

山茶科植物內生真菌研究*

林秀榮¹

摘要

內生真菌普遍存在植物中，扮演角色不僅可為病原菌更可與植物共生，甚至可促進植物生長、增加植物對逆境之抗性、與病原菌拮抗等。山茶科植物內生真菌目前研究甚少，本研究以山茶科植物-山茶花-作模式植物進行內生真菌相關研究應用，期能達到促進茶樹生長及降低病蟲害對茶樹影響之目標。研究中試驗材料包括臺灣常見的十種成茶與美國當地山茶花植株。結果顯示成茶之內生真菌分離率以白茶最高，達 28.18%，其他茶種類之內生真菌分離率皆低於 5%，利用分子生物技術方法測定成茶之真菌量，結果得知真菌量隨著不同茶類製程而有差異，偵測得知真菌量多至少分別為：不發酵茶（綠茶）、部分發酵茶（白茶、包種茶）、全發酵茶（紅茶），故推測揉捻步驟對生內真菌之存活有直接影響。十種試驗成茶經過熱水沖泡後即未分離出任何內生真菌，顯示成茶經過熱水浸泡即不會有內生真菌存活。山茶花內生真菌相隨著不同分離部位而有差異，根部內生真菌相較葉部豐富，根部內生真菌分離率皆可超過 50%，且與植物種類 (species) 有關，*Camellia sasanqua* 之內生真菌相較 *C. japonica* 豐富；葉部內生真菌分離率與植株成熟度 (樹齡) 呈正相關，內生真菌隨植株齡期越大內生真菌分離率則越高，可達 90% 以上，而 C 型之內生真菌形態型出現在各試驗植物葉部。

關鍵字：內生真菌、山茶科、茶葉製程、揉捻

前言

內生真菌 (endophytic fungi) 為存活於植物體中卻不會造成明顯傷害與病徵之微

1. 行政院農業委員會茶業改良場 助理研究員。臺灣 桃園市。

*本研究為作者 2014 年在美國西伊利諾大學短期研究成果。

生物(Wilson, 1995)，而其中研究最普遍的為子囊菌門 (Ascomycota) 麥角菌科 (Clavicipitaceae) 之真菌 (Luis et al., 2008)。草本植物中，一般來說內生真菌為垂直傳播 (vertical transmitted)(Clay and Schardl, 2002)，此種傳播方式被視為與寄主建立一良好之寄生關係 (Herre et al., 1999)，然而，在草本研究中，內生真菌所扮演的角色可自一般寄生行為至強互利共生行為 (Clay and Schardl, 2002)。內生真菌對寄主植物有益的效應包括增加對環境逆境的適應能力，如抗旱能力 (Arechavaleta et al., 1989)、妨礙植食性昆蟲對寄主植物之取食 (Breen, 1994; Rowan and Latch, 1994)、抗線蟲危害 (Pedersen et al., 1988; West et al., 1988; Kimmons et al., 1990) 及抗真菌性病害 (Gwinn and Gavin, 1992; Bonos et al., 2005; Clarke et al., 2006)。相較於草本植物中內生真菌的垂直傳播，其他熱帶木本樹種如可可，其內生真菌為水平傳播，即內生真菌來源為外部環境 (Herre et al., 1999, 2005, 2007; Arnold et al., 2000; Van Bael et al., 2005)，在前人研究中得知，剛萌發 (emergence) 的可可葉及果實無內生真菌 (endophyte-free)，而二至三周期間可接收環境中多樣的孢子雨 (spore rain)，部分種類可快速盤據，成為可可主要內生真菌，而其他真菌亦陸續盤據 (Arnold et al., 2003; Herre et al., 2005; Van Bael et al., 2005)。上述研究結果與 Xu 氏等人 (2009) 之研究結果相似並指出，茶樹在芽葉萌發初期為無內生真菌狀態，隨著葉片成長接收環境中孢子的自然接種，組織中之內生真菌的盤據率亦隨之提升，其中芒果球座菌 (*Guignardia mangiferae*) 在成熟葉片的分離率可達 73.5%，而葉片成熟程度、溫度及降雨會影響該真菌之分離率。除了水平傳播外，茶樹之內生真菌 *G. mangiferae* 亦可自母株垂直傳播 (Xu et al., 2009)。在同一寄主植物中不同部位之內生真菌相呈現相異情形，如可可葉及枝條之內生真菌主要屬於 *Collectotricum*、*Botryosphaeria*、*Xylaria* 及 *Phomopsis*，但樹幹之內生真菌則多屬 *Clonostachys* 及 *Trichoderma* (Luis et al., 2008)。

內生真菌之抗病作用機制包括直接抑制病原菌之感染與盤據，如利用拮抗、競爭及超寄生等；或間接的誘發寄主植物產生防禦機制 (Aneja et al., 2006; Bailey et al., 2006)，而正確的了解寄主植物與內生真菌之生態關係，如辨識內生真菌與寄主及與病原菌之交互作用，才可提供日後正確及有效生物防治之策略研究 (Herre et al., 2007)。

