



# 甲殼素合劑在防治洋香瓜白粉病上之應用

陳俊位

## 摘要

洋香瓜白粉病(Powdery mildew)係由白粉病菌(*Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht) Poll)所引起，其發生於葉、葉柄、嫩蔓等部位，產生白色粉末狀的分生孢子與菌絲，而後漸變為灰色，同時在其上面亦形成黑色小粒點之子囊殼。如病害繼續進行被害葉即變黃而枯落，發生嚴重時全株表面皆覆滿白色粉狀物而呈青白色。在白粉病的防治上，化學藥劑防治一直是農友所倚賴的防治方法，但相關藥劑普遍有形成藥斑、降低農產品品質、動物毒性顧慮及抗藥性產生等問題。鑑於化學防治所造成的抗藥性及病害再猖獗問題，除抗病育種外，世界各國均以各種非農藥防治法來防治本病。本研究旨在探討利用生物製劑枯草桿菌、木黴菌及甲殼素合劑來降低設施栽培內洋香瓜白粉病之危害，篩選液化澱粉芽孢桿菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)TCB102-B7、TCB9407、WG6-14、枯草桿菌(*B. subtilis*)TKS-1等菌株及木黴菌(*Trichoderma asperelloides* TCTr668)與甲殼素合劑(TCT-LC)進行防治試驗，另以10.5%平克座水基乳劑為對照藥劑。田間試驗結果發現，在發病初期，單獨施用各供試菌株與平克座皆無法有效防治白粉病，添加展著劑施用後則以甲殼素合劑(TCT-LC)防治效果最佳，防治率可達98%，且效果可維持3~4周。各供試菌株與甲殼素合劑混合施用後，可有效降低洋香瓜白粉病之危害，發病率可由90%降至10~30%，分析葉片上液化澱粉芽孢桿菌與枯草桿菌菌量發現，混合甲殼素合劑(TCT-LC)處理者其菌量比未混合者高 $1\sim 3\times 10^2$ cfu/ml。於洋香瓜白粉病發生嚴重時以葵無露、可濕性硫磺、平克座、80%碳酸氫鉀、水及甲殼素合劑施用於葉片上，以葵無露防治效果最佳，其次為甲殼素合劑，其餘處理則皆無法有效控制洋香瓜白粉病菌之危害，部份藥劑則對植株葉片及新稍造成藥害。由結果顯示，在洋香瓜白粉病發病初期施用甲殼素合劑可有效控制白粉病菌危害。

天然資材；Natural materials；甲殼素；chitosan；植物保護；Plant Protection

## 前 言

國內洋香瓜產地大多集中在台南、嘉義一帶，以台南市安南區、七股鄉栽培歷史最久，面積也多，新興地區則以佳里鎮、後壁鄉、白河鎮、鹽水鎮、東山鄉栽培較多。此外全省各地都有洋香瓜產地，蘭陽地區、的壯圍、蘇澳以出產新世蜜哈密瓜而聞名，桃園新屋鄉、雲林崙背鄉、水林鄉、太保市、義竹鄉、鹿草鄉等各有一、二百公頃之栽培面積。本省氣候終年均可生產洋香瓜主要產季大都集中在春、秋二季，大約自十一份至翌年，五月為生產旺季。洋香瓜白粉病(Powdery mildew)為洋香瓜栽培之重要葉部病害，其主要由白粉病菌(*Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht) Poll)所引起，好發生於葉、葉柄、嫩蔓等部位，會產生白色粉末狀的分生孢子與菌絲，而後漸變為灰色，同時在其上面形成黑色小粒點之子囊殼。

白粉病的嚴重性早為農友所熟知，尤其以連續採收型作物更為嚴重。白粉病菌可感染瓜類作物葉片、葉柄、嫩蔓等部位，在葉片上產生白粉狀斑點，隨後變為灰色或暗灰色，後期病斑擴大佈滿全葉，導致葉片枯萎；病斑可延伸至葉柄及莖部，影響光合作用，降低瓜果品質及產量，而以溫網室栽培者，更易受白粉病侵染。國內瓜類白粉病防治多使用化學藥劑，除造成藥劑殘留及農業環境破壞外，更會誘發抗藥性。

