

叢枝菌根菌與其他微生物在香蕉黃葉病防治之應用¹

林素禎^{2,4} 王朝儀² 蘇慶昌³

摘 要

林素禎、王朝儀、蘇慶昌。2012。叢枝菌根菌與其他微生物在香蕉黃葉病防治之應用。台灣農業研究 61:241-249。

香蕉黃葉病 (*Fusarium wilt*) 是目前影響台灣香蕉產業發展之最大限制因子之一。本研究乃利用微生物接種，期能降低香蕉黃葉病之發病率或減輕病害程度。試驗中所使用之微生物為本所自行生產之叢枝菌根菌 *Glomus clarum* Nicolson & Schenck 與另一種市售微生物商品內含兩種菌劑 *Pseudomonas putida* 與 *Trichoderma asperellum*。香蕉組織培養苗由台灣香蕉研究所提供，馴化地點在農業試驗所進行，馴化過程開始於 2009 年 9 月，香蕉組織培養苗在馴化 34 天後接種 *G. clarum*，每株組織培養苗接種 200 個孢子。香蕉組織培養苗馴化 92 天後，移植至香蕉研究所進行田區試驗，同時在移植當天接種 *Pseudomonas putida* (1×10^8 cfu per plant) 與 *Trichoderma asperellum* (1×10^6 spores per plant)。香蕉移植至田區 158 天後做生育調查與病害調查，試驗結果顯示：接種菌根菌之處理其香蕉生長勢最好，株高比對照組高 12.6% (高 16 cm)，而葉數比對照組多 36.9% (多 2.4 葉)，且接種菌根菌處理之香蕉其黃葉病發病率 (67%) 明顯 ($P < 0.05$) 比對照組 (88%) 低。接種菌根菌後再接種市售微生物菌劑之香蕉其黃葉病發病率及病害程度與對照組無顯著 ($P > 0.05$) 差異。由以上結果可知，單獨接種叢枝菌根菌可降低香蕉黃葉病之病害程度與發病率，但降低病害的幅度還不能符合實際的需要，尚須搭配其他因子。

關鍵詞：叢枝菌根菌、*Glomus clarum*、香蕉、*Musa acuminata*、黃葉病、*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*。

前 言

香蕉是本省重要經濟果樹，外銷到日本市場約有百年之歷史。根據行政院農業委員會編印之中華民國 90 年到 99 年農業統計年報資料

顯示，全台灣香蕉栽培面積 10,184-14,072 ha，總產量為 148,715-287,895 t，每公頃之產量為 15,104-23,663 kg，產區主要集中於中南部之屏東縣、南投縣與高雄縣等地。台灣中南部

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2693 號。接受日期：101 年 7 月 26 日。
2. 本所農業化學組助理研究員、研究助理。台灣 台中市。
3. 台灣香蕉研究所助理研究員。台灣 屏東縣。
4. 通訊作者，電子郵件：linmay@tari.gov.tw；傳真機：(04)23302805。

香蕉生產主要以種植‘北蕉’ [*Musa acuminata* Colla (Cavendish Group) cv. ‘Pei Chiao’] 品種為主，其果形、風味俱佳，深受內外銷市場歡迎。但‘北蕉’對黃葉病不具抗病性，香蕉黃葉病於 1967 年首次出現在屏東縣佳冬地區，由於當時未能立即採取隔離及撲滅措施，1980 年期間已由南台灣擴及台蕉所有主產區。在 2002 年間中南部約七千多公頃蕉園，受黃葉病波及者達四千多公頃 (Hwang 2002)，台灣香蕉產業受到嚴重威脅。

香蕉黃葉病又稱巴拿馬病或鐮胞菌萎凋病，其病原菌為尖鐮胞菌香蕉分化型 *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *cubense* (E. F. Smith) Snyder & Hansen。台灣香蕉研究所於 1970 年成立，對於香蕉黃葉病之防治以選育抗病品種為主要工作，歷年來選育的耐抗病品種有‘台蕉一號’、‘台蕉三號’及‘寶島蕉’，分別於 1992 年、2000 年與 2001 年命名推廣。‘台蕉一號’與‘台蕉三號’為黃葉病耐病栽培種，適合在土層深厚、排水良好及富含有機質之蕉園種植，在黃葉病重病區域或排水不良之病園仍會發病，不宜種植。‘寶島蕉’兼具抗黃葉病與豐產之優良特性，雖然香蕉研究所致力於‘寶島蕉’之推廣，但在外銷日本推展上並不順利。香蕉研究所於 2007 年再推出‘台蕉5號’，此品種主要特徵是株型及果實風味保留了傳統‘北蕉’的特質，同時又具有對香蕉黃葉病的抗病能力，屬中抗病性品種，目前正推廣中 (台灣香蕉研究所網頁 <http://www.banana.org.tw/>；首頁《關於本所》組織及部門職掌》品種改良)。

