

中国植物内生微生物研究的发展和展望

王志伟^{1,2} 陈永敢³ 王庆璨¹ 纪燕玲^{1*}

(1. 南京农业大学 生命科学学院 江苏 南京 210095)

(2. 海南丰源无公害农业技术研究所 海南 海口 570207)

(3. 琼州学院 生物科学与技术学院 海南 三亚 572022)

摘要：我国植物内生微生物的早期研究论文，基本上以非豆科植物根瘤菌 *Frankia* 属细菌为主。进入 21 世纪后，植物内生菌的研究，无论是研究领域的扩大，研究人员的增加，还是论文数量的递增都有了迅猛的发展，为国际上少有。我国植物内生微生物的研究具有资源探索多、分离培养多、活性检测多、活性物质功能研究多；方法研究少、涉及林木少、与宿主的关联少、实际应用少等特点。其研究主要集中在红豆杉类、红树类、鬼白类、兰、银杏等植物中的内生微生物。论文的发表以药物开发为研究目标的最多，又以初级的资源探索型为最。以抗菌、抗肿瘤等指标为主的药物开发，是植物内生微生物研究中最耀眼的亮点，目前已获得了紫杉醇生产效率较高的内生真菌菌株资源。我国植物内生微生物研究有 4 大类 24 个应用研究的方向，其中特别值得关注的是豆科植物根瘤内生细菌的研究；尚待加强的有 6 个方面，尤其是深色有隔内生真菌(DSE)的研究。我国植物内生微生物研究在药用植物内生微生物的资源探索和筛选方面积累较丰富，而在有害内生微生物方面的研究则比较薄弱。最后，作者提示了一些尚待加强的研究技术，供相关人员参考。

关键词：内生真菌，内生细菌，共生体，生物制药，抗病虫害，有毒内生菌，DSE 真菌，根瘤内生细菌

Progresses and perspectives of studies on plant endophytic microbes in China

WANG Zhi-Wei^{1,2} CHEN Yong-Gan³ WANG Qing-Can¹ JI Yan-Ling^{1*}

(1. College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

(2. Fengyuan Institute of Frontier Technologies for Agriculture (FIFTA), Haikou, Hainan 570207, China)

(3. College of Biological Science and Technology, Qiongzhou University, Sanya, Hainan 572022, China)

Abstract: Early start of studies on plant endophytic microbes in China mainly focused on actinomycetes *Frankia* spp.. Since 2000, studies on plant endophytic microbes grow rapidly in various areas and people engaged in. Studies on plant endophytic microbes in China could be characterized as abundant in resource investigations, isolation and incubation, detection of

基金项目：国家自然科学基金项目(No. 30800156, 30970081, 31372365)

*通讯作者：Tel: 86-25-84395531; 信箱: yanlingji@njau.edu.cn

收稿日期：2014-02-17；接受日期：2014-03-04；优先数字出版日期(www.cnki.net)：2014-03-05

bio-activities, functions of bioactive compounds; few in technological advancement, forest resources, association with hosts, practical applications. The common reported hosts are *Taxus* spp., mangrove, Podophylloideae, *Ginkgo biloba*, Orchidaceae. Most reports of resource investigations targeted in screening medicines. Advancements on antimicrobial and antitumor compounds, especially in obtaining strains which can effectively synthesis taxol, ranked top of progress on plant endophytes. In this review, 24 applied branches within 4 classes of studies on plant endophytic microbes in China were listed, especially non-specific endophytic bacteria in nodules. Well, 6 aspects, including Dark septate endophytes (DSE) need to be improved in the future. Studies on plant endophytic microbes in China are rich in medical plants and resource discovery, while weak in harmful microbes. Finally, we list seven technologies need to be developed for consideration.

Keywords: Endophytic fungi, Endophytic bacteria, Symbiota, Biological pharmacy, Plant resistances to pests and diseases, Toxic endophytes, DSE fungi, Non-specific endophytic bacteria in nodules

1 我国植物内生微生物研究信息的检索

植物内生微生物通常包括细菌和真菌,被称为植物内生菌(Plant endophytes)、植物内生真菌(Fungal endophytes; Endophytic fungi)和植物内生细菌(Bacterial endophytes; Endophytic bacteria)。关于植物内生微生物的概念比较混乱,“存在于外表正常的植物组织内的真菌和细菌”可能是植物内生微生物最笼统的、可大范围内被接受的说法。但是,实际上没有多少人会同意将植物病原物、根瘤菌、甚至于部分动物病原物称为植物内生菌。另一方面,在汉语中,植物内生菌和植物内生细菌以及植物内生真菌在习惯用法上略有一些区别。文献检索时,用“内生菌”、“内生真菌”或“内生细菌”分别进行检索时所获得的信息重叠较少,这三种说法一直在学术界并行。为了将这三个领域综合到一起,本文采用“植物内生微生物(Plant endophytic microbes)”来概括。

相对于其它微生物资源,植物内生微生物资源的研究在我国起步较晚、但发展较快。要完整地我国的植物内生微生物研究综合起来,不是一件容易的事。这里,我们在中国知网的中国学术期刊网络出版总库(<http://epub.cnki.net/KNS/brief/result.aspx?dbprefix=CJFQ>)中对论文篇名中含有“内生菌”、“内生真菌”或“内生细菌”一词的文章进行检索,获得了各年份的从正面直接研究植物内生微生物的文章,总数高达 2 294 篇。将这些文章下载后

经逐一阅读确认,去掉重复的检索结果,获得了 2 227 篇可靠的有效论文。从这些论文中,我们总结了一些研究倾向和特点,与关注植物内生微生物研究的广大科学工作者分享。

根据从中国学术期刊网络出版总库检索获得的数据,早期的植物内生菌研究以零星报道为主。从 20 世纪 80 年代开始国内杂志上出现篇名中含有“内生菌”的论文,但总数不多。第一篇有效检索结果是 1981 年黑龙江省农业科学院土壤肥料与环境资源研究所窦新田的《早熟禾根系固氮活性和根瘤内生菌的观察》一文^[1]。而篇名中含有“内生细菌”或“内生真菌”的论文则到 1994 年才出现^[2-3]。在 1981-1993 年的 14 年间,从中国学术期刊网络出版总库查阅到篇名中含有“内生菌”字样的文章共有 61 篇,而含有“内生细菌”或“内生真菌”的分别只有 1 篇和 2 篇。在这 3 篇文章中,只有一篇是 1985 年南京农业大学李扬汉的关于毒麦中内生真菌检测的研究报告^[4],其余两篇为编译的国外的综述。因此,从这个角度来看,1985 年是中国植物内生真菌研究开启纪元之年。

1994 年也是中国植物内生菌研究史上值得纪念的一年。北京大学的邱德有和中国科学院植物研究所朱至清联合发表了《一种云南红豆杉内生真菌的分离》一文,开启了我国药用植物内生真菌的研究^[3]。90 年代末开始,国家自然科学基金委生命科学部连续几年出台了支持植物内生菌研究的政策,

有效地促进了我国植物内生菌研究的发展。进入 21 世纪后,我国植物内生微生物研究人员急速增加,论文数量也随之递增,我国植物内生微生物的研究进入了快速发展的轨道(图 1)。

2 我国早期的植物内生微生物研究

早期的研究中以植物内生菌为题的报道,绝大部分都是非豆科植物根系内分离到的固氮根瘤菌 *Frankia* 属细菌,宿主植物主要有桤木(*Alnus* spp.)、木麻黄(*Casuarina* sp.)、沙棘(*Hippophae* sp.)、杨梅(*Myrica* sp.)和胡颓子(*Elaeagnus* sp.)等。此外还有百合科(Liliaceae)百合(*Lilium* sp.)细胞中的内生菌研究。

篇名中第一次出现内生细菌的原著论文是 1996 年中国农业大学刘云霞等关于水稻内生细菌巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)在水稻内分布的研究^[5],以及吴加志等关于 *Enterobacter*、*Pseudomonas* 和 *Bacillus* 三属植物内生细菌在植物病害生物防治潜力方面的研究^[6]。受国外植物内生细菌研究的影响,作为植物病害的生防因子,我国棉花、水稻、马铃薯等作物的内生细菌首先受到了

关注。

我国首次正面研究内生真菌的是已故南京农业大学终身教授李扬汉关于麦田有毒杂草毒麦(*Lolium temulentum*)中内生真菌的观察^[4],此后我国内生真菌的研究沉寂了约 10 年。邱德有等关于红豆杉内生真菌的先驱性研究开启了我国药用植物内生真菌研究的蓬勃时代^[3,7-9]。目前,关于药物开发指向的植物内生微生物及其所产生生理活性物质研究,在我国遍及以药用植物和农用植物为主的数十科野生植物和农作物,连年产出百余篇原著论文和十余篇文献综述(图 1)。按现在的趋势,我国年度发表植物内生真菌相关原著论文将很快会超过 200 篇,研究热潮有增无减,成为植物内生微生物研究中最活跃的领域。

