

開發生物農藥液化澱粉芽孢桿菌ML15-4 防治草莓灰黴病

鄭志文¹、李吉峰¹、吳岱融¹、盧美君¹、林盈宏²、朱盛祺^{1*}

¹行政院農業委員會苗栗區農業改良場

²國立屏東科技大學植物醫學系

摘 要

草莓是全世界重要的經濟蔬果之一，灰黴病菌隨空氣大量傳播，感染危害草莓果實，造成嚴重損失；苗栗區農業改良場開發生物性農藥菌種液化澱粉芽孢桿菌ML15-4進行生物防治，該菌株已完成5噸工業級發酵量產製程，並開發成生物農藥商品化水懸劑(SC)與可濕性粉劑(WP)雙劑型，產品室溫儲架壽命可達2年，活菌數均可維持 1×10^9 CFU/ml；經溫室高架先期試驗可降低草莓果實灰黴病的罹病率達12.8%；調整為預防性施藥，ML15-4水懸劑(SC)與可濕性粉劑(WP)分別進行3場田間藥效測試，稀釋300倍對灰黴病平均防治率可達54~58.7%，可訂為推薦使用倍數，生物農藥為安全資材無殘毒風險，可減少化學農藥使用，提升草莓食用安全與品質。

關鍵詞：液化澱粉芽孢桿菌、生物農藥、灰黴病

前 言

植物病害一直是作物產量損失的重要因子之一，因此如何提高產量或減少作物產量的損失，已成為當今世界各國農業發展所必須克服的重要課題。在作物病害管理上，雖有作物抗病育種、栽培管理、檢疫、種子處理及物理化學治

療等（林等，2004），但不幸的是在一般人的印象中，似乎僅著重化學藥劑防治一途。在毫無節制的重複或過量使用化學藥劑的狀況下，往往易造成抗藥性菌系的產生、土壤及水資源的污染、降低或減少有益微生物的存活、農藥殘毒、致癌等對人類、動物有害的影響

*論文聯繫人

e-mail: 7124@mdais.gov.tw

...等。目前世界各已開發國家無不盡全力，在法規上嚴格限制化學藥劑的使用，並且尋求低汙染及低毒性的防治方法。利用拮抗微生物之生物防治法 (biocontrol) 可減少農藥使用，具有發展的潛力。

草莓 (*Fragaria x ananassa*) 廣泛分布於世界各地區，臺灣在2015年之栽培面積為459 公頃，每公頃產量平均為17,975 公斤，產區主要分布於苗栗縣 (行，2016)。苗栗縣所栽種的草莓主要品種為「桃園1號」(豐香)，育苗期為5月至9月，9月至11月為定植期，採果期為12月至翌年4月 (張等，2004)。育苗期為草莓營養生長時期，植株生成走蔓進行種苗繁殖。定植期為營養生長轉至生殖生長的階段，植株在此時受到日長與溫度的影響，逐漸進入以生殖生長為主的採果期。草莓從開花後30~40日開始採收，果皮薄，果肉軟 (農，2005)，因此容易受到病蟲害侵襲，也不易保存。

草莓重要之果實病害包含灰黴病 (*Botrytis cinerea*)、果腐病 (*Phytophthora cactorum* and *P. citrophthora*)、炭疽病 (*Colletotrichum gloeosporioides*)、及白粉病 (*Sphaerotheca macularis* f. sp. *fragariae*、*S. humuli*)，其中炭疽病菌除可感染果實外，亦對草莓苗造成嚴重的危害而發生缺苗問題 (李及呂，1994)。此外，草莓屬漿果類，為連續採收性的作物，採收期達4個月，採收時為防治果實病菌侵染，農民均以化學農藥做

為防治藥劑，使用率頻繁，時有發生農藥殘留事件，為產業發展的隱憂。草莓灰黴病菌 (*Botrytis cinerea*) 廣泛存於自然界中，寄主範圍廣泛能感染危害235種作物，包括多種蔬菜、花卉、水果及觀賞植物 (Schoonbeek, 2004)，本病可藉由空氣與雨水傳播，好發於低溫多濕季節，草莓採收期12月至隔年3月，若遇連續降雨，危害甚鉅 (李，2005)。本病原主要以危害果實為主，初由萼片開始感染，成熟果若遭受感染，被害果腐敗呈現木乃伊化，降低產量與品質，被害果上著生灰色黴狀物為分生孢子，為田間重要感染源 (Paulus, 1990)。

前人研究顯示芽孢桿菌 (*Bacillus* spp.) 對於草莓灰黴病菌之發芽有明顯之抑制效果，預先處理拮抗菌於草莓果實表面上，使其先萌發生長，對於灰黴病菌孢子之發芽有更好的抑制效果 (劉，1993)。此結果於國外同樣被驗證，*Bacillus licheniformis* N1 對於灰黴病菌之抑制效果以預防為佳，故宜在灰黴病菌感染之前先行噴施保護 (Kim et al., 2007)。謝等 (2003) 利用稀釋100~200倍的芽孢桿菌發酵液，浸泡剛採收之芒果5分鐘，可延緩炭疽病斑出現約5~7天，亦可延緩病斑擴展速度達50%，證實該種益生菌可做為蔬果採收後防止腐敗的抗真菌劑。芽孢桿菌在植物病害防治上已知的應用範圍很廣，包含土壤病害、葉部病害 (碗豆白粉病、菜豆銹病) 及儲藏期病害 (桃褐腐病、柑橘青黴病) 等 (謝，2011)，其中以土壤病害方面有關之研究最多，研究指出具應用潛力的病害標的包括: 康乃馨莖

腐病、玉米苗枯病、甜菜舞病、洋蔥白腐病、菊花莖腐病及綠豆苗立枯病等。國立中興大學植病系測試芽孢桿菌 BS1 與 WG6-14 發酵液，對於 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 引起的水稻白葉枯病菌及 *Sclerotium rolfsii* 所引起的秧苗立枯病菌、及芒果黑斑病菌、柑橘潰瘍病菌之感染，均具有很好的抑制能力；另外施用後對作物生長具有明顯的促進效果，已證實的作物包括水稻、甘藍、草莓、山藥、甜椒、茭白筍、番茄、馬鈴薯、蘭花、茶樹、柑橘及甜柿等。

