

作物病蟲害

本年度作物病蟲害共辦理 3 項科技計畫，分別為微生物資材防治草莓病害之開發及應用，繼續分離純化本土木黴菌株，以玻璃紙抗生法測試，結果顯示木黴菌對草莓之果腐病菌、灰黴病菌及炭疽病菌均有拮抗性；另進行草莓育苗期炭疽病田間灌菌試驗，初步顯示數株分離之木黴菌株對草莓冠部腐壞有抑制之效果。拮抗酵母菌對柑橘採後果實防病保鮮之研究，繼續分離純化本土酵母菌株，人工接種青黴菌孢子，檢測 4 種柑橘人工接種感染率；極柑表皮刺傷後再接種青黴菌孢子可明顯增加感染率，適當接種孢子量為 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ spores/mL；A4 酵母菌在 YMB 培養液增殖，初期增殖量隨時間增加而增多，至 20 小時達最高峰；果皮拮抗試驗發現 A4 及 WSIE001 菌株拮抗效果佳具開發潛力，下年度將繼續進行相關試驗。拮抗性細菌對秧苗立枯病防治之研究，自作物根圈土壤及水稻育苗土樣本，分離得耐高溫細菌及能產生鏈狀孢子與菌絲的鏈黴菌屬細菌，以平板對峙試驗法，篩選到耐高溫菌 12 株及鏈黴菌屬細菌 1 株具有良好的拮抗性，將 S15-4 與 S4-4 菌株，利用 Biolog 細菌鑑定均為枯草桿菌 *Bacillus subtilis*。

微生物資材防治草莓病害之開發及應用

草莓重要之病害包含灰黴病 (*Botrytis cinerea*)、果腐病 (*Phytophthora cactorum* and *P. citrophthora*)、炭疽病 (*Colletotrichum dematium*、*C. fragariae*、*C. acutatum*、

C. gloeosporioides)、青枯病 (*Ralstonia solanacearum*)、白粉病 (*Sphaerotheca macularis* f. sp. *fragariae*、*S. humuli*)，其中以灰黴病、果腐病、白粉病為危害果實最嚴重之病害，而炭疽病及青枯病則是苗期主要病害。自然界各種微生物間相互依存，其中拮抗現象即為發展生物防治的良好策略。本計畫於轄 之作物土壤根部病害以及採集自較原始之土壤樣本陸續分離得木黴菌 (菌株編號：MD004、ML001、ML002、ML022、ML023、ML024、ML025、ML027 ~ 31、ML042、ML050、ML053 ~ ML058 共計 20 株)。將分離之 18 株木黴菌與分離自草莓之果腐病 (ML036)、灰黴病 (ML037)、炭疽病 (ML038) 進行玻璃紙抗生法測試，結果顯示其中 13 株木黴菌對果腐病菌有 84-100% 之抑制率，11 株對灰黴病菌有 53.8-97% 之抑制率，3 株對炭疽病菌有 56.8-73.1% 之抑制率 (詳見附表 1)。後續欲進行草莓果實田間病害防治試驗時，若僅針對果腐病、灰黴病以 ML001 及 ML057 最佳，其抑制率分別為 100%、90.31% 及 100%、97.47%，若同時防治果腐病、灰黴病及炭疽病三種果實病害，則以 ML001 (抑制率 100%、90.31% 及 60.15%)、ML031 (抑制率 100%、82.21% 及 56.8%) 及 ML056 (抑制率 84%、87.25% 及 73.1%) 為佳。而為進行草莓育苗期炭疽病田間防治試驗，以對炭疽病菌有較佳抑制效果之菌株 ML001、ML031 及 ML056 進行灌菌試驗。經連續六周處理後，調查各組罹病度，ML031 10^5 spores/ml 罹病度 5.56%，相

較於對照組罹病度 14.24%，減少罹病程度。植株冠腐死亡部分則以 ML001 10^5 spores/ml、ML056 10^5 spores/ml 各罹病死亡 3 株，相較於對照組死亡 8 株，初步結果顯示木黴菌對草莓冠部腐壞有抑制之效果（附圖1-4）。



