

白殭菌對蔬菜田常用殺菌劑感受性之探討

蕭文鳳* 林悅強 國立嘉義農專植物保護科 嘉義市紅毛碑鹿寮里84號

摘 要

本試驗在室內進行探討八種殺菌劑對白殭菌(*Beauveria bassiana* Bals.)孢子存活與菌落生長的效應。在含不同濃度之八種供試殺菌劑的Yeast-Peptone-Dextrose中, 鋅乃浦、甲基鋅乃浦、銅滅達樂、鋅錳滅達樂、依普同、依滅列、多保鏈黴素等藥劑, 即使在提高稀釋濃度時, 白殭菌菌落生長皆完全受抑。只有在含布瑞莫的平板上可見到其生長, 但顯然地比不加藥劑的對照組慢很多。依普同、多保鏈黴素、銅滅達樂具靜菌作用, 鋅乃浦、甲基鋅乃浦、依滅列、鋅錳滅達樂具殺菌作用。各種供試殺菌劑和白殭菌孢子懸浮液, 在不同的混合時間處理後, 有程度不一的反應。依滅列-白殭菌混合組, 不論混合時間的長短, 完全無菌落出現, 顯示有抑制作用。銅滅達樂在浸潤60分鐘及120分鐘處理者並無菌落形成, 顯示已產生抑制作用。其它六種供試殺菌劑, 菌落的直徑長度皆隨培養的時間增長而增加。但隨著混合浸潤時間之增加而菌落有逐漸縮小的趨勢。

關鍵詞: 蟲生真菌, 白殭菌, 殺菌劑

前 言

在現行病蟲害防治策略中, 蟲生病原微生物因具有對人畜無害的特性而廣受矚目。其中已經商品化的有線蟲、蘇力菌、真菌及病毒(McCoy, 1990; Roberts and Hajek, 1992; Entwistle *et al.*, 1993; Kaya and Gaugler, 1993; Possee, 1993)。蟲生真菌優於蘇力菌及病毒的即是其具有穿透體皮的能力, 不需經口腔食入, 故被推薦用於刺吸式口器的害蟲(Hajek and Leger, 1994)。在地球中已分離出約700種的蟲生真菌, 有十種已

被用於蟲害防治。所以白殭菌已逐漸引起學者的注目(Hajek and Leger, 1994)。

在田間常是病蟲害同時發生, 若要個別施用藥劑防治, 則耗費時間、人力甚多, 故農民常將多種的藥劑一齊混合使用。蟲生真菌若欲用於田間防治害蟲, 端賴致病性孢子在田間的殘存及生長。許多學者已証實若在固體或液體培養基中加入殺蟲、殺菌、及除草劑等化學農藥, 發現有些商品會抑制白殭菌的生長(Urs *et al.*, 1967; Olmert and Kenneth, 1974; Tedders, 1981; Clark *et al.*, 1982; Anderson and Roberts, 1983; Saito,

1984; Gardner & Storey, 1985; Su, 1988; Anderson *et al.*, 1989)。故使用時應儘量避免和會抑制它的化學農藥混合或交互使用，否則會使白殭菌失去其防治害蟲的效果。另者來自不同地區的菌株可能對不同藥劑的感受性不同。故需針對各個品系做一篩選，以供農民使用時參考。故本文擬對由同翅目分離出的白殭菌 *Beauveria bassiana* Balt HO212) 品系為測試對象，探討其對蔬菜田常用殺菌劑的感受性，及混合後的反應，以供農民未來田間使用時參考。

材料與方法

一、供試菌株

白殭菌菌株 (*Beauveria bassiana* HO212) 係由臺灣大學植物病蟲害系曾顯雄教授提供，再接種於Yeast-Peptone-Dextrose (YPD) 培養基上；置於25°C，光週期12L:12D的生長箱培養七天後，再採收孢子。採收孢子的步驟為加無菌水於長滿白殭菌的YPD平板上以L形的玻璃棒打斷菌絲，先以200網目的絹網過濾再以滅過菌內裝一層glass wool的滴管再次過濾，再置於離心機以6000rpm轉速離心30秒後取其下層沉澱。再加入無菌水及殺菌過的0.05% Tween80。於顯微鏡下以血球計數器計數，配製成 10^7 conidia / ml懸浮液供測試。YPD瓊脂培養基的組成為0.2% 酵母菌粹取物(Difco Co.)，1% peptone(Difco Co.)，2% 葡萄糖(Hanawa Chem. Co. Japan)及瓊脂(Difco Co.)，Tween 80則購自日本Hanawa Chem.公司。

