

出國報告（出國類別：研究）

利用植物內生性微生物防治茄科青枯病之研究

服務機關：農業試驗所

姓名職稱：林宗俊助理研究員

派赴國家：美國

出國期間：104年9月5日~18日

報告日期：104年12月7日

目次

一、摘要.....	3
二、目的.....	4
三、行程規劃.....	5
四、研究內容.....	6
(一) 美國國家家禽研究中心簡介.....	6
(二) 毒理學和黴菌毒素研究部簡介.....	6
(三) 查爾斯·培博士簡介.....	8
(四) 利用植物內生性細菌打擊危害作物並產生毒素的真菌.....	11
(五) 博士班研究生從葡萄中分離到 <i>Fusarium fujikuroi</i> 揭示了需要重新評估具生產伏馬菌素潛力的物種.....	12
(六) 利用雷射脫附電子噴霧游離系統 (Laser Ablation Electrospray Ionization System , LAESI) 觀察 <i>Bacillus mojavensis</i> 生物膜的形成和生物表面活性劑的產生.....	13
(七) 未來可利用 Quorum Sensing 及 Quorum Quenching 的機制來篩選有用的微生物.....	13
五、心得與建議.....	15
六、照片及說明.....	16

一、摘要

茄科青枯病是台灣夏季番茄生產的重要的限制因子之一。本病為維管束病害，目前尚無化學藥劑可有效的防治青枯病。農業試驗所執行 104 國際合作計畫到美國農業部查爾斯•培根博士 (Dr. Charles Bacon) 團隊進行參訪。查爾斯•培根博士發現一種細菌 *Bacillus mojavensis*，具有大幅減少 *Fusarium verticillioides* 纏繞玉米的效果並降低 70% 黴菌毒素的含量 (fumonisin)。玉米種子經由處理一次的 *B. mojavensis*，此細菌即可以自然地“感染”玉米幼苗，便可在持續存在整個玉米的生長發育時期。從 *B. mojavensis* 生長在液態培養基中分離 Leu7-surfactin，其在非常低的濃度 (20 mg/L) 即可有效地抑制 *F. verticillioides*。不過，當 *F. verticillioides* 在遭受逆境的條件下，它對產生對 *B. mojavensis* 有毒的鐮孢菌酸 (fusaric acid)。後來，查爾斯•培根博士找到一個突變的 *B. mojavensis* 菌株可以抗鐮孢菌酸，並能夠有效地控制 *F. verticillioides*。他們發現該 *B. mojavensis* 可與多種的植物形成天然內生關係，可預期使用植物內生性細菌或可保護多種植物免於病菌的侵擾。查爾斯•培根博士的研究生意外發現從美國東南部釀酒葡萄園發現到族群龐大的 *F. fujikuroi* 並可產生高含量的伏馬毒素，需要重新考量 *F. fujikuroi* 菌株在美國食品安全的重要性。查爾斯•培根博士利用雷射脫附電子噴霧游離系統 (Laser Ablation Electrospray Ionization System, LAESI) 配合質譜分析 (Mass spectrometry, MS) (LAESI – MS) 技術可快速、準確、無侵入性的測量和化學分析，以釐清 *B. mojavensis* 生物膜的產生與生物表面活性劑 (biosurfactants) 以及其對抗玉米病原菌 (*Fusarium verticillioides*) 的關係。新的對付抗藥性病原菌的防治策略，即利用破壞病原菌 Quorum Sensing (QS) 機制 (所謂 Quorum Quenching)，來達到破壞病原菌的通訊系統，進而避免啟動病原菌的致病性。查爾斯•培根博士已經完整搜集 Quorum Sensing 研究的指示細菌，可作物篩選具潛力的微生物使用，並願意提供所有菌株作相關的研究，預計行文給動物防疫檢疫局，獲許可後，將引進國內進行研究。

