

臺灣牛樟樹内生真菌之多樣性調查 與防治植物病害潛力評估

吳舒雅¹、陳以錚¹、鍾文全²、鍾文鑫^{1,*}

¹ 國立中興大學植物病理學系

² 農業委員會種苗繁殖改良場

* 聯絡作者, E_mail: wenchung@nchu.edu.tw; 傳真: +886-4-22854292

摘要

吳舒雅、陳以錚、鍾文全、鍾文鑫。2017。臺灣牛樟樹内生真菌之多樣性調查與防治植物病害潛力評估。植物醫學 59(3):13-26。

牛樟樹 (*Cinnamomum kanehirai*; Syn. *C. micranthum*) 為台灣本土特有之闊葉樹種。本研究之目的為調查牛樟樹中内生真菌之多樣性、篩選具拮抗能力之菌株，並分析有效物質成分與種類。自惠蓀林場內牛樟樹分離到分屬13科22屬共189株内生真菌菌株；自國立自然科學博物館內牛樟樹則分離到7科7屬共35株。内生真菌菌相的族群分布與密度會因枝條部位、氣候環境之不同而有所差異。測試224株内生真菌對植物病原真菌之拮抗能力，僅有6株對供試病原真菌具有不同程度之抑制作用，其中CKL005菌株可抑制8種植物真菌病原，一種卵菌病原及4種病原細菌。根據形態及分子親緣性之特性，CKL005菌株與*Colletotrichum*屬種類較相似。CKL005菌株發酵液經乙酸乙酯萃取後，不具有有效抗生物質；然而，菌絲萃取液對草莓灰霉病菌、十字花科黑斑病菌、芒果及白菜炭疽病菌的抑制效果顯著。菌絲萃取物經管柱層析、高效能液相層析 (HPLC) 分離、純化之後，進行NMR與GC/MS分析，得知具有活性的主要成分包括β-胡蘿蔔素、單棕櫚甘油酸、乙酸去氫皮質醇、麥角固醇、蟾蜍他靈、皮質類固醇、洋地黃毒苷及吉勃素，其中以酯類蟾蜍他靈的相對含量最高。CKL005菌株亦能產生揮發性氣體以抑制白菜炭疽病菌菌絲生長。GC/MS分析結果得知：可能有抗菌作用的氣體成分為二種BHT (Butylated hydroxytoluene) 類脂溶性抗氧化劑 (2,5-Cyclohexadiene-1,4-dione, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-methylphenol 與 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol) 及 3,6,7-thimethoxy-isobenzofuran-1(3H)-one。CKL005菌絲萃取液稍可提高白菜種子發芽率及幼苗鮮重量。於溫室防治試驗中得知，無論於接種白菜炭疽病菌孢子2小時之前或之後，施用菌絲萃取液均可有效降低炭疽病罹病度。

關鍵詞：牛樟、内生真菌、生物活性、二次代謝物、生物防治

緒言

内生菌 (endophytes) 的概念是由De Bary⁽¹²⁾ 於1886年最早提出，係指生活在植物組織內的微生物。爾後歷經多位學者的修正，將内生菌定義為：能於植物體內完成生活史或其生活史中某一階段可與植物共存，即使寄主植物內部有被侵染的現象，也不會產生病徵之真菌或細菌，則稱之內生菌^(7, 24, 27, 47)。前人研究認為每種植物內部都存在至少一種内生真菌，且在不同植物間有很大差異性，其中木本植物中可存在著上百或上千種内生真菌^(14, 27)。内生真菌會因寄主種類、地理環境及溫度與氣候的變化而有差異^(3, 19)；目前内生真菌被依據其分類地位、寄主範圍、纏繞寄主組織的區域、於寄主組織內部的廣泛性、生物多樣性、傳播方式及環境適應性等特性分成4大群^(31, 43)。第一群是以麥角菌科 (Clavicipitaceae) 為主的内生真菌，寄主範圍窄，主要分布於寄主之莖部與根圈容易被分離，生物多樣性不高，可進行水平或垂直傳播。第二群内生真菌具有在寄主植物中行系統性感染的特性，寄主範圍廣，主要屬擔子菌或子囊菌。第三群内生真菌僅分布在寄主植物的枝條上，盤據範圍較小，僅能行水平式傳播，常見如子囊菌中的盤菌綱 (Pezizomycetes)、錘舌菌綱 (Leotiomycetes) 等，擔子菌中的傘菌亞門 (Agaricomycotina)、餅鏽菌亞門 (Pucciniomycotina) 及黑粉菌亞門 (Ustilaginomycotina) 亦屬於此群。第四群内生真菌主要生長於植物根部，具有深黑色的隔膜，這些内生真菌常與菌根共存而被稱為假菌根真菌 (pseudomycorrhizal fungi)。

内生真菌可與植物維持互利共生的關係，也可產生多種二次代謝物質⁽³⁹⁾。目前已知的内生真菌二次代謝物依化學結構可分成生物鹼 (alkaloids)、固醇類 (steroids)、萜類 (terpenoids)、異香豆素衍生物 (isocoumarin derivatives)、類黃酮 (flavonoids)、醌類 (quinones)、苯丙烷類 (phenylpropanoids) 與木酚素類 (ligans)、肽類 (peptides)、酚及酚酸類 (phenol and phenolic acid)、脂肪族化合物 (aliphatic compounds) 及含氯代謝物 (chlorinated

metabolites) 等類型；然仍有許多的代謝物質尚未被鑑定，值得進一步深入探討研究⁽³⁹⁾。對植物而言，內生菌可能影響植物代謝產物的組成，因而扮演著直接或間接防禦的功能；而對內生菌而言，植物則是提供內生菌存活之營養所需與庇護空間⁽⁴⁴⁾。有許多學者認為內生菌是植物有效代謝天然產物的來源⁽²⁵⁾。某些內生真菌代謝產物具有生物農藥的功能，如麥角生物鹼類 (ergot alkaloids) 中的 ergonovine、ergocryptine、agroclavine 及 elymoclavine 等可在實驗室中降低甜菜夜蛾幼蟲的重量與取食葉片的能力。在熱帶雨林中分離到內生真菌 *Pestalotiopsis jester* 能產生對 *Pythium* sp. 等多種植物病原菌具抑制效果之醌類化合物 (jesterone)⁽³⁷⁾。實驗室合成之 jesterone 與其異構物和對人類癌細胞具抑制作用的二聚體⁽¹⁶⁾。近年研究也開始探討內生真菌在農產業上的應用。Popay 氏等人⁽²⁸⁾成功的將 *Neotyphodium* sp. 產製生物鹼的能力除去，生產兩種含不同內生菌品系之黑麥草 (ryegrass) 種子，並生產銷售。Miller 氏等人⁽²³⁾ 也成功的將能產生 rugulosin 的內生真菌接種至雲杉 (*Picea glauca*) 以防治雲杉色卷蛾 (*Choristoneura fumiferana*) 的侵害。於熱帶雨林錫蘭肉桂 (*Cinnamomum zeylanicum*) 內分離到之 *Muscodora albus* 能產生揮發性物質抑制多種植物病原菌的生長；此菌株已被開發成生物熏蒸劑，用來防治儲藏性病害，延長作物儲藏壽命^(13, 36)。

微生物具有易於培養與繁殖的特性，且能夠進一步工業化生產，因此，內生菌可成為尋找有益於人類新天然活性成分的最佳來源之一。根據 Strobel 與 Daisy 兩氏⁽³⁹⁾ 認為篩選內生菌可依寄主生存的環境條件為依據：1) 植株來自獨特環境，且生態環境較為特別與原始者佳；2) 具有特殊用途的植物，如應用於藥物、驅蟲或有特殊氣味者佳；3) 植株已經在當地存在相當長的時間，屬於風土型植物者佳；4) 植株生長地區生物多樣性越高，體內內生菌的多樣性越高。

吾人對牛樟樹 (*Cinnamomum kanehirai*) 中內生真菌的族羣形態了解甚微。樟科 (Lauraceae) 多屬木本植物，含有豐富的活性物質。目前已知有多種樟科植物可用來作為精油提煉 (樟樹、羅文沙葉及花梨木等)、藥用 (肉桂、天台烏藥及山倉子等) 及非農藥防治 (樟樹)⁽³⁵⁾。樟樹、菲律賓樟及土肉桂等具有抗發炎、抗氧化、抗真菌、抗細菌及抗病毒等功能⁽¹⁹⁾。牛樟樹為台灣本土特有且稀有的闊葉樹種，具有多種生物活性物質，如脂肪醇 (fatty alcohol)、薄荷烷類 (*trans-p*-menthane-1,4-diol)、松香醇 (terpineol)、阿魏酸二十烷酯 (n-eicosyl ferulate)、木酚素類 (1-(3,4-(methylenedioxy)phenyl)-2,3-epoxypropan-1-ol) 及 2-6 and 2,4-diaryl-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octanes 等⁽¹⁹⁾。此外，牛樟木在自然界為牛樟芝 (*Taiwanofungus camphoratus*; Syn. *Antrodia cinnamomea* and *A. camphorata*) 之主要寄主。本研究之目的在於調查牛樟樹中內生真菌的族羣菌相，並探討內、外部環境對其影響；另外，篩選具拮抗植物病原菌之內生菌株，進一步分析最具生物活性菌株之有效物質成分與種類，並評估其防治白菜炭疽病之效果。

材料與方法

牛樟樹樣品的採集與內生真菌的分離

攜本研究所使用的牛樟樹，樹齡約20年左右，蒐集自惠蓀林場 (GPS 24.090723, 121.030047) 與國立自然科學博物館 (GPS 24.158107, 120.667168)，採集時間為2010年4月、2011年1月、8月、10月及12月。每個樣點各選9株植株，每株隨機採取末梢帶嫩綠葉片 (直徑小於0.3公分) 之年輕健康枝條1枝與直徑為1公分左右之成熟健康枝條1枝。樣本經自來水洗淨後，依序置於 75 % 的酒精溶液中1分鐘，3.25% 的次氯酸鈉 (NaClO) 中浸泡10分鐘⁽⁵⁾，續以無菌蒸餾水漂洗三次，以滅菌濾紙吸去多餘水分，並將植物組織切成0.3-0.5公分小塊後，置於內含 50 μ g/ml 之 streptomycin 玉米粉瓊脂培養基 (Corn meal dextrose agar, Difco, USA) 於 28°C 不照光下進行培養，待內寄生真菌自植物組織內長出後，切下菌絲尖端移至馬鈴薯蔗糖培養基 (Potato sucrose agar, PSA) 進行單一菌落 (single colony) 純化培養。

