

中華民國第 56 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 植物學科

佳作

052102

純天然農藥-印度梨型孢真菌的探討

學校名稱：高雄美國學校

作者： 高二 賀子苓	指導老師： Marilou Gallos
---------------	-------------------------

關鍵詞：印度梨型孢真菌、共生

摘要

Piriformospora indica 為一支可被獨立培養的植物根部共生菌，在農業上有極大的應用價值。然而，活體需要每月繼代，十分麻煩，而冷凍乾燥的 *P. indica* 保存時效比活體長，具有共生能力，輕且易碎、容易生成粉末，不管是學術用途價值還是實際應用價值都極高。冷凍乾燥的 *P. indica* 於 Kafer 活化六小時效果最佳，然而以水活化六小時最為實用。*P. indica* 的孢子更可比一般真菌承受溫度較高的熱應激。但是，*P. indica* 並不是完美真菌，雖然學術界目前都回報 *P. indica* 的優點，然而本研究發現其有可能負面反應，在將來開發為生物農藥時需要多加注意。本研究也同時發現 *P. indica* 對於青枯病原菌的抗性，增添 *P. indica* 的研究價值與外來用途。

壹、研究動機

在基礎生物(1) 陸、生物與環境章節中有討論到，植物與各式各樣物種共同演化，產生互利共生、片利共生或是寄生等關係。共生真菌會與植物產生菌根，植物提供碳水化合物給真菌作為養分，而真菌則可能增強植物的養分吸收力或是對於病蟲害、應激的抵抗能力。因此，共生真菌常常被作為可能的生物農藥來研究或開發，比起化學農藥更為環保且無毒、對人畜農作物有益蟲較無害，像是黑殭菌（屏東可可椰子被紅胸葉蟲入侵，黑殭菌可作為殺蟲劑殺死紅胸葉蟲）（葉瑩，2009）和 Arbuscular mycorrhiza (AM) 真菌等（生物肥料）（Douds *et. al.*, 2005）。

台灣的癌症死亡率世界第十高，因此，國人更應該注重食物來源與種植過程。18 種廣泛使用的農藥具有致癌性，而常用的氮肥的硝酸鹽具有淺在致癌風險（Ward and Mary, 2009）。因此，生物農藥既可增進植物生長，又免除了農藥對健康的威脅，為未來趨勢。台灣位於亞熱帶地區（高溫潮濕）、土地面積狹小、耕作密度高所以土壤容易疲乏、地力容易衰退。以長久經營的觀點，不管從農業亦或者環境保護，化學農藥並不適合於台灣的环境。然而，我們在土地面積狹小的情況下迫切需要植物有豐厚的收成，因此，生物農藥（或肥料）成為少數的解決方針。

除此之外，許多疾病容易在高溫潮濕的情況下找上作物。植物病害每年在台灣造成 28 億新台幣的經濟損失 (潘, 2015)，而其中青枯病為最嚴重的絕症之一，可感染超過 30 科、200 多種植物。青枯病病原菌主要經由土壤傳播，由植物根部的傷口入侵作物，增殖後菌

體與分泌物阻塞維管束導致植物缺水枯萎 (林, 2009)。青枯病無法用農藥防治或治療 (潘, 2015)，其他方法像是曬田、拔除病株並不是非常有效，因此近年來科學界看向生物防治作為青枯病災害的解決方法。

印度梨型孢真菌 (*Piriformospora indica*, 簡稱為 *Piri*) 是一支可促進根部生長的根部內共生真菌，被 Prof. Ajit Verma 發現於熱帶地區 (Verma *et al.*, 1998)。 *P. indica* 實際應用價值極高，能與阿拉伯芥、菸草、玉米、小麥、大麥共生；目前其對植物的正影響為促進根部生長、提高植物抗病、抗旱能力等；負面影響尚未被發現。(Zamani *et al.*, 2015; Waller *et al.*, 2005; Serfling *et al.*, 2007; Peškan-Berghöfer *et al.*, 2004; Varma *et al.*, 1999)

瀏覽資料時，我發現大多學術研究都是使用新鮮培養的真菌來進行，但未來如果真的開發成生物農藥，必定要讓孢子進行休眠以利保存應用。因此，我很好奇 *P. indica* 的保存與活化方式，展開了以下實驗。

原本這個研究應該活化完成後畫下句點，但沒想到實驗過程中我發現了非常奇怪的現象：番茄在被活化完的真菌處理後竟然出現了負面反應。目前學術界對於 *P. indica* 的研究都是正向的，然而，世界上並沒有完美的天然物種，因此，若 *P. indica* 有朝一日被開發為生物農藥，那其限制也是我們必須面對的。於是，我也開始對此現象展開研究，希望可以找出底下的原因。

貳、研究目的

- 一、*P. indica* 的液態培養、冷凍乾燥與觀察
- 二、*P. indica* 冷凍乾燥孢子的活化測試
- 三、*P. indica* 的甘油保藏與活化測試
- 四、*P. indica* 冷凍乾燥孢子的短期熱應激測試
- 五、*P. indica* 的活化後水耕共生測試
- 六、*P. indica* 的阿拉伯芥培養基共生
- 七、*P. indica* 的番茄培養基共生
- 八、*P. indica* 的番茄土壤共生
- 九、*P. indica* 的抗青枯病能力

參、研究設備及器材

MS Medium	培養箱	錐形瓶	無菌水	載波片
PNM Medium	-80°C 冰箱	培養皿	生理食鹽水	蓋波片
Kafer Medium	-20°C 冰箱	鉢	酒精 (95%)	顯微鏡
阿拉伯芥種子	切片機	小鉢棒	酒精 (100%)	吸管尖
H7996 番茄種子	烘箱	玻璃棒	1%NaOCl	本生燈
L390 番茄種子	旋渦混合器	1.5ml 離心管	Tween20	20ml 長 pipette
CL5915 番茄種子	包埋機	15ml 離心管	FAA 固定液	夾子
泥炭土	展片機	醬瓜瓶	t-butanol	刀片
珍珠石	蛭石	花寶	石蠟片	塑膠袋
離心機	pipetman	甘油	<i>P. indica</i>	Fuchsin Acid
美工刀	<i>Ralstonia solanacearum</i>			

肆、研究過程或方法

一、*P. indica* 的液態培養、冷凍乾燥與觀察。

- (一) 配置液態 Kafer Medium (簡稱 KF) (成分於附錄一) 並拿出培養箱裡的 *P. indica* 菌株。
- (二) 使用已滅菌的 1000 ml 吸管尖接種真菌至 KF 中：
 1. 將剪刀用本生燈烤過一遍滅菌，剪下吸管尖前端約三分之一處。
 2. 插在 *P. indica* 菌盤約 1 公分遠的地方以得到 *P.indica* 的 agar plug，並拿新的吸管尖從後戳下 agar plug 至裝有 100 ml 的 KF 的錐形瓶中 (一瓶一個 agar plug)。 *P.indica* 的 agar plug 與上一個 agar plug 在同一環中為佳。
- (五) 拿至 23.5 °C 培養箱，震盪培養 270 rpm 兩個星期。

(六) 兩個星期後將液態培養的 *P. indica* 從培養箱取出。將它倒在真空過濾裝置中(布式漏斗與抽濾瓶連接真空機)抽乾 KF 後，將真菌團放入 50 ml 離心管中。

(七) 冷凍真菌團於-80 °C 冰箱一小時後，將含有真菌團的離心管的瓶蓋鬆開，放入真空冷凍乾燥機的瓶子中、關閉排水孔，開始冷凍乾燥。

(八) 兩天後關閉冷凍乾燥機，將冷凍乾燥的 *P. indica* 保存放於-20°C 冰箱。

二、*P. indica* 冷凍乾燥孢子的活化測試。

(一) 將冷凍乾燥的 *P.indica* 以無菌的研鉢和鉢棒磨成粉末。秤 0.025 克的 *P. indica* 粉末於離心管中後加入 0.5 ml 的 Kafer、無菌水、PNM (成分於附錄二)、或是生理食鹽水，並劇烈震盪使菌粉懸浮於水中。

(二) 活化 6、12、48 小時後，以無菌水清洗三遍，取 10 μ l 的 *P. indica* 液體，滴到載玻片上，並蓋上蓋玻片，放在顯微鏡下 400 倍觀察並照相。

(三) 用玻璃棒(使用前過火)在取 1.25 ml 的 *P. indica* 菌液，於無菌操作台中，塗盤於 Kafer，待風乾後倒放於 22°C 培養箱。每天觀察照相。

三、*P. indica* 的甘油保藏與活化測試。

(一) 保藏：將菌種接種在斜面的 Kafer 培養基(試管)上，待菌長好後倒入甘油並放入 4 °C 冰箱。

(二) 活化：拿 pipetteman 用吸管尖戳出一些斜面上菌體，放在 Kafer 培養基上，倒置於 22°C 培養箱保存。

四、*P. indica* 冷凍乾燥孢子的短期熱應激測試。

(一) 將冷凍乾燥的 *P. indica* 用無菌的鉢和鉢棒磨成粉末。秤 0.025 克於離心管中後加入 0.5ml 的無菌水使懸浮，用 parafilm 封起後放入 25 °C、40 °C、50 °C、60 °C 水浴機 20 分鐘、80 分鐘、120 分鐘。

