

茶園木黴菌種類之調查

林秀穗¹

摘 要

木黴菌 (*Trichoderma* spp.) 係為一種土壤真菌，其為目前公認之最有潛力之植物病原菌拮抗微生物之一，亦為現今已知之一項重要生物防治資材。本研究利用土壤稀釋平板法自 30 處茶園表土檢體中，分離出四大類菌落形態不同之木黴菌，初步鑑定其中 23 株為 *T. harzianum*、12 株為 *T. atroviride*、4 株為 *T. virens* 及其它仍未鑑定出之木黴菌類 15 株，總共收集了木黴菌菌株 54 株。在今日茶菁農藥殘留問題備受重視之時，未來生物防治法或可提供茶樹病害防治更多的選擇，而本研究所收集之菌株將可供作日後進行茶樹病害生物防治研究時菌株之來源。

關鍵字：茶樹、木黴菌、台灣

前 言

木黴菌 (*Trichoderma* spp.) 係為一種土壤真菌，其數量多且易培養，常分佈植物根部附近，某些木黴菌為植物根圈之良好拓植者，其亦為公認之植物病原菌拮抗微生物之一，其無性世代 (anamorph) 屬於不完全菌 (*Deuteromycetes*)，目前發現之有性世代 (Teleomorph) 屬於子囊菌之 *Hypocrea*、*Podostroma* 或 *Sarawakus* 屬等子囊菌 (Kubicek et al., 1998)。

木黴菌在防治由 *Phytophthora* spp. 引起之蘋果根腐病 (Smith et al., 1990)、*Rhizoctonia solani* 引起之大豆莖腐病 (Datta et al., 2000)、*Sclerotium rolfsii* Sacc. 引起之番茄猝倒病 (Tsahouridou et al., 2002) 等病原菌方面皆有良好之效果，此外，其也可促進如康乃馨及甘藍等作物之生長，為目前一項重要之生物防治資材。

一般認為木黴菌具有可對抗植物病原菌及促進植物生長之功能，可能是藉由下列之生物防治機制 (Datta et al., 2000; Smith et al., 1990; Srivastava et al., 2002; Tsahouridou et al., 2002; Yedida et al., 1999) 來達成：1. 超寄生作用 (mycoparasitism)，2. 抗生作用 (antibiosis)，3. 營養及空間競爭，4. 使病原菌致病酵素失去活性，5. 溶出無機性營養，6. 誘導抗病及幫助植物對抗逆境等方式等。而學者們也認為木黴菌於對抗植物病原菌時可能不是單純地只依靠上述之其中一種拮抗機制而已，其可能是以數種機制併用之型式來達成抑制病原菌之效果。

目前國外已有一些植物病害防治之相關生物製劑出現，如由 *T. harzianum* 所製造之 Bio-Trek 22GTM、TrichodexTM、PlantShieldTM 及 RootShieldTM，以及由 *T. harzianum* 及 *T. viride* 所製造之 TrichopelTM 等多項產品問市，故木黴菌為目前植物保護之熱門題材之一。

1. 行政院農業委員會茶業改良場 助理研究員。台灣 桃園縣。

在今日茶菁農藥殘留問題備受重視之時，生物防治法或可提供茶樹病害防治時更多的選擇項目，而本研究進行茶園中木黴菌種類之調查，不僅可瞭解茶園之原生性木黴菌種類，並可收集木黴菌菌株以供日後進行茶樹病害之生物防治研究時之菌株來源。

材料方法

一、培養基製備：

依培養基配製標示加入適當量之蒸餾水及下列市售培養基粉末：馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基 (Potato dextrose agar, PDA, Merck, 39g/L)、Rose Bengal chloramphenicol 洋菜培養基 (Rose Bengal chloramphenicol agar, RBC agar, Merck, 32.2g/L)、玉米葡萄糖洋菜培養基 (Corn Meal Agar, CMA agar, BBL, 17g/L) 及 0.2% 水洋菜 (0.2% water agar, WA, Merck)，加熱攪拌使瓊脂完全溶解後，經 121°C 滅菌 15 分鐘，取出置於 50°C 烘箱中保溫，待溫度降低後於無菌操作台內，倒入 20 mL 於 9 cm 滅菌塑膠培養皿中配置成平板培養基。欲配製酸化馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基 (Acidified potato dextrose agar, APDA) 時，則加入以經過 0.22 μ m 過濾之 0.1N HCl 及 pH 試紙調整至 pH 4 後，經數步驟製成馬鈴薯葡萄糖平板培養基備用，若欲配置斜面培養基時則於加熱攪拌使瓊脂完全溶解後，以分注器分注 5 mL 至每一試管 (16x125 mm) 中，蓋上透氣矽膠塞後，經 121°C 滅菌 15 分鐘，取出後斜放靜置待凝固後備用。

