

可提升植物免疫的 *Bacillus amyloliquefaciens* 微生物菌株商品開發

植物醫學系

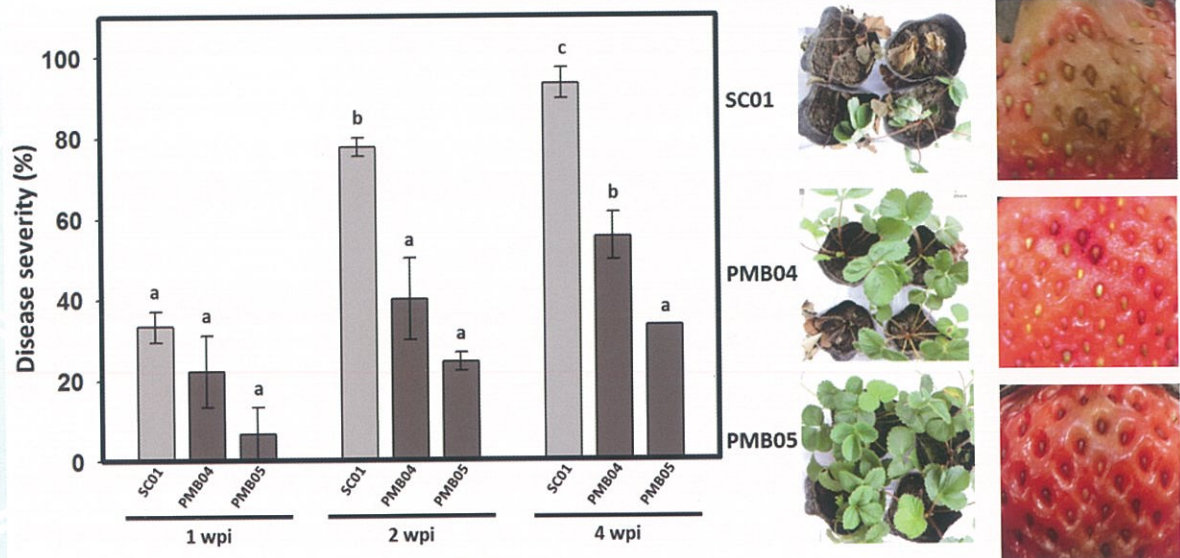
林宜賢 副教授

電話：08-7703202 # 6182

E-mail：yhlin@mail.npust.edu.tw

一 源起 / Introduction

利用微生物作為植物病害防治材料為目前國內積極推動漸少農業藥劑施用的積極策略。在國內外的研究已有相當足夠的基礎，其中又以*Bacillus*屬細菌的應用因其可以產生內生孢子來增加儲架壽命為最常見。在利用*Bacillus*屬細菌做為防治資材最主要係因此屬細菌可產生拮抗化合物來抑制或殺死植物病原菌，在此作用機制的篩選上，藉由不同來源可能的拮抗微生物利用平板培養基與病原菌的對峙培養，即可快速獲得具有防治病害效果的微生物菌株。然而，此方法所篩選出來的微生物可衍生於田間的實際應用的例子鮮少，可能與拮抗微生物之抗菌化合物在田間是否能穩定產生有關，但仍為重要的參考指標。除此之外，近年來在植物免疫機制的研究已逐漸闡明，且目前在植物醫學系之細菌研究室已經證明，可藉由外源蛋白提升植物免疫訊號，使植物對多種病害均有良好的防治效果。以上發現說明，利用植物免疫反應的提升可能廣效的提升植物對不同種類病原(真菌、細菌或病毒)的抗性。欲將此機制轉換為商品應用端，在未來技術商品化的過程中，篩選平台的建立與標準菌株的建立尤為關鍵。首先，本研究室已由本校達仁林場及植物醫學系農場分離出超過300株之土壤微生物，利用與病原菌之對峙培養及其所純化之誘導物在植物上的免疫訊號分析，已確認其中PMB04菌株為具有較強拮抗作用的菌株，而PMB05菌株則為唯一可提升植物免疫的菌株，且此二菌株經鑑定後皆為*Bacillus amyloliquefaciens*。本研究係以草莓炭疽病及西瓜果斑病做為防治對象，評估此二細菌菌株之防治效果。



