

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

綜合防治園藝作物灰黴病之生物製劑的開發

Development of bio-pesticide to control gray mold of horticultural crops

計畫編號：NSC 89-2317-B002-007

執行期限：89 年 8 月 1 日 ~ 90 年 7 月 31 日

執行單位：國立臺灣大學植病系

計畫主持人：吳文希

聯絡電話：(02) 23630231-2506

傳真：(02) 23660148

電子信箱：hoganwu@ccms.ntu.edu.tw

一、中文摘要

噴佈帶有 Tn 917 之 *B. amyloliquefaciens* B190 轉型株於百合花器及葉片上，15 天後，花器上轉型株之族群數與最初接種量比較，呈顯著性地 ($p = 0.05$) 增加，在上位葉及中位葉上，5 天後，及下位葉上 10 天後，轉型株之菌落數與最初接種量相較，均呈顯著性地 ($p = 0.05$) 增加；分別噴施有或未添加製劑配方之轉型株，於葉表上，在 20、28 或 36°C 下，10 及 15 天後，轉型株在葉片上之族群數量顯著性地 ($p = 0.05$) 較第 5 天者多；*Bacillus amyloliquefaciens* B190 轉型株在溫度為 12、20 或 28°C 及相對濕度為 98 或 100 % 時，與相對濕度

為 55 % 比較，有或未製成製劑，均可顯著性地 ($p = 0.05$) 提高於葉表的存活能力。*Bacillus amyloliquefaciens* B190 轉型株在相對濕度為 98 % 以上時，於葉部正面及背面，比相對濕度為 55 % 時，具顯著性地 ($p = 0.05$) 可促進其在葉表上之遷移能力。轉型株有或未添加製劑配方，於百合葉正面及葉背，當溫度為 28°C，相對濕度為 90、95、98 或 100 % 時，比相對濕度為 55 % 時，具顯著性地 ($p = 0.05$) 高遷移能力。轉型株於黑暗或經 254 nm 波長光線照射，10 天後，存活能力顯著性地 ($p = 0.05$) 比以 315 nm 波長光線處理者高；其中，又以黑暗處理之轉型株菌落數，比光線波長為

254 nm 之處理組高，且呈顯著性地 ($p = 0.05$) 差異。將 *B. amyloliquefaciens* B190 與二十三種植物病原菌進行對峙及共同培養，可顯著性地 ($p = 0.05$) 抑制其中十六種病原菌。而 *B. amyloliquefaciens* B190 對百合灰黴病菌防治之機制，包含抗生作用及造成灰黴病菌菌絲隘縮及破裂。*Bacillus amyloliquefaciens* B190 儲存在製劑配方中，於第八個月時，族群仍與原始菌量比相若，若存放於水中，經十六個月後，仍保有 1×10^8 cfu / ml 菌體保存數。

關鍵詞：生物防治，灰黴病，百合，存活，*Bacillus amyloliquefaciens*

Abstract

Transformant of *Bacillus amyloliquefaciens* B190 could survive on lily flower for 15 days without declining its population. The population of transformant sprayed on upper and central lily leaves for 5 day or on lower lily leaves for 10 days increased significantly ($p = 0.05$) compared to the initial population. Transformant could survive well under 20°C, 28 or 36 °C on lily leaves for 10 and 15 days. *Bacillus amyloliquefaciens* B190 transformant could migrate on lily

leaves when the relative humidity (RH) was 98 or 100 %. Intact or formulated *B. amyloliquefaciens* B190 could migrate well under 28°C with 90, 95, 98 or 100 % RH compared to 55 % RH on lily leaves. Transformant grew significantly ($p = 0.05$) more under dark than under 315 nm light on lily leaves. The mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* B190 to control inhibit *B. elliptica* was due to its ability of antibiosis and mycoparasitism. *Bacillus amyloliquefaciens* B190 significantly ($p = 0.05$) inhibited 16 species of plant pathogens by means of dual and concomitant cultures on PDA. Formulated *B. amyloliquefaciens* B190 was able to survive for 8 months at least without significantly decreasing its population. Whereas the transformant in sterile pure water remained alive of 1×10^8 cfu / ml for 16 months.