在白粉病的防治歷史上，硫磺粉一直沿用到近代，直到有機硫磺、二硝酸類的發明才有比較可靠的防治效果，然而這類藥劑多只有保護效果，且易造成藥斑，降低農產品品質，並有動物毒性的顧慮。二次戰後免賴得系或麥角醇抑制劑系藥劑的發明使得這類病害的防治，有近乎完美的效果，它們作用位置專一，在寄主內系統移行且使用劑量極低，兼具保護及治療的效果，在全世界廣受歡迎；唯一缺點，便是極易產生抗藥性。鑑於化學防治所造成的抗藥性及病害再猖獗問題，除抗病育種外，世界各國均以各種非農藥防治法來防治本病。在以色列，以白粉病的寄生菌(超寄生) *Ampelomyces quisqualis* 來防治設施內的白粉病<sup>(8,14,15)</sup>，其業已被商品化(AQ10、M-10、Bio-Dewcon、POWDERYCARE<sup>(r)</sup>、Filamen AQ、Green-all AQ)。在法國，有研究單位證明以矽化物可增加植物抗病性。另外中國大陸則以烷醇高分子薄膜來防止白粉菌之侵染，亦有成效<sup>(11)</sup>。我國近年來以光動物質核胺光動素作為防治手段，也得到相當的成果，甫近，利用拮抗微生物<sup>(20,21,23)</sup>、石灰硫磺合劑、乳化之植物食用油（葵無露）<sup>(17)</sup>、重碳酸鹽（80%碳酸氫鉀）、枯草桿菌<sup>(19)</sup>及植物萃取物<sup>(6,10,16,18)</sup>等有機資材，對白粉病亦有防治效果，但效果不一。近年來有機農業的推廣，在白粉病害防治上仍需更有效之防



治資材。

甲殼素應用在農業上是一種兼具生物環保的物質，甲殼素的特性有：增加產量、提高品質、增強對環境氣候變化及病蟲害的容忍性，在大自然環境中容易生物分解，並且不會累積在土壤、植物、動物及人體。甲殼質在製造過程中首先係製成甲殼素(即Chitin)，甲殼中除含有甲殼素外，尚有碳酸鈣及脂肪、蛋白質、色素等物質，故在製程中，一般以弱酸(HCl)去除碳酸鈣、以弱鹼(NaOH)去除蛋白質及脂肪。將甲殼素再以濃鹼在高溫下浸煮一段時間後，即產生脫乙醯作用，經過脫乙醯化以後的產品，即稱為甲聚醣或幾丁聚醣(Chitosan)，前述相關處理皆需用大量化學強酸鹼藥劑處理，所造成廢水廢料問題除安全問題外亦造成環境污染，而製造過程中大量原料的損耗亦是一大問題。

為增進農產品安全及促進有機農業發展，本研究目的在開發有機栽培可使用之天然素材植物保護劑及資材，運用微生物醱酵與分解技術生產高濃度幾丁聚醣合劑供有機作物栽培病蟲害防治使用，以減少連續採收型作物農藥殘留之問題。

## 材料與方法

### 菌株來源與分類特性

枯草桿菌菌株WG6-14及TKS1-1二菌株由中興大學植物病理學系分子植物病理研究室所提供，其中枯草桿菌WG6-14(*Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* Sym. *B.subtilis* WG6-14)係於台中市霧峰區的番石榴根圈土壤中分離得到，TKS1-1由埔里栽培介質中分離得到。TCB9407及TCB102-B7則為自行分離之枯草桿菌菌株，TCB9407為自彰化田中牛糞堆肥場分離得到，TCB102-B7則自雲林育苗場甘藍幼苗根系分離得到，分類鑑定後皆為液化澱粉芽孢桿菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。木黴菌(*Trichoderma asperelloides* TCTr668)則自雲林育苗場甘藍幼苗根系分離得到。甲殼素合劑(TCT-LC液態醱酵製劑)則為木黴菌(*Trichoderma asperelloides* TCTr668)添加甲殼素混合醱酵產製之製劑。

### 試驗一、生物製劑與甲殼素合劑白粉病防治測試

以生物製劑液化澱粉芽孢桿菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) TCB102-B7、TCB9407、WG6-14、枯草桿菌(*B. subtilis*)TKS-1、木黴菌(*Trichoderma asperelloides* TCTr668)等菌株及甲殼素合劑(TCT-LC液態醱酵製劑)各100倍稀

