

國立臺灣大學生物資源暨農學院

植物病理與微生物學系

碩士論文

Department of Plant Pathology and Microbiology

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

評估蟲生真菌 *Isaria javanica* 防治溫室作物害蟲之潛力

Assessing the potential of entomopathogenic *Isaria javanica* for management of the greenhouse insect pests

胡馨元

Hsin-Yuan Hu

指導教授：曾顯雄 博士

Advisor: Dr. Shean-Shong Tzean

中華民國 103 年 10 月

October, 2014



國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

評估蟲生真菌 *Isaria javanica* 防治溫室作物害蟲之潛力

**Assessing the potential of entomopathogenic *Isaria javanica* for
management of the greenhouse insect pests**

本論文係胡馨元君 (R00633015) 在國立臺灣大學植物病理與微生物學系所完成之碩士學位論文，於民國 103 年 9 月 30 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

曾顯雄 博士

曾顯雄

國立台灣大學植物病理與微生物學系 教授

林乃君 博士

林乃君

國立台灣大學農業化學系 副教授

鍾嘉綾 博士

鍾嘉綾

國立台灣大學植物病理與微生物學系 助理教授

陳啟予 博士

陳啟予

國立中興大學植物病理學系 副教授

系主任

張雅君

誌謝

謹將本論文獻給我的指導教授曾顯雄博士、應用真菌實驗室同仁。

感謝我的論文口試委員陳啟予副教授、鍾嘉綾助理教授及林乃君副教授；感謝台南區農改場彭瑞菊學姐、楊梅茶改場曾信光副研究員、台大昆蟲系病媒昆蟲實驗室與遺傳與發育學研究室提供本實驗之蟲源；感謝葉信宏老師遺留的植物生長箱與洪挺軒老師、鍾嘉綾老師管理的溫室；感謝在碩士生涯中給予我鼓勵、支持與解惑的所有師長、夥伴、朋友、家人及伴侶。

因為有你們，才有今日的我。

中文摘要



現代農業以有機無毒、建立永續農業生態系為目標，針對害物發展多元整合的管理策略。發展微生物製劑來防治害物是生物防治的選項之一。本研究室之前自滿月圓所採集鱗翅目蟲體所分離之 *Isaria javanica* Friedrichs & Bally 經初步探討其寄主範圍、酵素活性後，評估其為具有防治潛力之蟲生真菌，故針對溫室小型害蟲繼續進行感染能力、生理特性、劑型的評估。施用 10^7 conidia/ml 於二齡桃蚜 (*Myzus persicae* Sulzer) 6 天後具有 88.13% 死亡率， LT_{50} 為 4 天；施用於二齡南黃薊馬 (*Thrips palmi* Karny) 5 天後死亡率為 85%；施用於二齡茶蠶 8 天後死亡率為 79.62%。在生理生態測試中，此菌之最適生長產胞溫度為 28°C 。以 9 種固態培養基培養 14 天後，最適生長與產胞之培養基為察氏酵母培養基 (Czapek's yeast autolysate agar, CYA)，可產生 3.29×10^9 conidia/plate。經水活性測試於相對濕度 94.9% 以上菌落可生長。在各式碳氮源素上，以山梨糖醇之菌落直徑生長最快，以麥芽糖為碳源產胞量最高；而以硝酸鉀為氮素源之生長產胞量最高。*I. javanica* 生長產胞不受部分殺蟲劑影響，顯示其可與部分殺蟲劑混合施用以添增防治多樣性。在大量培養部分，於白米的固態培養中可生產 2.94×10^{10} conidia/g。將 *I. javanica* 配置成乳劑後，施用於平均溫 30°C 溫室中防治桃蚜，殺蟲效果不如預期，死亡率僅 22%。施用兩次水懸劑或乳劑於均溫為 25°C 溫室之芥藍幼苗植株，8 天後桃蚜死亡率為 98%，然單獨施用乳劑仍對芥藍幼葉具有藥害。總結，*I. javanica* 具有廣泛寄主、良好的致病力與產胞能力，且培養簡便，是一株具商業化潛力之菌株。但於 30°C 以上、相對濕度 96.4% 以下的環境，不適孢子生長發芽，未達預期施用成效。未來可經由劑型改良、添加抗乾燥劑、防曬劑甚或利用基因工程等方法，來增進 *I. javanica* 抗環境逆境與防治害蟲的能力。

關鍵字：蟲生真菌、爪哇擬青黴菌、薊馬、蚜蟲、生物防治

英文摘要



Organic nontoxic sustainable agroecosystem is the goal of perspective agriculture management. To fulfill this purpose, integrated pest management (IPM) is compulsory. Previously, *Isaria javanica* isolated from caterpillar (Lepidoptera), after host range and enzymatic study showed a potential to control small insect pests, particularly in greenhouse. To further test its biocontrol efficacy, experiments on pathogenicity, physiological, characteristics and formulation were conducted. Pathogenicity tests in laboratory, *I. javanica* led to a mortality 88.15% and medium lethal time (LT₅₀) in four days toward green peach aphid (*Myzus persicae* Sulzer); 85% mortality in 5 day against southern yellow thrips (*Thrips palmi* Karny); and 79.62% in 8 days toward tea bug (*Andraca theae* Matsumura). Of the nine cultural media tested, *I. javanica* grew and sporulated best on Czapek's yeast autolysate agar (CYA) at 25°C in the dark, capable of producing 3.29×10^9 conidia/plate. However, *I. javanica* showed slow growth and lower germination rate under 95.9% RH. In carbon and nitrogen source test of *I. javanica*, sorbital was the best for colony growth, by contrast, maltose for sporulation. For growth and sporulation, potassium nitrate was better than other nitrogen source. On the other hand, *I. javanica* was somewhat more tolerant and compatible toward Acetamiprid, Abamectin and Pyriproxyfen insecticides, thus perhaps can be integrated use for pest control. On polish rice alone *I. javanica* produced 2.94×10^{10} conidia g⁻¹, better than brown rice or amended with rice bran or soybean meal. The emulsified conidia formulation exhibited a 98% mortality rate toward aphids on cabbage in 8 days at 25°C compared with 22% mortality rate at 30°C in greenhouse. Overall, *I. javanica* was characterized with high conidia production capacity and moderate to high virulence toward many notorious greenhouse micro-insect pests, hence posed a high potential for commercialization as mycoinsecticides. However, the low tolerances to stressed environments, such as desiccation, UV-radiation etc., need to be overcome by protectants or via genetic engineering approach.

Keyword: entomopathogenic fungi, *Isaria javanica* (= *Paecilomyces javanicus*), aphid, thrips, biological control

目錄



口試委員會審定書	i
誌謝	ii
中文摘要	iii
英文摘要	iv
目錄	v
表目錄	ix
圖目錄	x
Chapter 1 前言	1
Chapter 2 前人研究	2
2.1 昆蟲寄生真菌介紹與發展	2
2.1.1 微孢子蟲門(Microsporidia)	2
2.1.2 游離孢子類真菌(Zoosporic fungi)	2
2.1.3 接合孢子類真菌(Zygosporic fungi)	2
2.1.4 子囊菌門	3
2.1.5 擔子菌門	3
2.2 昆蟲寄生菌侵染寄主策略	3
2.3 昆蟲的防禦模式	5
2.4 環境對昆蟲寄生菌影響	5
2.4.1 溫度	5
2.4.2 濕度	5
2.4.3 紫外線	6



2.5	<i>Isaria javanica</i>	6
2.6	生物防治模式	7
2.7	真菌微生物製劑劑型	7
2.7.1	溼式(液態)劑型	8
2.7.2	乾式(固態)劑型	8
2.8	大量培養	9
2.9	真菌殺蟲製劑商品現況與展望	10
Chapter 3 實驗材料與方法		12
3.1	菌種培養、保存與分生孢子萃取	12
3.2	作物害蟲接種測試	12
3.2.1	寄主範圍測試	12
3.2.2	蚜蟲	12
3.2.3	南黃薊馬	13
3.2.4	茶蠶	13
3.3	生理生態測定	13
3.3.1	菌落、顯微型態觀察	13
3.3.2	溫度對生長、產胞能力影響	14
3.3.3	不同水活性下菌落生長產胞、孢子發芽影響	14
3.3.4	不同培養基對菌落生長、產胞影響	14
3.3.5	不同碳素源對菌落生長、產胞影響	14
3.3.6	不同氮素源對菌落生長、產胞影響	15
3.3.7	農藥對菌落生長、孢子發芽的影響	15



3.4	米類大量培養分生孢子測試	16
3.5	外加氮源於米類培養分生孢子測試	16
3.6	O/W 乳劑製作方式.....	16
3.7	溫室試驗	16
3.8	統計分析	17
Chapter 4	結果.....	18
4.1	作物害蟲接種測試	18
4.1.1	寄主範圍測試.....	18
4.1.2	桃蚜	18
4.1.3	南黃薊馬	18
4.1.4	茶蠶	18
4.2	生理生態測定	18
4.2.1	<i>I. javanica</i> 產胞枝與分生孢子型態特徵.....	18
4.2.2	溫度對生長、產胞能力影響.....	18
4.2.3	不同水活性下菌落生長、產胞影響.....	19
4.2.4	不同培養基對菌落生長、產胞影響.....	19
4.2.5	不同碳素源對菌落生長、產胞影響.....	19
4.2.6	不同氮素源對菌落生長、產胞影響.....	19
4.2.7	農藥對孢子發芽、菌落生長的影響.....	19
4.3	穀類大量培養外加氮源分生孢子產量比較	19
4.4	O/W 劑型.....	20
4.5	溫室中桃蚜防治試驗	20

Chapter 5	討論.....	21
5.1	寄主範圍與致病力	21
5.2	生理生態測定	21
5.2.1	溫度對生長、產胞能力影響.....	21
5.2.2	水活性對菌落生長、產胞影響.....	21
5.2.3	營養源對菌落生長、產胞影響.....	22
5.2.4	農藥對菌落生長的影響.....	22
5.3	基質培養分生孢子	23
5.4	乳劑劑型製作	23
5.5	溫室試驗	24
Chapter 6	結論.....	25
Chapter 7	參考文獻.....	47
附錄 1、	各培養基配方.....	58
附錄 2、	桃蚜、南黃薊馬的接種裝置.....	60



表目錄

表 一、培養在不同水活性之 <i>I. javanica</i> 菌落直徑與產胞量	26
表 二、培養在不同培養基之 <i>I. javanica</i> 生長的菌落直徑與產胞量	27
表 三、培養在添加不同碳素源之培養基之 <i>I. javanica</i> 的菌落直徑與產胞量	28
表 四、培養再添加不同氮素源之 <i>I. javanica</i> 的菌落與產胞量	29
表 五、培養在含有農藥之培養基之 <i>I. javanica</i> 菌落直徑與發芽率	30
表 六、培養於不同米類或米糠之 <i>I. javanica</i> 15 天後所產生的分生孢子量	31
表 七、培養於白米外加氮源之 <i>I. javanica</i> 10 天後所產生的分生孢子量	32

圖目錄



圖 1、可被 <i>I. javanica</i> 寄生的其他昆蟲	33
圖 2、桃蚜接種含有 <i>I. javanica</i> 10^5 、 10^6 和 10^7 conidia/ml 之死亡率	34
圖 3、健康桃蚜和被 <i>I. javanica</i> 感染後型態	35
圖 4、南黃薊馬接種含有 <i>I. javanica</i> 10^5 、 10^6 和 10^7 conidia/ml 之死亡率	36
圖 5、健康南黃薊馬與被感染後的南黃薊馬	37
圖 6、茶蠶幼蟲接種 <i>I. javanica</i> 之死亡率	38
圖 7、未被寄生的茶蠶與被 <i>I. javanica</i> 寄生死亡的茶蠶幼蟲	39
圖 8、 <i>I. javanica</i> 構造	40
圖 9、 <i>I. javanica</i> 在各溫度下菌落生長速度與產胞量	41
圖 10、 <i>I. javanica</i> 之乳劑劑型	42
圖 11、試驗一 A 桃蚜接種 <i>I. javanica</i> 不同天數致死率	43
圖 12、試驗一 A 桃蚜經施用 2 次 10^7 conidia/ml 菌液後 8 天之型態	44
圖 13、試驗一 B 桃蚜接種 <i>I. javanica</i> 不同天數致死率	45
圖 14、試驗二桃蚜接種 <i>I. javanica</i> 不同天數致死率	46

Chapter 1 前言

現代農業注重永續經營，兼顧農業生態多樣性，生產無毒安全蔬果，與以往期望農產品多產、賣相佳不盡相同。近年有機農業成長快速，自 2003 年的 1092 公頃，至 2013 年有機農產品的栽培面積已達 5920.3 公頃 (楊，2014)。為減低化學農藥的施用，運用本土獲得的天然微生物經大量培養再施放來防治病蟲害，即為一種對環境友善的管理農田策略。

設施因其封閉式、室內較為高溫多濕，但也因遮罩裝置而降低紫外線、風雨和其他生物的干擾，與田間相較，溫室生態、環境相對穩定，適於施用微生物製劑來防治害物。溫室害物主要有：蚜蟲、薊馬、粉蝨和葉蟎等。其個體小、生活史短，喜棲息於葉背、新芽、花苞間，藥液噴灑範圍不及故不易防治。害物除直接刺吸於植株上導致發育不良，葉片黃化萎凋、畸形，更可為病毒傳播媒介，於國際間造成數以萬計的經濟損失。

本研究室先前於自然界棲地採集各式蟲生真菌，經鑑定、純化後測試各菌寄主範圍及酵素活性。從中篩選出一株 *Isaria javanica* (PJ)，因而接續並擴大測定此株蟲生真菌的寄主範圍及害蟲致病率；此外，亦探討該菌株生理特性，包含溫度生長產胞、相對濕度生長發芽、最適培養基生長產胞、碳氮素源偏好和化學農藥耐受性。最後，以米作為大量培養的基質，試作成乳劑劑型，並在溫室接種測試生物防治能力。藉此評估此昆蟲寄生菌商品化的效益與潛能。



Chapter 2 前人研究

2.1 昆蟲寄生真菌介紹與發展

昆蟲寄生真菌為可寄生在昆蟲上，汲取昆蟲養分，以昆蟲為生之真菌。目前世界各地有 1000 種以上的真菌被鑑定可以感染昆蟲，大約有 10 種現正用來生物防治或正在開發中。比較常見的有白殭菌屬 (*Beauveria*)、黑殭菌屬 (*Metarhizium*)、輪枝菌屬 (*Lecanicillium*)、橙色真菌屬 (*Aschersonia*)、多毛菌屬 (*Hirsutella*) 和擬青黴菌屬 (*Isaria*) (Hajek & Leger, 1994; Kabaluk et al., 2005; Gul et al., 2014)。

昆蟲寄生真菌泛指可侵染昆蟲之寄生真菌，種類繁多，遍布於世界各地。以下依分類介紹常見物種。

2.1.1 微孢子蟲門 (Microsporidia)

此類原屬原生生物界，後被歸為真菌界，屬單細胞生物，行胞內寄生，寄主侷限於動物且大多數對寄主具有高專一性。在自然界中扮演著平衡昆蟲族群的角色。昆蟲經取食感染，亦可經母體傳染給後代。過去曾被嘗試用來防治子子、蝗蟲、紅火蟻和森林害蟲等，其中 *Paranosema locustae* 已有產品上市多年，用來防治蚱蜢 (Solter et al., 2012)。

2.1.2 游離孢子類真菌 (Zoosporic fungi)

具有鞭毛的真菌原先僅有壺菌門 Chytridiomycota，後來壺菌門再細分出芽枝黴門 Blastocladiomycota 和新美鞭菌門 Neocallimastigomycota (Hibbett et al., 2007)。其中蟲生真菌僅芽枝黴目 Blastocladiales 的幾個屬，*Coelomycidium* spp. 可寄生在甲蟲幼蟲、雙翅目的蛹和介殼蟲；*Catenaria* spp. 多寄生於線蟲，少部分可寄生在昆蟲；*Coelomomyces* spp. 則需要交替寄生於子子和蟻足科動物上 (Gleason et al., 2010)。

2.1.3 接合孢子類真菌 (Zygosporic fungi)

此類即以往的接合菌門，現被細分為 Glomeromycota 門，和四個亞門 (Hibbett et al., 2007)。昆蟲寄生菌主要在 Entomophthoromycotina 亞門內的 Entomophthoraceae 科，例如：*Strongwellsea* spp. 寄生於雙翅目昆蟲、*Massospora* spp. 則好發於蟬類 (Benny, 2009)。Anyclistaceae 科中亦有少數昆蟲記生菌集中於

Conidiobolus spp.。Neozygiteaceae 科中 *Neozygites* spp. 可寄生在繸翅目、半翅目昆蟲或蟎類身上。許多屬對寄主具有很高的專一性。

