

· 天麻互作微生物研究专题 ·

内生细菌资源及其次级代谢产物研究进展

宋瑞琦, 南铁贵, 杨健, 周骏辉, 袁媛*
(中国中医科学院 中药资源中心, 北京 100700)

[摘要] 内生细菌是宿主内生态系统的重要组成部分,存在于宿主内部且不会对宿主造成明显伤害,其种类多样、分布广泛,是一类重要的微生物资源,具有成为潜在中药资源的可能。内生细菌在与宿主长期协同进化的过程中,逐渐形成了对抗、互惠等多种关系,能够直接或间接调节宿主的生长发育、协助宿主抵抗病虫害及环境胁迫等生物过程。内生细菌在与宿主互作的过程中能够产生丰富多样的次级代谢产物,逐渐成为新型天然产物开发研究的资源库,发挥了重要的作用。近年来,内生细菌及其次级代谢产物广泛应用于新药研发、生物防治等领域,展现出巨大的研究与开发价值。该文综述了内生细菌资源的多样性、种属鉴定方法、次级代谢产物及其在农业、医药领域应用等方面的研究进展,并对未来发展方向进行了探讨,为中药内生细菌资源的研究、开发利用提供参考,拓展和提升中药资源价值。

[关键词] 植物内生细菌; 真菌内生细菌; 多样性; 次级代谢产物

[中图分类号] R284.2; R289; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)19-0001-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202014

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200722.1809.006.html>

[网络出版日期] 2020-7-23 08:47

Research Progress of Endophytic Bacterial Resources and Their Secondary Metabolites

SONG Rui-qi, NAN Tie-gui, YANG Jian, ZHOU Jun-hui, YUAN Yuan*

(National Resource Center for Chinese Meteria Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] Endophytic bacteria exist in the host and do not cause obvious damage to the host, which is an important part of the host ecosystem. Endophytic bacteria are a kind of important microbial resources with diverse species and wide distribution. In the process of long-term coevolution between endophytic bacteria and host, many symbiotic relationships, such as antagonism and reciprocity, have been gradually formed, which can directly or indirectly regulate the growth and development of host, assist host to resist diseases and insect pests, environmental stress and other biological processes. Endophytic bacteria can produce a variety of secondary metabolites in the process of symbiosis with the host, which plays an important role in the development of new natural products. In recent years, endophytic bacteria and their secondary metabolites have been widely used in the research and development of new drugs, biological control and other fields. In this paper, the diversity, species identification and secondary metabolites of endophytic bacterial resources are reviewed, and the future development direction is discussed, hoping to provide reference for the further development and utilization of endophytic bacterial resources.

[Key words] endophytic bacteria of plants; endophytic bacteria of fungi; diversity; secondary metabolites

[收稿日期] 20200229(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81891013);中央本级重大赠减支项目(2060302);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZZ10-008);科技基础性工作专项(2015FY111500)

[第一作者] 宋瑞琦,在读硕士,从事中药资源开发与品质评价研究,E-mail:songruiqi13@163.com

[通信作者] *袁媛,研究员,博士生导师,从事中药鉴定与分子生药学研究,Tel:010-64087649,E-mail:y_yuan0732@163.com

细菌在自然界中分布极为广泛,除存在于空气、水、土壤等环境中,细菌与宿主共存的现象也十分普遍。1922年KLEOPPER首次提出了植物内生细菌的概念;1926年PEROTTI等提出内生生长作为细菌生长的一个特殊阶段,其可以感染植物并与植物形成寄生、互生或共生等关系,从而影响植物的生长过程;此后相继报道了从健康植株中分离得到众多细菌,进一步验证了内生细菌的存在。现在学界普遍认为内生细菌指自经表面消毒的植物组织中分离出来,且不会对宿主植物造成明显伤害的正常菌群^[1]。内生细菌可以存在于植物体的地上部、地下部和种子等部位,同时细菌利用植物作为一个独特的保护性生态位,不受植物根际和附生细菌波动的影响,使其处于相对安全稳定的环境^[2]。随着内生细菌研究的深入,人们发现除植物外,真菌内也存在着一定数量的细菌,MOSSE^[3]于1970年首次提出了真菌内生细菌的概念。与植物内生细菌相似,真菌内生细菌在与其宿主真菌长期协同进化过程中也可形成对抗、互惠等多种作用,影响真菌的生物学和生态学特性。

研究表明,内生细菌具有固氮、促进植物生长、增强植物抗性、降解毒性物质等诸多生物学功效^[4],其一方面作为生物肥料或生物农药在促进农业生产的安全、有效、可持续发展中具有巨大的潜力;另一方面,内生细菌丰富的次级代谢产物也成为新药研究的资源库,尤其是在新型低毒、高效生物活性化合物筛选中具有极高的科学和应用价值。同时,基于内生细菌种类多、繁殖快、次级代谢产物丰富的特点,中药内生细菌资源的发掘与研究也为中药资源的保护与开发提供了新思路。为此,本文针对内生细菌资源的多样性、研究方法、活性代谢产物及其在农业、医药领域的研究现状进行了综述分析,并针对内生细菌在中药领域的研究前景进行阐述和讨论,以期能为内生细菌资源的进一步开发利用提供参考。

