

研究報告

微生物製劑在褐根病防治管理之應用研究

吳孟玲¹⁾ 許育晏¹⁾ 李芷芸¹⁾ 吳厚德²⁾ 洪挺軒^{3,4)}

摘 要

本研究藉由開發多株拮抗微生物菌之不同混合比例，在培養基上進行對褐根病菌抑菌效果測試。並篩選效果較佳之生物製劑進行量產，及溫室、野外樹木褐根病防治試驗，再以褐根病PCR檢測技術進行防治效果檢測。培養基試驗結果顯示對照組經培養4日後，褐根病菌可佈滿整個培養皿(直徑9 cm)，而試驗組褐根病之生長直徑介於0.62~7.80 cm，顯示生物製劑1~4號均具有抑菌效果。培養20日後，又以生物製劑2號之生長直徑1.08 cm效果最佳。模擬野外試驗結果顯示錫蘭肉桂與榕樹褐根病殘根，在僅加水保持土壤濕潤的狀態下，七週後檢測仍分別有88.89及80%褐根病病菌存活於殘根中。而每週持續添加0.2X、1X及10X濃度的2號生物製劑一次，可有效抑制褐根病菌。田間試驗方面，一株受褐根病菌感染之象牙栒經2號生物製劑處理8週後，發病情形獲得改善，且PCR檢測褐根病呈陰性反應，表示菌量已降低。另外，選定受褐根病感染疫區，在清除病株後，選定在疫區周圍尚未出現病徵之植株為樣木(台灣欒樹11棵及鳳凰木20棵)，施用大量生物製劑，可有降低及減緩發病情形。結果顯示生物製劑可被應用在褐根病之防治，預防及降低褐根病大量發生之機率，掌握褐根病防治先機。

關鍵詞：褐根病、褐根病菌、微生物、PCR、聚合酶鏈鎖反應。

吳孟玲、許育晏、李芷芸、吳厚德、洪挺軒。2014。微生物製劑在褐根病防治管理之應用研究。台灣林業科學29(Supplement):S41-53。

¹⁾ 林業試驗所森林保護組，10066台北市南海路53號 Division of Forest Protection, Taiwan Forestry Research Institute, 53 Nanhai Rd., Taipei 10066, Taiwan.

²⁾ 綠德光電股份有限公司，10582台北市松山區三民路101巷30號 Taiwan Green Device Co. Ltd. Ln. 101, 30 Sanmin Rd., Songshan Dist., Taipei 10582, Taiwan.

³⁾ 國立臺灣大學植物病理與微生物學系，10617臺北市羅斯福路四段1號 Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan Univ., 1 Roosevelt Rd., Sec. 4, Taipei 10617, Taiwan.

⁴⁾ 通訊作者 Corresponding author, e-mail: thhung@ntu.edu.tw

2014年8月送審 2014年11月通過 Received August 2014, Accepted November 2014.

Research paper

Application of Biocontrol Agents to Control *Phellinus noxius*

Meng-Ling Wu,¹⁾ Yu-Yen Hsu,¹⁾ Chih-Yun Lee,¹⁾
Hew-Der Wu,²⁾ Ting-Hsuan Hung^{3,4)}

【 Summary 】

In this study, biocontrol agents, derived from 4 screened microorganisms, for preventing the growth of *Phellinus noxius* which causes brown root rot disease were tested using simulations and field tests. The technology of a polymerase chain reaction (PCR) specific for *P. noxius*, created in our laboratory, was used to monitor the control efficiency of the biocontrol agents against *P. noxius* infection. *Phellinus noxius* covered the entire PDA culture dish (at 9 cm in diameter) within 4 d in the control group; in contrast diameters of colonies ranged 0.62~7.8 cm in the test groups bearing the 4 screened biocontrol agents. These results revealed that all agents possessed control potential against *P. noxius* infection. Of these biocontrol agents, 2 showed the best control efficiency and persistency. The *P. noxius* stubs in moistened soil for 7 wk retained about 88.89 and 80% germ survival on cassia and banyan stubs in the simulated field test, respectively. Interestingly, *P. noxius* was inhibited when the soil was moistened with 0.5x, 1x, and 10x of biocontrol agent 2. In the actual field tests, we found that 1 Philippine ebony persimmon infected by *P. noxius* gradually grew a green leaf from the withered portion after treatment with biocontrol agent 2 for 8 wk, consistent with a decrease in the *P. noxius* population detected by the PCR. Likewise, detectable *P. noxius* was gradually reduced with treatment time with biocontrol agent 2 from Taiwanese and 20 flame-infected trees. Collectively, damage by *P. noxius* can be significantly ameliorated by the biocontrol agents examined in this study.

Key words: brown root rot disease, *Phellinus noxius*, microbiology, biocontrol agent, polymerase chain reaction (PCR).

Wu ML, Hsu YY, Lee CY, Wu HD, Hung TH. 2014. Application of biocontrol agents to control *Phellinus noxius*. Taiwan J For Sci 29(Supplement):S41-53.

緒言

樹木褐根病是熱帶及亞熱帶地區林木及木本多年生作物重要病害，其病原菌為 *Phellinus noxius* 此病害會造成根部腐朽，造成植株生長衰弱，或急速枯萎死亡(Wu et al. 2009)。張東柱等(Chang 1992, Chang and Yang 1998)指出本病原寄主範圍極廣，經多年來在褐根病病原性及寄主範圍調查研究，發現在台灣已有100多種寄主植物，包括多種珍貴老樹、公園行道樹、

海岸防風林及數種草本一年生植物等，並陸續被增加中。在褐根病發病的林地，常發現病害自一發病中心逐漸向四周擴散，此現象顯示褐根病的傳播主要經由根部接觸由病根傳給健康植株之根部(Chang 1996)。以往褐根病診斷技術，通常是進行病組織純培養分離，觀察菌絲型態來判定(Ann et al. 2002)。且本病原菌在自然界鮮少形成子實體，必須當病原菌已嚴重危

害樹種，從其為害的根部及莖基部之茶褐色或黑褐色的大片菌絲面包圍，及受害木材切面具有明顯黃褐色網紋帶判斷。在診斷上有賴植病專業人員尚且不易立刻診斷鑑定，每每造成疫情之延誤(Wu et al. 2009)。蔡志濃等(Tsai et al. 2005, 2008)指出*Phellinus noxius*引起之褐根病為目前引起我國果樹、木本觀賞植物及林木立枯之最重要病害，約佔超過50%左右的比率。故尋求有效防治褐根病的策略與方法為現今刻不容緩之議題。