2.1.4 子囊菌門


Hypocreales 內具有全真菌目裡最豐富的蟲生真菌物種。於自然界中僅觀察到無性世代的不完全菌，現今已可使用分子比對出有性世代，而許多亦被歸於子囊菌中，這個目包含了許多以無性世代著名的生物防治菌及幾個被當成中藥材的物種。此目分成麥角菌科 (Clavicipitaceae)、蟲草科 (Cordycipitaceae) 和蛇型蟲草科 (Ophiocordycipitaceae)。麥角菌科中無性世代的座殼菌 *Aschersonia* spp. 可寄生於柑桔介殼蟲 (Wang et al., 2013)；黑殭菌屬中 *Metarhizium anisopliae* 可寄生於鞘翅目等昆蟲、綠殭菌屬 *Nomuraea rileyi* 則可防治鱗翅目昆蟲 (Ignoffo et al., 1976; Quintela & McCoy, 1997)。另外 *Pochonia* 和 *Rotiferophthora* 分別感染線蟲與輪蟲 (Zare et al., 2001)。蟲草科有 *Torrubiella* 屬可寄生在介殼蟲、蜘蛛上 (Johnson et al., 2009)；*Cordyceps* 屬內則有北方蟲草 (Fukatsu & Nikoh, 2003)；蟲草科的無性世代白殭菌 *Beauveria bassiana* 可防治多種害蟲 (Ugine et al., 2005; Castrillo et al., 2010)、擬青黴菌屬中 *Isaria fumosorosea* 及臘玢輪支菌屬中 *Lecanicillium lecanii*, *L. muscarium* 被用來防治溫室小型害蟲 (Goettel et al., 2008; Hamdi et al., 2011)。蛇型蟲草科 *Ophiocordyceps sinensis* 為著名的中華蟲草寄生於蝠蛾；蛇行蟲草科無性世代 *Hirsutella* spp. 有螞蟻、蟎類等寄主，而 *Hirsutella sinensis* 是中華蟲草的無性世代。

2.1.5 擔子菌門

擔子菌蟲生真菌較為稀少，只在 Septobasidiales 科內，*Septobasidium*, *Auriculoscypha*, *Uredinella*, *Coccidioidictyon* 和 *Ordonia* 這五個屬，均寄生於介殼蟲中。這些菌也被認為與介殼蟲行互利共生，吸取介殼蟲的養分後，於蟲體上長出巨大的子座(真菌層)藉此保護介殼蟲 (Humber, 2008; Vega et al., 2012)。

2.2 昆蟲寄生菌侵染寄主策略

蟲生真菌侵染的先決條件，主要係使其接種原接觸寄主。經由雨水夾帶、風力傳播或是罹病蟲體直接接觸，讓蟲生真菌附著於昆蟲寄主上。在高溼適宜的環境下，真菌孢子受到環境與寄主的誘引，開始發芽。



由於體壁上具有角質與外骨骼，真菌侵染昆蟲多經由口器、各節間或氣孔。菌絲搜尋適當侵入點後，即形成膨大之附著器，附著器末端連有侵入釘，侵入釘會分泌大量的角質分解酵素，集中而專一的入侵植物組織；同時經由膨壓壓力，菌絲得以穿透表皮層進入昆蟲體內寄生 (Hajek & Leger, 1994)。

真菌內已有一些小分子被證實為侵染昆蟲重要因子，可被歸類為：影響侵入分子、毒素、酵素用來降低寄主防禦能力；運輸分子用以保護真菌本體、感測周遭環境及傳遞訊息調控代謝途徑 (Pedrini et al., 2007)。

寄生真菌會分泌各種不同酵素，例：蛋白質分解酶、幾丁質分解酶、脂質分解酶來軟化昆蟲體表。其中蛋白質分解酶與酯酶經寄主誘導，會在 24 小時內分泌，而幾丁質酶、脂質分解酶則要經過 4-5 天才會產生 (St. Leger et al., 1986)。 *M. anisopliae* 分泌至少 14 種蛋白質分解酶於染病昆蟲體內 (St. Leger et al., 1987)。以 subtilisin (Pr1) 研究最為透徹。Pr1 為 *M. anisopliae* 之水溶性蛋白質酶基因。當 Pr1 基因被增強表現時，能水解更多角質蛋白，分解寄主的表皮並利用，與寄主致死率成正相關。而此基因被終止時，寄主死亡率也降低。取液態培養 *I. fumosorosea* 的上清液接種於小菜蛾上，會降低其取食和化蛹的能力，而此上清液經檢測內含有蛋白質水解酶 Pr1 和 Pr2、幾丁質酶與脂質酶 (Ali et al., 2010)。

研究發現，許多蟲生真菌外泌的二次代謝物為昆蟲毒素，可使昆蟲中毒而死。例如：*Metarhizium* spp. 會產生超過 28 種不同的毒素 destruxin。不同的 destruxin 對每種蟲類具有不同的致死性。而 *Beauveria* spp. 也會分泌毒素，例：oosporein, beauvericin, bassianolide。另外還有 *Tolypocladium* spp. 分泌 efrapeptins、*Hirsutella thomposnii* 分泌 hirsutellin。而 *Isaria fumosorosea* 也會分泌毒素，例：beauvericin, beauverolides, dipicolinic acid, 2,6-pyridindicarboxylic acid (Asaff et al., 2005)。

蟲生真菌經由體表入侵後，進入體腔中殖據，所分泌的酵素與毒素干擾並抑制寄主的免疫系統，經吸收寄主水溶性養分後，於體腔內繁殖芽孢 (blastospore)，破壞並吸收寄主養分。當寄主無力負荷臟器運作，能量耗盡死亡後，真菌即利用昆蟲殘體大量生長與繁殖。至感染末期，菌絲會由蟲體節間穿出，產生分生孢子 (aerial conidia)，經由外界之風、雨水傳播，或其他寄主動物的接觸，行下一次感染 (Meyling & Eilenberg, 2007)。



2.3 昆蟲的防禦模式

昆蟲表皮細分為三層：上表皮、表皮、真皮，每層都有不同的化學防禦方式。昆蟲上表皮最外層是層蠟質膜，此層不透水，可阻擋蟲體內水分散失、使體表不易積水，並可抵擋真菌等外物的物理侵害。蠟質層下方為角質層，內含有脂肪酸鏈，包埋許多脂蛋白等訊號蛋白，訊號蛋白偵測到入侵者後，會誘導體內產生抗菌物質來抑制菌絲生長。表皮再被細分為外表皮與內表皮。其中外表皮具有豐富的脂蛋白，可以防止醌 (quinone) 傷害；而真皮上層具有豐富的溶酶細胞。

昆蟲內部防禦與哺乳類動物相似，具有免疫系統，分為體液防禦與細胞防禦。體液中含有抗菌蛋白質，例：溶酶、抗菌肽。因應蟲生真菌侵染過程中會分泌酵素與毒素，昆蟲體液中亦含有蛋白酶抑制物與解毒蛋白質。

在血細胞循環系統內，含有顆粒球 (granular cells) 和漿細胞 (plasmatocytes)，會行胞噬作用或包膜作用 (encapsulation) 將入侵細胞隔離。視入侵細胞抵抗能力，包膜的細胞會形成多層、多皺褶，並生成大量黑色素來阻絕入侵者代謝進而造成死亡 (Vilcinskis & Götz, 1999)。

遭受感染的昆蟲，體內防禦反應之一是使蟲體內溫度增高，溫度過高不利於蟲生真菌的生長。蝗蟲為抵禦 *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* 的侵染，會讓體內溫度快速升高，讓體內的芽孢孢子無法增殖，藉此拉長存活時間與降低死亡率 (Ouedraogo et al., 2003)。

2.4 環境對昆蟲寄生菌影響

2.4.1 溫度

真菌在遇高溫逆境時，細胞內會迅速產生耐熱逆境的物質，如：液態脂肪、經熱休克後迅速合成的代謝蛋白質及抗熱結構組織 (John & Naresh, 1999)。在許多生物中，細胞內含有較高的 polyol 和 trehalose 的含量，其耐熱、耐乾等耐逆境的能力較高 (Fernandez et al., 2010; Hallsworth & Magan, 1996; Benoit, 2011)。要獲得耐高溫的菌株，除於炎熱環境中篩選外，另於培養基中添加水楊酸或脂肪酸可以生成耐高溫的分生孢子 (Rangel et al., 2012; Kim et al., 2010)。

2.4.2 濕度

真菌需要水分才能發芽和延伸菌絲。許多研究發現蟲生真菌需要在較高的濕

度下方能發芽，大都介於相對濕度 97-99% 間。如：*Beauveria bassiana* 和 *Isaria fumosoroseus*。因此在低濕度的條件下，昆蟲寄生菌可能無法感染寄主；或感染後利用寄主營養的能力不彰，導致菌絲殖據速度較腐生菌緩慢，不利於繁殖與再次傳播 (Borisade & Magan, 2014)。

2.4.3 紫外線

紫外線存在於大自然中，是一種肉眼看不到的光線。可大致依波長不同被分成 UV-A、UV-B 與 UV-C。其波長分別為 320-400 nm、280-320 nm 與 100-280 nm。紫外線中約有 95% 為 UV-A。一般含有黑色素或顏色較深的真菌比較耐紫外線的照射。為防止紫外線破壞孢子活性，Tseng et al. (2014) 運用基因轉殖方式，將黑色素基因殖入黑殭菌細胞內；Shang et al. (2012) 將酪胺酸蛋白酶轉殖入白殭菌體內，增加致病力與抗紫外線照射的能力。將 *I. fumosorosea* 與黑殭菌的分生孢子添加防曬乳或製備成油劑後，與水懸劑對照組相較，照射超過 12 小時的 UV-B，發芽率不受影響 (Loong et al., 2013)。

2.5 *Isaria javanica*

Isaria javanica 舊名為 *Paecilomyces javanicus*。擬青黴菌屬 (*Paecilomyces*) 是一種絲狀真菌，早期被分為兩類，一類存於土壤、腐植質、食品中，另一類為昆蟲病原菌，皆可成為人體伺機感染菌或是食品污染菌 (Schinabeck & Ghannoum, 2003)。於 1907 年隸屬於散囊菌目 (Eurotiales)，初期物種數不多，被認為是單系群。1957 年 Brown 和 Smith 將原 *Isaria* 屬及 *Spicaria* 屬內，嗜中溫並與昆蟲有關的菌歸於 *Paecilomyces* 屬中。Samon 於 1974 年將 *Paecilomyces* 中特徵為嗜高溫，具散囊型態分生孢子定為 *Paecilomyces* 群 (sect. *Paecilomyces*)，而將原位於 *Isaria*, *Spicaria* 屬中的菌定為 *Paecilomyces Isariaoidea* 群 (sect. *Isariaoidea*)。2004 年 Luangsa-ard 等人運用 18S rDNA 確定 *Isariaoidea* 群與 *Paecilomyces* 群親緣關係遠，其中 *Paecilomyces* 群較接近青黴菌屬，也證明 *Paecilomyces* 屬不為單系群，不應將兩群歸為同一屬。包含 *Paecilomyces* 屬的模式物種之有性世代經 rDNA 鑑定為 *Byssosclamyces*，而 *Isaria* 屬的有性世代則為 *Cordyceps*，作者並認為 *Isariaoidea* 群中物種依然不是單系群 (Luangsa-ard et al., 2004)。

Isaria javanica 最早於 1957 年由 Friedrichs 與 Bally 記載於英國 British Mycological Society 期刊 (Brown & Smith, 1957)，有性世代經 18S rDNA 比對屬子

囊菌門 (Ascomycota) 肉座菌目 (Hypocreales) 蟲草菌科 (Cordycipitaceae) 中的 *Cordyceps* sp.。傳統鑑定上，以其菌落顏色和生理型態諸如：分生孢子梗、分生孢子形態來辨別種。

它是一種寄主廣泛的蟲生真菌 (entomopathogenic fungi)，於自然界中主要於鱗翅目幼蟲上發現，亦可寄生於雙翅目、半翅目、等翅目等昆蟲上。被寄生初期，寄主包覆白色或灰白色菌絲，並於分生孢子梗上產生眾多白色粉狀分生孢子，經風吹或碰觸即飛散四周 (Tzean et al., 1997)。於 1990 年初次在台灣被用來防治銀合歡木蝨 (劉等, 1990)。依據前人研究，*I. javanica* 可寄生在蚜蟲、粉蝨、薊馬、葉蟎、小菜蛾上。分子鑑定上 rDNA ITS4, ITS5 與 *I. javanica* 有極高相似度之 *Isaria fumosorosea*，其中菌株 Apopka 97 已被商品化為 Preferal™ 販售於歐美國家，可施用於風景區、苗圃或是溫室當中防治小型害蟲 (SePRO, 2012)。

2.6 生物防治模式

生物防治分為古典生物防治 (classical biological control)、接種式防治 (inoculative control) 與淹沒式防治 (inundative control)，古典生物防治主要防治外來入侵種，特指引進入侵種當地天敵來進行防治。此需經過縝密的試驗，確認外來天敵不會對本土物種與環境造成威脅，經由小規模樣區定期施放，再漸次擴展、放大，並隨時監測田間害物與天敵的數量，評估成效，於自然界天敵數不足時人工補充，例如：引進南美洲銹病菌至台灣或北美防治小花蔓澤蘭 (曾, 2009; Ellison et al., 2004)。接種式防治是將天敵施放至目標樣區中，期望天敵可於當地繁衍，使害物密度、被害物種與天敵數量趨於動態平衡，降低生態失衡所造成的衝擊，適用於開放式的自然生態，通常是季節性的施放天敵。淹沒式防治是將本土天敵大量施用於目標田中，以達到快速降低害物密度的效果 (Hajek et al., 2007)。

農民施用生物製劑僅為達到環境友善、產品無毒，為快速降低損失並與化學農藥競爭市場，田間商品化生物製劑應以第三種防治模式來設計。

2.7 真菌微生物製劑劑型

一般農藥含有三大成分：農藥粉末原體、惰性載體、界面活性劑。界面活性劑讓農藥粉末能均勻分散至溶液中。依據配方的缺點選擇性加入抗沉劑、抗凍劑、消泡劑、分散劑、抗結塊劑等協力劑來改良藥劑品質，增進微生物製劑能力 (Behle

& BIRTHISEL, 2014)。

微生物製劑較易因溫度、濕度、紫外線等環境因素而導致儲存時活性下降和施用時成效不彰。這時可添加防曬劑、抗乾燥劑、營養物等或改善外在儲藏空間、田間微氣候來降低製劑於環境中失效的機率。

農藥依據外觀可分為乾式(固態)和濕式(液態)劑型兩種。考量微生物製劑原體的差異，有效遞送至害物目標及包裝、運送、製造成本等，而發展出各式各樣劑型。

2.7.1 溼式(液態)劑型：

油分散劑 (oil dispersion, OD)：一種或一種以上固體穩定懸浮於油性溶劑中，使用前需加水稀釋攪拌。因油劑可防止孢子內水分散失，油性態下又較容易附著於昆蟲體壁上，下雨時，又不怕雨水沖刷，且具有部分反射紫外線的效果。但孢子懸浮於溶液上方，噴灑時需要不斷的攪拌，才能均勻散佈於溶液中。可製作成超低容量製劑 (ultra-low volume (ULV) application)，降低藥劑用量。

水基乳劑 (emulsion, oil in water (O/W), EW)：添加界面活性劑的油滴與有效成分混合，再施用前以水劑稀釋，使包被真菌孢子之油滴分散於水中。分散效果較油分散劑佳，且也兼具油劑不被雨水沖刷、容易附著於葉表昆蟲體表的優點，目前廣泛被製為真菌微生物製劑。

多重乳劑 (double emulsion)：將有效成分包被於水相中，外再覆一層油滴，使用時添加水劑稀釋，則可見內含原體的小水滴包被在大油滴中，大油滴又與外界的水劑成乳化狀態。此劑型具乳劑優點，且更不易乳水分離。惟製作時有難度。

微膠囊 (capsule suspension, CS) 技術：雖然微膠囊的技術在實驗室中已探討多年，但將其商業化呈產品仍相當有限。主因是製作過程較昂貴且防治成效較緩慢。但好處是能延長微生物製劑於田野中的存活時間，抵禦環境逆境，待適當環境時再釋出自大自然當中。微生物製劑因屬於活體，多使用不具毒性的成膠性蛋白質或多醣類等天然聚合物來包被。包被完成後亦須依靠界面活性劑與增黏劑來維持穩定性 (Vemmer & Patel, 2013)。

2.7.2 乾式(固態)劑型：

乾式劑型溶液內含有固體顆粒，為免噴灑時機具堵塞，顆粒直徑經溶解後須小於 1-3 μm 。

水懸劑 (suspension concentrates, SC)：原體經水等溶液混合，即一般的懸浮菌液，使用時須注意有效物質是否均勻。

可濕性粉劑或粒劑 (wettable powder, WP)：將真菌原體(孢子或菌絲片段)風乾後，加入惰性載體及介面活性劑加以製成。惰性載體可為高嶺土、紅土、矽藻土、滑石粉等不會與介面活性劑、環境或孢子發生不良反應之物質。有些在製作過程中會添加養分保持真菌活性 (Skinner et al., 2012)。因其方便農民施用、儲存，製造成本低廉，目前為微生物製劑主要的劑型。

水分散性粒劑 (water dispersible granules, WG)：因水分散性粒劑包裝上較為方便，搬運過程中不會揚起粉末，對人體健康較佳；且粒劑投入水中後可在 2 分鐘內溶於水中開始施用，因此逐漸成為水懸粉劑和可濕性粉劑的替代品。它溶解後的顆粒更為細小，更均勻，但相對成本較高。Hsia et al. (2014)將 *M. anisopliae* 中添加不同鈉鹽為輔劑並製作成此劑型，其中 sodium lingosulfonate, sodium acetate 經高溫 45°C 暴露 30 分鐘後仍有高發芽率。

2.8 大量培養

大量培養蟲生真菌的目標為：在低廉的成本下，生產出數量高、致病力高、穩定性高的良好接種源。絲狀真菌喜歡生長在營養高的基質上，多數農業廢棄物、殘餘物、穀物、蔬菜、種子皆可生長 (Sahayaraj & Namasivayam, 2008)。依基質狀態，可分成固態培養與液態培養。固態培養於基質表面生成氣生分生孢子；相較於液態培養多於液體中生成芽生孢子 (blastospore) 和菌絲球。氣生分生孢子壁較厚、耐環境逆境，且儲藏的穩定性高，較不易喪失活性 (Arzumanov et al., 2005)。因此，目前微生物製劑商品化中的真菌原體仍以氣生分生孢子為大宗。現今培養技術多為雙相培養生產系統 (diphasic production system)，即以液態培養基生產接種源，再接種至大量的固態基質上培養分生孢子，此方法具有接種操作簡便、降低雜菌汙染及接種孢子源齡期相近的優點 (Machado et al., 2010)。

在基質上大量培養時，除基質營養成分選擇外，尚要顧及基質含水量、水活性、產胞空間密度和熱梯度。Arzumanov et al. (2005) 以 500 g 的米作為培養基質，分別測量通氣與含水量對 *M. anisopliae* var. *acridum* 生長產胞的影響，發現產胞時氧氣需求量低，通氣與否對產胞量沒有太大影響；而基質含水量在 57-58% 間，經培養可獲得最多的分生孢子，低於或高於此含水量都會阻礙分生孢子生成。Ye et al.

