

植物内生微生物及其“暗物质”开发技术的研究进展

袁志辉, 蒋琼凤, 何福林*

¹ 湘南优势植物资源综合利用湖南省重点实验室; ² 湖南科技学院化学与生物工程学院, 永州 425199

摘要: 植物内生微生物包含内生菌、内生细菌、内生真菌、内生放线菌、内生古细菌等领域, 其“暗物质”是指尚未被开发的菌种资源、遗传资源和代谢物资源。根据对宿主植物的作用, 可以将内生微生物分为共生内生微生物、有益内生微生物和潜在的病原微生物三类。内生微生物在植物促生、提高植物抗逆性、提高植物的环境适应性、影响植物代谢物合成、参与被污染环境的修复等方面具有广泛的应用。具有生理活性的次级代谢产物的开发和利用是植物内生微生物研究的另一个热门领域, 但由于大多数不能被分离培养、次级代谢物的分离分析技术不足等原因, 使得大量的植物内生微生物资源仍处于未知状态。表面消毒技术、分离培养技术的改进, “多组学”技术的联合使用和次级代谢物分离分析技术的发展极大促进了植物内生微生物的研究。在此基础上, 开展微生物组研究和多单位多地域的协同研究将会进一步加快植物内生微生物资源的研究、发掘和利用。以上述内容为基础, 本文综述了植物内生微生物的功能及其代谢产物研究进展, 当前植物内生微生物研究的分离培养方法和组学技术, 并在文章最后对该领域的研究方向提出了建议。

关键词: 植物内生微生物; 分离培养技术; 组学技术; 次级代谢物; 暗物质

中图分类号: Q938.1+5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.7.029

Review on the Research of Plant Endophytic Microbes and Dark Matter's Exploring Techniques

YUAN Zhi-hui, JIANG Qiong-feng, HE Fu-lin*

¹ Key Laboratory of Comprehensive Utilization of Advantage Plants Resources in Hunan South;

² College of Chemistry and Bioengineering, Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou 425199, China

Abstract: Plant endophytic microbes include endophytes, endophytic bacteria, endophytic fungi, endophytic actinobacteria and endophytic archaeobacteria in concept, and the dark matter, which originated from astrophysics, refers to the vast universe of unknown microbes, derived genetic resources and the unexplored second metabolites. Plant endophytic microbes can be divided into symbiosis endophytes, beneficial endophytes and potential pathogens according to their association with the host plant. Plant endophytic microbes played an extensive part in the promotion of plant growth, protection against biotic and abiotic stresses, improved plant fitness, infection of the biosynthesis of metabolites in host plant, and the phytoremediation of polluted environment with host plant. Another focus on endophytes' research is the exploitation and utilization of bioactive second metabolites produced by plant endophytic microbes. Majority of endophytic resources were untapped owing to the unculturability of most microbes and the deficiency in separation and analysis of second metabolites. The improvements of surface sterilization, isolating and culturing techniques, and the combination of multi-omics have greatly promoted the research in plant endophytic microbes. Endophytic microbiomes and cooperation in this area will enhance the discovering, understanding and utilizing of plant endophytic resources. Based on the aforementioned, present paper reviewed the progress in function and metabolites of endophytes, -omics technologies and methods of isolating and culturing in plant endophytes research. In addition, the research directions in this field was suggested at last.

Key words: plant endophytic microbes; isolation and culturing techniques; omics techniques; secondary metabolites; dark matters

收稿日期: 2016-03-14

接受日期: 2016-05-05

基金项目: 湖南省科技厅项目(2014NK3002); 湖南优势植物资源综合利用湖南省重点实验室开放基金项目(XNZW15C11)

植物内生微生物(Plant Endophytic Microbes)是王志伟等^[1]在进行相关研究信息检索分析后, 为减少概念的混乱将“内生菌”、“内生细菌”、“内生真

菌”三种说法综合概括而成,笔者认为应将“内生放线菌”、“内生古细菌”这两个领域也包含进去会更加全面。在植物内生微生物的定义方面,Hardoim等^[2]在分析了前人定义的不足之处后,认为应只考虑其栖息场所,而不应强调其功能性,因此将其定义为“在植物组织内部度过其全部或部分生命周期的所有微生物”,而王志伟等^[1]认可的概念则为“存在于外表正常的植物组织内的真菌和细菌”。这两者之间的最大差异在于是否应包含植物病原物和根瘤菌。笔者认为前一概念包容性更大,而且有些植物病原体只会在特定条件下表现出致病性^[3]。另外有些病原体只针对某一特异植物,但对其它植物来说可能具有促生作用^[4]。而且,一些对植物有益的内生微生物本身可能就是从病原微生物进化而来的^[5]。

“暗物质”(Dark Matter)是借用自天体物理学界的一个名词,在微生物学界该词有两重含义:一是指尚未被分离培养或尚未被发现的微生物^[6],以及这些微生物所蕴含的尚未被研究的遗传资源;二是指微生物代谢产物(包括次级代谢物)中尚未被鉴定的化学物质^[7]。在植物内生微生物中也同样存在着大量的“暗物质”等待我们去发掘。本文综述了植物内生微生物的功能及其代谢产物研究进展,当前植物内生微生物研究的分离培养方法和组学技术,并在文章最后对该领域的研究方向提出了建议。

