

专论与综述

植物内生放线菌研究*

曹理想 周世宁**

(中山大学生命科学学院生物化学系 广州 510275)

摘要:近年来从植物组织中发现一些新的放线菌菌种,有些内生放线菌产生新的生物活性代谢物,或产生具有新特性的酶;对植物内生放线菌与植物宿主及其他微生物之间的关系研究有新的发现,植物内生放线菌在植物病害防治中的作用已引起重视。本文将简单介绍近年来这方面的研究进展。

关键词:植物内生放线菌,生物防治,链霉菌

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 04-0093-04

1 植物内生放线菌定义

植物内生菌(endophyte)指生活于健康植物组织内部、不引发植物产生明显病症的微生物,但在植物衰老或外界刺激条件下,植物自身免疫力下降,也可能出现某些病症;植物内生菌包括真菌、细菌与放线菌等,它们在其全部或部分生活周期内生活在植物组织内。目前,对植物内生菌的定义还有不少争论,但以 Hallmann 依据植物与内生菌的相互关系所做的定义最为全面,他认为植物内生菌应满足两个要求:(1)可从表面消毒的植物组织或植物组织内部分离到;(2)不对植物造成可见的伤害^[1]。这种功能性的植物内生菌定义不仅包括植物组织内的无害类群,也将那些变换于内生与附生类型之间的微生物类群包括在内,它虽然将植物组织内一些不可培养的微生物排除在外,但这种定义把目前开展的这方面的工作都包括在内,是目前使用最为广泛的定义。

放线菌是土壤中重要的一类原核生物,通常指在生活史中具有分支菌丝形态的细菌。但随着 16 S rRNA 序列分析技术用于放线菌的系统进化研究,放线菌的定义逐渐演变为:一群革兰氏阳性、高 G+C 含量(>55%)的细菌,除了包括通常所指的放线菌外,其他如微球菌属、节杆菌属、丙酸杆菌属、肾杆菌属(*Renibacterium*)、口腔球菌属(*Stomatococcus*)、热酸菌属(*Acidothemus*)等也划入放线菌类群^[2]。这群细菌也是植物根际微生物中的重要组成部分,有些是植物病原菌,如棒状杆菌属的某些种以及引起马铃薯疮痂病的疮痂链霉菌。由于目前对植物内生真菌与植物内生细菌已有综述^[3,4],本文主要介绍放线菌方面的研究进展。

* 国家自然科学基金资助项目 (No.30370030)

广东省自然科学基金资助项目 (No.011124)

** 联系人 Tel: 020-84110238, E-mail: LSSZSL@zsu.edu.cn

收稿日期: 2003-08-25, 修回日期: 2003-10-10

2 植物内生放线菌类群

能在非豆科植物根部形成根瘤并具有固氮能力的弗兰克氏菌属 (*Frankia*) 是最早被发现的内生放线菌。目前已从 8 个科的本双子叶植物中发现弗兰克氏菌形成的根瘤, 这些放线菌菌根植物的代表种广泛分布于除南极洲外的各大洲, 但主要分布于温带地区, 在山地、沼泽、沙丘、盐沼、干旱灌丛地带以及冲积区均有放线菌菌根植物的分布。此外, 从意大利西北部的 28 种植物根部分离到 499 株内生放线菌, 主要属于链霉菌属、链轮丝菌属、诺卡氏菌属、小单孢菌属与链孢囊菌属; 从大甜茅 (*Glycine max*) 上分离的链霉菌最多为 68 株, 从山黄连 (*Chelidonium majus*) 上分离的链霉菌最少, 仅 3 株; 部分菌株对藤黄微球菌、尖孢镰刀菌显示拮抗活性。从巴西东北部热带地区种植的玉米根、叶部位也分离到小双孢菌属 (*Microbispora*)、链霉菌属、链孢囊菌属的放线菌共 53 株, 部分菌株对金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌有抗性。从巴西热带地区卫矛科、豆科及茄科植物中均分离到内生放线菌, 如拟诺卡氏菌属 (*Nocardopsis*)、马杜拉菌属 (*Actinomadura*)、红球菌属 (*Rhodococcus*)、浅黄球菌属 (*Luteococcus*) 及微弯月菌属 (*Microbunatus*) 等, 不少菌株产生抗细菌、抗真菌物质, 从药用植物分离的内生放线菌还产生宿主植物的药物活性物质。