本篇研究為執行行政院農業委員會菁英計畫之短期研究項目，內生真菌研究國外已蓬勃發展，國內仍屬起步階段，在本次出國研究中除了瞭解國外研究進程外，更尋求研究團隊及合作窗口，期能配合國內外研究資源達到發展臺灣茶樹內生真菌之研究與應用之目的。

材料及方法

一、分生技術操作

材料：自臺灣已萃取之茶樹 DNA 及自臺灣之冷凍乾燥茶葉葉片（表一）。

方法：

(一) 將自臺灣已萃取之茶樹 DNA 利用 ITS nrDNA fungal specific primers, ITS1F (5'-CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA-3') 及 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Gardes et al. 1993) 增幅，增幅片段長度約為 700 bp。

Master mix:

Taq	12.5 µl
PCR water	6.5µl
F primer	1.0 µl
R primer	1.0 µl
BSA	3.0 µl

註：每次製備 Master mix 務必要加一正對照與一負對照與 0.5 個誤差。

DNA 1.0µl

PCR 條件：增幅 ITS 區間反應如下，先加熱至 95°C 2 分鐘，第 1 至第 35 循環為 94°C 30 秒；50°C 30 秒；72°C 45 秒，最後再以 72°C 反應 7 分鐘，最後停止於 4°C，最後進行核酸電泳分析。

(二) 利用兩種不同 DNA 核酸萃取套組進行測試。

材料：

1. no.32 (臺東分場青心烏龍冷凍乾燥葉片)、no.34 (茶乾-白茶)、no.35 (茶乾-龍泉茶)。
2. Power Soil Kit 及 Qiagen Kit。

方法：將萃取後的 DNA 利用上述方法進行 PCR。

(三) 核酸電泳分析

製備 1.2 % Agrose (0.9 g Agrose + 75 mL 1X TAE buffer)(Tris Acetate EDTA)，取 3 µl PCR 產物，標記 (Marker) 為 2µl dye + 3 µl ladder，以 125 v 電壓跑膠 25 分鐘，取出膠體以 EtBr 染色 25 分鐘，退染數秒，進行照膠。

二、成茶真菌研究

材料：自臺灣之 10 種成茶茶乾 (表二)，種類包括不發酵、部分發酵及全發酵茶等不同製程成茶，分別為白茶、綠茶 (碧螺春)、文山包種茶、高山茶、龍泉茶、東方美人茶、紅烏龍、高山紅茶、日月潭紅茶及佳葉龍茶。

方法：

(一) 成茶真菌分析：利用液態氮研磨茶乾，取 200 μg 茶樣並以 Qiagen Kit 抽取 total DNA，利用 ITS nrDNA fungal specific primers，ITS1F 及 ITS4 進行增幅。

(二) 成茶中内生真菌相調查：内生真菌分離純化培養

1. 樣品處理：分成用冷水及熱水浸泡成茶。

(1) 冷水處理：茶乾直接以冷水將泡開待用。

(2) 熱水處理：以煮沸熱水直接浸泡茶乾，3 公克茶乾加入 250 毫升熱水，浸泡 5 分鐘後將茶湯倒出。

2. 樣品表面消毒：

(1) 將樣品放入塑膠培養皿中，每一樣品分別放入十公分塑膠滅菌培養皿。

(2) 將茶葉以 70 %酒精浸潤樣品，確定樣品完全泡在液體中，1 分鐘後將酒精倒除。

(3) 以 0.5 %Clorox (10 ml Clorox + 120 ml 滅菌水) 浸潤樣品，確定樣品完全泡在液體中，2 分鐘後將漂白水倒除。

(4) 以滅菌水漂洗 3 次，注意若仍有漂白水殘留 (異味) 可以滅菌水多漂洗幾次，確定未有漂白水殘留。

(5) 盡量將樣品上之液體移除或是可使用微量吸管吸取多餘液體，避免殘留液體造成汙染。

3. 麥芽汁瓊脂培養基 (Malt Extract Agar, MEA medium) 製備：

取 MEA 培養基 33.6 g 加入一公升過濾水，加入培養基粉前加入磁石，以 121°C，15 磅壓力進行高溫高壓滅菌，待培養基溫度降至 60°C 後加抗生素 Streptomycin 及 Tetracyclin，每升培養基加 1 毫升抗生素，邊攪拌邊加。倒入 10 公分塑膠滅菌培養皿，當日未使用完畢之培養基保存於 4°C 冰箱。

4. 内生真菌分離培養：

(1) 將表面消毒後之樣品於無菌操作台中進行，以熱消毒過的剪刀將葉片周圍剪去，再剪成小塊約 2 x 2 mm² 大小，每一培養皿放入六小片，每種茶 17 皿培養皿，培養皿以石臘膜封住，於室溫下避光培養。

