

# 【2021 全國科學探究競賽 - 這樣教我就懂】

## 高中 ( 職 ) 組 成果報告表單

題目名稱：以水稻內生菌抑制紋枯病

### 一、摘要：

本實驗藉由植物內生菌的氣味，研究其對病原菌的影響。本次實驗使用水稻作為實驗材料，並從中篩選出內生菌，而後我們選擇導致水稻紋枯病的立枯絲核菌，將內生菌與其共培養，發現內生菌對立枯絲核菌有顯著的抑制效果。此實驗結果證實，水稻內生菌氣味對植物病原菌具有顯著抑制生長的影響，水稻內生菌能作為抑制紋枯病的生物媒介。在本次實驗中，說明水稻內生菌在水稻抵抗病原菌上具有良好的助力。

### 二、探究題目與動機

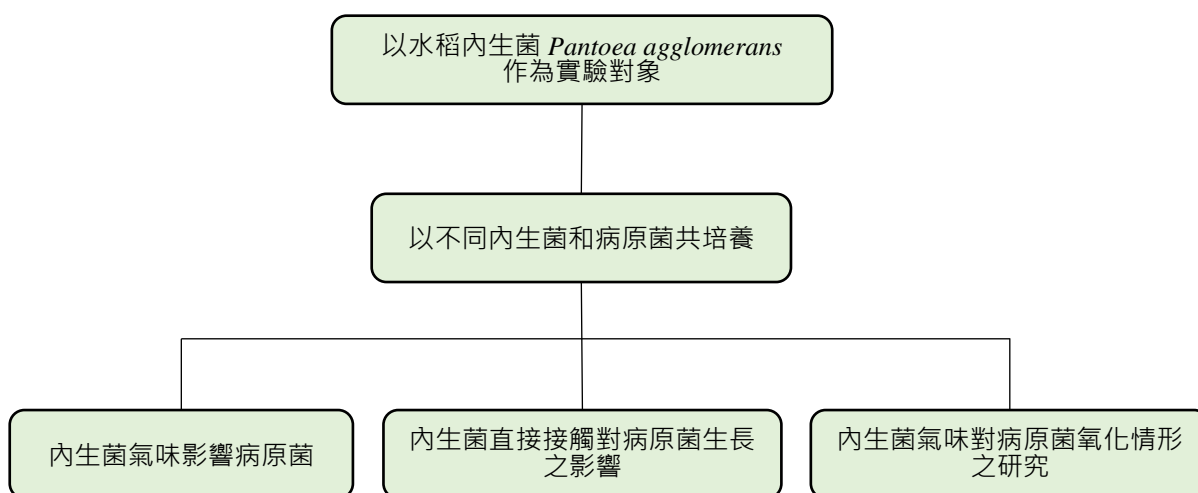
在植物觀察時，我們發現空氣中散發著花朵的香味，能讓我們感受到放鬆歡愉的情緒，因而好奇氣味是否對其他生物一樣有影響。於是查詢了網路上關於氣味、植物、共生等資料，發現微生物氣味對植物的確具有交互關係，使得我們對此產生了研究的興趣，並決定開始探討植物、立枯絲核菌及植物內生菌之間氣味層面的關係。

### 三、探究目的與假設

- 一、了解水稻內生菌之種類及篩選方式
- 二、探究水稻內生菌對立枯絲核菌生長之影響及其機制
- 三、探究水稻內生菌對立枯絲核菌氧化之情形

### 四、探究方法與驗證步驟

#### 一、研究架構流程圖



#### 研究物種：

立枯絲核菌(*Rhizoctonia solans*)、水稻內生菌(*Pantoea agglomerans*)、水稻(台南 9 號)

立枯絲核菌為親水、嗜熱性真菌，主要生存在土壤的上部。它是一個好發於夏季，六月到十月份的真菌。在水稻上的病徵，初期於葉鞘及葉片上出現灰汙綠色水浸狀病斑，後期病斑中央灰白色，邊緣褐色。高濕高溫環境下，葉鞘組織會枯死，並導致水分輸送不良，造成黃化乾枯。

## 二、實驗過程：

### (一) 配製 400ml 馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 Potato Dextrose Agar (PDA medium)、大豆分解蛋白質乾酪素培養基 Tryptic Soy Broth (TSB medium)、洋菜培養基(LB medium)

