篩選適用甜椒栽培之微生物資材

林玫珠[*]、宋孟真[**]、楊芃葏[***]、廖芳瑾[***]、梁瑩如[**]
[*]行政院農業委員會農業試驗所鳳山分所 助理研究員
[**]行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所 助理研究員
[***]行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所 研究助理

一、摘要

本試驗係針對設施茄果作物篩選適當之微生物資材，主要是甜椒上常見的病害進行篩選策略，同時評估所得微生物資材酵素分解能力等，藉由瞭解微生物資材的能力，提出適合設施茄果栽培的微生物應用策略。結果顯示，在所篩獲的微生物中，以木黴菌屬以 T23-1、鏈黴菌屬 Cu4 與枯草桿菌屬 Ydj3 及 CB36 菌株等，其酵素分解能力、病原菌拮抗能力、種苗促進生長之能力最為優異。

關鍵字：甜椒(Sweet pepper)；拮抗微生物(Antagonistic microorganism)

二、前言

番椒 [*Capsicamannunm*L.] 屬一年生草本植物，包含辣椒 (hot pepper) 及甜椒 (sweet pepper)，原產於中美洲、南美洲熱帶地區，哥倫布發現新大陸後傳入歐洲(郭 1998)。台灣於 80 年代自荷蘭引進甜椒培育上市，由於顏色鮮艷，外型討喜，且果實具有豐富的維生素 A、C，因此深受國人喜愛。台灣甜椒全年皆有生產，主要栽培於南投縣、嘉義縣、雲林縣及屏東縣等地，根據行政院農委會農業統計年報，2015 年南投縣種植面積最大約達 400 公頃，產量約達 6000 公噸，其中信義鄉成為夏季彩椒的生產基地。甜椒性喜溫暖濕潤的氣候，但忌多雨及強烈陽光直射，因其光合成飽和點只有 30klux，屬於較耐陰作物，故甜椒栽培多以設施栽培為主，不僅可以降低外在氣候的影響，亦可以提昇產品品質與產量。

甜椒稍能耐高溫，生育適溫為 25℃左右，花芽分化適溫在 27~28℃之間，果實生育溫度則以 20~25℃為最佳；溫度低於 15℃以下，植株會生長停滯、授粉不良及受精率低，形成單偽結果，產生畸型之三角果或尖尾圓錐果，影響商品價值；而高於 35℃的晝溫或 25℃的夜溫會造成落花落果，使產量下降(李 2000；郭 1998)。為使果實在發育成熟期能吸收充足的養分，宜選擇排水良好、富含有機質，且通氣、保水良好之砂質壤土或壤土進行栽培，土壤酸鹼值以 6.5 左右為宜。當土壤中氧氣少、通氣性差、土壤過濕或過乾皆會造成根群發育不良，影響水份之吸收，導致植株生長勢無法長期維持，不適於甜椒之栽培，所以必須注意土壤的選擇或以介質栽

培來克服土質不佳或土壤管理的問題(郭 1998)。

目前國內種植的甜椒品種多是歐美國家種子公司育種，只有少數品種可以符合台灣高溫高濕、抗病等特性，所以栽培選擇性少，或是種子與種苗價格居高不下，種苗商供貨不及的情形也時有所聞(謝 2008)。由於受限於本島氣候與栽培模式，加上品種選擇性少，外來種品種對本土氣候環境適應度較弱，所產生的病蟲害問題複雜，如夏季高山生產之甜椒常面臨炭疽病、白粉病、灰黴病或疫病菌為害，細蟎或二點葉蟎等節肢動物危害，導致生產量與品質不穩定，甚或衍生農藥殘留等問題。在設施栽培環境方面，由於缺乏雨水淋洗土壤，容易導致網室土壤或介質鹽分累積較露天田地更為快速嚴重，目前信義鄉農民已嘗試於栽培過後利用熱水淋洗栽培介質，並藉以降低介質中的病原菌等。

