

金線連根圈分離木黴菌菌株之生物特性

蔡金池^{1,2} 曾德賜^{1,3} 謝式垚鈺¹

¹ 國立中興大學植物病理學系

² 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局台中分局

³ 聯絡作者，電子郵件：dstzeng@nchu.edu.tw；傳真：+886-4-2285-9741

接受日期：中華民國 97 年 3 月 15 日

摘要

蔡金池、曾德賜、謝式垚鈺. 2008. 金線連根圈分離木黴菌菌株之生物特性. 植病會刊 17 : 127-142.

本研究旨在釐清分離自台灣金線連 (*Anoectochilus formosanus* Hayata) 根圈，並經證實對金線連莖腐病 (*Fusarium oxysporum* Schl.引起) 具防治應用潛力之 TA 與 PT103 兩木黴菌菌株特性。兩菌株同樣分別以 30 與 37 °C 為最適與最高生長溫度，且皆能產生厚膜孢子。唯其中 PT103 菌株具氣生菌絲且生長較為快速，分生孢子梗為直立型、黏帚黴菌 (*Gliocladium* spp.) 形態，不具無限生長之無性生殖絲，分生孢子圓至橢圓形，表面呈細疣狀突起；相較下TA 菌株生長較慢，唯其能利用蜜三糖，並可產生異腈類 (isonitrile) 抗生物質及明顯的可可氣味，分生孢子梗多為對稱分枝，其上著生之瓶狀枝呈瘦長瓶壺形，分生孢子圓形或近卵圓形，表面具有明顯不規則金字塔型疣狀突起。綜合上述形態、生理特性，可將 PT103 菌株歸屬於 *Trichoderma virens* (Miller *et al.*) Arx，並將 TA 菌株歸屬於 *T. asperellum* (Samuels, Liechfeldt & Nirenberg)。此二供試菌株另經萃取、選殖及解序其 rDNA ITS 序列，所獲得結果經與 NCBI 資料庫既有木黴菌菌株序列資料比對並分析其親緣關係，其結果亦證實與上述利用形態特性鑑定所獲結論一致，本文為可供生物防治應用菌株 *T. asperellum* 於台灣地區首次紀錄。

關鍵詞：生物防治、鐮胞菌、台灣金線連、木黴菌、內轉錄區間親緣性

緒言

台灣金線連 (*Anoectochilus formosanus* Hayata) 為國內民間傳統藥用植物，近年來更被廣泛應用於健康食品、化妝品材料及癌症病人化療時之輔助食品，由於產量少，而需求日益增加，價格一直居高不下。種植過程中，鐮胞菌 (*Fusarium oxysporum* Schl:Fr.)⁽²⁵⁾ 感染引起的莖腐病為影響台灣金線連產量之主要限制因子，嚴重發生時常造成栽培業者鉅額虧損。就病害管理而言，由於台灣金線連主要以生鮮植體供應藥材與保健食品，在栽培過程中宜避免使用化學藥劑，且目前亦尚無推薦藥劑可供應用，因此非藥劑防治管理技術為多數業者所迫切需要。

木黴菌 (*Trichoderma* spp.) 在生物防治上之應用，早在 1932 年即有報導，許多相關研究皆相繼指出，其可應用於棉花、小麥⁽⁴⁵⁾、樹豆⁽³⁹⁾、香蕉⁽⁴⁷⁾ 及番茄⁽⁴⁶⁾ 等

作物上，防治由鐮胞菌 (*Fusarium* spp.) 引起的病害，為多數作物真菌病害防治應用上極具開發價值的微生物資源。為瞭解其於台灣金線連莖腐病防治上之應用性，本研究曾嘗試自埔里地區罹病嚴重之栽培場採集存活的金線連植株根系及根圈栽培介質，利用 Elad 與 Chet 氏之 TSMC 選擇性培養基⁽¹⁷⁾ 進行分離，並與金線連莖腐病菌 *F. oxysporum* F66 菌株 (*F. o.* F66) 行對峙培養，系列篩選測試結果所獲得 TA 與 PT103 兩拮抗性與產孢特性俱為優異菌株 (圖一)，繼經生長箱人工接種試驗與栽培場田間試驗，已證實其對莖腐病菌之危害均具優異防治效果，部份實驗結果已於先前在摘要報告中報導⁽⁴⁸⁾。

本研究旨在瞭解 TA 與 PT103 兩菌株種的歸屬及其相關生物特性，以開發作為生物防治製劑之參考。就已知木黴菌之生物防治應用性而言，由於菌種不同

其作用機制迥異，其在田間病害防治之應用效果亦受影響，常見作為生物防治應用的木黴菌種類中，部分種類特定菌株已知存在負面的風險，因而在開發應用前即有必要就種的歸屬與菌株特性加以釐清。舉例言之，常見應用於生物防治之 *T. viride*，其部分菌株施用在胡瓜、番茄與胡椒等幼苗上會造成根及葉部水浸狀病斑⁽³⁴⁾，*T. harzianum* 之第 II 生物型菌株則已知對洋菇具有致病性⁽²³⁾，另外包括 *T. longibrachiatum*、*T. viride* 以及 *T. harzianum* 等則有可能為人體伺機性病原菌 (opportunistic pathogen)⁽¹²⁾。本研究中應用之 TA 與 PT103 菌株，其型態特徵與上述菌株相當類似，鑑於分類地位之確立有助於生物防治上之應用與人體安全考量，確有必要究明其種的歸屬與其相關生物特性。

木黴菌屬 (*Trichoderma*) 的建立始自 Persoon 氏 (1794)，主要以菌株無性世代之形態特徵為依據，其後包括 Bisby (1939)⁽²⁾、Rifai (1969)⁽⁴⁰⁾、Domsch (1980)⁽¹⁶⁾，以及 1984 年開始 Bissett 所進行之一系列 *Trichoderma* spp. 種的鑑定報告，皆以無性世代之形態特徵為主要依據^(3, 4, 5, 6, 7, 19)，而以菌株有性世代形態特徵作為分類依據則始自 Tulasne 兄弟 (1865)，繼之則有 Dingley (1957)、Doi (1969)，以至 Samuels (1994, 1999)^(19, 43) 等。由於菌株形態特徵易受培養天數與培養條件變化影響而產生差異變化，以致造成鑑定上的困擾。Samuels 氏 (1994) 與 Nirenberg 氏 (1976) 分別嘗試以玉米葡萄糖培養基 (corn meal dextrose agar, CMD)⁽⁴³⁾ 及人工合成低營養培養基 (Synthetic low nutrient agar, SNA)⁽¹⁹⁾ 為基礎，制定標準培養流程，作為量測菌落、分生孢子梗及膿疱狀突出物 (pustules) 等形態特徵之依據，由營養成份高低不同的兩種培養基同時進行培養比較，已證實可避免因培養條件及量測時間之差異所造成種鑑定上之困擾⁽²⁰⁾。另外，Okuda 氏等 (1982) 開創輔以菌株生長最高與最適溫度、菌落外觀與顏色之差異、可否產生異腈類 (isonitrile) 抗生物質、產生 isonitrile 種類、以及產生色素與不同氣味之揮發性代謝物等特性作為種鑑定之輔助依據⁽³⁸⁾，Kubicek 氏等 (2003) 則以化學測定法 (chemical test) 輔佐形態鑑定之不足⁽²⁶⁾。Meyer 氏等 (1991) 利用 isoenzyme 作為分析種間差異之參考依據，開啓了以分子生物技術作為鑑定輔助工具之先端⁽³⁵⁾，各種真菌菌株鑑定可供應用之分子技術，包括核醣體 DNA (rDNA)⁽²⁴⁾、粒線體 DNA (mtDNA)⁽³⁵⁾、核醣核酸轉錄區間 (ITS) 或 43 kDa endochitinase 基因⁽³¹⁾ 等之內切限制酶切割圖譜多型性分析、通用型引子對聚合酶連鎖反應 (universally primed-PCR, UP-PCR)^(8, 32)、特定核苷酸片段所製備探針與菌株 mtDNA 雜合作用 (hybridization) 所產生之限制片段長

度多型性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 圖譜分析與 ITS (ITS1-5.8 rDNA- ITS2) 之核苷酸序列比對⁽²²⁾ 等，於親源關係檢討及種鑑定上之應用蔚為潮流。

為瞭解 TA 與 PT103 兩菌株種的歸屬，本研究一方面嘗試利用傳統形態與生理化特性進行檢討，另一方面鑑於 ITS 技術已普遍應用於親源關係分析與鑑定，既有報告並顯示其已經應用於木黴菌種間或種內不同生物型^(9, 27) 之鑑別，本研究亦針對 TA 與 PT103 菌株 rDNA ITS 轉錄區間之核苷酸序列，檢討其與已知木黴菌種間之親緣關係，本文僅就兩供試菌株種的歸屬有關特性提出報告。

材料與方法

供試菌株與植物材料

供試木黴菌編號 TA 與 PT103 兩菌株係以木黴菌選擇性培養基 (*Trichoderma* selective medium supplemented with captan, TSMC)⁽¹⁷⁾ 分離自埔里台灣金線連栽培場之栽培介質，先前試驗中，已證實其對莖腐病原性鐮胞菌之優異拮抗性 (圖一)，於 89 至 92 年間在埔里地區之栽培場田間試驗更已證實其對本病危害之防治效果⁽⁴⁸⁾。本研究過程中，供試菌株培養在馬鈴薯蔗糖瓊脂培養基 [20% (w/v) potato, 2% (w/v) sucrose, 1.6% (w/v) agar, PSA] 斜面上，每年一次更新於 PSA 斜面，置室溫 (25-28°C) 下保存。另視試驗需要，將供試菌株更新於 PSA 平板，置 28°C、每日光照 12 hr 之定溫箱中培養 4 天後，以直徑 0.3 cm 打孔器切取菌落邊緣之菌絲塊，或以無菌蒸餾水調製成適當濃度之孢子懸浮液，作為下列試驗之接種源，所有試驗至少重複三次。

溫度對供試菌生長影響

以移殖針分別沾取依上述製備產出之供試菌株分生孢子，點接在直徑 8.5 cm 之 SNA⁽³⁷⁾ 及 PDA 平板近培養皿邊緣 5 mm 處，分置 20、25、30、37、38、40°C 定溫箱黑暗中培養，每處理三重複，培養過程中逐日量測菌落半徑。

