中華民國第 57 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

第三名

052104

對抗惡勢力—菸草與印度梨形孢菌共生對抗致命病害

學校名稱：臺北市私立復興實驗高級中學

作者：	指導老師：
高三 田芷寧	馬瑪宣

關鍵詞：菸草、印度梨形孢菌、青枯病

摘 要

茄科植物在農業生產與科學研究上皆非常重要，但卻極易因病菌感染而造成重大損失，這包括具全球重要性卻苦無有效防治方法的三種病害：青枯病、灰黴病及番茄疫病。印度梨型孢菌是植物根部內共生真菌，其寄主範圍極廣，且可增強植物之生長與抗逆能力，但此共生真菌是否可促進植物抗上述三種重要病害則未知。本研究利用模式植物圓葉菸草作為試驗材料，建立了高效印度梨型孢菌感染系統。本研究發現，雖然印度梨型孢菌感染菸草根部後對植株生長並無明顯影響，初步病害試驗結果顯示，與此菌共生後會誘發植物內部產生全株訊息傳導，因而加強了菸草對抗上述三種嚴重病害之能力。我們預期這些重要的初步研究結果將有助於近一步的研究發展與農業應用。

壹、 研究動機

一、背景資料

(一) 印度梨型孢真菌 *Piriformospora indica* (以下簡稱 *P. indica*)

此菌為植物根部內共生性真菌，屬於擔子菌門（*Basidiomycota*）、蕈菌綱（*Hymenomycetes*）、絲核菌屬（*Rhizoctonia*）。此菌與菌根真菌有許多類似的特性，包括：可以與非常多的植物進行根部共生，增加植物對氮、磷等礦物質的吸收，促進植物的生長發育，且提高作物對逆境脅迫的忍耐性(如：耐旱、耐鹽性)，誘導宿主植物對病原菌具抗性、抗氧化能力增强等等(吳金丹，2015)。然而，與目前尚無法以人工培養基培養的植物共生菌根真菌不同的是，印度梨形孢可以在合成或半合成培養基上生長，並得到純培養物。**這為研究印度梨形孢與植物互作的分子基礎提供了極大方便性，並可能廣泛應用於農林業和花卉園藝業(李縈榛，2009)**。

圖 1.在液體培養基中培養一週之 *P. indica*

圖 2.在液體培養基中培養四週之 *P. indica*

(二) 圓葉菸草 *Nicotiana benthamiana* (以下簡稱 *Nb*)

圓葉菸草屬於茄科菸草屬，原產地為澳洲北部地區，生長容易、快速，所需時間與空間等條件不嚴苛，且其許多特性與反應與其他重要經濟茄科作物（如：番茄）非常雷同，所以是許多科學研究常用之極佳模式植物。另外，因圓葉菸草極易被各種植物致病微生物感染，故常用來進行植物病理研究。此外，目前已經有其基因體序列草圖，更增添其適用於各種研究之優勢。

圖 3. 種植於室內之盆栽圓葉菸草

(三) 青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* (以下簡稱 *R. solanacearum*)

此細菌為革藍氏陰性菌，為土壤傳播性病原菌，可藉由土壤(如鞋或腳底攜帶土壤)、機械(如耕作用之農具)、作物繁殖體、風雨飛濺、灌溉水、寄主植物根部與根部接觸等方式傳播，寄主範圍廣泛，超過 250 種。根部天然開口與傷口是青枯病菌侵入感染的重要管道，並快速蔓延於維管束內，因此青枯病菌感染源可能來自帶菌之苗、土壤及灌溉水源 (許秀惠、安寶貞，1995)。不抗病之植株經感染後，植株雖保持綠色，但快速萎凋而枯死，若病勢進展緩慢時，發病初期在下位葉的葉柄首先呈現下垂，而後葉漸次萎凋，同時莖部形成不定根。被害株莖部橫切，可觀察到維管束變褐色，以手壓之，有乳白色粘性的細菌菌泥溢出，如切取被害莖一小片段放入盛有水的玻璃管中，數分鐘後，大量病原細菌由莖部切口流到水中，顯現乳白色煙霧狀(陳文雄、鄭安秀、王添成，1999)。由青枯病菌所引起的細菌性萎凋病又稱青枯病，分布遍及全世界，是熱帶及亞熱帶地區發生相當普遍且頗具威脅性的植物細菌病害之一。台灣氣候高溫多濕，使青枯病成為夏季栽植茄科作物的一大限制因子。16～36℃下青枯病均會發生，當溫度在 24～36℃時，青枯病發生較為嚴重 (許秀惠、安寶貞，1995)。

圖 4. 番茄青枯病病株

(資料來源：唐春生，2010)。

(四) 灰黴病菌 *Botrytis cinerea* (以下簡稱 *B. cinerea*)

此病菌為一種多侵犯性植物病原真菌，寄主範圍廣泛，超過 400 種，亦是目前世界重要作物如水果、蔬菜及花卉類等最普遍存在的病害，設施內栽培之作物亦普遍發生。根據統計，每年因為灰黴病所造成全世界的農業損失，高達有數十億美金。植物在感染後首先出現水浸狀小點，後轉為褐色或暗褐色，溼度高實小點滋生灰黑色沒狀物，就是病菌的菌絲與分生孢子，主要引起果實腐敗、花壞疽斑、葉斑、猝倒、莖潰瘍或腐敗、塊莖、球莖、球根及根部腐敗。灰黴菌為低溫

菌，生長最適溫度為 18～26℃，分生孢子發芽之溫度範圍為 12～26℃。此菌在罹病寄主上可產生分生孢子，待其成熟後釋放到空氣中，藉由空氣之流動而散布於田間各地，分生孢子附著於適當的寄主組織表面後侵入，在寄主組織內之菌絲逐漸生長成熟後，再產生新的分生孢子，重複感染過程。（位國慶，1994）

圖 5. 番茄灰黴病病株

(資料來源：蔡淑艷，2014)

(五) 番茄疫病菌 *Phytophthora parasitica* (以下簡稱 *P. parasitica*)

此菌屬於原生生物卵菌類，寄主範圍廣。番茄疫病於 20～25℃的環境下發生，而潮濕的環境有助於疫病菌胞囊與游走子的形成與傳播，所以降雨頻繁的夏秋時節發病較嚴重，可以在短期內造成植株大量死亡。疫病的發生受水分的影響最大，病害一旦發生，病菌在十數小時內就可產生大量胞囊，釋放幾游走子，兩三天就會出現病斑。因此，疫病菌的病害史需時極短，只需 3-5 天，病害傳播蔓延極為快速。疫病菌平常靠菌絲或厚膜胞子存活於土壤、或其他相鄰田園的寄主植物上，等降雨過久或灌溉過於頻繁時，土壤濕度飽和，誘發病菌產生胞囊及游走子。游走子可在水中游泳，或藉灌溉流水、或靠風雨吹送至遙遠之田園，侵入感染，誘發病害。(費雯綺、王喻其編，2007)

圖 6. 番茄疫病病株 (資料來源：Kisha Shelton, 2001)

二、研究動機

我們從課本瞭解了關於植物的構造與體內的運輸相關訊息，同時也學習到生物互利共生有助於扶植彼此的事例。而今，植物是我們日常生活中不可或缺的重要生物，

提供人類與其他生物眾多的資源。但自然界中許許多多的微生物會侵害植物，甚至造成極大之農業損失。尋求作物之可行生物防治策略，以發展對環境友善之病害控制方法，當然十分重要。在因緣際會下，我們從文獻中獲知關於印度梨形孢菌之相關訊息，並對其產生莫大興趣。此菌是在印度西邊的沙漠中被發現的根部內共生真菌，而近年的積極研究也證實此菌有利於其共生植物之生長發育與抗逆能力，多篇文獻也指出，植物與印度梨形孢菌共生後，其抵抗真菌、病毒及線蟲的能力增加，唯是否可增強植物對細菌性的病害之抗性則未知，且對於番茄特定重要病害是否有助益亦待檢視，尤其像引起全球許多重要經濟作物驚人損失之數種病害，如：青枯病、軟腐病及疫病等，更是尚無任何研究報導，故本研究便針對此重要議題進行探討。

貳、 研究目的

一、茄科作物在農業與科研上皆極為重要，而菸草更為最佳之研究資材。

二、本研究之主要試驗目的為探討與 *P. indica* 共生是否可促進菸草生長與對抗重要病害（青枯病、灰黴病及番茄疫病），期望集結有利於農作物生物科技發展資源，以利發展永續農業。

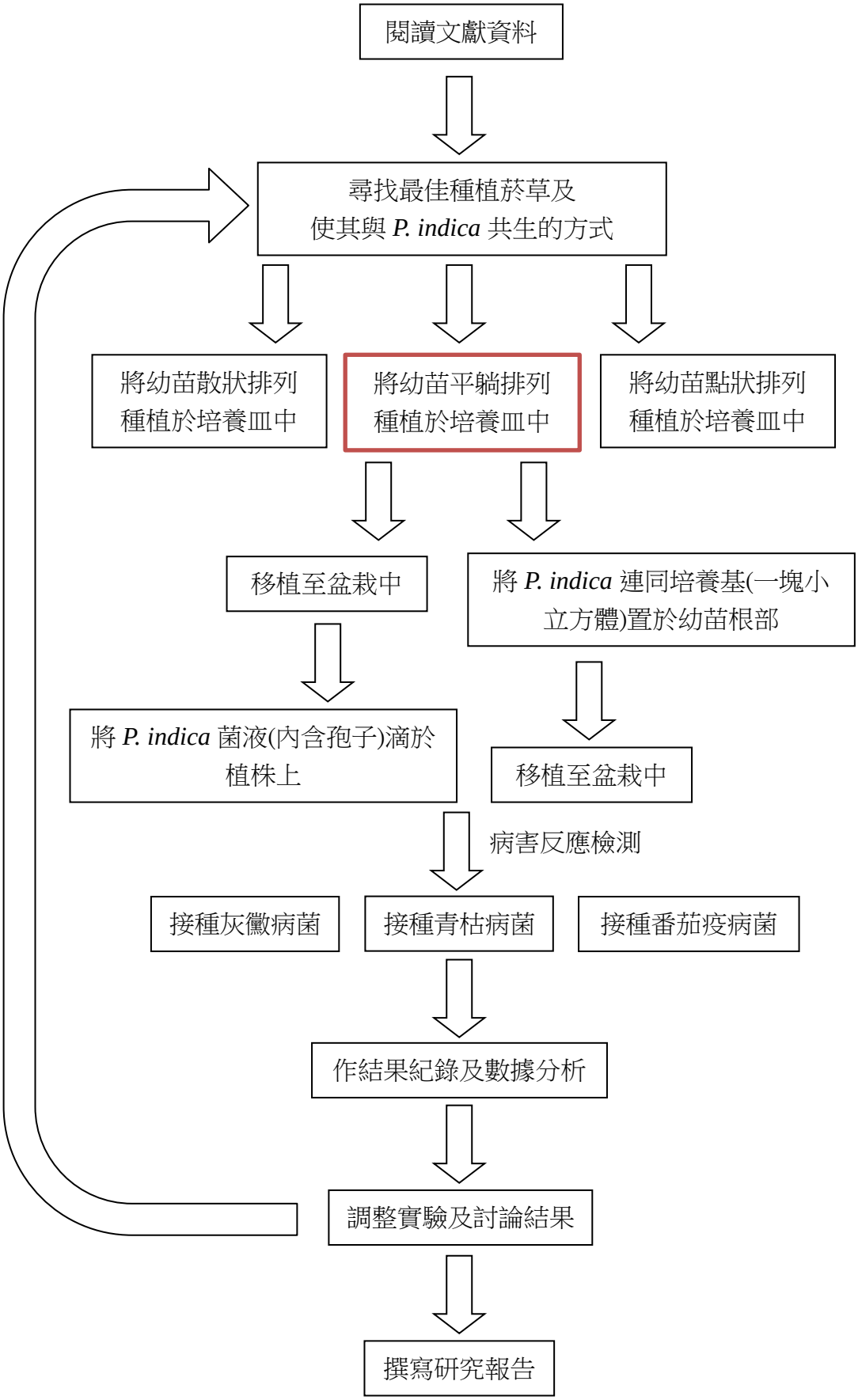
三、我們的研究預期將可為菸草與其他茄科作物重要病害之防治提供重要資訊與相關資源，兼具學術重要性與產業發展價值。

參、 研究設備及器材

培養箱、微量離心機、震盪機、分光光度計、相機、無菌操作台、顯微鏡、微量滴管、培養皿、活體材料（如細菌、真菌、幼苗）、酒精燈、鑷子、盆栽、土壤、保鮮膜、肥料、酒精、漂白水、無菌水。（來源：台大生命科學館植科所實驗室）

肆、 研究過程或方法

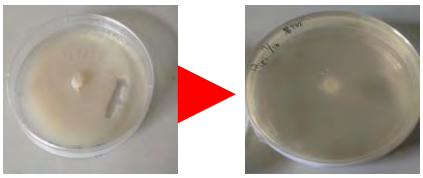
一、 研究過程或方法流程圖



二、 研究方法與步驟

(一) 植物材料 *Nb* 之種植

1. 洗滌種子：將清水及少許種子置於離心管中搖勻，再將清水吸出以酒精取而代之並搖勻，之後將酒精吸出以漂白水取代並放入桌上型震盪機搖晃 5 分鐘。自震盪機取下後，移置無菌工作台操作。將離心管內混濁的漂白水吸出，並以無菌水洗滌種子 3～5 次。
2. 播種時，分別以以下數種方式進行
   (1) 將種子以不同形態(散狀、點狀、平躺狀)排列，以便接下來的實驗（結果二-(一)、(二)、(三)）。
   (2) 以 5～7 顆種子為一單位移置培養皿中種植，使培養皿中種子呈現以單位為主的群聚現象，待一週後將幼苗移植並平躺種植於另一培養皿中（排列整齊，一個培養皿種植大約 16 棵植株）以便接下來的實驗(結果二-(四))



