

植物内生菌分离培养技术研究进展

黄霜叶¹, 潘小霞², 杨明挚^{*1}

1 云南大学 生态与环境学院暨云南高原山地生态与退化环境修复重点实验室, 云南 昆明 650504

2 云南民族大学 民族医药学院 民族药资源化学国家民委-教育部重点实验室, 云南 昆明 650504

黄霜叶, 潘小霞, 杨明挚. 植物内生菌分离培养技术研究进展[J]. 微生物学通报, 2025, 52(5): 2033-2045.

HUANG Shuangye, PAN Xiaoxia, YANG Mingzhi. Technological advances in isolation and culture of plant endophytes[J]. Microbiology China, 2025, 52(5): 2033-2045.

摘要: 植物内生菌是指生活史的全部或部分阶段栖息于植物组织内的微生物类群。内生菌与植物协同进化, 并在宿主的生长发育和环境适应中产生诸多效应。近 30 年来, 针对内生菌的起源、传递、功能及其与宿主植物相互作用规律和机制方面已有大量的研究成果。然而, 目前的技术手段局限性使得绝大多数的植物内生菌仍不能被纯培养, 这严重制约了这些植物内生菌资源的研究和有效利用。本文综述了目前对内生菌特别是那些难培养内生菌分离培养方法的现状, 着重关注植物内生菌分离培养方面的技术创新和进展, 为植物内生菌的深入研究和资源的有效开发利用提供借鉴。

关键词: 内生菌; 培养技术; 技术创新; 难培养内生菌; 资源利用

Technological advances in isolation and culture of plant endophytes

HUANG Shuangye¹, PAN Xiaoxia², YANG Mingzhi^{*1}

1 School of Ecology and Environmental Science & Yunnan Key Laboratory for Plateau Mountain Ecology and Restoration of Degraded Environments, Yunnan University, Kunming 650504, Yunnan, China

2 Key Laboratory of Chemistry in Ethnic Medicinal Resources, State Ethnic Affairs Commission & Ministry of Education, School of Ethnic Medicine, Yunnan Minzu University, Kunming 650504, Yunnan, China

Abstract: Plant endophytes are microorganisms that reside inside plant tissue for all or part of their life cycle. These endophytes have co-evolved with plants, contributing significantly to host

资助项目: 国家自然科学基金(32360255, 32471746); 云南省重大科技专项计划(202102AE090042); 云南省科技厅-云南大学“双一流”建设联合基金(2019FY003024)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32360255, 32471746), the Major Science and Technology Special Program of Yunnan Province (202102AE090042), and the Joint Foundation of the Yunnan Provincial Department of Science and Technology and Yunnan University (2019FY003024).

*Corresponding author. E-mail: yangmzh@ynu.edu.cn

Received: 2024-08-14; Accepted: 2024-11-01; Published online: 2024-11-22

growth, development, and environmental adaptation. Over the past 30 years, extensive research has been conducted on the origins, transmission, and functions of plant endophytes and the interaction mechanisms between endophytes and their host plants. However, current technological limitations hinder the pure culture of the majority of endophytes, restricting the study and utilization of these valuable microbial resources. This paper provides an overview of current methods for isolating and culturing plant endophytes, with a particular focus on cultivation-recalcitrant endophytes (CREs), highlighting recent technological innovations and advances in this field to offer insights for in-depth research and effective exploitation of endophyte resources.

Keywords: endophytes; culture method; technological innovation; cultivation-recalcitrant endophytes; resource utilization

1866年,德国科学家 De Bary 率先提出了内生菌(endophyte)这一概念,是指存在于植物组织内部的微生物类群^[1]。1997年, Hallmann 等^[2]提出了一个被广泛接受的定义:内生菌是指一段时间或整个生命周期生活在健康植物组织中而不会对宿主植物造成明显的感染症状的细菌或真菌。但是,该内生菌定义在实际应用中存在需要进行致病性鉴定的问题,有学者建议将植物内生菌定义为生活史的全部或部分栖息于植物组织中的微生物,而不考虑其功能^[3]。自从 Stierle 等^[4]分离并鉴定了能够在短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*)中产生紫杉醇的内生真菌后,引起了许多研究人员对内生菌的关注,并引发了对分离和培养能够产生与宿主植物次生代谢物相同或相似的功能性内生菌株的兴趣。

植物内生菌按内生微生物的种类可归类为内生真菌、内生细菌和内生放线菌;依据分离培养的难度分为可培养内生菌(culturable endophytes, CE)和难培养内生菌(cultivation recalcitrant endophytes, CRE);按内生菌的来源可分为水平传递内生菌(horizontally transmitted endophytes, HT)和垂直传递内生菌(vertically transmitted endophytes, VTE);按内生菌与宿主间的相互关系又可分为兼性内生菌(facultative endophytes, FE)和专性内生菌(obligate endophytes, OE),专性内生菌由于对宿主的高度依赖又称为宿主依赖性内生菌(host-dependent

endophytes, HDE)(图1)。

目前,针对植物内生菌的起源、传递及其对宿主植物生长调控、环境适应、代谢及生化品质调控等层面的研究已取得大量且深入的成果^[5-8]。许多内生菌资源作为植物生长促进剂、生防菌剂、品质调控剂等被广泛应用于农业生产中^[9-10]。由于内生菌对宿主功能的多样性、效应的长期性及其环境友好性等优势,对植物相关微生物包括内生菌的合理管控和应用有望促进第二次绿色革命到来^[11]。而针对内生菌的分离培养是研究和利用植物内生菌的基础。目前,绝大多数的内生菌仍然不能进行纯培养,但随着对微生物生长发育规律和营养需求的深入了解,许多创新性的技术被用于植物内生菌的分离培养,使可培养内生菌的种类不断得以扩大。

1 可培养与难培养内生菌

内生菌与宿主植物在进化中的相互选择形成了一种独特的空间和功能关系。内生菌需要宿主提供营养和庇护场所完成其生命周期,同时,多数内生菌会通过释放效应物对宿主植物的生命活动产生积极影响。因此,植物-内生菌互作已成为植物学、微生物学、农学、生态学等最活跃的研究领域之一。早期关注的植物内生菌都是那些可以纯培养类群,即CE。然而,随着基因组测序技术的飞速发展,高通量测序及

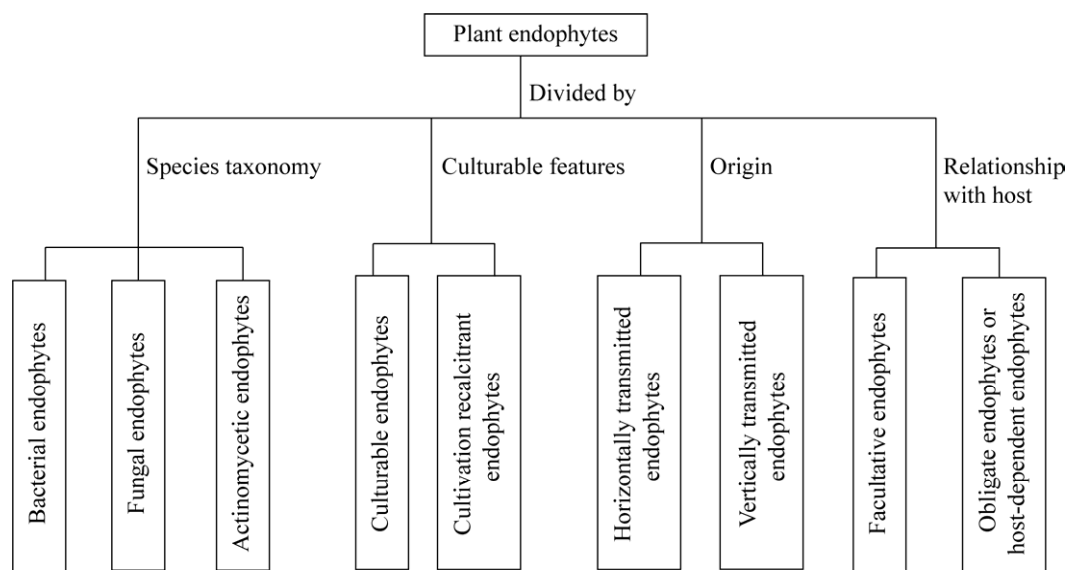


图1 植物内生菌的分类

Figure 1 Categories of plant endophytes.

