

# 芽孢桿菌屬細菌處理芥藍種子方法對 黑腐病菌抑制效果探討<sup>1</sup>

陳俊位<sup>2\*</sup>、曾德賜<sup>3</sup>

## 摘 要

甘藍黑腐病(black rot)為全球十字花科蔬菜之重要病害，其可藉由種子進行長距離傳播，在世界各地造成嚴重危害。目前化學藥劑防治與種子消毒處理並無法有效控制本病害的發生與蔓延，且甘藍黑腐病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)菌株抗藥性亦已產生，為此生物農藥遂為本病害防治的新途徑。本研究擬篩選具拮抗黑腐病菌的芽孢桿菌屬細菌，應用於十字花科蔬菜種子處理上，以減少黑腐病菌藉由種子傳播的機率。將所搜集的芽孢桿菌屬細菌菌株與黑腐病菌進行對峙培養，篩選出以 WG6-14 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、TKS1-1 (*B. subtilis*) 與 SP4-17 (*B. megaterium*) 三菌株拮抗能力最強。進一步以 WG6-14、TKS1-1、SP4-17 三菌株處理芥藍種子，以建立種子拌種技術。結果發現噴霧、浸種與混拌方式拌種處理皆可抑制種子上之黑腐病菌；50°C 熱風乾燥處理對種子發芽沒有影響，其每粒種子上之含菌量在  $3 \times 10^6$  cfu/seed 以上，菌株耐熱性在 50°C 熱風乾燥處理 90 分鐘後種子上的菌量以 WG6-14、TKS1-1 二者高於 SP4-17。結果顯示運用芽孢桿菌屬細菌處理芥藍種子可有效降低種子上的微生物量，且可維持高濃度的芽孢桿菌數量，對種子發芽率也有提升的效果。

**關鍵字：**芥藍、液化澱粉芽孢桿菌、種子拌種

## 前 言

種媒傳染的病原菌主要可分為(1)病毒、(2)真菌、(3)細菌與(4)線蟲。而由種子媒介傳播的病原菌係溫室蔬菜穴盤苗病害的主要來源，可經由種子傳播的病害很多，而目前蔬菜穴盤苗主要作物為十字花科，其種子上可攜帶之病原菌及病害種類甚多(Bain, 1952)。其上的病害有些被列為進口植物檢疫上的重要病害，其原因即在於這些病害侵入後，會形成嚴重的危害及損失，造成農業上無法補救的災害。另外其種子上所攜帶的病原菌亦因其種類而有所不同，此可由十字花科種子上檢測出的

<sup>1</sup> 農業部臺中區農業改良場研究報告第 1080 號。

<sup>2</sup> 農業部臺中區農業改良場研究員。

<sup>3</sup> 國立中興大學植物病理學系兼任教授。

\*通訊作者 e-mail: chencwol@tcdares.gov.tw

微生物相看出。在不同的作物上如蘿蔔、甘藍、芥菜、芥藍、白菜、結球白菜、蕪菁、花椰菜、青花菜、油菜等上可檢測出的病原有 *Alternaria* spp.、*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*等多種微生物(楊等人, 1994)。這些微生物可藉由菌原體侵入種子內來危害或以繁殖體夾帶在種子中, 形成初級感染源而進行危害, 故種子種植前處理以化學藥劑進行種子消毒或以其他物理方法(如溫湯浸種)消毒, 可有效降低種子上病原菌的量, 而來減少其危害(黃, 1988a、b)。

種子處理是減少種傳病害發生的有效措施, 國外對種子處理技術的研究迄今, 已開發的方法有: 有機汞劑處理、熱水浸漬、抗生素浸漬(Sutton *et al.*, 1954)、次氯酸鈣拌種、銅劑處理及氯酸鈉(Nyolate)浸漬(Harman *et al.*, 1987)等, 這些方法都能有效除滅種傳(seed borne)黑腐病菌(Schaad *et al.*, 1980), 但也各有缺點, 有機汞劑殘毒問題嚴重已遭禁用; 熱水浸漬操作方面簡單而且安全, 以往亦被普遍採用, 但經常影響種子發芽率, 且無法完全除滅病菌(黃, 1998); 抗生素效果優良, 但容易造成幼苗傷害, 且病菌對抗生素容易產生抗性, 也常影響處理效果(Klisiewicz *et al.*, 1961); Schaad等人(1980a)推薦的熱酸性醋酸銅處理法, 不但可除滅黑腐病菌, 也可防治*Phoma lingam*引起的黑腳病, 但處理時必須調整pH值, 不便於農友採行, 且該處理法會降低許多品種種子的發芽率, 亦不適於當做例行的處理措施(Clayton, 1924); Harman等人(1987)的Nyolate浸漬法及Schultz等人(1986)的次氯酸鈣拌種法, 操作簡便, 不會造成種子或幼苗傷害, 但僅能除滅種子表面病菌, 效果未臻理想。熱酸性硫酸鋅種子浸漬法則為國內黃與李(1987a; 1987b; 1988)所研發, 效果優於前述二者化學藥劑。這些種子消毒方法雖然有效, 但因操作上的限制, 並未被普遍被採用。

