

# 芽孢桿菌防治紅龍果炭疽病 與濕腐病之評估

郭建志

行政院農業委員會臺中區農業改良場

kuocc@tdais.gov.tw

## 摘要

紅龍果為國內近年來新興的果樹產業，栽培面積逐年增加，易衍生病蟲害的問題。影響紅龍果的產量及果品經濟價值的病害包含紅龍果炭疽病 (Anthracnose)、紅龍果莖潰瘍病 (Stem canker)，以及近年新發生的紅龍果濕腐病 (Wet rot) 等，但目前僅只有炭疽病有推薦化學藥劑可供使用，其餘病害仍無有效的藥劑使用。因此，本場致力於開發有益微生物製劑，期望可融入紅龍果栽培體系中，藉以降低病害的威脅與延長果實的貯存時間。本場自轄內紅龍果栽培田土壤中，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 3 株微生物菌株具有澱粉、纖維素、脂肪及蛋白質分解酵素活性，對於紅龍果炭疽病、莖潰瘍病與濕腐病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 3 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，顯示此 3 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*。此 3 菌株經由少量 400 ml 搖瓶、10 公升醱酵量產試驗，所產製的液態製劑之菌量可穩定達到  $10^8 \sim 10^9$  cfu/ml。經由果實浸泡 3 菌株醱酵液 10 分鐘，後續接種炭疽病及濕腐病，Tcb45 處理之發病率為最低，相較對照組具有延緩發病之效果。紅龍果濕腐病先期田間試驗中，於開花期、花瓣摘除期與果實套袋前，各噴施 1 次微生物製劑，結果以 Tcb45 菌株處理之果實腐敗病率為最低，僅 2.38%，對照組不摘花處理則已達 13.34%，具有顯著差異。因此，Tcb45 菌株可作為後續開發微生物製劑的潛力菌株。

關鍵字：紅龍果、炭疽病、莖潰瘍病、濕腐病、芽孢桿菌

## 前言

紅龍果在國內的栽培面積呈現逐年增加的趨勢，根據 103 年紀錄統計結果，國內栽培面積已達 1,676 公頃，然而，單一作物相栽培面積擴大，伴隨而來的是病蟲害日益增加的困擾，產業發展面臨病害防治不易等問題逐漸發生。紀錄上可以危害紅龍果的病害種類大約數十種，多數由植物病原真菌所引起，少部分是由病原細菌 *Erwinia sp.*、*Xanthomonas campestris* 及 *Enterobacter cloacae* (Masanto *et al.*, 2009) 引起的軟腐病。目前國內紅龍果種植過程與採收階段，常會碰到紅龍果炭疽病 (Dragon fruit anthracnose) 與紅龍果莖潰瘍病 (Pitaya fruit stem canker)，以及近幾年國內才出現的紅龍果濕腐病 (Dragon fruit wet rot)。以上這些病害均會造成紅龍果產量減少及品質下滑，特別是目前紅龍果濕腐病尚未有推薦藥劑可以給農友使用。

紅龍果炭疽病是由 *Colletotrichum* 屬的病原真菌所造成，該病原具有潛伏感染之特性，因此紅龍果在採收前受到此病原入侵，往往在採收期至儲存期間顯現出病徵，造成商品價值下降，目前根據文獻紀錄，紅龍果炭疽病主要由 *Colletotrichum gloeosporioides* 所引起，另外 *C. truncatum*、*C. capsici* 與 *C. boninense* 亦能造成紅龍果炭疽病 (蔡等，2013；Guo *et al.*, 2014)。炭疽病原以分生孢子為主要感染源，平時存活於植株殘體及莖部的病斑中，遇到高溫高濕的環境下，可藉由風力及雨水進行傳播。果實上的病斑初期呈現褐色小斑點，病斑逐漸擴大成為暗黑褐色圓形至橢圓形病斑，病斑中央會凹陷轉成黑褐色，環境潮濕情況下，中間凹陷處會產生粉紅色黏性孢子堆集子囊殼，嚴重時果實整顆腐敗，喪失商品價值。紅龍果採收期已無法使用化學藥劑進行保護，受到炭疽病感染之外觀正常果實仍會被收穫，造成儲存期間紅龍果炭疽病害的發生。