1 植物内生细菌资源

1.1 植物内生细菌的多样性 植物内生细菌的生物多样性主要包括宿主多样性、宿主不同组织分布的多样性以及内生细菌种群多样性。内生细菌几乎在自然界所有的植物中都有分布,且同一株植物体内往往含有丰富类群的内生细菌,且不同种细菌的相对丰度也存在差异。早在1982年GARDNER等^[5]报道了粗皮柠檬根内生细菌中优势菌属为假单胞菌属(*Pseudomonas*),肠杆菌属(*Enterobacter*),芽

孢杆菌属(*Bacillus*),棒状杆菌属(*Corynebacterium*),而其他属细菌仅占细菌总量的16%。

截至到目前为止,已从农作物^[6]、林木^[7]、药用植物^[8]、藻类植物等中分离得到大量的内生细菌。其中常见的植物内生细菌多数为变形菌门、拟杆菌门和厚壁菌门;在属水平上,常见的为芽孢杆菌属(*Bacillus*),伯克氏菌属(*Burkholderia*),微杆菌属(*Microbacterium*),泛菌属(*Pantoea*),假单胞菌属(*Pseudomonas*),寡单胞菌属(*Stenotrophomonas*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)等^[9-10]。

1.2 植物内生细菌的生物学功能 内生细菌可以通过直接或间接的方式对植物宿主产生一些有益的作用,表现为①促进植物获取营养物质、调节内源生长激素水平,有助于植物在正常或胁迫条件下更好生长;②产生抗生素和水解酶、启动植物防御机制,有助于抑制植物病原菌的生长,间接改善植物生长状况。

1.2.1 促进矿质元素的吸收 土壤中存在的一些矿质元素难以被植物直接吸收利用,内生细菌可以帮助宿主植物获得更多的养分^[11],如固氮细菌*Azoarcus* sp. BH72, *Azospirillum brasilense*, *Burkholderia* sp., *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*等可提高植物固氮效率和氮素积累量,从而增加宿主植物的生物量^[12]。

尽管土壤中磷含量丰富,但不溶性的磷居多,内生细菌可以转化分解不溶性磷酸盐,增加植物对磷的利用^[13];可以分泌酸性磷酸酶矿化有机磷,增加土壤中磷的有效性^[14];可以吸收可溶性磷,减少磷缺乏条件下植物对磷酸盐的吸附和固定^[15]。与磷元素相似,铁元素通常以不溶性形式 Fe^{3+} 存在,造成大多数植物无法直接获得,而内生细菌可以产生铁载体结合不溶性铁离子,使植物通过根整合降解或配体交换方式从铁载体中获取铁元素^[16]。

1.2.2 调节植物内源激素水平 目前已报道从植物内生细菌中分离得到细菌源植物激素,包括生长素(IAA),乙烯(ETH),赤霉素(GA),细胞分裂素(CTK)等,可直接参与调节植物生长^[17]。另一方面,内生细菌可通过促进IAA降解影响宿主植物的生长。LEVEAU等^[18]报道了内生假单胞菌解除外源性IAA对胡萝卜根伸长的抑制作用,同时该细菌在色氨酸存在的情况下可产生IAA,说明内生细菌可以有效调节植物体内IAA水平从而使其对植物生长产生净正效应。同样,内生细菌还可以通过产

生 ACC 水解酶水解 ETH 前体物质,抑制 ETH 的产生,从而缓解植物受到胁迫的损伤^[19]。

1.2.3 抑制植物病原菌及害虫的生长 内生细菌,如放线菌属、芽孢杆菌属、肠杆菌属、拟杆菌属、假单胞菌属和沙雷氏菌属细菌等,可通过抑制植物病原菌和病虫害的产生,间接促进宿主植物的生长。首先,内生细菌可以产生能拮抗植物病原菌的物质,如抗生素、毒素、铁载体、水解酶和抗微生物挥发性有机化合物等^[20];其次,内生细菌也可以通过产生几丁质酶、蛋白酶和葡聚糖酶等降解病原真菌的细胞壁,从而产生抗真菌活性^[21-22];第三,内生细菌如蜡样芽孢杆菌 AR156 还可以使宿主植物拟南芥获得水杨酸、茉莉酸或乙烯介导的诱导系统抗性^[23],且同一种细菌可以启动两种不同途径以分别防御两种不同病原菌。

2 真菌内生细菌资源

2.1 真菌内生细菌的多样性 由于真菌与细菌的生存环境十分相似,二者在大多数自然环境中共同存在,有关二者互作及其对生态系统的影响近年来引起学界的重视^[24]。目前已从多种真菌中分离得到了大量的内生细菌,包括毛霉菌门^[25]、子囊菌门^[26]、担子菌门等^[27]。HOFFMAN 等^[28]报道在植物内生真菌 *Pezizomycetes*, *Dothideomycetes*, *Eurotiomycetes* 和 *Sordariomycetes* 中存在至少 15 种内生细菌,其中大多数为变形菌门,少量为厚壁菌门。目前研究最为透彻的真菌内生细菌为 β 变形菌纲、柔膜菌纲细菌,其中柔膜菌纲内生细菌分布较广,几乎所有球囊菌门真菌中均存在此类细菌。内生细菌与真菌之间的联系在二者长期共同进化过程中逐渐变得紧密起来,造成真菌内生细菌的基因组收缩、宿主依赖性^[29]。

