

幾丁質分解酵素基因 ChiF 之表現與鏈黴菌 *Streptomyces griseobrunneus* S3 對 *Rhizoctonia solani* AG4 與 *Pythium aphanidermatum* 超寄生作用之關係

楊尚書¹ 陳泰元¹ 曾德賜^{1,2}

¹ 國立中興大學植物病理學系

² 聯絡作者：電子郵件 dstzeng@nchu.edu.tw，電話：+886-4-22851038，傳真：+886-4-22851038

接受日期：中華民國 94 年 6 月 13 日

摘要

楊尚書、陳泰元、曾德賜 . 2005. 幾丁質分解酵素基因 *ChiF* 之表現與鏈黴菌 *Streptomyces griseobrunneus* S3 對 *Rhizoctonia solani* AG4 與 *Pythium aphanidermatum* 超寄生作用之關係. 植病會刊 14:147-158.

本研究旨在瞭解屬於 family 19 的幾丁質分解酵素 ChiF 在鏈黴菌 *Streptomyces griseobrunneus* S3 (SGS3) 對 *Rhizoctonia solani* AG4 與 *Pythium aphanidermatum* 兩種主要土傳性病原真菌的超寄生作用中所扮演之角色。於平板培養基上行人工接種時，SGS3 之孢子可在 24 小時內於兩供試寄主真菌菌絲體上很快發芽並形成纏據菌絲團，以掃描式電子顯微鏡檢視發現 SGS3 之菌絲體在兩寄生真菌菌絲體上生長、纏據甚至侵入寄主體內情形，在其纏據部位下方並明顯有蝕刻性嵌入痕跡，顯示此一入侵作用明顯有細胞壁分解酵素之參與，另於部分纏據部位可見有類似吸附器構造 (appressorium-like structure) 之形成，唯其功能仍有待瞭解。進一步以 SGS3-ChiF 專一性抗血清行免疫螢光標示檢測發現，沿 SGS3 纏據部位均可見顯示 ChiF 存在之螢光反應，其中尤以在細胞壁含幾丁質的 *R. solani* AG4 菌體上可測得的螢光反應較強，而在細胞壁不含幾丁質的 *P. aphanidermatum* 菌絲體上，其螢光反應相對較弱；於兩供試真菌所測得之差異性結果，顯示 SGS3 *ChiF* 基因於幾丁質存在下有優先表現的情形，而於不含幾丁質的細胞壁上仍有弱螢光表現，應為細胞壁分解酵素被誘導表現時多種酵素同時誘導表現之調控作用所導致。利用雙重染色技術，本研究並證實，在 SGS3 細胞壁分解酵素對寄主菌體尚未見有明顯的崩解效應之前，寄主細胞已明顯失去活力，此顯示於超寄生作用過程中可能尚有抗生物質的協力作用參與。本報告為首度在鏈黴菌對病原真菌之超寄生作用部位以免疫螢光檢測證實，有屬 family 19 的幾丁質分解酵素之參與作用。

關鍵詞：*Streptomyces griseobrunneus* S3、超寄生、ChiF 蛋白、幾丁質分解酵素、掃描式電子顯微鏡、免疫螢光染色、活性染色

緒言

鏈黴菌 (*Streptomyces* spp.) 為常見腐生存在於土壤中根圈附近之革蘭式陽性細菌，具有氣生性營養菌絲體，及可形成大量具抗 UV、乾旱等逆境特性之斷生孢子，為其最為獨特而與一般細菌種類有別之處。許多

鏈黴菌種類已知對多數重要病原真菌具有優異的拮抗性，長久以來一直有學者嘗試利用其做為土壤傳播性真菌病害之防治工具，這些相關研究中且已有許多成功應用性開發實例，包括對鐮孢病菌 *Fusarium*^(20, 30)、腐疫病菌 *Phytophthora*^(37, 38)、腐霉病菌 *Pythium*^(15, 21, 41)、立枯絲核菌 *Rhizoctonia*^(6, 28, 34)、菌核病菌 *Sclerotinia*⁽³⁴⁾ 與黃

萎病菌 *Verticillium*⁽¹⁰⁾ 等重要病原菌的防治等，均已獲得肯定之成果。此些既有成功實例，充分顯示本屬細菌作為土傳真菌性病害防治生物製劑之應用潛力。為開發本土性微生物資源，以供作物病害防治微生物製劑發展應用，甫近本研究室團隊由根圈土壤與栽培介質大量篩選抗菌性及幾丁質分解性 (chitinolytic) 鏈黴菌菌株，由這些菌株當中所選出的 *S. griseobrunneus* S3 (SGS3)，已經以 Pilot 級發酵設備成功建立活體孢子製劑之量產技術，其所產出之試量產製劑樣品，並已經溫室及田間試驗證實，對 *Phytophthora parasitica*、*Pythium aphanidermatum* 與 *Rhizoctonia solani* AG4 等重要土傳性病原真菌之危害，均有明顯的降低效果⁽²²⁾。

就鏈黴菌屬於真菌性病害防治之作用機制而言，對諸多病原真菌的廣譜性抗生作用，多年來一直是有關研究所關注的重點，許多鏈黴菌屬成員所產生之抗生物質，如 macrolide benzoquinones⁽²⁷⁾、aminoglycosides⁽²⁵⁾、polyenes⁽²⁶⁾ 及 tubercidin⁽¹⁴⁾ 等，已經先後被證實能有效抑制病原菌於根圈之纏據危害，產生抗生物質的能力，也因而普遍被認為是對鏈黴菌的生物防治效果具決定性影響之要素。除了抗生物質的作用外，超寄生作用 (mycoparasitism) 亦應為鏈黴菌屬對廣泛性病原真菌具抗生作用之重要因子，Tu 氏⁽³⁵⁾ 曾報導指出，在 PDA 平板上共同培養時，*S. albus* 的營養菌絲可在病原真菌 *Nectria inventa* 與 *Colletotrichum lindemuthianum* 菌絲體上纏據及產生類似吸附器之構造 (appressorium-like structure, ALS)，並可侵入寄主菌絲體內。另於 *S. griseus* 對 *C. lindemuthianum* 之超寄生作用研究中更發現，寄主真菌 *C. lindemuthianum* 的菌體顯能分泌特定對 *S. griseus* 生長產孢具促進作用之因子，其應為誘使 *S. griseus* 於 *C. lindemuthianum* 菌絲體上纏據並侵入菌絲內部之主要原因⁽⁶⁾。

在微生物之超寄生作用中，由超寄生菌在寄主微生物菌體上之纏據與侵入作用，明白顯示應有寄生菌產生對寄主菌體細胞壁具分解作用酵素的參與，此些對超寄生作用攸關重要之細胞壁多醣體分解酵素，近年來為許多從事微生物超寄生現象有關學者熱切研究之課題。諸多常見的微生物超寄生作用應用性，其有關的細胞壁分解酵素參與作用亦已相繼被證實。例言之，在 *Trichoderma hamatum* 對 *Sclerotinia sclerotiorum* 之超寄生作用中，已證實有幾丁質分解酵素基因 *chit42* 與蛋白質分解酵素基因 *prb1* 之誘導表現⁽³³⁾；另外在 *T. harzianum* 多種病原真菌的超寄生作用中，亦已證實於超寄生過程中有 -1,3-葡萄糖聚醣水解酵素 (-1,3-glucanase)⁽⁹⁾、-1,6-葡萄糖聚醣水解酵素 (-1,6-

glucanase)⁽⁸⁾ 以及幾丁質分解酵素^(7, 11, 31) 等的參與作用。相較於這些超寄生性真菌寄生作用過程中，有關細胞壁分解酵素參與之熱切研究，與鏈黴菌之真菌寄生性有關的酵素參與作用，或因多數有關研究都以抗生物質的參與作用為重點，其截至目前為止瞭解相當有限。儘管如此，許多由鏈黴菌所產生的多醣類分解酵素，近年來在生物科技發展上的重要性卻與日俱增，其中與真菌細胞壁組成分解有關者，諸如幾丁質分解酵素^(17, 23, 24, 29, 39)、-1,3-葡萄糖聚醣水解酵素⁽¹⁹⁾ 及 -1,6-葡萄糖聚醣水解酵素⁽¹²⁾ 等，除已相繼被證實與鏈黴菌菌株本身之抗真菌能力具相關性，其個別對應基因與分子特性並已分別被選殖、定序、解析完成；可惜的是，此些相關研究咸未針對鏈黴菌屬成員對植物病原真菌的超寄生性關係加以闡述。

