

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2025.06.004

严钰萧, 杨艳芬, 杨梓泰, 等. 除草方式对茶树根系内生菌拮抗活性的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2025, 47(6): 34-43.

除草方式对茶树根系内生菌拮抗活性的影响

严钰萧¹, 杨艳芬¹, 杨梓泰¹, 王凯博²,
马玉青², 吕才有¹, 杨广容¹

1. 云南农业大学 茶学院, 昆明 650201; 2. 云南省农业科学院 茶叶研究所, 昆明 650205

摘要: 采用尖端菌丝纯化法, 从不除草、人工耕作除草和防草膜覆盖 3 种不同方式的茶树根系中分离内生菌株, 探讨了不同除草方式对茶树根系内生菌的种类多样性及其对病原菌的拮抗活性, 旨在为茶树病害的生物防治提供理论依据。通过五点对峙培养法, 筛选和检测内生菌株对 5 种常见病原真菌的拮抗活性, 并结合分子生物学方法对具有较强活性的菌株进行鉴定与分类。在分离的菌株中, 共获得 24 株内生真菌和 13 株内生细菌, 其中 11 株内生真菌和 5 株内生细菌对病原菌表现出较强的拮抗活性。尤其是在不除草处理中分离的 *Aspergillus piperis* 和 *Aspergillus brunneoviolaceus*, 人工耕作除草处理中分离的 *Achromobacter xylosoxidans*, 以及防草膜覆盖处理中分离的 *Pseudomonas tolaasii*, 对茶树轮斑病(*Pseudopezalotiopsis camelliae-sinensis*)的抑制率均超过 80%, 为强拮抗菌株。防草膜覆盖处理中分离的 *Aspergillus aculeatus* 对尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)病原菌的抑制率也达 75% 以上, 表现出较强的拮抗效果。此外, 内生细菌如 *Achromobacter spanius* 和 *Pseudomonas tolaasii* 同时对卷枝毛霉菌(*Mucor circinelloides*)、茶树轮斑病、茶树炭疽病(*Colletotrichum camelliae*)和白地霉(*Geotrichum candidum*)中的 3 种供试病原菌菌株的抑制率均大于 50%。在人工耕作除草处理中, 分离的 *Aspergillus flavus*、*Purpureocillium lilacinum* 和 *Fusarium oxysporum* 对茶树轮斑病的抑制率在 50% 到 66% 之间, 而内生细菌的拮抗活性普遍低于 50%。不除草处理中的 *Aspergillus piperis* 对茶树轮斑病、尖孢镰刀菌和白地霉的抑制率均超过 50%, *Aspergillus brunneoviolaceus* 对所有 5 种病原菌的抑制率也均大于 50%。总体来看, 3 种除草方式均分离出对茶树轮斑病具有强拮抗活性的内生菌株, 其中防草膜覆盖方式在防治多种病害, 特别是土传性病害如尖孢镰刀菌方面表现出较好的防治效果。*Pseudomonas tolaasii* 和 *Aspergillus brunneoviolaceus* 分别在防草膜覆盖和不除草处理中表现出强拮抗活性。

关键词: 茶树; 除草方式; 内生真菌; 内生细菌; 拮抗活性

中图分类号: S571.1

文献标识码: A

文章编号: 1673-9868(2025)06-0034-10

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Effect of Weeding Methods on Antagonistic Activity of Endophytes in Tea Tree Roots

收稿日期: 2024-11-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(32460778); 云南省茶学重点实验室开放基金项目(2022YNCX003)。

作者简介: 严钰萧, 硕士研究生, 主要从事茶树栽培生理生态研究。

YAN Yuxiao¹, YANG Yanfen¹, YANG Zitai¹, WANG Kaibo²,
MA Yuqing², LYU Caiyou¹, YANG Guangrong¹

1. College of Tea Science, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Institute of Tea, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China

Abstract: This study aims to provide theoretical support for the biological control of tea tree diseases by investigating the diversity of endophytic microorganisms in tea tree roots under different weeding methods and their antagonistic activity against pathogenic fungi. Endophytes were isolated from tea tree roots subjected to three weeding methods, no weeding, manual tillage, and mulch film coverage, using the hyphal tip purification method. The antagonistic activity of the isolates was evaluated against five common pathogenic fungi using the dual-culture confrontation method. Strains exhibiting strong antagonistic activity were identified and classified through molecular techniques, and their phylogenetic relationships were analyzed. A total of 24 endophytic fungi and 13 endophytic bacteria were isolated from the tea tree roots under the three weeding methods. Among them, 11 fungal strains and 5 bacterial strains exhibited strong antagonistic activity against the tested pathogens. Notably, *Aspergillus piperis* and *Aspergillus brunneoviolaceus*, isolated from the no-weeding treatment, *Achromobacter xylosoxidans*, from the manual tillage treatment, and *Pseudomonas tolaasii*, from the mulch film coverage treatment, showed inhibition rates exceeding 80% to tea ring spot disease pathogen *Pseudopezalotiopsis camelliae-sinensis*, and were identified as strong antagonists. Additionally, *A. aculeatinus*, isolated from the mulch film treatment, showed an inhibition rate of over 75% against *Fusarium oxysporum*, and was classified as a strong antagonist. The endophytic bacteria *A. spanii* and *P. tolaasii* demonstrated inhibition rates greater than 50% against 3 strains of testing pathogens of *Mucor circinelloides*, *P. camelliae-sinensis*, *Colletotrichum camelliae*, and *Geotrichum candidum*. Under manual tillage treatment, *A. flavus*, *Purpureocillium lilacinum*, and *F. oxysporum*, isolated from tea tree roots, showed inhibition rates ranged from 50.98% to 66.08% against *P. camelliae-sinensis*, while the antagonistic activity of bacterial strains was generally below 50%. In the no-weeding treatment, inhibition rates of *A. piperis* against *P. camelliae-sinensis*, *F. oxysporum*, and *G. candidum* exceeded 50%. *A. brunneoviolaceus* showed inhibition rates above 50% against all five tested pathogens. Endophytic strains with strong antagonistic activity against *P. camelliae-sinensis* were isolated from the tea tree roots under all three weeding methods. Mulch film coverage showed broad-spectrum efficacy against multiple diseases, particularly soil-borne pathogens like *F. oxysporum*. *P. tolaasii* and *A. brunneoviolaceus* demonstrated the strong antagonistic activity in mulch film treatment and no-weeding treatment, respectively.

