

國立臺灣大學生物資源暨農學院

植物醫學碩士學位學程

碩士論文

Master Program for Plant Medicine

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

茶樹赤葉枯病之流行病學及非農藥防治

Epidemiological study and non-pesticide control of tea brown blight
disease

蔡志千

Tsai, Chih-Chien

指導教授：孫岩章 博士

Advisor: En-Jang Sun, Ph.D.

中華民國 103 年 7 月

July, 2014



誌謝



首先感謝口試委員楊宏仁分所長、郭章信教授、洪挺軒教授讓我可以通過此次的考試也指我許多論文需要注意的細節，還有最重要的孫岩章老師讓我對於植物醫學有更深的認識，也教導我許多從論文寫作到實驗的技巧等，也要感謝學長姐們友倫、筱娟、勝志、及昉、奕德、玉瑤、品叡、桓瑜、明毅、柏寬給與諸多幫助，也感謝學弟妹們鈺平、僑莉、佩琳、嘉玲、立雯、韋辰、彥安時常幫我做東做西，也感謝我的好夥伴政融給予很多建議。也感謝許多系上老師給予協助與建議，還有好同學們佳燕、秉峰、羽萱、庭禕、又嘉，給予許多支持。


在論文寫作與實驗上，多靠茶改場的秀蕊與思穎學姊給予非常多的幫助，也感謝茶改場邱垂豐課長與許多人的幫助，以及坪林陳陸合師兄、林金定先生以及貓空高振盛先生提供研究用場地，以及颱風中心大氣資料庫提供氣候相關資料。

也要感謝我偉大的家人們提供我許多的資料，還帶著我上山下海順利完成論文，最後要感謝自己，秉持著信念走到最後，才得以完成這份論文。



中文摘要

茶樹 *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze 為多年生常綠灌木至小喬木植物，經加工成為嗜好性飲料，因其清香深受國人喜愛而有大量之種植。茶樹病害甚多，其中以炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)所造成之茶赤葉枯病最為常見。本研究為調查茶赤葉枯病之流行及所造成之危害並研究防治之道，於北部坪林、文山、楊梅三地區進行病害嚴重度之監測，又因於坪林地區發現到有新芽焦枯之芽枯病產生，經組織塊分離法可得到炭疽病菌(*Colletotrichum* spp.)與擬盤多毛孢菌(*Pestalotiopsis* spp.)兩種病原真菌，經柯霍氏準則接種嫩芽確認芽枯病主要由茶赤葉枯病病原菌所造成，而經分生技術鑑定為茶赤葉枯病病原(*C. gloeosporioides*)。芽枯病於坪林冬天可造成20~50%之新芽焦枯，造成冬茶產量下降甚至無法採收。該病菌在不同溫度下培養發現於25°C菌絲生長最佳，於15°C下生長較差，在35°C下則無法生長。而依據2013年12月至2014年6月流行病學研究調查顯示，該病害於坪林地區月均溫較低、月平均相對溼度較低及月平均風速較大時易發病，且與坪林地區之赤葉枯病有中度至高度正相關，說明赤葉枯病於葉片產生之孢子，可經風雨飛濺至嫩芽。而茶赤葉枯病則是於月平均風速較大時，較易發病，且青心烏龍比台茶十二號、四季春及鐵觀音皆較感病。由於近年非農藥防治逐漸為大眾所青睞，也免除農藥殘留之疑慮，因此選用植物萃取液及拮抗微生物來進行防治試驗。經選用大蒜、薑、薑黃、肉桂、丁香、五味子及藿香等七種植物萃取液進行菌絲生長抑制與孢子發芽抑制試驗，發現酒精萃取之丁香、肉桂及藿香皆具有抑菌效果，然只有薑黃之酒精萃取液及蒜之酒精萃取液(0.2%)於盆栽防治試驗中具抑制芽枯病之效果，其抑制率僅25%。經拮抗菌對峙試驗顯示商品化之枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)與鏈黴菌(*Streptomyces* sp.)YU01均有抑菌效果，但於盆栽試驗中發現鏈黴菌 YU01於接種前一天施用有83%之抑制率，枯草桿菌則無。而於農



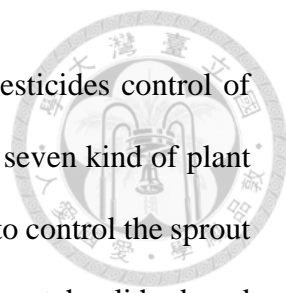
藥對芽枯病菌絲生長抑制試驗證實測試之13種藥劑中免賴得、嘉賜貝芬可有效防治此病原菌。而根據接種試驗結果，發現芽枯病菌除青心烏龍外對四季春、臺茶十二號及大葉烏龍等品種皆有病原性，而以芒果炭疽病、草莓炭疽病、咖啡炭疽病等病原菌接種茶樹嫩芽，皆不會造成芽枯。本研究於田間調查、病原性測試結果皆證明茶赤葉枯病單獨感染嫩芽可造成芽枯病，但為何此病徵只於坪林地區發生仍有待進一步之研究。

關鍵字：茶赤葉枯病、炭疽病、非農藥防治、芽枯病

Summary



Tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) is a kind of evergreen perennial shrub or small tree, can be processed to the most widely consumed beverage in the world. Due to its fragrant flavor, tea has been massively grown in Taiwan. Tea can be affected by many diseases, among them the tea brown blight disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) is the most common fungus disease in the field. To investigate the severity of tea brown blight disease, and to control it, this study monitored the disease severity of tea brown blight at Pinglin, Wenshan and Yangmei areas. As a new sprout wilt disease was found at Pinglin, New Taipei, tissue isolation methods were conducted to obtain the suspect pathogen. Results showed that both *Colletotrichum* and *Pestalotiopsis* can be isolated from the wilting sprout. Through the rules of Koch's postulates and molecular identification, we confirmed that the sprout wilt is mainly caused by *C. gloeosporioides*. Sprout wilt disease can cause 20 to 50 percent of yield loss in Pinglin, resulting in severe economic impact on winter tea in Pinglin area. Culturing this pathogen at different temperatures showed that this pathogen grows best at 25°C and slower at 15°C, but cannot grow at 35°C. Basing on epidemiological study from December 2013 to June 2014, this disease prefer the low temperature, low humidity and high wind speed. The relationship between sprout wilt and tea brown blight disease is generally positively correlated, indicating that the spores from tea leaves with brown blight disease can splash to sprout by wind and rain and cause the disease. On the other hand, brown blight disease occurred more severe in season of high speed wind. As compared to Ttes No.12, Shy Jih Chuen and Tieguanyin, the cultivar Chih Shih Oolong is the most sensitive to brown blight disease.



In order to eliminate the concerns of pesticide residues, non-pesticides control of plant disease is right now a favorite by farmer. Therefore we choose seven kind of plant to prepare their extracts and two antagonistic microorganisms to test to control the sprout wilt in this study. They are ginger, turmeric, cinnamon, cloves, cablin potchouli herb and Chinese magnoliavine fruit. The test of their extracts for effect on mycelial growth and spores germination, showed that only ethanol extract of clove, cinnamon and cablin potchouli herb have some inhibition potential against the pathogen. However, only the ethanol extract of turmeric and garlic (0.2%) exhibit the inhibition rate of about 25% in pot plant test. On the other side, antagonism microorganisms *Streptomyces* (*Streptomyces* sp.) YU01 and *Bacillus subtilis* also have inhibition effect on this pathogen in dual culture experiment. *Streptomyces* YU01 even has 83% inhibition rate to control the sprout wilt disease in pot plant test, when applied one day before the inoculation. Whereas the *Bacillus subtilis* has no inhibition effect in pot plant test. A total of 13 fungicides were screened for their control rates on tea brown blight pathogen by mycelial growth inhibition test. Results showed that both benomyl, kasugamycin plus carbendazim, have the best potential to control the disease. In this study, we found that the sprout wilt pathogen can infect not only the Chin Shin Oolong cultivar, but also the cultivar Ttes No.12, Shy Jih Chuen and Dah Yeh Oolong. We also found that anthracnose pathogens from mango, strawberry and coffee, cannot cause the tea sprout wilt. Our study proved that the pathogen from brown blight can transmit and cause sprout wilt as shown in our field survey and pathogenicity test. However the reason of sprout wilt only occur in Pinglin area still need further studies in the future.

Key words: Brown blight disease; *Colletotrichum gloeosporioides*; non-pesticide control; sprout wilt.

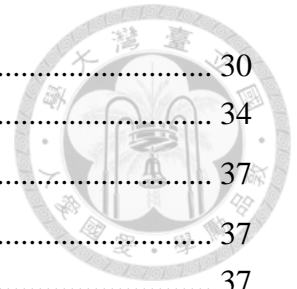
目錄



口試委員會審定書	i
誌謝	ii
中文摘要	iii
Summary.....	v
目錄	vii
表目錄	xi
圖目錄	xiii
第一章 前言	1
一、茶樹之簡介	1
二、茶樹之品種介紹	2
三、茶樹之栽培管理	3
四、研究目的	5
第二章 前人研究	6
一、炭疽病菌	6
二、茶赤葉枯病	7
三、非農藥防治	8
四、植物萃取液防治法	9
五、拮抗微生物防治法	11
六、流行病學	13
第三章 材料與方法	14



一、臺灣北部茶樹赤葉枯病及芽枯病之田間調查	14
二、茶赤葉枯病及芽枯病之病原菌分離、保存及鑑定	14
(一)嫩芽芽枯之病原菌分離	14
(二)赤葉枯病之病原菌分離	15
三、茶赤葉枯病及芽枯病分離株之病原性測試	15
(一)供試健康茶樹之栽種	15
(二)茶樹嫩芽以孢子懸浮液針刺接種試驗	15
(三)茶樹葉部以孢子懸浮液進行傷口接種之試驗	16
四、人工接種茶赤葉枯病及芽枯病之病原再分離	17
五、茶赤葉枯病及芽枯病分離株之鑑定	17
(一)形態鑑定	17
(二)分子鑑定	17
六、溫度對芽枯病菌生長速度之影響	19
七、北部地區茶赤葉枯病及芽枯病流行病學調查	19
(一)調查地點及品種	19
(二)調查方法	20
(三)氣象資料取得	20
八、芽枯病之非農藥防治	21
(一)防治資材取得	21
(二)植物萃取液對孢子發芽抑制之試驗	23
(三)植物萃取液對菌絲生長抑制之試驗	23
(四)拮抗微生物對峙培養試驗	24
(五)植物萃取液對芽枯病之盆栽防治試驗	24
(六)拮抗微生物對芽枯病之盆栽防治試驗	24
九、農藥對芽枯病菌絲生長抑制試驗	25
十、以不同來源炭疽病菌對茶樹進行病原性之檢定	26
十一、以芽枯病菌對不同品種茶樹之病原性測試	26
第四章 結果	27
一、臺灣北部地區茶樹赤葉枯病及芽枯病之田間調查	27
二、茶赤葉枯病及芽枯病之病原菌分離及初步鑑定	30



(一)嫩芽芽枯之病原菌分離	30
(二)赤葉枯病葉之病原菌分離	34
三、茶赤葉枯病及芽枯病分離株之病原性測試	37
(一)供試健康茶樹之栽種	37
(二)茶樹嫩芽以孢子懸浮液針刺接種試驗之結果	37
(三)茶樹葉部以孢子懸浮液進行傷口接種之結果	41
四、人工接種茶赤葉枯病及芽枯病之病原再分離	42
五、茶赤葉枯病及芽枯病分離株之鑑定	43
(一)茶赤葉枯病菌芽枯型分離株 BC-5，DNA 片段之 PCR 增幅及 ITS 序列分析	43
(二)病原菌之形態學鑑定	47
六、溫度對芽枯病菌生長速度之影響	50
七、北部地區茶赤葉枯病及芽枯病流行病學調查	51
(一)茶赤葉枯病危害嚴重度之變遷	51
(二)坪林地區芽枯病之流行趨勢	54
八、芽枯病之非農藥防治	58
(一)植物萃取液對芽枯病菌孢子發芽之抑制試驗結果	58
(二)植物萃取液對芽枯病菌菌絲生長抑制試驗	61
(三)拮抗微生物對芽枯病菌對制培養試驗	65
(四)植物萃取液對芽枯病之盆栽防治試驗	65
(五)拮抗微生物對芽枯病之盆栽防治試驗	69
九、農藥對芽枯病菌絲生長抑制試驗	72
十、以不同來源炭疽病菌對茶樹進行病原性之檢定	75
十一、以芽枯病菌對不同品種茶樹之病原性測試	75
第五章 討論	76
一、臺灣北部茶赤葉枯病及芽枯病之田間調查	76
二、茶赤葉枯病及芽枯病之病原分離及初步鑑定	76
三、茶赤葉枯病及芽枯病分離株之病原性檢測	77
四、人工接種茶赤葉枯病及芽枯病之病原性再分離	78
五、茶赤葉枯病及芽枯病分離株之鑑定	78

六、溫度對芽枯病菌生長速度之影響	79
七、北部地區茶赤葉枯病及芽枯病流行病學調查	79
八、芽枯病之非農藥防治	80
九、農藥對芽枯病菌絲生長抑制試驗	82
十、以不同來源炭疽病菌對茶樹進行病原性之檢定	82
十一、以芽枯病菌對不同品種茶樹之病原性測試	83
十二、結論與未來發展	83
參考文獻	84



表目錄



表 1	茶赤葉枯病葉片罹病級數標準。.....	20
表 2	本研究用以製備萃取液之植物種類及其處理方法。.....	22
表 3	臺灣北部地區茶赤葉枯病及芽枯病病害調查結果。.....	28
表 4	臺灣北部茶樹芽枯病以組織塊分離法分離病原之結果。.....	31
表 5	臺灣北部茶樹芽枯病以稀釋分離法分離病原之結果。.....	31
表 6	臺灣北部茶樹芽枯病分離所得真菌分離株之編號及其來源。.....	32
表 7	臺灣北部茶樹赤葉枯病斑以組織塊分離法分離病原之結果。.....	35
表 8	臺灣北部茶樹赤葉枯病斑分離所得真菌分離株之編號及其來源。.....	36
表 9	臺灣北部茶赤葉枯病分離所得分離株以針刺接種青心烏龍後之發病結果。.....	38
表 10	臺灣北部茶樹芽枯病分離所得分離株以針刺接種青心烏龍後之發病結果。.....	39
表 11	人工接種以稀釋分離法分離芽枯病之結果。.....	43
表 12	臺灣北部茶赤葉枯病分離株 BC-5 以引子對 ITS1/ITS4 經 PCR 增幅所得之 DNA 序列至 NCBI 網站基因庫比對之結果。.....	46
表 13	茶赤葉枯病菌株 BC-5 在不同溫度下以 PDA 培養 5 天之菌絲長度。...	50
表 14	2013 年 12 月至 2014 年 6 月坪林地區茶赤葉枯病危害嚴重度與當地氣象資料之相關分析。.....	52
表 15	2013 年 12 月至 2014 年 5 月楊梅地區茶赤葉枯病危害嚴重度與當地氣象資料之相關分析。.....	54
表 16	2013 年 12 月至 2014 年 6 月文山地區茶赤葉枯病危害嚴重度與當地氣象資料之相關分析。.....	54
表 17	2013 年 12 月至 2014 年 6 月坪林地區芽枯病罹病率與茶赤葉枯病危害嚴	

重度之相關分析。.....	55
表 18 2013 年 12 月至 2014 年 6 月坪林區芽枯病罹病率與氣象資料之相關分析。.....	56
表 19 不同植物萃取液對茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 孢子發芽率之影響。 .	59
表 20 七種植物之萃取液對茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 之孢子發芽抑制率。 .	60
表 21 不同植物萃取液對茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 菌絲生長之影響。	62
表 22 七種植物萃取液對茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 之菌絲生長抑制率。 .	64
表 23 五種植物萃取液對茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 在盆栽防治試驗之結果。	66
表 24 不同拮抗微生物對茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 在盆栽防治試驗之結果。	70
表 25 共十三種藥劑對茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 菌絲生長之影響。	72
表 26 共十三種藥劑對茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 之菌絲生長抑制率。	73
表 27 四種不同炭疽病菌接種於茶樹造成芽枯之發病率。	75
表 28 茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 接種於不同品種茶樹之發病率。	75

圖目錄



圖 1、茶樹嫩芽以孢子懸浮液接種後保溼處理之狀況。.....	16
圖 2、新北市坪林區有機茶園青心烏龍芽枯病之萎凋病徵。.....	28
圖 3、新北市坪林區有機茶園青心烏龍赤葉枯病之炭疽病徵。.....	29
圖 4、桃園縣楊梅區茶園青心烏龍赤葉枯病之炭疽病徵。.....	29
圖 5、臺灣北部茶芽枯病分離所得之擬盤多毛孢菌分離株之分生孢子形態。	33
圖 6、臺灣北部茶芽枯病分離所得之炭疽病菌分離株之分生孢子形態。.....	33
圖 7、臺大中非大樓頂樓溫室中健康茶苗之栽種情形。.....	37
圖 8、茶樹赤葉枯病菌分離株 BC-5 以針刺接種青心烏龍嫩芽 5 天後之發病情 形。.....	40
圖 9、臺灣北部茶芽枯病分離株 BC-X 以針刺接種青心烏龍 8 天後之發病情形。	41
圖 10、臺灣北部茶赤葉枯病分離株以孢子懸浮液進行傷口接種後於葉片出現之 病徵。.....	42
圖 11、臺灣北部茶赤葉枯病分離株 BC-5 以引子對 ITS1/ITS4 進行 PCR 增幅分所 得之 DNA 片段電泳圖譜。.....	44
圖 12、臺灣北部茶赤葉枯病分離株 BC-5 以引子對 ITS1/ITS4 進行 PCR 增幅後所 得之 DNA 序列。.....	45
圖 13、茶赤葉枯病菌芽枯型菌株 BC-5 於葉上產生分生孢子盤(A)，及其分生孢 子形態(B)。.....	47
圖 14、茶赤葉枯病菌芽枯型菌株 BC-5 分生孢子之發芽形態。.....	48
圖 15、茶赤葉枯病菌芽枯型菌株 BC-5 於載玻片培養基上產生之壓器。.....	48
圖 16、茶赤葉枯病菌芽枯型菌株 BC-5 培養於 PDA 之菌落形態。.....	49
圖 17、茶赤葉枯病菌芽枯型菌株 BC-5 於載玻片培養基上產生之分生孢子梗 ...	49
圖 18、茶赤葉枯病菌芽枯型菌株 BC-5 在不同溫度下以 PDA 培養五天菌絲長度	

之比較。.....	50
圖 19、臺灣北部茶赤葉枯病於 2013 年 12 月至 2014 年 6 月病勢發展曲線。....	52
圖 20、2013 年 12 月至 2014 年 6 月坪林地區月平均相對溼度與茶赤葉枯病危害嚴重度之相關性。.....	53
圖 21、2013 年 12 月至 2014 年 6 月坪林地區月平均風速與茶赤葉枯病危害嚴重度相關分析。.....	53
圖 22、2013 年 12 月至 2014 年 6 月坪林地區芽枯病病勢發展曲線。.....	55
圖 23、2013 年 12 月至 2014 年 6 月坪林地區芽枯病罹病率對月均溫之相關性。.....	56
圖 24、2013 年 12 月至 2014 年 6 月坪林地區芽枯病罹病率對月平均相對溼度之相關性。.....	57
圖 25、2013 年 12 月至 2014 年 6 月坪林地區芽枯病罹病率對月平均風速之相關性。.....	57
圖 26、酒精及農藥處理對茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 孢子發芽率之影響。 ...	59
圖 27、七種植物之萃取液對茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 孢子發芽率之影響。 60	
圖 28、七種植物之萃取液對茶赤葉枯病菌 BC-5 之孢子發芽抑制率。.....	61
圖 29、酒精及農藥處理對茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 菌絲長度之影響。.....	63
圖 30、七種植物之萃取液對茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 菌絲長度之影響。 ...	63
圖 31、七種植物之萃取液對茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 之菌絲生長抑制率。 64	
圖 32、枯草桿菌及放線菌 YU01 對茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 對峙培養之菌絲生長結果。.....	65
圖 33、大蒜酒精萃取液防治茶赤葉枯病效果。.....	67
圖 34、薑黃酒精萃取液防治茶赤葉枯病效果。.....	68
圖 35、使用免賴得防治芽枯型茶赤葉枯病之效果。.....	69
圖 36、前一天施用放線菌 YU01 對茶赤葉枯病菌之防治結果。.....	71

圖 37、共 13 種藥劑對於茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 之菌絲生長抑制率比較。

74



第一章 前言



一、茶樹之簡介

茶樹 (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) 為多年生常綠灌木至小喬木植物，在植物分類上屬於雙子葉植物綱 (Magnoliophyta) 杜鵑花目 (Ericales) 山茶科 (Theaceae)。林奈氏於 1753 年將茶樹學名訂為 *Thea sinensis* L., 後又改為 *Camellia sinensis* L., 1823 年印度阿薩姆野生種被發現後學者再將茶樹分為印度大葉種 (*Camellia sinensis* var. *assamica*) 及中國小葉種 (*Camellia sinensis* var. *sinensis*)。現今國際間通用的茶樹學名為 *Camellia sinensis* (L.) Kuntze. (阮, 1995)

茶葉原產於中國、印度，約於西元 725 年傳到日本栽培，西元 828 年傳到韓國，到十六世紀時西方國家開始接觸中國茶葉，臺灣約於清朝嘉慶 15 年 (西元 1810 年) 開始種植茶樹，過去臺灣的茶業有非常輝煌的歷史，目前全年產量約一萬四千公噸，種植面積約一萬三千公頃(賴, 2013)。

茶樹嫩芽可經過加工成為嗜好性飲料，因其清香深受國人喜愛，故在臺灣有大量之種植，主要分布於南投縣 (6,821 公頃)、嘉義縣 (2,189 公頃)、新北市 (1,674 公頃)、桃園縣(758 公頃)、新竹縣(535 公頃)，其他縣市如苗栗縣、雲林縣、臺中市、臺東縣、高雄市、宜蘭縣、花蓮縣、臺北市皆有生產 (賴, 2013)。

二、茶樹之品種介紹

臺灣茶樹品種主要由大陸引入，在 20 世紀中後期才開始有本土茶樹的育種，最初由平鎮及魚池茶葉試驗所進行，至茶葉改良場成立後再積極推展，首先於民國 58 年育成臺茶一號、二號、三號及四號等四種優良品種，至民國 103 年止經正式登記命名者共有 21 品種(邱等，2009)，目前栽培品種以青心烏龍、清新大有、臺茶十二號、臺茶十三號、四季春為主(林和蕭，2004)，以下對本研究使用之茶樹品種加以介紹：

1. 青心烏龍(*Camellia sinensis* cv. Chin Shin Oolong)：於臺灣各茶區均有栽培，樹身略小，枝葉著生多，葉色較其他品種濃綠而光澤，樹性稍弱，植於貧瘠地或新墾地成活率較低，易罹患白蟻及枝枯病，抗病蟲害能力弱，耐旱性弱，適合製造包種茶及烏龍茶。
2. 臺茶十二號(*Camellia sinensis* cv. Ttes No.12) 或稱“金萱”：是以硬枝紅心為父本與臺農 8 號雜交之後裔，於西元 1981 年命名，富有茸毛，芽密度高，樹勢強產量高，採摘期長，對枝枯病有抗性，適合製作包種茶及烏龍茶，成茶帶有奶香味。
3. 四季春(*Camellia sinensis* cv. Shy Jih Chuen)：屬地方品種，由木柵農民自行選育而成，樹型中大橫張，枝葉與茶芽密生，下位枝條仍易長芽，萌芽期早，開花數多，抗病能力強，耐旱性中等，適合製作包種茶。
4. 鐵觀音(*Camellia sinensis* cv. Tieguanyin)：屬地方品種，主要分布於基隆市與臺北市文山區，樹大枝肥，枝葉疏生，萌芽期短，收量少，茶芽芽色綠帶紫，抗病能力強，耐旱性中等，適合製作包種茶(李和張，2013)。



三、茶樹之栽培管理

茶樹性喜溫暖溼潤，自南緯 45 度至北緯 38 度間均可栽培。茶樹對於溫度的適應性視品種而異，一般而言小葉種之抗寒性及抗旱性皆較大葉種為強。

茶樹最適宜生長溫度為 20°C~25°C 之間，年降雨量為 1,800~3,000 公厘，且分布平均者最佳，朝晚有霧，相對溼度經常保持在 75~80% 有利於茶芽發育及茶菁品質，反之長期乾旱或溼度過大則不適於茶樹經濟栽培。

茶樹喜好微酸性土壤，雖於不同種類土壤皆可生長，但以酸鹼度在 4.5~5.5 之間，透氣排水良好且富含腐植質及礦物質之砂質壤土或砂質黏土為佳，一般中性或鹼性土壤均不適於茶樹生長。


