

# 木黴菌 *Trichoderma asperellum* TA 菌株在 台灣金線連莖腐病防治上之應用

蔡金池<sup>1,2</sup> 曾德賜<sup>1,3</sup> 謝式垚鈺<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 國立中興大學植物病理學系

<sup>2</sup> 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局台中分局

<sup>3</sup> 聯絡作者，電子郵件：dstzeng@nchu.edu.tw；傳真：+886-4-2285-9741

接受日期：中華民國 97 年 5 月 26 日

## 摘 要

蔡金池、曾德賜、謝式垚鈺 2008. 木黴菌 *Trichoderma asperellum* TA 菌株在台灣金線連莖腐病防治上之應用. 植病會刊 17: 243-254.

由金線連根圈栽培介質分離所得之五個具拮抗性木黴菌 (*Trichoderma* spp.) 菌株，經無菌培養系統評估對金線連生長之促進效果測定，結果顯示以 *T. asperellum* TA 菌株表現最好。在溫室試驗中，以不同濃度TA菌株分生孢子製劑行栽培介質混合處理，於處理 15 週後，試驗結果顯示，病害防治效果隨施用濃度提高而有明顯增加之趨勢，每克栽培介質施用  $5.7 \times 10^6$ - $10^7$  cfu 之 TA 菌株分生孢子處理，其莖腐病發病率低於 10% 以下，而未處理 TA 菌株之對照處理組發病率則達 93.3%。田間試驗進一步證實，以TA菌株分生孢子製劑行根部被覆處理或栽培介質混拌處理，其對莖腐病之防治效果明顯優於厚膜孢子製劑處理。栽培場種植之金線連根部經混合分生孢子之羧甲基纖維素製劑 (CoCMC) 行被覆處理，其對莖腐病防治效果在種植後連續九週幾達 100%，相對於未處理之對照組病害發生率則已達 82%。添加 1% 麩皮於 CoCMC 之處理，可增強對病害防治效果，在連續十八週持續檢視栽培介質中木黴菌與鐮胞菌族群動態變化調查中，已確定添加麩皮之 CoCMC 處理組，栽培介質中木黴菌族群菌量皆可維持在每克  $10^7$  cfu 左右，伴隨之則可見莖腐病發生率之明顯受到抑制。本研究所提供之試驗結果顯示，研究中所用之 *T. asperellum* TA 菌株確為金線連莖腐病生物防治上極具應用潛力之菌株。

關鍵詞：生物防治、鐮胞菌、台灣金線連、木黴菌、海藻酸鈣、羧甲基纖維素

## 緒 言

台灣金線連 (*Anoectochilus formosanus* Hayata) 為本省海拔 500~1800 公尺山間闊葉林蔭下，原生、廣為民間應用的多年生藥草，近年來因需求日增，野生金線連日漸匱乏，主要以組織培養配合溫室栽培方式生產。在栽培過程中金線連極易遭受鐮胞菌 (*Fusarium oxysporum* Schl.) 感染危害，所造成之莖腐病 (stem rot) 為目前栽培上最主要的限制因子之一<sup>(12)</sup>，其主要感染近地基部莖部組織，造成水浸狀軟腐、乾腐、枯萎甚至折斷倒伏，部分並可感染葉部造成壞疽性病斑。本病於台灣一年四季皆可發生，高溫多濕之夏季尤為其

危害之高峰期，每當病害危害嚴重常導致栽培業者血本無歸。由於台灣金線連主要以生鮮植體供作藥用食材，常為癌症病人化療時之輔助食品，栽培過程中化學藥劑之施用備受質疑，非農藥病害防治技術之發展在業界期盼甚為殷切。

木黴菌 (*Trichoderma* spp.) 為多年來被廣泛應用在葉部<sup>(30)</sup>、根部<sup>(2, 32, 33)</sup>、採後儲藏期<sup>(27)</sup> 病害等生物防治之有益微生物，於花卉生產上具有延長切花保鮮期之效果<sup>(23)</sup>。本菌可以防治的病原菌種類包括 *Botrytis cinerea* Pers、*Colletotrichum truncatum* Schwein、*Cylindrocladium floridanum* Sobers & Seymour、*Gaeumannomyces graminis* Sacc.、*Pythium* spp.、

*Phytophthora citrophthora* Smith & Smith、*Rhizoctonia solani* Kühn 與 *Sclerotinia sclerotiorum* Lib. 等<sup>(3)</sup>。其中以對腐霉病菌 (*Pythium* spp.)<sup>(32, 40)</sup>、菌核病菌 (*Sclerotinia* spp.)<sup>(16)</sup> 與立枯絲核菌 (*Rhizoctonia* spp.)<sup>(2, 20, 37)</sup> 等多種作物危害至為嚴重的土壤傳播性植物病原菌，防治效果尤為顯著；另外對嚴重危害棉花、茄科作物、向日葵<sup>(24)</sup>、小麥<sup>(7)</sup>、香蕉<sup>(36)</sup>、番茄<sup>(16)</sup> 及水稻<sup>(14)</sup> 等作物，且藥劑防治殊為不易之鐮胞菌感染，防治效果也相當優異。除了病害防治效果外，木黴菌的應用已知同時具有促進種子發芽、植株生長及提升作物產量<sup>(3, 22)</sup> 等功效。由於應用效果卓著，目前已有 Binab (*T. atroviride* Karst.)、Ecofit (*T. asperellum* Samuels, Liechfeldt & Nirenberg)、Trichodex<sup>®</sup> (*T. harzianum* Rifai)<sup>(11)</sup>、Supresivit (*T. harzianum* PV 5736-89)、Tri 002 (*T. harzianum* KRL-AG2)、Soilgard 12G (*T. virens* Miller.)<sup>(13)</sup> 等多種木黴菌生物製劑產品上市，這些木黴菌生物製劑，在病害防治上已知可經由栽培介質混拌<sup>(10, 25)</sup>、種子被覆<sup>(7, 15, 25, 30, 35)</sup>、澆灌與噴灑等<sup>(24, 36)</sup> 慣行化學農藥應用方法施用，除了使用便利，更可針對不同病原菌之為害特性而調整劑型與施用方式，並配合其他物理、化學、栽培管理等防治施作，而落實理想的綜合防治管理目標。在實際應用上，木黴菌生物製劑已知端受施用劑型所含孢子型態<sup>(10, 18, 24, 25, 36)</sup>、孢子濃度<sup>(1, 25)</sup>、培養介質<sup>(36, 37)</sup>、營養物添加<sup>(15, 25, 31)</sup> 與孢子被覆介質<sup>(18, 25, 31)</sup> 等之影響，因而對病害防治效果呈顯著差異。本研究旨在探討木黴菌生物製劑於金線連莖腐病防治之應用性，有鑑於本病之發生關鍵問題之一在於金線連瓶苗移出種植過程容易有傷口造成，有利於栽培介質中存在的鐮胞病菌入侵，本研究室先前已由金線連根圈栽培介質分離篩選獲得對鐮胞菌具有強拮抗性之木黴菌菌株，並經栽培場初步測試證實對本病危害確具防治效果<sup>(38)</sup>，利用這些具應用潛力菌株，以無菌培養瓶為模式系統，進而篩選對金線連生長具最佳促進效果之菌株，繼而檢討其不同孢子型態、施用濃度、施用方式以及營養物質的添加等對病害防治效果之影響，期由而建立最佳化菌株、劑型、施用技術等相關資料，以提供本病綜合防治管理應用之依據。

## 材料與方法

### 供試植物與木黴菌菌株

以黑葉品種之台灣金線連為供試材料，取其種子經 1% (v/v) 次氯酸鈉 (NaOCl) 消毒 5 min，再經無菌水漂洗兩次，播種於裝有添加 1.5% (w/v) 瓊脂 MS 培養

基 (Murashige and Skoog basal salt mixture, Sigma M5524) 之無菌瓶中，培養 18 個月後所獲得之實生苗，在無菌操作箱內取出，以無菌蒸餾水洗淨附著根部之培養基後，移至底部置雙層紗布、瓶中添加 10 ml 濃度減半 (half strength) MS 培養液之培養瓶中，置 25°C 每日 12 hr 光照之培養箱培養供作試驗材料，田間試驗用供試植株則取同齡期幼苗在溫室中以清水洗淨後備用。

