

植物内生菌及其防治植物病害的研究进展

石晶盈, 陈维信, 刘爱媛*

(华南农业大学园艺学院, 广州 510642)

摘要:综述了植物内生菌及其防治植物病害的研究进展。植物内生菌分布广, 种类多, 几乎存在于所有目前已研究过的陆生及水生植物中, 目前全世界至少已在 80 个属 290 多种禾本科植物中发现有内生真菌, 在各种农作物及经济作物中发现的内生细菌已超过 120 种。感染内生菌的植物宿主往往具有生长快速、抗逆境、抗病害、抗动物危害等优势, 比未感染内生菌的植株更具生存竞争力。植物内生菌的防病机理主要表现在通过产生抗生素类, 水解酶类, 植物生长调节剂和生物碱类物质, 与病原菌竞争营养物质, 增强宿主植物的抵抗力以及诱导植物产生系统抗性 etc 途径抑制病原菌生长。另外, 对植物内生真菌和内生细菌的分离、筛选和检测方法; 利用植物内生菌控制植物病害的途径如人工接种内生菌, 利用内生菌代谢产生的抗生素以及将内生菌作为基因工程的载体菌等进行了综述。同时, 对植物内生菌作为生物防治因子未来发展前景及存在的问题进行了讨论。利用植物内生菌作为生物防治因子进行大田防病, 需要考虑它的病理学、生态学和形态学等方面的影响。

关键词:内生菌; 植物病害; 生物防治

文章编号: 1000-0933(2006)07-2395-07 中图分类号: S476; S432 文献标识码: A

Advances in the study of endophytes and their effects on control of plant diseases

SHI Jing-Ying, CHEN Wei-Xin, LIU Ai-Yuan* (College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(7): 2395 ~ 2401.

Abstract: Recent advances in the study of endophytic bacteria and endophytic fungi in plants and their effects on biological control of plant diseases were reviewed. Endophytes with many varieties are widely distributed and almost exist in all aquatic and terrestrial plants. Now endophytic fungi have been observed in gramineous plants of 80 genera and 290 species and more than 120 species of endophytic bacteria have been found in some agronomic and cash crops in the world. The host plants infected by endophytes usually grow fast, have a strong resistance to adversity and diseases, and are immune to animal attack compared to uninfected plants. Therefore endophytes-infected plants are more competitive than uninfected ones in adverse circumstances. The mechanism whereby endophytes act as biological control agents is that endophytes inhibit pathogen growth by producing antibiotics, hydrolases, plant growth regulators and alkaloids, competing with pathogen for nutrition, enhancing resistance of host plants to diseases and inducing system resistance. The techniques of isolating, screening and detecting endophytes, approaches of controlling plant diseases by endophytes such as artificial inoculation of endophytes to plant, and application of antibiotics produced by endophytes, and utilization of endophytes as vectors in gene engineering were also reviewed. In addition, prospects and problems about endophytes as biological control agents were discussed. Many factors such as ecology, pathology and morphology should be considered in using endophytes as biological agents in the field.

Key words: endophyte; plant disease; biological control

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(04020593); 广东省果蔬采后重点实验室研究资助项目(2002B60116)

收稿日期:2005-03-11; **修订日期:**2005-11-10

作者简介:石晶盈(1980-), 女, 山东人, 博士生, 主要从事果蔬采后病害生物防治研究. E-mail: shijingying2003@126.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: Ywm21081@sohu.com

Foundation Item: The project was supported by Guangdong Natural Science Foundation (No. 04020593) and Key Lab of Postharvest of Fruit and Vegetables Project (No. 2002B60116)

Received date: 2005-03-11; **Accepted date:** 2005-11-10

Biography: SHI Jing-Ying, Ph.D., mainly engaged in biocontrol in postharvest of fruit and vegetables. E-mail: shijingying2003@126.com

使用化学杀菌剂是控制农作物病害的有效方法,但化学杀菌剂污染环境,诱导病菌抗性增强,破坏生态平衡,它的残毒问题也令人担忧,因此植物病害的生物防治研究越来越受到重视。人们发现植物体内存在大量有益的内生细菌和内生真菌,这些内生菌在植物体内能产生多种生物学作用,可以提供植物所需要的营养物质如氮源(内生共生固氮)及一些激素,参与植物的防卫功能,能够促进植物快速生长,增强植物抗逆境、抗病害、抗动物危害的能力^[1]。内生菌对植物病害的生物防治作用及开发应用引起了植物学家、植物病理学家、微生物学家以及生态学家的广泛关注和重视。本文对植物内生菌及其防治植物病害的研究进展及未来发展前景和存在的问题进行了综述和讨论。

1 植物内生菌的概念

按照目前较常用的宽泛的实用性概念,植物内生菌是指那些在其生活史的一定阶段或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细菌,被感染的宿主植物(至少是暂时)不表现出外在症状。可以把植物内生菌理解为植物组织内的正常菌群,是植物微生态系统中的天然组成成分,它们不仅包括了互惠共利的和中性的内共生微生物,也包括了那些潜伏在宿主体内的病原微生物。可通过组织学方法或从严格表面消毒的植物组织和汁液中分离获得,或从植物组织内直接扩增出微生物 DNA 的方法来证明内生菌的存在^[2]。