二、目的

茄科青枯病是台灣夏季番茄生產的重要的限制因子之一。本病為維管束病害，目前尚無化學藥劑可有效的防治青枯病。本研究嘗試利用內生性微生物防治番茄青枯病，初步測試的結果顯示有 4 個菌株具有降低 46.9-65.6% 青枯病罹病度之效果。經 ITS 序列比列，2 菌株為 *Bacillus amyloliquefaciens*，2 菌株為 *B. subtilis*。國內已有多篇利用微生物防治茄科青枯病的研究報告，唯實際在田間可有效防治青枯病者不多。農業試驗所執行 104 國際合作計畫「利用植物內生性微生物防治茄科青枯病之研究」，前往參訪利用內生性微生物防治作物病害且具有豐碩成果的美國農業部查爾斯•培根博士 (Dr. Charles Bacon) 團隊進行植物內生性微生物之篩選指標、量產技術與施用技術之研習及實地參訪。本計畫欲藉以此參訪獲得篩選特定微生物的重要指標及相關技術進而加速國內利用植物內生性微生物防治茄科青枯病的研究進度。

三、行程規劃

本次赴美研習期間自民國104年9月5日至9月18日，行程日期、地點及研習內容詳如下表：

日期	參訪地點	行程安排
9/5 (六)	美國喬治亞州亞特蘭大市	搭機赴美，本所—桃園國際機場(1005)—日本東京成田國際機場(1430)(1625)—美國亞特蘭大(1600)
9/6 (日)	美國喬治亞州亞特蘭大市	參訪前資料準備及參訪喬治亞大學Griffin校區
9/7 (一) 至 9/16 (三)	美國喬治亞州雅典市	至美國農業部 (USDA) 位於喬治亞州雅典市的農業研究中心 (ARS)之美國國家家禽研究中心的毒理學和黴菌毒素研究部研習及技術交流。
9/17 (四)	美國喬治亞州亞特蘭大市	至美國農業部 (USDA) 位於喬治亞州雅典市的農業研究中心 (ARS)之美國國家家禽研究中心的毒理學和黴菌毒素研究部研習及技術交流。當晚起程至亞特蘭大市。
9/18 (六)	美國喬治亞州亞特蘭大市—台灣	搭機返國，美國亞特蘭大(1212)—日本東京成田國際機場(1525)(1745)—桃園國際機場(2045)—本所

四、研究內容

(一) 美國國家家禽研究中心簡介

美國國家家禽研究中心，其任務為以支持農業研究局 (Agricultural Research Service, ARS) 為使命，美國國家家禽研究中心的研究項目主要有 3 個重點領域：(1) 保障和改善食品和飼料安全；(2) 將確保和改進的食物和農作物質量和生產效率；(3) 實際利用天然化學和生化產品。研究經費支持 ARS 在植物科學、動物科學與商品轉換和交付的目標。該中心的研究持續強調 ARS 食品安全及利用研究項目的優先性。

(二) 毒理學和黴菌毒素研究部簡介

毒理學和黴菌毒素研究部的任務是確定的作用機制和黴菌毒素對人類和動物的毒性危害，並制定干預辦法來消除這種對食品和飼料的危害。目前其主要研究課題有三。

研究課題一：黴菌毒素是全球的兒童生長缺陷的一個危險因子

其目的為：改善科學和公共衛生的理解，暴露在黴菌毒素的飲食如何與其他危險因子如腹瀉的結合，會影響中低收入國家的兒童之生長發育。其研究做法：利用人類生物標誌評估在尼泊爾和坦桑尼亞之玉米的消費者之伏馬菌素的曝露量與腹瀉病的發生率以及兒童生長發育的相關性。

研究課題二：食品之毒物學和黴菌毒素的毒理學研究

其目的為：1. 利用動物模式確認伏馬毒素 (fumonisins) 的特異性的生物化學和分子基礎。2. 利用動物模式型確認”無明顯作用”和”最低作用水平”的膳食，在誘導

自然神經管缺陷，與評估動物尿中的神經鞘脂生物標誌 (sphingolipid biomarkers) 在血點 (blood spots) 和伏馬毒素的劑量反應的臨界值。3.確定伏馬菌素的暴露、尿中的伏馬菌素 (暴露的生物標誌) 以及在血點中神經鞘脂類 (效果的生物標誌) 的變化與食用玉米的人群之間的關係。4.確定伏馬毒素很容易被玉米的根吸收，但僅能有限的位移到玉米地上部營養組織的具體機制。5.確定利用鹼性蒸煮減少伏馬菌素污染的整粒玉米粒之潛在毒性的有效性。研究做法：1.進行劑量反應研究，以確定 fumonisin B1 (FB1) 在大鼠腎臟和小鼠肝臟中擾亂神經鞘脂類代謝和誘導毒性 (增加細胞凋亡) 的最小口服劑量。2. 在易感的小鼠品系進行劑量反應研究，以確定暴露和效果生物標誌與誘導神經管缺陷的臨界值。3.開展的流行病學研究，以確定在大量消耗以玉米為基礎食品 (分為不經常發現 FB 污染與經常發現 FB 污染) 的社區裡，檢測樣品和尿液分析 (FBs) 和血點 (神經鞘脂類)。4. 進行劑量反應研究，以確定 FB1 對植物的蒸散、鞘氨醇鹼 (sphingoid bases) 和其 1-磷酸鹽 (1-phosphates) 在 FB1 敏感和不敏感基因型的玉米的根和地上部組織之量的影響。5. 利用化學分析和動物體內生物測定 FB 污染的整粒玉米粒，以確定最大限度減少 FB1 的處理條件。