1 植物内生微生物的分类、功能与应用

1.1 植物内生微生物的分类

根据对宿主植物的作用,可以将内生微生物分为三类:1、中性内生微生物。该类微生物利用植物产生的代谢物生活,对宿主既没有明显的有害作用,也没有明显的有益作用。它们会从宿主植物中汲取部分营养,但对宿主没有损害作用。2、有益内生微生物,可以给宿主植物提供有益的作用,如保护植物免受病原体或草食生物的伤害、促进植物生长等。3、潜在的病原微生物^[8]。一般来说,在正常生长条件下,内生微生物对植物的作用是中性或有害的,它们只会是一些特殊条件如受到病原体侵害或某个特殊生长周期表现出有益性,如玉米内生真菌轮枝镰孢菌(*Fusarium verticillioides*)。该菌在正常条件下作为内生真菌寄生于玉米组织内,在特异基因表达和外界非生物因素胁迫的双重作用下表现出病害特

征并大量产生烟曲霉毒素^[9]。但轮枝镰孢菌的存在能使玉米免受另一种病原真菌玉米黑粉菌(*Ustilago maydis*)的侵害^[10]。

1.2 植物内生微生物的功能

内生微生物对植物的有益作用可以分为三种,第一种是通过共生作用提高植物的环境适应性。如链格孢属内生真菌 *Alternaria alternata* 能增强斑点矢车菊(*Centaurea stoebe*)对丛生禾草(*Koeleria macrantha*)的竞争力^[11],而麦角真菌 *Claviceps purpurea* 与宿主植物野生紫羊茅联合产生的有毒生物碱则减少了宿主植物被羊等草食动物摄食的风险^[12]。

第二种是对植物的促生长作用。如伯克氏菌属 *Burkholderia phytofirmans* PsJN 通过提高植物的光合效率、CO₂ 同化速率、叶绿素含量以及干旱条件下水的利用效率来促进宿主植物的生长^[13,14]。更多的研究表明内生微生物主要通过产生植物生长激素如吲哚-3-乙酸(Indole-3-Acetic Acid)和细胞分裂素(Cytokinin)、某些具促生作用的挥发性化合物如3-羟基-2-丁酮(乙偶姻)(acetoin)和2,3-丁二醇(2,3-butanediol)、多胺类化合物(Polyamines)、腺苷酸和腺苷酸核苷等一些具有促生长作用的化合物来促进宿主植物的生长^[2]。而植物根部的根瘤菌(Rhizobial)和放线根瘤菌(Actinorhizal)则通过自身的固氮作用为宿主提供氮素营养来促进植物的生长^[15]。具有固氮作用的内生微生物还有 *Gluconacetobacter diazotrophicus*,其可以生活在甘蔗^[16]、松针^[17]等多种植物组织内部。

第三种是提高宿主植物的抗生物和非生物胁迫作用。如伯克氏菌属 *Burkholderia phytofirmans* PsJN 能够提高玉米^[18]和小麦^[14]的抗旱能力。发现于印度沙漠中的内生真菌 *Piriiformospora indica* 在植物根部定殖后可显著促进植物生长并诱导植物产生抵御各种生物逆境和非生物逆境的能力,提高植物生物量及经济产量,比如其既能提高大麦的生物胁迫抗性,也能够诱导大麦的耐盐(NaCl)能力提升至300 mM^[19]。另外,有些植物内生微生物可以通过降解除草剂等外源化学物质或诱导宿主植物启动抗性机制或和宿主植物对外源化学物质进行共代谢的方式增强植物如一些杂草对于除草剂的抗性^[20]。

除以上三种类型的有益作用之外,内生微生物还能通过其它形式对宿主植物产生影响。如甲基杆菌属(*Methylobacterium*)中的一种菌能影响草莓中香味物质如呋喃酮的合成^[21],而内生真菌 *Paraphae-*

osphaeria sp. 同样也能影响越橘 (*Vaccinium myrtillus* L.) 中酚酸类化合物 (phenolic acids)、黄酮类化合物 (flavan-3-ols) 和原花青素 (oligomeric proanthocyanidins) 的合成与积累^[22], 另外一项研究则表明内生微生物对植物的侵染会影响到宿主的性别选择^[23]。所有这些研究均提示我们, 植物内生微生物的一些新的特性仍然有待我们去发掘和加以利用。