2 植物内生菌存在的普遍性

植物体内普遍存在着内生菌,植物内生菌与植物之间存在一种复杂的微生态关系。虽然早在 100 多年前就已经发现在健康植物组织的内部也有微生物存在,这类微生物在文献中后来被称为植物内生菌,但由于内生菌生活在没有外在感染症状的健康植物组织内部,所以内生菌的存在和作用长期以来被忽视。直到 20 世纪 30 年代,发现某些感染内生真菌的牧草产生毒性,造成畜牧业重大损失的牲畜中毒是由于食用了感染内生真菌的牧草,这时才开始对内生菌开展广泛深入的研究^[3]。

在内生菌-植物宿主-食草动物生态系统中,植物内生菌起着重要的生态学作用。发挥这些作用的物质基础是内生菌产生的丰富多样的次生代谢产物,它们具有多种生物活性,在农业和(或)医药业中具有重要的应用潜力。因此有关植物内生菌的研究开展得十分活跃^[4]。

内生菌普遍存在于目前已研究过的各种陆生及水生植物中。最早的认识主要来自禾本科植物如牧草中的系统发生的内生真菌。目前全世界至少已在 80 个属 290 多种禾本科植物中发现有内生真菌。近年来在甘蔗(*Saccharum officinarum* L.)、玉米(*Zay mays*)、水稻(*Oryza sativa* L.)等禾本科农作物中还发现多种能固氮的内生细菌。从 20 世纪 70 年代后期以来,前后在一些重要的经济林木如针叶类的各种冷杉(*Abies* spp.)、云杉(*Picea asperata*)、红杉(*Sequoia sempervirens* Endll.)、松(*Pinus Seylvestris*)柏(*Cupressus sempervirens*)等以及阔叶的栎树(*Quercus* sp.)、桦树(*Betula* L.)、桉树(*Eucalyptus urophyll*)等植物树皮、枝叶内发现内生真菌的存在,并进行了广泛的研究。后来在多种灌木和草本植物以及栽培作物、果树甚至藻类、苔藓和蕨类植物中也发现了内生真菌和(或)内生细菌^[4]。

研究也发现内生菌具有丰富的生物多样性。对于一种植物而言,从中可分离到的内生真菌和(或)细菌通常为几种至几十种,有的甚至多达几百种。在热带雨林植物中内生菌的这种多样性更为突出。Anorld 等^[5]分析了巴拿马中部雨林中两种植物叶子中的内生菌,结果发现从 83 个健康叶片上分离的内生菌可多达 418 个形态学种(其中基因型不同的分类元至少有 347 个)。这些内生菌同时也表现出一定的宿主专化性和地域专化性。现代分子系统学研究也表明,同一种内生菌往往还具有多样化的遗传型^[6-8]。大多数内生真菌都属于子囊孢子类(Ascomycetes),包括核菌纲(Pyrenomyetes)、盘菌纲(Discomyetes)和腔菌纲(Loculoascomyetes)的许多种类以及它们的一些衍生菌。在多种植物中广泛分布的几个属是:半壳霉属(*Leptostroma*)、Cryptocline 属、拟隐孢霉属(*Cryptosporipsis*)、拟茎点霉属(*Phomopsis*)和叶点霉属(*Phyllosticta*)^[9]。牧草中的内生真菌主要集中在子囊菌亚门麦角菌科瘤座菌族(*Balansieae*)的 *Balansia*(无性型为 *Ephelis*)和 *Epichloe*(无性型 *Neotyphodium*)两属^[2]。内生细菌也具有相似的生物多样性。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)。这些内生细菌大多为土壤微生物种类,其中假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽胞杆菌属

(*Bacillus*)、肠杆菌属(*Eterobacter*)以及土壤杆菌属(*Agrobacterium*)为最常见的属^[4]。

3 内生菌控制植物病害的机理

(1)产生抗生素类物质 抗生素是一类异源小分子化合物,在低浓度下可以对微生物的生长或代谢产生影响^[10]。在植物病害的生物防治中,根部定殖的微生物产生的抗生素起着重要的作用,这可以用抗生素产生突变体获得证明。内生菌产生的抗生素类物质存在植物体内,在植物体内转运,利于发挥防病作用^[11]。根际内生菌产生的抗生物质包括 2,4——二乙酰藤黄酚(PHL)、吩嗪羧酸(PCA)、藤黄绿脓菌素(pyoluterin, PLT)、硝吡咯菌素(pyrrolnitrin, PRN)、脓青素(PYO)、HCN 和一类丁酰内酯(butyrolactones)。其中,PHL 和 PCA 的研究最为深入,它们对小麦全蚀病菌有较强的抑制作用,对黄瓜枯萎病也有一定的生防作用。香港城市大学 Urijmoed 教授等从中国南海红树中分离出来的内生真菌能产生灰黄霉素 A 和多种醌类抗生素,对酵母菌和霉菌等均有抑制作用^[12]。

