

香竹箐栽培型古茶树内生真菌对植物病原真菌的拮抗活性*

陈建英¹, 陈肖学¹, 罗旭璐¹, 杨崇仁², 张颖君²,
李绍忠³, 江鸿建⁴, 赵平^{1**}

(1. 西南林业大学, 西南地区林业生物质资源高效利用国家林业和草原局重点实验室, 云南 昆明 650224;

2. 中国科学院昆明植物研究所, 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 云南 昆明 650201;

3. 凤庆县茶叶办公室, 云南 凤庆 675900; 4. 临沧市茶叶办公室, 云南 临沧 677000)

摘要:【目的】了解香竹箐栽培古茶树内生真菌对植物病原真菌的拮抗活性。【方法】采用尖端菌丝纯化法分离内生真菌, 并结合形态学和分子生物学方法对内生真菌进行鉴定, 采用五点对峙培养法筛选对供试病原真菌具有拮抗活性的内生真菌菌株, 对具有较强活性的菌株进行分类地位归属。【结果】从香竹箐栽培古茶树枝叶中共分离纯化出 308 株内生真菌, 归属于 61 个形态型。病原真菌拮抗试验结果显示: 有 18 株内生真菌对 4 种以上供试菌的抑制率大于 50%, 分别隶属于 2 门 3 纲 10 目 13 科 14 属。有 13 株对至少 1 种供试菌的抑制率大于 75%, 有 9 株对 5 种供试菌的抑制率均大于 50%。其中, 菌株 Ct-BC40、Ct-BC72 和 Ct-LP113 对 5 种供试菌的抑制率达 80% 以上, 属强拮抗菌株。【结论】香竹箐栽培古茶树内生真菌中广泛分布着抑菌活性菌株, 占分离菌株总数的 96% 以上, 且抗菌活性、种属分布具有多样性。

关键词: 栽培古茶树; 内生真菌; 植物病原真菌; 拮抗活性

中图分类号: S 476.1; S 571.1

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X(2020)03-0422-08

The Phytopathogenic Antagonistic Activity of Endophytic Fungi from Xiangzhuqing Ancient Cultivated Tea

CHEN Jianying¹, CHEN Xiaoxue¹, LUO Xulu¹, YANG Chongren², ZHANG Yingjun²,
LI Shaozhong³, JIANG Hongjian⁴, ZHAO Ping¹

(1. Key Laboratory of State Forestry and Grassland Administration on Highly-Efficient Utilization of Forestry Biomass resources in Southwest China, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China; 2. State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China; 3. Tea Administration Office of the Government of Fengqing County, Fengqing 675900, China; 4. Tea Administration Office of the Government of Lincang City, Lincang 677000, China)

Abstract: [Purpose] In this study, the antagonistic activity of the endophytic fungi from Xiangzhuqing ancient cultivated tea against phytopathogenic fungi was investigated. [Method] Endophytic fungi were isolated by mycelium cusp purification, and identified by morphological and molecular

收稿日期: 2018-08-17

修回日期: 2019-10-11

网络首发时间: 2020-06-19 14:54:40

*基金项目: 国家自然科学基金项目(31470429); 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室开放基金项目(P2017-KF10); 西南林业大学科技创新基金项目(Z17004, Z17005)。

作者简介: 陈建英(1995—), 女, 云南宁蒗人, 本科生, 主要从事天然产物化学研究。

E-mail: 1829147610@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 赵平(1965—), 男, 重庆人, 博士, 研究员, 主要从事天然产物化学研究。E-mail: hypzhao@yahoo.com

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20200619.0910.002.html>



biological methods. The active isolates were screened by five-point confrontation culture method and clarify their taxonomic status. [Result] 308 of endophytic fungi were isolated from the branches and leaves of the title plant, which belonged to 61 morphological types. The results showed that the inhibition rates of 18 active endophytic fungi belonging to 2 phylum, 3 classes, 10 orders, 13 families and 14 genera were above 50% against more than 4 species of tested pathogenic fungi. The inhibition rates of 13 isolates against at least one species of tested pathogenic fungi were more than 75%, and those of 9 isolates against 5 species of tested pathogenic fungi were over 50%. Of which, there are three strains Ct-BC40, Ct-BC72 and Ct-LP113 that had an inhibitory rate of more than 80% on 5 species of tested pathogenic fungi, respectively. [Conclusion] Active endophytic fungi accounting for more than 96% of the total isolates were widely distributed in Xiangzhuqing ancient cultivated tea, and their antifungal activities and species distribution are diverse.

Keywords: ancient cultivated tea; endophytic fungi; phytopathogenic fungi; antagonistic activity

植物内生真菌是指那些在其生活史的某一段或全部时期生活在植物组织内,对植物组织没有引起明显病害症状的真菌^[1]。研究表明:一些植物内生真菌能够产生新型的抗性天然产物,也可产生与宿主植物相同或相似的次生代谢产物,成为发掘和筛选新型植物病虫害生防因子的新来源^[2-4]。

