

马蕊,林勇,马婷婷.丛枝菌根真菌对六堡茶茶叶品质及其相关基因表达的影响[J].江苏农业科学,2022,50(17):157-163.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.17.025

丛枝菌根真菌对六堡茶茶叶品质及其相关基因表达的影响

马蕊¹,林勇²,马婷婷¹

(1.广西职业技术学院,广西南宁 530226; 2.湖南农业大学园艺园林学院,湖南长沙 410128)

摘要:采用盆栽试验,设置接种根内根孢囊霉(*Rhizophagus intraradices*, RI)、摩西斗管囊霉(*Funneliformis mosseae*, FM)、浅窝无梗囊霉(*Acaulospora lacunosa*, AL)及3种丛枝菌根真菌(AMF)混合接种处理(MX),以不接种为对照(CK),探索AMF对六堡茶化学组分及其相关品质参数的影响,以期为今后将菌根技术应用于茶树栽培提供参考。结果表明,接种AMF处理的侵染率为22.74%~51.33%,接种AMF整体提高了茶树株高、叶面积及生物量累积,其效果表现为CK<接种AL<接种MX<接种FM<接种RI。接种AMF均显著提高了茶叶养分(N、P、K、Ca、Mg、Mn、Fe、Cu、Zn)含量及相关品质参数(多糖、总可溶性蛋白、茶多酚、儿茶素、总黄酮、咖啡碱含量),其中FM、RI处理的养分含量及品质皆显著优于其他处理,且多AMF混合处理没有表现出叠加效应,表明不同AMF物种之间存在相互干扰作用。此外,酶基因中的*CsAPX*、*CsTCSI*、*CsPAL*、*CsC4H*、*CsF3H*、*CsDFR*与其对应的品质参数表现出相同趋势,表明AMF可以通过上调相关基因的表达来促进次生代谢物的合成,从而影响茶叶品质。特别要注意的是,氨基酸含量与*CsGDH*、*CsGS*和*CsGOGAT*表达量无明显相关,其含量的增加是菌丝中氨基酸转移的结果。综上,接种AMF可促进茶树生长发育和对养分含量的吸收,并通过上调相关基因表达来促进品质形成,但是不同AMF种类间存在互相干扰作用,以单独接种根内根孢囊霉(*Rhizophagus intraradices*)的效果最佳。

关键词:丛枝菌根真菌;六堡茶;次生代谢物;茶多酚;儿茶素;基因表达水平

中图分类号:S571.101;S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)17-0157-07

茶树[*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]是世界范围内广泛种植的食用性植物之一,主要以嫩叶为收获对象,经过加工的茶叶是广受消费者喜爱的商品^[1]。茶树主要种植于热带、温带的酸性土壤中,由于酸性土壤的特殊性质,其中的有效养分易产生钝化作用,因此生长于酸性土壤的茶树往往需要依靠与根系微生物相互作用,以更好地适应土壤环境中有限的养分供应^[2-3]。

丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)是土壤系统中重要的功能性微生物^[3]。大量研究结果显示,茶树根围存在大量AMF类群,以无梗囊霉属(*Acaulospora*)、根孢囊霉属(*Rhizophagus*)、

球囊霉属(*Glomus*)及斗管囊霉属(*Funneliformis*)为主^[4]。夏庭君等的研究结果表明,接种AMF可增加福鼎大白茶主根长、一级侧根和三级侧根数量,提高根系脱落酸、赤霉素及油菜素内酯的含量^[5]。在盐胁迫土壤中接种AMF可以促进茶树对氮(N)、磷(P)、钾(K)、镁(Mg)、铁(Fe)和锌(Zn)的吸收,降低水分饱和阈值、增强茶树对盐胁迫的耐受性、改善茶叶品质^[6]。此外,在酸性土壤中接种AMF可显著增加实生茶苗、扦插茶苗的生物量累积,促进根系发育,提高叶片氨基酸、蛋白质、总多酚和咖啡碱等指标含量^[7]。以上研究结果表明,AMF可与茶树形成良好的共关系,在提高茶树生长发育、生理代谢及品质形成等方面具有良好的促进作用。

茶叶的化学组分包括糖分、茶多酚、可溶性总蛋白、儿茶素、氨基酸、总黄酮及挥发性物质等,同时也是评价茶叶品质的重要指标^[8]。相关酶类代谢是影响化学组分含量的重要枢纽,一般而言,环境因素、管理措施、生育时期及微生物定殖等皆可在一定程度上影响植物的酶类代谢^[9]。目前,众多研究结果显示,AMF可与茶树形成良好的共生关

收稿日期:2021-11-03

基金项目:2020年度广西高校中青年教师科研基础能力提升项目(编号:2020KY29020);2020年广西高等学校高水平创新团队及卓越学者计划[编号:桂教人才(2020)6号];茶叶产业化发展科技创新团队项目。