(2)产生水解酶 植物内生真菌和内生细菌另一个重要的生防机制是产生水解酶类,如几丁质酶和葡聚糖酶。这些水解酶与植物抗真菌能力有密切关系,因为真菌细胞壁的主要组成成份是几丁质和葡聚糖。这些水解酶可以降解真菌的细胞壁或其它致病因子如毒素等,达到防病效果。一种用于防治水稻稻瘟病的内生细菌 *Pseudomonas fluorescens* 产生的几丁质酶和葡聚糖酶的水平与它的防病效果有密切的关系^[13]。某些生防菌的几丁质酶基因已经被克隆,可以将这些基因转化到内生菌中,发挥内生菌的优势,提高防病效果。一种用于防治棉花黄萎病的内生菌,可产生某些蛋白酶降解毒素达到防病的效果^[14]。

(3)产生植物生长调节剂 内生菌也可产生植物生长激素类物质,如 IAA、吲哚乙腈等^[4]。Lu 等^[15]发现大多数黄花蒿内生真菌在体外培养时能产生对小麦和黄瓜幼苗生长不同程度的抑制或促进作用的代谢产物,对其中一种炭疽菌(*Colletotrichum* sp.)发酵产物的深入分析表明,该菌能产生植物生长激素 IAA。假单胞菌属、肠杆菌属、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、固氮菌属(*Azotobacter*)以及固氮螺菌属(*Azospirillum*)内生细菌的一些菌株也可产生植物生长调节物质如乙烯、生长素、细胞激动素,对宿主植物的生长起促进作用^[16]。草生欧文氏菌(*Erwinia herbicola*)不仅能产生吲哚乙酸,而且还能产生细胞分裂素。这些物质都能有效地促进植物的生长。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^[17]。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,而且还可以通过生长素的调节作用影响植物的代谢,促进植物生长^[18]。最近的一项研究表明,产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*)产生的生长素对水稻植株的生长和发育起着重要的调节作用^[19]。

(4)与病原菌竞争营养物质 内生菌可以与病原菌形成营养竞争的对抗关系,使病原菌因得不到正常的营养供给而消亡。某些根际定殖内生细菌能产生噬铁素与病菌竞争铁元素,而植物并不受其影响。荧光假单胞杆菌能产生一种黄绿色噬铁素与病菌竞争铁,导致病菌因得不到铁元素而死亡,但在铁充足的情况下,此种竞争引起的病害下降就不明显^[20]。田新莉等^[21]证明水稻内生真菌在平板拮抗试验中是通过竞争铁元素来抑制纹枯病菌的生长的。

(5)促进宿主植物生长或增强抵抗力 感染内生菌的植物一般具有比未感染内生菌的植株生长快速的特点。内生菌可增进宿主植物对 N、P、K 等营养元素的吸收。内生菌帮助植物吸收营养一个最典型的例子是内生固氮菌,1988 年从甘蔗的根茎中分离到内生固氮营养醋杆菌,后来在其它作物中如玉米、高粱、水稻等分离到内生固氮菌草螺菌,从巴基斯坦生长在盐碱地的 Kallar 草中分离到固氮弧菌(*Azoarcus* sp.)。人们在研究这些内生固氮菌时发现有些菌类能提供植物高达 80% 的氮量^[22]。傅正擎等^[23]用内生菌及其代谢产物与棉花黄萎病菌共培养的方式,证明内生菌可通过促生长作用来提高棉株的抗逆性。陈世莘等^[24]证明,在正常条件下,感染内生真菌的黑麦草体内保护酶系统如 POD、SOD 的活性明显高于未感染内生真菌的植株,并认为内生真菌很可能增强了植物的 SOD 活性调节能力,从而对植物的抗旱性产生有益影响。许多研究表明,感染内生菌的植物比未感染内生菌的植物具有更强的抗干旱、盐碱等胁迫的能力。

(6)诱导植物产生抗性 对这个生物防治机制, Van Loon^[25]和 Van Wees 等^[26]叙述的较为清楚。他们认为

根际微生物包括在根内定殖的微生物能诱导植物产生一种抗性,这种抗性不同于传统的系统获得性抗性(systemic acquired resistance, SAR),命名为诱导系统抗性(induced systemic resistance, ISR)。ISR 表型与病菌诱导的 SAR 相似,都能诱导植物产生对病菌的广谱抗性。但 ISR 中所包含的抗性机制没有病程相关蛋白(PR)的产生。目前对 ISR 的抗性机制知道得不如 SAR 的抗性机制清楚,一般认为 ISR 的抗性与植保素水平的提高和酚类物质积累有关。ISR 和 SAR 信号传导途径是两种不同的路径^[25]。同时内生菌能诱导植物产生一些结构方面的抗性, Benhamou 等^[27]用内生菌 *Bacillus pumilus* strain SE34 预接种基因转化豌豆,然后接种病菌,如果病菌的生长限制在木栓层和外皮层内,在病菌企图侵入部位,通过木质和酚类物质的大量沉积,这些细胞的胞壁得到加厚,有效阻止了病菌的侵入。