茶樹為異交作物，利用有性繁殖的後代無法保存品種原有特性，一般以無性之扦插苗或壓條法來進行繁殖，扦插時期依據臺灣氣候環境可分為 12 至 1 月、5 至 6 月、9 至 10 月等三個時期，其中以 12 月至翌年 1 月最適宜(阮，1995)。

種植時以行距 150~180 公分，株距 40~50 公分，每公頃定植 12,000~14,000 株為基準，於雨後、氣溫較低及土壤溼潤時種植較佳，應儘量避免晴天種植，若於晴天種植，應先將土壤溼潤，種植後再行澆水，使根部充分與土壤接觸。

種植後為減少葉片水分蒸發，應於植株離地面 20 公分處行水平式剪枝。為防止乾旱保護幼苗，應於幼苗兩側覆蓋稻草或其他乾草，以防止水份蒸發。茶樹在幼年期樹冠尚未鄰接時，茶行間因光照充足相當容易產生雜草，此時可以利用雜草抑制席、稻草、花生殼等資材覆蓋，減少人工除草的成本。

茶芽伸長至一芯五葉時即可採摘。臺灣地處亞熱帶氣候溫暖，全年自二月至十一月在不同茶區皆有茶芽可採摘，因採摘季節不同分為：早春茶、春茶、夏茶、六月白、秋茶、白露茶、冬茶等，但一般以一年採收四至五次為宜(賴，2005)。

茶樹為多年生常綠作物，可提供病蟲之食物和居所，且臺灣處亞熱帶氣候條件適合病蟲害發生，也因此病蟲害在茶園終年皆可發現。根據文獻記載，臺灣發生之茶樹病蟲害種類，蟲害方面有昆蟲綱 8 目 47 科 173 種及蜘蛛綱蟎蟬亞綱 4 科 6 種，



合計 179 種；病害包括真菌 40 種，線蟲 4 種及細菌性病害 1 種，合計 45 種，常見病害包含茶枝枯病由 *Macrophoma theicola* Petch 所造成；茶赤葉枯病由 *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. 所造成；茶褐色圓星病由 *Pseudocercospora ocellata* Deighton 所造成；茶髮狀病由 *Marasmius cinisequi* Muller ex Kalchbrenner 所造成；茶餅病由 *Exobasidium vexas* Masee 所造成；茶網餅病由 *Exobasidium reticulatum* Ito & Sawada 所造成；白紋羽病由 *Rosellinia necatrix* Prillieux 所造成；茶輪斑病由 *Pestalotiopsis theae* (Sawada) Steyaer 所造成(林和蕭，2004)。

四、研究目的

臺大植微系植醫研究室於 2009 年秋天首先於坪林地區觀察到青心烏龍嫩芽焦黑枯萎之現象，危害嚴重造成茶農經濟上之損失，暫稱之為芽枯病(孫，2009)，後經鑑定與茶赤葉枯病相同，隨後作者發現仍常發生，故對此茶樹芽枯現象加以深入研究。

本研究首先於民國 102 年 12 月至民國 103 年 6 月進行為期半年之茶園赤葉枯病或芽枯病危害嚴重度之調查，期望能對於茶赤葉枯病或芽枯病有更深層的了解，此即為流行病學之研究。在此期間再度於坪林地區發現嫩芽受到危害之現象，此病對於坪林之茶產業帶來嚴重之損害，故即進一步加以深入研究，並鑒於有機農業之需求以及農藥所帶來之負面影響，故亦嘗試以非農藥進行防治之試驗，期能有效解決此一嚴重問題，以增加茶農之產量及收益。

第二章 前人研究



一、炭疽病菌

炭疽病菌(*Colletotrichum* spp.)最早於 1790 年由 Tode 記錄歸類於 *Vermicularia* 屬，其後 Corda 於 1831 年命名，屬於真菌界(Fungi)子囊菌門(Ascomycota)、囊殼菌綱(Sordariomycetes)、小叢殼目(Glomerellales)、小叢殼科(Glomerellaceae)炭疽病菌屬(*Glomerella*) (Réblová *et al.*, 2011)，可為植物內生菌、寄生菌、腐生菌或植物病原菌(Hyde *et al.*, 2009b)。在臺灣有記錄炭疽病菌共 72 種，寄主植物種類 200 餘種(中華民國植物病理學會，2002)，炭疽病菌寄主繁多，根據記錄全世界擁有至少 470 種寄主(Sutton, 1980)，且普遍流行於熱帶地區，但在亞熱帶與溫帶也常出現，炭疽病菌以潛伏感染造成採果後之傷害而聞名(Prusky, 1992)，其中於世界各地危害廣泛之 *C. gloeosporioides* 及 *C. acutatum*，因形態特徵重疊，形成甚多隱蔽種(Cryptic species)，故兩者被認為皆屬為複合種(Species complex)(胡，2013)。

炭疽病菌因形態學混淆，缺少可供區辨之形態特徵，加上寄主範圍與病原性變化大、培養易產生變異等諸多因素，導致分類相當複雜，早期是以寄主植物之屬名作為炭疽病菌之種名，如山葡萄(*Ampelopsis heterophylla*)炭疽病學名為 *C. ampelopsidis*(中華民國植物病理學會，2002)。於 1957 年首由 von Arx 將 668 個名稱之炭疽病菌歸類至 11 個種(von Arx, 1957)，至 1992 年則由 Sutton 將之分類至 39 個種(Sutton, 1980)，至 2009 年再由 Hyde 等人整理發表炭疽病菌物種總共 66 種，加上 19 種尚須確認之物種(Hyde *et al.*, 2009a)。唯現今常用之分類則為 2012 年由 Cannon 等人所提出，係依照親源分析結果將炭疽病菌歸類為九大群(Clade)，共 119 個炭疽病菌物種(Cannon *et al.*, 2012)。

炭疽病菌在自然界中可能透過種子傳播、於土中或寄主中殘存並以分生孢子由風雨飛濺傳播，或以子囊孢子靠風傳播，當孢子落於適當寄主時，即會發芽產生壓器(Appressorium)，進而侵入植物組織，擴展後逐漸產生病徵(Cannon *et al.*, 2012)。

二、茶赤葉枯病

茶赤葉枯病最早於 1899 年於錫蘭發現，在 1982 年則被報導會侵染茶樹造成葉片褐化與枝條枯萎，並自紐西蘭傳至英國(Dickens & Cook, 1989)。此病係由 *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. 所造成，為臺灣重要茶樹病害之一，它可同時危害茶樹葉片及嫩芽，造成茶葉產量降低。

其病原菌有性世代為 *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & Schrenk，而目前定義之 *Colletotrichum gloeosporioides* 是炭疽病菌的集群(Clade)之一，鑑定上主要以 ITS gene tree 來將炭疽病菌歸類至 *C. gloeosporioides* 之中(Cannon *et al.*, 2012)。

本病在葉片感染初期會產生黃綠色小點病徵，擴大後顏色加深呈赤褐色，上有灰黑色小點，病斑後期則為灰色。本病在嫩葉上之病斑多呈褐色小點斑，在嫩枝條上，可造成枝條變黑，容易折斷(曾，2004)。

茶赤葉枯病係以分生孢子為主要傳染源，多隨雨露及灌溉水行飛濺傳播，風雨可擴大其傳播距離，各品種間抗病性之差異極大，不同植株個體之生長狀況亦可影響其發病程度(曾和陳，1984)。

三、非農藥防治

由於我國地處亞熱帶，氣候高溫多溼，適合多種病害發生與傳播，農民也多以化學農藥來防治病害，然而農藥之使用雖經濟便利但對於環境也有諸多負面影響。如(1)農藥殘毒：有礙消費者之健康。(2)藥害：使用不當或用量過多造成植物傷害。(3)抗藥性：經常使用農藥，使病原產生抗藥性，導致藥效不彰。(4)危害非目標生物：對於土壤內有益微生物或微小動物造成傷害。(5)環境污染：許多農藥於自然界分解較慢，可能造成水源或土壤污染。因此近年來政府極力提倡有機農業與永續農業(林等 2004)。

非化學防治之方法如使用得當，不但減少農藥使用，對病害防治亦可達事半功倍之效。現今常用之非化學防治策略包含：健康種苗、抗病育種、誘導性抗病、拮抗微生物、非農藥殺菌物質、植物營養液、土壤添加物、栽培管理、物理防治法等(林等 2004)。

四、植物萃取液防治法

非農藥殺菌物質為具有抑制病原菌之生物性或天然化學物質，近年來因有機農業之興起而逐漸受到重視，在自然界有許多天然植物或中草藥，富含許多特殊的抑菌物質如葡萄糖苷(Glucosides)、生物鹼(Alkaloids)、類萜(Terpenoids)、酚類(Phenols)、鞣質或單寧(Tannins)、類黃酮(Flavonoids)、皂素(Saponins)、類胡蘿蔔素(Carotenoids)、香豆素(Coumarin)等(謝等，2005)，可用於抑制植物病原菌或促進植物產生抗病機制，因此將之以萃取之方式製成植物萃取液來使用。

1993 年德國 BASF 曾發表大虎杖(*Reynoutria sachalinensis*)的酒精萃取物對防治觀賞作物白粉病及灰黴病有良好之防治效果，且於美國登錄為植物抽出物殺菌劑，商品名為 Milsana[®](吳，2012)。該抽出液的防病原理為誘導植物體產生系統性抗病性。植物萃取液大多用於防治植物葉部病害，其滅菌效果可與化學合成農藥相當，而與農藥相比對環境較為友善，故已廣泛引起植醫及環保人士重視(林等，2004)。

而用於炭疽病上有效植物萃取物被研究者頗多，例如大風子(*Hydnocarpus castaneus* H.F. &Th.)、及山韭菜(*Allium thumbergii* G. Don)之水萃液與乙醇萃取液被認為對於小白菜炭疽病(*C. higginsianum*)之孢子發芽抑制率可達 100%(謝等，2005)。癩瘋樹(*Jatropha curcas*)、餘甘子(*Embllica officinalis*)及萬桃花水茄(*Solanum torvum*)使用磷酸緩衝液(sodium phosphate buffer)萃取，發現可抑制香蕉炭疽病(*C. musae*)之菌絲生長(Thangavelu *et al.*, 2004)。於中國之研究則顯示芒果炭疽病(*C. gloeosporioides*)可使用肉桂(*Cinnamomum zeylanicum* (L.))、丁香(*Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L.M.Perry)及霍香(*Agastache rugosa* (Fisch. & C. A. Mey.) O. Ktze.)之丙酮萃取液抑制菌絲之生長(He *et al.*, 2009)。而在斯里蘭卡則有研究顯示肉桂與丁香油可防治香蕉炭疽病菌 (*C. musae*)菌絲之生長(Ranasinghe *et al.*, 2002)。另丁香油也被發表可用於抑制十字花科蔬菜炭疽病菌 (*C. higginsianum*)，當施用濃度為 1000 ppm 時，可降低 50%的罹病度(林等，2010)。又在印度的一篇論文研究中顯示使用大蒜(*Allium sativum* L.)、薑(*Zingiber officinale* Rosc.)、薑

黃(*Curcuma longa* L.)、歐洲鱗毛蕨(*Dryopteris filix-max* (L.) Schott)及洋金花(*Datura metel* L.)之水或乙醇萃取液對於茶樹之四種真菌病原(*Pestalotiopsis theae* (Sawada) Steyaert, *Colletotrichum camelliae* Mass, *Curvularia eragrostidis* (P. Hennings) Mayer, *Botryodiplodia theobromae* Patouillard)等皆具有抑制其孢子發芽之能力(Saha *et al.*, 2005)。

五、拮抗微生物防治法

拮抗微生物屬於生物防治方法之一種，其病害防治之機制可約略分為五種：
(1)產生抗生素，直接殺死病原菌；(2)營養競爭，直接或間接使病原菌缺乏營養；
(3)微寄生或捕食，以殺害病原菌；(4)產生細胞壁分解酵素；及(5)誘導植物產生
抗病性，藉以抑制病原菌(林等，2004)。拮抗微生物除了不會有農藥殘留問題之
外，也可於田間形成族群，達到長期防治之效果。

枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)屬為革蘭氏陽性菌，分類上屬於厚壁菌門
(Firmicutes)、芽孢桿菌綱(Bacilli)、芽孢桿菌科(Bacillales)，屬於植物根圈之有益
微生物(Plant rhizobacteria / PR)，除能促進植物生長外，也可保護植物免受真菌之
侵染。然其作用機制尚未完全清楚，但已知會產生多種抗菌物質，如多種脂肽類
(Lipopeptides)，其中如表面素(Surfactin)為一種強力的生物表面活性劑(Bais *et al.*,
2004)。

而已被商品化之枯草桿菌(*Bacillus subtilis* Y1336)，已知具有防治豌豆白粉病
(*Erysiphe pisi* DC.)、胡瓜露菌病(*Pseudoperonospora cubensis* (Berkeley et Curtis)
Rostovzev.)、蓮霧果腐病(*Pestalotiopsis euginae*)及芒果蒂腐病(*Botryodiplodia*
theobromae Pat.)之功效，在臺灣之商品名為台灣寶[®]，且於網站(百泰生物科技，
2011)敘明其擁有 *Glomerella cingulata* 之防治效果。目前枯草桿菌之生物製劑則
已於全世界被廣泛使用中。

另一方面放線菌亦被認為具有抑菌效果，其中之鏈黴菌(*Streptomyces* spp.)即
常被用於生物防治。據研究指出鏈黴菌與 *Alternaria* sp., *Curvularia* sp.,
Phytophthora capsici, *Colletotrichum* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus*
niger 等進行對峙培養，發現約有 47~90%之抑制效果(Evangelista-Martinez, 2014)。
鏈黴菌屬於放線菌門(Actinobacteria)、放線菌綱(Actinobacteria)、放線菌目
(Actinomycetales)、鏈黴菌科(Streptomycetaceae)。鏈黴菌會產生許多二次代謝物，
包括許多用於臨床的抗生素如新黴素(Neomycin)和氯黴素(Chloramphenicol)等，
可抑制病原菌之生長(Kieser *et al.*, 2000)。

本研究使用之鏈黴菌 YU01 係自花蓮玉里之水稻田篩選而出，而根據前人研究證實該菌具有抑制多種植物病原真菌之效果，包括鏈隔孢菌(*Alternaria* sp.)、灰黴病菌 (*Botrytis* sp.)、炭疽病菌 (*Colletotrichum* sp.)、鐮孢菌 (*Fusarium* sp.)、疫病菌 (*Phytophthora* sp.)、腐霉菌 (*Pythium* sp.)、立枯絲核菌 (*Rhizoctonia* sp.)、菌核病菌 (*Sclerotinia* sp.)、白絹病菌 (*Sclerotium* sp.) 等九種病原真菌 (張，2012)。

六、流行病學

流行病學(Epidemiology)是研究病害在空間與時間如何變化的學問，狹義的流行病是指短時間快速或大量發生之病害，而廣義來說病害之演替以及病害在不同時間與空間之改變皆稱為流行病，研究過去之病程記錄除了可預測未來病勢發展之外也可用於防治，且許多植物病害一經感染便無法治療更凸顯預防之重要性(Jeager, 2000)。

一個病害會受到病原菌、寄主、環境與時間之影響，影響病害的環境因子中又以溫度與溼度最為重要，由於病害嚴重程度會隨時間而改變，一般以病害嚴重度隨時間變化作圖是為病勢發展曲線(Disease progress curve)，並與氣象因子進行相關與迴歸分析，以求得病害預測方程式來預測病害(Milgroom & Peever, 2003)。

而根據前人對炭疽病菌之研究，在低溫尤其是溼度較高時容易使孢子散播與入侵，也造成病害為害較嚴重，如 *C. gloeosporioides* 造成柑橘落果，即在 1 至 3 月發病較嚴重(Denham & Waller, 1981)，而 *C. gloeosporioides* 造成咖啡炭疽與破葉也是在 9 至 11 月發病較嚴重(Mohanani, et al., 1989)，其推論是因夏季溫度較高，下雨後水分蒸發速度較快，較不利於孢子之入侵，而冬天則因可用自由水較多，較適宜孢子之入侵。

第三章 材料與方法



一、臺灣北部茶樹赤葉枯病及芽枯病之田間調查

本研究為深入研究 2013 年秋季起在坪林茶園發現之茶樹芽枯之病因，乃於 2013 年 11 月開始有系統地至臺灣北部茶園調查茶樹芽枯之發生情形。由於初步認定該病為赤葉枯病菌所造成，故一併調查典型赤葉枯病之發生情形。地點包括桃園縣楊梅市茶葉改良場之茶園、新北市坪林區陳陸合先生之茶園、新北市坪林區林金定先生之茶園及臺北市文山區高振盛先生之茶園，除了調查上述二病徵之發病情形，並將發病嫩芽及葉片帶回實驗室進行拍照、鏡檢及分離。

二、茶赤葉枯病及芽枯病之病原菌分離、保存及鑑定

(一)嫩芽芽枯之病原菌分離

本項嫩芽芽枯之病原菌分離，係使用組織塊分離法及稀釋分離法。組織塊分離法係自發病茶園採集罹病芽，以消毒過之解剖刀切下約 5 mm 長之病健部，浸泡於 2% 次氯酸鈉水溶液中進行表面消毒 10 秒後，以無菌水漂洗三次，每次 10 秒，將多餘水分吸乾後置於 1.5 % (w/v) 水瓊脂培養基 (Water agar, WA, Difco™) 中進行常溫培養，待長出菌絲後，於解剖顯微鏡下，以解剖刀切取菌絲尖端，移至馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基 (Potato Dextrose Agar Medium, PDA, Difco™) 上，置於十二小時光週 25°C 定溫生長箱中進行培養，以供後續之鑑定及試驗。

稀釋分離法係先將嫩芽發病組織以消毒過之解剖刀切下病健部，浸泡於 2% 次氯酸鈉水溶液中進行表面消毒 10 秒後，以無菌水每次 10 秒共漂洗三次，將多餘水分吸乾後，即移入含有 1 mL 無菌水之微量離心管中，使用消毒過之研磨棒磨碎組織塊，靜置約 30 分鐘後即吸取 0.3 mL 病組織液滴於 PDA 洋菜培養基上，再以消毒過之三角玻棒將病組織液均勻塗佈於培養基表面，置於十二小時光週 25°C 定溫生長箱中進行培養，4 天後觀察分離結果。因在同一培養皿中可能會長出多種可疑病原，故依菌絲或菌落不同，分別挑取移至 PDA 洋菜培養基中培

養，之後細菌類皆以畫線平板法得到單菌落，移至 PDA 洋菜上培養，得到純化分離株。所得到之純種分離株皆培養於 PDA 洋菜培養基上以供後續之鑑定及試驗(葉，2012)。

為保存菌株，每月會進行繼代培養，確認為同分離株後培養於十二小時光週 25°C 定溫生長箱中，並且將確認有病原性之分離株寄存於財團法人食品工業發展研究所生物資源及保存研究中心(BCRC)，以供後續試驗使用。

(二)赤葉枯病之病原菌分離

本項為分離赤葉枯病菌，亦使用組織塊分離法，係自田間採取病葉，以消毒過之解剖刀切下約 5 × 5 mm/mm 病健部，浸泡於 2% 次氯酸鈉水溶液中進行表面消毒 10 秒後，以無菌水漂洗三次，每次 10 秒，將多餘水分吸乾後置於 1.5 % WA 中進行常溫培養，待長出菌絲後，於解剖顯微鏡下，以解剖刀切取菌絲尖端移至 PDA 洋菜培養基上，置於十二小時光週 25°C 定溫生長箱中進行培養，以供後續之鑑定及試驗。

三、茶赤葉枯病及芽枯病分離株之病原性測試

(一)供試健康茶樹之栽種

健康茶苗係自南投縣購入種植一年之青心烏龍茶苗(*Camellia sinensis* cv. Chin Shin Oolong)、大葉烏龍(*Camellia sinensis* cv. Dah Yeh Oolong)、臺茶十二號(*Camellia sinensis* cv. Ttes No.12)及四季春(*Camellia sinensis* cv. Shy Jih Chuen)等，皆將茶苗種於紅土、蛭石、珍珠石(按 2 : 1 : 1 體積比混合)的 5 吋盆中，置於遮雨棚培育至少 1 週後，供作本研究試驗用。

(二)茶樹嫩芽以孢子懸浮液針刺接種試驗

本項為確認分離株之病原性，以青心烏龍作為供試植株，先將酒精噴在擦手紙上，用以去除嫩芽之髒污，再以清水噴在擦手紙上，以去除嫩芽上之酒精共兩

次，即以消毒過之直徑 1 mm 解剖針穿過嫩芽造成傷口，並將事先配製濃度為 1×10^5 之孢子懸浮液噴灑於嫩芽。另以蒸餾水噴灑有相同傷口之嫩芽作為對照組，每組實驗皆進行 3 重複，接種後即以內部噴水之塑膠袋套封該嫩芽保溼並置於溫室，觀察並記錄其是否發病，如發病則進行再分離以確認其病原性。



圖 1、茶樹嫩芽以孢子懸浮液接種後保溼處理之狀況。

Figure 1. Tea sprout in moist PE bag after wound inoculation with conidia suspension.

(三) 茶樹葉部以孢子懸浮液進行傷口接種之試驗

本項試驗主要目的在於確認自赤葉枯病斑及芽枯病分離所得炭疽菌株之葉部病原性，故以青心烏龍作為供試植株，先將酒精噴在擦手紙以去除葉部髒汙，再以清水噴在擦手紙以去除葉上酒精共兩次，即對葉部以消毒過之解剖刀造成傷口，並將事先配製濃度為 1×10^5 之孢子懸浮液噴灑於傷口。並以蒸餾水噴灑刀割傷口作為對照組，每組實驗皆進行 3 重複，接種後即以內部噴水之塑膠袋套封該茶樹葉片保溼並置於溫室中，觀察並記錄其是否發病，並進行再分離以確認病原性。

四、人工接種茶赤葉枯病及芽枯病之病原再分離

為確認上述分離株之病原性，需依柯霍氏準則將接種發病之植株進行病原再分離，採用的再分離方式為前述之組織分離法及稀釋分離法，皆自病健部進行再分離，所得之分離株則與原接種之分離株進行比對及鑑定，以完成柯霍氏準則第四條。

五、茶赤葉枯病及芽枯病分離株之鑑定

(一)形態鑑定

根據前人研究，使用形態學鑑定對於區分炭疽病菌非常困難 (Cai *et al.*, 2009)，例如參考不完全菌之檢索表“*Illustrated genera of imperfect fungi*” (Barnett & Hunter, 1972)，一般只能檢索至屬，因此本研究乃使用分子鑑定技術來確認病原菌之分類，但也將菌株之形態特徵加以記錄及拍照。

(二)分子鑑定

1、核苷酸(DNA)之萃取

使用 MagCore® Nucleic Acid Extractor HF16 依照波仕特生物科技 Gene-Spin™ – V³, 1-4-3 DNA Extraction Kit 來萃取完整之 DNA。本項係將培養 10 天之分離株自 PDA 洋菜培養基刮下約 100 mg 之菌絲放入微量離心管，加入液態氮磨碎後，加入 400 μ L GP1 Buffer, 5 μ L RNase A (10mg/mL) 至微量離心管並震盪，於 65°C 水浴槽中放置 10 分鐘，每 5 分鐘翻轉一次，再加入 100 μ L GP2 Buffer 並震盪，於冰上放置 3 分鐘，將 Filter Column 放入 2 mL Collection Tube 再把樣品加入，以 13,200 rpm 離心 3 分鐘，丟棄 Filter Column 吸取 400 μ L 上清液加入 Sample Tube，再將 Sample Tube 放入 MagCore® Nucleic Acid Extractor HF16 機器中，將 Elution Tube, Tip Plus Holder Set 放入機器中，將機器設定為 Plant Kit，運作機器，待運轉完成取出 60 μ L 用於 PCR。

2.目標片段之增幅(PCR 反應)

Polymerase chain reaction(PCR)反應流程如下：於 PCR tube 加入 DNA 1 μL , Primer ITS1 0.5 μL , Primer ITS4 0.5 μL , 2X Taq PCR Master Mix 10 μL , DEPC H₂O 8 μL ，放入 Bioer LifePro thermal cycler 中進行增幅。反應條件為預熱 94 $^{\circ}\text{C}$ 、10 分鐘後；94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 秒，50 $^{\circ}\text{C}$ 、30 秒，72 $^{\circ}\text{C}$ 、30 秒，三種溫度循環 40 次，接著 72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 分鐘，10 $^{\circ}\text{C}$ 、10 分鐘即完成反應。PCR 反應後，進行電泳分析，確定 PCR 增幅產物。