另以 *T. virens* PT103 菌株以及 *T. asperellum* PT57、TA、PT06 與 PT89 等五個木黴菌菌株作為供試拮抗微生物，這些供試菌株係以添加蓋普丹之木黴菌選擇性培養基 (*Trichoderma* selective medium supplemented with captan, TSMC) [每公升培養基含 0.2 g MgSO<sub>4</sub>、7H<sub>2</sub>O、0.9 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.15 g KCl、1 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、3 g glucose、0.25 g chloramphenicol、0.2 g pentachloronitrobenzene、0.15 g rose bengal、0.02 g captan (43%WP, 杜邦) 以及 20 g agar]<sup>(8)</sup> 分離自埔里地區所採集人工栽培場台灣金線連根圈之栽培介質，於先前試驗中，已證實其對莖腐病病原性鐮胞菌具優異拮抗性，且於 89 至 91 年間在埔里地區之栽培場田間試驗更已證實其對本病危害之防治效果<sup>(38)</sup>。試驗過程中，供試菌株培養在馬鈴薯蔗糖瓊脂培養基 [每公升含 200 g 馬鈴薯煎汁、20 g 蔗糖及 16 g 瓊脂, PSA] 斜面上，每兩週一次更新於 PSA 斜面上保存備用。

### 不同木黴菌菌株對金線連生長之影響

上述移入含 10 ml 濃度減半之 MS 培養液及金線連植株之培養瓶，每瓶經接種 1 ml 於室溫 (25-28°C) 每日 12 hr 光照下於 PSA 平板上培養五天，所收取各供試木黴菌菌株之分生孢子懸浮液 (5.2×10<sup>8</sup> conidia/ml) 後，置於 25°C 每日 12 hr 光照之培養箱中培養，經 8 個月後取出調查金線連植株存活率及各處理之植株總鮮重。

### 木黴菌孢子濃度對金線連生長及莖腐病發生之影響

於溫室中以商業用栽培介質 (BVB 007，大將軍園藝資材公司生產，台灣) 為栽培材料，加入以太空包培養 7 天後所收取之 TA 菌株分生孢子懸浮液 (5.7×10<sup>11</sup> conidia/ml) (製備方法見下文)，調整接種菌量使每克栽培介質最終濃度分別為 5.7×10<sup>2</sup>、5.7×10<sup>3</sup>、5.7×10<sup>4</sup>、5.7×10<sup>5</sup>、5.7×10<sup>6</sup> 及 5.7×10<sup>7</sup> cfu，並以未接種處理之栽培介質作為對照，每處理以栽培盤 (長×寬×高：45×25×10 cm) 種植 30 株金線連瓶苗，每處理三重複，試驗兩次，處理 15 週後調查莖腐病發生率及植株鮮重。

### TA 菌株不同形式接種源之製備

太空包接種源製備：將碎麥粒 (100 - 200 mesh)、泥炭土 (TKS-1, 芬蘭生產, 大將軍園藝資材公司, 台灣)、稻穀與麥粉以 1 : 1 : 1 : 0.5 (w/w) 比例均勻混合, 調整含水量為 60% (w/w), 分裝於太空包用 PP 袋 (46×25×10 cm) 中, 每袋 200 g, 經高壓滅菌後, 每袋接種 5 ml 由 PSA 平板培養 5 天所收取之 *T. asperellum* TA 菌株分生孢子懸浮液 ( $8.3 \times 10^8$  conidia/ml), 混拌均勻後置於室溫 (25-28°C) 每日 12 hr 光照 (2000-3000 Lux) 下培養一星期, 其間每日混拌一次, 俟其大量產生分生孢子後置 4°C 黑暗中低溫冷藏備用。

分生孢子接種源製備：以移殖環沾取 PSA 斜面上產孢良好之 TA 菌株分生孢子, 塗抹至 PSA 平板上, 置 28°C 每日 12 hr 光照定溫箱中培養 5 天後, 以無菌水洗下分生孢子並調製成  $5.6 \times 10^8$  conidia/ml 菌量, 吸取 0.5 ml 菌液滴入 PSA 平板上, 以高壓滅菌過之三角玻璃棒均勻塗抹, 置 26-30°C 每日光照 (2000-2500 Lux) 24 hr 條件下, 經 48 hr 培養後, 俟分生孢子大量形成, 再以無菌水洗下, 經以 Whatman No. 1 濾紙過濾, 調製成  $8.3 \times 10^8$  conidia/ml 之孢子懸浮液備用。

厚膜孢子接種源製備：以微量吸管吸取 2 ml TA 菌株分生孢子懸浮液 ( $5.6 \times 10^8$  conidia/ml), 注入裝有 100 ml CH 培養液 [每公升中含 2 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.5 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.01 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、5 g Molasses、1 g gelatin 及 50 g corn meal] 之 500 ml 三角錐瓶中, 經於 28°C 180 rpm (Orbital shaking incubator Model-S305R, Firstek Scientific) 振盪培養 14 天, 將脫落之厚膜孢子以無菌水清洗兩次, 再以無菌水調配成  $8.2 \times 10^8$  chlamydo spores/ml 濃度供作試驗用。

藻膠粒劑之製作：將上述製備之 TA 菌株分生孢子 ( $8.3 \times 10^8$  conidia/ml) 或厚膜孢子 ( $8.2 \times 10^8$  chlamydo spores/ml) 懸浮液樣品以 2% (w/v) 海藻酸鈣溶液調配成  $5.7 \times 10^5$  conidia/ml 濃度, 進而個別以空氣壓縮機 (GM-3030, Kuma Taiwan) 高壓噴入 0.25 M 碳酸鈣溶液中使凝結形成藻膠顆粒後, 撈出放置室溫中晾乾備用, 試驗中並以不含 TA 菌株之分生孢子或厚膜孢子之海藻酸鈣同法製備膠囊粒劑供對照處理應用。

### TA 菌株不同接種源製備對莖腐病之防治效果

本試驗於 89 年度在埔里地區商業用栽培場進行二次, 每處理栽培盤種植 60 株金線連瓶苗, 四重複。以上述利用 TA 菌株所製備之不同型式接種源進行處理, 處理方式包括：1. 種植前栽培介質與太空包接種源以 4 : 1 (w/w) 均勻混合後種植；2. 種植後每一培養盤以供試 TA 菌株厚膜孢子懸浮液 400 ml ( $5.2 \times 10^5$

chlamydo spores/ml) 均勻澆灌處理；3. 種植前根部以上述同一厚膜孢子懸浮液浸漬 1hr；4. 種植前瓶苗根部以利用分生孢子 ( $5.7 \times 10^5$  conidia/ml) 所調製之藻膠粒劑每處理 3 g 行被覆處理；及 5. 每盤 2.5 公升栽培介質中混拌 3 g 含 TA 菌株分生孢子 ( $5.7 \times 10^5$  conidia/ml) 之藻膠粒劑後種植, 試驗中以水澆灌及栽培介質與植株未經任何處理等作為對照。處理後, 每三週一次調查莖腐病發生率及採取栽培介質樣品, 1g 栽培介質置入裝有 99 ml 無菌水之三角錐瓶中, 經 150 rpm/min 振盪 20 min 後靜置 10 min, 吸取 1 ml 沉澱後之上清液經無菌水 10 倍系列稀釋, 以稀釋平板法塗抹於 TSMC 與 PCNB [每公升含 5 g peptone, 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 g pentachloronitrobenzene, 0.3 g streptomycins 以及 15 g agar] <sup>(26)</sup> 兩選擇性培養基, 經 28°C 每日光照 24 hr 培養 5 天後, 分別計數 TSMC 及 PCNB 平板上之木黴菌與鐮胞菌菌落數, 每處理 16 重複, 藉以估算木黴菌及鐮胞菌在栽培介質中的族群數量 (colony forming units/g substrates, cfu/g subs.), 另外, 秤取各處理之栽培介質 1 g 樣品, 置 80°C 烘箱烘乾 24 hr 後, 秤取乾重以推算其含水重。

