

植物内生菌研究及其科学意义

王志伟^{1,2*} 纪燕玲¹ 陈永敢³

- (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 572200)

摘要: 植物内生菌是近三十年来在国内外迅速受到关注的微生物类群, 研究的角度不同, 概念也比较混乱。本文就植物内生菌研究及其科学意义进行了综述和讨论。植物内生菌在国外广受关注, 始于禾本科植物内生真菌以及林木内生真菌的特殊作用。产紫杉醇的红豆杉内生真菌被报道后, 植物内生菌研究在生理活性物质领域开始暴发式的增加。通过对一年生草本植物、多年生草本植物、木本植物和藤本植物各部位的内生微生物的比较和分析, 总结了植物内生菌的一些共性和特殊性, 指出了植物内生菌研究的一些发展趋势。本文探讨植物内生菌对地球上的微生物物种总量的贡献。提出“植物体在自然界的实际生存状态实际上是微生物和植物的状态”的观点, 导出植物育种实际上是“植物和微生物的共生体的培育”的观点。还讨论了植物内生菌对生态学、生物学、微生物的进化和物种形成、内生菌/宿主的联合代谢、以及植物保护学、畜牧兽医学、林学等领域的意义和影响。本文认为, 植物内生菌研究打开了微生物资源的一个新局面, 将在多个领域中产生更广泛的影响。植物内生菌研究的真正意义不仅在于其生态独特性, 更在于微生物在宿主主体内和宿主植物的协同作用及协同作用所产生的新功能和物质。

关键词: 植物内生菌, 植物内生细菌, 植物内生真菌, 共生, 内生菌/宿主共生体, 联合代谢

Studies and biological significances of plant endophytes

WANG Zhi-Wei^{1,2*} JI Yan-Ling¹ CHEN Yong-Gan³

- (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 572200, China)

Abstract: During the last 30 years, plant endophytes deserve more attention around the world although its definition still remains confused and controversy. In this review, major historic events in endophyte researches and their scientific significances were discussed. Scientists firstly focused on special roles of endophytic fungi within woody plants and Gramineae plants. After anticancer natural product taxol was found to be produced by a plant endophytic fungus in 1993, biologically active metabolites were widely screened from plant endophytic microbes in many countries. Though comparing and contrasting the

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30970081, 30800156, 31372365, 30070019, 30670008)

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

收稿日期: 2013-11-27; 接受日期: 2014-06-04; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-11-26

endophytes from different tissues of annual grasses, perennial grasses, woody plants and vine plants, common and specific properties of these endophytes were reviewed. The tendency of researches on endophytes were revealed. Plant endophytes contributed a lot to the total amount of microbe species on the earth. This review pointed that “the real situation of plants in the nature were microbes-plants symbiota”. Therefore, plant breeding were actually improvement of microbes-plants symbiota. Finally, the influences of endophytes on the ecology, biology, microbial evolution, species formation, plant-endophyte co-metabolism, plant protection, animal husbandry, veterinary science, forestry and some other fields were also discussed. Endophyte researches exhibit another view of microbial resources, significant impacts should be observed in many areas. The significance of endophytes not only rely on their niche, the ecological characteristics, but also the synergism between endophytes and their hosts, resulting some new functions and new metabolites due to the co-metabolism and interactions.

Keywords: Plant endophytes, Plant endophytic bacterium, Plant endophytic fungus, Symbiosis, Plant-endophyte symbiota, Co-metabolism

1 植物内生菌研究及其现状

虽然关于植物中的微生物的记载以及植物内生菌的概念早就出现,但现代植物内生菌研究的基础,形成于20世纪70年代的对林木内生真菌和禾本科植物内生真菌的研究^[1-3]。20世纪80年代,随着PGPR (Plant growth promoting rhizobacteria)研究的深入和发展,植物体内的细菌也开始引起人们的关注^[4]。进入20世纪90年代,在“只要来自外表健康的植物体内的真菌或细菌即内生菌”的倡议下^[5],很多研究者根据各自的目的开始研究植物体内的微生物。从此,菌根菌、植物病原菌、木材腐朽菌等概念比较成熟、内涵十分清晰、自成一统的微生物也不断以植物内生菌的面目出现在文献中。这快速地促进了植物内生菌研究的发展,扩大了其范畴、极大地丰富了植物内生菌的内涵,也直接导致了植物内生菌的概念异质化^[6-7]。后来,Endophyte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,现在对于“Plant endophyte”一词的用法也未能形成较为统一的意见^[8-11]。

通过文献检索我们不难了解到,内生菌(Endophyte)一词被认为是由de Bary于1866年将“Endo-”(希腊语Endon,内部的)和“-phyte”(希腊语Phyton,植物;当时真菌还是被认为是植物界的一部分)合成而来,专指“生活在植物组织内的真菌”,

用以区分那些生活在植物表面的表生真菌(Epiphyte)。因此,英语中提到的“Endophyte”一般指内生真菌Endophytic fungus,是用于表示真菌的生活场所的微生物生态学用语^[10]。后来出现的“内生细菌”的概念则一般表达为Endophytic bacterium(内生性细菌),或者Bacterial endophyte(细菌性内生菌)。汉语中细菌(Bacteria)和真菌(Fungi)均俗称为“菌”。虽然菌物(真菌)和细菌在微生物学界有着严格的区分,但交叉学科中也存在部分人员未必能进行严格区分。Plant endophyte一词在我国倾向于被译为“植物内生菌”,因此,它一般就包括了真菌和细菌。这和国外主要指代内生真菌的用法有所不同,值得注意^[6,11-13]。

植物内生菌在生理活性物质方面受到关注的程度^[14-17],是国内外关于植物内生菌研究的另一个差别。在这方面,北京大学邱德有等和中国科学院植物研究所朱至清联合进行的先驱性研究,从云南红豆杉中分离得到能够合成抗癌药物紫杉醇的内生真菌,以及后来南京大学邹文欣等的创新性研究等起到了明显的范式化作用^[18-19]。而在国外研究比较多的林木内生菌以及禾本科植物内生菌的研究则相对较少^[7,20-21]。因此,在现阶段国内外关于植物内生菌(Plant endophytes)的关注实际上有着比较明显的不同,这也导致了国内外关于植物内生菌的研究各具不同特征。

2 植物内生菌研究的源头——植物内生真菌

要将植物内生真菌真正说透,笔者认为需要从微生物学鼻祖、化学家和微生物学家巴斯德(Louis Pasteur; 1822-1895)开始说起。在 19 世纪微生物学研究的初兴阶段,法国的巴斯德进行了很多奠基性的工作。巴斯德在年轻时就通过解决葡萄酒和啤酒酸败的问题,证明了酸败的原因是微生物的作用,用巧妙的实验否定了微生物的自然发生学说,并发明了巴斯德灭菌法(Pasteurization)。此外,他还在家蚕微粒子病、炭疽杆菌的免疫等方面做出了不可磨灭的贡献,奠定了现代微生物学基础,对当时的欧洲社会也产生了巨大影响。为了培养和繁殖微生物,巴斯德提出了以下 3 个条件:(1) 大约接近人体的温度;(2) 大约接近中性的酸碱度;(3) 气压接近常压等培养条件。在这种条件下,巴斯德从各种地方、各种样品分离得到了各种各样的微生物,获得了众所周知的巨大成就。然而容易被忽视的是,巴斯德曾在多种场合反复强调:植物体内没有微生物(Sterile within plants)。虽然某些植物中的微生物在一百多年前就有记录,植物体内存在微生物这一事实直到几十年前植物组织培养盛行后才逐渐为人们广泛了解^[22]。

随着植物细胞的全能性(Totipotency)被证实,世界各地都有很多科研人员开始参与植物的组织培养和细胞培养,随后也产生了细胞融合技术。植物组织培养和细胞培养这股潮流在 20 世纪 70 年代盛行于世界各地,植物内生菌也在这个时代开始受到比较频繁的关注——以植物培养物的“杂菌”的形式。这种“杂菌”——植物中的微生物——在植物组织培养过程中曾让很多学者为杀菌和消毒而烦恼。熟悉早期植物组培的科研人员往往都有过这样的经历:无论你将植物组织进行消毒,就是很难完全消除组培过程中“杂菌”的产生^[22]。随着时间的推移和组培外植体(Explant)的多样化,“杂菌”的普遍性逐渐显示出来,特别是在树木的组培过程中“杂菌”问题尤为突出。笔者在 20 世纪 80 年代中期就曾