二、供試藥劑

供試藥劑計有八種殺菌劑；65% 鋅乃浦可濕性粉劑(Zineb，利台公司)，70% 甲基鋅乃浦可濕性粉劑(Propineb，好達公司)，74.1% 銅滅達樂可濕性粉劑(Matalaxyl + copper

oxychloride，惠光公司)，74.1% 鋅錳滅達樂可濕性粉劑(Matalaxyl + Mancozeb，汽巴嘉基公司)，23.7% 依普同水懸劑(Iprodione，法台公司)，21.2% 依滅列乳劑(Imazalil，德成公司)，68.8% 多保鏈黴素可濕性粉劑(Thiophenate Methyl + Streptomycin，瑞芳公司)和25% 布瑞莫乳劑(Bupirimate，卜內門公司)。

三、殺菌劑對白殭菌菌落生長影響測試

取供試各種藥劑最高濃度的10倍藥量溶於無菌去離子水當做原液，再由原液配製實驗所需的濃度。配製方法如下：測試最高濃度則為各取10ml原液加入90ml溫度為45-50°C之無菌YPD瓊脂培養基中，置於Vortex-2(Scientific Industries, USA)上以中等轉速均勻震盪後，倒成平板培養基。其它濃度則為取不同量之原液配製成所需之濃度(表一)。準備妥當後，以微量吸管吸取 $5\mu\text{l}$ 的 10^7 conidia / ml的白殭菌懸浮液滴於取已滅菌處理過(121°C、15磅，20分鐘)之直徑6mm濾紙片上(Toyo，*1)，再將其反蓋在平板中心點，完成接種。並以未加任何藥劑之YPD平板為對照組。將所有的測試平板放入25°C，光週期12L:12D的生長箱培養。自接種後每日觀察白殭菌生長情形，並記錄白殭菌菌落直徑，持續9天。在分析資料時則扣除濾紙直徑。若有不產生白殭菌菌落之處理組，則在無菌操作臺下以鑷子取出其濾紙片，移到不含任何殺菌劑之YPD平板上，逐日觀察並記錄菌落之大小，俾便確認殺菌劑對白殭菌是靜菌抑或殺菌作用。每處理有五重覆。

四、殺菌劑和白殭菌懸浮液混合之生長效應

配製各種殺菌劑—白殭菌孢子混合懸浮液時，依推薦濃度轉換，使之含鋅乃浦(1300 ppm)、甲基鋅乃浦(1400 ppm)、依普同(237 ppm)、鋅錳滅達樂(1160 ppm)、銅滅達樂(765 ppm)、布瑞莫(125 ppm)、多保鏈黴

表一 本試驗供試藥劑及測試濃度

Table 1. The concentration of fungicides tested in this study.

Pesticides	Concentrations(ppm)
Zineb	1300, 650, 325
Propineb	1400, 700, 350
Metalaxyl+copper oxychloride	3060, 1530, 765, 382.5
Metalaxyl+Mancozeb	2320, 1160, 580, 290
Iprodione	474, 237, 118.5
Imazalil	212, 106, 53
Bupirimate	500, 250, 125, 62.5
Thiophenate Methyl+Streptomycin	688, 344

素(688ppm)和依滅列(212ppm)的懸浮液。於混合後第0, 30, 60, 及120分鐘以微量吸管吸取5 μ l滴於滅菌過的直徑6mm的無菌濾紙上(Toyo, #1), 再將其反蓋在不含任何藥劑之YPD平板中央點, 爾後將所有的測試平板置於25 $^{\circ}$ C, 光週期12L:12D的生長箱培養, 並逐日觀察菌落的大小, 如此持續9天, 每處理重覆五次。以上試驗皆進行三次, 所得數據皆經過ANOVA及鄧肯氏多變域分析並作顯著性差異比較。