(7)产生生物碱 植物内生真菌可以产生多种生物碱,大多生物碱对食草动物和昆虫具有毒性,其中一些对植物病害也有防治作用。Li 等^[28]从雷公藤(*Tripterygium wilfordii*)中分离到一株内生真菌(*Cyrtosporiopsis cf. quercina*),从其液体发酵产物中分离到一种新酰胺生物碱(cryptocin),对稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*)有抑制作用。Elmi 等^[29]推测感染了内生真菌的高羊茅植株的抗线虫性与内生真菌产生的生物碱有关。

4 植物内生菌的分离、筛选和检测

(1)植物内生菌的分离和纯化 植物的根、茎、叶、花、果实等器官的组织中均有内生菌存在。通常选取长势好、无病害的植株,采用直接切取植物组织分离的方法或榨取植物组织汁液稀释分离的方法从植物体中分离内生菌^[30]。常用平板划线和稀释涂布的方法纯化所分离出的内生菌,纯化后接种于试管斜面培养基上,在 5℃ 温度下保存,供作进一步的筛选^[31,32]。

(2)植物内生菌的筛选 筛选对病原菌有抑制作用的内生菌,常用的方法有培养基平板对峙培养法和抑菌圈法,即通过观察病原菌生长被抑制的程度来判断内生菌对病原菌拮抗作用的大小。但内生菌在离体条件下对病原菌的抑制能力与在活体上控制该病原菌所致病害的能力并不一定呈正相关,所以离体筛选的在培养基平板上对病原菌产生最大抑制作用的内生菌并不一定是最好的生物防治菌。

为了筛选能在根部定殖的内生菌, Bennett 和 Lynch 发明了一种试管试验法测定在无菌条件下的内生菌株在植物根部定殖能力^[33]。此方法只能筛选出能在根部定殖的内生菌,而对于一种理想的生物防治因子而言,既要能在植株体内有很好的定殖能力,又要能产生有效的拮抗因子抑制病原菌。郭坚华等^[34]采用抑菌圈-定殖力双重测定方法筛选出青枯病的生物防治菌株,既能在根部很好的定殖,又有抑菌效果。此外,还有其它一些筛选内生菌的方法,项勇等^[35]采用薄层层析法从东北红豆杉树皮中筛选出一株能产生紫杉烷类物质的内生真菌。

(3)内生菌的检测 检测植物体内内生菌的方法有不少,最早采用苯胺蓝染色光学显微镜观察法来检测内生真菌,此法简便易行,结果直接明了,现在仍然在采用。20 世纪 80 年代以来,一些先进的技术手段也应用于内生菌的检测,其中酶联免疫分析(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)^[36,37]和近红外反射光谱分析(Near Infrared Spectroscopy, NIRS)^[38]方法被用于内生真菌的定量检测。抗利福平、氨基青霉素、卡那霉素等抗菌素标记法^[39,40],免疫技术结合电子显微镜技术^[41]和分子生物学方面的技术^[42]被用于内生细菌的检测。目前检测植物体内内生细菌采用较多的是抗利福平标记法,此方法比较简便,但用此方法对内生菌的定量测定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^[43]。所以,用分子生物学的方法来检测内生菌,既可以定性又可以定量,但是所用成本较高,花费时间较长。

5 利用内生菌控制植物病害的途径

(1)人工接种内生菌 可以通过人工接种方法将有防病活性的内生菌接种到植物体内,发挥内生菌的防病作用。目前常用的人工接种内生细菌的方法有 3 种:①灌根接种法,用内生菌悬浮液浇灌植株根际,这种方法可以使内生菌进入植物根茎内^[44]。②浸种接种法,在播种前将宿主植物的种子在含有内生菌悬浮液中浸泡一定时间,在生长出的植物体内可以检测到被标记的内生菌^[45]。③涂抹叶片接种法,何红等^[30,46]采用这种

方法可以将枯草芽孢杆菌 BS-2 菌株接种到多种植物体内。

常用的人工接种内生真菌的方法有茎基部注射、人工侵染和愈伤组织培养等方法。中国农业大学从棉株分离的一种内生真菌(*Chaetomium* sp.),经人工茎基部注射后有抑制萎蔫镰刀菌扩展的作用。用内生真菌人工侵染植物是对其利用的另一种有效手段。Latch 和 Christensen 用 5 种内生真菌进行了人工侵染实验,发现在幼苗期侵染能够实现,而成熟植株的侵染没有成功^[47]。Johnson 等用愈伤组织培养的方法进行了侵染实验,发现有 17% 的再生植株被感染^[48]。

(2)利用内生菌分泌的抗生素 植物内生菌分泌的抗生素是抑制和杀死病原菌的直接作用物质,内生菌代谢产物的应用也受到了人们的注意。可以直接利用内生菌的代谢产物控制植物病害,内生菌产生的抗生素可以作为无公害农药的又一来源。根际内生菌 *Pseudomonas* spp. 产生的一类鼠李糖脂生物表面活性剂(rhamnolipid biosurfactants)物质,破坏腐霉菌(*Pythium*)卵孢子的原生质膜,引起卵孢子细胞壁的水解破裂^[49]。对小麦全蚀病有防效的 *P. fluorescens* CHAO 能产生一些吩嗪类(phenazine)物质。*Bacillus strains* 能产生一些脂多肽(lipopeptide)类抗生素对植物根部病害有显著的抑制作用^[49]。对多种植物病害有防治作用的 *P. fluorescens* CHAO 能产生几种毒性代谢物质,包括 PCA,HCN 和 PLT 等^[50]。PCA 和 PHL 合成的相关基因簇已经被克隆,这就可以将两者的基因整合到同一个内生细菌中,大量地合成提高生物防治效果^[51]。