3.PCR 產物電泳分析

使用水平電泳槽系統，電源供應系統與製膠模為 Mupid[®]-2plus。秤取 2.1 g agarose(Amresco[®])，加入 140 mL 1X TAE buffer，微波加熱至完全溶解，並於室溫冷卻數分鐘後，倒入製膠盤中，插入齒梳，待凝固後取出齒梳，將膠體取出置於電泳槽中，加入 1X TAE buffer 至淹滿膠體，分別 Loading 樣品與 marker 至 well 中(樣品含 80 μL PCR 產物、12 μL DNA-Dye-NonTox 染劑；marker 包含 80 μL 100bp DNA Ladder Green、12 μL 染劑)，以 400 A, 100 V 進行電泳 25 分鐘後，將膠片以 UV 燈照射，觀察並記錄之。

4.純化 DNA

將膠體上之 DNA 條帶(Band)切下置於微量離心管，每 100 mg 樣品加入 100 μL binding Buffer，置於 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴槽加熱至膠體完全融解且每 3 分鐘搖晃一次，將樣品加入含 spin column 之 collection tube，極速(13,200 rpm)離心 1 分鐘，去除 collection tube 中之液體，再加入 500 μL binding Buffer 極速離心 1 分鐘，去除 collection tube 中廢液，加 700 μL Washing Buffer 至 spin column 極速離心 1 分鐘，去除 collection tube 中廢液，再次加入 700 μL washing buffer 極速離心 1 分鐘，去除 collection tube 中廢液，極速離心 3 分鐘，去除 collection tube 中廢液，丟棄 collection tube，將 spin column 放入微量離心管，於 45 $^{\circ}\text{C}$ 熱水浴 5 分鐘去除酒精，

於室溫加入 30 μ L elution buffer 靜置 2 分鐘，極速離心 1 分鐘，置於冰上保存準備送定序。



5. 基因片段之定序

純化之產物委託波仕特生物科技股份有限公司進行定序，取回之序列經校正後，於美國 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 網站上，以 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 功能鑑定本研究使用之分離株分類地位。

六、溫度對芽枯病菌生長速度之影響

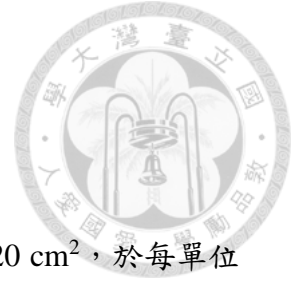
為了解芽枯病菌於不同溫度下生長之情況，選取經病原性測試得知具有病原性之菌株培養於 PDA 洋菜培養基，於 25°C 十二小時光週定溫生長箱培養五天後，以消毒過之直徑 35 mm 打孔器切取菌絲塊，反貼接入 PDA 洋菜培養基之中央，分別置於 15、20、25、30、35°C 之十二小時光週梯度定溫生長箱中，觀察溫度對於菌絲生長速度之影響，每處理各 5 重複，並於五日後觀察。

七、北部地區茶赤葉枯病及芽枯病流行病學調查

(一) 調查地點及品種

自 2013 年 12 月至 2014 年 6 月，每月於北部三個地區對各品種之茶樹進行茶赤葉枯病或芽枯病危害嚴重度之調查：

1. 桃園縣楊梅區行政院農業委員會茶葉改良場(桃園縣楊梅市埔心中興路 324 號)：品種有青心烏龍、臺茶十二號、鐵觀音、四季春等。
2. 新北市坪林區陳陸合茶農(新北市坪林區漁光里大舌湖 11-2 號)：品種為青心烏龍、臺茶十二號。
3. 新北市坪林區林金定茶農(新北市坪林區大粗坑茶區)：品種為青心烏龍。
4. 臺北市文山區高振盛茶農(臺北市文山區指南路三段 34 巷 21 號)：品種為鐵觀音、四季春。



(二)調查方法

1.茶赤葉枯病葉片危害嚴重度

每地點調查五排茶樹，每排調查三單位，每單位定為 20×20 cm²，於每單位中隨機挑選 10 片成葉觀察茶赤葉枯病危害並依照葉片罹病級數(見表 1)進行記錄，並計算各地點、各品種之危害嚴重度。

表 1 茶赤葉枯病葉片罹病級數標準。

Table 1. The disease index of tea brown blight used in this study.

葉片未受害則罹病級數定為 0 級
葉片受害面積 < 1 cm ² 罹病級數定為 1 級
葉片受害面積 ≥ 1 cm ² 罹病級數定為 2 級
葉片受害面積 ≥ 4 cm ² 罹病級數定為 3 級

$$\text{危害嚴重度(\%)} = (\sum(\text{罹病級數} \times \text{葉片數}) / (3 \times \text{調查總葉數})) \times 100\%$$

2.芽枯病罹病率

只用於坪林之茶園，因有芽枯病徵故增加此項調查，於前述調查單位(20×20 cm²)中，調查有病斑之嫩芽及健康嫩芽數，計算嫩芽之芽枯病罹病率。

$$\text{芽枯病罹病率(\%)} = (\text{罹病芽數} / \text{調查總嫩芽數}) \times 100\%$$

(三)氣象資料取得

係自國家實驗研究院台灣颱風洪水研究中心，由大氣研究資料庫取得坪林區(中央氣象局自動測站，站碼：C0A530，站名：坪林，121°42'05" E，24°56'23" N，標高 300M)、文山區(中央氣象局自動測站，站碼：C0AC80，站名：文山，

121°34'03.1" E, 25°00'14.7" N, 標高 40M)之氣象資料, 另自茶葉改良場取得楊梅(農業氣象觀測站, 站碼: 82C16, 站名: 茶葉改良場, 121°12' E, 25°45' N, 標高 195M)之氣象資料。



八、芽枯病之非農藥防治

(一)防治資材取得

從一般市場購買蒜、薑, 另自中藥店(安生藥局, 臺北市中正區南昌路二段 191 號)購買藿香、丁香、五味子、薑黃、肉桂粉等總共七種防治資材。首先將防治資材經去皮或泡軟等前處理後以 RO 水清洗, 各取 100 g 加入 500 mL 水或 50% (w/v)乙醇 500 mL 中(表 2), 先將萃取液以 3000 rpm 離心 15 分鐘後, 再將上清液以孔徑 0.22 μ L 之濾紙過濾後倒入無菌玻璃瓶內密封, 置於陰涼處三天, 每天搖盪一次, 三天後儲存於 4 °C 備用(謝等, 2005)。此些即為 20% 萃取液。

另取百泰公司商業化之產品台灣寶: 枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)與本實驗室分離自花蓮玉里之水稻田之放線菌(*Streptomyces* sp.)編號 YU01, 作為拮抗微生物進行試驗。

表 2 本研究用以製備萃取液之植物種類及其處理方法。



Table 2. The plant material used for non-pesticide control test against the anthracnose pathogen in this study and their pretreatment and extract method.

普通名 Common name(Chinese)	學名 Scientific name	科別 Family name(Chinese)	使用部位 Part	前處理 Pretreatment	製成萃取液 Extraction method
Garlic(蒜)	<i>Allium sativum</i> L.	Alliaceae(蔥科)	鱗莖	剝皮，清洗後切丁	以果汁機打碎
Cinnamon (肉桂)	<i>Cinnamomum cassia</i> Nees	Lauraceae(樟科)	乾燥樹皮	取得已是肉桂粉	加入水中混合均勻
Cablin Potchouli Herb (藿香)	<i>Agastache rugosa</i> (Fisch. et Mey.) O. Ktze.	Lamiaceae (脣形花科)	地上部乾 燥	以均質機磨碎	加入水中混合均勻
Chinese magnoliavine fruit (五味子)	<i>Schisandra sphenanthera</i> Rehd.et Wils.	Magnoliaceae (木蘭科)	乾燥果實	以均質機磨碎	加入水中混合均勻
Clove (丁香)	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merrill & Perry	Myrtaceae (桃金娘科)	乾燥花蕾	以均質機磨碎	加入水中混合均勻
Turmeric(薑黃)	<i>Curcuma longa</i> L.	Zingiberaceae(薑科)	乾燥根莖	以均質機磨碎	加入水中混合均勻
Ginger(薑)	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe.	Zingiberaceae(薑科)	根莖	剝皮，清洗後切丁	以果汁機打碎

(二)植物萃取液對孢子發芽抑制之試驗

為測定植物萃取液對芽枯病菌之孢子發芽抑制效果，取於 PDA 培養 10 天之赤葉枯病菌分離株，每皿加入 5 mL 無菌水，以消毒過之三角玻棒將孢子洗下，將孢子懸浮液濃度調為 1×10^5 conidia/mL，即取 30 μ L 孢子懸浮液與 36 μ L 之植物萃取液混合，使植物萃取液最終濃度為 1%, 0.2%, 0.1%，並各添加 6 μ L 之 1% 無菌葡萄糖水以促進孢子之發芽，共 72 μ L 置於懸滴載玻片上，另以無菌水、酒精(0.125%, 0.25%, 1.25%)、免賴得 1,500 倍(依照植物保護手冊推薦濃度)做為對照組，共為十三種處理，每處理 6 重複，皆放置於 25°C 全天光照定溫箱下 24 小時後，即取出玻片以光學顯微鏡觀察孢子發芽之情形，並以發芽管長度超過孢子長度判定為發芽，每一處理之重複皆計數 100 個孢子，以求其發芽抑制率(謝等，2005)。

$$\text{孢子發芽抑制率(\%)} = ((\text{對照組發芽率} - \text{實驗組發芽率}) / \text{對照組發芽率}) \times 100\%$$

(三)植物萃取液對菌絲生長抑制之試驗

為測定植物萃取液對芽枯病菌之菌絲生長抑制效果，配製 PDA 於三角燒瓶中每瓶 120 mL，在高溫高壓滅菌後尚未凝固前約 60°C 即先加入植物萃取液，使萃取液最終濃度為 1%, 0.2%, 0.1%，混淆均勻後立即倒入 9 cm 培養皿中做為萃取液培養基，另以無菌水、酒精(0.125%, 0.25%, 1.25%)、免賴得 1,500 倍(依照植物保護手冊推薦濃度)做為對照組。試驗時先以 PDA 培養菌株 10 天後，即以消毒過之打孔器打出直徑 3.5 mm 圓形菌絲塊，立即移置萃取液培養基中央，於十二小時光週 25°C 定溫生長箱培養，五天後觀察並記錄菌絲生長直徑，每處理作 10 重複，並計算菌絲生長抑制率(林等，2010)。

$$\text{菌絲抑制率(\%)} = ((\text{對照組菌絲生長長度} - \text{實驗組菌絲生長長度}) / \text{對照組菌絲生長長度}) \times 100\%$$



(四)拮抗微生物對峙培養試驗

為測試拮抗微生物(枯草桿菌及放線菌)對於芽枯病菌之抑制效果，將拮抗微生物培養於 PDA 洋菜培養基上，培養五天後使用滅菌過之移植環挑取單菌落，畫於事先吹乾並有標記之 PDA 洋菜培養基之中線，再取出以 PDA 培養 10 天之茶赤葉枯菌株，以消毒過之打孔器打出直徑 3.5 mm 圓形菌絲塊，立即反貼置於 PDA 洋菜培養基距中線 30 mm 處之兩端。另以未使用拮抗微生物之 PDA 洋菜培養基做為對照組，於十二小時光週 25°C 定溫生長箱培養，待對照組菌絲生長至靠近中線時記錄各實驗組菌絲生長半徑，每處理做 6 重複，並計算菌絲生長抑制率。

(五)植物萃取液對芽枯病之盆栽防治試驗

為測試植物萃取液對芽枯病之防治效果，以青心烏龍作為供試植株，將酒精噴在擦手紙用以去除嫩芽之髒污，再以清水噴在擦手紙以去除嫩芽上之酒精共兩次，即以消毒過之解剖針對嫩芽造成傷口，立即將 0.2% 之植物萃取稀釋液噴灑於傷口上，待其自然風乾後，將濃度為 1×10^5 之孢子懸浮液噴灑於嫩芽。另以蒸餾水噴灑於有接種之傷口作為負對照組，以 1% 酒精噴灑於有接種之嫩芽作為酒精對照組，以只噴灑孢子懸浮液於傷口者作為正對照組，每株茶樹皆各取 2 枝條參與試驗，每組皆進行 6 重複，接種後皆使用內部噴水之塑膠袋套封茶樹之嫩芽以求保溼並置於溫室。為確認植物萃取液為保護型或殺菌型，亦進行噴灑病原菌孢子後再施用植物萃取液之試驗。隨後對已發病者進行再分離，以確認其病原性。

(六)拮抗微生物對芽枯病之盆栽防治試驗

為測試拮抗微生物之防治效果，將枯草桿菌依照推薦使用濃度稀釋 800 倍，放線菌方面，待放線菌於 PDA 產孢後，即各加入 5 mL 無菌水，使用消毒過之三角玻棒洗下孢子，並以序列稀釋法計算放線菌之濃度，即將 0.1 mL 不同稀釋倍

數(10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9})之菌液以消毒過之三角玻棒塗佈於 PDA 上，隔天觀察並計算其菌落數。

本項係以青心烏龍作為供試植株，將酒精噴在擦手紙以去除嫩芽之髒污，再以清水噴在擦手紙以去除嫩芽上之酒精共兩次，即以消毒過之解剖針對嫩芽造成傷口，立即將枯草桿菌、放線菌噴灑於傷口上，待其自然風乾後，將濃度為 1×10^5 之孢子懸浮液噴灑於嫩芽。放線菌 YU01 之濃度為每皿 5 mL 洗下之原液、稀釋 10 倍、及稀釋 100 倍三種濃度，另只噴灑孢子懸浮液於傷口者作為對照組，每株茶樹皆各取 2 枝條參與試驗，每組實驗皆進行 6 重複，接種後即使用內部噴水之塑膠袋套封茶樹之嫩芽以求保溼並置於溫室。為確認拮抗微生物效果為保護型或殺菌型亦進行噴灑病原菌孢子後再施用拮抗微生物之試驗，而放線菌作用需較長時間因此額外進行於接種前一天噴灑放線菌之試驗。隨後對已發病者進行再分離，以確認其病原性。

九、農藥對芽枯病菌絲生長抑制試驗

使用藥劑為植物保護手冊中推薦使用於茶赤葉枯病之農藥，分別為 25.9% 得克利(Tebuconazole)、39.5% 扶吉胺水懸劑(Fluazinam)、11.6% 四克利水基乳劑(Tetraconazole)、40% 克熱淨(烷苯磺酸鹽)可溼性粉劑(Iminoctadinetris(albesilate))、50% 免賴得可溼性粉劑(Benomyl)、70% 甲基多保淨可溼性粉劑(Thiophanate-methyl)、24.9% 待克利乳劑(Difenoconazole)、23.6% 百克敏乳劑(Pyraclostrobin)、43% 嘉賜貝芬可溼性粉劑(Kasugamycin+Carbendazim)、24.55% 貝芬四克利濃懸乳劑(Carbendazim+Tetraconazole)、16% 睛硫克敏水分散性粒劑(Pyraclostrobin+Dithianon)、42.2% 睛硫醜水懸劑(Dithianon)以及 23% 亞托敏水懸劑(Azoxystrobin) 等共十三種。

試驗前先配製 PDA 於三角燒瓶中，待高溫高壓滅菌後尚未凝固前約 60°C 立即加入農藥，使十三種藥劑有效成分濃度分別為 1, 10, 100, 1000 ppm，二者混合均勻後即倒入 9 cm 培養皿做為農藥培養基，另以無菌水做為對照組。各取

於 PDA 培養 10 天之菌株，以消毒過之打孔器打出直徑 7 mm 圓形菌絲塊，反貼於農藥培養基中央，於 25°C 定溫生長箱中培養，五天後觀察並記錄菌絲生長直徑，每處理進行 5 重複，並計算其生長抑制率。



十、以不同來源炭疽病菌對茶樹進行病原性之檢定

本項不同來源炭疽病菌共有 3 株，包括(1)自苗栗取得具有病原性之咖啡炭疽病菌，(2)自實驗室取得具病原性之草莓炭疽病菌，(3)自臺北取得具有病原性之芒果炭疽病菌。供試茶樹為清心烏龍茶苗，先將酒精噴在擦手紙以去除嫩芽之髒汙，再以清水噴在擦手紙以去除嫩芽上之酒精進行兩次後，即在嫩芽以消毒過之解剖針造成傷口，將濃度為 1×10^5 之芒果炭疽病、草莓炭疽病、咖啡炭疽病之病原菌分生孢子懸浮液噴灑於嫩芽。以確認有病原性之茶樹芽枯病菌分離株做為對照組接種，接種後即以內部噴水之塑膠袋套封該嫩芽保溼並置於溫室，觀察並記錄是否發病，並進行再分離以確認其病原性，再分離方法與前述分離病原菌方法相同。

十一、以芽枯病菌對不同品種茶樹之病原性測試

本項係以大葉烏龍、四季春、臺茶十二號即青心烏龍等四品種茶樹作為供試植株，先將酒精噴在擦手紙以去除嫩芽之髒汙，再以清水噴在擦手紙以去除嫩芽上之酒精進行兩次後，即在嫩芽以消毒過之解剖針造成傷口，將濃度為 1×10^5 之孢子懸浮液噴灑於嫩芽。以無菌水做為對照組接種，接種後即以內部噴水之塑膠袋套封該嫩芽保溼並置於溫室，觀察並記錄是否發病，並進行再分離以確認其病原性，再分離方法與前述分離病原菌方法相同。

第四章 結果



一、臺灣北部地區茶樹赤葉枯病及芽枯病之田間調查

於 2013 年 11 月至 2014 年 6 月間，前往臺灣北部種植茶樹地區進行茶赤葉枯病與芽枯病之調查，調查地點主要有新北市坪林區陳陸合先生之茶園、新北市坪林區林金定先生之茶園、桃園縣楊梅鎮茶葉改良場之茶園、臺北市文山區高振盛先生之茶園，除了記錄各地點之典型茶赤葉枯病發生情形外，並將罹病葉、罹病芽帶回實驗室進行拍照、鏡檢及分離。其田間病害調查所得結果如表 3，並概述如下：

1. 新北市坪林區陳陸合先生之茶園：於 2013 年 11 月至 2014 年 6 月間，發現該處青心烏龍生長狀況不佳，冬天時芽枯病發生頻繁(圖 2)，茶赤葉枯病則是一直都有發現(圖 3)，臺茶十二號芽枯病也是發生頻繁，但赤葉枯病發病較少，此茶園行有機農法，以下以坪林區有機茶園表示。

2. 新北市坪林區林金定先生之茶園：於 2013 年 11 月至 2014 年 6 月間，調查該處茶赤葉枯病或芽枯病發生情形，發現該處青心烏龍生長狀況不佳，冬天時芽枯病發生，但較陳陸合先生之茶園輕微，茶赤葉枯病則是一直都有發現，此茶園行慣行農法，以下以坪林區慣行茶園表示。

3. 桃園縣楊梅鎮茶葉改良場之茶園：於 2013 年 11 月至 2014 年 6 月間，調查該處茶赤葉枯病或芽枯病發生情形，發現該處四季春、鐵觀音、臺茶十二號等植株，生長狀態皆良好，新芽並無芽枯病發生，茶赤葉枯病則零星發生，青心烏龍雖無芽枯病發生，但受茶赤葉枯病危害較嚴重(圖 4)，此茶園行有機農法，以下以楊梅區茶園表示。

4. 臺北市文山區高振盛先生之茶園：於 2013 年 11 月至 2014 年 6 月間，調查該處茶赤葉枯病及芽枯病發生情形，發現該處四季春、鐵觀音植株生長狀態良好，新芽並無芽枯病發生，鐵觀音茶赤葉枯病較少發生，四季春則於 2014 年 5,

6月受茶赤葉枯病危害較嚴重，此茶園行慣行農法，以下以文山區茶園表示。



表 3 臺灣北部地區茶赤葉枯病及芽枯病病害調查結果。

Table 3. The results of field investigation on tea brown blight disease and sbroust wilt disease in northern Taiwan.

地點	茶樹品種	病徵
新北市坪林區有機茶園	青心烏龍、臺茶十二號	芽枯病、赤葉枯病
新北市坪林區慣行茶園	青心烏龍	芽枯病、赤葉枯病
桃園縣楊梅區茶園	青心烏龍、臺茶十二號、 四季春、鐵觀音	赤葉枯病
臺北市文山區茶園	四季春、鐵觀音	赤葉枯病



圖 2、新北市坪林區有機茶園青心烏龍芽枯病之萎凋病徵。

Figure 2. Sprout wilt symptoms on Oolong tea plants found in Pinglin organic tea garden.



圖 3、新北市坪林區有機茶園青心烏龍赤葉枯病之炭疽病徵。

Figure 3. Anthracnose symptoms on Oolong tea leaves found in Pinglin organic tea garden.



圖 4、桃園縣楊梅區茶園青心烏龍赤葉枯病之炭疽病徵。

Figure 4. Anthracnose symptoms on Oolong tea leaves found in Yangmei, Taoyuan.

二、茶赤葉枯病及芽枯病之病原菌分離及初步鑑定

(一) 嫩芽芽枯之病原菌分離

對坪林區有機茶園及坪林區慣行茶園之芽枯病，係以組織塊分離法及稀釋進行分離，其組織塊分離法之分離結果如表 4，而稀釋分離法結果如表 5。由於田間調查時於楊梅區及文山區茶園並未發現芽枯病之病徵故未予以納入。結果發現坪林區茶園芽枯病分離所得真菌分離株，可大致分成兩類，第一類為白色雲狀菌絲，生長速度較快，可於 PDA 上產生黑色分生孢子堆，分生孢子具隔膜且基部有 3-5 根附屬絲 (圖 5)，分生孢子大小為 $25-32 \times 9-11\mu\text{m}$ ，經初步鑑定為擬盤多毛孢菌(*Pestalotiopsis* sp.) (Maharachchikumbura 2013)。第二類為灰白色菌絲，可於 PDA 培養基底部產生黑色色素，分生孢子無色長橢圓形，不具隔膜 (圖 6)，大小為 $12.5-22.5 \times 2.5-7.5\mu\text{m}$ ，初步鑑定為炭疽病菌(*Colletotrichum* sp.)。

本項統計自坪林區有機茶園之青心烏龍芽枯病以組織塊分離法分離，共得到 11 株真菌分離株，其中 4 株為炭疽病菌，另有 6 株則為擬盤多毛孢菌，尚有一株為尚無法鑑定之粉紅色菌落真菌，此些分離株之編號皆以 BC 後加不同代碼(如表 6)。於坪林區有機之臺茶十二號則獲得 12 株分離株，其中 1 株為炭疽病菌，9 株為擬盤多毛孢菌，還有一株為桃紅色之真菌菌落另一株為橘色真菌菌落，並將其編號為 BT 後加不同代碼(如表 6)。自坪林區慣行茶園得到 3 株分離株，皆為炭疽病菌，其編號為 GC 後加不同代碼(如表 6)。

而以稀釋分離法分離得到許多菌株，其中有炭疽病菌菌落，但卻沒有分離到擬盤多毛孢菌，而分離得到之細菌菌落多大同小異，且與對照組之細菌菌落相似，故未與以記錄。

表 4 臺灣北部茶樹芽枯病以組織塊分離法分離病原之結果。

Table 4. The fungi isolated from tea sprout wilt in northern Taiwan by tissue isolation method.

地點	茶樹品種	分離樣本數	擬盤多毛孢菌 (<i>Pestalotiopsis</i> spp.) 之分離率	炭疽病菌 (<i>Colletotrichum</i> spp.) 之分離率
新北市坪林區 有機茶園	青心烏龍	11	6/11(55%)	4/11(36%)
新北市坪林區 有機茶園	臺茶十二號	12	9/12(75%)	1/12(8%)
新北市坪林區 慣行茶園	青心烏龍	3	0/3(0%)	3/3(100%)

表 5 臺灣北部茶樹芽枯病以稀釋分離法分離病原之結果。

Table 5. The fungi isolated from tea sprout wilt in northern Taiwan by dilution method.

地點	茶樹品種	真菌/細菌 菌落種類	真菌種類	炭疽病菌之分離率
新北市坪林區 有機茶園	青心烏龍	5 種真菌 4 種細菌	白色菌落 深黑色菌落 淺褐色菌落 炭疽菌落	2/3(66%)
新北市坪林區 有機茶園	臺茶十二號	3 種真菌 2 種細菌	深黃色菌落 深黑色菌落 褐色菌落	0/3(0%)
新北市坪林區 慣行茶園	青心烏龍	3 種真菌 3 種細菌	白色雲狀菌落 綠色菌落 炭疽菌落	1/3(33%)

表 6 臺灣北部茶樹芽枯病分離所得真菌分離株之編號及其來源。

Table 6. Number and source of fungus isolates derived from tea sprout wilt in northern Taiwan.

