

管飘萍, Enkhbayar Munkhbayer, 黄紫贝, 等. 茶叶中 23 株真菌的分离鉴定[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(16): 285-290.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.16.053

茶叶中 23 株真菌的分离鉴定

管飘萍^{1,2}, Enkhbayar Munkhbayer^{1,2}, 黄紫贝^{1,2}, 黎顺庚³, 嵇静慧⁴,
陈诗涵^{1,2}, 王海燕⁵, 刘文博^{1,2}, 卞建春^{1,2}

(1. 扬州大学兽医学院, 江苏扬州 225009; 2. 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏扬州 225009;
3. 江苏溧阳市天目湖龙鑫特色农机专业合作社, 江苏溧阳 213334; 4. 江苏省溧阳市农业技术推广中心, 江苏溧阳 213300;
5. 江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300)

摘要:我国茶叶特别是发酵茶叶中含有许多有益真菌,其代谢产物具有抗菌、抗癌、降脂、降压的功能。目前,关于茶叶中真菌功能的研究很多,但在畜牧业中尚无相关应用研究。取湖南安化金花茯砖茶、天福南糯山熟饼、天福茗茶、天福白茶、安吉普洱茶、天福普洱、祁门红茶和金茯茶共 8 种茶叶进行真菌分离、纯化,共得到 23 株菌株,通过形态学和 ITS 基因序列的鉴定,共得到拟茎点霉菌 1 株,变色栓菌 1 株,枝状枝孢菌 1 株,黑曲霉 2 株,曲霉菌 1 株,冠突曲霉 2 株,阿姆斯特丹曲霉 6 株,棕曲霉 2 株,格孢菌 1 株,扩展青霉菌 1 株,拟盘多毛孢菌 1 株,球孢枝孢菌 2 株,变色曲霉 2 株。结果为这些真菌的进一步研究和在生产实践中的应用提供了物质基础。并且将其中的优势菌属冠突散囊菌进行扩大培养,为后期的生产实践做好准备。

关键词:茶叶;真菌;分离;鉴定;冠突散囊菌;阿姆斯特丹曲霉

中图分类号: TS272.7;S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)16-0285-06

茶叶种类繁多,不同国家的茶叶分类方法各有不同。我国根据出口茶类别,将茶叶一共分为 7 类,分别是绿茶、红茶、黄茶、黑茶、白茶、青茶。祁门红茶属于红茶,茯砖茶、普洱茶和天福南糯山熟饼属于黑茶,天福白茶属于白茶。

我国多种茶中存在有益的真菌,尤其是渥堆发酵的茶叶,其代谢产物具有降血脂^[1-3]、抗动脉粥样硬化^[4-6]、抗菌以及抗氧化^[7]等多种功能,冠突散囊菌就是其中之一,它是茯砖茶中的主要优势菌种,是茯砖茶后段发酵的益生菌,可在茶叶上形成菌苔,呈金黄色,俗称“金花”。冠突散囊菌能够在高温下存活并能产生各种胞外酶,能有效地催化茶叶中多酚、氨基酸和多糖等成分发生降解和转化^[8]。温琼英证实了冠突散囊菌能分解茶中单宁物质和淀粉,减少茶叶的苦涩口感,使茶味香醇^[9]。黄群

等的研究表明,冠突散囊菌有助于人体消化吸收淀粉和蛋白质^[10]。目前这些研究主要集中于茶叶学和医学领域,而在畜牧学方面的应用研究很少。本试验于 2019 年在扬州大学动物医院进行,拟从茶叶中分离出有益的真菌,研究其代谢产物和过程,并将其应用于畜牧学领域。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 茶叶来源 试验所用的茶叶均通过网购或者在茶叶店购买获得,有湖南安化金花茯砖茶(2007)、天福南糯山熟饼、天福茗茶、天福白茶、安吉普洱茶、天福普洱茶、祁门红茶和湖南安化金茯茶(2014)共 8 种茶叶。

1.1.2 主要器材 超净工作台(苏州净化设备有限公司),Mini Plus 小型离心机(Eppendorf 公司),PCR 仪[爱普拜斯应用生物系统贸易(上海)有限公司],DYY-8C 型电泳仪(北京市六一仪器厂),冰箱,恒温培养箱(上海福玛实验设备有限公司),电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司),电热恒温金属浴(上海比朗仪器有限公司)等。

