

枯草桿菌 *Bacillus subtilis* WG6-14 對水稻秧苗之生長促進及對 *Sclerotium rolfsii* 所造成水稻秧苗立枯病之防治效果

林漢釗¹ 黃文的¹ 楊尚書¹ 曾德賜^{1,2}

¹ 臺中市 國立中興大學 植物病理學系

² 聯絡作者：電子郵件：dstzeng@nchu.edu.tw；傳真：+886-4-22851038

接受日期：中華民國 97 年 3 月 1 日

摘 要

林漢釗、黃文的、楊尚書、曾德賜 2008. 枯草桿菌 *Bacillus subtilis* WG6-14 對水稻秧苗之生長促進及對 *Sclerotium rolfsii* 所造成立枯病之防治效果 植病會刊 17: 53-64

本文旨在探討枯草桿菌 (*Bacillus subtilis* WG6-14) 於水稻 (*Oryza sativa* L.) 育苗過程病害管理之應用性。利用本研究室所建立技術以 750 公升發酵槽所產出之 WG6-14 發酵菌液 (每毫升約含 1×10^{10} 內生孢子)，以 50~100 倍稀釋浸漬處理台梗八號 (cv. TK8) 稻種，溫室試驗證實，其較之慣行利用撲克拉 (25% 乳劑，經 2000 倍稀釋應用) 行浸種處理，有提早發芽且明顯提高發芽率的效果。繼而於台中市南屯區產銷班育苗場，以 50 倍稀釋 WG6-14 發酵菌液同法分別浸漬處理台梗八號與台梗九號 (cv. TK9) 稻種亦發現，其與利用撲克拉 (cv. TK8) 或利用清水 (cv. TK9) 行浸種處理之對照組相較，處理兩週後調查結果顯示，兩供試品種發芽率分別提升 50 (TK8) 與 22% (TK9)，秧苗生長則分別提高 10 與 13%。針對 *Sclerotium rolfsii* 在秧苗上之危害，經由對峙培養證實 WG6-14 可產生對 *S. rolfsii* NTSR-01 菌株具優異生長抑制效果之抗生物質，於 WG6-14 培養過濾液處理下，可造成後者菌絲細胞膜滲漏作用。於田間選取已被 *S. rolfsii* 感染的秧苗盤，以稀釋 50 倍之 WG6-14 每日一次連續澆灌一週，處理後三天，相對於對照組發病面積平均增加 4.92%，WG6-14 處理組只增加約 0.88%，被害部位菌核形成數量亦大為減少。在密閉培養皿中，以 WG6-14 連同尿素一起處理，對存在於未經滅菌處理土壤中之 *S. rolfsii* NTSR-01 菌核可有明顯協力致死效果，單獨施用尿素時菌核存活率僅降至 56.8%，而 WG6-14 與尿素共同施用則可導致菌核接近全數死亡。上述結果顯示枯草桿菌 WG6-14 生物製劑於水稻秧苗生產及苗期立枯病之防治上極具應用潛力。

關鍵詞：枯草桿菌 WG6-14、生物殺菌劑、生物防治、電解質滲漏、水稻秧苗立枯病、白絹病菌

緒 言

隨著自動插秧機的應用，傳統水稻秧苗培育的方式已由專業箱植育苗法所取代。由於採高密度種植，高溫高濕的環境，加上育苗箱長年重覆使用，秧苗培育過程中由 *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium* spp., *Mucor* spp. 及 *Rhizopus* spp. 等所造成的立枯病常見發生⁽⁵⁾，嚴重影響水稻育苗作業及箱育苗品質。此些立枯病原菌

中，於中部地區育苗場近年來尤以 *S. rolfsii* 之危害最為普遍，其典型病徵在受害部位可有病原菌的白色菌絲體纏繞秧苗基部，受害幼苗植株逐漸枯萎黃化，後期於莖基部並可見褐色菌核形成。在環境適合時，本病蔓延極為快速，常造成大量秧苗死亡甚至插秧後大量缺株，除造成育苗業者、農民的損失相當可觀，也徒增栽培管理上之困擾⁽⁷⁾。有關箱育苗立枯病之防治，除應注意育苗場環境管理與栽培介質的選擇外，主要

仰賴化學藥劑行稻種消毒與土壤消毒處理，台灣目前植物保護手冊上主要推薦藥劑有滅達樂 (Metalaxyl)、依得利 (Etridiazole)、殺紋寧 (Hymexazol) 與滅速克 (Methasulfocarb) 等⁽¹⁴⁾。然由於 *S. rolfii* 主要以菌核於土壤中殘存，化學藥劑防治殊為不易，病害一旦發生，防治效果往往不如預期，加強施藥的結果，除藥害的發生時有所聞，所導致抗藥性與環境生態嚴重劣變的虞慮，及對農民一般民眾健康的威脅更不容忽視。有鑑於此，在水稻健康種苗培育上，有益微生物於病害管理上的應用性日漸受到矚目。

Sclerotium rolfii 為一多犯性病原真菌，多達 500 種以上的植物可被其為害⁽¹⁵⁾，常見受害作物包括豆科、十字花科及瓜類等，於熱帶、亞熱帶地區尤為猖獗；病害防治上除上述化學藥劑的施用外，包括輪作⁽¹⁵⁾、深耕⁽¹⁸⁾、有機添加物的利用⁽¹⁶⁾、太陽能消毒 (soil solarization)^(9, 17, 32, 41)、以及生物防治^(4, 9, 27, 39) 等非化學的防治方法已有許多報導，這些非化學防治方法中，利用拮抗性微生物導入的生物防治近年來尤其受到重視，具應用潛力之微生物種類已見諸報導者有 *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *Bacillus subtilis*, *Penicillium* spp. 以及 *Gliocladium virens* 等^(15, 29, 33, 34)。

在農作物病害生物防治應用上，益生性 (Probiotic) 拮抗微生物之發展近年來備受重視，*B. subtilis* 為一常見且被認定具安全性的有益土壤微生物，其對多種植物之生長促進性^(8, 6, 46)，及對多種病原真、細菌所造成植物病害之防治效果均備受肯定^(21, 38)，有關之生物製劑商品化發展也逐漸增加中。本研究所利用分離自霧峰地區番石榴根圈土壤之 *B. subtilis* WG6-14 菌株，由拮抗範圍測試，李氏⁽²⁶⁾ 已証實其對 *S. rolfii* 有優異之拮抗性，利用液體發酵槽所產出每毫升含 5×10^{10} 內生孢子之 WG6-14 培養液，邱氏⁽⁸⁾ 更進而證實其對包括水稻等多種作物種子之發芽與幼苗生育具有顯著的促進效果；本研究之主要目的在於瞭解 WG6-14 菌株於水稻箱型育苗作業流程之改進效果，及其對幼苗立枯病菌 *S. rolfii* 危害之防治應用性，以供水稻栽培管理應用之參考。

材料與方法

供試病原菌之分離培養及接種源製備

自台中市南屯區水稻育苗場所採集嚴重感染 *S. rolfii* 之秧苗箱，取病原菌所產生之菌核，經 1% (w/v) 次氯酸鈉表面消毒 15 秒後，以無菌水漂洗二次，置 1.5% (w/v) 水瓊脂培養基上，待菌絲長出，於解剖顯微

鏡下切取菌絲尖端，移置馬鈴薯蔗糖瓊脂培養基 (potato sucrose agar, PSA) 斜面培養，所獲得 NTSR-01 菌株，經以光學顯微鏡檢視，確定具有扣子體 (clamp-connections)、大小二型菌絲體等典型 *S. rolfii* 菌絲體特徵⁽⁴²⁾，培養後期並有典型褐色菌核生成，將其更新於 PSA 斜面，待長滿即置 10°C 長久保存，做為供試菌株；試驗過程中，視需要將供試菌自保存管中移植到新的 PSA 平板上更新培養兩次後，待菌落接近長滿，以直徑 0.5 公分打孔器切取菌落邊緣菌絲塊，做為供試菌絲體接種源。另則俟菌落長滿並形成大量菌核後，收取菌核風乾⁽²⁰⁾，保存於室溫供試驗之用。