植物内生真菌的另一个重要内容——禾本科植物麦角类内生真菌的研究,自甘肃草原生态研究所南志标从新西兰回国后才真正兴起。南志标先生在甘肃省自然科学基金和国家人事部归国留学人员科研启动资金的资助下,利用执行联合国粮食计划署 2817 项目咨询任务时从新疆阿勒泰地区采集到的野生植物样品,首次检测到我国产布顿大麦

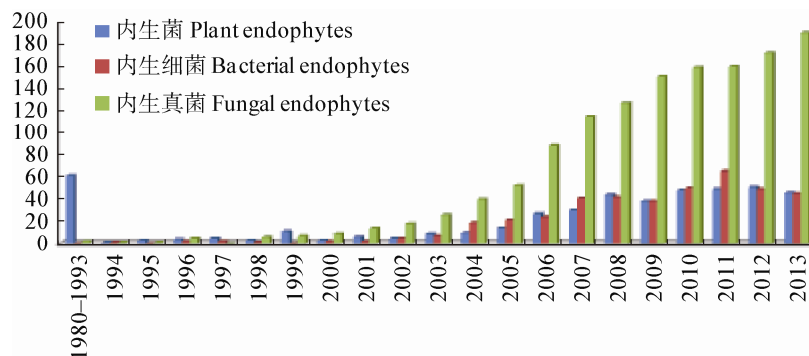


图 1 在中国学术期刊网络出版总库分别用“内生菌”、“内生细菌”和“内生真菌”对篇名的检索结果
Figure 1 Numbers of references titled by “plant endophytes”, “bacterial endophytes” and “fungal endophytes” in <http://epub.cnki.net/KNS/brief/result.aspx?dbprefix=CJFQ>

注:以内生菌为题的论文有的是内生细菌、有的是内生真菌,有的则是内生细菌和内生真菌兼有。其早期的研究则以放线菌(内生细菌)居多,实际上,至今仍有不少论文将内生放线菌与内生细菌并记。

Note: References titled by “endophytes” could be “bacterial endophytes”, “fungal endophytes” or together. Early reports focused on actinomycetes (bacterial endophytes). Now actinomycetes and “bacterial endophytes” still remain interchangeable.

草(*Hordeum bogdanii*)中含有内生真菌,并指出内生真菌的植株能促使宿主植物总生物量、干物质产量、根重以及分蘖数均有所增加。同时也发现,甘肃省的中华羊茅、紫羊茅和部分雀麦属植物中不同程度的含有内生菌^[10-11]。同时,在美国牧草种子公司的资助下,新疆草原研究所的李宝军等利用新疆种子资源库的11种牧草种子进行了内生真菌的检测,发现醉马草种子中含有内生真菌^[12]。2000年后关于禾本科植物内生菌,兰州大学的南志标/李春杰课题组、南开大学的高玉葆/任安芝课题组以及南京农业大学的王志伟/纪燕玲课题组等展开持续性的研究。

3 植物内生微生物研究的基本特点

首先应该指出,国际国内植物内生微生物研究最突出的特点是其范围大、涉及微生物的种类多样、功能繁杂、潜力广阔。据现行学术界通用的概念和范畴,只要是有机体在植物体内出现的微生物,几乎无所不包括在植物内生微生物的范畴之内^[13-15]。这个特征决定了植物内生微生物的研究领域是广阔的,所涉及的学科除生物科学类各基础学科外,还有农学和林学类各基础学科、药物化学、医学、生物工程、食品保藏与加工等多方面的学科。因此,植物内生微生物的研究适合多领域共同协作,在视角和概念运用等方面出现多元化也是很自然的。

第二,植物内生微生物基本功能是多层次的。最基本的层次是微生物本身的显性功能。这种功能以微生物的分离物为基础、在人工培养时即得以表达,可通过人工培养以及人工发酵进行研究、挖掘和改良,我国这方面的研究报告最多^[16-18]。第二层次是微生物和宿主植物形成共生体(Symbiota)所表现出来的功能。就像绝大多数产毒素的冷季型禾本科植物与其 *Epichloae* 类内生真菌的共生体那样,这种毒素的生产和积累的功能不是植物或微生物单独所具有的,或者单独能达到的强度和高度,只有通过宿主植物和内生微生物形成共生体后才体

现出来^[19-21]。第三层次是内生微生物/宿主植物共生体在不同环境中所表达出来的不同功能或不同程度。上述产毒 *Epichloae* 类内生真菌和其宿主植物的共生体也不是在任何时候、任何环境中都能生产和积累毒素,在某种特定的环境条件下生产毒素(多),在另外的条件下则少生产或根本不生产毒素^[19,22]。植物生长环境直接介入微生物和宿主植物共生体的生物学特性的表达。这一现象十分符合植物和微生物相互作用的基本规律,可能对利用植物内生微生物的生理活性物质进行生物制药研究和开发的科研人员也会有积极的启发。

第三,植物内生微生物给人类带来的影响不全是有益的,有时也会出现有害的一面。从文献的描述来看,这一点在我国目前仅在少数研究中引起了注意。黑麦草内生真菌、苇状羊茅内生真菌、疯草内生真菌等给宿主植物带来的毒素生产和积累则是最突出的例子。无论是产毒的禾本科植物内生真菌还是疯草内生真菌,这些有害事例已经给社会造成了巨大的损失^[19,23]。另外,虽然没有出现鹅观草致毒的报道,但从其中的内生真菌中也检测到了一些毒素生产基因(王志伟等,未发表)。因此,我们有必要对植物内生微生物给人类带来的有害影响给以足够的关注。同样,我们固然可以期望植物内生微生物给宿主植物带来或加强抗菌作用(Antagonism)、化感作用(Allelopathy)等抑制其它生物生长和发育的功能,在植物抗病、抑制杂草等方面起到一定的正面作用。但另一方面,这些作用是否会导致区域内生物多样性的降低^[24-25],产生新的生态问题?这些都需要认真评价。

第四,植物内生微生物的功能一部分可通过生物学/生物化学的特征表现出来,另有一部分功能必须通过生态学的方法才能加以研究和利用。新西兰在飞机场及其周边大规模种植产毒素 *Epichloae* 类内生真菌和其宿主植物共生体,以此驱避在机场聚集的鸟类(John Caradus, 私人通信)。这是通过生态学的方法对植物内生微生物的功能加以利用的一个代表性事例。在我国,利用植物内生微生物

进行植物病虫害的生物防治也是这类事例中的典型^[25-27]。在这些情况下,内生微生物和其宿主植物的共生体特征的稳定表达就十分重要。一般来说,植物内生微生物作为药用微生物利用时,微生物本身相对重要一些,而作为农用资源或环境修复手段加以利用时,共生体的特征则往往更加重要。

4 我国植物内生微生物研究的发展和特点

进入 21 世纪,特别是近 10 年来,我国植物内生微生物的研究发展迅猛。据最保守统计,在我国发行杂志上由我国科研人员发表的植物内生微生物的论文(篇名中含有“内生菌”、“内生细菌”或“内生真菌”字样的论文)在 2008 年以后每年都超过 200 篇,2013 年论文总数已逼近 300 篇(图 1)。考虑篇名中没有体现出来的论文以及在国外发表的论文,我国科研人员近年来发表的植物内生微生物研究的论文大约每年可达 400 篇以上。研究领域也全面开花,基本形成了 4 大板块、24 个分支的局面(表 1)。至此,我国已形成了一支队伍庞大、成果丰硕的科研力量,在国际植物内生微生物研究中占有十分显要的地位。

从整体趋势来看,我国植物内生微生物研究的特点可概括为“四多四少”。资源探索多、分离培养多、活性检测和生物功能研究多、基础性前期工作多;方法研究少、涉及林木少、与宿主的关联少、

实际应用少。特别是以药物开发为目的的资源探索性研究报告最多,以抗菌、抗肿瘤等指标为主的药物开发指向的论文大量出现,形成了我国植物内生微生物研究中最耀眼的亮点^[17,28-29]。植物内生微生物研究以生理活性检测以及活性物质探索为主要范式(Paradigm)之一,思路清晰易懂、方法简单、实施容易,是研究生训练的好材料。关注我国植物内生微生物论文数量的上升时机,也不难发现其上升趋势和研究生毕业数量的上升基本同步(图 1)。

