Aspergillus terreus Yua-6 菌株對草莓灰黴病菌與木瓜炭疽菌病之拮抗能力分析

曾敏華[1]　王昇陽[2]　余聰安[3] 彭瑞菊[4]劉興隆[5]江主惠[6*]
[1, 3, 6]大葉大學分子生物科技學系（彰化縣大村鄉學府路 168 號）
[2]中興大學森林學系（台中市南區國光路 250 號）
[4]行政院農委會台南改良場（台南市新化區牧場 70 號）
[5]行政院農委會台中改良場（彰化縣大村鄉田洋村松槐路 370 號）
[*]聯絡人電子郵件: chchiang@mail.dyu.edu.tw

植物的根圈存在許多能和植物相互作用的微生物，其中有些能幫助植物對抗病原菌。本實驗從田間土壤分離微生物，並以對峙培養與玻璃紙抗生法篩選出對草莓灰黴菌(*Botrytis cinerea*)及木瓜炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*) 有拮抗能力之菌株，其中Yua-6菌株對此兩種病原真菌具最佳拮抗能力。利用適當引子對及聚合酶連鎖反應，可擴增出Yua-6菌株之DNA片段約1.6 kb，經由DNA選殖、核苷酸解序及進行NCBI基因庫序列比對，得知Yua-6菌株和土麴菌(*Aspergillus terreus*) 在此1.6 kb的序列上有100% 的相同度。於馬鈴薯萃出液培養基培養6天的Yua-6發酵濾液經冷凍乾燥後發現含1 mg/ml 及5 mg/ml 的Yua-6冷凍乾燥液成分對木瓜炭疽病分別有19.29%及70.63%之抑制率，對草莓灰黴菌則分別具4.93%及51.73%抑制率。另外，當噴灑10倍稀釋之Yua-6菌株發酵液到已接種木瓜炭疽菌病孢子懸浮液(濃度4×10^5/ml)之成熟木瓜果實時，亦具有明顯保護效果。以Yua-6菌株發酵液之液相－液相萃取後得到乙酸乙酯層，於2 mg/ml 濃度時對木瓜炭疽病具81.92% 抑制率，對草莓灰黴菌則具54.11 %抑制率。此乙酸乙酯層再經矽膠管柱層析分離，當中以正己烷:乙酸乙酯＝55%:45%所得之沖堤液，調製成300 µg /ml濃度時，對木瓜炭疽病有抑制效果。 將此充堤液再以高壓液相層析儀分析，在滯留時間5分鐘時所收集之化合物，為具較佳抗菌效果之活性成分。

關鍵字: 拮抗菌，草莓灰黴菌，木瓜炭疽病菌，土麴菌

前言

台灣草莓栽培主要在苗栗縣，栽培面積約 500 公頃，其中以大湖鄉栽培面積最大，約 370 公頃，約佔全縣 75%，其次為獅潭、卓蘭、公館等地區，全台其他地區也有零星栽培(彭淑貞 et al., 2008)。草莓育苗期於五月初至九月底，均採健康苗或走莖苗育苗。目前草莓病害以灰黴病、果腐病、白粉病及炭疽病最為嚴重，另有葉芽線蟲危害。草莓灰黴病是由草莓灰黴菌(*Botrytis cinerea*)所感染，當草莓在開花及收穫期時，遇到適合病害發生的溫度與溼度即可造成病害，使損失達 50 %以上(Jarvis, 1962)。田間花的部位的潛伏感染(latent infection)認為是造成生長後期成熟果實腐爛的原因(Powelson, 1960; Jarvis, 1962, 1964; Jarvis and Borecka, 1968; Jarvis, 1969; Jordan, 1978)。病原菌感染幼葉時，不易觀察到病徵，待葉片衰老時，菌絲快速生長且迅速產生孢子，從被感染的葉子和花產生的分生孢子可成為初次接種源(primary inoculums)，用來傳播病害及感染果實(Braun and Sutton, 1988)。灰黴病其腐生能力極強且寄主範圍泛，除草莓外，多種蔬菜、水果、花卉等作物均會受到感染，除了可寄生在生長中的作物外，亦能存活在植物殘株上，在適當的環境中可形成大量的分生孢子，並藉由空氣與雨水傳播。灰黴病最易發生在低溫多濕季節，發病主要與雨量之多寡有關，於 12 月至 2-3 月間，遇下雨時較易發生，若下雨連綿，則發病嚴重，可危害葉片、莖、花器、幼果及成熟果，因此降雨日數增加，灰黴病發生率顯著提高。

番木瓜(*Carica papaya* L.)為臺灣重要熱帶果樹，產區主要分佈於台灣中南部，包括屏東、高雄、台南、嘉義、雲林及南投等地區，民國99年台灣木瓜種植面積為3294公頃，年產量約13萬公噸(行政院農委會農業統計年報, 2010)，木瓜植株可被有許多病害威脅，其中木瓜炭疽病為木瓜重要病害之一。木瓜炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)主要為害葉柄、果梗、果實及幼果，但以成熟果實上之病徵最為嚴重，造成之損失亦最大。初期在果實表面產生多數突起之圓形小病斑，病斑中央略凹陷，病斑四周並可見白色木瓜乳汁溢出，之後病斑逐漸擴大，病斑亦漸凹陷而呈水浸狀，多數病斑可互相癒合而成不規則形狀，嚴重時病斑處破裂，遇高濕度時可溢出粉紅色之黏狀物，為病原菌之分生胞子堆，病斑下之果肉，有菌絲生長，罹病嚴重之果實會整個腐爛，葉柄會產生褐色病斑，而提前乾枯下垂，病斑處著生分生胞子堆。在夏威夷和許多熱帶國家木瓜炭疽病是最重要的採後所發生的病害(Paull et al., 1997)，控制此病害通常使用熱水處理及化學殺菌劑(Couey et al., 1984)，但使用熱處理會導致衰老速度加快，而使用化學殺菌劑處理易造成損傷，影響採收後木瓜果實品質(Lay-Yee et al., 1998)。

植物病害是造成農作物生產減少的大問題，因此農民經常使用化學農藥來防治植物病害，然而在不當或長期使用下經常衍生抗藥性和環境污染等問題。近年來，由於對食品安全及環境保育意識的提高，為了達到永續經營的目標，在植物病害防治上已逐漸利用生物防治策略替代化學農藥的使用，根據美國生物防治學家巴哈(DeBach)的定義，生物防治是利用自然界中捕食性、寄生性及病原性的天敵，把有害生物的族群壓制在較低的密度下，使其不致造成危害。因此生物防治可大量減少化學農藥之使用與降低對環境的污染，其中的方法之一就是利用拮抗微生物(包含真菌、細菌、病毒和線蟲)來降低植物病害(Pal and McSpadden Gardener, 2006)，因此拮抗微生物之篩選與其作用機制之探討，對於開發生物製劑以應用於植物病害防治是很重要的一步。

土壤根圈中的有許多微生物，有些微生物能和植物互相作用，進而幫助植物對抗病原菌。而微生物之所以能有效用於植物病害防治，其可能作用機制包括: 利用營養競爭方式直接或間接造成病原菌營養缺乏、抗生素的產生、超寄生或捕食病原菌(Bowers et al., 1996; Neeno-Eckwall et al., 2001; Schottel et al., 2001)、產生細胞壁分解酵素直接分解病原菌細胞壁及誘導植物產生抗病性等皆可直接或間接抑制病原菌(Alstrom, 1991)。

常用於防治植物病害的拮抗微生物為絲狀不完全真菌綱(Deuteromycetes)木黴菌屬(*Trichoderma* spp.)之真菌，可在腐質土壤中發現是一種能夠抑制植物土壤傳播病源菌普遍存在的真菌，其廣泛分佈於土壤、空氣、枯枝落葉及各種發酵物上，從植物根圈、葉片及種子、球莖表面經常可以分離到。有許多種類的木黴菌可作為植物病害防治菌，用來抑制植物病原菌的產生(Chet et al., 1997)。木黴菌最早是用來防治立絲枯核病菌(*Rhizoctonia solani*)所引起的病害(Trillas et al., 2006)，其之所以可做為生物防治菌是因為繁殖容易、對環境耐受性高、對許多植物病原真菌生長有極佳之拮抗性、可促進植物生長及誘導植物抗性等特性(Schisler et al., 2004)。利用木黴菌來防治的病害已有許多報告，包括鐮胞菌(*Fusarium oxysporum*)引起的萎凋、根腐病(Rojo et al., 2007)，立絲枯核病菌引起的莖腐病(Bertagnolli et al., 1998)，腐黴菌(*Pythium* spp.)引起的猝倒病和根腐病(Ahmed et al., 1999)，其他如白絹病、菌核病、十字花科作物根瘤