(二) 無菌水 wash 2 次，restore 4 小時後用玻璃棒(使用前過火)在取 1.25 ml 的 *P. indica* 液於無菌操作台塗盤於 Kafer medium 上，待風乾後倒放於 22°C 培養箱。每天觀察照相。

五、*P. indica* 的活化後共生測試。

(一) 配置 Murashige and Skoog (MS) medium 於醬瓜瓶中以種植無菌番茄 (*Solanum lycopersicum*) 種子 (品系 CL5915)。

1. 在離心管中用 70%酒精蓋過種子，1 分鐘後將酒精倒出，加入 ddH₂O 後劇烈震盪以洗掉酒精；倒出 ddH₂O。
2. 配置 1%NaOCl+0.01%Tween20 用以替種子殺菌，蓋過種子後抽真空 10 分鐘。
3. 用旋轉混合器搖 15 分鐘。
4. 在無菌操作台中用無菌 ddH₂O 清洗 5 次以上。
5. 使用吸管尖播種於 MS 上。

(二) 使用無菌水活化冷凍乾燥的 *P. indica* 粉末，濃度 0.05%，使懸浮後靜置於室溫 6 小時。

(三) 將 *P. indica* 水用水耕液稀釋 21.8 倍，澆灌至珍珠石上。對照組不加 *P. indica* 水，用水耕液澆灌珍珠石即可。將兩週大番茄移植到珍珠石上。第一個星期在番茄周圍撐起保鮮膜以馴化。一個星期後拿掉保鮮膜，三天澆水耕液一次。

(四) 第一、三、六、十、二十天收植物，用 FAA 固定液（70% ethanol : Formaldehyde : glacial acetic acid = 90 : 5 : 5）固定並抽真空 20 分鐘。

(五) 切片以確定共生。

1. 脫水

(1) 製備 10% t-butanol + 40% ethanol (95%) (液 1)、20% t-butanol + 50% ethanol (95%) (液 2)、35% t-butanol + 50% ethanol (95%) (液 3)、55% t-butanol + 40% ethanol (95%) (液 4)、75% t-butanol + 25% ethanol (100%) (液 5)、100% t-butanol (液 6)

(2) 倒掉固定液，在試管中加入液 1 蓋過 sample 並抽真空 30 min，靜置 90 min。

(3) 倒掉液 1 重複步驟 2-3，但使用液 2、液 3、液 4、液 5。

(4) 倒掉液 5、加入液 6，overnight 12hr。

2. 浸蠟

(1) 將石蠟片放入鐵杯中，在 60°C 烘箱中加熱成液態

(2) 將離心管中的 100% t-butanol 倒掉，加入液態石蠟，蓋過植物的根。

(3) 四小時（或以上）換一次蠟，換三次。

(4) 第四次換蠟等十二小時，第五次換蠟等八小時。

3. 包埋

(1) 折長方形小紙盒並預熱包埋機到 66 °C。

(2) 紙盒對準出蠟口，加蠟至紙盒 $\frac{1}{3}$

(3) 將植物的根用夾子從液態石蠟中夾出，快速放入紙盒的蠟中，用夾子調到蠟的左下方並將紙盒移到冰的面板上。

(4) 石蠟凝固後，收起來等過夜以確保全部石蠟凝固。

4. 切片

(1) 將凝固的石蠟塊多餘的地方切掉，使石蠟塊變小。將石蠟塊用燒熱的刀片黏在蠟座上。

(2) 用切片機切片，厚度 10 mm。切下的薄蠟放到沾水的載波片上攤平，展片機上展片過夜。

(3) 將展片完的載波片放在鐵架間泡入玻璃槽裡的 xylene，脫臘兩小時。

(4) 將有載波片地鐵架泡入 Fuchsin Acid Solution（1 ml GL solution + 0.01 g Fuchsin Acid）（染色 10 分鐘，染完用 ddH₂O 洗載波片。放在通風處曬乾。

(5) 點上封片劑後，蓋上蓋波片封片。等封片劑乾後，即可用顯微鏡觀察。

六、*P.indica* 的阿拉伯芥培養基共生。

（一）配置 MS medium，滅菌後在無菌操作台使用長 pipette 吸取 50ml 至培養皿中，風乾一小時。

（二）在無菌操作台中，無菌播種阿拉伯芥於 MS 培養基。

1. 將阿拉伯芥種子放入離心管，加入 70% 酒精消毒一分鐘。

2. 將酒精倒出加入 ddH₂O 以洗掉酒精；倒出 ddH₂O。

3. 配置消毒水 (1% NaOCl + 0.01% Tween20) , 用以消毒種子, 蓋過種子後抽真空 10 分鐘。用旋轉混合器搖 15 分鐘。
 4. 在無菌操作台中用無菌 ddH₂O 清洗 5 次以上。
 5. 使用吸管尖播種於 MS 培養基上。
- (三) 配置固態 PNM、滅菌、使用長 pipette 吸取 20ml 至培養皿中, 並將 *P. indica* 接種至凝固的培養基的正中央。
- (四) 將 10 天大的阿拉伯芥移植至含有 7 天大 *P.indica* 的培養基中。一個培養皿四棵阿拉伯芥, 根接觸到 *P. indica* 的菌絲。對照組將沒有菌的固態 Kafer 接至 PNM 上。照相存證。
- (五) 10 天後收植物, 照相存證, 秤地上部與地下部的重量。

七、*P. indica* 的番茄培養基共生

- (一) 在 MS 上種植三品種 (H7996、CL5915、L390) 番茄, 種植步驟如實驗四步驟二。L390 為感病品種、CL5915 為中抗病品種、H7996 為高抗病品種。
- (二) 配置固態 PNM 在醬瓜瓶中, 並將 *P. indica* 接種至 PNM 上。
注: 因為 agar 過硬, 番茄的根拔出來時會斷掉, 所以我將 PNM 配方中的 agar 改成 0.3% phytigel。
- (三) 在番茄 14 天大、*P. indica* 7 天大時移植蕃茄至有 *P. indica* 的醬瓜瓶中, 根部接觸到菌絲。
- (四) 三週後, 量測地上部與地下部鮮重與長度。
- (五) 使用 FAA 固定地下部後切片 (步驟如實驗三第五步), 確認共生情形。

八、*P. indica* 的番茄土壤共生

- (一) 於 MS medium 種植番茄, 播種步驟如實驗四步驟二。
- (二) 將冷凍乾燥完的 *P. indica* 磨碎, 每個離心管秤 0.5 克 *P. indica* 粉末, 加水至 100 ml 後劇烈震盪, 活化 6 小時。
- (三) 將泥炭土混裝珍珠石後在鋪有蛭石的 25 寸盆裝八分滿, 澆水土壤直到水從底盤低湧出。(泥炭土: 珍珠石: 蛭石= 10: 1: 1)

(四) 將十四天大的番茄移植到已經澆飽水的土壤後，並將活化的 *P. indica* 澆淋於番茄植株附近的土壤。替番茄套透明塑膠袋以馴化植株。兩個星期後將袋子拿掉並一個星期澆一次水。

(五) 觀察 *P. indica* 共生後對番茄的影響。

九、*P. indica* 的抗青枯病能力

(一) 接種 *P. indica* 2 周後的番茄 (CL 5915) 用以感染青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*, R.s.)

1. 感染前三天於 523 上劃盤 *Ralstonia*，28°C 隔夜培養。

2. 感染前兩天取 523 盤上的一個菌落，震盪培養於 5 ml 523 培養液中，28°C 過夜培養。

3. 感染前一天將預培養菌液倒至 500 ml 523 中放大震盪培養，28°C 隔夜培養。

4. 離心 15 分鐘，保留菌體，並用無菌水稀釋菌液至 $A_{600} = 0.3$

6. 用美工刀切一刀於距離植物大約一公分處的土中以在植物根系製造傷口。切完後倒入 150 ml 菌液

(五) 於處理後 4 天觀察並照相。剪下 stembase (莖底部至子葉處) 並用 ddH₂O 沖洗掉泥土後放至 3 號夾鏈袋中。加入 1ml 無菌水到夾鏈袋後用小鉢棒磨碎。