Key words: tea tree; weeding methods; endophytic fungi; endophytic bacteria; antagonistic activity

茶树(*Camellia sinensis*)属山茶科山茶属的常绿木本植物,是我国重要的经济作物^[1],其生长状况直接影响到茶叶的产量和品质。茶树根系的健康是保证其生长的基础,根系内生微生物群落,尤其是内生细菌和真菌,对根系健康生长及水分、养分的吸收利用均具有重要影响。

植物内生菌是指能够在宿主植物细胞内(或细胞间)度过整个(或部分)生命周期而不引起植物病理性病变的一类微生物^[2]。常见的植物内生菌类群主要包括内生真菌、内生细菌和内生放线菌^[3]。研究表明,内生细菌能够通过产生植物生长调节物质如吲哚乙酸(IAA)等,促进茶树根系的生长,增强其对营养的吸收

能力^[4]。此外, 内生真菌也能够影响茶树的代谢途径, 从而影响茶叶的化学成分和品质^[5]。在茶树生长过程中, 茶树能够与其内生菌相互作用, 提高茶树对病原微生物的抗性。黄晓琴等^[6]从茶树健康组织上筛选鉴定到解淀粉芽孢杆菌 Y1, 能够显著抑制冰核细菌生长的内生菌, 防治茶树霜冻害。张林平等^[7]从健康油茶叶片中分离鉴定得到 6 株内生细菌菌株, 其对油茶炭疽病抑制率最高可达到 82.4%。宋维兴^[8]研究证实, 在 Cd-LDPE(镉-低密度聚乙烯)复合污染下, 接种植物内生菌增加花生地下部生物量, 显著提高光合作用和 SPAD 值, 显著降低了细菌群落多样性和丰富度。Yan 等^[9]发现在防草膜覆盖下, 根系土传病原菌尖孢镰刀菌的相对丰度显著降低。

本试验以云南省澜沧县阿木戛村茶园中不同除草方式下的茶树根系内生菌分布及拮抗活性为研究内容, 将分离纯化获得的内生菌株, 通过与植物病原真菌拮抗活性筛选及分子生物学鉴定, 探究其潜在的生物防治价值, 旨在获得具有优良抑菌活性菌株, 为茶叶新型活性抑菌物质和新型生物农药的研发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 茶园除草方式与茶树根系采样

采样时间为 2022 年 4 月, 采样茶园位于云南省澜沧县阿木戛村, 3 种处理方式茶园位于同一区域。海拔为 900~1 640 m, 年平均气温为 16.5℃, 年降雨量为 1 673 mm, 为茶树的生长提供了良好的气候条件。在采样区域, 选择了 3 个具有代表性的茶园样地为研究对象, 栽种的茶树品种均为地方群体种(景迈群体种), 3 个取样茶园采用了不同的杂草管理方式, A 样点使用防草膜覆盖除草的方式, 防草膜在 2019 年 12 月前完成铺设, 覆盖时间在两年以上, 防草膜的材质为聚乙烯; B 样点采用人工耕作除草的方式; C 样点则是不除草的管理。除不同除草方式外, 所有样点茶园都采取了相同的栽培措施, 如种植遮荫树、不施用化肥和打不打农药。3 个取样茶园分布地理信息及除草方式见表 1。在每个位点采用对角线法选取 3 株健康茶树进行根系组织的采集, 总共获得 9 个根系样本。将采集的样本放置于冰上, 24 h 内带回实验室进行处理。

表 1 采样位点基本概况

茶园	经度	纬度	海拔/m	大气压/hpa	管理方式
A	E99°53′22″	N22°14′28″	1 495.9	842.8	防草膜覆盖除草
B	E99°53′22″	N22°14′28″	1 498.3	842.6	人工耕作除草
C	E99°53′28″	N22°14′27″	1 556.2	838.9	不除草

1.1.2 培养基

PDA 培养基(用于菌株筛选): 马铃薯(去皮)200 g, 蔗糖(或葡萄糖)20 g, 蒸馏水 1 000 mL。配制方法如下: 将马铃薯去皮, 切成约 2 cm² 的小块, 放入 1 500 mL 的烧杯中煮沸 30 min, 注意用玻棒搅拌以防糊底, 然后用双层纱布过滤, 取其滤液加糖, 再补足至 1 000 mL; Martin 培养基(用于真菌分离): K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, 蛋白胨 5 g, 葡萄糖 10 g, 1/3 000 孟加拉红水溶液 100 mL, 蒸馏水 900 mL, 121℃ 湿热灭菌 30 mins, 待培养基融化后冷却至 55~60℃ 时加入链霉素(链霉素含量为 30 μg/mL); 牛肉膏蛋白胨培养基(用于细菌分离): 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值 7.4~7.6。

1.1.3 供试植物病原真菌

选择 5 株植物病原真菌作为对峙试验的供试病原菌: 卷枝毛霉菌(*Mucor circinelloides*)(CGMCC 3.215)、茶树轮斑病(*Pseudopezalotiopsis camelliae-sinensis*)、茶树炭疽病(*Colletotrichum camelliae*)、

尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)(CGMCC 3.363 8)、白地霉(*Geotrichum candidum*)菌株,均由云南农业大学及云南农业科学院茶叶科学研究所提供,并于中国普通微生物菌种保藏管理中心(<https://cgmc.net>)保存。