芽孢桿菌屬細菌為需氧或兼性厭氧之桿菌, 在種子保護劑生技產業發展上應用已有多年(Verschure *et al.*, 2000), 在植物病蟲害的生物防治之研究與應用上, 許多芽孢桿菌屬已知會產生可以抑制植物病原細菌、真菌及昆蟲之抗性物質(Walff *et al.*, 2003; 郭等人, 2004)。芽孢桿菌屬細菌在實際應用時所需的量產與製劑化技術已趨於成熟, 因此於植物病害防治應用上為很值得研究開發之微生物資源。本研究擬利用所篩選的芽孢桿菌屬菌株針對芥藍種子上所帶之黑腐病菌進行防治試驗, 從種子處理上進行探討, 以建立芥藍健康種子的處理技術。

## 材料與方法

### 一、芽孢桿菌屬細菌菌株來源與製備

菌株來源與保存: 芽孢桿菌屬細菌菌株WG6-14、TKS1-1及SP4-17三菌株由中興大學植物病理學系分子植物病理研究室所提供。各供試菌株分類為芽孢桿菌屬中的枯草桿菌(*Bacillus subtilis*) TKS1-1, 液化澱粉芽孢桿菌(*B.amyloliquefaciens*) WG6-14 及巨大芽孢桿菌(*B.megaterium*) SP4-17。供試菌株經劃線培養於PSA斜面上, 於30℃定溫箱培養一天後, 移置4℃定溫箱保存。進行各項試驗前, 將保存之菌株取出塗抹於PSA平板上, 置於30℃定溫箱中培養, 俟菌落長出, 挑取單一菌落於PSA平板上培養在30℃中。繼而於PSA斜面繼代

培養兩次後，每1-2週更新一次供各項試驗之用。

供試菌株製備：TKS1-1、WG6-14 及 SP4-17 等三菌株，培養在黃豆粉酵母蔗糖培養基(soybean yeast brown sugar agar (SYB agar : 0.75%(w/v)soybean powder , 0.5% (w/v) yeast powder , 2%(w/v) brown sugar , 0.24% (w/v)  $K_2HPO_4$ , 0.03% (w/v)  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , and 1.5% Bacto TM agar , pH 7.5) )，於 38°C 培養箱黑暗培養，5 天後以消毒過的無菌水洗下，調整菌量為(OD<sub>620</sub> = 0.3)備用。

二、試驗種子：本試驗供試芥藍菜品種為本場培育之「臺中 1 號」薑用芥藍品種，係由本場之授權業者溪湖農生種子行於雲林生產採種及提供，種子帶黑腐病菌比率在 20-30%之間。以當年度採收的種子為「新採種子」，另以存放 2 年以上的種子為「舊種子」，各處理稱取種子 10 g，三重複供試。

三、菌液處理種子方式：(一)噴霧處理：取製備菌量為(OD<sub>620</sub> = 0.3)之三供試菌株菌液裝入已消毒過的 100 ml 玻璃噴霧瓶中，以噴霧方式將菌液均勻噴覆到種子上，隨後置於室溫下自然風乾，對照組則以無菌水噴覆種子。(二)浸種處理：取製備菌量為(OD<sub>620</sub> = 0.3)之三供試菌株菌液 10 ml 分別裝入已消毒過的玻璃試管中，隨後加入芥藍種子浸泡其中，靜置 20 min 後取出瀝乾，隨後置於室溫下自然風乾。(三)拌種處理：取芥藍種子置於 9 cm 已消毒過的塑膠培養皿中，將各菌株製備菌量為(OD<sub>620</sub> = 0.3)濃度之菌液吸取 1 ml 滴入培養皿，隨後以消毒過 L 型玻棒將種子與菌液混拌均勻，隨後置於室溫下自然風乾，對照組則以無菌水混拌種子另以熱風乾燥。