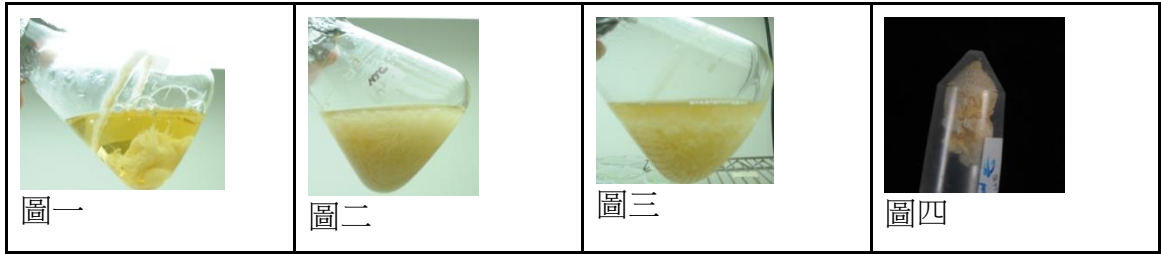
(六) 菌液序列稀釋從 10^1 至 10^8 。在 523 盤上畫八個格子後取 10 μ l 至盤子上。於 28°C 培養箱中隔夜培養。

(七) 利用計數器計算菌落數。

伍、研究結果

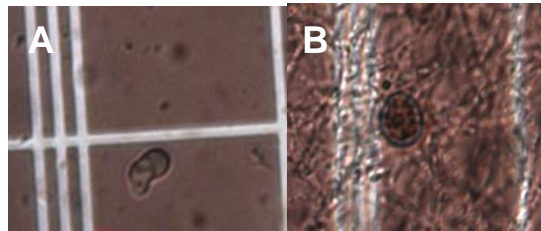
一、*P. indica* 的液態培養、冷凍乾燥與觀察

液態震盪培養的 *P. indica* 觀察其顏色以及形狀。可見 *P. indica* 在震盪培養的時候會有幾種不同可能形狀：一為有完整主體並有觸手狀菌體從主體長出 (如圖一)；二為觸手狀菌體密布在培養液中 (如圖二)；三為顆粒圓球狀菌體 (如圖三中間部分)。冷凍乾燥後的 *P. indica* (圖四) 輕且脆，容易且適合拿來磨碎成粉狀。



二、*P. indica* 冷凍乾燥孢子的活化測試

在 Kafer、水、PNM、和生理食鹽水中，6hr、12hr、48hr 時，顯微鏡皆可看到正在萌發的 *P. indica* (如圖五 A)。



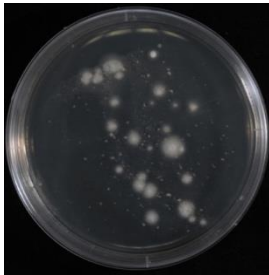
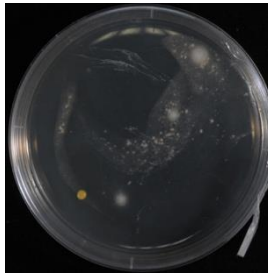
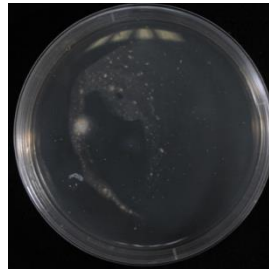
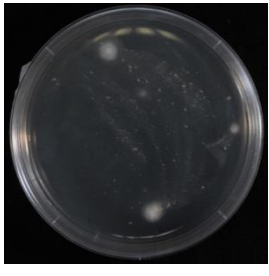
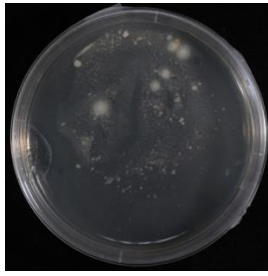
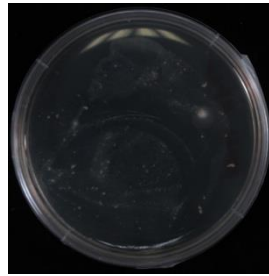
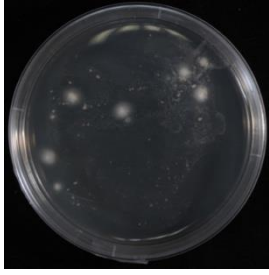
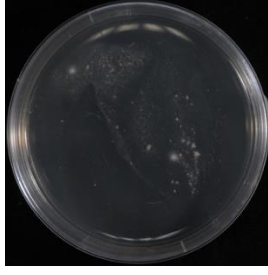
圖五、冷凍乾燥後加入 KF 活化六小時後 A.萌發的 *P. indica* B. 尚未萌發的 *P. indica*

第 6 天時用 Kafer 活化的 *P. indica* 已經長出明顯菌落，以 6hr 和 12hr 菌落最多、最大，48hr 菌落最少、最小 (如圖六)。其他介質活化的 *P. indica* 皆還沒長出明顯菌落。

	6hr	12hr	48hr
Kafer			

圖六、*P. indica* 冷凍乾燥保存孢子後，以 KF 不同處理時間後，培養在培養基中六天後的真菌生長情形的比較。時間為活化的處理時間。

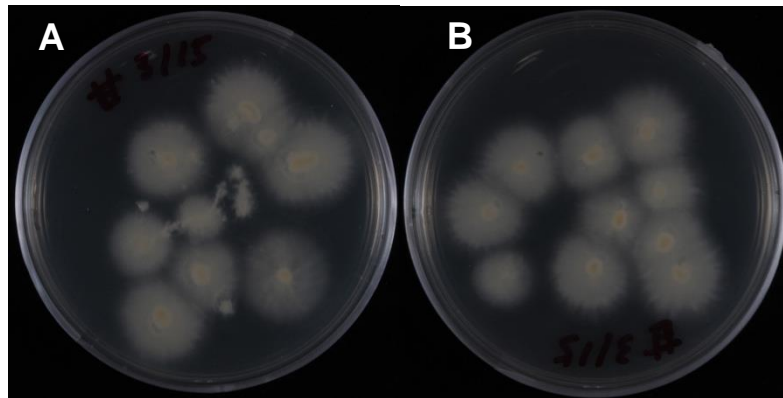
第 8 天時用 Sterile H₂O、PNM、生理食鹽水活化的真菌長出明顯菌落。三種介質中，Sterile H₂O 菌落最多、最大；PNM 活化的菌落其次於 Sterile H₂O；生理食鹽水活化的菌落最少最小 (如表三)。三個活化介質皆是 6hr 活化菌落最大、最多，12hr 其次，48hr 最少，生理食鹽水 48hr 尚未長出明顯菌落 (如圖七)。

	6hr	12hr	48hr
Sterile H2O			
PNM			
生理食鹽水			

圖七、*P. indica* 冷凍乾燥保存孢子後，以不同活化溶液及不同處理時間後，培養在培養基中八天後的真菌生長情形的比較。分別以水，PNM 及生理食鹽水處理甘油保存後的真菌，時間為活化的處理時間。NaCl 48 hr 空缺圖則是沒有任何生長。

三、*P. indica* 的甘油保藏與活化測試

三天後即可看到明顯菌落，活化效果與其他冷凍乾燥後用介質活化的 *P. indica* 相較之下優。第六天時菌落較實驗五中的其他介質大許多。

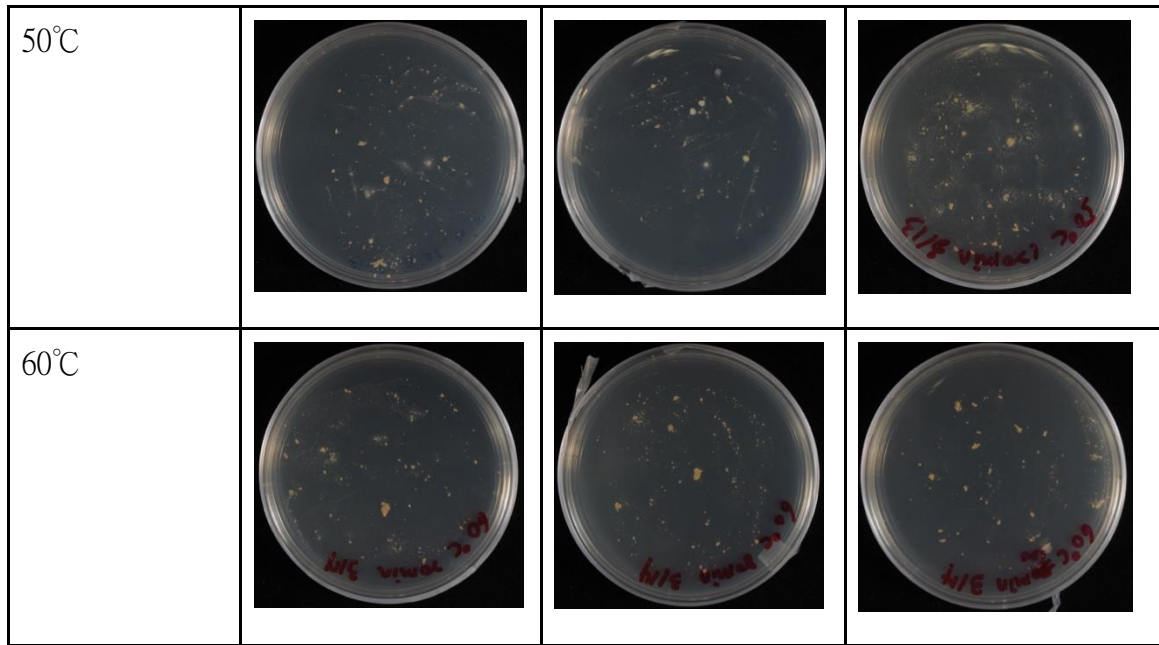


圖八 A、B 第六天用甘油斜面保存法的 *P. indica* 活化盤

四、*P. indica* 冷凍乾燥孢子的短期熱應激測試

六天後，25°C 水浴後長出的菌落最大最多，40°C 其次，50°C 最小最少，60°C 沒有任何菌落長出。在 25°C 和 40°C 的情況下，20 分鐘水浴長出菌落最少最小，80 和 120 分鐘最多最大。