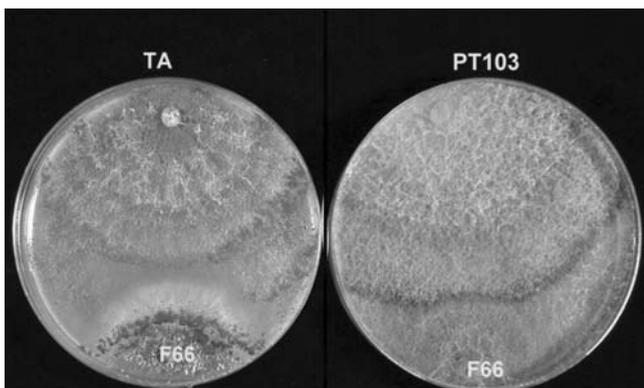
形態特徵檢視

同上述製備之接種源，經接種至 SNA 及玉米粉葡萄糖瓊脂培養基 (Cornmeal dextrose agar, CMD; Difco cornmeal agar + 2% dextrose) 平板上，置於 20 - 21°C、每日 12 hr 光照之培養箱中培養 7 天後，按 Lieckfeldt

氏等 (1999) 方法，挑取膿疱狀突起物 (pustule) 置滴有 3% KOH 溶液之載玻片上，於光學顯微鏡 (BH2, Olympus) 下檢測分生孢子 (conidia)、厚膜孢子 (chlamydospores)、瓶狀枝 (phialides) 及分生孢子梗 (conidiophores) 形態、大小與著生情形，每試驗三重複，每重複取 30 個量測值之平均⁽³¹⁾。同法接種兩供試菌株於 PDA 與 2% 麥芽培養基 (malt agar, MA; Difco)⁽³⁵⁾ 平板，於 20-21 °C、黑暗下培養二天後，改以每日光照 12 hr 培養 14 - 17 天，選取產孢良好菌落，切取 4 × 3 mm 大小樣本，直接以液態氮急速冷凍約 3 min 後，隨即以掃描式電子顯微鏡 (Field emission scanning electron microscope; model JSM-633 OF, FESEM) 檢視菌株產孢結構、分生孢子形態與著生情形⁽²⁶⁾。

氣味、結晶物與色素之產生

依據 Okuda 氏等 (1982)⁽³⁸⁾ 之方法，將兩供試菌株分別移置 PDA、MA、CMD 與 SNA 平板上培養，每處理三重複，每重複三個培養皿，經接種後以透明膠帶密封，置於 25 °C 黑暗下培養 7 天後，逐一打開記錄其所散發之氣味。另依據 Okuda 氏 (1982) 方法⁽³⁸⁾ 於 500 ml 三角瓶盛入 100 ml 馬鈴薯葡萄糖煎汁培養液 (PDB)，經高溫滅菌後，每瓶接種 1 ml 孢子懸浮液 (10^8 spores/ml)，每處理三重複，每重複三瓶，置 28 °C 振盪培養箱中 (Orbital shaking incubator Model - S305R, Firstek Scientific) 以 150 rpm 振盪培養一個月後，檢視培養液中特定結晶物形成情形。另將兩菌株分別移置 PDA、MA、CMD 與 SNA 平板上，置 28 °C 定溫箱培



圖一、供試木黴菌 TA 與 PT103 菌株於馬鈴薯蔗糖瓊脂 (PSA) 平板上與金線連莖腐病 *Fusarium oxysporum* F66 菌株對峙培養下，所顯現對 F66 菌株菌絲生長之抑制作用及在 F66 菌株菌落上產孢情形。

Fig. 1. Dual culture of *Trichoderma* TA and PT103 strains against *Fusarium oxysporum* F66 on PSA plate showing the inhibited mycelial extension of F66 and the sporulation of the antagonists on its colony.

養 14 天後，觀察記錄由培養皿背面所見培養基顏色變化情形。

碳素源對生長之影響

依據 Aube 與 Gagnon (1986)⁽⁴¹⁾ 及 Okuda 氏等 (1982)⁽³⁸⁾ 方法，以最終濃度含 0.5% (w/v) 葡萄糖、0.5% (w/v) 蔗糖、0.5% (w/v) 蜜三糖 (melezitose)、0.5% (w/v) 棉子糖 (raffinose) 之瓊脂 [0.2% (w/v)] 培養基，經高壓滅菌後，加入經 2 μm 過濾膜過濾消毒之酵母菌氮素基礎培養基 (yeast nitrogen base, Difco) 製成平板，另以不加碳素源之基礎培養基作對照，每處理三重複，每重複三個培養皿，各處理經接種直徑 0.3 cm 供試菌株之菌絲塊後，置 28 °C 定溫箱中培養，逐日量測菌落生長情形。

異腈類 (Isonitrile) 抗生物質的萃取與檢測

依據 Fujiwara 氏等 (1982)⁽⁴⁸⁾ 方法，500 ml 的三角瓶裝入 100 ml 的培養液 [2% (w/v) glucose, 3% (w/v) glycerol, 0.5% (w/v) polypeptone, 0.2% (w/v) yeast extract, 0.3% (w/v) NaCl, 1% (w/v) CaCO₃, 1 L distilled water]，經高壓滅菌後，每瓶接種 1 ml 供試菌株孢子懸浮液 (10^8 spores/ml)，於 27 °C 180 rpm 下振盪培養 2 天，經二層 Whatman No.1 濾紙過濾，濾液以 2 N HCl 調至 pH 4.0，再以 200 ml 乙酸乙酯 (ethyl acetate) 萃取，萃取液以減壓濃縮機 (Speed vac concentrator) 濃縮乾燥，再以 1 ml 甲醇溶解萃取物，將獲得之濃縮液點在薄層色層分析板 (Kieselgel 60, F-254, Merck) 上，以 n-hexane/ethyl acetate (1:3) 混合液展開至離頂點 1 cm 處後取出，以波長 254 nm UV 光檢視抗生物質可能存在的位置，旋將該部位矽膠小心自板上刮下，置於 2 ml 甲醇中將抗生物質溶出後，再以光電比色計 (Shimadzu UV-160A) 分別檢測 A₂₃₆、A₂₂₃、A₂₁₈ 與 A₂₇₃ 吸光值，以瞭解兩菌株產生異腈類 (isonitrile) 抗生物質的種類⁽¹⁶⁾。

rDNA ITS 區間序列分子特性之比對

供試菌株總量 DNA 之抽取：參考 Kutchma 氏等 (1998)⁽³⁰⁾ 之方法進行總量 DNA 之抽取，所得之 DNA 沈澱塊經溶於 50 μl 無菌蒸餾水，以光電比色計檢測 A₂₆₀ 吸光值定量後，供作 PCR 增幅反應之模板。

rDNA ITS 區間序列之增幅：聚合酵素連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 採用 White 氏等 (1990) ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 及 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')⁽⁵⁰⁾ 通用性引子對 (universal primer pair) 作為增幅引子，以抽取自供試菌株之 DNA 作為供試模板，利用自動溫度循環控制反應

器 (PerKin Elmer PCR 9600 System Thermocycler) 進行增幅反應，反應液先於 94 °C 5 min 使雙股 DNA 分開為單股後，再分別以 94、50 及 72 °C 各 50 sec 進行 50 個循環，最終再以 72 °C 5 min 延長。反應完成後，吸取 5 μ l 增幅產物，以 1% (w/v) 瓊脂膠片 (agarose gel) 進行電泳分析，檢測所獲得含 5.8 S 全長 rDNA ITS 片段大小，試驗中另以反應液中不添加模板 DNA 之處理為對照組。

增幅rDNA 片段之選殖與轉型 (transformation) : 利用 POSI-T PCR cloning Kit I (GeneMark, Taiwan) 進行，取上述增幅產物 2 μ l，經加入 1 μ l T-vector DNA，5 μ l 2X ligation buffer，1 μ l 10 mM ATP 及 1 μ l 無菌蒸餾水，使其總體積為 10 μ l，經混合均勻後，於室溫反應 5 min，再瞬間離心 (Beckman Microfuge® Lite Centrifuge, No. F1802 rotor) 後置冰上，並依廠商所附操作流程進行轉型作用，待大腸桿菌轉形菌株 (*Escherichia coli* DH5 α) 長出後，取單一菌落劃至含有 50 μ g/ml ampicillin 之 LB 平板 [1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) tryptone, 0.5% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) agar, Sigma] 培養或以無菌蒸餾水懸浮菌液低溫保存備用。

質體DNA 的抽取: 參照 Sambrook 氏等 (1989)⁽⁴²⁾ 方法，將冰凍在 -70 °C 大腸桿菌轉形菌株取出解凍後，以移殖環沾取輕劃在 LB 平板上，待其長出後重新挑取單一菌落至新的平板，再挑取其新長出之單一菌落至 3 ml 含有 50 μ g/ml ampicillin 的 LB 培養液中，於 37 °C、120 rpm 振盪培養過夜，旋以 8,000g (Sigma 1 K15, rotor 12024) 4 °C 下離心 5 min，再以 1 ml SET 緩衝液 [20% (w/v) sucrose, 50 mM Tri-HCl pH 7.6, 50 mM EDTA] 懸浮菌體，於 4 °C 下以 4,000 g 離心 10 min，重複上述步驟再以 150 μ l SET 緩衝液懸浮菌體，置 -20 °C 過夜 (或 -70 °C 30 min)。翌日取出溶解，加 5 μ l RNase A (10 mg/ml) 混合均勻 (最終濃度為 5 μ g/ml)，經添加 350 μ l 現配的 Lytic mixture [0.2 N NaOH, 1% (w/v) SDS]，混合均勻後置冰浴 5 min，再添加 250 μ l 冰冷的 Solution 3 (3 M potassium acetate, 用 glacial acetic acid 調至 pH 5.2)，混合均勻後置冰浴 5 min。旋以 10,000 g 於 4 °C 離心 10 min，將上清液移至新的離心管，添加等量 phenol/chloroform (1:1, v/v) 混合均勻後，在 4 °C 下以 10,000 g 離心 5 min。取約 650 μ l 上清液移至新的離心管，加入等體積的 isopropanol，混合均勻並靜置片刻後，以 12,000 g 於 4 °C 離心 20 min，移去上層液，用 1 ml 70% (v/v) 冰冷的酒精潤洗管壁，離心 5 min 後倒掉酒精，再重複一次，離心沉降後，所得 DNA 沈澱塊經吹乾，並以 20 μ l 無菌水將 DNA 溶解備用。

表一、菌種相關性分析所使用木黴菌菌株種類、ITS 片段大小及基因庫註冊碼

Table 1. List of *Trichoderma* strains used for the phylogenetic study, and their respective size and GenBank accession numbers of ITS fragment

