

應用 *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05 發酵液防治檸檬潰瘍病林鍇遠<sup>1</sup>、梁佑慎<sup>2</sup>、蕭嘉祐<sup>1</sup>、王菲<sup>1</sup>、黃姿碧<sup>3</sup>、林宜賢<sup>1\*</sup><sup>1</sup> 國立屏東科技大學植物醫學系<sup>2</sup> 國立屏東科技大學農園生產系<sup>3</sup> 國立中興大學植物病理學系

\* 聯絡作者，E-mail: yhlin@mail.npust.edu.tw

## 摘 要

林鍇遠、梁佑慎、蕭嘉祐、王菲、黃姿碧、林宜賢。2021。應用 *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05 發酵液防治檸檬潰瘍病。植物醫學63(4): 17-26。

檸檬是國際上重要的經濟作物，在台灣以高雄及屏東地區為最主要的產區。在作物的生長期中，常受 *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 所引起之檸檬潰瘍病危害而造成品質下降，因此如何防治此病害為重要的課題。本研究主要探討應用可提升植物免疫訊號之 *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05 菌株所建立之發酵液是否可防治檸檬潰瘍病的發生。首先確認 *B. amyloliquefaciens* PMB05 細菌懸浮液可在檸檬葉片上強化檸檬潰瘍病菌所誘導的激活化氧產生與癒傷葡聚醣的累積等植物免疫訊號外，也能在檸檬葉片上展現良好的存活能力。進一步 PMB05 於溫室試驗中，利用細菌懸浮液測試之結果亦顯示對檸檬潰瘍病之防治效果顯著，罹病度可降低 25.6%。為了可進一步應用於田間，本研究分別利用 500 毫升搖瓶及 30 公升發酵槽來評估較佳之發酵條件，由菌量及產孢率兩項指標的結果顯示在 500 毫升的搖瓶培養中，碳氮比 3:1 能獲得最高之產孢率，並將此配方所獲得之發酵液稱 PMBFL-2A。進一步於 30 公升發酵槽中也顯示 PMBFL-2A 之發酵配方在 120 rpm 及 1.5 vvm 通氣量下有最高之產孢率。將 30 公升發酵槽所獲得之 PMBFL-2A 發酵液進行儲架壽命試驗之結果顯示，54°C 處理二周及分別在 4、25、37°C 處理八個月都能維持 90% 以上的菌量。同時，我們也證明 PMBFL-2A 發酵液相較於單純細菌懸浮液可顯著增強 PMB05 在檸檬葉片上所提升的免疫反應，於溫室條件下處理 100、200 及 500 倍稀釋之發酵液後分別減少檸檬潰瘍病之罹病度達 64.4、61.0 及 53.0%。在 2020 年於屏東縣里港鄉所進行的田間試驗至第三個月的防治率更達 100%。綜上所述，本研究已建立可增強植物免疫反應之 *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05 之最適發酵條件，且具有應用在田間防治檸檬潰瘍病之潛力。

關鍵詞：檸檬潰瘍病、*Bacillus amyloliquefaciens* PMB05、液態發酵、植物免

## 緒 言

檸檬為世界上重要果樹之一，於 2018 年全世界產量高達一千九百多萬噸<sup>(1)</sup>。在台灣，則以高雄及屏東地區為最主要的產區<sup>(2)</sup>。此作物栽培的過程中，由 *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) 所引起的細菌性潰瘍病為重要的限制因子，其病徵在葉片上會造成木栓化與黃暈，在果實上則是在後期會產生褐色木栓化病斑。病害發生嚴重時，會造成葉片大量掉落，影響植物光合作用甚鉅，導致樹勢衰弱，進而使果實之產量及品質明顯降低<sup>(3, 4)</sup>。此外，受到潰瘍病的影響，國內和國際上檸檬貿易受到限制，對商業上產生了重大損失<sup>(5)</sup>。目前在國際上檸檬潰瘍病的防治主要使用含銅殺菌劑，且全年需要多次使用才能防治此病害<sup>(6, 7)</sup>，含銅殺菌劑長期使用也會導致潰瘍病菌對銅劑產生抗藥性或影響環境和可能對植物造成傷害<sup>(8, 9)</sup>。

近年來多篇報導利用土壤根際細菌來降低植物土壤傳播性病害及葉部病害之發生，且均是以 *Bacillus* spp. 細菌為主要發展目標<sup>(10-13)</sup>。這是因為 *Bacillus* spp. 具內生孢子形成能力而且能抵抗許多極端的環境壓力並有利於商品化後生物製劑之儲藏，因此被視為較具發展與應用潛力之拮抗細菌<sup>(14, 15)</sup>。在 *Bacillus* spp. 這群細菌中，近年來研究指出 *B. amyloliquefaciens* PMB05 菌株具有防治由西瓜果斑病、草莓炭疽病、細菌性軟腐病及番茄青枯病之潛力。且進一步發現此菌株可在植物免疫反應發生過程中，對於植物辨識病原誘引物分子 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 後的 PAMPs-triggered immunity (PTI) 之指標訊號會有所提升，這些訊號包括激活化氧產生與癒傷葡聚醣累積等<sup>(16-19)</sup>。PMB05 菌株對於多種植物細菌性病害是否具

有廣效防治效果仍然未知，本研究係探討利用可提升植物免疫反應之*Bacillus amyloliquefaciens* PMB05菌株，評估其對於檸檬潰瘍病之防治效果並進一步探討發酵液製劑之應用。首先，藉由在PMB05與*Xanthomonas citri* subsp. *citri* PMBKW1共同存在的條件下分析對檸檬葉片植物免疫相關訊號，包括激活化氧快速產生與癒傷葡聚醣累積等植物免疫訊號之影響。同時，探討PMB05細菌懸浮液在溫室條件下是否具有防治檸檬潰瘍病發生之效果。由於利用發酵技術大量生產*Bacillus* spp.生物防治菌為實現其田間應用的可行辦法之一，且已有多篇文獻表明發酵條件的調整對菌量及終產物產量都扮演著關鍵性因素<sup>(20-24)</sup>。本研究係以菌量及內生孢子量做為評估指標，分別在500毫升三角燒瓶搖瓶試驗及30公升發酵槽中調整最適配方，並確認由此配方所製成的PMBFL-2A發酵液有良好之儲架壽命。此外，此發酵液也能有效提高Xcc所誘發的PTI防禦訊號。進一步在溫室及田間試驗中也可證明由此發酵液所製備之發酵液可有效防治檸檬細菌性潰瘍病的發生。

## 材料與方法

### 植物材料之準備

本研究使用之檸檬苗為栽培於溫室一年生之‘優利卡’(*Citrus limon* (L.) Burm. f. cv. Eureka)。檸檬種植所使用之栽培介質為珍珠石、蛭石及培養土在體積比為1:1:10混合均勻後，種植於7吋栽培盆中，放置於溫室中生長。選取葉齡約為出芽後一個月至二個月之完全展開葉片，作為後續試驗之主要材料。

### 菌株來源及培養

本研究供試之病原菌菌株*Xanthomonas citri* subsp. *citri* 菌株PMBKW1為分離自田間採集檸檬潰瘍病之植物葉片，並經過柯霍式法則確認可在檸檬葉片上接種出相同病徵之菌株。本研究所使用之*Bacillus amyloliquefaciens* PMB05則為研究室所保存之菌株<sup>(25)</sup>。實驗開始前將保存之菌株進行純培養後，挑取單一菌落至含有5 mL Difco™ Nutrient broth (NB; Becton Dickinson, France) 之培養管，於28°C以200 rpm震盪培養16小時後，取菌液與30% (v/v) 甘油以體積比為1:1震盪混合均勻後，移至-80°C冰箱保存備用。進行各項實驗前，將前述之菌株以移植環畫線培養於含有1.2%洋菜之Nutrient broth 培養基平板 (NA)，並置於28°C恆溫培養箱培養兩天後，挑取單一菌落繼代兩次，供後續實驗使用。

