

# *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05粉劑的種子處理於甘藍黑腐病之防治

蕭嘉祐、嚴若晴、彭安禮、陳柏葳、李佳容、林宜賢\*

國立屏東科技大學植物醫學系

聯絡作者，E-mail: yhlin@mail.npust.edu.tw

## 摘要

蕭嘉祐、嚴若晴、彭安禮、陳柏葳、李佳容、林宜賢。2022。*Bacillus amyloliquefaciens* PMB05粉劑的種子處理於甘藍黑腐病之防治。植物醫學64(4): 149-158。

由 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) 所引起的甘藍黑腐病是一種種子傳播性病害，會導致甘藍產量的嚴重損失。因此，減少種子上初始接種原的數量是控制此病害的一種有效策略。由之前的研究結果表明，在汙染有Xcc的種子上處理 *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05 的細菌懸浮液可以有效減少病害的發生。然而，這樣的處理仍然需要種子浸泡與後續乾燥的過程。在此限制下，本研究擬進一步探討是否利用發酵液結合噴霧乾燥的技術所製備完成的粉劑來處理種子後仍能有效減少黑腐病的發生。為了以麥芽糊精作為載體，本研究首先證明以麥芽糊精直接處理種子並不會抑制種子發芽。然後，將 *B. amyloliquefaciens* PMB05 發酵液和麥芽糊精的混合液進行噴霧乾燥，顯示在三種不同的入口溫度處理下，內生孢子數均達到  $10^9$  CFU/g 以上。進一步將粉劑處理於甘藍種子上，結果顯示入口溫度為  $140^\circ\text{C}$  與  $160^\circ\text{C}$  時，粉劑可以增加種子的發芽率。此外，本研究也推測來自於入口溫度  $120^\circ\text{C}$  的粉劑對種子發芽率的抑制可能是由於麥芽糊精在噴霧乾燥過程中所產生抑制物的影響。在後續以入口溫度  $160^\circ\text{C}$  處理之 PMB05 粉劑的分析結果顯示，PMB05 在此狀態下於  $26^\circ\text{C}$  和  $4^\circ\text{C}$  下可以保持在 90% 以上存活率達 16 週以上。最重要的是，將受到 Xcc 汙染的種子用 1% 的 PMB05 粉劑混合處理後，甘藍幼苗黑腐病的發病率與罹病度均顯著降低。此外，結果指出粉劑處理種子所獲得的葉片在利用細菌性誘引物誘導下，可觸發較強的植物免疫反應訊號，推測此種子處理可使甘藍得到更強的保護效果。綜上所述，本研究提供了噴霧乾燥之較佳條件並證明應用 *B. amyloliquefaciens* PMB05 粉劑來處理甘藍種子確實為防治甘藍黑腐病簡單又有效的方法。

關鍵詞：提升植物免疫反應、噴霧乾燥、粉劑、種子處理、農業管理

## 前言

甘藍 (*Brassica oleracea*) 為十字花科蕓薹屬的葉菜類，根據 2021 年農委會統計資料顯示在台灣的種植面積達 8 千公頃，總收成為 40 萬公噸，以宜蘭、雲林及南投等地為主要產區<sup>(3)</sup>。在甘藍種植過程中常受到細菌性黑腐病的危害，初期的典型病徵為葉片邊緣開始出現 V 字形壞疽，周圍組織黃化，嚴重時葉片掉落並造成植株死亡，使農民承受巨大的損失<sup>(20, 22)</sup>。此病害是由 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) 所引起，種子帶菌為此病原菌最主要的傳播路徑，在田間可由根部、傷口、水孔及葉片氣孔等部位侵入造成感染<sup>(30)</sup>。在目前推薦的防治方法上，以使用銅劑與抗生素最為常見<sup>(6)</sup>，在台灣目前的推薦用藥則為嘉賜銅 (FRAC D<sub>3</sub> + FRAC M<sub>1</sub>) 與維利黴素 (FRAC U18)<sup>(4)</sup>。而前述殺菌劑的廣泛使用也逐漸衍生出抗藥性菌株的產生而減損藥劑的防治效果<sup>(10, 29, 31)</sup>。在此情況下，開發其他有效的防治策略確實有其需求。在病害綜合管理概念中，利用有益微生物進行生物防治是一種有效的植物保護管理策略，也被認為是一種對環境更安全且友善的方式<sup>(24)</sup>。近年來研究指出許多微生物菌株可對 Xcc 具有良好的拮抗能力，進一步利用其細菌懸浮液處理於甘藍幼苗均可有效減少黑腐病的發生<sup>(17, 19-22)</sup>。由於甘藍黑腐病為種子傳播性病害，因此若能將拮抗微生物處理在種子上，將有可能在苗期即可發揮良好的保護效果。在利用 *Bacillus amyloliquefaciens* PMB04 與 PMB05 兩個菌株所進行對黑腐病菌的防治試驗中也證實，利用細菌懸浮液處理在汙染有 Xcc 的種子上可以有效降低罹病度<sup>(15)</sup>。然而，種子浸泡細菌懸浮液的方式對農民來說，種子處理後仍需後續的風乾處理而顯得較無實際應用的價值。除此之外，細菌懸浮液的製備到實際的應用也是必須克服的困難。因此，確實有必要開發一個簡單

處理的方式。

本研究擬利用已被證明可在多種植物上提升植物免疫訊號，並可有效防治多種病害發生的*Bacillus amyloliquefaciens* PMB05<sup>(8, 16, 33)</sup>，利用其發酵液進行後續防治技術的開發。近年來也有許多研究利用麥芽糊精為載體，以噴霧乾燥技術來作植物有益微生物的微膠囊，也證明可以增加微生物的存活時間<sup>(1, 2, 13)</sup>，且由於*Bacillus* spp.的細菌具有形成內生孢子的能力，有助於其在不同的環境中具較長時間的存活<sup>(23)</sup>。另有報告指出將*Bacillus* spp.的有益微生物進行噴霧乾燥後，可維持菌量達九個月以上<sup>(5, 18)</sup>。因此，若能將*B. amyloliquefaciens* PMB05製成發酵液後利用噴霧乾燥的方式製成粉劑，可能有助於菌量的維持外，若能後續將粉劑與種子的混合處理，可能成為一個防治甘藍黑腐病的簡單方法。本研究係利用麥芽糊精為載體，利用噴霧乾燥機以噴嘴上方不同的入口溫度製作粉劑後，應用於種子上評估其對甘藍種子發芽率與其在甘藍黑腐病上的防治效果。為了進一步了解粉劑處理後之甘藍幼苗上所帶有的*B. amyloliquefaciens* PMB05是否仍具有提升植物免疫的效果，後續應用代表植物免疫誘發指標訊號之癒傷葡聚糖累積的觀察來分析<sup>(8, 9, 16, 28, 32)</sup>。結合上述之研究來建立*B. amyloliquefaciens* PMB05粉劑製作的技術與評估其粉劑種子處理在防治甘藍黑腐病上之可行性。