Species	strains	bps	GenBank accession nos
<i>T. harzianum</i>	ATCC58673	542	AF057583
<i>T. aureoviride</i>	NR6950	631	AF194015
<i>T. virens</i>	Tvir2	539	AF057603
<i>T. virens</i>	GL-20	636	AF099007
<i>T. asperellum</i>	Ir. 459	610	AY154944
<i>T. asperellum</i>	T-203	616	AF278789
<i>T. viride</i>	GJS 02-87	508	DQ315461
<i>T. atroviride</i>	GJS 02-96	544	DQ315469
<i>T. ovalisporum</i>	Dis 203c	560	DQ315458
<i>T. croceum</i>	CCRC33581	530	AF414316
<i>T. afertile</i>	—	583	DQ083018
<i>T. longibrachiatum</i>	CCRC33582	527	AF414317
<i>T. asperellum</i>	TA	507	EU274381
<i>T. virens</i>	PT103	527	EU274380

ITS 的定序及序列分析: 將上述由 TA 與 PT103 菌株之基因體核酸，經增幅選殖所獲得涵蓋 ITS1 與 ITS4 之 ITS 區段 DNA，由選殖體上以 *Eco*RI 切下，所得到的 DNA 片段送交明欣生技公司 (Mission Biotech, Taiwan) 進行選殖基因片段核酸序列解序。於全長序列解出後，除將供試菌株之 ITS 序列送交 NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 登錄，並利用網站上之 Blast 2 電腦軟體搜集下載已知相關菌株之 ITS 序列 (表一)，繼而利用國家衛生研究院之核酸序列分析軟體 (SeqWeb Version 2 Software, <http://apdb1.nhri.org.tw:8003>) 進行序列特性分析，菌種間親緣關係性分析採用 parsimony sequence analysis software (PAUP) v4.0b 軟體所提供之鄰接法 (Neighbor-joining method, NJ)⁽⁴¹⁾ 進行，Bootstrap value 以 1,000 次重複隨機取樣評估，以繪製兩菌株與木黴菌各種間親緣關係樹狀圖 (phylogenetic tree)。

結 果

溫度對供試菌生長影響

兩供試菌株分別於 20、25、30、37 及 38 °C 下於 PDA 與 SNA 兩種供試培養基上培養 48 hr 後量測菌落生長半徑，測試結果顯示 TA 菌株於 PDA 上菌落半徑分別為 1.9 \pm 0.1、2.7 \pm 0.1、3.4 \pm 0.2、2.1 \pm 0.7 及 0.0 \pm 0.0 cm (表二)，而在 SNA 上則分別為 1.4 \pm

0.2、1.5 ± 0.3、2.4 ± 0.2、0.7 ± 0.3 及 0.0 ± 0.0 cm。PT103 菌株培養在 PDA 上分別為 1.7 ± 0.1、3.3 ± 0.1、4.2 ± 0.2、2.2 ± 0.4 及 0.0 ± 0.0 cm (表二)，而在 SNA 上則分別為 1.5 ± 0.0、2.4 ± 0.2、3.8 ± 0.1、0.4 ± 0.2 及 0.0 ± 0.0 cm，兩供試菌株均以在 PDA 上生長較佳，並以 30°C 為最適生長溫度 (圖二)，兩供試菌株，以 PT103 生長較為快速，此外兩菌株在 37°C 皆可有限度生長，而在 38°C 則均無法生長 (圖二)。

菌落與菌株形態特徵

於四種供試培養基上，TA 菌株菌絲體於平板呈平鋪狀生長，其生長緊密度、茂盛程度及產孢，四種培養基以 PDA 上表現最好，其他供試培養基依序為 MA、CMD 及 SNA (圖三)，菌絲在光學顯微鏡下觀察為無色，產生之分生孢子初期為黃綠色隨後轉為深綠色。在 PDA 與 MA 平板上，其白色菌絲體生長快速緻密，並可產生大量濃綠色分生孢子，分生孢子產生呈帶狀分佈，顯受明暗交替光照之影響，生長最好的

PDA 平板上，30°C 下培養 48 hr 即開始產生分生孢子 (圖三)，相對在 CMD 與 SNA 平板上其菌落生長皆顯著較慢而稀疏，產孢結構呈膿疱狀突起 (pustules) (圖四、A)，單獨存在或數個聚集，零散分佈於平板上，尤以生長圈及培養皿邊緣為多，直徑約在 0.4 ~ 1.9 mm 之間。

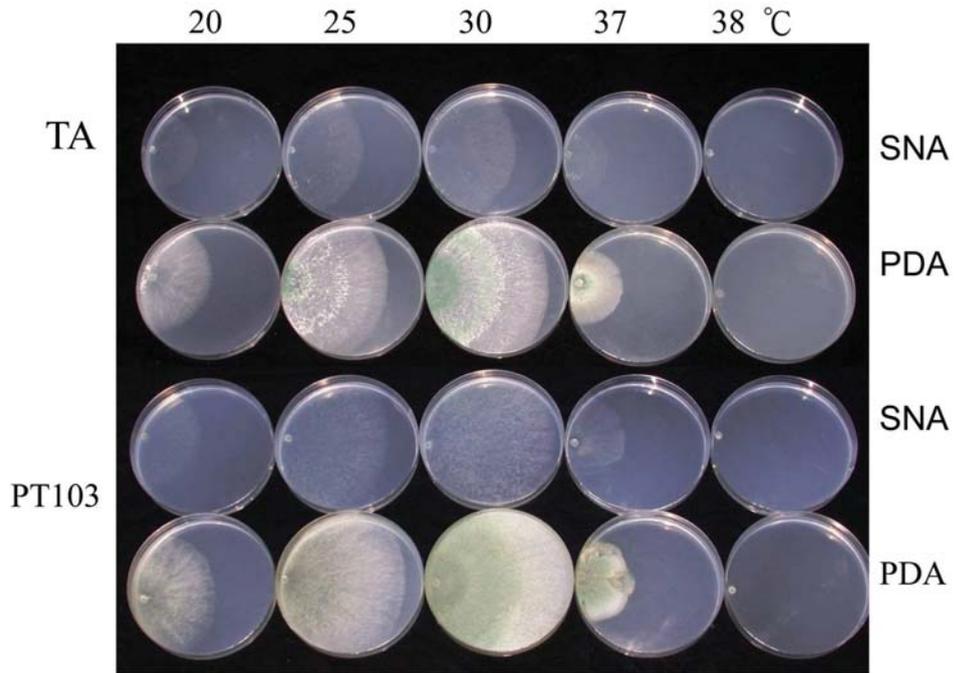
於平板上，TA 菌株之分生孢子梗 (conidiophore) 分枝型態經顯微鏡觀察結果呈木黴菌型 (viride type) (圖四、B, C)，形似羽毛狀，伸出 pustules 外 (圖四、B)，主軸為有限生長、不具有無性剛毛 (sterile hair)，側枝兩兩對稱分枝於主軸兩側，側枝與側枝間以不等距離排列分佈著生於主軸上，長度短於頂部主軸，形成金字塔型 (圖四、D)，分生孢子梗長 1.6~20.5 μm，平均為 18.6 ± 0.5 μm，寬約 4.1 ~ 8.1 μm，平均為 5.4 ± 0.4 μm。瓶狀枝為瘦長 (slender) 瓶壺形 (ampulliform)、中間寬底部窄 (圖四、I, J)，直立著生於小梗上，以輪生狀 (verticillates) 分枝著生於主軸、側枝及第三次側枝之末端，一般為 2-3 分枝、短梗，與分生孢子梗呈近直角對稱生長 (圖四、D, I)，瓶狀枝主軸

表二、木黴菌 *Trichoderma* TA 與 PT103 菌株形態與培養特性

Table 2. Cultural and morphological characteristics of *Trichoderma* strains TA and PT103

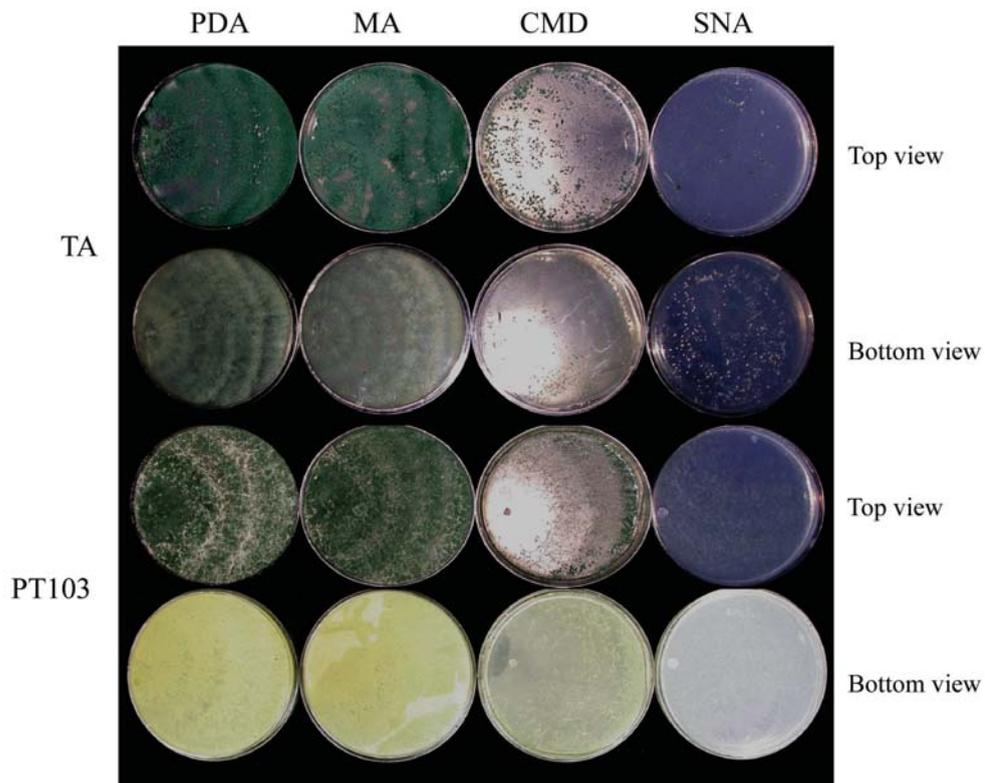
Characteristics	Tested strains	
	TA	PT103
Max. growth temp. (°C)	37	37
Opt. growth temp. (°C)	30	30
Coconut smell		
PDA	+ ¹	—
CMA	—	—
Pigmentation on medium		
PDA, PDB	—	yellow
MA	—	yellow
CMD	—	—
SNA	—	—
Crystal	—	—
Isonitrin D	—	—
Isonitric acid E	+	—
Isonitric acid F	+	—
Colony radius (cm) on PDA (30°C, 48 hr)	3.4 ± 0.2	4.2 ± 0.2
Conidiophore branching type	viride	vertical
Conidiophore size (μm)	1.6 ~ 20.5 × 4.1 ~ 8.2	very long
Phialides form at the tips	verticillate	gliocladium-like
Size (μm)	6.1 ~ 10.3 × 2.1 ~ 6.2	4.9 ~ 11.1 × 2.9 ~ 4.8
Conidia size (μm)	3.2 ~ 4.9 × 2.8 ~ 4.1	2.7 ~ 4.0 × 2.3 ~ 3.5
L/W	1.21 ~ 1.27	1.18 ~ 1.24
Conidial warts on microscope	inconspicuous	inconspicuous
Conidia surface	irregularly pyramidal warts	tiny thin warts
Chlamydospore (μm)	6.2 ~ 12.3 × 5.1 ~ 10.3	8.8 ~ 4.7 × 8.8 ~ 3.7 1

