洋菇腦菌病病原菌生理研究

杜 自 彊　　于 紫 靜

一、前　　言

洋菇腦菌病爲洋菇栽培上之嚴重病害之一，爲求徹底之防治方法，除由藥劑方面直接殺菌外，由其病原菌之生理研究，利用洋菇栽培技術之改進，在不影響洋菇正常生長之原則下，減少腦菌病之發生，更爲經濟而理想之防治方法。本病於 1929 年，首先在美國 Ohio 州發現，後經 E. B. Lambert 氏研究定名，其學名爲*Pseudobalsamia microspora* Diehl and Lambert[1], 1954 年 Gilkey 氏建議改爲 *Diehliomyces microsporus*[3]，英文病名稱 Calve's Brains 或 Truffle Disease 屬於子囊菌類。本省在1963年發現，於 1964 年始有記載[13]，近年來本病嚴重影響洋菇產量，尤以1965年至1966年除宜蘭地區外，全省普遍發生。受害菇床產量減少，或不產菇。作者等有鑑於此，着手研究本病之生理性質，希望能利用栽培技術，控制本病之發生。本報告係由農復會之 66-MRF-A 1778 號計劃補助，始能完成。並蒙所長徐水泉博士及臺大教授蘇鴻基博士誠心指導，在此深表謝意。

二、材 料 及 方 法

I　材料：

洋菇菌種 *Agaricus bisporus*

腦菌病病原菌 *Pseudobalsamia microspora* (*Diehliomyces microsporus*)

化學藥品：

硫酸鋅	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$
硫酸銅	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$
硫酸錳	$MnSO_4$
硫酸鎂	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$
硝酸鈉	$NaNO_3$
氯化鐵	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$
氯化鈣	$CaCl_2$
生石灰	CaO
氯化鈉	$NaCl$
鹽酸	HCl
鉬酸銨	$(NH_4)_6\ Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$
硫酸銨	$(NH_4)_2\ SO_4$
磷酸二鉀	KH_2PO_4
葡萄糖	$C_6H_{12}O_6$
Biotin	
Thiamine	

II　方法：

1. 環境溫度對腦菌病菌及洋菇菌絲生長之影響

將腦菌病病原菌及洋菇菌絲接種於堆肥馬鈴薯洋菜培養基 於 20°C, 24°C, 28°C 32°C, 之定溫箱中斜面培養 一星期後計算腦菌病菌及洋菇菌絲生長情形 兩星期後計算腦菌病菌子囊果之生長情形

2. 堆肥含水量對腦菌病菌及洋菇菌絲生長之影響

使用口徑 2.8cm 長度 18cm 之試管 內裝入篩訖之乾燥堆肥 100g, 每管澆注不同量之蒸餾水 分爲 200cc, 175cc, 150cc, 125cc, 100cc 等五種處理 經高壓殺菌後 接種腦菌病及洋菇定期測量其菌絲生長速度

3. 不同 pH 值對腦菌病菌及洋菇菌絲生長之影響

堆肥馬鈴薯洋菜固體培養基中 經高壓殺菌後 加適當量之生石灰與鹽酸 調成不同之 pH 值在 6cm×8cm×3cm 之四角培養瓶中 接種腦菌病病原菌與洋菇 置於 28°C 定溫箱中培養 7日後測量菌落之直徑

4. 不同營養環境對腦菌病菌及洋菇生長之影響

在基本培養基上 加碳水化合物 有機氮及無機氮等不同營養 分別在 100cc 之三角瓶內接種腦菌病菌及洋菇菌絲 置於 28°C 定溫箱中 舉行液體培養 每處理重覆三次 一星期後觀察菌絲生長差異情形 其基本培養基及各種營養之配合量如下

基本培養基

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1mg
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	5mg
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	10mg
$MnSO_4$	10mg
$MgSO_4\ 7H_2O$	0.25g
KH_2PO_4	1g
$(NH_4)_6\ Mo_7O_{24}\ 4H_2O$	1mg

