

由嗜菊短頭脊沫蟬泡沫液中分離之拮抗細菌對 植物病原真菌之抑菌效用

張淑貞¹ 石憲宗² 蔡志濃³ 林宗俊⁴ 路光暉^{5,*}

摘要

張淑貞、石憲宗、蔡志濃、林宗俊、路光暉。2019。由嗜菊短頭脊沫蟬泡沫液中分離之拮抗細菌對植物病原真菌之抑菌效用。台灣農業研究 68(3):226–236。

沫蟬若蟲的泡沫液在田間未見有真菌發霉現象，據此觀察，由台灣的嗜菊短頭脊沫蟬 [*Poophilus costalis* (Walker, 1851)] 之泡沫液分離拮抗細菌，並針對此類細菌進行對植物病原真菌生長之抑制效果及幾丁質酶活性分析。本研究由沫蟬泡沫液中分離出 2 種細菌對豌豆镰孢菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*) 與芒果炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) 之生長有明顯抑制作用，並經由 16S rDNA 及幾丁質酶基因序列鑑定 AY 與 DT 分別為 *Stenotrophomonas maltophilia* 與 *Delftia tsuruhatensis*。其中已確認 *S. maltophilia* AY 可產生外幾丁質酶：N-乙酰葡萄糖胺酶與幾丁二醣酶，以及內幾丁質酶，其比活性各為 1.1、19.9 及 19.1 nmol *p*-nitrophenol min⁻¹ mg⁻¹ protein。這 2 種拮抗細菌未來在植物病害防治上具有發展潛力。

關鍵詞：*Stenotrophomonas maltophilia*、*Delftia tsuruhatensis*、幾丁質酶、抑制真菌效用。

前言

沫蟬總科 (Cercopoidea) 昆蟲，因其若蟲會分泌泡沫 (froth) 包覆全身而得名。此泡沫液已證實由馬氏管 (Malpighian tubules) 分泌之蛋白質、醣類，再加上其腸道排出之液狀排泄物混和，由肛門排出。此液體在流至腹面的尾附器 (caudal appendages)，與腹部第 7–8 腹節之皮下黏液腺體 (the glands of Batelli) 所分泌的黏液混合，並藉由腹節的前後伸縮形成泡沫 (Guilbeau 1908; Marshall 1966, 1973; Mello *et al.* 1987)。

嗜菊短頭脊沫蟬 [*Poophilus costalis* (Walker, 1851)] 屬於半翅目 (Hemiptera) 沫蟬總科 (Cercopoidea)、尖胸沫蟬科 (Aphophoridae) 之短頭脊沫蟬屬 (*Poophilus*)，其若蟲具有產生

泡沫液包覆全身之行為 (Ajayi & Oboite 2000; Shih & Yang 2002)。這類泡沫液在田間複雜環境下，並未見有真菌發霉的現象，推測此抑制真菌生長的原因可能來自小分子物質、蛋白質或微生物。柳尖胸沫蟬 (*Aphophora costalis*) 若蟲的泡沫液中，已證實含有幾丁質酶 (chitinase) 及蛋白質酶 (protease)，具有抑制真菌生長之潛力 (Maksytova *et al.* 1999)。嗜菊短頭脊沫蟬若蟲的泡沫液中，更進一步確認有外幾丁質酶 (exochitinase)，包括 N-乙酰葡萄糖胺酶 (β -N-actylglucosaminidase)、幾丁二醣酶 (chitobiosidase) 及內幾丁質酶 (endo-chitinase)，且已證實若蟲泡沫液可抑制豌豆镰孢菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*) 的生長 (Chang *et al.* 2019)。

投稿日期：2018 年 6 月 21 日；接受日期：2019 年 3 月 25 日。

* 通訊作者：khlu@dragon.nchu.edu.tw

¹ 農委會農業試驗所應用動物組助理研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所應用動物組副研究員。台灣 台中市。

³ 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。

⁴ 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。

⁵ 國立中興大學昆蟲學系教授。台灣 台中市。

大部分真菌的細胞壁有幾丁質，由 β -1,4-N-acetylglucosamine 聚合而成，可被幾丁質酶水解。已知有多種微生物可分泌幾丁質酶，並被應用於真菌之生物防治 (Zhang & Yuen 2000; Zhang *et al.* 2001; Prasannakumar *et al.* 2015)。為更進一步瞭解普遍分布於台灣之嗜菊短頭脊沫蟬若蟲泡沫液之抑菌應用潛力，擬篩選其泡沫液中可抑制真菌之微生物，並進一步分析其幾丁質酶活性與其抑制真菌生長之關係，探究其抑制真菌生長之原因。

材料與方法

供試蟲源及真菌病原

由於嗜菊短頭脊沫蟬目前尚無法於實驗室中完成繼代繁殖，故本研究所需蟲源皆採自屏東縣長治鄉及麟洛鄉的竹仔菜 (*Commelina diffusa* Burm. f.)、大花咸豐草 (*Bidens pilosa* L. var. *radiata* Sch.) 及銀膠菊 (*Parthenium hysterophorus* L.) 上。採得之沫蟬若蟲皆飼養於室內插於水瓶中已發根之竹仔菜上。

病原真菌豌豆鐮孢菌購自新竹食品工業研究所菌種保存中心 (BCRC 35290)。芒果炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) 則分離自台南市官田區罹病芒果。試驗前先將此 2 菌株之菌絲置於直徑 9 cm 含馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基 (potato dextrose agar; PDA) 中，置於定溫 $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 暗室中，豌豆鐮孢菌在 4 d 後以直徑 8 mm 打孔器取下菌落邊緣新生長之菌絲塊，芒果炭疽病菌則在培養 8 d 後取邊緣菌絲塊，以供真菌抑制力試驗所需。

寄主植物之栽培

在溫室種植竹仔菜，每週施用一次複合肥料必達 (20N-20P-20K, Scotts, OH, USA)。待竹仔菜生長至 20–30 cm 長，剪取末端 20 cm 攜回實驗室後插於水瓶中，待 7 d 發根後，置於含複合肥料必達之水瓶內，成長的植株即可供飼育沫蟬若蟲。

