

2023 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 070004

參展科別 微生物學

作品名稱 探討番茄根圈菌對農桿菌的生物防治

得獎獎項 二等獎

就讀學校 國立臺灣師範大學附屬高級中學

指導教師 賴爾珉、林峻緯

作者姓名 林祐安、張皓翔

關鍵詞 生物防治、冠瘻瘤、抑制圈

作者簡介



我們是就讀師大附中的高三生。在植微所實驗將近兩年，中途雖遇到疫情阻擾，但我們仍透過線上討論的方式繼續研究相關內容。這一路上接受教授、學長姐們和老師很大的幫助與支持，不只教我們學術上的知識與培養科學邏輯思考，也加強我們在實驗失敗中的挫折忍受力與隊員彼此團隊合作力，讓我們有機會踏上國際科展展現成果，十分感謝。

摘要

前人以含農桿菌 C58 (*Agrobacterium tumefaciens* C58) 土壤接種番茄小苗後，發現有些番茄未產生腫瘤，故推測其土壤根圈中，有能抑制農桿菌 C58 的細菌。本研究從番茄小苗根圈分離並純化培養細菌，再透過抑制圈實驗測試分離菌。結果發現分離株 YA7-1，有顯著抑制農桿菌 C58 的效果，進而測試其他農桿菌菌株。結果顯示 YA7-1 對多種農桿菌具拮抗能力，且不同於現行的生物防治菌農桿菌 (*Agrobacterium radiobacter* K84 and K1026) 有高選擇性限制。定序其 16S 核糖體核糖核酸基因片段，序列比對為節桿菌屬 (*Arthrobacter*)。經由接種試驗得知 YA7-1 對番茄沒有致病力，且預先接種於根部時，可降低土壤中農桿菌誘導腫瘤的機率。測試 YA7-1 對其他植物病菌及非病原微生物的抑制效果，發現 YA7-1 具有廣效性的抑菌能力。藉由分析培養液上清液的實驗可得知 YA7-1 的抑菌因子為分泌物質。完成 YA7-1 全基因體定序後，找到四種可能被 YA7-1 分泌且具有抑制性的次級代謝物。

。未來將繼續找尋 YA7-1 的抑菌物質與機制，來完善對根癌農桿菌或其他植物病原菌的生物防治。

Abstract

Gram-negative bacterium *Agrobacterium tumefaciens* C58 is a phytopathogenic pathogen in soil that can cause crown gall disease and lead to economic loss. Interestingly, previous studies showed that some tomato seedlings inoculated with *A. tumefaciens* C58 in the soil did not form tumors. Hence, we hypothesize that there are some bacteria which can inhibit *A. tumefaciens* C58 growth or tumor formation in the rhizosphere. In this study, we isolated one bacterium, named YA7-1, from the tumor-free tomato rhizosphere, which could inhibit *A. tumefaciens* C58 growth *in vitro* (zone of inhibition test, ZOI test). Compared to the current bacterial biocontrol agents *A. radiobacter* K84 and K1026 that only target *A. tumefaciens*, the inhibition spectrum of YA7-1 was broader, which can even inhibit fungus. We identified YA7-1 as *Arthrobacter* by 16S rRNA sequencing, and the inoculation test on tomato seedlings suggested YA7-1 is not pathogenic. More importantly, pre-treatment of YA7-1 on root reduced the tumor formation caused by *A. tumefaciens* C58. In addition, the ZOI test results of YA7-1 supernatant also showed inhibition zones, but what the antibacterial factors are and their inhibition mechanisms are still remained unknown. To further analyze about YA7-1, we have performed whole-genome sequencing by Illumina and Oxford nanopore, which reveal possible antibiosis metabolites. In the future, we will continue to search for the antibacterial substances and mechanisms of YA7-1 to improve the biological control of *Agrobacterium tumefaciens* or other plant pathogens.

壹、前言

一、研究動機

在田間中，時常會觀察到植物的不同部位長有腫瘤，其中有些是被植物病原菌—根癌農桿菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 感染後形成的。經查閱研究報導後，發現一種特殊的生物防治方法可對抗此病原菌，它是藉由另一種非致病性的細菌抑制根癌農桿菌的生長，進而達到預防病害的效果。得知此事的我們深感好奇，便深入查詢根癌農桿菌的相關問題。

在前人的實驗結果中，觀察到在番茄土壤接種根癌農桿菌的致病率並不是百分之百。因此，我們推測番茄根圈裡可能存在能抑制根癌農桿菌的細菌，進而設計一系列實驗測試番茄根圈分離株是否有能用於對抗植物癌腫病的潛力。目前用以對抗根癌農桿菌的生物防治菌株不多，且有抑制能力的菌株也並不能防範所有的致瘤性農桿菌，故希望藉由本研究，我們能找防治植物癌腫病的新菌株。

二、目的

- (一)、分離並分析番茄根圈細菌是否能抑制根癌農桿菌生長。
- (二)、比較根圈分離株與生物防治菌 K84、K1026 對不同農桿菌之抑制效果。
- (三)、進行 16S 核糖體核酸(ribosomal RNA)基因定序鑑定具抑菌力之分離株。
- (四)、接種具抑菌力之分離株於番茄莖、根部，觀察在植物上的生物防治效果。
- (五)、分析根圈分離菌是否能對不同植物病原菌和非病原微生物有抑制效果。
- (六)、分析抑菌因子的特性並試著探討抑菌機制。

三、文獻回顧

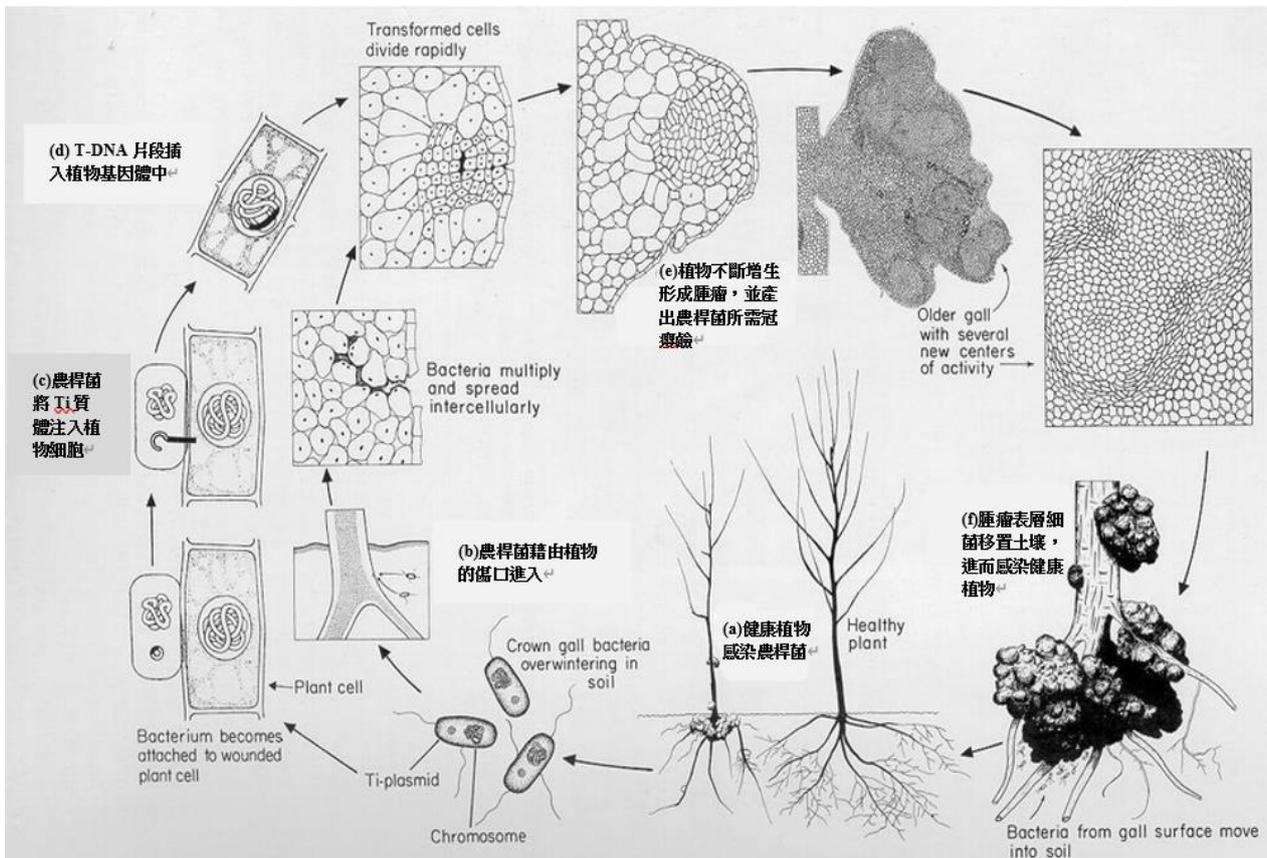
(一) 農桿菌 *Agrobacterium* 與癌腫病 (crown gall disease)

農桿菌是一種普遍存活在土壤中的好氧革蘭氏陰性菌 (Gram-negative bacteria)，藉由植物莖或根部之傷口，將一段位於一巨大質體 (Tumor-inducing plasmid, Ti plasmid) 上的特定 DNA 片段 (transferred DNA, T-DNA) 轉移入植物細胞進而插入植物的基因體內。由於此 T-DNA 片段含有合成植物生長素和細胞分裂素的基因 (Hooykaas and Beijersbergen, 1994)，因此造成被感染的植物細胞開始不正常分裂、增生，進而形成冠瘿瘤，稱為癌腫病 (crown gall disease) (Smith and Townsend, 1907) (圖一)。

農桿菌除了常見的根癌農桿菌 *A. tumefaciens* (Smith and Townsend, 1907)，主要會感染雙子葉植物的根莖部產生冠瘿瘤外，還有其他種農桿菌能感染不同種的植物或部位，並形成各式的冠瘿瘤，例如：*Agrobacterium vitis* 能感染葡萄藤莖部造成冠瘿瘤 (Burr and Otten,

1999)、*Agrobacterium rhizogenes* 能感染植物根系造成毛根病 (hairy root disease) (Chilton et al., 1982) 等。

對於已生成的冠瘿瘤，目前無有效的根治方法，治療方法為挖除瘤後再塗上藥劑，並薰蒸土壤殺死病原菌，但植物生長勢終究會受損。而常見的預防手段與一般植物細菌性病害相同，例如：落實清園、健康種苗、減少修枝（傷口）等。



▲圖一、農桿菌病害環

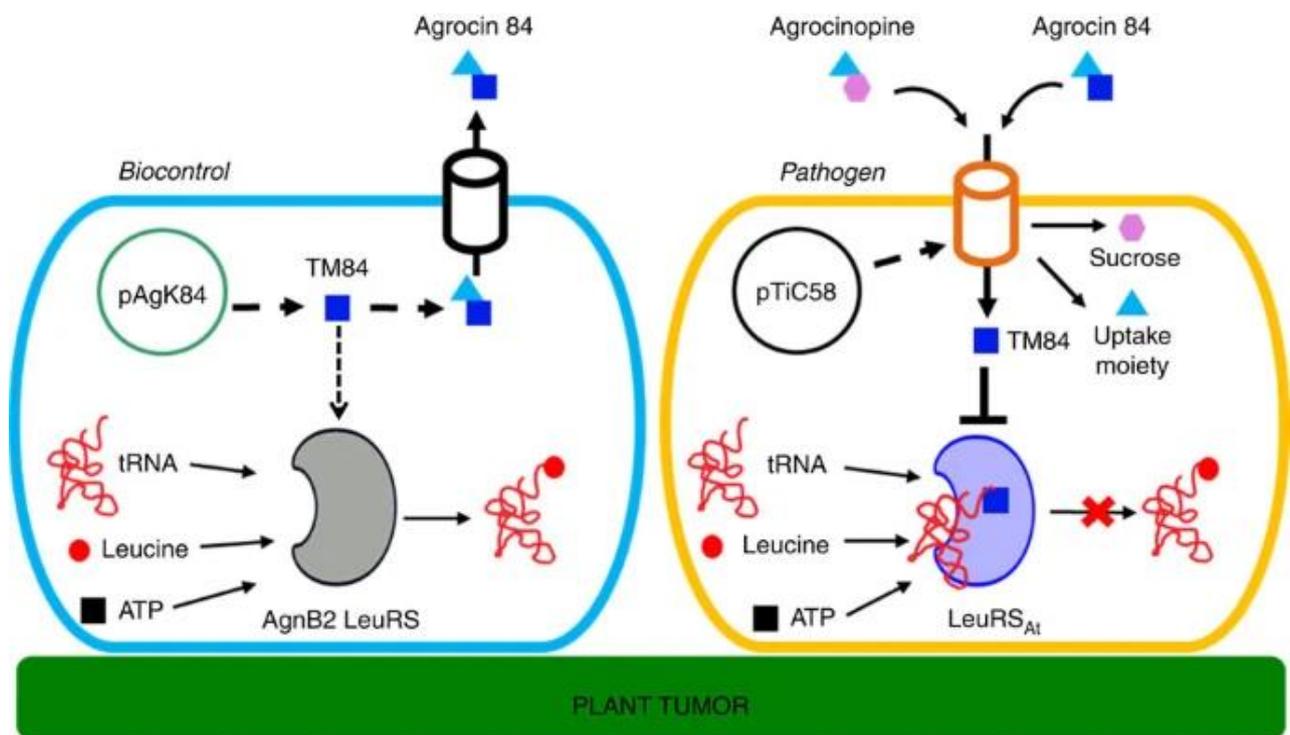
(Agrios, Plant Pathology, 5th edition, 2004)

(二) 生物防治 (biological control)