各種養分配合量

Biotin	0.005mg
Thiamine	1mg
Glucose	20g
$NaNO_3$	6.05g
$(NH_4)_2SO_4$	4.50g

以上各種營養按照上述之量 配成各種組合 共分六處理 觀察供試兩種菌對上列營養之差異情形

5. 腦菌病菌對滲透壓之抗性實驗

以無菌水調製 1/10N 之 NaCl, $CaCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$, 及 CaO 另以無菌水作爲對照 分別注入已形成子囊果之腦菌病菌斜面培養中（堆肥馬鈴薯洋菜培養基試管） 經12小時取出子囊果 以無菌水充分洗滌後 移至堆肥馬鈴薯洋菜培養基上 置於 28°C 定溫箱中培養 一星期後觀察其成活及死亡情形

三 實驗結果及討論

1. 環境溫度對腦菌病菌及洋菇菌絲生長之影響 實驗結果如表一

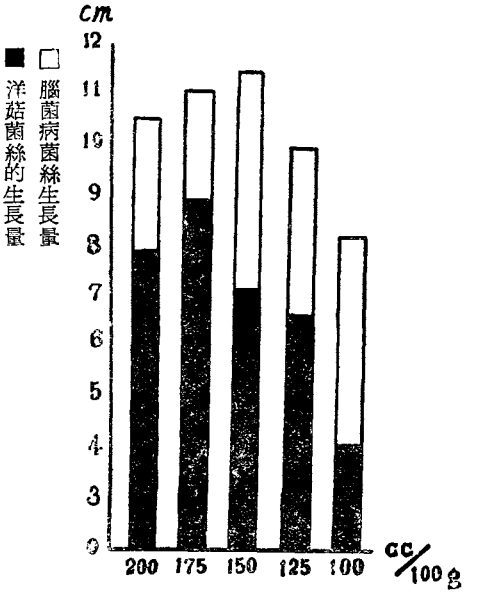
表一：不同溫度之腦菌病菌絲及子囊果與洋菇菌絲生長比較表

溫　度 (°C)	腦菌子囊果	腦菌菌絲	洋菇菌絲
20°	少	+	卅
24°	多	卅	卅
28°	特多	卅	卅
32°	少	艹	+

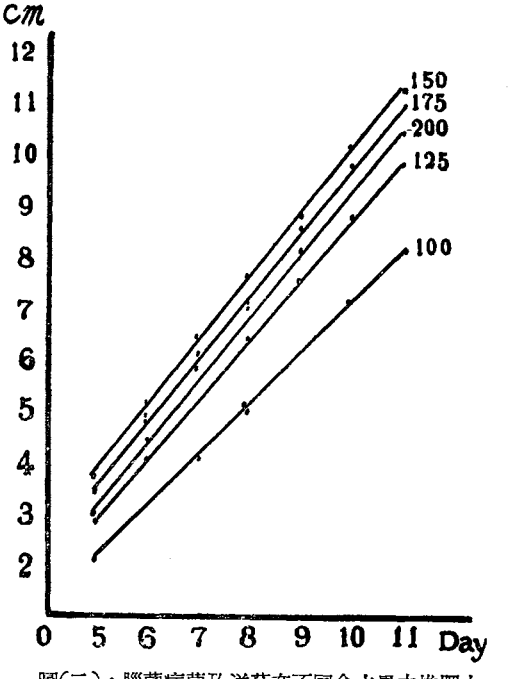
+ 表示生長量（隨量多寡而增加艹，卅等）。

由上表知腦菌病菌絲及子囊果，生長最適溫度 28°C 左右，與 Kneebone 氏所報告相同[6]，洋菇在 20°C, 24°C 均生長良好，可知洋菇與腦菌病菌絲生長所需溫度於 20°C 左右有差異，在 32°C 差異極小，但腦菌病菌較能適應高溫，洋菇於高溫則生長微弱。D.G. Gandy 氏謂溫度低於 15°C，腦菌病之胞子不能發芽[2]，與藤沼智忠氏所言胞子發芽適宜溫度爲 15°C～32°C 相符[15]，藤沼氏又謂胞子發芽適溫 18°C，一旦發芽後，使溫度降低 15°C 以下，對腦菌病菌絲生長無抑制效果。由以上結果，可見利用栽培溫度控制腦菌病之發生，只在低溫環境下有效，在本省未能改善爲人工調節溫度之栽培設備以前，本方法尙未能成爲實用之方法。