真菌菌株鑑定

真菌的鑑定方法，分為形態學觀察與分子生物學兩種。*Colletotrichum* 之鑑定則參考 Prihastuti 氏等人⁽²⁹⁾ 與 Su 氏等人⁽⁴⁰⁾ 所發表之 *Colletotrichum* 屬形態特徵描述，並與 *C. musae*、*C. siamense*、*C. asianum* 及 *C. fruticola* 等菌株相比較。形態觀察則以孢子大小與形狀、菌落形態、寄生方式及菌絲生長速率為主。真菌總量 DNA 之抽取，依 Wu 氏等人⁽⁴⁸⁾ 所發表的方法。分子鑑定所用序列，包括 rDNA internal transcribed spacer (ITS)、large-subunit (LSU)、Partial actin (ACT)、 β -tubulin (TUB2) 及 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPDH)，均以聚合酶連鎖反應 (PCR) 增幅。引子對 ITS1 (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') / ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 用以增幅 ITS。引子對 NL1 (5'-GCATATCAAT AAGCGGAGGAA AAG-3') / NL4 (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') 則用以增幅 LSU D1/D2 領域。其它所用之引子對：ACT512F (5'-ATGTGCAAGGCCG GTTTCGC-3') / ACT783R (5'-TACGAGTCCTTCTGGCCCAT-3')；Bt2a (5'-GGTAACCAATCGGTGCTG CTTTC-3') / Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCCTTGGC-3')；GDF1 (5'-GCCG TCAACGACCCCTTCATTGA-3') / GDR1 (5'-GGGTGGAGTCGTACTIONTGGAGCAT GT-3')，則參考 Prihastuti 氏等人⁽²⁹⁾ 所發表對 *Colletotrichum* 屬的分子鑑定序列而設計。所得 PCR 產物送至源資生物科技有限公司 (Tri-I Biotech, Inc., Taiwan) 進行解序，所得序列切除二端引子序列後，輸入美國生物技術中心 (National Center of Biotechnology Information) 網站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 利用 BLAST 與基因庫中的序列進行比對。

植物病原菌及其培養方式

本實驗所使用之植物病原真菌包括：芒果炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides* NG8-3)、草蓴灰黴病菌 (*Botrytis cinerea* GBS1-104)、十字花科黑斑病 (*Alternaria brassicicola* ABA31)、百合萎凋病 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii* Fol-41)、番茄萎凋病 (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol-04)、菜豆萎凋病 (*F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* PMF-05)、白菜炭疽病 (*C. higginsianum* PA01)、十字花科幼苗立枯病 (*Rhizoctonia solani* AG-4 RST-04) 及茄科疫病菌 (*Phytophthora capsici* PC151)。植物病原真菌依需求，培養於馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar, PDA) 或馬鈴薯葡萄糖培養液 (potato dextrose broth, PDB)。供試植物病原細菌包括：軟腐病菌 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Ec4)、十字花科蔬菜黑腐病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Xcc17)、甘薯青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum* NC01) 及茄科青枯病菌 (*R. solanacearum* PW2)。植物病原細菌則培養於營養瓊脂 (Nutrient agar, NA), 28°C。所用之植物病原菌均分離自罹病植株，並經單一菌落純化後以30%甘油保存於-80°C供後續實驗使用。

對植物病原真菌菌絲生長抑制能力測試

將牛樟枝條中所分離224株內生真菌，分別以對峙培養法測試其抑制植物病原真菌菌絲生長的效果。以內直徑 8 mm 的打孔器分別切取待測病原菌與供試內生真菌菌絲塊，先將病原菌菌絲塊置於 8-9 cm 大小 PDA 培養皿左方 1/4 處，而內生菌絲塊則置於培養皿右方 1/4 處，二者相距約 4 公分。於 28 °C 的定溫培養箱內不照光培養 3-10 天，觀察供試內生真菌菌絲是否具有抑制植物病原菌菌絲生長的能力。除植物病原 *Botrytis cinerea* GBS1-104 培養於 20 °C，其餘皆培養於 25°C。於培養 3-8 天後測量供試菌絲菌落邊緣至病原真菌菌落邊緣之抑制寬度。抑制區 (mm) 與抑制指數的對應關係，抑制指數 0：當病原菌生長接觸供試菌絲時，視為無抑制區；1：抑制區介於 0-10 mm 時；2：抑制區介於 10-15 mm 時；3：抑制區大於 15 mm 時。測試揮發性氣體抑制作用時，則將內生真菌供試菌絲培養於 PDA 平板 3 日後，與已培養 1 日之 *C. higginsianum* 進行對蓋培養，以正常培養之 *C. higginsianum* 作為對照組，置於 28°C 不照光定溫箱，觀察其菌絲生長的抑制率，計算方法如下：

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{\text{對照組菌絲生長半徑} - \text{處理組菌絲生長半徑}}{\text{對照組菌絲生長半徑}} \times 100$$

不同碳氮素源對內生真菌生長與拮抗活性之影響

為了瞭解不同營養來源是否影響內生真菌的生長與拮抗活性，本研究以液態培養方式測試不同碳及氮素源對內生真菌的菌絲生長及內生真菌對芒果炭疽病菌 (*Colletotrichum*

gloeosporioides NG8-3) 菌絲生長抑制能力的影響。菌絲生長實驗以液態培養方式，拮抗活性實驗則以固態培養方式為之。

碳素源實驗以 Thom (1910) 修改調整過的察氏培養基 (Czapek's medium) 為基礎培養基⁽⁴²⁾。菌絲生長實驗係於配製好的察氏培養液中分別添加濃度為 30g/L medium 的 9 種不同碳素源包括單醣類的葡萄糖 (glucose) 和果糖 (fructose)；雙醣類包括乳糖 (lactose)、蔗糖 (sucrose)、麥芽糖 (maltose) 及海藻糖 (trehalose)；三醣類的棉子糖 (raffinose)；戊醣類類的木醣 (xylose)；脫氧醣類的鼠李糖 (rhamnose) 等，成為不同碳素源培養液，並以馬鈴薯葡萄糖養液 (PDB) 及不含碳素源之察氏培養液為對照組。配製好之養液以 500 mL 之三角燒瓶分裝，每瓶中裝有 250 mL 之養液，每處理 3 重複；再經高溫高壓滅菌 (121°C, 15 lb, 20min) 後，置入以內徑 0.8 cm 之打孔器切取之經 PDA 培養基培養 14 天之內生真菌菌落邊緣菌絲塊完成接種。接種後以室溫震盪培養 (100 rpm) 10 天，將培養液以 2 層紗布過濾菌絲體，再將菌絲體裝入以秤重之微量離心管中離心 (10,000 rpm, 5 min)，去除上清液，再將離心管移至 50 °C 烘乾 24hr，取出秤取總重量以得到菌絲乾重 (biomass)。拮抗活性實驗將前述不同碳素源培養液添加 20 g/L 濃度之瓊脂 (agar) 後經高溫高壓滅菌，冷卻後製成直徑 9 cm 之平板。以內徑 8 cm 之打孔器切取培養於 PDA 14 天之內生真菌與芒果炭疽病菌菌絲塊，分別置於同一平板內兩側離邊 1.5 cm 處成為對峙培養，再置於 28°C 不照光定溫箱，觀察其菌絲生長情形並測量培養 5 天後，內生真菌對芒果炭疽病菌之抑制率。

氮素源實驗則以前述方法測試內生真菌經 12 種不同氮素源培養 10 天後之菌絲乾重及在平板上對芒果炭疽病菌對峙培養 5 天後的抑制率。12 種氮素源分別為：6 種含氮鹽類包括硝酸鈉 (sodium nitrate)、氯化銨 (ammonium chloride)、硫酸銨 (ammonium sulfate)、尿素 (urea)、磷酸氫銨 (diammonium hydrogen phosphate) 和硝酸銨 (ammonium nitrate)；6 種胺基酸包括組胺酸 (histidine; His)、精氨酸 (arginine; Arg)、丙氨酸 (alanine; Ala)、穀氨酸 (glutamate; Glu)、甘氨酸 (glycine; Gly) 和天冬氨酸 (aspartic acid; Asp)，並以 PDB 及不含氮素源之察氏培養基為對照組。添加方式若氮素原為鹽類則直接加入基礎培養基中 (3g/L medium) 高壓滅菌；胺基酸類則先配置成 10,000 ppm 濃度之濃縮液，再經 0.22μm 之微孔過濾膜過濾後，加入經高壓滅菌之基礎培養基中，調整胺基酸濃度為 3g/L medium。本實驗每處理 3 重複。

進一步，本試驗選擇前述兩試驗中對病原菌抑制效果較好之碳素及氮素源處理，以上述方式配製成碳氮素源混合培養基，並比較對內生真菌菌絲生長及內生真菌對芒果炭疽病的抑制能力之差異。

抑菌成分之分離與其抑菌效果分析

將內生真菌培養於 PDA 平板上，於 28 °C 無照光環境下培

養14日後，以內直徑8 mm打孔器切取培養菌落邊緣菌絲塊5片，移入已滅菌300 ml PDB培養液中進行前培養，於28°C不照光下以120 rpm震盪培養14-20天後，將產物以雙層紗布過濾，分離菌絲體與發酵液。後將菌絲體於50°C下烘乾去除水分，經定量稱重後以液態氮磨碎，接著以適量乙酸乙酯(ethyl acetate, HPLC級)覆蓋磨碎之菌絲體後，於室溫下浸泡3天為內生真菌之活性產物粗萃取液；粗萃取液以減壓濃縮機進行縮乾與定量。發酵液則先加入精鹽直到飽和後，再加入與飽和精鹽發酵液同體積之乙酸乙酯進行液相-液相分配萃取(Liquid-liquid partition)，進一步將所分離之乙酸乙酯層產物進行縮乾與定量。將菌絲及發酵液之乙酸乙酯萃取產物解溶於Dimethyl sulfoxide (DMSO)後，再以高溫高壓滅菌之蒸餾水配製成產物濃度5,000mg/L之濃縮母液。另配製馬鈴薯瓊脂，滅菌後於凝固前再加入濃縮母液調整成含有0、1、10、100及500 mg/L菌絲萃取物的PDA，搖勻後倒入9公分培養皿中製成平板。將長滿9公分培養皿之待測病原真菌菌株以打孔器切取直徑3 mm的菌絲塊置於不同濃度菌絲萃取物之培養基上培養於28°C不照光定溫箱，記錄菌絲生長直徑，並計算其EC50值(half maximal effective concentration)。測試植物病原細菌之抑制能力時，則將單一細菌菌落塗抹於NA培養24小時，以無菌水將菌落洗下製成懸浮液，於波長620 nm下調整濃度至吸光值為0.3。將細菌懸浮液以玻璃噴霧器均勻噴於NA上5次，後於培養基中央置入濾紙片(Toyo Roshi Kaisha)，並滴上30 μ l濃度為500 mg/l的菌絲萃取液，於28°C無光照下培養1天後，觀察抑制圈的大小並記錄。實驗重複4次。