生物防治是病蟲害防治的一種方法，利用其他生物的自然機制減緩野草和病蟲害對植物或環境等形成的傷害。

非致瘤性農桿菌 *Agrobacterium radiobacter* 菌株 K84 和 K1026 為預防冠瘿瘤的生物防治菌 (Kerr and Htay, 1974; Jones and Kerr, 1988)，其中 K84 菌株是世界上第一個對植物病害商品化的生物防治菌 (Kerr, 1973)。K84 含有能產生農桿菌素(Agrocin 84)，使 K84 可以有效抑制致瘤性農桿菌生長 (Kerr and Tate, 1984; Roberts et al., 1977; Chopra et al., 2016) (圖二)。但是到 1970 年代後期，發現致瘤性農桿菌藉由細菌接合作用 (conjugation)，從 K84

獲得含有會抑制 Agrocine 84 的同源免疫基因的質粒 pAgK84，因而對 K84 產生抗性。因此，Jones 博士（1987）將 K84 中與細菌接合作用相關的基因突變，並篩選出 K1026。迄今，K84 和 K1026 仍是為預防植物癌腫病的主要生物防治菌。



▲圖二、生物防治菌 *A. radiobacter* K84 產生的農桿菌素 84 機制

生物防治菌體內有 K84 質體（pAgK84）能產生農桿菌素（TM84），和蛋白承載體（uptake moiety）合成農桿菌鹼（agrocine 84），再分泌至細胞外。農桿菌鹼和冠瘿鹼（agrocinopine）的蛋白承載體相似，因此被致瘤菌吸收到體內，而農桿菌素會與白胺酸（leucine）競爭，抑制 tRNA^{Leu} 的氨酰化。

(Chopra et al., 2016)

貳、研究方法或過程

一、研究設備及器材

(一)、研究生物

番茄（農友 301）、農桿菌（表一）

▼表一、農桿菌種類

EML#	名稱	物種	Genome species	寄主	冠瘿鹼類型
530	C58	<i>A. tumefaciens</i>	G8	櫻桃李	nopaline
4130	K84	<i>A. tumefaciens</i>	A		未知
4	EML4	<i>A. tumefaciens</i>	G4		nopaline
5	Ach5	<i>A. tumefaciens</i>	G1		octopine
302	1D1108	<i>A. tumefaciens</i>	G1	衛矛	nopaline
303	1D1460	<i>A. tumefaciens</i>	G4	聖克魯斯的覆盆子藤 (或甘蔗)	nopaline
304	1D1609	<i>A. tumefaciens</i>	G7	苜蓿	octopine
305	1D132	<i>A. tumefaciens</i>	G8	櫻桃	nopaline
459	15955	<i>A. tumefaciens</i>	G1	番茄	agropine
461	Chry5	<i>A. tumefaciens</i>	G1	菊花	chrysopine
470	CG412	<i>A. vitis</i>	未知		未知
471	CG678	<i>A. vitis</i>	未知		未知
473	CG49	<i>A. vitis</i>	未知		未知
474	CG78	<i>A. vitis</i>	未知	葡萄	vitopine
477	CG475	<i>A. vitis</i>	未知		未知
492	A4	<i>A. rhizogenes</i>	未知	玫瑰	Agropine、mannopine
460	A8196	<i>A. rhizogenes</i>	G8	蘋果	mannopine

(二)、實驗器材

1.根圈細菌分離實驗：塑膠試管、研鉢、杵、震盪機(Branson 1510-DTH)、培養皿(9公分)。

2.抑制圈實驗：玻璃試管、培養箱、無菌操作台、離心機、微量分注器、培養皿、酒精燈、分光光度計、噴頭、玻璃噴瓶。

3.定序：核酸增幅機、電泳槽、智慧型電泳照膠分析系統、離心機、電腦。

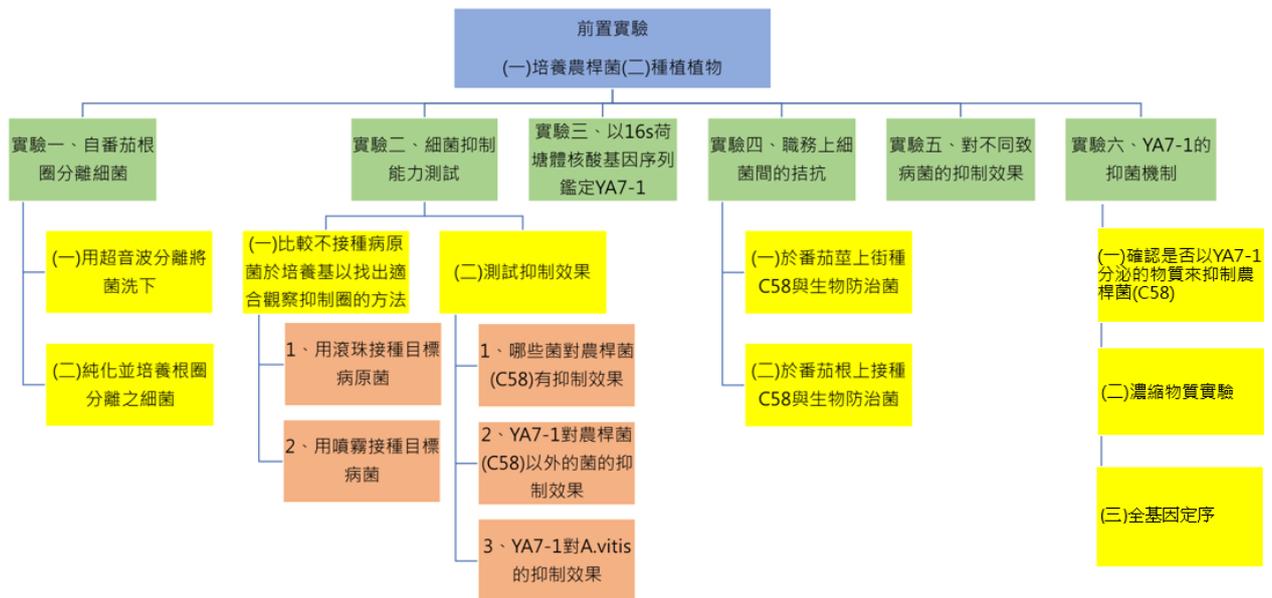
4.植物接種試驗：盆栽、泥炭土、蛭石、珍珠石、植物生長箱、針、微量分注器、玻璃試管、酒精燈。

(三)、培養基的配方 (表二)

▼表二、培養基種類和成分

523	NA	YMA
pH = 7.0	pH = 7.0 ^u	pH = 7.0
10g sucrose	5g peptone	10g mannitol
8g casein	5g NaCl	0.5g K ₂ HPO ₄
4g yeast extract	3g yeast extract	0.4g yeast extract
3g K ₂ HPO ₄	15g agar	0.2g MgSO ₄
0.3g MgSO ₄		0.1g NaCl
15g agar		15g Agar

二、研究過程



▲圖三、實驗規劃流程圖

(一)前置步驟

1.培養農桿菌

在溫度 25°C 下，將農桿菌接種到 523 培養基，培養 16 小時。

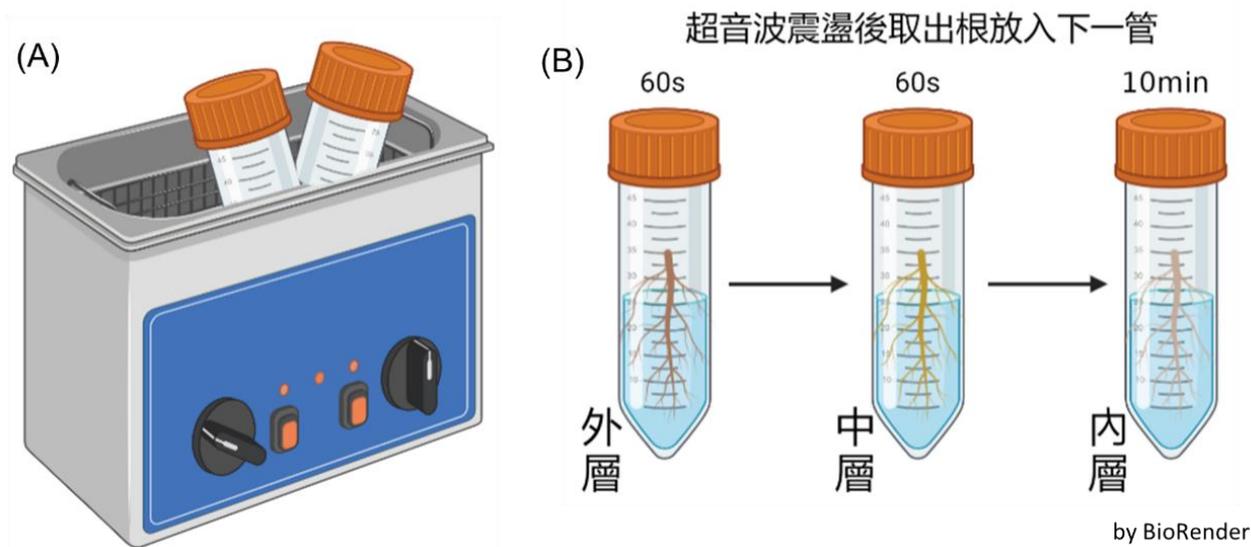
2. 番茄種植

將泥炭土、蛭石、珍珠石分別以 4:1:1 均勻混和，分裝在盆栽中，並均勻種下番茄種子。將盆栽置於 25°C 的植物生長箱中，生長兩星期，待幼苗發芽並長出第一對真葉。

(二) 分離番茄根圈細菌

1. 超音波震盪分離細菌

首先，將二株健康的番茄植株拔出，簡單清除根系中鬆散的土壤後，放入超音波震盪儀（40 千赫茲／每分鐘）震盪三次，並分次將根周圍的土取出（分別為內層、中層、外層），最後加入漂白水去除根圈菌，並將洗乾淨的根搗成泥，同時分離番茄之內生菌（White et al., 2015）。將這四種樣品以 0.9% 食鹽水進行序列稀釋，取 10^{-3} ~ 10^{-5} 各 100 μL 塗佈於 NA 固態培養基上，放入 25°C 恆溫生長培養箱，培養兩天。



▲圖四、(A)超音波震盪示意圖 (B)流程圖

2. 純化培養根圈分離菌株

將顏色、形狀、大小不同的菌分別挑出，為避免分菌過程汙染而非單一菌落，故用四區畫線法於 523 固態培養基上，再放入 25°C 恆溫生長培養箱，培養兩天，再觀察確認其型態是否為單一菌株。

(三)細菌抑制能力測試

1.比較不同的接種方式找出適合觀察抑制圈的方法

觀查待測菌周圍是否有長出目標病原菌，假如出現透光之抑制圈代表目標病原菌沒有生長，該待測菌株有抑制力，如圖五；假如有代表沒抑制力，如圖六。

(1)細菌培養

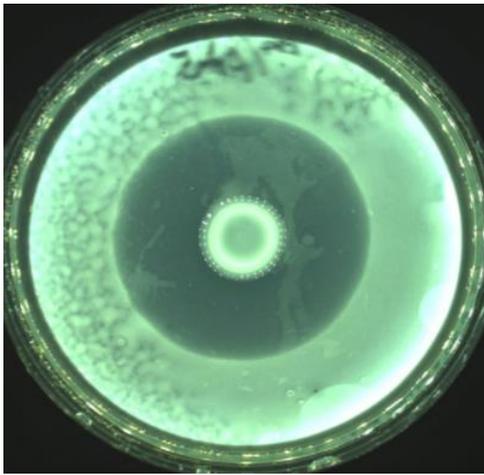
取 C58 與所有根圈分離株的單一菌落，培養於 20 ml NA 液態培養基，在 25°C 恆溫震盪生長培養箱培養至隔天。

(2)玻璃珠接種抑菌圈實驗—同時共培養待測菌株及農桿菌 C58

將隔夜培養之 C58 菌液濃度調整成 $OD_{600}=1$ ，取 100 μ L 滴在 YMA 固態培養基中央，加入玻璃珠後並搖晃塗佈均勻，倒出玻璃珠等菌液乾後，再將待測的根圈分離菌株滴在中央晾乾，放置 25°C 恆溫生長培養箱兩天，觀察有無抑制圈。

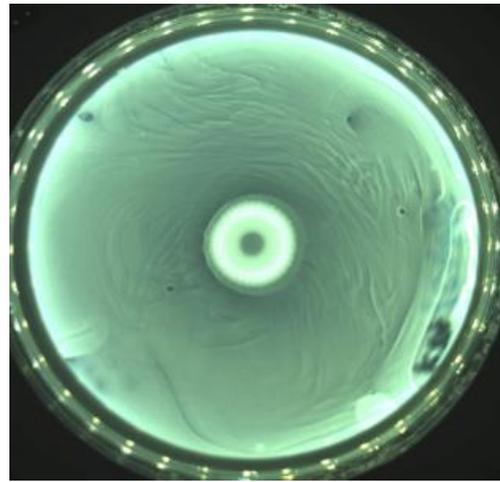
(3)噴霧接種抑菌圈實驗—噴霧接種 C58 和其它農桿菌於已培養測菌株之培養基

取 20 μ L 根圈分離株菌液滴在 YMA 固態培養基中央，於 25°C 恆溫生長培養箱中培養兩天。次日，以 NA 液態培養基於 25°C 隔夜培養 C58 和其它農桿菌。第三日，再將 C58 和其它農桿菌以 0.9% 食鹽水離心 16000 轉、10 分鐘，清洗掉培養基，並配置成 $OD_{600}=0.8$ 、30c.c. 的菌液，倒入玻璃噴瓶中，均勻噴灑在上已長有分離株之 YMA 固態培養基上，放置於 25°C 恆溫生長培養箱，兩天後觀察有無抑制圈。



