

# 台灣地區土壤中木黴菌株對植物病原真菌拮抗能力之篩選<sup>1</sup>

倪蕙芳<sup>2</sup> 許淑麗<sup>2</sup> 陳瑞祥<sup>3</sup> 楊宏仁<sup>4,5</sup>

## 摘 要

倪蕙芳、許淑麗、陳瑞祥、楊宏仁。2010。台灣地區土壤中木黴菌株對植物病原真菌拮抗能力之篩選。台灣農業研究 59:29-41。

本研究自台灣田間作物土壤分離獲得 643 株木黴菌，利用玻璃紙抗生法篩選對百合灰黴病菌 (*Botrytis elliptica*)、褐根病菌 (*Phellinus noxius*) 及疫病菌 (*Phytophthora capsici*) 等植物病原真菌生長具有拮抗性之木黴菌菌株；結果顯示 Tri-003 及 Tri-080 菌株對這 3 種病菌之菌絲生長抑制率皆可達 100%。另外，此兩菌株對荔枝露疫病菌 (*Peronophythora litchii*) 及腐霉菌 (*Pythium* sp.) 之菌絲生長亦具有 100% 的抑制率。此兩菌株經由形態特徵及 rDNA ITS 序列比對後鑑定皆為 *Trichoderma virens*。

**關鍵詞：**木黴菌、拮抗性、植物病原真菌、生物防治。

## 前 言

植物病害在農業生產中為一重要之限制因子，截至目前為止，約有 30% 之植物仍受到植物病原菌之危害，而土傳性病原之危害更是造成作物生產量降低之重要因素。雖然利用殺菌劑防治植物病害一直是農民廣為使用的方法，然而藥劑之不當使用常衍生出病原菌抗藥性增加及環境污染等問題 (Kucuk & Kivanc 2003)。生物防治利用原本即存在於自然界之微生物進行植物病害之防治，可以大幅度減少化

學藥劑之使用與其對環境之污染，已成為植物病蟲害防治的新趨勢，因此拮抗微生物之篩選與應用便成為開發植物病害防治用生物製劑的首要目標。

木黴菌 (*Trichoderma* spp.) 為普遍存在於自然界之土壤微生物，種類繁多，而最常用於生物防治菌之木黴菌種類有 *T. virens* von Arx、*T. viride* Pers. 及 *T. harzianum* Rifai 等 (Benitez *et al.* 2004)。木黴菌之所以可以成功做為生物防治菌乃因其具有繁殖容易、對環境耐受性高、根圈纏據力佳、對許多植物病原真菌

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2396 號。接受日期：99 年 3 月 9 日。
2. 本所嘉義農業試驗分所植物保護系副研究員兼系主任、研究助理。台灣 嘉義市。
3. 國立嘉義大學生化科技學系副教授。台灣 嘉義市。
4. 本所嘉義農業試驗分所研究員兼分所長。台灣 嘉義市。
5. 通訊作者，電子郵件：yhr@dns.caes.gov.tw；傳真機：(05)2764525。

生長有極佳之拮抗性以及具有促進植物生長及誘導植物抗性等特點 (Benitez *et al.* 2004)。木黴菌作為生物防治菌目前主要還是應用在防治土傳性病害 (Monte 2001)，例如由鐮胞菌 [*Fusarium oxysporum* Schldl.; *F. solani* (Mart.) Sacc.; *F. colmorum* (Wm. G. Sm.) Sacc.] 引起之萎凋及根腐病 (Federico *et al.* 2007)、*Rhizoctonia solani* J. G. Kühn 所引起之莖腐病 (Bertagnolli *et al.* 1998; Jong *et al.* 1999)、*Pythium* spp. 引起之猝倒病及根腐病以及 *Phytophthora* 引起之根腐病等 (Sid *et al.* 1999)。*Trichoderma* 除了在真菌性病害防治之應用外，在細菌性及病毒性病害之防治上亦有成功之報告，如應用 *Trichoderma* GT3-2 菌株可以誘導胡瓜對由 *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* 造成之細菌性斑點病的抗性，使保護率達 52% (Koike *et al.* 2001)；*T. harzianum* T-1 & T-22 及 *T. virens* T-3 菌株可誘導胡瓜抗病毒病害，能降低由病毒所造成胡瓜植株生長抑制程度 (Lo *et al.* 2000)。目前國外已有多種木黴菌相關商品問世，如美國的 Topshield (T22) 及以色列的 Trichodex (T39) 均為實際應用之商品 (Bhuyan 1994)。

有關木黴菌防治病害或抑制病原的主要機制，已知有五大類，即產生抗生素、營養競爭、超寄生、細胞壁分解酵素、以及誘導植物產生抗性等 (Benitez *et al.* 2004)。木黴菌產生之抗生物質以 gliotoxin、viridin 及 gliovirin 最廣為人知。Gliotoxin 由 Weinding (1941) 首先發現，其具有很強之抗生活性，包括能抑制細菌繁殖、真菌孢子發芽及病毒之複製 (Rightsel *et al.* 1964)。*T. virens* 所產生之 gliotoxins 能有效抑制 *Phytophthora* spp. 菌絲之生長、產生孢子及游走孢子之能力 (Wilcox *et al.* 1992)。另外 viridin 屬於 steroids 類抗生素，亦具有抑制 *R. solani* 與 *Pythium* spp. 生長，以及 *Sclerotium rolfsii* Sacc. 菌核發芽之能力 (Ghisalberti 2004)。

台灣位處熱帶與亞熱帶，擁有豐富之自然資源，微生物相極具多樣化，亦有利於具有生物防治效力拮抗微生物之篩選，因此本研究由台灣各地之農田土壤分離收集木黴菌株，並測試其對植物病原真菌的拮抗能力，篩選台灣本土具生物防治潛力之木黴菌，供進一步作為開發生物製劑之用。

## 材料與方法

### 供試材料來源

**木黴菌菌株之採集、分離及保存：**採集彰化、雲林、嘉義、台南、高雄、屏東及台東等地區作物之根圈土壤，每份土樣之採集點皆以 GPS 衛星定位，利用土壤連續稀釋平板法分離木黴菌。每一土壤採樣秤取 10 g 加入 100 mL 無菌水攪拌，靜置後再將上層液以無菌水進行 10 倍系列稀釋後，取 100 倍及 1000 倍之稀釋液各 100  $\mu$ L，以 L 型玻棒均勻塗抹於添加 0.25% 乳酸 (lactic acid) 之 PDA 培養基 (Potato Dextrose Agar, Merck, USA) 平板上，於室溫 (25°C–28°C) 下培養。初步以培養基上菌落及產孢形態為依據，挑取木黴菌絲尖端移至 PDA 平板上純化，待產孢後進行菌株編號及單孢純化。純化後之菌株刮取孢子以無菌水製成懸浮液，再與 25% 甘油進行混合，分別置於 -20°C 及 -80°C 下保存。於每次試驗前取出菌種保存液於 PDA 平板上進行更新，以恢復菌種之生長及活力。