1.2 试验方法

1.2.1 茶树根系内生菌分离与纯化培养

采集的茶树根系样本经去除表面土壤与杂质等预处理后,依次进行表面消毒处理:用无菌水冲洗 30 s,浸入 75%乙醇 1 min,转入 2.5% NaClO 溶液浸泡 3 min,再次用 75%乙醇浸泡 1 min,最后用无菌水冲洗 3 次。取根系中段约 1 cm 部位,纵切后使切口最大限度接触培养基,分别接种于 Martin 培养基和牛肉膏蛋白胨培养基。样本置于 28 ℃黑暗环境培养 3~7 d,记录菌落形态、生长速度和颜色差异。

从初筛菌落中挑取边缘生长良好且未污染的部分,转移至培养基进行纯化,筛选出具备内生真菌与细菌特征的菌株并编号,为后续试验提供明确样本。向试管加入约 8 mL PDA 培养基,灭菌后倾斜冷却成斜面。使用无菌接种针从纯化平板转移菌落菌丝接种至培养基斜面,培养完成后,试管置于 4 ℃冷藏保存,延缓菌株代谢以长期保藏资源。

1.2.2 拮抗活性菌株筛选

采用五点对峙培养法测定了内生菌对病原菌的拮抗作用^[10]。选择 5 种植物病原菌作为对峙试验的供试病原菌,在直径为 9 cm 的 PDA 平板正中央接入直径为 5 mm 的供试病原菌菌饼,同时分别在平板距供试菌菌饼 2.5 cm 处接入 4 个相同大小的内生菌菌饼,以只接供试病原菌、不接内生菌的平板作为对照,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 d 起测量病原菌菌落直径和抑菌带距离,统计抑菌率。

$$\text{抑菌率}(IR) = \frac{\text{对照组病原菌净生长半径} - \text{治疗组病原菌净生长半径}}{\text{对照组病原菌净生长半径}} \times 100\% \quad (1)$$

抑菌区距离(D)为内生菌菌落与被试病原菌菌落之间的无菌区宽度。

1.2.3 活性菌株分子生物学鉴定及系统发育树构建

将筛选所得拮抗活性较好的菌株进行纯化培养,再进一步进行形态观察,记录其菌落特征、细胞形态等信息之后再进行分子生物学鉴定。使用试剂盒提取拮抗活性较好的菌株基因组 DNA,采用通用引物 36F(5'-TCTGGCTCAGGATGAACGC-3')和 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACTT-3')扩增活性细菌菌株的 16S rRNA 基因序列,使用通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4(5'-TCCTC-CGCTTATTGATATGC-3')扩增活性真菌菌株的内部转录间隔区(ITS),对具有显著抑制活性的细菌或真菌进行分子生物学鉴定。对所得 PCR 产物进行测序,并使用 National Center for Biotechnology Information (NCBI)数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)进行 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)检索,与 GenBank 中存储的其他序列进行比对。这些序列在相同的方向,即 5'~3',保存为 FASTA 格式,并上传到 MEGA X 软件(Molecular Evolutionary Genetics Analysis X)上,将序列对齐并修剪到合适的长度以获得保守区域。然后将这些修剪过的序列转换为 MEGA X 格式并保存以用于 Neighbor-joining 系统发育树的构建^[11]。

2 结果与分析

2.1 不同除草方式下茶树根系内生真菌与内生细菌的分离

从不同除草方式下茶树的无症状根系组织中分离得到 37 株内生菌(表 2)。其中,分离自防草膜覆盖除草、人工耕作除草和不除草处理的分别有 14 株、13 株和 10 株,分离自 Martin 培养基和牛肉膏蛋白胨培养基的分别有 24 株和 13 株。

表 2 不同除草方式下茶树根系内生菌的分离

管理方式	分离培养基	数量/株	内生菌菌株编号
防草膜覆盖除草	Martin 培养基	9	A1-1, A1-2, A1-3, A1-4, A1-5, A1-6, A1-7, A1-8, A1-9
	牛肉膏蛋白胨培养基	5	A2-1, A2-2, A2-3, A2-4, A2-5
人工耕作除草	Martin 培养基	10	B1-1, B1-2, B1-3, B1-4, B1-5, B1-6, B1-7, B1-8, B1-9, B1-10
	牛肉膏蛋白胨培养基	3	B2-1, B2-2, B2-3
不除草	Martin 培养基	5	C1-1, C1-2, C1-3, C1-4, C1-5
	牛肉膏蛋白胨培养基	5	C2-1, C2-2, C2-3, C2-4, C2-5

2.2 茶树根系分离的内生真菌与病原菌拮抗活性的测定

从 3 种除草方式茶园茶树根内分离出 24 株内生真菌, 为了评估其与植物病原真菌的拮抗能力, 24 株内生真菌与 5 种植物病原真菌进行了对峙培养, 其抑菌率见表 3。根据拮抗作用强弱分为三级: 强(抑制率 $\geq 75\%$)、较强($50\% \leq$ 抑制率 $< 75\%$)和弱(抑制率 $< 50\%$)^[12]。由表 3 可知, 11 株内生真菌对供试病原真菌具有较强的拮抗作用, 占内生真菌的 45.83%。其中, 对至少 1 种供试病原真菌的抑制率达 75%以上有 4 株(菌株 A1-8、C1-2、C1-3 和 C1-5), 具有强拮抗活性。

