

化學藥劑與生物防治菌共同使用於防治馬鈴薯瘡痂病之評估

莊姿瑩¹、馮如瑩²、蔡佳欣³、陳穎練^{1*}

¹ 國立臺灣大學植物病理與微生物學系，台灣台北市。

² 行政院農業委員會農業試驗所應用動物組，台灣台中市。

³ 行政院農業委員會農業試驗所植物病理組，台灣台中市。

* 聯絡作者，E-mail: ychen28@ntu.edu.tw

摘要

莊姿瑩、馮如瑩、蔡佳欣、陳穎練^{*}。2022。化學藥劑與生物防治菌共同使用於防治馬鈴薯瘡痂病之評估。植物醫學64(1): 11-20。

馬鈴薯瘡痂病主要由馬鈴薯瘡痂病菌 (*Streptomyces scabies*) 造成，侵染馬鈴薯表皮組織形成凸起或凹陷之木質化壞疽病斑，破壞馬鈴薯之外觀，影響其經濟價值，是田間重要病害，台灣目前尚未有推薦之化學藥劑或微生物製劑防治此病害。由於生物防治菌於田間之防治效率易受到環境之影響，故本研究欲結合化學藥劑與生物製劑共同防治馬鈴薯瘡痂病，期許能提升個別防治的效率，並探討藥劑對液化澱粉芽孢桿菌 *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01重要基因表現之影響。研究首先以濾紙片擴散試驗與搖瓶培養發現Ba01對於免得爛和四氯異苯腈的耐受性較*S. scabies* PS07高，推測可能與Ba01產生內生孢子的特性有關。利用濾紙片擴散及馬鈴薯薯片試驗，發現免得爛250 ppm、125 ppm或四氯異苯腈200 ppm、100 ppm與Ba01具有共同或交替施用之潛力；且於PS07接種1天前、後施用處理，均有好的抑制效果。而兩化學藥劑並不影響Ba01重要二次代謝物表面素 (surfactin) 基因*urfAD*以及部分參與氮代謝相關基因 (*tnrA*、*glnR*、*codY*) 的表現。未來期望能進行盆栽及田間試驗，希冀提供農民防治馬鈴薯瘡痂病之參考。

關鍵詞：馬鈴薯瘡痂病、免得爛、四氯異苯腈、液化澱粉芽孢桿菌、表面素、氮代謝

緒言

馬鈴薯 (*Solanum tuberosum* L.) 是茄科茄屬之一年生草本植物，以土溫介於16-18 °C、土壤酸鹼值介於pH 5.5-6.5最

適生長^(5, 33)。其為僅次於玉米、小麥及水稻的世界重要糧食作物^(5, 6)。馬鈴薯會受到不同病原菌的侵染，在台灣常發生之馬鈴薯病害以晚疫病、瘡痂病、青枯病及病毒病害為主。其中，馬鈴薯瘡痂病主要由馬鈴薯瘡痂病菌*Streptomyces scabies* (又名*Streptomyces scabiei*) 所造成⁽⁴⁾。亦有其它鏈黴菌屬如*S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies*, *S. europaeiscabiei*, *S. stelliscabiei* 等亦可在馬鈴薯上形成瘡痂病徵^(2, 5)。*S. scabies*會於馬鈴薯薯塊形成初期，從皮孔侵入，並分泌植物毒素thaxtomin，於表皮形成平滑、凸起或是深凹陷的木栓化瘡痂病斑，破壞馬鈴薯的外觀，影響其經濟價值，也會影響植株地下部根系的生長，但不會侵染成熟之馬鈴薯^(5, 15, 16, 21)。國內在馬鈴薯瘡痂病上之防治策略^(8, 10)主要為：注意田間土壤水分、與水稻或豆科作物輪作、調整土壤酸鹼值、選用抗或耐病品種以及透過健康種苗三級制度生產健康種苗。以上防治方法效果均有限，且國內目前沒有推薦防治藥劑，使得瘡痂病的防治變得較為困難。

國內在防治馬鈴薯瘡痂病之研究主要分為兩個部分：(1) 生物防治。研究發現枯草桿菌*Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* WG6-14，以及液化澱粉芽孢桿菌*Bacillus amyloliquefaciens* Ba01 (Ba01) 對於*S. scabies*有抑制效果^(10, 19)；鏈黴菌*Streptomyces* isolates 35-2與43-21對於*S. europaeiscabiei*有抑制效果⁽¹⁸⁾，兩者均能降低馬鈴薯瘡痂病的罹病度 (disease severity)。(2) 化學防治。研究發現FRAC G1類之得克利 (tebuconazole) 能降低馬鈴薯瘡痂病的罹病度⁽¹⁷⁾、FRAC M3類之免得爛 (metiram) 及FRAC M5類之四氯異苯腈 (chlorothalonil) 也對於*S. scabies*有抑制效果⁽⁸⁾，並且較得克利明顯。

因著化學藥劑對於環境與人體、動物健康可能造成之危害，以及生物防治菌於田間易受環境影響使得防治效果侷限等因素，部分研究開始轉而探討化學藥劑與生物防治菌共同施用對於病害的防治效果。*Bacillus* spp.會產生內生孢子

(endospore)，對於溫度與環境有好的耐受性，在土壤中普遍存在，亦被評估為一安全之生物防治菌，使其具有與化學藥劑混合施用之潛力⁽³¹⁾。結合化學藥劑的研究，多數以枯草桿菌 (*B. subtilis*) 為主，防治真菌類病害如水稻紋枯病、番茄立枯病、小麥紋枯病等^(13, 27, 28)；以及防治細菌病害如番茄青枯病⁽²⁹⁾。此外亦有 *B. amyloliquefaciens*⁽³⁾、*B. methylophilicus*⁽¹¹⁾ 及 *B. cereus*⁽¹⁴⁾ 等生物防治菌與殺菌劑結合來防治植物病害。本研究欲測試馬鈴薯晚疫病推薦藥劑—免得爛與四氯異苯腈，分別與生物防治菌Ba01混合後，以現行馬鈴薯晚疫病推薦稀釋倍率，並再以此稀釋倍率分別進行2倍、4倍、8倍、16倍及32倍稀釋之藥劑濃度以尋找與Ba01合適之施用濃度，並探討藥劑是否會影響Ba01生長相關基因和重要二次代謝物表面素 (surfactin) 基因表現，以期能提供農民在防治馬鈴薯瘡痂病之參考。