沫蟬泡沫狀分泌物中之細菌分離

將採自野外之沫蟬 4–5 齡若蟲，以無菌水清洗蟲體後，飼養於竹仔菜上，隔天再以無

菌水清洗蟲體及竹仔菜。再飼養隔夜後，以秤藥勺舀約 0.5 mm^3 沫蟬分泌之泡沫液，塗佈於 lysogeny broth (LB) 培養基 37°C 培養隔夜，觀察菌落外型。再挑出單一菌落置於 1 mL LB 培養液、 37°C 、200 rpm 震盪培養隔夜。

拮抗細菌的篩選

與豌豆鐮孢菌之對峙培養

以移殖環分別沾取供試菌液塗劃線於直徑 9 cm 之 PDA 培養基左端，距菌液 5 cm 處，培養基右端則置一碗豆鐮孢菌之菌絲塊後，置於 25°C 定溫箱中。對照組則以 LB 培養液取代菌液。每日觀察至對照組之豌豆鐮孢菌長滿培養基，拍照。每處理各 4 重複。測試後將具有拮抗效果的菌株，進一步劃線平板，挑取單一菌落，獲得該拮抗細菌的分離株。

與芒果炭疽病菌之對峙培養

取上述對豌豆鐮孢菌抑制效果最好之 AY 菌進一步分離出 10 個菌落，改與芒果炭疽病菌進行對峙培養，挑出其中抑制芒果炭疽病菌最好的 2 個菌落 AY-1、AY-7，再與 DT 菌同時進行對芒果炭疽病菌的對峙培養。各取 30 μL 菌液置於 PDA 培養基左端直徑 8 mm 濾紙上，距此濾紙 5 cm 處，培養基右端置一芒果炭疽病菌之菌絲塊，置於 25°C 定溫箱中。對照組則以 LB 培養液取代菌液。每日觀察至對照組之芒果炭疽病菌長滿培養基，拍照、量測菌絲生長距離並計算其抑制率，各 5 重複。抑制率：(對照組菌絲塊中心點至菌絲生長最遠距離 - 處理組菌絲塊中心點至菌絲生長最遠距離) / 對照組菌絲塊中心點至菌絲生長最遠距離 $\times 100\%$ 。並以 SAS Enterprise Guide 7.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA) 先進行變方分析，再以 least significant difference (LSD) 法比較各組菌絲長度與抑制率的差異，並採 $P < 0.05$ 顯著水準比較處理間平均值之差異。

細菌之分離及 16S rDNA 鑑定分析

取上述有明顯抑菌效果之細菌 AY、DT 菌液，以劃線於 LB 培養基平板上，將平板置於 25°C 細菌培養箱中，經培養 72 h 後觀察並

拍照記錄。另將菌液以劃線於 LB 培養基，37°C 培養隔夜後，挑出單一菌落置於 1 mL LB 培養液。經 37°C 隔夜培養，再取出菌液以 Tissue & Cell Genomic DNA Purification Kit (GeneMark, Taichung, Taiwan) 萃取 DNA，最後可得 200 µL DNA 溶液，詳細流程同試劑的使用說明。參考 Weisburg *et al.* (1991) 設計之細菌 16S DNA 通用引子組 fD1/rD1，縮減序列為 fD1-S/rD1-S (表 1)，以此對引子進行 polymerase chain reaction (PCR) 增幅其部分 16S rDNA 片段。以 2× PCR Master Mix-SuperTherm 試劑組 (JMR, Stourbridge, UK) 進行 PCR，每一反應總體積為 20 µL，包含 2 µL 細菌 DNA 溶液，10 µL 之 2× PCR Master Mix (內含 2 U SuperTherm DNA polymerase Mix、2× buffer、400 µM dNTPs、3 mM MgCl₂)，以及引子組 fD1-S/rD1-S 各 10 pmol，不足體積以無菌水補足至 20 µL。PCR 增幅以 Perkin-Elmer 公司 (Waltham, MA, USA) 的 GeneAmp® PCR System 2400 迴溫循環器進行，於 94°C 1 min、60°C 1 min、72°C 2 min；隨即進行 94°C 20 s、60°C 20 s、72°C 20 s，30 個循環；最後以 72°C 7 min 使反應完全。電泳後，切取增幅之主要片段，續以 TOPO TA cloning kit (Invitrogen, CA, USA) 選殖此段基因。將此增幅的 PCR 產物接入 pCR® II-TOPO® 載體後，轉形至 DH5α 勝任細胞 (GeneMark, Taichung, Taiwan) 中，再委請源資國際生物科技股份有限公司 (Tri-I Biotech Inc., New Taipei, Taiwan) 以自動定序儀 (ABI 3730) 進行定序。每種細菌各取 3 個菌落，進行雙向定序。另外，

因此片段序列長約 1.5 kb，故再根據已解序之片段，選取不同細菌之共同序列，並參考 Carvalho *et al.* (2008) 的報告，以 16SF2/16SR2 (表 1) 進行此片段中間序列的 PCR 及定序。將所有所得序列再以 Vector NTI® Suite 11.0 軟體 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 之 Contig-Express™ 程式進行整理。

進一步將這些序列在 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 網站上，以 BLAST 程式進行相似序列檢索，下載相近序列後，以 Vector NTI® Suite 9.0 軟體之 AlinX® 程式進行多序列比對分析。選取這些序列的共同區域，以 ClustalW2 進行多序列排比，再以 PHYLIP 3.6 進行親緣關係推衍，繪出 neighbor-joining tree，繼之以 bootstrap analysis 做 1,000 次統計分析，評估此親緣關係樹各分枝間之信賴度。

細菌幾丁質酶基因

依據細菌 *Aeromonas caviae* (GenBank CA D24484)、*Shewanella baltica* (GenBank AF193 506)、*Stenotrophomonas maltophilia* (GenBank AEM52154) 之幾丁質酶胺基酸共有序列設計簡併引子對 AC1/AC2 (表 1)，此引子對位置在 *A. caviae* 幾丁質酶胺基酸序列 307–314 的 FDGVDIDW 與 444–451 的 YGRGMTGV。以此引子組增幅細菌 DNA 溶液，PCR 及定序方法同上，僅 PCR 循環改為 94°C 2 min、60°C 1 min、72°C 2 min；隨即進行 94°C 30 s、60°C 30 s、72°C 20 s，30 個循環；最後 72°C 7 min 使反應完全。

表 1. 本研究中增幅與定序基因所使用的引子。

Table 1. Oligonucleotide primers used for amplification and sequencing of genes in this study.