結 果

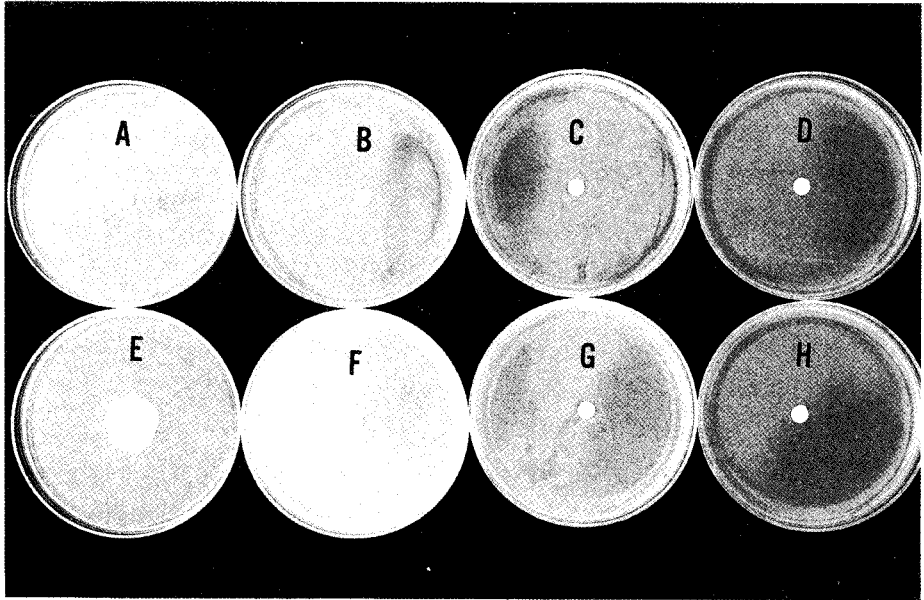
一、殺菌劑對白殭菌菌絲生長影響測試

在含有不同濃度之八種供試殺菌劑的YPD中, 只有在含布瑞莫的平板上可見到白殭菌生長(圖一), 但顯然地菌落比不加藥劑的對照組之菌落小很多(圖二)。鋅乃浦、甲基鋅乃浦、銅滅達樂、鋅錳滅達樂、依普同、依滅列、多保鏈黴素等藥劑, 即使在提高稀釋濃度時, 白殭菌菌落生長皆完全受抑。另者, 為確認此7種藥劑的效應, 本實驗將布瑞莫以外的其它處理組濾紙片移到不含藥劑的YPD平板上培養9天後, 發現依普同、多保鏈黴素、銅滅達樂組皆可長出菌落, 此數據顯示其為靜菌作用。鋅乃浦、甲基鋅乃浦、依滅列、鋅錳滅達樂均無菌落生長, 故可視為