¹ + = positive reaction ; — = negative reaction



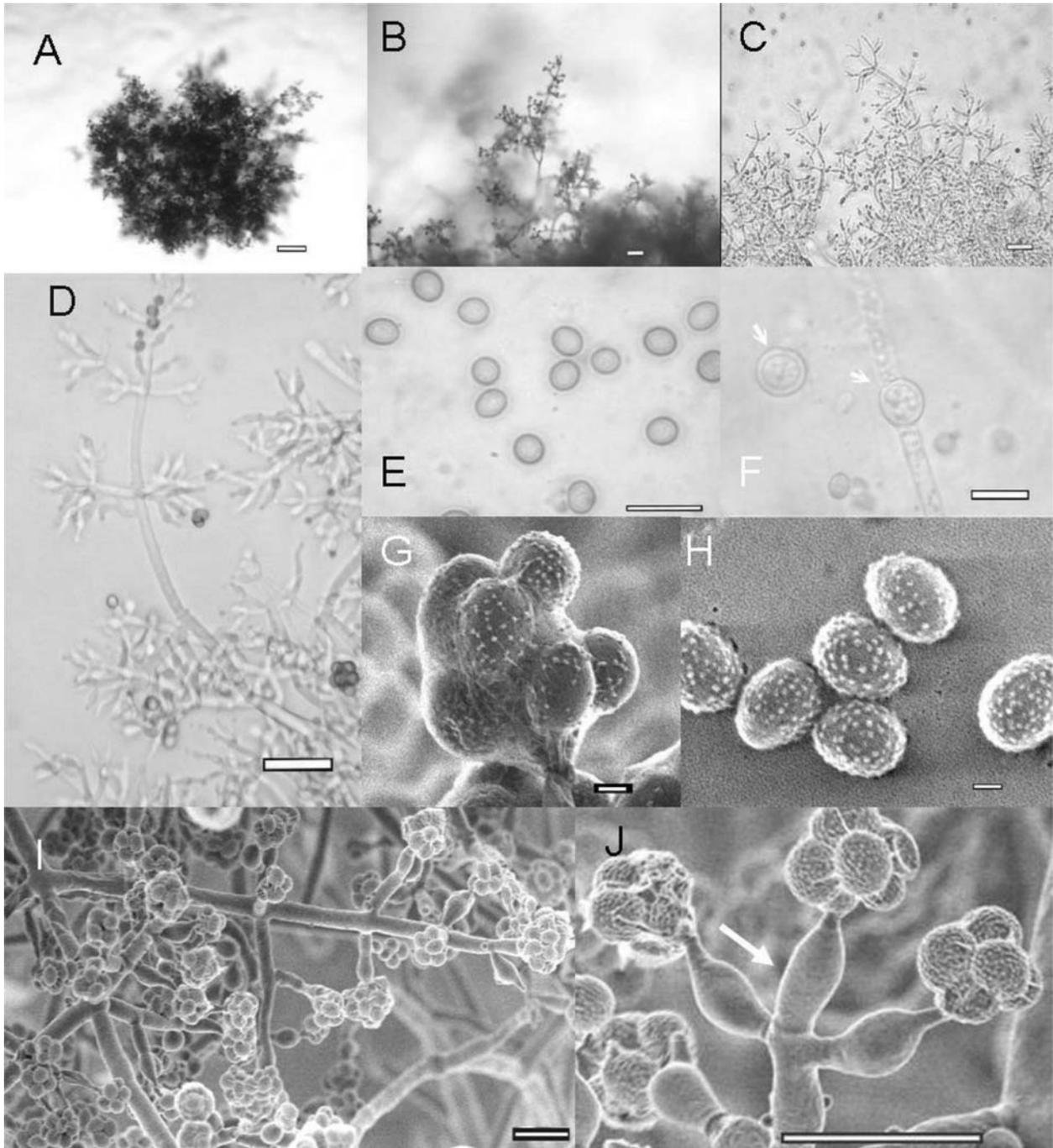
圖二、木黴菌 TA 與 PT103 菌株分別培養在人工培養基 (SNA) 及馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (PDA) 上並分別置於 20、25、30、37 及 38 °C 溫度下培養 72 hr 的生長情形。

Fig. 2. Colony characteristics of *Trichoderma* TA and PT103 strains after cultured on low synthetic nutrient agar (SNA) and potato dextrose agar (PDA) at 20, 25, 30, 37 and 38 °C in the dark respectively, for 72 hrs.



圖三、木黴菌 TA 及 PT103 菌株在 PDA、MA、CMD 及 SNA 培養基經 14 天培養後產生色素情形。

Fig. 3. Pigment production of *Trichoderma* TA and PT103 strains after cultured on PDA, MA, CMD and SNA respectively, for 14 days. The pictures were taken from top and bottom side of the petri plate to show the effect from pigmentation.



圖四、木黴菌 TA 菌株培養在 CMD (A至F) 與 MA (G至J) 培養基上的形態特徵。A. 菌絲團在菌落中形成；B. 羽毛狀的分生孢子梗自菌絲團中伸出；C 及 D. 分生孢子梗側枝兩兩對稱且規則地排列於主軸上，主軸為有限生長，瓶狀枝頂端為輪生型分枝形態；E. 卵圓形到橢圓形之分生孢子，在光學顯微鏡下無法辨識出表面疣狀突起；F. 球形至橢圓形厚膜孢子於菌絲間形成；G. 著生於瓶狀枝頂端之分生孢子；H. 分生孢子表面具不規則金字塔形疣狀突起；I. 分生孢子梗分枝形態；J. 瘦長瓶壺型瓶狀枝。

比例尺長度：A = 100 微米，G, H = 1 微米，其餘皆 = 10 微米

Fig. 4. Morphological characteristics of *Trichoderma* TA strain cultured on CMD (A to F) and MA (G to J) as revealed by light and scanning electron microscopy, respectively. A. The pustules formed in the colony; B. Projecting conidiophores with feather-appearance from the pustules; C and D, Conidiophores branched as regular pairs, no fertile extension was observed, and phialides in verticillate form developed at tip of these branches; E. Conidia are ovoid to subglobose and the surface looks smooth through microscope; F. Intercalary and detached chlamydospores; G. Conidia produced on the tip of phialides; H. Irregularly distributed pyramidal warts of conidial surface; I. Branches of conidiophore; J. Phialides with slender ampulliform morphology. For bars showing in each photo, A = 100 μ m; G and H = 1 μ m; others are 10 μ m.

長 $6.1 \sim 10.3 \mu\text{m}$ ，平均 $8.5 \pm 0.4 \mu\text{m}$ ，寬度 $2.1 \sim 6.2 \mu\text{m}$ ，平均 $3.5 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ，長寬比(L/W)平均2.4，基部寬度 $1.1 \sim 1.7 \mu\text{m}$ ，平均 $1.1 \pm 0.1 \mu\text{m}$ 。分生孢子大小為 $3.2 \sim 4.9 \times 2.8 \sim 4.1 \mu\text{m}$ ，長寬平均值分別為 $4.2 \pm 0.1 \times 3.4 \pm 0.1 \mu\text{m}$ ，長寬比平均1.25，分生孢子由瓶狀枝末端產出，呈卵圓形或近卵圓形，單孢單室，孢子外圍繞一層黏膜(slime sheath)將孢子連結成團聚集在瓶狀枝上(圖四、G, H)，分生孢子在光學顯微鏡下以100倍油鏡檢視看不出其孢子表面有疣突結構(圖四、E)，但在電子顯微鏡檢視下即可明顯看出其孢子表面具有不規則金字塔型疣狀突起，疣突數目於成熟孢子並不一致(圖四、H)，於PDA平板上 30°C 下培養7天後可見厚膜孢子在菌絲間形成，成熟後脫落，在光學顯微鏡100倍油鏡檢視下厚膜孢子表面平滑(圖四、F)，大小為 $6.2 \sim 12.3 \times 5.1 \sim 10.3 \mu\text{m}$ ，長寬比(L/W)平均為0.88。