芽孢桿菌屬革蘭氏陽性，好氣性桿狀細菌，具週生鞭毛及內生孢子為其形態上主要特徵，此類細菌普遍存在於土壤及植物體表，由於可以產生內生孢子，在逆境下易於存活，且在產孢過程中，可產生對多種病原菌具有抑制作用之抗生物質 (antibiotic substances)，因而在植物病害防治應用性之開發，多年來寄予厚望 (Whipps, 2001)。芽孢桿菌防治病害的主要機制通常可被歸類成：一、營養競爭 (competition for nutrients)，拮抗菌與植物病原菌競爭養分、生存空間，尤其在作物的根圈部位建立族群優勢，進而達到抑制病原菌的生長及存活，間接保護作物免於被病原危害。二、抗生素的產生 (antibiotic production)，拮抗菌所分泌的代謝物質如抗生素或酵素，可以抑制病原菌的生長或直接殺菌。三、超寄生作用 (hyperparasitism)，拮抗微生物寄生於病原菌上，致使其菌絲或生殖構造遭受破壞甚至死亡。四、細胞壁分解酵素 (cell wall degrading enzymes)，具有分

泌纖維素分解酵素 (cellulase) 和幾丁質分解酵素 (chitinase) 的能力，可分解不同真菌的細胞壁 (cellulose) 為卵菌綱真菌細胞壁之主要成分；chitin 為其他高等真菌細胞壁之重要成分。五、誘導植物產生抗性 (induce systemic acquired resistance)，細胞壁分解酵素分解病原菌細胞壁成小分子，這些小分子具有類似 elicitor 功能，可以引起植物細胞之防禦反應，並刺激細胞內酚類化合物 (phenolic compound) 的累積，有利於抵禦其他病原菌之入侵 (Lin *et al.*, 2010)。此外促進植物生長的作用也是相當顯著，拮抗菌可加速分解土壤中的植物殘體和有機質，增加或促進根圈與介質營養的利用與吸收，並誘發植物產生植物賀爾蒙，促進植株生長；一般而言，上述機制會因拮抗微生物的種類 (species) 或菌株 (strain) 的不同而所含機制略有差異，但病害防治的機制則通常可能含蓋一種以上。本研究擬開發具有生物農藥商品化潛能的芽孢桿菌 ML15-4 菌株，建立擴大發酵量產製程，開發成水懸劑與可濕性粉劑雙劑型，測試產品儲架壽命與安定性，並於溫室與田間測試對於草莓灰黴病之防治藥效，期望能減少化學農藥的使用，降低農藥殘留風險以提升草莓食用品質。

材料與方法

一、菌種來源與劑型製備

ML15-4 菌株篩選自苗栗縣大湖鄉草莓栽培田土，經馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 Potato Dextrose Agar (PDA) 平板拮抗測

試，對秧苗立枯病菌、徒長病菌、白絹病菌及草莓灰黴病菌、果腐病菌、炭疽病菌，具有廣效性拮抗能力（李，2002）；該菌株委託財團法人食品工業發展研究所進行專業菌種鑑定，經16S rDNA (16S ribosomal RNA) 序列分析及gyrB (DNA gyrase, subunit B) 基因片段分析比對，結果為液化澱粉芽孢桿菌 *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*（食工所鑑定編號：2014ID179）；ML15-4菌株經配方調整與發酵條件最適化，訂定量產標準程序，進一步委託聯發生物科技公司代工生產，以5公噸工業級發酵槽培養48小時完成水懸劑 (suspension concentrates; SC) 生產，並以冷凍乾燥法並混拌賦型物製成可濕性粉劑 (wettable powders; WP)，有效菌數皆達 1×10^9 CFU/ml以上。

二、儲存安定性測試

(一) 28°C儲存測試

由上述所生產的水懸劑與可濕性粉劑樣品，存放於28°C定溫生長箱中，每月從保存管取1 ml菌液做為原液共3重覆，吸入1.5 ml離心管後再以80°C水浴槽加熱10分鐘；振盪混合均勻再取100 μ l原液加入裝有900 μ l無菌水之1.5 ml離心管中進行序列稀釋，以此步驟將菌液連續稀釋至 10^{-7} ，再取100 μ l稀釋菌液至LA (Luria-Bertani (LB) broth + Bacto Agar: 121°C, 20 mins) 平板上塗佈均勻乾燥後，放入28°C定溫生長箱中

24小時計算活菌數，共進行為期2年之安定性測試。

(二) 40°C及54°C儲存測試

利用上述樣品存放於54°C定溫生長箱4週，每週檢測菌量共4次，並存放於40°C生長箱2個月，每月檢測菌量共2次，進行加速儲存安定性試驗。

三、溫室草莓灰黴病防治試驗

利用本場生物防治分場溫室高架草莓試驗區（張，2005），採用5×5之拉丁方格進行排列，共進行5種處理，每處理5重複，每重複逢機調查50顆草莓果實，各處理條件如下A：*B. amyloliquefaciens* ML8-8 稀釋300倍、B：ML15-4 稀釋300倍、C：藥物毒物試驗所對照菌株 BaNaNa 11稀釋300倍、D：62.5%賽普護汰寧水分散性粒劑 (Cyprodinil + Fludioxonil) 稀釋2000倍（化學農藥組）、E：CK對照組。ML8-8、ML15-4、BaNaNa11供試製劑均儲藏於室溫，試驗前均測試有效菌數達 1×10^9 CFU/ml以上。罹病率計算方式為：罹病率 = Σ （罹病指數×該指數罹病果數）/（5×全部調查果數）×100%，罹病指數分成：1級為病斑面積佔10%、2級為病斑面積25%、3級為病斑面積50%、4級為病斑面積75%、5級為病斑面積100%者。每周處理1次，連續處理4次後，調查果實灰黴病罹病率。

