



植物内生细菌的研究

杨海莲* 孙晓璐 宋 未

(中国农业科学院原子能利用研究所 北京 100094)

关键词 植物内生细菌, 促生作用, 生物防治

分类号 Q938

植物内生细菌是能够定殖在植物细胞间隙或细胞内, 并与寄主植物建立和谐联合关系的一类微生物^[1]。自本世纪初开始, 人们不断地从植物的根、叶、甚至茎和种子上分离并鉴定出多种微生物, 但其在寄主植物中的生物学作用却未能引起研究者的重视。近年来, 由于一些研究结果表明内生细菌能够作为外源基因的载体, 又具有植物保护剂的功能, 可以产生植物促生物质或可作为联合固氮菌剂, 由此有关内生细菌的研究才引起植物学家和微生物学家的兴趣。

1 植物内生细菌的研究现状

有关植物内生细菌的研究主要涉及两方面的内容: (1)生态学研究: 内生细菌是植物微生态系统中的正常群落; (2)植物病理学研究: 内生细菌是否属于植物病害感染源。两者具有共同的研究方法。a. 从植物中分离鉴定内生细菌; b. 估计内生细菌的数量; c. 进行内生细菌的植物组织细胞定位。但两者也各有侧重。

1.1 植物内生细菌的生态学研究 人们可以将植物看作是一个复杂的微生态系统, 在此系统中存在着一系列不同的栖息者即各种细菌, 它们不仅可以存在于植物的外部表面(附生细菌), 也可以存在于植物的内部组织。比较植物的不同器官和组织, 可以发现不同的细菌能够占据不同的生态位。在植物微生态系统中, 不同的微生物(细菌、真菌)能够相互作用, 并建立一种生态平衡, 其中一些是分离频率高, 数量大的优势种群, 而另一些属于稀有^[2]。

过去人们忽视了健康组织中存在细菌这一现象。近年来, 研究者不断地从不同的植物, 不同的器官和组织中分离到越来越多的内生细菌, 并对其同一性、多样性及种群动态和可能的生物学作用进行了研究, 由此推动了植物是复杂微生态系统这一理论的发展。

1.1.1 植物内生细菌的种类及其寄主植物 现在已研究的植物微生态系统涉及植物约 30 种, 其中包括小麦、高粱、水稻、棉花及土豆、番茄、黄瓜、甜菜和柠檬等; 内生细菌有革兰氏阴性杆菌和革兰氏阳性菌约 50 个属。其中研究得比较系统的有棉花、甜玉米, 土豆^[3]和柠檬^[3], 特别是对棉花、甜玉米和柠檬内生细菌进行的系统调查表明了植物微生态系统的生物多样性, 大大拓宽了内生细菌的分类范围, 并发现了内生细菌的新的分类单位, 如金杆菌属(*Aureobacterium* sp.)的一个种, 栖稻黄色单胞菌(*Flavimonas oryzihabitans*)、黄色氢噬胞菌(*Hydrogenophaga flava*)、蛾微杆菌(*Microbacterium imperiale*)和人苍白杆菌(*Ochrobactrum arthropi*)等。

人们不仅从不同植物上分离了内生细菌, 而且植物的分离部位也趋于多样化。目前对多种健康植物组织的不同器官中的内生细菌都进行了研究。已从黄瓜、甜菜根、花生果仁、百慕大草的茎、土豆的块茎、种子和胚珠、棉花的胚根、未开的花及棉铃和水稻叶子(未发表)及其它植物的贮藏器官都分离到大量内生细菌^[4]。

1.1.2 植物内生细菌的来源及进入途径 有关内生细菌的来源有两种假说, 一种是 Mundt 的观点。他分离了 27 种不同植物种子和胚珠中的内生细菌, 这些内生细菌涉及 19 个属 46 个种, 其中 8 个属, 31 个种分离频率很高, 并认为它们来源于植物的表面。另一种假说是内生细菌来源于根际, 并从此进入植物组织内部^[5]。过去报道的土壤中普遍存在的内生细菌种类包括芽孢杆菌

