

植物内生菌研究方法

刘梦洁^{1,2}, 徐亚军², 黄雪珍^{1,2}, 赵龙飞^{*2}

1 河南师范大学生命科学学院, 河南 新乡 453007

2 商丘师范学院生物与食品学院 商丘市农业微生物资源开发重点实验室, 河南 商丘 476000

刘梦洁, 徐亚军, 黄雪珍, 赵龙飞. 植物内生菌研究方法[J]. 微生物学通报, 2024, 51(6): 1887-1897.

LIU Mengjie, XU Yajun, HUANG Xuezhen, ZHAO Longfei. Advances in research methods for plant endophytes[J]. Microbiology China, 2024, 51(6): 1887-1897.

摘要: 植物内生菌是植物微生态系统中不可或缺的组成部分, 植物微生物类群的主要成员是内生菌, 它们栖息在植物组织或组织间隙中, 并且多数内生菌通过不同的途径协助植物生长。植物中普遍存在种类丰富且结构复杂的内生菌群落, 有益内生菌具有促进植物生长、增强植物抗逆性、产生有利用价值次生代谢物的功能。本文通过对国内外内生菌资源研究方法的相关文献回顾, 探讨植物内生菌与宿主植物的关系、内生菌多样性、分离和定殖的研究方法, 探索内生菌资源对宿主植物的作用和相关机制, 展望新技术在植物内生菌研究方面的趋势, 为其在相关领域的应用提供理论参考。

关键词: 植物内生菌; 促进生长作用; 抗逆性; 定殖; 次生代谢物

Advances in research methods for plant endophytes

LIU Mengjie^{1,2}, XU Yajun², HUANG Xuezhen^{1,2}, ZHAO Longfei^{*2}

1 College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, Henan, China

2 Key Laboratory on Agricultural Microorganism Resources Development of Shangqiu, College of Biology and Food, Shangqiu Normal University, Shangqiu 476000, Henan, China

Abstract: Plant endophytes as indispensable components of plant microcosms are the major part of the plant microbial community. They inhabit plant tissues or tissue gaps, and most of them promote plant growth via different pathways. The plant endophyte community is characterized by diverse species and a complex structure. Beneficial endophytes can promote plant growth,

资助项目: 国家自然科学基金(U1204301); 河南省重点研发与推广专项(212102310223); 河南省高校重点科研项目(24A180022)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (U1204301), the Key Specialized Research and Development Program of Henan Province (212102310223), and the Key Scientific Research Program of Henan Universities (24A180022).

*Corresponding author. E-mail: hnzhaolongfei@163.com

Received: 2023-11-19; Accepted: 2024-03-14; Published online: 2024-04-02

enhance plant resistance, and produce valuable secondary metabolites. By reviewing the articles about the research methods for endophyte resources, we explored the relationship between plant endophytes and host plants, the diversity of endophytes, the research methods for isolation and colonization, and the roles and functioning mechanisms of endophytes in host plants. Furthermore, we make an outlook on the trend of new technologies in the research on plant endophytes, aiming to provide a theoretical reference for the application of plant endophytes.

Keywords: plant endophytes; growth-promoting effect; resistance; colonization; secondary metabolites

植物内生菌(plant endophyte)是在其生活史一定阶段或全部阶段生活于植物组织、组织间隙和器官内部的微生物类群。1992年, Kloepper第一次提出了“植物内生菌”的概念。但早在1926年, Perotti 等在许多健康植物的根部组织内发现了细菌, 被确定为植物体内存在细菌的起始点^[1]。关于植物内生菌多样性的研究已表明内生菌种类主要包括内生真菌、内生细菌、内生放线菌等^[2]。微生物群落在植物发育、养分获取和氧化应激耐受性中起着关键作用, 植物微生物类群的主要成员是内生菌, 它们栖息在植物组织中, 并且研究发现植物内生菌是植物生态系统中不可或缺的组成部分, 大多数内生菌通过不同的途径协助植物生长^[3]。许多研究揭示了内生菌与其宿主之间的有益关系, 促进植物生长如固氮作用、溶磷、产生 1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase, ACC)脱氨酶、产生植物激素如吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)、分泌铁载体、产生挥发性有机物质、增强养分吸收以及对生物胁迫[抑制病原真菌、诱导系统抗性(induction of systemic resistance, ISR)]和非生物胁迫(盐碱、干旱、农药、温度和金属)的抵抗力^[4]。同时, 宿主植物为内生菌提供了栖息场所。由于农业上喷施有毒化学农药和生产长期使用化学肥料, 均引起系列环境污染和植物病原菌抗药等问题, 研究发现多数植物内生菌能够在

植物的内部组织中定殖, 并具有减少病虫害和促进植物生长等作用, 从而能够规避化学农药带来的负面影响, 提供一种有效环保的替代方案^[5]。由于大多数内生菌, 特别是那些不能在植物体外生存的内生菌很难在实验室环境中生长, 因此, 不同内生菌的分离和培养过程有所不同, 方法的选择对结果有很大影响。近年来, 随着各类交叉学科研究领域的逐步拓展及研究方法的不断深入, 分子技术的进步简化了一些不可培养物种的分离和鉴定, 而且对内生菌多样性、功能、代谢和基因的了解不断深入。

本文结合目前国内外植物内生菌研究现状及本课题组相关研究, 综述内生菌与植物间相互关系的研究方法, 探讨内生菌多样性、分离、定殖的测定方法, 探索内生菌资源对宿主植物的作用和研究方法, 以促进研究者对植物内生菌资源的开发与应用以及内生菌抗病与促生长机制的探讨。