(2006) 針對開發中國家大量生產蟲生真菌，設計了一種廉價、簡易的箱型裝置，在有限的空間中、以層疊托盤的方式增加真菌生長表面積，並通入無菌空氣保持相對濕度，此裝置與一般太空包之固態培養相較，可運用少量基質生成高單位量、無雜菌汙染的分生孢子。

使用不同基質大量培養所產生的孢子除數量差異外，有些具有抗逆境的能力，有些則較耐儲藏。Kim et al. (2010) 將玉米混合 1% 玉米油作為基質來培養 *I. fumosoroseus*，待產胞後連同基質置於 50°C 中 2 小時，分生孢子仍有 91.2% 的發芽率。比較以米、大麥或高粱培養後之 *M. anisopliae*，經儲藏於 4°C 半年後，大麥與高粱分別具有 79%、76% 存活率，米的僅存 28% (Bhanu Prakash et al., 2008)。

2.9 真菌殺蟲製劑商品現況與展望

影響生物性農藥市場的三大因素分別為：有機農業規模、綜合性蟲害管理應用範圍、劇毒化學農藥禁用與農藥殘留量降低的政策 (許，2007)。2002 年至 2011 年間，全球有機生產面積以 7.3% 複合成長率成長。在 2009 年，全球農藥產值約 379 億美元，而生物農藥僅占其中的 3.5%。但近年來，發掘新的農藥化學結構式日益困難；為求食品安全、人畜健康，化學農藥登記的法規漸趨嚴苛，導致開發新型化學藥劑的成本上升。而長期施用的化學農藥又逐漸發生抗藥性。相對的，生物性農藥為多重作用機制，作用對象相對單一，對自然環境友善。在美國，經研發至上市約 3 年，而新型化學農藥約需 10 年；在研發經費上，開發新型生物性農藥的花費也較低。於是許多農藥公司、生技公司轉型研發微生物農藥 (Glare et al., 2012)。

本土生物農藥，因檢測項目繁多導致登記困難，除蘇力菌外目前無合法登記販售的殺蟲產品。行政院農委會農業藥物毒物試驗所於 2008 年將白殭菌 A1 菌株技術轉移至沅漢生技公司；於 2009 年將黑殭菌 F061 菌株技術轉移至聯發生技公司，兩者皆登記生物農藥補件中。聯發生技公司於市面上另有黑殭菌以固態微生物肥料產品販售 (陳，2005)。

一生物製劑能否有效推廣，取決於最初對目標害物的影響潛力、害物市場規模、施用於多樣性農園型態、成本合理而防治效益高，依據消費者施用後的回饋來調整與修正製劑配方。而在製劑製作過程中，則面臨大量的技術挑戰。例如：真菌孢子大量發酵培養、劑型施用與改良活性、如何準確觸及害物並迅速發病死

亡。微生物農藥為活性物質，需要依據微生物特性、標的害物，量身訂做劑型與施用方式 (許，2007)。

真菌殺蟲藥劑可經由蟲體表進行入侵，害蟲經昆蟲寄生菌殖據而死亡，待真菌吸收蟲體養分後，於適宜環境中，可再產生接種原，散佈於環境中行再次感染，可再接續抑制害蟲族群。而佔市面上微生物殺蟲劑市場 97% 蘇力菌是經由蟲體取食攝入中腸後，釋放毒蛋白子毒素而死，兩者的殺蟲模式相輔相成。目前本土販售的蘇力菌，只防治鱗翅目咀嚼式口器幼蟲。而其餘的害蟲，尤其是盛行於溫室中刺吸式口器的害蟲，尚有商業發展市場需求。

Chapter 3 實驗材料與方法



3.1 菌種培養、保存與分生孢子萃取

本實驗中使用的 *Isaria javanica* 來源有兩種：

- (1) 原先於野外採集之鱗翅目蟲體上培養於 PDA 斜面試管，再繼代於培養基後，經 14 天暗室培養於 25°C 中，將其保存於 4°C 中備用。
- (2) 經接種實驗後，於被感染之蟲體重新分離純化而得。

3.2 作物害蟲接種測試

3.2.1 寄主範圍測試

於田間採集少許紋白蝶、介殼蟲、螞蟻和葉蟬，將各蟲浸置於 *I. javanica* 1×10^7 conidia ml⁻¹ 懸浮液中再迅速撈起，給予新鮮食物，經 3 天後觀察是否被寄生。接種源製備：刮取整片培養基的菌落置於離心管中，添加 10 ml 0.01% Tween 80 經震盪後以濾膜過濾孢子，濾液中之孢子以血球計數器計數，並調整至適當濃度後備用。實驗中施用之 *Isaria javanica* 繼代皆不超過四代。

3.2.2 蚜蟲

若蟲與飼料製備：由本校昆蟲系張俊哲教授實驗室給予桃蚜蟲源，其原飼養於 20°C, 50% RH, L:D=12:12 之新鮮小白菜上。芥藍種子購於農友公司，將其灑播於 2.5 吋穴盆，泥炭培養土(Bas van Buuren B.V.)，於 25°C, L:D 12:12，每 7 天施用花寶 2 號 1000 倍稀釋液，待生長出 2 片本葉後即可飼養桃蚜。

將數隻桃蚜成蟲飼養於新鮮芥藍葉上，等待成蟲產下若蟲，1 天後將成蟲移除，可得齊一齡期之一齡若蟲，再將之飼養 3 天得 2 齡若蟲備用。

接種測定：以毛筆快速挑取 10 隻 2 齡若蟲置於接種裝置中(附錄 2)，以噴筆噴灑 500 μL 菌液或 0.01% Tween 80，靜待 1 分鐘使菌液沉降後，將若蟲挑至插有保水管之新鮮芥蘭葉片上，置於直徑 15 cm 培養皿中，25°C 暗室培養，每 2 天記錄若蟲致死率，並將死亡若蟲另置於濕室培養，2 天後長出該菌菌絲以確認感染。菌液濃度分別為含有 0.01% Tween 80 之 10^5 、 10^6 、 10^7 conidia ml⁻¹，對照組僅含 0.01% Tween 80。每處理至少 8 重複。此實驗獨立施做兩次。

致死率計算方式：

- (1) 各處理組：將桃蚜死亡後長出 *I. javanica* 之蟲數 / 所有蟲口數。



(2) 對照組：死亡桃蚜/所有蟲口數。

3.2.3 南黃薊馬

幼蟲與飼料製備：由本校蔡志偉教授實驗室給予南黃薊馬蟲源，原飼養於 28 °C, 70% RH, L:D=12:12 之新鮮花豆上。花豆種子購於傳統市場，播種前浸置於 0.1% 次氯酸鈉消毒後，以一次水潤洗 2 次，播於 2.5 吋穴盆，泥炭培養土中，於 25°C，L:D 12:12，5-10 天長出兩片子葉後即可飼養南黃薊馬。

將數隻南黃薊馬成蟲飼養於新鮮花豆上待其產卵，4 天後將成蟲移除，得齊一齡期之幼蟲，再將之飼養 4 天得 2、3 齡幼蟲備用。

接種測定：以毛筆快速挑取 20 隻 2,3 齡幼蟲置於接種裝置中，以噴筆噴灑 500 μL 菌液或 0.01% Tween 80，靜待 1 分鐘使菌液沉降後，將幼蟲挑至插有保水管之新鮮花豆葉上，置於直徑 15 cm 培養皿中，25°C 暗室培養，每 2 天記錄若蟲致死率，並將死亡蟲體另置於濕室培養，2 天後長出該菌菌絲以確定感染。菌液濃度分別為含有 0.01% Tween 80 之 10^5 、 10^6 、 10^7 conidia ml^{-1} ，對照組僅含 0.01% Tween 80。每處理至少 5 重複。此實驗獨立施做兩次。致死率計算方式與桃蚜相同。

3.2.4 茶蠶

蟲體與飼料製備：由楊梅茶葉改良場曾信光副研究員提供茶蠶，飼養於 23°C，L:D 12:12，RH 70% 培養箱中，每日由田間採集的新鮮茶葉供予餵食。

接種測定：取二齡幼蟲作為接種對象，每處理 10 隻蟲。將含有 0.1% Tween 80 的 10^7 conidia ml^{-1} 與 30% 葵花油震盪混合，取 2 μl 塗佈於幼蟲背部，飼養於 23°C, L:D=12:12, 70% RH 培養箱中，每日餵食由田間採集的新鮮茶葉，每 2 天記錄致死率。對照組成分為 0.1% Tween 80 和 30% 葵花油。每處理 3 重複。致死率計算方式與桃蚜相同。

3.3 生理生態測定

3.3.1 菌落、顯微型態觀察

經由採集之蟲體分離純化後，培養於水瓊脂培養基 (2% agar powder in ddH₂O) 或 1/4 濃度馬鈴薯糖瓊脂培養基 (1/4 Potato Dextrose Agar, 1/4 PDA, 配法：9.425 g PDA powder, 11.25 g agar powder, 1L ddH₂O) 3 天，挑取產胞部分的菌絲製作成玻片，置於光學顯微鏡上觀察，並測量 30 個分生孢子之長寬平均。



3.3.2 溫度對生長、產胞能力影響

刮取生長於 1/4 PDA 之 *I. javanica* 菌絲置於 0.01% Tween 80 中過濾，經血球計數器調整為 1×10^5 conidia ml^{-1} ，取 5 μl 滴於 1/4 PDA 中央。將培養基分別放置於 15°C、20°C、25°C、28°C、30°C，每處理至少三重複。每 7 天測量菌落生長直徑，於第 18 天刮下整個培養皿，添加 10 ml 0.01% Tween 80，經震盪後過濾，以血球計數器計算分生孢子量。

3.3.3 不同水活性下菌落生長產胞、孢子發芽影響

添加不同摩耳數(M)的 polyethylene glycol 200 (PEG 200)於沙氏葡萄糖培養基 (Sabouraud dextrose agar, SDA, Sigma, USA)中，可以調整水活性(water activity, a_w)。而水分活性與相對溼度關係為 $\text{RH}\% = a_w \times 100$ 。

分別添加 0、0.4、0.6、1.0、1.2 M PEG 200 於 SDA 培養基中，將水活性分別調整成 0.998、0.987、0.975、0.964、0.959；即配置出相對溼度(RH)為 99.8%、98.7%、97.5%、96.4%、95.9%之培養基，滴 5 μl 1×10^5 conidia ml^{-1} 於培養基中央，每處理五重複，每 8 天測量菌落生長直徑，於第 16 天刮取整個培養皿的菌絲，添加 10 ml 0.01% Tween 80，經震盪後過濾，以血球計數器計算分生孢子量。

取 100 μl 1×10^5 conidia ml^{-1} 塗佈於各個不同相對溼度培養基中，經過 48 小時後鏡檢計算孢子發芽率，每處理三重複。

3.3.4 不同培養基對菌落生長、產胞影響

依據附錄 1 配方製作 1/4 PDA、PDA、1/4 SDA、SDA、1/4 OMA、OMA、1/4 YPD、YPD、1/4 MEA、MEA、CMA、CYA、WA、SSM 培養基 (Keller & Turner, 2012)，於高溫高壓滅菌釜 121°C，30 分鐘滅菌後冷卻，倒入直徑 9 cm 培養基備用。滴定 5 μL 於培養基，每處理至少四重複。每 7 天測定菌落生長直徑，於第 18 天刮取整個培養皿，添加 10 ml 0.01% Tween 80，經震盪後過濾，以血球計數器計算分生孢子量。

3.3.5 不同碳素源對菌落生長、產胞影響

以察式培養基 (Czapeck dox agar, CZA)作為基礎培養基，其配方如下：
NaNO₃ 3 g, sucrose 30 g, K₂HPO₄·H₂O 1.3 g, Czapek concentrate 10 mL, agar 15 g, 1L ddH₂O
Czapek concentrate: KCl (5 g/100 mL), MgSO₄·7H₂O (5 g/100 mL), FeSO₄·5H₂O (0.1

g/100 mL), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.1 g/100 mL), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.05 g/100 mL) in 100 mL ddH₂O.

置換 Sucrose 為其他碳素源製備培養基，測定的碳源有：fructose、glucose、glycerol、lactose、maltose、mannose、soluble starch、sorbital、xylose

滴定 *I. javanica* 10^5 conidia ml^{-1} $5 \mu\text{m}$ 於培養基中央，每 7、14 天觀察菌落生長。

分生孢子萃取方法如下：切下整盤菌落置於 10 ml 0.1% Tween 80 中，於超音波震盪機震盪 5 分鐘後，以濾布過濾。濾液以 4000 rpm 離心 5 分鐘，倒掉上清液。再加入 4 ml 0.1% Tween 80 溶解後，此視為原液。將原液稀釋，以血球計數器計算分生孢子量。

3.3.6 不同氮素源對菌落生長、產胞影響

將上述察式培養基之 sodium nitrate 置換為其他氮素源，測定的氮源有：bacto peptone、cicada slough、corn steep powder、gelatin、histidine、potassium nitrate、ammonium biphosphate、tryptone、yearst。

取 *I. javanica* 10^5 conidia ml^{-1} $5 \mu\text{m}$ 滴於培養基中央，每 7、14 天觀察菌落生長。於第 14 天洗下分生孢子測定產胞量，測定方法同碳素源實驗。

3.3.7 農藥對菌落生長、孢子發芽的影響

配置 PDA 培養基，於培養基冷卻將凝固時添加農藥溶液，添加量為施用時最高推薦倍率，經搖晃均勻後倒至 9 cm 培養皿冷卻備用。取 *I. javanica* 10^5 conidia ml^{-1} $5 \mu\text{m}$ 滴於培養基中央，第 12 天觀察菌落生長。

取 $100 \mu\text{l}$ 1×10^5 conidia ml^{-1} 塗佈於各個不同相對濕度培養基中，經過 24 和 36 小時後鏡檢計算孢子發芽率，每處理三重複。

殺蟲劑：阿巴汀 2% 乳劑 1000 ppm、亞滅培 20% 水溶性粉劑 500 ppm、賜諾殺 25% 溶液 1333 ppm、陶斯松 50% 可濕性粉劑 1000 ppm、百利普芬 11% 乳劑 1000 ppm、馬拉松 50% 乳劑 2000 ppm。

殺蟎劑：依殺蟎 10% WS(高濃度可濕性粉劑施用於種子) 286 ppm、畢達本 20% 可濕性粉劑 500 ppm、合賽芬普寧 11% 乳劑 500 ppm。

殺真菌劑：免賴得 50% 可濕性粉劑 1000 ppm、撲克拉 25% 乳劑 500 ppm、三泰芬 25% 可濕性粉劑 1000 ppm、普拔克 66.5% 溶液 2500 ppm、腐絕快得寧 53% 可濕性粉劑 833 ppm、大克爛 50% 可濕性粉劑 1000 ppm、亞托敏 23% 水懸劑 1000 ppm。

抗生素殺菌劑：嘉賜黴素 2% 可濕性粉劑 1000 ppm、維利黴素 10% 溶液 1000 ppm。

3.4 米類大量培養分生孢子測試

本次試驗基質有：白米、發芽糙米、米糠、稻穀。取 150 g 白米、發芽糙米、米糠、稻穀，加入 90 ml 蒸餾水於大同電鍋蒸 20 分鐘後，秤重平分為三等分，代表三重複，置入 125 ml 錐形瓶中，瓶口塞上矽膠塞。經 121°C, 30 分鐘滅菌，冷卻後，添加 10 ml 10^5 conidia ml⁻¹ 菌液，每 5 天充分搖晃一次，使其均勻在基質上生長。待 15 天後以滅過菌的藥杓絞碎基質後，加入 100 ml 0.1% Tween 80 放入超音波震盪 5 分鐘，將菌液過濾後，置於 50 ml 離心管中，以轉速 4000 rpm 離心 5 分鐘，倒掉上清液後，以 4 ml 回溶，測量基質中含有的分生孢子量。

3.5 外加氮源於米類培養分生孢子測試

以 50 g 白米為基質，於 125 ml 錐形瓶中分別添加 1 g, 2 g, 4 g 蟬蛻或 5 g 大豆粕與白米混合均勻後，再加入 30 ml 一次水，每處理三重複。至高壓滅菌釜 121°C, 30 分鐘滅菌冷卻後，添加 10 ml 10^5 conidia ml⁻¹ 菌液，每 5 天充分搖晃一次，使其均勻在基質上生長。待 10 天後以滅過菌的藥杓絞碎基質後，加入 100 ml 0.1% Tween 80 放入超音波震盪 5 分鐘，將菌液過濾後，置於 50 ml 離心管中，以轉速 4000 rpm 離心 5 分鐘，倒掉上清液後，以 4 ml 回溶，測量基質中含有的分生孢子量。