**供試植物病原菌：**本研究測試之植物病原菌真菌包括 *Phytophthora capsici* Leonian 番茄菌株 (Pc-T) 及辣椒菌株 (Pc-P)、*Phellinus noxius* (Corner) G. H. Cunn. (荔枝)、*Pythium* spp. (莧菜、甜瓜、蘭花、胡瓜)、*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. (芒果)、*Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. (木瓜)、*Phomopsis* sp. (芒果)、*Peronophythora litchii* Chen ex Ko *et al.* (荔

枝)、*Botrytis elliptica* (Berk.) Cooke (百合)、*Fusarium* sp. (百合) 及 *Rhizoctonia solani* (百合) 其中 *Phytophthora capsici*、*Phellinus noxius* 及 *Pythium* sp. 分別由農業試驗所植物病理組安寶貞博士、蔡志濃博士及黃晉興助理研究員提供，其餘則為本實驗室保存之菌株。上述菌株除 *Peronophythora litchi* 保存於 10% V-8 Agar 外，其餘菌株皆保存於 PDA 試管，於 25°C 恆溫箱中培養，每次試驗前進行更新。

### 木黴菌與植物病原真菌之抗生測定

將純化保存於-20°C 甘油之木黴菌菌株，分別吸取 10 µL 於 PDA 培養基活化後再以 PDA 於 25°C 恆溫箱培養 3 天後所得之菌落，以直徑 5 mm 打孔器切取菌絲邊緣製作菌絲塊，移至已貼有滅菌之 3.5 cm × 3.5 cm 玻璃紙之直徑 5.5 cm PDA 培養基中心點位置，在 25°C 恆溫箱培養 16 小時後，將玻璃紙連同木黴菌菌絲塊一起撕下。再將培養於 PDA 平板上之 *B. elliptica*、*C. gloeosporioides*、*F. sp.*、*L. theobromae*、*Peronophythora litchii*、*Phellinus noxius*、*Phomopsis* sp.、*Phytophthora capsici* (Pc-T & Pc-P)、*Pythium* sp. 及 *R. solani* 等植物病原真菌，用直徑 5 mm 打孔器切取菌絲邊緣得到之菌絲塊接種於前述 PDA 培養皿中心點上。另設不接木黴菌之對照組，每處理 5 重複，置於 25°C 恆溫箱培養，每天測量記錄菌落大小至對照組菌絲長滿。以下列公式計算木黴菌對植物病原真菌菌絲生長之抑制百分率，藉以篩選對植物病原菌具拮抗能力之木黴菌菌株。病原真菌菌絲生長抑制率計算公式如下：

$$\text{病原真菌菌絲生長抑制率 (\%)} = \left[ \frac{\text{對照組培養平均直徑} - \text{處理組培養平均直徑}}{\text{對照組培養平均直徑}} \right] \times 100$$

### 木黴菌之形態及分子鑑定

木黴菌之形態鑑定以掃描式電子顯微鏡及光學顯微鏡進行觀察。於室溫 (25°C–28°C) 培養於 PDA 平板 3 天之 Tri-003 及 Tri-080 菌

株，切取約 10 mm<sup>2</sup> 之菌絲塊，先以液態氮進行固定後，再置於桌上型掃描式電子顯微鏡 (SEM, TM-1000, Hitachi, Japan) 之觀察載台上，立即以 SEM 進行觀察孢子梗之形態及構造並照相紀錄。另於 PDA 培養基上挑取產生之孢子，以光學顯微鏡觀察並記錄 50 個以上之孢子大小，並進行平均值計算。木黴菌之分子鑑定則以分析核糖體非轉錄區間序列 (ITS) 進行。將木黴菌菌絲培養於裝有 15 mL PDB 之 50 mL 離心管，置於 25°C 定溫箱以 100 rpm 振盪培養，待菌絲長至適當大小時，於預冷 4°C 之離心機以 8000 rpm 離心 10 分鐘，倒掉上層液並以無菌水沖洗 3 次後冷凍乾燥。取 300 mg 冷凍乾燥之菌絲體，以預冷的玻棒搗碎後，置於 1.5 mL 的離心管中，加入 700 µL lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.2; 50 mM EDTA, pH 7.2; 3% SDS; 1% mercaptoethanol)，震盪混合均勻後置於 65°C 乾浴器中處理 1 小時，每隔 15 分鐘取出震盪 15 秒，以利菌絲體溶解。再加入比例為 25:24:1 的 phenol:chloroform:isoamyl alcohol (Amresco, USA) 700 µL，輕微翻轉數次，混合均勻，於 4°C 以 12,000 rpm 離心 10 分鐘。小心吸取 600 µL 上層液至新的離心管中，加入 600 µL chloroform (Riedel-de Haen, Germany) 輕微翻轉數次，於 4°C 12,000 rpm 離心 10 分鐘。取 500 µL 上層液加 50 µL 3 M NaOAc (醋酸鈉)、500 µL 2-isopropanol (Fluka, Switzerland)，置於冰上 20 分鐘後以 12,000 rpm 於 4°C 離心 10 分鐘，倒掉上層液，加入 500 µL 70% 冰冷酒精，於 4°C 以 12,000 rpm 離心 5 分鐘，將酒精倒掉後烘乾，待沉澱物變透明時，加入 80 µL 滅菌之超純水，置於 65°C 水浴槽 5 分鐘，即完成木黴菌 DNA 之萃取 (Lai 2003)。取 30 ng 所得之 DNA 作為聚合酶素連鎖反應 (PCR) 所需的模板 DNA (template DNA) 濃度，加入內含 10× Taq buffer 2.5 µL、0.25 µL 10 mM dNTP、0.5 µL 10 mM ITS1 primer (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3')、0.5 µL 10 mM

ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') primer (White *et al.* 1990)、0.2  $\mu\text{L}$  Taq (Protech, Taiwan) 反應液中，並於溫度循環控制反應器 (Applied Biosystems Gene Amp PCR System 2400, USA) 中進行聚合酵素連鎖反應，反應條件為以 94°C 30 秒變性 (denaturing)、52°C 30 秒黏合 (annealing)、72°C 30 秒延長 (extension) 進行 3 個循環 (cycles)，最後再以 72°C 反應 7 分鐘後，取 10  $\mu\text{L}$  產物以 1.5% Agarose 膠體於 0.5 $\times$  TBE buffer (0.45 M Tris, 0.45 M Boric acid, 0.01 M EDTA, pH 8.0) 緩衝液下，以 100 V 電壓進行電泳分離，並以 100 bp DNA Ladder (Protech, Taiwan) 作為分子量大小的標記。電泳完成後，取出膠片，以溴化乙錠 (ethidium bromide) 染色 25 分鐘，再以影像分析系統 (Bio-Rad, Gel Doc 2000, USA) 觀察聚合酵素連鎖反應的結果。另外所得 PCR 產物委託源資生物科技公司以 ITS1 及 ITS4 為定序引子進行核酸定序。

## 結 果

### 木黴菌菌株之採集與分離

於彰化、雲林、嘉義、台南、高雄、屏東及台東等地採集 328 包作物之根圈土壤，土壤 pH 值由 3.3 至 8.5，作物相包括果樹、蔬菜、花卉、特用作物、森林作物等 80 種以上之作物，利用土壤連續稀釋平板法進行木黴菌之分離，所分離之木黴菌培養形態具有多樣化 (圖 1)，本研究目前於實驗室共低溫保存 643 株木黴菌菌株於甘油中。

### 玻璃紙抗生法篩選具拮抗性木黴菌菌株

本研究將所獲得之木黴菌菌株，取其中 301 株以玻璃紙抗生法與 *Fusarium oxysporum*、*Phytophthora capsici*、*Phellinus noxius*、*Botrytis elliptica* 等植物病原真菌分別進行拮抗性初步篩選試驗 (圖 2)，共篩選出 2 株對 *P. noxius*、*B. elliptica* 及 *P. capsici* 等病原真菌菌絲生長具有 100% 抑制效果之木黴菌

菌株，分別為 Tri-003 及 Tri-080 (表 1)。其中 Tri-003 由台南縣白河鎮之木瓜園分離而得，另外 Tri-080 則由台南縣東山鄉之香蕉園分離而來。為進一步瞭解此兩株拮抗性木黴菌對其它病原真菌菌絲之生長抑制效果，本研究另以 *Colletotrichum gloeosporioides*、*Lasiodiplodia theobroma*、*Peronophythora litchii*、*Phomopsis sp.*、*Phytophthora capsici* (Pc-T & Pc-P)、*Pythium spp.* 及 *Rhizoctonia solani* 等植物病原菌進行拮抗試驗，結果發現兩株木黴菌對 *Peronophythora litchii*、*P. capsici* (Pc-T & Pc-P)、*Pythium sp.-46*、*Pythium sp.-94*、*Pythium sp.-97* 菌絲生長均可達 100% 之抑制效果，而 Tri-003 及 Tri-080 對 *Rhizoctonia solani* 之菌絲平均生長抑制率分別為 86% 及 100% (表 2)，但對 *Fusarium* 屬之真菌之拮抗性則不明顯。

### 木黴菌形態及分子鑑定

本研究所得之木黴菌 Tri-003 及 Tri-080 菌株，其生長速度很快，約 3 天即可長滿直徑 9 cm 之 PDA 平板，菌落呈棉絮狀外觀，未產生分生孢子時為白色，產生後為綠色，均會使培養基呈黃色 (圖 3A-D)，分生孢子梗直立或略微彎曲，並可再形成次級分支，其瓶狀孢子梗略呈圓錐狀，分生孢子圓形或橢圓形為單孢單室，在瓶狀枝上連結成團 (圖 3E、F)，測量 50 個分生孢子後，Tri-003 及 Tri-080 分生孢子大小分別為  $(3.99 \pm 0.40 \times 4.02 \pm 0.24) \mu\text{m}$ ，長寬比平均 1.14，以及  $(4.02 \pm 0.53 \times 3.49 \pm 0.40) \mu\text{m}$ ，長寬比平均 1.15 (圖 3G、H)。

在菌株的分子鑑定則以核糖體非轉錄區間之序列與 NCBI 基因庫中已知之木黴菌同段序列進行比對，結果發現 Tri-003 及 Tri-080 兩菌株皆可產生大小為 614 bp 之 PCR 產物，經進一步將 PCR 產物純化及核酸定序並以 Vector NTI 軟體 (Invitrogen Co., USA) 進行比對後，發現此兩木黴菌菌株 ITS1 及 ITS2 之核酸序列相同度均為 100%，而與基因庫中編號 EU280076