1 内生菌与宿主关系研究方法

大量研究发现内生菌是非致病性的, 并且可与宿主共生, 一方面宿主为内生菌提供营养和保护; 另一方面内生菌可以增强寄主植物的竞争能力, 以及对食草动物、病原体和各种非生物胁迫的抵抗力^[6]。已有研究表明接种的大多数内生菌可使其定殖到对应植物而发挥积极响应。在研究内生菌与宿主之间的关系时, 将内生菌接种到宿

主体内的方法是关键,有多种接种方式,如伤根、灌根、蘸根、浸种等人工接种方法,使内生菌成功定殖在植物体内。一旦内生菌被成功接种到宿主主体内,就需要采用一系列定殖、生理生化指标测定方法来验证内生菌与宿主之间的关系。例如,可以通过测定内生菌在宿主植物体内的数量、分布和生长情况,以及其对宿主植物生长、发育和抗逆性的影响等方面来评估内生菌的作用。

此外,还可以通过分析宿主植物的生理生化指标,如光合作用、营养元素吸收和抗病性等,揭示内生菌对宿主植物的影响机制。例如,Tang等^[7]将从 *Bischofia polycarpa* 内皮中分离到的内生真菌 *Phomopsis liquidambaris* 接种到水稻,并利用荧光显微镜观察接种后的定殖效果,以保证内生菌在植物内接种成功,然后通过低含量矿物质元素土壤中进行田间盆栽试验,研究表明 *P. liquidambaris* 的接种减轻了水稻衰老根系对养分吸收的负面影响,显著提高了籽粒中 N、P、Fe、Mn、Zn、Mo 和 Se 的积累量,并且产量和蛋白质含量显著增加; Lastochkina 等^[8]评价在干旱胁迫条件下接种内生菌枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 引发对小麦 (*Triticum aestivum* L.) 品种激素系统的影响,经表面灭菌处理的小麦幼苗,通过芽孢杆菌选色琼脂鉴别培养基和多态性 DNA 的随机扩增-聚合酶链反应 (random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction, RAPD-PCR) 分析证明了枯草芽孢杆菌定殖于小麦内部组织的能力,通过 ELISA 测定了植物样品中游离 IAA、脱落酸和乙烯的含量,发现枯草芽孢杆菌对胁迫植物具有保护作用,压力诱导的激素系统变化幅度显著降低。

目前,内生菌和宿主之间共生的潜在机制在很大程度上仍然未知,研究者正在尝试深入地探索不同的实验方法,常使用高通量 RNA 测序 (RNA-Seq) 系统地评估植物对生物或非生物胁迫

反应的转录变化,一些研究已利用此方法报道了内生菌对宿主基因转录的影响。Shi 等^[9]研究发现内生菌 *Epichloë sibirica* 接种到 *Achnatherum sibiricum* 中对病原体 *Curvularia lunata* 产生抗性,并结合植物总酚含量、基因表达分析和致病性实验来研究内生菌增强宿主抗病性的可能机制,结果发现内生菌对植物生长的促进可能与生长素信号通路和光合作用相关基因的表达上调有关,以及对宿主植物抗病性的改善可能与酚类化合物的增加有关。有研究对有内生菌、无内生菌、有内生菌无病原体、有内生菌有病原体这 4 种接种情况进行差异表达基因 (differentially expressed gene, DEG) 的 GO 和 KEGG 富集分析,通过对 DEG 富集分析表明,内生菌可以激活与光合作用和防御相关的功能基因群^[10]。一些研究发现少数内生菌是有害的,主要由于其在宿主内产生一些不利于宿主生长的次生物质,相关研究对内生菌产生的体外分泌物分析发现,内生菌还可以通过产生很多胞外酶发挥对宿主的毒性作用^[11]。

2 内生菌多样性的测定技术

大多数内生菌多样性的信息均为使用培养方法获得,分离后进行形态学鉴定是所有早期内生菌研究的基础。目前,多样性分析方法包括高通量测序、PCR-DGGE 和宏基因组测序。例如,郑斯平等^[12]用 16S rRNA 基因 PCR-DGGE 技术、电子显微镜和平板培养的方法系统地揭示了小叶满江红 (*Azolla microphylla*) 中内生细菌的遗传多样性和表型多样性; Woźniak 等^[13]为了评估在多个寄主植物中菌株间基因组多样性,对代表 4 个物种 18 个细菌分离株进行了变性梯度凝胶电泳,16S rRNA 基因分析将所有细菌分离株归入 10 个属,其中 *Rhizobium* 有 19 个, *Delftia* 有 11 个, *Agrobacterium* 有 5 个, *Stenotrophomonas* 有 3 个, *Brevundimonas* 有 2 个, *Novosphingobium*、

Variovorax、*Collimonas*、*Achromobacter* 和 *Comamonas* 分别有 1 个分离株；此外，使用 BOX-PCR 和肠杆菌重复基因间共识-聚合酶链式反应 (enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction, ERIC-PCR) 方法评估了 *Delftia* sp. 的 11 个分离株基因组多样性。