3.6 O/W 乳劑製作方式

將 10% 葵花油、2% 大豆卵磷脂、0.1% Tween 80 以震盪機混合 10 秒後，置入最高頻率為 35 Hz 超音波震盪機震盪 5-10 分鐘，使三者完全乳化呈均勻乳液。再加入 0.1% Tween 80 內含 *I. javanica* 10^8 conidia ml⁻¹ 分生孢子懸浮液。置於均質機以 1200 rpm, 90 秒混合完成。施用前以 0.1% Tween 80 溶液稀釋 10 倍。

3.7 溫室試驗

本試驗處理如下：

- (1) 10^7 conidia ml⁻¹ *I. javanica* 水懸浮液
- (2) 10^7 conidia ml⁻¹ *I. javanica* 乳劑
- (3) 未含有分生孢子懸浮液之乳劑
- (4) 0.1% Tween 80

試驗一：放置 30 隻二、三齡桃蚜若蟲於生長 21 天芥藍菜上，施用上述不同劑型之接種源，每處理 5 重複。試驗一 A 於溫度為 24-26°C，平均溫 25°C，95-100% RH。試驗一 B 於溫度為 27-34°C，60-85% RH。兩溫室光照週期 L:D=12:12，經 4 日觀察後再次接種。

試驗二：於生長 7 天芥藍植株上施用處理藥劑一次後，放置 30 隻二、三齡桃蚜若蟲於芥藍植株上，經四天再施用處理藥劑一次，每 4 天記錄死亡率。溫度為 24-26°C，平均溫 25°C，95- 100% RH，光照週期 L:D=12:12。

3.8 統計分析

運用統計分析軟體 Sigmaplot 12.5v 進行實驗數據分析，以 Holm-Sidak method 做各數據間之比較。



Chapter 4 結果

4.1 作物害蟲接種測試

4.1.1 寄主範圍測試

本實驗發現紋白蝶、介殼蟲、螞蟻、葉蟬皆可被 *I. javanica* 感染殖據 (圖 1)。

4.1.2 桃蚜

隨施用分生孢子濃度愈高，桃蚜的致死率愈高。 10^7 與未施藥對照組、 10^5 有顯著差異。 10^7 conidia/ml 於桃蚜若蟲 6 天後具有 $88.13 \pm 9.19\%$ 死亡率， LT_{50} 為 4 天(圖 2)。桃蚜未經感染及感染 *I. javanica* 後死亡經 3 天殖據如圖 3 所示。

4.1.3 南黃薊馬

施用 10^7 conidia ml^{-1} 具有良好的殺蟲效果，南黃薊馬幼蟲經施用 10^7 conidia ml^{-1} 5 天後死亡率為 $85 \pm 8.16\%$ ， LT_{50} 為 3-4 天。施用濃度低於 10^7 conidia ml^{-1} 則無顯著差異(圖 4)。南黃薊馬未經感染及感染 *I. javanica* 後死亡經 3 天殖據如圖 5 所示。

4.1.4 茶蠶

施用添加油劑之 10^8 conidia ml^{-1} 於二齡茶蠶上具有殺蟲效果，於 8 天後死亡率為 79%(圖 6)。茶蠶幼蟲未經感染及感染 *I. javanica* 後死亡經 3 天殖據如圖 7 所示。

4.2 生理生態測定

4.2.1 *I. javanica* 產胞枝與分生孢子型態特徵

I. javanica 產胞枝成環生瓶梗狀，每一節具有 2-4 個瓶梗，瓶梗頂端著生長橢圓形分生孢子，分生孢子串生成長鏈狀。分生孢子長為 $4.16 \pm 0.85 \mu m$ ，寬為 $1.76 \pm 0.31 \mu m$ (圖 8)。

4.2.2 溫度對生長、產胞能力影響

I. javanica 於 1-21 天中菌落生長大略呈直線上升， $25-28^\circ C$ 為最適合生長溫度。高於 $30^\circ C$ 、低於 $20^\circ C$ 則生長率降低，於 $15^\circ C$ 、 $35^\circ C$ 則不生長。產胞量則以培養於 $28^\circ C$ 時最多，一盤具有 9.6×10^9 conidia。圖 9 顯示 *I. javanica* 在各溫度下菌落生長速度與產胞量。



4.2.3 不同水活性下菌落生長、產胞影響

I. javanica 在相對溼度 95.9% 以上可以生長產胞。隨相對溼度遞減，菌落生長速率愈慢。產胞量上，相對濕度 96.5% 以下明顯降低產胞能力。*I. javanica* 於相對溼度 95.5% 之培養基上時，菌落生長與發芽非常緩慢(表 一)。

4.2.4 不同培養基對菌落生長、產胞影響

各培養基之菌落大致呈圓形生長。14 天後，菌落生長速率最高為 CYA 培養基，平均直徑為 6.3 cm、最低則為 SSM 培養基，直徑為 3.58 cm。各培養基於 14 天後皆有產胞，以培養基 CYA 的產胞量最多，一盤為 3.29×10^9 conidia；WA 培養基一皿的產胞量最少，一盤為 3.38×10^6 conidia。而 1/4 OMA 培養基雖菌落生長較慢，14 天後直徑為 3.63 cm，但產胞量卻為其中第 2 高，一盤為 1.99×10^9 conidia(表 二)。

4.2.5 不同碳素源對菌落生長、產胞影響

除 xylose、lactose 外，各碳源皆為良好的碳源，有效提供 *I. javanica* 生長、產胞。xylose 與 lactose 會降低生長速率。培養於含碳源 lactose 之 *I. javanica* 之菌落稀疏而不產胞(表 三)。

4.2.6 不同氮素源對菌落生長、產胞影響

不同之氮源對 *I. javanica* 都有良好的生長效果。14 天後以硝酸鉀(potassium nitrate)為氮源之菌落生長最快。以明膠(gelatin)為氮源之菌落，在短期內生長較快。但在 14 天後，其生長與產胞能力與其它處理相較並無顯著差異(錯誤! 找不到參照來源。)

4.2.7 農藥對孢子發芽、菌落生長的影響

實驗中所有殺真菌劑均有抑制 *I. javanica* 分生孢子發芽、菌落生長與產胞的能力，抗生素類的農藥維利黴素、嘉賜黴素與部分殺蟲殺蟎劑亞滅培、阿巴汀、百利普芬及合賽芬普寧對 *I. javanica* 分生孢子發芽、真菌生長與產胞影響細微。殺蟲殺蟎劑中，依殺蟎、益化利、馬拉松有較強抑制分生孢子發芽能力(表 五)

4.3 穀類大量培養外加氮源分生孢子產量比較

各基質皆會產胞。以白米、發芽玄米培養的效果最好，1 g 分別產生 2.94×10^{10} 與 7.63×10^9 conidia。而純米糠易吸水，真菌接種後，透氣性差，菌絲不易生長，僅產生 1.24×10^7 conidia ml⁻¹(表 六)。外加氮源蟬蛻或大豆粕後後，產胞量不增反

減，仍以白米產胞量最多(表 七)。

4.4 O/W 劑型

本施作劑型原液經光學顯微鏡觀察，油滴成圓形，被卵磷脂與水相分隔，在油滴直徑 5-30 μm ，平均直徑 10 μm 以上的油滴內，有機會包覆到分生孢子一顆至數顆不等。經過靜置，分生孢子會沉澱在溶液底部(圖 10)。

4.5 溫室中桃蚜防治試驗

試驗一 A 中，攝氏 24-26 $^{\circ}\text{C}$ ，相對溼度 95-100% 的溫室，乳劑施用於植株，4 天後桃蚜死亡率為 19 \pm 8.63%，水懸劑則為 13 \pm 4.80%；8 天後桃蚜死亡率為 81.94 \pm 10.34%，水懸劑組則為 76.04 \pm 9.63%，對照組桃蚜死亡率為 18.97 \pm 3.63%(圖 11)(圖 12)。於試驗一 B 中 27-34 $^{\circ}\text{C}$ 相對溼度為 60-85% 之溫室，乳劑與水懸劑施用於桃蚜後，第 4 天死亡率約為 30 \pm 8.32%，對照組死亡率為 8.36 \pm 7.33%(圖 13)。此區溫度過高不適桃蚜生殖。

試驗二在攝氏 24-26 $^{\circ}\text{C}$ ，相對溼度 95-100% 的溫室，乳劑預先施用於植株，4 天後死亡率為 43 \pm 11.9%，水懸劑則為 44 \pm 14.7%。再次施用藥劑後，第 8 天死亡率乳劑處理為 95.37 \pm 9.26%，水懸劑處理組致死率為 95.48 \pm 5.75%。乳劑對照組致死率為 9.16 \pm 5.96%、水劑對照組致死率為 0.77 \pm 1.54%(圖 14)。



Chapter 5 討論

5.1 寄主範圍與致病力

I. javanica 根據前人的記載可感染鱗翅目的小菜蛾、吉普賽蛾 (Shimazu & Takatsuka, 2010)；半翅目的桃蚜、銀葉粉蝨、溫室粉蝨、椿象、葉蟬、介殼蟲 (Zimmermann, 2008)。於先前的研究當中，本株菌亦可感染繭翅目東方花薊馬、小黃薊馬、西方花薊馬、蚜類等(蔡, 2011)。本實驗發現膜翅目螞蟻也可能成為寄主。此屬有性世代為 *Cordyceps* sp., 而 *Cordyceps* 屬中亦含有寄生於螞蟻的種 (Tzean et al., 1997)。本株菌寄主範圍廣泛，經測試其寄主遍及半翅目、繭翅目、鱗翅目、膜翅目及蚜類各種，若日後成為生物製劑，為其產品優勢之一。

5.2 生理生態測定

5.2.1 溫度對生長、產胞能力影響

為讓昆蟲寄生菌能在天氣炎熱的狀態下對害蟲仍有致病力，尋找耐高溫的菌株是需要的。Vidal et al. (1997) 於各國蒐集了 37 株 *I. fumosoroseus*，以培養基測試生長溫度，發現各菌最適生長溫度在 20-30°C 間。在 35°C 以上、8°C 以下則幾乎不生長。而地處於熱帶、亞熱帶季風氣候盛行的印度所蒐集之菌株最為耐熱。本株菌在 20-30°C 可以生長及產胞，於 35°C 以上不生長、15°C 以下幾乎不生長，與上述菌株之生長溫度相當，本菌於夏天北台灣低海拔山區採集，而此區夏天均溫約為 25°C，與所測之生長溫度相當(蔡, 2011)。欲篩選可在廣域溫度生長的菌株，可在氣候變動大的環境中採集較有機會獲得(Rangel et al., 2005; Meyling & Eilenberg, 2007)。其他學者亦嘗試培養耐高溫的分生孢子，如：將 *M. robertsii* 分生孢子培養在碳源飢餓或是滲透壓逆境的環境中，其耐熱和耐紫外線照射的能力與營養豐富的培養基產生的分生孢子相較增加兩倍以上(Rangel et al., 2006)；而培養在含低濃度水楊酸培養基中，所生產的分生孢子亦有耐熱效果(Rangel et al., 2012)。

5.2.2 水活性對菌落生長、產胞影響

若環境中的濕度過低，則分生孢子無法侵染昆蟲。據 Smith and Edgington (2011) 研究，*Metarhizium* spp. 可於 94.4% RH 下生長與發芽，而較新生的分生孢子在缺水的培養基上發芽率較高。本實驗的 *I. javanica* 菌株在 95.5% RH 生長非常緩慢，與 *M. anisopliae* 相較，需要更高的溼度才有良好的侵染能力。本實驗使用 PEG 200

來調整培養基的水活性，並經公式換算而得相對濕度，但 *I. javanica* 不生長亦有可能是添加過多的 PEG 200 導致滲透壓過高，進而抑制 *I. javanica* 生長及發芽。

5.2.3 營養源對菌落生長、產胞影響

為了在實驗室中菌落培養便捷，利於後續製備實驗材料可供其相關實驗，因此檢測各商業化的培養基在菌落生長與產胞量。經測試以 CYA 培養基菌落生長與產胞量最多。在高營養的培養基，一般菌絲生長速度快，產生的分生孢子反而較少，但此培養基生成分生孢子量亦不差。

添加類似蟲體表皮的成分或選擇蟲生真菌偏好的碳氮源培養基可能可以增加真菌孢子發芽速度進而增加致病力 (Pedrini et al., 2007)。蟲體表皮內含有豐富的長鏈碳氮鏈，Crespo et al. (2002) 以正十六烷為碳源培養 *B.bassiana*，經接種於鞘翅目後，與以葡萄糖為碳原的培養基的對照組相比，致死率多 1 倍以上。但本實驗中 *I. javanica* 以蟬蛻為氮源的產胞量不佳，不利將來商業化上大量培養。

I. javanica 在生長上偏好的碳源是山梨糖醇及水溶性澱粉，但在這兩者在產胞量上卻偏低，產胞上偏好的碳源為麥芽糖及甘油，顯示 *I. javanica* 在生長與產胞上利用的碳源不相同。偏好的氮源為好水解的硝酸鉀和磷酸胺。不同營養源生成之分生孢子耐逆境特性亦有差異，Rangel et al. (2006) 將添加乳糖的培養基所生成的 *M. anisopliae* 分生孢子拿去測試，發現耐 UV-B 照射的時間，相對於培養基較高營養所生成的分生孢子多兩倍以上，可能是真菌為吸收此不偏好的碳源，生成多種的酵素，菌體內有害物質代謝變快，也較耐逆境。而 Ming et al. (2014) 在 *M. acridum* 中發現 MaSnf1 基因是麥芽糖不發酵蛋白基酶，將此基因自菌體中止或去除後，會降低對熱、紫外線的耐受性和致病力，可見菌體內分解醣類酵素與生成耐逆境分生孢子有關。本實驗中以乳糖為碳源所生成的菌落小，培養 14 天尚未生成分生孢子，即使較耐逆境，因其產胞時間過長，在未來製劑製作上仍有待改善。

5.2.4 農藥對菌落生長的影響

本實驗中，殺真菌劑均對 *I. javanica* 有明顯的抑制效果。與對照組相比，殺蟲劑雖可生長，但有些微的抑制生長，而部分殺蟲劑和殺蟎劑如：馬拉松、益化利、依殺蟎，則有較強的抑制發芽效果。在未來的防治策略中，殺真菌劑不可與 *I.*

javanica 混用，而部分殺蟲劑可以嘗試與 *I. javanica* 配置成混合劑型防治害蟲。Al Mazraáwi (2007) 嘗試將 *B. bassiana* 與益達胺混合施用於蔥薊馬上，與單獨施用白僵菌或益達胺相較，混合施用增加了防治能力同時也可以減少化學農藥用量。

相較化學藥劑，昆蟲寄生菌在殺蟲速率上較慢，但可較長效，可嘗試混合農藥或其他生物製劑來提升殺蟲成效，降低害蟲對化學農藥的抗藥性。James (2003) 混合印楝素與 *I. fumosorosea* 來防治銀葉粉蝨，不論先後施用或是同一時間混合施用兩者，與單獨施用一種相較，銀葉粉蝨致死率增加 20% 以上。

5.3 基質培養分生孢子

本實驗中，以純白米培養 *I. javanica* 具有高產胞量。以米糠作為基質，添加水後其結構變得緻密，透氣性差，不適合拿來做大量培養。而於白米中添加蟬蛻、豆粕等增加氮素源，會使基質營養過高，產胞量下降。大量固態培養，要注意容器中央的基質是否有空間可以產胞，還要注意培養容器內的分生孢子齡期差異。不同地區的菌株偏好的基質也不盡相同，Mascarin et al. (2010) 將 *I. fumosorosea* 培養於米、玉米、小麥、豆粕、甘蔗上，經測得培養於米基質上的產胞量最高；而 Sahayaraj and Namasivayam (2008) 以米、小麥、高粱、玉米、大麥培養 *I. fumosorosea*，以高粱為基質的產胞量最高。

白米雖可產出高量分生孢子，但此孢子原體在耐環境逆境、耐保存、是否仍具有高致病力仍需要再次檢測，此為此論文不足之處。而收成、儲藏這些分生孢子的方式是否降低孢子活性也需要再次確認。

5.4 乳劑劑型製作


由於 *I. javanica* 分生孢子表面呈疏水性，在萃取分生孢子的過程或使孢子均勻散佈於液體中，都需要界面活性劑來輔助，因此界面活性劑種類與濃度非常重要 (Santos et al., 2012; Jin et al., 2009)。濃度過低則分生孢子分散不均；濃度過高會抑制分生孢子發芽，施用於植物時，亦可能會使植物產生藥害。據 Mascarin et al. (2013) 研究，介面活性劑 Silwet L-77 在 100-1000 ppm 不會抑制分生孢子發芽，部分油劑與介面活性劑可用於自然農法中降低昆蟲與病害的侵害 (Irish et al., 2002; Regnault-Roger et al., 2012)，但濃度過高有些會毒害植物細胞導致葉面傷害，或是黃化萎凋，植株矮化等病徵；但有些會促使植株生長，例如：在大麥上施用 Tween