分離株編號	來源地	茶樹品種	分離部位	菌株歸類
BC-X	坪林區有機茶園	青心烏龍	芽枯病	<i>Colletotrichum</i> sp.
BC-Y	坪林區有機茶園	青心烏龍	芽枯病	<i>Colletotrichum</i> sp.
BC-F1	坪林區有機茶園	青心烏龍	芽枯病	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
BC-F2	坪林區有機茶園	青心烏龍	芽枯病	未明粉紅菌落
BC-F3	坪林區有機茶園	青心烏龍	芽枯病	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
BC-F4	坪林區有機茶園	青心烏龍	芽枯病	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
BC-F5	坪林區有機茶園	青心烏龍	芽枯病	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
BC-F6	坪林區有機茶園	青心烏龍	芽枯病	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
BC-F7	坪林區有機茶園	青心烏龍	芽枯病	<i>Colletotrichum</i> sp.
BC-F8	坪林區有機茶園	青心烏龍	芽枯病	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
BC-F9	坪林區有機茶園	青心烏龍	芽枯病	<i>Colletotrichum</i> sp.
BT-S2	坪林區有機茶園	臺茶十二號	芽枯病	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
BT-S3	坪林區有機茶園	臺茶十二號	芽枯病	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
BT-S5	坪林區有機茶園	臺茶十二號	芽枯病	<i>Colletotrichum</i> sp.
BT-F1	坪林區有機茶園	臺茶十二號	芽枯病	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
BT-F2	坪林區有機茶園	臺茶十二號	芽枯病	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
BT-F3	坪林區有機茶園	臺茶十二號	芽枯病	未明桃紅菌落
BT-F4	坪林區有機茶園	臺茶十二號	芽枯病	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
BT-F5	坪林區有機茶園	臺茶十二號	芽枯病	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
BT-F6	坪林區有機茶園	臺茶十二號	芽枯病	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
BT-F7	坪林區有機茶園	臺茶十二號	芽枯病	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
BT-F8	坪林區有機茶園	臺茶十二號	芽枯病	未明橘色菌落
BT-F9	坪林區有機茶園	臺茶十二號	芽枯病	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
GC-S1	坪林區慣行茶園	青心烏龍	芽枯病	<i>Colletotrichum</i> sp.
GC-S2	坪林區慣行茶園	青心烏龍	芽枯病	<i>Colletotrichum</i> sp.
GC-S3	坪林區慣行茶園	青心烏龍	芽枯病	<i>Colletotrichum</i> sp.

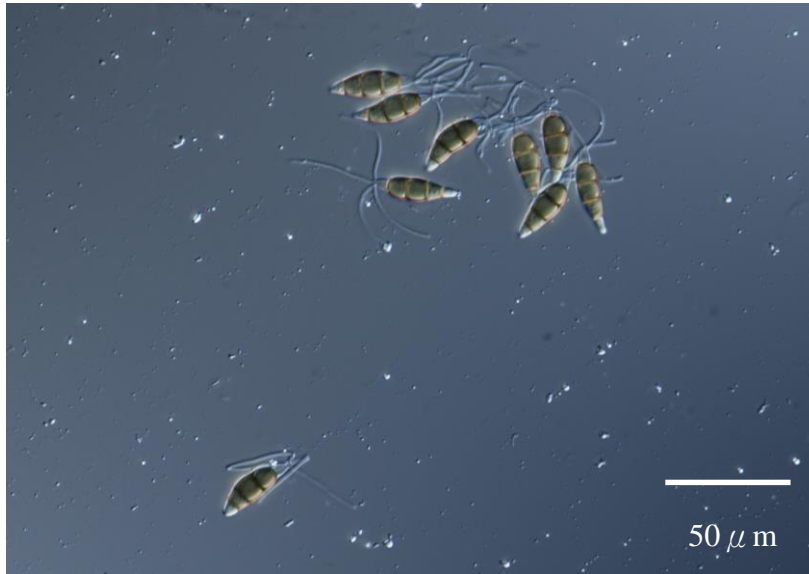


圖 5、臺灣北部茶芽枯病分離所得之擬盤多毛孢菌分離株之分生孢子形態。

Figure 5. The conidia of *Pestalotiopsis* sp. isolated from tea sprout wilt in northern Taiwan.



圖 6、臺灣北部茶芽枯病分離所得之炭疽病菌分離株之分生孢子形態。

Figure 6. The conidia of *Colletotrichum* sp. isolated from tea sprout wilt in northern Taiwan.

(二) 赤葉枯病葉之病原菌分離

本項使用組織塊分離法，對坪林區有機茶園、坪林區慣行茶園、楊梅區之茶園、文山區之茶園之赤葉枯病進行分離，其如表 7 所示。所獲得之真菌分離株，可大致分成擬盤多毛孢菌及炭疽病菌兩類。

本項統計自坪林區有機茶園青心烏龍典型赤葉枯病病斑，共得到 4 株真菌分離株，其中 3 株為炭疽病菌，另外 1 株則為擬盤多毛孢菌，此些分離株之編號為 BC 後加不同代碼(如表 8)。而於坪林區有機之臺茶十二號則獲得 5 株分離株，其中 1 株為炭疽病菌，4 株為擬盤多毛孢菌，並將其編號為 BT 後加不同代碼(如表 8)。自坪林區慣行茶園得到 1 株分離株為炭疽病菌，其編號為 GC 後加不同代碼(如表 8)。由於文山區鐵觀音、典型茶赤葉枯病病斑以組織分離法分離並未得到真菌菌株而在臺茶十二號上發現病斑，分離後得到 3 株炭疽病菌分離株，其編號為 CT 後加不同代碼(如表 8)，而四季春則分得 1 株炭疽病菌，4 株擬盤多毛孢菌，其編號為 CS 後加不同代碼(如表 8)。於楊梅區之青心烏龍得到 6 株炭疽病菌分離株，其編號為 AC 後加不同代碼(如表 8)，並於楊梅區不同品種分離得到炭疽病菌分離株，其編號如表 8。

表 7 臺灣北部茶樹赤葉枯病斑以組織塊分離法分離病原之結果。

Table 7. The fungi isolated from tea anthracnose lesions in northern Taiwan by tissue isolation method.

地點	茶樹品種	分離樣本數	擬盤多毛孢菌之分離率 Isolation rate of <i>Pestalotiopsis</i> spp.	炭疽病菌之分離率 Isolation rate of <i>Colletotrichum</i> spp.
新北市坪林區 有機茶園	青心烏龍	4	1/4(25%)	3/4(75%)
新北市坪林區 有機茶園	臺茶十二號	5	4/5(80%)	1/5(20%)
新北市坪林區 慣行茶園	青心烏龍	1	0/1(0%)	1/1(100%)
臺北市文山區 茶園	臺茶十二號	3	0/3(0%)	3/3(100%)
臺北市文山區 茶園	四季春	4	1/4(25%)	3/4(75%)
桃園縣楊梅區 茶園	青心烏龍	6	0/6(0%)	6/6(100%)

表 8 臺灣北部茶樹赤葉枯病斑分離所得真菌分離株之編號及其來源。

Table 8. Number and source of fungal isolates derived from tea anthracnose lesions in northern Taiwan.

分離株 編號	來源地	茶樹品種	分離部位	菌株歸類
BC-1	坪林區有機茶園	青心烏龍	赤葉枯病葉	<i>Colletotrichum</i> sp.
BC-2	坪林區有機茶園	青心烏龍	赤葉枯病葉	<i>Colletotrichum</i> sp.
BC-3	坪林區有機茶園	青心烏龍	赤葉枯病葉	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
BC-5	坪林區有機茶園	青心烏龍	赤葉枯病葉	<i>Colletotrichum</i> sp.
BT-1-1	坪林區有機茶園	臺茶十二號	赤葉枯病葉與 輪斑病混合	<i>Colletotrichum</i> sp.
BT-1-2	坪林區有機茶園	臺茶十二號	赤葉枯病葉與 輪斑病混合	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
BT-2	坪林區有機茶園	臺茶十二號	赤葉枯病葉	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
BT-3	坪林區有機茶園	臺茶十二號	赤葉枯病葉	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
BT-4	坪林區有機茶園	臺茶十二號	赤葉枯病葉	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
GC-2	坪林區慣行茶園	青心烏龍	赤葉枯病葉	<i>Colletotrichum</i> sp.
CT-2	臺北市文山區茶園	臺茶十二號	赤葉枯病葉	<i>Colletotrichum</i> sp.
CT-3	臺北市文山區茶園	臺茶十二號	赤葉枯病葉	<i>Colletotrichum</i> sp.
CS-1	臺北市文山區茶園	四季春	赤葉枯病葉	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
CS-2	臺北市文山區茶園	四季春	赤葉枯病葉	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
CS-3	臺北市文山區茶園	四季春	赤葉枯病葉	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
CS-4	臺北市文山區茶園	四季春	赤葉枯病葉	<i>Colletotrichum</i> sp.
15-3-1	桃園縣楊梅鎮茶園	臺茶十五號	赤葉枯病葉	<i>Colletotrichum</i> sp.
18-3-1	桃園縣楊梅鎮茶園	清新大有	赤葉枯病葉	<i>Colletotrichum</i> sp.
25-3-1	桃園縣楊梅鎮茶園	青心柑仔	赤葉枯病葉	<i>Colletotrichum</i> sp.
AC-4	桃園縣楊梅鎮茶園	青心烏龍	赤葉枯病葉	<i>Colletotrichum</i> sp.
AC-5	桃園縣楊梅鎮茶園	青心烏龍	赤葉枯病葉	<i>Colletotrichum</i> sp.
AC-6	桃園縣楊梅鎮茶園	青心烏龍	赤葉枯病葉	<i>Colletotrichum</i> sp.
AC-7	桃園縣楊梅鎮茶園	青心烏龍	赤葉枯病葉	<i>Colletotrichum</i> sp.

三、茶赤葉枯病及芽枯病分離株之病原性測試

(一)供試健康茶樹之栽種

自南投縣購入約 300 株健康之青心烏龍茶苗，於臺大中非大樓頂樓陽台以五吋塑膠盆種植，另外也購入大葉烏龍、四季春、臺茶十二號各 20 株，作為不同品種接種試驗之使用。



圖 7、臺大中非大樓頂樓溫室中健康茶苗之栽種情形。

Figure 7. The healthy tea seeding grown in NTU green house.

(二) 茶樹嫩芽以孢子懸浮液針刺接種試驗之結果

本接種法健康之茶樹品種為青心烏龍，皆先以消毒過之解剖針於嫩芽刺出接

種點，並以不接病菌只噴水之接種點作為對照組，每盆植株各接種兩個嫩芽，將濃度為 10^5 /mL 之孢子懸浮液噴灑於其上，所有接種點均以噴溼之塑膠袋套封保溼，於溫室中觀察後續發病情形，並以新芽枯黑當作發病與否之依據，其結果如表 9 及表 10。

表 9 臺灣北部茶赤葉枯病分離所得分離株以針刺接種青心烏龍後之發病結果。

Table 9. The inoculation result of major fungal isolates derived from tea anthracnose lesions by needle inoculation method.

接種分離株	菌落歸類	接種芽數	芽枯發病數*	發病率(%)
AC-5	炭疽菌菌落	6	6	100
AC-6	炭疽菌菌落	6	5	83
BC-1	炭疽菌菌落	6	5	83
BC-2	炭疽菌菌落	6	5	83
BC-5	炭疽菌菌落	6	6	100
BT-1-1	炭疽菌菌落	6	6	100
CT-2	炭疽菌菌落	6	5	83
15-3-1	炭疽菌菌落	6	6	100
18-3-1	炭疽菌菌落	6	6	100
BT-2	擬盤多毛孢菌	6	0	0
—	對照組	6	0	0

*芽枯發病數係接種後十天觀察而得

表 10 臺灣北部茶樹芽枯病分離所得分離株以針刺接種青心烏龍後之發病結果。

Table 10. The inoculation result of fungal isolates derived from tea sprout wilt by needle inoculation method.

接種分離株	菌落歸類	接種芽數	芽枯發病數*	發病率(%)
BC-X	炭疽菌菌落	6	4	66
BC-Y	炭疽菌菌落	6	5	83
GC-S1	炭疽菌菌落	6	6	100
BC-F3	擬盤多毛孢菌	6	0	0
BT-F6	擬盤多毛孢菌	6	0	0
BT-F2	擬盤多毛孢菌	6	0	0
BT-S2	擬盤多毛孢菌	6	0	0
BC-F4	擬盤多毛孢菌	6	0	0
—	對照組	6	0	0

*芽枯發病數係接種後十天觀察而得



圖 8、茶樹赤葉枯病菌分離株 BC-5 以針刺接種青心烏龍嫩芽 5 天後之發病情形。(A) 為接種造成芽枯病徵，(B) 為對照組。(箭頭指示處為接種處)

Figure 8. The symptom development of tea sprout wilt after 5 days by needle inoculation method: (A) inoculated with tea brown blight isolate BC-5, (B) Control (Arrow indicates the inoculation point)



圖 9、臺灣北部茶芽枯病分離株 BC-X 以針刺接種青心烏龍 8 天後之發病情形。(箭頭指示處為接種處)

Figure 9. The symptom development of tea sprout wilt on Oolong tea sprout by needle inoculation with isolate BC-X for 8 days. (Arrow indicates the inoculation point)

(三) 茶樹葉部以孢子懸浮液進行傷口接種之結果

本試驗供試之菌株係來自赤葉枯病斑及芽枯病之分離所得之炭疽菌株(包括分離株 BC-5, GC-S1, BC-X, BC-Y)，結果顯示於葉部傷口噴灑孢子懸浮液皆會造成典型赤葉枯病之病斑(圖 10)，且實驗組 3 重複皆出現病徵，而對照組皆未出現病徵。



圖 10、臺灣北部茶赤葉枯病分離株以孢子懸浮液進行傷口接種後於葉片出現之病徵。

Figure 10. The symptom development of tea brown blight disease on Oolong tea leaves after wound isolation with conidia suspension for 8 days.

四、人工接種茶赤葉枯病及芽枯病之病原再分離

經針刺接種法所產生之茶樹芽枯病病斑，皆再利用前述之組織塊分離法進行病原再分離。即取組織塊表面消毒後先置入 WA 培養再使用 PDA 進行純化與鑑定，結果顯示所有自發病病徵再分離之分離株皆與原接種菌株相同，故已完成柯霍氏準則第四條。

除組織塊分離法外，本項也利用稀釋分離法進行再分離，以確認所有造成病害之可能病原菌。此一稀釋分離法之分離總結果如表 11 所示，於全部稀釋分離法得到之 PDA 皆有分到炭疽菌菌落，且與原接種之分離株(BC-5)型態相同，而於對照組皆未發現炭疽菌菌落，但有分離到兩株白色菌絲之未知真菌，此結

果與組織塊分離法結果相符，由此可證實芽枯型病徵主要是由炭疽菌分離株所造成。



表 11 人工接種以稀釋分離法分離芽枯病之結果。

Table 11. The reisolation result from Oolong tea sprout wilt by dilution method.

菌落類型	分離率
炭疽菌菌落	3/3(100%)
未知菌落 1*	1/3(33%)

*未知菌落 1：黃色菌落

五、茶赤葉枯病及芽枯病分離株之鑑定

(一)茶赤葉枯病菌芽枯型分離株 BC-5，DNA 片段之 PCR 增幅及 ITS 序列分析

經上述病原性測試後，發現目前臺灣北部地區之茶赤葉枯病與芽枯病，其炭疽病菌之形態大致相同，病原性必相近似，故取自茶赤葉枯病分離而可造成芽枯之菌株 BC-5 做為代表，進行分子鑑定，即發現目前台灣北部將確定且有芽枯病原性之分離株 BC-5，利用 PCR 增幅、ITS 序列分析及序列比對分析進行分子鑑定。其利用引子對 ITS1、ITS4 進行 PCR 增幅後所得之電泳圖譜如圖 11，得到大小約為 550 bp 之 DNA 片段，經 ITS1 端及 ITS4 端序列分析得到兩條 DNA 序列，將兩條序列(alignment)除錯後得到大小為 526 bp 之 DNA 序列，如圖 12，將續列資料送上 NCBI 網站之基因庫進行 Blast 比對，得到結果如表 12，發現與 *Colletotrichum gloeosporioides* (Accession# JF710562.1)相似度高達 100%且分數也是最高，由此可確認分離株 BC-5 為茶赤葉枯病菌菌株，並且會造成芽枯型病徵。

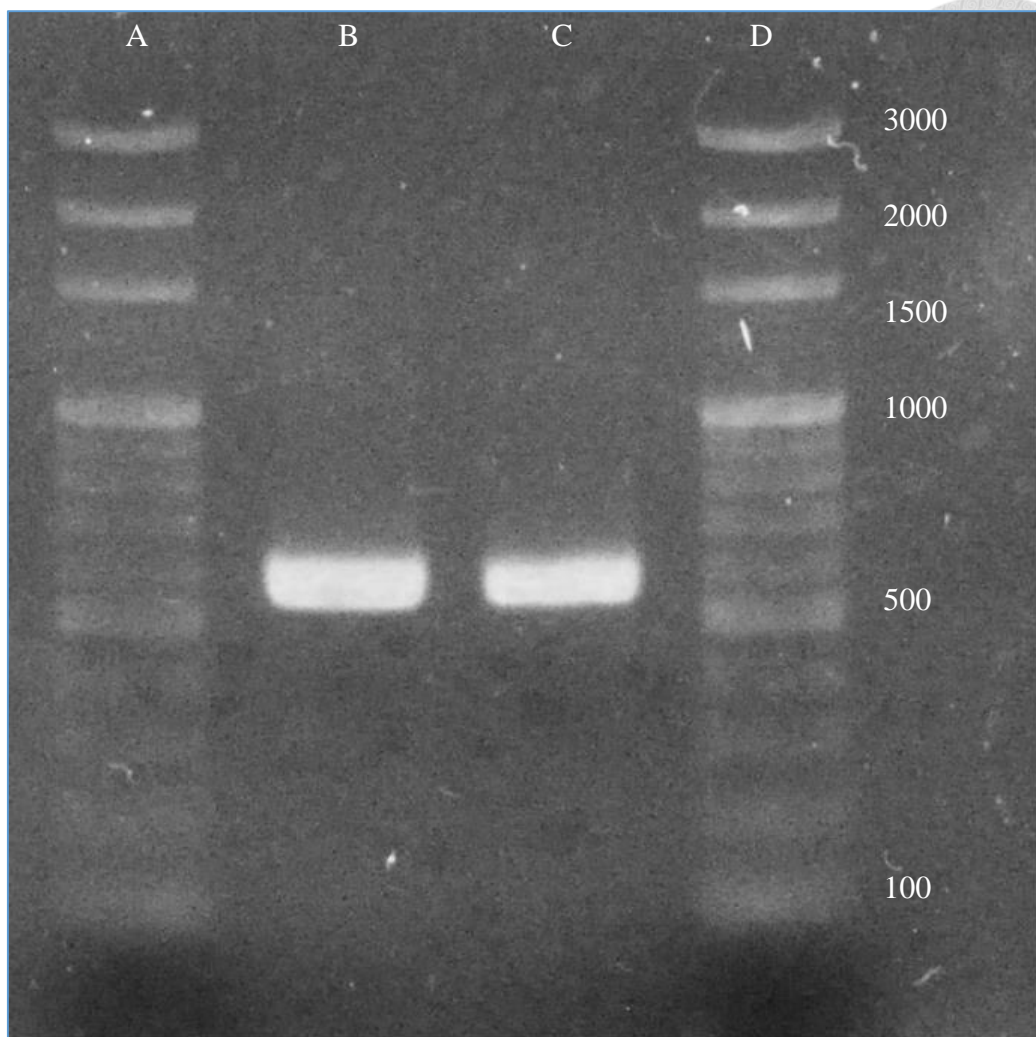


圖 11、臺灣北部茶赤葉枯病分離株 BC-5 以引子對 ITS1/ITS4 進行 PCR 增幅分
所得之 DNA 片段電泳圖譜。

A、D 欄為分子記號，B、C 欄為 BC-5 之 PCR 增幅片段。

Figure 11. Electrophoresis pattern of PCR products of tea anthracnose pathogen BC-5
from northern Taiwan, which use primer ITS1 and ITS4 to amplify. A and D column
are molecular marker, B and C column are PCR products of BC-5.



1 ACGCTCTACACCCTTTGTGACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAG
51 GGTCTCCGTGACCCCCCGGCCTCCCGCCCCGGGCGGGTTCGGCGCCCCGC
101 CGGAGGATAACCAAACCTCTGATTAAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAA
151 GCAAATAATCAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATG
201 AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAA
251 TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCAT
301 GCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCC
351 CTACGGCTGACGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCT
401 CCTTTGCGTAGTAACTTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTG
451 CCGTAAAACCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATA
501 CCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA

圖 12、臺灣北部茶赤葉枯病分離株 BC-5 以引子對 ITS1/ITS4 進行 PCR 增幅後所得之 DNA 序列。

Figure 12. DNA sequence of PCR products of tea anthracnose pathogen BC-5, which use primer ITS1 and ITS4 to amplify.

表 12 臺灣北部茶赤葉枯病分離株 BC-5 以引子對 ITS1/ITS4 經 PCR 增幅所得之 DNA 序列至 NCBI 網站基因庫比對之結果。

Table 12. The identification result of tea anthracnose pathogen BC-5 DNA sequence submitted to NCBI gene bank.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
JF710562.1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	970	970	99%	0.0	100%
JF710563.1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	970	970	99%	0.0	100%
KF836743.1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	963	963	100%	0.0	99%
JQ809665.1	<i>Colletotrichum</i> sp.	963	963	100%	0.0	99%
HQ832797.1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	963	963	100%	0.0	99%
GQ916544.1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	963	963	100%	0.0	99%
FJ459929.1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	963	963	100%	0.0	99%
JX010224.1	<i>Glomerella cingulata</i> f.sp. <i>camelliae</i>	961	961	99%	0.0	99%
JX010223.1	<i>Glomerella cingulata</i> f.sp. <i>camelliae</i>	961	961	99%	0.0	99%
JN936981.1	<i>Colletotrichum</i> sp.	959	959	99%	0.0	99%

(二)病原菌之形態學鑑定

茶赤葉枯病菌可產生分生孢子盤於寄主組織的表皮(圖 13 A)，成熟後表皮細胞破裂而露出寄主表面，分生孢子盤無剛毛，表面著生特化的分生孢子柄，頂端著生分生孢子；分生孢子長橢圓形、無色透明，一端尖一端鈍圓或兩端鈍圓，平均大小為 12.5-22.5 X 2.5-7.5 μm (圖 13 B)。分生孢子遇適當環境藉發芽管發芽(圖 14)，若遇寄主表面可產生具有黑色素之壓器(圖 15)，壓器產生穿透釘會以物理性壓力穿透寄主表面入侵。

在人工培養基上本菌會產生灰色至白色菌體(圖 16)，菌絲形成分生孢子柄而不形成分生孢子盤(圖 17)，成熟時分生孢子極易脫落。在人工培養基上易產生氣生菌絲，並分泌深色色素至培養基中。

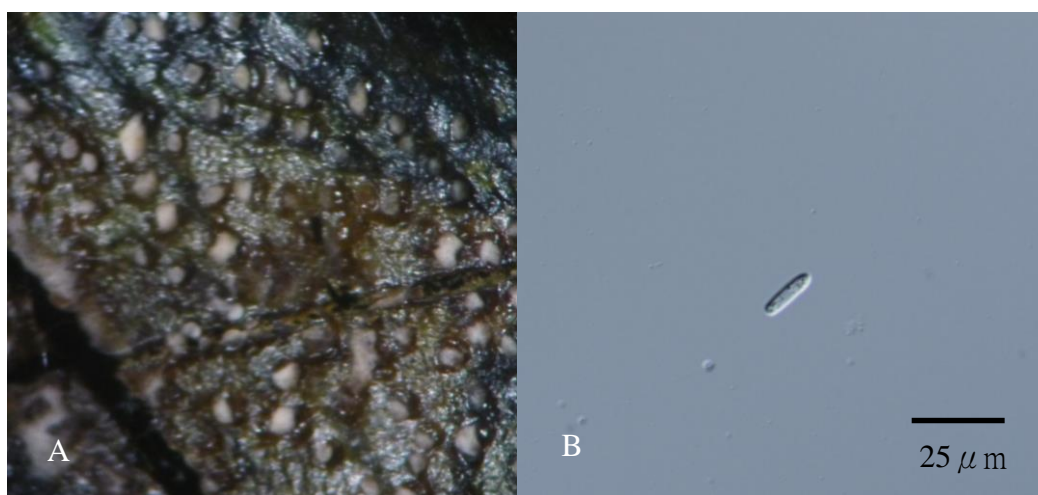


圖 13、茶赤葉枯病菌芽枯型菌株 BC-5 於葉上產生分生孢子盤(A)，及其分生孢子形態(B)。

Figure 13. The morphology of tea brown blight pathogen (strain BC-5) causing sprout wilt symptom. (A) Its acervulus on leaf, (B) Its conidia.



圖 14、茶赤葉枯病菌芽枯型菌株 BC-5 分生孢子之發芽形態。

Figure 14. Germination of tea brown blight pathogen (strain BC-5) from conidia.

