

多黏類芽孢桿菌TP3應用於草莓葉枯病之防治

馮全¹、陳昭瑩^{1,2}

¹ 國立臺灣大學植物醫學碩士學位學程

² 國立臺灣大學植物病理與微生物學系

聯絡作者，E-mail: cychen@ntu.edu.tw

摘要

馮全、陳昭瑩。2022。多黏類芽孢桿菌TP3應用於草莓葉枯病之防治。植物醫學64(4): 131-138。

草莓(*Fragaria × ananassa* Duchesne)為重要經濟作物，臺灣主要栽培產區為苗栗縣，近年因*Neopestalotiopsis rosae*引起之葉枯病危害猖獗，造成嚴重經濟損失。本研究測試多黏類芽孢桿菌(*Paenibacillus polymyxa*) TP3是否能用以防治草莓葉枯病。經由孢子發芽及對峙培養試驗，得知TP3具有抑制草莓葉枯病菌分生孢子發芽及菌絲生長的能力。在盆栽試驗，以黃豆粉培養基培養之TP3菌液一週內噴施三次於草莓植株上，可明顯抑制葉枯病之病斑發展，防治率近90%。於接種葉枯病菌前10天單次噴施TP3菌液仍有防治效果，防治率為85%。TP3噴施處理草莓植株後3天，葉片測得最高菌數35,000 CFU/cm²，第10天之處理葉仍有25,000 CFU/cm²之菌數，故認為草莓葉之TP3菌數對其防治葉枯病具有重要性。田間每10天噴施TP3內生孢子懸浮液1次，噴施7次，由接種葉枯病菌之草莓果實病斑面積較小，得知噴施TP3可抑制葉枯病菌感染草莓果實。TP3噴施10次後，計算草莓開花及幼果之總量較對照組明顯增加。本研究由盆栽試驗及田間處理驗證TP3內生孢子可用以防治草莓葉枯病，減少草莓葉及果實的感染，進一步發展為微生物製劑，將有助於草莓育苗及果實之生產。

關鍵詞：多黏類芽孢桿菌、内生孢子、生物防治、草莓葉枯病

緒言

草莓(*Fragaria × ananassa* Duchesne)為薔薇科多年生常綠草本小漿果植物，營養價值高，外型與風味饒有特色，可供鮮食與加工，用途廣泛，為極具經濟價值的作物，自寒帶至熱帶地區均有栽培。根據2021年聯合國糧食及農業組織統計，2019年全世界草莓的栽培面積為39.6萬公頃，產量為888千萬公

噸，其中亞洲草莓種植面積最大，約占全球的45.5%，其次為美洲佔26.3%；最大生產國為中國，年產量計有1,400萬公噸，其次為美國，年產量為617萬公噸⁽¹⁴⁾。臺灣之草莓主要產地在苗栗縣，主要集中在大湖地區。草莓性喜冷涼氣候，生育適溫為6-24℃，適合栽培於土層深厚、富含有機質、排水與通氣性良好的砂質壤土或壤土，9月下旬至10月上旬適合定植，若是高海拔地區，則可於九月中旬定植⁽²⁰⁾。草莓產業以成熟強健且不帶特定病原的健康種苗為根基，每年所需要的草莓種苗為2,500萬株，產值高達2億5千萬元。草莓育苗期常受病害威脅，如炭疽病(anthraxnose)⁽⁹⁾、葉枯病(leaf blight)⁽³³⁾等，造成嚴重之經濟損失。

過去農民普遍種植豐香草莓(桃園1號)，屬於炭疽病菌容易感染的品種，近年來多數農民改種較抗炭疽病的香水草莓，使得新興病害—葉枯病嚴重發生。2018年在臺灣各地如台北、桃園、苗栗、嘉義等草莓栽培地區皆發現嚴重葉枯病徵；2019年及2020年葉枯病更加盛行，造成近30%的草莓苗在定植後死亡⁽³³⁾。葉枯病菌可感染草莓葉部產生褐色壞疽斑及黑色之分生孢子堆，在果實上形成下凹的紅褐色壞疽斑。經由ITS (internal transcribed spacer region)、TUB2 (β -tubulin 2)、TEF-1 α (translation elongation factor 1 alpha) 與 LSU (large subunit of the nrRNA region)之分子鑑定得知臺灣發生之草莓葉枯病為新擬盤多毛孢屬真菌 *Neopestalotiopsis rosae* 所引起⁽³³⁾。許多研究以單一基因對草莓葉枯病菌進行分子鑑定，如Chamorro等人所鑑定的病原真菌為 *N. clavispora*⁽⁵⁾，但由多個目標基因進行分子鑑定的結果則為 *N. rosae*⁽⁴⁾。

類芽孢桿菌(*Paenibacillus* spp.)早期被歸類於芽孢桿菌屬(*Bacillus*)中，經16S rRNA序列分析歸類為新屬-類芽孢桿菌屬中⁽³⁾，其與芽孢桿菌相同，具有生成内生孢子的能力⁽¹¹⁾，在不適宜的環境下呈休眠狀態，可在土壤中長存。多黏類芽孢桿菌(*Paenibacillus polymyxa*)可存在於多種作物組織^(12, 22, 26, 37)，可產生多種抗菌物質^(12, 22, 23, 32)，在植物病害防治上扮演

重要的角色，如降低小麥莖基腐病(*Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. verticillioides*, *Microdochium nivale*)⁽²¹⁾、甜椒疫病(*Phytophthora capsici*)⁽³⁵⁾、番茄青枯病(*Ralstonia solanacearum*)⁽³⁴⁾、胡瓜苗枯及根腐病(*Pythium* spp.)⁽³⁶⁾等病害之嚴重度。

