

國立臺灣大學生物資源暨農學院

植物病理與微生物學研究所

碩士論文

Department of Plant Pathology and Microbiology

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

生物製劑多元防治能力快速測試系統之研究

The Study on Rapid Biocontrol Testing System

for Multiple Pathogens



張鳳書

Feng-Shu Chang

指導教授：孫岩章 博士

Advisor: En-Jang Sun, Ph.D.

中華民國 101 年 7 月

July, 2012

國立臺灣大學碩士學位論文

口試委員會審定書

生物製劑多元防治能力快速測試系統之研究

The Study on Rapid Biocontrol Testing System

for Multiple Pathogens

本論文係 張鳳書 君 (R99633010) 在國立臺灣大學植物病理與微生物研究所完成之碩士學位論文，於民國一百零一年七月九日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

孫岩章 博士 孫岩章 (指導教授)
國立臺灣大學植物病理與微生物學系 教授

洪挺軒 博士 洪挺軒
國立臺灣大學植物病理與微生物學系 副教授

楊宏仁 博士 楊宏仁
行政院農委會農業試驗所嘉義分所 研究員兼分所長

張東柱 博士 張東柱
行政院農委會林業試驗所森林保護組 研究員

誌謝

這一份論文的完成，首先要感謝我的指導老師孫岩章教授，感謝老師不遺餘力的諄諄教誨，此外還要感謝口試委員洪挺軒老師、楊宏仁老師、張東柱老師對於這份論文不吝給予指教。最後感謝我的家人及朋友們，在我感到疲憊的時候給我支持和鼓勵，謝謝大家！



中文摘要

由於糧食不足問題日漸嚴重，進行適當的作物病害防治以減少產量損失也成為重要議題，而生物防治則是最佳解決方法之一。數十年來，投入生物防治的相關單位漸多，在台灣登記上市的產品也逐漸增加，顯示其具有極大發展潛力。另一方面，許多宣稱具有防治能力的生物製劑也不斷推陳出新，而這些產品是否確實具有所標榜之效力則還需要再確認。常見對於生物製劑採取的檢測方法，如對峙培養、玻璃環法、田間試驗等等，存在一些諸如無法確切表示生物製劑之拮抗能力、測試時間較長等缺點。因此本研究擬針對生物製劑之多元防治能力測試尋求更加妥善快速之方法。本研究選用台灣重要的十二種植物病原菌：鏈格孢菌 *Alternaria brassicicola*、灰黴病菌 *Botrytis cinerea*、炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides*、鐮孢菌 *Fusarium oxysporum*、疫病菌 *Phytophthora nicotianae*、腐霉菌 *Pythium spinosum*、立枯絲核菌 *Rhizoctonia solani*、菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum*、白絹病菌 *Sclerotium rolfsii*、軟腐病菌 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*、青枯病菌 *Ralstonia solanacearum*、黃單胞菌 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 等，進行各種測試方法之實驗，目標是設計出多元快速之測試系統。實驗首先採用三分格毒食法，再改良成三分格抑制環法。另外亦一併測試瓊脂膜法、玻璃紙法、雙層培養基法等三種方法。其中三分格抑制環法係結合系統將不同生長速度之病原真菌分成三組之三分格，加上細菌一組，即可一次使用四皿測試十二種病原，是一創新技術，其在八天內即可獲得結果，未來應可將此法應用於市面上生物製劑之測試，並快速驗證其所宣稱之效力。另針對本研究室自行篩選之拮抗性鏈黴菌 *Streptomyces* sp. YU-01 進行培養，篩選出紅豆及米糠煎汁為較有利其抗生活性表現之培養資材，將此發酵產物以三分格抑制環法進行測試，確實發現其對於多數病原均具有良好抑制效果。利用上述多元快速測試系統配合三分格抑制環法，已對市售四種生物製劑 B01~B04 進行拮抗成效之驗證，發現其效果仍多紛歧，但也確認本研究多元快速測試系統之可行性。

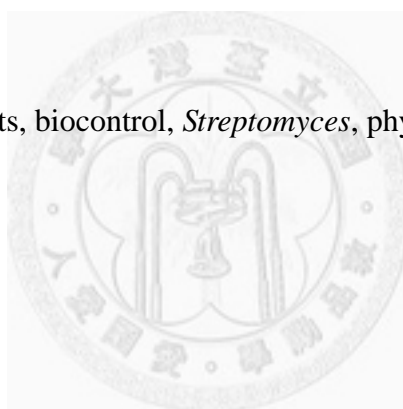
關鍵字：生物製劑；生物防治；鏈黴菌；藥劑測試；植物病原

Summary

Since food shortage has become an increasingly serious problem, the prevention and control of crop diseases in order to reduce the yield loss is also now an important issue. The biological control is at present one of the best solution for the diseases or pests control. For decades, there has been more and more scientists devoted themselves in biological control research. The biopesticide products registered in Taiwan is also increasing, showing its great potential for future application. On the other hand, many biocontrol agents that claim to have the ability to prevent plant disease continued to go to market, and their effectiveness need to be checked or confirmed. Therefore, we initiate this study on rapid biocontrol testing system. There are many methods for testing the efficiency of the biocontrol agents, such as the dual culture, glass ring method, and field trials. However, they have some disadvantages such as not so accurate, need longer test times and the other shortcomings. Therefore, this study intends to seek proper and rapid methods to screen the anti-phytopathogen ability of biocontrol agents. In this study, 12 important phytopathogens has been gathered into the testing system: *Alternaria brassicicola*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora nicotianae*, *Pythium spinosum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. A variety of testing methods has tried. We first tried the Y-plate poison food method and then improve it to develop the 3-way ring-plate method. We've also tried the agar film method, cellophane method, and two-layer medium method. Among these methods, the 3-way ring-plate method in combination with the system divides the pathogenic fungi into three groups and the pathogenic bacteria for another. Therefore, we can screen all the 12 pathogens in 4 plates at a time. This system is a brand new one, and we can get the whole results

within 8 days. The 3-way ring-plate method in combination with the system may provide a good way to screen the commercial biocontrol agents in the future. In addition, we also study on the culture of *Streptomyces* sp. YU-01, find out that red beans and rice bran are better materials for the antibiotic performance of YU-01. The fermentation products have showed good antibiotic activity to the majority of pathogens in our study, using 3-way ring-plate method in combination with the system. Finally, we have actually applied the 3-way ring-plate method in combination with the system to test 4 commercial biocontrol agents, finding that these products have various antibiotic abilities. Our conclusion is that 3-way ring-plate method in combination with the system is a reliable method for the rapid biocontrol testing.

Key words: biocontrol agents, biocontrol, *Streptomyces*, phytopathogen,



目錄

口試委員審定書	i
誌謝	ii
中文摘要	iii
英文摘要	iv
目錄	vi
表目錄	ix
圖目錄	x
第一章 前言	1
一、台灣地區生物製劑或生物農藥之現況	1
二、生物製劑之檢測及其規範	2
三、鏈黴菌簡介	2
四、研究目的	3
第二章 前人研究	4
一、植物病原之生物防治	4
二、拮抗微生物及生物製劑對植物病原防治能力之測試	5
三、鏈黴菌對植物病害之防治	6
第三章 材料與方法	8
一、針對生物製劑建構快速測試系統	8
(一) 台灣重要作物病原之挑選(供測之重要作物病原)	8
(二) 提供系統驗證之已知生物製劑及製備	9
(三) 以三分格毒食法建構拮抗九種病原真菌之快速測試系統	9
(四) 以三分格抑制環法建構拮抗十二種病原之快速測試系統	10
二、針對生物製劑代謝產物或全製劑建構測試系統	11
(一) 以瓊脂膜法測試生物製劑代謝產物抑制孢子發芽率	11

(二) 以玻璃紙法測試生物製劑全藥劑抑制生長率	12
(三) 以雙層培養基法測試生物製劑全藥劑抑制生長率	12
三、本實驗室分離鏈黴菌之培養及拮抗能力驗證	13
(一) 鏈黴菌來源及鑑定	13
(二) 鏈黴菌 YU-01 對九種重要病原真菌之拮抗測試	13
(三) 以天然資材培養鏈黴菌 YU-01 之成效測試	14
(四) 以天然資材額外添加鹽類培養鏈黴菌 YU-01 之成效測試	14
(五) 以鏈黴菌 YU-01 發酵物進行多元快速測試系統之驗證	15
四、對其他市售生物製劑拮抗能力之測試應用及驗證	15
(一) 測試對象即市售生物製劑之取得及製備	15
(二) 以多元快速測試系統測試市售生物製劑抑制病原能力	16
第四章 結果	17
一、針對生物製劑建構快速測試系統	17
(一) 以三分格毒食法建構拮抗九種病原真菌之快速測試系統	17
(二) 以三分格抑制環法建構拮抗十二種病原菌之快速測試系統	23
二、針對生物製劑代謝產物或全製劑建構測試系統	32
(一) 以瓊脂膜法測試生物製劑代謝產物抑制孢子發芽率	32
(二) 以玻璃紙法測試生物製劑全藥劑抑制生長率	34
(三) 以雙層培養基法測試生物製劑全藥劑抑制生長率	40
三、本實驗室分離鏈黴菌之培養及拮抗能力驗證	46
(一) 鏈黴菌 YU-01 對九種重要病原真菌之拮抗測試	46
(二) 以天然資材培養鏈黴菌 YU-01 之成效測試	50
(三) 以天然資材額外添加鹽類培養鏈黴菌 YU-01 之成效測試	53
(四) 以鏈黴菌 YU-01 發酵物進行多元快速測試系統之驗證	55
四、對其他市售生物製劑拮抗能力之測試應用及驗證	59

(一) 以多元快速測試系統測試市售生物製劑抑制病原能力	59
第五章 討論	66
一、針對生物製劑建構快速測試系統	66
二、針對生物製劑代謝產物或全製劑建構測試系統	67
三、本實驗室分離鏈黴菌之培養及拮抗能力驗證	69
四、對其他市售生物製劑拮抗能力之測試應用及驗證	70
參考文獻	71



表目錄

表 1 快速測試系統供試之九種植物病原真菌及三種病原細菌資料。.....	8
表 2 市售生物製劑之編號及其相關資料。.....	15
表 3 以快速測試系統三分格抑制環法測試三種驗證藥劑對九種病原真菌之拮抗結果。三種驗證藥劑分別為純白鏈黴菌素、台灣寶(枯草桿菌)、賜倍效(枯草桿菌)。	26
表 4 以快速測試系統三分格抑制環法測試三種驗證藥劑對三種病原細菌之拮抗結果。三種驗證藥劑分別為純白鏈黴菌素、台灣寶(枯草桿菌)、賜倍效(枯草桿菌)。	27
表 5 利用玻璃紙法測試驗證藥劑台灣寶(枯草桿菌)不同濃度對九種病原真菌之生長結果。.....	37
表 6 利用玻璃紙法測試驗證藥劑賜倍效(枯草桿菌)不同濃度對九種病原真菌之生長結果。.....	38
表 7 利用雙層培養基法測試驗證藥劑台灣寶(枯草桿菌)不同濃度對九種病原真菌之生長抑制結果。.....	43
表 8 利用雙層培養基法測試驗證藥劑賜倍效(枯草桿菌)不同濃度對九種病原真菌之生長抑制率。.....	44
表 9 本實驗室分離之鏈黴菌 YU-01 與九種病原真菌在 PDA 上對峙培養之抑制圈大小。.....	47
表 10 鏈黴菌 YU-01 以七種資材培養基振盪培養後，對腐霉菌以 PDA 對峙培養結果。.....	51
表 11 鏈黴菌 YU-01 以米糠或紅豆分別添加 ISP4 鹽類或花寶三號進行液態培養後，分別取其三、四、五、六、七天之濾液與腐霉菌對峙培養之抑制結果。....	54
表 12 市售生物製劑 B01、B02、B03、B04 之稀釋液以三分格抑制環法，對九種病原真菌進行測試所得之抑制圈。.....	62

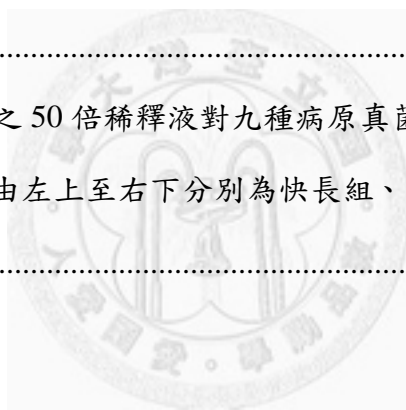
圖目錄

圖 1、驗證藥劑台灣寶代謝產物不同濃度對九種病原真菌之生長抑制率，使用方法為三分格毒食法。	18
圖 2、驗證藥劑賜倍效代謝產物不同濃度對九種病原真菌之生長抑制率，使用方法為三分格毒食法。	19
圖 3、驗證藥劑純白鏈黴菌素代謝產物不同濃度對九種病原真菌之生長抑制率，使用方法為三分格毒食法。	20
圖 4、驗證藥劑純白鏈黴菌素代謝產物不同濃度對三種慢長菌之生長抑制結果，使用方法為三分格毒食法，圖片中每皿之正上方格為鏈格孢菌、右下格為鐮孢菌、左下格為疫病菌，由左至右由上至下之三分格內藥劑稀釋倍數分別為 125、250、500、0(control)、1000、2000、4000 倍。	21
圖 5、驗證藥劑純白鏈黴菌素代謝產物不同濃度對三種中速菌之生長抑制結果，使用方法為三分格毒食法，圖片中每皿之正上方格為灰黴病菌、右下格為菌核病菌、左下格為炭疽病菌，由左至右由上至下之三分格內藥劑稀釋倍數分別為 125、250、500、0(control)、1000、2000、4000 倍。	22
圖 6、以多元快速測試系統對三種驗證藥劑測試其對九種病原真菌之拮抗結果，使用方法為三分格抑制環法，三種藥劑分別為純白鏈黴菌素、台灣寶(枯草桿菌)、賜倍效(枯草桿菌)。	24
圖 7、以多元快速測試系統對三種驗證藥劑測試其對三種病原細菌之拮抗結果，使用方法為三分格抑制環法，三種藥劑分別為純白鏈黴菌素、台灣寶(枯草桿菌)、賜倍效(枯草桿菌)。	25
圖 8、以多元快速測試系統對三種驗證藥劑測試其對慢長菌組之拮抗情形，三種藥劑分別為純白鏈黴菌素(右上)、台灣寶(左下)、賜倍效(右下)，左上為對照組。每三分格之正上為鏈格孢菌，左下為疫病菌，右下為鐮孢菌。	28
圖 9、以多元快速測試系統對三種驗證藥劑測試其對中速菌組之拮抗情形，三種藥	

劑分分別為純白鏈黴菌素(右上)、台灣寶(左下)、賜倍效(右下)，左上為對照組。每三分格之正上為灰黴病菌，左下為炭疽病菌，右下為菌核病菌。.....	29
圖 10、以多元快速測試系統對三種驗證藥劑測試其對快長菌組之拮抗情形，三種藥劑分分別為純白鏈黴菌素(右上)、台灣寶(左下)、賜倍效(右下)，左上為對照組。每三分格之正上為立枯絲核菌，左下為白絹病菌，右下為腐霉菌。.....	30
圖 11、以多元快速測試系統對三種驗證藥劑測試其對三種病原細菌之拮抗情形，三種藥劑分分別為純白鏈黴菌素(右上)、台灣寶(左下)、賜倍效(右下)，左上為對照組。每三分格之正上為青枯病菌，左下為黃單胞菌，右下為軟腐病菌。.....	31
圖 12、驗證藥劑台灣寶(枯草桿菌)代謝產物不同濃度對產孢菌鏈隔孢菌、灰黴病菌、炭疽病菌、鐮孢菌孢子發芽率之影響。.....	32
圖 13、驗證藥劑純白鏈黴菌素代謝產物不同濃度對產孢菌鏈隔孢菌、灰黴病菌、炭疽病菌、鐮孢菌孢子發芽率之影響。.....	33
圖 14、利用玻璃紙法測試驗證藥劑台灣寶(枯草桿菌)不同濃度對九種病原真菌之生長結果。.....	35
圖 15、利用玻璃紙法測試驗證藥劑賜倍效(枯草桿菌)不同濃度對九種病原真菌之生長結果。.....	36
圖 16、利用玻璃紙法以小培養皿測試驗證藥劑台灣寶(枯草桿菌)不同濃度對腐霉菌之生長抑制情形，圖片中由左上至右下之藥劑稀釋倍數分別為 125、250、500、0(control)、1000、2000、4000 倍。.....	39
圖 17、利用雙層培養基法測試驗證藥劑台灣寶(枯草桿菌)不同濃度對九種病原真菌之生長抑制結果。.....	41
圖 18、利用雙層培養基法測試驗證藥劑賜倍效(枯草桿菌)不同濃度對九種病原真菌之生長抑制率。.....	42
圖 19、利用雙層培養基法測試驗證藥劑台灣寶(枯草桿菌)其對立枯絲核菌之生長抑制情形，圖片中由左上至右下之藥劑稀釋倍數分別為 250、1000、4000、0(control)	

倍，圖中之上層培養基為 5.5 cm 之馬鈴薯葡萄糖瓊脂。.....	45
圖 20、鏈黴菌 YU-01 與九種病原真菌在 PDA 上對峙培養之抑制情形。.....	48
圖 21、鏈黴菌 YU-01 與九種病原真菌在 PDA 對峙培養之結果，圖片中由左上至 右下之病原菌分別為鏈隔孢菌、灰黴病菌、炭疽病菌、鐮孢菌、疫病菌、腐霉菌、 立枯絲核菌、菌核病菌、白絹病菌。.....	49
圖 22、鏈黴菌 YU-01 以七種資材培養基振盪培養後，對腐霉菌以 PDA 對峙培養 結果。七種資材分別為燕麥、高粱、米糠、黃豆、ISP4、黑豆、紅豆等。各培養 三、四、五、六、七日。.....	50
圖 23、鏈黴菌 YU-01 以米糠、紅豆及燕麥培養基液態培養七天後，測試其濾液與 腐霉菌對峙培養之抑制結果。圖片中由左上至右下分別為米糠對峙培養一天、米 糠對峙培養二天、紅豆對峙培養一天、紅豆對峙培養二天、燕麥對峙培養一天、 燕麥對峙培養二天。.....	52
圖 24、鏈黴菌 YU-01 以米糠或紅豆分別添加 ISP4 鹽類或花寶三號進行液態培養 後，分別取其三、四、五、六、七天之濾液與腐霉菌對峙培養之抑制結果。....	53
圖 25、鏈黴菌 YU-01 以米糠及紅豆搖瓶培養七天後以三分格抑制環法測試其對九 種病原真菌抑制之結果。.....	55
圖 26、鏈黴菌 YU-01 以米糠及紅豆搖瓶培養七天後以三分格抑制環法測試其對三 種病原細菌抑制之結果。.....	56
圖 27、鏈黴菌 YU-01 以紅豆培養基搖瓶培養七天後，以三分格抑制環法測試原液 對九種病原真菌及三種病原細菌拮抗之結果。圖中由左上至右下分別為快長組、 中速組、慢長組及細菌組。.....	57
圖 28、鏈黴菌 YU-01 以米糠培養基搖瓶培養七天後，以三分格抑制環法測試原液 對九種病原真菌及三種病原細菌拮抗之結果。圖中由左上至右下分別為快長組、 中速組、慢長組及細菌組。.....	58
圖 29、市售生物製劑 B01、B03、B04 之稀釋液以三分格抑制環法驗證其對九種病	

原真菌抑制之結果。	60
圖 30、市售生物製劑 B02 之 50 倍稀釋液以三分格抑制環法驗證其對九種病原真菌抑制之結果。	60
圖 31、市售生物製劑 B01、B03、B04 之稀釋液以三分格抑制環法驗證其對三種病原細菌抑制之結果。	61
圖 32、市售生物製劑 B01 之 10 倍稀釋液對九種病原真菌及三種病原細菌進行三分格抑制環法之結果。圖中由左上至右下分別為快長組、中速組、慢長組及細菌組。	63
圖 33、市售生物製劑 B03 之 50 倍稀釋液對九種病原真菌及三種病原細菌進行三分格抑制環法之結果。圖中由左上至右下分別為快長組、中速組、慢長組及細菌組。	64
圖 34、市售生物製劑 B04 之 50 倍稀釋液對九種病原真菌及三種病原細菌進行三分格抑制環法之結果。圖中由左上至右下分別為快長組、中速組、慢長組及細菌組。	65



第一章 前言

一、台灣地區生物製劑或生物農藥之現況

目前全球人口成長迅速，聯合國人口基金會調查顯示 2011 年全球人口已達 70 億，而 2050 年預計將超過 91 億，糧食需求不足將日漸嚴重。在糧食生產過程中，病蟲害是造成減產的主要原因之一，可以使產量損失高達 50%，故病蟲害防治是作物生產中重要的一環。台灣農業多採集約栽培，病蟲害十分猖獗，長期以來農民多仰賴化學藥劑，然而作物病害之防治方法很多，其中生物防治更是集合無污染、無農藥殘留、對環境及人畜安全、專一性高、不易產生抗藥性等優點之防治方法。(吳，2011)

國內許多學術單位及政府機構皆曾積極投入生物防治之研究，然而歷經一、二十年以來已登記可作為生物農藥之產品僅有枯草桿菌及鏈黴菌之生物製劑二種而已，其他許多具有生物防治潛力之微生物，例如螢光假單胞菌、液化澱粉芽孢桿菌、白粉病寄生菌、黏帚黴菌、光桿菌、木黴菌等，多仍處於研發或登記階段，或有少數已製劑化而以肥料品項登記之。(蔡等，2004；黃，2002；謝等，2004)

上述目前已通過登記之枯草桿菌生物農藥，主要有百泰生物科技的台灣寶 (BioBac™)、興農公司的興農寶 (*Bacillus subtilis* Y1336)、沅漢生物科技的金雞牌賜倍效 (*Bacillus subtilis* WG6-14) 等，前兩者登記之防治範圍包括豌豆白粉病、蓮霧果腐病、番荔枝果腐病、胡瓜露菌病、芒果蒂腐病，而後者登記之防治對象則為水稻秧苗徒長病。至於鏈黴菌生物農藥方面則僅有百泰生物科技的安心寶 (BioAid™，純白鏈黴菌素) 一項，其有效成分記載為 *Streptomyces candidus* Y21007-2 整體代謝物效價，而登記之防治對象為木瓜果疫病。上述兩類之外，另有一些市售生物製劑是以肥料品項之型式販售，如福壽公司、台肥等均有生產此類型產品。

二、生物製劑之檢測及其規範

針對微生物農藥，農委會農業藥物毒物試驗所已公告相關之檢測方式，例如根據已公布之「農藥標準規格與檢驗方法」，枯草桿菌之檢驗係依其有效成分，即單位重量或體積中活孢子數標稱含量(CFU) (馮等，2007)。而公告之純白鏈黴菌素檢驗則依每克樣品中相當於 1 μ g 標準品 Borrelidin 之效價(PCU/g)。但對於微生物農藥之外，常見標榜含有拮抗微生物之生物製劑未公告標準之檢測方法。

