

出國報告(出國類別：短期研究)

山茶科植物內生真菌之研究

服務機關：行政院農業委員會茶業改良場

姓名職稱：林秀榮 助理研究員

派赴國家：美國

出國期間：103 年 5 月 19 日~9 月 29 日

報告日期：103 年 11 月 6 日

經費來源：行政院農業委員會

摘要

於美國西伊利諾大學進行植物內生真菌研究方法短期研究計畫，學習內容包含操作分子生物技術的熟稔、分析成茶中內生真菌及利用山茶花做模式植物進行研究。在成茶內生真菌分析試驗中，結果顯示來自臺灣之十種成茶以冷水泡開後進行內生真菌分離，僅白茶之內生真菌分離率達 28%，其他十種成茶的內生真菌分離率皆在 5% 以下，再以熱水沖泡後進行內生真菌分離，所有成茶皆無分得任何內生真菌，表示茶葉經熱水沖泡後飲用均無真菌影響之虞。以山茶花進行內生真菌研究結果發現，根部的內生真菌分離率與品種有相關，其中 *Camellia sasanqua* 根部內生真菌分離率皆較 *C. japonica* 高；葉部內生真菌分離率則與樹齡有關，調查結果為成株山茶花較幼苗內生真菌分離率來的高。根部與葉部分離之內生真菌相差異大，僅自葉部分離得之 C 型真菌出現在各試驗山茶花品種，可針對此真菌進行深入研究，以了解此真菌在植物生長中所扮演腳色，進而應用於茶樹栽培管理中。本次在美國進行的短期研究心得建議包括學術研究面及茶業推廣面，學術部分希望政府能更加重視基礎研究的投入並設立長程目標，以達確實提供農業生產模式具有因應未來整體環境變遷的能力，及鼓勵國內研究人員與國外學者專家交流，並形成跨國團隊進行共同研究。茶業推廣部分，美國人尚未有飲茶習慣，且對原葉茶的了解不深，但經過一次公開演講場合讓外國人試飲，對台式烏龍茶接受度相當高，建議可以與國外知名品牌進行合作，推出臺灣茶品項，以提升臺灣茶在國際的知名度。

目 次

壹、目的

貳、行程

參、研究內容

肆、研究心得建議事項

壹、目的

茶樹(*Camellia sinensis*)栽培為臺灣重要高經濟產值作物，耕作栽培管理的效益均直接反應在成茶商品價格上。目前臺灣茶樹病害以茶枝枯病、茶赤葉枯病及茶髮狀病等對茶葉製成品質影響甚大，目前已有核准登記使用藥劑，但防治效果有限，加上茶樹更新修剪或害蟲危害情形，許多已知或未知微生物(或病害)均可影響茶樹的生長及品質。茶樹內生微生物已有許多國外報導針對茶樹內生真菌在茶葉化學成份和茶葉品質形成過程中的作用進行探討，指出部分茶樹內生真菌會改變兒茶素類的結構或本身代謝物會增加茶多酚含量而改變茶樹品質，除改變茶葉品質之外，亦會產生對病原真菌與細菌有抑制作用的多酚類物質。雖然大陸在茶樹內生微生物上已有許多研究報導，但是，臺灣茶樹栽培管理及製茶方式與大陸迥異，除臺灣茶樹病害的發展屬性或病原性與其他國家不同外，具臺灣特性的內生微生物的存在對茶樹生長和茶葉品質推測亦有所差異性，然臺灣對茶樹內生微生物的研究均闕如，如能針對臺灣的栽培環境及茶樹品種，(1)探討內生微生物對茶葉品質的影響、(2)選定臺灣特有的茶樹有益內生微生物，作為促進茶樹生長潛勢(Growth promoting)應用、(3)篩選本土茶樹內生拮抗微生物，探討其機制並進行生物防治(Biological control)研究，將使國內茶樹栽培管理及生物防治走向新穎、環境安全及經濟效益的生產模式。

貳、行程

日期	行程
5月19日(臺灣時間) (星期一)	桃園機場出發至美國皮歐立亞機場 (09:10-13:25 15:05-14:05 15:25-15:49) (台北-成田 成田-底特律 底特律-皮歐立亞)
5月19日(美國時間) (星期一)	皮歐立亞-馬克母 到達目的地西伊利諾大學
5月20日至9月27日(美國時間) (星期二) (星期六)	西伊利諾大學進行研究
9月28日	美國皮歐立亞機場出發至桃園機場 (10:45-13:15 15:23-17:45 18:35-19:25) (皮歐立亞-底特律 底特律-成田 成田-台北)

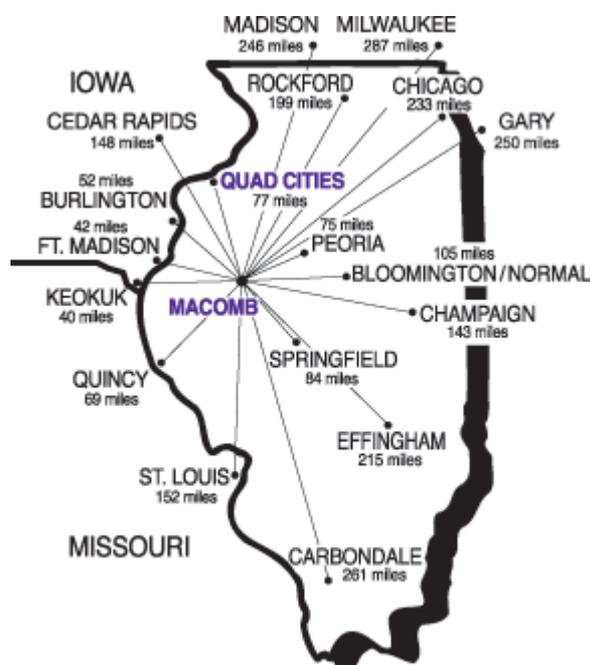
參、研究內容

一、研究地點--美國西伊利諾大學

西伊利諾大學(Western Illinois University)位於伊利諾州馬克姆(Macomb)，初名西伊利諾師範大學(Western Illinois Normal and Training School)始建立於1899年，1957年更名自西伊利諾州立大學(Western Illinois State College)至西伊利諾大學

