

郭宾会. 植物内生菌的生态学作用与天然产物研究现状及展望[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(20): 13-19.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.20.004

植物内生菌的生态学作用与天然产物研究现状及展望

郭宾会

(扬州大学生命科学基础实验教学中心, 江苏扬州 225009)

摘要:植物内生菌是指生活史中某一时期生活在植物内而对植物组织没有引起明显病害症状的一类微生物。内生菌普遍存在于多种植物中, 具有丰富的生物多样性。近年来, 内生菌内逐渐发现一些天然活性代谢产物, 并了解到其较为重要的生理、生态学作用。基于科研工作者对内生菌研究的关注, 主要就国内外在内生菌的多样性、内生菌与宿主植物的生态学作用、内生菌一些重要的活性代谢产物等方面的研究进展及报道进行综合评述, 并对目前内生菌研究所存在的问题和展望进行讨论, 以期对现在内生菌的研究有所借鉴, 在原有的基础上有所突破。

关键词:植物内生菌; 生物多样性; 生物防治; 代谢产物; 生态学作用; 固氮作用; 生物降解; 宿主植物

中图分类号:Q143+.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)20-0013-06

内生菌(endophyte)一词由德国科学家 de Bary 首先提出, 是指生活在植物组织内的微生物, 用以区分那些生活在植物表面的附生菌(epiphyte)^[1]。后来, “内生菌”这一词汇的定义和解释先后多次被不同的研究人员修改和解释。Petrini 将“内生菌”定义为那些在其生活史中的某一段时期生活在植物内而对植物组织没有引起明显病害症状的菌, 这个定义包括那些在其生活史中的某一阶段营附生的腐生菌和对宿主暂时无伤害的潜伏性病原菌(*Latent pathogens*)和菌根菌^[2]。Bills 认为, 一些类型的菌根菌, 如内外生菌根菌、杜鹃菌根菌和假菌根菌等也应归类为内生菌^[3]。尽管目前关于内生菌的概念范畴还有争议, 但 Petrini 的观点得到普遍认可^[4]。不过, 须要指出的是内生菌只是一个生态学上的概念, 而非分类学单位。

内生菌主要包括内生真菌、内生细菌、内生放线菌三大类微生物^[5]。对内生菌的分离和研究工作主要集中在内生真菌(endophytic fungi)方面。植物内生真菌多数属于双核菌门子囊菌亚门中的核菌纲(Pyrenomyetes)、盘菌纲(Discomycetes)和腔菌纲(Loculoascomycetes)及其无性态的多种真菌, 也包括少数担子菌(Basidiomycotina)和接合菌(Zygomycotina), 主要分布于植物的叶鞘、种子、花、茎、叶片和根等组织、器官的细胞或细胞间隙^[6-7]。内生真菌的传播途径一方面通过菌丝生长进入子房和胚珠, 经寄主植物种子传播, 或者产生孢子, 通过风、降水等途径传播^[8]。

关于内生菌的研究最早可追溯至 1833 年从小麦叶片中发现的不明锈状物, 其后来被证实为真菌的一种结构。Wilson 从黑麦草(*Lolium temulentum* L.)的种子内分离出第 1 株内生真菌^[9], 至今关于内生菌的研究已经有 100 多年的历史。经过科学家们长期以来的工作积累, 内生菌的研究已经

奠定了比较深厚的基础, 内生菌在菌种的分离与鉴定中对宿主植物的侵染及相互作用、内生菌株的培养及代谢产物的提取等方面都已经建立了行之有效的方法。基于科研工作者对内生菌研究的关注, 笔者主要就国内外在内生菌的多样性、内生菌与宿主植物的生态学作用、内生菌相关重要的活性代谢产物等方面的研究进展及报道进行综合评述, 并对目前内生菌研究所存在的问题和展望进行讨论, 以期对现在内生菌的研究有所借鉴, 在原有的基础上有所突破。

1 内生菌的多样性

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, 具有丰富的生物多样性。研究发现, 对于一种植物而言, 从中可分离到的内生真菌和(或)细菌通常为数十种至几十种, 有的甚至多达数百种^[10]。在热带雨林中, 同一植物内生菌的种类多样性更为突出。Anorl 等分析了巴拿马中部雨林中 2 种植物叶子中的内生菌, 结果发现, 分离自 83 个健康叶片上的内生菌多达 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^[11]; Suryanarayanan 等研究了 Nilgiri 生物圈保护区里分属于 17 科的 24 株树木中内生菌的分布和多样性, 总共分离到 81 个不同的内生菌^[12]; Suryanarayanan 等继续研究了位于美国亚利桑那州不同地理位置的 21 种仙人掌中的内生菌, 结果分离到 900 个内生菌, 分属于 22 个不同的种^[13]。Glynou 等最新的一项研究证实, 185 株植物根部的内生真菌分属于 5 个不同的执行分类单元^[14]。现代分子系统学研究也表明, 许多形态学上一致的同一种内生菌往往还具有多样化的遗传型^[15-17], 进一步丰富了内生菌的多样性。考虑到内生菌对宿主的专一性, 按照现在已经知道的地球上超过 25 万种植物统计, 微生物学家 Hawksworth 等指出, 地球上内生菌的种类应该在 100 万左右, 然而有记录的仅占其中的十分之一^[18]。随着新物种的发现和证据积累, 人们对内生菌总数的估计也在不断改变。Dreyfuss 等估计, 地球上仅内生真菌就至少有 100 万种^[19]。2001 年, Hawksworth 在他的研究报告中指出, 热带植物中的内生真菌种类应该能达 150 万

收稿日期: 2018-06-25

基金项目: 扬州大学人才启动项目(编号: 137011195)。

作者简介: 郭宾会(1970—), 男, 山东东营人, 博士, 实验师, 主要从事植物/微生物代谢调控与天然产物研究。E-mail: bhguo@yzu.edu.cn。