### 激活化氧產生與癒傷葡聚醣累積之分析

為了觀察*B. amyloliquefaciens* PMB05是否能提高*X. citri* subsp. *citri*所誘導的植物免疫訊號，並進一步評估此菌株經由

發酵培養後之發酵液(後續材料與方法中說明)是否對其促進植物免疫能力的效用亦會發生影響。本試驗係參考Wang等人之方法並稍做修飾<sup>(18)</sup>。在激活化氧產生試驗中，分別利用*B. amyloliquefaciens* PMB05之細菌懸浮液及其200倍稀釋之發酵液進行分析。另外也準備*X. citri* subsp. *citri* PMBKW1菌株之細菌懸浮液，其濃度為OD<sub>600</sub>為0.3。在試驗開始前，將前述細菌懸浮液或發酵液之稀釋液與無菌水以體積比1:1分別混合作為單獨處理組外，共同處理組則為PMB05細菌懸浮液或發酵液之稀釋液與Xcc細菌懸浮液以體積比1:1混合所獲得之混合液。混合液再利用微量吸管吸取10 µl滴至檸檬葉片上，於1小時後將滴有混合液之葉片區域剪下。將葉片切成絲狀，於室溫下先利用95%酒精浸泡30分鐘，再利用75%酒精浸泡30分鐘以褪去葉綠素。接著加入600 µl phosphate buffered saline (PBS) (NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g in 1 L H<sub>2</sub>O, pH 7.4) 緩衝液漂洗後，再以溶解於PBS緩衝液中，最後以終濃度為20 µM之H<sub>2</sub>DCFDA (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate) (Molecular Probes, USA) 之染劑進行葉片組織染色。隨後，利用螢光顯微鏡進行觀察，濾鏡波長為Excitation/Emission (465-495 nm/515-555 nm) (Leica, Germany)，並以ImageJ軟體進行螢光強度量化分析。

在癒傷葡聚醣累積的分析，則是將前述混合液處理於檸檬葉片上8小時後進行分析。將葉片剪下後切成絲狀，並利用95%酒精浸泡16小時以褪去葉綠素。接著利用PBS緩衝液漂洗後，再浸泡於含0.02% aniline blue (Sigma, USA) 之PBS緩衝液於黑暗中染色90分鐘。利用螢光顯微鏡於特定濾鏡波長Excitation/Emission (340-380 nm/400-425nm) 進行觀察，最後結果利用ImageJ軟體進行分析並計算螢光度。本試驗每處理皆以5個葉絲樣品為5重複，並進行三次之重複試驗以確認試驗之再現性。

### *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05葉表殘存能力測試

有益微生物在防治部位的殘存能力是影響生物防治效果的重要因子之一<sup>(26)</sup>。葉表殘存能力測試之進行，為先將PMB05利用0.1% (w/v) carboxymethyl cellulose (CMC; Sigma, UAS) 水溶液配製細菌懸浮液至OD<sub>600</sub>為0.3，利用噴瓶將細菌懸浮液噴佈於5片檸檬葉片上，完成處理後待其晾乾。處理後之植物葉片均不套袋處理，放置於溫室中(溫度介於28-33°C間)，僅每日由根圈澆水以保持濕度。分別於處理後3、7、10、14、21與30天，將葉片剪下並秤重後，以每0.1 g使用1 mL無菌水之比例進行均質，經系列稀釋後取100 µl菌液塗於NA培養基，置於28°C環境下培養48小時進行菌落之計算，以回推PMB05於葉片上之族群數目，單位以log CFU/g leaf表示。

### 發酵培養基配方於500毫升三角燒瓶之搖瓶試驗

發酵的流程為首先挑取*B. amyloliquefaciens* PMB05之單一菌落培養至含有5 mL LB之培養管，經37°C、200 rpm震盪培養

16小時後，以2 ml之培養液加入總體積100 mL的液態培養基，分別由二砂糖與酵母粉所調製之不同重量百分率濃度之碳氮源 (1:1、1:2、1:3、2:1、2:2、2:3、3:1、3:2及3:3) 所組成，置於500 ml三角燒瓶中以相同條件培養2天。以1:1作為對照組。在發酵液細菌族群量分析上，分別於24及48小時取樣，以系列稀釋法測定細菌族群量。每處理3重複。在發酵液內生孢子量分析上，則是參考Gould and Wrighton之方法並稍做修改<sup>(27)</sup>。將1 mL的發酵液加入裝有9 mL無菌水的玻璃試管進行序列稀釋，經過70°C、30分鐘的精密恆溫水浴循環水槽 (BC-2D, Taiwan) 加熱後，取100  $\mu$ l塗盤後計算菌落，並回推內生孢子量，每處理3重複。產孢率=(內生孢子量/原液細菌族群量)  $\times$  100%。

### PMBFL-2A之發酵配方於30公升發酵槽之培養試驗

為了得知於30公升全自動滅菌發酵槽 (Biotop, BTF-B30L, Taiwan) 中，發酵條件是否影響PMBFL-2A之發酵配方對*B. amyloliquefaciens* PMB05細菌族群量及內生孢子量具有影響，以總發酵體積20公升進行發酵與分析。首先，將*B. amyloliquefaciens* PMB05之培養液分別添加於100 mL LB 之500 mL三角燒瓶培養後，再將培養液以2%體積加入含有已滅菌之PMBFL-2A發酵配方的30公升全自動滅菌發酵槽中，依不同轉速設定與通氣量培養5天後收槽。在轉速的試驗上是設定37°C、壓力值0.2 kg/cm<sup>2</sup>及通氣量設定為1.0 vvm的條件下，轉速分別為120及150 rpm進行分析。在最佳通氣量的分析上則是以發酵條件設定為固定轉速120 rpm，壓力值設定為0.2 kg/cm<sup>2</sup>，於37°C進行培養，來分析1.0及1.5 vvm條件下的差異性。培養期間每天監測細菌族群量、內生孢子量及產孢率。單位以log CFU/mL表示。獨立試驗3次，每處理3重複。

### 發酵液儲存之細菌族群量變化

根據美國EPA (Environmental Protection Agency) 所發布之產品測試指南，評估發酵液中微生物的存活率<sup>(28)</sup>。本試驗為將發酵液分裝於100 mL血清瓶中，至54°C進行儲存，分別於0天與14天檢測細菌族群量。此外，本試驗也將發酵液分別儲存在4°C、25°C、37°C恆溫箱中，每個月檢測細菌族群量，以此推測*B. amyloliquefaciens* PMB05以PMBFL-2A所製備之發酵液在不同儲存條件下細菌族群量之變化，上述試驗於試驗前將發酵液分裝，使每個溫度均有3瓶，數據之計算以1瓶為1重複。

### *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05之發酵液在溫室中對檸檬潰瘍病之防治試驗

為評估*B. amyloliquefaciens* PMB05之細菌懸浮液、不同碳氮比配方之發酵液或不同稀釋倍數之PMBFL-2A發酵液在溫室條件下對檸檬潰瘍病之防治效果。首先將*B. amyloliquefaciens* PMB05菌株所製備之OD<sub>600</sub>達0.3的細菌懸浮液 (此時菌量為10<sup>8</sup> CFU/mL)、經200倍稀釋之不同碳氮比配方發酵液或不同稀釋倍數之PMBFL-2A發酵液，分別均勻噴佈於檸檬葉片上，待其