目前在學理上對於生物製劑拮抗效力之測試方法，主要有對峙培養(dual culture method)、玻璃環法(glass ring method)、田間試驗(field test)等等(劉，1988；謝等，2003)。然而上述方法皆有一些缺點，如對峙培養是以拮抗菌本身對病原菌進行之測試方法，而非完整之生物製劑，且對生長速度較慢之病原菌，測試易有困難且需時較長；而玻璃環法亦有類似缺點；田間試驗則有測試時間更長之缺點(謝等，2003)。

三、鏈黴菌簡介

放線菌普遍存在於自然界中，如土壤、海洋、河川、動物、植物等各種環境均可見其蹤跡，其中土壤之放線菌 90% 以上皆為鏈黴菌屬(*Streptomyces* spp.)(石及黃，2010)。由於鏈黴菌在培養基上能產生具分隔之多核基質菌絲(substrate mycelium)，此基質菌絲可再長出氣生菌絲(aerial mycelium)，其上即著生分生孢子，可耐乾旱、UV 等逆境(Williams *et al.*, 1989)，因此被認為其形態有類似真菌之處，但依其生理生化及細胞特性，因不具有核膜，故仍歸類為細菌。*Streptomyces* 屬之分類地位如下：

Procaryotae(Kingdom)

Firmicutes(Division II)

Streptomycetes(Section 29)

Streptomyces(Genus)

鏈黴菌為革蘭氏陽性菌，DNA 有很高之 G+C 值，好氧氣且耐逆境，目前已為醫學、農業、食品等領域廣泛應用。鏈黴菌因能產生多種抗生物質及酵素，也是現今許多抗生素及酵素的生產菌種來源 (Miyadoh, 1997；Williams *et al.*, 1989)。另外，因其可拮抗多種植物病原，又可產生多種胞外酵素，具有降解多醣類聚合物如幾丁質、纖維素、木質素、澱粉等能力，故被認為是根圈重要微生物，及可保護植物根部以防治重要的多種土壤病害。(Tsujito, 1999；Crawford *et al.*, 1993；Sabaratnam and Traquair, 2002；Water and Kaplan, 1990)

四、研究目的

因國內目前生物製劑產品眾多，藥效及品質參差不齊，甚至常有農民使用自製之生物製劑造成嚴重藥害者(孫等，2009)，而目前檢測藥效之方法十分多元，卻常曠日費時，故本研究擬研究發展建構一快速、對象完整之生物製劑測試系統。此乃本研究之最主要目的。另一方面，因本實驗室近年已分離到具有強效拮抗力之鏈黴菌，故亦併入「快速測試系統」進行驗證，同時探討適當培養基，以利後續之量產及製造。

第二章 前人研究

一、植物病原之生物防治

1914年 C. F. von Tubeuf 針對植物病原首次提出生物防治之概念，係指利用一種或多種生物以降低病原數量或減輕病害者(Baker, 1987)。而根據 De Bach 之定義，生物防治為利用自然界中具捕食性、寄生性、病原性之天敵，將有害生物族群密度壓制在較低狀態，使其不致於造成為害者(De Bach and Rosen, 1991)。

台灣首次有關於生物防治之研究報告，是在 1976 年吳氏提出以 *Eppicoccum nigrum* Link、*Trichoderma harzianum* Rifai、*Aspergillus clavatus* Desm. 等防治小麥及燕麥之種媒病害(Wu, 1976)。其後數十年間，國內陸續有許多生物防治相關之研究，如以 *Bacillus* sp. 及 *T. pseudokoningii* 防治 *Rhizoctonia solani* 造成之馬鈴薯黑痣病(Chu and Wu, 1980)；以 *Gliocladium virens*、*Penicillium oxalicum*、*T. harzianum* 處理甘藍種子以防治十字花科黑斑病(Wu and Lu, 1984)；以 *T. harzianum* 防治 *Sclerotinia sclerotiorum* 造成之向日葵菌核病(Lee and Wu, 1989)；以 *Gliocladium deliquescens* 及 *Paecilomyces marquandii* 防治菊花之 *Rhizoctonia solani* 病害(Tschen et al., 1989)；以 *Bacillus amyloliquefaciens* 防治 *Geotrichum candidum* 造成之胡蘿蔔酸腐病(吳等, 1999)；以 *Pseudomonas putida* 防治甜椒細菌性斑點病(蔡等, 2004)；以 *Streptomyces* sp. RS70 對番茄種子被覆及幼苗澆灌防治青枯病(鄧等, 2006)；以 *B. subtilis* 防治 *Sclerotium rolfsii* 造成之水稻秧苗立枯病(林等, 2008)；及以 *B. cereus* 防治 *Bipolaris maydis* 造成之南方玉米葉枯病(Huang et al., 2010)等。

儘管國內生物防治之研究已歷時數十年並有許多成果，但大多數都是在實驗室、溫室、試驗田下完成，除前言所敘述已登記之生物農藥之外，尚有一些已上市之產品如以 *Streptomyces saraceticus* 為主成分之 LT-M 等，然而真正商品化的產品並不多。

二、拮抗微生物及生物製劑對植物病原防治能力之測試

關於拮抗微生物對病原防治能力之測試，在學理最常用方式為對峙培養(dual culture method)，即將病原真菌及拮抗菌分別接種於培養基兩端再觀察其抑制圈(inhibition zone) (Dhingra and Sinclair, 1995)。

當拮抗微生物經由發酵製成生物製劑後，其防治能力測試常以濾液進行。其對病原真菌之測試方法主要有：(1)孢子發芽檢定法(Spore germination test)、(2)液態培養基檢定法(Assay in liquid medium)、(3)毒食法(Poison food technique)等(劉，1988)。孢子發芽檢定是用載玻片或凹槽玻片測試濾液抑制孢子發芽之能力；液態培養基檢定法則是將濾液和液態培養基混合測試病原生長量(biomass)受抑制之情形；毒食法則是將濾液和培養基混合成固態培養基以測試其生長是否受抑制者(方，1996；劉，1988；Manten *et al.*, 1950)。

而上述生物製劑對病原細菌之測試方法則主要有：(1)濾紙片法(Filter paper disk method)、(2)瓊脂井法(Well-in-agar method)、(3)抑制環檢定法(方，1996；劉，1988)。其濾紙片法之操作，係將病原細菌塗布於培養基表面或接種入半冷卻之培養基後倒平板，係使病原細菌平均分布在培養基，再將含有拮抗菌濾液之濾紙片置於其上，即可觀察病原細菌受抑制產生抑制圈之情形。瓊脂井法亦為類似方法，係以打洞器在培養基上製造出瓊脂井，在其內滴加濾液以取代濾紙片者。而抑制環檢定法則是以外加之不銹鋼或玻璃抑制環取代瓊脂井者(方，1996；劉，1988)。

謝等曾在 2003 年時，針對三支市售枯草桿菌生物製劑進行 *in vitro* 之防治能力測試，其將枯草桿菌藥劑經適當稀釋後製作為固體培養基，並額外添加新黴素硫酸鹽以抑制生物製劑內枯草桿菌生長，再以此含藥劑之培養基培養病原真菌以測試藥劑之防治能力，其結果認為此一類似毒食法之方法可以做為測試生物製劑原體對病原防治能力之有效方式(謝等，2003)。

生物製劑之有效成分並非只有濾液，應還有拮抗微生物本身(謝等，2003)。然而生物製劑原體之測試方式一般以溫室試驗及田間試驗為主，實驗室規模的實驗

則較少被報導。

三、鏈黴菌對植物病害之防治

鏈黴菌在植物病害防治歷史上，最早出現於1943年，Waksman發現 *Streptomyces griseus* 並且從中分離出抗生素 Streptomycin，其後即應用於果樹及蔬菜之細菌性病害防治(Waksman *et al.*, 1946；Fravel, 1988)。

早期鏈黴菌在植物病害防治應用上，多著重在其產生之抗生素部份，如 kasugamycin(嘉賜黴素)及 blasticidin-S(保米黴素)被應用於水稻稻熱病之防治，polyoxin(保粒黴素)及 validamycin(維利黴素)被應用於水稻紋枯病之防治(Prinham *et al.*, 1956)，這些抗生素直到今日仍為水稻稻熱病及紋枯病之用藥。

關於鏈黴菌之生物防治研究亦甚多，列舉部分如下：(1) *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* 可抑制土壤中 *Rhizoctonia solani* 之生長，其產生之 geldanamycin 為主要因素，然而 geldanamycin 亦會影響植物之生長(Rothrock and Gottlieb, 1984)；(2)以 *Streptomyces griseoviridis* 被覆結球白菜種子，可防治種媒病害黑斑病(Valkonen and Koponen, 1990)，而此菌之產品 Mycostop™ 則已知含抗生素 Aromatic heptaene polyenes (AHPs)，可抑制 *Alternaria brassicicola*、*Botrytis cinerea*、*Fusarium culmorum* 等病原菌(Raatikainen *et al.*, 1994)，亦能防治 *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* 造成之康乃馨萎凋病(Lahdenpera, 1987)；(3)以 *S. pulcher*、*S. canescens*、*S. citreofluorescens* 被覆番茄種子可防治 *Fusarium oxysporum*、*Verticillium albo-atrum*、*Alternaria solani*、*Clavibacter michiganensis*、*Pseudomonas solnacearum* 等病原菌之為害(El-Abyad *et al.*, 1993；El-Shanshoury *et al.*, 1996)；(4) *Streptomyces lydicus* WYEC108 可產生 chitinase，能造成 *Pythium* sp.細胞壁瓦解，而 chitinase 被認為是根圈放線菌(rhizosphere-colonizing actinomycete)拮抗病原真菌能力重要的成分(Mahadevan and Crawford, 1997)；(5) *S. padanus* PMS-702 能有效抑制 *Rhizoctonia solani* 造成之甘藍猝倒病，分析其有效物質為 fungichromin(Shih *et*

al.,2003)。

鏈黴菌相關研究發展至今，除了造就眾多抗生素產品之外，目前已有相關生物製劑上市，如荷蘭 Kermira 公司研發之 Mycostop™ (*S. griseoviridis* K61)，是由泥炭土(peat)分離而來，可防治多種植物病害；另外還有美國 Natural Industries 公司之產品 Actinovate™。



第三章 材料與方法

一、針對生物製劑建構快速測試系統

(一) 台灣重要作物病原之挑選(供測之重要作物病原)

為建構快速、對象完整之生物製劑測試系統，本研究需首先挑選台灣地區極具經濟重要性之病原，經共同討論後，本實驗共挑選九種為害作物最烈之病原真菌及三種病原細菌作為建構快速測試系統之標的，其詳細資料如表一。

表 1 快速測試系統供試之九種植物病原真菌及三種病原細菌資料。

Table 1. The nine pathogenic fungi and three pathogenic bacteria for test in rapid bioncontrol testing system.

Species	Source
<i>Alternaria brassicicola</i>	Black spot of crucifers
<i>Botrytis cinerea</i>	Grey mold of strawberry
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Anthraxnose of mango
<i>Fusarium oxysporum</i>	Basal stem rot of <i>Anoectochilus formosanus</i> Hay.
<i>Phytophthora nicotianae</i>	Root rot of lavender
<i>Pythium spinosum</i>	Root rot of lavender
<i>Rhizoctonia solani</i>	Root of lavender
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Sclerotinia rot of crucifers
<i>Sclerotium rolfsii</i>	Root and crown rot of <i>Dendrobium</i> sp.
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	Soft rot of potato
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Bacterial wilt of tomato
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Black rot of crucifers

上述病原真菌部份皆以馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(Potato dextrose agar)於 25°C 下繼代培養；病原細菌部份則以營養瓊脂培養基(Nutrient agar)於 25°C 繼代培養，另外皆參考各病原菌之最佳保存方法予以保存之。

(二) 提供系統驗證之已知生物製劑及製備

本實驗之目的為針對生物製劑設計出快速且對象完整之測試系統，以供未來快速篩檢任一生物製劑是否確實具有拮抗效果。而為測試已建構之快速多元測試系統是否妥適，即以台灣地區已登記為生物農藥之製劑作為驗證製劑，共包括下列三種：(1)台灣寶(BioBac™，枯草桿菌 *Bacillus subtilis* Y1336)，由百泰生物科技產製、(2)金雞牌賜倍效(枯草桿菌 *Bacillus subtilis* WG6-14)，由沅漢生物科技產製、(3)安心寶(BioAid™，純白鏈黴菌素)，亦由百泰生物科技產製。所有上述三種驗證藥劑在測試時，均以 3 克藥劑溶於 12 mL 無菌水配製成五倍稀釋液，即以振盪器在 25°C、200 rpm 下振盪一小時再置於 60°C 水浴 30 分鐘，即以此稀釋液進行後續之實驗。唯若測試成分為代謝產物者，則再以 4000 rpm 離心一小時，取上清液，經 0.22 μm 之 millipore 過濾，得到之濾液即為代謝產物之五倍稀釋液。

(三) 以三分格毒食法建構拮抗九種病原真菌之快速測試系統

三分格毒食法是參考 Dhingra 及 Sinclair(1995)所著 Basic Plant Pathology Method, 2nd ed.之方法，使用三分格培養皿，每一培養皿可測三個對象，故可節省耗材、提升效率。本研究第一階段即先利用此一系統，針對表一所列九種真菌，建構拮抗九種病原真菌之快速測試系統。

本方法係取馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(Potato dextrose agar, PDA)經過滅菌後，冷卻至 50°C，即以微量吸管將三種驗證藥劑即台灣寶、賜倍效或純白鏈黴菌素之代謝產物五倍稀釋液加入，使最終藥劑稀釋倍數分別為 125、250、500、1000、2000、4000 倍等，另以未添加藥劑者做為對照組。即將含有不同藥劑濃度之 PDA 分別倒入三分格培養皿中，待凝固後，即將在 PDA 培養五到七天之九種病原真菌，以打洞器在菌落邊緣切取直徑 4 mm 之菌絲塊，分別接種在上述不同藥劑濃度之三分格培養皿邊緣，每一皿內之三格各接種不同真菌，每處理三重複，再於 25°C 下培養二至八天，待對照組長滿該分格後量測、記錄其拮抗抑制率，抑制率為：

(對照組菌落半徑－實驗組菌落半徑)/ 對照組菌落半徑

為達成以三個三分格培養皿即可快速測試九種不同病原真菌之目的，乃將九種病原真菌依據其生長速度之快慢分為三組，分別是腐霉菌、立枯絲核菌、白絹病菌之快長組，其生長速度最快，約兩天可得結果；其次為灰黴病菌、炭疽病菌、菌核病菌之中速組，約四至五天可得結果；第三是鏈隔孢菌、鐮孢菌、疫病菌組合之慢長組，生長速度最慢，約七至八天方可得結果。

(四) 以三分格抑制環法建構拮抗十二種病原之快速測試系統

因上述三分格毒食法雖可供建構拮抗九種病原真菌之快速測試系統，但對剩餘之三種病原細菌仍難以納入，故即研究改良此一三分格培養皿，成為三分格抑制環法(3-way ring-plate method)。

此一三分格抑制環，係將三分格培養皿在無菌操作下事先以烙鐵在正中央融化約 1 cm 直徑之缺口，在倒入已滅菌之 PDA 培養基後，即在中央缺口處放入長 10 mm 內徑 6 mm 之不鏽鋼抑制環，再以微量吸管在抑制環內加入驗證藥劑如台灣寶 100 倍、賜倍效 25 倍或純白鏈黴菌素 100 倍等之全藥劑稀釋液 100 μ L，另以加入無菌水者為對照組。

以本方法測試九種病原真菌之拮抗時，係將九種病原真菌之菌絲塊接種至培養皿邊緣，每三皿內之三分格各接種三種生長速度相近之真菌，各進行三重複，於 25 $^{\circ}$ C 下培養二至八天，待對照組長滿該分格後即分別量測、記錄其抑制圈，抑制圈為實驗組菌落邊緣至抑制環之距離或其他意義相同之抑制率。

以本法測試三種病原細菌之拮抗時，係將表一之軟腐病菌、青枯病菌、黃單胞菌分別以營養瓊脂(NA)培養 24、24、36 小時後，即以移植環刮取菌落溶於無菌水中，調整菌落濃度分別至 10^7 、 10^7 、 10^8 cfu/mL，將長 3 cm 寬 5 mm 之滅菌濾紙條浸吸細菌液，再以鑷子夾取帶菌濾紙條由中向外平貼於三分格中線區，輕壓後移

除，如此可均勻接種病原細菌，且每一皿內之三格可各接種不同細菌，每測試皆取三重複，並於室溫下培養 36 小時後，量測、記錄其抑制圈，該抑制圈為細菌菌落邊緣至抑制環之距離。

二、針對生物製劑代謝產物或全製劑建構測試系統

如前所述生物製劑如帶有活菌或菌體可稱為全製劑，如濾除活菌或菌體可稱為代謝產物。本研究為在快速測試系統建立後，進一步為測試生物製劑之拮抗機制，乃建構進一步之測試系統，包括對代謝物測試拮抗之部分以及對全製劑測試拮抗之部分。

(一) 以瓊脂膜法測試生物製劑代謝產物抑制孢子發芽率

本法係針對較易產孢，可以孢子發芽率測試之病原真菌，建構其測試系統。依表 1 之九種病原真菌中可取鏈隔孢菌、灰黴病菌、炭疽病菌、鐮孢菌四種建構一測試系統。

上述鏈隔孢菌、灰黴病菌、炭疽病菌、鐮孢菌等各在 PDA 培養基上培養兩週後，以無菌水洗下孢子，配入已經高溫高壓滅菌(121°C，25 分鐘)之馬鈴薯葡萄糖培養基(Potato dextrose broth, PDB)中，調整最終孢子濃度至約 1000 個/ mL，另配 2%水瓊脂培養基(Water agar, WA)滅菌，待冷卻至 50°C 後，和前述 PDB 之孢子懸浮液以等比例混合後，倒平板得厚度約 2 mm 含孢子之瓊脂膜，以 1 cm 打洞器壓出直徑 1 cm 之小瓊脂膜塊備用。

本法之驗證藥劑係取台灣寶、純白鏈黴菌素二者之代謝產物五倍稀釋液，以無菌水稀釋至 125、500、2000、8000 倍，即以滴管滴加在載玻片上使成直徑約 8 mm 之液滴，另以滴加無菌水者作為對照組，待風乾後，即將前述之直徑 1 cm 含孢子之瓊脂膜塊置於藥劑乾滴上，於室溫下及飽和濕室中培養 18 小時，觀察發芽率。其發芽率為 100 顆孢子中已發芽孢子之數量，每處理各二重複。

(二) 以玻璃紙法測試生物製劑全藥劑抑制生長率

玻璃紙法乃是將生物製劑融入 PDA 中，其上平放滅菌玻璃紙，可直接用以測試對九種病原真菌之生長抑制。

本法之步驟係取 PDA 經過滅菌，冷卻至 50°C 時，即以微量吸管將驗證藥劑如台灣寶或賜倍效之全藥劑五倍稀釋液加入，使 PDA 內最終藥劑稀釋倍數分別為 125、250、500、1000、2000、4000 倍，另以未添加藥劑者做為對照組。將各組皆倒入 5.5 cm 之小型培養皿中，待凝固後即在培養基上放置直徑 5.5 cm 之滅菌玻璃紙。如上述接種九種病原真菌之菌絲塊於小型培養皿中央，每處理各三重複，並於 25°C 下培養二至八天，待對照組長滿培養皿後，量測、記錄其抑制率，抑制率為：

$$(\text{對照組菌落半徑} - \text{實驗組菌落半徑}) / \text{對照組菌落半徑}$$

(三) 以雙層培養基法測試生物製劑全藥劑抑制生長率

雙層培養基法係將生物製劑融入不含養份之 WA，避免含藥培養基內拮抗菌的生長影響實驗結果，並且在其上添加第二層 PDA 以供病原菌之正常生長。

本法之步驟為取 WA 經過滅菌後，冷卻至 50°C，以微量吸管將驗證藥劑如台灣寶或賜倍效之全藥劑五倍稀釋液加入，使 WA 內最終藥劑稀釋倍數分別為 250、1000、4000 倍，另以未添加藥劑者做為對照組。將含有不同藥劑濃度之 WA 分別倒入 9 cm 培養皿中，待凝固，在其上放置厚度 2 mm，直徑 3 cm 或 5.5 cm 之 PDA 片各三片及一片。如上述實驗接種九種病原真菌(表 1)之菌絲塊在 PDA 片中央，每處理三重複，25°C 下培養二至五天，待對照組長滿 PDA 片之後記錄抑制率，抑制率為：

$$(\text{對照組菌落半徑} - \text{實驗組菌落半徑}) / \text{對照組菌落半徑}。$$

三、本實驗室分離鏈黴菌之培養及拮抗能力驗證

(一) 鏈黴菌來源及鑑定

本實驗使用之鏈黴菌菌株係由本實驗室分離自花蓮玉里之水稻田，此菌株經食品工業發展研究所鑑定後，暫名為 *Streptomyces* sp. YU-01。

該所係以生理生化鑑定方法法發現 YU-01 菌株之細胞壁胺基酸及全細胞糖類成份分別為 L-二氨基庚二酸(L-diaminopimelic acid, L-DAP)及 glucose，故根據 Lechevalier 等人之分類，應屬於 Chemotype IC 型，由此判斷其為 *Streptomyces* 屬。

本菌在 30°C 下培養，其在 ISP2(International Streptomyces Project Medium)、ISP3、ISP4 培養基上均可正常生長及產孢，其在 ISP2 及 ISP3 培養基上之營養菌絲呈深黃灰色，氣生菌絲則為淺灰褐色；在 ISP4 培養基上之營養菌絲呈淺灰褐色，氣生菌絲亦為淺灰褐色。又此菌株不會產生黑色素。以掃描式電子顯微鏡觀察 YU-01，發現其孢子鏈生呈螺旋狀排列，孢子數目約 20 至 50 個，表面光滑。

YU-01 經鑑定可利用的醣類有：cellobiose、glucose、mannitol、fructose、xylose；另可分解 adenine、casein、hypoxanthine、milk coagulation、milk peptonization、starch、tyrosine、urea 及 esculin。

根據以上結果，並參考 16S rRNA 全長度基因序列比對結果，此菌株接近 *S. anadii*、*S. geysiriensis*、*S. carpinensis*、*S. capillispiralis* 等菌，然而比對其生理生化特性及型態特徵後，發現有多處不同，無法確認種名，因此鑑定為 *Streptomyces* sp.。

(二) 鏈黴菌 YU-01 對九種重要病原真菌之拮抗測試

鏈黴菌 YU-01 以 PDA 平板培養五至七天後，即以移植環沾取菌落，於另一批 PDA 平板上距離邊緣 1 cm 處畫一條線，長約 4 cm，預先培養 3 天後，於另一側距邊緣 1 cm 處接種九種病原真菌(表 1)之 5 mm 菌絲塊後進行對峙培養，以未接種 YU-01 者為對照組，每處理三重複，等培養至對照組長滿之後即量測、記錄其抑制圈，抑制圈為病原菌落邊緣至 YU-01 菌落邊緣之距離。