殺菌作用。

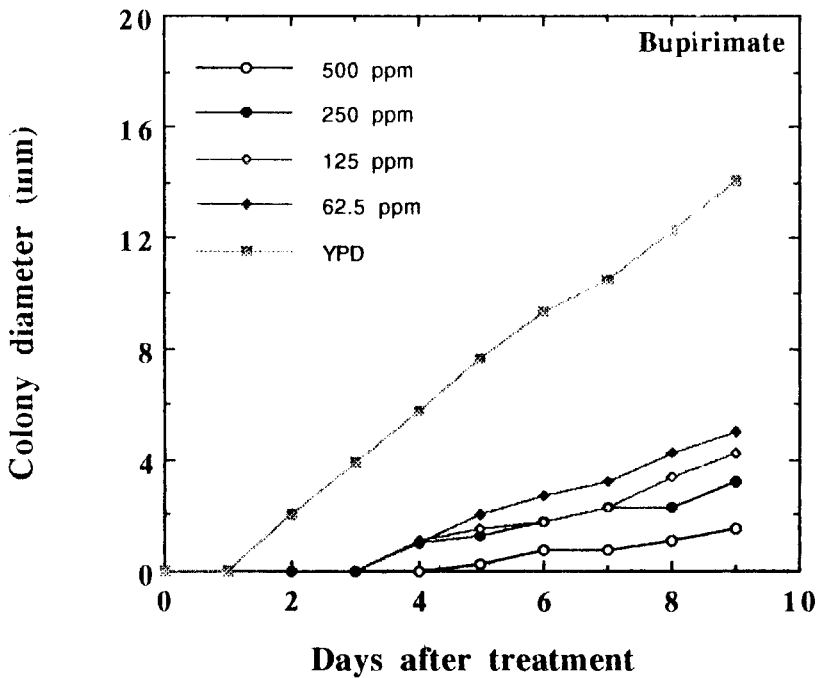
二、殺菌劑和白殭菌懸浮液混合之生長效應

各種供試殺菌劑和白殭菌孢子懸浮液在不同的浸潤時間處理後, 除依滅列藥劑組並無任何菌落生長外, 其它七種供試殺菌劑, 菌落的直徑長度在同一處理皆隨培養的時間增長而增加。但隨著混合浸潤時間之增長而菌落有逐漸縮小的趨勢。在浸潤60分鐘後, 銅滅達樂已無菌落生長(圖三)。就鋅乃浦而言, 混合浸潤120分鐘者要至第四天才有菌落出現(圖四A)。不同浸潤時間處理之菌落大小皆有顯著性差異。甲基鋅乃浦處理組浸潤60分鐘(菌落=6.5mm)和120分鐘(菌落=7.25mm)者的菌落長度皆顯著小於浸潤30分鐘處理者(菌落=10.75mm)(圖四B)。銅滅達樂在浸潤60分鐘及120分鐘處理者並無菌落形成, 顯示已產生抑制作用(圖三C)。鋅錳滅達樂不管混合浸潤的時間長短皆在第四天才有菌落出現。而浸潤60分鐘(菌落=4.375mm)及120分鐘(菌落=4.5mm)處理者約為浸潤30分鐘者(菌落=8.125mm)的一半(圖四D)。依普同處理組各浸潤時間其菌落皆有顯著性差異(圖四E)。而布瑞莫處理組浸潤60分鐘(菌落=9mm)和120分鐘(菌落=9mm)者的菌落長度皆顯著小於浸潤30分鐘處理者(菌落=12.875mm)(圖四F)。多保鏈黴素處理組浸潤60分鐘(菌落=9.375mm)和120分鐘(菌落=8mm)者



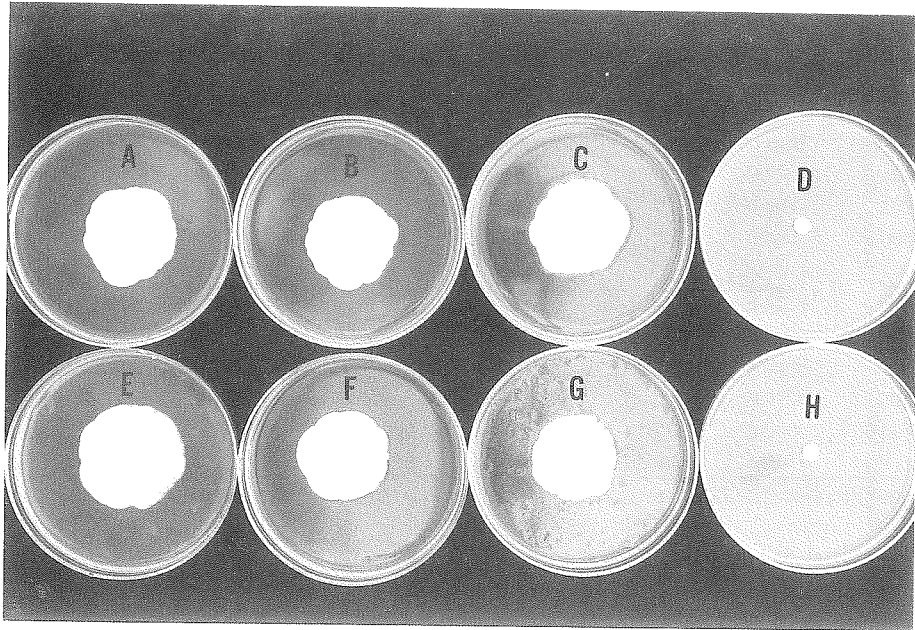
圖一 蔬菜田常用殺菌劑對白殭菌效應之測試。至第九天只有布瑞莫有菌落形成。a. 甲基鋅乃浦。b. 鋅錳滅達樂。c. 多保鏈黴素。d. 鋅乃浦。e. 布瑞莫。f. 依普同。g. 依滅列。h. 銅滅達樂。