中国茶树已有3 000多年的栽培历史,云南省凤庆县是世界茶树发源地的中心地带,全县拥有百年以上的栽培古茶园1 626.66 hm²、野生茶树群落2 106.66 hm²,古茶树资源极为丰富^[5]。目前中国对茶树内生真菌的研究仅围绕现代栽培小叶种茶树(*Camellia sinensis*)内生真菌的种类、分布特征、生物学功能及其与茶树的相互作用等方面^[6]。研究表明:内生真菌在现代栽培茶树体内的分布具有明显的组织专化性,在其种类和数量上以叶和枝条尤为丰富,并发现茶树内生木霉菌(*Trichoderma* sp.)、青霉菌(*Penicillium* sp.)和曲霉菌(*Aspergillus* sp.)等对多种丝状病原菌具有明显的抑制作用^[7-9]。但迄今为止对古茶树内生真菌的相关研究尚未见报道。位于凤庆县小湾镇锦秀村的1号香竹箐古茶树(*C. taliensis*)又称为“锦秀茶祖”,被认为是世界上现存最古老、最粗大的栽培型茶树,至今仍然生长良好,并与其周边古茶群落常年枝繁叶茂、千年不衰,这与当地优越的生态环境和适宜的土壤条件有着密不可分的关系,同时也提示栽培古茶树体内可能拥有较为完备的微生态系统,内生菌群在与宿主长期协同进化的过程中,对增强古茶树的抗性和环境适应性发挥着重要作用。

本试验以云南省凤庆县1号香竹箐古茶树叶和枝条为材料,从中分离纯化内生真菌,并进行植物病原真菌拮抗活性筛选,以期获得具有良好抑菌活性的菌株,为进一步寻找新型活性抑菌物质及研发新型生物农药等提供基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料

2017年6月,在云南省凤庆县小湾镇香竹箐(N24°35'51", E100°04'53", 海拔2 245 m)采集1号香竹箐古茶树(*C. taliensis*)的健康无症状枝条用于内生真菌分离。

1.1.2 培养基

试验培养基为马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基和察氏(CDA)培养基。

1.1.3 供试植物病原真菌

选择5株常见植物病原真菌作为对峙试验的供试病原菌,即灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*) (CG-MCC 3.3790)、腐皮镰孢(*Fusarium solani*) (CG-MCC 3.2889)、禾谷镰孢(*Fusarium graminearum*) (CGMCC 3.4733)、尖孢镰孢(*Fusarium oxysporum*) (CGMCC 3.3633)和芸苔链格孢(*Alternaria brassicicola*) (CGMCC 3.7805),均由中国普通微生物菌种保藏管理中心提供。

1.2 试验方法

1.2.1 内生真菌的分离

将古茶树枝、叶分离,清水洗净,再用蒸馏水冲洗晾干水分后,75%酒精浸泡45 s,0.1%升汞浸泡3 min,最后用无菌水清洗3次。组织块

印迹法^[10]检验表面消毒是否彻底。消毒处理后的组织块切成 0.5 cm × 0.5 cm 的小块接种于 PDA 和 CDA 培养基内, 置于 25 ℃ 条件下避光静置培养, 期间随时观察, 待叶片边缘长出菌丝, 挑取菌丝前端接入新培养基上继续培养。连续纯化培养 3~4 代得到单一菌株。根据所得菌株的形态特征进行形态学重排, 具有相同形态特征(菌落颜色、菌丝形态结构、孢子形态等)的内生真菌菌株归为一组形态型^[11], 每组选 1 株菌株作为活性筛选试验的供试内生真菌, 其余菌株皆按类保存。

1.2.2 活性菌株筛选

内生真菌对病原真菌的拮抗作用采用五点对峙培养法^[12]进行测定。在直径为 9 cm 的 PDA 平板正中央接入直径为 5 mm 的供试菌菌饼, 同时在平板 4 个距供试菌菌饼 2.5 cm 处接入相同大小的内生真菌菌饼, 以只接供试菌、不接内生真菌的平板作为对照, 每个处理重复 3 次, 25 ℃ 条件下培养。每 24 h 观察 1 次, 从对峙培养第 3 天起测量病原真菌菌落直径和抑菌带距离。抑制率(inhibitory rate, IR)=(对照组供试菌净生长半径 - 处理组供试菌净生长半径)/对照组供试菌净生长半径×100%。抑菌带距离(D)为内生真菌菌落与

供试菌菌落之间的无菌区域宽度。

1.2.3 活性菌株的聚类分析

将筛选所得活性较好的菌株进行插片培养, 进一步进行形态观察。用 Omega 真菌 DNAkit 试剂盒提取其基因组 DNA, 采用 ITS1 (5'-AGAAGT CGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3') 和 ITS4 (5'-TC CTCCGCTTATTGATATGC-3') 引物^[13]对其基因组 DNA 的 ITS 区序列进行 PCR 扩增, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后进行测序。测序获得的序列经 DNAMAN 处理后, 再与 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上已知的序列进行同源性比对, 确定菌株分类地位。采用软件 MEGA 6 构建 Neighbor-joining 系统发育树, 对活性菌株进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 古茶树内生真菌的分离

自 1 号香竹箐古茶树的健康无症状枝叶组织中分离得到 308 株内生真菌, 分为 61 个形态型(表 1)。其中, 分离自叶片和枝条的分别有 28 株和 33 株, 分离自 PDA 培养基和 CDA 培养基的分别有 34 株和 27 株。

表 1 1 号香竹箐古茶树内生真菌
Tab. 1 Endophytic fungi isolated from No.1 Xiangzhuqing ancient tea