▲圖五、有抑制效果的圖像

中央是生物防治菌 K84，周圍是農桿菌 Ach5，圖五。



▲圖六、無抑制效果的圖像

中央是生物防治菌 K84，周圍是農桿菌 CG475，圖六。

中央是生物

2.細菌抑制能力測試

(1)哪些分離菌對農桿菌(C58)有抑制效果

用噴霧接種抑菌圈實驗之方式，將待測菌滴在培養基中央，接著配製 15c.c. 的溶液（內含農桿菌 C58）， $OD_{600}=0.8$ ，將此溶液倒入噴瓶中，均勻噴灑在已長有分離株之 YMA 固態培養基上，放置一星期，紀錄哪些分離菌對農桿菌(C58) 有抑制效果。

(2)YA7-1 對農桿菌(C58)以外的菌的抑制效果

從實驗(一)發現 YA7-1 有抑制農桿菌(C58)的效果，將 YA7-1、K84、K1026(現有的防治菌)滴在培養基中央，接著配製 15c.c.的溶液（共 14 組，除了表一的 CG412、CG49、CG78，其他都有）， $OD_{600}=0.8$ ，將此溶液倒入噴瓶中，均勻噴灑在已長有分離株之 YMA 固態培養基上，放置一星期並紀錄抑制圈大小。

(3)YA7-1 對 vitis 的抑制效果

從實驗(二)發現 YA7-1 有抑制 *A. vitis* 的效果，將 YA7-1 滴在培養基中央，接著配製 15c.c.的溶液（共五組，表一中的 CG 全）， $OD_{600}=0.8$ ，將此溶液倒入噴瓶中，均勻噴灑在已長有分離株之 YMA 固態培養基上，放置一星期並紀錄抑制圈大小。

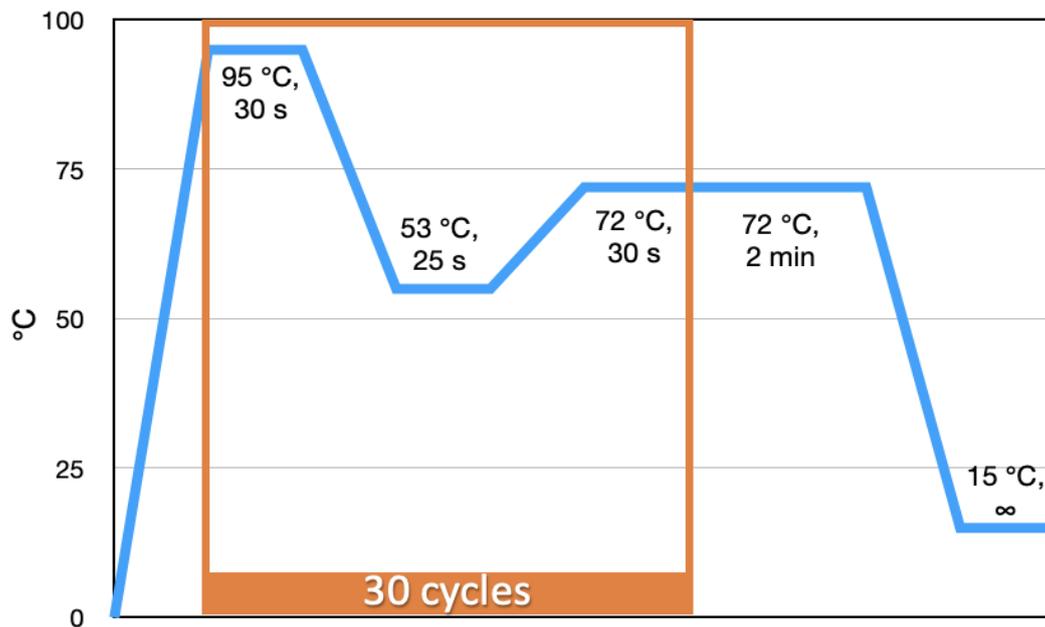
(四)以 16S 核糖體核酸基因序列鑑定 YA7-1

1. 聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)

以 YA7-1 之單一菌落為模板進行聚合酶連鎖反應，利用引子對 (如表三) 分別以聚合酶連鎖反應增幅 16S 核糖體核酸基因之可變區 V1-V3, V3-V5 及 V5-V8 片段。使用之 DNA 聚合酶為試劑為 2X SuperRed PCR Master Mix (圖爾思, 台灣), 反應溶液設置為 12.5 μ L Master Mix、相對應之 10 μ M 引子各 0.5 μ L、11.5 μ L 無菌二次水。熱循環條件設定為起始 95 $^{\circ}$ C 破壞細胞 5 分鐘, 95 $^{\circ}$ C DNA 變性 (denature) 30 秒, 53 $^{\circ}$ C 煉合 (anneal) 25 秒, 72 $^{\circ}$ C DNA 延長 (extend) 30 秒, 重複變性-煉合-延長步驟三十個循環, 再進行 72 $^{\circ}$ C DNA 合成 2 分鐘。增幅片段經 DNA 純化 (GenepHlow Gel/PCR kit, 旭基, 台灣), 每一反應回溶於 20 μ L 無菌二次水中, 如圖七。

▼表三、增幅大小、引子序列

16S rRNA 區域 [Ⓔ]	引子名字 [Ⓔ]	引子序列 [Ⓔ]	增幅長度 (bp) [Ⓔ]
V1-V3 [Ⓔ]	27F ~ 518R [Ⓔ]	5' -AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' [Ⓔ] 5' -WTT ACC GCG GCT <u>GCT</u> GG-3' [Ⓔ]	491 [Ⓔ]
V3-V5 [Ⓔ]	341F ~ 688R [Ⓔ]	5' -CCT ACG GGN GGC WGC AG-3' [Ⓔ] 5' -CGC TTT CGH DCC TCA GYG TCA-3' [Ⓔ]	347 [Ⓔ]
V5-V8 [Ⓔ]	819F ~ 1391R [Ⓔ]	5' -GTC CAC VCC STA AAC GWT G-3' [Ⓔ] 5' -ACG TCA TCC CCA CCT TCC-3' [Ⓔ]	572 [Ⓔ]



▲圖七、聚合酶連鎖反應示意圖

2. 16S 核糖體核糖核酸基因片段定序

以 Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, 威斯康辛, 美國) 按照萃取細菌之流程純化, 將純化後之 10 μ L DNA 溶液加入 2 μ L 相對應的 10 μ M 單方向引子, 送至中研院植物暨微生物學研究所核酸分析實驗室進行定序。定序後之短片段序列利用 Benchling (<https://benchling.com>) 軟體合併成長片段的序列, 以該長片段序列於美國國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 之 16S ribosomal RNA (Bacteria and Archaea type strains) 資料庫進行比對, 鑑定出該分離株之物種。

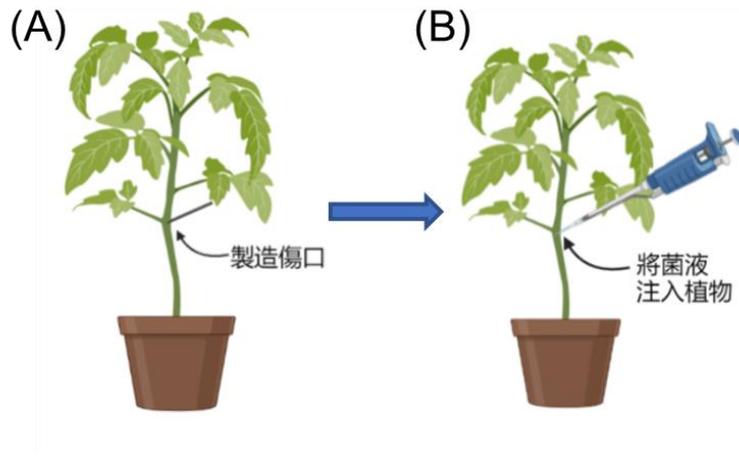
(五) 番茄根莖上細菌間拮抗的分析

1. 番茄種植

將泥炭土、蛭石、珍珠石分別以 4 : 1 : 1 均勻混和, 分裝在盆栽中, 並均勻種下番茄種子。將盆栽置於 25°C 的植物生長箱中, 生長一個月 (光週期 12 小時, 一般日光燈)。

2.混合接種 YA7-1 和 C58 於番茄莖部

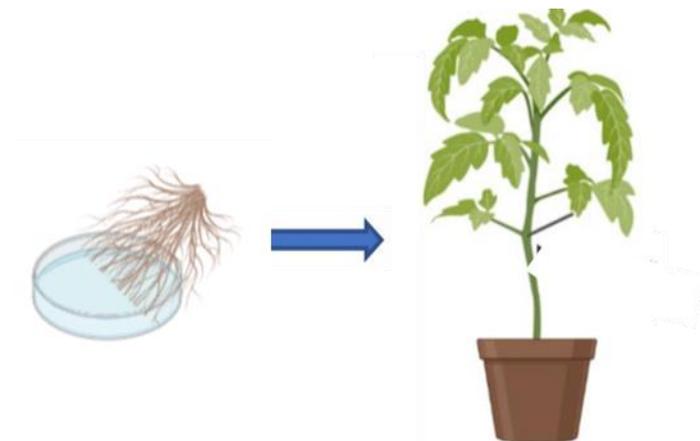
以酒精燈高溫滅菌過的針，在兩片子葉中間的莖上製造傷口，分別將 $OD_{600}=1$ 的單一或混合菌液和 0.9%食鹽水（對照組） $10 \mu\text{l}$ 接種在傷口上。最後將接種過後的番茄植株放入精密溫室培養兩周（圖八）。



▲圖八、番茄莖上接種示意圖

3.接種 YA7-1 於番茄根部並種在含 C58 土壤中

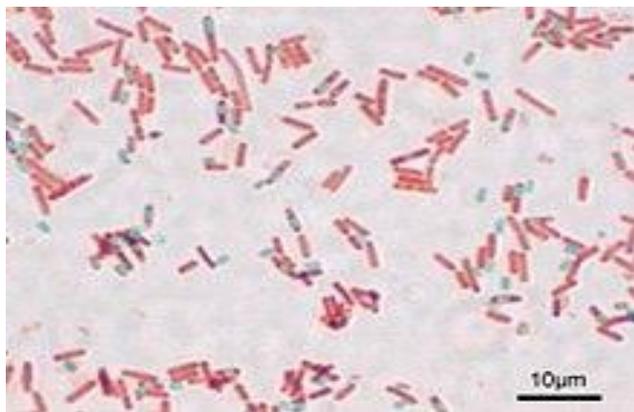
用剪刀在番茄根部製造傷口，分別把番茄的根泡入 YA7-1 菌液和 0.9%食鹽水 10 分鐘，再分別平分成兩組，移植到一般土壤和含 C58 的土壤（約 10^6 菌數），共四組（有 YA7-1、只有食鹽水、YA7-1 和 C58 混合、食鹽水和 C58 混合），每組十重複，再放入精密溫室培養一個月（圖九）。



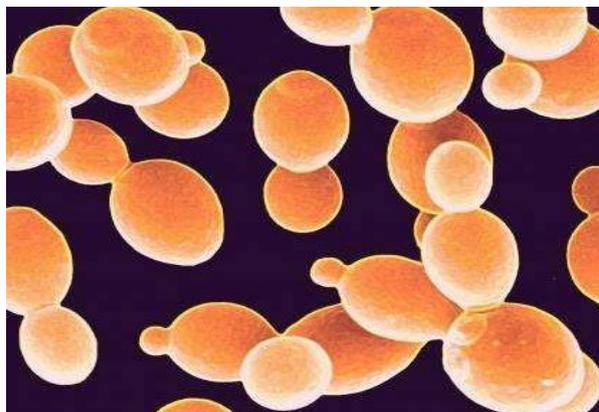
▲圖九、番茄根上接種示意圖

(六) 對不同植物病原菌和非病原微生物的抑制效果

用噴霧接種抑菌圈實驗之方式，將待測菌(YA7-1)滴在培養基中央，接著配製 15c.c.的溶液，內含農桿菌 C58(對照組)、枯草桿菌 (*Bacillus subtilis* 268)、番茄葉斑病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)、水稻白葉枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)、酒釀酵母 (yeast)、馬鈴薯軟腐病菌 (*Dickeya dadantii* 3937)，如圖九，OD₆₀₀=0.8，將此溶液倒入噴瓶中，均勻噴灑在已長有分離株之 YMA 固態培養基上，放置兩天，紀錄帶測菌對哪些致病菌有抑制效果。