晾乾。將病原菌懸浮液利用穿刺接種後，將滅菌棉花以無菌水潤濕，套袋保濕5天。植物置於溫室條件下21天後，觀察接種處病徵之發展，並計算罹病度及防治率。計算罹病度 (disease severity) 前，需先建立病害指數 (disease index)。病害指數係依據潰瘍病斑嚴重程度分成三級，0級為無病徵；1級為輕微突起及周圍有水浸狀；2級為輕微突起、黃暈及水浸狀；3級為木栓化突起、周圍伴隨黃暈及水浸狀。罹病度計算方式為，罹病度 (%) =  $[(0 \times N_0 + 1 \times N_1 + 2 \times N_2 + 3 \times N_3) / (3 \times N_{Total})] \times 100\%$ 。防治率計算方式為，防治率 (%) =  $[1 - (\text{處理組罹病度} / \text{對照組罹病度})] \times 100\%$ 。本試驗進行獨立試驗3次，每一處理接種10片葉片所獲得之罹病度視為1重複，每個處理有3重複。

### 利用PMBFL-2A發酵液防治檸檬潰瘍病之田間試驗

本研究於2020年於屏東里港進行田間試驗以評估*B. amyloliquefaciens* PMB05菌株之PMBFL-2A發酵液對檸檬潰瘍病之防治效果。試驗時間為2020/03/20至2020/06/12日。試驗田由天秀有機農場黃先生提供 (屏東縣里港鄉；GPS: 22.790466, 120.543872)。試驗之進行係以發酵液經200倍稀釋後，施用於田間檸檬葉片及果實，每兩週處理一次，連續處理三個月，並於三個月期間進行葉片及果實潰瘍病之調查，分為三區處理組及三區對照組。病徵調查方法與溫室防治試驗調查的方法略有差異，葉部病徵為每區調查五棵樹，一棵樹調查五個枝條的數據為1重複，一個枝條調查展開之十片新葉；果實病徵每區調查五棵樹，一棵樹調查十顆果實為1重複。罹病度計算方式為，罹病度 (%) =  $[(0 \times N_0 + 1 \times N_1 + 2 \times N_2 + 3 \times N_3 + 4 \times N_4) / (4 \times N_{Total})] \times 100\%$ 。新葉及果實罹病指數區分如下：0級為無病徵；1級為有1~10個病斑；2級為11~20個病斑；3級為21~30個病斑；4級為31個以上病斑。

### 統計分析

本研究之各實驗統計結果皆以SPSS (statistical product and service solutions) 軟體之單因子變異數 (One-Way ANOVA) 進行分析，並依各試驗所得數據以Tukey's HSD (honestly significant difference) test或以Student's t-test分析各平均值間之顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

## 結果

### *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05細菌懸浮液強化植物免疫訊號

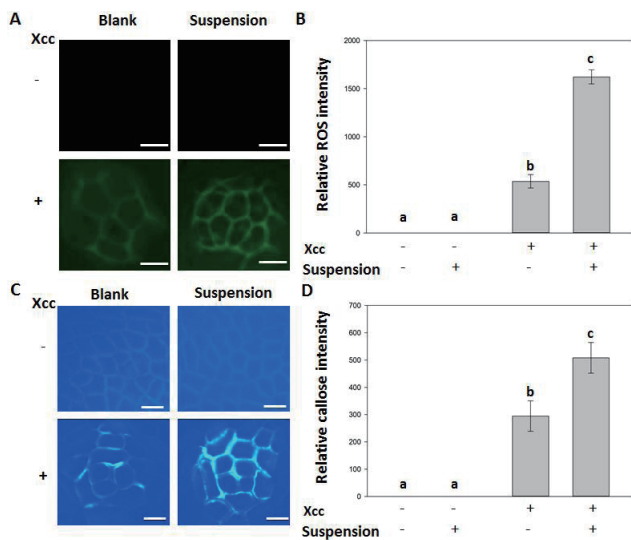
為了瞭解*B. amyloliquefaciens* PMB05細菌懸浮液是否能在檸檬葉片上強化植物免疫之強度，分別分析激活化氧產生與癒傷葡聚醣累積之情形。由激活化氧之快速產生的結果顯示，單獨處理*Xanthomonas citri* subsp. *citri* PMBKW1細菌懸浮液後一小時可觀察到微量之激活化氧的螢光訊號。而單獨處理PMB05



細菌懸浮液，則無法觀察到激活化氧之螢光訊號。進一步處理混合PMB05及PMBKW1的細菌懸浮液，可觀察到表示激活化氧的綠色螢光訊號明顯增加(圖1A)。以Tris-HCl緩衝液作為基準，將螢光訊號進行量化後的結果顯示，PMBKW1單獨處理組所誘導的相對螢光量為519.7倍，PMB05與PMBKW1混合處理後所誘導的螢光量為1644.3倍。PMB05與PMBKW1混合處理組相較於單獨PMBKW1處理組增加3.2倍(圖1B)。在癒傷葡聚醣之累積上，單獨處理PMBKW1細菌懸浮液後可測得微量之癒傷葡聚醣之累積，而單獨處理PMB05細菌懸浮液則無。於PMB05與PMBKW1細菌懸浮液混合處理組，可觀察到表示癒傷葡聚醣之累積的亮藍色亮點明顯增加(圖1C)。以Tris-HCl緩衝液作為基準，將螢光訊號進行量化後，PMBKW1單獨處理組之螢光量為270.2倍，PMB05與PMBKW1混合處理組之螢光量為505.7倍。PMB05與PMBKW1混合處理相較於PMBKW1單獨處理，其所誘導的相對螢光量顯著增加1.9倍(圖1D)。

### *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05葉表殘存測試

檸檬葉片噴佈*B. amyloliquefaciens* PMB05細菌懸浮液後，分析在溫室條件下檸檬葉表PMB05的族群變化，結果顯示PMB05在葉片上於噴佈後之初始菌量為 $2.37 \times 10^6$  CFU/g leaf，分別到第3、7、10、14及21天後的菌量分別為2.4、2.4、2.3、2.3



圖一、利用*Bacillus amyloliquefaciens* PMB05所製備之細菌懸浮液於檸檬葉片上強化Xanthomonas citri subsp. citri所誘導之激活化氧產生與癒傷葡聚醣的累積。

**Fig. 1.** Effect of *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05 bacterial suspension on rapid reactive oxygen species generation and callose deposition upon *Xanthomonas citri* subsp. *citri* treatment on lemon leaves. Panel A and C indicated the images of rapid ROS generation and callose deposition, respectively. Panel B and D indicated the fluorescent intensity of ROS and callose calculated by ImageJ, respectively. Different letters indicated significant differences between treatments based on Tukey's HSD test ( $P < 0.05$ ). Bars indicated 10  $\mu$ m in length.