Primer	Nucleotide sequence (5' to 3')	Gene	Amplicon (bp)
fD1-S	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S rDNA	1,526–1,537
rD1-S	AAGGAGGTGATCCAGCC		
16SF2	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	16S rDNA	734–779
16SR2	AGGGTTGCGCTCGTTG		
AC1 ²	TTYGAYGGNGTDGAYATHGAYTGG	Chitinase	378
AC2 ²	HACNCCDGTCAATCCDCGNCRCRA		

² IUPAC code: The International Union of Pure and Applied Chemistry code (Johnson 2010).

細菌幾丁質酶活性

參考 Zhang *et al.* (2001) 方法修改如下，取上述有明顯抑菌效果之細菌 AY2 菌液塗劃於 tryptic soy agar (TSA) 培養基、25°C 培養 24 h，刮下菌體回溶於 phosphate buffered saline (PBS) buffer 中，測量 600 nm 的吸光值、計算菌液濃度。取出 1.25×10^9 colony forming units (CFU)，加入內含 1 g 膠狀幾丁質的 100 mL basic broth medium (BBM) broth，30°C、180 rpm 培養 60 h。以 $10,000 \times g$ 在 4°C 離心 10 min。取上清液在室溫中加入上清液體積 85% 的硫酸銨 (ammonium sulfate) 沉澱蛋白質，攪拌 60 min。續以 $10,000 \times g$ 在 4°C 離心 15 min，再以 5 mL 20 mM pH 8.0 含 1 mM PMSF 的 Tris-HCl buffer 回溶沉澱物，並改置沉澱液於 12–14 kDa 的透析膜中 (Spectra/Por[®], Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, USA)。續以此 buffer 800 mL 在 4°C 透析 1 d，並以 $10,000 \times g$ 離心 15 min，重複透析 4 次。最後，將上清液以 Amicon ultra 10K (Millipore, Bedford, MA, USA) 濃縮，並換成 PBS buffer，此即為細菌萃取液。

取上述細菌萃取液，參考 Nawani *et al.* (2002) 及 Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis, MS, USA) Citinase assay kit (CS0980) 之使用說明，分別分析其 2 種外幾丁質酶 N-乙酰葡萄糖胺酶與幾丁二醣酶，以及 1 種內幾丁質酶活性。各以其模式受質 4-Nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosaminide、4-Nitrophenyl N,N'-diacetyl- β -D-chitobioside 及 4-Nitrophenyl β -D-N,N',N'-triacetylchitotriose 20 μ L 分別與待測物細菌萃取液 20 μ L，於 37°C 反應 30 min，再加入 0.4 μ M sodium carbonate 80 μ L 終止反應，於 405 nm 測吸光值。另取 *p*-nitrophenol 0.01 μ mol mL⁻¹ 120 μ L，置於 37°C、30 min 後，以 405 nm 測吸光值，作為幾丁質酶活性計算的參考值。並以 Micro BCA[™] Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 進行蛋白質定量。最後結合活性及蛋白質定量結果，計算此細菌萃取液之幾丁質酶比活性。

結果

由沫蟬泡沫液分離之細菌與病原真菌之對峙培養

由沫蟬泡沫液中，以 LB 培養基分離得 4 個菌落 AY、DT、W3、W4，將此 4 個菌落各與豌豆鐮孢菌在 PDA 培養基上進行對峙培養。AY 菌落為淺黃色，DT、W3、W4 菌落則為白色 (圖 1)。AY 菌落明顯抑制豌豆鐮孢菌生長，接種後分別於 13 d、24 d 皆有顯著抑菌效果；DT 菌落為乳白色，抑菌效果稍弱；其餘 W3、W4 菌落則無明顯抑菌效果 (圖 1)。

將對豌豆鐮孢菌生長有明顯抑制效果之 AY 菌，再進一步分離出 10 個菌落，改與芒果炭疽病菌進行對峙培養，此 10 個菌落對芒果炭疽病菌的抑制效果略有差異。挑出其中抑制芒果炭疽病菌最好的 2 個菌落 AY-1、AY-7，並與 DT 菌落同時進行對芒果炭疽病菌的對峙培養，其抑制情形如圖 2，芒果炭疽病菌絲生長距離如表 2 所示。對照組的芒果炭疽病菌絲生長距離，皆顯著長於被此 3 菌落抑制的芒果炭疽病菌絲長度，差異極顯著。此 3 菌落 AY-1、AY-7、DT 皆對芒果炭疽病菌有明顯抑制效果，抑制率如表 2。AY-1、AY-7 菌落間抑制的芒果炭疽病菌絲長度及抑制率差異皆不明顯，DT 對芒果炭疽病菌的抑制力顯著較前 2 菌落差 (表 2)。

細菌外觀與 16S rDNA

對豌豆鐮孢菌或芒果炭疽病菌有抑制效果的細菌 AY 與 DT，經 25°C、72 h 培養於 LB 培養基後，細菌 AY 菌落呈黃色，細菌 DT 菌落呈乳白色、菌落邊緣有一透明圈 (圖 3)。