为日本的白杨树(*Populus tomentosa*)组织培养研究成功解决过内源细菌污染问题,90 年代在参与禾本科植物组织培养和细胞融合研究过程中发现了禾本科植物内生细菌(未发表)。这些经历直接影响到后来发现日本冰草属植物(*Agropyron* spp.)中的内生真菌^[23-24]。有类似经历的一定不止笔者一人。

实际上,从巴斯德的时代开始,关于植物体内微生物的记录一直就没有断过,只是一直没有受到人们的广泛关注。巴斯德去世之后,类似的记录也断断续续地出现,直至 20 世纪 70 年代。根据美国植物生态学家 Keith Clay 的文献统计,从 1798 年至 1969 年的 170 多年的国际文献中确认到有关禾本科植物内生真菌的研究记录至少有 71 项^[25]。

20 世纪 70 年代中期人们开始注意植物体内微生物。这是由两个不同领域中的杰出研究而开始的:一个是曾任美国真菌学会理事长的林木病理学家 George C. Carroll 等的关于松科(Pinaceae)针叶树花旗松(Douglas fir; *Pseudotsuga menziesii* (Mirbel) Franco)内生真菌研究^[2,26-28];另一个是 Charles W. Bacon 等进行的禾本科植物内生真菌和禾本科植物对家畜产生毒性的研究^[1,29-30]。前者向人们展示了林木茎叶内其实含有很多的微生物,它们种类繁多,生物量多变,除了植物种类以外,还受季节、地点、降雨量、海拔等因素影响,是宿主特异性不明显的生物类群;后者向人们揭示了困扰美国和新西兰多年、招致大量牛羊马中毒的原因在于禾本科牧草中含有的内生性真菌,在学术界产生了巨大的震动。由禾本科牧草引起的家畜中毒的临床记录在新西兰和美国于 1949 年和 1963 年先后出现,此后,此类中毒现象日益加重以至成灾,家畜中毒的原因和对策在两国受到了畜牧学家、兽医学家、化学家和微生物学家等前所未有的关注。

进入 20 世纪 80 年代,禾本科植物内生真菌的研究迅猛发展,成为内生菌研究中最突出的领域。植物内生菌研究,特别是禾本科植物内生真菌研究进入了第一个黄金时代^[31-33]。1982 年,第一个与家

畜中毒现象相关的植物专性内生真菌 *Acremonium coenophialum* Morgan-Jones et Gams [= *Neotyphodium coenophialum* (Morgan-Jones et Gams) Glenn et al.] 被正式命名^[34]。这时距离巴斯德的时代大约一百年。进入 20 世纪 90 年代以后, 从生理活性物质层面暴发的研究则将植物内生菌的研究推进到前所未有的黄金时代, 一直延续至今。

随着时间的推移, 关注植物内生真菌的科研人员不断增加, 从各种植物中分离得到各种各样的内生菌的研究报道也迅速增加。同时, 植物内生真菌的概念也开始异质化。从林木病理学研究的视角, Carroll 认为生活在地上部分、活的植物组织内并不引起明显病害的真菌即内生真菌, 并突出强调内生真菌与植物的互惠共生关系; 但很多人并不赞同这些观点。1991 年 8 月, 美国植物病理学会真菌委员会在 St. Louis 就禾本科植物和林木内生真菌专门召集会议进行了讨论。会议不仅集中讨论了种类丰富、宿主特异性不显著的林木内生真菌和宿主特异性十分严格的禾本科植物内生真菌, 还涉及到芒果、柑橘、柿子以及蔷薇科果树等多种木本植物, 葡萄等藤本植物和蔬菜、香蕉、以及各种杂草等草本植物中的真菌。会议一致认为植物内部存在真菌的现象十分普遍, 提示关注植物体内的微生物对人类的作用和人们干预植物体内微生物的方法。讨论会的内容后来被整理成了第一本关于植物内生真菌的单行本, 由美国植物病理学会出版^[3]。

1997 年, 在英国 Edinburgh 召开的国际植物病理学会就此召集了一个分组讨论会, 专门讨论了植物内生真菌, 提出了注重“主要生活史”的说法, 要求仅将主要生活史在植物体内过渡的微生物作为植物内生菌。此后, 有人先后将植物体内的细菌、菌根菌等也相继纳入植物内生菌的研究范畴, 植物内生菌的研究又迎来了新的局面^[8,35], 植物内生菌的主要生活史也随之很少被人关注。

此外, 1990 年 11 月, 关于禾本科植物内生真菌的第一次国际会议在美国的 New Orleans 召开^[36]。此后每 3 年一次, 第八次会议于 2012 年在

中国兰州顺利召开, 第九次会议将于 2015 年在澳大利亚举行。这是关于植物内生真菌的唯一的定期国际会议, 会议的主要内容集中在麦角菌科的禾本科植物内生真菌的研究, 近期偶尔也有少量关于其他种类(Non-Clavicipitaceae endophytes)的内容。

3 植物内生菌研究的发展趋势

至今的研究表明, 从藻类、蕨类, 到木本、藤本的维管束植物, 几乎所有类群的植物体内都含有微生物。它们的生理活性物质生产能力、以及它们和植物病虫害的关系、和植物残骸分解进程的关系等都受到人们的普遍关注。

在所有植物内生菌中, 禾本科植物的 *Epichloïd* 内生真菌在国际上研究较多, 它们的资源、生理、生态、代谢、遗传和与宿主植物相互作用的研究展开得比较深入。但是, 这个领域的研究重点至今还是 *Neotyphodium coenophialum*、*N. lolii* 和 *Epichloë festucae* 等羊茅属和黑麦草属植物的内生真菌, 研究本身也在新西兰和美国等国家比较集中。早期的研究认为, 禾本科植物的 *Epichloïd* 类内生真菌主要原产于欧洲, 在欧洲、新西兰和美国等国家有较多的发现^[37]。后来, 南美洲、亚洲和非洲等地也发现了一些, 但关于它们的研究尚未深入。我国的研究同样起始于对资源的调查^[38-39], 2004 年报道了第一个新种^[40], 最近接连发表了多个 *Epichloïd* 内生真菌新种^[41-42]。虽然这些真菌不像新西兰和美国等地那样使植物积累生物碱, 导致家畜中毒, 但由于其宿主禾本科植物的重要性, 其生理、生态、遗传学特征, 以及对宿主的作用等值得我们进行深入研究^[43]。关于禾本科植物内生真菌的研究国际上有两个倾向比较引人注目: 一个是以美国 Kentucky 大学 Christopher L. Schardl 为代表的、围绕生物碱合成的比较基因组学研究^[44]; 另一个是以新西兰 Massey 大学的 Barry Scott 为代表的、围绕真菌如何选择寄生生活还是与宿主植物和平共生的研究^[45-47]。

其他植物中内生菌的研究比较复杂, 微生物种类丰富、功能多样化突出、宿主的物种和生活史多

样、宿主/微生物共生体的基本特征各异,也有很多研究从内生菌代谢产物筛选的角度展开。在我国,围绕药用植物内生菌的生理活性物质生产研究是近二十年的热点。很多研究结果显示,分离自植物体内的微生物有些能够产生一些生理活性物质。国外的 Strobel 等以及国内的邹文欣等的研究给人们留下了深刻的印象^[6,17,48-49]。但是,在我国,这些研究在内生微生物的基础研究方面往往不够仔细和深入,在生理活性物质的种类及其生产特征等方面往往与土壤微生物没有比较。林木内生菌对于自然界的倒木和枯枝落叶的物质循环有重要作用,对于林木的植物保护、木材品质和寿命等也有一定的影响。在农业方面,果树内生菌对果树和水果品质的影响值得深入关注。

一年生和两年生的草本植物中也有很多微生物存在,但是,这些微生物绝大多数在种子/幼苗中检测不到^[3]。因此,它们实质上是种子播种后、或者种苗移栽后从土壤、水或空气中进入植物体内的非种传微生物。在一、两年生植物的生育期,这些微生物可以在植物体内定殖和适度繁殖,甚至可以从一个器官移动到另一个器官,并在新分化产生的器官中定殖和适度繁殖。但是,随着植物的成熟和营养体的老化,这些微生物中绝大部分又重新回归到土壤中,这是土壤微生物的典型生活方式。在植物营养体中,极少种类的微生物能进入种子中,成为“种传微生物”随植物的世代交替而繁衍和进化。落叶树的树叶中的微生物基本也是如此。因此,在交替时间比较短的植物器官中,绝大部分微生物可能是从环境中随机进入植物体内的环境微生物。虽然从微生物学,特别是从遗传学的角度来看,它们和土壤微生物或植物病原微生物等难以区别,但是从生态学的角度来看,这些微生物具有和宿主植物共同营生的能力,也被认为是一类植物内生菌。这类植物内生菌的种类和密度往往受环境的影响(环境依赖性)很大,在功能上,与具有宿主特异性的内生菌往往有着较大的区别。

