

研究簡報

## *Phellinus noxius* 與其相近真菌具有選擇性氮源同化作用

張東柱 邱文慧 楊文雯

台北市 台灣省林業試驗所森林保護系

接受日期：中華民國 83 年 12 月 20 日

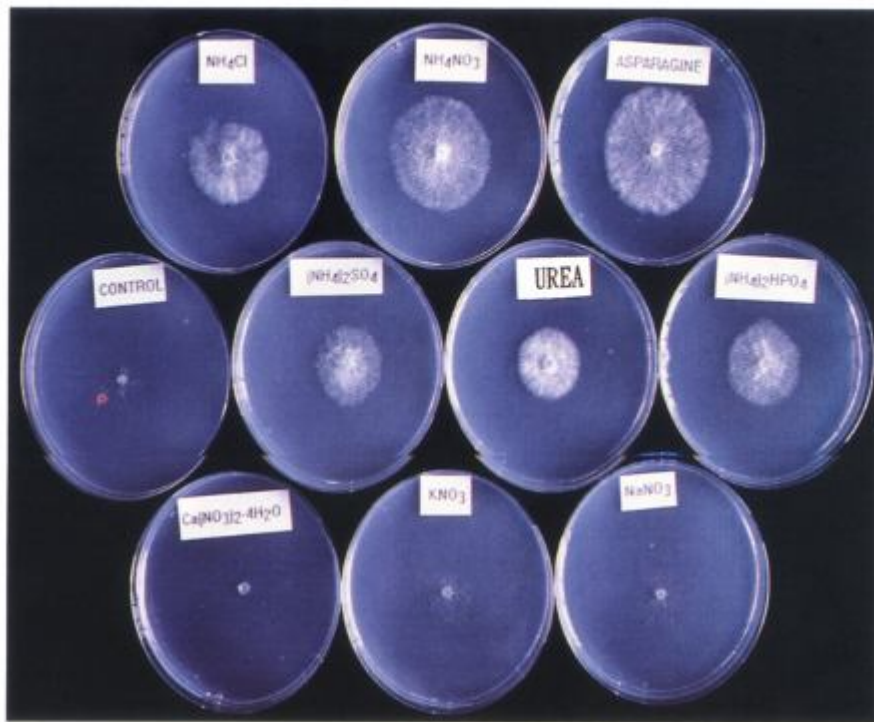
張東柱、邱文慧、楊文雯，1994. *Phellinus noxius* 與其相近真菌具有選擇性氮源同化作用. 植病會刊 3:230-233.

褐根病菌 (*Phellinus noxius* (Corner) Cunningham) 廣範分佈在熱帶地區 (10)。其引起多種農園藝及森林樹木病害導致褐根腐及萎凋死亡 (5,8,9)。近年來，本病害已成為台灣中南部低海拔地區果樹及森林樹木最重要的病害之一 (1,2)。在北美洲西北地區針葉樹最重要病害之一薄層根腐病 (laminated root rot) 的病原菌 *Phellinus weirii* (Murr.) Gilbn. (11)，已知因缺乏分泌硝酸還原酵素 (nitrate reductase) 的能力而無法利用硝酸鹽中的氮源 (6)。在該地區有一種赤楊 (*Alnus rubra* Bong.)，林地因與其共生根瘤菌可以固定空氣中的氮使其土壤含有較多的硝酸鹽。此種赤楊林地相當不利 *P. weirii* 的發病。其原因可能是土壤中高濃度的硝酸鹽存在之影響。因此在發病嚴重地區利用赤楊輪作，應可以降低病害的發生 (6)。在國外，目前褐根病的防治方法以挖除病根及藥劑施用為主 (8)，但其實際推廣在田間防治仍有程度上的困難。*P. noxius* 與 *P. weirii* 如同樣具有選擇性氮源同化作用，則在其病害防治經營的策略上應可多一種選擇。本文報導 *P. noxius* 及一些分離自台灣之 *P. noxius* 相近真菌具有選擇性氮源同化作用，也就是缺乏分泌硝酸還原酵素因而無法利用硝酸鹽中的氮源。