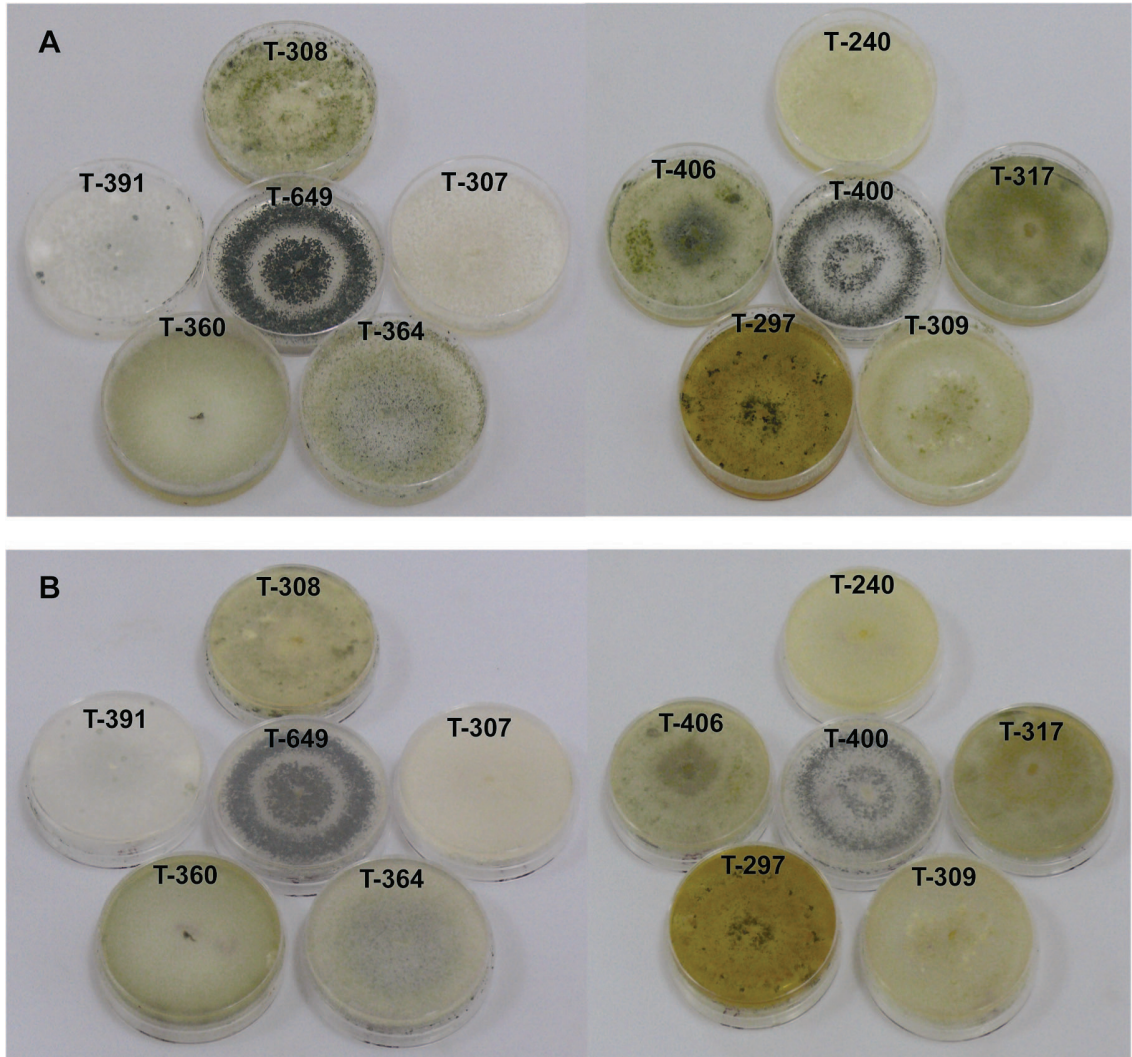


圖 1. 台灣地區土壤分離所得之不同木黴菌株在 PDA 培養基上之形態差異。

**Fig. 1.** Variations in culture morphology among different *Trichoderma* isolates collected from rhizosphere soils in Taiwan. (A) PDA cultures, top view; (B) PDA cultures, bottom view.

僅在 ITS1 序列有一個鹼基之差異，而與 EF442081 之 *T. virens* 同段核酸序列之相同度達 100% (圖 4)，Tri-003 與 Tri-080 之 ITS 序列則登錄於 NCBI 編號分別為 GU111538 及 GU111539。

## 討 論

木黴菌為廣泛存在於土壤中之微生物，本研究為收集存在於台灣彰化以南之農田根圈土壤中之木黴菌菌株，用土壤稀釋平板法以含 2.5% 之乳酸之 PDA 平板進行分離，以木黴菌

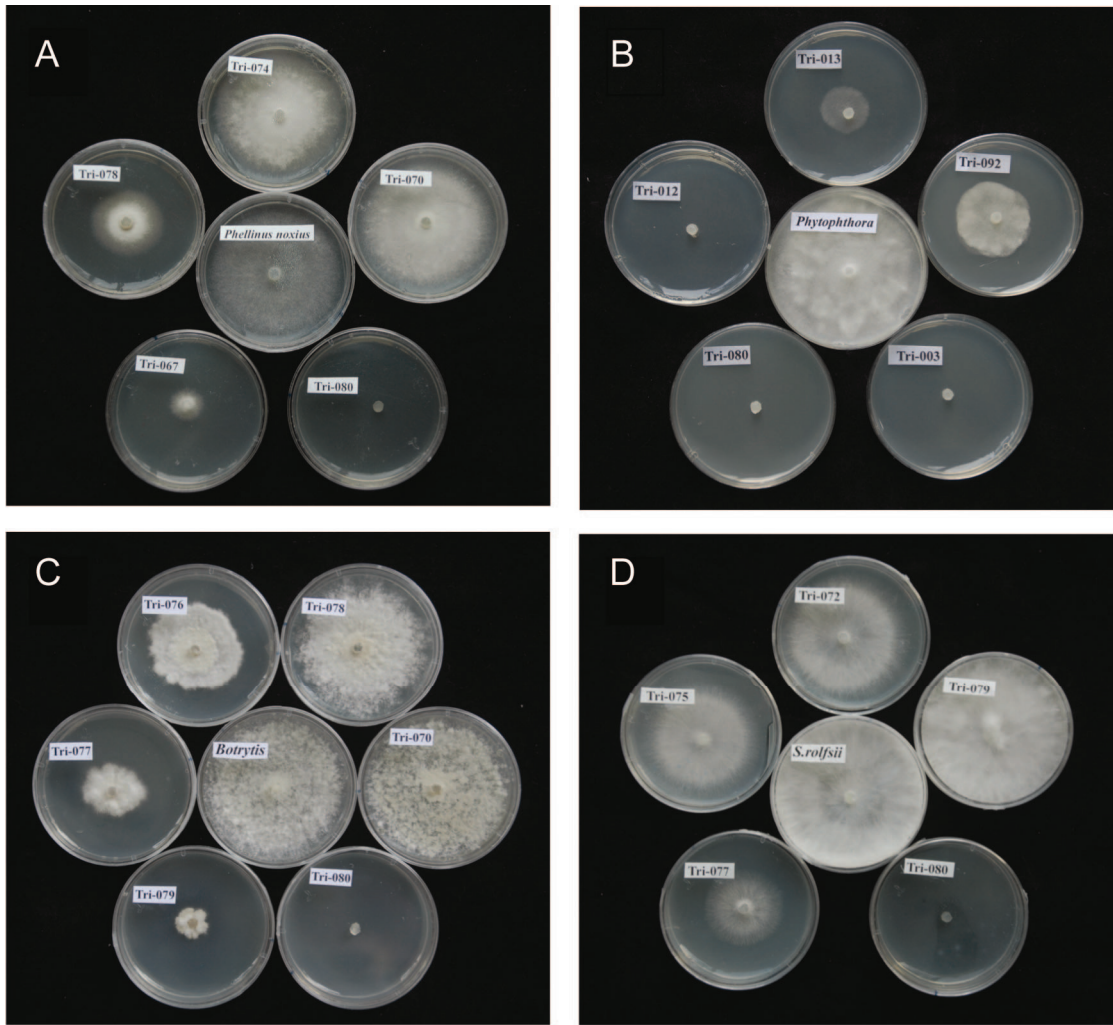


圖 2. 利用玻璃紙抗生法於 PDA 平板上測試木黴菌株對 *Phellinus noxius* (A)、*Phytophthora capsici* (B)、*Botrytis ellipitica* (C)、以及 *Sclerotium rolfsii* (D) 等植物病原真菌生長之拮抗作用。

**Fig. 2.** Antagonism of *Trichoderma* spp. on *Phellinus noxius* (A), *Phytophthora capsici* (B), *Botrytis ellipitica* (C), and *Sclerotium rolfsii* (D) using cellophane paper test. *Trichoderma* sp. isolate Tri-080 completely suppressed mycelial growth of all four plant pathogens (A–D).