种^[20];同年,Arnold 等在研究了新热带地区的 9 种林木后推断,热带植物中的内生真菌 150 万种的数量可能被低估了^[21]。

影响内生菌多样性的因素很多。Arnold 等的研究表明,寄居于热带地区植物宿主中的内生菌的种类和数量要远高于温带地区植物中的种类和数量^[11,22]。Seena 等研究分析了海滩沙丘上生长的 2 种豆科植物小刀豆(*Canavalia cathartica*)和海刀豆(*C. maritima*)不同的发育时期,种子、幼苗、成熟植株及不同的组织(子叶、种皮、根、茎和叶)中的内生真菌情况,他们采用平板培养的方法,在麦芽琼脂培养基上共分离得到包括子囊菌和接合菌在内的 46 种内生真菌;在不同的发育阶段和组织材料中,内生真菌主要(>90%)分布在苗期和成熟的组织如根、茎和叶中;研究还发现小刀豆中内生真菌的种类和数量高于海刀豆中的内生菌^[23]。Muller 等研究表明,开始腐烂的挪威云杉针叶中内生真菌的种类比正常生理状态下针叶中内生真菌的种类急剧下降^[24];Danti 等研究发现,当用十二烷基磺酸钠盐(SDBS, sodium dodecylbenzene sulphonate)气雾剂对欧洲山毛榉(*Fagus sylvatica* L.)的嫩枝长时间处理以后,也观察到植物体内内生真菌的种类和数量下降的现象^[25];Rasmussen 等研究表明,多年生黑麦草(*Lolium perenne*)在高氮和高糖条件下其共生内生真菌的浓度及生物碱产量都大幅度下降^[26]。Gao 等采用 RFLP 和 rDNA ITS 文库序列分析等分子生物学手段,在研究百合科植物肖菝葜(*Heterosmilax japonica* Kunth)不同季节里内生菌的分布情况后,发现,肖菝葜(*Heterosmilax japonica* Kunth)中内生菌在春季的丰度高于秋季^[27]。众多研究表明,内生菌多样性的影响因素与宿主植物所处的地球纬度、地理方位、具体的小生态环境和季节因素等有关,而且宿主植物的不同器官、组织,生长周期中不同的发育阶段,植物材料的不同处理等均可影响到植物体内寄居的内生菌数量和种类。

2 植物-内生菌的生态学作用

植物与内生菌的关系在多数情况下是共生互惠的。一方面植物体作为内生菌的宿主,为后者提供了生活、栖息的环境;另一方面很多内生菌能够产生大量的活性代谢产物^[28-29],这些物质在某种程度上对植物的生长、发育及逆境环境(如干旱胁迫、病害和虫害等)的抗逆等方面起到了重大的生态学作用。

2.1 内生菌的固氮作用

作为植物生长的大量元素之一,氮对植物而言是必需的。空气中约 80% 的氮气不能被植物直接利用,只有固氮微生物具有将氮气转化成氨的能力,人们称为生物固氮。据联合国粮农组织(FAO) 1995 年粗略估计,全球每年由生物固定的氮量约占全球植物需氮量的 3/4。从 1862 年发现生物固氮现象到目前为止,生物固氮的研究已经有 100 多年了,其间的研究领域涉及到形态结构、细胞水平、分子水平及遗传等诸多领域。其中,在农业生产应用上较广泛、意义较重要的固氮资源主要是豆科植物共生固氮、红萍和固氮蓝藻、结瘤的非豆科植物、联合固氮和自生固氮等^[30]。

某些作物(如水稻和甘蔗等)体内内生固氮菌的发现,为作物生物固氮增添了新途径。Baldani 等报道,从玉米、水稻

和高粱的根部均分离出固氮细菌织片草螺菌(*Herbaspirillum seropedicae*)^[31]。此后,他们又相继从多年生作物甘蔗根茎分离到一些具有独特生理生态特征的固氮菌,这类固氮菌即内生固氮菌,它们可提供给宿主相当数量的氮素,在土壤中不能生存或生存能力很差,但能以相当高的数量存在于植物组织内,并不会引起宿主任何不良反应。Barraquio 等研究报道,从菲律宾湿地水稻根、茎中成功分离到具有固氮能力的内生菌^[32]。Robert 等从巴西产的甘蔗中分离出多株内生固氮菌醋杆菌(*Gluconacetobacter diazotrophicus*)、织片草螺菌、接种草螺菌(*H. rubrisubalbicans*)和伯克霍尔德菌(*Burkholderia* sp.)^[33]。固氮弧菌属(*Azoarcus* sp.) 株系 BH72 是一类能够为水稻和其他草类植物提供生物固氮能力的内生菌,Krause 等完成了对该内生菌的全基因组测序,他们研究结果表明,BH72 株系基因组全长为 4 376 040 个碱基对,含 3 992 个可预测的蛋白编码序列,这为今后从分子水平上了解该类内生菌的固氮机制打下了基础^[34]。

生物固氮是生命科学中的重大基础研究课题之一,它在生产实际中发挥着重要作用,即为植物特别是粮食作物提供氮素、提高产量、降低化肥用量和生产成本、减少水土污染和疾病、防治土地荒漠化、建立生态平衡和促进农业可持续发展。内生固氮菌的发现为生物固氮的研究增添了新的内容。

2.2 内生菌的生物降解及生物防治作用

近代工业的发展不可避免地造成了土壤和水资源的污染,导致环境的恶化及生物多态性的降低,其影响程度有越来越严重的趋势。为了降低种种不利因素对环境和资源的人为破坏,生态学家们提出了多项保护环境资源的有利措施,其中利用微生物或植物内生菌对环境中的污染物进行生物降解或取代化学药剂对植物病虫害进行有效防治成为生物学家和生态学家研究的热点之一,并取得了较好的进展。