材料與方法

供試菌株、農藥成品及培養基

馬鈴薯瘡痂病菌 *Streptomyces scabies* PS07 (PS07)⁽¹⁸⁾ 培養於 YME 固態培養基 (0.4% yeast extract, 1% malt extract, 0.4% D-glucose 及 2% agar)，欲使其大量產孢時則培養於 MPYSC 固態培養基 (0.1% MgSO₄ · 7H₂O, 0.05% K₂HPO₄, 0.1% yeast extract, 1% soluble starch, 0.1% casein 及 1.5% agar)。液化澱粉芽孢桿菌 *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01 (Ba01)⁽¹⁹⁾ 培養於 LB 液態與固態培養基 (0.5% yeast extract, 1% tryptone, 1% sodium chloride 及 1.5% agar)。藥劑與 PS07 與 Ba01 共同培養的實驗，使用 Mueller-Hinton 液態培養基 (M-H broth; 0.15% starch, 0.2% beef extract 及 1.75% acid hydrolysate of casein)⁽²⁴⁾。本實驗使用兩種市售殺菌劑農藥進行測試，分別為馬鈴薯晚疫病之推薦防治藥劑⁽³⁸⁾：80% 免得爛水分散性粒劑 (Metiram, 抗病[®]，德國巴斯夫) 及 75% 四氯異苯腈可濕性粉劑 (Chlorothalonil, 達克靈[®]，台灣庵原)，供試藥劑及施用之濃度詳見表一。

測試免得爛與四氯異苯腈對於 PS07 及 Ba01 之影響

濾紙片擴散試驗

利用濾紙片擴散試驗^(19, 30)初步測試不同稀釋倍率之免得爛與四氯異苯腈分別對於 PS07 及 Ba01 的影響。將藥劑以 distilled water (dH₂O) 配製成如表一的濃度。分別添加 100 μl 10⁸ cfu/mL PS07 孢子懸浮液於 YME 固態培養基，及 100 μl 1 OD₆₀₀ (~10⁸ cfu/mL) Ba01 細菌懸浮液於 LB 固態培養基，於每一皿培養基上放置四片直徑 6 mm 之濾紙片，並添加 4 μl 表一中敘述濃度之免得爛與四氯異苯腈農藥。PS07 於培養 96 小時，Ba01 於培養 24 小時後觀察與測量抑制圈的直徑。每處理進行三重複。

表一、免得爛與四氯異苯腈測試之濃度

TABLE 1. Dilution rate of metiram and chlorothalonil

Common name	Concentration (a.i. ³)	Brand
80% metiram WG ¹	2000 ppm (1600) ⁴	Polyram [®]
	1000 ppm (800)	(BASF Societas Europaea,
	500 ppm (400)	Germany)
	250 ppm (200)	
	125 ppm (100)	
75% Chlorothalonil WP ²	62.5 ppm (50)	
	1700 ppm (1275) ⁴	(Ihara Chemical Co. Ltd.,
	800 ppm (600)	Taiwan)
	400 ppm (300)	
	200 ppm (150)	
	100 ppm (75)	
	50 ppm (37.5)	

¹ water dispersible granule

² wettable powder

³ active ingredient (ppm)

⁴ concentration of recommended dilution rate (rdr) in controlling potato late blight

搖瓶培養

為了進一步探討免得爛與四氯異苯腈對於 PS07 的影響及對於 Ba01 的兼容性，將 PS07 及 Ba01 分別與藥劑進行共同培養。150 μl 10⁸ cfu/mL PS07 孢子懸浮液及 150 μl 10⁸ cfu/mL Ba01 細菌懸浮液 (兩者最終菌量為 10⁶ cfu/mL) 分別加入 15 mL 含有表一濃度之藥劑的 M-H 液態培養基中。PS07 以 28°C，200 rpm 震盪培養；Ba01 則以 37°C，200 rpm 震盪培養，並於共同培養後第 0、1、3、5、7 天時，序列稀釋塗盤計算細菌菌量，每個處理組進行三重複。將數據取對數，並利用 GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, CA, USA) 以二因子變異數分析 (two-way analysis of variance) 及 Bonferroni 事後比較試驗進行統計分析⁽⁸⁾。

探討免得爛與四氯異苯腈分別與 Ba01 共同施用之合適濃度與施用方法

濾紙片擴散試驗

Ba01 與免得爛及四氯異苯腈具有共同施用之潛力，因此以濾紙片擴散試驗^(19, 30)來觀察藥劑與 Ba01 混合後對於 PS07 的抑制效果。於培養基的中央放上 1 片直徑 6 mm 之濾紙片，並進行以下處理：(1) 添加 ddH₂O 之負對照組；(2) 免得爛稀釋液；(3) 四氯異苯腈稀釋液；(4) 10⁸ cfu/mL Ba01 細菌懸浮液；(5) 免得爛與 10⁸ cfu/mL Ba01 1:1 混合液；(6) 四氯異苯腈與 10⁸ cfu/mL Ba01 1:1 混合液。每個處理各添加 4 μl 於濾紙片上。免得爛測試 250、125、62.5 ppm；四氯異苯腈測試 200、100、50 ppm。將培養基放置於 28°C 培養，96 小時後觀察與紀錄抑制圈直徑，而 Ba01 以及兩藥劑分別混合 Ba01 之組別之抑制圈直徑則會扣除掉菌落之直徑，每個處理進行三重複，並取代表的培養皿進

行拍照。計算之數據利用GraphPad Prism 5以two-way analysis of variance及 Bonferroni事後比較試驗進行統計分析。

馬鈴薯薯片試驗

為了進一步探討免得爛與四氯異苯腈分別與Ba01混合施用的合適濃度，以及在馬鈴薯上對於PS07的抑制效果，因此利用馬鈴薯薯片試驗測試。將馬鈴薯(品種：大葉克尼伯G4健康種薯)以400 ppm次氯酸水表面消毒1小時，以流動水清洗後，風乾。於馬鈴薯的髓部切出直徑約1.2 cm，厚度約2 mm的馬鈴薯薯片，放置於濾紙片上保濕⁽¹⁹⁾。並進行以下處理：(1) 添加ddH₂O的負對照組；(2) 免得爛稀釋液；(3) 四氯異苯腈稀釋液；(4) 10⁸ cfu/mL Ba01細菌懸浮液；(5) 免得爛或四氯異苯腈分別以1:1比例混合10⁸ cfu/mL Ba01，並於接種PS07前一天施用處理；(6) 免得爛或四氯異苯腈分別以1:1比例混合10⁸ cfu/mL Ba01，並於接種PS07後一天施用處理；(7) 只接種PS07之正對照組。藥劑的試驗濃度與前述濾紙片擴散試驗相同，處理組各添加20 µl，而PS07則添加25 µl 10⁸ cfu/mL孢子懸浮液於薯片上，並放置於28°C培養5天後進行觀察。每處理組進行三重複。