(三) 以天然資材培養鏈黴菌 YU-01 之成效測試

為求未來之擴大培養鏈黴菌 YU-01，以應用於田間之生物防治，乃選擇台灣地區易取得、價廉之物質，進行培養成效之測試，並探討 YU-01 適合之營養及其條件。

本項初步選取燕麥、高粱、米糠、黃豆、黑豆、紅豆等共六種五穀雜糧類進行測試，皆先研磨成粉末之後，各取 1.5g 和 50 mL 蒸餾水混勻，倒入 250 mL 錐形瓶內，另外配製 50 mL 之 ISP4 培養液(可溶性澱粉 10.0g、 K_2HPO_4 1.0g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0g、NaCl 1.0g、 $(NH_4)_2SO_4$ 2.0g、 $CaCO_3$ 2.0g 及微量鹽溶液 1 mL、1L 蒸餾水，瓊脂 14.0g。微量鹽溶液： $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g、 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.1g、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g，溶於 100 mL 蒸餾水。)，滅菌之後備用。

上述鏈黴菌 YU-01 以 PDA 培養五至七天後，即以無菌水洗下孢子，調整濃度至 1.6×10^8 cfu/ mL 之後，以微量吸管吸取此一菌液每錐形瓶接種 500 μ L，使每瓶初始濃度為 1.6×10^6 cfu/ mL，每處理兩重複。置於定溫箱以 30°C，120 rpm 之搖瓶振盪培養，並自第三天起直到第七天，每日收集 4 mL 培養液，各以 4000 rpm 離心 15 分鐘，再以孔徑 0.45 μ m 之 millipore 過濾而得培養濾液。於 9 cm 之 PDA 平板兩側距邊緣 1.5 cm 處放上抑制環，其內以微量吸管加入 100 μ L 培養濾液，中央接種 4 mm 之腐霉菌菌絲塊，每處理兩重複，室溫下培養一天之後測量抑制圈。

(四) 以天然資材額外添加鹽類培養鏈黴菌 YU-01 之成效測試

為求未來廣泛之應用，乃在上一項完成後，進行天然資材額外添加營養鹽類之培養測試。本項係取上一項中效果較佳之米糠、紅豆二種資材來進行，皆將其研磨成粉末之後，取 1.5g 和 50 mL 蒸餾水混勻，倒入 250 mL 錐形瓶內，額外加入花寶三號(台和園藝企業股份有限公司)0.25 g。另配製 ISP4 之鹽溶液 50 mL，加入 1.5 g 之米糠或紅豆，作為另一處理。而以無添加其他物質者之 3% 米糠或紅豆培養液為對照組。上述各組皆滅菌後接種 YU-01 孢子液至初始濃度為 1.6×10^6 cfu/ mL，

每處理兩重複。置於定溫箱以 30°C，120 rpm 之搖瓶振盪培養，並自第三天起直到第七天，每日收集 4 mL 培養液以 4000 rpm 離心 15 分鐘再以 0.45 µm 之 millipore 過濾而得培養濾液。其後測試方式同上述。

(五) 以鏈黴菌 YU-01 發酵物進行多元快速測試系統之驗證

因初步測試本實驗室分得之鏈黴菌 YU-01 對多數病原真菌具有拮抗效果，故反過來以此 YU-01 發酵液進行前述所建構之「多元快速測試系統」之驗證。本項係取 YU-01 之 3% 紅豆 7 天發酵液，進行對九種病原真菌及三種病原細菌之防治能力測試，其培養及測試方法皆同前述，而測試系統為使用三分格抑制環法者。

四、對其他市售生物製劑拮抗能力之測試應用及驗證

(一) 測試對象即市售生物製劑之取得及製備

此項實驗係在前述「多元快速測試系統」建構完成後，實際應用於針對市售生物製劑進行測試，以了解該等實際產品是否確有拮抗防治能力之效能，所取得之市售生物製劑四種，為避免影響商業利益故隱匿其商品名而改為編號 B01~B04，其中 B01 來自台灣瓦克國際股份有限公司，B02 來自福壽實業，B03 來自益祿發生物科技，B04 來自新合發聯合股份有限公司，其相關公示資料列如表 2。其配製方法皆如前述。

表 2 市售生物製劑之編號及其相關資料。

Table 2. The information of biocontrol agents for test.

Number	Manufacturer	Active ingredient
B01	Walker Grow-rite International Co., Ltd.	Lactobacillus, yeasts, <i>Bacillus subtilis</i> natto
B02	Fwusow Industry Co., Ltd.	Fluorescent pseudomonads、 <i>Trichoderma</i> sp.
B03	T168 bio-technique Co., Ltd.	Actinomycetes
B04	Sing For Far Co., Ltd	Lactobacillus, yeasts, actinomycetes, photosynthetic bacteria

(二) 以多元快速測試系統測試市售生物製劑抑制病原能力

上述四種市售生物製劑 B01~B04，皆以無菌水稀釋之，分別為 B01 之 10 倍、B02 之 50 倍、B03 之 50 倍、B04 之 50 倍。其後測試方法皆如上述三分格抑制環法，唯因 B02 內含木黴菌，因此未用於測試三種病原細菌。



第四章 結果

一、針對生物製劑建構快速測試系統

(一) 以三分格毒食法建構拮抗九種病原真菌之快速測試系統

本項係以三分格毒食法分別以三種驗證藥劑，即台灣寶(枯草桿菌)、賜倍效(枯草桿菌)、純白鏈黴菌素等之代謝產物測試對九種病原真菌生長之抑制率，其具代表性之結果如圖 1、圖 2 及圖 3 所示。由圖 1 可知台灣寶(枯草桿菌)僅在鏈隔孢菌部分有較為明顯之抑制率，在 250 倍稀釋時抑制率可達到 0.75。賜倍效(枯草桿菌)亦僅對鏈隔孢菌有較為明顯之抑制率，在 125 倍稀釋時抑制率可達到 0.82(圖 2)。然而兩藥劑之代謝產物對於其餘病原真菌均無明顯抑制率，甚至有輕微促進鐮孢菌、疫病菌之生長結果產生。純白鏈黴菌素則是對疫病菌、腐霉菌有極好的抑制效果，在 1000 稀釋倍數時，抑制率即可達 0.84 及 0.77(圖 3)。

為達成以三個三分格培養皿即可快速測試九種不同病原真菌之目的，乃將九種病原真菌依據其生長速度之快慢分為三組，分別是腐霉菌、立枯絲核菌、白絹病菌之快長組，其生長速度最快，約兩天可得結果；其次為灰黴病菌、炭疽病菌、菌核病菌之中速組，約四至五天可得結果；第三是鏈隔孢菌、鐮孢菌、疫病菌組合之慢長組，生長速度最慢，約七至八天方可得結果。(圖 4 及圖 5)。由此一建構成對九種病原真菌之快速測試系統成效頗佳。其主要優點有：(1)一次三皿即可供測試九種重要病原真菌之拮抗測試。(2)約八天即可完成對九種病原之抗性篩選。(3)可具節省資材及時間之效果。

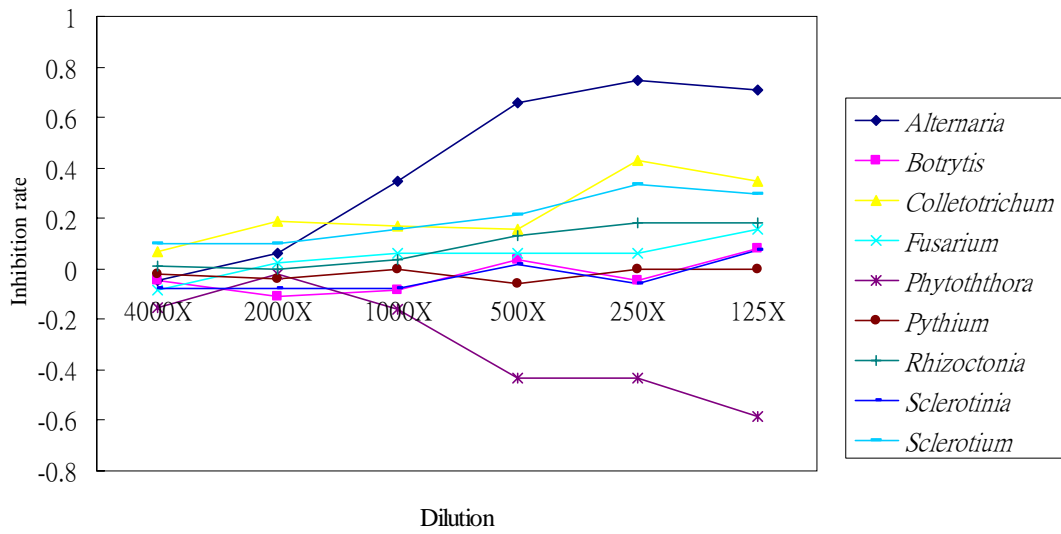


圖 1、驗證藥劑台灣寶代謝產物不同濃度對九種病原真菌之生長抑制率，使用方法為三分格毒食法。

Figure 1. The inhibitory rates of nine pathogenic fungi by the filtrate of verifying biopesticide BioBac™, using Y-plate poison food method.

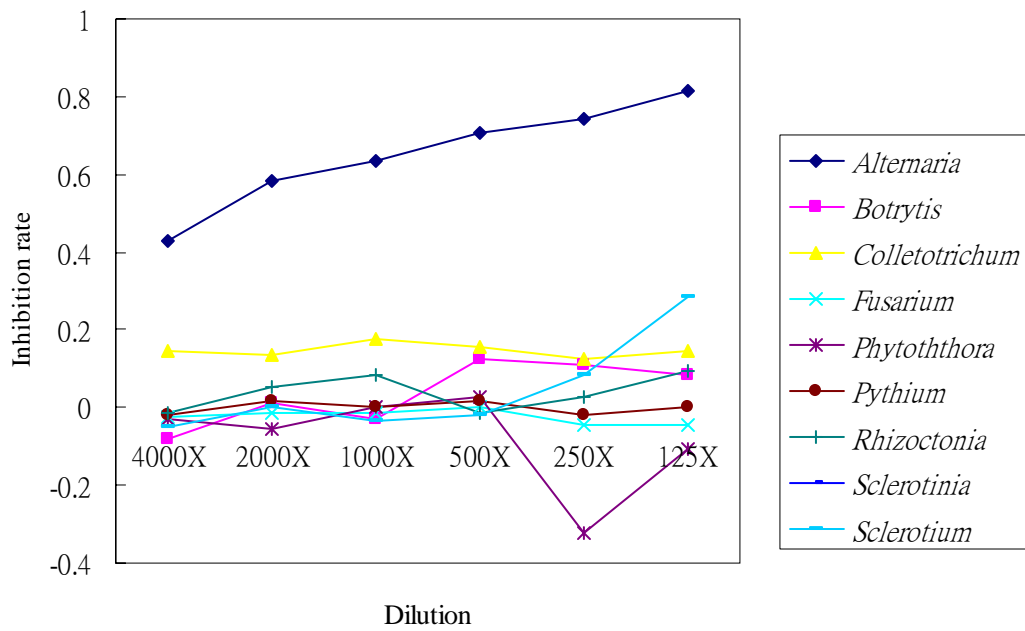


圖 2、驗證藥劑賜倍效代謝產物不同濃度對九種病原真菌之生長抑制率，使用方法為三分格毒食法。

Figure 2. The inhibitory rates of nine pathogenic fungi by the filtrate of verifying biopesticide Tsz bei shiau, using Y-plate poison food method.

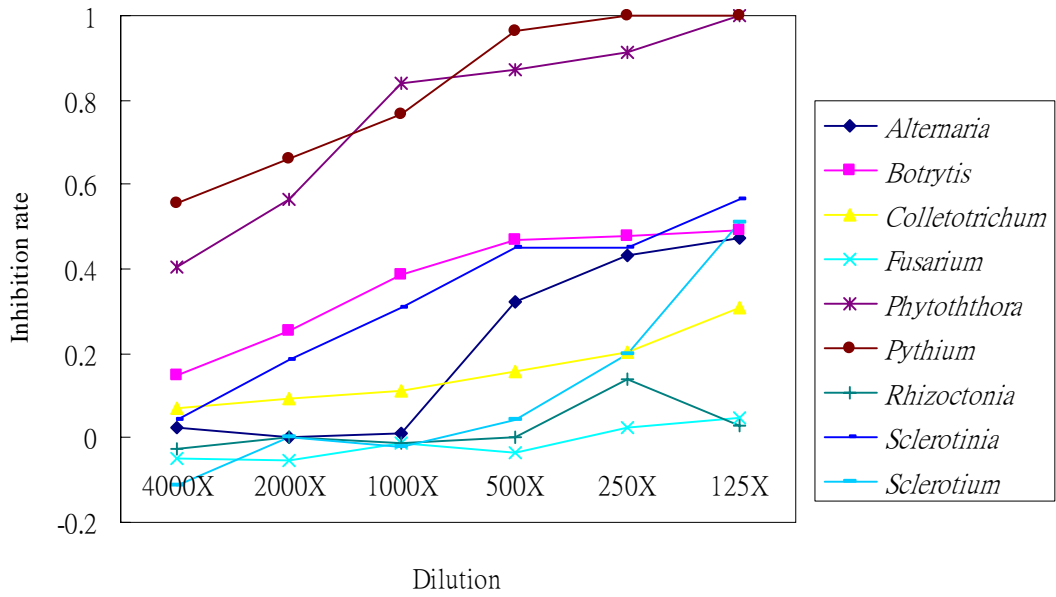


圖 3、驗證藥劑純白鏈黴菌素代謝產物不同濃度對九種病原真菌之生長抑制率，使用方法為三分格毒食法。

Figure 3. The inhibitory rates of nine pathogenic fungi by the filtrate of verifying biopesticide BioAid™, using Y-plate poison food method.

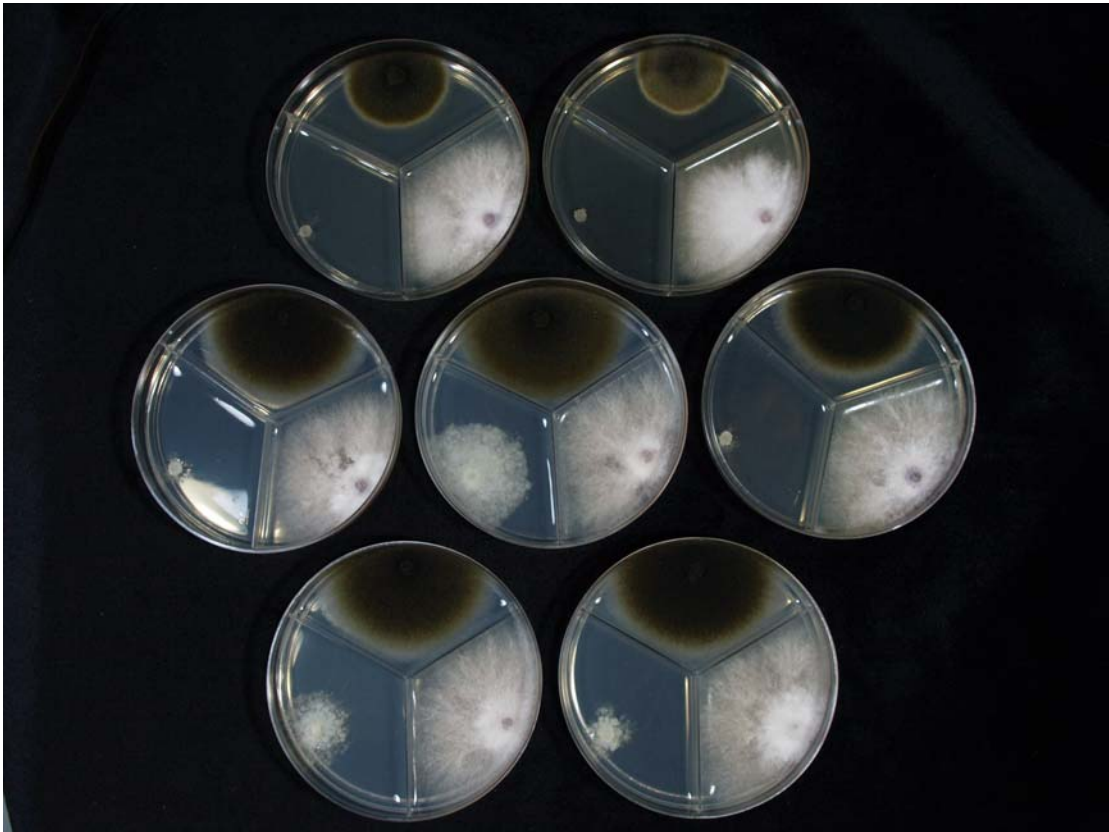


圖 4、驗證藥劑純白鏈黴菌素代謝產物不同濃度對三種慢長菌之生長抑制結果，使用方法為三分格毒食法，圖片中每皿之正上方格為鏈格孢菌、右下格為鐮孢菌、左下格為疫病菌，由左至右由上至下之三分格內藥劑稀釋倍數分別為 125、250、500、0(control)、1000、2000、4000 倍。

Figure 4. The suppression of three slow-growing fungi by the filtrate of verifying biopesticide BioAid™, using Y-plate poison food method. In each plate, the upper pathogen is *Alternaria* sp., the lower-right is *Fusarium* sp., and the lower-left is *Phytophthora* sp. From upper left to lower right, the dilutions are 125x, 250x, 500x, 0(control), 1000x, 2000x, 4000x, respectively.



圖 5、驗證藥劑純白鏈黴菌素代謝產物不同濃度對三種中速菌之生長抑制結果，使用方法為三分格毒食法，圖片中每皿之正上方格為灰黴病菌、右下格為菌核病菌、左下格為炭疽病菌，由左至右由上至下之三分格內藥劑稀釋倍數分別為 125、250、500、0(control)、1000、2000、4000 倍。

Figure 4. The suppression of three moderate-growing fungi by the filtrate of verifying biopesticide BioAid™, using Y-plate poison food method. In each plate, the upper pathogen is *Botrytis* sp., the lower-right is *Sclerotinia* sp., and the lower-left is *Colletotrichum* sp., From upper left to lower right, the dilutions are 125x, 250x, 500x, 0(control), 1000x, 2000x, 4000x, respectively.

(二) 以三分格抑制環法建構拮抗十二種病原菌之快速測試系統

因上一項三分格毒食法確可一次測試九種病原真菌之拮抗，僅對剩餘三種細菌仍有測試之困難，故改良此一三分格培養皿，使成為中央三通之三分格抑制環法(3-way ring-plate method)。為驗證此一拮抗十二種病原菌之快速測試系統，乃取三種驗證藥劑即台灣寶(枯草桿菌)、賜倍效(枯草桿菌)、純白鏈黴菌素之全藥劑，經適當稀釋後測試對九種病原真菌及三種病原細菌生長之抑制圈，其代表性之結果如表 3、表 4 及圖 6、圖 7 所示。其中台灣寶(枯草桿菌)對鏈隔孢菌及炭疽病菌有較為明顯之抑制率，其抑制圈為 0.45 及 0.4 公分。賜倍效(枯草桿菌)則對鏈隔孢菌、灰黴病菌、炭疽病菌、鐮孢菌、疫病菌有較為明顯之抑制率，抑制圈分別為 0.58、0.57、0.73、0.36、0.64 公分。純白鏈黴菌素則是對疫病菌有極好的抑制效果，抑制圈高達 1.52 公分，並且對鏈隔孢菌、炭疽病菌、腐霉菌也分別有 0.58、0.65、0.54 公分之抑制圈。

而在細菌方面亦以三分格抑制環法分別對三種驗證藥劑即台灣寶(枯草桿菌)、賜倍效(枯草桿菌)、純白鏈黴菌素之全藥劑進行測試細菌生長之抑制圈，其結果如表 4 及圖 7 所示。由此代表性之結果可知，三支藥劑對軟腐病菌皆無抑制效果，而台灣寶(枯草桿菌)、賜倍效(枯草桿菌)則對青枯病菌及黃單胞菌有 0.6 cm 以上之抑制圈。細菌之三分格抑制環法為了一次能測試不同細菌，故採用中央三通之三分格進行，約 36 小時之後即可產生清晰之抑制圈以供判定(圖 11)。

三分格抑制環法為達成以一個三分格培養皿即可快速測試三種不同病原菌之目的，亦和上述三分格毒食法有相同的設計，即將九種病原真菌依據其生長速度快慢分為三組，在七至八天後可得全部結果(圖 8、圖 9、圖 10)。

由以上三分格抑制環法一次可快速驗證三種驗證藥劑對十二種病原之拮抗能力，在現階段應已達成本研究之主要目的。而其具體優點有：

- (1) 耗材一次四皿可供測試十二種主要病原之拮抗。
- (2) 約八日內可完成完整之測試。

(3)操作簡單、容易。

(4)據有未來開發成測試專用商品之潛力。

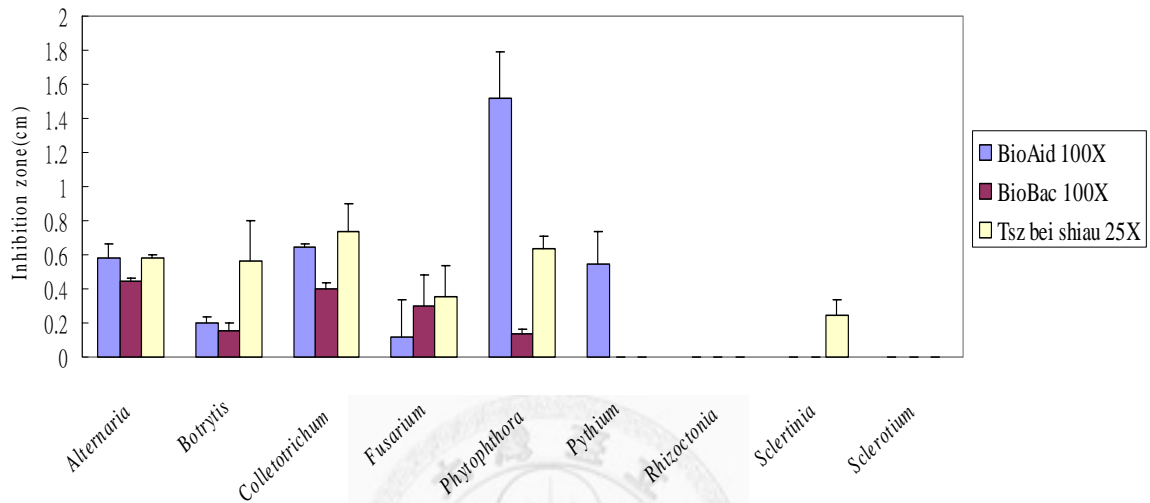


圖 6、以多元快速測試系統對三種驗證藥劑測試其對九種病原真菌之拮抗結果，使用方法為三分格抑制環法，三種藥劑分別為純白鏈黴菌素、台灣寶(枯草桿菌)、賜倍效(枯草桿菌)。

Figure 6. The inhibition zone of nine pathogenic fungi by three verifying biopesticides using the rapid biocontrol testing system(3-way ring-plate method). The three biopesticides are BioAidTM, BioBacTM, and Tsz bei shiau.