圖一、草莓炭疽病防治



圖二、西瓜果斑病防治

二 設計概念 / Design Concept

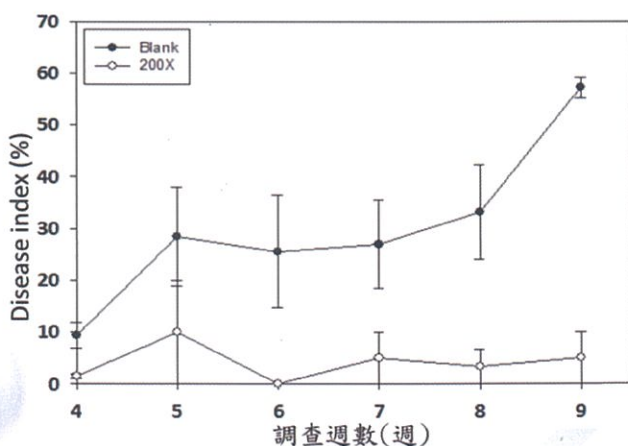
為開發應用有益微生物來防治植物病害發生之策略中，前述以防治草莓炭疽病(圖一)與西瓜果斑病(圖二)研究中，顯示PMB05具有強化植物免疫之能力並能極為有效的防治病害的發生，為具有商品化價值的特殊菌株。

三 技術開發 / Technical Development

將此種具有提升植物免疫能力的PMB05菌株應用發酵槽技術大量生產，目前已建立基礎配方。

四 技術競爭力 / Technological Competitiveness

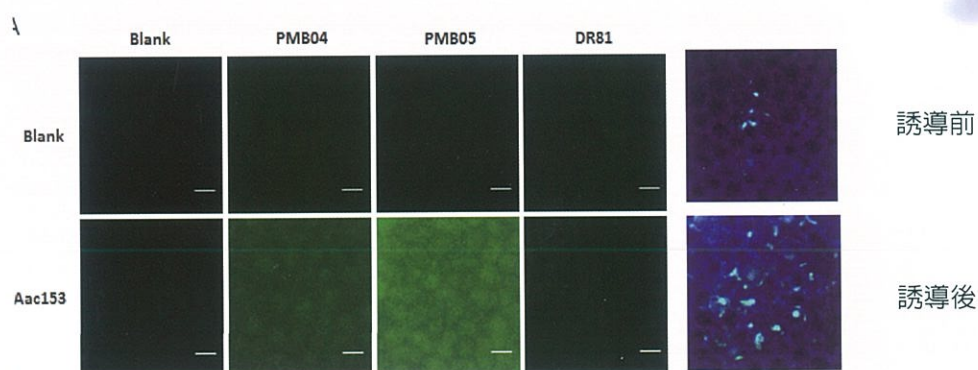
現今農業仰賴化學農藥來防治植物病害，但長期不當的施用化學藥劑已經對環境造成了影響，而使用有益微生物來防治病害為有效的策略，且不會對環境造成傷害。在有益微生物防治病害的研究中顯示出，PMB05菌株具有提升植物免疫的能力，而此種能力相較於直接殺菌的拮抗微生物更具發展潛能。除了使前述兩種植物產生抗病性外，在後續利用檸檬潰瘍病(圖三)進行田間防治試驗的結果也極具防治效果，說明此菌株在抗病性上屬於廣效性。



圖三、PMB05發酵稀釋液防治檸檬潰瘍病(田間)