四、草莓灰黴病田間防治試驗規劃

自2015年2~3月、2015年2~4月及

2016年3~4月分別於苗栗縣大湖鄉義和村、獅潭鄉豐林村及大湖鄉富興村3處進行液化澱粉芽孢桿菌ML15-4防治草莓灰黴病田間試驗，水懸劑與可濕性粉劑各別進行3場，合計6場田間防治試驗，田間防治試驗場次代號分別為大湖鄉義和村SC-EUP1、WP-EUP1；獅潭鄉豐林村SC-EUP2、WP-EUP2；大湖鄉富興村SC-EUP3、WP-EUP3，田區設計為單因子試驗，採逢機完全區集設計(Randomized Complete Block Design, RCBD)，分為100倍、300倍、500倍及CK對照組(水)共4處理，每處理4重複。以1公尺×5公尺為一小區，小區面積約5平方公尺，共計16小區，以逢機方式配置於各區集內(圖一)。小區間設置30公分之隔離區，所有小區之栽培管理方法需均一。

施藥適期：生物農藥為預防性藥劑，宜於罹病前開始施藥，但為避免試驗期間無病害發生，於第2期花結小果時之罹病初期開始施藥。實際開始施藥時期需依氣候而定，若病害提早發生則提早開始施藥，當萼片變紫色且鏡檢確定有灰黴病菌產孢構造時即開始施藥，早期防治效果較佳，但若於連日陰雨高濕時可採預防性噴藥。

五、噴藥作業程序

噴藥程序依據藥物毒物試驗所公告之農業藥劑委託試驗新制方法，使用二氧化碳(CO₂)氣壓式噴霧器及扇形噴頭(空心圓錐)，噴施前先調整壓力為30 psi，並在此壓力下校準噴頭之均勻度、流量，皆校正6次，使差異度不超過±

10%。草莓每小區(5 m²)用水量1000 ml，目標施用量為775 ml，施藥時，先進行初始漏液，使藥液充滿於管線中，再進行噴施，首先噴施對照組，以碼錶記錄噴施時間，確認用水量，並以相同壓力、時間、流速與前進速度，噴施其他處理小區，由低倍數之500倍依序往高倍數之100倍噴施，並於施用完畢後更換藥瓶，紀錄及計算每小區實際施用量，以此換算為每公頃藥液量(l/ha)，並依農民慣行種植法估算不同栽種方法及不同生長期之藥液量/公頃。

六、病害調查方法

在第一次處理前及每次處理後第7天調查草莓灰黴病罹病率，共計七次。調查時每小區選取50顆果實，按果實罹病面積大小分級，共分為5個等級，0代表無罹病；1代表果實罹病面積為1~10%；2代表果實罹病面積為11~25%；3代表果實罹病面積為26~50%；4代表果實罹病面積為51%以上。並依下列公式計算罹病率：

$$\text{罹病率} = \frac{\sum (\text{指數} \times \text{該指數罹病果數})}{4 \times \text{總調查果數}} \times 100\%$$

罹病率計算防治率：

$$\text{防治率}(\%) = \left[1 - \frac{\text{處理組罹病度}}{\text{對照組罹病度}} \right] \times 100$$

結 果

一、儲存安定性測試

ML15-4水懸劑(SC)起始活菌數為7X10⁹ CFU/ml、可濕性粉劑(WP)起始活

菌數為 2×10^9 CFU/g存放於 28°C ，每月定期檢測活菌數共為期2年，皆可維持在 1×10^9 CFU/ml 以上（圖一）；並進行 54°C 儲存4週及 40°C 儲存2個月，加速儲存安定性試驗，活菌數也均可維持在 1×10^9 CFU/ml 以上。

二、溫室草莓灰黴病防治試驗

利用溫室高架草莓試驗區進行灰黴病防治試驗，3種供試芽孢桿菌製劑及62.5%賽普護汰寧水分散性粒劑，每1週處理1次，連續4次後調查草莓灰黴病罹病率，結果顯示ML8-8稀釋300倍處理組罹病率為18.2%，ML15-4處理組罹病率為20.2%，藥物毒物試驗所提供之對照菌株BaNaNa 11處理組為20.2%，化學藥劑（62.5%賽普護汰寧水分散性粒劑）處理組罹病率最低為13.0%，各供試處理組與對照組罹病率32.8%比較，均達顯著差異（表一）。

三、草莓灰黴病田間防治試驗

自2015年2~3月，2015年2~4月及2016年3~4月分別於苗栗縣大湖鄉義和村、獅潭鄉豐林村及大湖鄉富興村3處進行液化澱粉芽孢桿菌ML15-4防治草莓灰黴病田間試驗，水懸劑與可濕性粉劑各別進行3場合計6場田間防治試驗，田間防治試驗場次代號分別為大湖鄉義和村SC-EUP1、WP-EUP1；獅潭鄉豐林村SC-EUP2、WP-EUP2；大湖鄉富興村SC-EUP3、WP-EUP3；由大湖鄉義和村試驗區SC-EUP1與WP-EUP1結果顯示，施藥前第1次調查草莓灰黴病罹病率均介於9.0~10.6%，各處理組均無顯著差異，