研究課題三：利用內生性菌菌控制有毒植物內生真菌與調控細菌代謝產物作為食品安全的新用途

其目的為：1.確定從革蘭氏陰性致病菌水平基因轉移到對植物友善的革蘭氏陽性內生性細菌 *Bacillus mojavensis* 的可能性和遺傳機制，將其改造為理想的生物防治菌。2.確定內生性細菌的多樣性、演化與其在玉米田環境的效果以及其對 *Fusarium verticillioides* 代謝功能 (包括黴菌毒素的產生以及外源性化合物的解毒/不活化) 的影響。3.確定如何讓生物防治菌可以被有效地利用，以防止伏馬毒素 (fumonisins) 的積累，特別是提高植物的抗病性與增加 *B. mojavensis* 產生抗真菌物質 (surfactin)。其研究做法：1. 進行測試以確定致病性革蘭氏陰性菌可以

通過結合，將遺傳信息傳遞革蘭氏陽性的內生性細菌，這可能會改變一個原本對植物無毒的細菌抵抗對人類有毒力的病原菌，但又同時維持其與植物穩定的內生關係。2. 利用多種方法包括分子遺傳學、生物信息學和在植物體的分析，用來區分可產生黴菌毒素之鐮孢菌屬的種間差異，研究重點針對不同代謝功能的基因，包括外源性化合物的解毒。這些功能基因可透過基因水平轉移的結果獲得標示。這些方法將評估這些代謝活動的對於病原真菌的適應性和競爭力的貢獻度。3. 根據在做法 1 所使用的實驗程序，使用相同的一群的 *B. mojavensis* 菌株，在控制的環境條件下評價這些 *B. mojavensis* 的菌株在幼苗植體的生物活性。將使用兩個品種的玉米，一個是較抗鐮孢菌，另一個是易感病的品種。大多數的技術包括接種、測量病害的表現、內生性、表面消毒及利用顯微鏡或目視病害的程度，都是做用多年的已經可行或在實驗室自創研究這類和其它植物內生性相關的方法。所有分析 surfactin 和伏馬菌素 (fumonisins) 分析方法，是過去研究所確定的方法。

(三) 查爾斯·培博士簡介

查爾斯·培根博士出生並成長在布雷登頓 (佛羅里達州)。在 1965 年，他獲得生物學和化學的學士學位，在克拉克大學 (亞特蘭大，喬治亞州)。於 1972 年，他在密歇根大學安娜堡分校獲得植物學 (真菌生理學) 的博士學位。從 1972 年到 1973 年，他在密歇根大學生物化學系擔任博士後，研究真菌和細菌的核苷酸合成。在 1973 年，查爾斯·培根博士加入了美國農業部位於喬治亞州雅典市的農業研究局 (ARS)，在那裡，他目前擔任科研領導者和微生物學家。

查爾斯·培根博士是在牧草內生真菌，主要是那些瘤座菌族 (*Balansieae*, *Clavicipitaceae* 麥角菌科) 真菌，及其在牧草內生性研究的國際權威。在他服務在 ARS 之前的 26 年期間，科學家們試圖了解為什麼在美國中南部，以及在新西蘭和澳大利亞超過 35,000,000 英畝的羊茅草，引起這麼多的動物健康問題 - 牛隻及綿羊的羊茅屬植物 FOOT 症候