藥劑對於Ba01表面素(surfactin)及氮代謝生成相關基因表現量之影響

Ba01 RNA純化

實驗步驟修改自Villa-Rodriguez Eber等人所發表之RNA純化方法⁽³⁵⁾。為了單純觀察藥劑對於Ba01之基因表現，而不受到菌量下降之影響，因此將2×10⁷ cfu/mL Ba01菌液分別與藥劑最低抑菌濃度(minimal inhibitory concentration)之半數濃度，即免得爛8 µg/mL，四氯異苯腈0.5 µg/mL共同震盪培養6小時後⁽⁷⁾以13000 rpm離心2分鐘，並利用微量離心管內剩餘之培養液懸浮細菌pellets，以液態氮處理後，放置-80°C冰箱，24小時。將細菌pellets以250 µl裂解緩衝液(buffer lysis; 30 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 10 mg/mL lysozyme, pH 6.2)溶解，並放置於37°C中處理30分鐘。每一管加入500 µl Trizol reagent (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)，混合均勻，並靜置5分鐘；加入200 µl氯仿混合均勻後靜置2~3分鐘。接著以13000 rpm於4°C的環境下離心15分鐘，將上清液吸取到新的微量離心管。加入300 µl食鹽水(saline solution; 0.6 M NaCl, 0.4 M sodium citrate)及300 µl isopropanol，置於-20°C，2小時後以13000 rpm於4°C環境下離心20分鐘。將上清液棄置，依序以200 µl 70%乙醇及100 µl 100%乙醇潤洗離心下來之沉澱物各一次，將沉澱物以55°C乾浴槽乾燥後，以20~30 µl RNase-free water回溶。利用NanoDrop One (Thermo Scientific, USA)測定RNA品質，挑選A260/280介於1.8-2.0之組別進行後續互補DNA(complementary DNA, cDNA)之反轉錄。實驗以沒有與藥劑共同培養之Ba01為負對照組，每一組處理進行三重複。

cDNA合成

將萃取出之RNA先以DNase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)處理，去除基因體DNA(genomic DNA, gDNA)以避免後續實驗的干擾及穩定cDNA。使用TURBO DNA-free™ kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)，根據kit的操作步驟將萃取出之RNA中的gDNA去除，並接續利用High-Capacity cDNA Reverse Transcription kits (Thermo Fisher Scientific Baltics, UAB)將2 µg RNA反轉錄成cDNA。

即時反轉錄聚合酶連鎖反應(Quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR)

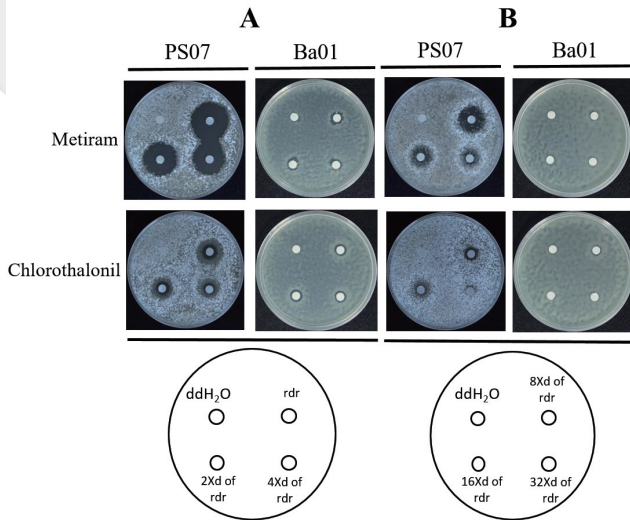
利用RT-qPCR進行比較分析，以瞭解免得爛及四氯異苯腈與Ba01混合後，是否會影響Ba01之重要二次代謝物表面素(surfactin)基因*srfAD*⁽⁸⁾，及參與在氮代謝與生長相關之基因*tnrA*，*glnR*及*codY*^(9, 37)的表現量。將10 µl包含1 µl cDNA template (5 ng)、5 µl 2X SYBR Green master mix、0.5 µl 正反股之引子(5 µM)及3 µl dH₂O之反應液，利用StepOnePlus™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)進行RT-qPCR，其反應程序為：以95°C 7 min進行DNA變性(denaturation)，並以95°C 10 sec及60°C 30 sec進行40個循環，後以95°C 15 sec、60°C 60 sec及95°C 15 sec進行解鏈曲線(melting curve)測定。接續以StepOnePlus™ Real-Time PCR system配合StepOnePlus™ software (v 2.3)進行cycle threshold (C_t) value分析，並以2^{-ΔΔC_t}之方法量化各基因轉錄表現量。因Ba01沒有進行全基因體解序，因此以親緣關係相近之*Bacillus velezensis* FZB42的*rspJ*⁽³⁴⁾基因為模板設計引子對，做為internal control進行數據標準化(normalization)，並以單因子變異數分析(one-way ANOVA)計算P-value。

結果

免得爛與四氯異苯腈對PS07及Ba01生長之影響

利用濾紙片擴散實驗初步觀察免得爛及四氯異苯腈分別對於*Streptomyces scabies* PS07 (PS07)與*Bacillus amyloliquefaciens* Ba01 (Ba01)的影響，並接續以搖瓶培養觀察免得爛、四氯異苯腈分別與兩細菌共同培養的情形。首先，濾紙片擴散試驗的結果顯示兩藥劑在所測試的稀釋倍率下皆能抑制PS07的生長；惟在四氯異苯腈50 ppm下，抑制效果較不明顯。而在Ba01的部分，免得爛250、125、62.5 ppm與四氯異苯腈200、100、50 ppm對於Ba01均沒有顯著的抑制效果(圖一A與B)。

搖瓶培養實驗中發現免得爛所測試的6個濃度，均在與PS07共同培養第1天時，使PS07的菌量有明顯的下降(P<0.001; Bonferroni test)，而在第3天時，所有的濃度均使菌量降到0 cfu/mL，顯示免得爛對PS07具有殺菌的效果。四氯異



圖一、免得爛與四氯異苯腈對於*S. scabies* PS07與*B. amyloliquifaciens* Ba01生長之影響。

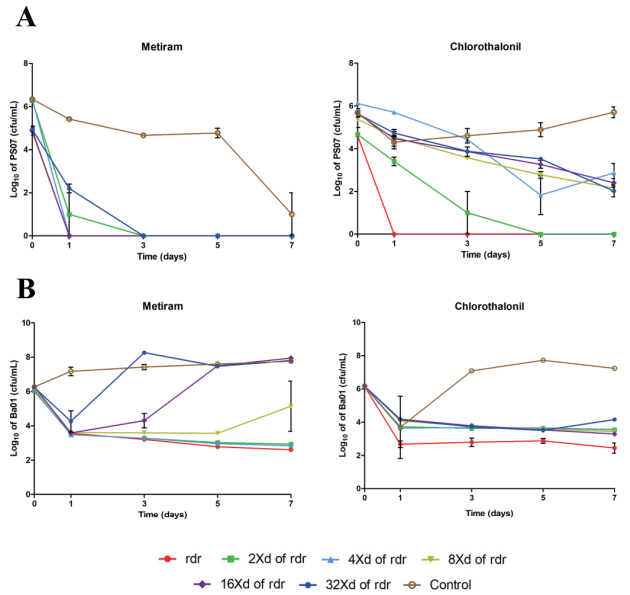
A. 免得爛2000、1000、500 ppm及四氯異苯腈1700、800、400 ppm (rdr, 2Xd, 4Xd of rdr) 之處理組。B. 免得爛250、125、62.5 ppm及四氯異苯腈200、100、50 ppm (8Xd, 16Xd, 32Xd of rdr) 之處理組。分別添加 10^8 cfu/mL PS07之孢子懸浮液及 10^8 cfu/mL Ba01細菌懸浮液於YME與LB固態培養基上，以4 μ l ddH₂O 的處理做為負對照組。rdr: 馬鈴薯晚疫病上推薦稀釋倍率之濃度。