Key words : Biocontrol, gray mold, lily, survival, *Bacillus amyloliquefaciens*

二、緣由與目的

當噴施生物製劑於欲防治病害之作物上，應確認拮抗微生物是否能長久佔據其上，而鑑定拮抗菌於植株上之佔據及分佈情形，可利用下列方式證明之，包括抗生素培養基篩選法、

酵素鏈結免疫分析、免疫螢光菌落、聚合酵素連鎖增幅反應、核糖核酸探針雜和反應或以標誌與報導基因 (marker and reporter genes) 之轉型株等 (Paulitz, 2000)。以報導基因 Tn917 應用於 *Bacillus amyloliquefaciens* B190 之轉型，將轉型成功之轉型株添加製劑配方後，噴施於百合花器及葉部上，可瞭解轉型株於不同溫度、濕度及 UV 光之環境逆境下所受的影響，藉以評估菌體於植株之存活及遷移能力。

三、結果與討論

拮抗菌因特性不同，而有不同的棲息位置，如上位葉或下位葉 (Elmer and Kohl, 1998)；*Bacillus amyloliquefaciens* B190 轉型株經噴佈於百合花器及葉部，15 天後，在花器上之菌落數與第 0 天比較，具顯著性地 ($p = 0.05$) 增加，而在下位葉上則無顯著性 ($p = 0.05$) 差異；但在上位葉及中位葉上則呈下降趨勢，其原因可能因花器所分泌之營養較葉片多，而利於轉型株生長所致，據報導在花器上之營養成分包括碳水化合物、氨基酸、有機酸、糖類、礦物元素、維他命及荷爾蒙 (Blakeman and Atkinson, 1981)。至於下位葉之菌落數較上位葉及中位葉高，則可能因下位葉環境

中之相對濕度較高 (Blakeman, 1972)，以及下位葉之葉表比上位葉之葉表所含之臘質少，易滯留水份，並聚集營養成分，易使微生物增殖所致 (Andrews, 1992)；*Bacillus amyloliquefaciens* B190 轉型株經噴佈於百合葉表，置於不同溫度下，15 天後，*B. amyloliquefaciens* B190 轉型株於 20、28 或 36°C 下，顯著性地 ($p = 0.05$) 增加在葉表上的生長；當轉型株製成製劑並噴佈於百合葉表，置於 20、28 或 36°C 下，經 10 天後，顯著性地 ($p = 0.05$) 增加在葉表上的菌落數。轉型株有或未添加製劑配方，於不同溫度及相對濕度下對轉型株在百合葉表上之增殖影響，以 12、20 或 28 °C，相對濕度為 98 及 100 % 時，在葉正面或背面之存活數，較低於 98 % 相對濕度之處理，呈顯著性地 ($p = 0.05$) 多，因為細菌一般不會在乾燥狀態下增殖 (Hirano and Upper, 1991)，而其他類型微生物，如酵母菌的生長，自由水是不必需的，但高溫環境 (大於 70 % 相對濕度) 對生長則是需要 (Fokkema *et al.*, 1979)。轉型株於葉背面及葉正面之相對濕度分別達 98 或 100 % 時，轉殖株之遷移能力呈顯著性地 ($p = 0.05$) 較其他處理組高；溫度為 12、20 或 28°C 時，濕度愈高，則轉型株於葉表之遷移能力顯著性地

($p = 0.05$) 較低濕度強，故高溫及高相對濕度，有利於轉型株於葉表上之存活及遷移。至於葉片正反面之菌落數，受 UV 光、低濕度及葉表氣孔及毛狀體數之差異而影響 (Surico, 1993)。

利用波長為 254 及 315 nm 之光線照射 *B. amyloliquefaciens* B190 轉型株，證明轉型株若添加製劑配方在 85 或 100 % 的相對濕度，與未添加製劑配方者比較，對 *B. amyloliquefaciens* B190 轉型株具顯著性地 ($p = 0.05$) 提高其存活之能力，其中，製劑配方中之 O-MO 物質具有保護轉型株免於 UV 光照射 (Morre *et al.*, 1993)；而菌體本身內含物，如 *Urocladium atrum* 孢子內之黑色素 (melanin) 也具有抗 UV 光的能力，(Diem, 1971)，但並無報告指出 *B. amyloliquefaciens* B190 具有產生黑色素的能力。

將拮抗菌之培養濾液，經有或無高溫殺菌或微孔過濾膜除菌，將所得之濾液與病原菌進行孢子發芽實驗，以證實拮抗菌是否為抗生作用。*B. amyloliquefaciens* B190 經培養後，菌體及其濾液有或未添加 1 % 麥芽萃取物，均可顯著性地 ($p = 0.05$) 抑制 *B. elliptica* 孢子之發芽或發芽管增長，此濾液經高溫殺菌釜滅菌後，抑制 *B. elliptica* 菌絲生長的能力則消失，當

