生物技術在植物病害生物防治之應用

台中區農業改良場／黃秀華

前言

台灣地處熱帶及亞熱帶，氣候高溫多濕、由平地到高山地區皆可耕作。但因每位農民耕 作面積不大，大多採集約栽培，土地利用頻繁，加上常年不當的使用化學肥料，土壤已有日 漸酸化的現象，導至本省土壤傳播性病害的日益猖獗。本省作物土傳性病害中，由鐮胞菌 屬、疫病屬、白絹病菌、立絲枯核菌等病菌所引起者佔大部份，如以香蕉黃葉病、瓜類蔓割 病、蔬菜萎凋病、瓜類疫病、各種作物之白絹病等尤爲嚴重，且不易防治，爲農業上頗爲棘 手之病害問題。過去灌注殺菌劑或使用燻蒸劑以防治這類土傳性病害，雖然有良好的效果， 但由於農藥殘毒及再污染的顧忌且成本過高等緣故，未能普遍應用。近數十年來，植病學者 開始尋求生物防治的可行性；而生物防治之所以被認爲最具潛力的病害防治策略之一，除較 少污染外，對研究一套有效的生物防治所需花費的經費，較傳統育種工作少，且所耗費的時 間更短。以往在植物病害防治的研究中，因傳統技術對於生物防治機制，不易了解與突破， 但近年來由於遺傳工程技術的發展，已有部分因藉由基因操作而得到解決。且由於利用基因 轉移技術來証明生物防治機制(抗生、競生及超寄生)，已較傳統的相關性推測精確，故目前 已被廣泛利用。

生物防治的研究，主要是希望藉由自然界生物的力量以減少病原菌在農業生態體系中所 造成的損失。亦即考慮自然生態的平衡與保育爲前題，謀求植物體的健康，以維繫農作物原 有的生產潛能。經由對病原菌、拮抗微生物、寄主及環境條件間相互作用的了解，目前生物 防治成功的例子有(1)以 *Peniophora gigantea* 防止 *Heterobasidion annosum* 對林木的感染，(2)馴化 的煙草嵌紋病毒(tobacco mosaic virus, TMV)系統，可以防止具毒性 TMV 對植物的感染，(3)以 Agrobacterium radiobacter 處裡寄主植物根尖，可以防治腫瘤細菌 *Agrobacterium tumefasciens* 的 感染，(4)螢光細菌對小麥根腐病的防治，(5)利用處女土解決夏威夷木瓜重植問題，(6)以木黴 菌防治草皮病害及蔬菜灰黴病等病。

最近生物技術在醫藥、發酵工業、農業上應用的突破，更有助於生物防治在植物病害防 治上的實現。故有關(1)鐵離子嵌合物的研究與利用，(2)利用基因轉殖技術修補植物的基因， 使其分泌有益微生物生存的代謝物, 以達防病的目的，(3)將拮抗微生物的拮抗基因嵌入寄主 植物而達防病的效果，(4)利用生物技術探討生物防治的機制，以作基因遺傳之探討， (5)利用 遺傳工程技術使適宜根圈生存之微生物遺傳性狀改變而成爲病原菌之拮抗菌等生物防治新技 術的發展，均是值得重視。

生物防治在植物病害之應用

曾經被記載過的土壤拮抗微生物種類甚多，如 *Fluorescent pseudomonads, Bacillus subtilis, Coniothyrium minitans, Penicillium spp., Trichoderma spp.,*等。其中以螢光細菌(fluorescent pseudomonads)如 *Pseudomonas fluorescens* 及 *Ps. putida* 等，最近幾年研究最多 。 主要有:

1.抑病土的研究

如 Scher & Baker (1982)從加州土壤分離出來的 *Pseudomonas putida* 菌株，可抑制有病原性 的 *Fusarium oxysporum*，並可因其加入導病土中而發生抑制作用，這種細菌後來被証明會產生 一種鐵離子嵌合物(sideropbore)而弱化病原菌或使其不能利用鐵離子。

2.抗生素的作用

如 *Pseudomonas fluorescens* 2-29 可促進小麥生長及降低小麥根腐病, 證明與其所產生的 Phenazine-1-carboxylate 有關；*P. fluorescens* Hv37a 可產生一種抑制疫病菌的化合物，降低棉花 猝倒病。Howell & Stipanovic 證明純化的抗生素, 可減少棉花遭受疫病菌及 *Rhizoctonia solani* 的 危害； *P. putida* M17 可產生一種未經鑑定的抗生素可抑制馬鈴薯軟腐病，但使用不產生抗生 素的變異菌株則較無效果。