研究表明,植物内生菌对周围环境中的毒素起到部分的降解作用。爱荷华州立大学的一项研究证实,1 株新发现的植物内生菌 *Methylobacterium populum* sp. BJ001 能有效降解三硝基甲苯(TNT)和硝基三嗪(HMX)等化合物^[35-36]。改造过的内生菌洋葱伯克氏菌(*Burkholderia cepacia*) VM1330 能够增加宿主植物对甲苯的忍受能力和降低植物向外界大气环境释放甲苯的能力^[37]。在抵御植物病虫害方面,Coombs 等研究表明,一些从健康的谷类作物中分离到的内生细菌经离体、活体试验证实能够有效抑制引起植物根部病变的致病真菌,38 株不同的内生菌中有 64% 的菌株被证实至少对某一种真菌有强烈的抑制作用,4 种内生菌具有较强的广谱抗菌作用^[38]。Cao 等从表面杀过菌的香蕉根部成功分离出 131 株内生放线菌,其中 18.3% 的分离菌能抑制植物致病菌香蕉枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)的生长^[39]。丁婷等研究证实,杜仲内生真菌抗性突变株 DZJ07-2 能诱导小麦植株根部的多酚氧化酶、过氧化物酶和苯丙氨酸酶的活性提高,从而增强小麦对纹枯病的抗性^[40]。相关研究表明,植物内生菌在一定程度上能很好起到生物防治的作用,对生态环境的保护和可持续资源的利用开发有着潜在的深远意义。

2.3 内生菌对宿主植物生长的促进作用和对环境胁迫的抗性

内生菌对宿主植物生长的促进作用主要因素为:一方面

许多内生菌可产生 IAA、GA 以及细胞激动素等植物生长激素;另一方面内生菌可增进宿主植物对氮、磷等营养元素的吸收。禾本科农作物如水稻、甘蔗、玉米、高粱上的内生细菌具有很强的固氮能力^[31-34],感染内生真菌的牧草对氮、磷的摄取能力也有所提高^[41-43],另外感染内生菌的牧草、玉米对环境胁迫如干旱^[44-45]以及铝的毒害^[46]等具有更强抗性,揭示出其内在生理、生态学方面的多效作用。Marquez 等研究证实,一种热带草 *Dichantheium lanuginosum* 及其内生真菌突弯孢霉 (*Curvularia protuberata*) 的共生关系可使双方能在 65 ℃ 的地热温度下存活,而分离来的 2 种生物在 38 ℃ 以上就无法生长了;研究结果还表明,某种病毒分子在植物与内生菌的共生关系中起着至关重要的作用^[47]。陈水红等评述了内生真菌对宿主禾草植物抗盐碱性影响的研究,指出内生真菌具有促进禾草分泌抗氧化剂、增强抗氧化酶活性和调节有机渗透物质的作用^[48]。

众多的研究表明,植物内生菌何以产生诸如固氮作用、促生作用、提高对环境的胁迫抗性等生态学功能与内生菌产生丰富多样的具有生物活性的代谢产物密不可分。

3 植物内生菌的活性代谢物质

植物内生菌可产生丰富多样的具有生物活性的代谢产物,按其功能主要分为抗生素类、杀虫剂类、抗肿瘤物质及其他类等。

3.1 抗生素类

抗生素是一类由微生物产生的具有极高活性的小分子量天然产物,在非常低的浓度下即可抑制、杀死其他类微生物。自 1928 年 Alexander Fleming 发现第 1 例抗生素——青霉素至今,人们对抗生素的研究和利用已经超过 180 多年的历史了。近来研究表明,从植物中分离的内生菌也可产生具有天然功效的抗生素类物质。

cryptocandin 是 Strobel 等从卫矛科著名药用植物雷公藤中分离到的 1 株内生真菌 *Cryptosporiopsis quercina* 中分离提取的 1 种独特的抗菌多肽,试验证明其对一些人类真菌病原体如白色念珠球菌 (*Candida albicans*) 和发癣菌属 (*Trichophyton* spp.)、植物致病真菌菌核菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 和灰霉菌 (*Botrytis cinerea*) 等均具有高效的抑制、杀死活性^[49]。目前,cryptocandin 及其相关产品已经被应用于真菌引起的人类皮肤病和指甲炎的治疗。Miller 等从 1 种内生于草本植物叶中的假单胞菌 *Pseudomonas viridiflava* 中分离出分子量为 1 153 和 1 181 的脂多肽类物质 ecomycins,该多肽除了含正常的氨基酸外,还有高丝氨酸等特别氨基酸参与其结构组成。研究证明,ecomycins 对人类致病真菌如新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*) 和白色隐球菌 (*C. albicans*) 等具有生理抗性^[50]。研究人员从黄花蒿和蒙古蒿的茎内分离到 10 多种内生真菌,其体外培养液的乙酸乙酯提取物几乎全部含有抗瓜枝孢 (*Cladosporium cucumerinum*) 和黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 2 种真菌的代谢产物。从其中 2 株炭疽菌 (*Colletotrichum* spp.) 的发酵物中分离出了一系列对人畜和植物病原真菌和(或)细菌有良好抑制作用的化合物,其最低抑菌浓度 (MIC, minimal inhibitory concentration) 值一般在 10 ~ 60 μg/mL,分离出的炭疽菌酸 (colletotric acid) 等 3 种活性物

质是首次报道的新化合物^[51-52]。Singh 等从 1 株未鉴定的内生真菌 CR115 的发酵液中分离到 1 个二萜化合物 guanacastepene,该化合物对多种革兰氏阳性和阴性细菌以及白色念珠菌有活性^[53]。Castillo 等研究分析了从植物蛇藤中分离出来的 1 株内生链霉菌株 NRRL 30562,他们通过质谱、高效液相色谱 (HPLC) 及病理等试验发现,该菌株溶剂抽提物中含有多种具有广谱抗性的化合物,研究表明,这些化合物对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都有明显抗性,同时还发现植物致病真菌终极腐霉 (*Pythium ultimum*) 对该类化合物敏感^[54]。