从论文数量整体来看,从 20 世纪末开始我国科研人员在本国的科学杂志上(中国学术期刊网络出版总库收录部分,1979-2013 年),植物内生微生物的研究有了飞速的发展。在 21 世纪的第一个 10 年中,我国关于植物内生微生物研究的突飞猛进,论文数量从 2000 年的 14 篇增加到 2010 年的 257 篇,翻了 18.4 倍(图 1);研究对象也从 *Frankia* 等非共生固氮根瘤菌为主、加上几个关于红豆杉内的紫杉醇生产菌以及冷季型禾本科植物中的麦角菌类真菌等零星报道,发展到包括草本、木本、单子叶、双子叶以及蕨类等数十科近百属植物中的微生物;研究方向也增加到包括医药、农业、环境、食品等多个领域(表 1)。最近几年来,植物内生微生物相关的论文数量继续增加、研究范围继续扩大,形成了我国微生物学研究中发展最快、研究人

| 表 1 植物内生微生物的研究方向 Table 1 Research areas of plant endophytic microbes | | | | |
|---|------------------|---------------------|---------------------|--------------|
| 编号 Number | 医药指向 Medicine | 农业指向 Agriculture | 环境指向 Environment | 其它 Others |
| 1 | 抗肿瘤 | 抗植物病原体 | 分解化学农药 | 抗菌蛋白 |
| 2 | 抗氧化 | 抗植物昆虫 | 分解难降解化合物 | 功能性酶制剂 |
| 3 | 抗动物病原体 | 抗杂草 | 生物修复 | 活菌体 |
| 4 | 抗病原媒介物 | 抗盐碱 | 公共卫生有害物控制 | 其它作用 |
| 5 | 酶抑制剂 | 抗不良气候 | 植物残害降解 | |
| 6 | 其它作用 | 促生长/繁殖 | 安全评估 | |
| 7 | | 其它作用 | 其它作用 | |

员增长和人才积累最快、研究范围扩大最快的领域。在这个领域中,显示各种生理活性、具有潜在的药物开发价值的植物内生真菌以及它们所生产的生理活性物质不断出现,具有抗病虫害活性的内生微生物菌株也大量积累,新的微生物物种被相继提出,并不断开发出重金属抗性增强、难降解化合物的分解等新的应用功能。同时,通过参与植物内生微生物研究而得到基本科学训练的年轻学者也大量进入社会,我国植物内生微生物的研究蕴含着巨大的发展潜力。

但是,我国植物微生物研究发展不平衡。在我国的期刊上发表的研究报告主要集中在医药方向和农业方向,尤其是以生物医药开发为目标的药用植物内生微生物的论文数量尤为突出^[17,28-29]。而在宏观生态学中十分重要的天然林木以及草原野草中的内生微生物则报道相对较少^[12,30-33]。在研究程度上也存在着“初步研究多、深入追究少”的特点。在生物活性和活性物质研究方面,分离和初步鉴定多、周密的分类鉴定少,活性菌株的初级筛选多、达到或接近可应用水平的筛选少,活性检测和物质初步提纯多、化合物纯化与鉴定少,发展到后期应用的事例则寥寥无几,有关生理活性物质生产的基因及其调控的研究则更少^[17,29]。在生态学研究方面,也存在微生物的群落结构、生态分布、生活史研究、培养条件的优化等都比较少的倾向^[33-36]。此外,微生物的分离技术、培养技术、微生物的消除技术、接种技术等开发还相对薄弱。考虑这些内生微生物的农业应用,能将植物内生微生物进行工具化的上述操作技术也有待于今后进一步开发。因此,我国的植物内生微生物研究的质量进一步提高、应用面继续扩大、实用性大幅度增加的空间依然很大。

5 我国植物内生微生物研究的成果

5.1 医药指向的研究

1993年,Strobel等报道了红豆杉内生真菌合成紫杉醇,在国际上形成了药用植物内生微生物开

发的范式。受此范式影响,我国医药指向的植物内生微生物研究以药用植物为材料居多,尤以红豆杉类植物、红树类植物、鬼臼类植物、石斛等兰科植物以及银杏等植物较为常见。

红豆杉属(*Taxus*)植物主要有短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*)、西藏红豆杉(*T. wallichiana*)、南方红豆杉(*T. chinensis* var. *mairei*)、云南红豆杉(*T. yunnanensis*)、东北红豆杉(*T. cuspidata*)等,我国微生物学工作者从中分离得到了紫杉霉属(*Taxomyces*)、镰孢霉属(*Fusarium*)、链格孢属(*Alternaria*)、拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis*)、曲霉属(*Aspergillus*)等植物内生真菌和内生细菌。从这些微生物中又分别检测到了抗肿瘤、抗氧化、抗动物病原物、抗病原媒介物、抑制特定酶活性等生物活性,分离到了生物碱类、苯丙素、萜类、醌类、脂类、酮类、酚类、有机酸类、甾体类等活性化合物及其衍生物,其中关于紫杉醇生产的研究报告最多^[17,28-29,37-38]。

常用的红树类植物主要包括生长在包括港澳地区在内的华南沿海的红海榄(*Rhizophora stylosa*)、秋茄树(*Kandelia candel*)、木榄(*Bruguiera gymnorhiza*)、蜡烛果(*Aegiceras corniculatum*)、白骨壤(*Auicennia marina*)、海漆(*Excoecaria agallocha*)等。我国微生物学工作者从中分离得到了链格孢属(*Alternaria*)、曲霉属(*Aspergillus*)、芽枝霉属(*Cladosporium*)、镰孢霉属(*Fusarium*)、拟青霉属(*Paecilomyces*)、拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis*)、青霉(*Penicillium*)、茎点霉(*Phoma*)、叶点霉(*Phyllosticta*)、木霉(*Trichoderma*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)等植物内生真菌和内生细菌^[39-41]。从这些微生物中又分别检测到了抗菌、抗肿瘤、抗氧化等活性,分离到了肽类、多糖类、尿囊素、异香豆素等活性化合物^[37,40-42]。

小檗科的桃儿七(*Sinopodophyllum hexandrum*)、八角莲(*Dysosma versipellis*)、南方山荷叶(*Diphylleia sinensis*)等鬼臼类(*Podophylloideae*)植物内生微生物中有些菌株能合成具有抗肿瘤活

性的鬼臼毒素(Podophyllotoxin); 银杏(*Ginkgo biloba*)的内生微生物中有些具有明显的抗氧化作用; 夹竹桃科长春花(*Catharanthus roseus*)的内生微生物中, 镰孢霉属(*Fusarium*)真菌等有些能合成具有明显的抗癌作用的长春新碱(Vincristine); 天麻(*Gastrodia elata*)、石斛属植物(*Dendrobium* spp.)等兰科(Orchidaceae)植物中的密环菌属(*Armillaria*)、角担菌属(*Ceratobasidium*)、皮伞菌属(*Marasmius*)、镰孢霉属(*Fusarium*)、丝核菌属(*Rhizoctonia*)等内生真菌也生产多种生理活性物质, 获得了高度的关注^[17,29,37]。

关于药用植物的内生微生物及其药物指向的生理活性物质的研究在我国如火如荼, 从各个角度总结出来的综述也层出不穷^[9,37,43-44], 在此不一赘述。但是王剑文、谭仁祥等提出的利用内生菌寡糖诱导黄花蒿(*Artemisia annua*)发根(Hairy root)合成青蒿素(Artemisinin)的研究提示了植物内生微生物利用的一个新方向^[45], 提示了植物内生微生物的作用并非一定要以微生物为主的思路, 唤起我们对内生菌和宿主两者的相互作用的关注, 值得借鉴。

5.2 涉农的植物内生微生物研究

涉农的植物内生微生物研究在我国以农作物以及部分药用植物为材料的居多, 包括醉马草、羽茅、鹅观草等冷季型禾草, 水稻、小麦、玉米等重要粮食作物, 番茄、油菜、棉花、辣椒、香蕉、哈密瓜等, 其中重要经济作物体内的内生微生物是关注的焦点。对这些重要农作物体内微生物研究的主要指向为植物病害的生物控制、植物生长发育的促进和抗逆性的提高^[26,46-49], 此外也兼顾了一些为生物制药服务的药物筛选等目的。有些植物内生微生物能产生植物激素、抗菌物质、杀虫物质、昆虫拒食物质等^[19,25,50], 更多的生理活性和抗病虫害功能的机理尚不清楚^[24,27,51-53]。

涉农的植物内生微生物研究还可为植物育种服务。冷季型禾本科植物的麦角菌类内生真菌(Clavicipitalean grass endophytes)大部分依赖于活

体植物生存, 并随宿主植物种子进行垂直传播, 因此可作为育种手段加以应用^[21,54]。十多年来, 南开大学高玉葆/任安芝课题组以多年生黑麦草、羽茅等植物为材料研究了内生真菌对宿主植物抗旱、耐盐碱、重金属抗性等性能的影响, 提示了内生真菌在提高宿主植物抗逆性方面的潜力^[55-57]。