宏基因组技术的检测结果发现,植物内生菌中的绝大部分类群(估计>90%)在目前的技术条件下都属于 CRE^[12]。多数 CRE 依赖于宿主植物提供的特定生态位和营养条件,又称为 HDE。传统的培养基和培养条件往往无法完全模拟这些 CRE 的微环境,从而导致内生菌的不可培养状态。这些内生菌常常以“可活但不可培养”(viable but non-culturable, VBNC)的形式存在,需要特定的激活条件才能转变为可培养状态^[13]。显然,找到合适的 CRE 分离培养策略方法,对拓展植物内生菌资源的研究和利用意义重大。

2 植物内生菌分离培养的常规方法

目前,针对不同类群的内生菌,其分离培养的方法略有差异,表1分别总结了内生真菌、内生细菌和内生放线菌常用的分离培养方法。

2.1 内生真菌的分离培养

分离内生真菌通常是先进行植物材料的表面消毒和预处理,然后在无菌操作下将植物组织切成小的组织块或研磨成匀浆接种于马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)或加入

抗生素(如氯霉素或链霉素)的培养基中培养。然后将组织块或匀浆组织中长出的真菌进行纯化培养,获得特定植物组织中的可培养内生真菌。目前的绝大多数内生真菌都是通过这种方法进行分离培养的。例如:王占斌等^[14]将连钱草(*Glechoma ongituba*)、小白酒草(*Conyza canadensis*)等多种植物的叶片与茎段放置于 PDA 上培养,分离得到 16 种内生真菌。Khadka 等^[15]从蒜香草(*Pativeria alliacea*)的叶、茎和根中分离和培养内生真菌时,依次将样品用 70%乙醇浸泡 30 s,置于 2.5% NaClO 溶液浸泡 5 min,再用无菌水连续冲洗 3 次,最后用无菌滤纸吸干材料的表面水分后在无菌条件下将样品切成小块放置在添加氯霉素(200 μg/mL)和硫酸链霉素(100 μg/mL)的 PDA 上。此外,丛枝菌根(arbuscular mycorrhizas, AM)真菌的培养是与完整植物体共生培养。其经典的培养方法有植物土壤盆栽法、营养液膜法、气雾栽培法及培养基培养法^[16]。黄玉丹等^[17]将根内根孢囊霉(*Rhizophagus intraradice*)接种在由高粱(*Sorghum bicolor*)、玉米(*Zea mays*)、红三叶草(*Trifolium repens*) 3 种寄主植物与沸石、河沙、草炭、珍珠岩和蛭石这 5 种培养基

表 1 不同类群内生菌的常规分离培养方法

Table 1 Standard isolation and culture methods for different groups of endophytes

Taxonomy of endophytes	Surface disinfectants	Medium
Fungal endophytes	70%–95% C ₂ H ₅ OH; 0.1% HgCl ₂ ; 2%–10% NaClO; 3% H ₂ O ₂ ; 2% KMnO ₄ ; 0.03% C ₂ H ₄ O ₃ ; 36% CH ₂ O	Potato dextrose agar (PDA); Potato dextrose broth (PDB); Potato sucrose agar (PSA); Czapek agar (Czapek); Corn meal agar (CMA), Martin's medium; Low-nutrient medium, PDA+streptomycin sulfate/nalidixic acid
Bacterial endophytes	70%–95% C ₂ H ₅ OH; 2%–10% NaClO; 0.1% HgCl ₂ ; 3% H ₂ O ₂ ; 1% Tween-20, 0.01% Tween-20; Silwet L-77 phosphate-buffered solution	LB; Nutrient agar (NA); Tryptic soy agar (TSA)
Actinomycetic endophytes	70%–95% C ₂ H ₅ OH; 2%–10% NaClO; 10% NaHCO ₃ ; 2.5% Na ₂ S ₂ O ₃	International streptomyces project medium No. 5 (ISP5); Tap water yeast extract (TWYE); Yeast extract-casein hydrolysate (YECD); TWYE+nystatin+nalidixic acid+ potassium dichromate; Gaoshi No. 1+potassium dichromate+ penicillin; TWYE+actidione+nystatin; YECD+actidione+nystatin

质构建的 4 种繁殖体系中进行培养,发现在以玉米+红三叶草为寄主植物,以河沙+蛭石+草炭(1:4:1)混合作为栽培基质的条件下,根内根孢囊霉的扩繁效果最显著,其孢子数目达到每克基质 1 912 个。

2.2 内生细菌的分离培养

与分离培养内生真菌不同的是,内生细菌所采用的培养基主要是营养琼脂(nutrient agar, NA)培养基、胰蛋白胨大豆肉汤(tryptone soy broth, TSB)培养基、胰蛋白胨大豆琼脂(tryptone soy agar, TSA)培养基、LB 培养基等(表 1)。例如:黄博闻等^[18]将经过表面消毒的水稻植株进行研磨,制成匀浆,并稀释涂布于 TSB 固体培养基上进行培养,经测序鉴定后,发现根中分离出的内生细菌 77 株,茎叶中分离出的内生细菌 39 株,3 株未定义,共涉及 19 个属;代亚锋等^[19]改进茶叶表面消毒方法,采用 3.0%过氧化氢浸泡 3 min,无菌水冲洗 3 次,研磨后稀释涂布于 NA 培养基上,37 °C 培养,分离纯化得到 7 株茶树内生细菌,并筛选到 4 株拮抗菌。

2.3 内生放线菌的分离培养

在分离内生放线菌的过程中, Ali 等^[20]采用酵母提取物-酪蛋白水解物(yeast extract-casein

hydrolysate, YECD)琼脂、PDA、自来水酵母提取物(tap water yeast extract, TWYE)和腐殖酸-维生素(humic acid vitamin, HV) 4 种不同的培养基来分离药西瓜(*Citrullus colocynthis*)根、叶及果实中的放线菌,共分离出 6 种放线菌。陈萌等^[21]采用 7 种选择性分离培养基分离川楝根、茎、叶、树皮和果实中的内生放线菌,研究共获得 403 株内生放线菌,主要归属于链霉菌属(*Streptomyces*)、北里氏孢菌属(*Kitasatospora*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、克里布所菌属(*Kribbella*)。

3 影响植物内生菌分离培养的因素

植物内生菌的成功分离培养受到多方面因素的影响。这些因素包括样品的处理方法、培养基的选择、培养条件以及内生菌的生物学特性等。

3.1 植物材料的采集和预处理

对于取样时的个体数量或每个个体的样本数量目前还没有统一的标准,但错误的采样或采样数量太少会影响内生菌的多样性的结果。另外,样品采集后的处理也是影响植物内生菌分离成功率和准确性的关键环节^[22-23]。因此,需

要注意的方面包括^[24]：(1) 在采集后的 48 h 内尽可能快地将样品进行处理；样品在运输或储存前，应先将其晾干，以去除表面的水分；运输过程中，样品应置于低温干燥的环境中；对于样品的包装，应使用棉、Tyvek 或纸袋(或纸信封)，尽量避免使用塑料袋。(2) 样品采集过程中若有伤口，应及时对伤口表面进行消毒，以防止外来微生物侵入组织；如果有较大伤口或内部组织暴露，表面消毒时可以适当延长消毒剂的处理时间，但要避免过度消毒导致内生菌的活性和数量降低。