Figure 1. The effect of fungicides (at the recommended rate) on the growth of *Beauveria bassiana*. A colony was found only on the Bupirimate-treated plate. a. Propineb; b. Metalaxyl+Mancozeb; c. Thiophenate Methyl-streptomycin; d. Zineb; e. Bupirimate; f. Iprodione; g. Imazalil; h. Metalaxyl+copper oxychloride.



圖二 含不同濃度之布瑞莫殺菌劑YPD培養基對白殭菌生長效應之測試。

Figure 2. The growth of *Beauveria bassiana* on YPD plates containing various concentration of Bupirimate.



圖三 不同殺菌劑和白殭菌孢子混合60分鐘後菌落生長狀況。a. 甲基鋅乃浦。b. 鋅乃浦。c. 多保鏈黴素。d. 銅滅達樂。e. 布瑞莫。f. 依普同。g. 鋅錳滅達樂。h. 依滅列。

Figure 3. Effect of fungicides on the development of *Beauveria bassiana* in liquid culture (mixed for 60 minutes). a. Propineb; b. Zineb; c. Thiophenate Methyl-Streptomycin; d. Metalaxyl+copper oxychloride; e. Bupirimate; f. Iprodione; g. Metalaxyl+Mancozeb; h. Imazalil.

的菌落長度皆顯著小於浸潤30分鐘處理者(菌落=12.25mm)(圖四G)。依滅列—白殭菌混合組，不論混合時間的長短，完全無菌落出現，顯示藥劑有抑制作用(圖四H)。

