤菌等^[40]。但目前在植物与内生细菌的相互作用研究中, GFP 标记技术的应用尚不多。相信在以后的内生菌定殖研究中,绿色荧光蛋白 (GFP) 标记技术将得到更多的应用,为彻底弄清内生细菌的定殖机制、定殖规律提供强有力的证据。

随着基因工程在植物内生细菌研究中的应用,在研究内生细菌体内定殖的基础上,将内生细菌作为外源基因载体转入抗病抗虫基因,利用内生菌的定殖接入宿主中表达,抗病虫物质直接分泌在植物体内运转,达到生防目的。Downing KJ (2000) 等^[41]在苹果内生菌 *Pseudomonas fluorescens* 中转入抗病 *chiA* 基因,然后将携带有 *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*。这是一项新的重大的工程,内生细菌作为外源基因载体有着天然优越性,必然为生物防治提供新的思路。

参考文献

- 1 Andrews JH, Ann, Rev. Phytopathol, 1992, 30:603-635.
- 2 Barraquio WL, Revilla L, et al. Plant Soil, 1997, 194:15-24.
- 3 Beauchamp CJ, Kloepper J. Can J Microbiol, 1992, 38: 1219-1232.
- 4 McInroy JA, Kloepper JW. Plant Soil, 1995, 173:337-342.
- 5 Cavalcante V, Dobereiner J. Plant Soil, 1998, 108:23-31.
- 6 Clemence C, Eric G, Yves P, et al. Appl Environ Microbiol, 2000, (2) :5437-5447.
- 7 Lappalainen JH, Yli-Mattila T. Mycol Res, 1999, 103: 328-332.
- 8 Clo SJ, Park SR, Kim MK, et al. Biosci Biotechnol Biochem, 2002, 66(6) :1270-1275.
- 9 Lamb TG, Tonkyn DW, Kluepfel DA. Can J Microbiol, 1996, 42: 1112-1120.
- 10 Hallmann J, Rodriguez, R. Kloepper, et al. Soil Biology and Biochemistry, 1999, 31(5) :551-560.
- 11 Tomblini R, Unge A, Davey ME, et al. Microbiol Ecol, 1997, 22: 17-28.
- 12 Mocali S, Bertelli E, Di Cello F, et al. Res Microbiol, 2003, 154 (2) : 105-114.
- 13 Bellone CH, De Bellone SDVC, Pedraza RO, et al. Soil Biol Biochem, 1997, 29(8) :965-967.
- 14 Katarina Cankar, Maja Ravnkar. Microbiology Ecology, 2005, 244 (2) :341-345.
- 15 刘云霞, 张青文, 周明祥. 农业生物技术学报, 1996, 4(4) : 354-358.
- 16 Schlöter M, A Bmüs B, Hartmann A. Biotech Adv, 1995, 13: 75 ~ 90.
- 17 Gyaneshwar P, James EK, Mathan N, et al. J Bacteriol, 2001, 183: 2634-2645.
- 18 Bai Y, D Aoust F, Smith DL, et al. Appl Environ Microbiol, 2002, 48(3) :230-238.
- 19 Ahlholm JU, Helander M. Evolution Int J OrgEvolution, 2002, 56 (8) :1566-1573.
- 20 Misaghi IJ, Donndelinger CR. Phytopathol, 1990, 80: 808-811.
- 21 Zinniel DK, Pat Lambrecht, Harris NB, et al. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(5) :2198-2208.
- 22 Bell CR, Dickie GA, et al. Microbiol, 1995, 41:46-53.
- 23 Pillay VJ, Nowak J. Can J Microbiol, 1997, 43:34-36.
- 24 Quadt-Hallmann A, Hallmann J, Kloepper JW, Can J. Microbiol, 1997, 43 :577-582.
- 25 Hall mann J, Quadt-Hal lmann A, et al. Soil Biol Biochem, 1998, 30:925-937.
- 26 张炳欣, 张平, 陈晓斌. 应用生态学报, 2000, 11(6) : 951-953.
- 27 Serge Gane. Can J Microbiol, 1997, 33:996-1000.
- 28 Glandorf DCM, Brand L, Bakker PA ILM, et al. Plant and Soil, 1992, 147:13 5-142.
- 29 吴嵩民, 顾本康, 傅正擎, 等. 植物病理学报, 2001, 31(4) :289-294.
- 30 Schlöter M, Hartmann A. Symbiosis, 1998, 25: 159 ~ 179.
- 31 James EK, Olivares FL, Baldani JL, et al. Moench J Exp Bot, 1997, 48: 785 ~ 797.
- 32 安千里, 匡柏健, 母锡金, 等. 自然科学进展, 1999, 9(12 增) : 1262 ~ 1268.
- 33 Nishiguchi T, Shimizu T, Njoloma J, Oota M, et al. Bulletin Faculty Agric Univ Miyazaki, 2005, 51:53-62.
- 34 Wilson KJ. Soil Biol Biochem, 1995, 27:501-514.
- 35 Sessitsch A, Wilson KJ, Akkermans ADL, et al. Microbiol, 1996, 62: 4191 ~ 4194.
- 36 陈小斌, 张炳欣, 楼兵干, 等. 微生物学报, 2001, 41(3) :287-292.
- 37 Van Elsas JD, Trevors JT, Jain D, et al. Biol Fertil Soil, 1992, 14: 14-22.
- 38 Amann R, Ludwig W, Schleifer KH. Microbiol Rev, 1995, 59: 143-169.
- 39 Ramos HJO, Roncato-Maccari LDB, Souza EM, et al. J Biotech, 2002, 97:243-252.
- 40 Xi C, Lambrecht M, Vanderleyden J, Michiels J. J Microbiol Meth, 1999, 35:85-92.
- 41 Downing KJ, Thomson JA. Can J Microbiol, 2000, 46(4) :363-369.