

白菜細菌性軟腐病生物防治潛力菌株的篩選與評估

陳純葳^{1*} 傅愈喬² 蔡佳欣³ 林宗俊³

摘要

陳純葳、傅愈喬、蔡佳欣、林宗俊。2023。白菜細菌性軟腐病生物防治潛力菌株的篩選與評估。台灣農業研究 72(1):1-11。

由 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*) 引起之細菌性軟腐病為白菜常見病害之一，本研究目的為篩選並評估具防治本病害潛力的微生物。利用離葉接種法評估 6 株拮抗能力較佳之 *Bacillus* spp. 菌株 AC35、BAC15、NA0301、HTT-11、HTT-61 及 HTT-62 對軟腐病之防治效果，結果顯示不管使用針刺接種法或是噴霧接種法，僅接種軟腐病菌 *Pcc10602* 之處理組於接種後第 5 天罹病度達 100%，而供試菌株 BAC15、HTT-61 及 HTT-62 對軟腐病具有防治效果，其罹病度分別為 52.4%、57.1% 及 57.1%。溫室試驗時，利用棉花包覆法與噴霧接種法於白菜上處理 *Bacillus amyloliquefaciens* HTT-62 菌株細胞懸浮液 [濃度 10^8 colony-forming unit (CFU) mL^{-1}]，1 d 後再接種 *Pcc10602* (濃度 10^5 CFU mL^{-1})，結果顯示對照組用兩種不同方式接種後 12 d 的罹病度分別為 97.9% 與 74.5%；而 HTT-62 菌株處理組較對照組延遲 2-4 d 出現病徵，且罹病度分別僅有 47.5% 與 30.2%，由此推測接種前 1 d 不論使用何種方式處理 HTT-62 均可延緩白菜軟腐病發病時間並降低罹病度。本研究證明 *B. amyloliquefaciens* HTT-62 為一具有防治白菜細菌性軟腐病的潛力菌株。

關鍵詞：白菜、細菌性軟腐病、生物防治、芽孢桿菌。

前言

結球白菜 (Chinese cabbage) 屬台灣大宗蔬菜之一，一年四季均可栽植，盛產期集中於秋、冬及春季，其主要產區在雲林縣、彰化縣、宜蘭縣及屏東縣等地。在種植期間，結球白菜的主要病害包括細菌性軟腐病、黑腐病、黑腳病及露菌病等。由 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*) 引起之細菌性軟腐病為田間許多蔬菜及花卉作物常見的病害，在白菜其主要為害地上部葉片及莖基部，初期可見植株外側呈現水浸狀病徵，嚴重時全株軟腐枯死、具惡臭，外側病葉如遇到環境變乾燥時則從病斑處脫水呈薄紙狀。本病害亦可在收穫、儲運或販賣過程中造成損失，據記載儲藏期的作物如果發生細菌性軟腐病可

造成 15-30% 之損失 (Agrios 2005; Bhat *et al.* 2010; Umunna & Austin 2016)。現今的防治方法採用栽培管理及化學防治，如使用化學藥劑進行細菌性軟腐病之防治，除有容易產生抗藥性的問題外，也易有食安疑慮，因此使用非化學合成農藥方式或生物防治進行本病害之防治成為另一個研究方向。

在台灣，2013 年曾盤點國內具防治病蟲害潛力之微生物共計 64 件，其中芽孢桿菌屬 (*Bacillus* spp.) 占 31 件，木黴菌 (*Trichoderma* spp.) 和鏈黴菌屬 (*Streptomyces* spp.) 各 14 件和 8 件 (Hsieh 2014)，至今已登記為生物農藥殺菌劑的微生物有液化澱粉芽孢桿菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) Ba-BPD1 菌株 (防治對象為多種作物灰黴病)、CL3 菌株 (多種作物灰黴

投稿日期：2022 年 6 月 30 日；接受日期：2022 年 9 月 6 日。

* 通訊作者：chunwei@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所植物病理組聘用助理研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所植物病理組計畫助理。台灣 台中市。

³ 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。

病)、PMB01 菌株 (多種作物青枯病及萎凋病)、QST713 菌株 (萵苣露菌病)、Tcba05 菌株 (菜豆萎凋病)、YCMA1 菌株 (多種作物黑斑病、葉斑病、葉枯病、早疫病及桃穿孔病)、蕈狀芽孢桿菌 (*Bacillus mycoides*) AGB01 菌株 (水稻紋枯病及蘭花黃葉病)、枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) KHY8 菌株 (稻熱病、芒果炭疽病及細菌性黑斑病)、Y1336 菌株 (甘藍根瘤病、水稻紋枯病、豆科白粉病、瓜類露菌病等)、WG6-14 菌株 (水稻秧苗徒長病)、貝萊斯芽孢桿菌 (*Bacillus velezensis*) BF 菌株 (多種作物灰黴病、細菌性葉斑病、炭疽病、黑腐病及水稻白葉枯病)、BACY 菌株 (番茄細菌性斑點病)、純白鏈黴菌 (*Streptomyces candidus*) Y21007-2 菌株 (防治對象為多種果樹疫病)、蓋棘木黴菌 (*Trichoderma gamsii*) ICC 080/012 菌株 (中草藥及蔬菜疫病) 及綠木黴菌 (*Trichoderma virens*) R42 菌株 (蔬菜苗立枯病) (植物保護資訊系統, <https://otserv2.tactri.gov.tw/ppm>), 仍以芽孢桿菌屬細菌為微生物製劑主要開發對象。目前台灣尚未有被推薦用來防治白菜細菌性軟腐病的微生物製劑, 本研究目的為篩選並評估具防治本病害潛力的微生物, 以供後續製成微生物製劑來防治白菜本田期及儲藏期之細菌性軟腐病。