20 會增加根葉生長，於菸草上會增加尼古丁合成 (Singh & Orsenigo, 1984; Knoche et al., 1992)。

5.5 溫室試驗

本實驗選於兩種不同接種策略，於不同溫、濕度範圍下接種測定，其中試驗一 B 環境溫度太高，不適宜蚜蟲繁殖，第一天至第八天桃蚜數量差異不大；而 *I. javanica* 雖可感染，但溫度過高濕度不高，降低殺蟲效果。試驗一 A 在第 4 天時，殺蟲效果仍未顯現，經施用第二次此劑型後 4 天，才有很顯著的殺蟲效果。試驗二在預先施用此生物性殺蟲劑的狀況下，第 4 天已有 40% 死亡率。經再次接種後，寄主蚜蟲有近 100% 死亡率，施用乳劑與水懸劑 4 天後蚜蟲死亡率兩者並無差異，但施用乳劑對芥菜嫩葉有些微斑點藥害。如未來要使用在幼嫩葉上時需要調整界面活性劑與油劑的含量。雖不施藥組蚜蟲皆健康，而對照組的蚜蟲絕大多是已經死亡，但兩者對芥藍植株危害程度在短時間內雖差異不大，仍需要經過更長期的試驗來加以驗證。

Chapter 6 結論



經過一系列的實驗，本株 *I. javanica* 在半翅目、縷翅目、鱗翅目、等翅目、蟎類等昆蟲上皆有致病能力；對溫室害蟲桃蚜、南黃薊馬具有高致病力。與本實驗室不同 *I. javanica* 菌株 (strain) 和常見昆蟲寄生菌 *Beauveria bassiana*、*Metarhrium anisopliae* 相較，產胞量差異不大或較多，且運用容易取得之白米為基質培養，即可生成高產量的分生孢子，適合工業化大量生產。但固態培養既有缺點，要避免使用低表面積的容器來培養。而為降低成本，可使用碎米培養，或再測試更廉價的基質，例如：各種農業廢棄物。劑型上，本劑型可成功將分生孢子包覆在油滴內，但經過數小時後，分生孢子仍會沉降至底部，是否可添加懸浮劑，增加其懸浮能力，有待探討。而完成製劑至生物防治之前，保存活性的方式也需要評估。

本株菌適合生長在 25-28°C 之高濕度環境下，而溫度低於 20°C、超過 30°C 或低溼度時會影響生長，因此在耐環境逆境方面還有待改善。

自 20 世紀末，分子技術快速發展，基因工程提供更便捷的方式增強致病力、發芽率、產胞率並擴大寄主範圍。而這些能力在一般的劑型改良尚無法突破，或可嘗試運用基因改造技術來增進菌株能力。但受限於健康安全疑慮，基因改良菌株仍無法在台、歐盟、日本等地區上市販售。

現今慣行農業管理害蟲的方法以預防蟲害大發生和化學防治為主，化學藥劑可以混用、成本低廉，耐保存、施用容易且作用迅速，但用量過多易導致害物產生抗藥性，對人、畜、環境亦有不良後果。微生物殺蟲製劑的市場可以針對安全採收期噴灑的藥劑、有機農業、城市菜圃、休憩區等來推廣與銷售，並可複合施用同害物目標之生物農藥來增加農園多樣性，補強不同微生物殺蟲活性。

表一、培養在不同水活性之 *I. javanica* 菌落直徑與產胞量。 *I. javanica* 生長、發芽與產胞隨水活性下降而降低。

Relative humidity (%)	48 hours germination (%)	Colony diameter (cm)		Sporulation (10 ⁹) conidia/plate
		8 days	16 days	
99.8	100±0.0 a	2.71±0.02 a	5.1±0.14 a	10.34±2.62 a
98.7	95.67±0.58 b	2.15±0.06 b	3.96±0.21 b	7.85±4.25 ab
97.5	76.00±6.08 c	1.55±0.05 c	2.95±0.06 c	4.11±1.58 bc
96.4	43.33±17.16 d	0.8±0.0 d	1.27±0.14 d	0.28±0.10 c
95.9	3.67±2.08 e	0* e	0.5±0 e	0 c

(Holm-Sidak method, p<0.05)

*: 於滴定位置肉眼可見分生孢子發芽，但未形成一個菌落

表二、培養在不同培養基之 *I. javanica* 生長的菌落直徑與產胞量；以培養在察式培養基添加酵母的菌落生長速度最快。燕麥培養基產胞量最高。整體來說已 CYA 培養基最適合 *I. javanica* 生長與產胞。



Medium	Colony diameter (cm)		Sporulation conidia/plate
	7 days	14 days	
1/4PDA	2.35±0.10 ef	3.93±0.10 ef	4.53±1.34 x 10 ⁸ de
PDA	2.48±0.05 de	4.18±0.05 e	2.79±0.77 x 10 ⁹ b
1/4SDA	2.33±0.05 ef	4.53±0.05 d	7.33±1.89 x 10 ⁸ cde
SDA	2.56±0.05 cd	5.23±0.05 c	1.52±0.43 x 10 ⁹ c
1/4OMA	2.0±0 g	3.63±0.55 fg	1.99±0.27 x 10 ⁹ bc
OMA	2.70±0.08 bc	5.40±0.08 c	5.17±1.34 x 10 ⁹ a
1/4YPD	2.62±0.04 cd	5.46±0.05 c	8.13±1.30 x 10 ⁸ cd
YPD	2.83±0.05 b	5.88±0.04 b	1.17±0.46 x 10 ⁹ cd
1/4MEA	2.40±0 ef	3.80±0 fg	1.95±1.73 x 10 ⁸ de
MEA	2.26±0.13 f	3.68±0.23 fg	7.93±2.25 x 10 ⁸ cde
CYA	3.0±0 a	6.30±0 a	3.29±1.15 x 10 ⁹ b
CMA	2.60±0 cd	5.23±0.19 c	1.94±1.55 x 10 ⁷ e
SSM	2.24±0.09 f	3.58±0.13 g	3.83±2.73 x 10 ⁶ e
WA	2.26±0.09 f	4.60±0.07 d	4.38±4.57 x 10 ⁶ e

(Holm-Sidak method, p<0.05)

表 三、培養在添加不同碳素源之培養基之 *I. javanica* 的菌落直徑與產胞量。其中以水溶性澱粉與山梨糖醇為碳源最適合生長；以麥芽糖與甘油為碳源最適合產胞。

Carbon source	Colony diameter (cm)		Sporulation (10 ⁸) conidia/plate
	7 days	14 days	
Fructose	1.6±0.72 d	5.1±0.10 c	11.27±1.27 bc
Glucose	1.93±0.97 cd	5.375±0.05 c	17.13±2.03 abc
Glycerol	2.47±0.18 b	5.97±0.12 b	26.4±4.73 a
Lactose	2.15±0.11 bc	2.95±0.13 d	0 e
Maltose	2.41±0.09 bc	5.32±0.25 c	28.67±2.56 a
Mannose	2.49±0.03 b	5.58±0.17 bc	18.27±6.22 abc
Soluble starch	2.49±0.13 b	6.08±0.20 ab	6.50±3.67 c
Sorbital	2.92±0.06 a	6.14±0.18 ab	10.48±6.88 c
Xylose	0.84±0.11 e	1.6±0.0 e	0.23±0.02 d
Sucrose	2.61±0.07 b	5.29±0.75 c	22.20±3.12 ab

(Holm-Sidak method, p< 0.05)

表 四、培養再添加不同氮素源之 *I. javanica* 的菌落與產胞量。以硝酸鉀為氮源的培養基菌落生長最好；以硝酸鉀或磷酸胺為氮源的產胞量最高。

Nitrogen source	Colony diameter (cm)		Sporulation (10 ⁹) conidia/plate
	7 days	14 days	
Bacto peptone	3.33±0.04 bc	6.15±0.07 b	4.98±0.19 b
Cicada slough	2.76±0.05 d	5.30±0.0 cd	3.57±1.18 c
Corn steep powder	2.50±0.13 d	4.83±0.10 e	1.00±0.16 c
Gelatin	4.84±0.05 a	5.52±0.03 cd	3.67±0.77 c
Histidine	2.79±0.10 cd	5.74±0.19 bc	1.86±0.75 c
Potassium nitrate	3.09±0.07 c	7.03±0.05 a	10.02±0.81 a
Ammonium biphosphate	2.54±0.08 d	5.07±0.06 d	11.67±3.26 a
Tryptone	2.89±0.11 cd	5.30±0.07 cd	ND*
Yearst	2.93±0.04 bcd	5.13±0.10 d	3.00±0.33 c
Sodium nitrate	2.61±0.07 d	5.29±0.75 d	5.55±0.78 b

(Student-Newman-Keuls Method, p< 0.05)

*ND : No tested.

表 五、培養在含有農藥之培養基之 *I. javanica* 菌落直徑與發芽率。亞滅培、阿巴汀、百利普芬及合賽芬普寧對 *I. javanica* 菌落生長和發芽沒有影響。

Pesticide name		Colony diameter (cm)	Germination rate (%)		IRAC & FRAC code*
In Chinese	In English		24 hours	36 hours	
對照組	PDA plate	3.97±0.32 a	96±2 a	100 a	-
殺蟲劑	pesticide				
陶斯松	Chlorpyrifos	3.05±0.09 bc	97.67±2.1a	100 a	[IRAC] 1B
馬拉松	Malathion	2±0 d	0 d	57.33±6.8 b	[IRAC] 1B
福化利	Tau-fluvalinate	1.96±0.5 d	0 d	0 c	[IRAC] 3A
亞滅培	Acetamiprid	3.67±0.12 a	97.33±1.2 a	100 a	[IRAC] 4A
賜諾殺	Spinosad	2.7±0.2 c	83.33±1.5 b	100 a	[IRAC] 5
阿巴汀	Abamectin	3.78±0.08 a	97.33±1.5 a	100 a	[IRAC] 6
百利普芬	Pyriproxyfen	3.97±0.06 a	99±1 a	100 a	[IRAC] 7C
殺蟎劑	acaricide				
依殺蟎	Etoxazole	1.57±0.37 d	0 d	0 c	[IRAC] 10B
畢達本	Pyridaben	2.48±0.03 cd	58.33±7.1 c	100 a	[IRAC] 21A
合賽芬普寧	Hexythiazox & Fenpropathrin	3.82±0.06 a	99±1 a	100 a	[IRAC] 10A [IRAC] 3A
殺真菌劑	fungicide				
三泰芬	Triadimefon	0 f	0 d	0 c	[FRAC] 3
大克爛	Dicloran	0 f	0 d	0 c	[FRAC] 14
普拔克	Propamocarb hydrochloride	0 f	0 d	0 c	[FRAC] 28
免賴得	Benomyl	0 f	0 d	0 c	[FRAC] 1
撲克拉	Prochloraz	0 f	0 d	0 c	[FRAC] 3
亞托敏	Azoxystrobin	1.02±0.29 e	0 d	0 c	[FRAC] 11
腐絕快得寧	Thiabendazole & Oxine-copper	0 f	0 d	0 c	[FRAC] 1 [FRAC] M1
維利黴素	Validamycin A	3±0 bc	89.33±3.2 b	100 a	[FRAC] 26
嘉賜黴素	Kasugamycin hydrochloride hydrate	3.05±0.18 bc	87±5 b	100 a	[FRAC] 24

(Holm-Sidak method, $p \leq 0.05$)


*FRAC code cited from Fungicide Resistance Action Committee; IRAC code cited from Insecticide Resistance Action Committee

表 六、培養於不同米類或米糠之 *I. javanica* 15 天後所產生的分生孢子量。*I. javanica* 在純白米的產胞量最高。

Substrate	conidia/ g
un-husked rice	$3.91 \pm 0.5 \times 10^8$ b
rice bran	$1.24 \pm 0.16 \times 10^7$ b
polished rice	$2.94 \pm 2.22 \times 10^{10}$ a
brown rice	$7.63 \pm 3.49 \times 10^9$ b

(Holm-Sidak method, $p < 0.05$)

表 七、培養於白米外加氮源之 *I. javanica* 10 天後所產生的分生孢子量。以純白米的產胞量最高。



Substrate	conidia/ g
polished rice	$2.03 \pm 1.27 \times 10^9$ a
polished rice with 1 g cicada slough	$1.93 \pm 0.46 \times 10^9$ a
polished rice with 2 g cicada slough	$7.17 \pm 2.02 \times 10^8$ ab
polished rice with 4 g cicada slough	$2.62 \pm 1.73 \times 10^8$ b
polished rice with 5 g soybean meal	$1.60 \pm 0.44 \times 10^9$ ab

(Student-Newman-Keuls Method, $p < 0.05$)

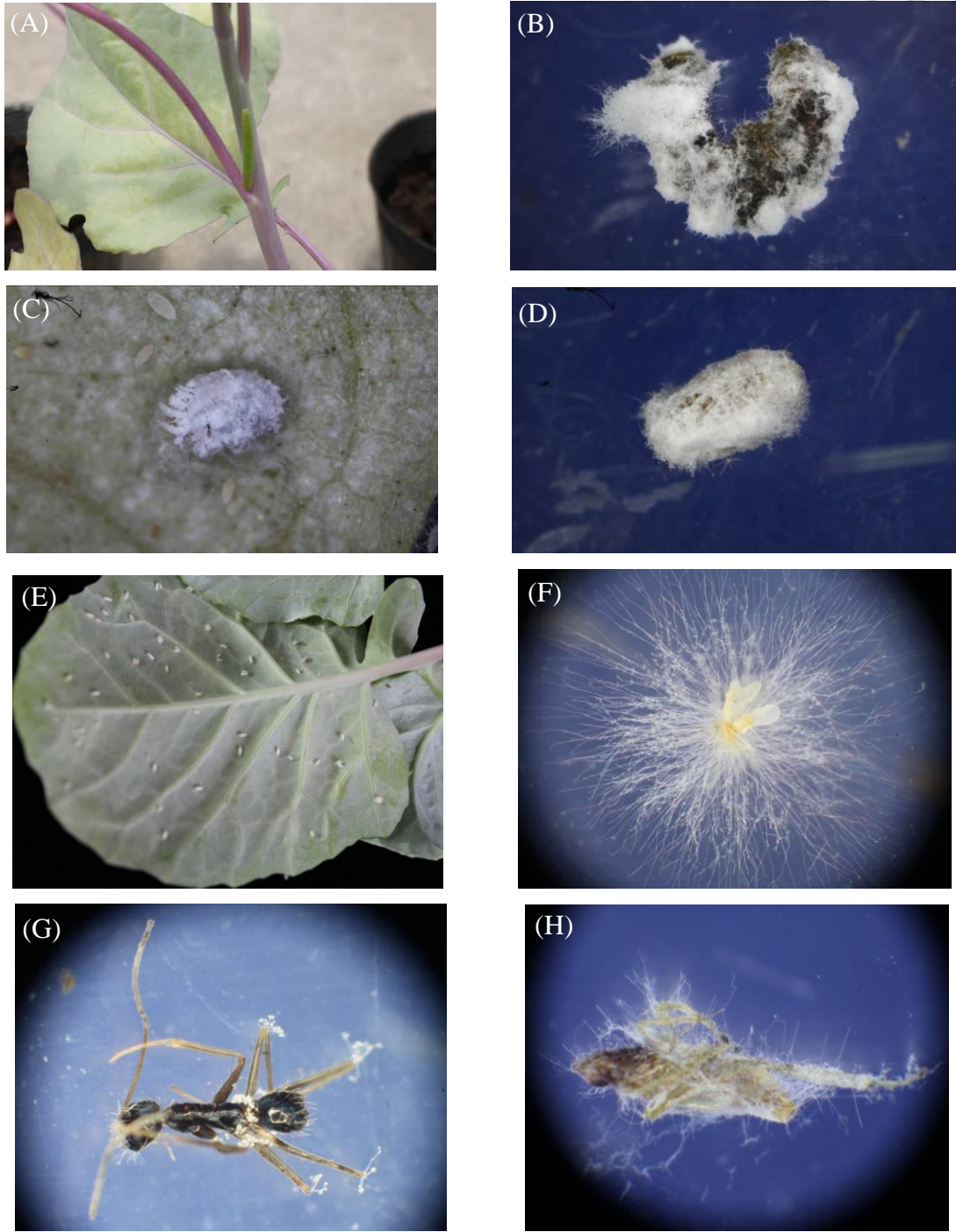


圖 1、可被 *I. javanica* 寄生的其他昆蟲。(A)健康紋白蝶；(B)被感染；(C)健康介殼蟲；(D)被感染；(E)健康銀葉粉蝨 (F)被感染；(G, H)感染後產胞的螞蟻與葉蟬

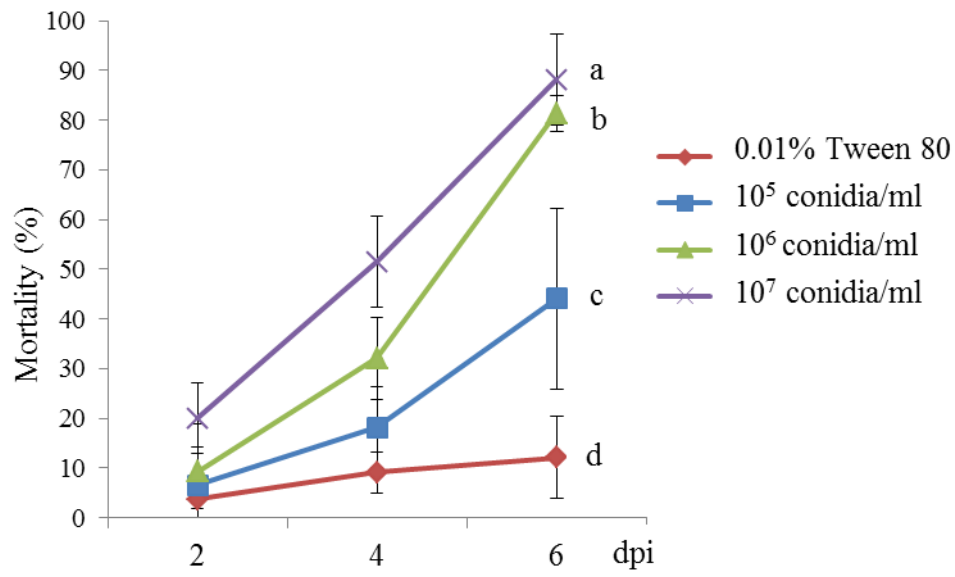


圖 2、二齡桃蚜分別接種含有 *I. javanica* 10⁵、10⁶ 和 10⁷ conidia/ml 之死亡率。在 10⁷ conidia/ml 下桃蚜的 LT₅₀ 為 4 天。(Holm-Sidak method p < 0.05)

