

液化澱粉芽孢桿菌 Ba01 防治馬鈴薯青枯病之探討

黃仁麒¹ 吳雅芳² 蔡佳欣³ 周浩平⁴ 林宜賢⁵ 陳穎練^{6,*}

摘要

黃仁麒、吳雅芳、蔡佳欣、周浩平、林宜賢、陳穎練。2021。液化澱粉芽孢桿菌 Ba01 防治馬鈴薯青枯病之探討。台灣農業研究 70(1):24–42。

茄科青枯病為馬鈴薯和番茄重要細菌性病害，由青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* 引起，除健康種苗、水旱輪作及合理化施肥等防治方法外，另有推薦液化澱粉芽孢桿菌 *Bacillus amyloliquefaciens* PMB01。本實驗室曾發現液化澱粉芽孢桿菌 Ba01 對馬鈴薯瘡痂病具防治效果，但目前 Ba01 或 PMB01 對馬鈴薯青枯病之防治仍未有相關研究。本文研究發現 Ba01 可產生蛋白酶、澱粉酶、纖維素酶、脂酶等胞外水解酶，並具溶磷能力。與已上市之 PMB01 相比，Ba01 具有較佳的澱粉、蛋白質、纖維素分解能力及溶磷效果。此外，Ba01 在泳動、表面移行與生物膜生成的能力亦較佳。對峙培養試驗發現，Ba01 與 PMB01 皆可以抑制馬鈴薯青枯病菌 race 1 菌株 RSN371 與 race 3 菌株 RSN245、RSN373、RSN439 之生長。然而，混合 Ba01 與 PMB01，並未較單獨施用 Ba01 或 PMB01 獲得更佳拮抗青枯病菌之效果。此 4 株青枯病菌以 RSN439 具較強毒力，故作為後續試驗菌株。於盆栽試驗中，單獨接種 RSN439 罹病度達 100%，而在分別澆灌 Ba01 或 PMB01 後，其罹病度顯著降至 20% ($P = 0.0009$) 與 40% ($P = 0.0135$)。於植物的防禦反應，發現同時接種 RSN439 與 Ba01 或 PMB01 能增加活性氧 (reactive oxygen species; ROS) 於馬鈴薯葉片的累積。總結，液化澱粉芽孢桿菌 Ba01 可有效防治馬鈴薯青枯病，其作用機制可能與抑制病原菌、胞外分解酶的分泌、溶磷作用及誘導 ROS 累積有關。

關鍵詞：馬鈴薯青枯病、青枯病菌、液化澱粉芽孢桿菌、生物防治。

前言

馬鈴薯青枯病為馬鈴薯重要的細菌性病害之一，由土壤傳播病原菌 *Ralstonia solanacearum* 引起，病菌可透過自然開口或傷口進入寄主植物，並自維管束快速入侵木質部定殖 (colonization)，釋放大量胞外多醣類 (exopolysaccharide) 以阻止木質部的水分運輸 (Peeters *et al.* 2013)。前期病徵似缺水狀，由上位葉開始萎凋，葉片仍呈綠色，傍晚葉片恢復正常，後期病徵擴展至全株，甚至導致全株死亡。青枯

病多發生在馬鈴薯植株生長後期至結薯形成前期，莖基部病徵橫切後可發現維管束褐化及產生白色菌流 (Álvarez *et al.* 2010)。青枯病菌依寄主不同，分為五個小種 (race)，第一小種 (race 1) 感染寄主最廣，例茄子、番茄、菸草、胡椒及部分雜草；第二小種 (race 2) 可感染三倍體香蕉及赫蕉屬植物；第三小種 (race 3) 主要感染馬鈴薯及番茄，對於其他茄科作物之毒性較弱；第四生理小種 (race 4) 僅感染薑；第五生理小種 (race 5) 則僅感染桑 (Denny 2007)。透過感

投稿日期：2020 年 9 月 3 日；接受日期：2020 年 11 月 26 日。

* 通訊作者：ychen28@ntu.edu.tw

¹ 國立台灣大學植物醫學碩士學位學程碩士生。台灣 台北市。

² 農委會台南區農業改良場作物環境課副研究員。台灣 台南市。

³ 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。

⁴ 農委會高雄區農業改良場作物環境課副研究員。台灣 高雄市。

⁵ 國立屏東科技大學植物醫學系教授。台灣 屏東縣。

⁶ 國立台灣大學植物病理與微生物學系副教授。台灣 台北市。

染不同植物，可以進行生理小種的傳統鑑定。其中，race 1 與 race 3 可感染馬鈴薯；不同於 race 1，race 3 較耐寒，在 16°C 以下仍具感染能力 (Ciampi & Sequeira 1980; Wu *et al.* 2011)。另，可依對 9 種碳水化合物 [乳糖 (lactose)、麥芽糖 (maltose)、纖維雙糖 (cellobiose)、甘露醇 (mannitol)、山梨聚糖醇 (sorbitol)、甜己醇 (dulcitol)、海藻糖 (trehalose)、肌醇 (myo-inositol)、D-核糖 (D-ribose)] 之利用能力，區分為 6 種生化型 (biovar)。而最新的分類系統，則是以不同 DNA 分析技術將其分為 4 個演化群 (phyloptype)。Phyloptype I 菌株主要分布於亞洲，寄主為茄科作物；phyloptype II 分布於歐美，寄主廣泛，為馬鈴薯、香蕉、番茄；phyloptype III 分布於非洲，寄主為番茄；phyloptype IV 分布於印尼，寄主為香蕉、番茄 (Denny *et al.* 2007)。

液化澱粉芽孢桿菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 為格蘭氏陽性菌，桿狀具周生鞭毛，屬好氣性、活動力強及無莢膜的細菌，可生長於 pH 2–10 的環境，生長最適溫度為 30–40°C，具耐高溫及產生內生孢子 (endospore) 之特性。內生孢子為特殊的休眠體，能產生極強的抗逆境能力，對酸鹼、高溫、高滲透及輻射均有強耐受性。芽孢桿菌防治作物病害的機制分為直接與間接促進植物生長。直接促進植物生長的途徑包括植物荷爾蒙吲哚-3-乙酸 (indole acetic acid; IAA) 與吉貝素 (gibberellin) 的合成 (Chen *et al.* 2010; Almoneafy *et al.* 2014)、溶磷作用和胞外分解酶的分泌以調節根部活化作用，促進植物生長以抵抗外來病原菌 (Bloemberg & Lugtenberg 2001)。間接促進植物生長的途徑包括產生抗生物質 (Pal & Gardener 2006; Chen *et al.* 2010)、嵌鐵物質 (Arguelles-Arias *et al.* 2009)、競爭作用 (Pal & Gardener 2006; Chowdhury *et al.* 2015)、揮發物質的產生 (Chowdhury *et al.* 2015) 及誘導植株產生抗病性 (induced resistance) (Kuo *et al.* 2014)。因此，液化澱粉芽孢桿菌具開發成為生物肥料或生物農藥之潛力。供試菌株 *B. amyloliquefaciens* Ba01 由馬鈴薯薯皮所分離，並由前人發現其對馬鈴薯瘡痂病具防治效果 (Lin *et al.* 2018)；PMB01 為已上市生物防治

菌，商品名為救你一命與絕症剋星 (嘉農，台灣新竹市) (Chou *et al.* 2013)，推薦於防治茄科青枯病及萎凋病；PMB05 可抑制草莓炭疽病菌 (Wu 2016) 及西瓜果斑病菌 (Chang *et al.* 2019) 發生，亦具有提升植物免疫能力。植物經病原菌感染後，植物組織產生過敏性反應 (hypersensitive response) 的同時會誘導生成超氧化物 (O_2^-)，經 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) 氧化酶氧化成 H_2O_2 ，而 H_2O_2 作為活性氧 (reactive oxygen species; ROS) 可視為訊號分子進一步誘導其他防禦機制，如基因表現、癒傷葡聚糖 (callose) 累積等 (Doke 1985)。除此機制，亦可透過吲哚乙酸、水楊酸、乙烯、離層素的產生、PAMP (pathogen associated molecular pattern) triggered immunity (PTI) 及環境壓力等誘導 ROS 的累積 (Mittler *et al.* 2011)。

2013–2014 年間，雲林縣及嘉義縣馬鈴薯種植區的青枯病發病率為 0–32% (Chuang *et al.* 2015)。目前防治方法包括健康種薯、燒毀病株、與水稻、小米、高粱、玉米等進行輪作 (Yuliar *et al.* 2015)。而生物農藥方面，僅台灣推薦液化澱粉芽孢桿菌 PMB01，但其防治效果仍未知。本試驗使用液化澱粉芽孢桿菌 Ba01，並與已商品化之 PMB01 比較其抑菌能力、胞外水解酶的分泌、溶磷能力、誘導 ROS 累積及其對馬鈴薯青枯病之防治能力，評估 Ba01 與 PMB01 使用於防治馬鈴薯青枯病之可能性。

材料與方法

試驗菌株與培養基製備

本試驗使用之液化澱粉芽孢桿菌 (*B. amyloliquefaciens*) 與馬鈴薯青枯病菌 (*R. solanacearum*) 菌株列舉於表 1。液化澱粉芽孢桿菌 Ba01、PMB01 與 PMB05 培養於 LB 液態培養基 [Luria-Bertani liquid medium, 1% Tryptone (Sigma, St. Louis, MO, USA)、1% NaCl (Bioshop, Burlington, Canada)、0.5% yeast extract (Bioshop, Burlington, Canada)]/固態 [1.5% agar (Bioshop, Burlington, Canada)]，溫度為 37°C。馬鈴薯青枯病菌 RSN245、RSN371、

表 1. 本研究使用之菌株，RSN371 與 RSN373 分離於同一田區，但不同植株；RSN245、RSN371 及 RSN439 則分離自不同田區。

Table 1. Strains used in this study. RSN371 and RSN373 were isolated from same field but different plants. RSN245, RSN371 and RSN439 were isolated from different field.

Microorganism	Strain	Source or reference	Collection area	Isolation site
Biocontrol agent				
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Ba01	Lin <i>et al.</i> (2018)	Houli, Taiwan	Potato tuber
	PMB01	Chou <i>et al.</i> (2013)	Neipu, Taiwan	Soil
	PMB05	Wang <i>et al.</i> (2019)	Neipu, Taiwan	Soil
Pathogen				
<i>Ralstonia solanacearum</i>	RSN245 (race 3)	This study	Dounan, Taiwan	Potato stem
	RSN371 (race 1)	This study	Gukeng, Taiwan	Potato stem
	RSN373 (race 3)	This study	Gukeng, Taiwan	Potato stem
	RSN439 (race 3)	This study	Gukeng, Taiwan	Potato tuber

RSN373 及 RSN439，於雲林縣斗南及古坑地區採集而得，以 TTC (triphenyl tetrazolium chloride) 鑑別性培養基 [0.1% casamino acid、1% peptone、0.5% glucose、1% 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride (Alfa Aesar, Ward Hill, MA, USA)、1.7% agar] 鑑定菌落型態 (Kelman 1954)。試驗時，則培養於 CPG 液態培養基 [0.1% casamino acid (Bioshop, Burlington, Canada)、1% peptone (Bioshop, Burlington, Canada)、0.5% glucose (Bioshop, Burlington, Canada)]/ 固態 (1.7% agar)，溫度為 28°C。再利用專一性引子對 AU759 (GTCGCCGTCACACTACTTCC) 和 AU760 (GTCGCCGTCAGCAATGCGGAA) (Opina *et al.* 1997; Villa *et al.* 2003) 確認菌株為青枯病菌，又分別以 race 1 和 race 3 專一性引子對 PS-IS-F (CGCAACGCTGGATGAACCC)、PS-IS-R (CAGACGATGCGAAGCCTGAC) (Lee *et al.* 2001)、630 (ATACAGAATTTCGACCGGCAC)、631 (AATCACATGCAATTCG-CCTAC) (Fegan *et al.* 1998) 鑑別生理小種。

胞外水解酶之定性分析

大部分液化澱粉芽孢桿菌菌株具分泌蛋白酶、澱粉酶、纖維素酶及脂酶的能力，且具備溶磷能力 (Lin 2015)。本研究使用不同培養基，測試液化澱粉芽孢桿菌 Ba01 與 PMB01 菌株是否具有分泌這些酵素之能力。蛋白質分解酵素活性測試之培養基配方，為利用 100 mL 的