供試枯草桿菌菌株之培養、保存及醱酵菌液製備

供試 *B. subtilis* WG6-14 菌株為本實驗室既有保存⁽²⁶⁾，試驗過程中供試菌株經由保存管取出，劃線塗抹於 PSA 平板上，置 30°C 黑暗下培養一天後，挑取典型單一菌落，更新培養於 PSA 斜面上，置 30°C 定溫箱培養，每週更新一次備用。

為供水稻浸種及秧苗澆灌處理之需，供試菌株以本研究室既有之液體醱酵量產技術，以 750 L 攪拌式醱酵槽產製其醱酵菌液⁽²⁶⁾，及以研究室所建立之開放式攪拌系統，進一步利用特定農用自然基質所調配製作之功能性營養配方 (functional nutritive formulation, FNF) 保存於 6°C 供試驗之用，FNF 製作方法參見王氏論文⁽⁴⁴⁾。

WG6-14 醱酵菌液對水稻種子發芽與幼苗發育之影響

台硬 8 號水稻 (*Oryza sativa* L. cv. Tai-Keng 8; TK8) 種子，經以尼龍網袋盛裝 (每袋約 50g)，於室溫下分別以撲克拉 (Prochloraz, 25% 乳劑，寶稼有限公司) 稀釋 2,000 倍及以醱酵槽所產製 WG6-14 醱酵菌液 (1.0×10^{10} cfu/ml) 稀釋 1X、10X、50X、100X 等不同倍數，個別進行浸種處理一天，另以清水浸種為對照組，每處理三重覆。隨後分別改置水中，每 8 小時更換清水一次，並逐日採取稻種樣品記錄其發芽情形。浸種五天後按慣行育苗作業流程保濕催芽，於第九天取樣量測記錄生長高度。

另於台中市南屯區產銷班水稻育苗場，以台硬 8 號 (TK8) 與台硬 9 號 (TK9) 水稻為供試材料，盛裝於尼龍網袋中之稻種以 WG6-14 醱酵菌液 50 倍稀釋浸種處理 24 小時後，隨之取出改置清水中，每 8 小時換水一次，三天後進行催芽，旋於播種時再以經稀釋 100 倍之 WG6-14 醱酵菌液追加澆灌一次，之後依照一般育苗作業流程^(19, 28) 進行播種及綠化的工作。試驗中

TK8 水稻同上述另以保護手冊所推薦撲克拉 (25% 乳劑, 寶稼有限公司, 終濃度 2,400X 稀釋)、滅達樂 (17.5% 溶液, 臺灣諾華股份有限公司, 終濃度 1,000X 稀釋) 與依得利 (25% 乳劑, 優品化工有限公司, 終濃度 1,000X 稀釋) 等三種化學藥劑^(14, 19) 混合行浸種處理作為對照, TK9 則另以清水浸種作為無處理對照。各不同處理稻種經綠化處理一週後, 由各處理中隨機選取二個秧苗盤, 每個秧苗盤再隨機取五個 5 cm×5 cm 的區塊 (25 cm²), 計數單位區塊中秧苗總數, 各區塊並隨機取樣二十株秧苗, 檢測平均株高與鮮重。

WG6-14 對 *S. rolfsii* 抗生活性測試

供試驗 *S. rolfsii* NTSR-01 菌株, 經更新於 PSA 平板, 置 28℃ 黑暗下培養一日, 以直徑 0.5 cm 鑽孔器切取含菌絲尖端瓊脂圓盤, 將其移至新的 PSA 平板。另將供試 WG6-14 菌株先畫線塗抹於 PSA 平板, 同樣置 28℃ 黑暗下培養一日後, 以移植環沾取典型之單一菌落, 在距離上述菌絲塊 3 cm 處畫線塗抹, 置 28℃ 黑暗下行對峙培養, 並逐日檢視白絹病菌菌落生長情形。

另外, 將 WG6-14 培養於 PSA 平板上一天後, 挑取單一菌落接種到盛裝 30 ml 523 培養基⁽²²⁾ 之 125 ml 三角瓶中, 於 30℃、150 rpm 下震盪增量培養 18 小時後, 以無菌蒸餾水將培養液之吸光值 A_{620} 調整為 0.3 (菌量約 1×10^8 cfu/ml) 作為接種源, 接種到盛裝有 150 ml SYM 培養基 [0.75%(w/v) 黃豆粉、1%(w/v) 酵母粉及 2% (w/v) 糖蜜⁽⁴⁵⁾] 的 500 ml 凹槽三角瓶, 接種終濃度為 1×10^6 cfu/ml, 接種後置 30℃、120 rpm 下震盪培養五天, 所獲培養液經 13,000 g (Sorvall RC5C, GSA rotor) 離心 20 分鐘, 取上清液, 參考 McKeen 等人的做法⁽³¹⁾, 以 1N 的濃鹽酸調整 pH 值至 2.5, 使抗生物質沈降, 經 13,000 g 離心 20 分鐘後將上清液除去, 沈降物以 80% 的酒精萃取三次, 所得到之酒精萃取液經真空減壓濃縮機 (SVC-100H, Savant Inc.) 濃縮至乾, 接著依序以醋酸乙酯及丙酮洗滌, 最後再以 8 ml 的 50% 酒精將其溶出, 所得即為抗生物質抽出液。活性檢測則以玻璃環法, 於 PSA 平板上置內徑 1 cm 之玻璃環, 每一環中加入 100 μ l 上述抽取之抗生物質, 並置 28℃ 一日後, 接種直徑 0.5 cm 之 *S. rolfsii* 菌絲塊, 再移置 28℃ 中, 逐日檢視抗生物質對 *S. rolfsii* 菌絲生長的抑制情形。試驗中以只添加 100 μ l 之 50% 酒精處理作為對照組。

WG6-14 培養濾液對 *S. rolfsii* 菌絲細胞膜功能之影響

將上述方式製備之 WG6-14 接種源以 1×10^6 cfu/ml 濃度接種至盛裝有 150 ml 523 培養液之 500 ml 凹槽三角瓶中, 置 30℃ 黑暗下以 120 rpm 震盪培養 5 天後, 培養液以 13,000 g (Sorvall RC5C, GSA rotor) 離心 20 分鐘, 取上清液經 0.22 μ m 孔徑過濾膜濾除菌體, 取過濾液備用。另將由 PSA 平板培養製備之 *S. rolfsii* NTSR-01 菌絲圓盤接種源, 接種到裝有 150 ml 馬鈴薯蔗糖培養液 (PSB) 之 500 ml 三角燒瓶中, 每瓶 25 個菌絲圓盤, 於 28℃、120 rpm 下培養 2 天後, 以 Whatman No.1 濾紙過濾, 菌絲體部分旋以 50 ml 無菌去離子水重複懸浮過濾漂洗三次後, 置 50 ml 離心管中, 以 20 ml 無菌去離子水懸浮, 並加入 10 ml 上述製備的 WG6-14 培養過濾液, 置 28℃、120 rpm 處理懸浮 5 小時, 繼而菌絲團以無菌去離子水漂洗三次後, 置 50 ml 離心管中, 經添加無菌去離子水至 30 ml 後, 置 28℃、120 rpm 震盪處理, 並按時序取樣, 以 Suntex SC-16A 型導電度計檢測處理液導電度之變化, 另以清水同法處理 *S. rolfsii* NTSR-01 菌絲團做為對照組。

WG6-14 醱酵菌液施用對 *S. rolfsii* 菌核發芽之影響

仿方與劉氏方法 (1989), 以砂質壤土為材料, 經風乾及 20 mesh 網篩過篩後, 於高 2 cm、直徑 9 cm 之培養皿中每皿置 100 g, 個別以 50 倍稀釋之 WG6-14 醱酵液 (每皿 20 ml) 於添加/不添加尿素 (每皿 0.5 g) 情形下添加處理, 另以只添加尿素液 (0.5 g/20 ml) 及水處理分別做為對照; 添加處理完成後, 每皿置 50 顆菌核於土表, 加蓋後以石蠟膜密封, 置 28℃ 培養, 每處理三重覆。處理五天後取出菌核移置 1.5% 水瓊脂培養基平板, 置 28℃ 培養並逐日計數菌核發芽情形。另將同樣之砂質土以高壓滅菌 (15 lbs, 121℃, 15 min) 處理後, 同上述方式重複試驗。