3.2 表面消毒

植物材料的表面消毒通常采用一种强氧化剂或常规的消毒剂进行短时间处理，再用无菌水冲洗以去除残留的消毒剂。但表面消毒不彻底或选择的消毒方案不当都可能导致附生在植物表面的内生菌群无法消除或影响分离结果^[25]，所以需要注意的是：(1) 消毒剂的选择、浓度和处理时间的控制。不同消毒剂对样品和内生菌的影响不同，某些内生真菌和放线菌对 NaClO 和 H₂O₂ 的耐受性较低，使用不当可能导致这些菌种被消灭，无法在培养基中存活^[24,26]。家庭用的 NaClO 漂白剂加水稀释至 2%–10% 的浓度，便是广泛使用的表面消毒剂^[27]。消毒剂的浓度和处理时间也应严格控制，过高的浓度或过长的时间可能会杀死内部的内生菌，从而降低分离结果的准确性^[28]。特别是耐受性较差的内生菌(如内生固氮菌、放线菌)的活性及生长会受到影响^[29]。另外，消毒后须用无菌水充分冲洗样品表面 3–5 次，以确保残留的消毒剂已冲洗干净。(2) 消毒后的样品应立即进行切割和内生菌分离操作，避免样品长时间暴露在空气中，防止外源微生物二次污染^[30]。

3.3 培养基的成分与培养条件

培养基成分中碳源、氮源、微量元素、pH 值等会影响内生菌是否能在该培养基中正常生长。内生放线菌和内生真菌通常在 pH 5.5–6.5 的酸性环境中生长良好，而内生细菌[如芽孢杆

菌(*Bacillus* sp.)]在 pH 7.0–7.5 的中性环境中更适宜^[31]；高糖分的 PDA 培养基会促进镰刀菌(*Fusarium* sp.)、曲霉菌(*Aspergillus* sp.)等真菌类内生菌的快速生长，从而抑制其他细菌类内生菌的分离^[26]；培养的温度、湿度、氧气浓度等也会影响内生菌的生长^[32]。植物内生菌的最适宜培养温度通常在 25–30 °C 之间；培养基中的氧气浓度通常在 21% 左右，适合大多数好氧性内生菌的生长；干燥的培养环境可能导致内生菌脱水失活，而过于潮湿的环境则可能引起杂菌污染^[32]。其注意事项有：(1) 使用正确的培养基，根据实验目的使用选择性培养基(如添加抗生素、调节 pH 值等)以抑制非目标内生菌的生长，从而提高目标菌种的分离效率。(2) 避免过度营养：培养基营养成分过于丰富(如过量的糖分和蛋白质)可能导致快速生长的内生菌(如芽孢杆菌)过度繁殖，影响其他慢生菌(如放线菌、固氮菌)的分离效果。(3) 设置适宜的培养条件：根据目标菌种设置适宜的温度、湿度和氧气浓度，避免不适宜的培养条件导致目标菌种无法生长或被其他微生物竞争性抑制。

3.4 宿主植物的影响

宿主植物的种类和健康状况也会显著影响内生菌的可培养性和多样性。例如，不同的植物具有不同的组织结构和化学成分，或者在病害或胁迫状态下的植物会释放不同的化学信号，这些不同的情况会导致不同种类的内生菌共生^[33]。在分离内生菌时需要注意的关键点有：(1) 宿主植物的选择。如果研究目标是某特定植物的内生菌，应集中采集该物种的植物样本，以减少不同物种之间的内生菌群落差异带来的混杂效应。如：禾本科植物常见的内生菌包括固氮螺菌(*Azospirillum* spp.)、草螺菌(*Herbaspirillum* spp.)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)和链霉菌(*Streptomyces* spp.)，豆科植物(如大豆、苜蓿)的根系固氮功能相关的内生菌主要是根瘤菌，如慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium* spp.)^[28,30]。(2) 植物组织类型的选择。在分离内生菌时，应

根据目标菌种选择合适的植物组织。植物的根、茎、叶、花和种子中内生菌的分布和种类各不相同。通常情况下，根部内生菌多样性最高，包括大量的细菌和放线菌；叶片更多地包含一些特定的可培养内生真菌；而花和种子的内生菌种类较单一^[34]。(3) 根据研究目标选择合适的生长阶段的样本采样。在采样过程中优先选择生长初期或成熟期的样本，通常幼苗期和成熟期的内生菌群落较为稳定，而在开花期和果

实成熟期则可能波动较大^[35]。

4 植物内生菌可培养策略的创新

为了克服植物内生菌分离培养的限制因素，研究者们开发了许多创新的植物内生菌分离培养的新型方法，尤其是在表面消毒、样品处理、培养基优化和其他一些技术的革新方面，使得能够分离培养到的内生菌群大幅度地扩展(表 2)，极大促进了内生菌资源的开发和利用。

表 2 培养技术的优化使用及其分离的内生菌类群

Table 2 Cultivation optimization and the isolated plant endophytic taxa

Optimization method	Medium	Isolated taxa of endophytes	Host plant and reference
Using new type medium and medium compositional optimization	PS; GG	<i>Acidobacteriota</i> -unclassified; <i>Verrucomicrobiota</i> -unclassified	<i>Dendrobium</i> (<i>Dendrobium nobile</i> L.) ^[36]
Using plant extracts as medium supplements	TWYE+nystatin; YECD+nalidixic acid	<i>Streptomycetaceae</i> -unclassified; <i>Nocardiopsidaceae</i> -unclassified	Bitter apple (<i>Citrullus colocynthis</i>) ^[20]
	LGI medium+ sugarcane juice	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Sugarcane (<i>Saccharum officinarum</i> L.) ^[37]
	extract of alfalfa leaf and stem+agar	<i>Novosphingobium</i> sp.; <i>Lysobacter</i> sp.; <i>Pedobacter</i> sp.	Alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.) ^[38]
	Oligotrophic medium+ potato root extract	<i>Verrucomicrobia</i> subdivision 1	Potato (<i>Solanum tuberosum</i> L.) ^[39]
	Extract of clover (<i>Trifolium alexandrinum</i> L.)+agar	BRC1 (candidate bacterial phylum BRC1); <i>Gracilibacteria</i> (GN02); <i>Omnitrophica</i> (OP3); <i>Atribacteria</i> (OP9); <i>Marinimicrobia</i> (SAR406); <i>Dependentiae</i> (TM6); <i>Latescibacteria</i> (WS3)	Maize (<i>Zea mays</i> L.) ^[40]
Co-cultivation technique	DTS medium+reed root homogenate	<i>Armatimonadetes</i> (OP10)	Reed (<i>Phragmites australis</i>), Loosestrife (<i>Lythrum anceps</i>) ^[41]
	Soil+MM medium	<i>Rhizophagus intraradices</i> ; <i>Rhizophagus aggregatus</i>	Carrot (<i>Daucus carota</i>) ^[42]
	MS medium	<i>Kosakonia</i>	Tomato (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) ^[13]
Enrichment culture	MS medium	<i>Methylobacterium</i> sp.	Potato (<i>Solanum tuberosum</i> L.) ^[43]
	PDA; BPA	<i>Bacillus</i> sp.	Grape callus (<i>Vitis vinifera</i> L.× <i>V. labrusca</i> L. cv.: Rose honey) ^[44]

PS 培养基：将稀释的 R2A 和 DTS 培养基中的磷酸盐和琼脂分开灭菌后的改良培养基；GG 培养基：将稀释的 R2A 和 DTS 培养基中的琼脂均替换为结冷胶，并补充 0.003 mol/L 的 CaCl₂ 的改良培养基。

PS medium refers to a modified medium in which the phosphate and agar from diluted R2A medium and DTS medium are sterilized separately. GG medium refers to a modified medium in which the agar from diluted R2A medium and DTS medium was replaced by gellan gum, and add 0.003 mol/L of CaCl₂ as supplement.