病、作物根瘤線蟲病、灰黴病及炭疽病等，因此木黴菌是目前生產與應用最普遍的生物防治的真菌菌種。

此外，枯草桿菌(*Bacillus* spp.)也是常用的拮抗微生物，細菌本身會與病原菌競爭根系中的營養成分，進而成為優勢菌種，降低病原菌的危害；加上可以產生內生孢子，在逆境中容易存活；且在產生孢子過程中，可產生對病原菌有抑制作用的抗生物質(Schisler et al., 2004)。另外，放線菌(*Streptomyces* spp.)在自然界中也廣泛存在，分佈於土壤中以腐生方式生存，屬於好氣性之革蘭氏陽性菌，因其型態類似真菌，可產生細長分支的菌絲亦具有無性生殖孢子，可單獨長於菌絲上或串生，另一特徵為可產生許多胞外分泌酵素、抗生物質，放線菌不具核仁和核膜，屬於原核生物，因其對於抑制細菌的抗生素敏感，所以將其歸類於細菌(Fourati-Ben Fguira et al., 2005)。土壤中的放線菌以鏈黴菌為主，其佔放線菌種類中將近九成，對多種植物病原菌具拮抗作用，有的自植物根圈分離到的菌株可促進植物生長。鏈黴菌可以產生多種二次代謝物，包括分解酵素及抗生物質，例如許多重要的抗生素如放線菌素、鏈黴素、四環黴素等，都可由鏈黴菌產生。這些代謝產物可用在人體的醫藥以及家畜飼料的添加物，此外，在農作物生產方面，也可做為植物保護之用。而利用鏈黴菌防治的植物病害，包括番茄萎凋病(El-Abyad et al., 1996)、番茄立枯病(Sabaratnam and Traquair, 2002)、豌豆苗根腐病(Yuan and Crawford, 1995)等。螢光假單胞細菌(*Fluorescent Pseudomonads*) 又名螢光菌，為革蘭氏陰性之桿狀菌，廣泛存在於自然界之中，之所以為螢光菌是因為當其存在於缺鐵的環境中，菌體會生成載鐵物質（siderophore）之螢光色素。螢光假單胞菌可群集於植物根部，為促進植物生長之根棲細菌（plant growth-promoting rhizobacteria，簡稱PGPR），主要以螢光假單胞菌中的*Pseudomonas fluorescens*及*Pseudomonas putida*為主。此外，螢光假單胞菌亦常應用於防治軟腐細菌、青枯病、十字花科黑腐病、鐮胞菌、腐黴菌及立枯絲核菌(Haas and Défago, 2005)等。這些微生物可防治多種植物病害，也可促進植物生長。

草莓灰黴病害可利用微生物進行防治，所使用的生物防治劑包括枯草桿菌(*Bacillus licheniformis*)N1 (Kim et al., 2007)、木黴菌(*Trichoderma harzianum*) T-39 (Elad et al., 2004)等。Vagelas等學者利用橄欖油工廠廢水，經消毒過濾後添加於PDA培養基上，進行草莓灰黴菌絲之體外抑制試驗並測試此過濾液對甜椒與草莓果實病害之抑制效果，結果發現具有抑制草莓灰黴菌絲生長之效果，推測其可能是橄欖油工廠廢水中含多酚化合物(phenolic compound) 所致(Vagelas et al., 2009)。木瓜炭疽病也可利用綜合防治的方法進行病害的防治，以洋蔥假單胞菌(*Burkholderia cepacia*)菌株B23與0.75% 甲殼素(chitosan) 和3% 氯化鈣(calcium chloride，$CaCl_2$)混合使用時，比單獨使用洋蔥假單胞菌(*B. cepacia*)菌株B23，可達到更佳抑制木瓜果實炭疽病之效果(Rahman et al., 2007; Rahman et al., 2009)，另外，MGP1是一種生物防治劑，是從木瓜果皮篩選到的戀臭假單胞菌株(*Pseudomonas putida* biovar A.)，亦具有抑制木瓜炭疽病之效果(Shi et al., 2010)。

土麴菌(*Aspergillus terreus*)在分類上屬於真菌界、不完全菌門之線菌綱(Hyphomycetes)、線菌目(Moniliales)、線菌科(Moniliaceae)，土麴菌可以產生多種二次代謝物，包括aspulvinone(Takahashi et al., 1978)、asterric acid(Curtis et al., 1960)、asterriquinone(Kaji et al., 1994)、butyrolactone I (Nitta et al., 1983)、citrinin(Sankawa et al., 1983)、emodin(Chen et al., 1992)、geodin(Nitta et al., 1977)、itaconate(Bonnarme et al., 1995)、lovastatin(Alberts et al., 1980; Greenspan and Yudkovitz, 1985)、questrin (Curtis et al., 1960)、sulochrin(Vinci et al., 1991)及terrecyclic acid(Nakagawa et al., 1982)。其中Hajja等學者從*A. terreus*之發酵液中分離出二次代謝產物lovastatin為降血脂劑的原料，因此成為工業生產用的菌種，其在液態發酵過程中，真菌之增長形態主要以菌絲纏(mycelium growth)或形成菌絲顆粒(pellet- formation)方式存在(Hajjaj et al., 2001)。另外利用*A. terreus*進行吸附廢水中的重金屬離子之實驗，顯示*A. terreus*對鎳（Ni^{2+}）、鉻（Cr^{3+}）和鉛（Pb^{2+}）具吸附能力，且其吸附量以對數期菌體對Ni^{2+}、Cr^{3+}的吸附能力最佳，而靜止期菌體對Pb^{2+}吸附最佳，且吸附時間達 6 小時後，吸附量逐漸趨於平衡(Dias et al., 2002)。*A. terreus*目前尚未有用於微生物防治的相關報告，但Melo等人發現*A. terreus*可寄生於植物的菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)內造成菌核病菌破裂死亡達到抑制效果(Melo et al., 2006)，*A. terreus*對其他植物病原菌是否也有抑制效果，值得進一步探討。

本實驗之目的為自土壤中分離出對草莓灰黴菌及木瓜炭疽病菌具有拮抗能力之菌種，並分析及鑑定其有效的拮抗成分將來可開發為微生物製劑，降低病害發生及農民採收後之損失。實驗首先從土壤中篩選出對草莓灰黴菌(*Botrytis cinerea*)及木瓜炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)具拮抗性之菌株並測試菌株之最佳培養時間，再將培養液經冷凍乾燥後，以含培養成分 1 mg/ml及 5 mg/ml之PDA培養基進行抑菌實驗，此外，也進行成熟及未成熟木瓜果實

炭疽病的保護試驗。最後利用乙酸乙酯(Ethyl acetate)進行拮抗菌液的液相萃取及利用HPLC分離並進行菌株發酵液生物活性，所得之抑制物質再進行^{1}H-NMR以得知其有效成分之結構。

材料與方法

植物根圈土壤微生物之分離

採集田間植物根圈土壤，土樣經自然風乾2-3天後，利用篩網(80目孔篩)去除石礫和雜草，取1 g土壤加入含9 ml 0.85 %生理食鹽水之離心管中，充分震盪混合，待其沉澱後取出上清液，再以0.85 %生理食鹽水進行10倍序列稀釋10^{-1}-10^{-6}，最後分別取0.1 ml 10^{-4}-10^{-6} 濃度的稀釋液均勻塗抹於含streptomycin 100 μg/ml濃度的PDA (Potato dextrose agar)選擇性培養基，用來分離真菌；和Tryptone yeast extract agar (10 g Casein、5 g Yeast extract、4.4 g K_2HPO_4、2 g Glucose、2 g NaCl, pH7.2)之培養基，用來分離其他菌株。於28 ℃培養箱培養7-14天後，各挑取單一菌落於PDA平板上進行單離及菌株編號，單獨分離後之菌株刮取菌塊置於50 %甘油中並保存於 -70℃。

土壤微生物拮抗能力之分析

於PDA平板上以對峙培養方法篩選對植物病原真菌，(包含草莓灰黴菌及木瓜炭疽病菌)具拮抗性之土壤分離菌株，再以玻璃紙抗生法進行確認。玻璃紙抗生法操作如下:首先以直徑5 mm打孔器切取土壤分離菌菌絲邊緣菌塊(土壤分離菌先於28℃培養5-7天後，才使用)，移至貼有滅菌過玻璃紙之PDA平板中心點位置，於28℃培養箱培養3天後，將玻璃紙連同土壤分離菌一併移除，再以直徑5 mm打孔器切取草莓灰黴菌及木瓜炭疽病菌，移至於前述PDA平板之中心點上，於28 ℃培養箱培養，觀察並記錄病原菌生長情形，待對照組的菌絲長滿整個培養基則停止培養。對照組為不加任何土壤分離菌的PDA平板，分別接種至草莓灰黴菌及木瓜炭疽病菌。