(Western Illinois University)，該大學包含人文社會科學、天文地理及生物科學等。

馬克姆(Macomb)位於伊利諾州McDonough縣，人口約2萬2千人(2010統計)，為西伊諾大學的故鄉。



二、山茶科植物內生真菌研究內容

以自臺灣帶去美國之乾燥茶葉樣品及以萃取之茶葉 DNA 進行分子生物技術熟稔相關實驗，及利用源自臺灣的茶乾探討內生真菌存在茶乾的情形，本次短期研究重點為以山茶花作為本次學習研究內生真菌之樣本植物，學習內生真菌研究流程及其中試驗注意事項。

材料方法

一、分生技術操作及熟稔

材料：自臺灣已萃取之茶樹 DNA 及自臺灣之冷凍乾燥茶葉葉片(表一)。

方法：

(一) 將自臺灣已萃取之茶樹 DNA 利用 ITS nrDNA fungal specific primers, ITS1F 及 ITS4 增幅，增幅片段長度約為 700 bp。

Master mix:

Taq	12.5 μ l
PCR water	6.5 μ l
F primer	1.0 μ l
R primer	1.0 μ l
BSA	3.0 μ l
DNA	1.0 μ l

PCR 條件：增幅 ITS 區間反應如下，先加熱至 95°C 2 分鐘，第 1 至第 35 循環為 94°C 30 秒；50°C 30 秒；72°C 45 秒，最後再以 72°C 反應 7 分鐘，最後停止於 4°C，最後進行核酸電泳分析。

(二) 利用兩種不同 DNA 核酸萃取套組進行測試。

材料：

1. no.32(台東分場青心烏龍冷凍乾燥葉片)、no.34(茶乾-白茶)、no.35(茶乾-龍泉茶)。
2. Power Soil Kit 及 Qiagen Kit。

方法：將萃取後的 DNA 利用上述方法進行 PCR。

(三) 核酸電泳分析

製備 1.2 % Agrose(0.9 g Agrose + 75 mL 1X TAE buffer)(Tris Acetate EDTA)，取 3 μ l PCR 產物，標記(Marker)為 2 μ l dye + 3 μ l ladder，以 125 v 電壓跑膠 25 分鐘，取出膠體以 EtBr 染色 25 分鐘，退染數秒，進行照膠。

二、成茶真菌研究

材料：自臺灣之 10 種成茶茶乾(表二)，種類包括不發酵、部分發酵及全發酵茶等不同製程成茶，分別為白茶、綠茶(碧螺春)、文山包種茶、高山茶、龍泉茶、東方美人茶、紅烏龍、高山紅茶、日月潭紅茶及佳葉龍茶。

方法：

(一) 成茶真菌分析：利用液態氮研磨茶乾，取 200 μ g 茶樣並以 Qiagen Kit 抽取 total DNA，利用 ITS nrDNA fungal specific primers，ITS1F 及 ITS4 進行增幅。

(二) 成茶中內生真菌相調查：內生真菌分離純化培養

1. 樣品處理：分成用冷水及熱水浸泡成茶。

(1) 冷水處理：茶乾直接以冷水將泡開待用。

(2) 熱水處理：以煮沸熱水直接浸泡茶乾，3 公克茶乾加入 250 毫升熱水，浸泡 5 分鐘後將茶湯倒出。

2. 樣品表面消毒：

(1) 將樣品放入塑膠培養皿中，每一樣品分別放入十公分塑膠滅菌培養皿。

(2) 將茶葉以 70 %酒精浸潤樣品，確定樣品完全泡在液體中，1 分鐘後將酒精倒除。

(3) 以 0.5 %Clorox(10 ml Clorox + 120 ml 滅菌水)浸潤樣品，確定樣品完全泡在液體中，2 分鐘後將漂白水倒除。

(4) 以滅菌水漂洗 3 次，注意若仍有漂白水殘留(異味)可以滅菌水多漂洗

幾次，確定未有漂白水殘留。

- (5) 盡量將樣品上之液體移除或是可使用微量吸管吸取多餘液體，避免殘留液體造成汙染。
3. 麥芽汁瓊脂培養基(Melt Extract Agar, MEA medium)製備：
取 MEA 培養基 33.6 g 加入一公升過濾水，加入培養基粉前加入磁石，以 121°C，15 磅壓力進行高溫高壓滅菌，待培養基溫度降至 60°C 後加抗生素 Streptomycin 及 Tetracyclin，每升培養基加 1 毫升抗生素，邊攪拌邊加。倒入 10 公分塑膠滅菌培養皿，當日未使用完畢之培養基保存於 4°C 冰箱。
4. 內生真菌分離培養：
 - (1) 將表面消毒後之樣品於無菌操作台中進行，以熱消毒過的剪刀將葉片周圍剪去，再剪成小塊約 2*2 mm² 大小，每一培養皿放入六小片，每種茶 17 皿培養皿，培養皿以石臘膜封住，於室溫下避光培養。
 - (2) 觀察：分離後 1、3、5 天觀察一次，檢查培養基上若有雜菌(非從樣品長出的菌)要重新移菌。
 - (3) 5 至 7 天後將培養皿上的菌移至新的 MEA 培養皿中培養(純化)，純化後之真菌待生長至產孢後以肉眼初步分群，並照相建檔。
 - (4) 編碼不同形態型(morphotypes)，並記錄每株採樣茶樹分得之真菌不同形態行出現次數。
 - (5) 將不同形態型之真菌抽 DNA 並以 ITS1F 及 ITS4 增幅後送解序。
 - (6) 送定序該菌株以無菌水進行保存，每一菌株保存兩管。