許多研究指出土壤的理化性質與微生物特性對植物的鐮胞菌病害具有影響力。Alabouvette (1986) 研究指出抑病土壤可降低植物土生性病害之嚴重程度，即使是在土壤中含有很高的病原菌接種密度，他認為土壤的抑病能力是由於微生物間的養分競爭。Amir & Alabouvette (1993) 研究黏土類型對萎凋病的影響，發

現易導病的砂質土壤添加蒙特石可增加萎凋病的抗病程度，而添加滑石則會增加萎凋病的罹病程度。Domínguez *et al.* (2001) 調查發現導病土中的土壤團粒之水穩定度 (Aggregate water-stability) 與可利用性鐵濃度較高，而抑病土土壤溶液中的 EC 值與可溶性鈉濃度較高。Stotzky & Martin (1963) 調查中美洲國家長期生產香蕉的 67 個土壤發現具有膨脹性黏土 (蒙特石) 的土壤其香蕉黃葉病發生率較低。Höper *et al.* (1995) 研究黏土類型與土壤 pH 值對鐮胞菌抑病能力之影響指出，黏土類型 (高嶺石、伊來石與蒙特石)、 CaCO_3 添加量與 CaCO_3 施入土壤的時間皆會影響土壤的抑病能力。Chuang (1991) 測試不同類型的鈣化合物 [CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$, CaCO_3 , CaSO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$] 對香蕉鐮胞菌厚壁孢子發芽之影響，試驗結果顯示 CaCO_3 對香蕉鐮胞菌厚壁孢子發芽的抑制效果最好。Peng *et al.* (1999) 研究指出在 300 g 的導病土壤中施用 3 g 的碳酸鈣可使香蕉黃葉病罹病程度從 93% 下降至 33%。Sanjeevk & Eswaran (2008) 研究指出在馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar, PDA) 培養基中加入 500 ppm 或 750 ppm 的硼砂可完全抑制鐮胞病原菌菌絲在 PDA 培養基上生長。Thangavelu *et al.* (2003) 研究指出接種螢光假單胞菌可增加香蕉葉組織內的酚類化合物與抗病酵素的含量。Mohandas *et al.* (2004) 研究指出接種螢光假單胞菌可降低鐮胞病原菌的感染率 72%，螢光假單胞菌可改變香蕉根部皮層細胞的構造，在鐮胞病原菌入侵的位置大量堆積防禦性的構造，防止病原菌在根細胞內擴展。Getha *et al.* (2005) 在溫室的盆栽試驗結果指出鏈黴菌可產生胞外抗真菌代謝物對鐮胞病原菌生理小種 1、2、4 皆有很強的拮抗作用，接種鏈黴菌可降低香蕉葉部病徵指數 (index for leaf symptom, LSI) 47% 及地下莖變色指數 53%。Nel *et al.* (2006) 在玻璃溫室中的研究結果指出

非病原性的鐮胞病原真菌可降低香蕉黃葉病發生率 8.4–87.4%，螢光假單胞菌可降低香蕉黃葉病發生率 83.4–87.4%，枯草桿菌可降低香蕉黃葉病發生率 62.4%，木黴菌可降低香蕉黃葉病發生率 33.4%–62.4%，叢枝菌根菌可降低香蕉黃葉病發生率 70.8%。

上述香蕉黃葉病防治之研究有添加碳酸鈣、硼砂或接種微生物菌劑，皆有很好的效果，但他們的試驗都是在溫室或實驗室中進行，至於田間防治應用之研究則鮮少有文章報導。本試驗選擇台灣香蕉研究所病園田區進行，希望能藉由微生物接種降低香蕉黃葉病之發病率與病害程度。

材料與方法

試驗田區與試驗設計

本試驗在台灣香蕉研究所病園田區進行，試驗田區為 13 m × 23 m (面積為 299 m²)。試驗田區採逢機完全區集設計 (randomized complete block design, RCBD)，試驗處理有 3 種：(1) 對照組 (CK)，不接菌；(2) 香蕉苗接種菌根菌 (AM)；(3) 香蕉苗接種菌根菌與市面販售之假單胞菌及木黴菌 (AM + BIO)。每處理 6 重複 (6 個畦)，每重複各種植 10 株，共計 180 株。在作畦前施用基肥，全試區基肥為 400 kg 蔗渣堆肥 (13.4 t/ha)、24 kg 蟹殼粉 (0.8 t/ha)、24 kg 蓖麻粕，6 kg 海草粉，3 kg 黃豆粉，3 kg 二號砂糖。基肥施完後打田，作畦。香蕉苗種植一個月後施用第一次追肥，氮肥 (尿素) 與鉀肥 (硫酸鉀) 施用量、施肥時期與分配率依照‘作物施肥手冊’ (Lo 2005) 進行。