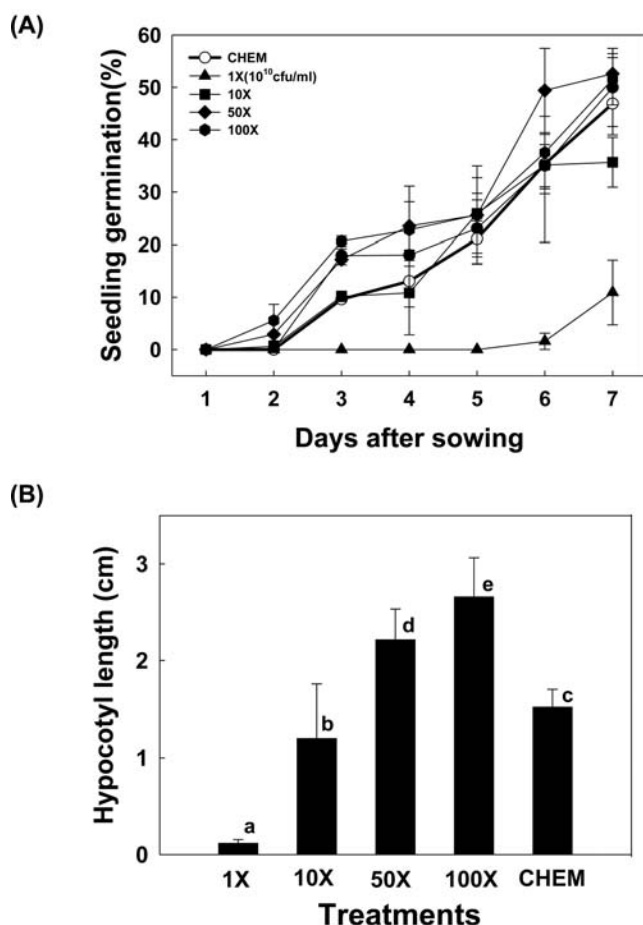
WG6-14 FNF 澆灌處理對 *S. rolfsii* 於秧苗盤上蔓延之影響

由南屯地區育苗場採集已感染 *S. rolfsii* 之秧苗盤, 取回後置溫室中, 經調查各盤發病面積後, 每日以稀釋 50 倍之 WG6-14 FNF 行澆灌處理 (每盤 500 ml)。以清水澆灌為對照組, 每處理三重覆。處理一週後調查其秧苗盤上秧苗被 *S. rolfsii* 菌絲感染黃化面積擴張程度, 並計數每盤菌核形成數量。

結 果

WG6-14 醱酵菌液對水稻種子發芽與幼苗發育之影響

供試水稻種子以 50 到 100 倍稀釋濃度之 WG6-14 醱酵菌液行浸漬處理後，均有發芽提早且發芽率提高之現象 (圖一、A)，相較於化學藥劑對照組，WG6-14 處理組於第 3 天發芽率即達 17~21%，第 7 天更達 52~53%，而對照處理第 3 天則只有 10%，第 7 天才達 47%；唯當 WG6-14 處理濃度提高到 10X 稀釋時，即未見此發芽促進現象，發芽率及發芽時間與對照處理均未見有明顯差異；當以未經稀釋的原液 (1X) 處理時



圖一、枯草桿菌 WG6-14 醱酵液 (1×10^{10} cfu/ml) 於不同稀釋倍數 (1X、10X、50X、100X) 下浸種處理，對溫室種植台梗 8 號水稻種子發芽 (A) 與幼苗生育 (B) 之影響。

Fig. 1. Effect of seed soaking by *Bacillus subtilis* WG6-14 broth culture at 1X, 10X, 50X, and 100X in dilutions on seed germination (A) and seedling growth (B) of greenhouse grown rice (*Oryza sativa* L. cv. TK8) comparing to that by Prochloraz treatment (CHEM).

更發現有極明顯的發芽抑制作用，處理後 7 天發芽率只有 11%。於處理後 9 天調查幼苗生長狀況則發現，以 WG6-14 稀釋 50 倍與 100 倍處理組，胚軸長度分別達 2.2 cm 與 2.7 cm (圖一、B)，化學藥劑處理組則分別只有 1.5 cm 與 1.6 cm；以 WG6-14 處理對胚軸發育之促進作用相當明顯 (圖一、B)。

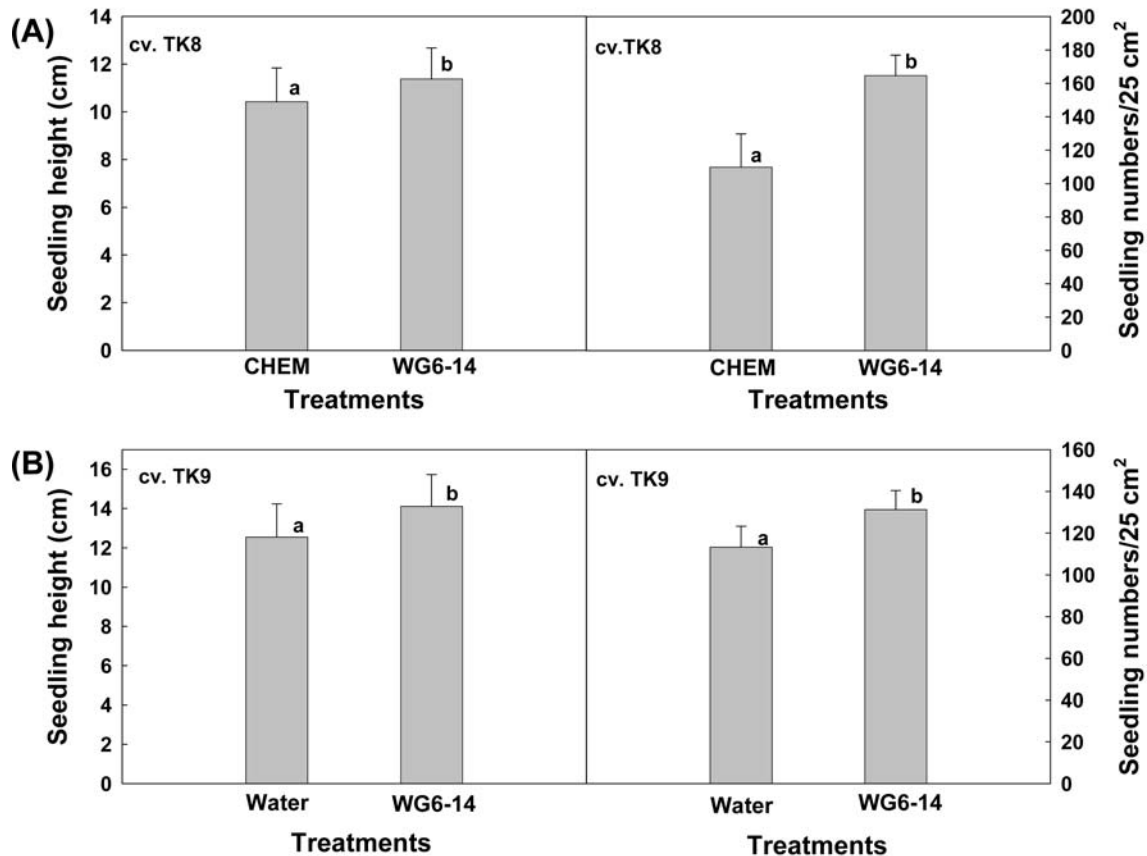
另外於台中市南屯區水稻育苗場同法檢測經 50 倍稀釋之 WG6-14 醱酵菌液浸種處理對水稻發芽及幼苗生長之影響，由播種後兩週之調查結果顯示，兩供試水稻品種經 WG6-14 處理後，對發芽率與植株發育均有顯著的促進作用 (圖二、A, B)，其中台梗 8 號每 5×5 cm² 範圍成長幼苗數，WG6-14 處理組為 165 株，其化學處理對照組為 110 株；而台梗 9 號則 WG6-14 處理組為 131 株，水處理對照組為 113 株，至於在株高方面則處理組台梗 8 號、9 號分別為 11.4 cm 與 14.1 cm，而相對的對照組則分別為 10.4 cm 與 12.5 cm。在試驗中台梗 9 號部分，於水稻種子催芽後 3 天，檢測每 25 cm² 取樣區塊秧苗之根長，WG6-14 處理組平均達 13 mm，清水處理對照組則為 10.2 mm，無論是秧苗密度及株高與根部發育，兩供試水稻品種處理組與對照組間差異均達顯著水準 ($p=0.05$) (圖二、A, B)。