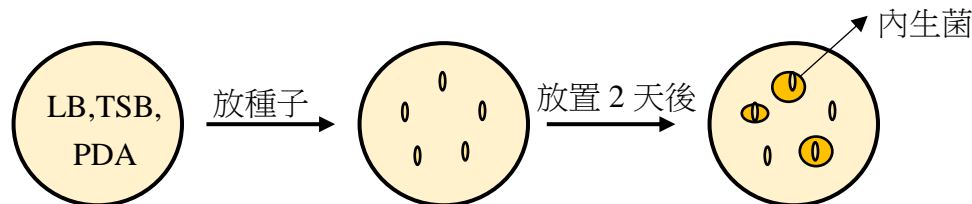
1. 使用電子秤量取 PDA 15.6g (TSB 12g + Agar 6g ; LB 12g + Agar 6g) 加入血清瓶中，
2. 再以量筒各量取蒸餾水至 400ml 加入血清瓶中。
3. 貼上滅菌膠帶，搖晃均勻後，放入滅菌釜，濕式滅菌一小時。
4. 取出滅菌完成的液態 PDA (TSB ; LB) 培養基，於無菌操作台中，將其取 50ml 倒入 9cm 圓盤中，各 20 盤合計 60 盤，冷卻靜置五個小時。
5. 冷卻完成後，將 PDA (TSB ; LB) 培養基裝袋，備用。

### (二) 配製 400ml 抗氧化馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(PDA medium+GSH)

1. 使用電子秤量取 PDA 15.6g 加入血清瓶中，再以量筒量取蒸餾水至 400ml 加入血清瓶中。
2. 加入抗氧化劑 GSH
3. 貼上滅菌膠帶，搖晃均勻後，放入滅菌釜，濕式滅菌一小時。
4. 取出滅菌完成的液態 PDA 培養基，於無菌操作台中，將其取 50ml 倒入 9cm 圓盤中，合計 20 盤，冷卻靜置五個小時。
5. 冷卻完成後，將 PDA 培養基裝袋，備用。

### (三) 以直接平板法篩出內生菌

1. 以電子天秤量取 7g 水稻種子，放入離心管。
2. 在離心管中加入 10% 次氯酸鈉溶液，置於震盪機上，進行表面消毒 15 分鐘，後以無菌水洗淨。
3. 於無菌操作台中，分別取出 5 顆種子放置於 PDA、TSB、LB 培養基上，每種培養基兩盤。
4. 以 paraflim 密封，置於養菌箱。放置 2 天後觀察盤中的內生菌。



圖一：平板法篩菌示意圖

### (四) 內生菌培養步驟

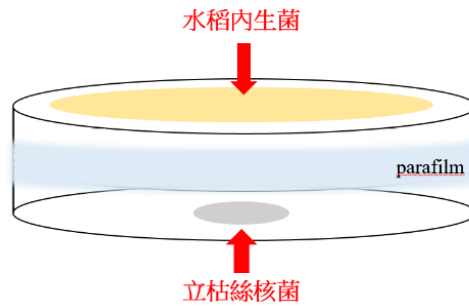
1. 於無菌操作台中，取出篩出的內生菌，以接種環於 PDA、LB 培養基上畫上四區，置於養菌箱中一天。
2. 取出養菌管，及液態 LB，使用電動分注器，注入 3ml 液態 LB。
3. 從養菌箱中取出畫上四區的培養基，以接種環取出內生菌，放置於養菌管中，置於養菌箱中一天。
4. 以微量低管吸取 1c.c.液態 LB，放入驗光機中，定標準值。
5. 將菌液稀釋 10 倍，以微量滴管取 900 $\mu$ l 液態 LB，加入 100 $\mu$ l 菌液。
6. 放入驗光機中，驗光後，調配 OD1 濃度的菌液。
7. 塗盤於 LB 培養基上，置於養菌箱中生長兩天。

### (五) 立枯絲核菌之繼代培養

1. 從養菌箱中取出立枯絲核菌，於無菌操作台中，利用不鏽鋼穿孔器取出相同大小之立枯絲核菌，繼代至 PDA 培養基上，共繼代三盤。
2. 放入養菌箱中生長三天，以作為新鮮實驗材料使用。

### (六) 立枯絲核菌與內生菌氣味共培養(未接觸)

1. 從養菌箱中取出培養三天的立枯絲核菌，並於無菌操作台中，繼代至新的 PDA 培養基上。
2. 將塗盤內生菌的菌盤和立枯絲核菌的菌盤相接，並以 parafilm 包覆兩圈，置於養菌箱中生長兩天。