从内生真菌中分离提取的抗生素类物质的另一奇妙功效是对病毒的抑制作用。Guo 等成功地从内生真菌 *Cytospora* sp. 的固相发酵物中提取出 2 种新型的人细胞巨化病毒 (cytomegalovirus) 蛋白酶抑制剂 cytonic acids A 和 cytonic acids B^[55]。

3.2 杀虫剂类

禾本科植物内生真菌能产生多达数十种的生物碱,这些生物碱具有抗病原菌、抗线虫、增强植物他感作用等多种生物学活性,其中大多数对食草昆虫乃至哺乳动物(牛和羊等)具有较强的毒性^[56]。

nodulisporic acids 是一类新型的呋喃二萜,它对产卵于腐烂创口的大苍蝇幼虫具有很强的杀死作用。第 1 个 nodulisporic 化合物是从植物 *Bontia daphnoides* 中分离出的 1 株内生真菌多节孢属 (*Nodulisporium* sp.) 中分离到的^[57]。此项发现也推动了人们更广泛的研究,意在寻求更多的多节孢属或是功效更大的 nodulisporic acids 类似物。Daisy 等研究发现,1 株从藤蔓植物 *Paullina paullinioides* 中分离到的内生真菌 *Muscodora vitigenus* 发酵液的主要成分是萘 (naphthalene),一种被广泛应用的驱虫剂——樟脑球的主效成分。同时,*M. vitigenus* 被证实对小麦茎秆叶蜂 (*Cephus cinctus*) 有强烈的驱除功效^[58]。Ju 等从内生菌感染的 1 种早熟禾 (*Poa ampla*) 中分离到数个对蚊子幼虫有毒性的黄酮类化合物^[59]。

生物制剂杀虫剂虽然生产的量不多,但由于其在生态学领域的优越性和世界各国对生态环境保护的日益重视,其所占市场份额正在逐年增加。

3.3 抗肿瘤物质

自从 1993 年 Stierle 等首次从太平洋红豆杉中分离出第 1 株产紫杉醇的内生真菌 *Taxomyces andreanae* 以来^[60],科学家们对从内生真菌中分离提取高效抗癌活性物质充满了浓厚的兴趣,他们投入了大量的精力和物力来开展这方面的研究并取得了一些重大的进展。

单就产紫杉醇的内生真菌而言,自第 1 株内生真菌 *T. andreanae* 报道至今,先后有不同的科学家从不同的植物中分离到不同种属的内生真菌,经多重试验证明,一些内生真菌的发酵产物中含有高效抗癌活性物质紫杉醇^[61-63]。研究人员已从南方红豆杉 (*T. chinensis* var. *mairei*) 中成功分离到 1 株新的内生真菌 BT2 (*Ozonium* sp.), 经 HPLC-MS 等试验证实其发酵产物中有紫杉醇及其前体 Baccatin III 的存在^[64]。

torreyanic acid 是一种抗癌的选择性细胞毒素醌二聚物。Lee 等从美洲濒临灭绝的树木 *Taxus taxifolia* 中分离到 1 株内生菌 *Phylum microspora*, 从中分离提取出 torreyanic acid, 在不

同的肿瘤细胞系中验证,它对于那些对蛋白激酶 C 敏感的肿瘤细胞系高出其他细胞系 5 ~ 10 倍的功效,通过引起细胞凋亡最终导致肿瘤细胞的死亡^[65]。

生物碱是另一大类抗癌物质,除了从植物次生代谢产物提取外,内生真菌中也常有报道。一些真菌如炭角菌属(*Xylaria*)、茎点霉属(*Phoma*)、炭团菌属(*Hypoxylon*)和横截霉菌属(*Chalara*)等菌属是生产诸如细胞松弛素类(cytochalasins)物质的典型代表。它们产生的许多化合物具有抗肿瘤活性和抗菌活性,只是由于它们本身对细胞具有毒性而还没有被应用到医药中^[28]。Wagenaar 等从来源于传统药用植物雷公藤(*Tripterygium wilfordii*)的内生菌喙枝孢属(*Rhinochlaidiella* sp.)中发现了 3 种新的细胞松弛素,试验结果表明,它们对多种人肿瘤细胞有很强的抑制作用^[66]。

长春碱(vinblastine)和长春新碱(vincristine)是与紫杉醇相类似的吲哚生物碱,对淋巴瘤和白血病有显著疗效,20 世纪 60 年代初就在美国上市。但在抗癌药用植物长春花中,长春碱和长春新碱含量非常低,无法大量生产。郭波等从长春花中分离出能产生长春碱和长春新碱的内生真菌^[67-68]。Kumar 等也从长春花中分离到 1 株产长春碱和长春新碱的尖孢镰刀菌 AA - CRL - 6^[69]。Palem 等从长春花中分离到的 22 株内生菌中找到 1 株产长春碱和长春新碱的内生真菌 CrP20^[70]。这些研究为用内生真菌生产长春碱开辟了新途径。

近年来,从植物内生真菌特别是药用植物内生真菌中寻找抗癌活性化合物的研究方兴未艾,从中发现分离到的抗肿瘤活性成分至少有数十种,其活性成分从已知结构到全新结构都有报道^[71-73]。来源于不同植物的内生真菌能够产生多种抗肿瘤活性物质为寻找新的抗肿瘤活性成分开辟了新的途径,因此具有非常广阔的研究前景。

3.4 其他类型的活性产物

Lee 等报道,自药用植物雷公藤分离的镰孢菌属内生真菌顶腐病菌(*Fusarium subglutinans*)能产生 1 种非细胞毒的二萜吡酮类化合物 Subglutanol A 和 Subglutanol B。试验证明,二者都具有免疫抑制活性^[74]。在混合淋巴细胞反应(mixed lymphocyte reaction, MLR)和胸腺细胞增殖(thymocyte proliferation, TP)评价系统的 IC₅₀都为 0.1 μmol/L。与环孢菌素 A(cyclosporin A)相比较,MLR 系统分析发现二者的活性与其相当,而 TP 试验结果则显示环孢菌素 A 的活性比前者高 104 倍。但因为 Subglutanol A 和 B 缺乏细胞毒性,所以二者仍具有应用前景。