WG6-14 對 *S. rolfsii* 之抗生活性檢測

供試 *S. rolfsii* NTSR-01 菌株，在 PSA 平板菌絲體生長緻密快速，並可於一週左右產生大量菌核 (圖三)；當與 WG6-14 行對峙培養時，其菌落生長顯著受到抑制 (圖三、A)，靠近 WG6-14 部位菌絲體明顯較為稀疏，且菌落外緣可見有類似蛋白質的乳白色沈澱物環繞，此乳白色沈澱物並有愈靠近 WG6-14 菌落濃度愈高的現象。進一步利用 McKen 氏等⁽³¹⁾ 針對 iturin 類抗生物質之萃取方法由 WG6-14 培養液萃取所獲得抗生物質萃取物，經以玻璃環法於 PSA 平板上檢測，進而證實其對 *S. rolfsii* NTSR-01 菌絲生長確具極強的抑制效果 (圖四)，在抗生物質環繞下，其菌落僅能在侷限部位有限度的生長，沿玻璃環外圍且可見明顯有相同於上述對峙培養所見類似蛋白的乳白色沈澱物形成之現象。

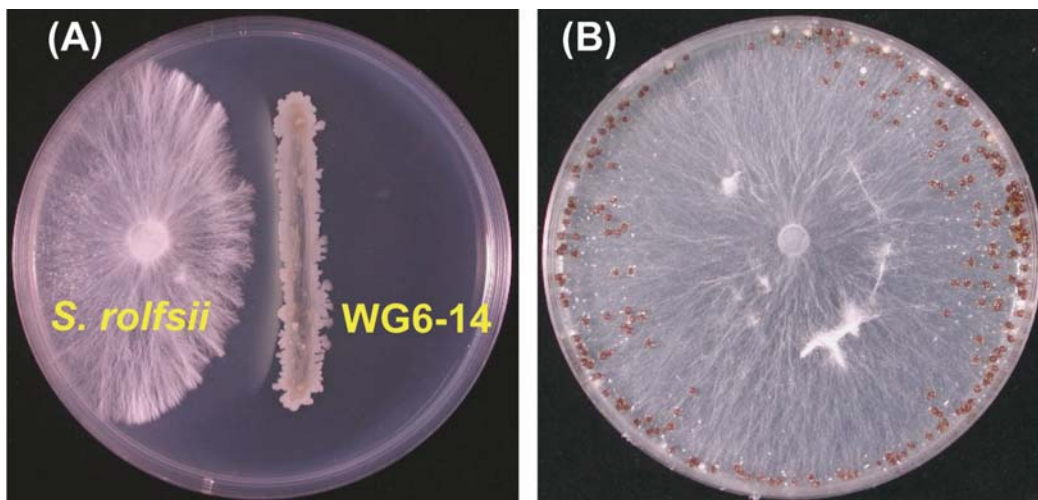
WG6-14 培養濾液對 *S. rolfsii* 菌絲體細胞膜功能之影響

經以 WG6-14 培養濾液處理 5 小時之 *S. rolfsii* NTSR-01 菌絲團，按時序檢測其導電度變化結果如圖五所示，供試處理組菌絲體懸浮液之導電度於初始 1.5 hr 內，導電度由 47 μ mho 快速爬升到 102.7 μ mho，其後一直到 24 hr，導電度則呈現緩和的穩定上升趨



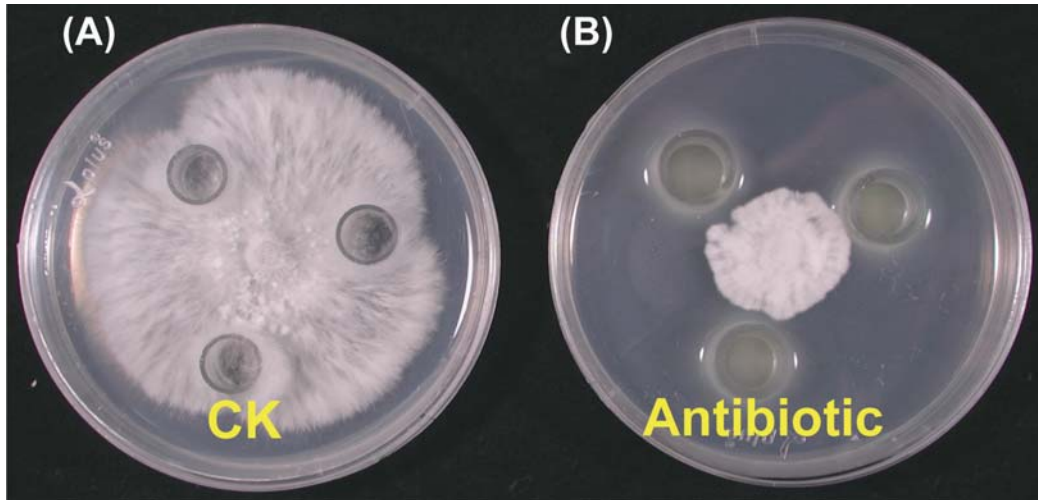
圖二、於台中市南屯區育苗場，以枯草桿菌 WG6-14 醱酵液 (1×10^{10} cfu/ml) 在 50 倍稀釋下浸種處理，對台梗 8 號 (A) 與台梗 9 號 (B) 水稻秧苗高度與密度之影響，試驗中分別以撲克拉化學藥劑處理 (CHEM) 及水 (Water) 處理作為對照。

Fig. 2. Effect of seed soaking with *Bacillus subtilis* WG6-14 broth culture (1×10^{10} cfu/ml) at 50X in dilution on seed germination and seedling growth of TK8 (A) and TK9 (B) rice. Rice treated with Prochloraz (CHEM, for TK8) or water (for TK9) was used as control. Seedling height and seedling density were determined 3 weeks after treatment. Bars top labeled with different letters are significantly different according to Duncan's multiple range test ($P=0.05$).



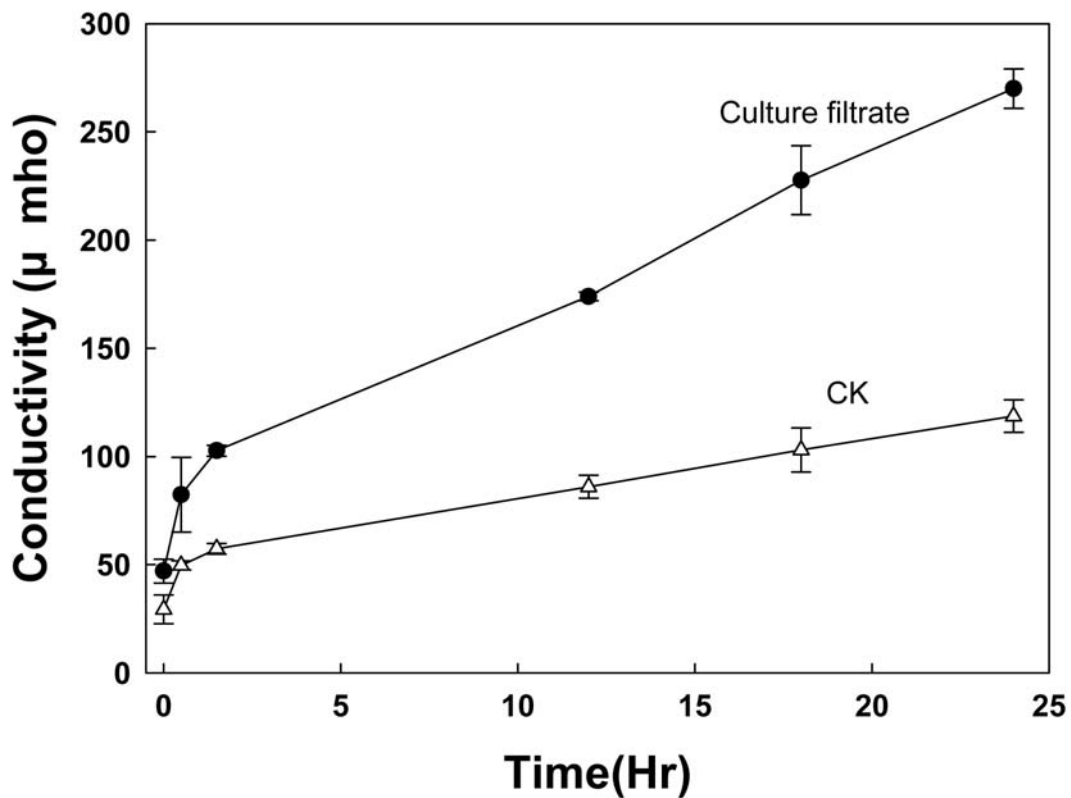
圖三、(A) 枯草桿菌 *Bacillus subtilis* WG6-14 與 *Sclerotium rolfsii* NTSR-1 於 PSA 平板對峙培養時之拮抗作用。(B) *Sclerotium rolfsii* NTSR-1 於 PSA 平板上培養一週的菌落生長情形。