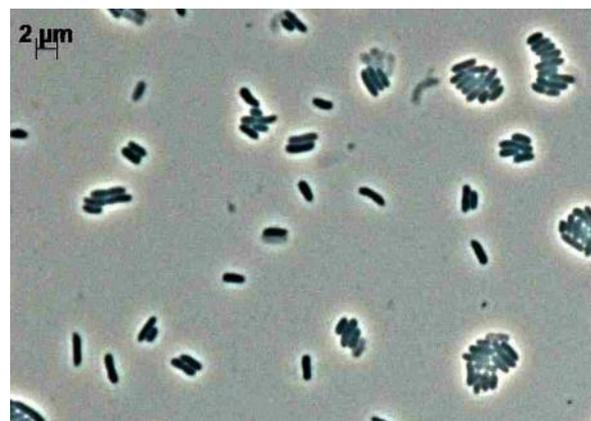
枯草桿菌，革蘭氏陽性



酵母菌，真菌安全性的有益微生物



水稻白葉枯病菌 革蘭氏陰性桿菌



馬鈴薯軟腐病菌革蘭氏陰性病原菌

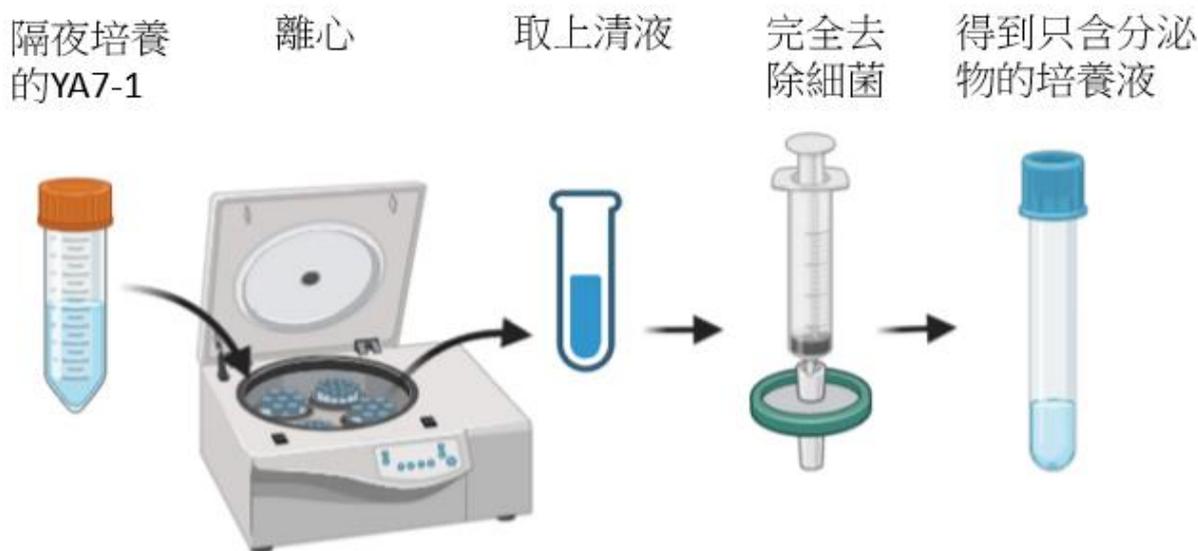
圖十、植物病原菌和非病原微生物的介紹

(七)YA7-1 的抑制機制

1. 分析 YA7-1 的抑制因子是否為分泌物質

將隔夜培養(YMA 液態培養)的 YA7-1 離心，分離細菌，取出上清液後，用 0.22 微米濾膜過濾，完全清除上清液內所含細菌。將 YMA 培養基打洞，並把無菌上清液體滴在洞中，等到培養基完全吸收後，再將 C58 配成 OD₆₀₀=0.8 後裝入噴

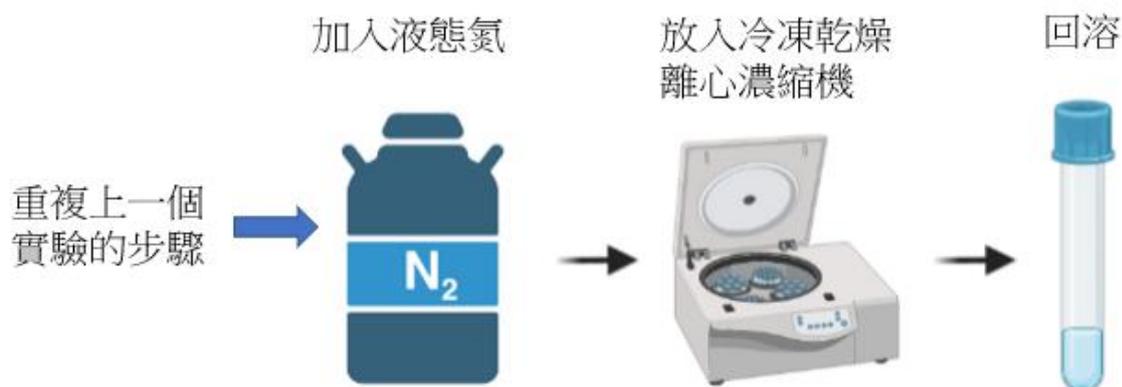
瓶，均勻噴灑在該培養基中，放置兩天並紀錄抑制圈大小。



圖十一、分析 YA7-1 的抑制因子是否為分泌物質的實驗示意圖

2.濃縮物質實驗

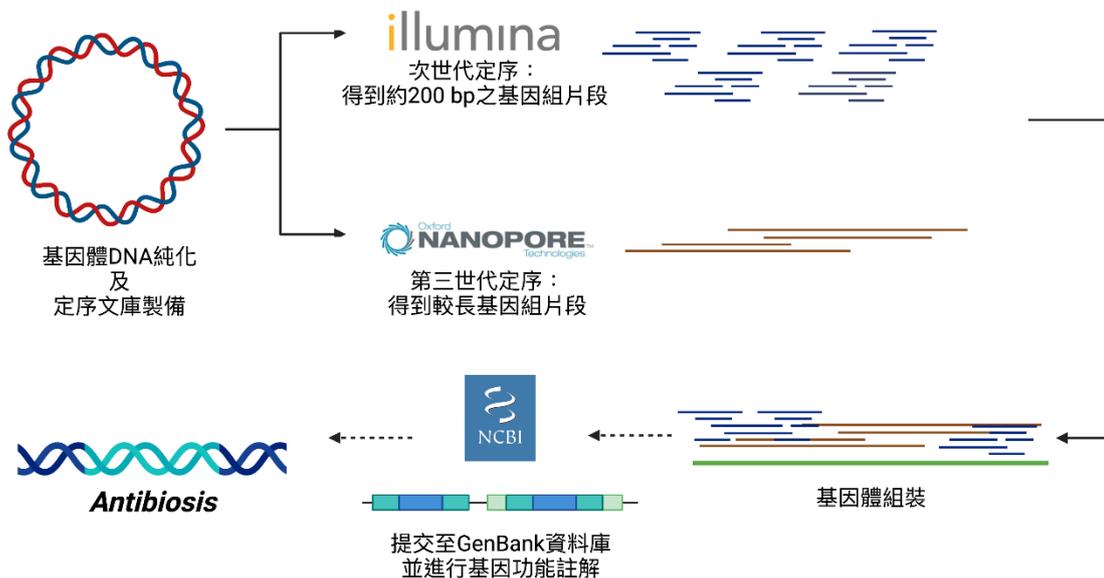
將培養三天(YMA 液態培養)的 YA7-1 離心，分離細菌，取出上清液後，用 0.22 微米濾膜過濾，完全清除上清液內所含細菌。接著，把無菌上清液體分裝於蓋子有孔洞的 15 ml 離心管中，每管 10 ml，置於液態氮中冷凍，再放入冷凍乾燥離心濃縮機裡，低溫真空濃縮兩天，避免物質變質。待管內液體成乾燥固體或粉末狀，取出離心管，並以不同體積 YMA 培養液（100 μ l、500 μ l、1000 μ l）回溶，再個別點在 YMA 固態培養基上，待培養基吸收後，再將 C58 配成 OD₆₀₀=0.8 後裝入噴瓶，均勻噴灑在該培養基中，放置兩天並紀錄抑制圈大小。



圖十二、濃縮物質實驗示意圖

3. YA7-1 的全基因體 DNA 純化及定序

全基因抽取採用 Wizard® Genomic DNA Purification Kit 並參照其實驗流程，簡述如下：取 1 ml 隔夜培養於 Nutrient broth (NB) 中的 YA7-1 菌液以 16,000 g 離心 2 分鐘。去除上清液後以 480 μ l 50 mM EDTA 回溶，再加入 120 μ l 溶菌酶 (lysozyme, 1 mg/ml) 於 37°C 培養箱放置 30 分鐘。以 16,000 g 離心後取上清液加入 600 μ l 細胞核裂解溶液 (Nucleic lysis buffer)，以倒轉離心管方式混勻，再放入 80°C 乾浴槽靜置 5 分鐘。恢復室溫後加入 3 μ l RNase 溶液混勻，於 37°C 靜置 15 分鐘。加入 200 μ l 蛋白質沈澱溶液 (protein precipitation buffer)，混勻後置於冰上 5 分鐘，再以 16,000 g 離心 3 分鐘。離心後將上清液加入到 600 μ l 常溫異丙醇中析出核酸，混勻後以 16,000 g 離心 2 分鐘，去除上清液後加入 600 μ l 70% 乙醇清洗析出沈澱物，再以 16,000 g 離心 2 分鐘後移除上清液。於室溫乾燥沈澱物 10 分鐘，再以 100 μ l 10 mM Tris-HCl 回溶。回溶之 DNA 溶液以 Nanodrop 測定濃度後，交由基因體學技術核心實驗室進行定序文庫建立及定序，此次定序的平台為 Illumina 及 Oxford Nanopore Technologies.



▲圖十三、全基因體定序流程及目前進度。

參、研究結果與討論

一、自番茄根圈分離細菌

番茄根圈之土壤溶液經由序列稀釋及塗布於 523 培養基培養兩天後觀察菌落。我們未能於塗布 10^{-4} 及 10^{-5} 稀釋液的培養基中觀察到菌落，僅 10^{-3} 稀釋液塗布之培養基上有菌落生成。因此，我們於這些培養基上挑選單一菌落，再以畫線平板的方式繼代於 523 培養基上。我們自兩株番茄的根圈土壤中各分離了 13 個單一菌落，其菌株命名、菌落型態等如表四、表

五、圖十四及圖十五所示。

▼表四、HS 系列菌株之資訊

土壤來源	菌株名	稀釋倍率	顏色	形狀
外層	HS1	10 ⁻³	黃	圓
	HS2-1	10 ⁻³	白	圓
	HS2-2	10 ⁻³	白	圓
	HS3	10 ⁻³	黃	圓
	HS4-1	10 ⁻³	白	圓
	HS4-2	10 ⁻³	白	圓
中層	HS7-1	10 ⁻³	黃	圓
	HS7-2	10 ⁻³	黃	圓
	HS8	10 ⁻³	白	圓
	HS9-1	10 ⁻³	白	圓
	HS9-2	10 ⁻³	白	圓
內層	HS5	10 ⁻³	白	圓
	HS6	10 ⁻³	白	圓

▲圖十四、HS 系列菌株之菌落型態。

▼表五、YA 系列菌株之資訊

土壤來源	菌株名	稀釋倍率	顏色	形狀
外層	YA1	10 ⁻⁴	黃	圓
	YA2-1	10 ⁻⁴	白	點狀
	YA2-2	10 ⁻⁴	白	點狀
	YA4-1	10 ⁻³	黃	圓
	YA4-2	10 ⁻³	黃	圓
	YA5	10 ⁻³	白	圓
	YA6-1	10 ⁻³	白	圓
	YA6-2	10 ⁻³	白	圓
中層	YA7-1	10 ⁻³	白	圓
	YA7-2	10 ⁻³	白	圓
	YA8	10 ⁻³	黃	圓
內層	YA3-1	10 ⁻⁴	白	點狀
	YA3-2	10 ⁻⁴	白	點狀

▲圖十五、YA 系列菌株之菌落型態。

二、比較不同接種病原菌於培養基的方式以找出適合觀察抑制圈的方法

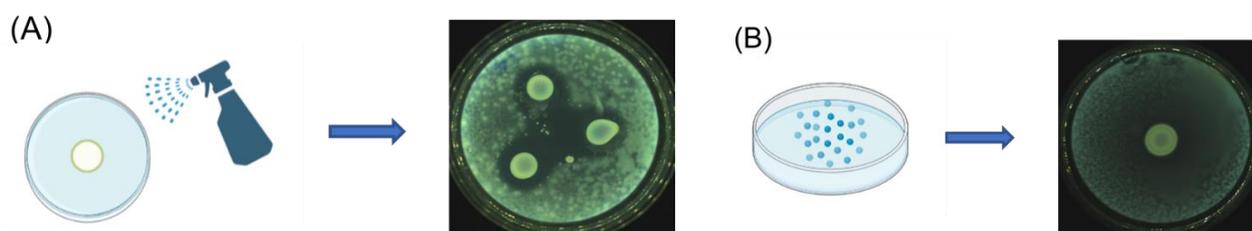
比較兩種觀察抑制圈的方法，以中間待測菌和周圍可看出明顯乾淨的抑制圈為目標。

(一)以噴霧進行接種

由圖三知，不但可看出中央有明顯的待測菌，也可看出周圍有明顯且乾淨的一圈抑制圈，故之後的實驗皆採用這種方式（圖十六 A）。

(二)以玻璃珠進行接種

雖可從中央看出明顯的待測菌及一小圈抑制圈，但無法看出周圍有明顯且乾淨的抑制圈，效果較差，故不採用來做後續的實驗（圖十六 B）。



▲圖十六、比較不同塗布方式對抑制圈觀察的影響。(A)用噴瓶噴灑；(B)用玻璃珠塗布

三、番茄根圈分離之菌株對農桿菌(*Agrobacterium*)抑制能力測試

(一) 番茄根圈分離之菌株對農桿菌 *Agrobacterium tumefaciens* C58 的抑制測試。

從在 YMA 培養基上所做的抑制圈實驗之結果可發現，只有從番茄根圈之中層所分離之菌株 YA7-1，有抑制農桿菌 *A. tumefaciens* C58 生長的效果，而其他有檢測的菌株對農桿菌 *A. tumefaciens* C58 皆無抑制效果（表六）。由此實驗結果，我們得知 YA7-1 是具有生物防治潛力的菌株。

▼表六、自番茄根圈分離之菌株對農桿菌 (*A. tumefaciens* C58) 的抑制效果

土壤來源	菌株名	抑菌結果	土壤來源	菌株名	抑菌結果
外層	YA1	-	外層	HS1	-
	YA2-1	未檢測		HS2-1	-
	YA2-2	未檢測		HS2-2	-
	YA4-1	-		HS3	-
	YA4-2	-		HS4-1	-
	YA5	-		HS4-2	-
	YA6-1	-		HS7-1	-
	YA6-2	-		HS7-2	-
中層	YA7-1	+	中層	HS8	-
	YA7-2	-		HS9-1	-
	YA8	-		HS9-2	-
內層	YA3-1	未檢測	內層	HS5	未檢測
	YA3-2	未檢測		HS6	-