### 羧甲基纖維素對 TA 菌株根部被覆處理防病效果之影響

本試驗於 90 年度在埔里金線連栽培場進行二次, 每處理種植 30 株金線連瓶苗, 4 重複。供試金線連植株分別以添加 0.1% (w/v) 羧甲基纖維素 (sodium carboxymethyl cellulose, CMC) 所調配 TA 菌株厚膜孢子 ( $5.7 \times 10^5$  chlamydo spores/ml) 或分生孢子之懸浮液 ( $5.8 \times 10^5$  conidia/ml) 行被覆處理, 及以厚膜孢子 ( $5.7 \times 10^5$  chlamydo spores/ml) 或分生孢子 ( $5.7 \times 10^5$  conidia/ml) 之藻膠粒劑行被覆處理, 另外以單用厚膜孢子或分生孢子懸浮液 [ $5.7 \times 10^5$  spores/ml + 0.1% (v/v) Tween 80] 作澆灌處理 (每盤 500 ml), 及以不添加厚膜孢子或分生孢子之藻膠粒劑、0.1% (w/v) CMC 溶液及水分別作對照處理, 種植後每三週調查各處理之金線連莖腐病發病率。

### 麩皮對 TA 菌株根部被覆處理防病效果之影響

本試驗於 91 年在埔里金線連栽培場進行, 每處理種植 30 株金線連瓶苗, 7 重複, 種植前供試瓶苗分別以含有 0.1% (w/v) CMC 之 TA 菌株分生孢子 ( $8.4 \times 10^6$  conidia/ml) 懸浮液 (CoCMC) 與添加 1% (w/v) 麩皮 (200 mesh 以下) 之上述 CoCMC 行根部被覆處理, 或種植後每盤直接澆灌上述分生孢子懸浮液 500 ml, 每三週一次, 並以不作任何處理之瓶苗作為對照, 種植後每三

週一次調查莖腐病發生率，並同前述之方法，每三週測定土壤中木黴菌之族群動態變化情形。

## 統計分析

以上試驗所得數據依據 ANOVA 統計程式之 Fisher's least significant difference (LSD) test 進行各處理間差異性分析，其顯著水準設定  $P \leq 0.05$ 。

## 結果

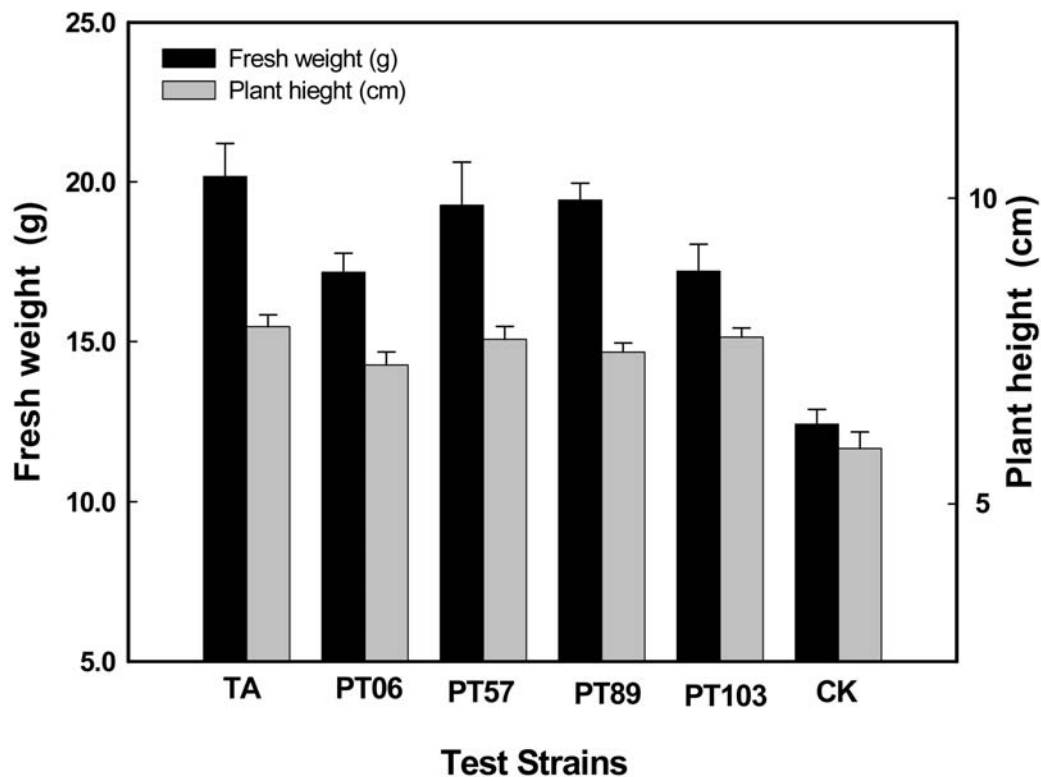
### 不同木黴菌菌株接種處理對金線連生長之影響

在無菌狀態下生長之金線連植株，經五個供試木黴菌菌株接種處理後均未見對其生長有抑制或侵害的現象，接種處理 8 個月後，TA、PT06、PT57、PT89 與 PT103 等五菌株處理之金線連植株平均高度分別為  $7.7 \pm 0.2$ 、 $7.1 \pm 0.2$ 、 $7.5 \pm 0.2$ 、 $7.3 \pm 0.1$  與  $7.6 \pm 0.1$  cm，平均鮮重則分別為  $20.2 \pm 1.0$ 、 $17.2 \pm 0.6$ 、 $19.3 \pm 1.4$ 、 $19.4 \pm 0.5$  及  $17.3 \pm 0.9$  g，相對的對照處理之株

高平均為  $5.8 \pm 0.3$  cm，平均鮮重則為  $12.4 \pm 0.5$  g (圖一)，不論是株高或鮮重，所有處理組與對照組間均呈現相當明顯的差異，各處理菌株中，尤以 TA 菌株對金線連植株之生長促進效果最為明顯 (圖二)。

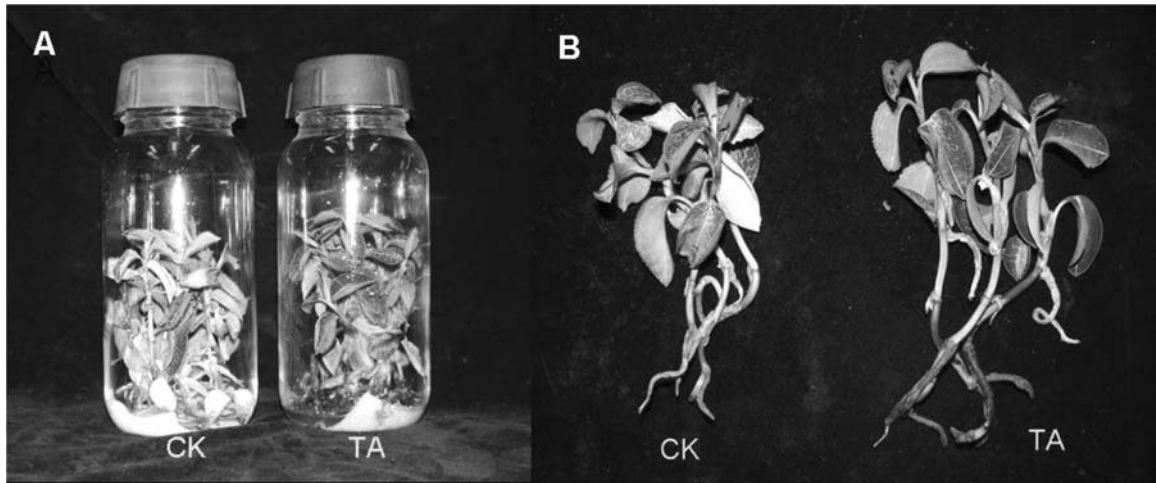
### 接種濃度對金線連生長及莖腐病發生之影響

溫室試驗結果顯示，栽培盤中之栽培介質經混入不同濃度之 TA 菌株分生孢子處理，在種植 1 個月後開始有莖腐病自然感染病徵表現，其中尤以對照處理組發病最早且最嚴重，處理十五週後對照處理發病率達  $93.3 \pm 3.3\%$  (圖三)，在每克介質接種濃度達  $5.7 \times 10^2 \sim 10^3$  cfu 之處理組，植株發病率為 60% 左右，較之對照組已有顯著差異，在接種濃度提高到  $5.7 \times 10^5$  (cfu/g subs.) 時，病害發生率已降到 20% 左右，而接種濃度進一步提高到  $5.7 \times 10^6$  (cfu/g subs.) 以上之處理，病害發生率更已降到 10% 以下。各不同處理濃度間，病害防治效果隨施用孢子濃度提高而呈現顯著差異性之現象甚為明顯 (圖三)。至於，各處理植株成活率及總鮮重均有隨接種濃度提高而升高的現象，相較於對



圖一、木黴菌 *Trichoderma asperellum* TA, PT06, PT57, PT89 菌株以及 *T. virens* PT103 菌株在無菌培養下對台灣金線連生長之影響。

Fig. 1. Effect of *Trichoderma asperellum* TA, PT06, PT57, PT89 and *T. virens* PT103 strains on the growth of Taiwan *Anoectochilus* in gnotobiotic system. Plants height and fresh weight of test plants were recorded 8 months after transplanting. Bars indicate the standard deviation. The significance of difference ( $P \leq 0.05$ ) was testified by Fisher's LSD test. LSD for fresh weight (%) = 2.665; LSD for plant height = 0.598.