分离部位 separation site	分离培养基 isolation medium	数量 number	供试内生真菌菌株编号 code of tested endophytic fungi
枝 branch	CDA	24	Ct-BC1, Ct-BC33, Ct-BC35, Ct-BC40, Ct-BC44, Ct-BC47, Ct-BC49, Ct-BC50, Ct-BC52, Ct-BC55, Ct-BC58, Ct-BC59, Ct-BC61, Ct-BC64, Ct-BC70, Ct-BC72, Ct-BC76, Ct-BC78, Ct-BC82, Ct-BC83, Ct-BC85, Ct-BC87, Ct-BC91, Ct-BC92
	PDA	9	Ct-BP1, Ct-BP28, Ct-BP41, Ct-BP42, Ct-BP48, Ct-BP61, Ct-BP74, Ct-BP77, Ct-BP78
叶 leaf	CDA	3	Ct-LC12, Ct-LC17, Ct-LC25
	PDA	25	Ct-LP107, Ct-LP110, Ct-LP113, Ct-LP115, Ct-LP117, Ct-LP12, Ct-LP125, Ct-LP13, Ct-LP17, Ct-LP24, Ct-LP34, Ct-LP37, Ct-LP48, Ct-LP5, Ct-LP6, Ct-LP61, Ct-LP67, Ct-LP7, Ct-LP70, Ct-LP75, Ct-LP8, Ct-LP80, Ct-LP86, Ct-LP96, Ct-LP99

2.2 古茶树内生真菌的植物病原真菌拮抗活性

61 株内生真菌与 5 种植物病原真菌的对峙培养测试结果见表 2。拮抗作用分为强(抑制率 ≥ 75%)、较强(50% ≤ 抑制率 < 75%) 和弱(抑制率 < 50%) 3 个等级^[14], 抑制率在 80% 以上的视为拮抗活性显著。从表 2 可知: 古茶树内生真菌普遍具有较好的植物病原真菌拮抗活性, 有 59 株内生真菌对供试病原真菌具有较强拮抗作用, 占内生真菌菌株总数的 96.72%。其中, 对至少 1 种供试菌的抑制率达 75% 以上的有 13 株, 对 5 种供

试菌的抑制率均达 50% 以上的有 9 株, 菌株 Ct-BC40、Ct-BC72 和 Ct-LP113 对 5 种供试菌的抑制率均达 80% 以上, 拮抗活性显著。

由图 1 所示: 内生真菌对禾谷镰孢的拮抗活性最弱, 抑制率在 50% 以下的有 41 株, 占比 67.21%, 而对灰葡萄孢的拮抗活性最强, 抑制率在 50% 以下的仅有 11 株, 占比 18.03%。有 10 株内生真菌对灰葡萄孢或芸苔链格孢具有选择性的高拮抗活性(抑制率达 80% 以上)。由此可知: 不同内生真菌菌株对不同供试病原真菌的拮

抗作用和强度存在差异。此外, 61 株内生真菌中, 对 5 种供试菌的抑制率均达 50%以上的有 9 株, 占比 14.75%, 对其中 4 种供试菌的抑制率达 50% 以上的有 9 株, 占比 14.75%, 对其中 3 种供试菌的抑制率达 50% 以上的有 15 株, 占比 24.59%, 对其中 2 种供试菌的抑制率达 50% 以上的有 18 株, 占比 29.51%, 只对 1 种供试菌的抑制率达 50% 以上的有 8 株, 占比 13.11%, 而对 5 种供试菌的抑制率皆低于 50% 的有 2 株, 占比 3.28%, 拮抗活性最弱或没有活性。

由此可知: 1 号香竹箬古茶树内生真菌中广泛分布着抑菌活性菌株, 并呈现出对不同植物病原菌的不同程度的抑制作用。

表 2 内生真菌拮抗病原真菌的抑制率
Tab. 2 Inhibitory rate of endophytic fungi against pathogenic fungi