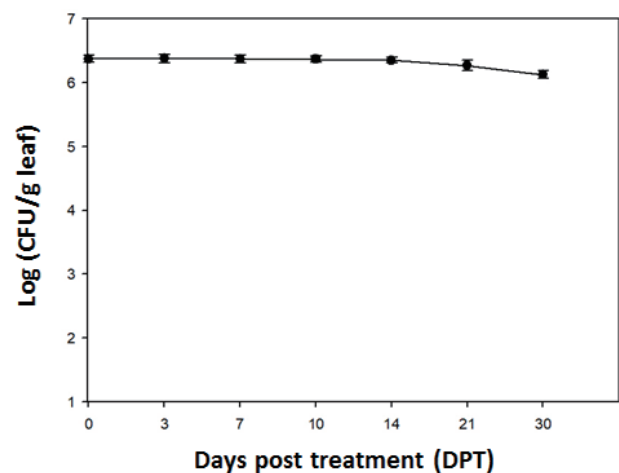
及 $1.9 \times 10^6$  CFU/g leaf，到30天也仍有 $1.3 \times 10^6$  CFU/g leaf之菌量(圖二)。

### 在500毫升三角燒瓶中對*Bacillus amyloliquefaciens* PMB05之發酵配方分析

以二砂糖及酵母粉作為發酵配方所組成不同重量百分率濃度之碳氮源配方來分析其對*B. amyloliquefaciens* PMB05在培養後之細菌族群量、内生孢子量及產孢率。經培養兩天後的結果顯示，所有發酵液中之細菌族群量均達 $10^8$  CFU/mL以上，其中以碳氮比3:3為最高，顯著高於其他處理組。在內生孢子量上，則以3:1顯著高於其他處理組。經計算後之產孢率仍以3:1之配方可達到85.15%為最高，而前述3:3配方之產孢率僅40.42%(表一)。此試驗中表現較佳之3:1配方在後續試驗中稱之為PMBFL-2A。

### 利用PMBFL-2A發酵配方於30公升發酵槽之發酵條件分析

三角燒瓶發酵試驗中產孢率表現較佳之PMBFL-2A於30公升發酵槽中，分別以不同轉速及通氣量進行測試來評估最適發酵條件。在轉速的條件上，於固定1.0 vvm下分別評估120及150 rpm條件下對細菌族群量、内生孢子量及產孢率之影響。培養後的結果顯示120及150 rpm之菌量分別達 $1.2 \times 10^9$ 及 $1.7 \times 10^9$  CFU/mL，以150 rpm之菌量顯著較高；而在產孢率上則以120 rpm為佳，在120小時之後即達100%(表二)。隨後以固定120 rpm條件下進行通氣量分析，結果顯示，1.0及1.5 vvm之細菌族群量分別達 $1.3 \times 10^9$ 及 $3.6 \times 10^8$  CFU/mL，以1.0 vvm之條件下有顯著較高



圖二、*Bacillus amyloliquefaciens* PMB05於檸檬葉片上之殘存。

**Fig. 2.** Population density of *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05 on the leaves of *Citrus limon*. The bacterial suspension was prepared in 0.1% (w/v) CMC and adjusted to an  $OD_{600}$  of 0.3 before treatment. Then, the bacterial suspension was sprayed on lemon leaves and further placed in the greenhouse. The population was determined by serial dilution to count the colony-forming unit (CFU) by 1 gram of fresh leaf tissue.

表一、不同碳氮比配方在500毫升三角燒瓶中對於*Bacillus amyloliquefaciens* PMB05產生內生孢子之影響

**TABLE 1.** Effects of distinct carbon/nitrogen ratios in formula on bacterial sporulation of *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05 in 500 mL flask

Cabon : Nitrogen	Cells (CFU/mL)	Spores (CFU/mL)	Sporulation (%)
1:1	8.28±0.02 <sup>a</sup>	6.95±0.03 <sup>a</sup>	4.66
1:2	8.35±0.04 <sup>a</sup>	6.97±0.04 <sup>a</sup>	4.25
1:3	8.42±0.03 <sup>a</sup>	6.89±0.09 <sup>a</sup>	3.13
2:1	8.67±0.07 <sup>ab</sup>	7.98±0.02 <sup>a</sup>	21.11
2:2	8.87±0.04 <sup>ab</sup>	8.08±0.07 <sup>a</sup>	16.69
2:3	9.01±0.05 <sup>b</sup>	7.94±0.03 <sup>a</sup>	8.73
3:1	9.41±0.03 <sup>c</sup>	9.33±0.04 <sup>d</sup>	85.15
3:2	9.28±0.01 <sup>bc</sup>	8.81±0.04 <sup>b</sup>	45.32
3:3	9.63±0.08 <sup>d</sup>	9.22±0.05 <sup>c</sup>	40.42

Brown sugar and yeast powder were used as carbon and nitrogen sources in formula, respectively. For example, 1:1 indicates the formula contains 1% of brown sugar and 1% of yeast powder. Means of cell and spore numbers were presented in Log values. Sporulations indicated the ratio of spores in living cells. Different letters indicated significant differences between treatments based on Tukey's HSD test ( $P < 0.05$ ).

表二、不同轉速在30公升發酵槽中對於*Bacillus amyloliquefaciens* PMB05產生內生孢子之影響

**TABLE 2.** Effect of distinct agitation rates on bacterial sporulation of *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05 in 30 liters submerged fermentation

Time (hour)	120 rpm			150 rpm		
	Cells	Spores	Sporulation (%)	Cells	Spores	Sporulation (%)
0	6.32±0.01	0.00	0.00	6.23±0.03	0.00	0.00
24	7.66±0.04	5.67±0.03	1.00	8.68±0.11*	8.13±0.04*	28.07*
48	8.80±0.05	8.72±0.06	82.19	9.20±0.07*	8.48±0.02*	18.60*
72	9.01±0.02	8.95±0.01	92.95	9.53±0.05*	8.96±0.04*	25.90*
96	9.10±0.03	9.04±0.01	93.05	9.56±0.03*	9.01±0.02*	29.30*
120	9.07±0.02	9.11±0.01	100.00	9.21±0.02	9.04±0.02	59.80*

A standard formula for PMBFL-2A was used in this assay. Means of cell and spore numbers were presented in Log values. Sporulations indicated the ratio of spores in living cells. The asterisks indicate significant difference compared to the treatment at 120 rpm based on the  $t$ -test ( $P < 0.05$ ).

之細菌族群量。同時，1.5 vvm之條件下，於培養48小時後即可達100%之產孢率，而1.0 vvm之條件則需於120小時才達到100% (表三)。

### 發酵液儲存後之細菌族群量變化

為分析發酵液於儲存時期細菌族群的穩定性，分別於54°C置放14天與在4°C、25°C及37°C恆溫狀態下長期評估細菌族群量兩種方式進行。結果顯示由PMBFL-2A發酵液的原始細菌族群

表三、不同通氣量在30公升發酵槽中對於*Bacillus amyloliquefaciens* PMB05產生內生孢子之影響

**TABLE 3.** Effect of distinct aeration rates on bacterial sporulation of *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05 in 30 liters submerged fermentation

Time (hour)	1.0 vvm			1.5 vvm		
	Cells	Spores	Sporulation (%)	Cells	Spores	Sporulation (%)
0	6.41±0.05	0.00	0.00	6.35±0.04	0.00	0.00
24	6.55±0.08	5.67±0.03	13.08	7.58±0.08*	0.00*	0.00*
48	7.98±0.17	6.72±0.06	16.57	8.00±0.03	8.13±0.03*	100.00*
72	8.25±0.04	7.97±0.02	52.14	8.56±0.06*	8.56±0.12*	100.00*
96	8.95±0.05	8.90±0.08	89.47	8.71±0.05*	8.78±0.03	100.00*
120	9.08±0.05	9.12±0.02	100.00	8.56±0.03*	8.59±0.03*	100.00

A standard formula for PMBFL-2A was used in this assay. Means of cell and spore numbers were presented in Log values. Sporulations indicated the ratio of spores in living cells. The asterisks indicate significant difference compared to the treatment at 1.0 vvm based on the  $t$ -test ( $P < 0.05$ ).

