

利用木黴菌防治穴盤甘藍苗立枯病之研究

葉俊巖、吳信郁、姚瑞禎

摘 要

本研究旨在探討利用木黴菌防治穴盤甘藍苗立枯病之效益。將液態培養之木黴菌(*Trichoderma harzianum* YM-1)厚膜孢子(chlamydospore)製成藻酸膠製劑(*Trichoderma alginate formulation*, T-AF)，及接種至添加 0.1%甲殼素、3%玉米桿粉與 1%米糠之固態基質醱酵後，經冷風乾燥成固態醱酵製劑(*Trichoderma fermentation formulation*, T-FF)。經儲存 3、6 及 10 個月之兩種製劑分別拌入 100 及 200 倍體積之含立枯絲核菌之育苗介質培育甘藍苗，播種後 21 天調查甘藍苗之苗立枯病感染率分別為 19.7、21.3、1.1 及 7.4%，與對照之 47.3%，處理間差異均達顯著水準。另以 polyethyleneglycol (PEG) 6000 $115 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{H}_2\text{O}^{-1}$ 滲調處理與不處理之甘藍種子，分別播種至添加與不添加 1%木黴菌藻酸膠製劑之含立枯絲核菌之育苗介質進行甘藍育苗，經滲調處理之種子播於兩種育苗介質處理 21 天之結果，甘藍苗之立枯病感染率分別為 71 與 84%，而甘藍種子不經滲調處理，播種至前述兩種介質之處理，結果甘藍苗之立枯病感染率分別為 8 與 37%，顯示甘藍種子以 PEG 滲調處理後，苗立枯病之感染反而較為嚴重，而未經滲調之甘藍種子仍可藉木黴菌製劑抑制苗立枯病。

關鍵字：木黴菌、立枯絲核菌、生物防治、製劑、種子滲調、穴盤育苗、甘藍

前 言

蔬菜育苗之傳統方式為播種在土壤育苗床，苗成長時再拔取移植，此種土拔育苗效率低且耗費人力，又常受土壤傳播性病害感染而造成大量損失(吳 1988)，且成為病害之傳染源。育苗業者為避免這些缺點，已改採利用介質進行穴盤育苗，並已採自動化操作，其穴盤蔬菜苗更已成為商品可供應遠距市場，且適於利用蔬菜移植機械進行大規模田間移植栽培。一般穴盤育苗介質大部份是以泥炭苔為基礎，各產品間之差異在於調配介質時添加之植物或動物殘體種類與百分比有所不同，而危害苗之立枯絲核菌與猝倒病菌屬土棲真菌，在沒有寄主植物狀態之時會利用植物殘體存活，因此植物殘體往往是這類病原菌在穴盤育苗介質中之感染源(Robertson, 1973; Kim et al., 1975; Couteaudier et al., 1985; Neate, 1987; Ousley, 1994; 葉, 1995a; 葉, 1995b; Cartright et al., 1995; 葉等, 1997a; 葉等, 1997b; 葉等, 2000; Farvin et al., 1988; Shiau et al., 1999)，以致利用育苗介質進行蔬菜育苗時蔬菜苗的立枯病危害甚為嚴重，苗損失率有時高達 60% (Shiau et al., 1999; 葉等, 2000; 葉等, 2002b; 葉等, 2003)。由於利用藥劑防治苗立枯病效果有限且影響環境生態，因此利用拮抗菌發展抑病育苗介質，進行蔬菜

育苗時苗期立枯病的生物防治，便成為 1990 年代以來植物病理專家研究的發展方向(Huang, 1991; Huang et al., 1992; Shiau et al., 1999)。