2.2 真菌内生细菌的生物学功能 由于真菌内生细菌的研究仍处于起步阶段,其整体生物学意义在很大程度上还不清楚,从现有的研究结果可以看出,内生细菌对真菌宿主的生长、繁殖均具有重要的影响。LASTOVETSKY 等^[30]报道了在真菌和内生细菌互作关系形成前,真菌 *R. microsporus* 为了容纳细菌 *Paraburkholderia* 会产生特定的脂质代谢变化。FOSSALUNGA 等^[31]报道了内生细菌可提高真菌的生物量,同时增加其 ATP 的产生,并引发了活性氧解毒机制。MONDO 等^[32]报道了垂直传播的内生细菌可以影响真菌的增殖、降低其孢子的产量。真菌宿主也可能是细菌的环境宿主或者避难所,研究表明与粘菌属相比,内生细菌在子囊菌与

担子菌中存在的时间更短,但这种短暂的细菌-真菌关联却可以影响宿主菌的表型和适应度^[33]。HOFFMAN 等^[34]报道内生细菌 *Luteibacter* sp. 可通过其真菌宿主间接促进了植物生长素 (IAA) 的产生,从而影响宿主植物的生长。PAKVAZ 等^[35]通过体外实验表明,柏树内生真菌的内生细菌对柏树的病原微生物具有拮抗作用,且发现细菌代谢产物对受测病原微生物具有抗真菌和抗细菌活性。PARTIDA-MARTINEZ 等^[36]从水稻病原真菌中分离得到了一种根霉素,并通过实验证明这种真菌毒素并不是由真菌自身生成,而是由其内生细菌 *Burkholderia rhizoxinica* 合成的,这一发现揭示了一个非常复杂的互作机制。由此可以看出,在特定情况下内生细菌具有通过与真菌宿主建立有益或有害的关联,从而影响真菌宿主、真菌与其自身宿主相互作用的能力,从而进一步导致了多水平的跨界互作。

3 内生细菌种属鉴别的研究方法

3.1 传统培养法 传统培养法是指基于体外分离培养的内生细菌群落研究方法^[37],具体步骤如下,首先需要对植物材料进行表面消毒,破碎、浸渍、连续稀释后将其涂在适宜培养基上进行细菌培养^[38]。常用表面消毒剂包括次氯酸钠、乙醇和过氧化氢等,实验中通常将这些化学药品串联使用以增强消毒程序的有效性^[39-40];消毒后应去除残留的消毒剂以减小其对内生菌群的损害,同时应设置阴性对照实验来保证消毒效果。对细菌种属的鉴定可采用形态、生理、生化或 DNA 分子标记等方法,其中 DNA 分子标记方法被认为是相对客观、准确的鉴定方法^[41],其中 16S rRNA 是最常用的细菌种属鉴定标记^[42]。据统计,利用传统培养法分离得到的细菌仅占植物实际内生菌数量的 0.001% 至 1%^[43-44],这很大程度上限制了内生细菌多样性研究。开发多样化细菌培养基及培养方法、获得种类丰富的菌株,是未来内生细菌研究面临的重要挑战之一。

3.2 分子生物学法 将分子生物学方法引入到内生细菌研究中,可为一些微生物难以通过传统培养法培养并获得菌株的问题提供一种解决途径,具体步骤如下,首先从植物组织中提取细菌基因组 DNA,采用分子生物学技术对其遗传物质进行分析,为快速、准确、全面地研究植物内生细菌群落多样性及相互作用机制奠定基础。常用分析方法包括核糖体 DNA 扩增片段限制性内切酶分析 (ARDRA),变性梯度凝胶电泳 (DGGE),温度梯度

凝胶电泳(TGGE), 终端限制片段长度多态性(T-RFLP)^[45-46], 核糖体间基因间隔分析(ARISA), 高通量测序^[47], 荧光原位杂交(FISH)技术^[48-49]等。

4 内生细菌次级代谢产物研究概况

与植物和真菌相比, 内生细菌在数量、种类、分布上均具有巨大的资源优势, 且内生细菌在与宿主协同进化、抵御外界胁迫的过程中产生了丰富多样的次级代谢产物, 因此其在新型天然产物开发研究中逐渐占据了重要地位。目前已从内生细菌中获得众多结构新颖且活性多样的新型化合物, 包括生物碱、类固醇、萜类、肽、聚酮、醌类和酚类等^[50], 这些化合物在抗病原菌、抗病虫害、调节植物生长、抗癌、抗氧化、抗炎症、免疫抑制剂中具有重要作用。

4.1 抗虫及抗病原菌类活性物质 内生细菌产生的抗菌代谢物^[51], 包括抗生素、毒素、铁载体、水解酶和抗微生物挥发性有机物等大多具有生物活性。如从 *Streptomyces* sp. TP-A0595 中分离的 prenylindole 具有抗植物病原菌活性^[52]; 从 *Streptomyces* sp. TP-A0569 中分离的 Fistupyrone 可以抑制甘蓝黑斑病原真菌 (*Alternaria circinans*)^[53]; 从红树林的一株内生放线菌发酵产物中分离纯化的不饱和脂肪酸 5, 8-二烯十四酸, 对线虫有较强的致死作用^[54]。

