

出國報告（出國類別：研究）

應用有益微生物於作物土壤傳播性 病害防治技術之研究

服務機關：國立中興大學 植物病理系

姓名職稱：鄧文玲副教授

派赴國家：日本

出國期間：104年7月11日~19日

報告日期：104年10月16日

摘要

本次前往日本東京農工大學及茨城大學，主要針對有益微生物防治作物土壤傳播性病害之研究研習。在東京農工大學農學部拜訪了有江力及橫山正兩位教授，在交流過程中，了解橫山正教授在日本 311 福島核災後，與全國的生物學家合作，開發微生物製劑，對遭受輻射線污染的土壤進行復育的工作；有江力教授則是研究鐮孢菌的專家，包含菌種鑑定、親和反應研究及應用無病原性鐮孢菌防治萎凋病及水稻徒長病，根據實驗結果得知無病原性鐮孢菌株確實可以降低種子發芽後病原菌的入侵與感染，具有田間應用的價值。另外我們也拜訪了茨城大學農學部的成澤才彥教授，其主要研究領域為篩選、分離植物內生性真菌，並著重於這些內生性真菌對促進植物生長及防治病害之應用。此次研習有關微生物防治作物病害的成果及研究方向可以提供國內研究人員參考。

目次

壹、目的.....	4
貳、過程	
一、行程規劃.....	5
二、研究內容.....	6
參、心得與建議.....	11
肆、附錄.....	12

壹、目的

利用微生物製劑與非農藥資材防治鐮孢菌與青枯病引起之土傳性病害為目前採行的防治策略。其中，利用微生物資材防治最具有潛力，也是目前世界各國正積極發展的研究重點之一，不僅可以減少化學藥劑的施用，更對於環境友善，同時亦達到防治病害的效果。日本東京農工大學與茨城大學，對於應用微生物防治作物病蟲害的研究已有良好的成果，從微生物的抗菌活性測試、抗病測試評估、菌種的培養量產技術、配方製劑的製程以及產業應用方面，已有一套標準的流程，可將研究成果與產業相互連結。本次參訪研究的目的是在於學習日本微生物製劑開發的經驗，擬透過國際合作方式建立雙邊技術及智識分享管道，強化本土性微生物農藥之開發與應用，以期開發出可有效管理土壤傳播性病害之微生物防治技術，並落實於產業應用。

本次日本參訪活動得到中興大學 104 年「邁向頂尖大學計畫—農業生物科技研究中心—跨國合作研究」資助，與東京農工大學有江力教授針對由鐮孢菌所引起的萎凋病及細菌引起之茄科青枯病討論研究成果與交流資訊，同時了解東京農工大學土壤微生物的相關研究及參觀校內植物工廠設施。此外，本次參訪行程透過有江力教授協助，到茨城大學拜訪成澤才彥教授，學習有關植物內生真菌防治植物病害的研究及應用。期能將這些研究方法、病害防治及應用策略等資訊攜回國內，供業者及農民參考，使產業日益精進，發展欣欣向榮。

貳、過程

一、行程規劃

本次研究期間自民國104年7月11日至7月19日止，共9天，行程日期、地點及研究內容等簡列如下表所示：

日期	參訪地點	行程安排
7/11 (六)	日本東京	搭機，由臺灣飛往日本東京，班機時間：07:45 臺北松山國際機場-11:45 東京羽田機場。
7/12 (日)	日本東京	東京農工大學校園參訪。
7/13 (一)	日本 東京	東京農工大學土壤學研究室研習及技術交流。
7/14 (二)	日本 東京	東京農工大學植物病理學研究室研習及技術交流。
7/15 (三)	日本 東京	東京農工大學植物病理學研究室研習及技術交流。
7/16 (四)	日本 東京	東京農工大學植物工廠參訪。
7/17 (五)	日本東京	茨城大學農學部資源生物科學科參訪
7/18 (六)	日本東京	茨城大學農學部資源生物科學科微生物生態學研究室研習及技術交流。
7/19 (日)	日本東京 臺灣桃園	搭機，由日本東京飛往臺灣，班機時間：12:40 東京羽田機場-15:05 臺北松山國際機場。