釋液為處理藥劑，並分有無添加展著劑處理，對照組則以10.5%平克座水基乳劑1000倍處理為對照，於本場（彰化縣大村鄉）簡易設施內進行對洋香瓜白粉病防治效果試驗。洋香瓜白粉病接種源係來自田間自然傳播發病之分生孢子。試驗採逢機完全區集設計，每小區10株，4重覆，發病初期開始處理，其後每隔7天處理一次，共二次，噴施時必須均勻覆蓋葉面、葉背及植株，並於處理前、第二次處理前及第二次處理後7天各進行一次罹病率調查罹病度，調查方式同下法。

## 試驗二、生物製劑與甲殼素合劑混合施用對白粉病防治效果探討

同上法將液化澱粉芽孢桿菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) TCB102-B7、TCB9407、WG6-14、枯草桿菌(*B. subtilis*)TKS-1、木黴菌(*Trichoderma asperelloides* TCTr668)等菌株與甲殼素合劑(TCT-LC液態醱酵製劑)100倍稀釋液混合有無為處理，對照組則以10.5%平克座水基乳劑1000倍處理與水為對照，於本場（彰化縣大村鄉）簡易設施內進行對洋香瓜白粉病防治效果試驗。洋香瓜白粉病接種源係來自田間自然傳播發病之分生孢子。罹病度調查方式同下法。

## 試驗三、生物製劑菌株施用後在洋香瓜葉片殘存量分析

將處理過生物製劑液化澱粉芽孢桿菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) TCB102-B7、TCB9407、WG6-14、枯草桿菌(*B. subtilis*)TKS-1、木黴菌(*Trichoderma asperelloides* TCTr668)等菌株及甲殼素合劑(TCT-LC液態醱酵製劑)之葉片取樣分析各菌種在其上之殘存量，並分有無添加展著劑處理及與甲殼素混噴處理。葉片含菌量測定於接種後隨即從植株上隨機剪下5葉，以直徑2公分之打孔器於葉片打孔後，將葉片加入含5ml無菌水之塑膠研磨袋中，以研磨器研磨葉片使其上之枯草桿菌懸浮於水中，隨後吸取1ml過濾液加入9ml無菌水之玻璃試管中進行10倍系列稀釋，取系列稀釋第1及第2管菌液5ml，以系列平板稀釋儀劃於馬鈴薯葡萄糖洋菜平板培養基上，俟乾後置於36°C培養箱中黑暗培養36小時，然後取出以菌落計數器計數其上菌落數量；以了解各供試枯草桿菌菌株在葉噴方式處理後在洋香瓜葉片之殘存量。

## 試驗四、生物製劑TCT-LC與其它白粉病防治藥劑防治效果比較

搜集市售防治白粉病藥劑進行試驗，各供試藥劑如下：a.木黴菌(TCT-



LC)50X、b.TCT-LC+泡舒50X、c.可濕性硫磺(80% WP松克魔粒)400X、d.葵無露(振詠興業)250X、e.平克座(脫百絲10.5%乳劑)1500X、f.泡舒100X、g.水、h.碳酸氫鉀(80%W.P.速綠佳)1000X。各處理並施用於發病率100%，罹病等級4之白粉病為害嚴重葉片。罹病級數則依下述方法調查。

### 罹病級數調查：

罹病級數調查時每株由頂端完全展開葉開始調查10葉。

0代表葉片無病斑，1代表葉片1-5%罹病面積，2代表葉片6-25%罹病面積，3代表葉片26-50%罹病面積，4代表葉片51%以上罹病面積，並依下列公式計算罹病度。