从内生菌代谢物中发掘新型抗菌素被认为是解决抗药性问题的新的研究方向途径之一^[55], 如从内生细菌 *Pseudomonas viridiflava* 中分离得到了一种新型脂肽类抗生素 ecomycin, 可用于治疗呼吸道和泌尿道感染、皮肤、眼睛和肠道感染, 这种抗生素的结构组成中除了常见的氨基酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸和甘氨酸外, 还含有高丝氨酸和 β -羟基天冬氨酸^[56]。药用植物中含有丰富的内生细菌资源, 如从攀西高原的 26 种药用植物中分离得到了大量的内生放线菌, 其抗菌谱极广, 具有良好的开发前景^[57]。

4.2 抗肿瘤类活性物质 植物内生细菌是获取抗肿瘤药物的天然资源, STROBEL 等^[58]在紫衫植物内生真菌中分离出具有抗肿瘤活性的紫杉醇^[59], 引起了对植物内生菌研究的关注。目前已报道了多个内生细菌具有抗肿瘤活性, 如从青椒叶片中分离到的内生细菌 EML-CAP3 具有很强的抗血管生成活性, 其可以产生一种新型的亲脂抗菌肽, 通过抗菌肽能够抑制低氧诱导因子-1 α 及其靶基因、血管内皮生长因子(VEGF)的表达从而阻断肿瘤细胞诱导的血管生成^[60]; 体外抗肿瘤活性分析结果表明,

人参内生细菌代谢产物对人宫颈癌细胞 HeLa 的生长表现出显著的抑制作用^[61]。此外, 在内生细菌中还分离获得了胞外多糖(EPS)^[62], L-天冬酰胺酶^[63]等, 显示其在抗肿瘤药物研发中具有巨大的应用潜力。

4.3 生长调节类活性物质 植物激素是协调细胞活动并控制植物生长发育的信号分子, 内生细菌与其宿主植物的相互作用会影响植物激素的产生、调节植物对各种胁迫的反应^[64-65], 且在互作的过程中内生细菌也可以分泌多种植物激素, 如从决明子根中分离的假单胞菌、农杆菌和芽孢杆菌均具有产生植物激素的能力^[66]; 研究表明 IAA 合成缺陷型假单胞菌 GR12-2 不能促进植物根系生长和侧根形成, 说明细菌 IAA 对植物生长具有重要的调节作用^[67]; 红景天内生细菌 *Piechaudi* E6S 可以产生 IAA, 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)脱氨酶, 增加磷酸盐的溶解, 促进植物生长^[68]; 玉米内生细菌 *Azospirillum lipoferum* 可以产生脱落酸(ABA)和赤霉素(GA), 提高玉米对干旱胁迫的防御^[69]。

5 内生细菌资源的应用前景

5.1 生物防治 农药滥用在一定程度上导致多种病原微生物对常用抗菌剂产生耐药性, 开发使用新型生防制剂控制病原菌已成为农药研究的重要方向之一。由于内生细菌可以长时间定植在植物体内上, 其与病原菌竞争营养和生态位, 并诱导宿主植物产生系统抗性和防御信号, 从而可以有效、持续抑制病原菌和其他致病因子(如线虫和昆虫)^[70]的生长和入侵。目前已利用内生细菌资源研发了多种生物防治剂, 如利用香蕉根球茎内生菌可防治香蕉束顶病^[71], 枯草芽孢杆菌可控制甜菜作物的尾孢叶斑病^[72], 对美洲棉铃虫的防治效果也较明显^[73]。

同时, 由于内生细菌具有在植物体内定殖、繁殖、转移的特点, 使其成为了构建工程菌较理想的载体。通过对内生细菌进行改造可有效提升宿主植物的抗病能力, 从而达到更好的生物防治效果, 如将枯草芽孢杆菌的几丁质酶基因导入伯克氏菌 B418, 改造后的工程菌仍保持伯克氏菌的固氮、解磷、解钾和促生作用, 且显著提高对大丽花轮枝胞、立枯丝核菌、麦根腐长蠕胞、禾谷丝核菌的抑菌效果^[74]。

内生细菌作为生物防治制剂具有良好的作用效果及应用前景, 但目前研究多停留在实验室水平, 很少有大规模的投产与应用。主要原因包括,

①生物防治制受细菌的侵染率及外界环境干扰的影响,生防效果不稳定;②内生细菌的安全性及有效性评价体制仍不完善,使用生物制剂后土壤微环境的改变及其在宿主体内的定植情况难以预测;③内生细菌生防机制与传统农药作用机制不同,其生防机制主要是通过增强植株自身抵御能力,作用效果有限,因此,在今后的研究中,多种生防制剂的联合应用将成为生防制剂发展的重点研究方向。

5.2 生物降解 一些植物内生细菌可以通过降解土壤中的毒性物质、重金属从而达到修复土壤、减轻环境污染的效果,研究表明,内生细菌有许多胞内聚合物,具有吸附、沉淀等功能,能够使重金属离子的毒性最小化^[75];分离自重金属污染土壤生长的油菜根内生细菌G10和G16可以促进油菜对重金属Pb的吸收^[76];假单胞菌具有降解有机氯除草剂2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)的能力。经现代生物技术改造的工程菌可以提高内生细菌对土壤修复的治理能力,如洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)经基因改造后可大幅提高植物对甲苯降解能力,降低甲苯挥发^[77]。