3.鐵離子嵌合物的作用

鐵是許多生物體中重要酵素的成份，惟土壤中的鐵常以鐵氫氧化物存在，不易被植物或 微生物利用。因此在缺鐵的環境下，微生物常會產生一種鐵離子嵌合物以獲取土中的鐵離 子。由於這些具有分泌鐵離子嵌合物的微生物如營光細菌，可有效的在土壤中競爭鐵離子， 故常被發現在生物防治中，扮演病原菌的拮抗微生物。Kloepper et al 首先証明在生物防治機制 中，鐵離子嵌合物產生的重要性，其後陸續發現鐵離子嵌合物與抑制鐮胞菌等多種亞種病原 菌、小麥根腐病、疫病菌及有害微生物有關。

4.促進作物生長的研究 :

Anderson & Guerra (1985) 報告水耕栽培的大豆接種 *Ps. putida* 會提高根系 lignin 含量 17~93%。Sakthivel et al (1986)亦曾報告 *Ps. fluorescens* 的多種菌系(strains)除可抑制多種病原菌 外，尚可增進水稻產量 12~27%及棉花 8~40%。Yuen & Schroth (1986)亦指出當康乃馨、紫蘿 蘭、向日葵等之種子或根接種 *Ps. fluorescens* 經 3~4 週後，與對照組相比，可增加植株鮮重 18~41%。

生物技術在生物防治上的應用實例及潛能

以往在植物病害防治的研究中，因傳統技術對於生物防治機制，不易了解與突破，但近 年來由於遺傳工程技術的發展，已有部分因藉由基因操作而得到解決。且由於利用基因轉移 技術來証明生物防治機制，已較傳統的相關性推測精確，故目前已被廣泛利用。目前在生物防治機制研究主要有抗生、競生及超寄生等三方面。

(1)抗生作用的研究

在抗生作用的研究主要証明抗生素與抑病效果的關係。方式有二：一爲生化方法直接純 化抗生素來使用，但常因不易從土壤中粹取到抗生素，或因粹取之抗生素量太低或未能施用 於感染點，而無法獲得好的結果。二爲利用基因分析技術，此技術可解決上述問題。應用步 驟如下：a 會產生抗生素之拮抗微生物應該會抑制病原菌或降低病害發生，b 若將會產生抗生 素的基因去除而獲得不產生抗生素的變異菌株，則其將喪失或降低對病害或病原之抑制能 力，c 當具有產生抗生素基因導入變異菌株後，應可恢復其抑制能力，d 依同樣原理亦可應用 於病原菌的測定(如產生對抗生素不敏感菌株等)。由此若獲得正相關則表示生物防治劑之效 用與抗生素有關。反之則無關。最明顯的例子有：

Agrocin 84：它是由 *Agrobacteium radiobacter* K84 菌株(帶有 PAG84 plasmid)所產生, 可抑制 *A. tumefaciens* (帶有 Ti-plasmid)引起雙方葉植物的癌腫病(crowngall)。証明方式爲 (i)當傳送 PAG84 進入細胞內，即可產生 Agrocin 84 而有抑制能力。反之若去除 PAG84 則失去產生 agrocin 84 的能力進而降低它的生物防治能力 (ii)當 *A.tumefaciens* 之菌株對 Agrocin 84 有抗性 時，K84 菌株即不能抑制病原之感染 (iii)當直接以部份純化的 Agrocin 84 處理於傷口可完全抑 制 *A. tumcfaciens* 爲害 (Moore1988)。另外由於基因轉移技術的利用又証明 Agrocin 84 雖然在防 治上是重要的，但並不是有效防治的唯一機制。如 Coodsey & Moore (1982) 顯示帶有已修復 PAG 84 的菌株僅能防治病害達 40~50%。

(2)營養競爭的研究

利用競爭能力強的微生物，主要在於減少可利用之特殊物質(如鐵、氮、碳、氧或其他適 宜病原生長的微量元素)而限制病原菌之生長、發芽或代謝。 由於營養競爭很難以變異菌株證 明，且添加物質可改變病害的發生，亦不能有結論性的證據顯示防治的機制是與競爭養份有 關。因此目前有顯著證明者僅在鐵離子的競爭而這又與能產生鐵離子嵌合物的微生物有關。