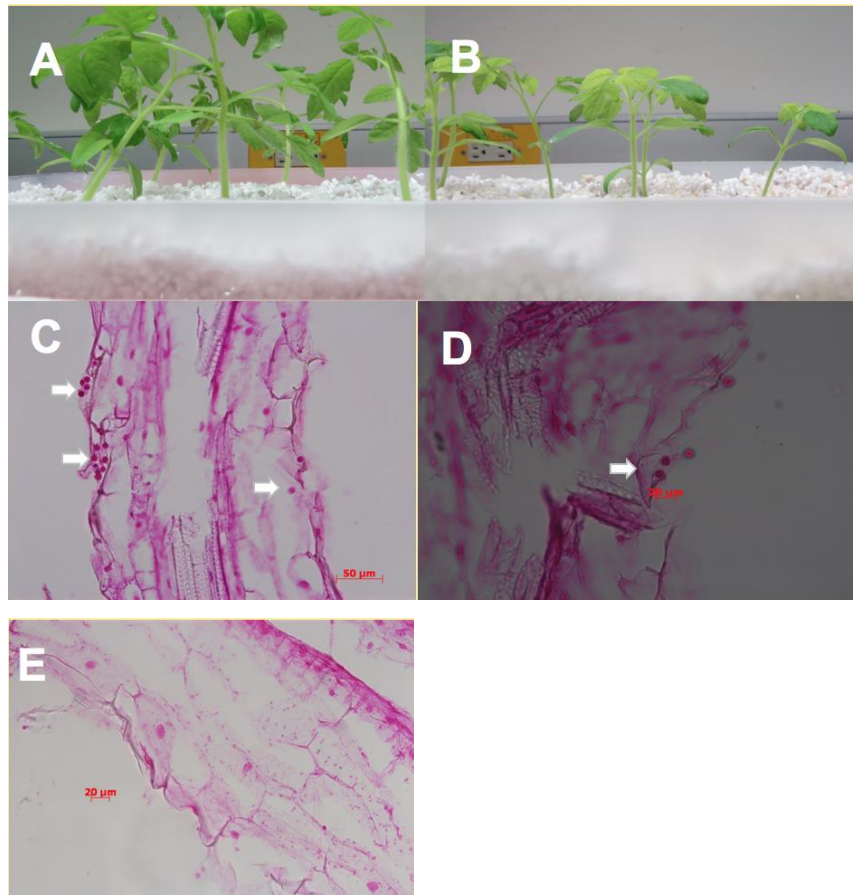
	20 min	80 min	120 min
25°C			
40°C			



圖九、不同水溫不同時間處理真菌後，培養真菌在培養基生長的情形。時間為處理時間。溫度則是處理溫度。

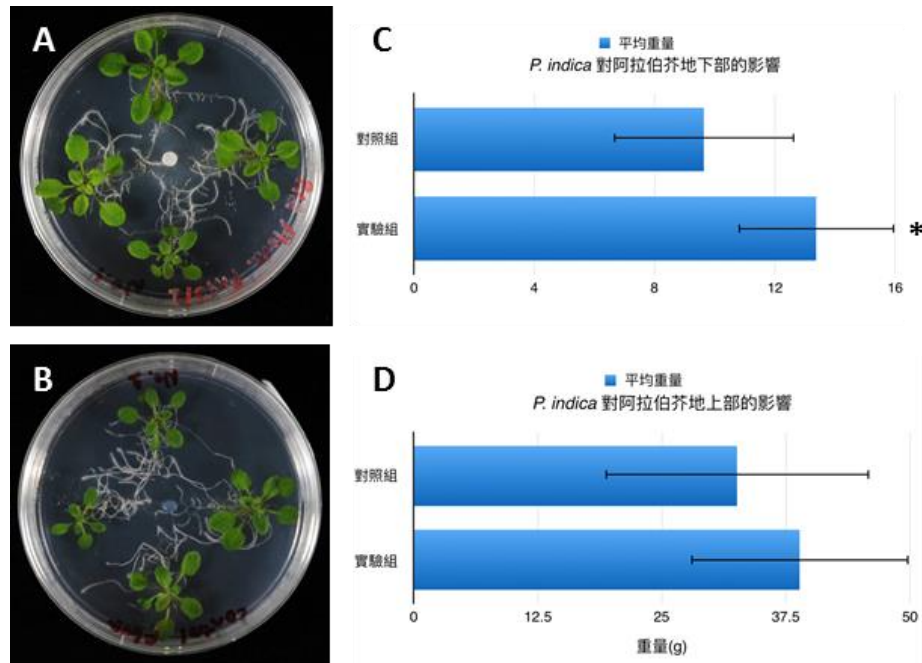
五、*P. indica* 的活化後共生測試

第十天，實驗組與對照組出現明顯差異（如圖十 A, B）。切片後確定 *P. indica* 有與番茄共生（如圖十 C, D）。



圖十、真菌與番茄共生後與對照組的生長及共生切片圖。A.沒有與真菌共生的植物。B.植物與真菌共生後，生長較弱勢。C.D.共生後，植物根部切片染色圖。白色箭頭為真菌孢子。E. 對照組植物根部切片染色圖

六、*P. indica* 的阿拉伯芥培養基共生測試



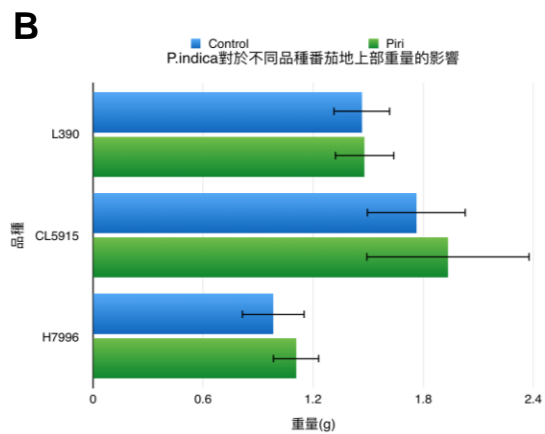
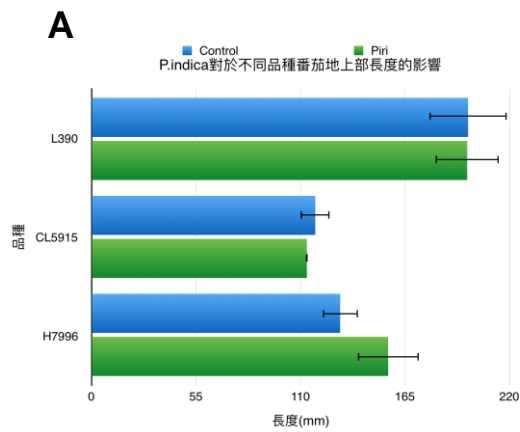
圖十一、*P. indica* 對阿拉伯芥植物生長情形與對地上部及地下部的影響。A. 真菌與阿拉伯芥共生後，地上部葉片較大，根系也較發達。B. 沒有真菌共生的阿拉伯芥對照組。C. 真菌對阿拉伯芥地下部生長重量的影響。D. 真菌對阿拉伯芥地上部生長重量的影響。*表示有顯著差異 (t-test 雙尾檢定, $p < 0.05$)。