5.3 新药源开发 内生细菌资源在抗癌、抗氧化、抗菌、抗炎和免疫抑制剂等药物研发中将发挥重要作用^[78],如从高良姜根中分离得到的LJK109可以产生3-甲基咪唑,其具有良好的抗炎作用,并以剂量依赖性方式抑制炎症介质NO, PGE₂, TNF- α , IL-1 β , IL-6和IL-10的巨噬细胞产生^[79]。

内生细菌可能存在与宿主植物相似的成分,如从半夏中分离得到的 *Bacillus cereus*, *Aranicolaproteolyticus*, *Serratia liquefaciens*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus licheniformis* 发酵液中含有与其宿主相似的生物碱类成分^[80];从龙舌兰中分离到的内生细菌可以产生与宿主植物化学结构相似的喜树碱(CPT)和9-甲氧基CPT(9-MeO-CPT)。此外,一些内生细菌也可以提高宿主植物活性成分的含量,如苍术荧光假单胞菌可以刺激植物活性氧(ROS)的产生,从而导致氧倍半萜类成分的增加^[81],上述研究将为中药活性成分合成生物学研究和中药资源的高效开发、利用提供一种新的研究思路。

6 中药内生菌资源及其次级代谢产物研究展望

6.1 以中药资源内生细菌作为重点研究对象,丰富内生细菌菌种资源库 现有的研究表明不同宿主材料及宿主生存的外部环境都是影响内生细菌多样性的重要因素。当前内生细菌资源的研究仍处

于初级阶段,关于内生细菌的研究多集中于农作物、特殊生境植物,作为中药资源的重要组成部分,相关研究缺较为滞后。内生细菌对中药材的生长发育、外观性状以及活性成分积累均有一定的影响,是导致药材品质差异的因素之一。内生细菌可能会产生与中药资源宿主功效相同或相似的次级代谢产物,可作为中药替代资源,对于濒危药材保护与深度开发具有重要意义。因此,在未来的研究中应当加强对中药内生细菌资源的发掘,构建中药内生细菌菌种资源库以及中药内生细菌活性化合物库,揭示内生细菌与药材间的相互作用关系,充分发挥内生细菌资源在名贵、濒危药材保护以及中药道地性研究中的重要作用。

6.2 建立内生菌高效分离培养方法 内生细菌菌种获得及筛选是中药内生菌资源研究和应用的前提和基础。由于内生菌具有特殊的生长环境,经典的细菌传统分离手段以及实验室培养条件往往会破坏其原生环境,使大部分细菌表现为“不可培养”,很大程度上限制了内生菌资源的开发。近年来,一些研究者开始尝试新的分离培养方法从而增加可培养微生物的种类,这些新方法主要包括对原生环境进行模拟以及结合分子生物学手段构建高通量分离方法,但仍不能满足内生菌培养需求。目前在该方向的研究较少,未来应模拟中药资源特有生境特征,构建多类型内生菌培养条件和培养体系,在获得丰富的内生菌菌株方面有突破性的进展。

6.3 优化内生细菌次级代谢产物的筛选及作用机制研究方法 当前内生细菌次级代谢产物的研究一定程度上也受制于体外培养条件的低仿真性。大量的研究表明,微生物次级代谢产物的产生与其所在环境具有密切的联系,内生细菌的体外培养与发酵过程往往难以复原宿主体内的微生态环境,从而导致难以分离得到真正的目的代谢物。未来中药内生细菌次级代谢产物研究应更多注重其与宿主生物的互作过程,通过构建体外互作模型、优化提取分离方法以及结合结构修饰与靶点预测等途径获得更准确更高效的目标代谢产物,进一步揭示内生细菌与宿主之间的相互作用关系。

6.4 扩大内生细菌资源的应用场景,推动产业化发展 从基础研究上,目前对植物和真菌内生细菌作用机制及应用的研究已成为国内外关注的科学热点。从应用研究上,利用内生细菌作为生物农药和生物肥料原料、以及作为新药源均显示出巨大的潜

在价值。随着分子药理学、生态学、生物学的发展,使内生细菌群落多样性分析、细菌与宿主间互作机制、内生细菌资源深度发掘成为可能。将基因组学、转录组学、代谢组学、表观组学等应用于内生细菌研究,有利于从多角度解读内生细菌的生物学功能,发现和挖掘内生细菌活性代谢产物,为新型药物及生防制剂的研发提供了新的创新点与突破口。我国中药资源丰富,但部分药材资源受制于生长周期长、生长发育机制不明确等因素,难以满足市场需求。内生细菌具有固氮、生成内源性植物激素、提高宿主抵抗胁迫能力等多种生物学功能,能够通过直接或间接的方式影响宿主的生长发育过程,这也为我国中药资源的开发与利用提供了新的思路。

[参考文献]