(2) 觀察：分離後 1、3、5 天觀察一次，檢查培養基上若有雜菌 (非從樣品長出的菌) 要重新移菌。

(3) 5 至 7 天後將培養皿上的菌移至新的 MEA 培養皿中培養 (純化)，純化後之真菌待生長至產孢後以肉眼初步分群，並照相建檔。

- (4) 編碼不同形態型 (morphotypes)，並記錄每株採樣茶樹分得之真菌不同形態型出現次數。
- (5) 送定序該菌株以無菌水進行保存，每一菌株保存兩管。

三、山茶花内生真菌相調查：内生真菌分離純化培養

材料：自網路購買美國當地山茶花植株，共兩品種 (*Camellia sasanqua*, *C. japonica*)，八種商品名品種 (表四、圖二)。

方法：

1. 樣品表面消毒及培養基配製：方法同成茶内生真菌調查。
2. 内生真菌分離培養：
 - A. 葉：將表面消毒後之樣品於無菌操作台中進行，以熱消毒過的剪刀將葉片周圍剪去，再剪成小塊約 $2 \times 2 \text{ mm}^2$ 大小，每一培養皿放入 6 小片，為六重複，每樣品至少 100 重複，培養皿以石臘膜封住，於室溫下培養。
 - B. 根：將表面消毒後之樣品於無菌操作台中進行，以熱消毒過的剪刀將根剪成小段約 3 mm 長，每一培養皿放入 6 小根，為 6 重複，每樣品超過 100 重複，培養皿以石臘膜封住，於室溫下培養。

其内生真菌分離培養方法同成茶内生真菌調查試驗方法。

結果

一、不同核酸萃取套組對茶樹核酸萃取效果比較

將利用 Magcore 核酸自動萃取儀萃取之茶樹 DNA 利用專一性引子對進行增幅，結果顯示臺灣產茶樹所製備根的 DNA 皆能被成功增幅，而來自葉片之 DNA 則增幅條帶不明顯或是無法成功被增幅，而利用 Qiagen 套組則能成功增幅茶樹葉片内生真菌片段，顯示 Qiagen 套組對抽取茶樹葉片及根之 DNA 效果優於 Magcore 核酸自動萃取儀。

二、成茶内生真菌研究

成茶茶乾利用核酸萃取套組抽取總去氧核糖核酸後，利用針對真菌所設計的專一性引子對進行特定片段之增幅。10 種不同成茶中，除日月潭紅茶未能成功被增幅外，其餘 9 種成茶皆能被偵測到内生真菌的存在，9 種成茶包括文山包種茶、白茶、龍泉茶、高山烏龍茶、紅烏龍、高山紅茶、佳葉龍茶、碧螺春綠茶及東方美人茶，可以專一性引子對成功增幅特定片段，表示該成茶中有真菌的存在，為確定成茶中之真菌是否仍有活力與是否為内生真菌，進一步分離純化内生真菌。

在成茶内生真菌的分離純化試驗中，各種成茶經過冷水浸泡葉片展開後，表面消毒

後以添加抗生素之麥芽汁瓊脂培養基 (MEA) 進行分離，結果如表三，可自 7 種成茶組織中分離得內生真菌，包括文山包種茶、白茶、龍泉茶、高山茶、紅烏龍、高山紅茶及佳葉龍茶，其中又以白茶分離率最高，所得內生真菌數量最多，共 31 株，分離率為 28.18%，其他成茶之分離率介於 0-3%。結果亦顯示自成茶分離之內生真菌具多樣性，其中自白茶分離之內生真菌共 31 株，其形態型共 30 種。來自白茶內生真菌分離株菌落形態如圖一。

在茶乾經熱水浸泡後進行內生真菌分離試驗結果顯示，茶乾經過沸水浸泡五分鐘後，所有的成茶經表面消毒後皆無內生真菌自組織中長出，故得知沸水可將所有成茶之內生真菌殺死。

三、山茶花內生真菌研究

山茶花根與葉之內生真菌分離率調查結果如表五，根部之內生真菌分離率皆在 50% 以上，其中以 *Camellia sasanqua* 中 6 個品種的內生真菌分離率最高，皆超過 70%。葉部內生真菌分離率自 12.75% 至 99.04%，分離率超過 90% 的品種包括 Leslie Ann 及 Yuletide Red，且該 2 品種植株尺寸皆為 30 吋左右。Falling Star White 及 Grace Albritton 此 2 品種之植株為小苗，而其內生真菌分離率較其他品種低，皆低於 40%。

山茶花內生真菌之分離株數與形態型調查結果如表六，每一品種分離樣品數皆超過 100 小片。自山茶花根部分離得之內生真菌分離株共 591 株，其形態型共 300 種，各品種之主要形態型 (出現率最高者) 自代號 33 至 50 分別為 6F、8B、9E 與 9F、10Y、13B、13R、13R、15K、15K，其菌落形態如圖三，其中 8B、9E、9F 及 13B 菌落正面看起來相似，但由於菌落背面差異甚大，故仍將其區分為不同之形態型；內生真菌自葉部分離得共 302 分離株，分離株之形態型共 158 種，各品種之主要形態型自代號 33 至 50 分別為 A、Y、C、B 與 C、C、C、F、5D (圖四)，在 8 種試驗植物之葉片上皆能分離得到 C 型之內生真菌，又在 *C. sasanqua* 種類中的 6 種供試植物有四種以 C 形態型真菌為主要之內生真菌，該 4 種品種為 Leslie Ann、Our Linda Pink、Winters Charm Pink 及 Yuletide Red。