作者简介:马蕊(1987—),女,黑龙江黑河人,硕士,副教授,研究方向为生产茶叶加工及植物功能成分化学。E-mail: malaoshi785@163.com。

系,AMF 可影响宿主的次生代谢水平,从而提高茶叶的品质形成,然而目前尚不清楚接种 AMF 是否能够调节氨基酸、黄酮及茶多酚等次生代谢物相关基因的表达水平。基于此,本研究以六堡茶为材料,探索接种不同 AMF 及其组合处理对茶叶化学组分及相关代谢基因水平的影响,研究结果可为今后将菌根技术应用于茶树栽培生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验于 2021 年 4—7 月于广西壮族自治区梧州市六堡茶研究院塑料大棚中进行,供试茶树品种为六堡茶,种子来自梧州中茶茶业有限公司。将茶树种子用 0.5% 次氯酸钠 (NaClO) 进行初次消毒,接着用 75% 乙醇再次进行灭菌处理 3 min,然后用流动无菌水小心冲洗。将表面灭菌的种子置于昼/夜温度为 28 ℃/30 ℃ 的环境中,在湿热灭菌 (121 ℃, 1.1×10^5 kPa, 2 h) 的细沙中培养 25 d。

供试 AMF 分别为根内根孢囊霉 (*Rhizophagus intraradices*)、摩西斗管囊霉 (*Funneliformis mosseae*) 及浅窝无梗囊霉 (*Acaulospora lacunosa*),这 3 株 AMF 来自广西农业科学院亚热带资源研究所。菌株皆采用玉米、白三叶进行扩繁,试验所用接种物由孢子(土中的含量为 25 个/g)、菌丝、根系残体和土壤基质组成。

供试土壤取自梧州市六堡茶茶园(地理位置为 23°39'49"E, 111°35'25"N) 的 0~20 cm 表层土壤。去除土壤中的植物残体及砂石,经自然风干后混匀,过 2.5 mm 网筛备用。供试土壤皆经高压湿热灭菌 (121 ℃, 1×10^5 kPa, 2 h) 以去除土壤土著 AMF 和其他微生物的干扰,反复灭菌 1 次,待土壤冷却后混合备用。土壤类型为棕红壤,其理化性质为 pH 值 5.83,有机质含量 19.25 g/kg,全氮含量 1.16 g/kg,全磷含量 0.41 g/kg,碱解氮含量 101.06 g/kg,有效磷含量 4.02 mg/kg,速效钾含量 117.69 mg/kg。

1.2 试验设计

试验采用完全随机设计,设置 5 个接菌处理:单接种 *R. intraradices* 处理(RI)、单接种 *F. mosseae* 处理(FM)、单接种 *A. lacunosa* 处理(AL)、混合接种 *R. intraradices* + *F. mosseae* + *A. lacunosa* 处理(MX) 及不接种处理(CK)。各处理重复 5 次。

盆栽器具盆高 15 cm,上口径 15 cm,底径 13 cm,每盆装土 3 kg。4 月 17 日将 2 叶期的茶树

幼苗转移至盆栽土中,保持土壤的持水量在 80%。接种 AMF 处理是将 60 g AMF 菌剂与灭菌的土壤混合,不接种处理仅加入经高温灭菌的菌剂。培养期间,每周转动盆体 1 次,同时每 2 周随机挪动 1 次盆体位置,以消除光照、通风等因素造成的试验误差。每 2 周向盆体中加入 50 mL 0.5 mol/L Hoagland 营养液且不时加入适量蒸馏水。试验于 7 月 15 日结束,共培养 89 d。

1.3 样品采集及测定分析

1.3.1 茶树生物量、根系侵染率、总叶面积及株高的测定 培养结束后,将根系切成 1 cm 长的小段,参照 Phillips 描述的方法^[10],采用台盼蓝染色、网格交叉记数法计算各处理的菌根侵染率。茶树株高采用卷尺测量,叶面积使用叶面积仪 (Li-3100C, Li-Cor, Biosciences, USA) 进行测定。收获全部盆栽植物,将茶树全部取出,小心清洗根系后,将茶树地上部、地下部分离,置于烘箱中杀青 30 min,于 70 ℃ 烘干至恒质量并称量,记录生物量。

1.3.2 茶叶化学养分元素含量的测定 茶叶的 P、K、Ca、Mg、Fe、Mn、Cu、Zn 含量采用电感耦合等离子体原子发射光谱法 (ICP-AES, IRIS Advantage, Waltham, USA) 测定,茶叶的氮 (N) 含量采用开氏法测定。

1.3.3 茶叶化学组分的测定 茶叶中多糖含量的测定参考傅博强等的步骤^[11],采用水浸提-分光光度法。总可溶性蛋白含量的测定采用 Folin 酚试剂法^[12],以牛血清白蛋白为标准品。总类黄酮含量的测定采用 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ -NaOH 体系络合化学吸光法^[13]。茶叶中总游离氨基酸含量的测定参考涂云飞的步骤^[14],采用茚三酮法。茶叶中咖啡碱含量的测定参照 GB/T 8312—2013《茶 咖啡碱测定》;茶叶中茶多酚及儿茶素含量的测定参考 GB/T 8313—2008《茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法》。

