

出國報告（出國類別：研習）

活動名稱

明尼蘇達大學植物病理學系國際合作計畫

服務機關：行政院農業委員會 農業藥物毒物試驗所

姓名職稱：梁瑩如 助理研究員

派赴國家：美國

出國期間：107年9月29日至107年10月7日

報告日期：107年12月19日

國際合作研習報告

申請人姓名 (中/英文)	梁瑩如 Liang Ying-Ru	職稱	助理研究員
活動期間 (西元年/月/日)	September 29 - October 7, 2018	研習地點 (中/英文)	美國明尼蘇達大學 University of Minnesota, U.S.A.
研習名稱	(中文)土壤微生物與作物及環境間的生物防治機制探討研習 (英文) Study on biocontrol mechanisms between soil microbiomes and crops		

摘要 (200-300 字)

鏈黴菌屬(*Streptomyces*)為多細胞(multicellular)之革蘭氏陽性細菌，具產生多種重要天然抗生物質、色素、生物活性物質或分解酵素之能力，約有 75%商品化之抗生素來自於鏈黴菌屬之二次代謝產物，此些二次代謝產物亦是臨床醫療上重要抑菌劑(antimicrobial agents)、抗癌藥物(anticancer agents)、免疫抑制劑(immunosuppressant)等。Dr. Kinkel 實驗室發現在抑病土土壤中，多含有大量鏈黴菌族群，因而對土壤傳播性病原菌(如 *Fusarium* spp.等)產生顯著的病害抑制效果。而該拮抗性鏈黴菌族群可藉由綠肥作物或使用土壤添加劑(營養源)而誘導產生。因此，在本次研習中，主要研習目標在於了解如何評估土壤鏈黴菌的作用機制，與探討如何藉由使用營養源來提高土壤拮抗鏈黴菌族群數量。

目次

摘要-----	III
目的-----	V
過程-----	V
心得與建議-----	X
附錄-----	XII

目的

與國際知名植物病理家研習與探討鏈黴菌與作物及土壤的交互作用關係，以利發展鏈黴菌生物製劑與強化田間應用，提高鏈黴菌的應用性，並促進國際合作與交流。現今探討土壤與微生物之關係，已大量利用次世代定序(NGS)的方法，本次研習同時希結合研習 NGS 技術與生物資訊學等綜合性科學，期以綜觀的角度了解鏈黴菌在土壤中的生態位與應用方式。

過程

研習日期:

9月29日 出發

9月29日 抵達明尼蘇達州

9月30日 週日，休息日

10月1日 ~ 10月5日 研習，研習內容如下表

	30-Sep	1-Oct	2-Oct	3-Oct	4-Oct	5-Oct	
09:30				Lindsey		Miriam (微生物生態/營養)	
10:00		Environment	George Heimpel (昆蟲系)	research on	Deepak (線蟲/田間試驗)	Matt (微生物代謝)	
10:30		introduction		Biocontrol	Linda (實驗室主持人)		
11:00	Minnehaha Fall Park	Lindsey/ Mariah	JP, Lunch	KB (線蟲實驗室)	Molly (微生物試驗)	Linda	
11:30							
12:00							
12:30							
01:00		Lab Meeting	Matt (微生物生態)	Nick (統計)	Sarah C (生物資訊)	airport departure	
01:30							
02:00		Seminar	Max (微生物)	JP (微生物試驗設計與田間試驗)	Mariah/ Wendy (實驗室 工作安排 與介紹)		
02:30							
03:00							
03:30							
04:00							
04:30							
05:00							

本次參訪中主要希望能藉由實際參訪明尼蘇達大學植物病理學系中 Dr. Linda Kinkel 實驗室對於土壤拮抗菌的評估方式與應用方式。Dr. Linda Kinkel 為 2017 年由植物保護基金會邀請來台演講之學者，其與 Dr. Jacque Fletcher 共同來台演講，內容除講授植物病理學研究外，也講授二位科學家的研究歷程。此外，在波士頓舉辦的 2018 國際植物病理學大會(2018ICPP)中，二位科學家亦給大會專題演講，二個會議為奠定本次合作與交流的契機。

本次到明尼蘇達大學的研習，除配合目前所執行的計畫內容外，在與 Dr. Kinkel 數次信件往返，確定本次研習將包含 Dr. Kinkel 實驗室主要試驗設計與試驗分析方法，同時由於該校植病系亦致力於大豆包囊線蟲的防治，因此也希望能交流關於線蟲防治的策略與方法。