- [1] SANTOYO G, MORENO-HAGELSIEB G, OROZCO-MOSQUEDA M D C, et al. Plant growth-promoting bacterial endophytes[J]. Microbiol Res, 2016, 183(5): 92-99.
- [2] SENTHILKUMAR M, ANANDHAM R, MADHAIYAN M, et al. Endophytic bacteria: perspectives and applications in agricultural crop production [M]//Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems. Berlin Heidelberg: Springer, 2011.
- [3] MOSSE B. Honey-coloured, sessile endogone spores: II. changes in fine structure during spore development [J]. Archiv für Mikrobiologie, 1970, 74(3): 129-145.
- [4] 曹焜, 王晓楠, 孙宇峰, 等. 植物根部内生细菌多样性及其生防作用研究进展[J]. 农业与技术, 2017, 37(17): 1-3.
- [5] GARDNER J M, FELDMAN A W, ZABLOTOWICZ R M. Identity and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon roots of Florida citrus trees[J]. Appl Environ Microbiol, 1982, 43(6): 1335-1342.
- [6] 邱平生. 玉米内生细菌[J]. 微生物学通报, 2010, 37(10): 1566.
- [7] 袁志林, 潘雪玉, 靳微. 林木共生菌系统及其作用机制——以杨树为例[J]. 生态学报, 2019, 39(1): 381-397.
- [8] 何冬梅, 赖长江生, 严铸云, 等. 中药微生态研究与展望[J]. 中国中药杂志, 2019, 43(17): 3417-3430.
- [9] CHATURVEDI H, SINGH V, GUPTA G. Potential of bacterial endophytes as plant growth promoting factors [J]. J Plant Pathol Microbiol, 2016, 7(9): 376.
- [10] HALLMANN J, MAHAFFEE W F, KLOEPPER J W, et al. Bacterial endophytes in agricultural crops [J]. Canadian J Microbiol, 1997, 43(10): 895-914.
- [11] GLICK, BERNARD R. Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications[J]. Scientifica, 2012, (2012): 1.
- [12] BHATTACHARJEE R B, SINGH A, MUKHOPADHYAY S N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 80(2): 199.
- [13] NAUTIYAL C S, BHADARIA S, KUMAR P, et al. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils[J]. FEMS Microbiol Lett, 2000, 182(2): 291-296.
- [14] HEIJDEN M G A V D, BARDGETT R D, STRAALLEN N M V. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems[J]. Ecol Lett, 2008, 11(3): 296-310.
- [15] KHAN K S, JOERGENSEN R G. Changes in microbial biomass and P fractions in biogenic household waste compost amended with inorganic P fertilizers [J]. Bioresource Technol, 2009, 100(1): 303-309.
- [16] RADZKI W, MAÑERO F G, ALGAR, et al. Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2013, 104: 321.
- [17] PATTEN C L, GLICK B R. Role of pseudomonas putida indoleacetic acid in development of the host plant root system [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(8): 3795-3801.
- [18] LEVEAU J H, LINDOW S E. Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290 [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71: 2365.
- [19] SUN Y, CHENG Z Y, GLICK B R. The presence of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutation alters the physiology of the endophytic plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN [J]. FEMS Microbiol Lett, 2009(1): 1.
- [20] SHEORAN N, VALIYA NADAKKAKATH A, MUNJAL V, et al. Genetic analysis of plant endophytic *Pseudomonas putida* BP25 and chemoprofiling of its antimicrobial volatile organic compounds [J]. Microbiol Res, 2015, 173: 66.
- [21] MANDANA Z, SAEED A, HOSSEIN Z, et al. Characterization of a chitinase with antifungal activity from a native *Serratia marcescens* B4A [J]. Brazilian J