1.1.3 主要试剂和培养基 80 万 U/支注射用青霉素钠、100 万 U/支注射用硫酸链霉素(山东鲁抗

收稿日期:2020-05-22

基金项目:现代农业白化茶夏秋鲜叶制益生茶提质增效技术研究(编号:LB2017002)。

作者简介:管飘萍(1995—),女,江苏溧阳人,硕士研究生,主要从事人兽共患病和动物疫病防治研究。E-mail:1849590554@qq.com。

通信作者:刘文博,博士,副教授,主要从事人兽共患病和动物疫病防治研究。E-mail:lwb@yzu.edu.cn。

医药股份有限公司); Fungi Identification PCR Kit 试剂盒[宝生物工程(大连)公司]; TIANamp Genomic DNA Kit 试剂盒、Super GelRed™ 10 000 × (苏州宇恒生物科技有限公司); 马铃薯葡萄糖琼脂粉(上海中科昆虫生物技术开发有限公司); *D*(+) - 无水葡萄糖(国药集团化学试剂有限公司); 马铃薯浸粉(青岛日水生物技术有限公司); Trypton、Yeast Extract(Thermo Fisher Scientific 公司), Agar(南京百斯凯科技有限公司)等。

1.2 方法

1.2.1 真菌培养

1.2.1.1 培养基的配制 PDA 培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂粉 39 g, 加超纯水定容至 1 L, 121 °C 高压灭菌 15 min; 改良 LB 培养基: Tryptone 4 g, Yeast Extract 4 g, 葡萄糖 16 g, 琼脂粉 6 g, 121 °C 高压灭菌 15 min。

1.2.1.2 茶叶样本的处理 取购得的湖南安化金花茯砖茶(2007)、天福南糯山熟饼、天福茗茶、天福白茶、安吉普洱茶、天福普洱、祁门红茶和湖南安化金花茶(2014), 各 5 g 于 15 mL 离心管中, 标记为 1~8, 备用。用超纯水溶解青霉素钠和硫酸链霉素至终浓度分别为 50 μg/mL 和 100 μg/mL, 取 5.5 mL 加入上述 8 个离心管中, 常温孵育 3 h。

1.2.1.3 真菌的培养 取 200 μL 上清液分别接种涂布于 PDA 固体平板和改良 LB 平板上, 28 °C, 保湿培养。

1.2.2 真菌纯化 蘸取分离培养得到的每种真菌的单个菌落, 接种于 PDA 固体培养基中央, 分别纯化培养, 共分离纯化培养 3 次, 直至形成单个菌落。

1.2.3 真菌鉴定

1.2.3.1 真菌 DNA 提取 取纯化培养 3 次后的真菌, 每个样都取火柴头大小, 放入灭菌的 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL 高压灭菌后的磷酸缓冲盐(PBS)溶液, 充分振荡混匀, 加入直径为 0.5 mm 的磁珠, 用振荡仪振荡研磨 3 min 后, 观察样本是否被充分研磨。如果仍然有大块的样本未被研磨破碎, 则采取水煮裂解法, 裂解 10 min 后, 再次用振荡仪研磨, 直至样本被研磨至无肉眼可见的大的团块。以 12 000 r/min 的转速离心 2 min, 取上清液置于灭菌后的 1 mL 离心管中标号, 保存于 -20 °C 冰箱中备用。

1.2.3.2 PCR 反应扩增 试验所需的真菌基因组 DNA 可通过试剂盒 TIANamp Genomic DNA Kit 提

取, 提取产物采用 0.8% 的琼脂糖凝胶进行电泳鉴定。

用于 ITS 序列扩增的反应体系见表 1。扩增条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 53 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。将获得的阳性样本的 PCR 扩增产物送至南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序, 使用 Seq Forward Primer 和 Seq Reverse Primer 进行 DNA 测序。测序引物序列为 Seq Reverse Primer: 5' - GAGC GGATAACAATTTTCACACAGG - 3'; Seq Forward Primer: 5' - CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC - 3'。

