國立臺灣大學生物資源暨農學院

植物醫學碩士學位學程

碩士論文

Master Program for Plant Medicine

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

開發番茄青枯病和晚疫病之生物防治技術

Establishment of techniques for biocontrol of tomato bacterial wilt and late blight

王思淮

Szu-Huai Wang

指導教授：劉瑞芬 博士

Advisor: Ruey-Fen Liou, Ph.D.

中華民國 107 年 7 月

July, 2018

doi:10.6342/NTU201803570

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

開發番茄晚疫病和青枯病之生物防治技術

Establishment of techniques for biocontrol of tomato late blight and bacterial wilt

本論文係王思淮（學號 R04645004）在國立臺灣大學植物醫學碩士學位學程完成之碩士學位論文，於民國 107 年 7 月 23 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：

劉瑞芬　博士 劉瑞芬 （指導教授）
國立臺灣大學植物病理與微生物學系　教授

張雅君　博士 張雅君
國立臺灣大學植物病理與微生物學系　教授

陳穎練　博士 陳穎練
國立臺灣大學植物病理與微生物學系　助理教授

碩士學位學程主任 [illegible] （簽名）

doi:10.6342/NTU201803570

目錄

目錄……I
中文摘要……II
ABSTRACT……III
壹、 前言……1
一、 番茄簡介……1
二、 番茄青枯病……3
三、 番茄晚疫病……4
四、 地衣芽孢桿菌 (*Bacillus licheniformis*) 應用於生物防治……6
五、 土壤微生物篩選……9
六、 本研究的目的……9
貳、 材料與方法……10
一、 拮抗菌特性試驗……10
二、 拮抗菌分泌物質分析……12
三、 番茄盆栽試驗……15
四、 土壤微生物篩選與鑑定……18
參、 結果……21
一、 地衣芽孢桿菌 *Bacillus licheniformis* (31-1) 抑菌特性測試……21
二、 溫室盆栽試驗……25
三、 土壤拮抗菌篩選……28
肆、 討論……30
一、 *B. licheniformis* (31-1) 拮抗能力分析……30
二、 *B. licheniformis* (31-1) 於番茄盆栽的應用……33
三、 土壤拮抗菌篩選……35
四、 未來展望與應用……37
伍、 參考文獻……39
陸、 附表……48
柒、 附圖……50
捌、 附錄一……75

doi:10.6342/NTU201803570

中文摘要

番茄為臺灣重要蔬果，具有高經濟價值。臺灣氣候及環境適宜，全臺皆可種植番茄，主要產區為中南部。雖然種植不難，但番茄容易罹患許多病害，包括病毒病、青枯病及晚疫病等，常造成農民嚴重經濟損失，因此防治這些病害成為番茄種植的重要課題。在現今環保意識抬頭的情況下，生物防治無疑提供一個良好的選項。本實驗室先前從疫病菌抑菌土所分離的地衣芽孢桿菌 *Bacillus licheniformis* (31-1) 對於青椒疫病有顯著抑制效果，且可促進植株生長。本研究發現 *B. licheniformis* (31-1) 外泌至培養基的拮抗物質可抑制多種病原菌生長，包括腐霉病菌、疫病菌、番茄萎凋病菌及炭疽病菌等；此外，*B. licheniformis* (31-1) 產生之揮發性物質也能抑制前述部分病原菌的生長。為進一步鑑別 *B. licheniformis* (31-1) 外泌拮抗物質的成分，將 *B. licheniformis* (31-1) 大量培養後，進行拮抗物質萃取、HPLC 及 FIA-MS 分析，再經由比對 AntiMarin 資料庫發現其中兩個化合物為 ochrindoles D 和 streptovirudin-A_1。在盆栽防治實驗中，澆灌處理 *B. licheniformis* (31-1) 可降低青枯病的罹病嚴重度，但無論是噴灑或是澆灌處理 *B. licheniformis* (31-1) 都無法抑制番茄晚疫病的發生，澆灌處理也無法促進番茄植株生長。此外，為獲得更多生物防治菌，本研究採集土壤樣本，以蔬菜汁培養並分離其中具潛力之微生物。目前以盆栽接種試驗篩選出一株具有防治青枯病潛力的細菌 (6-2)，經由 16S rDNA 序列親緣關係分析，發現此菌可能為 *Sinomonas* 屬的成員。

關鍵詞：地衣芽孢桿菌、拮抗物質、生物防治、青枯病菌、晚疫病菌、土壤微生物篩選

doi:10.6342/NTU201803570

Abstract

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is an important economic crop in Taiwan, with the main cultivation areas encompassing the middle and southern Taiwan. It is susceptible to various diseases, including virus diseases, bacterial wilt, late blight, which cause heavy economic loss for the farmers. Consequently, management of tomato diseases is always an important issue, which usually involves the application of chemical pesticides. However, pesticide overuse is a direct threat not only to the environmental quality but also to food safety. As a result, biocontrol has become a better choice for crop cultivation in a ecofriendly and safe way. Previously, *Bacillus licheniformis* (31-1) was found to inhibit the growth of various pathogens including *Phytophthora capsici,* is effective for the control of Phytophthora blight on bell pepper, and is able to accelerate the growth of this plant. In this study, it is demonstrated that metabolites secreted by *B. licheniformis* (31-1) can inhibit the growth of various pathogens, including *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp. and *Colletotrichum boninense*. Volatile organic compounds produced by *B. licheniformis* (31-1) can also inhibit the growth of some of the aforementioned pathogens. Analyses based on butanol extraction, HPLC, and FIA-MS identified two of the substances secreted by *B. licheniformis* (31-1), namely ochrindoles D and streptovirudin-A_1, respectively. When applied by soil drench on tomato plants grown in pots, *B. licheniformis* (31-1) reduced the disease severity of bacterial wilt. However, no matter applied by soil drench or by phyllosphere spray, *B. licheniformis* (31-1) failed to reduce the disease incidence of late blight. Application by soil drench failed to promote the growth of tomato. As well, to get more isolates for efficient biocontrol of tomato bacterial wilt, some bacterial and fungal isolates were collected from soil

doi:10.6342/NTU201803570

samples and screened for biocontrol potential. Among them, one bacterial isolate (6-2) showed good ability to reduce the disease severity of bacterial wilt. It is likely *Sinomonas* sp. as suggested by phylogenetic analysis of 16S rDNA sequence.

Keywords: *Bacillus licheniformis*, biocontrol, soil microbes screening, *Phytophthora infestans*, *Ralstonia solanacearum*, metabolites

doi:10.6342/NTU201803570

壹、 前言：

一、 番茄簡介

1. 番茄栽種史

番茄 (*Solanum lycopersicum* L; tomato) 屬於茄科作物，原產於南美洲安地斯山區，栽培歷史已有兩千年。16 世紀傳入歐洲，一開始番茄僅做為觀賞植物或藥用植物，直至 19 世紀歐洲才普遍食用番茄，台灣則在日據時期才開始有規模栽培。

番茄可分為大果番茄、小果番茄及加工番茄 (劉等，2016)。小果番茄歷經多年的研究及品種改良，在市場上出現各式品種，例如國內種苗公司育種的小番茄「聖女」及「玉女」、黃色小番茄「橙蜜香」；農政單位改良番茄的園藝及抗病特性獲得的品種，例如耐熱能在夏天收成的「台南亞蔬 6 號」(劉等，1997)、對番茄黃化捲葉病具抗性的「種苗亞蔬 22 號」(李等，2009) 等。因此在各方的研究努力下，小果番茄種類越來越多、栽種面積也逐年上升，成為台灣重要的蔬果之一。

2. 番茄經濟重要性

番茄主要栽種於嘉義、臺南和高雄。根據農糧署的 105 年農業統計年報，民國 105 年栽種總面積約 5,000 公頃，總產量將近 12 萬公噸，產值超過 53 億新台幣，相較於 103 年 (33 億) 和 104 年 (38 億) 的產值，明顯大幅提升。

3. 番茄營養價值

番茄富含營養，每 100 g 中含有 1.2 g 蛋白質、0.2 g 脂質、 3.18 g 碳水化合物；無機礦物質包含鈣 5 mg、鎂 8 mg、磷 29 mg、鉀 212 mg、鈉 42

doi:10.6342/NTU201803570

mg、鋅 0.14 mg、錳 0.088 mg；維生素包含維生素 C 16 mg、硫胺 (維生素 B_1) 0.046 mg、核黃素 (維生素 B_2) 0.034 mg、菸鹼酸 0.059 mg、泛酸 (維生素 B_5) 0.018 g 及維生素 B_6 0.06 mg (Perveen et al., 2015)。

4. 番茄生長條件

番茄日照需求量大，光週期在 12 ~ 14 小時之間，開花不受光週期影響，是一種光中性植物。最適生長溫度為日溫 21 ~ 26 ℃，夜溫 15 ~ 20 ℃，開花著果時溫度最好低於 28 ℃，以免造成著果率不佳或是果實轉色不良。另外番茄生長期需水量大，不過著果時過多的水分會導致裂果；部分農友會限水使番茄果實甜度上升，但限水過度也可能致使植株生長不良，果實品質反而下降。因此水分的控管對番茄栽培很重要。土壤方面，以富含有機質、排水良好的弱酸性砂質壤土為佳，土壤酸鹼值 (pH) 最好在 6.0 ~ 6.6。另外茄科作物要避免連作，以減少根瘤線蟲、萎凋病等土傳性病害的發生。臺灣 9 ~ 12 月氣候較為涼爽，適合種植番茄。在定植約一個月後會陸續開花，再一個月差不多就能開始採收，採收期約為一個月至一個半月 (劉等，2016)。

5. 番茄病蟲害

如同其他茄科作物，在栽種過程中番茄也容易罹患病害及遭受夜蛾類、銀葉粉蝨與蟎類等多種害蟲侵擾。常見病害包括卵菌引起的晚疫病 (Late blight)、幼苗疫病 (Phytophthora blight)；細菌性的青枯病 (Bacterial blight)、細菌性斑點病 (Bacterial spot)；真菌性的白絹病 (Southern blight)、萎凋病 (Fusarium wilt)；病毒性的黃化捲葉病；或是根瘤線蟲等。其中多種病害都難以防治，常造成農民嚴重經濟損失，像是青枯病會藉由土壤、水分大面積感染，且發病迅速難以防治；晚疫病藉由風力、雨水傳播，只要下雨過後就很容易大面積感染；另外，也可能因為缺乏有效藥劑 (如青枯病)、或因土壤薰

doi:10.6342/NTU201803570

蒸等處理成本過高造成防治困難。因此，如何有效解決這些問題就成了番茄產業的重要課題。

二、 番茄青枯病 (bacterial wilt)

1. 青枯病簡介

青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) 是全球最重要的病原細菌之一，造成多種重要作物的經濟損失，特別是茄科植物。青枯病菌最早是 1890 年由 Thomas Jonathan Burril 在美國南方的馬鈴薯上發現，後來陸續也在番茄和茄子被發現 (Smith et al., 1896)，目前在全球熱帶、亞熱帶的區域皆能發現其蹤跡。

青枯病菌是由許多不同菌系組成的複合種 (species complex)，可依菌株寄主差異分為 5 個生理小種 (race) (Buddenhagen et al., 1962; He et al., 1983)；依據菌株不同的碳水化合物利用能力，分為 6 種生化型 (biovar) (Hayward, 1964; Denny, 2006)；另外再依據基因序列的差異分為 4 群演化型 (phylotype) (Fegan and Prior, 2005)。臺灣的青枯病菌主要為 phylotype I race 1/ biovar 3 或 biovar 4 及 phylotype II race 3/ biovar 2 (吳等，2011; Lin, 2008; Wu et al., 2010; Chiou, 2002)。

2. 青枯病病徵及發病生態

青枯病菌寄主範圍廣泛，目前已記載至少 53 科 200 多種寄主植物 (Denny, 2006)。青枯病為典型的土壤傳播病原，冬季可殘存於土壤或是以雜草作為寄主，一旦氣候轉為高溫高濕，即可藉由帶病土壤及灌溉水傳播從根部傷口或是自然開口侵入。植株遭感染後，由於維管束遭到病原菌及其分泌物阻塞，初期從下位葉開始枯萎，至後期全株萎凋。將感病植株莖部橫切，

doi:10.6342/NTU201803570

會看到維管束褐化，將莖部放入水中，數分鐘後即可看到從切口處流出大量病原菌，呈現乳白色煙霧狀 (Buddenhagen et al., 1964; Peeters et al., 2013)。由於發病極為迅速，以致植物全株萎凋時仍為青綠色，故名青枯病。

3. 番茄青枯病防治

目前無推薦的化學農藥，主要以耕作防治預防病害的發生。由於青枯病為土媒病害，控制土壤條件及水分管理就顯得非常重要，可以藉由使用滴灌的澆水系統限制水量、注意園中積水及田間衛生。也可以種植抗病品種或以抗病茄砧進行嫁接。另外與水稻等非寄主作物輪作也是好選擇，種植水稻時得在田間灌水，正好創造出青枯病菌無法存活的淹水環境，進而減少青枯病的發生 (林，2009)。另外施用生物防治菌 *Bacillus amyloliquefaciens* (PMB01) (周等，2014)，也能有效減少病害發生。

三、 番茄晚疫病 (late blight)

1. 晚疫病簡介

晚疫病菌 *Phytophthora infestans* de Bary 引起的晚疫病為番茄重要病害。馬鈴薯晚疫病發源地為墨西哥中部 (Goss et al., 2014)，後來逐漸傳播至南美洲。西班牙自從發現新大陸後，持續從南美洲向歐陸輸入馬鈴薯 (Yoshida et al., 2013)，結果於 1840 年代也將晚疫病菌帶回歐洲，此病害迅速於歐洲大陸大傳播 (Bourke, 1964)，並於 1845-1846 年導致「愛爾蘭大饑荒」，幾乎摧毀了馬鈴薯產業。

晚疫病菌為異絲型 (heterothallic) 菌種，需要 A^1 和 A^2 配對型 (mating types) 共同存在才會行有性生殖。在 1980 年代之前，在歐洲及美加地區所分析之晚疫病菌菌株均為 A^1 配對型，A^2 配對型只有在墨西哥檢出

doi:10.6342/NTU201803570

(Grünwald et al., 2001; Flier et al., 2003)，只有單一配對型大幅降低了晚疫病菌因有性生殖而造成災情的機率；但在 1984 年開始在墨西哥以外的地區也檢測出 A^2 配對型菌系 (Fry et al., 1992; Fry et al., 1993)，造成歐美新的災情，世界各先進國更加關注於晚疫病菌之族群分布及變異，陸續開發多種分子標記，包括 glucose-6-phosphate isomerase (Gpi), malic enzyme (Me) 及 peptidase (Pep) 等之異位酶譜 (allozyme pattern) (Tooley et al., 1985)、粒線體 DNA 限制片段長度多型性 (mitochondrial restriction fragment length polymorphism) (Griffith et al., 1998) 及 DNA 指紋分析 (DNA fingerprint analysis) (Goodwin et al., 1992) 等。

1997 年以前晚疫病在臺灣發生不嚴重，且只要適當使用滅達樂等農藥，再注意田間衛生，即可有效防治晚疫病；但 1997 年冬季，在后里馬鈴薯田突然爆發嚴重晚疫病，造成農民鉅大經濟損失 (安等，2010)。經調查發現，其可能肇因於田間有晚疫病菌新菌系 US-11 入侵 (Jyan et al., 2004)。1997 年前存在於田間的晚疫病菌屬於舊菌系 US-1，其生長速度慢，生長溫度不能高於 25 度，所以只要天氣稍微回暖， 就不致造成嚴重災情，且 US-1 對滅達樂、依得利均無抗性，只要在發病期間定期施藥，即可避免危害擴大；而 US-11 新菌系雖仍為 A^1 配對型，但相較於 US-1，其競爭優勢包括耐熱性較佳、對滅達樂有抗藥性、生長速率快 1.4 倍、致病性較強且寄主範圍較廣等，以致晚疫病自此成為台灣番茄和馬鈴薯棘手的病害，常造成農民嚴重損失 (安等，2010)。

2. 晚疫病病徵及發病生態

晚疫病好發於涼爽潮濕的氣候，在臺灣一般發生在冬季 12 月至隔年 4 月。晚疫病菌的孢囊可直接發芽，但也可能在高濕度環境下釋放游走子，藉由風和雨水傳播，感染番茄全株。被感染部位初期呈現水浸狀不規則病斑，

doi:10.6342/NTU201803570

之後病斑逐漸擴大轉為深褐色且壞死，感染後期會造成落花落果。氣候合適時容易在園間快速傳播，造成整個園區植株發病死亡 (陳和陳，2002)。

晚疫病菌初次感染源為帶菌種薯或是殘存於土壤中的菌絲與卵孢子。當環境適合時，孢囊釋放游走子，隨風及雨水侵染植株，約 3 – 5 天後即在被感染之組織生成大量孢囊，成為二次感染源，再次向外傳播，完成一個無性生活史，而被感染之植物組織可能殘留在田間或是種薯上，成為下一次的感染源 (安等，2010)。

3. 番茄晚疫病防治

雖然晚疫病容易造成整個園區的危害，但如果好好採取防治手段，就能減少損失。目前市面上有不少耐高溫的番茄品種，像是小果番茄臺南亞蔬 6 號、臺南亞蔬 19 號、種苗亞蔬 22 號等，農民可以選擇在三-四月間育苗，避開 12 月至 4 月晚疫病最易發生的季節，如此即便遇上炎熱的夏季，也能有不錯的收成。也可選擇使用設施栽培，直接隔絕病原，降低植株受到外界病原影響的可能性。田間衛生管理也是有效降低病原感染機率的重要手段，包括減少病原入侵的傷口、移除枯枝落葉、地面覆蓋黑色塑膠布以避免土中病原飛濺至植株等。此外，由於晚疫病菌 US-11 菌系對於滅達樂具有抗藥性，需要輪流使用鋅錳乃浦、亞托敏及免得爛等不同藥劑以便獲得較佳的防治效果 (陳和陳，2002)。在雨季來臨前，連續 2-3 次噴灑亞磷酸中和液以誘導植株產生抗性，也可有效降低晚疫病罹病率 (蔡等，2009)。

四、 地衣芽孢桿菌 (*Bacillus licheniformis*) 應用於生物防治

近年來環保意識及食安意識高漲，人們對於農藥的施用情況越來越重視，噴灑過量或是不當用藥都將引起民眾反彈；而施用不當對於環境也會造成很

doi:10.6342/NTU201803570

大的影響。生物防治無論對於人體或是環境都具有較高的安全性，且無安全採收期的問題，很適用於茄科作物，也能使農作的栽培更符合永續經營的目標。因此如何加強生物防治應用於茄科作物栽培這方面，將是重要的研究議題。

1. 生物防治簡介

生物防治即是以生物相關之技術防治植物病害，可能是用微生物、昆蟲、寄生植物等生物的本體，或是利用生物的代謝物及萃取物降低病原菌的數量，也可能是直接以抗病育種或是轉基因技術達到防治病害的效果。目前關於植物病害的生物防治，由於抗病育種及轉基因作物有其通行的困難，大多是以微生物或是其代謝物進行防治。

2. 地衣芽孢桿菌抑菌代謝物

地衣芽孢桿菌是革蘭氏陽性菌，普遍存在於土壤中，能分泌 keratinase, L-asparaginase 及 α-Amylase 等多種酵素，被應用於多種領域，例如 keratinase 可將羽毛分解轉換成動物飼料 (Lin et al., 1992)；L-asparaginase 可用於治療急性淋巴性白血病 (Sudhir et al., 2016)；α-Amylase 可用於分解澱粉 (Haki and Rakshit, 2003) 等。

近年來發現地衣芽孢桿菌亦具有生物防治之潛力，能分泌多種抗生物質，例如幾丁質酶 (chitinase) 可抑制多種病原菌的生長 (Gomaa, 2012; de la Vega et al., 2006)；*B. licheniformis* 菌株 MKU3 所產生的細菌素 (bacteriocin) 可抑制金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、藤黃微球菌 (*Micrococcus luteus*)、仙人掌桿菌 (*Bacillus cereus*) 等多種革蘭式陽性菌 (Kayalvizhi and Gunasekaran, 2010)；表面素 (surfactin) 對茄科常見病原菌，例如番茄晚疫病菌、炭疽病菌

doi:10.6342/NTU201803570

(*Colletotrichum gloeosporioides*) 及灰黴病菌 (*Botrytis cinerea*) 具有顯著抑制效果 (Kong et al., 2010)；lichenicidin 則是一種新被發現的 lantibiotic，對於多種革蘭氏陽性菌都有抑制生長效果 (Alvarez-Ordóñez et al., 2014; Dischinger et al., 2009)；伊枯草菌素 (iturin) 對小麥葉銹病菌 (*Puccinia* spp.) 及大麥白粉病菌 (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) 有良好的抑制能力 (Kong et al., 2010)。*B. subtilis* AH18 和 *B. licheniformis* K11 藉由分泌 β-葡聚糖酶 (β-glucanase) 及鐵載體 (siderophores) 降低甜椒疫病的罹病嚴重度 (Lim and Kim, 2010)。

台灣目前並無 *B. licheniformis* 商品化之生物農藥，在美國則有已上市商品 Biofungicide Green-Releaf TM 710-140 (Novozyme)，主要用於防治裝飾草坪和高爾夫球草坪上的菌核病菌 (*Sclerotinia homoeocarpa*) 和炭疽病菌 (*Colletotrichum graminicola*)，不論在發病前或發病後施用都能有良好的防治效果 (US EPA, 2001)。

3. *Bacillus licheniformis* (31-1)

李 (2015) 經由針對青椒疫病菌 (*Phytophthora capsici*) 孢囊發芽篩選抑菌土的方式，成功自土壤中篩選一支拮抗效果良好的細菌，根據 16S rDNA (Galkiewicz and Kellogg, 2008) 及 gyrase B 基因 (Huang et al., 2012a) 的核酸序列鑑定命名為 *Bacillus licheniformis* (31-1) (李，2015)。*B. licheniformis* (31-1) 對於多種病原菌的生長具有顯著抑制效果，包括晚疫病菌、番茄萎凋病菌、香蕉黃葉病菌、草莓炭疽病菌、褐根病菌、水稻徒長病菌及稻熱病菌等。在溫室盆栽試驗中，澆灌 *B. licheniformis* (31-1) 能降低青椒疫病和青枯病的病害嚴重度。此外也能促進青椒根系生長及增加其乾重，具有促進植物生長的潛力 (李，2015)。

doi:10.6342/NTU201803570

五、 土壤微生物篩選

土壤中富含各式各樣的微生物,科學家嘗試從中分離各種不同的微生物，經過進一步的研究發展許多技術，例如用在醫療中的抗生素、工業用的催化劑、食品工業中使用的發酵技術等。在農業領域中，微生物對於作物栽培也有相當大程度的影響，其中生物防治便是很重要的一環，例如枯草桿菌及高雄農改場發現之液化澱粉芽孢桿菌 (PMB01) 皆是成功開發的微生物製劑。

土壤中龐大的微生物，要如何有效的篩選是重要的課題。過去多是直接將土壤稀釋、分菌，再將分離之菌株和病原菌做對峙培養，以便從為數眾多的微生物種類中挑選有效拮抗菌，例如 Cazorla (2006) 從土壤分離的 *Pseudomonas fluorescens* PCL160,能夠有效抑制由 *Dematophora* 引起的酪梨根腐病。雖然對峙培養能有效尋找到有效拮抗微生物，但是這種篩選方式也可能遺漏許多菌株，因為有些菌株無法在一般培養基生長，有些菌株雖然無法分泌抗生物質或酵素，但能夠促進植物生長，並促使植物啟動防禦反應，進而達到抗病的效果。因此，可嘗試不同方式進行土壤微生物分離，以更有效率的方式尋找拮抗微生物。