在木本和藤本植物(无论是常绿植物还是落叶植物)中,叶片也是寿命相对较短的器官。在这些植物中,刚刚抽出的新叶片中含有的微生物往往很少,随着叶片日龄的增加,微生物种类逐渐增加;在老化期叶片内部的微生物含量达到最高(这些数据常出现在相关学位论文中)。这些现象显示了这些微生物出入叶片内部的日常性和随机性。因此,除去少数例子外,生活在植物叶片中的内生菌往往也可认为是能从外部较为随机地进入植物体内的环境微生物,这类微生物一般不依赖植物体就能完成自己的生活史。它们在土壤中营生是常态,进入植物体内仅仅是偶发事件。与动物不同,植物没有体细胞免疫,对于环境中的微生物体而言,植物体是一个相对开放的空间,很多意想不到的微生物也有机会出入植物体内。例如,有些人类病原细菌甚至也会在植物体内检测到^[50-52]。因此,对植物内生微生物,我们需谨慎对待。

在多年生常绿型草本、木本和藤本植物的叶以外的组织中,微生物可能长久定居在植物的营养体内,与植物建立比较稳定的共生和协同关系(Symbiotic and synergetic relationships)。这部分微生物则往往,虽然不是必需依赖,在植物体内完成生活史。这些微生物在植物体内的密度、作用往往是持久和稳定的,因此它们在促进植物生长、增强植物抗性等方面有较大的实用空间。

植物块根、块茎等在土壤中发育的肉质组织内生微生物比较特殊。这些肉质组织一般都是储藏器官,根据植物所储藏的主要物质类型以及器官的发育部位,内部也不同程度地含有各类植物内生真菌。这些内生菌的密度和种类随着植物生长发育环境的不同也有着很大的不同,在很大程度上表现出环境依赖性。

植物果实中的内生微生物则情况往往比较复杂。禾本科、葫芦科、豆科、蔷薇科以及松科等科植物的果实在基本形态和结构上完全不同。禾本科、蔷薇科以及松科等科植物果实结构复杂,往往

存在着大量的果实内生微生物；而豆科、葫芦科、十字花科等科的植物果实结构比较简单，内生微生物的种类和数量等往往也比较简单。

在被称为树木内生菌的微生物类群中，存在很多环境微生物、潜在病原菌以及木材腐朽菌。这些微生物对于林木的植物保护、木材品质和寿命、落叶的物质循环等有一定的影响。这类微生物在果树的植物保护等方面的作用值得重视。

植物体内存在大量的细菌。这些细菌有些是植物体内特有的，从种子/种苗中就能检测和分离得到(甘蔗等)，但这只占植物体内的细菌中比较少部分。整个植物营养体中的大部分细菌是植物生长过程中从外部进入的，这个现象在植物根系和叶片中更加常见。在有些学者看来，内生菌的概念往往和生活史挂钩。但是，细菌以二分裂为主要繁殖方法，也很少发生分化。人们在细菌学中不常使用生活史这个概念。因此，植物体内的细菌在国外往往被称为“Endophytic bacteria”(内生性细菌)或“Bacterial endophytes”(细菌性内生菌)。自从 Kleopfer 的研究小组发表了黄瓜、棉花等植物体内的细菌和宿主植物的抗病能力关系以来^[53]，很多研究人员开始致力于植物体内的细菌研究，至今在植物保护方面积累了大量的植物内生细菌研究信息^[54-56]。

植物内生细菌研究的另一个热点则在生理活性物质研究领域。

近年来，国内外各地出现了生产各类生理活性物质的植物内生细菌。但是由于这些细菌的生理活性物质生产往往和土壤微生物或其他类型的微生物的类似特性缺乏比较，其生理活性物质生产能力的实际应用潜力一般都不明了。因此，这个漏洞需要今后加以补充。

4 植物内生菌研究的科学意义

4.1 微生物总量

现在大家都认识到植物体内存在着大量的微生物。甚至有人按照“一种植物体内可能存在 5 种新的微生物”的假设，根据地球上的维管束植物总量推

测地球上还存在大量(100 万种以上)的新植物内生菌资源^[48]。这一观点在我国被很多的研究人员反复引用。

关于地球上的微生物总量，最近十几年来从不同领域至少出现了两个使地球上的微生物总量大幅增加的说法。一个是基于 VBNC (Viable but non-culturable)的说法，另一个是 Strobel 等提出的基于植物内生菌的说法。关于基于 VBNC 的说法强调的是微生物的生物量，不涉及到微生物的种类，得到了一些实验数据的支持。而基于植物内生菌的说法涉及的是微生物的种类，基本不涉及到微生物的生物量，但至今几乎没有获得可靠的实验数据支持。关于生物物种多样性，笔者认为“100 万种以上的植物内生菌”的说法值得商榷。

Strobel (2003 年)的“Microbes and Infection”杂志上发表的综述中提出了上述观点。在这篇文章中，Strobel 主要强调了人类疾病的增加、治疗药物需求的增加，以及植物内生菌可能成为药物的新来源，而推测地球上的内生真菌生物量并不是该文的主要内容^[48]。在同年发表的另一篇文章中^[16]，他们认为地球上还存在大量(100 万种以上)新植物内生菌资源的说法并非他们的原创，而是来自于 1994 年出版的一本关于天然化合物的专著中的一章^[57]。这种说法和 Hawksworth 等编著的著作中关于微生物总量的推测相吻合。但不得不指出的是，这些说法至今没有获得足够的试验数据的支持^[8,58]。至今的研究结果显示，除少量具有宿主特异性的内生微生物以外，很多不同种类植物体内的微生物大体类似，且受环境、季节等因素的影响^[59-61]。即在研究初期一种植物的体内可能会有 5 种或更多的新的微生物，但是随着研究的深入，地球上 20 万种植物体内未必都会有不相同的微生物被发现。因此，用简单的乘法来估算植物内生微生物总量的方法的科学性值得商榷。

不论上述关于植物内生菌的设想以及关于地球上的内生菌资源总量的说法是否合理，内生菌的研究使人们认识到了微生物在植物体内的存在方

式和生活方式,这毋庸置疑地增加了微生物新种出现的可能性。从这个角度来看,由于人们对于植物内生菌的认识的增加,会使人们可预测的全球微生物总生物量和物种量又会有所增加。但至于会新增多少,上述 100 万种以上的简单猜测到底有多少合理性,笔者认为这需要根据不断积累的实验数据来进行评估和推测。植物内生菌对地球生物量的贡献还需要今后从更多的角度进行更加细致的调查、评估。

4.2 植物在自然界中的存在方式

在传统的观念中,植物是独立的生物体,植物单独生活在土壤环境中。微生物是作为土壤微生物(包括菌根菌)、病原微生物或体表微生物与植物发生关系。植物和微生物是截然不同的两类生物群体,植物生长和发育主要受植物自身的遗传因素决定。

在植物内生菌被广泛认识的今天,可以说在野外生存的植物体实际上是传统概念上的植物体和

各种微生物群体的共同体(Symbiota 或复合体 Complexes):不仅在植物体表,在植物体内也存在着大量的微生物^[61-63]。这些微生物有些可以随种子(种苗)进行传播,有些则仅仅在营养体中,随着营养体的衰老和消亡进入(回归)土壤、水体和空气。随着植物的发芽、生长到成熟,其间很多微生物都有可能进入植物体内,有可能参与植物的生理作用和各种代谢,给植物带来各种变化和功能^[62-65]。因此,笔者认为,植物的整个生长过程就是宿主植物和植物内生菌共同体的生命过程(图 1)。当植物体内出现内生菌后,内生菌在营养和能源上增加了植物的负担,同时使植物体内的基因组总量增加(植物基因组加微生物基因组),也给植物带来了新的功能或功能增强的可能,扩大了植物的适应和传播范围^[32]。笔者认为,人们对在自然状态下生长的植物的理解已经到了可以发生较大变化的时候,那些在自然环境中高频率地、且比较稳定地存在于某些植物体内的内生微生物对宿主的作用,尤其值得关注。