近年來很多研究報告指出用生物防治，如微生物拮抗作用以及土壤有機添加物，或許可以替代化學農藥以防治植物病害(Huang and Chou 2005)。且天然篩選出之微生物，對高等動物，如人體、禽、畜、魚；或是較低等動物，如蜜蜂、蝴蝶、蚯蚓等，毒性低及對環境不造成污染。因此，應用生物製劑在林業上也可減少化學藥劑的使用，以降低化學藥劑對環境的衝擊，符合世界環保的潮流(Wu et al. 2005)。除此之外，功能性微生物也扮演促進植物生長、養分吸收及病害抑制之各種角色。近年來更發現其能誘導植物產生系統性抗性，而使病原感染時所造成之發病率或罹病程度顯著降低，此種抗性現象顯露了生物防治的一種新機制，也開啟了植物病害防治的新途徑(Berg 2009, Zhou et al. 2009)。

故本研究之目的是先以培養基試驗來篩選生物製劑在培養基上抑制褐根病菌生長之效能。獲得之最優效能之生物製劑，進一步地進行溫室及野外試驗防治評估。並透過褐根病病徵觀察，配合聚合酶鏈鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)進行分子檢測褐根病菌量變化，綜合評估樹木經生物製劑處理後之耐病防治效果，期能提供環保而有效的方式，預防褐根病大發生，以做為褐根病健康管理之參考。

材料與方法

一、微生物製劑之製造

(一)本研究之採樣土壤來自於台北內湖白石湖原始天然森林之有機質土壤。採集好的土壤樣品

並且於當日時處理。

(二)採樣之有機質土壤加入纖維素作為微生物的碳源，以利增殖培養，以提高樣本中微生物的濃度。

(三)經過增殖培養後，樣品中的微生物經分離、純化，取得本研究所須要之菌種。在這一步驟中，使用劃線法分離取得本研究所須的不同菌種。依不同的培養基，本研究中所須之菌種共有放線菌(Actinobacteria)、乳酸桿菌(*Lactobacillus* spp.)、光合成菌(Photosynthetic bacteria)及酵母菌(yeast)。

(四)經過分離培養，在平板上出現很多單個菌落，通過菌落形態觀察，選出所需菌落，取菌落的一半進行菌種鑒定，對於符合目的菌特性的菌落，可將之轉移到試管斜面純培養，即可得純種野生型菌株。

(五)依本研究之目的，調配包含不同上述分離菌種比例之四種複合型微生物製劑配方，供褐根病菌菌株在培養皿拮抗實驗。選擇拮抗狀況最強之一組複合型微生物製劑作為後續實驗之複合型微生物製劑配方。

二、褐根病菌菌株之收集與純培養

從罹病林地的植物根部組織切取 0.5×0.5 cm²大小樣本數片，浸泡於0.5% NaOCl溶液45秒作為初步消毒，再以ddH₂O震盪清洗數秒，靜置於擦手紙上以除去多餘水分，用鑷子夾取置於MA+4選擇性培養基(Chang 1995) (2% malt-extract, 2% agar含有1000 ppm Benlate, 1000 ppm Dicloran, 40 ppm Ampicillin, 200 ppm Gallic acid)上，於28°C恆溫生長箱中培養2~3天，切取菌落邊緣之新生菌絲塊(0.5×0.5 cm²) 4~5片，轉置到新的選擇性培養基上，待4~5天後重覆轉置一次，之後切取十數片新生菌絲塊，浸泡於ddH₂O中作為菌種保存。將*P. noxius* 菌株培養於MA+4培養基上，在經切取單菌絲尖端或經單胞分離後培養於MA+4培養基上，以供後續實驗之用。

三、培養基試驗

生物製劑之篩選是將PDA培養基分別添加各種試樣後接種褐根病菌絲塊（約 $0.5 \times 0.5 \text{ cm}^2$ ），於溫度 28°C 之環境下培養觀察褐根病菌於各種生物製劑添加培養基之生長情形。各試樣分成兩種處理組：(一)生物製劑添加於整個培養基；(二)培養基半側添加生物製劑，另半側不添加生物製劑。並根據結果選用效果較佳之生物製劑進行後續試驗。

四、模擬野外溫室試驗

模擬野外溫室試驗是將已感染褐根病之錫蘭肉桂與榕樹根部裁切成約 $3 \times 3 \times 10 \text{ cm}^3$ 之尺寸，分別置於經高壓滅菌釜處理之培養土中，將含有褐根病菌殘根之樣土做下列五種處理：(一)添加生物製劑10X；(二)添加生物製劑1X；(三)添加生物製劑0.2X；(四)不添加生物製劑，僅添加水保持土壤濕潤；(五)不添加生物製劑，添加化學藥劑(三得芬)。每週施用生物製劑或化學藥劑一次，連續施用7週，並於施用前採集各試樣，將各試樣以MA+4培養基於 28°C 生長箱中培養7日後，取培養基上之菌絲做DNA抽取，再進行褐根病專一性聚合酶鏈鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)檢測，分析其是否有褐根病菌反應。並且比較褐根病菌於上述五種處理土壤之消長情形，進行生物製劑防治效果評估。

五、將受褐根病感染樹木做病期分級，進行野外試驗

將感染褐根病之樹木進行病期分級：早期，樹木本身並無病徵出現，但PCR分子檢測呈現陽性反應；中期，樹木樹勢出現衰弱，枝葉生長不茂盛，且PCR分子檢測呈現陽性反應；晚期，樹木全株出現枯黃，瀕臨枯死。

野外試驗是將受褐根病菌感染之樹木經生物製劑施加處理後，觀察其樹木外觀病徵變化，並配合褐根病菌聚合酶鏈鎖反應技術進行檢測褐根病菌消長反應。本試驗選則三個樣區：林業試驗所研究大樓右方象牙柿、三重高中校門口旁右側11棵台灣欒樹、淡江大學商館大樓與教職員停車場一帶之20棵鳳凰木為樣

區。試驗方法是於施用生物製劑前採集各樹木根部，將各試樣以MA+4培養基培養4日後，取培養基上之菌絲做DNA抽取，再進行PCR檢測，分析觀察PCR反應產物的電泳結果，觀察其是否有褐根病菌反應。而生物製劑之使用劑量為每棵澆灌40 L，並在其根部至離地120 cm處噴灑2 L。使用時間為第一個月施藥4次，每週施藥1次；第二個月施藥1次；第三個月施藥1次；第四個月施藥1次，施藥共計7次。