六、 本研究的目的

本研究想更多方面了解 *B. licheniformis* (31-1)的應用潛力，除了尋找其抑菌物質之外，也想知道 *B. licheniformis* (31-1) 是否適用於番茄青枯病及晚疫病之防治,期許此菌能為這兩種重要番茄病害增添有效的防治手段。另外，除了單獨使用 *B. licheniformis* (31-1)，也期望再尋找不同的拮抗菌，增加更多能夠用於生物防治的菌株，或是也能試著將多種菌共同施用以達到更佳的效果，使 *B. licheniformis* (31-1) 更有機會實際投入田間使用。

doi:10.6342/NTU201803570

貳、 材料與方法

一、 拮抗菌特性試驗

1. 對峙培養測試

本實驗使用之 *Bacillus licheniformis* (31-1) 菌株為李 (2015) 在宜蘭三星鄉採集土壤分離得之。對峙培養方式為先將青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* 小量培養一天後，將濃度調整為 OD_{600} = 0.3 (約為 3 x 10^7 cfu/mL) 並以 100 µL 塗盤於 CPG 培養基。取 *B. licheniformis* (31-1) 單菌落至 LB 液態培養基試管中，放置於 28 °C 生長箱以 200 rpm 搖晃小量培養。16 至 20 小時後，濃度調整為 OD_{600} = 0.1, 0.5 及 1.0，於青枯病塗盤後滴加 10 µL 於 CPG 培養基上三點。於第二天開始觀察及拍照記錄，重複 3 次。青枯病菌是和鄭秋萍老師取得，接種至番茄後，再取罹病莖部重新做病健部分離，以 TTC 培養基鑑定，得到感染性較強之菌株。晚疫病菌對峙培養以同樣濃度之 *B. licheniformis* (31-1) 滴加 10 µL 於裸麥培養基上三點，並於中央放入晚疫病菌菌絲塊 (直徑 0.5 cm)，於第六天開始觀察及拍照，重複 3 次。晚疫病菌 *Phytophthora infestans* 使用之菌株為安寶貞老師所提供，再經由初步噴灑孢囊液接種植株後，選定感染力和生長勢較佳之菌株 *P. infestans* (318-4)。

2. 對不同植物病原菌對峙培養

取 *B. licheniformis* (31-1) 單菌落至 LB 液態培養基試管中，放置於 28 °C 生長箱以 200 rpm 搖晃小量培養。16 至 20 小時後，濃度調整為 OD_{600} = 0.1, 0.5 及 1.0，滴加 10 µL 於 V8 培養基上三點，將培養基中間放上不同病原菌菌絲塊，包含 *Pythium myriotylum*, *Pythium splendens*, *Pythium aphanidermatum* 及 *Colletotrichum boninense* 進行對峙培養，重複 3 次。*Py. myriotylum*, *Py. splendens*, *Py. aphanidermatum* 是以 5% V8 培養基進行對峙

doi:10.6342/NTU201803570

培養，於二天後觀察紀錄；*C. boninense* 是以 10% V8 培養基進行對峙培養，於五天後觀察紀錄。

3. 拮抗物質測試

此試驗使用之菌株包含 *Py. myriotylum*, *Py. splendens*, *Py. aphanidermatum* 腐霉病菌，*Phytophthora parasitica*, *Phytophthora capsici* (28173, 213061), *P. infestans* 疫病菌和真菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense, Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici, C. boninense*。腐霉病菌使用之培養基為 5% V8，疫病菌及真菌則是 10% V8，其中 *P. infestans* 使用裸麥培養基。

將 *B. licheniformis* (31-1) 以 LB 試管小量培養後，調整濃度為 OD_{600} = 1.0，取 100 μL 塗盤於 LA 培養基，置於 28 °C 生長箱培養兩天。將煮沸 15 分鐘之玻璃紙平鋪於 5% V8 培養基上，在正中間放上一塊直徑 5 mm 之 *B. licheniformis* (31-1) 菌塊。此培養基置於 25 °C 生長箱培養三天後，將玻璃紙和菌塊一同撕去，在培養基正中間放上直徑 5 mm 之前述病原菌菌絲塊，置於 25 °C 生長箱培養，分別於一天、三天、四天、八天後分別觀察記錄腐霉病菌、*P. capsici* (28173, 213061)、*P. parasitica*, *F. oxysporum* f. sp. *cubense, F. oxysporum* f. sp. *lycopersici, C. boninense*、*P. infestans* 之生長情形。以 *Escherichia coli* (DH5α) 作為對照組，重複 3 次。

4. 揮發性拮抗物質測試

此試驗使用之病原菌及其培養條件等同拮抗物質測試。將 *B. licheniformis* (31-1) 以 LB 試管小量培養後，調整濃度為 OD_{600} = 1.0，取 100 μL 塗盤於 LA 培養基。另外將病原菌取 5 mm 之菌絲塊，放置於 V8 或是裸麥培養基正中間，再將此培養基和 *B. licheniformis* (31-1) 塗盤之 LA 培養

doi:10.6342/NTU201803570

基對蓋，以石蠟封膜密封，培養於 25 °C 生長箱，之後觀察記錄時間同拮抗物質測試。以 *E. coli* (DH5α) 作為對照組，重複 3 次。

二、 拮抗菌分泌物質分析

1. 拮抗物質分析

拮抗物質分析試驗是和中研院楊玉良助研究員合作，採用影像質譜分析 (Imaging mass spectrometry) 的技術，分析 *B. licheniformis* (31-1) 能夠拮抗病原菌的物質。事前準備先將晚疫病菌菌絲塊 (直徑 0.5 cm) 置於裸麥培養基 (無添加 $CaCO_3$) 上，隔天滴加 5 μL $OD_{600} = 0.5$ 的 *B. licheniformis* (31-1) 於距離菌絲塊 2.5 cm 處，對峙培養六天。接著將培養基拮抗區域 (包含少量的晚疫病菌菌絲及完整 *B. licheniformis* (31-1) 菌落) 以刀片切取，置於載物板上，噴灑 matrix，放入 37 °C 生長箱烘乾。隔日再將載物板放入 Bruker autoflex speed MALDI-TOF/TOF system 中，藉由雷射光激發待測物進行影像質譜分析。

2. 拮抗物質萃取 (Liaw et al., 2015; Liu et al., 2010)

將 *B. licheniformis* (31-1) 滴加在大量裸麥培養基 (無添加 $CaCO_3$) 上各十數滴，培養六天後將所有裸麥培養基打碎一同浸泡於乙酸乙酯 (ethyl acetate, EA) 中，浸泡隔夜。隔天先將浸泡液抽氣過濾，以濾紙篩掉培養基殘渣，進行真空濃縮，再進行冷凍乾燥處理。最後以 EA 回溶，配製成濃度為 1 mg/ 10 μL 之萃取液。

浸泡過 EA 之剩餘菌塊，再以丁醇 (butanol, BuOH) 浸泡隔夜。隔天再重複前述過濾及濃縮之步驟。最後以甲醇 (MeOH) 回溶配製成相同濃度之萃

doi:10.6342/NTU201803570

取液。兩種有機溶液之萃取方法，都以無養菌之裸麥培養基 (無添加 $CaCO_3$) 作為對照組。

3. 萃取液活性測試

分別將乙酸乙酯或丁醇萃取液取 10 μL 滴到無菌濾紙片 (Advantec®) 上，待其風乾 10 分鐘後放置於裸麥培養基上，在距離三公分處放上晚疫病菌菌絲塊 (直徑 0.5 公分)。將培養皿放在 19 °C 生長箱，約八天後記錄抑制情形。

4. 萃取液 LC/MS 分析 (Rønning et al., 2015)

LC/MS 分析是由中研院農業生物科技研中心核心實驗室進行，待分析之樣本是將萃取物質以 MeOH (LC/MS level) 回溶，濃度為 10 mg/mL。分析系統為 Thermo UPLC-ESI Orbitrap Elite mass spectrometer，同時進行正離子及負離子的分析，分析條件為：0-6 分鐘 5% to 99.5% ACN (乙腈), 6-8 分鐘 99.5% ACN, 8-8.2 分鐘 99.5% to 5% ACN, 8.2-10 分鐘 5% ACN, ACN 和 H_2O 均含 0.1% 甲酸。使用之管柱為 ACQUITY UPLC BEH C18, 1.7 μm, 2.1 × 100 mm; 流速為: 0.4 mL/min。

5. 萃取液 HPLC 層析 (Liu et al., 2010)

HPLC 層析是在中研院進行，取 10 μL 萃取液 (1 mg/ 10 μL) 注入高效液向層析儀 (Hitachi L2455 HPLC-DAD system)，以管柱 (Discovery HS C18, 4.6 mm × 250 mm, SUPELCO) 進行層析，層析條件是 0-30 分鐘 5% ACN-100% ACN, 30-35 分鐘 100% ACN, 35-40 分鐘 100% ACN-5% ACN, DAD range: 200-500 nm，每分鐘收一管 1 mL 之層析液，再將其真空濃縮後，以 10 μL MeOH 回溶，配製成濃度為 1 mg/ 10 μL，進行活性測試，六天後

doi:10.6342/NTU201803570

拍照記錄結果。另外以每 5 分鐘收一瓶 5 mL 之層析液，進行大層析範圍的測試。將其真空濃縮後，以 1 mL MeOH 回溶，再濃縮後以 10 μL MeOH 回溶，進行活性測試，六天後拍照記錄結果。最後將 31-40 分鐘的層析液改以每 2 分鐘收取一瓶 2 mL 之層析液，濃縮後以 MeOH 回溶配製成濃度為 1 mg/ 10 μL，進行活性測試，六天後拍照記錄結果。

6. 層析液 FIA-MS 分析 (Nanita and Kaldon., 2016)

FIA-MS 實驗是由中研院基因體中心質譜實驗室進行。將每 2 分鐘收取之層析液，分別為 31-32 分鐘、33-34 分鐘、35-36 分鐘、37-38 分鐘、39-40 分鐘五個樣品送到中研院基因體研究中心質譜儀實驗室，進行流動注入分析系統-質譜儀 (FIA-MS) 分析。分析系統為 LTQ Orbitrap XL ETD mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA)，搭載電噴灑游離技術（electrospray ionization, ESI)。樣本稀釋至 5 μL，以 Ultimate 3000 RSLC system from Dionex (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA) 流動注入，速率為每分鐘 50 μL in 80% ACN/H2O 0.1% FA。Full-scan MS 條件為：mass range m/z 100-2000 or 500-4000, resolution 60,000 at m/z 400. 電噴灑系統電壓為 4 kV 且 capillary 溫度為 275 °C。

7. 結果分析

LC/MS 及 FIA-MS 的分析結果以軟體 Thermo Xcalibur Roadmap 2.2 讀取，進行數據分析，挑選 LC/MS 或 FIA-MS 當中強度較高的特定質荷比數值紀錄。再以 ChemFinder 17.0 讀取化合物資料庫 antimarine 707，將挑選的質荷比數值輸入資料庫 antimarine 707 中進行比對。

doi:10.6342/NTU201803570

三、 番茄盆栽試驗

1. 供試植物

選用從臺中種苗改良繁殖場購買之「臺南亞蔬 6 號」作為試驗品種。種子保存於 4 °C，種植前先浸泡於一次水中，使其發芽。兩天後挑選發芽情況合適的種子移植於軟缽，使用的栽培介質為 BVB 3 號泥炭土和根基旺以 2:1 之比例混和。置於溫室，環境為溫度 22 - 24 °C，光週期為 16 小時光照 / 8 小時黑暗。番茄於四周大移盆至五吋盆，待後續實驗進行。

2. 地衣芽孢桿菌澆灌

從 LA 培養皿上刮取 *B. licheniformis* (31-1) 單一菌落至 LB 液態培養基試管中，放置於 28 °C 生長箱 以 200 rpm 小量培養。16 至 20 小時後取 1 mL 至裝有 100 mL LB 液態培養基之三角錐形瓶中，放置於 28 °C 生長箱以 200 rpm 大量培養。16 至 20 小時後，以 5500 rpm 轉速於 10 °C 離心 15 分鐘，之後移除大部分上清液，以剩餘液體回溶 *B. licheniformis* (31-1)，測量吸光值並稀釋調整至 OD_{600} = 0.1 (約為 10^7 cfu/mL)。於番茄二週大至四周大澆灌，每週澆灌一次，每次澆灌 30 mL，以水處理作為對照組。第四周移盆後兩天，進行第四次澆灌，澆灌量增加為 100 mL。

3. 液化澱粉芽孢桿菌澆灌

選用由嘉農企業股份有限公司所製作的「救你一命」，產品中拮抗微生物為液化澱粉芽孢桿菌 (*Bacillus amyloliquefaciens* PMB01)。將產品以一次水稀釋 30 倍 (約為 3.0 x 10^7 cfu/mL) 後，於番茄二週大至四周大澆灌，每週澆灌一次，每次澆灌 30 mL。第四周移盆後兩天，進行第四次澆灌，澆灌量增加為 100 mL。

doi:10.6342/NTU201803570

4. 黃豆粉-玉米澱粉培養液

培養液配方為每 100 mL 含 2 g 黃豆粉 (soybean powder, 里仁)、1 g NaCl (Amresco) 及 1 g 玉米澱粉 (corn starch, 日正)。先將黃豆粉以一次水煮沸，以 3 層紗布過濾，加入 NaCl 及玉米粉，再加熱至沸騰，分裝每個角瓶 25 mL，高溫高壓滅菌。

從 LA 培養皿上刮取 *B. licheniformis* (31-1) 單一菌落至 LB 液態培養基試管中，放置於 28 °C 生長箱 以 200 rpm 小量培養。16 至 20 小時後取 1 mL 至裝有 25 mL 黃豆粉-玉米澱粉培養液之三角錐形瓶中，放置於 28 °C 生長箱以 200 rpm 大量培養。16 至 20 小時後，將其稀釋 30 倍 (約為 3.0 x 10^7 cfu/mL) 進行澆灌。

5. 促進植物生長效果測試

植株栽種前及移盆前，栽培介質先以孔徑 5 mm 之篩網進行過濾，除去較大顆的土塊及雜質，以利後續清洗。*B. licheniformis* (31-1) 澆灌處理後之番茄，於滿六週大時將其根部土壤洗淨，分別測量其地上部及地下部之長度。然後將植株放入 60 °C 烘乾，再分別測量其地上部和地下部的乾重。

6. 番茄產量測試

待番茄第五周大時，將其移植至大型盆栽，並將大型盆栽移放至中非頂樓遮雨棚內。分為三組處理：對照組、澆灌三週 (第 3 ~ 5 週) 及持續每週澆灌一次 *B. licheniformis* (31-1) 至產果前的組別。五個月產果後持續收取果實，分別拍照和秤重，並統計果實產量。

doi:10.6342/NTU201803570

7. 接種青枯病

青枯病菌培養於 523 培養基，刮取數個菌落至 523 液態培養基試管中，放置於 28 °C 生長箱 以 200 rpm 轉速培養 16 至 20 小時後，取 120 μL 塗盤 523 培養皿。16 至 20 小時後，倒入一次無菌水，75 rpm 搖晃至少 15 分鐘。收集菌液並調整濃度至 OD_{600} = 0.3 (約為 3 x 10^7 cfu/mL)。

番茄移盆至五吋盆一周後進行接種，每棵澆灌 100 mL 菌液於土壤中，置於 22 - 24 °C 溫室。接種後每天觀察病徵並記錄病害指數 (disease index)，並依病害發生嚴重程度分為五級：0 為健康植株；1 為一片葉子萎凋；2 為 50% 以下葉子萎凋；3 為 50% 以上葉子萎凋；4 為全部葉片萎凋或是植株死亡。罹病嚴重度 (disease severity) 依照公式計算：

$$\text{罹病嚴重度 (disease severity)} = \frac{\sum \text{發病級數} \times \text{該級植株數量}}{\text{最大級數} \times \text{植株總量}} \times 100\%$$

防治率依照公式計算：

$$\text{防治率} = \frac{\text{對照組罹病嚴重度} - \text{處理組罹病嚴重度}}{\text{對照組罹病嚴重度}} \times 100\%$$

8. 晚疫病菌接種

晚疫病菌培養於裸麥培養基。製備孢囊時，先切取菌絲塊繼代至裸麥培養基，放置於 19 °C 生長箱培養 10～14 天後，加入約 10 mL 一次水，刮取菌絲，收集孢囊，以血球計數器計算孢囊數量，並稀釋至 1.0 x 10^3 孢囊 / mL。

番茄移盆至五吋盆一周後進行接種，以噴瓶均勻噴灑孢囊液於番茄葉面，置於 22 - 24 °C 溫室。接種後每天觀察病徵並記錄病害指數，並依病害發生嚴重程度分為七級：0 為健康植株；1 為病斑佔 1-5% 葉片面積，病斑小於 2 mm 且無莖部病斑；2 為病斑佔 6-15% 葉片面積，明顯有壞疽的病斑，且

doi:10.6342/NTU201803570

無莖部病斑;3 為病斑佔 16-30% 葉片面積,病斑連接或莖部有水浸狀病斑；4 為病斑佔 31-60% 葉片面積，病斑擴大或莖部有小型病斑 (小於 5 mm)；5 為病斑佔 61-90% 葉片面積，葉片乾枯或是莖部病斑擴展；6 為病斑佔 91-100% 葉片面積、葉片萎凋、大量的莖部受損或死亡 (Hanson, et al., 2015)。罹病嚴重度及防治率計算方式同上。

四、 土壤微生物篩選與鑑定

1. 土壤微生物分離

土樣採集地點為臺大校園內，選取植被生長旺盛之處：黑森林、醉月湖畔、園藝分場和農藝分場，另外有採集花蓮玉里地區之農田兩處，以大鏟子挖掘，從深度 2～20 公分處挖取約 500 g 之土壤。待土樣風乾後，以直徑 2 mm 之篩網去除雜質，保存於乾燥陰涼處，待後續實驗進行。

本研究採用的土壤拮抗菌篩選方式是參考 Ko et al. (2010)。將空心菜、菠菜、地瓜、番茄和馬齒莧各取 5% 重量打碎，加一次水配置成 20% 的蔬菜汁。再將蔬菜汁 20 mL 加入採取的土樣 20 g 中，放置於 28 °C 生長箱培養三周，再取出 3 g 的土加上 100 mL 的一次水進行序列稀釋至 10^{-6} 倍。從稀釋倍率 10^{-2} ~ 10^{-4} 各取 100 μL 塗盤至真菌性篩選培養基，從 10^{-4} ~ 10^{-6} 各取 100 μL 塗盤至細菌性篩選培養基。約 10～14 天，再將生長優勢的菌分離純化至 10 % V8 培養基，確認為單一菌株再進行後續測試。

2. 土壤微生物抗病測試

將純化之土壤微生物，取細菌菌落 1 loop 的量或是真菌菌絲塊一塊 (直徑 5 mm) 加入滅菌之蔬菜汁，放置於 28 度培養箱，150 rpm 震盪培養 10 天。再加入 100 mL 一次水稀釋，於番茄第四周時每株植株澆灌 30 mL 的

doi:10.6342/NTU201803570

蔬菜汁菌液。第五周時，接種青枯病菌 50 mL (OD_{600} = 0.8)，並記錄觀察病害發生程度。初步篩選，每組處理組為 4 株番茄，而第二輪篩選則為每組 8 株番茄，減少各因素造成之誤差。

3. 微生物序列鑑定

自盆栽試驗中，挑選青枯病發病較低的處理組菌株，細菌以 16S rDNA 序列鑑定，真菌以 ITS 序列鑑定。

細菌鑑定是挑選單一菌落，加到單菌落聚合酶聯鎖反應 (colony PCR) 的反應容液中，增幅目標片段 16S rDNA。反應容液包含 5 μL MixRed (Amplicon)、0.5 μL 8F 引子 (10 μM, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')、0.5 μL 1492R 引子 (10 μM, 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Galkiewicz and Kellogg, 2008) 和 4 μL 水，總體積為 10 μL。反應條件為 94 °C/5 分鐘，[94 °C/30 秒，55 °C/30 秒，72 °C/90 秒] 30 個循環，72 °C/10 分鐘，4 °C/5 分鐘。

真菌鑑定是將培養基上的菌絲刮取後，放入裝有 50-100 μL 0.5N NaOH 之 1.5 mL 微量離心管，以 Proxxon 的迷你研磨機 (D-54518 Niersbach) 裝上塑膠研磨棒打碎，將 NaOH 補至 500 μL，以 17,000 g 離心 5 分鐘，取 50 μL 上清液至新的微量離心管，再加入 450 μL 之 0.1 M Tris buffer (pH = 8.0)，混勻後測量粗萃的 DNA 濃度。之後增幅 ITS 序列，反應容液包含 5 μL MixRed、0.5 μL ITS1 引子 (10 μM, 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')、0.5 μL ITS4 引子 (10 μM, 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990)、3 μL 水和 1 μL 的真菌 DNA，總體積為 10 μL。反應條件為 94 °C/5 分鐘，[94 °C/30 秒，57 °C/30 秒，72 °C/60 秒] 30 個循環，72 °C/10 分鐘，4 °C/5 分鐘。

doi:10.6342/NTU201803570

PCR 產物以 1% 瓊酯凝膠進行電泳分析，切下細菌約 1500 bp 之片段或真菌約 600 bp 之片段，以 Gel Extration Kit (Qiagen) 回溶，將回溶之 DNA 片段放入 pGEN-T Easy (Promega) 載體，轉形至 *Escherichia coli* (DH5α) competent cell 中。再將轉形之細胞塗盤培養，以 colony PCR 確認是否有成功轉形後，以 FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit (Favorgen® Biotech Corp) 抽取 plasmid，交由基龍米克斯生物科技有限公司進行定序，最後將定序完之序列放入 NCBI BLAST 比對。

4. 親緣關係樹分析 (Phylogenetic analysis)

比對完的 16S rDNA 序列可能為 *Sinomonas* sp.，接著自 NCBI genome 資料庫及 EzTaxon-e server 資料庫 (Kim et al., 2012) 下載 *Sinomonas* 屬細菌及其他微球菌科 (*Micrococcaceae*) 不同屬之細菌的 16S rDNA 序列進行親緣樹狀圖分析。先將序列以 Clustal X 進行多序列並列分析，排序後以 MEGA 7 (Tamura et al., 2013) 轉檔並進行樹狀圖分析，分析方法為 Neighbor-Joining，bootstrap 設為 1000 次。

doi:10.6342/NTU201803570

參、 結果

一、地衣芽孢桿菌 *Bacillus licheniformis* (31-1) 抑菌特性測試

1. 培養皿對峙試驗

將 *B. licheniformis* (31-1) 的濃度調整為 OD_{600} 為 0.1, 0.5 及 1.0 分別進行對峙培養的實驗結果顯示，其在 CPG 培養基上能對 *R. solanacearum* 產生直徑分別約 2.5, 2.1 及 1.9 公分的抑制圈 (圖一 A)，以最小顯著差異性檢定 (LSD test)，檢定結果在 5% 顯著水準下，濃度 0.1 和 1.0 兩處理間有顯著差異，但 0.1 與 0.5 及 0.5 與 1.0 間無顯著差異 (圖一 B)；而對晚疫病菌，則是各處理濃度都能抑制其將近六成的菌絲生長 (圖一 C, D)，但不同濃度處理間，檢定結果在 5% 顯著水準下無顯著差異。因此，*B. licheniformis* (31-1) 對於 *R. solanacearum* 及晚疫病菌都有明顯抑制能力。

作為生物防治資材，會期望 *B. licheniformis* (31-1) 對不同病原菌也能有抑制效果，以提高其利用價值。李 (2015) 的實驗發現 *B. licheniformis* (31-1) 能抑制 *Phytophthora parasitica, Phytophthora capsici, Colletotrichum, Phellinus noxius, Magnaporthe grisea, Fusarium moniliforme, Fusarium oxysporum f. sp. cubense* 和 *F. oxysporum f. sp. lycopersici* 等植物病原菌生長，我再針對其他植物重要病原菌包括 *Pythium myriotylum*, *Pythium splendens*, *Pythium aphanidermatum* 腐霉病菌和真菌 *Colletotrichum boninense* 等進行對峙培養分析 (圖二)，發現 *B. licheniformis* (31-1) 都能抑制這些病原菌的生長，不過效果不一，對於氣生菌絲和匍匐菌絲的抑制效果也不盡然相同，對氣生菌絲的抑制效果顯然較佳。

doi:10.6342/NTU201803570

2. 拮抗物質測試

李 (2015) 的研究證實 *B. licheniformis* (31-1) 所分泌的拮抗物質可抑制青椒疫病菌 (*P. capsici* 28173)。為進一步分析抗生物質的特性，本研究另針對晚疫病菌及前述重要病原菌進行拮抗物質測試。在培養基上放置玻璃紙，再將 *B. licheniformis* (31-1) 菌塊放置在上面培養三天後，移除玻璃紙及菌塊，並放上病原菌及觀察其生長情形，如此可隔絕細菌與培養基的直接接觸。觀察結果發現無論是腐霉病菌、疫病菌或真菌的生長都受到抑制 (圖三 A)。測量菌落直徑並以 Student's *t* test 進行統計分析後，確認都有顯著性差異 ($P < 0.05$) (圖三 B)，且以腐霉病菌 *Pythium splendens* 與 *Pythium aphanidermatum* 及晚疫病菌最為顯著。因此 *B. licheniformis* (31-1) 所分泌之拮抗物質可穿過玻璃紙，留在培養基中抑制不同病原菌生長。

