

枯草桿菌處理對'青皮'苦瓜種子發芽之影響

楊惠如¹⁾ 宋好²⁾

關鍵字：苦瓜、種子、枯草桿菌、發霉率

摘要：苦瓜種子種皮厚且硬，在發芽過程中常有發霉的現象，會造成種子發芽率不佳及不整齊等問題，因此利用三品牌枯草桿菌以浸泡、披覆及滲調處理種子以改善種子發霉的問題。'青皮'苦瓜種子經 60°C 水浴 10 分鐘再浸 25°C 自來水 24 小時，發芽率為 86.7%，發霉率為 10%。'青皮'苦瓜種子以披覆或滲調活地菌發芽率分別為 76.4% 及 83.3%，發霉率均為 0%，以披覆及滲調處理種皮表面的孢子數及抗生素含量較高，且抗生素含量隨時間增加而增加。

前 言

苦瓜為一年生或多年生蔓性草本植物，種子有厚且硬的種皮，於農業栽培上其會妨礙發芽，是個不良的特性(Klejdus and Kuban, 2000)。可將種子浸泡在熱水中軟化種皮，允許水分進入種子中，使種子發芽快速、整齊及提高發芽率(Baskin and Baskin, 1998；Teketay, 1996)。*'Special Six'* 苦瓜種子在 50°C 溫水中 30 分鐘，有促進發芽的效果(Wang *et al.*, 2003)。枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)普遍存在土壤及植物體表(王, 2002；周等, 1997)，逆境下能產生內生孢子維持其存活，且在產孢過程中可產生具抑制多種病原菌的抗生物質，較常見的為 iturin A，iturin A 會誘發原生質膜電子的滲漏，及磷脂質的降解(Latoud *et al.*, 1987；1990)。隨著添加 iturin A 的量增加，細胞膜的通透性也增加，鉀離子釋放隨之增加(Latoud *et al.*, 1990)。枯萎病菌 *Fusarium udum* 在含枯草桿菌 AF1 蛋白萃取物的培養基中 24 小時後抑制將近 80% 的病原菌生長，而且抑制現象與濃度有關，濃度愈高抑制情形也愈高(Harish *et al.*, 1998)。

1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。

2) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

本試驗主要是分離出造成苦瓜種子發霉之病原菌，並利用枯草桿菌處理苦瓜種子，探討不同種類菌液及處理方式對苦瓜種子發芽的影響，並分析造成影響的因素，以證明枯草桿菌抑菌之效果。

材料與方法

一、試驗材料

本試驗所使用的材料為'青皮'(購自富農種子公司)苦瓜種子。枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)使用永馨枯草桿菌(1.54×10^7 CFU/ml)(秀明科技有限公司)、活力寶(1.08×10^9 CFU/ml)(玉田地公司)、活地菌(8.67×10^8 CFU/ml)(中興大學創新育成中心生研公司提供)。

二、試驗方法

種子前處理：將以網袋包裹種子置入 60°C 水浴槽 10 分鐘或直接浸於 25°C 自來水中 24 小時或先以 60°C 水浴 10 分鐘再直接浸於 25°C 自來水中 24 小時，回乾一天。

(一)、種子處理枯草桿菌：將前處理種子進行下列處理

(a)披覆處理：種子浸於含1% 甲基纖維素之菌液中10分鐘後蔭乾。

(b)浸泡處理：種子直接浸於枯草桿菌菌液中10分鐘後蔭乾。

(c)滲調處理：以種子：二號蛭石：菌液=6：8：12的比例均勻混合，置於200 ml的塑膠罐中，將塑膠罐放入旋轉培養器中，於20°C 恆溫箱，以2 rpm轉速旋轉，24小時後，以篩網將種子及介質分離，種子於室溫中回乾至原來種子含水量。

(二)、發芽試驗

各處理之'青皮'苦瓜種子取10粒，播於玻璃培養皿中，加1.5 ml 去離子水，於30°C 恆溫箱內進行發芽試驗。試驗期間保持濾紙濕潤，每日計算發芽粒數(胚根突破種皮即視為發芽)，至完全不發芽為止，每處理三重複。調查項目包括最終發芽百分率(final germination percentage, FGP%)= $(\sum \text{第}i\text{天發芽之種子數} / \text{試驗種子數}) \times 100$ ， $i:1,2,\dots$ 至發芽調查結束日)、平均發芽天數(mean days to germination, MDG(days))= $\sum(i \times \text{第}i\text{天發芽之種子數}) / \sum \text{第}i\text{天發芽之種子數}$ 及發霉率(final mildewy percentage, FMP%)= $(\sum \text{第}i\text{天發霉之種子數} / \text{試驗種子數}) \times 100$ ， $i:1,2,\dots$ 至發霉調查結束日)。