(二) *P. indica* 的培養與製備

1. 繼代與大量培養：進行繼代培養時，將原菌絲塊切下，移至新的固態培養基上，於 28°C 無光照的環境下在固體 [1]*KF 培養基培養兩週。大量培養時，則將原菌絲塊置入 KF 液體培養基中，並於 28°C 無光照的環境下晃動培養(200 rpm/min)，經培養四週後以濾紙過濾培養液，以收取其中的菌絲塊及孢子，以研缽或果汁機將菌絲塊磨碎，用無菌水稀釋後以細胞計數器計算孢子濃度。

[1]*KF 培養基配方(名詞解釋詳見**附錄一、配方字典**)

D-glucose	20 g/L
Tryptone	2 g/L
Yeast extract	1 g/L
Casein hydrolysate	1 g/L
Macronutrient mix (20x)	50 ml/L

[$NaNo_3$ 12 g/L, KCL 10.4 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 10.4 g/L, KH_2PO_4 30.4 g/L(溶於二次水後 4 於保存)]	
Micronutrient mix (100x) [$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.2 g/L, boric acid 1.1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, $CoCl_2 \cdot 5H_2O$ 0.16 g/L, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.16 g/L, ammonium molybdate 0.11 g/L (溶於二次水後 4 於保存)]	100 ml/L
Fe-EDTA (100x) [Na_2EDTA 0.77 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.556 g/L(溶於二次水後 4 於保存)]	1 ml/L

調整酸鹼值至 6.5 後，高溫高壓滅菌 20 分鐘，待其冷卻後加入 1 mL vitamin mix (100x)[thiamin 10 g/L, glycine 0.04 g/L, nicotinic acid 0.01 g/L, pyridoxine 0.01 g/L(溶於二次水後-20 次保存)]，便可放入 4 便保存。

2. 計算孢子濃度：計算 *P. indica* 孢子數並計算實驗中需與植物共生的濃度
   (1) 收集培養皿中的孢子
   (2) 將孢子液滴入細胞計數器，並放在顯微鏡下觀察
   (3) 分別計算正方形四角(格子較大、較白處)的孢子數，加總後除以四再乘上 10^4(此結果便為目前收集到之孢子的濃度)
   (4) 計算出需加多少水以達到所需濃度，調配出需要的孢子液
3. 植物共生試驗： 目前使用了以下兩種方式進行共生的步驟：(1)先將幼苗移植至盆栽中，然後將稀釋的 *P. indica* 菌液澆至其植株上；(2)將 *P. indica* 連同培養基(一塊小立方體)置於幼苗根部，然後隔週將幼苗移植至盆栽中。
4. 檢測 *P. indica* 與植物之共生： 將有處理過 *P. indica* 的植株，移入微量離心管內，以 2:1 的比例加入酒精和 [2]*Trypan blue 染劑 (使植株內真菌

構造染成藍色以利觀察) ，將其搖晃數小時，用鑷子將泡過酒精和 Trypan blue 菸草的根取出，置換到透化藥劑 (Chloral hydrate) 中，再搖晃數小時，用鑷子移出透化過的植株，放在載玻片上以顯微鏡觀察之。

[2]*Trypan blue"染劑"的配方

(Trypan blue 本身是一個固態粉末狀的東西，必須和許多溶劑混和均勻後才會有較好的染色效果)。

酒精	30 mL
苯酚	10 mL
水	10 mL
乳酸	10 mL
錐藍	10 mg

5. 植物生長之評估：未接種病菌之植株(對照組)中包含有與 *P. indica* 共生及未與 *P. indica* 共生之植株，故可觀察 *P. indica* 共生是否能促進植株生長。

(三) 病菌之培養與製備

1. 計算病菌菌液的吸光值

(1) 收集培養皿中的細菌

(2) 以比色皿測量清水的吸光值(歸零)

(3) 將菌液滴入比色皿中(菌液：水＝1：9)

(4) 將比色皿放入分光光度計中檢測吸光值

(5) 計算出需加多少水以達到所需濃度，調配出需要的菌液

2. 青枯病菌

本研究使用 Pss4(中毒力菌株)作為實驗材料，從－80°C 冷凍狀態下取出後，將病菌培養於 [3]*CPG 培養基上兩天，而後挑取單一菌落置於液態的 [4]*523 培養基中放大培養一天，再將菌液移至 523 固態培養基上

進行放大培養一天，以上環境皆為 28°C 黑暗的狀況下，而後以無菌水和三角玻棒將細菌刮下，以分光光度計測量濃度，再稀釋至指定濃度。OD_{600}＝0.3 大約等同於 10^8 cfu/mL。

[3]*CPG 培養基配方(名詞解釋詳見**附錄一、配方字典**)

Peptone	10.0 g
Casein hydrolysate	1.0 g
Glucose	5.0 g
Agar	15.0 g

1 公升的水加滿後高溫高壓滅菌

[4]*523 培養基配方(名詞解釋詳見**附錄一、配方字典**)

MgSO4 方字典溫高	0.30 g
K2HPO4	2.0 g
Yeast extract	4.0 g
Casein hydrolysate	8.0 g
Sucrose	10.0 g
Agar	15.0 g

1 公升的水加滿，pH 值調整到 7.0，而後高溫高壓滅菌

3. 灰黴病

將菌絲塊或孢子置放於 [5]*PDA 培養基上，在 25°C 無光照的環境下培養一週，而後以無菌水將表面的孢子洗下，以 6000 rpm 離心至較高濃度後以細胞計數器計算孢子數量，再稀釋至指定濃度，分裝後存入－20°C 冰箱待用。

[5]*PDA 培養基配方(名詞解釋詳見**附錄一、配方字典**)

Potato Starch	4.0 g
Dextrose	20.0 g
Agar	15.0 g

1 公升的水加滿後高溫高壓滅菌

4. 番茄疫病

將菌絲塊或遊走孢子懸浮液，放置在 5% [6]*V8 培養基上，於 25°C 無光照的環境下培養一週，將培養基切成小塊並倒入無菌水混勻，於室溫光照下放置兩天，而後移至 4°C 冰箱中 2 小時後取出，待回復常溫後以細胞計數器計算游走孢子的濃度，稀釋到指定濃度後待用。

[6]*V8 培養基配方(名詞解釋詳見**附錄一、配方字典**)

V8 juice	50 mL (5%)
Agar	15.0 g

1 公升的水加滿後高溫高壓滅菌

(四) 對峙培養實驗

在同一培養皿上同時培育 *P. indica* 與三種病菌之一，並觀察其是否有抵制病菌生長之能力。由於不同菌類之最佳培養基成分可能有所不同，故本研究選擇以生長要求較嚴苛、生長較慢之菌種所適用之培養基為主進行此試驗。本實驗是於 28℃ 黑暗中進行。

(五) 病原接種與病況評估

1. 青枯病：將上述製備之病菌稀釋到適當濃度，用於澆灌植物，並逐日觀察植物萎凋情況，以 wilting score 統計葉片萎凋數量及植株凋萎情形

青枯病 Wilting score 計算方法	
無凋萎	0 分
1 片葉子凋萎	1 分
2-3 片凋萎	2 分
只剩頂芽未凋萎	3 分
整株凋萎	4 分

2. 灰黴病

(1) 收集培養基上生長 7～10 天的菌絲，離心後去除上清液並調整至 10^4 spores/mL 保存於－20℃。

(2) 以四～五週大的菸草為材料，自葉柄將其葉片切下，放置於塑膠盒，並在底部鋪有充分吸水之紙巾，以維持濕度。

(3) 在主葉脈兩側各兩滴菌液（每滴 10 μL），每片葉共滴 4 個點。

(4) 以保鮮膜封蓋於塑膠盒以維持濕度，並放置於 25℃生長箱中。

(5) 觀察 36～60 小時後之病徵，並以 Image J 軟體量測病斑直徑。

3. 番茄疫病

(1) 收集番茄疫病菌孢子液後，將之稀釋至 10^4 zoospores/mL 以進行接種實驗。

(2) 以四～五週大的菸草為材料，自葉柄將其葉片切下，放置於塑膠盒，並在底部鋪有充分吸水之紙巾，以維持濕度。

(3) 在主葉脈兩側各兩滴菌液（每滴 10 μL），每片葉共滴 4 個點。

(4) 以保鮮膜封蓋於塑膠盒以維持濕度，並放置於 25℃生長箱中。

(5) 觀察 24～48 小時後之病徵，並以 Image J 軟體量測病斑直徑。

4. 統計分析

試驗數據皆以 Student's *t*-test 分析，以檢視與對照組是否有顯著差異。

伍、 研究結果

一、 印度梨形孢菌與病菌之對峙生長

為初步瞭解 *P. indica* 是否可影響病菌之生長，首先在人工培養基上檢測 *P. indica* 與病菌共培養時兩者之生長狀況。

(一) 我們由實驗室的配方得知：

1. 印度梨形孢菌(*P. indica*)利於生長在 KF 培養基上。
2. 青枯病菌利於生長在 523 培養基上。
3. 番茄疫病菌利於生長在 V8 培養基上。

(二) 結果如下**圖. 7**，我們可發現：

1. *P. indica* 較空氣中的真菌有侵略性和防禦性。
2. 對峙生長先後順序、時間和培養基類型會影響到對峙生長的成效。

   例如：*P. parasitica* 和 *P. indica* 接種到培養基上，在生長箱生長 7 天後，可以較 3 天後清楚的看到在 *P. indica* 外的一圈抑制圈；若 *P. indica* 先接種到培養基上一週，再接上 *P. parasitica*，會發現 *P. indica* 的菌絲生長蓋過了 *P. parasitica* 的菌絲生長。
3. 並不是所有培養基都能夠讓對峙生長順利進行

   例如：在 *P. indica* 偏好 KF 的培養基上，*P. parasitica* 沒有辦法生長。
4. 由**圖.7-2** 可以看到 *P. indica* 的菌絲即便是在利於 *P. indica* 的培養基上，仍會受到 *R. solanacearum* 的菌落的影響，有些會朝反方向生長，有些則會產生凹陷，明顯的被 *R. solanacearum* 所壓制。但由於先前有學者證實 *P. indica* 和模式生物阿拉伯芥共生有利於對抗青枯病菌，所以就繼續以以下實驗呈現。
5. 由**圖.7-3** 可以看到雖是同時接種，*B. cinerea* 佔的面積卻明顯較 *P. indica* 大，可說明 *P. indica* 的生長速度沒有 *B. cinerea* 快，但是仍可以看到他們之間的一圈空隙，也就是抑制圈，代表 *P. indica* 還是可以抑制 *B. cinerea* 的擴散。

6. 由**圖.7-4** 可以看出 *P. parasitica* 的生長速度較 *P. indica* 快，但卻可以看到比**圖.7-3** 更明顯的抑制圈，代表 *P. indica* 可以抑制 *P. parasitica* 的生長，阻撓 *P. parasitica* 的生長。

7. 除了 *R. solanacearum* 外，*P. indica* 與另二種病害(*B. cinerea* 和 *P. parasitica*)的對峙生長都有抑制的效果，和空氣中的真菌甚至能侵占其生長空間，成效極佳。

(三) <u>結論：</u> 雖然對峙生長只是實驗前的參考依據，但是依然可以看出 *P. indica* 的特性和成長，以及和病害們在尚未接種到植株前的關係。

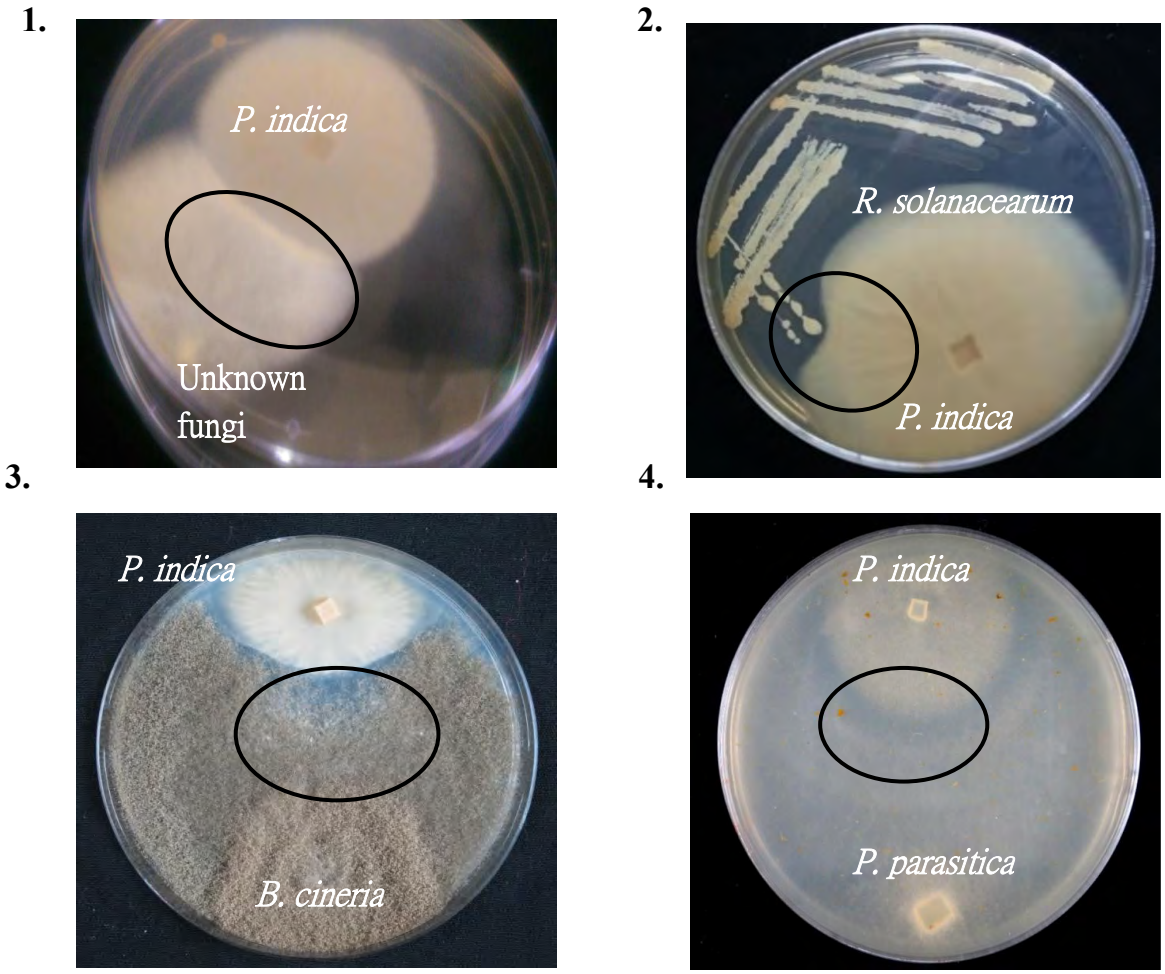


圖. 7 病菌和印度梨形孢菌 (*P. indica*) 的對峙生長

1. 先在培養皿內放置 *P. indica* 菌絲塊，數日後再接上空氣中的真菌一同生長
2. 先在培養皿內放置 *P. indica* 菌絲塊，數日後再劃上 *R. solanacearum* 一同生長。
3. 同時在培養皿中放置 *P. indica* 菌絲塊以及 *B. cinerea* 菌絲塊，使其同時生長。
4. 同時在培養皿中放置 *P. indica* 菌絲塊以及 *P. parasitica* 菌絲塊，使其同時生長。