討 論

茶樹具有多種多酚化合物，而因其市售核酸萃取套組各廠牌成分與配方皆不同，故針對本實驗室常用之核酸萃取套組作核酸萃取效能比較，結果顯示以 Qiagen 核酸萃取套組能成功萃取茶樹去氧核糖核酸，而 Megacore 自動萃取儀萃取得之去氧核糖核酸量較少，故若針對抽取新鮮茶樹組織推薦以 Qiagen 核酸萃取套組進行核酸萃取，以提升後續研究之效能與準確性。

在成茶內生真菌研究中，直接以 Qiagen kit 進行茶乾 DNA 萃取，結果發現除了日月潭紅茶中未能偵測得真菌 DNA 外，其他 9 種成茶中皆能以分子生物技術確定有真菌之存

在，又隨著不同的製茶方式，檢測得之真菌 DNA 量亦有不同，其中以不發酵茶之三峽碧螺春綠茶及部分發酵茶白茶之真菌 DNA 量 (以電泳膠條帶之亮度判別) 高於其他 8 種成茶，其次為部分發酵茶中的文山包種茶、龍泉茶、高山烏龍茶、紅烏龍、佳葉龍茶及東方美人茶之真菌 DNA 量，而全發酵之高山紅茶僅有不明顯條帶，故其真菌 DNA 量相較其他成茶為少，比較不同茶類製成 (圖五) 推測此結果與茶類之製成有關，發現真菌 DNA 量與揉捻及發酵程度呈負相關，經過揉捻及發酵者能偵測得之內生真菌 DNA 量較低，但為確定茶乾中之真菌 DNA 皆為内生真菌，故將成茶利用冷水使葉片展開後，以表面消毒方式確定葉面真菌被移除，利用含有兩種抗生素之麥芽汁瓊脂培養基進行成茶内生真菌之分離，結果發現共有七種成茶中可分離得内生真菌，其中又以白茶分得之內生真菌最多，有 31 株，分離率為 28.18%，而其他六種成茶之內生真菌分離率則皆低於 3%。白茶之內生真菌分離株型態差異大，共有 30 種形態型，且與來自其他成茶之內生真菌型態亦不相同，值得將分離得之內生真菌進行分子生物鑑定。

成茶之內生真菌分離率以白茶最高，推測與茶葉製成有關，白茶之製程與其他試驗茶種製成差異在於缺乏“揉捻”步驟，故推測茶葉在揉捻時因細胞被破壞大量釋放出多酚類物質及氧化酵素，進而殺死内生真菌，而白茶僅經由長時間萎凋後直接進行乾燥，故内生真菌殘存機率提升使得分離率遠高於其他茶種。又因白茶之內生真菌分離率近三成，懷疑内生真菌是否會造成食安問題，故進行熱水沖泡後再以表面消毒方式進行内生真菌之分離，試驗結果顯示 10 種成茶經過熱水浸泡後皆未分離得内生真菌，故證明成茶經由熱水沖泡後不會有内生真菌之存在，此結果證明熱水沖泡之茶湯無真菌殘留之疑慮。

在山茶花内生真菌研究結果中，可自山茶花根部分離得之內生菌共 303 株，自葉部可分離得 161 株，且顯示試驗植株根部内生真菌分離率與種類 (species) 有關，内生真菌分離率在 *Camellia sasanqua* 植株之根部皆較高於 *C. japonica*，且分離率皆超過 70% 以上；葉部之內生真菌分離率則與植株大小 (樹齡) 成正相關，其中為苗期植株的 *Falling Star White* 及 *Grace Albritton* 之內生真菌分離率皆低於 40%；植株大小在 10-14 吋之 *Cecilia White*、*Our Linda Pink* 及 *Debutante Pink* 葉部内生真菌分離率則在 42.31~50.69% 之間；14-18 吋的 *Winters Charm Pink* 葉部内生真菌分離率為 66.67%；而樹齡較大者 (植株超過 24 吋) 之 *Leslie Ann* 與 *Yuletide Red* 葉部内生真菌分離率超過 90%，證實内生真菌在山茶花之盤據會隨著植株之成熟度而增加。内生真菌分離株之形態型觀察結果，自根部分離之內生真菌種類較葉部來得多，且其大部分分離株之菌絲顏色偏黃至褐色，而在葉部内生真菌分離株則顏色較豐富。各品種之根部内生真菌形態型相互重複者少，但在葉部内生真菌分離株之形態型以 C 型皆出現於各品種中，又 C 型為大部分 *C. sasanqua* 之主要内生真菌，未來針對本菌對山茶花之影響可再作深入研究。