木黴菌雖然普遍存在於土壤中，但與其他土棲拮抗性微生物不同的是除了抑制病原菌 (Chang et al., 1986; Inbar et al., 1994)之特性外，其同時具有屬於根圈微生物的特性(Ahmad and Baker, 1987a; Ahmad and Baker, 1987b; Ristaino and Papavizas, 1985)，已有報告顯示栽培介質添加木黴菌，除了抑制病害之外也會促進作物根系發展改善生長 (Chang et al., 1986; Paulitz et al., 1986; Windham et al., 1986; Harman, 1989; Ousley et al., 1993)，以及誘發植物體產生抗病物質(Howell et al., 2000)。防治植物病害除了抑制病原菌之外，利用植物的生長特性以避開病原菌的感染，是抗病品種不易取得的狀況下可用的策略(吳, 1987; Agrios, 1988)，Fower 等(1999)之研究發現，發芽及胚軸發育較快之苜蓿品種對立枯絲核菌之抗病性較強，種子若經滲調處理，也可調整其發芽整齊度以及胚軸發育速度(郭和朱, 1981)，如滲調處理可改善種苗之發育，讓植物生長最易受病原菌感染之時期避免接觸到病原菌則可減少受害，因此在理論上種子滲調處理若配合拮抗菌處理，則對病害防治應有協力效果(synergism)，Harman 等(1989)之研究顯示，棉花、玉米、胡瓜與豌豆等作物經滲調處理再播種，也表現逃避病原菌感染之情形。本研究基於此兩種觀念，進行木黴菌製劑及種子滲調處理防治甘藍苗立枯病之效應研究。

材料與方法

木黴菌藻酸膠製劑之製備

木黴菌(*T. harzianum* YM-1)以液體培養 21 天形成成熟之厚膜孢子後，加入藻酸膠粉、玉米粉、麥粉、黃豆粉及矽藻粉，混合均勻後加入等體積之 4% CaCl_2 水溶液，在室溫進行造粒製劑 (Trichoderma Alginate formulation, T-AF)，然後以冷風乾燥 36-72 hr，而後於室溫保存，元月時之製劑分別於 3、6 及 10 月取出拌入感染性育苗介質，以檢測其對甘藍苗立枯病之抑制效果。

木黴菌固態醱酵製劑之製備

木黴菌以液體培養至厚膜孢子成熟後，接種至含 0.1 % 甲殼素粉 (100 mesh)、3 % 玉米桿粉 (20 mesh) 與 1 % 米糠(均為體積比)之泥炭土(BVB No.4)中，於自然室溫環境 (25-30 °C) 進行固態醱酵 25 天，再以 10-15 °C 之冷風乾燥 5-7 天即為固態製劑(T-FF)，而後於室溫保存，元月時之製劑分別於 3、6 及 10 月取出拌入感染性育苗介質，以檢測其對甘藍苗立枯病之抑制效果。

感染性育苗介質製備

由甘藍苗分離之立枯絲核菌(*Rhizoctinia solani* Cab 4-1)，以馬鈴薯平板(PDA)在 25°C 培養 7 天，再用直徑 0.5 cm 之無菌打孔器取菌落邊緣，接種至每瓶裝 150 克含 10% 馬鈴薯泥之無菌細沙(12-20 mesh)培養瓶中每瓶 5 片，之後在 25°C 培養，過程中每天劇烈搖晃(agitation) 10 min，10 天後取出，以 10-15 °C 之冷風乾燥 48 hr，而後拌入 50 倍體積之 BVB No.4 育苗介質中，作為感染性育苗介質，每次播種前 24 hr 製備使用。

木黴菌製劑防治甘藍苗立枯病效果試驗

前述製備之木黴菌藻酸膠製劑與固態醱酵製劑，分別於儲存至第 3、6 與 10 個月時取出，拌入 100 及 200 倍體積之感染性育苗介質，填充入 72 格育苗盤培育甘藍苗，靜置 48 hr 後以真空播種機播甘藍種子，每格一粒，播種後於暗室靜置 72 hr，於第四日傍晚再移至簡易育苗網室之床架上開始澆水，移置床架第 21 天調查甘藍苗立枯病之發生株率，以評估其抑制立枯病之效果。經微波處理至 60℃，並在保麗龍箱中維持溫度 4hr，且不接種立枯絲核菌與木黴菌之介質為空白試驗(Blank)，每處理每重複播 72 格之育苗穴盤各 5 盤，四重複。