## 材料與方法

### 供試植物材料與菌種

本研究使用之甘藍品種為初秋，所有試驗之進行均是將種子播種於泥炭土:珍珠石:蛭石以10:1:1 (v/v/v)混合而成的介質後進行後續的分析。本試驗所使用之兩個*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*菌株(Xcc14與Xcc15)與*Bacillus amyloliquefaciens* PMB05係實驗室所保存，在試驗開始前由保存管畫在nutrient agar (NA)培養基後，再於NA培養基經二次純培養後作為試驗用的材料。所有供試菌株之培養條件皆為28°C，2天。

### 麥芽糊精對甘藍種子發芽影響測試

為分析麥芽糊精或以其為載體所製成粉劑是否會影響甘藍種子之發芽率，將其以1% (w/w)混合處理於含有10 g甘藍種子的離心管中，使麥芽糊精或粉劑可以黏附於種子上。在分析麥芽糊精對種子發芽率影響試驗中，以不混合麥芽糊精組為對照組；在分析*B. amyloliquefaciens* PMB05粉劑或麥芽糊精粉劑對種子發芽率影響試驗中，則是以以噴霧乾燥時不同入口溫度所獲得的粉劑為處理組，未處理之甘藍種子作為對照組。發芽試驗之進行則是將種子分別點播於每穴4.5 × 5.0公分的穴盤，每處理分析72顆種子，視為一重複，每次試驗有4重複。播種好的種子隨後放置於28°C的生長箱 (F-1200, Hipoint, Taiwan)，每

天調查種子之發芽率，連續14天。

### *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05發酵液與粉劑之製備

為製備*B. amyloliquefaciens* PMB05之粉劑，須先製作發酵液。發酵液的製作係參考標準流程於30公升全自動滅菌發酵槽 (Biotop, BTF-B30L, Taiwan)進行，以獲得PMBFL-2A發酵液<sup>(16)</sup>。接著，於PMBFL-2A發酵液中添加20%的麥芽糊精(w/v)，均勻混合後經由噴霧乾燥機 (KohSieh, Taiwan)在固定流速與噴霧時間下，分別設定120°C、140°C及160°C三個不同入口溫度的條件來製備粉劑，可分別獲得SD-120、SD-140及SD-160三種粉劑。將所收集之粉劑以稀釋平板法評估其菌量。回收率的計算公式為：回收率(%) = (收集粉劑總重量/噴霧乾燥前添加麥芽糊精之總重量) × 100%。每處理為三重複。而單純麥芽糊精之粉劑，則是製備於蒸餾水中20%之麥芽糊精，再分別於前述三個入口溫度進行噴霧乾燥，所獲得的粉劑分別為M-120、M-140及M-160。

### *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05粉劑之存活率分析

為分析*B. amyloliquefaciens* PMB05粉劑之穩定性，利用入口溫度為160°C所獲得之粉劑 (SD-160)進行測試。首先，將10 g粉劑分裝至50 mL離心管中，分別存放於26°C與4°C之定溫箱，每4週取樣一次。菌量之評估係利用1 g粉劑進行系列稀釋後，再取0.1 mL稀釋液塗抹於NA平板上，培養兩天後計算菌落數，每個溫度不同的時間點各3重複。所獲得每個時間的所得的菌量後再利用初始菌量來推算其存活率，共計分析16週。

### *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05粉劑種子處理對甘藍黑腐病之防治試驗

為測試*B. amyloliquefaciens* PMB05粉劑之防治效果，本試驗以預先處理*X. campestris* pv. *campestris*後所獲得之帶菌種子進行分析。帶菌種子為分別將Xcc14與Xcc15二個菌株先於NA平板增量培養2天後，利用含0.1% carboxymethylcellulose sodium (Sigma, USA) 之無菌水溶液製備OD600為0.3之細菌懸浮液，此時細菌菌量濃度約為 $1 \times 10^8$  CFU/mL。在種子處理前，先將1.6 g種子浸泡於1% (v/v)之次氯酸鈉水溶液中消毒5 min，再以無菌水漂洗三次後，放置於風乾機(DHR-20TW, Cuisinart, USA)乾燥1.5 hr，即視為無菌之種子。將此無菌種子浸泡於前述製備之10 mL細菌懸浮液中並以120 rpm振盪處理1 hr。隨後，在將處理後的種子放置於風乾機(DHR-20TW, Cuisinart, USA)中1.5 hr吹乾種子，即為供後續試驗使用的帶菌種子。將PMB05粉劑SD-160以1% (w/w) 與帶菌種子均勻混合處理，即為粉劑防治處理組，對照組則為不處理粉劑之帶菌種子。將甘藍種子分別點播於穴盤後種植於溫室，於4週的期間內調查其真葉之病徵並計算罹病率與罹病度。罹病度 (disease severity)之計算係依據病害指數 (disease index)將黑腐病之病徵嚴重程度分成三級，0級為無病徵；1級為些許水浸狀黃化病徵；2級為葉片邊緣有明顯小

面積的黃化；3級為葉緣有v字型的壞疽病徵。罹病度計算方式為：罹病度 (%) =  $[(0 \times N_0 + 1 \times N_1 + 2 \times N_2 + 3 \times N_3) / (3 \times NT)] \times 100\%$ 。每株植株取1片葉片。每處理30顆種子為一重複，每處理4重複。