宏基因组测序通过系统分析获得环境中微生物遗传多样性和分子生态学信息，宏基因组测序分为 4 步：样品制备、文库构建、计算机测序和数据分析。罗兴等^[14]根据 16S rRNA 基因限制性片段长度多样性 (16S rRNA-restriction fragment length polymorphism, 16S rRNA-RFLP) 及 16S rRNA 基因全长序列研究了乌头 (*Aconitum carmichaelii* Debeaux) 产吲哚乙酸内生细菌遗传多样性及系统发育地位。Niem 等^[15]使用 Illumina 测序表征了与葡萄树干相关的内生微生物组，并使用 16S rRNA 基因和 ITS 序列分别对内生群落细菌菌株和真菌菌株进行宏基因组表征，数据显示，有无葡萄树干病害 (grapevine trunk diseases, GTD) 症状的葡萄树其细菌和真菌群落多样性在检查区域之间有所不同，这表明葡萄树干内的有益生物和病原生物之间存在潜在的相互作用。测序技术的革新和发展，特别是宏基因组和单细胞基因组技术的成功应用，同时借助相应生物信息学工具，能更全面地了解植物中内生菌多样性，并且能够从复杂环境中获得大量未培养内生菌的基因组信息，但是现代技术仍有其局限性，可能会阻止异质物种的鉴定，而且植物内生菌尚未建立完善的数据库。

3 内生菌的分离鉴定方法

植物内生菌分离鉴定法主要包括两类，即可培养内生菌鉴定法和免培养内生菌鉴定法。可培养内生菌的分离鉴定，首先将菌悬液或表面消毒

后样品组织液，根据细菌生长需求选择合适的培养基，获得内生细菌的纯培养物，通常采用划线分离法、稀释涂布法等^[16-17]在选择性培养基上分离单菌落，采用平板对峙法等^[18]对植物病原菌拮抗内生菌进行筛选。赵龙飞等^[19]从地黄 (*Rehmannia glutinosa* Libosch) 根状茎分离的内生菌中筛选棉花枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*) 拮抗性内生菌，采用平板涂布法进行分离纯化，以及采用对峙平板培养法对棉花枯萎病菌进行拮抗性筛选。

由于传统分离技术的局限性，许多内生真菌未分离到。这可能是因为内生真菌不能生长或生长缓慢，在人工培养基上被快速生长的微生物因竞争营养生态位所抑制。为了克服潜在的技术瓶颈，建立了植物内生细菌的免培养测定法，其中包括核酸测定、免疫组化检测、显微镜观察等^[20]。高通量技术在传统方法的辅助下可大大减少漏筛有价值功能菌株的几率。王红阳等^[21]对比传统分离方法和高通量测序获得的不同药用植物内生真菌在属水平的多样性，结果发现利用传统分离方法分离到的内生真菌仅有高通量测序检测到的真菌数量的 1/10，在属水平同样占 1/10 左右，因此，传统分离方法远不能满足研究内生菌多样性的分离要求，利用 DNA 提取、高通量测序和生物信息分析可弥补传统方法的不足。然而，高通量技术不仅有核酸测定，还有细胞高通量表型分析的技术，如表型微阵列是近 20 年发展起来的新型表型芯片技术，可同时定量分析数千个细胞表型，还提供了测试基因功能和改进基因组注释的方法，与高通量测序技术相比，表型分析是在活细胞上进行的，从而提供有关全细胞性能的全面信息^[22]。然而，Woźniak 等^[23]利用 Biolog GEN III 微孔板对内生细菌进行表型分析和鉴定，根据 Biolog GEN III 数据库中广泛的物种库捕获和分析结果，与基于 16S

rRNA 基因测序的鉴定结果进行比较, 结果表明内生菌分离株的鉴定存在一定程度的不确定性, 可能会因为微生物代谢活性较低或微生物产生突变导致错误识别。传统内生菌生理生化鉴定系人工操作, 可能会造成较大误差。此外, 实验时需要使用大量培养基和化学试剂, 造成资源浪费且费工费时。因此, 采用自动化技术、微量检测技术和实时监测技术可以提高实验效率和准确性, 这有助于推动内生菌理化特性鉴定方法的改善。国内外已兴起了其他分离筛选微生物的新型技术, 如基于光学镊子结合拉曼光谱的细胞分选技术、荧光活化细胞分选法、基于激光导向前转移技术的细胞分选技术、基于原位培养的细胞分离技术等^[24], 可弥补传统分离筛选微生物方法的缺陷和不足, 因此有望推动植物内生菌的研究发展。

4 内生菌在宿主体内的定殖定量分析方法

内生菌的成功定殖受不同因素的影响, 包括植物组织类型、植物基因型、微生物分类群和菌株类型以及生物和非生物环境条件等, 研究目标内生菌的定殖机制时, 可从定殖位置区分目标内生菌在宿主植物中的位置, 并有利于研究内生定殖成功的重要决定因素及促生机制, 研究方法主要为标记技术包括绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 标记法、抗生素标记法和基因标记法^[25]。

GFP 标记技术以其性能稳定、表达与受体细胞无关、方便检测等优点被许多研究者所采用。Zhao 等用 GFP 标记报道了 GFP 标记的绿针假单胞菌 (*Pseudomonas chlororaphis*) 菌株 Zong1 在 *Sophora alopecuroides* 根组织或根瘤中的定殖^[26]。Pal 等^[27]使用 Syto-9 荧光染色在荧光显微

镜下观察由内生菌处理的玉米幼苗根部, 以评估引发细菌分离株在根薄壁组织和根毛上的定殖模式, 结果在阳性处理过的幼苗中, 可在其根表面、根毛和根薄壁细胞之间的细胞间隙观察到细菌的定殖。

抗生素标记法主要靠菌株的自生抗性或者人工诱化, 筛选高抗抗生素的菌株变体, 具有造价低、使用范围广的特点, 但是定量不准确, 如利福平、卡那霉素、氨基青霉素、红霉素、青霉素、卡那霉素等标记方法可鉴定内生菌在植物组织的耐药和定殖情况^[28-29]。高振峰等^[18]从 58 株内生细菌中选取了对番茄灰霉病有良好抑菌效果的内生细菌, 并采用利福平抗性菌株诱导标记法测定内生细菌的定殖。目前抗生素标记法的研究不仅有单抗生素标记, 还有多种抗生素同时标记, 有研究通过多抗生素诱导法得到了 *Bacillus subtilis* DZSY21, 该菌株具有卡那霉素和氯霉素两种药物的抗性, 通过透射电子显微镜观察到菌株 DZSY21 能够在玉米叶中定殖^[30]。