高效能液相層析 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 分析

內生真菌之菌絲萃取物，進一步以填充silica gel的管柱分離、純化。silica gel管柱先以正己烷潤洗後，再將乙酸乙酯層的產物經2倍重量的silica gel吸附後再填入管柱。之後，以不同比例之正己烷(H)、乙酸乙酯(E)與甲醇(M)混合為不同極性之序列沖提液(H:E:M; v:v:v; 100:0:0、90:10:0、80:20:0、70:30:0、60:40:0、50:50:0、40:60:0、30:70:0、20:80:0、10:90:0、0:100:0、0:90:10、0:80:20、0:70:30、0:30:70和0:0:100)，由100%正己烷開始沖提，每種沖提劑收集2瓶各250 ml。各分層之產物經減壓濃縮後稱重定量，取部份回溶於100%之甲醇溶液中，並以濾紙測定法測試抑菌(*C. higginsianum*或*C. gloeosporioides*)活性。將有活性之管柱層析分離樣品經減壓濃縮機縮乾後稱重定量，以甲醇稀釋至10 mg/ml後，以HPLC分析。HPLC分離系統為紫外光檢測器(UV Detector)，紫外光檢測器及壓力幫浦均為Agilent 1200型(Agilent 1200 series vacuum degasser G1322A and quaternary pump G1311A, Agilent, Germany)，管柱採用C18管柱(Cosmosil 5 μ m, 250x10 mm)；用甲醇沖提，流速為0.5 ml/min。以陣列式波長檢測器(Agilent 1260 Infinity diode array

detector, Germany)於波長218、230及254 nm偵測標的物。收集之沖提液以濾紙測定法測試抑菌活性。具有活性的成份則以核磁共振光譜(Nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)分析其氫譜(^1H)、碳譜(^{13}C)及DEPT(Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)，以確定化合物的結構。

氣相層析質譜儀 (Gas Chromatography-Mass Spectrophotometer, GC-MS) 分析

在進行GC-MS分析前，首先將樣品進行減壓濃縮乾燥，視樣品量加入吡啶(pyridine)與1/4倍吡啶體積之N-甲基-N-(三甲基硅烷)三氟乙酰胺[N-methy-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, MSTFA]，於60°C下反應1個小時後，減壓濃縮乾燥，再以氮氣吹乾後，以乙酸乙酯溶解，注入Hewlett-Packard - HP G1800A GCD Series II之GC-MS(Agilent Technologies)進行分析。所使用的管柱為DB-5MS(Crossbond 5% phenyl methylpolysiloxane)，長度為30 m，內徑為0.25 μ m，載送氣體氮氣流速為1 ml/min，分流比(splitting ratio)為1:60，注射孔溫度為270°C，離子化電壓為70 eV，質譜範圍(Mass range) m/z為50-650 a.m.u。所使用的起始溫度為50°C，持溫1 min後，以15°C/min的升溫速度至130°C，持溫10 min；續以5°C/min的升溫速度至280°C。成分鑑定上使用National Institute of Standards and Technology (NIST)和Wiley 7.0資料庫的質譜比對，並使用標準品進行共注射確定之。此外，也使用Kovats indices (KI)進行比對。內生真菌菌株所產生的揮發性氣體，進一步亦以GC-MS分析。簡言之，將菌株置於PDA培養基上，於28°C培養14天後。刮取約1克的菌絲置於樣本瓶中，以石蠟膜封口後，置於60°C水浴處理30分鐘，再以220°C預先熱脫附30分鐘的活性碳吸附針，插入瓶中的氣相區吸附菌株所揮發的氣體30分鐘後，將吸附針注入GC-MS，仿上述之條件進行分析。

菌絲萃取液防治白菜炭疽病害

病害防治試驗於溫室中進行，以不結球三鳳白菜為供試植株，而供試病原菌為*C. higginsianum* PA01。將白菜種子均勻灑布於10公分高之泥炭土中，續覆上薄層泥炭土，5-7天後將發芽長出兩片新葉小苗移植至4吋圓形育苗盆中，每天定時澆水，每週施用花寶2號1,000倍一次，4週後取生長大小一致的植株進行試驗。供試接種源為濃度 2×10^5 spores/ml之*C. higginsianum*孢子懸浮液，另配製濃度為10與100 mg/l的菌絲萃取液，進行處理。試驗項目為：單獨施用菌絲萃取液；施用菌絲萃取液2小時前，接種*C. higginsianum*孢子懸浮液；接種2小時後，施用菌絲萃取液；以水與孢子懸浮液作為正與負對照組。於接種7天後，觀察各處理組的罹病指數並計算罹病度。罹病指數之評估方式依Lin氏等人(22)所發表：0級為無病斑；1級為病斑面積為葉片的0~10%；2級的病斑分布面積為11~25%；3級的病斑分布面積為26~50%；4級的病斑分布

面積為 51~100%。罹病度計算方式如下：

$$\text{罹病度(Disease severity)\%} = \frac{\sum (\text{罹病指數} \times \text{該指數葉片總和})}{\text{總調查葉數} \times 4} \times 100$$

本實驗每一處理為3株植株，4重複，實驗重複兩次。

統計分析

本研究所得之實驗數據以 SPSS 統計軟體進行分析，並使用鄧肯氏分析 (Duncan's multiple range test) 各處理間之顯著性差異 ($P=0.05$)。

結 果

內生真菌之分離、鑑定

本研究自惠蓀林場內牛樟樹分離到189株內生真菌菌株；亦自國立自然科學博物館內牛樟樹分離到35株。經形態與分子

生物學鑑定，得知來自惠蓀林場牛樟樹所分離之菌株可分成13科22屬，其中以 *Phomopsis*、*Colletotrichum*、*Pestalotiopsis*、*Nigrospora*、*Xylaria* 及 *Guignardia* 等六屬為主要菌相（表一）。此外還有 Botryosphaeriaceae 科的 *Botryosphaeria*、*Neofusicoccum*、*Nodulisporium* 及 *Phyllosticta* 等屬；Pleosporaceae 科的 *Cladosporium*、*Pleosporales* 及 *Stemphylium* 等屬；Xylariaceae 科的 *Annulohyphoxylon*、*Hypoxylon* 及 *Daldinia* 三屬；其他如 *Corynespora*、*Diaporthe*、*Fusarium*、*Physalospora*、*Mycocleptodiscus*、*Trametes*、*Penicillium* 等單一科屬，另外還有31株內生真菌無法以形態與分子生物學鑑定。科博館內生真菌僅可分為7科7屬，依分離率高低依次為 *Nigrospora*、*Colletotrichum*、*Phomopsis*、*Guignardia*、*Exserohilum*、*Torula* 及 *Rhodotorula*，僅有1株無法以形態及分子生物學鑑定。

內生真菌的菌相依取樣部位與時間而相異

比較惠蓀林場內牛樟樹成熟與嫩綠枝條、直徑1公分左右健康成熟枝條與0.3公分以下嫩綠枝條內生菌菌

表一、自惠蓀林場與自然科學博物館內牛樟樹中所分離之內生真菌的種類

TABLE 1. Fungal endophytes collected from *Cinnamomum kanehirae* grown in Hui-sun forest and National Museum of Natural Science

Fungal family	Fungal genus	Number of endophytic isolates			Museum (2010)
		Hui-sun forest (year)			
		Combined (2010)	Mature (2011)	Young (2011)	
Amphisphaeriaceae	<i>Pestalotiopsis</i>	22 (11.6%)	13	9	0
Botryosphaeriaceae	<i>Guignardia</i>	14 (7.4%)	7	7	3 (8.6%)
	<i>Botryosphaeria</i>	3 (1.6%)	1	2	0
	<i>Neofusicoccum</i>	2 (1.1%)	2	0	0
	<i>Nodulisporium</i>	2 (1.1%)	1	1	0
	<i>Phyllosticta</i>	1 (0.5%)	1	0	0
Corynesporaceae	<i>Corynespora</i>	1 (0.5%)	1	0	0
Diaporthaceae	<i>Phomopsis</i>	32 (16.9%)	19	13	5 (14.3%)
Glomerellaceae	<i>Colletotrichum</i>	22 (11.6%)	10	12	7 (20.0%)
Hypocreaceae	<i>Fusarium</i>	5 (2.6%)	5	0	0
Hyponectriaceae	<i>Physalospora</i>	1 (0.5%)	1	0	0
Magnaporthaceae	<i>Mycocleptodiscus</i>	1 (0.5%)	0	1	0
Pleosporaceae	<i>Cladosporium</i>	1 (0.5%)	1	0	0
	<i>Exserohilum</i>	0	0	0	1 (2.9%)
	<i>Pleosporales</i>	1 (0.5%)	0	1	0
	<i>Stemphylium</i>	1 (0.5%)	0	1	0
Saccharomycetaceae	<i>Torula</i>	0	0	0	1 (2.9%)
Trichocomaceae	<i>Penicillium</i>	1 (0.5%)	0	0	0
Trichosphaeriaceae	<i>Nigrospora</i>	19 (10.0%)	10	9	16 (45.7%)
Xylariaceae	<i>Annulohyphoxylon</i>	2 (1.1%)	1	1	0
	<i>Hypoxylon</i>	5 (2.6%)	3	2	0
	<i>Daldinia</i>	3 (1.6%)	2	1	0
	<i>Xylaria</i>	18 (9.5%)	4	14	0
Sporidiobolaceae	<i>Rhodotorula</i>	0	0	0	1 (2.9%)
Polyporaceae	<i>Trametes</i>	1 (0.5%)	0	1	0
Unknown		31 (16.4%)	11	20	1 (2.9%)
Total		189	93	96	35