在 APDA 生長之型態及產孢之特性等，共分離到 643 株木黴菌之菌株。所得之木黴菌移至 PDA 純化，待其產孢後，利用單胞分離再次純化，並將最後純化之木黴菌分別將孢子懸浮於 25% glycerol 中，以 -20 及 -80°C 進行冷凍保存，本研究以此方法保存於 -20°C 冷凍

2 年以上之菌株，經重新更新仍具有相當好之活性。

本研究將所保存之木黴菌菌株先以玻璃紙抗生法篩選對 *Phytophthora* 等四種重要植物病原真菌生長具有抑制性之木黴菌菌株，經由隨機挑選之 301 株木黴菌菌株中篩選到 Tri-003

**表 1.** 利用玻璃紙抗生法測定不同木黴菌株對 4 種植物病原真菌生長之抑制能力**Table 1.** Antagonism of five isolates of *Trichoderma* spp. from Taiwan on four fungal plant pathogens, using cellophane paper test

Isolates of <i>Trichoderma</i>	Growth inhibition of plant pathogens (%)			
	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. capsici</i>	<i>P. noxius</i>	<i>B. elliptica</i>
Tri-003	22.6 ± 1.3 <sup>z</sup>	100.0	100.0	100.0
Tri-004	0.0	78.0 ± 7.7	0.0	12.7 ± 2.4
Tri-006	0.0	77.5 ± 8.9	0.0	36.9 ± 3.1
Tri-080	31.8 ± 1.5	100.0	100.0	100.0
Tri-082	31.8 ± 0.4	16.5 ± 2.6	0.0	34.7 ± 15.2

<sup>z</sup> Vaule of inhibition of mycelial growth (%) ± standard deviation; 4 replicates/treatment.**表 2.** 利用玻璃紙抗生法測試木黴菌 Tri-003 及 Tri-080 分離株對植物病原真菌生長之抑制**Table 2.** Antagonism of *Trichoderma* isolates Tri-003 and Tri-080 from Taiwan on fungal plant pathogens, using cellophane paper test

Fungal plant pathogens	Growth inhibition (%)	
	Tri-003	Tri-080
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	11.6 ± 3.4 <sup>z</sup>	24.4 ± 8.9
<i>Lasiodipodia theobromae</i>	24.2 ± 3.0	40.4 ± 5.0
<i>Peronophythora litchi</i>	100.0	100.0
<i>Phomopsis</i> sp.	23.8 ± 5.5	62.7 ± 13.8
<i>Phytophthora capsici</i> (Pc-T)	100.0	100.0
<i>Phytophthora capsici</i> (Pc-P)	100.0	100.0
<i>Pythium</i> sp.-13	90.2 ± 6.0	50.2 ± 11.5
<i>Pythium</i> sp.-46	100.0	100.0
<i>Pythium</i> sp.-94	100.0	100.0
<i>Pythium</i> sp.-97	100.0	100.0
<i>Rhizoctonia solani</i> -222	58.6 ± 8.4	79.6 ± 8.8
<i>Rhizoctonia solani</i> -227	86.0 ± 4.5	100.0
<i>Rhizoctonia solani</i> -367	59.3 ± 5.6	78.0 ± 4.9

<sup>z</sup> Vaule of inhibition of mycelial growth (%) ± standard deviation; 4 replicates/treatment.

及 Tri-080 對 *Phytophthora capsici*、*Rhizoctonia solani*、*Botrytis elliptica*、*Pythium* spp. 及 *Phellinus noxius* 等植物病原真菌生長具有相當顯著之抑制能力。此兩菌株分別由台南縣之木瓜園及香蕉園之土壤獲得，此兩菌之抑菌範圍相當廣泛，舉凡對屬於擔子菌之褐根病菌、屬於卵菌綱之疫病菌、露疫病菌、腐黴菌及屬於

不完全菌之灰黴病菌之生長都可以達到 100% 之抑制效果，為深具植物病害防治潛力之木黴菌菌株，值得進一步開發利用。至於其抑菌機制為何則值得進一步探討。已知測試病原菌菌株中 *Peronophythora litchii*、*Phytophthora* spp. 及 *Pythium* spp. 皆屬於卵菌綱 (Oomycetes)，卵菌綱之細胞壁以纖維素為主 (Gurr *et al.* 1992)，

顯示了本研究篩選得到之木黴菌菌株具拮抗性或許與纖維素分解酵素之產生有關，有待進一步測定纖維分解酵素之產量。已知木黴菌菌株

除具有纖維素分解酵素之能力外，其亦具有分泌 chitinase (El-Katatny *et al.* 2001; de la Cruz *et al.* 1992; Nguyen *et al.* 2008)、 $\beta$ -1,3-glucanases