有益微生物為近年來熱門的農業資材，對非目標生物具有低毒性與安全性，對標的病原微生物具高專一性，十分適合永續農業的資材。將有益微生物處理種子或施用於幼苗與土壤，進而達到改善土壤物理性質、分解土壤中大分子成為植物營養源、增加根系之生長與吸收、促進作物生長及誘導作物抗病抗蟲等等功效，因此被稱之為微生物肥料 (microbial fertilizer)(Ahemad&Kibret 2014)。土壤中有益微生物族群增加，可以促進作物生長、拮抗病原菌、促進土壤大分子分解與使作物產生誘導抗病等功效(Nihorimbere*et al.* 2010,Ahemad&Kibret 2014)。因此，本研究藉由微生物功能性進行初步篩選有益的微生物，尋找適合台灣設施甜椒栽培之微生物資材，達促進生長與增進甜椒產業發展之目的。

三、材料與方法

3.1 菌株分離與培養

秤取土壤樣本 3g 加入含有 30mL 無菌水之離心管，經劇烈震盪後以無菌水進行序列稀釋，塗抹於 PDA (Potato dextrose agar, Difco)平板，30℃培養 2 d 後挑取單一菌落純化後進行後續試驗。木黴菌部分，利用前述方法連續稀釋平板法分離木黴菌，所得單一菌落塗抹於選擇性培養基上，以菌落及孢子型態為依據移植純化。刮取待測菌株培養於 5 mLLB (Luria-Bertainibroth, Difco)培養基，放置於 30℃培養箱，轉速 120 rpm，黑暗培養 16 h 後，將菌液濃度調整為 1×10^{7}cfumL^{-1}，以進行後續的種子發芽試驗、酵素分析試驗、病原菌拮抗對峙試驗及甜椒種苗生長促進試驗。

3.2 微生物 IAA 產生之定量分析與定性分析

IAA 之定量試驗參考 Chen *et al.*(2010)步驟進行，取 100 uL 菌液 (1×10^{8} cfu mL^{-1}) 於 5 mL LB broth (含 200 ppm tryptophane)，培養於 32℃、150 rpm 培養 90 h，以 10,000 rpm 離心 5 min 去除菌泥；取 500 uL 上清液於分光光度計測量管中，加入 500 uL 的 Salkowski A 試劑 (內含 2% 0.5 M $FeCl_3$ 的 35% 過氯酸溶液)，於室溫下反應 30 min，於分光光度計波長 530 nm 測量吸收值，以 IAA 標準液劃出標準曲

線，換算 IAA 濃度 (Chen *et al.* 2010)。

IAA 定性試驗經改良後於 LA (Luria-Bertaini agar, Difco)培養基進行，在 LA 培養基上覆蓋一聚碳酸酯膜(Nucleporemembrane, 90 mm, 0.2 um, Whatman)及一圓盤濾紙 (8 mm, ADVANTEC, Japan)，取 80 uL 上述微生物菌液滴在圓盤濾紙上，於 30℃培養 2-3d 後，移去聚碳酸酯膜及圓盤濾紙，在 LA 培養基上加入 2 mL 的 Salkowski A 試劑，靜置呈色後，以無菌水洗去 Salkowski A 試劑，拍照記錄。木黴菌部分則直接切取圓盤菌絲塊放置於聚碳酸酯膜上培養 2-3d 後，移除聚碳酸酯膜後進行呈色試驗。

3.3 種子發芽根部生長促進試驗

甜椒種子(品種金華星, 農友)經消毒後進行催芽。將上述培養之拮抗微生物經定量後加入未凝固的 1/2MS (Murashige and Skoog Basal Medium, Sigma)培養基，倒入含 35 mL 1/2 MS 的 15 cm 塑膠平板上，使菌液最終濃度為 5×10^7cfumL^{-1}、1×10^7cfu mL^{-1}或 1×10^6cfu mL^{-1}。待凝固後於平板上放入已催芽 4 d 的種子，每處理六顆種子，將平板直立於斜面架上，於 27℃生長箱培養 7d 觀察種子根長度，並照像記錄結果。木黴菌部分則配置 1/2MS 培養基，並依序放置經催芽的種子，種子對面側則放置一待測菌絲圓盤進行測試。

