功能性微生物製劑應用於甘藍栽培與黑腐病防治之評估[1]

郭建志[2]、莊天心[3]、陳俊位[4]、廖君達[2]

摘　要

本研究篩選促進生長與對病害發生具保護效果之微生物菌株，並導入甘藍苗期與田間施用方法，結合病蟲害發生時機資料，建立甘藍病害綜合管理策略。本試驗自南投縣魚池鄉及霧社鄉的土壤樣本中，篩選出30株具耐熱性之微生物菌株，經由溶血測試後，選取17株不溶血的微生物菌株，進行後續的溶磷活性分析、4種分解酵素能力測定，結果選擇溶磷活性達500 (μg/ml/day)以上的5株菌株進行5種甘藍病原菌的抗菌圖譜測定，其結果以TCB237對甘藍黃葉病、甘藍苗立枯病*Rhizoctonia solani*、甘藍黑腐病與甘藍軟腐病的拮抗測試最為優異，其次為TCB207，而TCB203、TCB263與TCB298則無明顯的拮抗效果。在菌種鑑定部分，TCB203為巨大芽孢桿菌*Bacillus megaterium*、TCB207為*Bacillus velezensis*、TCB237與TCB263為*Bacillus* sp. (尚未確認其種名)，TCB298則是鑑定為類芽孢桿菌(臺中種) *Paenibacillus taichungensis*。經由搖瓶培養的試驗結果，所有菌株以LB broth培養菌量均可達10^9 cfu/ml以上，選定LB broth為基礎發酵培養基。應用此5菌株經LB broth發酵72 hr後，進行甘藍台中2號盆栽與溫室之根部澆灌試驗，盆栽處理的結果，經6次澆灌後，以TCB237處理最佳，其葉片數、株高及根長相較對照組具有顯著差異。此外，在溫室栽培的處理中，仍以TCB237處理之單球重最高。其後應用本場原有的液化澱粉芽孢桿菌微生物製劑Tcba05、TCB102-B7與TCB9407，進行甘藍台中2號黑腐病帶菌種子處理，檢測處理後之黑腐病帶菌率，結果以Tcba05、TCB102-B7處理後的甘藍種子無檢出黑腐病產生，顯示種子預先浸泡於微生物製劑中，可以降低種子帶菌風險及苗期病害的發生。此3株微生物製劑，施用於夏季甘藍台中2號的試驗田中，經根部澆灌與葉部噴施共7次，以TCB102-B7處理之黑腐病罹病度最低，僅6.25%，而Tcba05處理9.17%，對照組則達45%，顯示預先澆灌與噴施可降低甘藍黑腐病的發生。本研究已篩選具有耐熱、溶磷與抗黑腐病之微生物菌株TCB237，具發展微生物農藥之潛力，可融入甘藍整合性病害管理中，成為友善耕作的植物保護資材。

關鍵詞：甘藍、功能性微生物、芽孢桿菌

---

[1] 行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第 0923 號。
[2] 行政院農業委員會臺中區農業改良場副研究員。
[3] 國立中興大學農資學院農業推廣中心研究助理。
[4] 行政院農業委員會臺中區農業改良場研究員兼分場長。

前　言

甘藍(*Brassica oleracea* L. var. *capitata*)為國人最普遍食用，以及世界各地民眾賴為維護健康的重要蔬菜，國內每年種植面積平均在7,000~8,000 ha左右，105年全國產量達399,174 ton，平地主要產地在雲林縣、彰化縣；高冷地區主要為南投縣、宜蘭縣、臺中市等地[5]。105年國內甘藍種植面積已達8,644 ha，而本場轄內甘藍生產面積為2,653 ha，佔全國總面積30.7%，是本場輔導的重點作物之一。目前臺灣甘藍品種主要來自日本，其中初秋甘藍市佔率高達70%，但該品種不耐熱，為滿足夏季消費市場需求，只能往高冷地種植；而近年興起之甘藍228品種，為臺灣目前最耐熱之夏季商業品種，但其食用品質並無法滿足消費者需求。隨著高冷地栽培所衍生之環境爭議及高生產成本問題，加上氣候變遷因素，甘藍品種之耐熱性成為種植成功與否之重要關鍵。甫近，本場所培育的甘藍台中1號及2號，則為夏季甘藍栽培品種的新生力軍，大量採種生產後，未來將可取代228品種成為夏季平地甘藍栽培的主力品種[5]。

甘藍生產從盤苗至採收需時約80~90天，平地種植的甘藍易受到立枯病、軟腐病與黑腐病之威脅與侵擾[4]，而夏季高海拔地區種植的甘藍則會受到根瘤病之危害。這些病害除影響田間甘藍種植的存活率與生長外，並易伴隨夏季的豪雨與颱風等天然災害的發生，造成重大損失而影響夏季甘藍產業。農友為搶夏季甘藍高價市場，濫用及誤用農藥情況嚴重，造成嚴重的食安問題。因此，如何導入友善的植物保護資材－微生物製劑施用，藉以降低甘藍栽培期間病害的發生，是目前尚需克服的問題。

目前國內針對生物農藥中的微生物製劑，有相當多的試驗機關與學者專家進行菌種篩選與產品研發，歷年來投入的經費更是可觀，但是實際應用於田間且成功的產品仍然有限。有關微生物肥料的發展近來亦相當熱門，此類的微生物菌株具有溶磷、溶鉀等功效，可以幫助作物更有效率的吸收土壤中的肥分，達到減少化肥仍可維持產量的農業資材[12,13]。近年來，本場除自行篩選與研發木黴菌、芽孢桿菌菌種製劑外，並結合各種農業資材研發生物製劑產品，相關微生物製劑與衍生性產品如生物堆肥、栽培介質、農業廢棄物與功能性製劑，互相搭配實際應用於田間，對作物生長促進效益及病蟲害防治，有極顯著效益[1,2,6]。

最近所篩選出的木黴菌*Trichoderma asperelloides* TCTr-668菌株，為國內首先發現的新菌種，與液化澱粉芽孢桿菌*Bacillus amyloliquefaciens* Tcba05，皆為農委會推動雄才大略計畫中生物農藥產業化的標的菌株，液化澱粉芽孢桿菌Tcba05及本場原有菌株TCB102-B7則對甘藍黑腐病具防治效果，對作物並具有促進生長與提升產量之效益[3,9]，其菌株發酵過程中，所產生的代謝物質中具有抗生物質[15]，可以抑制植物病原真菌與細菌[7,8,11]。

有鑑於本場在微生物製劑研發技術純熟，因此，本研究篩選並研發促生與保護型微生物菌株及製劑，並導入甘藍苗期與田間預先施用方法，結合病蟲害發生時機資料，建構甘藍病害綜合管理策略，改善甘藍栽培種植問題與提升產業價值，提供建構整套病害綜合管理策略使用之新技術或防治資材等，以供農友參考利用，裨益提升國內甘藍產業的生產力與競爭力。

材料與方法

一、功能性微生物菌種之篩選

(一)耐熱性有益微生物之篩選

分離與篩選具耐熱性之微生物菌種並分析其溶血與溶磷活性及4種分解酵素能力。

1.耐熱性菌株之篩選

本試驗從南投縣魚池鄉及霧社鄉的山林土採集土壤樣本，將每批土壤樣本均勻混拌後，取10 g土樣加入90 ml的無菌水血清瓶中，混和攪拌後放置於60℃的水浴槽30 min，後續再取1 ml土壤稀釋液加入9 ml的無菌水試管中，依序序列稀釋至10^{-4}次方，最後從10^{-4}次方的取樣100 µl，均勻塗抹於LA (Luria-agar, Difco)上，放置於28℃定溫箱中培養2~3 hr，後續挑選微生物菌株。