二、 菸草和印度梨形孢菌 (*P. indica*)於培養皿共生，對抗 *R. solanacearum*

(一) 散狀排列法

在本實驗進行前，因為我們尚未確定何種方法較易使 *P. indica* 進到菸草種子內，所以我們便先將洗好的種子(見於步驟(一)之 1)，以散亂的方式種在培養基上，做最初步的實驗，一週後，再各自接上 *P. indica* 和 *R. solanacearum*，做比較和觀察。

結果如下圖. 8，我們可發現：

1. 即便沒有加入 *R. solanacearum*，有加入 *P. indica* 的植物(圖.8-2)顏色青綠，完全沒有凋萎情形，而未加入 *P. indica* 的植株(圖.8-4)，雖然也幾乎無凋萎情形，但是顏色卻較暗黃，不過二者並無明顯差距。
2. 皆加入 *R. solanacearum* 的對照組和實驗組，有非常明顯的差異，有 *P. indica* 共生的植株(圖.8-1)和未加入病菌的植株(圖.8-4)生長情形相差不遠，雖有一些凋萎，但大部分完好無缺；但只加入 *R. solanacearum* 的植株(圖.8-3)，凋萎情況嚴重。

<u>結論：</u> *P. indica* 看似有用處，但由於種子散亂在培養基上，有些植株集中在同一小塊的培養基上，不能精準計算，只能以觀察代替精確數據。所以下面的實驗即改變栽種種子的方式。

(二) 點狀排列法(8 排×8 列)

由於實驗(一)的缺點為：無法計算完好和凋萎的植株數量，進而得到專業數據，所以我們改使用點狀排列的方式，將每一顆種子分開，不僅希望種子不會互相爭奪培養基中的養分，也希望能助於我們的觀察，栽種完一週後，接上 *P. indica*，再經一週後，再接種 *R. solanacearum*，做比較和觀察。

結果如下圖. 9，我們可發現：

1. 點狀排列可一株株數出他們的生長情況(圖. 9)，但無法明顯看出差異，所以將實驗數據化，即製成圖表(圖. 9-3、圖. 9-4)做比較。
2. 接種 *P. indica* 和 *R. solanacearum* 後的 7 天，並無明顯變化，因為尚有許多植株

根本未發芽，但卻又不能確認是被 *R. solanacearum* 侵入而無法生長，還是尚未成長健全。

3. 14 天後，所有植株都生長出幼苗，凋萎情形較 7 天時明顯，但仍無明顯差距。
4. 圖. 9-3 為將圖. 9-1 結果數據化後的成果，可看出有加入 *P. indica* 的凋萎數量甚至比未加入 *P. indica* 的凋萎數量來得多，但是也可能是因為將未發芽的植株算成萎凋數量。
5. 圖. 9-4 為將圖. 9-2 結果數據化後的成果，可看出加入 *P. indica* 和未加入 *P. indica* 的凋萎數量，僅有 4 株的小差距，不能確認 *P. indica* 的效能。

<u>結論：</u> 由於無法判別凋萎原因是由病害造成，還是生長時間過短所產生的數據，或是 *P. indica* 並沒有進入到植株內，所以下面的實驗再次改變栽種種子的方式。

(三) 平躺狀排列法 (隨機種植)

由於實驗(二)的缺點為：無法確定生長不健全，甚至凋萎的原因，所以我們改變了新的種植方法，先再培養皿中種植菸草，兩週後從中挑選已經生長健全的幼苗連根拔起，整齊排列於另一培養皿內，再各自接上 *P. indica* 和 *R. solanacearum*，做比較和觀察。

結果如下圖. 10，我們可發現：

1. 觀察兩培養皿(圖. 10-1、圖. 10-2)的生長情形，仍無明顯差異，所以必須將其數據化(圖. 10-3)
2. 圖. 10-1、圖. 10-2 分別為將已在培養皿中生長一週的菸草幼苗，移植到另一培養皿，有加入 *P. indica* 共生和未加入 *P. indica* 共生的成果，以肉眼觀察，圖. 10-1 較 圖. 10-2 生長的好，於是我們將其化為數據，做較準確的比較。
3. 數據得知，有加入 *P. indica* 相較於未加入 *P. indica* 的植株，凋萎數量少了許多，而且也較晚發病，此明顯差距，可說明 *P. indica* 有顯著效果。
4. 圖. 10-4 為利用步驟五之 8 的方式，抽測出 *P. indica* 是否順利進入植株，結果顯示 *P. indica* 孢子確實有在菸草植株中反應。

結論： 因為植株的年齡、大小與有限制的生長空間仍然是不太穩定的因素，因此我們決定置換成更大的容器來重複此實驗，並確保 *P. indica* 有進入植株。

(四) 將已在培養皿稍微長出的菸草幼苗，移至組織培養盆中

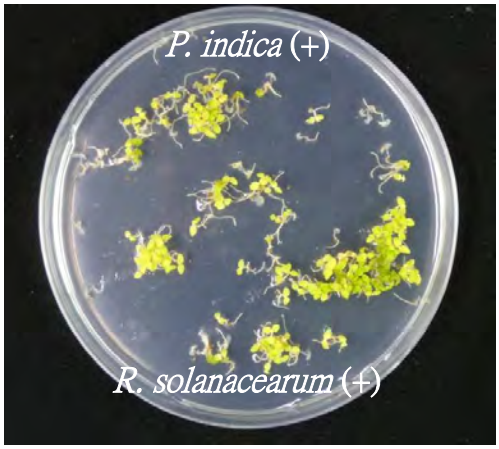
由於實驗(二)的缺點為：植物生長空間較受限，反映出的生長情況不明顯，所以我們就將前三個實驗所使用的培養皿，更換成組織培養盆，給予菸草更多生長空間。我們先在培養皿中種植菸草，一週後，從中挑選已經生長健全的幼苗連根拔起，整齊排列於截面積較大、深度較深的組織培養盆內(每盆六株)，經一週後接上 *P. indica*，再經一週，接種 *R. solanacearum*，做比較和觀察。

結果如下圖. 11，我們可發現：

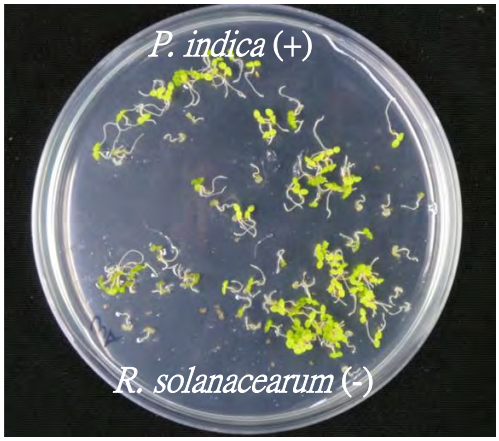
1. 由於每盆的植株少，且生長空間較之前大，我們觀察時容易許多，植株的生長情形也較易區別和判斷。
2. 有接種 *P. indica* 的菸草相對於沒有接種 *P. indica* 的菸草，發病的機率大幅下降，實驗組和對照組的菸草植株有著顯著的差異性，這讓我們確定了 *P. indica* 可以致使菸草增強抵抗 *R. solanacearum* 的能力。

結論： 我們由此實驗幾乎已可以斷定 *P. indica* 的效能，但上述的實驗都並不是在土壤介質的環境中，而現實生活中，菸草仍是生長於大自然，所以為了增加在現實情況下，利用 *P. indica* 抵抗 *R. solanacearum* 的可行性，我們便進行了在土壤中菸草的實驗測試。

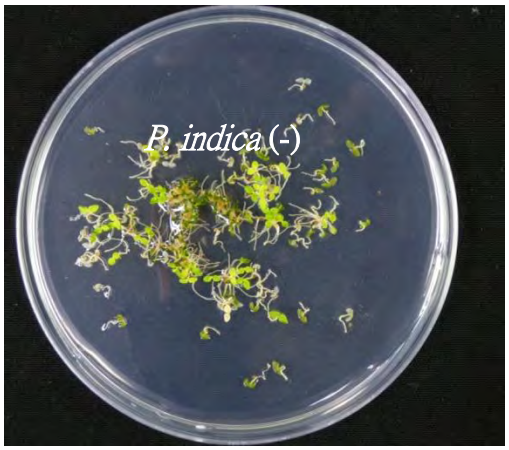
(1)



(2)



(3)



(4)

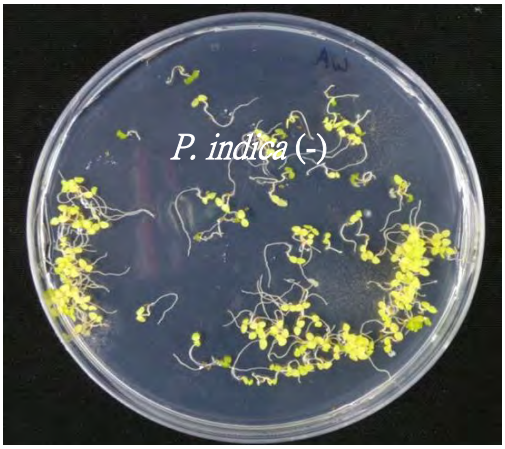


圖. 8 散狀排列之菸草與 *P. indica* 共生對抗青枯病菌(*R. solanacearum*)

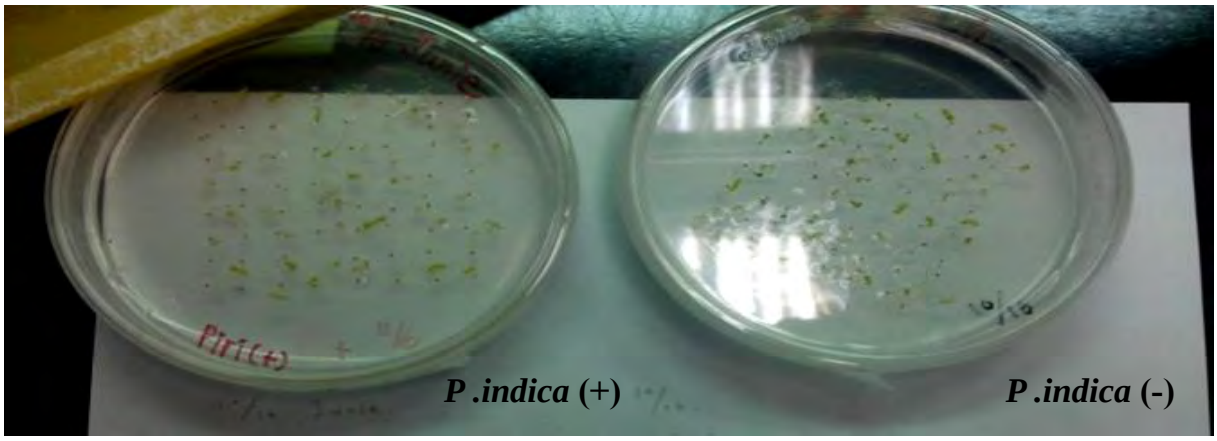
(1) 左上方可看到一點點凋萎，但是大部分植株皆正常生長。

(2) 無法看出植物是否有因為共生而生長較佳。

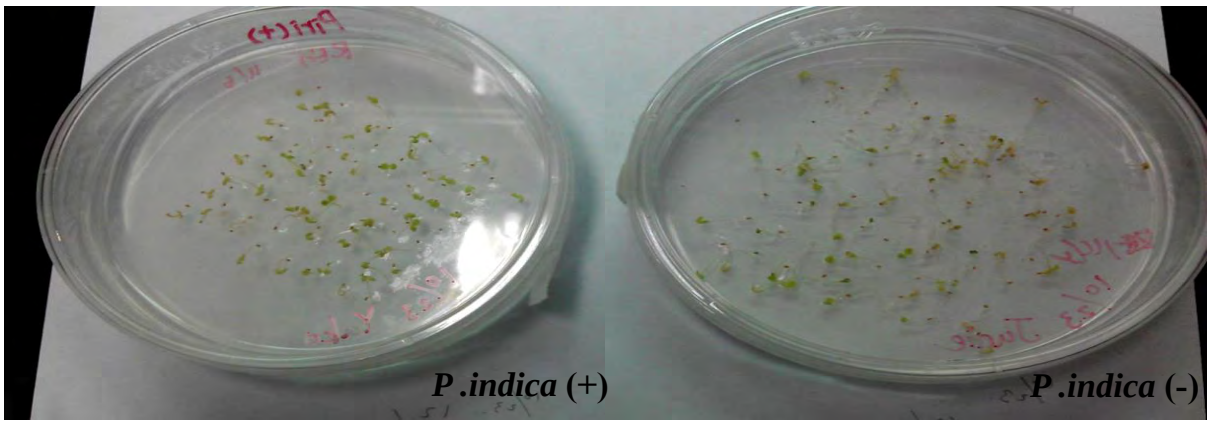
(3) 可見中間一處凋萎情形嚴重，和(A)形成明顯對比。

(4) 無法看出植物是否有因為共生而生長較佳。

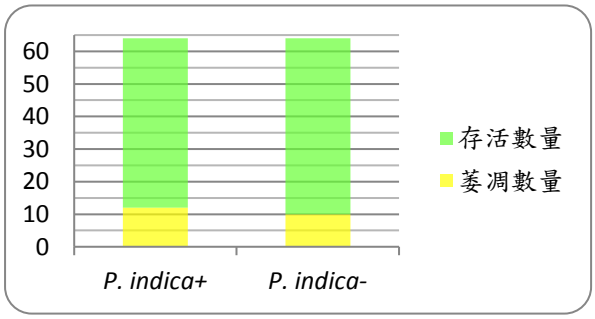
(1)