土壤分離菌之菌種鑑定

本實驗室與員林高中合作，有篩選到一些具拮抗能力之菌株，因此之後則以其中一株菌Yua-6進行相關實驗。將Yua-6菌株總核酸以Plant Genomic DNA Purification kit萃取出來，並以對應核糖體核酸之引子進行聚合酶連鎖反應，PCR反應條件如下: (1) 95 ℃，5分鐘；(2) 95 ℃，1分鐘；(3) 50 ℃，2分鐘；(4) 72 ℃，3分鐘；(5)第(2)步驟到第(4)步驟重複30個循環；(6) 72℃，7分鐘。可擴增約400 bp之DNA片段。進行解序後，再由NCBI中找到序列相似程度較高的菌種，將這些菌種的序列進行比對後再設計引子進行聚合酶連鎖反應，所設計之兩條引子分別為5' Yua-6(實驗室引子編號:378) 5'-CRAAGAARCGMCAGAAGAAGAT-3'及3' Yua-6(實驗室引子編號: 379)5'-CCDGTRTGYTGACTGCTGTC-3'，可擴增約1600 bp之DNA片段。

Yua-6菌株DNA片段構築至TA載體及質體轉型作用

將Yua-6菌株DNA片段利用Micro-Elute DNA Clean Extraction (捷恩麥克公司)進行純化，最後可以得到約20 μl的回收DNA 溶液。由於所使用*Taq* DNA polymerase XL(5 unit/μl)除了具有校正功能的DNA聚合酵素之外，還含有*Taq*聚合酶，因此經PCR放大的DNA 3'端可能會多一個核苷酸A，因此可直接與TA載體進行黏合(yT&A，益生生技開發股份有限公司)。轉型作用以熱休克(heat shock)的方式進行，將10 μl已進行黏合反應後的質體DNA和200 μl勝任細胞於微量離心管中均勻混合後，置於冰上30分鐘，再放入42 ℃水浴鍋中，靜置2分鐘，再放置到冰上10分鐘後，將其加入1 ml的LB，於37 ℃/150 rpm震盪培養1個小時後，均勻塗在含有抗生素Ampicillin (100 μg/ml)的固態平板培養基中，置於37 ℃培養14-16小時。

Yua-6菌株冷凍乾燥菌液之抑菌活性測試

將Yua-6菌株培養6天後之菌液以濾紙過濾後，再將過濾液進行冷凍乾燥並秤重定量，並利用dimethyl sulfoxide(DMSO)與水溶解冷凍乾燥粉末，調配成1 mg/ml (0.05g冷凍乾燥粉末以0.1 ml 100%DMSO及1ml 無菌水溶解)及5 mg/ml (0.25 g 冷凍乾燥粉末以0.1 ml 100%DMSO及1ml無菌水溶解)，之後添加至滅過菌後的PDA培養基中，使DMSO最終濃度為0.2 %，對照組為PDA培養基含0.2 % DMSO。培養基於無菌操作臺吹乾後，將直徑5 mm之草莓灰黴菌及木瓜炭疽病菌絲菌塊移入，於28 ℃培養箱培養，待對照組長滿則停止培養。觀察草莓灰黴菌及木瓜炭疽病

菌絲生長之抑制情形。

木瓜果實炭疽病的防治試驗

首先準備病菌接種源:以5 ml含0.01 % Tween-20之無菌水加入含木瓜炭疽病菌孢子的PDA培養基上，震盪懸浮1小後以微量吸管吸取液體至離心管，再以細胞計數器計算木瓜炭疽病菌孢子懸浮液濃度。另外將成熟與未成熟木瓜果實進行表面消毒，先將木瓜浸在75%酒精5分鐘後再放入無菌水中5分鐘，晾乾10-15分鐘後，於成熟與未成熟木瓜果實表面製造4個傷口(深3 mm、寬5 mm)，將木瓜炭疽病菌孢子懸浮液(濃度4×10^5/ml)取50 μl至木瓜表面傷口中，同時也噴灑孢子懸浮液於傷口表面，置於28 ℃培養箱培養2小時，接著再噴灑稀釋10倍之Yua-6菌株發酵液於木瓜表面傷口，待乾燥15分鐘後，置於28 ℃培養箱培養並每天觀察記錄木瓜果實發病情形。正對照為成熟與未成熟木瓜果實表面消毒後，接種木瓜炭疽病菌孢子懸浮液再噴無菌水之木瓜果實，負對照為健康的成熟與未成熟木瓜果實，僅表面消毒及噴無菌水。

Yua-6菌株發酵液之液相－液相萃取

利用液相－液相萃取(liquid－liquid partition)方式進行乙酸乙酯層和水層之分離。取5 g Yua-6菌株冷凍乾燥粉末放入離心管內，再加入100 ml乙酸乙酯(Ethyl acetate)及100 ml無菌水後混合，靜置30分鐘後將水層和乙酸乙酯層各別取出，將水層以減壓濃縮及冷凍乾燥儀器(Kingmech，FD4.5-12P)進行乾燥，而乙酸乙酯層則以減壓濃縮方式進行乾燥濃縮，所得之粉末分別秤取重量並記錄。之後將乙酸乙酯層和水層各別調配成到PDA培養基上使其含最終濃度為50 μg /ml、100 μg /ml、500 μg /ml、1000 μg /ml、2000 μg /ml，且DMSO最終濃度為0.2 %，觀察草莓灰黴菌及木瓜炭疽病菌絲生長之抑制情形。對照組為將草莓灰黴菌及木瓜炭疽病菌絲菌移殖至含0.2 %DMSO PDA培養基。

抑菌活性成分分離與分析

利用正相管柱色層分析法、薄層色層分析法及高壓液相層析儀等技術進一步分離Yua-6菌株冷凍乾燥粉中，具有抑菌活性之成分。首先取3.85 g Yua-6菌株冷凍乾燥粉，以200 ml乙酸乙酯混合後，再加入200 ml二次水混合，靜置1小時後，將乙酸乙酯層萃取物及水層分別取出，乙酸乙酯層萃取物進行減壓濃縮，水層部分再加入200 ml乙酸乙酯混合後，再加入200 ml二次水混合靜置1小時(水層再以乙酸乙酯重覆萃取一次)，目的為將水層中能溶於乙酸乙酯的成分完全萃取出來。由Yua-6菌株發酵液之液相－液相萃取實驗中知乙酸乙酯層具有抑菌效果，所以本實驗取乙酸乙酯層萃取物進行管柱色層分析。乙酸乙酯層萃取物在進行管柱層析前，先用研缽將Silica gel和乙酸乙酯層萃取物均勻混合後 (Silica gel :萃取物＝1:1，w/w)，填入Silica gel溼式填充玻璃管柱中並於其上方覆蓋海砂，依序以不同比例之正己烷(n-hexane)與乙酸乙酯、乙酸乙酯與甲醇(Methanol)混合為沖提液，(H/E 100:0、90:10、80:20、70:30、60:40、50:50、40:60、30:70、20:80、10:90、0:100，E/M 50:50、0:100)，由100 %正己烷開始沖提，每500 ml收集1瓶，沖提液收集2瓶後更換極性，逐次提高沖提極性至100 %甲醇，將所含成份自管柱內完全沖提乾淨。之後進行薄層色層分析法，使用表面塗佈矽膠(Silica gel,SIL G/UV254ALUGRAM)之正相TLC薄片，依序以不同比例正己烷與乙酸乙酯、乙酸乙酯與甲醇為展開液(H/E 90:10、70:30、50:50、30:70、10:90，E/M 50:50、0:100)，展開後以紫外光觀察並浸漬15 %硫酸，以60-70℃烘烤呈色，展開後成份分佈情形相似者之沖提液則合併並進行減壓濃縮後秤重，以150 μg /ml、300 μg /ml濃度進行抑菌活性測試。將具拮抗能力之沖提液進一步以HPLC分析，此儀器為安捷倫的液相層析系統(Agilent 1100 series,Germany)，配備有紫外線光偵測器(VWD UV detector)及100 μl注射器，沖提條件為正己烷:乙酸乙酯＝65 %:35 %，流速3 ml/min，共45分鐘並收集波峰沖提液進行抑菌活性試驗。接著進一步以^{1}H-NMR及GC-MS等分析技術確定化合物之結構。

結果

土壤微生物之拮抗能力

自土壤中篩選48個菌株，其中由含streptomycin 100 μg/ml濃度的PDA之選擇性培養基，分離到13種菌株；由Tryptone yeast extract agar之培養基分離到35種菌株。這些分離之菌株用來和木瓜炭疽病菌和草莓灰黴菌進行PDA平板的拮抗分析時，發現均不具拮抗效果，但之前本實驗