為瞭解幾丁質分解酵素活性在鏈黴菌拮抗真菌特性中可能扮演之角色，並進而開發其應用性，本研究室已自 SGS3 菌株基因體 DNA 成功選殖其 family 19 抗真菌性幾丁質分解酵素全長基因 *ChiF*，利用此基因轉型 *E. coli* 菌體所純化之 *ChiF* 酵素重組蛋白，並已製備成功其對應之抗血清⁽³⁹⁾；由酵素蛋白之胺基酸序列分析更已證實，其與植物上已知與抗病性表現有關的 class IV 幾丁質分解酵素有極高的同源性。為進一步瞭解此一基因的表現是否與 SGS3 對病原真菌的超寄生性相關，本研究以 *R. solani* AG4 與 *P. aphanidermatum* 為試驗標的菌，於接種 SGS3 後，除以位相差及掃描電子顯微鏡分別檢視其於病原菌菌絲體之超寄生現象，並配合免疫螢光偵測技術與細胞活力染色技術，直接於被寄生之菌體上檢視 *ChiF* 蛋白表現與宿主細胞死亡之關係，期能瞭解在其超寄生作用過程中，*ChiF* 蛋白之表現於侵入甚至致死過程中可能參與的作用。

材料與方法

供試菌株與培養基

供試菌株包括 *Pythium aphanidermatum*、*Rhizoctonia solani* AG4 與 *Streptomyces griseobrunneus* S3 (SGS3) 等，所有菌株均以馬鈴薯蔗糖洋菜培養基 (Potato sucrose agar, PSA : 200 g 馬鈴薯煎汁、20 g 蔗糖、15 g 洋菜粉，加蒸餾水至一公升) 培養保存⁽⁶⁾；其中 *P. aphanidermatum* 與 *R. solani* AG4 經接種於 PSA 斜面上，於 28℃ 定溫箱黑暗下培養 3 天，俟菌絲生長良好，即移至 10℃ 定溫箱保存，每個月繼代培養一次；SGS3 則塗抹接種於 PSA 平板上於 28℃ 培養 5 天，俟其產孢發育成熟，收集其孢子，定量混拌於高

溫滅菌過之壤土中至末濃度為 10^7 CFU/g, 置 4 永久保存⁽²²⁾。 *P. aphanidermatum* 與 *R. solani* AG4 更新培養於 PSA 平板上 2 天後, 以解剖刀切取其生長活力最旺盛的菌落邊緣洋菜膠塊, 做為超寄生試驗之接種源, SGS3 則塗抹接種於 PSA 平板上更新培養 3 天, 待其產孢良好, 即以添加 0.05% (v/v) Tween 20 溶液洗下, 並經分光儀定量檢測調整為 10^8 spores/ml 濃度做為接種源⁽²²⁾。

標的菌 *P. aphanidermatum* 與 *R. solani* AG4 之超寄生接種

將玻璃紙裁成 4×4 cm² 大小置蒸餾水中, 經高壓滅菌 (121 °C, 15分鐘) 後, 取出平鋪於 1.5% (w/v) 水洋菜培養基平板 (water agar, WA) 上, 上述培養於 PSA 平板上之 *P. aphanidermatum* 與 *R. solani* AG4 接種源, 經切取成 1.5 mm \times 4 cm 包含菌絲之洋菜條, 分別移置於玻璃紙上, 旋將培養皿以石臘膜密封後, 置 28 °C 黑暗下培養 2 天, 待菌落將近長滿玻璃紙上, 分別於其上滴入上述調製之 SGS3 接種源菌液至淹過標的菌 *P. aphanidermatum* 與 *R. solani* AG4 菌落, 經靜置 1 分鐘, 將 SGS3 多餘菌液傾倒去除, 再將平板培養以石臘膜密封後置 28 °C 培養, 並按時序檢視超寄生作用之顯微結構改變、 *ChiF* 基因表現情形以及對寄主真菌細胞活力之影響。

掃描式電子顯微鏡檢測

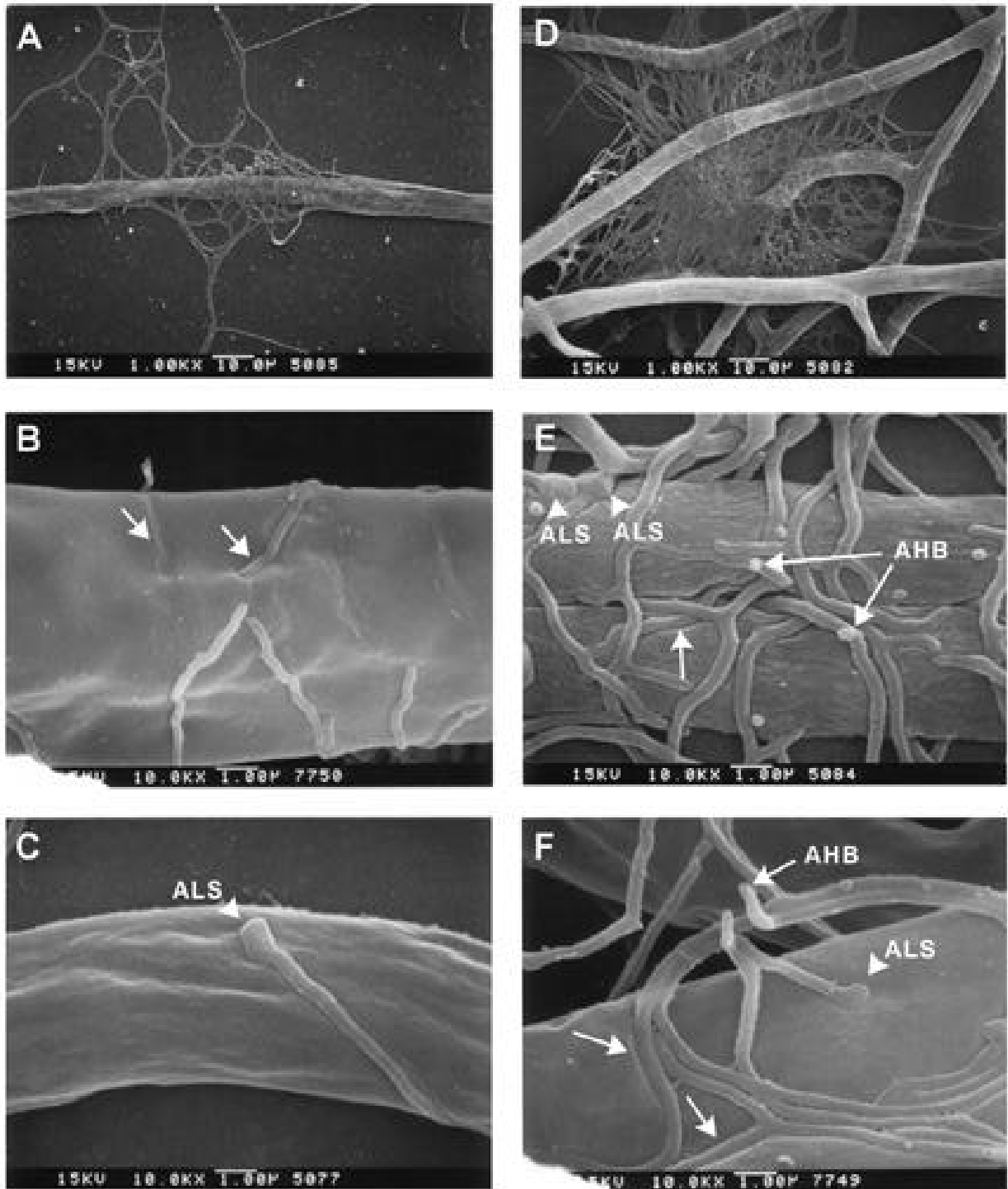
視標樣品之製備主要參考 Boyde 氏等方法⁽⁵⁾, 將上述經以 SGS3 接種處理之 *P. aphanidermatum* 與 *R. solani* AG4 菌絲培養, 連同玻璃紙自 WA 平板取下, 切取 1×1 cm² 大小, 置有螺旋蓋之 10 ml 玻璃瓶中, 以 4% (w/v) glutaraldehyde 電顯固定液 (以 100 mM 磷酸緩衝液配製, pH 7.0, 6.5 ml) 浸泡過夜, 次日以 100 mM 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 重複清洗兩次, 每次 10 分鐘, 繼之將磷酸緩衝液吸取去除後, 即於玻璃瓶內依序加入 60、70、80、90、及 95% 序列濃度酒精, 進行逐步脫水, 每濃度浸泡 30 分鐘, 最後再以無水酒精重複脫水兩次, 每次 30 分鐘, 隨後將菌絲樣品以 ethanol:amylacetate (1:1, v/v) 浸泡 2 小時, 再以 100% amylacetate 浸泡過夜後, 以二氧化碳臨界點乾燥儀 (critical point drier, CPD, LADD 28000) 乾燥處理, 再則以雙面膠帶將乾燥樣品黏附在鋁製台座上, 以鍍膜機 (JBS, E5150) 進行金粒子包覆鍍膜, 最後以掃描式電子顯微鏡 (scanning electron microscope, Topcon ABT-150S) 檢視樣品。