编号 code	灰葡萄孢 <i>B. cinerea</i>		尖孢镰孢 <i>F. oxysporum</i>		禾谷镰孢 <i>F. graminearum</i>		腐皮镰孢 <i>F. solani</i>		芸苔链格孢 <i>A. brassicicola</i>	
	IR/%	D/mm	IR/%	D/mm	IR/%	D/mm	IR/%	D/mm	IR/%	D/mm
Ct-BC1	82.08*	2.67±0.58	59.95	0.00	38.71	1.33±0.58	58.55	0.00	87.34*	8.33±3.21
Ct-BC33	80.39*	0.00	52.75	0.00	43.75	0.00	47.14	0.00	86.82*	0.00
Ct-BC35	62.55	0.00	40.00	1.00±0.00	15.58	2.00±1.00	36.74	1.00±0.00	56.13	2.33±0.58
Ct-BC40	93.73*	0.00	84.03*	0.00	86.46*	0.00	88.00*	0.00	88.41*	0.00
Ct-BC44	63.33	0.00	44.79	0.00	30.88	0.00	53.53	0.00	53.48	0.00
Ct-BC47	79.22	0.00	30.22	0.00	56.88	0.00	33.64	0.00	65.54	0.00
Ct-BC49	84.71*	5.67±8.14	59.17	0.00	49.75	3.00±0.00	61.14	0.00	74.36	2.67±0.58
Ct-BC50	54.17	0.00	26.74	0.00	12.44	1.33±0.58	37.35	0.00	37.97	1.00±0.00
Ct-BC52	24.00	0.00	50.47	0.00	36.45	2.00±0.00	61.14	0.00	58.44	0.00
Ct-BC55	89.61*	6.67±0.58	63.57	0.00	46.23	0.00	67.10	0.00	72.65	1.67±1.15
Ct-BC58	41.00	0.00	47.29	0.00	37.35	1.00±0.00	0.00	0.00	37.68	0.00
Ct-BC59	60.00	3.67±2.08	48.86	0.00	38.49	5.00±1.00	50.93	0.00	67.45	5.67±2.51
Ct-BC61	47.70	0.00	60.15	0.00	58.14	2.00±0.00	57.87	0.00	48.79	1.00±0.00
Ct-BC64	100.00*	0.00	61.29	0.00	73.53	0.00	67.44	0.00	87.76*	0.00
Ct-BC70	84.31*	0.00	60.44	0.00	25.00	0.00	42.86	0.00	62.84	0.00
Ct-BC72	100.00*	0.00	100.00*	0.00	100.00*	0.00	100.00*	0.00	100.00*	0.00
Ct-BC76	68.33	0.00	49.31	0.00	39.17	1.00±0.00	65.54	0.00	59.49	0.00
Ct-BC78	45.92	0.00	43.53	0.00	55.43	1.33±0.47	38.37	0.00	68.05	0.00
Ct-BC82	66.67	1.00±0.00	8.79	0.00	20.00	2.00±0.00	24.30	0.00	50.68	2.00±0.00
Ct-BC83	76.46	0.00	57.64	0.00	62.67	1.50±2.12	57.65	0.00	68.04	0.00
Ct-BC85	55.33	0.00	24.60	0.00	11.88	0.00	20.00	0.00	50.00	0.00
Ct-BC87	98.24*	5.00±0.00	74.19	2.67±0.58	78.75	4.33±1.15	79.44	2.33±0.58	94.93*	6.50±3.79
Ct-BC91	32.50	0.00	59.49	0.00	51.40	1.00±0.00	61.92	0.00	51.56	0.00
Ct-BC92	50.26	0.00	35.29	0.00	56.98	2.00±0.00	39.15	0.00	39.79	0.00
Ct-BP1	70.20	0.00	55.24	0.00	0.00	3.00±0.00	32.38	0.00	66.22	4.00±0.00
Ct-BP28	38.76	1.00±0.00	49.88	0.00	25.76	0.00	34.09	0.00	58.13	0.00
Ct-BP41	41.34	0.00	72.59	10.00±0.00	45.99	0.00	39.61	0.00	56.02	0.00
Ct-BP42	56.08	1.00±0.00	11.49	0.00	18.22	4.00±0.58	29.64	0.00	43.12	0.00
Ct-BP48	61.37	1.00±0.00	62.05	1.00±0.00	37.38	2.00±0.00	60.10	1.00±0.00	48.10	0.00
Ct-BP61	37.25	0.00	42.97	0.00	51.70	0.00	48.32	0.00	48.79	0.00
Ct-BP74	45.02	0.00	60.97	0.00	27.11	0.00	33.33	0.00	11.27	1.00±0.00
Ct-BP77	53.73	1.00±0.00	24.90	0.00	30.37	2.00±0.00	26.09	0.00	49.13	1.00±0.00
Ct-BP78	42.15	0.00	30.08	0.00	57.21	7.67±0.58	39.61	0.00	58.43	0.00
Ct-LC12	59.22	3.00±0.00	28.16	0.00	15.32	1.00±0.00	19.25	0.00	53.62	0.00
Ct-LC17	65.49	0.00	45.45	0.00	23.62	1.33±0.58	41.85	0.00	65.38	3.00±0.00

表 2 (续)

编号 code	灰葡萄孢 <i>B. cinerea</i>		尖孢镰孢 <i>F. oxysporum</i>		禾谷镰孢 <i>F. graminearum</i>		腐皮镰孢 <i>F. solani</i>		芸苔链格孢 <i>A. brassicicola</i>	
	IR/%	D/mm	IR/%	D/mm	IR/%	D/mm	IR/%	D/mm	IR/%	D/mm
Ct-LC25	70.20	0.00	53.94	0.00	30.89	0.00	62.94	0.00	60.26	0.00
Ct-LP107	67.06	0.00	55.94	0.00	50.40	0.00	54.62	0.00	67.72	0.00
Ct-LP110	79.11	0.00	62.10	0.00	35.00	0.00	68.69	0.00	74.32	0.00
Ct-LP113	100.00*	0.00	100.00*	0.00	100.00*	0.00	100.00*	0.00	100.00*	0.00
Ct-LP115	92.82*	10.00±0.00	63.61	0.00	61.47	6.00±0.00	68.65	0.00	81.00*	6.33±1.53
Ct-LP117	57.66	0.00	55.59	0.00	48.42	2.00±0.00	57.27	0.00	69.09	2.00±0.00
Ct-LP12	52.93	0.00	46.77	3.00±0.00	42.53	2.00±0.00	45.99	0.00	63.12	0.00
Ct-LP125	66.86	0.00	45.02	0.00	53.39	2.33±0.58	57.97	0.00	70.91	1.67±0.58
Ct-LP13	64.71	0.00	53.03	0.00	37.69	0.00	48.56	0.00	55.56	0.00
Ct-LP17	60.20	0.00	51.31	0.00	2.13	0.00	20.79	0.00	51.56	0.00
Ct-LP24	66.86	0.00	43.17	0.00	52.94	0.00	56.32	0.00	53.98	0.00
Ct-LP34	57.65	0.00	36.53	0.00	31.12	0.00	26.32	0.00	60.54	0.00
Ct-LP37	59.22	0.00	40.82	0.00	25.00	0.00	49.85	0.00	57.83	0.00
Ct-LP48	58.96	2.33±0.58	26.39	0.00	21.66	3.33±0.58	46.11	1.00±1.00	51.27	4.00±1.00
Ct-LP5	58.24	0.00	36.97	0.00	19.88	4.00±1.41	32.91	0.00	33.65	0.00
Ct-LP6	62.16	0.00	58.40	0.00	29.52	0.00	44.95	0.00	52.25	0.00
Ct-LP61	45.56	0.00	34.19	0.00	20.24	0.00	34.87	0.00	32.72	0.00
Ct-LP67	58.56	0.00	56.13	0.00	44.80	2.00±0.00	45.08	0.00	48.10	0.00
Ct-LP7	56.76	1.00±0.00	32.58	0.00	45.25	1.00±0.00	14.01	0.00	52.25	0.00
Ct-LP70	61.96	0.00	49.45	0.00	51.58	1.00±0.00	45.86	0.00	64.94	0.00
Ct-LP75	51.18	0.00	1.61	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	17.23	0.00
Ct-LP8	62.16	0.00	45.25	0.00	56.11	1.33±0.58	29.95	0.00	63.32	0.00
Ct-LP80	90.43*	13.00±0.00	39.46	0.00	47.47	0.00	18.69	0.00	59.49	0.00
Ct-LP86	60.59	0.00	36.36	0.00	8.54	2.00±1.00	30.35	0.00	57.53	11.33±1.15
Ct-LP96	71.57	2.00±0.00	48.39	0.00	23.13	3.00±0.00	34.58	0.00	57.43	5.00±0.00
Ct-LP99	91.46*	2.67±0.58	84.82*	0.00	67.28	1.00±0.00	76.17	0.00	86.39*	1.00±0.00