1.3.4 茶叶品质相关酶基因的提取与测定 摘取每盆茶树的上 3 张新鲜、幼嫩的叶片,迅速保存于 -80 ℃ 环境中。绕开主叶脉打孔,采用磁球珠对称取的样品进行快速研磨,用 TaKaRa MiniBEST 植物 RNA 提取试剂盒 (TaKaRa Bio. Inc, Japan) 提取样本总 RNA,用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测其纯度与浓度。采用 PrimeScript™ RTreagent Kit gDNA (PK02006, TaKaRa Bio. Inc, Japan) 构建互补基因文库 (cDNA)。基于 GenBank 数据库中的茶树相关基因,以 *GADPH* 作为看家基因,根据以上基因序列,

借助 Primer Express 5.0 软件设计扩增引物(表 1)。将测量的转录本标准化为非 AMF 植物中的相对表达值,使用 SYBR GREEN PCR Master Mix(Toyobo, Osaka, Japan)和 Bio-Rad CFX96 实时检测系统,一式 3 份进行 PCR 定量复孔检测。

qRT-PCR 反应体系:8.8 μL ddH₂O,0.5 μL

cDNA 模板,5 μL 天根 2 × Taq PCR Mix,0.5 μL Rox,0.4 μL 正向引物,0.4 μL 反向引物。qRT-PCR 反应参数:95 ℃ 5 min;95 ℃ 15 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,共 40 个循环数。实时定量试验结果采用断层扫描,基于扫描系统的 2^{-ΔΔC_T}算法进行相对表达量的分析。

表 1 qRT-PCR 引物序列信息

基因名	登录号	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')
<i>GADPH</i>	XM_002263109	TTGGCATCGTTGAGGGTCT	CAGTGGGAACACGGAAGC
<i>CsGDH</i>	JN602371	AAGCGGCAAATCATCTACTGA	TCGTCCCACATGAAACCTTGA
<i>CsGS</i>	JN602372	CCTCAGAAGCAAAGCAAGGACT	AACATCAGGGTGGCTGAAAATC
<i>CsGOGAT</i>	JN602373	TGCTTCAGGACGTTTGTGT	CATGATGTGGAGGTGGGATAT
<i>CsAPX</i>	EU547804	TTCTATCAGTTGGCTGGAGTTG	AATGGTCACATCCCTTATCGG
<i>CsTCSI</i>	AB031280	TTCCGTGTTATGTGATGGGAGTA	TGACTCCTTTTGGTGCCTGA
<i>CsPAL</i>	D26596	ATGACTTCTACAACAATGG	GGAGTTCTGAGCAATAAG
<i>CsC4H</i>	AY641731	CAATGGCAATGACTTTAG	CTCAGCAGTATCAATCTT
<i>CsDFR</i>	AB018685	AGTTGTGTCGTTCTCATC	GTATCAATGGCTCCTCTG
<i>CsF3H</i>	AY641730	GCGACAGTATACCCCTGAA	AGTATGGCAAAGGCACATCC

1.4 数据处理与统计分析

用 Excel 2013 进行数据整理,用 SPSS 19.0 进行单因素方差分析(ANOVA),用邓肯氏多重比较法进行试验数据的统计分析($\alpha=0.05$),用 Origin 8.0 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 丛枝菌根真菌对六堡茶菌根侵染率及生长参数的影响

从表 2 可以看出,六堡茶树根系可被根内根孢囊霉、摩西斗管囊霉及浅窝无梗囊霉定殖,同时混合接种也存在共生结构,不同处理菌根的侵染率在 22.74%~51.33%之间,且不同处理的菌根侵染率排序呈 RI>MX>FM>AL,且两两处理间存在显著差异,其中 RI 处理比其他处理高 29%~126%。

从表 2 还可以看出,与未接种处理(CK)相比,接种 *R. intraradices* 处理(RI)的株高、总叶面积、地上部和根系的干物质含量分别显著增加了 44.25%、59.44%、94.09% 和 64.65%,接种 *F. mosseae* 处理(FM)的株高、总叶面积、地上部和根系的干物质含量分别显著增加了 42.25%、52.29%、70.97% 和 52.60%,混合接种处理(MX)的株高、总叶面积、地上部和根系的干物质含量则分别提高了 38.42%、21.60%、60.22% 和 21.64%。而与 CK 处

理相比,接种 *A. lacunosa* 对上述植物生长指标皆存在一定的促进作用,但除叶面积、地上部干物质含量外,其他指标皆无统计学差异。此外,在 AMF 处理中,RI 处理对植物生长性能的影响大于混合接种处理(MX),AL 处理的影响则小于 MX 处理,表明 *R. intraradices* 对植物的影响在混合处理后可能与其他 AMF 物种发生相互干扰。

2.2 丛枝菌根真菌对六堡茶茶叶化学养分元素含量的影响

由表 3 可以看出,与 CK 处理相比,RI 处理的叶片 N、P、K 含量分别显著提高了 96.97%、74.51%、111.84%,AL 处理的叶片 N、P、K 含量分别提高了 25.39%、13.73%、30.19%,FM 处理的叶片 N、P、K 含量分别提高了 74.12%、123.53%、132.37%,混合处理(MX)的叶片 N、P、K 含量则分别增加了 71.00%、15.69%、98.55%。从微量元素含量上看,与 CK 处理相比,RI 处理的叶片 Ca、Mg、Mn、Fe、Cu、Zn 含量分别显著提高了 317.26%、109.59%、96.20%、20.00%、68.37%、72.94%,AL 处理的叶片 Ca、Mg、Mn、Fe、Cu、Zn 含量分别增加了 150.60%、47.95%、11.39%、6.67%、13.95%、14.69%,FM 处理的叶片 Ca、Mg、Mn、Fe、Cu、Zn 含量分别提高了 160.12%、80.82%、37.97%、-13.33%、46.60%、114.69%,混合接种处理的叶片 Ca、Mg、