2.溶血活性分析測定

自土壤中所篩選出來的微生物菌株，進行試驗前需經過溶血性測試，以確保菌株的安全性。將所有待測菌株已滅菌過的移植環沾取單一菌落，接種於含羊血成分的Blood Agar Plate (BAP) (TSA with 5% Sheep Blood)血液培養基，放置於28℃定溫箱中培養48 hr，檢測菌株在培養基透化之情形。

3.溶磷活性分析測定

將所篩選之微生物菌株進行純化培養，並挑選單一菌落接種至5 ml的LB (Luria-Bertaini broth, Difco) Broth培養1天後，自LB Broth中取出500 µl至液態磷酸三鈣、磷酸鋁及磷酸鐵或磷礦石粉(Rock-P, CCM FERTILIZER Sdn Bhd)培養基中，經培養4天後以鉬藍法[17,18]進行水溶性磷含量分析，藉以篩選具溶磷特性菌株，並分析其溶磷量(µg/ml/day)。磷酸三鈣、磷礦石粉、磷酸鋁及磷酸鐵培養基之配方參照肥料檢驗方法(方法編號AFS3183-1)。此外，配製含有溴酚藍(bromophenol blue)的溶磷平板(Dissolve Phosphorus Agar, DPA)，將測試菌株接種於平板上，經24 hr後觀察菌落周圍是否有透化情形。

4.分解酵素能力分析測定

依據前人研究文獻配製測試澱粉酶(amylase)、脂肪分解酶(lipase)、蛋白酶(protease)與纖維素酶(cellulase)活性之培養基[14,16,20]，將測試菌株已移植環沾取單一菌落，接種於上述各培養基上，依照測試條件，培養足夠天數後，直接觀察或是利用染劑，量測酵素作用圈(degradation zone)。

5.抗菌圖譜之建立

篩選具耐熱、溶磷及分解酵素特性的菌株與甘藍病原菌，包含甘藍黑腐病(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)、立枯病(*Rhizoctonia solani* 與 *Pythium aphanidermatum*)、甘藍黃葉病(*Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*)及甘藍軟腐病(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*)等5種病原菌進行平板拮抗測試，真菌

病原測試微生物菌株對病原菌菌絲生長抑制率；細菌病原測試微生物菌株對該細菌之透化圈大小。

(二)微生物菌株鑑定與少量搖瓶發酵測試

利用本場已篩選之微生物菌株，應用16S核糖體RNA與旋解酶(gyrB)基因進行分子生物鑑定，其片段序列與美國國家生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)比對，並進行與測試功能性微生物菌株500 ml搖瓶菌量濃度測試。

1. 16S核糖體RNA與旋解酶(gyrB)基因鑑定

抽取各篩選菌株之DNA樣本，再以可增幅出16S核糖體RNA之引子對primer 27F/1492R，與旋解酶基因引子對gyrB-41F/gyrB-44R分別進行PCR反應，根據Brosius等人的文獻[10]，利用27F與1492R為細菌16S rRNA通用引子對，所添加之引子濃度約10 μM，分別加入PCR各反應物，總反應體積20 μl，進行PCR反應，反應條件增幅序列之條件為：94℃-5 min，94℃-30 sec，57℃-45 sec，72℃-1 min 30 sec，共30個循環，最後再進行72℃-7 min 1個循環，預期產物長度約1,400~1,500 bp。利用gyrB-41F/gyrB-44R，針對*Bacillus*屬菌種進行種間鑑定。反應條件為：95℃-5min，95℃-60 sec，55℃-60 sec，72℃-1 min 30 sec，共30個循環，最後再進行72℃-10 min 1個循環，預期產物長度為1,200 bp[19]。兩組序列如下。

27F：5' -AgAgTTTgATCMTggCTCAg- 3'

1492R：5'-TACggYTACCTTgTTACgACTT-3'

gyrB-41F：5'-gAAgTCATCATgACCgTTCTgCAYgCNggNggNAARTTYgA-3'

gyrB-44R：5'-AgCAgggTACggATgTgCgAgCCRTCNACRTCNgCRTCNgTCAT-3'

所得之專一性片段經委由源資國際生物科技股份有限公司進行定序作業，所得序列再經由NCBI進行比對結果，鑑定其菌種學名。

2.基礎500 ml培養基的搖瓶測試

本試驗以LB、NB (Nutrient Broth, Difco)及PDB (Potato Dextrose Broth, Difco)等基礎液態培養基作為篩選菌株的培養基，將每個菌株的單一菌落分別接種於LB、NB及PDB broth中，以28℃、125 rpm轉速的條件下進行培養，每隔6hr取樣1次，檢測OD_{620}的數值，經取樣7次後，比較測試的結果。

(三)甘藍盆苗、盆栽與溫室小規模應用微生物製劑之促進生長試驗

以具有優異分解酵素與溶磷特性之微生物菌株，分別處理甘藍盆苗、盆栽以臺中改良場有機區溫室小規模之甘藍，品種為台中2號，應用5種微生物製劑，包括TCB203、TCB207、TCB237、TCB263及TCB298，經LB培養3天後，分別以100倍稀釋液澆灌於甘藍台中2號盆栽與溫室小規模栽培，其中盆栽處理，每盆種植3株，每處理3盆，對照組則是以澆灌水處理，每週1次，連續澆灌6次調查其生長性狀，溫室栽培每處理共定植15株苗，待定植後15天開始進行根部澆灌，每週1次，連續2次後改成葉噴處理，連續4次葉噴後，待採收時調查病害發生情形與園藝性狀。

二、應用微生物菌株發酵液防治甘藍黑腐病之試驗

(一)甘藍黑腐病苗期防治評估試驗

利用本場先前篩選與研發之液化澱粉芽孢桿菌Tcba05、TCB9407與芽孢桿TCB102-B7等三種微生物菌株，針對甘藍黑腐病之種子帶菌防治試驗，測試微生物製劑對黑腐病之效果評估，據以建立防治種子與苗期處理防治技術1式。試驗的進行為利用甘藍種子以浸菌的方式分別處理Tcba05、TCB9407與TCB102-B7等3菌株，並設置無菌水處理之對照組。供試種子之處理為秤取種子10 g後，將甘藍種子預先浸泡於濃度達10^6 cfu/ml的甘藍黑腐病菌(*X. campestris* pv. *campestris*)菌株TCXCC01細菌懸浮液3分鐘。等蔭乾後再浸泡各微生物製劑100倍稀釋液中，菌量調製為(OD_{620} = 0.3)，5分鐘後取出蔭乾，再將種子播種於PDA上，置於30℃培養箱中黑暗培養24 hr，然後取出調查其PDA上之種子發芽率、黑腐菌率及拮抗微生物的種子帶菌率。