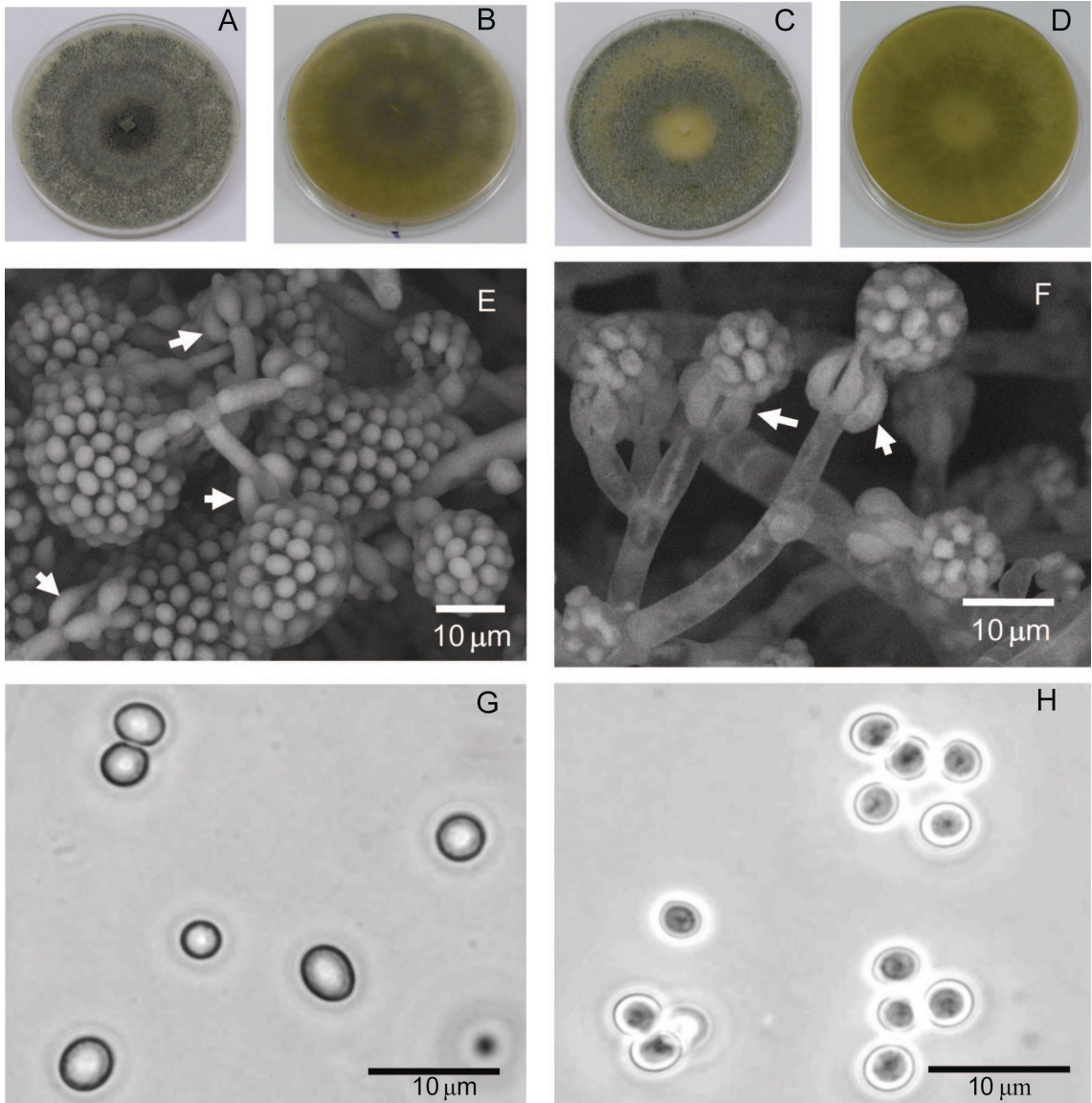


圖 3. 木黴菌 Tri-003 (A、B) 及 Tri-080 (C、D) 菌株培養在 PDA 培養基上之形態特徵。Tri-003 菌株產生瓶狀分生孢子梗 (E) 及球形分生孢子 (G)；Tri-080 菌株產生瓶狀分生孢子梗 (F) 及球形分生孢子 (H)。

**Fig. 3.** Morphological characteristics of *Trichoderma* Tri-003 and Tri-080 isolates cultured on PDA. Colony (A, B), conidiophores (E), and of conidia (G) of Tri-003, and colony (C, D) conidiophores (F) and of conidia (H) of Tri-080. (A) and (C), PDA cultures, top view; (B) and (D), PDA cultures, bottom view.

## A

		1	50
EF442081-ITS1	(1)	CCGAGTTTACAACTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCT	
EU280076-ITS1	(1)	CCGAGTTTAACTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCT	
GU111538-ITS1 (Tri-003)	(1)	CCGAGTTTACAACTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCT	
GU111539-ITS1 (Tri-080)	(1)	CCGAGTTTACAACTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCT	
		51	100
EF442081-ITS1	(51)	CGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCG	
EU280076-ITS1	(50)	CGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCG	
GU111538-ITS1 (Tri-003)	(51)	CGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCG	
GU111539-ITS1 (Tri-080)	(51)	CGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCG	
		101	150
EF442081-ITS1	(101)	CCGGAGGACCAACCAAACTCTTATTGTATACCCCCTCGCGGGTTTTTTTA	
EU280076-ITS1	(100)	CCGGAGGACCAACCAAACTCTTATTGTATACCCCCTCGCGGGTTTTTTTA	
GU111538-ITS1 (Tri-003)	(101)	CCGGAGGACCAACCAAACTCTTATTGTATACCCCCTCGCGGGTTTTTTTA	
GU111539-ITS1 (Tri-080)	(101)	CCGGAGGACCAACCAAACTCTTATTGTATACCCCCTCGCGGGTTTTTTTA	
		151	199
EF442081-ITS1	(151)	CTATCTGAGCCATCTCGGCGCCCCTCGTGGGCGTTTCGAAAATGAATCA	
EU280076-ITS1	(150)	CTATCTGAGCCATCTCGGCGCCCCTCGTGGGCGTTTCGAAAATGAATCA	
GU111538-ITS1 (Tri-003)	(151)	CTATCTGAGCCATCTCGGCGCCCCTCGTGGGCGTTTCGAAAATGAATCA	
GU111539-ITS1 (Tri-080)	(151)	CTATCTGAGCCATCTCGGCGCCCCTCGTGGGCGTTTCGAAAATGAATCA	

## B

		1	50
EF442081-ITS2	(1)	CAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTTTACG	
EU280076-ITS2	(1)	CAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTTTACG	
GU111538-ITS2 (Tri-003)	(1)	CAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTTTACG	
GU111539-ITS2 (Tri-080)	(1)	CAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTTTACG	
		51	100
EF442081-ITS2	(51)	GGGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGACGCTCTCCTGCGCA	
EU280076-ITS2	(51)	GGGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGACGCTCTCCTGCGCA	
GU111538-ITS2 (Tri-003)	(51)	GGGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGACGCTCTCCTGCGCA	
GU111539-ITS2 (Tri-080)	(51)	GGGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGACGCTCTCCTGCGCA	
		101	150
EF442081-ITS2	(101)	GTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGGGCGCGTCCACAGCCGTTAAAC	
EU280076-ITS2	(101)	GTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGGGCGCGTCCACAGCCGTTAAAC	
GU111538-ITS2 (Tri-003)	(101)	GTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGGGCGCGTCCACAGCCGTTAAAC	
GU111539-ITS2 (Tri-080)	(101)	GTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGGGCGCGTCCACAGCCGTTAAAC	
		151	170
EF442081-ITS2	(151)	ACCCCAAACCTTCTGAAATGT	
EU280076-ITS2	(151)	ACCCCAAACCTTCTGAAATGT	
GU111538-ITS2 (Tri-003)	(151)	ACCCCAAACCTTCTGAAATGT	
GU111539-ITS2 (Tri-080)	(151)	ACCCCAAACCTTCTGAAATGT	