4.1 表面消毒技术创新

近年来,植物表面消毒的方法取得了诸多创新,旨在更有效地去除外源微生物,同时最大限度地保留样本中内生菌的活性。有学者提出采用天然消毒剂消毒的方法,茶树油具有广谱的抗菌活性,对许多细菌和真菌的耐药株有极好的杀灭或抑制作用,对植物组织的损伤较小,无毒无害,将其开发成消毒剂具有广泛的前景^[45]。利用姜黄和安息香熏蒸产生的烟雾中的纳米碳颗粒对植物进行表面消毒,能够实现 50%甚至 100%的无污染的植物组织培养^[46]。将表面消毒和除湿结合的消毒方法很适合疏水或表面长满短毛的叶子^[47]。消毒过程中,植物表面残留的 NaClO 可能会杀死内生菌或抑制其生长,为改善这一状况,用 NaClO 处理后加入硫代硫酸钠溶液进行中和处理,有助于提高分离时的培养效果^[2]。如在分离内生放线菌时,对植物材料表面消毒后,可将其浸渍在 10% NaHCO₃ 中以抑制快速生长的内生真菌对放线菌的覆盖^[48]。

4.2 样品预处理技术创新

样品预处理方法的创新主要集中在利用物理或化学手段来改善样本表面结构,减少机械损伤,提高内生菌分离率。常用的样品处理方法有高温处理、冷冻处理、液氮研磨、抑制剂浸泡等多种方法^[49]。样品预处理技术的创新可以参考超声波与酶联合处理法,在样品处理过程中加入浓度为 1.5%的酶混合物,随后超声处理 90 min,发现石莼(*Ulva lactuca*)多糖的提取率可以提高到 30.14%^[50]。虽然是针对植物化合物提取的方法,但该方法的原理也可以应用于分离植物内生菌中对样品材料的预处理。不同的处理方法对内生菌会有多方面的影响,包括生长活性、存活率和群落多样性。因此,应根据样品类型和内生菌特性选择合适的处理方法,并在必要时优化组合使用,以减少负面影响,保证分离的有效性和准确性。

4.3 培养基的优化

培养基优化的原理在于通过调整营养成分、添加特定生长因子以及控制环境条件、模拟内生菌的自然生境等,以满足不同菌群的代谢需求,从而提高其分离和培养的成功率。在分离培养内生细菌的过程中, Nishioka 等^[36]使用磷酸盐和琼脂(phosphate and agar, PS)分开灭菌的培养基和结冷胶(gellan gum, GG)作为凝结剂的培养基能分离到的内生菌 OTU 增加了 50%;进一步分析发现,使用 PS 或 GG 培养基时,能分离出酸杆菌门(*Acidobacteriota*)和疣微菌门(*Verrucomicrobiota*)中一些很少被培养出来的内生菌^[36]。还有报道显示,利用添加碳源的培养基、补充葡萄糖或者淀粉的培养基分离培养银杏(*Ginkgo biloba*)根系中的内生菌,能培养出超过高通量结果中核心菌群 OTU 数的 90.0%^[51]。分离培养放线菌时, Ali 等^[20]在 TWYE 和 YECD 培养基的基础上添加制霉菌素和萘啶酸,分离出药西瓜(*Citrullus colocynthis*)中 6 种新的内生放线菌,归属于链霉菌科(*Streptomycetaceae*)和拟诺卡氏菌科(*Nocardiopsaceae*)。在关于真菌的分离培养研究中,王晓光等^[52]将松口蘑菌丝体接种于添加有赤松根提取液和蛋白胨的 modified melin-norkrans (MMN)培养基上,菌丝生长速度比在未经改良的培养基上的菌丝更快。

目前,使用各种植物材料作为培养基补充剂已有较多研究。如利用草坪草、仙人掌和三叶草的植物提取液作为可持续的植物培养基用于培养植物内生菌,能大量分离出大麦(*Hordeum murinum* L.)的根际细菌,并且分离出的大麦内生菌总量大于 qPCR 中内生菌数量的 16%^[53]。Sarhan 等^[40]将不同植物组织作为原材料制备成固体和液体培养基对玉米根部微生物群落在门类水平的丰度进行了分析,研究表明,基于植物提取液的混合培养基能够显著富集候选门类 *Candidatus* phylum (BRC1)、*Omnitrophica* (OP3)、暗黑菌(*Atribacteria*, OP9)、*Dependentiae* (TM6)、迟杆菌门(*Latescibacteria*, WS3)以及海

微菌门(*Marinimicrobia*, SAR406); 此外, 还富集了一些丰度较低或 CRE 的细菌门, 如酸杆菌门(*Acidobacteria*)、芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)和软壁菌门(*Tenericutes*)。基于采用植物培养基进行培养, 这些候选门类群和不同的 OTU 在培养基上能显著富集, 说明培养基中所含的营养物不仅有可能符合菌群的营养需求, 还能复现它们在自然界中的栖息条件, 为它们作为共生生物提供适宜的环境^[54]。

4.4 共培养技术

共培养技术是一种通过将 2 种或多种微生物与细胞或植株在同一培养体系中培养的技术。研究发现, 某些内生菌在与活体植物共培养时可以触发内生菌之间的信号传递, 激活原本沉默的基因, 从而实现内生菌的培养, 而单独接种到培养基上时则无法培养出来^[55-58]。通常利用 1 种或几种内生菌与宿主植物共培养, 以激活 CRE 或之前未被培养出的内生菌。将罗尔斯通氏菌属(*Ralstonia*)、鞘氨醇菌属(*Sphingobium*)和考克氏菌(*Kocuria* spp.) 3 种不同的内生菌接种于“Arka Vikas”番茄无菌幼苗上, 激活了小浴氏菌属(*Kosakonia*)的培养状态, 相较于未接种内生菌的对照组, 对照组未分离出该种内生菌^[13]。在丛枝菌根共生体中, AM 真菌依赖于植物根系提供的营养和能量来生长, 将植物根系独立于植物体, 建立离体的根系与植物 AM 真菌进行纯培养是目前研究的热点。特别是 Ri T-DNA 转化的胡萝卜(*Daucus carota* L.)培养系统允许在无菌条件下建立 AM 共生关系和不同 AM 真菌菌种的繁殖体系^[59]。Silvani 等^[42]采用土壤与培养基相结合的方法培养内生根瘤菌根内根孢囊霉(*Rhizophagus intraradices*)和聚合根瘤菌聚丛根孢囊霉(*Rhizophagus aggregatus*), 结果显示内生根瘤菌的孢子值达到了每克基质(506±49)个, 聚合根瘤菌孢子值达到了每克基质(415±29)个。在 Podolich 等^[43]研究中, 利用荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) IMGB163 激活马铃薯组织中的甲基杆菌属(*Methylobacterium*)的生