(三)、枯草桿菌與病原菌之拮抗活性測試

利用由'青皮'苦瓜種皮上所篩選出之*Rhizoctonia solani* AG4病原菌與永馨枯草桿菌、活力寶及活地菌三種枯草桿菌菌液進行對峙培養。利用8 mm打孔器打取病原菌菌絲塊，以5 mm圓形濾紙沾取枯草桿菌菌液，將枯草桿菌及病原菌分別接種在PDA平板培養基最大直徑的兩端，離邊緣1cm處，菌絲面朝下，置於30°C 黑暗生長箱中2天後取出觀察，並紀錄PDA平板上透明區域抑制區的直徑。

(四)、抗生素之定量分析

利用HPLC之分析方法，將20 μ l 樣品注入HITACHI L-2130 Intelligent Pump中，以乙睛Acetonitrile：3.8M TFA(tri-fluoroacetic acid)=80：20(v/v)混合均勻，經孔隙0.45 μ m(HV, Millipore)過濾後作為流動相，流速1.0 ml/min，每樣品流動時間為30分鐘。經RP-18 column(Mightysil, KANTO CHEMICAC co., INC.)其後以HITACHI UV Detector L-2400紫外光接受器測定280nm之吸光值。以500 ppm iturin A(Sigma)為標準液，計算樣品中iturin A含量。

(五)、枯草桿菌於培養基上抗生素之含量分析

於測定拮抗活性之對峙培養時，分別取濾紙邊緣一天2 cm、一天4 cm及兩天種子周圍之培養基各10 g，加入5 ml甲醇沉澱萃取，再以11269 xg離心25分鐘，取懸浮液用孔隙0.45 μ m直徑13 mm PVDF(polyvinylidene fluoride)之millipore過濾，澄清液置於2 ml小玻璃瓶中，取20 μ l進行HPLC分析。

(六)、種子上抗生素之含量分析

浸泡、披覆及滲調活地菌處理後之種子與病原菌進行對峙培養，於30 $^{\circ}$ C黑暗生長箱中，分別取種子邊緣一天2 cm、一天4 cm及兩天種子周圍之培養基各10 g，加入5 ml甲醇沉澱萃取，再以11269 xg離心25分鐘，取懸浮液用孔隙0.45 μ m直徑13 mm PVDF(polyvinylidene fluoride)之millipore過濾，澄清液置於2 ml小玻璃瓶中，取20 μ l進行HPLC分析。

三、統計分析

數據統計採用 SAS 套裝軟體(SAS Institute, Cary, NC)中以 PROC ANOVA(analysis of variance procedure)進行變方分析($\alpha=0.05$)，以 Fisher's LSD 進行各處理間平均值的比較，發芽率及出土率的資料經過 arcsin 轉換。

結 果

一、促進種子發芽處理

'青皮'苦瓜種子未進行處理之種子發芽率為 65%，發霉率高達 100%。'青皮'苦瓜種子經不同溫水處理條件及浸水時間之發芽結果如表 1，種子以 60 $^{\circ}$ C 水浴 10 分鐘再經浸水 24 小時處理之發芽率 86.7% 為最高，且平均發芽天數 2.5 天即可發芽，發霉率降低至 10% 左右，60 $^{\circ}$ C 10 分鐘浸水 12 小時及 55 $^{\circ}$ C 10 分鐘浸水 24 小時處理發芽率分別為 83.3% 及 80.0% 與其並無顯著差異，唯 60 $^{\circ}$ C 10 分鐘浸水 12 小時處理平均發芽天數延長至 3.5 天，而 55 $^{\circ}$ C 10 分鐘浸水 24 小時處理發霉率 30%。

溫水及浸水處理對苦瓜種子發芽的情形如表 2，'青皮'種子經浸水 24 小時或 60 $^{\circ}$ C 水浴 10 分鐘處理發芽率可以由 65% 增加至 83.3%，浸水 24 小時使發霉率降低至 80%，而 60 $^{\circ}$ C 水浴 10 分鐘處理可以使發霉率比未處理減少 75%，若 60 $^{\circ}$ C 水浴 10 分鐘加上浸水 24 小時處理可以使發芽率顯著提高至 86.7%，而發霉率顯著降低至 10%。

表 1. '青皮' 苦瓜種子處理不同溫水條件及浸水時間之發芽情形

Table 1. Effect of immersion in water on seed germination of 'Ching Pi' bitter gourd.