(二)甘藍黑腐病田間先期防治評估試驗

本次試驗應用3種微生物製劑進行田間先期甘藍黑腐病防治評估試驗，試驗的甘藍品種為夏季耐熱的臺中2號，待試驗田之甘藍苗定植後15天，開始應用Tcba05、TCB9407與TCB102-B7等發酵後之微生物製劑100倍稀釋液，包含對照組共4組處理，每組處理三重複。試驗採用逢機完全區集排列，每重複種植20株。自106年9月4日開始，每週進行根部澆灌1次，連續2次後，改成由葉部噴施，每週1次，共4次，待採收期前後進行甘藍黑腐病防治評估調查。甘藍黑腐病罹病率調查，每小區調查20株甘藍，每棵調查5片下位葉。依發病面積分為4級，0：未發病；1：發病面積佔全葉1~5%；2：發病面積佔全葉6~25%；3：發病面積佔全葉25~50%；4：發病面積佔全葉面積50%以上。罹病度=Σ (發病面積指數×該指數葉數) / (4×總調查葉數)×100%。

三、結合促生及植物保護型功能性微生物製劑應用於甘藍田間試驗

本試驗於2016年11月份在彰化溪州與南投水里甘藍栽培地區選定2處試驗田，品種為「初秋」，利用先前篩選及測試之3株具有促進生長效果之菌株進行田間處理，田間規劃5種處理，包括對照組1 (不用殺菌劑)、慣行區、TCB207-100X、TCB237-100X與TCB298-100X共5種處理、均以澆灌甘藍根部為主，每週1次共澆灌3次；每種處理甘藍棵數均達200粒以上，兩處試驗田之田間規劃相同。依據病害發生時期，進行整合性病害管理試驗，調查項目為：甘藍促進生長效果、栽培期程縮短效益評估及栽培期間病害之罹病度調查。此外，以不施微生物製劑、慣行區作為對照區。蟲害預防與管理，則以性費洛蒙誘蟲器與蘇力菌微生物殺蟲劑施用為主。

結　果

一、促進生長型微生物菌種之篩選及鑑定

(一)耐熱性有益微生物之篩選

1.耐熱性菌株之篩選

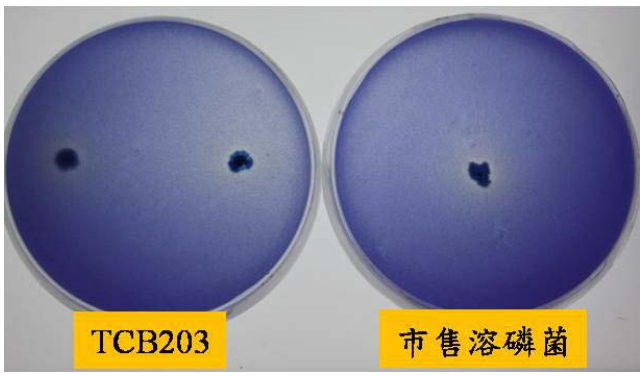
本試驗從魚池鄉與霧社的土壤中，經由60℃處理30 min後，於LA培養基上挑選出30株微生物菌株，從魚池鄉土壤所篩選之菌株共有10株，分別為TCB203、TCB204、TCB205、TCB206、TCB207、TCB208、TCB215、TCB237、TCB239、TCB240；從霧社土壤樣本1篩選之菌株共11株，分別為TCB261、TCB263、TCB264a、TCB 264b、TCB265、TCB266、TCB267、TCB268、TCB269、TCB270、TCB271；從霧社土壤樣本2篩選之菌株共9株，分別為TCB298、TCB304、TCB305、TCB306、TCB307-1、TCB310、TCB311-1、TCB312、TCB313，共計有30株。

2.溶血活性分析測定

將本試驗中所篩選的30株微生物菌株，均以移植環沾取單一菌落後，接種於5%羊血Sheep Blood培養基上，經過48 hr培養後，不具有溶血特性的菌株為TCB203、TCB207、TCB237、TCB215、TCB239、TCB240、TCB263、TCB264a、TCB264b、TCB266、TCB267、TCB268、TCB271、TCB298、TCB305、TCB307-1、TCB312等17株微生物菌株，其餘菌株初步檢測具有溶血特性，暫不進行後續試驗。

3.溶磷活性分析測定

將所篩選的耐熱且不具溶血特性的17株菌株，進行溶磷活性測定，具有溶磷效果之菌株如圖一所示，可產生出透化情形。所有菌株經培養於溶磷培養基上及磷酸三鈣液態培養基、磷酸鋁培養基、磷酸鐵培養基及磷礦石粉培養基中，培養4天以鉬藍法進行水溶性磷含量分析，檢測出17株菌株每天可溶出水溶性磷的含量。磷酸三鈣液體培養測試分析結果，共14株菌株具有活性，其中以TCB298表現最優異，活性可達4357.38 μg/ml/day、磷酸鋁培養基分析結果僅只有TCB298具有活性，可達31.60 μg/ml/day、磷酸鐵培養基分析結果僅只有TCB203與TCB237具有活性，分別為4.26 μg/ml/day與182.56 μg/ml/day、磷礦石培養基分析結果僅7株具有活性，以TCB267為最高，可達196.63 μg/ml/day。



圖一、TCB203 菌株接種於含有磷酸三鈣之溶磷平板上 48 小時之透化結果

Fig. 1. The hydrolysis of tricalcium phosphate by strain TCB203 inoculated on soluble phosphorous plate at 28℃ for 48 hr.

表一、17 株耐熱菌株測試溶磷活性(μg/ml/day)分析之結果
Table 1. The phosphate solubilizing activity by 17 heat-resistance strains.

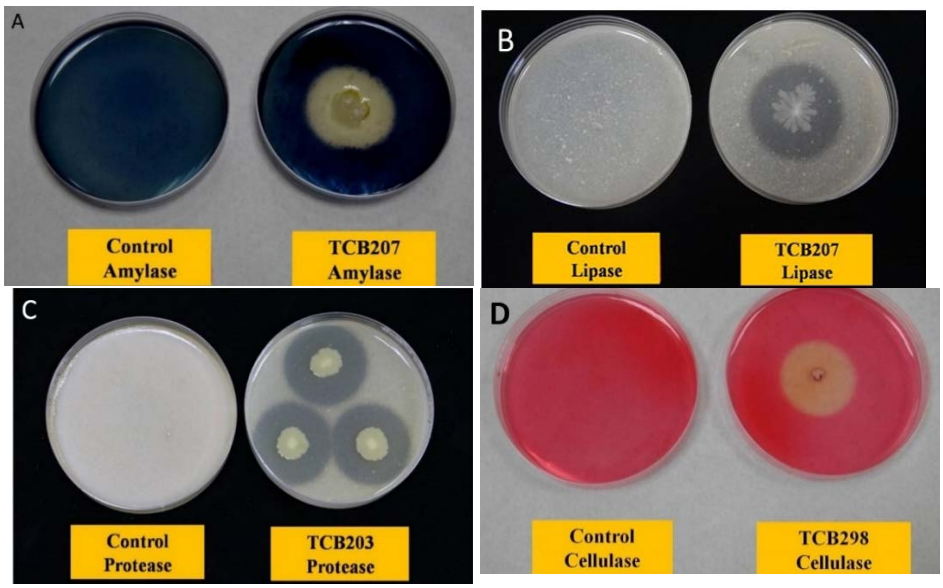
Strains	Tricalcium phosphate	Aluminium phosphate	Iron phosphate	Phosphate powder
TCB203	1941.80	--[1]	4.26	23.78
TCB207	680.91	--	--	--
TCB237	573.85	--	182.56	13.65
TCB215	219.98	--	--	--
TCB239	450.29	--	--	--
TCB240	453.69	--	--	--
TCB263	681.97	--	--	1.52
TCB264a	162.17	--	--	--
TCB264b	498.63	--	--	--
TCB266	--	--	--	10.7
TCB267	--	--	--	196.63
TCB268	35.88	--	--	--
TCB271	9.73	--	--	4.38
TCB298	4357.38	31.60	--	23.21
TCB305	110.10	--	--	--
TCB307-1	122.88	--	--	--
TCB312	--	--	--	--
Control[2]	--	--	--	--

[1] Indicated the detected data lower than control.
[2] Use water as the control.

