

茶树中内生菌的动态分布

游见明

(四川理工学院 生物工程系, 四川 自贡 643000)

摘要: 从茶树的根、茎、叶中分离得到 143 株内生真菌, 经显微形态特征观察鉴定为 14 个属, 其中根部 62 株涉及 11 个属, 茎部 55 株涉及 9 个属, 叶部 26 株涉及 6 个属。结果表明, 茶树的的不同部位内生真菌的数量、分布和种群存有差异。

关键词: 茶树; 内生真菌; 多样性; 优势菌群

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2008)01-0082-04

Dynamic distributes of endophytic fungi from *Camellia sinensis*

YOU Jian-Ming

(Department of Bioengineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China)

Abstract: 143 strains of endophytic fungi belonging to 14 genera were isolated and morphologically identified from the roots, stems and leaves of tea. Among which 62 strains of 11 genera were isolated from roots, 55 strains of 9 genera from stems, and 26 strains of 6 genera from leaves. The results showed that the quantity, population, and distribution of the endophytic fungi varied in different part of the plant *Camellia sinensis*.

Key words: *Camellia sinensis*; endophytic fungi; diversity; dominant genera

在正常生长的植物体内, 通常定殖着一些真菌, 它们与植物体建立了和谐的关系, 植物体为真菌提供营养及稳定的生活环境; 真菌通过代谢活动, 产生一些物质, 如某些次生代谢物使植物体获得较非感染植株具有更强的对环境胁迫的抵抗能力(王万能等, 2005; 杨春平等, 2005; Strobel, 2003; Wilson, 1995); 这类寄生于正常生长植物体内的真菌就是内生真菌(endophytic fungi)。内生菌在某些植株上还会产生和该植物相似的生理活性物质(曾松荣等, 2000; 王伟等, 1999; 李海燕等, 1999a, b)。内生真菌在植物体内是普遍存在的。目前, 有关植物内生菌生物学、生理生态学、次生产物化学的研究日益增多(邹文欣等, 2001), 显示了内生菌具有重要的研究意义与广泛的应用前景。

茶树(*Camellia sinensis*), 常绿灌木, 原产中国, 在中国至少有 2 500 年的栽培历史。茶叶内含有咖啡碱、茶碱、可可碱、有机酸、杀菌物质等, 具有兴奋解倦、益思少睡、消食去痰、解毒止渴、利尿明目、增

加营养等功效, 因而是日常主要饮料之一(安徽农学院, 1993)。就茶树内生真菌的研究少见报道, 本文就茶树内生真菌的动态分布情况作了初步研究, 着重考察了在茶叶出产时节(3 月中旬至 9 月)的优势菌群, 为进一步评价内生真菌对茶叶品质形成的影响等工作奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

茶树品种: 早白尖 5 号无性系 5 年生健壮植株; 采样时间: 2005 年 3 月 12 日、5 月 8 日、7 月 15 日、9 月 22 日; 采集地: 四川省自贡市荣县五通农场茶园(海拔 715 m); 采样方法: 在不同植株上随机剪取 30 cm 左右长度的带叶或不带叶茎段、根; 样品用无菌塑料保鲜袋密封保湿, 所有样品在 5 h 内进行内生菌的分离实验。

1.2 培养基

(1) WA- 抗生素培养基: 琼脂 20 g, 氨苄青霉素 200

收稿日期: 2006-06-29 修回日期: 2006-12-13

作者简介: 游见明(1966-), 男, 四川自贡人, 硕士, 从事生物技术教学和科研等工作。

mg, 链霉素 200 mg, 水 1 000 mL(周俊辉等, 2005)。(2)马铃薯培养基: 马铃薯 200 g; 葡萄糖 10 g; 琼脂 20 g; 水 1 000 mL; pH 自然。(3)查氏培养基: NaCO₃ 2 g; KCl 0.5 g; FeSO₄ 0.01 g; K₂HPO₄ 1.0 g; MgSO₄ 0.5 g; 蔗糖 30 g; 琼脂 20 g; 水 1 000 mL; pH 自然。

1.3 方法

1.3.1 材料消毒 根、茎刮去外表皮, 自来水冲洗→剪成 2.5 cm 小段; 叶片切成 3 cm 方块→75%乙醇漂洗 30 s→无菌水冲洗→0.1%升汞漂洗 3 min→无菌水冲洗。经消毒后, 无菌条件下将茎、根剪去两端, 取中央 0.5 cm 左右小段作定植用; 叶片剪去四周边沿, 取中央 2 cm 方块作为定植用。