土壤採樣

試驗前於試區內均衡分散採集 5–15 cm 表土土壤，試區內共採集 12 點。香蕉移植田間 158 天後，於根附近採集 5–15 cm 表土土壤，每畦內有 3 處理，每處理各採集 1 點，6 個畦 (6 重複) 共採集 18 點。試驗前與香蕉移植田

間 158 天後所採集之土壤進行理化性質分析與微生物分離培養與鑑定。

土壤理化性質分析

採集土壤先風乾過篩後進行土壤理化性質分析，包括土壤 pH 值、EC 值、質地、有機質、有效性氮、磷、鉀、鈣、鎂、鐵、錳、銅、鋅等。土壤 pH 值與 EC 值的測定方法為水土比 1:1 (g/g)，以酸鹼測定儀及電導度測定儀檢測之。土壤質地以粒徑分析儀分析。有機質以總有機碳分析儀測定後換算為有機質含量。有效性氮先用 2 M KCl 抽出後以自動分析儀測定。有效性磷、鉀、鈣、鎂、鐵、錳、銅、鋅、硼以 Mehlich-3 method (Mehlich 1984) 抽出後，以感應耦合電漿分析儀 (Inductively coupled plasma spectrometry, ICP) 測定。酸鹼測定儀的廠牌與型號為 Suntext SP-701；電導度測定儀的廠牌與型號為 Denver Instrument Model 20；粒徑分析儀的廠牌與型號為 Beckman Coulter LS 13 320；總有機碳分析儀的廠牌與型號為 Elementar vario MAX C；自動分析儀的廠牌與型號為 Astoria Analyzer Series 300；感應耦合電漿分析儀的廠牌與型號為 HORIBA Jobin Yvon ULTIMA 2C。

土壤微生物之分離培養與鑑定

採集土壤先經混勻後秤取 10 g 濕土，加入無菌水中進行連續稀釋，稀釋液以瓊脂平板 (Agar Plate) 分離培養微生物 (Wollum II 1982)。以營養瓊脂 (Nutrient Agar, NA) 培養基分離培養土壤之細菌，以馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (Potato Dextrose Agar, PDA) 培養基分離培養土壤之真菌，以澱粉酪蛋白瓊脂 (Starch Casein Agar, SCA) 培養基分離培養土壤之放線菌。營養瓊脂培養基的成份為 1000 mL 的純水中含 3 g Beef extract、5 g Peptone、15 g Agar；馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基的成份為 1000 mL 的純水中含 200 g Potato、20 g Dextrose、15 g Agar；澱粉酪蛋白瓊脂培養基的成份為 1000 mL 的純水

中含 10 g Starch、0.3 g Casein、2 g KNO_3 、2 g NaCl、2 g K_2HPO_4 、0.05 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.02 g CaCO_3 、0.01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、15 g Agar。細菌與真菌在室溫下培養 7 天後計數菌數，放線菌在室溫下培養 14 天後計數菌數。以 Komada's medium (Komada 1975) 分離培養並計數鐮胞病原菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* 之菌數。以濕篩法與糖度離心法 (Daniels & Skipper 1982) 分離土壤中之叢枝菌根菌孢子，在實體顯微鏡下計數菌根菌數量；叢枝菌根菌孢子以 PVLG (polyvinyl alcohol lactic glycerol) (Koske & Tessier 1983) 與 Melzer's 碘液 (Hawksworth *et al.* 1995) 作成半永久片，在光學顯微鏡下根據孢子的孢壁構造及其他形態特徵鑑定菌根菌種類 (Schenck & Perez 1990)。

香蕉苗馴化與栽培

香蕉品種為北蕉，由香蕉研究所提供組織培養苗，在農業試驗所玻璃溫室進行馴化，馴化時所使用之栽培介質為 4 號南海蛭石，栽培盆為 35 格穴盤。馴化 34 天後進行第一次移植，栽培介質為泥炭土加珍珠石之混合物，混合比例為體積比 3:1，栽培盆為 35 格穴盤。移植 41 天後再進行第二次移植，移至 5 吋圓形塑膠盆。栽培介質為泥炭土加珍珠石之混合物，混合比例為體積比 3:1。第二次移植 17 天後再移植至香蕉研究所試驗田中。

叢枝菌根菌與市售微生物菌劑接種

香蕉在第一次移植至 35 格穴盤時接種農業試驗所自行培養之叢枝菌根菌 *Glomus clarum*，每株香蕉苗接種 200 個孢子，接種方式為菌土與栽培介質充分混勻。市售微生物菌劑為福壽牌活麗送 FS-BIO-1，所含菌株為假單胞菌 (*Pseudomonas putida*) 與木黴菌 (*Trichoderma asperellum*)，假單胞菌的菌種濃度為 1×10^8 cfu/g，木黴菌的厚膜孢子數為 1×10^6 spores/g，施用方法為香蕉苗移植田間後馬上澆灌，每株灌注 500 mL 稀釋 1000 倍之稀釋液，隔週再灌