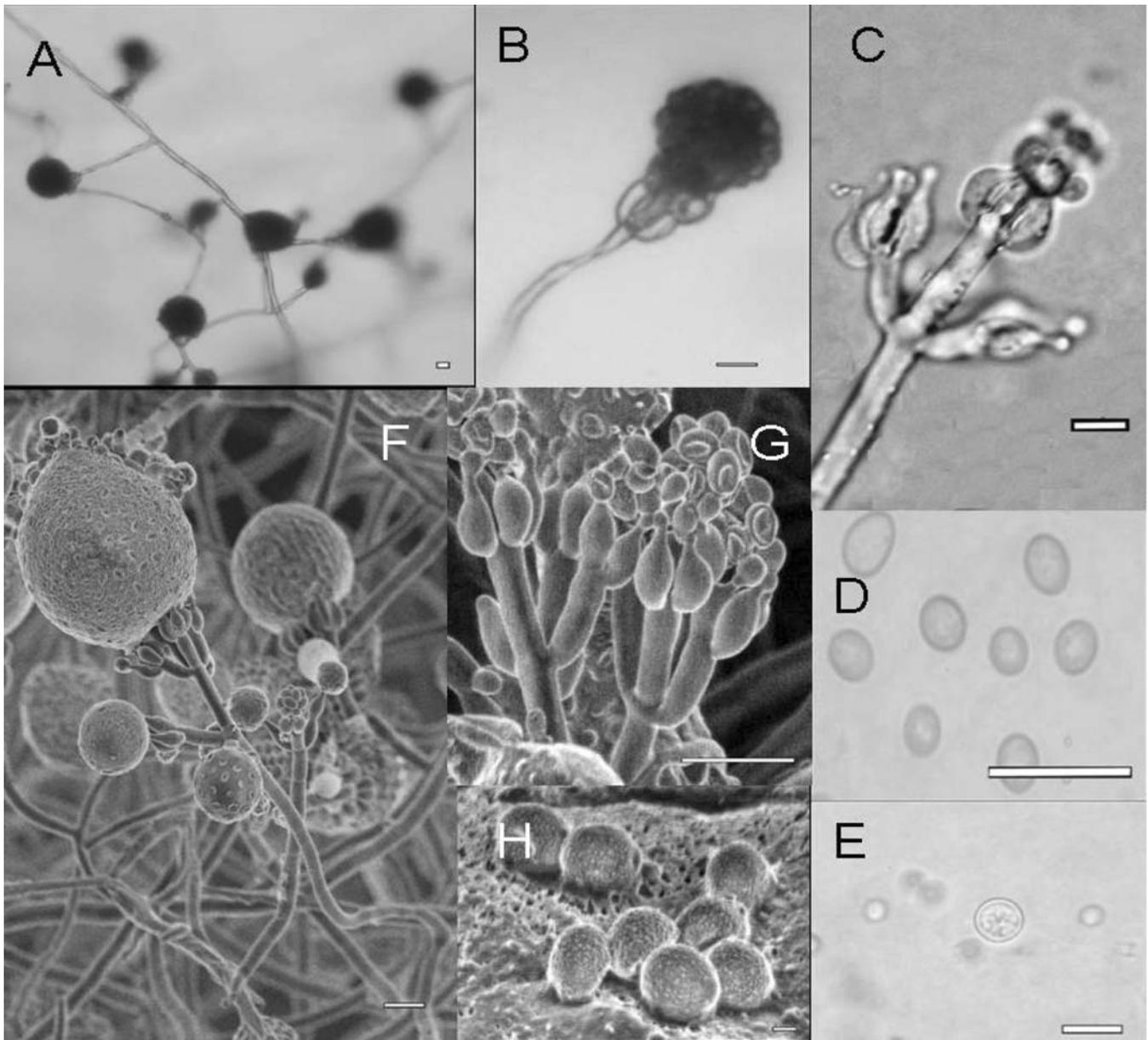
PT103 菌株菌絲體於平板上生長初期為白色細緻絨毛叢狀，不形成 pustules，具有濃密的氣生菌絲，能產生大量的暗綠色分生孢子，其生長緊密度、茂盛程度及產孢數目，四種供試培養基依序為 MA、PDA、CMD 及 SNA (圖三)，生長最好的 MA 平板上，40 hr 後開始產生暗綠色分生孢子，分生孢子產生受明暗交替光照之影響呈帶狀分佈(圖三)，菌絲在光學顯微鏡檢視下為無色，分生孢子梗為直立型(standing type)(圖五、A)，在掃描式電子顯微鏡檢視下，分生孢子梗非常長，直立或略為彎曲(圖五、B, C, F)，分生孢子梗於主軸末端對稱分枝，分枝緊靠著主軸，夾角小，不具無限生長之無性頂生延長絲(no fertile extension)，末端分枝形態為黏帚黴菌型(*Gliocladium-like*)(圖五、C, F, G)，瓶狀枝著生其上，每一分枝上著生3-5個瓶狀枝，瓶狀枝長 $4.9 \sim 11.1 \mu\text{m}$ ，平均 $8.9 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ，寬 $2.9 \sim 4.8 \mu\text{m}$ ，平均 $3.7 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ，基部寬 $1.2 \sim 3.2 \mu\text{m}$ ，平均 $2.1 \pm 0.2 \mu\text{m}$ 。分生孢子圓至橢圓形，單孢單室，具黏性，在瓶狀枝上連結成團(圖五、F)，孢子大小為 $2.7 \sim 4.0 \times 2.3 \sim 3.5 \mu\text{m}$ ，長平均為 $3.4 \pm 0.3 \mu\text{m}$ 、寬平均為 $2.9 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ，長寬比(L/W)為1.19。分生孢子在光學顯微鏡100倍油鏡檢視下表面疣狀突起形態並不明顯(圖五、D)，在電子顯微鏡檢視下孢子表面呈細疣狀突起(圖五、H)，在CMD培養基經7天培養可檢視到菌株尖端或菌絲間產生之厚膜孢子，橢圓型至圓形，大小為 $8.8 \sim 4.7 \times 8.8 \sim 3.7 \mu\text{m}$ 。在油鏡檢視下(圖五、E)厚膜孢子表面平滑，細胞壁厚 $0.7 \sim 1.0 \mu\text{m}$ 之間，長寬比(L/W)之平均約為1.2。

菌株培養特性

四種供試碳素源中兩供試菌株，除 PT103 無法利用蜜三糖外，於添加葡萄糖、蔗糖及棉子糖之平板上皆可生長，其中又以葡萄糖作為碳素源時最能促進 TA 菌株之分生孢子產生，其次為棉子糖，而以蔗糖為碳源者則產孢能力最差(圖六)。可供 PT103 菌株作為碳素源生長之三種糖中，以蔗糖添加下分生孢子產生最好，其次為棉子糖，而以葡萄糖添加者產孢能力最差。兩供試菌株中 TA 菌株培養於 PDA 上有類似椰子氣味產生，其餘在 MA、CMA 或 SNA 培養者則皆無之，相對的 PT103 菌株則在所有供試培養基上皆未見有類似氣味產生。兩供試菌株中，PT103 菌株在 PDB 培養液中以及在 PDA 與 MA 平板上之菌落均可見有黃色色素沉澱(表二、圖五)，TA 菌株則無之。另外，兩供試菌株在所有供試培養基上皆無結晶物質形成，也無抗生素 isonitric D 之產生，但 TA 菌株可檢測到 A_{223} 為 0.505 之 isonitric acid E，及 A_{218} 與 A_{273} 分別為 2.467 及 1.970 之 isonitric acid F，而 PT103 則未檢測出有 isonitric acid F 之產生(表二)。

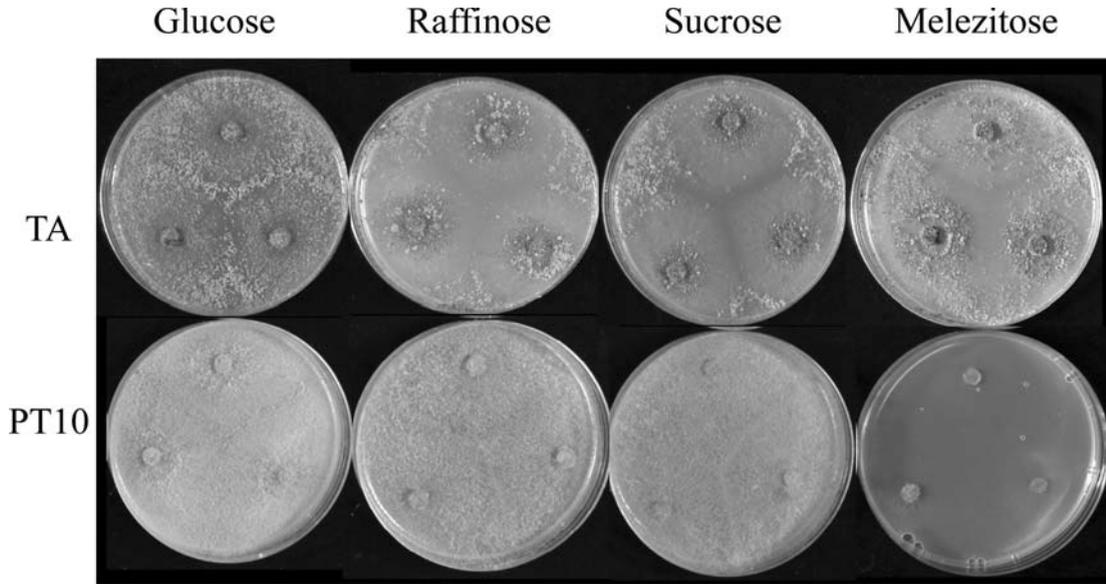
rDNA ITS 區間序列分子特性之比對

TA 與 PT103 供試菌株之總量 DNA 經 PCR 增幅後所獲得之增幅樣品，以 1% (w/v) 瓊脂膠片電泳檢視，均如預期在 600 bp (圖七) 左右檢測到含增幅片段條帶，將其個別選殖轉形到大腸桿菌菌株增量，並抽取其含增幅片段之質體 DNA 送請解序，解序結果亦證實兩選殖片段均為預期涵蓋 ITS1、5.8S rDNA 及 ITS4 之片段，兩個選殖片段長度分別為 507 bp (TA 菌株) 與 527 bp (PT103 菌株)，其中所含 5.8S rDNA 位於 263 ~ 419 base 之間。將所得序列與 NCBI 資料庫比對結果，所有用以比對之對照菌株中以 *Trichoderma asperellum* strain T203 (GenBank accession number AF278789) 與 TA 菌株最為接近，其中 TA 菌株除在第 214 bp 多一個鹽基 T，及在第 267 bp 為 C 取代 T 外，其餘核酸序列與用以比對之 T203 菌株完全一致(如表三)，另與 *T. asperellum* strain Ir.459 (AY154944) 比較，TA 菌株與其相對序列相似度也達 99-100%。至於菌株 PT103 所選殖的片段與 NCBI 網站上搜尋所獲比對菌株相較，則與 *T. virens* 最為接近，序列相似度可達 92% 以上，其中與 *T. virens* strain CL-20 (AF099007) 之相對序列比較，PT103 菌株只有在第 181 bp 為 G 取代，其餘序列完全一致，另與 *T. virens* strain Tvir2 (AF057603) 比較則 PT103 分別在第 134 與第 181 bp 為 T 取代 C 及 G 取代 A，且在第 168 bp 位置為缺失，其餘序列皆相同(表四)。供試菌株之核苷酸序列資料，



圖五、木黴菌 PT103 菌株培養在 CMD (A 至 E) 與 MA (F 至 H) 培養基上的形態特徵。A. 直立的分生孢子梗及產自瓶狀枝上連接成團的分生孢子；B. 分生孢子自瓶狀枝頂部產生並黏聚成球狀；C. 分生孢子梗頂端不具無性生殖絲，瓶壺型瓶狀枝對稱生長在分生孢子梗兩側；D. 暗綠色分生孢子為橢圓形表面光滑；E. 菌絲尖端或菌絲間產生具有光滑細胞壁之橢圓形厚膜孢子；F. 略有彎曲之細長分生孢子梗末端行成掃帚型分枝形態，分生孢子團聚在瓶狀枝末端；G. 分生孢子梗末端不具無性生殖絲，瓶壺型瓶狀枝頂端為掃帚型分枝形態；H. 分生孢子具細小的疣狀凸起。微尺比例：除 H = 1 微米外，其餘皆 10 微米。