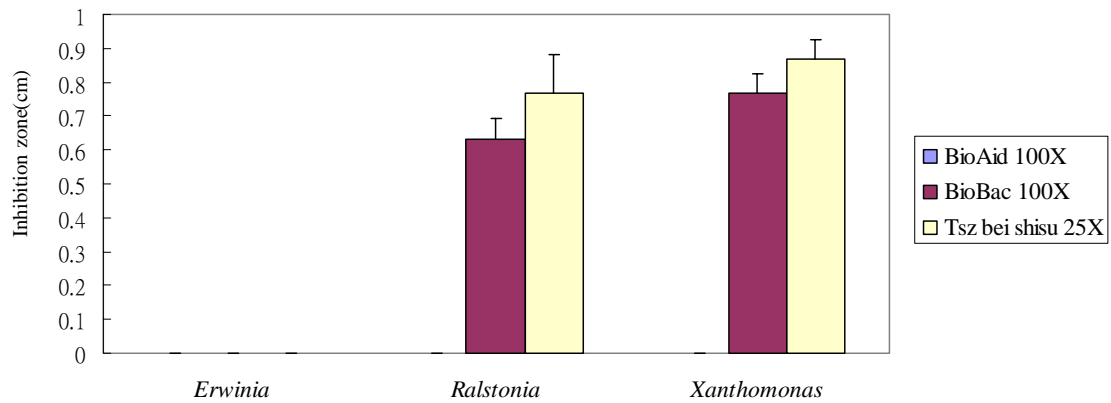


圖 7、以多元快速測試系統對三種驗證藥劑測試其對三種病原細菌之拮抗結果，使用方法為三分格抑制環法，三種藥劑分別為純白鏈黴菌素、台灣寶(枯草桿菌)、賜倍效(枯草桿菌)。

Figure 7. The inhibition zone of three pathogenic bacteria by three verifying biopesticides using the rapid biocontrol testing system(3-way ring-plate method). The three biopesticides are BioAidTM, BioBacTM, and Tsz bei shiau.

表 3 以快速測試系統三分格抑制環法測試三種驗證藥劑對九種病原真菌之拮抗結果。三種驗證藥劑分別為純白鏈黴菌素、台灣寶(枯草桿菌)、賜倍效(枯草桿菌)。

Table 3. The inhibition results of nine pathogenic fungi by three verifying biopesticides using the rapid biocontrol testing system(3-way ring-plate method). The three biopesticides are BioAid™, BioBac™, and Tsz bei shiau.

Pathogens	Inhibition zone(cm)*		
	BioAid™ 100X	BioBac™ 100X	Tsz bei shiau 25X
<i>Alternaria</i>	0.58±0.08 ^{b**}	0.45±0.02 ^a	0.58±0.02 ^a
<i>Botrytis</i>	0.20±0.05 ^c	0.15±0.07 ^c	0.57±0.24 ^a
<i>Colletotrichum</i>	0.65±0.02 ^b	0.4±0.05 ^{ab}	0.73±0.24 ^a
<i>Fusarium</i>	0.12±0.21 ^c	0.30±0.19 ^b	0.36±0.18 ^b
<i>Phytophthora</i>	1.52±0.28 ^a	0.13±0.03 ^c	0.64±0.07 ^a
<i>Pythium</i>	0.54±0.19 ^b	0 ^d	0 ^c
<i>Rhizoctonia</i>	0 ^c	0 ^d	0 ^c
<i>Sclerotinia</i>	0 ^c	0 ^d	0.25±0.12 ^b
<i>Sclerotium</i>	0 ^c	0 ^d	0 ^c

*此抑制圈之結果乃各種病原菌之對照組長滿該三分格時測量所得，此時對照組菌落半徑均為 2.8 cm。

**依據最小顯著差異法(least significant difference)檢定，英文字母相同者表示兩者間無顯著差異。

表 4 以快速測試系統三分格抑制環法測試三種驗證藥劑對三種病原細菌之拮抗結果。三種驗證藥劑分別為純白鏈黴菌素、台灣寶(枯草桿菌)、賜倍效(枯草桿菌)。

Table 4. The inhibition results of three pathogenic bacteria by three verifying biopesticides using the rapid biocontrol testing system(3-way ring-plate method). The three biopesticides are BioAidTM, BioBacTM, and Tsz bei shiau.

Pathogens	Inhibition zone (cm)		
	BioAid TM 100X	BioBac TM 100X	Tsz bei shiau 25X
<i>Erwinia</i>	0	0 ^{c*}	0 ^b
<i>Ralstonia</i>	0	0.63±0.06 ^b	0.77±0.12 ^a
<i>Xanthomonas</i>	0	0.77±0.06 ^a	0.87±0.07 ^a

*依據最小顯著差異法(least significant difference)檢定，英文字母相同者表示兩者間無顯著差異。



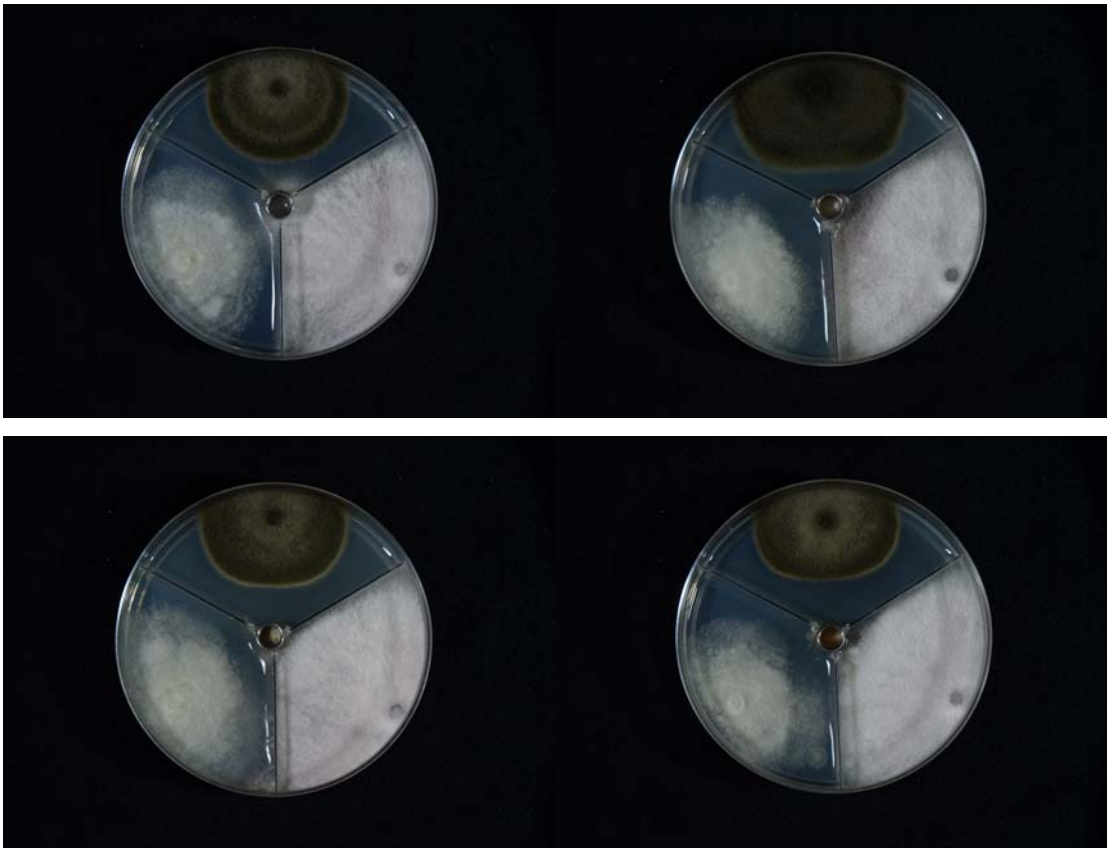


圖 8、以多元快速測試系統對三種驗證藥劑測試其對慢長菌組之拮抗情形，三種藥劑分別為純白鏈黴菌素(右上)、台灣寶(左下)、賜倍效(右下)，左上為對照組。每三分格之正上為鏈格孢菌，左下為疫病菌，右下為镰孢菌。

Figure 8. The inhibition zone of three slow-growing fungi by three verifying biopesticides using the rapid biocontrol testing system(3-way ring-plate method). The three biopesticides are BioAid™ (upper right), BioBac™ (lower left) , and Tsz bei shiau(lower right). In each plate, the upper pathogen is *Alternaria* sp., the lower-right is *Fusarium* sp., and the lower-left is *Phytophthora* sp.

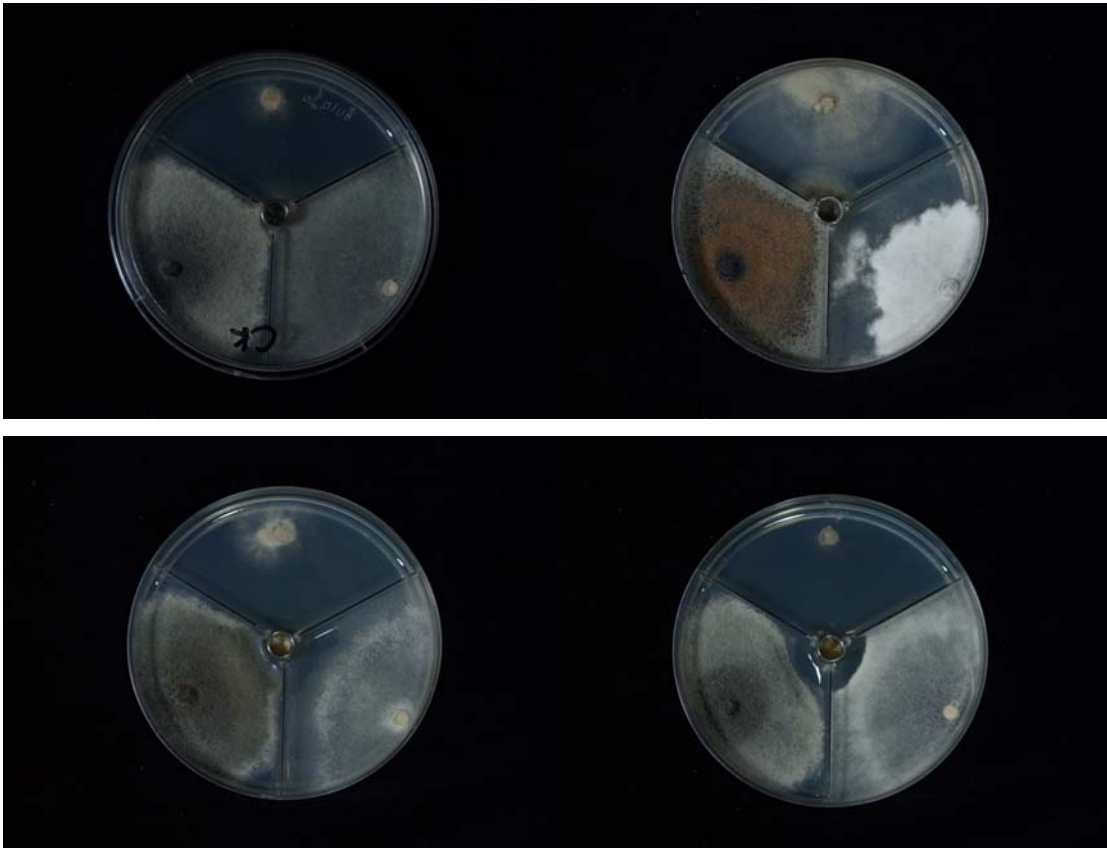


圖 9、以多元快速測試系統對三種驗證藥劑測試其對中速菌組之拮抗情形，三種藥劑分別為純白鏈黴菌素(右上)、台灣寶(左下)、賜倍效(右下)，左上為對照組。每三分格之正上為灰黴病菌，左下為炭疽病菌，右下為菌核病菌。

Figure 9. The inhibition zone of three moderate-growing fungi by three verifying biopesticides using the rapid biocontrol testing system(3-way ring-plate method). The three biopesticides are BioAid™ (upper right), BioBac™ (lower left) , and Tsz bei shiau(lower right). In each plate, the upper pathogen is *Botrytis* sp., the lower-right is *Sclerotium* sp., and the lower-left is *Colletotrichum* sp.

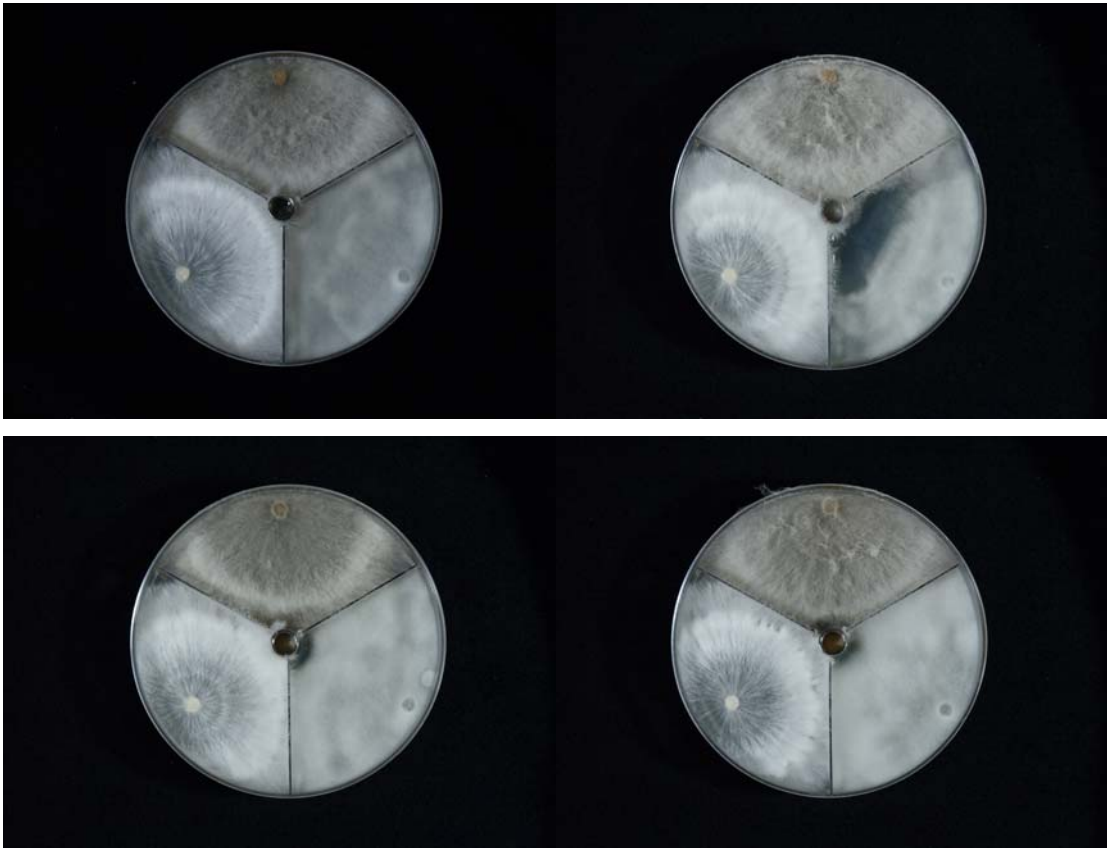


圖 10、以多元快速測試系統對三種驗證藥劑測試其對快長菌組之拮抗情形，三種藥劑分別為純白鏈黴菌素(右上)、台灣寶(左下)、賜倍效(右下)，左上為對照組。每三分格之正上為立枯絲核菌，左下為白絹病菌，右下為腐霉菌。

Figure 10. The inhibition zone of three fast-growing fungi by three verifying biopesticides using the rapid biocontrol testing system(3-way ring-plate method). The three biopesticides are BioAid™ (upper right), BioBac™ (lower left) , and Tsz bei shiau(lower right). In each plate, the upper pathogen is *Rhizoctonia* sp., the lower-right is *Pythium* sp., and the lower-left is *Sclerotinia* sp.

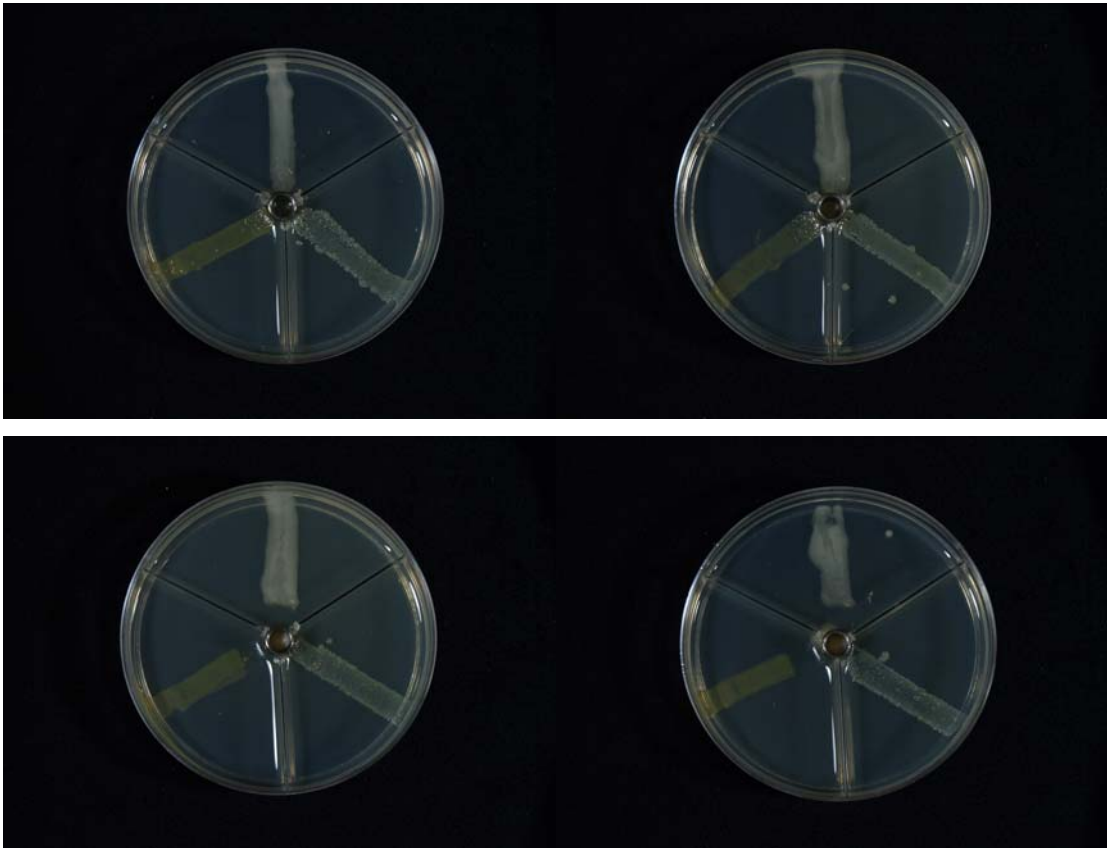


圖 11、以多元快速測試系統對三種驗證藥劑測試其對三種病原細菌之拮抗情形，三種藥劑分別為純白鏈黴菌素(右上)、台灣寶(左下)、賜倍效(右下)，左上為對照組。每三分格之正上為青枯病菌，左下為黃單胞菌，右下為軟腐病菌。

Figure 11. The inhibition zone of three pathogenic bacteria by three verifying biopesticides using the rapid biocontrol testing system(3-way ring-plate method). The three biopesticides are BioAid™ (upper right), BioBac™ (lower left) , and Tsz bei shiau(lower right). In each plate, the upper pathogen is *Ralstonia* sp., the lower-right is *Erwinia* sp., and the lower-left is *Xanthomonas* sp.

二、針對生物製劑代謝產物或全製劑建構測試系統

(一)以瓊脂膜法測試生物製劑代謝產物抑制孢子發芽率

本法係針對易產孢且可以孢子發芽率測試之病原真菌，建構其測試系統。依表 1 之九種病原真菌中可取鏈隔孢菌、灰黴病菌、炭疽病菌、鐮孢菌四種進行測試。

本項為了解生物製劑代謝產物對能產孢病原孢子發芽之抑制能力，乃以二種驗證藥劑，即台灣寶(枯草桿菌)及純白鏈黴菌素之代謝產物分別測試對於鏈隔孢菌、灰黴病菌、炭疽病菌、鐮孢菌等四種孢子發芽率之影響，其結果如圖 12 及圖 13 所示，其與對照組之發芽率比較後可知，兩藥劑均無法降低四種孢子之發芽率，甚至有些反使其發芽率較對照組為高，故由此證明上述二種生物製劑之代謝物對病原真菌孢子之發芽並無抑制能力。

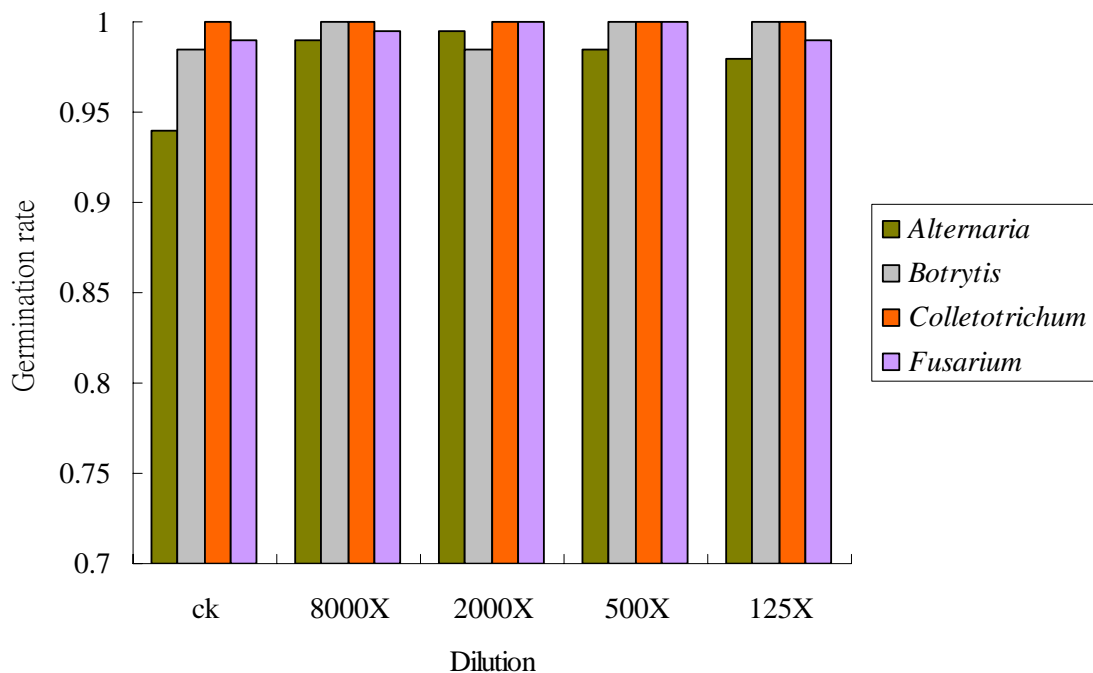


圖 12、驗證藥劑台灣寶(枯草桿菌)代謝產物不同濃度對產孢菌鏈隔孢菌、灰黴病菌、炭疽病菌、鐮孢菌孢子發芽率之影響。

Figure 12. The inhibition results of four sporulating pathogens, *Alternaria* sp., *Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., by the filtrate of verifying biopesticide BioBac™.