ChiF 基因表現之免疫螢光檢視

經以 SGS3 孢子懸浮液接種處理之 *P. aphanidermatum* 與 *R. solani* AG4 菌絲體培養, 接種後按時序連同玻璃紙自 WA 上取下, 分別平鋪於另一新培養皿內, 菌絲體上以 5% (w/v) glutaraldehyde 固定液 (以 50 mM 磷酸緩衝液配置, pH 7.0) 處理 1 小時, 之後以含 0.1% (v/v) Tween 20 之 50 mM 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 清洗三次, 每次 5 分鐘; 再於菌絲體上添加 1% (w/v) 牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA, 以 50 mM 磷酸緩衝液配製, pH 7.0) 500 μ l 行填充處理 (blocking treatment), 反應 30 分鐘後, 吸去填充液, 再以本研究先前利用 ChiF 純化蛋白製備之多元抗血清 (血清力價經以間接酵素聯結抗體法檢測可稀釋到 10,000 倍仍可檢測到正反應)⁽³⁹⁾, 以 50 mM 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 稀釋 100 倍濃度下, 每樣品添加 500 μ l, 反應 30 分鐘後, 再以同樣緩衝液清洗三次, 每次 5 分鐘, 清洗後之菌絲體, 繼而以市售經以 FITC 螢光標幟之大白兔免疫球蛋白抗血清 (anti-rabbit IgG FITC conjugate, Sigma, USA) 在 100 倍稀釋濃度 (50 mM 磷酸緩衝液, 1% BSA, pH 7.0), 每一樣品以 500 μ l 添加量反應 30 分鐘, 反應後以同一緩衝液清洗三次, 小心將菌絲體自玻璃紙上移置載玻片上, 最後以螢光顯微鏡 (Leica DMLB, Germany) 在藍光 (470 nm-490 nm) 激發下檢視有綠色 (530 nm-560 nm) 散射螢光標幟部位。

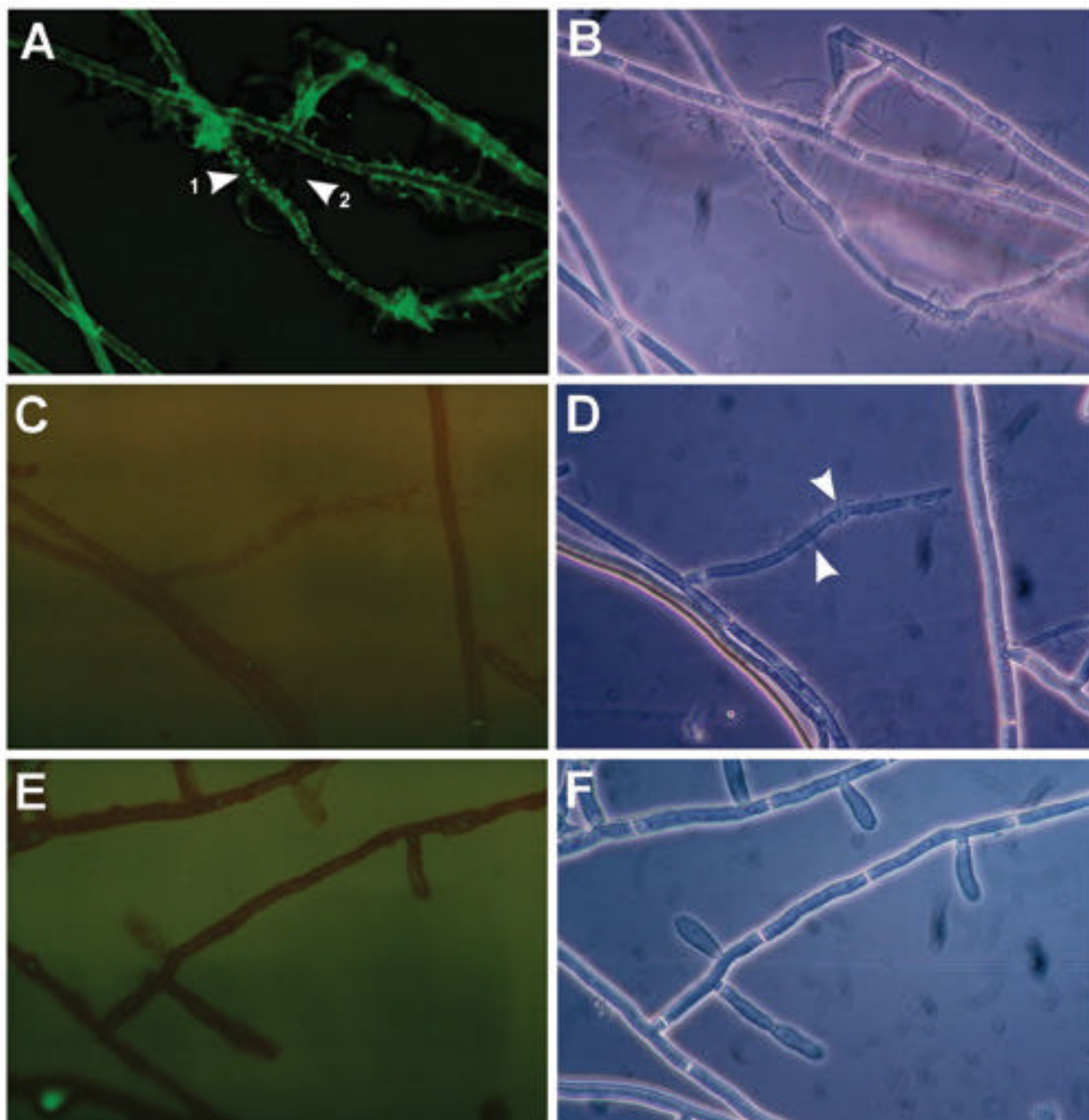
供測菌體之細胞活性檢測

以修改自 Jones 氏等之方法⁽¹⁶⁾, 同上述將經接種處理之 *P. aphanidermatum* 及 *R. solani* AG4 菌絲體連同玻璃紙自 WA 上取下, 平鋪於另一新培養皿內, 菌絲體先以 500 μ l 濃度 1 mg/ml 之 fluorescein diacetate (FDA, Sigma, CA, USA, 以 50 mM 磷酸緩衝液配製, pH 7.0) 於室溫下處理 20 分鐘後, 以添加 0.1% (v/v) Tween 20 之 50 mM 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 將染劑沖洗乾淨, 隨後以 propidium iodide (PI, Sigma, CA, USA, 50 ng/ml 以 50 mM 磷酸緩衝液配製, pH 7.0) 於室溫下行複染 (double staining), 反應 3 分鐘後, 立即以同樣緩衝液清洗三次將多餘染劑去除, 隨後於菌絲體上添加 1% (w/v) paraformaldehyde (以 50 mM 磷酸緩衝液配製, pH 7.0) 行固定處理, 反應 3 分鐘後, 小心將菌絲體自玻璃紙上移至載玻片上, 最後以螢光顯微鏡在藍光 (470 nm-490 nm) 激發下, 檢視活細胞中 FDA 被 lipase 作用下釋出色基所呈現的綠色螢光, 以及死亡細胞因吸收 PI 所呈現紅色螢光。