圖二、無菌培養下接種供試木黴菌 *Trichoderma asperellum* TA 菌株對金線連生長之影響。A：為所應用之無菌培養測試系統；B：為處理 8 個月後處理植株與對照植株生長差異。

Fig. 2. Effect of *Trichoderma asperellum* TA strain on the growth of Taiwan *Anoectochilus* grown in a gnotobiotic vial system shown in A. The test plants (TA) in each vial were cultured in the broth medium with addition of the conidia suspension of TA at  $5.2 \times 10^8$  conidia/ml. The control plants (CK) were cultured in the medium without addition of TA conidia. Photo shows the compared growth of test plants (TA) and the control plants in (photo A) and after pulled out from the vials (photo B) 8 months after treatment.

照處理總鮮重平均為 51 g，當接種濃度在  $5.7 \times 10^6$  (cfu/g subs.) 以上之處理總鮮重皆達 67 g 以上，與對照處理比較極為顯著。

#### TA 菌株不同形式接種源對莖腐病之防治效果

TA 菌株不同接種源防治莖腐病處理中，處理 15 週後，以厚膜孢子製備之澆灌處理組發病率達  $69.3 \pm 1.4\%$  (圖四)，根部浸漬處理則為  $35.8 \pm 1.4\%$ ，而太空包接種源混合栽培介質處理組發病率為  $52.3 \pm 2.7\%$ 。另外分生孢子藻膠粒劑行根部被覆處理與栽培介質混拌處理發病率分別為  $15.0 \pm 1.4\%$  與  $12.5 \pm 1.3\%$ 。相對於水澆灌之對照處理組發病率達 27%，各木黴菌防治處理中，防治效果以分生孢子藻膠粒劑最為顯著，而厚膜孢子與太空包接種源製備混拌處理則均未見有防治效果。病害調查同時採取各處理栽培介質樣品，檢視其木黴菌與鐮胞菌之族群濃度，各處理中，木黴菌菌量大體介於  $1.8 \times 10^4 \sim 7.0 \times 10^4$  之間，各不同接種源製備處理中以分生孢子藻膠粒劑混拌介質處理及厚膜孢子澆灌處理組之木黴菌菌量較高，每克分別在  $6.9 \times 10^4$  與  $6.8 \times 10^4$  cfu，其餘各處理則依次為厚膜孢子製劑根部浸漬處理  $6.3 \times 10^4$  cfu、分生孢子藻膠粒劑行根部被覆處理  $6.1 \times 10^4$  cfu 及太空包接種源混合栽培介質處理  $4.3 \times 10^4$  cfu，對照處理則只有每克  $1.8 \times 10^4$  cfu 左右。除了厚膜孢子製劑澆灌及分生孢子藻膠粒劑混拌栽培介質處理菌量顯著較高，與對照處理顯著差異，

其他處理與對照處理比較則未見有顯著差異。另檢視各處理栽培介質中鐮胞菌菌量密度則發現，大體皆分佈在每克  $5.4 \times 10^3 \sim 4.3 \times 10^3$  cfu 之間，各處理間差異均未達顯著水準(圖四)。

#### 羧甲基纖維素對 TA 菌株根部被覆處理防病效果之影響

處理第六週後，供試植株開始有莖腐病感染病徵陸續發生，其中對照處理植株發病最早且蔓延最快，在處理 15 週後，發病率已達約 78% 左右(圖五)，各供試處理中，以添加 CMC 之分生孢子製劑 (CoCMC) 行根部被覆處理對病勢進展之抑制效果最佳，於處理 15 週後之發病率約為 37%，其次則以分生孢子製劑行澆灌處理及添加 CMC 之厚膜孢子製劑行根部被覆處理，其發病率分別在 49% 與 44% 左右，其他各處理發病率則依序為藻膠被覆處理 (Alg)、分生孢子藻膠粒劑被覆處理 (CoAlg)、厚膜孢子藻膠粒劑被覆處理 (ChAlg) 及 CMC 被覆處理等，其發病率分別為  $55.0 \pm 0.8\%$ 、 $56.5 \pm 12.4\%$ 、 $60.0 \pm 12.4\%$  與  $63.3 \pm 8.9\%$ ，至於厚膜孢子製劑澆灌處理 (ChD) 則在試驗過程中發病率與對照處理極為相近，未見有明顯之防治效果。

#### 麩皮對 TA 菌株根部被覆處理防病效果之影響

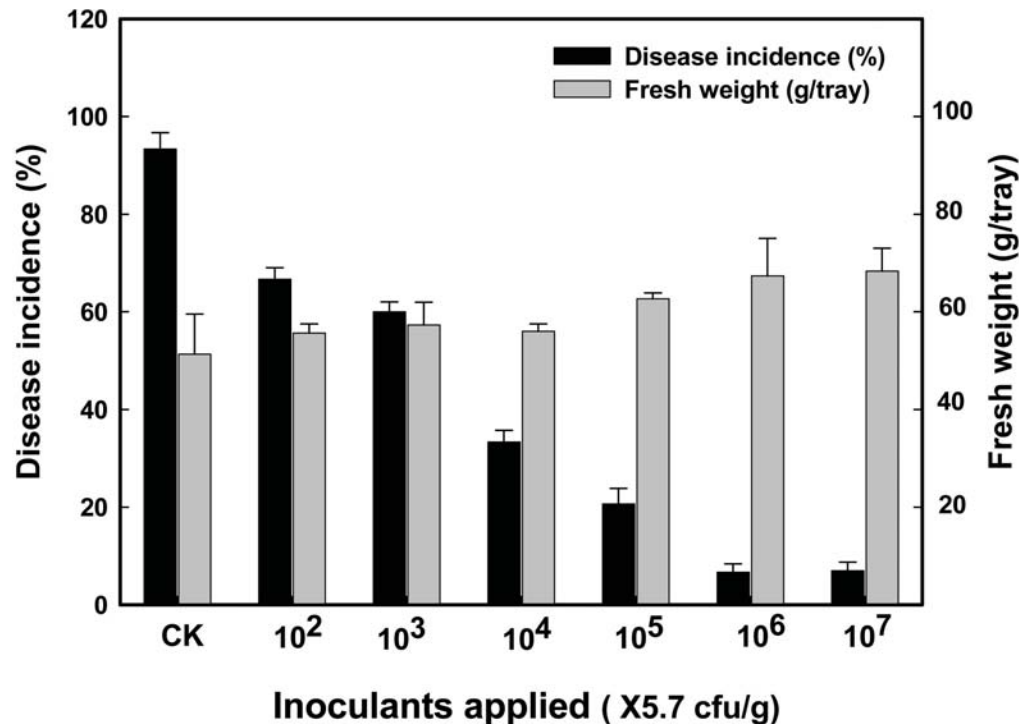
供試植物材料在處理後第三週檢視栽培介質中木黴菌族群數目發現，各供試處理中以添加 CMC 行根部

被覆處理 (CoCMC) 及分生孢子製劑行澆灌處理, 木黴菌濃度每克栽培介質分別達  $4.3 \times 10^7$  與  $4.0 \times 10^7$  cfu, 添加麩皮之 CoCMC 被覆處理居次, 只有  $9.9 \times 10^6$  cfu, 而未處理之對照組則為  $2.0 \times 10^6$  cfu。在無麩皮添加下, 供處理應用之 TA 菌株分生孢子, 不論以 CMC 添加行被覆處理或單獨澆灌處理方式, 處理後栽培介質中木黴菌菌量在初始六週均可維持在每克介質  $4.2 \times 10^7$  cfu ~  $4.7 \times 10^7$  cfu 左右(圖六), 唯第六週後, 其菌量即有快速遞減現象, 到第十二週每克介質僅存  $5.7 \times 10^6$  cfu 與  $5.4 \times 10^6$  cfu 左右, 其後菌量遞減則趨於不明顯, 至第十五週仍維持在每克  $5.3 \times 10^6$  cfu 左右。相較於上述過程中木黴菌快速遞減之現象, 添加麩皮之 CoCMC 被覆處理組, 其試驗過程中, 初始第三至第九週栽培介質中木黴菌菌量一直維持在每克  $9.3 \times 10^6$  cfu 左右, 在處理第十五週後菌量更明顯上升至  $1.7 \times 10^7$  cfu 左右, 至於未以 TA 孢子被覆處理之對照組, 其介質中木黴菌族群在處理後第三至第九週間, 則一直維持在每克  $2.0 \times 10^6$  cfu 以下, 惟之後則有小幅度增加的趨勢, 在處理後第十五週, 菌量達  $4.3 \times 10^6$  cfu, 與未加麩皮之 CoCMC 處理組相近(圖六)。