六、罹褐根病樹木根部DNA之抽取

採集感染褐根病之樹木根部，取0.15g組織利用液態氮於研鉢磨碎後，加入2X CTAB核酸抽取緩衝溶液(100 mM Tris-HCl, 1.5 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB (hexadecyltrimethyl ammonium-bromide), 0.2% mercaptoethanol, pH 8.0)，置於 65°C 水浴作用1小時，加熱期間取出震盪數次。之後加入1/2體積之氯仿/異戊醇(chloroform/isoamyl alcohol, CIAA, 24: 1 v/v)，劇烈混合至乳褐色後，以12,000 rpm離心5分鐘，收集含有核酸之上方水層；再加入1/2體積之酚/氯仿/異戊醇(phenol/CIAA, phenol: CIAA = 1: 1 v/v)，劇烈混合至乳白色，以12,000 rpm離心5分鐘，收集含有核酸之上方水層。最後加入等體積之異丙醇(isopropanol)及1/10體積之3M NaOAc在 -20°C 沉澱DNA 10 min，高速12,000 rpm離心5 min收集沉澱核酸，再以70%酒精洗滌沉澱之核酸以去除殘留之鹽類，真空抽氣乾燥處理，加入50 μl TE buffer溶解核酸，置於 -20°C 下保存備用，供PCR反應之用。

七、*Phellinus noxius*專一性引子對PCR增幅反應

褐根病聚合酶鏈鎖反應部份是先抽取感染褐根病樹木根部DNA，再以針對*P. noxius* ITS1-F與ITS4區間之保守性序列設計專一性引子對，引子對序列為：primer G1-F：5'-GCC CTT TCC TCC GCT TAT TG-3'；primer G1-R：5'-CTT GAT GCT GGT GGG TCT CT-3'。以引子對G1F/G1R進行PCR增幅反應，25 μl PCR反應溶液中含：2 mM MgCl_2 、0.2

mM dNTPs mixture、50 ng引子對、1.5 U Tag DNA polymerase (Invitrogen, San Diego, CA, USA)、100 ng模板核酸(template DNA)。PCR反應器所設定之反應程式為：94°C預熱2分鐘；再以94°C 30秒變性(denaturation)，54°C 30秒黏合(annealing)，72°C 30秒延展(extension)進行30個循環(cycles)；最後再以72°C反應10分鐘使Taq酵素完全作用，即完成PCR反應。PCR反應產物分析，以1.5%瓊脂凝膠溶於0.5X TAE (Tris-acetate-EDTA) buffer，使用100伏特之迷你電泳槽(Mulpid II, Cosmo, Japan)進行分析，經EtBr (Ethidium Bromide, 0.5 µg/ml)染色後，以AlphaImager™電泳照相系統(Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA)分析觀察聚合酶連鎖反應產物的電泳結果。

結果與討論

一、培養基試驗

利用生物製劑添加在培養基上，對褐根病菌消長試驗之評估，來進行生物製劑應在褐根病健康管理之篩選。Figures 1~4分別為生物製劑1~4號添加於PDA培養基下抑制褐根病菌20日之生長情形。試驗組之上排為右半側有添加生物製劑，左半側則未添加；下排為整個培養基均添加生物製劑。試驗結果(Table 1與Figs. 1~4)顯示：對照組PDA培養基於28°C培養4日後，褐根病已長滿整個培養皿(直徑9 cm)；而試驗組之褐根病菌生長直徑則被限制於0.62~7.80 cm。經Duncan's多變域測驗在顯著水準5%的檢定結果顯示有顯著差異，表示生物製劑1~4號均具有抑制褐根病菌生長的效果，其中又以生物製劑2號之抑制效果最佳。若培養10日後，生物製劑4號處理組其培養基已長滿褐根病原菌絲，而其他處理組之褐根病菌生長直徑仍侷限於0.63~3.37 cm，顯示生物製劑1~3號經10日後仍有抑制褐根病菌生長之效果。培養20日後，生物製劑1~3號仍對褐根病菌生長仍具抑制性，其中生物製劑2號之效果最佳，其生長直徑僅為1.08 cm。而從右半側添加生物製劑，左半側未添加之試驗組中可觀察到褐根病菌於右半邊生

長較為緩慢，而左半邊之褐根病菌其菌絲會先往遠離添加生物製劑之方向生長，顯示褐根病菌之生長會受生物製劑抑制。因培養基試驗結果以生物製劑2號結果為最佳，故選取生物製劑2號進行後續試驗。

二、模擬田間試驗

本試驗以模擬田間試驗，進行生物製劑對於土壤中含有褐根病菌殘根之生物防治效果評估。由於褐根病主要經由殘留在土壤的病根傳播，因此殘留土壤病根的生態與病害的發生息息相關，故以模擬田間試驗探討生物製劑於土壤中對殘根之褐根病菌的影響。模擬田間試驗結果顯示(Tables 2 and 3)，錫蘭肉桂與榕樹褐根病殘根於試驗期間加水保持土壤濕潤不作任何處理七週後，錫蘭肉桂有88.89%、榕樹有80%褐根病菌存活於殘根中，此結果與Chang (1996)感染*P. noxius*的木材於各種含水率的處理後，除浸水的處理外，經過兩年仍有高達80%以上的存活率相符合。

錫蘭肉桂殘根實驗中，於第1、2次添加生物製劑10X、1X及0.2X與未處理組經過Duncan's多變域測驗即有明顯的差異。於第3次添加生物製劑後與未處理組的差異更加顯著，這個顯著差異維持直到第7次施藥後。其中以添加1X劑量生物製劑的效果最好，在第3次添加生物製劑後可將有褐根病反應之機率降低到達0至0.11之間。

榕樹殘根實驗中，添加生物製劑10X、1X及0.2X試驗組於第4次添加生物製劑後，結果與錫蘭肉桂相同，且連續施用7次後均與對照組仍有顯著差異。因為本生物製劑中的微生物添加入土壤中後，可直接抑制病原菌之生長、繁殖與為害。而且微生物會在土壤環境中迅速繁殖，成為優勢族群，與病原菌產生空間與營養性競爭，阻擾病原菌生長，間接達防治效果。無論是直接或間接的作用，都會使褐根病菌的數量大幅下降，達到PCR檢測不出的程度。

Hesslink et al. (1990)指出三得芬為抑制固醇合成之殺菌劑(Sterol biosynthesis inhibiting fungicides, SBIs)，其作用機制是影響真菌細胞