罹病度 =  $\Sigma$  (指數×該指數罹病葉數) / (4×總調查葉數) ×100%。

試驗資料以LSD分析各處理罹病度，以顯著基準5%比較。

## 結果與討論

甲殼素在農作物栽培上，利用其抑菌性<sup>(7)</sup>，可促進植物生長、活化植物免疫力、增加抗病能力<sup>(9)</sup>，間接達成防治病蟲害的效果，在使用實務上可用葉面噴灑、種子浸泡或混入土壤等方式來達成其作用，是一種純天然的病蟲害抑制劑<sup>(1,2,3,4,12,13)</sup>。田間試驗結果發現，在發病初期，單獨施用各供試菌株與平克座皆無法有效防治白粉病，添加展著劑施用後則以甲殼素合劑(TCT-LC)防治效果最佳，防治率可達98%，且效果可維持3~4周(表一)。各供試菌株與甲殼素合劑混合施用後，可有效降低洋香瓜白粉病之危害，發病率可由90%降至10~30%(表二)。分析葉片上液化澱粉芽孢桿菌與枯草桿菌菌量發現，添加農用展著劑對菌量維持無差異(表三)，但混合甲殼素合劑(TCT-LC)處理者其菌量則比未混合者高 $1\sim 3 \times 10^2$ cfu/ml(表四)，顯示添加甲殼素合劑有提高葉片上的枯草桿菌菌量的數目。於洋香瓜白粉病發生嚴重時以葵無露、可濕性硫磺、平克座、80%碳酸氫鉀、水及甲殼素合劑施用於葉片上，以葵無露防治效果最佳，其次為甲殼素合劑，其餘處理則皆無法有效控制洋香瓜白粉病菌之危害(表五)，部份藥劑則對植株葉片及新稍造成藥害(圖一)。由結果顯示，在洋香瓜白粉病發病初期施用甲殼素合劑可有效控制白粉病菌危害。

表一、生物製劑與甲殼素合劑對洋香瓜白粉病防治效果

Table 1. Effect of bioagent and chitosan mix-agent on control of muskmelon powdery mildew in the greenhouse test

Treatment	disease severity (%)	
	—	+ D*
a. <i>Trichoderma asperelloides</i> (TCTr668)	60	45
b. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (TCB9407)	37.5	30
c. <i>B. amyloliquefaciens</i> (TCB102-B7)	55	35
d. <i>B. amyloliquefaciens</i> (WG 6-14)	27.5	22.5
e. <i>B. subtilis</i> (TKS-1)	27.5	22.5
f. Chitosan Mix (TCT-LC)	15	7.5
g. CK : Penconazole	75	70

\*+D=spreader activator(Latron AG-89,Rohm &amp; Hass Co.)

表二、生物製劑添加甲殼素合劑TCT-LCP對白粉病防治效果之影響

Table 2. Effect of bioagent with/out chitosan mix agent on control of muskmelon powdery mildew in the greenhouse test

Treatment	disease severity (%)	
	—	+ TCT-LCP
a. <i>Trichoderma asperelloides</i> (TCTr668)	95	7.5
b. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (TCB9407)	90	12.5
c. <i>B. amyloliquefaciens</i> (TCB102-B7)	90	17.5
d. <i>B. amyloliquefaciens</i> (WG 6-14)	77.5	10
e. <i>B. subtilis</i> (TKS-1)	70	17.5
f. Chitosan Mix (TCT-LC)	32.5	4
g. CK : Penconazole	100	-

\*+D=spreader activator(Latron AG-89,Rohm &amp; Hass Co.)



表三、生物製劑菌株在洋香瓜葉片上殘留量之探討

Table3. Population dynamics of *Bacillus subtilis* WG 6-14、TKS 1-1、TCB 9407、TCB 102-B7 and Chitosan Mix on muskmelon leaf (*Cucumis melo*) after application.

Treatment	dilution(100x)	
	—	+ D*
a. <i>Trichoderma asperelloides</i> (TCTr668)	木黴菌	木黴菌
b. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (TCB9407)	$3.6 \times 10^5$	$2.8 \times 10^5$
c. <i>B. amyloliquefaciens</i> (TCB102-B7)	$1.1 \times 10^6$	$7.0 \times 10^5$
d. <i>B. amyloliquefaciens</i> (WG 6-14)	$6.2 \times 10^5$	$3.9 \times 10^5$
e. <i>B. subtilis</i> (TKS-1)	$4.4 \times 10^5$	$5.0 \times 10^5$
f. Chitosan Mix (TCT-LC)	$6.2 \times 10^5$	$1.6 \times 10^5$
g. CK : Penconazole	$8.0 \times 10^3$	$3.0 \times 10^5$

\*+D=spreader activator(Latron AG-89,Rohm & Hass Co.)

表四、生物製劑與TCT-LCP混用後菌株在洋香瓜葉片上之殘留量分析

Table4. Population dynamics of *Bacillus subtilis* WG 6-14、TKS 1-1,TCB 9407、TCB 102-B7 and Chitosan Mix TCT-LCP on muskmelon leaf (*Cucumis melo*) after application.