Zhang 等从靠近刚果首都金沙萨的非洲热带雨林植物中分离到内生真菌 *Pseudomassaria* sp.,并从中分离提取出 1 种非肽类代谢物(L - 783, 281),该物质具有类似胰岛素的作用,能显著降低小鼠血液中葡萄糖的含量。因该化合物在口服时不被胃肠道酶破坏、生物利用度高,因而有望开发成口服类似胰岛素药物^[75]。

Harper 等从巴布亚新几内亚生长的植物榄仁树(*Terminalia morobensis*)的内生真菌 *P. microspora* 中分离到了 2 种化合物 pestacin 和 isopestacin。试验证实,二者既具有抗菌活性,又有抗氧化活性。pestacin 是一种消旋体,试验发现其抗氧化活性至少比奎诺二甲基丙烯酸酯(trox, 维生素 E 的派生物)大 1 个数量级。isopestacin 的结构与黄酮类物质

(flavanoids)相似,在缓冲液中,它可以消除超氧自由基和羟基自由基^[76]。

丰富多样的内生菌活性代谢产物的发现,激发了研究者更大的研究兴趣,也进一步拓宽了从自然界中提取新物质的渠道。

4 植物内生菌研究存在的问题与展望

目前,对植物内生菌的研究还处于早期水平,研究的植物类群不过数百种,相对于数量庞大的内生菌种类来说,仅涉及了其中很小一部分。由于研究的角度、内容不尽相同,因此不同学者也提出了一些不同的观点。王志伟等认为,由于缺少可靠的试验数据支持,内生菌的数量在 100 万种以上的说法有待商榷^[77-78]。植物内生菌及其代谢产物的研究虽然取得了一定的成果,但其中也发现不少问题,主要表现在以下几个方面:(1)即使用不同营养的培养基,也不能保证所有生活在植物组织内的内生菌能够全部被分离出来,专性寄生内生菌不能在人工培养基上生长;同时,一些生长缓慢的内生菌由于受快速生长的内生菌的抑制也往往被遗漏。(2)内生菌的鉴定较为困难。虽然有时分离到内生菌,但是有的菌株在人工培养基上不会产生孢子。从已有的研究结果来看,不产孢菌株数占总菌株数的比例高达 41.3%,这些不产孢菌株是无法用传统的形态学方法来进行鉴定的^[4]。(3)内生菌次生代谢产物种类多但每个种类产量甚微,加大了新化合物分离的难度,容易出现漏失。即使分离到一些新化合物,往往因为量少,不足以完成结构鉴定和活性测定的需要,导致分离物无法定性。

正是这些不足和问题的存在,促使研究者在更广的领域对植物内生菌进行更深的研究:(1)在内生菌的分离与鉴定方面,随着科学技术的不断进步,指纹图谱分析、DGGE、DNA - DNA 杂交及 G + C 的摩尔比例测定等分子生物学方法已经被用来分析一些不可培养型内生菌群落的结构及差异^[27,78],内生菌的生物多样性也扩展了。(2)在次生代谢产物方面,内生菌有无在长期的进化过程中形成与宿主植物的协同代谢或基因的诱导表达来产生新的生物活性物质和接受外在调控,这些都是值得研究和让人期待的。(3)有关植物内生菌的起源和系统进化、内生菌在宿主中的种群组成和相互关系、内生菌与宿主植物对外在环境的作用机制等方面尚待更深入的研究。

植物内生菌是个巨大的微生物新资源,具有重要的工农业生产与医药应用潜力。从特殊生境植物和传统的药用植物内生菌次生代谢产物中筛选具有药用价值的活性物质或新型化合物以创制新药,解决自然资源不足、开发紧缺药物及新型药物,将在很大程度上丰富人类的药物宝库。同时,植物内生菌通过生物固氮、调节植物激素等作用促进宿主植物的生长和产量增加,以及对病虫害的生物防治和对污染土壤的生物修复作用,减少了化肥和化学药剂的使用,对全球农业的可持续发展具有深远的意义。

参考文献:

- [1] de Bary A. Morphologie und physiologie der pilze, flechten und Myxomyceten[M]. Leipzig: Engelmann, 1866.