(3)作为外源基因的载体 内生菌是构建“工程菌”的理想载体。因内生菌具有在植物体内定殖、繁殖、转移的特点,将某些抗病虫基因导入到内生菌中,能提高植物的抗病虫能力,而植物本身的基因并未发生改变,这样可以保持植物的天然性状。Kostaka 发现从百慕大草(*Cynodon dactylon*)中分离的木质棍状杆菌犬齿亚种(*Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*)接种到某些些植物上后可以很快转移到整个植物体中。利用这一特点将苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)的伴胞晶体编码基因转移到这种内生细菌中,实现了对欧洲玉米螟(*Qstrinia. nubilalis*)的生物防治^[52],减少了化学农药的使用。将苏云金杆菌基因转入蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)内,实现了对两种鳞翅目昆虫的防治^[53]。

6 植物内生菌防治植物病害的未来发展前景及存在问题

关于植物内生菌在防治病害、促进植物生长发育以及固氮方面的作用,国内外都有研究,我国有从棉花、水稻、马铃薯、番茄、辣椒等植物中分离到内生菌,并证明了某些内生菌对植物病害具有防治效果的报道。如:吴蔼民^[54]2000 年报道了内生菌 73a 和 Ala 对棉花黄萎病的田间防效及增产作用,其中 73a 的田间防效达 51.28%,表现出 18.15% 的增产效果。袁军等^[55]2002 年报道了防治马铃薯环腐病有益内生菌的分离和筛选及防病效果,筛选出 5 个比较好的菌株,其中 118 菌株定殖、促生、拮抗 3 种作用兼备。黎起秦等^[56]2003 年报道了番茄青枯病内生拮抗细菌的筛选及防病效果。其中内生菌 B47 对番茄青枯病的大田防效达 74.98%。何红等^[57]2004 年报道了辣椒内生拮抗细菌的筛选及防病效果。其中 BS-1 和 BS-2 菌株对辣椒炭疽菌的防效 10d 以后为 57.34% ~ 94.08%,另外在田间对辣椒喷施两种菌液发现 20d 没有炭疽菌发病,而对照发病率为 15%。张立新等^[58]2005 年报道了番茄内生真菌对多种植物病原菌的抑制效果。其中 Fq72 菌株的培养滤液对灰霉和菌核病菌的抑制效果分别达到 75.68% 和 66.11%。

国内外研究均表明内生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应用植物内生菌防治病害,还存在一些问题,最大问题之一是防治效果不稳定。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许多因子都会影响内生菌防病作用的发挥。

由于植物本身就是一种复杂的微生态系统,内生菌生活在此系统中,也处于复杂的环境中,不同植物和不同的组织中内生菌的种类和数量不相同。因此内生菌生物防治作用的发挥,有许多制约因素,除内生菌的防御机制和转运之外,内生菌在植物体内的数量也是制约因素之一。Sturz 证明马铃薯软腐病的严重程度与能抑制这种病菌的内生菌的数量成负相关,即内生菌数越少,病害越重^[59]。当内生菌种类与寄主相容时,内生菌和寄主就能相互促进。红三叶草-马铃薯的轮作中,同一种内生菌能在两种作物中定殖,促进两种作物的生长和三叶草根瘤的形成。但当内生菌种类与寄主不相容时,产生异株相克的负面影响。如在三叶草与玉米的

轮作中,把三叶草锄掉以后,内生菌随着残体进入到土壤中,抑制玉米的发芽和生长^[60]。

将植物内生菌应用于生产实际,需要解决的问题很多,植物的栽培条件,栽培措施,自然环境,微生态环境,内生菌的形态稳定性等因素都影响内生菌发挥作用,因此利用植物内生菌进行大田防病,必须考虑它的生态学、病理学和形态学等方面的影响。内生菌作为植物病害的生物防治因子,必须考虑以下问题:(1)内生菌的病理学作用,在正常条件或恶劣环境下对寄主植物是否致病;(2)内生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;(3)是否有一些植物其抗病或抗虫的作用不是由于植物本身产生的抗性物质而是由于某些内生菌产生的物质起作用?