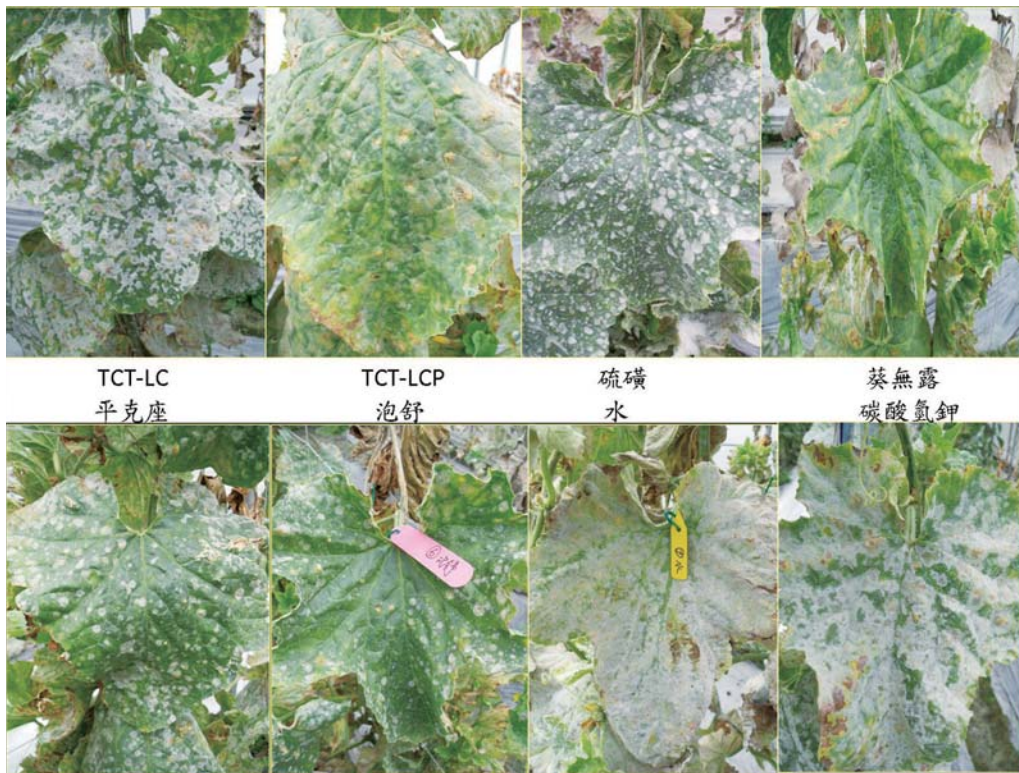
Treatment	dilution(100x)	
	—	TCT-LC + POAS ( 10Xdilute )
a. <i>Trichoderma asperelloides</i> (TCTr668)	$8.0 \times 10^4$	$2.7 \times 10^6$
b. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (TCB9407)	$4.0 \times 10^4$	$1.9 \times 10^5$
c. <i>B. amyloliquefaciens</i> (TCB102-B7)	$5.4 \times 10^4$	$1.1 \times 10^6$
d. <i>B. amyloliquefaciens</i> (WG 6-14)	$6.0 \times 10^4$	$2.1 \times 10^6$
e. <i>B. subtilis</i> (TKS-1)	$3.0 \times 10^4$	$1.1 \times 10^5$
f. Chitosan Mix (TCT-LC)	$8.0 \times 10^4$	$3.9 \times 10^4$
g. CK : Penconazole	$4.8 \times 10^4$	$1.5 \times 10^4$

表五、生物製劑TCT-LC與其它白粉病防治藥劑防治效果比較

Table 5. Effect of powdery mildew disease control after application different bioagent and chemical fungicide on field grown muskmelon.

Treatment	disease severity (%)
a. 甲殼素合劑 (TCT-LC)50X	50
b. 甲殼素合劑 TCT-LC+ 泡舒 50X	60
c. 可濕性硫磺 400X	72.5
d. 葵無露 250X	37.5
e.10.5% 平克座 1500X	87.5
f. 泡舒 100X	80
g. 水	90
h.80% 碳酸氫鉀 1000X	90

施用於發病率 100%，罹病等級 4 之白粉病為害嚴重葉片



圖一、生物製劑TCT-LC與其它白粉病防治藥劑防治效果比較

Fig1. Effect of powdery mildew disease control after application different bioagent and chemical fungicide on field grown muskmelon.





