

中華民國第四十八屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 生物(生命科學)科

佳作

040710

戀鏈黴菌－鏈黴菌對真菌影響因素之探討

學校名稱：國立臺中女子高級中學

作者： 高二 凌郁捷 高二 黃富榆 高二 黃薇嘉	指導老師： 謝金山
---	------------------

關鍵詞： 鏈黴菌、病原真菌

摘要

本實驗分別由拮抗、透化圈、葡萄聚醣分解酶及幾丁質分解酶基因和超寄生等四大方面來探討鏈黴菌和五種不同病原真菌的交互作用。結果顯示所篩選之鏈黴菌對真菌多具有抑制生長的作用，且鏈黴菌所產生的抑制物質會因不同採集地區而有所差異。另外超寄生現象之結果顯示鏈黴菌會纏繞在真菌的菌絲上，並使真菌菌絲失去活力。由此實驗結果證明鏈黴菌會對真菌的生長造成抑制，未來可應用在植物病害的防治上。

壹、 研究動機

在菌物界中，有些寄生性的病原真菌常對植物造成相當大的傷害，在農業的發展上尤其造成損失。隨著環保意識的進步，現今解決病害之方式多傾向對環境較為友善的生物防治法，利用生物之間的交互作用來抑制病原菌的活力，未來在減少化學農藥的使用上甚具潛力。

我們觀察到水稻田深受寄生真菌危害，試圖尋找防治方法之過程中，翻閱相關文獻得知鏈黴菌會對寄生真菌產生多層面的抑制效果。但到底是哪些因素會對病原真菌造成影響？又它們的影響程度為何？為了更進一步了解其作用機制，我們設計了以下的實驗，希望由多方面來探討鏈黴菌和病原真菌間的交互作用，並期望日後能應用於生物防治上。

貳、 研究目的

藉由觀察鏈黴菌與病原菌所產生之拮抗現象與幾丁質分解能力，了解鏈黴菌特性，另分析葡萄聚醣分解酶與幾丁質分解酶基因之存在，並探討超寄生現象。最後綜合比較鏈黴菌對病原真菌多方面的影響，探討其於生物防治上的應用潛力。

參、 研究設備及器材

一、供試菌株

(一) 鏈黴菌 (*Streptomyces* sp.)

(二) 真菌：立枯絲核菌 (*Rhizoctonia solani*, AG 4)、炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*)、靈芝 (*Ganoderma* spp.)、灰黴病菌 (*Botrytis cinerea*)、疫病菌 (*Phytophthora* spp.)、菌核病菌 (*Sclerotinia* spp.)、稻熱病菌 (*Pyricularia oryzae*)

二、一般化學藥品

蔗糖 (sucrose)、洋菜粉 (agar powder)、洋菜粉 (agarose)、幾丁質 (chitin)、

酒精(C_2H_5OH)、氯化鈉($NaCl$)、氯化氫(HCl)、氫氧化鉀(KOH)、硝酸鈉($NaNO_3$)、磷酸二氫鈉(NaH_2PO_4)、硫酸鎂($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)、氯化鉀(KCl)、硫酸亞鐵($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)、界面活性劑(Tween 20)、磷酸氫二鈉($NaH_2PO_4 \cdot 7H_2O$)、氯化鉀(KCl)、磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)、氫氧化鈉($NaOH$)、SSC、N-lauroylsarcosine、SDS、Blocking reagent、maleic acid、Tris-HCl、TE 緩衝液、lysozyme、TBE

三、實驗藥品及配方

(一) 馬鈴薯蔗糖培養基平板製備 (PSA)

1. 取大約 200 g 的馬鈴薯，削皮，切片至適當厚度，煮沸 10 min。
2. 以 3 到 4 層紗布過濾雜質 1 到 2 次，使溶液清澈。
3. 將溶液加水至 800 ml 後，邊攪拌邊倒入 20 g 蔗糖，將 pH 值調至 7。
4. 將溶液加水至 1000 ml，分裝在 4 個 500 ml 錐形瓶中。
5. 在每個錐形瓶加入 3.75 g 洋菜粉，以濾紙及秤量紙封好後，高壓滅菌 20 min，滅菌完成後傾注平板備用。

(二) 液態馬鈴薯蔗糖培養基 PSB

1. 取大約 200 g 的馬鈴薯，削皮，切片至適當厚度，煮沸 10 min。
2. 以 3 到 4 層紗布過濾雜質 1 到 2 次，使溶液清澈。
3. 將溶液加水至 800 ml 後，邊攪拌邊倒入 20 g 蔗糖，將 pH 值調至 7。
4. 將溶液加水至 1000 ml，分裝在 4 個 500 ml 錐形瓶中。
5. 以濾紙及秤量紙封好後，高壓滅菌後備用。

(三) 磷酸緩衝液 (Phosphate-buffer Saline) (1000 ml)

1.15 g $NaH_2PO_4 \cdot 7H_2O$ ，0.2 g KCl ，8 g $NaCl$ ，0.2 g KH_2PO_4 並加水至 1000 ml。

(四) 幾丁質培養基 (1000 ml)

1. 取 0.5~1 g 的酸解幾丁質於 50 ml 蒸餾水，以均質機打碎至無顆粒、成乳白色，並添加下列藥劑：2 g $NaNO_3$ ，1 g NaH_2PO_4 ，0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ，0.5 g KCl ，0.01 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 。
2. 將溶液加水至 1000 ml，將 pH 值調至 7，分裝在 4 個 500 ml 錐形瓶中。
3. 在每個錐形瓶加入 3.75 g 洋菜粉，以濾紙及秤量紙封好後，高壓滅菌後備用。

(五) Standard hybridization buffer

5×SSC，N-lauroylsarcosine, 0.1% (w/v)，SDS, 0.02% (w/v)，Blocking reagent 1% (1/10 volume of blocking solution, 10×conc.)。

(六) Maleic acid buffer

0.1 M maleic acid, 0.15 M $NaCl$ ，以 $NaOH$ 調至 pH 7.5。

(七) Washing buffer (新鮮配製)

500 ml 1M acetic acid buffer + 1.5 ml Tween 20。

(八) Blocking Solution

180 ml 1M acetic acid buffer + 20 ml Blocking reagent。

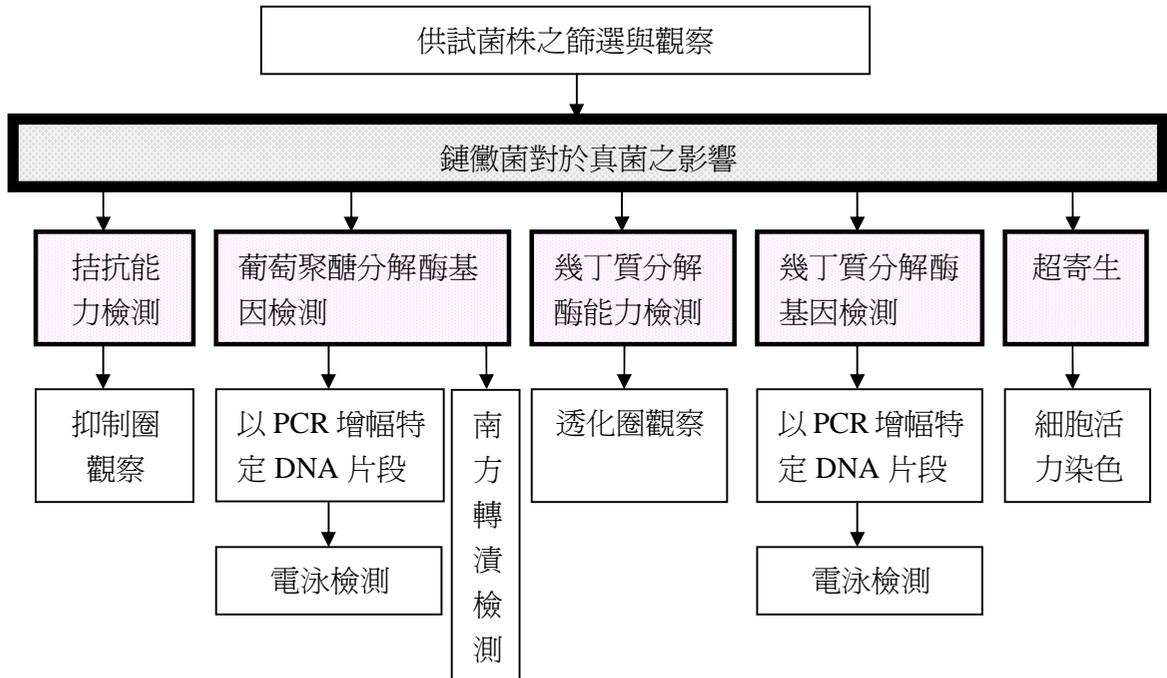
(九) Detection Buffer

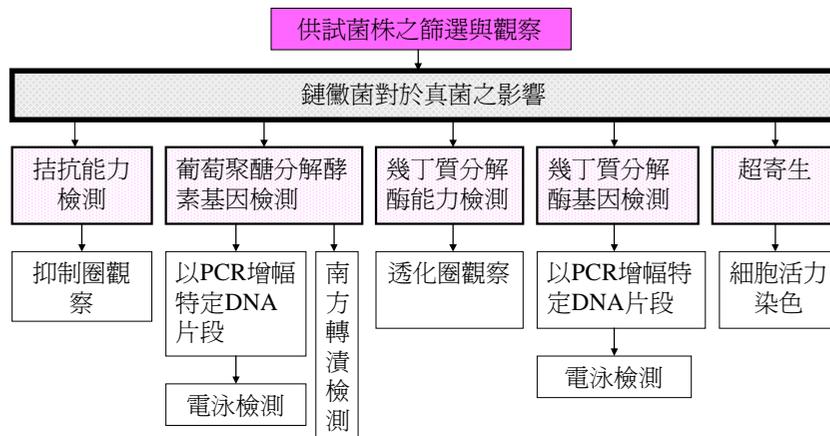
0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, pH 9.5。

四、器材

無菌操作箱 (LaminarFlow)、生物安全操作台 (炬安)、生物安全無菌無塵操作台 (欣霸 VCM 6212)、植物生長箱 (名器 F-3600N)、紫外線可見光光譜儀 (Perkin Elmer M BA 2000)、核酸聚合反應 PCR 系統 (Perkin)、紫外光核酸固著器 (Spectro Linker)、紫外光觀察箱 (Spect-312A)、恆溫箱 (LPH -100)、多點定溫水浴器 (Risen Volts 110)、震盪器 (Mild Mixer PR -36)、桌上型離心機 (Beckman Microfuge)、微量高速冷凍離心機 (Sigma 1K1S)、高速離心機 (Sorvall RC -5C)、電磁爐 (National)、微波爐 (尚朋黨 SM -1291) 定溫熱盤攪拌器 (Coming)、PH 儀 (Mettler Toledo)、迴轉震盪器 (Scientific Industries Vortex Genie 2)、電子天平 (Mettler Toledo)、培養皿、恆溫培養箱 (20 °C、28 °C、30 °C)、微量吸管、微吸管頭、移植針、移植環、100 ml 燒杯、500 ml 燒杯、1000 ml 燒杯 1000 ml 量筒、125 ml 錐形瓶、250 ml 錐形瓶、500 ml 錐形瓶、1 ml 離心管、50 ml 離心管、電子天平、本生燈、均質機、濾紙 (直徑 6.5 cm)、濾紙片 (1 cm)、秤量紙