表 1 PCR 反应体系

反应液	使用量 (μL)
模板 DNA	5
PCR Premix	25
ITS Forward Primer	0.5
ITS Reverse Primer	0.5
dH ₂ O	19

1.2.4 冠突散囊菌的扩大培养

1.2.4.1 液体培养基配制 PDA 液体培养基: 取 49 g 马铃薯浸粉, 溶于 1 000 mL 蒸馏水中, 121 °C 高压灭菌 15 min, 备用; 马铃薯安化茶汤培养基: 将洗净的马铃薯去皮切块, 称取 200 g, 加水煮沸 30 min, 用纱布过滤, 取滤液, 加葡萄糖 20 g, 用去离子水定容至 1 L, 121 °C 高压灭菌 15 min, 备用。

1.2.4.2 扩大培养 将纯化好的冠突散囊菌分别接种于装有 300 mL PDA 液体培养基和马铃薯安化茶汤培养基的锥形瓶中, 于 28 °C 下保湿培养。

2 结果与分析

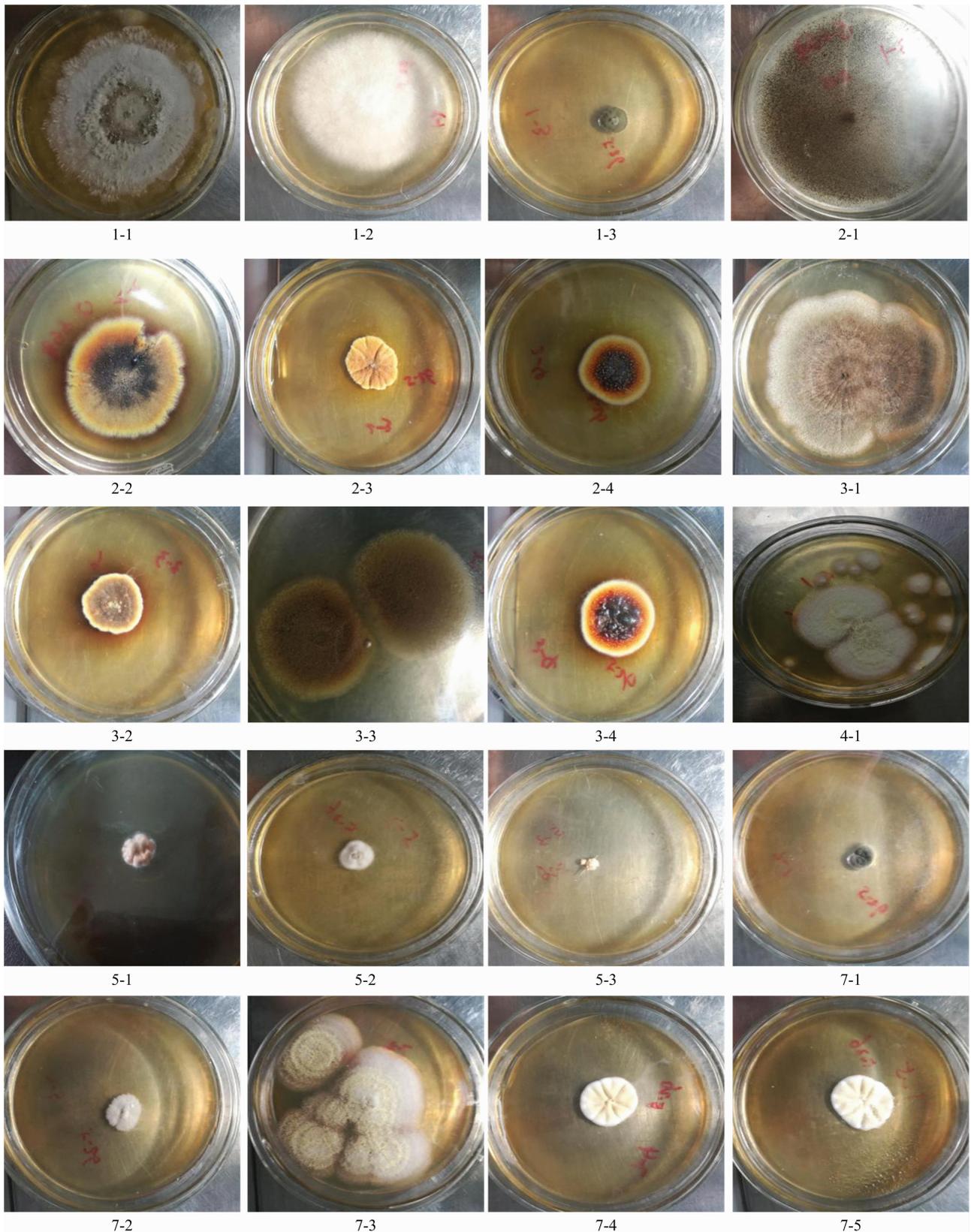
2.1 真菌形态学鉴定

分离菌株纯化后的菌落形态见图 1 和表 2。

2.2 真菌分子鉴定结果

23 株分离株 DNA 经 PCR 扩增后的电泳结果见图 2、图 3。