群 (fescue foot) (fescue toxicosis, 羊茅屬植物中毒), 以及其他性狀問題。在查爾斯·培根博士服務於 ARS 後, 他提出假設和實施一個研究項目, 以確定真菌是否為有毒高羊茅的病因。在 1977 年, 他和同事第一次記錄到大多數無病徵的高羊茅都被內生真菌所感染, 這個真菌後來被命名為 *Neotyphodium coenophialum*。在建立這個研究系統後, 他發現這種真菌所產生的麥角鹼 (ergot alkaloids), 會造成牲畜的問題。

這些具有里程碑意義的成果, 提供了全世界許多研究小組的研究動力, 進一步深入探討許多證據顯示在冷涼季節時牧草與 *Neotyphodium / Epichloë* 等內生真菌間互惠共生關係。查爾斯·培根博士的研究活動已經佔據了這些相互關係的大部分內容, 包括形態學、生理學、生態學、遺傳學、分子生物學和內生真菌的進化, 還有發現 *Balansieae* 真菌具有致病力的菌種。這些植物病理和毒理學的研究已經指引了植物內生微生物對草皮和牧草性能的改進, 在未來生物技術實際應用具有相當大的潛力。

查爾斯·培根博士開發至今仍用於全世界的研究方法, 如從高羊茅所分離的麥角鹼之鑑定, 以及如何評估內生真菌的感染和其對動物毒性可能性的研究流程。查爾斯·培根博士除了在飼料的黴菌毒素和疾病的研究外, 他的研究團對對闡明了內生菌對植物的主要正向功用, 包括增強抗旱能力, 增加生根, 和更長壽命等。依據這些研究結果, 查爾斯·培根博士提出了一個結論, 即內生真菌的存在對植物是極為重要的。而且他的工作也產生了重大的實際利益, 如創建第一個獲得專利的, 由內生真菌強化 (然而對牲畜友善) 的草皮和高羊茅牧草品種。

查爾斯·培根博士的研究通常考量在農業系統中微生物、植物和動物的作用和相互作用的關係。除了研究牛隻及綿羊的羊茅屬植物 FOOT 症候群 (fescue foot) (fescue toxicosis, 羊茅屬植物中毒) 和 *Balansieae* 真菌的關係外, 查爾斯·培根博士和他的同事也已經研究其他植物內生真菌和細菌間的相互關係。其中他所關注的對象之一為 *Fusarium verticillioides* (synonym *F. moniliforme*), 是一種會感染玉米植株的真菌, 並且

可產生對食品安全和畜牧業健康有威脅的的黴菌毒素 (mycotoxin) - 伏馬菌素 (fumonisin)。因此，查爾斯·培根博士擴大植物內生性的概念，包括無症徵的 *F. verticillioides* 與玉米間的相互關係，發現當這個真菌感染玉米幼苗並建立一定的族群量後便可很快地產生毒素。另外，查爾斯·培根博士發現了一種名為 *Bacillus mojavensis* 的植物內生性細菌，其透過競爭排斥，可以保護玉米遠離那些不希望存在的內生性真菌 (*F. verticillioides*)，進而減少玉米積累對人類和牲畜具中毒可能性的黴菌毒素 (fumonisin)。因此，這種細菌已由 ARS 申請美國的專利。

查爾斯·培根博士具有植物病理學的專業背景。因為他在植物內生真菌的專業知識，使得他參與了美國國內和國際間諮詢和指導團隊。他曾擔任多個領域小組成員，例如 the CSREES Biology of Plant–Microbe Interactions Program，他也一直是 Journal of Food Protection 的編委會成員，並曾擔任兩屆 Journal of Applied and Environmental Microbiology 的編委。他曾是國際植物病理學協會鐮孢菌分類學委員會 (International Society of Plant Pathology Committee on Fusarium taxonomy) 的成員。查爾斯·培根博士曾是美國植物病理學會 (APS) 關於少數民族和文化多樣性常委會 (the APS Standing Committee on Minorities and Cultural Diversity) 以及 APS 黴菌毒素委員會 (the APS Mycotoxin Committee) 的創立者、前任主席與成員。他的宣傳活動，包括指導少數民族高校的學生，並在 1890 Capacity Building Grants Program 推廣植物病理學與真菌學。查爾斯·培根博士是 International Symbiosis Society 的創始會員和第一個財務主管。他也曾指導過幾個博士後學者，並在喬治亞大學植物病理學系任兼職教授，指導 7 名研究生並共同指導其他十名學生。