3. 氣態拮抗物質測試

除了測試 *B. licheniformis* (31-1) 分泌至培養基中的物質是否能抑制病原菌生長之外，本研究也想探討其生成之氣態物質的拮抗效果。將 *B. licheniformis* (31-1) (或 *E. coli* 作為對照組) 塗盤至 LA 上，另將供試病原菌放置於另一片 V8 或裸麥培養基中間位置，再將兩者對蓋後以石蠟膜密封，培養數天後紀錄病原菌生長情形 (圖四 A)。實驗結果發現 *B. licheniformis* (31-1) 生成之氣態物質對於 *P. myriotylum, P. splendens* 與 *P. aphanidermatum* 等三種腐霉菌和 *P. capsici* (28173) 與 *P. parasitica* 等疫病菌有顯著抑制效果 ($P < 0.05$) (圖四 B)。對於其他病原菌雖然也有抑制的趨勢，但統計分析並未呈現顯著差異。*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* 和 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 的生長雖未被抑制，但整體生長勢明顯比對照組較差，顯示 *B. licheniformis* (31-1) 的氣態分泌物仍有抑制作用。

doi:10.6342/NTU201803570

4. 拮抗物質分析

B. licheniformis (31-1) 與晚疫病菌對峙培養時，有明顯的抑制圈 (圖一 C)，為應用影像質譜鑑定拮抗物質的種類，首先測試 *B. licheniformis* (31-1) 與晚疫病菌在不同對峙距離 (包括 2, 2.5, 及 3 公分) 的抑菌成效，這主要是因為進行影像質譜鑑定時，對於培養基樣本的大小有限；此外，從培養基上切取樣本時，也必須在有限的樣本中同時包括少量晚疫病菌菌絲以及整個 *B. licheniformis* (31-1) 菌落，故須避免對峙距離太短，以免抑制作用過強或是拮抗菌作用空間不夠

實驗結果發現在前一日先接種晚疫病菌菌絲塊，隔日再以 2.5 公分距離滴加 *B. licheniformis* (31-1) 最適用於影像質譜分析 (圖五 A)，故可以此條件切取適當大小的培養基，經過 matrix 處理及烘乾後，進行影像質譜分析。但是以影像質譜分析技術無法鑑別 *B. licheniformis* (31-1) 的拮抗物質，同時也未能偵測出晚疫病菌是否因應拮抗菌的影響分泌任何化合物，因此改用傳統方式自培養基萃取拮抗物質。

將 *B. licheniformis* (31-1) 大量培養在裸麥培養基上，分別以乙酸乙酯 (EA) 及丁醇 (BuOH) 萃取，分別取 10 µL 萃取液 (濃度 1 mg/ 10 µL) 滴在濾紙片上並風乾，之後將濾紙片放置於裸麥培養基，並於距離三公分處接種晚疫病菌，八天後觀察。乙酸乙酯萃取液能大幅抑制晚疫病菌氣生菌絲，但匍匐菌絲仍然能夠生長至濾紙片周圍，受到抑制的影響很小 (圖五 B)；丁醇萃取液相較於前者作用範圍較小，但能同時抑制晚疫病菌氣生菌絲及匍匐菌絲的生長 (圖五 B)。因此先以丁醇萃取液進行 LC/MS，以鑑定有效活性物質；不過，LC/MS 分析無法自現有資料庫比對出特定的化合物，故 *B. licheniformis* (31-1) 所分泌的拮抗物質很可能是一種 (或數種) 尚未登記發表的化合物。

doi:10.6342/NTU201803570

為了縮小分析範圍，進一步將丁醇萃取物進行 HPLC 分析。一開始先每分鐘收取一管層析物，真空濃縮後以 10 μL MeOH 回溶，滴在濾紙片上，風乾之後將濾紙片放置於裸麥培養基，並於距離三公分處接種晚疫病菌，圖中白色數字代表是第幾分鐘收取的層析物 (圖六 A)。分析結果顯示，原始之丁醇萃取液仍明顯抑制晚疫病菌生長，但無論是哪一分鐘收取的 HPLC 分離物質都沒有抑制效果。由於考慮有些化合物可能需要共同作用才能表現抑菌活性、或是每分鐘收取之活性物質過少而無抑菌活性，改以每五分鐘收取一次 HPLC 層析產物，滴在濾紙片上，風乾之後將濾紙片放置於裸麥培養基，並於距離三公分處接種晚疫病菌，圖中白色數字代表特定時間範圍 (以分鐘計) 收取的層析物 (圖六 B)。實驗結果顯示 31-35 分鐘及 36-40 分鐘兩組層析樣品呈現和原始之丁醇萃取液類似之晚疫病菌生長抑制效果。為了再縮小目標範圍，以便後續分析能減少不必要的雜訊，再將 31-40 分成五組，即每兩分鐘收取一次產物，結果顯示以 35-36 及 37-38 分鐘兩組的抑制效果最明顯 (圖六 C)，33-34 分鐘的抑制效果較差一些；而 31-32 和 39-40 分鐘兩組則更需要等病原菌接近時，才能看到些微的抑制作用。這些研究結果顯示丁醇萃取液主要的活性物質集中在 HPLC 的 35-38 分鐘層析物之中，而 31-34 及 39-40 分鐘層析物所含活性物質可能較少，或是有其他活性較弱的物質存在。

將每兩分鐘收取之層析液，共五組進行 FIA-MS 分析，取分析結果中質荷比信號強度高者與 AntiMarine 707 資料庫進行比對，發現從負電分析之結果中，五組資料都能找到質荷比為 421.16 以及 789.37 的兩筆訊號 (圖七 A)，且能從資料庫分別比對到 ochrindole-D (圖七 B) 及 streptovirudine-A1 (圖七 C) 兩種化合物；而將 1-30 分鐘收取為一管的層析物並未出現 421.16 及 789.37 這二筆訊號。

doi:10.6342/NTU201803570

二、溫室盆栽試驗

1. 青枯病接種試驗

對峙培養試驗結果顯示 *B. licheniformis* (31-1) 對 *R. solanacearum* 具有抑制效果，為進一步確認其在番茄植株的抗青枯病效果，本研究以對青枯病不具抗性的臺南亞蔬 6 號小果番茄進行分析，本實驗共進行三次，處理組和對照組均分析九棵植物。

於種植後第二週開始，每週一次、連續三週澆灌處理 *B. licheniformis* (31-1) (OD_{600} = 0.1; 30 mL)。第四週澆灌完後 2-3 天移至五吋盆，2 天後再澆灌一次 (OD_{600} = 0.1; 100 mL)，5 天後接種青枯病 (OD_{600} = 0.3; 100 mL) (圖八)。植物在接種青枯病菌最快於第六、七天出現病徵，葉片開始萎凋，約過一至兩天即會萎凋，記錄過程中也有發現一夜直接萎凋的情形 (圖九 A)。逐日記錄病害指數 (disease index) (圖九 B)，對照組大概在第十一天開始就有半數植株萎凋情形大於 50% (病害指數 3 和 4)，而處理組要到十天才有植株死亡，到第十三天才會有半數植株萎凋情形大於 50%。進一步將病害指數轉化為罹病嚴重度 (disease severity) (圖九 C)，並進行統計分析，發現在接種後第十二和十三天，*B. licheniformis* (31-1) 處理組和對照組呈現顯著差異 ($p < 0.01$)，*B. licheniformis* (31-1) 處理組罹病嚴重度比對照組低約 20%，防治率大約為 30%。顯示番茄植株在持續處理 *B. licheniformis* (31-1) 的情形下，能減緩青枯病的發生，但並不能達到完全抑病或是非常良好的效果。

為達到更良好的防治效果及降低成本，本研究另測試以黃豆粉-玉米澱粉培養液培養 *B. licheniformis* (31-1)，再進行澆灌，同時以水處理為負對照組、市售的「救你一命」(主成分為液化澱粉芽孢桿菌 PMB01)(3×10^7 cfu/mL) 為正對照組，以測試 *B. licheniformis* (31-1) 的防治效果。本實驗共進行三次，處理組、水對照組和正對照組均分析六棵植物。逐日記錄病害指數 (圖十 A)，

doi:10.6342/NTU201803570

三組整體發病進程其實差不多，不過 *B. licheniformis* (31-1) 處理組發病株數較少。進一步將病害指數轉化為罹病嚴重度 (圖十 B)，統計分析結果顯示相較於水處理組，*B. licheniformis* (31-1) 處理植物的罹病嚴重度顯著降低，甚至比 PMB01 處理植物低約 15%；PMB01 處理植物的罹病嚴重度和水處理植物未達顯處差異。

2. 晚疫病接種試驗

為瞭解 *B. licheniformis* (31-1) 能否促進番茄對晚疫病菌的系統性防禦反應，依前述方式將 *B. licheniformis* (31-1) 菌液澆灌處理番茄，在於植株移盆後一週葉部噴灑接種晚疫病菌游走子囊 (1×10^3 /mL)，並觀察病害發展情形。本實驗共進行三次，處理組和對照組各分析九棵植物。實驗結果發現，接種後兩至三天就能在各組番茄葉片上看到水浸狀病斑，至七或八天，病斑擴大至涵蓋至少 80% 植株面積，還可能伴隨著嚴重的落葉，甚至植株死亡 (圖十一 A)。逐日記錄的病害指數 (圖十一 B)，處理組和對照組在病害發展進程很相似，接種後第六天就幾乎所有植株都達到 60% 的病斑面積 (指數 5 和 6)；而進一步將病害指數轉化為為罹病嚴重度 (圖十一 C)，統計分析結果也顯示 *B. licheniformis* (31-1) 處理組和對照組的罹病度無明顯差異；不過，相較於對照組，處理組的植株落葉情形較為輕微，可能澆灌 *B. licheniformis* (31-1) 仍有些許抗病效果。

這次實驗顯示，很難藉由土壤澆灌 *B. licheniformis* (31-1) 促進番茄植株的系統性防禦反應，以減緩晚疫病發生的情形。為瞭解將 *B. licheniformis* (31-1) 噴灑於植物地上部能否有效防禦葉部病害，以相同濃度 *B. licheniformis* (31-1) 連續四周共四次噴灑於植物表面後，接種晚疫病，並觀察病害發生情形。在接種後七至八天，處理組和對照組植物均呈現至少 80% 的發病度 (圖十二 A)。逐日記錄發病嚴重度 (圖十二 B)，噴灑 *B. licheniformis* (31-1) 之處理組

doi:10.6342/NTU201803570

發病進程和其餘兩組均相似，統計後的罹病嚴重度 (圖十二 C) 也顯示，將 *B. licheniformis* (31-1) 噴灑於植株表面統計並無顯著差異，代表噴灑無法有效減緩晚疫病的發生。

3. 植株生長促進測試

為了探討 *B. licheniformis* (31-1) 能否促進番茄生長，自番茄植株二週大開始至第五週，連續四週、每週一次澆灌 *B. licheniformis* (31-1)，測試濃度包括 OD_{600} = 0.1, 0.5 及 1.0，並於第四週將植株移至五吋盆。種植滿六週後，取出植物，將根部土壤洗淨，拍照記錄 (圖十三 A)，並秤量其乾重及進行統計分析；本實驗共進行兩次，處理組各濃度和對照組各分析九棵植物。

以長度而言，無論是地上部或是地下部，處理組和對照組均無顯著差異 (圖十三 B)。以乾重而言，經過三種濃度之 *B. licheniformis* (31-1) 處理後，地上部和地下部均有增加趨勢，但與對照組無顯著差異 (圖十三 C)。這些實驗顯示 *B. licheniformis* (31-1) 處理對於促進番茄根部發育的效果有限。

此外，本研究也探討 *B. licheniformis* (31-1) 處理對於番茄產果及果實品質的影響。此次實驗分為三組，水處理對照組、持續施用 *B. licheniformis* (31-1) 至結果的處理組，以及只施用 *B. licheniformis* (31-1) 三週的處理組。由於戶外測試較能知道 *B. licheniformis* (31-1) 在自然環境的效果，故在植株四週大時，將番茄植株移植至大盆，置於中非頂樓簡易溫室 (附圖一 A) 種植約五個月後，開始採收果實，持續採收約三至四週。本實驗共進行一次，處理組各濃度和對照組各分析四棵植物。

在產果試驗中，施用 *B. licheniformis* (31-1) 並無明顯促進結果，無論是單株果實重量 (附圖一 B) 或是單株產果量 (附圖一 C) 均無顯著差異，對照組的產果數量甚至比另兩種處理組均來的高；但由於當初產果試驗之環境

doi:10.6342/NTU201803570

變因多，易受天氣及其他生物因子影響，且重複數不足，若要下定論則需要再進行多次試驗。

三、 土壤拮抗菌篩選

1. 土壤採集

目前許多植物生長促進劑或是生物防治藥劑，並不是由單一菌株就能發揮效用，而是有複合配方才有良效，因此本研究想嘗試從土壤中找尋更多青枯病和晚疫病的拮抗菌，以便獲得更佳防治效果。本研究主要先從臺大校園內採取 10 個土樣，其編號與相關紀錄詳見表一，其中前八個土樣為四個地點不同採集深度，分別為 10-20 cm 及 2-10 cm；另二個土樣取自臺大園藝分場。第 9 號和 10 號土樣取自花蓮玉里田區。

2. 拮抗菌篩選

本研究參考柯文雄教授研發，藉由「蔬菜汁」篩選土壤微生物 (Ko et al., 2010b)，期望能夠更快、更有效率的從土壤為數龐大的微生物中，尋找對生物防治有助益的菌。

將土塊浸泡蔬菜汁兩週後，進行序列稀釋，分別利用細菌選擇性培養基和真菌選擇性培養基塗盤分離。細菌方面，稀釋為 10^{-4}～10^{-6}，挑選稀釋倍率最高以及菌落數較多的細菌分離、純化，從編號 1～12 土樣中分離得到共 67 支細菌 (表二)；真菌方面，稀釋為 10^{-2} ～ 10^{-4}，同樣挑選稀釋倍率最高以及菌落較多的真菌，從編號 1～12 土樣中分離得到共 39 支真菌 (表二)。

番茄盆栽抗青枯病實驗之初步篩選，在植株第四週時澆灌以蔬菜汁培養十天之菌液，第五週接種青枯病菌，每組處理各四株番茄。實驗結果以細菌編號 3-1, 3-5, 5-3,6-1, 6-2, 7-1, 7-2, 11-1, 11-2, 11-6 及真菌編號 2-3, 5-3, 6-1,

doi:10.6342/NTU201803570

7-2, 7-4 等十五株菌發病較輕微 (圖十四 A)，相對處理蔬菜汁之對照組的罹病嚴重度分別為 22.2%, 0.0%, 40.0%, 40.0%, 0.0%, 42.1%, 42.1%, 50.0%, 37.5%, 50.0%, 29.6%, 40.0%, 0%, 42.1% 及 38.1%。將以上十五株菌進行第二次的篩選，處理日程相同，不過將處理重複數增加至八株番茄，並進行二重複。這次只有細菌 6-2 勉強能將相對罹病嚴重度降低在 58.9% (圖十四 B)，其餘菌株表現並不如預期 (高於 80%)，因此將細菌 6-2 進行鑑定。

3. 拮抗菌鑑定

將細菌編號 6-2 以引子對 8F 及 1492R (Galkiewicz and Kellogg, 2008) 增幅 16S rDNA 基因片段，並分析產物之序列，在 NCBI 上進行 BLASTn 分析，結果發現此序列與 *Sinomonas atrocyanea* KCTC 3377 之 16S rDNA 基因序列的相同度 (identity) 高達 99%。

再從 EzTaxon-e server 資料庫下載 *Sinomonas* 屬及微球菌科 (*Micrococcaceae*) 多個菌種的核酸序列進行親緣關係分析，發現 6-2 分離株和 *S. flava* (CW 108) 的類緣關係最近，但和 *S. atrocyanea* (KCTC 3377) 及 *S. atrocyanea* (DSM 20127) (Kim, unpublished; Zhou et al., 2009) 的關係較遠 (Zhou et al., 2009) 較為接近 (圖十五)。因此，6-2 應很可能屬於 *Sinomonas* ，但其詳細分類仍待後續實驗進一步證實。

doi:10.6342/NTU201803570

肆、 討論

一、 *B. licheniformis* (31-1) 拮抗能力分析

1. 對不同植物病原菌之拮抗能力

本研究證實 *B. licheniformis* (31-1) 能夠抑制 *R. solanacearum, P. myriotylum*, *P. splendens*, *P. aphanidermatum*, *P. capsici* (213061), *P. infestans*, 和 *C. boninense* 等病原菌的生長 (圖一和圖二)。先前 *B. licheniformis* (31-1) 也被證實能在對峙實驗抑制 *P. capsici* (28713)*, P. parasitica, F. oxysporum* f. sp. *cubense, 和 F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (李，2015)，這些結果顯示 *B. licheniformis* (31-1) 對不同病原菌具有廣泛的拮抗能力，而且這些病原菌中，除了 *P. infestans* 造成的晚疫病和 *C. boninense* 造成的炭疽病屬於地上部病害之外，其他皆引發根部病害，若施用 *B. licheniformis* (31-1) 於根部有機會能廣效的防治多種根部病害，頗具應用價值。其中，*B. licheniformis* (31-1) 對於所測試的三種腐霉病菌，相較於其他病原菌有較佳的抑制生長效果。而這三種腐霉病菌寄主廣泛，生長勢又強，常造成許多作物萎凋，在苗期感染發病會更迅速，如果以 *B. licheniformis* (31-1) 製為生物防治劑或是苗期保護劑，也許能減少依德利、滅普寧等農藥的用量。

之前嘗試將番茄種子浸泡於 25 mL 一次水中，再加入 1 mL 之不同濃度 *B. licheniformis* (31-1) (OD_{600} = 0.1, 0.5, 1.0) 菌液作為種子披衣 (seed coating)，想測試能否幫助番茄幼苗抵抗由 *P. splendens* 或 *P. aphanidermatum* 引起的幼苗猝倒病。在浸泡過程中，可以發現添加濃度 1.0 菌液會使番茄種子發芽的胚根較為粗短，有些會有密集根毛產生，不過種植於土壤後不同濃度和對照組植株生長無明顯差異 (結果未呈現)。若是以混拌有病原菌 *P. splendens* 或 *P. aphanidermatum* 的病土移植，對照組和浸泡於 *B. licheniformis* (31-1) 菌液之處理組，均發病嚴重死亡 (結果未呈現)。一部分原

doi:10.6342/NTU201803570

因可能是病原菌混拌於土壤中濃度過高，*B. licheniformis* (31-1) 防治效果有限，另一部分原因則可能是 *B. licheniformis* (31-1) 未如期附著於種子表面而無法達到種子披衣的功效。若在種子浸泡時，添加披衣物質及黏著劑，像是石灰、纖維素、醣類等 (陳，1999) 更有機會成功。Oliveira (2016) 以二氧化矽、沸石、黏土等材料，將菌根真菌 *Rhizophagus irregularis* (BEG140) 附著於小麥種子上，幫助其生長；以麥稈或是亞麻桿粉末，搭配拮抗菌 *Pseudomonas fluorescens* (708)，以 methyl cellulose (MC) solution 進行種子披衣，都能使甜菜有效抵抗由 *Pythium* sp. (BR583) 引起的幼苗猝倒病，大幅提升種子發芽率 (Bardin et al., 2004)。

另外比較特別的是，以 *B. licheniformis* (31-1) 和青枯病菌進行對峙培養時，濃度 $OD_{600}=0.1$ 處理組之抑制效果是顯著大於濃度 0.5 和 1.0 的處理組。一般而言抑制效果會隨著濃度上升而增加或是持平，本實驗中抑制效果卻是和濃度成反比。除了可以以更低濃度 ($OD_{600}=0.01, 0.05$) 再行測試，也有可能是因為拮抗菌本身群體感應 (quorum sensing)，在高濃度時影響 *B. licheniformis* (31-1) 群落的生長或是和青枯病菌的互動，使得高濃度表現反而不如預期。

2. *Bacillus licheniformis* (31-1) 拮抗物質分析

在所分析的菌株中，*B. licheniformis* (31-1) 分泌的揮發性物質明顯抑制 *P. myriotylum, P. splendens, P. aphanidermatum*, *P. capsici* (28173) 和 *P. parasitica* 五支菌的生長，其他病原菌只有氣生菌絲受到部分抑制，但對病原菌的生長半徑無顯著影響。不過 *B. licheniformis* (31-1) 可分泌物質穿過玻璃紙，並於培養基中抑制前述所有病原菌生長，代表 *B. licheniformis* (31-1) 主要的抑菌能力不是來自於揮發性物質，而是分泌至培養基之中的物質。本實

doi:10.6342/NTU201803570

驗想鑑定 *B. licheniformis* (31-1) 分泌至培養基之拮抗物質進行研究，採用的方式是影像質譜。

但這次以影像質譜分析的方式並無法分析出 *B. licheniformis* (31-1) 分泌的拮抗物質，有幾種可能原因：一是因為拮抗物質無法被雷射光激發，無法游離出來便無法被儀器測得；二是因為 *B. licheniformis* (31-1) 以氣體拮抗為主，但氣體拮抗應該無法在培養皿上產生明顯地抑制圈 (圖二 A)，所以此可能性較小；三是因為以目前操作條件、技術無法測得，可能得測試其他條件，包括對峙培養條件、樣品準備條件、不同 matrix 的配方或是游離物質方式等 (Esquenazi et al., 2009; Shih et al., 2014)。

3. *Bacillus licheniformis* (31-1) 拮抗物質萃取

由於丁醇萃取液的抑制效果較為完整，本研究將丁醇萃取液進行 HPLC 和 FIA-MS 的分析，得到丁醇萃取液中的拮抗物質很可能為 ochrindole-D 及 streptovirudine-A1。ochrindole-D 最早是在 1994 年從 *Aspergillus ochraceus* NRRL 3519 的菌核萃取得到 (de Guzman et al., 1994)，是一種 bis-indolyl benzenoids，該類物質能抑制病原細菌生物膜之生成 (Buttachon et al., 2018)。該團隊一開始是尋找殺蟲物質，測試後證實 ochrindole-D 具有對棉鈴蟲及黃斑出尾蟲的中度毒性，不過發現其對於 *Bacillus subtilis* 也具有抑制的效果。streptovirudin-A_1 最早則是從 *Streptomyces griseofulvis* subsp. *thuringiensis* 中萃取得到 (Eckardt et al., 1975; Thrum et al., 1975)，streptovirudine-A_1 是屬於 tunicamycin 的一種抗生物質，該類物質主要是抑制 polyprenol-P:*N*-acetylhexosamine-1-P translocase family，影響細菌的細胞壁生成或是影響真核生物 *N*-glycosylation 蛋白的生成 (Tsvetanova and Price, 2001)。該團隊證實對細菌 *B. subtilis*、病毒 vaccinia virus 都具有抑制效果，後續也有研究證實能抑制流感病毒 (influenza virus) A 型和 B 型 (Tonew et

doi:10.6342/NTU201803570

al., 1982)、水疱性口炎病毒 (vesicular stomatitis virus) (Kang et al., 1981) 等。這兩個物質目前研究都不多，也許在植物病害防治領域，有更多值得研究的空間。不過以 FIA-MS 分析得到的結果，需要再以萃取之純化合物進行 LC/MS 的 MS02 之分子斷片，比對 GNPS 資料庫，才能斷定是否是正確的物質。

