



液化澱粉芽孢桿菌對防治蔬菜土壤傳播性病害之評估

郭建志、陳俊位、陳葦玲

摘要

本場自轄內果樹栽培田土壤中，篩選數十株微生物菌種，經由分解酵素測試與抗菌活性分析，其中Tcba05菌株具有多種分解酵素活性，對於數種土壤傳播性病害之真菌病原具有抑制其菌絲生長之功效。此外，利用PCR技術可以自Tcba05菌株之核酸中，增幅出伊枯草菌素A (Iturin-A)、表面活性素(Surfactin)之專一性DNA片段，顯示Tcba05菌株具有產生抗生物質之能力。經由Biolog system細菌自動鑑定系統、16S rRNA與gyrB之序列分析後，鑑定為液化澱粉芽孢桿菌*Bacillus amyloliquefaciens*。利用此菌株經由少量250ml搖瓶、10公升以及500公升醱酵量產試驗，所產製的液劑之菌量可穩定達到 10^9 cfu/ml以上，經由溫室與田間進行小規模防治豇豆萎凋病之評估試驗，自苗期預先以100倍處理澆灌豇豆根部，每週1次，連續澆灌8次，結果可有效抑制萎凋病的發生，溫室處理組罹病度為16.7%，對照組則達87.5%；田間試驗組則是30.3%，未澆灌之對照組罹病度達79.6%。此外針對韭菜白絹病之防治試驗，以液化澱粉芽孢桿菌Tcba05液劑100倍與200倍處理，包含對照組共5種處理，自苗期開始連續澆灌3次及白絹病發病初期連續澆灌3次，經由6週的白絹病的罹病率調查，液化澱粉芽孢桿菌Tcba05之100倍與200倍處理之罹病率分別為2.81%與3.37%，但與對照組無明顯差異，而農友慣行區之罹病率則達30%以上。由試驗結果顯示，預先澆灌後可降低萎凋病與白絹病之罹病度。

前言

豆類萎凋病係由真菌镰孢菌*Fusarium spp.*所引起，為世界性重要病害之一。臺灣豆類萎凋病較常見的，由*Fusarium oxysporum f. sp. pisi*引起的豌豆萎凋病、*F. oxysporum f. sp. tracheiphilum* race 3引起的長豇豆萎凋病，此兩種病原菌皆可以存在於土壤與種子中，待種子萌芽後，由根部直接侵入，並沿著維管束而上，阻塞導管的輸水功能，造成下位葉開始黃化，初期可見半側萎凋現象，最後全株枯

死。目前仍無有效的化學防治藥劑與策略。韭菜白絹病(Southern blight)係由土壤傳播性病害*Athelia rolfsii*所引起，其無性世代為*Sclerotium rolfsii*。本病最初發病於株莖基部呈水浸狀病斑，較嚴重時之罹病株呈現倒伏狀，葉片枯萎，並於地際至被害組織表面長出白色棉狀之菌絲體，後期於菌絲體上形成多數白色的小菌核，漸變為棕色及紅棕色或深褐色，於沙質土壤危害較嚴重。本計畫擬利用所分離之液化澱粉芽孢桿菌進行功能性分析，與產製液態製劑，針對長豇豆萎凋病及韭菜白絹病，進行小規模田間防治試驗，評估其防治效果。

芽孢桿菌屬細菌在病害防治上的機制，是以多重作用機制的呈現，包含利用族群優勢與病原菌競爭養份及空間、可產生抗生物質 (antibiotics) 抑制病原菌的生長、產生多種分解酵素、產生複合揮發性物質抑制病原菌之生長、促進植物的生長及誘導植物產生抗病反應等作用^(4,5,9)。液化澱粉芽孢桿菌 (*B. amyloliquefaciens*) 是為一種好氣性的桿菌，多數菌株均可產生大量的 α -amylase 及 protease，因菌種外觀與表現特性與枯草桿菌 *B. subtilis* 相似，因此最早被學者認為是 *B. subtilis* 中的一個亞種。而 Welker et al. 在 1967 年應用 DNA hybridization 之進行研究⁽¹³⁾，發現枯草桿菌和液化澱粉芽孢桿菌之基因相似度僅 14.7~15.4%，其中兩者之 DNA guanine-plus-cytosine 成分 (G+C%) 比率亦有所差異，因此判斷兩種芽孢桿菌為不同的菌種。在 1986 年 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 的分類中，亦將液化澱粉芽孢桿菌分類為 1 個獨立菌株。後來隨著分子層次的研究以及在 α -amylase 的表現差異，之後學者 Priest 等人正式在期刊上發表，將液化澱粉芽孢桿菌真正定義與枯草桿菌是不同的菌種⁽¹⁰⁾。