紅龍果炭疽病除了以化學藥劑防治外，以微生物製劑結合採收後處理技術，可以降低紅龍果收穫後炭疽病菌的發生 (Mohamed *et al.*, 2011)。目前常被研發為抑菌功能的微生物菌種包括螢光假單孢菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、芽孢桿菌 (*Bacillus spp.*)、木黴菌 (*Trichoderma spp.*)、放線菌 (*Streptomyces spp.*) 等，其中以芽孢桿菌屬細菌的研究為最多 (陳等，2014；郭等，2014)。芽孢桿菌屬細菌為多功能性的生物防治菌，作用機制包括抗生作用、競生作用、誘導抗病及促進生長等。可分泌抗生物質、胞外水解酵素、氨氣與揮發性氣體等 (謝，2011；Cawoy *et al.*, 2011；Ongena *et al.*, 2007)。可

間接或直接促進植物生長，提供固氮、溶磷作用活化根部的代謝表現與誘導植物產生抗病性，藉以抵抗病原菌的入侵 (Pal and Gardener, 2006)。研究學者將酪梨果實接種病原菌前後，分別浸泡於液化澱粉芽孢桿菌 (*B. amyloliquefaciens*) PPCB004 醱酵液，對於柑橘黑斑病 (*Alternaria citri*)、酪梨炭疽病 (*C. gloeosporioides*) 與柑橘青黴病 (*Penicillium crustosum*) 等 3 種貯藏病害，均有優異的防治效果 (Arrebola *et al.*, 2009)。Ashwini 等人利用 *B. subtilis* 菌株混和辣椒種子後，與炭疽病菌 (*C. gloeosporioides*) OGC1 拌種後，處理 *B. subtilis* 的種子相較對照組可降低 65% 的罹病率 (Ashwini and Srividya, 2013)。泰國研究人員利用 *B. subtilis* B12 菌株單獨處理芒果果實或結合 55°C 熱水處理果實，24 小時後再接種芒果炭疽病病原，其炭疽病防治率分別可達 91.33% 及 88.00%，而對照組免賴得藥劑處理果實之防治率僅 49.33%，另外 B12 菌株處理芒果炭疽病 12 小時後，檢測其孢子發芽率與發芽管長度僅 24% 及 21.3 um，而對照組則已達 52% 與 55.5 um (Prakong *et al.*, 2004)。

紅龍果濕腐病為近年來危害紅龍果之新興病害，林等人於 2009 年發現紅龍果果實常於採收後，自切口處發生水浸狀腐敗病徵，後續病斑迅速擴展，3~5 天內果實整顆腐敗，失去商品價值。分離其病原經鑑定與確認後，係由 *Gibbertella persicaria* 所引起 (林，2014)。本病害至田間開花期到採收後果實貯藏期間均會發生。病原菌主要是藉由風和雨水進行傳播，並以孢囊孢子殘存於植株殘體上，遇到連續降雨的時候，環境高溫多濕的情況下，病原孢子可藉由花苞與花瓣或傷口組織入侵，可為害花器、幼果及成熟果實，受害果實呈現水浸狀腐爛病徵，後期會出現灰色黴狀物，剖開後果肉呈現褐化腐敗情形，已無商品價值，由於紅龍果是連續性採收，因此掉落於果園土壤中的罹病果實與花器變成第二次感染源，等環境高溫多濕的情況，可藉由雨水飛濺再度危害紅龍果，對於紅龍果的產量及品質造成相當大的危害。林等人研究經由施用亞磷酸、波爾多液等非農藥資材，可以抑制紅龍果濕腐病菌絲生長及孢囊孢子發芽，降低濕腐病的發生 (Lin *et al.*, 2015)。