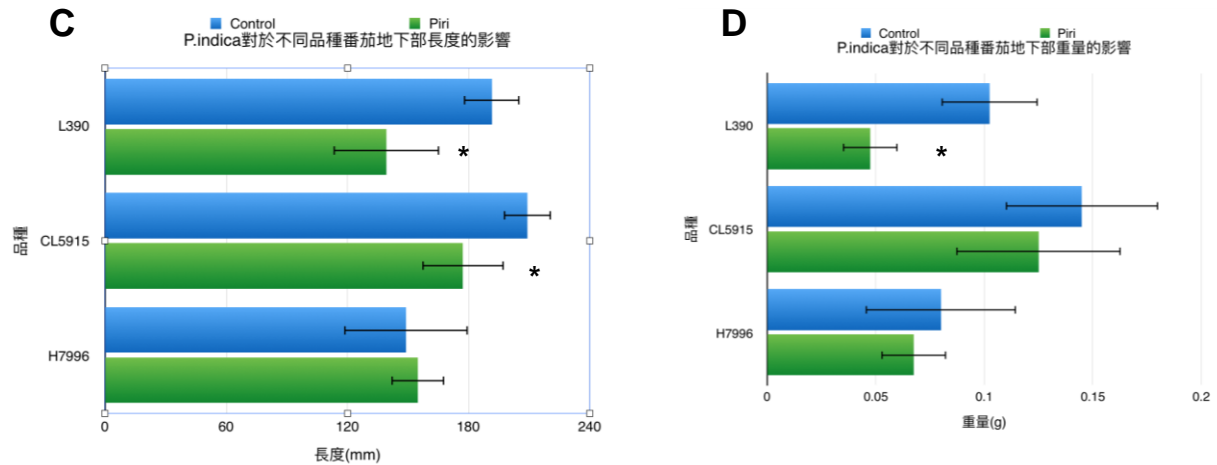
七、*P. indica* 的番茄培養基共生

三品系的實驗組及對照組葉子皆有明顯的黃化透明現象，莖皆可看到不定根長出。感染三個星期後收植物 並掃描根部，實驗組與對照組皆沒看到明顯根毛。我們測量實驗組與對照組的地下部長、地下部重、地上部長、地下部重，結果記錄於表七並繪製長條圖於圖十、圖十一、圖十二、圖十三。實驗組的地下部重與長皆與對照組有顯著差異，地上部的重與長則皆無。切片後 L390 實驗組在顯微鏡 400x 下看見明顯內孢子於植物根部內，如圖十四（圖九為對照組）。CL5915 實驗組則可看到孢子。H7996 實驗組則沒看到孢子。因為圖十三孢子的葡萄串狀結構，我們可確定看到的圓點為孢子。且有些孢子為梨形，所以是 *P. indica*。

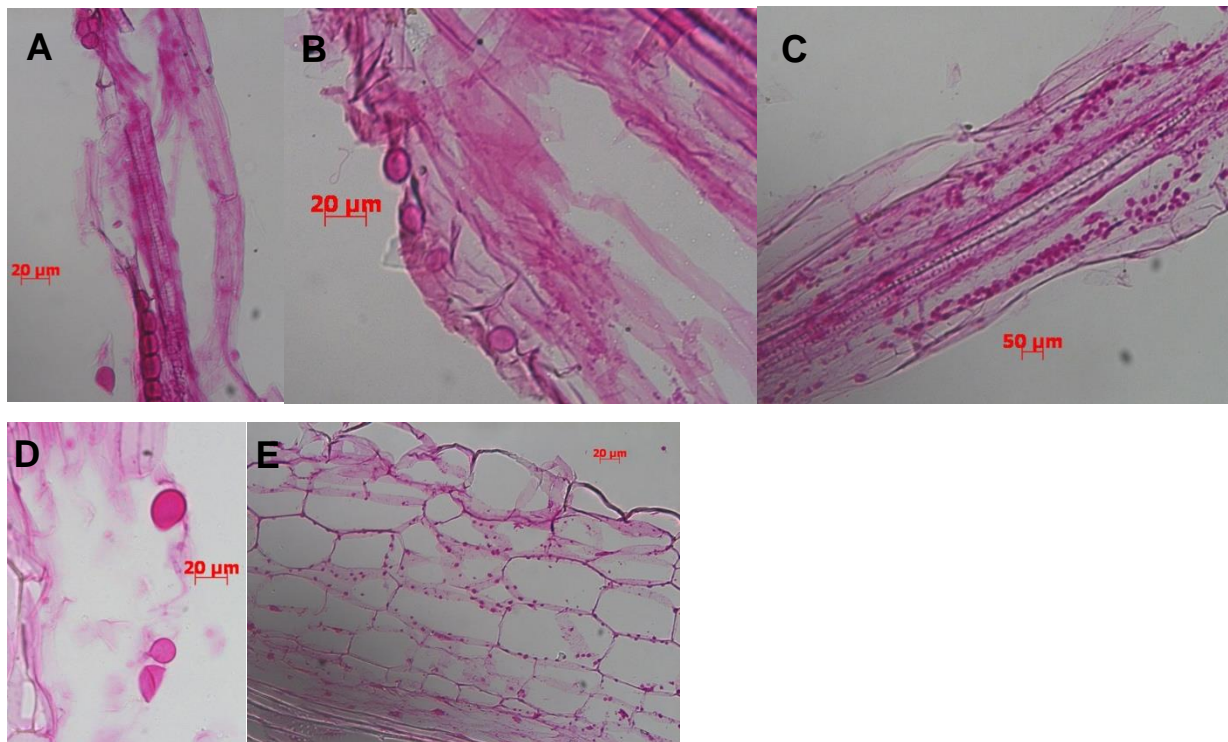
表四、各品系番茄實驗組與對照組的平均根長、重、莖長、重與標準差

	Avg. root weight (g)	STD	Avg. stem weight (g)	STD	Avg. Stem Length (g)	STD	Avg. Root Length (g)	STD
L390 Control	0.103	0.0222	1.47	0.156	198	20.3	192	13.7
L390 Piri	0.0475	0.0126	1.48	0.162	198	16.6	139	26.1
CL5915 Control	0.145	0.0351	1.76	0.271	118	7.64	209	11.7
CL5915 Piri	0.125	0.0379	1.94	0.444	113	0.0379	177	20.1
H7996 Control	0.08	0.0346	0.987	0.210	131	9.17	149	30.6
H7996 Piri	0.0675	0.0150	1.11	0.127	156	16.0	155	13.1





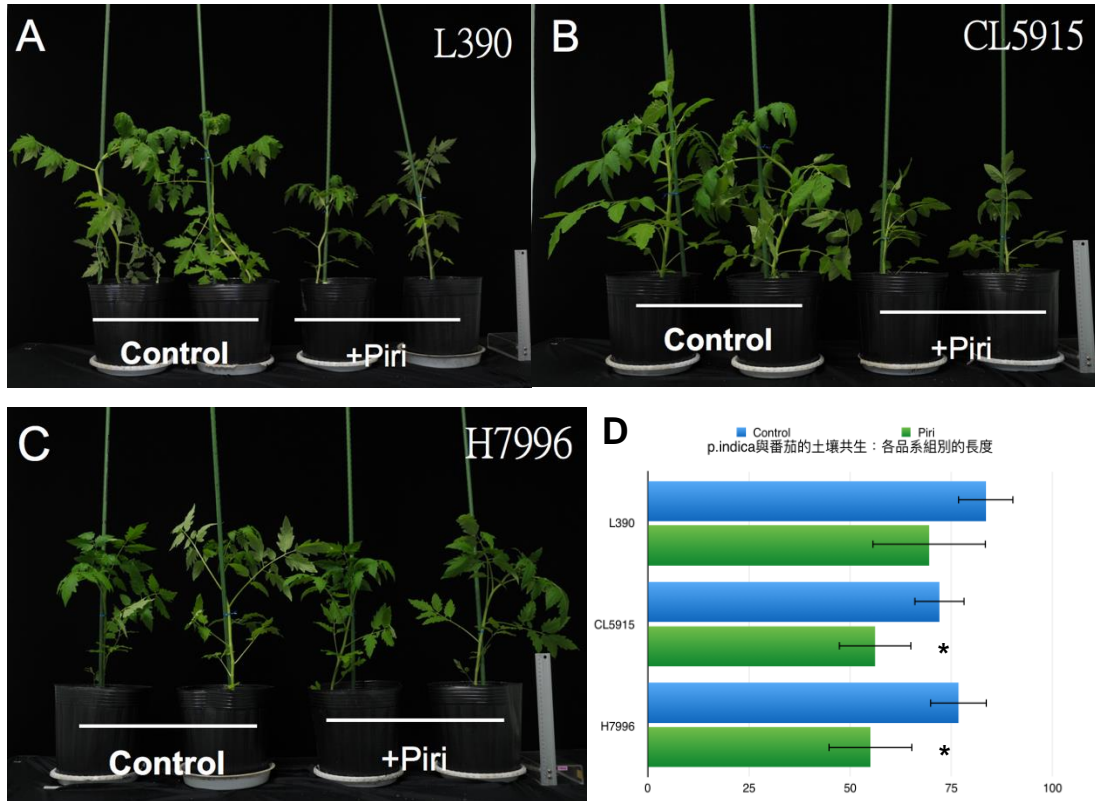
圖十二、A.真菌與三種蕃茄品種共生後，地下部重量的生長差異。B.真菌與三種蕃茄品種共生後，地上部重量的生長差異。C.真菌與三種蕃茄品種共生後，地下部長度的生長差異。D.真菌與三種蕃茄品種共生後，地上部高度的生長差異。*表示有顯著差異 (t-test 雙尾檢定， $p < 0.05$)