二、研究內容

(一) 東京農工大學簡介

東京農工大學(Tokyo University of Agriculture and Technology)位於東京都府中市，是一所擁有農學部和工學部的日本國立大學。與京都工藝纖維大學、信州大學並稱「纖維三大學」。2004年依法改為國立大學法人。農學部的部分，1874年(明治7年)設立的內務省勸業寮內藤新宿派出所農事修學場是其前身。此後，經過數度變遷，1944年改為東京農林專門學校，1949年改為新制東京農工大學。工學部的部分，1874年(明治7年)設立的內務省勸業寮內藤新宿派出所蠶業試驗科是其前身。此後，經過數度變遷，1944年改為東京纖維專門學校，1949年改為新制東京農工大學。農學部內設有5個學科，分別為：生物生產學科，應用生物科學科，環境資源科學科，地域生態系統學科，獸醫學科。本次拜訪的有江力教授與橫山正教授，分別屬於農學部的生物生產學科土壤學研究室及應用生物學科植物病理學研究室。有江力教授的研究領域包括植物病理、土壤傳播性病原萎凋病及青枯病之防治以及病害綜合防治等；橫山正教授的研究領域則是微生物肥料開發、植物復育及土壤性質研究。

(二) 土壤微生物及微生物肥料研究及討論

此部分是與橫山教授進行學術交流與討論。因為日本311大地震後，日本將所有計畫資源全投入福島災後重建，東京農工大學開始著手研究相關研究。日本政府提供特別研究基金計畫，重建福島農地發展安全作物生產，東京農工大學分配的子項計畫為福島銫污染農地的整治及重建。該計畫共有三大目標；包含了

1. 了解放射性銫在森林移動到農地土壤的路徑及其循環；
2. 了解放射性銫在作物食用部位累積情形；
3. 如何恢復放射性銫污染之農地。

橫山政教授利用植生復育方式，配合施用菌根菌可使芥菜吸附較多的放射性銫。另外行山教授也正進行低放射性銫累積水稻品系之篩選，而目前正在進行200個品系於放射性銫污染農地栽培試驗。東京農工大大學因311大地震後，需迫切執行的放射性銫污染農地整治計畫，在橫山教授團隊發展出多種多功能生物肥料及生物肥料協同促進劑，該團隊的溶磷菌 *Aspergillus sp.* 可增加花生生質量，枯草桿菌生物肥料可增加水稻生質量及分蘗數，該團隊施用生物肥料 *Burkholderia*、*Azospirillum* 與

Gluconobacter 分別可減少小麥、水稻及甘蔗 25% 的肥料施用量，橫山教授團隊也發現多種溶鉀及溶磷菌，正在朝商品化的方向努力。另外，橫山教授團隊也發現施用含有 *Klebsiella* sp. 與 *Enterobacter* sp. 綜合微生物液肥，配合 40 ppm 幾丁寡糖可以增加水稻的產量。本次的研習及交流可以發現，日本農業大學也正極力篩選各種生物性肥料，製作成液肥製品，努力使其商品化，且各生物肥料都有其針對的作物，並配合幾丁寡糖等物質，使得微生物肥料的效果更加顯著。