长状态, 使其恢复到可培养状态, 并且在接种的根部和茎部中分别检测到甲基杆菌属的菌落数为 1.2×10^4 CFU/g 和 0.4×10^2 CFU/g。

4.5 富集培养方法

富集培养方法是一种通过为特定微生物群体提供优选的培养条件、促进其在样本中增殖的技术, 从而在混合菌群中提高目标微生物的相对丰度, 便于后续的分离和鉴定。Wang 等^[44]通过对茎尖愈伤组织和果肉愈伤组织的正常和褐化组织内生菌群的多样性及丰度分析, 发现芽孢杆菌在茎尖愈伤组织和果肉愈伤组织的褐化部分中都被检测到, 其丰度分别高达 1.13×10^7 CFU/g 和 2.78×10^7 CFU/g, 但正常愈伤组织中未分离培养出任何内生菌。通过这种方法可以发现改变宿主植物的生理状态, 激活了芽孢杆菌的可培养状态, 使其相对丰度达到一定程度后被分离出来。还有, 当植物组织在褐化或者老化时, 培养基中会出现细菌污染, 这也可能是由于植物组织内某些物质的分解、培养基 pH 值的变化及其他因素激活了 VBNC 转变为可培养状态的开关, 使某些特定菌株的丰度升高, 以便被分离出^[12,60-61]。

5 总结与展望

5.1 植物内生菌的分离培养技术的局限性

尽管植物内生菌的分离培养技术取得了一定进展, 但其仍遇到诸多挑战与局限。(1) 培养基和培养条件的局限性。内生菌群落的多样性极高, 不同的内生菌在植物体内具有不同的作用, 如固氮、解磷、促生长、病害防治等^[62-63]。而传统的分离培养方法无法满足内生菌对营养成分和生长条件的要求, 导致一些特定的内生菌无法在实验室条件下培养出来。像酸杆菌门(*Acidobacteriota*)、绿弯菌门(*Chloroflexota*)、疣微菌门(*Verrucomicrobiota*)、浮霉状菌门(*Planctomycetota*)及热袍菌门(*Thermotogae*)的一些内生菌是无法通过常规培养方法进行分离培

养的^[64-66],特别是那些诸如甲基杆菌等对特定环境依赖较强的物种,传统的培养条件无法满足其生长需求^[67]。另外,内生菌与宿主植物长期共生,对宿主、环境有特定的要求,实验室培养很难模拟这种多样化的环境。(2) 表面消毒及样品处理的局限性。在内生菌分离过程中,过高浓度的消毒剂及消毒时间会使内生菌渗透至植物组织内而死亡,而消毒不彻底又可能引入外生菌的污染,这些都会影响分离的准确性^[28]。此外,样品处理过程中的操作步骤(如切割、灭菌等)以及材料保存方式的不当也可能引入外部污染^[68]。(3) 微生物自身的不可培养性。主要归因于2点:(1) 有些微生物基因组较小、合成代谢能力受限,具有营养缺陷性^[69]。假设某菌株仅缺少1个基因或基因簇用于合成某种有机化合物,则可以通过在培养基中加入该化合物来满足其生长需求。然而,微生物基因缺失的数量(即其营养缺陷的程度)决定了是否能够通过补充特定营养物质来实现其体外培养。(2) 微生物的寡营养性。具有较大基因组和复杂代谢途径的微生物,能够合成其大多数的营养需求,但其复制机制受到限制。这些微生物通常有1个或2个核糖体RNA操作子,这限制了它们的复制能力^[70-71]。

5.2 未来研究的可能性

针对目前研究方法的状况,我们认为可以从以下几个方面优化分离培养技术:(1) 调整培养的动态环境,即通过在实验中模拟植物在不同环境条件下的生长状态,分别在不同温度、不同时间点进行取样培养,可发现不同的培养条件下分离出种类和数量不一样的内生菌^[72]。(2) 增加采样数量和样本多样性。有研究表明,不同种类的植物和同一种植物的不同组织内的内生菌种类和分布情况可能大不相同,甚至内生菌的分布还受地理位置、气候条件、植物生长阶段等影响^[73-74]。(3) 利用高通量测序指导传统内生菌分离培养,利用高通量测序技术全面分析样本中内生菌的结构和多样性组成,确定

优势目标菌株,再根据目标菌株的特性设计或查询适合的培养基^[75]。(4) 开发有益复合菌群的培养技术,比如采用共生培养法或者设计多样化培养基以满足不同内生菌的营养需求和生长条件;利用微流控技术实现高通量的菌株筛选和功能分析,有助于快速识别和培养具有特定功能的复合菌群^[76];利用生物反应器进行连续培养,提供稳定的环境和营养供应,促进复合菌群的持续生长和代谢活动^[77]。(5) 与其他分子生物学技术相结合,取长补短。通过CRISPR-Cas9等基因编辑技术精确地修改内生菌的基因组,去除或调整那些可能导致难培养的基因。例如,去除抑制生长的基因或插入增强生长的基因,从而提高这些菌种在实验室条件下的生长速度和生存率^[78]。(6) 结合多组学技术推动新培养策略的开发。多组学技术(基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢组学等)的整合分析能够在基因、蛋白质和代谢物水平上全面揭示内生菌的代谢途径、生态功能及与寄主的互作机制等,有助于开发更加特异化的培养基,如通过代谢组学研究某些植物内生菌所依赖的特定代谢产物,研究人员可以在培养基中添加这些化合物,改善微生物的培养条件,从而促进难培养菌株的生长和分离^[79-80]。

5.3 内生菌资源开发潜力的展望

(1) 作为生物肥料和生物农药的开发。内生菌能够通过固氮、解磷、解钾等机制提高植物对养分的吸收率,或分泌植物激素促进植物生长^[81-82]。因此,将这些菌株开发为生物肥料,可以减少传统化肥的使用,降低农业生产对环境的负面影响。另一些内生菌能够分泌抗生素、抗真菌化合物或挥发性有机物,从而抑制病原微生物的生长^[83],这使得它们在生物农药开发中具有巨大的潜力。(2) 作为生物修复剂在环境保护中的应用。内生菌能够在植物体内和土壤中降解有机污染物或重金属。例如:一些内生真菌可以分泌木质素酶和纤维素酶,从而分解土壤中复杂的有机污染物^[84]。此外,某些内生

菌还能够通过螯合或转化重金属,使其毒性降低或稳定化,从而应用于受污染土壤和水体的生物修复^[85]。(3) 医药领域的新型抗生素与次生代谢产物。植物内生菌由于其与寄主植物长期共生进化,往往能够产生具有独特结构和新型生物活性的次生代谢产物。这些代谢产物包括抗菌、抗病毒、抗肿瘤及抗氧化等生物活性分子^[86-88],未来可以将这些物质开发为新型药物,为医药产业提供新型的天然活性分子库。

新型的分离培养技术、分子生物学技术以及多组学整合分析等为基础的特定培养策略是发现植物内生菌新成员以及揭示其与宿主植物互作机制的关键。这些培养策略将有助于恢复具有重要生态功能的新分类群,从而为合理利用植物内生菌提供新的手段,进一步改善植物的适应性和产量。

