

液化澱粉芽孢桿菌Nana 11在蝴蝶蘭黃葉病的防治潛力評估

蘇俊峯^{1,3}、簡蘭懿¹、林宗俊¹、陳純葳¹、謝奉家^{2,*}

¹ 行政院農業委員會農業試驗所植物病理組

² 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所生物藥劑組

³ 共同通訊作者: forte9135101@tari.gov.tw

* 聯絡作者, E-mail: hsiehf@tactri.gov.tw

摘要

蘇俊峯、簡蘭懿、林宗俊、陳純葳、謝奉家。2022。液化澱粉芽孢桿菌Nana11在蝴蝶蘭黃葉病的防治潛力評估。植物醫學64(2): 63-70。

蝴蝶蘭植株發生葉片黃化、落葉，在葉鞘或裸露的根部會出現黑腐，有時也會有成堆橙紅色子囊殼產生，此為*Fusarium solani* (teleomorph *Haematonectria haematococca*) 所引起的蝴蝶蘭黃葉病，本研究主要在評估液化澱粉芽孢桿菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) Nana 11水懸劑在溫室防治蝴蝶蘭黃葉病的可行性。在對峙培養測試中，Nana 11的 200倍稀釋液對黃葉病菌絲生長的干擾抑制率 (the interference and inhibition rate, IIR) 為14%，表示Nana 11 200倍水懸劑可以干擾黃葉病菌菌絲的生長。在高接種源濃度 (3.9×10^5 spores/mL) 的黃葉病菌接種中，接種蝴蝶蘭品種小斑馬 (*Phalaenopsis Taida Little Zebra*) 後第23天，相較於水對照處理組100%的發病度，連續澆灌4次Nana 11水懸劑400倍稀釋液可使供試植株發病度顯著得降低至84%。在低接種源濃度 (1.3×10^2 spores/mL) 的黃葉病菌接種中，接種蝴蝶蘭品種綠精靈 (*Phal. Green Pixie "Ever Green"*) 後第21天，相較於水對照處理組的36%發病度，連續澆灌4次Nana 11水懸劑400倍稀釋液可使供試植株發病度顯著得降低至18%。在採用病害綜合防治管理策略的蝴蝶蘭園中，選用供試蝴蝶蘭A4268 (*Doritaenopsis Mount Lip "Chou"*) 2.5吋盆苗株，經每星期、連續7次施用Nana 11水懸劑 400倍稀釋液處理，第77天的發病度為3%，與水對照組處理的16%發病度具有顯著差異。綜合以上結果顯示，*B. amyloliquefaciens* Nana 11 的400倍水懸劑可用於預防性施藥，每星期施用1次，連續施用4次，可減少蝴蝶蘭黃葉病的發生。

關鍵詞：蝴蝶蘭黃葉病、液化澱粉芽孢桿菌、干擾抑制率、生物防治、綜合防治

緒言

蝴蝶蘭植株發生葉片黃化、落葉，葉鞘或靠近葉鞘的裸露根部出現黑腐病徵，有時在罹病葉鞘與根部黑腐部位出現成堆的橙紅色子囊殼，此為*Fusarium solani* (有性世代為*Haematonectria haematococca*) 所引起的蝴蝶蘭黃葉病 (*Phalaenopsis yellowing leaf*)，田間發病嚴重時發病率可達59% (Su *et al.*, 2012)。目前田間常用整合性病害管理模式，使得蝴蝶蘭黃葉病的平均發病度儘量被控制在10% 以下 (Su *et al.*, 2018)，但為了增加綜合防治病害管理方法的可選擇性，尋找以生物防治用菌株的病害管理方式是可行策略之一。

好氧型可產生内生孢子的細菌 (aerobic endospore-forming bacteria, AEFB)，如*Bacillus* spp.，普遍存在於農業栽培環境中。這類細菌常見有許多助於存活的生理特性，包括具有多層細胞壁構造、可產生對抗環境逆境的內生孢子 (endospore)、可分泌抗生物質、肽訊息傳替分子與胞外分解酵素等。除此之外，這類細菌對營養源有極佳的利用性，以及具泳動性 (motility)，使其可以在農業栽培環境中達到最佳的生理生化成長 (McSpadden Gardener, 2004)。在病害防治上具有潛力的分離株，多屬於*Bacillus* spp. 菌株，如*B. amyloliquefaciens*, *B. coagulans*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*與*B. vallismortis* 等 (Singh *et al.*, 2016; Tan *et al.*, 2013)。而*Bacillus* spp. 分離株具有多項優點，包括耐乾燥、在高溫下存活能力強與可以促進植物生長等 (Nihorimbere *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012)，這些優點則符合蝴蝶蘭在臺灣的栽培環境條件，因此*Bacillus* spp. 分離株可考慮作為蝴蝶蘭黃葉病防治用的有益微生物菌株。

Bacillus amyloliquefaciens Nana 11 1×10^9 CFU/mL水懸劑在先前的溫室與田間初步測試結果中，對蝴蝶蘭黃葉病的防治上具有可減少病害發生效果。但是目前蝴蝶蘭溫室多採用綜合病害管理策略，又在符合「臺灣輸美附帶栽培介質植物工作計畫」的規範，田間蝴蝶蘭黃葉病的平均發病度被控制在10% 以

下 (Su et al., 2018)。若要在田間評估 Nana 11 防治蝴蝶蘭黃葉病的防治效果，結果往往是無顯著差異。因此，本研究嘗試以人工接種的方式，在溫室利用高接種源與低接種源的接種方式，評估液化澱粉芽孢桿菌 Nana11 於蝴蝶蘭黃葉病防治上的可行性與施用時機。