室與員林高中合作有篩選到Yua-6菌株對草莓灰黴菌及木瓜炭疽病菌具拮抗能力，因此後續以Yua-6菌株進行相關實驗。本實驗首先再利用對峙培養方法及玻璃紙抗生法(圖1)確認拮抗效果，結果顯示木瓜炭疽病菌和草莓灰黴菌的菌絲生長與對照組相比有明顯被抑制的效果，顯示Yua-6菌株確實具有能抑制這兩種病原菌的能力。

Yua-6菌株之菌種鑑定

將Yua-6菌株利用對應核糖體核酸序列的上游引子18S up和下游引子28S down可擴增約400 bp之DNA片段，定序結果至NCBI網站以BLAST Analysis程式進行分析比對，結果顯示Yua-6菌株與土麴菌(*Aspergillus terreus*)的hypothetical protein(Accession number: XM_001210986)有99 %相似度和其他*Aspergillus* spp. 菌種則只有74 %-77 %相似度，因此再由NCBI中相似程度較高的菌種，的序列進行比對後再設計引子，上游引子5' Yua-6及下游引子3' Yua-6進行聚合酶連鎖反應，可擴增約1600 bp之DNA片段，定序後再至NCBI網站以BLAST Analysis程式與相似基因片段進行分析比對，結果顯示土麴菌(*Aspergillus terreus*) hypothetical protein (Accession number: XM_001210986) 與Yua-6菌株序列完全相同，所以確認Yua-6菌株是土麴菌與其他*Aspergillus* spp. 菌種僅有72 %-88 %核苷酸相似度。

Yua-6菌株冷凍乾燥液抑菌活性測試

本實驗共收集Yua-6菌株培養液7 L，冷凍乾燥後Yua-6菌株粉末之總重為36.45 g。將Yua-6菌株冷凍乾燥液分別以1 mg/ml和 5 mg/ml之濃度添加於 PDA 培養基中觀察其對草莓灰黴菌和木瓜炭疽病菌之抑制效果，結果顯示含1 mg/ml及5 mg/ml的Yua-6 冷凍乾燥液成分對木瓜炭疽病及草莓灰黴菌皆有抑制能力，以含5 mg/ml的冷凍乾燥液的抑菌效果最佳，其中針對木瓜炭疽病菌以1 mg/ml及5 mg/ml乾燥液成分的抑制率分別具19.29 %及 70.63 %之抑制率，對草莓灰黴菌則分別具4.93%及51.73%抑制率(表1)。

木瓜果實炭疽病的防治試驗

在木瓜果實炭疽病的防治試驗中，將成熟及未成熟木瓜果實接種木瓜炭疽菌病孢子懸浮液(濃度 4×10^5/ml)後，噴灑稀釋10倍之Yua-6菌株發酵液並每天觀察木瓜果實發病情形。顯示未成熟木瓜果實不論是否噴灑Yua-6菌株發酵液，自從接種炭疽菌病孢子至第5天以肉眼皆未觀察到都沒有木瓜炭疽病菌絲產生(圖2B)，而成熟木瓜果實在接種炭疽菌病孢子及Yua-6菌株發酵液後，第1天沒有觀察到木瓜炭疽病菌絲產生，第3天有少許木瓜炭疽病菌絲從傷口產生，第5天比第3天增加一些木瓜炭疽病菌絲整體來說炭疽病菌的菌絲變化範圍並不大，與成熟木瓜接種炭疽菌病孢子及噴灑無菌水的果實相比未有噴灑Yua-6菌株發酵液之木瓜，到第3天約有1/3面積已佈滿菌絲，到第5天整個木瓜已快爛掉(圖2D)。由此可知Yua-6菌株發酵液具明顯抑制木瓜炭疽病菌在成熟木瓜果實上生長之效果。

Yua-6菌株發酵液之液相－液相萃取

取5 g Yua-6菌液冷凍乾燥粉末經液相－液相萃取分割後得到乙酸乙酯層1.96 g及水層4.02 g，經菌絲生長抑制能力之測試，發現含2 mg/ml乙酸乙酯層之濃度對木瓜炭疽病菌和草莓灰黴菌皆有抑制效果(圖3)，其中對木瓜炭疽病菌具81.92 %抑制率，對草莓灰黴菌則具54.11 %抑制率，而2 mg/ml水層之濃度對木瓜炭疽病僅具15.41 %抑制率，對草莓灰黴菌則具16.03 %抑制率。顯示水層的成分對木瓜炭疽病及草莓灰黴菌無明顯抑制效果，因此後續皆以乙酸乙酯層當中之抗生物質為分析對象(圖3)。

抑菌活性成分分離與分析

取30.85 g Yua-6菌株冷凍乾燥粉末再經液相－液相萃取分割後得到乙酸乙酯層3.4 g後進行管柱色層分析，以不同比例之正己烷(n-hexane)與乙酸乙酯、乙酸乙酯與甲醇(Methanol)混合為沖提液，(H/E 100:0、90:10、80:20、70:30、60:40、50:50、40:60、30:70、20:80、10:90、0:100，E/M 50:50、0:100)，每種比例之沖提液各收集2瓶，最後共26瓶。接著進行薄層色層分析，成份分佈情形相似者則合併混合，最後共併成12瓶(H/E 95:5、80:20、80:20、70:30、70:30、55:45、45:55、35:65、25:75、5:95，E/M 50:50、0:100)並進行抑菌活性測試(圖4，表2)。其中以含0.3 mg /ml濃度之正己烷:乙酸乙酯＝55 %:45 %沖提液對木瓜炭疽病具50.87%抑制率(圖4D)。此具拮抗能力的沖堤液再進一步以HPLC分析其內成分，沖提條件為以正己烷:乙酸乙酯＝65 %:35 %，流速3 ml/min，共45分鐘。於滯留時間5、11、13、16、19及34分鐘共獲得6瓶較大波峰之收集液，各別調配到PDA培養基上使其含最終濃度為0.15 mg /ml及0.3 mg /ml，且DMSO最終濃度為

0.2 %，觀察草莓灰黴菌及木瓜炭疽病菌絲生長之抑制情形。經抑菌測試得知在滯留時間5分鐘所收集之化合物於0.3 mg/ml濃度下對草莓灰黴菌具27.02 %抑制率，至於其他波峰收集物於0.15 mg /ml及0.3 mg/ml濃度下，抑菌率皆低於12.48 %，無法測得較高之抗菌活性(圖5)。

討論

植物病害需要進行控制，以維持農產品的品質和足夠的食物，防治植物病害的方法有很多種，但農民仍偏重於化肥和農藥，經長期過度使用和濫用的結果，往往造成生態環境的污染，因此利用生物防治策略替代化學農藥使用，將使環境污染減少，也不會有化學物質殘留的問題。植物真菌病害是造成作物產量減少的大問題，木瓜炭疽病更是作物採後容易發生的一個重要的病害(Paull et al., 1997)，此病害可造成採收後20 %木瓜果實的損失，最嚴重時更可達50 %損失。控制此病害通常使用熱處理及化學殺菌劑(Couey et al., 1984)，但使用熱處理會導致衰老速度加快，而使用化學殺菌劑處理易造成損傷，影響採收後木瓜果實品質(Lay-Yee et al., 1998)，本實驗篩選到Yua-6菌株在培養基中進行測試，發現其對木瓜炭疽病菌具有拮抗能力，當實際以木瓜果實進行炭疽病的防治試驗中，也證明Yua-6菌株發酵液對成熟木瓜果實有明顯抑制病菌的效果，因此Yua-6菌株是具有開發成微生物製劑潛能之菌種。

本實驗在進行Yua-6菌種鑑定時，原本是以實驗室已有的引子〔對應高等植物的核糖體核酸序列(18S 26S)〕來進行聚合酶連鎖反應，有趣的是此引子對可擴增出Yua-6的DNA片段，但此DNA卻不屬於核糖體核酸之序列，定序結果至NCBI網站以BLAST Analysis程式進行分析比對時，發現在NCBI基因庫中與Yua-6菌株的序列相似程度較高的菌種及其對應之基因產物有: *Aspergillus oryzae* DNA的 binding protein SART-1(Accession number: XM_001820206)、*A. flavus* 的DNA binding protein SART-1(Accession number: XM_002374117)、*A. niger*的DNA binding protein SART-1(Accession number: XM_001401964)、*A. fumigatus* 的DNA binding protein SART-1(Accession number: XM_746691)、*A. clavatus*的DNA binding protein SART-1(Accession number: XM_001271915)和*A. terreus*中的一個hypothetical protein(Accession number: XM_001210986)，將這些菌種的序列進行比對後再設計引子，(5’ Yua-6及3’ Yua-6)進行聚合酶連鎖反應，可擴增出1.6 kb DNA片段，其序列進行分析比對結果顯示與土麴菌(*A. terreus*)中的hypothetical protein (Accession number: XM_001210986)完全相同，而跟其他*Aspergillus* spp. 相比則僅有72 %-88 %之核苷酸相同度，顯示此Yua-6菌株為土麴菌之一品系。