### 癒傷葡聚醣累積分析

為評估 *B. amyloliquefaciens* PMB05 粉劑處理於甘藍種子後，是否也能夠使其幼苗在細菌誘引物存在下強化植物免疫訊號，後續應用代表植物免疫誘發指標訊號之癒傷葡聚醣累積的觀察來分析。首先，先將所製備之 *B. amyloliquefaciens* PMB05 粉劑SD-160以1% (w/w)與甘藍種子混合進行處理，即為粉劑處理組並種植於溫室中。進一步利用根據 *X. campestris* pv. *campestris* B305所發表鞭毛蛋白(GenBank accession number DQ356465)，依其flg22<sub>xcc</sub> (QRLSSGLRINSKDDAAGLAIS)之序列委由 Life Tein LCC (South Plainfield, USA)合成，作為本研究供試觸發植物免疫反應之細菌性誘引物。首先，利用針頭於葉片上戳出孔洞，再將溶解於25 mM Tris HCl buffer (pH 7.5)之0.5 μM flg22<sub>xcc</sub> 以注射接種至4週大的葉片內。經8 hr反應後，切取葉片成葉絲，並以95%酒精浸泡2 min後再置換成70%酒精處理16 hr以褪去葉綠素。經0.1 M磷酸緩衝液(1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 93.2 mL, 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6.8 mL, 1 L H<sub>2</sub>O, pH 8.0)漂洗後，再利用含0.01% analine blue (Sigma, USA)之磷酸緩衝液於黑暗中染色2 hr。進一步以帶有濾鏡波長為 Excitation/Emission (340-380 nm/400-425nm)之螢光顯微鏡 (Leica, Germany)觀察，並將影像利用 ImageJ軟體進行分析與計算螢光亮度，每次試驗的單一處理取10張不同位置之影像為重複，並以三次重複試驗的結果進行統計分析。

### 統計分析

本試驗結果以SPSS (Statistical Product and Service Solutions) 進行評估。利用軟體中單因子變異數分析 (One-Way ANOVA) 之Tukey's HSD (Honestly Significant Difference)或Student's t-test，進行分析數據間之顯著差異(P < 0.05)。

## 結 果

### 不同入口溫度對 *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05 在粉劑中的影響

將PMB05發酵液混合麥芽糊精後，經三個不同入口溫度所製成粉劑(SD-120、SD-140及SD-160)。在菌量上的結果顯示，三個入口溫度所獲得的粉劑均可將原有液態發酵液 (PMBFL-2A)中的菌量由8.60 (Log CFU/mL)濃縮至粉劑中的9.37-9.42 (Log CFU/g)，且三個處理溫度間的菌量無明顯差異。同時，三個處理溫度的回收率也在47.36%至50.17%，三個入口溫度間亦無顯著差異(表一)。

表一、在噴霧乾燥器中不同入口溫度對細菌族群和發酵液回收率的影響。

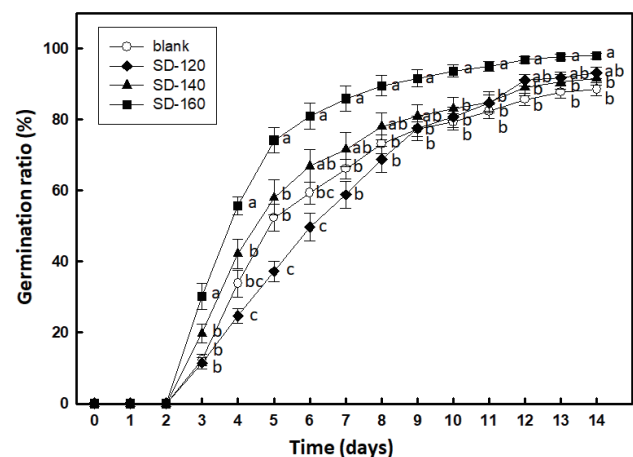
**TABLE 1.** Effects different inlet temperatures on bacterial population and the conversion rate from fermentation broth in a spray dryer.

Treatments	Cells (Log CFU/g)	Conversion (%)
PMBFL-2A	8.60 ± 0.45	-
SD-120	9.42 ± 0.12 <sup>a</sup>	49.34% ± 0.02 <sup>a</sup>
SD-140	9.42 ± 0.12 <sup>a</sup>	47.36% ± 0.02 <sup>a</sup>
SD-160	9.37 ± 0.36 <sup>a</sup>	50.17% ± 0.01 <sup>a</sup>

Different letters behind values indicate significant differences between different treatments based on Tukey's HSD test (P < 0.05).

### *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05 在粉劑處理對甘藍種子發芽之影響

將不同入口溫度所製作出之 *B. amyloliquefaciens* PMB05 粉劑 (SD-120、SD-140及SD-160)處理甘藍種子後，分析14天內對發芽率的影響。結果顯示，未處理有粉劑的對照組在種植後第11天有超過80.0%的發芽率，到14天最高為88.5%；SD-120、SD-140及SD-160三個處理組超過80.0%以上發芽率的時間分別為10天、9天及6天；同時，在第14天之發芽率分別為93.2%、91.7%及97.9%，SD-160處理組為最佳且顯著高於對照組與其他處理組。然而，在這些處理中，SD-120和SD-140均與未處理的對照組間無顯著差異(圖一)。為進一步了解 *B. amyloliquefaciens* PMB05 在所製成SD-120和SD-140粉劑中促進



圖一、不同入口溫度的 *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05 粉劑對甘藍種子發芽率的影響。