隨著試驗過程中栽培介質木黴菌族群之起伏變化, 所有防治處理, 以添加麩皮之 CoCMC 被覆處理組病害防治效果最佳, 處理後三週並未發現病害的發生, 自第十二週開始發病率方從 1.9% 逐漸上升至第十八週 21% 左右; 另外以 CoCMC 被覆處理組及分生孢子製劑及澆灌處理防治效果也相當不錯, 於處理後到第十二週前之發病率分別在 1% 及 7% 之下, 其在第十五週後病害快速上升分別為 26% 與 21% 左右, 較之添加麩皮之 CoCMC 處理組防治效果略遜。

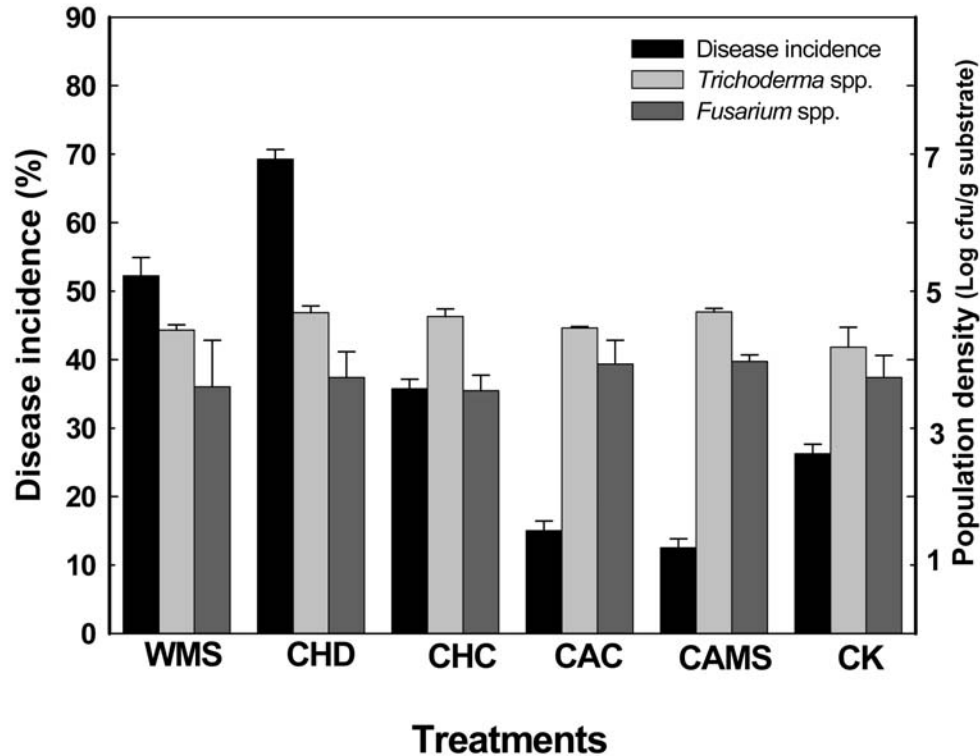
## 討 論

在拮抗性木黴菌生物防治相關作用機制的瞭解中, 拮抗菌株所具備生長快速特性及與病原菌競爭空間與養份之能力<sup>(2, 33, 37)</sup> 為其能否達到保護植株免受病原菌入侵之關鍵特性, 此外多數拮抗性木黴菌已知可分泌抗生物質及可分解真菌細胞壁組成之多種分解酵素, 因而可導致病原菌菌體之致死解體, 有效降低病原菌族群密度<sup>(6)</sup>, 部分木黴菌菌株更已知可分泌揮發性氣體如 6-pentyl-alpha-pyrone 等, 因而有抑制镰孢菌產



圖三、*Trichoderma asperellum* TA 菌株分生孢子接種不同濃度對金線連生長與莖腐病發生之影響。

Fig. 3. Effect of inoculant concentration of *Trichoderma asperellum* TA strain on the growth and disease incidence of *Fusarium* stem rot infection on Taiwan *Anoectochilus*. The conidial inoculants at indicated concentration were applied to the culture substrates right before transplanting. Disease incidence and fresh weight of test plants were recorded 15 weeks after transplanting. Bars indicate the standard deviation. The significance of difference ( $P \leq 0.05$ ) was testified by Fisher's LSD test. LSD for disease incidence (%) = 7.5; LSD for fresh weight = 15.3.



圖四、*Trichoderma asperellum* TA 菌株不同接種源製備處理對莖腐病發生率與木黴菌及鐮孢菌在栽培介質中之族群密度之影響。

Fig. 4. Effect of different inoculant preparation of *Trichoderma asperellum* TA strain on disease incidence of Fusarium stem rot infection on Taiwan *Aneoctochilus* and population density of *Trichoderma* spp. and *Fusarium* spp. in substrates. Disease incidence and *Trichoderma* /*Fusarium* population density were surveyed 15 weeks after transplanting. Bars indicate the standard deviation. The significance of difference ( $P \leq 0.05$ ) was testified by Fisher's LSD test. LSD for disease incidence (%) = 5.30; LSD for *Trichoderma* spp. log cfu/g subs. = 0.49; LSD for *Fusarium* spp. log cfu/g subs. = 1.10. The applied treatments include: PP bags produced conidial biomass (WMC); drenching by chlamydospore preparation (CHD); root coating by chlamydoconidia preparation (CHC); root coating by alginate encapsulated conidial preparation (CAC); cultural substrates mixed with alginates encapsulated conidial preparation (CAMS); and non-treated control (CK).

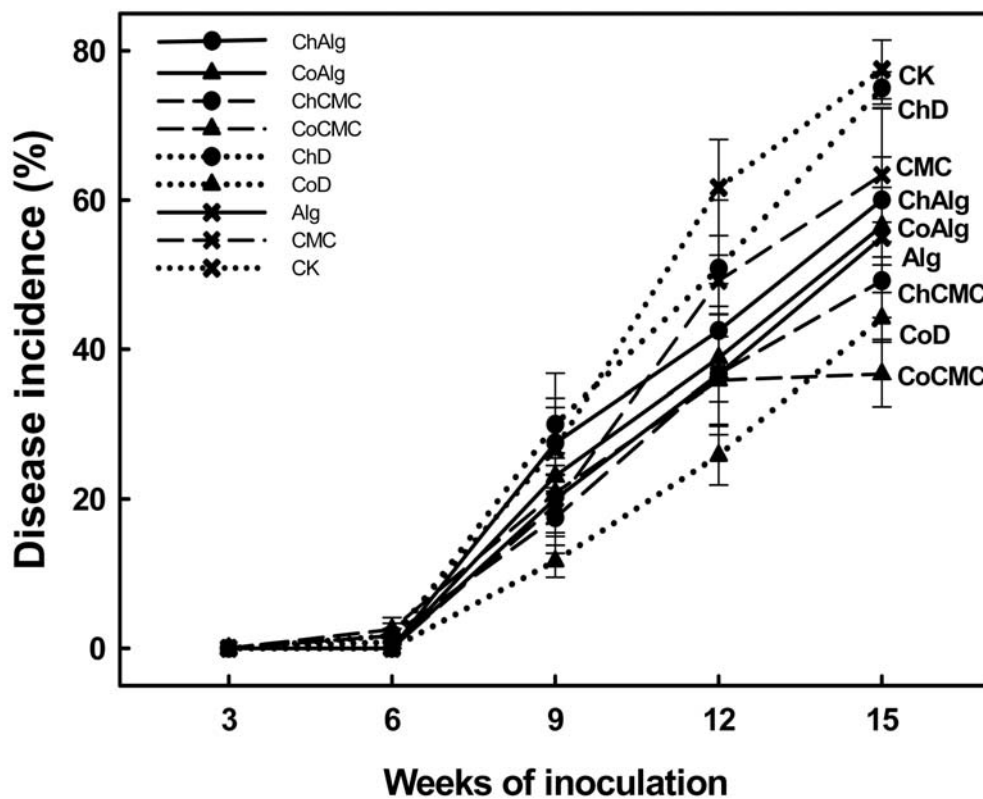
生 fusaric acid 及降低其入侵植物之能力<sup>(9)</sup>。就拮抗性木黴菌之病害防治應用性，Webber 氏等<sup>(39)</sup> 與 Lewis 氏等<sup>(21)</sup> 曾報告指出利用與病原菌對峙培養所篩選出的拮抗性木黴菌菌株在田間應用時可能有無法達到預期的防治效果之遺憾，此顯示除拮抗性以外，其他生物特性包括環境纏據能力、生長速度、對環境逆境之抗性等均為相當重要的特性，此外應用劑型、施用方法等之影響亦不容忽略。本研究中利用對峙培養拮抗性篩選配合生長促進性等測試篩選所獲得之 *T. asperellum* TA、PT06、PT57、PT89 與 *T. virens* PT103 等五供試菌株在金線連莖腐病應用上所顯示的優異效果<sup>(38)</sup>，證實利用對峙培養配合拮抗菌整體特性篩選及適當防治技術應用，確可獲得防治效果優異拮抗菌株，此結果與 Campbell 氏<sup>(4)</sup> 及 Swadling 氏等<sup>(34)</sup> 報告所見一致。