## 參考文獻

1. 但漢鴻、吳純仁 1995 植物幾丁質酶與病害防治研究進展。生物技術通報 2:1-3。
2. 陳松、黃駿麒 1997 幾丁質酶及其在植物抗真菌病中的作用。生物學雜誌 14(2): 1 - 2。
3. 馮俊麗、朱旭芬 2004 微生物幾丁質酶的分子生物學研究。浙江大學學報(農業與生命科學版) 30(1):102-108。
4. 陳榮輝 2001 幾丁質、幾丁聚醣的生產製造檢測與應用。科學發展月刊29(10): 776-787。
5. 廷芳、黃晉興、謝麗娟、胡敏夫、柯文雄 2005 植物萃取液對植物病原真菌之抑菌效果。植病會刊 14:59-66。
6. Back ,J. M., C. R.Howell and C. M. Kenertey. 1999.The role of an extracellular chitinase from *Trichoderma virens*GV 28-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. Curr. Genet. 35:41-50.
7. Belanger, R.R., C. Labbe and W.R. Jarvis. 1994. Commercial-scale control of rose powdery mildew with a fungal antagonist. Plant Dis.78:420-424.
8. Chemin, L. S. 1997.Molecular cloning , structural analysis , and expression in *Escheriehia coil* of a chitinase gene from enterobaeter agglomeram. Appl. Environ. Microbiol. 63(3):834-839.
9. Daayf, F., A. Schmitt and R. R. Belanger. 1995. The effects of plant extracts of *Reynoutria sachalinensison* powdery mildew development and leaf physiology of long English cucumber. Plant Dis. 79:577-580.
10. Dik, A. J., M. A. Verhaar and R. R. Belanger. 1998. Comparison of three biological control agents against cucumber powdery mildew(*Sphaerotheca fuliginea*) in semi-commercial scale glasshouse trials. Euro.J. Plant Pathol. 104:413-423.
11. Bolar, J. P., J. L. Norelli and K. W. Wong. 2000. Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor. Phytopathology 90:72-77.
12. Elad, Y. 2000. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. Crop Prot. 19:704-709.
13. Kiss, L. 2003. A review of fungal antagonists of powdery mildews and their potential as biocontrol agents. Pest Manag. Sci. 59:475-483.



14. Kiss, L., J.C. Russell, O. Szentivanyi, X. Xu and P. Jeffries. 2004. Biology and biocontrol potential of *Ampelomyces mycoparasites*, natural antagonists of powdery mildew fungi. *Biocon. Sci. and Technol.* 14:635-651.
15. Konstantinidou-Doltsinis, K. and A. Schmitt. 1998. Impact of treatment with plant extracts from *Reynoutria sachalinensis* (*F. schmidt*) Nakai on intensity of powdery mildew severity and yield in cucumber under high disease pressure. *Crop Prot.* 17:649-656.
16. Ko, W. H., S. Y. Wang, T. F. Hsieh and P. J. Ann. 2003. Effects of sunflower oil on tomato powdery mildew caused by *Oidium neolycopersici*. *J. Phytopathol.* 151:144-148.
17. Paik, S. B., S. H. Kyung, J. J. Kim and Y. S. Oh. 1996. Effect of a bioactive substance extracted from *Rheum undulatum* on control of cucumber powdery mildew. *Korean J.Plant Pathol.* 12:85-90.
18. Romero, D., A. Perez-Garcia, M.E. Rivera, F.M. Cazorla and de A. Vicente. 2004. Isolation and evaluation of antagonistic bacteria towards the cucurbit powdery mildew fungus *Podosphaera fusca*. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 64:263-269.
19. Romero, D., M.E. Rivera, F.M. Cazorla, de A. Vicente and A. Perez-Garcia. 2003. Effect of mycoparasitic fungi on the development of *Sphaerotheca fusca* in melon leaves. *Mycological Research* 107:64-71.
20. Szejnberg, A., Z. Paz, T. Boekhout, A. Gafni and U. Gerson. 2004. A new fungus with dual biocontrol capabilities: reducing the numbers of phytophagous mites and powdery mildew disease damage. *Crop Prot.* 23:1125-1129.
21. Urquhart, E.J., J.G. Menzies and Z.K. Punja. 1994. Growth and biological control activity of *Tilletiopsis* species against powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) on greenhouse cucumber. *Phytopathology* 84:341-351.
22. Zhu, Q., E. A. Maher and S. Masoud. 1994. Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Biotechnology* 12:807-812.