2, 堆肥含水量對腦菌病菌及洋菇菌絲生長之影響，實驗結果如圖(一)



圖(一)：腦菌病菌及洋菇在不同含水量之堆肥中生長情形。



圖(二)：腦菌病菌及洋菇在不同含水量之堆肥中，每日之菌絲生長速度直線圖。

若將圖(一)每日之菌絲生長速度繪成直線圖，則如圖(二)

由上圖可知 100g 堆肥中，含水量 150cc，腦菌病菌絲生長速度最快，依次爲 175cc, 200cc, 125cc, 100cc, 洋菇菌絲生長速度以含水量 175cc, 200cc, 150cc, 125cc, 100cc，依次遞減。

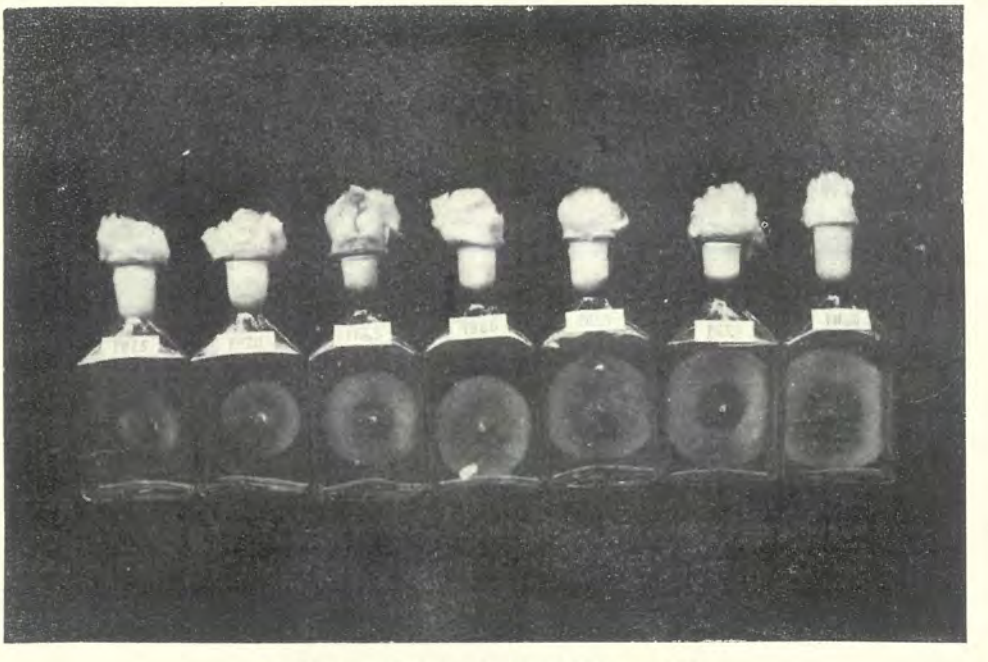
洋菇適宜生長水分，據藤沼智忠氏認爲堆肥醱酵後濕度在60%，以手掌握無游離水分滲出，僅潮濕時，最適洋菇生長[15]，本實驗結果與其相符合，但腦菌病菌絲於此濕度，生長速度亦最快，據 Pinkerton 氏謂有些菇農認爲堆肥太乾時，會發生此病，有些則認爲太濕時會發生[8]，本實驗證明腦菌病發生適宜濕度，與洋菇適宜濕度相同，均爲60%左右，故由堆肥中之水分含量，控制腦菌病之生長，實屬不可能。