三、山茶花內生真菌相調查：內生真菌分離純化培養

材料：自網路購買美國當地山茶花植株，共兩品種 (*Camellia sasanqua*, *C. japonica*)，八商品種(表五、圖七)。

方法：

1. 樣品表面消毒：
 - (1) 將樣品(葉、根)在流動水下以清水沖洗乾淨，再放入塑膠培養皿中，每一樣品放個別一塑膠培養皿。
 - (2) 以 70 %酒精浸潤樣品，確定樣品完全泡在液體中，1 分鐘後將酒精倒除。
 - (3) 以 0.5 %Clorox(10 ml Clorox + 120 ml 滅菌水)浸潤樣品，確定樣品完全泡在液體中，2 分鐘後將漂白水倒除。
 - (4) 以滅菌水漂洗 3 次，注意若仍有漂白水殘留(異味)可以滅菌水多漂洗幾次，確定未有漂白水殘留。
 - (5) 盡量將樣品上之液體移除或是可使用微量吸管吸取多餘液體，避免殘留液體造成汙染。
2. 麥芽汁瓊脂培養基(Melt Extract Agar, MEA medium)製備：

取 MEA 培養基 33.6 g 加入一公升過濾水，加入培養基粉前加入磁石，以 121°C，15 磅壓力進行高溫高壓滅菌，待培養基溫度降至 60°C 後加抗生素 Streptomycin 及 Tetracyclin，每升培養基加 1 毫升抗生素，邊攪拌邊加。倒入 10 公分塑膠滅菌培養皿，當日未使用完畢之培養基保存於 4°C 冰箱。

3. 內生真菌分離培養：

A.葉：將表面消毒後之樣品於無菌操作台中進行，以熱消毒過的剪刀將葉片周圍剪去，再剪成小塊約 2*2 mm²大小，每一培養皿放入六小片，為六重複，每樣品至少 100 重複，培養皿以石臘膜封住，於室溫下培養。

B.根：將表面消毒後之樣品於無菌操作台中進行，以熱消毒過的剪刀將根剪成小段約 3 mm 長，每一培養皿放入六小根，為六重複，每樣品超過 100 重複，培養皿以石臘膜封住，於室溫下培養。

(1)將表面消毒後之樣品於無菌操作台中進行，以熱消毒過的剪刀將葉片周圍剪去，再剪成小塊約 2*2 mm²大小，每一培養皿放入六片，培養皿以石臘膜封住，於室溫下培養。

(2)觀察：分離後 1、3、5 天觀察一次，檢查培養基上若有雜菌(不是從樣品長出的菌)要重新移菌。

(3)5 至 7 天後將培養皿上的菌移至新的 MEA 培養皿中培養(純化)，純化後之真菌待生長至產孢後以肉眼初步分群，並照相建檔。

(4)編碼不同形態型(morphotype)，並記錄每株採樣茶樹分得之真菌不同形態行出現次數。

(5)將不同形態型之真菌抽 DNA 並以 ITS1F 及 ITS4 增幅後送解序。

(6)送定序該菌株以無菌水進行保存，每一菌株保存兩管。

結果與討論

一、不同核酸萃取套組對茶樹核酸萃取效果比較

將利用 Magcore 核酸自動萃取儀萃取之茶樹 DNA 利用專一性引子對進行增幅，結果如圖一至三，結果顯示自臺灣製備茶樹 DNA，來自根的樣品皆能被成功增幅，而來自葉片之 DNA 則增幅條帶不明顯或是無法成功被增幅，而利用 Qiagen 套組則能成功增幅茶樹葉片內生真菌片段，顯示 Qiagen 套組對抽取茶樹葉片及根之 DNA 效果優於 Magcore 核酸自動萃取儀。故若針對抽取新鮮茶樹組織推薦以 Qiagen 核酸萃取套組進行核酸萃取，以提升後續研究之效能與準確性。

二、成茶內生真菌研究

成茶茶乾利用核酸萃取套組抽取總去氧核糖核酸後，利用針對真菌所設計的專一性引子對進行特定片段之增幅，結果如圖四。十種不同成茶中除

了日月潭紅茶未能成功增幅外，其餘九種成茶皆能偵測內生真菌的存在，九種成茶包括文山包種茶、白茶、龍泉茶、高山烏龍茶、紅烏龍、高山紅茶、佳葉龍茶、碧螺春綠茶及東方美人茶，可以專一性引子對成功增幅特定片段，表示該成茶中有真菌的存在，為確定成茶中之真菌是否仍有活力及是否為內生真菌，故進行內生真菌分離純化試驗。

在成茶內生真菌的分離純化試驗中，各種成茶經過冷水浸泡葉片展開後，表面消毒後以添加抗生素之麥芽汁瓊脂培養基(MEA)進行分離，結果如表三，共有七種成茶分離得內生真菌，其中包括文山包種茶、白茶、龍泉茶、高山茶、紅烏龍、高山紅茶及佳葉龍茶，其中又以白茶分離率最高，得之內生真菌數量最多，共 31 株，分離率為 28.18%，其他成茶之分離率皆在 3% 以下。結果亦顯示自成茶分離之內生真菌具多樣性，其中自白茶分離之內生真菌共 31 株，其形態型共 30 種。

在茶乾經熱水浸泡後進行內生真菌分離試驗結果如表四，茶乾經過沸水浸泡五分鐘後，所有的成茶經表面消毒後皆無內生真菌自組織中長出，故得知沸水可將所有成茶之內生真菌殺死。