多黏類芽孢桿菌TP3分離自田間草莓植株的地上部組織，具有溶磷的能力^(7, 31)，將TP3噴灑或是澆灌處理，皆可抑制草莓灰黴病及炭疽病的病徵發展^(6, 7, 31)。以生化分析方法萃取TP3之抗菌物質，粗萃物可抑制草莓灰黴病菌之生長，以高效液相層析儀配合基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀(MALDI-TOF MS)推斷抗菌物質為殺鐮孢菌素(fusaricidins)；經影像質譜分析，在抑菌圈周圍觀察到殺鐮孢菌素及多黏菌素E(polymyxin E)的訊號⁽³⁰⁾。由於殺鐮孢菌素具有廣效性^(17, 18)，推測TP3除了能防治草莓灰黴病與炭疽病外，亦能防治草莓葉枯病。

近年來農產品之農藥殘留是國民所關注的議題，為了果實採收期的病害防治及符合安全採收期的規範，採果期的病蟲害防治亟需要非化學農藥防治方法，微生物農藥即為可行的方案，故於本研究探討多黏類芽孢桿菌TP3內生孢子的生產方法及於草莓葉枯病防治的應用效果，期能協助解決草莓生產的病害問題。

材料與方法

草莓苗繁殖及栽培

香水(Xiang-Shui)草莓繁殖母株每週澆灌一次0.05%花寶5號(Hyponex No.5 Fertilizer, N-P-K=30-10-10)，於走莖小芽長出2片小葉時於盆栽(8.5公分內徑)介質誘植，所使用的栽培介質為以6:1:1比例混合之BVB 6D泥炭土(Bas van Buuren, Massland, Holland)、珍珠石及蛭石，7天後剪斷走莖。每週澆水3-4次以保持土壤濕潤，植物生長室之溫度為22°C，光照週期為16小時光照與8小時黑暗。以剪斷走莖後3週的草莓苗用於盆栽防治試驗。

供試菌株培養與保存

多黏類芽孢桿菌TP3以竹籤挑取單一菌落培養於3毫升LB(Luria-Bertani)液態培養基(1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 1 N NaOH)中，於28°C、175 rpm條件下震盪培養16-18小時，達到菌數為 1×10^8 CFU/ml，作為實驗材料或是後續放大培養之接種源。TP3菌株之保存為800 μ l菌液及400 μ l已滅菌之50%甘油均勻混合於凍菌管，保存於-80°C冷凍櫃中。

常用之內生孢子生產培養基AK medium可培養TP3內生孢子，為降低培養基成本，以黃豆粉培養基生產TP3內生孢子。所使用的黃豆粉為大統益公司所生產之普通蛋白豆粉，為大豆榨油後的副產物，其粗蛋白質含量約43%，為資源再利用之

氮素營養。將培養於3毫升LB培養基隔夜之TP3菌液，以1%體積加入50毫升之2%黃豆粉培養基中，於175 rpm轉速下在28°C培養3天，計算內生孢子產量，並與22°C及37°C下培養之內生孢子產量比較。內生孢子計量方法參考Prabakaran等(2007)所述之加熱溫度及時間⁽²⁷⁾，取1毫升菌液放入離心管中，放置於水浴槽中，以80°C加熱15分鐘，隨後將菌液序列稀釋，塗盤於LB固態培養基，於28°C之生長箱培養2天後，估算內生孢子濃度。另將TP3菌液稀釋100倍，取10 μ l塗於玻片表面，以火烤固定菌體，續以1%結晶紫(crystal violet)染色15分鐘，以一次水退染後於相位差顯微鏡(Leica Model DMR, Germany)下觀察，估算TP3內生孢子產率。將50毫升之2%黃豆粉培養基於28°C、175 rpm下震盪培養3天之菌液(估算之內生孢子數為 3×10^8 CFU/ml)，稀釋10倍並懸浮於0.05% Silwet-L77展著劑(統友)中，用於盆栽試驗。另一方面，田間試驗使用桌上型5 L發酵槽培養TP3，將3毫升LB液態培養基培養隔夜之TP3菌液，取1毫升體積添加於100毫升之2%黃豆粉培養基中，於28°C、175 rpm下震盪培養隔夜，作為接種源添加至3公升之2%黃豆粉培養基中，接種體積近3%，培養3天後將菌液稀釋10倍，以加熱法估算內生孢子濃度。將發酵培養之TP3菌液以9,000 \times g轉速10分鐘離心收集內生孢子並重新懸浮於無菌水中，保存於7°C冰箱，稀釋為 3×10^7 CFU/ml用於田間試驗。

自苗栗縣大湖鄉多利草莓園所採集之疑似葉枯病感染之草莓病葉，經組織分離及單孢分離法純化菌株，所得菌株MLSBL1經臺大植微系歐海仁教授協助鑑定為*N. rosae*，以馬鈴薯葡萄糖瓊脂(potato dextrose agar, PDA)於23°C培養7天，配製分生孢子懸浮液於0.005% docusate (Alfa Aesar)中。將5毫升0.005% docusate加入培養基上，輕輕刮取培養基表面的分生孢子堆，以不鏽鋼濾茶器過濾分生孢子懸浮液中的菌絲，以血球計數器計算懸浮液中的分生孢子濃度及以0.005% docusate調整濃度，作為盆栽防治試驗的病原真菌接種源。

多黏類芽孢桿菌TP3對草莓葉枯病菌MLSBL1分生孢子之發芽抑制試驗

將培養於3毫升LB培養基隔夜之TP3菌液，於6,000 g、25°C下離心(MX-307, TOMY)10分鐘，以無菌水懸浮菌體，稀釋為 1×10^7 CFU/ml、 1×10^6 CFU/ml、 1×10^5 CFU/ml。另取原液上清液經0.45 μ m之Millex混合纖維針頭式過濾器(Mixed cellulose esters-syringe filter, Merck)過濾去除菌體，稀釋10倍與100倍，將不同濃度之TP3細菌懸浮液或培養上清液與草莓葉枯病菌MLSBL1孢子懸浮液各10 μ l混合於懸滴玻片上，終濃度為 2.5×10^4 conidia/ml，內含0.5%葡萄糖以利孢子發芽，放置於保鮮盒中保濕，16小時後觀察孢子發芽情形。