	溫度	時間	浸水時間	發芽率 (%)	平均發芽天數 (day)	發霉率 (%)
青皮	60°C	10min	12hr	83.3 a ^z	3.5 a	10.00d
	60°C	15min		73.3 b	3.4 a	16.7 cd
	55°C	10min		66.7 b	3.1 ab	55.0 a
	55°C	15min		73.3 b	3.3 ab	25.0 b
	60°C	10min	24hr	86.7 a	2.5 c	10.0 d
	60°C	15min		76.7 b	2.9 bc	13.3 d
	55°C	10min		80.0 ab	2.8 bc	30.0 b
	55°C	15min		76.7 b	3.1 ab	23.3 bc

^z Mean followed by the same letter within each column are not significantly different by LSD($p \leq 0.05$).

表 2. '青皮' 苦瓜種子浸水及溫水處理之發芽情形

Table 2. The germination of 'Ching Pi' bitter gourd seeds immersion in 60°C and 25°C water.

	發芽率 (%)	平均發芽天數 (day)	發霉率 (%)
未處理	65.0b ^z	2.9ab	100.0a
浸水 24hr	83.3a	2.4b	80.0b
溫水 60°C 10min	83.3a	3.0a	25.0c
溫水 60°C 10min 浸水 24hr	86.7a	2.5b	10.0c

^z Mean followed by the same letter within each column are not significantly different by LSD($p \leq 0.05$).

二、枯草桿菌處理之種子

'青皮' 苦瓜種子經 60°C 水浴 10 分鐘浸水 24 小時處理後以披覆、浸泡及滲調枯草桿菌菌液處理之發芽影響如表 3，使用的菌液對於發芽率有顯著的影響，處理方式對於平均發芽天數有極顯著的影響，使用的菌液對於發霉率有顯著影響。在表 4 中，使用活地菌的發芽率達 73%~83.3%，較水(對照組)及其他兩種菌液高，浸水(對照組)及三種菌液可縮短平

均發芽天數 3.5 天~2.5 天。經前處理的發霉率為 10%，使用活力寶降低發霉率至 0~2.5%，活地菌於三種使用方法上皆無發霉的情形發生，披覆及浸泡水(對照組)之發霉率為 0~6.7%。

三、種子表面菌量計數

'青皮'苦瓜種子經 60°C 水浴 10 分鐘浸水 24 小時後以披覆、浸泡及滲調枯草桿菌菌液處理種子種皮上枯草桿菌孢子附着情形如圖 1，以披覆永馨及活地菌的種皮含孢子量最高，披覆活力寶及滲調活力寶及活地菌處理者次之，而浸永馨及活力寶處理者為最低。於浸泡及滲調處理皆以使用活地菌的種子種皮上孢子量為最高，活力寶次之，永馨最低。

表 3. '青皮'苦瓜種子經 60°C 水浴 10 分鐘及浸水 24 小時後以披覆、浸泡及滲調處理枯草桿菌液之種子發芽情形

Table 3. Effect of coating, soaking, or priming *Bacillus subtilis* solutions on germination of 'Ching Pi' bitter gourd seeds treated 60°C water for 10 minutes and 25°C water for 24 hours.

	發芽率 (%)	平均發芽天數 (天)	發霉率 (%)
水 (對照組)	74.4	2.8	2.2
永馨	70.0	3.4	5.3
活力寶	71.7	2.9	0.8
活地菌	77.6	2.9	0.0
LSD ^z	7.3	0.4	3.8
披覆	76.4	3.1	0.8
浸泡	70.5	2.8	1.3
滲調	73.3	3.1	4.2
LSD	6.8	0.3	3.4
菌液	* ^y	ns	*
方法	ns	**	ns
菌液×方法	ns	ns	ns

^z Mean followed by the same letter within each column are not significantly different by LSD($p \leq 0.05$).