圖十三、A.B.C 真菌與 L390 共生後，根部切片。D.真菌與 CL5915 共生後，根部切片。E.真菌與 H7996 共生後，根部切片。

八、*P. indica* 的番茄土壤共生

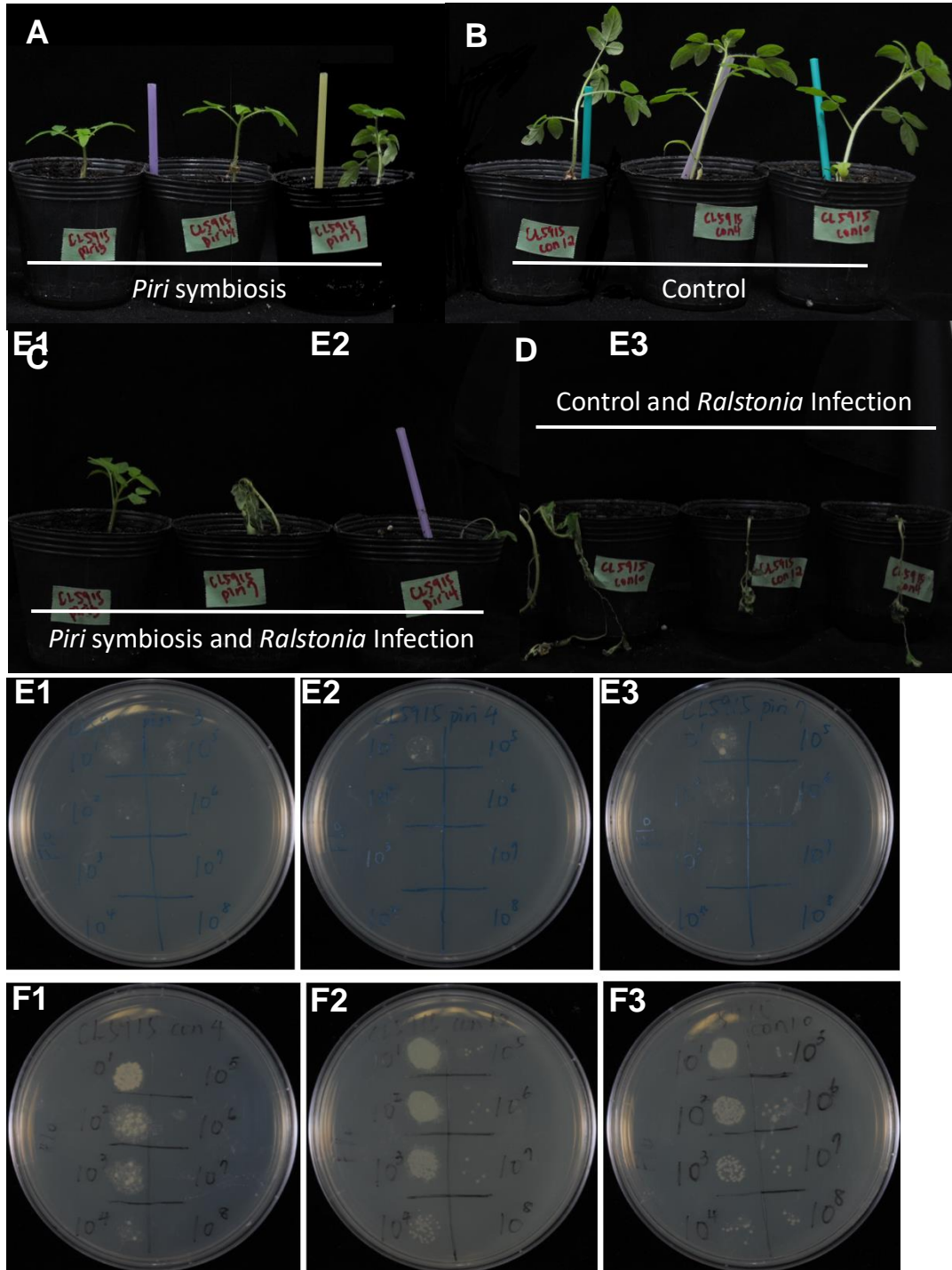
CL5915 對照組開花速度較快，實驗 58 天時，兩株已經開出完整黃色花朵，而實驗組只有一株長出花穗。番茄 L390 和 CL5915 實驗組莖顯然比對照組莖高，H7996 乍看之下沒有明顯差異，所以我們測量每株番茄的莖高，繪製表八及長條圖（圖十四 D）。

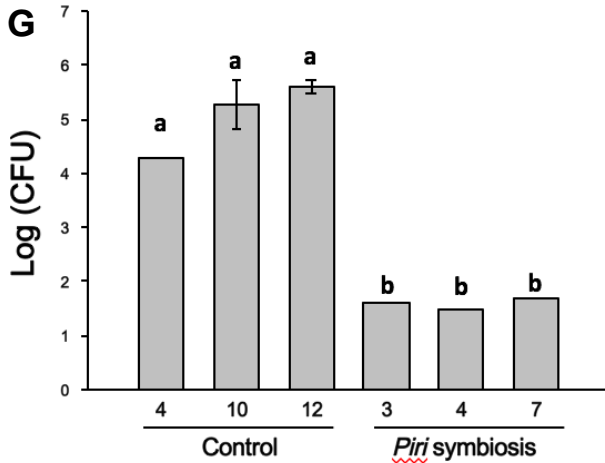


圖十四、真菌與不同蕃茄品種共生後，生長勢差異比較。A.L390 與真菌共生後，生長勢受到影響。B.CL5915 與真菌共生後，生長勢受到抑制。H7996 與真菌共生後，生長勢受到影響。D.不同蕃茄品種與真菌共生後，高度的差異。*表示有顯著差異 (t-test 雙尾檢定， $p < 0.05$)

九、*P. indica* 的抗青枯病能力

與 *P. indica* 共生的番茄對於青枯病有較好抗性（圖十五）。





圖十五、A. +Piri 感染 *Ralstonia* 前 B. Control 感染 *Ralstonia* 前 C. +Piri 感染 *Ralstonia* 後 D.

Control 感染 *Ralstonia* 後 E1.2.3. +Piri 第一節莖磨碎劃盤菌落 F1.2.3. Control 第一節莖磨碎劃盤菌落 G. Piri treatment 的番茄植株 Colony-forming unit (CFU) 比 Control 低與 Piri 共生的番茄在感染 *Ralstonia* 後植株狀況比 Control 好：植物莖部還皆挺著，有些葉子尚未枯萎，Control 葉子凋萎情況比 Piri 組嚴重。而且劃盤後確認 Piri 組的感染較輕微：CFU 與 Control 組產生顯著差異表示成功進入植物 stembase 的青枯病菌較少。(Duncan' s 檢定, $p < 0.05$)。確認與 Piri 共生的番茄對於青枯病有較好抗性。

陸、討論

一、*P. Indica* 的液態培養、冷凍乾燥與觀察

P.indica 和其他 AM 共生真菌最不同之處為 *P.indica* 可在沒有宿主植物的情況下獨立生長 (Varma *et al.*, 1998)。實驗一重複驗證此點，顯現出 *P.indica* 若是被開發於生物農藥的優點之一：容易培養及不需從植物體分離。冷凍乾燥後的 *P.indica* 非常輕、脆、易碎，所以適合磨碎拿來當生物農藥。

二、*P. indica* 冷凍乾燥孢子的活化測試

P. indica 的孢子為分生孢子，目前尚未發現它具有有性世代 (Varma *et al.*, 1998)。休眠的分生孢子不像有性孢子需要熱刺激或是化學刺激才可活化，相對的，他只在環境適合他生長時才會萌發，熱刺激或是化學刺激反而會抑制它生長甚至殺死它 (Ramesh Maheshwari, 2011)。我的結果顯示在 Kafer medium 中活化它 6 小時之後，*P. indica* 生長最茂盛，無菌水其次、PNM 再下、生理食鹽水最差。因此 Kafer medium 是活化 *P. indica* 最好的媒介。雖然一樣是培養 *P. indica* 的介質，然而，PNM

的效果沒有 Kafer 好，因此我們可得知 *P. indica* 的休眠孢子於營養的環境中容易萌發及生長。

但是，在未來應用上 Kafer Medium 並不是那麼的實際：Kafer Medium 昂貴且容易被污染，既不經濟也不好保存。水雖然無法像是 Kafer Medium 一般活化快速，但是活化效率比 PNM 或是生理食鹽水佳，且便宜、容易取得。因此在生物農藥應用方面使用水活化 6 小時為佳。

三、*P. indica* 的甘油保藏與活化測試

用甘油包存的 *P. indica* 不需活化過程，只需從冰箱中拿出，挖一點在盤子上放在培養箱即可。過程簡單，且不需如冷凍乾燥般好時；結果更顯示，甘油包存的 *P. indica* 比冷凍乾燥保存的 *P. indica* 生長效果好。然而，在實際使用方面不可能使用甘油保存法，農夫無法澆灌甘油給植物，甘油包存的 *P. indica* 也不好稀釋以利使用。所以我們認為在學術研究中使用甘油包存法較為便利，然而在實際使用方面還是用冷凍乾燥法為佳。