雖然當初選擇丁醇萃取液進行後續分析，但是在乙酸乙酯萃取液中，仍可抑制晚疫病菌氣生菌絲的生成 (圖五 B)，抑制氣生菌絲生長的同時，也會影響病原菌的致病能力 (Lee et al., 2012; Wang et al., 2016)，因此，乙酸乙酯萃取物也值得進一步再分析。另外，無論是乙酸乙酯或是丁醇萃取液，其中得到的拮抗物質抑制效果和直接以 *B. licheniformis* (31-1) 進行對峙培養的抑制效果有一段差距，有可能是因為以 *B. licheniformis* (31-1) 作對峙，會不斷分泌拮抗物質而有較強抑制效果；但也可能是因為乙酸乙酯或是丁醇沒有完全分離出 *B. licheniformis* (31-1) 的拮抗物質，這部分就還要再經過後續的實驗、分析才能得知。

二、 *B. licheniformis* (31-1) 於番茄盆栽的應用

1. 番茄青枯病防治

B. licheniformis (31-1) 不僅能在培養基的對峙實驗中抑制青枯病菌的生長，以土壤澆灌也能降低番茄青枯病的發病嚴重度。一方面是能減少處理組發病的株數，另一方面也減緩發病後病害的進程；對照組植物的青枯病罹病嚴重度約 78.7 ± 3.5 %，*B. licheniformis* (31-1) 處理植物的罹病嚴重度降低至 55.6 ± 4.5 %，防治率約為 30 %。將 *B. licheniformis* (31-1) 施用於甜椒時，青枯病罹病嚴重度度下降至處理組 32.5 %，相較於對照組 (62.5%)，防治率約為 48%，兩者之間有一段差距。不過，不同作物分泌至土壤的物質不

doi:10.6342/NTU201803570

同，可能會影響微生物相；在李 (2015) 的研究中，甜椒青枯病發病紀錄日程長達 17 天，而本實驗接種番茄青枯病紀錄日程為 13 天，有可能是因為青枯病對番茄的感染力較強，而降低了 *B. licheniformis* (31-1) 的作用；試驗環境是否適合番茄或是青椒也是需要考量的點，其他還有像是試驗條件是否完全一致等很多因素都會影響。但是無論是處理組或是對照組，只要植株一旦感染青枯病一定會死亡，無法藉由施用 *B. licheniformis* (31-1) 阻止或是治療。

目前國內已有研發青枯病的生物農藥產品「救你一命」，其主成分為液化澱粉芽孢桿菌 (*B. amyloliquefaciens* PMB01)。*B. amyloliquefaciens* (PMB01) 對茄科青枯病防治效果顯著，在田間試驗對橙蜜香番茄有 79.2% 的防治率 (罹病度由 39.5% 降低至 8.2%) (周等，2014)。本實驗想比較自行篩選之菌株 *B. licheniformis* (31-1) 和已經商品化之 *B. amyloliquefaciens* (PMB01) 防治率相差多少，因此以兩者同時進行溫室試驗，結果在本實驗中的防治效果以 *B. licheniformis* (31-1) 略佳，代表 *B. amyloliquefaciens* (PMB01) 並不是對於任何青枯病都能有極強的防治效果，可能是因為植株、環境、病原菌菌株的差異，而導致 *B. amyloliquefaciens* (PMB01) 效果有限，也許換一種生物防治劑防治效果會較佳。不過「救你一命」的施用建議是發病初期每七天施用一次，連續施用五週，和本研究預防性的澆灌處理不太相同，可能因此使本研究中的「救你一命」效果較差。後續研究可以將 *B. licheniformis* (31-1) 和 *B. amyloliquefaciens* (PMB01) 於番茄接種青枯病後再施用，比較兩者的防治效果。

2. *B. licheniformis* (31-1) 無法促進番茄對晚疫病之系統性防禦

B. licheniformis (31-1) 能有效抑制晚疫病菌生長，但在植株盆栽試驗無法明顯抑制晚疫病發病的效果。推測 *B. licheniformis* (31-1) 根部澆灌的處理無法促進番茄的系統性防禦增強，所以無法減緩地上部病害的發生，相對的，

doi:10.6342/NTU201803570

地下部感染的青枯病很可能直接被 *B. licheniformis* (31-1) 抑制，因而降低青枯病發病率。

不過即便以 *B. licheniformis* (31-1) 噴灑葉部，仍和澆灌處理組一樣，都和對照組無顯著差異，無法提升植株對晚疫病菌的防禦反應。*B. licheniformis* (31-1) 無促進性統性防禦反應，也無促進生長 (圖十三)，但卻能降低青枯病罹病度，其抑制青枯病的方式很可能是直接殺死土壤中的病原菌，而非促進植物防禦反應，那可以嘗試在接種晚疫病菌後，再噴灑 *B. licheniformis* (31-1)，就可能可以直接干擾病原菌，以防治而非預防的形式減少植物發病的情形。*Bacillus subtilis* TKS1-1 就是以內生孢子直接噴灑地上部，藉由生成生物膜保護植物表面，或是可干擾柑橘潰瘍病菌在植株表面形成生物膜，使其無法順利感染，藉此抑制柑橘潰瘍病的發生 (Huang et al., 2012b)。

另外也能進一步研究番茄的系統性防禦相關基因表現，測試 *B. licheniformis* (31-1) 施用於番茄植株後，水楊酸防禦反應中的相關基因 *NahG*, *GluA* 等 (Gaffney et al., 1993; Shah and Klessig, 1996)、茉莉酸防禦反應中的相關基因 *def-1, pin2* 等 (Farmer et al., 1992; Howe et al., 1996) 的基因表現量是否有變化，確定 *B. licheniformis* (31-1) 究竟有沒有啟動番茄植株的系統性防禦反應。

三、 土壤拮抗菌篩選

多數的生物防治菌、生物肥料或是土壤添加劑等，若只依靠單一種菌株效果有限，添加不同種的菌株共同作用，有時能得到更佳的效果 (Lim and Kim, 2010)，因此本實驗除了試驗 *B. licheniformis* (31-1) 之外，另外尋找複方處理的可能性。

doi:10.6342/NTU201803570

1. 土壤微生物分離

Ko (2010b) 建立的土壤微生物篩選方式，主要是使用蔬菜汁培養土壤微生物，再分離出大量增殖之微生物，後續再以蔬菜汁進行大量培養後直接施用於植株上，尋找能夠促進植物防禦反應的菌株及其代謝物。在此策略下，近幾年來成功找到幾支具有潛力的生物防治菌株，像是 *Pseudallescheria boydii* 在甘藍黑斑病 (Ko et al., 2010a)、*Streptomyces strain* TKA-5 萃取物對青椒疫病及甘藍黑斑病同時具有抑制能力 (Ko et al., 2010b)、管 (2012) 找到能使植株系統性抗 TMV 之微生物代謝物等，代表此方式具有不錯的成果。本研究採用此方式從臺大校園中採集 12 個土樣，分離出生長勢及菌落較多的 67 株細菌及 39 株真菌。

2. *Sinomonas* sp. (6-2)

經過以蔬菜汁培養土壤微生物，對青枯病菌進行盆栽拮抗試驗後，我挑選防治率最佳的細菌 6-2 進行鑑定。由於其在盆栽試驗中相對對照組之罹病嚴重度仍有將近 60%，若是能確認 6-2 的菌種，也許能更加善用於生物防治。我以 16S ribosomoal RNA 的基因序列進行比對，16S rDNA 的基因序列保守性高，容易設計通用性引子對 (universal primers)(Fox et al., 1977; Ward et al., 1990)，是目前常用來鑑定細菌的方式之一。定序後比對 NCBI 資料庫，得知此菌有可能為 *Sinomonas atrocyanea*。不過以親緣關係樹的分析結果而言，只能確定 6-2 是 *Sinomonas* 屬的一員，要斷言細菌 6-2 是否為 *S. atrocyanea* 這個種還缺乏證據，有待後續更多的測試分析。

Sinomonas 屬於放線菌門，放線菌綱，放線菌目，微球菌科，從前被歸類於節桿菌屬 (*Arthrobacter*)，直到 2009 年藉由基因、菌落型態及生理的分析，才將其獨立為新的一屬 (Zhou et al., 2009)；該研究團隊分析所採集的新菌株 (CW 108^T)，之 16S rDNA 序列，發現和 *Arthrobacter atrocyaneus* DSM 20127^T

doi:10.6342/NTU201803570

具有高度的相似性，但是和微球菌科其他屬 (包含 *Citricoccus, Micrococcus, Zhihengliuella, Arthrobacter, Acaricomes* and *Renibacterium*) 序列相似性均不高，而且以特定培養基 PYES, YDC, TYB 培養，其生理和型態特性均和微球菌科現有的各屬不同，因此決定將 CW 108^T 菌株和 *A. atrocyaneus* DSM 20127^T 獨立成為新屬 *Sinomonas*，並將該二菌分別命名為 *Sinomonas flava* 及 *Sinomonas atrocyaneus* (Zhou et al., 2009)；近年來有越來越多其他菌種被納入 (Bao et al., 2015; Guo et al., 2015; Lee et al., 2015; Prabhu et al., 2015)。

目前 *Sinomonas* 屬的研究並不多，不過仍有生物防治菌株的研究案例。Adhikari et al. (2017) 研究指出 *Sinomonas atrocyanea* (NSB27) 對於西瓜細菌性果斑病具有良好的防治能力，同時也具有促進植株生長及顯著提升植株葉綠素含量、高度、鮮重和乾重的能力，顯示 *S. atrocyanea* (NSB27) 為良好的生物防治資材。根據目前溫室實驗結果，雖然 *Sinomonas* sp.(6-2) 的防治效果有限，但經過後續更多研究也許仍有應用之機會。

四、 未來展望與應用

綜合本研究之成果，*B. licheniformis* (31-1) 無論是對峙培養實驗或是拮抗物質分泌測試的實驗中，均能有效抑制多種病原菌的生長，其分泌的揮發性物質也能抑制或干擾部分病原菌生長。溫室試驗中，*B. licheniformis* (31-1) 能有效降低番茄青枯病發生。未來若能進行田間試驗，可更準確評估 *B. licheniformis* (31-1) 應用之可行性，另外可將 *B. licheniformis* (31-1) 和目前番茄栽培過程中慣行農藥共同施用，測試慣行農藥是否會殺死 *B. licheniformis* (31-1)、測試防治效果能否提升。若是能在栽培過程中共同施用，可望提供多一種防治手段供農民使用。新分離的拮抗菌 *Sinomonas* sp. (6-2)，

doi:10.6342/NTU201803570

若再經過更深入的研究，了解其培養條件、施用方式等，也許有機會和 *B. licheniformis* (31-1) 共同培養、共同施用，作為複方，達到更好的抗病效果。

其實生物防治在使用上有許多限制，包括效果非短期立即見效、效果易因應環境條件有所改變、價格較化學農藥貴等，因此生物防治很難取代化學農藥的地位，但可搭配其他防治手段，作為整合防治的一環，彼此相輔相成。以番茄栽種而言，從幼苗起就需要注意許多病害，時時執行好衛生管理，除去枯枝病葉、避免積水；生長過程遭遇不同病害時，除了耕作防治，也能適量使用農藥進行防治；而進入結果期、採收期時，由於番茄是屬於連續採收型作物，很不適用農藥防治，無安全採收期限制的生物防治就是非常好的一個選擇。

doi:10.6342/NTU201803570

伍、 參考文獻

安寶貞、劉瑞芬、蔡志濃。2010。近年我國重大疫病之研究。近年來我國重大作物病害之發生及其診斷、監測與防治研討會專刊，127 – 146 頁，台中。

李秉峰。2015。評估 *Bacillus licheniformis* (31-1) 對於甜椒疫病之生物防治潛力。國立臺灣大學植物醫學碩士學位學程碩士論文。

李建勳、柯天雄、陳正次。2009。小果番茄新品種「種苗亞蔬 22 號」栽培管理。種苗科技專訊 65: 11-13。

邱硯詩。2002。最近為害台灣中部馬鈴薯之青枯病菌菌系。國立中興大學植物病理學系碩士論文。

林駿奇。2009。作物青枯病之生態與防治。花蓮區農業專訊 70: 18-21。

吳雅芳、林志鴻、王肇芬、鄭安秀。2011。馬鈴薯青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum* phylotype II/race 3/biovar 2) 於雲林縣斗南地區田間之族群密度與馬鈴薯罹病率調查。植病會刊 20: 68-77。

周浩平、陳昱初、黃德昌。2014。應用液化澱粉芽孢桿菌防治土壤傳播性病害之成效評估。高雄區農業專訊 88: 16-18。

陳哲民、陳任芳。2002。番茄晚疫病防治策略。花蓮區農業專訊 42: 2-5。

陳榮坤。1999。種子披系統之設置與測試。國立臺灣大學農藝系研究所碩士論文。

管彤。2012。篩選能產生次級代謝物以誘導植物抗病毒病害的土壤微生物。國立臺灣大學植物病理與微生物學所碩士論文。

蔡志濃、安寶貞、王姻婷、王馨媛、胡瓊月。2009。利用中和後之亞磷酸溶液防治馬鈴薯與番茄晚疫病。台灣農業研究 58: 185-195。

劉依昌、傅成美、陳正次、陳農哲。1997。小果番茄臺南亞蔬六號之育成。臺南區農業改良場研究彙報 34: 1-13。

劉依昌、黃瑞彰、蔡孟旅、黃秀雯。2016。小果番茄設施栽培及健康管理技術。行政院農業委員會臺南區農業改良場。臺南。48 頁。

Adhikari, M., Yadav, D. R., Kim, S. W., Um, Y. H., Kim, H. S., Lee, S. C., Song, J. Y., Kim, H. G., and Lee, Y. S. 2017. Biological control of bacterial fruit blotch of watermelon pathogen (*Acidovorax citrulli*) with rhizosphere associated bacteria. Plant Pathol. J. 33: 170-183.

doi:10.6342/NTU201803570

Ann, P. J., Hsieh, T. F., Tsai, J. N., Wang, I. T., and Lin, C. Y. 2000. A simple method for use of phosphorous acid and the spectra of disease control. Plant Pathol. Bull. 9: 179.

Alvarez-Ordóñez, A., Begley, M., Clifford, T., Deasy, T., Considine, K., O'Connor, P., Ross, R. P., and Hill, C. 2014. Investigation of the antimicrobial activity of *Bacillus licheniformis* strains isolated from retail powdered infant milk formulae. Probiotics & Antimicro. Prot. 6: 32-40.

Bao, Y. Y., Huang, Z., Mao, D. M., Sheng, X. F., and He, L. Y. 2015. *Sinomonas susongensis* sp. nov., isolated from the surface of weathered biotite. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65: 1133-7.

Bardin, S. D., H. C. Huang, and J. R. Moyer. 2004. Control of *Pythium* damping-off of sugar beet by seed treatment with crop straw powders and a biocontrol agent. Biological Control 29: 453-460.

Bourke, P. M. A. 1964. Emergence of potato blight, 1843-46. Nature 203: 805–808.

Buddenhagen, I., Sequeira, L., and Kelman. A. 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 52: 726.

Buddenhagen, I., Kelman, A., 1964. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annu. Rev. Phytopathol. 2, 203–230.

Buttachon, S., Ramos, A. A., Inácio, Â., Dethoup, T., Gales, L., Lee, M., Costa, P. M., Silva, A. M. S., Sekeroglu, N., Rocha, E., Pinto, M. M. M., Pereira, J. A., and Kijjoa, A. 2018. *Bis*-indolyl benzenoids, hydroxypyrrolidine derivatives and other constituents from cultures of the marine sponge-associated fungus *Aspergillus* candidus KUFA0062. Mar. Drugs 16: 119.

Cazorla, F. M., Duckett, S. B., Bergström, E. T., Noreen, S., Odijk, R., Lugtenberg, B. J., Thomas-Oates, J. E., and Bloemberg, G. V. 2006. Biocontrol of avocado *Dematophora* root rot by antagonistic *Pseudomonas fluorescens* PCL1606 correlates with the production of 2-hexyl 5-propyl resorcinol. Mol. Plant Microbe Interact. 19: 418-28.

Cohen, T., and Coffey, M. D. 1986. Systemic fungicides and the control of oomycetes. Annu. Rev. Phytopathol. 24: 311-338

De Guzman, F. S., Bruss, D. R., Rippentrop, J. M., Gloer, K. B., Gloer, J. B., Wicklow, D. T., Dowd, P. F. 1994. Ochrindoles A-D: new bis-indolyl

doi:10.6342/NTU201803570

benzenoids from the sclerotia of *Aspergillus ochraceus* NRRL 3519. J. Nat. Prod. 57: 634-9.

De la Vega, L.M., Barboza-Corona, J.E., Aguilar-Uscanga, M.G., and Ramirez-lepe, M. 2006. Purification and characterization of an exochitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Aizawai* and its action against phytopathogenic fungi. Can. J. Microbiol. 52: 651-657.

Denny, T. P. 2006. Plant pathogenic *Ralstonia* species. Pages 573-644 in: Plant-associated bacteria. S. S. Gnanamanickam ed., Springer, Dordrecht, Netherlands, 718 pp.

Dischinger, J., Josten, M., Szekat, C., Sahl, H. G., and Bierbaum, G. 2009. Production of the novel two-peptide lantibiotic lichenicidin by *Bacillus licheniformis* DSM 13. PLoS One 4: 67-88.

Eckardt, K., Thrum, H., Bradler, G., Tonew, E., and Tonew, M. 1975. Streptovirudins, new antibiotics with antibacterial and antiviral activity II. Isolation, chemical characterization and biological activity of streptovirudins A_1, A_2, B_1, B_2, C_1, C_2, D_1 and D_2. J. Antibiot. 28: 274-279.

Esquenazi, Eduardo., Yang, Y. L., Watrous, J., Gerwick, W. H., and Dorrestein, P. C. 2009. Imaging mass spectrometry of natural products. Nat. Prod. Rep. 26: 1521-1534.

Farmer, E. E., Johnson, R. R., and Ryan, C. A. 1992. Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. Plant Physiol. 98:995-1002.

Fegan, M., and Prior, P. 2005. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex? Pages 449-461 in: Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward, eds. APS Press, St. Paul, MN, USA, 510 pp.

Flier, W. G., Grünwald, N. J., Kroon, L. P., Sturbaum, A. K., van den Bosch, T. B., Garay-Serrano, E., Lozoya-Saldaña, H., Fry, W. E., Turkensteen, L. J. 2003. The population structure of *Phytophthora infestans* from the Toluca valley of central Mexico suggests genetic differentiation between populations from cultivated potato and wild *Solanum* spp. Phytopathology 93: 382-90.

Fry, W. E., Goodwin, S. B., Dyer, A. T., Matuszak, J. M., Drenth, A., Tooley, P. W., Sujkowski, L. S., Koh, Y. J., Cohen, B. A., Spielman, L. J., Deahl, K. L., Inglis,

doi:10.6342/NTU201803570

D. A., and Sandlan, K. P. 1993. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: Chronology, pathways, and implications. Plant Dis. 77: 653–661.

Fry, W. E., Goodwin, S. B., Matuszak, J. M., Spielman, L. J., Milgroom, M. G., and Drenth, A. 1992. Population genetics and intercontinental migrations of *Phytophthora infestans*. Annu. Rev. Phytopathol. 30: 107–130.

Fox, G. E., Magrum, L. J., Balch, W. E., Wolfe, R. S., and Woese, C. R. 1977. Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization.. Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 4537-41.

Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., and Ryals, J. 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. Science 261: 754–756.

Galkiewicz, J.P., and Kellogg, C. A. 2008. Cross-kingdom amplification using bacteria-specific primers: complications for studies of coral microbial ecology. Appl. Environ. Microbiol. 74: 7828-7831.

Gomaa, E. Z. 2012. Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: Their potential in antifungal biocontrol. J. Microbiol.50: 103-111.

Goodwin, S. B., Drenth, A., and Fry, W. E. 1992. Cloning and genetic analyses of two highly polymorphic, moderately repetitive nuclear DNAs from *Phytophthora infestans*. Curr. Genet. 22:107-115.

Goss, E. M., Tabima, J. F., Cooke, D. E. L., Restrepo, S., Fry, W. E., Forbes, G. A., Fieland, V. J., Cardenas, M., and Gr¨unwald, N. J. 2014. The Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* originated in central Mexico rather than the Andes. Proc. Natl. Acad. Sci. 111: 8791-8796.

Griffith, G. H., and Shaw, D. S. 1998. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4007-4014.

Grünwald, N. J., Flier, W. G., Sturbaum, A. K., Garay-Serrano, E., van den Bosch, T. B., Smart, C. D., Matuszak, J. M., Lozoya-Saldaña, H., Turkensteen, L. J., and Fry, W. E. 2001. Population structure of *Phytophthora infestans* in the Toluca valley region of central Mexico. Phytopathology 91: 882-90.

doi:10.6342/NTU201803570

Guo, Q. Q., Ming, H., Meng, X. L., Huang, J. R., Duan, Y. Y., Li, SH., Li, S., Zhang, J. X., Li, W. J., and Nie, G. X. 2015. *Sinomonas halotolerans* sp. nov., an actinobacterium isolated from a soil sample. Antonie. Van. Leeuwenhoek. 108: 887-95.

Haki, G. D., and Rakshit, S. K. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. Bioresour. Technol. 89: 17-34.

Hanson, P., Lu, S. F., Wang, J. F., Chen, W., Kenyon, L., Tan, C. W., Kwee, L. T., Wang, Y. Y., Hsu, Y. C., Schafleitner, R., Ledesma, D., and Yang, R. Y. 2015. Conventional and molecular marker-assisted selection and pyramiding of genes for multiple disease resistance in tomato. Scientia Horticulturae 201: 346-354.

Hayward, A. C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. J. Appl. Bacteriol. 27: 265-277.

He, L. Y., Sequeira, L. and Kelamn, A. 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. Plant Dis. 67: 1357-1361.

Howe, G. A., Lightner, J., Browse, J., and Ryan, C. A. 1996. An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. Plant Cell 8: 2067-2077.

Huang, C. H., Chang, M. T., Huang, L., and Chu, W. S. 2012a. Development of a novel PCR assay based on the gyrase B gene for species identification of *Bacillus licheniformis*. Mol. Cell Probes 26: 215-7.

Huang, T. P., Tzeng, D. D., Wong, A. C., Chen, C. H., Lu, K. M., Lee, Y. H., Huang, W. D., Hwang, B. F., and Tzeng, K. C. 2012b. DNA polymorphisms and biocontrol of *Bacillus* antagonistic to citrus bacterial canker with indication of the interference of phyllosphere biofilms. PLoS One.7: e42124.

Johnson, D. A., Inglis, D. A., and Miller, J. S. 2004. Control of potato tuber rots caused by oomycetes with foliar applications of phosphorous acid. Plant Dis. 88: 1153-1159.

Jyan, M. H., Ann, P. J., Tsai, J. N., Hsih, S. D., Chang, T. T. and Liou, R. F. 2004. Recent occurrence of *Phytophthora infestans* US-11 as the cause of severe late blight on potato and tomato in Taiwan. Can. J. Plant. Pathol. 26: 188-192.

Kang, M. S., Park, J. J., Singh, I., and Phillips, L. A. 1981. Streptovirudin inhibits glycosylation and multiplication of vesicular stomatitis virus. Biochem.

doi:10.6342/NTU201803570

Biophys. Res. Commun. 99: 422-8.

Kayalvizhi, N. and Gunasekaran, P. 2010. Purification and Characterization of a novel broad-spectrum bacteriocin from *Bacillus licheniformis* MKU3 Biotechnol. Bioproc. E. 15: 365.

Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M. , Na, H., Park, S. C., Jeon, Y. S., Lee, J. H., Yi, H., Won, S., and Chun, J. 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62:716–721.

Kloepper, J. W., and Schroth, M. N. 1981. Relationship of *in vitro* antibiosis of plant growth-promoting rhizobacteria to plant-growth and the displacement of root. Microflora. Phytopathology 71:1020-4.

Ko, W. H., Tsou, Y. J., Ju, Y. M., Hsieh, H. M., and Ann, P. J. 2010a. Production of a fungistatic substance by *Pseudallescheria boydii* isolated from soil amended with vegetable tissues and its significance. Mycopathologia 169: 125-31.

Ko, W. H., Tsou, Y. J., Lin, M. J., and Chern, L. L. 2010b. Activity and characterization of secondary metabolites produced by a new microorganism for control of plant diseases. New Biotechnol. 27: 397-402.

Kong, H. G., Kim, J. C., Choi, G. J., Lee, K. Y., Kim, H. J., Hwang, E. C., Moon, B. J., Lee, S. W. 2010. Production of surfactin and iturin by *Bacillus licheniformis* N1 responsible for plant disease control activity. Plant Pathol. J. 26: 170-177.