总的来说,植物内生菌的生境特殊性决定了内生菌既有理论研究的广度和深度,又有多方面的应用潜力,是个潜力巨大、尚待开发的微生物新资源。传统药用植物以及一些特殊环境中生长的植物中存在很多内生菌,从这些内生菌的代谢产物中寻找新型活性物质,将继续是内生菌研究的主流。从各个层次上深入探讨内生菌-宿主之间的相互作用,将有助于了解内生菌的生物学本质及其未知的生态学作用。分子生物学手段将在内生菌研究的各个方面发挥重要作用。总之,植物内生菌在农作物的固氮增收、生物防治等应用领域将可能发挥重要作用。

References:

- [1] Fiore S D, Gallo M. Endophytic bacteria: their possible role in the host plant. In: Fendrik, I. Eds. *Azospirillum* VI and related microorganisms. Berlin: Springer Vefiag, 1995, 5: 169 ~ 187.
- [2] Stone J K, Bacon C W, White J F Jr. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. New York: Marcel Dekker, 2000. 3 ~ 29.
- [3] Leuchtmann A. Systematics, distribution, and host specificity of endophytes. *Nat Toxins*, 1992, 1(3): 150 ~ 162.
- [4] Sturz A V, Christie B R, Norwak J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2000, 19(1): 1 ~ 30.
- [5] Anord A E, Maynard Z, Gibert G S, *et al.* Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecol Lett*, 2000, 3: 267 ~ 274.
- [6] Mccucheon T L, Carroll G C, Sc hwab S. Genotypic diversity in populations of a fungal endophyte from Douglas fir. *Mycologia*, 1993, 85: 180 ~ 186.
- [7] Lappalainen J H, Yli-Mattila T. Genetic diversity in Finland of the birch endophyte *Genomonium setacea* as determined by RAPD-PCR markers. *Mycol Res.*, 1999, 103: 328 ~ 332.
- [8] Reddy P V, Bergen M S, Patel R, *et al.* An examination of molecular phylogeny and morphology of the grass endophyte *Balansia cleveiceps* and similar species. *Mycologia*, 1998, 90: 108 ~ 117.
- [9] Carroll G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*, 69: 2 ~ 9.
- [10] Sturz A V, Christie B R, Matheson B G, *et al.* Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. *Plant Pathol.*, 1999, 48: 360 ~ 369.
- [11] Maurhofer M, Keel C. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO with enhanced antibiotic production. *Plant Pathol*, 1998, 45: 126 ~ 129.
- [12] Jiang G C, Lin Y C, Zhou S N, *et al.* Studies on the secondary metabolites of mangrove fungus No 1403 from the south china sea. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2000, 39(6): 68 ~ 72.
- [13] Velazhahan R, Samiyappan R. Relationship between antagonistic activities of *Pseudomonas fluorescens* isolates against *Rhizoctonia solani* and their production of lytic enzymes. *J. Plant Disease and Protection*, 1999, 106(3): 244 ~ 250.
- [14] Cook R J. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 1993, 31: 53 ~ 80.
- [15] Lu H, Zou W X, Meng J C, *et al.* New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant Sci.*, 2000, 151: 67 ~ 73.
- [16] Hallmann J, Quadl-Hallmann A, Mahaffee W F, *et al.* Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J. Microbiol*, 1997, 43: 895 ~ 914.
- [17] Dobereiner J, Baldani V L D, Reis V M. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: Fendrik I, de Callo M, Vanderleyden J, eds. *Azospirillum* VI and Related Microorganisms. Berlin: Springer-Verlag, 1995. 3 ~ 14.
- [18] Glenn A E, Bacon C W, Price R, *et al.* Molecular phylogeny of *Acremonium* and its axonomic implications. *Mycologia*, 1996, 88: 369 ~ 383.
- [19] Feng Y J, Song W. Endophytic bacteria. *Ziran zazhi*, 2001, 23(5): 249 ~ 252.
- [20] Weisbeek P J H. Gerritis: Ison uptake and competition, In: Ogoshi A, K. Kobayashi, Y. Homma, eds. *Plant growth-promoting rhizobacteria-Present status and future prospects*. Proc. 4th Inter. workshop on plant growth-promoting rhizobacteria, Japan-OECD Joint workshop. Sapporo. Japan, 1997, 10(5-10): 102 ~ 106.
- [21] Tian X L, Cai A Q, Cao L X, *et al.* Studies on communities of endophytic fungi from rice and their antipathogenic activities in Vitro. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2005, 44(2): 69 ~ 73.
- [22] Reinhold-Hurek B, hurek T, Gillis M *et al.* Azoarcus gen. nov. nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth) and description of two species. *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 1993, 43: 574 ~ 584.
- [23] Fu Z Q, Xia Z J, Wu A M, *et al.* Mechanism of controlling cotton *Verticillium* wilt with endophytic bacterium 73a. *Jiangsu J. of Agr. Sci.*, 1999, 15(4): 211 ~ 215.
- [24] Chen S P, Gao Y B, Liang Y, *et al.* Effects of endophyte infection on protective enzyme activities in leaves of *Lolium perenne* under water stress. *Chin J Appl Envir Biol*, 2001, 7(4): 348 ~ 354.
- [25] Van Loon, L C. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol*, 1998, 36: 453 ~ 483.
- [26] Van Wees, S C M, Pieterse, C M J, *et al.* Differential induction of systemic resistance in Arabidopsis by biocontrol bacterial. *Mol. Plant-Microbe interaction*, 1997, 10: 716 ~ 724.
- [27] Benhamou N, Kloepper J W, Quadl-Hallman A, *et al.* Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacterial. *Plant Physiol*, 1996, 112: 919 ~ 929.
- [28] Li J Y, Strobel G A, Harper J, *et al.* Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*. *Org Lett*, 2000, 2: 767 ~ 770.
- [29] Elmi A A, West C P, Robbins R T, *et al.* Endophyte effects on reproduction of a root-knot nematode (*Meloidogyne marylandi*) and osmotic adjustment