許多絲狀真菌像土麴菌，當其營養來源改變，會影響菌體的形態和生理狀態，當營養來源充足時，菌體會大量生長，此階段的代謝程式稱初級代謝(primary metabolism)，此種代謝模式普遍存在於所有生物中；當氮、碳和磷營養條件受限制下而減少時，菌體生長速度會變緩慢，形態和代謝發生改變，此時的代謝程式稱為二次代謝(secondary metabolism)，這類的代謝反應是具有生物獨特性的。真菌容易產生二次代謝物，主要為抗生素和抗菌蛋白(Schimmel et al., 1998)。土麴菌可以產生多種二次代謝物，包括aspulvinone(Takahashi et al., 1978)、asterric acid應用在抑制血管內皮生長因數(VEGF)(Curtis et al., 1960)、asterriquinone(Kaji et al., 1994)、butyrolactone I 用來抑制真核細胞cyclin-dependent kinases(Nitta et al., 1983)、citrinin(Sankawa et al., 1983)、emodin(Chen et al., 1992)、geodin(Nitta et al., 1977)、itaconate(Bonnarme et al., 1995)、lovastatin也被稱為mevinolin或Monacolin K，在臨床上已經成為降低血清中膽固醇的一個主要用藥，另外它也可以減緩動脈粥樣硬化及抑制細胞增生(Alberts et al., 1980; Greenspan and Yudkovitz, 1985)、questrin (Curtis et al., 1960)、sulochrin(Vinci et al., 1991)及terrecyclic acid是一種抗生素(Nakagawa et al., 1982)。由此可知土麴菌的二次代謝物質種類多，又具多方面之應用價值，因此是一個值得開發的真菌種類。

在本研究中，土麴菌的培養液具有抑制植物病原真菌生長的能力，由HPLC及H-NMR分析結果，初步認為其中主要含的有效成分是類似Butyrolacetone之物質，此物質為土麴菌之二次代謝產物。由過去研究指出，營養的組成及消耗，可能影響生物體產生二次代謝路徑，本實驗在進行Yua-6培養液成分的分析時，是以培養6天之PDB溶液為分析對象，雖然也具有抑菌生長能力，但其實也可以嘗試以其他的培養基配方或改變培養時間來進行分析，或許可以找到有利於誘導Yua-6菌株走二次代謝路徑之條件。

許多微生物包括細菌及真菌皆為有應用在微生物防治上，這些拮抗菌之所以能防止病害發生，有些是因為其能產生抗生物質，*A. terreus*也能分泌出Terrecyclic acid A，為具抗生素特性之物質(Nakagawa et al., 1982)，抗生素是微生物產生的毒素，可以在低濃度下，殺死其他微生物

。大多數微生物的產生可分泌一種或多種具抗菌活性的化合物。有某些情況下，由微生物產生的抗生素可特別有效地抑制植物病原菌和它們所造成的疾病，例如：螢光假單胞細菌(*Fluorescent Pseudomonads*)F113產生2,4-diacetylphloroglucinol抗生素可以抑制腐黴菌(*Pythium* spp.)造成的猝倒病(Damping off)(Shanahan et al., 1992) ；枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)AU195產生Bacillomycin D可抑制黃麴菌(*Aspergillus flavus*)造成的黃麴毒素污染(Moyne et al., 2001) ；*Agrobacterium radiobacter*所產生Agrocin 84可抑制農桿菌腫瘤菌(*Agrobacterium tumefaciens*)造成植物癌腫病(Crown gall)(Kerr, 1980) ；液化澱粉芽孢桿菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) FZB42所產生Bacillomycin和豐原素(fengycin)可以抑制*Fusarium oxysporum*造成鐮胞菌萎凋病(Koumoutsi et al., 2004) ；*Bacillus subtilis* QST713所產生Iturin A可以抑制灰黴菌(*Botrytis cinerea*)和立枯絲核菌(*Rhizoctonia solani*)造成猝倒病(Damping off)(Islam et al., 2005) ；木黴菌(*Trichoderma virens*)產生Gliotoxin可抑制立枯絲核菌(*Rhizoctonia solani*)造成根腐病(Root rots)(Wilhite et al., 2001)、*B. subtilis* BBG100產生的Mycosubtilin可以抑制腐黴菌(*Pythium aphanidermatum*)造成的猝倒病(Damping off)(Leclere et al., 2005) ；立枯絲核菌(*R. solani*)造成的根腐病、泛菌(P*antoea agglomerans*) C9-1所產生Herbicolin可抑制火凋枯病(*Erwinia amylovora*)造成火枯病(Fire blight)(Wright et al., 2001) ；假單胞菌(*Burkholderia cepacia*)產生的 Pyrrolnitrin和pseudane可以抑制 *Pyricularia oryzae*和立枯絲核菌(*R. solani*)造成的稻熱病和根腐病(Yoshihisa et al., 1989)等。本研究中所進行的防治對象為病原真菌而非細菌，但由於*A. terreus*也能產生抗生素之代謝物，因此或許土麴菌對於其他細菌病害也有抑制能力。Yua-6菌株冷凍乾燥液經乙酸乙酯萃取對草莓灰黴菌具54.11 %抑制率，但經HPLC分析後對草莓灰黴菌只剩27.02 %抑制率，理論上應該成分愈分離抑制純度愈高，其抑制效果要愈佳才對，其之所以如此可能是Yua-6菌株的多種二次代謝物質是共同參與在抑制病原菌上或是*A. terreus*還具有其他拮抗能力，如營養競爭或菌絲直接寄生在病菌上等。Melo等人在進行植物菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)的研究中，發現*A. terreus*可寄生於真菌的菌核內造成菌核病菌破裂死亡，而達到抑制效果(Melo et al., 2006)，*A. terreus* 也曾用來抑制*Ophiobolus graminis*造成的小麥倒伏病(wheat take-all disease)(Slagg and Fellows, 1947)而本研究從土壤中分離的*A. terreus*則具有抑制木瓜炭疽病及草莓灰黴菌的能力，由此可知*A. terreus*應可用來對抗多種植物病原菌，因此是一個具開發價值的菌種。

結論

本實驗自田間植物根圈分離出微生物，篩選出對草莓灰黴菌及木瓜炭疽病菌具拮抗作用之Yua-6菌株，並分析其抑菌效果與作用成分。在抑菌實驗中發現含Yua-6冷凍乾燥物成分達1 mg/ml即對木瓜炭疽病及草莓灰黴菌具抑制效果，且濃度愈高，抑制效果愈佳。10倍稀釋之Yua-6菌株發酵液對成熟木瓜果實也具明顯保護效果，可抑制木瓜炭疽病之發展。利用乙酸乙酯進行液相萃取及抑菌測試，發現其抑菌成分主要存在乙酸乙酯層，而水層中之成分則對病菌無明顯抑制效果。以矽膠管柱層析分離Yua-6菌株之有效抑菌的活性成分時，由正己烷:乙酸乙酯＝55 %:45 %濃度收集之沖堤液對木瓜炭疽病具較佳抑制效果，其他極性之沖堤液則對木瓜炭疽病和草莓灰黴菌不具明顯抑制效果。以HPLC分析當中之沖堤成分，以5分鐘所收集之化合物，具較佳之抑菌能力，經H-NMR分析，推測其可能是類似丁內酯(Butyrolactone)之化合物。

誌謝

感謝員林高中葉昌憲老師及林明輝同學協助收集土壤分離菌株。

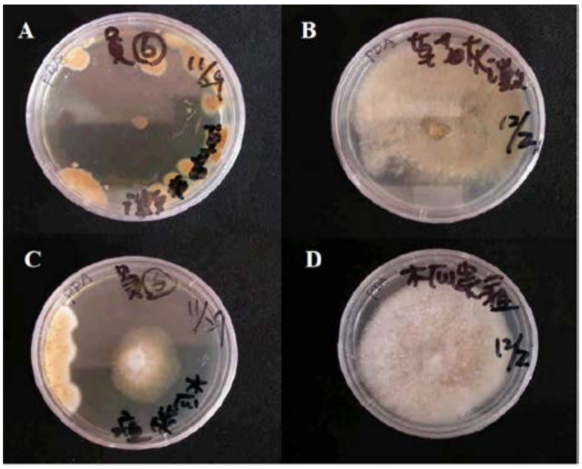

圖 1、 利用玻璃紙抗生法於 PDA 平板上測試 Yua-6 菌株對植物病原真菌生長之拮抗作用。(A)覆蓋玻璃紙的 PDA 平板上先培養 Yua-6 菌株，三天後去除玻璃紙，再接種草莓灰黴菌；(B) PDA 平板上接種草莓灰黴菌；(C)同(A)條件，但最後接種病菌為木瓜炭疽病菌；(D)PDA 平板上接種木瓜炭疽病菌。