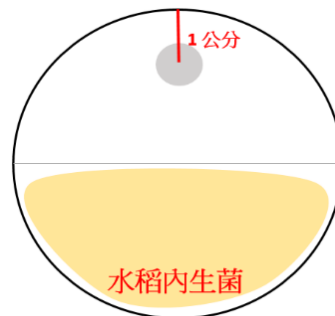
圖三：內生菌氣味與立枯絲核菌共培養裝置示意圖

### (七) 立枯絲核菌抗氧化實驗

1. 於無菌操作台中，將立枯絲核菌繼代至加入 GSH 後的 PDA 培養基(抗氧化 PDA)上。
2. 將塗盤的內生菌和立枯絲核菌相接，並以 parafilm 包覆兩圈，於養菌箱中生長兩天。

### (八) 立枯絲核菌與內生菌共培養(直接接觸)

1. 從養菌箱中取出培養三天的立枯絲核菌，於無菌操作台中，繼代至新的 PDA 培養基上，距離邊緣 1cm 處。
2. 將內生菌與立枯絲核菌塗在同一盤上，塗上一半，並以 parafilm 包覆兩圈，於養菌箱中生長兩天。

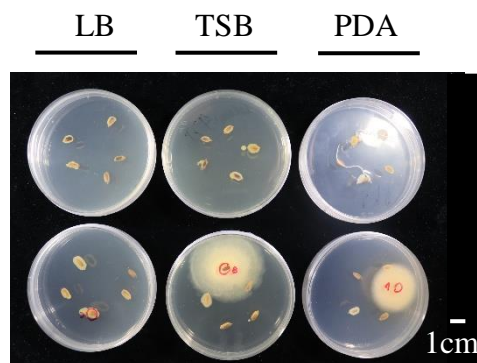


圖四：內生菌與立枯絲核菌直接接觸裝置示意圖

## 三、研究結果：

### (一) 以直接平板法篩出水稻內生菌

在本研究的一開始，我們透過直接平板法，篩出在水稻種子內部的內生菌。

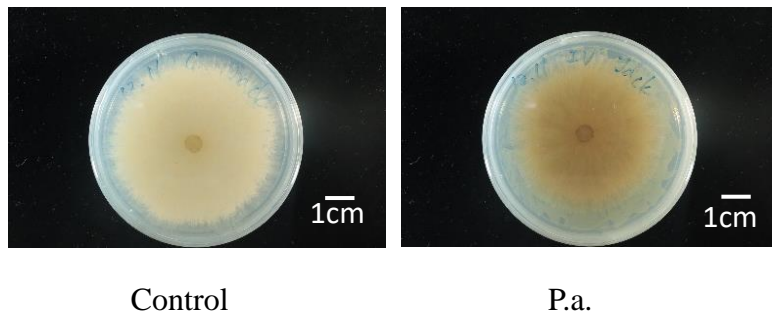


圖五：水稻內生菌篩菌結果

實驗後，我們在結果中篩選出了水稻內生菌 *Pantoea agglomerans*，並將在後續的實驗中，以這種水稻內生菌為主要研究對象。