基因标记法如特异性寡核苷酸片段标记法灵敏度高、特异性强, 还可再借助激光扫描仪或者荧光显微镜对目标内生菌的 RNA 或者 DNA 与核酸探针杂交以后荧光信号进行观察, 使检测更为准确, 该技术为寡核苷酸探针标记荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH)。FISH 除了对单个菌株进行基因标记, 还可对两个及多个菌株进行标记, 有实验对 3 种内生菌同时接种的植物进行寡核苷酸探针双重标记荧光原位杂交 (double labeling of oligonucleotide probes for fluorescence in situ hybridization, DOPE-FISH), 选定靶向 3 种内生菌 23S rRNA 基因的 3 种探针与有机染料偶联, 结合共聚焦显微镜, 研究发现不同的内生菌定殖在不同的组织中^[31]。内生菌标记方法的多样可使内生菌

在植物中定殖定量直观分析、为解析内生菌对病虫害的拮抗机制,探讨内生菌与植物的互作提供多种方法选择,并从中寻找潜在的新生物制剂、作用信号分子发挥着积极的贡献。基因标记法还有寡核苷酸芯片标记法,主要用于调控基因的突变分析,有利于研究植物内生菌的定殖基因^[32]。

5 植物内生菌的功能研究技术

5.1 抗逆和促生作用测定方法

许多研究已明确有益内生菌可以促进宿主植物生长和增强宿主抗逆性,对有益内生菌的筛选通常分为几个步骤:环境压力测试(高温、抗生素、盐和干旱、病虫害等);植物促生长性状和代谢能力(IAA 和铁载体产生、ACC 脱氨酶活性、磷酸盐溶解能力等);通过盆栽/田间试验对所选内生菌的影响进行定量分析^[33-34]。例如,Zhao 等^[35]使 276 株内生细菌处在大豆疫霉病(*Paenibacillus polymyxa*)环境压力下,筛选出 6 株抑制活性大于 63%的菌株,除了对病原菌有拮抗作用外,经过促生性状分析,6 株菌均能产生铁载体和 IAA,其中 5 株菌能固定氮,内生菌在抑制植物病原菌和促进植物生长方面具有多种功能;在盐胁迫下赵龙飞等^[36-38],通过生化反应测定了接种过相关内生菌植株的过氧化物酶、过氧化氢酶、活性脯氨酸、丙二酸、超氧化物歧化酶等活性,这些酶对植物具有修复作用,有效缓解盐胁迫对植物的伤害,提高植物的抗胁迫能力,利用生化指标推断内生菌对植物有促生抗逆作用;Govindasamy 等^[39]从高粱根组织中分离出 4 种植物根际促生菌,评估了其在干旱易感高粱 [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] 基因型(R-16)中诱导干旱胁迫耐受性的能力,并在干旱胁迫下将分离株内生菌对种子进行接种处理,之后进行盆栽试验,测定根系指标即根长、根干重和根系表面

积,以及对植株相对含水量和细胞膜稳定性指数等生理反应进行测定,结果表明其根际内生菌可以改善植物生长,而且通过对高粱干旱响应基因的差异表达分析,在内生菌处理的植物中观察到干旱响应基因的上调。

上述传统筛选抗逆或促生长内生菌面临某些局限性,例如传统方法需要很长时间来筛选目标内生菌;最佳菌株难以确定,因为最佳特性并不总是出现在一种菌株上;由于内生菌对环境胁迫的抗性和植物生长促进性状与植物修复效率不严格相关,因此促进效率不显著,加大了筛选难度,有必要开发更准确、更省时的内生菌筛选方法。Liu 等^[40]为内生菌筛选提供了一种新型高效的方法,设计了一套用于内生菌筛选的微流控装置,应用微流控装置筛选具有促进植物生长和积累重金属能力的内生菌,并验证了微流控法在重金属条件下内生菌对植物的修复参数,而且与传统方法数据接近,微流控设备实现了对内生菌接种引起的植物根微小变化的观察和分析,这使得在短时间内评估植物生长状态的变化成为可能,微流控芯片中培养根系生长可以方便地成像和定量分析,而无须人工干预,使数据更加准确。该方法有望推广至固氮菌、磷酸盐溶解菌、重金属解毒和污染物降解菌选择。随着高通量生物技术的发展,研究者们已开发了多种组学方法,并利用其对内生菌诱导植物抗病机制及植物-内生菌相互作用机制进行初步研究,基因组学研究整个基因组序列,转录组学研究 RNA 和基因表达模式,蛋白质组学研究动态蛋白的结构、功能和相互作用,代谢组学旨在了解特定生物体中代谢物的合成、分解和转化^[41]。

如 Lery 等^[42]通过基于质谱的蛋白质组学分析,鉴定了内生菌 *Gluconacetobacter diazotrophicus* 与两个不同基因型甘蔗相互作用的差异表达蛋白,揭示了在内生菌与植物细胞识别中起重要