Fig. 1. Effects of metiram and chlorothalonil on the growth of *B. amyloliquifaciens* Ba01 and *S. scabies* PS07. A. Treatment of metiram at 2000, 1000, 500 ppm and chlorothalonil at 1700, 800, 400 ppm (rdr, 2Xd, 4Xd of rdr). B. Treatment of metiram at 250, 125, 62.5 ppm and chlorothalonil at 200, 100, 50 ppm (8Xd, 16Xd, 32Xd of rdr). 10^8 cfu/mL spore suspension of PS07 and 10^8 cfu/mL Ba01 suspension were separately spread on YME medium and LB medium. 4 μ l ddH₂O were used as a negative control. rdr: concentration of recommended dilution rate in controlling potato late blight.

苯腈在1700 ppm與800 ppm，分別在第1及第5天時使PS07菌量降到0 cfu/mL，而在400、200、100、50 ppm雖不能完全抑制PS07的生長，但隨著共同培養時間的增長，仍使菌量下降至 10^2 至 10^3 cfu/mL，對於PS07的生長仍有影響（圖二A）。在Ba01的部分，發現免得爛與四氯異苯腈各個測試濃度與Ba01共同培養時，均會在第1天使菌量下降，然Ba01在與免得爛250、125、62.5 ppm共同培養下，分別於第7天、第5天及第3天菌量有上升的現象，尤以在125 ppm及62.5 ppm的濃度菌量能上升至與沒有添加藥劑的對照組趨勢相同；而Ba01與四氯異苯腈在50 ppm共同培養下，於第7天時菌量有些微上升的現象。顯示免得爛與四氯異苯腈均不會完全抑制Ba01的生長，且在較高稀釋倍率下，Ba01不受供試藥劑的影響，而有增殖的現象（圖二B）。

免得爛或四氯異苯腈混合Ba01對PS07之抑制效果

根據前述結果得知，Ba01與免得爛或四氯異苯腈具有共同施用之潛力，並以免得爛250、125、62.5 ppm及四氯異苯腈



圖二、免得爛與四氯異苯腈對於PS07及Ba01於M-H液態培養基存活之影響。

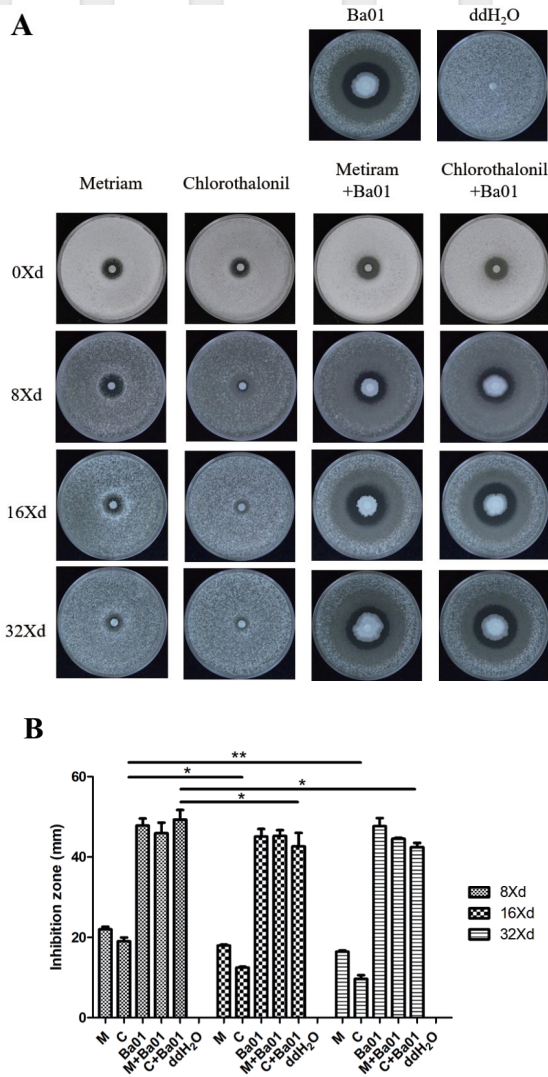
以M-H液態培養基將A. 10^8 cfu/mL PS07與 B. 10^8 cfu/mL Ba01 (最終濃度 10^6 cfu/mL) 分別與免得爛2000、1000、500、250、125、62.5 ppm或四氯異苯腈1700、800、400、200、100、50 ppm (rdr~32Xd of rdr) 共同震盪培養。並於第0、1、3、5、7天時序列稀釋塗盤觀察PS07與Ba01的生長情形。每組數據呈現為三重複之平均 \pm 平均標準差。

Fig. 2. Effects of metiram and chlorothalonil on the survival of PS07 and Ba01 in M-H broth. Separately cultured A. 10^8 cfu/mL PS07 and B. 10^8 Ba01 (with final concentration of 10^6 cfu/mL) with metiram 2000、1000、500、250、125、62.5 ppm or chlorothalonil 1700、800、400、200、100、50 ppm (rdr~32Xd of rdr) in M-H broth were calculated the amount at 0, 1, 3, 5 and 7 days by serial dilution and spreading plates. Data was demonstrated as the average of three repeats \pm standard error of the mean.

50 ppm具有較好之兼容性。根據濾紙片擴散試驗的結果發現免得爛2000 ppm及四氯異苯腈1700 ppm與 10^8 cfu/mL Ba01以1:1 (1 mL+1 mL) 的體積比例混合，藥劑會抑制Ba01的生長，對於PS07抑制效果不顯著。而免得爛250、125、62.5 ppm與四氯異苯腈200、100、50 ppm與Ba01混合，藥劑並不會完全抑制Ba01的生長，並且相較於單獨以藥劑處理的組別，對於PS07具有較好的抑制效果，而與單獨以Ba01處理的組別抑制效果則沒有顯著差異。其中，Ba01混合免得爛250 ppm或四氯異苯腈200 ppm的處理，相較於其他濃度與Ba01混合的組別，產生較大之抑制圈（圖三A與B）。