以引子對 fD1-S/rD1-S 增幅細菌部分核糖體 16S rDNA，PCR 產物電泳後各可見一約 1,500 bp 長度的片段。將此片段回收、轉殖並定序，AY 細菌定序得 1,500 bp 並已登錄到 NCBI 基因庫 (GenBank MH478205)，與中國大陸、菲律賓、英國的 *S. maltophilia* (GenBank GQ267817、JF729305、LT906480) 序列 100% 相同。DT 細菌之部分片段 16S rDNA 1,488 bp 亦已登錄到 NCBI 基因庫 (GenBank

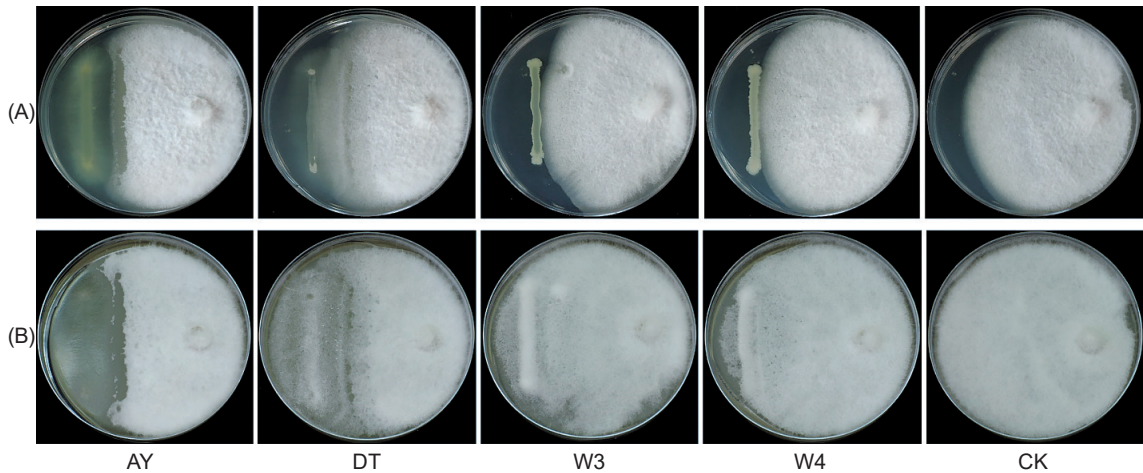


圖 1. 由沫蟬泡沫狀分泌物中分離出之細菌 (培養皿左方) 對植物病菌豌豆镰孢菌 (培養皿右方) 在 PDA 培養基、25°C 培養 13 d (A 列)、24 d (B 列) 之抑菌效果。

Fig. 1. Screening of antagonistic bacteria from the froth of spittlebug *Poophilus costalis* against plant pathogenic fungi *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* on potato dextrose agar (PDA) medium, 13 d (A row) and 24 d (B row) after incubated at 25°C.

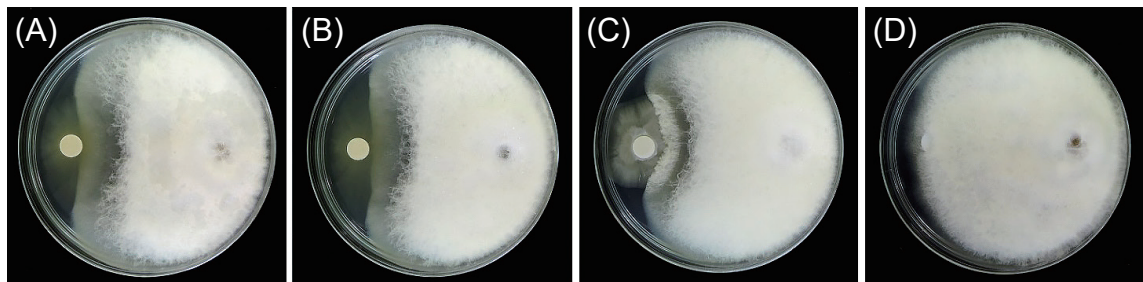


圖 2. 由沫蟬泡沫狀分泌物中分離出之拮抗菌 *Stenotrophomonas maltophilia* AY-1、AY-7 與 *Delftia tsuruhatensis* DT 對芒果炭疽病菌在 PDA 培養基上接種 12 d 後之抑制效果。培養基的左方接種拮抗菌或 LB 培養液：(A) AY-1；(B) AY-7；(C) DT；(D) 對照組 LB 培養液；右方接種芒果炭疽病菌。

Fig. 2. Antifungal effect of antagonistic bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from the froth of spittlebug *Poophilus costalis* against plant pathogenic fungi *Colletotrichum gloeosporioides* on potato dextrose agar (PDA) medium, 12 d after incubated at 25°C. Left side of plate: (A) AY-1; (B) AY-7; (C) DT; and (D) Control, lysogeny broth (LB) broth. Right side of plate: *Colletotrichum gloeosporioides*.

MH478206)，其與中國大陸、法國、美國的 *Delftia tsuruhatensis* (GenBank AY302438、CP017420、KC572558) 序列皆 100% 相同。

由 AY 細菌在 LB、PDA 培養基上的菌落外觀與 *S. maltophilia* 之高度相似，以及 16S rDNA 序列與中國大陸、菲律賓、英國的 *S. maltophilia* 序列 100% 相同，推論此 AY 細菌應為 *S. maltophilia*。另由 DT 細菌在 LB、PDA 培養基上的菌落外觀與 *D. tsuruhatensis*

之高度相似，以及 16S rDNA 序列與中國大陸、法國、美國的 *D. tsuruhatensis* 序列皆 100% 相同，推論此 DT 細菌應為 *D. tsuruhatensis*。

進一步比較 AY、DT 細菌 16S rDNA 與 NCBI 基因庫上相近序列的親緣關係，選取這些序列的共同區域，即相當於 *S. maltophilia* AY 第 71–1,439 bp。以細菌 *Chryseobacterium ginsengisoli* (AB245373) 為外群，繪出 neighbor-joining tree (圖 4)。顯示 *S. maltophilia* 歸

表 2. 由沫蟬泡沫狀分泌物中分離出之拮抗菌 *Stenotrophomonas maltophilia* AY-1、AY-7 和 *Delftia tsuruhatensis* DT 對芒果炭疽病菌在馬鈴薯培養基上之生長抑制效果。

Table 2. Antifungal effect of antagonistic bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* AY-1, AY-7 and *Delftia tsuruhatensis* DT isolated from the froth of spittlebug *Poophilus costalis* against plant pathogenic fungi *Colletotrichum gloeosporioides* on potato dextrose agar.