REFERENCES

- [1] de BARY A. Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten[M]. Leipzig: W. Engelmann, 1866.
- [2] HALLMANN J, QUADT-HALLMANN A, MAHAFFEE WF, KLOPPER JW. Bacterial endophytes in agricultural crops[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1997, 43(10): 895-914.
- [3] HARDOIM PR, van OVERBEEK LS, BERG G, PIRTTILÄ AM, COMPANT S, CAMPISANO A, DÖRING M, SESSITSCH A. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2015, 79(3): 293-320.
- [4] STIERLE AA, STIERLE DB, BUGNI T. Sequoiatones A and B: novel antitumor metabolites isolated from a redwood endophyte[J]. The Journal of Organic Chemistry, 1999, 64(15): 5479-5484.
- [5] CORDOVEZ V, DINI-ANDREOTE F, CARRIÓN VJ, RAAIJMAKERS JM. Ecology and evolution of plant microbiomes[J]. Annual Review of Microbiology, 2019, 73: 69-88.
- [6] XIANG SY, WANG YT, CHEN CX, LIAO CM, LI T, PAN XX, ZHU SS, YANG MZ. Dominated "inheritance" of endophytes in grapevines from stock plants via *in vitro*-cultured plantlets: the dawn of plant endophytic modifications[J]. Horticulturae, 2023, 9(2): 180.
- [7] PAN XX, CHEN CX, WANG YT, ZHU YY, YANG MZ. Exposure to the endophytic fungi regulates the anthocyanin profiles in the post-veraison grape berries of 'cabernet sauvignon'[J]. Horticulturae, 2023, 9(2): 237.
- [8] PAN XX, LIU HZ, LI Y, ZHOU P, WEN Y, LU CX, ZHU YY, YANG MZ. The interactions between two fungal endophytes *Epicoccum layuense* R2-21 and *Alternaria alternata* xhyn2 and grapevines (*Vitis vinifera*) with *de novo* established symbionts under aseptic conditions[J]. Journal of Fungi, 2023, 9(12): 1154.
- [9] PACIFICO D, SQUARTINI A, CRUCITTI D, BARIZZA E, SCHIAVO FL, MURESU R, CARIMI F, ZOTTINI M. The role of the endophytic microbiome in the grapevine response to environmental triggers[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 1256.
- [10] YU M, CHEN JC, QU JZ, LIU F, ZHOU M, MA YM, XIANG SY, PAN XX, ZHANG HB, YANG MZ. Exposure to endophytic fungi quantitatively and compositionally alters anthocyanins in grape cells[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2020, 149: 144-152.
- [11] LI XF, ZHENG X, YADAV N, SAHA S, SALAMA ES, LI XK, WANG LK, JEON BH. Rational management of the plant microbiome for the second green revolution[J]. Plant Communications, 2024, 5(4): 100812.
- [12] THOMAS P, SEKHAR AC. Cultivation versus molecular analysis of banana (*Musa* sp.) shoot-tip tissue reveals enormous diversity of normally uncultivable endophytic bacteria[J]. Microbial Ecology, 2017, 73(4): 885-899.
- [13] SHAIK SP, THOMAS P. *In vitro* activation of seed-transmitted cultivation-recalcitrant endophytic bacteria in tomato and host-endophyte mutualism[J]. Microorganisms, 2019, 7(5): 132.
- [14] 王占斌, 周暄, 马鑫博, 王靖琳. 药用植物内生真菌的分离及拮抗菌的筛选与鉴定[J]. 中国农学通报, 2022, 38(1): 75-81.
- [15] WANG ZB, ZHOU X, MA XB, WANG JL. Isolation of endophytic fungi from medicinal plants and screening and identification of antagonism[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2022, 38(1): 75-81 (in Chinese).
- [16] KHADKA G, ANNAMALAI T, SHETTY KG, TSE-DINH YC, JAYACHANDRAN K. Isolation and characterization of fungal endophytes from *Petiveria alliacea* and their antimicrobial activities in south Florida[J]. Microbiology Research, 2023, 14(3): 1470-1482.
- [17] 李少杰, 肖清山, 宋福强, 王歆. 丛枝菌根(AM)真菌扩培技术研究进展[J]. 中国农学通报, 2022, 38(9): 115-122.
- [18] LI SJ, XIAO QS, SONG FQ, WANG X. Propagation of arbuscular mycorrhizal fungi: a review[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2022, 38(9): 115-122 (in Chinese).
- [19] 黄玉丹, 张淑彬, 李琳, 梁斌, 高雪, 武亚芬, 李敏, 向丹. 丛枝菌根真菌繁殖体的高效扩繁[J]. 微生物学通报, 2023, 50(2): 503-513.
- [20] HUANG YD, ZHANG SB, LI L, LIANG B, GAO X, WU YF, LI M, XIANG D. Efficient propagation of arbuscular mycorrhizal fungal propagules[J]. Microbiology China, 2023, 50(2): 503-513 (in Chinese).
- [21] 黄博闻, 王亚, 葛静, 孙星, 王冬兰, 余向阳. 水稻组织中可培养内生细菌的分离鉴定及功能分析[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(4): 1145-1148.
- [22] HUANG BW, WANG Y, GE J, SUN X, WANG DL,

- YU XY. Isolation, identification and functional analysis of culturable endophytic bacteria in rice tissue[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2022, 38(4): 1145-1148 (in Chinese).
- [19] 代亚锋, 吴楠楠, 郜振, 王高瞻, 宫安东, 张艺美. 茶树炭疽病拮抗内生细菌贝莱斯芽胞杆菌的筛选与鉴定[J]. 信阳师范学院学报(自然科学版), 2021, 34(2): 201-207.
- DAI YF, WU NN, GAO Z, WANG GZ, GONG AD, ZHANG YM. Screening and identification of the endophytic bacteria *Bacillus velezensis* against tea anthracnose[J]. Journal of Xinyang Normal University (Natural Science Edition), 2021, 34(2): 201-207 (in Chinese).
- [20] ALI AR, BAHRAMI Y, KAKAEI E, MOHAMMADZADEH S, BOUK S, JALILIAN N. Isolation and identification of endophytic Actinobacteria from *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad and their antibacterial properties[J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 206.
- [21] 陈萌, 李小林, 李强, 张矛宇, 张波, 甘炳成, 张小平. 川楝内生放线菌的分离及多样性研究[J]. 微生物学通报, 2015, 42(2): 264-271.
- CHEN M, LI XL, LI Q, ZHANG MY, ZHANG B, GAN BC, ZHANG XP. Isolation and diversity of endophytic actinomycetes from *Melia toosendan*[J]. Microbiology China, 2015, 42(2): 264-271 (in Chinese).
- [22] dos REIS JBA, LORENZI AS, DO VALE HMM. Methods used for the study of endophytic fungi: a review on methodologies and challenges, and associated tips[J]. Archives of Microbiology, 2022, 204(11): 675.
- [23] VERMA SK, KHARWAR RN, GOND SK, KINGSLEY KL, WHITE JF Jr. Exploring endophytic communities of plants: methods for assessing diversity, effects on host development and potential biotechnological applications[M]//Seed Endophytes. Cham: Springer International Publishing, 2019: 55-82.
- [24] SCHULZ B, BOYLE C. The endophytic continuum[J]. Mycological Research, 2005, 109(Pt 6): 661-686.
- [25] PAOLA SALDIerna GUZMÁN J, NGUYEN K, HART SC. Simple methods to remove microbes from leaf surfaces[J]. Journal of Basic Microbiology, 2020, 60(8): 730-734.
- [26] COMPANT S, DUFFY B, NOWAK J, CLÉMENT C, BARKA EA. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(9): 4951-4959.
- [27] HOEFNAGELS MH. Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods[J]. BioScience, 2005, 55(3): 282-283.
- [28] SAHU PK, TILGAM J, MISHRA S, HAMID S, GUPTA A, JAYALAKSHMI K, VERMA SK, KHARWAR RN. Surface sterilization for isolation of endophytes: ensuring what (not) to grow[J]. Journal of Basic Microbiology, 2022, 62(6): 647-668.
- [29] REINHOLD-HUREK B, HUREK T. Life in grasses: diazotrophic endophytes[J]. Trends in Microbiology, 1998, 6(4): 139-144.
- [30] STROBEL G, DAISY B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2003, 67(4): 491-502.
- [31] LODEWYCKX C, VANGRONSVELD J, PORTEOUS F, MOORE ERB, TAGHAVI S, MEZGEAY M, van der LELIE D. Endophytic bacteria and their potential applications[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2002, 21(6): 583-606.
- [32] MISHRA A, GOND SK, KUMAR A, SHARMA VK, VERMA SK, KHARWAR RN, SIEBER TN. Season and tissue type affect fungal endophyte communities of the Indian medicinal plant *Tinospora cordifolia* more strongly than geographic location[J]. Microbial Ecology, 2012, 64(2): 388-398.
- [33] MWAMBURI LA. Cultivation-based studies of endophytic fungi in plants[M]//Endophytic Microbes: Isolation, Identification, and Bioactive Potentials. New York: Springer International Publishing, 2022: 145-151.
- [34] AL-BLOOSHI SY, LATIF MAA, SABANEH NK, MGAOGAO M, HOSSAIN A. Development of a novel selective medium for culture of Gram-negative bacteria[J]. BMC Research Notes, 2021, 14(1): 211.
- [35] HARDOIM PR, van OVERBEEK LS, van ELSAS JD. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth[J]. Trends in Microbiology, 2008, 16(10): 463-471.
- [36] NISHIOKA T, TAMAKI H. Improved cultivation and isolation of diverse endophytic bacteria inhabiting *Dendrobium* roots by using simply modified agar media[J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(6): e0223822.
- [37] CAVALCANTE VA, DOBEREINER J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane[J]. Plant and Soil, 1988, 108(1): 23-31.
- [38] HEGAZI NA, SARHAN MS, FAYEZ M, PATZ S, MURPHY BR, RUPPEL S. Plant-fed versus chemicals-fed rhizobacteria of lucerne: plant-only teabags culture media not only increase culturability of rhizobacteria but also recover a previously uncultured *Lysobacter* sp., *Novosphingobium* sp. and *Pedobacter* sp.[J]. PLoS One, 2017, 12(7): e0180424.
- [39] Da ROCHA UN, ANDREOTE FD, de AZEVEDO JL, van ELSAS JD, van OVERBEEK LS. Cultivation of hitherto-uncultured bacteria belonging to the Verrucomicrobia subdivision 1 from the potato (*Solanum tuberosum* L.) rhizosphere[J]. Journal of Soils and Sediments, 2010, 10(2): 326-339.
- [40] SARHAN MS, PATZ S, HAMZA MA, YOUSSEF HH, MOURAD EF, FAYEZ M, MURPHY B, RUPPEL S, HEGAZI NA. G3 PhyloChip analysis confirms the promise of plant-based culture media for unlocking the composition and diversity of the maize root microbiome and for recovering unculturable candidate divisions/Phyla[J]. Microbes and Environments, 2018, 33(3): 317-325.
- [41] TANAKA Y, TAMAKI H, MATSUZAWA H, NIGAYA M, MORI K, KAMAGATA Y. Microbial community analysis in the roots of aquatic plants and isolation of novel microbes including an organism of the candidate phylum OP10[J]. Microbes and Environments, 2012, 27(2): 149-157.
- [42] SILVANI VA, STATELLO M, SCORZA MV, PÉRGOLA M, COLOMBO RP, GODEAS AM. A novel *in vitro* methodology to cultivate arbuscular mycorrhizal fungi combining soil and synthetic