圖一、掃描式電子顯微鏡檢視鏈黴菌 *Streptomyces griseobrunneus* S3 (SGS3) 於 *Pythium aphanidermatum* (A、B及C) 及 *Rhizoctonia solani* AG4 (D、E、F) 超寄生作用中對兩寄主菌絲體之影響。

Fig. 1. Scanning electron microscopy (SEM) illustrating the mycoparasitism of of *Streptomyces griseobrunneus* S3 (SGS3) on *Pythium aphanidermatum* (A, B and C) and *Rhizoctonia solani* AG4 (D, E and F) respectively. Photos shown were taken 24 hours after inoculation of SGS3 on the mycelial mass of the two target fungi. The bacterial mycelia appeared to grow vigorously on, tangle and interweave well on the host mycelium (Figs. A and D), and formed prominent etching lesion along the colonized parts (Figs. B, C, E and F); some of them even formed appressorial like structure (Figs. A and F, ALS as indicated by arrow head). The aerial hyphal branching of SGS3 (AHB as shown on Figs. E and F) was apparent on the samples examined.



圖二、以免疫螢光顯微檢測技術 (A、C、E) 配合位相差顯微鏡 (B、D、F) , 觀察 SGS3 於 *Rhizoctonia solani* AG4 菌絲體上纏據過程中, 幾丁質分解酵素 ChiF 蛋白之產生及參與作用。

Fig. 2. *In situ* detection by fluorescent microscopy of *ChiF* gene expression of *Streptomyces griseobrunneus* S3 (SGS3) during the course of mycoparasitism on *Rhizoctonia solani* AG4. Photos presented were taken from samples obtained 24 hours after SGS3 inoculation. The expression of *ChiF* gene was detected by immunostaining with application of an anti-rabbit IgG FITC conjugated *ChiF* specific antiserum as that described in the text. The fluorescent microscopy images A, C and E are presented each respectively with their comparative images revealed by phase contrast microscopy (B, D and F) to illustrate the morphological detail of the mycoparasitism. Photo A shows the detection of green fluorescence all over the SGS3 colonized parts on the host mycelium. Photo C shows the image of fluorescent microscopy on the same inoculation treatment where that *ChiF* specific antiserum was not applied. Whereas photo E is the compared detection on the control treatment without SGS3 inoculation.

結 果

SGS3 超寄生作用之掃描式電子顯微鏡檢視

生長於玻璃紙上之兩供試真菌 *P. aphanidermatum* 與 *R. solani* AG4，在以 SGS3 孢子懸浮液接種處理後，兩菌株之菌絲體生長速度，相較於未接種 SGS3 之對照處理組，均呈明顯減緩甚至停滯之狀態（結果未示出）。試驗過程中，經以掃描式電子顯微鏡檢視發現，SGS3 菌株之孢子於接種後一天內即可發芽良好，所長出之菌絲體，並可分別在 *P. aphanidermatum*（圖一、A）與 *R. solani* AG4（圖一、D）之菌絲體上纏據，進而於 10,000 倍下檢視被纏據之菌體則發現，不論是 *P. aphanidermatum*（圖一、B）或 *R. solani* AG4（圖一、E，F），其菌絲體被 SGS3 纏據部位，均有明顯蝕刻嵌入與凹陷的現象（白色箭號指處）；另外值得注意的是，於標的菌 *P. aphanidermatum*（圖一、C，ALS 箭頭指處）與 *R. solani* AG4（圖一、E，F，ALS 箭頭指處）菌絲體表面，超寄生菌 SGS3 有明顯類似吸附器（ALS）結構之形成，局部超寄生菌此時並已有向上突起氣生菌絲分枝構造之形成（圖一、E 與 F，AHB 箭號指處）。

ChiF 基因表現之免疫螢光檢視

兩標的病原真菌 *R. solani* AG4 與 *P. aphanidermatum* 在經 SGS3 孢子懸浮液接種處理 24 小時後，以 ChiF 專一性抗血清，配合以 FITC 標識的大白兔 IgG 抗血清行標定染色處理結果，兩標的真菌菌體上 SGS3 纏據明顯部位，均可檢測到有 ChiF 明顯表現情形（圖二、三）；以立枯絲核菌 *R. solani* AG4 為例，於位相差顯微鏡檢視下，可見 SGS3 菌絲體在 *R. solani* 菌絲體上纏據聚集（圖二、B，D），且於 *R. solani* 菌絲體上普遍可見有 SGS3 孢子的黏附及發芽管之形成（圖二、D 箭頭指處）；至於距離 *R. solani* AG4 菌絲體較遠部位，則所見 SGS3 孢子數與發芽數均顯著減少，大多只有較短的發芽管。同樣視野以螢光顯微鏡檢視則發現，在 ChiF 抗血清配合 FITC 標識之大白兔 IgG 抗血清的標定下，於 *R. solani* AG4 菌絲體上黏附之 SGS3 孢子與纏據菌絲，均有明顯顯示 ChiF 蛋白存在的綠色螢光呈現（圖二、A 箭頭 1），此種主要出現於 SGS3 菌體上之螢光標示，在距離 *R. solani* AG4 菌絲體纏據點較遠之 SGS3 菌體上則明顯較弱（圖二、A 箭頭 2）；試驗中於沒有添加 ChiF 專一性抗血清（圖二、C）以及未接種處理 SGS3 孢子懸浮液（圖二、E）之兩對照處理組，均未見有類似的螢光標識反應。

另外於標的真菌病原 *P. aphanidermatum* 菌體則發

現，於接種後之反應與 *R. solani* AG4 上所呈現類似，於 *P. aphanidermatum* 菌絲體上，在接種 24 小時後即可發現有大量 SGS3 菌絲纏據之情形（圖三、B，D），然其不同之處，則在於當以 ChiF 專一性抗血清同上進行免疫螢光檢測時，其雖亦可測得有 ChiF 蛋白之表現，然其反應性明顯較微弱，僅有在菌絲纏據較密集部位有微弱的螢光顯現（圖三、A 箭頭指處）；而在未添加 ChiF 專一性抗血清（圖三、C），以及未以 SGS3 孢子懸浮液行接種處理（圖三、E）之對照組，則完全檢測不到有螢光產生。