近年来, 还有两类农业指向的植物内生微生物值得关注。一类是深色有隔内生真菌(Dark septate endophytes, DSE), 另一类则是特异性共生根瘤菌以外的根瘤内生细菌(Endophytic bacteria in root nodules)。DSE 是广泛分布在健康植物的根部, 在根的皮层、表皮等部位形成微菌核(Microsclerotia), 其生理功能尚不明了, 至少促进植物营养吸收, 提高植物的抗逆性能等功能已经得到了确认^[58]。王桂文和李海鹰从华南沿海的红树植物的根部观察到了这种真菌^[59], 我们从生长在南京的鹅观草的根部也发现了 DSE 真菌(崔荣凯、王志伟等, 未发表, 图 2)。分离自豆科植物根瘤内部的特异性共生根瘤菌以外的内生细菌多发表在国外杂志上, 在我国杂志上发表的只有从新疆的豆科野生植物苦豆子(*Sophora alopecuroides*)和山东大田栽培花生植株的根瘤内部分离得到的内生细菌等少量事例^[60-62]。关于豆科植物根瘤结构内部的这些非特异性共生细菌, 我国学者发表了很好的综述^[63-64]。

特别需要指出的是, DSE 真菌和豆科植物根瘤内部的非特异性内生细菌(Non-specific endophytic bacteria in nodules, NEBN)的生理功能



图2 鹅观草植株根系 DSE 真菌(作者原图; 标尺=10 μ m)
Figure 2 Fungal hyphae of DSE in root of *Roegneria kamoji* (Photographed by authors; Bar=10 μ m)

和存在意义等还不十分明了。DSE 真菌十分普遍, 有效研究方法似乎不足, 有待突破。根瘤内部的非特异性内生细菌的研究刚刚起步, 我国科研人员在起步阶段就起着重要作用, 在国际上引领着这个领域的研究^[63-64]。但是, 这些内生微生物的研究刚刚兴起, 这两个领域在国内发表的原著论文数量较少, 需要加强。这些植物内生微生物的存在意义和微生物学规律、以及利用价值等还有待于今后进一步研究。

5.3 环境指向的研究

作为我国环境指向的研究中比较重要的有: 具有抑制钉螺、控制血吸虫病传播潜力的、具有杀螺活性的植物内生微生物、具有生物修复功能、微生物降解功能的植物内生微生物以及能促进植物残骸降解的微生物等^[65-67]。某些植物对重金属污染具有一定的修复作用。这些植物的内生微生物中又具有促进宿主植物的生长和重金属抗性的提高, 促进植物修复重金属污染的作用^[68-71]。戴传超课题组的研究显示来自重阳木(*Bischofia polycarpa*)茎内皮的拟茎点霉属真菌(*Phomopsis* sp.) B3 菌株不仅具有独立降解多环芳烃(PAH)菲(Phenanthrene)的能力, 而且能和水稻表现出联合降解的活性, 实现了更高的菲降解效率^[72]。同时植物内生菌在活体植物内和植株营共生生活, 在植物组织老化或植物凋亡后这些微生物有时能起到促进植物残骸降解的作用^[65]。因此, 利用好这些作用, 植物内生微生物在作物秸秆还田等农田物质大循环、森林植物残骸降解、城乡环境优化等方面可能会有更广阔的前景^[31,65]。

5.4 挥发性物质生产

值得注意的研究还有我国关于生产易挥发有机化合物(VOC)的内生菌研究^[73-77], 这些挥发性成分在医药中间体、调节植物生长和诱导抗性、香料和香精的开发等方面有一定的作用。植物内生微生物产色素的研究也值得关注, 这些色素不仅在医药开发方面, 而且在食品等其他方面也有一定的应用潜力^[78-80]。

5.5 食品指向的研究

在食品方面陆兆新课题组的研究对植物内生微生物给予了一定的关注。他们关注神经指向性物质 GABA, 筛选出具有 GAD 活性, 催化谷氨酸合成 GABA 活性的植物内生微生物^[81], 从食品防腐剂的角度审视了植物内生微生物的抗菌活性物质的研究, 指出了内生微生物的抗菌活性物质在食品加工方面的意义^[82]。事实上, 各种新鲜水果等生食植物组织内部均不同程度地含有内生微生物。这些微生物作为食品的一个组份, 通过水果等直接进入人体, 对人的营养和健康可能起到一定的作用。

5.6 生物安全评价

植物内生微生物在植物体内的种类和分布相对比较稳定。利用植物体内的内生微生物的分布和多样性, 也为人们了解植物体内的变化提供一个新思路。我国微生物学工作者研究了转 Bt 基因棉花茎秆内以及转 Bt 基因的水稻植株各部位的内源微生物的变化, 从植物体内的微生物生态环境变化的角度对转基因作物的风险评估提供新的思路^[83-84]。在这方面, 如果在方法上继续进行改善, 随着数据的积累, 应该会成为比较有用的方法。

5.7 微生物资源研究

作为微生物资源的植物内生微生物, 较普遍地存在于植物中。与通常的微生物相比, 植物内生微生物对植物表现出一定的亲和力。植物又是内生微生物赖以生存的物质基础, 植物生产极大地关系到社会的繁荣和发展。因此植物内生微生物研究、资源的积累及其操作技术和利用技术的研究有着重要的意义。

我国二十多年来植物内生微生物研究的蓬勃发展, 揭示了我国各种植物资源中含有丰富的内生微生物资源。最近我国每年在各种杂志发表数百篇有关植物内生微生物的论文, 其中约半数论文涉及到植物内生微生物的分离与培养。有些论文所涉及的菌株有数百株之多。其中不乏具有极其宝贵特征和特性、具有重要潜在利用价值的菌株, 也有一些

是原创性很强的新发现^[8]。由于其和小麦的近缘性,王志伟/纪燕玲课题组在国际上率先研究的鹅观草属植物(*Roegneria* spp.)和披碱草属植物(*Elymus* spp.)内生真菌(图3)、南志标/李春杰课题组率先研究的赖草属植物(*Leymus* spp.)、披碱草属植物内生真菌在国际上受到了高度的关注^[15,33,54,85],相关中文文章有些被翻译成英文在国外学者间传阅(Wayne Simpson,私人通信)。

另一方面,各种微生物都是遗传资源的宝库。这些微生物所拥有的基因绝大部分可以克隆出来,转移到高效表达系统中加以利用。一般来说,每个微生物都含有数千个ORF,这些ORF有些在培养基上或植物中表达,有些则不表达。因此,将分离得到的植物内生微生物进行保藏和整理,这对微生物资源的利用有着十分重要的意义。因此,植物内生微生物资源的保藏和有益基因的克隆、表达和利用也是重要研究方向^[86]。

这些微生物资源是今后人们从事各种研究和

利用的宝贵财富,应当在菌种保藏机构进行永久的保藏和整理。作为微生物资源,特征明显、但功能尚不明确的菌株和功能明确的菌株同样重要。它们都蕴含着未知功能、未知特性的可能性,也是各种未知基因的潜在持有者。因此,植物内生微生物作为微生物资源的重要部分,其收集、保藏和整理有着不可忽略的科学意义和现实意义。

5.8 重要粮食作物的内生微生物研究

刘云霞领导的课题组在植物内生菌研究的早期关于水稻体内的内生细菌的研究值得关注^[5,87-88]。现在关于水稻内生真菌和内生细菌的研究在我国淮河以南多地展开,内容涉及到内群分析、功能研究、定殖和生态以及潜在致病性评价等^[89-94]。在小麦内生微生物研究方面同样也有很多报道^[95-99],小麦的内生细菌、内生真菌在对小麦纹枯病、全蚀病的抗性,提高小麦耐旱性等方面有一定的作用^[100-102]。这些主要粮食作物的内生微生物研究,对于今后的作物栽培和植物防御有着积极的意义。

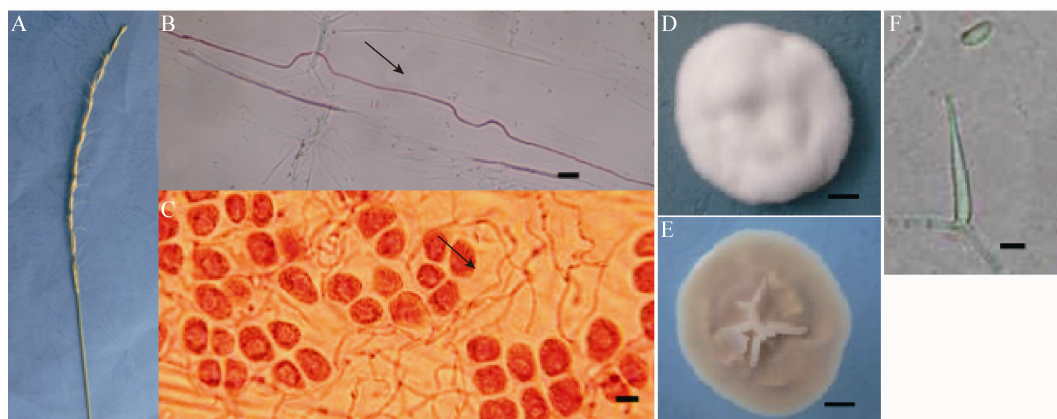


图3 犬草 *Roegneria canina* 及内生真菌资源的形态和无性结构特征^[85]