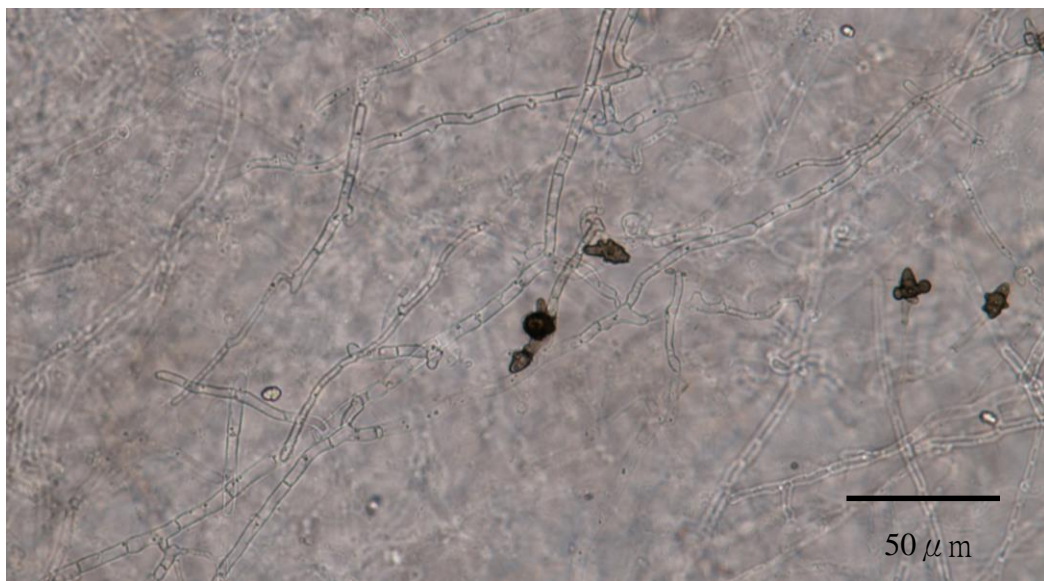


圖 15、茶赤葉枯病菌芽枯型菌株 BC-5 於載玻片培養基上產生之壓器。

Figure 15. The appressorium of tea brown blight pathogen (strain BC-5) formed on slide culture.

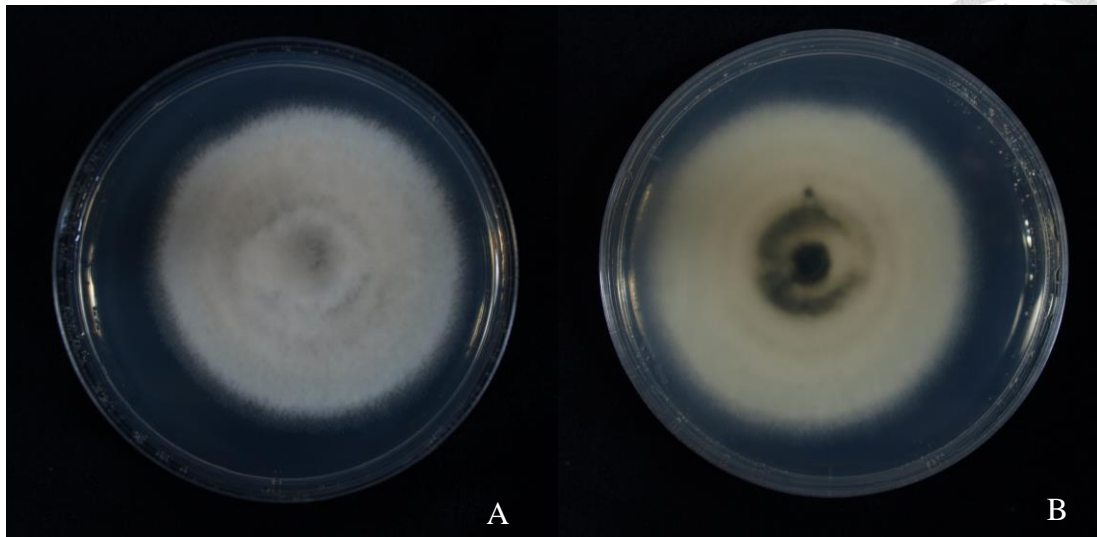


圖 16、茶赤葉枯病菌芽枯型菌株 BC-5 培養於 PDA 之菌落形態。(A)為正面觀，(B)為背面觀。

Figure 16. Cultural colony of tea brown blight pathogen (strain BC-5) on PDA. (A) Front view, (B) Back view.

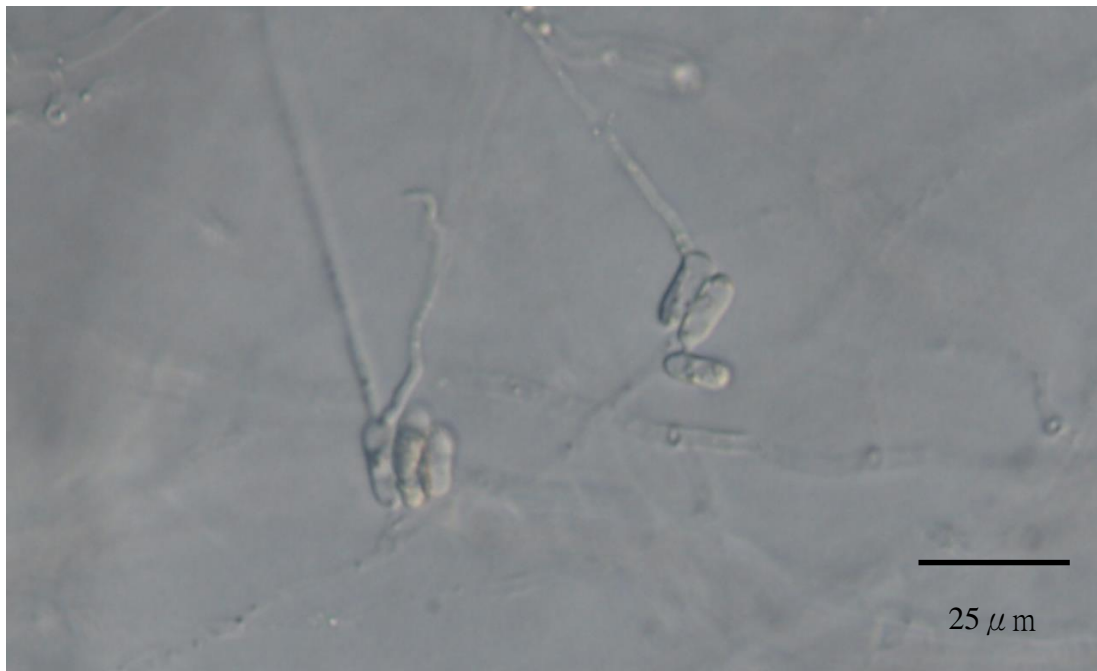


圖 17、茶赤葉枯病菌芽枯型菌株 BC-5 於載玻片培養基上產生之分生孢子梗

Figure 17. The conidiophore of tea brown blight pathogen (strain BC-5) on slide culture.

六、溫度對芽枯病菌生長速度之影響

本試驗於 15、20、25、30、35°C 共五種溫度下，比較茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 在 PDA 上培養 5 天之菌絲長度，結果如表 13 及圖 18，發現菌株 BC-5 於 35°C 即無法生長，而在 25°C 生長最快，於較寒冷之情況下雖能存活，但生長力較差。

表 13 茶赤葉枯病菌株 BC-5 在不同溫度下以 PDA 培養 5 天之菌絲長度。

Table 13. Growth of tea brown blight pathogen (strain BC-5) on PDA for 5 days under different temperature.

溫度	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C
菌絲生長長度(cm)	3.33	5.30	6.45	3.08	0
標準差	0.18	0.21	0.95	0.09	0

*每組試驗為 5 重複之平均。

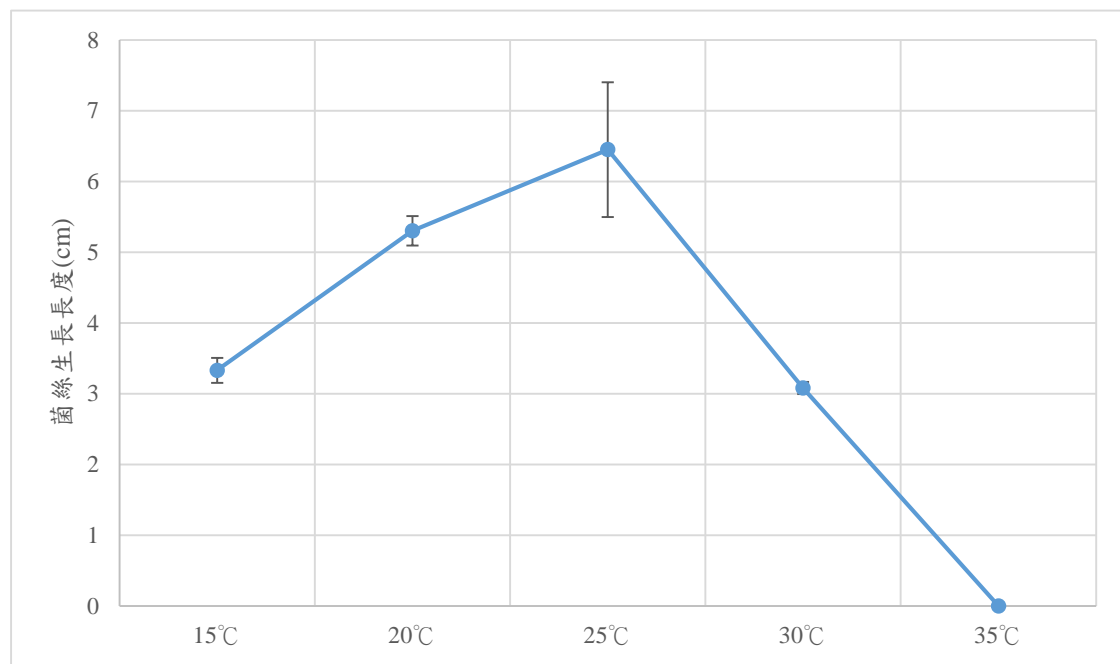


圖 18、茶赤葉枯病菌芽枯型菌株 BC-5 在不同溫度下以 PDA 培養五天菌絲長度之比較。

Figure 18. Mycelium length of tea brown blight pathogen (strain BC-5) grown on PDA for 5 days under different temperature.

七、北部地區茶赤葉枯病及芽枯病流行病學調查

自 2013 年 12 月至 2014 年 6 月，每月於北部三個地區對各品種之茶樹進行茶赤葉枯病危害嚴重度之調查，並於坪林區增加調查芽枯病之發生趨勢。

(一)茶赤葉枯病危害嚴重度之變遷

自 2013 年 12 月至 2014 年 6 月，於三大地區調查赤葉枯病危害嚴重度，其結果如圖 19，楊梅地區 6 月份由於氣象站維護，因此楊梅地區與氣象資料比對時不包括 6 月份資料。茲簡述各地區發病之變遷狀況如下：

1. 坪林區有機及慣行茶園：於不同月份皆可發現青心烏龍之赤葉枯病危害嚴重度皆較臺茶十二號嚴重，而從整體趨勢可看出三地區之嚴重度皆自 2013 年 12 月至 2014 年 4 月呈現下降趨勢。經與氣象因子做相關分析，結果如表 14，可發現病害嚴重度皆與月平均相對溼度呈負相關(如圖 20)，而與月平均風速(圖 21)、月平均氣壓皆呈正相關。
2. 楊梅區茶園：楊梅區之茶園除青心烏龍與臺茶十二號以外其病害嚴重度均較低，而病害嚴重度起伏不定，並沒有一定的規律。經與氣象因子進行相關分析，結果如表 15，可發現並無一致性，但若忽略病害嚴重度較低、易出現誤差之四季春後，可發現病害嚴重度與月總降雨量、月平均相對溼度、月平均風速呈正相關，而與月平均溫度則呈負相關。
3. 文山區茶園：文山區之茶園自 2013 年 12 月至 2014 年 5 月，茶赤葉枯病危害嚴重度皆較低，但至 2014 年 6 月，四季春卻出現本次調查中受害最嚴重之 24%，經與氣象因子進行相關分析，結果如表 16，可發現與氣象因子皆無顯著相關性。

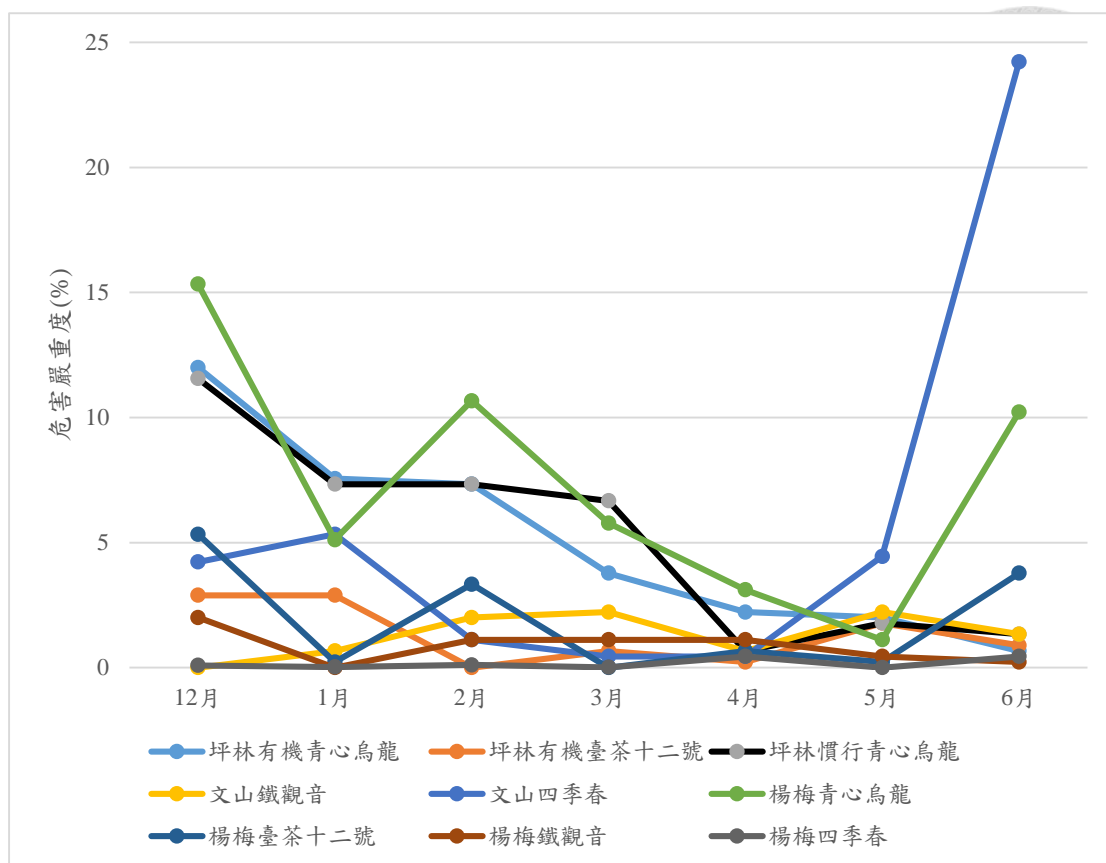


圖 19、臺灣北部茶赤葉枯病於 2013 年 12 月至 2014 年 6 月病勢發展曲線。

Figure 19. Monthly tea brown blight disease severity investigated from December 2013 to June 2014 in northern Taiwan.

表 14 2013 年 12 月至 2014 年 6 月坪林地區茶赤葉枯病危害嚴重度與當地氣象資料之相關分析。

Table 14. The correlation between tea brown blight disease severity and meteorological factors investigated from December 2013 to June 2014 at Pinglin, New Taipei.

危害嚴重度	相關係數(r)				
	月均溫	月平均相對溼度	月總降雨量	月平均風速	月平均氣壓
有機青心烏龍危害嚴重度	-0.8642	-0.7015	-0.3348	0.8574	0.7558
有機臺茶十二號危害嚴重度	-0.3165	-0.5298	0.05480	0.3323	0.3415
慣行青心烏龍危害嚴重度	-0.8677	-0.6924	-0.3289	0.8490	0.7628

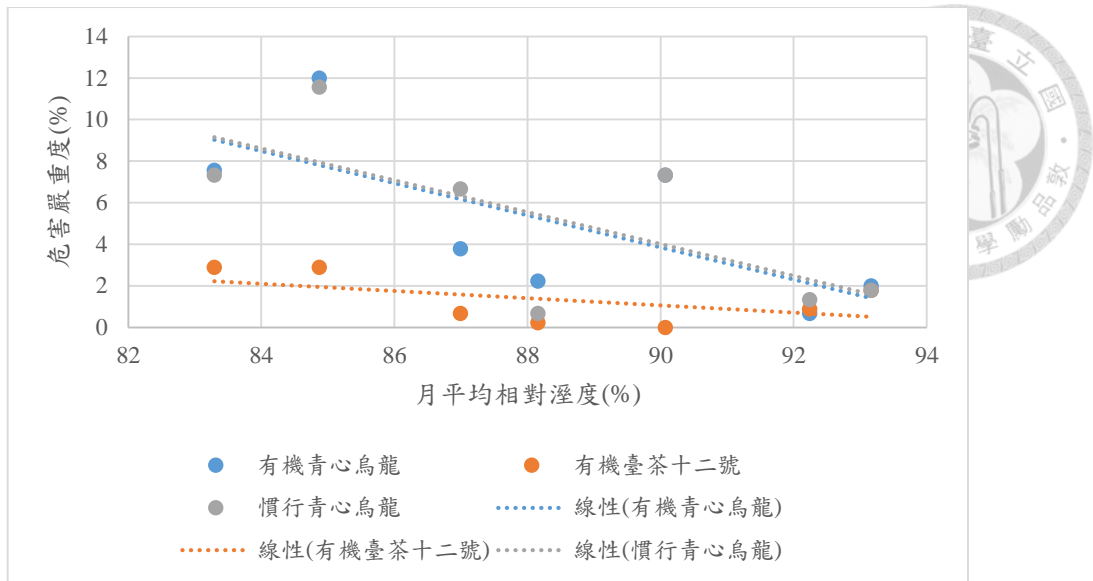


圖 20、2013 年 12 月至 2014 年 6 月坪林地區月平均相對溼度與茶赤葉枯病危害嚴重度之相關性。

Figure 20. Relationship between tea brown blight disease severity and monthly relative humidity investigated from December 2013 to June 2014 at Pinglin, New Taipei.

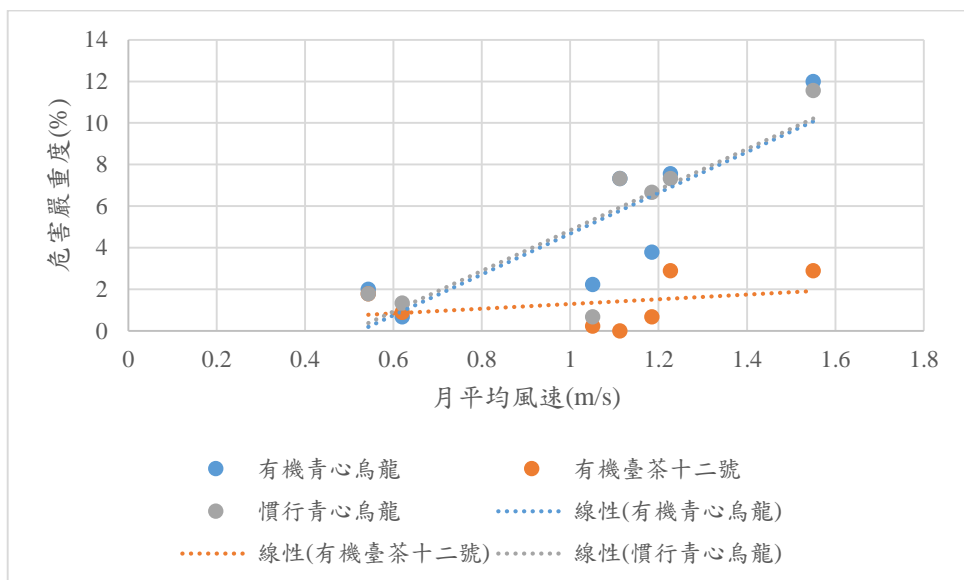


圖 21、2013 年 12 月至 2014 年 6 月坪林地區月平均風速與茶赤葉枯病危害嚴重度相關分析。

Figure 21. Relationship between tea brown blight disease severity and monthly mean wind speed investigated from December 2013 to June 2014 at Pinglin, New Taipei.

表 15 2013 年 12 月至 2014 年 5 月楊梅地區茶赤葉枯病危害嚴重度與當地氣象資料之相關分析。

Table 15. The correlation between tea brown blight disease severity and meteorological factors investigated from December 2013 to May 2014 at Yangmei, Taoyuan.

危害嚴重度	相關係數(r)					
	月均溫	月平均相對溼度	月總降雨量	月平均風速	月平均氣壓	月總日照
青心烏龍危害嚴重度	-0.7701	0.8198	0.8575	0.8219	0.6139	-0.4716
臺茶十二號危害嚴重度	-0.5318	0.8485	0.8447	0.6476	0.3384	-0.5786
鐵觀音危害嚴重度	-0.2736	0.3975	0.8987	0.4298	0.1176	-0.7531
四季春危害嚴重度	0.2301	-0.2008	-0.0938	-0.3312	-0.2143	0.1686

表 16 2013 年 12 月至 2014 年 6 月文山地區茶赤葉枯病危害嚴重度與當地氣象資料之相關分析。

Table 16. The correlation between tea brown blight disease severity and meteorological factors investigated from December 2013 to June 2014 at Wenshan, Taipei.

危害嚴重度	相關係數(r)				
	月均溫	月平均相對溼度	月總降雨量	月平均風速	月平均氣壓
鐵觀音危害嚴重度	0.2854	0.2932	0.3947	-0.6457	-0.2885
四季春危害嚴重度	0.6629	0.5159	0.6209	-0.5182	-0.7338

(二)坪林地區芽枯病之流行趨勢

自 2013 年 12 月至 2014 年 6 月，於坪林地區調查芽枯病之發生趨勢，結果如圖 22。

為了解茶赤葉枯病與芽枯罹病率之關係，進行兩者間相關分析，結果如表 17，由此表可看出兩者間具有高度相關性。經與氣象因子進行相關分析，結果如表 18，可發現與月均溫、月平均相對溼度皆呈高度負相關(圖 23 與圖 24)，而與月平均風速、月平均氣壓成高度正相關(圖 25)。

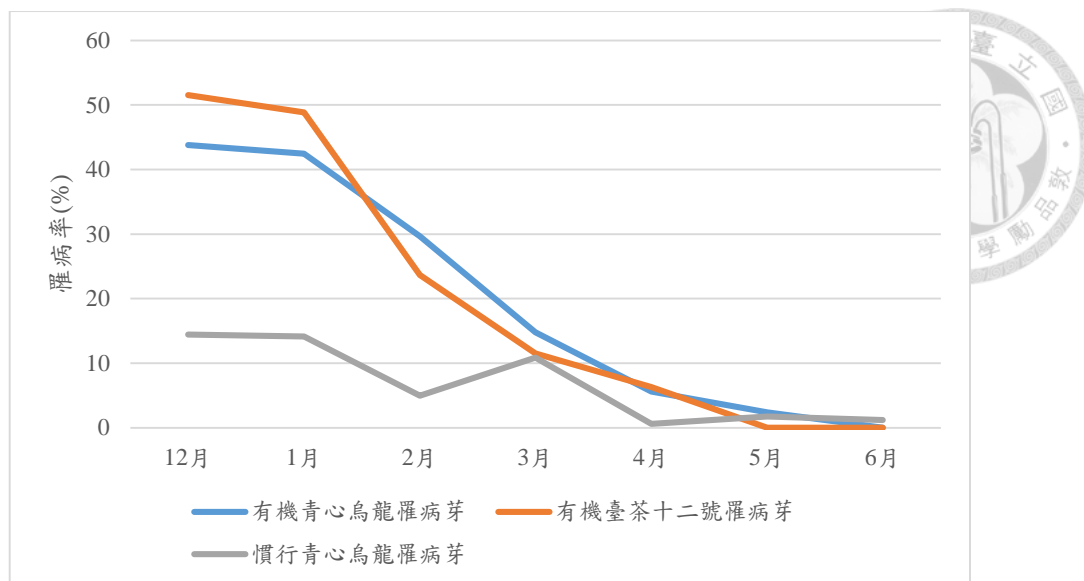


圖 22、2013 年 12 月至 2014 年 6 月坪林地區芽枯病病勢發展曲線。

Figure 22. Tea sprout wilt incidence curves investigated from December 2013 to July 2014 at Pinglin, New Taipei.

表 17 2013 年 12 月至 2014 年 6 月坪林地區芽枯病罹病率與茶赤葉枯病危害嚴重度之相關分析。

Table 17. The correlation between tea sprout wilt incidence and tea brown blight disease severity investigated from December 2013 to June 2014 at Pinglin, New Taipei.