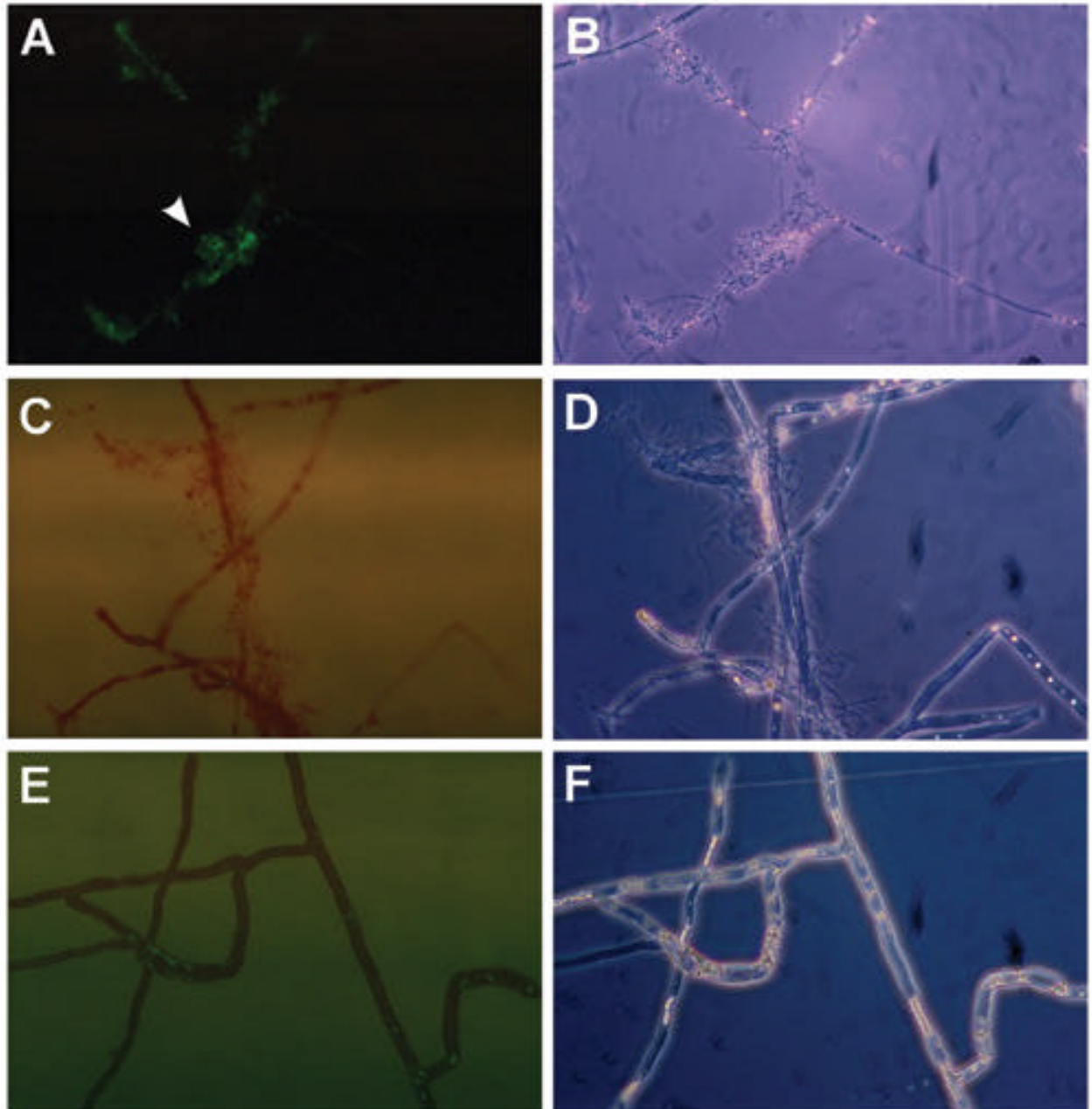
供試標的真菌細胞活性檢測

經以 SGS3 接種處理之 *R. solani* AG4 菌絲體，處理後 24 小時以 FDA 及 PI 兩種染劑進行雙重染色結果，於螢光顯微鏡檢視下，發現當以藍光作為激發光時，幾乎所有纏據於寄主菌絲體上之 SGS3 孢子與菌絲體，均呈現顯示細胞活性良好的綠色螢光（圖四、A 箭頭 1），而相對的被 SGS3 菌絲體纏據的 *R. solani* AG4 菌絲體，則多呈現顯示活性失去的紅色螢光（圖四、A 箭頭 2），另有部分黏附纏據在 *R. solani* AG4 菌絲體上之 SGS3 菌體則呈現紅與綠混合之黃色螢光（圖四、A 箭頭 3）。至於未接種 SGS3 之對照組 *R. solani* 菌絲，則呈現極強之綠色螢光（圖四、C），顯示菌絲活性良好。

同法以 FDA 與 PI 檢測 SGS3 接種對 *P. aphanidermatum* 菌絲體之影響，則發現於 *P. aphanidermatum* 上纏據之 SGS3 菌絲體與上述同樣呈現極強活力的綠色螢光（圖五、A 箭頭 1），而被 SGS3 纏據寄生之 *P. aphanidermatum* 菌絲體則呈現已失去活性的紅色螢光（圖五、A 箭頭 2）。至於未以 SGS3 孢子懸浮液接種處理之 *P. aphanidermatum* 菌絲體，則有些菌絲體呈現具有活力的綠色螢光（圖五、C 箭頭 1），有少數菌絲體則呈現已失去活力的紅色螢光（圖五、C 箭頭 2），另外還有部分菌絲體則呈現黃綠色螢光（圖五、C 箭頭 3）。

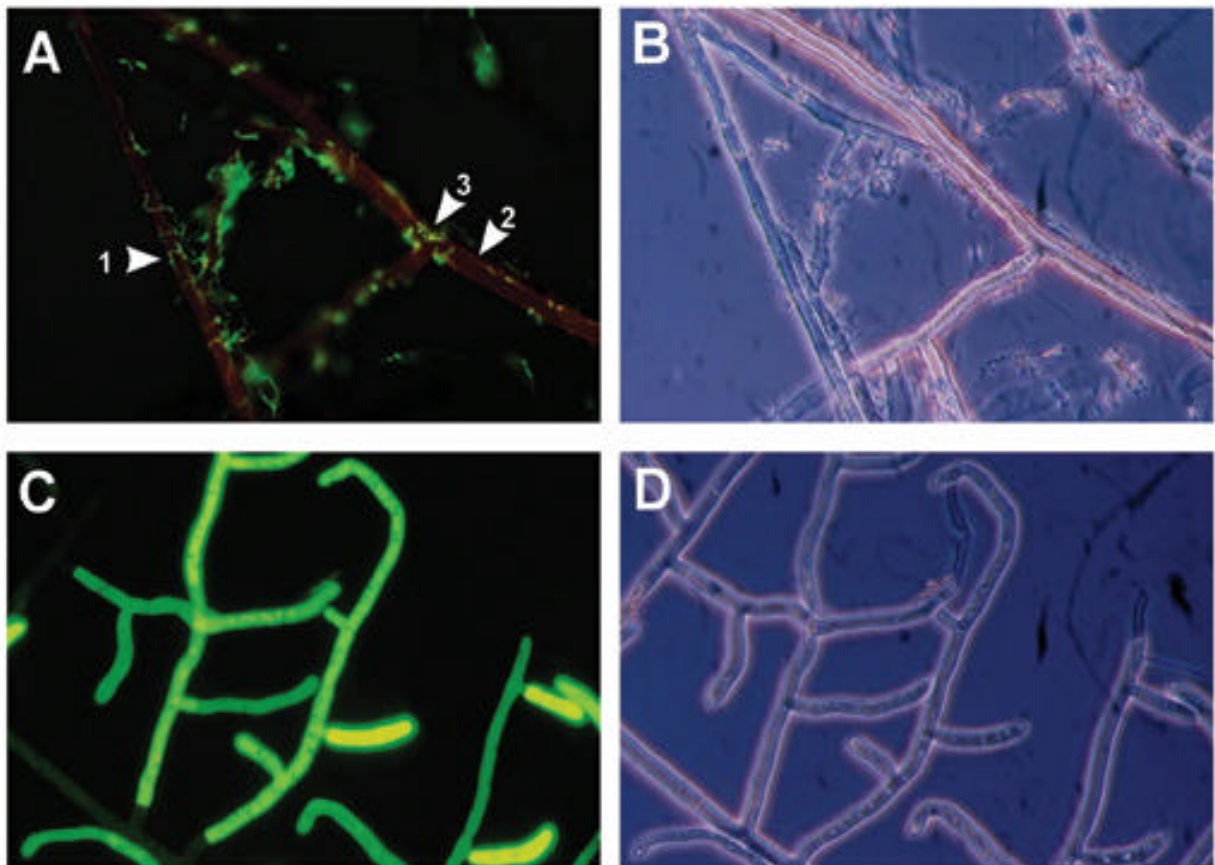
討 論

就鏈黴菌對病原真菌之拮抗性而言，諸多抗生素物質（antibiotics）的參與作用，多年來一直是有關研究人員所熟知的現象，然對於與拮抗性亦攸關重要的超寄生性作用，則雖已見零星之報導，咸只限於現象之描述，而可能有關的分子基礎及應用性，則迄今仍有待瞭解。本研究以 family 19 幾丁質分解酵素專一性抗血清，配合以 FITC 螢光標識，嘗試闡明 ChiF 基因表現與 SGS3 超寄生作用之關係，為鏈黴菌屬細菌於植物