表 3 内生真菌拮抗病原真菌的抑制率

编号	卷枝毛霉		茶树轮斑病		茶树炭疽病		尖孢镰孢菌		白地霉	
	IR/%	D/mm	IR/%	D/mm	IR/%	D/mm	IR/%	D/mm	IR/%	D/mm
A1-1	38.52	0	11.76	0	0.00	0	14.14	4	32.18	0
A1-2	36.81	0	39.80	0	26.45	0	38.38	0	48.21	0
A1-3	33.82	0	30.59	0	24.80	0	11.11	0	18.62	0
A1-4	23.15	0	37.84	0	30.10	0	0.00	0	43.28	0
A1-5	44.50	0	53.73	0	45.01	0	47.12	0	40.81	0
A1-6	55.60	0	37.65	0	39.04	0	22.22	0	40.81	0
A1-7	46.20	0	48.10	0	65.21	0	70.19	0	32.18	0
A1-8	55.62	0	57.06	0	42.02	0	76.92	0	59.31	0
A1-9	49.62	0	39.41	0	1.28	0	22.22	0	28.48	0
B1-1	38.09	0	37.65	0	40.04	0	43.43	0	11.22	0
B1-2	0.00	0	41.18	0	18.01	0	28.28	0	12.45	0
B1-3	57.31	4	66.08	0	42.36	0	65.38	0	61.78	0
B1-4	47.49	2	60.29	0	45.67	0	41.35	0	18.62	5.5
B1-5	51.76	0	50.98	0	30.10	0	35.35	0	40.81	0
B1-6	34.68	0	34.71	0	42.69	0	9.09	0	38.35	0
B1-7	37.67	0	35.49	0	38.71	0	25.25	0	30.95	0
B1-8	56.45	0	33.14	0	1.94	0	28.85	0	16.15	0
B1-9	33.40	0	34.70	0	32.09	0	30.30	0	30.95	0
B1-10	49.62	0	24.51	0	19.17	0	15.15	2	17.39	3
C1-1	42.79	0	29.41	0	22.81	0	35.35	0	26.02	0
C1-2	43.64	0	84.51	0	49.31	0	69.23	0	59.19	0
C1-3	49.62	0	80.69	0	46.66	0	64.27	0	56.84	0
C1-4	45.78	0	33.73	0	47.82	0	9.09	0	35.88	0
C1-5	61.57	0	80.40	0	56.60	0	67.31	0	66.71	0

注: IR 表示内生菌对供试病原真菌的抑制率; D 表示抑菌带宽度; 加粗部分代表大于 50%的抑制率。

图 1 表明, 24 株内生真菌对卷枝毛霉(*Mucor circinelloides*)抑制率为 50%~75%的内生真菌有 6 株, 占 25%; 对茶树轮斑病(*Pseudopezalotiopsis camelliae-sinensis*)抑制率为 50%~75%的内生真菌有 5 株, 占 20.8%, 抑制率 75%以上的内生真菌有 3 株, 占 12.5%, 其中, C1-2 表现出的抑制率最高, 达到 84.52%; 对茶树炭疽病(*Colletotrichum camelliae*)抑制率为 50%~75%的内生真菌有 2 株, 占 12.5%; 对尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)抑制率为 50%~75%的内生真菌有 5 株, 占 20.8%, 抑制率在 75%以上的内生真菌共 1 株, 占 4.1%, 达到 76.92%(A1-8); 对白地霉(*Geotrichum candidum*)抑制率为 50%~75%的内生真菌共 5 株, 占 20.8%。

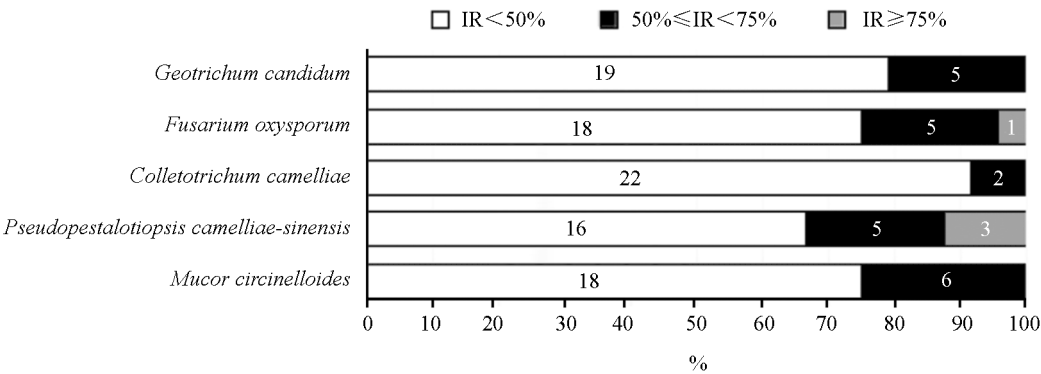


图 1 内生真菌对不同病原真菌的抑制情况

2.3 茶树根系分离的内生细菌与病原菌拮抗活性的测定

从 3 种除草方式茶园茶树根内纯化分离获得 13 株内生细菌(表 4)。由表 4 可知, 6 株内生细菌对供试病原真菌具有较强拮抗作用, 占 46.15%。菌株 A2-2 和 B2-2 对茶树轮斑病菌的抑制率超过了 80%, 显示出强抑制作用。图 2 表明, 13 株内生细菌对尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)显示出弱抑制效果, 其抑制率均低于 50%; 对卷枝毛霉(*Mucor circinelloides*)抑制率为 50%~75%的内生细菌共 4 株, 占 30.77%; 对茶树轮斑病(*Pseudopezalotiopsis camelliae-sinensis*)抑制率为 50%~75%的内生细菌共 4 株, 占 30.77%, 抑制率在 75%以上的内生细菌共 2 株, 其中, B2-2 抑制率最高, 达到 86.76%; 对茶树炭疽病(*Colletotrichum camelliae*)抑制率为 50%~75%的内生细菌共 1 株, 占 15.38%; 对白地霉(*Geotrichum candidum*)抑制率为 50%~75%的内生细菌共 1 株, 占 7.70%。结果表明, 不同内生细菌对不同病原真菌的拮抗作用和强度均有所不同。