^y ns, *, ** : nonsignificant or significant at $p=0.05$ or 0.01 , respectively.

表 4. '青皮' 苦瓜種子經 60°C 水浴 10 分鐘浸水 24 小時後以披覆、浸泡及滲調處理枯草桿菌液之種子發芽情形

Table 4. The germination of 'Ching Pi' bitter gourd seeds treated 60°C water for 10 minutes and 25°C water for 24 hours, then coating, soaking or priming *Bacillus subtilis* solutions.

菌液商品名	處理	發芽率 (%)	平均發芽天數 (天)	發霉率 (%)
水 (對照組)	未處理	86.7	2.5	10.0
	披覆	76.7	2.6	0.0
	浸泡	73.3	2.6	0.0
	滲調	73.3	3.2	6.7
永馨	披覆	80.0	3.6	3.3
	浸泡	63.3	3.5	2.5
	滲調	66.7	3.2	10.0
活力寶	披覆	72.5	3.1	0.0
	浸泡	72.5	2.5	2.5
	滲調	70.0	3.1	0.0
活地菌	披覆	76.4	3.0	0.0
	浸泡	73.0	2.7	0.0
	滲調	83.3	3.0	0.0
LSD ^z		11.8	0.6	6.3

^z Mean followed by the same letter within each column are not significantly different by LSD($p \leq 0.05$).

四、枯草桿菌與病原菌之對峙培養

將永馨、活力寶及活地菌枯草桿菌菌液與由'青皮'種皮挑出的病原菌 *R. solani* 對峙培養之情形，培養過程中抑制範圍如圖 2 所示，經過五天培養後，永馨枯草桿菌不能抑制病原菌的生長，因此在培養第八天時抑制範圍就降至 0cm，活力寶及活地菌可以明顯的抑制菌絲生長，至第 8 天抑制範圍仍分別有 2.3 及 2.7cm。

五、抗生素之檢測

檢測永馨、活力寶及活地菌枯草桿菌菌液內抗生素 Iturin A 含量如圖 3，菌液經 HPLC 分析，其中以 2.69 分鐘出現高峰，與 iturin A 500 ppm 比較三種菌液，以活地菌菌液內的抗生素 iturin A 含量顯著較活力寶及永馨枯草桿菌液高，有 1653 ppm，其含量約活力寶的八倍，約永馨的 14 倍。

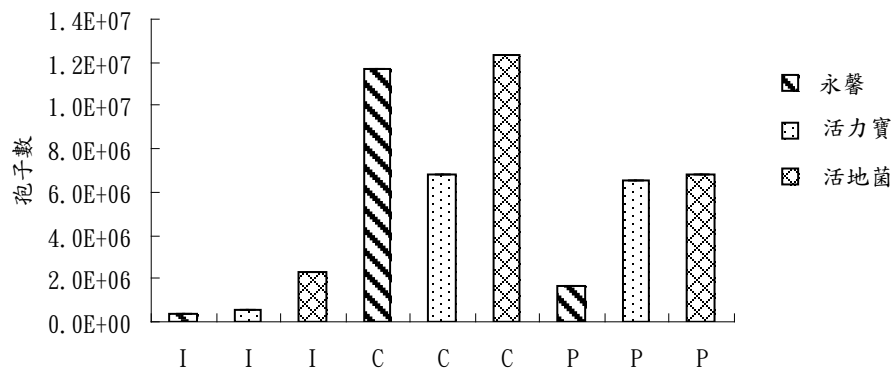


圖 1. '青皮' 苦瓜種子經枯草桿菌液處理後種皮上之孢子數。*I: 浸泡, C: 披覆, P: 滲調
Fig 1. The spore amounts on 'Ching Pi' seed coat after soaking, coating or priming with *Bacillus subtilis* solution.