(2)



(3)



(4)

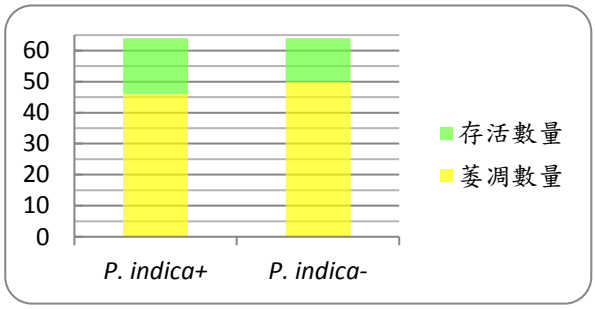


圖. 9 點狀排列之菸草與 *P. indica* 共生對抗青枯病菌(*R. solanacearum*)

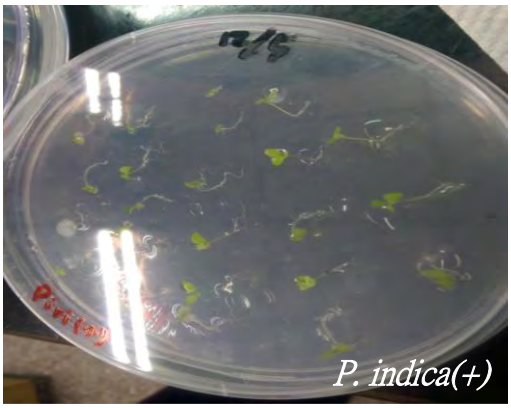
(1) 為接種 *R. solanacearum* 並分別以 P(+)和 P(-)為實驗組和對照組 7 天後的觀察結果。

(2) 為接種 *R. solanacearum* 並分別以 P(+)和 P(-)為實驗組和對照組 14 天後的觀察結果。

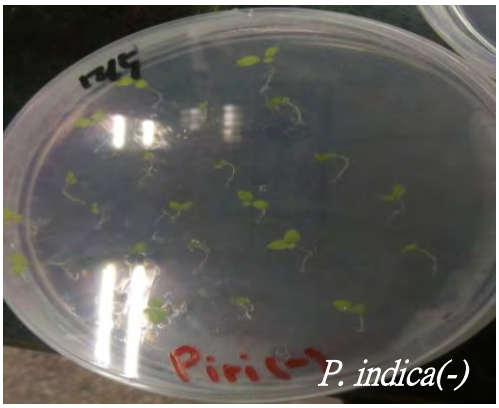
(3) 為將(1)結果數據化後的成果。

(4) 為將(2)結果數據化後的成果

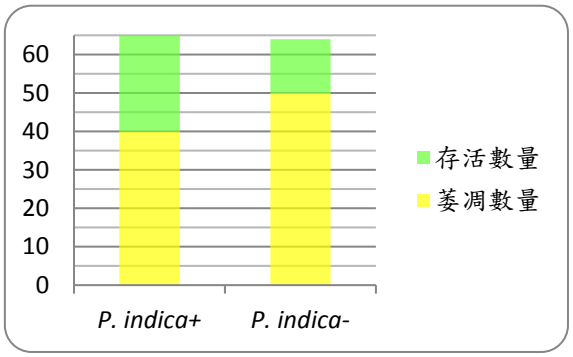
(1)



(2)



(3)



(4)

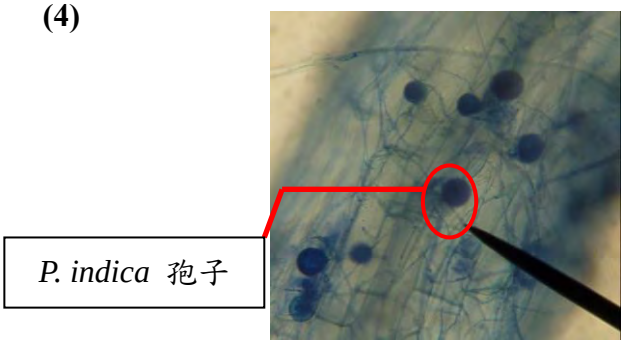


圖. 10 平躺狀排列之菸草與 *P. indica* 共生對抗青枯病菌(*R. solanacearum*)

(1)、(2) 分別為將已在培養皿中生長一週的菸草幼苗，移植到另一培養皿，有加入 *P. indica* 共生和未加入 *P. indica* 共生的成果。

(3) 為將(1)、(2)數據化後的成果。

(4) 為加入染劑後，以倍率：x400 顯微鏡觀察菸草內的孢子。

(1)

P. indica(+)

(2)

P. indica(-)

圖.11 組織培養盆中 菸草與 *P. indica* 共生對抗青枯病菌(*R. solanacearum*)

(1) 為有加入 *P. indica* 共生對抗 *R. solanacearum* 的成果。

(2) 為沒有有加入 *P. indica* 共生對抗 *R. solanacearum* 的成果。

三、 菸草和印度梨形孢菌 (*P. indica*)於盆栽內共生，對抗 *R. solanacearum*

(一) 直接種植於盆栽中

為了讓本實驗更貼近現實生活，也為了使我們的實驗之後能應用到生活上，我們即用貼近大自然的土壤替代培養基來進行實驗。我們將種子撒在盆栽內(每盆一株)，14 天後平均澆灌 *P. indica* 於植株上，再隔 7 和 14 天後，澆灌 *R. solanacearum* 的菌液(步驟(三)之 1)於盆栽中，並用專業的分析法 Wilting score(植物凋萎程度)(步驟(五)之９)來紀錄和比較。

結果如下圖. 12、圖. 13，我們可發現：

1. 生長時間會影響凋萎程度，用觀察的方式即可發現一些成果差距，我們可發現出現了一些反常的情形，有加入 *P. indica* 共生的植株枯萎的數目反而較沒有加入 *P. indica* 共生的植株多出許多，但是我們仍需專業數據來證明其成效。
2. 經由 Wilting score 分析完後，製成圖表(圖.13)，即可看出 7 天時有加入
3. *P. indica* 共生的植株完全枯萎數雖比沒加入 *P. indica* 的植株少，但是完好的植株卻少了許多，14 天時，有加入 *P. indica* 的凋萎數，遠超過於沒加入 *P. indica* 的數目，此反常情形，使我們必須檢討許多環節。

結論：可以從本次實驗中得知，在土壤介質的環境下，有接種 *P. indica* 的植株，對於抵抗 *R. solanacearum* 沒有實質上的助益，這與我們先前的實驗結果相左，所以我們推測很有可能是因為土壤介質的阻擋，使印度梨形孢菌的孢子與菌絲沒辦法直接接觸到菸草的根部進而感染菸草，也有可能是因為植株的生長快慢不一，導致菸草並不具備有抵抗青枯病菌的能力，所以我們就更改了實驗方法。

(二) 將已在培養皿稍微長出的菸草幼苗，移至盆栽中

由於實驗(一)的缺點為，植株生長快慢不一，不能確認是植株的本身因素，還是澆灌 *R. solanacearum* 後抑制其生長，所們改變了方法。將已經在培養皿內生長且接種過 *P. indica* 的菸草幼苗，移入盆栽內並確保每盆只有一株成長中的菸草(並且未受到嚴重傷害)，兩周後再倒入 *R. solanacearum* 的菌液，再加

以觀察其萎凋係數。

結果如下圖. 14，我們可發現：

1. 因為以確認 *P. indica* 有進入實驗組的植株內，所以即減少了變數，亦較易做結論，但我們也同樣使用專業分析來比較。
2. 未加入 *P. indica* 共生的植物(圖.14-圓圈圖示)較有加入 *P. indica* 共生的植物(圖.14-方塊圖示)早發病，大約在 11 天時，未加入 *P. indica* 共生的植物，便幾乎全數萎凋，而有加入 *P. indica* 共生的植物還有約一半的植株是完好的。

結論：從實驗結果中可以得知，接種印度梨形孢菌後的菸草，對於抵抗青枯病菌的能力被提高，雖然沒辦法完全抵抗疾病，卻可以達到延緩發病的效果，若能夠繼續鑽研其延緩發病機制，或許就能找到另菸草完全抵抗青枯病菌的方式。

(1)

(2)

(3)

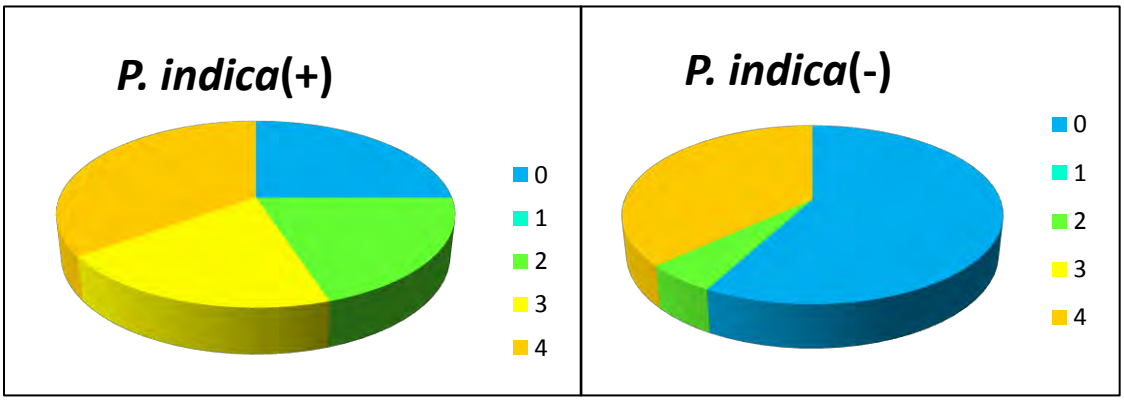
(4)

圖.12 盆栽種植之菸草與 *P. indica* 共生對抗青枯病菌(*R. solanacearum*)

(1) 為接種病原菌 7 天後 *P. indica*(+) 的成果。(2) 為接種病原菌 7 天後 *P. indica*(-)的成果。(3) 為接種病原菌 14 天後 *P. indica*(+)的成果。(4) 為接種病原菌 14 天後 *P. indica*(-)的成果。

為求更精確的數據來驗證，我們用專業的 Wilting score 來做分析**(圖.13)**。

(1)



(2)

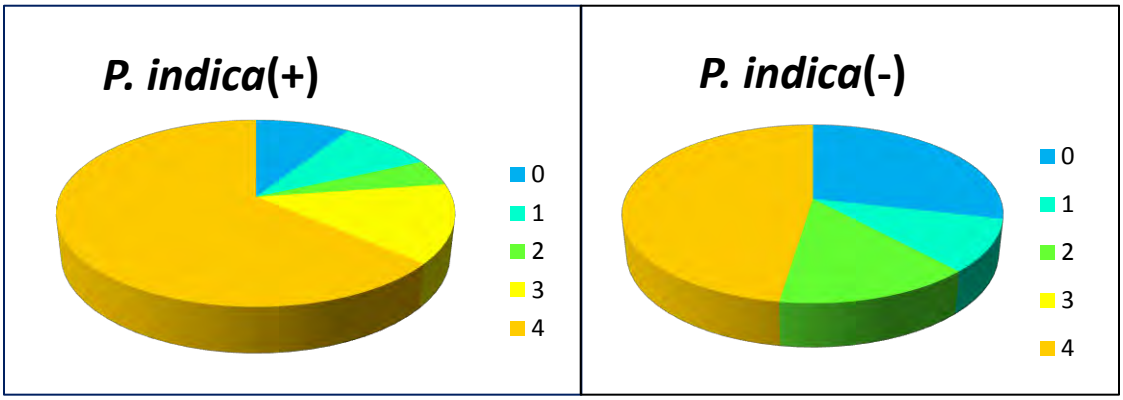


圖.13 盆栽種植之菸草與 *P. indica* 共生對抗青枯病菌(*R. solanacearum*)的 wilting score

Wilting score(植物凋萎程度) 計算法可見步驟(五)-9 ，數字越大，凋萎程度越高。

(1) 為接種病原菌 7 天後 *P. indica* (+) 和 *P. indica* (-) Wilting score

(2) 為接種病原菌 14 天後 *P. indica* (+) 和 *P. indica* (-) Wilting score

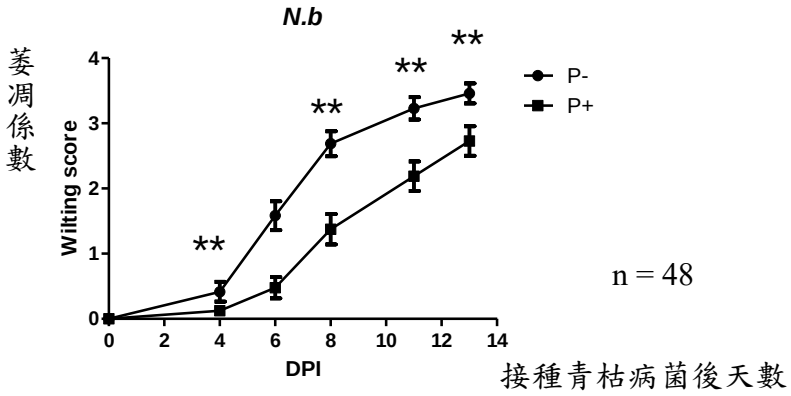


圖. 14 先培養皿後盆栽之菸草與 *P. indica* 共生對抗青枯病菌(*R. solanacearum*)