多黏類芽孢桿菌TP3與草莓葉枯病菌MLSBL1對峙培養試驗

將PDA培養基上的草莓葉枯病菌MLSBL1菌落邊緣以打孔

器切取直徑1公分之菌絲塊，放置於PDA培養基中央，左右兩側距離2公分處各以竹籤沾取TP3於LB液態培養基培養隔夜之菌液劃一直線，放置於室溫四天後，觀察並記錄菌絲之生長情形。

多黏類芽孢桿菌TP3對草莓葉枯病之盆栽防治試驗

接種葉枯病菌MLSBL1前7、3及1天，於前述盆栽草莓苗噴灑以黃豆粉培養基培養之TP3稀釋菌液(估算之內生孢子濃度為 3×10^7 CFU/ml)直至濕透。TP3處理後將葉枯病菌分生孢子懸浮液 5×10^5 conidia/ml噴霧接種於草莓苗表面。另於接種葉枯病菌前14、10、7及3天，於草莓苗噴灑以黃豆粉培養基培養之TP3稀釋菌液(估算之內生孢子濃度為 3×10^7 CFU/ml)，將葉枯病菌分生孢子懸浮液 3×10^5 conidia/ml噴霧接種於草莓苗表面。將接種病原菌後的草莓苗放置於植物生長室之保濕箱中，分別於接種後6天及8天記錄及比較葉片之罹病面積，病斑面積以Image J分析軟體 (<https://imagej.nih.gov/ij/>) 量化。各處理有五個植株，記錄每個植株由上至下的第2及第3片葉的罹病面積。

草莓葉之多黏類芽孢桿菌TP3菌數調查

為了解TP3施用於草莓植株表面後的族群變化，參考Anand及Chanway (2012) (2)之報告以多黏類芽孢桿菌TP3抗立復黴素(rifampicin)菌株調查植表的TP3菌數。將抗立復黴素之TP3菌株，培養於含100 µg/ml 立復黴素之50毫升2%黃豆粉培養基3天，以6,000 xg離心後，以50毫升無菌水懸浮菌體，稀釋10倍(含0.05% Silwet-L77)噴灑於草莓苗表面，約2小時後，待植株表面乾燥，取由上往下數來之第2及第3片葉，以打孔器取直徑1公分之葉盤6片，添加1毫升之無菌水，以組織細胞均質機(Bullet blender BBX24, Next Advance)於直徑0.5 mm之不鏽鋼珠中磨碎(速度10)，時間為5分鐘。將磨碎樣品序列稀釋，塗盤於含100 µg/ml 立復黴素之LB培養基，計算單位面積葉片上的TP3菌數，為0天的菌數。以相同取樣及細菌回收方法於處理TP3後不同天數至處理後21天，檢測單位面積草莓葉片上的TP3菌數，每個檢測TP3菌數的時間點有4個草莓植株。

多黏類芽孢桿菌TP3之草莓園田間試驗

於大湖多利草莓園進行TP3田間試驗，將TP3内生孢子濃縮液稀釋為 3×10^7 CFU/ml (含0.05% Silwet-L77)，以施用0.05% Silwet-L77為對照組，每7-10天處理一次，噴灑於草莓園試驗植株直至全株地上部濕潤且有水珠滴落，每個處理2畦，每畦40株草莓。將噴灑處理TP3内生孢子液後之部份草莓植株葉片取回實驗室，接種葉枯病菌MLSBL1 (1×10^6 conidia/ml)，保濕7天後記錄病斑面積，此試驗進行兩次。針對果實的部分，在處理7次後每處理各採取15顆草莓果實，保存於7°C隔天進行接種試驗，接種10 µl草莓葉枯病菌MLSBL1之分生孢子懸浮液(1×10^6 conidia/ml)於草莓果實表面，放置於前述植物生長室之保濕盒中7天，觀察及比較病斑面積。並於TP3處理10次後，每畦各取

10株，每處理共取20株草莓植株，每間隔2株取1株，計算花及幼果數目。

統計分析

各處理所得之數據以SAS (Statistical Analysis System, version 9.4)進行變方分析(Analysis of Variance, ANOVA)，並以最小顯著差異性試驗(Fisher's Least Significant Difference (LSD) test)進行事後檢定，相同英文字母表示處理間無顯著差異(p -value < 0.05)。另以Student's t -test進行處理組與對照組的比較，以'*'表示具有顯著差異(p -value < 0.05)。