*I: soaking, C: coating, P: priming

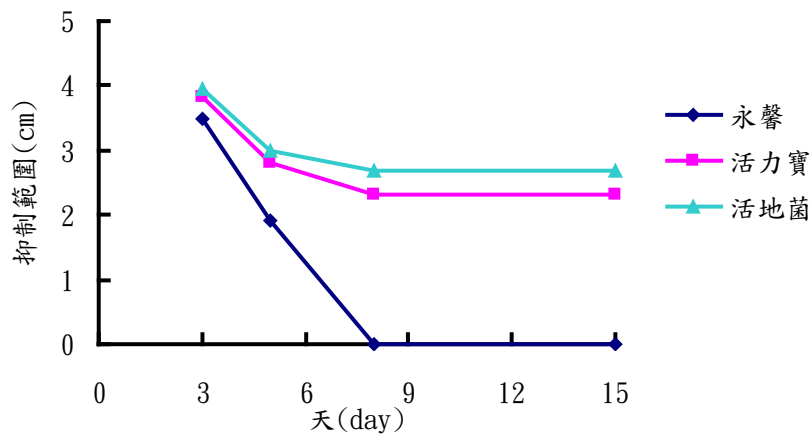


圖 2、枯草桿菌菌液與 *R. solani* 對峙培養之抑制範圍

Fig 2. The inhibit ranges of *Bacillus subtilis* dual culture with *R. solani*.

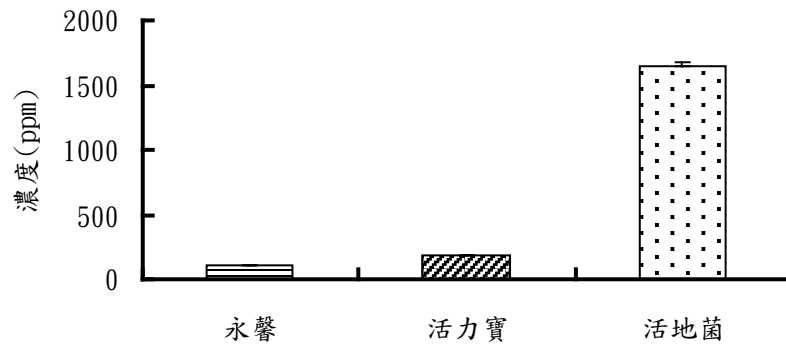


圖 3、枯草桿菌菌液中抗生素 iturin A 含量

Fig 3. The content of antibiotic iturin A in *Bacillus subtilis* solutions.

將永馨、活力寶及活地菌枯草桿菌菌液與病原菌 *R. solani* 對峙培養，分別取沾取永馨、活力寶及活地菌濾紙旁邊透明的培養基一天 2cm、一天 4cm 及 2 天 2cm 等範圍的 agar，檢測 agar 內抗生素 iturin A 含量如圖 4，永馨培養兩天與一天 2cm 無顯著差異，培養二天之抗生素含量活地菌顯著比活力寶含量高，活力寶及活地菌培養兩天皆比培養一天的抗生素含量高，可高出 50 ppm 以上，於培養一天的處理中以靠近菌液濾紙之含量愈高，三種菌液中一天 2cm 皆較 1 天 4cm 含量高，活地菌顯著較永馨及活力寶的含量高，但三種菌液在一天 4cm 並無顯著差異。

將經披覆、浸泡及滲調活地菌處理之'青皮'苦瓜種子與病原菌 *R. solani* 對峙培養，分別取種子旁邊透明的培養基一天 2cm、一天 4cm 及二天 2cm 等的 agar，檢測 agar 內抗生素 iturin A 含量如圖 5，於培養一天的處理中以愈靠近種子之含量愈高，三種處理中一天 2cm 皆較 1 天 4cm 含量高，披覆及滲調處理的含量較高，而浸泡的含量較低，尤其浸活地菌一天 4cm 的含量僅 21.2 ppm。三種處理中以披覆活地菌 2 天的抗生素含量較高，達 240 ppm，滲調次之，而浸泡最低。披覆及浸活地菌處理之種子培養 2 天皆較培養一天高，可高出 25 ppm 以上，而滲調處理培養一天與兩天間無顯著差異。