結 論

在成茶內生真菌研究中，得知製程對內生真菌之殘存有關，其中又以揉捻該步驟直接影響內生真菌之存活，日後研究可針對揉捻程度及茶葉細胞破裂釋出之化合物種類與對內生真菌之存活影響作深入研究，而茶葉之內生真菌種類與成茶品質關係亦為重要研究方向。在成茶內生真菌分離試驗中指出，所有成茶經過沸水浸泡五分鐘後，即無法分得任何內生真菌，故一般熱水沖泡法之飲茶習慣下是不會有內生真菌存活在茶湯中之疑慮。

山茶花內生真菌研究中發現內生真菌相與內生真菌分離率在根部及葉部皆有不同之結果，且不同種山茶花之內生菌相與分離率亦有差異。根據本試驗結果顯示 *Camellia sasanqua* 之內生真菌分離率較 *C. japonic* 高，葉部內生真菌相種類普遍少於根部。而在葉部分離調查結果得知，然不同種之山茶花皆可分離得同一種真菌，如 *C. sasanqua* 類型的山茶花葉部內生真菌主要菌落形態型皆為 C 型，且該形態型之內生真菌皆出現在所有試驗山茶花中，推測 C 型內生真菌為山茶花中之主要內生真菌種類之一，日後將對 C 型內生真菌進行鑑定與病原性測試，了解該真菌在山茶花中扮演之角色。

本次研習所學得之智能可以應用於國內山茶科植物 (*C. sinensis* 及 *C. olifera*) 內生真菌相調查、進而探討內生真菌對茶樹之影響，期能達到了解內生真菌對茶葉品質影響與找尋具生物防治潛力之內生針菌之目標。

致 謝

本計畫承蒙農委會菁英計畫支持，本文蒙二位委員悉心斧正，於此一併致以最誠摯的謝意。

參考文獻

1. Arachevaleta, M., Bacon, C. W., Hoveland, C. S., Radcliffe, D. E. 1989. Effect of the tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. *Agronomy Journal* 81: 83-90.
2. Arnold, A. E., Maynard, Z., Gilbert, G. S., Coley, P. D. and Kursar, T. A. 2000. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecological Letters* 3: 267-274.
3. Bonos, S. A., Wilson, M. M., Meyer, W. A. and Reed Funk, C. 2005. Suppression of red thread in fine fescues through endophyte-mediated resistance. *Applied Turfgrass Science*. Doi:10.1094/ATS-2005-0725-01-RS.
4. Breen, J. P. 1994. Acremonium endophyte interactions with enhanced plant resistance to insects. *Annual Review of Entomology* 39: 401-423.
5. Clarke, B. B., White Jr., J. F., Hurley, R. H., Torres, M. S., Sun, S. and Huff, D. R. 2006. Endophyte-mediated suppression of dollar spot disease in fine fescues. *Plant Disease* 90: 994-998.
6. Clay, K. and Schardl, C. 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grass. *The American Naturalist* 160: 99-127.
7. Gardes, M. and Bruns, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2: 113-118.
8. Gwinn, K. D. and Gavin, A. M. 1992. Relationship between endophyte infestation level of tall fescue seed lots and *Rhizoctonia zeae* seedling disease. *Plant Disease* 76: 911-914.
9. Herre, E. A., Knowlton, N., Muller, U. and Rehner, S. 1999. The evolution of mutualisms: exploring the paths between conflict and cooperation. *Trends in Ecology & Evolution* 14: 49-53.
10. Herre, E. A., Van Bael, S. A., Maynard, Z., Robbins, N., Bischoff, J., Arnold, A. E., Rojas, E., Mejia, L. C., Cordero, R. A., Woodward, C. and Kylo, D. A. 2005. Tropical plants as chimera: some implications of foliar endophytic fungi for the study of host plant defense, physiology, and genetics. In: D. F. R. P. Burslem, M. A. Pinard and S. E. Hartley (Eds). "Biotic Interactions in the tropics: Their Role in the Maintenance of Species Diversity". Cambridge University Press, pp. 226-237.
11. Herre, E. A., Mejia, L. C., Kylo, D. A., Rojas, E., Maynard, Z., Butler, A. and Van Bael,

- S. A. 2007. Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. *Ecology* 88: 550-558.
12. Kimmons, C. A., Gwinn, K. D. and Bernard, E. C. 1990. Nematode reproduction on endophyte-infected and endophyte-free tall fescue. *Plant Disease* 74: 757-761.
 13. Pedersen, J. F., Roderiguez-Kabana, R. and Shelby, R. A. 1998. Ryegrass cultivars and endophyte in tall fescue affect nematodes in grass and succeeding soybean. *Agronomy Journal* 80: 811-814.
 14. Rowan, D. D. and Latch, G. C. M. 1994. Utilization of endophyte-infected perennial ryegrasses for increased insect resistance. In: C. W. Bacon and J. F. White (Eds). "Biotechnology of Endophytic Fungi of Grasses". CRS Press, Boca Raton. pp. 169-183.
 15. Van Bael, S. A., Maynard, Z., Robbins, N., Bischoff, J., Arnold, A. E., Rojas, E., Mejia, L. C., Kylo, D. A. and Herre, E. A. 2005. Emerging perspectives on the ecological roles of endophytic fungi in tropical plants. In: J. Dighton, P. Oudemans, and J. F. White (Eds). "The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem"(3rd ed). CRP Press, Boca Raton. pp. 181-193.
 16. West, C. P., Izeke, P., Robbins, R. T., Oosterhuis, D. M. and Robbins, R.T. 1988. The effect of *Acremonium coenophialum* on the growth and nematode infestation of tall fescue. *Plant and Soil* 112: 3-6.
 17. Wilson, D. 1995. Endophyte-The evolution of a term and clarification of its use and definition. *Oikos* 73: 274-276.
 18. Xu, Y. P., Huang, W., Wang, G. H. and Yang, M. 2009. Distribution and transmission of endophytic *Guignardia mangiferae* isolated from tea plant, *Camellia sinensis*. *Scientia Silvae Sinicae* 45(4): 65-71.

