



Formosan Entomologist

Journal Homepage: entsocjournal.yabee.com.tw

Biological Characteristics of the Entomopathogenic Fungus, *Nomuraea viridulus* 【Research report】

蟲生真菌 *Nomuraea viridulus* 之生物學探討 【研究報告】

Hsin-Yi Peng, Chiao-Chih Chien, and Wen-Feng Hsiao*

彭馨儀、簡巧治、蕭文鳳*

*通訊作者E-mail: wfhsiao@mail.ncyu.edu.tw

Received: 2009/12/04 Accepted: 2010/04/28 Available online: 2010/06/01

Abstract

This study investigated the biological characteristics of entomopathogenic fungus, *Nomuraea viridulus*. The mycelial growth of *N. viridulus* range from 15 to 35°C and the optimum temperature for sporulation and germination was found at 25°C. The optimum growth of this fungus was when it was cultured on SMA+Y medium; at pH 7, with maltose as the carbon source, and peptone as the nitrogen source, respectively. Hydrolyte enzymes such as protease, lipase, chitinase and amylase, were present when tested with a specific culture media at 25°C. However, the activities of lipase (C14), trypsin, chymotrypsin, β -glucuronidase, α -glucosidase and α -fucosidase were not detected using the API ZYM assay. *Nomuraea viridulus* did not grow on media containing fungicides such as 50% benomyl WP, 22.7% dithianon SC, 50% prochloraz Mn WP or 65% Dodine WP, or those containing insecticides such as 85% carbaryl WP or 50% cartap WP. However, when inoculated with more than 2×10^6 conidia/mL, the fungus appeared on media containing the insecticides, e.g., 2% abamectin EC, 40.64% carbofuran SC, 2.8% cyhalothrin EC, 40% carbosulfan WP or 44% dimethoate EC, at 12 days after inoculation. When cultured on media containing 90% methomyl WP, 9.6% imidacloprid SL, 4.95% fipronil FP, or 99% narrow range oil EC resulted in a poor production of conidia. Only one cicada, *Cryptotympana atrata*, among 11 insects assayed was infected with *N. viridulus* causing ca. 25% mortality, indicating that *N. viridulus* has a narrow host range.

摘要

本論文探討一種蟲生真菌 *Nomuraea viridulus* 之生物特性。本菌在溫度 15 ~ 35°C 範圍內皆可生長。最適生長條件為 25°C 下以 SMA+Y (Sabouraud's maltose agar with yeast extract) 培養基培養。其產孢量及發芽率為最高。液體震盪培養以 pH 7 其菌絲乾重為最重。碳源中以麥芽糖 (maltose) 其產孢量為最高。氮源以蛋白胨 (peptone) 其產孢量為最高。於 25°C 下培養可同時產生蛋白酶 (protease)、脂解酶 (lipase)、幾丁質酶 (chitinase) 及澱粉酶 (amylase) 等酵素；另以 API ZYM 系統檢測胞外酵素活性。結果顯示並未偵測到脂肪分解酶 (lipase (C14))、胰蛋白酶 (trypsin)、胰凝乳蛋白酶 (chymotrypsin)、 β -葡萄糖苷酸酶 (β -glucuronidase)、 α -葡萄糖苷酶 (α -glucosidase) 及 α -岩藻糖苷酶 (α -fucosidase)。其他 13 種酶皆有活性呈現。表示本菌能分泌多種不同的胞外酵素。本菌經殺蟲劑及殺菌劑處理 18 天後。結果顯示殺菌劑免賴得 (benomyl) 50% WP、腈硫醌 (dithianon) 22.7% SC、撲克拉錳 (prochloraz Mn) 50% WP 及多寧 (dodine) 65% WP 皆會抑制其生長；十一種殺蟲劑中僅加保利 (carbaryl) 85% WP 與培丹 (cartap) 50% WP 其毒性極強會抑制本菌生長。納乃得 (methomyl) 90% WP、益達胺 (imidacloprid) 9.6% SL、芬普尼 (fipronil) 4.95% FP 及窄域油 (narrow range oil) 99% EC 則會降低產孢量。阿巴汀 (abamectin) 2% EC、加保扶 (carbofuran) 40.64% SC、賽洛寧 (cyhalothrin) 2.8% EC、丁基加保扶 (carbosulfan) 40% WP 及大滅松 (dimethoate) 44% EC 等殺蟲劑加入仍有 2×10^6 conidia/mL 以上產孢量。以十一種昆蟲測試致病性之結果顯示僅有紅脈熊蟬 (*Cryptotympana atrata*) 以爬行於真菌固體培養基的方式接種才受感染。感染率 25%。顯示本菌的寄主範圍相當狹小。

Key words: *Nomuraea viridulus*, enzymes, insecticides, fungicides

關鍵詞: *Nomuraea viridulus*、酵素、殺蟲劑、殺菌劑。

Full Text: [PDF \(1.69 MB\)](#)

下載其它卷期全文 Browse all articles in archive: <http://entsocjournal.yabee.com.tw>

蟲生真菌 *Nomuraea viridulus* 之生物學探討

彭馨儀、簡巧治、蕭文鳳*

國立嘉義大學生物資源學系 60004 嘉義市學府路 300 號

摘要

本論文探討一種蟲生真菌 *Nomuraea viridulus* 之生物特性，本菌在溫度 15~35°C 範圍內皆可生長，最適生長條件為 25°C 下以 SMA+Y (Sabouraud's maltose agar with yeast extract) 培養基培養，其產孢量及發芽率為最高，液體震盪培養以 pH 7 其菌絲乾重為最重，碳素源中以麥芽糖 (maltose) 其產孢量為最高、氮素源以蛋白胨 (peptone) 其產孢量為最高。於 25°C 下培養可同時產生蛋白酶 (protease)、脂解酶 (lipase)、幾丁質酶 (chitinase) 及澱粉酶 (amylase) 等酵素；另以 API ZYM 系統檢測胞外酵素活性，結果顯示並未偵測到脂肪分解酶 (lipase (C14))、胰蛋白酶 (trypsin)、胰凝乳蛋白酶 (chymotrypsin)、 β -葡萄糖苷酸酶 (β -glucuronidase)、 α -葡萄糖苷酶 (α -glucosidase) 及 α -岩藻糖苷酶 (α -fucosidase)，其他 13 種酶皆有活性呈現，表示本菌能分泌多種不同的胞外酵素。本菌經殺蟲劑及殺菌劑處理 18 天後，結果顯示殺菌劑免賴得 (benomyl) 50% WP、腈硫醌 (dithianon) 22.7% SC、撲克拉錳 (prochloraz Mn) 50% WP 及多寧 (dodine) 65% WP 皆會抑制其生長；十一種殺蟲劑中僅加保利 (carbaryl) 85% WP 與培丹 (cartap) 50% WP 其毒性極強會抑制本菌生長，納乃得 (methomyl) 90% WP、益達胺 (imidacloprid) 9.6% SL、芬普尼 (fipronil) 4.95% FP 及窄域油 (narrow range oil) 99% EC 則會降低產孢量，阿巴汀 (abamectin) 2% EC、加保扶 (carbofuran) 40.64% SC、賽洛寧 (cyhalothrin) 2.8% EC、丁基加保扶 (carbosulfan) 40% WP 及大滅松 (dimethoate) 44% EC 等殺蟲劑加入仍有 2×10^6 conidia/mL 以上產孢量。以十一種昆蟲測試致病性之結果顯示僅有紅脈熊蟬 (*Cryptotympana atrata*) 以爬行於真菌固體培養基的方式接種才受感染，感染率 25%，顯示本菌的寄主範圍相當狹小。

關鍵詞：*Nomuraea viridulus*、酵素、殺蟲劑、殺菌劑。

*論文聯繫人

Corresponding email: wfhsiao@mail.ncyu.edu.tw

Nomuraea viridulus 該病原微生物屬於一種蟲生真菌。最早於 1992 年 Tzean *et al.* 自熊蟬 (*Cryptotympana facialis*) 上所發現，經分離鑑定後確認為新種，將其命名為 *N. viridulus*。該蟲生病原菌落呈淺綠色至深綠色，分生孢子為長橢圓柱形，大小約為 14.4~19.4 × 3.8~4.4 μm，梗基約為 11.7~31.6 × 2.6~3.8 μm，瓶梗約為 5.3~9.2 × 3.3~4.6 μm (Tzean *et al.*, 1992)。目前該蟲生病原所知寄主種類為半翅目 (Hemiptera) 的蟬科 (Cicadidae)，關於經濟重要性研究不多。以紅脈熊蟬 (*Cryptotympana atrata*) 為例，雌成蟲常產卵於枝條髓心部分，產卵部位以上的枝條很快萎凋，若蟲孵化後即入土中，吸食植物根系養分，當數量過多時，往往會對植物造成傷害 (Yang *et al.*, 2001)。Li *et al.* (2007) 指出紅脈熊蟬能危害柳樹、楊樹、榆樹、桑樹、棟樹、桃樹、櫻樹、梨樹、蘋果樹等 41 科 77 屬 144 種植物；雌成蟲在枝梢上連續刺穴產卵，成不規則螺旋狀排列，使枝梢皮下木質部成斜口狀裂口，造成上部枝條乾枯，苗木受到危害。