此圖表為四次結果組合而成，並經過 Student's *t*-test 統計過後，得高顯著差異。

四、 菸草和印度梨形孢菌 (***P. indica***)於盆栽內共生，對抗 ***B. cinerea***

確認了 *P. indica* 和菸草共生對抗 *R. solanacearum* 的成效後，我們即改變病種，以證明 *P. indica* 更廣泛的使用性。由於實驗三之（二）的成效極佳，而且貼近現實自然，所們延續此方法，將已經在培養皿內生長且接種過 *P. indica* 的菸草幼苗，移入盆栽內，一週後，挑選健康的菸草葉片出來，滴上 ***B. cinerea*** 的菌液(步驟(五)之 2)，並觀察其變化。

結果如下圖. 15，我們可發現：

1. 有觀察法並無太大差異，必須利用專業分析法才能做出精確的比較。
2. 利用 Image J，我們一一丈量每片葉子發病的最大直徑，經由分析後，差距變得很明顯，也能得出我們所要的結果。

結論：*P. indica* 和菸草共生是能成功對抗 ***B. cinerea*** 的。

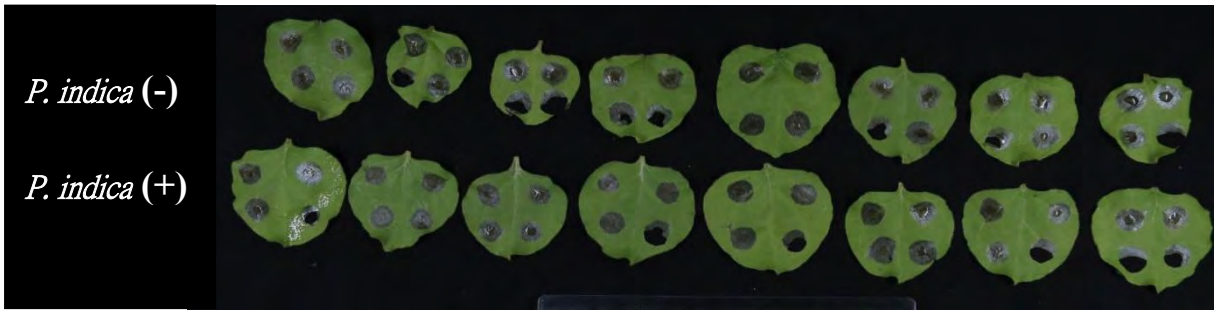
五、菸草和印度梨形孢菌 (*P. indica*)於盆栽內共生，對抗 *P. parasitica*

確認了 *P. indica* 和菸草共生對抗 *R. solanacearum 和* ***B. cinerea*** 的成效後，我們再次改變病種，讓 *P. indica* 能得到更好的成效證明。由於前兩次實驗的方法成功率極高，而且貼近現實自然，所們繼續使用此方法，將已經在培養皿內生長且接種過 *P. indica* 的菸草幼苗，移入盆栽內，一週後，挑選健康的菸草葉片出來，滴上 *P. parasitica* 的菌液**(步驟(五)之 3)**，並觀察其變化。

結果如下**圖. 16**，我們可發現：

1. 有觀察法並無太大差異，必須利用專業分析法才能做出精確的比較。
2. 利用 Image J，我們一一丈量每片葉子發病的最大直徑，經由分析後，差距變得很明顯，也能得出我們所要的結果。
3. 結論：*P. indica* 和菸草共生是能成功對抗 *P. parasitica* 的。

(1)



(2)

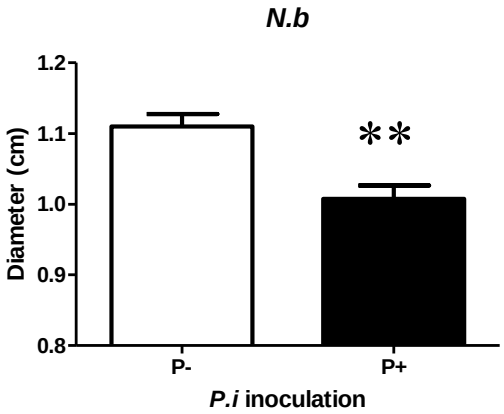


圖. 15 菸草與 *P. indica* 共生對抗灰黴病菌(*B. cinerea*)

(1) 為一週後，有加入 *P. indica* 和未加入 *P. indica* 的發病程度比較

(2) 分別以 P(+)和 P(-) 作實驗組和對照組的菸草發病直徑比較

(1)

(2)

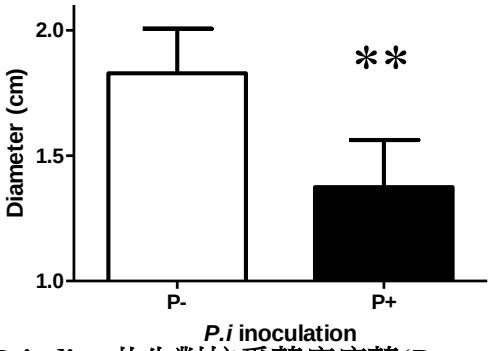


圖. 16 菸草與 *P. indica* 共生對抗番茄疫病菌(*P. parasitica*)

(1) 為一週後，有加入 *P. indica* 較未加入 *P. indica* 發病程度比較。

(2) 為分別以 P(+)和 P(-) 作實驗組和對照組的菸草發病直徑比較。

陸、 研究討論

一、 種植的方式不同對共生成效的影響

(一) 散狀排列種植(圖. 8)

我們發現未與 *P. indica* 共生的植物組別因無法對抗 *R. solanacearum* 而明顯較其他三盤枯萎嚴重，而有無加入 *P. indica* 的結果並無很大的差異，究其可能原因，除了因無法正確得出確切數據(每一株植株是否都有受影響)，我們發現 *P. indica* 進入植株內的數量很少。所以之後便改成使用排列整齊，方便計算的點狀排列。

(二) 點狀排列種植(圖.9)

此法較第一種方法易於計算被感染的植株數量。根據有加入 *P. indica* 者和未加入 *P. indica* 的植株凋萎數量，僅有四株的些微差異，甚至在某次實驗時，有加入 *P. indica* 的植株凋萎數量比未加入 *P. indica* 多。再者，我們發現 *P. indica* 進入植株內的數量仍然很少。另外，屢次嘗試後，都因植物被汙染而重新來過，我們找出了污染的原因，大部分都是因為人為因素，而造成培養皿內長出各式各樣的真菌，我們猜測是因為我們未做好消毒工作，或者頭髮碰觸到實驗物品而造成汙染。在此之後我們都會做好防範工作，用器材前也都會先行使用酒精燈進行消毒，並在無菌工作台進行實驗。

(三) 平躺狀排列種植(圖.10)

由於使用此法時植株已發芽，我們推測有利於 *P. indica* 進入植物根部(圖.10(D)) 並協助抵抗 *R. solanacearum*，且我們亦能比較有無加入 *P. indica* 時根部長短變化的差異。經過實驗後證實，不管是否加入 *P. indica*，皆無法促進植物的根增長或生長。另外使用顯微鏡觀察發現，雖然 *P. indica* 成功進入植株的比例為 70％，而非 100%，我們試驗結果仍顯示平躺狀排列的種植方式的確有效幫助 *P. indica* 由根部進入植株並與之共生。

(四) 將已在培養皿稍微長出的菸草幼苗，移至組織培養盆(圖.11)

有加入 *P. indica* 的植物可明顯看幾乎沒有凋萎，我們推測應培養盆較培養

皿深而厚，裡頭的培養基相較之下較多，植物的根物吸收養分的程度較佳，導致我們得到了不錯的結果，但由於植物的正常生長環境，是位於土壤裡的，所以之後我們便開始嘗試完成此步驟後再移植至土壤，然後驗收其效能。

(五) 直接將種子種在盆栽內(圖.13)

由 wilting score 結果可看到，有加入 *P. indica* 的植株萎凋數目接近於甚至更勝於未含 *P. indica* 之培養皿的萎凋數目，故無法得證 *P. indica* 是否有效。我們推測可能是因為我們是將含有 *P. indica* 之液體澆灌在已生長一週的菸草盆栽內，雖較接近正常植物的生活環境，但由於無法將植株連根拔起的拿去鑑驗（恐怕造成植株死亡或實驗組和對照組數據不精確)，我們較難確認 *P. indica* 是否進入植株，故我們改用先在培養皿中種植植物，等到約 7 天後(植株已冒芽)，並已確認過 *P. indica* 進入植株的平躺狀排列植株，再移植進入盆栽內種植(植物生長較原始的環境)來進行實驗。

(六) 先於培養皿中種植，再移植到盆栽內(圖.14)

我們推測將已在培養皿中長出數片葉子的植物移植至盆栽中，較在盆栽間移植的植物容易存活，並且也確認了 *P. indica* 能順利進入植株內並進行抵抗青枯病的工作，而此點由多次實驗獲得證實。由結果的圖表得知，未加 *P. indica* 的植物較有加 *P. indica* 的植物早發病且也較早凋萎死亡。故我們後續以成功率最高的此法來檢測 *P. indica* 共生對植物對抗其餘兩種病菌(*B. cinerea* 與 *P. parasitica*)之效應。

二、 接種 *P. indica* 方式的不同

(一) 我們多使用澆灌的方式接種 *P. indica*，不同處僅為在培養皿中滴灌或者在盆栽中澆灌，而實驗也證明在培養皿中較合適。

(二) 近期研究文獻中也使用將 *P. indica* 菌根連同小塊立方體培養基一同放置於平躺的植物苗之根上以進行共生的做法。我們也於嘗試此種接種方式，不同之處為液體菌液及裁切成小立方體之菌根，而目前仍在其中斟酌較能有效共生的方式。

三、 與 *P. indica* 共生對抗不同病菌

(一) 菸草與 *P. indica* 共生對抗青枯病菌(*R. solanacearum*) (圖.14)

由圖上可看到，雖然一開始實驗組和對照組差異不大，但到後期其差距則十分明顯，有加入 *P. indica* 的植株之抗病能力提升許多。經由 wilting score 的分析結果也顯示菸草與 *P. indica* 共生對抗 *R. solanacearum* 有顯著的成效。

(二) 菸草與 *P. indica* 共生對抗灰黴病菌(*B. cinerea*) (圖.15)

我們以稀釋過的 *B. cinerea* 孢子液滴在葉片上進行病菌接種，經一周後再觀察發現此方法成效極佳。摘下發病葉片之後，不但可清楚看出葉片發病範圍，也較易進行比較。雖然肉眼無法觀察到有無加入 *P. indica* 之葉片的病斑大小是否有顯著差異(圖.15(A))，我們進一步利用 Image J 專業影像分析軟體進行量化分析，發現有無加入 *P. indica* 之葉片的病斑大小有顯著差異(圖.15(B))，顯示 *P .indica* 共生可協助菸草對抗灰黴病菌。

(三) 菸草與 *P. indica* 共生對抗番茄疫病(*P. parasitica*) (圖.16)

我們以稀釋過的 *P. parasitica* 孢子液滴在葉片上進行病菌接種，但因 *P. parasitica* 較易觀查出發病成效，所以只在每片葉片上滴了兩滴。實驗結果發現，不管是肉眼觀察(圖.16(A))或以 Image J 影像分析(圖.16(B)) 都可以發現有無加入 *P. indica* 之葉片的病斑大小有顯著差異，證明 *P .indica* 共生可有效幫助菸草有效防禦 *P. parasitica*。

柒、 結論

一、 結論

(一) 經由一連串的試驗嘗試，我們建立了菸草與 *P .indica* 共生種植的最佳方式，亦即先將菸草種植於培養皿內並接 *P .indica*，待其發芽長出葉片後，將其移植至盆栽中，如此便能確保菸草皆能成功與之共生，利於進行許多進一步的研究試驗。