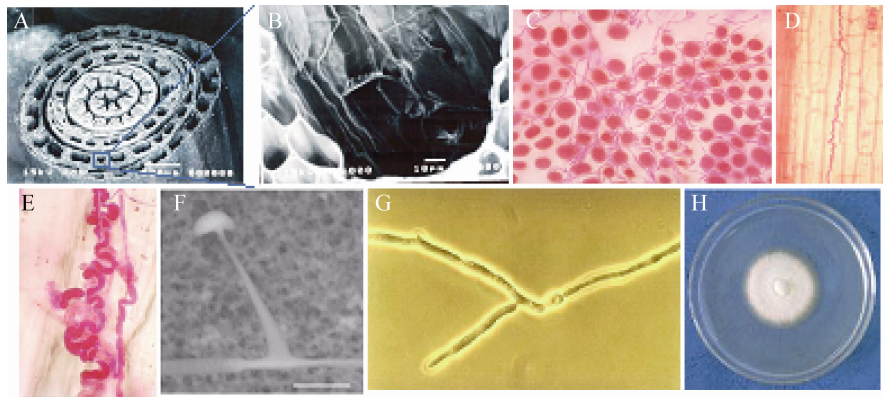


图 1 几种植物内生菌在植物体内外的生存状态

Figure 1 *In vitro* and *in vivo* morphology of several grass endophytes

注: A: 草甸羊茅茎秆横切面(SEM); B: 图 1A 中的一个气腔的放大,内部着生数条菌丝体(SEM); C: 草甸羊茅种子中的内生真菌菌丝体; D: 鹅观草叶鞘中的菌丝体; E: 苇状羊茅茎髓中的菌丝体; F: 鹅观草内生真菌 *N. sincium* 的分生孢子和分生孢子梗(SEM); G: *N. sincium* 分生孢子的萌发; H: 拂子茅内生真菌 *N. stromatolongum* 在 PDA 培养基上形成的菌落。菌丝体直径约 1-2 μm , 分生孢子长约 4-6 μm 。王志伟原图,部分研究生参与工作。

Note: A: A cross section of *Lolium pratense* sheath (SEM); B: Magnify of an air cavity, contain several endophytic hyphae (SEM); C: Endophytic hyphae within *L. pratense* seed; D: Endophytic hyphae within *Roegneria kamoji* leaf sheath; E: Endophytic hyphae within *L. arundinaceum* culm pith; F: A conidiophore of *Roegneria* endophyte *N. sincium*; G: A conidium germination of *N. sincium*; H: A colony of *Calamagrostis* endophyte, *N. stromatolongum* grown on PDA medium. Diameter of hyphae 1-2 μm , length of a conidium 4-6 μm . All the pictures were taken by Wang Z., some graduate students also co-contributed.

有些禾本科植物内生真菌增强宿主植物对不良环境(包括温度、水分等气候胁迫,昆虫、病原菌、线虫等生物胁迫,刈割、践踏等人畜胁迫)的抗性,使宿主植物作为冷季型牧草和草坪草传遍全球。内生真菌 *N. coenophialum* 给宿主植物苇状羊茅(*Lolium arundincium*=*Festuca arundinacea*)带来对昆虫、线虫、干旱的抗性以及带来更旺盛的生长能力和分蘖能力就是很好的例子^[32]。同时,欧洲存在很多古老的多年生黑麦草(*Lolium perenne*)自然草地,有些已有百年以上。这些古老的多年生黑麦草草地中的绝大多数植株都含有内生真菌。这也从另一个侧面证明了内生真菌对宿主植物的生态作用^[66]。但是,近三十年来,尽管国际国内关于植物内生真菌的研究暴发式增加,但这些真菌资源的生物功能的研究还比较少。这可能是今后植物内生菌研究的一个发展方向。

应该指出,在国内大多数研究都停留在检测从植物体内分离真菌的培养液中的产物及其生物活性的层次,涉及分离菌株的详细鉴定以及对宿主植物的生态学影响等比较少^[14]。因此,我国的植物内生菌研究中绝大多数至今仍然停留在生理活性物质生产的资源探索方面,其生物学意义和生态学意义等还需今后进一步研究。植物内生菌存在于宿主体内,随着时间的推移,我们不难想象,内生菌的存在可能对于宿主植物的物种进化也存在一定的作用。这方面的研究至今在国际国内尚未看到,值得今后关注。

4.3 微生物的进化和物种形成

植物内生菌主要生活在植物体内。植物体内是一个和外界完全不同的环境,有充足的水分和营养,有适当的氧气,而竞争对手却很少——形成了一个独特的适合微生物生长、繁殖和进化的小世界。在这个小世界里,植物内生菌进行着独特的进化和物种形成过程。植物体内的环境对于一些仅仅存在于植物体内、依靠植物体才能生存的微生物的物种形成来说尤其重要。

近期研究结果表明,麦角菌科 *Neotyphodium* 属有丝分裂子囊菌(Mitotic ascomycetes)是由同科的 *Epichloë* 属真菌单独或杂交演化而来的,失去了有性生殖能力的真菌^[67-71]。*Neotyphodium* 属各个种的经典分类学特征十分类似,基本上只能分为少数几个类型。*Epichloë* 属真菌的基因组大约有 25-30 Mb,含有单拷贝的 *tefA* 和 *tubB* 基因,而有些 *Neotyphodium* 属真菌则分别含有两种类型拷贝的 *tefA* 和 *tubB* 基因,且其基因组在 50-60 Mb^[44,72]。此外,RAPD 分析以及微卫星分析的结果都显示,这类菌起源于不属真菌同的 *Epichloë* 属真菌的非正常杂交^[69,73-74]。这种杂交现象在 *Neotyphodium* 的新种形成过程中比较普遍^[69-70,75]。因此,内生真菌为微生物的物种起源、特别是有丝分裂子囊菌的起源提供了很好的研究材料和模型。

在 *Neotyphodium* 属真菌的二十多个种中,根据经典分类学特征所能区分的仅有少数几个种,1997 年后发现的十多个种的经典分类学特征与 *N. typhinum* 等个别种十分类似^[69,71,76]。近年来,利用某些特定基因的拷贝数进行的核型分析等分子遗传学手段催生了大量的新种。这些新种的建立,为从各种植物中发现新的内生微生物提供了新的手段^[67,70,75,77]。2014 年, *Neotyphodium* 属被并入 *Epichloë* 属中^[78]。有丝分裂子囊菌在子囊菌的各个纲,以及肉座菌目中的各个科中十分普遍,其他有丝分裂子囊菌是否也具有和 *Neotyphodium* 属真菌类似的起源,值得进行深入的研究。同时, *Acremonium* (枝顶孢霉)、*Penicillium* (青霉)、*Aspergillus* (曲霉)等属中很多成员的经典分类学特征十分简单,往往很多不同属的子囊菌的无性世代和同一个有丝分裂子囊菌类似。因此,一个特定的有丝分裂子囊菌菌群往往遗传多样性十分丰富,其中可能含有的物种甚至远远超过至今的认识。

4.4 对植物育种的影响

需要特别指出的是,至今的植物育种一直是建立在植物单独存在的概念之上,通过对植物基因组

的内容(植物细胞内的遗传物质)进行人为干预而达成的。直接针对植物和微生物共同体(共生体)的育种,目前似乎只有带有花纹的郁金香(感染郁金香碎锦花叶病毒)和部分草坪草的例子。前者是人类在漫长的实践中无意间达成的成就,而后者则是人们认识内生真菌作用之后的新式植物育种——植物/微生物共生体的培育。现在,全球的多年生黑麦草、苇状羊茅等绝大多数品种都是这种植物/微生物共生体,这些成功经验为在更多的领域中培育植物/微生物共生体、获得更优良的品种提供了一个新的思路^[20,43,62,66,79]。

还有一种可能性可以考虑。植物内生菌和宿主植物之间或多或少地存在着相互作用,不同基因型的宿主植物对内生菌的种类和密度等均可能有所选择。因此,可以设想通过改变宿主植物的遗传背景,改变宿主植物从环境中接纳的植物内生菌种类,达到改变植物(实际上是植物内生菌/宿主共同体)表型的目的。美国的 McInroy 等通过对来自中国和美国的品种棉花植株的内生细菌的检测、分离和分析,认为抗病棉花中的植物内生细菌对棉花的抗病性有一定的贡献,同时认为棉花的抗性育种可能也包括对抗病性植物内生细菌的亲能力的培育^[80]。因此,通过调节和培育对微生物的亲能力来改良植物表型,这对于植物育种来说可能是一种新思维和新策略。