Figs. 5. Morphological characteristics of *Trichoderma* PT103 strain cultured on CMD (A to E) and MA (F to H) as revealed by light and scanning electron microscopy, respectively. A. Standing conidiophores and conidia that aggregating in mucoid heads on the tip of phialides; B. Conidia aggregation in mucoid head and produced on the tip of phialides; C. Conidiophores branched as regular pairs, no fertile extension was observed, and ampulliform phialides growing laterally on the conidiophore and branches; D. Ellipsoidal and smooth looking conidia; E. Subglobose chlamydospores produced on the terminal or intercalary; F. Conidiophores slightly curved and the apex frequently bearing a terminal whorl of branches and phialides with conidia globe on the phialides tip; G. Conidiophores branched as regular pairs, no fertile extension was observed, and ampulliform phialides in *Gliocladium* like form developed at tip of these branches; H. Tiny thin warts of conidial surface. For bars showing in each photo, H=1 μm ; others =10 μm

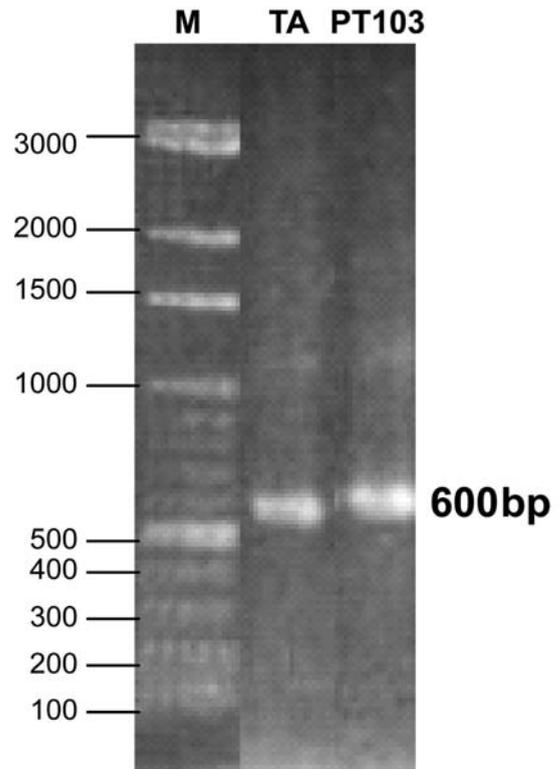


圖六、碳源5% (w/v) 葡萄糖、棉子糖、蔗糖與蜜三糖對木黴菌TA 與PT103 菌株生長的影响。
 Fig. 6. Effect of glucose, raffinose, sucrose and melezitose supplementation (each at 5% w/v) on the growth and sporulation of *Trichoderma* TA and PT103. Photos shown were taken 72 hrs after inoculation.

經以鄰接法分析其與已知木黴菌相似菌株之親緣關係 (Phylogenetic relationship)，所得結果顯示，可將所有供比對菌株歸成兩親緣關係密切之族群，其中菌株 PT103 與 *T. virens* strain GL-20 (AF099007) 及 strain Tvir2 (AF0576039) 形成一群，其 bootstrap value 為 92%，而 TA 菌株則與 *T. asperellum* strain Ir.459 (AY154944) 及 strain T203 (AF278789) 形成一群，bootstrap value 為100% (圖八)，本研究中兩供試菌株所選殖之 ITS 區間片段已送交 NCBI 註冊登錄，註冊號碼 (GenBank accession number) 分別為 EU274381 (TA) 及 EU274380 (PT103) (表一)。

討 論

兩形態特性與木黴菌相似的供試菌株中，由上述試驗結果顯示 PT103 菌株生長快速，可以產生氣生菌絲，培養過程中不會產生類似椰子氣味，也無法利用蜜三糖做為碳源生長，其瓶狀枝皆集中在分生孢子柄末端 1/3 處，形成黏帶黴菌型之特徵，此些特性與 1939 年 Bisby (2) 對 *Gliocladium virens* 之描述相符，唯由其分生孢子梗非常長且明顯直立之特性，則符合 Arx 1987 年將其自 *Gliocladium* spp. 移至 *Trichoderma* spp. 之分類依據⁽⁴⁾，此外其孢子表面疣狀突起形態之電顯檢視結果亦顯示與 Meyer 氏等⁽³⁶⁾ 電顯檢視結果相同，是典型 *T. virens* 之特徵⁽¹⁹⁾。就 *T. virens* 之已知特性而言，PT103 菌株之最高生長溫度與前人研究結果一致，其最適生長溫度為 30 °C 則較大部份 *T. virens* 菌株之生長



圖七、聚合酶連鎖反應增幅所獲 TA 與 PT103 兩供試菌株之 rDNA ITS 區間 (包括 ITS1、ITS2 及 5.8S rDNA) 片段電泳分析
 Fig. 7. Electrophoretogram showing the detection of expected PCR amplicons (arrow indicated) of ITS region (consisting of ITS1, ITS2 region, 5.8S rDNA) of *Trichoderma* TA and PT103, respectively. Lane M: 100 bp marker.

適溫 25 °C 略為偏高，唯類此生長適溫略為偏高之現象，於 Chaverri 氏等 (2001) 研究中所用之部份菌株亦有類似情形⁽¹⁰⁾，另外，本研究中所見 PT103 無法產生 isonitrile 類抗生物質特性則與 Dennis 與 Welster (1971)⁽¹⁵⁾ 及 Lumsden 氏等 (1992)⁽³³⁾ 就 *T. virens* 有關菌株之研究結果相同。

本研究中另一供試菌株 TA，其在 PDA 與 MA 平板培養過程可明顯檢測到有椰子氣味之產生，與 Okuda 氏等(1982)⁽³⁸⁾ 所報導之 *T. viride* 第 I 群與 Meyer 氏等 (1989)⁽³⁶⁾ 所報告之 *T. viride* 第 II 型描述相同，分生孢子梗分枝形態為 *viride* type，此 *viride* type 產孢特性可將其歸屬到 *Trichoderma* 屬中 *Trichoderma* 部門⁽³⁸⁾，在此部門中兼具產生氣味特性者有 *T. koningii* 第 I 群、*T. harzianum* 之第 I 群與第 III 群、*T. viride* 之第 I 群與第 II 群、*T. aureoviride* 以及 *T. atroviride* 等 7 個種群，其中生長溫度可達 37 °C 之種群有 *T. viride* 第 I 群及 *T. harzianum* 第 III 群兩種；上述試驗結果中，就 TA 菌株部份所見生長適溫為 30 °C、可產生 isonitrinic acid E、F，但不產生 isonitrile D 抗生物質，以及能利用蜜三糖作為碳源生長與在培養基上不產生色素、結晶物質等特性，均與 *T. viride* 之第 I 群之特性相符⁽³⁸⁾。此外此 TA 菌株分生孢子表面具金字塔型疣突型態則與 Meyer 氏等 (1989)⁽³⁶⁾ 所發表之 *T. viride* 第 II 型相符合，培養在 CMA 培養基上不會產生類似椰子氣味之特性又與 Samuels 氏⁽⁴⁴⁾ 等人 (1999) 描述 *T. asperellum* (相當於 Meyer 氏等 1989 年⁽³⁶⁾ 所報導之 *T. viride* 第 II 型，以及 Okuda 氏等⁽³⁸⁾ 1982 年所報告之 *T. viride* 第 I 群) 特性相符。

進而審視 TA 菌株在不同供試培養基上之生長型態，其於最適生長溫度下，在 PDA 上經 48 hr 之培養後，生長半徑平均為 3.4 ± 0.2 cm，無氣生菌絲產生。而在 CMA 及 SNA 上培養生長較為稀疏狀況下，產孢結構會有 pustules 狀突出物之形成，由顯微鏡檢視突出物中產孢結構所見，分生孢子梗具規則分枝形態、側枝對稱分枝於主軸兩側並以不定距規則排列在分生孢子梗上、側生分枝等長、整個分生孢子梗呈羽狀之金字塔型，以及瓶狀枝為瘦長瓶壺形直立於分枝上，並於分枝末端呈現十字輪生型 (cruciate whorls) 形態等，皆與 Samules 氏等⁽⁴⁴⁾ (1999) 發表之 *T. asperellum* 特性一致，而與瓶狀枝形態為鉤型、瓶狀枝與分生孢子梗呈斜角、且分生孢子梗側枝非對稱分枝之 *T. viride* (相當於 Meyer 氏等 1989 年所報導之 *T. viride* 第 I 型及 Okuda 氏等 1982 年報導之 *T. viride* 第 II 群) 不符。另外其在 CMA 上培養 7 天即可檢測到厚膜孢子產生之特性也與 Samules 氏等 (1999) 於 *T. asperellum* 培養上所見相同，而與在培養過程不會有厚膜孢子產生之 *T. viride* 明顯有別⁽⁴⁴⁾。

就 *T. asperellum* 與 *T. viride* 種層次的鑑別，Samules 氏等 1999 年認為分生孢子的大小、長寬比與表面結構均為必需考量之特性，以被歸為 *T. viride* 原種之 *T. viride* 第 I 型為例，其分生孢子長寬比為 1.1⁽⁴⁴⁾，本研究中之 TA 菌株其在 CMD 上所產生近卵形分生孢子較之 Samules 氏等所報導之 *T. asperellum* 略小，但長寬比兩者皆為 1.2 則一致。在光學顯微鏡下 TA 菌株分生孢子之表面疣狀突起雖不明顯，然在掃描式電子顯微鏡檢視下則可見其分生孢子表面有明顯金字塔型不

表三、依據 ITS 序列之特異性定義 *Trichoderma asperellum* 基因型態

Table 3. Definition of *Trichoderma asperellum* genotypes according to ITS sequence differences

Genotype	Characteristic sequences at												
	211 th nts						266 th nts						
AY154944	5'...	T	T	C	T	T	...	C	T	T	T	C	...3'
AF278789	5'...	T	T	C	—	T	...	C	T	T	T	C	...3'
TA	5'...	T	T	C	T	T	...	C	C	T	T	C	...3'

¹ Note that dots between sequence areas do not correspond to the actual nt-distance between the indicated motifs.