二、採樣：

於名間、鹿谷及本場等共計 30 處茶園實施採樣工作，採樣時於茶園之茶行間以對角線交叉方式於左下角、左上角、中間點、右下角及右上角共五點進行取樣，每一點挖取 15cm 內表土約 300 克裝於封口袋內密封，攜回實驗室後將土樣風乾，混合後以孔徑 2mm 篩網過篩備用。

三、分菌：

以修飾過之土壤稀釋平板法 (Dhingra et al., 1995) 進行木黴菌之分離，取相當於烘乾土 10 克之風乾土樣，置於滅菌過之三角瓶內加入 0.2% 水洋菜 90 mL 後，以攪拌子攪拌 30 分鐘後，於土壤粒子未沉降前迅速吸取 10 mL 土壤稀釋液至含有 90 mL 滅菌過 0.2% 水洋菜之三角瓶內，作成 10 至 10⁵ 倍之系列土壤稀釋液後，吸取 1mL 各系列之稀釋液於無菌之塑膠培養皿中，加入 20 mL 45°C 之 RBC 培養基後，靜置待凝固後置於 24°C 12 小時循環光照下培養 3-7 天至菌落產孢後，於立體顯微鏡下挑選疑似木黴菌之菌落進行鏡檢，並挑單孢以 PDA 平板於 24°C 12 小時循環光照下培養得到純培養以備後續鑑定使用。

四、鑑定：

1. 菌落生長特性：

將木黴菌純培養菌株分別接種至 CMA 及 PDA 二種培養基上，於 20、25、30 及 35°C 黑暗條件下進行培養，每一處理條件各三重複，於 96 小時後觀察菌落生長特性。

2. 立體顯微鏡鏡檢：

於立體顯微鏡下分別以不同倍率對 PDA 及 CMA 上之木黴菌落進行鏡檢，觀察並照相及記錄其形態特性。

3. 光學顯微鏡鏡檢：

以挑針挑取木黴菌之產孢構造，置於含有一滴 lactophenol 之載玻片上，蓋上蓋玻片後製成玻片，於相位差光學顯微鏡下進行鏡檢，照相及觀察產孢構造之形態特性，以測微尺量取各 30 個下

述構造之大小並記錄之：分生孢子 (conidia)、分生孢子梗 (conidiophore)、分生孢子瓶梗 (phialide) 及厚膜孢子 (chlamydo-spore) 等，並依據檢索表 (Barnette et al., 1988) 及相關文獻 (Bissett, 1991a, 1991b, 199c, 1992; Chaverri, Smuels, Stewart, 2001; Chaverri et al., 2001) 進行菌種鑑定。

五、菌株保存：

切取馬鈴薯葡萄糖培養基上純培養菌株之菌落邊緣約 5×5×2 mm 大小菌絲塊，置於馬鈴薯葡萄糖斜面培養基中於 24°C 12 小時循環光照下培養至產孢後，以石蠟膜封口置於冷藏保存。

結果與討論

表一為本研究之採樣地點一覽表，採樣地點分佈於中北部 7 個縣之茶區內，採樣地點總共有 30 處茶園：其中以全國最大茶區南投縣之取樣點最多，其次為桃園縣，而東部茶區亦有進行取樣，取樣茶園所栽植之茶樹品種包括青心烏龍、台茶 12 號、台茶 13 號、四季春等主要茶樹品種，而耕作方式則包括有機耕作及一般之耕作方式。