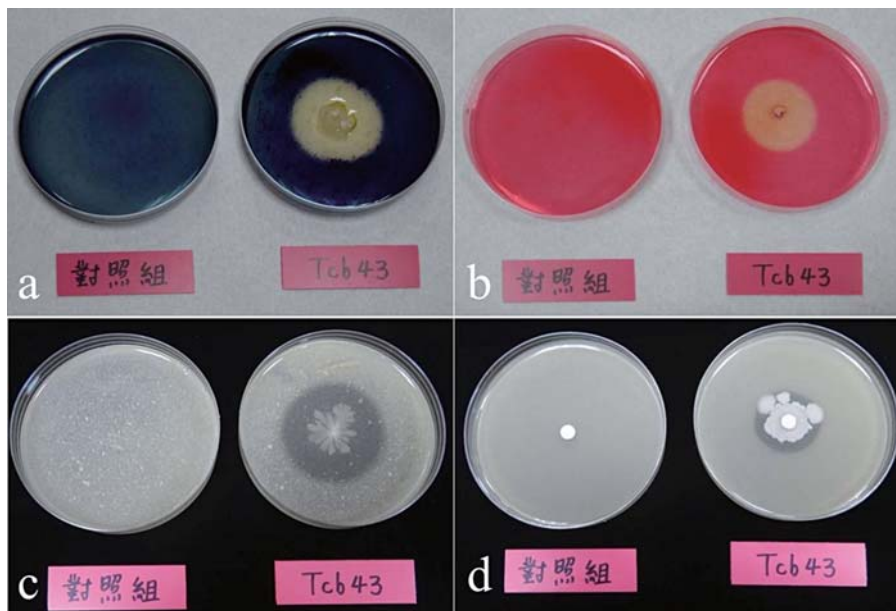
近來紅龍果栽種面積逐年增加，根據 103 年農情報告統計，本場轄內紅龍果種植面積佔全臺面積約 44%，以彰化縣種植面積為最多，將近 420 公頃。種植面積增加，容易誘發病蟲害的發生，也衍生出病蟲害抗藥性問題、農藥殘留過量情形及採收後之儲藏性病害如炭疽病的發生，近幾年經常發生之紅龍果莖潰瘍病與濕腐病等，例如濕腐病目前

並無推薦藥劑可供施用。因此本場研發有益微生物製劑於採收前預先施用，達到保護之效果，藉以降低紅龍果病害發生與延長果品之貯存時間與商品價值。

## 試驗內容

### 一、有益微生物之篩選及鑑定

自本場轄內有機紅龍果栽培田土壤中，篩選出 10 株之微生物菌株，測定澱粉、纖維質、脂質與蛋白質等 4 種分解酵素能力；以及對於 3 種紅龍果病原真菌，炭疽病、潰瘍病與濕腐病進行菌絲生長拮抗測試，結果以 Tcb42、Tcb43 與 Tcb45 之表現最佳，3 株微生物菌株均具有澱粉、蛋白質、纖維素與脂肪之分解酵素活性 (圖一)，對於 3 種紅龍果病原真菌之菌絲抑制率分別介於 40~73% 之間 (表一、圖二)。以 Biolog system 細菌自動鑑定系統進行菌株鑑定，分析 95 種碳元素利用情形，此 3 株菌株均為芽孢桿菌屬 (*Bacillus* spp.)。後續針對 16S rRNA 及 *gyrB* 基因序列，利用專一性引子對進行聚合酶連鎖反應增幅出專一性核酸片段，比對美國全國生物技術信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 上之資料庫，進行分子鑑定。鑑定結果此 3 株菌株皆為液化澱粉芽孢桿菌 *Bacillus amyloliquefaciens*。