Figure 3 Morphological characters of the host plant, fungal hyphae, colony and conidiophore in *Roegneria canina*^[85]

注: A: 犬草; B: 植物髓中的菌丝(标尺=10 μm); C: 植物种子中的菌丝(标尺=10 μm); D: 菌落正面(标尺=5 mm); E: 菌落背面(标尺=5 mm); F: 分生孢子梗和分生孢子(标尺=5 μm)。

Note: A: An inflorescence of *Roegneria canina*; B: Hyphae within the grass pith (Bar=10 μm); C: Hyphae in the seed (Bar=10 μm); D: Obverse of colony (Bar=5 mm); E: Reverse of colony (Bar=5 mm); F: Conidium and conidiogenous cell of the fungal strain (Bar=5 μm).

5.9 有害植物内生微生物的研究

在自然生态系统中植物内生微生物有时与植物的毒素合成和积累有密切的关联。禾本科植物内生真菌之所以受到各方关注,与含菌牧草对草食动物的毒性分不开。在我国北方的草原地区禾本科(Gramineae)的醉马草(*Achnatherum inebrians*)、羽茅(*Achnatherum sibiricum*)、豆科(Leguminosae)的疯草(Locoweeds)类植物以及南方的旋花科(Convolvulaceae)的牵牛花(Morning glories)等植物中含有大量的毒素,导致草食动物中毒,并因此而得名。醉马草是我国较早被发现的含有种传麦角类内生真菌的植物^[11-12]。这个真菌在20世纪90年代即被检测到,于2004年被提名为新种 *Neotyphodium gansuensis* (*Epichloë gansuensis*),羽茅中的内生真菌在2009年被提名为新种 *Neotyphodium sibiricum* (*Epichloë sibiricum*)。它们能合成麦角类毒素,对草食动物有较大的危害。疯草是豆科棘豆属(*Oxytropis*)和黄芪属(*Astragalus*)植物中能引起家畜产生相似中毒症状的植物统称^[23]。这些有毒植物中有些含有产毒内生真菌。至今我国已在6种黄芪属植物,2种棘豆属植物中发现了疯草内生真菌。这些内生真菌以菌丝体的形态分布于茎、叶和种子中。这些真菌有波浪芽管孢属(*Undifilum*=*Embellisia*)的 *U. cinereum*、*U. fulvum* 等^[23]。这些真菌产生苦马豆素(Swainsonine, SW)类毒素,引起家畜中毒。疯草中的镰孢霉属真菌(*Fusarium* spp.)也受到一定的关注^[23]。这些产毒内生菌的植物被认为是草原上的有害植物,是草原的有害生物防治对象之一。

需要指出的是,苦马豆素也具有一定的药用功能,苦马豆素是高尔基复合体内 α -甘露糖苷酶II的抑制剂,能抑制恶性肿瘤细胞N-连接的寡糖的合成,影响肿瘤细胞与内皮的粘附,阻止人肿瘤细胞浸润细胞外基质,抑制这些细胞型胶原酶的表达,从而阻止肿瘤细胞在体内的浸润转移。苦马豆素具有免疫刺激作用,能增加肿瘤细胞对天然免疫的敏感性,在抗肿瘤作用中具有重要意义^[23]。

5.10 其他研究

此外也表现出环境、食品、生物安全评价等新的指向。关于利用植物内生微生物进行植物病虫害的生物防治已有大量的综述^[2,21,25,51],在此不再赘述。值得关注的是兰科植物参与菌根形成内生真菌的研究在我国并不多见^[103-106],蕨类植物内生菌的研究也不多见^[107]。

6 我国植物内生微生物研究尚待加强的方面

植物内生微生物通常存在于活体植物体内。研究人员如能对植物内生微生物的分离、培养的方法,功能研究的方法,接种技术,消除技术(除菌技术),以及安全评价技术等进行进一步的审视和改进,我国植物内生微生物研究或将取得更大的成就。

6.1 分离技术

正如一些作者指出的那样,植物内生微生物的有效分离是一个潜在的问题。在目前普遍使用的分离方法下不仅内生微生物和植物表面的表生微生物难以完全区分,而且生长缓慢的植物内生微生物往往很难获得^[14,97,108-109]。生长快的菌株把植物外植体提前覆盖,导致生长慢的内生微生物失去生长空间,而难以形成被研究人员发现的菌落。植物体内环境和人工培养环境有着较大的区别,这样可能导致内生微生物不容易形成菌落。目前,我国内生微生物研究人员利用常用的通用培养基进行微生物分离/培养,与植物和微生物的多样性大不相称。事实上,同样的植物样品在不同的培养基能分离得到的微生物种类和数量差别较大。我们应该在菌株分离的实施之前,根据分离目的来决定培养基的选择^[110]。20年前作者曾体验过培养基的pH对禾本科植物内生细菌分离效率的影响,这一经验值得借鉴。

6.2 接种技术

植物内生微生物的独特功能往往通过和宿主植物的共生才能表达完整,因此植物内生微生物的

功能研究,需要将微生物学方法和技术与植物学方法和技术进行有机结合和集成创新。植物内生微生物的接种技术是这些微生物利用的前提技术,也是创制新的“内生菌/宿主植物共生体”、改善和加强生理功能以及获得新的生理功能的主要手段。植物内生微生物的接种看似与植物病原物的接种类似,但也有很大差异。在应用层面,高通量、高效且稳定的植物内生微生物的接种需要有独特的技术支持。

6.3 消除技术

植物内生微生物的消除技术的开发不仅在研究植物内生微生物功能过程中不可或缺,也是产毒植物内生微生物对策的一个重要组成部分。目前关于植物内生微生物的接种和消除技术的开发基本停留在引进阶段^[111-113],自主的研究和开发还有待于进一步加强^[114-116]。

6.4 培养技术

微生物的培养和鉴定是各种植物内生微生物分离之后的重要环节。与我国至今发现的丰富的植物内生微生物资源相比,在菌株培养方法的改进、创新等方面的研究还不大相称。笔者相信,通过对菌株的培养基以及培养方法的改良,人们可以获得更大幅度的生理活性物质的产能。这一点在至今国内外紫杉醇生产菌株的培养方法改良方面,已经得到很好的验证^[18,117-118],同时笔者相信通过培养方法进一步的改良,紫杉醇的微生物发酵产量还会得到进一步的提高。其它生理活性物质的生产也会有类似的倾向。

6.5 菌株的鉴定和深入的微生物学研究

在我国植物内生微生物研究中,进行功能筛选的占绝大多数,而对分离物进行比较深入的研究、比较,从较全面的角度进行分类学研究的事例不多。在这一方面,南京农业大学的王志伟/纪燕玲课题组、中国科学院微生物研究所的郭良栋课题组的研究值得关注。为了研究常规菌物学研究手段难以区分的“*Neotyphodium* 属”分离菌株的遗传特征和交配能力,亢燕等将有子座鹅观草属植物的 *Epichloë yangzii* (*Epichloë bromicola*) 和无子座表现的“*Neotyphodium* 属”真菌的孢子悬液,分别与鹅观草茎秆上的 *E. yangzii* 子囊壳子座杂交。发现“*Neotyphodium* 属”的 23 株菌中,21 株不能和 *Epichloë yangzii* 子座杂交,2 株能够完成杂交。并确认了杂交后代正常弹射子囊孢子,弹射出的子囊孢子能在人工培养基上正常发芽(图 4)。从而发现了 2 个混杂其中偶尔不使宿主植物产生子座的 *Epichloë yangzii* 菌株^[119]。

我国禾本科植物内生微生物分离菌株的分类和鉴定也往往是比较的简单和粗略的。很多研究中对分离物的经典微生物学特征的调查和审视不够充分,往往依靠 16S rDNA 片段或 18S rDNA 片段的序列进行序列相似度检索,以此来推测细菌或真菌分离菌株的分类地位。但是,这样做,其实不仅所获得的关于分类地位的信息不可靠,而且往往会丢失很多发现新微生物的机会。在我国杂志上发表的大量植物内生微生物的研究事例中,提议新物种或提出新物种的可能的报告数量很少。这和在我国