表一、採樣地點一覽表

Table 1. List of the sampling locations of tea gardens in Taiwan

編號	地區	茶樹品種	備註
1	南投名間中山	四季春	有機
2	南投名間中山	青心烏龍	
3	南投名間竹圍	台茶 13 號	
4	南投名間大庄	四季春	有機
5	南投名間松柏	台茶 13 號	有機
6	南投名間	台茶 12 號	有機
7	南投名間	台茶 13 號	有機
8	南投名間	四季春	有機
9	南投竹山	青心烏龍	有機
10	南投鹿谷凍頂山	青心烏龍	
11	南投鹿谷永隆	青心烏龍	
12	南投鹿谷鳳凰	青心烏龍	
13	新竹新埔	青心烏龍	
14	桃園楊梅埔心	青心烏龍	本場苗圃
15	桃園楊梅埔心	青心烏龍	本場品種園
16	桃園蘆竹	青心大石	
17	桃園蘆竹	青心烏龍	
18	桃園蘆竹	台茶 13 號	
19	桃園蘆竹	台茶 12 號	
20	苗栗頭份	青心大石	有機
21	苗栗頭份	台茶 13 號	有機
22	苗栗頭份	台茶 17 號	有機
23	台中梨山	青心烏龍	
24	台北坪林	青心烏龍	有機
25	台北坪林	青心烏龍	有機

(續表一)

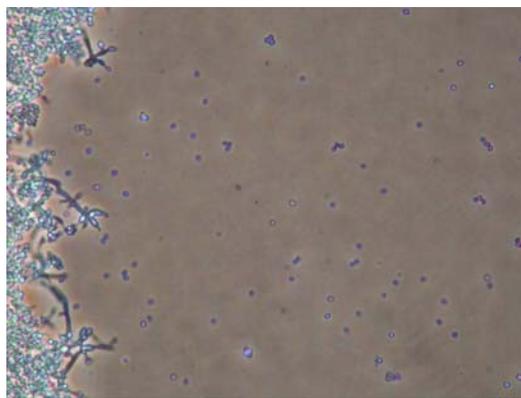
編號	地區	茶樹品種	備註
26	台北坪林	台茶 12 號	有機
27	台北坪林	台茶 12 號	有機
28	台北坪林	青心烏龍	有機
29	宜蘭三星	青心烏龍	
30	宜蘭礁溪	青心烏龍	

所採表土土樣攜回後，利用土壤稀釋平板法主要分離出四大類菌落形態不同之木黴菌，依據相關文獻 (Barnette et al., 1988; Bissett, 1991a, 1991b, 1991c, 1992; Chaverri, Smules, Stewart, 2001; Chaverri et al., 2001) 進行鑑定，所鑑定出之第一類木黴菌為 *T. harzianum*，共 23 株，其於 20°C 及 30°C 96 小時黑暗下菌落已長滿整個 PDA 平板，於 20°C 96 小時黑暗下之 CMA 上菌落大小為 6.5-7.0 cm，於 30°C 96 小時黑暗下菌落亦已長滿整個平板，於 PDA 上可產生擴散性之黃色色素，於 CMA 上則未產生色素，菌落無特殊氣味，圖一 A 為立體顯微鏡下其分生孢子柄之形態，其具有高度分枝，圖一 B 為光學顯微鏡下之分生孢子梗及分生孢子形態，分生孢子梗常呈安瓶狀 (ampulliform)，中央膨大，頂端縮，長約 6.0-7.0 μ m，最寬處約 2.5-3.5 μ m，底部寬約 1.5-3.0 μ m 與孢子梗支撐細胞寬度差不多，孢子梗與孢子梗支撐細胞常呈 90° 生長，往往 2-4 個孢子梗長成一環或單獨生長，長寬比約 2.0-2.5，而分生孢子乾性呈次球形 (subglobose) 至卵形 (ovoid)、綠色平滑，大小約 2.5-4.0 \times 2.0-3.0 μ m。

A.



B.



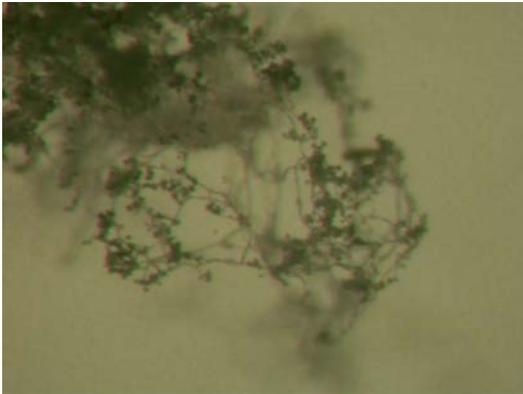
圖一、木黴菌 (*T. harzianum*) A. 立體顯微鏡下之分生孢子柄 (60X) B. 光學顯微鏡下之分生孢子柄及分生孢子 (200X)