試驗結果顯示十種成茶經過熱水浸泡後皆未分離得內生真菌，故證明成茶經由熱水沖泡後不會有內生真菌之存在，此結果證明熱水沖泡之茶湯無真菌殘留之疑慮。

三、山茶花內生真菌研究

山茶花根及葉之內生真菌分離率調查結果如表六，根部之內生真菌分離率皆在 50% 以上，其中以 *Camellia sasanqua* 中的六品種的內生真菌分離率皆超過 70%。葉部內生真菌分離率自 12.75% 至 99.04%，分離率超過 90% 的品種包括 Leslie Ann 及 Yuletide Red，且該二品種植株尺寸皆為 30 吋左右。Falling Star White 及 Grace Albritton 此二品種之植株為小苗，而其內生真菌分離率較其他品種低，皆低於 40%。

山茶花內生真菌之分離株數與形態型調查結果如表七，每一品種分離樣品數皆超過 100 小片。自山茶花根部分離得之內生真菌分離株共 591 株，其形態型共 300 種，各品種之主要形態型(出現率最高者)自代號 33 至 50 分別為 6F、8B、9E 與 9F、10Y、13B、13R、13R、15K、15K，其菌落型態如圖六，其中 8B、9E、9F 及 13B 菌落正面看起來相似，但由於菌落背面差異甚大，故仍將其區分為不同之形態型；內生真菌自葉部分離得共 302 分離株，分離株之形態型共 158 種，各品種之主要形態型自代號 33 至 50 分別為 A、Y、C、B 與 C、C、C、F、5D，在八種試驗植物之葉片上皆能分離得到 C 型之內生真菌，又在 *C. sasanqua* 種類中的六種供試植物有四種以 C 形態型真菌為主要之內生真菌，該四種品種為 Leslie Ann、Our Linda Pink、Winters Charm Pink 及 Yuletide Red。

在山茶花內生真菌研究結果中分離得自山茶花根部之內生菌共 303 株，

自葉部分離得 161 株內生真菌，且發現試驗植株根部內生真菌分離率與種類 (species) 有相關，內生真菌分離率在 *Camellia sasanqua* 植株之根部皆較高於 *C. japonica*，且分離率皆超過 70% 以上；葉部之內生真菌分離率則與植株大小(年齡)成正相關，其中為苗期植株的 Falling Star White 及 Grace Albritton 之內生真菌分離率皆低於 40%；植株大小在 10-14 吋之 Cecilia White、Our Linda Pink 及 Debutante Pink 葉部內生真菌分離率則在 42.31~50.69% 之間；14-18 吋的 Winters Charm Pink 葉部內生真菌分離率為 66.67%；而樹齡較大者(植株超過 24 吋)之 Leslie Ann 與 Yuletide Red 葉部內生真菌分離率超過 90%，此結果顯示內生真菌在山茶花之盤據會隨著植株之成熟度而增加。在內生真菌分離株之形態型觀察中，自根部分離之內生真菌種類較葉部來得多，且其大部分分離株之菌絲顏色偏黃至褐色，而在葉部內生真菌分離株則顏色較豐富。各品種之根部內生真菌形態型相互重複者少，但在葉部內生真菌分離株之形態型以 C 型皆出現於各品種中，又 C 型為大部分 *C. sasanqua* 之主要內生真菌，針對本菌對山茶花之影響可再作深入研究。

結論

在成茶內生真菌研究中，發現製程對於內生真菌之殘存有關係，其中又以揉捻該步驟直接影響內生真菌之存活，日後研究可針對揉捻程度及茶葉細胞破裂釋出之化合物種類與對內生真菌之存活影響作深入研究。甚至進一步探討茶葉之內生真菌種類與成茶品質關係亦為重要研究方向。在成茶內生真菌分離試驗中發現，所有成茶經過廢水浸泡五分鐘後，即不再分得任何內生真菌，故一般熱水沖泡法之飲茶習慣是無內生真菌存活在茶湯中之疑慮。

山茶花內生真菌研究中發現內生真菌相與內生真菌分離率在根部及葉部皆有不同之結果，且不同種山茶花之內生菌相與分離率亦有差異，根據本試驗結果顯示 *Camellia sasanqua* 之內生真菌分離率較 *C. japonica* 高，且普遍葉部內生真菌相種類少於根部，且由在葉部分離結果得知儘管不同種之山茶花皆可分離得同一種真菌，如皆為 *Camellia sasanqua* 類型的山茶花葉部內生真菌主要形態型皆為 C 型，且該形態型之內生真菌皆出現在所有試驗山茶花中，故推測 C 型內生真菌為山茶花中之主要內生真菌種類之一，日後會進一步針對 C 型內生真菌鑑定與病原性測試，以更進一步了解該真菌在山茶花中扮演之角色。

本次研習所學得之智能可以應用於國內山茶科植物(*C. sinensis* 及 *C. olifera*) 內生真菌相調查、進而探討內生真菌對茶樹之影響，期能達到了解內生真菌對茶葉品質影響與找尋具生物防治潛力之內生針具之目標。

表一、自臺灣之試驗材料

Table 1. Materials form Taiwan

代號 Code	種類及來源 Type and resource	備註 Note
12	總場台茶 12 號	DNA
18	總場台茶 18 號	DNA
20	總場台茶 20 號	DNA
23	總場青心烏龍	DNA
24	阿里山青心烏龍	DNA
25	總場香櫞 1	DNA
26	總場香櫞 2	DNA
27	總場小果油茶	DNA
28	總場四季春	DNA 及冷乾葉片
29	總場武夷	DNA 及冷乾葉片
30	臺東分場台茶 12 號	DNA 及冷乾葉片
31	臺東分場台茶 18 號	DNA 及冷乾葉片
32	臺東分場青心烏龍	DNA 及冷乾葉片

表二、試驗茶乾資料

Table 2. Profile of testing dry tea

代號 Code	茶葉種類 Tea type	品種 Variety
33	文山包種茶	臺茶 13 號
34	白茶	武夷
35	龍泉茶	青心烏龍
36	高山茶	青心烏龍
37	紅烏龍	臺茶 12 號
38	高山紅茶	青心烏龍
39	佳葉龍茶	未知
40	碧螺春	青心柑仔
41	日月潭紅茶	臺茶 21 號
42	東方美人茶	臺茶 12 號