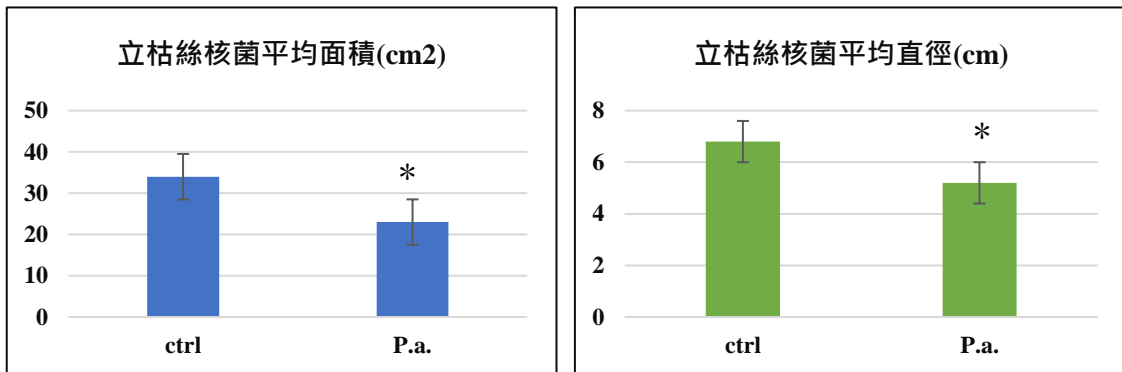
## (二) 水稻內生菌氣味對立枯絲核菌之影響

第二個實驗中，我們使用內生菌 *P.a.* 與立枯絲核菌共培養，目的是了解水稻內生菌的氣味對立枯絲核菌生長之影響。



圖六：水稻內生菌氣味與立枯絲核菌共培養之結果

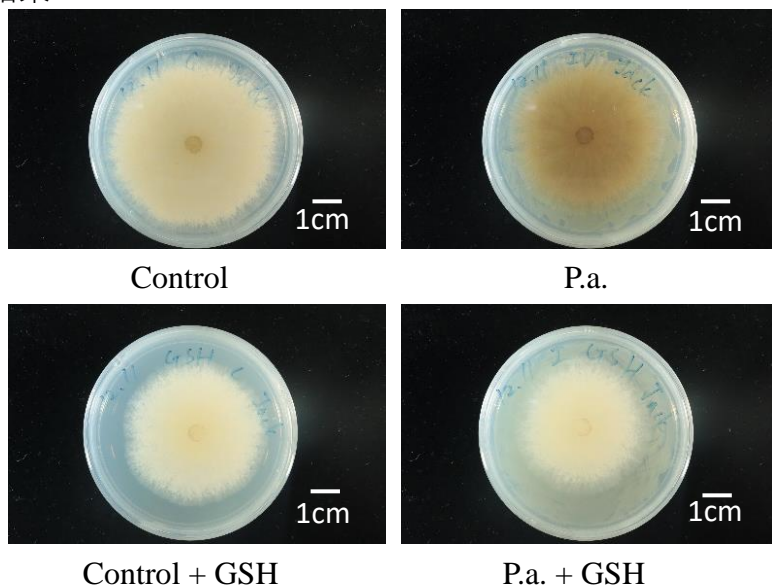
表一：內生菌氣味與立枯絲核菌共培養後之面積及直徑結果



從實驗結果中能發現，水稻內生菌的氣味對立枯絲核菌本身生長具有顯著抑制效果。在這個實驗中，我們亦發現水稻內生菌 *P.a.* 能使立枯絲核菌氧化產生黑色素。

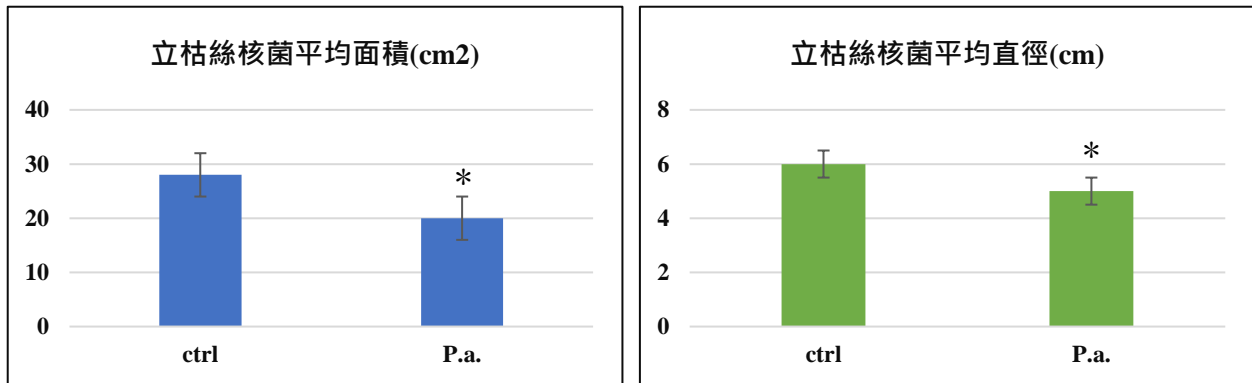
## (三) 內生菌氣味對加入抗氧化劑之立枯絲核菌生長之影響

我們進行第三個實驗，以了解水稻內生菌 *P.a.* 與立枯絲核菌共培養後產生黑色素之機制。經過文獻查找及分析後，我們發現微生物在遇到逆境時會產生氧化壓力，推測立枯絲核菌會變黑是因為菌本身形成黑色素以保護自己免於受到傷害。因此，本實驗於培養基中加入抗氧化劑 GSH，使立枯絲核菌不會氧化，並觀察結果。