3. 不同 pH 值對腦菌病及洋菇菌絲生長之影響，實驗結果如下表：

表二　不同pH值對腦菌病菌及洋菇菌絲菌落直徑(cm) 調查表：（接種後七天）

pH值 / 供試菌	5.0—5.2	5.2—5.4	6.0—6.2	6.4—6.6	5.6—5.8	6.8—7.0	7.4—7.6
洋　　菇	2.62	2.45	2.56	1.03	1.4	3.12	2.10
腦 菌 病	5.35	5.3	4.4	4.37	4.26	3.10	2.65

由上表知腦菌病菌絲 pH 值 5.0～5.2 生長良好，依次爲 5.2～5.4, 6.0～6.2, 6.4～6.6, 5.6～5.8, 6.8～7.0, 7.4～7.6 見圖三洋菇菌絲於 pH 值6.8～7.0 生長良好，依次爲 5.0～5.2, 6.0～6.2, 5.2～5.4, 7.4～7.6, 5.6～5.8, 6.4～6.6，Treschow 氏謂洋菇適宜 pH 值爲 6.0～7.0[11] Lambert 又報告洋菇覆土 pH 值在7.0生長最好[7]，William 氏認爲洋菇菌絲生長到最後，會使堆肥趨酸性，卽 pH 7.5～7.2 至 pH 6.0 而覆土之趨酸性，不似堆肥顯著，但如最初 pH 6.0 以上時會減少 pH 值，pH 6.0 以下時，則會增加[12]。橋本氏亦報告洋菇接種後20天，菌絲生長最多，於此時起，會在培養基中累積蔴酸，而使 pH 值上降，因蔴酸能使菌絲自行消化之故，pH 值又漸漸上升[14]。



圖（三）：腦菌病菌絲在不同PH值之生長狀況。

4. 不同營養環境對腦菌病菌及洋菇生長之影響，實驗結果如下表：

表三：腦菌病菌及洋菇菌絲營養生理實驗表

Treatment \ Repeat / Mushroom or Truffle	1		2		3	
	Mush-room	Truffle	Mush-room	Truffle	Mush-room	Truffle
I. A. Basal Medium	+	−	+	−	−	−
B. Basal Medium+Biotin	+	−	−	−	−	−
C. Basal Medium+Thiamine	−	−	−	−	−	−
D. Basal Medium+Biotin+Thiamine	−	−	−	−	−	*
II. A. Basal Medium+$NaNO_3$	−	−	−	−	−	−
B. Basal Medium+Biotin+$NaNO_3$	+	−	−	−	−	−
C. Basal Medium+Thiamine+$NaNO_3$	−	+	−	+	−	−
D. Basal Medium+Biotin+Thiamine+$NaNO_3$	−	−	−	−	−	*
III. A. Basal Medium+$(NH_4)_2SO_4$	−	−	−	−	−	−
B. Basal Medium+Biotin+$(NH_4)_2SO_4$	−	−	−	−	−	−
C. Basal Medium+Thiamine+$(NH_4)_2NO_4$	−	−	−	−	−	−
D. Basal Medium+Biotin+Thiamin+$(NH_4)_2SO_4$	−	−	−	−	−	−
IV. A. Basal Medium+Glucose	+	+	+	+	−	*
B. Basal Medium+Biotin+Glucose	+	+	−	++	−	++
C. Basal Medium+Thiamine+Glucose	+	+	+	++	−	+
D. Basal Medium+Biotin+Thiamine+Gulcose	+	+	+	+	−	+
V. A. Basal Medium+$NaNO_3$+Glucose	++	−	+	−	*	−
B. Basal Medium+Biotin+$NaNO_3$+Glucose	++	−	−	−	−	−
C. Basal Medium+Thiamine+$NaNO_3$+Glucose	++	−	++	−	−	−
D. Basal Medium+Biotin+Thiamine+$NaNO_3$+Glucose	−	−	*	−	*	−
IV. A. Basal Medium+$(NH_4)_2SO_4$+Glucose	++	−	++	−	++	−
B. Basal Medium+Biotin+$(NH_4)_2SO_4$+Glucose	++	−	++	−	++	−
C. Basal Medium+Thiamine+$(NH_4)_2SO_4$+Glucose	++	−	*	−	++	−
D. Basal Medium+Biotin+Thiamine+$(NH_4)_2SO_4$+Glucose	++	−	*	*	*	−