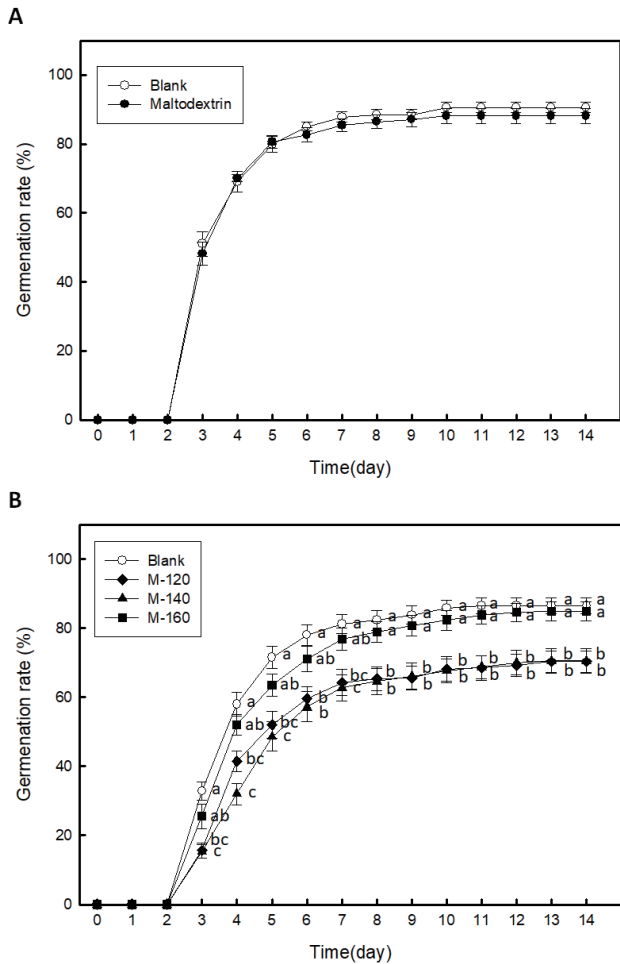
**Fig. 1.** Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05 powders from different inlet temperatures on the germination ratio of cabbage seeds. Cabbage seeds were mixed with 1% (w/w) of *B. amyloliquefaciens* PMB05 powder from inlet temperature at 120 °C (SD-120), 140 °C (SD-140), or 160 °C (SD-160) in different treatments. Different letters indicated significant differences between treatments at each day based on Tukey's HSD test (P < 0.05).



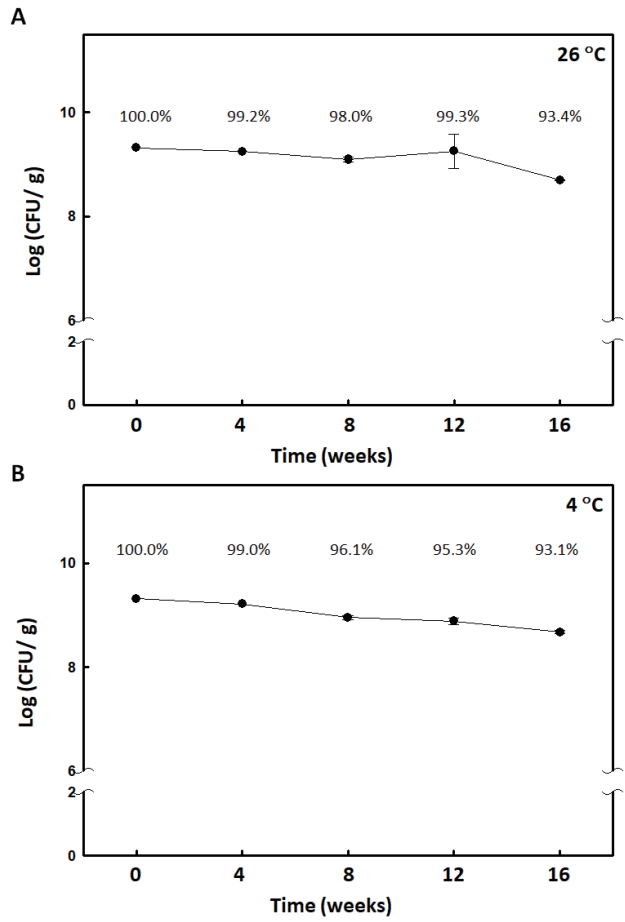
發芽能力消失的原因是否與麥芽糊精有關，結果顯示麥芽糊精處理組與為處理的對照組在14天後，種子發芽率分別為87.9%與90.6%，兩者間並無顯著差異(圖二A)。接著測試經不同入口溫度噴霧乾燥後的麥芽糊精(M-120、M-140及M-160)對甘藍種子發芽率上的影響，結果顯示M-160處理組對於種子發芽率與未處理的對照組相比，在第14天之種子發芽率分別為84.9%與86.5%，兩者間不具顯著差異。然而，M-120與M-140處理組在第14天時之甘藍種子發芽率分別為70.3%與70.6%，兩處理均顯著低於對照組(圖二B)。

**Bacillus amyloliquefaciens** PMB05粉劑之存活率

將前述由入口溫度160 °C所製作出之*B. amyloliquefaciens*



圖二、麥芽糊精處理對甘藍種子發芽率之影響。  
**Fig. 2.** Effects of treatments with maltodextrin on the seed germination ratio of cabbage. Panel A shows the seed treatment with 1% (w/w) of maltodextrin. Panel B shows the seed treatments with re-spray drying 1% (w/w) of maltodextrin from inlet temperature at 120 °C (M-120), 140 °C (M-140), or 160 °C (M-160). Different letters indicate significant differences between treatments at each day based on Tukey's HSD test ( $P < 0.05$ ).



圖三、不同儲存溫度對SD-160粉劑中*Bacillus amyloliquefaciens* PMB05族群變化之影響。  
**Fig. 3.** Effect of different storage temperatures on the population change of *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05 in SD-160 powder. Panel A and B reveal the SD-160 was placed in an incubator at 26 °C and 4 °C, respectively. Values indicate the means of survival rates.