Antifungal effect	Control	AY-1	AY-7	DT
Radial growth of fungi (cm) ^z	6.66 ± 0.05 a	3.48 ± 0.11 c	3.50 ± 0.12 c	4.74 ± 0.05 b
Inhibition (%) ^y	-	47.70 ± 1.80 a	47.70 ± 2.10 a	28.80 ± 0.60 b

^z Mean ± standard error ($n = 5$). Means of length followed by the different letters are significantly different between bacteria at 5% level by least significant difference (LSD) test.

^y Inhibition rate (%) = $(R-r)/R$. R is the radial growth of fungal mycelia on the control plate and r is the radial growth of fungal mycelia interacting with antagonistic bacteria. Mean ± standard error ($n = 5$). Means of inhibition followed by the different letters are significantly different between bacteria at 5% level by LSD test.

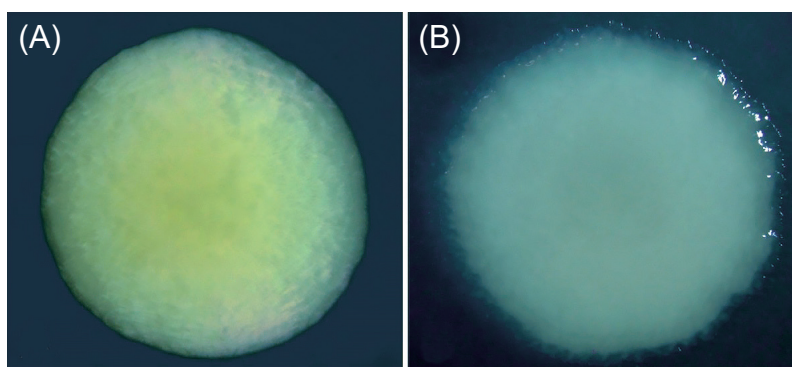


圖 3. 由沫蟬泡沫狀分泌物中分離出之拮抗菌 *Stenotrophomonas maltophilia* AY (A) 與 *Delftia tsuruhatensis* DT (B) 培養於 LB 培養基。

Fig. 3. Antagonistic bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* AY (A) and *Delftia tsuruhatensis* DT (B) were isolated from the froth of spittlebug *Poophilus costalis* and grown on lysogeny broth (LB) medium.

納成同一群，其 bootstrap value 為 100，其中 AY 細菌與大陸的 *S. maltophilia* 關係最接近，bootstrap value 為 92。*D. tsuruhatensis* DT 自成一類，其 bootstrap value 為 75。

細菌幾丁質酶基因與活性

進一步以自行設計之細菌幾丁質酶簡併引子組 AC1/AC2 增幅 AY 細菌之 DNA，可增幅得一明顯片段，定序得 378 bp。以此序列在 NCBI 網站中 BLAST 搜尋，可知其與 NCBI 資料庫中分離自中國大陸廢水的 *S. maltophilia* CP072562、土壤的 *S. maltophilia* CP015612 及來自澳洲廢水分離而得之 *S. maltophilia* CP028899 序列各有 4 bp 不同，與來自英國、西班牙臨床病例分離而來的 *S. maltophilia*

AM743169、HE798556 各有 6、7 bp 不同，與來自泰國的 *S. maltophilia* AF047411 有 11 bp 不同。

取上述有明顯抑菌效果且已確認有幾丁質酶基因的細菌 *S. maltophilia* AY，分析其幾丁質酶活性，其 2 種外幾丁質酶 N-乙醯葡萄糖胺酶與幾丁二醣酶及 1 種內幾丁質酶比活性各為 1.1、19.9 及 19.1 nmol *p*-nitrophenol min⁻¹ mg⁻¹ protein。可見此細菌分泌之外幾丁質酶 N-乙醯葡萄糖胺酶比活性最低，其餘二者相近。以此細菌 109 CFU 細菌數，30°C 培養 60 h 後，其比活性各為 2.6、45.3、43.5 nmol *p*-nitrophenol min⁻¹ mg⁻¹ protein，以外幾丁質酶之幾丁二醣酶比活性高，內幾丁質酶次之，外幾丁質酶之 N-乙醯葡萄糖胺酶最低 (表 3)。

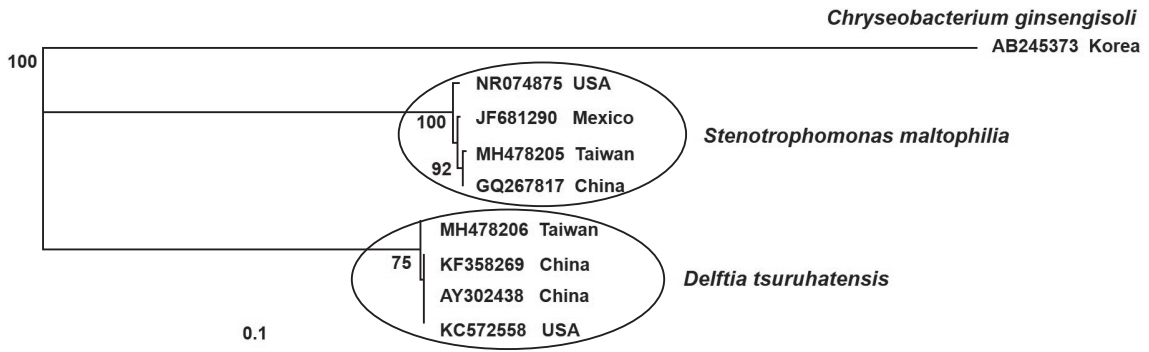


圖 4. 拮抗菌 *Stenotrophomonas maltophilia* 與 *Delftia tsuruhatensis* 之 16S rDNA 片段序列，以 Kimura 2-parameter 運算模式，再經 neighbor-joining 群聚方法所推導之親緣關係樹。樹形上的數值為經 1,000 次 bootstrap 的值，> 70% 才會顯示其上。

Fig. 4. A phylogenetic tree of antagonistic bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* and *Delftia tsuruhatensis* based on the 16S rDNA sequences by neighbor-joining method of pairwise distance model of Kimura 2-parameter. Bootstrap values > 70% are indicated at the nodes (bootstrap analysis 1,000 replicates).