Fig. 3. Antagonistic effect of *Bacillus subtilis* WG6-14 (A) against *Sclerotium rolfsii* NTSR-1 shown by dual culture assay on potato sucrose agar plate (A) comparing to that of non-treated control (B).



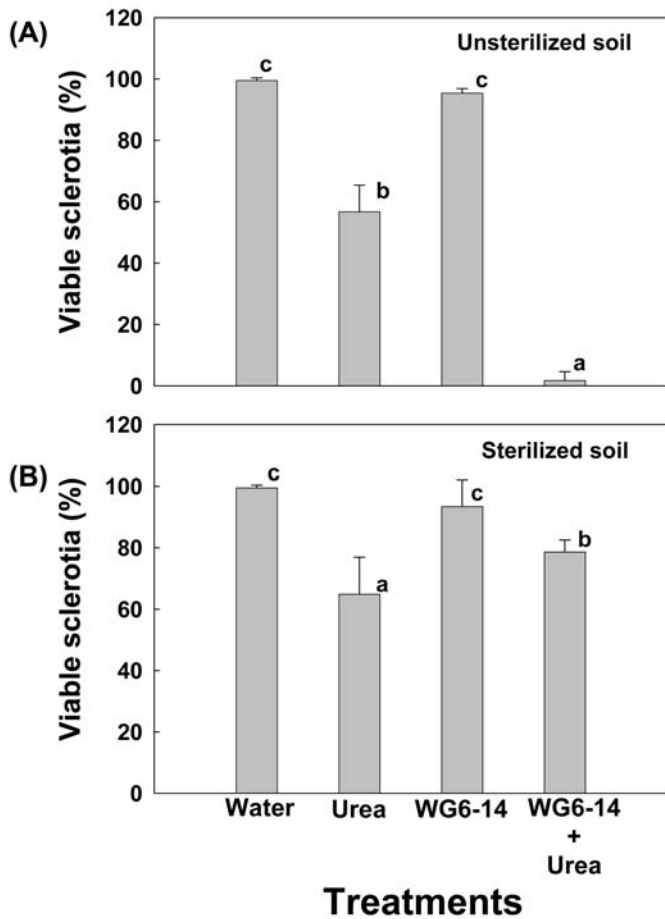
圖四、枯草桿菌 *Bacillus subtilis* WG6-14 的抗生物質粗萃取液對 *Scelrotium rolfsii* NTSR-01 菌絲生長之抑制情形。(A) 為添加 50% 酒精之對照組處理 (CK)，(B) 則為抗生物質粗萃取液處理組 (Antibiotic)，照片為培養二日後拍攝。

Fig. 4. Antagonistic effect of crude antibiotic extract obtained from broth culture of *Bacillus subtilis* WG6-14 by the method described by McKeen *et al.*, (1985) against *Scelrotium rolfsii* NTSR-01 (B). The compared control (CK) was treated with 50% ethanol only (A). Photo was taken 2 days after inoculation.



圖五、以枯草桿菌 *Bacillus subtilis* WG6-14 培養濾液添加處理 (以 523 培養液培養，最終稀釋濃度 3X) 5 小時，對 *Scelrotium rolfsii* NTSR-01 菌絲體所造成之細胞膜滲漏作用。試驗中以 Milli-Q 水處理作為對照 (CK)。

Fig. 5. The electrolyte leakage from mycelia of *Scelrotium rolfsii* NTSR-01 after a 5-hour treatment by 3X diluted *Bacillus subtilis* WG6-14 culture filtrate (grown in 523 broth). The compared control (CK) was treated with only Milli-Q water.



圖六、密閉培養皿(每皿置 20 mesh 網篩過篩之砂土 100 g)中, *Bacillus subtilis* WG6-14 醱酵菌液(稀釋 50 倍, 每皿 20mL)與尿素(每皿 0.5g)添加處理對存在土壤中的 *Sclerotium rolfsii* NTSR-01 菌核(每皿置 50 顆)活性之影響。試驗中以水處理為對照組(CK)。

Fig. 6. Effect of drenching application of 50X diluted *Bacillus subtilis* WG6-14 (1×10^{10} cfu/mL) with or without addition of urea (0.5%) on viability of *Sclerotium rolfsii* NTSR-01 sclerotia present on non-sterilized (A) and sterilized (B) soil. The compared control was treated with only water or urea.

勢, 於第 24 小時達 270 μ mho; 而對照組, 其導電度亦可見同樣兩段上升的現象, 唯上升幅度較小; 於初始 1.5 hrs 其導電度由 29.3 μ mho 上升到 57.3 μ mho; 其後到 24 hrs 則繼續增加到 118.7 μ mho; 處理 24 hr 後, WG6-14 處理組導電度約為對照組的 2.3 倍。

WG6-14 醱酵菌液施用對 *S. rolfsii* 菌核之影響

如圖六、A, B 所示, 在培養皿密閉系統中經以 WG6-14 處理五天後調查菌核活性, 發現於無尿素添加處理下, 所獲得菌核發芽率於水處理對照組, 滅菌土

與非滅菌土皆達 99.5%, 而於 WG6-14 處理組, 滅菌土與非滅菌土則分別為 93.4% 與 95.3%, WG6-14 單獨處理對菌核之存活雖略見降低效果, 然與對照處理組比較差異並不顯著; 而在有尿素添加處理下, 單獨尿素處理滅菌土與非滅菌土菌核發芽率分別為 64.8% 與 56.8%, 對菌核存活之影響均相當顯著; 另外 WG6-14 與尿素同時添加處理者, 則於非滅菌土, 菌核發芽率降到 1.8%, 然於滅菌土則菌核仍有高達 78.6% 發芽率。

WG6-14 FNF 澆灌處理對 *S. rolfsii* 於育苗盤上蔓延之影響

由田間取回遭立枯病菌感染之育苗盤樣品, 分別調查記錄各箱秧苗被害狀況後, 經以 WG6-14 FNF 稀釋 50 倍每日行澆灌處理, 施用一週後調查育苗箱發病情形, 試驗結果如表一所示, 對照處理之苗盤發病面積分別增加 8.2、4.2 與 2.4%, 而經 WG6-15 FNF 澆灌處理之苗盤分別只增加 0.9%、1.7% 與 0.1%。進一步檢視各苗箱上菌核數發現, 於對照處理分別達 12,972、3260 及 972 粒, 而 WG6-14 FNF 處理組則分別只有 746、602、548 粒。經 WG6-14 FNF 處理後病原之蔓延危害與菌核形成數量均有明顯受抑情形。圖七所示由供試苗箱處理前後病徵發展, 更可清楚看出在對照處理於處理一週後病害均有明顯蔓延擴張的情形, 其中以 CK-1 尤為嚴重(圖七、B)。而在 WG6-14 FNF 處理組則病害多侷限在原本感染的部位, 處理後除部份原已發病植株有枯死現象, 被害面積未見有明顯擴大情形(圖七、A)。