注: IR. 内生真菌对供试病原真菌的抑制率; D. 抑菌带宽度; 加粗并带*号. 大于 80% 的抑制率。
Note: IR. the inhibition rate of endophytic fungi on the tested pathogenic fungi; D. width of antifungal zone; Bold with *. inhibition more than 80%.

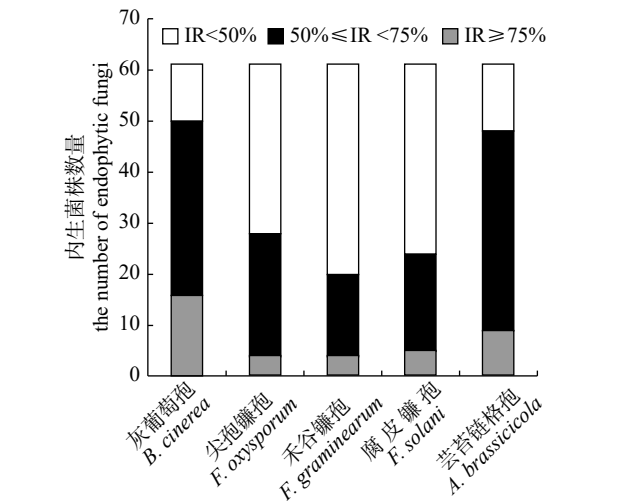


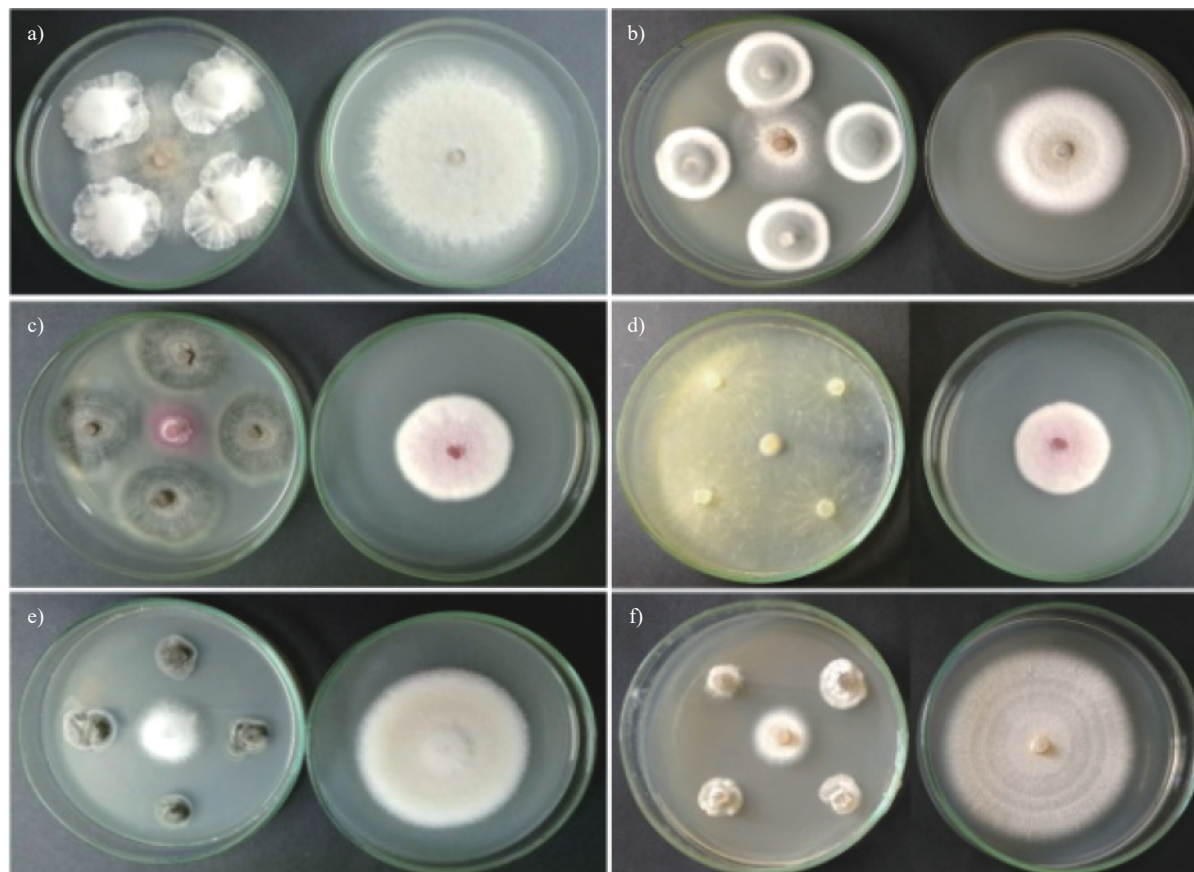
图 1 内生真菌对不同病原真菌的抑制情况
Fig. 1 Inhibition of endophytic fungi on different pathogenic fungi