+ : 有抑制圈產生 - : 無抑制圈產生 未檢測 : 無法在培養基上生長

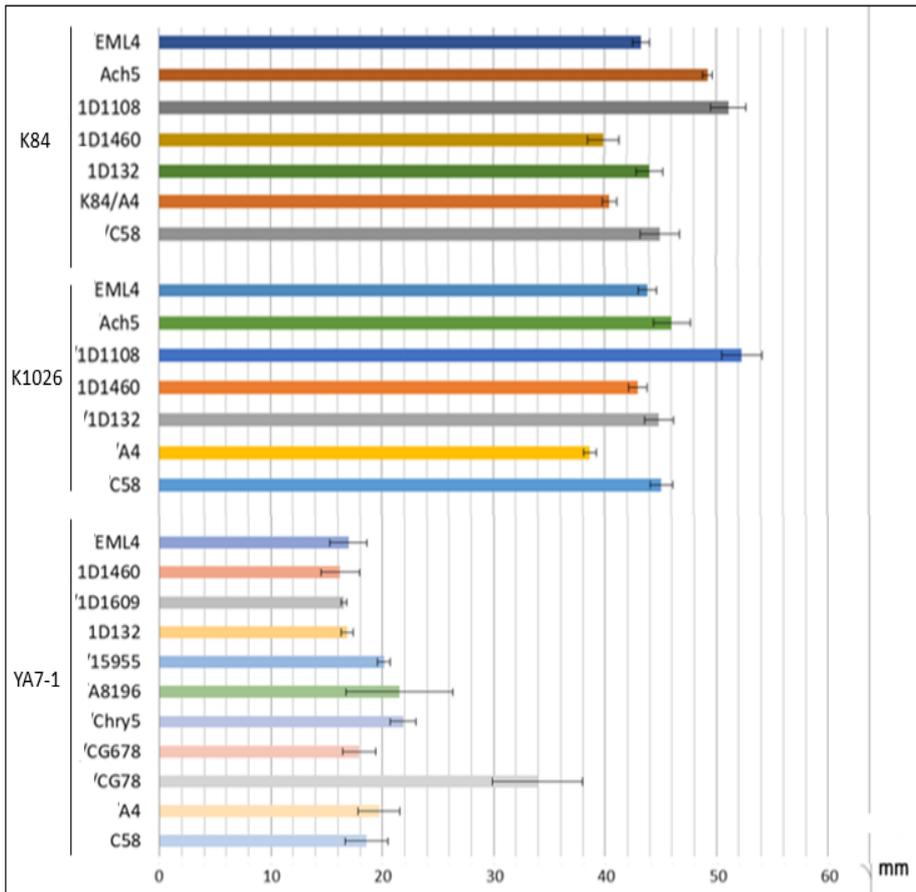
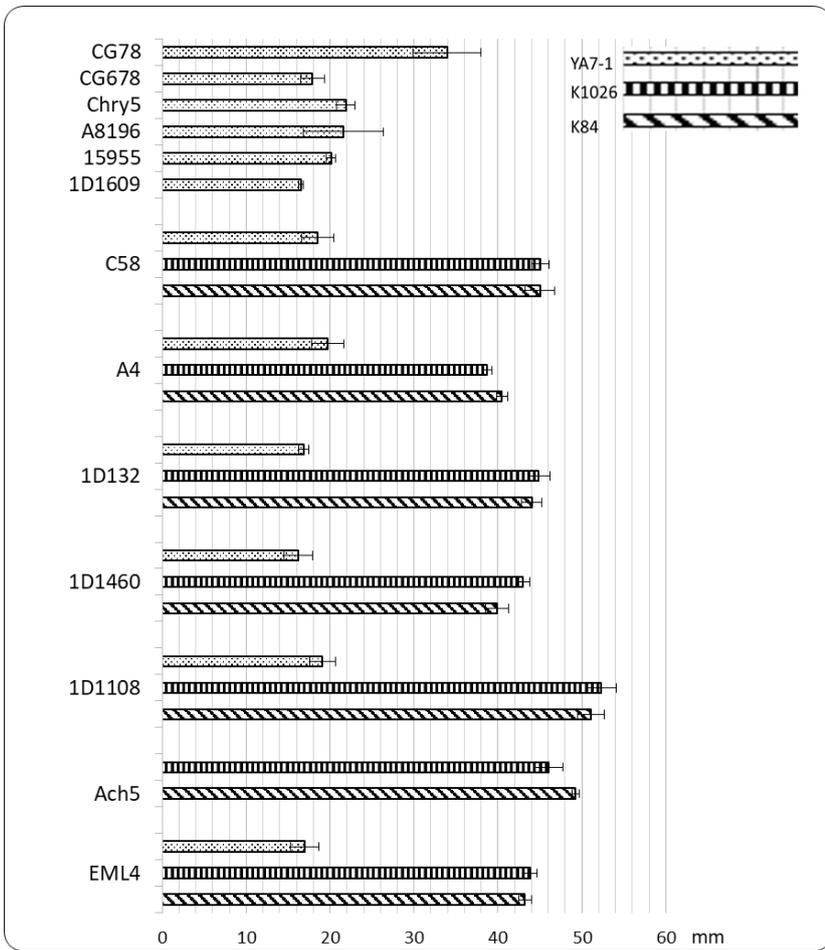
(二) YA7-1 對其他農桿菌屬的病原菌之抑制效果

我們進一步測試 YA7-1 對 C58 以外的農桿菌之抑制效果。在此實驗中，我們一樣用 YMA 培養基做抑制圈實驗，測試 YA7-1 其對其他 13 株具致病性的農桿菌菌株(包含 *A. tumefaciens*, *A. vitis*、*A. rhizogones*)，發現除了 Ach5 以外，YA7-1 對其他所測試的農桿菌菌株同樣也有抑制效果。將 YA7-1 與現有的生物防治菌株 K84、K1026 比較，可得知 YA7-1 可抑制的農桿菌菌株比 K84 及 K1026 多，且可以抑制 *A. vitis*、*A. rhizogones* 等不同種之致病性農桿菌的生長，說明其具有更廣泛的抑菌對象，具有應用於防治不同致病菌株造成的癌腫或根毛病的潛力 (表七)。透過自動影像分析菌落計數儀來測量抑制圈的直徑大小，將數次抑制圈結果統計後，可發現 YA7-1 的抑制圈直徑大小較 K84、K1026 小了兩倍，因此相較於 K84、K1026 而言，YA7-1 對於農桿菌菌株的抑制效果較弱，但具有更廣範圍的抑制對象 (圖十七)。

▼表七、YA7-1 與已知生物防治菌株 K84 及 K1026 對不同農桿菌的抑制效果

物種	菌株名	K84	K1026	YA7-1
<i>A.tumefaciens</i>	EML4	+	+	+
	Ach5	+	+	-
	1D1108	+	+	+
	1D1460	+	+	+
	1D1609	-	-	+
	1D132	+	+	+
	15955	-	-	+
	C58	+	+	+
	Chry5	-	-	+
<i>A.vitis</i>	CG678	-	-	+
	CG78	-	-	+
<i>A.rhizogenes</i>	A4	+	+	+
	A8196	-	-	+

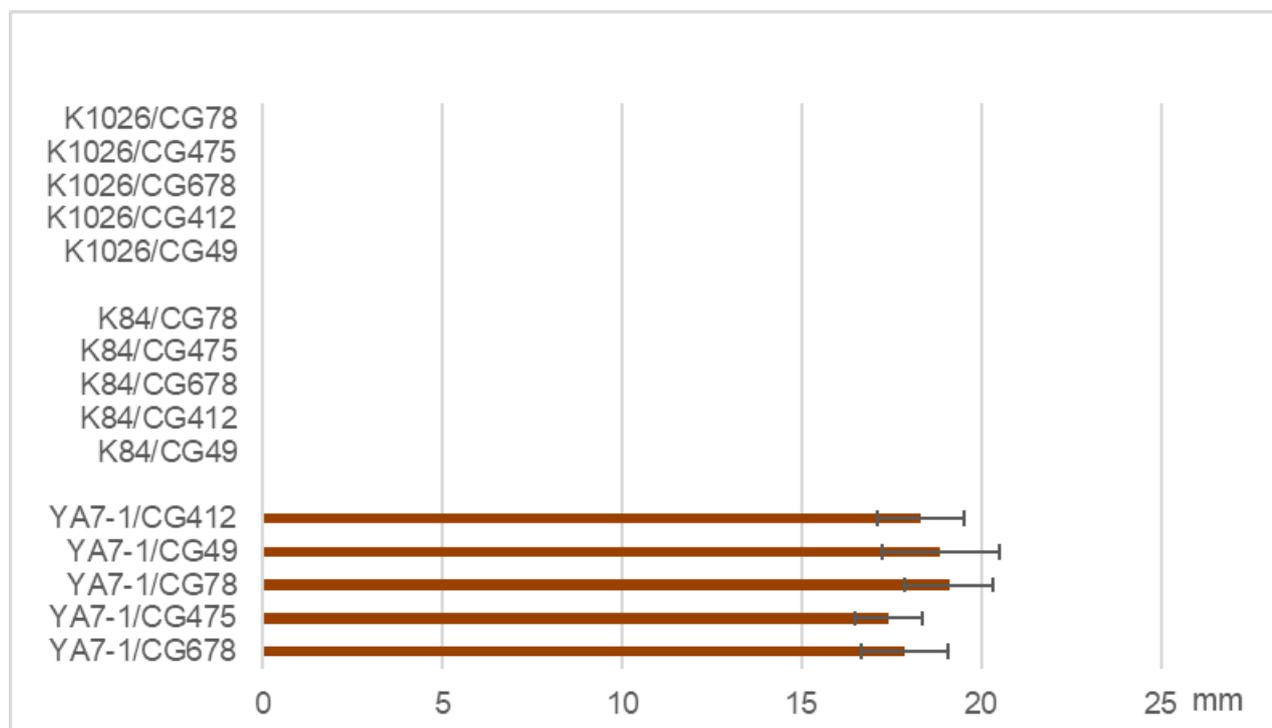
+ :有抑制圈產生 - :無抑制圈產生



▲圖十七、不同抑制菌對不同農桿菌菌株所造成之抑制圈直徑。(提供兩種比較方式)

(三) YA7-1 對 *A. vitis* 的抑制效果

YA7-1 對不同的致病性農桿菌 *A. vitis* 菌株均具有一定的抑制效果，而 K84 及 K1026 則沒有（圖十八）。



▲圖十八、YA7-1 對 *A. vitis* 所造成之抑制圈直徑。(K84 與 K1026 對 CG 系列無抑制效果)

四、以 16S 核糖體核酸基因序列鑑定 YA7-1

經由針對 16S 核糖體核酸基因之引子增幅 V1-V3，V3-V5 及 V5-V7 片段後，再定序增幅片段並組合成含 V1-V7 之部分核糖體核酸基因序列，長度為 1,300 bps。以該片段與美國國家生物技術資訊中心（NCBI, National Center for Biotechnology Information）之 16S ribosomal RNA（Bacteria and Archaea type strains）資料庫進行比對，得到的最高相似度的物種為 *Arthrobacter ramosus* strain CCM 1646 16S ribosomal RNA, partial sequence（NR_114963.1），比對之相似度（identity）為 97.73%，故 YA7-1 應為 *Arthrobacter* 屬細菌，為放線菌綱（Actinobacteria）、微球菌科（*Micrococcaceae*）之一屬。

五、植物上細菌間的拮抗造成的生物防治分析

(一) 測試 YA7-1 對於癌腫病發生的防治效果

我們分別將三株拮抗菌(YA7-1、K84、K1026)、不具拮抗力的 HS9-2 和 *A. tumefaciens* C58 進行單一菌株接種，以及混合拮抗菌與 C58 的菌液接種到番茄植物莖上，等待三週後將

番茄接種部位切下 1 公分，觀察不同實驗組在番茄上造成癌腫的能力（圖十九）。在接種 28 天後，接種只含 *A. tumefaciens* C58 的正對照組、C58 混合分離株 YA7-1 或 HS9-2 的植株罹病率為 100%，而接種 0.9%生理食鹽水（負對照組，NC）、單獨接種分離株 YA7-1 或 HS9-2、C58 混合 K84 或 K1026 者則為 0%（表八）。在罹病組織重量上，接種 K84/C58、K1026/C58 及單獨接種分離株 YA7-1 或 HS9-2 的平均重量分別為 135±22 mg、107±15 mg、128±19 mg、111±14 mg，其外觀、大小以及重量和接種生理食鹽水者相似，無腫瘤產生；而接種 YA7-1/C58、C58 的組織平均重量分別為 0.304±0.083 g、0.232±0.067 g（圖二十），接種 YA7-1/C58 的平均腫瘤重量甚至比與只接種 C58 的植株稍高，因此推斷 YA7-1 在莖上無抑制癌腫病發生的效果。

▼表八、接種 *A. tumefaciens* C58 與生物防治菌 21 天後番茄之罹病率

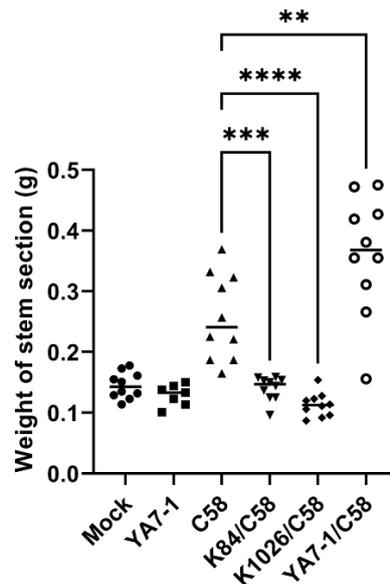
莖的接種罹病率		NC*	C58	YA	HS	K84/ C58	K1026/ C58	YA/ C58	HS/ C58
第一次		0%	100%	0%	0%	0%	0%	100%	100%
第二次		0%	100%	0%	0%	0%	0%	100%	100%