表一、來自臺灣之試驗材料

Table 1 Materials form Taiwan

代號 Code	種類及來源 Type and resource	備註 Note
12	總場 台茶 12 號	DNA
18	總場 台茶 18 號	DNA
20	總場 台茶 20 號	DNA
23	總場 青心烏龍	DNA
24	阿里山 青心烏龍	DNA
25	總場 香櫞 1	DNA
26	總場 香櫞 2	DNA
27	總場 小果油茶	DNA
28	總場 四季春	DNA 及冷乾葉片
29	總場 武夷	DNA 及冷乾葉片
30	臺東分場 台茶 12 號	DNA 及冷乾葉片
31	臺東分場 台茶 18 號	DNA 及冷乾葉片
32	臺東分場 青心烏龍	DNA 及冷乾葉片

表二、試驗成茶資料

Table 2 Profiles of testing made teas

代號 Code	茶葉種類 Tea type	品種 Cultivar
33	文山包種茶	臺茶 13 號
34	白茶	武夷
35	龍泉茶	青心烏龍
36	高山茶	青心烏龍
37	紅烏龍	臺茶 12 號
38	高山紅茶	青心烏龍
39	佳葉龍茶	未知
40	碧螺春	青心柑仔
41	日月潭紅茶	臺茶 21 號
42	東方美人茶	臺茶 12 號

表三、成茶內生真菌分離率、分離株及其形態型調查

Table 3 Investigation of endophytic fungi isolation rate, amount of isolates and its morphotypes of made tea

成茶代號 Made tea No.	內生真菌分離率 Endophytic fungi isolation rate (%)	分離株代號 Isolate code	形態型數 Amount of morphotypes
33	1 (1/100)	D101	1
34	28.18 (31/110)	D1~31	30
35	1.67 (2/120)	D201, D202	2
36	0.95 (1/105)	D301	1
37	1.90 (2/105)	D401, D402	2
38	1.81 (2/110)	D501, D502	2
39	2.72 (3/100)	D601~D603	2
40	0 (0/120)	-*	0
41	0 (0/120)	-	0
42	0 (0/120)	-	0
總數		42	40

*：無分離株。

表四、試驗植物資料-山茶花

Table 4 Profiles of testing *Camellia* plants

代號 Code	植物品種 Plant species	植物品種 (商品名) Plant variety name (Commercial name)	植株尺寸 Plant size (inch)
43	<i>Camellia sasanqua</i>	Cecilia White	10-14
44	<i>C. sasanqua</i>	Falling Star White	seedling
45	<i>C. sasanqua</i>	Leslie Ann	24-30
46	<i>C. sasanqua</i>	Our Linda Pink	10-14
47	<i>C. sasanqua</i>	Winters Charm Pink	14-18
48	<i>C. sasanqua</i>	Yuletide Red	24-30
49	<i>C. japonica</i>	Debutante Pink	10-14
50	<i>C. japonica</i>	Grace Albritton	seedling