將 *P. noxius* (isolate B 8) 培養在以 Johansen 培養基為基本配方 (13)，但其氮源則分別用等量的  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{KNO}_3$ 、天門冬精胺 (asparagine) 或尿素取代，不同氮源的濃度分別為 50、500 和 1000 ppm 三種。另基本培養基的 agar 以 agarose 取代，agarose 的濃度為每 1 公升培養基 15 公克。培養液之基本配方為 0.8 公克磷酸一鉀 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )、0.5 公克硫酸鎂 ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )、30 公克葡萄糖和 1 ppm 維生素  $\text{B}_1$  溶於 1000 毫升蒸餾水。每一處理四重複，培養於 30 C 無光恆溫箱中。

硝酸還原酵素的萃取是根據 Li *et. al.* (6) 的方法：將 *P. noxius* 培養在 300 毫升三角瓶含有 50 毫升麥芽抽出液 (20 克麥芽抽出物和 1000 毫升蒸餾水) 的培養基培養 10 日，在 Bucher funnel 上以蒸餾水將菌絲洗淨，洗淨的菌絲放置在 -15 C 冷凍 1 至 3 小時，加入菌絲三倍重的 0.1 M  $\text{K}_2\text{PO}_4$  pH 7 與菌絲混合磨勻，在 4 C 下以 10,000 g 離心力離心 20 分鐘，取上層液當酵素抽出液。酵素活性的測定則以光譜儀 (Beckman Du-65 spectrophotometer) 測定亞硝酸之光度反應。在測定酵素活性的開始，將 0.2 ml 或 0.1 ml 的酵素抽出液與下列試劑混合：0.1 ml 之 0.1 M  $\text{KNO}_3$ ，0.05 ml 之  $2.6 \times 10^{-5}$  M flavin adenine dinucleotide (FAD)，0.04 ml 之  $2.0 \times 10^{-3}$  M nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) 和 0.26 ml 之 0.2 M pyrophosphate 緩衝液 (pH 7)，最後加水到 0.5 ml。混合後，放置在 30 C 的恆溫箱使其作用 20 分鐘，加入 0.9 ml 水和 0.5 ml 之 1% sulfanilamide 以終止酵素的作用，之後加入 0.5 ml 之 0.02% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride (DPNH) 使其呈色。作用 20 分鐘後放置於波長為 540 nm 的光譜儀測量其 O.D. 值。以不加 DPNH 或酵素抽出液以開水煮 10 分鐘當對照組。

本試驗除了測定 *P. noxius* 對不同氮源的利用情形及硝酸還原酵素活性之外，也測定另外九種 *Phellinus* 及六種 *Inonotus* 菌類。*Phellinus* 和 *Inonotus* 同屬於 Hymenochaetaceae，皆為木生性多孔菌。測定之供試菌種包括 *P. pini* (Brot: Fr.) Ames., *P. inermis* (Ell. et Everh.) Cunn., *P. apiahyunus* (Speg.) Rajch. et Wright., *P. ribis* (Schum. : Fr.) Quel., *P. cesatii* (Bres.) Ryv., *P. longisetulosus* Bond. et Herr., *P. membranaceus* Wright et Blumenf., *P. hoehnelii* (Bres.) Ryv., *P. melleoporus* (Murr.) Ryv., *I. xeranticus* (Berk.) Imaz. et Aoshi., *I. tabacinus* (Mont.) Karst., *I. mikadoi* (Lloyd) Imaz., *I.*



圖一、*Phellinus noxius*在含不同氮源之培養基上生長之菌落形態，氮源的濃度為500 ppm。

Fig. 1. Colony appearance of *Phellinus noxius* on Johnson agarose plate containing different nitrogen sources at concentration of 500 ppm.