3.4 病原菌之對峙試驗

對峙試驗的病原菌株為危害甜椒常見的病原菌，測試菌株為炭疽病菌(*Colletotrichumgloeosporioides*)、灰黴病菌(*Botrytis cinerea*)及青椒疫病菌(*Phytophthoracapsici*)。炭疽病菌及灰黴病菌之對峙試驗於 PDA 平板進行，而青椒疫病菌之對峙試驗則於 10% V8 平板 (100 mL L^{-1} V8 juice、100 mg L^{-1} $CaCO_3$ 及洋菜 20 g L^{-1})進行，取 80 µl 有益微生物菌液 (1×10^7cfumL^{-1})於圓盤濾紙進行病原菌之拮抗測試，培養於 28℃ 5 d 後紀錄結果。

3.5 拮抗病原菌之酵素能力分析

根據 Hankin&Anagnostakis (1975)報告進行纖維素分解酵素(cellulase)能力測試，纖維素培養基 (pH 5.0)內含酵母抽出物 (Yeast extract, Difco) 2.5 g L^{-1}、微量元素溶液 500 ml L^{-1}、纖維素(Carboxymethylcellulose, SIGMA)5 g L^{-1} 及洋菜 20 g L^{-1}；微量元素溶液內含$(NH4)_2SO_4$ 2 g L^{-1}、KH_2PO_4 4 g L^{-1}、Na_2HPO_4 6 g L^{-1}、$FeSO_4{\cdot}7H_2O$ 0.2 g L^{-1}、$CaCl_2$ 1 g L^{-1}、H_3BO_3 10 ug L^{-1}、$MnSO_4$ 10 ug L^{-1}、$ZnSO_4$ 70 ug L^{-1}、$CuSO_4$ 50 ug L^{-1} 及 MoO_3 10 ug L^{-1}，其上覆蓋一聚碳酸酯膜與圓盤濾紙，將微生物培養液滴至圓盤濾紙上，於 30℃培養 5d 後移除膜與濾紙，以 0.4%剛果紅(congo red)浸潤平板後清洗，並測量透化圈。

幾丁質分解酵素(chitinase)能力測試，配製幾丁質培養基含 KH_2PO_4 0.7g L^{-1}、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g L^{-1}、$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g L^{-1}、0.1% $ZnSO_4$ 100 ug L^{-1}、4% 幾丁質膠(Colloidae chitin) 125 mL L^{-1} 及洋菜 20 g L^{-1}，微生物培養方法同上述，移除膜與濾紙後測量透化圈。

明膠分解酵素 (gelatinase) 能力測試於明膠培養基進行，明膠培養基含 NB (Nutrient broth, Difco) 10 g L^{-1}、明膠 (gelatin, Sigma) 4 g L^{-1} 及洋菜 20g L^{-1}，微生物培養方法同上述，移除膜與濾紙後以硫酸胺飽和水溶液浸潤平板，並測量透化圈。蛋白質分解酵素(protease)能力測試於蛋白質培養基進行，蛋白質培養基含酵母抽出物 1.5 g L^{-1}、脫脂奶粉 100 g L^{-1} 及洋菜 20 g L^{-1}，微生物培養方法同上述，移除膜與濾紙後測量透化圈大小。

脂質分解酵素(lipase)能力測試於脂質培養基 (pH 6.5)上進行，培養基含蛋白腖 (Peptone, Difco) 10 g L^{-1}、NaCl 5 g L^{-1}、7.5% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 2.665 mg L^{-1} 及洋菜 20g L^{-1}，滅菌後加入 4 mL Tween20，倒製平板，微生物培養方法同上述，移除膜與濾紙後測量沉澱環。