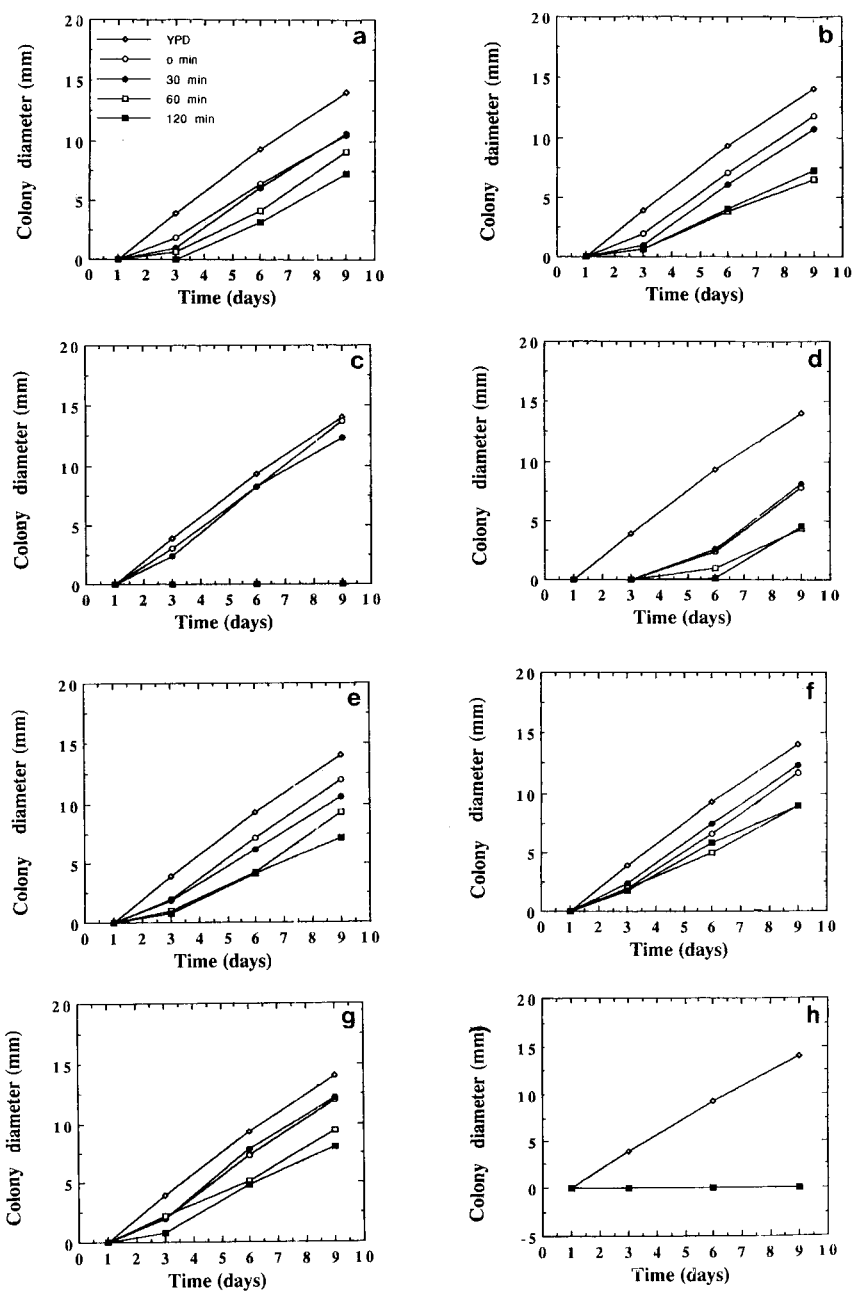
表二列出不同的混合時間內，各供試藥劑對白殭菌孢子生長影響之比較。在混合30分鐘處理組中對藥劑的容忍性排列次序為布瑞莫、銅滅達樂、多保鏈黴素>鋅乃浦、甲基鋅乃浦、依普同>鋅錳滅達樂，依滅列無菌落出現為最低(圖二)。在混合60分鐘處理組中，其排序則為鋅乃浦、依普同、布瑞莫、多保鏈黴素>甲基鋅乃浦>鋅錳滅達樂；銅滅達樂及依滅列最低並無菌落出現。在混合120分鐘處理組中，布瑞莫>多保鏈黴素>鋅乃浦、甲基鋅乃浦、依普同>鋅錳滅

達樂；銅滅達樂及依滅列處理組並無菌落生長。

討 論

本試驗將藥劑加入固體培養基會使得白殭菌孢子生長過程中一直處在藥劑的逆境下。另將白殭菌孢子浸潤在藥劑的測試則是讓白殭菌孢子短暫的接觸藥劑，後者的狀況下可能發生全部或部份的孢子死亡，但殘存的孢子一旦移到不含藥劑的YPD上，可立即回復生長。故可能白殭菌對同一種藥劑在固、液態不同的處理方式下會有二種不同的表現。

Anderson *et al.* (1989)提到殺菌劑的劑



圖四 各供試藥劑與白殭孢子懸浮液於不同混合時間下，白殭菌的生長狀況。a. 鋅乃浦。b. 甲基鋅乃浦。c. 銅滅達樂。d. 鋅錳滅達樂。e. 依普同。f. 布瑞莫。g. 多保鏈黴素。h. 依滅列。

Figure 4. The effect of fungicides on the growth of *Beauveria bassiana* when soaked for various periods. a. Zineb; b. Propineb; c. Metalaxyl+copper oxchloride; d. Metalaxyl+Mancozeb; e. Iprodione; f. Bupirimate; g. Thiophenate Methyl-Streptomycin; h. Imazalil.

表二 不同殺菌與白殭菌孢子混合對菌絲生長之影響

Table 2. The effect of conidia-fungicides mixtures on mycelial growth of *Beauveria bassiana* HO 212 (9 days).