表 4 内生细菌拮抗病原真菌的抑制率

编号	卷枝毛霉		茶树轮斑病		茶树炭疽病		尖孢镰孢菌		白地霉	
	IR/%	D/mm	IR/%	D/mm	IR/%	D/mm	IR/%	D/mm	IR/%	D/mm
A2-1	50.47	0	57.06	0	54.28	0	42.31	0	11.22	0
A2-2	60.29	3	80.39	0	0.00	0	20.19	0	50.68	0
A2-3	0.00	0	0.00	0	36.39	0	0.00	5	9.99	0
A2-4	0.00	0	15.10	0	0.00	0	19.19	6	3.82	0
A2-5	53.04	0	16.47	0	42.69	0	45.19	3	0.00	0
B2-1	0.00	0	15.10	0	20.16	0	0.00	2	12.45	0
B2-2	0.00	0	86.76	0	49.98	0	41.35	0	8.75	0
B2-3	40.23	0	42.65	0	24.80	0	18.18	0	9.99	0
C2-1	51.76	0	29.41	0	6.82	0	16.16	3	6.29	0
C2-2	0.00	0	52.75	0	6.91	0	43.43	2	6.19	0
C2-3	0.00	0	5.10	0	2.60	0	11.11	6	8.75	0
C2-4	0.00	0	12.94	0	3.10	0	0.00	0	0.00	0
C2-5	0.00	0	44.71	0	40.37	0	0.00	0	16.15	0

注: IR 表示内生菌对供试病原真菌的抑制率; D 表示抑菌带宽度; 加粗部分代表大于 50%的抑制率。

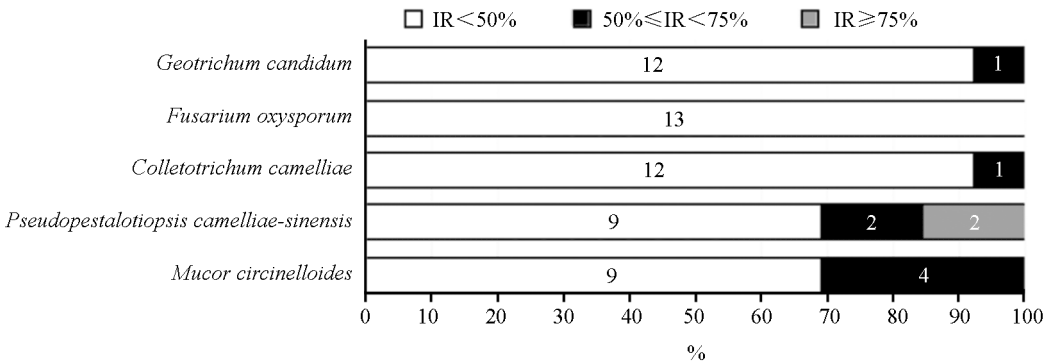


图 2 内生细菌对不同病原真菌的抑制情况

2.4 拮抗活性菌株的鉴定

根据各个菌株对峙培养及拮抗能力试验结果, 共有 11 株内生真菌和 5 株内生细菌菌株对至少 1 种病原菌的抑制率在 50% 以上, 属于拮抗活性菌株。其中, 部分内生真菌和细菌菌株与病原菌株的拮抗效果如图 3 所示。