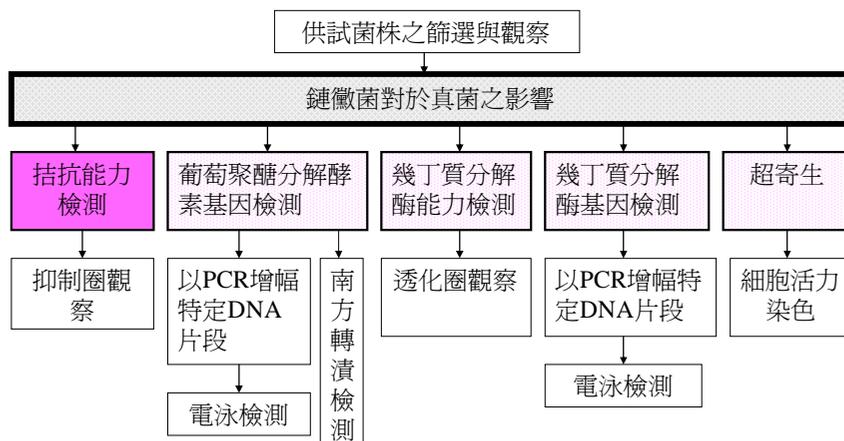
肆、 研究過程或方法





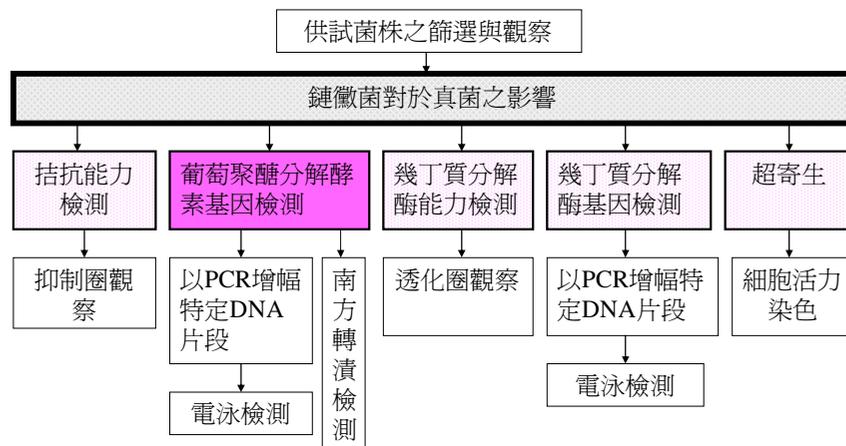
一、供試菌株之篩選與觀察

- (一) 土壤樣本由全台各處收集而得，編號 A、B 與 M a 分別由台南縣將軍鄉兩不同處與麻豆鎮水稻田取得，W c 則自中研院之白雞樹下取得。
- (二) 取 2 g 土壤加入 20 ml 10.5% Tween 20，震盪均勻，並加以序列稀釋。
- (三) 自各管中取 100 μ l 分別滴在五個幾丁質培養基上，從低稀釋度開始以塗抹棒抹勻，靜置於 28 $^{\circ}$ C 定溫箱三天。
- (四) 觀察培養基上的菌株周圍透化圈之大小，選取透化圈較明顯的菌株，以移植環取樣，線性稀釋塗抹於 PSA 上，靜置三天。
- (五) 於線性稀釋之成果中取單一菌落並再次以移植環將其移至另一 PSA 上。
- (六) 將初步挑選之菌株對稻熱病菌做拮抗，再從結果挑選出效果最好的 10 隻菌以進行接下來的實驗，十隻菌分別為 A4、B4、B10、M a7、M a6、M a15、M a21、W c4、W c6、W c17。
- (七) 將挑選出的 10 隻菌置於複式顯微鏡下觀察其型態（是否具鏈生孢子）並確定其為鏈黴菌，照相紀錄。



二、拮抗能力之檢測

- (一) 於 PSA 培養基上距中心 2 cm 處放上 3 個濾紙片，並在正中心放上病原菌。
- (二) 在 15 ml 離心管中加入 1 ml 1% Tween 20，再由培養皿中刮取適量鏈黴菌孢子放入離心管中。
- (三) 將溶液震勻後，以 Pipet 吸取 20 μ l 滴在濾紙片上。
- (四) 分別於 24 hr、48 hr、72 hr 後測量鏈黴菌與病原菌菌絲尖端之間的距離並加以照相記錄。



三、葡萄糖聚醣分解酶 (glucanase) 基因之檢測

(一) 供試菌株 DNA 之萃取

1. 取單一菌落置於已裝好 20 ml PSB 之 250 ml 錐形瓶，在 30 °C 定溫箱黑暗中震盪培養，一天後將菌落以均質機打碎。
2. 以 10,000 g 離心高速旋轉 15 min，去除上清液，收集孢子及菌絲體，加入 3 ml 含 1 mg/ml lysozyme 之 TE 緩衝液。
3. 置於 37 °C 水浴 1 hr 後，加入 SDS 及 NaCl 使其最終濃度分別達到 1% 及 1 M，於液態氮與 65 °C 水浴槽各 4 min 重複冷凍解凍的步驟 3 次，使細胞爆破。
4. 置於冰浴 10 min，再以 10,000 g 離心 10 min。
5. 取上清液加入 RNase (終濃度 200 μ g/ml) 作用 15 min，再加入 protease K (終濃度 50 μ g/ml) 作用 30 min，加入等體積的 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) 混勻，以 10000 g 離心 10 min。
6. 取上清液加入等體積 chloroform/isoamyl alcohol (24:1)，以 10000 g 離心 5 min，再加入兩倍體積的 95% 酒精，置於 -20 °C 過夜使 DNA 沉澱。
7. 24 hr 後以 12,000 g、4 °C 離心 10 min 並倒掉上清液，以 70% 酒精洗滌沉澱物，再以 12,000 g、4 °C 離心 5 min。
8. 風乾後，加入適量無菌水將 DNA 回溶，置於 -20 °C 保存。

(二) 以聚合酶連鎖反應 (PCR) 增幅供試菌株之葡萄聚醣分解酶基因片段

1. 於離心管中加入 5 M Betine 5 μ l、5% DM SO 5 μ l、1 μ M prim er 2.5 μ l、Gen Taq Buffer 2.5 μ l、0.25 M dNTP (dATP, dTTP, dCPT, dGTP) 2 μ l、H₂O 4 μ l、Taq 0.5 μ l、供試菌株 DNA 1 μ l (約 25 ng)。
2. 將上述材料進行熱循環反應
 - (1) 第 1 個循環：94 °C 4 m in、55 °C 30 s、72 °C 30 s。
 - (2) 第 2 至 29 個循環：94 °C 30 s、55 °C 30 s、72 °C 30 s。
 - (3) 第 30 個循環：94 °C 30 s、55 °C 30 s、72 °C 5 m in。

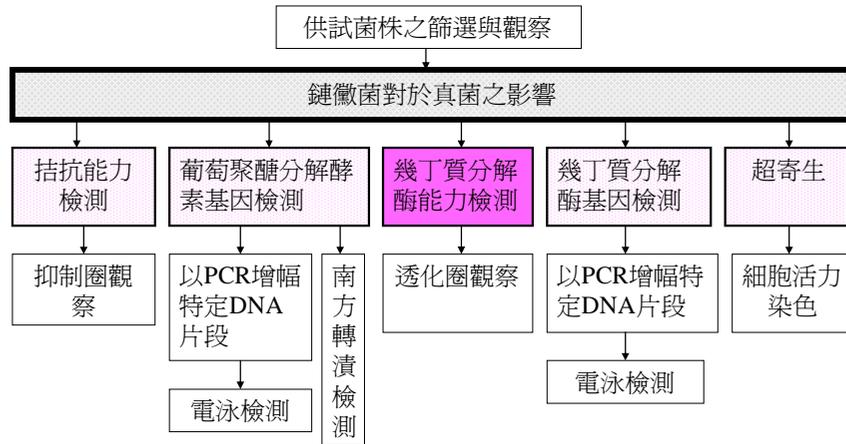
(三) 以電泳檢測葡萄聚醣分解酶基因

1. 配置電泳膠片：於 100 ml TBE 中加入 1 g 的 agarose，搖勻後微波 1 到 1.5 m in 使其完全溶解，注入模中，插尺梳 (com b)，靜置 15 m in。
2. 取出做好的電泳膠片放入電泳槽，加入 0.5 \times TBE 為緩衝液。
3. 將 PCR 後的 DNA 取 5 μ l 加上 dye 1 μ l，放入 Gen-100 DNA ladder (100~3,000 bp) 3 μ l 為 m aker，通電約 25 m in 後放入 ETBr 浸泡約 30 m in。
4. 在紫外光下觀察螢光並照相。

(四) 以南方轉漬 (Southern blot) 檢測葡萄聚醣分解酶基因

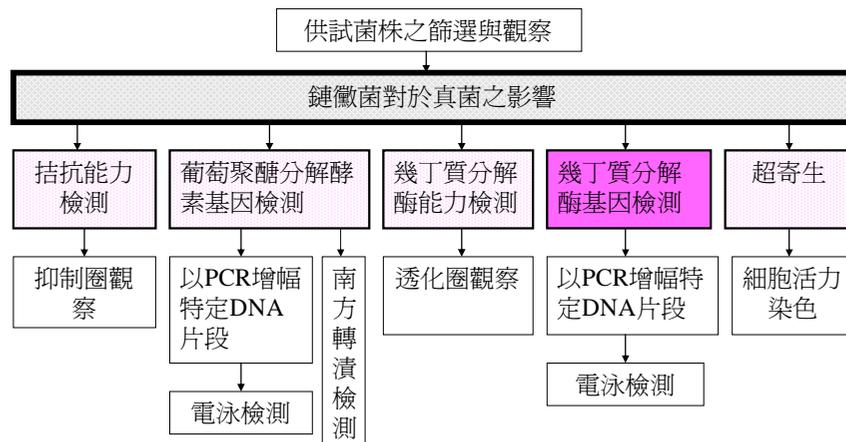
1. 自不同鏈黴菌萃取之 DNA 分別以 DNA 限制酶 (Bam HI) 剪切後，同上述之方法進行電泳分離。
2. 跑完之電泳膠片，以 0.25 N 之 HCl 緩慢震盪處理 30 m in 直到 dye 因酸性變成黃綠色，之後加入 denature solution (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) 緩慢震盪處理 30 m in。
3. 去除 denature solution 後加入 neutralization solution (0.1 M Tris-HCl, pH 7.5; 1.5 M NaCl) 緩慢震盪處理 30 m in，去除 neutralization solution 後以真空轉漬法轉漬至硝化纖維膜上。
4. 將 DNA 固定於膜上：將膜放入 UV 以 1200 KJ 之能量照射兩次 (正反面各一)，以加強 DNA 之固定。
5. 將反應後之硝化纖維膜右上角剪下一角作為標記，置入適當大小雜合瓶加入 15 ml standard hybridization solution，以 60 °C 前雜合 1 hr，反應完後將前雜合液倒掉。
6. 將製好之核酸探針 (20 μ l) 加入 20 ml 之 standard hybridization solution 中並於 100 °C 中煮沸 10 m in，趁熱倒入雜合瓶內，調整雜合溫度為 65 °C 並進行雜合反應過夜。
7. 將膜取出以含有 0.1% (w/v) SDS 之 2 \times SSC 於室溫下漂洗 10 m in 兩次，再以 0.1% (w/v) SDS 之 0.2 \times SSC 於 65 °C 下漂洗 10 m in 兩次，再以 blocking solution 於室溫下反應 30 m in。

8. 將膜取出置於 anti-DIG -AP (以 Maleic acid buffer 稀釋至 1:10,000, 配置 20 ml) 於室溫下反應 2 hr。
9. 以 washing buffer 清洗 2 次每次 15 min, 再置入 detection buffer 2~5 min。
10. 置於雜合袋內, 加入 CSPD 混合均勻先於室溫放 5 min, 再置於 37 °C 5~15 min 加強螢光。
11. X-ray 底片曝光 30 min, 以顯影液將底片顯影。



四、幾丁質分解酶 (chitinase) 之能力檢測

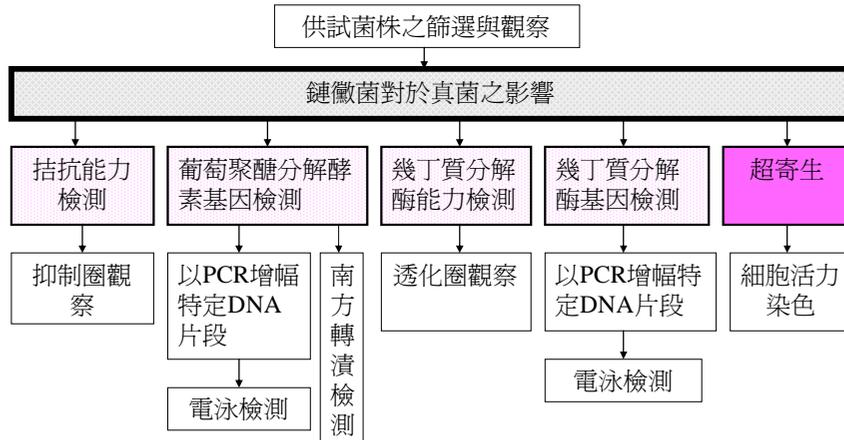
- (一) 於幾丁質培養基上距中心 2 cm 處放上 3 個濾紙片, 並在正中心放上病原菌。
- (二) 在 15 ml 離心管中加入 1 ml 1% Tween20, 再由培養皿中刮取適量鏈黴菌放入離心管中。
- (三) 將溶液震勻後, 以微量分注器吸取 20 μ l 滴在濾紙片上。
- (四) 靜置三至五天後觀察培養基被分解的狀況並 測量透化圈的寬度。