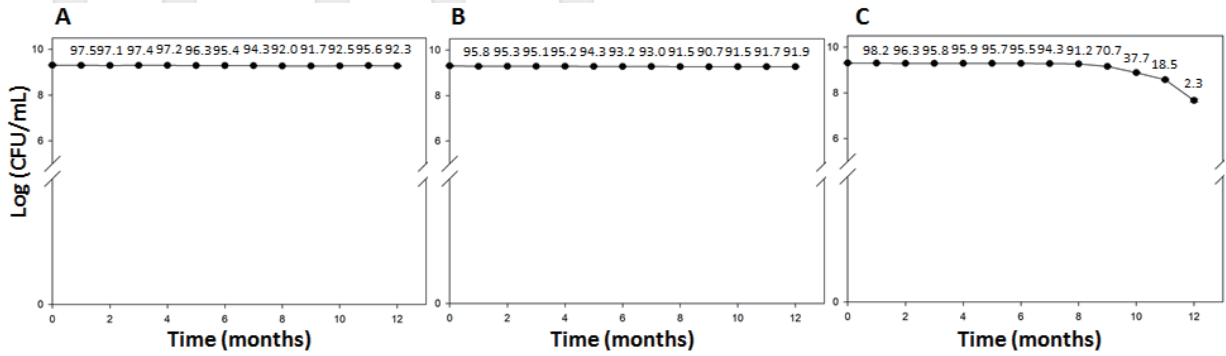
量為 $2.1 \times 10^9$  CFU/mL，於54°C置放14天後可測得 $2.0 \times 10^9$  CFU/mL之菌量，存活率達95.3%。而在4°C及25°C儲存12個月後仍分別有 $1.9 \times 10^9$ 及 $1.9 \times 10^9$  CFU/mL，存活率分別達92.3及91.5%。但是在37°C儲存8個月後的菌量為 $1.9 \times 10^9$  CFU/mL，存活率達91.9%，之後逐漸下降至第12個月後僅有2.3%之存活率 (圖三)。

### 不同配方之*Bacillus amyloliquefaciens* PMB05發酵液在溫室中對檸檬潰瘍病之防治效果

在評估*B. amyloliquefaciens* PMB05對檸檬潰瘍病之防治效果上，分別利用PMB05細菌懸浮液與不同碳氮源比例配方之發酵液經200倍稀釋後進行評估。結果顯示處理PMB05細菌懸浮液與碳氮比1:1、3:1及3:3配方發酵液的稀釋液皆可顯著減少潰瘍病之發生，與對照組之罹病度97.2%相較，則分別下降至64.3%、47.1%、35.5%及37.0% (圖四)。由PMB05細菌懸浮液與碳氮比1:1、3:1及3:3配方發酵液的稀釋液所獲得之防治率分別為33.8%、51.6%、63.5%及62.0%，其中又以碳氮比3:1 (PMBFL-2A) 及3:3之發酵液防治效果最佳。

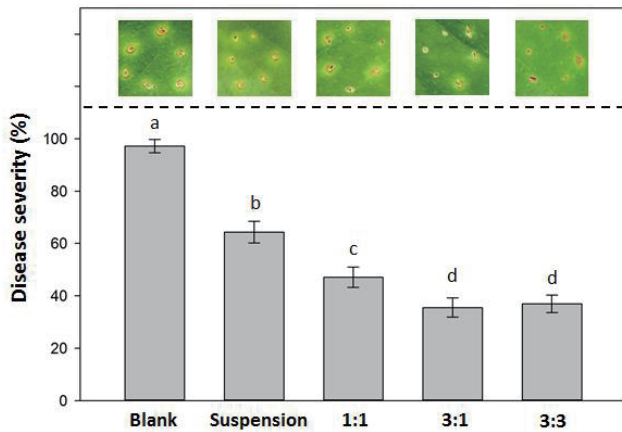
### PMBFL-2A發酵液對檸檬葉片免疫反應強化之影響

為了瞭解*B. amyloliquefaciens* PMB05所製作之PMBFL-2A發酵液是否能在檸檬葉片上有效提高植物免疫訊號之強度，分別利用激活化氧與癒傷葡聚糖之染色進行觀察，並以*B. amyloliquefaciens* PMB05之細菌懸浮液作為對照。在激活化氧之快速產生上，處理後一小時的結果顯示單獨處理*Xanthomonas citri* subsp. *citri* PMBKW1細菌懸浮液，可觀察到微量之激活化氧的螢光訊號，但是單獨處理PMB05細菌懸浮液或PMBFL-2A發酵液均無法觀察到激活化氧之螢光訊號。進一步以PMBKW1細菌懸浮液混合PMB05細菌懸浮液或PMBFL-



圖三、不同溫度對PMBFL-2A發酵液中*Bacillus amyloliquefaciens* PMB05族群變化。

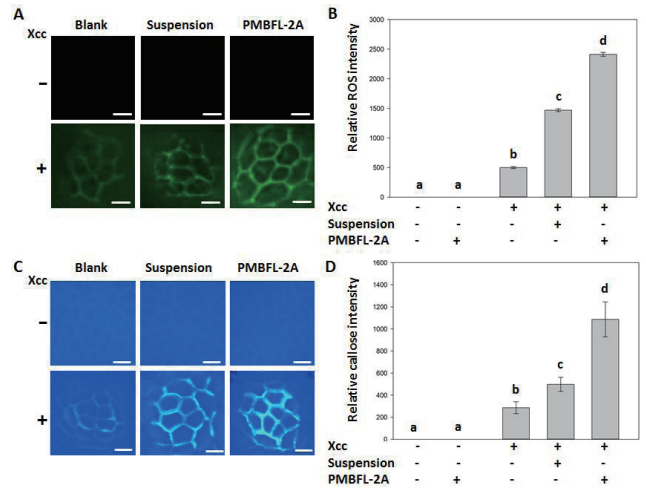
**Fig. 3.** Effect of distinct temperatures on the population change of *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05 in PMBFL-2A fermentation broth. Panel A, B, and C revealed the fermentation broth was placed in an incubator at 4, 25, and 37 °C, respectively. Values above the black circle are mean to the percentage of survival rate.



圖四、利用不同碳氮比發酵配方所製成之*Bacillus amyloliquefaciens* PMB05發酵液對其在防治檸檬潰瘍病之影響。

**Fig. 4.** Effect of distinct carbon/nitrogen ratios of *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05 fermentation broth on control efficacies of bacterial citrus canker. The assay was performed on the leaves of *Citrus limon*. The 200-fold dilutions of distinct carbon/nitrogen ratios of PMB05 fermentation broth were sprayed before inoculation. Disease severity was evaluated 3 weeks post-inoculation with the strain PMBKW1 at  $10^8$  CFU/mL. Different letters indicated significant differences between treatments based on Tukey's HSD test ( $P < 0.05$ ).

2A發酵液處理，都可觀察到激活化氧的螢光訊號較單獨處理 PMBKW1有明顯增加(圖五A)。將螢光訊號進行量化後並以 Tris-HCl緩衝液作為基準，結果顯示PMBKW1單獨處理組所誘導的螢光量為492.3倍，PMB05細菌懸浮液與PMBKW1混合處理組的螢光量為1436.7倍，PMBFL-2A發酵液與PMBKW1混合處理組的相對螢光量為2439.6倍。PMBFL-2A發酵液與PMBKW1混合處理處之螢光強度顯著高於PMB05細菌懸浮液與PMBKW1混合處理組(圖五B)。在癒傷葡聚醣累積的分析上，單獨處理PMBKW1細菌懸浮液下，可測得微量之癒傷葡聚醣之累積。然而在單獨處理PMBFL-2A發酵液及PMB05細菌



圖五、*Bacillus amyloliquefaciens* PMB05之PMBFL-2A發酵液於檸檬上對強化*Xanthomonas citri* subsp. *citri*所誘導之激活化氧產生與癒傷葡聚醣累積之影響。

**Fig. 5.** Effect of PMBFL-2A fermentation broth prepared with *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05 on reactive oxygen species generation and callose deposition upon treatment of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* on the leaves of *Citrus limon*. Panel A and C indicated the images of rapid ROS generation and callose deposition, respectively. Panel B and D indicated the fluorescent intensity of ROS and callose calculated by ImageJ, respectively. Different letters indicated significant differences between treatments based on Tukey's HSD test ( $P < 0.05$ ). Bars indicated 10  $\mu$ m in length.