膜上重要組成份—麥角固醇(ergosterol)之生合成，使其缺乏導致膜的通透性改變菌類形態改

變，菌絲乾重無法增加。Table 2顯示錫蘭肉桂殘根經三得芬化學藥劑處理後，檢測出褐根病

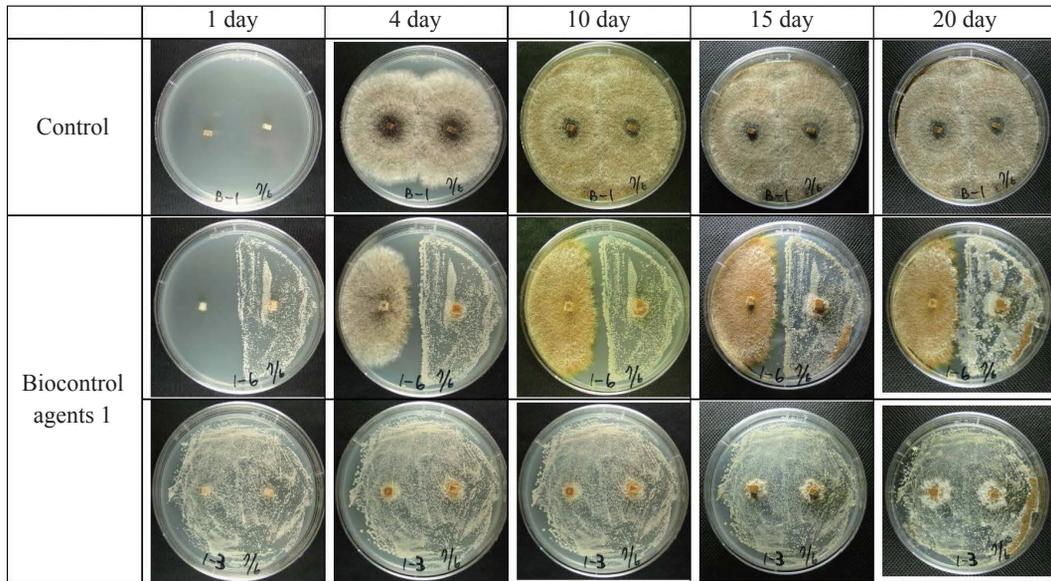


Fig. 1. Evaluation of the inhibitory effect of biocontrol agent 1 on mycelial growth of *Phellinus noxius*; *P. noxius* and the biocontrol agent were cocultured on PDA plates. Top panel: no biocontrol agent.

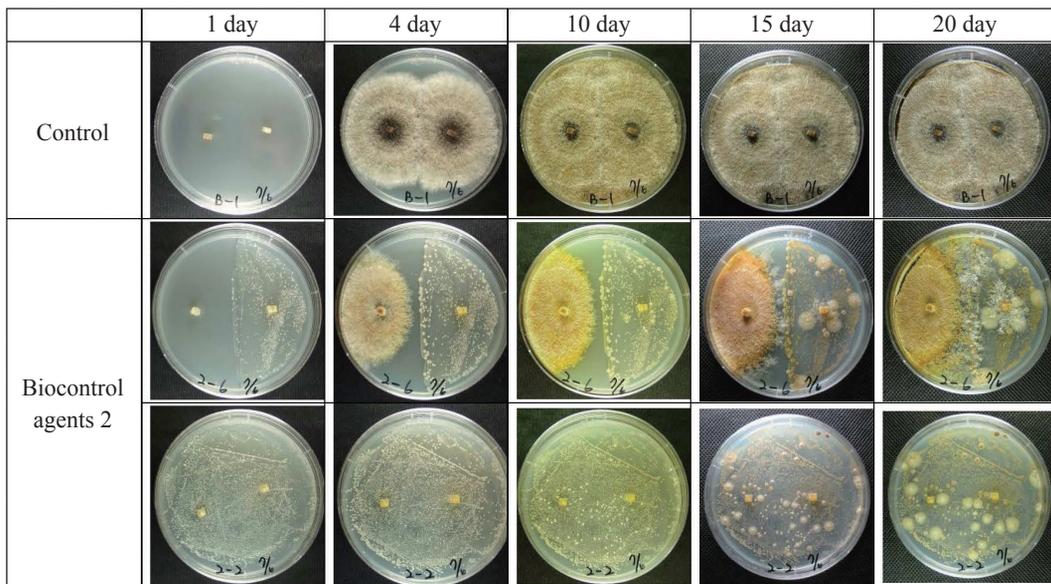


Fig. 2. Evaluation of the inhibitory effect of biocontrol agent 2 on mycelial growth of *Phellinus noxius*; *P. noxius* and the biocontrol agent were cocultured on PDA plates. Top panel: no biocontrol agent.

菌反應之機率由0.55降至0.11，是三得芬直接抑制褐根病菌所致，且抑制褐根病菌之效果會與

化學藥劑添加量成正比。然而添加三得芬化學藥劑雖可有效抑制褐根病，且添加越多抑制褐

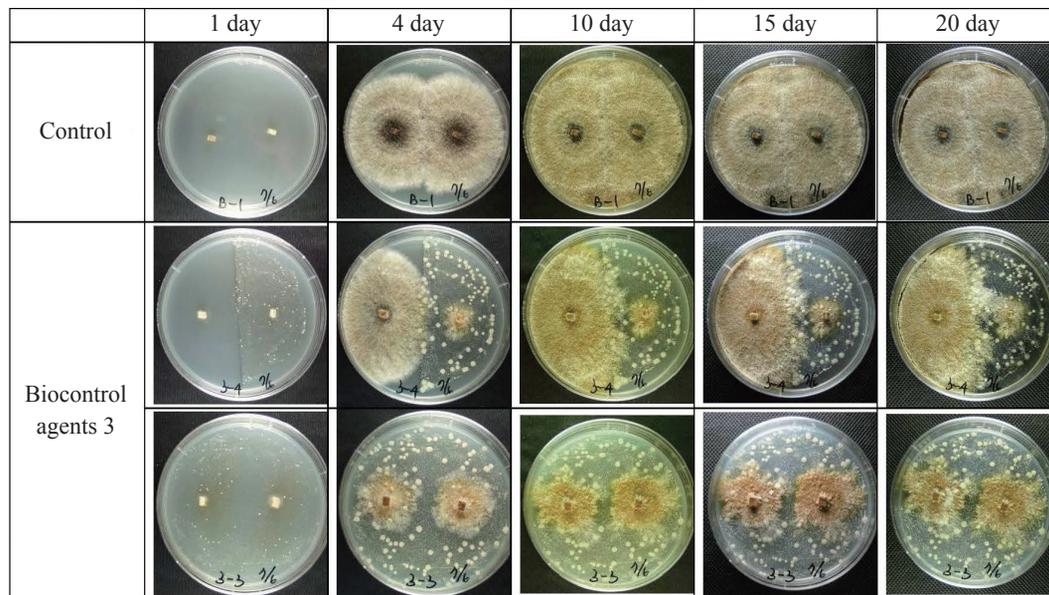


Fig. 3. Evaluation of the inhibitory effect of biocontrol agent 3 on the mycelial growth of *Phellinus noxius*; *P. noxius* and the biocontrol agent were cocultured on PDA plates. Top panel: no biocontrol agent.