1 次，共澆 2 次。

生育調查與病害調查

香蕉苗移植至試驗田前先調查其株高、葉數與總鮮重。香蕉根洗淨後以苯胺藍 (Aniline Blue) 染色 (Koske & Gemma 1989)，以格子線交叉法計算菌根菌感染率 (Giovannetti & Mosse 1980)。香蕉移植至試驗田 158 天後調查其株高、葉數、香蕉黃葉病發病率與病害程度。香蕉黃葉病發病率之判定標準如下：香蕉葉片黃化且假莖維管束褐化判定為發病，發病率 (%) = 發病株數 ÷ 總株數 × 100。香蕉黃葉病病害程度之判定分為外部病徵與內部病徵，外部病徵包括葉片黃化，假莖縱裂及假莖維管束褐化，葉片黃化等級為葉片無黃化以 '0' 表示，葉片黃化以 '1' 表示；假莖縱裂等級為假莖無縱裂以 '0' 表示，假莖縱裂以 '1' 表示；假莖維管束褐化程度分 4 級，以 '0' 表示無褐化、'1' 表輕微褐化、'2' 表中度褐化、'3' 表嚴重褐化；香蕉黃葉病內部病徵則為塊莖維管束褐化，褐化程度分 4 級，以 '0' 表示無褐化、'1' 表輕微褐化、'2' 表中度褐化、'3' 表嚴重褐化。以上香蕉黃葉病發病率與病害程度為台灣香蕉研究所現行之判定標準。

資料統計與分析

上述所有資料利用 SAS 套裝統計分析軟體先進行變方分析 (analysis of variance, ANOVA)，若處理效應顯著 ($P < 0.05$)，則再利用最小顯著性差異 (least significant difference, LSD) 測驗以比較各處理平均值間之差異性。其中，微生物菌落數及香蕉黃葉病發病率在進行 ANOVA 之前先予開方根轉換 (square-root transformation)。

結果與討論

試驗土壤理化性質分析

試驗前土壤理化性質如表 1 所示，試驗田土壤 pH 平均為 6.1 (5.8–6.7)，質地為砂質

壤土 (SL)，土壤磷含量較高，平均 490 mg/kg (178–694 mg/kg)，硼含量偏低，平均 0.3 mg/kg (0.1–0.9 mg/kg)，其他營養元素含量適中。由於土壤中磷含量已偏高，故追肥中不施磷肥。香蕉移植田間一個月後，三種處理之部分香蕉幼葉出現缺硼現象，故每株香蕉以 500 mL 硼酸液肥澆灌，硼酸液肥濃度為硼酸 0.5 mg/L (即為 2000 倍稀釋液)，隔週再灌一次，連續灌兩次，在第三週，每株香蕉另以 1.67 g 硼砂撒施後澆水，經過肥料補充後，香蕉缺硼現象慢慢消失。

香蕉移植田間 158 天後採集土壤進行理化性質分析，分析結果如表 1 所示，三種處理各項理化性質差異均未達 5% 顯著水準，但香蕉接種叢枝菌根菌處理組 (AM) 之土壤 pH 值、有效性鈣含量與有效性鎂含量為三種處理中最高者 (分別比對照組高 0.2 unit、16%、43%)，而有效性磷與有效性鐵含量皆為三種處理中最低者 (分別比對照組低 11% 與 11%)。

土壤微生物數量

試驗土壤在處理前測定其細菌、真菌、放線菌與香蕉黃葉病鐮胞病原菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cubense*) 之菌落數，結果如表 2 所示，細菌之總菌落數為 1.4×10^5 cfu/g of soil_{DW} (DW, dry weight)，真菌之總菌落數為 2.4×10^5 cfu/g of soil_{DW}，放線菌之總菌落數為 2.5×10^5 cfu/g of soil_{DW}，病原菌 *F. oxysporum* f. sp. *cubense* 之菌落數為 6.7×10^2 cfu/g of soil_{DW}。採樣土壤亦調查叢枝菌根菌之孢子數，其孢子數為 35 ± 20 spores/100 g of soil_{DW}，主要菌種為 *Gigaspora albida* 與 *Glomus mosseae*。

香蕉移植田間 158 天後採集土壤測定土壤微生物之菌落數，結果如表 2 所示，三種處理之細菌、真菌、放線菌與鐮胞病原菌之總菌落數差異均未達 5% 顯著水準。各處理之細菌總菌落數為 9.7×10^5 – 1.3×10^6 cfu/g of soil_{DW}，真菌總菌落數為 1.3×10^5 – 1.7×10^5 cfu/g of soil_{DW}，