材料與方法

供試菌株

本研究所使用的白菜細菌性軟腐病菌為農業試驗所植物病理組細菌研究室保存之 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc10602, 供試有益微生物菌株則為菌類生技研究室從健康或腐爛之稻稈分離並純化保存的菌株, 其採集地點及相關資料請見表 1。Pcc10602 供試菌株均先利用移植環從冷凍保存管中取出並劃至 Nutrient Agar (NA; BD Difco™, Franklin Lakes, NJ, USA) 培養基平板上, 隨後放置於 28°C 環境下生長, 之後再挑選單一菌落移植更新兩次使其活化, 以供後續試驗使用。

供試植物

本研究分別使用結球白菜之切離葉組織塊

與盆栽白菜進行後續試驗。市售結球白菜進行表面清潔消毒後, 利用消毒過之剪刀將結球白菜莖部裁切成面積 6.0 cm × 4.0 cm 大小之組織塊, 並將切離葉組織塊浸泡於 75% 酒精 (v/v) 內 30 s 後置於培養皿 (直徑 9 cm) 中風乾表面多餘水分, 再使用滅菌消毒過之棉花包覆切離葉組織塊兩端切口, 最後於每個棉花上滴入 1 mL M-solution (mannitol 10 mg L⁻¹ + benzimidazole 0.03 mg L⁻¹) 使其保持濕潤, 以延緩切離葉組織塊變質的速度。溫室試驗使用之盆栽白菜品種為「玉豐」(農友種苗), 首先於溫室中將種子播種至含泥炭土介質的 5 吋黑色軟盆中, 每盆 1 株, 培養溫度約為 28 ± 5°C, 直至白菜植株 4 wk 大時進行試驗。

利用平板法篩選具拮抗能力之微生物菌株

將病原菌 Pcc10602 接種至 Nutrient Broth (NB; BD Difco™, Franklin Lakes, NJ, USA) 液體培養基中震盪培養 (28°C, 轉速 120 rpm) 24 h 後, 高速離心 8 min (8,000× g), 去除上清液後再加入無菌水配製成 10⁷ colony-forming unit (CFU) mL⁻¹ 之細胞懸浮液 [optical density (OD)₆₀₀ = 0.3], 並依照 1 : 9 比例將 Pcc10602 細胞懸浮液加入尚未凝固之 NA 及 Tryptone Soy Agar (TSA; BD Difco™, Franklin Lakes, NJ, USA) 培養基中, 混合均勻後將其倒至培養皿中製備成含菌平板。將培養於 NA 平板上 (28°C, 48 h) 之 35 株供試 *Bacillus* spp. 利用移植環分別點至含菌平板上, 每一處理 4 重複, 隨後於 28°C 下培養 48 h 後測量其菌落與抑制圈直徑大小。

病原菌 Pcc10602 不同接種量對白菜軟腐病發生之影響

首先利用含 0.05% (v/v) Tween 80 的無菌水將培養於 NA 平板 48 h 之病原菌 Pcc10602 配製成 10⁷ CFU mL⁻¹ 的細胞懸浮液 (OD₆₀₀ = 0.3), 並序列稀釋成 10³–10⁶ CFU mL⁻¹ 之細胞懸浮液。利用蟲針於白菜莖基部製造傷口, 將滅菌消毒過之棉花平鋪於傷口上, 分別取 2 mL 10³–10⁷ CFU mL⁻¹ 之 Pcc10602 細胞懸浮液滴至棉花上, 並以無菌水作為對照組, 每處理 5 棵, 之後移置於溫室內並每天調查病害發

表 1. 供試有益微生物資訊。

Table 1. The information of 35 microorganisms tested in this study.

Scientific name	Code	Collection place	Time of collection
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	37P-2	Wufeng, Taichung	July 2011
	37P-4	Wufeng, Taichung	July 2011
	AC35	Mailiao, Yulin	August 2009
	BAC15	Pitou, Changhua	March 2013
	HTT-11	Citong, Yulin	February 2012
	HTT-61	Citong, Yulin	February 2012
	HTT-62	Citong, Yulin	February 2012
	NA0301	Nantou, Nantou	August 2009
	P2-2	Wufeng, Taichung	July 2011
	P2-8	Wufeng, Taichung	July 2011
	P3-2-2	Wufeng, Taichung	July 2011
	P4-1-2	Wufeng, Taichung	July 2011
	T1-7-3	Wufeng, Taichung	July 2011
	T3-2-4	Wufeng, Taichung	July 2011
	T3-2-5	Wufeng, Taichung	July 2011
	TJP-2	Tianzhong, Changhua	September 2012
	TJP-4	Tianzhong, Changhua	September 2012
	TJP-6	Tianzhong, Changhua	September 2012
	TWP-1	Ershui, Changhua	September 2012
	TWP2-4	Ershui, Changhua	September 2012
	TWP2-5	Ershui, Changhua	September 2012
	TWP2-6	Ershui, Changhua	September 2012
	<i>Bacillus cereus</i>	WP-2	Mailiao, Yulin
XLP-3		Xiluo, Yulin	February 2012
HLP2-1		Houli, Taichung	September 2012
<i>Bacillus pumilus</i>	LOP-2	Xiluo, Yulin	February 2012
	TWP3-8	Ershui, Changhua	September 2012
<i>Bacillus subtilis</i>	TWT-2	Ershui, Changhua	September 2012
	37P-8	Wufeng, Taichung	July 2011
	LNP-1	Linnei, Yulin	July 2011
	LNP-8	Linnei, Yulin	July 2011
	LNT-2	Linnei, Yulin	July 2011
	NA1102	Nantou, Nantou	August 2009
	TWP3-7	Ershui, Changhua	September 2012
	TWP-8	Ershui, Changhua	September 2012

生情形，共試驗 5 次。溫室試驗所使用的病害指數 (disease index) 以植株整體軟腐面積占比進行分級，分為 0–5 級，無病徵為 0 級，病徵出現 1–25% 為 1 級，26–50% 為 2 級，51–

75% 為 3 級，76–90% 為 4 級，> 90% 至全株死亡為 5 級。罹病度 (disease severity, %) = $\frac{\sum(\text{指數} \times \text{該指數植株數量})}{(5 \times \text{總供試植株數量})} \times 100\%$ 。