基礎培養基 (2% peptone、3.2% agar) 及含 2% 脫脂奶粉的 100 mL dH₂O，兩者分別滅菌後，將其均勻混合。將 Ba01 與 PMB01 劃於此培養基，2 d 後觀察是否產生透化圈 (Sonune & Garode 2018)。而澱粉分解能力測試，乃利用 0.2% soluble starch (藥理純藥株式會社，日本宇治市)，1.6% agar 加入 100 mL dH₂O 混勻配置。培養 2 d 後，將培養基上的 Ba01 或 PMB01 菌落水洗後加入碘液 (杏輝，台灣宜蘭縣) 至培養基中，若能產生透化圈則表示具有澱粉分解能力 (Sonune & Garode 2018)。纖維素酶活性測試，則以纖維素培養基 [1% peptone、1% yeast extract、1% carboxymethyl cellulose (Sigma, St. Louis, MO, USA)、0.5% sodium chloride、0.1% monopotassium phosphate (ShimakYU's Pure Chemicals, Osaka, Japan)、1.6% agar 加入 100 mL dH₂O，pH7] 進行培養。培養 2 d 後，利用 dH₂O 水洗將培養基上的 Ba01 或 PMB01 菌落，再使用 0.1% 之 Congo red (Bio Basic Canada, Markham, Canada) 染色 1 h，再以 1 M sodium chloride 退染 1 h，透化區的產生代表具有分解纖維素之能力 (Kasana *et al.* 2008)。脂酶活性測試，則使用 Tween 80 培養基 [1% peptone、0.5% sodium chloride、0.01% calcium chloride (MPBio Inc, Irvine, CA, USA)、1% Tween 80 (Biotech, Paris, France)、1.6% agar 加入 100 mL dH₂O，pH 7] 分析。培養於 Tween 80 培養基 5 d 後，

利用 dH₂O 水洗將培養基上之 Ba01 或 PMB01 菌落，再觀察菌落附近是否有沉澱物之產生 (Sonune & Garode 2018)。溶磷能力測試，乃使用 Pikovskayas 培養基 [0.05% yeast extract、0.5% calcium phosphate、1% glucose (Bioshop, Burlington, Canada)、0.05% ammonium sulfate (Sigma, St. Louis, MO, USA)、0.02% potassium chloride (Bioshop, Burlington, Canada)、0.01% magnesium sulfate (Sigma, St. Louis, MO, USA)、1.5% agar 與 0.00001% manganese sulphate (Santoku Chemical Company, Osaka, Japan) 和 0.00001% ferrous sulphate (ShimakYU's Pure Chemicals, Osaka, Japan)] 分開滅菌後，再將其均勻混合，總體積 400 mL 進行分析。培養 5 d 後，利用 dH₂O 將培養基上之 Ba01 或 PMB01 菌落，再觀察是否有透化圈的產生，其代表溶磷能力 (Almoneafy *et al.* 2014)。液化澱粉芽孢桿菌 Ba01 與 PMB01 皆滴定 3 μ L [1.0 OD₆₀₀ (optical density; OD)] 的菌液至培養基進行試驗，並培養於 37°C。

濾紙片擴散試驗

將 Ba01 與 PMB01 液態搖瓶培養於 37°C、16 h，而青枯病菌 RSN245、RSN371、RSN373 及 RSN439 則液態搖瓶培養於 28°C、48 h。利用 dH₂O 將 Ba01 與 PMB01 濃度調整為 1.0 OD₆₀₀ (約 10⁸ cfu mL⁻¹)，青枯病菌濃度調整為 1.0 OD₆₀₀ (約 3 × 10⁹ cfu mL⁻¹)。接著，將 4 株馬鈴薯青枯病菌懸浮液以玻璃珠均勻塗抹於 CPG 固態培養基，並放置於無菌操作台風乾 20 min。之後，再將直徑 6 mm 的濾紙片放置於 CPG 固態培養基，分別滴 3 μ L Ba01 或 PMB01，對照組為 3 μ L dH₂O。放置於 28°C 生長箱培養 3 d 後以游標卡尺測量 Ba01 與 PMB01 抑制馬鈴薯青枯病菌的抑制圈 (Singh *et al.* 2016; Lin *et al.* 2018)。

液化澱粉芽孢桿菌可以不同作用機制抑制病原菌，其二次代謝物的產生亦具防治病原菌的潛能，因此取液化澱粉芽孢桿菌濾液對青枯病菌進行抑菌測試。首先取 Ba01 與 PMB01 單一菌落培養於 LB 液態培養基中 16 h，隔天稀釋至 0.1 OD₆₀₀，體積為 5 mL。培養 3 d 後，將試管以 2,851 × g 離心 7 min，並取 1.5

mL 上清液於微量離心管，以轉速 12,470 × g、8 min 離心 2 次，最後以 0.22 μ m 的 millipore filter (Millex-GS, MilliporeSigma, Burlington, MA, USA) 過濾，並存於 4°C 備用。同時製備青枯病菌懸浮液，沾取固態 CPG 培養基上的青枯病菌，培養於 CPG 液態培養基過夜後離心 (2,851 × g, 6 min)，以 dH₂O 稀釋至 1.0 OD₆₀₀，再以青枯病菌菌液：液化澱粉芽孢桿菌濾液：CPG 培養基 = 1 : 2 : 7 之比例配置成 3 mL 之培養液，培養於 28°C，轉速為 2.68 × g。2 d 後，稀釋塗盤於 CPG 固態培養基，以進行青枯病菌之菌落計算。

細菌的移動能力與生物膜之形成有關，進而影響芽孢桿菌防治病原菌的能力。其移動方式分為液態中的泳動 (swimming) 與固態表面的移行 (swarming)，為測試此種能力，分別使用含 0.3% 和 0.7% agar 之 LB 培養基。芽孢桿菌先培養 16 h，再將濃度調至 1.0 OD₆₀₀，並以體積 3 μ L 滴定於培養基中央，觀察其菌落在培養於 37°C、8 h 後菌落擴散的範圍並進行統計分析 (Lin 2015; Cao *et al.* 2018)。

Ba01 與 PMB01 拮抗馬鈴薯青枯病菌之加乘作用測試

經過對峙培養試驗得知，Ba01 與 PMB01 皆具抑制馬鈴薯青枯病菌之能力，雖然 Ba01 與 PMB01 抑制青枯病菌所產生之抑制圈不盡相同，PMB01 抑制 4 株青枯病菌的能力亞於 Ba01。因此，欲評估同時使用 Ba01 與 PMB01 是否可提高抑制馬鈴薯青枯病菌之能力。分別培養芽孢桿菌與青枯病菌於 LB 與 CPG 固態培養基，沾取單一菌落並分別培養於 LB 與 CPG 液態培養基一晚 (芽孢桿菌培養於 37°C、10.73 × g；青枯病菌培養於 28°C、2.68 × g)。將青枯病菌 RSN245、RSN371 懸浮液以 100 μ L (1.0 OD₆₀₀)，青枯病菌 RSN373、RSN439 懸浮液則以 200 μ L (1.0 OD₆₀₀) 利用玻璃珠進行塗盤，於無菌操作台內開蓋風乾約 20 min。等待期間，分別取 500 μ L (1.0 OD₆₀₀) 之 Ba01 和 500 μ L (1.0 OD₆₀₀) 之 PMB01 均勻混合於微量離心管。20 min 後，將滅菌過之 6 mm 濾紙片放入培養基，將 3 μ L Ba01、PMB01 或 3 μ L Ba01 + PMB01 混合液滴於 6 mm 濾紙片上，

培養於 28°C 生長箱。2 d 後利用游標尺進行抑制圈之觀察，如 Ba01 或 PMB01 分別與 Ba01 + PMB01 相比之 $P < 0.05$ ，則具加乘作用。另，測試 Ba01 與 PMB01 之生長速率，取 2 株芽孢桿菌，調整至 0.1 OD₆₀₀，培養於 10 mL 液態 LB 培養基 (37°C)，並分別於 0、3、6、9、12、24 及 36 h 進行濃度測定，利用 GraphPad Prism version 8.0.2，以 two-way analysis of variance (ANOVA) 進行統計分析。

生物膜形成測定

將液化澱粉芽孢桿菌培養於 5 mL LB 液態培養基，並培養 16 h，利用分光光度計將培養菌液稀釋至 0.1 OD₆₀₀，於 37°C 下再培養 4 h 增幅菌量。4 h 後，再以 LB 液態培養基稀釋至 0.1 OD₆₀₀，並以每孔 1,000 μL 之菌量滴入 12 孔盤中 (Haggag & Timmusk 2008)。每個處理組皆為 3 重複，於 37°C 下培養 48 h，再以 1,000 μL dH₂O 沖洗菌落 2 次後，每孔滴入 1,000 μL 之 0.1 % crystal violet (Sigma, St. Louis, MO, USA)。於室溫下進行染色 10 min，再利用 1,000 μL dH₂O 沖洗 4 次。完成沖洗的 12 孔盤放置晾乾 24 h 後，每孔加入 2,000 μL 之 30% acetic acid 以溶解 crystal violet (Arrebola *et al.* 2010; Algburi *et al.* 2020)。靜置 10 min 後，以 100 μL 分裝至 96 孔盤中，以吸光值 OD₆₀₀ 上機檢測。將 Ba01 之 OD₆₀₀ 設為 100%，並計算 PMB01 之生物膜生成百分比，進行比較。以同樣的培養條件進行 Ba01 與 PMB01 的生長速率測試，並於 0、3、6、9、12、24、36、48 h 進行濃度測定。試驗期間如產生生物膜，需將其打碎並與細菌懸浮液混合均勻再進行檢測。試驗統計利用 GraphPad Prism version 8.0.2，以 two-way ANOVA 進行統計分析。

四株馬鈴薯青枯病菌之毒力測試

馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*) 薯塊購自台中市潭子區農會產銷班，品種為「克尼伯」(‘Kennebec’)。種植馬鈴薯前，先以水洗薯塊表面，表面噴灑 75% 酒精，放置於陽台經太陽曝曬。待芽點萌芽且轉變成綠色後，以 1 個芽點為單位切成小薯塊，再將其浸泡於 400 mg L⁻¹ 次氯酸水 (歐克靈，台灣台北市) 30 min，於 25°C 生長箱內風乾 1 晚即可種植。栽培介質使用泥

炭土 (Euflo, Schermbeck, Germany)、蛭石 (蔬菜之家，台灣彰化縣)、珍珠石 (蔬菜之家，台灣彰化縣)，以 3:1:1 比例混合，高壓蒸氣消毒鍋 (宏霖儀器有限公司，台灣新北市) 121°C、1.5 kg cm⁻² 滅菌 20 min。植株生長至 28 d 即可進行接種，試驗期間 7 d 施花寶 2 號 (Hyponex Corporation, Marysville, OH, USA) 1 次，接種後則停止。青枯病菌使用 CPG 液態培養基，培養於 28°C 2 d，配成懸浮液 (0.3 OD₆₀₀) 澆灌接種 150 mL (7 吋盆)，5 株為一組。於 15 d 內每天觀察植物萎凋情況 (葉片全數萎凋或全株死亡皆計為植株死亡)，存活植物數越少，代表此青枯病菌毒力較強 (Phukan *et al.* 2019)，並利用 log-rank test 進行統計分析。