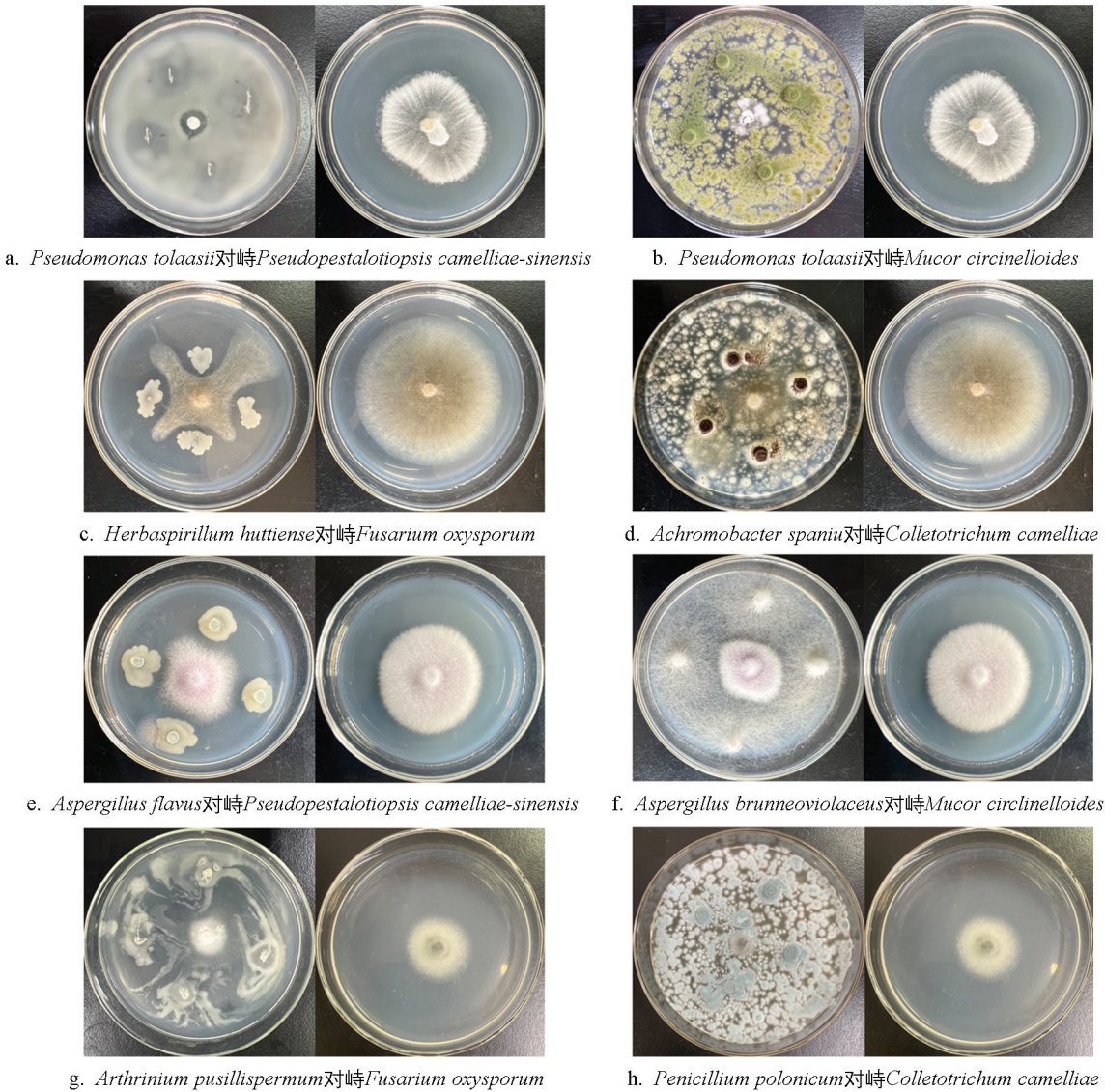


图 a~d 为内生细菌对峙结果, 图 e~h 为内生真菌对峙结果。

图 3 部分内生菌株与病原真菌的拮抗效果

通过菌株测序及分子生物学鉴定,结合 GenBank 序列比对结果,对 11 株内生真菌进行分类地位鉴定,并基于其 rDNA-ITS 序列进行了系统发育分析如图 4,其中,菌株 *Syncephalis depressa* (GenBank 登录号 MF340361) 为外源种。11 株活性菌株分别隶属于 9 个真菌种类,即青霉菌属 2 个种: *Penicillium polonicum* (A1-7) 和 *Penicillium simplicissimum* (B1-8); 曲霉菌属有 4 个种: *Aspergillus piperis* (C1-2, C1-3)、*Aspergillus flavus* (B1-3)、*Aspergillus aculeatinus* (A1-8)、*Aspergillus brunneoviolaceus* (C1-5); 镰刀菌属 1 个种: *Fusarium oxysporum* (A1-6, B1-5); 紫孢霉属 1 种: *Purpureocillium lilacinum* (B1-4); 节菱孢属 1 种: *Arthrinium pusillispermum* (A1-5)。

从防草膜覆盖茶树根内分离出的曲霉菌属 A1-8 对 4 株病原真菌的抑制率达到 50% 以上,其中,对 *Fusarium oxysporum* 抑制率达到 76.92%,属于强拮抗作用;从人工耕作除草茶树根内分离出的曲霉菌属 B1-3 对 4 株病原真菌的抑制率达到 50% 以上;从对照不除草茶树根内分离出的曲霉菌属 C1-5 对 5 株病原真菌的抑制率达到 50% 以上,其中,对 *Pseudopestalotiopsis cameliae-sinensis* 抑制率达到 80.40%,属于强拮抗作用。同时,曲霉菌属 C1-2 和 C1-3 对 *Pseudopestalotiopsis cameliae-sinensis* 的抑制率分别达到 84.51% 和 80.69%。