顯示田間灰黴病均勻發生，生物農藥ML15-4水懸劑(SC)施藥6次後，第7次調查罹病率SC-100倍為6.6%、SC-300倍為6.9%、SC-500倍為9.9%、對照組罹病率為19.8%，經統計分析SC-100倍、SC-300倍、SC-500倍與對照組(CK)比較罹病率均達顯著差異，防治效果顯著，防治率分別為66.5、為65.2、為50.0，而SC-100倍與SC-300倍罹病率比較無顯著差異（表二）；生物農藥ML15-4可濕性粉劑(WP)施藥6次後，第7次調查罹病率WP-100倍為7.6%、WP-300倍為7.9%、WP-500倍為13.8%、對照組罹病率為29.3%，經統計分析WP-100倍、WP-300倍、WP-500倍與對照組(CK)比較罹病率均達顯著差異，防治效果顯著防治率分別為73.9、為73.1、為53.0（表五），而WP-100倍與WP-300倍罹病率比較無顯著差異（表二）。由獅潭鄉豐林村試驗區SC-EUP2與WP-EUP2結果顯示，施藥前第1次調查草莓灰黴病罹病率均介於8.0~9.5%，各處理組均無顯著差異，顯示田間灰黴病均勻發生，生物農藥ML15-4水懸劑(SC)施藥6次後，第7次調查罹病率SC-100倍為17.5%、SC-300倍為19.8%、SC-500倍為22.8%、對照組罹病率為43.4%，經統計分析SC-100倍、SC-300倍、SC-500倍與對照組(CK)比較罹病率均達顯著差異，防治效果顯著，防治率分別為SC-100倍為59.7、SC-300倍：54.5、SC-500倍為47.6（表五），而SC-100倍、SC-300倍與SC-500倍罹病率比較無顯著差異（表三）；生物農藥ML15-4可濕性粉劑(WP)施藥6次後，第7次調查罹病率WP-100倍為

14.3%、WP-300倍為16.1%、WP-500倍為20.8%、對照組罹病率為40.9%，經統計分析WP-100倍、WP-300倍、WP-500倍與對照組(CK)比較罹病率均達顯著差異，防治效果顯著，防治率分別為WP-100倍：65.1、WP-300倍為60.6、WP-500倍為49.2，而WP-100倍與WP-500倍罹病率比較達顯著差異(表三)。由大湖鄉富興村試驗區SC-EUP3與WP-EUP3結果顯示，施藥前第1次調查草莓灰黴病罹病率均介於16.0~19.6%，因受當時連續降雨所影響，低溫高濕有利於草莓灰黴病侵染，各處理組罹病率均偏高；第1次施藥後連續降雨情形並未停止，導致田間灰黴病急速竄升，各試驗區罹病率介於38.4~62.1%之間，立即進行採除病果全面清園措施，減少田間病原菌密度並持續處理生物農藥；ML15-4水懸劑(SC)施藥6次後，第7次調查罹病率SC-100倍為37.1%、SC-300倍為35.6%、SC-500倍為40.3%、對照組罹病率為61.9%，經統計分析僅SC-100倍與對照組(CK)比較罹病率達顯著差異(表四)，防治率分別為SC-100倍為40.0、SC-300倍為42.4、SC-500倍為34.9(表五)；生物農藥ML15-4可濕性粉劑(WP)施藥6次後，第7次調查罹病率WP-100倍為25.5%、WP-300倍為22.8%、WP-500倍為27.8%、對照組罹病率為39.5%，經統計分析僅WP-100倍與對照組(CK)比較罹病率達顯著差異(表四)，防治率分別為WP-100倍為35.4、WP-300倍為42.4、WP-500倍為29.7(表五)。試驗期間於田區內持續以目視方

式進行藥害發生之觀察，並未發現ML15-4水懸劑或可濕性粉劑100倍、300倍及500倍處理組對草莓植株有任何藥害症狀(數據未顯示)。

討 論

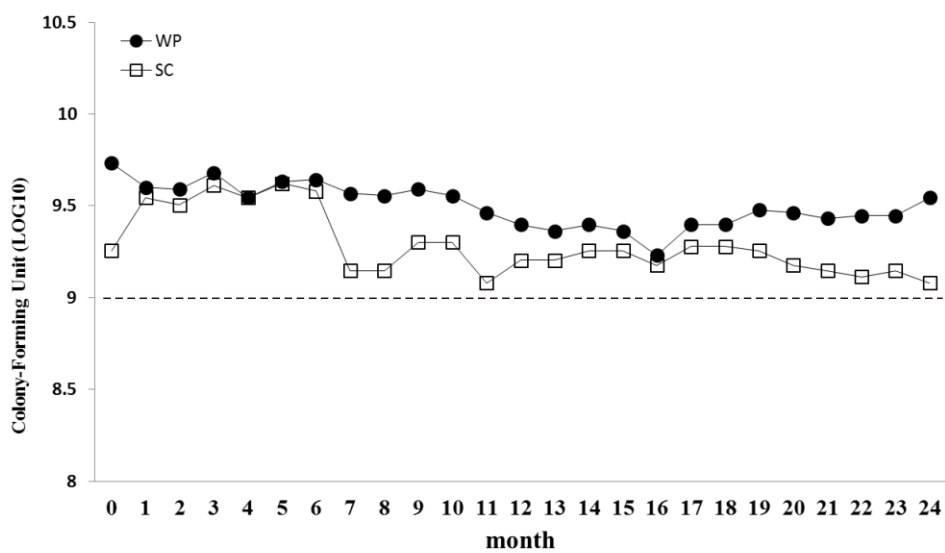
微生物製劑商品化上市，其效用、安定性及儲架壽命為重要關鍵，而生物農藥的施用效果及保存期限皆受到製劑配方影響，製劑配方中的「製劑」是指製程與技術，「配方」則是指成分與配比(許等，2010)。ML15-4菌株經碳素、氮素與微量元素配方調整與發酵條件包含溶氧量、轉速、酸鹼值與溫度等最適化，訂定量產標準程序，進一步以5公噸工業級發酵槽培養48小時完成水懸劑(SC)生產，並以冷凍乾燥法製成可濕性粉劑(WP)，有效菌數(內生孢子)皆達 1×10^9 CFU/ml以上。此外，生物農藥研發，需注意產品之有效性、安定性、保存期限、施用方法，然而微生物與蛋白質產品因為比化學品更不穩定，還需克服微生物於期限內是否活著、孢子的發率、蛋白質是否變性等問題，一般而言，化學農藥可保存2年，就實用性觀點來看，生物農藥至少需達到12個月的保存期限，較具商業應用價值(許等，2010)。ML15-4水懸劑(SC)起始活菌數為 7×10^9 CFU/ml、可濕性粉劑(WP)起始活菌數為 2×10^9 CFU/g存放於 28°C ，模擬平均室溫的儲藏條件，每月定期檢測菌量，為期2年，皆可維持在 1×10^9 CFU/ml以上，因ML15-4菌株於發酵製程