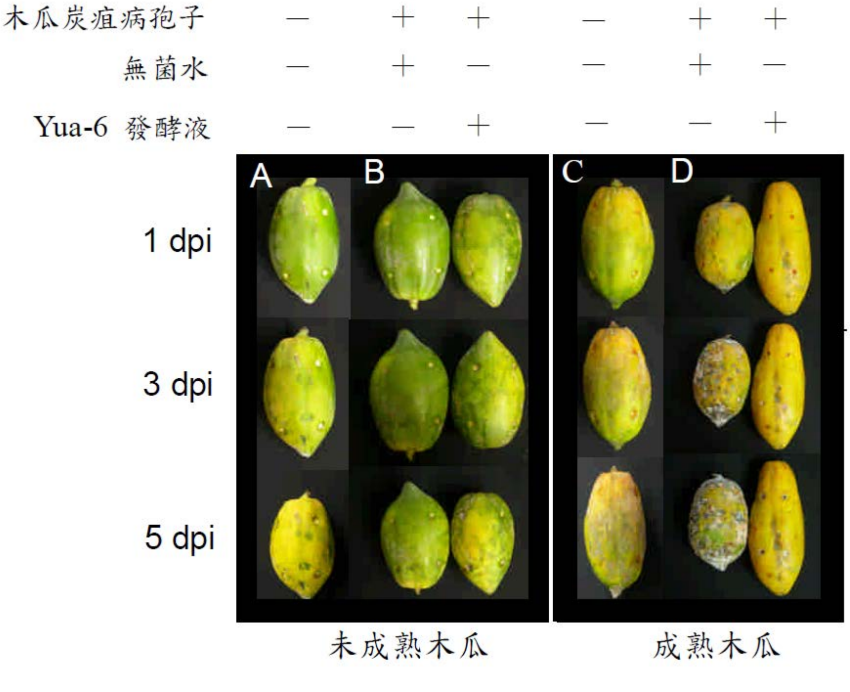

圖 2、 Yua-6 菌株發酵液進行木瓜果實炭疽病防治試驗。將未成熟及成熟木瓜經 75 %酒精和無菌水表面消毒後進行病菌接種與Yua-6 菌株發酵液保護測試。(A)與(C)分別為健康木瓜；(B)與(D)為接種木瓜炭疽病孢子(4×10^5/ml)之木瓜，再個別以無菌水(B左及D左)或以稀釋10 倍之Yua-6 菌株發酵液(B右及D右)噴灑，並於接種後第 1、3 及 5 天觀察其保護效果。

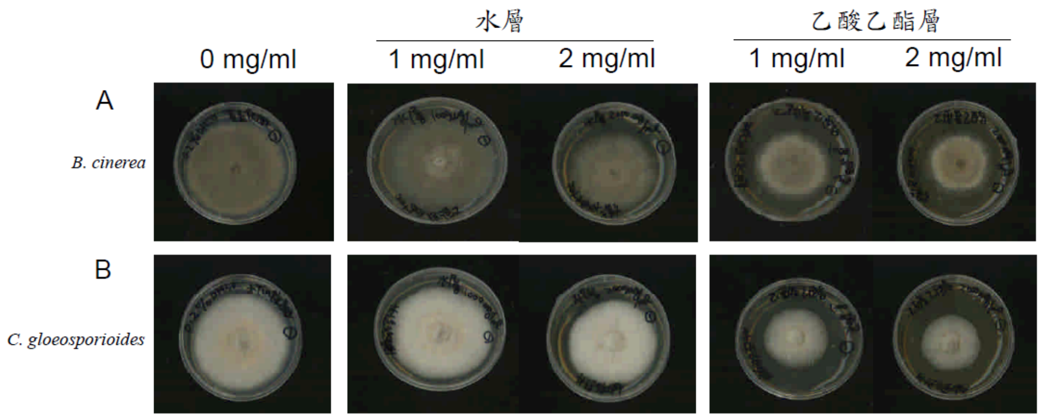

圖 3、 Yua-6 菌株發酵液冷凍乾燥以乙酸乙酯及水層分別萃取成分，所得之乾燥粉末再配置成含 1 mg/ml 及 2 mg/ml 之 PDA 平板，進行草莓灰黴菌及木瓜炭疽病菌之生長抑制分析。(A)不含水層及乙酸乙酯層之 PDA 平板，含水層 1 mg/ml 及 2 mg/ml 之 PDA 平板及含乙酸乙酯層 1 mg/ml 及 2 mg/ml 之 PDA 平板，分別接種草莓灰黴菌；(B)則是分別接種木瓜炭疽病菌，PDA 平板內均含 0.2 % DMSO。

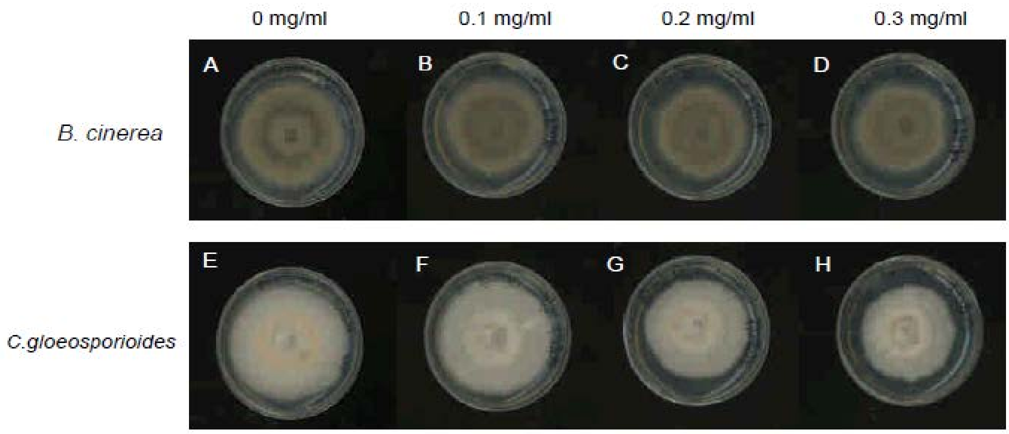

圖 4、 不同濃度之乙酸乙酯層經矽膠管柱層析的沖堤部對草莓灰黴菌及木瓜炭疽病菌之生長抑制效果。(A)不含乙酸乙酯層沖堤部之 PDA 接種草莓灰黴菌；(B)，(C)及(D)為分別含 0.1 mg/ml，0.2 mg/ml 及 0.3 mg/ml 濃度的乙酸乙酯層沖堤部之 PDA 接種草莓灰黴菌；(E)不含乙酸乙酯層沖堤部之 PDA 接種木瓜炭疽病菌；(F)，(G)及(H)為分別含 0.1 mg/ml，0.2 mg/ml 及 0.3 mg/ml 濃度乙酸乙酯層的沖堤部之 PDA 分別接種木瓜炭疽病菌。PDA 均含 0.2 % DMSO。

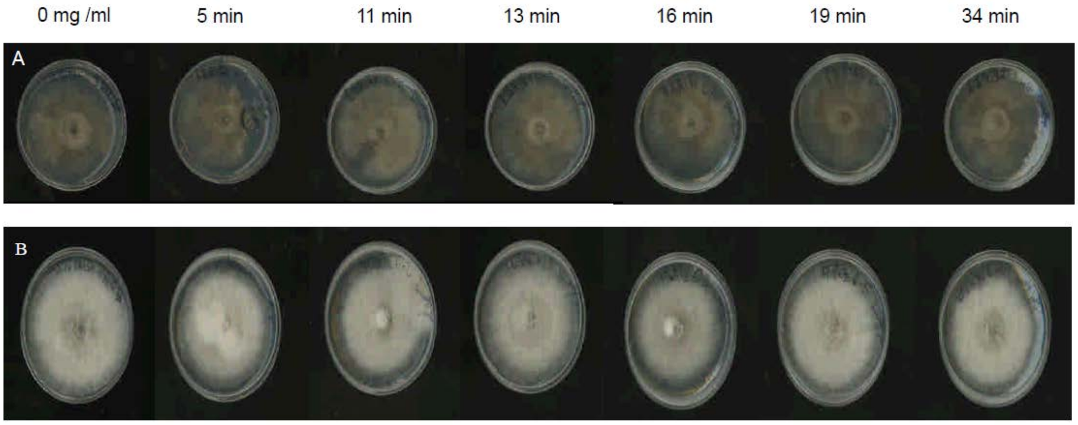

圖 5、HPLC 分析於所得之收集液個別調配到 PDA 培養基上使其含最終濃度為 0.3 mg/ml，且 DMSO 最終濃度為 0.2 %，觀察當中成分對(A)草莓灰黴菌及(B)木瓜炭疽病菌菌絲生長之抑制效果。收集液為分別在滯留時間 5、11、13、16、19 及 34 分鐘波峰時段收集。