表四、依據 ITS 序列之特異性定義 *Trichoderma virens* 基因型態

Table 4. Definition of *Trichoderma virens* genotypes according to ITS sequence differences

Genotype	Characteristic sequence at																		
	131 th nts					166 th nts					181 th nts								
AF057603	5'...	G	G	G	C	G	...	G	G	G	A	C	...	A	C	T	C	T	...3'
AF099007	5'...	G	G	G	T	G	...	G	G	—	A	C	...	A	C	T	C	T	...3'
PT103	5'...	G	G	G	T	G	...	G	G	—	A	C	...	G	C	T	C	T	...3'

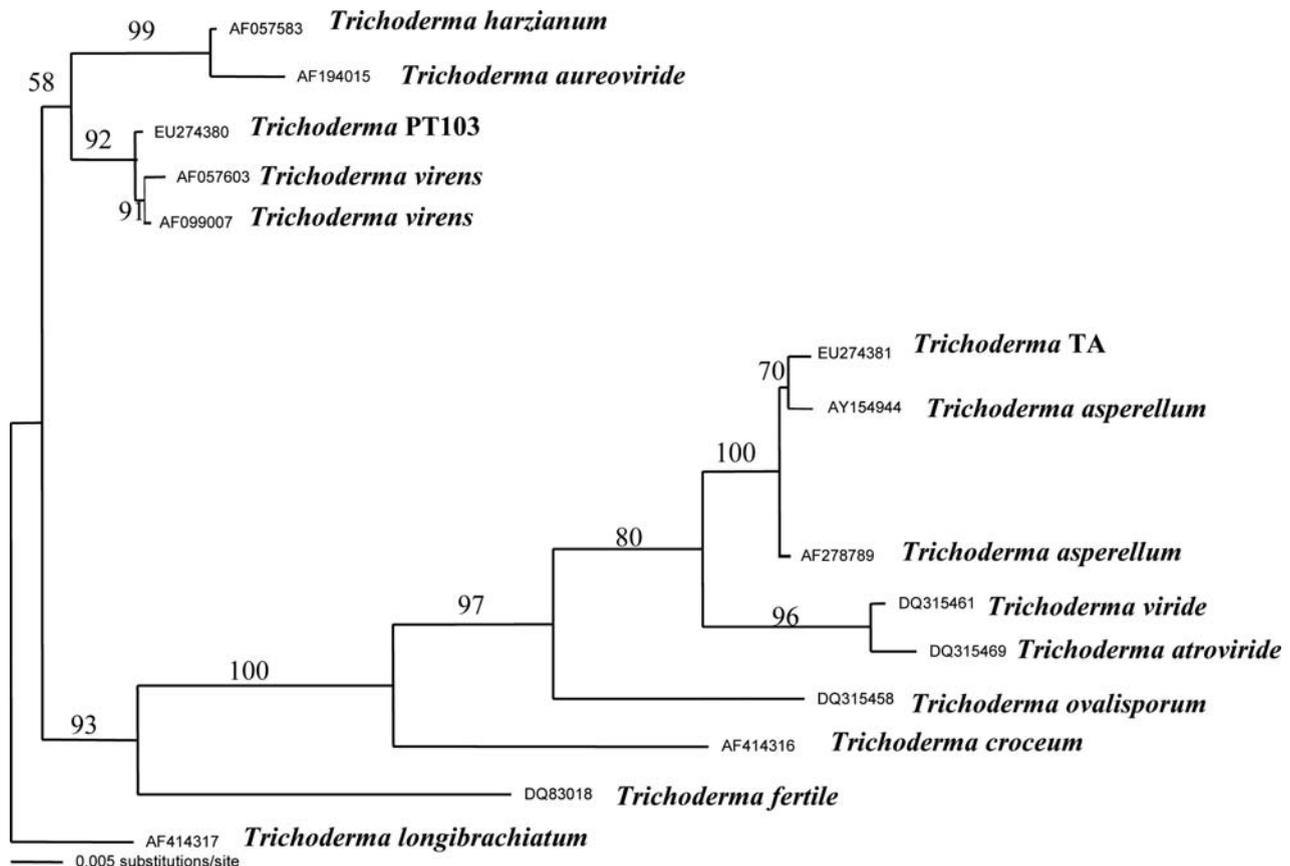
¹ Note that dots between sequence areas do not correspond to the actual nt-distance between the indicated motifs.

規則且不同孢子間為數不一之疣狀突起，此一特性較之孢子表面為光滑型之 *T. atroviride* 與 *T. harzianum*，以及疣狀突起形態為規則寬板型之 *T. viride* 第 I 型⁽³⁸⁾ 均有明顯差異，而與 1989 年 Meyer 氏等⁽³⁶⁾ 所報導之 *T. viride* 第 II 型、1999 年 Samuels 氏等⁽⁴⁴⁾ 所報導之新種 *T. asperellum*，以及 2005 年 Watanabe 氏等⁽⁴⁹⁾ 所報導於日本可用於水稻稻苗徒長病生物防治應用之 *T. asperellum* SKT-1 菌株，在電子顯微鏡檢視下所見一致。

有關木黴菌屬種的鑑別，ITS 區間 DNA 序列的親緣性分析近年來蔚為趨勢；本研究中所檢討之 TA 與 PT103 兩菌株，由上述不同培養基上所瞭解之形態發育特性，其分別歸屬於 *T. asperellum* 與 *T. vires* 兩種群之事實已相當明顯，另由試驗結果中包含 5.8S rDNA 之 ITS 區間序列與 NCBI 資料庫搜尋所獲既有相近菌株資料，經以 NJ method 分析程式進行分析，亦證實確可將 PT103 菌株歸屬於 *T. vires*，並將 TA 菌株歸屬於 *T. asperellum* (圖八)，其中 TA 菌株與 *T. viride* 及 *T.*

atroviride 親源關係僅次於 *T. asperellum*，三者之 bootstrap value 為 80%，符合傳統分類中將 *T. asperellum* 由 *T. viride* 獨立出來自成一種之結論，及與 *T. atroviride* 極為相似之菌株型態之事實一致，本研究中利用 NJ method 所繪製相關菌株親源關係圖樹型與 Watanabe 氏等所發表新菌株 *T. asperellum* SKT-1 之菌株親源關係樹型亦相符。

自 1932 年 *T. vires* 被嘗試應用於病害生物防治以來，有關木黴菌生物殺菌劑之商品化發展應用已有許多成功的實例，國內近年來相關應用上之發展亦不遺餘力，不少既有選出之本土菌株也相繼被證實可應用在水稻紋枯病⁽¹³⁾、甘藍立枯病⁽¹¹⁾ 與向日葵、菊花菌核病⁽⁵¹⁾ 等作物之生物防治上。鑑於部份木黴菌種的應用可能存在負面風險，在開發應用之前，種的歸屬鑑定確宜審慎，在以往種的歸屬上被鑑定為 *T. viride* 或 *T. harzianum*⁽⁵²⁾ 者，近年來菌株經重新檢討鑑定，相繼被證實應將其歸屬於 *T. asperellum*，本研究之 TA 菌株是國內生物防治用木黴菌菌株首次被鑑定為 *T. asperellum*



圖八、依據鄰接法推演木黴菌TA 菌株之 rDNA ITS 區間核苷酸序列之親緣關係樹。

Fig. 8. The Phylogenetic tree of 10 *Trichoderma* species used for sequence comparison as revealed by Neighbor-joining analysis using their internal transcribe spacer (ITS) region of rDNA. Numbers above internodes indicate values of the interior branch tests obtained derived from 1000 replicates. Only those greater than 50% of interior branch test are shown. Branch lengths are proportional to the number of base changes along each branch.

之記錄，其與歸屬於 *T. harzianum* Th2/4⁽²³⁾ 生物型，已知可造成洋菇綠黴病之木黴菌有別，截至目前所知，尚未有 *T. asperellum* 對植物會造成為害之負面性報導。而在病害防治應用上，則已相繼有報導指出其對 *Rhizoctonia solani*、*Fusarium oxysporum*、*Sclerotinia sclerotiorum* 等所引起包括水稻^(28, 29)、胡瓜⁽⁵²⁾、番茄⁽¹⁴⁾及菊花⁽⁵¹⁾等之病害，皆有很好的防治效果。其由 6-pentyl-pyrone 及 6-pentenyl-pyrone 所構成⁽²¹⁾之椰子氣味揮發性氣體，目前已被證實可抑制 *R. solani*、*F. oxysporum*、*Mucor hiemalis*、*Pythium ultimum* 之生長⁽¹⁵⁾，因而在生物熏蒸 (biofumigation) 之應用效果顯可預期，本研究嘗試其於金線連莖腐病之田間防治應用之相關試驗中，已證實除可如預期獲得良好的防治效果，試驗中更發現其對植株生長具有顯著的促進作用，有關其於生物殺菌劑發展上之應用性，值得進一步探討。

謝 辭

本研究承蒙行政院農業委員會動植物防疫檢疫局計畫部份經費資助，藥物毒物試驗所蘇副研究員秋竹與李祈益先生協助低溫掃描式電子顯微鏡檢視，鍾助理教授文鑫提供 Neighbor-joining analysis 分析軟體，特此致謝。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