評估拮抗微生物對白菜細菌性軟腐病之防治效果-切離葉接種法

為進一步確認具有拮抗 *Pcc* 能力之微生物菌株在白菜上的防治能力，將先採用切離葉接種法進行評估。結球白菜切離葉組織塊與 *Pcc10602* 細胞懸浮液製備步驟如前述，供試微生物則選取 6 株拮抗能力較佳之菌株 (AC35、BAC15、NA0301、HTT-11、HTT-61 及 HTT-62) 與 1 株拮抗能力較弱之菌株 (NA1102)，分別於 Tryptic Soy Broth (TSB; BD Difco™, Franklin Lakes, NJ, USA) 中震盪培養 48 h (28°C, 轉速 120 rpm) 後高速離心 8 min (8,000× g)，去除上清液後再利用無菌 TSB 配製成 10^9 CFU mL⁻¹ 之細胞懸浮液備用，另以無菌水及殺細菌劑歐索林酸 [Oxolinic acid; 金星, 台灣住友化學股份有限公司, 台灣台北市; 20% (w/v) 可濕性粉劑] 1,000× 水稀釋液作為對照組，試驗處理方式使用針刺接種法 (Puncture) 及噴霧接種法 (Spray) 兩種，每處理 6 重複。針刺接種法修改自 Garge & Nerurkar (2017) 之共同培養接種法，分別取等體積之 *Pcc10602* 細胞懸浮液與供試微生物細胞懸浮液進行混合，混合後之濃度分別為 10^5 及 10^8 CFU mL⁻¹，震盪培養 12 h 後從混合液中取 10 μL 滴至於切離葉組織塊中央使用消毒過之針頭製造的傷口處；噴霧接種法則先將供試微生物之細胞懸浮液 (10^8 CFU mL⁻¹) 均勻噴灑在具有傷口之切離葉組織塊表面，24 h 後再將 10 μL *Pcc10602* (10^5 CFU mL⁻¹) 接種於組織塊傷口處。完成病原菌接種之切離葉組織塊隨後放入培養皿中並以石蠟膜密封，置於 28°C 培養 120 h，每天記錄病害指數，並換算成罹病度。切離葉接種試驗的病害指數以病斑占離葉組織塊表面積之百分率為判定依據，共分為 0–7 級，無病徵為 0 級，1–15% 為 1 級，16–30% 為 2 級，31–45% 為 3 級，46–60% 為 4 級，61–75% 為 5 級，76–90% 為 6 級，91–100% 為 7 級。罹病度 (%) = $\Sigma(\text{指數} \times \text{該指數組織塊數量}) / (7 \times \text{總測試組織塊數量}) \times 100\%$ 。

溫室內評估拮抗微生物對白菜細菌性軟腐病之防治效果

本試驗選取 *B. amyloliquefaciens* HTT-62

做為供試微生物，白菜植株培育、*Pcc10602* 以及 HTT-62 細胞懸浮液製備步驟如前述。至白菜植株 4 wk 大時，用蟲針於白菜莖基部製造傷口後進行接種處理，接種方式使用棉花包覆法 (Cotton-cover) 及噴霧接種法兩種，前者將滅菌消毒過之棉花置於傷口上，並滴入 2 mL HTT-62 細胞懸浮液 (10^8 CFU mL⁻¹)，24 h 後換上含有 2 mL *Pcc10602* 細胞懸浮液 (10^5 CFU mL⁻¹) 之棉花置於傷口處；噴霧法則是先將 HTT-62 細胞懸浮液噴灑至傷口處，24 h 後再以相同方式接種 *Pcc10602*。兩種接種處理法均以無菌水作為對照組，每處理 5 盆，共試驗 5 次，之後放置於溫室內並每天觀察調查病害發生情形，以評估其防治效果。

結果

利用平板法篩選具拮抗能力之微生物菌株

根據結果可見 35 株 *Bacillus* spp. 在 NA 與 TSA 平板上形成之菌落及抑制圈大小有所差異。在 NA 平板上 (圖 1A)，37P-8、LNP-8、LNT-2、LOP-2、NA1102、TJP-6 及 TWP-8 等 7 株菌株不產生抑制圈，而 HIP2-1、P-2-2、P3-2-2、T1-7-3、T3-2-4、T3-2-5、TJP-4、TWP2-5、TWP3-7 及 TWP3-8 等 10 株菌株形成之抑制圈較菌落小，其餘 18 株菌株均產生比菌落大之抑制圈，HTT-62 (10.2 mm)、HTT-61 (10.2 mm)、AC35 (10.0 mm)、NA0301 (9.8 mm) 以及 WP-2 (9.7 mm) 為產生抑制圈最大的前 5 名；在 TSA 板上 (圖 1B)，HIP2-1、LNP-8、LOP-2、T3-2-4、TWP2-6、TWP-8、TWT-2 及 XLP-3 等 8 株不產生抑制圈，其餘 27 株菌株均產生較菌落大之抑制圈，HTT-11 (14.8 mm)、HTT-62 (13.6 mm)、HTT-61 (12.8 mm)、BAC15 (11.3 mm) 以及 LNP-1 (10.2 mm) 為產生抑制圈最大的前 5 名。最後選取在兩種平板中各自排名前 4 名的 6 株菌株 (AC35、BAC15、NA0301、HTT-11、HTT-61 和 HTT-62)，以及 1 株在 NA 平板上無產生抑制圈但在 TSA 平板上產生抑制圈的菌株 NA1102 進行後續研究。