四、調查項目：(一)種子發芽率與帶菌率以洋菜平板法測定，每處理挑選 25 粒種子置於馬鈴薯葡萄糖洋菜平板培養基(Potato Dextrose Agar , PDA , 配方為 250g 去皮馬鈴薯、20g 葡萄糖、15g 洋菜和 1L 蒸餾水)中，每處理四重複。種子放置好後將培養皿置於室溫下培養一星期，一星期後取出調查各處理之發芽率、芽孢桿菌屬細菌及黑腐病菌帶菌率，以比較不同處理方式對種子萌芽能力與其上所帶細菌之影響。熱風循環之烘箱進行乾燥，比照一般十字花科種子調製溫度，乾燥溫度定為 50°C，乾燥時間分別為 30、60 及 90 min，另以室溫風乾為對照組。(二)種子上之帶菌量分析：方法為各處理之種子於乾燥後稱取 1 g 加入含 9 ml 無菌水之玻璃試管中，以振盪器振盪試管使各處理之枯草桿菌屬菌株懸浮於水中，靜置 1 小時後再次振盪試管，隨後吸取 1 ml 菌液加入 9 ml 無菌水之玻璃試管中進行 10 倍系列稀釋，取系列稀釋第 3、4 及第 5 管菌液 0.01 ml，滴於馬鈴薯葡萄糖洋菜平板培養基上，以消毒過 L 型玻棒將菌液塗抹均勻，俟乾後置於 38°C 培養箱中黑暗培養 24 小時，然後取出調查其上菌落數量，以求取不同乾燥處理時間對芥藍種子上帶各芽孢桿菌屬細菌數量之影響。

## 結 果

### 一、不同拌種方式對種子萌芽及帶菌率之影響

將 WG6-14、TKS1-1 及 SP4-17 三株芽孢桿菌屬細菌以浸種、噴霧及混拌方式與芥藍種子拌種，

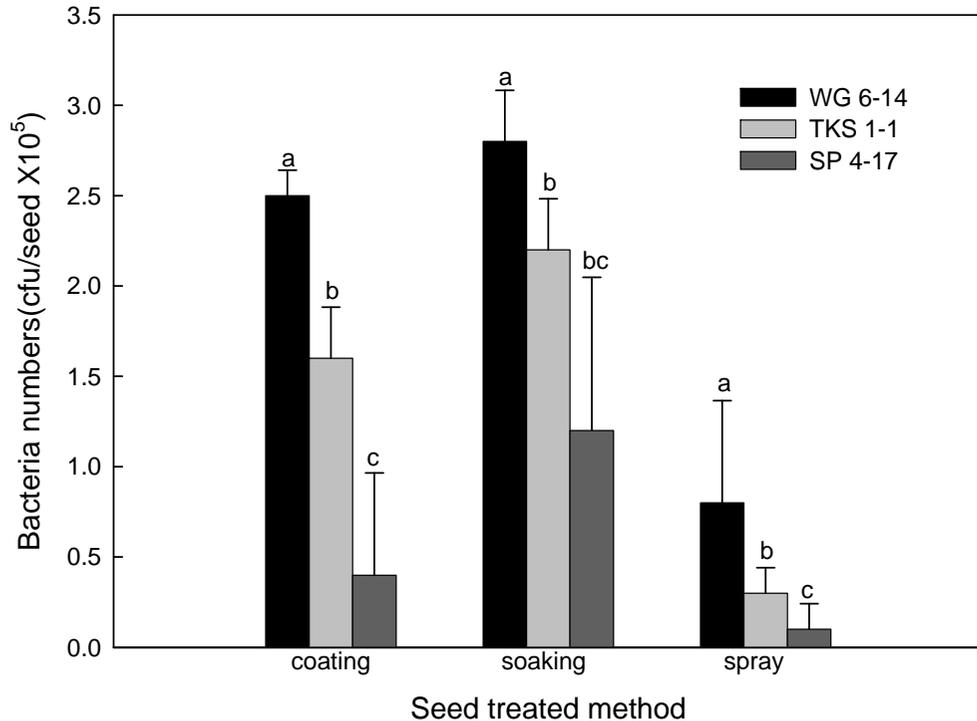
以洋菜平板法測試發芽率發現以浸種方式跟噴霧接種二者處理方式者發芽率為高，平均發芽率在 84-90%之間，高於混拌方式處理的 64%，但三種處理的發芽率皆高於對照組的 23-36%(表一)。三種處理種子上的芽孢桿菌屬細菌帶菌率除 TKS1-1 浸泡處理的 96%外，其餘帶菌率皆為 100%，帶菌量三菌株皆以浸泡處理方式平均每粒種子上可達  $1 \times 10^5$  cfu/seed 以上最高，其次為混拌處理，噴霧處理上所帶之菌量則最低(圖一)。各處理間不同芽孢桿菌屬細菌皆以 WG 6-14 帶菌量最高，其次為 TKS 1-1，SP 4-17 則最低(圖一)。各處理皆可有效抑制種子上黑腐病菌的產生(表一)。