- Aube, C., and Gagnon, C. 1969. Effect of carbon and nitrogen on growth and sporulation of *Trichoderma viride* Pers. Ex Fries. Can. J. Microbiol. 5:703-706.
- Bisby, G. R. 1939. *Trichoderma viride* Pers. ex Fries, and notes on *Hypocrea*. Trans. Br. Mycol. Soc. 23:149-168.
- Bissett, J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. Can. J. Bot. 62:924-931.
- Bissett, J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. Can. J. Bot. 69:2357-2372.
- Bissett, J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. Can. J. Bot. 69:2373-2417.
- Bissett, J. 1991c. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. Can. J. Bot. 69:2418-2420.
- Bissett, J. 1992. *Trichoderma atroviride*. Can. J. Bot. 70:639-641.
- Bulat, S. A., Lubeck, M., Mironenko, N., Jensen, D. F., and Lubeck, P. S. 1998. UP-PCR analysis and ITS1 ribotyping of strains of *Trichoderma* and *Gliocladium*. Mycol. Res. 102:933-943.
- Castle, A., Speranzini, D., Rghei, N., Alm, G., Rinker, D., and Bissett, J. 1998. Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates on North American mushroom farms. Appl. Environ. Microbiol. 64:133-137.
- Chaverri, P., Samuels, G. J., and Stewart, E. L. 2001. *Hypocrea virens* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma virens*. Mycologia 93:1113-1124.
- Chen, C. Y. 1998. Biological control of soilborne disease by *Trichoderma* spp. and *Gliocladium* spp. M. S. Thesis. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University. 109 pp. (in Chinese)
- Chouaki, T., Lavarde, V., Lachaud, L., Raccurt, C. P., and Hennequin, C. 2002. Invasive infections due to *Trichoderma* species: report of 2 cases, findings of in vitro susceptibility testing, and review of the literature. Clin. Infect Dis. 35:1360-1367.
- Chu, S. C. 2004. Biological characteristics of *Gliocladium virens* WJGV2, TLGV22 and the mass production of chlamyospore formulation for disease control. M. S. Thesis. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University. 93pp. (in Chinese)
- Cotxarrera, L., Trillas-Gay, M. I., Steinberg, C., and Alabouvette, C. 2002. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato. Soil Biol. Biochem. 34:467-476.
- Dennis, C., and Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. Trans. Br. Mycol. Soc. 57:41-48.
- Domsch, K. H., Gams, W., and Anderson, T. H. 1980. Compendium of Soil Fungi. vol. 1. Academic Press, London, United Kingdom. 859 pp.
- Elad, Y., and Chet, I. 1983. Improved selective media for isolation of *Trichoderma* spp. or *Fusarium* spp. Phytoparasitica 11:55-58.
- Fujiwara, A., Okuda, T., Masuda, S., Shiomi, Y., Miyamoto, C., Sekine, Y., Tazoe, M., and Fujiwara, M. 1982. Fermentation, isolation and characterization of isonitrile antibiotics. Agric. Biol. Chem. 45:1803-1809.
- Gams, W., and Bissett, J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. Pages 3-34. in *Trichoderma and Gliocladium*, vol 1. Kubicek, C. P., and Harman, G. E., eds., Taylor & Francis, London. 278 pp.
- Gams, W., and Gräfenhan, T. 2006. Highlights of progress and remaining problems in the taxonomy of *Trichoderma*. 4th International subcommission on *Trichoderma* and *Hypocrea* taxonomy. Vienna,

- Austria. (<http://www.isth.inf/meetings/tgm2006.php>)
21. Ghisalberti, E. L., and Sivasithampam, K. 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biol. Biochem.* 23:1011-1020.
 22. Grondona, L., Hermosa, M. R., Tejada, M., Gomis, M. D., Mateos, P. F., Bridge, P., Monte, E., and García-Acha, I. 1997. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3189-3198.
 23. Hermosa, M. R., Grondona, I., Iturriaga, E. A., Diaz-Minguez, J. M., Catro, C., Monte, E., and Garcia-Acha, I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 :1890 - 1898.
 24. Hillis, D. M., and Dixon, M. T. 1991. Ribosomal DNA molecular evolution and phylogenetic inference. *Quart. Rev. Biol.* 66:411- 453.
 25. Hsieh, S. P. Y., Chuang, W. R., and Huang, S. F. 1994. Stem rot of Taiwan *Anoectochilus* and its causal organism. *Plant Pathol. Bull.* 3:140-146.
 26. Kubicek, C. P., Bissett, J., Druzhinina, I., Kullnig-Gradinger, C. M., and Szakacs, G. 2003. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South East Asian isolates. *Fungal Genet Biol.* 38:310-319.
 27. Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G. J., Meyer, W., Kubicek, C. P., and Börner, T. 1997. Revision of *Trichoderma* sec. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer regions. *Mycologia* 89:442-460.
 28. Kumakura, K., Watanabe, S., Toyoshima, J., Makino, T., Iyozumi, H., Ichikawa, T., and Nagayama, K. 2003a. Effect of *Trichoderma* sp. SKT-1 on suppression of six different seedborne diseases of rice. *Jpn. J. Phytopathol.* 69:384-392.(in Japanese with English abstract)
 29. Kumakura, K., Watanabe, S., Toyoshima, J., Makino, T., Iyozumi, H., Ichikawa, T., and Nagayama, K. 2003b. Selection of *Fusarium* spp. and *Trichoderma* spp. for effective control of rice seedborne pathogens. *Jpn. J. Phytopathol.* 69:393-405. (in Japanese with English abstract)
 30. Kutchma, A. J., Roberts, M. A., Kanaeble, D. B., and Crawford, D. L. 1998. Small-scale isolation of genomic DNA from *Streptomyces* mycelia or spores. *Biotechniques* 24:452-457.
 31. Lieckfeldt, E., Samuels, G. J., Nirenberg, H. I., and Petrini, O. 1999. A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species? *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2418-2428.
 32. Lübeck, M., Poulsen, S. K., Lübeck, P. S., Jensen, D. F., and Thrane, U. 2000. Identification of *Trichoderma* strains from building materials by ITS1 ribotyping, UP-PCR fingerprinting and UP-PCR cross hybridization. *FEMS Microbiol. Lett.* 185:129-134.
 33. Lumsden, R. D., Ridout, C. J., Vendemia, M. E., Harrison, D. J., Waters, R. M., and Walter, J. F. 1992. Characterization of secondary metabolites produced in soilless mix by a formulated strain of the biocontrol fungus *Gliocladium virens*. *Can. J. Microbiol.* 38:1274-1280.
 34. Menzies, J. G. 1993. A strain of *Trichoderma viride* pathogenic to germinating seedlings of cucumber, pepper and tomato. *Plant Pathology* 42:784-791.
 35. Meyer, R. J. 1991. Mitochondrial DNAs and plasmids as taxonomic characterization in *Trichoderma viride*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2269-2276.
 36. Meyer, R. J., and Plaskowitz, J. S. 1989. Scanning electron microscopy of conidia and conidial matrix of *Trichoderma*. *Mycologia* 81:312-317.
 37. Nirenberg, H. I., and Aoki, T. 1997. *Fusarium nisikadoi*, a new species from Japan. *Mycoscience* 38:329-333.
 38. Okuda, T., Fujiwara, A., and Fujiwara, M. 1982. Correlation between species of *Trichoderma* and production patterns of isonitrile antibiotics. *Agric. Biol. Chem.* 46:1811-1822.
 39. Prasad, R. D., Rangeshwaran, R., Hegde, S. V., and Anuroop, C. P. 2002. Effect of soil and seed application of *Trichoderma harzianum* on pigeonpea wilt caused by *Fusarium udum* under field conditions. *Crop Prot.* 21:293-297.
 40. Rifai, M. A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Pap.* 116:1-56.
 41. Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
 42. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 1063 pp.
 43. Samuels, G. J., Petrini, O., and Manguin, S. 1994. Morphological and macromolecular characterization of *Hypocrea schweinitzii* and its *Trichoderma* anamorph. *Mycologia* 86:421-435.
 44. Samuels, G. J., Lieckfeldt, E., and Nirenberg, H. I. 1999. *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription of *T. viride*. *Sydowia* 51:71-88.
 45. Sivan, A., and Chet, I. 1986. Biological control of *Fusarium* spp. in cotton, wheat and muskmelon by *Trichoderma harzianum*. *J. Phytopathol.* 116:39-47.

46. Sivan, A., and Chet, I. 1987. Control of *Fusarium* crown rot of tomato by *Trichoderma harzianum* under field conditions. *Plant Dis.* 71:589-592.
47. Thangavelu, R., Palaniswami, A., and Velazhahan, R. 2004. Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing Fusarium wilt of banana. *Agric. Ecosyst. Environ.* 103:256-263.
48. Tsai, C. C., Hsieh, S. P. Y., and Tzeng, D. D. S. 2006. A preliminary study on the biocontrol of Taiwan *Anoectochilus* stem rot diseases caused by *Fusarium oxysporum* Schl. *Plant Pathol. Bull.* 15:293-294. (Abstract in Chinese)
49. Watanabe, S., Kumakura, K., Kato, H., Iyozumi, H., Togawa, M., and Nagayama, K. 2005. Identification of *Trichoderma* SKT-1, a biological control agent against seedborne pathogens of rice. *J. Gen. Plant Pathol.* 71:351-356.
50. White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322 *in*: PCR protocols: a guide to methods and applications. M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J. eds., Academic Press, New York. 482pp.
51. Wu, W. S. 1991. Control of sclerotinia rot of sunflower and chrysanthemum. *Planr Prot. Bull.* 33:45-55.
52. Yedidia, I., Benhamou, N., and Chet, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plant (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1061-1070.

ABSTRACT

Tsai, C. C.^{1,2}, Tzeng, D. S.,^{1,3} and Hsieh, S. P. Y¹. 2008. Biological characteristics of biocontrol effective *Trichoderma* TA and PT103 strains isolated from rhizosphere of *Anoectochilus formosanus* Hayata. Plant Pathol. Bull. 17: 127-142. (¹Department of Plant Pathology, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan; ²Taichung Branch, Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Executive Yuan; ³Corresponding author, Email: dstzeng@nchu.edu.tw; Fax: +886-4-2285-3741)

The main objective of this investigation was to elucidate the species characteristics of *Trichoderma* TA and PT103 strains which were isolated from rhizosphere of *Anoectochilus formosanus* Hayata and have been shown effective for bio-controlling stem rot infection by *Fusarium oxysporum* Schl. on *A. formosanus*. Both tester strains produced chlamydospores on culture and showed a similar optimum and maximum growth temperature at 30 and 37 °C, respectively. However, among them PT103 strain appeared to grow faster and produced abundant aerial mycelia. And upon conidiation, it produced long erect conidiophores with characteristic Gliocladium-type morphology and no apical sterile elongation. The conidia appeared to be spherical to subglobose structure covered with abundant tiny thin warts. As a comparison, TA strain grew considerably slower, utilized melezitose as sole carbon source and produced antifungal isonitric acids and unique coconut smells. Also, upon conidiation, it produced conidiophores predominantly in paired branching, and among them bore slender-ampulliform phialides with characteristic viride-type morphology. The conidia were ovoid to subglobose structure covered with conspicuous irregular pyramidal warts. The morphological characteristics indicated clearly PT103 strain a member of *T. virens* (J. Miller, Giddens & Foster) and TA strain a member of *T. asperellum* (Samuels, Liechfeldt & Nirenberg). By polymerase chain reaction, the rDNA internal transcribed spacer (ITS) sequence of the two tested strains were amplified and sequenced. Results obtained from the pair-wise comparison of the sequence data of comparative strains available from NCBI and the phylogenetic analysis supported fully the above species identification based on the morphological characteristics. This is the first report of *T. asperellum* as a biological control agent in Taiwan.

Keywords: Biological control, *Fusarium oxysporum* Schl:Fr, *Anoectochilus formosanus* Hayata, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma virens*, ITS phylogeny