Dr. Kinkel 研究室專注於土壤拮抗微生物的基礎研究，透過精確瞭解作物、微生物的互動，與各營養源對於拮抗微生物的關係，將有助於提高土壤拮抗微生物的族群密度，進而降低化學農藥或化學肥料的使用。在該實驗室中，特別專注於土壤鏈黴菌族群，Dr. Kinkel 實驗室發現，一般病害抑病菌多存在數量可觀的鏈黴菌族群，且菌相豐富，拮抗能力優異。因此如能藉由分析主要鏈黴菌族群的營養需求與生態位(niche)，將可藉由施用營養源或肥料的方式，提高土壤中鏈黴菌對於土傳病病害的抑制能力，而可降低病害的發生與增進作物健康。

鏈黴菌屬(*Streptomyces*)為多細胞(multicellular)之革蘭氏陽性細菌，具產生多種重要天然抗生物質、色素、生物活性物質或分解酵素之能力，約有75%商品化之抗生素來自於鏈黴菌屬之二次代謝產物，此些二次代謝產物亦是臨床醫療上重要抑菌劑(antimicrobial agents)、抗癌藥物(anticancer agents)、免疫抑制劑(immunosuppressant) (Hopwood, 2007, Liu et al., 2013, Law et al., 2017)。鏈黴菌屬所產生之二次代謝產物在農業之應用亦已行之多年，最早之紀錄為Waksman氏在1943年由*Streptomyces griseus*分離出鏈黴素(streptomycin)，並將其成功應用於果樹與蔬菜細菌性病害防治；1950年則有自*Streptomyces aureofaciens*分離出鏈黴素(tetracycline)，而應用於柑桔立枯病防治；後繼則有由日本學者或公司所分離鏈黴菌生產其抗生素用於水稻病害防治，如：保米黴素(blasticidin-S)與嘉賜黴素(kasugamycin)應用於水稻稻熱病防治，以及保粒黴素(polyoxins)與維利黴素(validamycin)則於應用水稻紋枯病防治(Fravel, 1988)。鏈黴菌代謝產物在植物保護之應用更廣及於殺蟲劑，如：阿巴汀(abamectin)、因滅汀(emamectin)與密滅汀(milbemectin)等以及殺草劑，如：畢拉草(bialaphos)(Fravel, 1988)。而嘗試應用鏈黴菌生物防治植物病害之報導實例多以土壤傳播性病害防治為主，如：由*Fusarium oxysporum*所引起之瓜類萎凋病與觀賞作物病害；由*Rhizoctonia solani*所引起之豌豆根腐病；由*Sclerotinia sclerotiorum* 所引起之萵苣菌核病(Lettuce drop)；與由*Pythium aphanidermatum*所引起胡瓜猝倒病及由*Phytophthora fragariae* var. *rubi* 所引起之紅莓根腐病等(Chen et al., 2016a, Lecomte et al., 2016, Saeed et al., 2017, Valois et al., 1996, Zacky & Ting, 2015, El-Tarabily, 2006, Rothrock & Gottlieb, 1984)。另有關應用鏈黴菌生物製劑於葉部病害如：水稻