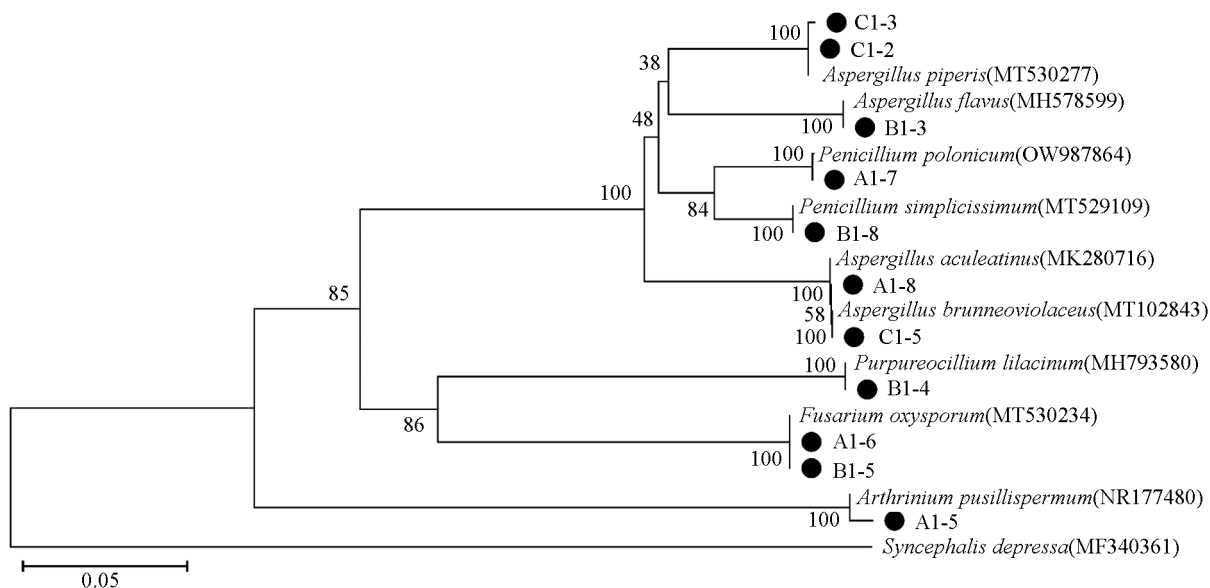


图 4 基于 11 株活性内生真菌 rDNA-ITS 序列构建的系统发育分析

5 株内生细菌经过形态学特征和 GenBank 序列比对分析,其分子生物学鉴定及菌株的 16S rRNA 序列系统发育树构建分析如图 5,其中,菌株 *Escherichia coli* (NC002127) 为外源种。5 株活性菌株分别隶属于 4 个菌种,即假单胞菌属 1 个种: *Pseudomonas tolaasii* (A2-2); 草螺菌属 1 个种: *Herbaspirillum huttiense* (A2-5, C2-1); 无色杆菌属 2 个种: *Achromobacter xylosoxidans* (B2-2)、*Achromobacter spanius* (A2-1)。从防草膜覆盖组中分离出的无色杆菌 *Achromobacter spanius* (A2-1) 和假单胞菌 *Pseudomonas tolaasii* (A2-2) 对 3 株病原真菌的抑制率达到 50% 以上,其中, A2-2 对 *Pseudopestalotiopsis cameliae-sinensis* 抑制率达到 80.39%,属于强拮抗作用;从人工耕作除草处理中分离出的无色杆菌属 *Achromobacter xylosoxidans* (B2-2) 对 *Pseudopestalotiopsis cameliae-sinensis* 抑制率达到 86.76%。

3 讨论与结论

3.1 讨论

茶树各种病虫害滋生与流行正威胁着世界各地茶叶的可持续发展,而内生菌与宿主植物之间能够通过建立密切的互惠共生关系^[13],可诱导植物抗病性从而达到防治植物病害的目的。同时,防草膜可以通过相应的覆盖效果抑制茶树病害。首先,其物理屏障作用阻止可能携带不同疾病孢子的雨水或灌溉水进入土壤^[14];其次,防草膜覆盖可以改变茶园土壤及茶树根际的温湿度与养分状况等条件,进而影响内生菌在茶

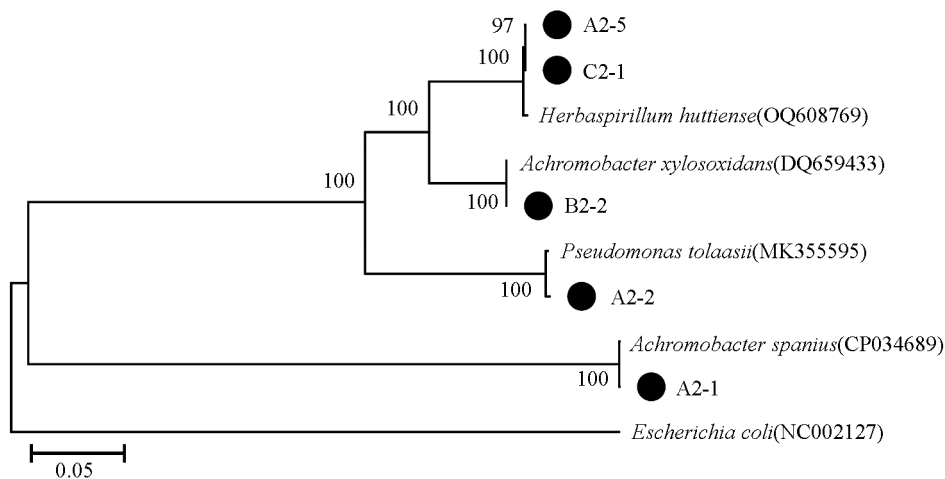


图 5 基于 5 株活性内生细菌 16S rRNA 序列构建的系统发育分析

树根内定殖与分布。在拮抗菌的分离鉴定中, 防草膜处理下鉴定出假单胞菌(*Pseudomonas tolaasii*), 对茶树常见病原菌茶树轮斑病(*Pseudopestalotiopsis camelliae-sinensis*)的抑制率达 80.39%。假单胞菌是一种广泛用于防治植物土传病害的生物防治剂^[15], 防草膜可能对竞争生态位的有益生物提供定殖位来抑制病原体^[16], 从而达到防治植物病害的目的。

镰刀菌是一种普遍存在的土传真菌^[17], 其在生长和代谢过程中也会产生一些新兴的真菌毒素, 这可能导致植物—土壤负反馈^[18]。不仅如此, 真菌毒素会污染作物, 长期接触会对茶树健康造成危害^[19]。本研究也证实, 在拮抗真菌的分离鉴定中, 防草膜处理中分离出对常见土传病害尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)拮抗效果较好的青霉菌(*Penicillium polonicum*, 70.19%)和曲霉菌(*Aspergillus aculeatinus*, 76.92%), 表明防草膜处理茶树根内存在相应的内生菌可以减少病原菌的积累和土壤病害的发生, 增加茶树根系内生菌株多样性和抗菌能力。

在农业可持续发展进程中, 微生物降解农药残留(特别是敌草隆), 是修复环境污染的有效方法之一^[20]。无色杆菌(*Achromobacter xylosoxidans*)作为一种新型生物防治材料, 对多种植物病原真菌具有广谱抗性, 对小麦赤霉病有较好的防治效果^[21], 同时能够高效降解敌草隆^[22]。本研究从人工耕作除草茶树根系中分离出的无色杆菌(*Achromobacter xylosoxidans*, B2-2)和淡紫紫孢菌(*Purpureocillium lilacinum*, B1-4)对茶树轮斑病(*Pseudopestalotiopsis camelliae-sinensis*)的抑制率达 86.76%和 60.29%。淡紫紫孢菌(*Purpureocillium lilacinum*)对黑色聚乙烯地膜有较好的降解能力^[23]。虽然防草膜覆盖会导致土壤中存在大量的塑料碎片及污染问题, 但是, 人工耕作除草茶树根中也分离出淡紫紫孢菌(B1-4), 说明茶树根内普遍分布有对地膜具备降解能力的淡紫紫孢菌(*Purpureocillium lilacinum*), 它有可能成为未来茶园土壤污染防治的研究方向。