4.分解酵素能力分析測定

17株試驗菌株進行澱粉、脂質、蛋白質及纖維素分解能力測試，經培養3天後，觀察菌株透化情形，如圖二。並量測透化圈直徑與菌落直徑數值，以菌落透化能力(透化圈直徑/菌落直徑)數值表示。分析其透化能力，測試Amylase的結果，以TCB207的表現最佳，數值可達2.74；分析Lipase的結果，僅只有TCB207具有分解效果；同樣地在Protease及Cellulase的分析結果，則以TCB203及TCB237的表現最佳，詳細數值與結果詳如表二。

本試驗所篩選之17株耐熱菌株，經由溶磷與分解酵素能力分析後，僅有TCB203、TCB207、TCB237、TCB263、TCB298此5株菌株之溶磷活性均達500 (μg/ml/day)以上，並具有1種以上的分解酵素能力。



圖二、利用所篩選的菌株進行於(A)澱粉(B)脂質(C)蛋白質(D)纖維素培養 48 小時之透化結果。

Fig. 2. The hydrolysis activity of 4 kinds of enzyme by screened strains inoculated on the plate at 28℃ for 48 hr. (A) Amylase, (B) lipase, (C) Protease, (D) Cellulase.

表二、17 株耐熱菌株測試 4 種分解酵素能力之透化圈透化數值結果

Table 2. The average diameters of 4 enzyme hydrolysis zone test of 17 heat-resistance strains.

Strains	Amylase	Lipase	Protease	Cellulose
TCB203	1.66b[1]	—[2]	2.49a	1.12c
TCB207	2.74a	1.31	1.25b	—
TCB237	2.33a	—	1.42b	2.29b
TCB215	—	—	—	—
TCB239	—	—	—	—
TCB240	—	—	—	—
TCB263	—	—	1.41b	1.21c
TCB264a	1.11c	—	—	—
TCB264b	1.13c	—	—	—
TCB266	—	—	—	—
TCB267	—	—	—	—
TCB268	—	—	—	—
TCB271	—	—	—	—
TCB298	—	—	1.59b	3.24a
TCB305	—	—	—	—
TCB307-1	1.22c	—	—	—
TCB312	—	—	—	—
Control[2]	—	—	—	—

[1] Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by LSD test.

[2] Indicated no hydrolysis zone production.

5.微生物菌株抗菌圖譜之建立

以此5株與5種甘藍病原菌進行平板拮抗試驗。結果在*P. aphanidermatum*的測試部分，所有菌株均無抑制菌絲之能力。對甘藍黃葉病的拮抗測試中，以TCB237的效果最佳，菌絲抑制率可達51.1%，其次為TCB207，菌絲抑制率為48.9%，其餘菌株皆低於10%以下。在甘藍苗立枯病*Rhizoctonia solani*測試結果，TCB207與TCB237的菌絲抑制率均為44.4%，其餘菌株皆低於10%以下。在細菌病害拮抗測試方面，TCB203、TCB263與TCB298對甘藍黑腐病與軟腐病無抑制拮抗效果，而TCB207與TCB237對兩細菌病原具有拮抗效果，TCB207對黑腐病與軟腐病之抑制圈直徑分別可達25.34±0.93 cm及10.33±1.15 cm；TCB237之抑制圈直徑分別可達33.23±1.74 cm與33.23±1.74 cm，結果以TCB237較TCB207優異，尤其對黑腐病之抑制圈直徑可達3 cm以上。

表三、5 株菌株對 3 種甘藍病原真菌之菌絲抑制率結果

Table 3. Mycelial inhibition rate of 5 tested strains against 3 pathogenic fungi on cabbage.

Strains	Mycelium growth inhibition of plant pathogens (%)[1]	
	F. oxysporum f. sp. *conglutinans*	*Rhizoctonia solani*
TCB203	4.4	9.3
TCB207	48.9	44.4
TCB237	51.1	44.4
TCB263	0	0
TCB298	8.9	1.5

[1] Inhibition (%)=[(Diameter of treatment mycelial growth - diameter of control mycelial growth) / diameter of control mycelial growth]×100%.

6. 16S核糖體RNA與旋解酶gyrB基因鑑定

本試驗針對16S rRNA及gyrB基因序列，利用各別之專一性引子對結合聚合酶連鎖反應PCR對此5試驗菌株增幅出專一性核酸片段，此專一性片段經膠體電泳確認後，將PCR產物委由源資國際生物科技股份有限公司進行片段定序，定序結果之核酸序列比對美國全國生物技術信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)資料庫，進行分子鑑定。鑑定結果TCB203為*Bacillus megaterium* (巨大芽孢桿菌)、TCB207為*Bacillus velezensis*、TCB237與TCB263鑑定仍為*Bacillus* sp. (芽孢桿菌)、TCB298為*Paenibacillus taichungensis* (類芽孢桿菌－臺中種) (表四、表五)。

表四、5 株試驗菌株之 16S rRNA 之定序片段與 NCBI 核苷酸資料庫比對結果

Table 4. The results of 16S rRNA sequences analysis of 5 tested strains compared with representative sequence in NCBI Nucleotide database.

Strains	16S rRNA		
	Identification	Accession no.	Identity%
TCB203	*Bacillus megaterium*	MF687401.1	98.3
TCB207	*Bacillus* sp.	AB918712.1	97.0
TCB237	*Bacillus* sp.	CP027061.1	98.4
TCB263	*Bacillus* sp.	KY312756.1	97.0
TCB298	*Paenibacillus taichungensis*	NR044428.1	99.3