討 論

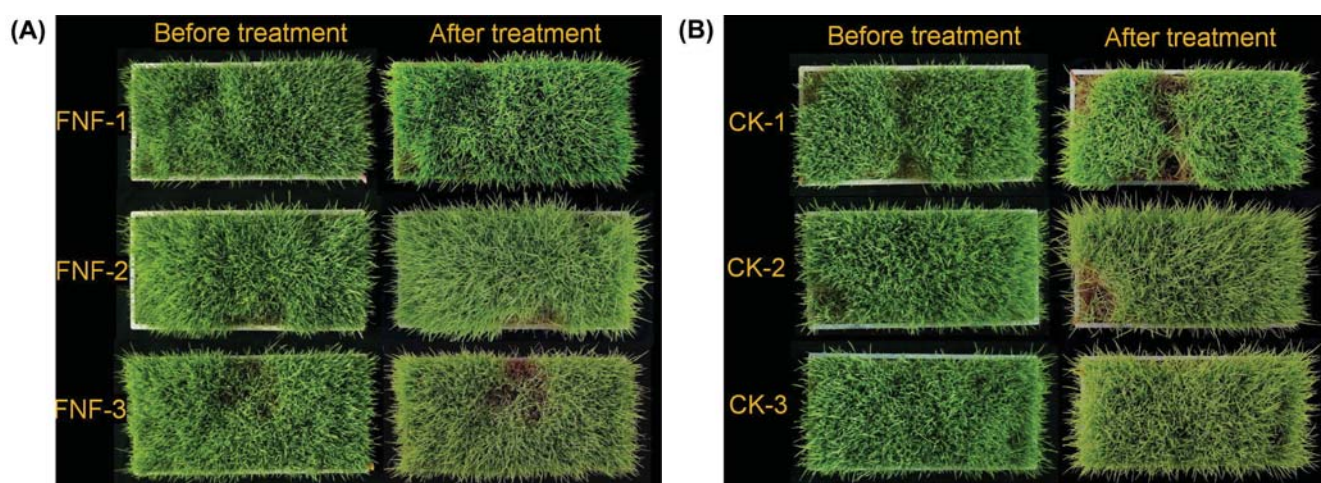
水稻箱型育苗作業上, 由於高密度種植及高濕度培育環境, 極適合病害的發生, 一旦病害發生常蔓延迅速且極為嚴重, 為防治苗期病害的發生, 多種化學農藥之使用成為必要之惡, 其不但徒增生產成本, 農藥殘留問題, 更常為社會大眾所關切。本研究嘗試枯草桿菌 WG6-14 於水稻栽培育苗上的應用, 期能在減少農藥使用之餘, 更可達到健康種苗管理的目標。

由本研究之結果可以看出, 利用醱酵槽所產製枯草桿菌 WG6-14 發酵菌液, 在 50-100X 稀釋下行浸種處理, 對稻種之發芽可有明顯之促進效果(圖一、二); 桿菌屬細菌中許多成員已知具 PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) 屬性, 對多種植物生長具促進效果^(6, 46); 由於其可促進土壤中大分子有機物的分解與營養物質的有效吸收, 並可改善土壤性質

表一、每日澆灌經 50 倍稀釋之枯草桿菌 WG6-14 FNF 對育苗場既有 *Sclerotium rolfsii* 苗立枯病感染部位擴大蔓延之影響。試驗中以水澆灌處理作為對照 (CK)，表中數字顯示處理前 (BT) 及處理一週後 (AT) 各供試育苗箱罹病面積所佔比率、處理後罹病面積增加比率 (% increase) 以及菌核形成數量。

Table 1. Effect of a daily drenching application of *Bacillus subtilis* WG6-14 FNF at 50X dilution on *Sclerotium rolfsii* seedling blight progression in seedling boxes. The compared controls (CK) were treated with water. Data shown were percentage of infected area observed before (BT), and one week after (AT) treatment and the % increases after treatment. Also shown was the total numbers of sclerotia produced in each box after the applied treatment.

Treatments	Infected area (%)			Sclerotia	
	BT	AT	Increase (%)	Number	Viable (%)
CK-1	3.17	11.34	8.16	12972	100.0
CK-2	5.54	9.76	4.22	3260	96.4
CK-3	0.00	2.38	2.38	972	94.5
Mean			4.92	5735	96.9
FNF-1	1.20	2.08	0.88	533	94.4
FNF-2	1.52	3.20	1.68	1190	98.2
FNF-3	11.70	11.78	0.08	3148	100.0
Mean			0.88	1624	97.5



圖七、以稀釋 50 倍 *Bacillus subtilis* WG6-14 FNF 連續每日澆灌處理自然感染 *Sclerotium rolfsii* 立枯病之秧苗箱，處理前及處理一週後，病勢蔓延情形變化及對秧苗生育之影響。試驗中之對照組 (CK) 以水澆灌處理。

Fog. 7. Effect of daily drenching application of 50X diluted *Bacillus subtilis* WG6-14 FNF on seedling blight progression and seedling growth. The test seedling boxes with *Sclerotium rolfsii* seedling blight infection were obtained from a seedling propagation station at Nun-tun Taichung. The photos were taken right before and 1 week after treatment.

等，因此除了促進植株生長，對病害的抗性也有顯著的提升效果^(24, 43, 45)。本研究應用之枯草桿菌 WG6-14 菌株，過去之研究中，已相繼証實其對甘藍植株生長、及對茭白筍植株生長與分蘖之增益具促進效果⁽²⁶⁾，其代謝所產生的揮發性氣體，也已分別被証實對甘藍、西瓜、胡瓜、番茄等種子的發芽與根部發育，以及對水稻幼苗生長與根毛發育均有明顯的促進性⁽⁸⁾。就這些植物生長促進作用而言，Ryu 等人曾報告指出其可能與 *Bacillus* spp. 代謝過程中 3-hydroxy-2-butanone (acetoin) 與 2,3-butanediol 等揮發性氣體之產生有關

(37)。Arkhipova 氏等人甫近更發現 *Bacillus subtilis* 可以產生細胞分裂素 (cytokinins)，且其在施用於萵苣後可進而促進植株細胞分裂素之產生⁽¹⁾。本研究中，經由實驗室測試及田間育苗箱作業處理測試，皆証實以本研究室利用液體醱酵槽所產製之枯草桿菌 WG6-14 醱酵菌液在 50X 及 100X 稀釋下應用，對台梗 8 號與台梗 9 號水稻種子發芽與秧苗生長均有顯著的促進效果，其較之推薦化學藥劑撲克拉 (稀釋 2000X) 之應用處理，不但發芽時間提早 (圖一、A)，成活苗數與秧苗生長勢均明顯較高 (圖一、B，圖二、A, B)。此一發芽與生長

之促進作用，很明顯與 WG6-14 之代謝物有關，處理濃度太高 (10X 稀釋或原液直接施用) 則反有抑制效果；有關 WG6-14 對植物種子發芽之促進作用，邱氏已証實其與揮發性代謝物 Butanediol 之產生有關⁽⁸⁾，此與 Ryu 氏等研究所見一致；由於發芽時間提早，此對縮短育苗作業流程相當有利；另於育苗場田間測試所見對成活秧苗密度具顯著的提升效果 (圖二、A, B)，更顯示其於節省育苗成本、強化產業競爭力之增益效果。