*: 0.9% NaCl



▲圖十九、接種 *A. tumefaciens* C58 與生物防治菌 21 天後番茄莖之型態。

NC：負對照組，為接種 0.9%生理食鹽水；C58：正對照組，為接種 *A. tumefaciens* C58；K84/C58：接種 K84 與 C58 混合菌液；K1026/C58：接種 K1026 與 C58 混合菌液；YA7-1/C58：接種 YA7-1 與 C58 混合菌液；HS9-2/C58：接種 HS9-2 與 C58 混合菌液。



▲圖二十、接種部位於接種 21 天後癌腫重量之比較。(以 ANOVA 統計分析, $p = 0.0018$ (**), 0.0005 (***) , < 0.0001 (****))

(A)、(B) 分別為兩次獨立實驗。NaCl, 負對照組, 接種 0.9%生理食鹽水; C58, *A. tumefaciens* C58; YA, YA7-1; K84/C58, 接種 K84 與 C58 混合菌液; K1026/C58, 接種 K1026 與 C58 混合菌液; YA/C58, 接種 YA7-1 與 C58 混合菌液。HS9-2 與 HS/C58(接種 HS9-2 與 C58 混合菌液)只是拿來當同次實驗從番茄根部取出細菌的對照組, 並不是本實驗重點, 故沒放入圖中。

(二) 先接種 YA7-1 於番茄根圈後觀察土壤接種農桿菌的致病情形

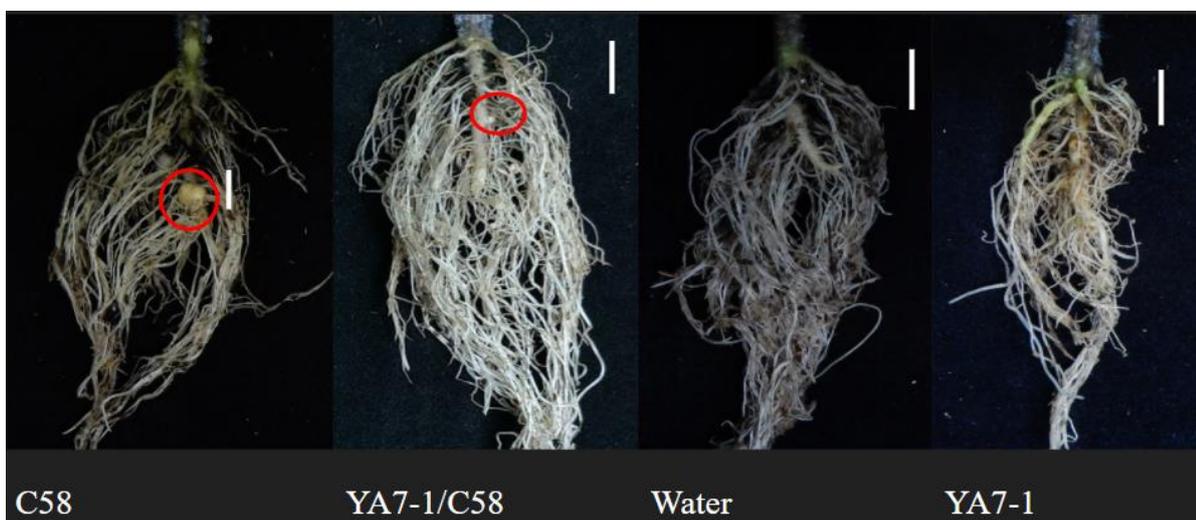
由於混合拮抗菌與 C58 的菌液同時接種到番茄植物莖上並沒有抑制癌腫病的發生, 因此進一步以先接種 YA7-1 於番茄根圈後觀察土壤接種農桿菌的抑制效果。用清水洗掉根上殘留的土壤後, 我們觀察到無論有無預先接種 YA7-1 於番茄根圈, 受傷番茄幼苗在種植於含 *A. tumefaciens* C58 的土壤中均有癌腫病的發生, 但並非 100%。其中, 單純經由土壤接種 C58 的 8 株番茄幼苗, 28 天後共有 7 株有癌腫產生; 而有預先接種 YA7-1 再土壤接種 C58 的 10 株番茄則有 4 株有癌腫產生。癌腫病的發生率在有預先接種 YA7-1 的情況下, 較無接種者降低約 1/2。而單純接種 YA7-1 或水作為對照組的番茄則沒有觀察到明顯的病徵 (表九, 圖二

十一)。此外，在有預先接種 YA7-1 的情況下，腫瘤病徵較無接種 YA7-1 者小，平均重量分別為 0.0050 g 與 0.0685 g（圖二十二）。因此，先接種 YA7-1 於番茄根圈後再進行土壤接種農桿菌可降低腫瘤發生率，且所產生的腫瘤平均重量較輕，雖統計上沒有顯著差異，但推測 YA7-1 仍具有生物防治的潛力。

▼表九、番茄根圈接種 YA7-1 後再以土壤接種農桿菌罹病率

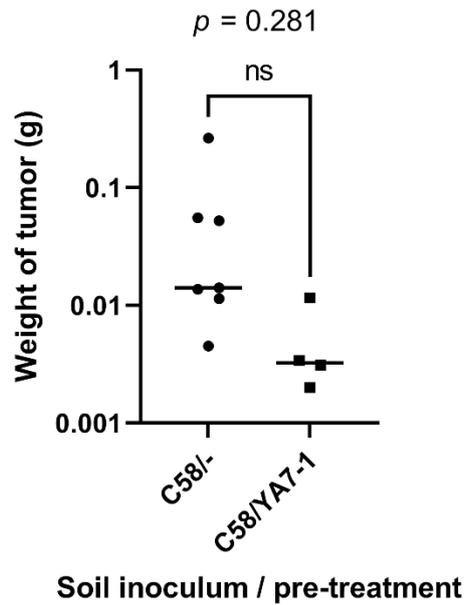
	C58	YA7-1/C58	水	YA7-1
百分比	87.5%	40%	0%	0%
比例	7/8	4/10	0/10	0/10

正對照組（C58）接種 8 株植物，其餘組別接種 10 株。



▲圖二十一、經土壤接種接種 28 天後製之番茄根系。

圖中紅圈處為癌腫生成的位置。C58 為單獨接種 *A. tumefaciens* C58 之樣本；YA7-1/C58 為預先接種 YA7-1 之樣本；Water 為接種水的負對照組；YA7-1 為單獨接種 YA7-1 之對照組。

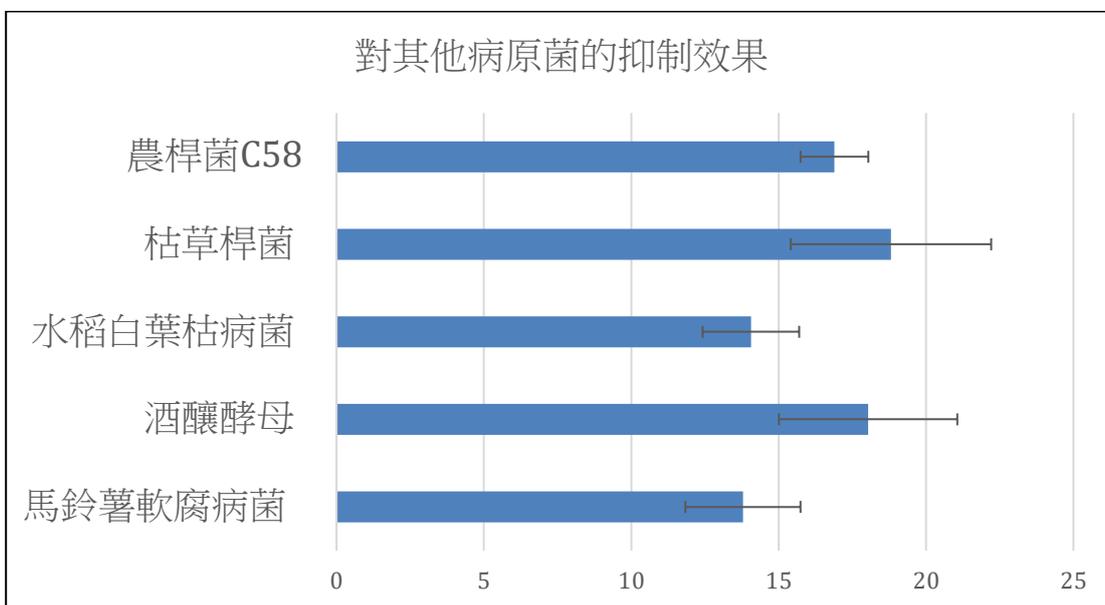


▲圖二十二、土壤接種後番茄根上增生之癌腫組織之重量。

圖中 C58 為單純接種 *A. tumefaciens* C58 之組別，其樣本數為 7；YA/C58 為預先接種 YA7-1 至組別，其樣本數為 4；單獨接種 YA7-1 或水並無造成癌腫，因此數值與樣本數為 0。

六、對不同植物病原菌和非病原微生物的抑制效果

經由測試 *Arthrobacter* sp. YA7-1 針對其他土傳性植物細菌，如枯草桿菌 (*Bacillus subtilis* 268)、水稻白葉枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)、酒釀酵母 (yeast)、馬鈴薯軟腐病菌 (*Dickeya dadantii* 3937)，皆有抑制效果，而對番茄葉斑病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)無明顯效果。如圖二十三。

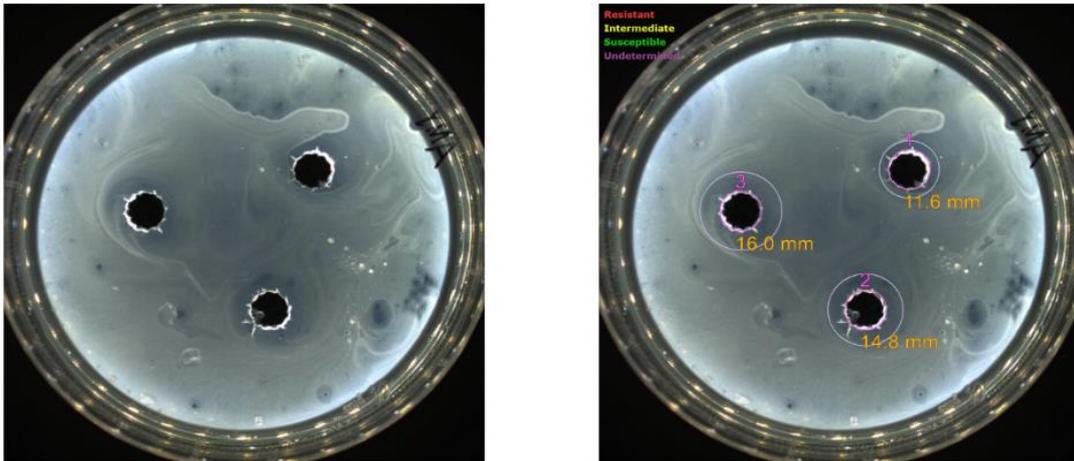


▲圖二十三、YA7-1 對不同植物病原菌和非病原微生物所造成之抑制圈直徑。

七、抑菌機制

(一) 分析 YA7-1 分泌物質對農桿菌(C58) 的抑制效果

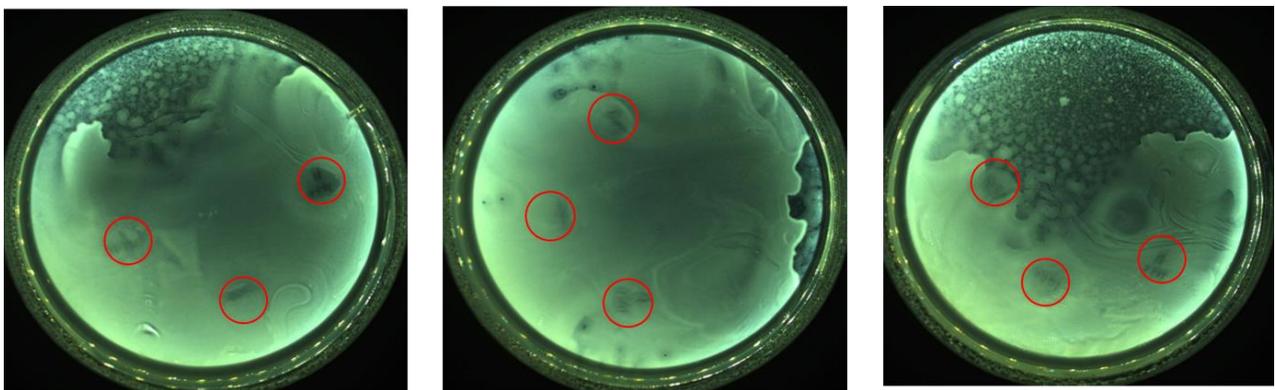
由於 YA7-1 對農桿菌(C58)的抑制效果為擴散的抑制圈，可推論 YA7-1 是藉由分泌物質來抑制農桿菌，因此收集培養基上清液進行抑制圈實驗，發現上清液具有明顯但微弱抑制效果（圖二十四）。



▲圖二十四、YA7-1 的分泌物質對農桿菌的抑制圈直徑與抑制效果。

(二)濃縮分泌物質實驗

我們進一步嘗試將培養基上清液以冷凍乾燥進行濃縮，測試不同回溶體積的無菌水對農桿菌(C58)的抑制效果。在此實驗中，我們一樣用 YMA 培養基上清液濃縮後做抑制圈實驗，由結果得知在此三種回溶情況下皆無法抑制效果。如圖二十五。



回溶 100 μ l

回溶 500 μ l

回溶 1000 μ l

▲圖二十五、YA7-1 的物質對農桿菌的抑制圈直徑與抑制效果

八、YA7-1 全基因體定序

(一) 抽取 YA7-1 的 DNA 濃度

抽取 YA7-1 的 DNA 後測量濃度及純度結果，如圖二十四。全基因體定序流程如圖二十六，目前已進行到功能比對。

YA7-1	ConC(ng/ul)	230/260	260/280
1	54.2	1.03	1.76
2	6	0.62	1.13
送定序所需濃度	50以上	>1.0	1.8~2.0