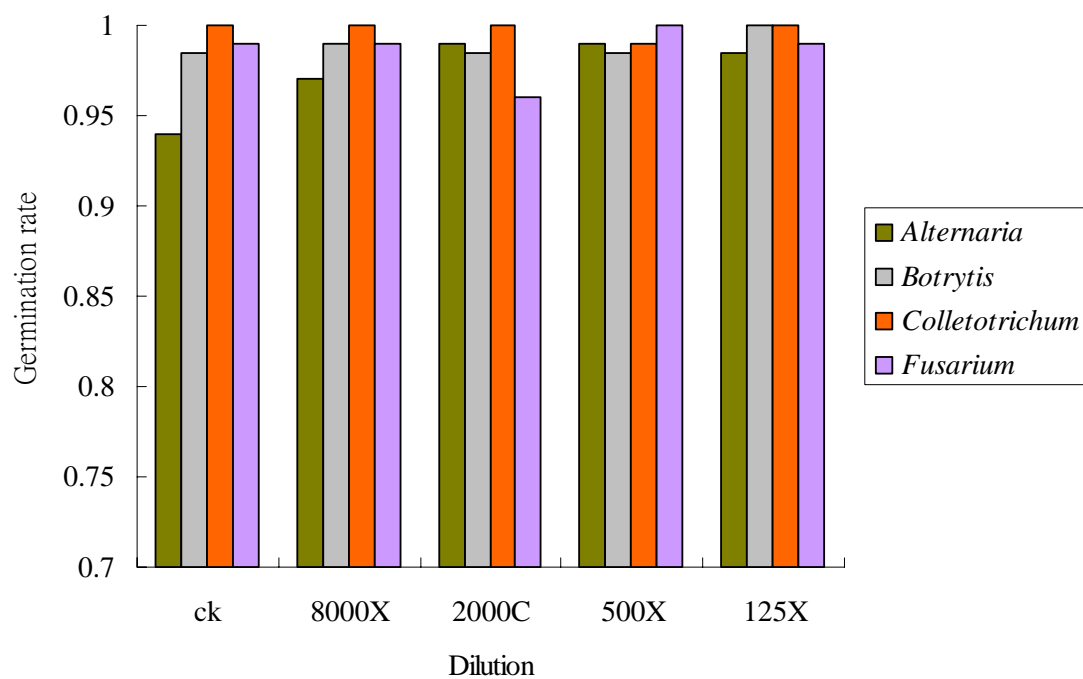


圖 13、驗證藥劑純白鏈黴菌素代謝產物不同濃度對產孢菌鏈隔孢菌、灰黴病菌、炭疽病菌、鐮孢菌孢子發芽率之影響。

Figure 13. The inhibition results of four sporulating pathogens, *Alternaria* sp., *Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., and *Fusarium* sp., by the filtrate of verifying biopesticide BioAid™.

(二) 以玻璃紙法測試生物製劑全藥劑抑制生長率

玻璃紙法是將生物製劑融入 PDA，其上平貼玻璃紙膜以直接培養測試其抑制病原菌之方式。本項是取二種驗證藥劑台灣寶(枯草桿菌)、賜倍效(枯草桿菌)之全藥劑，測試其對九種病原真菌生長之抑制率，結果如表 5、6 及圖 14、圖 15 所示。

本項結果，由表 5 及圖 14 可知，台灣寶(枯草桿菌)對九種供試真菌之鏈隔孢菌、灰黴病菌、炭疽病菌、立枯絲核菌、菌核病菌、白絹病菌等皆可達百分之百的抑制率，包含各級稀釋倍數。

而由表 6 及圖 15，可看出而賜倍效(枯草桿菌)則在各級稀釋倍數下，皆對九種病原真菌具有百分之八十以上之抑制率。

本項玻璃紙法為求快速及節約資材，乃使用 5 公分之培養皿以縮短培養時間，如圖 16，一般在約七至八天可得全部結果。此一方法應可供測試全藥劑對病原真菌之生長抑制，但由上述結果可之各級稀釋倍數皆見相近之結果，似顯示生物製劑中之活菌在此法之 PDA 中會快速增殖，故對活菌型之生物製劑在測試時需考慮此一因素。

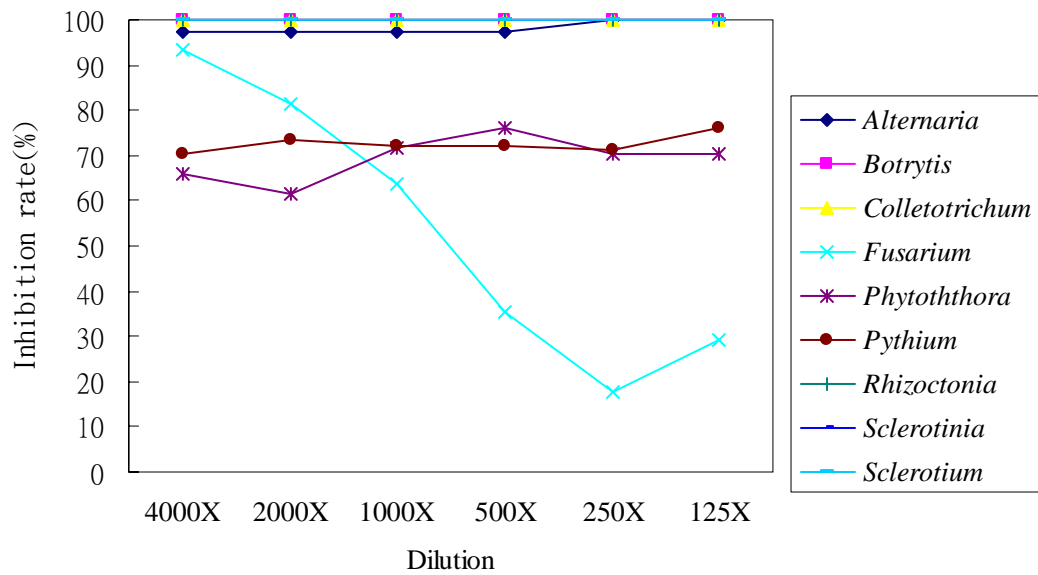


圖 14、利用玻璃紙法測試驗證藥劑台灣寶(枯草桿菌)不同濃度對九種病原真菌之生長結果。

Figure 14. The inhibitory results of nine pathogenic fungi by the whole fluid of verifying biopesticide BioBac™, using cellophane on PDA method.

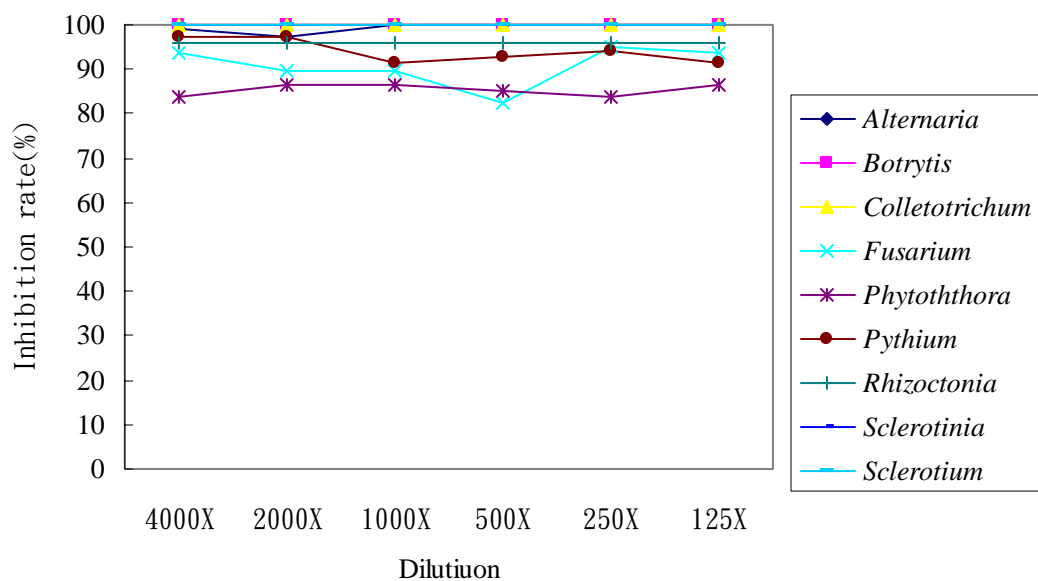


圖 15、利用玻璃紙法測試驗證藥劑賜倍效(枯草桿菌)不同濃度對九種病原真菌之生長結果。

Figure 15. The inhibitory results of nine pathogenic fungi by the whole fluid of verifying biopesticide Tsz bei shiau , using cellophane on PDA method.

表 5 利用玻璃紙法測試驗證藥劑台灣寶(枯草桿菌)不同濃度對九種病原真菌之生長結果。

Table 5. The inhibitory results of nine pathogenic fungi by the whole fluid of verifying biopesticide BioBac™, using cellophane on PDA method.

Pathogen	Inhibition rate by BioBac™ (%)					
	4000X	2000X	1000X	500X	250X	125X
<i>Alternaria</i>	97.5	97.5	97.5	97.5	100	100
<i>Botrytis</i>	100	100	100	100	100	100
<i>Colletotrichum</i>	100	100	100	100	100	100
<i>Fusarium</i>	93.5	81.5	63.7	35.5	17.7	29.0
<i>Phytophthora</i>	65.9	61.7	71.6	75.9	70.2	70.2
<i>Pythium</i>	70.3	73.3	72.3	72.3	71.3	76.2
<i>Rhizoctonia</i>	100	100	100	100	100	100
<i>Sclerotinia</i>	100	100	100	100	100	100
<i>Sclerotium</i>	100	100	100	100	100	100

表 6 利用玻璃紙法測試驗證藥劑賜倍效(枯草桿菌)不同濃度對九種病原真菌之生長結果。

Table 6. The inhibitory results of nine pathogenic fungi by the whole fluid of verifying biopesticide Tsz bei shiau , using cellophane on PDA method.

Pathogen	Inbition rate by Tsz bei shiau (%)					
	4000X	2000X	1000X	500X	250X	125X
<i>Alternaria</i>	99.1	97.4	100	100	100	100
<i>Botrytis</i>	100	100	100	100	100	100
<i>Colletotrichum</i>	100	100	100	100	100	100
<i>Fusarium</i>	93.5	89.5	89.5	82.3	95.2	93.5
<i>Phytophthora</i>	83.6	86.6	86.6	85.1	83.6	86.6
<i>Pythium</i>	97.1	97.1	91.4	92.9	94.3	91.4
<i>Rhizoctonia</i>	95.8	95.8	95.8	95.8	95.8	95.8
<i>Sclerotinia</i>	100	100	100	100	100	100
<i>Sclerotium</i>	100	100	100	100	100	100



圖 16、利用玻璃紙法以小培養皿測試驗證藥劑台灣寶(枯草桿菌)不同濃度對腐霉菌之生長抑制情形，圖片中由左上至右下之藥劑稀釋倍數分別為 125、250、500、0(control)、1000、2000、4000 倍。

Figure 16. The suppression of *Pythium* sp. by the whole fluid of verifying biopesticide BioBac™, using cellophane on PDA method. From upper left to lower right, the dilutions are 125x, 250x, 500x, 0(control), 1000x, 2000x, 4000x, respectively.

(三) 以雙層培養基法測試生物製劑全藥劑抑制生長率

雙層培養基法係將生物製劑融入不含養份之 WA 以避免藥劑本身之拮抗菌生長而影響實驗結果，並且在其上添加第二層 PDA 以供病原菌之正常生長。本項係取二種驗證藥劑即台灣寶(枯草桿菌)、賜倍效(枯草桿菌)之全藥劑，以測試其對九種病原真菌生長之抑制，結果如表 7、表 8 及圖 17、圖 18 所示。

本項之結果，如表 7 及圖 17 可知，台灣寶(枯草桿菌)對九種供試病原真菌中之鏈隔孢菌、灰黴病菌、炭疽病菌、菌核病菌等可具有百分之七十五以上之抑制率，且隨著藥劑濃度之增加而有抑制率之提升。而在賜倍效(枯草桿菌)方面，如表 8 及圖 18，可知其對九種真菌中之鏈隔孢菌及灰黴病菌有較好的抑制效果，亦是隨著藥劑濃度增加而提高抑制率。

本項雙層培養基法為求快速及正確得到結果，其上覆蓋之 PDA 片之直徑係隨著欲測試之病原菌生長速度不同而有別，如腐霉菌、立枯絲核菌、白絹病菌、灰黴病菌、菌核病菌等之生長速度較快，故上層之 PDA 片直徑取 5.5 公分者，如圖 19。而炭疽病菌、鏈隔孢菌、鐮孢菌、疫病菌等之生長速度較慢，其上層之 PDA 片直徑即取 3 公分，如此約在五天内可得全部之結果。

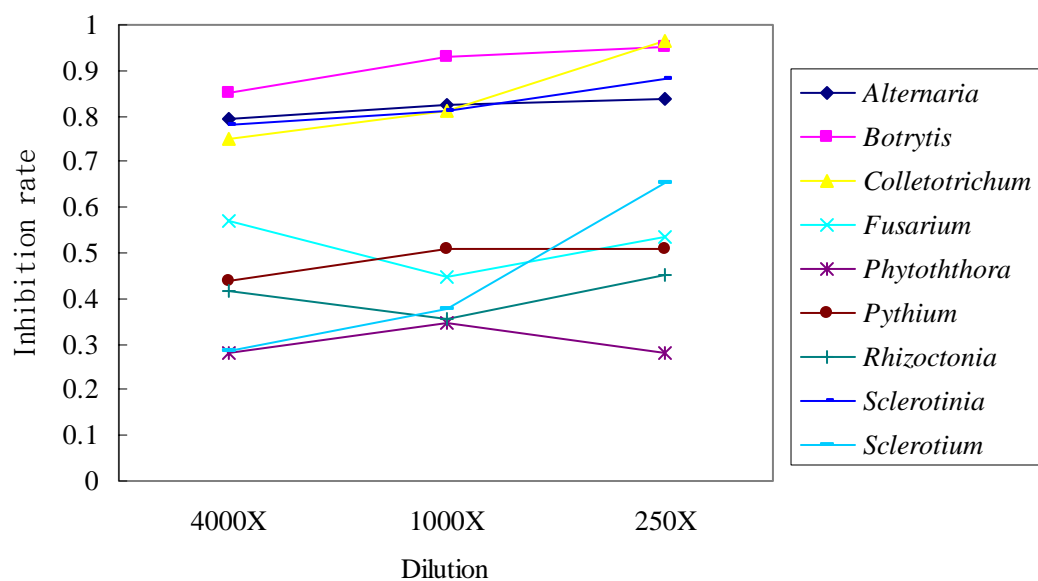


圖 17、利用雙層培養基法測試驗證藥劑台灣寶(枯草桿菌)不同濃度對九種病原真菌之生長抑制結果。

Figure 17. The inhibitory results of nine pathogenic fungi by the whole fluid of verifying biopesticide BioBac™, using two-layer medium method.

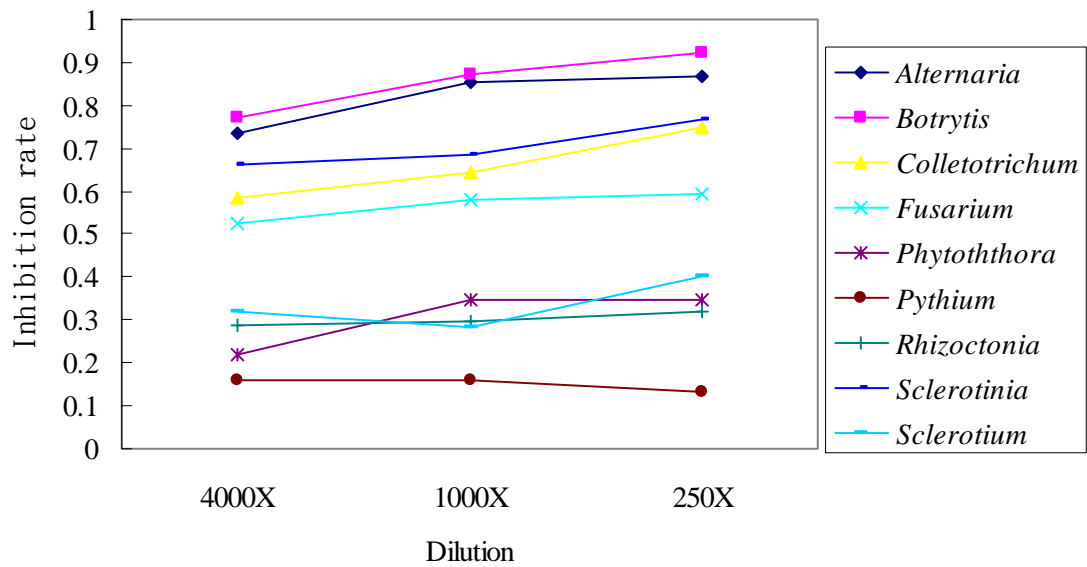


圖 18、利用雙層培養基法測試驗證藥劑賜倍效(枯草桿菌)不同濃度對九種病原真菌之生長抑制率。

Figure 18. The inhibitory results of nine pathogenic fungi by the whole fluid of verifying biopesticide Tsz bei shiau , using two-layer medium method.

表 7 利用雙層培養基法測試驗證藥劑台灣寶(枯草桿菌)不同濃度對九種病原真菌之生長抑制結果。

Table 7. The inhibitory results of nine pathogenic fungi by the whole fluid of verifying biopesticide BioBac™, using two-layer medium method.

Pathogen	Inhibition rate by BioBac™ (%)		
	4000X	1000X	250X
<i>Alternaria</i>	79.4	82.4	83.8
<i>Botrytis</i>	85.1	92.9	95.0
<i>Colletotrichum</i>	75.0	80.9	96.4
<i>Fusarium</i>	57.1	44.6	53.7
<i>Phytophthora</i>	28.3	34.8	28.3
<i>Pythium</i>	43.9	50.9	50.9
<i>Rhizoctonia</i>	41.5	35.7	45.0
<i>Sclerotinia</i>	78.0	81.3	88.0
<i>Sclerotium</i>	28.4	37.6	65.1

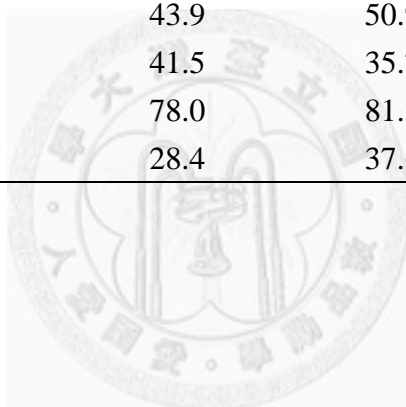


表 8 利用雙層培養基法測試驗證藥劑賜倍效(枯草桿菌)不同濃度對九種病原真菌之生長抑制率。

Table 8. The inhibitory results of nine pathogenic fungi by the whole fluid of verifying biopesticide Tsz bei shiau , using two-layer medium method.

Pathogen	Inhibition rate by Tsz bei shiau (%)		
	4000X	1000X	250X
<i>Alternaria</i>	73.5	85.3	86.8
<i>Botrytis</i>	77.3	87.2	92.2
<i>Colletotrichum</i>	58.3	64.3	75.0
<i>Fusarium</i>	52.5	58.2	59.3
<i>Phytophthora</i>	21.7	34.8	34.8
<i>Pythium</i>	15.8	15.8	13.2
<i>Rhizoctonia</i>	28.7	29.8	32.2
<i>Sclerotinia</i>	66.0	68.7	76.7
<i>Sclerotium</i>	32.1	28.4	40.4



圖 19、利用雙層培養基法測試驗證藥劑台灣寶(枯草桿菌)其對立枯絲核菌之生長抑制情形，圖片中由左上至右下之藥劑稀釋倍數分別為 250、1000、4000、0(control) 倍，圖中之上層培養基為 5.5 cm 之馬鈴薯葡萄糖瓊脂。

Figure 19. The inhibition results of *Rhizoctonia* sp. by the whole fluid of verifying biopesticide BioBac™, using two-layer medium method. Plates from upper left to lower right, the dilution is 250x, 1000x, 4000x, and 0x as control. The upper medium on each plate is an 5.5 cm PDA membrane.

三、本實驗室分離鏈黴菌之培養及拮抗能力驗證

(一) 鏈黴菌 YU-01 對九種重要病原真菌之拮抗測試

本項以本實驗室自花蓮玉里水稻田分離所得之鏈黴菌 YU-01，在 PDA 上初步與九種病原真菌進行對峙培養測試，其結果如表 9 及圖 20、圖 21 所示。

由表 9 及圖 20、圖 21 可知，鏈黴菌 YU-01 對九種病原真菌均能產生明顯之抑制圈，除對生長快速之立枯絲核菌及腐霉菌產生之抑制圈較小之外，其對鏈隔孢菌、灰黴病菌、炭疽病菌、鐮孢菌、疫病菌、菌核病菌、白絹病菌皆能產生 2 公分以上之抑制圈。



表 9 本實驗室分離之鏈黴菌 YU-01 與九種病原真菌在 PDA 上對峙培養之抑制圈大小。

Table 9. The inhibition zone of nine pathogenic fungi by *Streptomyces* YU-01 on PDA medium.

Pathogen	Inhibition zone(cm)*
<i>Alternaria</i>	2.57±0.06 ^{cd**}
<i>Botrytis</i>	2.77±0.12 ^{bc}
<i>Fusarium</i>	2.77±0.29 ^{bc}
<i>Colletotrichum</i>	2.40±0 ^d
<i>Rhizoctonia</i>	0.73±0.12 ^g
<i>Phytophthora</i>	3.50±0.17 ^a
<i>Pythium</i>	1.40±0.10 ^f
<i>Sclerotinia</i>	2.90±0 ^b
<i>Sclerotium</i>	2.07±0.06 ^e

*此抑制圈之結果乃各種病原菌之對照組長滿該培養皿時測量所得，此時對照組菌落半徑均為 7.7 cm。

**依據最小顯著差異法(least significant difference)檢定，英文字母相同者表示兩者間無顯著差異。

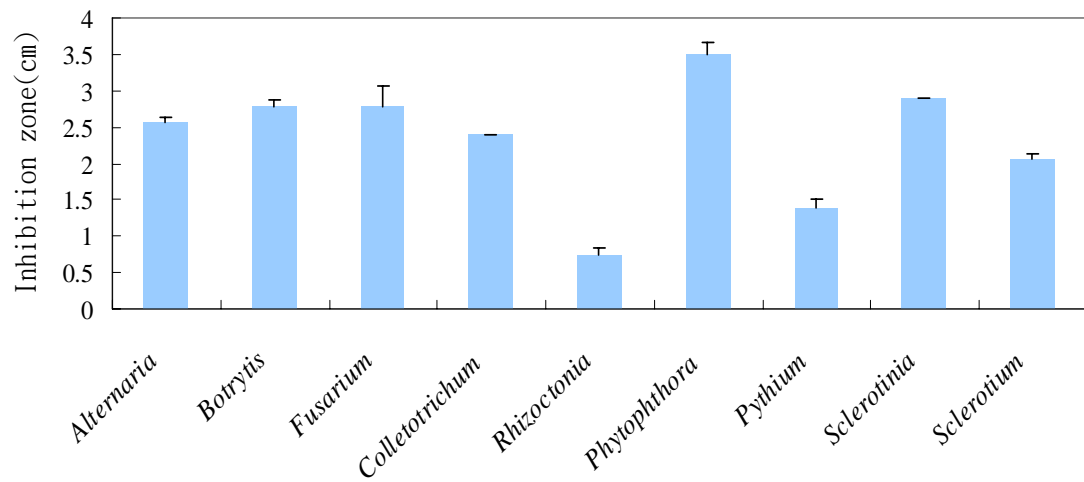


圖 20、鏈黴菌 YU-01 與九種病原真菌在 PDA 上對峙培養之抑制情形。

Figure 20. The inhibition results of nine pathogenic fungi by *Streptomyces* YU-01 on PDA medium .