（三） 作物萎凋病之防治成果交流與探討

有江力教授主要研究領域為鐮孢菌屬的鑑定、親和反應及無病原性鐮孢菌防治萎凋病之研究。此次進行技術交流，除了向教授的團隊說明國內有關作物萎凋病的防治成果以外，同時也了解目前有江力教授研究團隊利用無病原性鐮孢菌防治水稻徒長病的成果，該試驗設計為水稻開花期後，應用微生物製劑 W3 及 W5 在第 1、3、5、7 日進行花器噴灑試驗，每穗平均施用量為 5 ml，對照組以無菌水替代。待水稻成熟後收取種子，將各處理之水稻種子浸泡於水稻徒長病之孢子懸浮液中，在進行播種作業，後續調查苗徒長病的罹病情形，其結果發現無菌水試驗組之水稻徒長病罹病率達 38.7%；而處理微生物製劑 W3 與 W5 之罹病率僅只有 2.1% 與 0%。另一方面，該團隊將帶有綠色螢光蛋白基因的微生物菌株於水稻開花期間噴灑，同樣進行採收種子，重新播種後 21 天，利用共軛焦顯微鏡檢測，發現可以在苗的子葉鞘、種子表面及根部發現綠色螢光基因的微生物轉型株，顯示接種後可以長時間於種子上存活，同時可以降低水稻徒長病的感染與入侵，達到保護的效果。另一個實驗是將微生物製劑 W3 與 W5 混和徒長病菌的孢子懸浮液共同接種於水稻種子上，在播種後觀察苗期徒長病的罹病率，對照組之罹病率已達 87.1%，處理組 W3 與 W5 之罹病率僅 2.9% 與 3.3%，顯示直接施用亦有降低與控制水稻徒長病的成效。

（四） 東京農工大學植物工廠參訪

本次至東京農工大學交流，除了解農學部在有機農業、生物肥料上的研究外，另一重點為了解東京農工大學在植物工廠研發的進程。了解東京農工大學如何以自動化技術取代人力作業，藉此降低生產成本，為重要的生產管理措施。本團本次接洽應用生物科學科有江力主任帶領參訪進行植物工廠的研習。

藍莓主要產地在美國緬因州、加拿大安大略省西北以及魁北克的聖約翰湖區。藍莓，尤其是野生種，含有抗氧化劑，可以減低癌症發生的機會。藍莓等漿果類植物屬於強力抗氧化水果，能夠幫忙減緩老化、活化腦力、增強記憶力。藍莓於日本深受大眾歡迎，但由國外進口的藍莓普遍價格偏高，因此多年前日本開始引進矮叢藍莓 (*V. angustifolium*) 進行栽植，但藍莓每年只收成一次，在高消費的東京都附近栽植並不符合成本，故東京農工大學開始著手研究植物工廠內的藍莓高產技術。位於東京農工大學的植物工廠為地下一層地上一層的建築物，為縮短藍莓的生產週期，植物工廠內共分為四季不同溫室，讓藍莓在一年內經歷兩次四季變換，使得植物工廠內藍莓可一年收成兩次。為節省冷卻所需能源，該植物工廠研究團隊將秋季、冬季溫室設計於地下一樓，光照採用密集的 T8 日光燈管。

藍莓位於溫室中的養分皆由養液所提供，養液母液分 A、B 兩液，A 母液主要為氮、鈣元素，B 母液主要為磷、鉀、鎂與其它微量元素，母液利用定比稀釋器汲取進入主管線，之後進入滴灌管，藉由插在介質中的滴劍將養液提供給作物。在養液提供的部分，本國皆有足夠的技術可以使用相同的系統，但該植物工廠較不一樣的部分為其使用的栽培介質。在植物工廠栽培的作物除藍莓為大宗，該校還有進行草莓的栽培研究，兩作物都使用相同的栽培介質鹿沼土，該研究團隊使用鹿沼土混和少量泥炭土進行各種作物栽培。鹿沼土原產於日本鹿沼地區的火山區一帶，由下層火山土生成之高透氣性火山沙。保水性和通氣性良好，pH 偏酸性 5.2~5.6。有江力教授雖沒向本團解釋，但可合理推測鹿沼土偏酸為植物工廠團隊選擇使用的主要原因，藍莓為嗜酸的作物，適合介質 pH 4.5~5.5，而植物工廠內種植的草莓適合介質 pH 5.0~6.8。因此，為使兩作物在最合適的介質環境下生長，使用的養液 pH 也不同，植物工廠的養液皆利用 pH 感測器進行監控，並隨時進行調整，藍莓的養液 pH 值維持在 5.0 左右。