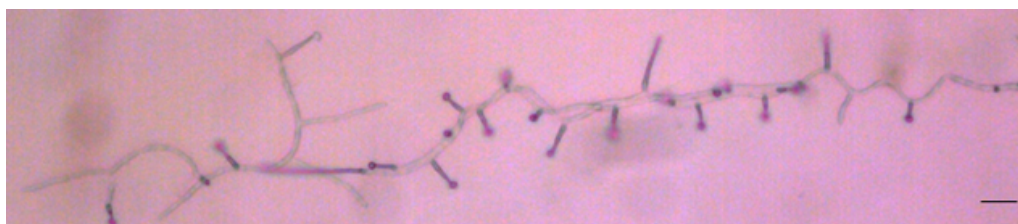


图 4 鹅观草内生真菌菌株 W2 和 Ryz5201 交配后形成的子座中弹射出的子囊孢子在水琼脂上的萌发^[119]
Figure 4 Ascospores ejected in chains and germinated onto glass slide mounted in water agar from stromata of W2×Ryz5201 (Bar=20 μm)^[119]

广泛流传、不断被引用的 100 万种以上内生菌的说法不相称。暂且不论 100 万种内生菌的说法是否合理, 在我国发表的植物内生微生物的分类和鉴定, 需要使用最新的微生物分类方法进行周密的研究。如此, 则可能有更多的微生物新物种将在我国被发现。

6.6 安全评估

唯物辩证法告诉我们事物都有两面性。植物内生微生物被认为是从正常植物体内获得的微生物群体, 因此不可避免的涵盖了一部分对植物、对人类有害的成员。关于植物内生微生物人们对有益功能高度关注, 却往往忽视了其有害的侧面。概观各种植物内生微生物, 人们不难发现其成员中不乏与植物病原物近源的微生物, 以及生产真菌毒素的微生物。然而, 这些微生物往往产生一些生理活性物质, 但是他们的安全评估需要得到高度的重视。江苏省农业科学院叶小梅等在番茄内生真菌 102 号菌株的促生作用、拮抗作用和拮抗物质研究的基础上, 根据国标 GB15670-1995《农药登记毒理学实验方法》对 102 号菌株进行了安全性评估, 获得了无致性、微毒性、以及对 10 多种常用抗生素较敏感的结果, 确认了 102 号菌株的动物安全性^[120-121]。这种做法特别在植物内生微生物的农业利用研究中值得推荐。

6.7 有害内生微生物的防治

如前所述, 醉马草、疯草等植物中含有产毒内生微生物, 并已造成了较大的社会损失。控制有毒有害杂草在草原上的蔓延, 是保障草地的草食动物承载量、提高草地产出、保护生态环境的主要手段之一。因此, 研究如何控制这些有害内生微生物的蔓延和危害, 对我国北方草原区域的社会生产能力有着直接的影响^[22-23,30]。除上述有毒草种之外, 徐瑞等从披碱草(*Elymus dahuricus*)中检测出了麦角酰胺(Ergine)、麦角新碱(Ergonovine)等麦角碱^[33], 我们也从鹅观草中检测到了部分有毒生物碱生产基因(王志伟等, 未发表), 这些草种的毒性评价也同样需要引起足够的重视。

7 展望

植物内生微生物的研究孕育着很丰富的可能性和极大的空间。我国国土辽阔、地处热带到寒带的广阔地域, 充足的雨水沐浴着十分丰富的植物资源和微生物资源。通过更巧妙的植物内生微生物的分离技术和培养技术, 可以获得更多样的、更实用的微生物资源。通过植物内生微生物去除技术和接种技术, 可创制出更多的宿主植物和内生微生物的新组合, 同时新共生体有可能给人类带来更多样的变化。我国更有丰富的药用植物资源和源远流长的中医中药的传统, 不仅这些药用植物中的内生微生物资源的研究蕴含着很多可能性, 中医思想也可能给我们带来更多的植物内生微生物研究和利用的可能性。

另一方面, 十多年来, 伴随着我国研究生扩招, 大量研究生毕业进入社会。这些了解植物内生微生物研究的人才, 在社会上也一定能对本领域的研究和应用起到积极的推动作用。期待中国微生物学研究、特别是植物内生微生物的研究蓬勃发展, 期待我国植物内生微生物的成果在社会上尽快得到广泛的应用, 特别期待植物内生微生物在主要粮食作物上的实际应用早日实现。

致谢: 郭萍、杨东航等对本文也有贡献, 谨致谢意!

参 考 文 献

- [1] 窦新田. 早熟禾根系固氮活性和根瘤内生菌的观察[J]. 土壤通报, 1981(6): 33.
- [2] 刘云霞. 植物内生细菌的研究与应用[J]. 植物保护, 1994, 20(5): 30-32.
- [3] 邱德有, 黄美娟, 方晓华, 等. 一种云南红豆杉内生真菌的分离[J]. 真菌学报, 1994, 13(4): 314-316.
- [4] 李扬汉. 毒麦及其变种籽实的成熟结构与内生真菌之间的关系[J]. 南京农业大学学报, 1985, 4: 1-7.
- [5] 刘云霞, 张青文, 周明群. 电镜免疫胶体金定位水稻内生细菌的研究[J]. 农业生物技术学报, 1996, 4(4): 354-358.
- [6] 吴加志, Shlomo P, Leonid C, 等. 植物土传、根际和内生细菌用于植物病害生物防治潜力的研究[J]. 中国微生物学杂志, 1996, 8(3): 4-13.
- [7] 王建锋, 吕华鹰, 苏文金. 植物内生真菌产紫杉醇的研