懸浮液，則無法觀察到癒傷葡聚醣之累積。於PMBKW1混合PMBFL-2A發酵液或PMB05細菌懸浮液處理組，可觀察到癒傷葡聚醣之累積有明顯增加(圖五C)。將螢光訊號量化後並以 Tris-HCl緩衝液作為基準，結果顯示，PMBKW1單獨處理組所誘導的螢光量達305.5倍，PMB05與PMBKW1混合處理組之螢光量為517.0倍，PMBFL-2A與PMBKW1混合處理組之螢光量為1131.8倍。PMBFL-2A與PMB05混合處理處之螢光強度也顯著

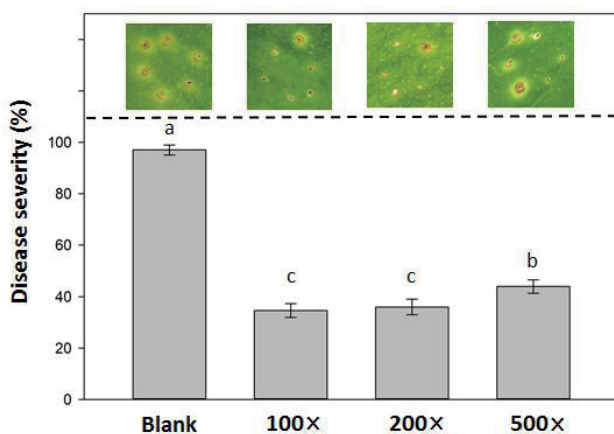


高於PMB05細菌懸浮液與PMBKW1混合處理組(圖五D)。

### PMBFL-2A發酵液對檸檬潰瘍病之防治

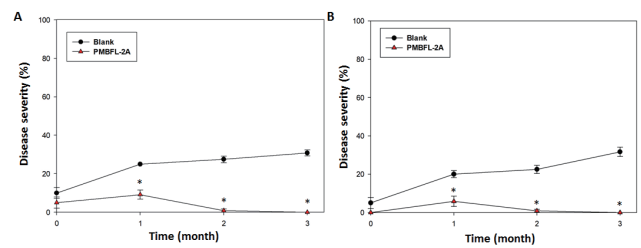
為應用*B. amyloliquefaciens* PMB05所製成之PMBFL-2A發酵液防治檸檬潰瘍病，將PMBFL-2A發酵液在不同稀釋倍數下評估其對於潰瘍病之防治效果。結果顯示處理100×、200×及500×稀釋之PMBFL-2A發酵液皆可減少潰瘍病之發生，與對照組之罹病度97.0%相較，分別顯著下降至34.6%、36.0%及43.9% (圖六)。100×、200×及500×稀釋之PMBFL-2A發酵液之防治率分別為64.4%、62.9%及54.7%，其中又以100×及200×稀釋之PMBFL-2A發酵液之防治效果顯著優於500×稀釋液處理組。

為瞭解PMBFL-2A發酵液於田間對檸檬潰瘍病之防治效果，分別於檸檬葉片及果實上進行防治評估。於檸檬葉片上之防治，結果顯示PMBFL-2A發酵液處理組於一個月後葉片之罹病度為9.2%顯著低於對照組的25.0%，並能持續且顯著的降低檸檬潰瘍病的發生，第二個月及第三個月的罹病度分別為0.8%、0.0%，對照組則分別為27.5%、30.8%。在第三個月PMBFL-2A發酵液之防治率可達100.0% (圖七A)。另一方面，在檸檬果實上之防治結果顯示PMBFL-2A發酵液於處理後一個月之罹病度為5.8%，與對照組20.0%相比，顯著降低果實病害的罹病度。之後的二個月與對照組相比皆顯著的降低檸檬潰瘍病的發生，其中PMBFL-2A發酵液第二個月到第三個月的罹病度分別為0.8%、0.0%，對照組則分別為22.5%、31.6%。在第三個月PMBFL-2A發酵液之防治率亦可達100% (圖七B)。



圖六、利用*Bacillus amyloliquefaciens* PMB05所製成之PMBFL-2A發酵液在不同稀釋倍數下對其防治檸檬潰瘍病之影響。

**Fig. 6.** Effect of dilutions of PMBFL-2A fermentation broth prepared with *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05 on control efficacies of bacterial citrus canker. The assay was performed on the leaves of *Citrus limon*. The treatments with distinct dilutions of PMBFL-2A were sprayed before inoculation. Disease severity was evaluated 3 weeks post-inoculation with the strain PMBKW1 at  $10^8$  CFU/mL. Different letters indicated significant differences between treatments based on Tukey's HSD test ( $P < 0.05$ ).



圖七、利用*Bacillus amyloliquefaciens* PMB05所製成之PMBFL-2A發酵液對於田間檸檬葉片(A)及果實(B)潰瘍病之防治試驗。

**Fig. 7.** Effects of PMBFL-2A fermentation broth prepared with *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05 on controlling bacterial canker on the leaves (A) and fruits (B) of lemon under the field conditions. The 200 fold dilutions of PMBFL-2A were sprayed on the lemon leaves every two weeks for 6 times. Disease severity of citrus canker was evaluated 10 newly developed blade or 10 newly produced fruits from the top shoots. Five shoots from one tree were evaluated as one repeat, and five repeats were performed in each treatment. The number of canker symptoms was observed monthly for three months. \* Indicated that the treatments have significant differences compared with blank treatments by *t*-test ( $P < 0.05$ ).

## 討 論

近年來多篇報導利用土壤根際細菌以生物防治方法降低病害發生<sup>(10-13, 29)</sup>。在防治植物病害與促進植物生長等多元需求下，許多不同的根圈微生物均具有發展價值，其中有多篇研究證明*Bacillus* spp.為開發微生物製劑上具有潛力的菌種<sup>(26, 30-32)</sup>。在*Bacillus* spp.中，由本研究室所分離之*B. amyloliquefaciens* PMB05已於多篇研究中證明具有能夠防治多種植物病害<sup>(16-19)</sup>，且研究顯示此菌株能夠防治病害之機制與其能提升植物免疫反應中PAMPs-triggered immunity (PTI) 之訊號強度有關<sup>(16, 18)</sup>。在Riera等人的研究中，利用具有誘導抗病特質之*Pseudomonas* sp.與*Burkholderia* spp.菌株均可增加葡萄柚對柑橘潰瘍病之抗病性<sup>(33)</sup>。更有研究顯示葡萄柚可以藉由鞭毛蛋白這種PAMP的處理來增加抗病性<sup>(34)</sup>。因此，可以提升植物PTI免疫反應訊號的*B. amyloliquefaciens* PMB05是否能夠在*X. citri* subsp. *citri* PMBKW1感染過程中提高檸檬免疫訊號並增強其對潰瘍病之抗病性值得研究。在PTI反應的訊號上，已於阿拉伯芥、番茄、西瓜及草莓證明*B. amyloliquefaciens* PMB05菌株可提高激活化氧產生與癒傷葡聚醣累積等指標訊號<sup>(16, 18, 19, 25)</sup>。本研究之結果顯示當檸檬葉片在PMBKW1菌株存在下，PMB05可提升在PMBKW1誘導下激活化氧的產生及癒傷葡聚醣的累積，說明PMB05菌株確實可在檸檬葉片因為柑橘潰瘍病菌的存在而提升植物免疫訊號。由此推測PMB05也應該可以具有防治檸檬潰瘍病發生的潛力。進一步應用*B. amyloliquefaciens* PMB05之細菌懸浮液也可以有效防治檸檬潰瘍病的發生，說明PMB05菌株在檸檬葉片所提升的植物免疫訊號確實與柑橘潰瘍病之防治有關。