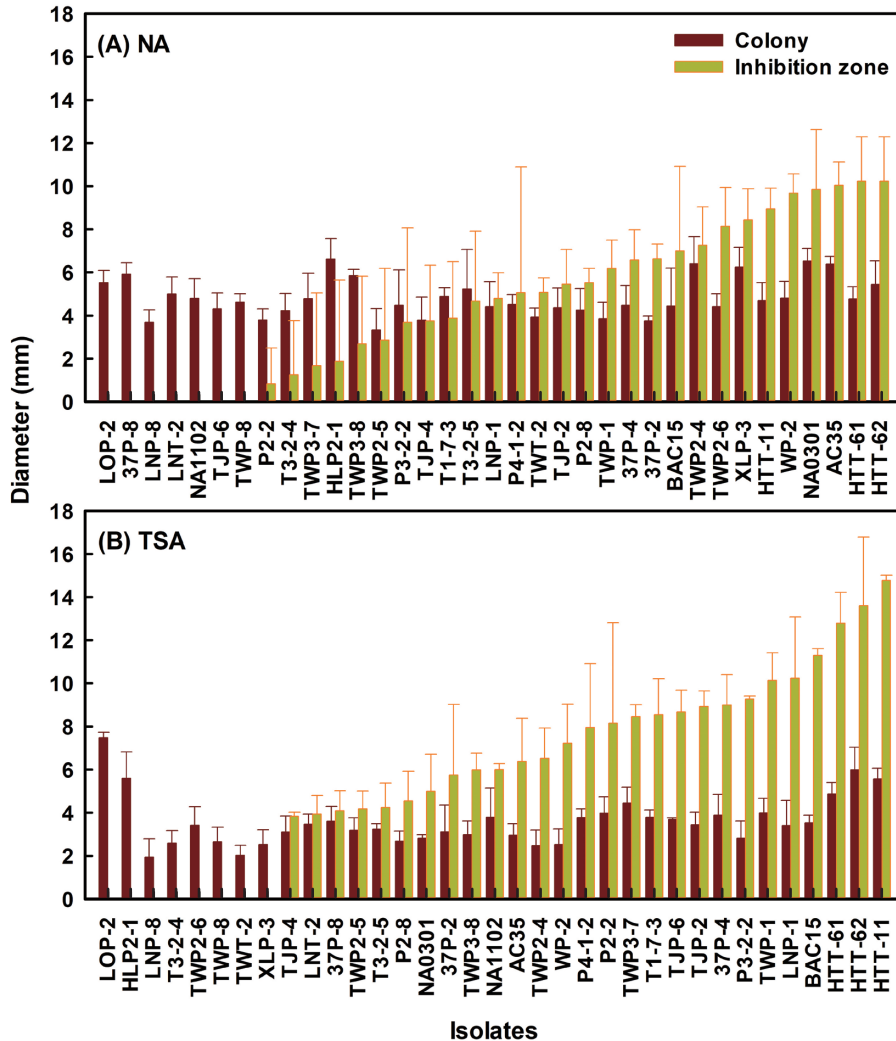


圖 1. 利用 (A) Nutrient Agar (NA) 與 (B) Tryptone Soy Agar (TSA) 平板測試 35 株供試 *Bacillus* spp. 對白菜細菌性軟腐病菌 *Pcc10602* 的拮抗能力。

Fig. 1. Antagonistic ability of 35 *Bacillus* spp. against bacterial soft rot pathogen *Pcc10602* on (A) nutrient agar (NA) plates and (B) tryptone soy agar (TSA) plates.

接種不同濃度病原菌 *Pcc10602* 細胞懸浮液對結球白菜切離葉與溫室白菜軟腐病發生之影響

為進行後續評估供試微生物防治能力的試驗，需選擇一發病速度較緩慢之接種濃度進行試驗。在盆栽試驗結果中可見不同接種濃度對白菜細菌性軟腐病的發病時間與罹病度有差異(圖2)。接種高濃度 10^7 及 10^6 CFU mL⁻¹ *Pcc10602*

細胞懸浮液之發病時間與發病進程相似，均於接種後第 2 天 [days after inoculation (DAI) 2] 即開始出現病徵，罹病度分別為 18.6% 及 19.0%，至 DAI 6 全株死亡 (罹病度 100%)；接種 10^5 CFU mL⁻¹ *Pcc10602* 細胞懸浮液則於 DAI 4 開始發病 (罹病度 18.4%)，DAI 7 罹病度才超過一半達 65.6%，至 DAI 12 才完全死亡；至於接種低濃度 10^4 及 10^3 CFU mL⁻¹ *Pcc10602* 細胞懸浮液之發病時間與發病進程明顯與前面三

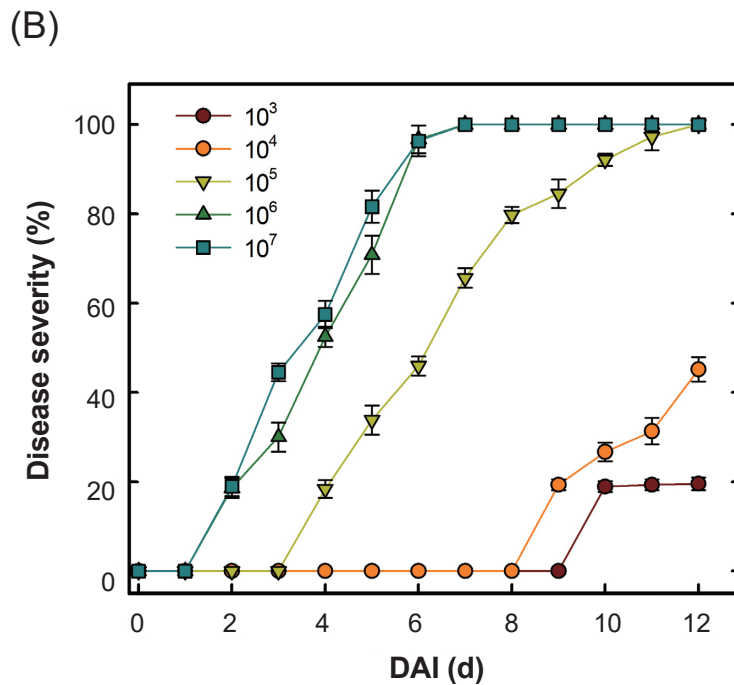
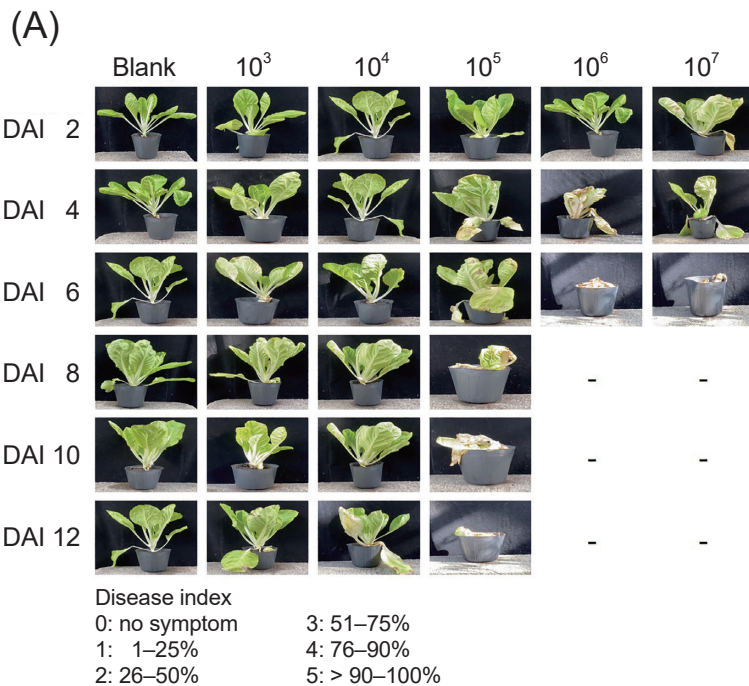