- [2] Petrini O. Fungal endophytes of tree leaves[M]. Heidelberg: Springer – Verlag, 1991.
- [3] Bills G F. Isolation and analysis of endophytic fungal communities from wood plants[M]. St Paul: APS Press, 1996: 31 – 65.
- [4] 郭良栋. 内生真菌研究进展[J]. 菌物系统, 2001, 20(1): 148 – 152.
- [5] 邓墨渊, 王伯初, 杨再昌, 等. 分子生物学技术在植物内生菌分类鉴定中的应用[J]. 氨基酸和生物资源, 2006, 28(3): 9 – 14.
- [6] Cerkaskas S J B. Endophytic colonization by fungi[M]. St Paul: APS Press, 1996.
- [7] Fisher P J, Petrini O, Petrini L E, et al. Fungal endophytes from the leaves and twigs of *Quercus ilex* L. from England, Majorca and Switzerland[J]. New Phytologist, 1994, 127(1): 133 – 137.
- [8] 李明. 植物内生真菌[J]. 生物学教学, 2003, 28(5): 1 – 3.
- [9] Wilson A D. Resources and testing of endophyte – infected germplasm in National grass repository collections [M]. St Paul: APS Press, 1996.
- [10] 邹文欣, 谭仁祥. 植物内生菌研究新进展[J]. 植物学报, 2001, 43(9): 881 – 892.
- [11] Arnold A E, Maynard Z, Gilbert G S, et al. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? [J]. Ecology Letters, 2000, 3(4): 267 – 274.
- [12] Suryanarayanan T S, Venkatesan G, Murali T S. Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees: diversity and distribution patterns[J]. Current Science, 2003, 85(4): 489 – 493.
- [13] Suryanarayanan T S, Wittlinger S K, Faeth S H. Endophytic fungi associated with cacti in Arizona[J]. Mycological Research, 2005, 109(5): 635 – 639.
- [14] Glynou K, Ali T, Kia S H, et al. Genotypic diversity in root – endophytic fungi reflects efficient dispersal and environmental adaptation[J]. Molecular Ecology, 2017, 26(18): 4618 – 4630.
- [15] Carroll M C C. Genotypic diversity in populations of a fungal endophyte from Douglas Fir[J]. Mycologia, 1993, 85(2): 180 – 186.
- [16] Lappalainen J H, Yli – Mattila T. Genetic diversity in Finland of the birch endophyte *Gnomonia setacea* as determined by RAPD – PCR markers[J]. Mycological Research, 1999, 103(3): 328 – 332.
- [17] 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[J]. Mycologia, 1998, 90(1): 108 – 117.
- [18] Hawksworth D L, Rossman A Y. Where are all the undescribed fungi? [J]. Phytopathology, 1997, 87(9): 888 – 891.
- [19] Dreyfuss M M, Chapela I H. Potential of fungi in the discovery of novel, low – molecular weight pharmaceuticals[M]. London: Butterworth – Heinemann, 1994.
- [20] Hawksworth D L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited [J]. Mycological Research, 2001, 105(12): 1422 – 1432.
- [21] Arnold A E, Maynard Z, Gilbert G S. Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity [J]. Mycological Research, 2001, 105(12): 1502 – 1507.
- [22] Fröhlich J, Hyde K D. Biodiversity of palm fungi in the tropics: are global fungal diversity estimates realistic? [J]. Biodiversity & Conservation, 1999, 8(7): 977 – 1004.
- [23] Seena S, Sridhar K R. Endophytic fungal diversity of two sand dune wild legumes from the southwest coast of India [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2004, 50: 1015 – 1021.
- [24] Muller M M, Valjakka R, Suokko A, et al. Diversity of endophytic fungi of single Norway spruce needles and their role as pioneer decomposers[J]. Molecular Ecology, 2001, 10(7): 1801 – 1810.
- [25] Danti R, Sieber T N, Sanguinetti G, et al. Decline in diversity and abundance of endophytic fungi in twigs of *Fagus sylvatica* L. after experimental long – term exposure to sodium dodecylbenzene sulphonate (SDBS) aerosol[J]. Environmental microbiology, 2002, 4(11): 696 – 702.
- [26] Rasmussen S, Parsons A J, Bassett S, et al. High nitrogen supply and carbohydrate content reduce fungal endophyte and alkaloid concentration in *Lolium perenne* [J]. New Phytologist, 2007, 173: 787 – 797.
- [27] Gao X X, Zhou H, Xu D Y, et al. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation – independent approach [J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 249(2): 255 – 266.
- [28] Strobel G, Daisy B, Castillo U, et al. Natural products from endophytic microorganisms[J]. Journal of Natural Products, 2004, 67(2): 257 – 268.
- [29] Guo B, Wang Y, Sun X, et al. Bioactive natural products from endophytes: a review[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2008, 44(2): 136 – 142.
- [30] 慈恩, 高明. 生物固氮的研究进展[J]. 中国农学通报, 2004, 20(1): 25 – 28.
- [31] Baldani J I, Baldani V L D, Seldin L, et al. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root – associated nitrogen – fixing bacterium[J]. International journal of systematic bacteriology, 1986, 36(1): 86 – 93.
- [32] Barraquio W L, Revilla L, Ladha J K. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice[J]. Plant and Soil, 1997, 194: 15 – 24.
- [33] Robert M B, Segundo U, Bruno J R, et al. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications[J]. Plant and Soil, 2003, 252: 139 – 149.
- [34] Krause A, Ramakumar A, Bartels D A, et al. Complete genome of the mutualistic, N₂ – fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72[J]. Nature Biotechnology, 2006, 24(11): 1385 – 1391.
- [35] van Aken B, Peres C M, Doty S L, et al. *Methylobacterium populum* sp. nov., a novel aerobic, pink – pigmented, facultatively methylotrophic, methane – utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoides* × *nigra*, DN34) [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54: 1191 – 1196.
- [36] van Aken B, Yoon J M, Schnoor J L. Biodegradation of nitro – substituted explosives 2,4,6 – trinitrotoluene, hexahydro – 1,3,5 – trinitro – 1,3,5 – triazine, and octahydro – 1,3,5,7 – tetranitro – 1,3,5 – tetrazocine by a phytosymbiotic *Methylobacterium* sp. associated with poplar tissues (*Populus deltoides* × *nigra* DN34) [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70: 508 – 517.
- [37] Newman L A, Reynolds C M. Reynolds. Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants [J]. Trends in Biotechnology, 2005, 23: 6 – 8.
- [38] Coombs J T, Michelsen P P, Franco C M. Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat[J]. Biological Control, 2004, 29(3): 359 – 366.
- [39] Cao L X, Qiu Z Q, You J L, et al. Isolation and characterization of