表五、山茶花葉及根之内生真菌分離率調查

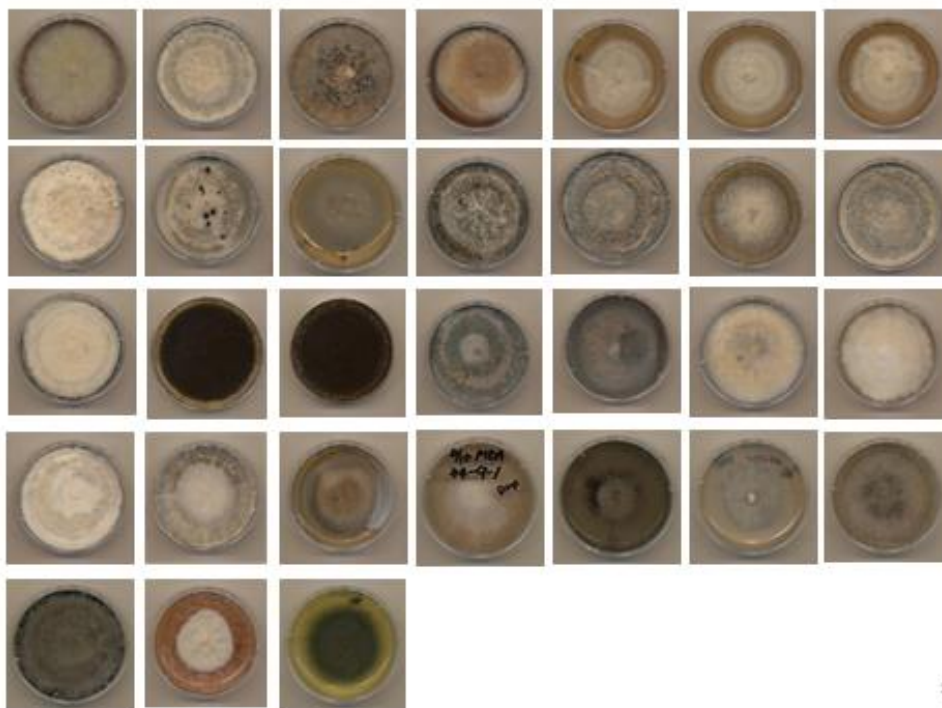
Table 5 Endophyisolation rate of roots and leaves form *Camellia* plants

代號 Code.	試驗植物種類 Plant species	品種名稱 Plant variety name	植株尺寸 Plant size (inch)	内生真菌分離率(%)(根/葉) Endophytic fungi isolation rate (%) (Roots/Leaves)
43	<i>Camellia sasanqua</i>	Cecilia White	10-14	87.25/50.69
44	<i>C. sasanqua</i>	Falling Star White	seedling	72.62/12.75
45	<i>C. sasanqua</i>	Leslie Ann	24-30	86.27/90.97
46	<i>C. sasanqua</i>	Our Linda Pink	10-14	80.39/42.31
47	<i>C. sasanqua</i>	Winters Charm Pink	14-18	98.04/66.67
48	<i>C. sasanqua</i>	Yuletide Red	24-30	77.45/99.04
49	<i>C. japonica</i>	Debutante Pink	10-14	55.88/42.59
50	<i>C. japonica</i>	Grace Albritton	seedling	58.82/39.05

表六、山茶花内生真菌分離株數與主要形態型調查

Table 6 Investigation of the amount of isolates and main morphotype of endophytic fungi in *Camellia* plants

代號 Code.	根 Root		葉 Leaf	
	分離株/形態型 No. of isolate/ No. of Morphotypes	主要形態型 Dominant morphortype	分離株/形態型 No. of isolate/ No. of Morphotypes	主要形態型 Dominant morphortype
43	95/59	6F	62/29	A
44	58/32	8B	13/12	Y
45	95/47	9E. 9F	35/14	C
46	64/41	10Y	58/43	B. C
47	85/41	13B	16/9	C
48	83/38	13R	19/13	C
49	53/29	15K	67/44	F
50	58/37	15K	32/21	5D