圖 2. 接種不同濃度 [colony-forming unit (CFU) mL^{-1}] 之細菌軟腐病菌 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc10602 對白菜植株 (A) 生長情形與 (B) 罹病度之影響。

Fig. 2. Effects of the inoculation with the different concentrations [colony-forming unit (CFU) mL^{-1}] of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc10602 on (A) the growth of the Chinese cabbage and (B) the disease severity of bacterial soft rot. Disease severity (%) = $\Sigma(\text{disease index} \times \text{numbers of leaf tissue for this index}) / (5 \times \text{total numbers of leaf tissue}) \times 100\%$. DAI: Day after inoculation.

種處理組不同，分別於 DAI 9 及 DAI 10 開始出現病徵，罹病度分別為 19.3% 及 18.9%，至 DAI 12 時之罹病度分別為 45.1% 及 19.5%，且接種 10^3 CFU mL⁻¹ Pcc10602 細胞懸浮液的病勢進展呈現停滯狀態。

評估拮抗微生物對白菜細菌性軟腐病菌之防治效果-離葉接種法

結球白菜切離葉組織塊分別利用針刺接種法與噴霧接種法處理後，每天觀察其發病情形，結果如圖 3 所示，不同微生物菌株處理在兩種接種法上對白菜軟腐病的防治效果有所差異，其中只接種病原菌 Pcc10602 之對照組均於 DAI 5 罹病度達 100%，農藥對照組則均不發病，兩種接種法的發病趨勢相似。7 株供試菌株中的 AC35、NA0301 及 NA1102 前期罹病度雖然比病原菌對照組低，但至 DAI 4 時其罹病度則趨近病原菌對照組，甚至在噴霧接種處理組 (85.7%) 中高於病原菌對照組 (81.0%)，DAI 5 時罹病度全達 100%；HTT-11 處理組於 DAI 4 時罹病度僅達 61.9 (共同接種法) 及 66.7% (噴霧接種法)，但至 DAI 5 時罹病度仍全達 100%，無防治效果；菌株 BAC15、HTT-61 及 HTT-62 則明顯可見對軟

腐病具有防治效果，至 DAI 5 時共同接種法的罹病度分別為 52.4、57.1 及 57.1%，噴霧接種法的罹病度稍高，分別為 61.9、66.7 及 66.7%。

溫室內評估拮抗微生物對白菜細菌性軟腐病之防治效果

於溫室利用不同方式 (棉花包覆法與噴霧接種法) 於白菜植株上施用 HTT-62 細胞懸浮液，24 h 後再用相同方式接種軟腐病菌 Pcc10602，隨後每天觀察其發病情形，結果發現使用棉花包覆法 (圖 4A) 的對照組於 DAI 4 開始出現病徵 (罹病度 19.7%)，而 HTT-62 處理組則於 DAI 8 才開始出現病徵 (罹病度 19.7%)，至 DAI 12 時對照組與 HTT-62 處理組之罹病度分別為 97.9 及 47.5%；噴霧接種法處理的對照組至 DAI 5 出現病徵 (圖 4B)，但病勢進展較慢，至 DAI 12 罹病度僅 74.5%，HTT-62 處理組於 DAI 7 開始出現病徵，至 DAI 12 的罹病度為 30.2%。上述結果顯示接種前 1 d 使用菌株 HTT-62 可以延遲白菜軟腐病的發病時間，並且明顯降低其罹病度。