五、幾丁質分解酶之基因檢測

以聚合酶連鎖反應（PCR）增幅供試菌株之葡萄聚醣分解酶基因片段，試驗中將引子對改為 ChIF 及 ChIR，而接續熱循環反應同三之（二）所述。

增幅片段之檢測法，同三之（三）。



六、超寄生現象

- (一) 將玻璃紙切成 $5 \times 5 \text{ cm}^2$ 大小鋪在 1.5% 水瓊脂 (water agar) 培養基上。
- (二) 自培養三天之立枯絲核菌培養皿中切取 $0.5 \text{ cm} \times 5 \text{ cm}$ 大小的菌絲塊，並移植至上述玻璃紙正中央。
- (三) 兩天後（視病原真菌的生長情形增減）分別刮取適量鏈黴菌 M a6、W c17、B4 溶於 0.5% Tween 20，震盪均勻後吸取 $500 \mu\text{l}$ 至石英管中，以光譜儀調整濃度，再吸取 1 ml 將病原真菌的菌絲浸濕，靜置 2~3 min 後吸出。
- (四) 兩天後以刀片將玻璃紙自培養基上取下，置於培養皿中備用。
- (五) 細胞活力染色
 1. 於菌絲上加入 $10 \mu\text{l}$ FDA 染劑將活的菌絲染成螢光下的綠色，置於黑暗中 5 min 避免螢光發散，再以磷酸緩衝液沖洗乾淨。
 2. 在於菌絲上加入 $10 \mu\text{l}$ PI 將死亡菌絲染成螢光下的紅色，置於黑暗中 5 min 後以磷酸緩衝液沖洗乾淨。
 3. 加入固定液 (1% paraformaldehyde) 鋪滿玻璃紙，置於黑暗中 15 min 後以磷酸緩衝液沖洗乾淨，並將菌絲從玻璃紙上移到載玻片上。
- (六) 置於顯微鏡下，分別以位像差及螢光顯微鏡觀察，並以正片拍攝。

伍、研究結果

一、供試菌株之篩選與觀察

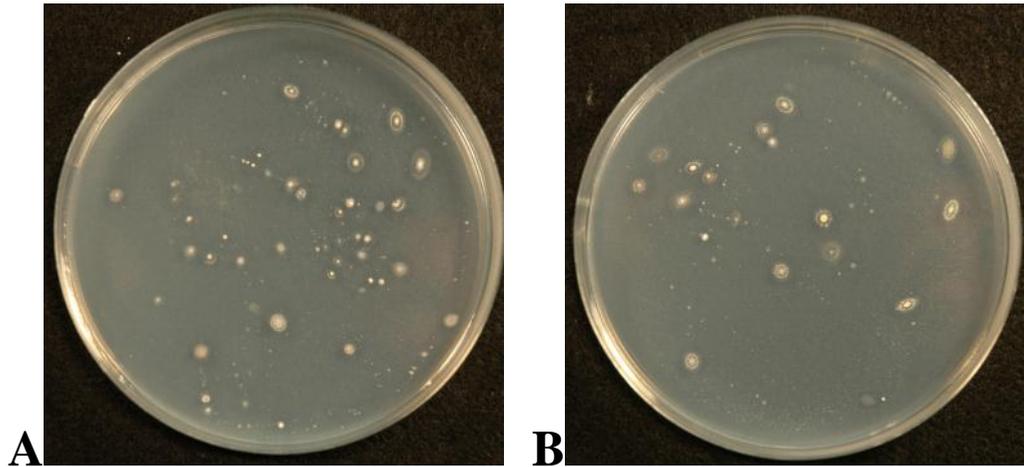


圖 1. 取土序列稀釋後塗於幾丁質培養基，選取具透化圈而較強之菌株。於圖中白色單一菌落四周明顯可見較透明之透化圈。圖例為稀釋至 10^{-3} 倍 (A) 及 10^{-4} 倍 (B) 之照片。

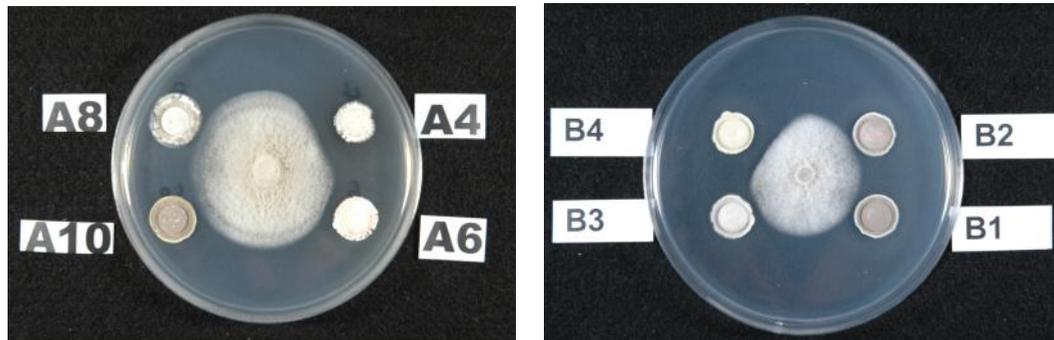


圖 2. 從序列稀釋初步篩選之鏈黴菌對稻熱病菌的拮抗作用，以篩選供試菌株。圖例為將軍 A 區及將軍 B 區之部分菌株。

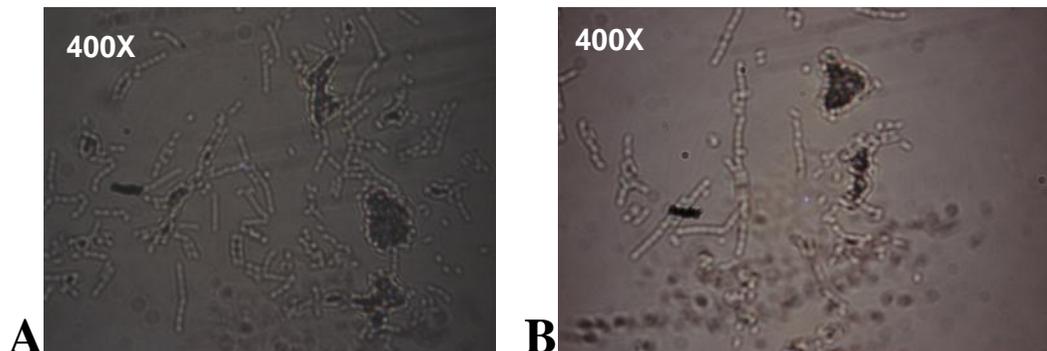


圖 3. 在 400 倍光學顯微鏡下觀察供試菌株之鏈生孢子。圖例為 M a6 (A)、M a15 (B)。

二、拮抗能力之檢測

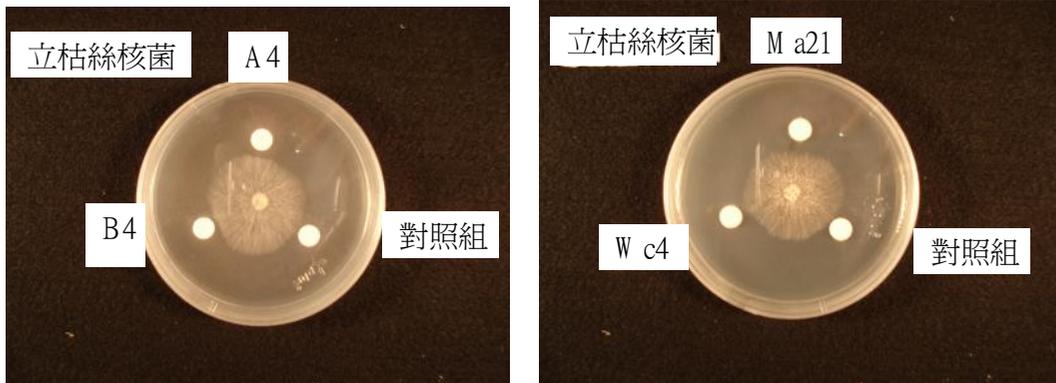
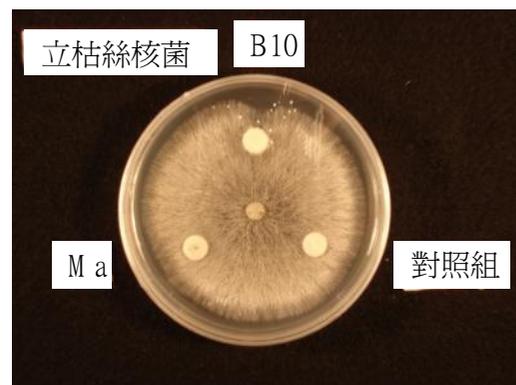
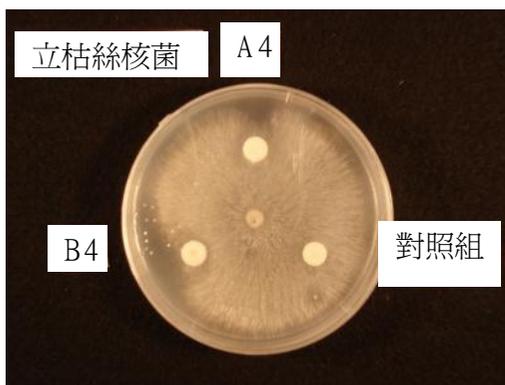
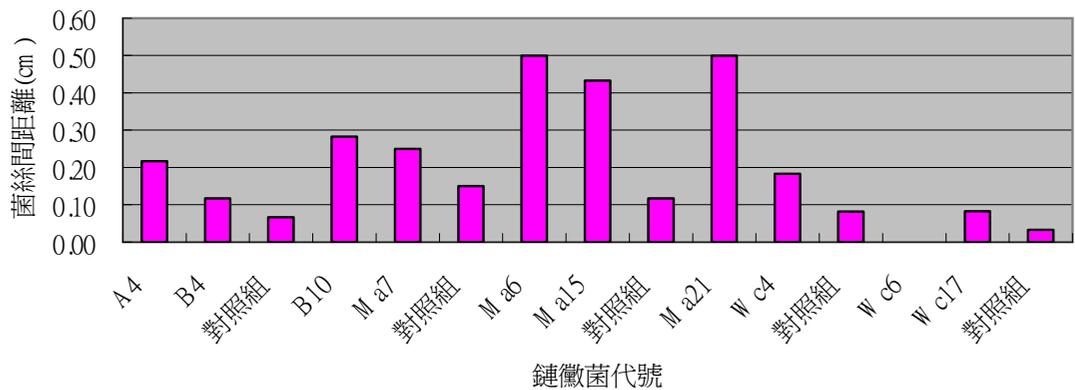