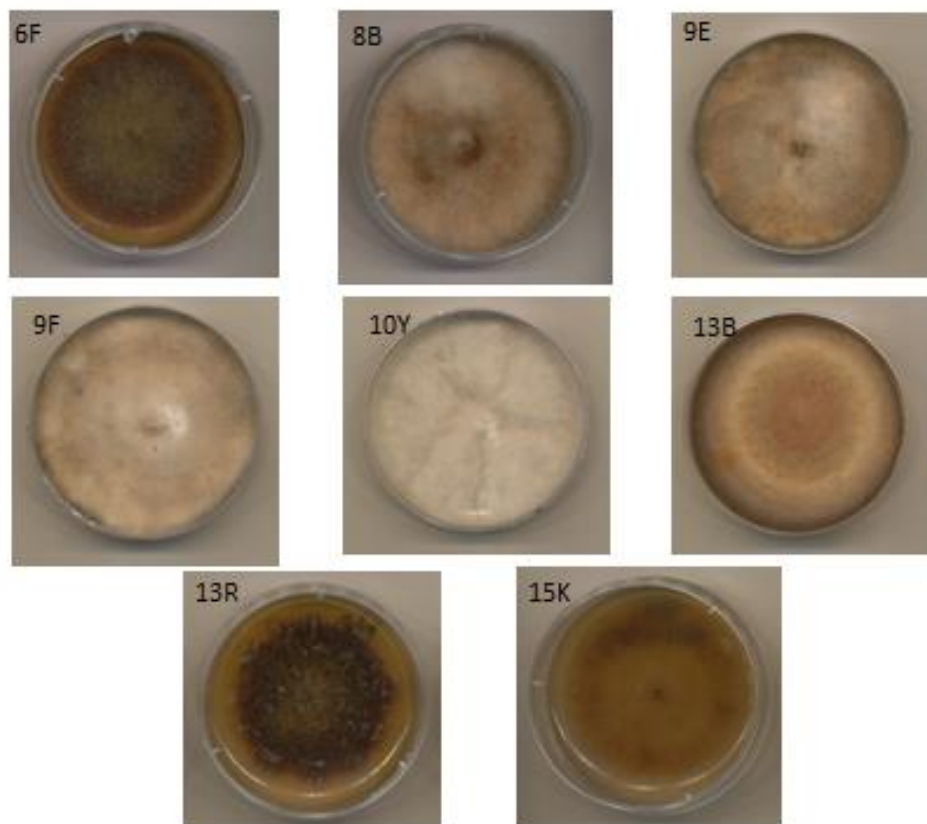
圖一、自白茶分離之內生真菌菌落外觀型態

Fig. 1. The endophytic fungi morphotypes of white teas



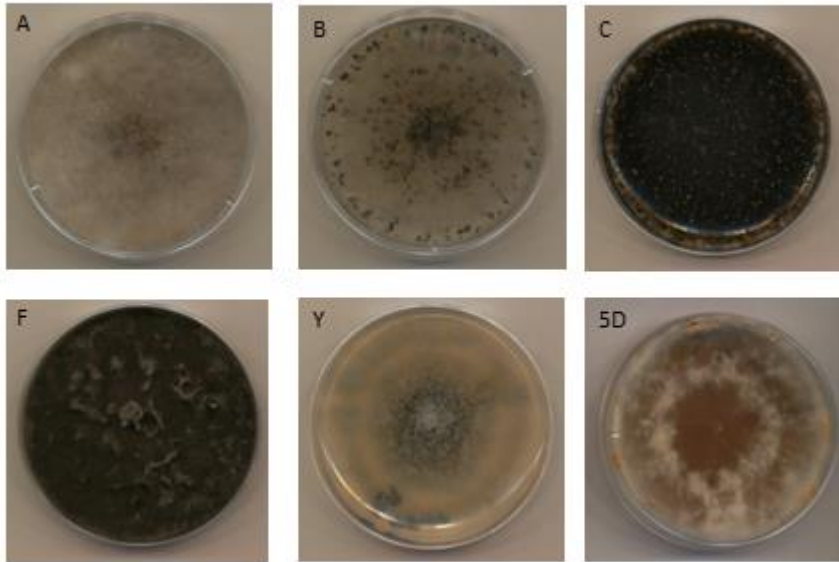
圖二、試驗山茶花植株

Fig. 2. Testing *Camellia* plants



圖三、山茶花根部內生真菌主要分離株之形態型

Fig. 3. The dominant endophytic fungi morphotypes in roots of *Camellia* plants



圖四、山茶花葉部内生真菌主要分離株之形態型

Fig. 4. The dominant endophytic fungi morphotypes in leaves of *Camellia* plants

不發酵茶(綠茶)

茶菁 → 殺菁 → 揉捻 → 乾燥

部分發酵茶(白茶, 烏龍茶)

茶菁 → 室內萎凋 → 乾燥
 茶菁 → 日光萎凋 → 室內萎凋 → 殺菁 → 揉捻 → 乾燥

全發酵茶(紅茶)

茶菁 → 室內萎凋 → 揉捻 → 解塊 → 後發酵 → 乾燥
 茶菁 → 室內萎凋 → 揉捻及切碎 → 後發酵 → 乾燥

圖五、不同茶類之製程

Fig. 5. The processing chart of various teas

Study of Endophytic Fungi in Theaceae Plants*

Shiou-Ruei Lin¹

Summary

Endophytic fungi normally exist in plants. Endophytic fungi not only symbiotic live within plants, but also promote plants growth, increase the tolerance of stress from environment and protect plants from pests. There is very less research about endophytic fungi in Theaceae plants in Taiwan. In this short-term research, *Camellia sasanqua* and *C. japonica* were considered as modeling plants for endophytic fungi study in order to apply in the research about *C. sinensis* in the future. Expect to achieve the goal which is to enhance the tea plants growth and decrease the damage from pests. Among ten kinds of made tea, the endophytic fungi isolation rate in white tea is 28.18% the highest one. The endophytic isolation rate is usually lower than 5% in other made teas. Detection fungi DNA in made tea by extraction and PCR showed that the fungi content in made tea influence by tea processing. The fungi content was reduced gradually as follow non-fermented tea, partially-fermented tea and fully fermented tea. According to this result we support “Rolling” in tea processing is the key factor influence the survival of endophytic fungi in made tea. However, there was no endophytic fungi isolated from the made tea after steeping in boiling water for five minutes. Endophytic fungi types are differ from different tissues. The morphotypes of endophytic fungi in roots are more than in leaves. The endophytic isolation rates of roots are more than 50% and correlated with the plant species. The endophytic fungi morphotypes from roots of *C. sasanqua* are usually more abundant than *C. japonica*. The endophytic isolation rates of leaves are increased with the plant age. The endophytic fungi isolation rate in leaves are usually high even more than 90%. The dominant endophytic fungi morphotype from leaves of testing Theaceae plants is *C.*

Key words: Endophytic fungi, Theaceae, Tea processing, Rolling

1. Assistant Researcher, Tea Research and Extension Station, Taoyuan, Taiwan, R.O.C.

* This short term research had done in Western Illinois University, U.S.A., 2014.