表 2 AMF 对六堡茶菌根侵染率及生长参数的影响

处理	根系侵染率 (%)	株高 (cm)	叶面积 (cm ²)	干物质含量(g/株)	
				地上部	根系
RI	51.33 ± 3.69a	18.81 ± 0.58a	24.06 ± 1.18a	3.61 ± 0.13a	24.73 ± 0.95a
FM	30.48 ± 3.72c	18.55 ± 0.96a	22.98 ± 1.29b	3.18 ± 0.05b	22.92 ± 1.29a
AL	22.74 ± 1.02d	13.29 ± 0.82b	16.28 ± 1.24d	2.27 ± 0.11d	16.23 ± 0.53c
MX	39.95 ± 4.45b	18.05 ± 1.26a	18.35 ± 1.01c	2.98 ± 0.06c	18.27 ± 1.01b
CK	—	13.04 ± 0.49b	15.09 ± 1.17e	1.86 ± 0.09e	15.02 ± 0.86c

注:数字后标有不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)。下表同。

表 3 AMF 对六堡茶茶叶养分元素含量的影响

处理	N 含量 (mg/株)	P 含量 (mg/株)	K 含量 (mg/株)	Ca 含量 (mg/株)	Mg 含量 (mg/株)	Mn 含量 (mg/株)	Fe 含量 (mg/株)	Cu (μg/株)	Zn (μg/株)
RI	20.17 ± 0.47a	0.89 ± 0.03b	8.77 ± 0.37b	7.01 ± 0.24a	1.53 ± 0.05a	1.55 ± 0.05a	0.18 ± 0.003a	4.95 ± 0.27a	10.48 ± 0.48b
FM	17.83 ± 0.39b	1.14 ± 0.03a	9.62 ± 0.41a	4.37 ± 0.17c	1.32 ± 0.06c	1.09 ± 0.01c	0.13 ± 0.002d	4.31 ± 0.22b	13.01 ± 0.59a
AL	12.84 ± 0.28c	0.58 ± 0.01c	5.39 ± 0.24c	4.21 ± 0.17c	1.08 ± 0.03d	0.88 ± 0.03d	0.16 ± 0.003b	3.35 ± 0.18c	6.95 ± 0.32c
MX	17.51 ± 0.38b	0.59 ± 0.02c	8.22 ± 0.38b	5.62 ± 0.24b	1.39 ± 0.06b	1.20 ± 0.05b	0.11 ± 0.002e	5.21 ± 0.29a	9.15 ± 0.44d
CK	10.24 ± 0.23d	0.51 ± 0.01d	4.14 ± 0.18d	1.68 ± 0.08d	0.73 ± 0.02e	0.79 ± 0.02e	0.15 ± 0.001c	2.94 ± 0.16d	6.06 ± 0.27e

Mn、Fe、Cu、Zn 含量分别增加了 234.52%、90.41%、51.90%、-26.67%、77.21%、50.99%。

2.3 丛枝菌根真菌对六堡茶茶叶化学组分的影响

由表 4 可以看出,与 CK 处理相比,接种 AMF 均在一定程度上提高了六堡茶茶叶多糖、总可溶性蛋白、儿茶素、总黄酮类化合物、茶多酚、咖啡碱和总游离氨基酸含量。与 CK 处理相比,接种 AMF 处理的茶叶多糖、总可溶性蛋白、儿茶素、总黄酮类化合物、茶多酚、咖啡碱和总游离氨基酸含量分别提高了 82.66% ~ 352.68%、76.81% ~ 201.00%、42.36% ~ 528.49%、130.59% ~ 262.56%、64.07% ~ 160.59%、1.19% ~ 33.99% 和 0.41% ~ 52.18%。整体来看,在接种 AMF 的处理中,RI 处理的茶叶多糖、总可溶性蛋白、儿茶素、总黄酮类化合物、茶多酚、咖啡碱和总游离氨基酸含量整体较高,其次为混合处理(MX)、FM 处理,AL 处理的任一指标中皆显著小于上述 3 个处理。与 CK 处理相比,AL 处理与 CK 处理间皆存在显著差异(除总游离氨基酸、咖

啡碱含量)。
2.4 丛枝菌根真菌对六堡茶叶片品质相关酶基因相对表达量的影响

2.4.1 丛枝菌根真菌对六堡茶叶片氨基酸相关酶基因相对表达水平的影响 氨基酸是茶叶的主要化学成分,可以调节与平衡茶水中儿茶素、咖啡碱的苦味、黏度。谷氨酸脱氢酶(GDH)是调控氨基酸转化的关键酶之一,谷氨酰胺合成酶(GS)、谷氨酸合成酶(GOGAT)主要参与谷氨酸的 GS/GOGAT 循环^[15]。从上述 3 个调节酶的编码基因(*CsGDH*、*CsGS*、*CsGOGAT*)表达水平看,*CsGDH*、*CsGS*、*CsGOGAT* 的相对表达量未发生明显上调或下调。从各处理的 *CsGDH*、*CsGS*、*CsGOGAT* 表达水平看,RI、FM、AL、MX、CK 处理的基因相对表达量的规律不尽一致,且对于任一基因而言,上述处理间皆无显著差异(图 1)。