種子滲調與介質添加木黴菌製劑併用防治甘藍苗立枯病試驗

甘藍種子浸於 22℃ 濃度為 115 g·kg⁻¹ 之 polyethyleneglycol (PEG) 6000 ($\Psi = -2$ bar) 之水溶液(郭與朱 1981)中滲調 24 hr，而後種子以流水沖洗 15min，濾除水分並以 20℃ 之涼風乾燥 2 hr，以未滲調處理之種子為對照，分別播種於添加木黴菌藻酸膠製劑(1% 體積比)之感染性育苗介質，不添加木黴菌製劑之介質為對照，至第 21 天調查甘藍苗立枯病之發病率，每處理每重複播 72 格之育苗穴盤各 5 盤，四重複。

結果與討論

木黴菌之藻酸膠製劑或固態醱酵製劑經儲存 3 個月之後，拌入 100 及 200 倍體積之感染性育苗介質之處理，均可使甘藍苗立枯病之感染率降至 4.9% 以下，與對照之 29.1% 相較，抑制苗立枯病感染之效果明顯，而儲存 10 個月之木黴菌藻酸膠製劑在添加至育苗介質中，甘藍苗立枯病感染率分別為 19.7 及 21.3%；但固態醱酵劑之處理，其苗立枯病感染率分別為 1.1 及 7.4%，與對照之 47.3%，均具抑制效果(表 1)，抑制苗立枯病之能力以固態醱酵之製劑效果較佳。而儲存 6 個月之製劑的處理，甘藍苗立枯病之感染均高於 11.9%，甚至達 31.1%，與對照之 74.3% 相較仍具顯著差異，雖然可能是因為此批試驗是在 6 月下旬進行，環境溫度較高利於發病，但也顯示木黴菌在高溫狀態下對立枯絲核菌之抑制能力會下降。

拮抗菌製劑之商品價值除了抑病能力外，耐儲性(Shelf life)是決定其能否推展的重要因素(Burges 1998)。本研究之結果顯示兩種製劑儲存至 300 天之久仍能抑制立枯絲核菌感染，而固態醱酵之木黴菌製劑對立枯絲核菌感染之抑制能力則優於藻酸膠製劑(表 1)，是因為木黴菌在自然界中之存活主要是在植物殘體(Papavizas 1985)上，介質之成份中除了泥炭土外，植物殘體亦佔相當高之比率，因此以介質添加營養物質供木黴菌醱酵，其條件較接近環境中存活之狀況。本試驗之結果以固態醱酵之製劑抑病效果較佳與 Lewis 及 Lumsden (2001)利用木黴菌製劑防治溫室栽培之辣椒苗立枯病的效果類似。Lewis 等人(Lewis and Papavizas 1983；Ousley et al. 1994；Papavizas et al. 1984)曾指出固態醱酵需要之容器體積較大，且培養增殖效率遠低於液態醱酵製成之藻酸膠製劑，在以量產為優先的考量下，目前仍以提昇增殖效率為主，所以也多著重在液態醱酵之研究。以本研究之結果而言認為，將來之醱酵程序宜朝採兩段甚至多段式發展，前段程序採用增殖效率較高之液態醱酵，後段應用劑型階段則採用固態醱酵可能會是較好的策略。

表 1. 不同儲存時間之木黴菌製劑對甘藍苗立枯病之抑制效果

Table 1. Inhibition of damping-off of cabbage seedlings by two formulations of *T. harzianum* YM-1.