+號表示生長量
−號表示不生長
*號表示有雜菌生長

由上實驗結果，腦菌菌絲於第4處理，即基本培養基加 Glucose, Biotin 與 Thiamine 生長較爲良好，其他各處理，除在第 2 處理即基本培養基加 Biotin, Thiamine 及 $NaNO_3$，有微弱生長外，其餘處理均不生長。

洋菇菌絲於第 6 處理，即基本培養基加 Glucose, Biotin, Thiamine，及 $(NH_4)_2SO_4$ 生長最好，其次爲第 5 處理，即基本培養基加 Glucose, Biotin, Thiamine 及 $NaNO_3$, 兩者處理僅硝酸鈉，及硫酸銨兩種氮素源不同而已。由本實驗結果，可推論腦菌病對無機態氮，無論氨態氮或硝酸態氮，其利用程度均甚低，其中硝酸態氮稍能利用，在同樣處理中觀察洋菇菌絲生長情形時，無機態氮無論氨態氮或硝酸態氮之處理區均能充分生長，在各處理中，以第 6 處理生長良好，可知洋菇菌絲在有 Biotin, Thiamine 之處理中，氨態氮增加至 6.05g/*l*，仍不會妨礙其正常生長。

關於此問題，Stoller 氏報告，堆肥中之含氮化合物多時，因其氨化作用，可阻礙腦菌病之胞

子發芽[10]，因氮素爲生活細胞所需之物質，生物必須取得氮素供其細胞之需要，腦菌病氮素之來源可能依賴有機態氮，而無機態氮對腦菌病菌絲之生長無法利用，或有抑制作用，在本試驗尙未能十分明瞭，故有進一步研究之價值。在洋菇菌絲生長方面觀察，洋菇菌絲對無機態氮之利用能力，與腦菌病不同。Schisler 氏報告，堆肥中增加蛋白質如可溶性蛋白質或氨基酸混合物之含量，則洋菇產量與之成比例增加[9]，可知洋菇對有機氮之需要程度甚高[5]。可知洋菇菌絲在 Biotin, Thiamine 之環境中增加至 6.05g/*l*，仍不會妨礙其菌絲正常生長，無機氮方面，本系徐忠廸先生與作者等同時研究洋菇生長所屬營養問題，他認爲硝酸態、亞硝酸態、氨態三種無機態氮中，只有氨態氮能使洋菇菌絲生長[4]，可知氨態氮對洋菇菌絲之生長，並無妨礙。再與本試驗之結果比較，觀察時，氨態氮不但對洋菇之生長無妨礙，且有帮助生長趨勢，由以上幾點看來，腦菌病與洋菇之生長狀況在氨態氮之有無不同情形下，有很大之差異。就此點，可望尋出以栽培技術，預防腦菌病發生之捷徑。

5. 腦菌病菌對滲透壓之抗性實驗，實驗結果列於表四

表四：腦菌病在鹽類溶液中抗性紀錄表

藥劑 \ 重覆 \ 生長狀況		供試數	生存數	死亡數	備考
NaCl	a	10	0	10	雜菌 1
	b	10	0	10	雜菌 2
$(NH_4)_2SO_4$	a	10	0	10	雜菌 3
	b	10	0	10	雜菌 3
$CaCl_2$	a	10	0	10	雜菌 8
	b	10	0	10	雜菌 7
CaO	a	10	0	10	無
	b	10	0	10	無
CK	a	10	10	0	無
	b	10	10	0	無