表三、成茶内生真菌分離率、分離株及其形態型調查

Table3. Investigation of endophytic fungi isolation rate, amount of isolates and its morphotypes of dry tea

成茶代號 Dry tea No.	内生真菌分離率 Endophytic fungi isolation rate (%)	分離株代號 Isolate code	形態型數 Amount of morphotypes
33	1(1/100)	D101	1
34	28.18(31/110)	D1~31	30
35	1.67(2/120)	D201, D202	2
36	0.95(1/105)	D301	1
37	1.90(2/105)	D401, D402	2
38	1.81(2/110)	D501, D502	2
39	2.72(3/100)	D601~D603	2
40	0(0/120)	-*	0
41	0(0/120)	-	0
42	0(0/120)	-	0
總數		42	40

* 無分離株。

表四、熱水處理後之成茶内生真菌分離率、分離株及其形態型調查

Table4. Investigation of endophytic fungi isolation rate, amount of isolates and its morphotypes of dry tea which treated with hot water

成茶代號 Dry tea No.	内生真菌分離率 Endophytic fungi isolation rate (%)	分離株代號 Isolate code	形態型數 Amount of morphotypes
33	0(0/102)	-*	0
34	0(0/102)	-	0
35	0(0/102)	-	0
36	0(0/102)	-	0
37	0(0/102)	-	0
38	0(0/102)	-	0
39	0(0/102)	-	0
40	0(0/102)	-	0
41	0(0/102)	-	0
42	0(0/102)	-	0
總數	0	-	0

* 無分離株。

表五、試驗植物資料-山茶花

Table 5. Profile of testing *Camellia* plants

代號 Code	植物品種 plant species	植物品種(商品名) plant variety name	植株尺寸 Plant size
43	<i>Camellia sasanqua</i>	Cecilia White	10-14"*
44	<i>C. sasanqua</i>	Falling Star White	苗
45	<i>C. sasanqua</i>	Leslie Ann	24-30"
46	<i>C. sasanqua</i>	Our Linda Pink	10-14"
47	<i>C. sasanqua</i>	Winters Charm Pink	14-18"
48	<i>C. sasanqua</i>	Yuletide Red	24-30"
49	<i>C. japonica</i>	Debutante Pink	10-14"
50	<i>C. japonica</i>	Grace Albritton	苗

* "：吋。

表六、山茶花葉及根之內生真菌分離率調查

Table 6. Endophyfungi isolation rate of roots and leaves form *Camellia* plants

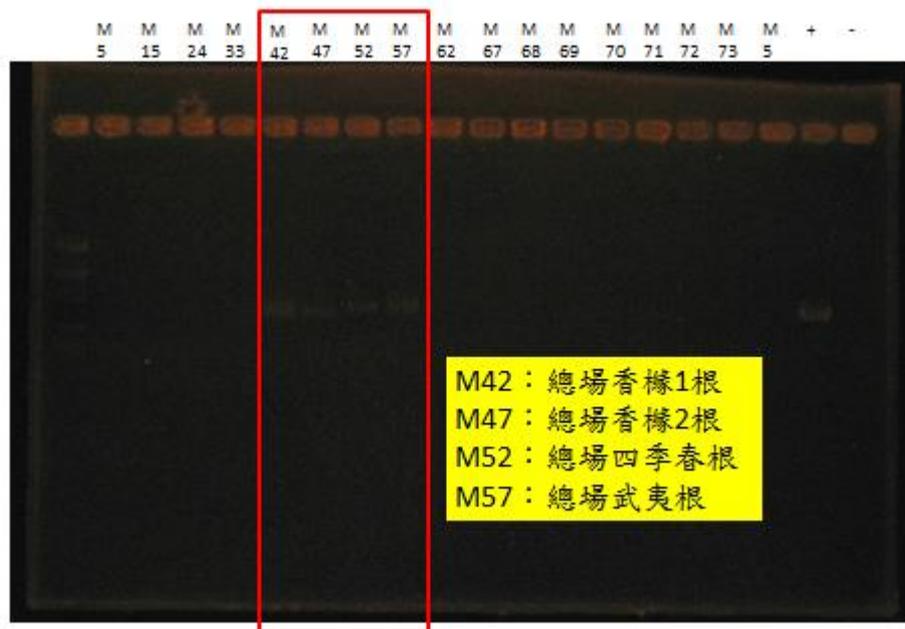
代號 Code.	試驗植物種類 Plant species	品種名稱 Plant variety name	植株尺寸 Plant size	内生真菌分離率 (%)(根/葉) Endophytic fungi isolation rate (%) (Roots/Leaves)
43	<i>Camellia sasanqua</i>	Cecilia White	10-14"*	87.25/50.69
44	<i>C. sasanqua</i>	Falling Star White	seedling	72.62/12.75
45	<i>C. sasanqua</i>	Leslie Ann	24-30"	86.27/90.97
46	<i>C. sasanqua</i>	Our Linda Pink	10-14"	80.39/42.31
47	<i>C. sasanqua</i>	Winters Charm Pink	14-18"	98.04/66.67
48	<i>C. sasanqua</i>	Yuletide Red	24-30"	77.45/99.04
49	<i>C. japonica</i>	Debutante Pink	10-14"	55.88/42.59
50	<i>C. japonica</i>	Grace Albritton	seedling	58.82/39.05