由於查爾斯·培根博士的研究團對在 1984 年的創造性研究成果，找到牛隻及綿羊的羊茅屬植物 FOOT 症候群 (fescue foot) (fescue toxicosis，羊茅屬植物中毒) 的原因，並將這些研究結果納入在開發具有很大的農藝重要性的牧草新品種，因此，他被授予美國農業部高級服務獎，以表彰他的成就。在 2000 年，他被授予 ARS 年度傑出科學家，

以表彰他在建立植物內生菌的研究作為農業研究的基礎和應用工具上的努力和成就。有一種牧草內生性真菌被命名為 *Epichloë baconii*，以表彰查爾斯·培根博士為植物內生性真菌領域所做出的眾多貢獻。

(四) 利用植物內生性細菌打擊危害作物並產生毒素的真菌

“當芽孢桿菌遇見镰孢菌”聽起來像一個怪物電影的片名，但美國農業部在喬治亞州雅典市的農業研究局 (ARS) 毒理學和黴菌毒素研究小組的微生物學家和研究的領導者查爾斯·培根博士發現一種細菌，具有大幅減少 *Fusarium verticillioides* 纏據玉米的效果。*F. verticillioides* 亦是玉米的內生性真菌，也就是說，它居住玉米的內部。有時候，這些植物的居民可能是有益的，但 *F. verticillioides* 顯然不是。所以查爾斯·培根博士和微生物學家多蘿西·辛頓就嘗試尋找一些“好”的內生性微生物，希望它們以將敵對真菌趕出植物體。這是一件好事，因為這一個镰孢菌是會產生黴菌毒素，因而降低被它感染作物的市場競爭力。

Bacillus mojavensis 是一種增強植物性狀的植物內生性細菌。查爾斯·培根博士和微生物學家多蘿西·辛頓發現這種細菌，ARS 已經申請了專利，保護植物免於病害，大大降低玉米中的真菌量。玉米種子經由處理一次的 *B. mojavensis*，此細菌即可以自然地“感染”玉米幼苗，便可在持續存在整個玉米的生長發育時期。

從 *B. mojavensis* 生長在液態培養基中分離 Leu7-surfactin。在實驗室測試中，這個化合物證明可有效的抑制真菌的生長。surfactin 具有像洗潔劑一樣活性，可以溶解真菌的脂質膜，最終導致其死亡。在查爾斯·培根博士的試驗中，Leu7-surfactin 是在非常低的濃度 (20 mg/L) 即可有效地抑制 *F. verticillioides*，使其可更有效地使用。除了它的抗菌效果，surfactin 也可以在紡織品的製造，環境的整治，和回放化石燃料。因這種化合物的屬性創造了巨大的生物技術和生物製藥之應用潛力。

由查爾斯•培根博士和微生物學家多蘿西•辛頓進行溫室試驗結果顯示 *B. mojavensis* 減少約 70% 黴菌毒素 (fumonisin)。遺憾的是，他們發現，當 *F. verticillioides* 在遭受逆境的條件下，它對產生對 *B. mojavensis* 有毒的鐮孢菌酸 (fusaric acid)。經過兩年，查爾斯•培根博士和微生物學家多蘿西•辛頓尋找到一個突變的 *B. mojavensis* 菌株可以抗鐮孢菌酸 (fusaric acid)，但還是能夠有效地控制 *F. verticillioides*。他們發現了兩個菌株，可提供更有效的實地玉米和小麥研究生物防治工具。

此外研究發現該 *B. mojavensis* 可與多種的植物形成天然內生關係，預期影響使用植物內生性細菌作為生物防治戰略來保護所有植物的基礎研究方法。此方法提供了許多優於傳統的生物防治細菌，因為植物內生性細菌是系統性的，而且只要植物宿主是活的時候便會持存在。