PMB05粉劑 (SD-160)分別儲存於26 °C與4 °C，每4週測試其菌量。結果顯示SD-160的初始菌量為9.31 (Log CFU/g)，於26 °C的條件下儲存至第12週的菌量為9.25 (Log CFU/g)，相較於初始菌量之存活率達99.3%，第16週之菌量為8.70 (Log CFU/g)，存活率則為93.4% (圖三A)。另於4 °C條件下，可見菌量緩步下降，第12週的菌量為8.88 (Log CFU/g)，相較於初始菌量之存活率為95.3%，在存放至第16週後的菌量則為8.68 (Log CFU/g)，存活率為93.1% (圖三B)。在兩個測試的存放溫度條件下，第16週的存活率均達90%以上。

**Bacillus amyloliquefaciens** PMB05粉劑種子處理對甘藍黑腐病之防治

為評估PMB05粉劑對甘藍黑腐病之防治效果，利用入口溫度160 °C所製作出之*B. amyloliquefaciens* PMB05粉劑 (SD-

160)處理於汙染有*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Xcc14或Xcc15菌株之帶菌種子來分析其防治效果。在汙染有Xcc14菌株的防治結果顯示，相較於對照組76.7%與69.0%的罹病率與罹病度，SD-160粉劑處理組可分別顯著減少至24.4%與23.0% (圖四A與B)。另外，在汙染有Xcc15菌株的防治結果顯示，相較於對照組83.7%與74.2%的罹病率與罹病度，SD-160粉劑處理組可分別顯著減少至24.6%與18.9% (圖四C與D)。

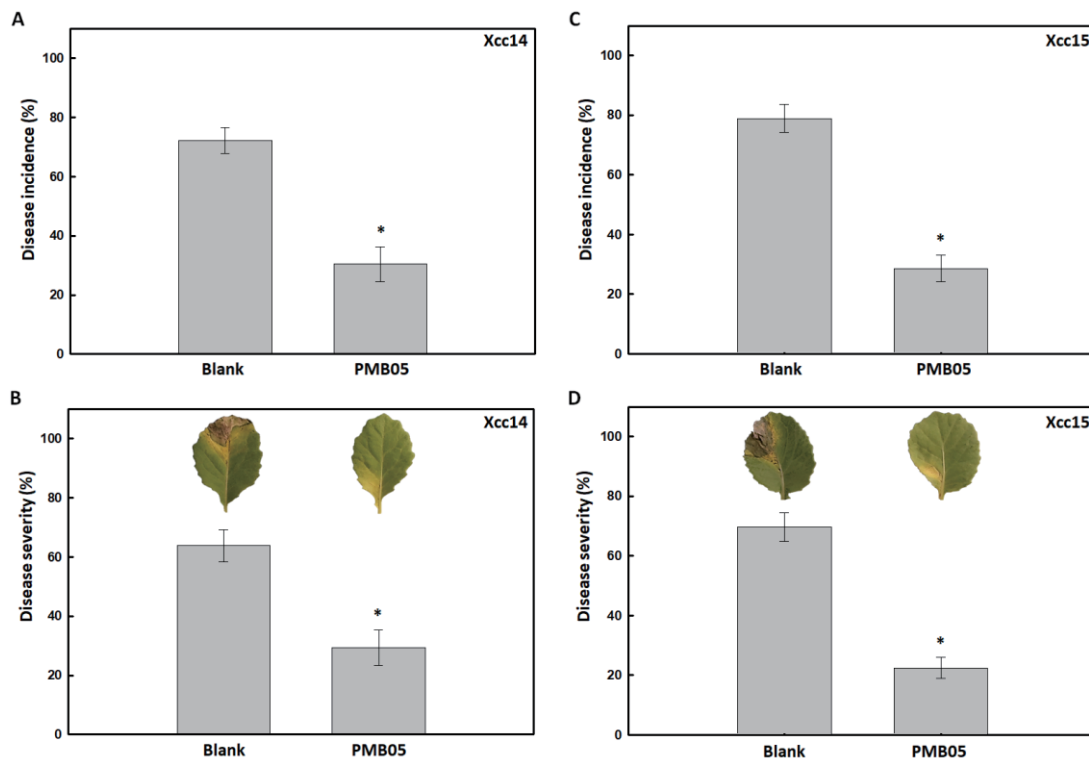
#### *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05粉劑種子處理幼苗對植物免疫訊號之誘發

在未處理粉劑的對照組葉片上，相較於僅注射緩衝液，flg22Xcc的注射處理確實可以誘導癒傷葡聚糖累積的螢光亮點 (圖五A)，將螢光訊號進行量化後，以Tris-HCl緩衝液作為基準，flg22<sub>Xcc</sub>處理組所誘導的相對螢光量為167.7倍 (圖五B)。在處理有SD-160粉劑的幼苗葉片上，在單獨注射緩衝液後亦無法誘導癒傷葡聚糖累積的螢光亮點，但在flg22<sub>Xcc</sub>的注射處理後確實可以明顯誘導出癒傷葡聚糖的累積的螢光訊號，也較未處理粉劑組的螢光訊號強，進一步量化後，以前述未處理粉劑對照組之Tris-HCl緩衝液的數值為基準，SD-160組中flg22<sub>Xcc</sub>處理組所誘導的相對螢光量為390.4倍。SD-160粉劑處理組的幼苗葉片