表五、5 株試驗菌株之 gyrB gene 之定序片段與 NCBI 核苷酸資料庫比對結果

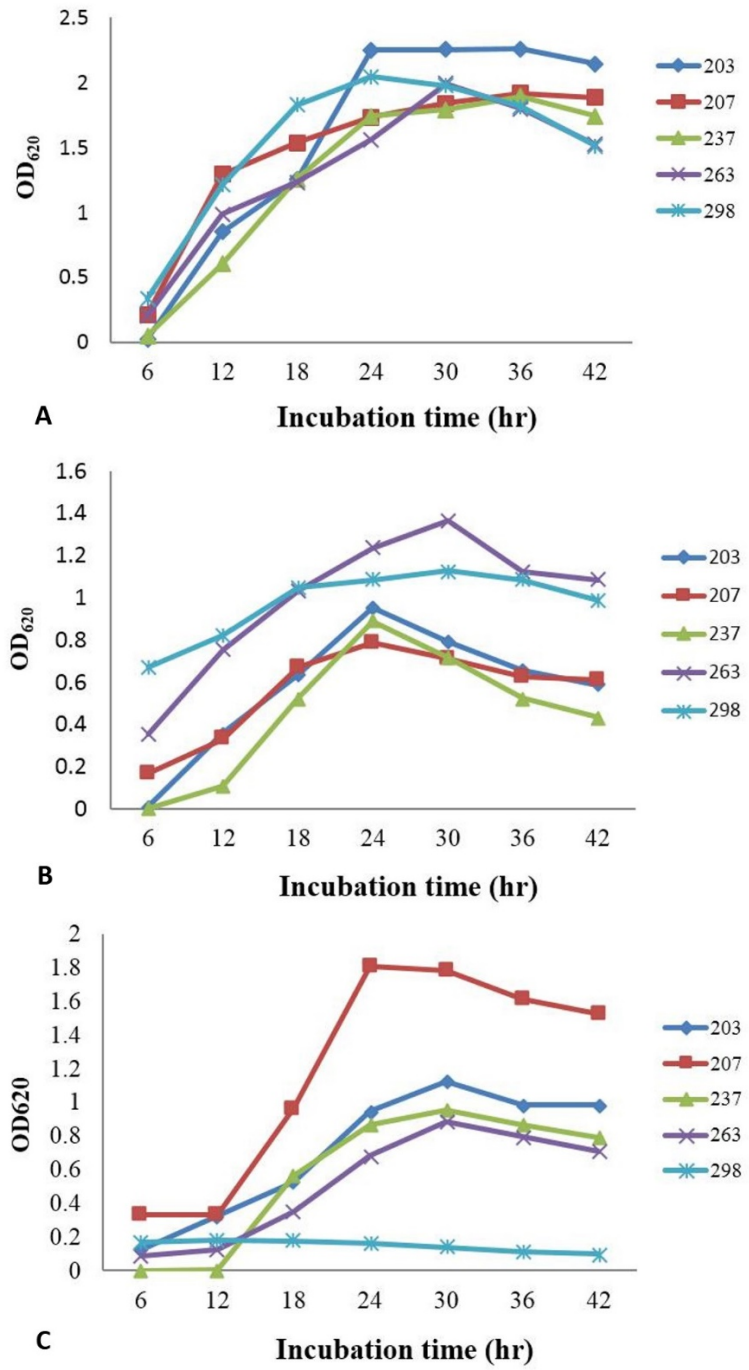
Table 5. The results of gyrB gene sequences analysis of 5 tested strains compared with representative sequences in NCBI Nucleotide database.

Strains	*gyr*B gene		
	Identification	Accession no.	Identity%
TCB203	*Bacillus megaterium*	CP018874.1	93.5
TCB207	*Bacillus velezensis*	CP015911.1	99.0
TCB237	*Bacillus* sp.	AB936836.1	99.0
TCB263	*Bacillus* sp.	KY673628.1	99.3
TCB298	*Paenibacillus taichungensis*	KT318609.1	99.1

(二)促生型微生物菌株少量搖瓶發酵測試

1.基礎500 ml培養基的搖瓶測試

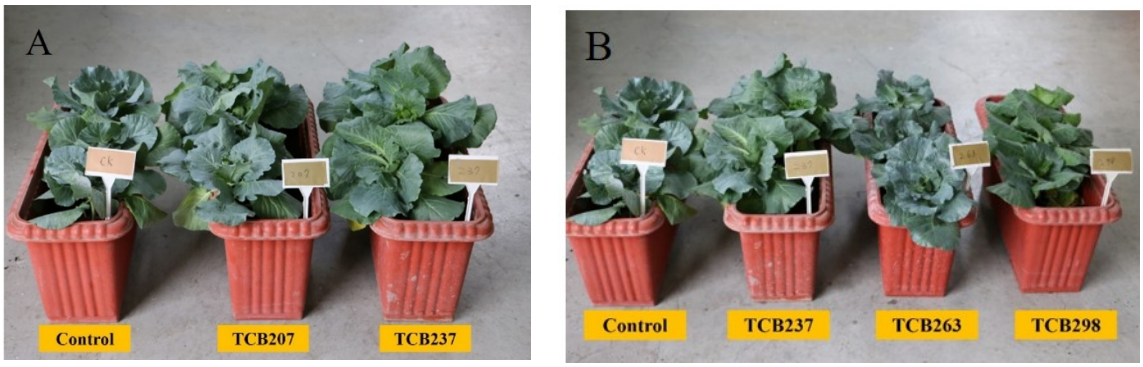
本試驗測試3種液態培養基，包含LB、NB及PDB等基礎培養基，將每個菌株的單一菌落接種於上述三種5 ml培養基試管中，以28℃、125 rpm轉速的條件下進行培養，每隔6小時取樣測試菌量的OD_{620}數值並記錄。經由42小時的取樣檢測結果後，此5株菌株以LB medium的數值最高，經由系列稀釋及塗佈平板計數活菌數，結果均可達10^8 cfu/ml以上。而NB及PDB等培養基檢測結果，數值偏低，僅TCB203與TCB207的濃度達10^8 cfu/ml，其餘菌株均低於10^7 cfu/ml以下。後續實驗均以LB medium為發酵培養的基礎培養基。三種取樣結果如(圖三)。



圖三、由根圈所篩選的 5 株菌株以 LB、NA 及 PDB 培養後之取樣檢測 OD_{620} 值結果
Fig. 3. The detected OD_{620} value of 5 strains cultured in (A) LB；(B) NB；(C) PDA media.

(三)甘藍盆栽與溫室小規模應用微生物製劑之促進生長試驗

應用5種微生物製劑處理盆栽甘藍試驗，經6次澆灌之後，調查其葉片數、株高及莖寬等資料，以TCB237與TCB298處理之葉片數最多，達9.33葉。株高及莖寬部分則以TCB237處理相較對照組具有顯著差異，分別為17.64 cm與4.57 cm，詳細對照如圖四(表六)。



圖四、盆栽處理試驗甘藍盆栽生長情形。由左至右依序為(A)對照組、TCB207 與 TCB237；(B)對照組、TCB237、TCB263 與 TCB298。

Fig. 4. Pot treatment test from left to right, is control, TCB207 and TCB237 in (A), and the control, TCB237, TCB263 and TCB298 in (B), respectively,

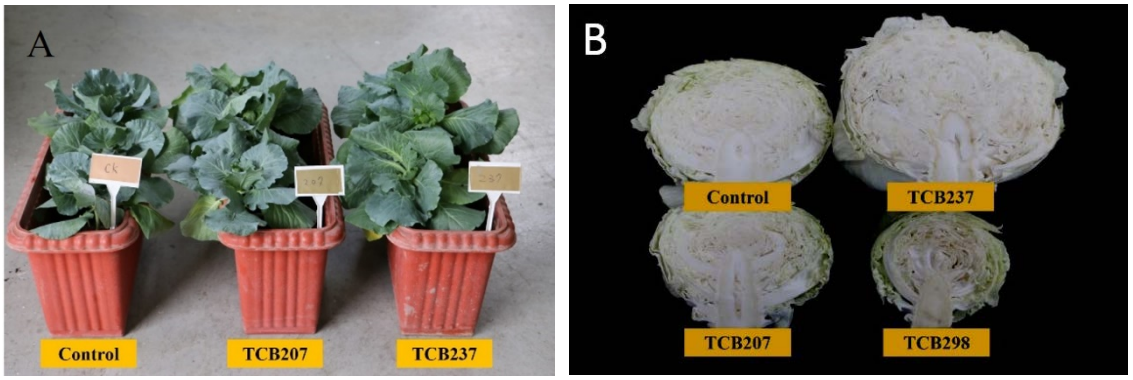
表六、5 株菌株微生物製劑施用甘藍盆栽 6 次後，調查其葉片、株高與莖寬之結果

Table 6. The growth of seedling after application of 5 microbial strains for 6 times. The number of leaves, plant height and stem width were recorded.