相分布，結果得知，兩枝條中的內生真菌菌相數目差異不大。然某些屬內生真菌僅能自成熟枝條處分離，包括 *Neofusicoccum*、*Phyllosticta*、*Corynespora*、*Fusarium*、*Physalospora* 及 *Cladosporium*；反之 *Mycoleptodiscus*、*Pleosporales*、*Stemphylium*、*Trametes* 及 *Penicillium* 則只能自嫩綠枝條處被分離（表一）。另比較不同採樣時期牛樟樹內生真菌菌相與氣候環境之關係，結果顯示除 *Pestalotiopsis*、*Colletotrichum*、*Nigrospora* 及 *Phomopsis* 等4屬為全年出現之菌相外，其餘各時間所分離之菌相有明顯不同。*Corynespora*、*Fusarium*、*Stemphylium*、*Trametes* 及 *Annulohyphoxylon* 屬於4月份被分離；*Phyllosticta*、*Mycoleptodiscus*、*Cladosporium*、*Pleosporales* 及 *Penicillium* 於1月份被分離；*Nodulisporium* 及 *Physalospora* 則於8月份被分離。

篩選、測試內生真菌之拮抗能力

用平板對峙培養法測試後發現：牛樟樹組織中所分離224株內生真菌，僅有6株（CKL005、CKS008、CKS013、CKB004、CKB006及CKB007），對 *C. gloeosporioides* NG8-3、*B. cinerea* GBS1-104 及 *F. oxysporum* f. sp. *lilii* Fol-41具生長抑制效果。依ITS核苷序列之比對結果卻無法得知CKL005菌株可能的屬與種。依LSU核苷酸序列進行比對，CKL005 菌株與 *Colletotrichum asianum* (JN940407)、CKS008 與 *Pestalotiopsis foedans* (JN940834)、CKS013 與 *C. gloeosporioides* (AJ301972)、CKB004 與 *C. nymphaeae* (JN939911) 及CKB007 與 *Rhodotorula* sp. (FJ896010) 之相似度最高。CKB006 菌株以LSU比對後，無法確定所屬。然而，CKB006之ITS核苷序列之與 *Torula caligans* (JQ246356) 之相似度最高。

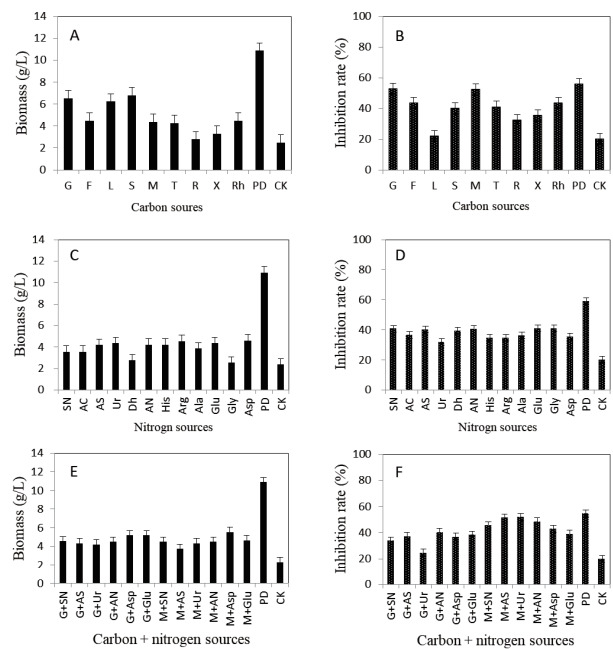
內生真菌CKL005、CKS008、CKS013及CKB004菌株可抑制供試之8株植物病原真菌與1株卵菌菌絲生長（表二）。其中抑制指數最佳為CKL005菌株，其次為CKS008菌株。CKB006與CKB007兩菌株對供試植物病原菌的抑制效果不顯著。之後試驗則以CKL005為主。生理測試顯示：CKL005最適生長溫度範圍介於24-32°C，最佳酸鹼值 pH 6~6.5。於 Czapek's 液態培養基中，以 glucose 或 sucrose 為主要碳素源，可明顯促進CKL005生長。其餘測試碳素源 (Raffinose、Xylose、Trehalose、Rhamose 及 Fructose) 皆無促進菌絲生長之效果(圖一A)。CKL005培養於PDA上對 *C. gloeosporioides* 生長抑制率(55.9%)比在 Czapek's 上較佳。於固態 Czapek's 培養基中，以glucose (53.0%)或 maltose (52.4%) 為主要碳素源，亦有相當之抑制生長效果（圖一B）。改變 Czapek's 中之氮素源，對CKL005之生長無顯著影響，且各氮素源間無明顯差異（圖一C）。對 *C. gloeosporioides* 菌絲生長抑制率，亦較於在PDA上為低（圖一D）。綜合而言，CKL005培養於PDA上，生長與抗生活性均比在合成培養基Czapek's上效果較好。在合成培養基中，若以maltose + (NH₄)₂SO₄、maltose + CO(NH₂)₂ 及 maltose

表二、內生真菌對植物病原真菌生長之抑制效果

TABLE 2. The inhibition index of fungal endophytes against phytopathogens

Phytopathogen	Inhibition index ¹					
	CKL005	CKS008	CKS013	CKB004	CKB006	CKB007
<i>Botrytis cinerea</i>	1	1	1	1	1	1
<i>Alternaria brassicicola</i>	1	1	1	1	1	1
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lilii</i>	2	2	1	1	1	1
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	1	2	1	1	1	1
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>tracheiphilum</i>	2	1	1	1	1	1
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	3	1	2	1	1	1
<i>C. higginsianum</i>	1	1	1	1	1	1
<i>Rhizoctonia solani</i>	2	1	1	1	1	1
<i>Phytophthora capsici</i>	1	1	1	1	1	1

¹ Inhibition index : 0: no inhibition zone; 1: ≤10 mm; 2: between 10 and 15 mm; 3: ≥15 mm.



圖一、不同碳氮素源對內生真菌CKL005菌株生長 (A、C和E) 及對芒果炭疽病菌抑制率 (B、D和F) 的影響。

Fig. 1. Effect of different carbon and nitrogen sources on biomass (A, C, and E) and bioactive of endophytic fungi CKL005 against the causal agent of mango anthracnose, *Collectotrichum gloeosporioides* NG8-3. (B, D, and F); G = glucose; F = fructose; L = lactose; S = sucrose; M = maltose; T = trehalose; R = raffinose; X = xylose; Rh = rhamnose; SN = Sodium nitrate; AC = Ammonium chloride; AS = Ammonium sulfate; Ur = Urea; Dh = Diammonium hydrogen phosphate; AN = Ammonium nitrate; His = histidine; Arg = arginine; Ala = alanine; Glu = glutamate; Gly = glycine; Asp = aspartic acid; PD = potato dextrose medium as positive control; CK = Czapek's medium as negative control.

+ NH_4NO_3 為主要碳及氮源，對 *C. gloeosporioides* 生長抑制率則分別可達54.8、51.6、52.0及48.6 % (圖一E和F)。綜合上述結果，並考量不同配方之效果及其來源簡便，後續分析及培養實驗仍以PDA為主要培養基。

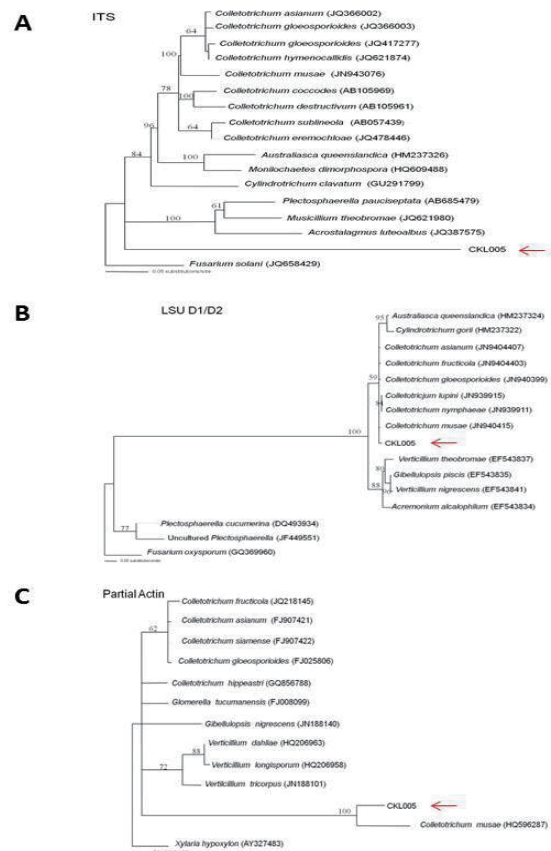
鑑定CKL005菌株

CKL005菌株於PDA平板上生長緩慢，菌落初呈現米色至米黃色，底部則呈現黃褐色至橘紅色色素。菌落形狀近乎圓形，隨培養時間增加菌落會變成深褐色至灰褐色並產生分生孢子。孢子形態為短橢圓形、一端略尖的橢圓形及較長的桿狀。孢子大小為 $13.24 \times 5.29 \mu\text{m}$ ，範圍與*Colletotrichum*屬的接近。比較CKL005與*Colletotrichum*屬之*C. musae*、*C. siamense*、*C. asianum*及*C. fructicola*的菌落生長形態並不完全相同。CKL005菌絲生長速度與*C. asianum*類似，但較其它*Colletotrichum*屬真菌緩慢。

以ITS序列進行比對，無法判別CKL005之種類。續以LSU (D1/D2)、ACT、TUB2及GPDH進行增幅與定序。結果顯示：CKL005之LSU rDNA D1/D2序列與*Colletotrichum asianum* (JN940407.1)的相似度達99%；CKL005之ACT序列與*C. hippastris* (GQ856788.1)的相似度達91%；CKL005之 β -tubulin序列與*Microsphaeropsis proteae* (JN712651.1)的相似度達82%；CKL005之GPDH序列與*C. gloeosporioides* (HQ846744.1)的相似度達97%。進一步以近鄰結合法(NJ)分析CKL005之ITS、LSU及ACT與GenBank中的Glomerellaceae科但不同屬菌株之親緣性。ITS序列親緣性分析結果顯示：CKL005與Glomerellaceae科各屬可區分為兩個不同的族群，未具有明顯親緣關係(圖二A)。在LSU D1/D2序列親緣性分析結果得知，CKL005菌株雖與*Colletotrichum*屬歸屬同一分子群，親緣性較相近，但可信度僅59%，且其中有兩株不同屬的*Australiasca queenslandica*與*Cylindrotrichum gorii*也歸屬於同一分子群(圖二B)。而ACT序列的親緣分析結果指出，菌株CKL005菌株落在Glomerellales目中的菌株群，與*C. musae*的親緣關係最近，bootstrap值為100%(圖二C)。