2.4.2 丛枝菌根真菌对六堡茶叶片多酚相关酶基因相对表达水平的影响 茶多酚主要由儿茶素、黄

表 4 AMF 对六堡茶茶叶化学组分的影响

处理	多糖含量 (mg/株)	可溶性总蛋白 含量(mg/株)	茶多酚含量 (mg/株)	总游离氨基酸 含量(mg/株)	儿茶素含量 (mg/株)	总黄酮 含量(mg/株)	咖啡碱含量 (mg/株)
RI	711.56 ± 47.47a	56.76 ± 4.26a	8 080.07 ± 116.93a	1 898.61 ± 63.45b	643.95 ± 32.02a	23.82 ± 0.69a	326.55 ± 8.25a
FM	506.85 ± 25.62c	63.09 ± 6.15a	7 369.84 ± 165.79b	1 986.21 ± 40.69a	277.03 ± 22.56c	15.15 ± 6.15d	286.48 ± 13.26b
AL	287.13 ± 42.55d	37.06 ± 3.25b	5 087.26 ± 260.55d	1 310.55 ± 41.53d	145.86 ± 10.26d	19.94 ± 3.47c	246.63 ± 5.99c
MX	552.42 ± 17.06b	42.12 ± 2.17b	7 036.95 ± 214.09c	1 695.74 ± 28.06c	475.08 ± 25.63b	21.86 ± 2.18b	274.80 ± 8.17b
CK	157.19 ± 29.57e	20.96 ± 2.78c	3 100.66 ± 45.64e	1 305.21 ± 49.86d	102.46 ± 4.35e	6.57 ± 2.63e	243.72 ± 7.14c

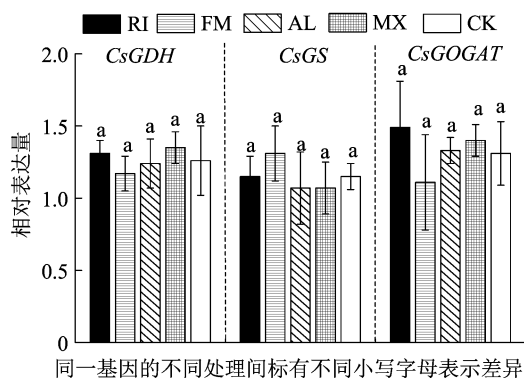
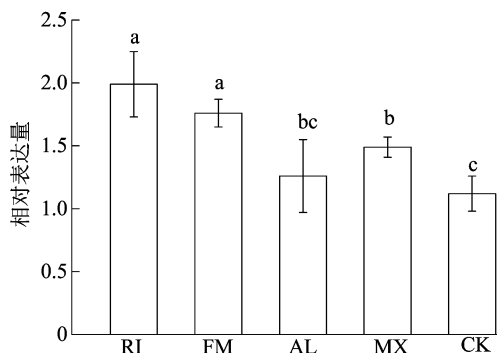


图1 AMF 对六堡茶叶片 *CsGDH*、*CsGS* 及 *CsGOGAT* 相对表达量的影响

酮、花青素和酚类氨基酸等组成,是茶叶的主要提取物,其决定了茶叶的颜色、香气、味道和功效。由图2可以看出,接种AMF处理(AL、MX、FM、RI)在整体上调了 *CsAPX* 的表达水平,不同处理的 *CsAPX* 相对表达量呈 $CK < AL < MX < FM < RI$,其中以RI处理的相对表达量最高,其次为FM处理,二者间无显著差异,并且皆显著大于其他处理,分别较其他处理显著增加 33.56% ~ 77.68%、18.12% ~ 57.14%。CK处理的相对表达量最低,与AL处理间无显著差异,比其他处理低 24.83% ~ 43.72%,且差异显著 ($P < 0.05$)。



不同处理间标有不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。图3同

图2 AMF 对六堡茶叶片 *CsAPX* 相对表达水平的影响

2.4.3 丛枝菌根真菌对六堡茶叶片咖啡碱相关酶基因相对表达水平的影响 咖啡碱是茶中主要的生化活性物质,可可碱合成酶(TCS)是茶树咖啡碱生物合成途径的关键酶,其中 *TCSI* 可同时调节合成可溴碱、咖啡碱^[16]。由图3可知,接种AMF处理(AL、MX、FM、RI)在整体上上调了 *CsTCSI* 的表达水平,不同处理的相对表达量表现为 $CK < AL < MX < FM < RI$,以RI处理的相对表达量最高,比其他处理高 41.67% ~ 85.15%,且差异显著 ($P <$