表一、不同氮源對 *Phellinus noxius* 菌絲生長之影響  
TABLE 1. Effect of different nitrogen sources on the mycelial growth of *Phellinus noxius*

Nitrogen source	50 ppm		500 ppm		1000 ppm	
	LG <sup>1</sup>	DM <sup>2</sup>	LG	DM	LG	DM
NaNO <sub>3</sub>	0.47 ±		0.40 ±		0.38 ±	
KNO <sub>3</sub>	0.40 ±		0.35 ±		0.35 ±	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.45 ±		0.5 ±		0.4 ±	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.57 +		0.65 ++		0.6 ++	
NH <sub>4</sub> Cl	0.57 +		0.55 ++		0.5 ++	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.4 +		0.45 ++		0.4 ++	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.4 +		0.4 ++		0.4 ++	
Asparagine	0.65 ++		0.7 +++		0.7 ++++	
Urea	0.35 +		0.4 ++		0.4 +++	

<sup>1</sup> LG: average mycelial linear growth (mm/day) of *P. noxius* at 30 C for 7 days.

<sup>2</sup> DM: density of mycelium from thinnest (±) to thickest (++++).

*nodulosus* (Fr.) Karst., *I. iodinus* (Mont.) Cunn. 和 *I. setiporus* (Berk.) Pat.。測定對不同氮源的利用情形時，氮源的濃度均為500 ppm，氮源為NaNO<sub>3</sub>和NH<sub>4</sub>Cl兩種，而在測定硝酸還原酵素活性時，則使用0.2 ml的酵素抽出液，其餘條件均與*P. noxius*相同。

實驗結果顯示 *P. noxius* 無法利用硝酸態氮，如NaNO<sub>3</sub>、Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O和KNO<sub>3</sub>，但可利用銨態氮如NH<sub>4</sub>Cl、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>和(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>及有機態氮如天門冬精胺和尿素(表一及圖一)。其中天門冬精胺之效果最好。硝酸態氮雖然不為*P. noxius*所利用，但其對病原菌也沒有毒害作用，因在添加NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>的培養基上，其生長情形與其它銨態氮相似。如以直線生長來判斷*P. noxius*是否可以利用硝酸態氮，各處理似乎沒有多大差異，但如其菌落之菌絲疏密來評斷，則處理間有明顯的不同。*P. noxius*培養在含不同濃度的硝酸態氮培養基時，其形成之菌落疏密大都類似，但不同濃度的銨態氮及有機氮，則有隨著濃度增加而有促進該菌生長之現象。比較九種*Phellinus*和六種*Inonotus*對硝酸鈉與氮化銨的利用情形時，供試之15種菌類也無法利用硝酸鈉，但可以利用氮化銨(表二及圖二至圖四)。雖然硝酸鈉和氮化銨對同一種菌之直線生長速率的影響沒有顯著之差異，但其對菌落菌絲的疏密度之影響，則有明顯的不同。再者，測定*P. noxius*抽取液之硝酸還原酵素活性時，顯示其不分泌此酵素。另外15種*Phellinus*和*Inonotus*也不分泌硝酸還原酵素。

大部份的不完全菌和子囊菌都可利用硝酸態氮(3)，因此被認為可產生硝酸還原酵素，此酵素可將硝酸基轉化成可利用的銨基。但很多的擔子菌，如*P. weirii*

表二、硝酸鈉與氯化銨對九種 *Phellinus* 及六種 *Inonotus* 菌絲生長之影響

TABLE 2. Effect of sodium nitrate and ammonium chloride on the mycelial growth of nine *Phellinus* spp. and six *Inonotus* spp.

Fungus	NaNO <sub>3</sub>		NH <sub>4</sub> Cl	
	LG <sup>1</sup>	DM <sup>2</sup>	LG	DM
<i>P. pini</i>	0.03	±	0.03	++
<i>P. inermis</i>	0.18	±	0.19	++
<i>P. apiahynus</i>	0.03	±	0.02	++
<i>P. ribis</i>	0.02	±	0.03	++
<i>P. cesatii</i>	0.03	±	0.03	++
<i>P. longisetulosus</i>	0.35	±	0.32	++
<i>P. membranaceus</i>	0.21	±	0.23	++
<i>P. hoehnelii</i>	0.43	±	0.44	++
<i>P. melleoporus</i>	0.22	±	0.20	++
<i>P. xeranticus</i>	0.03	±	0.03	++
<i>P. tabacinus</i>	0.1	±	0.13	++
<i>P. mikadoi</i>	0.12	±	0.11	++
<i>P. nodulosus</i>	0.31	±	0.32	++
<i>P. iodinus</i>	0.03	±	0.03	++
<i>P. setiporus</i>	0.18	±	0.17	++

<sup>1</sup> LG: average mycelial linear growth (mm/day) of test fungus at 30 C for 7 days.