▲圖二十六、抽取 YA7-1 的 DNA 濃度

(二) 全基因定序結果

基因組總大小為 4,453,085 bp。染色體總大小為 4,233,512 bp。質體 pYA7-1a 總大小為 129,773 bp。質體 pYA7-1b 總大小為 89,800 bp。隨後使用 NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) v6.1 (12) 對基因組進行註釋。總共鑑定了 4167 個基因，包括 4096 個蛋白編碼序列(CDS)，其中 4051 個(98.9%)具有預測功能，以及 45 個非蛋白質編碼基因。

將註解後的基因體資料以 PRISM (Skinnider et al., 2016, 2017, 2020) 進行可能產生的二級代謝物預測(如表十)，我們發現 YA7-1 可能產生四種有具有拮抗微生物生長的物質：

(1) 環狀多肽(Bacterial head-to-tail cyclized peptide)

目前已有 40 多種環狀類藥物應用於臨床，具有巨大的潛在應用效果。具有受限骨架，尤其是頭尾環狀結構的 AMP 可用於開發具有更高活性的新型抗菌藥物。此外，肽的環化可以增強它們的穩定性、對外肽酶和（在某種程度上）內肽酶的抗性、結合親和力和對目標生物分子的選擇性；因此，人們積極研究將環肽用作生化工具和治療劑。鑑於環肽的耐條件穩定性及其高滲透效率，環肽被認為是用作抗菌藥物的理想候選物 (Na Dong, et al., 2019)。

(2) 丁內酯(Butyrolactone)

丁內酯分為單環和多環 γ -丁內酯它們顯示出廣泛的生物學特性，包括強抗生素、抗蠕蟲藥、抗真菌藥、抗腫瘤藥、抗病毒藥、抗炎藥和細胞生長抑制特性(Seitz, M., & Reiser, O., 2005)。

(3) 聚酮化合物(Polyketide)

聚酮化合物是由細菌、真菌和植物合成的一組天然產物。聚酮化合物是通過聚酮化合物合酶 (PKS) 從乙酰輔酶 A 合成的。它們的生物活性多種多樣，包括抗生素、抗癌、抗真菌、抗寄生蟲、免疫抑制和神經毒性活性(Santos, T. R., & Duarte, A. C., 2014)。

(4) Class II/III Confident Bacteriocin(II/III 類可信細菌素)

細菌素分為兩大類：I 類稱為羊毛硫抗生素，含有高度修飾（含羊毛硫氨酸）的肽；II 類包含未修飾的肽或具有輕微修飾（含二硫鍵形成或環化）的肽。已經研究了許多細菌素抑制腸道病原體的能力，例如腸炎沙門氏菌、單核細胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)、艱難梭菌(*Clostridium difficile*) 和金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)。還觀察到它們可以消除耐多藥或萬古黴素的腸球菌(multidrug- or vancomycin-resistant enterococci)以及影響一些與細菌相關的疾病，例如肥胖症 (obesity)。在感染治療中，細菌素比抗生素有幾個優勢，因為它們更具靶標特異性，並且避免殺死共生細胞和有益細胞。它們對真核細胞的毒性也很低或沒有，並且對病原體及其衍生的抗生素耐藥菌株具有活性(Umu, Ö. C., et al., 2016)

▼表十、全基因定序結果

Table. Summary of predicted secondary metabolites via PRISM

編號 (Cluster) #	有抑制性物質 (Cat. Of metabolites)	基因位置 Locus tag (OIT41_)	領域預測 Domain prediction	領域位置 Domain position	分數 Score
1	Bacterial head-to-tail cyclized peptide	05245	DUF95-family enzyme	3-162	28
		05250	Bacterial head-to-tail cyclized peptide motif A	34-58	2.18e-10
2	Butyrolactone	11930	A-factor biosynthesis enzyme	1-291	196.9
3	Polyketide	12455	Acyltransferase	5-299	137
		12465	Thiolation	9-76	55.2
		12470	Ketosynthase	5-411	173.1

4	Class II/III Confident Bacteriocin	19545	matE: MATE efflux family protein	23-417	301.5
		19555	Lactococcin 972 like protein	3-96	40.6

九、討論

在本研究中，我們成功從健康番茄幼苗根圈分離出對農桿菌 (*Agrobacterium*) 有抑制能力的菌株，並測試其於防治農桿菌導致之植物癌腫病的潛力。

我們參照前人的方法 (White et al., 2015)，利用不同時長的超音波震盪番茄根系，將番茄根圈微生物分成外、中、內三層，並嘗試從表面消毒後的根部組織中分離出內生細菌。塗布培養番茄根圈溶液後可發現，我們僅能從 10^3 或 10^4 稀釋倍率下培養出單一菌落，而 10^5 稀釋倍率下則無菌落出現。由此可說明我們使用的稀釋倍率過高，可嘗試使用 10^1 - 10^2 塗布 100 μ L 即可，有助於發現及分離更多根圈細菌。而內生菌的部分，我們未能從塗布之培養基上觀察到菌落生成，其原因可能為稀釋倍率太高，或消毒條件太嚴苛導致組織內的微生物死亡。

經由在 YMA (yeast mannitol agar) 培養基上進行抑制圈實驗，我們發現大部分分離株並沒有抑制癌腫農桿菌 (*Agrobacterium tumefaciens* C58) 生長的能力，分離株 YA2-1、YA2-2、HS5 及 HS6 在液態營養培養基 (nutrient broth) 中無法生長成均勻懸浮液，因此並無測試其拮抗農桿菌的能力。YA7-1 是在本批次分離的菌株中唯一有被觀察到在 YMA 培養基上能對農桿菌 C58 產生抑制圈的菌株，其抑制圈大小約為 18 mm；而現有之生物防治菌株 *A. radiobacter* K84 及 K1026 在相同條件下對農桿菌 C58 產生的抑制圈大小分別約為 44 及 45 mm。進一步測試了屬於 *A. tumefaciens*, *A. vitis* 及 *A. rhizogenes* 的其他具病原性的菌株，發現 YA7-1 除無法拮抗 *A. tumefaciens* Ach5 之外，均能拮抗其他菌株 (表七)。 *A. radiobacter* K84 及 K1026 對大多數 *A. tumefaciens* 菌株具有抑制能力，但對 *A. tumefaciens* 菌株 1D1609、Chry5 以及所測試的 *A. vitis* 菌株 CG412、CG4975、CG49、CG678 及 CG78 均無抑制能力；對 *A. rhizogenes* A4 有抑制能力，但 A8196 則無。根據前人研究，*A. radiobacter* K84 及 K1026 所分泌的細菌素 agrocine 84 可被運送冠繸鹼 agrocine 之通道蛋白運送到細胞內，分解後成為能抑制蛋白質合成的毒素 TM84，造成細胞死亡 (Chopra et al., 2016)。也因為 agrocine 84 之毒性需要仰賴特定通道蛋白、代謝路徑，所以 *A. radiobacter* K84 的拮抗作用並不具有廣譜性 (broad spectrum)，通常其抑制對象為具有 nopaline-type Ti 質體的菌株 [MOU1] (Hendson, Askjaer, Thomson, & Van Montagu, 1983)，如 *A. tumefaciens* C58。而供試菌株中，帶有 chrysopine-type Ti 質體的菌株 *A.*

tumefaciens Chry5、帶有 octopine-type Ti 質體的 *A. tumefaciens* 1D1609、帶有 vitopine-type Ti 質體的 *A. vitis* CG78 均無法被 *A. radiobacter* K84 及 K1026 所拮抗，符合前人研究結果。此外，本次研究觀察到同樣帶有 octopine-type Ti 質體的 *A. tumefaciens* Ach5 菌株卻可被 *A. radiobacter* K84 與 K1026 拮抗。從抑制圈的實驗中可得知，*A. radiobacter* K84 及 K1026 雖然對大部分植物病原性農桿菌有抑制效果，但仍有其作用對象的限制。同時，也有研究指出，具病原性的農桿菌菌株可經由水平基因轉移，獲取 K84 的質粒 pAgK84，帶有抵禦 TM84 自身毒性的免疫基因 *agnB2*，因而對 *A. radiobacter* K84 及 K1026 產生抗性 (Chopra et al., 2016)。因此，YA7-1 的拮抗可作用於不同的農桿菌菌株，具有一定的廣譜性，且有突破對現有生物防治菌株抗性的潛力，是 YA7-1 的特點與優勢之一。

接種農桿菌 *A. tumefaciens* C58 與生物防治細菌於番茄莖上傷口時，我們發現混合接種 *A. tumefaciens* C58 及 *A. radiobacter* K84 或 K1026 可完全避免由 *A. tumefaciens* C58 引起的癌腫病徵，而混合 YA7-1 或另一株本研究分離之番茄根圈微生物 HS9-2 時則無法防止接種處癌腫病的發生，罹病率與只接種 *A. tumefaciens* C58 的組別一樣，均為 100%。這樣的結果可能導因於：一、YA7-1 所產生的抗生物質濃度不足，或在植物莖上無法產生抗生物質；或二、YA7-1 是從番茄根圈分離之細菌，較適合生長於土壤，無法纏據 (colonize) 於植物葉圈 (phyllosphere) 或植物體內。此外，在番茄莖上接種 YA7-1 與接種生理食鹽水的負對照組別在植株外觀型態上無異，並無病徵產生，說明 YA7-1 應不會對植物本身造成危害。且由結果得知 YA7-1 與 C58 在植物的莖部接種時，觀察到的腫瘤反而比較大，從所做的拮抗實驗來推測，YA 7-1 對許多菌都有抑制效果，它可能先把其他菌殺掉 (降低 C58 的競爭對手)，自己又因不能生長在莖上而死亡，進而造成 C58 生長順利，腫瘤變大。然而由此實驗也可得知在培養基上 YA7-1 對農桿菌與其他植物病原菌和非病原微生物的抑制能力差不多，此抑制結果在植物莖上是否有所改變目前不知道，故腫瘤變大原因仍值得探討。

由於 YA7-1 為健康番茄幼苗根圈分離之細菌，因此我們嘗試將受傷番茄幼苗根系先浸泡於 YA7-1 懸浮液中以達成預先纏據 (pre-colonization) 的目的，再將處理後的番茄幼苗種植於含有 *A. tumefaciens* C58 的土壤中 (每克土壤約含 10^6 - 10^7 colonies formation unites)。接種 28 天後我們發現有預先纏據 YA7-1 的組別癌腫病罹病率為 40% (n=10)，而沒有處理 YA7-1 的組別則為 87.5% (n=8)，降低約 1/2 的罹病率。此外，處理 YA7-1 後仍罹病的植株，其生成的癌腫大小也較未處理的組別小，說明 YA7-1 有在感病土中預防癌腫病發生，並抑制癌腫生長的潛力，此部分結果有待更多重複實驗及更多樣本數來確認。根部重複性實驗遇到困難，連單接 C58 都無腫瘤產生，故植物實驗可能要改到培養箱執行。因為農桿菌主要是生活在溫

帶地區的細菌，可能因為在溫室進行實驗時溫度太高，造成接種失敗

根據 YA7-1 之 16S 核糖體核酸基因序列，我們得知 YA7-1 為放線菌綱 (Actinobacteria)、微球菌科 (*Micrococcaceae*)、*Arthrobacter* 屬之革蘭氏陽性菌，與資料庫中 *Arthrobacter ramosus* strain CCM 1646 之序列最為接近，相似度 (identity) 為 97.73%。*Arthrobacter* 屬之細菌常被從土壤或受工業廢棄物或輻射污染的土壤中分離，具有高效利用有機或無機化合物的能力，因此常被用於生物復育 (bioremediation)。雖然部分 *Arthrobacter* 菌株曾被從植物葉表分離並具有纏據於葉圈的能力 (Scheublin & Leveau, 2013)，但在葉圈分離之 *Arthrobacter* 普遍被認為是因雨水潑濺等而出現於植物體上，也並無造成植物病害的紀錄 (Amaresan, Kumar, Annapurna, Kumar, & Sankaranaryanan, 2020)，此觀念也符合我們在番茄莖上觀察到的結果。部分 *Arthrobacter* 菌株已被實驗證實為幫助植物生長的根圈細菌 (plant-growth promoting rhizobacteria)，例如能幫助小麥抵抗高鹽逆境 (Safdarian, Askari, Shariati, & Nematzadeh, 2019) 或幫助玉米發芽 (Tchakounté, Berger, Patz, Fankem, & Ruppel, 2018)。在抗生能力的部分，前人研究 (Wietz et al., 2012) 發現於北冰洋相關生態區位分離的七株 *Arthrobacter* spp. 具有抑制鰻弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 及金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 之能力，並針對培養萃出物進行液相層析-質譜法 (liquid chromatography/mass spectrometry, LC-MS) 分析，得知其抗生物質為 arthrobacilin，為一種環化醣脂質 (cyclic glycolipids)，但對其作用機制則鮮有探討。而陸域環境中，在印度芒果園分離的 *Arthrobacter kerguelensis* VL-RK_09 菌株也被證實具有抗生物質分泌能力，經電噴游離質譜 (electrospray ionization mass spectrometer, ESI-MS)、紅外線吸收光譜 (infrared absorption spectrum) 及質子核磁共振 (proton nuclear magnetic resonance) 等實驗鑑定其抗生物質為 S,S-dipropyl carbonodithioate，可抑制革蘭氏陰、陽性細菌及酵母型或絲狀真菌，最小抑制濃度介於 75-150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之間 (Munaganti et al., 2016)。