* "：吋。

表七、山茶花内生真菌分離株數與主要形態型調查

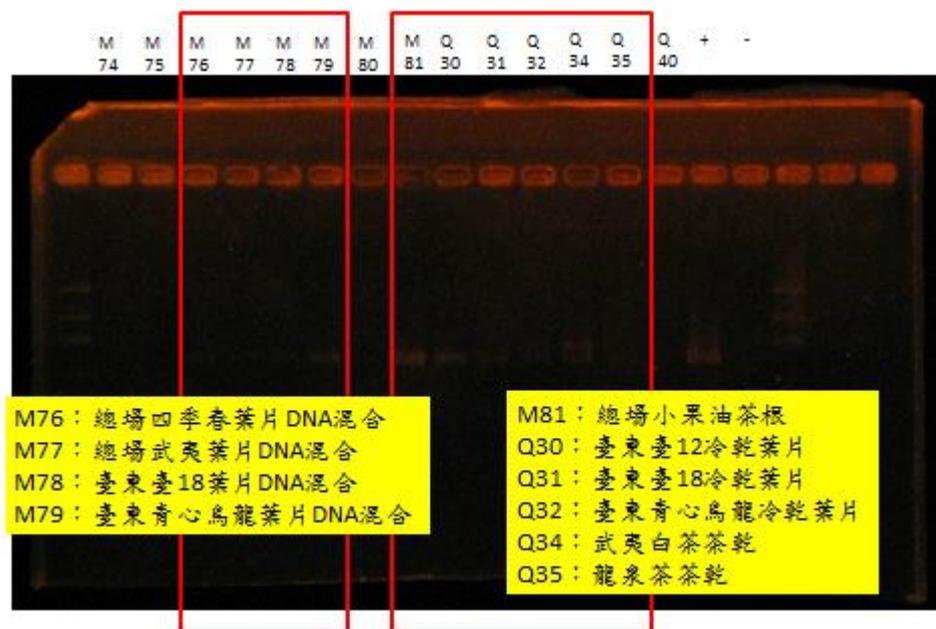
Table 7. Investigation of the amount of isolates and main morphotype of endophytic fungi in *Camellia* plants

代號 Code.	根 Root		葉 Leaf	
	分離株/形態型 Isolates/Morphotypes	主要形態型 Dominant morphortype	分離株/形態型 Isolates/Morphotypes	主要形態型 Dominant morphortype
43	95/59	6F	62/29	A
44	58/32	8B	13/12	Y
45	95/47	9E. 9F	35/14	C
46	64/41	10Y	58/43	B. C
47	85/41	13B	16/9	C
48	83/38	13R	19/13	C
49	53/29	15K	67/44	F
50	58/37	15K	32/21	5D



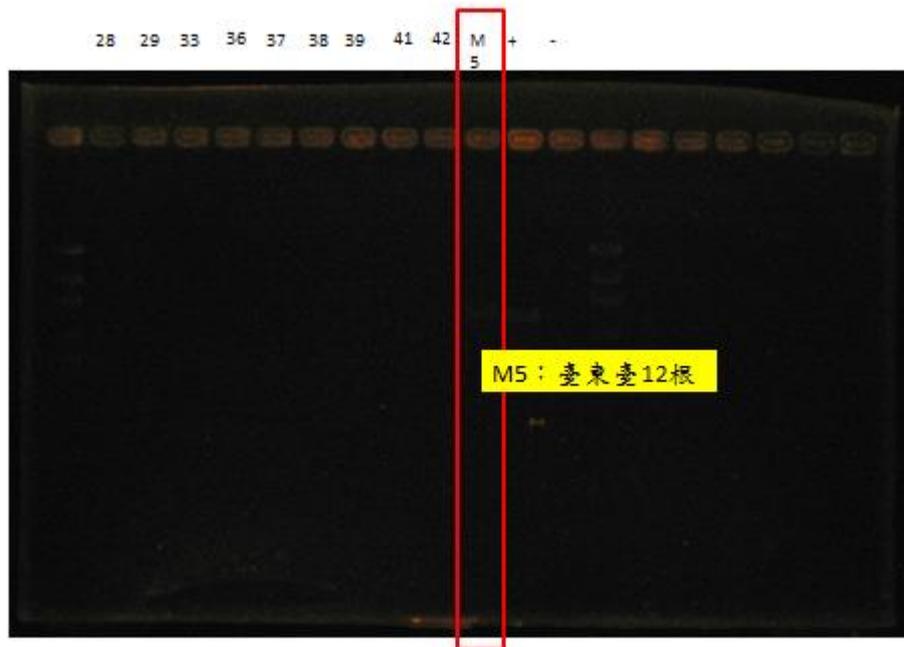
圖一、利用核酸萃取法初步調查茶樹內生真菌含量情形(I)。M：Magcore 核酸自動萃取儀。

Fig1. Investigation of endophytic fungi in tea plant by DNA extraction(I). M：Magcore, DNA auto-extraction machine.