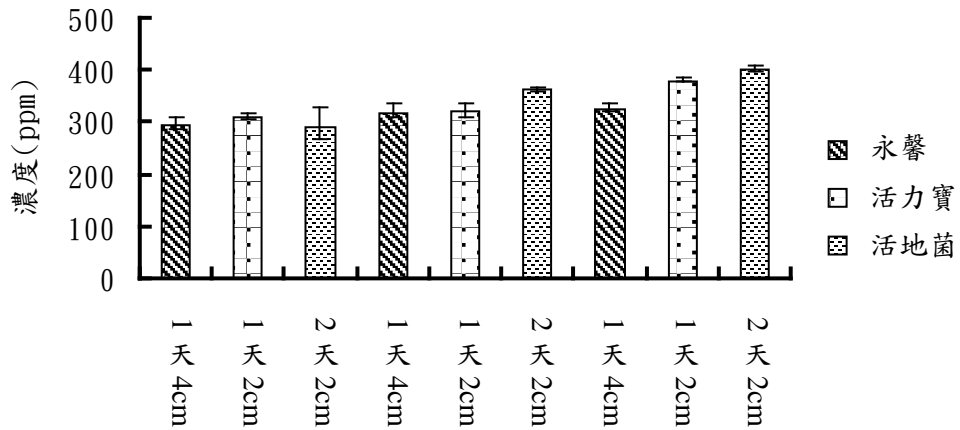


圖 4、枯草桿菌菌液與病原菌對峙培養之培養基內抗生素含量

Fig 4. The content of antibiotic iturin A in agar that *R. solani* dual culture with *Bacillus subtilis*. Vertical bars represent SE(n=3).

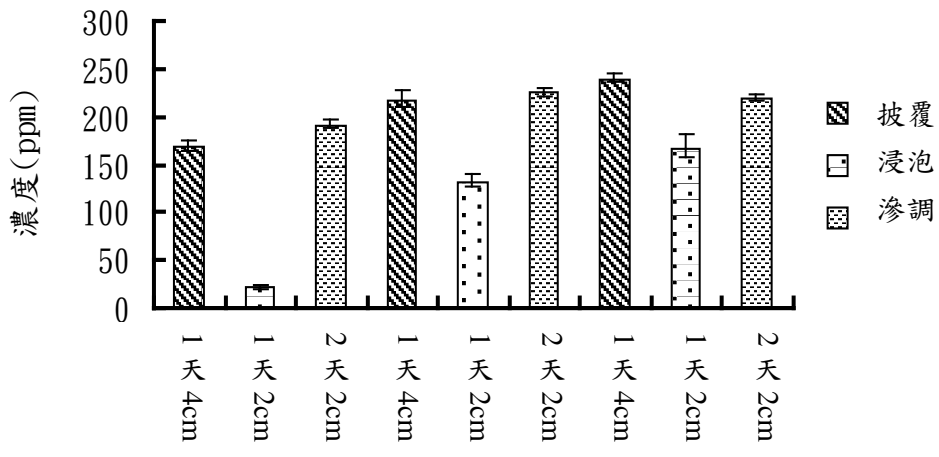


圖 5、經披覆、浸泡及滲調活地菌之'青皮'苦瓜種子與病原菌對峙培養之培養基內抗生素含量。

Fig 5. The content of antibiotic iturin A in agar from 'Ching Pi' bitter gourd seeds that treated *Bacillus subtilis* with coating, soaking or priming when dual culture with *R. solani*. Vertical bars represent SE(n=3).

討 論

苦瓜種子之種皮厚且硬，可以保護胚免受傷害，但會造成發芽的機械限制，為軟化種皮本實驗以 60°C 水浴 10 分鐘再於室溫下浸水 24 小時處理，結果顯示可促進青皮'苦瓜種子發芽，且明顯的減輕發霉情形。結構不緊密或經掐開處理的種皮可使胚根容易突破種皮，促進氣體及水分進入西瓜種子內(Duval and NeSmith, 1999)，顯示溫水處理不僅可以軟化種皮，允許水分進入西瓜種子中(Baskin and Baskin, 1998)，其也可以促進豆科種子快速且整齊的發芽(Teketay, 1996)。於浸種過程中可淋洗出種子內的發芽抑制物質，促進種子發芽(Puppala and Fowler, 2002)。經流水 12 小時處理的'粉青'及'青皮'苦瓜種子，可以顯著提高苦瓜種子發芽率至 93.0% 及 86.7%，掐開苦瓜種子再經流水浸種 12 小時處理可以顯著提高種子發芽率(Aye, 2004)，'青皮'苦瓜種子僅經浸種或溫水處理發芽率差異不顯著，但'青皮'苦瓜種子經溫水處理發霉率顯著比浸種處理減少 55%，顯示溫水及浸種處理都可以有效的去除抑制種子發芽的因子。溫水處理能有效控制種皮上微生物的生長，許多學者也指出溫湯浸種處理有殺菌的效果，甘藍種子以 55°C 之溫湯消毒種子 20 分鐘，可以殺死一些附著種子上的病菌及真菌孢子，因而有效防治甘藍黑腐病(陳, 1994)。