圖 4. 鏈黴菌與立枯絲核菌同時接種，24 hr 後鏈黴菌對立枯絲核菌的拮抗作用。圖例取 A 4、B 4、M a21、W c4 為代表。

表 1. 鏈黴菌與立枯絲核菌同時接種，24 hr 後鏈黴菌對立枯絲核菌的拮抗作用其菌絲尖端間的距離。



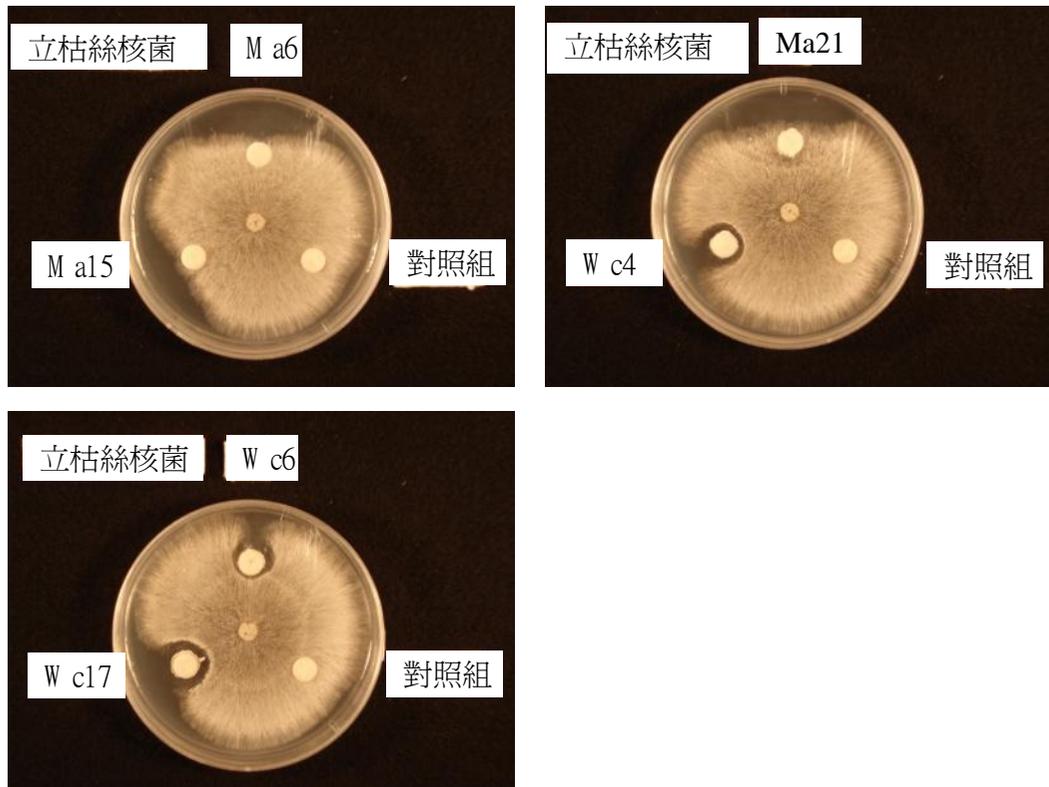
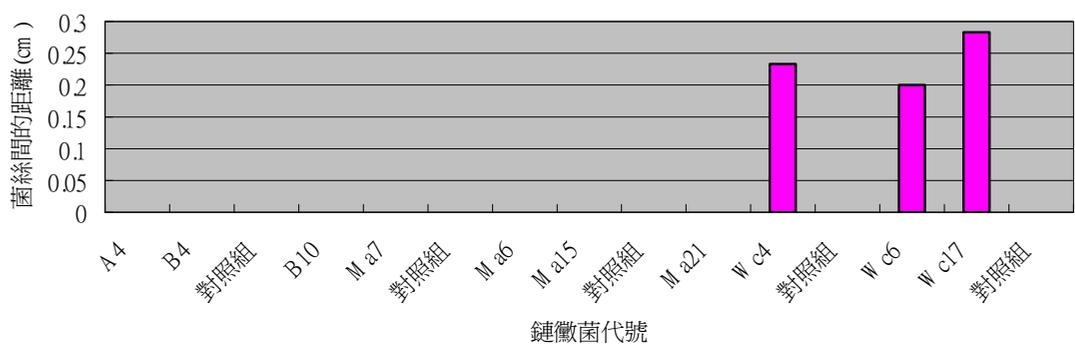


圖 5. 鏈黴菌與立枯絲核菌同時接種，48 hr 後十株鏈黴菌對立枯絲核菌的拮抗作用。由圖中可明顯看出 M a 菌群使立枯絲核菌邊緣菌絲近乎切齊，而 W c 菌群則產生界線清楚之抑制圈，兩者造成之拮抗現象表現形態明顯差異。

表 2. 鏈黴菌與立枯絲核菌同時接種，48 hr 後鏈黴菌對立枯絲核菌的拮抗作用其菌絲尖端間的距離。



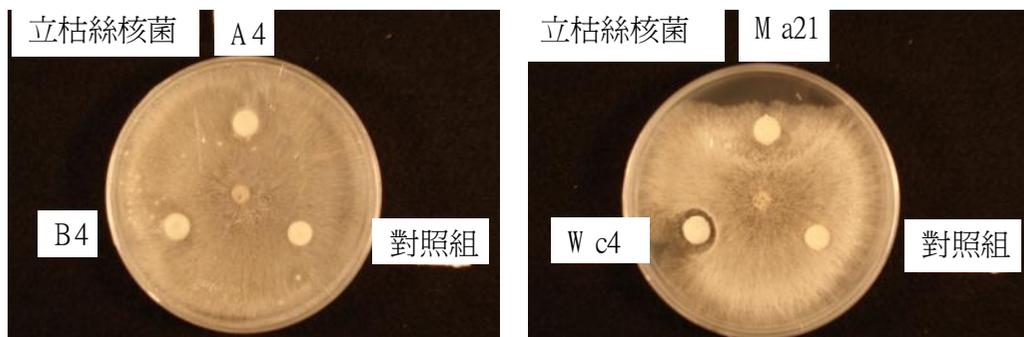


圖 6. 鏈黴菌與立枯絲核菌同時接種，72 hr 後鏈黴菌對立枯絲核菌的拮抗作用。圖例取 A 4、B 4、M a21、W c4 為代表。

表 3. 鏈黴菌與立枯絲核菌同時接種，72 hr 後鏈黴菌對立枯絲核菌的拮抗作用其菌絲尖端間的距離。

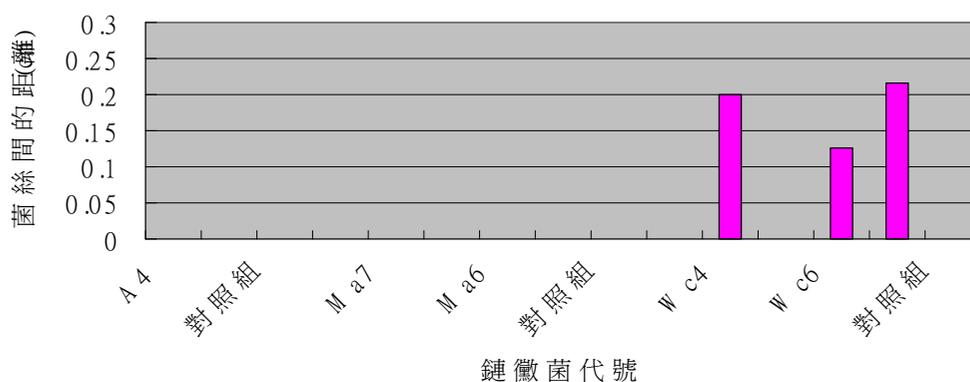
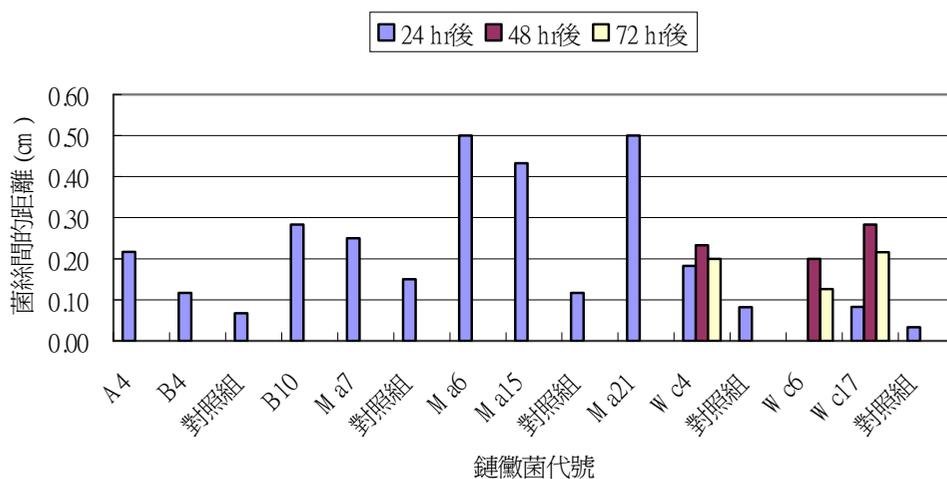


表 4. 鏈黴菌與立枯絲核菌同時接種，24、48、72 hr 後鏈黴菌對立枯絲核菌的拮抗作用其菌絲尖端間距比較。



由表可知鏈黴菌對立枯絲核菌拮抗作用其菌絲尖端間的距離隨時間而減少，直至被立枯絲核菌菌絲的生長覆蓋過。但是 24 hr 觀察時其拮抗作用較弱之 Wc 菌群，卻於 48 hr 及 72 hr 觀察時依舊保有明顯界線之環狀抑制圈。

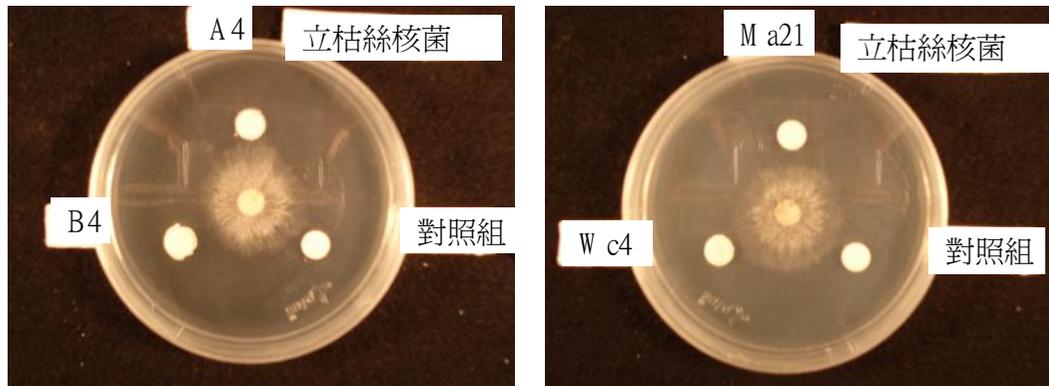


圖 7. 鏈黴菌早立枯絲核菌一天接種，兩者皆接種後 24 hr 鏈黴菌對立枯絲核菌的拮抗作用。圖例取 A4、B4、M a21、W c4 為代表。

表 5. 鏈黴菌早立枯絲核菌一天接種，兩者皆接種後 24 hr 鏈黴菌對立枯絲核菌的拮抗作用其菌絲尖端間的距離。

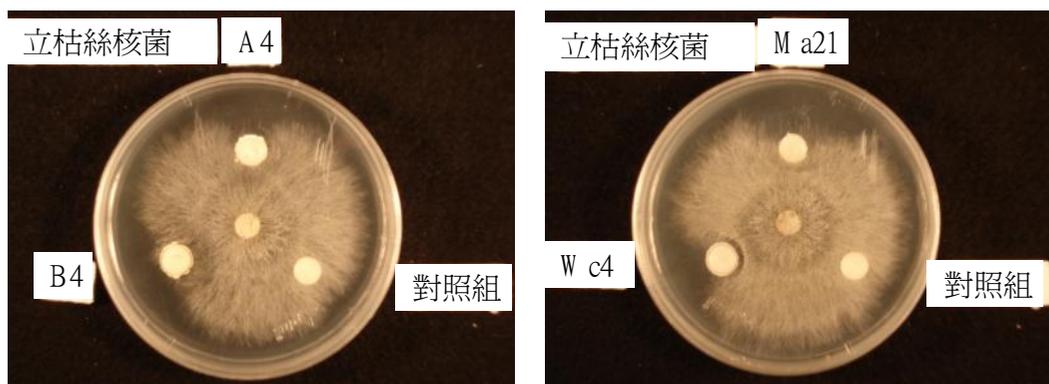
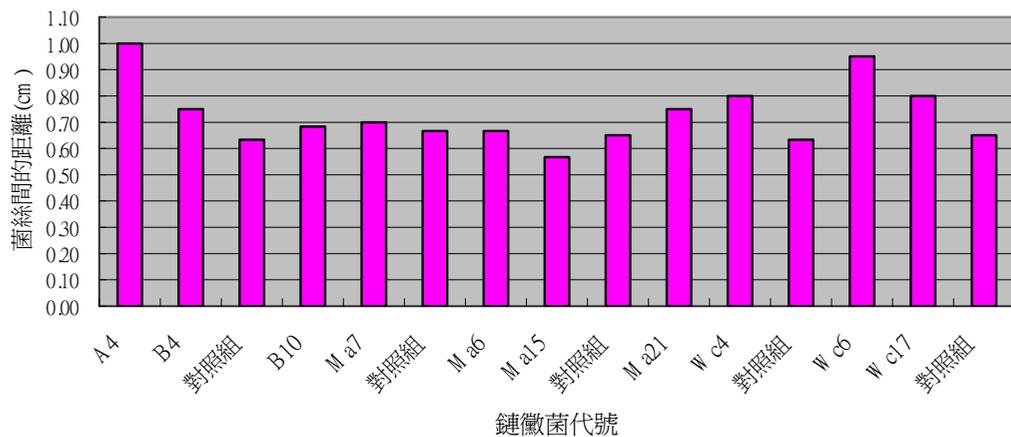