Fungicides	The diameter of colony after various treatment periods(mm)			
	0 min	30 min	60 min	120 min
Zineb	10.500c ¹	10.625c	9.125b	7.250d
Propineb	11.750b	10.750c	6.500c	7.250d
Metalaxyl+ copper oxychloride	13.750a	12.375b	0.000e	0.000f
Metalaxyl+Mancozeb	7.750d	8.125d	4.375d	4.500e
Iprodione	12.000b	10.625c	9.250b	7.250d
Bupirimate	11.625b	12.250b	9.000b	9.000b
Thiophenate Methyl+Streptomycin	12.000b	12.250b	9.375b	8.000c
Imazalil	0.000e	0.000e	0.000e	0.000f
YPD	14.000a	14.500a	14.000a	14.200a

1). Means with the same letter in a given column indicates no significant differences (P<0.01).

型可能與孢子的抑制有關。乳劑常會抑制 *B. bassiana* 的發芽，可濕性粉劑不會抑制而是增加菌落數。依滅列及布莫瑞皆為乳劑型態，前者對白殭菌有抑制效果但後者未顯出此效應，極可能藥效成份的效應大於劑型。

本試驗中依滅列不論是加入固體培養基或浸潤方法，皆會抑制白殭菌生長。Hall (1981) 也曾指出依滅列不能和白殭菌混合。推究其因極可能是依滅列與 Benomyl 和 thia-bendazole 是相近的殺菌劑，也是系統性殺菌劑，因干擾有絲分裂及 DNA 的合成，會使孢子發芽、細胞複製及生長受抑之故 (Ware, 1991)。

滅達樂是系統性殺菌劑只對 oömycetes 有作用，故不會影響蟲生真菌孢子殘存 (Loria *et al.*, 1983)。據 Clarke *et al.* (1982) 的結果顯示在藥劑浸潤下，會輕微抑制白殭菌孢子的存活。本實驗的鋅錳滅達樂及銅滅達樂，產生中等程度的抑制效應，可能是兩者皆含有金屬離子。Ware (1991) 指出金屬離子會在真菌細胞形成 chelate，因而打斷蛋白質的合

成與代謝，故其生長會比 YPD 上培養基的慢。在固態時，銅滅達樂是靜菌，但在藥劑浸潤時，銅滅達樂在混合 60 分鐘時就顯出抑菌情形，故農民在施用時切記勿混合 30 分鐘以上，應儘快噴灑。本實驗中發現白殭菌不太受依普同處理的影響，此和 Hall (1981) 的研究結果同。

鋅乃浦和鋅錳乃浦作用在真菌細胞的氨基酸及酵素 (Ware, 1991)，對白殭菌有頗強的抑制效果 (Loria *et al.*, 1983; Saito, 1984; Su, 1988)。在本實驗中在固態培養基中顯現出強烈的殺菌作用，但在藥劑浸潤時呈中等程度的殺菌作用，極可能是部份未被殺死的白殭菌孢子移到不含藥劑的培養基上生長的結果。但在溶有藥劑的固態 YPD 培養基上，白殭菌孢子持續的接觸鋅乃浦和鋅錳乃浦之故。鋅錳滅達樂也有同樣的效應。故將來在田間施用殺菌劑時也應考量殺菌劑的殘留時間，儘可能選用殘留短的藥劑。

多保鏈黴素中的成份之一為鏈黴素會干擾蛋白質的合成。在固態培養時為靜菌，但

在藥劑浸潤時呈中等程度的殺菌作用。布瑞莫會干擾固醇(Sterol)的合成，在本實驗的菌落生長和多保鏈黴素處理組極類似。綜合本實驗結果，以多保鏈黴素、布瑞莫、依普同對白殭菌的影響較小，而依滅列則決不可和白殭菌混合使用。