經由測試 *Arthrobacter* sp. YA7-1 針對革蘭氏陽性、陰性細菌與真菌皆有抑制效果，如枯草桿菌 (*Bacillus subtilis* 268)、水稻白葉枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)、酒釀酵母 (yeast)、馬鈴薯軟腐病菌 (*Dickeya dadantii* 3937)，皆有抑制效果，而對番茄葉斑病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000) 無明顯效果，其原因可能是它在 YMA 上生長能力較差，導致觀察不易所致。也由此得知 YA7-1 的廣效性太大，超出我們原先預期以農桿菌生物防治為目標的範圍，但從以文獻資料來看，大多的生物防治菌的抑制機制對許多菌都有拮抗能力，故這並非 YA7-1 缺點，且因 YA7-1 是從土壤中取出，故可推估接種 YA7-1 相較於接種其他細菌，較不會對土壤造成影響，然而接種大量劑量的 YA7-1 是否會負面影響土壤根系環境還有待更多實驗觀察。由於 YA7-1 能抑制目前 K84 及 K1206 生物防治菌無法抑制的農

桿菌株 *A.tumefaciens* 1D1609、15955、Chry5 菌株，故我們期望未來能藉由了解其抑菌機制，並利用基因工程或人工合成改造其專一性，達成我們的實驗目的：來完善對根癌農桿菌或其他植物病原菌的生物防治，且並非像直接噴灑抗生素般全部殺死。

在找尋抑制機制的實驗中，我們得知 YA7-1 的抑制物質是可以分泌到細胞外，故我們推測他的抑制因子是物質，並且抑制方式無須細菌持續存在。然而在濃縮物質實驗中卻無抑制效果。我們原先的實驗都是將 YA7-1 液態培養三天後，再取出上清液做實驗，但我們從實驗中得知這樣它所分泌的抑制物質可能會太少。故我們想將原先實驗 YMA 3 day culture → 濃縮 → 無 inhibition，改為 Na 兩天 → YMA 一天，如此更改的原因為增加逆境。從以往文獻中可知，細菌在逆境中，照理會分泌更多物質，因從之前實驗得知 YA7-1 在 NA 培養基上生長的程度差於在 YMA 上生長，我們想藉由提供環境逆境來模擬 YA7-1 遇到農桿菌的情形，讓產生的物質達到濃縮實驗所需的量。且在濃縮物質實驗中，我們最終得到些粉色物質，而它的成份有待釐清。濃縮實驗沒結果也可能是物質發生變性，未來我們可能會先透過高效液相層析 (high performance liquid chromatography) 來分析物質成分，判斷該物質為蛋白質還是其他小分子物質。並將原先實驗將上清液放入冷凍乾燥離心濃縮機裡，低溫真空濃縮兩天，更正為最佳的實驗方式。

藉由進行 YA7-1 菌株的全基因體基因功能比對，結合相關文獻及所得此抑菌物質的成份，我們找出四種可能產生抑制物質，並獲得產生此抑菌物質的基因。因濃縮物質實驗並沒有分離出單一物質，故無法直接從外觀(濃縮物質所得知的粉色)分析出可能物質，且雖化合物的化學名稱皆相同，例: 環狀多肽，但它的結構式與環數實際都有所差異，故無法直接用人工華和物替代 YA7-1 所產化合物。故最好的判定方式是透過跳躍子實驗，並透過抑制圈的方式找到相關基因片段，進而找出抑制物質。這四種物質分別為環狀多肽(Bacterial head-to-tail cyclized peptide)、丁內酯(Butyrolactone)、聚酮化合物(Polyketide)、II/III 類可信細菌素(Class II/III Confident Bacteriocin)。

綜上所述，本研究自健康番茄根圈分離之微生物 *Arthrobacter* sp. YA7-1 具有在培養基上抑制不同植物病原性農桿菌菌株的能力，其作用範圍較現有癌腫病生物防治菌株 *A. radiobacter* K84 與 K1026 大，並可作用於多種具較大經濟危害的葡萄癌腫病原 *A. vitis* 之菌株上。在初步的癌腫病生物防治實驗中，於植物傷口上與農桿菌 C58 同時接種 YA7-1 並無法防止癌腫病的發生，但預先施用 YA7-1 於植物根系能降低經由土壤接種時引發癌腫病的發生率，並降低發病植物腫瘤的大小，且並不會造成植物明顯的外觀型態變化，顯示其可纏據於植物根圈，並具有作為生物防治植物癌腫病資材的潛力。前人研究也顯示同屬之物種分泌之抗生物質可作用於細菌及真菌，但 *Arthrobacter* 屬之微生物鮮有用於植物生物性病害的報

導，故除癌腫病外，未來可繼續測試 *Arthrobacter* sp. YA7-1 針對其他土傳性植物病原之拮抗能力、評估其防治其他造成重大經濟損失之植物病害的能力，如青枯病菌（*Ralstonia solanacearum*）、立枯絲核菌（*Rhizoctonia solani*）引起的幼苗猝倒病或根瘤線蟲（*Meloidogyne* spp.）造成的根瘤病等。

肆、結論與應用

一、結論

- (一)、成功於番茄根圈中分離出的 26 株單一菌落的細菌，其中分離株 YA7-1 分離株具有抑制 *Agrobacterium tumefaciens* C58 生長的效果。
- (二)、在抑菌圈實驗中，YA7-1 的抑制能力較目前用來預防植物癌腫病的主要生物防治菌 *A. radiobacter* K84 和 K1026 弱，但對不同致瘤性農桿菌抑制範圍廣。
- (三)、經 16S 核糖體核酸基因 rRNA 定序後，分析比對結果 YA7-1 為節桿菌屬（*Arthrobacter*），根據目前文獻資料此屬並無相關植物病害記載。
- (四)、同時混合接種 YA7-1 和 C58 在番茄莖部，無抑制癌腫病的效果；而先接種 YA7-1 在根部能降低土壤中 C58 感染根系引發癌腫病的機率。
- (五)、YA7-1 是一株具有廣效性抑菌能力的菌株，對革蘭氏陽性、陰性細菌與真菌皆有抑制效果。
- (六)、YA7-1 的抑制因子是物質，抑制方式無須細菌持續存在。
- (七)、進行 YA7-1 的全基因體定序，且找到四種可能被 YA7-1 分泌且具有抑制性的次級代謝物。

二、應用

YA7-1 的抑菌能力具廣效性，且 YA7-1 能抑制目前 K84 及 K1206 生物防治菌無法抑制的農桿菌菌株與植物病原菌。故我們期望未來能藉由了解其抑菌機制與抑制代謝物，並利用基因工程或人工合成，讓 YA7-1 對這些病原菌具抑制專性，來完善對根癌農桿菌或其他植物

伍、參考文獻

1. Beijersbergen AG ,Hooykaas PJ(1994). "The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*". Annual Review of Phytopathology. 32 (1): 157 – 181.
2. Smith, E. F., and Townsend, C. O. (1907). A plant tumor of bacterial origin. Science 25, 671 – 673.
3. Agrios, Plant Pathology, 5th edition, 2004.
4. Otten, L; Burr, T (1999). "Crown gall of grape: biology and disease management". Annu Rev Phytopathol. 37 (1): 53 – 80.
5. David C, Petit A, Tepfer D, Chilton MD. (1982). ” *Agrobacterium rhizogenes* insert T-DNA into the genome of the host plant root cells” . nature. 295:432-4
6. Htay, K. & Kerr, A. (1974). “Biological control of Crown Gall through bacteriocin production.” Physiol. Plant Pathol. 4, 37 – 44
7. Jones, D. A., Kerr, A. (1988). “*Agrobacterium radiobacter* Strain K1026, a Genetically Engineered Derivative of Strain K84, for Biological Control of Crown Gall.” Plant Dis. 73:15-18.
8. Kerr, A. & Tate, M. E. (1984). "Agrocins and the biological control of crown gall." Microbiol. Sci. 1, 1 – 4
9. Kerr, A, Roberts, W. P. & Tate, M. E. (1977). "Agrocin 84 is a 6-N-phosphoramidate of an adenine nucleotide analogue." Nature 265, 379 – 381
10. Chopra, S., Cusack, S., J., Temple, B. R., Palencia, A ., Reader Schulwitz, S. , and Virus, C. (2016). “Structural characterization of antibiotic self-immunity tRNA synthetase in plant tumour biocontrol agent.” Nat. Commun. 7: 12928.
11. Brözel, V. S., Subramanian, S, White, L. J. (2015). "Laura J. White,Xijin Ge,Volker S. Brözel,Senthil Subramanian.” BIO-PROTOCOL. 5(16): e1569.
12. Amaresan, N., Annapurna, K., Kumar, K., Kumar, M. S. & Sankaranaryanan, N. (2020). *Beneficial microbes in agro-ecology: bacteria and fungi*. Academic Press.

13. Cusack, S., Chopra, S., Palencia, A., Reader, J., Schulwitz, S., Temple, B. & Virus, C. (2016). Structural characterization of antibiotic self-immunity tRNA synthetase in plant tumour biocontrol agent. *Nature communications*, 7(1), 1-13.
14. Askjaer, L., Hendson, M., Thomson, J. A., & Van Montagu, M. (1983). Broad-host-range agrocin of *Agrobacterium tumefaciens*. *Applied and environmental microbiology*, 45(5), 1526-1532.
15. Akkewar, D., Dorigondla, K. R., Konda, S., Naragani, K., Mangamuri, U. K., Munaganti, R. K., & Muvva, V. (2016). Antimicrobial profile of *Arthrobacter kerguelensis* VL-RK_09 isolated from Mango orchards. *brazilian journal of microbiology*, 47, 1030-1038.
16. Askari, H., Safdarian, Nematzadeh, G., & Shariati, V. (2019). Transcriptional responses of wheat roots inoculated with *Arthrobacter nitroguajacolicus* to salt stress. *Scientific reports*, 9(1), 1-12.
17. Leveau, J. H., & Scheublin, T. R. (2013). Isolation of *Arthrobacter* species from the phyllosphere and demonstration of their epiphytic fitness. *Microbiologyopen*, 2(1), 205-213.
18. Berger, B., Fankem, H. , Patz, S., Ruppel, S.& Tchakounté, G. V. T. (2018). Community structure and plant growth-promoting potential of cultivable bacteria isolated from Cameroon soil. *Microbiological research*, 214, 47-59.
19. Bowman, J. S., Blom, N., Ng, Y., Gram, L., Månsson, M., & Wietz, M., (2012). Wide distribution of closely related, antibiotic-producing *Arthrobacter* strains throughout the Arctic Ocean. *Applied and environmental microbiology*, 78(6), 2039-2042.
20. Skinnider, M.A., Johnston, C.W., Gunabalasingam, M., Merwin N.J., Kieliszek A.M., MacLellan R.J., Li H., Ranieri M.R.M., Webster A.L.H., Cao M.P.T., Pfeifle A., Spencer N., To Q.H., Wallace D.P., Dejong C.A., and Magarvey N.A. (2020). Comprehensive prediction of secondary metabolite structure and biological activity from microbial genome sequences. *Nat Commun* 11, 6058.
doi: [10.1038/s41467-020-19986-1](https://doi.org/10.1038/s41467-020-19986-1)
21. Skinnider, M.A., Merwin, N.J., Johnston, C.W., and Magarvey, N.A. (2017). PRISM 3: expanded prediction of natural product chemical structures from microbial genomes. *Nucleic Acids Research*, 45, W49-W54.
doi: [10.1093/nar/gkx320](https://doi.org/10.1093/nar/gkx320).
22. Skinnider, M.A., Johnston, C.W., Edgar, R.E., Dejong, C.A., Merwin, N.J., Rees, P.N., and Magarvey, N.A. (2016). Genomic charting of ribosomally synthesized natural product chemical space facilitates targeted mining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*,

113, E6343-E6351.

doi: [10.1073/pnas.1609014113](https://doi.org/10.1073/pnas.1609014113).

23. Dong, N., Wang, C., Li, X., Guo, Y., & Li, X. (2019). Simplified head-to-tail cyclic polypeptides as biomaterial-associated antimicrobials with endotoxin neutralizing and anti-Inflammatory capabilities. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(23), 5904.
24. Seitz, M., & Reiser, O. (2005). Synthetic approaches towards structurally diverse γ - butyrolactone natural-product-like compounds. *Current opinion in chemical biology*, *9*(3), 285-292.
25. Santos, T. R., & Duarte, A. C. (2014). *Analysis of Marine Samples in Search of Bioactive Compounds*. Elsevier.
26. Umu, Ö. C., Bäuerl, C., Oostindjer, M., Pope, P. B., Hernandez, P. E., Perez-Martinez, G., & Diep, D. B. (2016). The potential of class II bacteriocins to modify gut microbiota to improve host health. *PLoS One*, *11*(10), e0164036.

【評語】 070004

此研究由未產生腫瘤之番茄土壤中分離到抑制農桿菌的菌株，並測試其對多種農桿菌有抑制效果，發現 YA7-1 對多種農桿菌具拮抗能力，不同於現行的生物防治菌農桿菌（*Agrobacterium radiobacter* K84 and K1026）有高選擇性限制，YA7-1 具有廣效性的抑菌能力可更廣泛應用，並進一步定序此菌株。研究有很好的動機與初步結果值得肯定，做的工作多且紮實！

建議：

1. 藉由分析培養液上清液的實驗可得知 YA7-1 的抑菌因子為其分泌物質，但確切抑菌物質與機制仍有待釐清。
2. 應查文獻是否有別種節桿菌屬（*Arthrobacter*）也能抑制農桿菌，以強調此研究的新穎性。若無文獻報導，那 16S 核糖體核糖核酸基因片段序列可找到其他相似節桿菌屬（*Arthrobacter*）可買來測試。
3. YA7-1 可抑制的農桿菌菌株，比生物防治菌株 K84、K1026 多，但抑制效果比較弱。

4. 接種 YA7-1/C58 的平均腫瘤重量甚至比與只接種 C58 的植株稍高，因此推斷 YA7-1 在莖上無抑制癌腫病發生的效果。為何？
5. 先接種 YA7-1 於番茄根圈後再進行土壤接種農桿菌可降低腫瘤發生率，且所產生的腫瘤平均重量較輕，但統計上沒有顯著差異，為何推測 YA7-1 仍具有生物防治的潛力？
6. 圖表結果呈現應一致(表七及圖 15)，應皆有詳盡的說明。