四、*P. indica* 冷凍乾燥孢子的短期熱應激測試

P. indica 的冷凍乾燥孢子在 25°C 處理下萌發率最佳，但是直到 50°C 它部份孢子尚可萌發而高於或是等於 60°C 則會死亡。這顯示 *P. indica* 對於短期熱應激耐受度較高，很多真菌的分生孢子無法忍耐 50°C 的高溫，例如模式生物小巢狀麴菌在 45°C、40 分鐘的熱處理後，大多分生孢子就會死亡（C d'Enfert *et al.*, 1999），相較之下 *P. indica* 竟可忍耐 50°C、2 小時的高溫。因此我們可預估冷凍乾燥的 *P. indica* 可被應用於日夜溫度極端的地區，例如峽谷或是沙漠。至於之後的生存問題倒是不用擔心，畢竟 *P. indica* 原本就是在沙漠被發現的。

在活化時間方面，以 6 小時為佳，六小時後萌發狀況會開始下跌，如實驗三的無菌水組。小於六小時活化情形也不好，例如實驗四的無菌水組。

五、*P. indica* 的活化後共生測試

用無菌水活化六小時的冷凍乾燥菌在實驗四中確定可以與番茄達到共生（切片有看到孢子）。因此冷凍乾燥 *P. indica* 粉有被作為生物農藥使用的可能。然而，番茄卻有奇怪的反應：實驗組感覺比對照組弱小？觀察到此現象，我們開始了下面的實驗來探討。

六、*P. indica* 的阿拉伯芥培養基共生

阿拉伯芥在與 *P. indica* 共同培養十一天後地下部的重量產生顯著差異，證實 *P. indica* 在與阿拉伯芥共生後具有促進植物根部生長的能力。*P. indica* 有被製作成生物農藥的潛力，若是在貧脊的土壤中（PNM 為營養貧脊的培養基）可壯大植物根系。

七、*P. indica* 的番茄培養基共生

我們猜測或許在實驗四觀察到的負面反應是因為水耕環境過於營養、*P. indica* 忘記其共生本能所導致，所以我們試了此實驗，將 *P. indica* 與植物共生於 PNM (營養貧脊的培養基) 中。

然而，當番茄種植於 PNM 裡與 *P. indica* 共生、實驗步驟與阿拉伯芥共生實驗一模一樣時，我們發現了相反的結果。L390 為低抗病品種、CL5915 為中抗病品種、H7996 為高抗病品種，結果顯示低抗性及中抗性的蕃茄品種在感染 *P. indica* 後地上部無影響但地下部較為短（具有顯著差異）。對真菌抗性越低，根系長得越輕、越短。對於 *P. indica* 較為不易入侵的 H7996 長的對照組與實驗組反而沒什麼差距。

P. indica 在與植物共生後菌絲會在根部細胞細胞壁間產生附着胞或是在植物皮質細胞內產生內生孢子，但是它絕對不會進入中柱 (Varma *et al.*, 1999)。孢子形狀為梨形，且成熟的孢子長 16~25 μ l、寬 10~17 μ l (Kost & Rexer, 2013)。上述特徵皆與切片後顯微鏡下的照片相符，因此我們能確認 *P. indica* 有與 L390 進行共生。CL5915 不能完全確定有沒有共生，因為我們雖然看見梨形的 *P. indica* 孢子，但那是在破碎的細胞外，造成原因應該是切片技術不夠純熟所導致。H7996 切片後根部完整但我們連孢子都沒看到，可確定沒有進行共生。這十分合理：L390 病菌防禦機制較差，易被菌種入侵，所以 *P. indica* 容易與它共生；CL5915 對於入侵菌種沒有顯著高抗性，屬於中抗性品種 (Kuo, Abbass, & Kalb, 2001)，H7996 有較好的病菌防禦機制 (Li *et al.*, 2011)，病菌較不容易侵入植物體內或者感染它，所以 *P. indica* 不易與它共生。

我們猜測 *P. indica* 會有此反應可能是因為組織培養環境過於安定、營養容易汲取，所以 *P. indica* 忘記了自己的本能，或是 *P. indica* 壯大根系的反應要在更長期的共

生下才會顯現（醬瓜瓶及組織培養的環境無法養殖更大或成熟的番茄植株）或是 *P.indica* 就是對番茄有害，因此我們測試了蕃茄與 *P. indica* 的土壤實驗。

八、*P.indica* 的番茄土壤共生

P. indica 對於 L390 和 CL5915 產生負面影響的可能原因：

1) 真菌入侵植物的反應過於劇烈

P. indica 在尚未與宿主共生時會在植物根細胞促使內質網壓力、造成細胞凋亡，以入侵植物並與植物共生（Qiang *et al.*, 2012）。在 *P. indica* 與大麥共生後，分芽繁殖時也必須要殺死宿主的根部細胞亦或者啟動宿主根部細胞的細胞程式死亡（Deshmukh *et al.*, 2006）。由此我們可知 *P. indica* 在一開始與植物共生時有可能會造成負面影響。

很多 AM 真菌一開始與植物共生時，宿主與真菌之間並沒有進行等價交易。植物提供給真菌碳水化合物，然而真菌尚未組織它完整的菌絲網路以幫植物吸收礦物質。這時後真菌亦會拖累植物，或是植物會將共生菌認為有害菌（Johnson & Oelmüller 2009）。真菌菌絲在 overcolonize 宿主時會對宿主造成負面影響，可能使共生關係變為拮抗的關係（Johnson & Oelmüller, 2009; Camehl *et al.*, 2010）。

若是如此，那將來 *P. indica* 在開發生物農藥時必須在不同物種、不同品系間測試劑量，以求得最佳共生濃度，否則再過高劑量時很有可能對植物負擔過大，造成不良影響。

2) *P. indica* 對於番茄（或者是某些品系的番茄）而言為有害菌而並非有益菌

有些真菌會在會對不一樣的宿主植物產生不一樣的反應。*Colletotrichum* species（會造成炭疽病的病原菌）可對某些宿主植物產生共生關係：抗病、抗旱、或是促進生長。*C. Orbiculare* 在一個品系的番茄（Seattle Best）之下成為病原菌，在另一個品系的番茄（Big Beef）下成為共生菌。（Redman, Dunigan & Rodriguez, 2001）。一些被篩選出來的 *C. magna* 突變株則會因番茄的品系不同，與番茄互利共生、片利共生、或是寄生（Redman, Dunigan & Rodriguez, 2001）。

目前為止的發現中，極少數的 AM 真菌對植物產生負面影響。J.D.Bever 於其 2002 的論文發現在混合 AM 真菌群落裡，*S. calospora*（一種 AM 真菌）會減緩車前草的生長速率，他在其論文說根據他的學識，這是他第一次在共生中看到負面

反應。(Bever *et al.*, 2002)有此可看，*P. indica* 在番茄共生後產生負面反應也並不是沒有可能。

而我們的實驗結果也很相似：在與阿拉伯芥組織培養狀況下共生的 *P. indica* 可促進根部生長，然而在一模一樣的實驗情況下共生的番茄卻對根部有負面反應。要是此假設成立，那在未來開發生物農藥時，我們對於不同物種、不同品系則需要嚴格測試、以免發生遺憾。

九、*P. indica* 的抗青枯病能力

P. indica 可使番茄耐青枯病（病原菌 *Ralstonia solanacearum*）。台灣春夏炎熱潮濕，青枯病時常發生殺死番茄，導致農作量減少。目前尚未有農藥可以預防或是治療青枯病，高抗青枯病的品種也尚未產出，因此，*P. indica* 可成為良好的生物防治。

此發現給予 *P. indica* 極高未來展望，特別是除了番茄外的茄科植物尚未在台灣育成抗青枯病的品種。接下來我們希望可以試驗其他品系番茄或是其他茄科植物和 *P. indica* 的共生。未來，*P. indica* 共生植物與病原菌的互動值得被研究，具有極高研究價值。

柒、結論

- *P. indica* 可不需宿主即可獨立培養，然而，其培養需要每個月繼代一次確保真菌活性。每半年還要重新共生植物一次，使用共生後的 *P. indica* 再培養，非常麻煩。目前尚未有人研究過冷凍乾燥的 *P. indica*，冷凍乾燥的 *P. indica* 保存時效比活體長，且具有共生能力，輕且易碎、容易生成粉末，不管是學術用途價值還是實際應用價值都極高
- 冷凍乾燥的 *P. indica* 於 Kafer 孢子活化 6hr 效率最佳，但生物農藥應用方面以水活化 6hr 最實際。
- 甘油斜面保存法能最有效且便利的包存真菌、活化起來亦較方便，因此在學術研究方面以甘油斜面保存法為佳，然而，實際田間使用（生物農藥）方面冷凍乾燥法較為實際。
- *P. indica* 與其他分生孢子真菌比較而言，孢子對於短期熱應激耐受度較高，因此作為生物農藥可被應用於日夜溫差大的地區。