Ba01 施用對感染植株之 ROS 累積情況

此試驗採用兩種染色方法觀察 ROS 累積情形，diaminobenzidine (DAB, Sigma, St. Louis, MO, USA) 與 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA, Biotium, Fremont, CA, USA)。於 DAB 染色試驗中，28 d 大的馬鈴薯植株分別以 150 mL (0.3 OD₆₀₀) 的 RSN439 細菌懸浮液和 150 mL (1.0 OD₆₀₀) 的 Ba01、PMB01 或其混合液，並以 150 mL (1.0 OD₆₀₀) 的液化澱粉芽孢桿菌 PMB05 (Wang *et al.* 2019; Ho *et al.* 2020) 作為正對照組，每組 3 株 (介質體積為 7 吋盆 8 分滿)。試驗期間 7 d 施花寶 2 號 (Hyponex Corporation, Marysville, OH, USA) 1 次，接種後則停止。土壤澆灌 24 min 後，剪取植株上位葉 (頂芽下方 3 個枝條的末端葉片) 浸泡於含有 0.1% DAB 之燒杯，於避光環境中，利用氣壓為 100 kPa 之 Rocker 400 無油式真空幫浦 (洛恩科技，台灣高雄市) 真空抽氣 15 min。取出後，讓葉片繼續浸泡於 DAB 溶液 24 h，於隔天使用 75% 酒精含 25% 醋酸去除葉綠素 (以隔水加熱方法，將葉片和酒精混合液之燒杯放入 50°C 的水浴槽，待其葉綠素褪去)，葉片之褐色色素代表 ROS 累積。另，為瞭解 Ba01、PMB01 及 RSN439 共同處理是否可以在葉肉細胞較快速產生 ROS，將培養的 RSN439、Ba01、PMB01 分別稀釋成 OD₆₀₀ 為 0.3、1.0、1.0 的細菌懸浮液。以 1:1 製備拮抗菌與病原菌混合液，利用一次性注射器 (Terumo, Tokyo, Japan) 進行葉片滲透接

種，並以 0.1 mL (1 OD₆₀₀) 的 PMB05 作為正對照組。3 h 後，將注射的葉片取下，浸泡於 75% 酒精含 25% 醋酸的混合液於 50°C 的水浴槽去除葉綠素，再以 phosphate buffered saline (PBS, pH = 7) 漂洗葉片至無味，最後將葉片浸泡於含有 20 μM H₂DCFDA 和 2% dimethyl sulfoxide (DMSO) 的 PBS，在避光情況下真空抽氣 15 min，後繼續避光一晚 (Zeng *et al.* 2015; Farzand *et al.* 2019)。使用 PBS 漂洗 2 次後將葉片移至螢光顯微鏡 Olympus BX53 (Olympus, Tokyo, Japan) 觀察。採用濾鏡 excitation/emission: 460–495 nm/470–495 nm (Lumencor, Beaverton, OR, USA)。

Ba01 防治馬鈴薯青枯病之盆栽試驗

PMB01 為番茄青枯病與萎凋病唯一核准之生物農藥，但對於馬鈴薯青枯病之防治仍未有相關研究，因此以 PMB01 為對照菌株，測試 Ba01 是否具防治馬鈴薯青枯病之潛力。2 次生物性重複，每次重複每組分別為 4 與 5 植株 (介質體積為 7 吋盆 8 分滿)，分組如下：(1) 只澆灌水；(2) 只接種 RSN439 (150 mL、0.3 OD₆₀₀)；(3) 只澆灌 Ba01 (150 mL、1.0 OD₆₀₀)；(4) 只澆灌 PMB01 (150 mL、1.0 OD₆₀₀)；(5) 同時澆灌 RSN439 (150 mL、0.3 OD₆₀₀) 和 Ba01 (150 mL、1.0 OD₆₀₀)；及 (6) 同時澆灌 RSN439 (150 mL、0.3 OD₆₀₀) 和 PMB01 (150 mL、1.0 OD₆₀₀)。馬鈴薯種植 28 d 後，進行 150 mL (0.3

OD₆₀₀) RSN439 接種，並同時澆灌 Ba01 或 PMB01 (150 mL、1.0 OD₆₀₀)。試驗期間 7 d 施花寶 2 號 (Hyponex Corporation, Marysville, OH, USA) 1 次，接種後則停止。試驗自接種馬鈴薯青枯病菌 RSN439 後，持續進行 14 d，以萎凋罹病指數 (disease index) (0 = 沒有病徵、1 = 0–25% 萎凋、2 = 26–50% 萎凋、3 = 51–75% 萎凋、4 = 76–99% 萎凋、5 = 植株死亡) 與萎凋罹病度 (wilt severity)： Σ (植株數量 × 萎凋罹病級數) / (植株總數量 × 最高萎凋罹病級數) × 100% 計算 (Chamedjeu *et al.* 2019)。

結果

馬鈴薯青枯病菌之鑑定

病原菌經分離培養於 TTC 鑑別性培養基 2–3 d 後，出現流質狀不規則圓形或橢圓形，中間呈粉紅色，外圍為乳白色之典型青枯病菌菌落型態。利用青枯病菌專一性引子 AU759/760 (Tran *et al.* 2016; Tsai *et al.* 2017) 對保守性 *IpxC* 基因序列進行增幅，4 株病菌皆可增幅 282 bp 的條帶 (圖 1A)，確定此 4 株為青枯病菌。另，利用鑑定青枯病菌 race 1 專一性引子 PS-IS-F/R (Jaunet & Wang 1999; Lee *et al.* 2001) 對 4 株馬鈴薯青枯病菌 insertion sequence IS1405 進行增幅，發現僅 RSN371 菌株產生預期 1,070 bp 的條帶，而 RSN245、

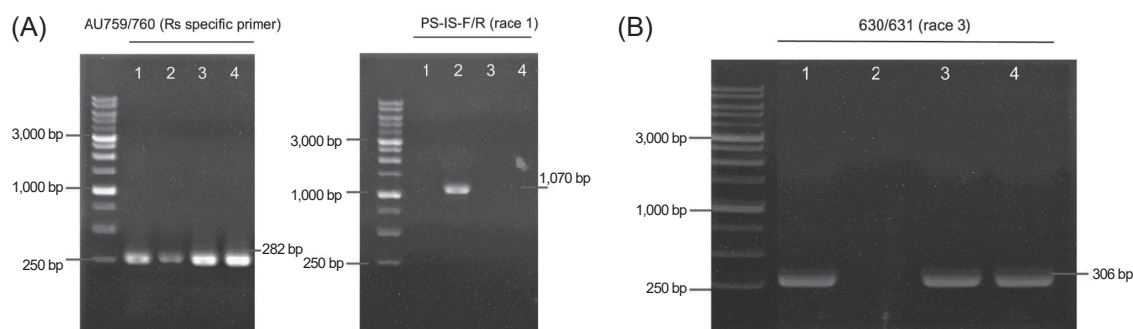


圖 1. 馬鈴薯青枯病菌之鑑定。(A) 分別利用青枯病菌專一性引子 AU759/760 與 race 1 專一性引子 PS-IS-F/R 於膠片上增幅 282 與 1,070 bp 大小的條帶；(B) 利用 race 3 專一性引子 630/631 於膠片上增幅 306 bp 大小的條帶。(1 = RSN245; 2 = RSN371; 3 = RSN373; 4 = RSN439)

Fig. 1. Identification of *Ralstonia solanacearum* isolates. (A) The DNA fragments 282 and 1,070 bp of *R. solanacearum* were amplified by *R. solanacearum* specific primer pair AU759/760 and its race 1 specific primer pair PS-IS-F/R, respectively; and (B) the DNA fragment 306 bp was amplified by *R. solanacearum* race 3 specific primer pair 630/631. (1 = RSN245; 2 = RSN371; 3 = RSN373; 4 = RSN439)

RSN373 和 RSN439 菌株則無此條帶 (圖 1A)。而利用 630/631 (Kubota *et al.* 2011) 引子對 (增幅區域為 prophage gene RRSL_02400) 鑑別 race 3 之增幅結果發現 RSN245、RSN373 和 RSN439 菌株產生 306 bp 的條帶 (圖 1B)，而 RSN371 則無此條帶。由以上結果推論，馬鈴薯青枯病菌 RSN371 為 race 1，而 RSN245、RSN373 與 RSN439 則為 race 3。

液化澱粉芽孢桿菌 Ba01 具分泌胞外水解酶及溶磷能力

將 Ba01 和 PMB01 分別培養於鑑別蛋白質酶、澱粉酶、纖維素酶、脂質酶及溶磷能力培養基，發現 Ba01 與 PMB01 皆具分泌蛋白質酶、澱粉酶、纖維素酶、脂質酶及具溶磷能力 (圖 2A)。在澱粉酶與溶磷能力方面，Ba01 與 PMB01 產生的透化圈大小無差異，而在蛋白質酶與纖維素酶的分泌能力上，Ba01 有較強的能力 (unpaired *t*-test, *P*-value 分別為 0.0025、0.023) (圖 2B)。另外，脂質酶分泌的關鍵，為其是否會在培養基上產生沉澱，Ba01 和 PMB01 皆觀察到沉澱產生 (圖 2A)，說明 Ba01 與 PMB01 皆具脂質分解能力，但無法定量比較。

Ba01 具抑制馬鈴薯青枯病菌之能力

在濾紙片擴散試驗中，Ba01、PMB01 皆可有效抑制馬鈴薯青枯病菌 RSN373 與 RSN439，而對於 RSN245 與 RSN371 則產生較小抑制圈 (圖 3A)。經過 unpaired *t*-test 統計，Ba01 抑制 4 株青枯病菌的效果與 PMB01 相比具顯著性差異 (表 2)。另，為測試液化澱粉芽孢桿菌濾液是否具抑制青枯病菌之能力，在經過 28°C 培養 2 d 後，取 100 μ L 濾液塗盤進行計量。生長於 70% CPG 液態培養基的 RSN439 菌落數為 6.9×10^{10} cfu mL⁻¹，而經 Ba01 或 PMB01 濾液和 RSN439 細菌懸浮液共同培養後，Ba01 濾液可將 RSN439 之菌量降至 6.47×10^{10} cfu mL⁻¹ \pm 1.36×10^{10} cfu mL⁻¹，而 PMB01 濾液則可將 RSN439 之菌量降至 2.35×10^{10} cfu mL⁻¹ \pm 0.67×10^{10} cfu mL⁻¹。此試驗結果顯示，液化澱粉芽孢桿菌可能會分泌一些具有抑制馬鈴薯青枯病菌生長之二次代謝物於培養液中。透過 unpaired *t*-test 進行分析，Ba01 與

PMB01 濾液針對青枯病菌並無顯著之抑菌效果，但 PMB01 濾液的抑制效果較 Ba01 佳 (*P* = 0.0092) (圖 3B)。

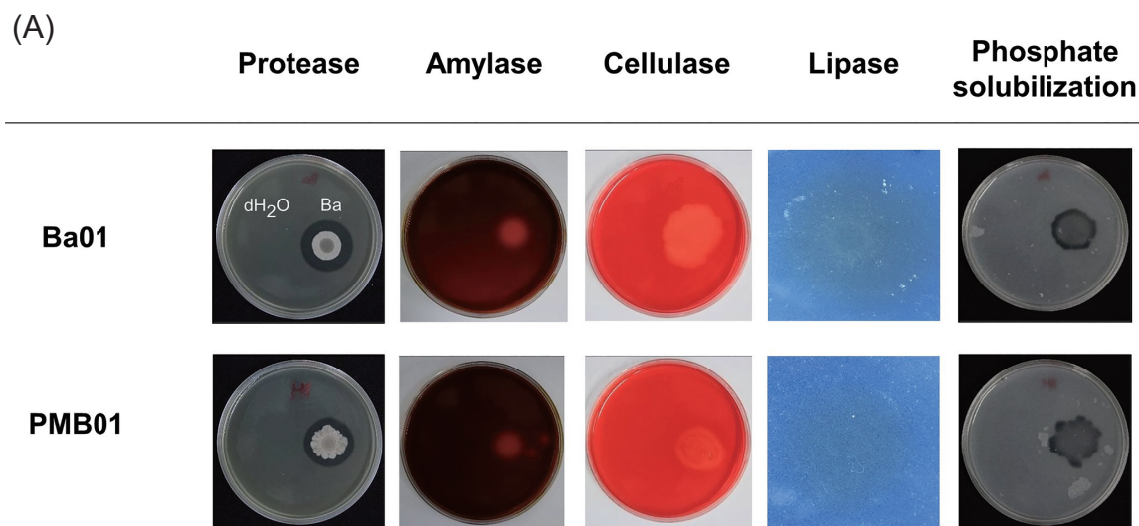
在泳動能力測試方面，於 0.3% LB 培養基培養 8 h 後，Ba01 所產生之菌落平均直徑為 66.78 mm \pm 2.41 mm，而 PMB01 的菌落平均直徑則為 40.87 mm \pm 3.31mm，與 PMB01 相比，Ba01 具較佳的泳動能力 (*P* < 0.0001) (圖 3C)。而表面移行的能力測試方面，於 0.7% LB 培養基培養 8 h 後，發現 Ba01 (菌落平均直徑為 59.26 mm \pm 6.53 mm) 相較於 PMB01 (32.72 mm \pm 2.64 mm) 具較佳表面移行能力 (*P* < 0.0001) (圖 3C)。