3.6 營養分分解酵素能力分析

根據 Hankin&Anagnostakis (1975) 報告進行澱粉分解酵素(amylase)能力測試，澱粉培養基(pH6.5)含 NB 10 g L^{-1}、可溶性澱粉(Soluble starch, Sigma) 2 g L^{-1} 及洋菜 20 g L^{-1}，微生物培養方法同上述，移除膜與濾紙後以 1%碘液浸潤平板後測量透化環。

溶磷酵素(phosphatase)能力測試，溶磷平板培養基(pH 6.0)含蛋白腖 14 gL^{-1}、酵母抽出物 5 g L^{-1}、葡萄糖 0.1 g L^{-1} 及洋菜粉 20 g L^{-1}，微生物培養方法同上述，移除膜與濾紙後倒入 28% NH_4OH，測量桃紅色暈圈。

尿素分解酵素(urease)能力測試，蛋白腖尿素培養基 (pH 6.0)內含蛋白腖 14 g L^{-1}、酵母抽出物 5 g L^{-1}、葡萄糖 0.1 g L^{-1} 及洋菜粉 20 g L^{-1}。滅菌後加入 8 ml L^{-1} 50% 尿素，倒製平板。微生物培養方法同上述，移除膜與濾紙，倒入未凝固的普魯氏藍凝膠(0. 1 M 磷酸緩衝液(pH 6.0) 10 ml L^{-1}、50% 尿素 20 ml L^{-1}、0.5% 普魯氏藍 10 ml L^{-1} 及洋菜 15g L^{-1})，靜置 2 小時後測量深藍色暈圈。

3.7 甜椒種苗生長促進試驗

經催芽的甜椒種子移植至 3.5 吋盆內續行生長促進試驗，將盆栽放置於 27℃ 定溫箱內，12h 光照，12 h 黑暗，種植 3 週後進行有益微生物之澆灌試驗，每週一次，連續澆灌四週，每處理各九盆，每盆澆灌 30mL。發酵液配方為 1%黃豆粉與 1%二號砂糖，30°C、150 rpm 黑暗培養 4d 後澆灌，菌液終濃度為 1×10^6cfu mL^{-1}，空白培養基作為對照，木黴菌部分則以孢子懸浮液進行。

四、結果與討論

4.1 微生物 IAA 定性分析

改良自 Chen *et al.* (2010)微生物產生 IAA 定量試驗，定性試驗評估待測微生物之 IAA 產生情形，發現所篩獲的微生物多可產生白色沉澱，與定量試驗之結果一致(圖一)，但沉澱圈大小不一，且與定量試驗值結果並無正相關性，顯示在相同培養

條件下各微生物之 IAA 產生量有極大的差別性。

4.2 種子發芽根部生長促進試驗

在種子發芽試驗中，希能找出對於種子發芽有促進效果之菌株作為溫室或田間後續試驗之用。在鏈黴菌屬(*Streptomyces* spp.)菌株以 Xst4 與 Xst8 為佳，枯草桿菌屬(*Bacillus* spp.)菌株以 Ydj3 為佳 (圖二)，木黴菌屬(*Trichoderma* spp.)菌株以 T23-1 為佳 (資料未顯示)。各類菌株的種子發芽試驗中，使用終濃度以 $1x10^{6}cfumL^{-1}$ 為佳 (圖二)。

4.3 酵素能力分析

由前述的酵素定性方法分別量測各微生物的分解能力，大多數的微生物在某一類別酵素分解能力優異，但並無法在各類分解酵素均表現良好，綜合評估後以鏈黴菌屬之菌株 Cu4 與 XN10，枯草桿菌屬之菌株 CB36、PS、Ydj3 與 Yca1 (表二、三)，及木黴菌屬之菌株 T53 與 T23-1 其綜合表現為佳。