Tang (1997) 指出同屬之綠殭菌 (*N. rileyi*) 能自然發生於 30 多種鱗翅目害蟲上，對夜蛾科害蟲的致病力特別強，並且對於低齡期害蟲致死率更高 (Ignoffo *et al.*, 1982)。Boucias *et al.* (1984) 指出 *Nomuraea* spp. 孢子之發芽需有昆蟲表皮抽出物來誘發，在孢子發芽時會膨大，並在外圍產生外鞘，大部分學者認為此外鞘可幫助菌體進入寄主，因而外鞘之有無與致病品系之判定有關。本實驗將所分離 *N. viridulus* 之菌株進行營養生理試驗，並測試其寄主範圍，以達建立該蟲生病原基礎生物學之研究。

一、供試 *Nomuraea viridulus* 之調查及該病徵之描述

為確認本菌是否僅在夏季及近水源區內出現，故於嘉義市地區設定 5 個樣點，自 2006 年 7 月至 2007 年 6 月每月於同一樣點連續觀察 5 日。樣點分別為嘉義市市區兩處 (GPS: 23.4891, N, 120.4618, E; 23.4827, N, 120.4642, E) 及蘭潭地區三處 (GPS: 23.4794, N, 120.4891, E; 23.2818, N, 120.4891, E; 23.4688, N, 120.4764, E)，採回罹病之紅脈熊蟬 (*C. atrata*) 成蟲，攜回室內將罹病病徵加以拍照。爾後再切取罹病昆蟲體表 0.25 cm²，樣本經前處理後置於掃描式電子顯微鏡 (SEM) 下觀察拍攝。

二、供試菌株之分離及製備

1. 真菌之分離及培養

將罹病蟲體切取 4~5 mm 大小塊狀，經組織分離處理後，單塊分別接種在 SMA+Y (Bell, 1975) 固體培養基 (Sabouraud's maltose agar + yeast extract, neopeptone 10 g, maltose 20 g, yeast extract 2 g, agar 15 g, distilled water 1000 mL)，放入 25°C 恆溫生長箱內 (12L:12D) 培養，待真菌產孢後，部分回接於塗抹 SMA+Y 培養基之載玻片上，在顯微鏡下觀察菌株形態。另將孢子接種於 SMA+Y 斜面培養基 (15 cm) 進行純粹培養，在斜面培養基內長出的分生孢子即視為 F₁ 世代之真菌，供後續實驗用。本菌菌絲體之培養係採用 PDB+Y 液體培養基，每公升 (1 L) 成分包含 potato starch 4 g、dextrose 20 g 和 yeast extract 2 g。

2. 孢子懸浮液之配製

將 *N. viridulus* 接種於 SMA+Y 固體

培養基上，置於 25°C 恆溫生長箱中培養 12 天，再以含 0.05% Tween 80 之無菌水溶液 5 mL 加於平板上，自固態培養基上洗下分生孢子，並利用石英棉 (quartz wool, Tosoh, Japan) 濾去菌絲，即可得到孢子懸浮液，利用血球計數器 (hemacytometer, Marienfeld, Germany) 計算孢子濃度，分裝 1×10^7 、 1×10^6 及 1×10^5 conidia/mL 孢子懸浮液 1 mL 於 1.5 mL 離心管內，作為原始菌種，保存於 -20°C 冰箱內備用。

三、蟲生真菌之生理特性測試

1. 孢子發芽過程之觀察

孢子發芽之認定，首先吸取 0.5 mL 已滅菌之 2% 洋菜培養基 (water agar, BD, USA)，滴於載玻片上塗抹一層；接著吸取 0.2 mL 之 1×10^6 conidia/mL 孢子懸浮液滴至上述之載玻片上，並以 L 型玻棒推抹均勻，爾後移到內置有 V 型玻棒的培養皿內，置於 25°C 恆溫生長箱中，於第 6、12、18、24 及 48 小時觀察孢子發芽之過程，當發芽管長度至少超過孢子之兩倍寬，即視為發芽。

2. 不同培養溫度對 *N. viridulus* 分生孢子發芽之影響

依上述之結果進行下列實驗，將分生孢子分別置於 15、20、25、30 及 35°C 恆溫生長箱中，分別於第 12、24、36 及 48 小時取出，以 50 μ L 乳酸酚棉藍染液 (lactophenol blue solution, Fluka, France) 固定，再以光學顯微鏡 (Zeiss Axioskop 50, Germany) 觀察計算發芽之分生孢子數量，每處理以 300 個孢子為一重複，計三重複。

3. 溫度對 *N. viridulus* 生長及產孢量之影響

取 1×10^6 conidia/mL 濃度之分生孢子懸浮液，每皿接種 5 μ L 於 SMA+Y 培養基中，分別置於 15、20、25、30 及 35°C 恆溫

生長箱中 (12L : 12D)，進行兩組實驗，一為自第 4 天後開始測定至第 14 天每日各菌落直徑及產孢量，產孢量以每 mL 之分生孢子量計算之，每處理四重複，以確定定溫下供試菌株之生長曲線，因第十二天後產孢量急劇下降，故進行第二組實驗，測定第 6 天及第 12 天各菌落之直徑及產孢量。

4. 碳素源對 *N. viridulus* 生長及產孢量之影響

以 Czapek's agar 為基礎培養基，各添加 3% 之葡萄糖 (glucose, Riedel-deHaën, Hungary)、麥芽糖 (maltose, Sigma, Japan)、蔗糖 (sucrose, Riedel-deHaën, Hungary)、半乳糖 (galactose, Sigma, Japan)、乳糖 (lactose, Fluka, Netherlands)、果糖 (fructose, Riedel-deHaën, Hungary)、澱粉 (starch, Riedel-deHaën, Hungary) 等七種不同供試碳素源，並以不含碳素者為對照組，分別經高壓滅菌後，每皿接種 5 μ L 的 1×10^6 conidia/mL 於滅菌之濾紙小圓片，再反蓋於培養基平板中央，置於 25°C 恆溫生長箱中 (12L : 12D)，每處理四重複。於培養第 6 及第 12 天後，分別測量各菌落直徑及產孢量，試驗結果以 SPSS 軟體之 Tukey's test (Honestly Significant Difference, HSD) 及變方分析 (ANOVA) 比較各處理在 5% 顯著水準下之差異 (SPSS 12)。

5. 氮素源對 *N. viridulus* 生長及產孢量之影響

以 Czapek's agar 為基礎培養基，各添加 3% 之硝酸鈉 (NaNO₃, Riedel-deHaën, Hungary)、硝酸胺 (NH₄NO₃, Riedel-deHaën, Hungary)、硫酸銨 ((NH₄)₂SO₄, J. T. Baker, USA)、蛋白胨 (peptone, BD, USA)、天門冬素 (asparagines, Sigma, Japan)、尿素 (urea, J. T. Baker, USA) 等六

種不同供試氮素源，以不含氮素者為對照組，其試驗方式同上述碳素源。

6. 酸鹼值對 *N. viridulus* 生長之影響

以 1N-NaOH 及 1N-HCl 調整基礎培養基 (SMB+Y) 的酸鹼度，利用酸鹼度測定器 (Mettler Toledo MP220, France) 測定，所測試之 pH 值範圍為 4~10。以 250 mL 錐形瓶內有 100 mL 培養基，接種 1 mL 濃度 1×10^6 conidia/mL，於室溫下振盪培養 12 天後，以 9 cm (Whatman No.1) 濾紙過濾後取出菌絲，放入 90°C 烘箱 1 天烘乾，以微量電子天平秤取各處理菌絲乾重 (Mettler AT261, Switzerland) 量後，每處理四重複，並依上述方法加以分析比較。

7. 不同培養基對 *N. viridulus* 生長及產孢量之影響

以下列九種培養基作為供試基質，經高壓滅菌後製成平板，將製備好之孢子懸浮液 1×10^6 conidia/mL，每皿接種 5 μ L，置於 25°C 恆溫箱中 (12L : 12D)，每處理四重複，測定第 16 天各菌落直徑及產孢量，以變方分析 (ANOVA) 及 Tukey's test (HSD) 分析比較數據。