材料與方法

供試微生物菌液的準備

本研究使用的微生物製劑已完成可商品化之配方配製，包括有液化澱粉芽孢桿菌 Nana11 (*Bacillus amyloliquefaciens* Nana11) 1×10^9 CFU/mL 水懸劑 (由藥物毒物試驗所生物藥劑組提供)、蕈狀芽孢桿菌 BM (*B. mycoides* BM) 1×10^9 CFU/g 可濕性粉劑 (由農業試驗所植物病理組提供)，與液化澱粉芽孢桿菌 P2-2 (*B. amyloliquefaciens* P2-2) 1×10^8 CFU/mL 水懸劑 (由農業試驗所植物病理組提供)。試驗用藥劑均保存於 4°C 冰箱中，試驗前 3 小時自冰箱取供試藥劑量，回溫。利用無菌水調整稀釋濃度後，裝入 5 L 塑膠瓶中攜至試驗溫室或田區施用。

供試蝴蝶蘭黃葉病菌株的準備

將蝴蝶蘭黃葉病菌供試菌株 TJP-2178-10 (*Fusarium solani* (有性世代為 *Haematonectria haematococca*)) 培養於馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar, PDA, Difco) 斜面試管中，於室溫下培養。培養兩星期之後，於該些試管培養基中分別加入 9 mL 的無菌水，利用移植環輕刮該些斜面培養基表面，使供試菌株之孢子懸浮。所得之懸浮液經兩層紗布過濾，以去除菌絲片段，並經震盪混合均勻，於光學顯微鏡 (CH40RF100, Olympus, Japan) 下，利用血球計數器 (Marienfeld, Germany) 計算單位體積的孢子數，並計算孢子懸浮液的濃度，再利用無菌水調整孢子懸浮液濃度至 3.9×10^5 spores/mL。

供試蝴蝶蘭的準備

供試蝴蝶蘭植株都購置彰化縣台大蘭園之健康蝴蝶蘭 2.5 吋盆苗，供試品種包括小斑馬 (*Phalaenopsis Taida Little Zebra*)、綠精靈 (*Phal. Green Pixie "Ever Green"*)、A4268 (*Doritaenopsis Mount Lip "Chou"*)、PS3269 (*Phal. Long Strong Venus "PS3269"*)、A8038 (*Phal. Taida Blush "Taida"*)、A2225 (*Dtps. Queen Beer "Mantefon"*) 與 A7193 (*Phal. Taida King's Caroline "Taida Little Zebra"*) 等。

微生物製劑對蝴蝶蘭黃葉病菌菌絲生長的干擾抑制率

將培養於 PDA 培養基的 TJP-2178-10 供試菌株，以 5 mm 打孔器取出大小一致的菌絲塊。將該菌絲塊接種於新鮮配製的 PDA 平板培養基左側。取供試微生物製劑懸浮液，分別稀釋

P2-2 100 倍、Nana11 200 倍與 BM 200 倍的稀釋液。L 型玻璃棒以酒精燈消毒後，沾取 P2-2 100X、Nana11 200X 與 BM 200X 稀釋液塗抹在已接種 TJP-2178-10 供試菌株菌絲塊的 PDA 平板培養基右半側 1/2 處，每處理 5 重複，並以無塗抹微生物製劑稀釋液處理當作對照組。室溫 (25-27°C) 下培養 8 天，量取與計算各處理的 TJP-2178-10 菌絲生長速度。再比較對照組菌絲生長長度，以 PDA 平板培養基中間 1/2 處為基準點，菌絲生長尖端測量點，測量點靠左側表示微生物製劑稀釋液對病原菌菌絲生長有抑制作用，測量點靠右側表示無抑制作用。再經與對照組菌絲生長速度相比，若菌絲生長速度大於對照組，則表示該處理有促進菌絲生長的效果。若菌絲生長速度小於對照組，則表示該處理有干擾菌絲生長的效果。據此，定義微生物製劑對病原菌菌絲生長的干擾抑制率 (the interference and inhibition rate, IIR)：

$$\text{干擾抑制率(\%)} = \frac{(\text{對照組菌絲生長速度} - \text{處理組菌絲生長速度})}{\text{對照組菌絲生長速度}} \times 100(\%)$$

當 IIR 大於 50%，表示處理組對菌絲生長有抑制作用，IIR 值越大，抑制菌絲生長作用越明顯。當 IIR 介於 0-50%，表示處理組對菌絲生長有干擾作用，IIR 值越大，干擾菌絲生長作用越明顯，但是對菌絲生長無抑制作用。當 IIR 小於 0，表示處理組對菌絲生長有促進作用，IIR 負值越大，促進菌絲生長作用越明顯。

黃葉病菌高接種源濃度 (3.9×10^5 spores/mL) 對液化澱粉芽孢桿菌 Nana 11 防治黃葉病的效果評估

取蝴蝶蘭小斑馬品種 2.5 吋盆苗共 128 棵為供試植株，取 *Bacillus amyloliquefaciens* Nana11 水懸劑稀釋 200 倍、400 倍與 800 倍為處理組，並以無菌水當對照組，每處理有 8 棵供試植株。試驗採逢機完全區集設計 (RCBD)，共有 4 小區。接種蝴蝶蘭黃葉病菌株 TJP-2178-10 前三天，先採行一次預防性處理，於每棵供試植株葉鞘部位澆灌 30 mL 各式供試 Nana11 水懸劑稀釋液。三天後，取供試植株，於葉鞘部位利用大頭針製造 7 個人工傷口。吸取 0.2 mL 的 TJP-2178-10 供試孢子懸浮液 (3.9×10^5 spores/mL)，緩緩滴於傷口上，再以透氣膠帶固定傷口，即完成孢子懸浮液接種手續，以無菌水為對照組。接種之後，隨即套袋保濕。而後，每星期於每棵供試植株葉鞘部位，再於介質澆灌各式供試 Nana11 水懸劑稀釋液 30 mL 一次，連續 3 次，共計有 4 次澆灌 Nana11 水懸劑稀釋液。