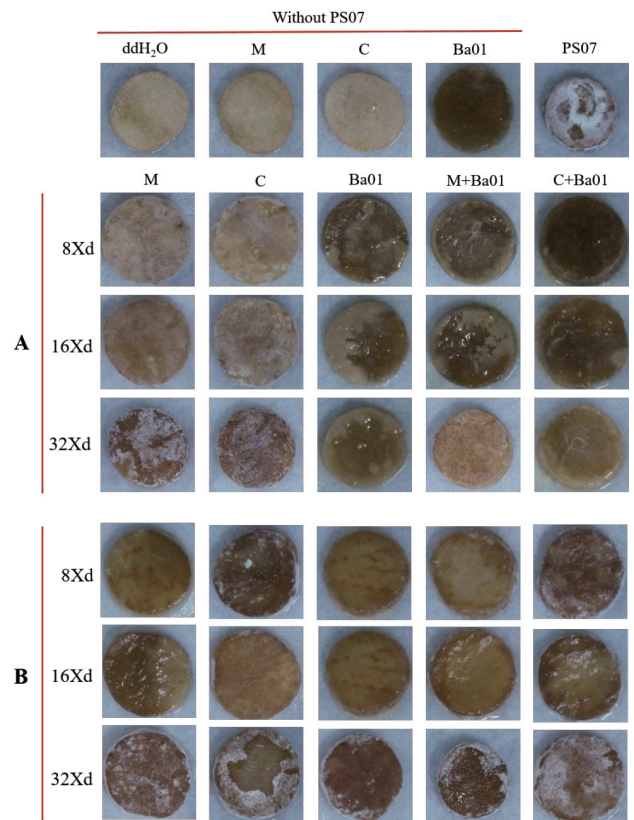
免得爛或四氯異苯腈混合Ba01的施用時機對PS07之抑制效果

此實驗以馬鈴薯薯片進行測試，觀察藥劑與Ba01混合處理，於馬鈴薯組織上對於PS07的抑制效果。實驗結果發現，在



圖三、 免得爛或四氯異苯腈混合Ba01對PS07之抑制效果。
 A. 濾紙片擴散試驗。10⁸ cfu/mL PS07之孢子懸浮液添加於YME固態培養基上。添加免得爛250、125、62.5 ppm及四氯異苯腈200、100、50 ppm (8Xd, 16Xd, 32Xd of rdr) 之處理、10⁸ cfu/mL Ba01細菌懸浮液以及藥劑與Ba01以1:1比例混合的處理於濾紙片上。4 μl ddH₂O的處理為負對照組。B. 濾紙片擴散試驗組間比較之統計圖表。"M" 代表免得爛, "C" 代表四氯異苯腈。統計使用GraphPad Prism 5軟體並以Bonferroni test進行兩兩處理之事後比較, 每組數據呈現為三重複之平均±平均標準差, *代表P-value<0.05, **代表P-value<0.01。

Fig. 3. Inhibition effects of the combination of metiram or chlorothalonil with Ba01 on PS07. A. 10⁸ cfu/mL spore suspension of PS07 was spread on YME medium. Metiram 250, 125, 62.5 ppm and chlorothalonil 200, 100, 50 ppm (8Xd, 16Xd, 32Xd of rdr), 10⁸ cfu/mL Ba01, and Ba01 in combination of metiram or chlorothalonil at the ratio of 1:1 were separately added on paper disks. 4 μl ddH₂O was used as a negative control. B. Statistical analysis between groups in different concentration. Data were represented as the average of three repeats ± standard error of the mean. P-value was calculated by Dunnett's test with GraphPad Prism 5 software, "*" and "***" represent P<0.05 and P<0.01, respectively, as compared with each treatment in different concentration. M: metiram; C: chlorothalonil.



圖四、 免得爛或四氯異苯腈混合Ba01於馬鈴薯薯片上對PS07之抑制效果。
 馬鈴薯薯片試驗處理組如下：A. 接種PS07一天前進行處理。B. 接種PS07一天後再進行處理。並進行 (1) 免得爛處理。(2) 四氯異苯腈處理。(3) Ba01處理。(4) 免得爛與Ba01以1:1比例混合後進行處理。(5) 四氯異苯腈與Ba01以1:1比例混合後進行處理。並以 (6) 只接種PS07作為正對照組。(7) 只處理ddH₂O作為負對照組。免得爛測試250、125、62.5 ppm, 而四氯異苯腈測試200、100、50 ppm (8Xd、16Xd、32Xd of rdr) 的濃度。

Fig. 4. Inhibitory effects of metiram or chlorothalonil combined with Ba01 on PS07 by using potato tuber slice assay. Treatments were as follows: A. applying treatments 1 day before PS07 inoculation, B. applying treatments 1 day after PS07 inoculation that conducted treatments of: (1) metiram, (2) chlorothalonil, (3) Ba01, (4) metiram in combination with Ba01, and (5) chlorothalonil in combination with Ba01. And also applied (6) only PS07 as a positive control, and (7) only ddH₂O as a negative control. Metiram 250, 125, 62.5 ppm and chlorothalonil 200, 100, 50 ppm were tested.

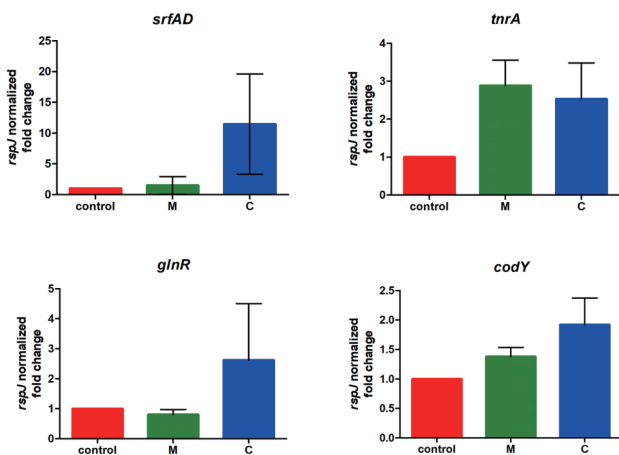
接種PS07一天前施用Ba01混合免得爛250、125、62.5 ppm 或四氯異苯腈200、100、50 ppm 之處理, 以及在接種PS07一天後施用Ba01混合免得爛250、125 ppm或四氯異苯腈200、100 ppm的處理, 於薯塊上沒有明顯的*S. scabiei*菌絲產生, 有別於其他處理組, 對於PS07具有較好的抑制效果。但與單獨處理Ba01對PS07的抑制效果類似 (圖四A與B)。故可以推論在PS07接種一天前或一天後施用Ba01混合免得爛250、125 ppm或四氯異苯腈200、100 ppm之處理, 均對於PS07有好的抑制效果。

免得爛與四氯異苯腈對於Ba01表面素生成及部分氮代謝基因表現之影響

為測試免得爛與四氯異苯腈是否會影響Ba01重要二次代謝物表面素以及與生長相關氮循環之基因表現，因此利用RT-qPCR測定基因表現的變化。經過單因子變異數統計分析，發現*srfAD*、*tnrA*、*glnR*及*codY*四個基因，於免得爛或四氯異苯腈處理之組別及沒有經過藥劑處理之對照組，在基因表現量上沒有差異，表示藥劑不顯著影響Ba01重要基因的表現。而其中在*srfAD*、*glnR*及*codY*的部分，四氯異苯腈處理之組別，相較於免得爛以及未經藥劑處理之對照組表現量較高，而免得爛處理之組別則是在*tnrA*的表現量上較高，但統計分析結果無差異(圖五)。