培養基有玉米粉瓊脂 (CMA, yellow cornmeal 40 g; agar 20 g; dist. H₂O 1000 mL)、牛肉汁瓊脂 (BEA, beef extract 25 g; agar 20 g; dis. H₂O 1000 mL)、麥芽萃取物瓊脂 (MEA, malt extract 50 g; agar 20 g; dist. H₂O 1000 mL)、Czapek's 氏培養基 (Cz-Dox, NaNO₃ 3 g; K₂HPO₄ 1 g; MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g; KCl 0.5 g; FeSO₄ · 7H₂O 0.1 g; sucrose 30 g; agar 20 g; dis. H₂O 1000 mL)、蛋白胰葡萄糖瓊脂 (PDA, glucose 10 g; peptone 10 g; Na₂HPO₄ · 12H₂O 0.96 g; KH₂PO₄ 1.45 g; agar 20 g; dist. H₂O 1000 mL)、V-8 果汁瓊脂 (V8A, V-8 juice 200 mL;

CaCO₃ 3 g; agar 20 g; dist. H₂O 1000 mL)、酵母葡萄糖瓊脂 (YEGA, yeast extract 3 g; glucose 10 g; K₂HPO₄ 2 g; MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g; agar 20 g; dist. H₂O 1000 mL)、薩氏葡萄糖瓊脂 (SDA, enzymatic digest of casein 10 g; dextrose 40 g; agar 15 g; dist. H₂O 1000 mL)、薩氏葡萄糖瓊脂 + 酵母萃取物 (SMA+Y, neopeptone 10 g; maltose 20 g; yeast extract 2 g; agar 15 g; dist. H₂O 1000 mL)。

8. 相對濕度對 *N. viridulus* 之分生孢子發芽之影響

依 Tang (1997) 之方法取用下列鹽類 Na₂HPO₄ · 12H₂O (Hanawa, Japan)、KNO₃ (Hanawa, Japan)、KCl (Hanawa, Japan)、(NH₄)₂SO₄ (J. T. Baker, USA) 及 NaCl (Hanawa, Japan) 配成各種飽和溶液，使之在固定空間內產生不同之相對濕度 (Na₂HPO₄ · 12H₂O: 95%, KNO₃: 92%, KCl: 85%, (NH₄)₂SO₄: 80%, NaCl: 75%)，以 H₂O 配置 100% 相對溼度。將飽和溶液振盪，分注 20 mL 於放置有 V 型玻棒之培養皿 (直徑 9 cm) 中，以支撐載玻片，載玻片上已塗有濃度 1×10^6 conidia/mL 之孢子懸浮液，靜置待其風乾後，置於 25°C 恆溫生長箱中進行培養 24 及 48 小時後，取出逢機計算孢子發芽百分率，每重複計算 300 個孢子之發芽率，共三重複。

9. 與侵染相關之胞外酵素檢測

根據 Hankin and Anagnostakis (1975) 方法配置培養基以檢測本菌之蛋白質分解酵素、幾丁質分解酵素、脂質分解酵素及澱粉質分解酵素之活性。切取自培養五天之菌落邊緣的菌絲圓片為接種源，接種於於 Difco nutrient agar (以下簡稱 NA) 中；接種後之培養皿置於 20、25、30 及 35°C 恆溫生長箱

中，無光照培養。

a. 蛋白質分解酵素 (protease)

於 NA 中加入 0.4% 明膠 (gelatin) 作為供試培養基，置於 20、25、30 及 35°C 恆溫生長箱中培養，接種七天後，每皿加入 5% sulphosalicylic acid 溶液 15 mL 浸置 2 分鐘，使培養基呈現混濁後，觀察菌落周圍有無透明環產生，若出現透明環則表示有蛋白酶之活性，並紀錄透明環之半徑及菌落半徑，每處理四重複。

b. 幾丁質分解酵素 (chitinase)

取純化之 chitin (Sigma) 經研鉢研磨至粉末狀後，作為待測幾丁質之來源；於營養培養基 (NA) 中加入 chitin 使濃度成為 2.4% (w/v) 之培養基。供試培養基之製作為事先於直徑 9 cm 培養皿中倒入 2% water agar 待冷卻凝固後，再於上層添加 1 mL 上述之幾丁質測試培養基。待測培養基凝固後，接種含菌絲之圓片，置於 20、25、30 及 35°C 恆溫生長箱中進行黑暗培養，接種七天後觀察菌落周圍是否具有澄清環出現，以確認幾丁分解酵素之活性，每處理四重複。

c. 脂質分解酵素 (lipase)

供試培養基之製備成分為蛋白胨 (peptone) 10 g、氯化鈉 (NaCl) 5 g、氯化鈣 (CaCl₂ · 2H₂O) 0.6 g、洋菜粉 (agar) 20 g 及蒸餾水 (distilled water) 1000 mL。供試培養基滅菌後加入 0.05% Tween 80 製成平板，置於 20、25、30 及 35°C 恆溫箱中培養，接種七天後觀察並記錄菌落周圍是否有沉澱物之產生，每處理四重複。

d. 澱粉質分解酵素 (amylase)

供試培養基為 NA 培養基加上 0.2% 水溶性澱粉 (soluble starch)，滅菌後製作成平板，挑取含菌絲之圓片移植於供試培養基後，置於 20、25、30 及 35°C 恆溫箱內培養，

接種七天後，每皿加入 1% 碘溶液使培養基呈現紫色色澤以顯現菌落周圍透明環之呈現與否，紀錄透明環之半徑及菌落半徑，每處理四重複。

e. API-ZYM 系統測試

根據 St. Leger *et al.* (1986) 及 Hsiao (1998) 之方法，利用 API ZYM 系統 (API Laboratory Ltd, Quebec, Canada) 快速檢測出真菌產生不同胞外酵素之種類及活性；欲比較 *N. viridulus* 在不同培養方式下，所產生之酵素活性的差異性，故將供試菌株以 SMA+Y 培養基與添加打碎之蟬蛻使濃度成為 1.0% (w/v) 之 SMA+Y 培養基培養七天，及糙米太空包培養 15 天，皆置於 25°C 恆溫生長箱內培養，以含 0.05% Tween 80 無菌水洗下孢子，配製成 1 × 10⁶ conidia/mL 孢子懸浮液。在測試前先讓 API ZYM kit 成為 moisten chamber，再以微量滴管吸取 100 μL 的孢子懸浮液，滴入每個測試孔中，蓋上塑膠蓋，並以石蠟膜封住周圍邊緣，置於 25°C 恆溫生長箱中，培養 12、24 小時、3 天及 5 天後，在每個測試孔中分別滴入 0.005 μL 之 ZYM A 與 ZYM B 試劑，經五分鐘反應後，藉由產生的顏色深淺分為五個等級，並與 API ZYM kit 標準比色表加以比較，進行評比其活性級數，五為顏色最深之強度反應，其餘反應為 4 > 3 > 2 > 1，級數越高表示其酵素活性越高。

10. 農業藥劑對供試菌株之影響

測試的農業藥劑包括殺菌劑 (fungicides)：免賴得 (benomyl) 50% WP、腈硫醯 (dithianon) 22.7% SC、撲克拉錳 (prochloraz Mn) 50% WP、多寧 (dodine) 65% WP；殺蟲劑 (insecticides)：阿巴汀 (abamectin) 2% EC、加保扶 (carbofuran) 40.64% SC、賽洛寧 (cyhalothrin) 2.8%

EC、加保利 (carbaryl) 85% WP、培丹 (cartap) 50% WP、納乃得 (methomyl) 90% WP、丁基加保扶 (carbosulfan) 40% WP、益達胺 (imidacloprid) 9.6% SL、大滅松 (dimethoate) 44% EC、芬普尼 (fipronil) 4.95% FP及窄域油 (narrow range oil) 99% EC。測試濃度為植物保護手冊上推薦之最高使用濃度，製備時以 SMA+Y 為培養基，各藥劑皆於培養基滅菌後降溫至約 45°C 時加入 (每皿加入 5 mL)，混合均勻後製成固態平板培養基，對照組則不添加任何藥劑。每皿接種 5 μ L 1×10^6 conidia/mL 之平板置於 25°C 恆溫生長箱中 (12L:12D)，測定第 6、12 及第 18 天各菌落直徑及產孢量，與對照組比較，每處理四重複，並以變方分析 (ANOVA) 及 Tukey 法分析比較數據，以評估各藥劑對本菌之影響。