稻熱病之防治，Zarandi 等人及 Li 等人研究中則分別指出葉面噴灑 *Streptomyces sindencensis* isolate 263 及 *Streptomyces globisporus* JK-1 之液態培養可有效防治稻熱病害發生(Zarandi M. E., 2009, Li et al., 2011)。Ruanpanun 及 Chamswarnng (2016)之研究中更指出由蚯蚓體壁所分離之鏈黴菌可應用於防治根瘤線蟲 *Meloidogyne incognita* (Ruanpanun & Chamswarnng, 2016)。除此之外，*Streptomyces bikiniensis* HD-087 之代謝物除可抑制由 *F. oxysporum* 引起之瓜類萎凋病，同時亦可誘導胡瓜 peroxidase、phenylalanine ammonia-lyase 及 β -1,3-glucanase 等抗病相關酵素之產生(Zhao et al., 2012)；而 Verma 等人研究中亦發現三株内生鏈黴菌株可產生 auxins 及 siderophores 具促進番茄生長之作用(Verma et al., 2011)。而台灣本土所開發鏈黴菌於植物病害防治研究見諸報導者有 *Streptomyces padanus* strain PMS-702 可產生 fungichromin 而可應用於防治由 *Rhizoctonia solani* 所引起之甘藍猝倒病與 *Phytophthora infestans* 引起之番茄晚疫病(Shih et al., 2003, Huang et al., 2007)；另 *Streptomyces plicatus* 具生成拮抗物質 borrelidin 之能力，並可用於防治由卵菌綱病原 *Phytophthora capsici* 所引起之茄科疫病(Chen et al., 2016b)。蔡等人亦研發出可快速篩選對線蟲具拮抗性之誘引袋，並成功篩選到具強幾丁質分解酵素活性及對線蟲具高度拮抗能力之 *Streptomyces saraceticus* 31，而將此菌株與蝦蟹殼粉混合施用可防治南方根瘤線蟲(Tsay et al., 2006)。綜觀國內外應用鏈黴菌產生之抗生素或應用鏈黴菌生物製劑於病蟲害防治潛力研究雖多，然目前國際間已商品化之產品卻僅有以 *Streptomyces griseoviridis* strain K61 菌體為生物農藥主成分之 Mycostop®，其具生長促進效果，並推薦於觀賞植物與瓜果類作物病害如: *Pythium*、*Fusarium*、*Botrytis*、*Alternaria*、*Phomopsis* 等病原所引起之病害之防治，但對 *Rhizoctonia* 及 *Phytophthora* 所引起病害防治效果較差(Palaniyandi et al., 2013)；及以 *Streptomyces lydicus* strain WYEC 108 菌體為主成分之 Actinovate®、Micro108®或 Actino Iron®，此商品主要推薦於苗期根部病害、觀賞植物與草皮真菌及卵菌所引起病害防治(Yuan & Crawford, 1995)。而台灣兩品項肥料登記產品，如:谷特® (肥製(質)字第 0695001 號，益祿發生物科技有限公司)含 *S. saraceticus* 31 及莎氏寶® (YAN TEN Saraceticus，肥製(質)字第 0285022 號，陽田生物科技有限公司)含 *Streptomyces saraceticus* strain KH400 菌及孢子體，雖含鏈黴菌，但並未以微生物肥料登記，而為一般堆肥產品。而本土所研發鏈黴菌登記為生物農藥應用於植物病害防治者，則僅有百泰生物科技公司由 *Streptomyces candidus* strain Y21007-2 所開發以抗生素為主成分之純白鏈黴菌素，主要登記應用於木瓜、棗類等果樹疫病防治，由此顯見可應用於植物病蟲害防治應用之鏈黴菌活體微生物農藥

或植物生長促進之微生物肥料仍亟待開發。

研習主題

主題一：微生物族群之研究與應用

抑病土可分為一般性抑病土(*general suppressive soil*)或專一性抑病土(*specific suppressive soil*)，前者展現廣譜性的拮抗作用，且可藉由栽培管理的方式達到提升土壤中整體拮抗微生物的族群數量，藉由整體拮抗微生物的族群量增加，對不特定病原菌產生抗生物質與空間、營養競爭，而達到抑病的效果；後者通常是具有高效，且可利用接種特定拮抗菌或特定抑病土至感病土中，而形成專一性抑病土(Weller et al., 2002)。然而，如何界定與區分一般性抑病土與專一性抑病土，對科學家而言，目前仍存有困難。截至目前的研究成果，發現相較於感病土，一般性抑病土中含有高量的抗生素產生菌(*antibiotic producing bacteria*)，而該抗生素產生菌其種類多為鏈黴菌屬(*Streptomyces spp.*)菌株。

Kinkel 等人在 2012 年比較了 Grand Rapids 地區的抑病土與鄰田的感病土，發現二者土壤中的鏈黴菌族群數量不同，抑病土有較高的抑制病害能力，且該區域的土壤有較高的抗生活性，此外 Bowers(1996)等人與 Liu(1995, 1996)等人將馬鈴薯瘡痂病抑病土區域所分離取得的拮抗鏈黴菌株，接種至馬鈴薯瘡痂病的感病田中，可顯著地降低馬鈴薯瘡痂病的發病率。此外，在其他抑病土壤中，如 Postma 等人(2010)發現在拮抗 *Rhizoctonia solani* AG2-1 的抑病土中，含有高量的鏈黴菌族群(21%)與 *Lysobacter* 族群。其他許多研究也顯示，鏈黴菌族群也如其他已知的拮抗微生物(例如 *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lysobacter* 等)一樣，在抑病土中可能扮演重要的角色(Meng, 2012; Rosenzweig, 2012)。