CKL005菌株之抑菌成分分離與分析

CKL005菌絲體與發酵液經乙酸乙酯初步萃取後，僅菌絲萃取物具抑制*C. gloeosporioides*菌絲生長效果($\text{EC}_{50} > 7.84 \text{ mg/l}$)，而發酵液萃取物之抑制效果不佳($\text{EC}_{50} > 100 \text{ mg/l}$)。CKL005菌絲萃取液對供試植物病原細菌(*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*、*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*、*Ralstonia solanacearum*)均有抑制效果，抑制圈介於25–43 mm。菌絲萃取液亦可抑制部分但非所有植物病原真菌之生長。CKL005菌絲萃取液對*F. oxysporum* f. sp. *lilii*、*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*、*F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*及*R. solani* AG4抑制效果並不顯著($\text{EC}_{50} > 500 \text{ mg/l}$)。對*P. capsici*之生長抑制效果亦不顯著($\text{EC}_{50} = 282.53$



圖二、使用近鄰結合法分析CKL005菌株於ITS領域(A)、LSU rDNA D1/D2(B)、Partial actin(C)序列與其他同屬或同科真菌之親緣性。

Fig. 2. Phylogenetic relationships of the fungal endophyte CKL005 collected from *Cinnamomum kanehirai* based on the conserved rDNA internal transcribed spacer ITS (A), large-subunit (LSU) D1/D2 regions (B), and partial actin genes to other fungi belonging to Glomerellales, whose sequences are available in the database. Their accession numbers are shown in parentheses. The phylograms were constructed by neighbor-joining analyses.

mg/l)。然而，菌絲萃取液對*B. cinerea*、*A. brassicicola*、*C. gloeosporioides*及*C. higginsianum*的抑制效果良好，其 EC_{50} 值分別為50.7、17.6、7.8及14.4 mg/l (表三)。

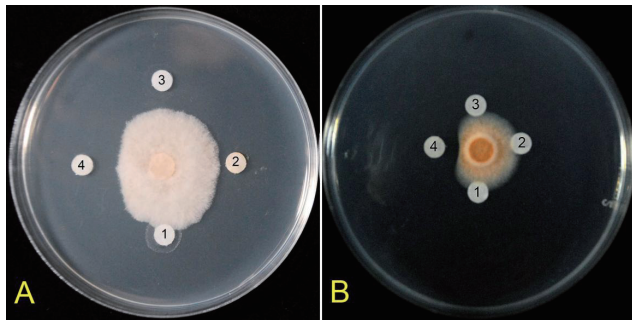
CKL005菌絲經乙酸乙酯萃取，管柱層析後，取部份回溶於100%甲醇中。調節其濃度為100 mg/l 後，以濾紙測定法測試對*C. gloeosporioides*及*C. higginsianum*生長抑制效果。結果得知：沖提液比例為90%乙酸乙酯與10%的甲醇的分離部，對兩植物病原真菌生長有抑制效果。將有活性之分離部經HPLC進一步分離，收集滯留時間(retention time)24、25、27及35分鐘時之4個沖提液，減壓濃縮後再以濾紙測定法，測試其對兩植物病原真菌生長抑制情形，結果發現，只有35分鐘沖提液(fraction 4)具有抑制效果(圖三)。根據NMR分析結果得知：35分鐘沖提液可能含有糖苷鍵結、脂肪酸及雙環鍵結

表三、內生真菌CKL005之菌絲萃取物對植物病原真菌生長之抑制效果與EC₅₀值

TABLE 3. The inhibition rate and EC₅₀ of mycelial extract of fungal endophytes CKL005 to mycelial growth of fungal phytopathogens

Phytopathogen	Inhibition rate (%) of mycelial extract ¹				EC ₅₀ (mg/L)
	1	10	100	500 (mg/L)	
<i>Botrytis cinerea</i>	14.1	40.3	60.9	65.2	50.66±0.08
<i>Alternaria brassicicola</i>	27.2	47.9	65.9	71.0	17.56±0.07
<i>Fusarium oxysporum f. sp. lilii</i>	4.8	25.4	23.4	30.6	>500
<i>F. oxysporum f. sp. lycopersici</i>	4.4	22.2	29.4	37.1	>500
<i>F. oxysporum f. sp. tracheiphilum</i>	10.2	19.6	23.2	23.7	>500
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	19.7	60.0	79.4	100.0	7.84±0.09
<i>C. higginsianum</i>	17.6	52.5	75.9	78.3	14.39±0.07
<i>Rhizoctonia solani</i>	9.4	9.9	24.4	36.3	>500
<i>Phytophthora capsici</i>	5.7	27.8	42.6	51.3	282.53±0.07

¹ Inhibition rate (%) = [(mycelial growth of pathogen on PDA) - (mycelial growth of pathogen on treatment)/ mycelial growth of pathogen on PDA]×100 (%)



圖三、高效能液相層析分析之分離物對病原菌菌絲生長抑制結果。A: 芒果炭疽病菌；B: 白菜炭疽病菌。

Fig. 3. Antagonistic effect of mycelium extracts against *Colletotrichum gloeosporioides* NG8-3 (A) and *C. higginsianum* PA01 (B). Mycelium extracts were separated by HPLC and four fractions were collected, placed on paper discs, and tested for inhibitory activities.

化合物。進一步將此沖提液先行衍生化處理後，進行GC-MS分析。將其圖譜所呈現的波峰 >1.0 % 積分面積與NIST資料庫進行比對，發現與下列物質相似：類萜類之β-胡蘿蔔素 (β-carotene, 滯留時間32.33 min)、脂肪酸類之單棕櫚甘油酸 (glycerol 1-palmitate, 31.58 min)、固醇類之乙酸去氫皮質醇 (prednisolone acetate, 42.98 min)、麥角固醇 (ergosterol, 44.03 min)、酯類的蟾蜍他靈 (gammabufotalin, 32.43 min)、固醇類之皮質類固醇 (hydrocortisone acetate, 31.08 min)、糖苷類之洋地黃毒苷 (digitoxin, 31.33 min) 酯類之吉勃素 (gibberellin, 28.61 min)。其中又與蟾蜍他靈具有最高的積分面積。

鑑定CKL005所產生之揮發性氣體

CKL005與*C. higginsianum*對蓋處裡 (plate-to-plate assays) 5天後，*C. higginsianum*的生長並未有明顯受抑制，然菌落生長的形態則明顯不同。*C. higginsianum*可能受到CKL005菌絲所產生之揮發性氣體影響，菌落顏色呈現較淡的粉橘色。持續培養15天之後，*C. higginsianum*菌絲生長則明顯受到抑制，且菌落顏色呈現黑色。以打孔器切取菌落外圍6片菌絲塊 (直徑3 mm) 移至新的PDA平板進行培養，則無法再長出菌絲。因為CKL005與*C. higginsianum*培養於不同的平板上，未有實體的接觸，因此推測CKL005可能產生有毒的氣體，而對*C. higginsianum*具有致死的作用。

以GC-MS分析CKL005所產生揮發性氣體，結果得知其主要成分為octamethyl-cyclotetrasiloxane (12.1%)、2,5-cyclonexadien-1-one 6-bis (1,1-dimethylethyl)-4-methylene (7.5 %)、decamethyl-cyclopentasiloxane, (7.2 %)、2-(triethylsilylethynyl)bromobenzene (6.7%)、4-isopropyl-5-methylhexa-2,4-dien-1-ol (6.3%)、1-methylrthenyl-benzene (6.0%)及2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol (butylated hydroxytoluene) (6.0%)。此外，還有少量常見的揮發精油成分：trans-opinocarveol (1.3%) 與酯類[bis](trimethylsilyl)oxy[phosphinyl]acetic acid trimethylsilyl ester (3.8%)、benzoic acid 2,6-bis(trimethylsiloxy)-trimethylsilyl ester (2.2%) 及4-hydroxy-4-methyl hex-5-enoic acid, tert-butylester (2.1%) 等 (表四)。

CKL005菌絲萃取物對溫室中白菜炭疽病發生之影響

在溫室防治試驗中顯示，施用不同濃度菌絲萃取液，白菜未呈現藥害徵狀。接種*C. higginsianum*孢子懸浮液之白菜植株，罹病度高達52.8%。但是，施用菌絲萃取液者，其病徵明顯減弱且罹病度均較低。先施用10或100 mg/l 菌絲萃取液於白菜植株上，2小時之後再接種孢子懸浮液，植株罹病度大約為25.0%。若先接種孢子懸浮液，再施用10或100 mg/l 菌絲萃取液，植株之罹病度分別為11.1%與19.4% (圖四)。

討 論

從惠蓀林場內牛樟樹分離到189株內生真菌，分屬於13科22屬；自國立自然科學博物館內牛樟樹分離到35株，分屬於7科7屬，初步顯示生長環境可能影響牛樟樹內生真菌菌相變化。根據內生真菌的分類規則⁽³¹⁾，得知惠蓀林場中的牛樟內生真菌有2科屬於第1群，2科屬於第2群，其餘9科皆屬於第3群；而分離自科博館的牛樟內生真菌則皆屬於第3群，第3群的內生真菌在寄主內部拓展較受限制，僅能於寄主植物枝條上纏據，但其多樣性高且對環境變化較能適應，故其分離率相對較高。根據前人研究報告顯示，內生真菌的菌相會受到人為活動的影響而有所差異⁽⁴⁾。比較採集地環境，惠蓀林場內的牛樟樹生長

表四、CKL005菌株所產揮發性氣體之成分分析與相對含量

TABLE 4. Volatile compounds released by the CKL005 isolate.