圖七：水稻內生菌與立枯絲核菌接觸共培養之結果

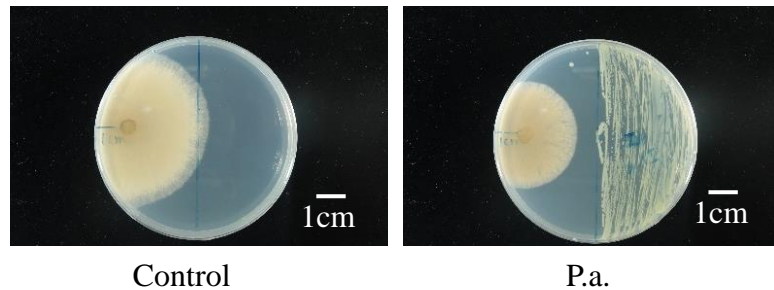
表二：內生菌與立枯絲核菌接觸共培養後之面積及直徑結果



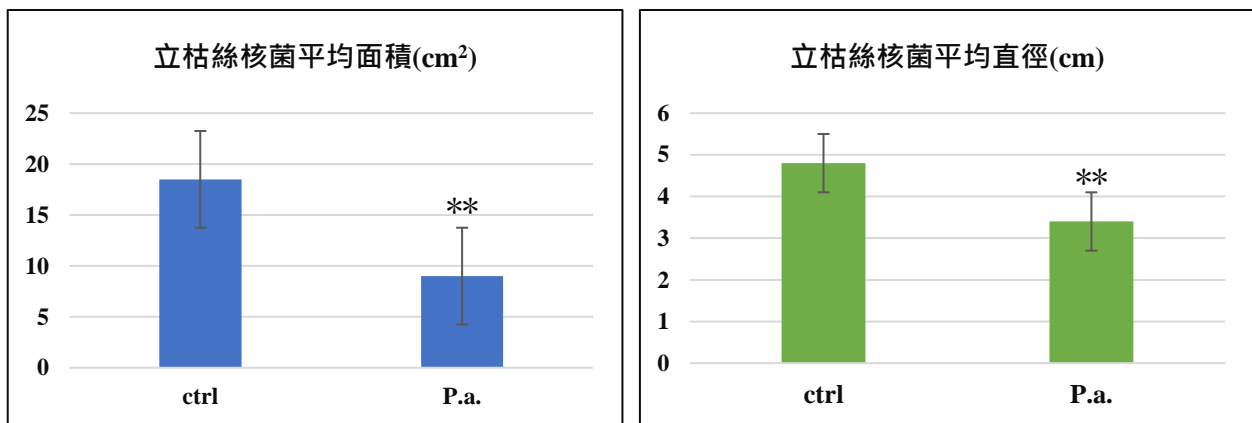
實驗結果證實，水稻內生菌 *P.a.* 與立枯絲核菌共培養後產生之黑色素的確是因為氧化逆境，而立枯絲核菌產生黑色素之行為，目的為保護自身免於環境的威脅，由此，可推測水稻內生菌 *P.a.* 具有危害立枯絲核菌的能力。

#### (四)內生菌直接接觸對立枯絲核菌生長之影響

第四個實驗，目的是了解當水稻內生菌 *P.a.* 與立枯絲核菌直接接觸時，對立枯絲核菌的生長是否具有影響。



圖八：水稻內生菌與立枯絲核菌加入抗氧化劑共培養之結果  
表三：內生菌與立枯絲核菌加入抗氧化劑共培養後之面積及直徑結果



從實驗結果中可看出，當水稻內生菌與立枯絲核菌放在同個培養基中進行共培養，對立枯絲核菌具有顯著的抑制效果。

#### 四、討論：

##### (一)平板法篩出內生菌

實驗結果中，我們透過直接平板法篩出了內生菌 *Pantoea agglomerans* 作為後續實驗的主要研究對象，希望能了解水稻內生菌氣味對立枯絲核菌的影響。

##### (二)內生菌氣味對立枯絲核菌生長之影響

在實驗中，我們使用水稻內生菌 *P.a.* 與立枯絲核菌共培養。實驗結果證實，水稻內生菌對立枯絲核菌有抑制作用。在這之中水稻內生菌 *P.a.* 會使立枯絲核菌氧化產生黑色素。