圖一、Tcb43 菌株具有澱粉、纖維素、脂肪及蛋白質分解酵素活性

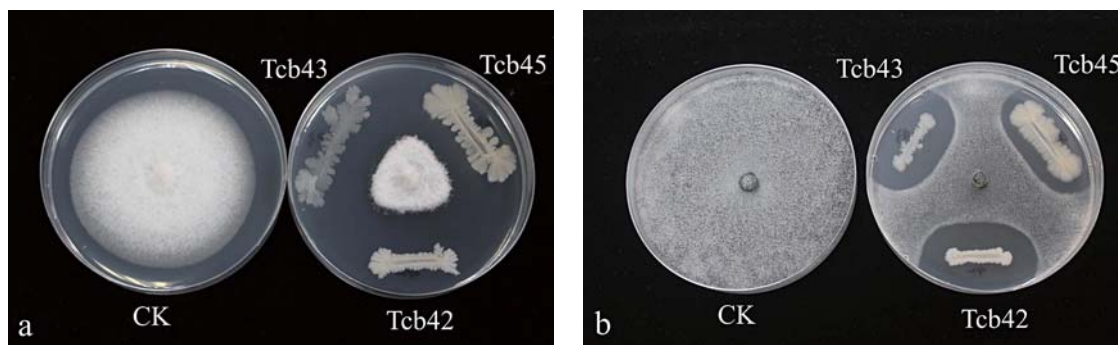
Fig 1. The Tcb43 strain have enzyme activities of amyolytic cellulolytic, lipase and proteolytic

表一、3 株芽孢桿菌菌株對 3 種紅龍果病原菌之菌絲生長抑制能力

Table 1. The antagonistic efficacy of 3 *Bacillus* spp. strain to 3 Pitaya pathogenic fungus

Pitaya Pathogen	CK	Tcb42	Tcb43	Tcb45
	antagonistic efficacy (%) <sup>1</sup>			
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	0	65	73	70
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	0	52	52	46
<i>Gibbertella persicaria</i>	0	41	43	41

<sup>1</sup> Inhibition rate was calculated according to the following formula: (mycelium diameter in check-mycelium diameter in treatment)/(mycelium diameter in check) × 100%.



圖二、3 株芽孢桿菌菌株可抑制紅龍果炭疽病 (2a) 及濕腐病 (2b) 菌絲生長

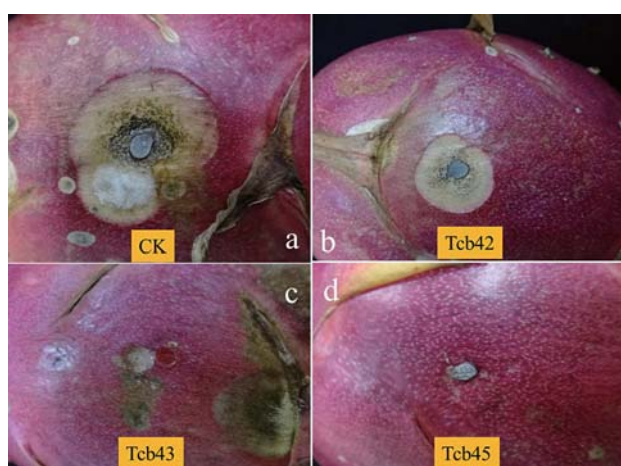
Fig 2. The 3 *Bacillus* spp. strains could inhibition the growth of *C. gloeosporioides* (2a) and *Gibbertella persicaria* (2b) mycelium

## 二、果實接種試驗

### 紅龍果炭疽病防治評估

利用本試驗中所篩選出來的 3 株芽孢桿菌菌株，以 LB Broth 進行小量 400ml 搖瓶培養，經 2 天後菌量可達  $10^8$  cfu/ml 以上，分別將紅龍果果實表皮以人工刺搓製造傷口後，浸泡於 3 菌株之 100 倍醱酵液中 10 分鐘，每種菌株處理 3 重複，每重複處理 3 顆，待果實自然陰乾後，再將炭疽病菌之菌絲塊放置於傷口處，放入保鮮盒觀察發病情形；另外同樣將紅龍果果實不製造傷口後浸泡於 3 株菌株之 100 倍醱酵液中 10 分鐘，每種菌株處理 3 重複，每重複處理 3 顆果實，之後噴施炭疽病菌之孢子懸浮液，濃度為  $1 \times 10^5$  spores/ml，每顆噴施量為 2 ml，同樣置於保鮮盒觀察發病情形。2 種接種防