菌體培養後，經微孔過濾膜除菌後，添加 1 % 麥芽萃取物，可顯著性地 ($p = 0.05$) 抑制百合灰黴病的發生，此種現象表示 *B. amyloliquefaciens* B190 對 *B. elliptica* 具抗生作用；但 Mari (1996 a) 指出，應用 *B. amyloliquefaciens* 防治番茄灰黴病之菌株並無胞外抗生物 (extracellular antibiotic substances) 之產生，而是靜菌作用表現所致；Pratella (1993) 及 Mari 等學者 (1996 b) 也成功地應用 *B. amyloliquefaciens* 防治梨灰黴病，且無抗生物產生。以掃描式電子顯微鏡觀察 *B. amyloliquefaciens* B190 及其製劑配方對灰黴病菌孢子發芽及菌絲生長影響，發現 *B. amyloliquefaciens* B190 具有使灰黴病菌菌絲產生隘縮及破裂之現象。

噴施 0.1 % S-TW 與 0.05 % O-MO 噴施於百合葉表，經 24 小時，並不會影響百合灰黴病菌菌絲之生長及發芽，但菌絲亦無法進入百合葉表，此可能為應用 0.1 % S-TW 與 0.05 % O-MO 於田間試驗時，表現出具有防治百合灰黴病功效的部份原因。至於，flusilazole 於百合葉表上，具有抑制灰黴病菌菌絲生長及發芽，此應為 flusilazole 於田間實驗時，具有顯著性地 ($p = 0.05$) 防治百合灰黴病發生之主因。

四、計劃成果自評

實驗進度係按原計劃實行，即已成功地瞭解溫度、濕度及 UV 光對有或未添加製劑配方之轉型株，於百合花器及葉表上的存活及遷移影響；另外，也獲知 *B. amyloliquefaciens* B190 對抑制百合灰黴病菌之作用機制，此等研究結果有助於瞭解拮抗菌的生態行為，便於未來有效地應用拮抗菌，成功地達成生物防治的目的；並為微生物生態學，提供實証實例。

五、參考文獻

- Andrews, J. H. 1992. Biological control in the phyllosphere. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30: 603-635.
- Blakeman, J. P. 1972. Effect of plant age on inhibition of *Botrytis cinerea* spores by bacteria on beetroot leaves. *Physiol. Plant Pathol.* 2: 143-152
- Blakeman, J. P., and Atkinson, P. 1981. Antimicrobial substances associated with the aerial surfaces of plants. *Microbial ecology of the phylloplane*. London: Academic. 502pp.
- Diem, H. G. 1971. Effect of low humidity on the survival of germinated spores commonly found in the phyllosphere. In: Preece, T. F. and Dickenson, C. H.(eds) *Ecology of leaf surface microorganisms* (pp. 211 - 219) Academic Press, London.
- Elmer, P. A. G., and Kohl, J. 1998. The survival and saprophytic competitive ability of the *Botrytis* spp. antagonist *Ulocladium atrum* in lily canopies. *Eur. J. Plant Pathol.* 104: 435-447.
- Fokkema, N. J., den Houter, J. G., Kosterman, Y. J. C., Nelis, A. L. 1979. Manipulation of yeasts on field-grown wheat leaves and their antagonistic effect on *Cochliobolus sativus* and *Septoria nodorum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 72: 19-29.
- Hirano, S. S., Upper, C. D. 1991. Bacterial community dynamics. P. 271-294. In Andrew, J. H., Hirano, S. S. eds. *Microbial ecology of leaves*. New York: Springer-Verlag.
- Mari, M., Guizzardi, M., Brunelli, M., and Folchi, A. 1996a. Postharvest biological control of gray mould (*Botrytis cinerea* Pers.: Fr.) on fresh-market tomatoes with *Bacillus amyloliquefaciens*. *Crop Prot.* 15: 699-705.
- Mari, M., Guizzardi, M., and Pratella, G. C. 1996b. Biological control of gray mold in pears by antagonistic bacteria. *Biol. Control* 7: 30-37.
- Morre, D., Bridge, P. D., Higgins, P. M., Bateman, R. P., and Prior, C. 1993. Ultra-violet radiation damage to *Metarrhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oil and chemical sunscreens. *Ann. Appl. Biol.* 122: 605-616.
- Paulitz, T. C. 2000. Population dynamics of biocontrol agents and pathogens in soils and rhizospheres. *Eur. J. Plant Pathol.* 106: 401-413.
- Pratella, G. C., Mari, M., Guizzardi, M., and Folchi, A. 1993. Preliminary studies on the efficiency of endophytes in the biological control of the postharvest pathogens *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in stone fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 3: 361-368.
- Surico, G. 1993. Scanning electron microscopy of olive and oleander leaves colonized by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. *J. Phytopathol.* 138:31-40.