- 究[J]. 微生物学通报, 2000, 27(1): 58-60.
- [8] 耿直, 刘开辉, 赵赟鑫, 等. 一株产紫杉醇中国红豆杉内生真菌的分离和鉴定[J]. 微生物学通报, 2010, 37(2): 199-203.
- [9] 康冀川, 靳瑞, 文庭池, 等. 内生真菌产紫杉醇研究的回顾与展望[J]. 菌物学报, 2011, 30(2): 168-179.
- [10] 南志标. 内生真菌对布顿大麦草生长的影响[J]. 草业科学, 1996, 13(1): 16-18.
- [11] 南志标. 内生真菌在我国部分国产和引进禾草品种种子中的分布[J]. 草业学报, 1996, 5(2): 1-8.
- [12] 李宝军, 郑晓红, 沙赫都拉, 等. 新疆部分禾草的植物内生菌调查[J]. 中国草地, 1996(2): 29-32.
- [13] 郭良栋. 内生真菌研究进展[J]. 菌物系统, 2001, 20(1): 148-152.
- [14] 文才艺, 吴元华, 田秀玲. 植物内生菌研究进展及其存在的问题[J]. 生态学杂志, 2004, 23(2): 86-91.
- [15] 王志伟, 纪燕玲, 陈永敢, 等. 禾本科植物内生真菌资源及其物种多样性[J]. 生态学报, 2010, 30(17): 4771-4781.
- [16] 郭尚彬, 陈钧, 何佳. 1株高效低毒具有杀钉螺活性的内生真菌[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2007, 18(1): 3.
- [17] 朱妍妍, 艾嫦, 张嘉, 等. 具有生物活性的植物内生真菌次生代谢产物[J]. 化学进展, 2011, 23(4): 704-730.
- [18] 苗莉云, 张鹏, 周蓬蓬, 等. 产紫杉醇内生真菌枝状枝孢霉 MD2的发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2013, 40(6): 1033-1040.
- [19] 高嘉卉, 南志标. 禾草内生真菌生物碱的研究进展[J]. 生态学报, 2007, 27(6): 2531-2546.
- [20] 魏宇昆. 内生真菌与禾本科植物的共生机制研究进展[J]. 中国农学通报, 2010, 26(12): 295-300.
- [21] 王志伟, 纪燕玲, 陈永敢. 禾本科植物内生真菌及其在农业上的应用潜力[J]. 南京农业大学学报, 2011, 34(5): 144-154.
- [22] 代乐英, 黄玺, 李春杰, 等. 麦角生物碱在醉马草内生真菌共生体中的空间分布[J]. 草业学报, 2010, 19(6): 215-221.
- [23] 陈基萍, 马尧, 路浩, 等. 疯草内生真菌研究进展[J]. 动物医学进展, 2011, 32(2): 77-81.
- [24] 王伟, 翟梅枝, 徐文涛, 等. 核桃内生菌研究 核桃内生菌的分离及代谢产物活性研究[J]. 西北农业学报, 2008, 17(1): 77-81.
- [25] 马养明, 赵洁, 周雪宁. 植物内生真菌抗植物病原真菌活性物质的研究[J]. 化学进展, 2010, 22(2/3): 440-448.
- [26] 林玲, 金中时, 马长文, 等. 棉花黄萎病生防内生细菌 Jaas cd 的鉴定及田间防效[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(1): 65-69.
- [27] 彭双, 杨茹, 闫淑珍, 等. 杀线虫植物内生细菌和根际放线菌对根结线虫的防效[J]. 植物保护学报, 2012, 39(1): 63-69.
- [28] 何颖, 谈锋, 谢建平. 红豆杉内生菌产紫杉醇研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18: 519-523, 513.
- [29] 严菊芬, 王素萍, 齐宁波, 等. 药用植物内生真菌研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24: 176-181.
- [30] 南志标, 李春杰. 禾草-内生真菌共生体在草地农业系统中的作用[J]. 生态学报, 2004, 24(3): 605-616.
- [31] 刘丽莉, 吕国忠, 孙晓东. 林木内生真菌研究进展[J]. 菌物研究, 2006, 4(2): 54-59.
- [32] 魏宇昆, 高玉葆, 李川, 等. 内蒙古东部草原羽茅内生真菌的遗传多样性[J]. 植物生态学报, 2006, 30(4): 640-649.
- [33] 徐瑞, 南志标, 周雁飞, 等. 披碱草内生真菌共生体中麦角生物碱的组织分布与季节动态[J]. 草业学报, 2012, 21(3): 84-92.
- [34] 蓝江林, 刘波, 朱育菁, 等. 茄子植物内生细菌群落结构与多样性[J]. 生态环境学报, 2009, 18(4): 1433-1442.
- [35] 文才艺, 王凯旋, 汪敏, 等. 内生细菌 EBS05在小麦体内的定殖动态及其对小麦纹枯病的防治作用[J]. 植物保护学报, 2011, 38(6): 481-486.
- [36] 许乐, 阮小蕾, 李冬丽, 等. 对枯萎病不同抗性的香蕉品种的内生细菌多样性及群落结构[J]. 微生物学通报, 2012, 39(9): 1250-1259.
- [37] 孙剑秋, 郭良栋, 臧威, 等. 药用植物内生真菌及活性物质多样性研究进展[J]. 西北植物学报, 2006, 26(7): 1505-1519.
- [38] 靳瑞, 康冀川, 文庭池, 等. 一株产紫杉醇内生真菌液体发酵工艺的优化[J]. 菌物学报, 2011, 30(2): 235-241.
- [39] 陈振明, 何进坚, 何红, 等. 红树林内生细菌的分离及抗菌筛选[J]. 微生物学通报, 2006, 33(3): 18-23.
- [40] 刘爱荣, 吴晓鹏, 徐同. 红树林内生真菌研究进展[J]. 应用生态学报, 2007, 18(4): 912-918.
- [41] 高剑, 李赤, 王燕, 等. 红树林内生真菌多样性及其应用潜能[J]. 菌物研究, 2013, 11(3): 212-216.
- [42] 王军, 林永成, 吴雄宇, 等. 从南海红树内生真菌 No.2533分离出新的异香豆素[J]. 中山大学学报, 2001, 40(1): 127-128.
- [43] 李海燕, 刘丽. 产生物活性物质植物内生菌的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(5): 482-485.
- [44] 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.
- [45] 王剑文, 郑丽屏, 谭仁祥. 促进黄花蒿发根青蒿素合成的内生真菌诱导子的制备[J]. 生物工程学报, 2006, 22(5): 829-834.
- [46] 彭双, 闫淑珍, 陈双林. 具杀线虫活性植物内生细菌的筛选和活性产物[J]. 微生物学报, 2011, 51(3): 368-376.
- [47] 朱英波, 史凤玉, 李建英, 等. 野生大豆内生芽孢杆菌 BHL3501的鉴定及对大豆胞囊线虫的抑制作用[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(34): 21077-21078, 21081.
- [48] 王刚, 刘凤英, 王森, 等. 内生细菌 B3-7的运动性参与其在小麦根系的内生定殖和对小麦全蚀病的生物防治

- [J]. 植物病理学报, 2011, 41(5): 526-533.
- [49] 徐涛, 胡同乐, 王亚南, 等. 苹果树皮内生真菌的分离及其对腐烂病的生物防治潜力[J]. 植物保护学报, 2012, 39(4): 327-333.
- [50] 姜晓宇, 高菊生, 徐凤花, 等. 水稻种子内生细菌多样性及其分泌植物生长素能力的测定[J]. 微生物学报, 2013, 53(3): 269-275.
- [51] 周晓鸿, 田芳, 杜丽璞, 等. 植物与有益微生物互作的分子基础及其应用的研究进展[J]. 中国农业科学, 2012, 45(14): 2801-2814.
- [52] 鄢小宁, 杨艳, 贺春萍, 等. 黄瓜内生 Ch1001菌株种子处理防治根结线虫的施用剂量研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(22): 263-267.
- [53] 杨波, 陈晏, 李霞, 等. 植物内生菌促进宿主氮吸收和代谢研究进展[J]. 生态学报, 2013, 33(9): 2656-2664.
- [54] 程飞飞, 高龙, 江龙飞, 等. 禾本科植物内生真菌研究 16: 内生真菌 *Neotyphodium sinicum* 对宿主鹅观草生长的影响[J]. 南京农业大学学报, 2013, 36(1): 52-58.
- [55] 梁宇, 高玉葆, 陈世苹, 等. 干旱胁迫下内生真菌感染对黑麦草实验种群光合、蒸腾和水分利用的影响[J]. 植物生态学报, 2001, 25(5): 537-543.
- [56] 任安芝, 高玉葆, 高文生. 内生真菌侵染对黑麦草种子萌发、幼苗生长及渗透胁迫抗性的影响[J]. 植物生态学报, 2002, 26(4): 420-426.
- [57] 韩荣, 李夏, 任安芝, 等. 干旱胁迫下内生真菌感染对羽茅的生理生态影响[J]. 生态学报, 2011, 31(8): 2115-2123.
- [58] 刘茂军, 张兴涛, 赵之伟. 深色有隔内生真菌(DSE)研究进展[J]. 菌物学报, 2009, 28(6): 888-894.
- [59] 王桂文, 李海鹰. 钦州湾红树植物根部内生真菌初步研究[J]. 广西林业科学, 2003, 32(3): 121-124.
- [60] 龚明福, 马玉红, 李超, 等. 苦豆子根瘤内生细菌分离及表型多样性分析[J]. 西北植物学报, 2009, 29(2): 408-411.
- [61] 龚明福, 韩松, 李超, 等. 苦豆子根瘤内生细菌分离及其对棉花枯萎病的生物防治效果测定[J]. 微生物学通报, 2011, 38(6): 865-870.
- [62] 陈殿绪, 谢宏峰, 卢俊玲, 等. 花生根瘤内生细菌对花生黑斑病和褐斑病拮抗作用的初步研究[J]. 山东农业科学, 2011(7): 76-78.
- [63] 刘杰, 汪恩涛, 陈文新. 豆科植物根瘤内生细菌的发现及其研究进展[J]. 微生物学报, 2011, 51(8): 1001-1006.
- [64] 邓振山, 李军. 豆科植物根瘤中非共生的内生菌遗传多样性研究进展[J]. 微生物学杂志, 2012, 32(4): 63-68.
- [65] 史央, 戴传超, 吴耀春, 等. 植物内生真菌强化还田秸秆降解的研究[J]. 环境科学学报, 2004, 24(1): 144-149.
- [66] 郭尚彬, 陈钧, 何佳, 等. 金钱松内生真菌杀螺活性菌株筛选[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2007b, 19(4): 285-288.
- [67] 韩邦兴, 陈钧, 郝蕾, 等. 醉鱼草内生真菌 LL3026杀螺作用实验研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2010, 28(3): 210-213.
- [68] 姜敏, 曹理想, 张仁铎. 重金属抗性内生真菌与其宿主植物重金属抗性关系初探[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(6): 2038-2042.
- [69] 丁建, 陈贝, 袁建军. 植物修复重金属污染及内生细菌效应[J]. 微生物学通报, 2011, 38(6): 921-927.
- [70] 彭安萍, 刘娟, 凌婉婷, 等. 功能内生细菌对植物体内有机污染物代谢的影响[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(4): 668-674.
- [71] 马莹, 骆永明, 滕应, 等. 内生细菌强化重金属污染土壤植物修复研究进展[J]. 土壤学报, 2013, 50(1): 195-202.
- [72] 田林双, 戴传超, 赵玉婷, 等. 一株内生真菌单独及与水稻联合降解菲的研究[J]. 中国环境科学, 2007, 27(6): 757-762.
- [73] 杨黎华, 李祖红, 陈东, 等. 香茅草产香内生真菌的筛选及香气成分分析[J]. 生物技术, 2006, 16(5): 53-56.
- [74] 李雪梅, 徐若飞, 杨黎华, 等. 利用香英兰内生菌制备天然香料及其在卷烟中的应用[J]. 烟草科技, 2008(3): 31-34, 62.
- [75] 游玲, 王涛, 李兰, 等. 78株油樟内生真菌发酵产物的挥发性组分分析[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2009(9): 193-198.
- [76] 朱宇, 郑琳, 刘煜宇, 等. 西瓜内生菌的挥发性成分分析及其发酵香料在卷烟中的应用[J]. 光谱实验室, 2011, 28(4): 2093-2097.
- [77] 王鸿, 蓝丽华, 易喻, 等. 鲜鱼腥草及其内生菌挥发性成分分析[J]. 浙江工业大学学报, 2012, 40(6): 626-629.
- [78] 王红庆. 产红色素果蔬内生菌菌种鉴定[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(25): 10756-10757.
- [79] 阿依努尔·阿不都热合曼, 于蘋蘋, 布热比亚·艾山, 等. 块根芍药产红色素内生菌 XJU-PA-6的分离鉴定[J]. 生物技术, 2008, 18(5): 33-36.
- [80] 李星秀, 李向敏, 侯成林. 竹红菌甲素高产菌株筛选[J]. 安徽农业大学学报, 2010(2): 218-223.
- [81] 杨胜远, 陆兆新, 孙力军, 等. 爬山虎内生菌的鉴定及其谷氨酸脱羧酶学特性[J]. 南京农业大学学报, 2007, 30(2): 122-127.
- [82] 孙力军, 陆兆新. 植物内生菌抗菌活性物质研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(2): 78-82.
- [83] 陈磊, 汪峰, 张祥志, 等. 转基因抗虫棉对茎部内生细菌多样性的影响[J]. 土壤, 2011, 43(6): 961-967.
- [84] 姜楠, 汪小福, 徐俊锋, 等. 转 Bt 基因对水稻内生原核微生物定殖数量效应分析[J]. 浙江农业学报, 2012, 24(5): 870-874.
- [85] 张晨炜, 纪燕玲, 杨守玲, 等. 禾本科植物内生真菌研究 12: 吉林犬草内生真菌的分离和鉴定[J]. 南京农业大学学报, 2011, 34(2): 78-84.