圖三、以免疫螢光顯微檢測技術 (A、C、E) 配合位相差顯微鏡 (B、D、F) , 觀察 SGS3 於 *Pythium aphanidermatum* 菌絲體上纏據過程中幾丁質分解酵素 ChiF 蛋白之產生及參與作用。

Fig. 3. In situ detection by fluorescent microscopy of *ChiF* gene expression of *Streptomyces griseobrunneus* S3 (SGS3) during the course of mycoparasitism on *Pythium aphanidermatum*. Photos presented were taken from samples obtained 24 hours after SGS3 inoculation. The expression of *ChiF* gene was detected by immunostaining with application of an anti-rabbit IgG FITC conjugated *ChiF* specific antiserum as that described in the text. The fluorescent microscopy images A, C and E are presented each respectively with their comparative images revealed by phase contrast microscopy (B, D and F) to illustrate the morphological detail of the mycoparasitism. Photo A shows the detection of green fluorescence only on SGS3 mycelial crowd colonizing on host mycelium. Photo C shows the image of fluorescent microscopy on the same inoculation treatment where that *ChiF* specific antiserum was not applied. Whereas photo E is the compared detection on the control treatment without SGS3 inoculation.



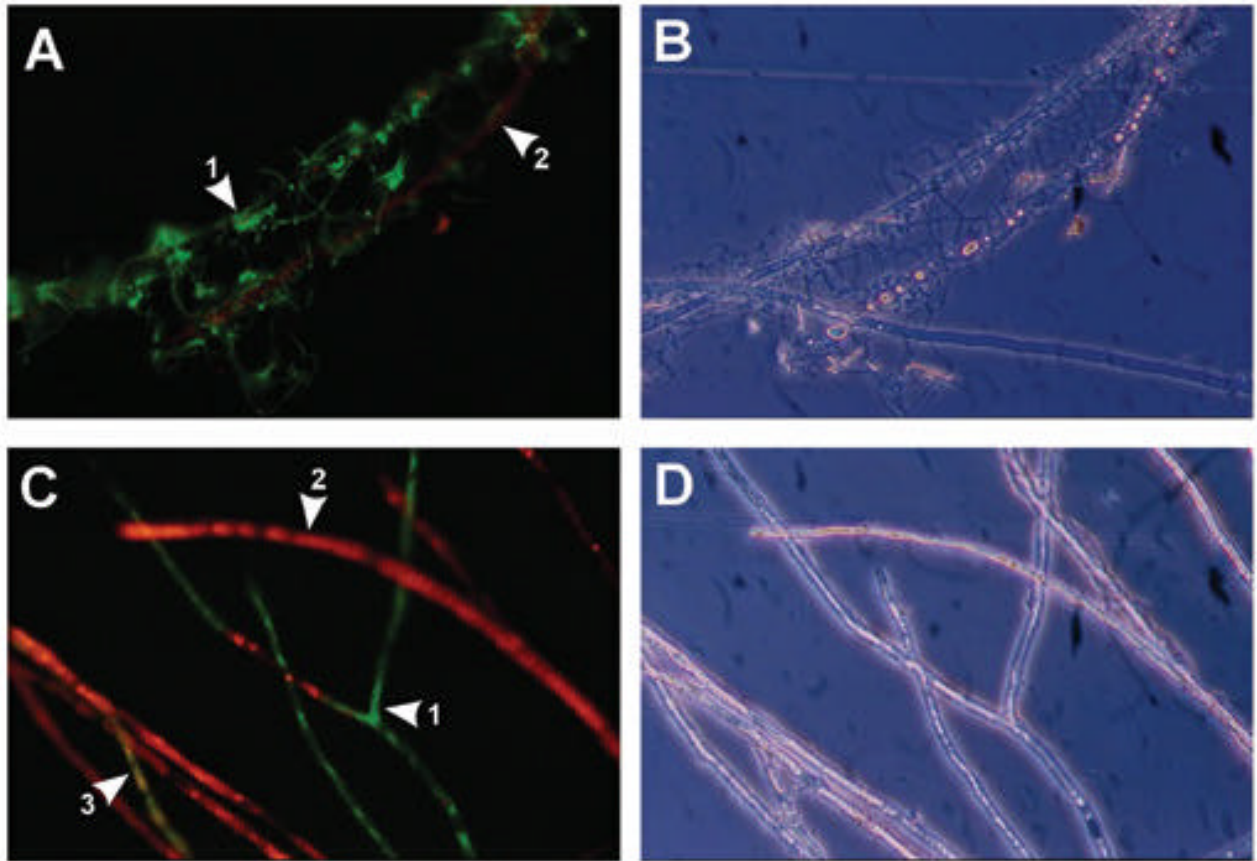
圖四、以 FDA 與 PI 雙重螢光染色技術檢視鏈黴菌 *Streptomyces griseobrunneus* S3 (SGS3) 超寄生作用對 *Rhizoctonia solani* AG4 寄主菌體細胞活力之影響。

Fig. 4. Fluorescent microscopy illustrating the effect of *Streptomyces griseobrunneus* S3 (SGS3) mycoparasitism on the viability of *Rhizoctonia solani* AG4. The fluorescence images A and C are presented with their respective images revealed by phase contrast microscopy (B and D) to show the detail of the morphological effect. Photo A shows the detection of green fluorescence among the invading bacterial propagules in contrasting to the red fluorescence detected among the host fungal mycelium. Photo C shows the detection of the green fluorescence on the control host fungal mycelia without SGS3 inoculation.

病害生物防治應用上，與超寄生性作用機制有關之首度報導。上述結果中，由圖一所示掃描式電子顯微鏡檢視結果明顯可以看出，供試菌 SGS3 於兩標的病原真菌上的超寄生纏據作用，為一相當快速有效率之過程，其在接種後一天內即可完成發芽、侵入、甚至致死之作用（圖一、五與六）。其中由 SGS3 菌絲體主要於兩標的菌絲體上發芽並形成交織之菌絲團（圖一、A, D）顯示，兩寄主菌絲體的存在，對 SGS3 孢子與菌絲體之纏據有明顯的誘導與促進作用。另由 SGS3 菌絲體於寄主菌絲體上形成蝕刻式嵌入或侵入作用（圖一、B、C、E、F 白色箭號所示），則明白顯示為細胞壁分解酵素的參與作用。而於入侵部位有類似真菌吸器狀膨大結構（ALS）之形成則進而顯示，其已有特化侵入構造之趨勢。有關鏈黴菌對真菌之超寄生性，Tu 氏曾先後報告指出，於 *S. albus* 與 *S. griseus* 兩鏈黴菌之超寄生作用中，均可見有此種 ALS 之形成^(35, 36)。唯

值得一提的是，此種 ALS 結構之存在，其與侵入作用看起來並無絕對關係，且其在侵入點上並未如真菌吸器一般在侵入後有皺縮退化之現象，此些特性與 Tu 氏先前報告所見一致。

兩標的病原真菌菌絲體上被纏據侵入部位 ChiF 酵素蛋白的存在（圖二、三），明白顯示於 SGS3 超寄生作用過程中確有 ChiF 基因誘導表現。本研究中所檢測之 SGS3 ChiF 基因，已知其在有幾丁質受質存在時為優先表現 (preferentially expressed) 的酵素之一⁽⁴⁰⁾，且其表現性與其他多醣分解酵素基因同樣受 glucose repression 調控機制之影響⁽³⁹⁾；本試驗中所見 ChiF 於 *R. solani* AG4 菌絲體上之強表現性，相對於在 *P. aphanidermatum* 菌絲體上之弱表現性，顯為受質誘導有關之差異性表現所致。於 *R. solani* AG4 菌絲體細胞壁上，幾丁質組成的存在為高等真菌類共有之特性^(1, 2, 13)，屬於卵菌綱之 *P. aphanidermatum*，其細胞壁組成已



圖五、以 FDA 與 PI 雙重螢光染色技術檢視鏈黴菌 *Streptomyces griseobrunneus* S3(SGS3) 超寄生作用對 *Pythium aphanidermatum* 寄主菌體細胞活力之影響。

Fig. 4. Fluorescent microscopy illustrating the effect of *Streptomyces griseobrunneus* S3 (SGS3) mycoparasitism on the viability of *Pythium aphanidermatum*. The fluorescence images A and C are presented with their respective images revealed by phase contrast microscopy (B and D) to show the detail of the morphological effect. Photo A shows the detection of green fluorescence among the invading bacterial propagules in contrasting to the red fluorescence detected among the host fungal mycelium. Photo C shows the detection of the green fluorescence on the control host fungal mycelia without SGS3 inoculation.