从赤杨根瘤中分离到一种 *Amycolata* 新种 (*A.alni*), 这种放线菌主要从赤杨的根际或根瘤中分离到。从日本猫尾木叶、莎草根及泥炭藓上分离到 11 株具有运动孢子的放线菌, 均为动孢菌属 (*Kineosporea*), 除其中一个种为该属仅有的一个种外, 另外 4 个种均为该属的新种, 极大丰富了对该属放线菌的了解^[5]。

由于内生放线菌分离培养比较困难, 利用 16S rDNA 序列分析方法分析植物内生放线菌的类群十分重要。采用该方法对 3 种马铃薯的茎、根、块茎的内生放线菌进行分析表明: 在抗疮痂病的马铃薯品种植物组织内, 发现与该病病原菌疮痂链霉菌相关的链霉菌在数量和种类多样性上均高于其他两个敏感品种, 很可能抗病品种的抗病能力与这些链霉菌有关^[6]。

3 植物内生放线菌生物活性

内生放线菌还产生一些重要的化合物, 有些具有新的化学结构。从多年生黑麦草分离到的一株链霉菌可产生甲基白诺氏菌素, 而通常这种抗生素的生产菌并没有甲基化能力。从欧洲桤木根瘤分离的一株链霉菌产生一种新的萘醌类抗生素, 对革兰氏阳性菌有活性, 对革兰氏阴性菌则无活性, 对 K562 人白血病细胞有细胞毒性。从红豆杉属植物分离的内生放线菌中, 14% 的菌株可产生 taxane 类物质, 浓度在 50 ~ 100ng/L 之间; 其中一株北里孢菌 (*Kitasatospora* sp.) 具有 paclitaxel 的全部合成途径, 但其调控机制尚不清楚^[7]。从杜鹃花植物中分离的链霉菌产生新的抗真菌物质 fistupyron, 对植物病原真菌甘蓝黑斑交链孢霉有抑制作用^[8]; 从卫矛科植物分离的内生链霉菌产生的新 chloropyrrol 抗生素对多种耐药性细菌和分枝杆菌有抑制活性^[9]; 从蛇藤分离的内生链霉菌可产生 4 种新的广谱抗生素 munumbicins A、B、C、D, 对耐药性细菌及疟原虫有抑制作用, 内生链霉菌作为尚未开发的微生物资源日益受到重视^[10]。内生放线菌还产生多种多样的酶以适应其独特的生活环境, 从玉米叶和薯蓣块茎中分离的内生放线菌可产生最适温度为 70℃ 的葡萄糖淀粉酶与 α -淀粉酶^[11]。

4 植物内生放线菌与宿主植物的关系

到目前为止,对植物内生放线菌与植物的关系研究并不多,特别是链霉菌与植物的关系研究更是十分缺乏,主要由于链霉菌中大多对植物无致病性或所导致病害并不严重而被忽略。用荧光假单胞菌 DR54 包被的大麦种子长出的幼苗在发芽后的 21 d 内,荧光假单胞菌 DR54 可占假单胞菌种群的 75% 左右,但到 50 d,其比例则低于 10%,而放线菌的数量则不受荧光假单胞菌 DR54 与抗真菌药物 imazalil 的影响,其数量随时间不断增加,并且很可能定殖在大麦的根部皮层。在弗兰克氏菌中,大多数菌株可以耐受 Pb^{2+} (6 ~ 8 mmol/L)、 CrO_4^{2-} (1.0 ~ 1.75 mmol/L)、 AsO_4^{3-} (> 50 mmol/L) 与 SeO_3^{2-} (1.5 ~ 3.5 mmol/L),但对 Ag^+ 、 AsO_2^- 、 Cd^{2+} 、 SbO_2^- 与 Ni^{2+} 敏感,不同菌株对 Cu^{2+} 耐受程度也不同,并且各种菌株对重金属离子的解毒机制也不相同^[12],弗兰克氏菌的这种特性可能有利于增强宿主植物对重金属离子抗性。