由上表知使用此四種鹽類浸漬試驗結果，在 1/10N 之濃度下，腦菌病之子囊果能全部死亡，而以無菌水作爲對照之區域，全部能生存。

所供試之鹽類，殺菌性極低，由實驗結果而知，據一般農民以硫銨或食鹽，撒佈堆肥，有抑制腦菌病生長作用，原因爲利用其滲透壓之作用，以子囊果之表皮爲半透膜，使子囊果細胞原生質內之水分滲透出來，子囊果枯萎或溶解。在本實驗結果又知氯化鈣能使子囊果死亡，但雜菌甚多，硫酸銨次之，食鹽再次之，更可證明使用之四種鹽類，使腦菌病致死之原因，並非殺菌作用，而是滲透壓之影響。本實驗設計之濃度，僅有1/10N之一種，將繼續研究更低濃度之溶液，對腦菌病之影響，同時對洋菇菌絲之影響如何等問題。

四、摘　　要

本報告係腦菌病之初步生理研究，其結果摘要如下：

1. 腦菌病菌絲於 24°C～28°C 生長良好，洋菇菌絲於 20°C～24°C 生長良好。

2. 腦菌病菌絲於60%左右之含量之堆肥中，生長良好，洋菇菌絲仍在含水量60%之環境中生長良好，兩者相似。

3. 腦菌病菌絲於 pH 值 5.0～5.2 生長良好，洋菇菌絲則於 pH 6.8～7.0 生長良好，兩者生長適宜之 pH 值不同。

4. 在本實驗之基本培養基加 Glucose, Biotin, Thiamine 之處理區，腦菌病及洋菇菌絲均能生長良好，僅在氨態氮之有無環境下，生長有差異。氨態氮對腦菌病之生長有抑制作用，而對洋菇之生長有幫助。

5. 氯化鈣、生石灰、食鹽及硫酸氨之 1/10N 溶液，均能使腦菌病之子囊果因滲透壓作用，萎縮溶解，本問題仍在繼續研究中。

五、參 考 文 獻

1. Diehl, W.W.and E.B. Lambert 1930. Mycologia 22(5):223-226
2. Gandy, D.G., C.W. Duncan and R.L. Edwards 1953. Mushroom Science II pp. 167.
3. Helen M. Gilkey 1954 Mycologia 46(6):788-789
4. Hus H.T. 1967 Unpublished report
5. Ian M. Fraser and Byron S. Fujikawa 1958 Mycologia 50(4):538-549
6. Kneebone, L. R. and E. Merek. 1961 Mushroom Pathogens, Weed Moulds, Indicator Moulds and Competitors p. 24.
7. Lambert, E. B. and H. Humfeld 1939 USDA circ. 507:1-11
8. Pinkerton, M.H. 1954 Commercial Mushroom Growing.
9. Schisler, L.C. and J.W. Sinden 1962 Mushroom Science V:150
10. Stoller, B.B. 1943 Plant Physiology vol. 18
11. Treschow C. 1944 Dansk. Bot. Ark. 11(6):1-180
12. William H. Allison and Leon R. Kneebone 1962 Mushroom Science V:81-90
13. 胡開仁、杜自疆、毛鑑銘 1964 農業研究13 (4) :36
14. 橋本一哉等 1966 日本菌學會報 7 (1) :20-24
15. 藤沼智忠 1954 洋菇栽培與加工 P.136

PHYSIOLOGICAL STUDY OF TRUFFLE DISEASE ON CULTIVATED MUSHROOM

T. C. DOUGH AND Z. J. YU

SUMMARY

A primary report on the physiological investigation on cultivated mushroom and truffle disease causal organism was compared.

1. Maximum growth of the mycelium of truffle was between 24°C～28°C, while maximum growth for myshroom was between 20°C～24°C.

2. The mycelium of truffle as well as the mycelium of mushroom grew well in the compost containing 60% water.

3. The optimum pH for the growth of the mycelium of truffle was 5.0～5.2 but the pH optimum for mushroom was pH 6.8～7.0.

4. No growth of the mycelium of truffle was observed when the Ammonium sulfate was used as the nitrogen source. Mushroom grew well on the medium containing Ammonium sulfate as the nitrogen source.

5. The ascocarp of truffle was observed wilted or dissolved after eight hours treatment of 1/10 N solution of Calcium chloride, Calcium oxide, Sodium chloride or Ammonium sulfate. Although the phenomenon might be attributed to the effect of osmotic pressure, the detail should be investigated further.