處理 Treatment	立枯病感染率(%) Disease incidence(%)		
	儲存時間(月) Storage(months)		
	3	6	10
感染性育苗介質 + 1% 木黴菌藻酸膠製劑 Infested nursery medium + 1% T-AF	4.9 a	26.6 c	19.7 b
感染性育苗介質 + 0.5% 木黴菌藻酸膠製劑 Infested nursery medium + 0.5% T-AF	1.7 a	31.1 c	21.3 b
感染性育苗介質 + 1% 木黴菌固態醱酵製劑 Infested nursery medium + 1% T-FF	2.1 a	11.9 b	1.1 a
感染性育苗介質 + 0.5 % 木黴菌固態醱酵製劑 Infested nursery medium + 0.5 % T-FF	1.7 a	16.3 b	7.4 a
感染性育苗介質對照 Infested nursery medium Check	29.1 b	74.3 d	47.3 c
育苗介質空白 Non-infested nursery medium, Blank	3.7 a	7.1 a	4.1 a

*：同一欄之數據後的英文字母相同，為鄧肯氏多變域分析無顯著差異

*: Means within column with same letters are not significantly different at 5% probability by Duncan' multiple range test.

本研究之結果顯示，經 PEG 6000 滲調之甘藍種子，播種後發芽整齊，但不論介質是否添加木黴菌製劑，均無法抑制苗立枯病之感染(表 2)，甚至於感染情形較對照組更嚴重！而不經 PEG 6000 滲調之種子，若播種於添加木黴菌製劑之介質，立枯絲核菌之感染率降至 8%，而播種於對照不添加木黴菌製劑之處理，其感染率則為 37%。由於拮抗菌導入介質時之發芽率、發芽速度與生長速率直接影響其實用性(Burges, 1998)，而木黴菌在導入介質時，其生長常受營養基質與靜菌作用之影響(Papavizas, 1985; Ristaino and Papavizas, 1985; 黃, 1993; 葉等, 2003)而無法立即發揮抑病效果。以拮抗菌防治的對象而言，Lifshitz 等(1985)認為生物製劑對萌前感染型之病原菌防治效果較佳，雖立枯絲核菌以萌前感染為主，但此病原菌對甘藍而言，萌前、萌後均會感染(吳, 1988)，故木黴菌若無法立即發揮抑病效果，則苗立枯病可能會較嚴重。由於本試驗未以 PEG 以外之物質進行種子滲調處理，因此，本試驗之結果是否因 PEG 影響木黴菌之抑病能力則尚須試驗探討。

表 2. 甘藍種子滲調處理與介質添加木黴菌藻酸膠製劑對甘藍苗立枯病之影響

Table 2. Effect of cabbage seeds Priming with PEG and nursery medium amended with T-AF on incidence of damping-off of cabbage seedling.

種子處理 Seed treatment	介質處理 Treatement of nursery medium	苗立枯病發生率(%) Disease incidence (%)
PEG 滲調處理 PEG-priming	介質添加木黴菌藻酸膠製劑 Amended with T-AF	71 c
PEG 滲調處理 PEG-priming	介質不添加木黴菌製劑 None	84 d
未滲調處理 Non- priming ck	介質添加木黴菌藻酸膠製劑 Amended with T-AF	8 a
未滲調處理 Non- priming ck	介質不添加木黴菌製劑 None	37 b

*：同一欄之數據後的英文字母相同，為鄧肯氏多變域分析無顯著差異

*: Means within column with same letters are not significantly different at 5% probability by Duncan' multiple range test.