表一、芥藍種子以芽孢桿菌屬細菌不同拌種方式對其種子萌芽及黑腐病菌帶菌率之影響

Table 1. Effect of germination and contaminated rate of Chinese kale seed with different coating method by three *Bacillus* strains *B. amyloliquefaciens* WG 6-14、*B. subtilis* TKS 1-1 and *B. megaterium* SP 4-17

Seed treatment method	Strains	Seed germination rate (%)	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> Xcc contaminated (%)	Bacillus contaminated (%)
Soaking	TKS1-1	84 <sup>b*</sup>	0 <sup>c</sup>	96 <sup>b</sup>
	SP4-17	84 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	100 <sup>a</sup>
	WG6-14	90 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>	100 <sup>a</sup>
	CK	36.5 <sup>d</sup>	61.4 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>
Spray	TKS1-1	84 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	100 <sup>a</sup>
	SP4-17	88 <sup>ab</sup>	0 <sup>c</sup>	100 <sup>a</sup>
	WG6-14	86 <sup>ab</sup>	0 <sup>c</sup>	100 <sup>a</sup>
	CK	28 <sup>d</sup>	30 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>
Coating	TKS1-1	64.2 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	100 <sup>a</sup>
	SP4-17	67 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	100 <sup>a</sup>
	WG6-14	66.6 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	100 <sup>a</sup>
	CK	23 <sup>d</sup>	20.5 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>

\* Means followed by different letter within days are significantly different by Fisher's LSD test at  $P \leq 0.05$ .



圖一、不同拌種方式對芥藍種子上芽孢桿菌屬細菌之影響。

Fig. 1. Population dynamics of *Bacillus amyloliquefaciens* WG 6-14, *B. subtilis* TKS 1-1 and *B. megaterium* SP 4-17 on Chinese kale seed (*Brassica alboglabra* Bail. var. *acephala* Dc, cultivar: Taichung No.1) after application different dressing method.

A total of 1 gram seed were sampled from each treatment, the survival count of test bacteria was determined by dilution plate method.

Bars indicate standard deviation.

## 二、50°C下不同處理時間對新採芥藍種子帶菌率之影響

將 WG6-14、TKS1-1 及 SP4-17 三株芽孢桿菌屬細菌混拌芥藍種子後，以洋菜平板法測試發芽率，發現在 50°C 下處理 30 及 60min 後，平均發芽率在 73-82% 之間高於室溫 49-64%，乾燥 90min 者除 WG 6-14 低於 60% 以外其於菌株發芽率皆高於 80% 以上。50°C 處理 30min 除處理組發芽率提昇外，對照組亦有提昇發芽率的效果，但對照組在室溫下乾燥及 50°C 處理 60、90min 者，其發芽率平均低於 40% 以下。帶菌率處理各芽孢桿菌屬細菌之種子其帶菌比率在 100%，且黑腐病菌未產生，對照組則可檢測到其上的黑腐病菌，部分處理下帶黑腐病菌可高達 65.2% (表二)。

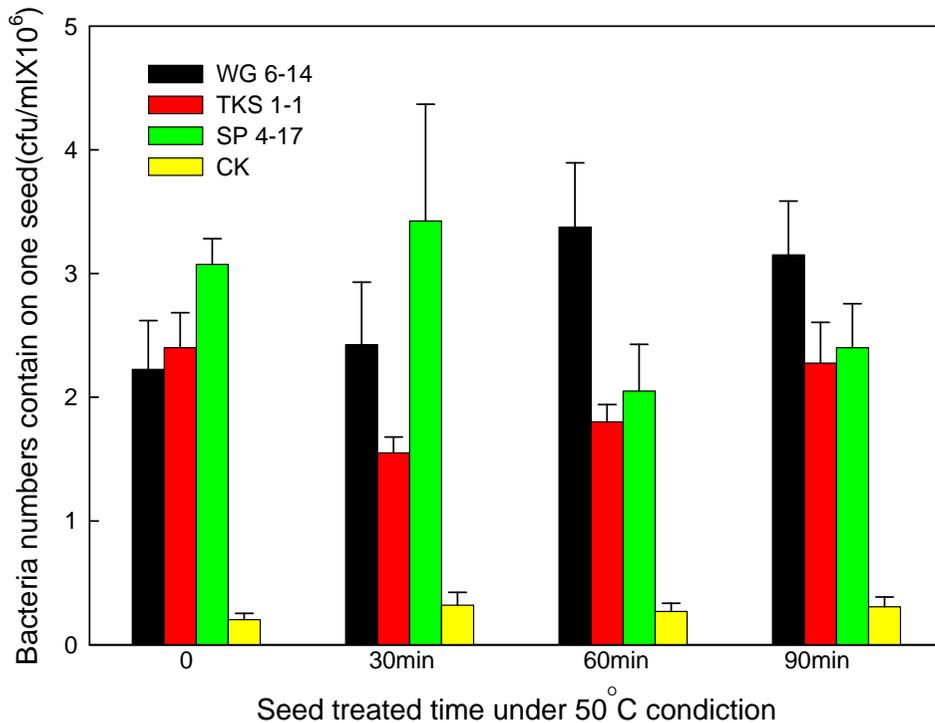
表二、不同乾燥時間對新採芥藍種子拌種芽孢桿菌屬細菌之影響

Table 2. Effect of germination and contaminated rate of new harvest Chinese kale seed with different drying time by treated three *Bacillus* strains *B. amyloliquefaciens* WG 6-14、*B.subtilis* TKS 1-1 and *B.megaterium* SP 4-17