圖 4. 木黴菌 EF442081、EU280076、Tri-003 及 Tri-080 等菌株 ITS1 (A) 及 ITS2 (B) 序列比對結果。

Fig. 4. The nucleotide sequence alignment of ITS1 and ITS2 regions among EF442081, EU280076, GU111538 (Tri-003), and GU111539 (Tri-080). All of accession numbers on DDBJ/NCBI/GenBank. (\* indicated sequences unconsensus)

(El-Katatny *et al.* 2001; Lorito *et al.* 1994) 及  $\beta$ -1,6-glucanases (de la Cruz *et al.* 1995; Montero *et al.* 2005) 及 protease (Germia *et al.*

1993; Pozo *et al.* 2004; Grinyer *et al.* 2007) 等酵素之能力，此 3 種酵素之主要功能為分解病原真菌細胞壁的 chitin、 $\beta$ -glucans 及

polysaccharides, 造成細胞壁不完整, 使病原菌無法繼續生長而死亡, 因此, 在木黴菌的拮抗機制中, 上述水解酵素扮演極重要之角色 (Yang *et al.* 2009)。

除真菌細胞壁分解酵素之作用外, 已知 *T. virens* 尚會分泌多種二次代謝產物如 gliotoxin、glioviridin 及 viredin 等, 抑制真菌孢子的發芽 (Wilcox *et al.* 1992)。Dennis & Webster (1971) 等人發現木黴菌分泌的酵素或二次代謝產物會通過玻璃紙滲透於培養基中, 進而抑制病原真菌的生長。Wang (2006) 為了解玻璃紙之通透性, 利用 protein marker 進行測試, 發現處理組與對照組所得到的條帶是相同的, 顯示玻璃紙對 97 kDa 以下之蛋白並無阻隔效果。本研究利用玻璃紙抗生法所篩選之 Tri-003 及 Tri-080 究竟是以產生細胞壁分解酵素或抗生物質拮抗真菌病原之生長則有待進一步闡明。另外在對 *Fusarium* 之生長抑制菌株篩選上, 過去雖已有報告顯示木黴菌對 *Fusarium* 之效果, 然而本研究篩選之木黴菌菌株, 在以玻璃紙抗生法做為篩選方法時, 對 *Fusarium* 生長並未具有明顯之抑制效果, 究其原因推測木黴菌對 *Fusarium* 之防治機制可能並非透過二次代謝物, 而可能是利用營養競爭或微寄生等機制達到抑菌作用, 因此在本研究並無法以玻璃紙抗生法篩選出來。

由本研究獲得 Tri-003 及 Tri-080 均為生長快速且產孢能力極佳之菌株, 具有瓶狀枝, 產生黃色素之特性, 為 *T. virens* 之特徵之一。有關木黴菌之分類一直是極具複雜性, ITS 區間 DNA 序列的親源性分析近年來蔚為趨勢, 本研究探討之 Tri-003 及 Tri-080 由核糖體 ITS 序列得知與 NCBI 資料庫搜尋所獲之相近菌株 *T. virens* EU280076 及 EF442081 之序列相同度達 100%, 綜合形態特徵與分子鑑定資料顯示兩菌應均為 *T. virens*。因此藉由核糖體非轉錄區間序列進行

鑑定輔助形態分類, 應不失為木黴菌方便而準確之鑑定方式。

有關 *T. virens* 應用於植物病害防治之研究, 已有許多由台灣地區土壤上篩選所得之菌株分別證實可以應用在防治水稻紋枯病 (Chu 2004)、甘藍立枯病 (Chen 1998) 與向日葵、菊花菌核病 (Wu 1991) 等。有關本研究所收集之木黴菌菌株 Tri-003 及 Tri-080, 應具有植物病害防治潛力, 值得進一步研究開發作為生物防治製劑。另外值得注意的是由於本研究為針對木黴菌所分泌之物質是否具有抑制植物病原生長之能力進行篩選; 至於其它機制, 如營養競爭、微寄生或是誘導抗性等均有待進一步加以評估。因此本研究中收集所得但未表現抗生作用之木黴菌菌株, 仍應加以保存並做為未來篩選測試之用。

## 誌 謝

本研究承農業試驗所安寶貞博士、蔡志濃博士、黃晉興助理研究員提供植物病原菌菌株; 柯文琪、蔡秀慧、曾怡婷、鄭淑芳、蔡姿瑩及田蕙萍等助理協助本研究中木黴菌之收集、菌株單孢純化及更新工作, 謹此致謝。

## 引用文獻 (Literature cited)

- Benitez, T., A. M. Rincon, and A. C. Codon. 2004. Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* 7:249–260.
- Bertagnolli, B. L., S. Daly, and J. B. Singlair. 1998. Antimycotic compounds from the plant pathogen *Rhizoctonia solani* and its antagonist *Trichoderma harzianum*. *J. Phytopathol.* 88:131–135.
- Bhuyan, S. A. 1994. Antagonistic effect of *T. viride*, *T. harzianum* and *Aspergillus terreus* on *Rhizoctonia solani* causing sheath blight of rice. *J. Agric. Sci.* 7:125–128.
- Chen, C. Y. 1998. Biological Control of Soilborne Disease by *Trichoderma* spp. and *Gliocladium* spp. Master Thesis. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University. 109 pp. (in Chinese with English abstract)