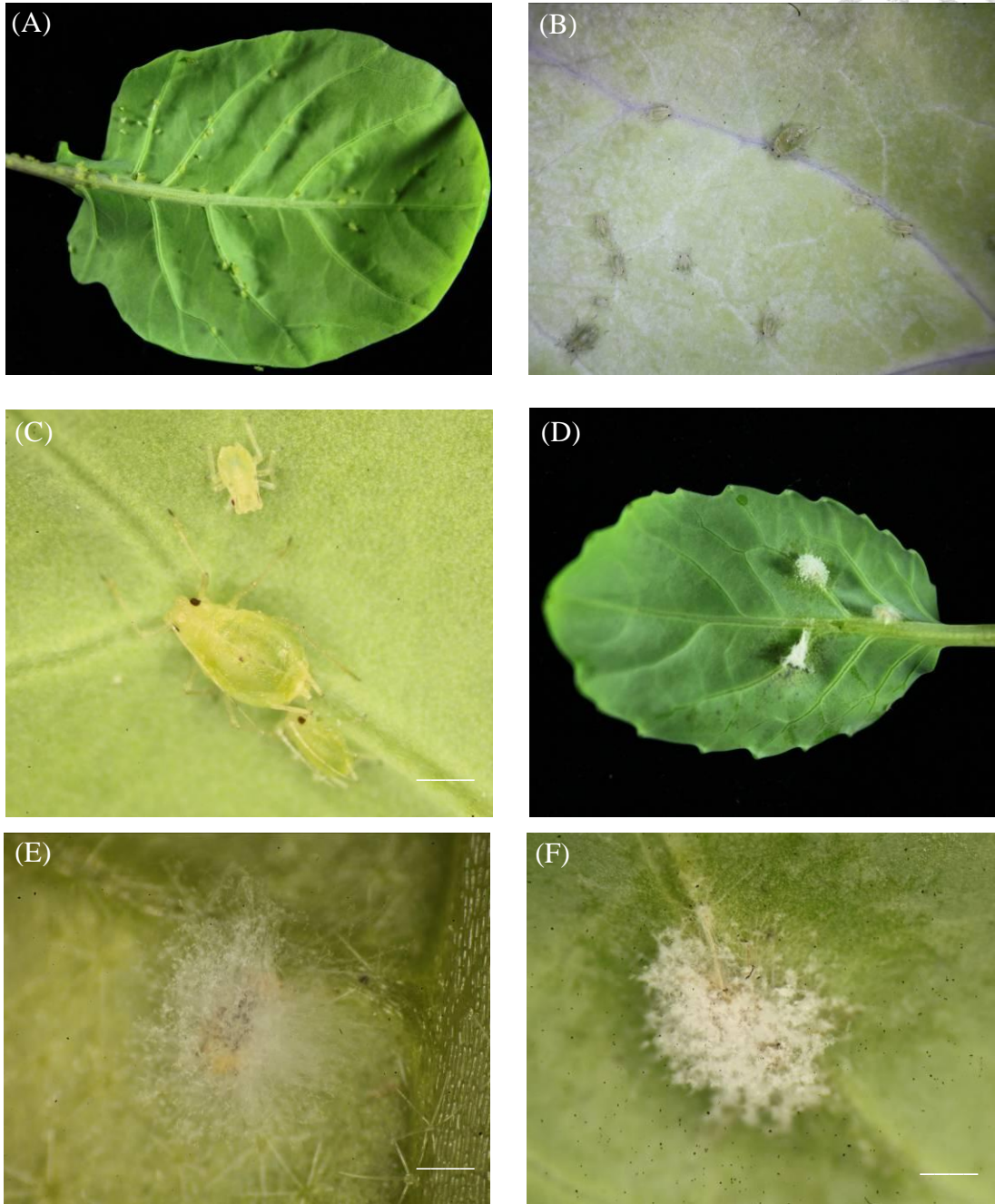


圖 3、健康桃蚜和被 *I. javanica* 感染後型態。(A-C)桃蚜母成蟲與若蟲；(D-F) *I. javanica* 於芥蘭葉片感染桃蚜 3 天後形態特徵。bar = 0.5 mm。

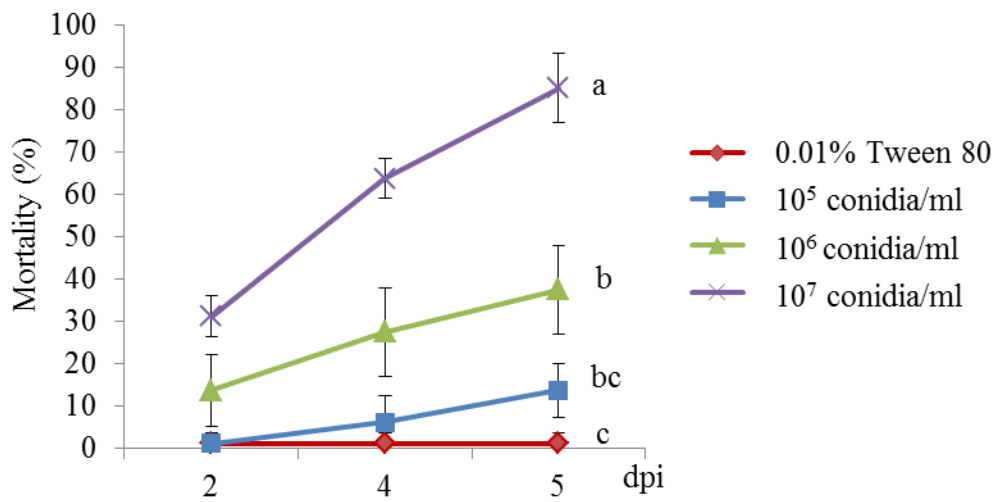


圖 4、二齡南黃薊馬分別接種含有 *I. javanica* 10⁵、10⁶ 和 10⁷ conidia/ml 之死亡率。
 在 10⁷ conidia/ml 下南黃薊馬的 LT₅₀ 為 3-4 天間。(Holm-Sidak method p< 0.05)

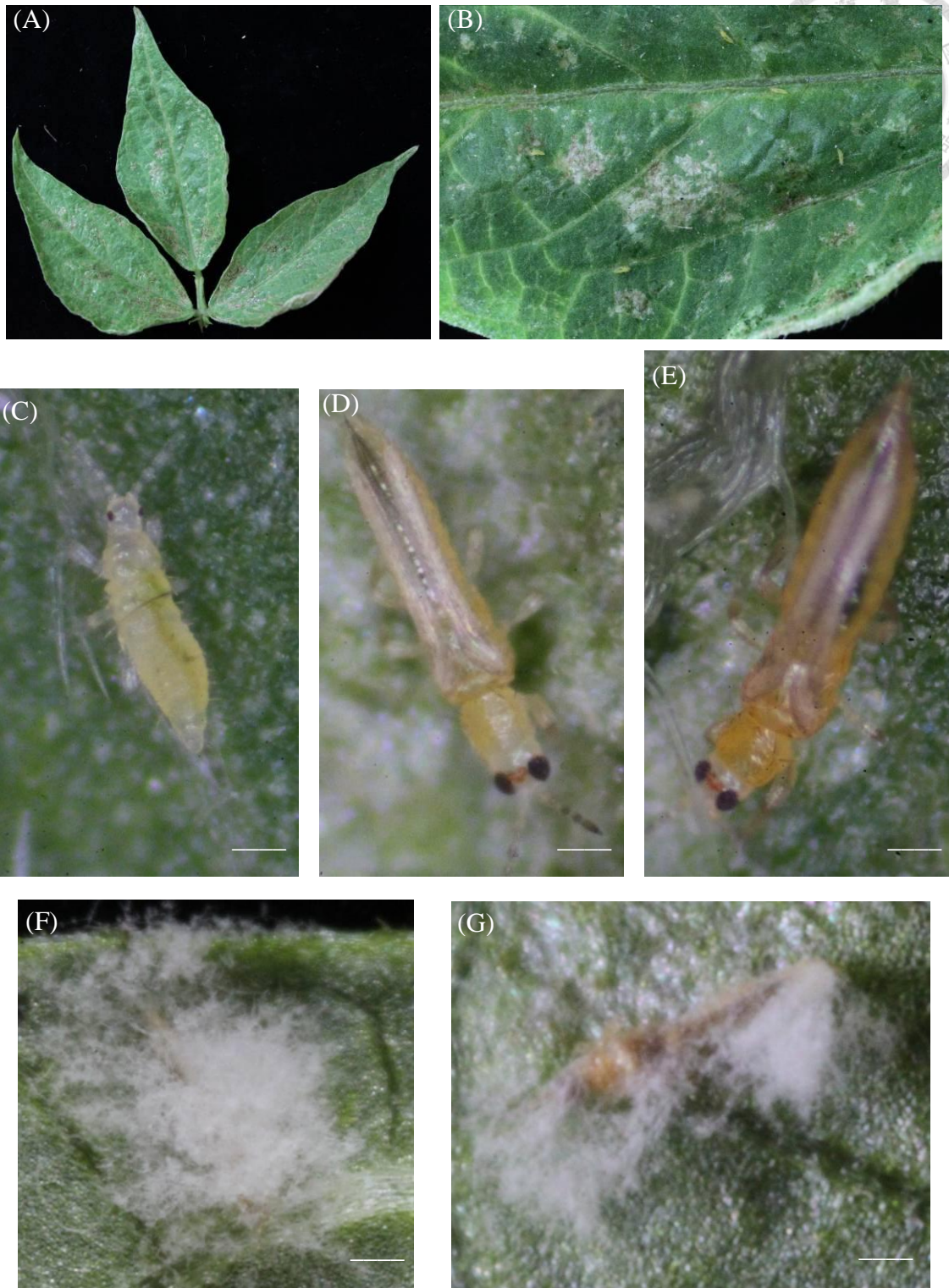


圖 5、健康南黃薊馬與被感染後的型態變化(A-B)遭剝吸的豆葉；(C)二齡幼蟲；(D-E)成蟲；(F-G) *I. javanica* 感染於花豆葉上之南黃薊馬 3 天後的型態特徵。bar = 0.2

mm。

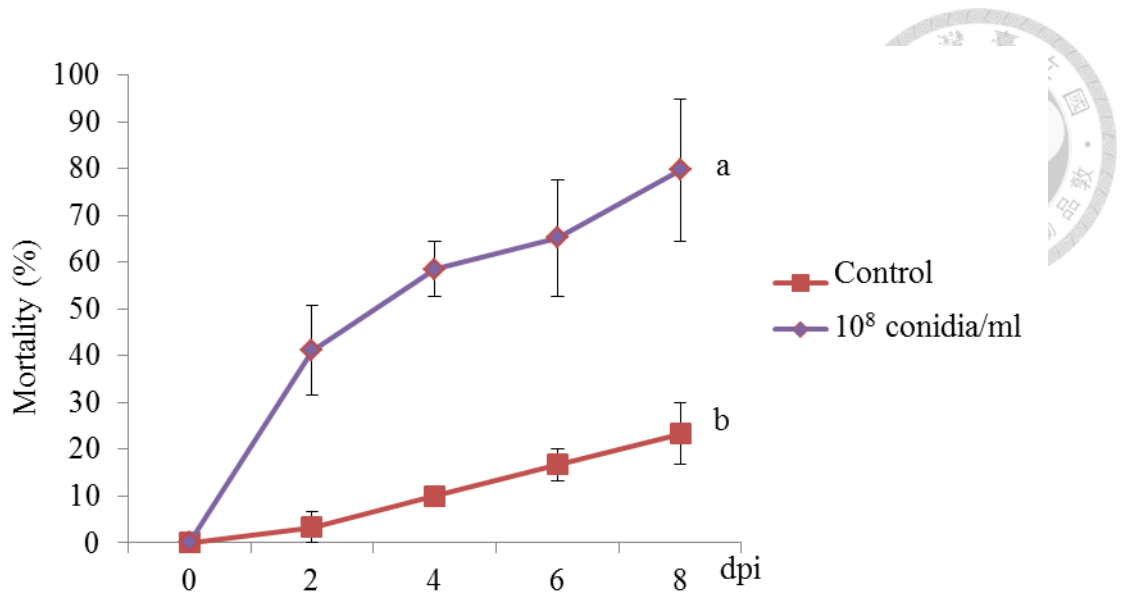


圖 6、二齡茶蠶幼蟲接種 *I. javanica* 分生孢子 10^8 conidia ml⁻¹ 乳劑後之死亡率。茶蠶經接種 *I. javanica* 後第 8 天死亡率為 79.63%。(Holm-Sidak method $p < 0.05$)



圖 7、(A)未被寄生蟲生真菌的茶蠶二齡幼蟲；(B-C)被 *I. javanica* 寄生死亡後 2 天的茶蠶幼蟲。bar = 4 mm。

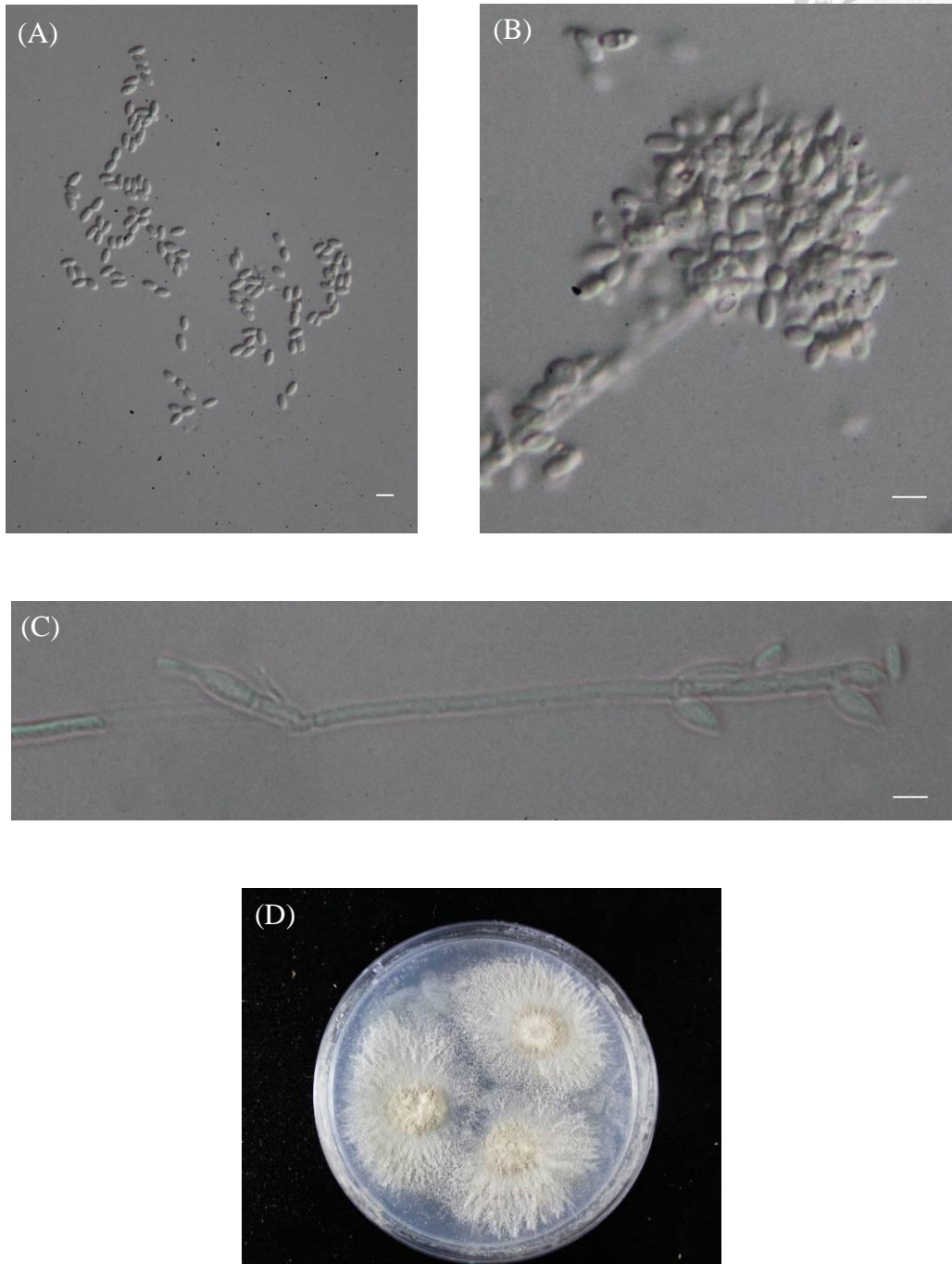


圖 8、*I. javanica* 構造。(A)分生孢子約呈長橢圓形，兩端稍尖。長 $4.16 \pm 0.85 \mu\text{m}$ 、寬 $1.76 \pm 0.31 \mu\text{m}$ ；(B)佈滿分生孢子的產胞梗；(C)產胞梗，呈環生瓶梗狀；(D)於 1/4 PDA 上培養 21 天後之菌落型態，菌絲呈灰色，菌落呈圓形，表面布滿淡紫色分生孢子。bar = $4 \mu\text{m}$