表1. 利用玻璃紙抗生法測定不同木黴菌株對草莓病原菌生長之抑制能力

Isolates of <i>Trichoderma</i>	Growth inhibition of strawberry pathogens (%)		
	<i>P. parasitica</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
ML001	100%	90.31%	60.15%
ML002	100%	60.58%	28.55%
MD004	100%	78.87%	28.29%
ML024	5.39%	6.81%	0.94%
ML025	15.00%	6.29%	1.87%
ML027	100%	63.86%	27.85%
ML028	100%	73.79%	24.43%
ML029	100%	40.51%	32.16%
ML030	100%	49.04%	32.20%
ML031	100%	82.21%	56.80%
ML042	-	45.90%	43.70%
ML050	100%	45.39%	28.77%
ML053	-	19.37%	14.87%
ML054	-	58.53%	25.07%
ML055	88.60%	86.25%	43.80%
ML056	84%	87.25%	73.10%
ML057	100%	97.47%	37.94%
ML058	74.38%	53.83%	29.48%



圖1. 對照組(水)防治草莓苗期炭疽病試驗結果(帶菌土)



圖2. 木黴菌株(ML001 10^5)防治草莓苗期炭疽病試驗(帶菌土)



圖3. 木黴菌株(ML031 10^5)防治草莓苗期炭疽病試驗(帶菌土)



圖4. 木黴菌株(ML056 10^5)防治草莓苗期炭疽病試驗(帶菌土)

拮抗酵母菌對柑橘採後果實防病保鮮之研究

柑橘儲藏的重要病害有青黴病(如圖1)、綠黴病為主,農民以往在儲藏前均使用化學藥劑浸泡柑橘果實,雖簡單有效,但也往往造成農藥殘留過量,隨著消費者安全的認知及環保意識的抬頭,如能改以較安全的拮抗酵母來控制柑橘儲藏性病害的發生,將對消費者的食用安全性更有保障。本計畫擬從本土柑橘園土壤、枝葉、果實等上分離與純化酵母菌種,作為防治柑橘儲藏性病害之微生物資材,以解決柑橘儲藏期化學農藥使用過量的情形。

新鮮極柑果皮培養的青黴菌分生孢子比PDA培養基培養之分生孢子具有較高的致病

力,產孢量亦較多,較符合自然感染方式,因此改用此方式培養出來的孢子作為接種源。4種柑橘人工接種感染力依次為極柑、柳橙、茂谷柑、有機桶柑,感染率分別為100%、83.3%、83.3%、50%,其中茂谷柑病徵約晚1~2天出現。2種化學藥劑以克熱淨防治效果明顯高於腐絕(如表1)。表皮刺傷後再接種青黴菌孢子可增加感染率30%,接種孢子量為 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^4$ spores/mL時,果皮病徵約4天出現,感染率達80%以上,因此認為適當接種孢子量為 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ spores/mL(如表2)。酵母菌不同接種濃度與

青黴菌感染，酵母菌 C8 原液濃度為 3.95×10^8 CFU/mL，經稀釋為 50 倍、100 倍、200 倍、500 倍，結果感染率分別為 20.8%、33.3%、37.5%、45.8%，顯示較高酵母菌濃度有較低感染率（如表 3）。A4 酵母菌在椪柑表皮增殖情形，果皮上酵母菌之增殖隨時間增加而增多，2 種不同洗下方式以超音波方式較旋轉震盪方式洗下多，其最大增殖率約餘接種後 20 小時達最高峰，其增殖量為 5 倍（圖 2）。經以果皮接種感染複篩，發現 A4 及 WSIE001 菌株拮抗效果佳

（如圖 3、圖 4），感染率分別為 8.3% 及 33.3%，具開發潛力，下年度將繼續進行相關試驗。



圖1. 柳橙果實感染青黴菌

表1. 四種柑橘對青黴菌感染比較

處理項目	感染率(%)			
	椪柑	柳丁	桶柑	茂谷柑
青黴菌	100	83.3	50	83.3
克熱淨	1	0	0	0
腐絕	83.3	66.7	66.7	66.7

表2. 刺傷處理與接種孢子濃度對青黴菌感染之關係

處理項目	感染率(%)
Blank 無刺傷	45.3
0.1% Tween20	15.3
1×10^2 刺傷	79.2
1×10^4 刺傷	100
1×10^6 刺傷	95.8
1×10^6 無刺傷	62.8