治試驗分別於接種炭疽病後第 1、3、5、7 日調查發病情形，接種菌絲塊之對照組於第 3 天開始呈現輕微凹陷情形，至第 7 天已出現褐化凹陷直徑 3 公分病徵；處理組以浸泡 Tcb45 菌株醱酵液的果實，第 5 天仍無變化，至第 7 天僅出現輕微凹陷情形 (圖三)，顯示 Tcb45 菌株可以抑制炭疽病菌的入侵並延後炭疽病發病時間。以炭疽病之孢子懸浮液接種試驗中，對照組在第 5 天後，噴施處均已出現凹陷腐敗病徵，而處理 Tcb43 與 Tcb45 菌株醱酵液的處理，至第 7 天則無明顯徵狀，顯示預先浸泡此 2 菌株醱酵液的處理，可以減緩炭疽病菌的入侵與發病時間，可供後續防治評估的材料。



圖三、利用 3 株芽孢桿菌於果實上防治炭疽病 7 天後的結果  
Fig 3. The resulted of applied the 3 *Bacillus* spp. for control the Pitaya fruit anthracnose disease

### 紅龍果濕腐病防治評估

同樣利用 3 株芽孢桿菌菌株，以 LB Broth 為基礎，添加不同比例氮素源、碳素源及礦物質成分，經由 72 小時搖瓶培養後，3 株菌株的活孢子量均高於  $10^8$  cfu/ml 以上，分別將紅龍果果實表皮以人工刺搓製造傷口後，浸泡於 3 菌株之 100 倍醱酵液中 10 分鐘，每種菌株處理 3 重複，每重複處理 3 顆，以浸泡於水為對照組，待果實自然陰乾後，再將濕腐病菌之菌絲塊放置於傷口處，放入保鮮盒每 1、3、5、7 日調查發病情形。結果顯示以對照組之發病率為 100%，第 3 天開始接種部位呈現水浸狀病徵，至第 7 天整顆果實腐敗並出現灰色黴狀物。處理組以 Tcb45 之發病率為最低，僅 11.1%，Tcb42 與 Tcb43 處理之發病率則為 44.4% 及 33.3%，顯示預先將紅龍果果實浸泡於 Tcb45 菌株之液態醱酵液 100 倍中 10 分鐘，可以抑制濕腐病原感染，降低其發病率。

### (三) 先期田間濕腐病防治試驗

本次試驗選定在南投縣中寮鄉紅龍果田進行，利用 4 種微生物製劑，包含 Tcb42、

Tcb43、Tcb45 與液化澱粉芽孢桿菌 Tcba05 水懸劑 (SC) 進行預先處理，處理時機為開花期、去除花瓣後及果實套袋前共 3 次。調查項目為花瓣濕腐率、幼果摘花處濕腐率及成熟果濕腐病罹病率。此外亦調查成熟果園藝性狀，包含果重、果長與果寬。經由試驗結果，其中花瓣濕腐率以不摘花處理為最高，可達 70%；Tcba05 SC 100 倍處理為最低，為 38.88%。幼果濕腐率仍以不摘花處理為最高，達 20%；Tcb45 100 倍處理為最低，為 3.57%。經由兩次的取樣調查結果，果實濕腐病罹病率，不摘花處理組為 13.34%，Tcb45 100 倍處理組為 2.38%，而摘花處理為 5.56% (表二)。處理期間發現，幼果摘花處雖出現濕腐現象，但部分幼果成熟後，果實外觀呈現無濕腐病徵，探究原因可能為環境濕度不夠，造成病原菌無法順利感染果實。取樣調查各處理間果實之園藝性狀，在平均果重部分，以 Tcba05 SC 100X 處理組為最高，果重達 541.38 g；平均果長與果寬，各處理間並無顯著差異。對照組中不摘花處理之濕腐病比率明顯較摘除花瓣處理高，接近 15% 的受害率，而去除花瓣後配合微生物製劑噴施花瓣摘除切口處，可降低濕腐病之罹病率，平均防治率可達 55% 以上。經由本次試驗結果顯示紅龍果於開花期間、摘花後與果實套袋前搭配微生物製劑的施用，可降低紅龍果濕腐病之發生。