- [86] 邢朝斌, 龙月红, 李宝财, 等. 刺五加 Cu/Zn SOD 的克隆及内生真菌对其表达的影响[J]. 东北林业大学学报, 2013, 41(1): 82-85, 105.
- [87] 刘云霞, 张青文, 周明群. Bt 杀虫基因向水稻内生细菌的转化研究[J]. 农业生物技术学报, 1997, 5(2): 188-193.
- [88] 刘云霞, 张青文, 周明群. 水稻体内细菌的动态研究[J]. 应用生态学报, 1999, 10(6): 735-738.
- [89] 郑爱萍, 孙惠青, 李平, 等. 水稻优势内生细菌鉴定、定位与重组研究[J]. 实验生物学报, 2005, 38(6): 467-473.
- [90] 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[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2005, 44(2): 69-73.
- [91] 陈夕军, 朱凤, 童蕴慧, 等. 水稻内生联合固氮细菌的分离、种类及对水稻的促生长作用[J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2007, 28(2): 61-64.
- [92] 张国霞, 茅庆, 何忠义, 等. 陵水普通野生稻(*Oryza rufipogon*)内生菌的固氮及溶磷特性[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(4): 457-460.
- [93] 刘佳, 林会, 赵斌. 内生团泛菌 HAUM1对宿主水稻的定殖及促生作用[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(23): 4820-4824.
- [94] 朱凤, 陈夕军, 童蕴慧, 等. 水稻内生细菌的分离及其拮抗性与其潜在致病性测定[J]. 中国生物防治, 2007, 23(1): 68-72.
- [95] 刘丽. 小麦内生菌的分离与鉴定[J]. 沈阳师范学院学报: 自然科学版, 1998, 16(4): 41-46.
- [96] 岳红宾, 王守正, 袁红霞, 等. 小麦种子内生真菌区系分析[J]. 河南农业大学学报, 1996, 30(4): 354-357.
- [97] 王刚, 王俊芳, 刘凤英, 等. 小麦内生细菌分离培养基的选择[J]. 河南农业科学, 2007(5): 63-65, 70.
- [98] 刘忠梅, 王霞, 赵金焕, 等. 有益内生细菌 B946在小麦体内的定殖规律[J]. 中国生物防治, 2005, 21(2): 113-116.
- [99] 乔宏萍, 黄丽丽, 康振生. 小麦内生细菌及其对根茎部主要病原真菌的抑制作用[J]. 应用生态学报, 2006, 17(4): 690-694.
- [100] 殷水宁, 孙广宇. 内生细菌 YSN-7提高小麦耐旱性研究[J]. 西北农业学报, 2007, 16(5): 282-284.
- [101] 张颖, 王刚, 郭建伟, 等. 利用小麦内生细菌防治小麦全蚀病的初步研究[J]. 植物病理学报, 2007, 37(1): 105-108.
- [102] 王刚, 李志强. 小麦内生细菌的分离及其对小麦纹枯病的拮抗作用[J]. 微生物学通报, 2005, 32(2): 20-24.
- [103] 范黎, 郭顺星, 徐锦堂. 我国部分兰科植物菌根的内生真菌种类研究[J]. 山西大学学报: 自然科学版, 1998, 21(2): 169-177.
- [104] 周德平, 吴淑杭, 姜震方, 等. 兰科植物内生真菌的功能及应用前景[J]. 上海农业学报, 2005, 21(3): 110-113.
- [105] 罗在柒, 乙引, 唐金刚, 等. 兰科植物内生真菌对其宿主植物生理效应研究[J]. 贵州林业科技, 2007, 35(1): 32-36.
- [106] 柯海丽, 宋希强, 谭志琼, 等. 野生五唇兰根部内生真菌多样性研究[J]. 生物多样性, 2007, 15(5): 456-462.
- [107] 张君诚, 王铮敏, 张杭颖, 等. 蕨类植物内生菌研究进展[J]. 中国农学通报, 2010, 26(20): 70-72.
- [108] 李晓红, 傅本重, 麻春花, 等. 不同表面消毒方法对核桃叶内生菌分离效果的比较[J]. 中国农学通报, 2012, 28(28): 163-168.
- [109] 崔宇, 郑春英, 刘松梅, 等. 药用植物内生菌研究概况[J]. 黑龙江医药, 2007, 20(1): 41-44.
- [110] 夏冬亮, 任玉, 李璐滨, 等. 毛竹内生细菌分离培养基的选择[J]. 北京农学院学报, 2009, 24(1): 15-19.
- [111] 李夏, 韩荣, 任安芝, 等. 高温处理构建不感染内生真菌羽茅种群的方法探讨[J]. 微生物学通报, 2010, 37(9): 1395-1400.
- [112] 宋艳祥, 王玉凤, 冉隆贤. 热处理和抗生素对桉树固有内生细菌去除的研究[J]. 河北农业大学学报, 2011, 34(4): 63-68.
- [113] 朱敏杰, 张丽红, 任安芝, 等. 用丙环唑杀除羽茅内生真菌[J]. 南开大学学报: 自然科学版, 2013, 46(2): 88-93.
- [114] 张志元, 罗永兰, 官春云. 油菜种子内生菌的检测及杀菌消毒处理方法[J]. 湖北农业科学, 2005(1): 52-55.
- [115] 王梅, 汤浩茹, 刘淑芳, 等. 4种抗生素对草莓‘章姬’内生菌的抑制及对试管苗生长的影响[J]. 四川农业大学学报, 2005, 23(2): 189-191.
- [116] 马同锁, 袁红楼, 赵士豪. 油菜种子内生菌的去除及对萌发率的影响[J]. 中国农学通报, 2012, 28(24): 31-34.
- [117] 陈文强, 彭浩, 邓百万, 等. 水杨酸对中国红豆杉内生真菌代谢产紫杉醇的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(9): 944-950.
- [118] 李娟花, 陈文强, 邓百万, 等. 植物生长调节剂对内生真菌生物合成紫杉醇的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(6): 879-883.
- [119] 亢燕, 李伟, 纪燕玲, 等. 我国内生真菌系列研究4: 我国原产植物内生真菌 *Epichloë yangzii* 的人工杂交[J]. 菌物学报, 2008, 27(6): 852-862.
- [120] 叶小梅, 常志州, 黄红英, 等. 番茄内生菌102安全性及其拮抗物质初步研究[J]. 江苏农业科学, 2005(1): 65-66.
- [121] 叶小梅, 常志州, 季国军, 等. 番茄拮抗内生细菌102菌株的分离及其防病促生作用[J]. 江苏农业学报, 2005, 21(4): 294-297.