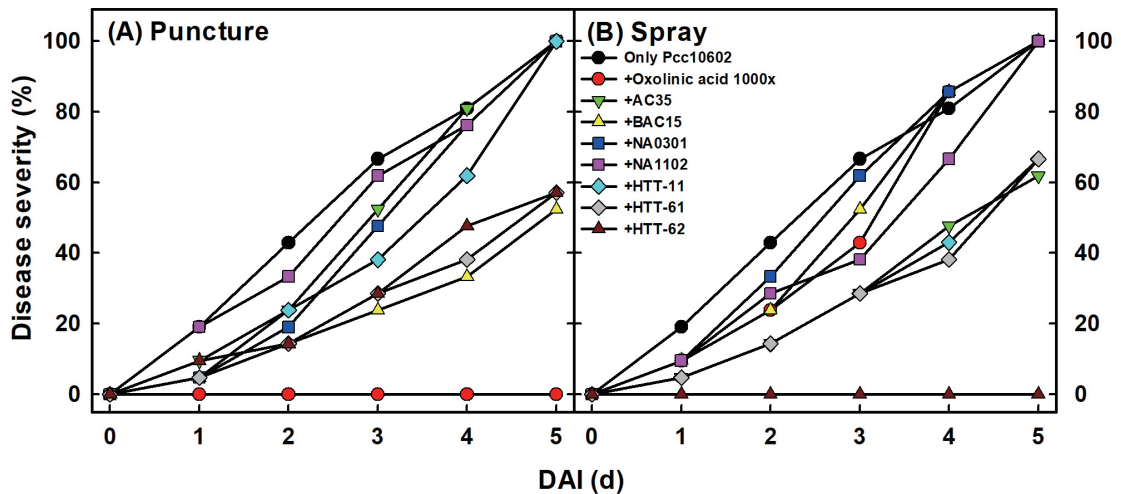


圖 3. 在白菜切離葉組織塊上利用 (A) 針刺接種與 (B) 噴霧接種法分別接種 7 種供試 *Bacillus* spp. (AC35、BAC15、NA0301、NA1102、HTT-11、HTT-61 及 HTT-62) 後對細菌性軟腐病之影響。

Fig. 3. Effects of the seven *Bacillus* spp. (isolate AC35, BAC15, NA0301, NA1102, HTT-11, HTT-61, and HTT-62) on the disease severity of the bacterial soft rot by using the (A) puncture and (B) spray methods on Chinese cabbage leaf tissue. DAI: Day after inoculation.

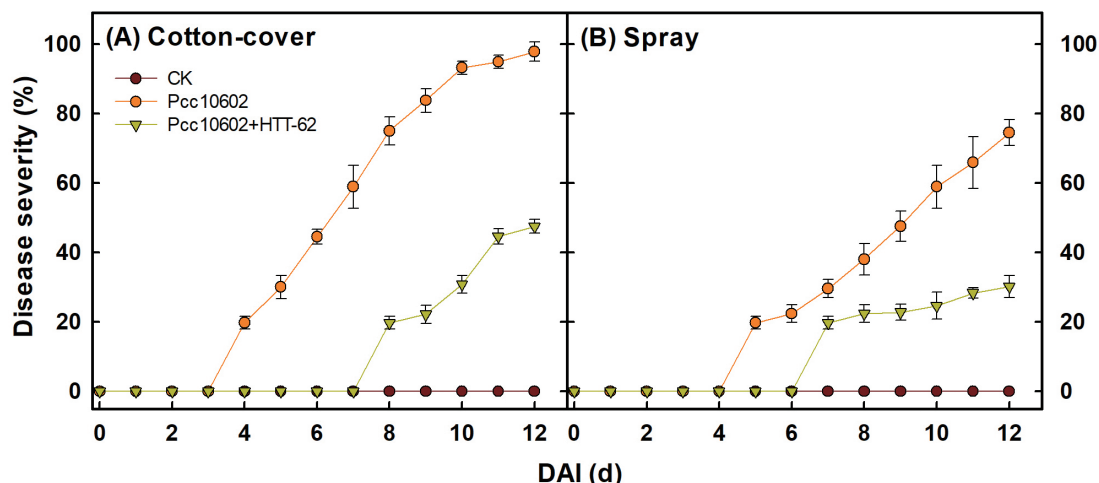


圖 4. 利用 (A) 棉花包覆法與 (B) 噴霧接種法接種液化澱粉芽孢桿菌 HTT-62 [10^8 [colony-forming unit (CFU) mL^{-1}] 及病原菌 Pcc10602 (10^5 CFU mL^{-1}) 對白菜軟腐病之罹病度的影響。

Fig. 4. Effects of inoculation of *Bacillus amyloliquefaciens* HTT-62 and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc10602 by using (A) cotton-cover and (B) spray methods on the disease severity of the Chinese cabbage soft rot. The inoculation concentration of HTT-62 and Pcc10602 was 10^8 and 10^5 CFU mL^{-1} , respectively. DAI: Day after inoculation.

討論

在台灣，防治白菜軟腐病多採用栽培管理法及化學防治法，但可使用在白菜上的化學農藥僅 68.8% 多保鏈黴素可濕性粉劑、12.5% 鏈黴素溶液以及 16.5% 鏈土黴素可濕性粉劑 (植物保護資訊系統, <https://otserv2.tactri.gov.tw/ppm>)，此些農藥殺菌作用機制單一 (抑制蛋白質合成)，且無法被用來防治採收後儲藏期的軟腐病發生，因此開發可用來防治軟腐病的非農藥資材或生物防治菌產品。目前被認為具潛力可做為防治細菌性軟腐病的微生物有芽孢桿菌 (*Bacillus*)、放線菌 (*Actinomycete*)、假單胞菌 (*Pseudomonas*)、乳酸桿菌 (*Lactobacillus*)、沙雷氏菌 (*Serratia*) 和嗜菌體 (phage) 等 (El Karkouri *et al.* 2010; Czajkowski *et al.* 2012; Des Essarts *et al.* 2015; Tsuda *et al.* 2016; Garge & Nerurkar 2017; Gerayeli *et al.* 2018; Cui *et al.* 2019; Tsai *et al.* 2019; Lee *et al.* 2021)，其中液化澱粉芽孢桿菌 (*B. amyloliquefaciens*) 因其具有顯著的生物防治能力及儲藏環境適應力而備受關注 (Romero *et al.* 2007; Ongena & Jacques 2008)。本研究為能篩選具