討 論

生物防治因其易受到田間環境影響而產生不穩定的特性，使其較化學防治更難以預測防治效果。化學農藥則對環境具有



圖五、免得爛與四氯異苯腈對Ba01表面素生成及氮代謝相關基因的表現之影響。

Ba01分別與8 µg/mL免得爛或0.5 µg/mL四氯異苯腈共同培養，測定Ba01之*srfAD*、*tnrA*、*glnR*與*codY*的表現量，以*rspJ*基因進行數據標準化，並以未添加藥劑之處理為對照組。"M"代表免得爛，"C"代表四氯異苯腈。基因表現差異倍數數據呈現為三重複之平均±平均標準差，利用GraphPad Prism 5軟體並以單因子變異數分析進行P值統計。

Fig. 5. Effects of metiram and chlorothalonil on the expression of surfactin-producing gene and genes associated with nitrogen metabolism in Ba01. Ba01 was separately cultured with 8 µg/mL metiram or 0.5 µg/mL chlorothalonil. The expression of *srfAD*, *tnrA*, *glnR* and *codY* were measured. The *rspJ* gene was used to normalize the data and the group without chemical treatment was used as a negative control. Data was represented as the average of three repeats ± standard error of the mean with GraphPad Prism 5 software. *P*-value of the gene fold change was calculated by one-way ANOVA. M: metiram; c: chlorothalonil.

較大的影響性，因此結合生物與化學防治可以補足單一防治方法之缺點，也是近年防治植物病害研究的趨勢。

馬鈴薯瘡痂病曾於台中潭子及雲林斗南地區造成嚴重危害，之後雖較少有瘡痂病嚴重發生的案例，但此病害仍普遍存在於各栽培田區，且能在購買之種薯觀察到瘡痂病徵，顯示其在田間仍屬一重要病害。在缺乏化學推薦防治藥劑，以及前人發現*Bacillus amyloliquefaciens* Ba01 (Ba01) 能降低馬鈴薯瘡痂病罹病度，顯示篩選化學藥劑並結合Ba01防治馬鈴薯瘡痂病是一個值得探究的方向。

*Bacillus*具有產生內生孢子的特性，對於高溫、紫外光、化學藥劑及乾旱等逆境具有耐受性。其內生孢子的結構由蛋白質構成之孢子套膜 (spore coat)、角質層 (cortex)、不透水的孢子核 (spore core) 及保護細菌孢子DNA之 α/β SASPs (small acid-soluble DNA-binding proteins) 所組成，使得一些親水性化學分子無法滲透進內生孢子破壞DNA，是其主要對於化學藥劑有抗性的原因^(25, 26)。而*Streptomyces*雖有由氣生菌絲所產生厚外壁之孢子，使其度過乾旱等不良環境，但不具有如同內生孢子外所包覆之構造⁽¹⁾，推測可能是對化學藥劑具有較差耐受性的原因，因此免得爛與四氯異苯腈對於*Streptomyces scabies* PS07 (PS07) 之生長抑制大於Ba01 (圖一)。*Bacillus*的生長已被報導會受到金屬離子如銅、鎳、鋅、鎘等影響，Vörös等人⁽³⁶⁾發現將*B. velezensis* SZMC 6161J與二硫代胺基甲酸鹽類 (dithiocarbamates) 的農藥，如錳乃浦 (maneb)、鋅錳乃浦 (mancozeb) 及得恩地 (thiram) 等，根據與測試的濃度 (6.25, 12.5, 25 µg/mL) 共同培養48小時，菌量會大幅降低 (0.9 OD₆₂₀至0.1 OD₆₂₀)。免得爛同屬二硫代胺基甲酸鹽類，相較於無藥劑處理之對照組，在62.5~2000 ppm (有效濃度50~1600 µg/mL) 的濃度，Ba01的菌量有降低的現象，推測應是受到免得爛成分中鋅離子的影響。而在免得爛62.5、125、250 ppm (有效濃度分別為50、100、200 µg/mL) 的濃度，則於共同培養3天後分別有菌量回升的現象，推測亦可能與內生孢子生成有關係，使其能耐較低濃度之免得爛(圖二B)。

Katayama等人⁽¹²⁾發現*Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*及*Bacillus* sp.在含有四氯異苯腈純藥品200 mg/L (200 ppm) 的固態培養基上無法生長，但具有可以分解0.5 mg/L四氯異苯腈的能力，透過置換四氯異苯腈上之氯原子成為甲硫基 (methylthio group) 或羥基 (hydroxyl group) 來達到分解的效果。在前述研究中，在含有200 ppm四氯異苯腈的固態培養基上，*Bacillus*不會生長；在本研究中，Ba01在低於200 ppm (有效濃度150 ppm) 的濃度下生長較不受影響。此外，在含有四氯異苯腈的液態培養基中，Zhang等人⁽³⁹⁾發現*B. cereus* NS1的菌量在培養6天後會從0.06 OD₆₀₀降至0.04 OD₆₀₀，藥劑並不會完全抑制NS1的生長，與本實驗的結果類似，但本研究在培養第1天時，菌量有上升的現象，略有差異(圖二B)。

在Ba01與藥劑共同搖瓶培養的實驗，發現免得爛對於Ba01

影響較小，且相較於四氯異苯腈與Ba01混合的處理，免得爛在與Ba01混合施用時，對PS07具有較好的抑制效果，顯示免得爛較不影響Ba01的生長(圖二、圖三)。推測可能的原因與藥劑的半衰期有關。根據Lin等人⁽²⁰⁾的報導，免得爛在含有微生物之液態環境下，半衰期為1-6小時，而四氯異苯腈在未滅菌的水中，半衰期為1.5-3.5天⁽³⁹⁾，顯示四氯異苯腈較免得爛具有較長之半衰期，故對於Ba01的影響大於免得爛。

在本研究中，發現免得爛或四氯異苯腈分別與Ba01結合後，對於PS07的抑制效果，與單獨施用Ba01沒有顯著差異，但優於單獨施用藥劑的處理(圖三)。推測可能原因是，因以不影響Ba01生長的濃度為主，因此選擇藥劑的濃度較低，而藥劑本身隨著濃度降低對於PS07之抑制效果變差，因此混合處理時，藥劑本身能發揮的抑制效果較不明顯，與Ba01混合施用時沒有顯著的協同作用。而在施用時機的部分於PS07接種前、後1天，施用Ba01混合免得爛250、125 ppm或四氯異苯腈200、100 ppm之處理，對於薯片上之PS07有好的抑制效果，故沒有觀察到明顯病菌菌絲的生成(圖四)。之後若是施用到田間，藥劑的穩定性及可預測性仍有機會輔助Ba01於田間應用的效果，降低只單獨使用Ba01可能產生之缺點，並且能減少化學藥劑的使用量^(22, 23)，後續能再額外測試藥劑與Ba01交替施用的效果，以更完整提出合適的施用方法。