1.3.2 内生真菌分离 消毒、剪切好的样品接到 WA-抗生素平板上, 28±1 °C 培养 2~8 d。待菌丝从切口处长出后, 及时转入 PDA 培养基培养; 采用菌丝顶端纯化法, 在查氏纯培养上获得纯培养菌落。

1.4 内生真菌初步鉴定

根据菌落表面形态、大小、颜色、质地、生长速度、边缘形态, 结合光学显微镜观察孢子形态、产孢结构、菌丝颜色及有无横隔等微观特征, 据相关资料进行菌株鉴定(魏景超, 1982; 邵力平等, 1984; 中国科学院微生物研究所, 1978; 巴尼特等, 1979), 鉴定到属。少数菌落由于无明显产孢结构或不产孢子而未鉴定出, 归为未知菌。

表 1 茶树内生真菌总株数

Table 1 Overall endophytic fungi from *Camellia sinensis*

时间 Time	根 Root	茎 Stem	叶 Leaf	合计 Total
3 月	18	17	8	43
5 月	16	14	7	37
7 月	13	11	5	29
9 月	15	13	6	34

2 结果与分析

2.1 茶树内生真菌组成

从分离到的菌株统计结果看, 茶树的内生真菌具多样性, 其数量和种类随样品采集时间、植株的部位不同而变化(表 1)。根据这些菌株的形态特征, 初步鉴定分属于 14 个类群(表 2)。大多内生真菌可定到属, 同时在 PDA 培养基上人工培养条件下, 部分菌株无明显的产孢结构或不产生分生孢子, 只能依据菌丝与菌落形态特征进行初步鉴定(Gambo

等, 2001)。

从分离的实验结果来看, 在茶树中分离到的 14 个类群的内生真菌中, 许多类群包含不止一种真菌, 如丛赤壳属(*Nectria* sp.), 表明茶树的内生真菌同其他植物的内生真菌一样具多样性(邹文欣等, 2001; Anordl 等, 2000)。

表 2 茶树内生真菌种类

Table 2 Species of endophytic fungi in *Camellia sinensis*

属 Genus	种类 Species
毛壳霉属	<i>Chaetomium</i> sp.
毛盘孢属	<i>Colletotrichum</i> spp.
毛霉属	<i>Mucor</i> sp.
木霉属	<i>Trichoderma</i> sp.
丛赤壳属	<i>Nectria</i> sp.
曲霉属	<i>Aspergillus</i> sp.
卵孢霉属	<i>Oospora</i> sp.
青霉属	<i>Penicillium</i> sp.
枝霉属	<i>Thamnidium</i> sp.
绿色木霉	<i>Trichoderma viride</i>
假丝酵母属	<i>Candida</i> sp.
链格孢属	<i>Alternaria</i> sp.
瘤座霉属	<i>Tubercularia</i> sp.
镰刀霉属	<i>Fusarium</i> spp.
未知菌	

2.2 内生真菌在茶树中的分布

比较同时期样品内生菌情况可以发现: 茶树不同部位内生真菌的分布存在差异, 有各自的优势菌群。总起来看, 根部内生真菌在种类与数量上较为丰富。各部位具体情况见表 3(表中: 占总菌株数的比例=该部位分离到的菌株数/该次采样分离的总菌株数×100%; 种类出现率=该部位分离到的菌株的种类数/分离到的总的种类数×100%)。

表 4 是同一菌群在茶树不同部位 4 次采样中总的出现率(=某菌群在某部位四次出现总数/该部位四次分离到菌株的总的种类数×100%)。结果表明: 同一种菌群在不同部位并不平均分布, 即存在部位特异性。如根中的优势菌群主要是镰刀霉属(*Fusarium* spp.)、丛赤壳属(*Nectria* sp.); 而茎中主要是木霉属(*Trichoderma* sp.); 叶中主要是链格孢属(*Alternaria* sp.)等。