基于上文提到的植物在自然界存在状态的观点(本文 4.2 节),结合本节中讨论的植物育种新思路,我们认为植物育种实际上是对“植物与微生物的共生体的选育”。对照现行的植物育种方法,今后可能需要考虑更多的微生物因素,增加微生物在新品种的性状形成中的贡献,加强微生物对植物育种事业的贡献。

4.5 对天然化合物研究的影响——代谢和联合代谢

需要特别指出的是,植物内生菌和植物的联合代谢的重要性。这种联合代谢有些是在植物源和微

生物源的酶类的联合作用下的产物,有些则是微生物的基因表达在植物体内受植物生理环境的影响在微生物细胞内合成的新产物或合成量显著增加的产物,或植物受微生物刺激后启动的新的次生代谢途径中的产物。前者例如在禾本科植物/*Epichloid* 内生真菌共生体中大量存在的波胺(Peramine)、麦角缬氨酸(Ergovaline)、黑麦草碱类(Lolines)和震颤素(Lolitrems)类化合物;后者例如在许多植物中被微生物诱导合成的植保素(Phytoalexins)类化合物^[71,81]。内生真菌含有完整的麦角缬氨酸(Ergovaline)、黑麦草碱类(Lolines)和震颤素(Lolitrems)类化合物的合成基因,但在多种真菌培养基上检测不到这些化合物的存在,说明这些化合物的合成完全由真菌合成,但需要植物体内的环境才能启动真菌中的这些相关基因^[71,82-84]。与此相反,植保素类化合物(Phytoalexins)的合成基因存在于植物细胞中,但在一般状态下植物体内不存在这些化合物。但受损伤、紫外线诱导或病原微生物侵染等生物或非生物伤害后开始合成,其合成量也会伴随植物组织病变的发生和发展而变化。这些化合物往往都不是利用中间代谢产物合成,而是 *de novo* 合成的诱导化合物,如:白藜芦醇(Resveratrol)^[85]、香豆素类化合物(Coumarins)^[86]等。这些化合物一般对病原物有抑制作用,在植物对病原物的能动抗性中起到十分重要的作用。

需要微生物与宿主植物相互作用才能合成的化合物往往都是新化合物,微生物单独或者植物单独通常都不合成(至少现阶段无法合成)。这些化合物中常具有新的生物活性的骨架,在生理活性物质研究中往往可以作为先导化合物(Leading compounds),对三药(农药、兽药和医药)的开发具有十分重要的意义。因此,在生物活性物质筛选中,内生菌的重要性不仅在于植物中的微生物的新颖性,而且微生物和宿主植物相互作用后产生的新的代谢物,或者有利产量显著增加的代谢物是更有价值的。

通过诱导表达、联合代谢等生产的新的化合物有时还受到植物所生长的环境的影响。在禾本科植物 *Epichloë* 内生真菌共生体中就存在波胺(Peramine)合成量和在植物体内的积累量有时则随着宿主植物的刈割而大幅度增加的现象^[44]。这提示人们可以通过栽培、或植物刺激方法的改变实现增加目标化合物的含量。从植物受微生物的激发后新合成的 Phytoalexins 类物质的研究经验来看,微生物体(或其化学组分)处理、物理伤害、化学物质(有机物、无机物以及有机无机混合物)处理、UV 等射线的照射、极端温度和湿度等因素或许都有可能成为刺激和改变联合代谢或基因诱导表达的手段。这些次生代谢产物的诱导手段均可在今后的研究和生产实践中进一步探索和利用。

4.6 对植物病理学的影响

植物体是一个相对开放、但又不是一个完全开放的空间,植物对进入体内的微生物有一定的选择。这种选择的生物学机理历来是植物病理学研究的中心话题之一。从抗性育种的角度,Flor 的“基因对基因学说(Gene for gene theory)”在近半个世纪以来一直被认为是解释植物病害发生或抗性发动的一个主导性学说,但是这个学说只能解释部分植物病害。在这个学说下很多现象难以得到很好的解释。从分子遗传学的角度看,植物的抗病基因(抗性基因, Resistance genes)以及病原微生物的毒力基因(Virulence genes)和非毒力基因(Avirulence gene)相继被克隆和分析。虽然第一个植物病原性基因被克隆和分析已将近三十年,第一个植物抗病性基因被克隆和分析也约有二十年,这些基因的作用至今依然不是十分明了。从信号传导的角度看,宿主和微生物之间的相互识别过程(Recognition process)对决定植物是否容纳这个微生物起着十分重要的作用。植物病理化学研究至今积累的数据也支持这种观点。因此,对于植物病害的发生来说,过程(Process)和识别(Recognition)都十分重要。新西兰 Massey 大学 Barry Scott 研究小组利用禾本科植物内生真菌,

揭示了活性氧(Active oxygen)以及 MAPK (Mitogen activated protein kinase)在内生真菌/宿主植物共生体的形成过程中的重要作用^[45-47]。菌丝体内部活性氧产生量的降低直接导致菌丝体生长方式的变化和对宿主植物的危害,即从没有明显危害的内生真菌转变为明显对宿主植物生长不利的真菌^[47]。植物内生菌的研究从另一个角度为微生物/宿主相互关系的研究提供了很好的材料,相关研究结果对于理解和解释植物病害可能会有一定的帮助。

4.7 对生态学的影响

Epichloid 真菌是专门和冷季型禾本科植物形成共生体的典型真菌,包括 *Epichloë* 属真菌和 *Neotyphodium* 属真菌,它们仅仅存在于植物体内和植物体表,至今没有从土壤或水体中分离得到的记录。这两属的成员在我国均有发现。*Neotyphodium* 属真菌一般仅存在于植物体内,随着植物的种子进行垂直传播,因此它们生活和传播完全依赖宿主植物。*Epichloë* 属真菌则更复杂,它是典型的子囊菌,偶尔能在宿主植物抽穗的季节在宿主的茎秆上形成子座,产生子囊孢子,但其交配必须由昆虫,如植种蝇(*Phorbia* spp.)等飞蝇作为媒介。因此,*Epichloë* 属真菌要在植株上形成子囊孢子,植株、真菌和昆虫必需先形成三元共生的关系^[87]。这种微生物、植物和动物三者之间形成的这种三元共生关系(Triparental symbiosis),在生物的世界中也是极少有的先例,对研究整个生态的复杂性和各个生物类群之间的相互关系有着十分重要的作用。

4.8 对木材和森林学的影响

林木内生真菌研究是植物内生菌的源头之一,这些内生真菌被认为对林木的病虫害抗性、林木的落叶、木材的寿命和颜色变化等有一定的关系^[2-3]。但事实上,林木内生菌由于其宿主的生活史长、个体大、材料不均一、木质化、和其他生物类群的关系等特殊性和复杂性,内生菌/宿主共生体的研究往往难以深入进行。虽然有些研究表明,某些植物内生菌会提高林木的抗病能力和抗虫能力,但也有研

究报道含有植物内生菌的叶片往往会提早落叶、含有植物内生菌的木材容易腐朽等不利于人类和生态环境的现象。与禾本科植物内生真菌相比,现在林木内生真菌的基础研究的落后十分明显。相反,禾本科植物内生真菌的研究也给林木内生菌研究提供了一个很好的参照。至今,林木内生菌中还没发现像禾本科植物内生真菌那样的宿主特异性十分突出的成员,但很多林木内生菌由于长久与林木经营共生生活,它们和宿主植物的联合代谢、协同作用等值得深入关注。在林木体内,植物器官或组织、内生真菌、林木病原菌、林木昆虫、鸟类以及其他生物构成了一个相对独立的小生态环境,在这个小生态环境中,这些生物类群如何作用?这些作用的结果对森林中的生物多样性、森林的变化规律、林木寿命、以及木材品质和变化等都是值得关注的问题。

4.9 对其他学科的影响

草食动物以及杂食动物都以采食大量新鲜的植物为生。这些微生物在动物体内虽然仅占很少的生物量,但在功能上对动物体是否有影响,也值得关注。此外,动物体内往往都有很多微生物在帮助消化植物。这些微生物来自何处,和植物内生微生物是否有关联,值得今后研究。

用生物学观念来看,人和其它动物一样,每天需要食用大量的动植物。人们摄入的微生物体主要是食用菌,其次就是酸奶、奶酪等奶制品,腐乳、咸菜等传统食品。从营养学观点来看,人们食用水果主要是摄入水果中的糖、酸、维生素、无机盐等食品化学成分,从中获得营养。而从植物内生菌的观点来看,人类食用水果不仅食用了水果中作为植物的化学成分,同时也摄入了水果中的活体微生物——植物内生菌。人体的消化道内部有很多微生物,它们对人体的健康和人的生活起到了不可或缺的作用。这些微生物应该是来源于出生后所处的环境中,其中植物内生菌也很可能是这些微生物来源的一部分。这些植物内生菌进入人体后,在体内