表3. 酵母菌不同接種濃度與青黴菌感染之關係

濃度	感染率(%)
Tween20	8.3
青黴菌	83.3
50X	20.8
100X	33.3
200X	37.5
500X	45.8
克熱淨	4.2

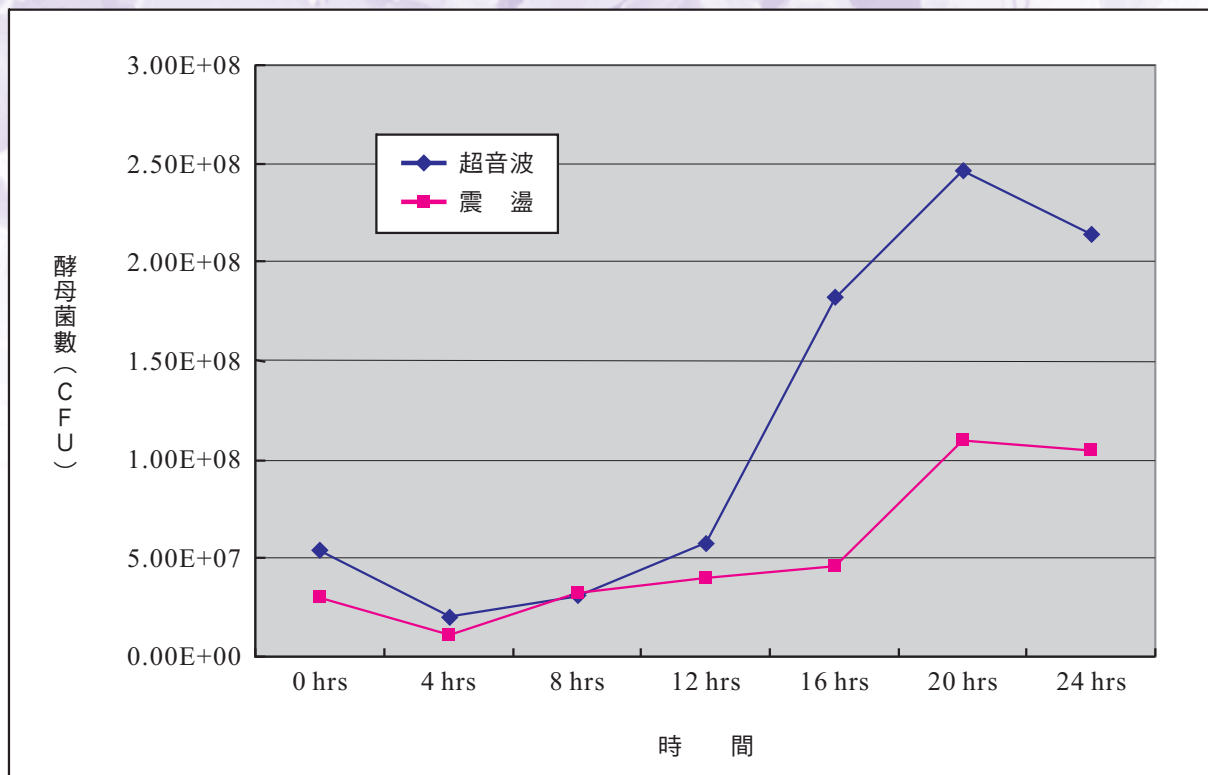


圖2. A4酵母菌接種後在柑橘表皮增殖情形



圖3. 以椪柑果皮作為拮抗酵母菌篩選



圖4. 拮抗酵母菌A4平板培養菌落

拮抗性細菌對秧苗立枯病防治之研究

水稻為國人的主要食物也是種植面積最廣的作物，近年來也積極推動有機稻米的生產與行銷，雖然有機稻米生產過程中，針對主要的病害如：稻熱病、紋枯病、白葉枯病及胡麻葉枯病等，均可用有機資材與策略控制得宜，達到有機稻米生產規範的標準；但在水稻秧苗生產的階段，為防治育苗土中帶有的立枯病菌，仍然需要依賴化學農藥的使用，導致種植於有機稻田所用的並非真正的有機秧苗；本研究擬篩選本土性拮抗細菌（如枯草桿菌屬或放線菌屬菌種）防治秧苗立枯病，期望能應用於有機秧苗的生產，使有機稻米生產由秧苗到田間均符合有機生產規範與標準。

自發秧苗立枯病的的秧苗盤，利用 WA 與 PDA 培養基，以組織分離和切單菌絲的方式，經數次繼代培養確認純化無雜菌後，依照其菌絲構造、菌核形態特徵鑑定，為白絹病菌為 *Sclerotium rolfsii*、腐黴病菌 *Pythium spp.* 及立枯絲核菌 *Rhizoctonia solani*。並以 4°C (in ddH₂O) 及 -70°C (in 10% glycerol) 保存；分別將 3 株純化病原菌的菌絲塊，接種至健康稻種及育苗土中，使病菌感染稻種，可發生原相同的立枯病徵，完成克霍氏法則，確認分離病原菌之正確性。