土壤微生物所產生的鐵離子嵌合物曾被證明與抑制鐮胞菌的厚膜孢子發芽及發芽管伸長 有關，例如對亞麻萎凋病或小麥根腐病的導病土, 可因加入 B10 菌株(可產生鐵離子嵌合物)而 變成抑病土。這顯示土壤的抑病作用部份是由於病原菌與土壤微生物競爭 Fe^{+3} 之結 果。Bakker et al(1986)曾利用 transposon element 誘變 *Pseudomonas putida* 去產生鐵離子

嵌合物的 變異菌株(sid-)，發現當其與野生菌株混合處理於土壤中,其菌落增加量較單獨處理於土中者多, 而從 *Ps. fluorescens* 病原獲得的 sid- 之菌株與 *Ps. putida* 野生菌株混合則其族群量顯著的降低。此 一結果被進一步證明顯示,來自 *Ps. putida* 的 sid-變異株會利用 *Ps. fluorescens* 的產生的鐵離子嵌 合物，反之則不能。透過遺傳分析不但有助於營養競爭作用機制的了解，且可將之直接應用 於農業栽培上。例如利用基因生物合成一種不平常的鐵離子嵌合物(不爲有害菌所利用者)， 則可適當的引入存活在一特殊寄主根圈的細菌，或利用基因轉移去改變拮抗微生物的外蛋白 質細胞膜，而能廣泛的利用土壤中微生物分泌的鐵離子嵌合物。

(3)超寄生作用研究：

超寄生作用的研究，雖有很多例子，但已經利用在植物病原之生物防治則甚少。然而有 關超寄生微生物的寄生過程(如吸附、確認等)則有助於未來生化或遺傳上的研究。至於有關 基因操作的應用，則有 Howell(1987)證明利用 *Gliocladium virens* 的超寄生是否與 *Rhizoctonia solani* 引起的棉花猝倒病有關(因爲 *G. virens* 除可寄生病原菌之菌核外，尚與抗生素 viridin 和 gliotoxin 有關)，經利用無寄生作用，但會產生抗生素的變異菌株，發現其除生長較慢外，仍 與野生菌株具有同樣的防治效果。說明了 *G. virens* 的超寄生作用不是生物防治的主要機制。 而此一結果提供了變異菌株分析是研究生物防治的良好例子，以及證明依靠外在表現出來的 相關性(如抑制作用)，去推論生物防治機制是危險的。

另外由於細胞融合技術(protoplast)的開發，也提供了寄生真菌在生物防治上的應用， 例 如 Stasz and Harman (1987)報告 *T. harzianum* 在不同菌株之核融合中，篩選出的菌株， 有些是 較具有防治 *P. ultimum* 的效果。因此生物技術的應用不僅有助於生物防治機制的探討，而且 可產生較有效的生物防治用微生物。

基因轉移技術(gene manipulation)在防治上的應用

拮抗菌在田間常受環境因子影響其殘存能力而降低其防治的效果，使得其防治成本等問 題。基因轉殖技術主要爲選殖具有防治效應的基因或殘存能力較強的基因，然後轉移至作物 或適合於存活在植物根圈內的微生物(或葉表微生物)來達到防治效果。在美國於植物表面分 離一種黃色細菌(*Erwinia herbicola*)，其中有些菌株會製造對梨火燒病(*Erwinia amylovora*)的抗菌 物質，有些具有高纏化率，利用基因轉殖技術將高纏化力基因轉移至會產生抗生物質的菌株 中，而增強這些拮抗菌在田間的殘存能力和抗生能力。目前雖然尚無實際應用在真菌病害防 治者，但由於其在病害防治上的應用深具潛力(如 siderophores)，且鑑於在醫藥、發酵工業、 細菌、病毒已有成功的例子，實是吾人應努力的目

標。

結語

生物防治成功與否，由於牽涉到病原菌、拮抗微生物、寄主及環境條件等多項因子的相互作用，因此它的應用與施行首應具備管理病原菌病害所須有的知識，尤其應先透晰病原菌本身生物學與生態學的全貌，同時也得明瞭作物及拮抗微生物生態，才能確保生物防治的成功。最近國外有關螢光細菌對其所產生的 siderophores 在抑制鐮胞菌(*Fusarium*)屬及其他土壤病害的研究甚多，尤其基因操作技術在生物防治機制的探討，更有助於生物防治策略的擬定與突破。