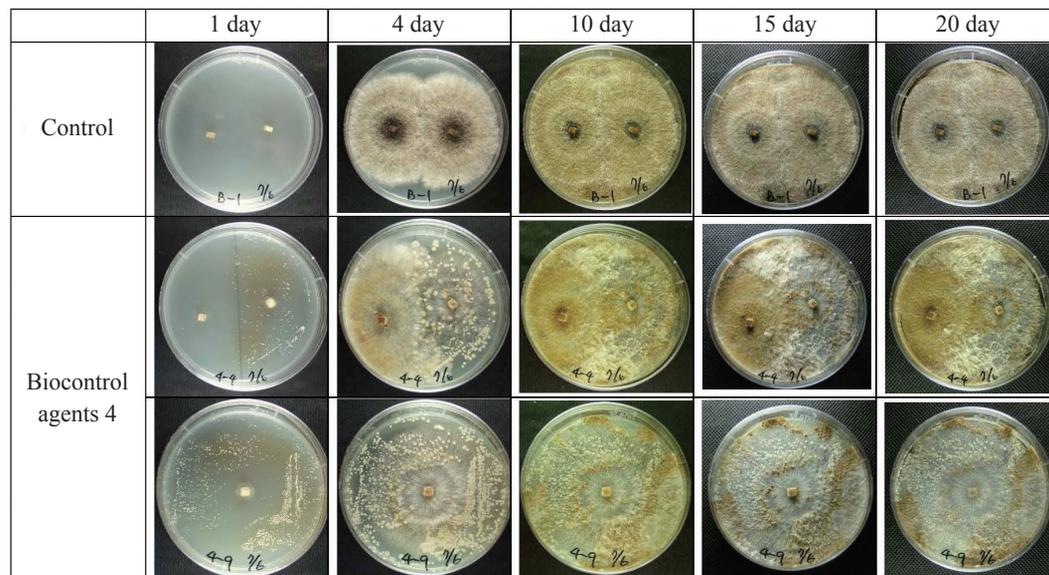


Fig. 4. Evaluation of the inhibitory effect of biocontrol agent 4 on the mycelial growth of *Phellinus noxius*; *P. noxius* and the biocontrol agent were cocultured on PDA plates. Top panel: no biocontrol agent.

Table 1. Effects of different biocontrol agents on the mycelial growth of *Phellinus noxius*

	4 d	10 d	15 d	20 d
Control ()	9.00 (0.00) ^a	9.00 (0.00) ^a	9.00 (0.00) ^a	9.00 (0.00) ^a
Biocontrol agent 1	0.80 (0.14) ^d	1.04 (0.20) ^c	1.21 (0.20) ^c	1.47 (0.23) ^c
Biocontrol agent 2	0.62 (0.13) ^d	0.63 (0.15) ^d	0.73 (0.28) ^d	1.08 (0.96) ^c
Biocontrol agent 3	2.83 (0.51) ^c	3.37 (0.68) ^b	3.91 (0.56) ^b	4.26 (0.52) ^b
Biocontrol agent 4	7.80 (0.93) ^b	9.00 (0.00) ^a	9.00 (0.00) ^a	9.00 (0.00) ^a

Diameters (cm) of *P. noxius* are represented by numbers, and the standard deviation is given in parentheses.

Results were analyzed by Duncan's multiple-range test at $p < 0.05$. Numbers with different letters significantly differ from each other.

Table 2. Examination of infected residual roots of *Cinnamomum verum* after treatment with biological agents and the fungicide, tridemorph

	Control	1 st treatment	2 nd treatment	3 rd treatment	4 th treatment	5 th treatment	6 th treatment	7 th treatment
Treatment date	—	2010.06.21	2010.06.28	2010.07.05	2010.07.12	2010.07.19	2010.07.26	2010.08.02
Collection date	2010.06.21	2010.06.28	2010.07.05	2010.07.12	2010.07.19	2010.07.26	2010.08.02	2010.08.09
Control (water)	1.00 (0.00) ^a	0.67 (0.34) ^a	0.78 (0.19) ^a	0.89 (0.19) ^a	0.67 (0.34) ^a	0.67 (0.00) ^a	0.67 (0.34) ^a	0.89 (0.19) ^a
Biocontrol agent 10x	1.00 (0.00) ^a	0.22 (0.19) ^a	0.33 (0.34) ^a	0.22 (0.19) ^b	0.22 (0.39) ^{ab}	0.33 (0.00) ^b	0.33 (0.34) ^{ab}	0.22 (0.19) ^b
Biocontrol agent 1x	1.00 (0.00) ^a	0.11 (0.19) ^a	0.33 (0.58) ^a	0.00 (0.00) ^b	0.00 (0.00) ^b	0.11 (0.19) ^b	0.11 (0.19) ^b	0.11 (0.19) ^b
Biocontrol agent 0.2x	1.00 (0.00) ^a	0.55 (0.39) ^a	0.45 (0.39) ^a	0.22 (0.19) ^b	0.11 (0.19) ^{ab}	0.22 (0.19) ^b	0.11 (0.19) ^b	0.22 (0.19) ^b
Chemical agent 10 ⁻⁴ x (Tridemorph)	1.00 (0.00) ^a	0.55 (0.39) ^a	0.55 (0.39) ^a	0.33 (0.34) ^b	0.33 (0.34) ^{ab}	0.22 (0.19) ^b	0.22 (0.19) ^{ab}	0.11 (0.19) ^b

The probability of a positive reaction from 3 experimental groups is shown, and every experimental group contained 3 replicates.

1.00 represents 100%, and the standard deviation is shown in parentheses.

Results were analyzed by Duncan's multiple-range test at $p < 0.05$. Numbers with different letters significantly differ from each other.

Table 3. Examination of infected residual roots of *Ficus spp.* after biological and chemical treatments