內 容

一、有益微生物菌株之篩選

自南投地區果樹園區之土壤採集表土，以系列稀釋法的方式，取稀釋倍數至 6-8 次方之稀釋液，以微量吸管取 100ul 的樣本均勻塗佈於 Nutrient Agar 培養基上，共 3 重複，放置於 28°C 培養，每個培養皿挑選 1-5 個微生物菌株，共選取 25 株菌株，其中初步鑑定 21 株為革蘭氏陽性細菌，4 株為革蘭氏陰性細菌。再 21 株陽性細菌中，有 18 株為芽孢桿菌屬細菌，其餘 3 株尚未鑑定。

二、抗生物質之分子檢測

參考吳與謝等人^(1,7,8)所發表之檢測伊枯草菌素 A (Iturin-A) 與表面活性素 (Surfactin) 之專一性引子對 *ituD-f/ituD-r* 與 *sfp-f/sfp-r*，以 18 株菌株之核酸 DNA 為模



板，利用PCR檢測，結果所有菌株均可增幅出伊枯草菌素 A之專一性 DNA片段，約1,200bp；而菌株為編號05、09、13、15、18、21等6株芽孢桿菌屬細菌可以增幅出表面活性素之專一性DNA片段，約675bp。

三、先期溫室與田間防治評估試驗

長豇豆萎凋病先期防治評估

評估所篩選的細菌中，選擇抗菌活性優異的Tcba05菌株進行後續試驗菌株，利用液化澱粉芽孢桿菌Tcba05菌株100倍液態製劑，進行4種處理，每種處理2盆，每盆3株長豇豆。分別為處理1：對照組；處理2：單純澆灌Tcba05醱酵液100倍；處理3：幼苗剪根接種浸泡於*F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (FOT-tc03) 之孢子懸浮液中20分鐘，濃度為 10^5 spore/ml；處理4：幼苗根部先浸泡於Tcba05醱酵液中20分鐘，種回長型盆後再澆灌FOT-tc03懸浮液，澆灌量為100ml/株。其中處理2與處理4，每周澆灌1次Tcba05醱酵液100倍稀釋液1次，待澆灌第7次後調查其發病率與罹病度。利用液化澱粉芽孢桿菌Tcba05菌株液態製劑100倍於連作10年以上之長豇豆萎凋病田進行土壤澆灌測試，處理組3重複，均以100倍濃度澆灌根部，自102年7月下旬開始至10月上旬共澆灌8次，期間記錄處理組與對照組罹病情形。罹病度調查方式為：罹病指數區分如下：0表健康植株無萎凋情形。1代表植株出現矮化現象；2表植株開始落葉且下位葉出現黃化現象；3表植株半數以上葉片萎凋且莖部出現莖枯現象；4表植株死亡。並依下列公式算出罹病度：罹病度(%) = Σ (罹病指數x該指數罹病株數) / (4x總調查株數) x 100 %。經由溫室與田間進行小規模防治豇豆萎凋病之評估試驗，自苗期預先以100倍處理澆灌豇豆根部，每週1次，連續澆灌8次，結果可有效抑制萎凋病的發生，溫室處理組罹病度為16.7%，對照組則達87.5%；田間試驗組則是30.3%，未澆灌之對照組罹病度達79.6%。顯示預先施用液化澱粉芽孢桿菌Tcba05液劑可以降低萎凋病之罹病度。

韭菜白絹病先期防治評估

利用本場所篩選之木黴菌TCTr-668複合甲殼素製劑配方1與配方2，及液化澱粉芽孢桿菌Tcba05液態製劑100倍與200倍處理，包含對照組共5種處理，於臺中市清水區韭菜栽培田，進行白絹病防治試驗。試驗採逢機完全區集設計，每小區98株x4行，每小區共392株，4重複，發病初期開始處理，每小區水量為20公升，自苗期開始連續澆灌3次及發病初期連續澆灌3次，每隔7天處理一次，共6次，噴