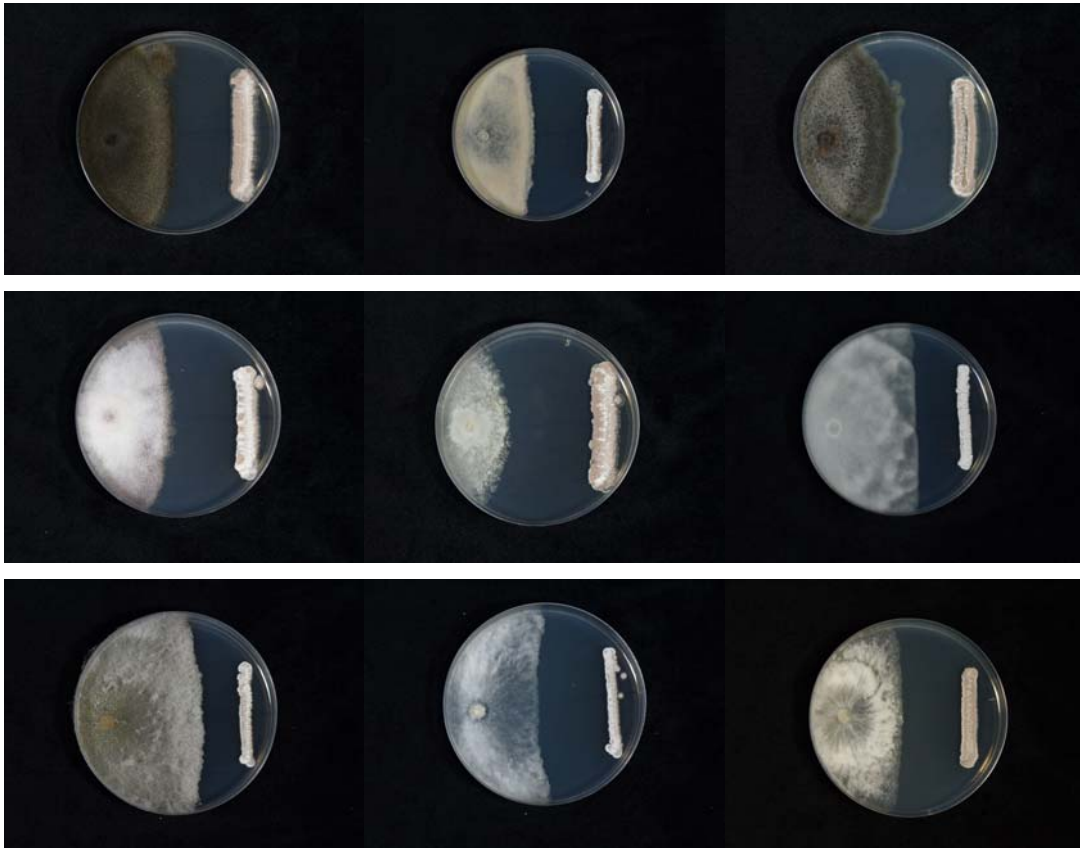


圖 21、鏈黴菌 YU-01 與九種病原真菌在 PDA 對峙培養之結果，圖片中由左上至右下之病原菌分別為鏈隔孢菌、灰黴病菌、炭疽病菌、鐮孢菌、疫病菌、腐霉菌、立枯絲核菌、菌核病菌、白絹病菌。

Figure 21. The dual culture results of nine pathogenic fungi with *Streptomyces* YU-01 on PDA medium. The pathogen on each plate from upper left to lower right is *Alternaria* sp., *Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp., *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Sclerotium* sp., *Sclerotinia* sp.

(二) 以天然資材培養鏈黴菌 YU-01 之成效測試

為求將來大量培養鏈黴菌 YU-01 以供應用，乃選擇易取得、價廉之物質，進行培養成效之測試。本項以六種天然資材對 YU-01 進行搖瓶培養並分別取三、四、五、六、七天之濾液與腐霉菌在馬鈴薯葡萄糖瓊脂進行對峙培養，其結果如表 10 及圖 22 所示。可知六種天然資材中以 3% 紅豆培養效果最好，其可在五至六天後得到最高之抑制能力，並且與腐霉菌對峙培養兩天後，腐霉菌仍無法越過抑制圈，如圖 23；其次為 3% 米糠，其培養七天後之抑制效果最佳，而 3% 燕麥培養七天之濾液雖可產生類似結果，然而在與腐霉菌對峙培養兩天後，抑制圈已是較不明顯狀態。其餘三種穀類及 ISP4 之搖瓶培養物均無明顯之抑制能力。

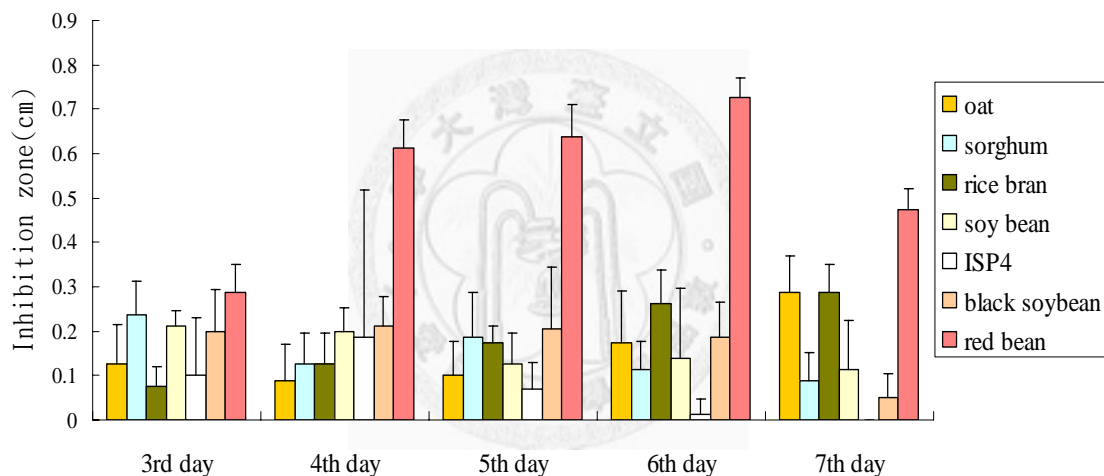


圖 22、鏈黴菌 YU-01 以七種資材培養基振盪培養後，對腐霉菌以 PDA 對峙培養結果。七種資材分別為燕麥、高粱、米糠、黃豆、ISP4、黑豆、紅豆等。各培養三、四、五、六、七日。

Figure 22. The inhibition results of *Pythium* sp. by the filtrate of *Streptomyces* YU-01 culture in six natural cereals and ISP4. The six cereals are oat, sorghum, rice bran, soybean, black soybean, and red bean, respectively. Each culture is sampled after 3, 4, 5, 6, 7 days of shaking cultivation.

表 10 鏈黴菌 YU-01 以七種資材培養基振盪培養後，對腐霉菌以 PDA 對峙培養結果。

Table 10. The inhibition results of *Pythium* sp. by the filtrate of *Streptomyces* YU-01 culture in six natural cereals and ISP4.

Culture	Inhibition zone(cm)*				
	3 rd day	4 th day	5 th day	6 th day	7 th day
Oat	0.13±0.09	0.09±0.08	0.1±0.08	0.18±0.12	0.29±0.08 ^{b**}
Sorghum	0.24±0.07	0.13±0.07	0.19±0.09	0.11±0.06	0.09±0.06 ^c
Rice bran	0.08±0.05	0.13±0.07	0.18±0.04	0.26±0.07	0.29±0.06 ^b
Soybean	0.22±0.04	0.20±0.05	0.13±0.07	0.14±0.16	0.11±0.11 ^c
ISP4	0.10±0.13	0.19±0.33	0.0±0.06	0.01±0.04	0 ^d
Black soybean	0.20±0.09	0.21±0.06	0.21±0.14	0.19±0.08	0.05±0.05 ^{cd}
Red bean	0.29±0.06	0.61±0.06	0.64±0.07	0.73±0.05	0.475±0.05 ^a

*此抑制圈之結果乃腐霉菌之對照組培養一天後測量所得，此時對照組菌落半徑均為 2.3 cm。

**依據最小顯著差異法(least significant difference)檢定，英文字母相同者表示兩者間無顯著差異。

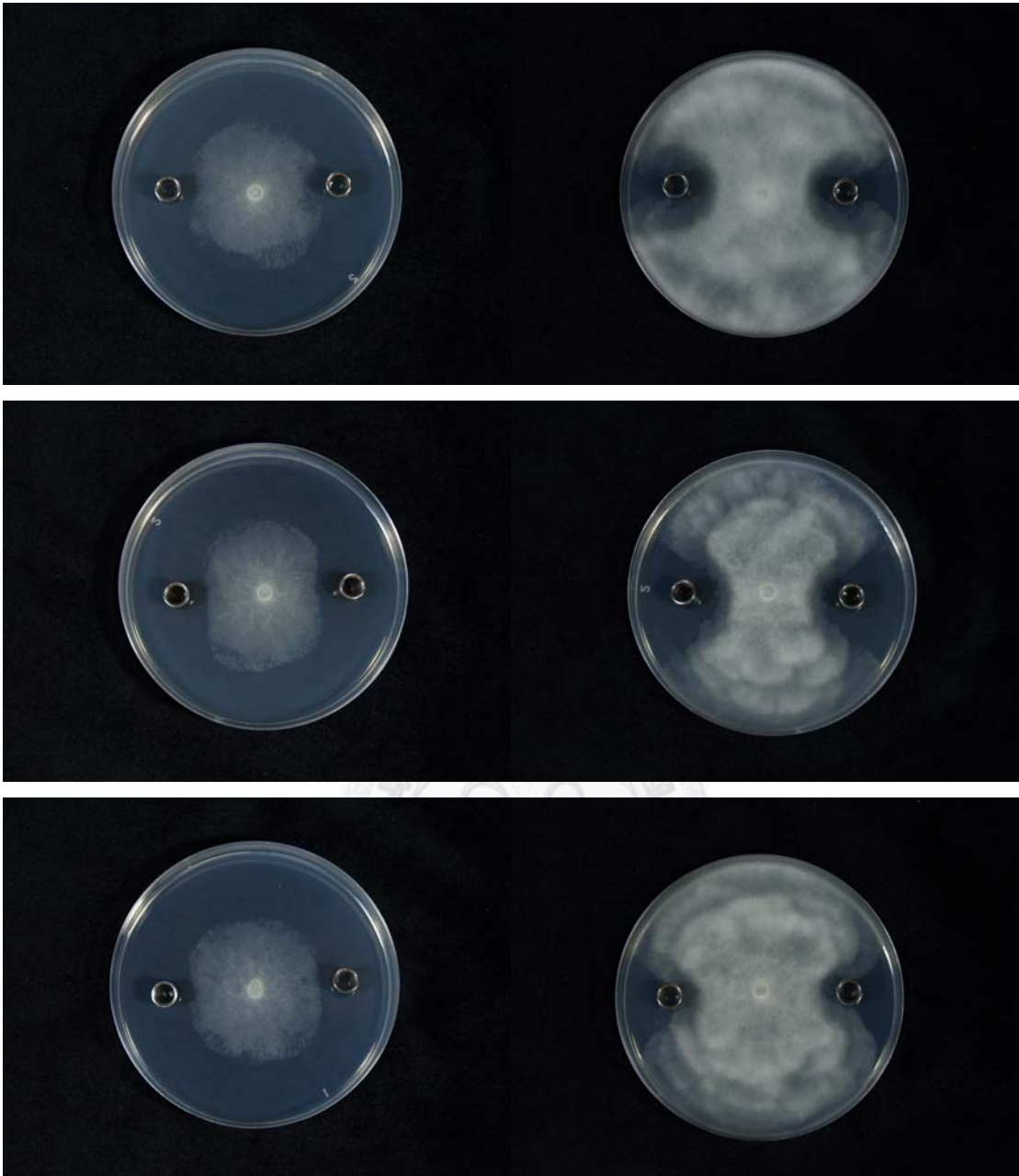


圖 23、鏈黴菌 YU-01 以米糠、紅豆及燕麥培養基液態培養七天後，測試其濾液與腐霉菌對峙培養之抑制結果。圖片中由左上至右下分別為米糠對峙培養一天、米糠對峙培養二天、紅豆對峙培養一天、紅豆對峙培養二天、燕麥對峙培養一天、燕麥對峙培養二天。

Figure 23. The inhibition results of *Pythium* sp. by the filtrate of *Streptomyces* YU-01 culture in rice bran, red bean, and oat after 7 days of shaking culture. The plates from upper left to lower right are rice bran dual for 1 day and 2 days, red bean dual for 1 day and 2 days, oat dual for 1 day and 2days.

(三) 以天然資材額外添加鹽類培養鏈黴菌 YU-01 之成效測試

由上一項實驗可知，米糠及紅豆為對鏈黴菌 YU-01 較佳之培養基，故本項以米糠及紅豆二資材為主，進一步測試添加營養鹽類是否有利於其拮抗能力。本項分別選取 ISP4 鹽類或花寶三號 0.5% 進行添加培養測試，皆以搖瓶培養，並分別取其三、四、五、六、七天之濾液與腐霉菌在 PDA 對峙培養，結果如表 11 及圖 24 所示。由此結果發現二種資材添加 ISP4 或花寶 3 號營養鹽類，並無法提高拮抗能力，故仍以單純紅豆或米糠配製之培養成效較佳。

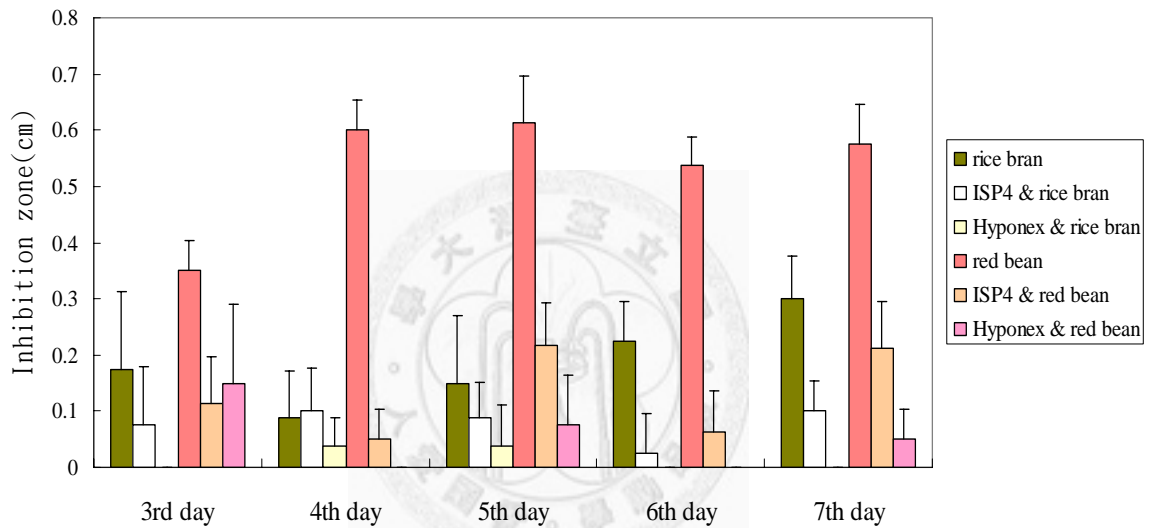


圖 24、鏈黴菌 YU-01 以米糠或紅豆分別添加 ISP4 鹽類或花寶三號進行液態培養後，分別取其三、四、五、六、七天之濾液與腐霉菌對峙培養之抑制結果。

Figure 22. The inhibition results of *Pythium* sp. by the filtrate of *Streptomyces* YU-01 culture in rice bran or red bean, added with ISP4 or Hyponex after shaking cultivation.

表 11 鏈黴菌 YU-01 以米糠或紅豆分別添加 ISP4 鹽類或花寶三號進行液態培養後，分別取其三、四、五、六、七天之濾液與腐霉菌對峙培養之抑制結果。

Table 11. The inhibition results of *Pythium* sp. by the filtrate of *Streptomyces* YU-01 culture in rice bran or red bean, added with ISP4 or Hyponex after shaking cultivation.

Culture	Inhibition zone(cm)*				
	3 rd day	4 th day	5 th day	6 th day	7 th day
Rice bran	0.18±0.14	0.09±0.08	0.15±0.12	0.23±0.07	0.30±0.07 ^{b**}
ISP4 & rice bran	0.08±0.10	0.10±0.08	0.09±0.06	0.03±0.07	0.10±0.05 ^d
Hyponex & rice bran	0	0.04±0.05	0.04±0.07	0	0 ^e
Red bean	0.35±0.05	0.60±0.05	0.61±0.08	0.54±0.05	0.58±0.07 ^a
ISP4 & red bean	0.11±0.08	0.05±0.05	0.22±0.08	0.06±0.07	0.21±0.08 ^c
Hyponex & red bean	0.15±0.14	0	0.08±0.09	0	0.05±0.05 ^{de}

*此抑制圈之結果乃腐霉菌之對照組培養一天後測量所得，此時對照組菌落半徑均為 2.3 cm。

**依據最小顯著差異法(least significant difference)檢定，英文字母相同者表示兩者間無顯著差異。

(四) 以鏈黴菌 YU-01 發酵物進行多元快速測試系統之驗證

為求未來廣泛應用，故進行天然資材額外添加營養鹽類之培養測試。本項係取本菌在米糠及紅豆搖瓶培養七天之發酵原液，對九種病原真菌及三種病原細菌進行多元快速測試系統之驗證，結果如圖 25 及 26 所示。

由圖 25 之結果可知以紅豆培養之發酵原液對九種病原真菌均能產生抑制圈，並且皆高於以米糠培養者，其中對鏈隔孢菌、炭疽病菌、菌核病菌抑制效果最佳。而在細菌病原方面，由圖 26 可看出，紅豆及米糠培養之 YU-01 均只對青枯病菌有抑制效果，且發酵原液以米糠培養者產生之抑制圈 0.37 cm，效果較佳。

本項驗證情形可如圖 27 及圖 28 所示，證明十二種病原真菌及細菌，皆可在一批次完成拮抗能力之測試，說明此一多元快速測試系統確實具有應用之價值。

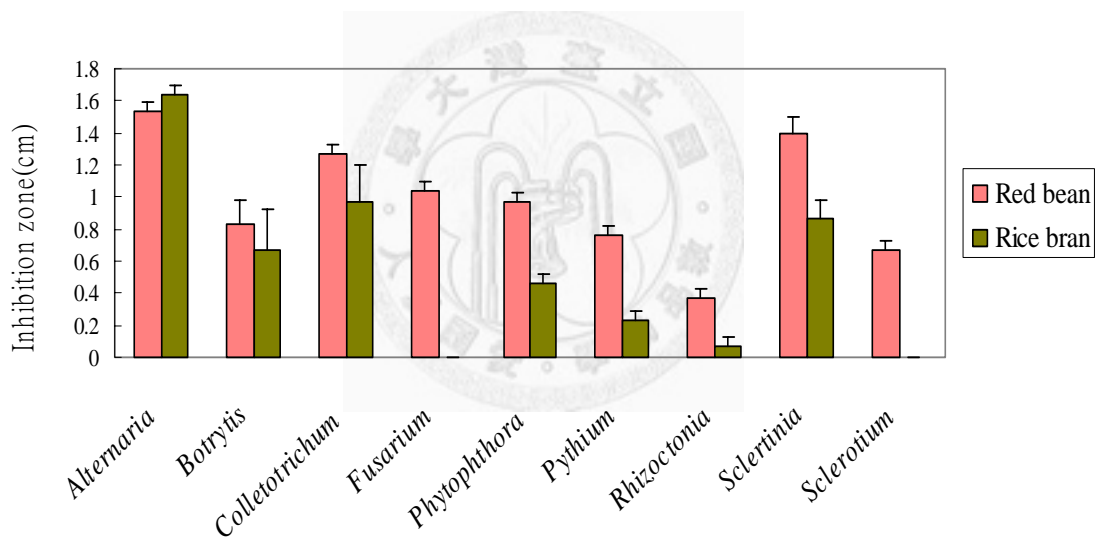


圖 25、鏈黴菌 YU-01 以米糠及紅豆搖瓶培養七天後以三分格抑制環法測試其對九種病原真菌抑制之結果。

Figure 25. The inhibition results of nine pathogenic fungi by the fermentation liquid of *Streptomyces* YU-01 cultured in rice bran or red bean for 7 days using the 3-way ring-plate method.

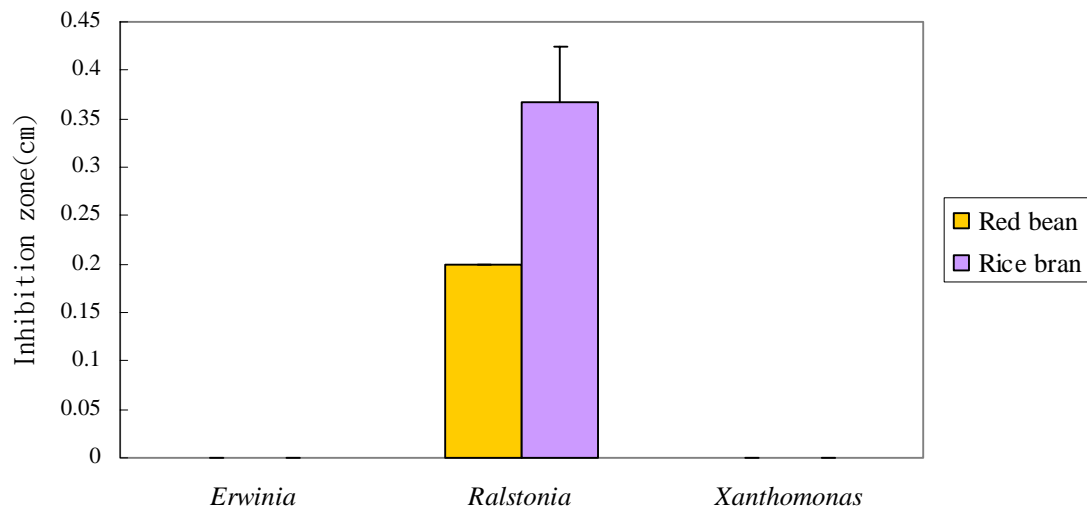
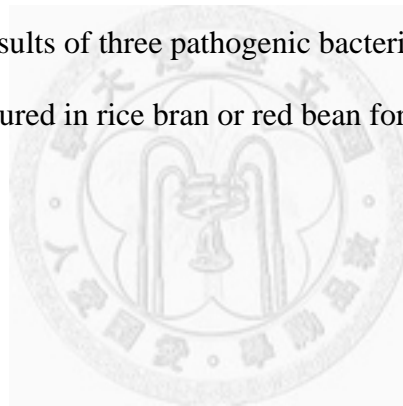


圖 26、鏈黴菌 YU-01 以米糠及紅豆搖瓶培養七天後以三分格抑制環法測試其對三種病原細菌抑制之結果。

Figure 26. The inhibition results of three pathogenic bacteria by the fermentation liquid of *Streptomyces* YU-01 cultured in rice bran or red bean for 7 days using the 3-way ring-plate method.