	Control	1 st treatment	2 nd treatment	3 rd treatment	4 th treatment	5 th treatment	6 th treatment	7 th treatment
Treatment date	—	2010.08.09	2010.08.16	2010.08.23	2010.08.30	2010.09.06	2010.09.13	2010.09.20
Collection date	2010.08.09	2010.08.16	2010.08.23	2010.08.30	2010.09.06	2010.09.13	2010.09.20	2010.09.27
Control (water)	1.00 (0.00) ^a	1.00 (0.00) ^a	0.80 (0.12) ^a	0.93 (0.12) ^a	0.87 (0.12) ^a	0.87 (0.12) ^a	0.80 (0.00) ^a	0.80 (0.00) ^a
Biocontrol agent 10x	1.00 (0.00) ^a	0.53 (0.12) ^b	0.33 (0.12) ^b	0.33 (0.12) ^c	0.13 (0.12) ^c	0.13 (0.12) ^{bc}	0.07 (0.12) ^c	0.13 (0.12) ^{bc}
Biocontrol agent 1x	1.00 (0.00) ^a	0.67 (0.12) ^{ab}	0.53 (0.12) ^{ab}	0.53 (0.12) ^{bc}	0.27 (0.23) ^{bc}	0.27 (0.23) ^{bc}	0.13 (0.12) ^{bc}	0.13 (0.12) ^{bc}
Biocontrol agent 0.2x	1.00 (0.00) ^a	0.73 (0.12) ^{ab}	0.73 (0.12) ^a	0.53 (0.12) ^{bc}	0.4 (0.00) ^b	0.4 (0.20) ^b	0.27 (0.12) ^b	0.33 (0.12) ^b
Chemical agent 10 ⁻⁵ x (Tridemorph)	1.00 (0.00) ^a	0.80 (0.35) ^{ab}	0.80 (0.35) ^a	0.67 (0.23) ^b	0.4 (0.00) ^b	0.4 (0.00) ^b	0.27 (0.12) ^b	0.27 (0.12) ^{bc}
Chemical agent 10 ⁻⁴ x (Tridemorph)	1.00 (0.00) ^a	0.67 (0.42) ^{ab}	0.53 (0.31) ^{ab}	0.27 (0.12) ^c	0.27 (0.12) ^{bc}	0.07 (0.12) ^c	0.00 (0.00) ^c	0.07 (0.12) ^c

The probability of a positive reaction from 5 samples of the experimental groups is shown, and every experimental group contained 15 replicates.

1.00 represents 100%, and standard deviation is given in parentheses.

Results were analyzed by Duncan's multiple-range test at $p < 0.05$. Numbers with different letters significantly differ from each other.

根病菌之效果越好，但三得芬化學藥劑容易對環境造成汙染，對水生生物有極高毒性，也會對水體環境產生長期不良影響，因此需謹慎使用。若持續添加生物製劑0.2X、1X及10X均可有效抑制褐根病菌，且效用優於三得芬，對環境相容性極高，顯示利用生物製劑抑治褐根病菌具有實用性。

三、田間試驗

田間試驗是將受褐根病菌感染之樹木經添加生物製劑處理後，觀察其外觀變化並配合褐根病菌專一性聚合酶鏈鎖反應技術進行檢測。田間試驗部分選擇三個樣區：林業試驗所保育大樓右方象牙柿、三重高中校門口旁右側11棵台灣欒樹、淡江大學商館大樓與教職員停車場一帶之20棵鳳凰木為樣區。

林業試驗所保育大樓右方象牙柿(中期)，樹木樹勢出現衰弱，枝葉生長不茂盛，且PCR分

子檢測呈現陽性反應)經生物製劑防治施作後，其外觀變化如Fig. 5所示。Figure 5可觀察到受褐根病菌感染之樹木，利用添加生物製劑使原本整株枯黃漸長出綠葉，顯示生物製劑能改善褐根病菌所造成之危害。在田間試驗前，電泳圖於653-bp的DNA片段有進行增幅，呈褐根病菌反應；然而經添加生物製劑8週處理後，已無褐根病菌反應(Fig. 6)，表示褐根病菌量已降低至不可測出之含量。

Table 4為三重高中校門外右側11棵台灣欒樹(其中8棵為早期，樹木本身並無病徵出現，但PCR分子檢測呈現陽性反應；其中3棵為晚期，樹木全株出現枯黃，瀕臨枯死) PCR與二次PCR之結果。試驗前，經PCR檢測結果，僅3、4、6號呈褐根病菌反應。將褐根病菌聚合酶鏈鎖反應之產物經二次PCR檢測後其電泳結果顯示，所有試樣於228-bp的DNA片段有呈現增幅訊號，為褐根病菌陽性反應。施用生物製劑三

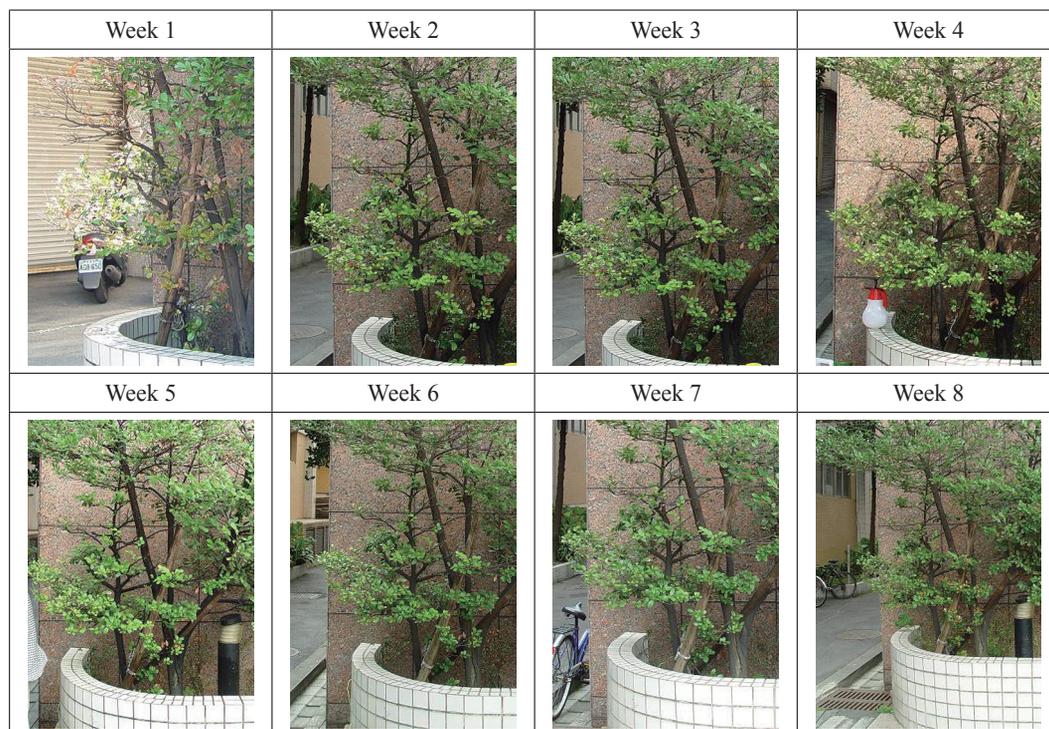


Fig. 5. Growth status of *Phellinus noxius*-infected *Maba buxifolia* after treatment with biocontrol agent 2. The tree was initially in the mid-stage of brown root rot disease.