1.3 植物内生微生物的其它应用

对土壤和水体中有机污染物的生物联合修复是植物内生微生物应用的另一个领域。在修复过程中, 内生微生物和宿主植物是相互配合、相互促进的关系^[24]。宿主植物为内生微生物提供栖息地和营养, 内生微生物通过自身的降解和代谢活性减少污染物对宿主的毒性和蒸散量, 或通过定殖于新的植物组织内降解植物体吸收富集的污染物如多环芳烃^[25]。另外有些内生微生物对宿主植物有促生作用, 能够帮助宿主更好的适应在被有机物污染的土壤和水体中生长, 从而增强宿主植物对于有机物污染环境的修复作用。在重金属污染土壤的修复作用中, 内生微生物可以与植物根系形成联合体, 通过增强植物抗性和优化根际环境, 促进根系发展, 增强植物吸收和向上转运重金属的能力^[26]。随着生物联合修复的持续和深入开展, 内生微生物与其宿主植物的互动关系和机制、影响修复效果和效率的因素 (包括生物因素和非生物因素) 如土壤的理化性质、植物类型、污染物浓度等的阐明能够进一步增强生物联合修复作用, 降低农作物产品的污染物残留, 更好的保障我们的食品安全。

尽管对植物有如此多的有益作用和环境污染的生物联合修复中也已得到应用, 植物内生微生物研究中的最重要和最有应用前景的领域是其次生代谢产物的研究、开发和利用, 这是到目前为止除土壤之外的第二个微生物资源开发的大本营。

2 植物内生微生物的次生代谢物开发

到目前为止, 至少有 120 种植物源活性化合物在多个国家被当做重点药物使用^[27], 市场上大约 47% 的抗肿瘤药物为包括植物提取物在内的天然产物^[28], 由此可见从植物中提取的活性物质为整个人类的健康发挥着重要作用。但植物源的生物活性分子特别是药用物质在生产过程中存在着以下几个不足: (1) 产量极低, 而且受植物生长的环境条件影响; (2) 有限的供应量导致来源植物被过度开采;

(3) 分子结构极其复杂, 难以进行全合成和半合成。以第一例植物源抗肿瘤药物紫杉醇为例, 该药物在产量最高的红豆杉树种 *Taxus brevifolia* 中的含量为 0.001% ~ 0.05%, 生产 1 kg 紫杉醇需要 10000 kg 的红豆杉树皮或 3000 棵红豆杉, 一个肿瘤病人需要 2.5 ~ 3 g 紫杉醇, 换句话说每治疗一个病人需要消耗 8 棵 60 年树龄的红豆杉^[29]。但使用植物内生微生物生产植物源药物具有成本低廉、生长速率快、污染风险小、发酵参数优化和控制简单、增产策略多样等优点^[30], 从而保证重要植物次生代谢物的稳定供应, 避免植物资源的过度开采, 也不用考虑环境条件的影响。而且, 近 30 年来首个新抗生素 Teixobactin^[31] 的发现, 也提示我们可以通过新技术、新方法和新思路寻找包括抗生素在内的生理活性物质。

栖息于植物内部的细菌相对土壤、根际等环境中的细菌来说, 由于与周围其它细菌的竞争更少, 因此产生的代谢产物也会更少^[32]。但从另一方面来说, 这些细菌在进入植物内部之前需要与其原栖息环境中的微生物进行竞争, 同时与宿主植物进行交流, 因此, 植物内生细菌产生防御性代谢产物如抗生素和与宿主植物相互交流的代谢物的可能性较大^[33]。

环丁烷生物碱是许多植物如白饭树 (*Flueggea virosa*)^[34]、蜜茱萸属 *Melicope denhamii*^[35] 中含有的活性成分, 具有抗肿瘤、抗细菌、抗真菌、增强免疫等生理活性。而生活在这些植物组织中的内生真菌也能够通过代谢产生此类生物碱并表现出同样优异的抗菌、杀虫、抗肿瘤活性^[36]。另外, 有些内生真菌能够产生与其宿主植物相同的次级代谢物, 如抗肿瘤药物紫杉醇^[37]、喜树碱及其类似物^[38-40]、抗肿瘤药前体物鬼臼毒素^[41] 和去氧鬼臼毒素^[42]、抗抑郁药金丝桃素和大黄素^[43,44]、天然杀虫剂印楝素 A 和 B^[45]。这使科学家们看到了采用工业发酵的方法大规模生产植物药用活性成分的希望。然而, 到目前为止并没有实现连续生产的目的, 导致这个问题的可能原因有多方面: 内生真菌本身的生理生化特性, 内生真菌需要与宿主植物、与其它内生微生物、与某些昆虫或与其它一些特异生物和非生物因素进行互作等^[46]。

植物内生微生物的代谢应用潜力^[33]、作为高价值植物次生代谢物生产平台的潜力^[30] 以及产生的一些特殊生理活性次级代谢物^[36] 在其它文献中已有报道。但现有研究中已培养出的内生微生物和从

中发现的生理活性物质只占有总数的极小一部分,如何将植物内生微生物资源进行最大化开发和利用是植物和微生物领域一个新的课题。

3 发掘植物内生微生物的“暗物质”

3.1 植物内生微生物的经典分离培养方法

3.1.1 样品的采集:选择新鲜健康的植株作为采样对象,采集部位主要包括根、茎和叶三种。根和茎切割成大约 20 cm 每段,叶分别采集老叶和嫩叶两种,采集后均进行低温保存和运输,4 °C 条件下可以保存 1~2 d,-80 °C 可以保存 1 个月。