- media[J]. Symbiosis, 2019, 79(2): 163-170.
- [43] PODOLICH O, LASCHEVSKYY V, OVCHARENKO L, KOZYROVSKA N, PIRTILÄ AM. *Methylobacterium* sp. resides in unculturable state in potato tissues *in vitro* and becomes culturable after induction by *Pseudomonas fluorescens* IMGB163[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106(3): 728-737.
- [44] WANG YT, CHEN CX, ZHOU P, LU CX, WEN Y, LI Y, PAN XX, ZHU SS, YANG MZ. Maintenance of callus-associated endophyte balance to mitigate oxidative browning in plant tissue culture practices[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2024, 157(2): 41.
- [45] 文洁, 李婕, 曹维. 天然茶树油消毒剂抗菌活性与应用前景[J]. 中药材, 2011, 34(3): 487-489.
- WEN J, LI J, CAO W. Antibacterial activity and application prospect of natural tea tree oil disinfectant[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2011, 34(3): 487-489 (in Chinese).
- [46] SIVANESAN I, MUTHU M, GOPAL J, TASNEEM S, KIM DH, OH JW. A fumigation-based surface sterilization approach for plant tissue culture[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2021, 18(5): 2282.
- [47] SCHULZ B, WANKE U, DRAEGER S, AUST HJ. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods[J]. Mycological Research, 1993, 97(12): 1447-1450.
- [48] 罗红丽, 林显钊, 张利敏, 刘宁, 黄英. 百部内生放线菌的分离、分类及次级代谢潜力[J]. 微生物学报, 2012, 52(3): 389-395.
- LUO HL, LIN XZ, ZHANG LM, LIU N, HUANG Y. Isolation, classification and biosynthetic potential of endophytic actinomycetes from *Stemona*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(3): 389-395 (in Chinese).
- [49] 张金丽, 秦玉丽, 熊子君, 赵国振, 朱文勇, 赵立兴, 徐丽华. 植物内生放线菌的选择性分离[J]. 微生物学通报, 2013, 40(7): 1305-1313.
- ZHANG JL, QIN YL, XIONG ZJ, ZHAO GZ, ZHU WY, ZHAO LX, XU LH. The selective isolation of endophytic actinomycetes[J]. Microbiology China, 2013, 40(7): 1305-1313 (in Chinese).
- [50] WANG WQ, LI JB, LU FP, LIU FF. Ultrasound-assisted multi-enzyme extraction for highly efficient extraction of polysaccharides from *Ulva lactuca*[J]. Foods, 2024, 13(6): 891.
- [51] ZHANG SF, SUN CR, LIU XD, LIANG YL. Enriching the endophytic bacterial microbiota of *Ginkgo* roots[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1163488.
- [52] 王晓光, 曾宪录, 张秉信. 松口蘑菌丝体分离与纯培养研究[J]. 农业与技术, 1994, 14(6): 6-9.
- WANG XG, ZENG XL, ZHANG BX. Study on isolation and pure culture of *Tricholoma matsutake* Mycelium[J]. Agriculture and Technology, 1994, 14(6): 6-9 (in Chinese).
- [53] MOURAD EF, SARHAN MS, DAANAA HA, ABDOU M, MORSI AT, ABDELFADEEL MR, ELSAWEY H, NEMR R, EL-TAHAN M, HAMZA MA, ABBAS M, YOUSSEF HH, ABDELHADI AA, AMER WM, FAYEZ M, RUPPEL S, HEGAZI NA. Plant materials are sustainable substrates supporting new technologies of plant-only-based culture media for *in vitro* culturing of the plant microbiota[J]. Microbes and Environments, 2018, 33(1): 40-49.
- [54] ARMANHI JSL, de SOUZA RSC, DAMASCENO NB, de ARAÚJO LM, IMPERIAL J, ARRUDA P. A community-based culture collection for targeting novel plant growth-promoting bacteria from the sugarcane microbiome[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 8: 2191.
- [55] NETZKER T, FISCHER J, WEBER J, MATTERN DJ, KÖNIG CC, VALIANTE V, SCHROECKH V, BRAKHAGE AA. Microbial communication leading to the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 299.
- [56] SCHROECKH V, SCHERLACH K, NÜTZMANN HW, SHELEST E, SCHMIDT-HECK W, SCHUEMANN J, MARTIN K, HERTWECK C, BRAKHAGE AA. Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(34): 14558-14563.
- [57] BRAKHAGE AA. Regulation of fungal secondary metabolism[J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11(1): 21-32.
- [58] KELLER NP. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery[J]. Nature Reviews Microbiology, 2019, 17(3): 167-180.
- [59] DECLERCK S, STRULLU DG, FORTIN JA. *In vitro* culture of mycorrhizas[M]. Berlin: Springer International Publishing, 2005.
- [60] THOMAS P, SWARNA GK, PATIL P, RAWAL RD. Ubiquitous presence of normally non-culturable endophytic bacteria in field shoot-tips of banana and their gradual activation to quiescent cultivable form in tissue cultures[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2008, 93(1): 39-54.
- [61] THOMAS P. Intense association of non-culturable endophytic bacteria with antibiotic-cleansed *in vitro* watermelon and their activation in degenerating cultures[J]. Plant Cell Reports, 2011, 30(12): 2313-2325.
- [62] SHAHZAD R, KHAN AL, BILAL S, ASAF S, LEE IJ. What is there in seeds? vertically transmitted endophytic resources for sustainable improvement in plant growth[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 24.
- [63] THEOCHARIS A, BORDIEC S, FERNANDEZ O, PAQUIS S, DHONDT-CORDELIER S, BAILLIEUL F, CLÉMENT C, BARKA EA. *Burkholderia phytofirmans* PsJN primes *Vitis vinifera* L. and confers a better tolerance to low nonfreezing temperatures[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2012, 25(2): 241-249.
- [64] JANSSEN PH. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(3): 1719-1728.
- [65] HUGENHOLTZ P, STACKEBRANDT E. Reclassification of *Sphaerobacter thermophilus* from the subclass Sphaerobacteridae in the Phylum Actinobacteria to the class Thermomicrobia (emended description) in the phylum Chloroflexi (emended description)[J]. International Journal of Systematic and