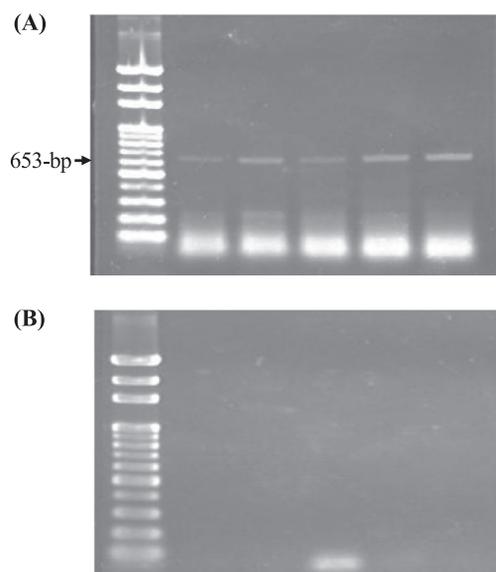


Fig. 6. PCR results of *Maba buxifolia* around the Forestry Research building using specific primer pairs (G1F/G1R) before the field trials (A) and 8 weeks after the field trials (B).

個月後，PCR結果顯示僅編號4號呈現褐根病菌陽性反應；經二次PCR檢測後，試樣3、4、6、7、9及11號呈現褐根病菌陽性反應，其它試樣則無褐根病菌反應。其中受褐根病感染晚期之台灣欒樹經施用生物製劑後之生長情形如Fig. 7所示，顯示台灣欒樹受褐根病感染達晚期，施用生物製劑仍無法顯著改善其狀態，應依防治褐根病標準流程進行防治。

淡江大學樣區鳳凰木感染褐根病菌(20棵皆為早期，樹木本身並無病徵出現，但PCR分子檢測呈現陽性反應)如Table 5所示。於施用生物製劑四個月後經PCR檢測結果僅剩3個試樣呈褐根病菌陽性反應，顯示施用生物製劑後呈褐根病陽性反應之試樣大幅減少。受褐根病感染早期之鳳凰木經施用生物製劑後之生長情形如Fig. 8所示，試驗期間樹木生長情況良好，且葉更加茂盛。三樣區經PCR或二次PCR檢測後，顯示施用生物製劑後呈褐根病陽性反應之試樣大幅減少，顯示褐根病早期與中期施用生物製劑灌注處理可抑制褐根病菌之生長。

Table 4. PCR and dual-PCR results from different sample blocks at SanChong High School (三重高中)

Treatment date	Control		1 st treatment 2010.04.30		4 th treatment 2010.05.20		5 th treatment 2010.06.17		6 th treatment 2010.07.15	
Collection and analysis date	2010.04.20		2010.05.06		2010.06.17		2010.07.15		2010.08.19	
Brown root rot detection	1 st PCR	2 nd PCR	1 st PCR	2 nd PCR	1 st PCR	2 nd PCR	1 st PCR	2 nd PCR	1 st PCR	2 nd PCR
1	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
2	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
7	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
8	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
9	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+
10	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
11	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

Positive PCR results of *Phellinus noxius* are indicated by a plus sign (+), while negative ones are indicated by a minus sign (-).

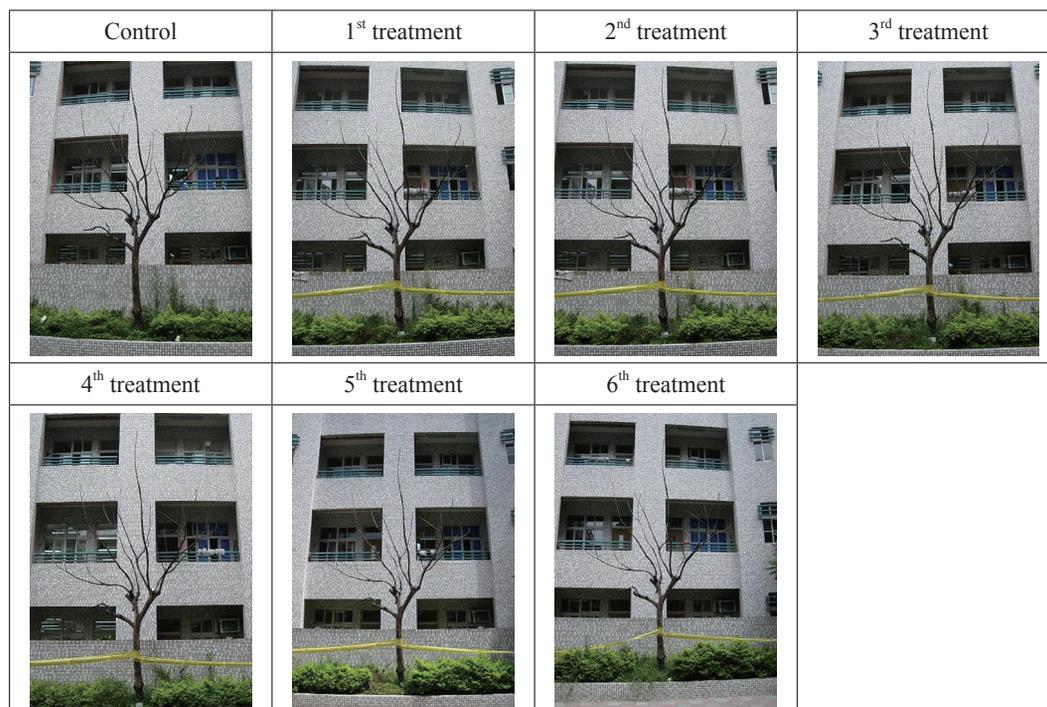


Fig. 7. Growth status of a *Phellinus noxius*-infected *Koelreuteria elegans* after treatment with biocontrol agent 2. The tree was initially in the late-stage of brown root rot disease.

結論

本試驗將已篩選出4種的天然微生物，進行對褐根病菌生長之抑菌效果測試，再選取抑制效果較佳之生物製劑進行模擬田間試驗與田間試驗，並利用本實驗室建立褐根病菌專一性聚合酶鏈鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)技術，進行褐根病感染株在生物製劑處理後之防治效果。所得結果歸納如下：

- 一、利用培養基試驗來進行生物製劑之篩選，結果顯示生物製劑1~4號對褐根病菌生長均有抑制效果，且生物製劑1~3號之抑制效果可達20日，其中又以生物製劑2號抑制效果最佳。
- 二、於模擬田間試驗中，添加2號生物製劑0.2X、1X及10X後均可有效抑制褐根病菌，且與對照組有顯著差異。
- 三、田間試驗結果顯示受褐根病感染之樹木

經生物製劑處理後，原本整株枯黃之情況，漸漸長出綠葉，顯示生物製劑除了能減紹褐根病菌數量，也能改善褐根病菌所造成之危害，恢復早中期感染之病株康復成健康林木。

- 四、受感染之樹木經生物製劑處理後，對於褐根病菌感染樣本進行PCR增幅反應電泳分析圖上呈褐根病菌呈陽性反應也減少，表示菌量已降低。
- 五、本次田間試驗的環境並未設有圍籬之開放空間，人、牲、畜等動物的活動可能會將含有褐根菌之病土交互傳遞。如能設立圍籬將可減少病土交互傳遞的可能，可能將使田間試驗的成效增加。
- 六、田間試驗結果顯示生物製劑適合用於早期與中期感染褐根病之樹木，將使之康復為健康的林木，晚期則建議依照褐根病標準流程進行防治。