黃葉病菌低接種源濃度 (1.3×10^2 spores/mL) 對液化澱粉芽孢桿菌 Nana 11 防治黃葉病的效果評估

取蝴蝶蘭綠精靈品種 2.5 吋盆苗共 160 棵為供試植株，取 *Bacillus amyloliquefaciens* Nana11 水懸劑稀釋 200 倍、400 倍與 800 倍為處理組，並以無菌水當對照組，每處理有 10 棵供試植株。試驗採逢機完全區集設計 (RCBD)，共有 4 小區。試驗於接種黃葉病菌株 TJP-2178-10 前，採兩次預防性處理，於每棵植株

葉鞘部位澆灌30 mL各式供試Nana11水懸劑稀釋液，每星期一次，連續兩星期。第三星期時，取供試蝴蝶蘭植株，於葉鞘部位利用大頭針製造7個人工傷口，吸取0.2 mL的TJP-2178-10供試孢子懸浮液 (1.3×10^2 spores/mL)，緩緩滴於傷口上，再以透氣膠帶固定傷口，即完成孢子懸浮液接種手續，以無菌水為對照組。接種之後，隨即套袋保濕。而後，每星期於每棵供試植株葉鞘部位，再行澆灌各式Nana11水懸劑稀釋液30 mL一次，連續7次，共計有9次澆灌Nana11水懸劑稀釋液。

微生物製劑在田間防治蝴蝶蘭黃葉病的效果評估

於台大蘭園彰化溪州場區挑選5個2.5吋盆苗供試蝴蝶蘭植株，包括A4268、PS3269、A8038、A2225與A7193，每品種各有144棵供試植株。取*Bacillus amyloliquefaciens* Nana11水懸劑稀釋200倍、400倍與800倍，取*B. mycooides* BM可濕性粉劑稀釋200倍、400倍與800倍，取*B. amyloliquefaciens* P2-2水懸劑稀釋100倍、300倍與500倍等為試驗防治用藥劑，並以無菌水當對照組，每處理有9棵供試植株。試驗採逢機完全區集設計 (Randomized Complete Block Design, RCBD)，共有4小區。本次試驗採田間自然發病，試驗開始後每星期於每棵供試植株葉鞘部位，澆灌各式微生物製劑稀釋液30 mL一次，連續7次。

病害調查與統計分析

供試植株在試驗期間，依照蘭園管理方式進行澆水與施肥，而試驗期間除試驗用藥劑外，無施用其他藥劑。於每次澆灌各式微生物菌液藥劑前，供試植株調查發病度 (disease severity)，將供試植株依發生黃葉病的嚴重程度區分為0-4級：0級表葉鞘基部無病徵；1級表葉鞘基部黑褐色病斑未擴展；2級表葉片黃化未超過1/2；3級表葉片黃化超過1/2；4級表葉片掉落。所得資料並依下列公式換算發病度 (%)：

$$\text{發病度}(\%) = \frac{(\text{發病級數} \times \text{罹病株數})}{(\text{總調查株數} \times 4)} \times 100(\%)$$

試驗所得發病度資料之差異顯著性測驗，係利用IBM SPSS Statistics (version 19) 統計分析軟體進行變方分析 (analysis of variance, ANOVA) 及最小顯著差異性 (Fisher's protected least significant different test, LSD test, $p = 0.05$) 測驗。

結果

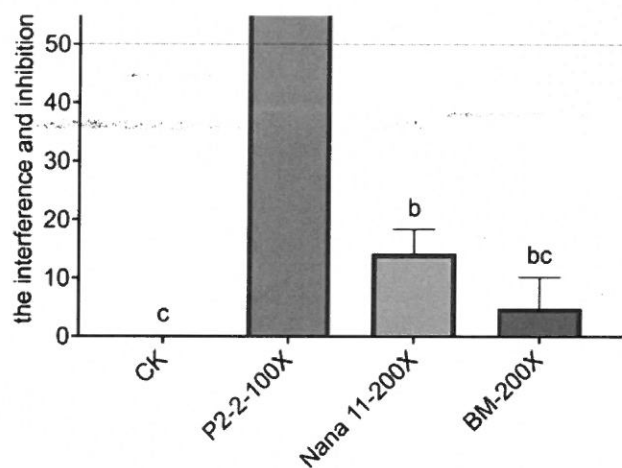
微生物製劑對蝴蝶蘭黃葉病菌菌絲生長的干擾抑制率

將培養於PDA培養基的TJP-2178-10供試菌株，與供試微生物製劑懸浮液P2-2 100倍、Nana 11 200倍與BM 200倍的稀釋液對峙培養。室溫 (25-27°C) 下培養8天，對照組處理菌絲生長已長滿PDA培養基，在PDA平板培養基右側塗佈培養P2-2 100倍稀釋處理，對供試TJP-2178-10菌株明顯出現有抑制圈。塗佈

培養Nana 11 200倍與BM 200倍稀釋液處理，對供試TJP-2178-10菌株沒有抑制圈產生，但是會干擾TJP-2178-10的菌絲生長降低生長速度。經量測各處理的菌絲生長長度與菌絲生長速度之後，換算微生物製劑對病原菌菌絲生長的干擾抑制率 (the interference and inhibition rate, IIR)。結果P2-2 100倍稀釋液處理的IIR值為57%。Nana 11 200倍稀釋液處理的IIR值為14%，BM 200倍稀釋液處理的IIR值為5%。所得資料經LSD統計分析，結果P2-2 100倍與Nana 11 200倍稀釋液處理的IIR值，與對照組和BM 200倍稀釋液處理者，具有5%的顯著差異水準 (圖一)。

蝴蝶蘭黃葉病菌高接種源濃度 (3.9×10^5 spores/mL) 對液化澱粉芽孢桿菌Nana 11防治的效果評估

蝴蝶蘭供試小斑馬植株，於試驗開始時均為健康未發生蝴蝶蘭黃葉病。一次預防性處理各式供試*Bacillus amyloliquefaciens* Nana11菌液濃度後，接種 3.9×10^5 spores/mL的TJP-2178-10孢子懸浮液。接種後第7天，對照組 (澆灌清水) 與施用Nana 11 200X、400X與800X稀釋液處理的供試植株發病度分別為44%、39%、43%與44%，所得資料經LSD統計分析，對照組的發病度與其他處理組間不具有5%的顯著差異水準 (表一)。接種後第14天，對照組與施用Nana 11 200X、400X與800X稀釋液處理的供試植株發病度分別為77%、50%、57%與61%，所得資料經LSD統計分析，對照組的發病度與其他處理