中均已調控轉換為耐熱耐儲存之內生孢子狀態，保存期限可較一般生物農藥長，經實測菌數活性可達2年，並進行54°C儲存4週及40°C儲存2個月，仿照化學農藥進行加速儲存安定性試驗，活菌數均可維持在 1×10^9 CFU/ml以上，達到與化學農藥相同的保存標準，可標示商品保存期限為2年，有助於增加商品儲架壽命與市場價值。

草莓灰黴病菌 (*Bortrytis cinerea*) 可藉由空氣與雨水傳播，好發於低溫多濕季節，草莓採收期12月至隔年4月，若遇連續降雨，危害甚鉅 (李, 2005)，灰黴病菌到處皆有散佈，三月春雨季節若陰雨綿綿不斷，則當季發生嚴重度極高。田間的病組織成為二次感染源，短時間形成大量分生孢子，藉由風與雨水散播。另外，栽植過密、偏施氮肥、植株生長旺盛、光照不足、排水不良等，均適於本病害發生 (李, 2005)。2014年利用本場生物防治分場溫室高架草莓試驗區，進行3株液化澱粉芽孢桿菌防治草莓灰黴病先期測試，結果顯示3株芽孢桿菌處理組罹病率平均為18.2~20.2%雖較對照組罹病率32.8%低，但由於草莓果實已感染灰黴病後才開始施藥，治療效果不及化學藥劑組，因此生物農藥作為預防性藥劑較洽當，需於病害發生前施藥或輕微發生之初期，即應立刻施用才可發揮較好的效果。劉氏1993研究顯示芽孢桿菌對於草莓灰黴病菌孢子發芽有明顯之抑制效果，預先處理拮抗菌於草莓果實表面上，使其先萌發生長，對於灰黴病菌孢子之發芽有更好的抑制效果。

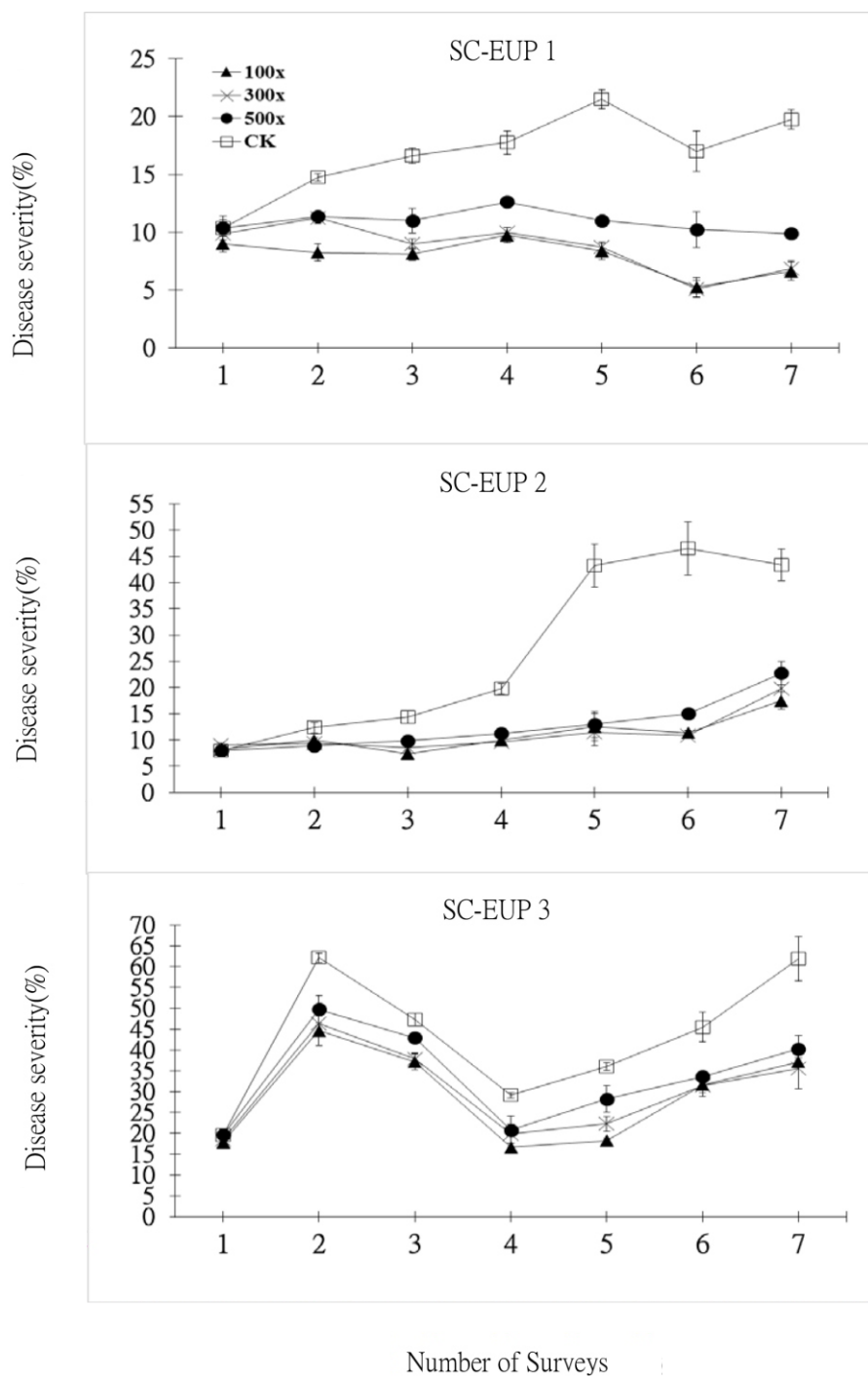
自2015年2~3月，2015年2~4月及2016年3~4月分別於苗栗縣大湖鄉義和