表 1、不同濃度之 Yua-6 冷凍乾燥發酵濾液對草莓灰黴菌及木瓜炭疽病菌之生長抑制率

病原真菌	平均抑制率* (%)	
	1 mg/ml	5 mg/ml
草莓灰黴病菌 (*B. cinerea*)	4.93	51.76
木瓜炭疽病菌 (*C. gloeosporioid*)	19.29	70.63

抑制比率 (%) ＝ (對照組之菌落半徑－處理組織之菌落半徑) ／對照組之菌落半徑 × 100

*平均抑制率為 3 重覆之平均值

表1

表2、乙酸乙酯層經矽膠管柱層析的沖堤部對草莓灰黴菌及木瓜炭疽病菌之生長抑制率。

H/E : 55:45 沖堤物

濃度(mg/ml)	草莓灰黴菌			木瓜炭疽病菌		
	0.1	0.2	0.3	0.1	0.2	0.3
抑制比率 (%)	17.33	18.9	28.54	2.27	26.47	50.87

表3

参考文獻

行政院農委會農業統計年報. (2010). 作物生產-果品, 98.

彭淑貞, 黃勝泉, and 張廣淼. (2008). 草莓產業的發展及展望. 苗栗區農業專訊 **48 期**.

Ahmed, A.S., Pe´rez-Sa´nchez, C., Egea, C., and Candela, M.E. (1999). Evaluation of Trichoderma harzianumfor controlling root rot caused by Phytophthora capsiciin pepper plants. Plant Pathology **48,** 58-65.

Alberts, A.W., Chen, J., Kuron, G., Hunt, V., Huff, J., Hoffman, C., Rothrock, J., Lopez, M., Joshua, H., Harris, E., Patchett, A., Monaghan, R., Currie, S., Stapley, E., Albers-Schonberg, G., Hensens, O., Hirshfield, J., Hoogsteen, K., Liesch, J., and Springer, J. (1980). Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. Proc Natl Acad Sci U S A **77,** 3957-3961.

Alstrom, S. (1991). Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere pseudomonads. Journal of General and Applied Microbiology **37,** 495-501.

Bertagnolli, B.L., Daly, S., and Sinclair, J.B. (1998). Antimycotic compounds from the plant pathogen rhizoctonia solani and its antagonist Trichoderma harzianum. Journal of Phytopathology **146,** 131-135.

Bonnarme, P., Gillet, B., Sepulchre, A.M., Role, C., Beloeil, J.C., and Ducrocq, C. (1995). Itaconate biosynthesis in *Aspergillus terreus.* Journal of bacteriology **177,** 3573-3578.

Bowers, J.H., Kinkel, L.L., and Jones, R.K. (1996). Influence of disease-suppressive strains of Streptomyces on the native Streptomyces community in soil as determined by the analysis of cellular fatty acids. Can J Microbiol **42,** 27-37.

Braun, P.G., and Sutton, J.C. (1988). Infection cycles and population dynamics of botrytis cinerea in strawberry leaves. Canadian journal of plant pathology **10,** 133-141.

Chen, Z.G., Fujii, I., Ebizuka, Y., and Sankawa, U. (1992). Emodin O-methyltransferase from Aspergillus terreus. Arch Microbiol **158,** 29-34.

Chet, I., Inbar, J., and Hadar, I. (1997). Fungal antagonists and mycoparasites. Environmental and microbial relationships **IV,** 165-184.

Couey, H.M., Alvarez, A.M., and Nelson, M.G. (1984). Comparison of hot-water spray and immersion treatments for control of postharvest decay of papaya. Plant Disease **68,** 436-437.

Curtis, R.F., Hassall, C.H., Jones, D.W., and Williams, T.W. (1960). The biosynthesis of phenols. Part II. Asterric acid, a metabolic product of *aspergillus terreus* thom. Journal of the chemical society (Resumed)**,** 4838-4842.

Dias, M.A., Lacerda, I.C., Pimentel, P.F., de Castro, H.F., and Rosa, C.A. (2002). Removal of heavy metals by an Aspergillus terreus strain immobilized in a polyurethane matrix. Lett Appl Microbiol **34,** 46-50.

El-Abyad, M.S., El-Sayed, M.A., El-Shanshoury, A.R., and El-Sabbagh, S.M. (1996). Antimicrobial activities of Streptomyces pulcher, S. canescens and S. citreofluorescens against fungal and bacterial pathogens of tomato in vitro. Folia Microbiol (Praha) **41,** 321-328.

Elad, Y., Freeman, S., Minz, D., Kolesnik, I., Barbul, O., Zveibil, A., Maymon, M., Nitzani, Y., Kirshner, B., Rav-David, D., Bilu, A., Dag, A., and Shafir, S. (2004). *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. European journal of plant pathology **110,** 361-370.

Fourati-Ben Fguira, L., Fotso, S., Ben Ameur-Mehdi, R., Mellouli, L., and Laatsch, H. (2005). Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated Streptomyces sp. strain US80. Res Microbiol **156,** 341-347.

Greenspan, M.D., and Yudkovitz, J.B. (1985). Mevinolinic acid biosynthesis by Aspergillus terreus and its relationship to fatty acid biosynthesis. J Bacteriol **162,** 704-707.

Haas, D., and Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nature Reviews Microbiology **3,** 307-319.

Hajjaj, H., Niederberger, P., and Duboc, P. (2001). Lovastatin biosynthesis by Aspergillus terreus in a chemically defined medium. Appl Environ Microbiol **67,** 2596-2602.

Islam, M.T., Hashidoko, Y., Deora, A., Ito, T., and Tahara, S. (2005). Suppression of damping-off disease in host plants by the rhizoplane bacterium Lysobacter sp. strain SB-K88 is linked to plant colonization and antibiosis against soilborne Peronosporomycetes. Appl Environ Microbiol **71,** 3786-3796.

Jarvis, W.R. (1962). Infection of strawberry and raspberry fruit by Botrytis cinerea Pers. Annals of applied biology **50,** 569-575.

Jarvis, W.R. (1964). The effect of some climatic factors on the incidence of grey-mould of strawberry and raspberry fruit. Hortic. Res. **3,** 65-71.

Jarvis, W.R. (1969). The phenology of flowering in strawberry and raspberry in relation to grey-mould control. Hortic. Res. **9,** 8-17.

Jarvis, W.R., and Borecka, H. (1968). The susceptibilty of strawberrry flowers to infection by *Botrytis cinerea* Pers. Hortic. Res. **8,** 147-154.

Jordan, V.W.L. (1978). Epidemiology and control of fruit rot caused by *Botrytis cinerea* on strawberry. Pflanzenshutz.-Nachr. Bayer

Kaji, A., Iwata, T., Kiriyama, N., Wakusawa, S., and Miyamoto, K. (1994). Four new metabolites of Aspergillus terreus. Chem Pharm Bull (Tokyo) **42,** 1682-1684.

Kerr, A. (1980). Biological control of crown gall through production of agrocin 84. Plant Disease **64,** 25-30.

Kim, J.H., Lee, S.H., Kim, C.S., Lim, E.K., Choi, K.H., Kong, H.G., Kim, D.W., Lee, S.W., and Moon, B.J. (2007). Biological control of strawberry gray mold caused by Botrytis cinerea using Bacillus licheniformis N1 formulation. J Microbiol Biotechnol **17,** 438-444.

Koumoutsi, A., Chen, X.-H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., Vater, J., and Borriss, R. (2004). Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42 Journal of Bacteriology **186,** 1084-1096.

Lay-Yee, M., Clare, G.K., Petry, R.J., Fullerton, R.A., and Gunson, A. (1998). Quality and disease incidence of 'Waimanalo Solo' papaya following forced-air heat treatments. Hort Science **33,** 878-880.

Leclere, V., Bechet, M., Adam, A., Guez, J.S., Wathelet, B., Ongena, M., Thonart, P., Gancel, F., Chollet-Imbert, M., and Jacques, P. (2005). Mycosubtilin overproduction by Bacillus subtilis BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. Appl Environ Microbiol **71,** 4577-4584.

Melo, I.S., Faull, J.L., and Nascimento, R.S. (2006). Antagonism of *Aspergillus terreus* to *Sclerotinia Sclerotiorum*. Brazilian Journal of Microbiology **37,** 417-419.

Moyne, A.L., Shelby, R., Cleveland, T.E., and Tuzun, S. (2001). Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against Aspergillus flavus. J Appl Microbiol **90,** 622-629.