本實驗於'青皮'苦瓜種皮上分離 *Rhizoctonia solani* AG4，其引起苦瓜種子發霉，而影響種子發芽及種苗生長。*Rhizoctonia solani* AG4 是常見引起幼苗病害的土傳性病原真菌，寄主範圍廣泛，以侵害寄主根部及莖基部為主，因此會造成幼苗猝倒、根腐與莖腐，以及正在生長的植株或成株之莖部潰瘍(stem canker)等病徵(Baker, 1970)，而減少種苗存活及產量(Harman *et al.*, 1999)。枯草桿菌可以控制植物於苗期許多植物病害，例如 *Rhizoctonia solani* 所引起之苗立枯病、*Fusarium udum* 所引起之萎凋病、*Pythium ultimum* 所引起之猝倒病等(Asaka and Shoda, 1996; Fiddaman and Rossal, 1993; Harish *et al.*, 1998; Kondoh *et al.*, 2001)。本試驗在發芽率方面，以活地菌抑制發霉的效果最佳，'青皮'苦瓜種子的發霉率可以降低至 0%，活力寶的效果次之，永馨枯草桿菌液的效果最差。以對峙培養瞭解菌液對病原菌的抑制效果，結果可以發現活地菌及活力寶可以有效的抑制 *R. solani* 的菌絲生長，且 22 天後其抑制效果仍存在。*Bacillus subtilis* RB14-C 及 RA1 兩種菌株的枯草桿菌對於 *R. solani* 病害抑制效果不同(Asaka and Shoda, 1996)。本實驗以浸泡的方法處理種子可以有效縮短種子發芽天數，且處理方式簡便，因此較推薦使用。

許多文獻已指出枯草桿菌可以產生多種抗生物質，能抑制植物病害(Asaka and Shoda, 1996; Fiddaman and Rossal, 1993; Harish *et al.*, 1998; Kondoh *et al.*, 2001; Pusey and Wilson, 1984)。本實驗經 HPLC 分析證明所使用的菌液中確實為產生 iturinA，永馨含 113.3 ppm、活力寶含 187.1 ppm 而活地菌含 1653.8 ppm，將枯草桿菌液在培養基內培養一天及兩天，以活地菌的抗生素含量較高，活力寶次之，永馨最低，且含量隨天數增加而增加，愈靠近接種處含量也較高，因此抗生物質 iturin A 是由菌液內的所產生，並漸漸向外擴散。不同枯草桿菌菌液所含之孢子量及產生抗生物質或抑制其他病原菌的效果不同，如活地菌

因其菌液內所含的抗生素較活力寶及永馨枯草桿菌液高，因此其在對峙培養的抑制範圍較大；活力寶的含量次之，但菌液內的孢子數量較高，其抑制效果較活地菌略差；永馨枯草桿菌液的抗生素含量最低，且菌液內孢子數量也最低，與活力寶相差約 100 倍左右，因此其幾乎無任何抑制效果。枯草桿菌抑制 *Fusarium oxysporum* 的能力與孢子量的多寡並無呈現正相關，與各菌株間所產生的抗生物質有關(Knox *et al.*, 2000)，枯草桿菌 RB14-C 及 RΔ1 兩種菌株的枯草桿菌對於 *R. solani* 病害抑制效果不同，因 RB14-C 可產生較多的 iturin A 及 surfactin，因此其抑制 *R. solani* 病害的能力較 RΔ1 佳(Asaka and Shoda, 1996)。