蘭科植物的根或假根上，已知常有共生性真菌之

存在，尤其所纏據之根部可向外延伸進入介質並將吸收之養份供給植株，以補強根毛吸收養份及水份能力的不足<sup>(17)</sup>。本研究中在無菌培育下，金線連植株在接種處理供試木黴菌菌株之分生孢子製劑後，較之未接種處理之對照處理植株在生長高度與鮮重所呈現之促進效果，與 Lindsey 與 Baker 兩氏<sup>(22)</sup> 類似之試驗所見相同，本試驗中，經 TA 菌株處理之金線連植株葉片較為濃綠，根毛密度也較未處理之植株為茂盛（圖二），對照組植株在培養後期老葉呈褪綠現象，顯現培養液中所提供之養分狀態有不敷植株生長所需之慮，而供試木黴菌菌株之接種處理則顯可彌補此一不足，同樣的培養液經供試木黴菌菌株的作用轉化，應為提供金線連植株生長所需較佳化養份之關鍵，此結果是否顯示本研究所應用之木黴菌菌株與寄主間存在類似 Yedidia 氏等<sup>(41)</sup> 所見共生之關係值得進一步探討。

拮抗菌能否在土壤中存活、繁殖<sup>(28)</sup> 與其在土傳病害防治上之應用性關係甚為密切，拮抗菌在土壤中存活時間則已知因作物、土壤質地、營養、水分等因素而有差異<sup>(10)</sup>，Papavizas 氏<sup>(28)</sup> 曾報告指出其供生物防治應用之木黴菌菌株之分生孢子製劑，在施用到土壤中 35 天後，存活菌量僅剩約 50% 左右。種子被覆應用上，許多報告已相繼指出，拮抗性木黴菌可隨種子發芽與根部伸展過程所分泌之養份而於根圈存活、增殖<sup>(2, 15, 28)</sup>。就土傳病害防治而言，多數學者都認為木黴菌需能在土壤中發芽及立足，方有防治植物病原菌的能力<sup>(15, 32, 33)</sup>，因而在木黴菌施用時，若能提供所需碳源，應可打破木黴菌局限於根圈生長之限制，使其在根圈外亦能建立族群<sup>(15, 18, 35)</sup>。Lewis 與 Papaviza 氏<sup>(18)</sup> 曾嘗試將供生物防治應用之木黴菌培養在麩皮培養基 40 天所獲得之總生質體 (total biomass) 及與添加 1% 麩皮的分生

孢子製劑，分別導入壤土中，經 3 週後檢視存活菌量，證實以總生質體導入者，其每克土壤木黴菌菌量由  $10^3 \sim 10^4$  cfu 增殖為  $10^9$  cfu 菌量，而以添加麩皮之分生孢子施用者，每克土壤中存活不超過  $10^3$  cfu。由於以菌絲體為主的總生質體並不適於長期貯存與運輸，Lewis 氏等認為提供拮抗菌在土壤中繁殖的營養物質倍為重要。就多數已知拮抗性木黴菌而言，包括纖維素、玉米、麩皮、麥粒、米糠、高粱穀粒、軟木屑、泥碳苔、香蕉假莖、香蕉葉片等皆曾被作為增殖用材料，於導入土壤過程添加應用。Thangavelu 氏等<sup>(36)</sup> 即曾以米糠、香蕉假莖、乾燥香蕉葉片、稻殼與農場堆肥等作為增殖用之介質，結果發現以乾燥香蕉葉片作為培養木黴菌材料之產孢量最高。於諸多可資應用之天然材料中，以麩皮最易於大量取得，有關應用嘗試也最多。Küçük 氏等<sup>(15)</sup> (2004) 與 Fravel 氏等<sup>(10)</sup> 均曾分



圖五、*Trichoderma asperellum* TA 菌株不同孢子型態製備對金線連莖腐病感染之影響。

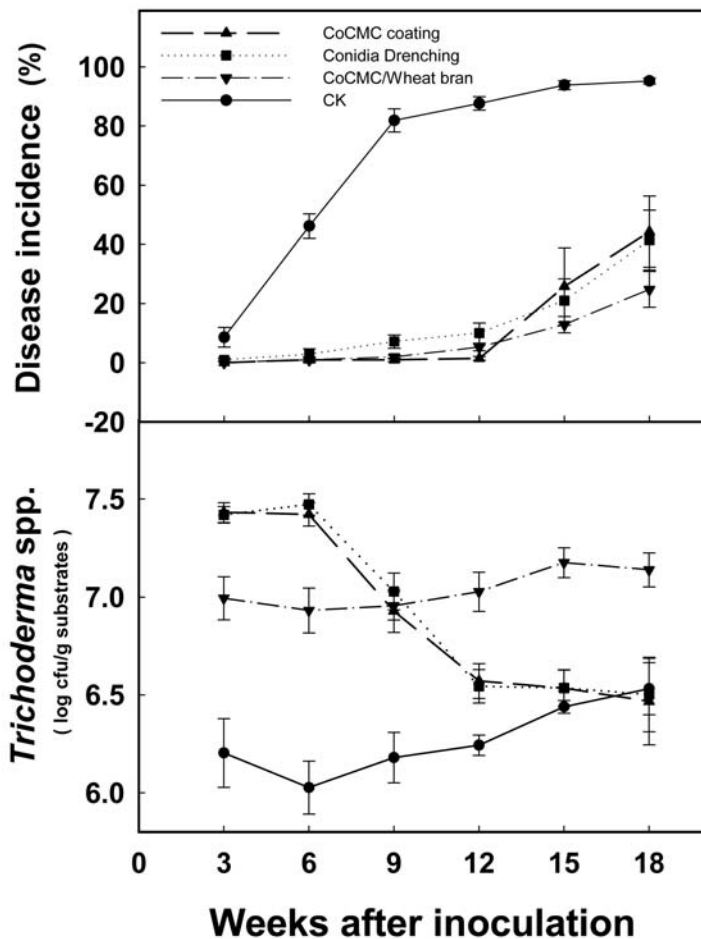
Fig. 5. Effect of different inoculant preparations of *Trichoderma asperellum* TA strain on disease incidence of Fusarium stem rot of Taiwan *Aneotochilus*. Disease incidence of test plants were recorded 15 weeks after transplanting. Bars indicate the standard deviation. The significance of difference ( $P \leq 0.05$ ) was testified by Fisher's LSD test. LSD for disease incidence (%) 9, 12 and 15 weeks after transplanting are 14.1, 21.5 and 22.5, respectively. The applied treatment included root coating by alginate encapsulated chlamydo spores preparation (ChAlg); root coating by alginate encapsulated conidial preparation (CoAlg); root coating by chlamydoconidia amended with sodium carboxymethyl cellulose preparation (ChCMC); root coating by conidia amended with CMC preparation (CoCMC); drenching by chlamydo spore preparation (ChD); drenching by conidial preparation (CoD); root coating by CMC preparation (CMC); root coating by alginate preparation (Alg); and non- treated control (CK).