相較於未處理粉劑組的幼苗葉片，在flg22<sub>Xcc</sub>注射後的癒傷葡聚糖螢光訊號增加了2.33倍。

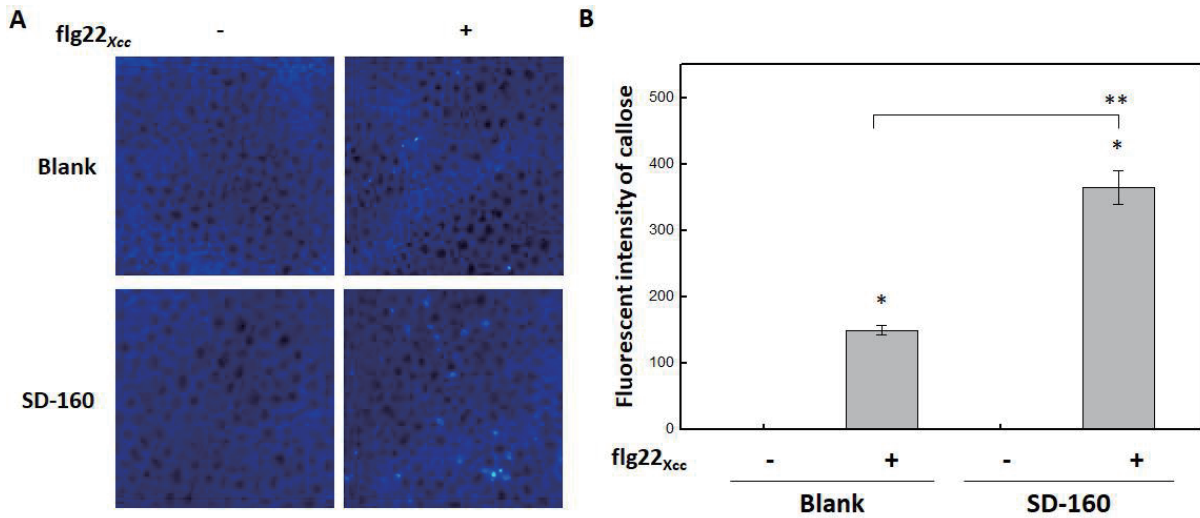
## 討 論

甘藍黑腐病為甘藍栽培生產過程中的重要種子傳播型病害，目前多以殺菌劑、熱水處理及抗病品種等多種方式進行防治<sup>(6)</sup>。然而，在田間的發病仍以殺菌劑中的抗生素與銅劑為主要的選擇標的<sup>(4)</sup>。雖然大部分這些藥劑都具有較高的安全性，但是在環境中的風險也是必須加以考量，如銅劑的蓄積可能會對植物造成毒害及病原菌對銅劑與抗生素具有抗性菌株的衍生等<sup>(10, 14, 29, 31)</sup>。由此可說明甘藍黑腐病的防治應朝向結合多種方法的整合性管理是比較合理的方式。因為種子帶有的甘藍黑腐病菌為田間病害發生的主要來源，除了利用溫水處理來殺死部分病原菌外，若能利用種子處理技術減少病原菌之汙染或在苗期即能發揮保護之作用，也是管理此病害的可行思考方向。目前在甘藍上利用種子處理來增加其對非生物性逆境的忍受性、增加化合物的豐富度及促進生長<sup>(7, 11, 12, 25)</sup>。因此，在研發防治甘藍黑腐病的方法中，種子處理是有可行性的。在之前



圖四、利用*Bacillus amyloliquefaciens* PMB05所製成之SD-160粉劑處理種子後對防治甘藍黑腐病之影響。

**Fig. 4.** Effects of seed treatment with SD-160 powder prepared by *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05 on the control of black rot of cabbage. The assay was performed on the infested seeds with *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strain Xcc14 or Xcc15. The treatments were carried out by mixing the SD-160 powder and distinct infested seeds. Disease incidence (A and C) and disease severity (B and D) were evaluated 4 weeks after sowing. \* indicates that the treatments have significant differences compared with blank treatments by *t*-test ( $P < 0.05$ ).



圖五、甘藍種子處理*Bacillus amyloliquefaciens* PMB05之SD-160粉劑後對其葉片在flg22<sub>Xcc</sub>誘導下癒傷葡聚醣累積之影響。

**Fig. 5.** Effect of seeds treatment with SD-160 powder of *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05 on callose deposition in leaves upon eliciting by flg22<sub>Xcc</sub>. Panels A and B show the images and fluorescent intensity of callose deposition, respectively. The fluorescent intensity of callose deposition was calculated by ImageJ. \* indicates that the treatments have significant differences compared with blank treatments in the same treated seedlings by *t*-test ( $P < 0.05$ ). And, \*\* indicates that the treatment with SD-160 have significant differences compared with blank treatment upon flg22<sub>Xcc</sub> activation by *t*-test ( $P < 0.05$ ).

的研究指出，應用*B. amyloliquefaciens* PMB05細菌懸浮液處理在污染有*X. campestris* pv. *campestris*的種子上，均能有效減少黑腐病在幼苗上的罹病率與罹病度<sup>(15)</sup>。利用細菌懸浮液的處理是有效的，然而在處理過程中除浸泡的時間外，接著仍要將種子風乾才能維持防治效果的穩定性，是十分不便與耗時的。有許多研究利用麥芽糊精為載體以噴霧乾燥技術來製作植物有益微生物的微膠囊<sup>(1, 2)</sup>。本研究利用已在田間證明可防治檸檬潰瘍病所發展出的發酵液<sup>(16)</sup>，將其後續利用麥芽糊精以噴霧乾燥的方式製成粉劑進行評估，且顯示本研究利用的三個不同的入口溫度，粉劑可達 $10^9$  CFU/g以上的菌量，且在回收率上並無明顯差異。隨後將不同入口溫度所製作出之PMB05粉劑處理於甘藍種子上，在發芽率的結果中發現僅入口溫度為140°C (SD-140)與160°C (SD-160)粉劑可促進種子發芽，但入口溫度為120°C (SD-120)之粉劑處理卻會抑制種子的發芽。由此結果說明，利用麥芽糊精製備PMB05粉劑至少需要140°C以上的入口溫度，且以160°C為最佳。此外，由前述結果推測麥芽糊精可能會抑制種子發芽。然而，直接將麥芽糊精直接處理甘藍種子卻不會抑制種子發芽。由此進一步推測可能為麥芽糊精在噴霧乾燥過程中所產生的抑制物。因此，直接將麥芽糊精製備為水溶液後，以三個入口溫度製成粉劑後(M-120、M-140及M-160)，再處理於甘藍種子上。結果顯示僅M-160處理對種子發芽不具有抑制效果，可推測麥芽糊精在噴霧乾燥加熱的過程中較低的加熱溫度可會產生抑制甘藍種子發芽的物質，而入口溫度達160°C時可使抑制作用消失，因此後續的試驗均以SD-160粉劑進行探討。

在Eski等人利用*Bacillus thuringiensis*進行噴霧乾燥的研

究結果指出，分別在22°C與4°C的條件儲存九個月後，仍分別有90%與95%的菌量，並推測較低的溫度下可儲存更長的時間<sup>(5)</sup>。本研究使用的SD-160粉劑儲存16週後不論在26°C或4°C皆仍有90%以上的菌量，此結果雖然與發酵液的存活能力相當<sup>(16)</sup>，但可說明SD-160粉劑的形式可以維持*B. amyloliquefaciens* PMB05長時間的存活外，也減少了儲存所需的空間。