4.4 病原菌之對峙試驗

利用拮抗微生物對峙甜椒病原菌部分，結果顯示菌株拮抗能力在種間差異大。在鏈黴菌屬菌株中拮抗能力以 Cu4 最佳，XN10 次之；枯草桿屬菌株中拮抗能力以 CB36 最佳，Ydj3 次之；木黴菌屬菌株中拮抗能力以 S45 抑制甜椒灰黴病最佳，抑制率達 85%，木黴菌 S45 與 T53 抑制甜椒疫病菌最佳，抑制率達 90%，木黴菌 T53 抑制甜椒炭疽病較佳，抑制率達 91%。

4.5 甜椒種苗澆灌試驗

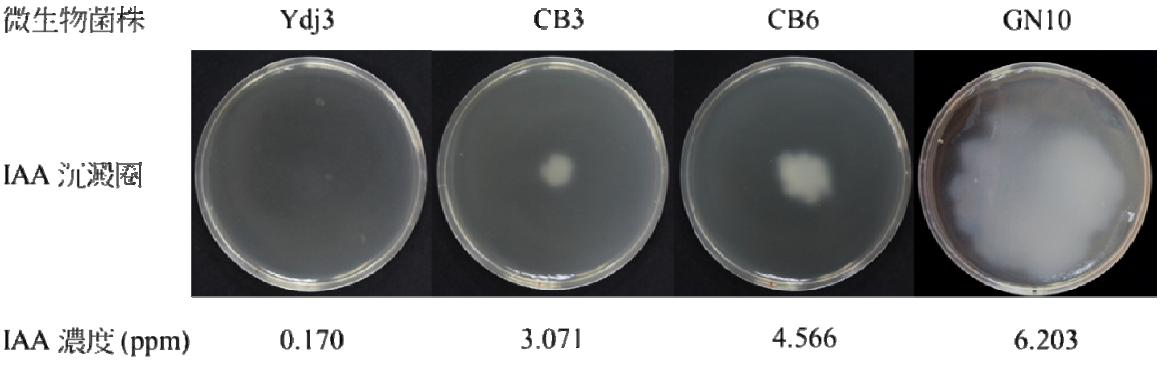
在枯草桿菌屬菌株以 CB36 菌株對於株高、根重與植株總重的促進效果最好；在木黴菌屬菌株中，所挑選之二個菌株對於甜椒種苗的促進效果差異不大；所挑選之鏈黴菌屬菌株以 Cu4 菌株對於株高、根重與植株總重的促進效果最好 (表四、圖三)。

綜合評估上述 IAA、酵素分解能力、對峙試驗與種子發芽測試後，未來溫室試驗與田間試驗將選定鏈黴菌屬菌株 Cu4、枯草桿菌屬菌株 CB36 與 Ydj3、木黴菌屬菌株 T23-1 進行試驗。由於不同地區病害與栽培情形條件不同，如炭疽病常發生在高山夏季栽種期，而灰黴病則多發生在冷涼的季節，因此若要使用微生物資材作為防治手段，可視季節或氣候等不同條件需求，搭配使用不同微生物資材。