別報告指出麩皮是相當適合木黴菌在土壤中增殖應用的營養源，Lewis 與 Papaviza 氏<sup>(18)</sup> 亦曾證實提高麩皮添加量可有利於木黴菌在土壤中的繁殖。本試驗中在麩皮添加下，供試 TA 菌株之 CoCMC 製劑於被覆處理後，栽培介質中木黴菌之族群可在每克  $10^7$  左右持續維持，甚至在後期有明顯再增殖 (圖六) 之現象，明白指出應為麩皮營養提供有關，相對的未添加麩皮之處理，則介質中木黴菌族群皆呈迅速下降之趨勢，而在麩皮添加下伴隨木黴菌族群之維持與增殖，鏹胞菌明

顯受到抑制及病害防治效果明顯較佳之表現，再再均顯示提供適當增殖營養源為供試 TA 菌株在田間防治應用上值得參考之作法。

淹沒式的策略 (inundative strategy) 為生物防治應用上確保成效極為重要的依循準則，就土傳病害防治應用而言，所導入拮抗菌之有效濃度為防治效果的關鍵。本試驗中供試 TA 菌株在栽培介質應用上，病害防治效果隨施用濃度而提高之現象充分證實此一觀點，其亦與 Küçük 氏等<sup>(15)</sup>、Lewis 與 Papaviza 氏<sup>(18)</sup> 等之報告結果一致<sup>(15, 18, 19, 29)</sup>。為增益木黴菌在田間之存活性及防治病原菌之能力，有關的報告相當多，包括利用藻膠、pyrax (a pyrophyllite, hydrous aluminum silicate) 將木黴菌被覆後供土壤混拌施用<sup>(19, 29)</sup>，或利用 CMC、瓊脂等黏著材質之添加供種子被覆應用<sup>(2, 7, 15, 25, 41)</sup> 等，有關被覆材料之應用性，Fravel 氏等<sup>(10)</sup> 曾由花生殼、麩皮、玉米軸、pyrax、幾丁質與魚粉等物質之添加測試，證實其中以花生殼、麩皮對促進拮抗菌在土壤中之繁殖有最佳的效果。Lewis 與 Papaviza 氏<sup>(20)</sup> 也曾證實添加麩皮之藻膠對拮抗菌的繁殖與及在病害防治上可有明顯的促進性；Zohar-Perez 氏等<sup>(42)</sup> 則曾報告指稱藻膠被覆應用可以保護微生物減少紫外線及乾旱逆境之傷害。在本試驗中藻膠的應用效果與分生孢子之 CoCMC 製劑被覆處理，不論使用便利性與有效性均略遜一籌。本研究中所應用之 TA 菌株，其分生孢子製劑與在莖腐病防治上之應用，顯以  $10^5 \sim 10^7$  conidia/ml 濃度間最好，在  $10^8$  conidia/ml 以上則效果反略受影響 (結果未示出)。Adams 氏<sup>(1)</sup> 報告曾證實土壤中木黴菌族群密度只要達到  $10^5$  propagules/g soil 即可；Aziz 氏等<sup>(2)</sup> 則指出種子被覆只需  $8 \times 10^6$  conidia/seed，每克土壤中只需  $10^6$  cfu 菌量即可達到降低 *R. solani* 感染之目的。另外就拮抗菌之接種源製備而言，上述研究結果由不同型態接種源製備導入介質中之應用效果，可以看出分生孢子較厚膜孢子為佳，此一結果與 Papavizas 氏等<sup>(29)</sup> 之 *Talaromyces flavus* (Klocker) Stolk & Samson 研究報告相似，但與 Lewis 與 Papavizas 氏<sup>(19)</sup> 之木黴菌報告結果則相反，這些結果之差異性是否為施用拮抗微生物菌株特性以及環境條件不同所致，仍有待進一步瞭解。種子被覆為土壤傳播性與幼苗期病害防治上常被推薦之方法，防治效果也備受肯定<sup>(5, 15, 25, 40)</sup>，由於金線連是以無菌組織培養方式繁殖，出瓶產生的傷口往往利於病原菌的入侵，由上述試驗結果顯示種植前根部以供試 TA 菌株 CoCMC 行被覆處理防治效果最好，處理時麩皮之添加對病原族群之抑制及病害防治之增益效果更顯示其應用性值得推薦。



圖六、*Trichoderma asperellum* TA 菌株分生孢子CMC製劑 (CoCMC) 添加麩皮對莖腐病防治效果之影響。

Fig. 6. Effect of wheat bran supplementation on the effectiveness of the CMC-amended TA strain conidial inoculant (CoCMC) for the control of *Fusarium* stem rot of Taiwan *Aneoctochilus*. Bars indicate the standard deviation. The Significance of difference ( $P \leq 0.05$ ) was testified by Fisher's LSD test. LSD for *Trichoderma* population analysis 3, 6, 9, 12, 15 and 18 weeks after treatment are 0.33, 0.31, 0.33, 0.29, 0.26 and 0.46, respectively; whereas that for disease incidence (%) are 6.34, 8.89, 9.23, 8.05, 28.31 and 28.45, respectively.

## 謝辭

本研究承蒙行政院農業委員會高雄區農業改良場前場長林富雄先生支持與農委會 90 農科 -2.1.2- 高 -K1、91 農科 -7.2.4- 高 -K1 計畫經費資助，特此致謝。

## 引用文獻 (LITERATURE CITED)

- Adams, P. B. 1990. The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. *Ann. Ev. Phytopathol.* 28: 59-72.
- Aziz, N. H., El-Essawy, A. A., and Khalaf, M. A. 1997. Influence of bean seedling root exudates on the rhizosphere colonization by *Trichoderma lignorum* for the control of *Rhizoctonia solani*. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 38:33-39.
- Bailey, B. A., and Lumsden, R. D. 1998. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. Pages 185-204 in: *Trichoderma and Gliocladium*, vol 2. C. P. Kubicek, and G. E. Harman, eds., Taylor & Francis, London. 393 pp.
- Campbell, R. 1986. The search for biological control agents against plant pathogens: a pragmatic approach. *Biol. Agric. Horti.* 3:317-327.
- Chao, W., Nelson, E., Harman, G., and Hoch, H. 1986. Colonization of the rhizosphere by biological control agents applied to seed. *Phytopathology* 76:60-65.
- Chet, I., Benhamou, N., and Haran, S. 1998. Mycoparasitism and lytic enzymes. Pages 153-172. in: G. E. Harman, C. P. Kubicek, eds., *Trichoderma and Gliocladium*, vol 2. Taylor & Francis, London, 393 pp.
- Dal Bello, G. M., Mónaco, C. I., and Simón, M. R. 2002. Biological control of seedling blight of wheat caused by *Fusarium graminearum* with beneficial rhizosphere microorganisms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18:627-636.
- Elad, Y., and Chet, I. 1983. Improved selective media for isolation of *Trichoderma* spp. or *Fusarium* spp. *Phytoparasitica* 11:55-58.
- El-Hasan, A., Walker, F., and Buchenauer, H. 2008. *Trichoderma harzianum* and its metabolite 6-pentyl-alpha-pyrone suppress fusaric acid produced by *Fusarium moniliforme*. *J. Phytopathol.* 156:79-87.
- Fravel, D. R., Lewis, J. A., and Chittams, J. L. 1995. Alginate prill formulations of *Talaromyces flavus* with organic carriers for biocontrol of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 85:165-168.
- Harman, G. E. 2004. Overview of new insights into mechanisms and uses of *Trichoderma* based products. *Phytopathology* 94:S138.
- Hsieh, S. P. Y., Huang, S. F., and Kao, S. T. 1995. Initial inoculum of stem rot of Taiwan *Anoectochilus* - aerial root of common treefern. *Plant Pathol. Bull.* 4:69-75. (in Chinese with English abstract)
- Koch, E. 1999. Evaluation of commercial products for microbial control of soil-borne plant diseases. *Crop Prot.* 18:119-125.
- Kumakura, K., Watanabe, S., Toyoshima, J., Makino, T., Iyozumi, H., Ichikawa, T., and Nagayama, K. 2003. Selection of *Fusarium* spp. and *Trichoderma* spp. for effective control of rice seedborne pathogens. *Jpn. J. Phytopathol.* 69:393-405. (in Japanese with English abstract)
- Küçük, Ç., Kivanç, M., Kinaci, E., and Kinaci, G. 2007. Biological efficacy of *Trichoderma harzianum* isolate to control some fungal pathogens of wheat (*Triticum aestivum*) in Turkey. *Biologia Bratislava* 62:283-286.
- Latunde-Dada, A. O. 1993. Biological control of southern blight disease of tomato caused by *Sclerotium rolfsii* with simplified mycelial formulations of *Trichoderma koningi*. *Plant Pathol.* 42:522-529.
- Leake, J. R. 1994. The biology of myco-herterotrophic (saprophytic) plants. *New Phytol.* 127:171-216.
- Lewis, J. A., and Papavizas, G. C. 1984. A new approach to stimulate population proliferation of *Trichoderma* species and other potential biocontrol fungi introduced into natural soil. *Phytopathology* 74:1240-1244.
- Lewis, J. A., and Papavizas, G. C. 1985. Characteristics of alginate pellets formulated with *Trichoderma* and *Gliocladium* and their effect on the proliferation of the fungi in soil. *Plant Pathol.* 34:571-577.
- Lewis, J. A., and Papavizas, G. C. 1987. Application of *Trichoderma* and *Gliocladium* in alginate pellets for control of *Rhizoctonia* damping-off. *Plant Pathol.* 36:438-446.
- Lewis, J. A., and Papavizas, G. C. 1991. Biocontrol of plant diseases: the approach for tomorrow. *Crop Prot.* 10:95-105.
- Lindsey, D. L., and Baker, R. 1967. Effect of certain fungi on dwarf tomatoes grown under gnotobiotic conditions. *Phytopathology* 57:1262-1263.
- MacKenzie, A. J., Ownley, B. H., Starman, T. W., and Windham, N. T. 2000. Effect of delivery method and population size of *Trichoderma harzianum* on growth response of unrooted chrysanthemum cuttings. *Can. J. Microbiol.* 46: 730-735.
- Mathivanan, N., Srinivasan, K., and Chelliah, S. 2000. Biological control of soil borne diseases of cotton, eggplant, okra and sunflower by *Trichoderma viride*. *J. Plant Dis. Prot.* 107:235-244.