0.05)。其次为FM处理, *CsTCSI* 的相对表达量比其他处理高 9.09% ~ 30.69%,且显著高于AL、CK处理。在MX、AL、CK处理中,以MX处理的 *CsTCSI* 相对表达量最高,但三者间皆无明显差异。

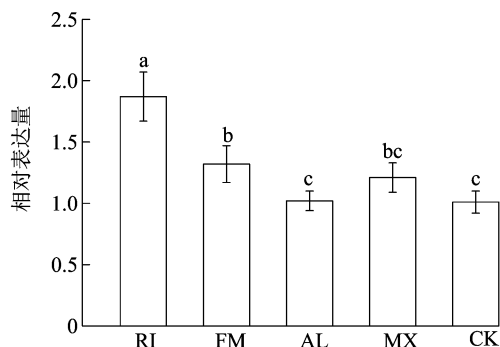


图3 AMF 对六堡茶叶片 *CsTCSI* 相对表达水平的影响

2.4.4 丛枝菌根真菌对六堡茶叶片黄酮类相关酶基因相对表达水平的影响 类黄酮是茶叶主要的功能性物质,苯丙氨酸解氨酶(PAL)和肉桂酸4-羟化酶(C4H)是类黄酮合成的主要关键酶。由图4可知,在 *CsPAL* 基因中,各处理表达量在 1.29 ~ 4.85,以CK处理表达量最低,其与FM处理无显著差异,均显著低于RI、AL、MX处理;以RI处理表达水平最高,较其他处理显著提高 40.17% ~ 275.97%。在 *CsC4H* 基因中,不同处理表达水平呈 $CK < FM < AL < MX < RI$,其中RI、MX分别显著大于其他处理 73.36% ~ 528.28%、40.08% ~ 419.66%;余下的CK、FM、AL处理中,两两处理间皆存在显著差异,其中FM、AL分别显著高于CK处理 43.49%、72.27%。

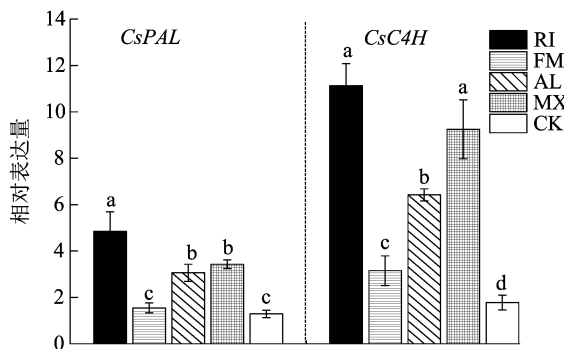


图4 AMF 对六堡茶叶片 *CsPAL* 及 *CsC4H* 相对表达水平的影响

2.4.5 丛枝菌根真菌对六堡茶叶片儿茶素相关酶基因相对表达水平的影响 在茶叶多酚组分中,儿茶素约占茶多酚总量的 70% ~ 80%,在茶叶颜色、香气和味觉品质的形成中起着重要作用。影响儿茶素含量的酶较多,如 F3H、F3'H、F3'5'H、LAR、

DFR、ANR 和 CHI 等直接参与了儿茶素的合成^[17]。由图 5 可以看出,与 CK 处理相比,接种 AMF 处理的 *CsDFR* 相对表达量显著提高了 16.77% ~ 42.13%,其中 RI、MX 处理的相对表达量较高,两者分别显著大于其他处理 26.32% ~ 72.8%、21.05% ~ 65.6%。在 *CsF3H* 基因的相对表达量上,CK、RI、FM、AL、MX 处理在两两间皆存在显著差异,其中以 RI 处理的相对表达量最高,显著高于其他处理 14.29% ~ 66.34%,以 CK 处理的表达量最低,显著低于其他处理 10.62% ~ 39.88%。

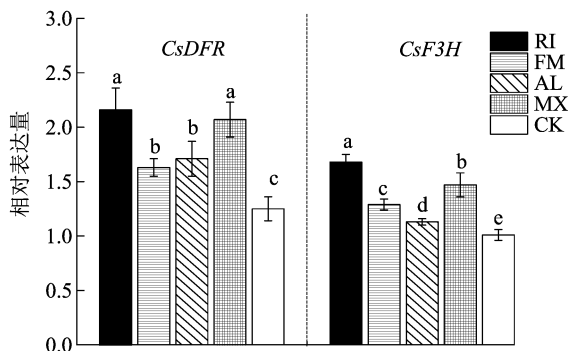


图5 AMF 对六堡茶叶片 *CsDFR* 及 *CsF3H* 相对表达水平的影响

3 结论与讨论

丛枝菌根真菌在土壤中广泛存在,是重要的功能性微生物组成部分,大多数陆地植物可与其建立互惠共生关系,AMF 可以协助植物吸收土壤中的矿物质养分、协调生理生化代谢以及更好地应对环境生物/非生物胁迫等^[2-3]。在本研究中,接种 AMF 处理的根系侵染率为 22.74% ~ 51.33%,且不同 AMF 种类的侵染率存在明显差异。本研究结果与前人研究结果一致,即不同植物宿主类型对于 AMF 具有特异招募性,不同 AMF 对宿主根系的依赖程度也存在一定差异,具体取决于 AMF 的特异性以及 AMF 与寄主植物之间的相容性^[3]。此外,本研究结果表明,混合接种处理的侵染率显著低于单一接种 *Rhizophagus intraradices* 处理 (RI),表明不同菌株在获取宿主营养方面可能存在竞争关系。