从抑菌带宽度来看 (表 2), 多数对峙结果中的抑菌带宽度均为 0 mm, 但这并不代表病原真菌生长未受抑制。真菌拮抗机制通常包括竞争作用、重寄生作用、分泌抑菌物质和产生抑菌挥发性气体等^[15-17]。例如在菌株 Ct-LP110 与灰葡萄孢的对峙培养中 (图 2a), 两者菌落之间无抑菌带, 但菌株 Ct-LP110 菌落随着生长时间延长, 逐渐将灰葡萄孢菌落覆盖, 灰葡萄孢生长受到抑制。在菌株 Ct-BC1 与腐皮镰孢对峙培养中 (图 2b), 随着菌株 Ct-BC1 的生长, 腐皮镰孢的生长受到抑制, 与对照组相比, 其菌丝贴近培养基, 且菌落边缘菌丝淡化, 但二者菌落间无抑菌带。同样, 在菌株 Ct-LP107 与禾谷镰孢的对峙培养中 (图 2c), 禾谷镰孢的生长受到抑制, 菌丝弱化贴

近培养基且变色, 几乎没有气生菌丝, 但二者菌落间亦无明显抑菌带。

此外, 在本试验中发现: 生长速度较快的内生真菌通常在对峙培养的第2天后, 其菌落呈覆盖式生长, 迅速占领生长空间 (图 2d), 如菌株 Ct-BC72, 与之一对峙培养的供试病原菌或无法扩

增其菌落, 或直接被内生真菌菌丝全部覆盖。而有些菌株的菌落生长速度缓慢 (图 2e、2f), 如菌株 Ct-LP86 和 Ct-BP41, 但这类内生真菌可能释放一些代谢产物到培养基中, 或产生一些挥发性抑菌气体, 使得供试病原菌生长受制, 并形成较宽的抑菌带。



注: a) Ct-LP110 对峙灰葡萄孢; b) Ct-BC1 对峙腐皮镰孢; c) Ct-LP107 对峙禾谷镰孢; d) Ct-BC72 对峙禾谷镰孢; e) Ct-LP86 对峙芸苔链格孢; f) Ct-BP41 对峙尖孢镰孢。

Note: a) Ct-LP110 inhibits *B. cinerea*; b) Ct-BC1 inhibits *F. solani*; c) Ct-LP107 inhibits *F. graminearum*; d) Ct-BC72 inhibits *F. graminearum*; e) Ct-LP86 inhibits *A. brassicicola*; f) Ct-BP41 inhibits *F. oxysporum*.

图2 内生真菌对病原真菌的不同拮抗性表现

Fig. 2 Different antagonistic manifestations of endophytic fungi to the pathogenic fungi

2.3 活性菌株的聚类分析

根据上述对峙培养测试结果, 有 18 株内生真菌对 4 种以上供试菌的抑制率均大于 50%, 属活性菌株。根据形态鉴别及 GenBank 序列比对结果, 对这 18 株内生真菌进行分类地位鉴定, 并基于它们的 rDNA-ITS 序列进行系统发育分析 (图 3), 菌株 *Syncephalis depressa* (GenBank 登录号 KY001683)^[18] 为外源种。

18 株活性菌株隶属于 2 门 3 纲 10 目 13 科 14 属, 其中, 刺盘孢属 (*Colletotrichum* sp.) 有

5 种, 其余每属各 1 种, 分别为裂褶菌属 (*Schizophyllum* sp.)、黑管菌属 (*Bjerkandera* sp.)、*Acrocalymma* sp.、小球腔菌属 (*Leptosphaeria* sp.)、伪盾壳霉属 (*Paraconiothyrium* sp.)、微毛色二孢属 (*Microdiplodia* sp.)、叶点霉属 (*Phyllosticta* sp.)、间座壳菌属 (*Diaporthe* sp.)、黏束孢霉属 (*Graphium* sp.)、目孢壳属 (*Coniochaeta* sp.)、炭角菌属 (*Xylaria* sp.)、刺盘孢属 (*Colletotrichum* sp.) 和木霉属 (*Trichoderma* sp.)。木霉属菌株 Ct-BC72 和炭角菌科菌株 Ct-LP113 对 5 种供试病原