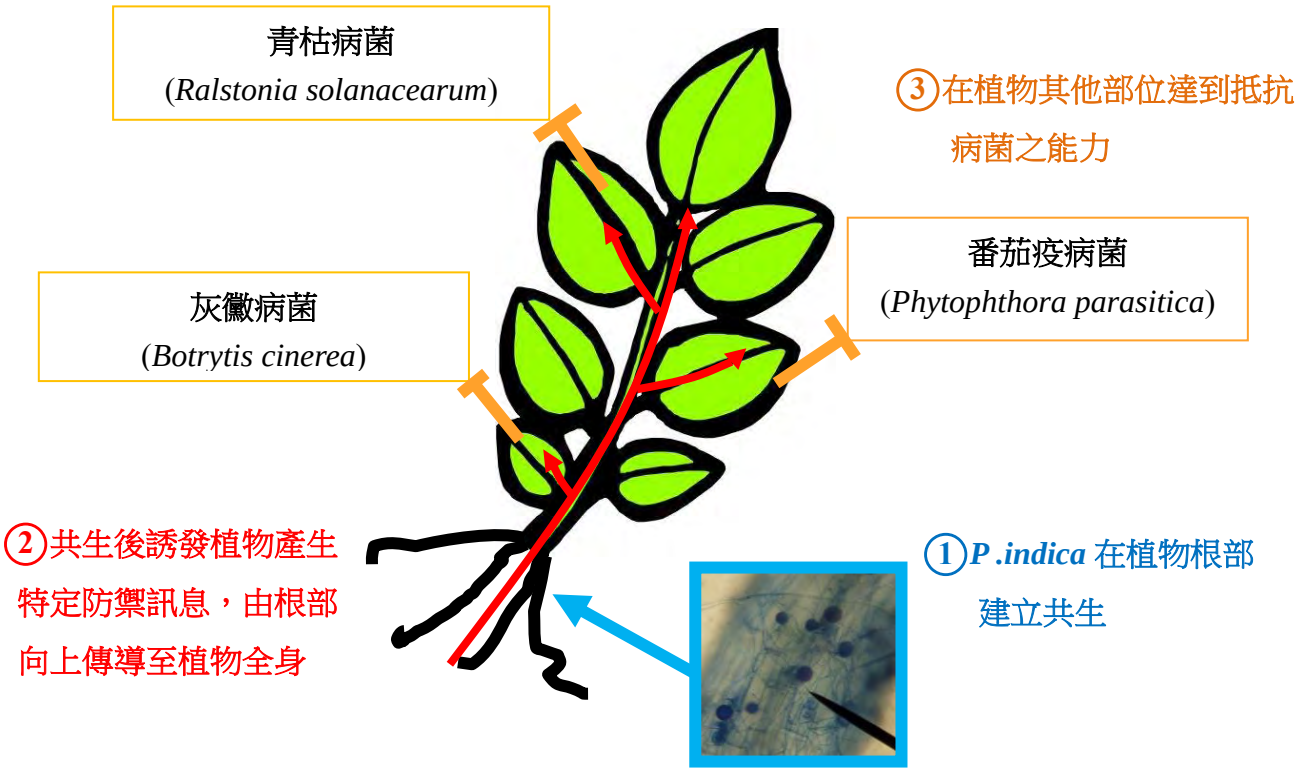
(二) 利用上述菸草-*P .indica* 共生培育系統，我們的試驗結果證明 *P .indica* 對於提升煙草對抗 *R. solanacearum* 是有效用的，初步推測此現象是由於 *P .indica* 協助植物某些防禦反應所致，值得未來進行進一步的實驗以闡述其相關詳細機制。未來也可進一步檢測 *P. indica* 共生是否也可促進植物成功抵抗其他重要細菌病害。

(三) 由於目前最佳的試驗系統都是先在培養皿培育植株然後再移植到土壤中，未來要確實應用在生態農業中則尚可檢試其他更為方便的系統，以利直接應用在植物原始的土壤環境，達到與 *P .indica* 共生提升植株抗病的成效。

(四) 實驗結果四與五顯示 *P .indica* 共生可促使植株有效防禦灰黴病菌(*B. cinerea*)與番茄疫病菌(*P. parasitica*)，故可樂觀推測 *P. indica* 在此二病害防治中的成效。未來可進一步檢測 *P. indica* 共生是否也有助於植物成功抵抗更多重要真菌和卵菌病害。

(五) 由於 *P .indica* 為根部共生菌，並不會移動到植物莖部或葉部，但卻可以促進植物抵抗葉部病害（灰黴病與番茄疫病），推測此現象是由於此菌與植物在根部建立共生後，會進一步誘發植物內部產生全株訊息傳導，因而加強了菸草對抗葉部病害之能力。

(六) 植物訊息傳導示意圖



二、 可能應用與未來展望

由於實驗過程為確保植株病害發病成功，我們皆採用過高病菌濃度 (高於田間實際病菌濃度)，因此在本研究中顯示 *P .indica* 共生有助於植物成功抵抗重要病

菌者，預期未來在田間實際病害防治之成功機率便可樂觀期待，亦即本研究呈現的這些重要初步研究結果將有助於近一步的研究發展與農業應用，未來有機會有效地運用於生態農業中以防治青枯病、灰黴病及番茄疫病。

捌、 參考資料

1. 位國慶。1994。台灣花卉病蟲害研討會專刊。中華植保學會編印。119～133 頁
2. 李縈榛。2009。印度梨型孢真菌促進小白菜生長的分子機制與生理研究。國立台灣大學植物科學研究所碩士論文。
3. 吳金丹。2015。印度梨形孢對水稻的促生作用及其機理的初探
4. 唐春生。Tang, Chun-Sheng。2010。唐春生植保。蔬菜病蟲防治
5. 許秀惠、安寶貞。1995。台灣農家要覽農作篇(三)，第 181 頁。葉瑩編
6. 陳文雄、鄭安秀、王添成。1999。果菜類-蕃茄。蔬菜病蟲害綜合防治專輯，果 5 頁。台灣省政府農林廳。南投。436 頁
7. 費雯綺、王喻其編。2007。植物保護手冊—蔬菜篇，第 46 頁。台中。229 頁
8. 楊秀珠。1994。觀賞植物灰黴病之發生及防治。臺灣花卉病蟲害研討會專刊。中華植保學會編印。167-176 頁
9. 蔡淑艷，2014。溫室大棚種植番茄灰黴病的發生特點及其綜合防治
10. Fakhro, A., Andrade-Linares, D.R., von Bargen, S., Bandte, M., Buettner, C., Grosch, R., Schwarz, D., and Franken, P. (2010). Impact of *Piriformospora indica* on tomato growth and on interaction with fungal and viral pathogens. Mycorrhiza 20: 191-200.
11. Kisha Shelton, (2001), Plant Pathology Department, University of Georgia

附錄一、配方字典

1. Potato Starch 馬鈴薯澱粉
2. Dextrose 葡萄糖
3. Agar 洋菜
4. Peptone 蛋白胴
5. Casein hydrolysate 酪蛋白水解物
6. Glucose 葡萄糖
7. Yeast extract 酵母萃取物
8. Sucrose 蔗糖
9. Tryptone 胰蛋白胴
10. macronutrient 宏量元素營養素
11. micronutrient 微量元素營養素
12. EDTA 乙二胺四乙酸
13. boric acid 硼酸
14. ammonium molybdate 鉬酸銨
15. thiamin 硫胺素
16. glycin 甘氨酸
17. nicotinic acid 菸(鹼)酸/煙酸
18. pyridoxine 比哆醇

【評語】052104

1. 本研究主要目的在探討物根部內共生真菌印度梨型孢菌對防治茄科植物圓葉菸草三種病害，青枯病、灰黴病及番茄疫病的能力。

2. 研究發現，印度梨型孢菌對植株生長並無明顯影響，但發現與此菌共生後會加強菸草對抗上述三種嚴重病害之能力，具有實際農業應用的潛力。

3. 學生對研究主題了解佳，表達能力清晰。

4. 本研究對印度梨型孢真菌的抗菌機制較缺探討，可再加強。

作品海報

摘要

茄科植物在農業生產與科學研究上皆極為重要，但卻極易因病菌感染而致重大損失，例如全球重要卻苦無有效防治方法的三種嚴重病害：青枯病、灰黴病及番茄疫病。印度梨型孢菌(*Piriformospora indica*)是植物根部內共生真菌，具有很廣的寄主範圍，可增強植物之生長與抗逆能力，但此共生真菌是否可促進植物抗上述病害則未知。本研究以模式植物圓葉菸草為研究材料，已建立有效的*P. indica*感染系統，且初步病害試驗結果顯示與此菌共生可加強菸草抗上述病害之能力。

壹、研究動機

植物是各生態系不可或缺的生物，提供人類與其他生物眾多資源。但許多微生物會侵害植物，甚至造成極大的農業損失，故尋求對環境友善之病害之作物病害生物防治策略便十分重要。我們從文獻中獲知植物根部內共生真菌*P. indica*有益許多植物之生長發育與對抗逆境，但此共生菌能否增強植物對上述三種重要病害之抗性則未知，故本研究利用圓葉菸草探討此重要議題。

貳、研究目的

一. 觀察*P. indica*與各種病害之菌種樣貌。
二. 探討與*P. indica*共生是否可促進菸草生長與對抗重要病害（青枯病、灰黴病及番茄疫病）。
三. 期望集結有利於農作物生物科技發展資源，以利發展永續生態農業。
四. 預期可為茄科植物重要病害之防治提供重要資訊與相關資源，兼具學術重要性與產業發展價值。