村、獅潭鄉豐林村及大湖鄉富興村3處，分別進行田間水懸劑與可濕性粉劑藥效試驗，評估液化生物農藥澱粉芽孢桿菌 (*B. amyloliquefaciens* ML15-4)對草莓果實灰黴病之防治效果，探討有效劑量擬定最佳施用方法，作為生物農藥登記之依據；草莓灰黴病田間試驗設計經防檢局審查通過後，取得田間試驗許可 (Experimental Use Permit, EUP)，核定公文字號:防檢三字第1041402114號，並依照藥劑委託試驗新制進行田間藥效試驗；綜合三個不同地區及劑型試驗結果，生物農藥ML15-4施用3至4次後，即可對灰黴病達到良好的防治效果，其中以大湖鄉義和村與獅潭鄉豐林村 (SC-EUP1、2與WP-EUP1、2) 之100倍及300倍效果最好，均符合防治率 $\geq 50\%$ 的藥劑效果評估基準，與對照組比較，經統計結果分析具有顯著性差異。6場次試驗中，100倍及300倍之第7次調查結果有3場次均無統計分析顯著差異，顯示其防治效果相當，故為節省使用成本，因此建議使用300倍稀釋作為推薦施用倍數。試驗過程發現掌握用藥時機對草莓灰黴病的防治效果具有關鍵的影響，當萼片變紫色且鏡檢確定有灰黴病菌產孢構造時即需開始施藥，早期防治效果較佳，但若於連日陰雨高濕時可採預防性噴藥，此結果於國外同樣被驗證，*B. licheniformis* N1對於灰黴病菌之抑制效果以預防為佳，故宜在灰黴病菌感染之前先行噴施保護 (Kim *et al.*, 2007)。

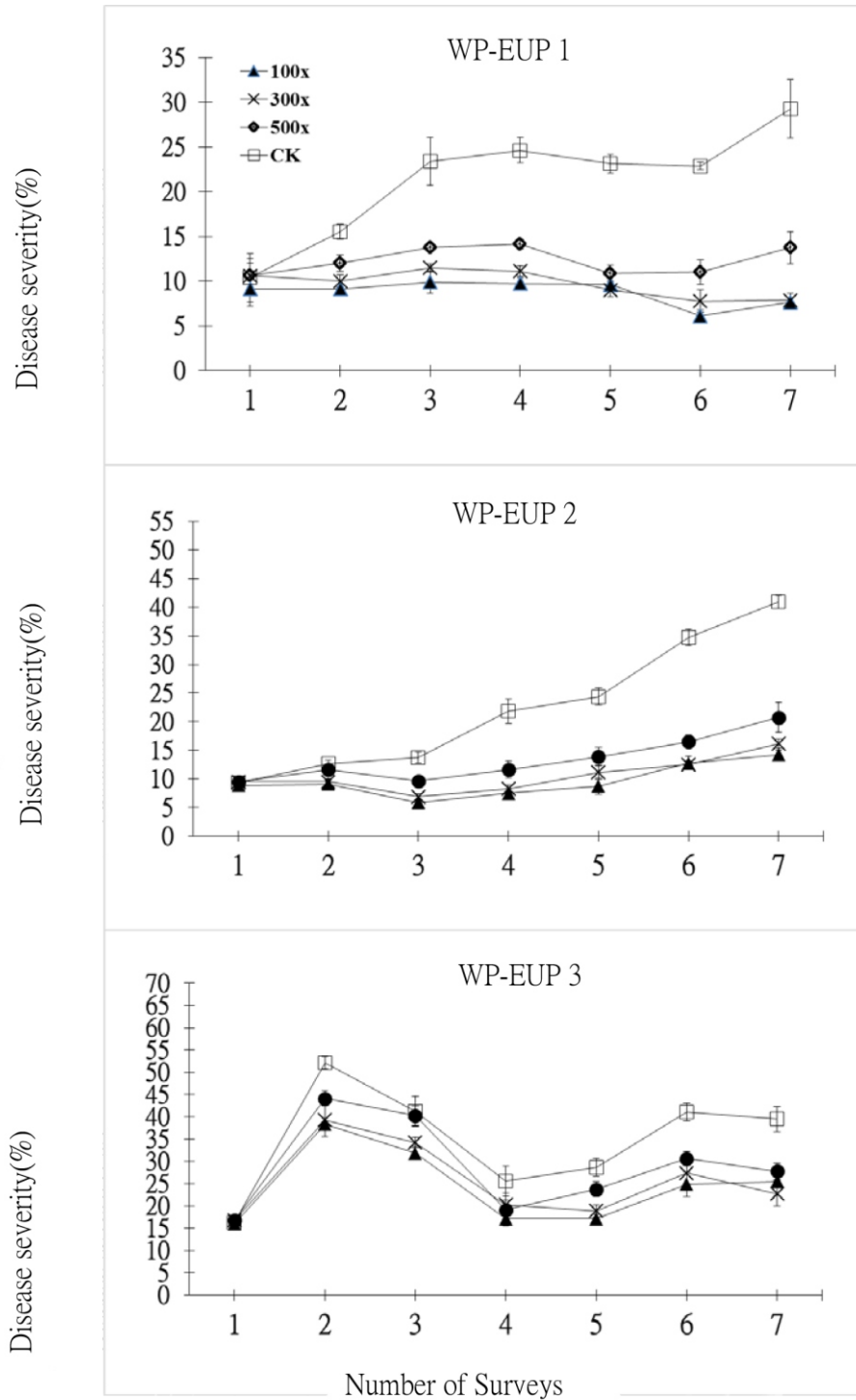


圖一 ML15-4水懸劑與可濕性粉劑28°C儲存24個月活菌數變化情形。

Fig. 1. The number of viable Colony-Forming Unit (CFU) of room temperature (28°C) storage 24 months stability test of ML15-4 suspension concentrates and wettable powder.



圖二 ML15-4水懸劑於3處不同地點防治草莓灰黴病之罹病率變化。
 Fig. 2. Disease severity of ML15-4 suspension concentrates on strawberry gray mold (*Botrytis cinerea*) from three locations.