知主要為葡萄聚醣 (glucan)，並不含幾丁質組成，本試驗中所見 SGS3 *ChiF* 於其菌絲體上較弱之差異性表現，顯示應為幾丁質受質缺如之影響。就超寄生性微生物而言，多種水解酵素基因表現之共同調控現象常見諸報導，於木黴菌 *T. hamatum* 對 *S. sclerotiorum* 之超寄生作用過程中，Steyaert 氏等甫近即報導指出，其幾丁質分解酵素 *chit42* 與蛋白質分解酵素 *prb1* 有共同調控表現之現象⁽³³⁾，柯氏以 *S. saraceticus* SS31 為試驗材料亦證實，於果膠、澱粉、纖維素等多醣類物質存在下，其幾丁質分解酵素群基因有明顯被誘導表現之情形⁽¹⁸⁾；本試驗中所見 SGS3 於 *P. aphanidermatum* 菌絲上纏據時 *ChiF* 基因表現微弱，然其寄生性顯然未受影響；由於此菌株已知具產生 -1,3-葡萄聚醣水解酵素 (-1,3-glucanase) 特性⁽²²⁾，是否由於 -1,3-葡萄聚醣水解酵素等其他水解酵素對應基因之共同調控而導致 *ChiF* 基因表現，仍有待進一步瞭解。

鏈黴菌屬具有多種多醣水解酵素為一普被認知之特性，其中尤以幾丁質分解酵素^(17, 23, 24, 29)、-1,3-葡萄聚醣水解酵素⁽¹⁹⁾在對於廣泛病原真菌之拮抗作用中可能扮演的角色最受重視；Fayad 氏⁽¹²⁾曾證實由 *Streptomyces* spp. EF-14 菌株培養液中分離純化之 -1,6-葡萄聚醣水解酵素，可有效分解 *Phytophthora* spp. 細胞壁上之 -1,6-葡萄聚醣，且此一分解作用顯然有利於 -1,3-葡萄聚醣水解酵素之參與，並加速對 *Phytophthora* spp. 細胞壁之破壞作用；此顯示鏈黴菌屬之拮抗作用，應為多種水解酵素共同，而非單一酵素單獨之作用。此種多種酵素協力作用所參與之超寄生性，在自然界中為一普遍存在之現象；於真菌之超寄生作用中，以 *T. hazianum* 為例，其於 *Sclerotium rolfsii* 之超寄生作用中，已知即有幾丁質分解酵素與 -1,3-葡萄聚醣水解酵素之共同參與，並可導致 *S. rolfsii* 細胞壁之快速分解及細胞之崩解⁽⁴⁾。本試驗中由 SGS3 於

細胞壁組成迥然不同的 *R. solani* AG4 與 *P. aphanidermatum* 菌絲上的快速有效超寄生纏據特性亦明白指出，其應為多種水解酵素共同參與作用之結果。

寄主微生物細胞的致死作用為超寄生現象中最常見的反應結果，在常見諸報導的 *Trichoderma* 屬與 *Gliocladium* 屬於病原真菌的超寄生作用中，細胞之致死作用已知為多種水解酵素分解細胞壁所造成之細胞崩解，以及特定抗生物質存在的毒害作用所共同造成⁽³²⁾，鏈黴菌屬成員已知為產生抗生物質種類最多的細菌，其所產生多種抗生物質^(14, 25, 26, 27)與多醣水解酵素^(12, 17, 19, 23, 24, 29)，已一再被證實為與其拮抗作用攸關之特性，而其共同作用結果與寄主細胞死亡之造成，其因果關係應無庸置疑。本研究中，包括 ChiF 在內細胞壁分解酵素於超寄生作用中之重要性，證據已相當明確；而就對寄主細胞之致死作用而言，由 FDA 與 PI 雙重染色檢測之試驗結果（圖五、六）可以看出，在接種後 24 小時之內，寄主細胞上未見有明顯崩解現象之時，致死作用已經普遍存在，此是否顯示為 SGS3 超寄生纏據過程中所產生特定抗生物質共同參與毒害細胞所致，仍有待進一步試驗證實。

謝 辭

本研究工作承蒙行政院農委會中美合作計畫（計畫編號 94 中美-1.4-合-01）經費資助，特此致謝。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

- Bartnicki-Garcia, S. 1966. Chemistry of hyphal walls of *Phytophthora*. *J. Gen. Microbiol.* 42:57-69.
- Bartnicki-Garcia, S. 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 22:87-108.
- Beever, R. E., and Bollard, E. G. 1970. The nature of the stimulation of fungal growth by potato extract. *J. Gen. Microbiol.* 60:273-279.
- Benhamou, N., and Chet, I. 1996. Parasitism of Sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of interaction. *Phytopathology* 86:405-416.
- Boyde, A., and Wood, C. 1969. Preparation of animal tissue for surface-scanning electron microscopy. *J. Micros.* 90:221-249.
- Chamberlain, K., and Crawford, D. L. 1999. In vitro and In vivo antagonism of pathogenic turf grass fungi by *Streptomyces hygroscopicus* strains YCED9 and WYE53. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23:641-646.
- De la Cruz, J., Hidalgo-Gallego, A., Lora, J. M., Benitez, T., Pintor-Toro, J. A., and Llobell, A. 1992. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *Eur. J. Biochem.* 206:856-867.
- De la Cruz, J., Pintor-Toro, J. A., Benitez, T., and Llobell, A. 1995. Purification and characterization of an endo- α -1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. *J. Bacteriol.* 177:1864-1871.
- De la Cruz, J., Pintor-Toro, J. A., Benitez, T., Llobell, A., and Romero, L. C. 1995. A novel endo- α -1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *J. Bacteriol.* 177:6937-6945.
- El-Abyad, M. S., El-Sayed, M. A., El-Shanshoury, A. R., and El-Batanouny, N. H. 1993. Inhibitory effects of UV mutants of *Streptomyces corchorusii* and *Streptomyces spiroverticillatus* on bean and banana wilt pathogen. *Can. J. Bot.* 71:1080-1086.
- Elad, Y., Chet, I., and Henis, Y. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.* 28:719-725.
- Fayad, K. P., Simao-Beaunoir, A. -M., Gauthier, A., Leclerc, C., Mamady, H., Beaulieu, C., and Brzezinski, R. 2001. Purification and properties of a α -1,6-glucanase from *Streptomyces* sp. EF-14, an actinomycete antagonistic to *Phytophthora* spp. *Appl. Microbiol. Biot.* 57:117-123.
- Griffin, D. H. 1994. Chemistry of the fungal cell. Pages 23-26 in: *Fungal Physiology*. 2nd edition. Wiley-Liss. New York. 23-62pp.
- Hwang, B. C., Ahn, S. J., and Moon, S. S. 1994. Production, purification, and antifungal activity of antibiotic nucleoside, tubercidin, produced by *Streptomyces violaceusniger*. *Can. J. Bot.* 72: 973-978.
- Jones, C. R., and Samac, D. A. 1996. Biological control of fungi causing alfalfa seedling damping-off with a disease-suppressive strain of *Streptomyces*. *Biol. Control.* 7:196-204.
- Jones, K. H., and Senet, J. A. 1985. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J. Histochem. Cytochem.* 33:77-79.
- Kawase, T., Kanai, R., Ohno, T., Tanabe, T., Nikaidou, N., Miyashita, K., Mitutomi, M., and Watanabe, T. 2001. Identification of three family 18 chitinase genes of *Streptomyces griseus* HUT6037. *Chitin Chitosan Res.* 7:241-251.
- Ko, H. -C. 2000. Effect of nutrient supplement on antibiotic and chitinase production by *Streptomyces saraceticus* SS31. M. S. Thesis. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University. 90pp. (in