国家自然科学基金和农业部九五重点项目资助

* 现在北京大学生命科学学院工作

1997-05-24 收稿

属(*Bacillus*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)及棒状杆菌群的纤维单胞菌属(*Cellulomonas*)和节杆菌属(*Arthrobacter*)等。对棉花和甜玉米的内生细菌调查也发现两种植物根部和茎部栖息着许多相同分类单位的细菌,而且根中的细菌数量大于茎中。大部分分类单位与土壤中常见的细菌相同,进一步证明这些内生细菌起源于根际,并由此进入植物组织内^[5]。

Kluepfel总结了细菌进入植物的一般途径。他认为细菌是通过自然开口和伤口进入植物的^[6]。自然开口通常包括侧生根发生处、气孔、水孔;伤口则包括土壤对根的磨损,病虫对植物的损害及收割多年生植物造成的几类伤口。研究者在对内生细菌研究的过程中发现,细菌可以通过维管束系统进入种子,也可以通过禾谷类花粉通道,成熟种子的种脐、种皮的裂缝开口、种壳、种皮背部索状细胞和种脊进入种子^[7],或能够通过次生根进入分生组织^[8],通过叶表吐水孔的水液进入叶内^[9]。

1.1.3 内生细菌在植物组织中的存在方式 在不同的植物中存在着不同的栖息者,它们的特征各不相同,但都可称为“与植物联合的微群落”^[10]。按照Lynch观点,将内生细菌的存在方式归于四组概念进行描述:依赖性(专性、兼性),耐耐性(持久、暂时),专一性(专一性、非专一性),定位(外部、内部)^[11]。目前内生细菌中如假单胞菌属(*Pseudomonas*)、肠杆菌属、沙雷氏菌属(*Serratia*)、产碱菌属(*Alcaligenes*)、志贺氏菌属(*Shigella*)和柠檬细菌属(*Citrobacter*)等及革兰氏阳性细菌的一些属都属于兼性内生,它们不仅存在于植物的内部,而且也常见于土壤。红苍白草螺菌(*Herbaspirillum rubrisubalbicans*)或织片草螺菌(*H. seropedicae*)只能生活在高粱和甘蔗等作物组织内^[12],它们属于只存在于植物内部而在植物根际无法分离到的专性内生细菌。植物内生细菌可以永久存在于植物组织内,也可以在整个生育期内只存在一段时间。甜菜中的腐烂棒杆菌(*Clavibacter sepedonicum*)存在于整个生活史中^[13],作者分离的水稻内生细菌成团肠杆菌(*E. agglomerans*)也能够在水稻整个生活史中存在(未发表),而大部分的内生细菌只存在于植物生活史中的部分生长时期。在内生细菌的研究中,人们还发现有些内生细菌可以存在于多种寄主中,而有些内

生细菌只存在单一寄主中。基于与寄主的亲和关系,可将内生细菌划分为专一性、非专一性两类。大部分内生细菌属于非专一性。荧光假单胞菌可以从菜豆^[14]、小麦、蕃茄、柠檬^[3]、甜菜^[15]和玉米^[2]上分离到,成团肠杆菌也可以从玉米、柠檬、黄瓜、土豆上分离到。而重氮营养醋杆菌(*Acetobacter*)只存在于甘蔗中^[16]。

1.2 植物内生细菌的植物病理学研究 该方面的研究目的在于分离内生细菌,鉴定其致病性,阻止其进入周围环境。首先从无病症或非寄主的健康植物上分离内生细菌,之后进行敏感性实验。通过制造人工伤口使植物处于感受态,接种分离物,并在模式植物如烟草上进行同样的实验。当第一例病症出现时,立即从受害的组织中重新分离导入的细菌,估计其致病性;或用寄主来源的菌种接种($10^6\sim 10^8$ 细胞/每植株)寄主,并使寄主生长在非生物的胁迫条件下,使其自身防御机能处于最弱状态,有助于病症产生。植物病理学方面的研究仍认为植物内生细菌是一种潜在的病原菌,它对于无病症寄主和感病寄主而言仍存在一定威胁。当在无病症的健康植物组织中存在的内生休眠病原菌偶然遇到突然恶劣的环境或外界微生物的干扰时,内生病原菌能够重新活动,引起寄主产生病害^[17]。

2 植物内生细菌可能的生物学作用

一般认为,植物内生细菌作为植物微生态系统中的天然组成成分,它们的存在可能促进了寄主植物对环境的适应,加强了系统的生态平衡^[10]。虽然对细菌在植物组织内的生物学作用还缺乏了解,但是许多内生细菌已作为生物防治剂、固氮菌剂和植物促生制剂广泛应用于实验室、温室和大田。