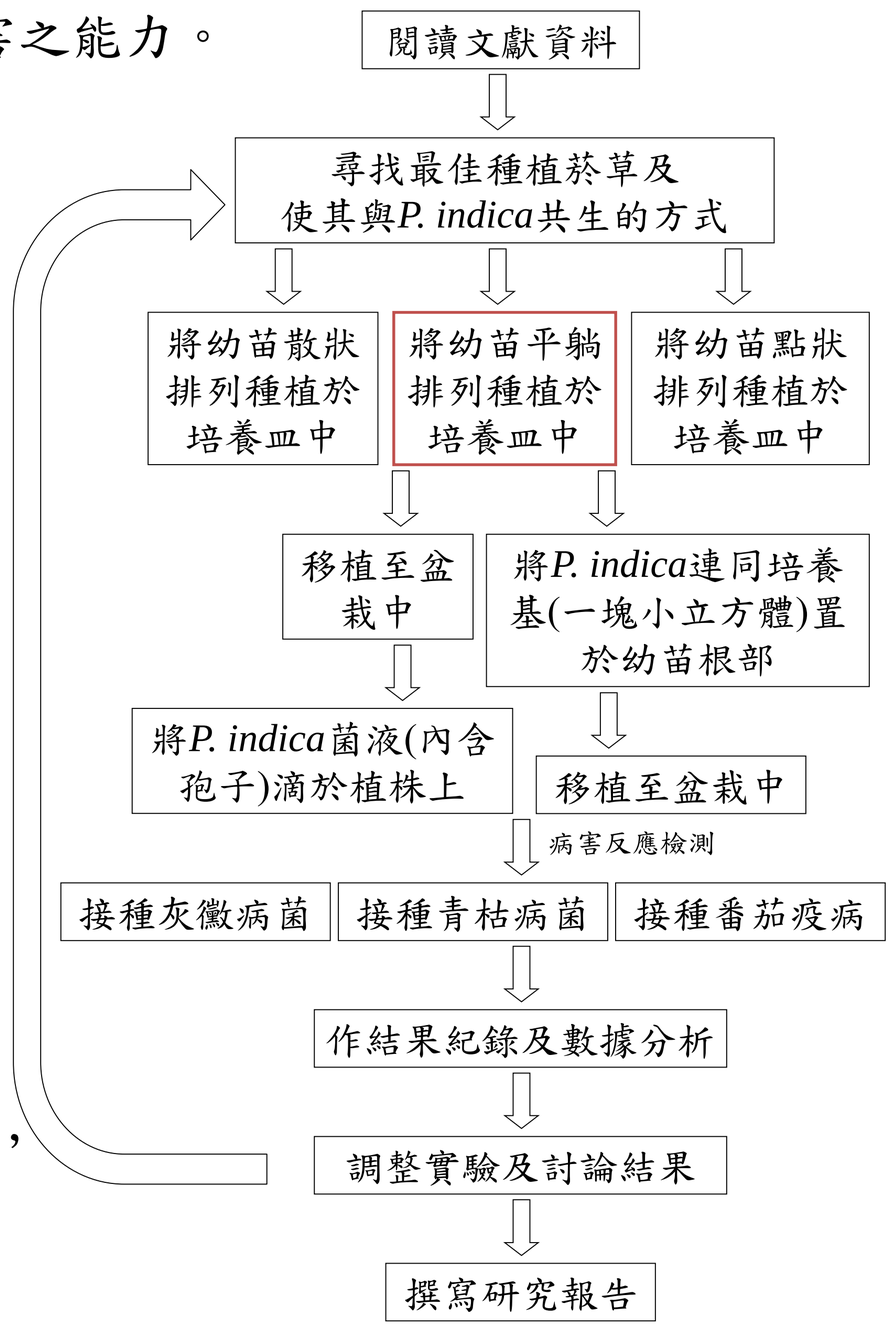


圖1、研究流程圖

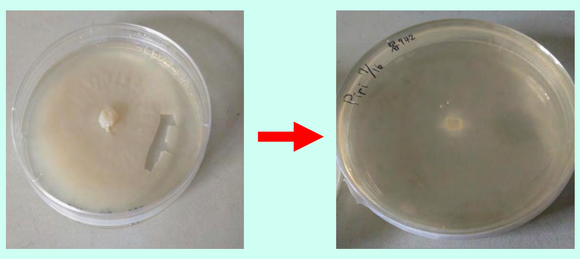
參、研究方法與步驟

(一)圓葉菸草之種植

1. 洗滌種子
2. 以散狀、點狀、平躺狀等方式播種

(二) *P. indica*之培養與製備

1. 繼代與大量培養
2. 計算孢子濃度(使用細胞計數器)
3. 植物共生試驗(菌液/菌塊)
4. 檢測*P. indica*與植物之共生
5. 植物生長之評估



(三)病菌之培養與製備

1. 計算病菌菌液的吸光值(使用分光光度計)
2. 青枯病菌的製備
3. 灰黴病菌的製備
4. 番茄疫病菌的製備

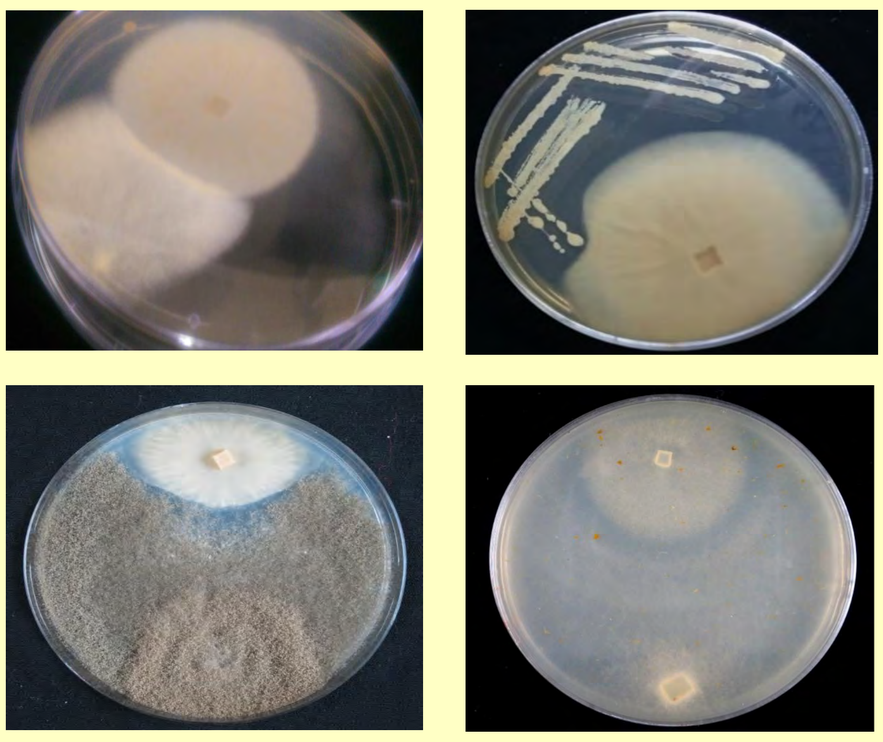
(四)對峙培養實驗(見結果一)

(五)病原接種與病況評估

1. 青枯病菌的評估--以Wilting score統計葉片凋萎數量
2. 灰黴病菌的評估--以Image J軟體量測病斑直徑
3. 番茄疫病菌的評估--以Image J軟體量測病斑直徑
4. 統計分析--以Student's t-test軟體進行分析

肆、研究結果

實驗一、印度梨形孢菌與病菌之對峙生長

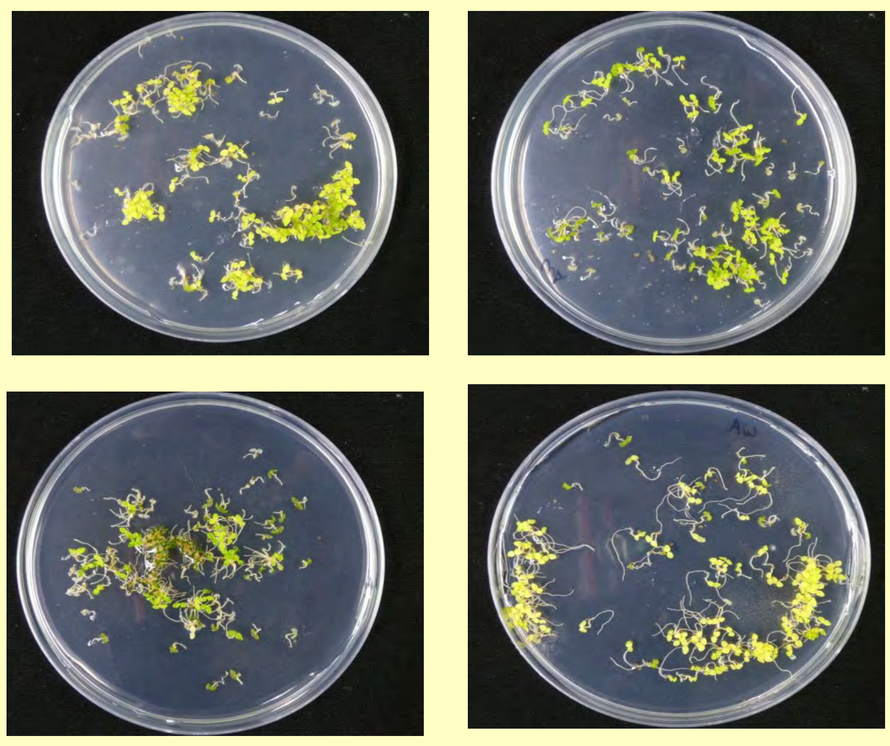


*P. indica*雖無法抑制青枯病菌 *R. solanacearum*生長，但可抑制灰黴病菌*Botrytis cinerea* 與番茄疫病菌*Phytophthora parasiticag*生長，且能侵占空氣中某真菌之生長空間，抑菌成效佳。雖然對峙生長只是實驗前的參考依據，但依然可以得知*P. indica* 的特性和成長，以及和病害們在尚未接種到植物體前的關係。此外，我們也發現：

1. 對峙生長先後順序、時間和培養基類型會影響到對峙生長的成效。
2. 並不是所有培養基都能夠讓對峙生長順利進行。

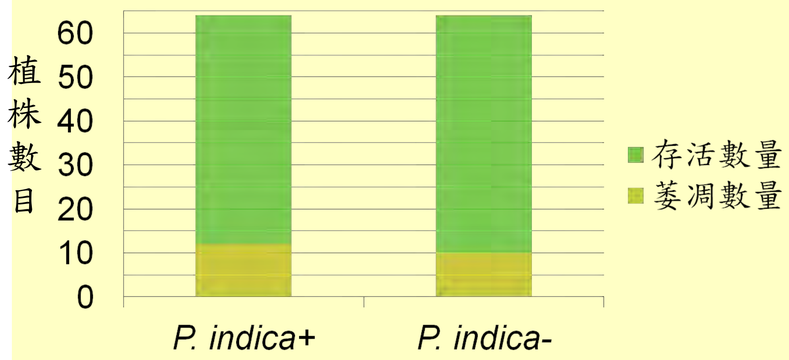
實驗二 、菸草和印度梨形孢菌 (*P. indica*) 在培養皿中共生後對抗*R. solanacearum*之效果

(1) 散狀排列法



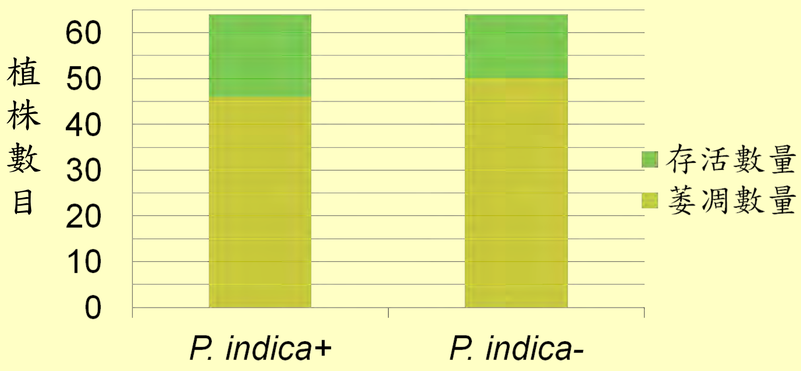
1. 在未確定*P. indica* 與菸草共生之最佳方法的情況下，我們先將洗好的菸草種子隨意佈種在培養基上，做最初步的實驗觀察，一週後，再各自接上*P. indica* 和 *R. solanacearum*，做比較和觀察。
2. 初步結果顯示，菸草在有接種*P. indica* 的情況下對青枯病之抗性增加，但須進一步改進實驗方法，以利進行確切之量化分析。

(2) 點狀排列法(8排×8列)

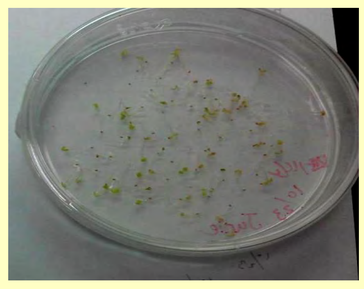


接種*R. solanacearum* 後7天

***P. indica* (+)**



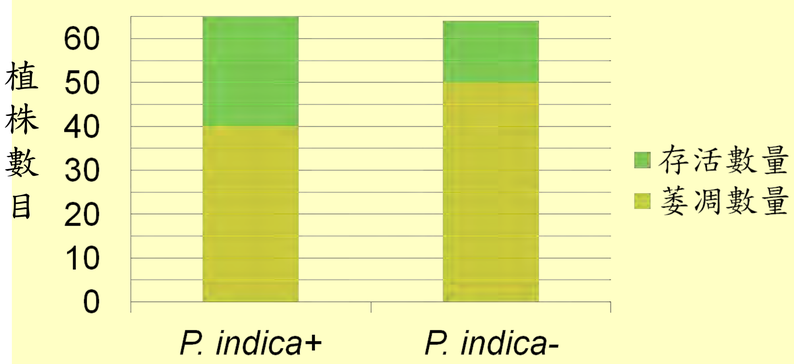
接種*R. solanacearum* 後14天

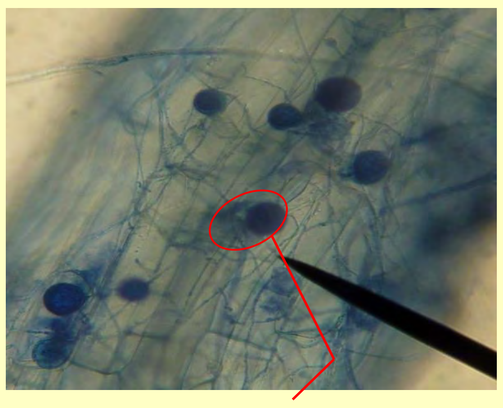


***P. indica* (-)**

1. 為進行精準之量化分析，本實驗改用點狀排列的方式佈植菸草種子。栽種完一週後，接種*P. indica*，再經一週後，再接種*R. solanacearum*，並定期記錄病況發展。
2. 所得結果顯示，在這種試驗條件下，接種*P. indica*對菸草抗青枯病之能力僅比未接種*P. indica*的對照組植物微佳，無法確認 *P. indica*幫助植物抗病的效能。
3. 另外，由於無法判別凋萎原因是由病害造成，或是*P. indica*並未成功進入植物體內，故需要在修改實驗條件以進行進一步試驗。

(3) 平躺狀排列法 (隨機種植)

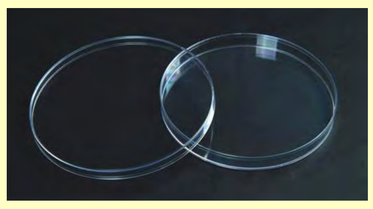


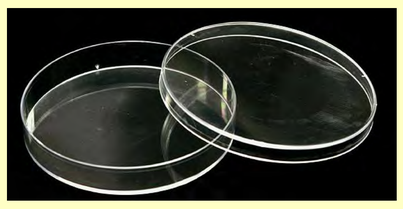


***P. indica* 孢子**

1. 改用大型組織培養盆進行試驗後，我們的植物跟內染色試驗結果確認 *P. indica* 成功地進入植物體內，且在根內產生大量菌絲與胞子。而且，與 *P. indica* 共生確實可增強菸草抵抗青枯病之能力。
2. 由於以上試驗系統皆在人工培養基進行，故需要進一步在土壤系統中進行試驗，以確認與 *P. indica* 共生可增強菸草抵抗青枯病之能力。

(4) 將已在培養皿稍微長出的菸草幼苗，移至組織培養盆中





更換培養容器

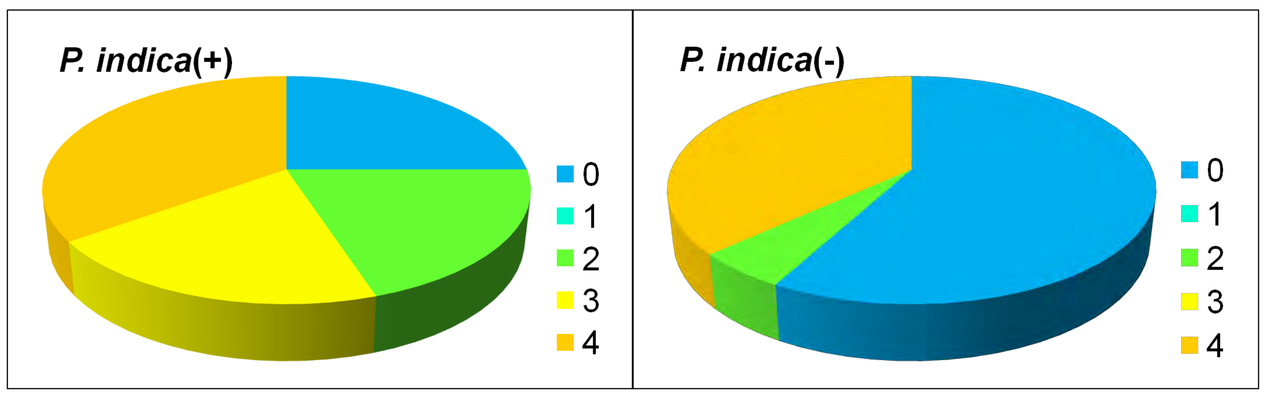
***P. indica*(+)**

***P. indica*(-)**

1. 由於實驗(二)之(3)的缺點為：植物生長空間較受限，反映出的生長情況不明顯，所以我們就將前三個實驗所使用的培養皿，更換成組織培養盆，給予菸草更多生長空間。
2. 我們由此實驗幾乎已可以斷定*P. indica*的效能，但上述的實驗都並不是在土壤介質的環境中，而現實生活中，菸草仍是生長於大自然，所以為了增加在現實情況下，利用*P. indica*抵抗*R. solanacearum*的可行性，我們便進行了在土壤中菸草的實驗測試。