Seed treated time	Strains	Seed germination rate (%)	Xcc contaminated (%)	Bacillus contaminated (%)
Room Temperature dry	TKS1-1	64 <sup>*</sup>	0 <sup>a</sup>	100
	SP4-17	56 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup>	100
	WG6-14	49 <sup>d</sup>	0 <sup>a</sup>	100
	CK	35.3 <sup>e</sup>	21 <sup>b</sup>	0
50°C dry 30min	TKS1-1	78 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	100
	SP4-17	80.4 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	100
	WG6-14	77.8 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	100
	CK	74.6 <sup>b</sup>	65.2 <sup>d</sup>	0
50°C dry 60min	TKS1-1	76 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	100
	SP4-17	82.7 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	100
	WG6-14	73.1 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	100
	CK	40 <sup>e</sup>	32 <sup>b</sup>	0
50°C dry 90min	TKS1-1	84.6 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	100
	SP4-17	82.9 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	100
	WG6-14	57.1 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup>	100
	CK	32.5 <sup>e</sup>	44.25 <sup>c</sup>	0

\* Means followed by different letter within days are significantly different by Fisher's LSD test at  $P \leq 0.05$ .

TKS1-1、WG6-14 及 SP4-17 等三菌株以拌種方式處理後，置於 50°C 的熱風循環烘箱中，乾燥時間分別為 30、60 及 90min，各供試菌株以 WG 6-14 處理效果最好，90min 後每粒種子上仍有  $3 \times 10^6$  cfu/ml 的菌量，其次為 SP 4-17 及 TKS 1-1。TKS 1-1 在種子上之菌量會隨處理時間增加而提昇，SP 4-17 菌量則隨處理時間的增加而降低。各處理時間下種子上的各芽孢桿菌屬細菌菌量皆可維持在  $1.5 \times 10^6$  cfu/ml 以上，顯示 50°C 的處理溫度對供試菌株在芥藍種子上的菌量影響不大(圖二)。



圖二、50°C下不同處理時間對芥藍種子帶菌率之影響。

Fig. 2. Effects of different treatment times on the population dynamics of *Bacillus amyloliquefaciens* WG 6-14、*B. subtilis* TKS 1-1 and *B. megaterium* SP 4-17 on Chinese kale seed (*Brassica alboglabra* Bail. var. *acephala* Dc, cultivar: Taichung No.1) at 50°C. Bars indicate standard deviation.

### 三、50°C下不同處理時間對芥藍舊種子帶菌率之影響

將 WG6-14、TKS1-1 及 SP4-17 三株芽孢桿菌屬細菌混拌芥藍舊種子後，以洋菜平板法測試發芽率發現在 50°C 下處理 30 及 60min 後，平均發芽率在 38-74% 之間高於室溫 37-66%，乾燥 90min 者三株菌株發芽率皆高於 60% 以上。各溫度處理對照組的發芽率皆極低，在 1.3-16% 之間，且可檢測到其上的黑腐病菌，部分處理下種子長時間儲存後其上帶黑腐病菌比例仍可高達 34% (表三)。但處理各供試菌株後即有改善發芽率的效果。帶菌率處理各芽孢桿菌屬細菌之種子其帶菌比率在 100%，且黑腐病菌未產生。

表三、不同乾燥時間對芥藍舊種子拌種芽孢桿菌屬細菌之影響

Table 3. Effect of germination and contaminated rate of old Chinese kale seed with different drying time by treated three *Bacillus* strains *B. amyloliquefaciens* WG 6-14、*B.subtilis* TKS 1-1 and *B.megaterium* SP 4-17