圖三 ML15-4可濕性粉劑於3處不同地點防治草莓灰黴病之罹病率變化。
 Fig. 3. Disease severity of ML15-4 wettable powders on strawberry gray.

表一 比較3種芽孢桿菌與62.5%賽普護汰寧水分散性粒劑防治草莓灰黴病之罹病率情形

Table 1. Disease severity of three species of *B. amyloliquifaciens* ML8-8, ML15-4, BaNaNa 11 and 62.5% Cyprodinil + Fludioxonil water dispersible granules to control strawberry gray mold (*Botrytis cinerea*)

	ML8-8	ML15-4	BaNaNa 11	62.5%Cyprodinil + Fludioxonil	Water
Dilution factor	300	300	300	2000	CK
	18.2 ± 3.0 b ^x	20.2 ± 1.1 b	20.2 ± 3.5 b	13.0 ± 2.9 b	34.7 ± 4.5 a

x: Mean ± standard error (n=50). Means within each row followed by the same letter(s) are not significantly at P<0.05 by Fisher's protected LSD test.

表二 ML15-4水懸劑與可濕性粉劑於SC-EUP1與WP-EUP1試驗區防治草莓灰黴病之罹病率情形(%)

Table 2. Disease severity of *B. amyloliquifaciens* ML15-4 control strawberry gray mold (*Botrytis cinerea*) at SC-EUP1 and WP-EUP1 test area

Number of Surveys	SC-EUP1 dilution factor				WP-EUP1 dilution factor			
	100	300	500	CK	100	300	500	CK
1	9.0 a ^x	9.9 a	10.4 a	10.4 a	9.1 a	10.6 a	10.6 a	10.4 a
2	8.3 c	11.3 b	11.4 b	14.8 a	9.1 c	10.0 b	12.0 b	15.5 a
3	8.1 c	9.0 bc	11.0 b	16.6 a	9.9 c	11.5 bc	13.8 b	23.4 a
4	9.8 c	10.0 c	12.6 b	17.8 a	9.8 c	11.1 c	14.1 b	26.6 a
5	8.4 c	8.8 c	11.0 b	21.5 a	9.6 c	9.0 c	10.9 b	23.1 a
6	5.3 c	5.1 c	10.3 b	17.0 a	6.1 c	7.8 c	11.0 b	22.9 a
7	6.6 c	6.9 c	9.9 b	19.8 a	7.6 c	7.9 c	13.8 b	29.3 a

x: Mean ± standard error (n=50). Means within each row followed by the same letter(s) are not significantly at P<0.05 by Fisher's protected LSD test.

表三 ML15-4水懸劑與可濕性粉劑於SC-EUP2與WP-EUP2試驗區防治草莓灰黴病之罹病率情形(%)

Table 3. Disease severity of *B. amyloliquifaciens* ML15-4 control strawberry gray mold (*Botrytis cinerea*) at SC-EUP2 and WP-EUP2 test area

Number of Surveys	SC-EUP2 dilution factor				WP-EUP2 dilution factor			
	100	300	500	CK	100	300	500	CK
1	8.3 a ^x	9.0 a	8.0 a	8.0 a	8.9 a	9.5 a	9.5 a	9.3 a
2	10.0 b	9.4 a	8.9 a	12.4 a	9.1 c	9.5 bc	11.6 ab	12.6 a
3	7.4 b	8.5 b	9.9 b	14.4 a	5.9 c	6.9 c	9.6 b	13.8 a
4	10.0 b	9.6 b	11.3 b	19.8 a	7.5 b	8.3 b	11.6 b	21.9 a
5	12.5 b	11.5 b	13.0 b	43.3 a	8.8 c	11.1 bc	13.9 b	24.4 a
6	11.4 b	10.9 b	15.0 a	46.5 a	12.8 c	12.5 bc	16.5 b	34.8 a
7	17.5 b	19.8 b	22.8 b	43.4 a	14.3 c	16.1 bc	20.8 b	40.9 a

x: Mean \pm standard error (n=50). Means within each row followed by the same letter(s) are not significantly at P<0.05 by Fisher's protected LSD test.

表四 ML15-4水懸劑與可濕性粉劑於SC-EUP3與WP-EUP3試驗區防治草莓灰黴病之罹病率情形(%)

Table 4. Disease severity of *B. amyloliquefaciens* ML15-4 control strawberry gray mold (*Botrytis cinerea*) at SC-EUP3 and WP-EUP3 test area

Number of Surveys	SC-EUP2 dilution factor				WP-EUP2 dilution factor			
	100	300	500	CK	100	300	500	CK
1	17.9 a ^x	18.5 a	19.6 a	19.5 a	16.0 a	16.8 a	16.8 a	16.3 a
2	44.6 b	46.4 a	49.8 a	62.1 a	38.4 b	39.3 a	44.1 a	52.1 a
3	37.1 b	37.8 b	42.9 a	47.2 a	31.9 c	34.3 b	40.3 ab	41.3 a
4	16.6 b	19.9 a	20.8 a	29.1 a	17.1 b	20.3 a	19.1 ab	25.6 a
5	18.3 b	22.3 b	28.3 ab	36.0 a	17.1 c	18.9 b	23.8 b	28.6 a
6	31.6 b	31.4 b	33.6 a	45.5 a	24.9 b	27.4 a	30.6 a	41.1 a
7	37.1 b	35.6 b	40.3 a	61.9 a	25.5 b	22.8 b	27.8 a	39.5 a

x: Mean \pm standard error (n=50). Means within each row followed by the same letter(s) are not significantly at P<0.05 by Fisher's protected LSD test.