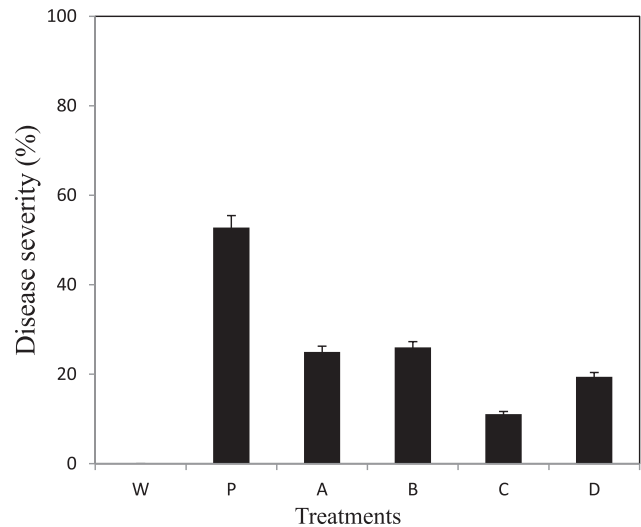
RT ¹ (min)	KI ²	% area	Compounds
3.76	793	1.99	1-Methylethyl-Bezene
4.45	932	1.47	Acetic acid, N'-[3-(1-hydroxy-1-phenylethyl)phenyl] hydrazide
4.59	939	2.09	3,6,7-thimethoxy-Isobenzofuran-1(3H)-one
5.07	962	6.03	1-Methylrthenyl-benzene
5.53	983	12.08	Octamethyl-Cyclotetrasibxane
6.31	1015	1.28	trans-Opinocarveol
7.49	1061	2.05	4-hydroxy-4-methylhex-5-enoic acid, tert-butylester
7.91	1075	1.05	1 H-Pyrrole, 2(5-chloro-2-methoxyphenyl)-
8.99	1111	6.65	2-(Triethylsilylethynyl)bromobenzene
9.66	1135	1.21	2,4,4,7-Tetramethyl-octa-5,7-dien-3-one
10.30	1156	7.17	Cyclopentasiloxane, decamethyl-
12.04	1209	6.32	4-Isopropyl-5-methylhexa-2,4-dien-1-ol
13.55	1259	4.65	3-(4'-Methoxyphenyl)-1 acetyl-2-phenyl indolizine
15.90	1332	3.77	Bis(trimethylsilyloxy) phosphinyl acetic acid trimethylsilyl ester
18.35	1409	1.01	3-(Hydroxymethyl)-1-phenyl-1-heptadecyn-3-ol
19.94	1463	1.79	2,5-Cyclohexadiene-1,4-dione,2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-
20.32	1476	7.49	2,5-Cyclohexadien-1-one, 2,6-bis(1,1-Dimethylethyl)-4-methylene
21.20	1504	2.76	2-methoxy-benzothieno[2,3-C]Quinolin-6(5H)-one
21.34	1509	6.02	2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol BHT(Butylated hydroxytoluene)
26.01	1673	2.20	Benzoic acid 2,6-bis(trimethylsiloxy)-, trimethylsilyl ester
30.21	1833	1.54	Hexadecamethyl-heptasiloxane

¹ RT, Retention time

² KI, Kovat's index in relation to n-alkanes (C₉-C₂₄) after separation in a DB-5MS column.

於半人工林，氣候條件與人工栽培環境不同於博物館內的牛樟樹。再者，林場種植之牛樟樹可能提供內生真菌較多傳播的途徑，內生真菌可藉寄主本身與不同植物接觸或由不同媒介將其攜帶進入寄主，進而增加寄主體內菌相之多樣性。自原始與生物多樣性較高的森林區或熱帶雨林區，所分離的內生真菌也較具多樣性⁽³⁹⁾。

此外，內生真菌於牛樟樹不同部位的菌相也不同，顯示，除外在環境可影響菌相外，內在環境亦可能影響內生真菌菌相。寄主內部環境與外部生態環境之氣候條件，包括溫度、濕度、熱帶、溫帶、沙漠、臨海區或森林區等，能影響內生真菌族群的分布與多樣性⁽⁸⁾。兩種內生真菌 *Rhodocline parkeri* 與 *Phyllosticta* sp. 可存在於花旗松 (*Pseudotsuga menziesii*) 的針葉中，但於嫩枝上卻無法被分離得到⁽³⁴⁾。此外，Bayman氏等學者⁽⁴⁾ 指出 *Xylaria* 屬內生真菌於植物開花結果後的種子部位分離率為8%，而於枝條之分離率可高達54%。Li氏等學者⁽²⁰⁾ 更指出棗樹於不同生育期，如越冬、發芽、開花及結果等時期，其內生真菌菌相差異大。證實了同一寄主植物的不同部位，由於內部組成或功能性不同，分布的菌相差異很大，推測



圖四、於溫室條件下評估內生真菌CKL005菌株菌絲萃取液防治白菜炭疽病之效果。

Fig. 4. Effect of mycelial extract (ME) from fungal endophyte CKL005 on controlling anthracnose of Chinese cabbage caused by *Colletotrichum higginsianum* PA01 in green house. [W = water control; P = Pathogen (PA01) control; A and B = spraying plants with PA01 after treatment with 10mg/L (A) or 100 mg/L (B) of ME for 2 hr; C and D = spraying plants with 10mg/L (C) or 100 mg/L (D) of ME after treatment with the pathogen (PA01) for 2 hr.]

原因為內生真菌與植物組織具有專一性，植物組織營養環境差異會限制某些內生真菌的消長。本研究於不同時間點採集牛樟樹枝條比較溫度對內生真菌之消長，只有 *Pestalotiopsis*、*Colletotrichum*、*Nigrospora* 及 *Phomopsis* 等4屬可於全年被分離，其餘各時間所分離之菌相明顯不同。*Colletotrichum*、*Phomopsis*、*Phyllosticta* 及 *Xylaria* 這類溫度適應範圍較廣，且生長速度較快的內生真菌屬被分離機率高⁽¹⁷⁾。Wei氏等人⁽⁴⁶⁾ 亦指出 *Pestalotiopsis* 屬的真菌，可廣泛分布於熱帶與亞熱帶，在多種不同植株上能被分離，包括印度的紅樹 (*Rhizophora apiculata*)、巴西的椰子 (*Cocos nucifera*) 及中國大陸的16種不同作物上。此外，*Nigrospora* 屬的真菌亦為常見內生真菌，廣泛存在於不同環境中，該屬真菌亦可存在於海洋⁽⁵¹⁾。由於該四屬內生真菌具有生長快速、溫度適應範圍較廣及寄主範圍廣的特性，因此可能會以較高密度族群存在於植物體內。

測試內生真菌對植物病原菌之拮抗活性，僅篩選出6株具抑制病原菌生長能力的菌株，分別為惠蓀林場與科博館各三株，該6株菌株對9種植物病原菌菌絲生長的抑制效果也有不同。根據Tejesvi氏等人⁽⁴¹⁾ 指出欖仁 (*Terminalia arjuna*) 中的 *Pestalotiopsis* 同屬或來自同種植物內之菌株，其拮抗能力也有極大差異。Zhao氏等人⁽⁵³⁾ 亦提出，不同地區之同種寄主所分離的內生真菌，於有效物質的產生或累積亦有高度差異性。雖然自牛樟樹中分出的內生真菌，大多數並未具拮抗病原菌的能力，然後續或可針對其他功能性進行測試，如誘導作物抗病或

是促進植物生長等。

自惠蓀林場所分離的CKL005菌株拮抗病原菌的活性最佳，然該菌株於PDA平板上生長緩慢。依孢子形態、LSU及Actin基因序列顯示，CKL005菌株與*Colletotrichum*屬的真菌較具親緣性。然ITS序列分析指出，CKL005菌株與*Colletotrichum*屬菌株之分子親緣性較遠。ITS序列常用於鑑定真菌的屬與種，在分類鑑定上是相當有用的高保留度基因區域。然某些真菌種類不能以ITS序列區別，如Xie氏等人(49)報告草莓上兩種炭疽病菌*C. gloeosporioides*與*C. acutatum*無法藉由ITS序列區分。根據CKL005孢子形態特性與LSU和Actin基因序列分析結果，推論菌株CKL005可能屬於Glomerellales目，Glomerellaceae科下之*Collrototrichum*屬，至於種目前無法確定。

CKL005菌株的最適生長溫度介於24-32°C，當溫度達36°C時菌絲生長明顯變慢。CKL005在溫度32°C時菌絲生長直徑最大，然菌絲生長形態卻明顯與低溫不同，菌絲較為稀疏且顏色呈現明顯褐白相間輪狀。前人研究報告指出，炭疽病菌的菌絲生長直徑與菌絲體的乾重並不一定成正比，所以最適溫度除測量菌絲生長直徑外，仍須考慮生長形態、產孢情形及菌絲量⁽⁵⁴⁾。CKL005菌株乃自牛樟幼嫩枝條中所分離，綜而言之，其最適生長、產孢溫度及酸鹼值均與前人對於*Colletotrichum*屬真菌之研究結果甚為相近^(45, 54)。

於Czapek's培養基中，以D-glucose或sucrose當作碳源可增加CKL005菌絲生長量，然PDB培養結果卻比任何碳源佳。*Colletotrichum*屬之菌株對於碳源的利用並不相同，碳源的利用除能促進菌絲生長，亦可能影響產孢。Hegde氏⁽¹⁵⁾證明檳榔炭疽病菌(*C. gloeosporioides*)菌絲生長最佳碳源為右旋葡萄糖(dextrose)與蔗糖；而Sangeetha氏⁽³³⁾則指出芒果炭疽病菌菌絲生長的最佳碳源為甘露糖、葡萄糖及蔗糖，但以麥芽糖作為碳源能有效增加病原菌的產孢量。而在固態培養實驗中，得知菌株在添加不同碳源培養基上之抗生活性明顯不同。本研究也發現glucose與maltose能促進CKL005之拮抗作用。一般真菌利用糖類的順序為葡萄糖、果糖、蔗糖、最後才是麥芽糖，然CKL005於添加果糖與蔗糖的培養基中菌絲生長較麥芽糖差，對病原菌的抑制率亦較麥芽糖低。在氮源添加培養基中的菌絲生長量差異不顯著。添加不同氮源對病原菌抑制效果也未顯著增加。前人研究指出真菌生長常會因氮源添加的不同而有差異，此外某些氮源無法被利用，如*C. gloeosporioides*無法利用亞硝酸鉀/鈉⁽⁹⁾；而*C. indicum*在含有硫酸銨或尿素的培養基上則會生長不佳⁽³⁰⁾，顯示並非所有氮源都可被利用。

試驗結果得知：相較於發酵液，由CKL005菌絲體所萃取之物質，具有較佳抑制病原菌生長的效果。可能因為CKL005於液態培養下無法大量誘導拮抗物質排出體外所致。然而，於固態培養下，CKL005可表現抑制能力，顯示菌體內某些拮抗物質可分泌出體外。許多真菌的有效成分，如多醣體，主要儲存於細胞內，無法以液態培養的方式分泌到胞外⁽⁵²⁾。推測

CKL005之有效代謝產物，並非全屬二次代謝產物，可能對菌體仍有某種用途而被保留於菌體內。綜而言之，CKL005菌絲萃取物對4種供試病原細菌皆有抑制效果；然對9種供試病原真菌抑制效果差異大，其對植物葉部與貯藏病原菌的抑制效果較佳，但對土壤傳播病原菌較差。