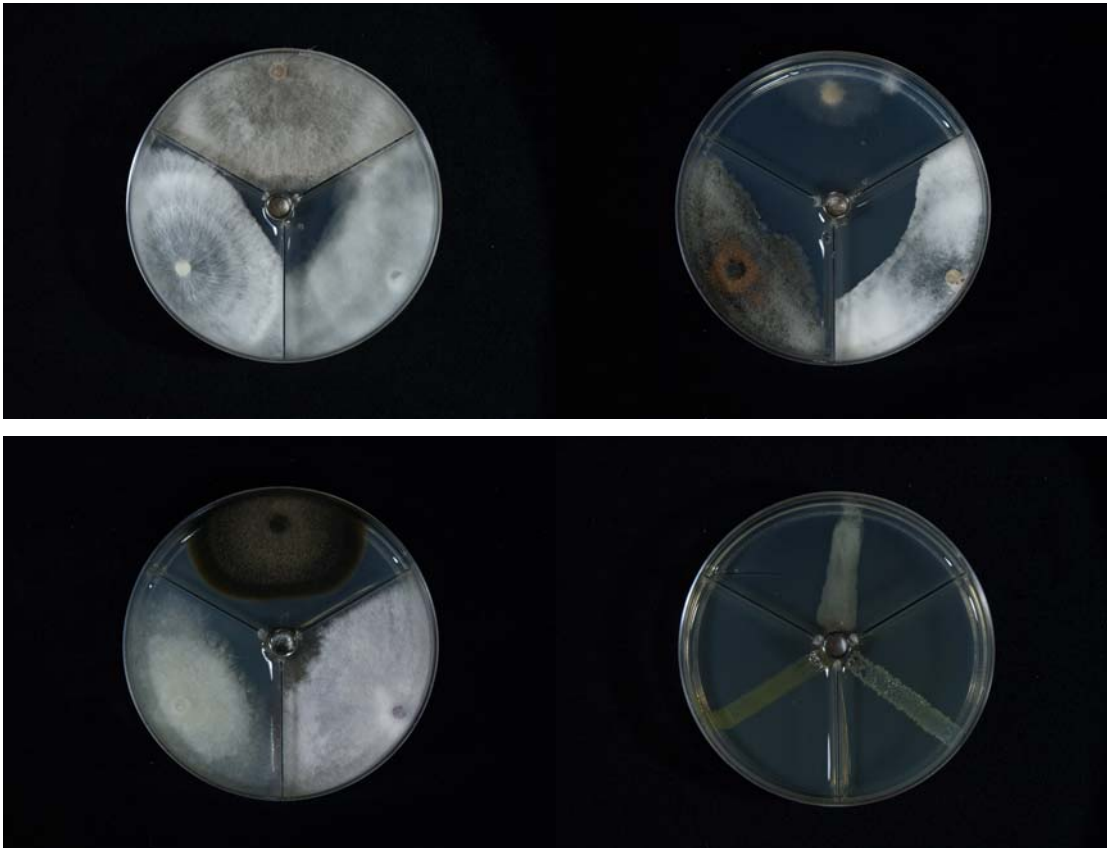


圖 27、鏈黴菌 YU-01 以紅豆培養基搖瓶培養七天後，以三分格抑制環法測試原液對九種病原真菌及三種病原細菌拮抗之結果。圖中由左上至右下分別為快長組、中速組、慢長組及細菌組。

Figure 27. The inhibition results of nine pathogenic fungi and three bacteria by the fermentation liquid of *Streptomyces* YU-01 cultured in red bean for 7 days using the 3-way ring-plate method. The plates from upper left to lower right are fast-growing fungi, moderate-growing fungi, slow-growing fungi, and bacteria.

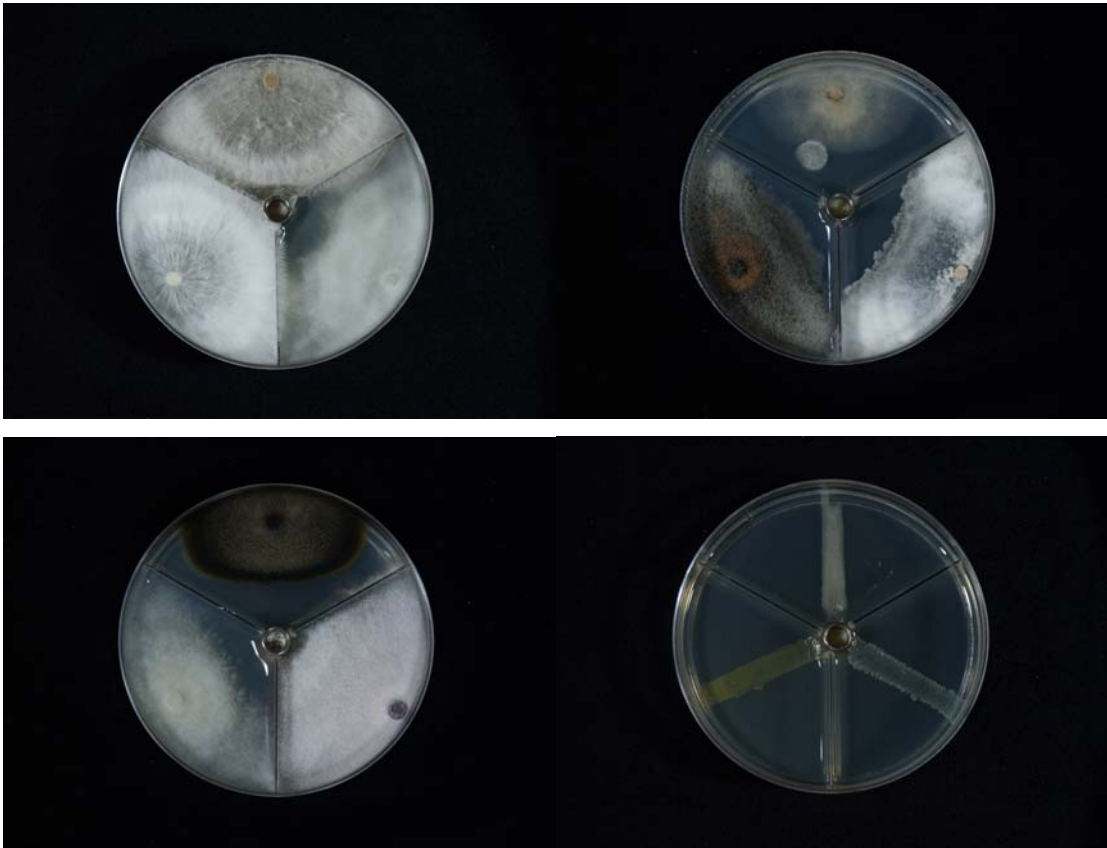


圖 28、鏈黴菌 YU-01 以米糠培養基搖瓶培養七天後，以三分格抑制環法測試原液對九種病原真菌及三種病原細菌拮抗之結果。圖中由左上至右下分別為快長組、中速組、慢長組及細菌組。

Figure 28. The inhibition results of nine pathogenic fungi and three bacteria by the fermentation liquid of *Streptomyces* YU-01 cultured in rice bran for 7 days using the 3-way ring-plate method. The plates from upper left to lower right are fast-growing fungi, moderate-growing fungi, slow-growing fungi, and bacteria.

四、對其他市售生物製劑拮抗能力之測試應用及驗證

(一) 以多元快速測試系統測試市售生物製劑抑制病原能力

本項係以本研究建構之多元快速測試系統，利用三分格抑制環法對四種市售生物製劑進行測試及驗證。其中 B01、B03、B04 對九種病原真菌之測試結果如圖 29 及表 12 所示，B01 對鏈隔孢菌及疫病菌有較好抑制效果，B03 則對鏈隔孢菌、鐮孢菌、疫病菌效果較佳，B04 則是對鏈隔孢菌及炭疽病菌較有效。B02 測試結果則如圖 30 及表 12 所示，其中由於 B02 之成分含有木黴菌，故無法測得真正之抑制圈，此部份之結果乃是紀錄當病原菌受到木黴菌抑制而生長停止後，其和對照組菌落半徑之差異，可知除生長快速之立枯絲核菌及腐霉菌外，對其餘病原真菌皆有抑制效果。

由結果顯示，三分格抑制環法可以測試一生物製劑對各種病原真菌之抑制能力，並且在不同病原之間有抑制效果的差異。

有關 B01、B03、B04 對三種病原細菌抑制能力測試結果則如圖 31 所示，由此結果可知此三支市售生物製劑對於測試之軟腐病菌、青枯病菌、黃單胞菌均無法產生抑制圈。

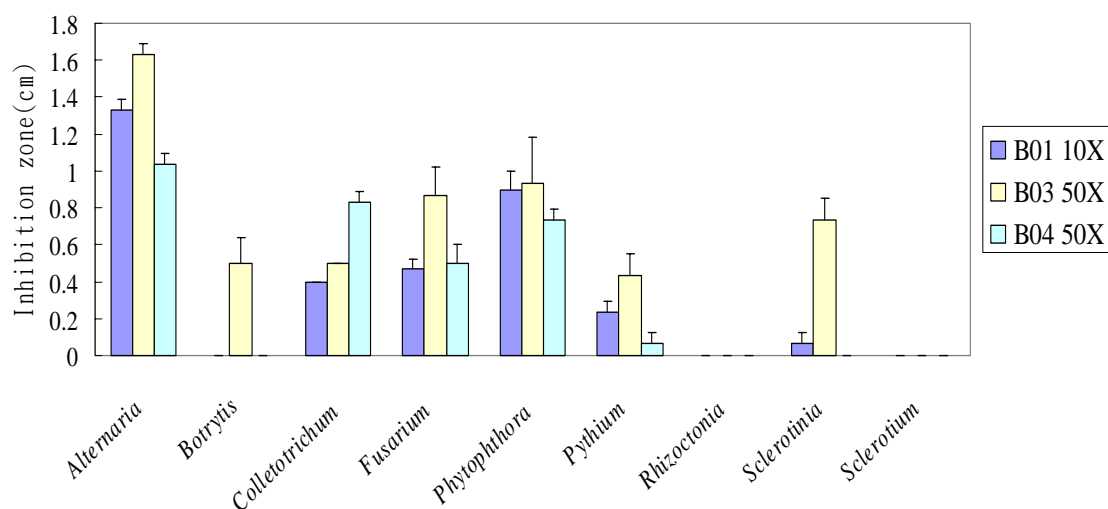


圖 29、市售生物製劑 B01、B03、B04 之稀釋液以三分格抑制環法驗證其對九種病原真菌抑制之結果。

Figure 29. The inhibition results of nine pathogenic fungi by commercial biocontrol products B01, B03, and B04, using 3-way ring plate method.

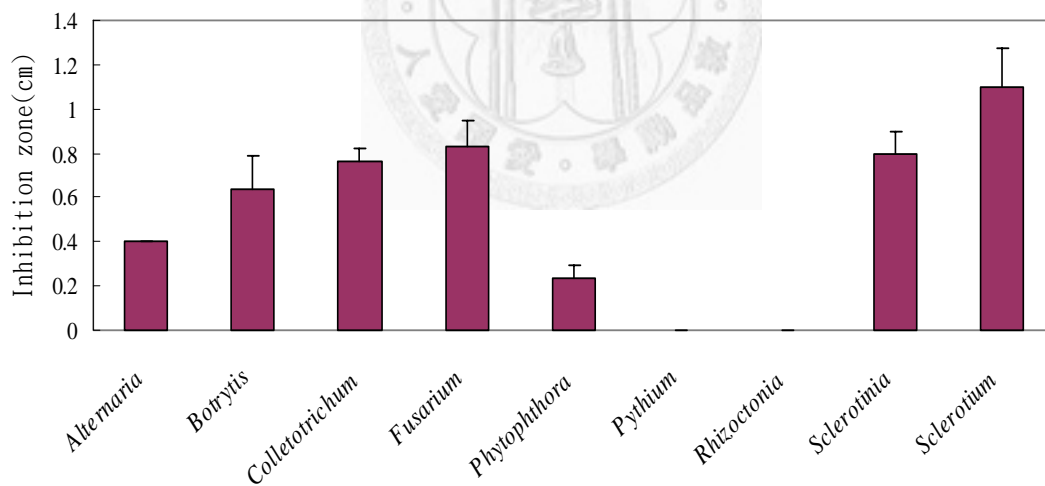


圖 30、市售生物製劑 B02 之 50 倍稀釋液以三分格抑制環法驗證其對九種病原真菌抑制之結果。

Figure 30. The inhibition results of nine pathogenic fungi by commercial biocontrol products B02, using 3-way ring plate method.

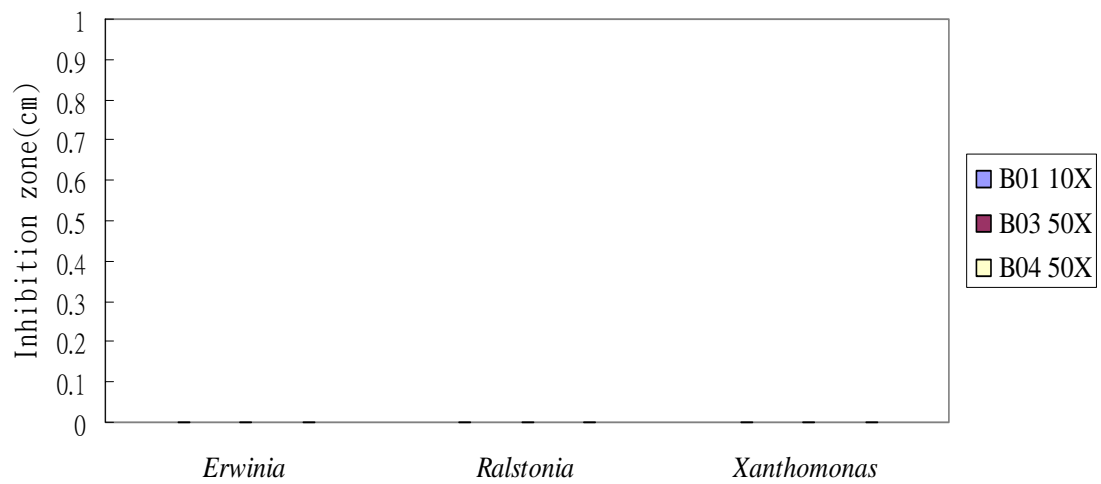


圖 31、市售生物製劑 B01、B03、B04 之稀釋液以三分格抑制環法驗證其對三種病原細菌抑制之結果。

Figure 31. The inhibition results of three pathogenic bacteria by commercial biocontrol products B01, B03, and B04, using 3-way ring plate method.

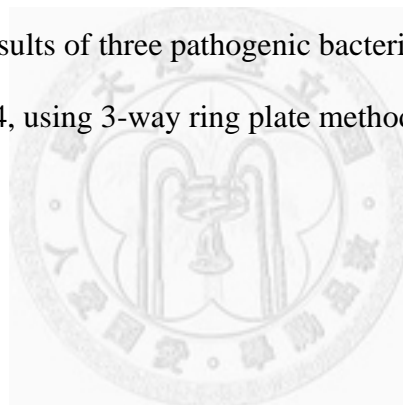


表 12 市售生物製劑 B01、B02、B03、B04 之稀釋液以三分格抑制環法，對九種病原真菌進行測試所得之抑制圈。

Table 12. The inhibition results of nine pathogenic fungi by commercial biocontrol products B01, B03, and B04, using 3-way ring plate method.

Pathogen	Inhibition zone(cm)*			
	B01 10X	B02 50X	B03 50X	B04 50X
<i>Alternaria</i>	1.33±1.33 ^{a**}	0.40±0 ^d	1.63±0.06 ^a	1.03±0.06 ^a
<i>Botrytis</i>	0 ^e	0.63±0.15 ^c	0.50±0.14 ^c	0 ^e
<i>Colletotrichum</i>	0.40±0 ^c	0.77±0.06 ^b	0.50±0 ^c	0.83±0.06 ^b
<i>Fusarium</i>	0.47±0.06 ^c	0.83±0.12 ^b	0.87±0.15 ^b	0.50±0.1 ^d
<i>Phytophthora</i>	0.90±0.1 ^b	0.23±0.06 ^e	0.93±0.25 ^b	0.73±0.06 ^c
<i>Pythium</i>	0.23±0.06 ^d	0 ^f	0.43±0.12 ^c	0.07±0.06 ^e
<i>Rhizoctonia</i>	0 ^e	0 ^f	0 ^d	0 ^e
<i>Sclerotinia</i>	0.07±0.06 ^e	0.80±0.1 ^b	0.73±0.12 ^b	0 ^e
<i>Sclerotium</i>	0 ^e	1.10±0.17 ^a	0 ^d	0 ^e

*此抑制圈之結果乃各種病原菌之對照組長滿該三分格時測量所得，此時對照組菌落半徑均為 2.8 cm。

**依據最小顯著差異法(least significant difference)檢定，英文字母相同者表示兩者間無顯著差異。

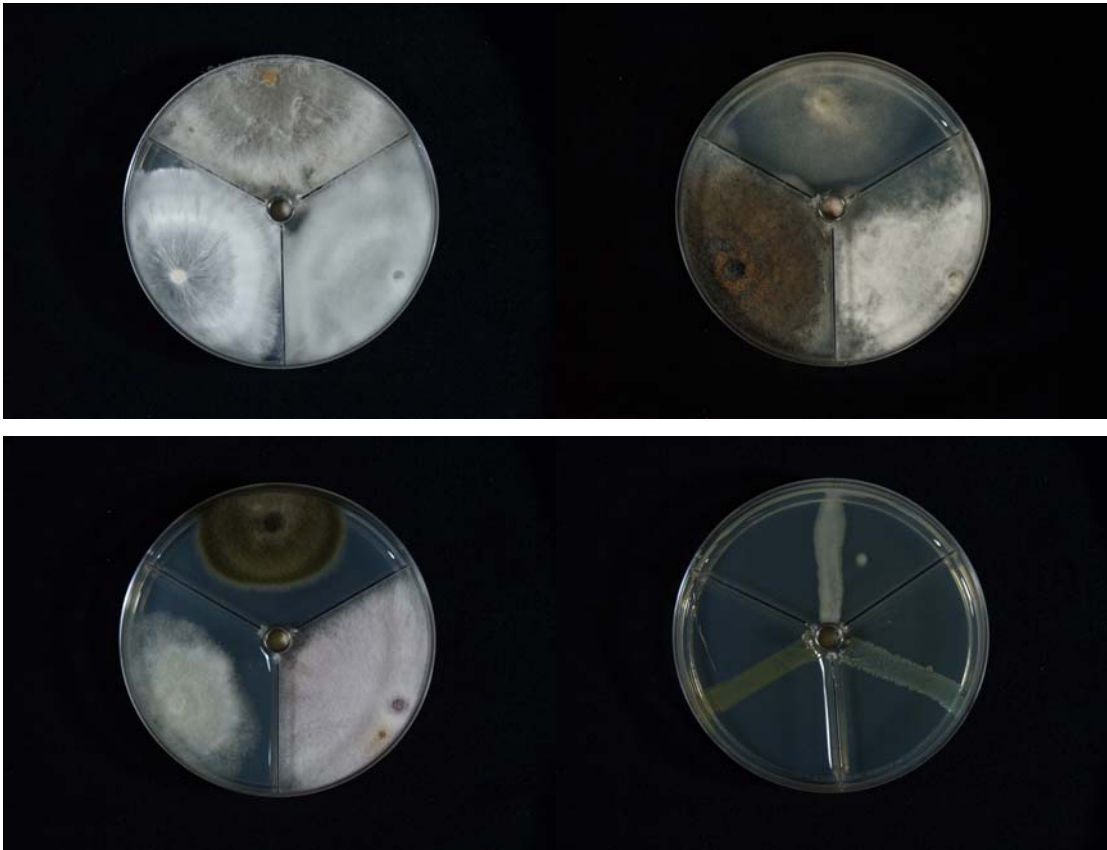


圖 32、市售生物製劑 B01 之 10 倍稀釋液對九種病原真菌及三種病原細菌進行三分格抑制環法之結果。圖中由左上至右下分別為快長組、中速組、慢長組及細菌組。

Figure 32. The inhibition results of nine pathogenic fungi and three pathogenic bacteria by commercial biocontrol products B01, using 3-way ring plate method. The plates from upper left to lower right are fast-growing fungi, moderate-growing fungi, slow-growing fungi, and bacteria.

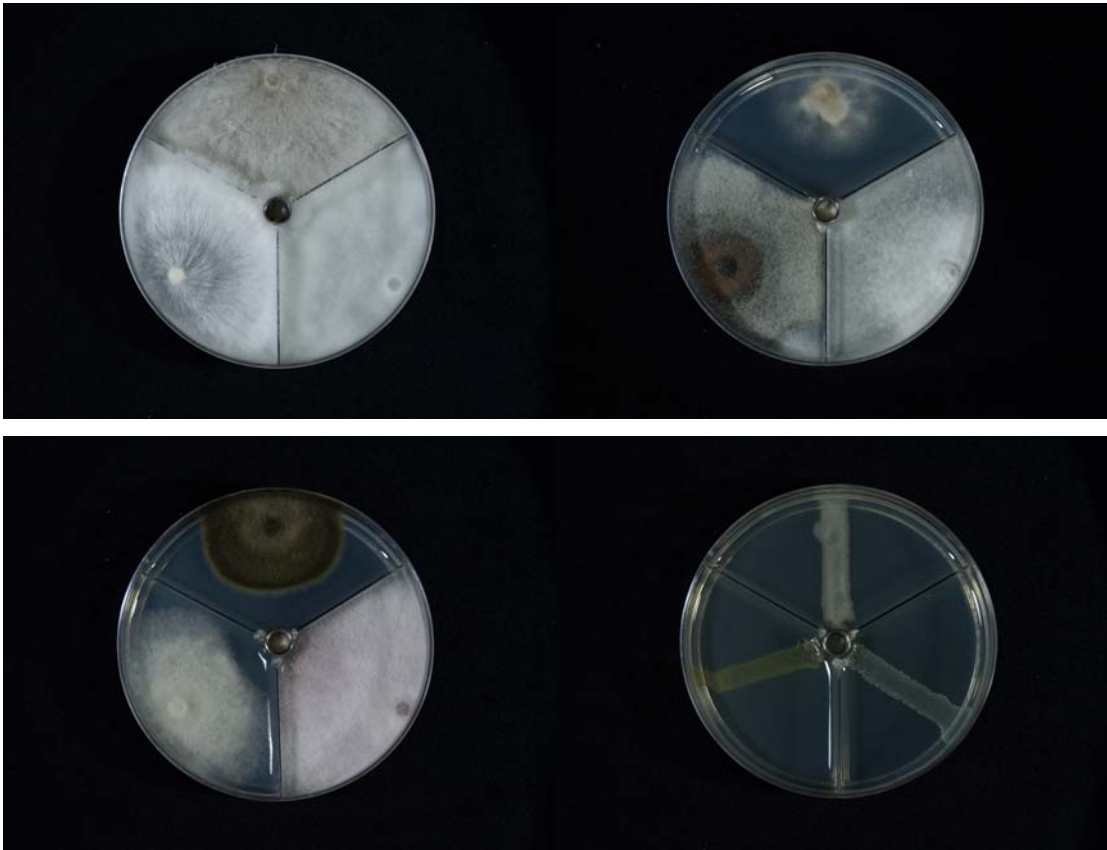


圖 33、市售生物製劑 B03 之 50 倍稀釋液對九種病原真菌及三種病原細菌進行三分格抑制環法之結果。圖中由左上至右下分別為快長組、中速組、慢長組及細菌組。

Figure 33. The inhibition results of nine pathogenic fungi and three pathogenic bacteria by commercial biocontrol products B03, using 3-way ring plate method. The plates from upper left to lower right are fast-growing fungi, moderate-growing fungi, slow-growing fungi, and bacteria.