(五) 博士班研究生從葡萄中分離到 *Fusarium fujikuroi* 揭示了需要重新評估具生產伏馬菌素潛力的物種

由於黴菌毒素造成威脅世界各地作物紀錄，使得植物病理學和食品科學家不得不就食品供應的安全性和成長進行合作。鐮孢菌屬 (*Fusarium*) 產生多種毒素，包括與動物嚴重疾病相關的伏馬菌素 (fumonisins)。在重要經濟作物上 *Fusarium verticillioides* 和 *F. proliferatum* 被認為是主要的伏馬菌素生產者。到目前為止，體外試驗結果顯示 *F. fujikuroi* 菌株僅能產生不可檢測或是少量的伏馬菌素。在 2013 年，從美國東南部的 8 種葡萄園和十個品種的釀酒葡萄發現到族群龐大的鐮孢菌。將族群的 translation elongation factor 1- α 基因序列與資料庫已確定的菌株作比較，發現其中 239 株為 *F. fujikuroi*，52 株為 *F. proliferatum*。系統演化分析顯示這兩個物種的種群中具有遺傳多樣性。利用 HPLC-MS / MS 定量伏馬菌素 B1-B3 (fumonisin B1-B3)，與大多數的報告不同的是大部分的 *F. fujikuroi* 菌株產生高含量的伏馬毒素，足以媲美 *F. verticillioides*

和 *F. proliferatum*。這項研究表明，需要重新考量 *F. fujikuroi* 菌株是一個會時常產生伏馬菌素的製造者，提高其在美國食品安全的相關性。

(六) 利用雷射脫附電子噴霧游離系統 (Laser Ablation Electrospray Ionization System, LAESI) 觀察 *Bacillus mojavensis* 生物膜的形成和生物表面活性劑的產生

生物膜 (Biofilms) 是由細菌產生的重要胞外聚合化合物，對其生長發育階段 (包括泳動、群聚、信號傳遞過程與利用疏水性養分) 很有幫忙，而且這些功能都對具生物防治潛力的植物內生性細菌相當的重要。因此，必需確定那些用於生物防治的菌株具有產生生物膜的能力。利用雷射脫附電子噴霧游離系統 (Laser Ablation Electrospray Ionization System, LAESI) 配合質譜分析 (Mass spectrometry, MS) (LAESI – MS) 技術是一種現代的方法，其允許組織的原位分子細胞成像，從而可對微生物和植物的寄生關係，進行快速、準確、無侵入性的測量和化學分析。*Bacillus mojavensis* 是一種具生物防治功能的植物內生性菌，利用 LAESI 質譜分析以釐清 *B. mojavensis* 生物膜的產生與生物表面活性劑 (biosurfactants) 以及其對抗玉米病原菌 (*Fusarium verticillioides*) 的關係。測試靜止培養 9 個菌株，以確定生物膜的發展和生物表面活性劑 (surfactin 和 fengycin) 的相關性。結果發現所有菌株自動在培養基的空氣與液體界面發展生物膜。這些結果顯示，在體外生產和生物膜並不必然一其拮抗作用有關，因為所有菌株對 *F. verticillioides* 都具有拮抗作用。但是，這也可能與 surfactin 和 fengycin 的濃度、其相似物質 (homologues) 或其他未知的生物表面活性劑參與這種病原菌的防治有關。

(七) 未來可利用 Quorum Sensing 及 Quorum Quenching 的機制來篩選有用的微生物

因為大量施用化學農藥防治作物的病害，導致多種植物病原菌已產生抗藥性，所以部份的化學農藥已失去殺菌的功能，在作物受到抗藥性病害菌感染時，無法適當投藥，造成作物健康的一大威脅。雖然世界上各大農藥廠持續的研究新藥開發，但是如果沒

有開發新的策略，則植物病原菌將一直突變產生抗藥性，作物也始終無法戰勝病原菌贏得這場戰役。所以開發新的防治病害研發策略，以發展不致或減緩病原菌產生抗藥性的新的防治方法，將是這個世紀植物病理學家重大責任與挑戰。所幸，目前已有嶄新的藥物研發策略—即利用破壞病原菌 **Quorum Sensing (QS)** 機制 (所謂 **Quorum Quenching**)，來達到破壞病原菌的通訊系統，進而避免啟動病原菌的致病性。由於病原有一套分泌訊息分子以判別它們的族群量是否已達一定規模，才開始啟動某些致病因子表達的機制。如果破壞了此一通訊機制，病原將無法開始表達致病因子，也就無法感染作物。由於此一機制並非直接殺死病原菌，故它應不會或可大量減緩病原菌產生抗藥性的機會。查爾斯•培根博士已經完整搜集 **Quorum Sensing** 研究的指示細菌，可作物篩選具潛力的微生物使用，並願意提供給我作相關的研究，預計行文給動植物防疫檢疫局，獲許可後，將引進國內進行研究。