放線菌總菌落數為 2.6×10^5 – 3.3×10^5 cfu/g of soil_{DW}，病原菌 *F. oxysporum* f. sp. *cubense* 菌落數為 2.8×10^2 – 3.8×10^2 cfu/g of soil_{DW}。採樣土壤中叢枝菌根菌之孢子數為 15 ± 13 spores/100 g of soil_{DW}，主要菌種為 *Gigaspora albida*。

叢枝菌根菌與市售微生物菌劑對香蕉生長與黃葉病病害之影響研究

香蕉苗移植田間前與移植田間 158 天後之生育調查如表 3 所示，移植至田間前三種處理中對照組之香蕉苗生長勢比其他兩處理好，株高顯著較高。香蕉移植田間前調查菌根菌感染率，接種菌根菌之香蕉其菌根菌感染率為 $20 \pm 6\%$ ，對照組為 0。移植田間 158 天後接種菌根菌之處理其香蕉生長勢最好，株高比對照組高 12.6% (高 16 cm)，而葉數比對照組多 36.9% (多 2.4 葉)。移植田間 158 天後調查香蕉黃葉病病害程度與發病率如表 4 所示，接種菌根菌處理 (AM) 之香蕉其葉片黃化程度、假莖縱裂程度、假莖維管束褐化、塊莖維管束褐化程度與發病率皆顯著小於對照組 (分別小於 25%、25%、30%、28%、21%)。香蕉接種菌根菌後再接種市售微生物菌劑 (*P. putida* 與 *T. asperellum*) 之處理，其黃葉病病害程度及發病率與對照組差異並不顯著。

根據 Whipps (2004) 的報導指出，菌根菌可降低萎凋病 (由 *Rhizoctonia*、*Fusarium* 或 *Verticillium* 所引起) 與根腐病 (由 *Phytophthora*、*Pythium* 或 *Aphanomyces* 所引起) 之發病率或降低病害的嚴重性。Whipps (2004) 將叢枝菌根菌在生物防治上的作用機制模式區分成四組：(1) 直接相互競爭或抑制；(2) 促進或改變植物的生長、營養狀態及外部形態；(3) 與植物防衛機制有關的生化改變並且誘導產生抗性；(4) 拮抗微生物相的建立。在本試驗中可得到證實的是第二組作用機制：菌根菌可促進或改變香蕉的生長、營養狀態及外部形態。

本試驗中，香蕉接種叢枝菌根菌處理組

表 1. 台灣香蕉研究所試驗前與香蕉移植 158 天後之土壤理化性質分析

Table 1. Physical and chemical properties of soils of the field used in this study prior to the experiment and at 158 days after transplanting of banana in the field

Treatment	pH (1:1)	Conductivity (μS/cm)	Soil texture	N (mg/kg)	P (mg/kg)	K (mg/kg)	Ca (mg/kg)	Mg (mg/kg)	Fe (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Zn (mg/kg)	B (mg/kg)
Before experiment ^z	6.1 ± 0.2 ^z	348 ± 103	SL ^x	90 ± 36	490 ± 146	257 ± 128	2545 ± 1296	255 ± 240	407 ± 136	58 ± 37	3.2 ± 1.4	16 ± 11	0.3 ± 0.3
CK ^y	5.8 ± 0.4 ^a	868 ± 147 ^a	SL	150 ± 34 ^a	509 ± 107 ^a	297 ± 111 ^a	2942 ± 1063 ^a	207 ± 135 ^a	425 ± 109 ^a	55 ± 27 ^a	3.0 ± 0.9 ^a	15 ± 8 ^a	0.8 ± 0.3 ^a
AM ^y	6.0 ± 0.3 ^a	829 ± 230 ^a	SL	145 ± 28 ^a	453 ± 118 ^a	288 ± 70 ^a	3415 ± 877 ^a	295 ± 159 ^a	377 ± 120 ^a	66 ± 28 ^a	2.8 ± 0.9 ^a	10 ± 3 ^a	1.0 ± 0.1 ^a
AM + BIO ^y	5.6 ± 0.3 ^a	881 ± 251 ^a	SL	144 ± 29 ^a	493 ± 114 ^a	273 ± 42 ^a	2475 ± 2141 ^a	215 ± 260 ^a	469 ± 152 ^a	46 ± 45 ^a	2.7 ± 0.4 ^a	9 ± 4 ^a	0.5 ± 0.8 ^a

^z Data collected before banana transplanting; Mean ± standard error ($n = 12$) before experiment

^y CK: control; AM: Banana seedlings inoculated with arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus clarum*; AM + BIO: Banana seedlings inoculated with *Glomus clarum*, *Pseudomonas putida* and *Trichoderma asperellum*. Data collected at 158 days after transplanting of banana; Mean ± standard error ($n = 6$). Means within each column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test.