2.3 茶树内生真菌分布随季节的变化

在 3 月、5 月、7 月、9 月份的样品内生真菌在数量与种类上也存在着差别(表 5)。

3 月、5 月份茶树内生真菌的检出率较高, 7 月份(夏季)内生真菌的检出率相对较低, 原因可能有二: ①由于 7~8 月份, 正至川南雨季时节, 气温较

高,各种霉菌大量繁殖,从而抑制和干扰了内生真菌的生长。②在高温多湿条件下,茶树生长较旺盛,在内生菌定植的速度一定时,分离检出率必然受影响。虽然不同季节茶树内生真菌的检出率有所不同,但内生真菌在种类上绝大部分一致,表明这些内生真菌存在于茶树体内已达到相对稳定,多数可在植株整个生长过程中保存下去(宋子红等,1999)。

表3 不同部位内生真菌随季节而变化的情况比较

Table 3 Comparison of the endophytic fungi in different plant positions as season changes

部位及时间 Position and time	菌株数 Strains	属数 No. of genus	占总菌株 数的比例 Percent (%)	种类出现 率(%) Percent
3月 March	根 Root	18	41.86	71.43
	茎 Stem	17	39.53	64.29
	叶 Leaf	8	18.60	42.86
5月 May	根 Root	16	43.24	64.29
	茎 Stem	14	32.56	64.29
	叶 Leaf	7	16.28	42.86
7月 July	根 Root	13	44.83	78.57
	茎 Stem	11	37.93	42.86
	叶 Leaf	5	17.24	28.57
9月 September	根 Root	15	44.12	78.57
	茎 Stem	13	38.24	50.00
	叶 Leaf	6	17.65	35.71

3 小结与讨论

(1)对茶树内生菌进行分离培养的结果表明:寄生于茶树的真菌种类较多,它们在茶树中的分布具有部位特异性和随季节变化而变化的特性,即存在优势种类现象。内生真菌与植物相互协调生活,形成共生关系,内生菌种类和数量常与植物生长的年限及所处的环境条件有一定关系(Guo,2001);这反映出,茶树体内寄生的不同的内生菌所占据的生态位不同,因此,其分布受到各种环境因子的影响。

不同季节采摘的茶叶,其成分品质存在一定的差异,这种差异除了与茶树生长的环境因素变化有关外,结合本次实验关于茶树内生菌分布特征的结果,这种差异是否与茶树内生菌优势菌群在不同季节的分布变化存在某种关系?是怎样的关系?这些问题的解答有待于进一步的实验。

(2)涉及茶树内生真菌的培养过程,在培养基的选择中忽略了内生真菌对茶树的特异性,因而分离出来的种类可能仅仅只是茶树所带有的所有内生菌中的一部分,可能有部分实际上在茶树体内的内生真菌在本文中没有被分离出来,如果改变培养条件,

这些内生菌可能会被发现。这也是需培养方法(culture-dependent)分离内生菌面临的问题;因此本次实验所得到的对于茶树内生真菌分布的认识可能还处于比较局部、不够客观和全面的状况。

表4 茶树不同部位内生菌优势菌群的出现率(%)

Table 4 Occurrence rate of the dominant genera in different positions of *Camellia sinensis*

属 Genus	根 Root	叶 Leaf	茎 Stem
毛壳霉属 <i>Chaetomium</i> sp.	14.63	0.00	0.00
毛盘孢属 <i>Colletotrichum</i> spp.	17.07	12.90	14.29
毛霉属 <i>Mucor</i> sp.	12.20	19.35	0.00
木霉属 <i>Trichoderma</i> sp.	14.63	25.81	0.00
丛赤壳属 <i>Nectria</i> sp.	21.95	16.13	0.00
曲霉属 <i>Aspergillus</i> sp.	0.00	9.68	9.52
卵孢霉属 <i>Oospora</i> sp.	2.44	22.58	0.00
青霉属 <i>Penicillium</i> sp.	4.88	16.13	4.76
枝霉属 <i>Thamnidium</i> sp.	12.20	0.00	19.05
绿色木霉 <i>Trichoderma viride</i>	9.76	9.68	0.00
假丝酵母属 <i>Candida</i> sp.	4.88	6.45	28.57
链格孢属 <i>Alternaria</i> sp.	0.00	19.35	38.10
瘤座霉属 <i>Tubercularia</i> sp.	9.76	0.00	0.00
镰刀霉属 <i>Fusarium</i> spp.	24.39	19.35	9.52