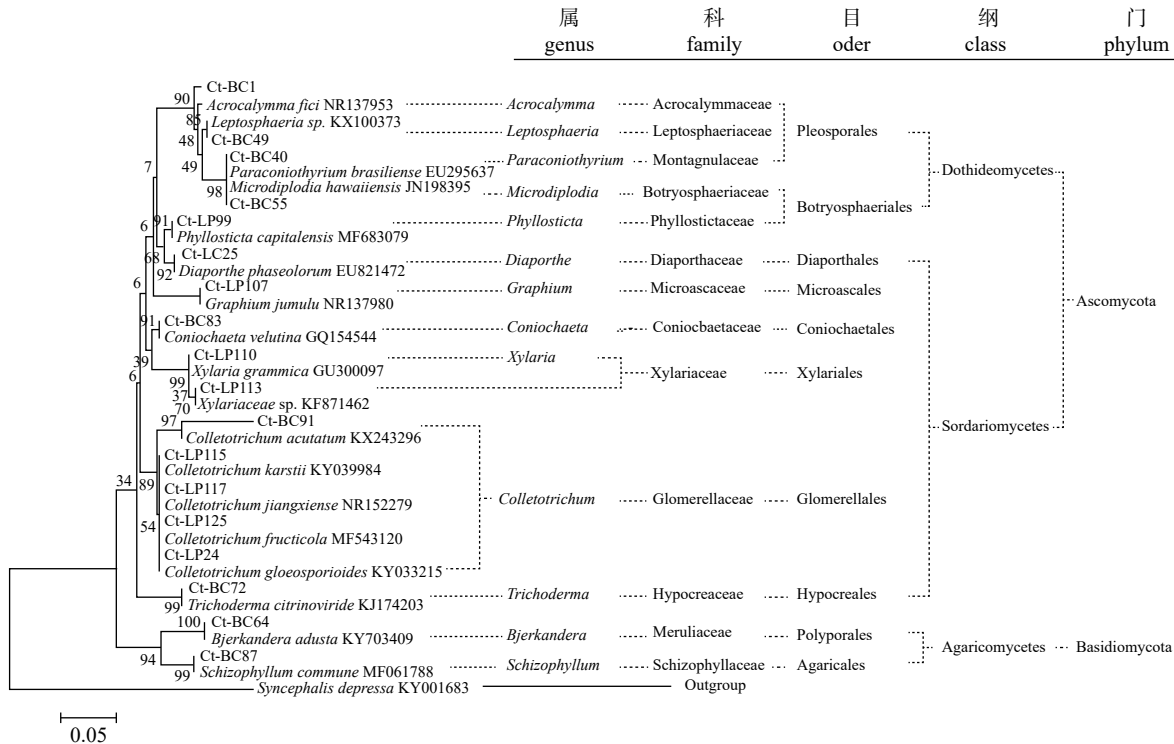


图 3 基于 18 株活性内生真菌 rDNA-ITS 序列构建的系统发育分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of the rDNA-ITS sequences of 18 active endophytic fungi

真菌的抑制率均为 100%。此外，裂褶菌属菌株 Ct-BC87、伪盾壳霉属菌株 Ct-BC40、目孢壳属菌株 Ct-BC83、黑管菌属菌株 Ct-BC64、黏束孢霉属菌株 Ct-LP107、叶点霉属菌株 Ct-LP99 和刺盘孢属菌株 Ct-LP115 对 5 株供试病原真菌的抑制率均在 50% 以上，而 *Acrocalymma* sp. 菌株 Ct-BC1、微毛色二孢属菌株 Ct-BC55、小球腔菌属菌株 Ct-BC49、炭角菌属菌株 Ct-LP110、间座壳属菌株 Ct-LC25、刺盘孢属菌株 Ct-LP24、Ct-BC91、Ct-LP125 及 Ct-LP117 对 4 株供试病原真菌均有 50% 以上的抑制率。

3 讨论

试验结果表明：1 号香竹箐古茶树内生真菌中广泛分布着抑菌活性菌株，占分离菌株总数的 96% 以上，且抗菌活性和种属分布具有多样性。不同属的内生真菌菌株对同一供试病原真菌显示出不同程度的拮抗活性，同属的菌株其抗菌范围及活性亦存在相似性或差异性。

茶树含有儿茶素类、咖啡因、多种矿物质及其他杀菌物质，茶树内生菌也不断受到人们的关注。茶树内生真菌种类繁多，资源丰富，在

长期的生长过程中，已形成独特的内生菌群，对茶树的生长具有重要作用，但目前对茶树内生菌的种群多样性、种群结构和功能微生物筛选等方面的研究仍不完善。游见明^[19]从茶树的根、茎、叶中分离得到 143 株内生真菌，经鉴定为 14 个属，其中根中的优势菌群主要是镰刀菌属 (*Fusarium* sp.) 和丛赤壳属 (*Nectria* sp.)，茎中主要是木霉属 (*Trichoderma* sp.)，叶中主要是链格孢属 (*Alternaria* sp.)。张林平等^[20]以油茶树为健康组织材料，分离到 625 株内生真菌，共计 59 个分类单元，其中半知菌有 31 个，子囊菌 19 个，担子菌 9 个。AGUSTA 等^[21]采用 RAPD 分析对茶树内生真菌进行了分类，将分离获得的 35 株内生真菌划分为 6 个类群，其中一组为镰刀菌属 (*Fusarium* sp.)，一组为青霉属 (*Penicillium* sp.)，两组为裂褶菌属 (*Schizophyllum* sp.)，另两组为间座壳属 (*Diaporthe* sp.)。本试验从 1 号香竹箐古茶树中分离所得内生真菌种群与已有报道基本一致。对茶树内生菌的生物学功能有大量文献报道，如茶树内生真菌能防治植物病害、促进植物生长、降解有机农药、改良茶叶风味等。本实验显示出较强拮抗活性的菌株

中,木霉属真菌已成为一种重要的植物生防因子^[22],具有较成熟研究。据报道,刺盘孢属真菌为茶树的主要内生真菌类群^[5],亦可发展为茶树的炭疽病病原,其在茶树健康组织中的动态平衡及生物活性机制值得深究。炭角菌属真菌能产生多糖、环肽及羧酸类活性物质,与植物共生的炭角菌亦会产生与宿主植物相似或相同的生理活性物质,具有抗氧化、抗菌和抗肿瘤等功能^[23-24]。此外,有关本试验中筛选出的其他活性菌株,即黑管菌属、小球腔菌属、*Acrocalymma* sp.、伪盾壳霉属、微毛色二孢属、黏束孢霉属和目孢壳属真菌的相关产物及生物活性研究有较少或无报道^[25-26]。