圖 8. 鏈黴菌早立枯絲核菌一天接種，兩者皆接種後 48 hr 鏈黴菌對立枯絲核菌的拮抗作用。圖例取 A4、B4、M a21、W c4 為代表。

表 6. 鏈黴菌早立枯絲核菌一天接種，兩者皆接種後 48 hr 鏈黴菌對立枯絲核菌的拮抗作用其菌絲尖端間的距離。

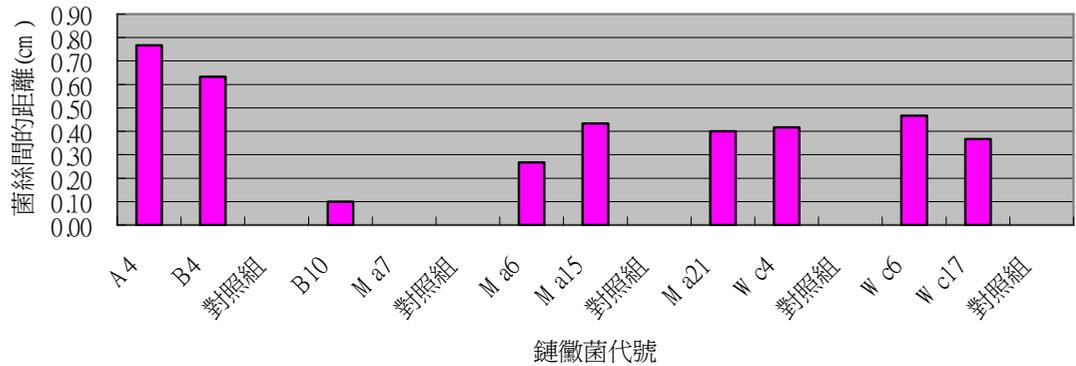


表 7. 鏈黴菌早立枯絲核菌一天接種，兩者皆接種後 24、48 hr 鏈黴菌對立枯絲核菌的拮抗作用其菌絲尖端間距比較。

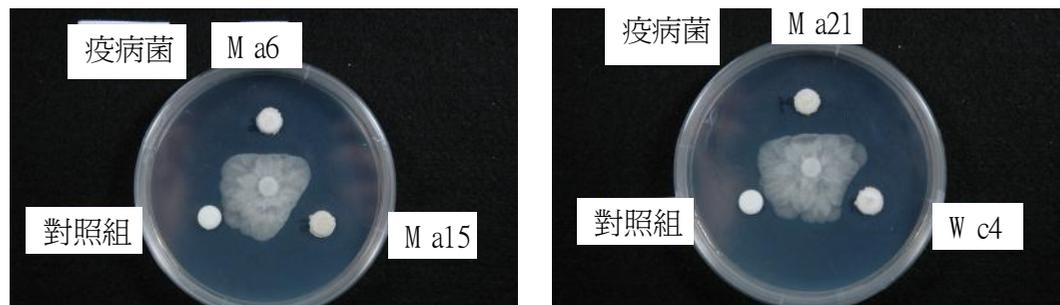
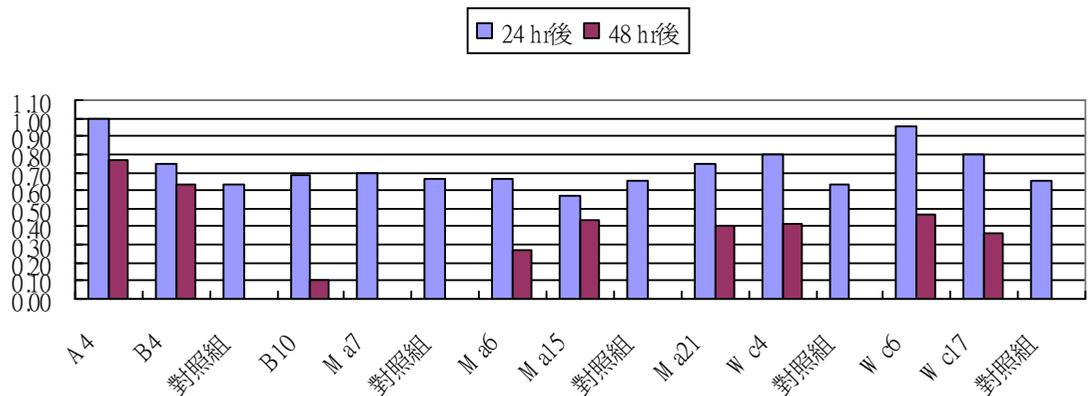


圖 9. 鏈黴菌與疫病菌同時接種，72 hr 後鏈黴菌對疫病菌的拮抗作用。圖例取 M a6、M a15、M a21、W c4 為代表。

表 8. 鏈黴菌與疫病菌同時接種，72 hr 後鏈黴菌對疫病菌的拮抗作用其菌絲尖端間的距離。

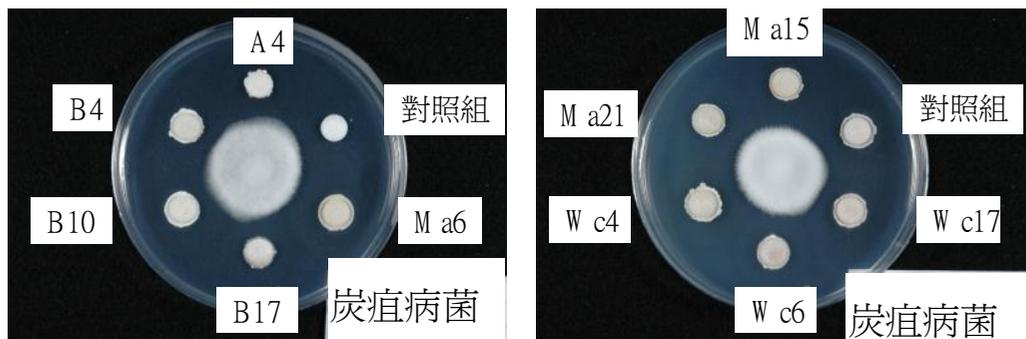
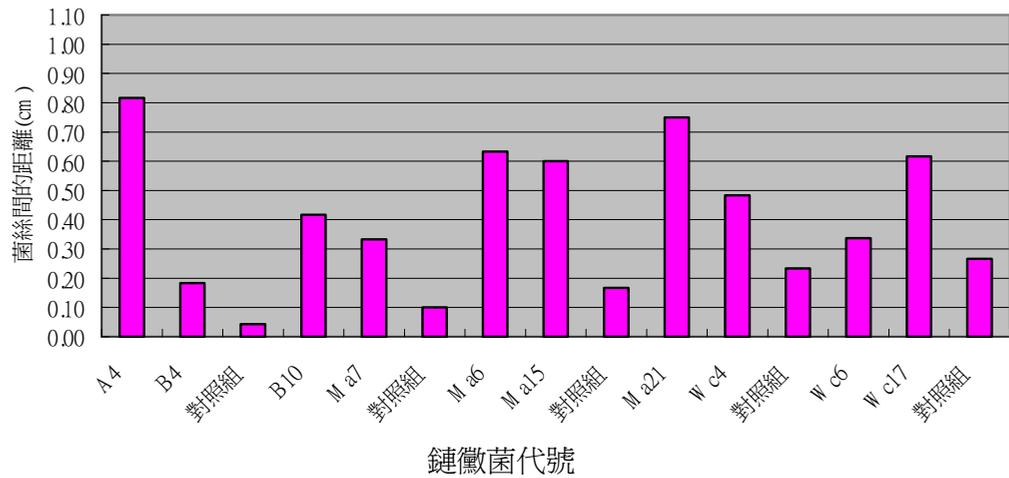
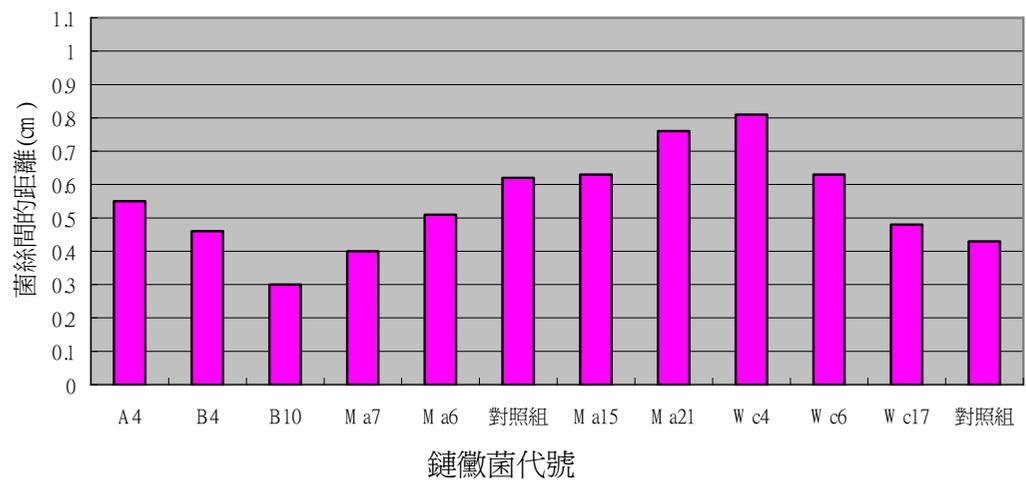


圖 10. 鏈黴菌與炭疽病菌同時接種，72 hr 後鏈黴菌對炭疽病菌的拮抗作用。

表 9. 鏈黴菌與炭疽病菌同時接種，72 hr 後鏈黴菌對炭疽病菌的拮抗作用其菌絲尖端間的距離。



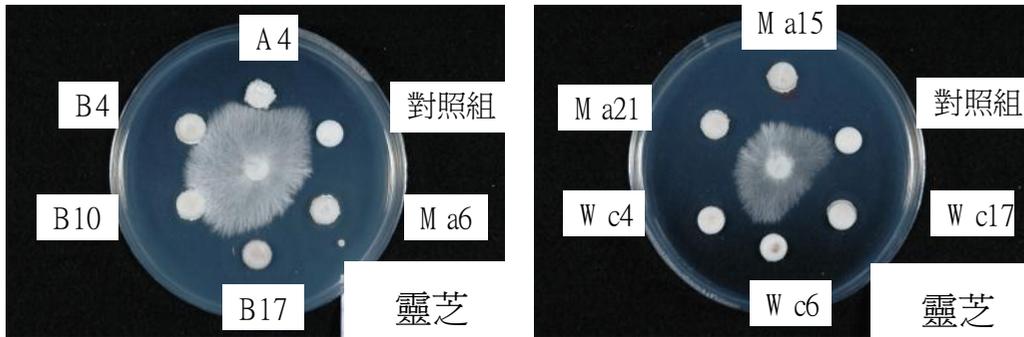


圖 11. 鏈黴菌與靈芝同時接種，72 hr 後鏈黴菌對靈芝的拮抗作用。

表 10. 鏈黴菌與靈芝同時接種，72 hr 後鏈黴菌對靈芝的拮抗作用其菌絲尖端間的距離。

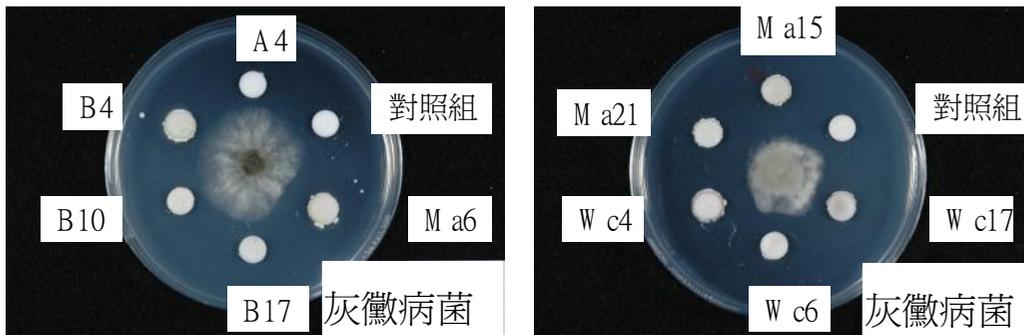
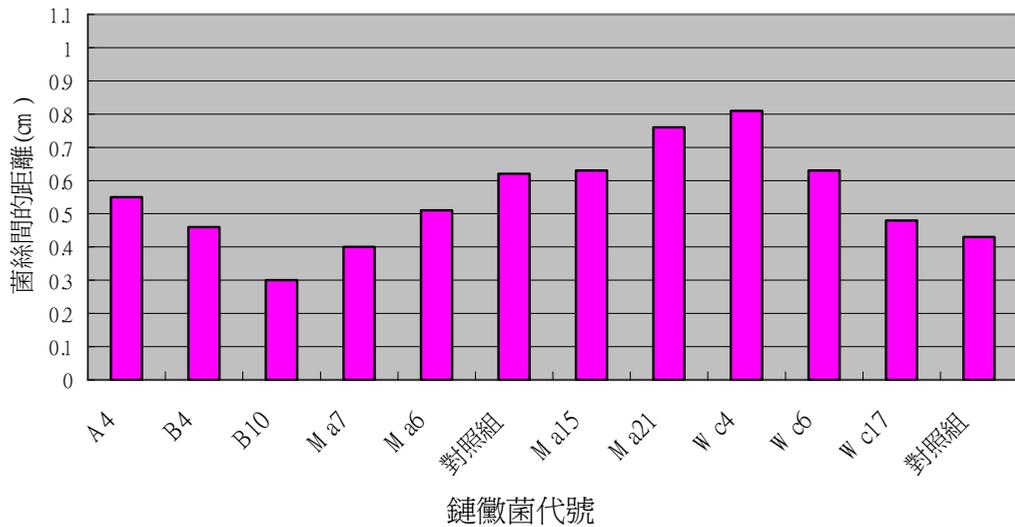