- Microbiol, 2011, 42(3): 1017-1029.
- [22] ZHANG D, SPADARO D, VALENTE S, et al. Cloning, characterization, expression and antifungal activity of an alkaline serine protease of *Aureobasidium pullulans* PL5 involved in the biological control of postharvest pathogens [J]. Int J Food Microbiol, 2012, 153(3): 453.
- [23] NIU D D, LIU H X, JIANG C H, et al. The plant growth-promoting Rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* by simultaneously activating salicylate- and jasmonate ethylene-dependent signaling pathways [J]. Mol Plant Microbe Interact, 2011, 24(5): 533-542.
- [24] FREY-KLETT P, BURLINSON P, DEVEAU A, et al. Bacterial-fungal interactions: Hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists [J]. Microbiol Mol Biol Rev: MMBR, 2011, 75(4): 583-609.
- [25] UEHLING J, GRYGANSKYI A, HAMEED K, et al. Comparative genomics of *Mortierella elongata*, and its bacterial endosymbiont, *Mycosporium cysteinexigens* [J]. Environ Microbiol, 2017, 19(8): 2964-2983.
- [26] SHAFFER J P, SARMIENTO C, ZALAMEA P-C, et al. Diversity, specificity, and phylogenetic relationships of endohyphal bacteria in fungi that inhabit tropical eeds and leaves [J]. Front Ecol Evol, 2016, 4: 116.
- [27] RUIZ-HERRERA J, VERA-NUÑEZ A, RUIZ-MEDRANO R, et al. A novel intracellular nitrogen-fixing symbiosis made by *Ustilago maydis*, and *Bacillus*, spp. [J]. New Phytologist, 2015, doi: 10.1111/nph.13359.
- [28] HOFFMAN M T, ARNOLD A E. Diverse bacteria inhabit living hyphae of phylogenetically diverse fungal endophytes [J]. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(12): 4063-4075.
- [29] GHIGNONE S, SALVIOLI A, ANCA I, et al. The genome of the obligate endobacterium of an AM fungus reveals an interphylum network of nutritional interactions [J]. ISME J, 2012, 6: 136-145.
- [30] LASTOVETSKY O A, GASPAR M L, STEPHEN J M, et al. "Lipid metabolic changes in an early divergent fungus govern the establishment of a mutualistic symbiosis with endobacteria [J]. Acad Sci, 2016, 113(52): 15102-15107.
- [31] FOSSALUNGA A S D, LIPUMA J, VENICE F, et al. The endobacterium of an arbuscular mycorrhizal fungus modulates the expression of its toxin-antitoxin systems during the life cycle of its host [J]. ISME J, 2017, 11: 2394-2398.
- [32] MONDO S J, LASTOVETSKY O A, GASPAR M L, et al. Bacterial endosymbionts influence host sexuality and reveal reproductive genes of early divergent fungi [J]. Nat Commun 2017, 8: 1843.
- [33] SPRAKER J E, SANCHEZ L M, LOWE T M, et al. *Ralstonia solanacearum* lipopeptide induces chlamydospore development in fungi and facilitates bacterial entry into fungal tissues [J]. ISME J, 2016, 10: 2317-2330
- [34] HOFFMAN M T, GUNATILAKA M K, KITHSIRI W, et al. Endohyphal bacterium enhances production of indole-3-acetic acid by a foliar fungal endophyte [J]. PLoS One, 2013, 8(9): e73132.
- [35] PAKVAZ S, SOLTANI J, BELBAHRI L. Endohyphal bacteria from fungal endophytes of the mediterranean cypress *Cupressus sempervirens*, exhibit, *in vitro*, bioactivity [J]. Forest Pathol, 2016, 46: 569.
- [36] PARTIDA-MARTINEZ L P, HERTWECK C. Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production [J]. Nature (London), 2005, 437(7060): 884-888.
- [37] DING T, PALMER M W, MELCHER U. Community terminal restriction fragment length polymorphisms reveal insights into the diversity and dynamics of leaf endophytic bacteria [J]. BMC Microbiol, 2013, 13(1): 1.
- [38] BARAC T, TAGHAVI S, BORREMANS B, et al. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants [J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(5): 583-588.
- [39] LODEWYCKX C, VANGRONVELD J, PORTEOUS F, et al. Endophytic bacteria and their potential applications [J]. Critical Rev Plant Sci, 2002, 21: 583.
- [40] SCHULZ B, WANKE U, DRAEGER S, et al. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods [J]. Mycol Res, 1993, 97(12): 1447-1450.
- [41] MA Y, PRASAD M N V, RAJKUMAR M, et al. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils [J]. Biotechnol Adv, 2011, 29(2): 248-258.
- [42] RAMYA S, ULAS K, MARINA V, et al. Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens [J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0117617.
- [43] ALAIN K, QUERELLOU J. Cultivating the

- uncultured: limits, advances and future challenges[J]. *Extremophiles*, 2009, 13(4):583.
- [44] TORSVIK V, ØVREÅS L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2002, 5(3):240-245.
- [45] HALLMANN J, MAHAFFEE W F, KLOEPPER J W, et al. Bacterial endophytes in agricultural crops [Review] [J]. *Canadian J Microbiol*, 1997, 43(10):895-914.
- [46] MA Y, RAJKUMAR M, ZHANG C, et al. Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation [J]. *J Environ Manage*, 2016, 174:14.
- [47] SESSITSCH A, HARDOIM P, DÖRING J, et al. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis [J]. *Mol Plant-Microbe Int*, 2012, 25(1):28-36.
- [48] SUN L, QIU F, ZHANG X, et al. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis [J]. *Microbial Ecol*, 2008, 55(3):415-424.
- [49] PICCOLO S L, FERRARO V, ALFONZO A, et al. Presence of endophytic bacteria in vitis vinifera leaves as detected by fluorescence in situ hybridization [J]. *Ann Microbiol*, 2010, 60:161.
- [50] YU H, ZHANG L, LI L, et al. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes [J]. *Microbiol Res*, 2010, 165(6):437-449.
- [51] GUO B Y, WANG Y, SUN X, et al. Bioactive natural products from endophytes: a review [J]. *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiya*, 2008, 44(2):153-158.
- [52] SASAKI T, IGARASHI Y, OGAWA M, et al. Identification of 6-prenylindole as an antifungal metabolite of *Streptomyces* sp. TP-A0595 and synthesis and bioactivity of 6-substituted indoles [J]. *J Antibiotics*, 2002, 55(19):1009-1012.
- [53] AREMU E A, FURUMAI T, IGARASHI Y, et al. Specific inhibition of spore germination of *Alternaria brassicicola* by fistupyrene from *Streptomyces* ssp. TP-A0569 [J]. *J General Plant Pathol*, 2003, 69(4):211-217.
- [54] 陶玲. 红树林植物内生放线菌 I07A-01824 发酵液中杀线虫活性成分的分离、纯化与鉴定 [J]. *中国医药生物技术*, 2012, 7(1):5-8.
- [55] TAECHOWISAN T, CHANAPHAT S, RUENSAMRAN W, et al. Anti-inflammatory effect of 3-methylcarbazoles on RAW 2647 cells stimulated with LPS, polyinosinic-polycytidylic acid and Pam3CSK [J]. *Adv Microbiol*, 2010, 2(2):98.
- [56] MILLER C M, MILLER R V, GARTON-KENNY D, et al. Ecomycins, unique antimycotics from *Pseudomonas viridiflava* [J]. *J Appl Microbiol*, 1998, 84(6):937-944.
- [57] ZHAO K, PENTTINEN P, GUAN T, et al. The Diversity and anti-microbial activity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants in panxi plateau, China [J]. *Current Microbiol*, 2011, 62(1):182-190.
- [58] STROBEL G A, HESS W M, FORD E, et al. Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity [J]. *J Industrial Microbiol Biotechnol (USA)*, 1996, 17:417-423.
- [59] SILVIA FIRÁKOVÁ, MÁRIA MARTA MÚKOVÁ, et al. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants [J]. *Biologia (Bratislava)*, 2007, 62(3):251-257.
- [60] JUNG H J, KIM Y, LEE H B, et al. Antiangiogenic activity of the lipophilic antimicrobial peptides from an endophytic bacterial strain isolated from red pepper leaf [J]. *Mol Cells*, 2015, 38(3):273-278.
- [61] 曲红光, 靳慧娟, 马丽伟, 等. 人参内生细菌的分离及其体外抗肿瘤活性分析 [J]. *中国妇幼保健*, 2014, 29(12):1926-1928.
- [62] LI C Y. Antitumor activity of bacterial exopolysaccharides from the endophyte *Bacillus amyloliquefaciens* sp. isolated from *Ophiopogon japonicus* [J]. *Oncol Lett*, 2013, 5(6):1787-1792.
- [63] JOSHI R D, KULKARNI N S. Optimization studies on L-asparaginase production from endophytic bacteria [J]. *Int J Appl Res*, 2016, 2:624-629.
- [64] MIGUEL A L, BANNENBERG G, CASTRESANA C. Controlling hormone signaling is a plant and pathogen challenge for growth and survival [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2008, 11(4):420-427.
- [65] GLICK BERNARD R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications [J]. *Scientifica*, 2012, doi:10.6064/2012/963401.
- [66] KUMAR V, KUMAR A, PANDEY K D, et al. Isolation and characterization of bacterial endophytes from the roots of *Cassia tora* L [J]. *Ann Microbiol*, 2015, 65:1391.
- [67] PATTEN C L, GLICK B R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002,