红球菌属是除弗兰克氏菌外,近年来研究较详细的内生放线菌,其中的两个种 *R. fascians* 与 *R. erythropolis* 具有固氮能力。但 *R. fascians* 更引人注意的特征是可感染双子叶与单子叶植物,干扰植物激素平衡,形成叶瘿,这种叶瘿的维持需要菌体的存在,如果去除菌体,则这种多胚芽会继续发育,在植物种质保存与快速繁殖领域有重要应用前景。在植物组织与 *R. fascians* 共培养时,红球菌可诱导多种植物的细胞分化与器官形成,可用于植物快速繁殖。红球菌的这个作用特点与其 *fas* 基因有关,该基因与细胞分裂素合成有关,可影响植物细胞的有丝分裂并受 *fasR* 基因与 *att* 位点的调控,在叶瘿提取物的诱导下, *fas* 基因开始表达,但未被感染的植物提取物则没有诱导活性。在自然条件下, *R. fascians* 细胞在开始阶段主要以附生形式生活在植物表面,细胞表面包裹粘液层,通过破坏表层细胞进入植物内部,在植物有伤口时通过伤口侵入,而不是通过气孔进入,当被感染叶片腐烂时,大量细菌可形成橙色斑点。该菌的侵入过程与细菌的线状结合质粒 pFiD188 有关,其 *fas* 基因、*fasR* 基因、*att* 位点均位于这个质粒上,该菌株还包含一个与 Cd^{2+} 抗性有关的环状质粒,但与其侵染无关^[13]。从澳大利亚不同种植区的小麦中均分离到同一种链霉菌,与链霉菌 *Streptomyces caviscabies*、*Streptomyces setonii* 有相关性,在不同地点分离的该种链霉菌均具有同一种质粒,该质粒含有 13 个 ORF,其中两个 ORF 编码的蛋白与宿主植物的转录调节蛋白和蛋白合成起始因子有同源性,表明内生放线菌可能参与宿主植物的基因表达,同时该质粒上与质粒转移有关的蛋白与弗兰克氏菌的 pFQ 质粒转移蛋白相似^[14]。在豆科植物中也发现有些内生放线菌定殖于根瘤的表层细胞,这种定殖可增加根瘤的体积,增加根瘤的数目并增加根瘤内类菌体的活力,推测很可能与放线菌向根瘤提供铁有关^[15]。

5 内生链霉菌在植物病害生物防治中的研究

链霉菌可形成孢子,对热和干燥的抵抗力较强,其在生防上的作用一直受到重视。一些链霉菌由于防治由疮痂链霉菌引起的疮痂病效果较好而受到重视。目前已经证实,可引起植物疮痂病的链霉菌菌株之间的进化关系相差很远,其致病原因是由于毒力因子基因如 *nec1* 基因在 *Streptomyces scabies* 类放线菌之间转移的结果^[16]。但从总体上来说,链霉菌致病菌株并不多,而且引发的植物病害并不严重。Thaxtomin A 是疮痂链霉菌产生的一种植物毒素,马铃薯疮痂病就是由这种毒素引起的。一些非致病性链霉菌和