的定殖、繁殖及其所起的作用值得进一步探索。

在生理活性物质生产方面,许多在药物开发方面具有利用价值的化合物很多必须从植物体内提取,而这些植物往往又都是珍稀植物。红豆杉及其体内的紫杉醇就是一个很好的例子^[16-17]。随着对植物体内微生物研究的深入,以前依靠植物提取来获得的化合物,有时可以通过植物内生微生物的发酵来生产。这不仅可以极大地保护有限的植物资源,而且为提高化合物的生产提取效率也提供了很大的改善空间。

5 展望——中国的植物内生菌研究

植物内生菌是生物进化过程中形成的生活方式比较特殊的一类群体,直到三十多年前一直未为人所关注。由于这些微生物在漫长的进化过程中一直和宿主植物保持着某种密切的(或比较松散的)联系,内生菌不可避免地对植物所涉及的所有领域都会有影响。因此,近三十年来的植物内生菌研究,实际上为人们打开了微生物资源的一个新的层面,今后这类微生物资源将在科学和技术领域中产生十分广泛的影响。同时植物内生菌研究也正开始对植物相关学科、微生物相关学科等产生一些影响。

三十多年来,尽管国际国内对植物内生菌的关注出现了暴发式增加,但其影响的范围还一直局限在微生物资源、活性物质的筛选、农学(实际上仅牧草和草坪育种)、兽医学(实际上仅和动物的牧草中毒相关)等领域(表 1)。特别是在我国,植物内生真菌的研究主要集中在生理活性物质生产菌的筛选以及生理活性物质的化学分析等方面,而在农学和兽医学等方面的研究则很少^[88]。就禾本科植物内生真菌而言,有些从事草坪育种的单位正在实施内生真菌利用计划,而其他类型的内生真菌的研究和利用则很少看到。我国幅员广大,人口众多,农业生产多样化十分丰富,各种农业资源种类繁多。因此,植物内生真菌的资源应该比较丰富,其生理功能也可能十分多样化。至今的研究中,随着研究积累的进一步增加和了解植物内生菌人群的不断扩大大,特

表 1 植物内生菌研究的历史性研究或事件
Table 1 Some historical researches or events on plant endophyte researches

年份 Year	重要研究或事件 Issue	报道人 Researcher
1974	Fungal succession on needles and young twigs of old-growth Douglas fir	Sherwood 等 ^[2]
1975	Toxicity and occurrence of <i>Balanisia</i> on grasses from toxic fescue pastures	Bacon 等 ^[1]
1977	<i>Epichloë typhina</i> from toxic tall fescue grasses	Bacon 等 ^[30]
1982	Endophyte of tall fescue renamed <i>Acremonium coenophialum</i>	Morgan-Jones 等 ^[34]
1987	Widespread distribution of endophytes in Poaceae	White 等 ^[37]
1990	First international symposium on <i>Acremonium</i> /grass interactions	Joost 等 ^[36]
1992	Measuring colonization of plant roots by bacteria	Kloepper 等 ^[53]
1993	Taxol and taxane production by <i>Taxomyces andreanae</i> , an endophytic fungus of <i>Pacific yew</i>	Stierle 等 ^[17]
1993	Importance of <i>Acremonium</i> endophytes in turf-grass breeding and management	Funk C 等 ^[66]
1994	一种云南红豆杉内生真菌的分离 Isolation of an endophytic fungus associated with <i>Taxus yunnanensis</i> et L. K. Fu	邱德有等 ^[19]
1995	Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn	Mcinroy 等 ^[4]
1996	Endophytic fungi in grasses and woody plants: systematics, ecology, and evolution 从中国醉马草、大麦草中发现内生真菌	Redlin 等 ^[3] 李春杰等 ^[38] ，南志标 ^[39]
1996	An investigation of endophyte-grasses in north-west of China	
2000	Incidence and distribution of endophytic fungi in seedlings and plants of some native and introduced grasses in China	
2003	Metabolites of <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , an endophytic fungus in <i>Artemisia mongolica</i>	Zou 等 ^[18]
2004	Endophytes as sources of bioactive products 中国本土提出第一个禾本科植物内生真菌新种	Strobel G 等 ^[48] Li 等 ^[40]
2006	A new <i>Neotyphodium</i> species symbiotic with drunken horse grass (<i>Achnatherum inebrians</i>) in China Genome sequencing of <i>Epichloë festucae</i> E2368	http://www.endophyte.uky.edu/ Kuldau 等 ^[62] 程飞飞等 ^[43]
2008	Clavicipitaceous endophytes: Their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses	
2013	内生真菌 <i>Neotyphodium sinicum</i> 促进小麦近缘植物鹅观草的分蘖 Effects of endophyte <i>Neotyphodium sinicum</i> on botanical characters of its host <i>Roegneria kamoji</i>	
2014	冷季型禾本科植物内生真菌被统一为 <i>Epichloë</i> 属真菌 Nomenclatural realignment of <i>Neotyphodium</i> species with genus <i>Epichloë</i>	Leuchtmann 等 ^[78]

别是植物内生真菌多样化的功能在生态学、生物学、生物资源学、农学、畜牧学、植物保护学、医药、兽药、农药、进化研究等领域中影响的扩大,关于植物内生菌的新知识将对这些方面产生广泛的影响。此外,在实用性技术方面,内生菌的发现也将为生物技术的利用提供一些新的手段。

应该指出,在现在主流的植物内生菌的概念下,植物内生微生物往往不是在分类学地位上具有相对固定位置的微生物类群,而是多种微生物的一个生态学概念。作为植物内生菌的特殊作用也往往通过和宿主植物的关系体现出来。作为生产生理活性物质的微生物资源,植物内生菌的珍贵之处在于内生菌可能和宿主植物体进行联合代谢或基因的诱导表达,导致全新的生理活性物质的生产或原有的化合物超量生产。这些都是人们可以加以深入研究和利用的。

植物内生菌和植物内生菌研究孕育着重大的科学意义和现实的实用意义。我国关于植物内生菌的研究仍然停留在十分基础的起步阶段,如何超越简单的活性物质初筛,将植物内生菌这一自然界赋予人类的宝藏物尽其用,使其更好地为人类服务,这需要我们用更长远的眼光、更踏实的态度去研究。

致谢: 感谢日本饲料作物研究所以及生物系特定产业研究推进机构(生研机构)为作者之一(王志伟)提供了研究植物内生真菌的机会;感谢原南京农业大学校长翟虎渠为王志伟回国工作创造了条件;感谢课题组全体学生的辛勤工作和创造性的学术讨论。没有上述机构和人员的支持,本文难以成稿。

参考文献

- [1] Bacon CW, Porter K, Robbins JD. Toxicity and occurrence of *Balansia* on grasses from toxic fescue pastures[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1975, 29(4): 553-556
- [2] Sherwood M, Carroll G. Fungal succession on needles and young twigs of old-growth Douglas fir[J]. Mycologia, 1974, 66(3): 499-506
- [3] Redlin SC, Carris LM. Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants: Systematics, Ecology, and Evolution[M]. St. Paul, MN: American Phytopathological Society (APS Press), 1996
- [4] Mcinroy JA, Kloepper JW. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn[J]. Plant and Soil, 1995, 173(2): 337-342