Nakagawa, M., Hirota, A., Sakai, H., and Isogai, A. (1982). Terrecyclic acid A, a new antibiotic from Aspergillus terreus. I. Taxonomy, production, and chemical and biological properties. J Antibiot (Tokyo) **35,** 778-782.

Neeno-Eckwall, E.C., Kinkel, L.L., and Schottel, J.L. (2001). Competition and antibiosis in the biological control of potato scab. Can J Microbiol **47,** 332-340.

Nitta, K., Kiriyama, N., Sakaguchi, Y., Tagushi, Y., and Yamamoto, Y. (1977). Studies on the metabolic products of *Aspergillus terreus*. III. metabolites of the strain IFO 8835. Chem. pharm. bull. (Tokyo) **25,** 2593-2601.

Nitta, K., Fujita, N., Yoshimura, T., Arai, K., and Yamamoto, U. (1983). Metabolic products of Aspergillus terreus. IX. Biosynthesis of butyrolactone derivatives isolated from strain IFO 8835 and 4100. Chem Pharm Bull (Tokyo) **31,** 1528-1533.

Pal, K.K., and McSpadden Gardener, B. (2006). Biological control of plant pathogens. The plant health instructor **10,** 1-25.

Paull, R.E., Nishijima, W., Reyes, M., and Cavaletto, C. (1997). Postharvest handling and losses during marketing of papaya (Carica papaya L.). Postharvest Biology and Technology **11,** 165-179.

Powelson, R.L. (1960). Initiation of Strawberry fruit rot caused by *Botrytis cinerea.* Phytopathology **50,** 491-494.

Rahman, M.A., Kadir, J., Mahmud, T.M.M., Abdul Rahman, R., and Begum, M.M. (2007). Screening of antagonistic bacteria for biocontrol activities on *Colletotrichum gloeosporioides* in papaya Asian journal of plant sciences **6,** 12-20.

Rahman, M.A., Mahmud, T.M.M., Kadir, J., Rahman, R.A., and Begum, M.M. (2009). Enhancing the efficacy of *Burkholderia cepacia* B23 with calcium chloride and chitosan to control Anthracnose of papaya during storage. The plant pathology Journal **25,** 361-368.

Rojo, F.G., Reynoso, M.M., Ferez, M., Chulze, S.a.N., and Torres, A.M. (2007). Biological control by Trichoderma species of Fusarium solani causing peanut brown root rot under field conditions. Crop Protection **26,** 549-555.

Sabaratnam, S., and Traquair, J.A. (2002). Formulation of a Streptomyces biocontrol agent for the

suppression of Rhizoctonia damping-off in tomato transplants Biological Control **23,** 245-253.
Sankawa, U., Ebizuka, Y., Noguchi, H., Isikawa, Y., Kitaghawa, S., Yamamoto, Y., Kobayashi, T., Iitak, Y., and Seto, H. (1983). Biosynthesis of citrinin in aspergillus terreus : Incorporation studies with [2-13C, 2-2H3], [1-13C, 18O2] and [1-13C, 17O]-acetate. Tetrahedron **39,** 3583-3591.
Schimmel, T.G., Coffman, A.D., and Parsons, S.J. (1998). Effect of Butyrolactone I on the producing fungus, Aspergillus terreus. Applied and Environmental Microbiology **64,** 3707-3712.
Schisler, D.A., Slininger, P.J., Behle, R.W., and Jackson, M.A. (2004). Formulation of Bacillus spp. for Biological Control of Plant Diseases. Phytopathology **94,** 1267-1271.
Schottel, J.L., Shimizu, K., and Kinkel, L.L. (2001). Relationships of in Vitro Pathogen Inhibition and Soil Colonization to Potato Scab Biocontrol by Antagonistic Streptomyces spp. Biological Control **20,** 102-112.
Shanahan, P., O'Sullivan, D.J., Simpson, P., Glennon, J.D., and O'Gara, F. (1992). Isolation of 2,4-Diacetylphloroglucinol from a *Fluorescent Pseudomonad* and investigation of physiological parameters influencing Its production. Applied and environmental microbbiology **58,** 353-358.
Shi, J., Liu, A., Li, X., Feng, S., and Chen, W. (2010). Identification of endophytic bacterial strain MGP1 selected from papaya and its biocontrol effects on pathogens infecting harvested papaya fruit. J Sci Food Agric **90,** 227-232.
Slagg, C.M., and Fellows, H. (1947). Effects of certain soil fungi and their by products on *Ophiobolus graminis*. J. Agr. Res. **75,** 275-293.
Takahashi, I., Ojima, N., Ogura, K., and Seto, S. (1978). Purification and characterization of dimethylallyl pyrophosphate:aspulvinone dimethylallyltransferase from *Aspergillus terreus*. Biochemistry **17,** 2696-2702.
Trillas, M.I., Casanova, E., Cotxarrera, L., Ordovás, J., Borrero, C., and Avilés, M. (2006). Composts from agricultural waste and the Trichoderma asperellum strain T-34 suppress Rhizoctonia solani in cucumber seedlings. Biological Control **39,** 32-38.
Vagelas, I., Papachatzis, A., Kalorizou, H., and Wogiatzi, E. (2009). Biological control of Botrytis fruit rot (gray mold) on strawberry and red pepper fruits by olive oil mill wastewater. Biotechnology & Biotechnological equipment **23,** 1489-1491.
Vinci, V.A., Hoerner, T.D., Coffman, A.D., Schimmel, T.G., Dabora, R.L., Kirpekar, A.C., Ruby, C.L., and Stieber, R.W. (1991). Mutants of a lovastatinhyperproducing *Aspergillus terreus* deficient in the production of sulochrin. Journal of industrial microbiology **8**.
Wilhite, S.E., Lumsden, R.D., and Straney, D.C. (2001). Peptide synthetase gene in Trichoderma virens. Appl Environ Microbiol **67,** 5055-5062.
Wright, S.A., Zumoff, C.H., Schneider, L., and Beer, S.V. (2001). Pantoea agglomerans strain EH318 produces two antibiotics that inhibit Erwinia amylovora in vitro. Appl Environ Microbiol **67,** 284-292.
Yoshihisa, H., Zenji, S., Fukushi, H., Katsuhiro, K., Haruhisa, S., and Takahito, S. (1989). Production of antibiotics by Pseudomonas cepacia as an agent for biological control of soilborne plant pathogens. Soil Biology and Biochemistry **21,** 723-728.
Yuan, W.M., and Crawford, D.L. (1995). Characterization of streptomyces lydicus WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. Appl Environ Microbiol **61,** 3119-3128.

Antagonism of Aspergillus terreus Yua-6 to *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum gloeosporioides*

[1] Min-Hua Tseng [2] Sheng-Yang Wang [3] Tsong-Ann Yu [4]Jui-Chu Peng [5]Liu, Hsing-Lung [6*]Chu-Hui Chiang

[1, 3, 6]Department of Molecular Biotechnology, Da Yeh University
[2]Department of Forestry, National Chung Hsing University
[4]Tainan District Agricultural Research and Extension Station
[5]Taichung District Agricultural Research and Extension Station
[*] Corresponding author's e-mail: chchiang@mail.dyu.edu.tw

ABSTRACT

Some soil microorganisms in rhizosphere are able to help plants against pathogens. In the present study, microorganisms were isolated from rhizosphere and tested for antagonistic effect against plant pathogenic fungi *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum gloeosporioides*. An isolated fungus Yua-6 showed the best antagonistic abilities. The sequences of Yua-6 showed 100% nucleotide identity to *Aspergillus terreus*. The Yua-6 dry-frozen power from 6-day-cultured potato dextrose broth was test for fungal growth inhibition. The result showed that the concentration (conc.) of 1 mg / ml and 5 mg / ml in PDA medium of Yua-6 dry-frozen power results in 19.29% and 70.63% , respectively, of inhibition rate on *C. gloeosporioides* and 4.93% and 51.73%, respectively, on *B. cinerea*. Additionally, spraying of 10-fold-diluted Yua-6 culture filtrate on *C. gloeosporioides* inoculated mature papaya fruits was able to protect them from disease development. The ethyl acetate layer of Yua-6 dry-frozen culture filtrate showed 81.92% of inhibition rate to *C. gloeosporioides* and 54.11% of inhibition rate to *B. cinerea* at the conc. of 2 mg / ml. The eluent by using n-hexane: ethyl acetate (55%: 45%) solvent through silica gel was collected and it showed the inhibit effect on *C. gloeosporioides* at the conc. of 0.3 mg/ml in PDA. This eluent was further analyzed by high-pressure liquid chromatography (HPLC) and the compound collected from retention time of 5 minutes had the best antagonism activity.

Keywords: Antagonism microorganisms , *Botrytis cinerea* , *Colletotrichum gloeosporioides* , *Aspergillus terreus*