防治細菌軟腐病的微生物，仍先以芽孢桿菌屬細菌作為首要供試菌株來建立篩選與防治測試平台，未來可提供後續其他微生物進行檢測。

芽孢桿菌屬細菌主要的作用機制為競爭營養物質或盤據點、拮抗作用 (抗菌物質如抗生素、iturin、surfactin、fengycin、bacteriocin 等) 以及誘導植物抗病性 (Molina *et al.* 2003; Hsieh *et al.* 2008; Diallo *et al.* 2011)，如 *B. amyloliquefacien* KC-1 更是被證實屬於內生菌，可顯著降低白菜根際土壤和葉片中的 *Pcc* 數量 (Cui *et al.* 2019)。首先利用平板法來篩選 35 株 *Bacillus* spp.，從中篩選對病原菌 Pcc10602 具拮抗能力的菌株，結果可見不同菌株對 Pcc10602 產生抑制圈的能力有所差異 (圖 1)，分別在 NA 及 TSA 平板上拮抗能力較佳之 5 株菌株中除 LNP-1 屬於 *B. subtilis* 外、AC35、BAC15、HTT-11、HTT-61、HTT-62、NA0301 以及 WP-2 均屬於 *B. amyloliquefaciens* (表 1)，而如是針對另一種軟腐病菌 *Pectobacterium chrysanthemi* (*Pch*) Pch01，前 5 名拮抗菌則有一半屬於 *B. subtilis* (實驗數據未呈現)，其中菌株 HTT-62 均出現於排名前 3，具有同時防治 *Pcc* 及 *Pch* 的潛力。

一般進行防治試驗之前，需先確認一可穩定發病之病原菌接種濃度，根據試驗結果(圖 2)顯示接種高濃度(10^6 及 10^7 CFU mL⁻¹)病原菌時發病至死亡時間太短，而低濃度(10^3 及 10^4 CFU mL⁻¹)處理組之發病時間則至 DAI 9 才開始，後續病害進展太慢且罹病度低，皆不容易進行防治效果的評估，因此挑選發病時間稍慢但罹病度仍可達 100% 的接種濃度(10^5 CFU mL⁻¹)進行後續防治試驗。使用離葉接種法(圖 3)確實可以區分不同供試 *Bacillus* spp. 之防治效果，實驗時間亦短，可以作為前期大量供試菌株篩選用平台，從中挑選明顯降低罹病度的微生物菌株供後續溫室盆栽試驗使用。其結果顯示 BAC15、HTT-61 及 HTT-62 防治效果較佳，而 AC35、NA0301 及 HTT-11 前期雖然有延緩病勢進展，但仍無法有效防治軟腐病，推測此些菌株在培養基及白菜離葉上有不同的盤踞繁殖及產生抗生物質能力，又或者有其他作用機制影響。根據前述試驗結果並考慮後續防治對象及使用範圍，挑選出拮抗及防治能力均佳的 HTT-62 進行溫室試驗。

最後根據溫室試驗結果(圖 4)顯示接種前 1 d 使用 *B. amyloliquefaciens* HTT-62 可以延遲白菜軟腐病的發病時間，並且明顯降低其罹病度，未來 HTT-62 將繼續進行田間或採收後防治試驗，以評估 HTT-62 是否有商品化的潛力以及建立未來推廣施用方式，但要注意 HTT-62 於本試驗中未造成白菜產生任何病變(數據未呈現)，但仍尚未評估長期施用下是否會影響白菜植株生長，且目前已發現有部分芽孢桿菌屬細菌會導致洋蔥、慈菇和馬鈴薯等蔬菜產生軟腐病變(Hwang *et al.* 2012; Zhong *et al.* 2015; Wang *et al.* 2017)，故 HTT-62 亦應針對白菜以外的作物進行病原性測試，避免田間施用時增加其他病害發生的機率。

引用文獻

- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. 5th ed. Elsevier Academic Press. Burlington, MA. 922 pp.
- Bhat, K. A., S. D. Masood, N. A. Bhat, M. A. Bhat, S. M. Razvi, M. R. Mir, S. Akhtar, N. Wani, and M. Habib. 2010. Current status of post harvest soft rot in vegetables: A review. *Asian J. Plant Sci.* 9:200–208. doi:10.3923/ajps.2010.200.208
- Cui, W., P. He, S. Munir, P. He, Y. He, X. Li, L. Yang, B. Wang, Y. Wu, and P. He. 2019. Biocontrol of soft rot of Chinese cabbage using an endophytic bacterial strain. *Front. Microbiol.* 10:1471. doi:10.3389/fmicb.2019.01471
- Czajkowski, R., W. J. de Boer, J. A. van Veen, and J. M. van der Wolf. 2012. Characterization of bacterial isolates from rotting potato tuber tissue showing antagonism to *Dickeya* sp. biovar 3 *in vitro* and *in planta*. *Plant Pathol.* 61:169–182. doi:10.1111/j.1365-3059.2011.02486.x
- Des Essarts, Y. R., J. Cigna, A. Quêtu-Laurent, A. Caron, E. Munier, A. Beury-Cirou, V. Hélias, and D. Faure. 2015. Biocontrol of the potato blackleg and soft rot diseases caused by *Dickeya dianthicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* 82:268–278. doi:10.1128/AEM.02525-15
- Diallo, S., A. Crépin, C. Barbey, N. Orange, J. F. Burini, and X. Latour. 2011. Mechanisms and recent advances in biological control mediated through the potato rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 75:351–364. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.01023.x
- El Karkouri, A., F. Z. El Hassani, M. El Mzibri, M. Benlemlih, and M. El Hassouni. 2010. Isolation and identification of an actinomycete strain with a biocontrol effect on the phytopathogenic *Erwinia chrysanthemi* 3937VIII responsible for soft rot disease. *Ann. Microbiol.* 60:263–268. doi:10.1007/s13213-010-0036-1
- Garge, S. S. and A. S. Nerurkar. 2017. Evaluation of quorum quenching *Bacillus* spp. for their biocontrol traits against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causing soft rot. *Biocatal. Agri. Biotechnol.* 9:48–57. doi:10.1016/j.cbac.2016.11.004
- Gerayeli, N., S. Baghaee-Ravari, and S. Tarighi. 2018. Evaluation of the antagonistic potential of *Bacillus* strains against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and their role in the induction of resistance to potato soft rot infection. *Eur. J. Plant Pathol.* 150:1049–1063. doi:10.1007/s10658-017-1344-0
- Hsieh, F. C. 2014. Development and application of microbial agents used in plant protection. *Sustain. Agric.* 35:31–38. (in Chinese)
- Hsieh, F. C., T. C. Lin, M. Meng, and S. S. Kao. 2008. Comparing methods for identifying *Bacillus* strains capable of producing the antifungal lipopeptide iturin A. *Curr. Microbiol.* 56:1–5. doi:10.1007/s00284-007-9003-x
- Hwang, S. K., C. G. Back, N. K. K. Win, M. K. Kim, H. D. Kim, I. K. Kang, S. C. Lee, and H. Y. Jung. 2012. Occurrence of bacterial rot of onion caused by *Bacillus amyloliquefaciens* in Korea. *J. Gen. Plant Pathol.*