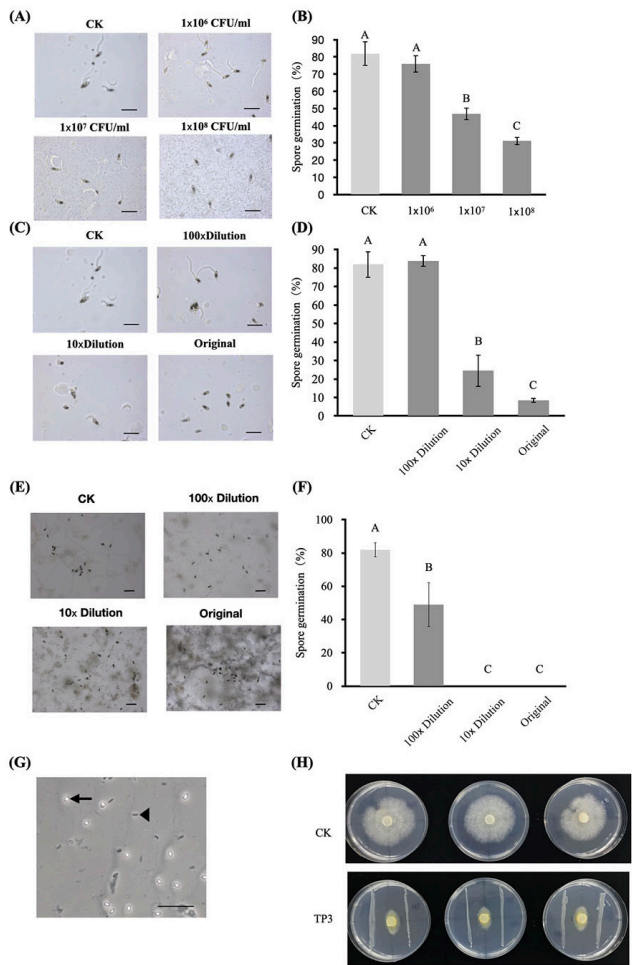
結 果

多黏類芽孢桿菌TP3可抑制草莓葉枯病菌之分生孢子發芽及菌絲生長

已知TP3可抑制草莓炭疽病菌、灰黴病菌之孢子發芽及菌絲生長 (6, 7, 31)，為了初步試驗TP3對於草莓葉枯病的病害防治潛力，測試TP3是否具有抑制葉枯病菌分生孢子發芽及菌絲生長的能力。由玻片上的孢子發芽試驗得知，TP3菌體以及LB培養上清液具有抑制草莓葉枯病菌孢子發芽的作用，菌體的有效抑菌濃度為 1×10^7 CFU/ml 至 1×10^8 CFU/ml，顯微鏡視野下亦可觀察到葉枯病菌周圍有細小的TP3菌體(圖一A, B)，培養上清液的原濃度及10倍稀釋液皆具有抑菌活性(圖一C, D)。為了開發田間應用之TP3產品，以黃豆粉培養基培養TP3，測試所得培養上清液對草莓葉枯病菌孢子發芽的影響，得知原液、10倍及100倍稀釋液皆有抑菌作用(圖一E, F)。以黃豆粉培養基培養3天的TP3菌液可見内生孢子以及營養細胞，内生孢子產量約佔總菌數之八成(圖一G)。於PDA之對峙培養結果可知TP3具有抑制草莓葉枯病菌菌絲生長的能力(圖一H)。

以黃豆粉培養基培養之多黏類芽孢桿菌TP3菌液可以防治草莓葉枯病

已觀察到TP3可抑制草莓葉枯病菌之孢子發芽及菌絲生長，為了驗證TP3於草莓植株噴灑施用對葉枯病的防治效果，以2%黃豆粉培養基測試生產TP3内生孢子的合適培養溫度，由結果得知在28°C培養3天所得的内生孢子產量較22°C及37°C者高(圖二A)。續以黃豆粉培養基於28°C培養的TP3稀釋菌液於接種葉枯病菌前7、3、1天噴灑於草莓植株表面，試驗結果得知對照組之植株枯萎，葉片呈現葉枯病徵(圖二B, C)，而TP3處理組之植株健康，葉表也僅有極輕微的病斑(圖二D, E)，將由上而下第2及第3片葉之罹病面積百分比進行統計分析，可知TP3菌液處理的罹病面積百分比相對於對照處理組明顯較低，顯示TP3可抑制草莓葉枯病的病斑發展(圖二F)。

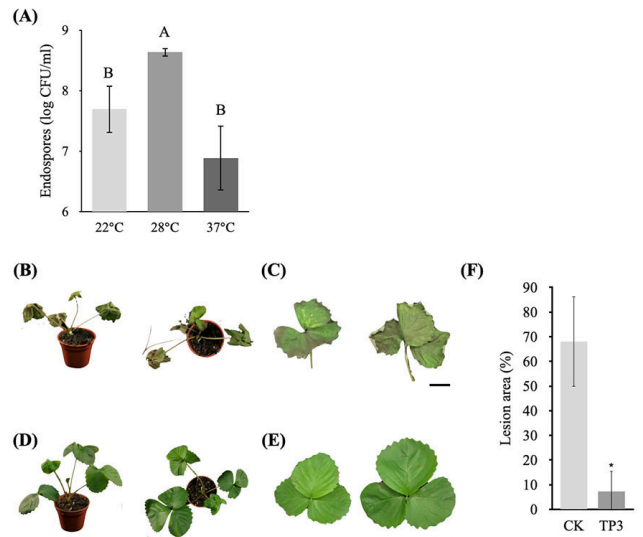


圖一、多黏類芽孢桿菌TP3抑制草莓葉枯菌分生孢子發芽及菌絲生長。(A) (B) TP3菌體抑制葉枯病菌孢子發芽情形；(C) (D) TP3之LB培養上清液抑制葉枯病菌孢子發芽情形；(E) (F) 黃豆粉培養基之TP3培養上清液抑制葉枯病菌孢子發芽情形；比例尺= 0.05 mm。(G)在相差顯微鏡下觀察TP3菌體及內生孢子，比例尺=0.01 mm。(H) TP3與葉枯病菌對峙培養，CK，無菌水對照組。誤差線：平均值標準誤差 (n=5)。

Fig. 1. *Paenibacillus polymyxa* TP3 inhibited conidial germination and mycelial growth of strawberry leaf blight pathogen. (A) (B) *P. polymyxa* TP3 inhibited spore germination of *Neopestalotiopsis rosae*; (C) (D) TP3 culture supernatant in LB inhibited spore germination of *N. rosae*; (E) (F) TP3 culture supernatant in soybean meal medium inhibited spore germination of *N. rosae*, scale bar= 0.05 mm. (G) Observation of *P. polymyxa* TP3 under phase contrast microscope, scale bar = 0.01 mm. (H) Dual culture of *P. polymyxa* TP3 and *N. rosae* CK, sterile H₂O. Standard error of means is indicated.