表5 不同季节的茶树内生菌比较

Table 5 Comparison of the endophytic fungi from *Camellia sinensis* at different seasons

时间 Time	部位 Position	菌株数 Strains	属数 No. of genus
3月 March	根 Root	18	10
	茎 Stem	17	9
	叶 Leaf	8	6
5月 May	根 Root	16	9
	茎 Stem	14	9
	叶 Leaf	7	6
7月 July	根 Root	13	11
	茎 Stem	11	6
	叶 Leaf	5	4
9月 September	根 Root	15	11
	茎 Stem	13	7
	叶 Leaf	6	5

在需培养方法基础上结合非培养方法(culture-independent)。一方面在尽可能接近茶树的真实生境条件下来分离培养茶树的内生菌,最大限度的分离其所带有的菌株类型;另一方面,借助基于分子生物学基础上产生的微生物种群检测技术,对茶树内生菌进行检测,从而更加客观地反映茶树内生真菌变化的真实面貌,这是评价内生菌对茶树生理的影响、对茶叶品质特征形成的影响等工作的基础。

参考文献:

中国科学院微生物研究所. 1978. 常见与常用真菌[M]. 北京:

- 科学出版社
- (美)巴尼特 H L, 亨特 B B, 沈崇尧(译). 1979. 半知菌属图解(第 3 版)[M]. 北京: 科学出版社
- 安徽农学院. 1993. 制茶学(第 2 版)[M]. 北京: 农业出版社
- 邵力平, 沈瑞祥, 张素轩, 等. 1984. 真菌分类学[M]. 北京: 中国林业出版社
- 曾松荣, 徐成东, 王海坤, 等. 2000. 药用植物内生真菌及其宿主相同活性成分的机制探讨[J]. 中草药, 31(4): 306—308
- 魏景超. 1982. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社
- Anorld A E, Maynard Z, Gilbert G S, et al. 2000. Are tropical Fungal endophytes hyperdiverse? [J]. *Ecol Letters*, (3): 267—274
- Gamboa M A, Bayman P. 2001. Communities of endophytic fungi in leaves of a tropical timber tree(*Guarea guidonia*)[J]. *Biotropica*, 33: 352—360
- Guo LD. 2001. Advances of researches on endophytic fungi[J]. *Mycosystema*, 20(1): 148—152
- Li HY(李海燕), Wang ZJ(王志军), Zhang LQ(张玲琪), et al. 1999a. Isolation of an endophytic fungus associated with *Sinopodophyllum emodi*(一种桃儿七内生真菌的分离初报)[J]. *J Yunnan Univ*(云南大学学报), 21(3): 243
- Li HY(李海燕), Zeng SR(曾松荣), Zhang LQ(张玲琪). 1999b. The diversity of the endophytic fungi isolated from the underground stems of *Podophyllum hexandrum* and the selection of a valuable isolate(云南桃儿七地下茎内生真菌多样性及有价值菌株的筛选)[J]. *Southwest China J Agric Sci*(西南农业学报), 12(4): 123—125
- Song ZH(宋子红), Ding LX(丁立孝), Ma BJ(马伯军), et al. 1999. Studies on the population and dynamic analysis of peanut endophytes(花生内生菌的种群及动态分析)[J]. *Acta Phyto-phyl Sin*(植物保护学报), 26(4): 309—314
- Strobel G A. 2003. Endophytes as sources of bioactive products [J]. *Microbes Infect*, 5(6): 535—544
- Wang W(王伟), He XL(贺雄雷), Zhong YC(钟英长). 1999. Isolation of endophytic fungi from *Taxus chinensis* var. *maireri* and Preliminary identification of taxane products(南方红豆杉内生真菌及紫杉烷产物的初步鉴定)[J]. *Acta Sci Nat Univ Sunyatseni*(中山大学学报·自然科学版), 38(3): 116—118
- Wang WN(王万能), Quan XJ(全学军), Xie YY(谢应宇). 2005. Biological control of plant diseases and micro-ecology(植物病害生物防治与微生物生态学)[J]. *China Plant Protection*(中国植保导刊), 25(3): 7—9
- Wilson D. 1995. Endophyte the evolution of a term, a clarification of its use and definition[J]. *Oikos*, 73: 274—276
- Yang CP(杨春平), Chen HB(陈华保), Wu WJ(吴文军), et al. 2005. Diversity of plant endophytic fungi secondary metabolites and their potential applications(植物内生真菌次生代谢产物的多样性及潜在应用价值)[J]. *Acta Agric Boreali-Occident Sin*(西北农业学报), 14(2): 126—132