由對峙培養測試結果，可明顯看出 WG6-14 對水稻上分離之立枯病菌 *S. rolfii* NTSR-01 菌絲生長有相當明顯的抑制作用 (圖三、A)，此一生長抑制作用與 WG6-14 抗生物質的分泌顯然有關，就病害防治應用枯草桿菌而言，已知可產生的抗生物質種類相當多，作用範圍亦相當廣泛，其化學組成大多屬於多肽化合物 (polypeptide)^(2, 3, 23, 35)。常見產生的 iturin A 已知為具環狀構造之 lipopolypeptide，對於多數真菌細胞，已知其可結合於膜之結構上，並造成膜通透性改變⁽⁴⁰⁾；另亦有報告指出，其可以活化細胞膜上之磷脂酶素，進而影響細胞膜的通透性⁽²⁵⁾。本研究對峙培養中於抑制帶所見類似蛋白質之白色沈澱，由濃度梯度形成似可看出，其應為 WG6-14 所產生之蛋白質分泌物，其沈降原因則有可能與酸的存在有關，就試驗中測試之標的病原菌而言，其分泌草酸的特性與毒力之關係為一眾所熟知之生理特性⁽³⁰⁾。就諸多對峙培養抑制帶形成所見，*S. rolfii* 對 WG6-14 之敏感性明顯較其他病原真菌為甚，是否與草酸之分泌及抗生性蛋白物之沈降濃縮有關很值得進一步瞭解。本研究中嘗試利用 iturin A 之純化流程將 WG6-14 培養濾液加以酸化萃取沈降之抗生物質，經於 PSA 平板上測試其對供試 *S. rolfii* NTSR-01 菌株生長之影響，由圖四、B 所示結果進一步顯示，上述菌絲生長抑制作用可能與類似 iturin 之環肽類抗生物質之作用有關；另外由 WG6-14 培養濾液處理後，NTSR-01 菌絲懸浮液電解質滲漏有明顯快速增加的現象 (圖五)，則進而證實其為標的菌細胞膜通透性受到抗生物質作用後，所導致離子滲漏現象。

就白絹病菌之防治而言，儘管過去之研究不乏證據顯示以拮抗性微生物進行生物防治之可行性，然既有的工作多僅止於研究模式系統之探討^(11, 15, 29, 34)，真正落實到病害防治管理應用者迄今未見之；方氏曾報告指出，土壤中尿素的施用，可導致氨的毒害作用，並使 *S. rolfii* 菌核表面破裂，進而有醣類與胺基酸等細胞內容物質滲漏，而使得土壤中其它微生物因之可利用其分泌物，進而從菌核裂縫進入內部，最後導致菌核破壞並使失去活性^(10, 12)。在其系列研究中亦發現，於

尿素施用下，菌核上包括 *Fusarium* spp. 等真菌之寄生作用明顯增加，應亦為致死作用之主要原因^(10, 11)。本研究中，以尿素與 WG6-14 醱酵菌液混合施用，對菌核活性之降低效果最好 (圖六)，其可使存活菌核降低至只有 1.7% (圖六、A)。較之單獨尿素處理菌核存活率只降到 43.2%，WG6-14 之添加對尿素處理下菌核之致死作用協力效果至為明顯，然此一對菌核之強致死作用僅限於未經消毒之自然土處理。有關尿素添加處理對菌核病菌之防治效果，於方氏等早期的報告中顯示，以 0.5% (w/w) 尿素單獨行土壤添加處理，在處理十五天後菌核之致死效果即可達到 100%⁽¹³⁾，其與本研究所獲得結果有相當的差距，是否由於所使用的土壤不同，其中所含的微生物相亦不同所致，甚值得進一步瞭解，唯此一結果更顯示土壤中微生物之參與作用對菌核的致死作用角色不容忽略；在該試驗過程中，於已失去活性之菌核上吾人亦發現有腐生性真菌生長產孢之現象 (結果未示出)，此與方與劉⁽¹¹⁾ 的報告中所見施用尿素後菌核上有寄生性真菌纏據之現象一致。

現行的水稻育苗流程，由浸種到保濕催芽約需五天左右，隨後由播種催芽一直到秧苗綠化，則隨溫度之改變，約需時二週至一個月左右。上述本研究之實驗室與田間育苗場試驗結果 (圖一、二)，已證實利用 WG6-14 醱酵菌液浸種，所需時間可望縮短一日以上，且存活秧苗數顯著提高達 11.5 ~ 50% 以上，於綠化階段繼續以 WG6-14 醱酵菌液或由其進而製備之 FNF 行噴洒或澆灌處理，更可縮短秧苗綠化所需之時日，有效降低病原菌菌核之存活及其對秧苗之危害，降低化學藥劑的施用及其所造成對環境、人及生態上的不良影響，有關 WG6-14 之應用性確值得水稻育苗作業上之參考。

謝 辭

本研究部分工作承國科會 NSC92-2317-B005-013 及農委會動植物防疫檢疫局 94 農科 -13.2.1- 檢 -B6 (1) 計畫資助完成，特此致謝。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Arkhipova, T.N., Veselov, S.U., Melentiev, A.I., Martynenko, E.V., and Kudoyarova, G.R. 2005. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant and Soil* 272:201-209.
2. Babad, J., Pinsky, A., Turnercreff, R., and Sharon, N. 1952. An antifungal polypeptide produced by *Bacillus*

- subtilis*. Nature 170:618-619.
3. Besson, F., Peypoux, F., Michel, G., and Delcambe, L. 1976. Characterization of iturin A in antibiotics from various strains of *Bacillus subtilis*. J. Antibiotics 29:1043-1049.
 4. Brathwaite, C. W. D., and Cunningham, H. G. A. 1982. Inhibition of *Sclerotium rolfsii* by *Pseudomonas aeruginosa*. Can. J. Bot. 60:237-239.
 5. Chang, Y. C. 2003. Seedling blight of rice cultivated in seedling boxes. Pages 241-249 in: Pictorial Monograph Series of Plant Protection No. 8. Rice Protection Part II. Taipei, 448pp. (in Chinese with English abstract)
 6. Chen, J. Y. 2003. Application of rhizosphere bacteria in plant disease control. Pages 15-25 in: Proceeding of Microbial Diversity and Its Sustainable Application. Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University. Taipei, Taiwan. (in Chinese with English abstract)
 7. Chien, J. C. and Hong, Y. C. 1971. Preliminary investigation of rice seedling blight disease. Agri. Res. 20: 47-52.
 8. Chiu, Y. -S. 2004. Control of citrus bacterial canker by antagonistic *Bacillus subtilis* WG6-14. M. S. Thesis. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University. 92pp. (in Chinese with English abstract)
 9. Elad, Y., Katan, J., and Chet, Y. 1980. Physical, biological, and chemical control integrated for soil born diseases in potatoes. Phytopathology 70:418-422.
 10. Fang, H. C. 1991. Study on the etiology of lost viability of *Sclerotium rolfsii* in urea-amended soil. Res. Bull. Tainan DAIS. 27:37-44. (in Chinese with English abstract)
 11. Fang, H. C. and Liu T. M. E. 1986. Feasibility of controlling *Sclerotium rolfsii* infection by urea and *Trichoderma harzianum* application. Plant Prot. Bull. 28:432. (Abstract)
 12. Fang, H. C., and Liu, T. M. E. 1989. Mechanisms of suppression of *Sclerotium rolfsii* by soil amendment with urea. Plant Pathol. Bull. 31:163-172. (in Chinese with English abstract)
 13. Fang, H. C., Liu, T. M. E., and Tu, C. -C. 1988. Effect of chemical fertilizers and nitrogenous compounds on the sclerotia of *Sclerotium rolfsii* in soil. Plant Pathol. Bull. 30:101-110. (in Chinese with English abstract)
 14. Fei, W. C., Wang, Y. M., Chang, K. H., Li, M. L., and Liao, L. L. 2002. Plant Protection Manual. Taiwan Agricultural Chemical and Toxic Substance Research Institute, Council of Agriculture, Taiwan. 791 pp.
 15. Ferreira, S. A., and Rebecca, R. A. 1992. *Sclerotium rolfsii*. Knowledge Master. Extension Entomology & UH-CTAHR Integrated Pest Management Program. http://www.extento.hawaii.edu/Kbase/Crop/Type/s_rolfs.htm
 16. Gautam, M., and Kolte, S. J. 1979. Control of sclerotium of sunflower through organic amendments of soil. Plant and Soil 53:233-238.
 17. Grinstein, A., Katan, J., Razik, A. A., Zeydan, O., and Elad, Y. 1979. Control of *Sclerotium rolfsii* and weeds in peanuts by solar heating of the soil. Plant Dis. Repr. 63:1056-1059.
 18. Gurkin, R. S., and Jenkins, S. F. 1985. Influence of cultural practices, fungicides and inoculum placement on southern blight and *Rhizoctonia* crown rot of carrot. Plant Dis. 69:477-481.
 19. Hou, F. F. 1983. Seedling nursing management for rice mechanical seeding. Extension News from Taichung DAIS. 17:1-10.
 20. Huang, H. C., and Chang, C. 2003. Effect of relative humidity on myceliogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia minor*. Plant Pathol. Bull. 12:65-68.
 21. Islam, Z., Pamplona, R., Cruz, C. V., Atkinson, A. D., and Azucena, E.J. 2003. Biological Control of Rice Diseases. International Rice Research Institute. 24 pp.
 22. Kado, C. I., and Heskett, M. G. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. Phytopathology 60:969-976.
 23. Katz, E., and Demain, A. L. 1977. The peptide antibiotic of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible function. Bacteriol. Rev. 41:449-474.
 24. Krebs, B., Höding, B., Kübart, S. M., Workie, A., Junge, H., Schmiedeknecht, G., Grosch, R., Bochow, H., and Hevesi, M. 1998. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. 1. Activities and characterization of *Bacillus subtilis* strain. J. Plant Dis. Prot. 105:181-197.
 25. Latoud, C., Peypoux F., and Michel, G. 1987. Action of iturin A, an antifungal antibiotic from *Bacillus subtilis*, on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: modifications of membrane permeability and lipid composition. J. Antibiotics 40:1588-1595.
 26. Lee, Y. -H. 2002. Antagonistic bacilli- the isolation and screening, the characterization and improvement on antagonisity and the disease control application evaluation. M. S. Thesis. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University. 79pp. (in Chinese with English abstract)
 27. Lewis, J. A. and Fravel, D. R. 1996. Influence of Pyrax/biomass of biocontrol fungi on snap bean damping-off caused by *Sclerotium rolfsii* in the field and on germination of sclerotia. Plant Dis. 80: 655-659.
 28. Lin, B. H. 1980. Cereal Crops. Part I: Rice. Page 375-397 in: Taiwan Growers Manual. R. Leong, ed.