圖 12. 鏈黴菌與灰黴病菌同時接種，72 hr 後鏈黴菌對灰黴病菌的拮抗作用。

表 11. 鏈黴菌與灰黴病菌同時接種，72 hr 後鏈黴菌對灰黴病菌的拮抗作用其菌絲尖端間的距離。

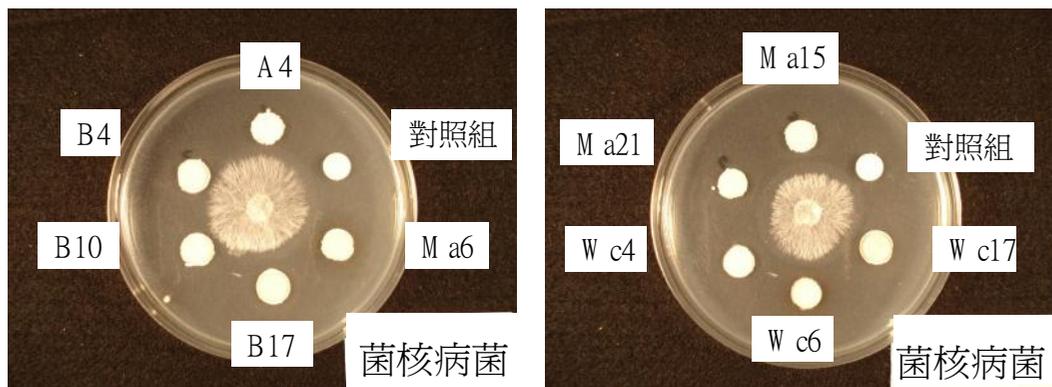
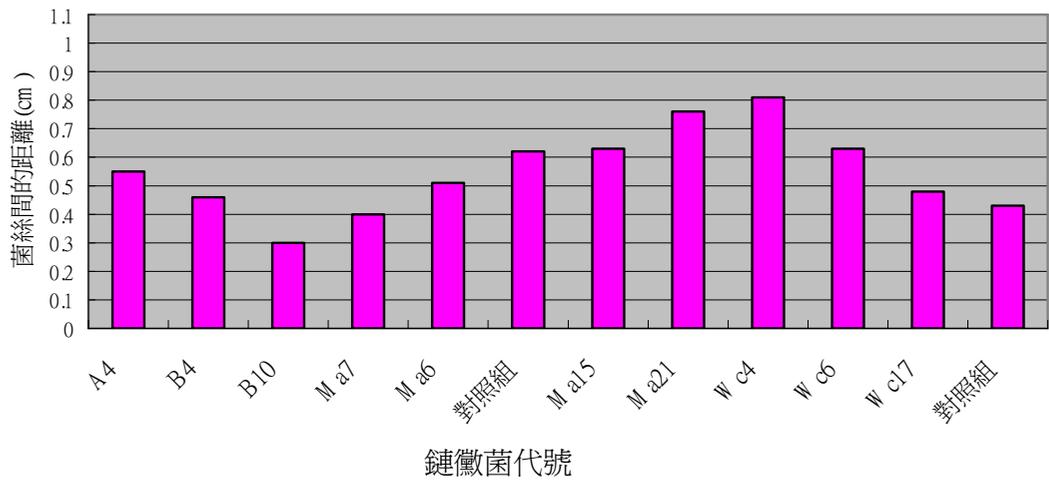
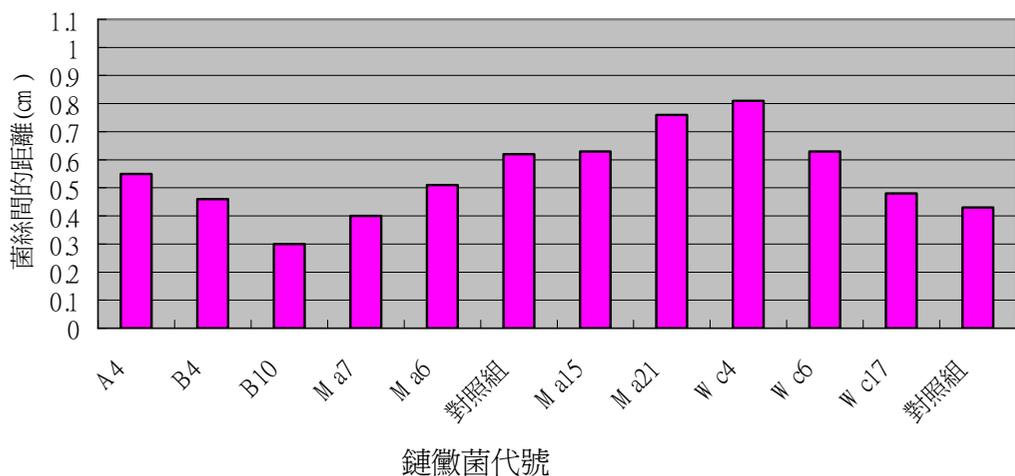


圖 13. 鏈黴菌與菌核病菌同時接種，24 hr 後鏈黴菌對菌核病菌的拮抗作用。

表 12. 鏈黴菌與菌核病菌同時接種，24 hr 後鏈黴菌對菌核病菌的拮抗作用其菌絲尖端間的距離。



三、葡萄聚醣分解酶 (glucanase) 基因之檢測

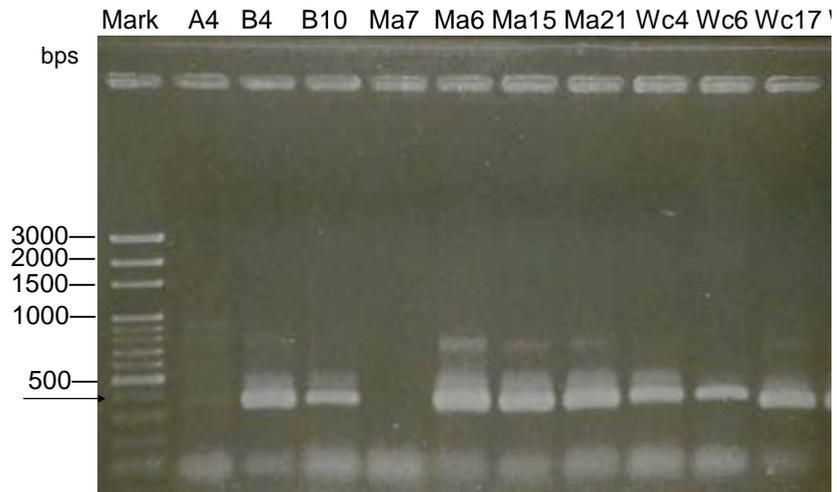


圖 14. 利用 PCR 配合葡萄聚醣分解酶專一性引子對檢測所篩選之鏈黴菌菌株，箭頭所指處即為所增幅之葡萄聚醣分解酶基因片段。

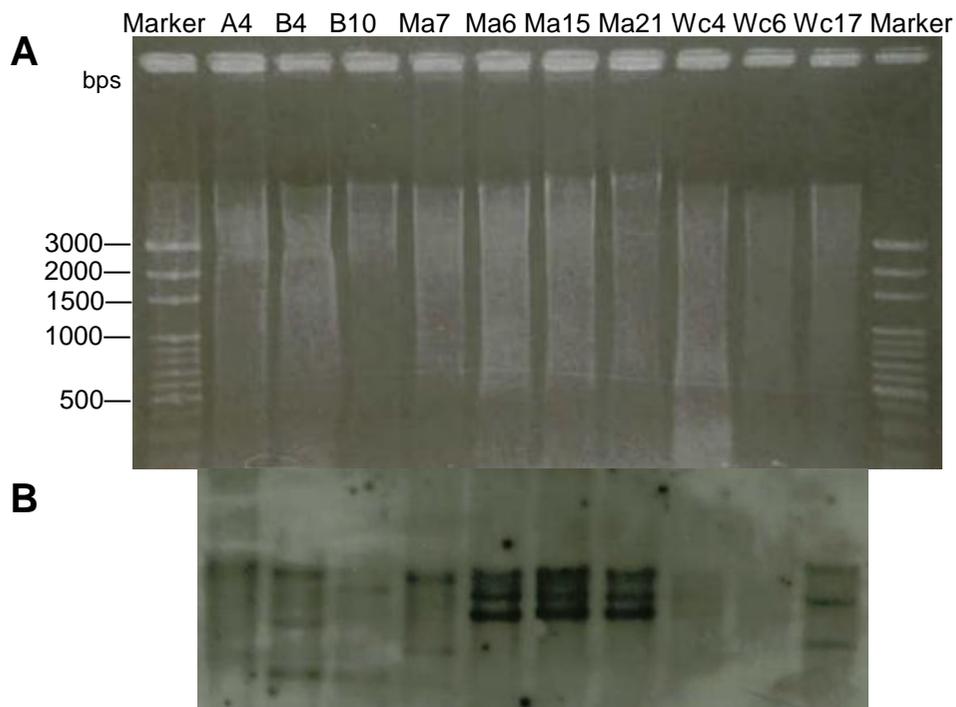
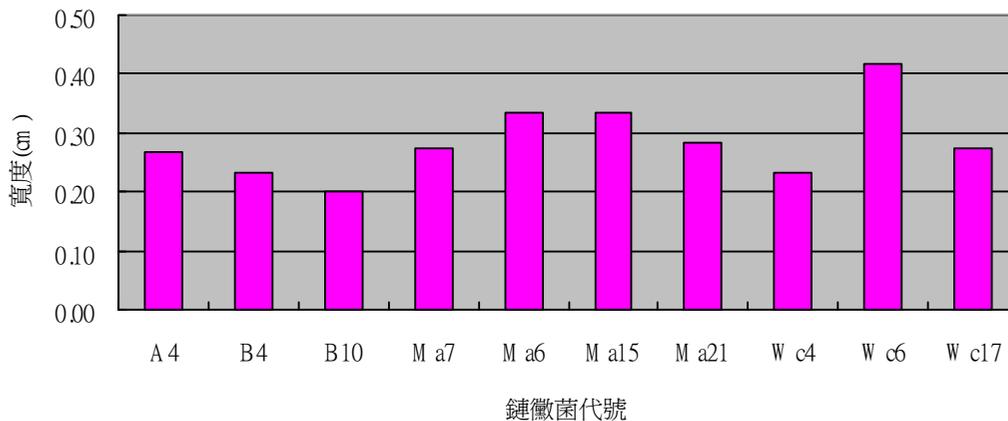


圖 15. 以南方轉漬檢測所篩選鏈黴菌之葡萄聚醣分解酶基因存在情形，以限制酶 (*Bam* HI) 切割鏈黴菌基因體之電泳結果 (A)，顯色處即為以葡萄聚醣核酸探針檢出之基因片段 (B)。

四、幾丁質分解之能力檢測

表 13. 鏈黴菌生長於幾丁質培養基 72 hr 所形成之透化圈寬度。



五、幾丁質分解酶 (chitinase) 之基因檢測



圖 16. 利用 PCR 配合幾丁質分解酶專一性引子對，檢測所篩選之鏈黴菌菌株，箭頭所指此處即為所增幅之葡萄聚糖分解酶基因片段。

六、超寄生現象

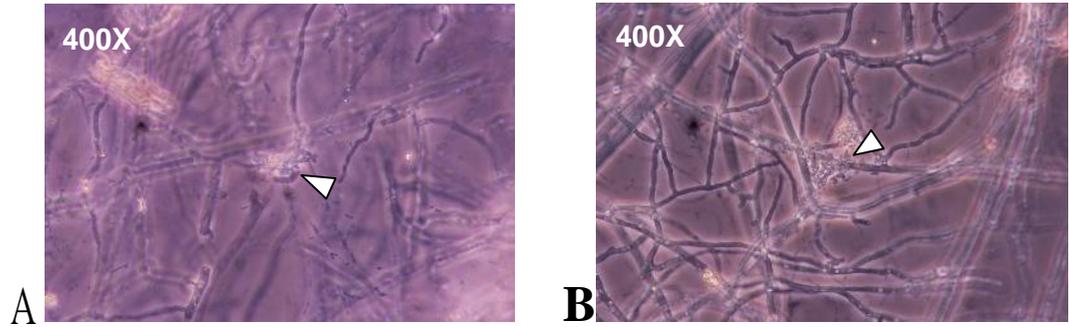


圖 17. 在 400 倍光學顯微鏡位像差視野之下，觀察鏈黴菌對病原真菌之超寄生現象。所舉圖例為 Ma6 對菌核病菌 (A) 及 Wc17 對菌核病菌 (B) 之菌絲纏繞現象。箭頭所指處即為鏈黴菌菌絲明顯纏繞病原真菌菌絲的現象。