在檸檬的種植上，屬於露天環境，拮抗微生物在葉面存活能力亦是防治葉部病害的重要指標。Jiang等人研究指出*B. amyloliquefaciens* 54在西瓜葉片上能夠殘存21天以上，且此能力與減少病害的發生有關<sup>(35)</sup>。在評估*B. amyloliquefaciens* PMB05於檸檬葉片上殘存能力的結果顯示此菌株在溫室中的存活至少達21天以上均可維持其葉片上的族群數量，可推測PMB05菌株具有開發成微生物製劑並可應用於田間防治檸檬潰瘍病之價值。在微生物製劑的開發上，利用發酵技術的大量生產為重要的一環，也為實現田間應用的可行辦法之一。然而，發酵條件與培養基組成在量產過程中扮演著關鍵性因素<sup>(20-22)</sup>。在Hong等人的研究中指出，有益微生物內孢子的形式在市場開發端為重要的因素<sup>(36)</sup>。在本研究中，500 mL搖瓶試驗的結果顯示碳氮比3:1有最高產孢率，推測可能較具有開發之價值，故將此配方所獲得之發酵液稱為PMBFL-2A並以此發酵液的配方進行後續研究。在文獻報導中利用*Bacillus amyloliquefaciens* B128菌株進行發酵培養基碳源分析指出，以乳糖作為碳源，所添加的最適濃度為2.5%，*B. amyloliquefaciens* B128菌株有較高內孢子量；但在0.5%乳糖作為碳源下*B. amyloliquefaciens* B128之內孢子量與2.5%乳糖相比，則會降低，推測碳源太少的情況下，營養源不足而使菌量無法提升進而導致內孢子量無法上升<sup>(37)</sup>。另外在以*Bacillus subtilis* KATMIRA 1933菌株進行培養基成分調整的研究中亦證實，以蛋白胨作為氮源的情況下，當達最適濃度後持續增加氮源的濃度會使內孢子量下降<sup>(14)</sup>。本研究亦得到類似結果，隨著碳源濃度的降低，菌量及內孢子量也隨之降低，故未來欲提高內孢子產孢率可能須有較高的碳源組成。在以*Bacillus licheniformis* NCIM 2324進行不同發酵槽通氣量的實驗結果指出，在2.0 vvm之通氣量與1.0 vvm相比，2.0 vvm通氣量菌量較高且生長較快<sup>(38)</sup>。本研究於30公升發酵槽中的結果顯示在較高的通氣量(1.5 vvm)下搭配120 rpm轉速可使*B. amyloliquefaciens* PMB05具有之最佳產孢率且約於72小時後即達穩定的狀態，與前人的研究結果類似，說明有較高的通氣量確實有助於菌量之生長。在最終菌量與產孢率的整合考量下，此菌株的發酵條件以轉速120 rpm及通氣量1.0 vvm下培養5天為最佳。進一步將PMB05藉此配方及固定發酵條件所製成之PMBFL-2A發酵液放置於54°C處理14天或分別在4°C、25°C放置12個月，結果均顯示處理後存活率都可達90%以上。然而，在37°C處理下僅能維持8個月有90%以上之存活率，推測在較高的溫度下可能較不利於此發酵液的保存。

利用*B. amyloliquefaciens* PMB05所製成之PMBFL-2A發酵液分析其對植物免疫反應之影響，由結果顯示發酵液相較於細菌懸浮液可更有效提升在柑橘潰瘍病菌存在下所誘導的激活化氧產生及癒傷葡聚醣累積，說明PMB05經發酵後確實能增加檸檬葉片的植物免疫訊號。在發酵的過程中可增加*B. amyloliquefaciens* PMB05何種化合物的產生而加強其提升植物免疫反應之效果仍然未知，值得後續之研究。另一方面，於溫

室進行檸檬潰瘍病的防治試驗結果，顯示200倍稀釋的PMBFL-2A發酵液相較於PMB05細菌懸浮液處理可以顯著地降低病害的發生。進一步應用PMBFL-2A發酵液於田間評估在檸檬上之防治效果，結果顯示經三個月後不管是檸檬果實或是葉片上都能顯著的降低檸檬潰瘍病，並且防治率達100%，由此可證明*B. amyloliquefaciens* PMB05之PMBFL-2A發酵液確實具有應用於田間防治檸檬潰瘍病之效果。

由於*Bacillus* spp.所產生拮抗物質常可抑制病原菌的生長，也是生物防治的主要機制之一。在多株*Bacillus* spp.對多種細菌性病原的拮抗分析中，*B. amyloliquefaciens* PMB05屬於弱抑制菌群，因此拮抗作用在病害防治上並非扮演重要的角色<sup>(16)</sup>。故本研究使用之PMB05菌株藉由發酵過程所產生的二次代謝物，其對檸檬潰瘍病菌具有拮抗物質的可能性較小，推測防治效果之增強可能與其能大幅增強植物免疫反應的強度有關。綜上所述，本研究證明*Bacillus amyloliquefaciens* PMB05可增強植物免疫反應，且為有效防治檸檬潰瘍病之主要因子。同時，本研究建立最適發酵條件製成之PMBFL-2A發酵液，於溫室或田間試驗均顯示此發酵液能夠有效的防治檸檬潰瘍病的發生。

## 引用文獻

1. FAO, World production of lemons and limes in 2018. 2019.
2. COA, COA yearbook, in Annu. Rep. Agri. Stat. 2019, Council of Agriculture, Executive Yuan: Taiwan.
3. Gottwald, T.R., J.H. Graham, and T.S. Schubert, Citrus canker: the pathogen and its impact. *Plant Health Prog.*, 2002. 3: p. 15.
4. Graham, J.H., et al., *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Mol. Plant Pathol.*, 2004. 5: p. 1-15.
5. Shiotani, H., et al., Survival and dispersal of *Xanthomonas citri* pv. *citri* from infected Satsuma mandarin fruit. *Crop Prot.*, 2009. 28: p. 19-23.
6. Behlau, F., et al., Effect of frequency of copper applications on control of citrus canker and the yield of young bearing sweet orange trees. *Crop Prot.*, 2010. 29: p. 300-305.
7. Graham, J.H., M.M. Dewdney, and M.E. Myers, Streptomycin and copper formulations for control of citrus canker on grapefruit. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 2010. 123: p. 92-98.
8. Alva, A., Copper contamination of sandy soils and effects on young Hamlin orange trees. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1993. 51: p. 857-864.
9. Behlau, F., et al., Copper resistance genes from different xanthomonads and citrus epiphytic bacteria confer resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 2012. 133:



- p. 949-963.
10. Cao, Y., et al., Isolation and identification of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* SQR 9 for suppressing *Fusarium* wilt of cucumber. *Sci. Hortic.*, 2012. 135: p. 32-39.
  11. Kim, P.I., et al., Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2010. 20: p. 138-145.
  12. Park, J.W., et al., Systemic resistance and growth promotion of chili pepper induced by an antibiotic producing *Bacillus vallismortis* strain BS07. *Biol. Control*, 2013. 65: p. 246-257.
  13. Ye, Y.F., et al., Identification of antifungal substance (Iturin A2) produced by *Bacillus subtilis* B47 and its effect on southern corn leaf blight. *J. Integr. Agric.*, 2012. 11: p. 90-99.
  14. Khardziani, T., et al., Elucidation of *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933 Potential for Spore Production in Submerged Fermentation of Plant Raw Materials. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, 2017. 9: p. 435-443.
  15. Young, S.B. and P. Setlow, Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide. *J. Appl. Microbiol.*, 2003. 95: p. 54-67.
  16. Ho, T.-H., et al., *Bacillus amyloliquefaciens* strain PMB05 intensifies plant immune responses to confer resistance against bacterial wilt of tomato. *Phytopathology*, 2020. 110: p. 1877-1885.
  17. Li'aini, A.S., et al., Application of *Bacillus amyloliquefaciens* to control black rot disease on cabbage caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J. Plant Med.*, 2017. 59: p. 39-44.
  18. Wang, Y.-H., et al., Using dynamic changes of chlorophyll fluorescence in *Arabidopsis thaliana* to evaluate plant immunity-intensifying *Bacillus* spp. strains. *Phytopathology*, 2019. 109: p. 1566-1576.
  19. Wu, Y.-M., et al., *Bacillus amyloliquefaciens* strains control strawberry anthracnose through antagonistic activity and plant immune response intensification. *Biol. Control*, 2021. 157: p. 104592.
  20. Al Mamun, M.A., et al., Optimization of fermenting medium by statistical method for production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* MZK05M9. *J. Appl. Biol.*, 2017. 5: p. 24-28.
  21. Irfan, M., et al., Relationship of process parameters for the production of alkaline protease by *Bacillus* sp. *Inter. J. Agro. Vet. Med. Sci.*, 2010. 4: p. 114-120.
  22. Nagar, S., et al., Production and optimization of cellulase-free, alkali-stable xylanase by *Bacillus pumilus* SV-85S in submerged fermentation. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 2010. 37: p. 71-83.
  23. Potumarthi, R., S. Ch. and A. Jetty, Alkaline protease production by submerged fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformis* NCIM-2042: Effect of aeration and agitation regimes. *Biochem. Eng. J.*, 2007. 34: p. 185-192.
  24. Uzuner, S. and D. Cekmecelioglu, Enhanced pectinase production by optimizing fermentation conditions of *Bacillus subtilis* growing on hazelnut shell hydrolyzate. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2015. 113: p. 62-67.
  25. Chang, J.-J., et al., Intensification of PAMP-triggered immunity in watermelon by *Bacillus* spp. strains as a strategy for controlling bacterial fruit blotch disease. *J. Plant Med.*, 2019. 61: p. 39-48.
  26. Shafi, J., H. Tian, and M.S. Ji, *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnol. Biotech. Eq.*, 2017. 31: p. 446-459.
  27. Gould, G. and C. Wrighton, Limitations of the initiation of germination of bacterial spores as a spore control procedure. *J. Appl. Bacteriol.*, 1968. 31: p. 357-366.
  28. USEPA., Office of Prevention, Pesticide and Toxic Substance (OPPTS). 2002, Product Properties Test Guidelines, OPPTS 830.6317.
  29. Vurukonda, S.S.K.P., D. Giovanardi, and E. Stefani, Plant Growth Promoting and Biocontrol Activity of *Streptomyces* spp. as Endophytes. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018. 19: p. 952.
  30. Ali, S., et al., Functional characterization of potential PGPR exhibiting broad-spectrum antifungal activity. *Microbiol. Res.*, 2020. 232: p. 126389.
  31. Aulia Rahma, A., et al., Induced Disease Resistance and Promotion of Shallot Growth by *Bacillus velezensis* B-27. *Pak. J. Biol. Sci.*, 2020. 9: p. 1113-1121.
  32. Miljaković, D., J. Marinković, and S. Balešević-Tubić, The Significance of *Bacillus* spp. in Disease Suppression and Growth Promotion of Field and Vegetable Crops. *Microorganisms*, 2020. 8: p. 1037.
  33. Riera, N., et al., Induced Systemic Resistance Against Citrus Canker Disease by Rhizobacteria. *Phytopathology*, 2018. 108: p. 1038-1045.
  34. Shi, Q., et al., Responsiveness of different citrus genotypes to the *Xanthomonas citri* ssp. *citri*-derived pathogen-associated molecular pattern (PAMP) flg22 correlates with resistance to citrus canker. *Mol. Plant Pathol.*, 2015. 15: p. 507-520.
  35. Jiang, C.H., et al., Study on screening and antagonistic mechanisms of *Bacillus amyloliquefaciens* 54 against bacterial fruit blotch (BFB) caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citricola*. *Microbiol. Res.*, 2015. 170: p. 95-104.

## 26 J. Plant Med.

36. Hong, H.A., le H. Duc, and S.M. Cutting, The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2005. 29: p. 813-835.
37. Rao, Y.K., et al., Medium optimization of carbon and nitrogen sources for the production of spores from *Bacillus amyloliquefaciens* B128 using response surface methodology. *Process Biochem.*, 2007. 42: p. 535-541.
38. Bajaj, I.B. and R.S. Singhal, Effect of aeration and agitation on synthesis of poly ( $\gamma$ -glutamic acid) in batch cultures of *Bacillus licheniformis* NCIM 2324. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 2010. 15: p. 635-640.

### ABSTRACT

Lin, K.-K., 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(4): 17-26

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

Lemon is an internationally important economic crop. In Taiwan, Kaohsiung and Pingtung are the main producing areas. During the growth period of crops, bacterial canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) is often reduce its quality. Due to the demand on disease control, this study mainly explores whether the fermentation broth established by using *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05, which can enhance plant immune signals and further contribute to control bacterial canker. Firstly, it was confirmed that the bacterial suspension of *B. amyloliquefaciens* PMB05 enhanced the plant immune signals such as reactive oxygen generation and callose deposition induced by Xcc on lemon leaves. *B. amyloliquefaciens* PMB05 also exhibited good survival ability on lemon leaves. Furthermore, in the greenhouse test of PMB05, the disease severity of bacterial canker can be significant reduced by 25.6% in the treatment with the bacterial suspension. To further develop its fermentation broth, bacteria amount and sporulation rate were used as indicators to evaluate the formula in 500 mL flasks and 30 L fermentation tanks. In the 500 mL shake flask culture, results revealed that the carbon to nitrogen ratio of 3:1 can achieve the highest cell yield and sporulation rate, and this fermentation broth is called PMBFL-2A. Furthermore, the 30 L fermentation tank also showed that PMBFL-2A had the highest sporulation rate under the 120 rpm and 1.5 vvm. The shelf life assay showed that the 54 °C treatment for two weeks and the treatment at 4, 25, and 37 °C for 8

months can maintain more than 90% of the bacterial population in PMBFL-2A. At the same time, we also proved that the PMBFL-2A fermentation broth can significantly enhance the immune response of PMB05 on lemon leaves compared to that of the bacterial suspension. After 100, 200 and 500 folds dilutions of PMBFL-2A, the occurrence of bacterial canker was reduced by 64.4, 61.0, and 53.0% in disease severity, respectively, in the greenhouse. In 2020, the field trial conducted in Ligang, Pingtung County, the control rate reached 100% to the third month. In summary, this study has established the optimal fermentation conditions for *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05, which can enhance plant immune response, and has the potential to be used in the field to control bacterial canker of lemon.

**Keywords:** Bacterial canker of lemon, *Bacillus amyloliquefaciens* PMB05, Fermentation broth, PAMPs-triggered immunity