- Zhou JH(周俊辉), Yang MX(杨妙贤), Li CX(李春霞), et al. 2005. Studies on contamination control by adding antibiotics into medium in stem culture of *Dief fenbuchia amoena* cv. Camill(在培养基中加入抗生素防止万年青茎段培养污染的研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), 25(3): 233—235
- Zou WX(邹文欣), Tan RX(谭仁祥). 2001. Recent advances on endophyte research(植物内生菌研究新进展)[J]. *J Integrative Plant Biol*(植物学报), 43(9): 881—892
- angensis seedlings[J]. *Chin J Appl Environ Biol*(应用与环境生物学学报), 10(3): 281—285.
- Poulson TL, Platt WJ. 1989. Gap light regimes influence canopy tree diversity[J]. *Ecol*, 70: 553—555
- Qi ZM(齐泽民), Wang KY(王开运), Yang WQ(杨万勤), et al. 2004. Ecological studies on bamboo(*Fargesia*)communitie(川西箭竹群落生态学研究)[J]. *World Sci-Tech R & D*(世界科技研究与发展), (2): 73—78
- Shen GZ(申国珍), Li JQ(李俊清), Jiang SW(蒋仕伟). 2004. Structure and dynamics of subalpine forests in giant panda habitat(大熊猫栖息地亚高山针叶林结构和动态特征)[J]. *Acta Ecol Sin*(生态学报), 24(6): 1 294—1 299
- Song LX(宋利霞), Tao JP(陶建平), Wang W(王微), et al. 2006. The ramet population structures of the clonal bamboo *Fargesia nitida* in different canopy conditions of subalpine dark coniferous forest in Wolong Nature Reserve, China(卧龙亚高山暗针叶林不同林冠环境下华西箭竹分株种群结构特征)[J]. *Acta Ecol Sin*(生态学报), 26(3): 730—736
- Tabarelli M, Mantovani W. 2000. Gap-phase regeneration in a tropical montane forest; the effects of gap structure and bamboo species[J]. *Plant Ecol*, 148(2): 149—155
- Taylor A H, Qin ZS. 1989. Structure and composition of selectively cut and uncut *Abies-Tsuga* forest in Wolong Natural Reserve and implications for panda conservation in China[J]. *Biol Conservation*, 47: 83—108
- Taylor A H, Jiang SW, Zhao LJ, et al. 2006. Regeneration patterns and tree species coexistence in old-growth *Abies-Picea* forests in southwestern China[J]. *For Ecol Man*, 223: 303—317
- van der Meer P J, Sterck F J, Bongers F. 1998. Tree seedling performance in canopy gaps in a tropical rain forest at Nouragues, French Guiana[J]. *J Trop Ecol*, 14(2): 119—137
- Wang W(王微), Tao JP(陶建平), Li ZF(李宗峰), et al. 2004. Gap features of subalpine dark coniferous forest in Wolong Nature Reserve(卧龙自然保护区亚高山暗针叶林林隙特征研究)[J]. *Chin J Appl Ecol*(应用生态学报), 15(11): 1 989—1 993
- Whitmore T C. 1989. Changes over twenty-one years in the Kolombangara rain forest[J]. *J Ecol*, 77: 469—483
- Wu N(吴宁). 1999. Dynamics of forests gap in subalpine coniferous forest on the eastern of Gongga Mountain(贡嘎山东坡亚高山针叶林的林窗动态研究)[J]. *Acta Phytoecol Sin*(植物生态学报), 23(3): 228—237
- Xia B(夏冰), Lan T(兰涛), He SA(贺善安), et al. 1996. Canopy gaps in subalpine spruce-fir forests of the hills around Bitahai Lake, Yunnan Province(云南亚高山云冷杉林林窗的研究)[J]. *J Plant Res Environ*(植物资源与环境), 5(4): 1—8
- Zang RG(臧润国), Xu HC(徐化成). 1998. Disturbance of gap regeneration dynamics(林隙干扰研究进展)[J]. *Sci Silv Sin*(林业科学), 34(1): 90—97

(上接第 56 页 Continue from page 56)