菌絲之乙酸乙酯萃取物經管柱層分離純化，以90%乙酸乙酯與10%甲醇所沖提之分離部，對芒果與白菜炭疽病菌有顯著抑制效果。以較高極性的甲醇來萃取菌絲，所得之萃取物對病原菌菌絲生長並無抑制作用(結果未顯示)。雖然經HPLC分離、純化後，能得到具有抑制芒果炭疽病的分離液，然相較於粗萃液，其抑菌效果明顯偏低。粗萃液對芒果與白菜炭疽病菌菌絲生長之 EC_{50} 大約介於7.8-14.4 mg/l，而分離部物質對兩種炭疽病菌菌絲生長之 EC_{50} 均高於500 mg/l。顯示：菌絲粗萃液中含有多種有效抑菌成分，對抑制病原菌生長具有協力作用，即混合狀態的萃取物較純化沖提後分離所得物質抑菌效果強。

根據¹H、¹³C及DEPT NMR與GC/MS可知分離部4 (retention time 35分鐘)包括多種混合物。NMR分析顯示此化合物中可能含有糖苷鍵結、脂肪酸及雙環鍵結物質。進一步以GC-MS分析比對，得知主要成分為類萜類之 β -胡蘿蔔素(β -carotene)與對水中魚類極具毒性的脂肪酸類單棕櫚甘油酸(glycerol 1-palmitate)。其餘分析所得化合物皆具抗菌作用，如二種固醇類中的乙酸去氫皮質醇(prednisolone acetate)與皮質類固醇(hydrocortisone acetate)可作為藥物使用。乙酸去氫皮質醇可使用於眼部與皮膚，具有良好的消炎及抗菌作用，皮質類固醇則是皮膚抗菌用藥，此兩類物質目前皆為人工合成為主，並未有以微生物生產之例子；另外一類固醇類為麥角固醇(ergosterol)，屬天然固醇類，常存於菇類(牛樟芝、巴西蘑菇及冬蟲夏草等)、真菌(*Claviceps purpurea* Tulasne)或酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)細胞膜中，是維生素D₂的中間體，經照光或熱可生成維生素D₂，目前對於麥角固醇的研究著重於其強抗氧化能力及對前列腺癌細胞株具有強抑制活性的研究⁽³²⁾。分析得知：有效成分中以酯類蟾蜍他靈(gammabufotalin)的相對面積百分比最高，此一化學物質為蟾蜍耳後腺及皮膚腺所分泌的白色漿液的成分之一，可由蟾蜍提取，對多種人體病原菌皆有抑制作用，也具抗癌功能⁽²⁾。近來，有研究顯示在藥用植物百科之海蔥(*Urginea maritima* L.)中亦可萃取出蟾蜍他靈，且具有抗赤擬穀盜幼蟲(*Tribolium castaneum*)之作用⁽²⁶⁾。另成分中亦分析到醴苷類的洋地黃毒苷(digitoxin)可存在於玄參科(Scrophulariaceae)洋地黃(*Digitalis Purpurea* L.)植物中，功能為增加心臟收縮力與改進心肌張力，由於該物質具細胞毒性，可抑制癌細胞，效果十分顯著⁽²²⁾。

除上述成分外，分析中亦得知分離部4的物質中含有屬酯類生長素的吉勃素(gibberellin, GA)。多種真菌皆能產生GA，如引起水稻徒長病的*Gibberella fujikuroi*，GA能促進莖葉

生長，增加作物產量，但亦會抑制根部的生長⁽⁶⁾。CKL005菌絲萃取物可提高白菜種子發芽率，並增加小苗的淨重。這可能與CKL005能夠產生GA的能力有關。David氏⁽¹¹⁾研究指出，經GA處理之43種澳洲西部原生植物的種子，均能提高其發芽率。內生真菌所產生的活性物質與寄主種類有關，例如存活於種子內的內生真菌具有分泌生物鹼(alkaloids)的特性，尤其是能避免昆蟲或動物取食的生物鹼⁽¹⁰⁾。本研究所調查的對象牛樟木，本身具有多種的芳香醇類、酯類及木酚素類等，這些成分常有天然抗菌作用，而與其共生的內生真菌必需能抵禦這類物質。然而，目前從CKL005菌株所分析到的活性化合物與牛樟樹本身的成分似無相關性。

CKL005菌株亦可產生揮發性氣體抑制病原菌菌絲生長。經GC/MS分析比對之後，得知其揮發性氣體中包括多種成分。其中[bis](trimethylsilyloxy[phosphinyl] acetic acid trimethylsilyl ester 及 decamethyl -cyclopentasiloxane,是常見的含矽化學溶劑，可用於化妝品添加與其他(乾洗劑、消泡劑、農藥界面活性劑)工業上的應用。這類物質極易釋放於環境中，也可能進入真菌細胞中。此類揮發性氣體亦曾在蟲生真菌(*Paecilomyces cicadae*)中被偵測到⁽²¹⁾。CKL005菌株所產生之揮發性氣體含高量的八甲基環四硅氧烷(octamethyl-cyclotetrasiloxane)。此物質會揮發至空氣中，並存於土壤與生物體內。報告曾指出：某些汙泥中的細菌(*Pseudomonas* sp.)可以八甲基環四硅氧烷為唯一的碳源⁽¹⁾。CKL005菌株所產生之揮發性氣體中包含BHT(butylated hydroxytoluene)類抗氧化劑，其中之一為2,5-cyclohexadiene-1,4-dione,2,6-bis(1,1-dimethylethyl)。此物質屬脂溶性抗氧化劑，可添加於食品中，具有殺菌作用，在藥用植物菊科植物中的天山雪蓮(*Saussurea involucreata*)與八楞木(*Saussurea japonica*)皆有此成分存在⁽⁵⁰⁾。CKL005菌株所產生之揮發性氣體中含有3,6,7-thimethoxy-isobenzofuran-1(3H)-one,是一種芳香呋喃環化合物(isobenzofuran)類的抗氧化劑，且具有很強的抗菌功能。從德國鳶尾(*Terminalia morobensis*)分離到之內生真菌*Pestalotiopsis microspore*也產生類似之1,3-dihydro isobenzofuran(Pestacin)，抑制*Pythium* sp.的生長⁽³⁸⁾。

CKL005菌絲萃取液施用於白菜後，皆能有效降低炭疽病罹病度。試驗結果顯示：接種後施用菌絲萃取液的防治效果較為明顯，推測可能原因為，CKL005菌絲萃取液無法有效地殘存於植株上，導致先施用萃取液植株防治效果較差。也可能CKL005菌絲萃取液必需直接與病原菌孢子接觸才有抑制效果。CKL005菌絲萃取液於自然界中的穩定性，有待進一步測試。

由於真菌擁有培養容易、生長週期短、培養成本低廉等優點，具有開發成新型藥物或萃取與寄主相同有效成分的應用潛力⁽³⁹⁾。且內生真菌可能參與植物產生代謝物的途徑，並產生與其寄主植物類似的衍生物或者相同的生物活性物質。牛樟樹不僅為台灣本土特有且稀有的闊葉樹種，本身能產生多種生

物活性物質，在自然界更為有多種藥用活性牛樟芝之主要寄主⁽¹⁸⁾。本試驗成功篩選出具有產生抑菌揮發性氣體與拮抗作用的CKL005菌株，而主要抗菌物質應該屬類固醇、酯類及糖苷類。於溫室試驗中，CKL005菌株菌絲萃取物不僅能有效提高白菜種子發芽率與幼苗重量，且降低白菜炭疽病罹病度

引用文獻

1. Accettola, F., Guebitz, G. M., and Schoeftner, R. 2008. Siloxane removal from biogas by biofiltration: biodegradation studies. *Clean Technol. Environ. Policy* 10:211 – 218.1
2. Akiyama, M., Ogura, M., Iwai, M., Lijima, M., Numazawa, S., and Yoshida, T. 1999. Effect of bufalin on growth and differentiation of human skin carcinoma cells in vitro. *Human Cell* 12:205 – 209.
3. Arnold, A. E., and Lutzoni, F. 2007. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology* 88:541 – 549.
4. Bayman, P., Sandoval, P. A., Ortiz, Z. B., and Lodge, D. J. 1998. Distribution and dispersal of *Xylaria* endophytes in two tree species in Puerto Rico. *Mycol. Res.* 102:944 – 948.
5. Bills, G. F. 1996. Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants. Pages 31-65 in: *Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants: Systematics, Ecology, and Evolution*. S. C. Redlin and L. M. Carris eds. APS press, St. Paul, Minnesota, U.S.A.
6. Brian, P. W., Hemming, H. G., and Lowe, D. 1960. Inhibition of rooting of cuttings by gibberellin. *Ann. Bot.* 24:407 – 419.
7. Carroll, G. C. 1986. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. Page 205 – 222 in: *Microbiology of the Phyllosphere*. N. J. Fokkema and J. van den Heuvel eds. Cambridge University Press, Cambridge.
8. Carroll, G. C. 1995. Forest endophytes: pattern and process. *Can. J. Bot.* 73:S1316 – S1324.
9. Chandra, S., and Tandon, R. N. 1962. The effect of sorbose on the utilization of different monosaccharide by certain fungi causing leaf spot diseases. *Phytopathol. Z.* 45:130 – 138.
10. Clay, K., and Schardl, C. L. 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *Amer. Natural.* 160:S099 – S127.
11. David, T. B., Deanna, P. R., Caterine, J. M., and Julie, A. P. 1995. Effects of temperature, light and gibberellin on the germination of seeds of 43 species native to Western Australia. *J. Veget. Sci.* 6:797 – 806.
12. De Bary, A. 1866. *Morphologie und Physiologie der Pilze*,