以黃豆粉培養基培養之多黏類芽孢桿菌TP3菌液噴灑處理有14天的持效性

為瞭解TP3具防治效果的合適施用時間模式，在接種葉枯病菌前不同天數進行一次噴灑處理，試驗結果得知接種前14天處理TP3對草莓葉枯病仍具有防治效果，但以接種前7天及10天



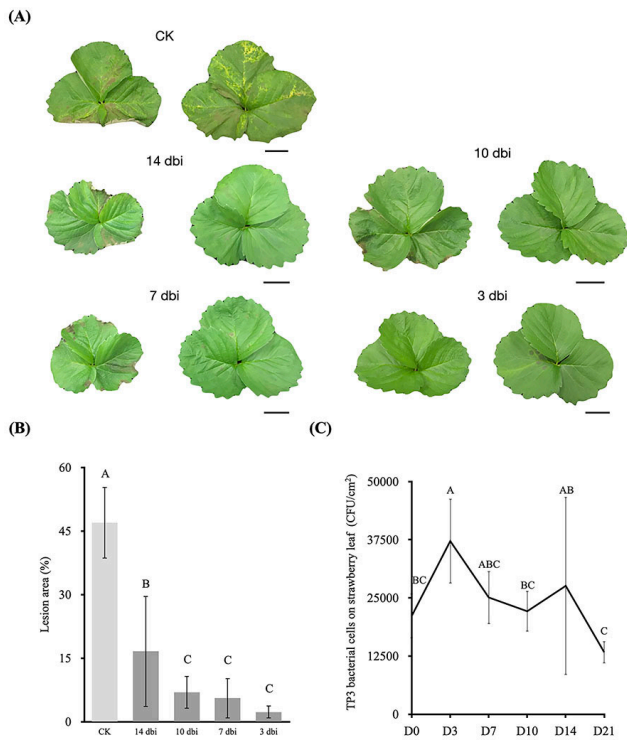
圖二、以黃豆粉培養基培養之多黏類芽孢桿菌TP3抑制草莓葉枯病之效果。(A) 2%黃豆粉培養基於不同溫度下培養TP3之內生孢子產量。(B) (C)及(D) (E)分別為接種前7天、3天以及1天進行水處理之對照組及TP3處理組的草莓苗罹病情形，比例尺= 2 cm。(F)草莓葉片之褐化面積百分比。CK，水處理對照組，誤差線：平均值標準誤差(n=5)。

Fig. 2. Suppression of strawberry leaf blight by *Paenibacillus polymyxa* TP3. (A) TP3 endospore production in 2% soybean meal medium at different temperatures. Data were statistically analyzed by one-way ANOVA and LSD post-hoc test. Same letter indicates the means are not significantly different ($p < 0.05$). (B)(C) and (D)(E) represent the direct and top views of the water control and TP3 treatment after fungal inoculation; scale bar=2 cm. (F) Percentage of lesion area in strawberry leaves was compared. CK, water control. Standard error of means is indicated (n = 5 plants).

處理TP3的防治效果較佳(圖三A, B)。使用對立復甦素具有抗性之TP3菌株以相同方法培養菌液，噴灑草莓苗表面，調查葉片之菌數變化情形，結果得知在噴灑處理TP3後第3天之TP3菌數有微幅上升，至第14天仍測得如初始施用之菌數，於處理TP3後第21天之菌數則明顯減少(圖三C)。

草莓園噴灑多黏類芽孢桿菌TP3內生孢子液可抑制葉枯病菌感染果實且可增加開花結果數量

為了在田間驗證TP3的防治功效，生產TP3內生孢子並製備成濃縮液以利攜帶至草莓園施用。將TP3內生孢子濃縮液稀釋為 3×10^7 CFU/ml，每7~10天施用一次。分別在處理3次及6次後，將草莓葉採回實驗室接種，兩次試驗的病斑面積在統計上並無顯著差異，但實測值皆低於對照組。施用TP3於草莓植株表面10次後，將植株上的果實採回實驗室接種葉枯病菌，結果得知經TP3處理之草莓植株的果實，病斑面積較小(圖四A)；並調查草莓園試驗植株的花及幼果數量，得知TP3處理的草莓植株有較多的花及幼果數量(圖四B)，與對照組有顯著差異。

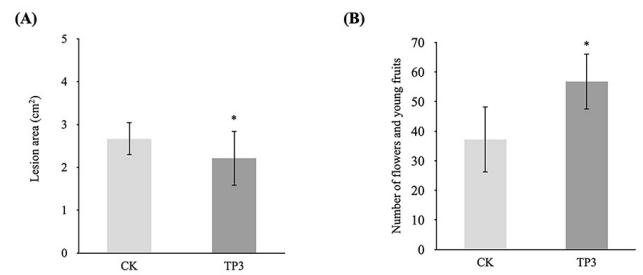


圖三、於接種前不同天數處理多黏類芽孢桿菌TP3對草莓葉枯病之防治效果。(A)接種葉枯病菌不同天數前處理TP3之草莓葉病徵，比例尺= 2 cm。(B)草莓葉褐化面積百分比，n=5。(C)處理後不同時間調查草莓葉之TP3菌數，n=4。誤差線:平均值標準誤差。

Fig. 3. Biocontrol of strawberry leaf blight by spray treatment of *Paenibacillus polymyxa* TP3 on different days before pathogen inoculation. (A) TP3 treatment at different days before inoculation with leaf blight pathogen (dbi). (B) Percentage of lesion area on strawberry leaves, n = 5 plants. (C) Number of TP3 bacterial cells on strawberry leaf different days after treatment, n = 4 plants. Standard error of means is indicated.

討論

芽孢桿菌內生孢子的培養多使用人工培養基，然其培養基成分對於工業化生產來說過於昂貴，因此發酵生產多以粗原料為培養基組成。粗原料的來源多為農產品加工副產物，雖然其成分組成可能因產地、季節而有所不同⁽²⁸⁾，但價格較為便宜，為符合經濟原則的培養基營養源。多黏類芽孢桿菌以固態發酵的方式生產時，利用新鮮梨渣作為主要粗原料，添加氮源如黃豆粉可明顯提高活菌數及內生孢子產量⁽³⁸⁾。黃豆粉為加工生產大豆沙拉油的副產物，含有高比例的蛋白質，常作為飼料用途⁽²⁸⁾。本研究以黃豆粉為培養多黏類芽孢桿菌內生孢子的粗原料，黃豆粉常被使用於生產有益微生物，以2%黃豆粉浸泡在無菌水中，過濾去除不可溶之固形物，即作為發酵培養基組成⁽²⁷⁾；本研究以小量震盪培養及桌上型發酵槽培養得知可如此運用黃豆粉作為發酵培養基之基礎配方，在22°C、28°C、37°C進



圖四、田間噴灑TP3對草莓果實之影響。(A)噴灑TP3 7次後採回果實接種葉枯病菌之罹病情形，n=15。(B)噴灑TP3 10次後對草莓植株花與幼果數量之影響，n=20。CK, 處理0.05% Silwet-L77為對照組，誤差線:平均值標準誤差。

Fig. 4. Effect of TP3 spray on strawberry fruits in the field. (A) Strawberry fruits were inoculated with *N. rosae* after TP3 treatment for 7 times, n=15. (B) Numbers of flowers and young fruits were measured after TP3 treatment of 10 times, n=20. CK, 0.05% Silwet-L77. Standard error of means is indicated.