表 3. 由沫蟬泡沫液中分離出之 *Stenotrophomonas maltophilia* AY 細菌之幾丁質酶活性。

Table 3. Chitinase activity of *Stenotrophomonas maltophilia* AY isolated from the froth of spittlebug *Poophilus costalis*.

<i>S. maltophilia</i>	β -N-acetylglucosaminidase	Chitobiosidase	Endochitinase
Unit ^z mg ⁻¹ protein	1.1	19.9	19.1
Unit ^z 10 ⁻⁹ CFU ^y	2.6	45.3	43.5

^z Unit definition: one unit will release 1.0 nmol of *p*-nitrophenol from the appropriate substrate per minute at 37°C.

^y CFU: colony-forming unit.

討論

沫蟬常分布於其寄主植物靠近地表的主莖上，若蟲分泌泡沫液覆蓋全身，皆不見有發霉現象，且已知柳尖胸沫蟬 (*Aphrophora costalis*) 泡沫液可抑制真菌生長 (Maksyutova *et al.* 1999)。此抑制真菌生長的能力，可能來自於沫蟬本身、寄主植物或伴隨而來之微生物。本研究首度由廣泛分布於台灣的嗜菊短頭脊沫蟬泡沫液中，分離出 2 種細菌 *S. maltophilia* AY 及 *D. tsuruhatensis* DT，此 2 種細菌皆可直接抑制真菌生長。其中，*S. maltophilia* 為革蘭氏陰性桿菌，原歸在假單胞菌屬 (*Pseudomonas*)，後改歸在黃單胞菌屬 (*Xanthomonas*)，最後獨立為 *Stenotrophomonas* 屬 (Palleroni & Bradbury 1993)。此細菌分布廣泛，可於環境中自由生存，亦可為植物內寄生菌 (endophyte) (Ryan *et al.* 2009)。已知 *S. maltophilia* 可自植物內部組織如莖、根、根際分離，亦可由土

壤中分離 (Juhnke & des Jardin 1989; Berg *et al.* 1996)。本研究首度提出由嗜菊短頭脊沫蟬泡沫液中分離得 *S. maltophilia*。此種沫蟬若蟲有 5 個齡期，若蟲末期 5 齡若蟲刺吸染成藍色的咸豐草汁液後 14.0 min，可見其排出藍色泡沫液 (Chang *et al.* 2011)。故可推論 *S. maltophilia* 很可能即是由此沫蟬之吸食行為，經由植物汁液進入沫蟬蟲體，再隨沫蟬排出之泡沫液流出體外。本研究採集嗜菊短頭脊沫蟬 4–5 齡若蟲，此時期沫蟬刺吸汁液量隨齡期上升，偏好分布在植物近根部之莖上，此亦增加 *S. maltophilia* 進入沫蟬蟲體機會。

大部分真菌的細胞壁組成中皆有幾丁質，幾丁質由 β -1,4-N-acetylglucosamine 聚合而成，可被幾丁質酶水解。幾丁質酶依其水解幾丁質的部位及產物，可概分為內幾丁質酶 (E.C. 3.2.1.14) 及外幾丁質酶。內幾丁質酶可由幾丁質鏈中間部位逢機水解幾丁質；外幾丁質

酶則由幾丁質鏈的非還原端水解幾丁質，釋出 di-acetylchitobiose 者稱為幾丁二醣酶 (E.C. 3.2.1.29)，釋出 β -1,4-N-acetylglucosamine 者稱為 N-乙醯葡萄糖胺酶 (E.C. 3.2.1.30) (Tron-smo & Harman 1993)。

S. maltophilia 34S1 品系於 30°C 培養 72 h，以幾丁二醣酶的模式受質，可測得其活性將近 0.3 nmol *p*-nitrophenol min⁻¹ 10⁻⁹ CFU (Kobayashi *et al.* 2002)。本研究分離之 *S. maltophilia* AY 品系於 30°C 培養 60 h，同樣受質測得之活性為 45.3 nmol *p*-nitrophenol min⁻¹ 10⁻⁹ CFU，為其 151 倍。二者不同的原因，除了菌種品系不同外，培養液亦不同，本研究使用之培養液係參考 Zhang *et al.* (2001)，彼等將 *S. maltophilia* C3 於 25°C 培養 10 d，同樣受質測得之幾丁二醣酶活性為 1,622 nmol *p*-nitrophenol⁻¹ min⁻¹ 10⁻⁹ CFU。若皆以平均培養生長 1 h 評估其幾丁質酶產出效率，*S. maltophilia* C3 與 *S. maltophilia* AY 測得之活性各為 6.758 與 0.755 nmol *p*-nitrophenol min⁻¹ 10⁻⁹ CFU。*S. maltophilia* C3 之幾丁二醣酶，為本研究 *S. maltophilia* AY 的 9.0 倍。二者不同的原因，除了菌種品系不同外，亦可能為本研究分離之 *S. maltophilia* AY 尚未經最適培養條件篩選。培養基成分與 pH 值對細菌產生大量幾丁質酶量有很大影響 (Prakash *et al.* 2015)，未來 *S. maltophilia* AY 欲實際應用於生物防治前，需再進一步篩選最適培養、量產條件。早期研究發現多數植物分泌內幾丁質酶，細菌則分泌外幾丁質酶如幾丁二醣酶 (Roberts & Selitrennikoff 1988)。本研究除確認細菌 *S. maltophilia* AY 分泌屬於外幾丁質酶之幾丁二醣酶且比活性最高，亦確認其可分泌同屬於外幾丁質酶之 N-乙醯葡萄糖胺酶及內幾丁質酶。