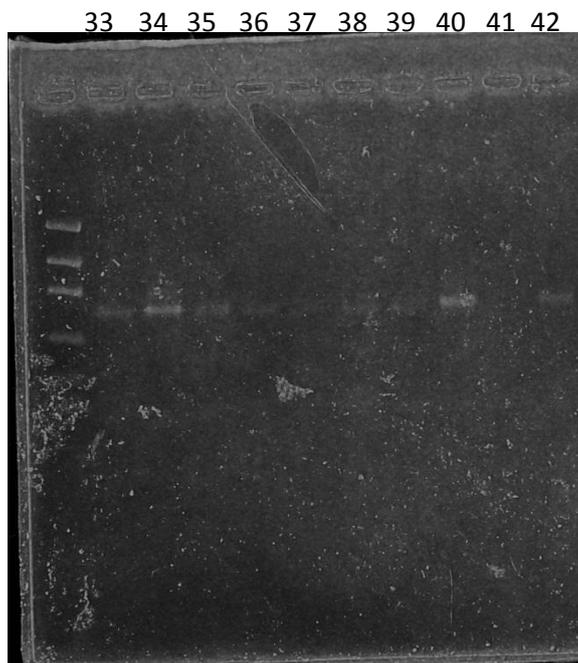


圖二、利用核酸萃取法初步調查茶樹內生真菌含量情形(II)。M：Magcore 核酸自動萃取儀；Q：Qiagen 套組。

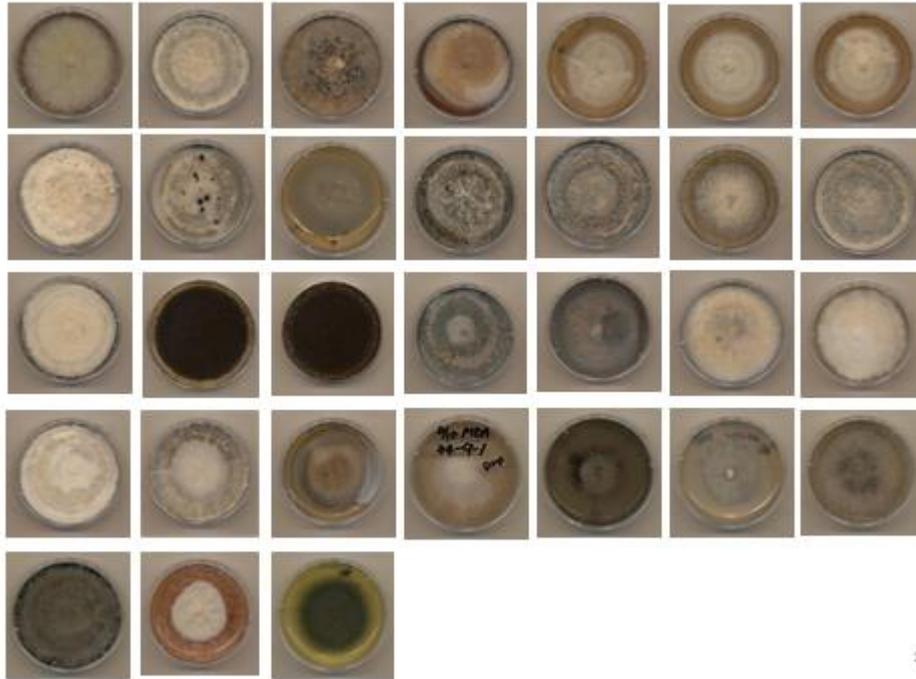
Fig2. Investigation of endophytic fungi in tea plant by DNA extraction(II). M：Magcore, DNA auto-extraction machine. Q: Qiagen kit.



圖三、利用核酸萃取法初步調查茶樹内生真菌含量情形(III)。
Fig3. Investigation of endophytic fungi in tea plant by DNA extraction(III).



圖四、利用特定真菌引子增幅茶乾内生真菌結果。
Fig4. Dry tea DNA amplified by fungal specific primer.

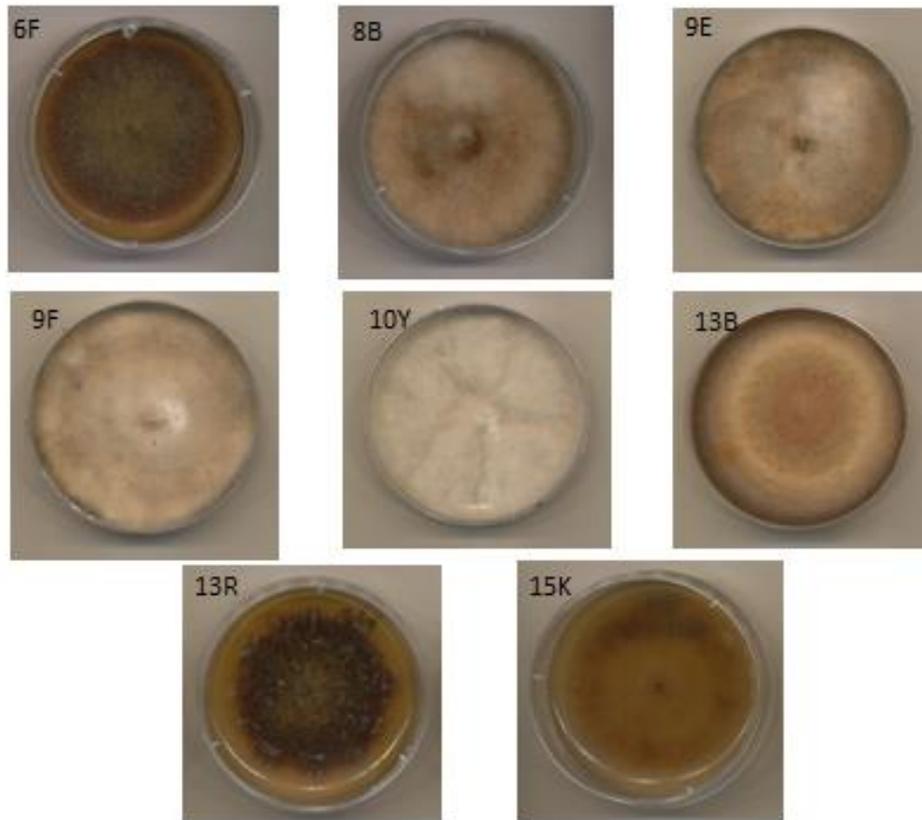


11

圖五、自白茶分離之內生真菌菌落外觀型態。
 Fig5. The endophytic fungi morphotypes of white tea.