行TP3之震盪培養，以28°C培養3天時可達到較高的內生孢子產量。Huo 等人(2012)於25°C、30°C及37°C培養多黏類芽孢桿菌之內生孢子，比較其耐熱性，得知以37°C培養之內生孢子有較佳的耐熱性，但其發芽率較低，指出培養溫度會影響多黏類芽孢桿菌之內生孢子特性，進而影響其應用⁽¹⁶⁾。本研究測試則得知28°C相較於20°C及37°C適合生產較高量的TP3內生孢子，也在草莓園獲得應用功效的驗證，包括促進草莓植株開花及結果，以及降低草莓果實受葉枯病菌感染的病斑發展。

農產品加工副產物木質纖維素生物質(lignocellulosic biomass)，為另一項經濟且容易取得的培養基粗原料，這類粗原料通常含有抑制微生物生長的物質，如呋喃醛(furfural)、香草酸(vanillic acid)等⁽²⁵⁾。Okonkwo 等人利用小麥桿水解物發酵培養多黏類芽孢桿菌 DSM 365，以生成丁二醇，作為生質能源的來源。由於DSM 365對於此等毒物質有相容性，且小麥桿水解物的木質纖維素生物質含量達60-80 g/L，故可用以發酵培養DSM 365生產高量的丁二醇⁽²⁴⁾。本研究利用黃豆粉為培養TP3之粗原料，此黃豆粉為大豆榨油後的副產物，可生產TP3內生孢子且菌量較LB培養基高，黃豆粉應無抑制微生物生長的物質或TP3可與之相容，所得菌液稀釋後也可施用於植物上，得以降低病原菌感染，也可促進開花結果，故黃豆粉粗原料十分適合於生產TP3的內生孢子以供田間病害防治之用途。

關於多黏類芽孢桿菌應用於植物病害防治之合適間隔時間的相關研究較少，本研究噴灑TP3內生孢子培養稀釋液於草莓葉表，14天後接種葉枯病菌仍有抑制病斑發展的效果，此施用間隔時間可做為田間應用之參考。將施用間隔時間的試驗結果與施用TP3後的草莓葉菌數調查結果比對，TP3於草莓葉上的菌數可維持14天，推測草莓葉之TP3菌數與病害防治效果密切相關。Salvatierra-Martinez等人篩選兩株液化澱粉芽孢桿菌，皆對灰黴病菌、鐮孢菌、菌核病菌有拮抗的能力，且能促進植

物生長，在固態培養基可生成較佳生物膜結構者，在植株上的纏聚能力較佳，在葉部與根部皆於施用後7天存在較多菌數，同時也有較佳的病害防治效果⁽²⁹⁾。而將兩株多黏類芽孢桿菌澆灌於花生植株土壤，140天後的根部菌數為處理日的100倍之多，生物膜形成能力較佳的菌株纏聚於花生根系的能力較佳，病原真菌(*Aspergillus niger*)於此菌處理後的根圈土壤菌數則較低，植株發病率也較低⁽¹⁵⁾，由此推測TP3在草莓上有良好的病害防治效果，可能與其在草莓上有良好的纏聚能力有關，而TP3施用後在草莓葉上的菌數維持情形，即可表示TP3在草莓葉部具有優秀的纏聚能力，TP3形成生物膜與病害防治的關係值得進一步探討。田間試驗中，為了方便攜帶，將TP3之內生孢子液以離心的方式製備成濃縮液，但同時也去除了培養上清液，由於培養上清液中含有TP3之抗菌代謝物，可能因此對田間試驗的病害防治效果稍有影響，使TP3田間處理的葉片防治試驗結果並不如盆栽試驗有顯著差異，又或者內生孢子的作用需要營養提供較容易呈現，故如果實上仍可見防治效果，後續可在TP3處理製劑上加加以改進之。

臺灣農政機關於植物保護資訊系統上公告多項可用於防治草莓葉枯病的殺菌劑，草莓為連續採收的小漿果作物，採收期的病害管理上需特別注重安全採收期，故提倡使用非化學農藥防治資材，以降低果實農藥殘留的風險。在泰國造成草莓葉枯病的擬盤多毛孢屬*Pestalotiopsis*病原菌，在59株分離株中有39株對於貝芬替(carbendazim)具有抗性，經由序列檢測得知在作用位點 β -tubulin生成相關基因突變，因而導致抗藥性⁽¹⁹⁾。而在臺灣草莓葉枯病菌對藥劑感受性方面的研究得知其對史托比類(strobilurin)的殺菌劑如百克敏，有一定程度的抗性⁽⁸⁾。TP3對多種化學殺菌劑與殺蟲劑具相容性⁽¹³⁾，可望應用於慣行農法減少化學農藥使用量，以降低病原菌產生抗藥性的風險。Amrutha及Vijayaraghavan (2018)對由新擬盤多毛孢屬真菌*Neopestalotiopsis clavispora*引起的草莓葉枯病，篩選具有防治效力的化學藥劑，也指出木黴菌*Trichoderma asperellum*能降低草莓葉枯病的發病程度⁽¹⁾；源自丁香、薑黃等植物之萃取物可抑制新擬盤多毛孢屬以及假擬盤多毛孢屬病原真菌之菌絲生長⁽¹⁰⁾；本研究則驗證多黏類芽孢桿菌可做為草莓葉枯病的生物性防治資材，可以低價粗原料組成之培養基生產內生孢子，期可促進菌株TP3的產量及田間應用。經本研究得知，多黏類芽孢桿菌TP3具有防治草莓葉枯病的應用性，先前研究亦得知菌株TP3可防治草莓炭疽病及灰黴病，故認為多黏類芽孢桿菌TP3極適合作為草莓病害的生物防治資材，以協助草莓苗及果實之生產，以及維護消費者安全及農業環境之永續利用。