在利用SD-160對甘藍黑腐病的防治結果顯示，不論甘藍種子預先以*X. campestris* pv. *campestris*之Xcc14或Xcc15菌株汙染種子，只要處理有SD-160後即能顯著降低甘藍幼苗黑腐病的罹病率與罹病度，且大部分的幼苗仍維持健康的狀態。由此可推測利用SD-160粉劑可較大規模的混合處理污染有甘藍黑腐病菌的種子，並可有效防治黑腐病在田間的發生。在前人研究報告中指出使用溫湯浸種可有效減少甘藍黑腐的發生<sup>(26)</sup>，若配合50°C的醋酸銅溶液浸泡雖然可大幅減少病害的發生，但卻會造成甘藍種子發芽率的下降<sup>(27)</sup>；在本研究使用SD-160粉劑的處理除可降低甘藍黑腐病的發生外，還能提升甘藍種子發芽率，因此我們認為粉劑的處理可為防治甘藍黑腐病簡單又有效的方法。此外，由於*B. amyloliquefaciens* PMB05已被證明可有效提升植物免疫反應中的PAMPs-triggered immunity (PTI)路徑，且可以利用癒傷葡聚醣累積等指標訊號的增強來確認PTI的提升<sup>(8, 15, 16, 33)</sup>。更進一步在處理有SD-160粉劑之甘藍種子，以其播種後4週大的幼苗葉片利用細菌性誘引物(fl g22<sub>Xcc</sub>)誘導後，相較於未處理粉劑的對照組，可觸發更多癒傷葡聚醣累積的螢光訊號，由此推測種子處理粉劑後，*B. amyloliquefaciens* PMB05仍可有良好的存活並能在甘藍幼苗葉片上有效提升細菌性誘引物所誘導的植物免疫訊號，使甘藍得到更全面的保護效果，以達

到防治黑腐病發生的效果。

綜合以上結果，本研究提供了*B. amyloliquefaciens* PMB05 利用噴霧乾燥製成粉劑之較佳條件及證明應用此粉劑來處理甘藍種子確實為防治甘藍黑腐病簡單又有效的方法。

## 引用文獻

- Baena-Aristizábal, C. M., Foxwell, M., Wright, D., and Villamizar-Rivero, L. 2019. Microencapsulation of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with guar gum: Preliminary approach using spray drying. *J. Biotechnol.* 302:32-41.
- Campos, D. C., Acevedo, F., Morales, E., Aravena, J., Amiard, V., Jorquera, M. A., Inostroza, N. G., and Rubilar, M. 2014. Microencapsulation by spray drying of nitrogen-fixing bacteria associated with lupin nodules. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30:2371-2378.
- COA. 2021. COA yearbook, Council of Agriculture, Executive Yuan, Taiwan. Annu. Rep. Agri. Stat.
- COA. 2022. Plant Protection Information System.
- Eski, A., Demirbağ, Z., and Demir, S. 2019. Microencapsulation of an indigenous isolate of *Bacillus thuringiensis* by spray drying. *J. Microencapsulation* 36:1-9.
- Gupta, M., Vikram, A., and Bharat, N. 2013. Black rot-A devastating disease of crucifers: a review. *Agric. Rev.* 34:269-278.
- Hassini, I., Baenas, N., Moreno, D. A., Carvajal, M., Boughanmi, N., and Martinez Ballesta, M. D. C. 2017. Effects of seed priming, salinity and methyl jasmonate treatment on bioactive composition of *Brassica oleracea* var. capitata (white and red varieties) sprouts. *J. Sci. Food Agric.* 97:2291-2299.
- Ho, T.-H., Chuang, C.-Y., Zheng, J.-L., Chen, H.-H., Liang, Y.-S., Huang, T.-P., and Lin, Y.-H. 2020. *Bacillus amyloliquefaciens* strain PMB05 intensifies plant immune responses to confer resistance against bacterial wilt of tomato. *Phytopathology* 110:1877-1885.
- Hong, C.-Y., Zheng, J.-L., Chen, T.-Y., Chao, H.-R., and Lin, Y.-H. 2018. PFLP-intensified disease resistance against bacterial soft rot through MAPK pathway in PAMP-triggered immunity. *Phytopathology* 108:1467-1474.
- Hsiao, Y. M., Liu, Y. F., Lee, P. Y., Hsu, P. C., Tseng, S. Y., and Pan, Y. C. 2011. Functional characterization of *copA* gene encoding multicopper oxidase in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J. Agric. Food Chem.* 59:9290-9302.
- Hussain, Z., Khan, M. A., Iqbal, F., Raffi, M., and Hafeez, F. Y. 2019. Electrospun microbial-encapsulated composite-based plasticized seed coat for rhizosphere stabilization and sustainable production of canola (*Brassica napus* L.). *J. Agric. Food Chem.* 67:5085-5095.
- Kamran, M., Wang, D., Xie, K., Lu, Y., Shi, C., El Sabagh, A., Gu, W., and Xu, P. 2021. Pre-sowing seed treatment with kinetin and calcium mitigates salt induced inhibition of seed germination and seedling growth of choysum (*Brassica rapa* var. parachinensis). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 227:112921.
- Kawakita, R., Leveau, J. H. J., and Jeoh, T. 2021. Optimizing viability and yield and improving stability of Gram-negative, non-spore forming plant-beneficial bacteria encapsulated by spray-drying. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 44:2289 - 2301.
- Kumar, V., Pandita, S., Sidhu, G. P. S., Sharma, A., Khanna, K., Kaur, P., Bali, A. S., and Setia, R. 2021. Copper bioavailability, uptake, toxicity and tolerance in plants: A comprehensive review. *Chemosphere* 262:127810.
- Li'aini, A. S., Lin, Y.-H., Huang, T.-C., and Sulistyowati, L. 2017. Application of *Bacillus amyloliquefaciens* to control black rot disease on cabbage caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J. Plant Med.* 59:39-44.
- Lin, K.-W., Liang, Y.-S., Hsiao, C.-Y., Wang, F., Huang, T.-P., and Lin, Y.-H. 2021. Application of fermentation broth of *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05 to control bacterial canker disease on lemon. *J. Plant Med.* 63:17-26.
- Liu, K., Garrett, C., Fadamiro, H., and Kloepper, J. W. 2016. Antagonism of black rot in cabbage by mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *BioControl* 61:605-613.
- Ma, X., Wang, X., Cheng, J., Nie, X., Yu, X., Zhao, Y., and Wang, W. 2015. Microencapsulation of *Bacillus subtilis* B99-2 and its biocontrol efficiency against *Rhizoctonia solani* in tomato. *Biol. Control* 90:34-41.
- Massomo, S. M. S., Mortensen, C. N., Mabagala, R. B., Newman, M.-A., and Hockenhull, J. 2004. Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of cabbage in Tanzania with *Bacillus* strains. *J. Plant Pathol.* 152:98-105.
- Mishra, S., and Arora, N. K. 2012. Management of black rot in cabbage by rhizospheric *Pseudomonas* species and analysis of 2, 4-diacetylphloroglucinol by qRT-PCR. *Biol. Control* 61:32-39.
- Mácha, H., Marešová, H., Juříková, T., Švecová, M., Benada, O., Škríba, A., Baránek, M., Novotný, Č., and Palyzová, A. 2021. Killing effect of *Bacillus velezensis* FZB42 on a



- Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) strain newly isolated from cabbage *Brassica Oleracea* Convar. *Capitata* (L.): A metabolomic study. *Microorganisms* 9:1410.
22. Monteiro, L., Mariano, R. L. R., and Souto-Maior, A. M. 2005. Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48:23-29.
  23. Nicholson, W. L. 2002. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cell. Mol. Life Sci.* 59:410-416.
  24. Okorski, A., Oszako, T., Nowakowska, J. A., and Pszczołowska, A. 2014. The possibilities of biologically protecting plants against diseases in nurseries, with special consideration of Oomycetes and Fusarium fungi. *For. Res. Pap.* 75:301-321.
  25. Othman, A. J., Eliseeva, L. G., Molodkina, P. G., Ibragimova, N. A., and Duksi, F. M. 2022. Dataset on the effect of soaking Kale (*Brassica Oleracea* L. var. *acephala* DC.) seeds in solution based on amorphous silicon dioxide on the bioactive components and physiological growth parameters. *Data Brief.* 40:107789.
  26. Pečenka, J., Bytešníková, Z., Kiss, T., Peňázová, E., Baránek, M., Eichmeier, A., Tekielska, D., Richtera, L., Pokluda, R., and Adam, V. 2021. Silver nanoparticles eliminate *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in cabbage seeds more efficiently than hot water treatment. *Mater. Today Commun.* 27:102284.
  27. Schaad, N. W., Gabrielson, R. L., and Mulanax, M. W. 1980. Hot acidified cupric acetate soaks for eradication of *Xanthomonas campestris* from crucifer seeds. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:803-807.
  28. Su, Y.-H., Hong, C.-Y., and Lin, Y.-H. 2014. Plant ferredoxin-like protein enhances resistance to bacterial soft rot disease through PAMP-triggered immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Plant Pathol.* 140:377-384.
  29. Sundin, G. W., and Bender, C. L. 1995. Expression of the *strA-strB* streptomycin resistance genes in *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas campestris* and characterization of IS6100 in *X. campestris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2891-2897.
  30. Vicente, J. G., and Holub, E. B. 2013. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Mol. Plant Pathol.* 14:2-18.
  31. Voloudakis, A. E., Bender, C. L., and Cooksey, D. A. 1993. Similarity between copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* and *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1627-1634.
  32. Wang, Y.-H., Lai, I.-L., Zheng, J.-L., and Lin, Y.-H. 2019. Using dynamic changes of chlorophyll fluorescence in *Arabidopsis thaliana* to evaluate plant immunity-intensifying *Bacillus* spp. strains. *Phytopathology* 109:1566-1576.
  33. Wu, Y.-M., Chen, X., Wang, F., Hsiao, C.-Y., Yang, C.-Y., Lin, S.-T., Wu, L.-H., Chen, Y.-K., Liang, Y.-S., and Lin, Y.-H. 2021. *Bacillus amyloliquefaciens* strains control strawberry anthracnose through antagonistic activity and plant immune response intensification. *Biol. Control* 157:104592.

### ABSTRACT

Hsiao, C.-Y., Yan, J.-C., Peng, A.-L., Chen, B.-W., Li, C.-R., and Lin, Y.-H.\* 2022. Seed treatment of *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05 powder for control black rot disease of cabbage. *J. Plant Med.* 64(4): 149-158.

\*Corresponding author, E-mail: yhlin@mail.npust.edu.tw

Cabbage black rot disease (CBRD) caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) is a seedborne disease that causes severe yield losses. Therefore, reducing the pathogen on seed could be a possible strategy to control CBRD. Our previous study revealed that CBRD could be controlled by bacterial suspensions of *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05 in Xcc-infested seeds. However, such treatments still require a process of seed soaking and subsequent drying. Under this limitation, this study intends to further explore whether using powder prepared by fermentation broths to treat infested seeds can still effectively reduce the occurrence of CBRD. In order to use maltodextrin as a carrier, it was first proved that seed germination was not inhibited by treatment with maltodextrin directly. Then, the mixture of *B. amyloliquefaciens* PMB05 fermentation broth and maltodextrin was spray-dried; the number of endospores reached more than 10<sup>9</sup> CFU/mL under the treatment with three distinct inlet temperatures. The 0.1% powder was further mixed with cabbage seeds, results showed that seed germination ratio was increased by the powders from the inlet temperature at 140 °C and 160 °C. In addition, we also found that the inhibition of seed germination by the powder from the inlet temperature of 120 °C might be due to the compounds produced from maltodextrin during the spray drying process. Furthermore, the PMB05 powder produced at 160 °C of inlet temperature showed more than 90% of the survival rate for over 16 weeks at room temperature and 4 °C in this state.



Most importantly, the disease incidence and disease severity of CBRD on seedlings were reduced significantly when the Xcc-infested seeds were coated with 0.1% of the PMB05 powder. In addition, we also found that the leaves obtained from the seed treatment can trigger stronger plant immune response signals upon the induction of a bacterial elicitor, suggesting that the seed treatment might give cabbage a more comprehensive protective effect. Combining the above results, we concluded that coating seeds with PMB05 powder is a convenient and effective way to control CBRD.

**Keywords:** Agricultural management, plant immunity intensification, powder, seed treatment, spray dry