五、心得及建議

1. 生物防治菌在植物體內，可能會因植物遭受到逆境（如乾旱）而進入休眠狀態不再活化，這或許是防治效果不穩定的原因之一。熱處理以及少數的胺基酸可活化休眠的內生孢子，但糖類不會，故一旦進入休眠狀態，便不易再活化。
2. 可從抗旱或耐旱的植物分離內生菌，一般植物在逆境下會產生一些 signal 使其內生菌提早產生休眠構造。
3. 在美國牧草被內生性真菌感染後，使牧草無法產生花穗及種子，在台灣茭白筍受黑穗菌感染後亦不會開花。由此推測如能找到蔓澤蘭等入侵雜草的內生性真菌或可使其不開花而降低傳播的速度，再利用除草劑防治之。
4. 對於化學藥劑或抗生素已產生抗性之病原菌，利用群體感應的抑制因子 quorum sensing inhibitor (QSI) 或可提供另一個解決的方法。如能引進一套 quorum sensing 的指示微生物，將有助於這方面的研究。
5. 美國對植物內生菌作為生物農藥的規定不嚴，較容易上市。
6. 由查爾斯•培根博士的研究指出牧草之內生真菌主要纏據在胚的附近，待種子發芽後，即可侵入胚軸，進而隨著植物生長而遍佈全株。此外，玉米種子經由處理一次的 *B. mojavensis*，此細菌即可以自然地“感染”玉米幼苗，便可在持續存在整個玉米的生長發育時期。未來的研究可朝利用植物內生菌粉衣種子的施用方式，以增加其防治病害的效果。

六、照片及說明



搭機前往美國



感謝張宗仁老師來接機



參訪喬治亞大學 Griffin 校區



參訪喬治亞大學 Griffin 校區



至農業研究中心 (ARS)之毒理學和黴菌毒素研究部研習及技術交流



與查爾斯·培根博士和微生物學家多蘿西·辛頓共進午餐



到溫室觀察牧草與內生性真菌



毒理學和黴菌毒素研究部的科學家



查爾斯·培根博士示範分離內生細菌的方法



查爾斯·培根博士親自操作分離微生物



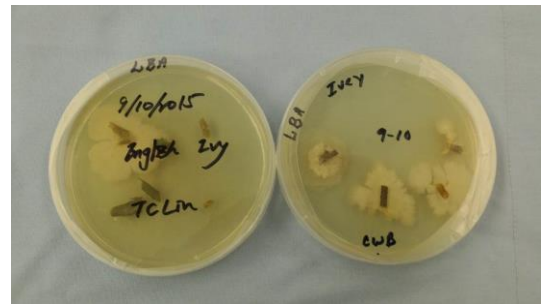
研究室使用市售的消毒噴劑與濕紙巾



研究室使用甲醇與市售氯水消毒



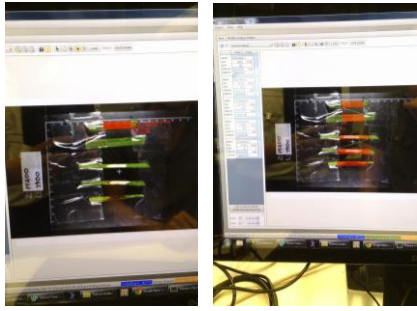
用來分離內生菌的材料-English Ivy



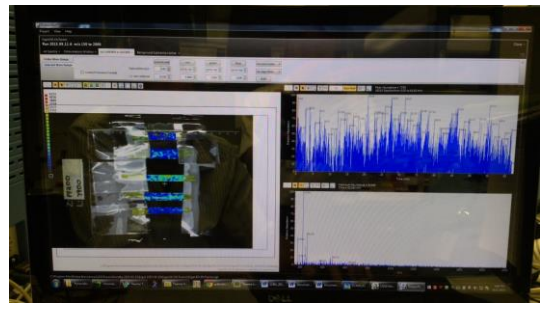
由 English Ivy 分離之內生細菌



利用雷射脫附電子噴霧游離系統 (Laser Ablation Electrospray Ionization System , LAESI) 配合質譜分析 (Mass spectrometry, MS) (LAESI – MS) 觀察不同階段之牧草中麥角醇的內量



利用程式規畫欲取樣的點



可同時在電腦螢幕觀察化合物的訊號



查爾斯•培根博士示範利用染劑觀察分離內生細菌的方法



美國亦受外來入侵植物（葛）的危害