芽枯罹病率	相關係數(r)		
	有機青心烏龍 赤葉枯病	有機臺茶十二號 赤葉枯病	慣行青心烏龍 赤葉枯病
有機青心烏龍芽枯罹病率	0.9519	0.5881	0.9089
有機臺茶十二號芽枯罹病率	0.9344	0.6924	0.8688
慣行青心烏龍芽枯罹病率	0.8016	0.6788	0.8889

表 18 2013 年 12 月至 2014 年 6 月坪林區芽枯病罹病率與氣象資料之相關分析。

Table 18. The correlation between tea sprout wilt incidence and meteorological factors investigated from December 2013 to June 2014 at Pinglin, New Taipei.

芽枯罹病率	相關係數(r)				
	月均溫	月平均相對溼度	月總降雨量	月平均風速	月平均氣壓
有機青心烏龍芽枯罹病率	-0.9089	-0.8052	-0.4770	0.8398	0.8240
有機臺茶十二號芽枯罹病率	-0.8469	-0.8460	-0.4576	0.8331	0.7779
慣行青心烏龍芽枯罹病率	-0.8133	-0.8654	-0.4700	0.8083	0.8019

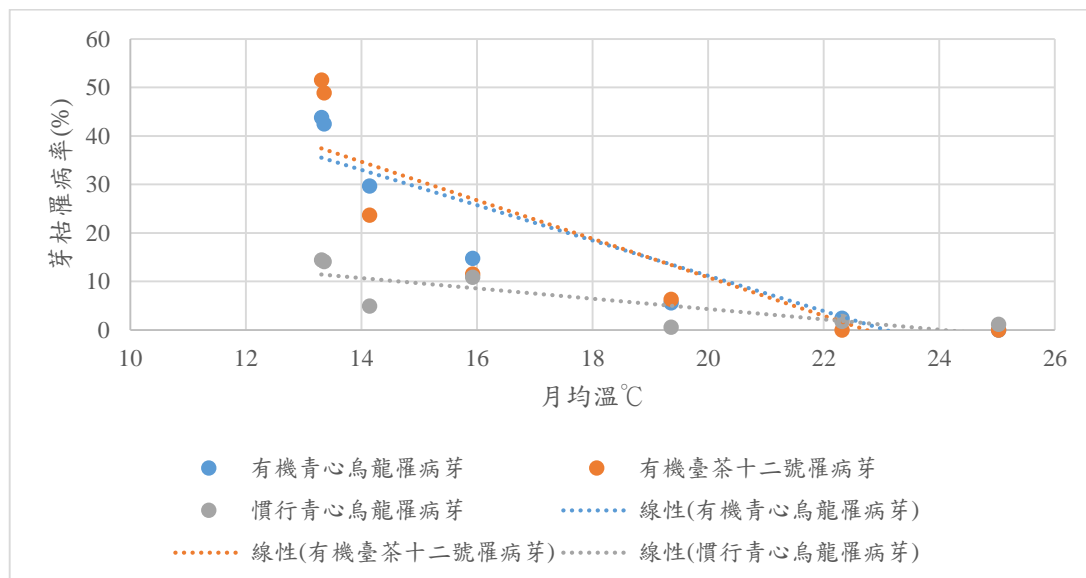


圖 23、2013 年 12 月至 2014 年 6 月坪林地區芽枯病罹病率對月均溫之相關性。

Figure 23. Relationship between tea sprout wilt incidence and monthly mean temperature investigated from December 2013 to June 2014 at Pinglin, New Taipei.

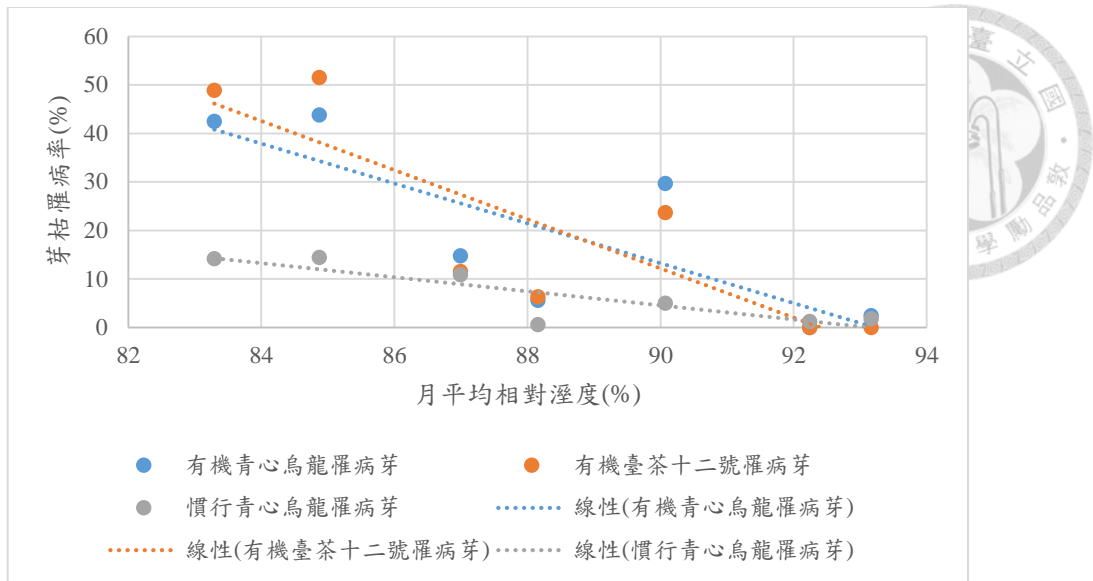


圖 24、2013 年 12 月至 2014 年 6 月坪林地區芽枯病罹病率對月平均相對溼度之相關性。

Figure 24. Relationship between tea sprout wilt incidence and monthly mean relative humidity investigated from December 2013 to June 2014 at Pinglin, New Taipei.

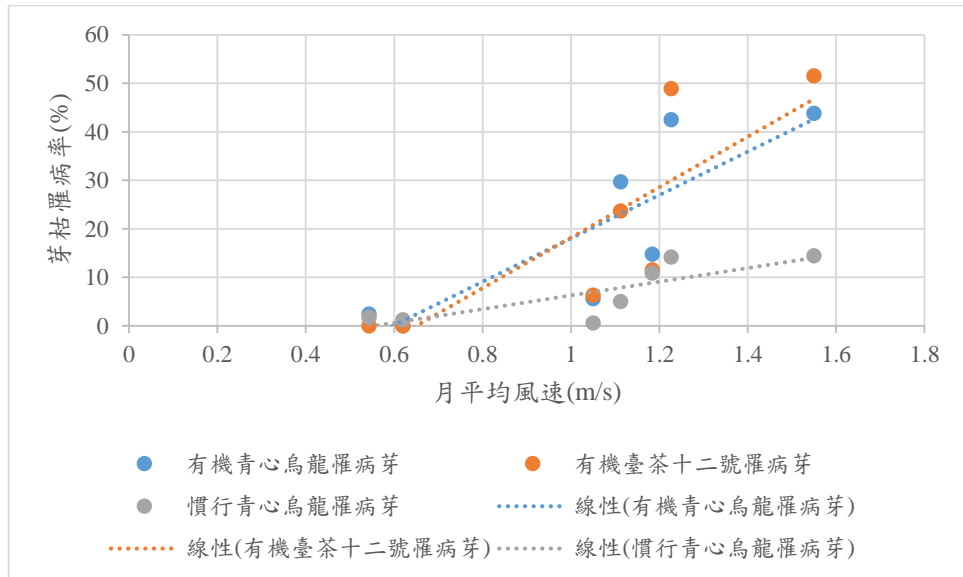


圖 25、2013 年 12 月至 2014 年 6 月坪林地區芽枯病罹病率對月平均風速之相關性。

Figure 25. Relationship between tea sprout wilt incidence and monthly mean wind speed investigated from December 2013 to June 2014 at Pinglin, New Taipei.

八、芽枯病之非農藥防治

(一)植物萃取液對芽枯病菌孢子發芽之抑制試驗結果

本項共選出七種植物，萃取完成後獲得水草、酒萃共十四種植物萃取液。並將植物萃取液依不同的原始濃度加入茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 之孢子懸浮液中觀察是否影響孢子發芽，其結果如表 19 及圖 26、圖 27 所示。發現本病原菌平均孢子發芽率約為 90%，而使用免賴得之對照組孢子發芽率則為 45%，其具有一定之抑制效果。

上述各孢子發芽率經過換算得到孢子發芽抑制率如表 20 及圖 28，其中蒜之水草萃取液及酒精萃取液其孢子發芽抑制率皆超越 95%，效果最佳，除蒜之外其餘植物都要以酒精萃取方有孢子發芽抑制效果；其中藿香酒萃 1% 效果良好，但稀釋 0.2% 即無抑制孢子發芽之效果；薑無論是以水草萃取或以酒精萃取皆無抑制孢子發芽之效用；肉桂、薑黃、丁香使用酒精萃取皆有良好抑制效果，即使濃度為 0.1% 抑制率也超過 95%，五味子使用酒精萃取 1%, 0.2% 皆有抑制效果，但稀釋至 0.1% 後即無效果。

表 19 不同植物萃取液對茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 孢子發芽率之影響。

Table 19. Effect of different plant extracts on conidial germination of *Colletotrichum gloeosporioides* after incubation at 25°C for 24 h.

		孢子發芽率(%)				
對照組		90.00				
免賴得(1500x)		45.55				
對照組酒精 1.25%		79.17				
對照組酒精 0.25%		99.00				
對照組酒精 0.125%		96.17				
植物	水萃 1%	水萃 0.2%	水萃 0.1%	酒萃 1%	酒萃 0.2%	酒萃 0.1%
蒜	0.17	1.17	1.00	3.83	2.60	3.17
藿香	99.50	95.33	92.00	1.50	99.17	98.33
薑	97.50	98.33	90.80	98.33	99.00	85.20
肉桂	95.50	97.67	97.67	1.67	3.50	0.00
薑黃	99.50	98.50	98.67	0.00	0.50	3.33
丁香	93.33	96.50	94.50	0.00	0.50	0.50
五味子	96.50	98.50	98.17	0.83	6.20	99.00

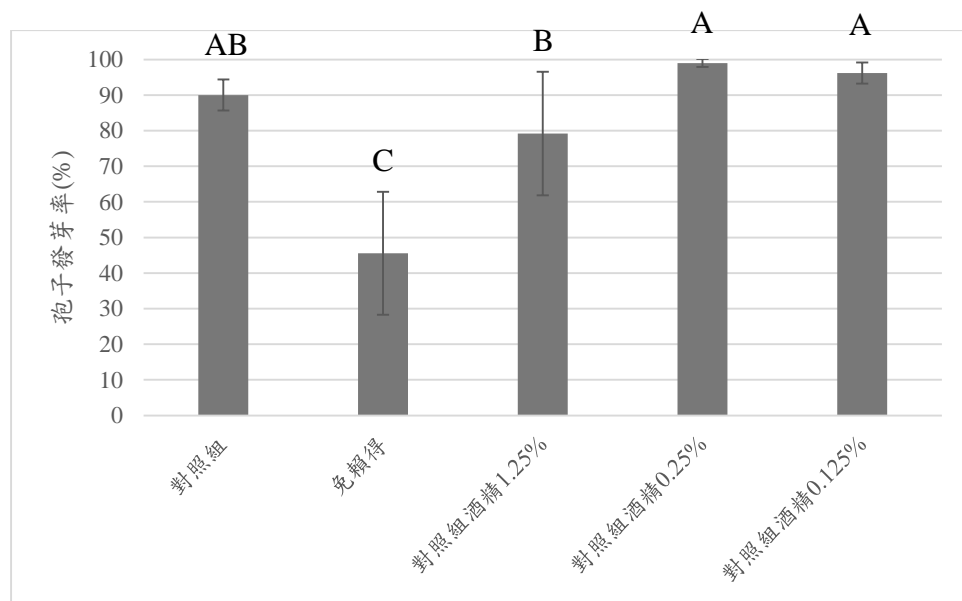


圖 26、酒精及農藥處理對茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 孢子發芽率之影響。

Figure 26. Effect of ethanol and fungicide on conidial germination of *Colletotrichum gloeosporioides* after incubation at 25°C for 24 h. *Columns (n=6) followed by the

same letter do not differ significantly ($P < 0.05$) according to least significant difference test.

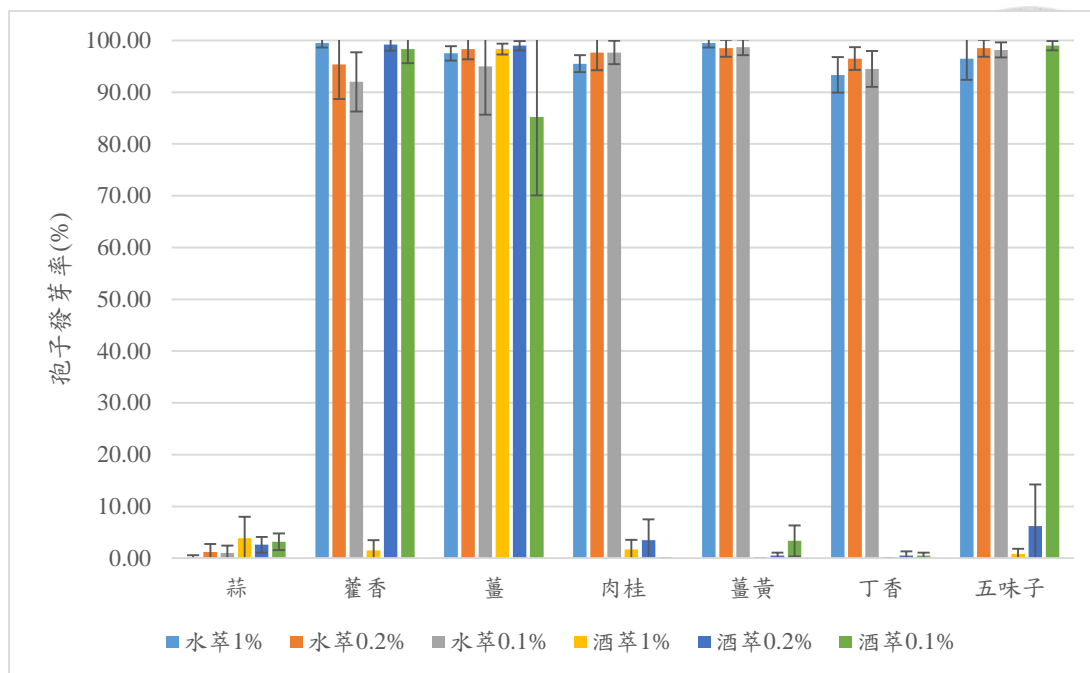


圖 27、七種植物之萃取液對茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 孢子發芽率之影響。

Figure 27. Effect of extracts from seven plant species on conidial germination of *Colletotrichum gloeosporioides* after incubation at 25°C for 24 h.

表 20 七種植物之萃取液對茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 之孢子發芽抑制率。

Table 20. Inhibition rates of extracts from seven plant species on conidial germination of *Colletotrichum gloeosporioides* after incubation at 25°C for 24 h.

植物	孢子發芽抑制率(%)					
	水萃 1%	水萃 0.2%	水萃 0.1%	酒萃 1%	酒萃 0.2%	酒萃 0.1%
蒜	99.78	98.49	98.71	95.16	97.81	96.71
藿香	-4.78	-0.21	3.34	98.11	-0.17	-2.25
薑	-2.13	-3.02	-3.05	-24.21	0.00	11.40
肉桂	-0.78	-4.63	-4.64	97.89	96.46	100.00
薑黃	-3.87	-2.81	-3.00	100.00	99.49	96.53
丁香	3.59	0.34	2.40	100.00	99.49	99.48
五味子	-5.74	-7.88	-7.55	98.95	93.74	-2.95

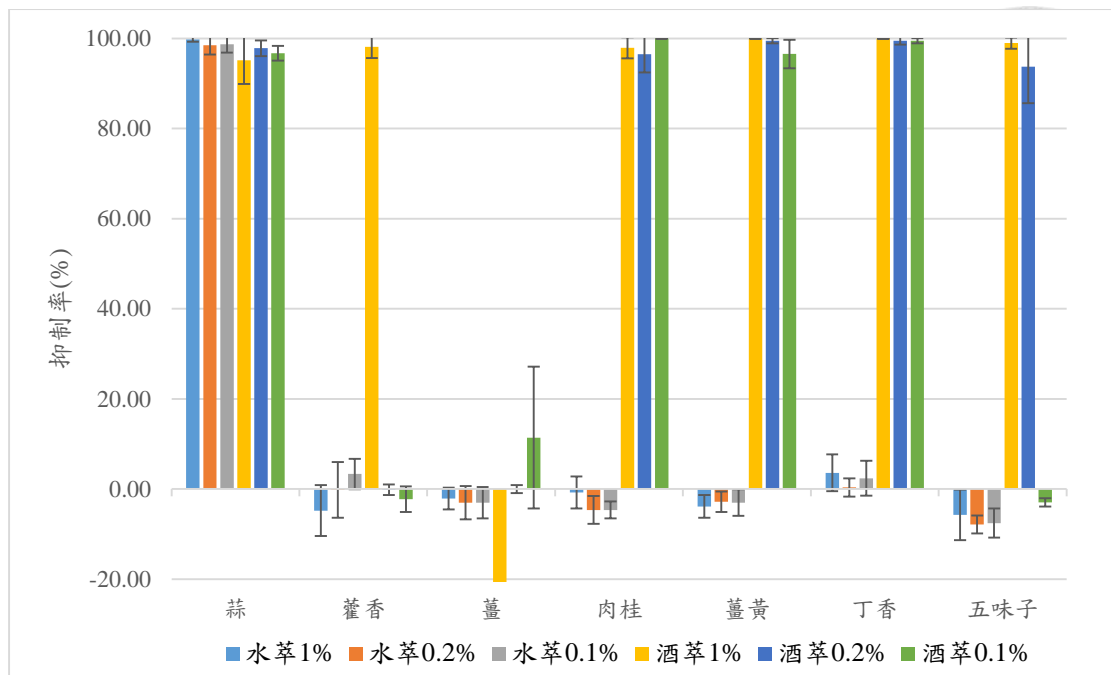


圖 28、七種植物之萃取液對茶赤葉枯病菌 BC-5 之孢子發芽抑制率。

Figure 28. Inhibition rates of extracts from seven plant species on conidial germination *Colletotrichum gloeosporioides* after incubation at 25°C for 24 h.

(二)植物萃取液對芽枯病菌菌絲生長抑制試驗

本項共選出七種植物，萃取完成後獲得水萃、酒萃共十四種植物萃取液。並將植物萃取液依不同的原始濃度加入 PDA 中做為萃取液培養基，並加入茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 之菌絲塊，觀察是否影響菌絲生長，其結果如表 21 及圖 29、圖 30 所示。發現本病原菌菌落培養五天後平均長度為 5.86 公分，而使用免賴得之對照組菌絲完全不會生長，具有強烈抑制效果，酒精與稀釋倍數對照如前所述，其中對照組 1.25% 酒精使菌絲生長受到抑制，菌落直徑為 2.99 公分，而 0.25, 0.125% 之酒精對照組則影響較小。

菌絲生長長度經過換算可得到菌絲生長抑制率如表 22 及圖 31 所示，由此可看出蒜、丁香與五味子之水萃取液相較其餘植物水萃取液有較好抑制效果，而蒜之酒精萃取液稀釋至 0.2% 後即無抑制效果；藿香酒精萃取液於 1% 時能完全抑制菌絲生長，但濃度為 0.2%, 0.1% 時抑制率分別剩 22, 11%；薑之水萃取液與酒精萃取液之菌絲生長抑制率皆非常低；而肉桂之酒萃液 1% 時可完全抑制菌

絲生長，而 0.2% 雖效果較差但仍有一定抑制效果；薑黃水萃取於 1% 之抑制效果最差，而在稀釋 0.1% 時有些微抑制效果，薑黃酒精萃取液於 1% 時能有 66% 抑制率，隨濃度下降至 0.1% 抑制率也下降至 12%；丁香於酒精萃取 1%，0.2% 皆能完全抑制菌絲生長，酒萃稀釋 0.1% 抑制率則為 59%；五味子之水萃 1% 有 28% 之抑制率，但稀釋 0.2% 即無抑制效果，而 1% 酒精萃取液抑制率高達 84%，隨濃度下降至 0.1% 抑制率也下降至 28%。

表 21 不同植物萃取液對茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 菌絲生長之影響。

Table 21. Effect of extracts from seven plant species on mycelial growth of *Colletotrichum gloeosporioides* after incubation at 25°C for 5 days.

		菌絲生長直徑 (cm)				
對照組		5.86				
免賴得 1500x		0.00				
對照組酒精 1.25%		2.99				
對照組酒精 0.25%		5.09				
對照組酒精 0.125%		4.94				
植物	水萃 1%	水萃 0.2%	水萃 0.1%	酒萃 1%	酒萃 0.2%	酒萃 0.1%
蒜	2.91	4.60	4.74	1.14	4.10	4.98
藿香	5.18	5.84	6.08	0.00	3.97	4.39
薑	5.87	6.38	5.76	2.81	5.00	5.60
肉桂	4.86	5.86	5.59	0.00	2.98	4.11
薑黃	5.99	5.64	5.45	1.02	4.10	4.34
丁香	4.12	4.71	4.83	0.00	0.00	1.99
五味子	4.18	5.86	5.63	0.48	3.18	3.54

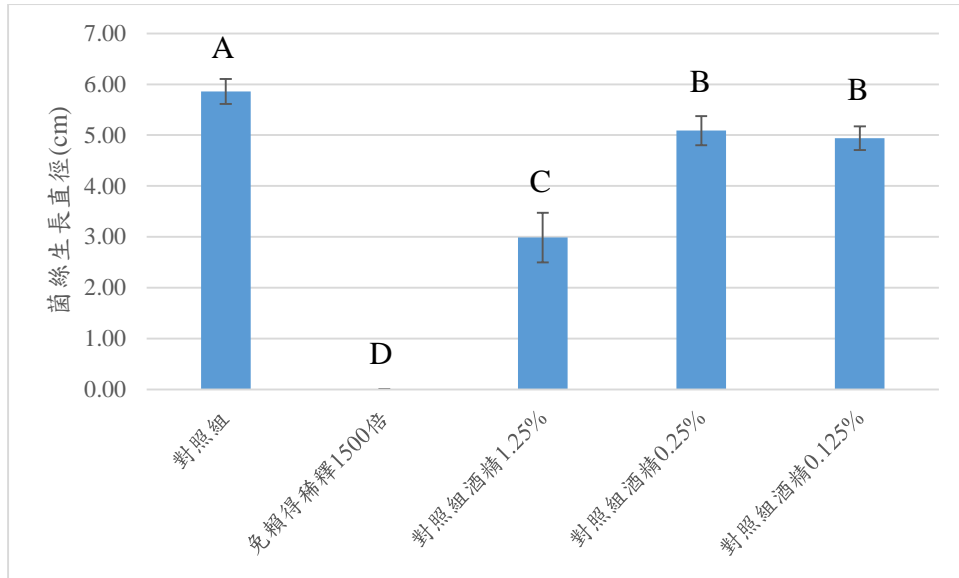


圖 29、酒精及農藥處理對茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 菌絲長度之影響。

Figure 29. Effect of ethanol and fungicide on mycelial growth of *Colletotrichum gloeosporioides* after incubation at 25°C for 5 days. *Columns (n=10) followed by the same letter do not differ significantly ($P<0.05$) according to least significant difference test.

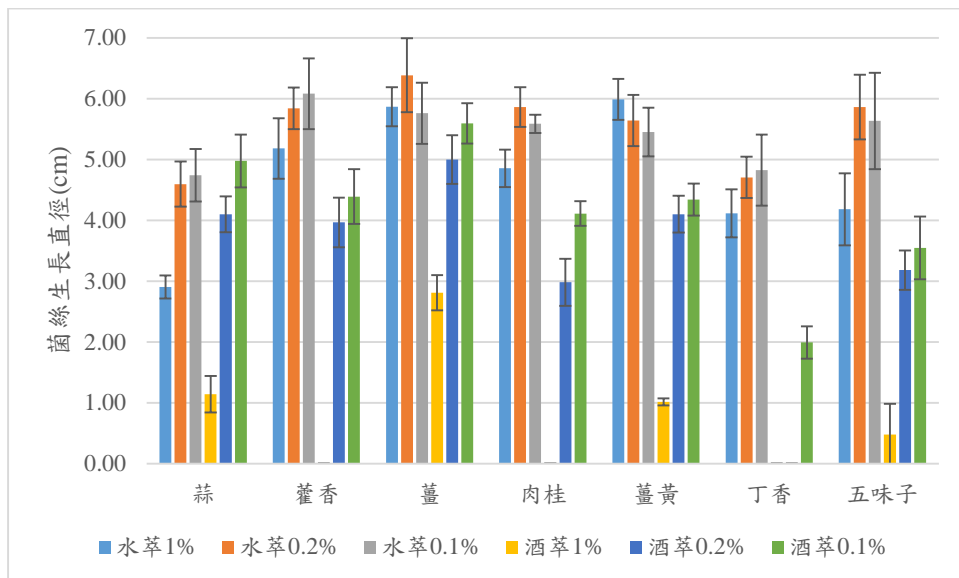


圖 30、七種植物之萃取液對茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 菌絲長度之影響。

Figure 30. Effect of extracts from seven plant species on mycelial growth of *Colletotrichum gloeosporioides* after incubation at 25°C for 5 days.