- in tall fescue. Grass & Forage Sci., 2000, 55: 166 ~ 172.
- [30] He H, Cai X Q, Guan X, et al. Inhibition of *Bacillus subtilis* BS-2 on vegetable damping-off disease. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2004, 33(1): 17 ~ 20.
- [31] Korsten L, DeJager E S, De Villiers E E. Evaluation of bacterial epiphytes isolated from avocado leaf and fruit surfaces for biocontrol of avocado postharvest disease. Plant Disease, 1995, 79: 1149 ~ 1156.
- [32] Long L K, Xiao C G, Dou Y X, et al. Preliminary report on isolation and screening of endophytic bacterial to control bacterial wilt of tomato. China Vegetables, 2003, 2: 19 ~ 21.
- [33] Bennett R A, Lynch J M, Gen J. Microbiol, 1981, 125: 95 ~ 102.
- [34] Guo J H, Wang Y J, Li J, et al. Screen of biocontrol bacterial of plant wilt by inhibiting zones and root-colonizing capacity. Acta Phytopathologica Sinica, 1996, 26(1): 49 ~ 54.
- [35] Xiang Y, Cui J X, Lü A G. Isolation and screen of *Taxus cuspidata* Sieb. et zucc. Endophytic fungi. Journal of Northeast Forestry University, 2002, 30(2): 30 ~ 35.
- [36] Johnson M C, Pirone T P, Siegel M R, et al. Detection of *Epichloe typhina* in tall fescue by means of enzyme-linked immunosorbent assay. Phytopathology, 1982, 72: 647 ~ 650.
- [37] Johnson M C, Anderson R L, Kryscio R J, et al. Sampling procedure for determining endophyte content in tall fescue seed lots by ELISA. Phytopathology, 1983, 73: 1046 ~ 1049.
- [38] Roberts C A, Barton F E II, Moore K T. Estimation of *Acremonium coenophialum* mycelium in infected tall fescue. Agron., 1988, 80: 737 ~ 740.
- [39] De Weger L A, Vander Bij A J, Dekkers L C, et al. Colonization of the rhizosphere of crop plants by plant-beneficial *Pseudomonas*. FEMS Microbiol Ecol, 1995, 17(4): 221 ~ 229.
- [40] Ding L X, Li W Z, Song Z H, et al. Screening ampicillin and kanamycin-resistant strains from peanut endophyte mutants induced with ultra-violet. Journal of Laiyang Agricultural College, 1997, 14(4): 235 ~ 239.
- [41] Quadri-Hullmann A, Kloepper J W. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter axburiae* JM22 in different plant species. Can J. Microbiol, 1996, 42: 1144 ~ 1156.
- [42] Whitesides S K, Spotts R A. Frequency, distribution and characteristics of endophytic *Pseudomonas syringae* in Pear Trees. Phytopathology, 1991, 81(4): 453 ~ 457.
- [43] Angela Sessitsch, Birgit Reiter, Ulrike Pfeifer, et al. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and *Actinomyces*-specific PCR of 16S rRNA genes. FEMS Microbiology Ecology, 2002, 39: 23 ~ 32.
- [44] Weng Q Y, Chen Q H, Zhao J, et al. Colonization of BS1 marked with Rifampicin root sand in root zone soil of tomato and egg plant. Fujian Journal of Agricultural Science, 2003, 18(2): 87 ~ 88.
- [45] Long L K, Xiao C G. Preliminary study on the colonization of endophytic bacterium 01-144 in tomato root and stem. Microbiology, 2003, 30(5): 53 ~ 56.
- [46] He H, Qiu S X, Cai X Q, et al. Colonization in plant and identification of endophytic bacteria BS-1 and BS-2 from *Capsicum annuum*. Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44(1): 13 ~ 18.
- [47] Latch G C M, Christensen M J. Artificial infection of grasses with endophyte. Ann Appl Biol., 1985, 107: 17 ~ 24.
- [48] Johnson M C, Bush L P, Siegel M R, et al. Infection of tall fescue with *Acremonium coenophialum* by means of callus culture. Plant Disease, 1986, 70: 380 ~ 382.
- [49] Buchenauer H. Biological control of soil-borne disease by rhizobacteria. J. Plant Disease and Protection, 1995, 44: 40 ~ 50.
- [50] Aaurhofer M, Keel C. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO with enhanced antibiotic production. Plant Pathol, 1995, 44: 40 ~ 50.
- [51] Pierson III L S, Pierson E A. Phenazin antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*: Role in rhizosphere ecology and pathogen suppression. FEMS Microbiology Letters, 1996, 136: 101 ~ 108.
- [52] Andrews J H. Biological control in the phyllosphere. Ann. Rev. Phytopathol, 1992, 30: 630 ~ 635.
- [53] Navon Amos. *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection - reality and prospects. Crop Protection, 2000, 19(8): 669 ~ 676.
- [54] Wu A M, Gu B K, Fu Z Q, et al. Effect in field and function of increasing production of endophyte for *Verticillium wilt* of cotton. Jiangsu J. of Agr. Sci., 2000, 5: 38 ~ 39.
- [55] Yuan J, Sun F Z, Tian H X, et al. Isolation and screening of beneficial endophytic bacterial to control bacterial ring rot of potato. Acta Microbiologica Sinica, 2002, 42(3): 270 ~ 274.
- [56] Li Q Q, Luo K, Lin W, et al. Isolation of tomato endophytic antagonists against *Ralstonia solanacearum*. Acta Phytopathologica Sinica, 2003, 33(4): 364 ~ 367.
- [57] He H, Cai X Q, Hong Y C, et al. Selection of endophytic antifungal bacteria from capsicum. Chinese Journal of Biological Control, 2002, 18(4): 171 ~ 175.
- [58] Zhang L X, Liu H P, Han J C, et al. Isolation and screen of endophytic antifungal fungi from tomato. J. Shanxi Agric. Univ., 2005, 25(1): 30 ~ 33.
- [59] Sturz A V, Matheson B G. Population of endophytic bacteria which influence host-resistance to *Erwinia*-induced bacterial soft rot in potato tubers. Plant and Soil, 1996, 184: 256 ~ 271.
- [60] Sturz A V, Christie Br. Endophytic bacterial of red clover as causal agents of allelopathic clover-maize syndromes. Soil Biology and Biochemistry, 1996, 28: 583 ~ 588.