植物工廠環境的調控，除溫度維持在藍莓喜好的日溫 20 度，夜溫則在 12 度左右。秋冬溫室日間光照維持在 $300 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ ，春夏溫室位於一樓玻璃溫室，自然日照為其主要光照來源，當東京都冬季光照嚴重不足時，會啟用整排高壓鈉燈補充光照。秋冬溫室二氧化碳維持在高於大氣濃度的 500 ppm，這也是為何藍莓在該植物工廠雖一年生產兩季還是可以維持高產量的因素之一。

在植物工廠內對藍莓的栽培技術，除一般整枝修剪外，最重要的技術是該團隊建置位於軌道上可旋轉的圓盤，藍莓植株置圓盤上，可沿軌道移動至所需位置，並利用定時移動的機械，轉動植株所在的圓盤，主要目的是使藍莓植株四面受光均勻，讓植株各面枝條生長及產果均勻。該研究團隊更導入自動採果機，在溫室內可減少採果的人力。為解決溫室內藍莓授粉問題，該團隊在溫室內養殖熊蜂，熊蜂的密度約 6~8 坪使用 2~3 隻熊蜂。

本次參訪東京農工大學植物工廠，無論在養液使用、環境自動調控、栽培技術都可以發現日本在農業研究所投入的人力及資源皆比臺灣還要多，植物工廠團隊對於各項參數的掌握及研究，極其精細，非常值得作為臺灣農業研究的參考。

（五） 茨城大學簡介

茨城大學 (Ibaraki University) 位於茨城縣水戶市、茨城縣日立市、茨城縣稻敷郡阿見町的國立大學。1949 年，水戶高等學校、茨城師範學校、茨城青年師範學校、多賀工業專門學校合併而成立。校區可分為三個，分為水戶校區，共有教育學部、人文學部及理學部；日立校區主要為工學部；阿見校區則主要為農學部，農學部又可分為生物生產科學科、資源生物科學科及地域環境科學科。此次所拜訪的教授為成澤才彥教授，屬於資源生物科學科，主要的研究領域則是在於植物內生菌的研究及應用。

（六） 植物內生菌的研究與應用

植物內生菌 (Endophytes) 在自然界中廣泛存在，是從植物組織中或植物內部所分離獲得的，而且能夠群聚於植物細胞間隙或細胞內，而且不使植物的表型特徵或功能發生變化的微生物。大部分的內生菌對於作物不造成危害，可以與寄主作物建立共生關係，某些菌種更可以促進作物生長作用、提高作物對於植物病原菌產生抵抗力及抗環境逆境之能力、或是能透過固氮、分泌激素誘發植物生長等多重功能。植物內生菌的種類相當繁多，主要包括內生細菌、內生真菌及內生放線菌等等，內生細菌中的根瘤菌是土壤中常見的格蘭氏陰性菌，與植物可以產生固氮共生作用，無植物時可行異營生活 (heterotrophy)。在植物缺氮時，根部會分泌甜菜鹼 (betaine)、類黃酮 (Flavonoid) 與異黃酮 (isoflavonoid) 等物質誘

引根瘤菌，根瘤菌受吸引後會分泌由幾丁質跟脂肪酸 (lipo-chitooligosaccharides) 組成的結瘤因子 (Nod Factor)，促進植物根毛捲曲 (curling)，使細菌入侵根部皮層細胞、啟動皮層細胞分裂後再持續分化為根瘤 (nodule) 的構造。