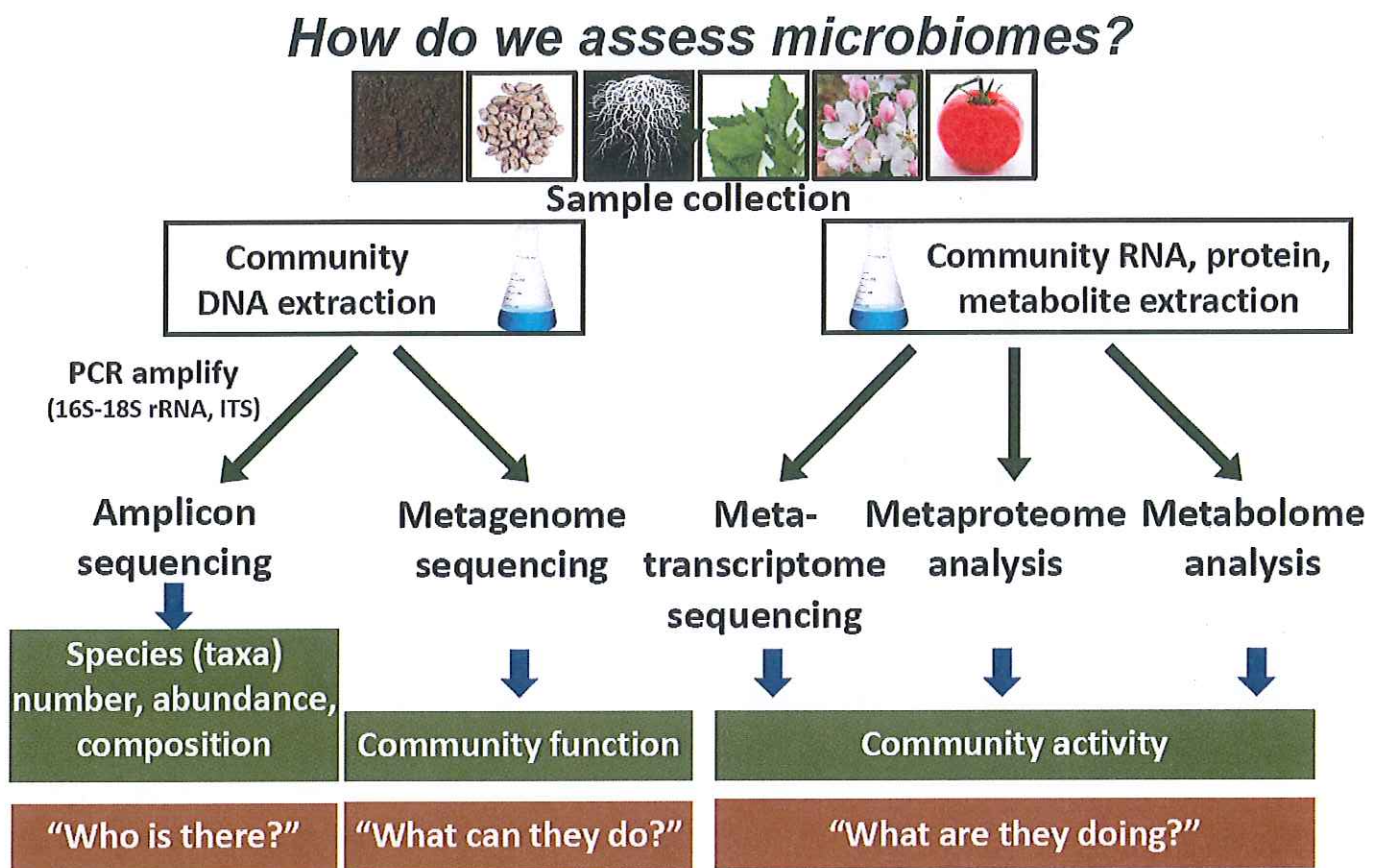
本次研習主題之一，係期望能在同一研究基準上交互比對研究結果與交流，了解植物與土壤微生物在農業環境的角色，並系統性的分析土壤微生物族群，最後能藉由土壤微生物達到增進農業生產力。其中，Dr. Kinkel 實驗室探討葉部微生物族群與肥料的關係，如施用氮磷鉀肥對於作物與葉部內寄生性微生物族群變化之關係、葉部內寄生性微生物族群表徵受氮磷鉀肥抑制或促進、該些資料可以讓我們如何應用潛力微生物等等。由發表之內容顯示，施用氮磷鉀肥對於真菌類微生物族群變化較大，而對於細菌類微生物族群影響較小，因此，可能可藉由施用氮磷鉀肥對微生物族群作選汰，同時施用氮磷鉀肥可能有助於拮抗微生物的生長。