Ba01 與 PMB01 對馬鈴薯青枯病菌之抑制無加乘作用

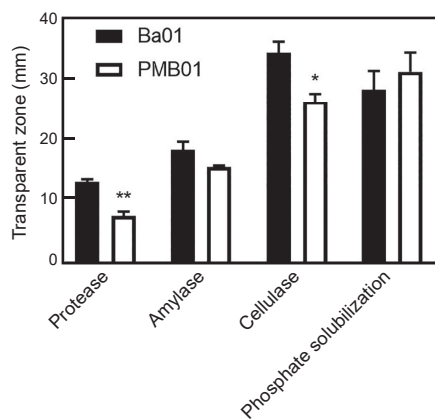
芽孢桿菌具防治多種植物病害之效果，而每株芽孢桿菌的抑菌機制有些許差異，因此欲探討混合液化澱粉芽孢桿菌 Ba01 與 PMB01 是否具提升抑制馬鈴薯青枯病菌之能力。Ba01、PMB01 或其混合液於塗有馬鈴薯青枯病菌 RSN245、RSN371、RSN373 或 RSN439 的 LB 固態培養基出現大小相似的抑制圈 (圖 4A)，經統計分析 Ba01 或 PMB01 與混合液之抑制圈，並無顯著性差異 (表 3)。此結果顯示，Ba01 與 PMB01 混合施用對於馬鈴薯青枯病菌並無加乘之抑制能力。由圖 4B 可見，培養 6 h 後，Ba01 之 OD₆₀₀ 接近 2，較 PMB01 高。到第 24 h，Ba01 之 OD₆₀₀ 已接近 5，為 PMB01 的 2 倍 (圖 4B)。結果顯示，Ba01 在 LB 液態培養基的生長速度較 PMB01 快 (圖 4B)。

液化澱粉芽孢桿菌 Ba01、PMB01 形成生物膜之能力無顯著差異

生物膜的生成與液化澱粉芽孢桿菌纏聚於植物根部以保護植物免受病原菌之侵入感染，因此透過 crystal violet biofilm assay 來檢測 Ba01 與 PMB01 2 株液化澱粉芽孢桿菌之間的生物膜合成能力。檢測結果，以 Ba01 的生物膜形成率設為 100%，而 PMB01 的生物膜生成百分比則為 99%，二者之間並無顯著性差異 (圖 5A)。另，為探討細菌之生長速率與生物膜生成之間的關係，進行細菌在 12 孔盤中培



(B)



Extracellular enzyme activity and phosphate solubilization

圖 2. 液化澱粉芽孢桿菌 Ba01 胞外水解酶與溶磷能力分析。(A) 胞外水解酶活性與溶磷能力之測試，每組技術性 3 重複。(B) Ba01 與 PMB01 於培養基上產生透化圈大小之比較。Ba01 蛋白酶與纖維素酶活性較 PMB01 強。統計使用 unpaired *t*-test (Prism 8.0.2)；* 代表 $P < 0.05$ ，** 代表 $P < 0.01$ 。

Fig. 2. Analysis of extracellular enzyme activity and phosphate solubilization in *Bacillus amyloliquefaciens*. (A) The assays of extracellular enzyme activity and phosphate solubilization were performed with agar plates containing specific substrates, and each assay included 3 technical replicates; (B) The comparison of transparent zones on medium produced by Ba01 and PMB01. *B. amyloliquefaciens* Ba01 has better ability to secrete protease and cellulase compared to that of PMB01. *P*-values were calculated using unpaired *t*-test; * and ** represent $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

養 48 h 後的生長曲線數據。兩細菌以同樣條件靜置培養於 12 孔盤中培養。測定結果發現，Ba01 於 LB 液態培養基生長 48 h 後的菌量約為 PMB01 的 1.6 倍 ($P < 0.0001$, *t*-test)，顯示 Ba01 於 12 孔盤靜置培養 48 h 後的生長速率較 PMB01 快 (圖 5B)。

青枯病菌 RSN439 對馬鈴薯具較強毒力

馬鈴薯植株接種青枯病菌 RSN439 後 15 d，全部出現萎凋病徵 (圖 6A)。而各青枯病菌株接種馬鈴薯後之病徵進展，如下所述。接種 RSN439 或 RSN373 的馬鈴薯於 9 d 後，開

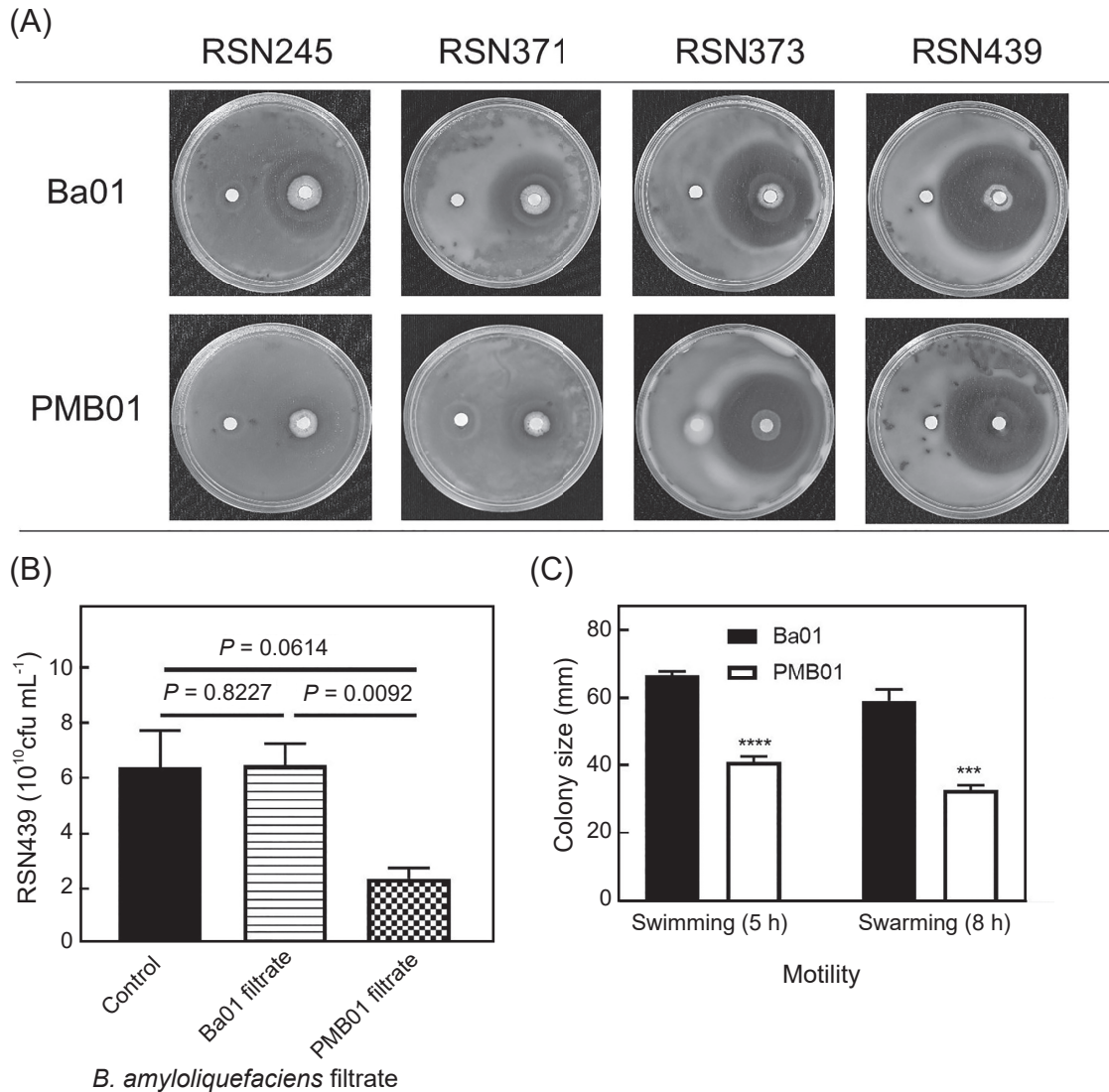


圖 3. 液化澱粉芽孢桿菌 Ba01 具抑制青枯病菌之能力。(A) 馬鈴薯青枯病菌懸浮液 (1.0 OD₆₀₀; RSN245、RSN371 體積為 100 μ L, RSN373、RSN439 體積為 200 μ L) 塗抹於 casamino acid peptone glucose (CPG) 固態培養基上, 待風乾後, 分別將 3 μ L dH₂O 和 3 μ L Ba01 (1.0 OD₆₀₀) 或 3 μ L PMB01 (1.0 OD₆₀₀) 滴定於左、右濾紙片上; (B) Ba01 與 PMB01 培養濾液拮抗 RSN439 之後菌量總計。Ba01 濾液無法有效抑制 RSN439 的生長。RSN439 菌液 (1.0 OD₆₀₀) : 液化澱粉芽孢桿菌 Ba01 或 PMB01 濾液 : CPG 培養基 = 1 : 2 : 7 之比例配置成 3 mL 之培養液, 於 28°C 培養 2 d 後, 進行 RSN439 菌落數計算。70% CPG 培養基作為對照組; (C) Ba01 與 PMB01 於泳動及表面移行測試培養基上之菌落大小統計。相較 PMB01, Ba01 有較強的表面移行與泳動能力, 統計使用 *t*-test 並與處理組 Ba01 比較; *** 代表 $P < 0.001$, **** 代表 $P < 0.0001$ 。

Fig. 3. *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01 inhibited the growth of *Ralstonia solanacearum*. (A) 100 μ L of *R. solanacearum* RSN245 or RSN371 and 200 μ L of RSN373 or RSN439 (1.0 OD₆₀₀) were spread on CPG solid medium, while 3 μ L of dH₂O and 3 μ L Ba01 (1.0 OD₆₀₀) or 3 μ L PMB01 (1.0 OD₆₀₀) were dropped on left and right filter paper, respectively; (B) the bacterial counts of RSN439 after incubation with Ba01 or PMB01 filtrate. Both Ba01 and PMB01 filtrates cannot inhibit the growth of RSN439. The 3 mL of broth were mixed with 1 : 2 : 7 ratio [1.0 OD₆₀₀ *R. solanacearum* suspension : filtrate of *B. amyloliquefaciens* (Ba01 or PMB01) : CPG broth] and incubated at 28°C for 2 d. 70% CPG broth was used as a control, and *P*-values were calculated using unpaired *t*-test with Prism 8.0.2; and (C) *B. amyloliquefaciens* Ba01 has better swimming and swarming ability than that of PMB01. *P*-values were calculated using *t*-test; *** and **** represent $P < 0.001$ and $P < 0.0001$, respectively; each assay included 3 technical replicates.

表 2. 相較 PMB01, Ba01 抑制馬鈴薯青枯病菌能力較佳。統計使用 *t*-test, 每組技術性 3 重複。

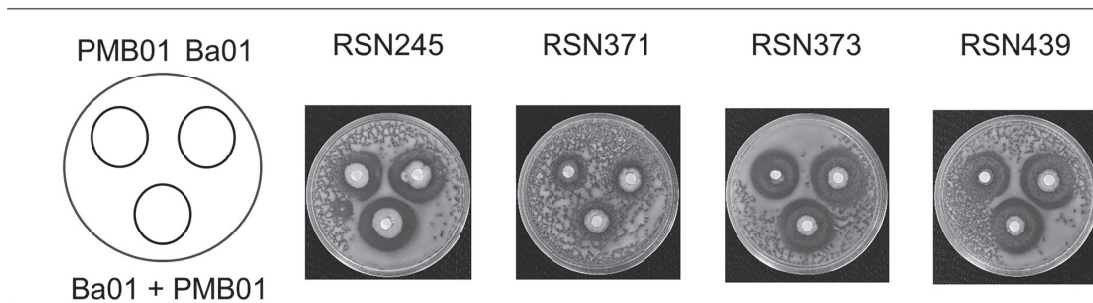
Table 2. Ba01 possessed better antibacterial activity against *R. solanacearum* compared to that of PMB01. *P*-values were calculated using unpaired *t*-test².