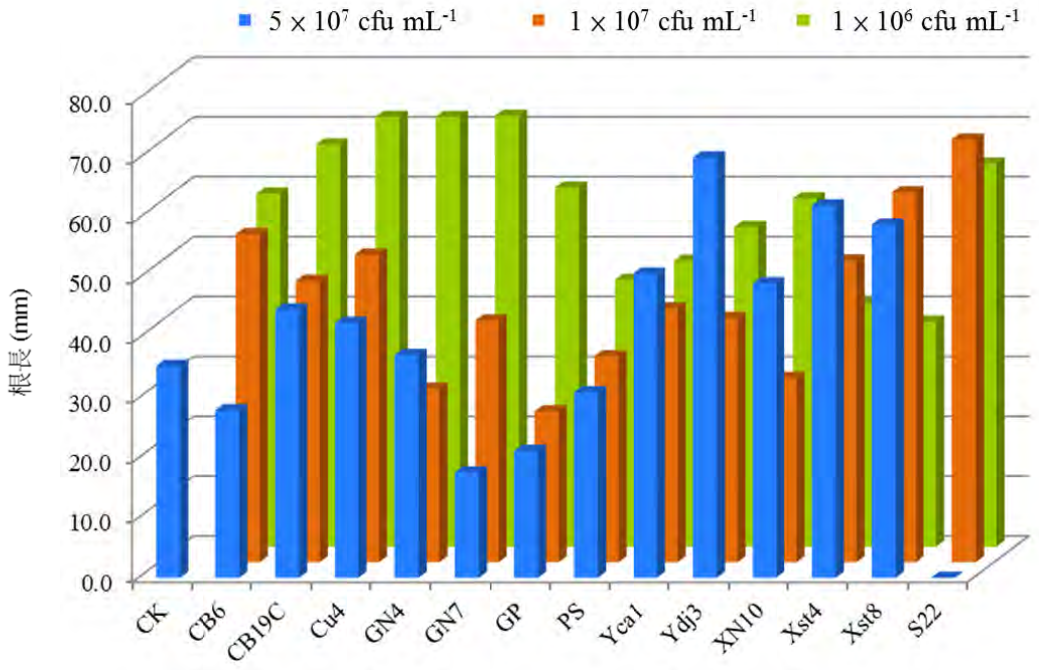
由 Mishra &Dash (2014)報導中可知，使用微生物資材有助於土壤養分平衡，促進作物健康。有利於提高土壤的生物活性，促進化學性肥料利用等優點。因此，在甜椒栽培過程添加拮抗微生物，或可解決部分設施中栽培介質所帶來的問題。同時經篩選的微生物可分泌酵素與二次代謝物，其具有促進作物養分吸收與對抗病原菌等功效(Glick2012)。本研究藉一系列篩選策略，針對高經濟價值之甜椒植株篩選適用之微生物資材，未來除可應用於田間外，另可擴大試用於其他高經濟價值之茄科作物，以期提高高品質茄科農產品比率與產量。

五、參考文獻

1. 郭孚耀。1998。彩椒栽培技術。台中區農推專訊 149 期。台中區農業改良場編印。
2. 行政院農委會農業統計資料 http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/inquiry/InquireAdvance.aspx
3. 李阿嬌。2000。彩色彩椒品種適應性與產銷慨況。桃園區農業專刊第 34 期。桃園區農業改良場編印。
4. 謝雪琴。2008。雜交一代番椒育種。計畫編號：97 農科-4.2.2-糧-Z2(7)
5. Glick, B.R. 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Hindawi Publishing Corporation, Scientifica. 15 pp.
6. Chen, M. C., T. C. Lin, and J. W. Huang. 2010. Factors affecting IAA production by rhizobacteria. Plant Pathol. Bull. 19: 201-212.
7. Hankin, L., and S. L. Anagnostakis. 1975. The use of solid media for the detection of enzyme production by fungi. Mycologia 67: 597–607.
8. Mishra, P., and D. Dash. 2014. Rejuvenation of biofertilizer for sustainable agriculture and economic development. J. of Sustainable Dev. 11:41-61.
9. Ahemad, M., and M. Kibret. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. Journal of King Saud University–Science (2014) 26, 1-20
10. Nihorimbere, V., M. Ongena, M. Smargiassi, and P. Thonart. 2010. Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2011 15: 327-337.