在本研究中,与 CK 处理相比,接种 AMF 处理的总叶面积、株高、地上部及根系生物量皆整体较高。Fajardo 等研究发现,接种异配盾孢囊霉 (*Dentiscutata heterogama*) 可显著提高胡桃幼苗植株的地上部生物量和总叶面积^[18]。本研究结果与前人结果基本一致。AMF 植物生物量和总叶面积的增加可能与外生菌丝改善根系养分获取有关^[2,19]。

本研究结果还表明,在接种 AMF 的处理中,不同处理间的生长参数整体呈 AL < MX < FM < RI,即混合处理没有表现出叠加效应,表明不同 AMF 物种之间可能存在相互干扰。养分含量组分是评价茶树生长发育、茶叶品质优劣的重要指标。在本研究中,与 CK 处理相比,接种 AMF 处理的 N、P、K、Ca、Mg、Mn、Fe、Cu、Zn 含量皆显著增加,这与前人对接种 *Glomus Zac-19* 的苜蓿和接种摩西斗管球囊霉 (*F. mosseae*) 的黑吉豆的研究结果^[20]一致。宿主植物养分含量增加的原因可能是:(1) AMF 自由菌丝在土壤中形成发达的菌丝网络,从而帮助寄主植物吸收土壤中的营养元素^[2];(2) AMF 刺激根系形态的发展,从而增强植物吸收水分、养分的能力^[3,21]。

茶叶的化学组分与茶叶风味、香气特征的生化物质组分及含量有关。在本研究中,接种 AMF 显著提高了茶多酚、儿茶酸、黄酮类化合物、氨基酸和可溶性蛋白质的含量。Tchameni 等研究发现,在可可上接种珠状巨孢囊霉 (*Gigaspora margarita*)、*F. mosseae* 后,宿主叶片的氨基酸含量显著增加^[22]。对生菜接种根内根孢囊霉 (*R. intraradice*) 和 *F. mosseae* 的混合物后,增加了生菜叶片可溶性蛋白质、可溶性糖含量^[23]。茶多酚、儿茶酸和黄酮类化合物具有很强的抗氧化活性,可对许多疾病起到预防作用。茶多酚是茶叶中主要的次生代谢产物,其中儿茶素含量可高达茶多酚总量的 80%^[17]。黄酮类化合物被认为是诱导 AMF 发育的重要信号化合物,反过来,多酚也可被菌根共生所诱导^[24]。Zubek 等研究发现,接种异型根孢囊霉 (*R. irregularis*)、*F. mosseae* 及其混合处理皆可显著增加三色堇根系的黄酮含量^[25]。但是目前关于 AMF 与黄酮合成的具体机制尚未揭示,在未来的工作中需要借助高通量及组学技术加以深入研究。

CsAPX 是限制活性氧产生的主要酶,其可促进次生代谢从而促进多酚合成。*CsTCS1* 可影响咖啡碱的合成,*CsPAL*、*CsC4H* 是影响黄酮化合物分泌的主要酶基因,*CsDFR*、*CsF3H* 则与儿茶素合成密切相关^[26]。在本研究中,不同处理的 *CsAPX*、*CsTCS1*、*CsPAL*、*CsC4H*、*CsDFR*、*CsF3H* 与其对应的化学组分呈相同趋势,表明 AMF 可通过上调相关基因表达,从而促进次生代谢物合成、影响茶叶品质。此外,本研究发现,上述基因表达水平与其对应的品质参数含量间并没有呈现完全一致的趋势,其原因可能是基因在经转录、翻译等过程中发生了变化,使得

相关化学组分含量与其基因表达水平存在一定偏差。*CsGS*、*CsGOGAT* 和 *CsGDH* 是影响氨基酸合成的主要酶基因^[26], 本研究发现总游离氨基酸含量呈 CK < AL < MX < RI < FM, 然而对于 *CsGS*、*CsGOGAT* 和 *CsGDH* 任一基因的相对表达量而言, 不同处理皆无明显规律且不同处理间的差异皆未达显著水平。前人研究发现, AMF 外生菌丝中存在大量氨基酸 (如天冬氨酸、谷氨酸、谷氨酸、天冬氨酸酯、鸟氨酸、丝氨酸和氨基乙酸), 菌丝可以将氨基酸可以转移到根系^[3,27]。因此, 推测本研究中 AMF 处理的总氨基酸含量的增加与 *CsGDH*、*CsGS* 和 *CsGOGAT* 的表达水平无关, 而是菌根菌丝传递氨基酸的结果。

参考文献:

- [1] 江 燕, 黎星辉, 浦 滇, 等. 基于茎材解剖结构的茶树树龄测定方法[J]. 茶叶科学, 2020, 40(4): 492–500.
- [2] 曹本福, 姜海霞, 刘 丽, 等. 丛枝菌根菌丝网络在植物互作中的作用机制研究进展[J]. 应用生态学报, 2021, 32(9): 3385–3396.
- [3] 曹本福, 姜海霞, 陆引罡, 等. 烟草与丛枝菌根真菌的共生效应研究进展[J]. 中国土壤与肥料, 2021, 58(1): 327–338.
- [4] 刘 辉, 陈 梦, 黄引娣, 等. 安徽茶区茶树丛枝菌根真菌多样性[J]. 应用生态学报, 2017, 28(9): 2897–2906.
- [5] 夏庭君, 吴强盛, 邵雅东, 等. 丛枝菌根真菌对福鼎大白茶生长、侧根数和根系内源激素的影响[J]. 广西植物, 2018, 38(12): 1635–1640.
- [6] 柳 洁, 肖 斌, 王丽霞, 等. 盐胁迫下丛枝菌根(AM)对茶树生长及茶叶品质的影响[J]. 茶叶科学, 2013, 33(2): 140–146.
- [7] Singh S, Pandey A, Kumar B, et al. Enhancement in growth and quality parameters of tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] through inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi in an acid soil[J]. Biology and Fertility of Soils, 2010, 46(5): 427–433.
- [8] 赵青华, 孙立涛, 王 玉, 等. 丛枝菌根真菌和施氮量对茶树生长、矿质元素吸收与茶叶品质的影响[J]. 植物生理学报, 2014, 50(2): 164–170.
- [9] Wang K B, Ruan J Y. Analysis of chemical components in green tea in relation with perceived quality, a case study with Longjing teas[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2010, 44(12): 2476–2484.
- [10] Phillips J M. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular – arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection[J]. Transactions of the British Mycological Society, 1970, 55(1): 158–161.
- [11] 傅博强, 谢明勇, 聂少平, 等. 茶叶中多糖含量的测定[J]. 食品科学, 2001(11): 69–73.
- [12] 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 42–47.
- [13] 王 英, 张玉刚, 戴洪义. 超声波法提取苹果果实中类黄酮最佳条件研究[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(2): 24–27.

- [14] 涂云飞. 茛三酮法测定茶叶游离氨基酸总量研究[J]. 现代农业科技, 2018(14): 235–238.
- [15] Duan Y, Zhu X J, Shen J Z, et al. Genome – wide identification, characterization and expression analysis of the amino acid permease gene family in tea plants (*Camellia sinensis*) [J]. Genomics, 2020, 112(4): 2866–2874.
- [16] Kato M, Misako K, Crozier A, et al. Caffeine synthase gene from tea leaves[J]. Nature, 2000, 406: 956–957.
- [17] Xiong L G, Li J, Li Y H, et al. Dynamic changes in catechin levels and catechin biosynthesis – related gene expression in albino tea plants (*Camellia sinensis* L.) [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2013, 71: 132–143.
- [18] Fajardo L, Cáceres A, Arrindell P. Arbuscular mycorrhizae, a tool to enhance the recovery and re – introduction of *Juglans venezuelensis* Manning, an endemic tree on the brink of extinction[J]. Symbiosis, 2014, 64(2): 63–71.
- [19] Zou Y N, Srivastava A K, Ni Q D, et al. Disruption of mycorrhizal extraradical mycelium and changes in leaf water status and soil aggregate stability in rootbox – grown trifoliate orange[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 203.
- [20] Krishnan A, Sharavanan P S. Effects of CdCl₂ and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on the growth and nutrient content of black gram (*Vigna mungo* L.) [J]. International Journal of Plant Sciences, 2016, 11(2): 282–287.
- [21] Upreti K K, Bhatt R M, Panneerselvam P, et al. Morpho – physiological responses of grape rootstock ‘Dogridge’ to arbuscular mycorrhizal fungi inoculation under salinity stress[J]. International Journal of Fruit Science, 2016, 16: 191–209.
- [22] Tchameni S N, Nwaga D, Wakam L N, et al. Growth enhancement, amino acid synthesis and reduction in susceptibility towards *Phytophthora megakarya* by arbuscular mycorrhizal fungi inoculation in cocoa plants [J]. Journal of Phytopathology, 2012, 160(5): 220–228.
- [23] Sanmartín C, Garmendia I, Romano B, et al. Mycorrhizal inoculation affected growth, mineral composition, proteins and sugars in lettuces biofortified with organic or inorganic selenocompounds[J]. Scientia Horticulturae, 2014, 180: 40–51.
- [24] 谢 伟, 郝志鹏, 郭兰萍, 等. 丛枝菌根影响植物萜类化合物合成与积累研究进展[J]. 生物技术通报, 2020, 36(9): 49–63.
- [25] Zubek S, Rola K, Szewczyk A, et al. Enhanced concentrations of elements and secondary metabolites in *Viola tricolor* L. induced by arbuscular mycorrhizal fungi [J]. Plant and Soil, 2015, 390(1): 129–142.
- [26] Cao J L, Shao Y D, Zou Y N, et al. Inoculation with *Clariodeoglossum etunicatum* improves leaf food quality of tea exposed to P stress [J]. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj – Napoca, 2021, 49(1): 12166.
- [27] Johansen A, Finlay R D, Olsson P A. Nitrogen metabolism of external hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* [J]. New Phytologist, 1996, 133(4): 705–712.