Seed treated time	Strains	Seed germination rate (%)	Xcc contaminated (%)	Bacillus contaminated (%)
Room Temperature dry	TKS1-1	66.7 <sup>ab*</sup>	0 <sup>a</sup>	100
	SP4-17	37.3 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup>	100
	WG6-14	56 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	100
	CK	1.3 <sup>e</sup>	21 <sup>b</sup>	0
50°C dry 30min	TKS1-1	52 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	100
	SP4-17	58.7 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	100
	WG6-14	49.3 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup>	100
	CK	13.3 <sup>d</sup>	24 <sup>b</sup>	0
50°C dry 60min	TKS1-1	64 <sup>ab</sup>	0 <sup>a</sup>	100
	SP4-17	38.7 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup>	100
	WG6-14	61.3 <sup>ab</sup>	0 <sup>a</sup>	100
	CK	16 <sup>d</sup>	26 <sup>b</sup>	0
50°C dry 90min	TKS1-1	68 <sup>ab</sup>	0 <sup>a</sup>	100
	SP4-17	74.7 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	100
	WG6-14	64 <sup>ab</sup>	0 <sup>a</sup>	100
	CK	4 <sup>e</sup>	34.6 <sup>c</sup>	0

\* Means followed by different letter within days are significantly different by Fisher's LSD test at  $P \leq 0.05$ .

## 討 論

目前蔬菜作物的種植仍以種子播種與培育幼苗後移植二者為主要操作方式，為防止種傳病害為害，蔬菜種子採收後調製作業除風選乾燥去除雜質與降低水份外，商業種子大多會混拌化學藥劑來防治種傳病原，以遏止種子萌芽時病原危害進而提高其發芽率。穴盤苗周圍的微氣候相常呈高溫高濕的狀態，此一狀態遂為苗期病害好發的環境，如以氣生菌絲為害之立枯絲核菌(*Rhizoctonia solani*)所致之損失較為嚴重，而黑腐病菌(*Xanthomonas campestris*)亦可因植物處於濕潤膨脹狀態，氣孔及水孔處水份含量高而有利其散佈及感染(林,1981)。而濕度高對露菌、疫病菌及猝倒病菌等水生菌胞囊之釋放亦有促進之效果，這些病害常造成蔬菜幼苗嚴重的危害。育苗場業者為了維持幼苗的外觀健康，皆採用大量的化學藥劑進行病害的預防與防治，但大量施用農藥的後果除了病原菌產生抗藥性外，部份農藥對幼苗生長產生傷害，而影響幼苗品質。此外抗藥性菌株的產生可拌隨種苗的銷售散播開來，除造成田間作物病害感染源的來源外，也增加防治上的困難，為此種苗病害非農藥防治技術的開發遂為當今研究的重點。

種苗病害非農藥的防治技術除種子以物理方式的溫湯、乾燥或熱風處理外，蔬菜苗期病害的防治則以具拮抗性的微生物為主，國內學者嘗試以木黴菌 *Trichoderma* spp.、黏帚黴菌 *Gliocladium* spp.、鏈黴菌 *Streptomyces* spp.與芽孢桿菌屬 *B. subtilis*、*B. megaterium* 與 *B. cereus* 來防治幼苗立枯病 (*Rhizoctonia solani*)，在苗期病害管理上獲得不錯的防治效果。此外利用 *Bacillus mycoides* CHT2402 處理萵苣幼苗更有促進生長的效果。在種子種苗處理上國外的生物製劑產品除前述 Kodiak、Serenade 及 Sonata 外，YieldShield (*B.pumilus* GB34)即做為種子處理劑，而 *B.subtilis* 與 *B. megaterium* 的混合產品 Companion 則於苗圃管理時使用。但上述所防治之病原種類皆以真菌性的病原為主，本研究亦嘗試篩選本土化具拮抗性的芽孢桿菌菌株來防治於甘藍種子及幼苗上的黑腐病菌。

在測試不同菌株拮抗甘藍黑腐病菌能力時，拮抗能力強的菌株 WG6-14、TKS1-1 及 SP4-17 在培養基上生長半徑低於其它菌株，但有較高之抑制指數(陳等人，2022)。芽孢桿菌在抑制病原時抗生作用為最主要的作用機制，已知芽孢桿菌屬細菌所產生抗生物質中 Iturin A 可對抗 *Xanthomonas oryzae* 及 *Pseudomonas lachrymans* 等植物病原細菌，WG6-14 及 TKS1-1 在研究室之前的研究已闡明其代謝產物中有抗菌物質 iturin A 的產生，菌株其它抑制黑腐病菌的代謝物質則需進一步分析。