四、*N. viridulus* 之寄主範圍檢定

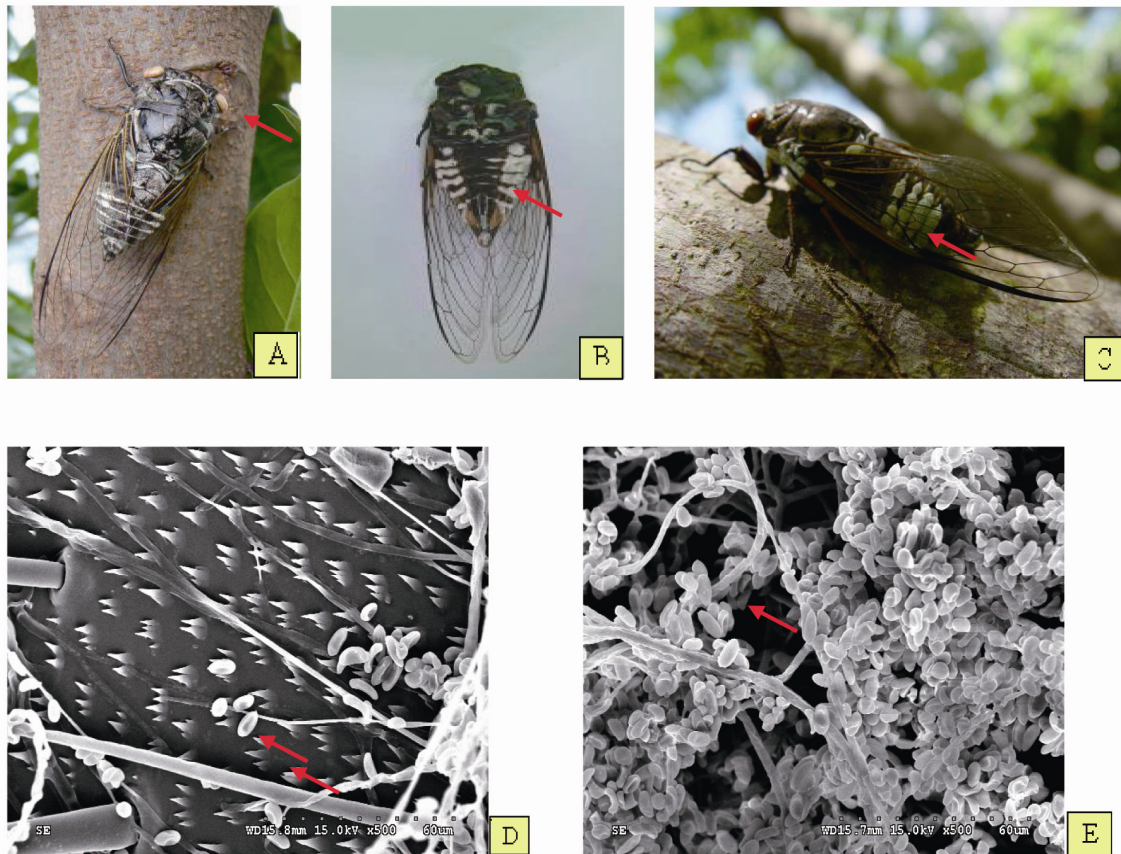
1. 供試昆蟲

選用五種鱗翅目幼蟲、四種半翅目及兩種鞘翅目為本菌生物檢定之供試昆蟲。家蠶 (*Bombyx mori*) 購自於泉明生態教育蠶業農場，以新鮮桑葉餵食，飼養一代後再進行試驗；大蠟蛾 (*Galleria mellonella*) 取自於農業藥物毒物試驗所，以人工飼料 (甘油 150 mL、蜂蜜 150 mL、桂格麥粉 200 g、全脂奶粉 100 g) 餵食，飼養一代後再進行試驗；偽菜蚜 (*Lipaphis erysimi*) 及桃蚜 (*Myzus persicae*) 採自於不施藥之蘿蔔盆栽植株上，分別用毛筆將偽菜蚜及桃蚜挑至蘿蔔植株飼養，定期更新蘿蔔植株作為食物之來源，並放置於 10L:14D 之光照恆溫生長箱下，飼養一代後再進行試驗；斜紋夜蛾 (*Spodoptera litura*)、大菜螟 (*Crocidalomia binotalis*) 及小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 取自於嘉義縣

水上鄉國姓村近郊高麗菜田採得卵塊或蛹，攜回實驗室飼育，將卵塊置於 25°C 恆溫生長箱 (12 L:12D)，幼蟲以高麗菜餵食，飼養一代再取其幼蟲進行試驗；紋白蝶 (*Pieris rapae crucivora*) 及台灣黃毒蛾 (*Porthesia taiwana Shiraki*) 採自於嘉義大學栽種之盆栽高麗菜葉片上之幼蟲，同樣以高麗菜葉餵食，飼養一代後再進行試驗；紅脈熊蟬 (*Cryptotympana atrata*)、黑翅蟬 (*Huechys sanguinea*) 採集自嘉義市蘭潭環潭公路旁行道樹；米象 (*Sitophilus oryzae*) 成蟲取自於市售中興米米袋中，以米粒飼養一代後供試；甘藷蟻象 (*Cylas formicarius*) 成蟲取自市售受危害之新鮮甘藷塊，以甘藷塊根飼養一代後供試。

2. 供試 *N. viridulus* 之製備與接種方式

N. viridulus 於 SMA+Y 平板培養基中培養 12 天後，將含 0.05% Tween 80 之無菌水配製成 1×10^7 conidia/mL 孢子懸浮液為接種源備用。接種方式以 (1) 噴佈法：將供試菌株以 10^7 conidia/mL 孢子懸浮液利用噴藥塔 (Potter spray tower, Burkard, England)，以 10 lb/in² 壓力進行噴佈均勻接種於寄主昆蟲體上；(2) 爬行法：將 *N. viridulus* 於 SMA+Y 平板培養基中培養 12 天後，讓寄主昆蟲於培養基上爬行 5 分鐘，使分生孢子沾附於寄主昆蟲體壁上；(3) 浸潤法：將幼蟲或成蟲浸入振盪均勻的懸浮液中，經十秒後陰乾；(4) 蟲體注射法：注射前先以 70% 酒精輕拭四齡幼蟲的第六對氣孔行表面殺菌後，以微量注射器 (Hamilton, USA) 注射 20 μ L 的 10^7 conidia/mL 孢子懸浮液於昆蟲血腔體內，另以注射無菌水作為對照組。每一處理 20 隻幼蟲，各三重複及一組對照組；紅脈熊蟬及黑翅蟬以一隻為一重複，每處理為 10 重複。所有處理於接種後皆



圖一 被感染之紅脈熊蟬及體表之真菌。A、罹病紅脈熊蟬背部節間膜產生菌絲，其複眼由黑色轉變成橘色；B、罹病紅脈熊蟬頸部節間膜和足基部被菌絲包覆；C、罹病紅脈熊蟬側面；D、*Nomuraea viridulus* 的孢子及菌絲體 SEM 照片 (500 倍)；E、蟲體密佈菌絲體和孢子的 SEM 照片 (500 倍)。

Fig. 1. Infected *Cryptotympana atrata* with fungus on insect cuticle. A. dorsal view of infected *Cryptotympana atrata*, intersegment membrane has mycelia; the color of compound eyes became orange; B. ventral view of *Cryptotympana atrata* cadavers, intersegment membrane of neck and leg basal part covered with mycelial mat; C. ventral view of infected *Cryptotympana atrata*. D. spore stuck on *Cryptotympana atrata* body surface under SEM (500X); E. mycelium and spores under SEM (500X).

移置於直徑 9.0 cm 之培養皿或直徑 9.5 cm、高 5.5 cm 透明塑膠盒中，置 25°C 恆溫生長箱 (12 L : 12D) 中飼養，每日觀察其死亡情形。

結 果

一、供試 *Nomuraea viridulus* 之調查及該病

徵之描述

1. 本菌在嘉義市地區分布之調查

於樣區內，嘉義市市區之兩樣點並未發現有罹病蟬隻，蘭潭地區近水源的三樣點內，其中於兩樣點 (GPS: 23.2818,N, 120.4891,E; 23.4688,N, 120.4764,E) 採到罹病蟬隻，另一樣點較近山區並未發現有罹病蟬隻，且主要發生在 5~8 月高溫高濕的夏季。

2. 病徵之描述

在野外罹病之紅脈熊蟬，首先可見到複眼由黑色轉變成橘褐色，後轉為亮橘黃色，剖開後可見到菌絲（圖一 A），三天後於頭部及腹部的背腹面的節間膜也出現白色菌絲（圖一 B、C），複眼縫周圍及單眼已出現白色菌絲；胸部腹面也可見到綠色之孢子堆，此時翅基部也開始出現綠色之孢子堆，節間膜和足的轉節被菌絲包覆，產卵管上產生菌絲。在 SEM 下觀察，顯示紅脈熊蟬體表佈有菌絲及孢子（圖一 D、E），孢子為橢圓形（500 倍）。

二、蟲生真菌之生理特性測試

1. 孢子發芽過程之觀察

圖二顯示孢子的發芽過程，分生孢子於第 12 小時，發芽前會膨大，並在前端突破胞壁長出發芽管（圖二 A~C）；24 小時，發芽管增長（圖二 D）；36 小時後，發芽管長度增長為 2 倍之多（圖二 E、F）；至 48 小時，大部分仍是發芽管變長（圖二 G、H），少數已有產孢現象（圖二 I）。