表五 ML15-4水懸劑與可濕性粉劑於3處不同試驗區對草莓灰黴病防治率(%)之比較
Table 5. Control rate of *B. amyloliquefaciens* ML15-4 control strawberry gray mold (*Botrytis cinerea*) at 3 different test area

Dilution factor	SC-EUP1	SC-EUP2	SC-EUP3	WP-EUP1	WP-EUP2	WP-EUP3
100	66.5	59.7	40.0	73.9	65.1	35.4
300	65.2	54.5	42.4	73.1	60.6	42.4
500	50.0	47.6	34.9	53.0	49.2	29.7

誌 謝

本研究感謝行政院農業委員會動植物防疫檢疫局補助液化澱粉芽孢桿菌 ML15-4 生物農藥商品化之研發與應用 103 農科 -14.3.2-檢 -B2(5) 與 104 農科 -16.2.3-檢 -B1(10) 計畫支持，謹致謝忱。試驗期間承蒙作物環境課蘇雯菁小姐、陳玉梅小姐、陳碧君小姐、涂鳳清小姐及生物防治分場羅玉滿小姐之協助，謹此一併誌謝。

引用文獻

- 李豐在。2005。草莓灰黴病之防治策略。花蓮區農業改良場農業專訊 54：12-13。
- 李雅惠。2002。拮抗性桿菌屬(*Bacillus* spp.)之分離、培養與抗生活性之改進以及病害防治之應用。國立中興大學植物病理學系碩士論文。79 頁。
- 李昱輝、呂理燊。1994。臺灣草莓炭疽病。植病會刊 3：256-257。
- 行政院農業委員會。2016。中華民國 104 年農業統計年報。行政院農業委員會。
- 林俊義、安寶貞、張清安、羅朝村、謝廷芳。2004。作物病害之非農藥防治。農業試驗所特刊 110 號。p.16-17。
- 許嘉伊、朱鴻鈞、楊玉婷。2010。臺灣生物農藥產業發展現況與趨勢論壇。農業生技產業季刊 24: 63-72。
- 張廣森、吳添益、彭淑貞。2004。草莓栽培管理。行政院農業委員會苗栗區農業改良場。39 頁。
- 張廣森。2005。草莓高架育苗新技術。農政與農情 156：95-97。
- 劉顯達。1993。草莓灰黴病之拮抗菌篩選與室內生物防治效果。植物保護學會會刊 35：105-115。
- 謝奉家、李美珍、高穗生。2003。芽孢桿菌菌體及其代謝物質對病原真菌之抑菌效果評估。植保會刊。45：155-162。
- 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第 205 號。
- 農委會臺灣農家要覽增修訂三版策劃委員會。2005。臺灣農家要覽增修訂三版-農作篇(二)。575-580。
- Benbow, J. M., and Sugar, D.** 1999. Fruit surface colonization and biological control of postharvest diseases of pear by preharvest yeast applications. *Plant Dis.* 83: 839-844.
- Kim, Ju, H., Lee, S.H., Kim, C.S., Lim, E.K., C, K.H., Kong, H.G., Kim, D.W., Lee, S.W., and Moon, B.J.** 2007. Biological control of strawberry bray mold caused by *Botrytis cinerea* using *Bacillus licheniformis* N1 formulation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 438-444.
- Lin, H.F., T.H. Chen, S.D. Liu.** 2010. Evaluation of *Bacillus subtilis* as a

- bio-control agent against pepper blight under greenhouse and field conditions. J. Agric Assn. Taiwan.11: 210-221.
- Paulus, A. O.** 1990. Fungal diseases of strawberry. HortScience 25: 885-889.
- Schoonbeek , H.** 2004. ABC transporters from *Botrytis cinerea* in biotic and abiotic interactions. Wageningen University (Netherlands).
- Weller, D. M.** 1988. Biological control of soilborn plant pathgens in the rhizosphere with bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 26: 379-407.
- Whipps, J. M.** 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. J. Exp. Bot. 52: 487-511.
- Williams, P. H.** 1980. Black rot: a continuing threat to world crucifers. Plant Disease. 64: 8, 736-742.

Development of bio-pesticide *Bacillus amyloliquefaciens* ML15-4 to control of the gray mold(*Botrytis cinerea*) of strawberry(*Fragaria x ananassa*)

Zhi-Wen Zheng¹、Ji-Feng Li¹、Dai-Rong Wu¹、Mei-Chun Lu¹、
Ying-Hong Lin²、Sheng-Chi Chu^{1*}

¹Miaoli District Agricultural Research and Extension Station, Council of Agriculture, Executive Yuan

²Department of Plant Medicine, National Pingtung University of Science and Technology, Neipu, Pingtung

ABSTRACT

Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) is one of the most economically important fruit crops in the world. However, the necrotrophic air-borne fungus, *Botrytis cinerea*, which can affects many plant species, occurs abundantly throughout the year as a saprophyte and facultative parasite on strawberry. In this study, the *Bacillus amyloliquefaciens* ML15-4 isolated by the Miaoli District Agricultural Research and Extension Station was formulated as the bio-pesticides for control of *Botrytis cinerea*. Specifically, we optimized the five-tons of industrial-grade production processes and completed two bio-pesticide formulations of suspension concentrate and wettable powder. We proved that 1×10^9 CFU/ml of viable bacteria can be maintained at least for 24 months at room temperature (28°C). The data of storage stability evaluation indicated that shelf life of the suspension concentrates and wettable powder was at least 2 years in duration at room temperature. In the greenhouse experiments, the disease severity of strawberry fruit gray mold (SFGM) in the early stage could be reduced about 12.8% by the ML15-4 suspension concentrates. To further evaluate the efficacy of the two bio-pesticide formulations on controlling SFGM, three preventive application experiments in fields were conducted. The results indicated that the applications of the formulated *B. amyloliquefaciens* ML15-4 (in 1:300 dilution) significantly reduced the disease severity of SFGM up to 54% to 58.7% in the field trials. The two bio-pesticide formulations of ML15-4 without residual toxin have the potentials to serve as the safety management methods for enhancing fruit quality and reducing the economic impacts of SFGM on the strawberry industry. We expect that the two bio-pesticide formulations of ML15-4 could provide an alternative approach to chemical pesticides in management of SFGM more safely and reliably.

Key words: *Bacillus amyloliquefaciens*, bio-pesticide, gray mold (*Botrytis cinerea*)

* Corresponding author, email: 7124@mdais.gov.tw