多環芳香烴 (polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs) 可由石油精煉過程而來，結構多樣，其中很多對生物具有毒性，並已證實其中多種對人體具致癌性。造成環境、生態的汙染。*S. maltophilia* 除在生物防治中深具潛力外，*S. maltophilia* AJH1 在酸性 pH 2 的培養基中，亦具有分解多環芳香烴之能力 (Arulazhagan *et al.* 2017)。此亦提供本研究分離而得之 *S. maltophilia* AY 未來可能應用及進一步研

究的方向。*D. tsuruhatensis* 則因有前人研究未檢測到幾丁質酶活性 (Prasannakumar *et al.* 2015)，故本研究不再進行其幾丁質酶評估。

拮抗菌 *S. maltophilia*、*D. tsuruhatensis* 在生物防治研究中，長期備受矚目。其中，*S. maltophilia* C3 可抑制 *Bipolaris sorokiniana* 引起的黑麥草葉斑病 (Zhang & Yuen 2000; Zhang *et al.* 2001)。*S. maltophilia* C5 可抑制 *B. sorokiniana* 引起的草坪草 (Kentucky bluegrass) 之夏季斑枯病 (summer patch disease) (Kobayashi *et al.* 2002)。*D. tsuruhatensis* 可促進植物生長、抑制多種真菌 (Han *et al.* 2005)。*D. tsuruhatensis* BT1 分泌多種化學物質及酵素促進番茄生長，並抑制其葉部及根圈病菌 (Prasannakumar *et al.* 2015)。*S. maltophilia* 與 *D. tsuruhatensis* 這 2 種細菌以往被視為對人類屬於低致病性細菌，但近來在免疫力不全的病人中亦曾發現 (Chang *et al.* 2011; Alavi *et al.* 2013; Tabak *et al.* 2013; Singh *et al.* 2017)，*S. maltophilia* 更進而出現在醫院院內感染及社區型感染報告中 (Chang *et al.* 2011)。這些細菌對人體健康的負面報告，皆對拮抗菌在農業生物防治中的應用性提出警訊。*S. maltophilia* 與 *D. tsuruhatensis* 這 2 種細菌未來若應用於生物防治，須經更謹慎的評估其對人體健康的危害，並斟酌使用方式。除此之外，之前對人體健康無相關危害報告的細菌，是真的無致病性、低致病性，還是只是尚未發現病例。隨著醫學越來越發達，人類壽命延長，醫院內免疫力低弱的病人越來越多，這些本來僅是無致病性、低致病性的伺機性病原 (opportunistic pathogens) 細菌，在未來也都可能傳出危害免疫力低弱病人的報告。吾人在選擇用於生物防治中的拮抗菌時，也須持更謹慎的態度，以期在農業收益、減少化學農藥使用量、保護人類健康等多重考量層面下，得到最大效益。