Rs	Ba01 (mm)	PMB01 (mm)	<i>P</i> -value
RSN245	31.08 ± 3.64	21.77 ± 1.31	0.0140
RSN371	28.33 ± 6.76	11.05 ± 0.40	0.0115
RSN373	43.46 ± 0.80	38.64 ± 1.99	0.0177
RSN439	46.44 ± 1.06	38.55 ± 2.11	0.0044

² Rs = *Ralstonia solanacearum*. The unit of inhibition zone diameter: mm.

始出現典型青枯病的萎凋病徵。接種 RSN371 的馬鈴薯, 則是 12 d 後開始出現萎凋病徵; 而接種 RSN245 的馬鈴薯, 亦於第 12 天出現第 1 株萎凋 (圖 6B)。透過 log-rank test 進行統計分析, RSN439 分別與 RSN245、RSN371 和 RSN373 比較之 *P*-value 為 0.018、0.040 及 0.013, 且 RSN439 的致死率最高, 故青枯病菌 RSN439 對馬鈴薯之毒力較其他菌株強, 因而後續的盆栽試驗皆使用 RSN439 進行試驗。

(A)



(B)

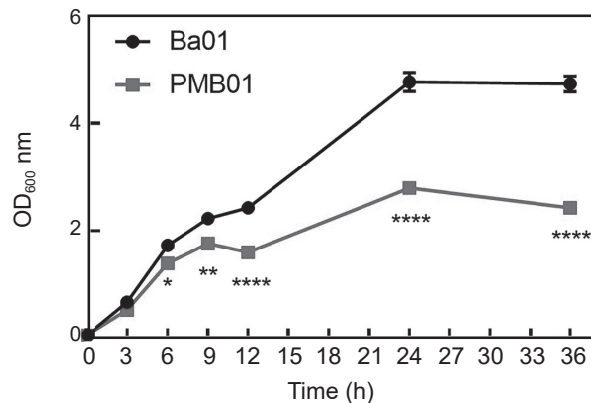


圖 4. Ba01 與 PMB01 混合液對馬鈴薯青枯病菌無加乘抑制作用。(A) 將 200 μ L (1.0 OD₆₀₀) 的馬鈴薯青枯病菌 RSN439 懸浮液均勻塗盤於 casamino acid peptone glucose (CPG) 培養基, 培養於 28°C。濾紙片分別滴上 3 μ L Ba01、PMB01 (1.0 OD₆₀₀) 或其混合液; (B) 液化澱粉芽孢桿菌 Ba01 與 PMB01 於 Luria-Bertani (LB) 液態培養基的生長速率 (以 OD₆₀₀ 表示)。培養於 37°C, 轉速 10.73 \times g; * 代表 *P* < 0.05, ** 代表 *P* < 0.01, **** 代表 *P* < 0.0001。

Fig. 4. The combination of Ba01 and PMB01 has no synergistic effect on inhibiting the growth of *Ralstonia solanacearum* RSN439. (A) The 200 μ L (1.0 OD₆₀₀) of *R. solanacearum* RSN439 suspension were spread on CPG solid medium, and 3 μ L of Ba01, PMB01 (1.0 OD₆₀₀) or Ba01/PMB01 mixed suspension were dropped on filter papers. Plates were incubated at 28°C for 24 h; and (B) the growth rate of *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01 and PMB01 (expressed in OD₆₀₀) at 37°C with shaking 10.73 \times g; *, ** and **** represent *P* < 0.05, *P* < 0.01 and *P* < 0.0001, respectively.

表 3. 共同使用 Ba01 與 PMB01 對 RSN439 無加乘抑制作用，統計使用 *t*-test，並比較混合液處理與單獨處理之具顯著性差異。

Table 3. Clear zones were measured after incubation, and *P*-values were calculated using unpaired *t*-test.

Inhibition zone (mm)	RSN245	RSN371	RSN373	RSN439
Ba01	15.26 ± 0.46	10.30 ± 0.69	16.43 ± 1.13	16.16 ± 0.42
PMB01	14.18 ± 0.24	11.11 ± 0.89	13.75 ± 0.73	15.41 ± 0.44
Ba01 + PMB01	15.41 ± 1.27	10.57 ± 0.92	16.99 ± 0.75	16.05 ± 0.30
Ba01 v.s. Ba01 + PMB01 (<i>P</i> -value)	0.8568	0.7051	0.5140	0.7238
PMB01 v.s. Ba01 + PMB01 (<i>P</i> -value)	0.1746	0.5055	0.0058	0.1070

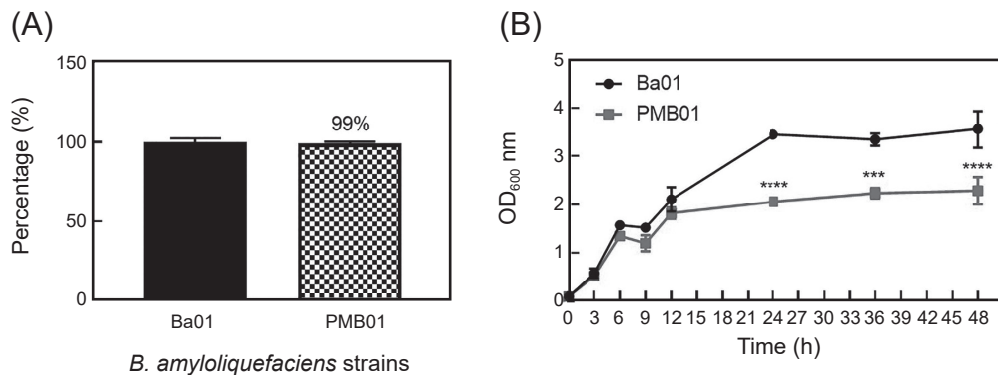


圖 5. 液化澱粉芽孢桿菌 Ba01 與 PMB01 生物膜生成能力與靜置培養之生長速率。(A) Ba01 和 PMB01 產生生物膜的能力相當；(B) Ba01 與 PMB01 於 Luria-Bertani (LB) 液態培養基之生長速率 (以 OD₆₀₀ 表示)。靜置培養於 12 孔盤中，溫度為 37°C；*** 代表 *P* < 0.001，**** 代表 *P* < 0.0001。

Fig. 5. Biofilm formation ability and growth rate of *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01 and PMB01. (A) *B. amyloliquefaciens* Ba01 and PMB01 have similar level of biofilm formation ability in LB liquid medium; and (B) the growth rate of *B. amyloliquefaciens* Ba01 and PMB01 (expressed in OD₆₀₀) in 12-well plates at 37°C without shaking; *** and **** represent *P* < 0.001 and *P* < 0.0001, respectively.

Ba01 在接種青枯病菌情況下能誘導植物產生抗病反應

為觀察植物接種後 ROS 累積情形，試驗使用 DAB 與 H₂DCFDA 進行染色。植物細胞被病原侵入後會產生過氧化物等活性氧，DAB 經過氧化物氧化後，會產生褐色的沉澱；H₂DCFDA 屬細胞滲透螢光探針，進入細胞後被細胞酯酶修飾形成非螢光的 H₂DCF，在細胞被病原侵入後，H₂DCF 會被活性氧氧化產生高強度螢光物質。在接種青枯病菌、液化澱粉芽孢桿菌 Ba01 與 PMB01 懸浮液 24 h 後，以 DAB 染色一晚後觀察葉片 ROS 累積所產生的褐色沉澱。液化澱粉芽孢桿菌 PMB05 已被證實於 PAMP 存在下可誘導阿拉伯芥產生 ROS 累積 (Wang *et al.* 2019)，而在馬鈴薯單獨接種 PMB05 之

正對照組葉片幾乎 100% 呈現褐色沉澱，而單獨接種 Ba01 或 PMB01 之葉片則無褐色沉澱產生 (圖 6A)。然而，經馬鈴薯青枯病菌 RSN439 處理之植株可觀察到葉片近葉柄的葉肉部分，呈現約 70% 褐色沉澱，而在葉尖則未發現此褐色沉澱。而觀察分別經 RSN439 + Ba01 或 RSN439 + PMB01 同時處理之葉片，可發現兩處理組的葉片，其褐色沉澱覆蓋率接近 100% (圖 7A)。另外，以 H₂DCFDA 染色法進一步分析 Ba01 與 PMB01 可否於青枯病菌 RSN439 接種 3 h 後增加 ROS 的產生。由結果可見，Ba01 與 PMB01 在青枯病菌 RSN439 存在下能快速累積螢光訊號 (圖 7B)，顯示 Ba01 與 PMB01 接種於感染青枯病菌植株具備能誘導馬鈴薯植株產生抗病能力之潛能。

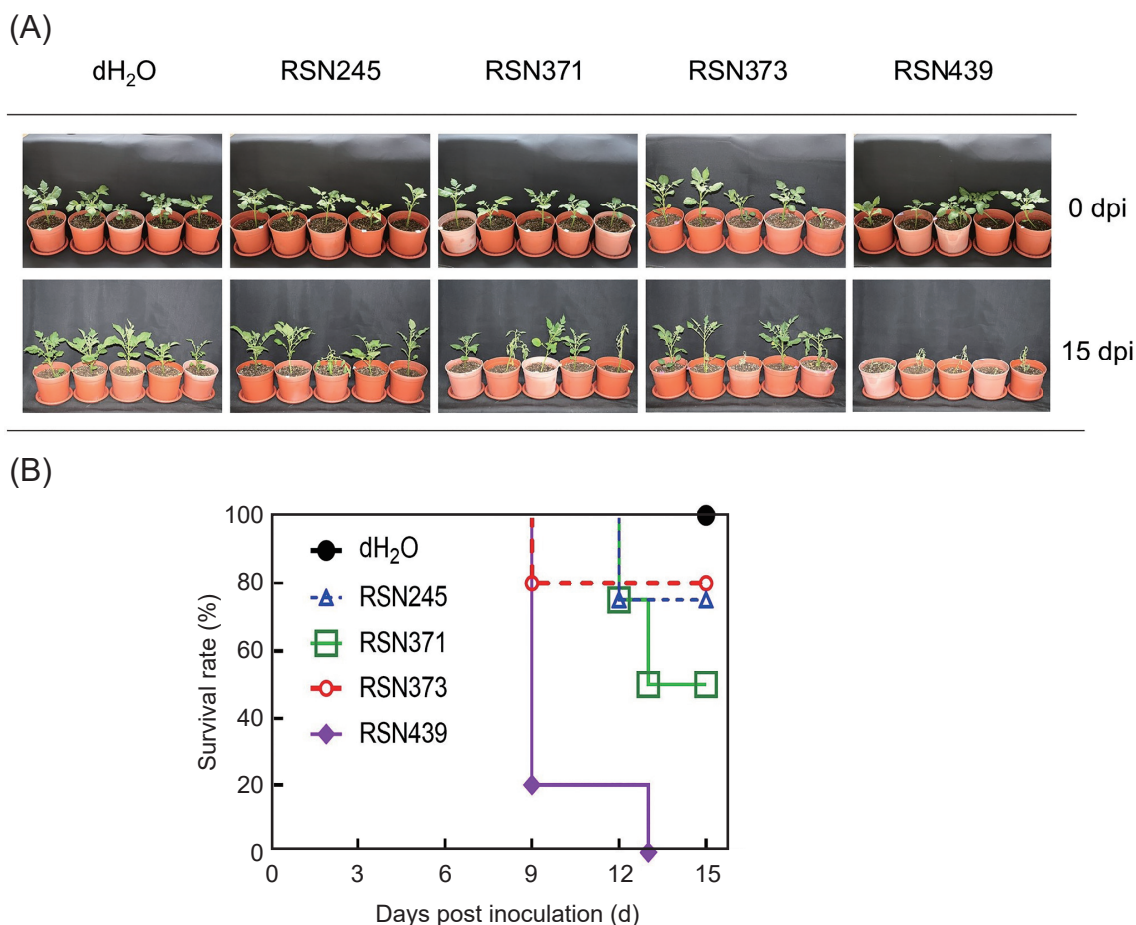


圖 6. 馬鈴薯青枯病菌 RSN439 具較強毒力。(A) 馬鈴薯青枯病菌接種 15 d 後的病徵。馬鈴薯青枯病菌接種濃度與體積為 0.3 OD₆₀₀、150 mL，每試驗組 5 株植株；(B) 使用 Prism 8.0.2 進行存活率製圖，從接種的第一天記為 Day 0，並於接種後每天紀錄，共觀察 15 d。