表二、以 6 種不同處理調查紅龍果之花瓣、幼果及成熟果濕腐比率

Table 2. The wet rot ratio of pitaya petal, young fruit and ripe fruit by applied 6 different treatment

No.	Treatment	Wet rot ratio of petal (%)	Wet rot ratio of young fruit (%)	Wet rot ratio of Ripe fruit (%)
1	Tcba05 100X within removed petal	38.88a <sup>1</sup>	5.88a	4.41a
2	Tcb42 100X within removed petal	55.55ab	4.77a	3.58a
3	Tcb43 100X within removed petal	56.41ab	5.40a	3.6a
4	Tcb45 100X within removed petal	54.84ab	3.57a	2.38a
5	CK within removed petal	62.50b	8.33b	5.56a
6	CK without removed petal	70.00b	20.00c	13.34b

<sup>1</sup> Means with the same letter in each column are not significantly different at 5% probability level by LSD test.

## 結語

紅龍果為我國近年來重要的果樹產業之一，栽培面積逐年增加，病蟲害的問題也日益增加，其中可造成紅龍果產量降低及品質下滑的病害主要是紅龍果炭疽病、莖潰瘍病及濕腐病，但目前農友僅只有炭疽病有推薦藥劑可以使用，其餘 2 種病害則無推薦藥劑可用。因此，本場近年致力開發微生物製劑，來導入於紅龍果栽培體系中，目前已自土壤中篩選出 3 株芽孢桿菌屬之細菌，此 3 株細菌均具有 4 種分解酵素活性，於平板拮抗試驗，對於 3 種紅龍果病害的菌絲均具有抑制生長之效果。此 3 株細菌經由鑑定結果均為液化澱粉芽孢桿菌，經由將果實浸泡於 3 株芽孢桿菌之醱酵、之後接種炭疽病及濕腐病之菌絲塊，放置 7 天後，其中以 Tcb43 及 Tcb45 處理之發病率為最低。後續進行紅龍果濕腐病田間防治試驗，於中寮鄉紅龍果試驗田中，於開花期、摘除花瓣期及果實套袋前各噴施 1 次微生物製劑 100 倍，其中以 Tcb45 微生物製劑配合摘除花瓣之處理，果實濕腐率最低，可作為微生物農藥的潛力菌株，後續開發適合國內紅龍果產業可以應用之生物資材。



## ■ 參考文獻

- 林筑蘋、安寶貞、蔡志濃、徐子惠、張捷婷 2014 臺灣新紀錄真菌 *Gilbertella persicaria* 引起之紅龍果濕腐病 植物病理學會刊 23: 109-124。
- 陳俊位、鄧雅靜、蔡宜峯 2014 木黴菌在作物病害防治的開發與應用農業生物資業發展研討會專刊 臺中區農業改良場特刊 121: 87-115。
- 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 121: 69-86。
- 蔡志濃、林筑蘋、安寶貞、鄧汀欽、廖吉彥、倪蕙芳、楊宏仁 2013 紅龍果的重要病害及其防治(下) 農業試驗所技術服務 96: 1-7。
- 謝奉家 2011 臺灣芽孢桿菌生物殺菌劑的研發與應用現況 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所技術專刊 205: 1-11。
- Ashwini, N. and S. Srividya. 2013. Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. 3 Biotech. 4(2): 127-136.
- Arrebola, E., R. Jacobs and L. Korsten. 2009. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. J. Appl. Microbiol. 108: 386-395.
- Cawoy, H., W. Bettiol, P. Fickers and M. Ongena. 2011. *Bacillus*-Based Biological Control of Plant Diseases. Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management. Chapter 13: 273-303.
- Guo, L. W., Y. X. Wu, H. H. Ho, Y. Y. Su, Z. C. Mao, P. F. He and Y. Q. He. 2014. First report of dragon fruit (*Hylocereus undatus*) anthracnose caused by *Colletotrichum truncatum* in China. J. Phytopathol. 162(4): 272-275.
- Lin, C. P., H. F. Ni, P. J. Ann, H. R. Yang, J. W. Huang, M. F. Chuang, S. L. Shu, S. Y. Lai, Y. L. Jiang and J. N. Tsai. 2015. Pathogen identification and management of pitaya canker and soft rot in Taiwan. Improving Pitaya Production and Marketing. International Workshop Proceedings. Kaohsiung 107-118.