^x SL: Sandy loam soil.

表 2. 台灣香蕉研究所試驗前與香蕉移植 158 天後之土壤微生物菌落數

Table 2. Population of soil microorganisms of the field used in this study prior to the experiment and at 158 days after transplanting of banana

Treatment	Bacteria (cfu/g soil)	Fungi (cfu/g soil)	Actinomycetes (cfu/g soil)	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (cfu/g soil)
Before experiment ^z	$1.4 \times 10^5 \pm 0.3 \times 10^5$ ^z	$2.4 \times 10^5 \pm 0.5 \times 10^5$	$2.5 \times 10^5 \pm 0.4 \times 10^5$	$6.7 \times 10^2 \pm 1.6 \times 10^2$
CK ^y	$12.2 \times 10^5 \pm 4.2 \times 10^5$ ^a	$1.7 \times 10^5 \pm 0.8 \times 10^5$ ^a	$2.6 \times 10^5 \pm 1.2 \times 10^5$ ^a	$3.8 \times 10^2 \pm 2.0 \times 10^2$ ^a
AM ^y	$9.7 \times 10^5 \pm 3.2 \times 10^5$ ^a	$1.4 \times 10^5 \pm 1.0 \times 10^5$ ^a	$3.3 \times 10^5 \pm 2.6 \times 10^5$ ^a	$3.7 \times 10^2 \pm 2.0 \times 10^2$ ^a
AM + BIO ^y	$12.5 \times 10^5 \pm 2.3 \times 10^5$ ^a	$1.3 \times 10^5 \pm 0.7 \times 10^5$ ^a	$2.7 \times 10^5 \pm 2.1 \times 10^5$ ^a	$2.8 \times 10^2 \pm 0.8 \times 10^2$ ^a

^z Data collected before banana transplanting; Mean ± standard error ($n = 12$) before experiment.

^y CK: control; AM: Banana seedlings inoculated with arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus clarum*; AM + BIO: Banana seedlings inoculated with *Glomus clarum*, *Pseudomonas putida* and *Trichoderma asperellum*.

^x Data collected at 158 days after transplanting of banana. Mean ± standard error ($n = 6$) at 158 days after transplanting of banana. Means within each column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test. Data were square-root transformed prior to analysis.

表 3. 香蕉移植前與移植 158 天後之生育調查

Table 3. Growth of banana plants at transplanting and at 158 days after growing in the field

Treatment ^z	At the time of transplanting		At 158 days after transplanting to the field	
	Plant height (cm)	No. leaves/plant	Fresh weight (g)	Plant height (cm)
CK	19.8 ± 2.3 ^a	8.1 ± 0.8 ^a	66.2 ± 8.6 ^a	127 ± 17 ^{ab}
AM	17.6 ± 1.6 ^b	7.6 ± 0.9 ^a	60.3 ± 13.7 ^a	143 ± 18 ^a
AM + BIO	17.6 ± 1.6 ^b	7.6 ± 0.9 ^a	60.3 ± 13.7 ^a	121 ± 10 ^b

^z CK: control; AM: Banana seedlings inoculated with arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus clarum*; AM + BIO: Banana seedlings inoculated with *Glomus clarum*, *Pseudomonas putida* and *Trichoderma asperellum*.

^y Mean ± standard error ($n = 6$). Means within each column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test.

表 4. 香蕉移植 158 天後黃葉病之發病率與病害程度

Table 4. Incidence and severity (leaf yellowing, pseudostem splits, vessel browning of pseudostem and vessel browning of corm) of *Fusarium* wilt of banana transplanted in the field for 158 days

Treatment ^z	Disease incidence (%)	Leaf yellowing	Pseudostem splits	Vessel browning of pseudostem	Vessel browning of corm
CK	88 ± 15 a ^y	0.91 ± 0.14 a	0.83 ± 0.20 a	2.06 ± 0.27 a	2.54 ± 0.36 a
AM	67 ± 15 b	0.68 ± 0.39 b	0.62 ± 0.32 a	1.45 ± 0.91 b	1.83 ± 1.11 b
AM + BIO	90 ± 12 a	0.89 ± 0.33 a	0.79 ± 0.28 a	2.04 ± 0.77 a	2.49 ± 0.93 a

^z CK: control; AM: Banana seedlings inoculated with arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus clarum*; AM + BIO: Banana seedlings inoculated with *Glomus clarum*, *Pseudomonas putida* and *Trichoderma asperellum*.

^y Mean ± standard error ($n = 6$). Means within each column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test. Percentage data were square-root transformed prior to analysis.