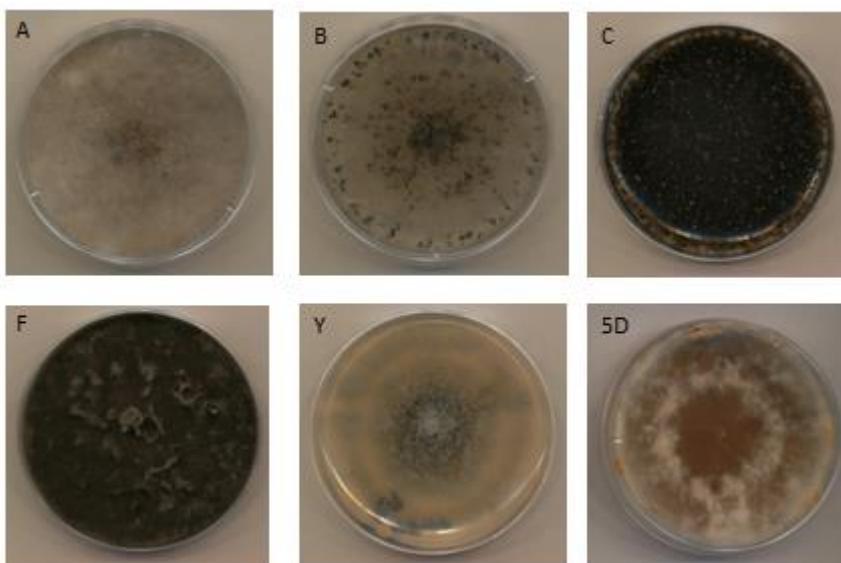


圖六、試驗山茶花植株。
 Fig6. Testing *Camellia* plants.



圖七、山茶花根部內生真菌主要分離株之形態型。

Fig7. The dominant endophytic fungi morphotypes in roots of *Camellia* plants.



圖八、山茶花葉部內生真菌主要分離株之形態型。

Fig8. The dominant endophytic fungi morphotypes in roots of *Camellia* plants.

不發酵茶(綠茶)

茶菁 → 殺菁 → 揉捻 → 乾燥

部分發酵茶(白茶, 烏龍茶)

茶菁 → 室內萎凋 → 乾燥
茶菁 → 日光萎凋 → 室內萎凋 → 殺菁 → 揉捻 → 乾燥

全發酵茶(紅茶)

茶菁 → 室內萎凋 → 揉捻 → 解塊 → 後發酵 → 乾燥
茶菁 → 室內萎凋 → 揉捻及切碎 → 後發酵 → 乾燥

圖九、不同茶類之製程。

Fig9. The tea processing.

肆、研究心得建議事項

1. 目前臺灣針對植物內生真菌研究主要方向為在已知具藥效或在極端環境之植物中找尋內生真菌，並探討該內生真菌對植物之影響，例如篩選中藥材植物之內生真菌，期能利用內生真菌有效增進該植物產生目標成分，如紫杉醇等。或是篩選乾旱環境下生長勢良好之植物內的內生真菌，期能找到增進植物耐旱能力之內生真菌。經過本次短期國外研習，了解國外對於內生微生物的研究應用不僅在篩選有益菌種外，更針對內生微生物的變動與環境的改變做長期調查與監測，如近年來愈益重視的氣候變遷問題，政府提供充足的研究經費讓國家研究機構與大學分工合作進行長期內生微生物變動監測，以得到科學證據與環境變化情形，並了解確切氣候變遷對生物的影響，進而擬定因應氣候變遷對策。建議臺灣亦能針對此類長期基礎研究投入經費與人力，確實讓本國農業具有因應整體環境改變之能力。
2. 內生微生物研究在國外發展已超過 20 年，不論經驗或成果皆較國內來得豐富，建議可以廣招國內專家學者形成團隊進行有目標性的研究，並且增加參與國際研討會以增加與國外專家交流機會，或是研提計畫請國外內生微生物專家學者來台訪問交流，提升國內內生微生物研究動能。
3. 美國研究系統及其組織能力與國內大專院校大致相同，而差異處包含研究內容較為彈性、研究經費相對充足、研究動能等，僅以本人進行短期研究之生物學系真菌研究室來說，研究學者會配合現存問題與專業方面進行研究方向擬定，且廣泛地與其他單位進行合作，形成團隊進行長期研究，當向主管機關做成果報告時，主管機關會依研究成果增加經費預算，讓優良的研究得以持續並深入進行，此項舉動不僅實質上支持了研究的進行，更提升了研究人員的研究動能。
4. 在研習期間曾參加該系上專題討論，介紹臺灣茶並且讓美國人品嚐五種臺灣茶，包括三峽碧螺春(綠茶)、文山包種茶、龍泉茶(包種茶)、東方美人茶、紅茶(如圖十)，其中以龍泉茶在該場最受歡迎，其次為綠茶與文山包種茶，在訪問品嚐後的感想，大部分的人覺得龍泉茶具有特殊香味及口感，打破一般對茶葉非苦即澀的觀感，但對於紅茶仍希望能加糖或牛奶。本次調查發現美國人對於台式烏龍茶的接受度相當的高，其中又以中度發酵的龍泉茶最受歡迎，建議可以在國際茶葉展覽等會議增加推廣台式烏龍茶。



圖十、系上專題討論後之茶葉品嚐(左)；茶湯品嚐後剩下情形(右)。

5. 美國研習期間，觀察外國人並沒有飲茶習慣，一般用餐仍以碳酸飲料、咖啡或水為主，少數有喝茶包習慣，國外主要為在超市購買茶葉，全為茶包形式(如圖十一)，種類豐富，以調配風味茶為主，如水果茶或是添加其他香料植物如肉桂等，而單純無其他添加之茶葉，如綠茶或紅茶茶包非常少見，僅在中國超市會有少數亞洲品牌茶葉，如天仁、T 世家等，才會有單純無其他風味添加的茶包。超市出售之茶包每盒單價約 90 至 150 新臺幣不等，與臺灣茶包價格相去不遠。建議臺灣茶葉可以向國外大廠合作，藉已有品牌之茶葉公司推廣及推銷台式烏龍茶。



圖十一、超市販售茶葉情形。

6. 非常榮幸本次能獲得經費出國短期研習，除了能向國外優秀學者學習及交流外，親身體驗國內外文化差異，實屬難得，非常建議本計畫能持續且擴大辦理，讓會內同仁皆有機會與國外研究單位及學者等交流，建立國際合作關係及國內資訊與國際同步，繼而提升臺灣農業研究軟實力。