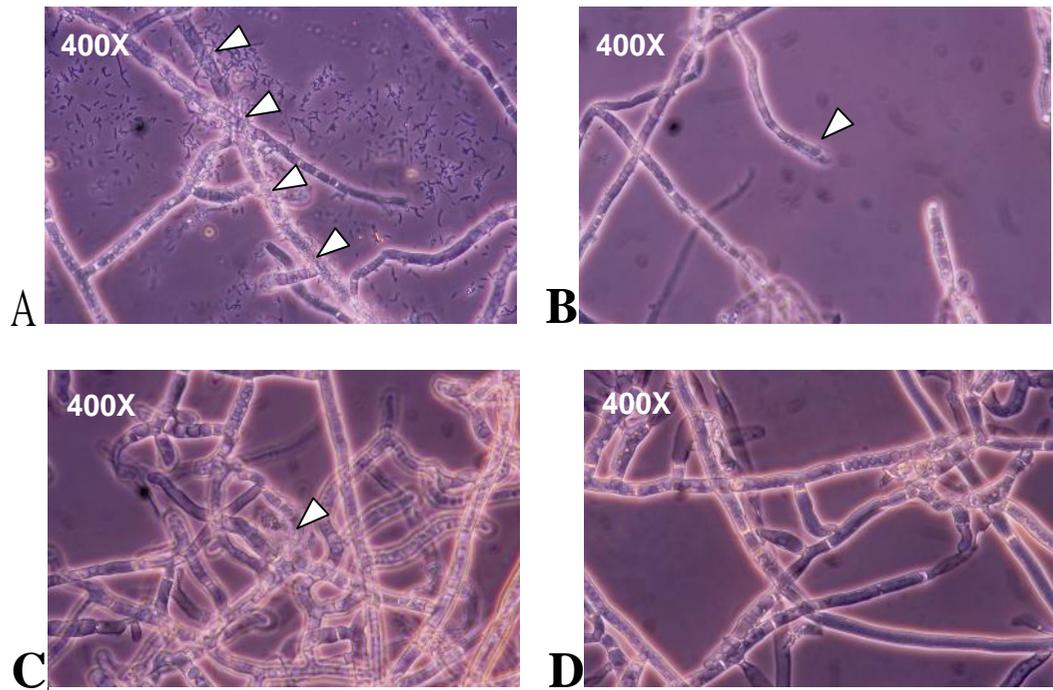


圖 18. 在 400 倍光學顯微鏡位像差鏡頭下，比較 M a6、B4、W c17 對立枯絲核菌所作用之超寄生現象。圖 A 為 M a6，圖 B 為 B4，圖 C 為 W c17，圖 D 為對照組。對照於圖 D，可見圖 A、B、C 之菌絲纏繞現象。

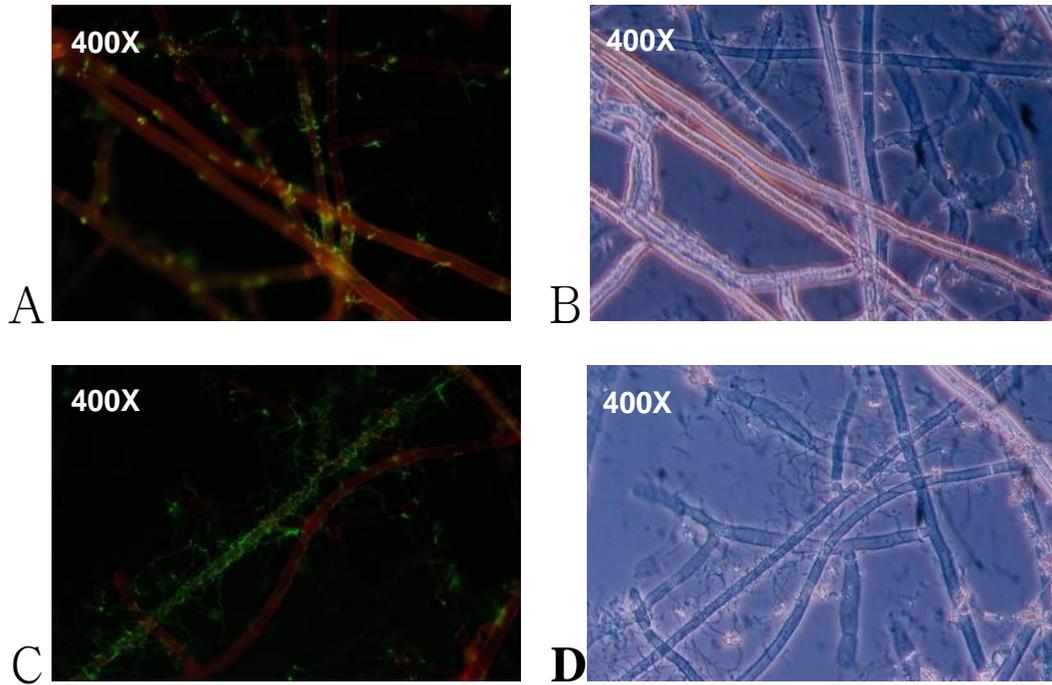


圖 19. 在螢光顯微鏡之下，觀察鏈黴菌對立枯絲核菌之超寄生現象。圖中舉 M a21 對立枯絲核菌的超寄生現象為例。圖 A 和圖 C 為細胞活力染色後在螢光顯微鏡下呈現之視野，其對應之位相差視野影像分別為圖 B、圖 D。

表 14. 綜合比較鏈黴菌對病原真菌之拮抗作用及其透化圈寬度。(cm)

病原菌種 供試菌株	立枯絲核菌				疫病菌 72 hr	靈芝病菌 72 hr	灰黴病菌 72 hr	菌核病菌 24 hr	炭疽病菌 72 hr	透化圈寬度 72 hr
	同時接種			鏈黴菌先放 24 hr 後移植 病原真菌， 再靜置 24 hr 後觀察						
	24 hr	48 hr	72 hr							
A 4	0.22	0.00	0.00	1.00	0.82	0.13	0.28	0.55	0.53	0.27
B 4	0.12	0.00	0.00	0.75	0.18	0.00	0.40	0.46	0.50	0.23
B 10	0.28	0.00	0.00	0.68	0.42	0.25	0.25	0.30	0.53	0.20
M a7	0.25	0.00	0.00	0.70	0.33	0.35	0.60	0.40	0.45	0.27
M a6	0.50	0.00	0.00	0.67	0.63	0.60	0.90	0.51	0.75	0.33
M a15	0.43	0.00	0.00	0.57	0.60	0.57	1.00	0.63	0.77	0.33
M a21	0.50	0.00	0.00	0.75	0.75	0.63	0.98	0.76	0.85	0.28
W c4	0.18	0.23	0.20	0.80	0.48	0.52	0.85	0.81	0.83	0.23
W c6	0.00	0.20	0.30	0.95	0.34	0.33	0.65	0.63	0.60	0.42
W c17	0.08	0.28	0.22	0.80	0.62	0.65	0.45	0.48	0.50	0.27

縱向視之，比較鏈黴菌 A4 到 Wc17 其能力之優劣，依序以紅、橙、綠、藍、紫標示。

六、 討論

一、實驗步驟之討論

(一) 供試菌株之篩選與觀察

於前文動機中所述及水稻枯死之現象，經鑑定得知其為稻熱病，因此試驗初期，即選取稻熱病菌作為菌株篩選之依據。

(二) 拮抗能力檢測之步驟討論

拮抗試驗中，由於供試之立枯絲核菌株及菌核病菌株的生長速度較快，此兩種病原菌在接種 24 hr 後觀察，其餘四種病原菌：疫病菌、炭疽病菌、靈芝病菌、灰黴病菌則是於接種後 72 hr 後進行觀察。

(三) 幾丁質分解酶基因檢測之步驟討論

前人研究顯示，若所選取之菌株具有 ChIF 基因，則其對真菌生長的抑制能力較強，因此本實驗採用引子對 ChIF、ChIFR。

(四) 超寄生現象之步驟討論

1. 此實驗選用之鏈黴菌 B4、M a6、W c17 係根據其產孢之多寡來選取。
2. 處理好的玻片標本需置放在培養皿中並加水保溼，避免水分蒸發使得細胞內之染色劑流出，造成視野下模糊不清。

二、實驗結果之討論

(一) 供試菌株之篩選與觀察的結果討論

經參閱文獻顯示多數鏈黴菌具有幾丁質分解之能力，因此我們將所採集之菌株置於幾丁質培養基上培養，以有無透化圈（圖 1.）為依據，選取具幾丁質分解能力之菌株，配合對稻熱病菌拮抗結果篩選所得之優異菌株，最後於光學顯微鏡下觀察所取供試菌株之型態，發現均具有鏈生孢子（圖 3.），因此我們推論所選定之供試菌株皆為鏈黴菌屬。

(二) 拮抗能力檢測之結果討論

為了解所篩選鏈黴菌之應用發展性，試驗中分別以立枯絲核菌、疫病菌、炭疽病菌、菌核病菌、靈芝病菌、灰黴病菌等菌源親屬關係差異大之病原真菌測試供試菌株之拮抗能力。由拮抗結果顯示，部分供試菌株對病原菌具有拮抗作用並產生抑制圈，且抑制圈之大小及型態因菌株之不同而異。

在觀察結果發現不同鏈黴菌對其拮抗的影響程度隨時間而不同的變化。以 M a21 及 W c4 為例，M a21 在 24 hr 後所觀察之拮抗作用較 W c4 明顯（圖 4.），其與立枯絲核菌菌絲間距離較寬且使菌絲在邊緣切齊，抑制立枯絲核菌菌絲生長之能力顯較 W c4 為強；但於 48 hr 後觀察時，M a21 已逐漸被病原菌菌絲覆蓋，而 W c4 四周仍保有清楚的環狀抑制圈（圖 5.），我們也在同為 W c 菌群的 W c6、W c17 發現與 W c4 相類似的情況，表示拮抗作用為一連續性的動態交互作用。

由將軍鄉水稻田採集之菌株（A、B）及由麻豆鎮水稻田採集之菌株（M a）的拮抗能力多在初期即表現出來，表示於初期即會產生抑制物質阻礙病原菌之生長，而至後期無法繼續抑制菌絲生長，推測此抑制物質有減少現象，或此抑制物質已無法阻擋病原菌菌絲生長勢；反觀在中研院白雞樹下採集到的菌株（W c），於初期雖無明顯抑制作用，而後期抑制現象明顯，顯然於後期有大量抑制物質誘導產生。

另一方面，除了概略的了解到鏈黴菌的抗生素及多醣水解酶會對真菌造成影響外，我們也發現不同地點採集到之供試菌株所造成的拮抗現象也不盡相同。於圖 5. 中，我們發現 A、B 菌群的拮抗現象普遍較不明顯；M a 菌群於 24 hr 後的拮抗結果則在病原真菌的菌絲邊緣產生了近乎切齊的現象；但是 W c 菌群則以滴有孢子懸浮液的濾紙片為中心，產生界線清楚的抑制圈。因此我們推論由 W c 菌群所產生的拮抗物質與 A、B 及 M a 三個菌群所分泌的可能差異較大，表示中研院白雞樹下的菌相可能與其餘三者有所歧異。

另外，本試驗中仍有方法需改進之處。如在圖 11. 中，由於 M a6 之拮抗現象十分顯著，使 M a7、B4 等周圍測試菌之拮抗現象亦受到 M a6 之影響，此等拮抗能力強的菌株，也可能抑制同皿拮抗菌株生長；供試菌株於培養皿上的交互作用也會使結果與預期的有所出入。

（三）多醣分解酶基因檢測之結果討論

1. 葡萄聚醣分解酶基因電泳結果

（1）圖中除 A4 及 M a7 外皆出現明顯條帶（圖 14.），經核對發現其分子量多落在 400 bp 左右，此結果與楊氏（Yang, S.S.）、陳氏（未發表資料）相符，顯示其皆具有葡萄聚醣分解酶之基因。

（2）有關 A4 及 M a7 未出現明顯條帶，我們推論可能原因為此二者之基因於引子對附著的地方產生突變，使得引子不易附著，並造成複製增幅上的困難。

2. 南方轉漬結果

由圖 15. 中可看出在 10 個供試菌株中，以 M a 菌群中的 M a6、M a15 及 M a21 的條帶最為明顯，表示其葡萄聚醣分解酶基因與所預期的目標基因序列最為吻合。