Fig. 1. The morphologies of conidiophores and conidia of *T. harzianum* under stereomicroscopy (A) and light microscopy (B)

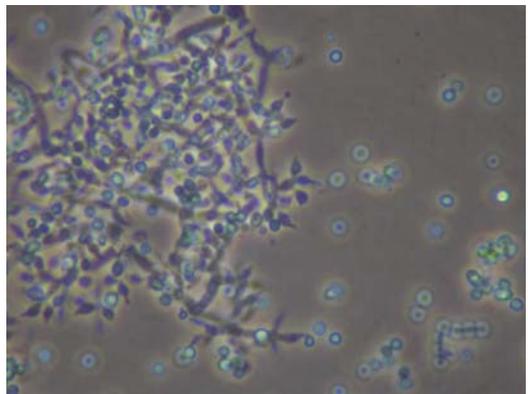
第二類木黴菌為 *T. atroviride*，共 12 株，其於 20°C 96 小時黑暗下 PDA 上菌落大小為 7.2-7.8 cm，30°C 96 小時黑暗下菌落已長滿整個 PDA 平板，於 20°C 96 小時黑暗下之 CMA 上菌落大小為 6.5-7.0 cm，於 30°C 96 小時黑暗下菌落則已長滿整個平板，於 PDA 及 CMA 上皆未產生色素，菌落發出近似椰子香之氣味，於 CMA 上可產生結構較鬆散之匏狀結構，圖二 A 為立體顯微鏡下匏狀結構上之分生孢子柄之形態，其分枝分歧，綠色部分已經產孢，圖二 B 為光學顯微鏡下之分生孢子梗形態，分生孢子梗常呈安瓶狀，中央膨大，頂端縮，長約 6.0-10.0 μ m，最寬處約 2.5-3.5 μ m，底部寬約 1.5-2.5 μ m，支撐細胞寬度約 2.0-3.5 μ m，孢子梗往往 2-4 個長成一環或單獨生長，長寬比約 2.0-3.5，分生孢

子乾性呈次球形至卵形、綠色平滑，大小約 $2.5-4.0 \times 2.0-3.0 \mu\text{m}$ 。

A.



B.

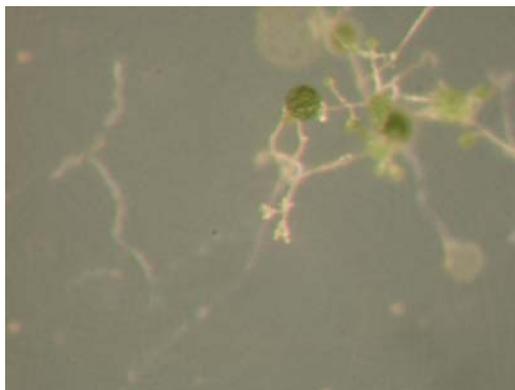


圖二、木黴菌 (*T. atroviride*) A. 立體顯微鏡下胞狀結構上之分生孢子柄 (60X) B. 光學顯微鏡下之分生孢子柄及分生孢子 (400X)

Fig. 2. The morphologies of conidiophores and conidia of *T. atroviride* under stereomicroscopy (A) and light microscopy (B)

第三類木黴菌為 *T. virens*，共 4 株，其於 20°C 96 小時黑暗下之 PDA 上菌落大小為 7.5-8.0 cm、CMA 上菌落大小為 7.5-7.8 cm， 30°C 96 小時黑暗下菌落已長滿整個 PDA 平板及 CMA 個平板，於 PDA 及 CMA 上未產生色素，菌落無特殊氣味，於 CMD 上也可產生胞狀結構，圖三 A 為立體顯微鏡下生孢子柄之形態，其上有許多由氣生菌絲所組成之分枝突出，末端團狀部分為分生孢子團，圖三 B 為光學顯微鏡下分生孢子柄之形態，其往往由 3-6 個緊鄰之分生孢子梗組成近似 *Gliocladium* 之形態，分生孢子梗常呈安瓶狀，中央膨大，頂端縮，長約 $8.5-10.0 \mu\text{m}$ ，最寬處約 $3.5-4.5 \mu\text{m}$ ，底部寬約 $2.0-3.0 \mu\text{m}$ ，長寬比約 2.1-2.5，末端為分生孢子團，成熟後液化成澄清綠色液滴，分生孢子呈橢圓形 (ellipsoid) 至倒卵形 (obovoid)、綠色平滑，大小約 $4.0-5.0 \times 3.5-4.5 \mu\text{m}$ 。

A.