Kuhn, D. A., and Starr, M. P. 1960. *Arthrobacter atrocyaneus* n. sp. and its blue pigment. Arch. Microbiol. 36: 175-181.

Lee, L. H., Azman, A. S., Zainal, N., Yin, W. F., Mutalib, N. S., and Chan, K. G. 2015. *Sinomonas humi* sp. nov., an amylolytic actinobacterium isolated from mangrove forest soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65: 996-1002.

Liaw, C. C., Yang, Y. L., Lin, C. K., Lee, J. C., Liao, W. Y., Shen, C. N., Sheu, J. H., and Wu, S. H. 2015. New meroterpenoids from *Aspergillus terreus* with inhibition of cyclooxygenase-2 expression. Org. Lett. 17: 2330-3.

Lim, J. H., and Kim, S. D. 2010. Biocontrol of Phytophthora blight of red pepper caused by *Phytophthora capsici* using *Bacillus subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11 formulations. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 53: 766-773.

doi:10.6342/NTU201803570

Lin, C. H. 2008. Application of population profiling and detection of *Ralstonia solanacearum* in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 3: 147-155.

Lin, X., Lee, C. G., Casale, E. S., and Shih, J. C. H. 1992. Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3271-3275.

Liu, W. T., Yang, Y. L., Xu, Y., Lamsa, A., Haste, N. M., Yang, J. Y., Ng, J., Gonzalez, D., Ellermeier, C. D., Straight, P. D., Pevzner, P. A., Pogliano, J., Nizet, V., Pogliano, K., and Dorrestein, P. C. 2010. Imaging mass spectrometry of intraspecies metabolic exchange revealed the cannibalistic factors of *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. 107: 16286-90.

Mckay, A. G., and Floyd, R. M. 1992. Phosphonic acid control downy mildew (*Peronospora parasitica*) in cauliflower curds. Aust. J. Exp. Agric. 32: 127–129.

Nanita, S. C., and Kaldon, L. G. 2016. Emerging flow injection mass spectrometry methods for high-throughput quantitative analysis. Anal. Bioanal. Chem. 408: 23-33.

Oliveira, R. S., Rocha, I., Ma, Y., Vosátka, M., and Freitas, H. 2016. Seed coating with arbuscular mycorrhizal fungi as an ecotechnological approach for sustainable agricultural production of common wheat (*Triticum aestivum* L.). J Toxicol Environ Health A. 79: 329-37.

Peeters, N., Guidot, A., Vailleau, F., and Valls, M. 2013. *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. Mol. Plant Pathol. 14:651–662.

Pegg, K. G., Whiley, A. W., Saranah, J. B., and Glass, R. J. 1985. Control of Phytophthora root rot of avocado with phosphorous acid. Aust. Plant Pathol. 14: 25-29.

Perveen, R., Suleria, H. A., Anjum, F. M., Butt, M. S., Pasha, I., and Ahmad, S. 2015. Tomato, A. S. (*Solanum lycopersicum*) carotenoids and lycopenes chemistry: Metabolism, absorption, nutrition, and allied health claims- A comprehensive review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 55: 919-929.

Prabhu, D. M., Quadri, S. R., Cheng, J., Liu, L., Chen, W., Yang, Y., Hozzein, W. N., Lingappa, K., and Li, W. J. 2015. *Sinomonas mesophila* sp. nov., isolated from ancient fort soil. J. Antibiot (Tokyo). 68: 318-21.

doi:10.6342/NTU201803570

Rønning, H. T., Madslien, E. H., Asp, T.N., and Granum, P. E. 2015. Identification and quantification of lichenysin - a possible source of food poisoning. Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess. 32: 2120-30.

Shah, J., and Klessig, D. F. 1996. Identification of a salicylic acid-responsive element in the promoter of the tobacco pathogenesis-related β-1,3-glucanase gene, *PR-2d*. Plant J. 10: 1089-1101.

Shih, C. J., Chen, P. Y., Liaw, C. C., Lai, Y. M., and Yang, Y. L. 2014. Bringing microbial interactions to light using imaging mass spectrometry. Nat Prod Rep. 31: 739-55.

Smith, E. F. 1896. A bacterial disease of the tomato, eggplant and Irish potato. U.S. Dept. Agric. Div. Veg. Phys. Path. Bull. 12: 1-26.

Sudhir, A. P., Agarwaal, V. V., Davea, B. R., Patel, D. H., and Subramanian, R. B. 2016. Enhanced catalysis of l-asparaginase from *Bacillus licheniformis* by a rational redesign. Enzyme Microb. Technol. 86: 1-6.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30: 2725-2729.

Thrum, H., Eckardt, K., Bradler, G., Fügner, R., Tonew, E., and Tonew, M. 1975. Streptovirudins, new antibiotics with antibacterial and antiviral activity: I. Culture taxonomy, fermentation and production of streptovirudin complex. J. Antibiot. 28: 514–521.

Tonew, E. M., Tonew, M. S., Indulen, M. K., and Dzeguze, D. R. 1982. Effects of streptovirudin on influenza viruses type A and B: inhibition of the lipid-linked oligosaccharide synthesis of fowl plague virus. Acta. virologica 26: 444-52.

Tooley, P. W., Fry, W. E., and Villarreal Gonzalez, M. J. 1985. Isozyme characterization of sexual and asexual *Phytophthora infestans* population. J. Hered. 76:431-435.

Tsvetanova, B. C., and Price, N. P. 2001. Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry of tunicamycin-type antibiotics. Anal Biochem. 289: 147-56.

US EPA. 2001. Biopesticides registration action document : *Bacillus licheniformis* Strain SB3086. US Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs. US EPA.

doi:10.6342/NTU201803570

Ward, D. M., Weller, R., and Bateson, M. M.1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. Nature 345: 63-5.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (Eds.), PCR protocols pp. 315-320. Academic Press.

Wu, Y. F., Lin, C. H., Chen, T. M., Huang, Y. F., Chen, S. H., Wang, J. F., and Cheng, A. S. 2010. Ecological survey of brown rot of potato in Dounan, Yunlin. Plant Pathol. Bull. 19: 87. (in Chinese)

Yoshida, K., Schuenemann, V. J., Cano, L. M., Pais, M., Mishra, B., Sharma, R., Lanz, C., Martin, F. N., Kamoun, S., Krause, J., Thines, M., Weigel, D., Burbano, H. A. 2013. The rise and fall of the *Phytophthora infestans* lineage that triggered the Irish Potato Famine. Elife 2: e00731.

Zhou, Y., Wei, W., Wang, X., and Lai, R. 2009. Proposal of *Sinomonas flava* gen. nov., sp. nov., and description of *Sinomonas atrocyanea* comb. nov. to accommodate *Arthrobacter atrocyaneus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 259-63.

doi:10.6342/NTU201803570

陸、 附表

表一、用於拮抗微生物分離之土壤樣本列表

編號	採集地點	GPS[a]	採集時間	植物	深度[b]
1	臺大 黑森林	25.019916, 121.543714	2017.08.05	白千層	2 – 10
2	臺大 黑森林	25.019916, 121.543714	2017.08.05	白千層	10 – 20
3	臺大 黑森林	25.019497, 121.543625	2017.08.05	蒲葵	2 – 10
4	臺大 黑森林	25.019497, 121.543625	2017.08.05	蒲葵	10 – 20
5	臺大 醉月湖畔	25.020955, 121.537266	2017.08.08	南洋杉	2 – 10
6	臺大 醉月湖畔	25.020955, 121.537266	2017.08.08	南洋杉	10 – 20
7	臺大 醉月湖畔	25.021016, 121.537616	2017.08.08	正榕	2 – 10
8	臺大 醉月湖畔	25.021016, 121.537616	2017.08.08	正榕	10 – 20
9	花蓮 玉里	23.456888, 121.395833	2017.08.20	菜園	2 – 20
10	花蓮 玉里	23.456991, 121.395544	2017.08.20	水稻	2 – 20
11	臺大 園藝分場農田	25.012845, 121.546898	2017.11.09	-[c]	2 – 20
12	臺大 園藝分場農田	25.012845, 121.546898	2017.11.09	-	2 – 20

a. 以智慧型手機 (zenfone 3) 的 google map App. 進行 GPS (Global Positioning System) 定位。

b. 土壤採集的挖掘深度，單位為公分 (cm)。

c. -: 休耕期無作物。

doi:10.6342/NTU201803570

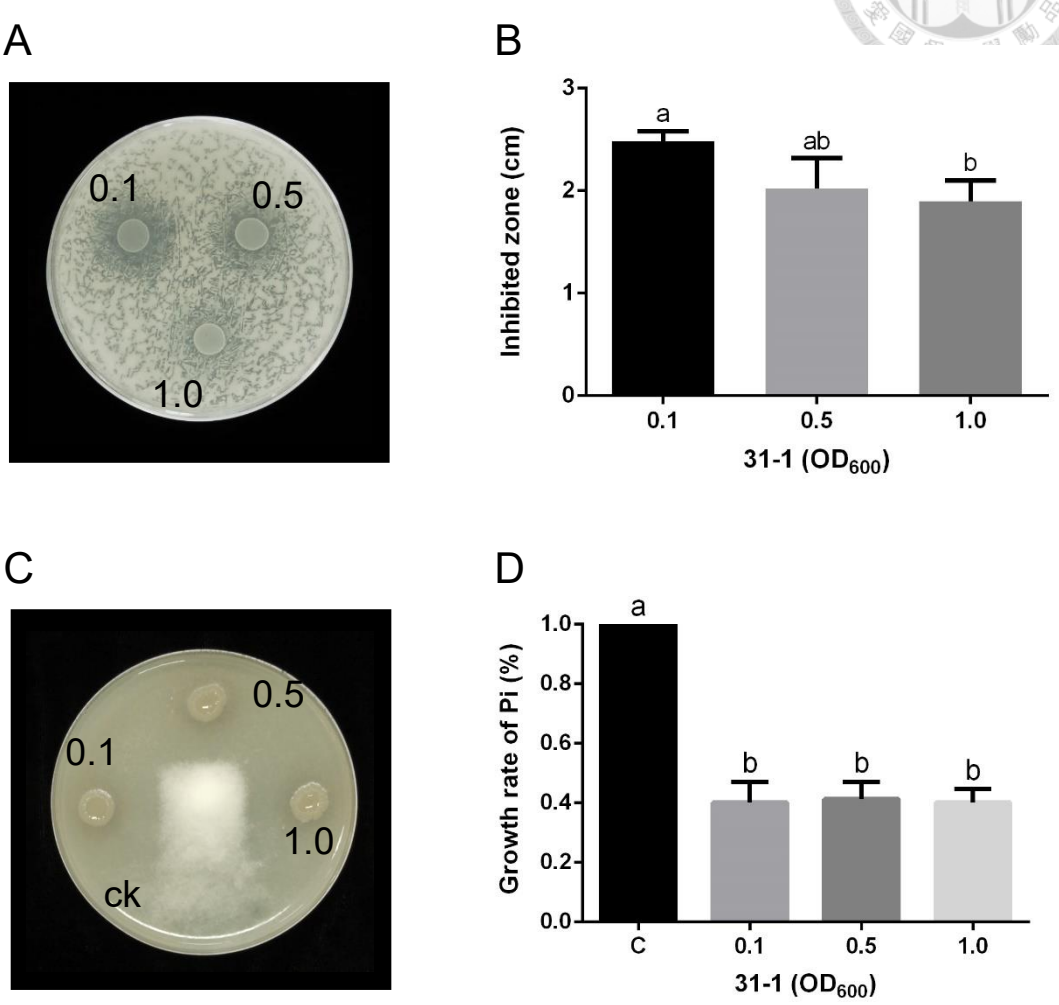
表二、從各個土樣分離出之細菌及真菌菌株數量統計表。

編號	細菌	真菌	編號	細菌	真菌
1	4[a]	5	7	5	3
2	8	3	8	3	5
3	5	3	9	7	1
4	4	5	10	8	0
5	3	5	11	7	3
6	3	3	12	10	3

a. 數量代表後續進行盆栽試驗的菌株數目。

doi:10.6342/NTU201803570

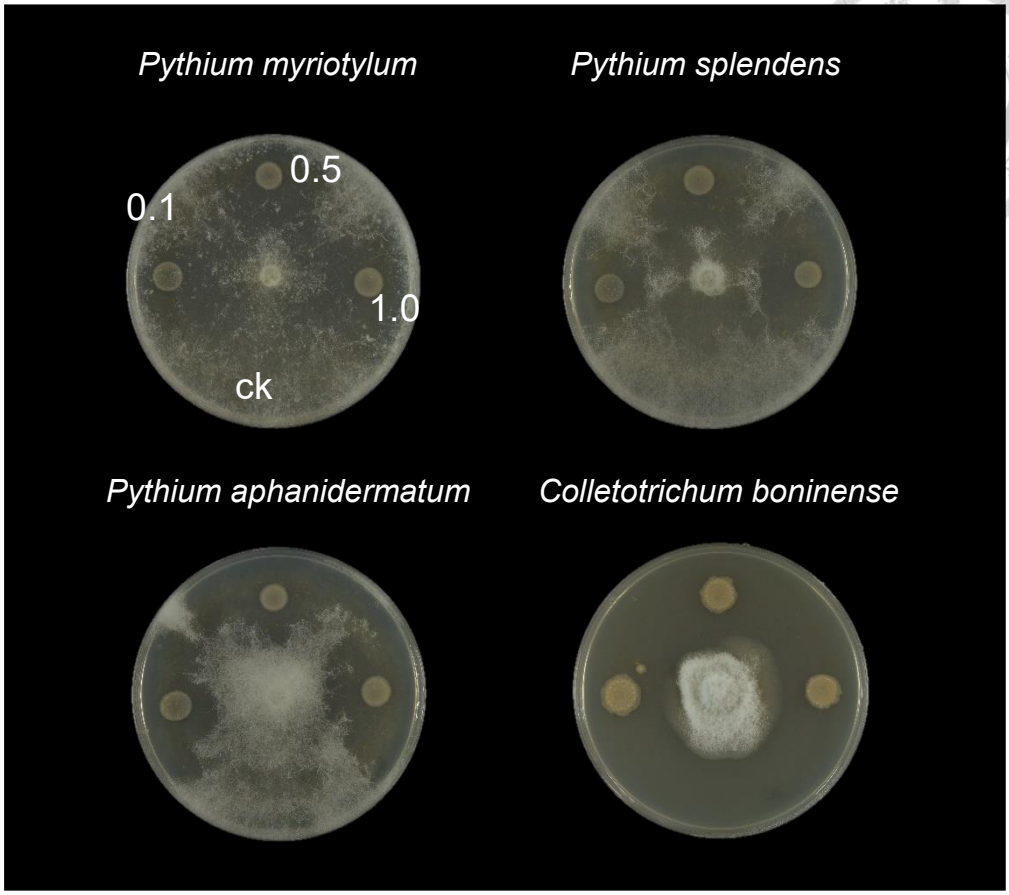
柒、 附圖



圖一、對峙培養試驗顯示 *Bacillus licheniformis* (31-1) 可抑制青枯病菌及晚疫病菌之生長。

A. 青枯病菌和 *B. licheniformis* (31-1) 於 CPG 培養基對峙培養。所測試之 *B. licheniformis* (31-1) 濃度分別為 OD_{600} = 0.1, 0.5, 及 1.0，並於對峙培養後第三天拍照記錄青枯病菌被抑制的情形。**B.** 以最小顯著差異性測驗 (LSD test) 分析抑制圈直徑差異性。相同字母代表未達顯著差異 ($P < 0.05$)。誤差線為三次試驗重複之平均值標準差。**C.** 晚疫病菌和 *B. licheniformis* (31-1) 於裸麥培養基對峙培養。所測試之 *B. licheniformis* (31-1) 濃度分別為 OD_{600} = 0.1, 0.5 及 1.0，並於對峙培養後第九天拍照記錄晚疫病菌被抑制的情形。**D.** 以 LSD 分析抑制圈直徑的差異性。相同字母代表未達顯著差異 ($P < 0.05$)。每次試驗重覆三皿對峙培養，誤差線為三次試驗重複之平均值標準差。

doi:10.6342/NTU201803570

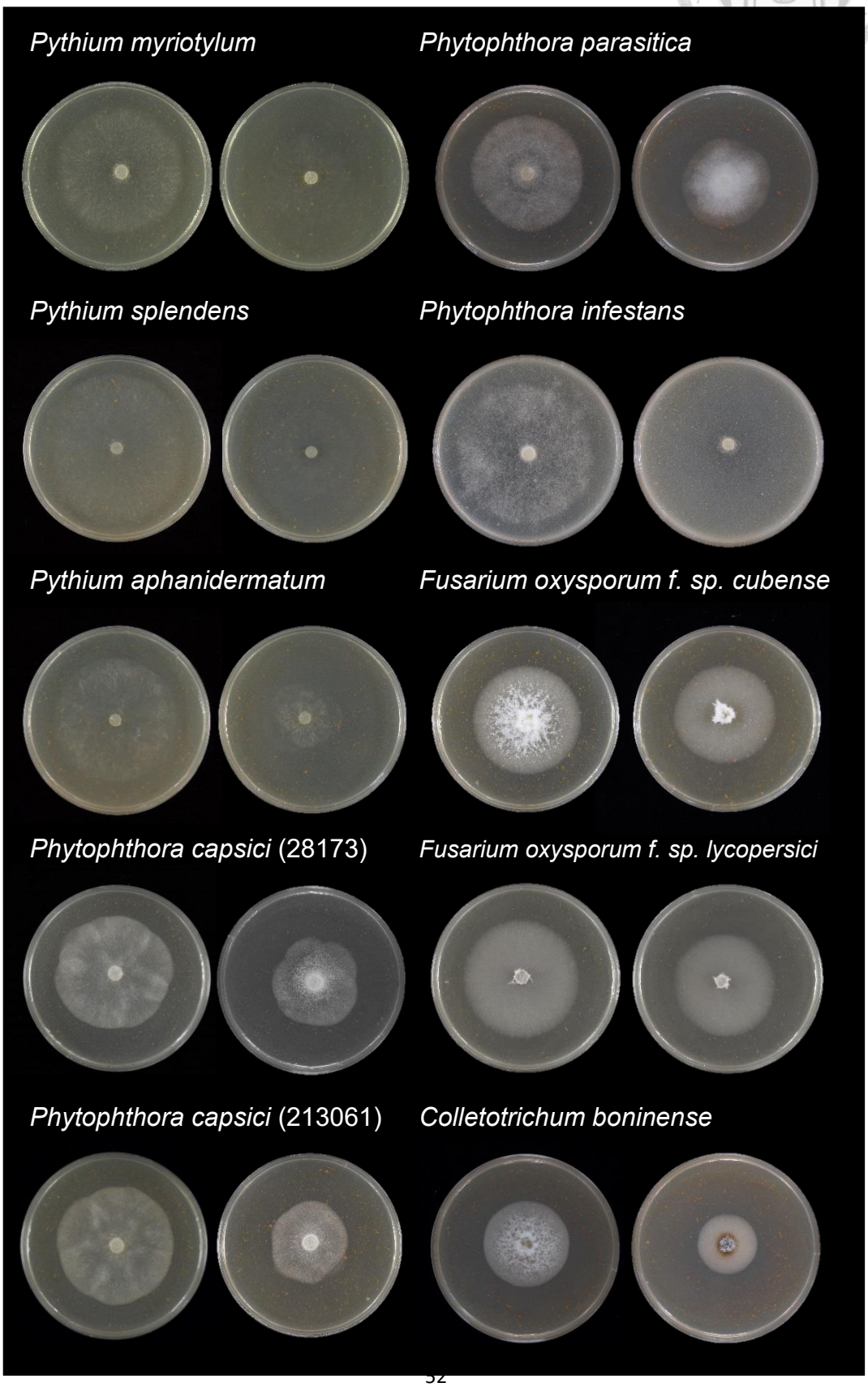


圖二、對峙培養試驗顯示 *Bacillus licheniformis* (31-1) 能抑制多種病原菌之生長。

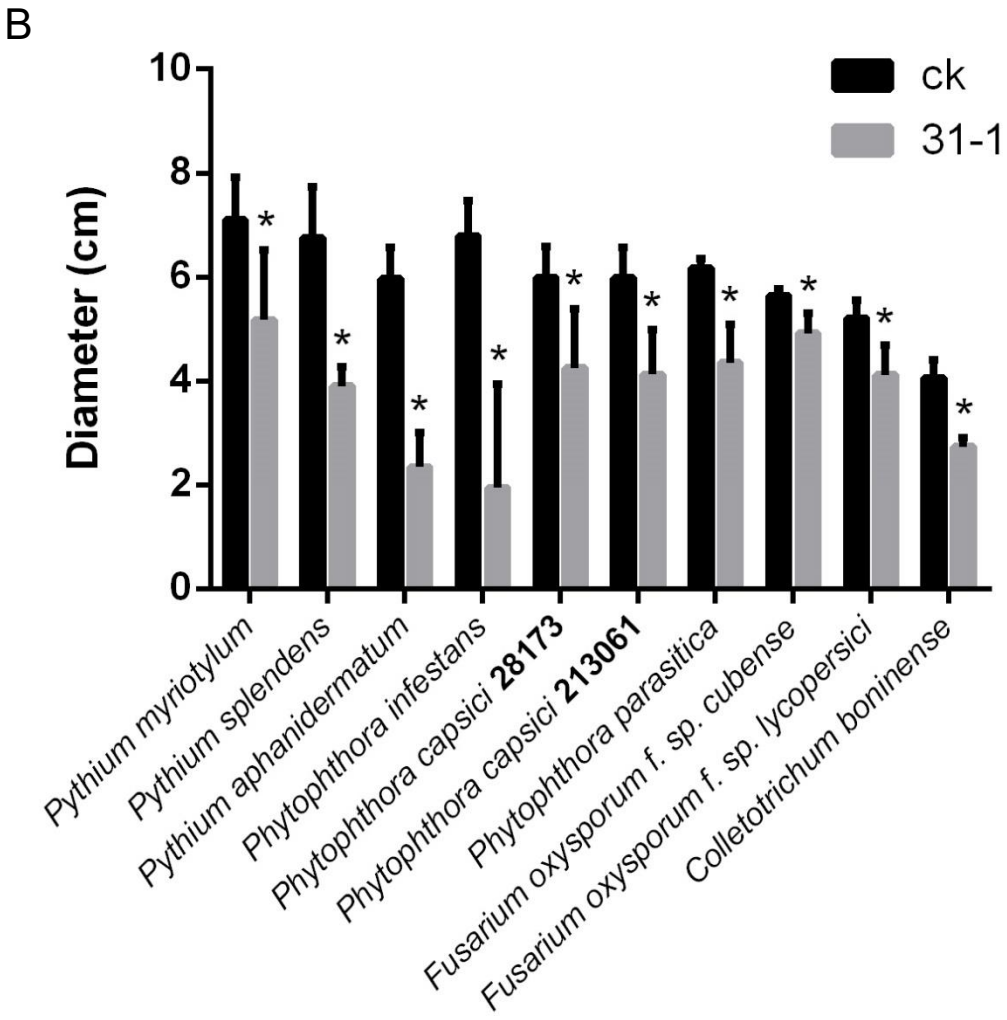
將 *B. licheniformis* (31-1) 和不同病原菌在 V8 培養基對峙培養，包括 *Pythium myriotylum*, *Pythium splendens*, *Pythium aphanidermatum* 和 *Colletotrichum boninense*，所測試之 *B. licheniformis* (31-1) 濃度分別為 OD_{600} = 0.1, 0.5, 及 1.0，並於對峙培養後第二天 (*P. myriotylum*, *P. splendens*, *P. aphanidermatum*)、第五天 (*C. boninense*) 拍照記錄菌株生長情形。