主要參考文獻

- 吳文希。1987。植物病害防治學，第四章：植物病害的防治原則 p87-106。茂昌圖書有限公司
- 吳文希。1988。植物土媒病原學－立枯絲核菌之性質及防治，陸：致病過程 p25-32。國立編譯館
- 郭華仁、朱鈞。1981。種子滲調法。科學農業 29(11-12):381-383。
- 黃振文。1993。開發有機添加劑防治作物病害的系列研究。永續農業研討會專集 p227-237
- 葉俊巖。1995。無土介質引起之病害問題。農藥世界 142：30-32。
- 葉俊巖。1995。底部間歇式灌溉法對苗立枯病管理之研究報告。農林廳八十四年度計畫評議會報告：桃 2-1。
- 葉俊巖，黃義雄，李敏郎，謝式垚鈺，許淑瑩，張光寧，張梅玲。1997。無土介質檢出之 *Rhizoctonia solani* 的病原性與族群動態。桃園區農業改良場研究報告 31：32-42
- 葉俊巖，黃義雄，李敏郎，謝式垚鈺，許淑瑩，張梅玲，張光寧。1997。蔬菜種子誘釣法檢測無土介質之病原菌。桃園區農業改良場研究報告 28：30-38
- 葉俊巖，羅朝村，謝式垚鈺，姚瑞禎，黃義雄。2000。木黴菌 *Trichoderma harzianum* T-2 之分離與苗立枯病防治之應用。植物保護學會會刊 42(4):257-258(2000)
- 葉俊巖、姚瑞禎、黃義雄、廖乾華。2002。利用木黴菌 (*Trichoderma harzianum*) 與毛殼菌 (*Chaetomium* spp.) 防治穴盤育苗蔬菜苗之苗立枯病與葉菜類菌核性病害。91 農科-7.2.4-桃-Y1 計畫報告 (尚未正式發表)。
- 葉俊巖、姚瑞禎、黃義雄、廖乾華。2002。利用農場廢棄物繁殖木黴菌 (*Trichoderma harzianum*) 與

- 毛殼菌 (*Chaetomium* spp.) 以防治蔬菜穴盤苗立枯病與葉菜葉類菌核病 91 農科-1.4.1-桃-Y1 計畫報告 (尚未正式發表)
- 葉俊巖、謝式垵鈺、羅朝村。2003。栽培介質與植物健康管理。2003 國際植物健康管理研討會專集 p121-136。
- Agrios, G. N. 1988. Ch. 9 Control of plant diseases. In "Plant Pathology" 3rd Ed. P180-236. Academic Press pp803
- Ahmad, J. S. and R. Baker. 1987. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 77:182-189.
- Ahmad, J. S. and R. Baker. 1987. Implications of rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. Can. A. J. Microbiol. 34:229-234.
- Burges, H. H. 1998. Formulation of microbial biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Kluwer Academic Publisher. 412pp.
- Cartwright, D.K., Sparr, H. W., and H. D. Shew. 1995. Commercial potting medium as the source of *Pythium* causing a disease on tobacco transplants. Plant. Dis. 79:538 (abstr.)
- Chang, Y -C., Yi-C. , Chang, R., Baker, O., Kleifield and I. Chet. 1986. Increased growth of plants in the presence of biological control agent *Trichoderma harzianum*. Plant Dis. 70:145-148.
- Couteaudier, Y., C., Alabouvette and M. L. Soulas. 1985. Necrose du collet et pourriture des racines de tomate. Rev. Hortic. 254:39-42 (English abstract)
- Favrin, R. J., J. E., Rahe, and B. Mauza. 1988. *Pythium* associated with crown rot of cucumber in British Columbia green house. Plant Dis. 72:683-687.
- Fower, M C., J. E. M. Garvin, D. P. Regulinski, and D. R. Viands. 1999. Association of alfafa radical length with resistance to *Rhizoctonia* damping-off. Crop Science 39:659-661.
- Harman, G. E., A. G. Tylor and T. E. Stasz. 1989. Combing effective strains of *Trichoderma harzianum* and solid matrix priming to improve biological seed treatments. Plant Dis. 73:631-637.
- Howell, C. R., L. E. Hanson, R. D. Stipanovic and L. S. Puckhaber. 2000. Induction of Terpenoid Synthesis in Cotton Roots and Control of *Rhizoctonia solani* by Seed Treatment with *Trichoderma virens*. Phytopathology 90:248-252.
- Huang, J. W. 1991. Control of soilborne crop diseases by soil amendments Plant Prot. Bull. 33:113-123(in Chinese).
- Huang, J. W., M. H. Chen and S. H. Yang. 1992. Chain effect of a formulated plant nutrition on control of leek rust. Plant Prot. Bull. 34:257-265(in Chinese).
- Inbar, J., M. Abramsky, D. Cohen and I. Chet. 1994. Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions. Euro. J. Pl. Pathol. 100:337-346.
- Kim, S. H., L. B. Forer, and J. L. Longenecker. 1975 Recovery of plant pathogens from commercial peat-products. Proc. Am. Phytopathol. Soc. 2:124 (abstr.)
- Lewis, J. A. and R. D. Lumsden. 2001. Biocontrol of damping-off of greenhouse-grown crops caused by *Rhizoctonia solani* with a formulation of *Trichoderma* spp. Crop protection 20:49-56.
- Lewis, J. A. and G. C. Papavizas. 1983. Production of chlamydospores and conidia by *Trichoderma* spp. in liquid and solid growth media. Soil. Biol. Biochem. 15(3):351-357.