圖一、微生物製劑對蝴蝶蘭黃葉病菌菌絲生長的干擾抑制率。

Fig. 1. The interference and inhibition rate (IIR) of microbial agent diluent on mycelial growth of *Fusarium solani*. When IIR was more than 50%, there was inhibition on mycelial growth; when IIR was between 0 and 50%, there was interference on mycelial growth but wasn't inhibition; when IIR was less than 0, there was promotion on mycelial growth. The same letters in the figure were not significantly different at $p > 0.05$ according to LSD test (Fisher's protected least significant different test).

表一、施用液化澱粉芽孢桿菌Nana 11對接種高接種源濃度 (3.9×10^5 spores/mL)後蝴蝶蘭黃葉病發病度的影響

TABLE 1. Effect of *Bacillus amyloliquefaciens* Nana 11 on disease severity after inoculation by high inoculum density of *Fusarium solani* (3.9×10^5 spores/mL)

Treatment ¹	Disease severity (%) ² of days after inoculation		
	7	14	23
CK (water)	44 a ³	77 a	100 a
Nana11-200X	39 a	50 b	87 b
Nana11-400X	43 a	57 b	84 b
Nana11-800X	44 a	61 b	87

¹ "Nana11-200X" meant "a strain of *Bacillus amyloliquefaciens* Nana 11 (1×10^9 CFU/mL) with 200 fold dilution". Each treatment had 32 tested plants (*Phalaenopsis Taida Little Zebra*). Treatments of Nana11 dilutions were conducted one time before inoculation of *Fusarium solani* (3.9×10^5 spores/mL). And then, the treatments of Nana11 dilutions were conducted once a week for 3 times after inoculation.

² The disease severities were assayed on a scale of 0-4: 0= healthy; 1= litter black rot on inoculated tissue; 2= less than 1/2 leaf yellowing; 3= more than 1/2 leaf yellowing; 4= leaf defoliation.

³ Values followed by the same letter in the same column are not significantly different at $p > 0.05$ according to LSD test (Fisher's protected least significant different test).

組間具有5%的顯著差異水準。接種後第23天，對照組與施用Nana 11 200X、400X與800X稀釋液處理的供試植株發病度分別為100%、87%、84%與87%。所得資料經LSD統計分析，對照組的發病度與其他處理組間具有5%的顯著差異水準(表一)。

黃葉病菌低接種源濃度 (1.3×10^2 spores/mL) 對液化澱粉芽孢桿菌Nana 11防治黃葉病的效果評估

蝴蝶蘭供試綠精靈植株，於試驗開始時均為健康未發生蝴蝶蘭黃葉病。先採行兩次預防性處理各式供試*Bacillus amyloliquefaciens* Nana11菌液濃度後，接種 1.3×10^2 spores/mL的TJP-2178-10孢子懸浮液。接種後第7天，對照組(澆灌清水)與施用Nana 11 200X、400X與800X稀釋液處理的供試植株發病度分別為10%、2%、0%與2%，所得資料經LSD統計分析，對照組的發病度與其他處理組間具有5%的顯著差異水準(表二)，對照組主要病徵出現下位葉黃化與葉鞘部位黑化。接種後第21天，對照組與施用Nana 11 200X、400X與800X稀釋液處理的供試植株發病度分別為36%、22%、18%與20%，所得資料經LSD統計分析，對照組的發病度與其他處理組間具有5%的顯著差異水準。接種後第32天，對照組與施用Nana 11 200X、400X與800X稀釋液處理的供試植株發病度分別為48%、40%、36%與28%，所得資料經LSD統計分析，對照組的發病度與其他處理組間不具有5%的顯著差異水準。接種後第49天，對照組與施用Nana 11 200X、400X與800X稀釋液處理的供試植株發病度分別為52%、46%、48%與36%，所得資料經LSD統計分析，對照組的發病度與其他處理組間不具有5%的顯著差異水準(表

表二、施用液化澱粉芽孢桿菌Nana 11對接種低接種源濃度 (1.3×10^2 spores/mL)後蝴蝶蘭黃葉病發病度的影響

TABLE 2. Effect of *Bacillus amyloliquefaciens* Nana 11 on disease severity after inoculation by less inoculum density of *Fusarium solani* (1.3×10^2 spores/mL)

Treatment ¹	Disease severity (%) ² of days after inoculation			
	7	21	32	49
CK (water)	10 a ³	36 a	48 a	52 a
Nana11-200X	2 b	22 b	40 a	46 a
Nana11-400X	0 b	18 b	36 a	48 a
Nana11-800X	2 b	20 b	28 a	36 a

¹ "Nana11-200X" meant "a strain of *Bacillus amyloliquefaciens* Nana 11 (1×10^9 CFU/mL) with 200 fold dilution". Each treatment had 40 tested plants (*Phalaenopsis Green Pixie* "Ever Green"). Treatments of Nana11 dilutions were conducted two times before inoculation of *Fusarium solani* (1.3×10^2 spores/mL). And then, the treatments of Nana11 dilutions were conducted once a week for 7 times after inoculation.