Fig. 6. Potato bacterial wilt pathogen RSN439 has stronger virulence. (A) The symptoms of potato plants infected by one of four *Ralstonia solanacearum* isolates shown at 15 dpi. Potato plants were inoculated with 150 mL *R. solanacearum* (0.3 OD₆₀₀). Each treatment included 5 potato plants; and (B) survival curves of potato plants after inoculation were graphed by Prism 8.0.2. (dpi: day-post-infection)

Ba01 具防治馬鈴薯青枯病之能力

試驗處理組含對照組共 6 組，2 次生物性重複，每次重複每組分別為 4 與 5 植株。結果顯示，只接種馬鈴薯青枯病菌 RSN439 的馬鈴薯植株，14 d 後，其罹病度 (disease severity) 為 95% ± 13.2%；而澆灌 Ba01 或 PMB01 的馬鈴薯植株則無病徵 (圖 8A)。而同時澆灌 RSN439 和 Ba01 後的處理組，其罹病度降至 20% ± 32.6% (*t*-test, *P* < 0.0001，與僅接種 RSN439 之處理組相比)，而同時澆灌 RSN439

和 PMB01 的處理組，其罹病度降至 33.3% ± 41.1% (*t*-test, *P* = 0.0006，與僅接種 RSN439 之處理組相比) (圖 8B)。此試驗結果顯示，Ba01 與 PMB01 皆能有效降低馬鈴薯青枯病之罹病度。然而青枯病菌感染植株經過 Ba01 或 PMB01 處理，青枯病的罹病度於兩者之間並無顯著性差異 (圖 7B)。

討論

芽孢桿菌長期以來已被使用於各種植物病

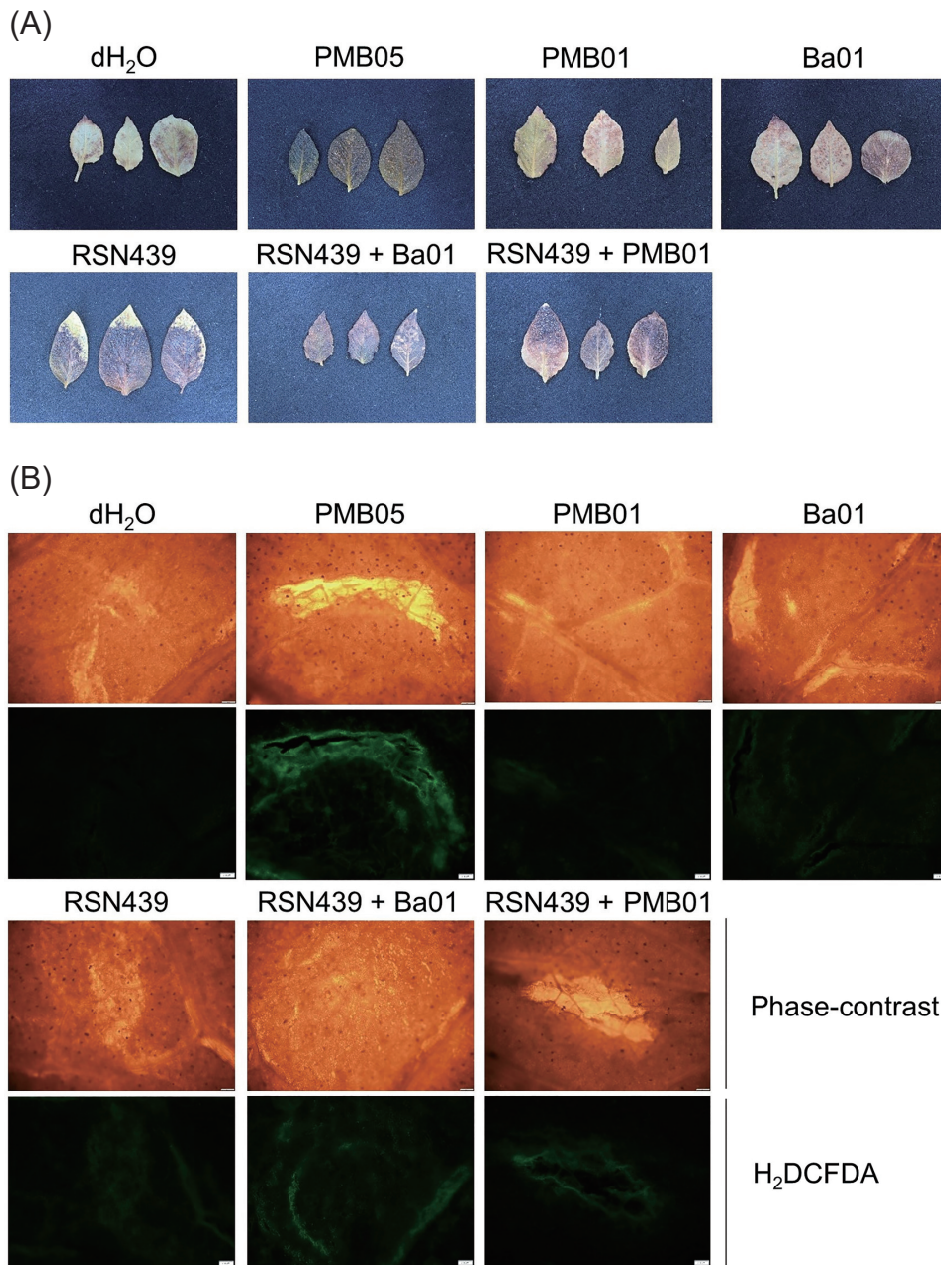
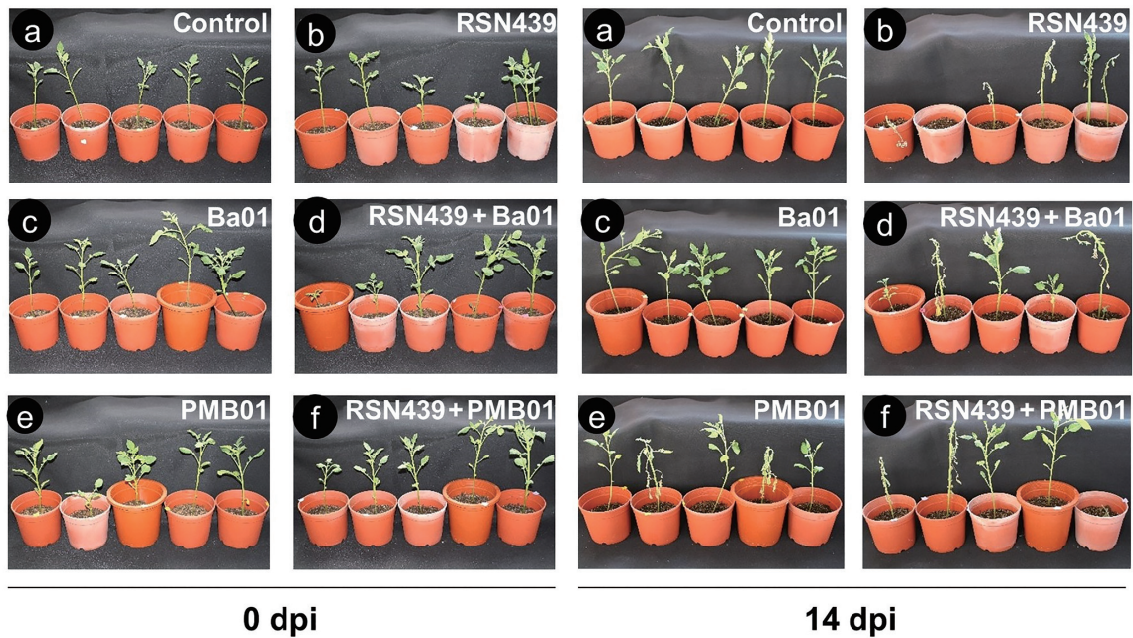


圖 7. Ba01 或 PMB01 與馬鈴薯青枯病菌 RSN439 共同施用能增加植物葉片內 reactive oxygen species (ROS) 的累積。(A) 液化澱粉芽孢桿菌 (1.0 OD₆₀₀) 和馬鈴薯青枯病菌 (0.3 OD₆₀₀) 單獨或混合以土壤澆灌 150 mL，24 h 後，利用二氨基聯苯胺 (DAB) 染色，並放置隔夜進行觀察；(B) 液化澱粉芽孢桿菌 (1.0 OD₆₀₀) 和馬鈴薯青枯病菌 RSN439 (0.3 OD₆₀₀) 以針筒接種 0.1 μL，3 h 後，利用 H₂DCFDA 染色並放置隔夜。使用螢光顯微鏡 Olympus BX53。比例尺代表 200 μm。

Fig. 7. ROS accumulation was increased in potato leaves after inoculation with *Ralstonia solanacearum* RSN439 simultaneously with *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01 or PMB01. (A) Potato leaves were dyed with diaminobenzidine (DAB) after soil inoculation for 24 h with 150 mL of *B. amyloliquefaciens* and/or *R. solanacearum* RSN439, and laid overnight before observation; and (B) potato leaves were dyed with H₂DCFDA after syringe injection for 3 h with 0.1 μL of *B. amyloliquefaciens* and/or *R. solanacearum* RSN439, and laid overnight before observation. The samples were observed by fluorescence microscope Olympus BX53. The scale represents 200 μm.

(A)



(B)

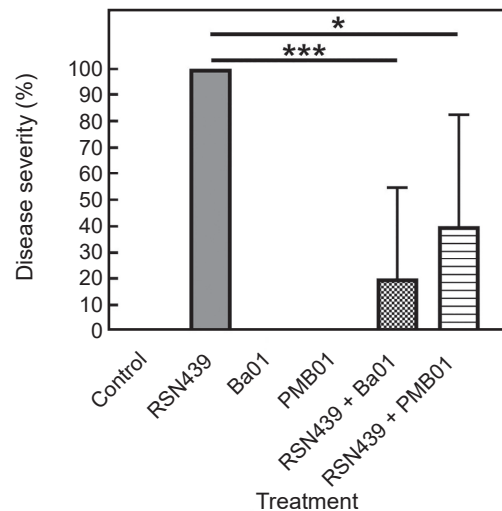


圖 8. Ba01 與 PMB01 皆能有效降低馬鈴薯青枯病之罹病度。(A) 共 6 處理組，進行 2 次生物性重複，每次每組分別為 4 與 5 植株 (以 5 植株之圖片為代表)：(a) 只澆灌水；(b) 只接種 RSN439；(c) 只澆灌 Ba01；(d) 同時澆灌 RSN439 和 Ba01；(e) 只澆灌 PMB01；(f) 同時澆灌 RSN439 和 PMB01。每盆澆灌 150 mL，Ba01 與 PMB01 濃度為 1.0 OD₆₀₀，RSN439 濃度為 0.3 OD₆₀₀。(B) 接種 14 d 後，馬鈴薯青枯病之罹病度統計圖。統計使用 9 株馬鈴薯植株的平均罹病度 ± 標準差，並以 *t*-test 與 RSN439 處理組比較。**P* < 0.05，****P* < 0.001。

Fig. 8. Applying Ba01 or PMB01 can effectively reduce the disease severity of potato bacterial wilt. (A) There were 6 treatments each with 2 biological repeats (4 and 5 potato plants). The figure with 5 potato plants was represented. (a) dH₂O (control); (b) RSN439 only; (c) Ba01 only; (d) RSN439 plus Ba01; (e) PMB01 only; and (f) RSN439 plus PMB01. For each pot, 150 mL of bacterial suspension as described were added, and the concentration of Ba01 or PMB01 was 1.0 OD₆₀₀, while RSN439 was 0.3 OD₆₀₀. (B) The disease severity of potato bacterial wilt after 14-day inoculation was expressed as the average ± standard deviation of 9 potato plants. *P*-values were calculated using unpaired *t*-test and compared with RSN439 treatment. * represents *P* < 0.05, and *** represents *P* < 0.001. (dpi: day-post-infection)