doi:10.6342/NTU201803570

A



doi:10.6342/NTU201803570

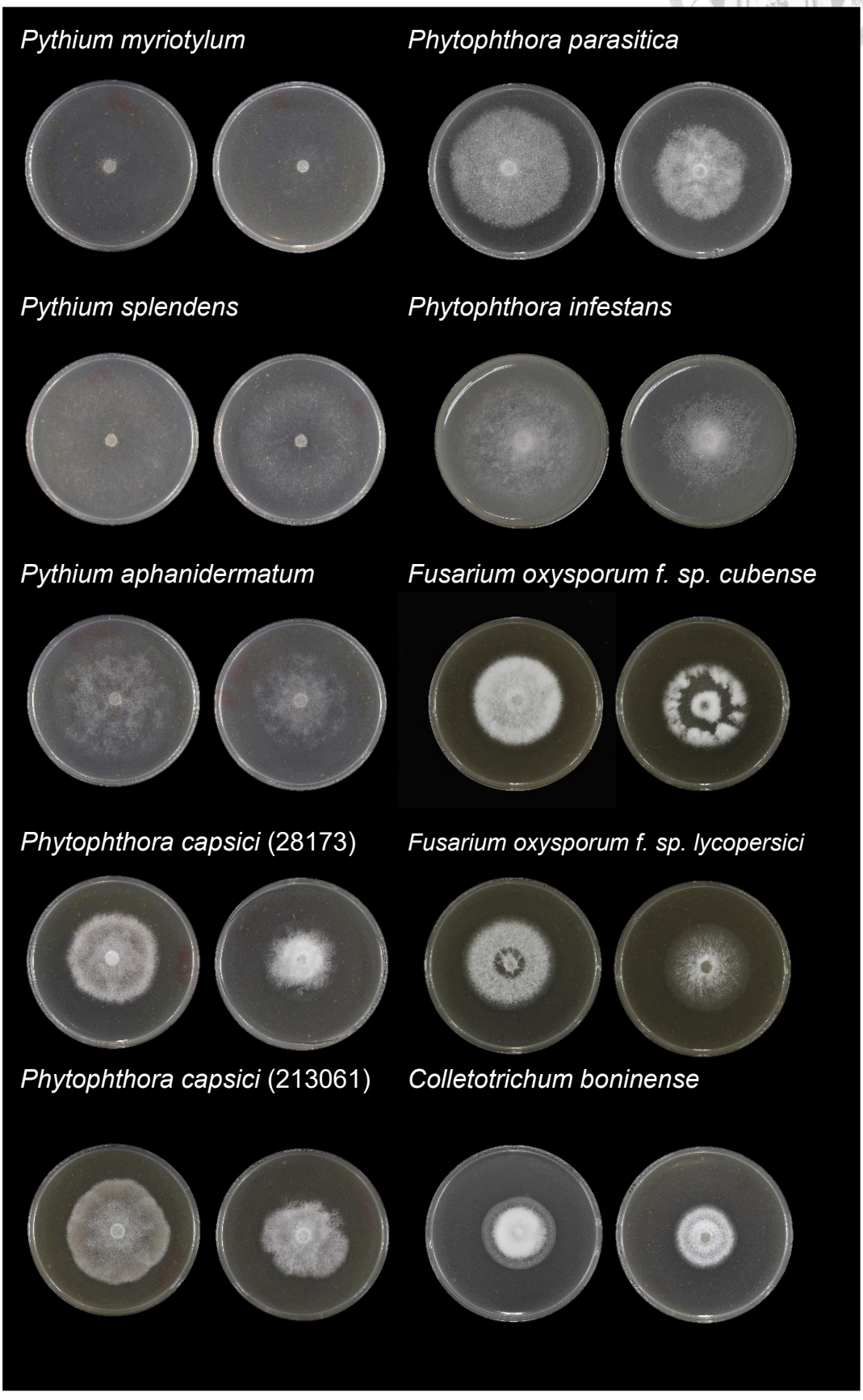


圖三、*Bacillus licheniformis* (31-1) 分泌之拮抗物質能夠抑制多種植物病原菌生長。

A. *B. licheniformis* (31-1) 之外泌物可抑制植物病原菌生長。將 *B. licheniformis* (31-1) 菌塊 (OD_{600} = 1.0) 放置於平鋪玻璃紙之培養基中間，培養三天後移除菌塊及玻璃紙，放上病原菌菌絲塊，並分別於培養後第一天 (*Pythium myriotylum*, *Pythium splendens*, *Pythium Aphanidermatum*)、第三天 (*Phytophthora capsici* 28173, 213061)、第四天 (*Phytophthora parasitica, Fusarium oxysporum f. sp. cubense, Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici, Colletotrichum boninense*) 及第八天 (*Phytophthora infestans*) 拍照記錄生長情形。**B.** 以 Student's *t* test 分析菌落直徑差異性。每次試驗重覆兩皿。誤差線為三次試驗重複之平均值標準差。*顯著差異 ($P < 0.05$)。

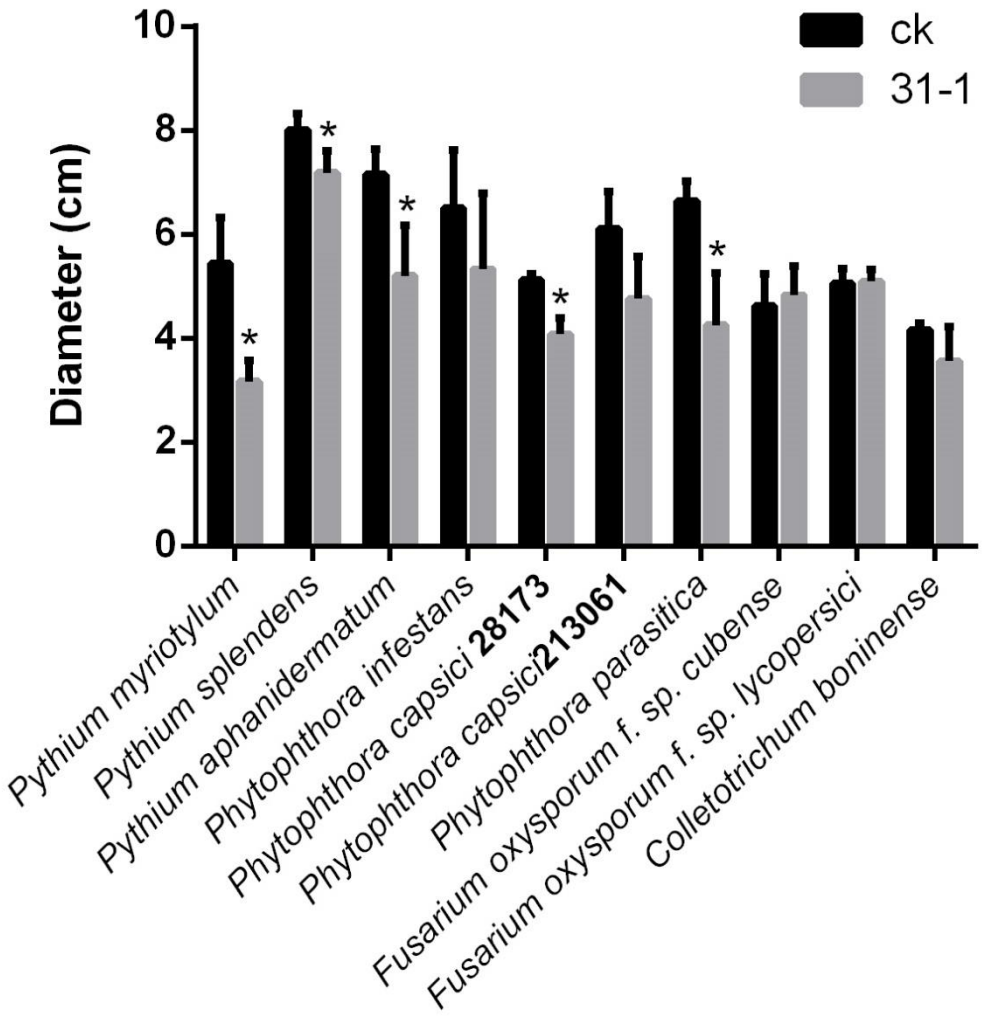
doi:10.6342/NTU201803570

A



doi:10.6342/NTU201803570

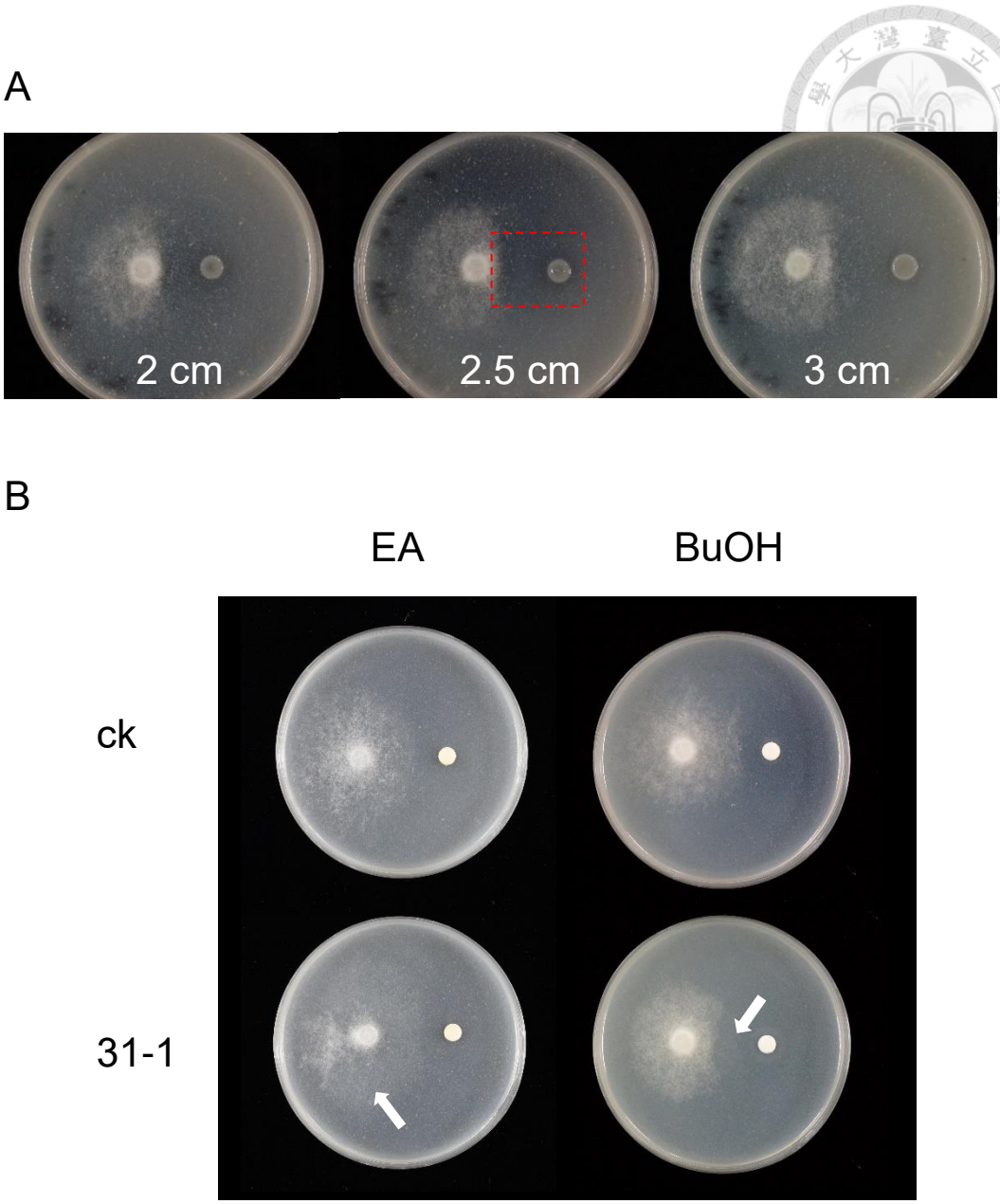
B



圖四、*Bacillus licheniformis* (31-1) 分泌之氣態物質能夠抑制部分植物病原菌生長。

A. *B. licheniformis* (31-1)之氣態外泌物質可抑制部分植物病原菌生長。將 *B. licheniformis* (31-1) (OD_{600} = 1.0) 塗盤於 LA 培養基，另將病原菌菌絲塊放置於 V8 或裸麥培養基上，將兩培養基對蓋封膜，分別於培養後第一天 (*Pythium myriotylum*, *Pythium splendens*, *Pythium aphanidermatum*)、第三天 (*Phytophthora capsici* 28173, 213061)、第四天 (*Phytophthora parasitica, Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense, Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) 、第五天 (*Colletotrichum boninense*) 及第八天 (*Phytophthora infestans*) 拍照記錄生長情形。**B.** 以 Student's *t* test 分析菌落直徑差異性。每次試驗重覆兩皿。誤差線為三次試驗重複之平均值標準差。* 顯著差異 ($P < 0.05$)。

doi:10.6342/NTU201803570

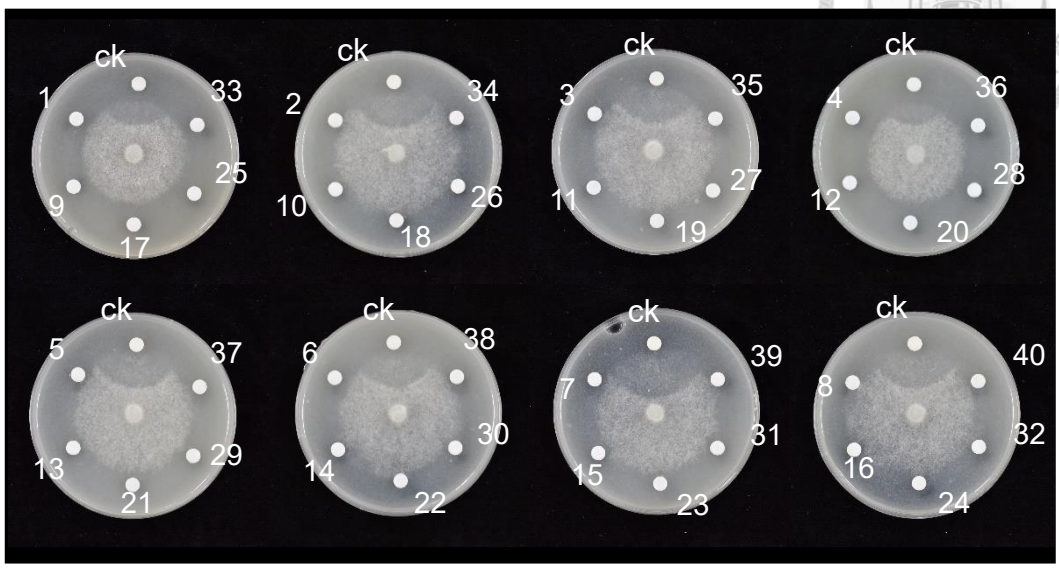


圖五、*Bacillus licheniformis* (31-1) 粗萃物能抑制晚疫病菌生長。

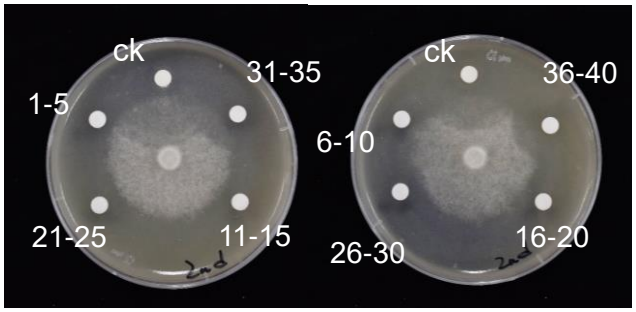
A. 測試晚疫病菌和 *B. licheniformis* (31-1) 之最適對峙培養距離。將晚疫病菌和 *B. licheniformis* (31-1) 分別相距 2, 2.5 或 3 cm 進行對峙培養，並於六天後拍照記錄。紅色框：進行影像質譜分析時取用的樣品。**B.** *B. licheniformis* (31-1) 外泌物之乙酸乙酯 (EA)及丁醇 (BuOH) 萃取物可抑制晚疫病菌生長。將 1 mg 粗萃物滴加在濾紙片上，測試對晚疫病菌生長的抑制情形，並於八天後拍照記錄。白色箭頭為晚疫病菌氣生菌絲生長被抑制部分。

doi:10.6342/NTU201803570

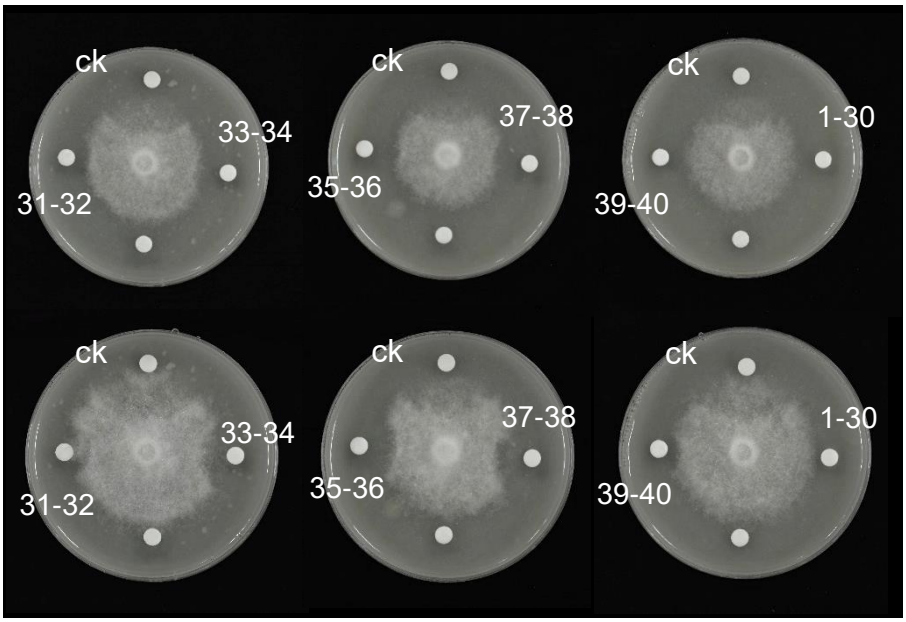
A



B



C

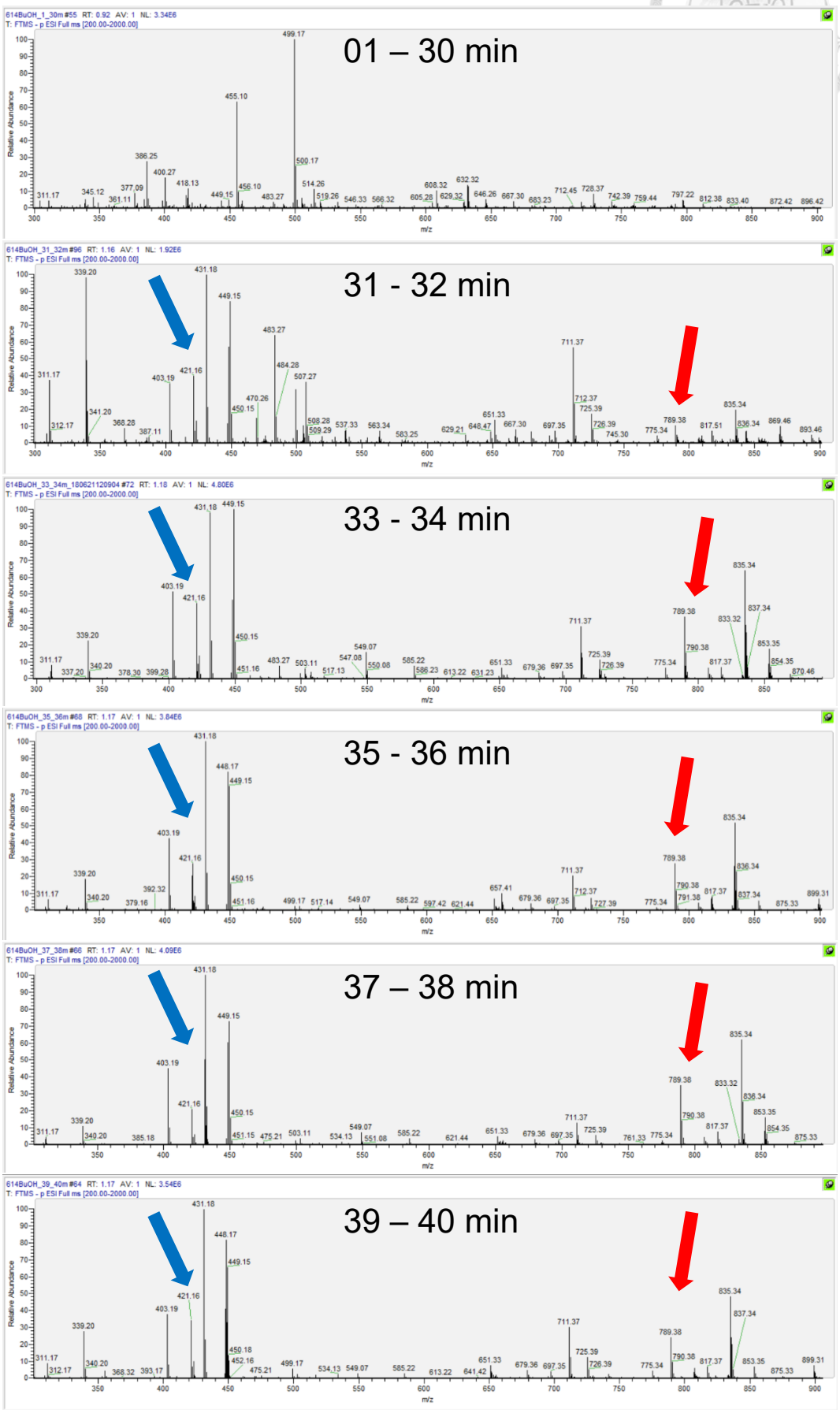


doi:10.6342/NTU201803570

圖六、以 HPLC 分離 *Bacillus licheniformis* (31-1) 抑菌物質之有效成份。
以 HPLC 分離 *B. licheniformis* (31-1) 外泌物之丁醇萃取液後，將所收集之層析液滴加在濾紙片，並分析其對晚疫病菌生長的抑制情形，於六至七天後拍照記錄。收集時間之間隔分別為：A. 每一分鐘；B. 每五分鐘； C. 每兩分鐘。ck 為粗萃物原液，白色數字為各處理的分鐘數。以甲醇 (MeOH) 為負對照組。