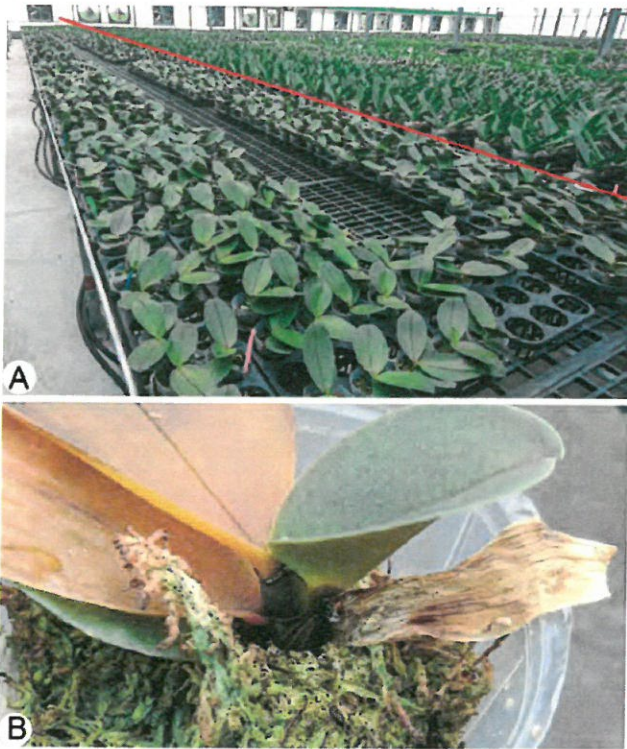
² The disease severities were assayed on a scale of 0-4: 0= healthy; 1= litter black rot on inoculated tissue; 2= less than 1/2 leaf yellowing; 3= more than 1/2 leaf yellowing; 4= leaf defoliation.

³ Values followed by the same letter in the same column are not significantly different at $p > 0.05$ according to LSD test (Fisher's protected least significant different test).

二)。

微生物製劑在田間防治蝴蝶蘭黃葉病的效果評估

在符合「臺灣輸美附帶栽培介質植物工作計畫」規範蝴蝶蘭園，一般都採用整合性的病害管理模式，使得蝴蝶蘭黃葉病的平均發病度被控制在10%以下(圖二、A)。本次田間試驗選在符合「臺灣輸美附帶栽培介質植物工作計畫」的台大蘭園彰化溪州場區進行，挑選供試的2.5吋蝴蝶蘭A4268苗株，於試驗開始時均為健康未發生蝴蝶蘭黃葉病。試驗採田間自然發病調查，試驗開始後第33天，對照組(澆灌清水)與施用Nana 11 200X、400X與800X稀釋液處理的供試植株發病度分別為6%、0%、0%與0%，所得資料經LSD統計分析，對照組的發病度與其他處理組間具有5%的顯著差異水準(表三)。試驗開始後第54天，對照組與施用Nana 11 200X、400X與800X稀釋液處理的供試植株發病度分別為11%、0%、0%與1%，所得資料經LSD統計分析，對照組的發病度與其他處理組間具有5%的顯著差異水準。試驗開始後第63天，對照組與施用Nana 11 200X、400X與800X稀釋液處理的供試植株發病度分別為14%、0%、0%與1%，所得資料經LSD統計分析，對照組的發病度與其他處理組間具有5%的顯著差異水準。試驗開始後第77天，對照組與施用Nana 11 200X、400X與800X稀釋液處理的供試植株發病度分別為16%、0%、3%與11%，所得資料經LSD統計分析，對照組的發病度與其他處理組間具有5%的顯著差異水準(表三)。另外，試驗開始後第77天，微生物製劑P2-2 100X、300X與500X稀釋液，以及BM 200X、400X與800X稀釋液處理的供試植株



圖二、(A) 採用整合性病害管理模式的蝴蝶蘭園，黃葉病的平均發病度被控制在10%以下，紅線左側為田間病害防治試驗區。(B) 黃葉病罹病植株表現葉鞘黑化與葉片黃葉的病徵。

Fig. 2. (A) When the *Phalaenopsis* garden adopted an integrated pest management cultivation, the average disease severity of *Phalaenopsis* yellowing leaf was controlled below 10%. The left side of the red line was the field experiment area of disease control. (B) The diseased plant of *Phalaenopsis* yellowing leaf showed symptoms of sheath blackening and leaf yellowing.

發病度分別為0%、6%、0%、8%、3%與3%，所得資料經LSD統計分析，對照組的發病度與其他處理組間具有5%的顯著差異水準(表四)。

在其他供試植株的試驗結果，包括PS3269、A8038、A2225與A7193，雖然有零星罹病植株，且皆有表現典型蝴蝶蘭黃葉病葉鞘黑化與葉片黃葉(圖二、B)，但是整體發病度皆低於10%以下，對照組的發病度與其他處理組間不具有5%的顯著差異水準。試驗開始後第77天，供試植株PS3269、A8038、A2225與A7193，在對照組與施用Nana 11、P2-2與BM等三種微生物製劑的9種試驗稀釋倍數的發病度分別介於0-2%、4-8%、0-2%與0-8%之間(表四)。

討 論

在病害的防治上有許多的方法可選用，包括施用化學藥劑、改變栽培環境與管理方式與清潔健康種苗等，施用化學藥

表三、施用液化澱粉芽孢桿菌Nana 11對蝴蝶蘭A4268發生黃葉病的影響

TABLE 3. Effect of *Bacillus amyloliquefaciens* Nana 11 on the occurrence of *Phalaenopsis* yellowing leaf of A4268

Treatment ¹	Disease severity (%) ² days after treatment			
	33	54	63	77
CK (water)	6 a ³	11 a	14 a	16 a
Nana11-200X	0 b	0 b	0 b	0 b
Nana11-400X	0 b	0 b	0 b	3 b
Nana11-800X	0 b	1 b	1 b	11 b

¹ "Nana11-200X" meant "a strain of *Bacillus amyloliquefaciens* Nana 11 (1×10^9 CFU/mL) with 200 fold dilution". Each treatment had 36 tested plants of A4268 (*Doritaenopsis Mount Lip* "Chou"). Treatments of Nana11 dilutions were conducted once a week for 7 times.

² The disease severities were assayed on a scale of 0-4: 0= healthy; 1= litter black rot on inoculated tissue; 2= less than 1/2 leaf yellowing; 3= more than 1/2 leaf yellowing; 4= leaf defoliation.