主題二: 新世代定序方法(NGS)分析微生物族群

次世代定序 Next Generation Sequencing (NGS) 主要以 massively parallel sequencing 的概念建構的高通量技術，達到同時高速大量的核酸定序。與傳統 Sanger 定序相比，NGS 幾乎快了約 6 萬倍的速度，且樣品不需經質體複製就能進行定序，減少了複製過程可能出現的錯誤率。

目前可藉由萃取土壤中的總體微生物基因體來進行次世代定序，了解土壤中微生物族群分布與處理前後的族群變化。本次研習特別針對已在本所實驗室進行處理之試驗結果，討論次世代定序的分析方法等，期能與國際知名實驗室交流，了解目前研究與分析之進展。

下圖是次世代定序方法的應用介紹: 由圖可知，藉由分析不同樣品中的微生物族群，收集萃取微生物族群的 DNA、RNA、蛋白質或代謝物等，可分析微生物族群的種類、分布與可能之功效。



Leach, 2014, APS-PPB

由本次研習可以發現，(1) 目前對於土壤微生物之研究，已由傳統著重單一菌株之應用，朝向多元應用方式，例如藉由土壤改質劑、或調整土壤營養源、或種植綠肥作物等手段，誘導土壤中拮抗微生物族群增加，以展現抑制病害的能力，而不再侷限於單一菌株的應用；(2) 應用新世代定序方法(NGS)分析微生物族群已為現今研究微生物學的主要方法之一；(3) 了解微生物與微生物之間的交互作用，以利知曉微生物的生態位階與探討其應用方式，包含了解微生物係以拮抗或協同作用相互影響等，來達到田間應用的最大效益。

心得及建議

- 1.在 Dr. Kinkel 實驗室提供一種不同的生物防治思考邏輯: 提升土壤中拮抗微生物的族群密度，而不僅僅是外加拮抗微生物，迫使外加的拮抗微生物適應新的環境，而是藉由提高土壤本身的拮抗菌族群數量，達到作物、環境健康的目的。
- 2.以應用人體腸道細菌的研究方法 microbiome 來探討土壤中有益微生物的分布與促進族群數量，為一種可行且有用的方式。
- 3.鏈黴菌為跨醫學、藥學與農業領域重要的菌種，在醫藥領域主要為應用其代謝產物—抗生素為主，因此偏向研究特定菌株的生理生化特性與轉基因菌株應用等。在農業領域已有應用抗生素或二次代謝物，如阿巴汀等，作為農藥使用。而活體菌株的應用目前較少見，主因還是局限於鏈黴菌的產孢機制不瞭解，和對於各類鏈黴菌的生理生化特性未能充分理解，因此在農業領域除新穎抗生素之開發外，應可專注於潛力菌株的產孢機制探討，以利製劑開發與產品保存。
- 4.鏈黴菌發酵量產部分為該菌株製劑發展的限制因子之一，目前該實驗室與本所實驗室均以固態發酵為主，Dr. Kinkel 實驗室固態發酵產量約為 $10^6\sim 10^7$ cfu/g，本所實驗室目前的固態發酵產孢量可達 10^9 cfu/g 以上，較為優異。此差異點的原因可能在於(1)菌種不同(2)菌株的產孢篩選與能力活化(3)固態發酵配方的改良(4)固態發酵條件的優化等。除(1)菌株不同的差異外，餘(2)至(4)點為本所實驗室可以貢獻與合作之處。未來或可藉由實驗室交換生物材料的方式評估(2)至(4)各點的可行性與應用性。對於難防治的土壤傳播性病害，例如卵菌綱病害如疫病菌或腐

黴病菌、鏟胞菌引起的各類病害如香蕉黃葉病等，仍為世界上重要的病害議題，如能藉由提高土壤原生性(indigenous)拮抗菌的族群數量與抗生活性，或可成為一種解決重要與難防治土壤傳播性病害的手段與方法。

附錄



圖 1、與 Dr. Linda Kinkel 合影