讓我們感到興趣的是水稻內生菌 *P.a.* 所帶來的結果。立枯絲核菌之所以會產生黑色素，原因是為了保護自己免於外界環境的傷害，這意味著水稻內生菌 *P.a.* 具有對立枯絲核菌造成傷害的能力。

### (三)內生菌氣味對添加抗氧化劑之立枯絲核菌生長之影響

在第二個實驗中，我們發現與水稻內生菌 *P.a.* 共培養的立枯絲核菌會產生黑色素，推測可能是因為立枯絲核菌遇到逆境而導致氧化傷害，需要靠生成黑色素來抵擋。而本實驗結果說明，立枯絲核菌之所以會產生黑色素，的確是為了抵抗氧化壓力，因此在加入抗氧化劑的情況底下，立枯絲核菌便不會產生黑色素。

### (四)黑色素與氧化的探究

實驗中，與水稻內生菌 *P.a.* 共培養的立枯絲核菌，會產生黑色素來保護自己。在查詢資料後，我們了解黑色素是經由細胞氧化而產生的，並能保護細胞免於紫外線、活性氧及生物降解等不利環境。

為了確認這一點，我們於 PDA 培養基中，加入抗氧化劑 GSH，並再次進行共培養，在相同的狀況下，與水稻內生菌 *P.a.* 共培養後，根據實驗結果，確認立枯絲核菌在加入抗氧化劑的 PDA 培養基中，並不會產生黑色素。因此，立枯絲核菌用於保護細胞的黑色素，確實是經由氧化而來，在加入抗氧化劑後失去了氧化產生黑色素的情形。

### (五)內生菌直接接觸對立枯絲核菌生長之影響

實驗結果顯示，在直接接觸下，我們發現水稻內生菌 *P.a.* 能抑制立枯絲核菌的生長，但隨著時間增長，最終都會被立枯絲核菌吞食，此結果說明了水稻內生菌並沒有辦法永久破壞立枯絲核菌生長能力，而是抑制其生長速度。

## 五、結論與生活應用

本次研究中，我們發現水稻內生菌對於立枯絲核菌有顯著抑制現象。而在與水稻內生菌 *P.a.* 共培養實驗中，也發現立枯絲核菌會發生防禦性的氧化。

水稻內生菌 *Pantoea agglomerans* 是水稻中常見的內生菌，在過去的生物課，我們學到了生物間的交互關係，瞭解到生物與生物間，會有共生的情形。而本研究證實了水稻內生菌對水稻的益處，能抑制病原菌生長，減緩水稻紋枯病的病癥，可推論水稻內生菌 *P.a.* 和水稻是一種互利共生，水稻提供內生菌安全的居住環境，而內生菌則幫助水稻抵禦病原菌。

我們未來的實驗方向會針對本次實驗結果，研究如何將其實際應用在農田中，以抑制立枯絲核菌的增長及紋枯病的擴散。未來可以實際應用在田地為目標研究，製作生物性的藥劑，讓農民不再使用具化學性的藥劑，減少水稻可能殘留化學物質進而影響顧客的購買意願的機會。使用生物性藥劑取代化學性，不僅不會造成環境負擔，也能有效達到抑制水稻染病的機率及現象。

雖然從目前的實驗中來看，水稻內生菌並無消滅立枯絲核菌的能力，比起現有市面上之化學性劑的效果較差，但從長遠的觀點及生態友善的角度來看，使用水稻內生菌做為新的替代方式，對環境及最後食用的人們，都是更好的選擇。

## 參考資料

- (1) 杜金池、張義璋。1981。水稻紋枯病原菌之生態及生物防治。臺南農改場研究彙報。15：1-24。
- (2) 郭鶴寶、何山文、王星、章俊、張曉霞。2019。水稻種子內生泛菌(*Pantoea* spp.)系統發育多樣性及其促生功能。微生物學報。59(12): 2285-2295。
- (3) 謝于婷。2014。國立中興大學土壤環境科學系碩士學位論文。不同水稻品種及土壤種類對植體內生細菌群落組成之研究。
- (4) Agata Swiecilo (2016). Cross-stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* yeast—new insight into an old phenomenon.
- (5) Konstantia Gkarmiri, Roger D. Finlay, Sadhna Alstrom, Elizabeth Thomas, Marc A. Cubeta and Nils Hogberg (2015). Transcriptomic changes in the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani* AG-3 in response to the antagonistic bacteria *Serratia protermaeulans* and *Serratia plymuthica*.