- [5] Petrini O. Fungal endophytes of tree leaves[A]//Andrew JH, Hirano SS. Microbial Ecology of Leaves[M]. New York: Springer Verlag, 1991: 179-197
- [6] Zou W, Tan R. Recent advances on endophyte research[J]. Acta Botanica Sinica, 2001, 43(9): 881-892 (in Chinese)
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
- [7] Hyde K, Soytong K. The fungal endophyte dilemma[J]. Fungal Diversity, 2008, 33: 163-173
- [8] Bayman P. Fungal Endophytes[A]//Kubicek CP, Druzhinina IS. The Mycota (IV): Environmental and Microbial Relationships[M]. New York: Springer, 2007: 213-227
- [9] Stone J, Bacon CW, White Jr J. An overview of endophytic microbes: endophytism defined[A]//Bacon CW, White Jr J. Microbial Endophytes[M]. New York: Marcel Dekker, 2000: 3-29
- [10] Wilson D. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition[J]. Oikos, 1995, 73(2): 274-276
- [11] Guo LD. Advances of researches on endophytic fungi[J]. Mycosystema, 2001, 20(1): 148-152 (in Chinese)
郭良栋. 内生真菌研究进展[J]. 菌物系统, 2001, 20(1): 148-152
- [12] Shi JY, Chen WX, Liu AY. Advances in the study of endophytes and their effects on control of plant diseases[J]. Acta Ecologica Sinica, 2006, 26(7): 2395-2401 (in Chinese)
石晶磊, 陈维信, 刘爱媛. 植物内生菌及其防治植物病害的研究进展[J]. 生态学报, 2006, 26(7): 2395-2401
- [13] Wen CY, Wu YH, Tian XL. Recent advances and issues on the endophyte[J]. Chinese Journal of Ecology, 2004, 23(2): 86-91 (in Chinese)
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
- [14] Jiang S, Chen DJ, Tao JH, et al. Advances of pharmaceutical research on plant endophytes and their metabolites[J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2008, 29(6): 424-426 (in Chinese)
江曙, 陈代杰, 陶金华, 等. 植物内生菌及其代谢产物的药学研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29(6): 424-426
- [15] He RQ. Plant endophyte becomes one of hot topics in the current microbiological study in China[J]. Microbiology China, 2009, 36(1): 1 (in Chinese)
赫荣乔. 植物内生菌成为我国当前微生物研究领域的热点[J]. 微生物学通报, 2009, 36(1): 1
- [16] Strobel G, Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2003, 67(4): 491-502
- [17] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew[J]. Science, 1993, 260(5105): 214-216
- [18] Zou W, Meng J, Lu H, et al. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*[J]. Journal of Natural Products, 2000, 63(11): 1529-1530
- [19] Qiu DY, Huang MJ, Fang XH, et al. Isolation of an endophytic fungus associated with *Taxus yunnanensis* et L. K. Fu[J]. Acta Mycologica Sinica, 1994, 13(4): 314-316 (in Chinese)
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
- [20] Wang ZW, Ji YL, Chen YG. Grass endophytes and their potential applications in agriculture[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2011, 34(5): 144-154 (in Chinese)
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
- [21] Wang ZW, Ji YL, Chen YG, et al. Endophytic fungi resources and species diversity in grass family[J]. Acta Ecologica Sinica,

- 2010, 30(17): 4771-4781 (in Chinese)
 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
- [22] Zhou JH, Zhou HG, Liu HQ. Endophytic bacterial contamination in plant tissue culture[J]. Guihaia, 2003, 23(1): 41-47 (in Chinese)
 周俊辉, 周厚高, 刘花全. 植物组织培养中的内生细菌污染问题[J]. 广西植物, 2003, 23(1): 41-47
- [23] Yoshida, Wang ZW, Shimanuki, et al. Japanese grass endophyte researches 1, endophytic fungi haboured in graminous grass collected from Nagano, Yamanashi, Tochigi and Hokkaido[J]. Annuals of Japan Turf Science, 1997, 43(Suppl.): 148 (in Japanese)
 吉田, 王志伟, 岛贵, 等. 日本产禾本科植物内生菌的研究1, 关于从长野县, 山梨县, 栃木县以及北海道收集到的禾本科植物体内的内生菌 [J]. 日本草地学会志(日文), 1997, 43(别册): 148
- [24] Wang ZW, Yoshida, Shimanuki, et al. Japanese grass endophyte researches 2, endophytic fungi was observed within *Agropyron* spp.[J]. Annuals of Japan Turf Science, 1997, 43(Suppl.): 150 (in Japanese)
 王志伟, 吉田, 岛贵, 等. 日本产禾本科植物内生菌的研究2, 关于从 *Agropyron* 属植物发现的内生菌[J]. 日本草地学会志(日文), 1997, 43(别册): 150
- [25] Clay K. Clavicipitaceous endophytes of grasses: their potential as biocontrol agents[J]. Mycological Research, 1989, 92(1): 1-12
- [26] Bernstein M, Carroll G. Internal fungi in old-growth Douglas fir foliage[J]. Canadian Journal of Botany, 1977, 55(6): 644-653
- [27] Carroll GC. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont[J]. Ecology, 1988, 69(1): 2-9
- [28] Carroll GC, Carroll FE. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest[J]. Canadian Journal of Botany, 1978, 56(24): 3034-3043
- [29] Bacon CW. Toxic endophyte-infected tall fescue and range grasses: historic perspectives[J]. Journal of Animal Science, 1995, 73(3): 861-870
- [30] Bacon CW, Porter JK, Robbins JD, et al. *Epichloë typhina* from toxic tall fescue grasses[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1977, 34(5): 576-581
- [31] Bacon CW, White Jr J. Stains, media, and procedures for analyzing endophytes[A]//Bacon CW, White Jr J. Biotechnology of Endophytic Fungi of Grasses[M]. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1994: 47-56
- [32] Hoveland CS. Importance and economic significance of the *Acremonium* endophytes to performance of animals and grass plant[J]. Agriculture, Ecosystems and Environment, 1993, 44(1/4): 3-12
- [33] White Jr JF, Morgan-Jones G, Morrow AC. Taxonomy, life cycle, reproduction and detection of *Acremonium* endophytes[J]. Agriculture, Ecosystems and Environment, 1993, 44(1/4): 13-37
- [34] Morgan-Jones G, Gams W. Notes on hyphomycetes. XLI. An endophyte of *Festuca arundinacea* and the anamorph of *Epichloë typhina*, new taxa in one of the two new sections of *Acremonium*[J]. Mycotaxon, 1982, 15: 311-318
- [35] Fröhlich J, Hyde KD, Petrini O. Endophytic fungi associated with palms[J]. Mycological Research, 2000, 104(10): 1202-1212
- [36] Joost R, Quisenberry S. Introduction-proceedings of the international-symposium on *Acremonium*/grass interactions, 5-7 November 1990, New-Orleans, LA, USA[J]. Agriculture Ecosystems & Environment, 1993, 44(*Acremonium*/grass interactions)(1/4): 1-2
- [37] White Jr JF. Widespread distribution of endophytes in the Poaceae[J]. Plant Disease, 1987, 71(4): 340-342
- [38] Li BJ, Zheng XH, Shahe D, et al. An investigation of endophyte-grasses in north-west of China[J]. Grassland of China, 1996, 2: 29-32 (in Chinese)
 李保军, 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
- [39] Nan ZB. Incidence and distribution of endophytic fungi in seedlings and plants of some native and introduced grasses in China[J]. Acta Prataculturae Sinica, 1996, 5(3): 13-17 (in Chinese)
 南志标. 内生真菌在我国部分国产和引进禾草品种的幼苗及成株中的分布[J]. 草业学报, 1996, 5(3): 13-17
- [40] Li C, Nan Z, Paul VH, et al. A new *Neotyphodium* species symbiotic with drunken horse grass (*Achnatherum inebrians*) in China[J]. Mycotaxon, 2004, 90(1): 141-147
- [41] Kang Y, Ji Y, Zhu K, et al. A new *Epichloë* species with interspecific hybrid origins from *Poa pratensis* ssp. *pratensis* in Liyang, China[J]. Mycologia, 2011, 103(6): 1341-1350
- [42] Zhang X, Ren A, Wei Y, et al. Taxonomy, diversity and origins of symbiotic endophytes of *Achnatherum sibiricum* in the Inner Mongolia Steppe of China[J]. FEMS Microbiology Letters, 2009, 301(1): 12-20
- [43] Cheng F, Gao L, Jiang L, et al. Grass endophyte researches 16: effects of endophyte *Neotyphodium sinicum* on botanical characters of its host *Roegneria kamoji*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2013, 36(1): 52-58 (in Chinese)
 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
- [44] Schardl CL, Young CA, Hesse U, et al. Plant-symbiotic fungi as chemical engineers: multi-genome analysis of the clavicipitaceae reveals dynamics of alkaloid loci[J]. PLoS Genet, 2013, 9(2): e1003323
- [45] Eaton CJ, Cox MP, Scott B. What triggers grass endophytes to switch from mutualism to pathogenism?[J]. Plant Science, 2011, 180(2): 190-195
- [46] Tanaka A, Takemoto D, Chujo T, et al. Fungal endophytes of grasses[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2012, 15(4): 462-468
- [47] Tanaka A, Takemoto D, Hyon GS, et al. *NoxA* activation by the small GTPase *RacA* is required to maintain a mutualistic symbiotic association between *Epichloë festucae* and perennial ryegrass[J]. Molecular Microbiology, 2008, 68(5): 1165-1178
- [48] Strobel G. Endophytes as sources of bioactive products[J]. Microbes and Infection, 2003, 5(6): 535-544
- [49] Zhao J, Zhou L, Wang J, et al. Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants[A]//Mendez-Vilas A. Curr Res, Technol Educ Trop Appl Microbiol Microbial Biotechnol[M]. Badajoz, Spain: Formatex Research Center, 2010: 567-576
- [50] Itoh Y, Sugita-Konishi Y, Kasuga F, et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 present in radish sprouts[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(4): 1532-1535
- [51] Takeuchi K, Frank JF. Penetration of *Escherichia coli* O157:H7 into lettuce tissues as affected by inoculum size and temperature and the effect of chlorine treatment on cell viability[J]. Journal of Food Protection, 2000, 63(4): 434-440
- [52] Cooley MB, Miller WG, Mandrell RE. Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and competition by *Enterobacter asburiae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(8): 4915-4926
- [53] Kloepper JW, Beauchamp CJ. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1992, 38(12): 1219-1232
- [54] Rosenblueth M, Martínez-Romero E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts[J]. Molecular Plant-Microbe