- endophytic streptomycete antagonists of fusarium wilt pathogen from surface – sterilized banana roots [J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 247(2): 147 – 152.
- [40] 丁 婷, 孙微微, 韩亚惠, 等. 杜仲内生真菌 DZJ07 在小麦根际定殖及对根部酶活的影响 [J]. 核农学报, 2015, 29(6): 1149 – 1157.
- [41] Gasoni L, de Gurfinkel B S. The endophyte *Cladorrhinum foecundissimum* in cotton roots: phosphorus uptake and host growth [J]. Mycological Research, 1997, 101: 867 – 870.
- [42] Malinowski D P, Brauer D K, Belesky D P. The endophyte *Neotyphodium coenophialum* affects root morphology of tall fescue grown under phosphorus deficiency [J]. Journal of Agronomy and Crop Science, 1999, 183: 53 – 60.
- [43] Reis V M, Baldani J I, Baldani V L D, et al. Biological dinitrogen fixation in Gramineae and palm trees [J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2000, 19: 227 – 247.
- [44] Ravel F, Courty C, Coret A, et al. Beneficial effects of *Neotyphodium lolii* on the growth and the water status in perennial ryegrass cultivated under nitrogen deficiency or drought stress [J]. Agronomie, 1997, 17: 173 – 181.
- [45] 胡美玲, 郑 勇, 孙 翔, 等. 内生真菌促进玉米幼苗的抗旱性研究 [J]. 菌物学报, 2017, 36(11): 1556 – 1565.
- [46] Malinowski D P, Belesky D P. Tall fescue aluminum tolerance is affected by *Neotyphodium coenophialum* endophyte [J]. Journal of Plant Nutrition, 1999, 22: 1335 – 1349.
- [47] Marquez L M, Redman R S, Rodriguez R J. A virus in a fungus in a plant: three – way symbiosis required for thermal tolerance [J]. Science, 2007, 315(5811): 513 – 515.
- [48] 陈水红, 曹 莹, 陈泰祥, 等. 内生真菌提高禾草抗盐碱性研究进展 [J]. 生物技术通报, 2017, 33(12): 1 – 8.
- [49] Strobel G A, Miller R V, Martinez – Miller C, et al. Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina* [J]. Microbiology, 1999, 145(8): 1919 – 1926.
- [50] Miller C M, Miller R V, Garton – Kenny D, et al. Ecomycins, unique antimycotics from *Pseudomonas viridiflava* [J]. Journal of Applied Microbiology, 1998, 84(6): 937 – 944.
- [51] Lu H, Zou W X, Meng J C, et al. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua* [J]. Plant Science, 2000, 151(1): 67 – 73.
- [52] Zou W X, Meng J C, Lu H, et al. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica* [J]. Journal of Natural Products, 2000, 63(11): 1529 – 1530.
- [53] Singh M P, Janso J E, Luckman S W, et al. Biological activity of guanacastepene, a novel diterpenoid antibiotic produced by an unidentified fungus CR115 [J]. The Journal of Antibiotics, 2000, 53: 256 – 261.
- [54] Castillo U F, Strobel G A, Mullenberg K, et al. Munumbicins E – 4 and E – 5: novel broad – spectrum antibiotics from *Streptomyces* NRRL 3052 [J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 255(2): 296 – 300.
- [55] Guo B Y, Dai J R, Ng S, et al. Cytonic acids A and B: novel tridepside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytospora species* [J]. Journal of Natural Products, 2000, 63(5): 602 – 604.
- [56] Qin S, Xing K, Jiang J H, et al. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant – associated endophytic actinobacteria [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(3): 457 – 473.
- [57] Demain A L. Microbial natural products: a past with a future [M] // Wrigley S K, Hayes M A, Thomas R, et al. Biodiversity: new leads for pharmaceutical and agrochemical industries. London: the Royal Society of Chemistry, 2000.
- [58] Daisy B H, Strobel G A, Castillo U, et al. Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus [J]. Microbiology, 2002, 148(11): 3737 – 3741.
- [59] Ju Y, Sacalis J N, Still C C. Bioactive flavonoids from endophyte – infected blue grass (*Poa ampla*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(9): 3785 – 3788.
- [60] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae* [J]. Science, 1993, 260(5105): 214 – 216.
- [61] Strobel G, Hess W M, Li J Y, et al. *Pestalotiopsis guepinii*, a taxol producing endophyte of the Wollemi Pine, *Wollemia nobilis* [J]. Australian Journal of Botany, 1997, 45: 1073 – 1082.
- [62] 万 波, 李安明, 王晓力. 一株产紫杉醇内生真菌的分离 [J]. 中国科学 (C 辑: 生命科学), 2001, 31(3): 271 – 274.
- [63] 席晓圆, 宋发军, 张 鹏, 等. 产紫杉醇内生真菌 MHZ – 32 的鉴定 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2015, 31(4): 429 – 434.
- [64] Guo B H, Wang Y C, Zhou X W, et al. An endophytic taxol – producing fungus BT2 isolated from *Taxus Chinensis* var. *mairei* [J]. African Journal of Biotechnology, 2006, 5(10): 875 – 877.
- [65] Lee J C, Strobel G A, Lobkovsky E, et al. Torreyanic acid: a selectively cytotoxic quinone dimer from the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspore* [J]. Journal of Organic Chemistry, 1996, 61(10): 3232 – 3233.
- [66] Wagenaar M, Corwin J, Strobel G A, et al. Three new chytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinochadiella* [J]. Journal of Natural Products, 2000, 63(12): 1692 – 1695.
- [67] 郭 波, 李海燕, 张玲琪. 一种产长春碱真菌的分离 [J]. 云南大学学报 (自然科学版), 1998, 20(3): 214 – 215.
- [68] 张玲琪, 郭 波, 李海燕, 等. 长春花内生真菌的分离及其发酵产生药用成分的初步研究 [J]. 中草药, 2000, 31(11): 7 – 9.
- [69] Kumar A, Patil D, Rajamohan P R, et al. Isolation, purification and characterization of vinblastine and vincristine from endophytic fungus *Fusarium xosporum* isolated from *Catharanthus roseus* [J]. PLoS One, 2013, 8(9): e71805.
- [70] Palem P P, Kuriakose G C, Jayabaskaran C. An endophytic fungus, *Talaromyces radicus*, isolated from *Catharanthus roseus*, produces vincristine and vinblastine, which induce apoptotic cell death [J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0144476.
- [71] 黎万奎, 胡之璧. 内生菌与天然药物 [J]. 中国天然药物, 2005, 3(4): 193 – 199.
- [72] Shweta S, Gurumurthy B R, Ravikanth G, et al. Endophytic fungi from *Miquelia dentate* Bedd, produce the anti – cancer alkaloid, camptothecin [J]. Phytomedicine, 2013, 20(3/4): 337 – 342.
- [73] Liang Z Z, Zhang J, Zhang X, et al. Endophytic fungus from *Sinopodophyllum emodi* (Wall.) Ying that produces podophyllotoxin [J]. Journal of Chromatographic Science, 2016, 54(2): 175 – 178.
- [74] Lee J C, Lobkovsky E, Pliam N B, et al. Subglutinols A and B: immunosuppressive compounds from the endophytic fungus *Fusarium subglutinans* [J]. The Journal of Organic Chemistry, 1995, 60(22): 7076 – 7077.