氮循環對於土棲菌在生長及其在土壤中之脫氮作用(denitrification)扮演重要角色。Yang等人曾於2011年整理出殺菌劑對於非標的微生物所造成的影響，二硫代胺基甲酸鹽類及苯二甲腈類(pathalonitrile)的藥劑會影響細菌氮循環的進行，其中免得爛屬於前者，四氯異苯腈屬於後者⁽³⁷⁾。也有研究提出，在土壤中長時間施用四氯異苯腈，會抑制土棲菌的脫氮反應⁽³²⁾。從研究結果可發現，當以不影響Ba01生長之免得爛或四氯異苯腈濃度進行培養時，表面素基因*srfAD*、受到環境氮含量高低影響相關的基因*mra*與*glnR*，以及參與氮代謝與生長相關之基因*codY*，處理組與對照組沒有顯著差異，且基因表現均屬正向調控(圖六)，結果顯示兩藥劑不會顯著影響表面素與部分參與在氮循環基因的表現。本試驗因未測試脫氮作用相關基因的表現量，因此供試藥劑是否完全不會影響Ba01的氮代謝活性，仍需進一步測試。

台灣目前尚無防治馬鈴薯瘡痂病的推薦藥劑，本研究中測試的免得爛與四氯異苯腈，均為馬鈴薯晚疫病之推薦防治藥劑，對於PS07有抑制效果，可直接應用於瘡痂病的防治。根據試驗結果得知Ba01會受到藥劑的影響，但其能產生耐化學藥劑之內生孢子，相較於PS07較不受化學藥劑影響。而免得爛250、125 ppm或四氯異苯腈200、100 ppm混合Ba01，在PS07接種1天前或1天後進行處理，對PS07具有抑制效果，顯示在後續施用能有共同或是交替施用的潛力。此外，供試藥劑不會影響Ba01的重要二次代謝物表面素基因及氮代謝相關基因的表現。然而後續在脫氮作用基因表現上需要再額外測試相關基

因，以完整說明藥劑對於Ba01氮循環相關基因的影響。未來期望能進行盆栽與田間試驗，希冀能提供農民適合防治馬鈴薯瘡痂病的方法。

謝 辭

感謝行政院農業委員會計畫109農科-1.1.5-科-a5與國立臺灣大學高等教育深耕計畫110L7811提供研究經費。

引用文獻

1. Bobek, J., Šmídová, K., and Čihák, M. 2017. A waking review: old and novel insights into the spore germination in *Streptomyces*. *Front. Microbiol.* 8:2205.
2. Braun, S., Gevens, A., Charkowski, A., Allen, C., and Jansky, S. 2017. Potato common scab: A review of the causal pathogens, management practices, varietal resistance screening methods, and host resistance. *Am. J. Potato Res.* 94:283-296.
3. Coffin, R. H., Borza, T., Alam, M. Z., Liu, Y., Desai, F., Xi, Y., Zhang, Z., Beaton, B., Goyer, C., and Coffin, J. 2020. Assessing the suppressive effects of biopesticides and phosphite on common scab development in potatoes. *Biocontrol Sci. Technol.* 30:1133-1149.
4. Dees, M. W., and Wanner, L. A. 2012. In search of better management of potato common scab. *Potato Res.* 55:249-268.
5. Devaux, A., Goffart, J.-P., Petsakos, A., Kromann, P., Gatto, M., Okello, J., Suarez, V., and Hareau, G. 2020. Global food security, contributions from sustainable potato agri-food systems. Pages 3-35 in: *The Potato Crop*. Springer, Cham., Switzerland. 518 pp.
6. Enciso-Rodriguez, F., Douches, D., Lopez-Cruz, M., Coombs, J., and de Los Campos, G. 2018. Genomic selection for late blight and common scab resistance in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*). *G3-Genes Genom. Genet.* 8:2471-2481.
7. Fan, B., Li, L., Chao, Y., Förstner, K., Vogel, J., Borriss, R., and Wu, X.-Q. 2015. dRNA-Seq reveals genomewide TSSs and noncoding RNAs of plant beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *PLoS One* 10:e0142002.
8. Feng, R.-Y. 2019. Surfactin is the major secondary metabolite of *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01 for combating potato common scab demonstrated by *srf* gene cluster deletion mutants (Master's thesis). National Taiwan University, Taipei, Taiwan. 73 pp. (in Chinese)
9. Fisher, S. H. 1999. Regulation of nitrogen metabolism in