茨城大學農學部資源生物科學科教授-成澤才彥博士則是研究有關植物內生菌的專家，他從植物深層根部分離出許多種內生性真菌，其中代號 Y34 菌株屬於暗色具隔膜之內生菌 (Dark Septate Endophytes, DSE)，可以產生高量的生長素 (Auxin)，濃度可達每毫升可產生 300 μg ，生長溫度與比對菌株 CBS 588.66 更能適應環境，在 37°C 的溫度 Y34 菌株仍然能夠生長，而 CBS 588.66 菌株則無法生長。此外，同時在 23°C、30°C 及 37°C 的環境下，施用 Y34 內生菌均可以明顯增加作物的乾重 (dry weight)。成澤教授也利用內生性真菌進行土壤堆肥試驗，混和一定比率內生性真菌的土壤，裝成小包裝放置於有光照的區域，後續作為農家推廣試驗用，可用來混拌育苗土，讓內生性真菌慢慢佔據植物的根部。另外利用 Y34 菌株處理作物種子，後續再接種萎凋病菌 *Fusarium oxysporum* 之孢子懸浮液；對照組則是用水處理作物種子，後續接種萎凋病菌，其結果顯示接種 Y34 之作物種子仍可正常發芽與生長，但僅接種萎凋病菌之作物種子則呈現腐敗無發芽現象，說明預先施用 Y34 可以預防萎凋病的發生。成澤教授以帶有綠色螢光蛋白 (Green Fluorescent Protein, GFP) 的 Y34 轉型株，接種於植物根部，後續以共軛焦電子顯微鏡觀察 Y34-GFP 轉型株在根部的分布情形，發現 Y34 轉型株分布於作物根表面、根毛及根組織內部，顯示 Y34 不僅可以纏聚於作物根部，還能進入植物內部組織，促進作物生長及誘導植物產生抗病反應。

參、心得與建議

- 一、 本次赴日本東京農工大學及茨城大學，研習有關土壤微生物在微生物肥料、微生物農藥研究及內生菌的病害防治研究，均得到相當多的新知及研究方向，在微生物肥料的部分，橫山教授團隊研發出多功能微生物肥料及生物肥料協同促進劑，特別也因為福島核災後，受到放射性銫污染的土壤耕作困難，遂利用微生物製劑進行土壤污染復育的工作，其結果顯示使用微生物製劑後，在落花生及水稻的產量有提升的效果，將這些具有多功能性的微生物肥料商品化，是橫山正教授研究團隊未來的研發重點。
- 二、 有關微生物防治病害的部分，特別是在對於水稻徒長病菌的研究，對於實驗的設計與細節可以給國內的研究人員參考。此外在基礎研究的部分，微生物的田間試驗有較多的可變因子及施用後對環境影響的不確定性，需經過長時間的反覆試驗，確保防治的成效能夠穩定，日本東京農工大學這部分做得相當確實。有關在無病原性的鐮孢菌微生物菌株應用於萎凋病的防治，在國內學者利用無病原性尖鐮孢菌防治胡瓜及長豇豆萎凋病的相關研究中，無病原性尖鐮孢菌菌株 Fo366 經種子粉衣與育苗介質混菌法導入胡瓜植株後，具有延緩胡瓜萎凋病病勢發展的能力，但仍無法保護胡瓜至採收後期，而後續有關 Fo366 劑型的開發與樹架壽命等問題則需要進一步的研究。
- 三、 植物內生菌的研究相當多，其中一群內生性真菌對於作物有多元的正面效應，可與植物共生、促進植物生長及誘導植物產生抗病反應。成澤才彥教授分離獲得多種內生性真菌，其中 Y34 菌株在各項實驗中均顯示有優異的促進植物生長表現，同時預先接種於作物根部，可以有效預防萎凋病的感染及降低罹病度。此外，成澤教授亦開發小包裝的真菌堆肥樣本，可以加入作物的育苗土混拌處理，提早讓內生性真菌佔據植物根部，同時達成內生作用，以避免病原菌的入侵，此部分亦可以提供國內研究人員參考。
- 四、 此次亦參訪東京農工大學植物工廠，對於藍莓與草莓的栽培研究融入了養液栽培、LED 光照及環境條件監控系統，可以生產優質的藍莓果實。另外工廠內也有模擬不同季節的生長室，每個生長室內均有可自動調整受光面的機器，確保作物受到適當的光照時間，整體而言，植物工廠的花費成本相當