测出序列后, 将所得基因序列用 EditSeq 生物软件正确打开后, 进入 NCBI 网站主页, 选择 BLAST 中的 Nucleotide BLAST 进行序列比对分析, 再结合表型特征确定分离到的真菌的种类。其中, 由于第 6 种茶叶天福普洱茶中未分离出真菌, 因此没有测序结果。将获得的基因序列提交至 GenBank 上, 得序列号 MH395152 ~ MH395172 和 MH424452 ~ MH424453(表 3)。



1-1、1-2、1-3 为从湖南安化金花茯砖茶(2007)中纯化所得真菌；2-1、2-2、2-3、2-4 为从天福南糯山熟饼中纯化所得真菌；3-1、3-2、3-3、3-4 为从天福茗茶中纯化所得真菌；4-1 为从天福白茶中纯化所得真菌；5-1、5-2、5-3 为从安吉普洱茶纯化所得真菌；7-1、7-2、7-3、7-4、7-5 为从祁门红茶中纯化所得真菌；8-1、8-2、8-3 为从湖南安化金花茯茶(2014)中纯化所得真菌；第 6 种茶叶天福普洱茶中未分离出真菌

图1 分离菌株的菌落形态

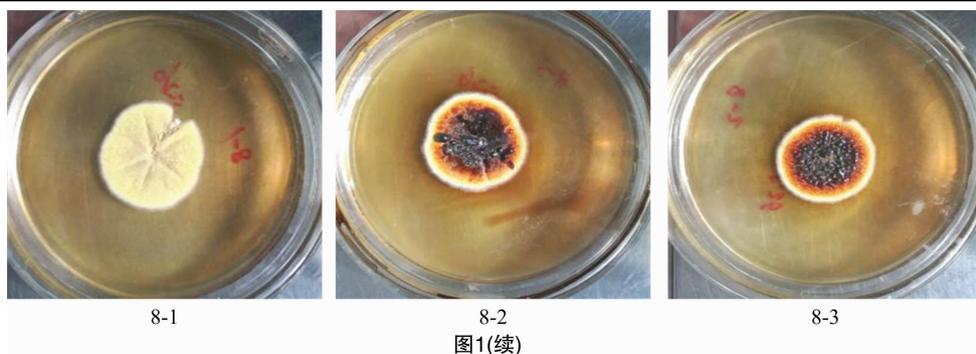
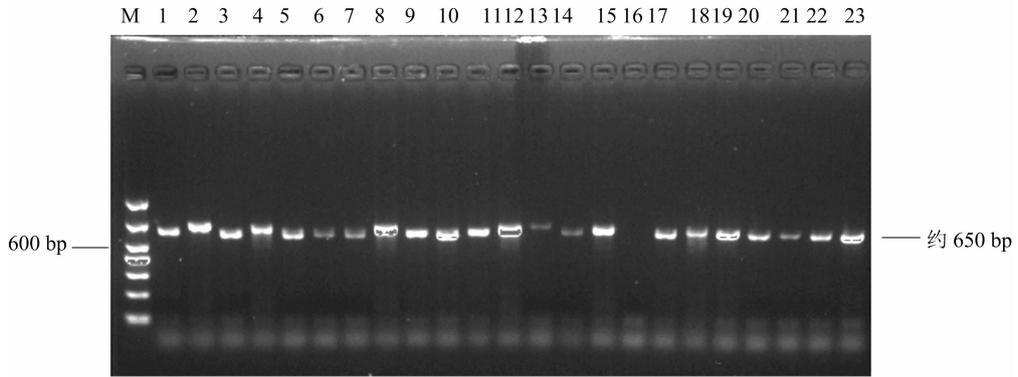