真菌均可以利用这种毒素生长,但接种真菌并不能保护马铃薯块茎免受危害,相反,在疮痂周围还出现软腐症状,而接种非致病性链霉菌则可以保护马铃薯块茎免受病害。

最近的研究表明:内生链霉菌不仅可促进植物生长、提高作物产量,而且可以增加植物对病原菌的抗性。与通常使用根际微生物进行植物病害生物防治相比:(1)内生放线菌定居在植物根内部,避免了同根际众多微生物的竞争,因而更具有竞争优势。利用内生放线菌防治小麦全蚀病的温室试验显示,可降低病害损失 70% 以上(www.abc.net.au/science/news);(2)内生放线菌可在植物组织中产生抗生素、溶解酶等拮抗物质。将内生链霉菌接种至杜鹃花组织培养幼苗,可发现其在叶内定殖、生长并增强叶部抗病原真菌的能力;而向组织培养基中加入放线菌素 D 与两性霉素 B,虽然植物组织中的抗生素浓度高于该病原真菌的 MIC 但并没有抗病效果^[17]。表明植物内生放线菌对宿主植物的影响远比现在认识到的复杂。目前澳大利亚与日本均有人在研究植物内生放线菌增强植物抗病能力与促进植物生长的机制。我们实验室已开展了多种植物内生放线菌的研究,从香蕉分离到一批香蕉内生放线菌,有近一半的菌株在香蕉组织提取物平板上对香蕉枯萎病原真菌尖孢镰刀菌古巴专化型显示拮抗活性,拮抗活性与铁载体的产生有密切关系。我们认为植物内生放线菌产生的铁载体在植物宿主与内生放线菌的关系中起重要作用,植物内生放线菌增强植物抗病能力与促进植物生长的特性可能与铁载体的产生有关。

总之,目前对植物内生放线菌(弗兰克氏菌除外)的研究尚有许多问题等待解决,但从目前的研究结果来看,对植物内生放线菌的研究将有利于寻找新的放线菌菌种,发现新的代谢物与新特征的酶,特别在植物病害防治中有重要意义。

参考文献

- [1] Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee W F, *et al.* *Can J Microbiol*, 1997, **43**: 895 ~ 914.
- [2] Embley T M, Stackebrand T E. *Annu Rev Microbiol*, 1994, **48**: 257 ~ 289.
- [3] 任安芝,高玉葆.微生物学通报,2001, **28** (6): 90 ~ 93.
- [4] 杨海莲,孙晓璐,宋 未.微生物学通报,1998, **25** (4): 224 ~ 227.
- [5] Kudo T, Matsushima K, Itoh T, *et al.* *Int J Syst Bacterial*, 1998, **48**: 1245 ~ 1255.
- [6] Sessitsch A, Reiter B, Pfeifer U, *et al.* *FEMS Microbiol Ecol*, 2002, **39**: 23 ~ 32.
- [7] Caruso M, Colombo A L, Crespi-Perellino N, *et al.* *Anal Microbiol*, 2000, **50**: 89 ~ 102.
- [8] Igarashi Y, Ogawa M, Sato Y, *et al.* *J Antibiotics*, 2000, **53**: 1117 ~ 1122.
- [9] Pullen C, Schmitz P, Meurer K, *et al.* *Planta*, 2002, **216**: 162 ~ 167.
- [10] Castillo U F, Strobel G A, Ford E J, *et al.* *Microbiology*, 2002, **148**: 2675 ~ 2685.
- [11] Stamford T L M, Stamford N P, Coelho L C B B, *et al.* *Bioresource Technol*, 2002, **83**: 105 ~ 109.
- [12] Richards J W, Krumholz G D, Chval M S, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 923 ~ 927.
- [13] Goethals K, Vereecke D, Jaziri M, *et al.* *Annu Rev Phytopathol*, 2001, **39**: 27 ~ 52.
- [14] Coombs J T, Franco C M M, Loria R, *et al.* *Plasmid*, 2003, **49**: 86 ~ 92.
- [15] Tokala R K, Strap J L, Jung C M, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 2161 ~ 2171.
- [16] Bukhalid R A, Takeuchi T, Labeda D, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 738 ~ 744.
- [17] Shimizu M, Furumai T, Igarashi Y, *et al.* *J Antibiotics*, 2001, **54**: 501 ~ 505.