3.1.2 样品的预处理和表面消毒:首先自来水冲洗去除泥沙和附着物,再用蒸馏水超声清洗 1 min;然后用 0.01% (V/V) 的吐温-20 浸泡 1 min 后无菌水冲洗 3 次;5% 的次氯酸钠溶液浸泡 3 min 后无菌水冲洗 3 次;浓度为 2.5% 的硫代硫酸钠溶液浸泡 10 min 后无菌水冲洗 3 次;75% 的乙醇溶液浸泡 30 s (叶)或 1~5 min (根和茎)后无菌水冲洗 3 次;最后用无菌吸水纸吸干表面水分或在无菌培养皿中干燥过夜。

3.1.3 表面消毒效果的检测:方法一,将最后一次冲洗的无菌水 0.1 mL 涂布于 LB、ISP-2 (International *Streptomyces* project medium-2) 和 PDA 培养基上;方法二,将表面消毒后的样品在以上 3 种培养基上滚动数次。将以上接种后的培养基置于 28 °C 和 37 °C 培养 2~7 d。表面消毒彻底的唯一标准是每一种培养基上均没有微生物生长。

3.1.4 内生细菌和放线菌分离培养基:LB 培养基、营养琼脂、高氏合成培养基、M9 基础培养基、TWYE 琼脂^[47]、HV 琼脂^[48]、甘油-天门冬酰胺琼脂、壳多糖琼脂^[49]。分离内生放线菌时,由于其生长速度较慢,可在培养基中加入一定浓度的无菌抑制剂如 50 mg/L 放线菌酮、25 mg/L 萘啶酮酸、50 mg/L 制霉菌素、25 mg/L 高锰酸钾中的一种或数种以进行选择分离。

3.1.5 内生真菌分离培养基:PDA 琼脂、麦芽提取物琼脂或水琼脂,其中加入 200 U/mL 青霉素 G,200 μg/mL 硫酸链霉素以抑制内生细菌的生长。

3.1.6 内生微生物的分离操作:方法一,将表面消毒后的叶片经无菌操作剪成 1×1 cm 的小块,根和茎先从两端各剪去 5 cm,余下的剪成 1 cm 的小段;小块叶或小段根茎以一定的间隔均匀放置在上述培养基上,一定温度下培养 2~15 d。方法二,将表面

消毒并表面干燥后的样品以无菌的方式用粉碎机打成粉末,将 0.1 g 粉末均匀的撒在上述培养基上,一定温度下培养 2~15 d。方法三,将表面消毒后的样品进行无菌匀浆,吸取 0.1 mL 匀浆液涂布于上述培养基上,一定温度下培养 2~15 d。

3.1.7 培养基上形成可见菌落或菌苔后,按常规方法进行纯化和保藏即可。

3.2 分离培养技术的改进

按以上方法可以分离培养出植物组织中少部分的内生微生物。但地球上任何一株植物中都生活着一种或多种内生微生物^[50],而环境中大部分微生物尚不能在实验室中被分离培养已是微生物学界的共识,在植物内生微生物的研究中也存在着同样的问题,如何跨越这种培养障碍成为植物内生微生物资源开发和利用过程中亟待解决的一个关键问题。目前,主要解决途径有二:采用特异或改进的培养技术在一定程度上能够提高微生物的可培养性 (Culturability);绕过培养障碍,采用非培养技术 (Culture-Independent) 发掘和利用植物内生微生物遗传和代谢资源。

特异和改进的环境微生物培养技术包括:培养基中加入栖息地浸提物如植物细胞提取物;降低营养物浓度和延长培养时间;添加信号分子;使用结冷胶作为凝固剂;改进培养箱中的气体组成;添加抗氧化成分如丙酮酸;模拟栖息地环境和营养水平;去除微生物生长抑制因素等^[51]。如 Nunes 等^[52]采用改进的培养技术,使马铃薯根际微生物的培养率提高大约 7 倍至 33.6%。

更为重要的是,在植物内生微生物分离研究过程中仅靠单一的一种或几种培养基和培养条件不可能把植物组织内的所有微生物都分离出来。现有的方法和条件只对那些生长快的优势菌群有效,种群数量较少但种类多的稀少微生物 (Rare microorganisms) 还需开发特殊的培养基、培养条件或特殊的培养装置,如为选择性分离植物根部的链霉菌而设计的湿法培育干法选择技术 (moist incubation and desiccation method, MI&D)^[53]。其主要过程为首先将新鲜的根部组织置于腐植酸维生素培养基 (即 HV 琼脂) 上培育一定时间后,对根部组织进行干燥处理。干燥过程中大多数细菌被杀死,链霉菌产生的节孢子因对干燥具有较强的抗性而仍然保持活力。在无菌水中将节孢子振荡打散并稀释后重新涂布培养于 HV 培养基上,生长出来的微生物多数为放线

菌尤其是链霉菌。另外,在培养基中加入宿主植物组织提取物,再配合适当的生长条件控制可以提高植物内生微生物的分离效率^[54]。对内生微生物栖息环境的分析也有助于分离培养,如 Gtari 等通过分析马桑属马桑科植物 *Coriaria myrtifolia* 根瘤组织的生理特征,配制高 pH 值培养基分离出之前难以培养的弗兰克氏菌(*Frankia*) BMG5.1^[55]。