作用的蛋白质,分析了内生菌 *G. diazotrophicus* 在甘蔗中定殖和防御机制的早期信号传导,相关数据还可丰富现有的蛋白质组学数据库。

5.2 内生菌次生代谢产物研究技术

在研究内生菌代谢物抗菌抗氧化的药用价值方面,如紫杉醇、丹参酮、鬼臼毒素、石杉碱、喜树碱和白藜芦醇等重要化合物,在从内生真菌中提取后已被有效分离和表征,它们具有重要的药用价值,开发和研究植物内生菌资源已经成为当今研究的热点之一^[43]。Zhao 等^[44]从药用植物黄精(*Polygonatum sibiricum*)中分离出内生菌,测定其抗氧化能力即清除自由基 α -二苯基- β -三硝基胍的能力,利用气相色谱-质谱(GC-MS)分析鉴定次级代谢物且结合化学指纹图谱鉴定了已知和未知化合物的谱图,结果测定了 8 种明确的化合物是活性粗提取物中含量最丰富的化合物,具有显著抗菌和抗氧化特性。由于许多内生真菌会产生有毒的次生代谢物,所以有必要在体外进行毒性检测,如 Singh 等^[45]将内生真菌分离物在麦芽提取物培养基中培养,并使用艾姆氏实验(Ames test)方法,即鼠伤寒沙门氏菌组氨酸营养缺陷型 His(-)菌株和中国仓鼠卵巢细胞(CHO)细胞系分别评估真菌提取物的致突变性和细胞毒性,研究表明该提取物本质上是非致突变和非细胞毒性的,可用于制药行业。植物病原菌对抗生素耐药性和多重耐药微生物的出现已成为当今世界一个严重问题。研究表明,内生菌可以通过产生抗菌次级代谢物直接限制病原体损伤,或刺激植物诱导的全身抗性间接控制植物病原体^[46]。因此,借助交叉学科如基因组学、蛋白质组学、合成生物学等方法手段深入挖掘内生菌次生生物活性代谢物,探索内生菌代谢物与宿主植物之间的相互作用机制,将有利于发现新的代谢基因和次生代谢途径,为抗病育种提供新策略。

通过同源重组进行基因工程已广泛应用于真菌功能基因组学研究,但许多丝状真菌的同源重组修复效率普遍较低,基于 CRISPR/Cas9 技术的基因组编辑已成为提高丝状真菌所需代谢物产量的有用工具,靶向和筛选新型生物活性次级代谢物的成功率已提高,并且可以在有益内生菌中以更快的速度标记和鉴定生物合成遗传簇^[47]。Gakuubi 等^[48]利用 CRISPR/Cas9 核糖核蛋白介导的基因组编辑技术验证了 *Lophiotrema* 囊菌属内生真菌中参与棕榈霉素和黑色素生物合成的基因簇。研究者曾提出利用 CRISPR/Cas9 技术提高内生真菌的洛伐他汀和紫杉醇产量,所以是否可以通过同时过表达关键调节酶和阻断竞争途径来增加代谢物的产量,还需进一步验证^[49]。Xu 等^[50]成功开发了用于内生真菌 *Pestalotiopsis fici* 的 CRISPR/Cas9 依赖性基因组编辑系统,通过将 CRISPR/Cas9 系统引入内生真菌,改进了聚乙二醇介导的原生质体转化方法,与根癌农杆菌介导的转化等传统方法相比,CRISPR/Cas9 应用后内生 *Pestalotiopsis fici* 的位点特异性基因插入和编辑效率分别提高了 48%和 44%;同时将 DNA 片段(5–10 kb)缺失的遗传操作时间缩短至 1 周,CRISPR/Cas9 的辅助研究可将特定遗传变化引入内生真菌基因组,使其能够研究基因的功能,改善其促进植物生长的特性,创造新颖有益的内生菌,挖掘更多次生代谢产物。

6 展望

对内生菌的分离、筛选及鉴定,有助于发现微生物新资源,以扩大对微生物圈的认识,促进对内生菌类群特征的了解。内生菌对植物抗菌性、抗逆性的研究有利于农药制剂的研发。深入研究内生菌与宿主植物的共生机制,尤其是在药用植物中利用内生菌上调植物药物成分引起研

究者的关注。根据环境和植物种类的不同,选择合适的接种方式,有利于促进田间试验的成功率。分子生物学、微生物学、基因组学、代谢组学等一系列科学技术手段相继取得重大突破,成为我国农业绿色发展的强有力“助推器”^[51]。近年来,植物内生菌研究已经成为多种交叉学科研究的热点,虽然采取很多传统方法对内生菌进行了探索,但效果不明显。灵敏、高效、科学、标准化的内生菌测定方法是系统研究内生菌特点和功能的基础手段。目前亟待创新有效的科学技术和方法来解决可培养和不可培养内生菌、内生菌定殖及对宿主代谢、抗逆、抗病、促生等系列问题,以探索内生菌-宿主间的互作机理。因此,农业绿色发展的前提是技术的进步,混合接种效果的优化、促生菌促生基因的功能分析和调控通路研究、组学技术的综合应用等将是未来研究植物内生菌的重要领域。