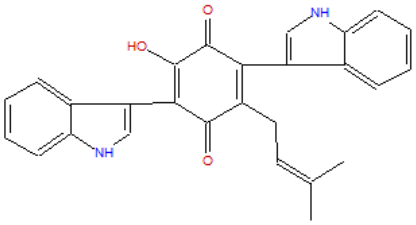
doi:10.6342/NTU201803570

A

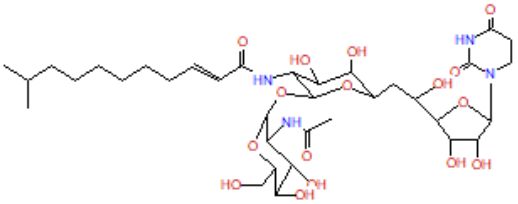


doi:10.6342/NTU201803570

B



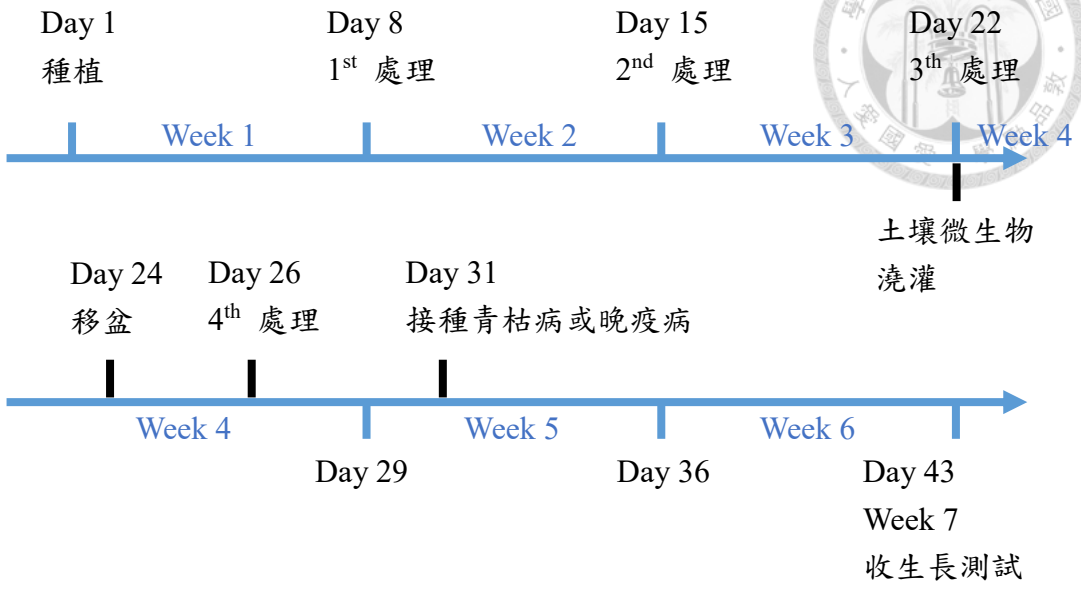
C



圖七、以 FIA-MS 分析每兩分鐘收取之層析液。

層析液樣品 1-30, 31-32, 33-34, 35-36, 37-38 及 39-40 分鐘經由 FIA-MS 負電分析後，以 Thermo Xcalibur Roadmap 分析。A. 藍色箭頭代表質荷比約 421.16，紅色箭頭代表質荷比約 789.38。B. 將 421.16 與資料庫比對，為化合物 ochrindole-D 之圖形。C. 將 789.38 與資料庫比對，為化合物 streptovirudine-A1 之圖形。

doi:10.6342/NTU201803570

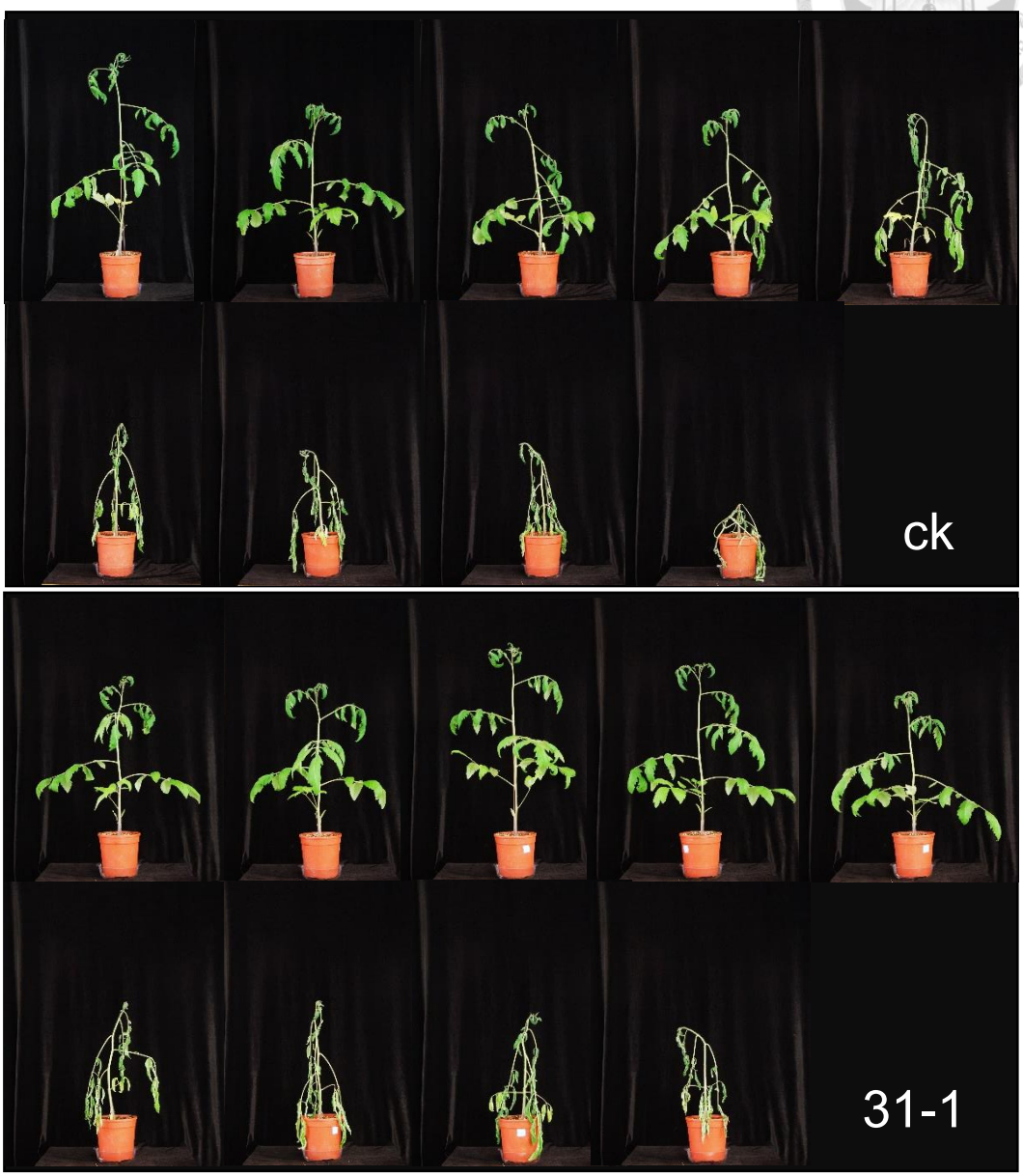


圖八、以番茄盆栽試驗分析 *Bacillus licheniformis* (31-1)防治效果之實驗流程示意圖。

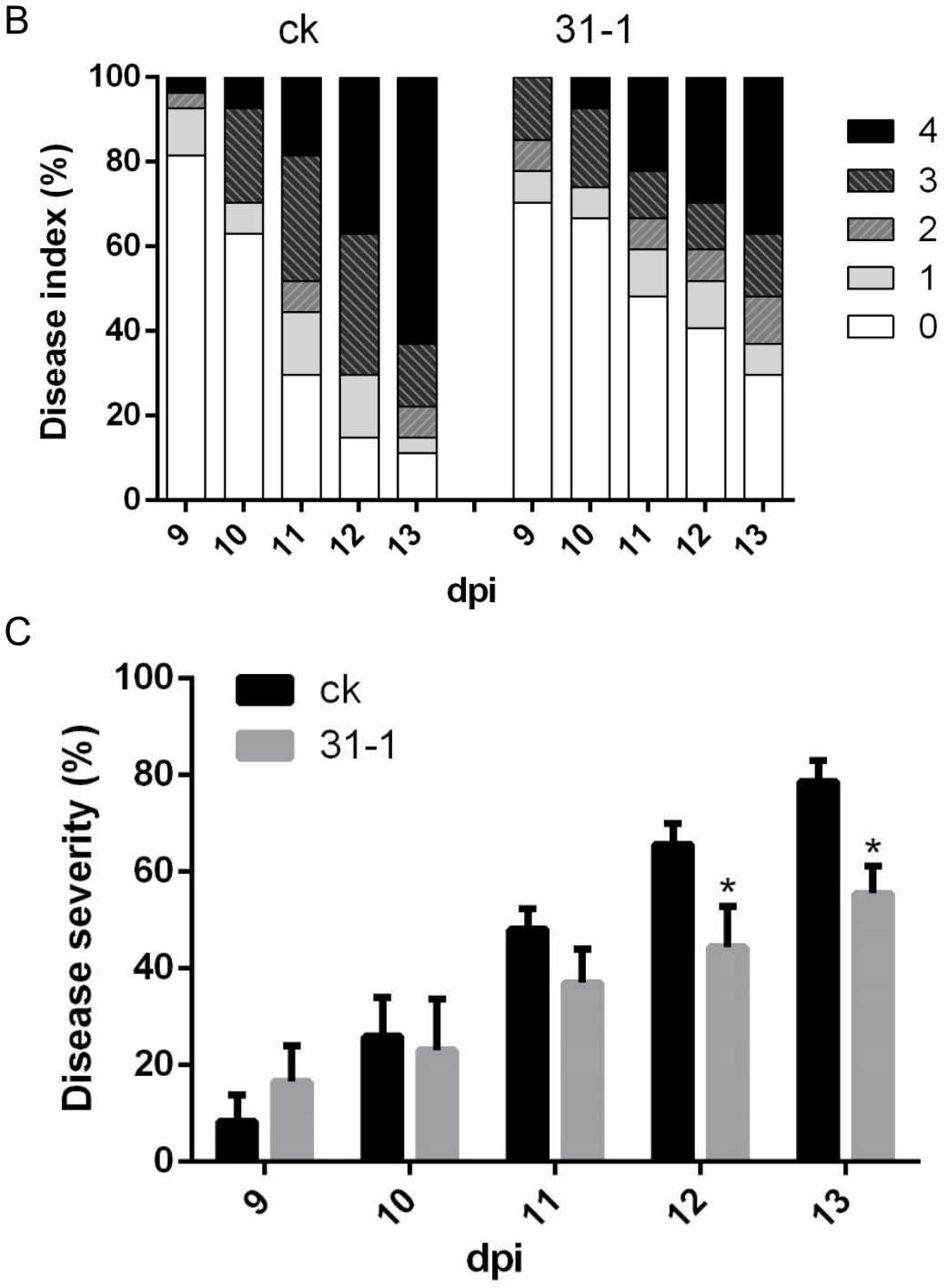
圖示為番茄盆栽試驗各項處理時間點。1^{th} – 4^{th} 四次處理為 *B. licheniformis* (31-1) 澆灌或噴灑，或是「救你一命」澆灌。土壤微生物澆灌處理的試驗，只處理一次且不需移盆。

doi:10.6342/NTU201803570

A

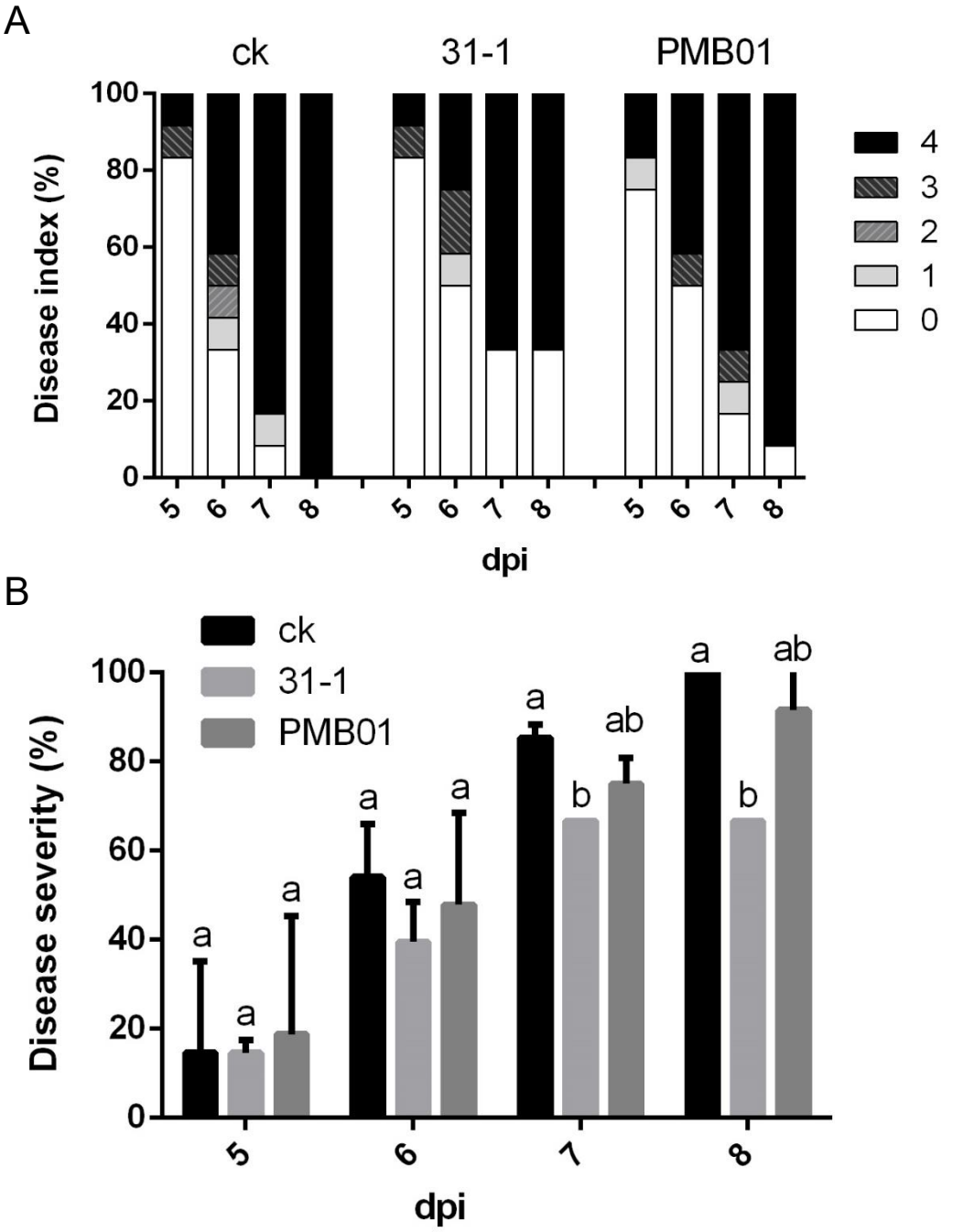


doi:10.6342/NTU201803570



圖九、番茄盆栽澆灌 *Bacillus licheniformis* (31-1) 能降低青枯病發生程度。 二週大番茄植株以 *B. licheniformis* (31-1) 連續澆灌處理三次，每週一次，第四週移盆後再澆灌一次。第五週接種青枯病後，逐日記錄病害指數 (disease index)。**A.** 接種青枯病菌後，在第十三天拍照記錄。**B.** 番茄植株發病逐日病害指數。**C.** 以 Student's *t* test 分析罹病嚴重度 (disease severity) 差異性。* 為顯著差異 ($P < 0.01$)。每組處理九株植株，誤差線為三次試驗重複之平均值標準差。

doi:10.6342/NTU201803570



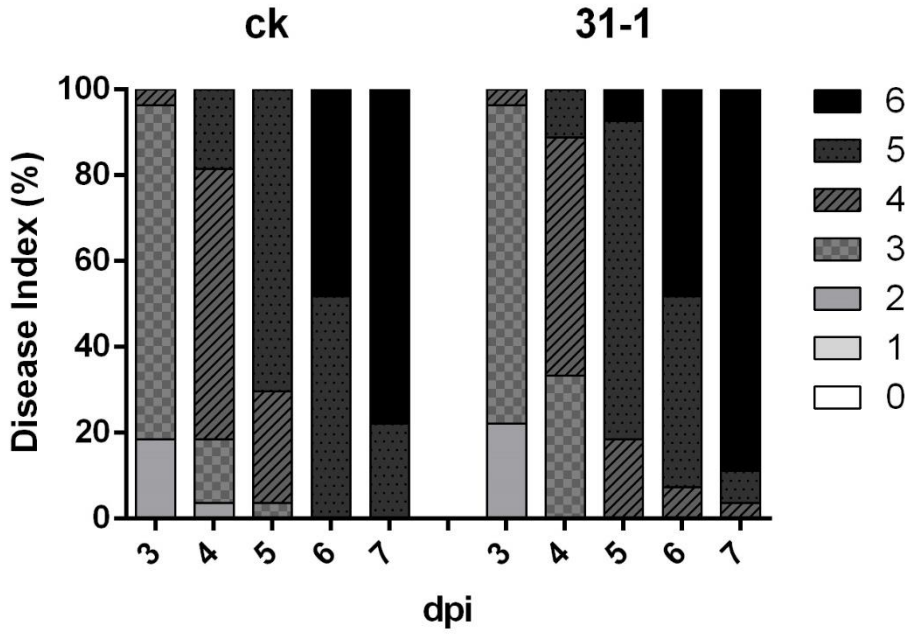
圖十、以黃豆粉-玉米澱粉培養液培養之 *Bacillus licheniformis* (31-1) 澆灌番茄盆栽能降低青枯病發生程度。

二週大番茄植株以黃豆粉-玉米澱粉培養液培養 *B. licheniformis* (31-1) 連續澆灌處理三次，每週一次，第四週移盆後再澆灌一次。第五週接種青枯病後，逐日記錄病害指數 (disease index)；另外以「救你一命」(*B. amyloliquefaciens* PMB01) 比較兩株菌抗病能力。**A.** 番茄植株發病逐日病害指數。**B.** 以最小顯著差異性測驗 (LSD test) 分析罹病嚴重度 (disease severity) 差異性。相同字母代表未達顯著差異 ($P < 0.05$)。每組處理六株植株，誤差線為三次試驗重複之平均值標準差。

doi:10.6342/NTU201803570

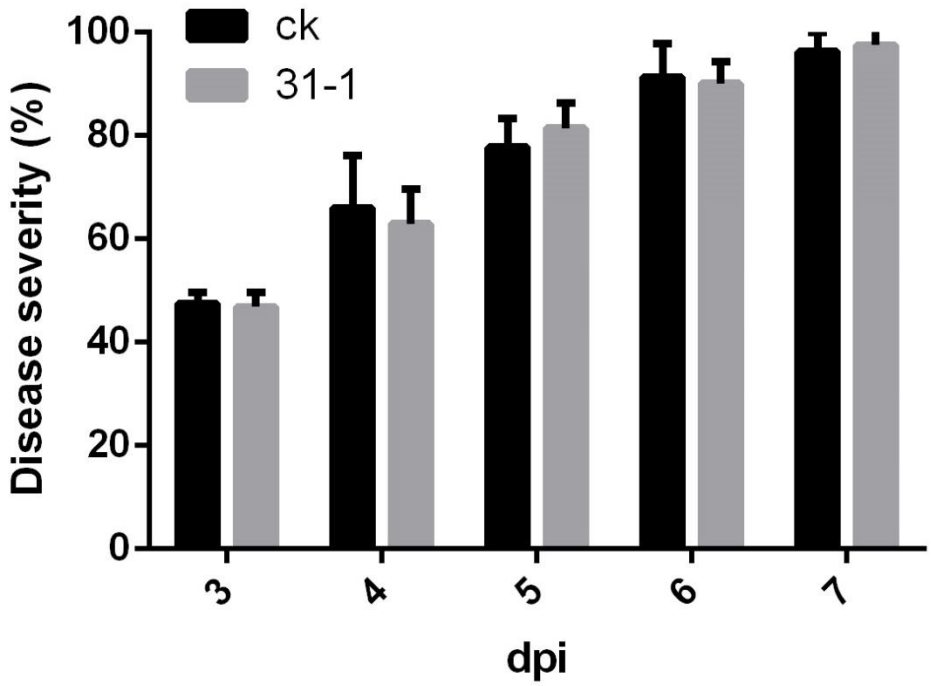
A

B



doi:10.6342/NTU201803570

C

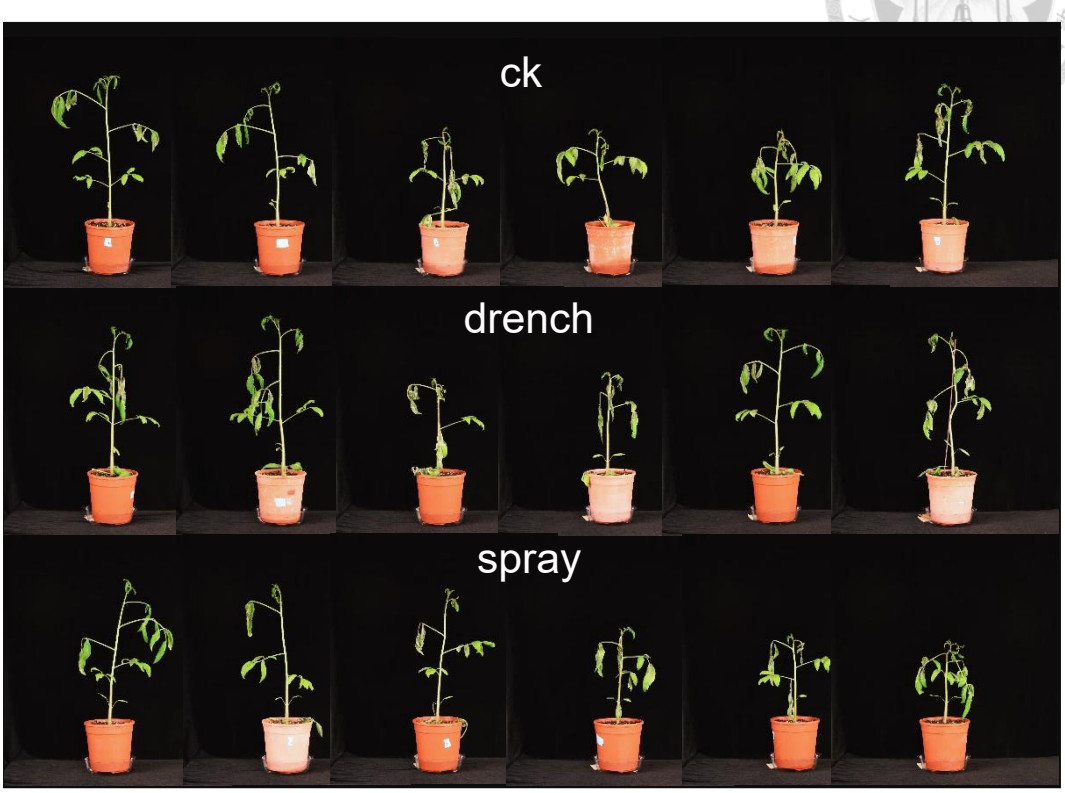


圖十一、番茄盆栽澆灌 *Bacillus licheniformis* (31-1) 無法降低晚疫病發生程度。

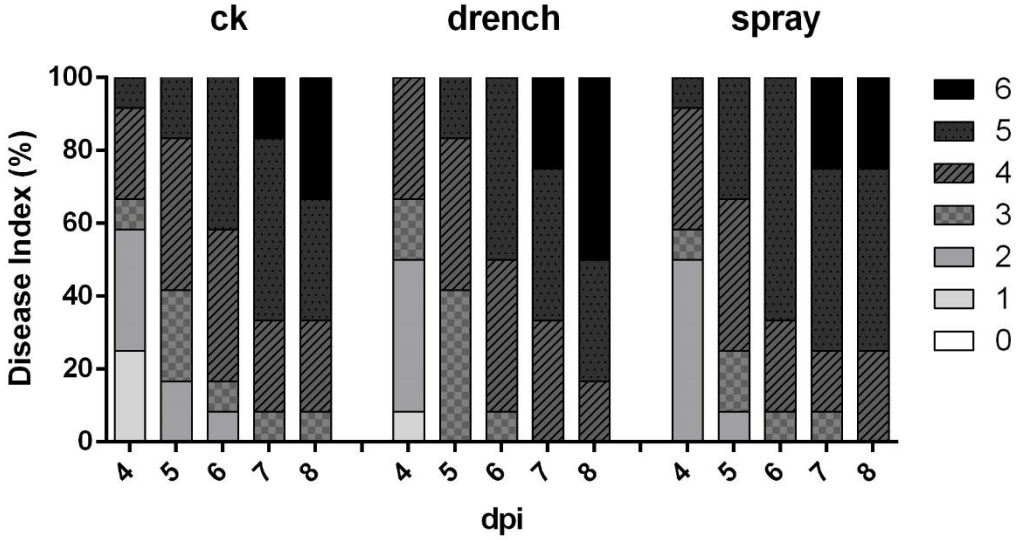
二週大番茄植株以 *B. licheniformis* (31-1) 連續澆灌處理三次，每週一次，第四週移盆後再澆灌一次。第五週接種晚疫病後，逐日記錄病害指數 (disease index)。**A.** 接種晚疫病後，在第七天拍照記錄。**B.** 番茄植株發病逐日病害指數。**C.** 以 Student's *t* test 分析罹病嚴重度 (disease severity) 差異性。每組處理九株植株，誤差線為三次試驗重複之平均值標準差。