採集轄 內作物根圈土壤及水稻育苗土樣本共 31 個，秤重及定量加水稀釋後，放置於 50°C 水浴槽中加熱 10 分鐘，陸續分離得 106 株耐高溫細菌；再與上述 3 株病原菌進行平板對峙拮抗試驗，篩選到耐高溫拮抗細菌共 15 株（如表 1）；挑選拮抗表現良好的分離細菌：S15-4 利用 10L 桌上型發酵槽於 37°C、轉速 200rpm、通氣量 1vvm，條件下培養 4 天後，可獲得 1X10⁹ CFU/ml 耐高溫（80°C、10min）的內生孢子液態培養液（如圖 1）；內生孢子的生成，有助於後續粉劑製程、儲架壽命及逆境耐受性的優勢維持。S15-4 與 S4-4 菌株，利用 Biolog 細菌鑑定系統分析為：枯草桿菌 *Bacillus subtilis*，該類菌株已公告為對環境友善且不須嚴格管制的有益菌，並有多研究 出該類菌對作物生長及養分吸收具有促進作用，亦可開發成兼具微生物肥料的多功能益菌製劑。

表1. 選15株耐高溫細菌與秧苗、草莓病原菌進行平板對峙拮抗試驗

	秧苗 白絹病菌	秧苗 腐霉病菌	秧苗 紋枯病菌	草莓 灰黴病菌	草莓 果腐病菌	柑橘 蒂腐病菌
S4-2	+	++	++	++	++	++
S4-4	+	++	++	++	++	++
S7-2-紅	-	+	+	+	-	-
S7-2-白	-	+	+	-	++	-
S15-1	++	++	+	++	++	++
S15-2	-	+	+	++	++	++
S15-3	+	++	+	++	++	++
S15-4	++	++	++	++	++	++
S8-2-紅	-	++	-	-	+	-
S8-4	-	++	++	++	++	++
S18-1	++	++	+	++	++	++
S18-3	-	+	+	++	-	-
S19-3	+	++	+	++	++	++
S23-2	+	++	+	++	++	++
S23-4	-	+	-	-	+	-

*定義：++病原菌無碰觸拮抗細菌
 +病原菌接觸拮抗細菌
 -病原菌生長越過拮抗細菌

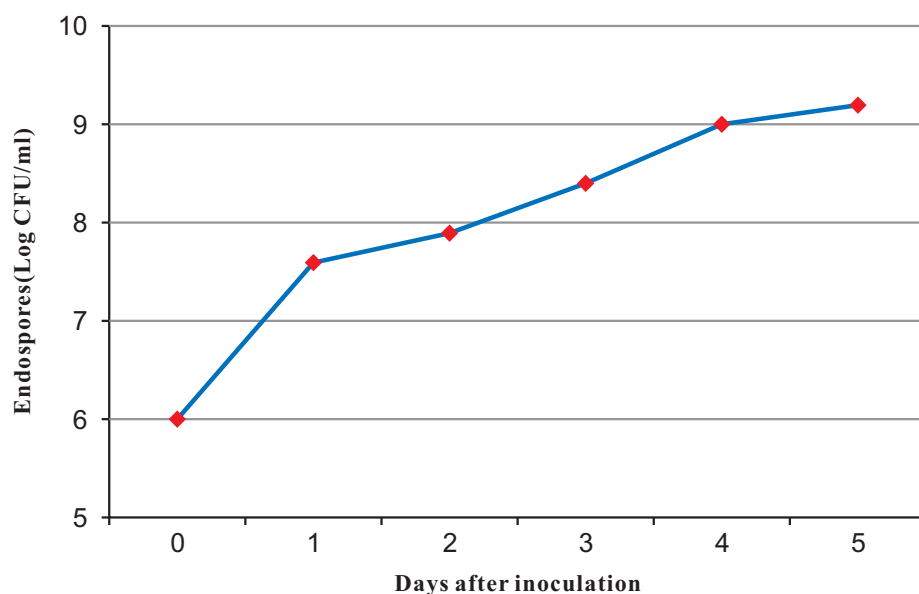


圖1. 15-4菌株利用10L桌上型發酵槽生產內生孢子的數量變化