³ Values followed by the same letter in the same column are not significantly different at $p > 0.05$ according to LSD test (Fisher's protected least significant different test).

表四、施用芽孢桿菌對田間蝴蝶蘭黃葉病發生的影響

TABLE 4. Effect of *Bacillus* spp. on the occurrence of *Phalaenopsis* yellowing leaf

Treatment ¹	Disease severity (%) ² 77 days after treatment				
	A4268	PS3269	A8038	A2225	A7193
CK (water)	16 a ⁴	0 a	8 a	2 a	2 a
Nana11-200X ³	0 b	2 a	5 a	2 a	2 a
Nana11-400X	3 b	0 a	4 a	2 a	0 a
Nana11-800X	11 b	1 a	7 a	0 a	2 a
P2-2-100X	0 b	1 a	7 a	5 a	2 a
P2-2-300X	6 b	2 a	2 a	4 a	2 a
P2-2-500x	0 b	0 a	5 a	4 a	4 a
BM-200X	8 b	0 a	8 a	2 a	6 a
BM-400X	3 b	0 a	6 a	2 a	0 a
BM-800X	3 b	0 a	2 a	0 a	8 a

¹ Each treatment had 36 tested plants, including A4268 (*Doritaenopsis Mount Lip* "Chou"), PS3269 (*Phalaenopsis Long Strong Venus* "PS3269"), A8038 (*Phal. Taida Blush* "Taida"), A2225 (*Dtps. Queen Beer* "Mantefon"), and A7193 (*Phal. Taida King's Caroline* "Taida Little Zebra"). Treatments of Nana11 1×10^9 CFU/mL dilutions were conducted once a week for 7 times.

² The disease severities were assayed on a scale of 0-4: 0= healthy; 1= litter black rot on inoculated tissue; 2= less than 1/2 leaf yellowing; 3= more than 1/2 leaf yellowing; 4= leaf defoliation.

³ Nana 11 was *Bacillus amyloliquefaciens* Nana11 (1×10^9 CFU/mL); BM was *B. mycooides* BM (1×10^9 CFU/g); P2-2 was *B. amyloliquefaciens* (P2-2 1×10^8 CFU/mL).

⁴ Values followed by the same letter in the same column are not significantly different at $p > 0.05$ according to LSD test (Fisher's protected least significant different test).

劑還是被認為是效果最直接、快速的病害防治方法 (Kondoh et al., 2001)。但是要能對症下藥，病害防治效果才會顯現，換句話說，有、無有效的防治用藥劑，才是施用化學藥劑防治病害成功的關鍵。在現代化的農業栽培領域，蝴蝶蘭產業是高經濟生產的經濟體系之一。要生產健康的蝴蝶蘭植物是商業栽培體系中最好的策略，不但可以降低成本亦可增加產品的品質與價值。要如何生產健康的蝴蝶蘭？栽培業主必須學會如何創造適合蝴蝶蘭植物生長的環境條件，而且不利於蝴蝶蘭病、蟲害發生的環境。根據「臺灣輸美附帶栽培介質植物工作計畫」的規定，在病蟲害防治上主要有四個重點，包括：(1) 溫室驗證作業：溫室主體結構設置0.6 mm防蟲網或其他防蟲設施，介質需經消毒、殺蟲殺菌等處理之水草，灌溉水源限經煮沸或消毒之雨水、乾淨井水、自來水或其他經消毒的水源。溫室內不得有任何植株、殘株、土壤（泥土與砂石）、雜草及有害生物。(2) 移入指定溫室：移入溫室栽培之蘭苗其母本必須在移入前60天內，先經防檢局人員檢查證明未罹染任何病蟲害。(3) 溫室定期檢查作業：工作日記檢查，工作日記記載定期清潔、消毒及防蟲等工作項目，記錄栽培操作過程及每批移入之植物批號等。(4) 輸美檢疫作業：蝴蝶蘭輸出前，須在驗證合格溫室內連續栽培4個月以上，並於出口前30天申報檢疫。符合「臺灣輸美附帶栽培介質植物工作計畫」規範蝴蝶蘭園，一般都採用病蟲害綜合管理 (IPM, integrated pest management)，除了可降低防治成本之外，更是一種促使化學藥劑減量與環境友善的綜合防治策略，使得蝴蝶蘭黃葉病的平均發病度被控制在10% 以下 (圖二)。

近年來，臺灣蝴蝶蘭的栽培管理模式，強調的是病蟲害綜合管理與與環境友善的防治策略。生物防治使用與植物具關聯性的微生物菌株 (plant-associated microorganism)，一般被認為是與環境友善的病害防治策略。生物防治更可與其他病害管理策略整合應用，以便提供更完善的病害防治效果 (Bargabus et al., 2003)。過去的研究，常用對峙培養的篩選方式，藉由調查微生物與病原菌之間的抑制圈大小，篩選得到具潛力的標的菌株。然而，此種篩選方式僅能篩選得到具抗生作用的微生物菌株，而忽略了具競爭作用與誘導性抗病的菌株。本研究改變過去對峙培養的培養方式，再藉由計算病原菌菌絲生長的速度，定義微生物製劑對病原菌菌絲生長的干擾抑制率 (the interference and inhibition rate, IIR)，當IIR常數大於50%，表示處理組對菌絲生長有抑制作用，IIR值越大，抑制菌絲生長作用越明顯。當IIR常數介於0-50%，表示處理組對菌絲生長有干擾作用，IIR值越大，干擾菌絲生長作用越明顯，但是對菌絲生長無抑制作用。當IIR常數小於0，表示處理組對菌絲生長有促進作用，IIR負值越大，促進菌絲生長作用越明顯。試驗結果顯示Nana 11 200倍與BM 200倍稀釋液處理的IIR值分別為14%與5% (圖一)，推測Nana 11 200倍與BM 200倍稀釋液，在防治蝴蝶蘭黃葉病上無法抑制病原菌生長，但可能會干擾病原菌