高，但仍可以提供具參考價值的研究資訊。

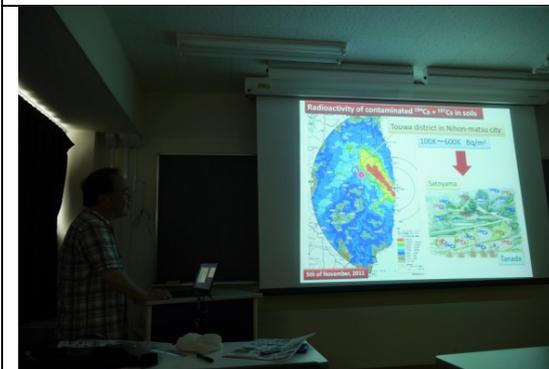
肆、附錄



東京農工大學導覽圖



東京農工大學農學部入口



橫山正教授解說他的土壤微生物近來有關微生物肥料與福島輻射污染計畫



與有江力教授（左一）與橫山正教授（左二）合照



有江力教授介紹實驗室成員



有江力教授介紹實驗室概況



有江力教授介紹實驗室微生物培養箱



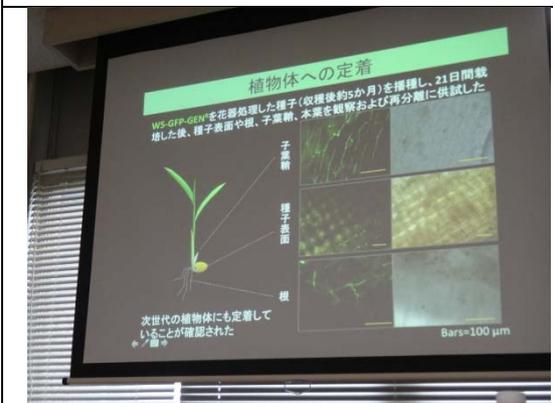
農學部公共儀器擺設於公共空間



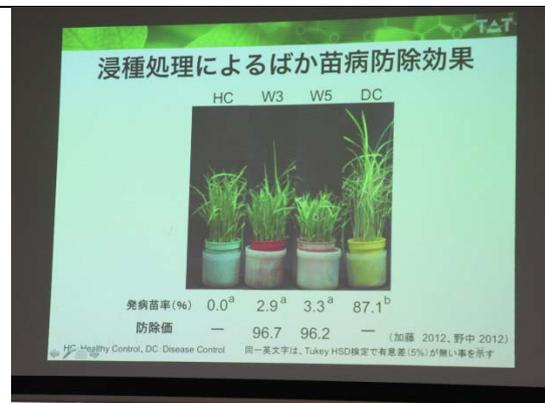
有江力教授分享微生物防治作物病害研究成果



水稻開花期預先施用無病原性鎌孢菌 W3 與 W5，後續種子接種徒長病之防治成效



施用無病原性之鎌孢菌 GFP 轉型株於水稻子葉鞘、種子表面及根部觀察情形



利用無病原性鎌孢菌 W3 與防治水稻苗徒長病，防治率可達 96.7%



有 江力教授向我們介紹植物工廠運作模式及核心技術



控制室內搭配國工研院所研發的LED光源設備



利用養液滴灌藍莓盆栽試驗



植物工廠內養液汲取系統(定比稀釋器)