2. 不同培養溫度對 *N. viridulus* 分生孢子發芽之影響

五種不同恆溫培養下分生孢子之發芽率，在第 12 小時，僅 25°C 發芽率達 1.3%，其他溫度發芽率皆為 0%。於 24 小時，15、20、25、30 及 35°C 發芽率各為 0.0、4.0、18.0、6.3 及 2.3%。在 36 小時，發芽率各為 0.3、4.3、37.0、5.7 及 3.0%。在 48 小時，發芽率各為 2.0、4.3、60.0、9.0 及 3.7%。經培養 48 小時後，25°C 之平均發芽率達 60.0%，較其他四種溫度之發芽率高，15~35°C 發芽率皆無顯著差異（表一）。

3. 溫度對 *N. viridulus* 生長及產孢量之影響

N. viridulus 於 25°C 恆溫培養下之菌絲生長速率隨著天數的增加而遞增（圖三）。菌絲直徑從第 4 天的 1.0 cm 生長至第 14 天的 2.7 cm；而產孢能力以第 12 天最高，孢子濃度為 2.5×10^7 conidia/mL，至第 13 天後產孢能力開始下降，其孢子濃度為 1.3×10^7 conidia/mL，顯示孢子經萌芽後生長發育迅速，但第 13 天後生長量迅速下降（圖四）。

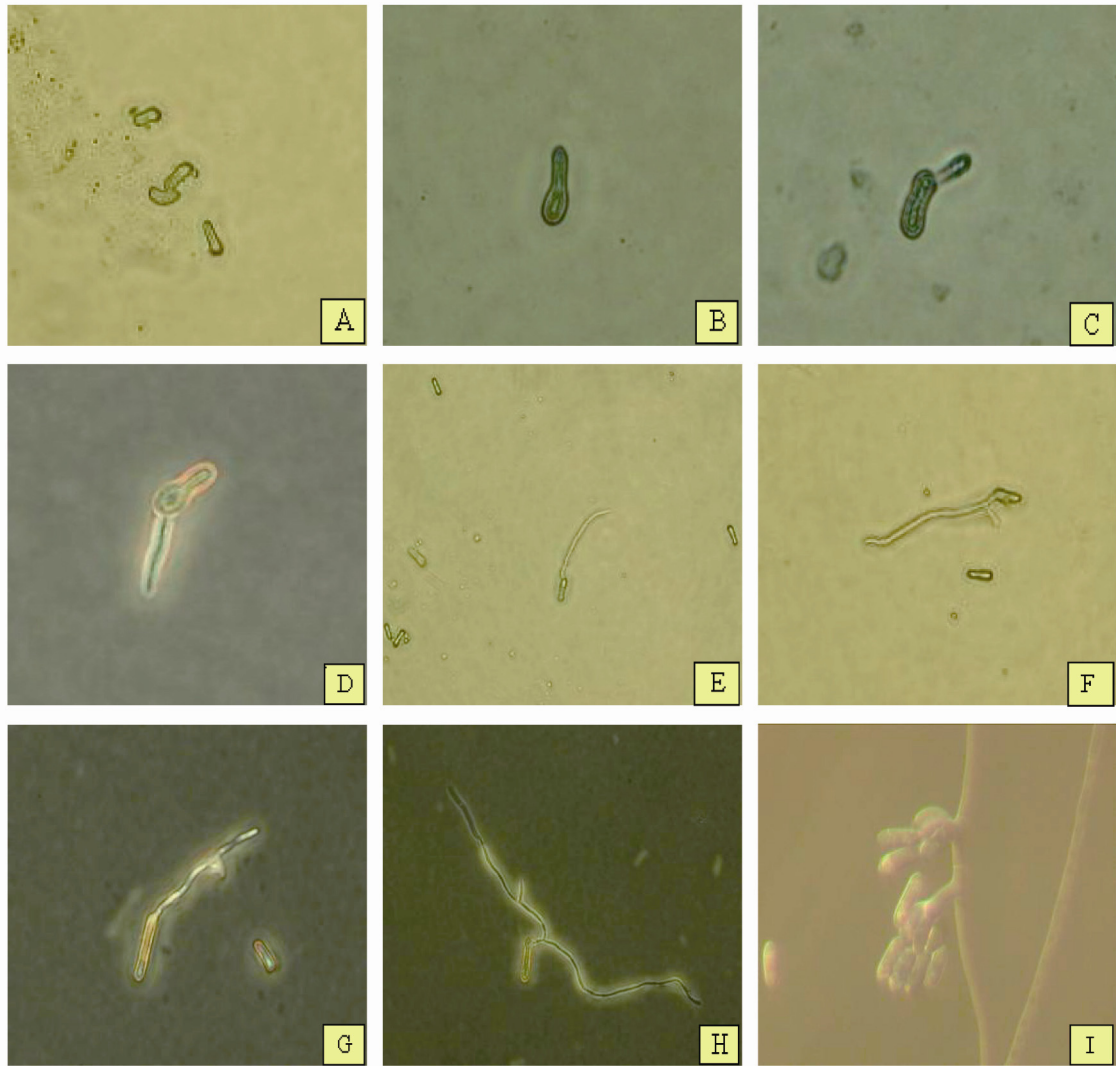
五種不同恆溫培養下之菌絲生長速率不一，產孢量亦有所不同。第 12 天菌絲直徑以 25 及 30°C 的 2.2 cm 最大，15 及 35°C 的 0.7 cm 為最小；產孢能力以 25°C 的 2.5×10^7 conidia/mL 最高，15 及 35°C 則無明顯產孢（表二）。顯示本菌最適生長溫度為 20~30°C，並具有產孢現象；在低溫 15°C 及高溫 35°C 生長速率較為緩慢，但仍具菌絲生長情形，推測此時產孢能力受影響，故於第 12 天挑取菌絲鏡檢，可觀察到少量產孢之情形，但置於血球計數器下無法計算出孢子濃度。

4. 碳素源對 *N. viridulus* 生長及產孢量之影響

七種不同供試碳源除了果糖處理組外，其他六種碳源皆可提供 *N. viridulus* 生長及產孢。菌落生長直徑以葡萄糖的 1.6 cm 最大，蔗糖的 1.4 cm 次之，果糖的 0.5 cm 最低。產孢量以麥芽糖的 3.7×10^5 conidia/mL 最高，蔗糖與葡萄糖的 2.5×10^5 及 2.4×10^5 conidia/mL 次之，果糖則不產孢，各碳素源的菌落及產孢能力具顯著差異（表三）。

5. 氮素源對 *N. viridulus* 生長及產孢量之影響

N. viridulus 對六種不同氮素源之利用程度不一，菌落直徑以蛋白胨的 1.8 cm 最大，天門冬素的 1.3 cm 次之，尿素則無生長情形，除蛋白胨及天門冬素外，其他氮素源之利用皆顯著低於對照組；產孢能力以蛋白胨的



圖二 *Nomuraea viridulus* 孢子發芽過程。A、分生孢子膨大；B、孢子萌芽；C、產生發芽管 (12 hr)；D~F 發芽管增長 (24~36 hr)；G~H 菌絲增長 (48 hr)；I、形成孢子 (48 hr)。

Fig. 2. Germination cycle of *Nomuraea viridulus*. A. conidiospore enlarged; B. budding; C. germination tube produced; D-F. germination tube elongated (24-36 hr); G-H. mycelium elongated (48 hr); I. sporulation (48 hr).

1.8×10^6 conidia/mL 最大，天門冬素的 6.3×10^5 conidia/mL 次之，其他氮素源皆無無法促進 *N. viridulus* 產孢，各氮素源培養之 *N. viridulus*，其菌絲及產孢能力除蛋白胨及天門冬素組外，皆無顯著差異 (表四)。

6. 酸鹼值對 *N. viridulus* 生長之影響

以不同 pH 之液體培養基培養，在所測試的 pH 4~10 範圍內，就菌絲量而言，各處理所得之乾重量多介於 0.010~0.020 g，但試驗處理上均具顯著差異；以 pH 7~8 間生長較快速，pH 6 以下及 pH 8 以上則隨 pH 之不同而生長速率變緩慢。其所得之乾重

表一 不同溫度對 *Nomuraea viridulus* 孢子發芽之影響

Table 1. Effect of temperature on germination rate of *Nomuraea viridulus*

Temperature (°C)	Germination (%) [*]			
	12 hr	24 hr	36 hr	48 hr
15	0.0 ^{b*}	0.0 ^d	0.3 ^b	2.0 ^b
20	0.0 ^b	4.0 ^{bc}	4.3 ^b	4.3 ^b
25	1.3 ^a	18.0 ^a	37.0 ^a	60.0 ^a
30	0.0 ^b	6.3 ^b	5.7 ^b	9.0 ^b
35	0.0 ^b	2.3 ^{cd}	3.0 ^b	3.7 ^b

* 300 conidia examined.

* Means with the same letters on each column are not significantly different by Tukey's test ($p < 0.05$).