在植物病原菌的分离中,一种名为双重限制选择性培养基设计程序(Selective Medium Design Algorithm Restricted by Two Constraints, SMART)的方法具有高度的选择性培养基^[56]。该法是以碳源和抗菌物质作为双重限制因素,运用 SMART 分析程序,设计对植物病原菌具有高度选择性的培养基,这些培养基能够从土壤和植物中特异性的分离出目标细菌,且抑制它种细菌的生长。采用这类选择性培养方法,Zhao 等^[57]从黄花蒿(*Artemisia annua*)中分离出至少 19 个属的 228 个放线菌菌株,其中有数株为新种。这种培养基的设计方法,也可运用于其它一些生态学和病理学研究。

此外,在植物内生微生物的分离过程中,表面消毒技术是防止污染和决定分离效果的关键性步骤。首先表面消毒剂的选择要充分考虑物种和组织的因素,以防止药剂进入组织内部杀死内生微生物。草本植物和早期叶组织的消毒应选择渗透力较弱的消毒剂如醇类和季铵盐类,而木本植物的根茎组织则可选择渗透力较强的消毒剂如石炭酚类。其次是消毒时间,作用力的强的消毒时间要短,反之则相应延长消毒时间。第三,选择性使用药剂可以促成选择性分离的目的。比如需要分离内生放线菌,则在表面消毒时使用 10% NaHCO₃ 浸泡植物组织 10 min,可以抑制内生真菌的生长^[58]。此外,使用次氯酸钠进行表面消毒时,为减少表面残留对分离的抑制作用,可以加入少量的硫代硫酸钠^[59]。

3.3 植物内生微生物的“组学研究”

当前进行环境微生物资源研究与开发的一个最强大的手段就是“组学”(Omics)技术。“组学”技术主要包括基因组学、蛋白质组学、转录组学和代谢组学。环境微生物的“组学”研究是对某一特定生态环境如植物组织内部的整个微生物群体及其所蕴含的资源进行分析和挖掘,因此属于“宏-组学”(Meta-omics)的范畴。目前国内外植物内生微生物的“组学”研究主要集中在宏基因组学(Metagenomics)方面,研究内容主要有两个:一是对微生物群体中的个

体进行分类,找出有哪些微生物生活在植物组织内部^[60,61];二是从构建的宏基因组文库中寻找功能基因^[62,63]。

但单独的宏基因组学研究并不能真正的揭露植物内生微生物中所蕴藏的丰富资源,只有将 RNA、蛋白质、代谢产物和基因组信息有效的整合在一起,才能窥看到这个庞大群体的一角。据推测,由于环境中绝大多数微生物尚未被培养、一些特殊生境如植物组织内部的微生物的分离和研究还不够全面、现有技术还不足以分离和鉴定所有的代谢产物等原因,目前已经鉴定的微生物代谢产物只占实际存在的很小一部分^[64]。

微生物的代谢组学(Metabolomics)技术可以用于检测和鉴定微生物初级和次级代谢产物,该技术依赖色谱(如高效液相色谱、气相色谱等)和质谱技术进行代谢物分离和定性定量及结构分析。在代谢组学分析中,近年来主要有两种方法用于微生物代谢组分的分析与发掘,即纳喷雾解吸电喷雾电离(Nanospray Desorption Electrospray Ionization, nano-DESI)质谱技术^[65,66]和 CSI(Compound Structure Identification):FingerID 技术^[7,67]。运用 nano-DESI 质谱技术进行菌落代谢物测定无需特别的样品准备过程,可以通过初级毛细管直接将溶剂泵入培养基表面,再用次级毛细管将溶解物从培养基表面吸取上来并直接电离喷雾进入质谱仪进行结构测定。获得的数据可以与质谱库和分子网络进行实时比对以获得代谢物组分信息^[66]。这一方法具有灵敏度高、应用范围广(可以用于微生物、植物和动物的代谢物测定)、成本效率高等优点,而且可以在系统和个体两级水平上同时开展分析^[65]。该方法的缺陷或挑战在于现有的 22 万个串联质谱图只包含 PubChem 数据库 6 千多万个分子中的 2 万个^[7],因此许多未知的化学物质(也可称为代谢“暗物质”)难以通过现有的质谱数据库获知其化学结构,也就无法进行更进一步的活性和机理分析,CSI:FingerID 方法的建立能部分解决这一问题。该方法通过机器学习(Machine Learning)和串联质谱(MS/MS)技术建立结构碎片树(Fragment Tree)来测定未知化合物的分子结构指纹(Molecular Structure Fingerprint),指纹则被用来在分子结构数据库如 PubChem 中进行搜索,并通过分值来分析推测最可能的化合物结构^[67]。尽管如此,微生物包括植物内生微生物中仍然有多达 98% 以上的未知代谢物^[7]特别是有生理