利用熊蜂替藍莓授粉



已接近熟成之藍莓果實



該植物工廠同時研究草莓高產模式



試驗草莓仍然受到蟎類及白粉病感染



植物工廠養液及環境監控系統



該工廠內設有模擬各個季節的生長室



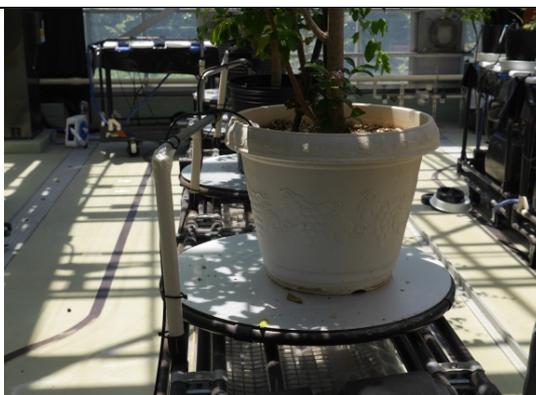
模擬夏天氣候的生長室



模擬春天氣候的生長室



可自動調整作物受光面的儀器



利用轉盤調整作物受光位置



參訪茨城大學阿見校區及農學部



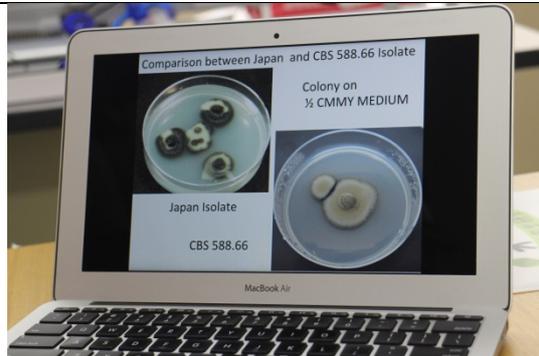
茨城大學農學部試驗大樓



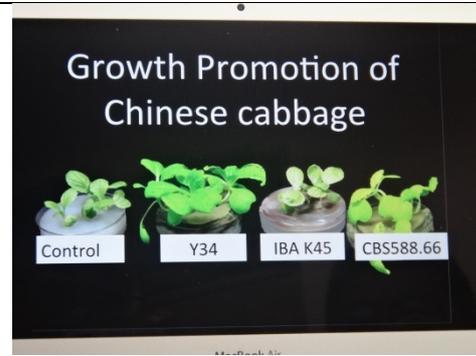
拜訪應用生物資源學科成澤才彥教授



成澤教授向我們解說內生菌的功用



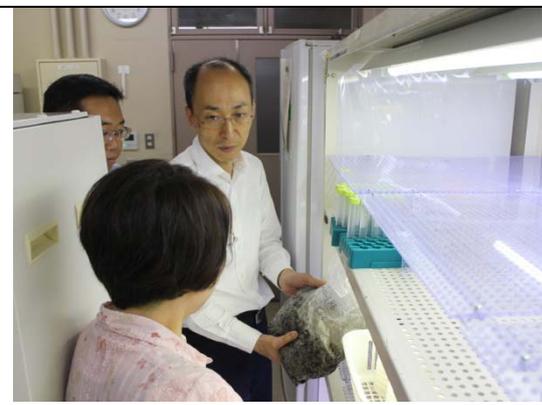
成澤教授說明內生菌的分離方式



三種內生菌施用白菜後與對照組比對結果



測試內生菌對苗期促進生長作用



成澤教授說明製作內生菌小包堆肥



試驗中的內生菌堆肥



利用土壤混拌內生菌堆肥進行盆栽青蔥疫病防治試驗



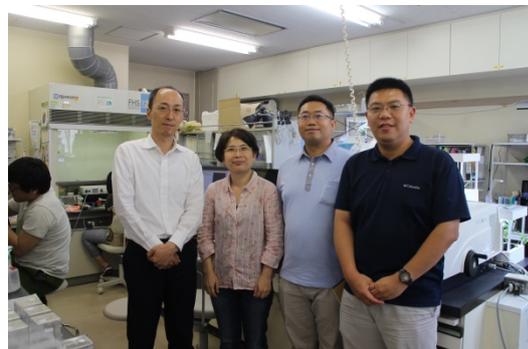
內生菌處理組可以預防萎凋病的發生



接種內生菌可以促進作物生長



暗色隔膜內生菌可以纏聚作物根部，可以促進生長及誘導作物產生抗病性



與成澤才彥教授於實驗室合影