- Chu, S. C. 2004. Biological Characteristics of *Gliocladium virens* WJGV2, TLGV22 and the Mass Production of Chlamyospore Formulation for Disease Control. Master Thesis. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University. 93 pp. (in Chinese with English abstract)
- de la Cruz, J., A. Hidalgo-Gallego, J. M., Lora, T. Benitez, J. A. Pintor-Toro, and A. Llobell. 1992. Isolation and Characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. Eur. J. Biochem. 206: 859–867.
- de la Cruz, J., J. Pintor-Toro, T. Benitez, and A. Llobell. 1995. Purification and characterization of an endo- $\beta$ -1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. J. Bacteriol. 177:1864–1871.
- Dennis, C. and J. Webster. 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* I. Production of nonvolatile antibiotics. Trans. Br. Mycol. Soc. 57: 353–369.
- El-Katatny, M. H., M. Gudelj, K. H. Robra, M. A. Elnaghy, and G. M. Gubitz. 2001. Characterization of a chitinase and an endo-beta-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56:137–143.
- Federico, G. R., M. M. Reynoso, M. Ferez, S. N. Chulze1, and A. M. Torres. 2007. Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. Crop Prot. 26:549–555.
- Germia, A., H. Goldman, D. Jacobs, W. Ardiles, S. Vila, M. Montagu, and A. Herreraestrella. 1993. Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, *prbl*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. Mol. Microbiol. 8:603–613.
- Ghisalberti, E. L. 2004. Anti-infective agent produced by the Hyphomycetes genera *Trichoderma* and *Gliocladium*. Med. Chem. Ser. Rev. 1:395–403.
- Grinyer, J., L. Kautto, M. Traini, R. D. Willows, J. Te’O, P. Bergquist, and H. Nevalainen. 2007. Proteome mapping of the *Trichoderma reesei* 20S proteasome. Curr. Genet. 51:79–88.
- Gurr, S. G., M. J. Mcpherson, and D. J. Bowles. 1992. Molecular Plant Pathology Vol. I. Oxford University Press. New York. 216 pp.
- Jong, M. B., R. Charkes, and C. Howell. 1999. The role of extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. Curr. Genet. 35:41–43.
- Koike, N., M. Hyakumachi, K. Kageyama, S. Tsuyumu, and N. Doke. 2001. Induction of systemic resistance in cucumber against several diseases by plant-growth-promoting fungi: lignification and superoxide generation. Eur. J. Plant Pathol. 107: 523–533.
- Kucuk, C. and M. Kivanc. 2003. Isolation of *Trichoderma* spp. and determination of their antifungal, biochemical and physiological features. Turk. J. Biol. 27:247–253.
- Lai, P. S. 2003. Evaluation of Genetic Diversity in Soybean Byrandom Amplified Polymorphic DNA Markers. Master Thesis. Graduate Institute of Biotechnology, National Chiayi University. 86 pp. (in Chinese with English abstract)
- Lo, C. T., T. F. Liao, and T. C. Deng. 2000. Induction of systemic resistance of cucumber to cucumber green mosaic virus by the root-colonizing *Trichoderma* spp. Phytopathology 90:S47.
- Lorito, M., K. Hayes, A. Pietro, L. Woo, and E. Harman. 1994. Purification characterization and synergistic activity of a  $\beta$ -1,3-glucosidase and an N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 84:398–405.
- Monte, E. 2001. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. Int. Microbiol. 4:1–4.
- Montero, M., L. Sanz, M. Rey, E. Monte, and A. Llobell. 2005. BGN 16.3, a novel acidic beta-1,6-glucanase from mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413. FEBS J. 272:3441–3448.
- Nguyen, N. V., Y. J. Kim, K. T. Oh, W. J. Jung, and R. D. Park. 2008. Antifungal activity of chitinase from *Trichoderma aureoviride* DY-59 and *Rhizopus microsporus* VS-9. Curr. Microbiol. 56:28–32.
- Pozo, M. J., J. M. Baek, J. M. Garcia, C. M. Kenerley. 2004. Functional analysis of *tvsp1*, a serine protease-encoding gene in the biocontrol agent *Trichoderma virens*. Fungal Genet. Biol. 41: 336–348.
- Rightsel, W. A., H. G. Schneider, B. J. Sloan, P. R. Graf, F. A., Miller, Q. R. Bartz, J. Ehrlich, and G. J. Dixon. 1964. Antiviral activity of gliotoxin and gliotoxin acetate. Nature 204:1333–1334.
- Sid, A. A., C. Perez-Sanchez, C. Egea, and M. E. Candela. 1999. Evaluation of *Trichoderma harzianum* for

- controlling root rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants. *Plant Pathol.* 48:58–65.
- Wang, M. H. 2006. Antagonistic Activity of *Trichoderma virens* FT-333 against Fungal Pathogens and Antifungal Protein Purification. Master Thesis. Graduate Institute of Biotechnology, National Chiayi University. 83 pp. (in Chinese with English abstract)
- Weindling R. 1941. Experimental consideration of the mold toxin of *Gliocladium* and *Trichoderma*. *Phytopathology* 31:991–1003.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p.315–322. *in: PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications.* (Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds.) Academic Press. New York.
- Wilcox, W. F., G. E. Harman, and A. Di Pietro. 1992. Effect of gliotoxin on growth, sporulation, and zoospore motility of seven *Phytophthora* spp. *in vitro*. *Phytopathology* 82:1121.
- Wu, W. S. 1991. Control of sclerotinia rot of sunflower and chrysanthemum. *Plant Prot. Bull.* 33:45–55.
- Yang, H. H., S. L. Yang, K. C. Peng, C. T. Lo, and S. Y. Liu. 2009. Induced proteome of *Trichoderma harzianum* by *Botrytis cinerea*. *Mycol. Res.* 113:924–932.

# Screening of *Trichoderma* spp. from Soils in Taiwan for Antagonism on Fungal Plant Pathogens<sup>1</sup>

Hui-Fang Ni<sup>2</sup>, Shu-Li Hsu<sup>2</sup>, Ruey-Shyang Chen<sup>3</sup>, and Hong-Ren Yang<sup>4,5</sup>

## Abstract

Ni, H. F., S. L. Hsu, R. S. Chen, and H. R. Yang. 2010. Screening of *Trichoderma* spp. from soils in Taiwan for antagonism on fungal plant pathogens. *J. Taiwan Agric. Res.* 59:29–41.

A total of 643 isolates of *Trichoderma* spp. were obtained from rhizosphere soils in central and southern Taiwan. Among them, 301 isolates were assayed *in vitro* for antagonism on the fungal plant pathogens, *Botrytis elliptica*, *Phellinus noxius*, *Sclerotium rolfsii*, and *Phytophthora capsici*, using for cellophane paper method. Results showed that two of the isolates, Tri-003 and Tri-080, completely suppressed the mycelial growth of these four fungal pathogens. Tri-003 and Tri-080 were further tested for antagonism on seven species of other fungal plant pathogens and the results showed that these two isolates also completely inhibited mycelial growth of *Peronophythora litchi* and *Pythium* sp. Results of the internal transcribed spacer (ITS) of rDNA sequence of Tri-003 and Tri-080 isolates showed a sequence identity of 99% with *Trichoderma virens*. Based on morphological and molecular studies, the identity of both Tri-003 and Tri-080 belongs to *T. virens*. The potential of these two antagonistic isolates of *Trichoderma* for control of plant diseases caused by *Phytophthora* spp., *Pythium* spp., and *Phellinus noxius* warrants further investigations.

**Key words:** *Trichoderma virens*, Antagonism, Fungal plant pathogens, Biocontrol.

- 
1. Contribution No.2396 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: March 9, 2010.
  2. Associate Researcher and Head and Assistant, Department of plant protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, TARI, Chiayi, Taiwan, ROC.
  3. Associate Professor, Department of Biochemical Science and Technology, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan, ROC.
  4. Researcher and Director, Chiayi Agricultural Experiment Branch, TARI, Chiayi, Taiwan, ROC.
  5. Corresponding author, e-mail: yhr@dns.caes.gov.tw; Fax: (05)2764525.