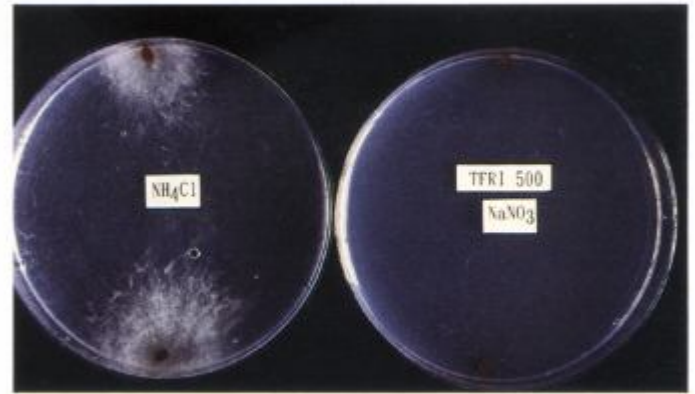
<sup>2</sup> DM: density of mycelium from thinner (±) to thicker (++) .



圖二、*Phellinus cesatii* 在添加硝酸鈉或氯化銨培養基生長之菌落形態。

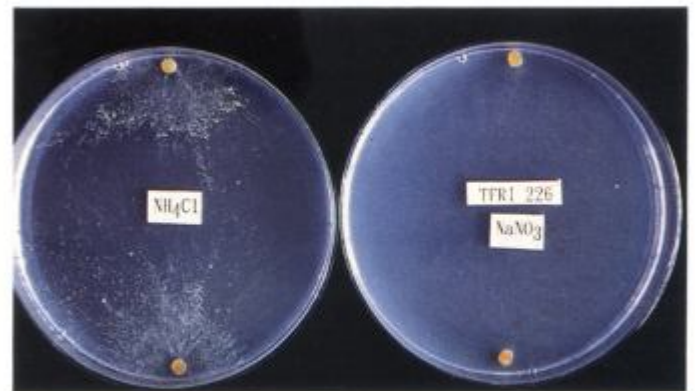
Fig. 2. Colony appearance of *Phellinus cesatii* on the medium amended with sodium nitrate or ammonium chloride.

和 *Armillaria mellea* (Vahl.) Quel. 無法利用硝酸態氮是由於缺乏分泌硝酸還原酵素的能力(4,6)。在北美針葉林已利用輪作赤楊以增加土壤之硝酸離子做其防治經營的策略，因硝酸離子有利拮抗菌如 *Streptomyces* spp. 的生長，但抑制 *P. weirii* 的活性。然而直接施用



圖三、*Phellinus hoehnelii* 在添加硝酸鈉或氯化銨培養基生長之菌落形態。

Fig. 3. Colony appearance of *Phellinus hoehnelii* on the medium amended with sodium nitrate or ammonium chloride.



圖四、*Inonotus nodulosus* 在添加硝酸鈉或氯化銨培養基生長之菌落形態。

Fig. 4. Colony appearance of *Inonotus nodulosus* on the medium amended with sodium nitrate or ammonium chloride.

硝酸鹽的肥料，只顯示有益樹木的生長並未直接減少病害的發生(12)。因此，輪作赤楊減少病害之發生是因為硝酸離子增加所致，仍需進一步的研究。另外赤楊根分泌之酚化合物可抑制 *P. weirii* 的生長(7)。如以輪作赤楊來防治台灣果樹或林木之褐根病，有實際應用的困難，但或許可以種植或輪作具有固氮能力的草本植物或矮小的木本植物來替代，以增加土壤硝酸離子。至於種植或輪作具有固氮能力的植物的防治效果仍需進一步以試驗證實。

關鍵詞：褐根病菌、硝酸還原酵素、*Phellinus* spp., *Inonotus* spp.