Strains	No. of Leaves	Plant height (cm)	Stem width (cm)
Control	7.89±0.6c[1]	14.23±1.29c	3.4±0.59b
TCB203	7.89±0.93abc	17.33±1.06ab	4.27±0.76a
TCB207	8.89±1.27ab	17.62±2.00a	4.42±0.46a
TCB237	9.33±1.12a	17.64±1.63a	4.57±0.45a
TCB263	8.89±1.17ab	17.39±1.65a	4.32±0.47ab
TCB298	9.33±1.22a	16.96±1.44ab	3.82±0.51ab

[1] Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by LSD test

有關溫室小規模試驗，本試驗於本場有機區溫室進行，於2017年8月中旬定植台中2號甘藍苗，待定植後15天，開始應用5種微生物製劑包含2組對照組(清水處理及活力3號處理)對照進行根部澆灌處理，每週進行部澆灌1次，連續2次後，改成由葉部噴施，每週1次，共4次，後續至10月中旬採收期進行園藝性狀生長調查。調查結果顯示以TCB237在地上部重、根鮮重、單球重方面，均優於其餘菌株、清水對照組與活力三號對照組(圖五與表七)。而TCB298-100倍處理後，並未提升甘藍生長勢與園藝性狀，後續可能須調整使用倍數及培養基成分微調。



圖五、溫室小規模種植甘藍台中 2 號生長情形。(A)，對照組與施用 TCB207、TCB237-100X 後植株生長；(B)，甘藍對照組與處理組採收後剖面比較。

Fig. 5. The growth of cabbage cultivar Taichung No. 2 in greenhouse small-scale planting trial (A) The treatment of TCB207, TCB237 and control. (B), The cross section of the control and strains TCB237 , TCB207 and TCB298.

表七、微生物製劑處理甘藍台中 2 號之溫室小規模試驗結果

Table 7. Results of microbial agent treatment on cabbage Taichung 2 in greenhouse small-scale trial.

Treatments	Weight of above ground (Kg)	Root fresh weight (g)	Single ball weight (Kg)	Single ball height (cm)	Single ball width (cm)
Control-water	1.449b[1]	70.882b	0.717b	12.122ab	15.611ab
Control-Bio-tech 3	1.407b	70.777b	0.810b	10.733b	15.167ab
TCB203	1.303b	80.715a	0.798b	12.133ab	15.167ab
TCB207	1.330b	76.807ab	0.747b	11.933b	15.500ab
TCB237	1.728a	93.323a	1.030a	13.217a	16.000a
TCB263	1.127b	48.533d	0.447c	10.767b	14.333b
TCB298	0.840c	60.453c	0.397c	10.433b	12.400b

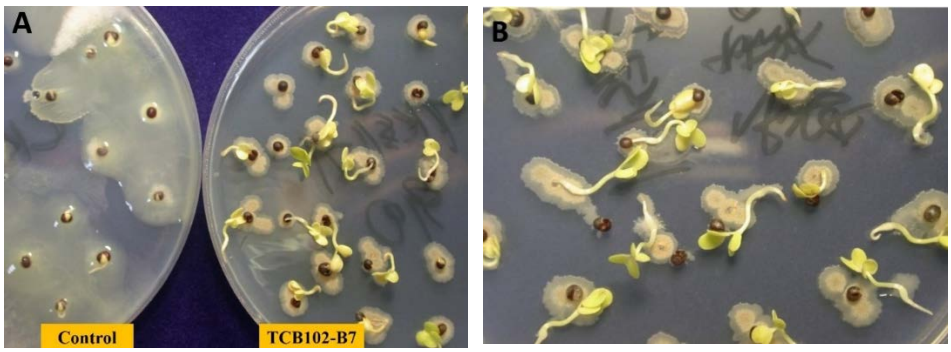
[1] Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by LSD test.

二、植物保護型功能性微生物製劑之研究

(一)甘藍黑腐病苗期防治評估試驗

應用甘藍種子浸泡甘藍黑腐病病原菌細菌懸浮液，當作帶菌種子，後續再浸泡Tcba05、TCB9407與TCB102-B7等3菌株發酵液100倍5分鐘後，取出種子待蔭乾後將種子放置於PDA培養基上與穴盤上，觀察後續種子帶菌發病情形。PDA培養基上之結果(如圖六)，對照組帶菌種子呈現黑腐病菌泥出現，而浸泡3種芽孢桿菌微生物製劑後之種子，僅TCB9407處理後有2%種子發病，其餘都無黑腐病菌泥產生。另一方面，帶菌種子浸泡3種芽孢桿菌100倍稀釋液後，其種子帶有芽孢桿菌的比率高達96%以上，以上結果說明，帶菌種子預先處

理芽孢桿菌的發酵液稀釋液後，具有明顯大幅降低種子發病的情形(表八)，並減少苗期產生黑腐病的機會。



圖六、甘藍帶菌種子測試處理微生物菌株之結果。(A)左為對照組、右為 TCB102-B7；(B)甘藍種子處理芽孢桿 TCB102-B7 菌株後發芽情形。

Fig. 6. Germination of cabbage seed pre-contaminated with Xanthomonas campestries pv. Campestries. (A) The contaminated control (left) and treated with TCB102-B7 (right). (B) The cabbage seeds harboring *Bacillus* sp. TCB102-B7 germinated successfully.

表八、甘藍帶菌種子處理 3 種芽孢桿菌微生物發酵液之種子發芽率、黑腐病種子帶菌率及芽孢桿菌帶菌率結果

Table 8. Percentage of seed germination. The seeds were pre-infested with *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* and further harboring 3 *Bacillus* spp. as treatments.

Strains	Cabbage seed germination (%)	[2]*XCC* infested seed (%)	*Bacillus* sp. harboring seed (%)
Control	32b[1]	72a	0
Tcba05-100x	90a	0	96a
TCB102-B7-100x	92a	0	100a
TCB9407-100x	92a	2b	100a

[1] Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by LSD test.
[2] XCC means *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

(二)甘藍黑腐病田間先期防治評估試驗

本次試驗應用3種芽孢桿菌微生物製劑進行先期田間黑腐病防治評估試驗。自8月下旬開始進行根部澆灌處理2次後，9月中旬開始進行葉部噴施處理連續5次後，10月下旬開始進行採收調查階段，調查期間均未見甘藍黃葉病與軟腐病的發生，僅只有甘藍黑腐病發生(圖七)，處理芽孢桿菌Tcba05-100倍、TCB102-B7與TCB9407之罹病率均低於10%以下，以TCB102-B7之100倍處理為最低，僅6.25%，相較對照組罹病率已達45% (結果詳如表九)。



圖七、甘藍先期田間病害防治試驗，左為對照組，右邊為 TCB102-B7 處理組

Fig. 7. The occurrence of cabbage black rot disease with the treatment of water as a control (left) and the *Bacillus* sp. TCB102-B7(right).

表九、利用芽孢桿菌發酵液於田間防治甘藍黑腐病之結果

Table 9. Disease incidence and disease severity of cabbage black rot control by *Bacillus* spp. fermentation solutions in field trial.

Treatments	Cabbage black rot disease incidence (%)	Cabbage black rot disease severity (%)
Control	85.67b[1]	45.05b
Tcba05-100x	36.67a	9.17a
TCB102-B7-100x	25.45a	6.25a
TCB9407-100x	40.25a	10.00a

[1] Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by LSD test.