謝 辭

本研究承農委會動植物防疫檢疫局及科技部計畫經費補

助，謹此致謝；並感謝臺大植微系歐海仁教授協助草莓葉枯病菌之鑑定，及林家華博士、李柏毅之實驗技術協助。

引用文獻

1. Amrutha, P., and Vijayaraghavan, R. 2018. Evaluation of fungicides and biocontrol agents against *Neopestalotiopsis clavispora* causing leaf blight of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.). Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 7:622-628.
2. Anand, R., and Chanway, C. 2013. N₂-fixation and growth promotion in cedar colonized by an endophytic strain of *Paenibacillus polymyxa*. Biol. Fertil. Soils 49:235-239.
3. Ash, C., Priest, F. G., and Collins, M. D. 1993. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test: proposal for the creation of a new group *Paenibacillus*. Antonie van Leeuwenhoek 64:253-260.
4. Baggio, J. S., Forcelini, B. B., Wang, N.Y., Ruschel, R. G., Mertely, J. C., and Peres, N. A. 2021. Outbreak of leaf spot and fruit rot in Florida strawberry caused by *Neopestalotiopsis* spp. Plant Dis.105:305 - 315.
5. Chamorro, M., Aguado, A., and De los Santos, B. 2016. First report of root and crown rot caused by *Pestalotiopsis clavispora* (*Neopestalotiopsis clavispora*) on strawberry in Spain. Plant Dis. 100:1495.
6. Chen, P. L. 2015. *Paenibacillus polymyxa* as a biocontrol agent against strawberry anthracnose. Master Thesis, National Taiwan University, Taipei, Taiwan. (in Chinese)
7. Chen, Y. T. 2013. Applied research of biological control of strawberry gray mold. Master Thesis, National Taiwan University, Taipei, Taiwan. (in Chinese)
8. Chung, P. C., Wu, H. Y., Jiang, S. J., and Tsai, C. Y. 2021. Emerging strawberry disease-identification of leaf blight pathogen and evaluation of control methods. MDARES Bulletin 10:1-14. (in Chinese)
9. Chung, P. C., Wu, H. Y., Wang, Y. W., Ariyawansa, H. A., Hu, H. P., Hung, T. H., Tzean, S. S., and Chung, C. L. 2020. Diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose in Taiwan and description of a new species, *Colletotrichum miaoliense* sp. nov. Sci. Rep. 10:14664.
10. Darapanit, A., Boonyuen, N., Leesutthiphonchai, W., Nuankaew, S., and Piasai, O. 2021. Identification, pathogenicity and effects of plant extracts on *Neopestalotiopsis* and *Pseudopestalotiopsis*

- causing fruit diseases. *Sci. Rep.* 11:22606.
11. Dondero, N. C., and Holbert, P. E. 1957. The endospore of *Bacillus polymyxa*. *J. Bacteriol.* 74:43-47.
 12. Fan, L., Zhang, D. J., Liu, Z. H., Tao, L. M., and Luo, Y. C. 2012. Antifungal lipopeptide produced by *Paenibacillus polymyxa* HY96-2. *Nat. Prod. Res. Dev.* 24:729 – 735.
 13. Fang, Q. 2021. Endospore production of *Paenibacillus polymyxa* TP3 and application in plant disease control. Master Thesis, National Taiwan University, Taipei, Taiwan. (in Chinese)
 14. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2021. FAOSTAT statistical database.
 15. Haggag, W. M., and Timmusk, S. 2008. Colonization of peanut roots by biofilm-forming *Paenibacillus polymyxa* initiates biocontrol against crown rot disease. *J. Appl. Microbiol.* 104:961 – 969.
 16. Huo, Z., Zhang, N., Raza, W., Huang, X., Yong, X., Liu, Y., Wang, D., Li, S., Shen, Q., and Zhang, R. 2012. Comparison of the spores of *Paenibacillus polymyxa* prepared at different temperatures. *Biotechnol. Lett.* 34:925 – 933.
 17. Kajimura, Y., and Kaneda M. 1996. Fusaricidin A, a new depsipeptide antibiotic produced by *Bacillus polymyxa* KT-8 taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activity. *J. Antibiot.* 49:129-135.
 18. Kajimura, Y., and Kaneda, M. 1997. Fusaricidins B, C and D, new depsipeptide antibiotics produced by *Bacillus polymyxa* KT-8: isolation, structure elucidation and biological activity. *J. Antibiot.* 50:220-228.
 19. Kummanid, J., Akimitsu, K., and Nalumpang, S. 2017. Mutations of the β -tubulin gene fragments from carbendazim-resistant isolates of *Pestalotiopsis* sp. causing strawberry leaf blight in Chiang Mai, Thailand. *J. Phytopathol.* 165:515 – 521.
 20. Lo, K. W. 2012. The cultivation and management of strawberry field. *Journal of Agricultural Technology in Taoyuan District No. 9-Strawberry: 9-13.* Taoyuan District Agricultural Research and Extension Station, Council of Agriculture (COA), Executive Yuan. (in Chinese)
 21. Lounaci, L., Guemouri-Athmani, S., Bouregghda, H., Achouak, W., and Heulin, T. 2016. Suppression of crown and root rot of wheat by the rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa*. *Phytopathol. Mediterr.* 55:355-365.
 22. Niu, B., Rueckert, C., Blom, J., Wang, Q., and Borriss, R. 2011. The genome of the plant growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* M-1 contains nine sites dedicated to nonribosomal synthesis of lipopeptides and polyketides. *J. Bacteriol.* 193:5862-5863.
 23. Niu, B., Vater, J., Rueckert, C., Blom, J., Lehmann, M., Ru, J. J., Chen, X. H., Wang, Q., and Borriss, R. 2013. Polymyxin P is the active principle in suppressing phytopathogenic *Erwinia* spp. by the biocontrol rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* M-1. *BMC Microbiol.* 13:137.
 24. Okonkwo, C. C., Ujor, V., and Ezeji, T. C. 2021. Production of 2,3-butanediol from non-detoxified wheat straw hydrolysate: impact of microbial inhibitors on *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. *Ind. Crops Prod.* 159:113047.
 25. Palmqvist, E., and Hahn-Hägerdal, B. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour. Technol.* 74:25-33.
 26. Phi, Q. T., Park, Y. M., Seul, K. J., Ryu, C. M., Park, S. H., Kim, J. G., and Ghim, S. Y. 2010. Assessment of root-associated *Paenibacillus polymyxa* groups on growth promotion and induced systemic resistance in pepper. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20:1605-1613.
 27. Prabakaran, G., Balaraman, K., Hoti, S. L., and Manonmani, A. M. 2007. A cost-effective medium for the large-scale production of *Bacillus sphaericus* H5a5b (VCRC B42) for mosquito control. *Biol. Control* 41:379 – 383.
 28. Ravindran, V., Abdollahi, M. R., and Bootwalla, S. M. 2014. Nutrient analysis, metabolizable energy, and digestible amino acids of soybean meals of different origins for broilers. *Poult. Sci.* 93:2567 – 2577.
 29. Salvatierra-Martinez, R., Arancibia, W., Araya, M., Aguilera, S., Olalde, V., Bravo, J., and Stoll, A. 2018. Colonization ability as an indicator of enhanced biocontrol capacity: An example using two *Bacillus amyloliquefaciens* strains and *Botrytis cinerea* infection of tomatoes. *J. Phytopathol.* 166:601 – 612.
 30. Tsai, S. H. 2016. Analysis of active antifungal compounds produced by *Paenibacillus polymyxa* TP3. Master thesis, National Taiwan University, Taipei, Taiwan. (in Chinese)
 31. Tsai, S. H., Chen, Y. T., Yang, Y. L., Lee, B. Y., Huang, C. J., and Chen, C. Y. 2022. The potential biocontrol agent *Paenibacillus polymyxa* TP3 produces fusaricidin-type compounds involved in the antagonism against gray mold pathogen *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 112:775-783.
 32. Vater, J., Niu B., Dietel, K., and Borriss, R. 2015. Characterization of novel fusaricidins produced by *Paenibacillus polymyxa*-M1 using MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Am.*