參考文獻

- Anderson, T. E., and D. W. Roberts.** 1983. Compatibility of *Beauveria bassiana* isolates with insecticide formulations used in Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) control. *J. Econ. Entomol.* 76: 1437-1441.
- Anderson, T. E., A. E. Hajek, D. W. Roberts, H. K. Preisler, and J. L. Robertson.** 1989. Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae): Effect of combinations of *Beauveria bassiana* with insecticides. *J. Econ. Entomol.* 82: 89-93.
- Clark, R. A., R. A. Casagrande, and D. B. Wallace.** 1982. Influence of pesticide on *Beauveria bassiana*, a pathogen of the Colorado potato beetle. *Environ. Entomol.* 11: 67-70.
- Entwhistle, P., M. J. Bailey, J. Cory, and S. Higgs.** 1993. *Bacillus thuringiensis*: An Environmental Bio-pesticide. Wiley and Sons. New York. 374pp.
- Gardner, W. A., and G. K. Storey.** 1985. Sensitivity of *Beauveria bassiana* to selected herbicides. *J. Econ. Entomol.* 78: 1275-1278.
- Hajek, A. E., and R. J. St. Leger.** 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 293-322.
- Hall, R. A.** 1981. Laboratory studies on the effects of fungicides and acaricides and insecticides on the entomopathogenic fungus, *Verticillium lecanii*. *Entomol. Exp. Appl.* 29: 39-48.
- Kaya, H. K., and R. Gaugler.** 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annu. Rev. Entomol.* 38: 181-206.
- Loria, R., S. Galaini, and D. W. Roberts.** 1983. Survival of inoculum of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* as influenced by fungicides. *Environ. Entomol.* 12: 1724-1726.
- McCoy, C. W.** 1990. Entomopathogenous fungi as microbial pesticides. pp. 115-138. *in*: R. R. Baker, P. E. Dunn, eds. *New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases*. Liss. New York.
- Olmert, I., and R. G. Kenneth.** 1974. Sensitivity of the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii*, and *Verticillium* sp. to fungicides and insecticides. *Environ. Entomol.* 3: 33-38.
- Possee, R. D.** 1993. Viral approaches for insect control. pp. 113-128. *in*: L. Kim, ed. *Advanced Engineering Pesticides*. Dekker Inc. New York. 430 pp.
- Roberts, D. W., and A. E. Hajek.** 1992. Entomopathogenic fungi as bioinsecticides. pp. 141-159. *in*: G. F.

- Leatham ed. *Frontiers in Industrial Mycology*. Chapman & Hall. New York.
- Saito, T.** 1984. Effect of pesticides on conidial germination and hyphal growth of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *J. Appl. Zool.* 28: 87-89.
- Su, C. Y.** 1988. The effect of certain pesticides on *Beauveria bassiana*. *Chinese J. Entomol.* 8: 157-160.
- Tedders, W. L.** 1981. In vitro inhibition of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* by six fungicides used in pecan culture. *Environ. Entomol.* 10: 346-349.
- Urs, N. R., H. C. Govindu, and K. S. S. Shastry.** 1967. The effect of certain insecticides on the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *J. Invert. Pathol.* 9: 398-403.
- Ware, G. W.** 1991. *Fundamentals of Pesticides*. 3rd ed. Fresno: Thompson Pub. California, U.S.A. 307pp.

收件日期：1995年10月3日

接受日期：1995年11月20日

Effects of Fungicides on the Entomopathogenic Fungus, *Beauveria Bassiana* Bals.

Wen-Feng Hsiao* and Yueh-Chiang Lin Department of Plant Protection, National Chiayi Institute of Agriculture, Chiayi, Taiwan 60083, R.O.C.

ABSTRACT

Eight fungicides commonly used in vegetables fields were evaluated in vitro for their effect on survival and growth of *Beauveria bassiana* Bals(Bb). Zineb, Iprodione, Metalaxyl+Mancozeb(MMC), Metalaxyl+copper oxychloride (MCO), Thiophenate methyl+Streptomycin(TMS), Propineb and Imazalil were detrimental to *B. bassiana* at the tested concentrations. Bupirimate exerted the least inhibition effect on the fungus yet it still showed slower growth than the fungus grown on the YPD plate. Zineb, Propineb, MMC, and Imazalil were fungicidal while Iprodione, MCO, TMS were fungistatic. Imazalil showed complete inhibition of Bb in liquid culture irrespective of the length of incorporating time. No colony was formed when Bb-MCO was mixed for 60 minutes or more. The colony sizes of the remaining of Bb-fungicide mixtures increased over time. However, Bb colony size decreased with increasing time of mixing.

Key Words: Entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* Bals., fungicides.