- Harvest Farm Magazine 1386pp. (in Chinese)
29. Maiti, D., and Sen, C. 1985. Integrated biocontrol of *Sclerotium rolfii* with nitrogenous fertilizers and *Trichoderma harzianum*. Indian J. Agri. Sci. 55:464-468.
30. Maxwell, D. P., and Bateman, D. F. 1968. Influence of carbon source and pH on oxalate accumulation in culture filtrates of *Sclerotium rolfii*. Phytopathology 58:1351-1355.
31. McKeen, C. D., Reilly, C. C., and Pusey, P. L. 1985. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. Phytopathology 76:136-139.
32. Mihail, J. D. and Alcorn, S. M. 1984. Effects of soil solarization on *Macrophomina phaseolina* and *Sclerotium rolfii*. Plant Dis. 68:156-159.
33. Muhammad, S. and Amusa, N. A. 2003. In vitro inhibition of growth of some seedling blight inducing pathogens by compost-inhabiting microbes. Afr. J. Biotechnol. 2:161-164.
34. Naima, K., Brahim, E., Latifa, L., and Abdallah, O. 2004. Effect of nitrogen fertilizers and *Trichoderma harzianum* on *Sclerotium rolfii*. Agronomie 24:281-288.
35. Nandi, P. and Sen, G. P. 1953. An antifungal substance from a strain of *Bacillus subtilis*. Nature 172:871-872.
36. Punja, Z. K. and Grogan, R. G. 1982. Effects of inorganic salts, carbonate, bicarbonate anions, ammonia, and the modifying influence of pH on sclerotial germination of *Sclerotium rolfii*. Phytopathology 72:635-639.
37. Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Wei, H. X., and Pare, P. W. 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:4927-4932.
38. Shoda, M. 2000. Bacterial Control of Plant Diseases. J. Biosci. Bioeng. 89:515-521.
39. Singh, R. S. and Reddy, C. S. 1979. Suppression of damping-off of tomato and seeding blight of chickpea and sugar beet by strains of *Streptomyces distaticus*. Indian Phytopathol. 32:374-377.
40. Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Mol. Microbiol. 56:845-857.
41. Tu, C. C., Cheng, Y. H., and Hwang, S. C. 1991. Effects of solar energy and green manures on the control of southern blight of tomato. Plant Pathol. Bull. 33:95-102.
42. Tu, C. C., Hsieh, T. F., Tsai, W. H., and Kimbrough, J. W. 1992. Induction of basidia and morphological comparison among isolates of *Athelia (Sclerotium) rolfii*. Mycologia 84:695-704.
43. Turner, J. T. and Beckman, P. A. 1991. Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. Plant Dis. 75: 347-353.
44. Wang, C. -H. 2003. Preparation of a massively amplified broth culture of *Bacillus subtilis* WG6-14 and its application as a functional nutritive formulation for disease management. M. S. Thesis. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University. 65pp. (in Chinese with English abstract)
45. Wang, S. -W. 2002. Control of rice bacterial blight by antagonistic *Bacillus* spp. - the potential application and the mode of action. M. S. Thesis. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University. 84pp. (in Chinese with English abstract)
46. Zehnder, W. G., Murphy, J. F., Sikora, E. J., and Kloepper, J. W. 2001. Application of rhizobacteria for induced resistance. Eur. J. Plant Pathol. 107:39-50.

ABSTRACT

Lin, H. C.¹, Huang, W. D.¹, Yang, S. S.¹, and Tzeng, D. S.^{1,2} 2008. Growth promotion and reduced *Sclerotium rolfsii* seedling blight of rice by *Bacillus subtilis* WG6-14. Plant Pathol. Bull. 17: 53-64 (¹ Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung Taiwan; ^{1,2} Corresponding author, E-mail: dstzeng@nchu.edu.tw; Fax: 886-4-22851038)

The application of *Bacillus subtilis* WG6-14 on seedling production of rice (*Oryza sativa* L.) was explored. In greenhouse test, the application of a fermentor produced WG6-14 broth culture (contains approximately 1.0×10^{10} endospores/ ml) at 50-100X in dilution compared to that by Prochloraz (EC, applied at 2000X dilution) as control treatment for seed soaking was shown resulted an earlier and increased seed germination and the increased hypocotyl growth. The germination and growth stimulation was further demonstrated in a followed field trial in a commercial rice seedling propagation station in 2005 at Nan-tun, Taichung. The soaking treatment of rice (cv. TK8 and cv. TK9) with WG6-14 at 50X in dilution led to a 50% (cv. TK8) and 22% (cv. TK9) increase of seed germination and a 10% and 13% increase of seedling height comparing to that of chemical (for cv. TK8) or water (cv. TK9) treated control 2 weeks after seeding. The potential of WG6-14 in the control of seedling blight caused by *Sclerotium rolfsii*, was also investigated. By dual culture assay, WG6-14 was shown strongly antagonistic against *S. rolfsii* NTSR-01. The growth inhibition was due mainly to the membrane damage by WG6-14 produced antibiotics which was manifested by the greatly increased electrolyte leakage from the tested mycelia. A daily drenching of seedling trays with severe infection of *Sclerotium rolfsii* by 50X diluted WG6-14 for 1 week greatly reduced increases of infected area and the total numbers of sclerotia produced. In a closed Petri dish system, the application of WG6-14 together with urea was shown to be lethal to sclerotial population of *S. rolfsii* NTSR-01 present in a non-sterile soil sample. The application of urea (0.5%) by itself led to only 56.8% reduction of the viable sclerotia, while with the combined use of WG6-14, the viable count was reduced to nearly zero. Although further effort are needed to work out the possibly involved mechanism regarding to the sclerotia killing, the results herein provided indicated clearly the great value of WG6-14 as a microbial agent for rice seedling production and as well the seeding blight control.

Key words: *Bacillus subtilis* WG6-14, biofungicide, biocontrol, electrolyte leakage, *Sclerotium rolfsii* seedling blight of rice