从可再生微生物资源寻找天然活性化合物一直是新药开发的重要途径,植物内生真菌种群庞大,代谢产物丰富,是新型活性产物的有力潜在来源。古茶树生长年份古老,历史悠久,其内生菌群在其生长史中起到重要作用。可对本研究筛选出的拮抗活性菌株开展次生代谢产物、相关生物活性及机制的进一步研究,以期获得结构新颖、应用性强的活性产物。

[参考文献]

- PETRINI O. Fungal endophytes of tree leaves[M]. New York: Springer-Verlag, 1991
- 石晶盈,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. DOI: 10.3321/j.issn:1000-0933.2006.07.044.
- BACKMAN P A, SIKORA R A. Endophytes: an emerging tool for biological control[J]. Biological Control, 2008, 46(1): 1. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2008.03.009.
- MEJIA L C, ROJAS E I, MAYNARD Z, et al. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens[J]. Biological Control, 2008, 46(1): 4. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2008.01.012.
- 张伟,汤培彪,杨忠兴,等. 浅析云南凤庆县古茶树资源对凤庆县茶叶产业地位和价值的影响[J]. 茶叶, 2011, 37(2): 72. DOI: 10.3969/j.issn.0577-8921.2011.02.002.
- 王雪萍,谭荣荣,曹丹,等. 茶树内生真菌研究进展[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(23): 5808.
- 曾如意,杨民和. 茶树叶部内生真菌相互关系及抗菌活性初步研究[J]. 江西植保, 2009, 32(1): 19. DOI: 10.3969/j.issn.2095-3704.2009.01.004.
- 苏经迁,王国红,杨民和. 茶树内生真菌混合培养增强对植物病原真菌的拮抗作用[J]. 菌物学报, 2010, 29(5): 753.
- 李绍锋,杨民和. 一株茶树内生淡紫拟青霉的鉴定及抗菌活性研究[J]. 生物灾害科学, 2012, 35(1): 45.
- SCHULZ B, WANKE U, DRAEGER S, et al. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods[J]. Mycological Research, 1993, 97(9): 80213.
- LI P Q, WU Z, LIU T, et al. Biodiversity, phylogeny, and antifungal functions of endophytic fungi associated with *Zanthoxylum bungeanum*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(9): 10.
- 王晓红,李会平,黄大庄,等. 毛白杨内生真菌的分离与拮抗菌的筛选[J]. 河北林果研究, 2007, 22(4): 343. DOI: 10.3969/j.issn.1007-4961.2007.04.001.
- WHITE T J, BRUNS T D, LEE S B, et al. PCR protocols: a guide to methods and applications[M]. New York: Academic Press Inc, 1990
- 刘泽星,阿依佳玛丽·依玛尔,惠建超,等. 陕西核桃内生真菌代谢产物抑菌活性分析[J]. 西南林业大学学报: 自然科学, 2017, 37(4): 126.
- 易茜茜,丁万隆,李勇. 木霉菌对荆芥茎枯病菌的拮抗机制[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(11): 1386. DOI: 10.4268/cjcm20101105.
- 时涛,黄贵修. 一株产生抑菌气体内生真菌的拮抗活性评价[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(9): 1803. DOI: 10.3969/j.issn.0439-8114.2011.09.023.
- 纪丽莲,张强华,崔桂友. 芦竹内生真菌 F0238 对植物病原菌的拮抗作用[J]. 微生物学通报, 2004, 31(2): 82. DOI: 10.3969/j.issn.0253-2654.2004.02.018.
- BENNY G L, HO H M, LAZARUS K L, et al. Five new species of the obligate mycoparasite *Syncephalasi* (Zoopagales, Zoopagomycotina) from soil[J]. Mycologia, 2016, 108(6): 1114.
- 游见明. 茶树中内生菌的动态分布[J]. 广西植物, 2008, 28(1): 82. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2008.01.015.
- 张林平,张扬,王舒,等. 油茶不同部位的内生真菌组成及多样性分析[J]. 林业科技开发, 2013, 27(6): 101. DOI: 10.3969/j.issn.1000-8101.2013.06.026.
- AGUSTA A, OHASHI K, SHIBUYA H. Composition of the endophytic filamentous fungi isolated from the tea plant *Camellia sinensis*[J]. Journal of Natural Medicines, 2006, 60(3): 268. DOI: 10.1007/s11418-006-0038-2.
- 徐同,柳良好. 木霉几丁质酶及其对植物病原真菌的拮抗作用[J]. 植物病理学报, 2002, 32(2): 97. DOI: 10.3321/j.issn:0412-0914.2002.02.001.
- 高聪,罗俊,刘霞,等. 炭角菌属真菌化学成分与生物活性研究进展[J]. 菌物学报, 2016, 35(7): 767.
- 张禧庆,康冀川,何劲,等. 两株石斛内生炭角菌的鉴定及活性成分初步研究[J]. 西南农业学报, 2008, 21(2): 317. DOI: 10.3969/j.issn.1001-4829.2008.02.016.
- 张旭辉,张红楠,李勇,等. 抑制西瓜蔓枯病菌的生防真菌筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(5): 76.
- 刘丛丛,韩俊杰,刘宏伟. 小球腔菌属次级代谢产物的化学及其生物学活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(12): 2163.

责任编辑: 何承刚