- Masanto, M., S. Kamaruzamana, A. Yahya and G. M. S. Mohd. 2009 First report on bacterial soft rot disease on dragon fruit (*Hylocereus* spp.) caused by *Enterobacter cloacae* in peninsular Malaysia. *Int. J. Agric. Biol.* 11: 659-666.
- Mohamed, S. O., D. Sivakumar and L. Korsten. 2011. Effect of biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* and 1-methyl cyclopropene on the control of postharvest diseases and maintenance of fruit quality. *Crop Prot.* 30(2): 173-178.
- Ongena, M. and P. Jacques. 2007. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16(3): 115-125.
- Pal, K. K. and B. M. Gardener. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- Prakong, Y., W. Chiradej, Jingtair and Warin. 2004. Use of promising bacterial strains for controlling anthracnose on leaf and fruit of mango caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Walailak J. Sci. Tech.* 1(2): 56-69.

# The Evaluation of *Bacillus spp.* Control the Anthracnose and Wet Rot Disease of Pitaya

Chien-Chih Kuo

Taichung District Agricultural Research and Extension Station, COA

kuocc@tdais.gov.tw

## Abstract

Pitaya was the emerging fruit tree industry recently years in Taiwan, the cultivated area expensive was increasing recently, the pest would be accompanied. Among them, the Pitaya anthracnose, stem canker and wet rot diseases would cause the Dragon fruit yield loss and low quality. There are only some fungicides for control anthracnose. Therefore, we devoted to develop and research the beneficial microorganisms agent to reduce losses caused by the diseases and extension the fruit storage time, it is expect to integrate the dragon fruit cultivation system. We isolated and screen dozens microorganism strains from soil in dragon fruit field. The 3 strains all have the enzyme activities of amylase, protease, cellulase and lipase. In addition, examination the antagonistic efficacy of the mycelium growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, *Neoscytalidium dimidiatum* and *Gibbertella persicaria* in vitro in dual cultures on PDA. The Iturin-A, Surfactin antibiotic specific DNA fragment could be amplified by PCR technique. The result showed that 3 strains can produce the antibiotics. Use the Biolog automatic identification system and 16s rRNA and gyrB gene identify 3 strains as *Bacillus amyloliquefaciens*. Through the 400ml shake flask, 10L fermentation broths, the total endospores count could reach to  $10^8\sim 10^9$  cfu/ml. We soaking the dragon fruit into the 3 *Bacillus* spp. fermentation broths 100 times for 10 minutes, follow-up inoculation the mycelium blocks of anthracnose and wet rot. The resulted showed that Tcb45 treatment have the lowest disease incidence. Compared to control treatment, the Tcb45 strains would have the efficacy to delay the pathogenesis. Early field trial of Pitaya wet rot, we spray the 3 *Bacillus* agents 3 times in

flowering stage, petals removal and before bagging time, respectively. The resulted show that the lowest fruit decay ratio were 2.38% by used Tcb45 treatment, the control without remove petals were reach 13.34% with a significant difference. Therefore, the Tcb45 strain would have potential to develop microorganism agent.

**Key words:** pitaya, anthracnose, stem canker, wet rot, *bacillus* spp