表二 溫度對 *Nomuraea viridulus* 生長及產孢量之影響

Table 2. Effect of temperature on the growth and sporulation of *Nomuraea viridulus*

Temperature (°C)	Colony diameter (cm)		Sporulation ($\times 10^6$ conidia/mL)	
	day 6	day 12	day 6	day 12
15	0.60 ^d	0.70 ^c	0.00 ^c	0.00 ^b
20	1.20 ^b	2.05 ^b	0.61 ^b	4.18 ^b
25	1.25 ^b	2.20 ^a	1.56 ^a	25.50 ^a
30	1.40 ^a	2.20 ^a	0.47 ^{bc}	4.40 ^b
35	0.70 ^c	0.70 ^c	0.00 ^c	0.00 ^b

* Means with the same letter on each column are not significantly different by Tukey's test ($p < 0.05$).

表三 碳源對 *Nomuraea viridulus* 生長及產孢量之影響

Table 3. Effect of various carbon sources on the growth and sporulation of *Nomuraea viridulus*

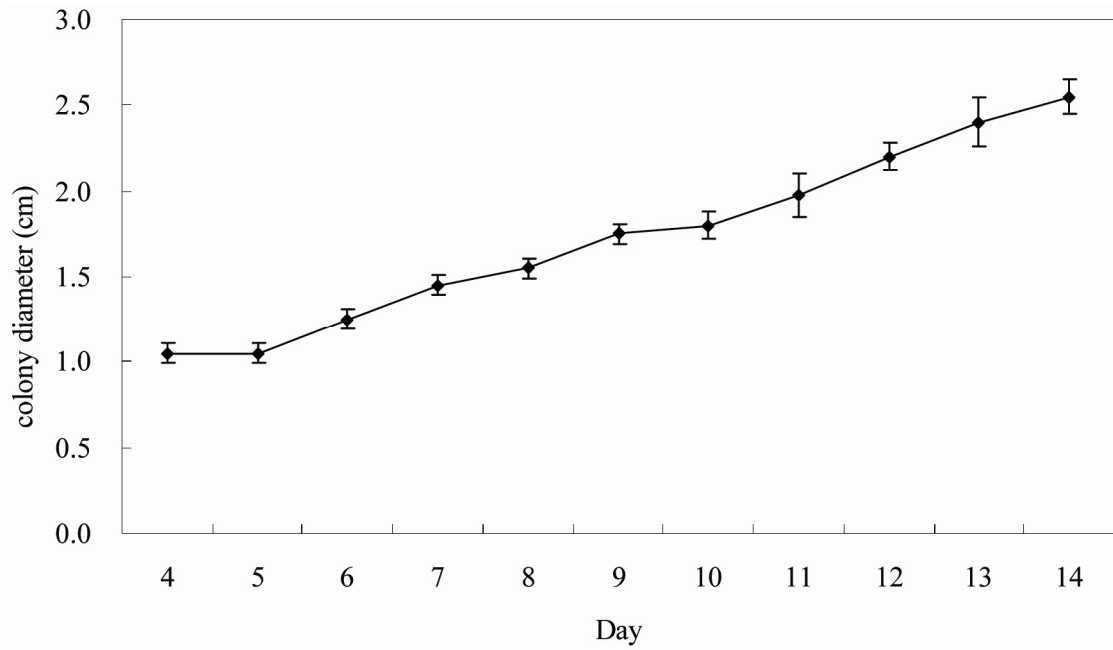
Carbon sources	Colony diameter (cm)	Sporulation ($\times 10^5$ conidia/mL)
Sucrose	1.4 ^{b*}	2.45 ^b
Starch	1.3 ^{bc}	1.98 ^{bc}
Lactose	1.3 ^{bc}	1.35 ^{bc}
Glucose	1.6 ^a	2.40 ^b
Maltose	1.2 ^{bc}	3.72 ^a
Galactose	1.0 ^c	1.20 ^c
Fructose	0.5 ^d	0.00 ^d
CK	1.0 ^c	1.80 ^{bc}

* Means with the same letter on each column are not significantly different by Tukey's test ($p < 0.05$).

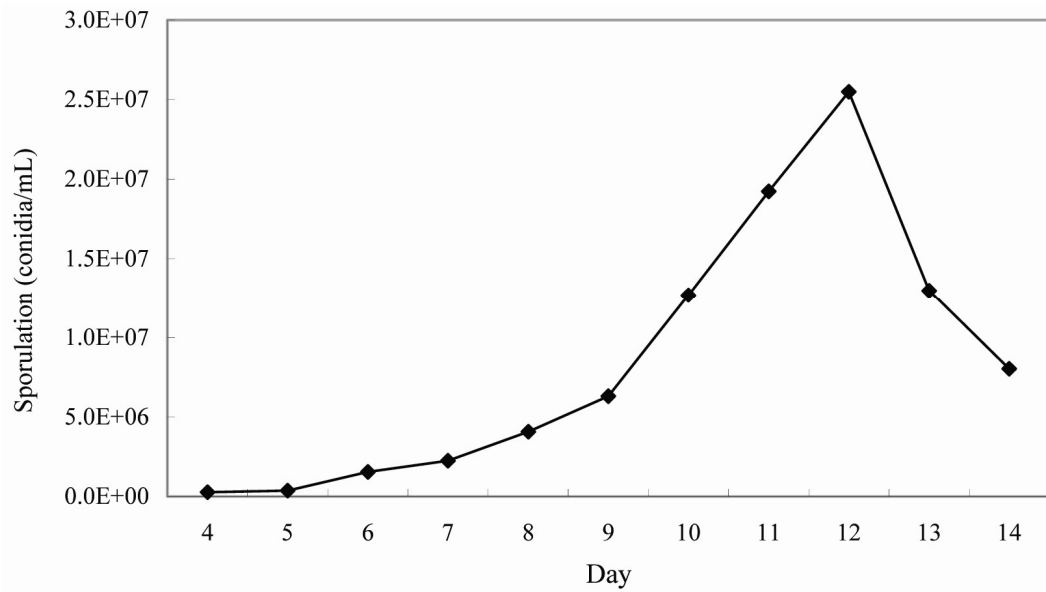
以 pH 7 的菌絲乾重 0.065 g 為最重，pH 8 的 0.055 g 次之，pH 10 的 0.015 g 最輕，pH 4 的 0.020 g 次之（圖五）。

7. 不同培養基對 *N. viridulus* 生長及產孢量之影響

以九種不同培養基培養，在菌絲直徑上以 SMA+Y 組的 2.8 cm 最大，牛肉汁瓊脂 2.5 cm 次之，麥芽萃取物瓊脂 1.3 cm 最小，其餘處理皆無顯著差異；產孢部分仍以 SMA+Y 的 1.1×10^7 conidia/mL 最高，酵母葡萄糖



圖三 25°C 恆溫下菌落直徑生長曲線。
 Fig. 3. The growth curve of *Nomuraea viridulus* at 25°C.



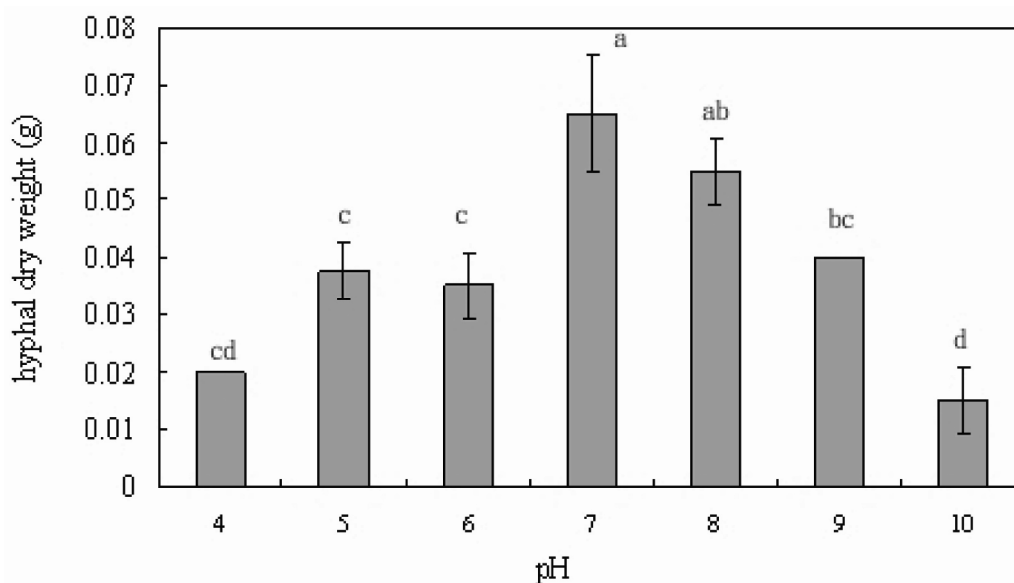
圖四 25°C 下 *Nomuraea viridulus* 產孢數量。
 Fig. 4. The sporulation of *Nomuraea viridulus* at 25°C.