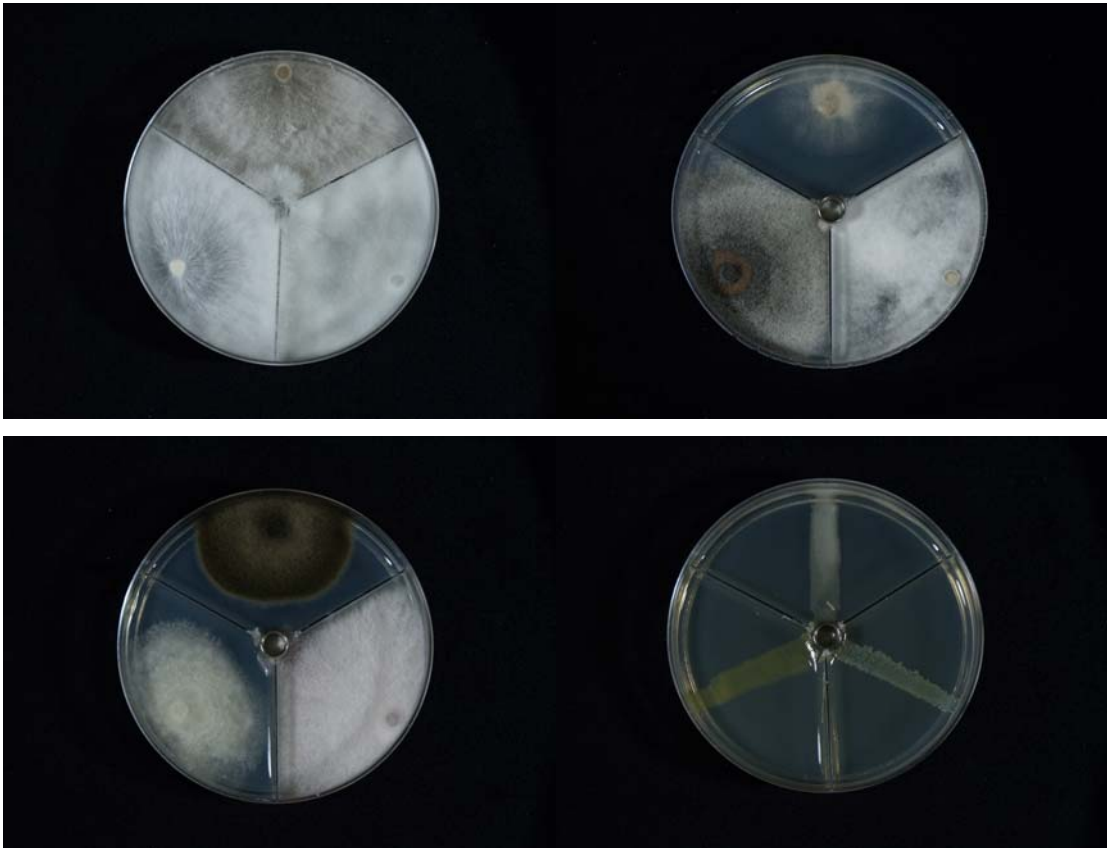


圖 34、市售生物製劑 B04 之 50 倍稀釋液對九種病原真菌及三種病原細菌進行三分格抑制環法之結果。圖中由左上至右下分別為快長組、中速組、慢長組及細菌組。

Figure 34. The inhibition results of nine pathogenic fungi and three pathogenic bacteria by commercial biocontrol products B04, using 3-way ring plate method.. The plates from upper left to lower right are fast-growing fungi, moderate-growing fungi, slow-growing fungi, and bacteria.

第五章 討論

一、針對生物製劑建構快速測試系統

本實驗之目的為針對目前市場出現之生物製劑設計出快速且對象完整之測試系統，以供未來快速篩檢任一生物製劑是否確實具有拮抗效果。首先採用之三分格毒食法是參考 Dhingra 及 Sinclair 所著之 Basic plant pathology methods 2nd ed. 而來，其可以一皿測試三種病原，並且因對峙距離縮短而可縮短實驗時間。以此方法所得之實驗結果，台灣寶(枯草桿菌)及賜倍效(枯草桿菌)之代謝產物皆只對鏈格孢菌有抑制效果，純白鏈黴菌素代謝產物則是對腐霉菌及疫病菌有良好抑制效果。

已知純白鏈黴菌素是木瓜果疫病(*Phytophthora palmivora*)登記用藥，故三分格毒食法之測試結果與其宣稱效果相同；而台灣寶(枯草桿菌)及賜倍效(枯草桿菌)以此法所得之結果卻不甚理想，並且可能是由於製劑本身含有營養成分，甚至輕微促進鐮孢菌及疫病菌之生長。

純白鏈黴菌素登記之有效成分為「整體代謝物效價」，故以三分格毒食法測試其代謝物之抑菌效果即可了解此生物製劑之防治效果。然而台灣寶(枯草桿菌)及賜倍效(枯草桿菌)之有效成分皆為活孢子，因此只測試代謝產物無法全盤了解其防治能力。又經前人研究得知，生物製劑之有效成分並非只有濾液，應還有拮抗微生物本身(謝等，2003)，因此接下來三分格抑制環法是以全藥劑進行之。

另外，因三分格毒食法雖可供建構拮抗九種病原真菌之快速測試系統，但對剩餘之三種病原細菌仍難以納入，故改良此一三分格培養皿，使其正中央產生缺口以容納抑制環，而成為可供測試驗證藥劑拮抗十二種病原之快速測試系統。

為達成以三個三分格培養皿即可快速測試九種不同病原真菌之目的，乃將九種病原真菌依據其生長速度之快慢分為三組，並且於七至八天內可得完整結果。另外，同一組內之病原菌間生長速度仍有些許差異，故一皿中不同病原之測量時間實際上不一定為同時，而此生長速度之差異並不影響實驗觀察。

三分格抑制環法中，同樣可以一皿測試三種病原，並且加速實驗時間，其中抑制環之目的是為防止生物製劑中的拮抗菌之滲出及干擾，如此才能有清晰之抑制圈，而抑制圈則是用以評估生物製劑防治能力之依據。以此法測試所得之結果可知台灣寶(枯草桿菌)對鏈格孢菌及炭疽病菌有較明顯之抑制能力，由於台灣寶登記用藥範圍之病原不在此次實驗測試對象當中，因此較難以與其宣稱效力做比較，然而以此法所得之可能防治對象已較三分格毒食法多。賜倍效(枯草桿菌)則對鏈格孢菌、灰黴病菌、鐮孢菌、炭疽病菌、疫病菌皆有抑制能力，而其為水稻秧苗徒長病登記用藥，本次實驗中之鐮孢菌會受其抑制，或許說明此結果與藥劑宣稱效果有關。純白鏈黴菌素則依然對疫病菌有良好抑制效果，另外此方法亦能得知其對鏈格孢菌、炭疽病菌、腐霉菌皆有明顯抑制圈產生。

植物病原細菌之藥劑測試如前言所述，常以濾紙片法、瓊脂井法進行，然而此二方法皆不適合用於測試含有活菌之生物製劑，因無法限制拮抗菌之生長而難以測試抑制圈。為測試生物製劑防治植物病原細菌之能力，乃將三分格抑制環法稍作修改以進行，而結果證實此方法確實可以獲得清晰抑制圈。

本研究所利用之多元快速測試系統是結合十二種病原，並將生長速度相近者放入同一三分格，加上中央挖空成三通，才能形成三分格抑制環法，此為過去所未見過之方法，故有機會量產以供未來擴大之應用。

二、針對生物製劑代謝產物或全製劑建構測試系統

瓊脂膜法目的為測試生物製劑之代謝產物抑制病原真菌孢子發芽能力，由於生物製劑為發酵產物，故其本身可能即具有養分，為了避免藥劑本身的養分影響實驗結果，亦應給予測試之病原孢子營養充足的環境，因此將其與馬鈴薯葡萄糖瓊脂混合配成接種用之瓊脂膜來進行實驗。

而由實驗結果可知，台灣寶(枯草桿菌)及純白鏈黴菌素之代謝產物對鏈格孢菌、灰黴病菌、炭疽病菌、鐮孢菌之孢子均無抑制發芽能力，然而在三分格毒食

法中可看到兩藥劑皆可抑制部分病原真菌生長，因此無法以是否能抑制孢子發芽來評估其防治能力。另外，瓊脂膜法只適用於可產孢之病原真菌，在運用上亦有限制。

玻璃紙法之目的為嘗試讓病原菌直接生長在含有生物製劑之培養基上，為避免兩者直接接觸而在培養基上覆蓋一張玻璃紙。以此方法測試的結果中，台灣寶(枯草桿菌)對鏈隔孢菌、灰黴病菌、炭疽病菌、立枯絲核菌、菌核病菌、白絹病菌皆可達百分之百的抑制，包含各級稀釋倍數。而賜倍效(枯草桿菌)則是無論藥劑濃度高或低，皆對九種病原真菌具有百分之八十以上之抑制率。可能是因為培養基內添加之生物製劑內含活菌，馬鈴薯葡萄糖瓊脂足夠使其生長，因此不論其初始濃度高低，拮抗菌皆可生長至一定程度，才讓實驗結果出現各濃度抑制率相近的情形。此法無法得知不同濃度之間抑制率的差異，並且馬鈴薯葡萄糖瓊脂內的營養可讓生物製劑中拮抗菌生長，使得藥劑濃度改變，因此並不適用於測試一含活菌生物製劑之能力，然而此法的確可測試生物製劑是否對病原具有抑制能力，只是無法確切了解濃度對抑制力之影響，並且需考慮測試的藥劑以及目的。

雙層培養基法為玻璃紙法進一步改良，為避免生物製劑內拮抗菌生長而將其配製於水瓊脂中做為第一層，再以外加之馬鈴薯瓊脂培養基作為第二層以供病原真菌生長並能隔離兩者。此方法之測試結果顯示，台灣寶(枯草桿菌)及賜倍效(枯草桿菌)均可以隨著藥劑濃度上升而對病原菌有較高的抑制率，因此相較於玻璃紙法是較好的方法。

由以上實驗可知，全藥劑的測試方能有效了解一生物製劑之防治能力。在全藥劑的測試方法之中，三分格抑制環法及雙層培養基法較適合測試生物製劑之防治能力，其中雙層培養基法雖然實驗時間只需五天，但是操作較為繁瑣，而三分格抑制環法操作簡便，實驗時間也只需要七至八天，因此建議後續之生物製劑多元防治能力快速測試系統皆可以三分格抑制環法進行。

三、本實驗室分離鏈黴菌之培養及拮抗能力驗證

本實驗室分離所得之鏈黴菌 YU-01 與供試之九種病原真菌對峙培養均可產生清楚抑制效果，而對腐霉菌及立枯絲核菌兩種生長快速之病原抑制效果較差，可能是因為 YU-01 培養時間不夠久，釋出到培養基內抗生物質較少，而此二病原菌又生長快速，因此抑制效果較不明顯。另一方面，其餘病原菌生長速度較慢，相對與其對峙的 YU-01 也培養更久，或許因此抑制效果比較明顯。

在 YU-01 的六種供試穀類培養基當中，所有培養基在前兩天均無明顯抑菌活性，第三天後才開始有抗生效果。其中以紅豆培養者之拮抗效果最佳，可在五至六天得到最高抑制能力，其次為米糠，兩者之抑制圈皆可維持兩天以上。而黃豆、黑豆、高粱培養效果均不佳，ISP4 培養者更是幾乎無抑制圈產生。

Bhatnagar 等曾提出以穀類培養鏈黴菌時，營養充足之環境下，二次代謝作用會降低(Bhatnagar *et al.*, 1988)，而 YU-01 的紅豆培養基拮抗效果則是隨培養天數上升，顯示其在培養過程中可能逐漸消耗養分而二次代謝產物增加。

何氏在其對於鏈黴菌 *Streptomyces sioyaensis* PMS502 之穀類培養基中指出，以高粱、燕麥等澱粉質豐富的培養基中，能獲得較高抗生活性，黃豆及紅豆等蛋白質及脂質含量較高的穀類培養基中，則幾乎無抗生活性(何，2001)。邱氏則在鏈黴菌 *S. fimbriatus* WRS9 之穀類培養基中，發現以 2% 燕麥培養液所獲得之菌量及拮抗力均為最高(邱，2003)。與本實驗結果不盡相同，也許和菌種之間生理生化差異有關。

額外添加的 ISP4 鹽類及花寶 3 號均無法使 YU-01 培養液之抗生活性增加。柯氏在鏈黴菌 *S. saraceticus* 培養實驗中提出，氮素源的提供不利鏈黴菌產生抗生物質(柯，2000)。而 ISP4 鹽類及花寶 3 號均含有氮，可能因此使得 YU-01 培養液拮抗效果不佳。

由三分格抑制環法測試，可知以 YU-01 之紅豆培養基效果較佳，對於供試之九種病原真菌及青枯病菌均有抑制效果，米糠培養者亦有良好效果，未來可以嘗試

以 5L 發酵槽進行培養。另一方面，Lahdenpera 曾提出，部分根圈放線菌之存在不利於植物生長(Lahdenpera, 1987)，因此溫室實驗亦為必要。

另外，菌量也是重要指標，未來應進一步測試 YU-01 在發酵過程中菌量之變化。保存安定性對發酵產品亦極為重要，也是需要考量的部份。

四、對其他市售生物製劑拮抗能力之測試應用及驗證

以三分格抑制環法實際測試市售生物製劑 B01、B03、B04、B02，確實可以測得這些生物製劑的防治能力。其中 B02 由於含有木黴菌，故其測量方式略有改變，並且無法進行對病原細菌之測試，這或許是先天的限制之處，然三分格抑制環法仍可適用於許多生物製劑。

綜合以上實驗結果，本研究之多元快速測試系統配合三分格抑制環法具有操作方便、測試時間短、對植物病原真菌及細菌皆適用等優點，在生物防治相關研究眾多的現今，可以作為生物製劑多元防治能力快速測試系統一簡單快速的方法之一。

參考文獻

1. 方中達。1996。植病研究方法。中國農業出版社。北京。427 頁。
2. 石信德、黃振文。2003。研製鏈黴菌植物保護製劑防治作物病害。植物病理學會特刊新一號：103-116。
3. 石信德、黃振文。2010。鏈黴菌生物製劑之應用潛力。農業生技產業季刊 24：38-46。
4. 吳文希。2011。臺灣植物病害之微生物防治。農業生技產業季刊 28：48-52。
5. 吳慧珍、陳子偉、吳文希。1999。胡蘿蔔酸腐病之發病生態及防治。植物病理學會刊 8：1-8。
6. 何炳璋。2001。鏈黴菌 *Streptomyces sioyaensis* PMS502 量產及其於病害防治之應用。國立中興大學植物病理學系碩士論文。73 頁。
7. 林漢釗、黃文的、楊尚書、曾德賜。2008。枯草桿菌 *Bacillus subtilis* WG6-14 對水稻秧苗之生長促進及對 *Sclerotium rolfsii* 所造成水稻秧苗立枯病之防治效果。植物病理學會刊 17：53-54。
8. 邱瓊瑩。2003。以鏈黴菌 *Streptomyces fimbriatus* WRS9 作為生物製劑之潛力及鏈黴菌屬聚合酶連鎖反應專一檢測引子之發展。國立中興大學植物病理學系碩士論文。79 頁。
9. 柯欣志。2000。營養供給對放線菌 *Streptomyces saraceticus* 31 號菌株抗生物質與幾丁質分解酵素產生之影響。國立中興大學植物病理學系碩士論文。109 頁。
10. 孫岩章、李英周、魏恆巍。2009。無毒農業疾病防治手冊。花蓮縣政府。台灣花蓮。111 頁。
11. 陳保良、李木川、黃穗昌、葉瑩。2005。生物性農藥管理與未來展望。農業生技產業季刊 4：54-59。
12. 馮海東、蔡峻芳、林明秀。2007。農藥標準規格與檢驗方法第九輯。行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所。278 頁。
13. 黃睿志。2002。黏帚黴菌 G-8 防治立枯絲核菌引起之病害。國立中興大學植物病理學系博士論文。179 頁。
14. 鄧雅靜、曾國欽、徐世典。2006。促進植物生長之根棲細菌 *Streptomyces* sp. RS70 誘導番茄對青枯病之系統性抗性。植物病理學會刊：15:107-116。
15. 蔡洵龍、陳敏瑞、徐世典、曾德賜、曾國欽。2004。葉表螢光假單胞菌 *Pseudomonas putida* YLFP 14 對甜椒細菌性斑點病之防治潛力。植物病理學會刊 13：191-200。
16. 劉媚恩譯。1988。植物病理研究法。茂昌圖書有限公司。台灣台北。484 頁。
17. 謝奉家、李美珍、高穗生。2003。枯草桿菌菌體及其代謝物對病原真菌之抑菌效果評估。植保會刊 45：155-162。
18. Baker, K. F. 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. Ann.

- Rev. Phytopathol. 25: 67-85.
19. Baker, K. F. and Cook, R. J. 1974. Biological Control of Plant Pathogens. W. H. Freeman Press. San Francisc. 433pp.
 20. Bhatnagar, R. K., Doull, J. L., and Vining, L. C. 1988. Role of the carbon source in regulating chloramphenicol production by *Streptomyces venezuelae*: studies in batch and continuous cultures. Can. J. Microbiol. 34:1217-1223.
 21. Chu F. F. and Wu W. S. 1980. Biological and chemical control of potato black scurf. Plant Protec. Bull. 22: 269-286.
 22. Crawford, D. L., Lynch, J. M., Whipps, J. M., and Ousley, M. A. 1993. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. Appl. Environ. Microbiol. 59:3899-3905.
 23. DeBach, P. and Rosen, D. 1991. Biological Control by Natural Enemies. Cambridge Univ. Press. Cambridge. 456pp.
 24. Dhingra, O. D., and Sinclair, J. B. 1995. Basic Plant Pathology Methods 2nd ed. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL. 434pp.
 25. El-Abyad, M. S. , El-Sayed, M. A., El-Shanshoury A. R., El-Sabbagh S. M. 1993. Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. Plant Soil. 149:185-195.
 26. El-Shanshoury, A. R., El-sououd, S. A., Awadalla, O. A. and El-Bandy, N. B. 1996. Effects of *Streptomyces corchorusii*, *Streptomyces mutabilis*, pendimethalin, and metribuzin on the control of bacterial and *Fusarium* wilt of tomato. Can. J. Bot. 74:1016-1022.
 27. Fravel, D. R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant disease. Annu. Rev. Phytopathol. 26:75-91.
 28. Huang, C. J., Yang, K. H., Liu, Y. H., Lin, Y. J., and Chen, C. Y. 2010. Suppression of southern corn leaf blight by a plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus* C1L. Ann. App. Biol. 157: 45–53.
 29. Lahdenpera, M. L. 1987. The control of fusarium wilt on carnation with a *Streptomyces* preparation. Acta. Horticu. 216:85-92.
 30. Lee, Y. and Wu, W. S. 1989. Chemical and biological controls of sunflowers *Sclerotinia* diseases. Plant Prot. Bull. 28: 101-109.
 31. Mahadevan B. and Crawford, D. L. 1997. Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. Enzyme Microbial Technol. 20:489–493.
 32. Manten, A., Klopping, H. L., and Van Der Kerk, G. J. M. 1950. Investigations on organic fungicides, II. A new method for evaluating antifungal substances in the laboratory. Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol. 16: 45-55.
 33. Miyadoh, S. 1997. Atlas of Actinomycetes. Asakura Pub. Co., Ltd. Japan. 223pp.

34. Prinham, T. G., Lindenfelser, L. A. Shotowell, O. L., Stodola, F. H., Benedict, R. G., Foley, G., Jackson, R. W., Zaumeyer, W. J., Preston, W. H., and Mitchell, J. W. 1956. Antibiotics against plant disease in laboratory and greenhouse survey. *Phytopathology* 46: 568-575.
35. Raatikainen, O. J., Paivinen, T. H., and Tahvonen, R. T. 1994. HPLC separation and subsequent detection of aromatic heptaene polyenes in peat after treatment with *Streptomyces griseoviridis*. *Pestic. Sci.* 41:149–154.
36. Rothrock, C. S. and Gottlieb, D. 1984. Role of antibiosis in antagonism of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* to *Rhizoctonia solani* in soil. *Can. J. Microbiol.* 30: 1440-1447.
37. Sabaratnam, S. and Traquair J. A. 2002. Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. *Biol. Control* 23: 245-253.
38. Shih, H. D., Liu, Y. C., Hsu, F. L., Mulabagal, V., Dodda, R. and Huang, J. W. . 2003. Fungichromin: A substance from *Streptomyces padanus* with inhibitory effects on *Rhizoctonia solani* . *J. Agric. Food. Chem.* 51: 95-99.
39. Shirling, E. B., and Gottlieb, D. 1968. Cooperative description of type cultures of Streptomyces II. Species description from first study. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 18:69-189.
40. Tschen, J. S. M., Lee, Y. Y., Wu, W. S., and Liu, S. D. 1989. Biological control of basal stem rot of chrysanthemum by antagonists. *J. Phytopathol.* 126: 313–322.
41. Tsujibo, H., Hatano, N., Okamoto N., Endo, H., Miyamoto, K., and Inamori, Y. 1999. Synthesis of chitinase in *Streptomyces thermoviolaceus* is regulated by a two-component sensor-regulator system. *FEMS Microbiol. Lett.*: 181:83–90.
42. Valkonen, J. P. T. and Koponen, H. 1990. The seed-borne fungi of Chinese cabbage (*Brassica pekinensis*), their pathogenicity and control. *Plant Pathol.* 39: 510–516.
43. Waksman, S. A., Reilly, H. C., and Johnstone, D. B. 1946. Isolation of streptomycin-producing strains of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 52: 393–397.
44. Water, D. E., and Kaplan, D. T. 1990. Antagonists of plant-parasitic nematodes in Florida citrus. *J. Nematol.* 22: 567-573.
45. Williams, S. T., Goodfellow, M., and Alderson, G. 1989. Genus *Streptomyces*. p.2452-2492 . *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 4. (Williams, S. T., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. eds.) Williams & Wilkins, Baltimore.
46. Wu, W. S. 1976. Biological control of seed- and soil-borne fungi associated with wheat and oats. *Bot. Bull. Academia Sinica* 17: 161-168.
47. Wu, W. S. and Lu, J. H. 1984. Seed treatment with antagonists and chemicals to control *Alternaria brassicicola*. *Seed Sci. Technol.* 12: 851-862.