蟲害之防治，其中液化澱粉芽孢桿菌是常使用的生物防治菌。液化澱粉芽孢桿菌於 1943 年由日本學者 Fukumoto 第一次發現，其可分泌澱粉酶、蛋白酶及多種抑菌物質。而溶磷或產生植物激素，如吡啶乙酸之能力，也使其被用作生物肥料 (Yuan *et al.* 2013)。台灣亦有許多已上市之液化澱粉芽孢桿菌產品：如 Ba-BPD1 (活力磷寶，台灣肥料，台灣台北市) 為生物肥料，具溶磷能力，亦可用來防治水稻紋枯病 (Liao 2017)；PMB01 (救你一命，絕症剋星，嘉農，台灣新竹市) 為生物農藥，主要防治番茄青枯病 (Chou *et al.* 2013)。Ba01 由馬鈴薯薯皮所分離，並由前人發現其對馬鈴薯瘡痂病菌具防治效果 (Lin *et al.* 2018)，且能分泌環脂肽類二次代謝物，包括伊枯草菌素 (iturin)、表面素 (surfactin) 及豐原素 (fengycin) (Lee *et al.* 2001) 等抑菌物質。本研究透過對峙培養與濾紙片擴散法等試驗發現 Ba01 亦具有抑制馬鈴薯青枯病菌的能力，其效果不亞於核准藥劑 PMB01。推測 Ba01 可透過產生二次代謝物防治馬鈴薯青枯病，未來可使用二次代謝物合成相關基因之突變株進行盆栽試驗加以證明。

微生物會分泌不同的分解酶以利外來養分之吸收，其中水解酶可分解多種大分子化合物，包括蛋白質、澱粉、纖維素、脂質、半纖維素與幾丁質等，例如 *Serratia marcescens* 防治豆科白絹病的能力與幾丁質酶表現有關；而 β -1,3-glucanase 的分泌能有效增強 *Lysobacter enzymogenes* C3 對高狐草葉斑病與甜菜猝倒病的生物防治能力 (Ordentlich *et al.* 1988; Palumbo *et al.* 2005)。這些酵素會分解植物殘體和非生物的有機物提供植物吸收，間接促進植物防禦能力 (Jadhav *et al.* 2017)。本試驗利用不同基質的培養基測試，發現 Ba01 與 PMB01 皆有分解蛋白質、澱粉、脂質及纖維素之能力 (圖 2)，且 Ba01 在分泌蛋白酶與纖維素酶之能力較 PMB01 大，這些分解酶可能會干擾病原菌的生長，例如蛋白酶和脂質分解酶可降解並破壞病原菌細胞壁，並與表面素的產生和表面移行能力有關 (Connelly *et al.* 2004)；而 α -澱粉酶可將糖殘基 (sugar residues) 分解供植物生長，另經過降解病原菌生物膜結構以達到抑制病原菌生長之目的 (Compaoré *et al.* 2013)。

除了表面移行能力，泳動能力亦會影響生物膜的形成，且芽孢桿菌的表面移行與泳動能力越強，其生物膜產生的能力越差 (Bartolini *et al.* 2019)，本研究發現 Ba01 的表面移行與泳動能力較 PMB01 佳 (圖 3C)，但兩者生物膜產生的量相當 (圖 5A)。後續 Ba01 與 PMB01 在 24 h 內的生長曲線發現，Ba01 生長速度亦較快 (圖 5B)。因此，試驗結果符合芽孢桿菌表面移行與泳動能力較佳之菌株 (如 Ba01)，其形成生物膜之量下降，然而因 Ba01 生長速度較快，最終與表面移行與泳動能力較弱之菌株 (如 PMB01) 達成相當的生物膜產生量。

除了上述的防治途徑外，Ba01 誘導馬鈴薯植株產生抗病反應，亦是防治馬鈴薯青枯病的可能途徑。前人研究發現，芽孢桿菌表面素可做為一種病原相關分子模型 (PAMP)，用以誘導菸草細胞活性氧 (ROS) 的產生，並增強植物抗病能力。因此，ROS 的累積也被視為誘發植物產生抗病反應的重要指標 (Zerrouh *et al.* 2014)。本研究發現，Ba01 與 PMB01 分別和馬鈴薯青枯病菌 RSN439 共同施用的情況下，相較於單獨施用 Ba01、PMB01 或 RSN439 之處理組，具有更多的 ROS 累積，與 Wang *et al.* (2019) 的研究中證明部分芽孢桿菌菌株具有提升 PTI 功能的研究相符。是否 Ba01 與 PMB01 也具有此功能，抑或是菌株本身即可引起 PTI，仍值得進一步研究；然而 Ba01 與 RSN439 共同施用的情況下， H_2DCFDA 染色後所產生的螢光訊號較 PMB01 和 RSN439 共同施用強。因此，推測 Ba01 於馬鈴薯青枯病菌存在時，其誘導植物產生抗病的能力比 PMB01 佳。在本文試驗中，PMB05 不需病原菌存在就可於馬鈴薯誘導 ROS 產生，但 Ba01 則需要病原菌存在。因此，顯示 PMB05 誘導 ROS 產生的機制可能與 Ba01 不同。PMB05 於 Ho *et al.* (2020) 之論文，發現 PMB05 需在 *Ralstonia solanacearum* 的 PopW (harpin) 作為 PAMP 的情況下，才能增強番茄透過鈣離子通道與 NADPH 氧化酶誘導 ROS 產生及抗病。而前人研究發現，Ba01 可透過分泌 surfactin 抑制馬鈴薯瘡痂病菌，且 *Bacillus* spp. 在病原菌同時存在的情況下，會比 *Bacillus* spp. 單獨培養分泌更多 surfactin。surfactin 作為 PAMP，亦可

誘導植物粒線體產生 ROS 的累積。因此，預測 surfactin 的分泌為 Ba01 誘導 ROS 累積的可能機制之一。

綜上所述，本研究發現 Ba01 可經由多種途徑直接或間接拮抗馬鈴薯青枯病菌，其機制可能與抑制病原菌生長、促進植物吸收營養與提升植物抗病能力有關，說明 Ba01 具防治馬鈴薯青枯病之潛力。

誌謝

感謝國立台灣大學陳昭瑩博士與林乃君博士提供試驗技術協助；農委會 (108 農科-1.2.1-科-a1) 及科技部 (107-2320-B-002-061-MY3) 提供研究經費。

引用文獻

- Algburi, A., S. A. Alazzawi, A. I. A. Al-Ezzy, R. Weeks, V. Chistyakov, and M. L. Chikindas. 2020. Potential probiotics *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 and *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 co-aggregate with clinical isolates of *Proteus mirabilis* and prevent biofilm formation. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 12:1471–1483. doi:10.1007/s12602-020-09631-0
- Almoneafy, A. A., K. U. Kakar, Z. Nawaz, B. Li, M. A. Saand, C. L. Yang, and G. L. Xie. 2014. Tomato plant growth promotion and antibacterial related-mechanisms of four rhizobacterial *Bacillus* strains against *Ralstonia solanacearum*. *Symbiosis* 63:59–70. doi:10.1007/s13199-014-0288-9
- Álvarez, B., E. G. Biosca, and M. M. López. 2010. On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. p.267–279. *in: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.* (Mendez-Vilas, A., ed.) Formatex Research Center. Badajoz, Spain. 1620 pp.
- Arguelles-Arias, A., M. Ongena, B. Halimi, Y. Lara, A. Brans, B. Joris, and P. Fickers. 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microb. Cell Fact.* 8:63. doi:10.1186/1475-2859-8-63
- Arrebola, E., D. Sivakumar, R. Bacigalupo, and L. Korsten. 2010. Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and essential oils for the control of peach postharvest diseases. *Crop Prot.* 29:369–377. doi:10.1016/j.cropro.2009.08.001
- Bartolini, M., S. Cogliati, D. Vileta, C. Bauman, L. Rateni, C. Leñini, F. Argañaraz, M. Francisco, J. M. Villalba, L. Steil, U. Völker, and R. Grau. 2019. Regulation of biofilm aging and dispersal in *Bacillus subtilis* by the alternative sigma factor SigB. *J. Bacteriol.* 201:e00473-18. doi:10.1128/JB.00473-18
- Bloembergen, G. V. and B. J. J. Lugtenberg. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:343–350. doi:10.1016/S1369-5266(00)00183-7
- Cao, Y., H. Pi, P. Chandransu, Y. Li, Y. Wang, H. Zhou, H. Xiong, J. D. Helmann, and Y. Cai. 2018. Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Sci. Rep.* 8:4360. doi:10.1038/s41598-018-22782-z
- Chamedjeu, R. R., J. Masanga, V. Matiru, and S. Runo. 2019. Potential use of soil bacteria associated with potato rhizosphere as bio-control agents for effective management of bacterial wilt disease. *J. Microbiol. Res.* 9:12–24. doi:10.5923/j.microbiology.20190901.03
- Chang, J. J., P. Y. Wu, Y. N. Lin, W. L. Deng, and Y. H. Lin. 2019. Intensification of PAMP-triggered immunity in watermelon by *Bacillus* spp. strains as a strategy for controlling bacterial fruit blotch disease. *J. Plant Med.* 61(1):39–48. (in Chinese with English abstract) doi:10.6716/JPM.201903_61(1).0004
- Chen, H. W., Y. H. Lin, J. W. Huang, and P. F. L. Chang. 2010. Effect of *Bacillus mycooides* on seedlings growth of lettuce. *Plant Pathol. Bull.* 19:157–165. (in Chinese with English abstract) doi:10.6649/PPB.201006_19(2).0005
- Chou, H. P., Y. C. Chen, and T. C. Huang. 2013. Application and evaluation of multiple microorganisms in controlling bacterial wilt of Solanaceous plants. *Agric. News* 84:24–25 (in Chinese)
- Chowdhury, S. P., A. Hartmann, X. Gao, and R. Borriss. 2015. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42- A review. *Front. Microbiol.* 6:780. doi:10.3389/fmicb.2015.00780
- Chuang, M. F., S. F. Lo, and C. Y. Lin. 2015. Effect of temperature on virulence of *Ralstonia solanacearum* biovars and response of potato cultivars (lines) to bacterial wilt. *J. Taiwan Agric. Res.* 64:89–98. (in Chinese with English abstract)
- Ciampi, L. and L. Sequeira. 1980. Influence of temperature on virulence of race 3 strains of *Pseudomonas solanacearum*. *Amer. Potato J.* 57:307–317. doi:10.1007/BF02854025
- Compaoré, C. S., D. S. Nielsen, L. I. I. Ouoba, T. S. Berner, K. F. Nielsen, H. Sawadogo-Lingani, B. Diawara, G. A. Ouédraogo, M. Jakobsen, and L. Thorsen. 2013. Co-production of surfactin and a novel bacteriocin by *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*