表 22 七種植物萃取液對茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 之菌絲生長抑制率。

Figure 22. Inhibition rate of extracts from seven plant species on mycelial growth of *Colletotrichum gloeosporioides* after incubation at 25°C for 5 days.

植物	菌絲生長抑制率(%)					
	水草 1%	水草 0.2%	水草 0.1%	酒萃 1%	酒萃 0.2%	酒萃 0.1%
蒜	50.43	21.59	19.11	61.81	19.43	-0.71
藿香	11.60	0.34	-3.75	100.00	22.09	11.13
薑	-0.11	-8.93	1.71	5.86	1.75	-13.26
肉桂	17.14	0.00	4.69	100.00	41.44	16.78
薑黃	-2.20	3.75	7.00	66.00	19.43	12.15
丁香	29.78	19.71	17.66	100.00	100.00	59.72
五味子	28.67	0.00	3.87	84.09	37.51	28.25

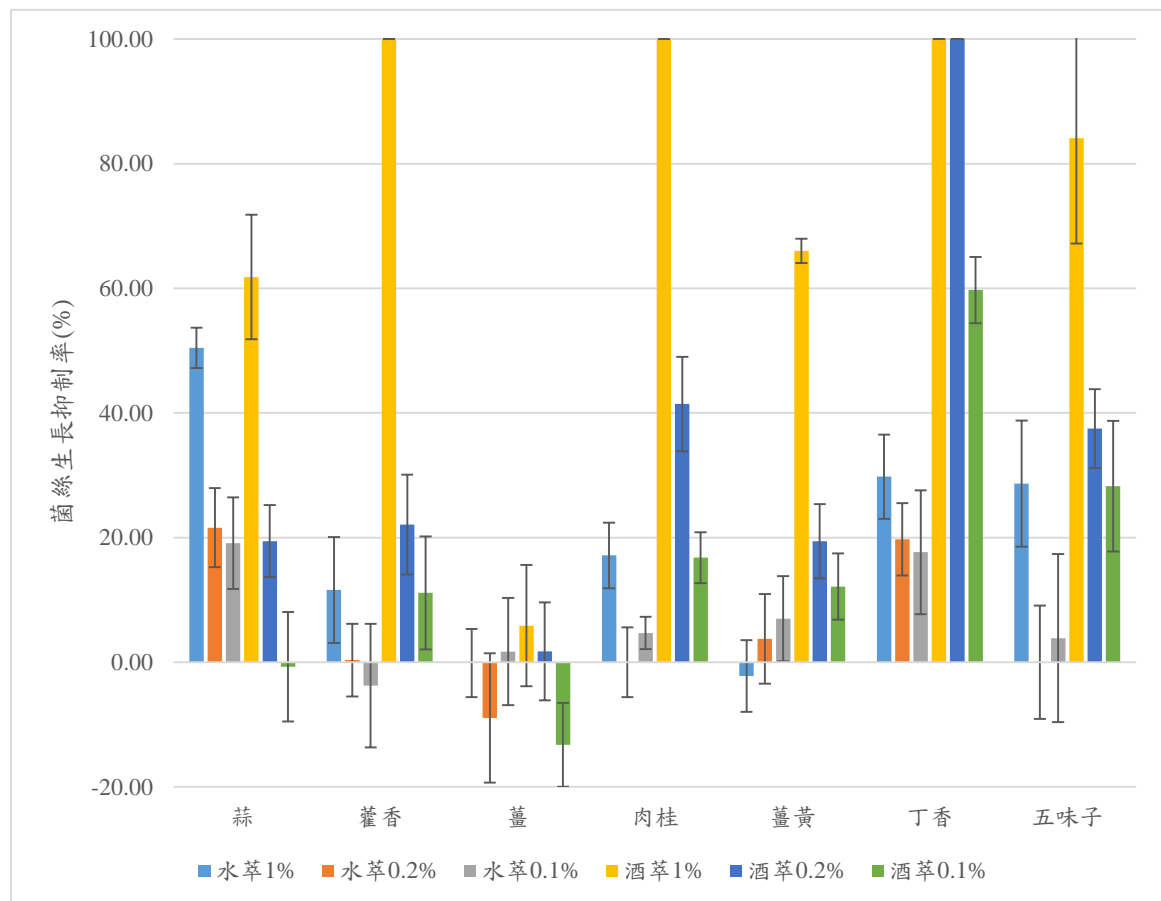


圖 31、七種植物之萃取液對茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 之菌絲生長抑制率。

Figure 31. Inhibition rates of extracts from seven plant species on mycelial growth of *Colletotrichum gloeosporioides* after incubation at 25°C for 5 days.

(三)拮抗微生物對芽枯病菌對峙培養試驗

使用放線菌與枯草桿菌接種於 PDA 中線上，並將茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 菌絲塊置於 PDA 兩側，測試拮抗微生物之拮抗效果，結果發現放線菌與枯草桿菌均有顯著抑制效果(圖 32)，兩者抑制率分別為 39% 及 37%。

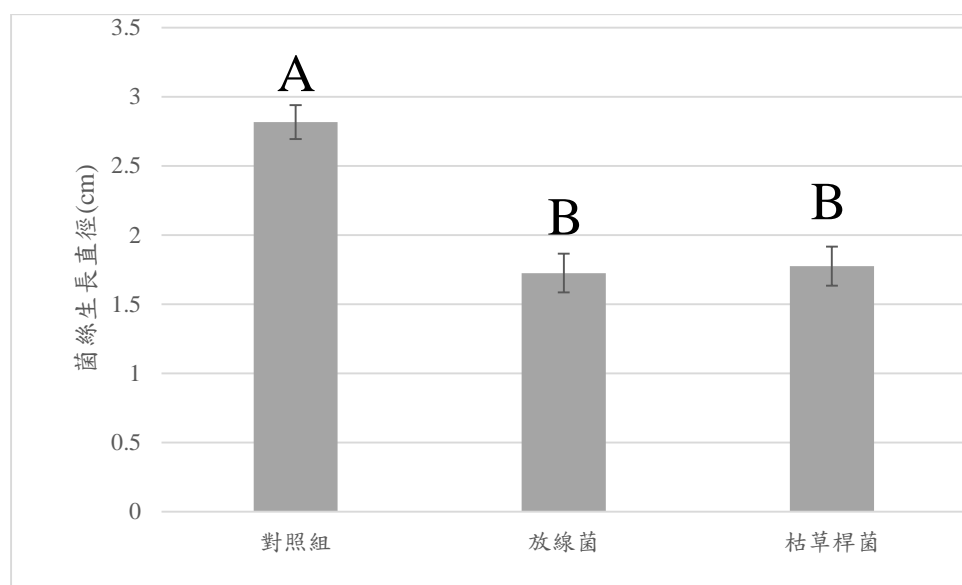


圖 32、枯草桿菌及放線菌 YU01 對茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 對峙培養之菌絲生長結果。

Figure 32. Effect of *Bacillus subtilis* and *Streptomyces* sp. YU01 dual culture with *Colletotrichum gloeosporioides* incubation at 25°C. *Columns (n=6) followed by the same letter do not differ significantly ($P<0.05$) according to least significant difference test.

(四)植物萃取液對芽枯病之盆栽防治試驗

本項選用於孢子發芽抑制試驗、菌絲生長抑制試驗效果良好之六種植物萃取液進行防治試驗，使用針刺接種法造成傷口後於接種前或接種後噴灑植物萃取液測試其防治效果，詳見表 23，其中蒜酒萃液與丁香酒萃液於接種後噴灑均無抑制效果，而於接種前噴灑實驗中蒜水萃液、肉桂酒萃液、丁香酒萃液、五味子酒萃液也未見任何抑制效果，具有抑制效果者為蒜酒萃取液與薑黃酒萃取

液，兩者都是在接種前噴灑才有抑制效果，抑制率皆為 25%，但在接種後 15 天蒜酒萃取液組又有一個新芽受到感染，薑黃酒萃取液組別則是保持不變，而對照組之免賴得有良好抑制效果，但仍不能完全抑制，另一方面對照組 1%酒精則完全沒有抑制效果。

表 23 五種植物萃取液對茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 在盆栽防治試驗之結果。

Table 23. Effect of extracts from five plant species on Oolong tea inoculated with tea brown blight pathogen (strain BC-5) in the greenhouse (Data taken at 5, 10, 15 days after treatment).

植物萃取液(0.2%)	施用 時間	重複芽數	發病率(%)		
			5 天	10 天	15 天
蒜水萃取液	接種前	6	100	100	100
蒜酒精萃取液	接種前	12	75	75	83
蒜酒精萃取液	接種後	6	100	100	100
薑黃酒精萃取液	接種前	12	75	75	75
薑黃酒精萃取液	接種後	6	100	100	100
肉桂酒精萃取液	接種前	12	100	100	100
丁香酒精萃取液	接種前	12	100	100	100
丁香酒精萃取液	接種後	12	83	100	100
五味子酒精萃取液	接種前	6	100	100	100
免賴得	接種前	6	0	0	0
免賴得	接種後	6	0	16	16
酒精	接種前	6	100	100	100



圖 33、大蒜酒精萃取液防治茶赤葉枯病效果，左邊為未發病芽，右邊則為病芽。

(箭頭指示處為接種處)

Figure 33. The treatment of ethanol extract of garlic on to control the tea sprout wilt disease in the greenhouse, left: intact sprout, right: wilt sprout. (Arrow indicate the inoculation point.)



圖 34、薑黃酒精萃取液防治茶赤葉枯病效果，左邊為發病芽，右邊則為未發病芽。(箭頭指示處為接種處)

Figure 34. The treatment of ethanol extract of turmeric to control the tea sprout wilt disease in the greenhouse, left: wilt sprout, right: intact sprout. (Arrow indicate the inoculation point.)



圖 35、使用免賴得防治芽枯型茶赤葉枯病之效果。(箭頭指示處為接種處)

Figure 34. Application of benomyl to control the tea sprout wilt disease in the greenhouse. (Arrow indicate the inoculation point.)

(五)拮抗微生物對芽枯病之盆栽防治試驗

從前述對峙培養試驗可發現放線菌與枯草桿菌皆有抑制茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 之效果，故使用針刺接種法來測試其防治效果，結果如表 24 所述，枯草桿菌使用商品推薦濃度稀釋 800 倍進行試驗，放線菌 YU01 使用稀釋平板法確認孢子濃度為 10^{13} /mL，發現枯草桿菌於防治試驗中並沒有抑制效果，另一方面放線菌於接種病原菌前一天施用有良好防治效果，抑制率約為 83%，於接種病原菌前立即施用雖有防治效果，但效果較差，抑制率約為 33%，而於接種後施用防治效果與接種前施用差不多，抑制率為 33%。

表 24 不同拮抗微生物對茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 在盆栽防治試驗之結果。

Table 24. Application of different antagonistic microorganisms to control the tea sprout wilt disease in the green house. (Data taken at 5, 10, 15 days after treatment)

拮抗微生物	施用時間	重複芽數	發病率(%)		
			5 天	10 天	15 天
枯草桿菌(800x)	接種前	6	100	100	100
枯草桿菌(800x)	接種後	6	100	100	100
枯草桿菌(800x)	接種前一天	6	100	100	100
放線菌(10^{13} /mL)	接種前	6	66	66	66
放線菌(10^{13} /mL)	接種後	6	66	66	66
放線菌(10^{12} /mL)	接種前	6	100	100	100
放線菌(10^{11} /mL)	接種前	6	83	83	83
放線菌(10^{13} /mL)	接種前一天	12	16	16	16
放線菌(10^{12} /mL)	接種前一天	6	0	33	33
放線菌(10^{11} /mL)	接種前一天	6	50	50	66



圖 36、前一天施用放線菌 YU01 對茶赤葉枯病菌之防治結果。(箭頭指示處為接種處)

Figure36. Application of actinomycetes YU01 oneday earlier to control the tea sprout wilt disease in the greenhouse. (Arrow indicate the inoculation point.)

九、農藥對芽枯病菌絲生長抑制試驗

本項係選取植物保護手冊推薦用於茶赤葉枯病之十三種藥劑：待克利、百克敏、腈硫醃、得克利、貝芬四克利、扶吉胺、亞托敏、腈硫克敏、四克利、克熱淨、嘉賜貝芬、免賴得、甲基多保淨。以不同濃度加入 PDA 使其有效成分濃度為 1, 10, 100, 1000 ppm，並加入茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 菌絲塊測量其菌絲長度。其菌絲生長抑制率是待對照組長滿 PDA 培養皿後，量取尚未長滿之實驗組，再以抑制率公式計算之。

本項試驗結果如表 25、表 26 及圖 37，發現十三種藥劑中以免賴得、嘉賜貝芬對菌株 BC-5 菌絲生長抑制率最強，即使 1 ppm 也能 100% 抑制菌絲生長，另貝芬四克利與甲基多保淨於 10 ppm 也能完全抑制菌絲生長，然腈硫醃與亞托敏抑制效果於本次試驗中對菌絲生長抑制率效果較低，即便 1000 ppm 抑制率僅達 59, 41%。

表 25 共十三種藥劑對茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 菌絲生長之影響。

Table 25. Effect of 13 fungicide on mycelium growth of tea brown blight pathogen (strain BC-5).

有效成分 濃度	菌絲生長直徑(cm)						
	對照組	待克利	百克敏	腈硫醃	得克利	貝芬四克利	扶吉胺
1000 ppm	8.130 _a	0.937 _f	0.833 _g	3.265 _c	1.248 _d	0.000 _h	1.032 _e
100 ppm	8.130 _a	2.466 _e	2.200 _f	5.475 _b	1.833 _g	0.000 _k	1.049 _i
10 ppm	8.130 _a	2.708 _e	2.625 _e	7.204 _b	2.680 _e	0.000 _h	1.145 _g
1 ppm	8.130 _a	2.961 _f	3.482 _f	8.028 _a	3.622 _e	0.389 _i	1.081 _h
有效成分 濃度							
	亞托敏	腈硫克敏	四克利	克熱淨	嘉賜貝芬	免賴得	甲基多保淨
1000 ppm	4.787 _b	1.093 _e	0.000 _h	0.000 _h	0.000 _h	0.000 _h	0.000 _h
100 ppm	4.848 _c	2.830 _d	1.333 _h	0.422 _j	0.000 _k	0.000 _k	0.000 _k
10 ppm	5.624 _c	1.603 _f	3.108 _d	1.608 _f	0.000 _h	0.000 _h	0.000 _h
1 ppm	5.937 _c	4.676 _d	7.035 _b	2.449 _g	0.000 _j	0.000 _j	2.417 _h

*依據最小顯著差異法(Least significant difference)檢定，字母相同者表示兩者間

無顯著差異($P < 0.05$)



表 26 共十三種藥劑對茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 之菌絲生長抑制率。

Table 26. The inhibition rate of 13 fungicide on mycelial growth of tea brown blight pathogen (strain BC-5).

有效成分 濃度	菌絲生長抑制率(%)						
	待克利	百克敏	睛硫醜	得克利	貝芬四克利	扶吉胺	亞托敏
1000 ppm	88.5	89.8	59.8	84.6	100.0	87.3	41.1
100 ppm	69.7	72.9	32.7	77.5	100.0	87.1	40.4
10 ppm	66.7	67.7	11.4	67.0	100.0	85.9	30.8
1 ppm	63.6	57.2	1.3	55.4	95.2	86.7	27.0

有效成分 濃度	睛硫克敏	四克利	克熱淨	嘉賜貝芬	免賴得	甲基多保淨
	1000 ppm	85.9	100.0	100.0	100.0	100.0
100 ppm	63.6	82.8	94.6	100.0	100.0	100.0
10 ppm	79.4	60.0	79.3	100.0	100.0	100.0
1 ppm	39.8	9.4	68.5	100.0	100.0	68.9

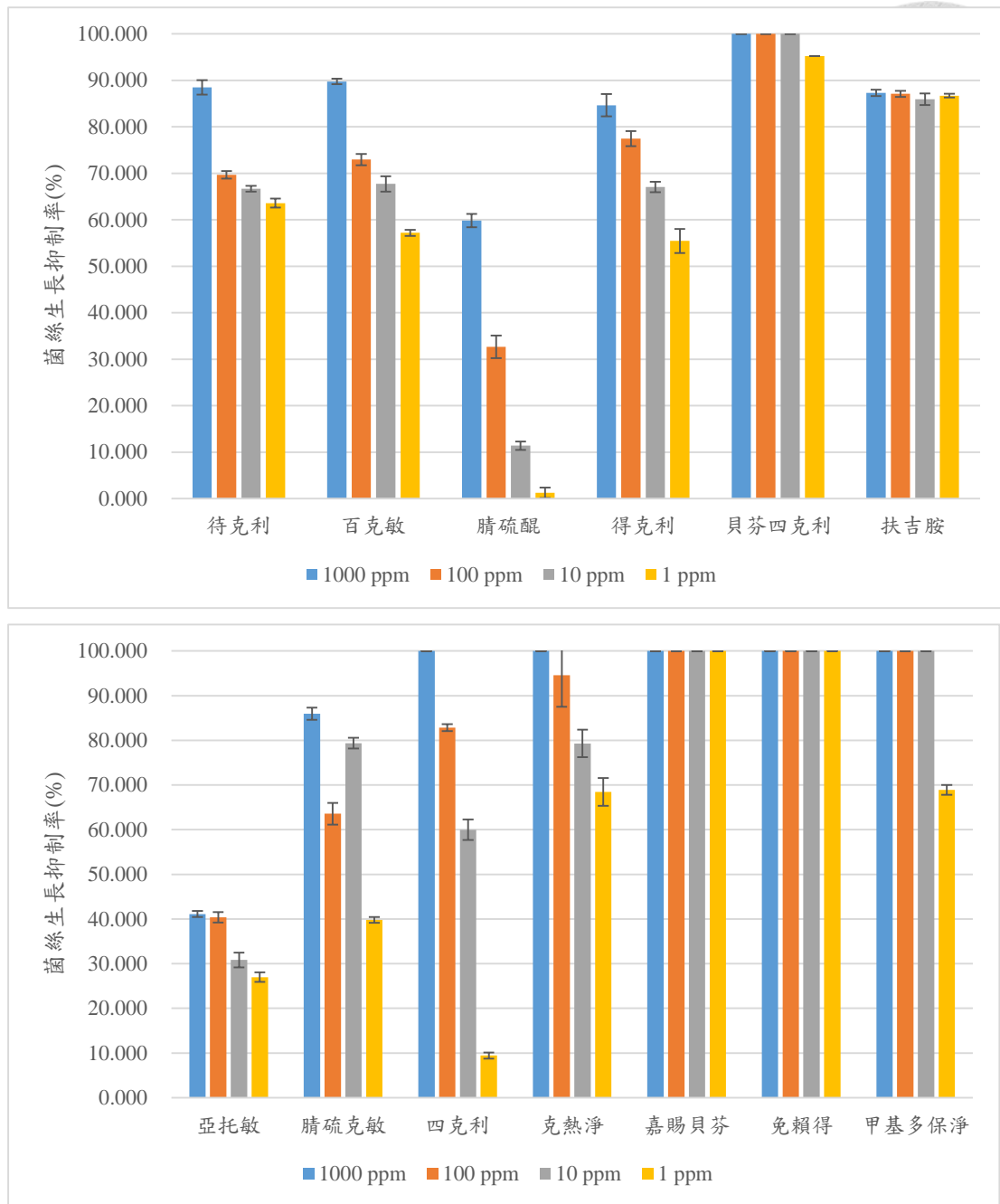


圖 37、共 13 種藥劑對於茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 之菌絲生長抑制率比較。

Figure 37. Comparison of inhibition rate of 13 fungicide on mycelial growth of tea brown blight pathogen (strain BC-5).



十、以不同來源炭疽病菌對茶樹進行病原性之檢定

本項分別取得芒果炭疽病、草莓炭疽病、咖啡炭疽病三種病原菌，待其產孢後接種於茶樹新芽，觀察是否會造成芽枯病，結果如表 27 所示，除對照組外皆未觀察到芽枯之發生。

表 27 四種不同炭疽病菌接種於茶樹造成芽枯之發病率。

Table 27. The sprout wilt incidence of tea seedling inoculated with 4 different *Colletotrichum* in the greenhouse. (Data taken 10 days after inoculation.)

炭疽病菌	茶赤葉枯病芽枯 型菌株(BC-5)	芒果 炭疽病	草莓 炭疽病	咖啡炭 疽病	水對照 組
芽枯病發病率	6/6(100%)	0/6(0%)	0/6(0%)	0/6(0%)	0/6(0%)

十一、以芽枯病菌對不同品種茶樹之病原性測試

本項以茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 接種於常見茶樹品種：大葉烏龍、四季春、臺茶十二號及青心烏龍，觀察其是否會於不同品種茶樹上產生芽枯病，結果如表 28，大葉烏龍與對照組青心烏龍發病率皆達 100%，而四季春與臺茶十二號也有高達 66% 之發病率。

表 28 茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 接種於不同品種茶樹之發病率。

Table 28. The sprout wilt incidence of different tea cultivars inoculated with tea brown blight pathogen (strain BC-5) in the green house.