誌謝

本研究承行政院農業委員會 101 農科-10.2.1-農-C5 計畫經費補助。試驗期間承朱雅琳小姐、楊侑蔡小姐協助養蟲及相關試驗執行，謹此致謝。

引用文獻

- Ajayi, O. and F. A. Oboite. 2000. Importance of spittle bugs, *Locris rubens* (Erichson) and *Poophilus costalis* (Walker) on sorghum in West and Central Africa, with emphasis on Nigeria. *Ann. Appl. Biol.* 136:9–14.
- Alavi, P., H. Müller, M. Cardinale, C. Zachow, M. B. Sánchez, J. L. Martínez, and G. Berg. 2013. The DSF quorum sensing system controls the positive influence of *Stenotrophomonas maltophilia* on plants. *PLOS ONE* 8:e67103. doi:10.1371/journal.pone.0067103
- Arulazhagan, P., K. Al-Shekri, Q. Huda, J. J. Godon, J. M. Basahi, and D. Jeyakumar. 2017. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by an acidophilic *Stenotrophomonas maltophilia* strain AJH1 isolated from a mineral mining site in Saudi Arabia. *Extremophiles* 21:163–174.
- Berg, G., P. Marten, and G. Ballin. 1996. *Stenotrophomonas maltophilia* in the rhizosphere of oilseed rape—Occurrence, characterization and interaction with phytopathogenic fungi. *Microbiol. Res.* 151:19–27.
- Carvalho, F. R. S., F. R. Nastasi, R. C. Gamba, A. S. Foronda, and V. H. Pellizari. 2008. Occurrence and diversity of *Legionellaceae* in polar lakes of the Antarctic Peninsula. *Curr. Microbiol.* 57:294–300.
- Chang, Y. T., P. W. Yang, C. T. Hung, W. L. Lin, and Y. H. Chen. 2011. The role of *Stenotrophomonas maltophilia* in healthcare-associated and community-acquired infections. *Infect. Control J.* 21:341–348. (in Chinese with English abstract)
- Chang, S. C., H. T. Shih, and K. H. Lu. 2019. Antifungal effect and chitinase activities of the froth of spittlebug *Poophilus costalis* (Walker) (Hemiptera: Cercopoidea: Aphrophoridae). *J. Asia Pac. Entomol.* 22:269–273.
- Guilbeau, B. H. 1908. The origin and formation of the froth in spittle-insects. *Amer. Nat.* 42:783–798.
- Han, J., L. Sun, X. Dong, Z. Cai, X. Sun, H. Yang, Y. Wange, and W. Song. 2005. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. *Syst. Appl. Microbiol.* 28:66–76.
- Johnson, A. D. 2010. An extended IUPAC nomenclature code for polymorphic nucleic acids. *Bioinformatics* 26:1386–1389.
- Juhnke, M. and E. des Jardin. 1989. Selective medium for isolation of *Xanthomonas maltophilia* from soil and rhizosphere environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:747–750.
- Kobayashi, D. Y., R. M. Reedy, J. Bick, and P. V. Oudemans. 2002. Characterization of a chitinase gene from *Stenotrophomonas maltophilia* strain 34S1 and its involvement in biological control. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1047–1054.
- Maksyutova, N. N., I. A. Tarchevsky, D. V. Yusupova, E. L. Gvozdeva, T. A. Valueva, and V. G. Yakovleva. 1999. Enzymatic activity of aphroproteins. *Biochemistry* 64:780–782.
- Marshall, A. T. 1966. Spittle-production and tube-building by cercopid larvae (Homoptera)- IV. Mucopolysaccharide associated with spittle-production. *J. Insect Physiol.* 12:635–644.
- Marshall, A. T. 1973. Protein synthesis and secretion by the Malpighian tubules of cercopid larvae (Homoptera). *J. Insect Physiol.* 19:2317–2326.
- Mello, M. L. S., E. R. Pimentel, A. T. Yamada, and A. Storopoli-Neto. 1987. Composition and structure of the froth of the spittlebug, *Deois* sp. *Insect Biochem.* 17:493–502.
- Nawani, N. N., B. P. Kapadnis, A. D. Das, A. S. Rao, and S. K. Mahajan. 2002. Purification and characterization of a thermophilic and acidophilic chitinase from *Microbispora* sp. V2. *J. Appl. Microbiol.* 93:965–975.
- Palleroni, N. J. and J. F. Bradbury. 1993. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings *et al.* 1983. *Intl. J. Syst. Bacteriol.* 43:606–609.
- Prakash, B., P. Perumal, J. Gowrishankar, P. Sivasankari, L. Ashokkumar, and P. Tamilmani. 2015. Optimization of cultural conditions for production of chitinase by *Bacillus* sp. isolated from agriculture soil using substrate as marine crab shell waste. *Intl. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 4:192–198.
- Prasannakumar, S. P., D. H. Gajendramurthy, P. Hariprasad, S. Prasad, and S. R. Niranjana. 2015. *Delftia tsuruhatensis* WGR-UOM-BT1, a novel rhizobacterium with PGPR properties from *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurz also suppresses fungal phytopathogens by producing a new antibiotic- AMTM. *Lett. Appl. Microbiol.* 61:460–468.
- Roberts, W. K. and C. P. Selitrennikoff. 1988. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *J. Gen. Microbiol.* 134:169–176.
- Ryan, R. P., S. Monchy, M. Cardinale, S. Taghavi, L. Crossman, M. B. Avison, G. Berg, D. Van Der Lelie, and J. M. Dow. 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nat. Rev. Microbiol.* 7:514–525.

- Shih, H. T. and J. T. Yang. 2002. Three new records of Aphrophoridae (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cercopoidea) from the Kinmen Islands (Taiwan). *Pol. Pis. Entomol.* 71:91–100.
- Singh, V. K., A. Mishra, and B. Jha. 2017. Anti-quorum sensing and anti-biofilm activity of *Delftia tsuruhatensis* extract by attenuating the quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7:337. doi:10.3389/fcimb.2017.00337
- Tabak, O., B. Mete, S. Aydin, N. M. Mandel, B. Otlu, R. Ozaras, and F. Tabak. 2013. Port-related *Delftia tsuruhatensis* bacteremia in a patient with breast cancer. *New Microbiol.* 36:199–201.
- Tronsmo, A. and G. E. Harman. 1993. Detection and quantification of *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels. *Anal. Biochem.* 208:74–79.
- Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173:697–703.
- Zhang, Z. and G. Y. Yuen. 2000. Effects of culture fluids and preinduction of chitinase production on biocontrol of *Bipolaris* leaf spot by *Stenotrophomonas maltophilia* C3. *Biol. Control* 18:277–286.
- Zhang, Z., G. Y. Yuen, G. Sarath, and A. R. Penheiter. 2001. Chitinases from the plant disease biocontrol agent, *Stenotrophomonas maltophilia* C3. *Phytopathology* 91:204–211.

Antifungal Effect of Antagonistic Bacteria Isolated from the Froth of Spittlebug *Poophilus costalis* Against Phytopathogenic Fungi

Shu-Chen Chang¹, Hsien-Tzung Shih², Jyh-Nong Tsai³, Tsung-Chun Lin⁴, and Kuang-Hui Lu^{5,*}

Abstract

Chang, S. C., H. T. Shih, J. N. Tsai, T. C. Lin, and K. H. Lu. 2019. Antifungal effect of antagonistic bacteria isolated from the froth of spittlebug *Poophilus costalis* against phytopathogenic fungi. *J. Taiwan Agric. Res.* 68(3):226–236.

For no fungi growing on the froth of spittlebug in field, the antifungal effect and chitinase activity of the bacteria isolated from the froth of *Poophilus costalis* (Walker, 1851) were analyzed in this study. Two isolates of bacteria had high antagonistic activities against *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* and *Colletotrichum gloeosporioides* Penz were identified as *Stenotrophomonas maltophilia* AY and *Delftia tsuruhatensis* DT by 16S rDNA and chitinase gene sequences. *S. maltophilia* AY produced 1.1, 19.9, and 19.1 nmol *p*-nitrophenol min⁻¹ mg⁻¹ protein of exochitinase β -N-actylglucosaminidase, chitinobiosidase and endochitinase, respectively. These two antagonistic bacteria may have the application potential on pathogenic control in the future.

Key words: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Delftia tsuruhatensis*, Chitinase, Antifungal effect.

Received: June 21, 2018; Accepted: March 25, 2019.

* Corresponding author, e-mail: khlu@dragon.nchu.edu.tw

¹ Assistant Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

² Associate Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

³ Associate Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

⁴ Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

⁵ Professor, Department of Entomology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.