REFERENCES

- [1] 张晓婧, 刘润进. 广义与狭义植物内生生物的定义及其研究进展[J]. 微生物学通报, 2014, 41(3): 560-571. ZHANG XJ, LIU RJ. Broad and narrow definition of endophytes and related advances in the study[J]. Microbiology China, 2014, 41(3): 560-571 (in Chinese).
- [2] 黄雪珍, 赵龙飞. 药用植物内生菌对宿主植物促生作用机制研究进展[J]. 微生物学通报, 2023, 50(4): 1653-1665. HUANG XZ, ZHAO LF. Mechanism of endophytes of medicinal plants in promoting the growth of host plants[J]. Microbiology China, 2023, 50(4): 1653-1665 (in Chinese).
- [3] VERMA SK, SAHU PK, KUMAR K, PAL G, GOND SK, KHARWAR RN, WHITE JF. Endophyte roles in nutrient acquisition, root system architecture development and oxidative stress tolerance[J]. Journal of Applied Microbiology, 2021, 131(5): 2161-2177.
- [4] VANDANA UK, RAJKUMARI J, SINGHA LP, SATISH L, ALAVILLI H, SUDHEER P, CHAUHAN S, RATNALA R, SATTURU V, MAZUMDER PB, PANDEY P. The endophytic microbiome as a hotspot of synergistic interactions, with prospects of plant growth promotion[J]. Biology, 2021, 10(2): 101.
- [5] YANG RX, FAN XJ, CAI XQ, HU FP. The inhibitory mechanisms by mixtures of two endophytic bacterial strains isolated from *Ginkgo biloba* against pepper phytophthora blight[J]. Biological Control, 2015, 85: 59-67.
- [6] WU W, CHEN WH, LIU SY, WU JJ, ZHU YT, QIN LP, ZHU B. Beneficial relationships between endophytic bacteria and medicinal plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 646146.
- [7] TANG MJ, LU F, YANG Y, SUN K, ZHU Q, XU FJ, ZHANG W, DAI CC. Benefits of endophytic fungus *Phomopsis liquidambaris* inoculation for improving mineral nutrition, quality, and yield of rice grains under low nitrogen and phosphorus condition[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2022, 41(6): 2499-2513.
- [8] LASTOCHKINA O, YULDASHEV R, AVALBAEV A, ALLAGULOVA C, VESELOVA S. The contribution of hormonal changes to the protective effect of endophytic bacterium *Bacillus subtilis* on two wheat genotypes with contrasting drought sensitivities under osmotic stress[J]. Microorganisms, 2023, 11(12): 2955.
- [9] SHI XJ, QIN TZ, QU YB, ZHANG JZ, HAO G, ZHAO NX, GAO YB, REN AZ. Infection by endophytic *Epichloë sibirica* was associated with activation of defense hormone signal transduction pathways and enhanced pathogen resistance in the grass *Achnatherum sibiricum*[J]. Phytopathology, 2022, 112(11): 2310-2320.
- [10] LI X, SUN HF, FAN JH, LI YY, MA LJ, WANG LL, LI XM. Transcriptome modulation by endophyte drives rice seedlings response to Pb stress[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2023, 254: 114740.
- [11] SCHULZ B, BOYLE C. The endophytic continuum[J]. Mycological Research, 2005, 109(Pt 6): 661-686.
- [12] 郑斯平, 陈彬, 关雄, 郑伟文. 小叶满江红内生细菌多样性的PCR-DGGE及电子显微镜分析[J]. 农业生物技术学报, 2008, 16(3): 508-514. ZHENG SP, CHEN B, GUAN X, ZHENG WW. Diversity analysis of endophytic bacteria within *Azolla microphylla* using PCR-DGGE and electron microscopy[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2008, 16(3): 508-514 (in Chinese).
- [13] WOŹNIAK M, GAŁĄZKA A, GRZĄDZIEL J, GŁODOWSKA M. The identification and genetic diversity of endophytic bacteria isolated from selected crops[J]. The Journal of Agricultural Science, 2018, 156(4): 547-556.