- 78:227–232. doi:10.1007/s10327-012-0376-8
- Lee, S., N. T. Vu, E. J. Oh, A. Rahimi-Midani, T. N. Thi, Y. R. Song, I. S. Hwang, T. J. Choi, and C. S. Oh. 2021. Biocontrol of soft rot caused by *Pectobacterium odoriferum* with bacteriophage phiPc-cP-1 in Kimchi cabbage. *Microorganisms* 9:779. doi:10.3390/microorganisms9040779.
- Molina, L., F. Constantinescu, L. Michel, C. Reimmann, B. Duffy, and G. Défago. 2003. Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: A preventive and curative biological control mechanism. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45:71–81. doi:10.1016/S0168-6496(03)00125-9
- Ongena, M. and P. Jacques. 2008. *Bacillus* lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16:115–125. doi:10.1016/j.tim.2007.12.009
- Romero, D., A. de Vicente, R. H. Rakotoaly, S. E. Dufour, J. W. Veening, E. Arrebola, F. M. Cazorla, O. P. Kuipers, M. Paquot, and A. Pérez-García. 2007. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20:430–440. doi:10.1094/MPMI-20-4-0430
- Tsai, W. A., P. J. Chiu, and Y. S. Shih. 2019. Screen of antagonistic bacteria *Bacillus* spp. on control of bacterial soft rot disease caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Bull. Hualien DARES* 38:105–121. (in Chinese with English abstract)
- Tsuda, K., G. Tsuji, M. Higashiyama, H. Ogiyama, K. Umemura, M. Mitomi, Y. Kubo, and Y. Kosaka. 2016. Biological control of bacterial soft rot in Chinese cabbage by *Lactobacillus plantarum* strain BY under field conditions. *Biol. Control* 100:63–69. doi:10.1016/j.biocontrol.2016.05.010
- Umunna, O. E. and A. A. Austin. 2016. An overview of characterization and identification of soft rot bacterium *Erwinia* in some vegetable crop. *Greener J. Biol. Sci.* 6:46–55. doi:10.15580/GJBS.2016.3.041916078
- Wang, L., X. B. Li, H. C. Suo, K. An, H. M. Luo, and X. J. Liu. 2017. Soft rot of potatoes caused by *Bacillus amyloliquefaciens* in Guangdong province, China. *Can. J. Plant Pathol.* 39:533–539. doi:10.1080/07060661.2017.1381994
- Zhong, L., N. Harijati, Y. Ding, Z. Z. Bao, W. D. Ke, and Z. L. Hu. 2015. First report of black rot of *Sagittaria sagittifolia* caused by *Bacillus amyloliquefaciens* in China. *Plant Dis.* 99:1270. doi:10.1094/PDIS-02-15-0148-PDN

Screening and Evaluation of the Potential Bacterial Antagonists for Controlling the Bacterial Soft Rot of Chinese Cabbage

Chun-Wei Chen^{1*}, Yu-Yao Fu², Chia-Hsin Tsai³, and Tsung-Chun Lin³

Abstract

Chen, C. W., Y. Y. Fu, C. H. Tsai, and T. C. Lin. 2023. Screening and evaluation of the potential bacterial antagonists for controlling the bacterial soft rot of Chinese cabbage. *J. Taiwan Agric. Res.* 72(1):1–11.

The bacterial soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*) is one of the destructive diseases of Chinese cabbage in Taiwan. The purpose of this study was to screen and evaluate the potential antagonists for control of this disease. The six *Bacillus* spp. isolates, AC35, BAC15, NA0301, HTT-11, HTT-61, and HTT-62, showed superior antagonistic ability against *Pcc* strain Pcc10602. Thus, the effect on controlling this disease was evaluated on leaf tissue of Chinese cabbage by using puncture and spray method. The results showed that the disease severity of *Pcc*10602 inoculated-only were 100% at the 5th day after inoculation (DAI 5) by using two different methods. In addition, *Bacillus amyloliquefaciens* isolates BAC15, HTT-61, and HTT-62 significantly reduced the disease severity to 52.4%, 57.1%, and 57.1% at DAI 5 by using puncture method, respectively. In the greenhouse test, the *B. amyloliquefaciens* HTT-62 was applied to Chinese cabbage with using different methods (cotton-cover method and spray method). After 1 day, *Pcc*10602 was subsequently applied by the same method. The results revealed that the disease severity of the control treatment was 97.9% and 74.5% at DAI 12 by two different methods, respectively, while the disease severity of the treatment with HTT-62 was only 47.5% and 30.2%, respectively. Therefore, it is speculated that *B. amyloliquefaciens* HTT-62 can delay the occurrence of soft rot and reduce disease severity on cabbage in any way one day before inoculation. This study revealed that *B. amyloliquefaciens* HTT-62 is a potential antagonist to control the bacterial soft rot of Chinese cabbage.

Key words: Chinese cabbage, Bacterial soft rot, Biocontrol, *Bacillus*.

Received: June 30, 2022; Accepted: September 6, 2022.

* Corresponding author, e-mail: chunwei@tari.gov.tw

¹ Contract Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

² Project Assistant, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

³ Assistant Research Fellows, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.