Table 5. Results from sampling sites at Tamkang University (淡江大學)

Treatment date	Control	1 st treatment 2010.05.14	4 th treatment 2010.06.10	5 th treatment 2010.06.24	6 th treatment 2010.07.22	7 th treatment 2010.08.26
Collection and analysis date	2010.05.14	2010.05.20	2010.06.24	2010.07.22	2010.08.26	2010.09.23
1	+	+	-	-	-	-
2	+	+	-	-	-	-
3	+	+	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-	-
5	+	-	-	-	-	-
6	+	+	+	-	-	-
7	+	+	-	-	-	-
8	+	+	-	-	-	-
9	+	+	+	+	+	+
10	+	-	+	-	-	-
11	+	+	+	+	+	+
12	+	+	-	+	+	-
13	+	+	+	+	+	-
14	+	-	-	+	-	-
15	+	-	+	+	+	-
16	+	-	+	-	-	-
17	+	+	+	-	+	+
18	+	-	+	-	-	-
19	+	-	-	-	-	-
20	+	-	+	-	-	-

Positive PCR results of *Phellinus noxius* are indicated by a plus sign (+), while negative ones are indicated by a minus sign (-).

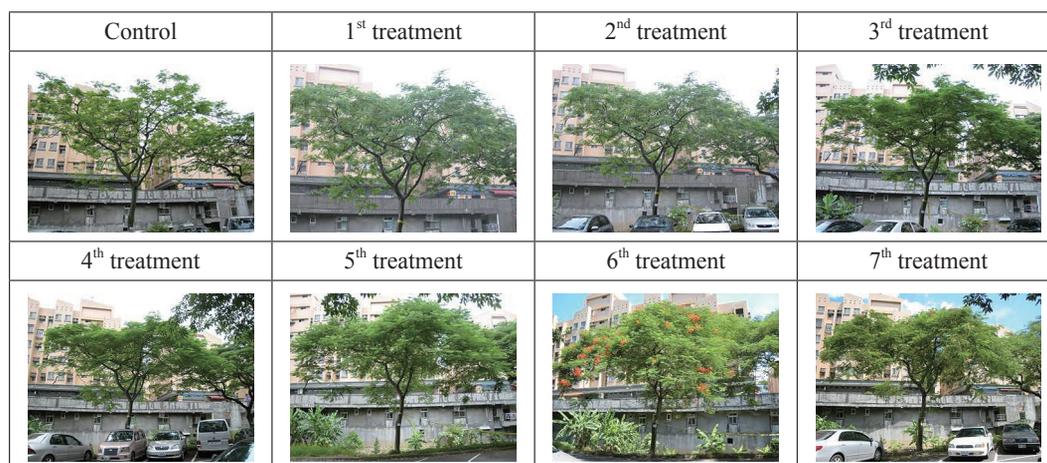


Fig. 8. Growth status of a *Phellinus noxius*-infected *Delonix regia* after treatment with biocontrol agent 2. The tree was initially in the early-stage of brown root rot disease.

綜合上述結果得知，生物製劑在培養基上可有效抑制褐根病菌之生長，可應用此生物製劑定期持續灌注初期及中期感染褐根病之病株，或對已發病砍除褐根病病株周圍之林木，進行灌注處理抑制褐根病菌之生長，提供褐根病綜合防治管理。此非農藥之防治法應用在林木保護，符合目前環保及健康管理，值得進一步研發及推廣。在褐根病感染疫區周圍尚未出現病徵之植株或感染初期之樹木，施用大量生物製劑，可有降低及減緩發病，並有改善生長之效果。生物製劑亦可被應用在褐根病藥劑防治處理後，預防及降低褐根病大量發生之機率，掌握褐根病防治先機，同時亦可配合土壤介質之改善，增加新植木抵抗褐根病菌之能力。

引用文獻

- Ann PJ, Chang TT, Ko WH. 2002.** *Phellinus noxius* brown root rot of fruit and ornamental trees in Taiwan. *Plant Dis* 86:820-6.
- Berg G. 2009.** Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl Microbiol Biot* 84:11-8.
- Chang TT. 1992.** Decline of some forest trees associated with brown root rot caused by *Phellinus noxius*. *Plant Pathol Bull* 1:90-5.
- Chang TT. 1995.** A selective medium for *Phellinus noxius*. *Eur J For Pathol* 25:185-90.
- Chang TT. 1996.** Survival of *Phellinus noxius* in soil and in the roots of dead host plants. *Phytopathology* 86:272-6.
- Chang TT, Yang WW. 1998.** *Phellinus noxius* in Taiwan: distribution, host plants and the pH and texture of the rhizosphere soils of infected hosts. *Mycol Res* 102:1085-8.
- Hesselink PGM, Kerkenaar A, Witholt B. 1990.** Inhibition of microbial cholesterol oxidases by dimethylmorpholines. *J Steroid Biochem* 35:107-14.
- Huang HC, Chou CH. 2005.** Impact of plant disease biocontrol and allelopathy on biodiversity and agricultural sustainability. *Plant Pathol Bull* 14:1-12. [in Chinese].
- Tsai JN, Ann PJ, Hsieh WH. 2005.** Evaluation of fungicides for suppression of three major wood-decay fungi *Phellinus noxius*, *Rosellinia necatrix* and *Ganoderma australe* in Taiwan. *Plant Pathol Bull* 14:115-23. [in Chinese].
- Tsai JN, Hsieh WH, Ann PJ. 2008.** Effects of nitrogen fertilizers and chemical fungicides on control of brown root rot of tree fruits and grapes caused by *Phellinus noxius*. *Plant Pathol Bull* 17:119-25. [in Chinese].
- Wu ML, Chang TT, Jaung LM, Hung TH, Chen CH, Lin LD. 2009.** Establishment of PCR rapid detection technique for tree brown root rot disease. *Q J Chin For* 42:239-47. [in Chinese].
- Wu ML, Jaung LM, Fu CH, Koh CN, Chang TT. 2005.** Application of borrelidin from *Streptomyces candidus* on biocontrol of tree seedling damping-off diseases. *J Exp For Natl Taiwan Univ.* 19:251-60. [in Chinese].
- Zhou Q, Li K, Jun X, Bo L. 2009.** Role and functions of beneficial microorganisms in sustainable aquaculture. *Bioresour Technol* 100:3780-6.