- Bacillus subtilis*: vive la différence! Mol. Microbiol. 32:223-232.
10. Huang, C.-W. 2008. Potato common scab caused by *Streptomyces scabies* in Taiwan — biological characteristics of the pathogen and an attempted biocontrol by antagonistic *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* WG6-14 (Master's thesis). National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan. 92 pp. (in Chinese)
 11. Ji, X., Li, J., Meng, Z., Zhang, S., Dong, B., and Qiao, K. 2019. Synergistic effect of combined application of a new fungicide fluopimomide with a biocontrol agent *Bacillus methylotrophicus* TA-1 for management of gray mold in tomato. Plant Dis. 103:1991-1997.
 12. Katayama, A., Itou, T., and Ukai, T. 1997. Ubiquitous capability to substitute chlorine atoms of chlorothalonil in bacteria. J. Pest Sci. 22:12-16.
 13. Kondoh, M., Hirai, M., and Shoda, M. 2001. Integrated biological and chemical control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* using *Bacillus subtilis* RB14-C and flutolanil. J. Biosci. Bioeng. 91:173-177.
 14. Lai, Y.-R., Lin, P.-Y., Chen, C.-Y., and Huang, C.-J. 2016. Feasible management of southern corn leaf blight via induction of systemic resistance by *Bacillus cereus* C1L in combination with reduced use of dithiocarbamate fungicides. Plant Pathology J. 32:481.
 15. Lerat, S., Simao-Beauvoir, A. M., and Beaulieu, C. 2009. Genetic and physiological determinants of *Streptomyces scabies* pathogenicity. Mol. Plant Pathol. 10:579-585.
 16. Li, Y., Liu, J., Adekunle, D., Bown, L., Tahlan, K., and Bignell, D. R. 2019. TxtH is a key component of the thaxtomin biosynthetic machinery in the potato common scab pathogen *Streptomyces scabies*. Mol. Plant Pathol. 20:1379-1393.
 17. Lin, C., Feng, R.-Y., Tsai, C.-H., Chen, Y.-L. 2017. The fungicide tebuconazole inhibits potato common scab caused by *Streptomyces scabies*. J. Plant Med. 59:31-37. (in Chinese)
 18. Lin, C.-Y., Ni, H.-F., and Lin, H.-J. 2020. Identification and evaluation of antagonistic actinobacteria on controlling potato common scab. J. Taiwan Agric. Res. 69:122-131. (in Chinese)
 19. Lin, C., Tsai, C.-H., Chen, P.-Y., Wu, C.-Y., Chang, Y.-L., Yang, Y.-L., and Chen, Y.-L. 2018. Biological control of potato common scab by *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01. PloS One 13:e0196520.
 20. Lin, R., Buijse, L., Dimitrov, M. R., Dohmen, P., Kosol, S., Maltby, L., Roessink, I., Sinkeldam, J. A., Smidt, H., and Van Wijngaarden, R. P. 2012. Effects of the fungicide metiram in outdoor freshwater microcosms: responses of invertebrates, primary producers and microbes. Ecotoxicology 21:1550-1569.
 21. Loria, R., Bukhalid, R. A., Creath, R., Leiner, R., Olivier, M., and Steffens, J. 1995. Differential production of thaxtomins by pathogenic *Streptomyces* species in vitro. Phytopathology 85:537-541.
 22. Meng, Q., and Hao, J. J. 2017. Optimizing the application of *Bacillus velezensis* BAC03 in controlling the disease caused by *Streptomyces scabies*. BioControl 62:535-544.
 23. Meng, Q., Jiang, H., Hanson, L., and Hao, J. 2012. Characterizing a novel strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BAC03 for potential biological control application. J. Appl. Microbiol. 113:1165-1175.
 24. Mueller, J. H., and Hinton, J. 1941. A protein-free medium for primary isolation of the *Gonococcus* and *Meningococcus*. Exp. Biol. Med. 48:330-333.
 25. Nicholson, W. 2002. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. Cell. Mol. Life Sci. 59:410-416.
 26. Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., and Setlow, P. 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. Microbiol Mol. Biol. R. 64:548-572.
 27. Peng, D., Li, S., Chen, C., and Zhou, M. 2014. Combined application of *Bacillus subtilis* NJ-18 with fungicides for control of sharp eyespot of wheat. Biol. Control 70:28-34.
 28. Peng, D., Li, S., Wang, J., Chen, C., and Zhou, M. 2014. Integrated biological and chemical control of rice sheath blight by *Bacillus subtilis* NJ-18 and jinggangmycin. Pest Manag. Sci. 70:258-263.
 29. Peng, D., Luo, K., Jiang, H., Deng, Y., Bai, L., and Zhou, X. 2017. Combined use of *Bacillus subtilis* strain B-001 and bactericide for the control of tomato bacterial wilt. Pest Manag. Sci. 73:1253-1257.
 30. Sarwar, A., Latif, Z., Zhang, S., Hao, J., and Bechthold, A. 2019. A potential biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* AC12AB for managing potato common Scab. Front. Microbiol. 10:202.
 31. Shoda, M. 2000. Bacterial control of plant diseases. J Biosci Bioeng 89:515-521.
 32. Su, X., Wang, Y., Peng, G., and He, Q. 2020. Long-term effects of chlorothalonil on microbial denitrification and N₂O emission in a tea field soil. Environ. Sci. Pollut. R. 27:17370-17381.
 33. Tsao, H.-C. 1993. Potato industry and research. Pages 139-164 in: Forty Years of Evolution of Vegetable Industry in Taiwan. TARI, Taichung, Taiwan. (in Chinese)

34. Velho, R. V., Caldas, D., Medina, L., Tsai, S., and Brandelli, A. 2011. Real-time PCR investigation on the expression of *sboA* and *ituD* genes in *Bacillus* spp. *Lett. Appl. Microbiol.* 52:660-666.
35. Villa-Rodríguez, E., Ibarra-Gómez, C., and de Los Santos-Villalobos, S. 2018. Extraction of high-quality RNA from *Bacillus subtilis* with a lysozyme pre-treatment followed by the Trizol method. *J. Microbiol. Meth.* 147:14-16.
36. Vörös, M., Manczinger, L., Kredics, L., Szekeres, A., Shine, K., Alharbi, N. S., Khaled, J. M., and Vágvölgyi, C. 2019. Influence of agro-environmental pollutants on a biocontrol strain of *Bacillus velezensis*. *Microbiologyopen* 8: e00660.
37. Yang, C., Hamel, C., Vujanovic, V., and Gan, Y. 2011. Fungicide: modes of action and possible impact on nontarget microorganisms. *ISRN Ecol.* 2011: 1-8.
38. Wang, R.-J., Chiang, W. -C., Wu, Y. -F., Lin, D. -L., Sun, W. -C., Chen, S. -K., Peng, R. -J., Cheng, A. -H., Hsieh, M. -H., and Chung, J. -Y. 2011. Technology of potato cultivation and management. Tainan DARES, Technology Special Issue No. 150. 25 pp. (in Chinese)
39. Zhang, Y., Lu, J., Wu, L., Chang, A., and Frankenberger Jr, W. T. 2007. Simultaneous removal of chlorothalonil and nitrate by *Bacillus cereus* strain NS1. *Sci Total Environ* 382:383-387.

endospores in Ba01. By adopting the disk diffusion and potato tuber slice assay, metiram 250, 125 ppm or chlorothalonil 200, 100 ppm possessed the potential efficacy in combination with Ba01 which were conducted 1 day before or after PS07 inoculation and retained better inhibitory effects on *S. scabies* PS07. Neither metiram nor chlorothalonil significantly affected the expression of surfactin producing gene *urfAD* and genes involved in nitrogen metabolism (*tnrA*、*glnR*、*codY*) in Ba01. We anticipate completing pot assay and field trial in the future and providing farmers an appropriate combination method in managing potato common scab.

Keywords: Potato common scab, metiram, chlorothalonil, *Bacillus amyloliquefaciens*, surfactin, nitrogen metabolism

ABSTRACT

Tzu-Ying Chuang, Ru-Ying Feng, Chia-Hsin Tsai, Ying-Lien Chen. 2022. Assessment of the combination of chemical and biocontrol agents in managing potato common scab. *J. Plant Med.* 64(1): 11-20.
*Corresponding author, E-mail: ychen28@ntu.edu.tw

Potato common scab mainly caused by *Streptomyces scabies* leads to the symptoms of raised and pitted corky lesions on the surface of potato tubers, damaging the potato appearance and affects the economic value of potatoes. Since it is an important disease in the field, there have been no recommended chemicals or biocontrol agents to manage the disease. Because of the unstable control efficiency of biocontrol agents in the field, the main purpose of this research is to combine chemicals with the biocontrol agent *B. amyloliquefaciens* Ba01 (Ba01) to control potato common scab and improve control efficacy. Meanwhile, the chemical's influence of important gene expression in Ba01 is investigated. The disk diffusion test and shake flask assay were used at first, and the results revealed that Ba01 was more tolerant to metiram and chlorothalonil than *S. scabies* PS07 (PS07) which might be due to the presence of