活性的次级代谢物有待于我们去开发和利用。

4 植物内生微生物的研究展望

4.1 植物内生微生物组研究

微生物组 (Microbiome) 是指与宿主、生态系统或栖息地相互作用的微生物群体,而微生物组研究是指运用组学技术在群体水平上进行的微生物学研究^[68],是近年来生物科学领域最具革命性的进展之一,通过这一研究我们已经充分认识到了微生物存在于地球的每一个角落,在人类的健康与疾病、生物地球化学进程中发挥着核心的作用。《Nature》杂志在其 2016 年科学展望中,预计 2010 年启动的一个分析全球微生物群落的地球微生物组计划 (Earth Microbiome Project) 将在 2016 年取得第一批研究成果,该计划承诺将对生物多样性作出前所未有的发现^[69]。最近,德国马克斯普朗克植物育种研究所与瑞士的科学家一起,在模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的微生物组研究中取得重大进展。他们将根和叶片中的细菌培养出了超过一半 (根 65%, 叶片 54%)。利用纯培养获得的 432 个细菌菌株,研究人员可以在实验室中重建拟南芥根和叶中的任何微生物组^[62]。

当前的微生物组研究已经不仅仅局限于寻找并编目微生物及其功能基因,而是聚焦于微生物-微生物相互作用、微生物-环境相互作用关系研究。此外,微生物组研究也可以进一步拓展其研究领域,如分别在单菌种、多菌种和群体条件下,研究微生物代谢产物种类和含量的变化关系,特别是在植物内生微生物方面,可以利用传统的非培养技术即宏基因组学 (Metagenomics) 技术和改进的高通量测序、单细胞测序技术以及“多-组学” (Multi-omics) 联合技术等^[70],结合新的计算工具和模型对植物内生微生物组进行研究,发掘其中蕴藏的丰富的菌种资源、遗传资源和生理活性物质资源,这也将为环境微生物多样性研究和新药物寻找注入活力和提供新的来源。

4.2 开展植物内生微生物的协同研究

鉴于各国的微生物组研究缺乏必要的协调,各用各的标准,各用各的方法,产生的数据难以进行比较和整合,2015 年 10 月份,中美德三国科学家先后在“Science”、“Nature”两大自然科学顶级杂志上发出倡议,成立“联合微生物组研究计划” (Unified Microbiome Initiative, UMI) 计划和“国际微生物组研

究计划” (International Microbiome Initiative, IMI), 希望能够得到全世界的资助机构和基金会的支持,这样才能保证不同国家、不同研究领域能够共享标准,并且实现已有的微生物组研究计划成果的整合^[71,72]。

同样,在植物内生微生物研究中,不同国家、不同地区和不同单位也缺乏必要的协调与合作,导致研究方向和领域集中且单一。以中国为例,植物内生微生物的研究主要集中在医药方向和农业方向,研究程度上也存在着“初步研究多,深入追究少”的特点,微生物的分离培养技术、消除接种技术等的开发还相对薄弱^[1]。除此以外,以下几个原因也提醒我们开展植物内生微生物组的协作研究也是十分必要的:

4.2.1 植物内生微生物种类数过于庞大,单靠一己一地一国之力难以完成全面的研究。地球上植物共有数十万种,而在数量上仅树木就达到惊人的 3.04 万亿棵^[73],每株植物上生活着一种乃至多种内生微生物^[50]。因此,植物内生微生物的种类数和总数都是难以估量的,唯有依靠全国乃至全世界的微生物学家的分工合作才有可能最大限度的发掘其中蕴藏的巨大资源。

4.2.2 在植物内生微生物庞大总数的背景下,其遗传资源和代谢产物包括有生理活性的次级代谢产物资源将更加庞大,且目前已经鉴定的微生物代谢产物只占实际存在的很小一部分^[7,64]。如何将如此庞大的遗传和代谢资源“暗物质”加以开发和利用也将极大的考验我们的研究技术和协作能力。

参考文献

- 1 Wang ZW (王志伟), *et al.* Progresses and perspectives of studies on plant endophytic microbes in China. *Microbiol Chin* (微生物学通报), 2014, 41: 482-496.
- 2 Hardoim PR, *et al.* The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2015, 79: 293-320.
- 3 Klopper JW, *et al.* Symptoms of fern distortion syndrome resulting from inoculation with opportunistic endophytic fluorescent *Pseudomonas* spp. *Plos One*, 2013, 8(3): e58531.
- 4 Coombs JT, *et al.* Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 5603-5608.
- 5 Xu XH, *et al.* The rice endophyte *Harpophora oryzae* genome