品種	對照組 青心烏龍	大葉烏龍	四季春	臺茶十二號
芽枯病發病率	6/6(100%)	6/6(100%)	4/6(66%)	4/6(66%)

第五章 討論



一、臺灣北部茶赤葉枯病及芽枯病之田間調查

茶樹芽枯已在坪林地區發生多年，但過去一直缺乏較有系統之研究，是以本研究自 2013 年秋天起，即至臺灣北部坪林、文山、楊梅等地進行病害調查。結果發現芽枯只於坪林地區發生，初步命名為芽枯病，由於茶赤葉枯病有記載會感染嫩芽(曾和陳，1984)因此也將葉部之茶赤葉枯病一併觀察記錄，而文山與楊梅兩地雖無發現芽枯病但都有觀察到茶赤葉枯病。

芽枯病之病徵初期會造成嫩芽局部枯黑，嚴重者幼葉會脫落，造成落葉，故會影響茶菁之生產。唯為何此病只在坪林地區才會發生，仍是個難以回答的問題。

二、茶赤葉枯病及芽枯病之病原分離及初步鑑定

自坪林、文山及楊梅三地區採集之茶赤葉枯病病葉及芽枯病病芽，經過組織塊分離法後主要分得兩種植物病原真菌，初步鑑定分別為炭疽病菌 (*Colletotrichum* sp.)與擬盤多毛孢菌 (*Pestalotiopsis* sp.)，而芽枯病以組織塊分離法分離 26 個樣本之結果顯示炭疽病菌之分離率為 31%，擬盤多毛菌分離率則為 58%，而另在研究初期曾以稀釋分離法只有分離出炭疽病菌，並未分離到擬盤多毛孢菌，可能是重複較不足之故。

炭疽病菌會造成茶赤葉枯病，也被記載會危害葉片與嫩芽(曾和陳，1984)，而擬盤多毛孢菌(*Pestalotiopsis theae*)則會造成茶樹輪班病 (台灣植物病理學會，2002)，又 Ando & Narisawa (1989)在日本靜岡縣曾發現有芽枯，且於芽上可觀察到黑斑，鑑定為 *Pestalotia longiseta* (已改名為 *Pestalotiopsis longiseta*)所造成，故知二者皆為茶樹之病原菌，在本研究之病原分離中也多可分到兩種病原，其是否因而造成造成坪林地區之芽枯，迄今仍屬不明。

本研究曾於茶赤葉枯病組織塊分離中發現輪斑病之病徵雖與茶赤葉枯病不同，但兩者病斑會長在同一片葉上，如表 8 之病葉編號 BT-1，即分離出炭疽病菌與擬盤多毛孢菌兩種病原菌，此可證明兩者在田間可共同發生，也會造成共同感染問題。

三、茶赤葉枯病及芽枯病分離株之病原性檢測

本研究經幼芽傷口接種試驗，發現只有炭疽病菌會造成芽枯病，而以擬盤多毛孢菌進行幼芽傷口接種，迄今未見造成芽枯。另經測試自葉部分離所得之炭疽病菌與自芽部分離所得之炭疽菌株皆具有造成芽枯之病原性，且其形態上多無差異，故即選擇新北市坪林有機茶園青心烏龍赤葉枯病之分離株 BC-5 做為代表性菌株，為後續各試驗之主要分離株。

如上述自文山地區與楊梅地區赤葉枯病葉分得之分離株皆具有芽枯之致病性，但於文山地區與楊梅地區並未觀察到芽枯病之發生，根據病害三角理論，在坪林地區與文山、楊梅地區之病原與寄主植物皆相同之情況，推論是環境因素造成坪林地區之芽枯，然而根據氣象資料坪林之氣候與文山卻又相近，故可能是坪林地區另有其他助病因子，如特殊昆蟲，或微氣候導致此病發生，仍未可知。唯此結果似與 Ando & Narisawa(1989)提出之芽枯由 *Pestalotiopsis longiseta* 所造成，而茶赤葉枯病則會抑制芽枯論點有所矛盾。

在本研究中另發現以孢子懸浮液噴灑於無傷口之茶樹嫩芽上，一般在短期內並不會出現芽枯病病徵，而人為造成傷口後若未進行保溼，則發病時間也需要十至二十日，此乃說明傷口與溼度是芽枯病發展重要之因素，這與前人研究炭疽病菌分生孢子附著後，於 25 至 28°C 且高溼情況下，最有利於孢子萌發符合(Arauz, 2000)，因當寄主植物受傷時，會增加糖分、有機酸物之營養，故有助於孢子發芽(Eckert & Ratnayake, 1994, Pandey *et al.*, 1993)。

四、人工接種茶赤葉枯病及芽枯病之病原性再分離

為完成柯霍氏準則中第四條之法則，須於病原性檢定後進行病原菌再分離，本研究結果皆顯示，每一接種之芽枯病皆可再分離到原接種之分離株，故皆可完成柯霍氏準則，故可證實炭疽病菌為造成茶樹芽枯之主要病原菌。

五、茶赤葉枯病及芽枯病分離株之鑑定

將確認有病原性之茶赤葉枯病代表菌株 BC-5，以分子生物學技術進行鑑定，結果確認為 *Colletotrichum gloeosporioides*，由於 *C. gloeosporioides* 分群較複雜，如需進一步去分辨，尚需進行 rDNA-ITS, β -tubulin, MAT1-2, GDPH 等多段序列，定序解析 (Hyde *et al.*, 2009a)，因非屬研究之主要目標故有待未來進一步之研究。

有關茶赤葉枯病菌之學名為 *Colletotrichum gloeosporioides* 或 *Colletotrichum camelliae* 也曾引起爭議，如 Masee 於 1899 年在斯里蘭卡將之紀錄為 *C. camelliae* (Willis, 1899)，至 1957 年 von Arx 則將之歸類為 *C. gloeosporioides* (von Arx, 1957)，而 2009 年 Hyde 整理之炭疽病菌種類中沿用此種名 (Hyde *et al.*, 2009a)，另一篇重要報導是 Weir 等人 (2012) 所提出，從怒江紅山茶 (*Camellia saluenensis*) 上分離之菌株 *Glomerella cingulate* f. sp. *Camelliae* 經試驗會造成茶花枝枯病，此病曾報導會感染茶花、雲南茶、茶梅，以茶樹葉片進行離葉接種也會造成茶赤葉枯病。但本研究則經由分子鑑定，結果確認造成茶赤葉枯之病菌為 *Colletotrichum gloeosporioides*。

而在形態學鑑定方面，本研究所分離到之炭疽病菌，發現與常見之草莓炭疽、芒果炭疽之病菌皆稍有不同。如本研究分離所得之茶炭疽病菌並不會於 PDA 上產生子囊，也不會形成肉眼可見之分生孢子堆，但其產孢量並不會較低。相對地，芒果炭疽病菌則會產生帶剛毛之子囊且會形成橘色分生孢子堆。

另一方面，本研究發現 BC-5 和多數炭疽病菌一樣會產生壓器 (如圖 15)，而附著器上含有黑色素 (melanin)，Kubo 等 (1996) 以無法產生黑色素之突變株證明

炭疽病菌需要黑色素才具致病性，而如同稻熱病(*Magnaporthe grisea*)之附著器一樣，炭疽病之附著器要有足夠的膨壓才能夠入侵植物組織(Latunde-Dada & Akinwunmi, 2001)。



六、溫度對芽枯病菌生長速度之影響

從溫度試驗結果可得知茶赤葉枯病原菌在 25°C 時，菌絲生長速度最快，於 35°C 即無法生長，但於 15°C 之環境下仍能生長，因此推測茶赤葉枯若於夏天高溫時發病將較緩慢或靜止，而於冬天低溫時則仍可能發生，此與坪林地區冬天發病較重似相一致。

七、北部地區茶赤葉枯病及芽枯病流行病學調查

本研究有觀察赤葉枯病及芽枯病之流行病學調查，自 2013 年 12 月至 2014 年 6 月，共持續七個月的時間，其中從茶赤葉枯病之葉部病徵加以分級記錄為茶赤葉枯病危害嚴重度，而芽枯病之危害嫩芽則記錄為芽枯病罹病率。其中芽枯病會造成茶農經濟之損失，而赤葉枯病則相對對經濟影響較小，但從本研究結果可發現坪林地區之赤葉枯病危害嚴重度與芽枯病罹病率有中度至高度正相關，似可說明赤葉枯病於葉片產生之孢子，經風雨飛濺至嫩芽，故可增加芽枯之發生。

在本流行病學調查中比較各品種之赤葉枯病危害嚴重度，發現除 2014 年 5 月及 6 月文山區四季春以外，四品種中皆以青心烏龍受害最嚴重，即青心烏龍一般比臺茶十二號、四季春及鐵觀音皆較為感病，而其中又以鐵觀音較為抗病。

本研究進行赤葉枯病危害嚴重度與氣象因子之相關分析，結果發現除文山區鐵觀音因危害嚴重度較低易出現誤差外，其餘品種之發病多與平均風速成正相關，推測是由於風速較大容易造成葉片傷口增加，致使病原容易入侵促進發病。

又新北市坪林區之茶樹赤葉枯病嚴重度對氣象因子之相關分析，可發現該病與月均溫、月平均相對溼度皆成負相關，這代表此病在溫度越低、溼度越低時較易發病，此結果似與曾和陳(1984)研究於 20~28°C 為最適生長溫度不一致，也與本研究之溫度對菌絲生長試驗結果有所出入但以目前之資料仍難加以解釋，即可能尚需更多觀察及研究才能確認。

較特別的是台北市文山區之茶赤葉枯病危害嚴重度，自 2013 年 12 月至 2014 年 4 月皆無顯著變化，危害嚴重度也不高，但至 2014 年 5 月及 6 月，四季春品種卻受到嚴重之危害，但楊梅地區之四季春並未有此情況發生。似可推論是因修剪後未將枯枝落葉清除又適逢梅雨季節導致嚴重危害。而鐵觀音由於本身較抗病並無發生此現象，但此現象為偶發或長期現象仍需未來之觀察才能確定。

另於桃園縣楊梅地區之調查，顯示除四季春外皆與月總降雨量成高度正相關，可知因雨水會增加炭疽病菌孢子之飛濺(安等，1994)，故月總降雨量高者炭疽病病害也較易傳播及發生。

在坪林地區芽枯病罹病率流行方面，自 2013 年 12 月至 2014 年 6 月中以 2013 年 12 月及隔年 1 月危害最嚴重，此後罹病率即不斷降低，至 2014 年 5 月於田間幾乎難以觀察到，而比較坪林區有機茶園與慣行茶園，發現慣行茶園芽枯罹病率較低，推論是由於施用農藥而降低病害發生，而與氣象因子進行分析可發現與月均溫、月平均溼度呈現高度負相關，此與前人研究炭疽病菌好發於 28°C 左右潮溼之環境(Dodd *et al.*, 1991)有所不同，其原因似仍需要長期觀察與研究才足以確定。

八、芽枯病之非農藥防治

本研究選取曾被用於炭疽病菌防治之植物資材中共七種，而在孢子發芽抑制試驗中，發現除大蒜之外其餘資材之水萃取液效果皆不佳，而薑無論是水萃取液或酒精萃取液效果皆不佳，這與 Saha 等人(2005)於印度之研究有很大出

入，在文獻中報導蒜、薑、薑黃之水萃取液與酒精萃取液皆可達到 85% 之孢子發芽抑制率，原因不明，但有可能是由於萃取方式不同且所使用菌株也不同才造成如此之差別。而藿香之酒精萃取液只有在最終濃度為 1% 時具有效果，稀釋至 0.2% 即失去效果。

在植物資材對菌絲生長抑制試驗中，發現一樣以薑之萃取物效果最差，肉桂、藿香、薑黃之水萃取物次之，而以丁香酒精萃取液效果最佳，即便濃度只有 0.2% 也能完全抑制菌絲生長，推測因丁香具有防制木材腐朽菌(*Lenzites betulina* and *Laetiporus sulphureus*)及甘藍苗立枯病(*Rhizoctonia solani* AG-4)之丁香酚(Eugenol)，故具抑制炭疽菌絲生長之能力(林等，2002，Cheng *et al.*, 2008)。另外肉桂也發現有一定之效果，可能係因肉桂醛(Cinnamaldehyde)之抑菌所致(Cheng *et al.*, 2008, Ranasinghe *et al.*, 2002)。而薑黃之抑菌效果推論是來自於薑黃素(Curcumin)，前人研究顯示其擁有防治水稻小黑菌核病(*Helminthosporium oryzae*)與秧苗立枯病(*Fusarium solani*)之效果(Chowdhury *et al.*, 2008)。大蒜之萃取物大蒜素(Allicin)則早於 1999 年即被研究具有抗菌之效果，且對多種植物病原菌如馬鈴薯晚疫病(*Phytophthora infestans*)、水稻稻熱病(*Magnaporthe grisea*)等皆有抑制效果(Ankri & Mirelman, 1999, Curtis *et al.*, 2004)。在五味子方面，其相關研究較少，但從試驗中也能看出其對於炭疽病菌有一定之抑制效果。另一方面對照組部分免賴得雖無法完全抑制孢子發芽，但對於菌絲生長有非常強之抑制效果，而酒精對照組對菌絲生長有一定之影響，但對於孢子發芽影響較低。本研究所試之酒精萃取物對於菌絲或孢子之抑制效果皆較酒精對照組更為顯著，顯示酒精萃取物本身具有抑制效果而非只是酒精之抑制效果。

然而噴灑植物萃取液於茶樹上防治芽枯病之效果卻差強人意，只有薑黃之酒精萃取液與蒜酒精萃取液於接種前噴灑有 25% 之抑制率，推測是多數萃取物在一般田間環境下較不穩定或容易分解，如大蒜素在 23°C 時可在 16 小時內被分解(P. Koch & Lawson, 1996)，且兩種萃取液都是要在接種前使用才有效，可

推斷其效果為保護型而非治療型藥劑。

有關本研究使用拮抗微生物之對峙培養試驗中，發現兩種拮抗菌皆有抑菌效果，但實際用在盆栽試驗時，枯草桿菌並無防治效果，而本實驗室之放線菌 YU01 則具有良好抑制效果，但由於放線菌需要時間才會產孢，因此要提早施用方能發揮最大效用，從試驗中即可看出提早一天施用效用比接種前使用放線菌抑制效果更佳。因鏈黴菌已被證實可產生多種抑菌物質，如鏈黴素 (Streptomycin)、保米黴素(Blasticidin-S)、保粒黴素(Polyoxins)、嘉賜黴素 (Kasugamycin)、維利黴素(Validamycin)等鏈黴菌產生之抗生物質已被作為農藥來施用(廖，2005)，而 YU01 產生之有效抗生物質為何還有待進一步實驗之探討，如要實際使用於田間，則建議可比照一般放線菌加入黃豆粉與砂糖攪拌數日擴大培養後後，噴灑於田間，或者前人研究 YU01 加入紅豆及米糠煎汁以助增抗生活性之表現(張，2012)。

九、農藥對芽枯病菌絲生長抑制試驗

從農藥試驗中我們發現免賴得、嘉賜貝芬具有良好抑菌效果，相反的亞托敏、腈硫醌效果則較差，其中免賴得屬於苯並咪唑系，具滲透性，有預防及治療效果，可自葉部及根部吸收向上移行，嘉賜貝芬為嘉賜黴素與貝芬替混合而成，其中嘉賜黴素為鏈黴菌所產生之水溶性抗生物質，也無怪乎本研究中使用放線菌 YU01 能擁有良好抑制效果，相反的亞托敏為 strobilurins 類殺菌劑，係透過阻礙 ATP 的產生而切斷真菌的能量循環，腈硫醌則為醯亞胺及醌類，為保護型藥劑，其機制為影響真菌硫醇團的反應，干擾細胞的呼吸作用(廖，2005)，可能需要施用在植物上才能顯現出其效果。

十、以不同來源炭疽病菌對茶樹進行病原性之檢定

為了解不同炭疽病菌是否亦會造成茶樹芽枯病，將不同植物上分離之炭疽病菌接種於茶樹嫩芽，其結果顯示芒果炭疽病、草莓炭疽病、咖啡炭疽病並不

會造成茶樹芽枯病，這顯示若於茶園旁邊種植芒果、草莓、咖啡等植物，並不會助長茶樹芽枯病之發生。



十一、以芽枯病菌對不同品種茶樹之病原性測試

為了解茶樹芽枯病是否會於不同品種茶樹上發病，將茶赤葉枯病芽枯型菌株 BC-5 接種於青心烏龍、大葉烏龍、四季春及臺茶十二號等不同茶樹品種，結果顯示四個品種皆會受到炭疽病感染並產生芽枯病病徵，這代表除青心烏龍外，其餘品種茶樹於種植時也要注意芽枯型病害之發生。

十二、結論與未來發展

多年來茶赤葉枯病一直被認為是次要病害不會造成太大的經濟損失而長期被忽略，本研究於坪林地區觀察到芽枯病之發生並且造成茶農經濟上之損失，經過柯霍氏準則確認，並以分子生物學技術鑑定出病原菌主要為炭疽病菌且為茶赤葉枯病病原菌，但其是否與擬盤多毛孢菌共同感染有關仍未可知。於 2013 年 12 月至 2014 年 6 月進行流行病學觀察可發現該病好發於較寒冷較乾之氣候，但詳細原因還需進一步之試驗與研究。


而根據非農藥試驗結果可推薦農民於冬季芽枯將發生前施用放線菌 YU01 以抑制該病害發生，於慣行茶園中可使用免賴得或嘉賜貝芬即可有效抑制該病，而本研究使用之蒜酒精萃取物與薑黃酒精萃取物雖有抑制效果，但實際使用於田間還有許多問題需要克服。

未來還需要釐清為何芽枯病僅只於坪林發生，並持續進行流行病學之調查，用以精準預測病害發生時機，以配合防治工作之進行，而實際施用放線菌 YU01 對於該病害以及整體茶園之影響皆尚有待進一步之研究。


參考文獻



1. 中華民國植物病理學會。2002。台灣植物病害名彙。第四版。中華民國植物病理學會出版。386 頁。
2. 百泰生物科技。2011。台灣寶。網址：
http://www.biontech.com.tw/biontech_ch/biopesticides/item/5-biobac-wp.html。
上網日期 2011-5-25。
3. 安寶貞、黃瑞卿、陳茂發。1994。環境因子對檬果炭疽病發生之影響。植物病理學會刊。3：34-44。
4. 阮逸明。1995。台灣農家要覽農作篇(一)。行政院農業委員會。386 頁。
5. 李台強、張清寬。2013。台灣茶樹種原圖誌。行政院農業委員會茶業改良場出版。205 頁。
6. 吳信郁。2012。植物萃取物及生物製劑對胡瓜白粉病防治效應研究。桃園農業改良場研究彙報。71：57-68。
7. 邱垂豐、林金池、黃正宗、林儒宏、蕭建興。2009。紅茶新品種--臺茶 21 號。臺灣茶業研究彙報。28：1-17。
8. 林木連、蕭素女。2004。作物簡介。植物保護圖鑑系列 4-茶樹保護。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局。158 頁。
9. 林宗俊、鄭可大、黃振文。2002。丁香及其主成分防治甘藍苗立枯病的功效。植病理學會刊。11：189-198。
10. 林秋莉、林宗俊、黃振文。2010。丁香油與植物營養防治十字花科蔬菜炭疽病之效果評估。植物病理學會刊。19：167-176。
11. 林俊義、安寶貞、張清安、羅朝村、謝廷芳。2004。作物病蟲害之非農藥防治(再版)。行政院農業委員會農業試驗所出版。58 頁。
12. 胡賢彬。2013。應用黑色素生合成基因研發鑑定炭疽病菌之生物晶片及探討其類緣關係。國立臺灣大學植物病理與微生物學系碩士論文。101 頁。
13. 孫岩章。2009。坪林鄉公所申請台大植物醫師巡迴輔導夏季病蟲害防治服務計畫成果報告書。台大農場。15 頁。
14. 張鳳書。2012。生物製劑多元防治能力快速測試系統之研究。國立臺灣大學植物病理與微生物學系碩士論文。73 頁。
15. 曾方明、陳際松。1984。茶赤葉枯病之研究-病原菌的形態觀察及促進產孢的方法。台灣茶業研究彙報 3：31-37。
16. 曾方明。2004。茶赤葉枯病。植物保護圖鑑系列 4-茶樹保護。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局。158 頁。
17. 葉洵瑜。2012。臺灣紅龍果莖部潰瘍病之研究。國立臺灣大學植物病理與微生物學系碩士論文。84 頁。
18. 廖龍盛。2005。實用農藥。得力興業股份有限公司出版。1311 頁。

- 
19. 賴正男。2005，茶作栽培技術(修訂版)。行政院農業委員會茶葉改良場出版。162 頁。
 20. 賴正南。2013。農業統計年報 101 年。行政院農業委員會。321 頁。
 21. 謝廷芳，黃晉興，謝麗娟，胡敏夫，柯文雄。2005。植物萃取液對植物病原真菌之抑菌效果。植物病理學會會刊 14: 59-66。
 22. Ando, Y., and Narisawa, N. 1989. Inhibition by the brown blight fungus *Glomerella-cingulata* of the occurrence of shoot blight of tea plant caused by *Pestalotia-longiseta*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 55(3):261-266.
 23. Ankri, S., and Mirelman, D. 1999. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and Infection* 1(2):125-129.
 24. Arauz, L. F. 2000. Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated management. *Plant Disease* 84(6):600-611.
 25. von Arx, J. A. 1957. Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Cda. *Phytopathologische Zeitschrift* 17:413-468.
 26. Bais, H. P., Fall, R., and Vivanco, J. M. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiology* 134(1):307-319.
 27. Barnett, H. L., and Hunter, B. B. 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Burgess, USA.
 28. Cai, L., Hyde, K. D., Taylor, P. W. J., Weir, B. S., Waller, J. M., Abang, M. M., Zhang, J. Z., Yang, Y. L., Phoulivong, S., Liu, Z. Y., Prihastuti, H., Shivas, R. G., McKenzie, E. H. C., and Johnston, P. R. 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity* 39:183-204.
 29. Cannon, P. F., Damm, U., Johnston, P. R., and Weir, B. S. 2012. *Colletotrichum* - current status and future directions. *Studies in Mycology*(73):181-213.
 30. Cheng, S. S., Liu, J. Y., Chang, E. H., and Chang, S. T. 2008. Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. *Bioresource Technology* 99(11):5145-5149.
 31. Chowdhury, H., Banerjee, T., and Walia, S. 2008. In vitro screening of *Curcuma longa* L and its derivatives as antifungal agents against *Helminthosporium oryzae* and *Fusarium solani*. *Pesticide Research Journal* 20(1):6-9.
 32. Curtis, H., Noll, U., Stormann, J., and Slusarenko, A. J. 2004. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 65(2):79-89.
 33. Denham, T. G., and Waller, J. M. 1981. Some epidemiological aspects of post-bloom fruit drop disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) in citrus. *Annals of*

- Applied Biology 98(1):65-77.
34. Dickens, J. S. W., and Cook, R. T. A. 1989. *Glomerella-cingulata* on camellia. Plant Pathology 38(1):75-85.
35. Dodd, J. C., Estrada, A. B., Matcham, J., Jeffries, P., and Jeger, M. J. 1991. The effect of climatic factors on *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of mango anthracnose, in the Philippines. Plant Pathology 40(4):568-575.
36. Eckert, J. W., and Ratnayake, M. 1994. Role of volatile compounds from wounded oranges in induction of germination of *Penicillium digitatum* conidia. Phytopathology 84(7):746-750.
37. Evangelista-Martinez, Z. 2014. Isolation and characterization of soil *Streptomyces* species as potential biological control agents against fungal plant pathogens. World Journal of Microbiology & Biotechnology 30(5):1639-1647.
38. He, Y. b., Guo, P. j., Zhao, Y. l., Chang, J. m., He, T. y., and Zhan, R. l. 2009. Screening of inhibitory efficacy from different plant extracts to mango anthracnose and study on activity of volatile oil of cortex cinnamomi. Nongyaoxue Xuebao 11(4):507-510.
39. Hyde, K. D., Cai, L., McKenzie, E. H. C., Yang, Y. L., Zhang, J. Z., and Prihastuti, H. 2009a. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. Fungal Diversity 39:1-17.
40. Hyde, K. D., Cai, L., Cannon, P. F., Crouch, J. A., Crous, P. W., Damm, U., Goodwin, P. H., Chen, H., Johnston, P. R., Jones, E. B. G., Liu, Z. Y., McKenzie, E. H. C., Moriwaki, J., Noireung, P., Pennycook, S. R., Pfenning, L. H., Prihastuti, H., Sato, T., Shivas, R. G., Tan, Y. P., Taylor, P. W. J., Weir, B. S., Yang, Y. L., and Zhang, J. Z. 2009b. *Colletotrichum* - names in current use. Fungal Diversity 39:147-182.
41. Jeger, M. J. 2000. Theory and plant epidemiology. Plant Pathology 49(6):651-658.
42. Kieser, T., Bibb, M. J., M.J. Buttner, K.F. Chater, and D.A. Hopwood. 2000. Practical Streptomyces Genetics (2nd ed.). John Innes Foundation, Norwich, England.
43. Koch, H.P., and Lawson, L. D. 1996. Garlic: The Science and Therapeutic Application of *Allium Sativum* L. and Related Species Williams & Wilkins.
44. Kubo, Y., Takano, Y., Endo, N., Yasuda, N., Tajima, S., and Furusawa, I. 1996. Cloning and structural analysis of the melanin biosynthesis gene SCD1 encoding scytalone dehydratase in *Colletotrichum lagenarium*. Applied and Environmental Microbiology 62(12):4340-4344.
45. Latunde-Dada., and Akinwunmi, O. 2001. *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. Molecular Plant Pathology 2(4):187-198.
46. Maharachchikumbura, S. S. N., Chukeatirote, E., Guo, L. D., Crous, P. W., McKenzie, E. H. C., and Hyde, K. D. 2013. Pestalotiopsis species associated with *Camellia sinensis* (tea). Mycotaxon 123:47-61.

- 
47. Milgroom, M. G., and Peever, T. L. 2003. Population biology of plant pathogens - The synthesis of plant disease epidemiology and population genetics. *Plant Disease* 87(6):608-617.
48. Mohanan, R. C., Kaveriappa, K. M., and Nambiar, K. K. N. 1989. Epidemiological studies of *Colletotrichum gloeosporioides* disease of cocoa. *Annals of Applied Biology* 114(1):15-22.
49. Pandey, R. R., Arora, D. K., and Dubey, R. C. 1993. Antagonistic interactions between fungal pathogens and phylloplane fungi of guava. *Mycopathologia* 124(1):31-39.
50. Prusky, D. 1992. Quiescent infections of *Colletotrichum* in tropical and subtropical fruits. In *Colletotrichum: biology, pathology and control*.
51. Réblová, M., Gams, W., and Seifert, K. A. 2011. Monilochaetes and allied genera of the Glomerellales, and a reconsideration of families in the Microascales. *Studies in Mycology*(68):163-191.
52. Ranasinghe, L., Jayawardena, B., and Abeywickrama, K. 2002. Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et LMPerry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. *Letters in Applied Microbiology* 35(3):208-211.
53. Saha, D., Dasgupta, S., and Saha, A. 2005. Antifungal activity of some plant extracts against fungal pathogens of tea (*Camellia sinensis*). *Pharmaceutical biology* 43(1):87-91.
54. Sutton, B. C. 1980. *The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia Acervuli and Stromata*. Oxford University Press.
55. Thangavelu, R., Sundararaju, P., and Sathiamoorthy, S. 2004. Management of anthracnose disease of banana caused by *Colletotrichum musae* using plant extracts. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 79(4):664-668.
56. Weir, B. S., Johnston, P. R., and Damm, U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology*(73):115-180.
57. Willis, J. 1899. Tea and Coffee Diseases. *Bulletin of Miscellaneous Information (Royal Gardens, Kew)* 1899(151/152):89-94.