實驗三　菸草和印度梨形孢菌 (*P. indica*)於盆栽內共生，對抗*R. solanacearum*

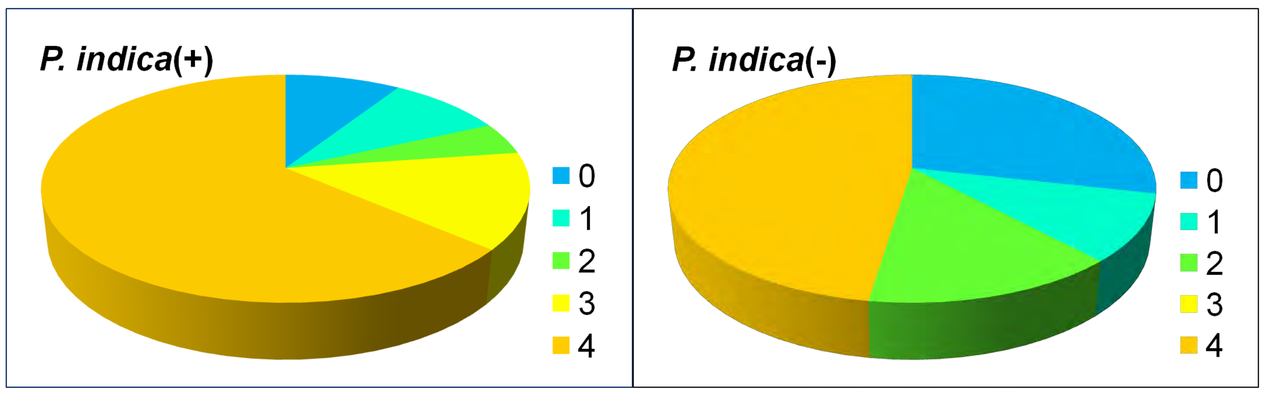
(1) 直接種植於盆栽中



接種*R. solanacearum* 後7天

***P. indica*(+)**

***P. indica*(-)**



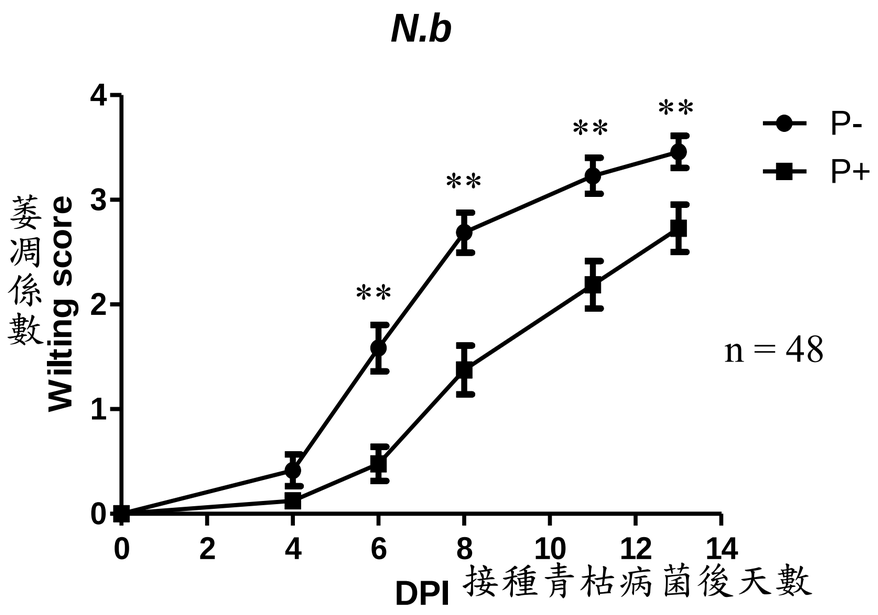
接種*R. solanacearum* 後14天

***P. indica*(+)**

***P. indica*(-)**

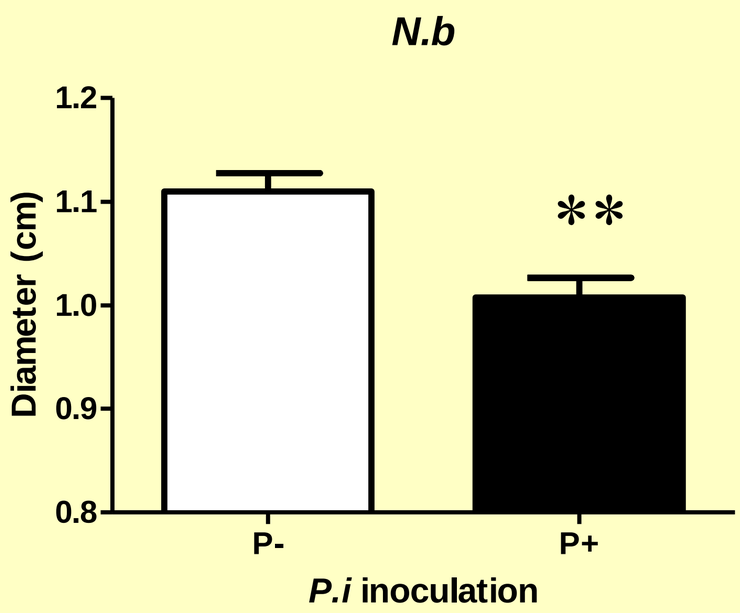
1. 我們將種子撒在盆栽內(每盆一株)，14天後平均澆灌*P. indica* 於植株上，再隔7和14天後，澆灌*R. solanacearum*的菌液於盆栽中，並用以wilting score (植物凋萎程度)分析法紀錄與比較。
2. 可以從本次實驗中得知，在土壤介質的環境下，有接種*P. indica*的植株，對於抵抗*R. solanacearum*沒有實質上的助益，這與我們先前的實驗結果相左，所以我們推測很有可能是因為土壤介質的阻擋，使印度梨形孢菌的孢子與菌絲沒辦法直接接觸到菸草的根部進而感染菸草，也有可能是因為植株的生長快慢不一，導致菸草並不具備有抵抗青枯病菌的能力，所以我們便又進一步修改了實驗方法。

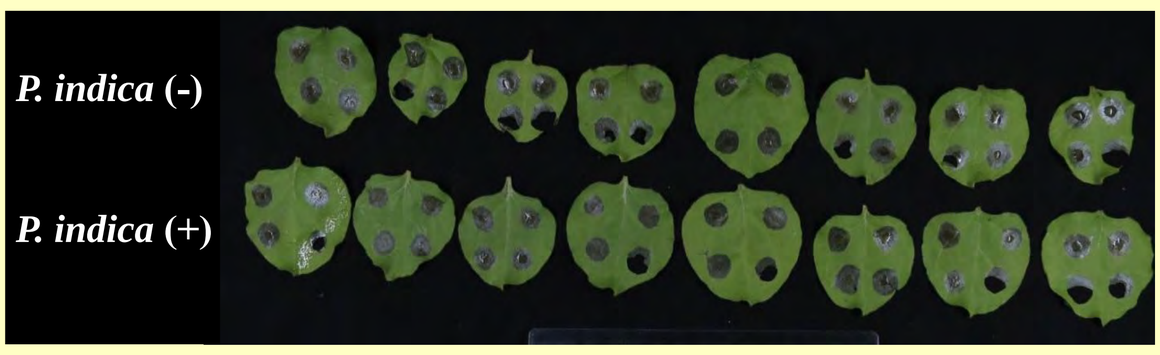
(2) 將已在培養皿稍微長出的菸草幼苗，移至土壤盆栽中



1. 因上述實驗之疑慮，本實驗改為將已經在培養皿內生長且已經接種過*P. indica*之菸草幼苗移入土壤盆栽內栽種，並確保每盆只有一株成長中的菸草(並且未受到嚴重傷害)，於移植兩週後再以土壤澆灌法接種*R. solanacearum*，並紀錄萎凋係數。
2. 從實驗結果可得知，接種印度梨形孢菌後的菸草，抵抗青枯病菌的能力被提高，雖然沒辦法完全抵抗疾病，卻可以達到延緩發病的效果，若能夠繼續改善實驗方法，並鑽研其延緩發病機制，或許就能找到使菸草更加抵抗青枯病菌的方式。

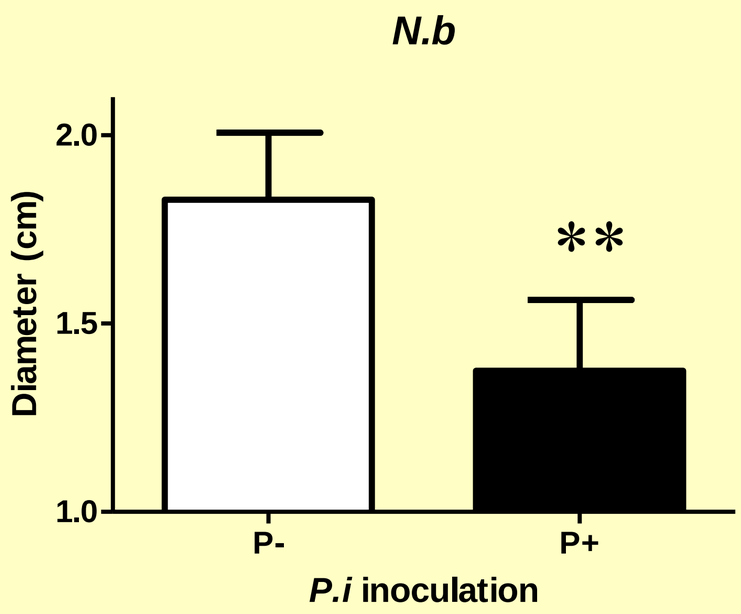
實驗四、菸草和印度梨形孢菌 (*P. indica*)於盆栽內共生，對抗*B. cinerea*





1. 為瞭解菸草與*P. indica*共生後是否對重要真菌病害之抵抗能力也會加強，我們持續使用實驗(三)之（2）之實驗方法，檢測對灰黴病之抗性。將已在培養皿內生長且接種過*P. indica*的菸草幼苗移入盆栽內，於一週後挑選健康的菸草葉片進行離葉接種試驗，滴上*B. cineria* 的胞子懸浮液(10^5 spores/mL)，並觀察其變化。
2. 結果顯示菸草與*P. indica*共生後對*B. cineria*之抵抗能力增強。

實驗五、菸草和印度梨形孢菌 (*P. indica*)於盆栽內共生，對抗*P. parasitica*



1. 為瞭解菸草與*P. indica*共生後是否對重要疫病病害之抵抗能力也會加強，我們持續使用實驗(三)之（2）之實驗方法，檢測對灰黴病之抗性。將已在培養皿內生長且接種過*P. indica*的菸草幼苗移入盆栽內，於一週後挑選健康的菸草葉片進行離葉接種試驗，滴上*P. parasitica*的游走胞子懸浮液(10^5 spores/mL)，並觀察其變化。
2. 結果顯示菸草與*P. indica*共生後對*P. parasitica*之抵抗能力增強。

肆、總結與應用

一、結論

(一) 經由一連串的嘗試，我們成功地建立了菸草與*P. indica*共生之最佳種植方式：先將菸草種植於培養皿內並接*P. indica*，待其發芽長出葉片後，將其移植至盆栽中，如此便能確保菸草皆能成功與之共生。

(二) 在土栽的系統中，成功與*P. indica*建立共生之菸草對於青枯病菌、灰黴菌及番茄疫病菌之抵抗能力皆有提升，然而其具體調控機制仍須進一步研究。

(三) 由於目前最佳的試驗種植方式都是先在培養皿栽培後再移植到土壤盆栽中，若要應用在實際農業系統並不可行，故未來仍希望建立在自然土壤栽培系統中植物與*P. indica*有效共生系統與抗病檢測。

(五) 未來可利用本研究建立之基礎，再進一步檢測*P. indica* 在其他重要病害之防治工作的應用潛力，發揮其最大效能。

二、可能應用與未來展望

由於實驗過程皆是採用較高濃度的病菌(高於田間實際濃度)，因此在此實驗中若顯示為*P. indica* (+)凋萎的較*P. indica* (-)少，則在田間便有更大的成功機率。也就是說，在未來有機會有效的運用於生態農業中，並成功防治青枯病、灰黴病及番茄疫病。

伍、參考與文獻

李縈榛。Lee, Yin-Chen。2009。印度梨型孢真菌促進小白菜生長的分子機制與生理研究

吳金丹。2015。印度梨形孢對水稻的促生作用及其機理的初探

唐春生。Tang, Chun-Sheng。2010。唐春生植保。蔬菜病蟲防治

陳文雄、鄭安秀、王添成。1999。果菜類-蕃茄。蔬菜病蟲害綜合防治專輯，果5頁。

楊秀珠。1994。觀賞植物灰黴病之發生及防治。臺灣花卉病蟲害研討會專刊。中華植保學會編印。167-176頁

蔡淑艷，2014。溫室大棚種植番茄灰黴病的發生特點及其綜合防治

Fakhro, A., Andrade-Linares, D.R., von Bargen, S., Bandte, M., Buettner, C., Grosch, R., Schwarz, D., and Franken, P. (2010). Impact of *Piriformospora indica* on tomato growth and on interaction with fungal and viral pathogens. Mycorrhiza 20: 191-200.

Kisha Shelton, (2001). Study on the growth effect of Chinese mustard（*Brassica campestris* subsp. chinensis L.）infected by *Piriformospora indica*. Plant Pathology Department, University of Georgia.