- reveals evolution from a pathogen to a mutualistic endophyte. *Sci Rep*, 2014, 4; 5783.
- 6 Cirie L. Mining the microbial dark matter. *Nature*, 2015, 522 (7556); 270-273.
 - 7 Silva RRD, *et al.* Illuminating the dark matter in metabolomics. *PNAS*, 2015, 112; 12549-12550.
 - 8 Scortichini M, *et al.* Occurrence of an endophytic, potentially pathogenic strain of *Pseudomonas syringae* in symptomless wild trees of *Corylus avellana* L. *J Plant Pathol*, 2007, 89; 431-434.
 - 9 Bacon CW, *et al.* *Fusarium verticillioides*; managing the endophytic association with maize for reduced fumonisins accumulation. *Toxin Rev*, 2008, 27; 411-446.
 - 10 Estra AER, *et al.* Interaction between *Fusarium verticillioides*, *Ustilago maydis*, and *Zea mays*; an endophyte, a pathogen, and their shared plant host. *Fungal Genet Biol*, 2012, 49; 578-587.
 - 11 Aschehoug T, *et al.* Fungal endophyte increases the allelopathic effects of a invasive forb. *Oecologia*, 2014, 175; 285-291.
 - 12 Wali PP, *et al.* Is the pathogenic ergot fungus a conditional defensive mutualist for its host grass? *Plos One*, 2013, 8; e69249.
 - 13 Kim S, *et al.* Growth promotion and colonization of switchgrass (*Panicum virgatum*) cv. Alamo by bacterial endophyte *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Biotechnol Biofuels*, 2012, 5; 37.
 - 14 Naveed DM, *et al.* Drought stress amelioration in wheat through inoculation with *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Plant Growth Regul*, 2014, 73; 121-131.
 - 15 Reinhold-Hurek B, *et al.* Life in grasses; diazotrophic endophytes. *Trends Microbiol*, 1998, 6; 139-144.
 - 16 Done ZM, *et al.* A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems; a new role for the apoplast. *Plant Physiol*, 1994, 105; 1139-1147.
 - 17 Carrella A, *et al.* *Pinus flexilis* and *Picea engelmannii* share a simple and consistent needle endophyte microbiota with a potential role in nitrogen fixation. *Front Microbiol*, 2014, 5; 333.
 - 18 Naveed M, *et al.* Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by *Burkholderia phytofirmans* PsJN and *Enterobacter* sp FD17. *Environ Exp Bot*, 2014, 97; 30-39.
 - 19 Baltruschat H, *et al.* Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytol*, 2008, 180; 501-510.
 - 20 Tetard-Jones C, *et al.* Potential roles for microbial endophytes in herbicide tolerance in plants. *Pest Manag Sci*, 2016, 72; 203-209.
 - 21 Naspoulou C, *et al.* Localization of strawberry (*Fragaria × ananassa*) and *Methylobacterium extorquens* genes of strawberry flavor biosynthesis in strawberry tissue by in situ hybridization. *J Plant Physiol*, 2014, 171; 1099-1105.
 - 22 Koskimaki JJ, *et al.* Flavonoid biosynthesis and degradation play a role in early defense responses of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) against biotic stress. *Eur J Plant Pathol*, 2009, 125; 629-640.
 - 23 Gorischek AM, *et al.* Fungal symbionts as manipulators of plant reproductive biology. *Am Natur*, 2013, 181; 562-570.
 - 24 Afzal M, *et al.* Endophytic bacteria; prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants. *Chemosphere*, 2014, 117; 232-242.
 - 25 Sun K, *et al.* Isolation, plant colonization potential, and phenanthrene degradation performance of the endophytic bacterium *Pseudomonas* sp. Ph6-gfp. *Sci Rep*, 2014, 4; 5462.
 - 26 Li YS (李韵诗), *et al.* A review on the functions of microorganisms in the phytoremediation of heavy metal-contaminated soils. *Acta Ecol Sin* (生态学报), 2015, 35; 6881-6890.
 - 27 Taylor L. Plant Based Drugs and Medicines. (2012-24) [2016-1-27]. <http://www.rain-tree.com/plantdrugs.htm#Vqiw09K19et>.
 - 28 Newman DJ, *et al.* Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod*, 2007, 70; 461-477.
 - 29 Malik S, *et al.* Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures; a review. *Proc Biochem*, 2011, 46(1); 23-34.
 - 30 Venugopalan A, *et al.* Endophytes as *in vitro* production platforms of high value plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv*, 2015, 33; 873-887.
 - 31 Ling LL, *et al.* A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*, 2015, 517; 455-459.
 - 32 Sturz AV, *et al.* Bacterial endophytes; potential role in developing sustainable systems of crop production. *Crit Rev Plant Sci*, 2000, 19; 1-30.
 - 33 Brader G, *et al.* Metabolic potential of endophytic bacteria. *Curr Opin Biotech*, 2014, 27; 30-37.
 - 34 Zhao BX, *et al.* a novel axisymmetric indolizidine alkaloid-dimer from *Flueggea virosa*. *Tetrahedr Lett*, 2013, 54; 4708-4711.
 - 35 Nakashimak I, *et al.* Novel quinolinone alkaloids bearing a lignoid moiety and related constituents in the leaves of *Melicope denhamii*. *Tetrahedron*, 2012, 68; 2421-2428.
 - 36 Dembitsky VM. Naturally occurring bioactive Cyclobutane-