五 研發成果 / R&D Result

本研究以真菌性的草莓炭疽病及細菌性的西瓜果斑病進行分析，結果分述如下。在草莓炭疽病上，以平板對峙試驗分析結果顯示PMB04及PMB05皆可抑制草莓炭疽病菌之菌絲生長，以PMB04為佳。PMB04菌株之培養過濾液可完全抑制草莓炭疽病菌分生孢子之發芽，然而PMB05之濾液則不具抑制孢子發芽的效果，僅些微抑制發芽管長度。隨後，以草莓果實進行接種之結果顯示，PMB04及PMB05之菌液均可顯著抑制草莓炭疽病菌的發生。進一步以草莓植株進行接種，結果顯示接種二週後PMB04及PMB05均可降低病害之發生，其中則以PMB05更有抑制病害發生的效果，在處理四週之防治率更高達63.4%。為了解PMB05菌株是否在草莓上具有強化草莓細胞免疫反應之效果，分別以激活化氧及癒傷葡聚糖之累積這兩項指標訊號進行分析。結果顯示確實僅PMB05菌液可增加草莓細胞辨識炭疽病菌後所誘發激活化氧及癒傷葡聚糖之累積。此結果說明PMB05確實可提升草莓對炭疽病菌所誘發的免疫反應而使草莓具有抗病性上。相同的，在西瓜細菌性果斑病防治上，*Bacillus sp.* PMB04與PMB05菌株均對西瓜果斑病菌不同菌株具有拮抗能力，其中仍以PMB04為佳。進一步分別利用西瓜種子及葉片處理分析此二菌株對病害之防治能力。在葉片的接種上，PMB04與PMB05二菌株之處理，相較於對照組可明顯抑制病害之發生。



在種子的處理中，PMB04與PMB05亦可有效降低幼苗之罹病率，其中又以PMB05之防治效果最佳，防治率高達96.6 %。由此結果可說明，拮抗作用非為防治西瓜果斑病之唯一因子。因此，植物免疫反應訊號值得進行分析。在植物免疫訊號的分析中，首先利用拮抗菌與病原菌共同接種，可顯示PMB04及PMB05菌株均可提升激活化氧快速產生及癒傷葡聚糖累積這二個指標訊號，其中又以PMB05的提升效果最為顯著。另以病原細菌誘導物進行分析的結果亦顯示出相同的趨勢。除此之外，在植物免疫發生的過程中，PMB05仍能顯著提升植物抗病過程關鍵酵素中之多酚氧化酶的活性。由以上結果說明此強化植物免疫之防禦訊號之PMB05菌株可降低果斑病之發生。將上述之PMB05菌株分別以16S rDNA基因序列進行鑑定，均已與確認發表的*B. amyloliquefaciens*的3個對照菌株具有最高的相同度，達99.0 %。在以*gyrB*基因序列進行鑑定，的結果顯示，PMB05與已發表的*B. amyloliquefaciens*的3個對照菌株具有最高之相同度，在98.0至98.5 %之間。由以上結果可確認PMB05菌株為*B. amyloliquefaciens*。

綜合上述，在以*Bacillus amyloliquefaciens*於草莓炭菌病及西瓜果斑病的防治分析上，具有強烈拮抗活性的PMB04菌株及可強化植物免疫反應的PMB05均扮演病害防治的關鍵角色。其中，PMB04菌株的系統與多數植物保護領域所開發出之拮抗微生物類似，屬於利用其拮抗活性作為抗病的基礎；然而，本研究室所篩選出之PMB05菌株則是目前唯一具有提升之植物免疫菌株的報導，值得將此菌株之功能進行專利及技術移轉。十分感謝學校的補助，使得此些菌株在專利及技轉的進行上出現曙光，未來本研究室將進一步開發出較成熟的菌株篩選技術，應更值得開發與保護。

六 致謝 Acknowledges

本計畫主要架構係由科技部計畫的支持及細菌研究室學生們的共同參與。非常感謝本校研究發展處對此商品化技術關心與經費支持。更感謝研究發展處同仁們在專利申請及技術轉移上的大力協助。

七 參考文獻 References

1. 吳意眉。2016。利用*Bacillus spp.* 防治草莓炭疽病及其可能機制探討。國立屏東科技大學植物醫學系碩士學位論文。屏東。71頁。
2. 張俊傑。2016。藉由*Bacillus amyloliquefaciens*啟動西瓜內源之免疫反應於果斑病之防治。國立屏東科技大學植物醫學系碩士學位論文。屏東。66頁。