图1(续)

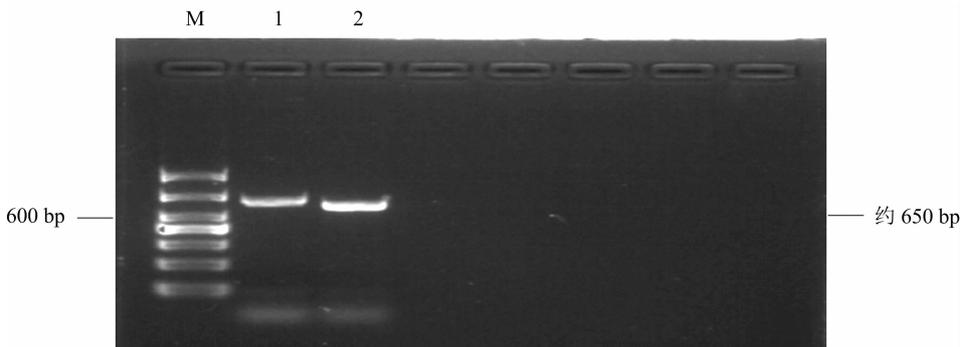
表2 23株真菌的菌落形态

菌种编号	培养第6天时 直径(mm)	培养第9天时 直径(mm)	菌落形态
1-1	6.2	8.0	菌落呈白色,菌丝生长呈发散状,边缘不规则,后期菌落中央出现零散黑色,背面呈黄白色,有地方呈黄色甚至棕色
1-2	4.1	7.5	菌落呈白色,后期菌丝生长浓密程度不同,长成稍密、疏、密3圈
1-3	1.0	1.6	菌落呈深绿色,形状不规则,背面呈黑色
2-1	6.8	8.6	菌落初始为白色,后表面出现深灰褐色颗粒物,菌落背面为白色
2-2	2.6	4.5	菌落初始为白色,后呈现3种颜色,由内到外依次为褐色、黄色、白色,菌落周围的培养基出现茶褐色,中央表面出现褐色水珠
2-3	0.9	2.4	菌落初始为白色,后呈现3种颜色,由内到外依次为黄褐色、黄色、白色,菌落表面有放射状皱褶
2-4	2.6	4.1	菌落初始为白色,后呈现3种颜色,由内到外依次为黄褐色、黄色、白色
3-1	6.4	8.6	菌落初始为白色,后中央逐渐出现绿色,并向周围扩散,中央颜色加深至灰绿色,表面有树叶状纹路,背面呈土黄色
3-2	1.7	3.1	菌落初始为白色,后呈现3种颜色,由内到外依次为黄绿色、黄色、白色
3-3	0.9	1.6	菌落初始为白色,后呈现3种颜色,由内到外依次为黄绿色、黄色、白色
3-4	2.7	4.0	菌落初始为嫩黄色,后呈现3种颜色,由内到外依次为黄棕色、黄色、白色
4-1	4.0	6.8	菌落呈现白色,表面产生淡黄色孢子,背面呈白色,中央呈褐色
5-1	1.2	1.8	菌落形状不规则,颜色为淡粉色,较为坚硬,有皱褶,中间有凸起,会逐渐往上生长,拱起成小山状,背面中央逐渐呈褐色
5-2	1.1	1.7	菌落初始周边呈淡粉色,中央呈白色,中央有小凸起,后形状不规则,背面呈偏黄,中央呈黄色
5-3	0.8	1.1	菌落初始形状不规则,颜色呈白色,后中央向上拱起,颜色呈白绿色,背面中央呈白色,周边呈淡黄褐色
7-1	0.9	1.4	菌落初始形状不规则,颜色为灰绿色,后形状不平整,中央向上拱起,背面中央呈黄绿色,周边呈深绿色
7-2	0.8	2.3	菌落初始形状不规则,颜色为白色,不平整,后中央向上拱起,周边呈淡白色
7-3	3.8	6.4	菌丝颜色为白色,表面长有黄色孢子,背面呈白色,中央呈褐色
7-4	1.8	3.2	菌落较厚,白色,中央出现黄色,表面有放射状皱褶
7-5	1.4	3.2	菌落较厚,白色,中央出现黄色,表面有放射状皱褶
8-1	2.4	4.1	菌落初始为白色,后中央慢慢变为淡黄色,周边有一圈透明带
8-2	2.4	4.1	菌落初始为白色,后中央慢慢变为黄色,逐渐分为4个颜色环,由内向外分别是棕色、黄棕色、金黄色、白色,周边有一圈透明带
8-3	1.3	3.7	菌落初始为白色,后呈现3种颜色,由内到外依次是褐色、黄色、白色,菌落周围的培养基变为茶褐色,中央表面出现褐色水珠