2.1 植物内生细菌与生物防治 Andrews综述了内生菌(包括真菌、细菌)作为生物防治剂的优点。他认为植物内生细菌可以系统地分布于植物组织内,并有足够的碳源、氮源,而且受到植物组织的保护,比暴露于恶劣环境(强烈的日光、紫外线、暴风雨等)的附生细菌更具有稳定的生存环境,易于发挥作用^[18]。

2.1.1 外源基因载体 Kostka将BT基因构建于内生细菌木质根状杆菌犬齿亚种(*C. xyli* subsp. *cydontis*)中进行玉米螟害虫生物防治^[18]。由于此实验的成功,许多研究者都认为植物内生细菌是一个很好的外源基因载体。Maffee等已应用来自棉花的非病原性内生细菌作为BT杀虫基因载体防治棉花蚜虫(*Heliothis*

virescens) 和玉米茎蛀虫 (*Elasmopalpus lignosellus*)^[14]。

2.1.2 植物保护剂 Chen 等用来自棉花的内生细菌回接棉花, 可以减轻人工接种感染的棉花枯萎病症状^[19], Sayonara 用分离自羽衣甘蓝、白菜、萝卜和花椰菜叶子中的 8 种内生细菌喷雾处理羽衣甘蓝叶子, 发现它们可以不同程度地减缓植物黑腐病病症^[20]。作者用来自水稻的内生细菌喷雾处理水稻叶子, 同样可以抑制人工接种水稻白叶枯病症的发展(未发表)。

植物内生细菌在病害防治上的应用刚刚起步, 应大力加强这方面的应用基础研究。

2.2 植物内生细菌与固氮作用 迄今为止, 使人们十分感兴趣的是内生细菌的固氮作用。在联合固氮的研究中, 已发现许多根际固氮菌都可以进入根内, 起到联合固氮作用。如粪产碱菌 (*A. faecalis*)^[21]、产酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella oxytoca*), 阴沟肠杆菌 (*E. cloacae*)^[22]、固氮螺菌 (*Azospirillum*)^[23]等都能存在于水稻根的皮层和维管组织中。近年来, 随着对内生细菌的深入研究, 内生固氮菌不断地分离出来, 特别是对专性内生固氮菌作用的研究表明, 内生固氮菌对植物有一定的氮素贡献。来自甘蔗的草螺菌^[24], 重氮营养醋杆菌, 可以利用甘蔗中的碳源进行代谢, 固定大气中的氮气, 提供甘蔗可利用的氮源^[25]。

2.3 植物内生细菌与植物促生作用 正如植物根际促生细菌一样, 植物内生细菌也可以产生植物促生物质, 直接促进植物生长。如从墨西哥分离到的 18 株重氮营养醋杆菌都能产生生长素, 表明重氮营养醋杆菌在与植物相互作用中不仅固氮, 而且可以直接作用于植物的代谢, 促进植物生长^[26]。同时, 内生菌也能够通过与病原菌竞争营养和空间或直接产生拮抗物质而抑制病原菌, 起到间接促生作用。如分自橡树的内生细菌, 有些能够产生抗生素或产生几丁质酶抑制病原菌^[27], 而分自土豆的某些内生细菌能够产生抑菌物质抑制一种引起马铃薯坏腐病的病原菌 (*C. michiganense* subsp. *sepedonicum*) 而间接促进植物生长^[28]。

3 植物内生细菌研究中值得探讨的问题及应用前景

在研究内生细菌的过程中, 特别是在研究方法和手段方面仍存在一些问题: a. 内生细菌的分离: 灭菌过轻或过重, 都会造成对植物内生细菌调查准确性的影响。前者会扩大植物内生细菌的生物多样性, 而后者会

导致许多内生细菌的丢失; b. 需要寻找一个切实可行的内生细菌标记和检测系统, 才有利于其功能的研究; c. 内生细菌在寄主植物中的数量是否足以保证其发挥生物学作用。现行对植物内生细菌的数量估计依赖于培养基, 用哪些培养基才能反映内生细菌在寄主组织中的真实数量, 尚需探讨; d. 植物内生细菌如何与植物相互作用而行使其生物学功能, 其机制尚待研究。