25. Mclean, K. L., Swaminathan, J., Frampton, C. M., Hunt, J. S., Hunt, J. S., Ridgway, H., J., and Stewart, A. 2005. Effect of formulation on the rhizosphere competence and biocontrol ability of *Trichoderma atroviride* C52. *Plant Pathol.* 54:212-218.
26. Nash, S. M., and Synder, W. C. 1962. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root for *Fusarium* in field soil. *Phytopathology* 52:567-572.
27. Okigbo, R. N., and Ikediugwu, F. E. 2000. Studies on biological control of postharvest rot in yams (*Dioscorea* spp.) using *Trichoderma viride*. *J. Phytopathol.* 148:351-355.
28. Papavizas, G. C. 1982. Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and in pea and bean rhizospheres. *Phytopathology* 72:121-125.
29. Papavizas, G. C., Fravel, D. R., and Lewis, J. A. 1987. Proliferation of *Talaromyces flavus* in soil and survival in alginate pellets. *Phytopathology* 77:131-136.
30. Perelló, A., Moreno, V., Mónaco, C., and Simón, M. R. 2007. Effect of *Trichoderma* spp. isolates for biological control of tan spot of wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis* under field condition in Argentina. *Bio. Control* DOI 10.1007/S10526-007-91104.
31. Shaban, G. M., and El-Komy, H. A. 2000. Survival and proliferation of alginate encapsulated *Trichoderma* spp. in Egyptian soil in comparison with allyl alcohol soil fumigation. *Mycopathologia* 151: 139-146.
32. Sivan, A., Elad, Y., and Chet, I. 1984. Biological control effects of a new isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum*. *J. Phytopathol.* 74: 498-501.
33. Sivan, A., and Chet, I. 1989. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. *Phytopathology* 79:198-203.
34. Swadling, I., and Jeffries, P. 1996. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Can. J. Plant Pathol.* 4:195-209.
35. Taylor, A. G., Harman, G. E., and Nielson, P. A. 1994. Biological seed treatments using *Trichoderma harzianum* for horticultural crops. *Hort. Technol.* 4:105-109.
36. Thangavelu, R., Palaniswami, A., and Velazhahan, R. 2004. Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing *Fusarium* wilt of banana. *Agric. Ecosyst. Environ.* 103:256-263.
37. Trillas, M. I., Casanova, E., Cotxarrera, L., Ordovás, J., Borrero, C., and Avilés, M. 2006. Composts from agricultural waste and the *Trichoderma asperellum* strain T-34 suppress *Rhizoctonia solani* in cucumber seedlings. *Biol. Control* 39:32-38.
38. Tsai, C. C., Hsieh, S. P. Y., and Tzeng, D. D. S. 2006. A preliminary study on the biocontrol of Taiwan *Anoectochilus* stem rot diseases caused by *Fusarium oxysporum* Schl. *Plant Pathol. Bull.* 15:293-294. (in Chinese with English abstract)
39. Webber, J., and Hedger, J. 1986. Comparison of interactions between *Ceratocystis ulmi* and elm bark saprobes in vitro and in vivo. *Tran. Brit. Mycol. Soci.* 86:93-101.
40. Wolffhechel, H., and Jensen, D. F. 1992. Use of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* for the biological control of post-emergent damping-off and root rot of cucumbers caused by *Pythium ultimum*. *J. Phytopathol.* 136:221-230.
41. Yedidia, I., Benhamou, N., and Chet, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumeris sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1061-1070.
42. Zohar-Perez, C., Chernin, L., Chet, I., and Nussinovitch, A. 2003. Structure of dried cellular alginate matrix containing fillers provides extra protection for microorganisms against UVC radiation. *Radiate Res.* 160:198-204.

## ABSTRACT

Tsai, C. C.<sup>1,2</sup>, Tzeng, D. S.<sup>1,3</sup>, and Hsieh, S. P. Y.<sup>1</sup>. 2008 . Biological control of *Fusarium* stem rot of *Anoectochilus formosanus* Hayata by *Trichoderma asperellum* TA strain. Plant Pathol. Bull. 17: 243-254. (<sup>1</sup> Department of Plant Pathology, National Chung-Hsing University, Taichung; <sup>2</sup> Taichung Branch, Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Executive Yuan; <sup>3</sup> Corresponding author, Email: dstzeng@nchu.edu.tw; TEL: +886-4-2285-1038, Fax: +886-4-2285-3741.)

For the biological control of stem rot of *Anoectochilus formosanus* Hayata caused by *Fusarium oxysporum* Schl., five antagonistic *Trichoderma* strains isolated from *Anoectochilus* rhizospheres were evaluated for their growth promoting effectiveness in a gnotobiotic culture system. Among five strains tested, *Trichoderma asperellum* TA strain was the best for promoting the growth of *Anoectochilus* plants . In a greenhouse trial, the effectiveness of stem rot control was shown dependent on the conidial concentration of the antagonist applied. The stem rot incidence of test plants grown in substrates treated by  $5.7 \times 10^6$ - $10^7$  cfu/gram conidial preparation 15 weeks after treatment was approximately 10%, whereas that of the compared non-treated control was about 93.3%. In a serial field trials, the effectiveness of disease control was consistently found better by root coating or preplanting substrate blending with the conidial suspension than that by the chlamydo-spores preparation of the antagonist. A conidial formulation with carboxymethyl cellulose (CoCMC) was most effective for the disease control in practical cultivation. By root coating during transplanting, the application of CoCMC resulted in nearly 100% protection of the test plants for 9 weeks, whereas the disease incidence of non-treated control at the same time reached about 82 %. The protective effect of CoCMC appeared to be further strengthened by the addition of wheat bran as a food base. A 18-week time course study of the *Trichoderma* / *Fusarium* population dynamics contained in the growth substrates indicated a well sustained *Trichoderma* population at approximately  $10^7$  cfu/g throughout the test period. And in accompany to that was the suppressed the disease incidence. These results suggest *T. asperellum* TA strain have an excellent potential to be used as biocontrol agents for the control of stem rot disease of Taiwan *Anoectochilus*.

Key words: Biological control, *Fusarium oxysporum* Schl., *Anoectochilus formosanus* Hayata, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma virens*, Ca-alginate, sodium carboxymethyl cellulose, CMC