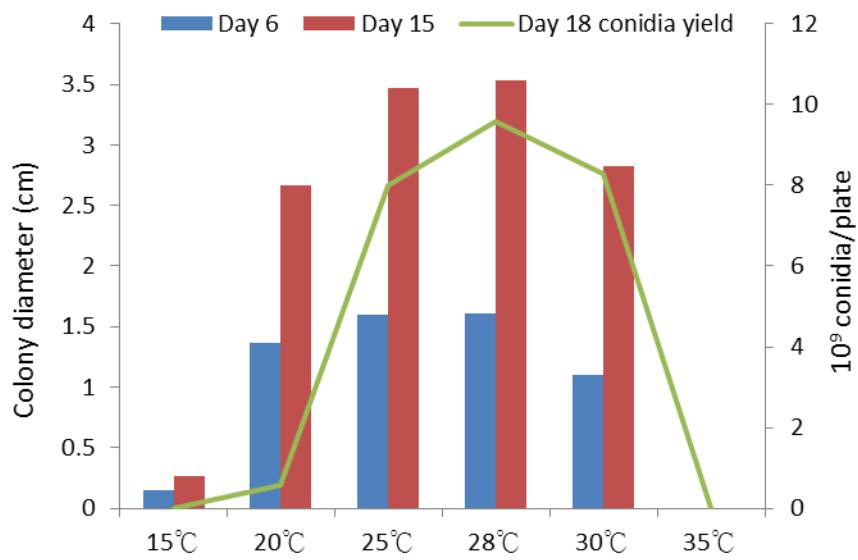


圖 9、*I. javanica* 在 1/4 PDA 上，各溫度下菌落生長速度與產胞量。*I. javanica* 最適生長與產胞溫度為 28°C。培養於 25-30°C 仍可生長產胞，培養於 20°C 時產胞量急遽下降。培養於 15、35°C 幾乎不生長也不產胞。

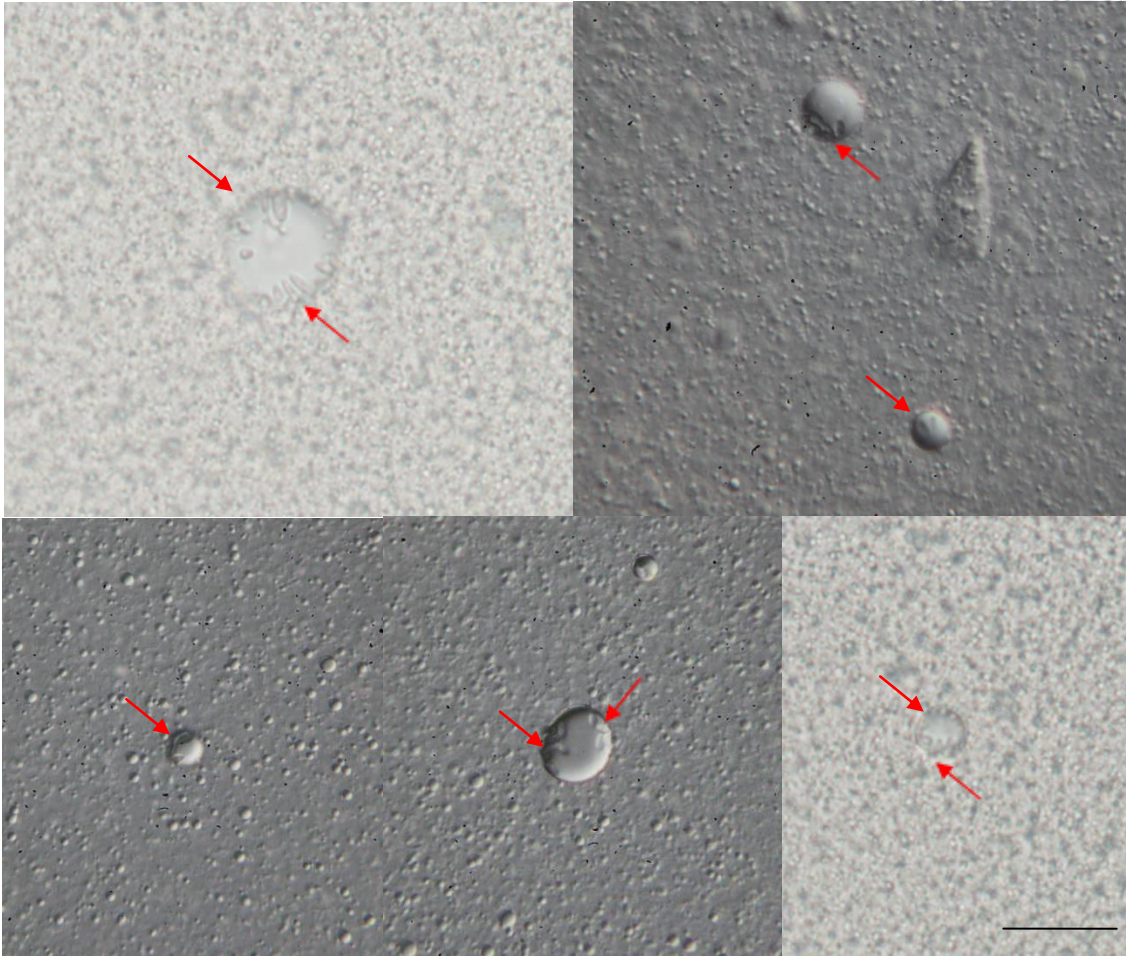
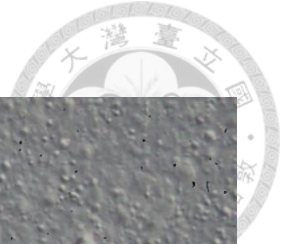


圖 10、*I. javanica* 之乳劑劑型。分生孢子(圖中箭頭所示)被乳劑中的油滴包覆，油滴平均直徑為 5-30 μm ，平均直徑 10 μm 以上可包覆一至數顆不等的孢子。bar = 20 μm 。

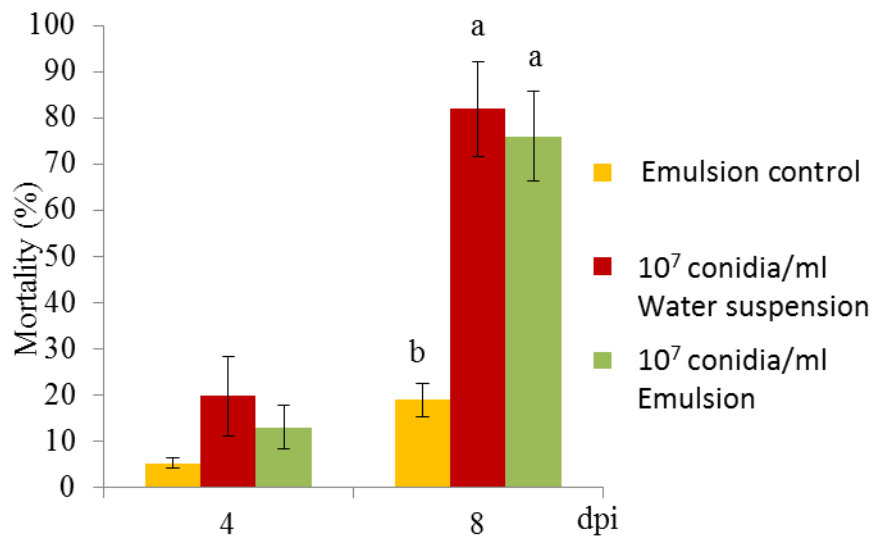


圖 11、試驗一 A 桃蚜接種 *I. javanica* 不同天數致死率。於平均 25°C, 95-100% RH, 光照週期 L:D=12:12 溫室接種桃蚜後噴灑 10⁷ conidia/ml 菌液。第 4 天後，水懸劑型死亡率為 19.74%；乳劑劑型為 13.02%。於第 4 天記錄後再次施用菌液，第 8 天桃蚜死亡率：水懸劑型為 76.03%；乳劑劑型為 81.94%。(Holm-Sidak method p< 0.05)

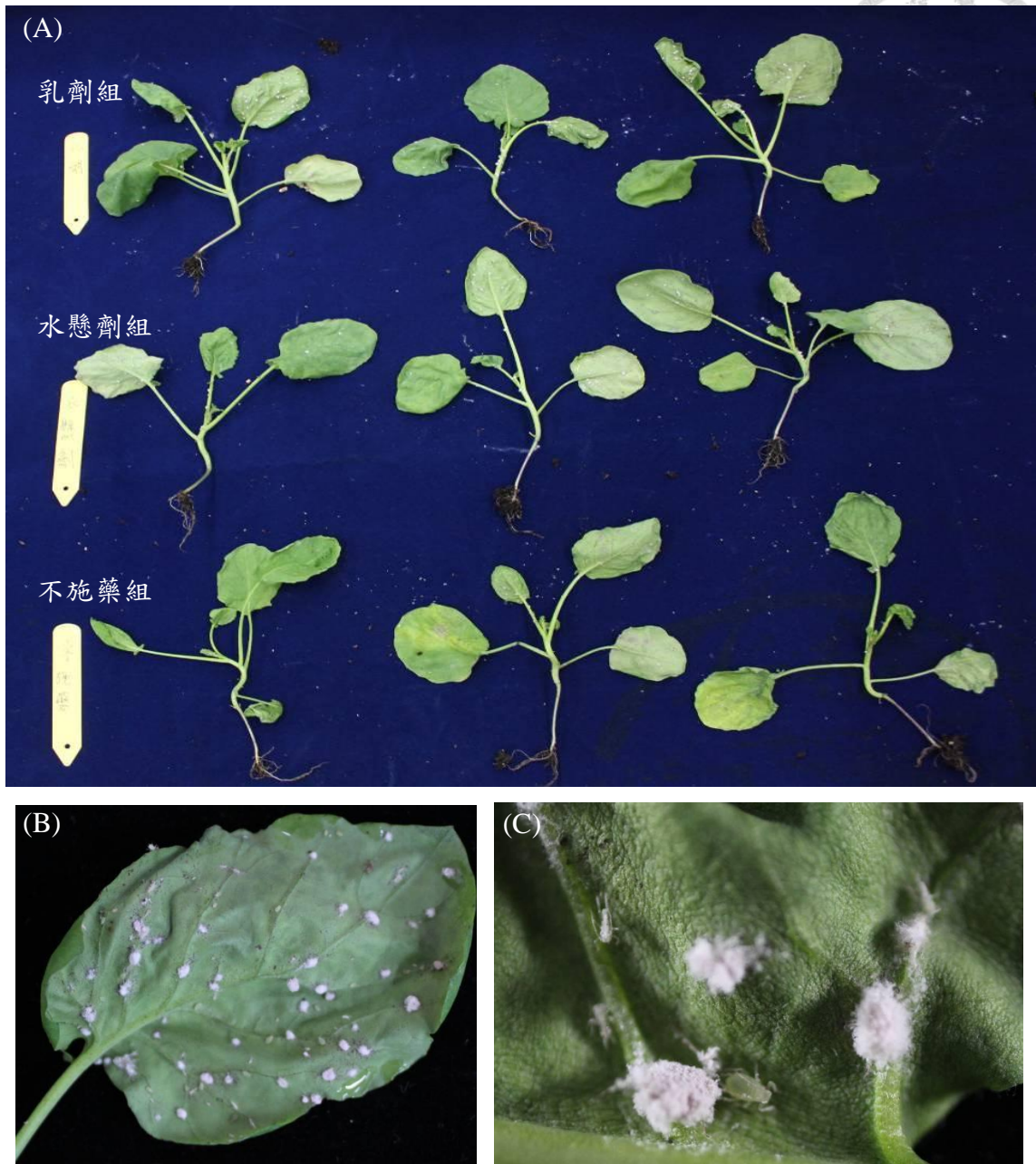


圖 12、不同劑型之測試，試驗一 A 桃蚜經施用 2 次 10^7 conidia/ml 菌液後 8 天，於芥藍葉之型態。(A)乳劑、水懸劑及不施藥組之芥藍生長情形，施藥組可觀察到葉部有經 *I. javanica* 寄生死亡並產生菌絲的蟲體，而不施藥組葉片略為黃化；(B-C) *I. javanica* 感染於芥藍葉片上之桃蚜的情形。

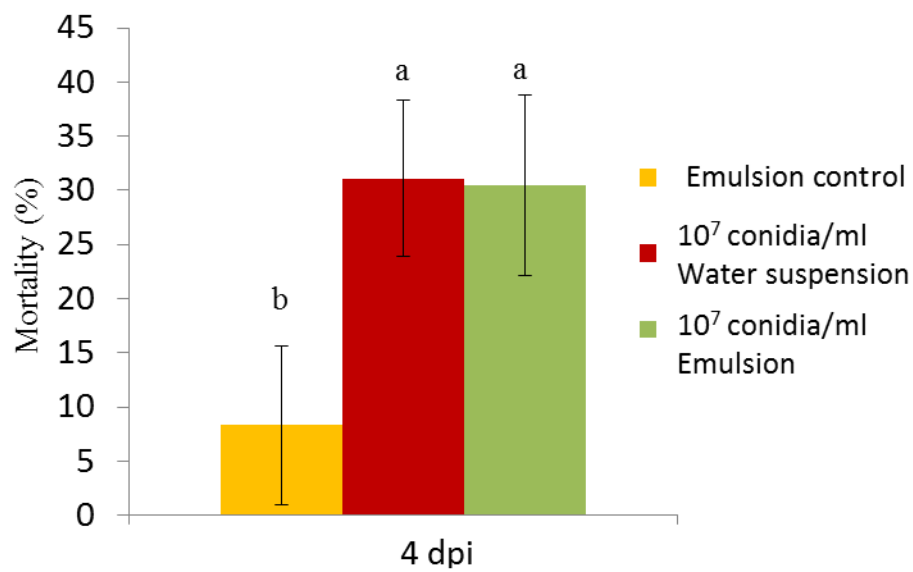


圖 13、試驗一 B 桃蚜接種 *I. javanica* 不同天數致死率。於 27-34°C, 60-85% RH, 光照週期 L:D = 12:12 溫室接種桃蚜後再噴灑 10⁷ conidia/ml 菌液，4 天後死亡率於水懸劑型處理下桃蚜死亡率 31.0%；乳劑劑型處理下桃蚜死亡率為 30.49%。對照組死亡率為 8.36%。(Holm-Sidak method $p < 0.05$)

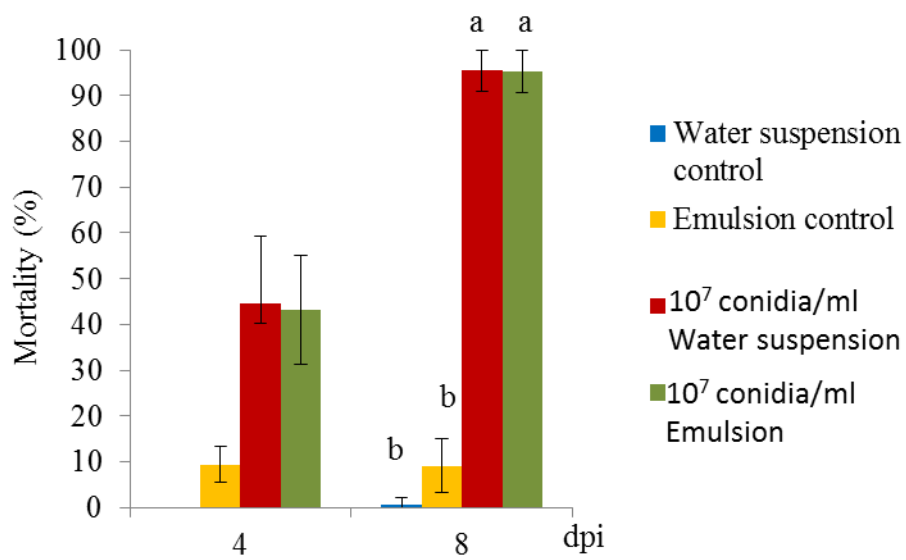


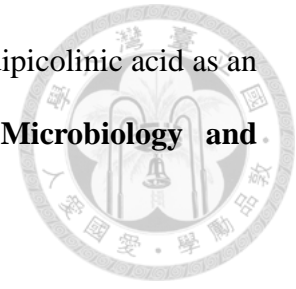
圖 14、試驗二桃蚜接種 *I. javanica* 不同天數致死率。於平均 25°C, 95-100% RH 光照週期 L:D=12:12 溫室預先噴灑 10^7 conidia/ml 菌液後再接種桃蚜，水懸劑型死亡率為 44.62%；乳劑劑型死亡率為 43.26%。第 4 天後再次施用菌液，第 8 天死亡率水懸劑型為 95.48%；乳劑劑型為 95.37%。(Holm-Sidak method $p < 0.05$)

Chapter 7 參考文獻



- 許嘉伊、2007。全球生物性農藥市場現況與趨勢發展。生物性肥料與農藥：12, 1-6。
- 陳政忻、2005。生技小尖兵開創新天地—專訪聯發生物科技股份有限公司。農業生技產業季刊：4, 23-7。
- 曾顯雄、2009。小花蔓澤蘭的古典生物防治。科學發展：444, 34-40。
- 楊玉婷、2014。深富自然及人文關懷的親土精神—我國有機農業發展策略分析。台灣經濟研究月刊：37, 42-8。
- 劉顯達、張玉珍、黃耀熙、1990。蟲生真菌防治銀合歡木蝨試驗。植物保護學會會刊：32, 49-58。
- 蔡昇宏、2011。An Assessment of the Biocontrol Potential of the Entomopathogenic Fungi Against *Aulacapsis Yasumatsui* and *Bemisia Argentifolii*. 國立台灣大學植物病理與微生物學系碩士論文。
- Al Mazraáwi MS, 2007. Interaction effects between *Beauveria bassiana* and imidacloprid against *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae). **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences** 72, 549-55.
- Ali S, Huang Z, Ren S, 2010. Production of cuticle degrading enzymes by *Isaria fumosorosea* and their evaluation as a biocontrol agent against diamondback moth. **Journal of Pest Science** 83, 361-70.
- Arzumanov T, Jenkins N, Roussos S, 2005. Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. **Process Biochemistry** 40, 1037-42.