表四 氮素源對 *Nomuraea viridulus* 生長及產孢量之影響

Table 4. Effect of various nitrogen sources on the growth and sporulation of *Nomuraea viridulus*

Nitrogen sources	Colony diameter (cm)	Sporulation ($\times 10^5$ conidia/mL)
Asparagine	1.33 ^{b*}	6.30 ^b
Urea	0.00 ^d	0.00 ^d
Peptone	1.80 ^a	18.90 ^a
NH ₄ NO ₃	0.28 ^{cd}	0.00 ^d
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.38 ^c	0.00 ^d
NaNO ₃	0.20 ^{cb}	0.00 ^d
CK	1.25 ^b	2.45 ^c

* Means with the same letter on each column are not significantly different by Tukey's test ($p < 0.05$).



圖五 不同酸鹼值對菌絲生長之影響。

Fig. 5. Effect of pH value on the hyphal growth of *Nomuraea viridulus*.

瓊脂及牛肉汁瓊脂次之，Czapek's 氏培養基 3.1×10^5 conidia/mL 最低，麥芽萃取物瓊脂 4.0×10^5 conidia/mL 次之 (表五)，結果顯示麥芽萃取物瓊脂不適於本菌之生長。

8. 相對濕度對 *N. viridulus* 之分生孢子發芽之影響

N. viridulus 菌株於 25°C 恆溫培養下孢

子發芽之情形，經 12 小時後，相對濕度 100、95、92、85、80 及 75% 發芽率各為 2.67、1.67、1.67、1.30、0.67 及 0.67%。在 24 小時，發芽率各為 20.00、11.30、4.30、4.67、4.67 及 4.00%。在 36 小時，發芽率各為 27.00、26.30、18.30、18.00、17.30 及 15.00%。在 48 小時，發芽率各為

表五 不同培養基對 *Nomuraea viridulus* 生長及產孢量之影響

Table 5. Effect of cultural media on the growth and sporulation of *Nomuraea viridulus*

Medium	Colony diameter (cm)	Sporulation ($\times 10^6$ conidia/mL)
CMA*	2.0 ^{b**}	0.89 ^{bc}
BEA	2.5 ^a	2.35 ^{bc}
MEA	1.3 ^c	0.43 ^c
Cz-Dox	2.0 ^b	0.31 ^c
PDA	1.8 ^b	0.81 ^{bc}
V8A	1.9 ^b	2.10 ^{bc}
YEGA	2.0 ^b	4.10 ^b
SDA	1.8 ^b	2.72 ^{bc}
SMA+Y	2.8 ^a	11.12 ^a

* CMA: Cornmeal agar, BEA: Beef extract agar, MEA: Malt extract agar, Cz-Dox: Czapek's-Dox agar, PDA: Pepton dextrose agar, V8A: V-8 juice agar, YEGA: Yeast extract glucose agar, SDA: Sabouraud's dextrose agar, SMA+Y: Sabouraud's maltose agar + Yeast extract.

** Means with the same letter on each column are not significantly different by Tukey's test ($p < 0.05$).

表六 不同相對濕度對 *Nomuraea viridulus* 孢子發芽之影響

Table 6. Effect of relative humidity on germination rate of *Nomuraea viridulus*

Relative humidity (%)	Germination (%) [*]			
	12 hr	24 hr	36 hr	48 hr
100	2.67 ^{a**}	20.00 ^a	27.00 ^a	80.00 ^a
95	1.67 ^a	11.30 ^{ab}	26.30 ^a	68.00 ^{ab}
92	1.67 ^a	4.30 ^b	18.30 ^a	70.30 ^{ab}
85	1.30 ^a	4.67 ^b	18.00 ^a	69.30 ^{ab}
80	0.67 ^a	4.67 ^b	17.30 ^a	70.00 ^{ab}
75	0.67 ^a	4.00 ^b	15.00 ^a	55.67 ^b

* 300 conidia examined.

** Means with the same letter on each column are not significantly different by Tukey's test ($p < 0.05$).

80.00、68.00、70.30、69.30、70.00 及 55.67%。經培養 48 小時後，RH 100% 之平均發芽率最高，RH 75% 之平均發芽率最低，較其他四種相對濕度皆無顯著差異（表六）。

9. 與侵染相關之胞外酵素檢測

表七顯示 *N. viridulus* 能產生蛋白質分解酵素，於 20°C 下酵素活性較高，其澄清環為 2.3 mm，高於 25、30 及 35°C 的 1.0 mm 澄清環。本實驗菌株能產生幾丁質分解酵素 (chitinase)，於 25 及 30°C 下能各產生 9.0 及 9.3 cm 的澄清環，20°C 的 6.0 mm 次

之。本實驗菌株於 25°C 下所產生的脂質分解酵素 (lipase) 活性較高，澄清環 10.0 mm，而其於 15、20 及 30°C 下無法產生澄清環。

從 API-ZYM 半定量的實驗結果可發現，*N. viridulus* 在四種不同時間及三種不同培養條件下，結果顯示鹼性磷酸酶、酯酶 (C4)、酯酶分解脂酶 (C8)、白胺酸肽分解酶、纈氨酸肽分解酶、胱氨酸肽分解酶、磷酸脂酶、磷酸水解酶、 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶、 β -氨基葡萄糖苷酶及 α -甘露糖苷酶活性測試中，均呈正反

表七 *Nomuraea viridulus* 在固體培養基上所偵測的各種酵素反應

Table 7. Enzymatic activities of *Nomuraea viridulus* detected by solid culture media

Enzymes	Diameter of hydrolytic ring (mm)			
	20°C	25°C	30°C	35°C
Protease	2.3 ^{b*}	1.0 ^b	1.0 ^b	1.0 ^a
Chitinase	6.0 ^a	9.0 ^a	9.3 ^a	0.0 ^b
Lipase	0.0 ^d	10.0 ^a	0.0 ^b	0.0 ^b
Amylase	1.0 ^c	1.0 ^b	1.0 ^b	1.0 ^a

* Means with the same letter on each column are not significantly different by Tukey's test ($p < 0.05$).

表八 利用 API ZYMZ 系統測試不同培養方式第 3 及 5 天之酵素活性

Table 8. Enzyme activity of *Nomuraea viridulus* detected by solid media, exuviae media and brown rice bag culture (incubated for 3 and 5 days)

No.	Substrates	Enzymes	solid media		exuviae media		brown rice bag culture	
			3 d	5 d	3 d	5 d	3 d	5 d
1.	Control		-	-	-	-	-	-
2.	2-Naphtyl-phosphate	Alkaline phosphatase	+	+	+	+	+	+
3.	2-Naphtyl-butyrate	Esterase(C4)	m	m	m	m	m	m
4.	2-Naphtyl-caprylate	Esterase lipase(C8)	m	m	m	m	m	m
5.	2-Naphtyl-myristate	Lipase(C14)	-	-	-	-	-	-
6.	L-Leucyl-2-naphtylamide	Leucine aminopeptidase	m	m	+	+	+	+
7.	L-Valyl-2-naphtylamide	Valine aminopeptidase	m	m	+	+	m	+
8.	L-Cystyl-2-naphtylamide	Cystine aminopeptidase	-	-	m	m	m	m
9.	N-Benzoyl-DL-arginine-2-naphtylamide	Trypsin	-	-	-	-	-	-
10.	N-Glutaryl-phenylalanine-2-naphtylamide	Chymotrypsin	-	-	-	-	-	-
11.	2-Naphtyl-phosphate	Acid phosphatase	+	+	+	+	+	+
12.	Naphtol-AS-BI-phosphate	Phosphoamidase	+	+	+	+	+	+
13.	6-Br-2-naphtyl- α D-galactopyranoside	α -Galactosidase	+	+	+	+	m	+
14.	2-Naphtyl- β D-galactopyranoside	β -Galactosidase	+	m	+	+	+	+
15.	Naphtol-AS-BI- β D-glucuronide	β -Glucuronidase	-	-	-	-	-	-
16.	2-Naphtyl- α D-glucopyranoside	α -Glucosidase	-	-	-	-	-	-
17.	6-Br-2-naphtyl- β D-glucopyranoside	β -Glucosidase	+	+	+	+	+	+
18.	1-Naphtol-N-acetyl- β D-glucosaminide	β -Glucosaminidase	+	+	+	+	+	+
19.	6-Br-2-naphtyl- α D-mannopyranoside	α -Mannosidase	+	+	+	+	+	+
20.	2-Naphtyl- α L-fucopyranoside	α -Fucosidase	-	-	-	-	-	-

-, reaction of 0 on manufacturer's scale; m, reaction of 1-2 on manufacturer's scale; +, reaction of 3-5 on manufacturer's scale.