- [14] 罗兴, 邹兰, 吴清山, 张要朋, 巫荣星, 王茜, 熊伟, 戴维, 叶坤浩, 黄晶. 乌头产吲哚乙酸内生细菌遗传多样性、抗逆性及其对水稻幼苗生长的影响[J]. 微生物学报, 2022, 62(4): 1485-1500.
LUO X, ZOU L, WU QS, ZHANG YP, WU RX, WANG Q, XIONG W, DAI W, YE KH, HUANG J. Genetic diversity, stress resistance, and effect on rice seedling growth of indoleacetic acid-producing endophytic bacteria isolated from *Aconitum Carmichaelii* Debeaux[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(4): 1485-1500 (in Chinese).
- [15] NIEM JM, BILLONES-BAAIJENS R, STODART B, SAVOCCHIA S. Diversity profiling of grapevine microbial endosphere and antagonistic potential of endophytic *Pseudomonas* against grapevine trunk diseases[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 477.
- [16] 王世茜, 陈天意, 冯亚萍, 张晓妍, 范馨予, 欧阳艳. 伊犁野生郁金香内生烟曲霉的分离鉴定及活性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(1): 289-300.
WANG SM, CHEN TY, FENG YP, ZHANG XY, FAN XY, OUYANG Y. Isolation, identification, and activity of endophytic *Aspergillus fumigatus* from wild tulip in Ili[J]. Microbiology China, 2023, 50(1): 289-300 (in Chinese).
- [17] XU X, SHAO MW, YIN CP, MAO ZC, SHI JJ, YU XY, WANG Y, SUN FF, ZHANG YL. Diversity, bacterial symbionts, and antimicrobial potential of termite-associated fungi[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 300.
- [18] 高振峰, 李娜, 张晓宇, 韩巨才. 番茄灰霉病高效内生拮抗细菌的筛选与定殖特性[J]. 河南农业科学, 2020, 49(3): 88-100.
GAO ZF, LI N, ZHANG XY, HAN JC. Screening and colonization characteristics of efficient endophytic antifungal bacteria against *Botrytis cinerea*[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2020, 49(3): 88-100 (in Chinese).
- [19] 赵龙飞, 徐亚军, 邓振山, 赖心河, 周金源, 马素珍, 符可, 周璞, 朱艳芳. 拮抗棉花枯萎病菌的地黄内生细菌筛选、鉴定和促生潜能[J]. 微生物学报, 2021, 61(8): 2338-2357.
ZHAO LF, XU YJ, DENG ZS, LAI XH, ZHOU JY, MA SZ, FU K, ZHOU P, ZHU YF. Screening, identification and growth-promoting of antagonistic endophytic bacteria associated with *Rehmannia glutinosa* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(8): 2338-2357 (in Chinese).
- [20] 陈丽莹, 方荣祥, 吴建祥, 张莉莉. 植物内生细菌测定方法的研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 1105-1119.
CHEN LY, FANG RX, WU JX, ZHANG LL. Research progress in the detection methods of endophytic bacteria[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 1105-1119 (in Chinese).
- [21] 王红阳, 康传志, 王升, 蒋待泉, 彭政, 徐扬, 杜用玺, 张燕, 刘大会, 郭兰萍. 基于高通量测序和传统培养分离方法的药用植物内生菌资源研究策略[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(8): 1910-1919.
WANG HY, KANG CZ, WANG S, JIANG DQ, PENG Z, XU Y, DU YX, ZHANG Y, LIU DH, GUO LP. Research strategies for endophytes in medicinal plants based on high-throughput sequencing and traditional culture and isolation methods[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2021, 46(8): 1910-1919 (in Chinese).
- [22] LI Z, HU JR, LI WH, WANG HC, GUO ZN, CHENG X, CAI LT, SHI CH. Characteristics of *Epicoccum laticollum* as revealed by genomic and metabolic phenomic analysis, the causal agent of tobacco *Epicoccus* leaf spot[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1199956.
- [23] WOŹNIAK M, GAŁĄZKA A, TYŚKIEWICZ R, JAROSZUK-ŚCISEŁ J. Endophytic bacteria potentially promote plant growth by synthesizing different metabolites and their phenotypic/physiological profiles in the Biolog GEN III MicroPlate™ test[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(21): 5283.
- [24] 荣楠, 李备, 唐昊冶, 林先贵, 冯有智. 微生物菌种筛选技术方法研究进展[J]. 土壤, 2021, 53(2): 236-242.
RONG N, LI B, TANG HY, LIN XG, FENG YZ. Advances in strain isolating technique and method for microorganisms[J]. Soils, 2021, 53(2): 236-242 (in Chinese).
- [25] 唐广宣, 何莉薇, 陈泳好, 张佳研, 戴雅琪, 吕辉雄, 刘丽辉. 植物内生菌定殖检测技术及其应用[J]. 生物技术进展, 2023, 13(1): 55-64.
TANG GX, HE LW, CHEN YY, ZHANG JY, DAI YQ, LYU HX, LIU LH. Techniques on colonization and detection of plant endophytes and its application[J]. Current Biotechnology, 2023, 13(1): 55-64 (in Chinese).
- [26] ZHAO LF, XU YJ, MA ZQ, DENG ZS, SHAN CJ, WEI GH. Colonization and plant growth promoting characterization of endophytic *Pseudomonas chlororaphis* strain Zong1 isolated from *Sophora alopecuroides* root nodules[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2013, 44(2): 623-631.