- Evolutionary Microbiology, 2004, 54(Pt 6): 2049-2051.
- [66] WARD N, STALEY JT, FUERST JA, GIOVANNONI S, SCHLESNER H, STACHEBRANDT E. The order planctomycetales, including the Genera *Planctomyces*, *Pirellula*, *Gemmata* and *Isosphaera* and the candidatus Genera *brocadia*, *kuenenia* and *scalindua*[M]//The Prokaryotes. New York: Springer International Publishing, 2006: 757-793.
- [67] CORPE WA, RHEEM S. Ecology of the methylotrophic bacteria on living leaf surfaces[J]. FEMS Microbiology Letters, 1989, 62(4): 243-249.
- [68] GU M, LI YL, JIANG HE, ZHANG SH, QUE QM, CHEN XY, ZHOU W. Efficient *in vitro* sterilization and propagation from stem segment explants of *Cnidioscolus aconitifolius* (mill.) I.M. johnst, a multipurpose woody plant[J]. Plants, 2022, 11(15): 1937.
- [69] HUG LA, BAKER BJ, ANANTHARAMAN K, BROWN CT, PROBST AJ, CASTELLE CJ, BUTTERFIELD CN, HERNSDORF AW, AMANO Y, ISE K, SUZUKI Y, DUDEK N, RELMAN DA, FINSTAD KM, AMUNDSON R, THOMAS BC, BANFIELD JF. A new view of the tree of life[J]. Nature Microbiology, 2016, 1: 16048.
- [70] NEMERGUT DR, KNELMAN JE, FERRENBURG S, BILINSKI T, MELBOURNE B, JIANG L, VIOLLE C, DARCY JL, PREST T, SCHMIDT SK, TOWNSEND AR. Decreases in average bacterial community rRNA operon copy number during succession[J]. The ISME Journal, 2016, 10(5): 1147-1156.
- [71] ROLLER BRK, STODDARD SF, SCHMIDT TM. Exploiting rRNA operon copy number to investigate bacterial reproductive strategies[J]. Nature Microbiology, 2016, 1(11): 16160.
- [72] DUTTA S, CHOI SY, LEE YH. Temporal dynamics of endogenous bacterial composition in rice seeds during maturation and storage, and spatial dynamics of the bacteria during seedling growth[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 877781.
- [73] ZHENG YK, QIAO XG, MIAO CP, LIU K, CHEN YW, XU LH, ZHAO LX. Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi[J]. Annals of Microbiology, 2016, 66(2): 529-542.
- [74] RANA KL, KOUR D, SHEIKH I, DHIMAN A, YADAV N, YADAV AN, RASTEGARI AA, SINGH K, SAXENA AK. Endophytic fungi: biodiversity, ecological significance, and potential industrial applications[M]//Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi. Cham: Springer International Publishing, 2019: 1-62.
- [75] OBERHARDT MA, ZARECKI R, GRONOW S, LANG E, KLENK HP, GOPHNA U, RUPPIN E. Harnessing the landscape of microbial culture media to predict new organism-media pairings[J]. Nature Communications, 2015, 6: 8493.
- [76] TEJESVI MV, PIRTILÄ AM. Endophytic fungi, occurrence, and metabolites[M]//Physiology and Genetics. Cham: Springer International Publishing, 2018: 213-230.
- [77] TOPPO P, SUBBA R, ROY K, MUKHERJEE S, MATHUR P. Elucidating the strategies for isolation of endophytic fungi and their functional attributes for the regulation of plant growth and resilience to stress[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2023, 42(3): 1342-1363.
- [78] VERMA V, BATT A, SINGH HB, SRIVASTAVA A, GARG SK, SINGH VP, ARORA PK. Bioengineering of fungal endophytes through the CRISPR/Cas9 system[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1146650.
- [79] KUMAR U, RAJ S, SREENIKETHANAM A, MADDHESHIYA R, KUMARI S, HAN S, KAPOOR KK, BHASKAR R, BAJHAIYA AK, GAHLOT DK. Multi-omics approaches in plant-microbe interactions hold enormous promise for sustainable agriculture[J]. Agronomy, 2023, 13(7): 1804.
- [80] ROYCHOWDHURY R, DAS SP, GUPTA A, PARIHAR P, CHANDRASEKHAR K, SARKER U, KUMAR A, RAMRAO DP, SUDHAKAR C. Multi-omics pipeline and omics-integration approach to decipher plant's abiotic stress tolerance responses[J]. Genes, 2023, 14(6): 1281.
- [81] YU HS, ZHANG L, LI L, ZHENG CJ, GUO L, LI WC, SUN PX, QIN LP. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes[J]. Microbiological Research, 2010, 165(6): 437-449.
- [82] DIMKPA CO, BINDRABAN PS. Fortification of micronutrients for efficient agronomic production: a review[J]. Agronomy for Sustainable Development, 2016, 36(1): 7.
- [83] PHOTOLO MM, MAVUMENGWANA V, SITOLE L, TLOU MG. Antimicrobial and antioxidant properties of a bacterial endophyte, *Methylobacterium radiotolerans* MAMP 4754, isolated from *Combretum erythrophyllum* seeds[J]. International Journal of Microbiology, 2020, 2020: 9483670.
- [84] NOURI J, KHORASANI N, LORESTANI B, KARAMI M, HASSANI AH, YOUSEFI N. Accumulation of heavy metals in soil and uptake by plant species with phytoremediation potential[J]. Environmental Earth Sciences, 2009, 59(2): 315-323.
- [85] SAHA LL, TIWARI J, BAUDDH K, MA Y. Recent developments in microbe-plant-based bioremediation for tackling heavy metal-polluted soils[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 731723.
- [86] GAO H, LI G, LOU HX. Structural diversity and biological activities of novel secondary metabolites from endophytes[J]. Molecules, 2018, 23(3): 646.
- [87] SAXENA S, DUFOSSÉ L, DESHMUKH SK, CHHIPA H, GUPTA MK. Endophytic fungi: a treasure trove of antifungal metabolites[J]. Microorganisms, 2024, 12(9): 1903.
- [88] XIA YD, LIU JN, CHEN C, MO XL, TAN Q, HE Y, WANG ZK, YIN J, ZHOU GY. The multifunctions and future prospects of endophytes and their metabolites in plant disease management[J]. Microorganisms, 2022, 10(5): 1072.