- Lifshitz, R., S. Lifshitz, and R. Baker. 1985. Decrease in incidence of *Rhizoctonia* preemergence damping-off by use of integrated chemical and biological controls. *Plant Disease* 69:431-434.
- Neate, S. M. 1987. Plant debris in soil as a source of inoculum of *Rhizoctonia* in wheat. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 88(2): 157~162.
- Ousley, M. A., J. M. Lynch and J. M. Whipps. 1993. Effect of *Trichoderma* on plant growth: A balance between inhibition and growth promotion. *Microb. Ecol.* 26:277-285.
- Ousley, M. A., J. M. Lynch and J. M. Whipps. 1994. The effects of addition of *Trichoderma* inocula on flowering and shoot growth of bedding plants. *Scientia Horticulturae* 59:147-155.
- Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 23:23-54.
- Papavizas, G. C., M. T. Dunn, J. A. Lewis and J. E. Beagle-Ristaino. 1984. Liquid fermentation technology for experimental production of biocontrol fungi. *Phytopathology* 74:1171-1175.
- Paulitz, T., M. Windham and R. Baker. 1986. Effect of peat vermiculite mixes containing *Trichoderma harzianum* on increases growth response of radish. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 111(5):810-814.
- Ristaino, J. B., G. C. Papavizas. 1985. Survival and proliferation of propagules of *Trichoderma* spp. And *Gliocladium virens* in soil and in plant rhizospheres. *Phytopathology* 75:729-732.
- Robertson, G. I. 1973. Occurrence of *Pythium* spp. in New Zealand soils, sands, pumices, and peat, and on roots of container-grown plants. *N. Z. L. Agric. Res.* 16: 357-365.
- Shiau, F. L., W. C. Chun, J. W. Huang and H. C. Huang. 1999. Organic amendment of commercial culture media for improving control of *Rhizoctonia* damping-off of cabbage. *Can. J. Plant Pathol.* 21:368-374.
- Windham, M. T., Y. Elad, and R. Baker. 1986. A mechanism for increase plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 76:518-521.

Control of Damping off in Plug Seedling of Cabbage by Using *Trichoderma harzianum*

Chun-Yen Yeh, Jui-Chen Yao, and Hsin-Yu Wu

Abstract

In this study, Chlamydospores of *Trichoderma harzianum* YM-1 were prepared as alginate formulation(T-AF) containing 2% of alginate, 0.5% of corn powder, 0.5% of wheat powder, 0.1% of soybean powder and 5% of diatomite powder, and fermented in peat mixture supplemented with 0.1% of chitin, 3% of corn stem powder (12-20 mesh) and 1% rice bran as fermented formulation (T-FF). T-AF and T-FF were air dried under 10-15 °C, and stored for 3, 6 and 10 months at room temperature, both formulations were incorporated 100 and 200 times in volume of culture media infested with *Rhizoctonia solani*, respectively. The incidences of damping off of cabbage seedlings treated with T-AF and T-FF stored for 10 months were 19.7, 21.3, 1.1 and 7.4%, respectively, which were significantly lower than the check. In another experiment, the infection rate of cabbage seedlings with seed priming and sowing in T-AF and non-T-AF culture media was 71% and 84%, respectively, that without seed priming was 8% and 34%, these result indicated that seed priming treatment increased the infection rate of damping off disease in cabbage seedlings.

Key words: *Trichoderma*, *Rhizoctonia*, biocontrol Formulation, seed priming