- Flechten, und Myxomyceten. Ho Hmeister's Handbook of Physiol. Bot. Vol 2, Leipzig.
13. Ezra, D., Hess, W. M., and Strobel, G. A. 2004. New endophytic isolates of *Muscodor albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus. *Microbiology* 150:4023 – 4031.
 14. Faeth, S. H., and Fagan, W. F. 2002. Fungal Endophytes: Common host plant symbionts but uncommon mutualists. *Integrat. Comparat. Biol.* 42:360 – 368.
 15. Hegde, Y. R., Hegde, R. K., and Kulkarni, S. 1990. Studies on nutritional requirements of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sac. – A causal agent of anthracnose of arecanut. *Mysore J. Agri. Sci.* 24:358 – 359.
 16. Hu, Y., Li, C., Kulkarni, B. A., Strobel, G., Lobkovsky, E., Torczynski, R. M., and Porco, J. A., Jr. 2001. Exploring chemical diversity of epoxyquinoid natural products: synthesis and biological activity of (-)-jesterone and related molecules. *Organ. Lett.* 3:1649 – 1652.
 17. Hyde, K. D., and Soyong, K. 2008. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Divers.* 33:163 – 173.
 18. Kao, Y. T. 2004. Effects of the extracts and essential oil from *Cinnamomum kanehirai* on the growth of mycelium and fruiting body *Antrodia cinnamomea*: Master Thesis, Natl. Taiwan Univ, Taipei, pp 66. (In Chinese).
 19. Leuchtman, A. 1992. Systematics, distribution and host specificity of grass endophytes. *J. Nat.Tox.* 1:150 – 162.
 20. Li, D. X., Wu, H.Y., Zhang, M., Chen, M.I., and Song, H. W. 2010. Isolation and identification of endophytic fungi in jujube and their diversity analysis. *J. Fruit Sci.* 27:975 – 979.
 21. Li, K. L., Bao, J. Y., Lu, R. L., Zhang, L.W., and Zhang, D. L. 2012. Analysis of volatile components of three entomogenous fungi by SDE-GC-MS. *Mycosystema* 31:92 – 101.
 22. Lopez-Lazaro, M., Pastor, N., Azrak, S. S., Ayuso, M. J., Austin, C. A., and Cortes, F. 2005. Digitoxin inhibits the growth of cancer cell lines at concentrations commonly found cardiac patients. *J. Nat. Product.* 68:1642 – 1645.
 23. Miller, J. D., Sumarah, M. W., and Adams, G. W. 2008. Effect of a rugulosin-producing endophyte in *Picea glauca* on *Choristoneura fumiferana*. *J. Chem. Ecol.* 34:362 – 368.
 24. Mostert, L., Crous, P. W., and Petrini, O. 2000. Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex. *Sydowia* 52:46 – 58.
 25. Nisa, H., Kamili, A. N., Nawchoo, I. A., Shafi, S., Shameem, N., and Bandh, S. A. 2015. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. *Microb. Pathog.* 82:50 – 59.
 26. Pascual-Villalobos, M. J., 2002. Chemical variation in an *Ocimum basilicum* germplasm collection and activity of the essential oils on *Callosobruchus maculatus*. *Biochem. Sys. Ecol.* 31, 673 – 679.
 27. Petrini, O., Sieber, T., and Toti, L. 1992. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Nat. Tox. Metabol. Prod. Subs. Util.* 1:185 – 196.
 28. Popay, A. J., Hume, D. E., Davis, K. L., and Tapper, B. A. 2003. Interactions between endophyte (*Neotyphodium* spp.) and ploidy in hybrid and perennial ryegrass cultivars and their effects on Argentine stem weevil (*Listronotus bonariensis*). *New Zealand J. Agri. Res.* 46:311 – 319.
 29. Prihastuti, H., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E. H. C., and Hyde, K. D. 2009. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fungal Divers.* 39:89 – 109.
 30. Ramakrishnan, T. S. 1941. Studies in the genus *Colletotrichum*: III. Physiological studies on *Colletotrichum falcatum*. *Proc. Ind. Nat. Sci. Acad.* 14:395 – 411.
 31. Rodriguez, R. J., White, J. F., Arnold, A. E., and Redman, R. S. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol.* 182:314 – 330.
 32. Russo, A., Cardile, V., Piovano, M., Caggia, S., Espinoza, C. L., and Garbarino, J. A. 2010. Pro-apoptotic activity of ergosterol peroxide and (22E)-erogosta-7,22-dien-5 α -hydroxy-3,6-dione in human prostate cancer cells. *Chem.-Biol. Inter.* 184:352 – 358.
 33. Sangeetha, C. G. 2003. Studies on anthracnose of mango cause by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. And Sac., PhD Thesis, Univ. Agri. Sci., Banagalore, pp.77 – 156.
 34. Sieber, C. F., and Sieber, T. N. 1988. Endophytische pilze in Tanne (*Abies alba* Mill.) – Vergleich zweier Standorte im Schweizer Mittellan (Naturwald-Aufforstung). *Sydowia* 40:250 – 273.
 35. Simic, A., Sokovic, M. D., Grujic-Jovanovic, S., Vukojevic, J., and Marin, P. D. 2004. The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. *Phytothera. Res.* 18:713 – 717.
 36. Strobel, G. A., Dirkse, E., Sears, J., and Markworth, C. 2001. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology* 147:2943 – 2950.
 37. Strobel, G. A., Yang, X., Sears, J., Kramer, R., Sidhu, R. S., and Hess, W. M. 1996. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallichiana*. *Microbiology* 142:435 – 440.
 38. Strobel, G. E., Worapong, F. J., Grant, D. M., and Fung, P. C. 2002. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis*

- microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. *Phytochemistry* 60:179 – 183.
39. Strobel, G., and Daisy, B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:491 – 502.
40. Su, Y. Y., Noireung, P., Liu, F., Hyde, K. D., Moslem, M. A., Bahkli, A. H., Abd-Elsalam, K. A., and Cai, L. 2011. Epitypification of *Colletotrichum musae*, the causative agent of banana anthracnose. *Mycoscience* 52:376 – 382.
41. Tejesvi, M. V., Kini, K. R., Prakash, H. S., Ven Subbiah, H. S., and Shetty, H. S. 2007. Genetic diversity and antifungal activity of species of *Pestalotiopsis* isolated as endophytes from medicinal plants. *Fungal Divers.* 24:37 – 54.
42. Thom, C. 1910. Cultural studies of species of *Penicillium*. USDA. Bur. Anim. Ind. Bull. 118: 1 – 109.
43. Van Der Putten, W. H. 2003. Plant defense belowground and spatiotemporal processes in natural vegetation. *Ecology* 84:2269 – 2280.
44. Wang, B., and Qiu, Y. L. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizae in land plants. *Mycorrhiza* 16:299 – 363.
45. Wasantha Kumara, K. L., and Rawal, R. D. 2008. Influence of carbon, nitrogen, temperature and pH on the growth and sporulation of some Indian isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose disease of papaya (*Carrica papaya* L.). *Trop. Agri. Res. Ext.* 11:7 – 12.
46. Wei, J. G., Xu, T., Guo, L. D., Liu, A. R., Zhang, Y. and Pan, X. H. 2007. Endophytic *Pestalotiopsis* species associated with plants of Podocarpaceae, Theaceae and Taxaceae in southern China. *Fungal Diversity* 24: 55-74.
47. Wilson, D. 1995. Endophyte – the evolution of the term, a clarification of its use and definition. *Oikos* 73:247 – 276.
48. Wu, S. Y., Chung, W. C., Huang, J. W., Ishii, H., and Chung, W. H. 2009. Identification and fungicidal sensitivity of the fungus *Venturia* sp. the causal agent of pear scab in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 18:135 – 143.
49. Xie, L., Zhang, J. Z., Wan, Y., and Hu, D. W. 2010. Identification of *Colletotrichum* spp. Isolated from strawberry in Zhejiang Province and Shanghai, China. *J Zhejiang Uni.-Sci. B* 11:61 – 70.
50. Zang, L. W., Liu, Y. L., Liu, J. Q., Tian, Q., and Xiang, F. N. 2008. An improved method for testing weak VOCs in dry plants with a purge and trap concentrator coupled to GC-M. *Chromatographia* 68: 351-356.
51. Zhang, Q. H., Tian, L., Zhou, L. D., Zhang, Y., Li, Z. F., Hua, H. M., and Pei, Y. H. 2009. Two new compounds from the marine *Nigrospora sphaerica*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 11:962 – 966.
52. Zhao, J. L., Shan, T. J., Huang, Y. F., Liu, X. L., Gao, X. W., Wang, M. A., Jiang, W. B., and Zhou, L. G. 1999. Chemical composition and in vitro antimicrobial activity of the volatile oils from *Gliomastix murorum* and *Pichia guilliermondii*, two endophytic fungi in *Paris polyphylla* var. yunnanensis. *Nat. Prod. Comm.* 4:1491 – 1496.
53. Zhao, J., Zhou, L., Wang, J., Shan, T., Zhong, L., Liu, X., and Gao, X. 2010. Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. *Curr. Res. Technol. Edu. Topics Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol.* 2:567 – 576.
54. Zhou, E. X., Yang, M., Zhang, H., and Liu, Z. Z. 2002. Factors affecting the mycelial growth, sporulation and conidial germination of *Colletotrichum higginsianum* Sacc. *J. Nanjing Agri. Univ.* 25:47 – 51.

ABSTRACT

Wu, S. Y., Chen, Y. J., Chung, W. C., and Chung, W. H. 2017. Diversity of fungal endophytes in *Cinnamomum kanehirae* in Taiwan and control assessment on crop diseases. *J. Plant Med.* 59(3): 13-25.

Cinnamomum kanehirae (Syn. *C. micranthum*) is an indigenous arbor in Taiwan. The objectives of this study are to investigate the distribution and diversity of fungal endophytes in *C. kanehirae* and environmental factors influencing their diversities, and to identify strains that have bioactivity against plant pathogens. Of 224 fungal endophytes isolated from *C. kanehirae* trees grown in two different locations, 189 were from Hui-Sun Forest, Nantou, Taiwan, belonging to 13 families and 22 genera and 35 from inside the National Museum of Natural Science, Taichung, Taiwan, belonging to 7 families and 7 genera. It appears that fungal endophytes have a higher diversity in trees grown in natural habitats. The diversity was also observed in the samples collected from different tissues of the same tree. Of 224 isolates examined, only 6 displayed antagonistic activities against *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*, and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii*. Among them, CKL005 had the most impressive ability to suppress additional pathogens, including *Phytophthora capsici*, *Alternaria brassicicola*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, *C. higginsianum*, *Rhizoctonia solani*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, and *Ralstonia solanacearum*. Judging from morphological and phylogenetic analyses, CKL005 was likely a *Colletotrichum* sp. Ethyl acetate extracts derived from mycelia but not culture filtrate displayed strong

26 J. Plant Med.

antagonistic activities. Purification and analysis through silica gel, HPLC, NMR and GC/MS revealed that the bioactive components contained β -carotene, glycerol 1-palmitate, prednisolone acetate, ergosterol, hydrocortisone acetate, gammabufotalin, digitoxin, and gibberellin with gammabufotalin being the highest. In addition, CKL005 could produce volatile 2,5-cyclohexadiene-1,4-dione, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol and 3,6,7-trimethoxy-isobenzofuran-1(3H)-one, which were likely toxic to plant pathogens. CKL005 mycelial extracts could promote the germination of cabbage seeds and increased seedling fresh weight. Most importantly, spray application of CKL005 mycelial extracts onto cabbage seedlings before or after inoculation of *C. higginsianum* effectively reduced disease severity.

Keywords: fungal endophyte, bioactivity, secondary metabolites, biocontrol