## 謝 辭

本研究報告承蒙行政院農業委員會經費補助，僅此致謝。

## 引用文獻

1. Ann, P. J., and Ko, W. H. 1992. Decline of longan trees: association with brown root rot caused by *Phellinus noxius*. Plant Pathol. Bull. 1:19-25.
2. Chang, T. T. 1992. Decline of some forest trees associated with brown root rot caused by *Phellinus noxius*. Plant Pathol. Bull. 1:90-95.
3. Bilgrami, K. S., and Verma, R. N. 1978. Physiology of fungi. Vikas pub. House PVT LTD. New Delhi, 507 pp.
4. Garrett, S. D. 1953. Rhizomorph behavior in *Armillaria mellea* (Vahl) Quel, I. Factors controlling rhizomorph initiation by *A. mellea* in pure culture. Anna. Bot. 17:63-79.
5. Hodges, C. S., and Tenorio, J. A. 1984. Root disease of *Delonix regia* and associated tree species in the Mariana Islands caused by *Phellinus noxius*. Plant Dis. 68:334-336.
6. Li, C. Y., Lu, K. C., Trappe, J. M., and Bollen, W. B. 1967. Selective nitrogen assimilation by *Poria weirii*. Nature 213:814.
7. Li, C. Y., Lu, K. C., Trappe, J. M., and Bollen, W. B. 1972. *Poria*-inhibiting and other phenolic compounds in roots of red alder and Douglas-fir. Microbios 5:65-68.
8. Nandris, D., Nicole, M., and Geiger, J. P. 1987. Root rot diseases of rubber trees. Plant Dis. 71:298-306.
9. Neil, P. E. 1986. A preliminary note on *Phellinus noxius* root rot of *Cordia alliodora* plantings in Vanuatu. Eur. J. For. Pathol. 16:274-280.
10. Pegler, D. N., and Waterston, J. M. 1968. *Phellinus noxius* C. M. I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 195.
11. Thies, W. G. 1984. Laminated root rot. The quest for control. J. For. 82:345-356.
12. Thies, W. G., Nelson, E. E., and Zabowski, D. 1994. Removal of stumps from a *Phellinus weirii* infected site and fertilization affect mortality and growth of planted Douglas-fir. Can. J. For. Res. 24:234-239.
13. Tuite, J. 1969. Plant Pathological Methods-Fungi and Bacteria Lafayette, Indiana. 208 pp.

## ABSTRACT

Chang, T. T., Chiu, W. H., and Young, W. W. 1994. Selective nitrogen assimilation by *Phellinus noxius* and its related fungi. Plant Pathol. Bull. 3:230-233. (Division of Forest Protection, Taiwan Forestry Research Institute, Taipei, Taiwan, R.O.C.)

*Phellinus noxius* was not able to use nitrate salts as its nitrogen source such as  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$  and  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , although it could use ammonium salts such as  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , and organic nitrogen such as asparagine and urea. Among test nitrogen sources, asparagine was the best for its mycelial growth. *P. noxius* was found not able to secrete nitrate reductase and thus was not able to use nitrate salts. Moreover, nine other *Phellinus* species and six *Inonotus* species including *P. pini*, *P. inermis*, *P. apiahynus*, *P. ribis*, *P. cesatii*, *P. longisetulosus*, *P. membranaceus*, *P. hoehnelii*, *P. melleoporos*, *I. xeranticus*, *I. tabacinus*, *I. mikadoi*, *I. nodulosus*, *I. iodinus* and *I. setiporus*, which were isolated from Taiwan, could use ammonium chloride but not sodium nitrate, and completely lacked nitrate reductase activity.

Key words: *Phellinus noxius*, nitrate reductase, *Phellinus* spp., *Inonotus* spp.