参考文献:

- [12] 姜广策, 林永成, 周世宁, 等. 中国南海红树内生真菌 No. 1403 次级代谢物的研究. 中山大学学报(自然科学版), 2000, 39(6): 68 ~ 72.
- [19] 冯永君, 宋未. 植物内生细菌. 自然杂志, 2001, 23(5): 249 ~ 252.
- [21] 田新莉, 蔡爱群, 曹理想, 等. 水稻内生真菌菌群分析及其拮抗病原菌活性研究. 中山大学学报(自然科学版), 2005, 44(2): 69 ~ 73.
- [23] 傅正擎, 夏正俊, 吴嵩民, 等. 内生菌防治棉花黄萎病机理. 江苏农业科学, 1999, 15(4): 211 ~ 215.
- [24] 陈世苹, 高玉葆, 梁宇, 等. 水分胁迫下内生真菌感染对黑麦草叶内保护酶系统活力的影响. 应用与环境生物学报, 2001, 7(4): 348 ~ 354.
- [30] 何红, 蔡学清, 关雄, 等. 内生菌 BS-2 对蔬菜立枯病的抑制效果. 福建农林大学学报(自然科学版), 2004, 33(1): 17 ~ 20.
- [32] 龙良鲲, 肖崇刚, 蔡彦霞, 等. 防治番茄青枯病内生菌的分离与筛选. 中国蔬菜, 2003, 2: 19 ~ 21.
- [34] 郭坚华, 王玉菊, 李瑾, 等. 抑菌圈-定殖力双重测定法筛选青枯病生防细菌. 植物病理学报, 1996, 26(1): 49 ~ 54.
- [35] 项勇, 崔京霞, 吕安国. 东北红豆杉内生真菌的分离和筛选. 东北林业大学学报, 2002, 30(2): 30 ~ 35.
- [40] 丁立孝, 李文泽, 宋子红, 等. 双抗性标记花生内生菌的诱变与筛选. 莱阳农学院学报, 1997, 14(4): 235 ~ 239.
- [44] 翁启勇, 陈庆河, 赵健, 等. 利福平标记菌株 BS1 在番茄、茄子根部及土壤中的定殖动态. 福建农业学报, 2003, 18(2): 87 ~ 88.
- [45] 龙良鲲, 肖崇刚. 内生菌 01-144 在番茄根茎内定殖的初步研究. 微生物学通报, 2003, 30(5): 53 ~ 56.
- [46] 何红, 邱思鑫, 蔡学清, 等. 辣椒内生菌 BS-1 和 BS-2 在植物体内的定殖及鉴定. 微生物学报, 2004, 44(1): 13 ~ 18.
- [54] 吴嵩民, 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. 江苏农业科学, 2000, 5: 38 ~ 39.
- [55] 袁军, 孙福在, 田红先, 等. 防治马铃薯环腐病有益内生菌的分离和筛选. 微生物学报, 2002, 42(3): 270 ~ 274.
- [56] 黎起秦, 罗宽, 林伟, 等. 番茄青枯病内生拮抗细菌的筛选. 植物病理学报, 2003, 33(4): 364 ~ 367.
- [57] 何红, 蔡学清, 洪永聪, 等. 辣椒内生菌的分离及拮抗菌的筛选. 中国生物防治, 2002, 18(4): 171 ~ 175.
- [58] 张立新, 刘慧平, 韩巨才, 等. 番茄内生真菌的分离和拮抗生防菌的筛选. 山西农业大学学报, 2005, 25(1): 30 ~ 33.