圖一、微生物產生 IAA 之定性試驗(沉澱圈)與定量試驗之比較。



圖二、有益微生物對種子發芽根部生長促進試驗。



圖 3、有益微生物促進彩椒種苗生長情形。

表 1、有益微生物對炭疽病菌、灰黴病菌及疫病菌之拮抗能力。

		對病原菌之拮抗能力		
微生物種類	菌株代號	炭疽病菌	灰黴病菌	青椒疫病菌
Bacillus Spp.	CB6	+	+	-
	CB36	++	++	++
	GN10	++	++	±
	LGA4	-	-	±
	PS	-	++	-
	S22	++	-	++
	Ydj3	+	+	+
Streptomyces spp.	XN10	++	++	+
	Cu4	+++	++	++
Trichoderma spp.	T23-1	++	+	+
	T53	+++	+	+++

[a] "-"：肉眼無可見透化圈或沉澱圈；"±"：肉眼可見隱約之抑制圈；"+"：肉眼可見之抑制圈；"++"與"+++"：肉眼可見明顯之抑制圈。

表 2、拮抗病原菌之分解酵素活性分析。

	分解酵素活性[a]						
菌株	Cellulase	Chitinase	Gelatinase	Lipase	PGA[b]	PTM[c]	Protease
CB6	++	-	++	+	-	+	+
CB36	+	-	+++	++	±	±	++
GN4	++	-	++	++	++	++	++
GN10	++	-	+++	++	++	++	++
PS	++	-	+	+	++	++	+
S22	++	-	+++	++	±	±	++
Yca1	++	±	++	-	±	±	+
Ydj3	++	-	++	+	-	-	+
Cu4	++	+	+	+	+	+	-
XN10	++	+	++	++	-	-	+
Xst4	-	+	+	++	±	±	-
Xst8	-	+	+	+	±	±	-
T23-1	ND[d]	ND	ND	+++	ND	ND	+
T53	ND	ND	ND	++	ND	ND	±

[a]"-"：肉眼無可見透化圈或沉澱圈；"±"：肉眼可見隱約之透化圈或沉澱圈；"+"：肉眼可見之透化圈或沉澱圈；"++"與"+++"：肉眼可見明顯之透化圈或沉澱圈。

[b] PGA：Polygalacturonase，聚半乳糖醛酸苷酶。

[c] PTM：Pectate transeliminase，果膠轉氨酶。

[d]ND：none detect。

表 3、營養分分解酵素能力分析

	分解酵素活性[a]		
菌株	Amylase	Phosphatase	Urease
CB6	++	±	+
CB36	+	-	-
GN4	++	-	+
GN10	++	-	±
PS	±	-	±
S22	++	-	++
Yca1	++	+	±
Ydj3	++	+	±
Cu4	++	+	±
XN10	++	+	+
Xst4	+	+	±
Xst8	+	+	±
T23-1	+	++	±
T53	++	+	±

[a] "-"：肉眼無可見透化圈或沉澱圈；"±"：肉眼可見隱約之透化圈或沉澱圈；"+"：肉眼可見之透化圈或沉澱圈；"++"與"+++"：肉眼可見明顯之透化圈或沉澱圈。

表 4、各類菌株對於彩椒種苗的生長促進試驗結果

Microbial isolate	Highest (cm)	Weight of root (g)	Weight of plant (g)
Bacillus spp.			
CB3	14.43±0.25 b	1.31±0.08 b	4.99±0.92 bcd
CB36	17.47±1.72 a	2.32±0.77 a	8.09±1.55 a
GN10	10.35±0.32 g	0.73±0.10 e	4.33±0.11 cd
LGA4	10.80±0.15 ef	0.84±0.12 de	4.66±0.32 bcd
PS	12.93±0.86 cd	1.11±0.13 bcd	5.82±0.27 b
S22	11.53±0.29 def	0.87±0.18 de	5.03±0.36 bcd
Streptomyces spp.			
Cu4	13.48±0.95 bc	1.20±0.14 bc	5.85±0.32 b
XN10	10.45±0.19 ef	0.48±0.10 e	4.02±0.23 d
Xst8	12.65±0.19 cd	1.14±0.14 bc	5.64±0.21 bcd
Trichoderma spp.			
T23-1	14.7±0.23 b	0.59±0.04 e	3.86±0.18 d
T53	14.7±0.39 b	0.62±0.07 de	4.08±0.18 d
Control (CK)	11.93±0.42 de	0.75±0.15 cde	4.59±0.35 bcd