- Soc. Mass Spectrom. 26:1548-1558.
33. Wu, H. Y., Tsai, C. Y., Wu, Y. M., Ariyawansa, H. A., Chung, C. L., and Chung, P. C. 2021. First report of *Neopestalotiopsis rosae* causing leaf blight and crown rot on strawberry in Taiwan. *Plant Dis.* 105:487.
34. Xu, L., Wang, W., Wei, H. G., Shen, G. M., and Li, Y. G. 2006. Effect of *Paenibacillus polymyxa* HY96-2 on bacterial wilt of tomato. *Chin. J. Biol. Control* 22:216-220.
35. Xu, S., and Kim, B. S. 2016. Evaluation of *Paenibacillus polymyxa* strain SC09-21 for biocontrol of Phytophthora blight and growth stimulation in pepper plants. *Trop. Plant Pathol.* 41:162 - 168.
36. Yang, J., Kharbanda, P. D., and Mirza, M. 2004. Evaluation of *Paenibacillus polymyxa* PKB1 for biocontrol of *Pythium* disease of cucumber in a hydroponic system. *Acta Hort.* 635:59-66.
37. Yaoyao, E., Yuan, J., Yang, F., Wang, L., Ma, J., Li, J., Pu, X., Raza, W., Huang, Q., and Shen Q. 2017. PGPR strain *Paenibacillus polymyxa* SQR-21 potentially benefits watermelon growth by re-shaping root protein expression. *AMB Express* 7:104.
38. Zhao, G., Niu, M., Lu, S., and Guan, J. 2016. Cultivation of *Paenibacillus polymyxa* by solid-state fermentation of pear residues. *Trans. Chin. Soc. Agric. Eng.* 32:303-308 (in Chinese).

ABSTRACT

Chung Fong and Chao-Ying Chen. 2022. Application of *Paenibacillus polymyxa* TP3 for the control of strawberry leaf blight. *J. Plant Med.* 64(4): 131-138.

*Corresponding author, E-mail: cychen@ntu.edu.tw

Strawberry (*Fragaria × ananassa* Duchesne) is an important crop and Miaoli is the major area of fruit production in Taiwan. New emerging leaf blight disease incited by *Neopestalotiopsis rosae* causes immense economic loss in strawberry industry. In this study, whether *Paenibacillus polymyxa* TP3 can protect strawberry plants from infection of leaf blight pathogen was investigated. *P. polymyxa* TP3 showed inhibitory activity on spore germination and mycelial growth of *N. rosae*. In pot assay, spray with TP3 culture fluid in soybean meal medium, containing 80% endospores, could inhibit lesion development of strawberry leaf blight and had near 90% of

disease control efficacy. The suppression effect could be maintained while TP3 treatment at 10 days before fungal inoculation and attained 85% of disease control efficacy. Three days after TP3 spray, strawberry leaf had higher detected TP3 population of 35,000 CFU/cm² and the tenth day kept at 25,000 CFU/cm²; thus, TP3 bacterial population should be important for the disease control efficacy of strawberry leaf blight. Furthermore, spraying with TP3 endospore suspension at 10 day intervals in an experimental field for 7 times, *N. rosae*-incited lesion area on strawberry fruits from the TP3-treated plants could be reduced as observed 7 days after fungal inoculation. The numbers of flowers and green fruits increased as measured after TP3 application for 10 times. Thus, the pot and field assays indicated that TP3 in the form of endospores was applicable for the control of strawberry leaf blight to reduce infection of leaves and fruits. Further development of TP3 bioagent would be useful for strawberry nursery and fruit production.

Keywords: *Paenibacillus polymyxa*, endospores, biocontrol, strawberry leaf blight