Asaff A, Cerda-Garcia-Rojas C, De La Torre M, 2005. Isolation of dipicolinic acid as an insecticidal toxin from *Paecilomyces fumosoroseus*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 68, 542-7.



Behle R, Birthisel T, 2014. Chapter 14 - Formulations of entomopathogens as bioinsecticides. In: Shapiro-Ilan JaM-RGRI, ed. *Mass Production of Beneficial Organisms*. San Diego: Academic Press, 483-517.

Benny GL, 2009. Zygomycetes. In. <http://zygomycetes.org/>.

Benoit JB, 2011. Stress tolerance of bed bugs: a review of factors that cause trauma to *Cimex lectularius* and *C. hemipterus*. **Insects** 2, 151-72.

Bhanu Prakash GV, Padmaja V, Siva Kiran RR, 2008. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. **Bioresource Technology** 99, 1530-7.

Borisade OA, Magan N, 2014. Growth and sporulation of entomopathogenic, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria farinosa* and *Isaria fumosorosea* strains in relation to water activity and temperature interactions. **Biocontrol Science and Technology** 24, 999-1011.

Brown AH, Smith G, 1957. The genus *Paecilomyces* Bainier and its perfect stage *Byssochlamys* Westling. **Transactions of the British Mycological Society** 40, 17-IN3.

Castrillo LA, Bauer LS, Liu H, Griggs MH, Vandenberg JD, 2010. Characterization of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) isolates associated with *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) populations in Michigan. **Biological Control** 54,

135-40.

Crespo R, Juárez MP, Dal Bello GM, Padín S, Fernández GC, Pedrini N, 2002. Increased mortality of *Acanthoscelides obtectus* by alkane-grown *Beauveria bassiana*. **BioControl** 47, 685-96.

Ellison CA, Evans HC, Ineson J. The significance of intraspecies pathogenicity in the selection of a rust pathotype for the classical biological control of *Mikania micrantha* (mile-a-minute weed) in Southeast Asia. *Proceedings of the XI International Symposium on Biological Control of Weeds, 2004*: CSIRO Entomology, Canberra, Australia, 102.

Fernandez O, Béthencourt L, Quero A, Sangwan RS, Clément C, 2010. Trehalose and plant stress responses: friend or foe? **Trends in Plant Science** 15, 409-17.

Fukatsu T, Nikoh N, 2003. Interkingdom host shift in the *Cordyceps* fungi. **Mycology Series** 19, 311-28.

Glare T, Caradus J, Gelernter W, *et al.*, 2012. Have biopesticides come of age? **Trends in Biotechnology** 30, 250-8.

Gleason FH, Marano AV, Johnson P, Martin WW, 2010. Blastocladian parasites of invertebrates. **Fungal Biology Reviews** 24, 56-67.

Goettel MS, Koike M, Kim JJ, Aiuchi D, Shinya R, Brodeur J, 2008. Potential of *Lecanicillium* spp. for management of insects, nematodes and plant diseases. **Journal of Invertebrate Pathology** 98, 256-61.

Gul HT, Saeed S, Khan FZA, 2014. Entomopathogenic fungi as effective insect pest

management tactic: a review. **Applied Sciences and Business Economics** 1, 10-8.

Hajek AE, Leger RJS, 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts.

Annual Review of Entomology 39, 293-322.

Hajek AE, Mcmanus ML, Delalibera I, 2007. A review of introductions of pathogens and nematodes for classical biological control of insects and mites. **Biological Control** 41, 1-13.

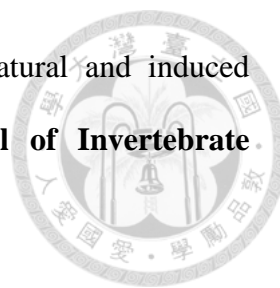
Hallsworth JE, Magan N, 1996. Culture age, temperature, and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. **Applied and Environmental Microbiology** 62, 2435-42.

Hamdi F, Fargues J, Ridray G, Jeannequin B, Bonato O, 2011. Compatibility among entomopathogenic hyphocreales and two beneficial insects used to control *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleurodidae) in Mediterranean greenhouses. **Journal of Invertebrate Pathology** 108, 22-9.

Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, *et al.*, 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research** 111, 509-47.

Hsia ICC, Islam MT, Ibrahim Y, How TY, Omar D, 2014. Evaluation of conidial viability of entomopathogenic fungi as influenced by temperature and additive. **International Journal of Agriculture and Biology** 16, 146-52.

Humber RA, 2008. Evolution of entomopathogenicity in fungi. **Journal of Invertebrate Pathology** 98, 262-6.



Ignoffo C, Marston N, Hostetter D, Puttler B, Bell J, 1976. Natural and induced epizootics of *Nomuraea rileyi* in soybean caterpillars. **Journal of Invertebrate Pathology** 27, 191-8.

Irish BM, Correll JC, Morelock TE, 2002. The effect of synthetic surfactants on disease severity of white rust on Spinach. **Plant Disease** 86, 791-6.

James R, 2003. Combining azadirachtin and *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to control *Bemisia argentifolii* (Homoptera: aleyrodidae). **Journal of Economic Entomology** 96, 25-30.

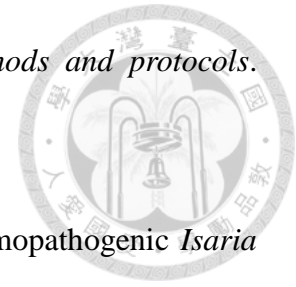
Jin X, Ugine TA, Chen J, Streett AD, 2009. Method for determining the best hydrophilic-lipophilic balance (HLB) number for a compatible non-ionic surfactant in formulation development for aerial conidia of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). **Biocontrol Science and Technology** 19, 341-7.

John EH, Naresh M, 1999. Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. **Journal of Invertebrate Pathology** 74, 261-6.

Johnson D, Sung G-H, Hywel-Jones NL, *et al.*, 2009. Systematics and evolution of the genus *Torrubiella* (Hypocreales, Ascomycota). **Mycological Research** 113, 279-89.

Kabaluk T, Goettel M, Erlandson M, Ericsson J, Duke G, Vernon B, 2005. *Metarhizium anisopliae* as a biological control for wireworms and a report of some other naturally-occurring parasites. **Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes: Melolontha IOBC/wprs Bulletin** 28, 109-15.

Keller NP, Turner G, 2012. *Fungal secondary metabolism: methods and protocols*. Humana Press.



Kim JS, Je YH, Roh JY, 2010. Production of thermotolerant entomopathogenic *Isaria fumosorosea* SFP-198 conidia in corn-corn oil mixture. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology** 37, 419-23.

Knoche M, Noga G, Lenz F, 1992. Surfactant-induced phytotoxicity: evidence for interaction with epicuticular wax fine structure. **Crop Protection** 11, 51-6.

Loong CY, Sajap AS, Noor HM, Omar D, Abood F, 2013. Effects of UV-B and solar radiation on the efficacy of *Isaria fumosorosea* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Hyphomycetes) for controlling bagworm, *Pteroma pendula* (Lepidoptera: Psychidae). **Journal of Entomology** 10, 53-65.

Luangsa-Ard JJ, Hywel-Jones NL, Samson RA, 2004. The polyphyletic nature of *Paecilomyces* sensu lato based on 18S-generated rDNA phylogeny. **Mycologia** 96, 773-80.

Machado ACR, Monteiro AC, Almeida AMBD, Martins MIEG, 2010. Production technology for entomopathogenic fungus using a biphasic culture system. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 45, 1157-63.

Mascarin GM, Alves SB, Lopes RB, 2010. Culture media selection for mass production of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa* **Brazilian Archives of Biology and Technology** 53, 753-61.

Mascarin GM, Kobori NN, Quintela ED, Arthurs SP, Júnior D, 2013. Toxicity of



non-ionic surfactants and interactions with fungal entomopathogens toward *Bemisia tabaci* biotype B. **BioControl** 59, 111-23.

Meyling NV, Eilenberg J, 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. **Biological Control** 43, 145-55.

Ming Y, Wei Q, Jin K, Xia Y, 2014. MaSnf1, a sucrose non-fermenting protein kinase gene, is involved in carbon source utilization, stress tolerance, and virulence in *Metarhizium acridum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1-12.

Quedraogo RM, Cusson M, Goettel MS, Brodeur J, 2003. Inhibition of fungal growth in thermoregulating locusts, *Locusta migratoria*, infected by the fungus *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. **Journal of Invertebrate Pathology** 82, 103-9.

Pedrini N, Crespo R, Juárez MP, 2007. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology** 146, 124-37.

Quintela ED, McCoy CW, 1997. Pathogenicity enhancement of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to first instars of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) with sublethal doses of imidacloprid. **Environmental Entomology** 26, 1173-82.

Rangel DE, Anderson AJ, Roberts DW, 2006. Growth of *Metarhizium anisopliae* on non-preferred carbon sources yields conidia with increased UV-B tolerance. **Journal of Invertebrate Pathology** 93, 127-34.

Rangel DE, Braga GU, Anderson AJ, Roberts DW, 2005. Influence of growth environment on tolerance to UV-B radiation, germination speed, and morphology of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* conidia. **Journal of Invertebrate Pathology** 90, 55-8.

Rangel DE, Fernandes EK, Anderson AJ, Roberts DW, 2012. Culture of *Metarhizium robertsii* on salicylic-acid supplemented medium induces increased conidial thermotolerance. **Fungal Biology** 116, 438-42.

Regnault-Roger C, Vincent C, Arnason JT, 2012. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. **Annual Review of Entomology** 57, 405-24.

Sahayaraj K, Namasivayam SKR, 2008. Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and by products. **African Journal of Biotechnology** 7, 1907-10.

Santos PDS, Da Silva MaQ, Monteiro AC, Gava CaT, 2012. Selection of surfactant compounds to enhance the dispersion of *Beauveria bassiana*. **Biocontrol Science and Technology** 22, 281-92.

Schinabeck MK, Ghannoum MA, 2003. Human hyalohyphomycoses: a review of human infections due to *Acremonium* spp., *Paecilomyces* spp., *Penicillium* spp., and *Scopulariopsis* spp. **Journal of Chemotherapy** 15, 5-15.

Sepro, 2012. Preferal. In. <http://www.sepro.com/default.php?page=preferal>.

Shang Y, Duan Z, Huang W, Gao Q, Wang C, 2012. Improving UV resistance and virulence of *Beauveria bassiana* by genetic engineering with an exogenous tyrosinase



gene. **Journal of Invertebrate Pathology** 109, 105-9.

Shimazu M, Takatsuka J, 2010. *Isaria javanica* (anamorphic Cordycipitaceae) isolated from gypsy moth larvae, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae), in Japan. **Applied Entomology and Zoology** 45, 497-504.

Singh M, Orsenigo JR, 1984. Phytotoxicity of nonionic surfactants to sugarcane. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** 32, 119-24.

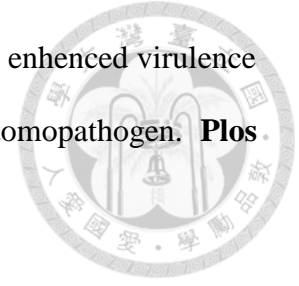
Skinner M, Gouli S, Frank CE, Parker BL, Kim JS, 2012. Management of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) with granular formulations of entomopathogenic fungi. **Biological Control** 63, 246-52.

Smith C, Edgington S, 2011. Germination at different water activities of similarly aged *Metarhizium* conidia harvested from ageing cultures. **Journal of Stored Products Research** 47, 157-60.

Solter LF, Becnel JJ, Oi DH, 2012. Chapter 7 - Microsporidian Entomopathogens. In: Kaya FEVK, ed. *Insect Pathology (Second Edition)*. San Diego: Academic Press, 221-63.

St. Leger RJ, Charnley AK, Cooper RM, 1986. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology** 48, 85-95.

St. Leger RJ, Charnley AK, Cooper RM, 1987. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 253, 221-32.



Tseng MN, Chung CL, Tzean SS, 2014. Mechanisms relevant to the enhanced virulence of a dihydroxynaphthalene-melanin metabolically engineered entomopathogen. **Plos One** 9, 1-16.

Tzean SS, Hsieh LS, Wu WJ, 1997. *Atlas of Entomopathogenic Fungi from Taiwan*. Council of Agriculture, Executive Yuan.

Ugine TA, Wraight SP, Sanderson JP, 2005. Acquisition of lethal doses of *Beauveria bassiana* conidia by western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, exposed to foliar spray residues of formulated and unformulated conidia. **Journal of Invertebrate Pathology** 90, 10-23.

Vega FE, Meyling NV, Luangsa-Ard JJ, Blackwell M, 2012. Chapter 6 - Fungal entomopathogens. In: Kaya FEVK, ed. *Insect Pathology (Second Edition)*. San Diego: Academic Press, 171-220.

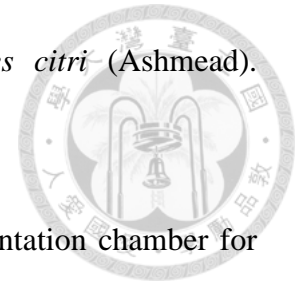
Vemmer M, Patel AV, 2013. Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. **Biological Control** 67, 380-9.

Vidal C, Fargues J, Lacey LA, 1997. Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: effect of temperature on vegetative growth. **Journal of Invertebrate Pathology** 70, 18-26.

Vilcinskas A, Götz P, 1999. Parasitic fungi and their interactions with the insect immune system. In: J.R. Baker RM, Rollinson D, eds. *Advances in Parasitology*. Academic Press, 267-313.

Wang P, Song X, Zhang H, 2013. Isolation and characterization of *Aschersonia placenta*

from citrus orchards and its pathogenicity towards *Dialeurodes citri* (Ashmead).
Journal of Invertebrate Pathology 112, 122-8.



Ye SD, Ying SH, Chen C, Feng MG, 2006. New solid-state fermentation chamber for bulk production of aerial conidia of fungal biocontrol agents on rice. **Biotechnology Letters** 28, 799-804.

Zimmermann G, 2008. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. **Biocontrol Science and Technology** 18, 865-901.

附錄 1、各培養基配方

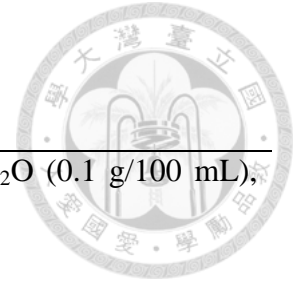


培養基名稱	配方 (in 1L ddH ₂ O)
Potato dextrose agar (PDA)	PDA powder (Difco™ & BBL™) 39 g, included potato starch (from infusion) 4.0 g, dextrose 20.0 g, agar 15.0 g
1/4 Potato dextrose agar (1/4 PDA)	9.75 g PDA powder (Difco™ & BBL™), 11.25 g agar powder
Sabouraud dextrose agar (SDA)	Mycological peptone 10 g, dextrose 40 g, agar 15 g (Sigma-Aldrich)
1/4 Sabouraud dextrose agar (1/4 SDA)	SDA powder 16.25 g (Sigma-Aldrich), agar 11.25 g
Oatmeal agar (OMA)	Oatmeal 60 g, agar 12.5 g (Difco™ & BBL™)
1/4 Oatmeal agar (OMA)	18.1 g oatmeal agar powder (Difco™ & BBL™), 9.4 g agar
Yearst potato dextrose agar (YPD)	10 g Yeast extract, 20 g peptone, 20 g dextrose (glucose), 15 g agar
1/4 Yearst potato dextrose agar (1/4 YPD)	2.5 g Yeast extract, 5 g peptone, 5 g dextrose (glucose), 15 g agar
Malt extract agar (MEA)	Maltose, technical 12.75 g, dextrin 2.75 g, glycerol 2.35 g, peptone 0.78 g, agar 15.0 g (Difco™ & BBL™)
1/4 Malt extract agar (1/4 MEA)	8.4 g malt extract agar (Difco™ & BBL™), 11.25 g agar
Czapek yeast autolysate Agar (CYA)	NaNO ₃ 3 g, yeast extract 5 g, sucrose 30 g, K ₂ HPO ₄ •H ₂ O 1.3 g, Czapek concentrate* 10 mL, agar 15 g
Corn Meal Agar with Polysorbate 80 (CMA)	Corn meal, infusion from (solids) 2 g, agar 15 g, polysorbate 80 10.0 mL (Difco™ & BBL™)

Spore suspension medium (SSM) Tween 80 0.5 g, agar 20 g

Water agar (WA) Agar 15 g

* Czapek concentrate: KCl (5 g/100 mL), MgSO₄•7H₂O (5 g/100 mL), FeSO₄•5H₂O (0.1 g/100 mL), ZnSO₄•7H₂O (0.1 g/100 mL), CuSO₄•5H₂O (0.05 g/100 mL) in 100 mL ddH₂O.



附錄 2、桃蚜、南黃薊馬的接種裝置