- [27] PAL G, KUMAR K, VERMA A, VERMA SK. Seed inhabiting bacterial endophytes of maize promote seedling establishment and provide protection against fungal disease[J]. Microbiological Research, 2021, 255: 126926.
- [28] 苏博, 江胡彪, 乔建礼, 潘洁, 许伟, 武安宁, 丁婷. 玉米纹枯病生防菌 DZSY21 的抗病机制[J]. 浙江农业学报, 2017, 29(3): 450-459.
- SU B, JIANG HB, QIAO JL, PAN J, XU W, WU AN, DING T. Resistance mechanism of bio-control strain DZSY21 against maize sheath blight[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2017, 29(3): 450-459 (in Chinese).
- [29] ZHANG L, BAI JH, ZHAI YJ, ZHANG KG, WANG YQ, XIAO R, JORQUERA MA. Effects of antibiotics on the endophyte and phyllosphere bacterial communities of lotus from above and below surface water in a typical shallow lake[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2023, 201: 107812.
- [30] DING T, SU B, CHEN XJ, XIE SS, GU SY, WANG Q, HUANG DY, JIANG HY. An endophytic bacterial strain isolated from *Eucommia ulmoides* inhibits southern corn leaf blight[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 903.
- [31] GALAMBOS N, COMPANT S, MORETTO M, SICHER C, PUOPOLO G, WÄCKERS F, SESSITSCH A, PERTOT I, PERAZZOLLI M. Humic acid enhances the growth of tomato promoted by endophytic bacterial strains through the activation of hormone-, growth-, and transcription-related processes[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 582267.
- [32] DUDEJA SS, SUNEJA-MADAN P, PAUL M, MAHESWARI R, KOTHE E. Bacterial endophytes: molecular interactions with their hosts[J]. Journal of Basic Microbiology, 2021, 61(6): 475-505.
- [33] ZHAO LF, XU YJ, LAI XH, SHAN CJ, DENG ZS, JI YL. Screening and characterization of endophytic *Bacillus* and *Paenibacillus* strains from medicinal plant *Lonicera japonica* for use as potential plant growth promoters[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2015, 46(4): 977-989.
- [34] 赵龙飞, 徐亚军, 曹冬建, 李源, 厉静杰, 吕佳萌, 朱自亿, 秦珊珊, 贺学礼. 溶磷性大豆根瘤内生菌的筛选、抗性及其系统发育和促生[J]. 生态学报, 2015, 35(13): 4425-4435.
- ZHAO LF, XU YJ, CAO DJ, LI Y, LI JJ, LÜ JM, ZHU ZY, QIN SS, HE XL. Screening, resistance, phylogeny and growth promoting of phosphorus solubilizing bacteria isolated from soybean root nodules[J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(13): 4425-4435 (in Chinese).
- [35] ZHAO LF, XU YJ, LAI XH. Antagonistic endophytic bacteria associated with nodules of soybean (*Glycine max* L.) and plant growth-promoting properties[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2018, 49(2): 269-278.
- [36] 赵龙飞, 徐亚军, 赖心河, 常佳丽, 欧启凡, 孟嘉琦, 彭顶华. 内生细菌 252 和 254 对盐胁迫下小麦幼苗过氧化物酶和过氧化氢酶活性的影响[J]. 应用生态学报, 2017, 28(9): 2984-2992.
- ZHAO LF, XU YJ, LAI XH, CHANG JL, OU QF, MENG JQ, PENG DH. Effects of endophytic bacteria 252 and 254 on peroxidase (POD) and catalase (CAT) activities of wheat seedlings under salt stress[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2017, 28(9): 2984-2992 (in Chinese).
- [37] 徐亚军, 赵龙飞, 邢鸿福, 罗云霄, 魏正欣. 内生细菌对盐胁迫下小麦幼苗脯氨酸和丙二醛的影响[J]. 生态学报, 2020, 40(11): 3726-3737.
- XU YJ, ZHAO LF, XING HF, LUO YX, WEI ZX. Effects of endophytic bacteria on proline and malondialdehyde of wheat seedlings under salt stress[J]. Acta Ecologica Sinica, 2020, 40(11): 3726-3737 (in Chinese).
- [38] 赵龙飞, 徐亚军, 邵璇, 杨静雅. 两株内生芽孢杆菌对盐胁迫下大豆幼苗超氧化物歧化酶和过氧化物酶活性影响[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1664-1677.
- ZHAO LF, XU YJ, SHAO X, YANG JY. Two endophytic *Bacillus* strains from soybean nodules affect superoxide dismutase and peroxidase activities in soybean seedlings under salt stress[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1664-1677 (in Chinese).
- [39] GOVINDASAMY V, GEORGE P, KUMAR M, AHER L, RAINA SK, RANE J, ANNAPURNA K, MINHAS PS. Multi-trait PGP rhizobacterial endophytes alleviate drought stress in a senescent genotype of Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench][J]. 3 Biotech, 2019, 10(1): 13.
- [40] LIU CJ, LIN H, LI B, DONG YB, QIU Y. Screening endophyte with capability to improve phytoremediation efficiency from hyperaccumulators: a novel and efficient microfluidic method[J]. Chemosphere, 2022, 286(Pt 2): 131723.
- [41] XIA Y, LIU J, CHEN C, MO X, TAN Q, HE Y, WANG Z, YIN J, ZHOU G. The multifunctions and future prospects of endophytes and their metabolites in plant disease management[J]. Microorganisms, 2022, 10(5): 1072.

- [42] LERY LMS, HEMERLY AS, NOGUEIRA EM, VON KRÜGER WMA, BISCH PM. Quantitative proteomic analysis of the interaction between the endophytic plant-growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* and sugarcane[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2011, 24(5): 562-576.
- [43] SHARMA A, MALHOTRA B, KHARKWAL H, KULKARNI GT, KAUSHIK N. Therapeutic agents from endophytes harbored in Asian medicinal plants[J]. *Phytochemistry Reviews*, 2020, 19(3): 691-720.
- [44] ZHAO LY, LIU Y, SUN HR, LI Y, PACHAIYAPPAN SK, FANG XY, RAN YL, QIN Y, LUO K, HE MJ. Metabolomics-guided identification of compounds with antibacterial and antioxidant activities from *Polygonatum sibiricum*-derived endophytic fungi[J]. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 2023, 12(1): 58.
- [45] SINGH B, SHARMA P, KUMAR A, CHADHA P, KAUR R, KAUR A. Antioxidant and *in vivo* genoprotective effects of phenolic compounds identified from an endophytic *Cladosporium velox* and their relationship with its host plant *Tinospora cordifolia*[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2016, 194: 450-456.
- [46] SHARMA A, KAUSHIK N, SHARMA A, MARZOUK T, DJÉBALI N. Exploring the potential of endophytes and their metabolites for bio-control activity[J]. *3 Biotech*, 2022, 12(10): 277.
- [47] CHOWDHARY K, ARORA H, SHARMA S. CRISPR/Cas9-based genome editing as a way ahead for inducing production of bioactive metabolites in endophytes[J]. *National Academy Science Letters*, 2022, 45(3): 275-280.
- [48] GAKUUBI MM, CHING KC, MUNUSAMY M, WIBOWO M, LIM CT, MA GL, LIANG ZX, KANAGASUNDARAM Y, NG SB. CRISPR/Cas9 RNP-assisted validation of palmarumycin biosynthetic gene cluster in *Lophiotrema* sp. F6932[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1012115.
- [49] EL-SAYED ASA, ABDEL-GHANY SE, ALI GS. Genome editing approaches: manipulating of lovastatin and taxol synthesis of filamentous fungi by CRISPR/Cas9 system[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(10): 3953-3976.
- [50] XU XR, HUANG RY, YIN WB. An optimized and efficient CRISPR/Cas9 system for the endophytic fungus *Pestalotiopsis fici*[J]. *Journal of Fungi*, 2021, 7(10): 809.
- [51] BURRAGONI SG, JEON J. Applications of endophytic microbes in agriculture, biotechnology, medicine, and beyond[J]. *Microbiological Research*, 2021, 245: 126691.