芥藍種子不同拌種方式對種子上之帶菌量影響極大，結果以浸種方式可使種子上帶菌量最高，混拌及噴霧接種次之，所拌菌種皆可抑制其種子上所攜帶之黑腐病菌，初步測試三種方法皆以 WG6-14 在種子上菌量最高，由此可知菌種與處理方法會影響種子上之帶菌率，但各種拌種方式又有不同使用時機，按種子採收後之調製作業流程，會先風選去除雜質與偽劣種子，然後乾燥降低水份後包裝儲藏，一般種子公司會在乾燥階段進行拌藥處理，拌藥方式以噴霧或混拌方式處理配合黏著劑，形成粉衣或造粒種子。因此本試驗所測試之方法以混拌處理可應用在種子調製上使用，噴霧處理則需配合噴霧設備及黏著劑以提高種子帶菌量，浸種處理則可推薦在育苗時種子處理使用。而三種處理種子上之芽孢桿菌帶菌率皆近 100%，而以浸泡處理方式平均每粒種子上可達  $1 \times 10^5$  cfu/seed 以上最高，其次為混拌處理，噴霧處理上所帶之菌量則最低，但各處理皆可有效抑制種子上黑腐病菌的產生。而種子上帶菌量各處理皆以 WG 6-14 最高，其次為 TKS 1-1，SP 4-17 則最低，顯示利用 SYB agar 所培養的菌株在種子上之殘留數量以 WG 6-14 效果最好。

十字花科種子調製處理時會使用熱風短時間乾燥，而減少種子上之黑腐病菌亦會使用 52°C 的溫湯浸種處理。本試驗以 50°C 溫度熱風乾燥處理各菌株之芥藍種子，結果顯示各處理時間下種子上之各芽孢桿菌菌量皆可維持在  $1.5 \times 10^6$  cfu/ml 以上，顯示 50°C 的處理溫度對供試菌株的菌量影響不大。芽孢桿菌菌種特性在當其細胞遇惡劣環境或化學藥劑(如硫酸錳等)時可產生抵抗力極強的內生孢子，以作為求生存的方法，不同菌種的內生孢子有不同的抗熱性，以抵抗惡劣環境；當遇適當的生長環境時，內生孢子可萌發形成營養細胞。本試驗所測試之三菌株在之前培養過程中內生孢子轉換率極高，此在調製種子上為具耐高溫優勢的添加菌種。

而在種子發芽率上，浸種方式跟噴霧接種二處理的平均發芽率 84-90%高於混拌處理的 64%，

但三種處理的發芽率皆高於對照組的 23-36%，但混拌方式在 50°C 下處理 30min 對種子發芽率即有提昇效果，不同菌種間可提高發芽率 25% 左右。部份種子在播種前會進行催芽動作，如葫蘆科、茄科種子泡水使原先乾燥的表皮濕潤膨脹，以利種子萌芽時可容易撐破種皮而發芽提高發芽率。而一些種子活性弱發芽率低的作物，種子會處理化學藥劑如聚乙二醇(Polythylene glycol, PEG)進行滲調處理(Priming)，使種子發芽率提昇且萌芽一致性。而甘藍種苗培育時，一般不會先浸泡催芽，而是在播種後會靜置室內隔夜後再移至育苗室，此一動作即在利用穴盤介質內的水分對種子進行催芽。本試驗的菌株可配合上述不同種子處理方式而選用，皆可提高種子發芽率。以往消毒甘藍種子以熱水浸漬方式處理，會影響種子發芽率，且無法完全除滅種子內的病菌；抗生素效果優良，但容易造成幼苗傷害；熱酸性醋酸銅處理會降低許多品種種子的發芽率；次氯酸鈣拌種法雖不會造成種子或幼苗傷害，但僅能除滅種子表面病菌，效果未臻理想。本試驗所使用的供試種子於拌種處理上殘存菌量高，且在洋菜平板法測試時對種子發芽率有改善之效果，各菌株與芥藍種子混拌後，在 50°C 下熱風乾燥處理不同時間下，各製劑的菌量在每粒種子上皆可維持在  $10^5$  cfu/ml 以上，顯示 50°C 下乾燥時間的長短對種子上所攜帶的各芽孢桿菌屬細菌數量影響不大，此對未來應用在種子調製過程中做為種子拌種製劑頗具應用潛力。未來可應用於相關芽孢桿菌生物製劑應用在種子調製上之參考。

## 參考文獻

1. 林俊義 1981 台灣十字花科黑腐病之研究 植保會刊 23: 157-168。
2. 黃德昌 1988(a) 十字花科黑腐病防治研究 豐年 38(7): 48-51。
3. 黃德昌 1988(b) 台灣十字花科黑腐病防治研究近況 頁29-43 蔬菜品種改良研討會專輯 台灣省政府農林廳台東區農業改良場編印。
4. 黃德昌、李惠鈴 1987(a) 熱酸性硫酸鋅浸漬法防治種帶十字花科黑腐病菌 植保會刊 29: 422 (摘要)。
5. 黃德昌、李惠鈴 1987(b) 酸、熱及銅、鋅、錳離子對十字花科黑腐病菌之致死效應 植保會刊 29: 421-422 (摘要)。
6. 黃德昌、李惠鈴 1988 熱酸性硫酸鋅種子浸漬法防治十字花科蔬菜黑腐病 植保會刊 30: 245-258。
7. 陳俊位、黃姿碧、曾德賜 2022 芽孢桿菌屬細菌處理甘藍種子對黑腐病之防治效果探討 臺中區農業改良場研究彙報 157: 61-75。
8. 郭建志、陳俊位、廖君達、陳葦玲、蔡宜峯 2004 液化澱粉芽孢桿菌在作物病害防治的開發與應用 頁 69-86 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 號。
9. 楊佐琦、林俊義、陳俊位 1994 台灣進口十字花科蔬菜種子之真菌相 植保會刊 36: 333-339。