刘益珍,姜振辉. 稻田水旱轮作生态效应研究进展及发展建议[J]. 江苏农业科学,2019,47(20):19-23.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.20.005

稻田水旱轮作生态效应研究进展及发展建议

刘益珍,姜振辉

(浙江大学环境与资源学院,浙江杭州 310058)

摘要:水旱轮作是克服水稻连作障碍的有效途径。本文从稻田水旱轮作对水稻增产效应、土壤理化性状、土壤生物学特性、病虫害生态调控以及温室气体减排效应 5 个方面综述了国内外关于水旱轮作生态效应的最新研究进展,指出了目前我国稻田水旱轮作面临的主要问题。最后,结合水旱轮作的模式特点提出,可以通过协调土壤养分,根据作物养分需求精准施肥;重视有机肥的使用,有效利用秸秆还田技术;改进农业管理措施,探索应用生物炭技术;多种农作技术综合应用,在发展高效高产栽培技术等方面加以改进,并对水旱轮作的研究方向进行展望,以期为实现我国农业生产中作物高产和环境友好的目标提供科学策略。

关键词:稻田;水旱轮作;生态效应;研究进展;发展建议

中图分类号: S181 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)20-0019-05

南方稻田耕作制度在我国农业发展中占有重要地位,对我国的水稻生产起着举足轻重的作用^[1]。目前我国南方稻区主要以单季稻或“冬闲一稻一稻”的连作种植模式为主,由于实行长期连作以及长期依赖化学肥料,有机肥的使用较少,逐渐出现了稻田土壤养分失去平衡、作物抗病虫害能力下降、稻田碳足迹增加和农田生态环境恶化等一系列问题,造成农田可持续利用能力下降,进而影响作物的产量和品质,对我国的粮食安全和农业生态环境造成威胁^[2]。

Chen 等的研究表明,稻田水旱轮作是克服水稻连作障碍的有效途径^[3]。水旱轮作是指在同一田块上,按季节有序地交替种植水稻和旱地作物(如小麦、玉米、油菜、蔬菜、棉花等)的一种种植模式,其中小麦—水稻和油菜—水稻轮作种植模式应用最为广泛。水旱轮作系统的显著特征是土壤水热条件交替变化,该系统遵循用地养地、高效高产和协调发展的原则,对维护农业生态系统的良性循环和维持农田的地力、保障粮食安全具有重要的理论和实践参考价值^[4-5]。然而,近年来这一体系也面临着生产力下降或徘徊不前、养分管理不合理及环境污染严重等问题^[6]。因此,本文在查阅了国内外相关文献资料的基础上对水旱轮作的水稻增产效应、土壤理化性状、土壤生物学性状、病虫害调控以及农田温室气体减排

等生态效应特征进行综合评价,指出水旱轮作系统存在的问题,并在此基础上进一步提出发展建议,以解决水旱轮作系统中作物生产、资源利用和环境风险之间的矛盾,为发展节本简化、环境友好、生态高效的可持续性农业提供参考。

1 稻田水旱轮作的生态效应

1.1 水稻增产效应

稻田水旱轮作可促使水稻分蘖早、快、数量多,提高叶面积扩展指数和叶绿素含量,使地上部干物质积累量明显增多,增加有效穗数和结实率,从而提高水稻产量^[7-9]。Linh 等研究发现,水旱轮作能明显促进水稻根系对土壤养分的吸收,轮作后的水稻株高、千粒质量、每穗实粒数、根系深度、秸秆产量和水稻产量与传统的水稻连作相比,均有一定程度的提高^[10]。由于水旱 2 季作物对养分的吸收规律不同会导致土壤的养分积累特点和产出有所差异,不同的水旱轮作体系对作物产量的影响各不相同^[3]。合理有效的水旱轮作模式一般能够使得农业产量增加 5%~8%,高效的轮作方式则能够使农作物产量增长达到 10%~15%,有的轮作方式则更高,甚至能够达到 20% 左右^[11]。然而,也有研究认为,水旱轮作对作物产量增加的效果不明显,长期的水旱轮作甚至会降低作物产量^[12]。作物的生长及产量除了受水旱轮作体系中土壤干湿交替变换的影响外,还与旱季作物和水稻季的施肥种类和数量有很大的关系,养分缺失会导致作物减产,过量施肥则可能造成作物对肥力的奢侈吸收,也会起不到增产作用^[13]。总之,水旱轮作对水稻产量的影响与轮作模式、土壤类型、施肥情况等一系列因素有关,水稻的最佳增产效应应该

收稿日期:2018-07-04

基金项目:国家重点研发计划(编号:2016YFD0300203-4)。

作者简介:刘益珍(1994—),女,四川达州人,硕士研究生,主要从事农业面源污染控制研究。E-mail:suxiangxue12345@163.com。

通信作者:姜振辉,博士研究生,主要从事水旱轮作生态效应研究。

Tel:(0571)88982007;E-mail:jiangzh1990@126.com。

[75] Zhang B, Salituro G, Szalkowski D, et al. Discovery of a small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice [J]. Science, 1999, 284 (5416): 974-977.

[76] Harper J K, Arif A M, Ford E J, et al. Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities [J]. Tetrahedron, 2003, 59 (14): 2471-2476.

[77] 王志伟,纪燕玲,陈永敢. 植物内生菌研究及其科学意义 [J]. 微生物学通报, 2015, 42 (2): 349-363.

[78] 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 and Biotechnology, 2008, 16 (3): 508-514.