本研究从不除草茶树根系中鉴定出两种曲霉菌(*Aspergillus piperis*, C1-2; *Aspergillus brunneoviolaceus*, C1-5)对茶树轮斑病(*Pseudopestalotiopsis camelliae-sinensis*)的抑制率均在 80%以上。这两种内生曲霉菌的发现, 表明茶树根系内生菌株能够有效抑制病原真菌的生长, 有助于茶园病害的绿色防控。未来的研究将进一步改进茶树根系内生菌株的分离技术、优化培养基和培养条件, 拓宽菌种的分离范围, 深入探讨这些内生菌株的生物防治潜力, 为茶叶领域的新型活性抑菌物质和生物农药的研发提供菌剂资源。

3.2 结论

本研究从 3 种不同除草处理的茶树根系中分离出具有拮抗活性的内生菌株。防草膜覆盖处理分离出 4 株内生真菌和 3 株内生细菌, 其中 *Aspergillus piperis* 和 *Aspergillus brunneoviolaceus* 对茶树轮斑病的抑制率达 80%以上, 表现出强拮抗作用; 人工耕作除草处理分离出的 *Achromobacter xylosoxidans* 和 *Purpureocillium lilacinum* 分别对茶树轮斑病的抑制率为 86.76%和 60.29%。防草膜处理对多种病害, 尤其是土传性病害尖孢镰刀菌表现出较好防治效果。研究结果为茶园病害防控及微生物农药研发提供了科学依据, 有助于推动茶园可持续发展。

参考文献:

- [1] 郑世仲, 周子维, 陈晓慧, 等. 拮抗炭疽病的茶树内生菌筛选、鉴定及培养条件优化 [J]. 茶叶科学, 2023, 43(2): 205-215.
- [2] 李方舟. 普洱茶树叶片内生细菌 *Bacillus velezensis* FZ06 的基因组测序及抗菌活性代谢产物研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2020.
- [3] 张华琳, 王科翰, 陈雪冰, 等. 茶树内生菌的研究进展 [J]. 农业技术与装备, 2022(2): 9-11.
- [4] 武警, 陈楠楠, 韩梦琳, 等. 茶树根系耐铝促生内生细菌的分离鉴定及其特性研究 [J]. 茶叶科学, 2022, 42(5): 610-622.
- [5] 谢丽华. 茶树内生真菌的分离、相互作用关系及菌株抗菌活性成分的初步研究 [D]. 福州: 福建师范大学, 2007.
- [6] 黄晓琴, 张丽霞, 刘会香, 等. 抗茶树冰核细菌内生菌的筛选及鉴定 [J]. 茶叶科学, 2015, 35(1): 97-102.
- [7] 张林平, 张仪平, 陈静, 等. 油茶炭疽病拮抗内生细菌的筛选及鉴定 [J]. 生物灾害科学, 2020, 43(1): 14-18.
- [8] 宋维兴. 植物内生菌对镉和微塑料污染下花生生长及土壤性质的影响 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2023.
- [9] YAN Y X, WANG C L, WAN R Y, et al. Influence of Weeding Methods on Rhizosphere Soil and Root Endophytic Microbial Communities in Tea Plants [J]. Frontiers in Microbiology, 2024, 15: 1334711.
- [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): 343-347.
- [11] AFZAL I, SHINWARI Z K, SIKANDAR S, et al. Plant Beneficial Endophytic Bacteria: Mechanisms, Diversity, Host Range and Genetic Determinants [J]. Microbiological Research, 2019, 221: 36-49.
- [12] 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): 126-131.
- [13] 马勉娣, 张秀英, 程玉, 等. 再接种内生真菌对葡萄叶内生真菌群落结构的影响 [J]. 微生物学通报, 2014, 41(12): 2458-2465.
- [14] IQBAL R, RAZA M A S, VALIPOUR M, et al. Potential Agricultural and Environmental Benefits of Mulches—A Review [J]. Bulletin of the National Research Centre, 2020, 44(1): 75.
- [15] WELLER D M. Pseudomonas Biocontrol Agents of Soilborne Pathogens: Looking back over 30 Years [J]. Phytopathology, 2007, 97(2): 250-256.
- [16] XU J, WEI Y, LI F L, et al. Regulation of Fungal Community and the Quality Formation and Safety Control of Pu-Erh Tea [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2022, 21(6): 4546-4572.
- [17] SCHERM B, BALMAS V, SPANU F, et al. *Fusarium culmorum*: Causal Agent of Foot and Root Rot and Head Blight on Wheat [J]. Molecular Plant Pathology, 2013, 14(4): 323-341.
- [18] YANG M, ZHANG X D, XU Y G, et al. Autotoxic Ginsenosides in the Rhizosphere Contribute to the Replant Failure of *Panax Notoginseng* [J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0118555.
- [19] GAUTIER C, PINSON-GADAIS L, RICHARD-FORGET F. *Fusarium* Mycotoxins Enniatins: an Updated Review of Their Occurrence, the Producing *Fusarium* Species, and the Abiotic Determinants of Their Accumulation in Crop Harvests [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(17): 4788-4798.
- [20] VERMA J P, JAISWAL D K, SAGAR R. Pesticide Relevance and Their Microbial Degradation: A-State-of-Art [J]. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 2014, 13(4): 429-466.
- [21] 邓云, 苏妍, 姚锦爱, 等. 一株木糖氧化无色杆菌的分离鉴定及其对小麦赤霉病的防治效果 [J]. 江苏农业学报, 2023, 39(2): 328-335.
- [22] 王浩东, 张嘉宇, 钱灿灿, 等. 敌草隆降解菌 SL-6 的筛选鉴定及降解条件优化 [J]. 华南农业大学学报, 2022, 43(1): 94-101.
- [23] 王蕾, 惠向娟, 支慧, 等. 一株淡紫紫孢菌对聚乙烯地膜降解能力的研究 [J]. 干旱地区农业研究, 2023, 41(4): 217-225.