- H4 isolated from Bikalga, an African alkaline *Hibiscus sabdariffa* seed fermented condiment. *Intl. J. Food Microbiol.* 162:297–307. doi:10.1016/j.ijfood-micro.2013.01.013
- Connelly, M. B., G. M. Young, and A. Sloma. 2004. Extracellular proteolytic activity plays a central role in swarming motility in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 186:4159–4167. doi:10.1128/JB.186.13.4159-4167.2004
- Denny, T. P. 2007. Plant Pathogenic *Ralstonia* species. p.573–644. *in: Plant-associated Bacteria.* (Gnanamanickam, S. S., ed.) Springer. Dordrecht, The Nederland. 712 pp.
- Doke, N. 1985. NADPH-dependent O₂-generation in membrane fractions isolated from wounded potato tubers inoculated with *Phytophthora infestans*. *Physiol. Plant Pathol.* 27:311–322. doi:10.1016/0048-4059(85)90044-X
- Farzand, A., A. Moosa, M. Zubair, A. R. Khan, V. C. Massawe, H. A. S. Tahir, T. M. M. Sheikh, M. Ayaz, and X. Gao. 2019. Suppression of *Sclerotinia sclerotiorum* by the induction of systemic resistance and regulation of antioxidant pathways in tomato using fengycin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Biomolecules* 9:613. doi:10.3390/biom9100613
- Fegan, M., G. Holoway, A. Hayward, and J. Timmis. 1998. Development of a diagnostic test based on the polymerase chain reaction (PCR) to identify strains of *R. solanacearum* exhibiting the biovar 2 genotype. p.34–43. *in: Bacterial Wilt Disease.* (Prior, P., C. Allen, and J. Elphinstone, eds.) Springer. Berlin, Germany. 449 pp.
- Haggag, W. M. and S. Timmusk. 2008. Colonization of peanut roots by biofilm-forming *Paenibacillus polymyxa* initiates biocontrol against crown rot disease. *J. Appl. Microbiol.* 104:961–969. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03611.x
- Ho, T. H., C. Y. Chuang, J. L. Zheng, H. H. Chen, Y. S. Liang, T. P. Huang, and Y. H. Lin. 2020. *Bacillus amyloliquefaciens* strain PMB05 intensifies plant immune responses to confer resistance against bacterial wilt of tomato. *Phytopathology* 110:1877–1855. doi:10.1094/PHYTO-01-20-0026-R
- Jadhav, H. P., S. S. Shaikh, and R. Z. Sayyed. 2017. Role of hydrolytic enzymes of rhizoflora in biocontrol of fungal phytopathogens: An overview. p.183–203. *in: Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation.* (Mehnaz, S., ed.) Springer. Singapore. 289 pp.
- Jaunet, T. X. and J. F. Wang, 1999. Variation in genotype and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* Race 1 Isolated from tomato in Taiwan. *Phytopathology* 89:320–327. doi:10.1094/PHYTO.1999.89.4.320
- Kasana, R. C., R. Salwan, H. Dhar, S. Dutt, and A. Gulati. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Curr. Microbiol.* 57:503–507. doi:10.1007/s00284-008-9276-8
- Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance in a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44:693–695.
- Kubota, R., M. A. Schell, G. D. Peckham, J. Rue, A. M. Alvarez, C. Allen, and D. M. Jenkins. 2011. In silico genomic subtraction guides development of highly accurate, DNA-based diagnostics for *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 and blood disease bacterium. *J. Gen. Plant Pathol.* 77:182–193. doi:10.1007/s10327-011-0305-2
- Kuo, C. C., C. W. Chen, C. T. Liao, W. L. Chen, and Y. F. Tsai. 2014. Development and application of *Bacillus amyloliquefaciens* on plant diseases biocontrol. p.69–86. *in: Proceedings of the Conference on the Development of Agricultural Biological Materials Industry.* March 18, 2014. Taichung, Taiwan. Agric. Biol. Agents Dev. Soc. Publ., Taichung, Taiwan. (in Chinese with English abstract)
- Lee, Y. A., S. C. Fan, L. Y. Chiu, and K. C. Hsia. 2001. Isolation of an insertion sequence from *Ralstonia solanacearum* race 1 and its potential use for strain characterization and detection. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3943–3950. doi:10.1128/AEM.67.9.3943-3950.2001
- Liao, J. H. 2017. Biocontrol of crop disease with *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1 and its major antifungal lipopeptide. Master Thesis, Department of Chemical Engineering, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 88 pp. (in Chinese with English abstract)
- Lin, C., C. H. Tsai, P. Y. Chen, C. Y. Wu, Y. L. Chang, Y. L. Yang, and Y. L. Chen. 2018. Biological control of potato common scab by *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01. *PLoS One* 13:e0196520. doi:10.1371/journal.pone.0196520
- Lin, S. S. 2015. Application of *Bacillus amyloliquefaciens* PMB01 to control bacterial leaf spot caused by *Xanthomonas euvesicatoria* on sweet pepper. Master Thesis, Department of Plant Medicine, National Pingtung University of Science and Technology. Pintung, Taiwan. 73 pp. (in Chinese with English abstract) doi:10.6346/NPUST.2015.00029
- Mittler, R., S. Vanderauwera, N. Suzuki, G. Miller, V. B. Tognetti, K. Vandepoele, M. Gollery, V. Shulaev, and F. Van Breusegem. 2011. ROS signaling: The new wave? *Trends Plant Sci.* 16:300–309.

- doi:10.1016/j.tplants.2011.03.007
- Opina, N., F. Tavner, G. Hollway, J. F. Wang, T. H. Li, R. Maghirang, M. Fegan, A. C. Hayward, V. Krishnapillai, W. F. Hong, B. W. Holloway, and J. N. Timmis. 1997. A novel method for development of species strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 5:19–30.
- Orendtlich, A., Y. Elad, and I. Chet. 1988. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 78:84–88.
- Pal, K. K. and B. M. Gardener. 2006. Biological control of plant pathogens. *Plant Health Instr.* 2:1117–1142. doi:10.1094/PHI-A-2006-1117-02
- Palumbo, J. D., G. Y. Yuen, C. C. Jochum, K. Tatum, and D. Y. Kobayashi. 2005. Mutagenesis of β -1,3-glucanase genes in *Lysobacter enzymogenes* strain C3 results in reduced biological control activity toward bipolaris leaf spot of tall fescue and *Pythium* damping-off of sugar beet. *Phytopathology* 95:701–707. doi:10.1094/PHYTO-95-0701
- Peeters, N., A. Guidot, F. Vailleau, and M. Valls. 2013. *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. *Mol. Plant Pathol.* 14:651–662. doi:10.1111/mp.12038
- Phukan, T., K. Kabyashree, R. Singh, P. L. Sharma, N. Singh, A. Barman, B. R. Jena, and S. K. Ray. 2019. *Ralstonia solanacearum* virulence in eggplant seedlings by the leaf-clip inoculation. *Phytopathol. Res.* 1:23. doi:10.1186/s42483-019-0030-x
- Singh, D., D. K. Yadav, G. Chaudhary, V. S. Rana, and R. K. Sharma. 2016. Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of bacterial wilt of tomato incited by *Ralstonia solanacearum*. *J. Plant Pathol. Microbiol.* 7:1–6. doi:10.4172/2157-7471.1000327
- Sonune, N. and A. Garode. 2018. Isolation, characterization and identification of extracellular enzyme producer *Bacillus licheniformis* from municipal wastewater and evaluation of their biodegradability. *Biotechnol. Res. Innov.* 2:37–44. doi:10.1016/j.biori.2018.03.001
- Tran, T. M., J. M. Jacobs, A. Huerta, A. Milling, J. Weibel, and C. Allen. 2016. Sensitive, secure detection of race 3 biovar 2 and native U.S. strains of *Ralstonia solanacearum*. *Plant Dis.* 100:630–639. doi:10.1094/PDIS-12-14-1327-RE
- Tsai, C. H., P. J. Ann, S. L. Hwang, Y. S. Lu, J. R. Li, and Z. Q. Hong. 2017. Occurrence of bacterial wilt on autumn maple tree. *J. Taiwan Agric. Res.* 66:44–52. (in Chinese with English abstract)
- Villa, J., K. Tsuchiya, M. Horita, M. Natural, N. Opina, and M. Hyakumachi. 2003. DNA analysis of *Ralstonia solanacearum* and related bacteria based on 282-bp PCR-amplified fragment. *Plant Dis.* 87:1337–1343. doi:10.1094/PDIS.2003.87.11.1337
- Wang, Y. H., I. L. Lai, J. L. Zheng, and Y. H. Lin. 2019. Using dynamic changes of chlorophyll fluorescence in *Arabidopsis thaliana* to evaluate plant immunity-intensifying *Bacillus* spp. strains. *Phytopathology* 109:1566–1576. doi:10.1094/PHYTO-02-19-0063-R
- Wu, Y. F., C. H. Lin, J. F. Wang, and A. S. Cheng. 2011. Population density of *Ralstonia solanacearum* potato strain, phylotype II/race 3/biovar 2, and incidence of potato bacterial wilt in fields in Dounan, Yunlin County. *Plant Pathol. Bull.* 20:68–77.
- Wu, Y. M. 2016. Study of *Bacillus* spp. on the control of strawberry anthracnose and possible mechanisms involved. Master Thesis, Department of Plant Medicine, National Pingtung University of Science and Technology. Pingtung, Taiwan. 61 pp. (in Chinese with English abstract)
- Yuan, J., Y. Ruan, B. Wang, J. Zhang, R. Waseem, Q. Huang, and Q. Shen. 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria strain *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6-enriched bio-organic fertilizer suppressed *Fusarium wilt* and promoted the growth of banana plants. *J. Agric. Food Chem.* 61:3774–3780. doi:10.1021/jf400038z
- Yuliar, Y. A. Nion, and K. Toyota. 2015. Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microbes Environ.* 30:1–11. doi:10.1264/jsme2.me14144
- Zeng, L., J. Zhou, B. Li, and D. Xing. 2015. A high-sensitivity optical device for the early monitoring of plant pathogen attack via the *in vivo* detection of ROS bursts. *Front. Plant Sci.* 6:96. doi:10.3389/fpls.2015.00096
- Zerriouh, H., A. de Vicente, A. Pérez-García, and D. Romero. 2014. Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. *Environ. Microbiol.* 16:2196–2211. doi:10.1111/1462-2920.12271

Biological Control of Potato Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum* with *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01

Zen-Chi Huang¹, Ya-Fang Wu², Chia-Hsin Tsai³, Hau-Ping Chou⁴, Yi-Hsien Lin⁵, and Ying-Lien Chen^{6,*}

Abstract

Huang, Z. C., Y. F. Wu, C. H. Tsai, H. P. Chou, Y. H. Lin, and Y. L. Chen. 2021. Biological control of potato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* with *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01. J. Taiwan Agric. Res. 70(1):24–42.

Solanaceae bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* has been an important disease of potato and tomato. Though there were no recommended bactericides, current ways to control the bacterial wilt included using bacteria-free tubers, rotation with cereals or rice, and applying *Bacillus amyloliquefaciens* PMB01 as a biocontrol agent. *B. amyloliquefaciens* Ba01 was isolated from healthy potato tuber, and demonstrated the antibacterial effect against potato common scab. In this study, we found that *B. amyloliquefaciens* Ba01 effectively inhibited the growth of potato bacterial wilt pathogen *R. solanacearum*, and it can enhance phosphate solubilization and secrete multiple extracellular enzymes, such as protease, amylase, cellulase and lipase, which could facilitate the growth of plants. Meanwhile, Ba01 exerted better swimming/swarming ability compared to PMB01, indicating it might colonize well in potato plants. We also found that Ba01 had better ability in biofilm formation than PMB01. In terms of antibacterial activity, both Ba01 and PMB01 can inhibit *R. solanacearum* race 1 strain RSN371, and race 3 strains RSN245, RSN373 and RSN439, but there were no synergistic effect between these two biocontrol agents. Furthermore, RSN439 has stronger virulence to potato among four *R. solanacearum* strains. Hence, we determined the disease severity of potato inoculated with *R. solanacearum* RSN439, and found that the disease severity significantly reduced to 20% ($P = 0.0009$) or 40% ($P = 0.0135$) after treatment with Ba01 or PMB01, respectively. As for plant defensive responses, leaves obtained from potato plants inoculated with *R. solanacearum* RSN439 and Ba01 or PMB01 simultaneously increased the accumulation of reactive oxygen species (ROS). In conclusion, potato bacterial wilt can be controlled by *B. amyloliquefaciens* Ba01 effectively due to the inhibition of *R. solanacearum*, the secreting of extracellular enzymes, phosphate solubilization and ROS accumulation in potato plants.

Key words: Potato bacterial wilt, *Ralstonia solanacearum*, *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01, Biological control.

Received: September 3, 2020; Accepted: November 26, 2020.

* Corresponding author, e-mail: ychen28@ntu.edu.tw

¹ Master's student, Master Program for Plant Medicine, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.

² Associate Research Fellow, Crop Environment Section, Tainan District Agricultural Research and Extension Station, Tainan City, Taiwan, ROC.

³ Assistant Research Fellow, Plant Pathology division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

⁴ Associate Research Fellow, Crop Environment Section, Kaohsiung District Agricultural Research and Extension Station, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

⁵ Professor, Department of Plant Medicine, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung County, Taiwan, ROC.

⁶ Associate Professor, Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.