- Chinese with English abstract)
19. Kusama, S., Kusakabe, I., and Murakami, K. 1986. Purification and some properties of beta-1,3-glucanase from *Streptomyces* sp. Agr. Biol. Chem. 50:1101-1106.
 20. Lahdenpera, M.L. 1987. The control of *Fusarium* wilt on carnation with a *Streptomyces* preparation. Acta Horticulture. 216:85-92.
 21. Lai, W. -R. 2003. Development of *Streptomyces griseobrunneus* S3 as a bioagent for the control of plant fungal disease. M. S. Thesis. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University. 114pp. (in Chinese with English abstract)
 22. Lai, W. R., and Tzeng, D. D. S. 2002. Development of *Streptomyces griseobrunneus* S3 as a bioagent for the control of plant fungal diseases. Plant Pathol. Bull. 11:246-247. (Abstr.)
 23. Miyashita, K., and Fujii, T. 1993. Nucleotide sequence and analysis of a gene (*chiA*) for a chitinase from *Streptomyces lividans* 66. Biosci. Biotechnol. Biochem. 57:1691-1698.
 24. Ohno, T., Armand, S., Hata, T., Nikaidou, N., Henrissat, B., Mitsutomi, M., and Watanabe, T. 1996. A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037. J. Bacteriol. 178:5065-5070.
 25. Qin, Z., Peng, K., Zhou, X., Liang, R., Zhou, Q., Chen, H., Hopwood, D. A., Kieser, T., and Deng, Z. 1994. Development of a gene cloning system for *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *yingchengensis*, a producer of three useful antifungal compounds, by elimination of three barriers to DNA transfer. J. Bacteriol. 176:2090-2095.
 26. Raatikainen, O. J., Paivinen, T. H., and Tahvonen, R. T. 1994. HPLC separation and subsequent detection of aromatic hepaene polyenes in peat after treatment with *Streptomyces griseoviridis*. Pestic. Sci. 41:149-154.
 27. Rothrock, C. S., and Gottlieb, D. 1984. Role of antibiosis in antagonism of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* to *Rhizoctonia solani* in soil. Can. J. Microbiol. 30:1440-1447.
 28. Sabaratnam, S., and Traquair, J. A. 2002. Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. Biol. Control. 23:285-295.
 29. Saito, A., Ishizaka, M., Francisco, P.B., Jr., Fujii, T., and Miyashita, K. 2000. Transcriptional co-regulation of five chitinase genes scattered on the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. Microbiology 146:2937-2946.
 30. Singh, P.P. 1999. Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. Phytopathology 89:92-99.
 31. Sivan, A., and Chet, I. 1989. Degradation of fungal cell wall by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. J. Gen. Microbiol. 135:675-682.
 32. Sivasithamparam, K., and Ghisalberti, E. L. 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: *Trichoderma* and *Gliocladium*. Basic biology, taxonomy and genetics. Vol. 1. Kubicek, C.P., and Harman, G.. E. Taylor and Francis. London. 139-191pp.
 33. Steyaert, J. M., Stewart, A., Jaspers, M. V., Carpenter, M., Ridgway, H. J. 2004. Co-expression of two genes, a chitinase (*chit42*) and proteinase (*prb1*), implicated in mycoparasitism by *Trichoderma hamatum*. Mycologia 96:1245-1252.
 34. Trejo-Estrada, S. R., Sepulveda, I. R., and Crawford, D. L. 1998. *In vitro* and *in vivo* antagonism of *Streptomyces violaceusniger* YCED9 against fungal pathogens of turfgrass. World J. Microbiol. Biotechnol. 14:865-872.
 35. Tu, J. C. 1986. Hyperparasitism of *Streptomyces albus* on a destructive mycoparasite *Nectria inventa*. J. Phytopathol. 117:71-76.
 36. Tu, J. C. 1988. Antibiosis of *Streptomyces griseus* against *Colletotrichum lindemuthianum*. J. Phytopathol. 121: 97-102.
 37. Tzeng, D. D. S., Huang, J. W., and Tzeng, K. C. 2001. Development of antagonistic bacteria as biofungicide for the control of plant disease. Pages 107-126 in: Proceedings of International Symposium on Biological Control of Plant Diseases for the New Century - Mode of Action and Application Technology. D. D. S. Tzeng and J. W. Huang (eds). Taichung, Taiwan: National Chung Hsing University.
 38. Xiao, K., Kinkel, L.L., and Samac, D.A. 2002. Biological control of *Phytophthora* root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. Biol. Control. 23:285-295.
 39. Yang, S. S., Lee, M. H., and Tzeng, D. D. S. 2005. Cloning of full length sequence of a family 19 chitinase gene *ChiF* from *Streptomyces griseobrunneus* S3 and the molecular characterization of the recombinant protein. Plant Pathol. Bull. 14:133-146.
 40. Yang, S.-S., Ko, H.-C., and Tzeng, D. D.-S. 2005. Molecular cloning and characterization of chitinase gene *ChiF* from *Streptomyces griseobrunneus* S3. Can. J. Microbiol. (Submitted)
 41. Yuan, W. M., and Crawford, D. L. 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rot. Appl. Environ. Microbiol. 61:3119-3128.

ABSTRACT

Yang, S. S.¹, Chen, T. Y.¹, and Tzeng, D. S.^{1,3} 2005. The role of *ChiF* gene expression in relating to mycoparasitism of *Streptomyces griseobrunneus* S3 on *Rhizoctonia solani* AG4 and *Pythium aphanidermatum*. Plant Pathol. Bull. 14:147-158. (¹Department of Plant Pathology, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan; ²Corresponding author, Email: dstzeng@nchu.edu.tw; Fax: +886-4-22851038)

The explicit role of ChiF, a member of family 19 chitinase, in mycoparasitism of *Streptomyces griseobrunneus* S3 (SGS3) was explored using *Rhizoctonia solani* AG4 and *Pythium aphanidermatum* as targeted fungi. Upon artificial inoculation on an agar plate system, the bacterial spores appeared to germinate readily on the mycelium of both host fungi and develop well into mycelial mass on the colonized part within 24 hours. The examination by scanning electron microscopy revealed that the bacterial mycelia grew on, and in some cases penetrated the host mycelium. The mycoparasitic effect was manifested by the development of etching lesions indicating the involvement of cell wall degrading enzymes. Also worth noting was the formation of an appressorium like structure (ALS) on host mycelium, although its role in the mycelial penetration remained to be determined. The involvement of *ChiF* in the observed mycoparasitism was well illustrated by an immuno-fluorescent microscopy where that SGS3-ChiF specific polyclonal antibody was applied. The fluorescent signal indicating the expression of *ChiF* gene was detected along the contact interface of SGS3 on the host mycelium. The detected signal was strong especially among those colonizing on *R. solani*; the fluorescence detected from that on *P. aphanidermatum* was comparatively low. The differential response observed implicated a preferential expression of the gene on the fungal cell wall with chitin as a major constituent. The low expression detected on the non-chitin cell wall of *P. aphanidermatum* further implicated the functioning of co-regulation of cohorts of cell wall degrading enzymes in the applied mycoparasite. By double staining of fluorescent diacetate and propidium iodide, it was shown further a complication of antibiotic in the observed mycoparasitism since the colonized cells of both targeted fungi lost their viability before the dismantling effect of the bacteria-secreted cell wall degrading enzymes became apparent. This is a first report of in situ detection of family 19 chitinase gene expression illustrating the involvement of *ChiF* chitinase in *Streptomyces* mycoparasitism.

Key words: *Streptomyces griseobrunneus* S3, mycoparasitism, ChiF protein, chitinase, scanning electron microscopy (SEM), immuno-fluorescent staining, viability staining