M—DL 1000 DNA Marker; 1—1-1号样品; 2—1-2号样品; 3—1-3号样品; 4—2-1号样品; 5—2-2号样品; 6—2-3号样品; 7—2-4号样品; 8—3-1号样品; 9—3-2号样品; 10—3-3号样品; 11—3-4号样品; 12—4-1号样品; 13—5-1号样品; 14—5-2号样品; 15—5-3号样品; 16—7-1号样品; 17—7-2号样品; 18—7-3号样品; 19—7-4号样品; 20—7-5号样品; 21—8-1号样品; 22—8-2号样品; 23—8-3号样品

图2 茶叶中 23 株真菌的 PCR 扩增结果



M—DL 1000 DNA Marker; 1—阳性对照; 2—7-1号样品

图3 茶叶中 23 株真菌的 PCR 扩增结果

2.3 冠突散囊菌扩大培养结果

静置培养 5 d 后, 2 种培养基中均出现菌落(图 4、图 5), 但是马铃薯安化茶汤液体培养基中的菌落比 PDA 液体培养基中的菌落长得更快更多, 能形成菌苔。

3 讨论与结论

本试验中茶叶真菌首先采用改良 LB 培养基和 PDA 培养基一起培养, 纯化时均采用 PDA 培养基培养。经试验, 所有菌株都生长良好。同一种茶叶中分离培养所得菌株, 经分子学鉴定后为同一种真菌的形态也有所不同, 如 2-3 和 2-4 以及 3-2、3-3 和 3-4, 它们为同一种真菌, 但在 PDA 培养基上菌落形态不一致, 因此用形态学方法很难进行具体区分, 具体的鉴定还需要用分子生物学的方法。

在分离到的 23 种真菌中, 主要的优势菌属为黑曲霉、冠突曲霉菌、阿姆斯特丹曲霉、棕曲霉和变色曲霉。在天福南糯山熟饼和天福茗茶中都分离到了黑曲霉; 在天福茗茶和湖南安化金花茶(2014)中

都分离到了阿姆斯特丹曲霉; 在天福白茶和祁门红茶中都分离到了棕曲霉, 由于以上 3 种真菌都是曲霉菌属, 可以得出, 本试验的大优势菌属就是曲霉菌属。接下来将对优势菌的代谢产物和代谢过程进行研究, 评价其抑菌和抗癌作用, 为其在畜牧业生产中的应用打下基础。枝孢属真菌是植物病原菌, 分布广泛, 可以从土壤、空气及各种有机质中分离得到。本试验在湖南安化金花茯砖茶(2007)、祁门红茶中均有分离到枝孢属真菌, 普洱茶发酵和贮藏中也发现有枝孢属真菌^[11], 目前对枝孢属真菌的研究较少, 有待进一步研究。拟茎点霉属真菌既是重要的植物病原, 可引起多种病害, 又是植物的一种内生真菌, 可与植物相互作用, 目前已作为致病菌在多种植物中分离到^[12-13], 本试验在湖南安化金花茯砖茶(2007)和安吉普洱中也有发现, 表明茶叶在生产过程中并未能完全抑制植物病原菌的生长, 且有这类真菌的茶叶中冠突散囊菌等优势真菌明显较少, 这些病原菌是否对茶叶的制作过程以及是否具有潜在毒性还需进一步研究。