10. Bain, D.C. 1952. Reaction of brassica seedling to blackrot. *Phytopathology*. 42, 497-500.
11. Clayton, E.E. 1924. Control of blackrot and black leg of cruciferous crop by seed and seed bed treatments. *Phytopathology*. 14, 24-25 (Abstr.)
12. Harman, G.H., Norton, J.M., Stasz, T.E., Humaydan, H.S. 1987. Nyolate seed treatment of *Brassica* spp. to eradicate or reduce black rot caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant Dis.* 71, 27-30.
13. Klisiewicz, J.M., Pound, G.S. 1961. Studies on control of black rot of crucifers by treating seeds with antibiotics. *Phytopathology*. 51, 495-500.
14. Schaad, N.W., Gabrielson, R.L., Mulanax, N.W. 1980(a). Hot acidified cupric acetate soaks for eradication of *Xanthomonas campestris* from crucifer seed. *Appl. Envir. Microbiol.* 39, 803-807.
15. Schaad, N.W., Sitterly W.R., Humaydan, H. 1980(b). Relationship of incidence of seedborne *Xanthomonas campestris* to black rot of crucifers. *Plant Dis.* 64, 91-92.
16. Schultz, T., Gabrielson, R.L., Olson, S. 1986. Control of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in crucifer seed with slurry treatment of calcium hypochlorite. *Plant Dis.* 70, 1027-1030.
17. Sutton, M.D., Bell, W. 1954. The use of aureomycin as a treatment of swede seed for the control of black rot (*Xanthomonas campestris*). *Plant Dis. Repr.* 38: 547-549.
18. Wulff, E. G., van Vuurde, J. W. L., Hockenhull, J. 2003. The ability of the biological control agent *Bacillus subtilis*, strain BB, to colonise vegetable brassicas endophytically following seed inoculation. *Plant Soil* 255: 463-474.
19. Verschuer, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstrete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Bio. R.* 64: 655-671.

# Discussion on Different Methods of Treating Kale Seeds with *Bacillus* spp. and Their Inhibitory Effects on Black Rot bacteria<sup>1</sup>

Chein-Wei Chen<sup>2\*</sup> and Dean Der-Syh Tzeng

## ABSTRACT

Cabbage black rot is an important disease of cruciferous vegetables worldwide. It can spread over long distances through seeds and cause serious damage around the world. At present, chemical control and seed disinfection cannot effectively control the occurrence and spread of this disease, and drug resistance has also developed in cabbage black rot bacteria (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*). Therefore, biopesticides are a new way to control this disease. This study intends to screen *Bacillus* spp. that is antagonistic to black rot bacteria and apply it to cruciferous vegetable seed treatment to reduce the probability of black rot bacteria being transmitted through seeds. The collected *Bacillus* spp. strains were cultured against black rot bacteria, and three strains, WG6-14 (*Bacillus amyloliquefaciens*), TKS1-1 (*B. subtilis*) and SP4-17 (*B. megaterium*), were screened out with the strongest antagonistic ability. Three strains of WG6-14, TKS1-1, and SP4-17 were further used to treat kale seeds to establish seed dressing technology. The results showed that spraying, soaking and coating treatments can inhibit black rot fungi on seeds; 50°C hot air drying treatment has no effect on seed germination, and the bacterial content on each seed is above  $3 \times 10^6$  cfu/seed. The heat resistance of the strains showed that after hot air drying at 50°C for 90 minutes, the number of bacteria on the seeds was higher in WG6-14 and TKS1-1 than in SP4-17. The results show that using *Bacillus* bacteria to treat kale seeds can effectively reduce the microbial load on the seeds, maintain a high bacterial number of *Bacillus*, and improve the seed germination rate.

**Key words:** kale, *Bacillus amyloliquefaciens*, seed dressing

---

<sup>1</sup> Contribution No.1080 from Taichung DARES, MOA.

<sup>2</sup> Researcher of Taichung District Agricultural Research and Extension Station, MOA.

<sup>3</sup> Adjunct Professor of Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taiwan.

\*Corresponding author's email: chencwol@tcdares.gov.tw