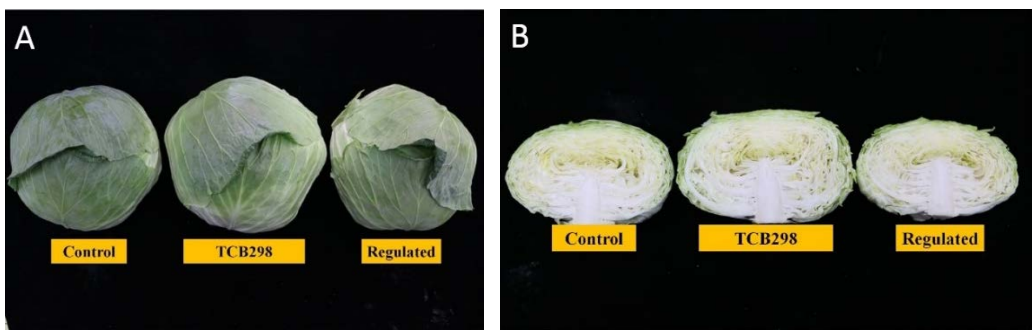
三、結合促進生長及植物保護型功能性微生物製劑應用於甘藍田間試驗

於本場轄內彰化縣溪州鄉與南投縣水里鄉上安村之2處甘藍試驗田，利用本場的促生型微生物製劑，選用TCB207、TCB237與TCB298作為田間試驗的菌株材料，進行甘藍根部澆灌處理；另外植物保護型微生物製劑則是施用液化澱粉芽孢桿菌TCB102-B7進行黑腐病管理。溪州試驗田之調查結果：本次試驗應用本場所篩選之芽孢桿菌TCB207、TCB237與TCB298菌株進行甘藍促生與病害防治試驗，結果在促進生長試驗方面，3株菌株在全株重、地上部重、根鮮重與甘藍單球重均高於對照組處理，尤其TCB298處理組之單球重最為顯著(表十)。病害防治部分，處理期間葉部噴施3株菌株處理與對照、慣行(conventional control)相比，甘藍黑腐病發生全區相當輕微(圖八)，而軟腐病與根瘤病均未發生。



圖八、對照區(A)與處理區(B)之甘藍黑腐病發生情形

Fig. 8. The occurrence of cabbage black rot disease in control group (A) and with the treatment of *Bacillus* sp. (B)



圖九、微生物製劑處理對甘藍結球之影響。(A)甘藍單球相比較；(B)甘藍剖面相比較。由左自右分別為對照組、TCB298 及慣行栽培。

Fig. 9. The effects of microbial agent on cabbage. (A) Appearance of cabbage head, (B) Cross section of cabbage head. Treatments from left to right are the control, TCB298 and conventation cultivation.

表十、溪州鄉初秋甘藍應用微生物製劑處理之田間試驗結果

Table. 10. The field trial of the application of microbial agents on 'Tsuchiu' cabbage in the field at Xizhou township

Treatments	Weight of above ground (Kg)	Root fresh weight (g)	Single head weight (Kg)	Single head height (cm)	Single head width (cm)
TCB207	3.118a[1]	45.257a	1.967ab	13.667a	16.354a
TCB237	3.163a	42.053b	1.997ab	13.667a	16.358a
TCB298	3.222a	41.895b	2.142a	13.833a	16.763a
Conventional control	3.007a	43.452ab	1.873ab	13.667a	14.321a
Control	2.682b	33.432c	1.617b	13.000a	14.527a

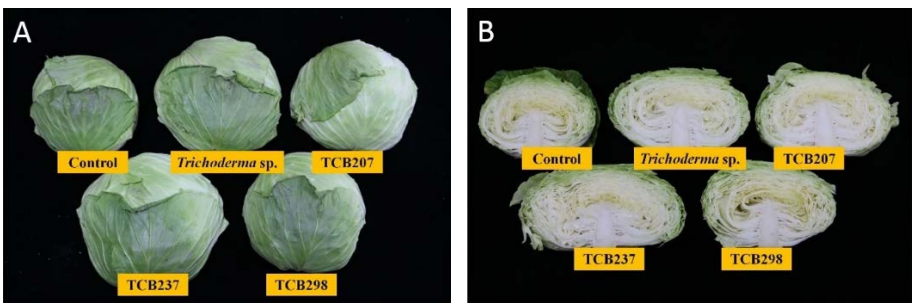
[1] Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by LSD test.

水里鄉上安村試驗田之調查結果：本次試驗應用本場所篩選之芽孢桿菌TCB207、TCB237與TCB298菌株進行甘藍促生與病害防治試驗，結果在促生試驗方面，3株菌株在全株重、地上部重、根鮮重與甘藍單球重均高於對照組處理，尤其TCB237與TCB298處理組之單球重最為顯著(表十一)。病害防治部分，處理期間葉部噴施3株菌株處理與慣行相比全區相當輕微，僅對照組黑腐病達6.5%。而軟腐病與根瘤病同樣均未發生。



圖十、甘藍黑腐病發生情形(A)對照區，與(B)微生物處理區。

Fig. 10. The occurrence of cabbage black rot disease in control group (A) and with the treatment of *Bacillus* spp. (B).



圖十一、本試驗採收各處理之單粒重比較(A)及各處理之單球剖面比較(B)。

Fig. 11. The head size of cabbage with each treatment in field trial (A) and cross section of cabbage head (B).

表十一、水里鄉初秋甘藍應用微生物發酵液處理之田間試驗結果

Table 11. The effects trial of application of microbial agents on 'Tsuchiu' cabbage the field trial at Shuili township.

Treatment	Weight of above ground (Kg)	Root fresh weight (g)	Single head weight (Kg)	Single head height (cm)	Single head width (cm)
TCB207	2.50a[1]	39.70a	1.74ab	13.00b	16.23ab
TCB237	2.76a	37.08ab	1.95a	14.67a	17.68a
TCB298	2.69a	36.61ab	1.88a	13.83ab	15.21b
Conventional	2.50a	36.55ab	1.62ab	13.58ab	15.43b
Control	2.10b	37.35ab	1.42b	13.78ab	14.22c

[1] Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by LSD test.