參 考 文 獻

- 陳哲民。1994。甘藍黑腐病、根瘤菌的防治。花蓮區農業專訊 7: 22-23。
- Aye, M. M. 2004. Improvement of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) seed germination. NCHU, Department of Horticulture, master thesis.
- Asaka, O. and M. Shoda. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. Appl. Environ. Microbiol. 62: 4081-4085.
- Baker, K. F. 1970. Types of *Rhizoctonia* diseases and their occurrence. In *Rhizoctonia solani* biology and pathology. University of California Press, Berkeley, Calif. p.125-148.
- Baskin, C. C. and J. M. Baskin. 1998. Germination ecology of seeds with physical dormancy. Seeds. Academic Press, USA. p.101-124.
- Duval, J. R. and D. S. NeSmith. 1999. Emergence of 'Genesis' triploid watermelon following mechanical scarification. J. Amer. Soc. Hor. Sci. 124: 430-432.
- Fiddaman, P. J. and S. Rossall. 1994. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 76: 395-405.
- Harish, S., K. Manjula, and A. R. Podile. 1998. *Fusarium udum* is resistant to the mycolytic activity of a biocontrol strain of *Bacillus subtilis* AF1. FEMS microbial. Eco. 25: 385-390.
- Harman, G. J., J. B. Sinclair, and J. C. Rupe. 1999. Compendium of soybean disease APS Press, St Paul, MN. p.100.
- Klejdus, B. and V. Kuban. 2000. High performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in seed exudates of *Festuca arundinacea* and *F. pretense*. Phytochemical Analysis. 11: 375-379.
- Knox, O. G. G., K. Killham, and C. Leifert. 2000. Effects of increased nitrate availability on the control of plant pathogenic fungi by the soil bacterium *Bacillus subtilis*. Appl. Soil Ecol. 15: 227-231.
- Kondoh, M., M. Hirai, and M. Shoda. 2001. Integrated biological and chemical control of

- damping-off caused by *Rhizoctonia solani* using *Bacillus subtilis* RB14-C and flutolanil. J. Bio. Bioen. 91: 173-177.
- Latoud, C., F. Peypoux, and G. Michel. 1990. Interaction of iturin A, a lipopeptide antibiotic, with *Saccharomyces cerevisiae* cells: influence of the sterol membrane composition. Can. J. Microbiol. 36: 384-389.
- Latoud, C., F. Peypoux, and G. Michel. 1987. Action of iturin A, an antifungal antibiotic from *Bacillus subtilis*, on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: modifications of membrane permeability and lipid composition. J. Antibiot. 40: 1588-1595.
- Puppala, N. and J. L. Fowler. 2002. *Lesquerella* seed pretreatment to improve germination. Industrial Crops and Products. 17: 61-69.
- Pusey, L. P. and C. L. Wilson. 1984. Post harvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. Plant Dis. 68: 753-756.
- Sailaja, P. R., A. R. Podile, and P. Reddanna. 1997. Biocontrol strain of *Bacillus subtilis* AF1 rapidly induces lipoxygenase in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared to crown rot pathogen *Aspergillus niger*. Eur. J. Plant Pathol. 104: 125-132.
- Teketay, D. 1996. Germination ecology of twelve indigenous and eight exotic multipurpose leguminous species from Ethiopia. Forest Ecol. Manage. 80: 209-223.
- Wang, H. Y., C. L. Chen, and J. M. Sung. 2003. Both warm water soaking and matricconditioning treatments enhance anti-oxidation of bitter melon seeds germinated at sub-optimal temperature. Seed Sci. Technol. 31: 47-56.

Influence of *Bacillus Subtilis* on the Seed Germination of 'Ching Pi' Bitter Gourd (*Momordica charantia* L.)

Hue-Ru Yang¹⁾ Yu Sung²⁾

Key words: bitter gourd, seed, *Bacillus subtilis*, mildew

Summary

This research studied the effect of application methods and three *Bacillus subtilis* solution brands on seed germination of 'Ching Pi' bitter gourd. The germination of 'Ching Pi' bitter gourd seeds soaked with 60°C water for 10 minutes, then 25°C water for 24 hours were 86.7%. Mildew appeared on 10% of the 'Ching Pi' control seeds. Germination of 'Ching Pi' bitter gourd seeds primed with 'Huo Di Jun' solutions was 83.3%, and no seeds mildewed. In dual culture, 'Huo Di Jun' solutions inhibited *Rhizoctonia solani* mycelium growth. The antibiotic content of 'Huo Di Jun' was greater than that of 'Huo Li Bao' and 'Yong Xin'. Bacillus spore number and antibiotic content in seed coated of seeds primed with *B. subtilis* solution were greater than that of soaked seed, and antibiotic content increased with time.

1) Graduate student, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