- 68(8):3795-3801.
- [68] YING M, CHANG Z, OLIVEIRA R S, et al. Bioaugmentation with endophytic *Bacterium* E6S homologous to *Achromobacter piechaudii* enhances metal rhizoaccumulation in host sedum *plumbizincicola* [J]. *Frontiers Plant Sci*, 2016, doi: 10.3389/fpls.2016.00075.
- [69] COHEN A C, TRAVAGLIA C N, BOTTINI R, et al. Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic, *Azospirillum*, in the alleviation of drought effects in maize [J]. *Botany*, 2009, 87 (5) : 455-462.
- [70] ZABALGOGEAZCOA I. Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens[J]. *Span J Agric Res*, 2008, doi:10.5424/sjar/200806S1-382.
- [71] HARISH S, KAVINO M, KUMAR N, et al. Induction of defense-related proteins by mixtures of plant growth promoting endophytic bacteria against banana bunchy top virus[J]. *Biol Control*, 2009, 51(1):16-25.
- [72] REITER B, BÜRGMANN H, BURG K, et al. Endophytic nifH gene diversity in African sweet potato [J]. *Canadian J Microbiol*, 2003, 49(9):549-555.
- [73] RAJENDRAN L, SAMIYAPPAN R, RAGUCHANDER T, et al. Endophytic bacteria mediate plant resistance against cotton bollworm[J]. *J Plant Int*, 2007, 2(1):1.
- [74] 黄玉杰,杨合同,周红姿,等. 芽孢杆菌几丁质酶基因的克隆、序列分析及其在伯克氏菌 B418 中的表达 [J]. *中国生物防治*, 2006, 22(1):72-77.
- [75] RAJKUMARA M, PRASADB M N V, SWAMINATHANA S, et al. Climate change driven plant-metal-microbe interactions [J]. *Environ Int*, 2013, 53:74-86.
- [76] SHENG X F, XIA J J, JIANG C Y, et al. Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape[J]. *Environ Poll*, 2008, 156(3) : 1164-1170.
- [77] BARAC T, TAGHAVI S, BORREMANS B, et al. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants[J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(5):583-588.
- [78] KORKINA L G. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: From plant defense to human health[J]. *Cellular Mol Biol(Noisy-le-Grand, France)*, 2007, 53(1):15-25.
- [79] TAECHOWISAN T, CHANAPHAT S, RUENSAMRAN W, et al. Anti-inflammatory effect of 3-methylcarbazoles on RAW 2647 cells stimulated with LPS, polyinosinic-polycytidylic acid and Pam3CSK[J]. *Adv Microbiol*, 2012, 2:98.
- [80] LIU Y, LIU W, LIANG Z. Endophytic bacteria from *Pinellia ternata*, a new source of purine alkaloids and bacterial manure[J]. *Pharm Biol*, 2015, 53(10):1545-1548.
- [81] ZHOU JY, YUAN J, LI X, et al. Endophytic bacterium-triggered reactive oxygen species directly increase oxygenous sesquiterpenoid content and diversity in *Atractylodes lancea* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 82(5):1577-1585.

[责任编辑 顾雪竹]