B.



圖三、木黴菌 (*T. virens*) A. 立體顯微鏡下之分生孢子柄放大圖 (100X) B. 分生孢子柄頂端之分生孢子梗及分生孢子 (400X)

Fig. 3. The morphologies of conidiophores and conidia of *T. virens*. under stereomicroscopy (A) and light microscopy (B)

第四大類為其他仍未鑑定出之木黴菌類共 15 株，本計畫總共收集了台灣地區茶園之木黴菌菌株 54 株。

參考文獻

1. Barnett, H. L. and B. B. Hunter. 1988. Illustrated Genera of imperfect fungi. 4th ed. APS, USA.
2. Bissett, J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. Can. J. Bot. 69: 2357-2372.
3. Bissett, J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. Can. J. Bot. 69: 2373-2417.
4. Bissett, J. 1991c. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. Can. J. Bot. 69: 2418-2420.
5. Bissett, J. 1992. *Trichoderma atroviride*. Can. J. Bot. 70: 639-641.
6. Chaverri, P., Samuels, G. J., and Stewart, E. L. 2001. *Hypocrea virens* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma virens*. Mycologia 93: 1113-1124.
7. Chaverri, P., Samuels, G.J., Stewart, E. L., and Umana, L. 2001. *Hypocrea nigrovirens*, a new species with a gliocladium-like anamorph. Mycologia 93: 758-763.
8. Datta, P., Das, B. C., and Hazarika, D. K. 2000. Integrated management of soybean stem rot. J. Biol. Control. 14(1): 67-69.
9. Dhingra, O. D. and Sinclair, J. B. 1995. Isolation and enumeration of soil organisms. Basic Plant Pathology Methods, sec. ed. pp. 217-219.
10. Kubicek, C. P. and G. E. Harman. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. pp. 1-34.
11. Smith, V. L., W. F. Wilcox, and G. E. Harman. 1990. Potential for biological control of *Phytophthora* root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. Phytopathology 70: 880-885.
12. Srivastava, R. K., R. D. Prasad, R. Rangeshwaran, A. R. Wasnikar, S. P. Singh, and N. S. Rao. 2002. A rapid in vivo bioassay method for testing and selection of fungal antagonists of plant pathogens. J. Biol. Control. 16: 173-176.
13. Tsahouridou, P. C. and C. C. Thanassoulopoulos. 2002. Proliferation of *Trichoderma koningii* in the tomato rhizosphere and the suppression of damping-off by *Sclerotium rolfsii*. Soil Biol. Biochem. 34(6): 767-776.
14. Yedidia, I., N. Benhamou, and I. Chet. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1061-1070.

Survey of *Trichoderma* of Tea Gardens in Taiwan

Hsiu-Sui Lin¹

Summary

Trichoderma is a kind of soil fungi. Nowadays, they are considered as one of the fungal antagonists of plant pathogens and a very important material for biological controls of plant diseases. In this study, the soil dilution method was applied to isolate *Trichoderma* from the surface soil samples collected from 30 tea gardens in Taiwan. Four different colony types of *Trichoderma* were isolated. There were 23 strains of *Trichoderma harzianum*, 12 strains of *T. atroviride*, 4 strains of *T. virens* and 15 other unidentified *Trichoderma* isolates. Recently, the problems of pesticides and fungicides residues of tea are among the most important issues that tea consumers concerned. Biological controls might provide other choices of tea diseases control. This study could execute not only a survey of the species of *Trichoderma* of tea garden in Taiwan. Moreover, the *Trichoderma* originated from the tea gardens could be used to study for biological controls of tea diseases in future.

Key words: *Camellia sinensis*, *Trichoderma*, Taiwan

1. Assistant Agronomist, Tea Research and Extension Station, Taoyuan, Taiwan, ROC.