随着现代科技的发展, 农业机械化程度提高, 促使农田耕作方式单一化。化肥、农药的大量使用, 造成环境污染致使农业生态系统中生物多样性下降。而植物内生细菌由于其与寄主植物在长期共同进化过程中形成密切的相互关系, 且生存微环境稳定, 成为化肥、农药和其它微生态制剂的最佳竞争者, 它的合理应用将减少化学药剂造成的环境污染, 提高农田生态系统的生物多样性, 有利于保持生态平衡, 因此植物内生细菌的应用具有广阔的前景。

参 考 文 献

- [1] Kloepper J W, Beauchamp C J. Can J Microbiol, 1992, 38:1219~123.
- [2] Fisher P J, Scott H M. New Phytol, 1992, 122: 299~305.
- [3] Gardner J M, Chandler J A, Feldman A W. Plant soil, 1982, 86:333~345.
- [4] McInroy J A, Kloepper J W. Plant and soil, 1995, 173:337~342.
- [5] McInroy J A, Koepper J W. In Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms. F O' Gara, D. N. Dowling, B. Boesteren (Eds). 1994, 19~28.
- [6] Kluepfel D A. Annu Rev Phytopathol, 1993, 31: 441~472.
- [7] Zaumeyer W J. Phytopathology, 1929, 19:96.
- [8] Hollis J P. Phytopathol, 1951, 41:350~306.
- [9] Bald J G. Am J Bot, 1952, 39:97~99.
- [10] Fiore S D, Gallo M D. In "Azospirillam VI and related microorganisms. Istvan Fendrik et al (Eds). Springer. 1995, 169~187.
- [11] Lynch J M, Fletcher M, Latham M J. In "Mycelial Ecology A Conceptual approach". Lynch J M, Poole N J (eds) Black well Scientific Publications, 1979, 171~189.
- [12] Bugbee W M, Gudmestad N C, Secor G A. et al. Phytopathology, 1987, 77:765~770.
- [13] Baldani V L D, Baldani J I, Olivares F Dobereiner.

- Symbiosis, 1992, 13:65~73.
- [14] Mahaffee W F, Kloepper J W, Van Vuurde J W L, et al. In "Improving plant productivity with rhizosphere bacteria". Ryder M H, Stephens P M, Bowen G D (eds). CSIRO, Australia, 1994, 180.
- [15] Jacobs M J, Bugbee W M, Gabrilson D A. Can J Bot, 1985, 3:1262~1265.
- [16] Reis V M, Olivares F, Dobereiner J. World J of Appl Microbiol and Biotech, 1994, 10:101~104.
- [17] Misaghi I J. Phytopathol, 1990, 80:808~811.
- [18] Andrews J H. Ann Rev Phytopathol, 1992, 30:603~635.
- [19] Chen C, Banske E M, Mussen G, Klepper J W. In "Improving plant productivity with rhizosphere bacteria" Ryder M H, Stephens P M, Bowen G D (eds). CSIRO, Australia, 1994, 191~193.
- [20] Sayonara M P Assis, Rosa L R Mariano, Sami J Michereff et al. In Advances in Biological Control of Plant Diseases Tang Wenhua, R James Cook, Albest Rovira (Eds). China Agricultural University Pressing. 1996, 347~353.
- [21] You C B, Zhou F Y. Can J Microbiology, 1989, 35: 403~408.
- [22] 王继文. 水稻联合固氮, 北京: 农业出版社, 1990, 296~304.
- [23] Patriquin D G, Dobereiner J, Jain D K. Can J Microbiol, 1983, 29:900~915.
- [24] Boddey R M, Dobereiner J. In: Okon Y(ed) Azospirillum / plant associations, CRC press, Boca Raton, London, 1994, 119~135.
- [25] Bodder U S, Reis V D. In Dolsinelli M Materrassi R, Vincenzini M (eds), Nitrogen Fixation kluwer Academic Publishers Dordsecht, 1991, 105~111.
- [26] Dobereiner J. Symbiosis, 1992, 13:1~13.
- [27] Brooks D S, Gonzalez, C F, Appel D N. (abstract) Phytopathol, 1988, 78:626.
- [28] Van Buren Ars, Andre C, Ishimaru C A. (abstract) Phytopathol, 1993, 83:1406.