doi:10.6342/NTU201803570

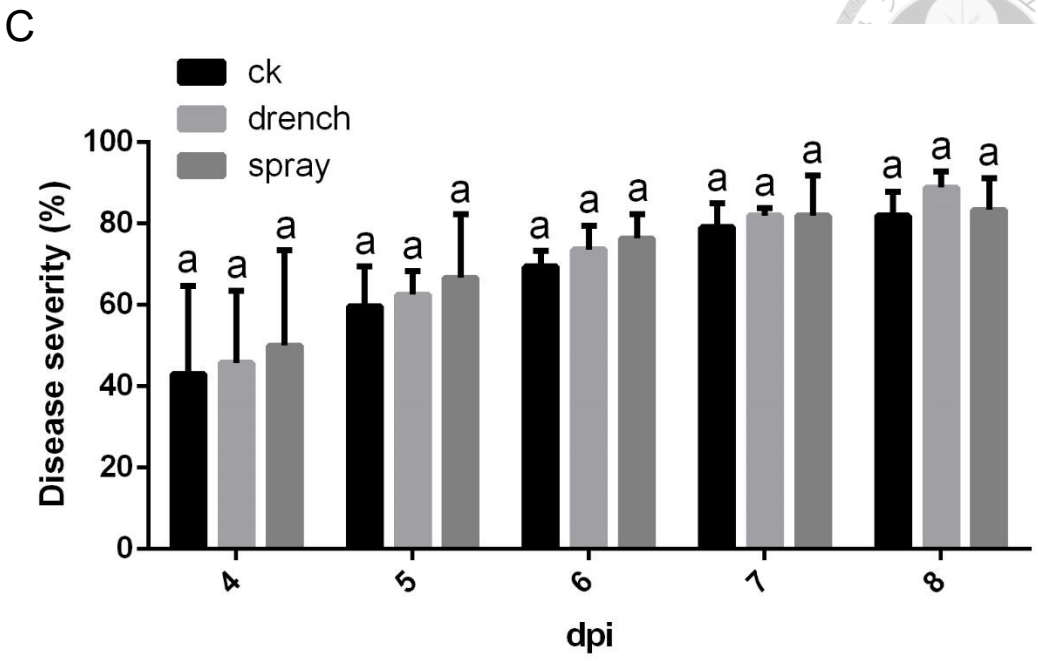
A



B



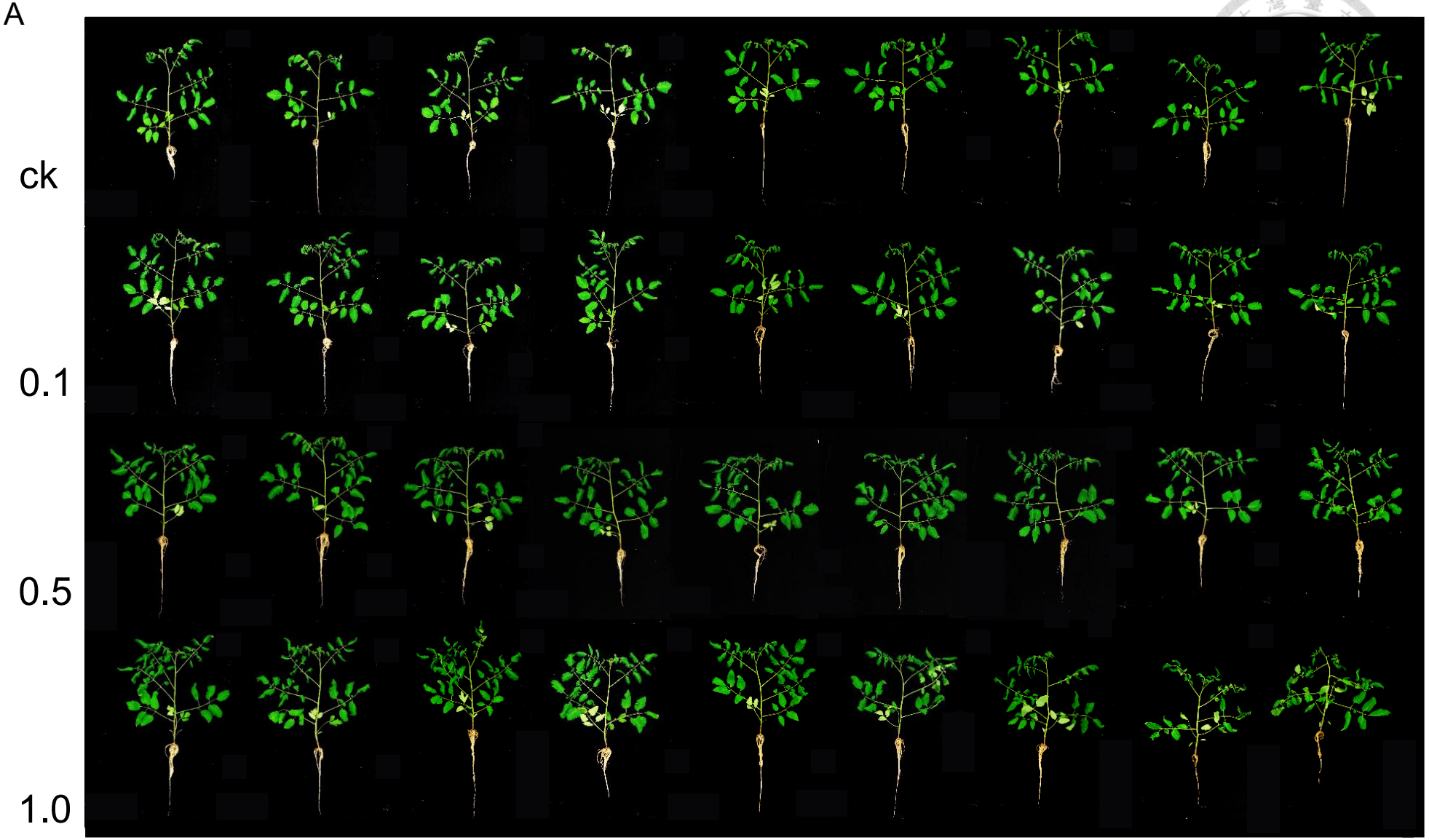
doi:10.6342/NTU201803570



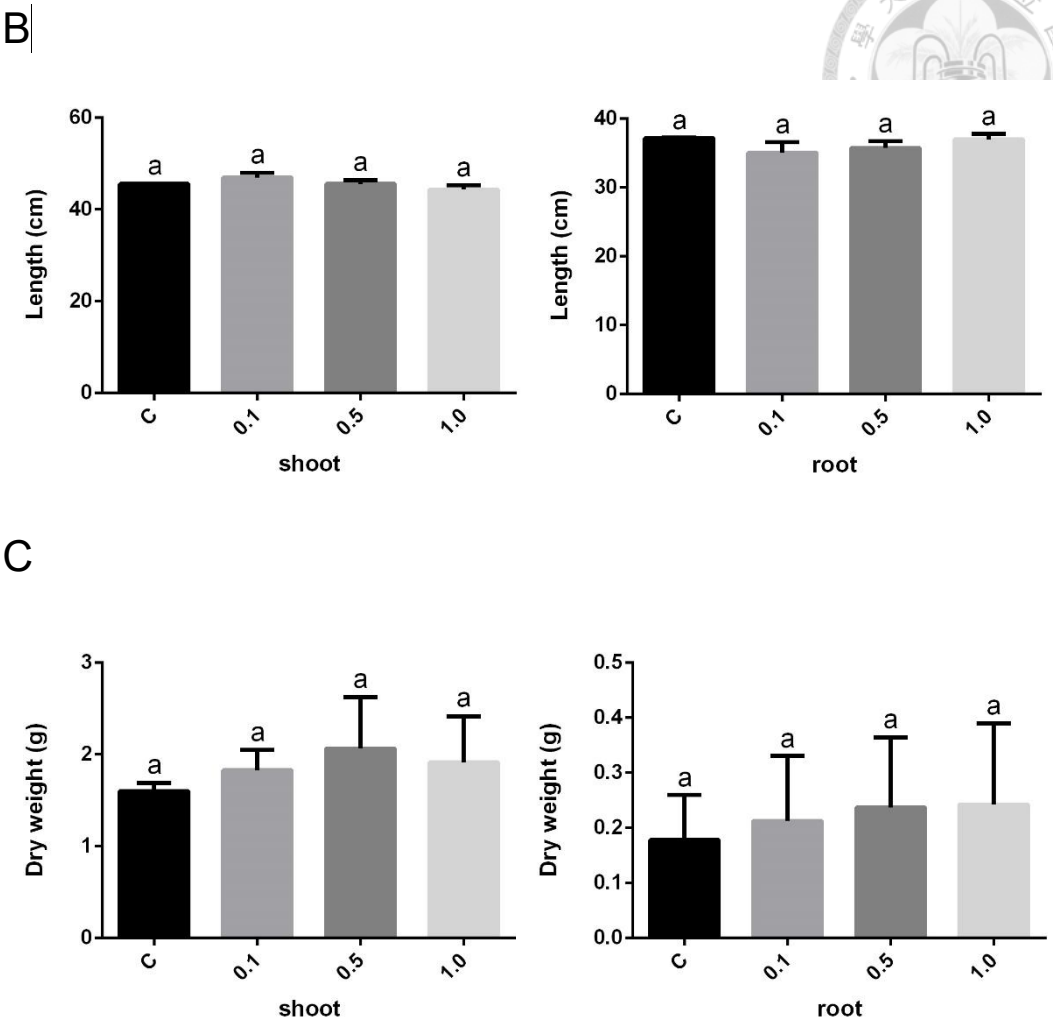
圖十二、番茄盆栽噴灑 *Bacillus licheniformis* (31-1) 無法降低晚疫病發生程度。

二週大番茄植株以 *B. licheniformis* (31-1) 連續噴灑處理三次，每週一次，第四週移盆後再噴灑一次。第五週接種晚疫病後，逐日記錄病害指數 (disease index)。**A.** 接種晚疫病後，在第八天拍照記錄。**B.** 番茄植株發病逐日病害指數。**C.** 以最小顯著差異性測驗 (LSD test) 分析罹病嚴重度 (disease severity) 差異性。相同字母代表未達顯著差異 ($P < 0.05$)。每組處理六株植株，誤差線為三次試驗重複之平均值標準差。

doi:10.6342/NTU201803570



doi:10.6342/NTU201803570

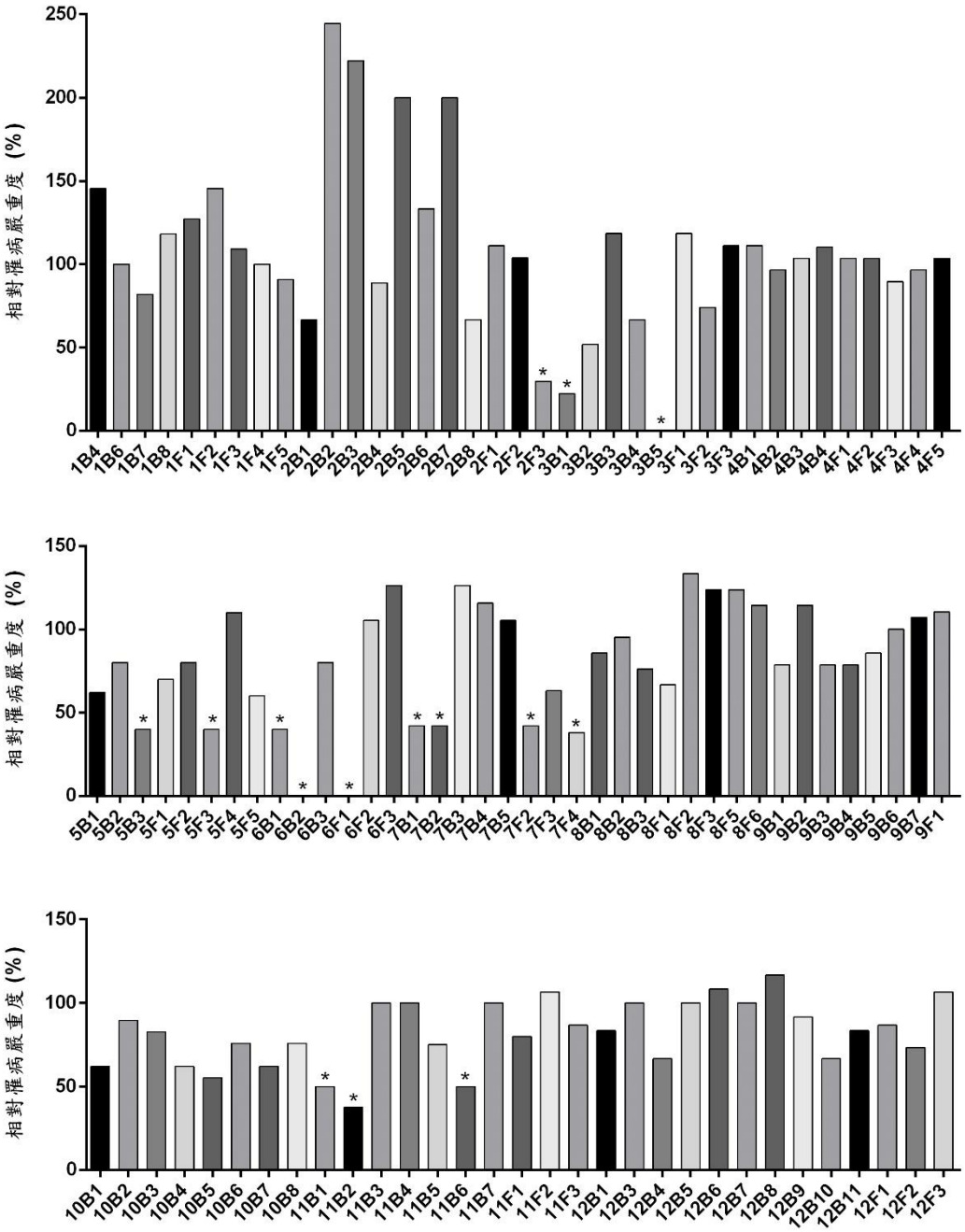


圖十三、澆灌 *Bacillus licheniformis* (31-1) 未能促進番茄生長。

二週大番茄植株以 *B. licheniformis* (31-1) 連續澆灌處理三次，每週一次，第四週移盆後再澆灌一次，六週大時將植株根部洗淨，拍照記錄其地上部、地下部的長度和乾重。**A.** 植株根部土壤洗淨。**B.** 以最小顯著差異性測驗 (LSD test) 分析各處理組地上部和地下部長度的差異性。相同字母代表未達顯著差異 ($P < 0.05$)。誤差線為三次試驗重複之平均值標準差。**C.** 以 LSD 分析各處理組地上部和地下部乾重的差異性。相同字母代表未達顯著差異 ($P < 0.05$)。每組處理九株植株，誤差線為三次試驗重複之平均值標準差。

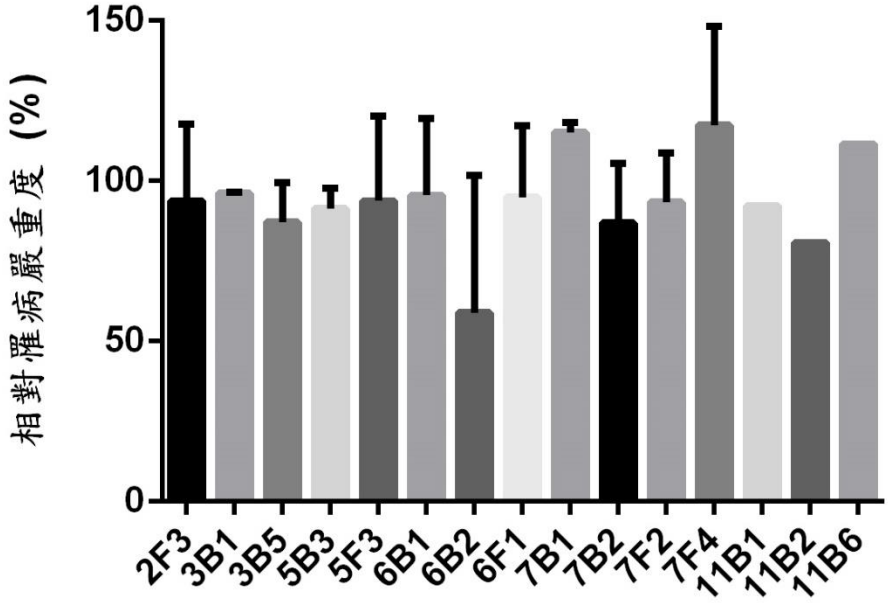
doi:10.6342/NTU201803570

A



doi:10.6342/NTU201803570

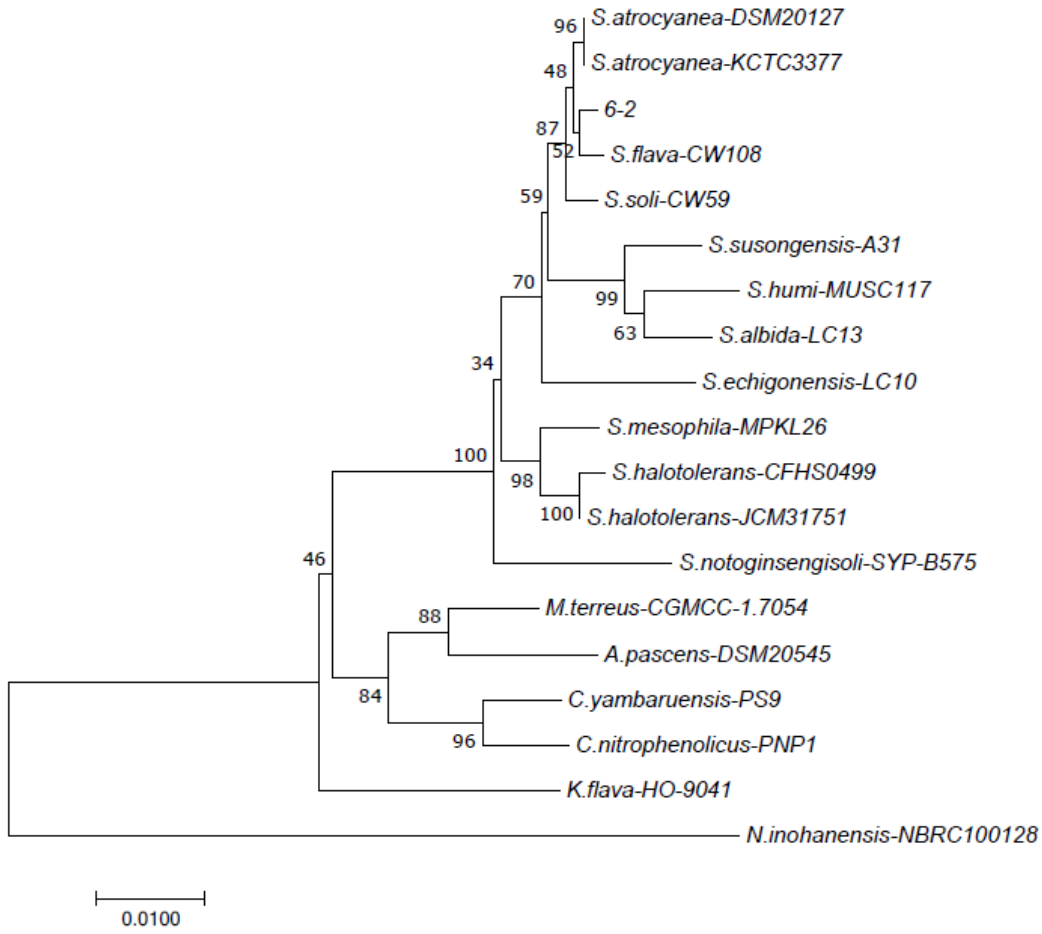
B



圖十四、青枯病抑病菌盆栽試驗。

四週大番茄植株以土壤分離之菌株澆灌處理，第五周澆灌接種青枯病。以蔬菜汁澆灌作為對照組。相對罹病嚴重度是將各菌株處理組的罹病嚴重度以對照組罹病嚴重度作為基準，對比得到。**A.** 初篩為每處理組四株植物。*為相對發病率低於 50% 的菌株。**B.** 十五株菌株進行複篩，每組處理為八株植物。誤差線為兩次試驗重複之平均值標準差。

doi:10.6342/NTU201803570



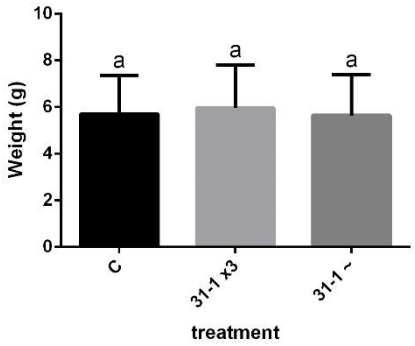
圖十五、*Sinomonas* spp. 之 16S rDNA 親緣關係分析。

以 Clustal X 進行各菌株的 16S rDNA 多序列並列分析，再以 MEGA 7 軟體用 Neighbor-joining 進行親源分析，bootstrap 設定為 1000 次。以 *Nocardia inohanensis* (NBRC 100128) 作為外群 (Outgoing)。

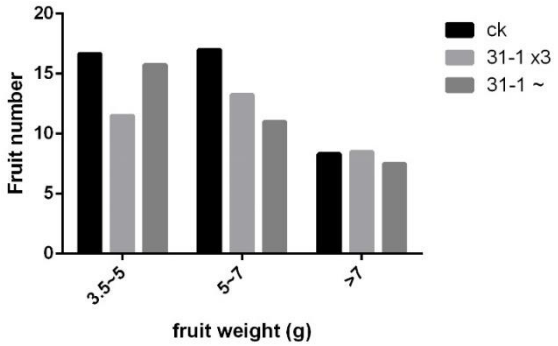
doi:10.6342/NTU201803570

A

B



C



Supplementary figure 1. 番茄產果促進試驗。

A. 番茄植株種植於中非頂樓之布置情形，總計 11 株，種植期間約五個月。**B.** 以 LSD 統計分析各處理組之總果實平均重量差異性。各平均值上示以相同字母代表 5% 水準下經 LSD 測驗未達顯著差異，誤差線為組內果實重量平均值標準差。**C.** 將各處理組果實產量製成圖表，對照組的總產量為三組最高。

doi:10.6342/NTU201803570

附錄一、各實驗所使用之培養基配方：

1. 裸麥培養基：

每 1 L 培養基含裸麥種子 60 g, sucrose 20 g, $CaCO_3$ 1 g, agar 15 g。配製時，先將裸麥種子以 0.25% 漂白水漂洗消毒 4 分鐘，再以一次水沖洗乾淨後，將種子放在燒杯中加適量一次水，室溫靜置 36 小時，以果汁機 (Philips HL 3252) 最大轉速打碎約 75 秒。再將打碎的裸麥液以 55 °C 煮 3 小時。而後以 4 層紗布過濾兩次，加入 sucrose, $CaCO_3$ 和 agar (FocusBio) 後滅菌。若要進行影像質譜，則裸麥培養基不加入 $CaCO_3$，避免影響分析。

2. 523 培養基：

每 1 L 培養基含 yeast extract 4 g, casein hydrolysate 8 g, sucrose 10 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g, K_2HPO_4 2 g, agar 15 g。

4. CPG 及 TTC 培養基：

每 1 L CPG 培養基含 casein hydrolysate 1 g, peptone 10 g, glucose 5 g, agar 17 g。滅菌後，待降溫至 55 °C 加入 5 mL 1% 的 2,3,5-tripheny tetrazolium chloride (TTC)，為青枯病菌鑑別性 TTC 培養基。

5. LB 培養液及 LA 培養基：

每 1 L 培養液加入 25 g LB broth 粉末 (FocusBio)。 LA 培養基配製為 LB 培養液再加入 15g / L agar。

6. V8 培養基 (5% & 10%)：

每 1 L 含 5% 或 10% V8 vegetable juice (Campell's), $CaCO_3$ 0.2 g, 15.0 g select agar (Invitrogen^{TM})。

7. 土壤拮抗菌篩選專一性培養基：

(1) 土壤萃取液：每 1 L 一次水加土樣 100 g，$CaCO_3$ 0.2 g，121 °C 滅菌 20 分鐘，以八層紗布過濾後，1,500 g 離心 5 分鐘，取上清液，放 4 °C 保存備用。

doi:10.6342/NTU201803570

(2) 真菌篩選性培養基：每 1 L 含 10% soil extract, 0.02% urea, 0.1% tergitol NP-7, 1.5% agar。高溫高壓滅菌後待其降溫至 45 °C，加 50 ppm chloramphenicol 和 50 ppm streptomycin sulfate。

(3) 細菌篩選性培養基：每 1 L 含 10% soil extract, 0.02% urea, 1.5% agar。高溫高壓滅菌後待其降溫至 70 °C，加 50 ppm PCNB，降至 45 °C 後加 50 ppm nystatin。

doi:10.6342/NTU201803570