(AM) 之發病率與病害程度皆比對照組低，這可能亦與土壤理化性質有關。接種菌根菌之處理，其土壤 pH 值、有效性鈣含量與有效性鎂含量為三種處理中最高者，而有效性磷與有效性鐵含量皆為三種處理中最低者，這可能是菌根菌可幫助香蕉吸收土壤中之磷與鐵，使被磷固定之鈣與鎂釋放至土壤中，促使土壤 pH 值提高。根據 Domínguez *et al.* (2001) 調查發現香蕉抑病土之土壤 pH 值較高，而其可利用性鐵濃度較低。Chuang (1988) 分析土壤樣品之 pH 值、鈣、鎂、鉀、磷與有機質含量，發現土壤 pH 值與鈣含量皆與香蕉黃葉病菌厚膜孢子發芽率成負相關。在本試驗中土壤理化性質的改變應是促使香蕉黃葉病發病率與病害程度降低之重要因子。

接種菌根菌後再接種市售微生物菌劑處理組，並未如預期的使香蕉黃葉病之病害程度與發病率降低，反而抵消了菌根菌的接種效果。Mohandas *et al.* (2004) 研究指出接種螢光假單胞菌可降低鐮胞病原菌的感染率 72%，Nel *et al.* (2006) 研究指出木黴菌可降低香蕉黃葉病發生率，本試驗所使用之市售微生物菌劑 *P. putida* 與 *T. asperellum* 在 PDA 培養基上與鐮胞病原菌作對峙試驗時，亦可抑制鐮胞病原菌之生長，但田間試驗無法表現出抑制的效果。

由以上結果可知，接種菌根菌雖可降低香蕉黃葉病之病害程度與發病率，但降低病害的

幅度還不能符合實際的需要，還要搭配其他因子，如拮抗微生物、忌避作物等，未來將朝拮抗微生物之篩選與綜合農耕法來努力。

引用文獻 (Literature cited)

- Alabouvette, C. 1986. *Fusarium*-wilt suppressive soils from the Châteaurenard region: review of a 10-year study. *Agronomie* 6:273–284.
- Amir, H. and C. Alabouvette. 1993. Involvement of soil abiotic factors in the mechanism of soil suppressiveness to *Fusarium* wilts. *Soil Biol. Biochem.* 25:157–164.
- Chuang, T. Y. 1988. Studies on the soils suppressive to banana *Fusarium* wilt II. Nature of suppression to race 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in Taiwan soils. *Plant Prot. Bull.* 30:125–134. (in Chinese with English abstract)
- Chuang, T. Y. 1991. Suppressive soil of banana *Fusarium* wilt in Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 33:133–141. (in Chinese with English abstract)
- Daniels, B. A. and H. D. Skipper. 1982. Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. p.20–45. *in: Methods and Principle of Mycorrhizal Research.* (Schenck, N. C., ed.) The Amer. Phytopathol. Soc. St. Paul. 244 pp.
- Domínguez, J., M. A. Negrín, and C. M. Rodríguez. 2001. Aggregate water-stability, particle-size and soil solution properties in conducive and suppressive soils to *Fusarium* wilt of banana from Canary Islands (Spain). *Soil Biol. Biochem.* 33:449–455.
- Getha, K., S. Vikineswary, W. H. Wong, T. Seki, A. Ward, and M. Goodfellow. 2005. Evaluation of *Streptomyces* sp. strain g10 for suppression of