討　論

本研究從南投縣魚池鄉與霧社鄉的土壤中，經熱處理分離出30株微生物菌株，再由溶血測試、溶磷活性分析與分解酵素能力測定試驗後，篩選出5株溶磷微生物菌株，分別為TCB203、TCB207、TCB237、TCB263與TCB298進行抗菌圖譜拮抗試驗，與5種甘藍病原真菌與細菌平板拮抗分析後，以TCB237的拮抗能力最為優異，其次為TCB207，而TCB203、TCB263與TCB298則無拮抗效果。此5株菌株經由PCR增幅出16S rRNA與*gyr*B基因後，進行專一性片段定序與比對後，鑑定結果TCB203為*Bacillus megaterium* (巨大芽孢桿菌)、TCB207為*Bacillus velezensis*、TCB237與TCB263鑑定仍為*Bacillus* sp.、TCB298為*Paenibacillus taichungensis* (類芽孢桿菌－臺中種)。後續此5株菌株在盆栽與溫室小規模栽培試驗中，仍以TCB237、TCB207處理相較對照組可顯著促進甘藍生長並具溶磷活性，而TCB207與TCB237之溶磷活性結果並非最高，僅介於550~700 μg/ml/day，推測可能促進作物生長的因子並非溶磷活性為主。許多文獻試驗報導，芽孢桿菌屬之細菌在發酵過程中會產生代謝產物，對於病原菌的孢子或菌絲有很強的抑制作用，連續施用田間後可以降低病害的發生[12,13,15]。選用本場的芽孢桿菌菌株Tcba05、TCB102-B7與TCB9407等三菌株，進行甘藍帶菌種子防治與田間小規模甘藍黑腐病防治試驗。種子帶菌防治試驗中，以浸泡Tcba05-100x與TCB102-B7-100x，種子黑腐病帶菌率則為0%。在田間小規模試驗方面，連續使用多次微生物製劑後，以施用TCB102-B7的處理，黑腐病可降低為6.25%、Tcba05處理後可降低為9.17%，而對照組則已達45%。顯示預先施用微生物製劑可以有效降低甘藍黑腐病的發生及罹病度。在結合促進生長及植物保護型功能性微生物製劑的實驗中，經由2處試驗田應用微生物製劑對甘藍栽培之田間試驗結果分析，以TCB237菌株及TCB298菌株的表現最為優異，但TCB298在溫室小規模栽培試驗中，呈現比對照組差的現象，可能溶磷活性太高或稀釋倍數較低的原因，導致此菌株的功效無法完全發揮。本研究中，已篩選具有耐熱、溶磷肥效及病害防治效果之微生物菌株TCB207與TCB298菌株，待後續可融入甘藍之整合性病蟲害管理中，或是發展成微生物農藥，成為友善環境的植物保護資材，同時可減少化農藥的施用，提供農友可用的一個新利器。

參考文獻

1. 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。
2. 陳俊位、鄧雅靜、蔡宜峯　2014　木黴菌生物製劑之開發與應用　生物性資材與生態綜合經營在有機農業之應用研討會專刊　臺中區農業改良場特刊 127: 10-47。
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 121: 69-86。
4. 楊秀珠　2011　十字花科蔬菜病蟲害發生情形與管理　行政院農業委員會藥物毒物試驗所 合理、安全及有效使用農藥輔導教材　p.1-58　行政院農業委員會動植物防疫檢疫局編印　臺北。

5. 蕭政弘　2017　甘藍產業特性與品種類型　甘藍栽培技術與病蟲害管理　臺中區農業改良場農業專訊 96: 3-5。
6. 蔡宜峯、陳俊位　2012　農業廢棄物資源化微生物之研究　農業生技產業季刊 32: 52-59。
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第205號　p.1-11。
8. Arrebola, E., R. Jacobs and L. Korsten. 2009. Iturin A is the principal inhibitor in the bio-control activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. J. Appl. Microbiol. 108: 386-395.
9. Ashwini, N. and S. Srividya. 2014. Potentiality of *Bacillus subtilis* as bio-control agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. Biotech 4: 127-136.
10. Brosius, J., J. L. Palmer, H. P. Kennedy and H. F. Noller. 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 4801-4805.
11. 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.
12. Chung, H. M., P. M. Madhaiyan, S. Seshadri, J. Song, H. Cho and T. Sa. 2005. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. Soil Biol. Biochem. 37: 1970-1974.
13. Gyaneshwar, P. G., G. Naresh Kumar, L. J. Parekh and P. S. Poole. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. Plant Soil 245: 83-93.
14. Magnelli, P. E., A. Martinez and O. A. Mercuri. 1997. Simple method for determining cellulolytic activity in fungi. Argent. Microbiol. 29: 210-214.
15. Ongena, M. and P. Jacques. 2007. *Bacillus* lipopeptides：versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiol. 16(3): 115-125.
16. Suzuki, T., T. Nakayama, T. Kurihara, T. Nishino and N. Esaki. 2001. Cold-active lipolytic activity of psychrotrophic *Acinetobacter* sp. strains No 6. J. Biosci Bioeng. 92: 144-148.
17. Tao, G. C., S. J. Tian, M. Y. Cai and G. H. Xie. 2008. Phosphate solubilizing and mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. Pedosphere 18: 515-523.
18. Watanabe, F. S. and S. R. Olsen. 1965. Test of an ascorbic acid method for determining phosphorous in water and $NaHCO_3$ extracts from soil. Soil Sci. Soc. Am. J. 29:677-678.
19. Yamamoto, S. and H. Shigeaki. 1995. PCR amplification and direct sequencing of *gyr*B genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1104-1109.
20. Yang, S. S. and J. Y. Wang. 1999. Protease and amylase production of Streptomyces rimosus in submerged and solid state cultivations. Bot. Bull. Acad. Sin. 40: 259-265.

The Evaluated of Functional Microbial Agents Application for the Cabbage Cultivation and Black Rot Disease Control[1]

Chien-Chih Kuo[2], Tian-Hsin Chuang[2],
Chien-Wei Chen[4] and Chung-Ta Liao[3]

ABSTRACT

The aim of this study are to screen and introduce growth-promoting, disease protecting microbial agents for cabbage integrated crop and diseases management. In this study, we isolated and screened about 30 microbial strains from the two soil samples in Lianhuachih and Wushe area. According to the blood agar test, phosphate-solubilizing analysis and 4 kinds of enzyme decomposition analysis, five strains were selected for further study. The five strains were selected based on the phosphate solubilizing activity that was 500 μg/ml/day at least, the antagonistic spectrum against 5 types of pathogen fungi and bacteria of cabbage. The result show that TCB237 could inhibit 4 kinds of pathogens. Based on the sequences of 16S rRNA and gyrB genes comparison with GenBank database. Strain TCB203 was identified as *Bacillus megaterium*, TCB207 as *Bacillus velezensis*, TCB237 and TCB263 as *Bacillus* spp. TCB298 as *Paenibacillus taichungensis*. The cell density of each strain cultured in LB medium could reach 10^9 cfu/ml, thus LB medium was selected for microbials fermentation.The five strains were applied on cabbage for six times in field trials and the leaves number, plant height and root length were recorded. We founded that the growth of cabbage with treatment of strain TCB237 was better than other treatments. In addition, we applied the 3 *Bacillus* sp. microbial agents Tcba05, TCB102-B7 and TCB9407 on seeds inoculated with *X. campestris* pv. *campestris*, the results showed that no black rot pathogen was detected with the treatment of strain Tcba05 and TCB102-B7, suggesting that soaking the seeds with microbial agents can reduce the black rot disease occurance in seedling stage. Application 3 *Bacillus* sp. microbial agents Tcba05, TCB102-B7 and TCB9407 on cabbage Taichung No.2 in the field trial in summer. The disease severity of black rot with treatment of strain TCB102-B7 by root irrigation and leaves spraying was 6.25%, while

the treatment with Tcba05 and water as the control were 9.17% and 45%, respective. It showed pre-irrigation and spraying could inhibited the black rot disease severity effectually. TCB237 which had phosphate-solubilizing characteristic had the potential to development the microbial pesticides, which would integrated into cabbage cultivation system, to be the plant protection materials which environment friendly.

Key words: cabbage, microbial agent, *Bacillus* sp.

[1] Contribution No. 0923 from Taichung DARES, COA.

[2] Associate researcher of Taichung DARES, COA.

[3] Corresponding Author. Assistant, National Chung Hsing University Agricultural Extension Center.

[4] Corresponding Author. Researcher (Branch Chief) of Puli Branch, Taichung DARES, COA.