生長，其可能機制包括競爭或佔據感染點的抗病機制。而P2-2 100倍稀釋液的IIR值為57% (圖一)，推測P2-2 100倍稀釋液可能會產生對黃葉病菌具有抗生作用的物質。

利用液化澱粉芽孢桿菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 可在田間達到降低病害發生的機制，主要有產生抗生物質 (Wu et al., 2014; Wu et al., 2017)、促進植物生長 (Wu et al., 2016) 與競爭作用等。不論是哪一種作用機制，液化澱粉芽孢桿菌在降低病害的防治效果，與其在植物的纏聚能力 (colonization) 有關。不同的液化澱粉芽孢桿菌分離株，在不同的植株種類上的纏聚能力有差異，有時植株的不同生長期亦會影響液化澱粉芽孢桿菌分離株的纏聚能力，進而影響病害的防治效果 (Wu et al., 2016)。在競爭作用上，液化澱粉芽孢桿菌可以與病原微生物競爭感染點 (Tan et al., 2016)、競爭根分泌物 (Wu et al., 2014; Wu et al., 2017) 或競爭其他物質 (Wei et al., 2015) 等。本研究嘗試在高接種源濃度下，接種蝴蝶蘭植株後第23天，對照組的發病度為100%，連續澆灌4次Nana 11 400倍稀釋液處理的發病度為84%，兩者相差16%的發病度 (表一)。在低接種源濃度下，接種蝴蝶蘭植株後第21天，對照組的發病度為36%，連續澆灌4次Nana 11 400倍稀釋液處理的發病度為18%，兩者相差18%的發病度 (表二)。目前尚不知Nana 11在與黃葉病菌競爭作用的機制為何？但由上述高、低黃葉病菌接種源濃度所進行得NaNa11的防治試驗結果，推論連續澆灌4次Nana 11 400倍稀釋液處理可減少16-18%的蝴蝶蘭黃葉病發病度。

因此，在接下來的田間自然發病的防治試驗中 (表三、四)，在符合「臺灣輸美附帶栽培介質植物工作計畫」規範蝴蝶蘭園，一般都採用整合性的病害管理模式，使得蝴蝶蘭黃葉病的平均發病度被控制在10% 以下。搭配Nana 11 400倍稀釋液的施用，連續澆灌4次，試驗開始後第33天，對照組與施用Nana 11 400倍稀釋液處理的供試植株發病度分別為6%與0%。連續澆灌7次，試驗開始後第77天，對照組與施用Nana 11 400倍稀釋液處理的供試植株發病度分別為16%與3% (表三)。換句話說，當蝴蝶蘭園採用IPM綜合性病害管理模式，使得蝴蝶蘭黃葉病的平均發病度被控制在10% 以下，若能再搭配一些配套措施，如本研究搭配Nana 11 400倍稀釋液的施用，試驗結果顯示田間蝴蝶蘭黃葉病的發病度皆低於5%以下。

本研究目前尚無法證實*Bacillus* 屬防治蝴蝶蘭黃葉病的機制為何？而*Bacillus* 屬微生物菌株在生物防治上的許多優點與病害防治的機制，包括有抗生作用、競爭作用與誘導性抗病 (Zhang et al., 2012)。*Bacillus* 屬的微生物菌株可產生許多的抗生物質，包括雙效菌素 (zwitermicin-A)、kanosamine (Leifert et al., 1995)、脂肽 (lipopeptides) (Stein, 2005)、聚酮 (polyketides) (Chen et al., 2006)、抗真菌蛋白 (antifungal proteins) (Liu et al., 2007)、iturin 與 fengycin (Ongena et al., 2005; Zerouh et al., 2011) 等。另外，微生物製劑亦可在植株上產生誘導性抗病 (induced systemic resistance, ISR)，包括於植株細胞內累積與抗病相關的

酵素，與強化抗病基因的表現等 (Van der Ent et al., 2009)，由 *Bacillus subtilis* 產生的 surfactin 與 fengycin 就可能是誘導性抗病的誘導原 (Ongena et al., 2007)。本研究接下來將進行液化澱粉芽孢桿菌 Nana 11 製劑在蝴蝶蘭黃葉病的防治機制探討。