表3 真菌鉴定结果

茶叶	分离株	结果	基因序列号
湖南安化金花茯	1-1	拟茎点霉菌	MH395152
砖茶(2007)	1-2	变色栓菌	MH395153
	1-3	枝状枝孢菌	MH395154
	2-1	黑曲霉	MH395155
天福南糯山熟饼	2-2	曲霉菌	MH395156
	2-3	冠突散囊菌	MH395157
	2-4	冠突散囊菌	MH395158
	3-1	黑曲霉	MH395159
天福茗茶	3-2	阿姆斯特丹曲霉	MH395160
	3-3	阿姆斯特丹曲霉	MH395161
天福白茶	3-4	阿姆斯特丹曲霉	MH395162
	4-1	棕曲霉	MH395163
安吉普洱茶	5-1	拟盘多毛孢菌	MH395164
	5-2	格孢菌	MH395165
	5-3	扩展青霉菌	MH395166
祁门红茶	7-1	球孢枝孢菌	MH395167
	7-2	球孢枝孢菌	MH395168
	7-3	棕曲霉	MH395169
	7-4	变色曲霉	MH395170
	7-5	变色曲霉	MH395171
湖南安化金花茯茶 (2014)	8-1	阿姆斯特丹曲霉	MH395172
	8-2	阿姆斯特丹曲霉	MH424452
	8-3	阿姆斯特丹曲霉	MH424453



图4 PDA 液体培养基培养结果

冠突散囊菌作为茶叶中的优势菌属,且有降脂、抗菌、抗氧化等多种功能,对其进行扩大培养,结果发现,马铃薯安化茶汤液体培养基更适合冠突散囊菌的生长,生长速度明显高于成品的PDA液体培养基,这可能是由于茶汤中含有更适于冠突散囊



图5 马铃薯安化茶汤液体培养基培养结果

菌生长的营养物质,对此进一步研究可以优化冠突散囊菌的培养条件。

参考文献:

- [1]张萍. 金花茶的花提取物降血脂作用研究[D]. 大连:大连理工大学,2015.
- [2]Sang M L,Chae W K,Jung K K,et al. GCG-rich tea catechins are effective in lowering cholesterol and triglyceride concentrations in hyperlipidemic rats[J]. *Lipids*,2008,43(5):419-429.
- [3]Maron D J,Lu G P,Cai N S,et al. Cholesterol-lowering effect of a theaflavin-enriched green tea extract;a randomized controlled trial[J]. *Archives of Internal Medicine*,2003,163(12):1448-1453.
- [4]卢春毅. 金花茶降低衰老机体动脉粥样硬化风险的作用[D]. 南宁:广西医科大学,2012:2-3.
- [5]Kavantzias N,Chatziioannou A,Yanni A E,et al. Effect of green tea on angiogenesis and severity of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbit[J]. *Vascular Pharmacology*,2006,44(6):461-463.
- [6]Young W,Hotovec R L,Romero A G. Tea and atherosclerosis[J]. *Nature*,1967,216:1015-1016.
- [7]Zhang L,Zhang Z Z,Zhou Y B,et al. Chinese dark teas: postfermentation, chemistry and biological activities[J]. *Food Research International*,2013,53(2):600-607.
- [8]王志刚,童哲,程苏云. 茯砖茶中霉菌数量和散囊菌鉴定及利弊分析[J]. *食品科学*,1992(5):29-33.
- [9]温琼英. 茯砖茶中主要微生物的研究[J]. *茶叶通讯*,1986(4):19-21.
- [10]黄群,陈林杰,李彦坡,等. 冠突散囊菌黑茶发酵液对消化酶活性影响的研究[J]. *微生物学通报*,2007,34(5):917-920.
- [11]路伟尧. 普洱茶发酵微生物的溯源分析[D]. 北京:北京化工大学,2013:31-32.
- [12]张秀伟,张鹏,李用奇. 金刺梨黑斑病原菌的分离及鉴定[J]. *中国南方果树*,2019,48(2):106-109.
- [13]杨绍丽,吴仁锋. 茄子烂籽病的病原鉴定[J]. *湖北农业科学*,2017,56(13):2455-2457.