- *P. indica* 冷凍乾燥粉末中的孢子確定可萌發，並與植物共生。
- *P. indica* 可在共生後壯大阿拉伯芥根系，具有開發價值。
- *P. indica* 並不是完美物種，在特定情況下有可能對植物造成負面反應。
- *P. indica* 與番茄進行共生可使番茄耐青枯病原菌 *Ralstonia solanacearum* 感染。

捌、參考資料及其他

1. Verma, S., Varma, A., Rexer, K. H., Hassel, A., Kost, G., Sarbhoy, A., ... & Franken, P. (1998). *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a new root-colonizing fungus. *Mycologia*, 896-903.
2. d'Enfert, C., Bonini, B. M., Zapella, P. D., Fontaine, T., Da Silva, A. M., & Terenzi, H. F. (1999). Neutral trehalases catalyse intracellular trehalose breakdown in the filamentous fungi *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Molecular microbiology*, 32(3), 471-483.
3. Maheshwari, R. (2012). *Fungi: Experimental methods in biology*. Boca Raton: CRC Press.
4. Kost, G., & Rexer, K. H. (2013). Morphology and ultrastructure of *Piriformospora indica*. In *Piriformospora indica* (pp. 25-36). Springer Berlin Heidelberg.
5. Qiang, X., Zechmann, B., Reitz, M. U., Kogel, K. H., & Schäfer, P. (2012). The mutualistic fungus *Piriformospora indica* colonizes *Arabidopsis* roots by inducing an endoplasmic reticulum stress – triggered caspase-dependent cell death. *The Plant Cell*, 24(2), 794-809.
6. Johnson, J. M., & Oelmüller, R. (2009). Mutualism or parasitism: life in an unstable continuum. What can we learn from the mutualistic interaction between *Piriformospora indica* and *Arabidopsis thaliana*. *Endocyt Cell Res*, 19, 81-110.
7. Michal Johnson, J., Sherameti, I., Ludwig, A., Nongbri, P. L., Sun, C., Lou, B., ... & Oelmüller, R. (2011). Protocols for *Arabidopsis thaliana* and *Piriformospora indica* co-cultivation – A model system to study plant beneficial traits. *Endocytobiosis and Cell Research*, 101-113.

8. Douds Jr, D. D., Nagahashi, G., Pfeffer, P. E., Kayser, W. M., & Reider, C. (2005).
On-farm production and utilization of arbuscular mycorrhizal fungus inoculum.
Canadian Journal of Plant Science, 85(1), 15-21.
9. 葉瑩. "微小世界的貢獻——生物農藥." 科學發展 443 (2009): 12-17. 國研院科政中心.
Web.
10. Ward, M. H. (2009). Too much of a good thing? Nitrate from nitrogen fertilizers and
cancer. Reviews on environmental health, 24(4), 357-363.
11. Armijo, R., & Coulson, A. H. (1975). Epidemiology of stomach cancer in Chile—the
role of nitrogen fertilizers. International Journal of Epidemiology, 4(4), 301-309.
12. Zamani, J., Hajabbasi, M. A., Alaie, E., Sepehri, M., Leuchtman, A., & Schulin, R.
(2015). The effect of Piriformospora indica on the root development of maize
(Zea mays L.) and remediation of petroleum contaminated soil. International Journal of
Phytoremediation, (just-accepted), 00-00.
13. Serfling, A., Wirsal, S. G., Lind, V., & Deising, H. B. (2007). Performance of the
biocontrol fungus Piriformospora indica on wheat under greenhouse and field
conditions. Phytopathology, 97(4), 523-531.
14. Peškan-Berghöfer, T., Shahollari, B., Giong, P. H., Hehl, S., Markert, C., Blanke, V.,
... & Oelmüller, R. (2004). Association of Piriformospora indica with Arabidopsis
thaliana roots represents a novel system to study beneficial plant – microbe interactions and
involves early plant protein modifications in the endoplasmic reticulum and at the plasma
membrane. *Physiologia Plantarum*, 122(4), 465-477.
15. Varma, A., Verma, S., Sahay, N., Bütchorn, B., & Franken, P. (1999). Piriformospora
indica, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. Applied and
Environmental Microbiology, 65(6), 2741-2744.
16. 卓家榮 (1996). 增進土壤肥力的觀念及管理要領。台南區農業專訊第 16 期：7~11
頁。
17. Li, C. W., Su, R. C., Cheng, C. P., You, S. J., Hsieh, T. H., Chao, T. C., & Chan, M. T.
(2011). Tomato RAV transcription factor is a pivotal modulator involved in the

AP2/EREBP-mediated defense pathway. *Plant Physiology*, 156(1), 213-227.

18. Kuo, G., Abbass, D., & Kalb, T. (Eds.). (2001). AVRDC report: 2000. Taiwan: Asian Vegetable Research and Development Center.
19. 林, 駿. (2009, December). 作物青枯病之生態與防治. 花蓮區農業專訊, (70), 18-18.
20. 潘, 子. (2015, August 21). 南北「菌男」一起發功 解開植物病害密碼. Retrieved June 15, 2016, from <https://www.newsmarket.com.tw/blog/74815/>

<附錄一> Kafer Medium 的成分與配法 (直接截圖自 Johnson et al., 2011)

Table 1: Kaefer Medium (KM; Hill and Käfer 2001) composition for *P. indica*.

Components for 1 liter	Amounts
D-glucose	20.0 g
Peptone/Trypton	2.0 g
Yeast extract	1.0 g
Casein hydrolysate	1.0 g
Macronutrient mix	50.0 ml
Micronutrient mix	10.0 ml
Fe-EDTA	1.0 ml
Agar	10.0 g
→ adjust pH to 6.5 with 10N KOH → autoclave at 121°C for 20 min → add 1 ml/l filter sterilised vitamin mix before pouring the media (temperature 45 to 50°C) to Petri plates.	
Macronutrient mix in 1 liter stock solution 12 g NaNO ₃ ; 10.4 g KCl; 10.4 g MgSO ₄ ·7H ₂ O; 30.4 g KH ₂ PO ₄ . All components are dissolved in sterile H ₂ O and then stored at 4°C.	
Micronutrient mix in 1 liter stock solution 2.2 g ZnSO ₄ ·7H ₂ O; 1.1 g H ₃ BO ₃ ; 0.5 g MnSO ₄ ·4H ₂ O; 0.16 g CoCl ₂ ·5H ₂ O; 0.16 g CuSO ₄ ·5H ₂ O; 0.11 g (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O (ammonium molybdate tetrahydrate). All components are dissolved in sterile H ₂ O and then stored at 4°C.	
Fe-EDTA → add 2.5 g FeSO ₄ ·7H ₂ O in 400 ml sterile H ₂ O → add 3.36 g Na ₂ EDTA·2H ₂ O → heat to boil in the microwave → stir for about 30 minutes while cooling → bring to the final volume of 450 ml.	
Vitamin mix in 100 ml stock solution 0.1 g thiamin; 0.04 g glycine; 0.01 g nicotinic acid; 0.01 g pyridoxine. All components are dissolved in sterile H ₂ O, then filter-sterilized and store as aliquots of 1 ml at -20°C.	

<附錄二> PNM Medium 的成分與配法 (直接截圖自 Johnson et al., 2011)

Table 2: Modified PNM medium composition used for co-cultivation experiments (*A. thaliana* and *P. indica*).

Components
5 mM KNO ₃ 2 mM MgSO ₄ ·7H ₂ O 2 mM Ca(NO ₃) ₂ 2.5 ml Fe-EDTA/liter 1.0 ml Micronutrient-mix/liter 10.0 g Agar/liter
Sterilize at 121°C for 20 min
Adjust pH (under sterile conditions) to 5.6 by adding 2.5 ml filter-sterilized 1 M KH ₂ PO ₄ .
Fe-EDTA → add 2.5 g FeSO ₄ ·7H ₂ O in 400 ml sterile H ₂ O → add 3.36 g Na ₂ EDTA·2H ₂ O → heat to boil in the microwave → stir for about 30 minutes while cooling → bring to the final volume of 450 ml.
Micronutrient-mix 70 mM H ₃ BO ₃ ; 14 mM MnCl ₂ ·4H ₂ O; 0.5 mM CuSO ₄ ·5H ₂ O; 1 mM ZnSO ₄ ·7H ₂ O; 0.2 mM Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O; 10 mM NaCl; 0.01 mM CoCl ₂ ·6H ₂ O.
Pour approximately 20 ml of PNM medium to each plate.

【評語】 052102

1. 本研究發覺如何利用冷凍乾燥加強印度梨型孢真菌的應用性，且發現印度梨型孢真菌可增強番茄抗青枯病菌的能力，具有實際農業應用的潛力。
2. 學生對研究主題極為投入，表達能力強，並確切做好實驗紀錄。
3. 若能進一步探討印度梨型孢真菌的抗菌機制，必可加強作品的深度。