- Interactions, 2006, 19(8): 827-837
- [55] Berg G, Krechel A, Ditz M, et al. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2005, 51(2): 215-229
- [56] Melnick RL, Bailey BA, Backman PA. Bacterial Endophytes of Perennial Crops for Management of Plant Disease[II] Maheshwari DK. Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management[M]. New York: Springer, 2013: 49-76
- [57] Dreyfuss M, Chapela IH. Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals[A]//Gullo VP. Discovery of Natural Products with *Therapeutic Potential*[M]. London: Butterworth-Heinemann, 1994: 49-80
- [58] O'Donnell AG, Goodfellow M, Hawksworth DL. Theoretical and practical aspects of quantification of biodiversity among microorganisms[A]//Hawksworth DL. Biodiversity: Measurement and Estimation[M]. London: Chapman & Hall, 1995: 65-74
- [59] Kowalski T, Kehr R. Endophytic fungal colonization of branch bases in several forest tree species[J]. Sydowia, 1992, 44(2): 137-168
- [60] Sinclair J, Cerkaskas R. Latent infection vs. endophytic colonization by fungi[A]//Redlin SC, Carris LM. Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants: Systematics, Ecology, and Evolution[M]. St. Paul, MN: American Phytopathological Society, 1996: 3-29
- [61] Yang T, Chen Y, Wang X, et al. Plant symbionts: keys to the phytosphere[J]. Symbiosis, 2013, 59(1): 1-14
- [62] Kuldau G, Bacon CW. Clavicipitaceous endophytes: Their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses[J]. Biological Control, 2008, 46(1): 57-71
- [63] Schulz B, Boyle C. The endophytic continuum[J]. Mycological Research, 2005, 109(6): 661-686
- [64] Chi F, Shen S, Cheng H, et al. Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(11): 7271-7278
- [65] Schardl CL, Leuchtmann A, Spiering MJ. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes[J]. Annual Review of Plant Biology, 2004, 55: 315-340
- [66] Funk C, White R, Breen J. Importance of *Acremonium* endophytes in turf-grass breeding and management[J]. Agriculture, Ecosystems and Environment, 1993, 44(1/4): 215-232
- [67] Ji Y, Zhan L, Kang Y, et al. A new stromata-producing *Neotyphodium* species symbiotic with clonal grass *Calamagrostis epigeios* (L.) Roth. grown in China[J]. Mycologia, 2009, 101(2): 200-205
- [68] Craven KD, Blankenship JD, Leuchtmann A, et al. Hybrid fungal endophytes symbiotic with the grass *Lolium pratense*[J]. Sydowia, 2001, 53(1): 44-73
- [69] Moon CD, Craven KD, Leuchtmann A, et al. Prevalence of interspecific hybrids amongst asexual fungal endophytes of grasses[J]. Molecular Ecology, 2004, 13(6): 1455-1467
- [70] Moon C, Guillaumin J, Ravel C, et al. New *Neotyphodium* endophyte species from the grass tribes Stipeae and Meliceae[J]. Mycologia, 2007, 99(6): 895-905
- [71] Schardl CL, Leuchtmann A. The *Epichloë* endophytes of grasses and the symbiotic continuum[A]//Dighton J, White Jr J, Oudemans PV. The Fungal Community[M]. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 2005: 475-503
- [72] Tsai H, Liu J, Staben C, et al. Evolutionary diversification of fungal endophytes of tall fescue grass by hybridization with *Epichloë* species[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994, 91(7): 2542-2546
- [73] Chen YG, Ji YL, Kang Y, et al. Grass endophyte researches 5. Genetic diversity in some Chinese *epichloë* endophytes[J]. Mycosystema, 2008, 27(6): 863-872 (in Chinese)
- 陈永敢, 纪燕玲, 亢燕, 等. 禾本科植物内生真菌研究5. 中国产部分 *epichloë* 内生真菌的遗传多样性[J]. 菌物学报, 2008, 27(6): 863-872
- [74] Li W, Ji YL, Yu HS, et al. Genetic diversity and rDNA-ITS sequence analysis of endophytic fungi isolated from gramineous plants in China[J]. Mycosystema, 2006, 25(2): 217-226 (in Chinese)
- 李伟, 纪燕玲, 于汉寿, 等. 中国产禾本科植物内生真菌的遗传多样性及 rDNA-ITS 系统发育分析[J]. 菌物学报, 2006, 25(2): 217-226
- [75] Chen YG, Ji YL, Yu HS, et al. A new *Neotyphodium* species from *Festuca parvigluma* Steud. grown in China[J]. Mycologia, 2009, 101(5): 681-685
- [76] Glenn AE, Bacon CW, Price R, et al. Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications[J]. Mycologia, 1996, 88(3): 369-383
- [77] Kang Y, Ji YL, Sun XH, et al. Taxonomy of *Neotyphodium* endophytes of Chinese native *Roegneria* plants[J]. Mycologia, 2009, 101(2): 211-219
- [78] Leuchtmann A, Bacon CW, Schardl CL, et al. Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichloë*[J]. Mycologia, 2014, 106(2): 202-215
- [79] Schardl CL, Phillips TD. Protective grass endophytes: where are they from and where are they going?[J]. Plant Disease, 1997, 81(5): 430-438
- [80] McInroy JA, Qi W, Mahaffee WF, et al. Comparative evaluation of endophytic bacteria from Chinese and U.S. cotton cultivars[A]//Ogoshi A, Kobayashi K, Homma Y, et al. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria--Present Status and Future Prospects[M]. Sapporo, Japan: Nakanishi Printing, 1997: 228-231
- [81] Darvill A, Albersheim P. Phytoalexins and their elicitors: a defense against microbial infection in plants[J]. Annual Review of Plant Physiology, 1984, 35: 243-275
- [82] Schardl C, Grossman R, Nagabhyru P, et al. Loline alkaloids: currencies of mutualism[J]. Phytochemistry, 2007, 68(7): 980-996
- [83] Wilkinson H, Siegel M, Blankenship J, et al. Contribution of fungal loline alkaloids to protection from aphids in a grass-endophyte mutualism[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2000, 13(10): 1027-1033
- [84] Young CA, Tapper BA, May K, et al. Indole-diterpene biosynthetic capability of *Epichloë* endophytes as predicted by *lm* gene analysis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(7): 2200-2211
- [85] Guo JN, Liu CH, Pan X, et al. Advances in research on resveratrol in *Vitis* spp.[J]. Journal of Fruit Science, 2002, 19(3): 199-204 (in Chinese)
- 郭景南, 刘崇怀, 潘兴, 等. 葡萄属植物白藜芦醇研究进展[J]. 果树学报, 2002, 19(3): 199-204
- [86] Hao G, Wang ZG, Fu WY, et al. Research progress on effect of coumarins compounds in anti-tumor[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2008, 33(18): 2016-2019 (in Chinese)
- 郝光, 王振国, 付文艳, 等. 香豆素类化合物抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(18): 2016-2019
- [87] Bultman TL, Leuchtmann A. A test of host specialization by insect vectors as a mechanism for reproductive isolation among entomophilous fungal species[J]. Oikos, 2003, 103(3): 681-687
- [88] Wang ZW, Chen YG, Wang QC, et al. Progresses and perspectives of studies on plant endophytic microbes in China[J]. Microbiology China, 2014, 41(3): 482-496 (in Chinese)
- 王志伟, 陈永敢, 王庆臻, 等. 中国植物内生微生物研究的发展和展望[J]. 微生物学通报, 2014, 41(3): 482-496