- Fusarium* wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* 32:24–32.
- Giovannetti, M. and B. Mosse. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84:489–500.
- Hawksworth, D. L., P. M. Kirk, B. C. Satton, and D. N. Pegler. 1995. *Dictionary of the Fungi*. 8th ed. University Press. Cambridge. 437 pp.
- Höper, H., C. Steinberg, and C. Alabouvette. 1995. Involvement of clay type and pH in the mechanisms of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt of flax. *Soil Biol. Biochem.* 27:955–967.
- Hwang, S. C. 2002. Application of tissue culture technology for controlling *Fusarium* wilt of banana. *Plant Pathol. Bull.* 11:57–61.
- Komada H. 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Rev. Plant Prot. Res.* 8:114–125.
- Koske, R. E. and B. Tessier. 1983. A convenient, permanent slide mounting medium. *Newsletter Mycol. Soc. Amer.* 34:59.
- Koske, R. E. and J. N. Gemma. 1989. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycol. Res.* 92:486–488.
- Lo, C. H. 2005. *Guidelines of Fertilizer Application in Taiwan*. Council of Agriculture, Executive Yuan Pub. Taipei. 154 pp. (in Chinese)
- Mehlich, A. 1984. Mehlich-3 soil test extractant: a modification of Mehlich-2 extractant. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 15:1409–1416.
- Mohandas, S., M. Manamohan, R. D. Rawal, S. Chakraborty, H. Sreekantappa, R. Manjula, and H. C. Lakshmikantha. 2004. Interaction of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* with *Pseudomonas fluorescens* precolonized to banana roots. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20:651–655.
- Nel, B., C. Steinberg, N. Labuschagne, and A. Viljoen. 2006. The potential of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other biological control organisms for suppressing *Fusarium* wilt of banana. *Plant Pathol.* 55:217–223.
- Peng, H. X., K. Sivasithamparam, and D. W. Turner. 1999. Chlamydospore germination and *Fusarium* wilt of banana plantlets in suppressive and conducive soils are affected by physical and chemical factors. *Soil Biol. Biochem.* 31:1363–1374.
- Sanjeevk, K. and A. Eswaran. 2008. Efficacy of micro nutrients on banana *Fusarium* wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*) and its synergistic action with *Trichoderma viride*. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj* 36:52–54.
- Schenck, N. C. and Y. Perez. 1990. *Manual for the Identification of VA Mycorrhizal Fungi*. Synergistic Publication. Gainesville. 286 pp.
- Stotzky, G. and R. T. Martin. 1963. Soil mineralogy in relation to the spread of *Fusarium* wilt of banana in Central America. *Plant Soil.* 18:317–337.
- Thangavelu, R., A. Palaniswami, S. Doraiswamy, and R. Velazhahan. 2003. The effect of *Pseudomonas fluorescens* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* on induction of defense enzymes and phenolics in banana. *Biol. Plant.* 46:107–112.
- Whipps, J. M. 2004. Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Can. J. Bot.* 82:1198–1227.
- Wollum II, A. G. 1982. Culture methods for soil microorganisms. p.781–802. *in: Methods of Soil Analysis, Part 2- Chemical and Microbiological Properties*. (Page, A. L., R. H. Miller, and D. R. Keeney, eds.) Amer. Soc. Agro. Madison. 1159 pp.

Using Arbuscular Mycorrhizal Fungus and Other Microorganisms for Control of *Fusarium* Wilt of Banana¹

Su-Chen Lin^{2,4}, Chao-Yi Wang², and Ching-Chung Su³

Abstract

Lin, S. C., C. Y. Wang, and C. C. Su. 2012. Using arbuscular mycorrhizal fungus and other microorganisms for control of *Fusarium* wilt of banana. J. Taiwan Agric. Res. 61:241–249.

Fusarium wilt of banana (*Musa acuminata*) caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* is one of the important factors limiting the development of banana industry in Taiwan. The objective of this study was to conduct a field experiment on control of *Fusarium* wilt of banana by microbial agents. Three microbial agents were used in this study including one mycorrhizal fungus *Glomus clarum*, which was developed at Taiwan Agricultural Research Institute (TARI) and two other agents, *Pseudomonas putida* and *Trichoderma asperellum*, which were mixed in a commercial product. Banana tissue culture from Taiwan Banana Research Institute (TBRI), was acclimated in TARI in September 2009. The tissue cultured plantlets, after 34 days acclimation, were inoculated with *G. clarum* 200 spores per plant, and the seedlings were thereafter 92 days acclimation, transplanted to the trial field of TBRI, located in Pingtung County. On the same day with transplanting, the seedlings were inoculated each with *Pseudomonas putida* (1×10^8 cfu per plant) and *Trichoderma asperellum* (1×10^6 spores per plant). At 158 days after transplanting banana to the field, plants infected by *F. oxysporum* f. sp. *cubense* were recorded and data on disease incidence and severity were collected and analyzed. Results showed that, compared to untreated control, banana plants treated with *G. clarum* resulted in 12.6% increase (or 16 cm increase) in plant height and 36.9% increase (or increase of 2.4 leaves) in number of leaves. Also, treatment of *G. clarum* resulted in a significant ($P < 0.05$) reduction in incidence of *Fusarium* wilt of banana (67%), compared to in untreated control (88%). However, banana plants pretreated with *G. clarum*, and then post-inoculated with the commercial product (*Pseudomonas* and *Trichoderma*) did not cause a significant difference ($P > 0.05$) in the incidence and severity of *Fusarium* wilt for banana, compared to the untreated control. This study indicates that the arbuscular mycorrhizal fungus *G. clarum* is an effective agent for reducing incidence and severity of *Fusarium* wilt of banana, but further studies on other control measures are needed for achieving effective protection of this devastating disease of banana under field conditions.

Key words: Arbuscular mycorrhizae, *Glomus clarum*, Banana, *Musa acuminata*, *Fusarium* wilt, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

-
1. Contribution No. 2693 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: July 26, 2012.
 2. Respectively, Assistant Researcher and Research Assistant, Agricultural Chemistry Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Assistant Researcher, Taiwan Banana Research Institute, Pingtung, Taiwan, ROC.
 4. Corresponding author, e-mail: linmay@tari.gov.tw; Fax: (04)23302805.