引用文獻

- Bargabus, R. L., Zidack, N. K., Sherwood, J. E., and Jacobsen, B. J. 2003. Oxidative burst elicited by *Bacillus mycoides* isolate Bac J, a biological control agent, occurs independently of hypersensitive cell death in sugar beet. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16: 1145-1153.
- Chen, X. H., Vater, J., Piel J., Franke, P., Scholz, R., Schneider, K., Koumoutsis, A., Hitzeroth, G., Grammel, N., Strittmatter, A. W., Gottschalk, G., Sussmuth, R. D., and Borriss, R. 2006. Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J. Bacteriol.* 188: 4024-4036.
- Kondoh, M., Hirai, M., and Shoda, M. 2001. Integrated biological and chemical control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* using *Bacillus subtilis* IXB14-C and flutolanil. *J. Biosci. Bioeng.* 91: 173-177.
- Leifert, C., Li H., Chidburee, S., Hampson, S., Workman, S., Sigeo, D., Epton, H. A. S., and Harbour, A. 1995. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. *J. Appl. Microbiol.* 78: 97-108.
- Liu, Y. F., Chen, Z. Y., Ng, T. B., Zhang, J., Zhou, M. G., Song, F. P., Lu, F., and Liu, Y. Z. 2007. Bacisubin, an antifungal protein with ribonuclease and hemagglutinating activities from *Bacillus subtilis* strain B-916. *Peptides* 28: 553-559.
- McSpadden Gardener, B. B. 2004. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. *Phytopathology* 94:1252-1258.
- Nihorimbere, V., Ongena, M., Cawoy, H., Brostaux, B., Kakana, P., Jourdan E., and Thonart, P. 2010. Beneficial effects of *Bacillus subtilis* on field-grown tomato in Burundi: reduction of local Fusarium disease and growth promotion. *African J. Microbiol. Res.* 4:1135-1142.
- Ongena, M., Adam, A., Jourdan, E., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J. L., and Thonart, P. 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol.* 9: 1084-1090.
- Ongena, M., Jacques, P., Touré, Y., Destain, J., Jabrane, A., and Thonart, P. 2005. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69: 29-38.
- Singh, D., Yadav, D. K., Chaudhary, G., Rana, V. S., and Sharma, R. K. 2016. Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of bacterial wilt of tomato incited by *Ralstonia solanacearum*. *J. Plant Pathol. Microbiol* 7:327. doi:10.4172/2157-7471.1000327.
- Stein, T., 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.* 56: 845-857.
- Su, J. F., Chen, S. P., and Hsieh, T. F.. 2018. Strategies in Orchid Health Maintenance. 447-460 pp. in *Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses- Methods and Protocols.* 524pp. Humana Press, New York.
- Su, J. F., Lee, Y. C., Chen, C. W., Huang, J. H., and Hsieh, T. F.. 2012. Field surveys for Fusarium diseases of *Phalaenopsis* in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 21: 115-130. (in Chinese with English abstract)
- Tan, S., Gu, Y., Yang, C., Dong, Y., Mei, X., Shen, Q., and Xu, Y. 2016. *Bacillus amyloliquefaciens* T-5 may prevent *Ralstonia solanacearum* infection through competitive exclusion. *Biol. Fert. Soils* 52:341-351.
- Tan, S., Jiyang, Y., Song, S., Huang, J., Ling, N., Xu, Y., and Shen, Q. 2013. Two *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated using the competitive tomato root enrichment method and their effects on suppressing *Ralstonia solanacearum* and promoting tomato plant growth. *Crop Prot.* 43: 134-140.
- Van der Ent, S., Van Wees, S. C., and Pieterse, C. M. 2009. Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry* 70: 1581-1588.
- Wei, Z., Yang, T., Friman, V. P., Xu, Y., Shen, Q., and Jousset, A. 2015. Trophic network architecture of root-associated bacterial communities determines pathogen invasion and plant health. *Nat. Commun.* 6:8413. doi: 10.1038/ncomms9413.
- Wu, B., Wang, X., Yang, L., Yang, H., Zeng, H., Qiu, Y., Wang, C., Yu, J., Li, J., Xu, D., He, Z., and Chen, S. 2016. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* ZM9 on bacterial wilt and rhizosphere microbial communities of tobacco. *Appl. Soil Ecol.* 103:1-12.
- Wu, K., Su, L., Fanga, Z., Yuana, S., Wang, L., Shen, B., and Shen, Q. 2017. Competitive use of root exudates by *Bacillus amyloliquefaciens* with *Ralstonia solanacearum* decreases the pathogenic population density and effectively controls tomato bacterial wilt. *Sci. Hortic.* 218: 132-138.
- Wu, K., Yuan, S., Wang, L., Shi, J., Zhao, J., Shen, B., and Shen, Q. 2014. Effects of bio-organic fertilizer plus soil amendment

on the control of tobacco bacterial wilt and composition of soil bacterial communities. *Biol. Fert. Soils* 50: 961-971.

21. Zeriouh, H., Romero, D., García-Gutiérrez, L., Cazorla, F. M., Vicente, D. A., and Pérez-García, A. 2011. The iturin-like lipopeptides are essential components in the biological control arsenal of *Bacillus subtilis* against bacterial diseases of cucurbits. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24: 1540-1552.
22. Zhang, R. S., Lie, Y. F., Luo, C. P., Wang, X. Y., Liu, Y. Z., Qiao, J. Q., Yu, J. J., and Chen, Z. Y. 2012. *Bacillus amyloliquefaciens* IX-11, a potential biocontrol agent against rice bacterial leaf streak. *J. Plant Pathol.* 94: 609-619.

reduce the occurrence of *Phalaenopsis* yellowing leaf.

Keywords: *Phalaenopsis* yellowing leaf, *Bacillus amyloliquefaciens*, interference and inhibition rate, RII, biological control, integrated pest management

ABSTRACT

Su, J. F., Chien, L. Y., Lin, T. C., Chen, C. W., Hsieh, F. C. 2022. *Bacillus amyloliquefaciens* Nana 11, a potential biocontrol agent against *Phalaenopsis* yellowing leaf. *J. Plant Med.* 64(2): 63-70.

*Corresponding author, E-mail: hsiehf@tactri.gov.tw and forte9135101@tari.gov.tw

This study was evaluated the feasibility a strain of *Bacillus amyloliquefaciens* Nana 11 to possess biocontrol activity against *Phalaenopsis* yellowing leaf caused by *Fusarium solani* (teleomorph *Haematonectria haematococca*) in the greenhouse. In the dual culture test, the interference and inhibition rate (IIR) of Nana 11 200-fold dilution was 14% indicating that the Nana 11 dilution could interfere with the mycelial growth of *F. solani*. In the inoculation with high inoculum density (3.9×10^5 spores/mL), the control group had a disease severity of 100% on the 23rd day after the inoculation of *Phalaenopsis Taida Little Zebra*, and the disease severity of Nana 11 400-fold dilution treatment was 84%. There was a significant difference of 5% between both. In the inoculation with less inoculum density (1.3×10^2 spores/mL), the control group had a disease severity of 36% on the 21st day after the inoculation of *Phal. Green Pixie* "Ever Green", and the disease severity of Nana 11 400-fold dilution treatment was 18%. There was a significant difference of 5% between both. In the field disease management experiment, the control group had a disease severity of 16% on the 77th day after the treatment of *Doritaenopsis Mount Lip* "Chou", and the disease severity of Nana 11 400-fold dilution treatment was 3%. There was a significant difference of 5% between both. The above results showed that *B. amyloliquefaciens* Nana 11 400-fold dilution might be a promising biocontrol agent for preventive application, which conducted once a week for 4 times, to