施時必須均勻澆灌根部及植株，並於每次處理前與處理後7天各進行一次罹病率調查，共計7次。經調查韭菜白絹病的罹病率，以木黴菌TCTr-668複合甲殼素製劑配方1及液化澱粉芽孢桿菌Tcba05之100倍稀釋液處理之罹病率為最低，分別為2.81%與1.85%，但與對照組無明顯差異，而農友慣行區之罹病率則達30%以上。

結 語

液化澱粉芽孢桿菌*Bacillus amyloliquefaciens*屬於為革蘭氏陽性細菌，現階段許多研究證實液化澱粉芽孢桿菌具有多種功能，可以分泌多種胞外酵素、抗生物質、產生揮發性物質⁽¹²⁾、具有plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) 功能⁽¹⁴⁾與誘導植物產生抗病反應等多重機制，甚至據研究報導指出，某些*Bacillus amyloliquefaciens*菌株具有內生性 (endophyte) 的特性，可以群聚於植物組織內，保護植物抵抗病原菌的入侵或感染^(2,3,6,11)。豆類萎凋病係由真菌镰孢菌*Fusarium oxysporum*所引起，國內許多豆菜類作物皆會受到此病原真菌的為害，本研究中所研發的液化澱粉芽孢桿菌液態配方，經溫室與小規模田間防治試驗，可有效降低長豇豆萎凋病的發生與罹病情形。此外，針對韭菜白絹病之防治評估中，在試驗初期預先施用*B. amyloliquefaciens* Tcba05微生物製劑進行土壤澆灌，可以有效控制白絹病的發生，後續無澆灌時，遭逢下雨後，環境較潮濕，白絹病的發生有逐漸擴大的趨勢，顯示在本田期，仍須施用多次微生物製劑或搭配殺菌劑的使用，來控制與降低白絹病的發生。

參考文獻

1. 吳琰奇 2008 *gryB* 基因於細菌分類上的應用。生物資源保存及研究簡訊 21(1): 5-8。
2. 陳俊位、鄧雅靜、曾德賜 2009 功能性微生物製劑在有機作物栽培病害管理上之應用。有機農業產業發展研討會專輯。臺中區農業改良場特刊第96號，彰化 p.147-181。
3. 郭建志、陳俊位、廖君達、陳葦玲、蔡宜峯 2014 液化澱粉芽孢桿菌在作物病害防治的開發與應用。農業生物資材產業發展研討會專刊。臺中區農業改良場特刊第121號。彰化 p.69-86。
4. 謝奉家、李美珍、高穗生 2003 枯草桿菌菌體及其代謝產物對病原真菌之抑菌效果評估。植物保護學會會刊 45：155-162。
5. Cawoy, H., W. Bettiol, P. Fickers and M. Ongena. 2011. *Bacillus*-based biological



- control of plant diseases. In: Chap. 13. Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management p.273-303.
6. Chen, Y. J., H. R. Pan, Y. S. Lin and W. H. Chung. 2013. Identification of an antagonistic bacterial endophyte from vegetable sweet potato and assessment of its efficacy on controlling bacterial wilt disease. *Plant Pathol. Bull.* 22: 45-56.
 7. Hsieh, F. C., M. C. Li, T. C. Lin and S. S. Kao. 2004. Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. *Curr. Microbiol.* 49:186-191.
 8. Hsieh, F. C., T. C. Lin, M. Meng and S. S. Kao. 2008 Comparing methods for identifying *Bacillus* Strains capable of producing the antifungal lipopeptide iturin A. 2008. *Curr. Microbiol.* 56:1-5.
 9. Ongena, M. and P. Jacques. 2007. *Bacillus* lipopeptides : versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16(3): 115-125.
 10. Priest, F. G., M. Goodfellow, L. A. Shute and R. C. W. Berkekey. 1987. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37(1): 69-71.
 11. Yang, J. W., S. H. Yu and C. M. Ryu. 2009. Priming of denfense related genes confers root-colonizing Bacilli-elicited induced systemic resistance in pepper. *Plant Pathol. J.* 25(4): 389-399.
 12. Yuan, J., W. Raza, Q. Shen and Q. Huang. 2012. Antifungal Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 Volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* *Appl. Environ. Microbiol.* 78(16): 5942-5944.
 13. Welker, N. E. and L. L. ampbell.1967. Comparison of the α -amylase of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *J. Bacteriol.* 94: 1131-1135.
 14. Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52: 487-511.