- containing (CBC) alkaloids in fungi, fungal endophytes, and plants. *Phytomedicine*, 2014, 21: 1559-1581.
- 37 Stierle A, *et al.* Taxol and taxane production by *Taxomyces andreae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Sci*, 1993, 260: 214-216.
- 38 Min CL (闵长莉), *et al.* Isolation and Identification of the 10-Hydroxycamptothecin-producing Endophytic Fungi from *Camptotheca acuminata* Decne. *Acta Botan Boreali-Occident Sin* (西北植物学报), 2009, 29: 614-617.
- 39 Kusari S, *et al.* Effect of artificial reconstitution of the interaction between the plant *Camptotheca acuminata* and the fungal endophyte *Fusarium solani* on camptothecin biosynthesis. *J Nat Prod*, 2011, 74: 764-775.
- 40 Shweta S, *et al.* Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacinaeae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin. *Phytochemistry*, 2010, 71: 117-122.
- 41 Puri SC, *et al.* The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. *J Biotechnol*, 2006, 122: 494-510.
- 42 Kusari S, *et al.* *Aspergillus fumigatus* Fresenius, an endophytic fungus from *Juniperus communis* L. Horstmann as a novel source of the anticancer pro-drug deoxypodophyllotoxin. *J Appl Microbiol*, 2009, 107: 1019-1030.
- 43 Kusari S, *et al.* An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. *J Nat Prod*, 2008, 71: 159-162.
- 44 Kusari S, *et al.* Light-independent metabolomics of endophytic *Thielavia subthermophila* provides insight into microbial hypericin biosynthesis. *J Nat Prod*, 2009, 72: 1825-1835.
- 45 Kusari S, *et al.* An endophytic fungus from *Azadirachta indica* A. Juss. that produces azadirachtin. *World J Microb Biot*, 2012, 28: 1287-1294.
- 46 Kusari S, *et al.* Untapped mutualistic paradigms linking host plant and endophytic fungal production of similar bioactive secondary metabolites. *Phytochemistry*, 2013, 91: 81-87.
- 47 El-Shatoury S, *et al.* Bioactivities of endophytic actinomycetes from selected medicinal plants in the world heritage site of saint Katherine, Egypt. *Int J Bot*, 2006, 2: 307-312.
- 48 Hayakawa MT, *et al.* Humic acid-vitamin agar, a new method for the selective isolation of soil actinomycetes. *J Ferment Bioeng*, 1987, 65: 501-509.
- 49 Lingappa Y, *et al.* Chitin medium for isolation, growth and maintenance of actinomycetes. *Nature*, 1961, 189: 158-159.
- 50 Strobel G, *et al.* Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, 67: 491-502.
- 51 Yuan ZH (袁志辉), *et al.* Progress in cultivation research on soil microbes. *Acta Pedol Sin* (土壤学报), 2014, 51: 1183-1191.
- 52 Rocha UND, *et al.* Cultivation of hitherto-uncultured bacteria belonging to the *Verrucomicrobia* subdivision 1 from the potato (*Solanum tuberosum* L.) rhizosphere. *J Soil Sediment*, 2010, 10: 326-339.
- 53 Matukawa E, *et al.* A new enrichment method for selective isolation of *Streptomyces* from root surfaces of herbaceous plants. *Actinomycetologica*, 2007, 21: 66-69.
- 54 Moricca S, *et al.* The Holomorph *Apiognomonina quercina*/ *Discula quercina* as a Pathogen/Endophyte in Oak [M]// Endophytes of forest trees. *Springer Netherlands*, 2011: 47-66.
- 55 Gtari M, *et al.* Cultivating the uncultured: growing the recalcitrant cluster-2 *Frankia* strains. *Sci Rep*, 2015, 5: 13112.
- 56 Kawanishi T, *et al.* New detection systems of bacteria using highly selective media designed by SMART: selective medium-design algorithm restricted by two constraints. *Plos One*, 2011, 6(1): e16512.
- 57 Zhao L, *et al.* Methods for the study of endophytic microorganisms from traditional Chinese medicine plants. *Method Enzymol*, 2012, 517: 3-21.
- 58 Tan HM, *et al.* Isolation of endophytic actinomycetes from different cultivars of tomato and their activities against *Ralstonia solanacearum* *in vitro*. *World J Microb Biot*, 2004, 22: 1275-1280.
- 59 Qin S, *et al.* *Nonomuraea antimicrobica* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from a leaf of *Maytenus austroyunnanensis*. *Int J Syst Evol Micr*, 2009, 59: 2747-2751.
- 60 Akinsanyam A, *et al.* Metagenomics study of endophytic bacteria in *Aloe vera* using next-generation technology. *Genomics data*, 2015, 6: 159-163.
- 61 Liu XZ (刘学周), *et al.* The community structure and diversity of the endophytes in American ginseng. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2015, 55: 330-340.
- 62 Bai Y, *et al.* Functional overlap of the Arabidopsis leaf and root microbiota. *Nature*, 2015, 528: 364-369.
- 63 Fu XL (付小莉), *et al.* Screening of new genes with biocatalytic potential from a plant microbiota metagenomic library. *Microbiol Chin* (微生物学通报), 2012, 39: 661-667.
- 64 Miao V, *et al.* Actinobacteria: the good, the bad, and the ugly. *Anton Leeuw*, 2010, 98: 143-150.
- 65 Traxler MF, *et al.* A massively spectacular view of the chemical lives of microbes. *PNAS*, 2012, 109: 10128-10129.
- 66 Watrous J, *et al.* Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. *PNAS*, 2012, 109: E1743-E1752.