3. 幾丁質分解酶基因電泳結果

除 A4、B10、M a15 並無明顯條帶，以及 M a7 及 W c6 之條帶位置與其他較不相同（圖 16.）之外，經核對發現其餘多數條帶分子量多落在 400 bp 左右，此結果與楊氏（Yang, S.S.）、陳氏（未發表資料）相符，顯示其皆具有幾丁質分解酶之基因。至於條帶未出現或位置上與預期有所差異之推測原因同 1. 之（2）。

（四）拮抗作用及多醣分解酶基因檢測之結果分析

經參閱前人文獻，產生拮抗之抑制物質有可能是供試鏈黴菌菌株所產生的抗生素、幾丁質分解酶、葡萄聚醣分解酶等，此與所觀察之現象或有關連。因

此本研究中，進而探討此兩種真菌細胞壁分解酶與所篩選菌株之基因分佈情形。試驗中分別以此兩基因之專一性引子對增幅供試菌株基因體，均能獲得預期之 400 bp 核酸片段，因此我們初步推斷所增幅之基因片段即分別為葡萄聚糖分解酶與幾丁質分解酶基因片段。為進一步證實初步推斷之結果，我們以南方轉漬檢測供試菌株之基因體，結果呈現明顯條帶。綜合 PCR、南方轉漬與幾丁質透化圈之結果，我們確認大部分供試菌株具有葡萄聚糖分解酶與幾丁質分解酶基因，由此再次證實上述推論由多醣分解酶所造成真菌生長抑制之現象。

然基因檢測結果僅能說明供試菌株具有該基因，並不能說明菌株於培養皿上分泌葡萄聚糖分解酶及幾丁質分解酶之能力，亦無法直接解釋拮抗之結果。培養皿上之拮抗結果為一綜合現象，除考慮細胞壁分解酶外，尚須將抗生素、培養皿上養分競爭、拮抗菌交互作用、生長空間抑制……等因素納入考慮，將於未來研究中繼續研究。

(五) 超寄生現象之結果討論

經查閱前人文獻顯示，鏈黴菌之孢子可在 24 hr 內於寄主真菌菌絲體上發芽並纏聚。本試驗中以所篩選之鏈黴菌 B4、M a6、W c17 分別對立枯絲核菌及菌核病菌進行超寄生現象作用觀察，發現接種 48 hr 後鏈黴菌均能分別對上述兩種病原菌菌絲進行纏聚，其中以 M a6 菌株最為明顯。另外，實驗中亦以螢光免疫細胞活力染色法對樣品進行染色，並對照位像差顯微鏡及螢光顯微鏡下呈現的結果，明顯發現被鏈黴菌所纏繞之立枯絲核菌菌絲呈現代表已死亡的紅色螢光，而鏈黴菌本身則呈現具活性之綠色螢光。顯示鏈黴菌不只是聚集纏繞於寄主菌絲上，更對寄主菌絲造成一定的影響，可能與其抗生作用及酵素分解作用有關。

柒、 結論

一、拮抗能力之檢測

鏈黴菌之拮抗型態大致可分為病原菌絲被切齊以及明顯環狀抑制圈等兩種，且同一採集地點之供試菌株所產生之拮抗型態較相近。

二、多醣分解酶基因檢測

確認大部分供試菌株具有葡萄聚糖分解酶與幾丁質分解酶基因。

三、幾丁質分解酶之能力檢測

所選取之供試菌株皆具有幾丁質分解能力，但所形成的透化圈寬度因菌株而異，且其能力與拮抗能力之強弱及基因檢測條帶之強弱並無一致性。

四、超寄生現象

鏈黴菌會纏聚於寄主菌絲上，並使寄主菌絲失去活力。

捌、 參考文獻

- Ho, B. C. 2001. The mass production of *Streptomyces sioyyaensis* PM S502 and its application in disease control. M. S. Thesis, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung.
- Kutchma, A. J., Roberts, M. A., Knaebel, D. B., and Crawford, D. L. 1998. Small-scale isolation of genomic DNA from *Streptomyces* mycelia or spores. *Biotechniques* 24:452-457
- Lai, W. R. 2003. Development of *Streptomyces griseobrunneus* S3 as a bioagent for the control of plant fungal diseases. M. S. Thesis, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung.
- Watanabe, T., Kanai, R., Kawase, T., Tanabe, T., Mitsumori, M., Sakuda, S., and Miyashita, K. 1999. Family 19 chitinases of *Streptomyces* species: characterization and distribution. *Microbiology* 145: 3353-3363.
- Yang, S. S. 2005. Molecular cloning of chitinase genes from *Streptomyces griseobrunneus* S3 (SG S3) and the preparation of transgenic tomato and tobacco with improved disease resistance. D. S. Thesis, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung.

玖、 附錄

一、基因檢測使用之引子對

(一) 葡萄糖分解酶基因檢測所使用之引子對序列：

Forward primer: Sglu-F 5' -TggCCSgCSTTCTggATgCTSggC -3' (24mer, Tm : 51.67 °C)

Reverse primer: Sglu-R 5' -gCCgCCSAYSgCSASgTTSAggAT -3' (24mer, Tm : 41.19°C)

(二) 幾丁質分解酶基因檢測所使用之引子對序列：

ChiFF: 5' AAG CGC GAG GCC GCG GCC TTC CTC GCC 3'

ChiFR: 5' GCA CTC CAG AGC GCC GTT GAT 3'

二、拮抗作用實驗結果

表 15. 鏈黴菌與立枯絲核菌同時接種，鏈黴菌對立枯絲核菌拮抗作用菌絲間的距離 (cm)。

	24 hr 後				48 hr 後				72 hr 後			
	A 皿	B 皿	C 皿	平均	A 皿	B 皿	C 皿	平均	A 皿	B 皿	C 皿	平均
A 4	0.10	0.20	0.35	0.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B 4	0.20	0.00	0.15	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
對照組	0.00	0.10	0.10	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

B10	0.25	0.20	0.40	0.28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
M a7	0.30	0.15	0.30	0.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
對照組	0.05	0.20	0.20	0.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
M a6	0.60	0.25	0.65	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
M a15	0.45	0.35	0.50	0.43	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
對照組	0.15	0.20	0.00	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
M a21	0.50	0.50	0.50	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
W c4	0.05	0.20	0.30	0.18	0.30	0.20	0.20	0.23	0.25	0.20	0.15	0.20
對照組	0.25	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
W c6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.20	0.30	0.20	0.18	0.10	0.10	0.13
W c17	0.25	0.00	0.00	0.08	0.40	0.20	0.25	0.28	0.15	0.30	0.20	0.22
對照組	0.00	0.10	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

表 16. 鏈黴菌早立枯絲核菌一天接種，兩者皆接種 24、48 hr 後鏈黴菌對立枯絲核菌拮抗作用菌絲間的距離（cm）。

	24 hr 後				48 hr 後				72 hr 後			
	A 皿	B 皿	C 皿	平均	A 皿	B 皿	C 皿	平均	A 皿	B 皿	C 皿	平均
A 4	0.10	0.20	0.35	0.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B 4	0.20	0.00	0.15	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
對照組	0.00	0.10	0.10	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B10	0.25	0.20	0.40	0.28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
M a7	0.30	0.15	0.30	0.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
對照組	0.05	0.20	0.20	0.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
M a6	0.60	0.25	0.65	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
M a15	0.45	0.35	0.50	0.43	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
對照組	0.15	0.20	0.00	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
M a21	0.50	0.50	0.50	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
W c4	0.05	0.20	0.30	0.18	0.30	0.20	0.20	0.23	0.25	0.20	0.15	0.20
對照組	0.25	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
W c6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.20	0.30	0.20	0.18	0.10	0.10	0.13
W c17	0.25	0.00	0.00	0.08	0.40	0.20	0.25	0.28	0.15	0.30	0.20	0.22
對照組	0.00	0.10	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

表 17. 鏈黴菌與疫病菌同時接種，72 hr 後鏈黴菌對疫病菌的拮抗作用 菌絲間的距離 (cm)。

	A 皿	B 皿	C 皿	平均
A4	0.70	0.85	0.90	0.82
B4	0.30	0.20	0.05	0.18
對照組	0.13	0.00	0.00	0.04
B10	0.30	0.25	0.70	0.42
Ma7	0.10	0.20	0.70	0.33
對照組	0.15	0.15	0.00	0.10
Ma6	0.60	0.60	0.70	0.63
Ma15	0.60	0.60	0.60	0.60
對照組	0.00	0.00	0.50	0.17
Ma21	0.80	0.60	0.85	0.75
Wc4	0.50	0.45	0.50	0.48
對照組	0.20	0.50	0.00	0.23
Wc6	0.41	0.30	0.30	0.34
Wc17	0.65	0.70	0.50	0.62
對照組	0.30	0.50	0.00	0.27

表 18. 鏈黴菌與炭疽病菌同時接種，72 hr 後鏈黴菌對炭疽病菌的拮抗作用 菌絲間的距離 (cm)。

	A 皿	B 皿	C 皿	平均
A 4	0.69	0.30	0.60	0.53
B4	0.45	0.50	0.55	0.50
B10	0.70	0.35	0.55	0.53
M a7	0.50	0.25	0.60	0.45
M a6	0.75	0.70	0.80	0.75
對照組	0.50	0.00	0.75	0.42
M a15	0.90	0.80	0.60	0.77
M a21	0.75	0.90	0.90	0.85
W c4	0.70	0.79	1.00	0.83
W c6	0.60	0.45	0.75	0.60
W c17	0.55	0.40	0.55	0.50
對照組	0.70	0.38	0.40	0.49

表 19. 鏈黴菌與靈芝病菌同時接種，72 hr 後鏈黴菌對靈芝病菌的拮抗作用菌絲間的距離 (cm)。

	A 皿	B 皿	C 皿	平均
A 4	0.10	0.15	NA	0.13
B 4	0.00	0.00	NA	0.00
B 10	0.00	0.50	NA	0.25
M a7	0.30	0.40	NA	0.35
M a6	0.60	0.60	NA	0.60
對照組	0.20	0.00	NA	0.10
M a15	0.80	0.40	0.50	0.57
M a21	0.60	0.65	0.65	0.63
W c4	0.60	0.40	0.55	0.52
W c6	0.30	0.40	0.30	0.33
W c17	0.85	0.50	0.60	0.65
對照組	0.50	0.00	0.25	0.25

表 20. 鏈黴菌與灰黴病菌同時接種，72 hr 後鏈黴菌對灰黴病菌的拮抗作用菌絲間的距離 (cm)。

	A 皿	B 皿	C 皿	平均
A 4	0.25	0.30	NA	0.28
B 4	0.25	0.75	0.20	0.40
B 10	0.20	0.40	0.15	0.25
M a7	0.40	0.50	0.90	0.60
M a6	0.75	1.20	0.80	0.92
對照組	0.30	0.00	0.15	0.15
M a15	0.90	NA	1.10	1.00
M a21	0.75	NA	1.20	0.98
W c4	0.90	NA	0.80	0.85
W c6	0.70	NA	0.60	0.65
W c17	0.50	NA	0.40	0.45
對照組	1.10	NA	0.50	0.80

表 21. 鏈黴菌與菌核病菌同時接種，24 hr 後鏈黴菌對菌核病菌的拮抗作用菌絲間的距離 (cm)。

	A 皿	B 皿	C 皿	平均
A4	0.61	0.65	0.39	0.55
B4	0.79	0.45	0.15	0.46
B10	0.55	0.20	0.15	0.30
Ma7	0.40	0.30	0.50	0.40
Ma6	0.29	0.50	0.73	0.51
對照組	0.50	0.76	0.60	0.62
Ma15	0.70	0.60	0.60	0.63
Ma21	0.72	0.80	0.76	0.76
Wc4	0.67	0.75	1.00	0.81
Wc6	0.70	0.50	0.70	0.63
Wc17	0.63	0.40	0.40	0.48
對照組	0.50	0.40	0.39	0.43

三、透化圈實驗結果

表 22. 鏈黴菌生長於幾丁質培養基 72 hr 後所形成之透化圈寬度。

A4	0.25	0.20	0.35
B4	0.20	0.25	0.25
B10	0.20	0.15	0.25
Ma7	0.30	0.27	0.25
Ma6	0.40	0.30	0.30
Ma15	0.30	0.40	0.30
Ma21	0.30	0.25	0.30
Wc4	0.25	0.20	0.25
Wc6	0.40	0.35	0.50
Wc17	0.30	0.27	0.25

【評語】 040710

1. 從多方面探討真菌的互動，且能有系統的歸納並呈現想法和結果，值得讚許。
2. 雖能用現有生物科技回應研究目的，也常使結果受限於學習科技，而無法有自己更創新的看法。
3. 可將拮抗和超寄生做出更進一步的比較。