應，顯示不同培養該菌株方式皆可產生上列酵素，只是活性強弱略有差異（表八）。

10. 農業藥劑對供試菌株之影響

本菌經接種殺蟲劑及殺菌劑 18 天後發

現，於免賴得、腈硫醃、撲克拉錳及多寧四種殺菌劑皆會抑制本菌之生長，十一種殺蟲劑中僅加保利和培丹其毒性極強本菌會抑制生長，另九種殺蟲劑中納乃得、益達胺、芬普尼

表九 不同農業藥劑對 *Nomuraea viridulus* 生長及產孢量之影響

Table 9. Effect of pesticides on the growth and sporulation of *Nomuraea viridulus*

Pesticides	Colony diameter (cm)			Sporulation ($\times 10^5$ conidia/mL)	
	6 days	12 days	18 days	12 days	18 days
Insecticides					
2% Abamectin EC	1.28 ^{ede}	1.95 ^{de}	2.68 ^c	4.21 ^c	24.00 ^e
40.64% Carbofuran SC	1.20 ^{de}	1.78 ^f	2.38 ^d	1.50 ⁱ	31.75 ^c
2.8% Cyhalothrin EC	1.20 ^{de}	2.00 ^{ed}	3.03 ^b	3.13 ^e	36.25 ^b
85% Carbaryl WP	0.00 ^h	0.00 ^h	0.00 ^e	0.00 ^k	0.00 ^k
50% Cartap WP	0.00 ^h	0.00 ^h	0.00 ^e	0.00 ^k	0.00 ^k
90% Methomyl WP	1.43 ^b	1.90 ^e	2.45 ^d	1.20 ^j	1.20 ^j
40% Carbosulfan WP	0.75 ^g	1.43 ^g	2.40 ^d	2.33 ^g	26.50 ^d
9.6% Imidacloprid SL	1.00 ^f	1.45 ^g	2.28 ^d	2.15 ^h	1.50 ⁱ
44% Dimethoate EC	1.30 ^{ed}	2.28 ^b	4.43 ^a	4.08 ^d	11.25 ^f
4.95% Fipronil FP	1.18 ^e	2.08 ^c	3.18 ^b	5.00 ^b	5.63 ^h
99% Narrow range oil EC	1.35 ^{bc}	2.35 ^c	3.35 ^a	2.50 ^f	9.13 ^g
CK	1.70 ^a	2.50 ^a	3.50 ^a	13.00 ^a	47.00 ^a

* Means with the same letter on each column are not significantly different by Tukey's test ($p < 0.05$).

及窄域油產孢量較低外，阿巴汀、加保扶、賽洛寧、丁基加保扶及大滅松等殺蟲劑於第 18 天產孢量皆在 2×10^6 conidia/mL 以上 (表九)。顯示 *N. viridulus* 對殺菌劑較敏感。

11. *N. viridulus* 對寄主範圍與生物檢定

本試驗經不同接種法處理後發現，*N. viridulus* 對家蠶、斜紋夜蛾、大菜螟、大蠟蛾、小菜蛾之幼蟲，偽菜蚜、桃蚜之若蟲，黑翅蟬、米象、甘藷蟻象之成蟲皆無感染死亡。試驗十一種寄主昆蟲中僅有熊蟬以爬行接觸固體培養基的試驗方式感染，感染百分率 25%。

討 論

Kao *et al.* (1998) 試驗 *N. viridulus* (菌株編號：CCRC 35504) 於 28°C 恆溫狀態下，經 24 小時孢子發芽率達 92%。本文試驗與 Kao *et al.* (1998) 之發芽率有所差異，推測此可能是本實驗所採用的孢子是來自太

空包所致。以蟲生真菌 *N. rileyi* 為例，Kao *et al.* (1998) 以菌種編號 CCRC 35543 及 35544 進行發芽率試驗，寄主來源皆為鱗翅目 (Lepidoptera) 昆蟲，於 24°C 恆溫狀態下，經 48 小時孢子發芽率分別為 85 及 54%，兩者之發芽率也具有不同之差異性。

Lin (2001) 試驗 9 株綠殭菌之溫度適應性，其最適生長溫度與本文之數據相同，但僅 1 株菌株 (菌株編號：WF) 可於 30°C 下產孢。顯示 *N. viridulus* 菌株可能較其他 *Nomuraea* 屬之蟲生真菌菌種有著較耐高溫的培養特點。

本實驗結果得知，*N. viridulus* 對碳源要求並不苛刻，試驗之麥芽糖之利用產孢能力為最佳，但葡萄糖、果糖及半乳糖是為單糖，卻僅只有果糖無產孢能力，且菌絲生長直徑也為最低，推測 *N. viridulus* 在利用果糖時，可能較不容易通過細胞膜運輸到體內。Chen (2005)、Hsieh (2000) 及 Peng (1985) 分別以蟲生真菌 *B. bassiana*、*N. rileyi* 及

Verticillium lecanii 試驗對碳素源的影響，其結果以麥芽糖最佳，果糖及半乳糖較差，本文試驗結果與此相同。

本試驗結果顯示，*N. viridulus* 具有較廣泛之 pH 生長範圍，大致上以中性及微鹼性之生長情況最佳。Peng (1985) 指出培養基之酸鹼值對真菌之代謝、吸收及生長均有密切之關係，各種真菌對酸鹼度的適應範圍亦有不同，且土壤中之 pH 亦能影響蟲生真菌於土壤中的致病力。大多數的蟲生真菌對酸鹼度不太敏感，在 pH 3~9 多能生長，各種酶的最適活性 pH 不同，多數為 pH 4~8 (Pu and Li, 1996)。

在真菌細胞內 50% 為碳水化合物，舉凡原生質、細胞壁、酵素等，均不可缺少碳素 (Wang and Yen, 1973)。因真菌不能行光合作用，無法利用空氣中的二氧化碳，故碳素之來源必須來自外界，醣類或其他有機化合物攝取之所得。所有醣類中以麥芽糖為最佳碳源，因為麥芽糖可由加水分解成菌類最容易利用之初勝肽葡萄糖 (Wang and Yen, 1973)，而本試驗之結果與上述理論吻合。

由上述氮源利用得知，蛋白脛利用為最佳，尿素則不適於本菌的生長。蟲生真菌是在特定環境下寄生在昆蟲體內的真菌，對於有機氮利用能力較強，而對無機氮的利用因菌種的種類而不同，生活條件的不同，所表現出具一定之差異 (Pu and Li, 1996)。Chen and Xu (1988) 研究 7 種氮素源對蟲生真菌的菌絲生長及產孢能力影響，結果顯示皆不能利用尿素，本試驗結果與此論述之結果相同。

蛋白脛為與動物性蛋白有關，因為蟲生真菌侵入寄主體內後，是以寄主體內之體液為營養來源，動物性蛋白質應有利於菌絲生長及產孢，故含氮化合物在細胞之氧化分解蛋白質及酵素作用上亦不忽視。蟲生真菌種類的不同對

氮素源之利用情形亦不相同，如黑殭菌 (*M. anisopliae*) 之生長以硫酸銨 ((NH₄)₂SO₄) 及蛋白脛為佳，而氯化銨不利其生長 (Wang and Yen, 1973)。

蟲生真菌侵入寄主昆蟲體表的主要途徑乃經由穿透昆蟲表皮，當孢子在昆蟲表皮附著，其分生孢子發芽產生發芽管後才得以侵入昆蟲，一般真菌發芽時必須在高濕的環境下方能完成 (Getzin, 1961)，本試驗不同濕度下孢子發芽率結果與此理論相符合。並有諸多學者強調濕度對蟲生真菌之重要性，例如 Deuteromycetes 的分生孢子在 92% RH 以上才能發芽 (Ferron, 1978)，而 Entomophthorales (Hall and Papierok, 1982) 則需在飽和相對濕度下，分生孢子才能發芽。

蟲生真菌會分泌許多酵素，藉由產生分解酵素和機械壓力來貫穿並分解昆蟲體表，達到感染蟲體之目的，若昆蟲體內要發展出對酵素產生抗性的機會是很難的，昆蟲表皮大部分由蛋白質所組成，蟲生真菌產生之蛋白質分解酵素能貫穿昆蟲之表皮層，且能在 gelatin 培養基中產生 (Urtz and Rice, 2000)。

利用 API ZYM 系統可快速半定量地測得分解酵素種類及活性，用來辨識不同蟲生真菌菌株產生之酵素活性，雖其方法無法精確測定酵素真正含量 (Hsiao and Khachatourians, 1997; St. Leger *et al.*, 1986)。

三種不同培養方式經 24 小時所產生之酵素，已有 aminopeptidases、esterase 和 N-acetyl-glucosaminidase 酵素。Silva and Messias (1986) 指出蟲生真菌殺蟲機制複雜，參與之酵素種類繁多，非單一酵素活性能完全左右。本試驗從 API ZYM 酵素活性檢測與生物檢定得知，即使酵素活性反應強烈，但其對寄主昆蟲的侵染力未必能呈現正相關，因

此確實無法指出任何一種酵素與侵染性強弱有絕對的關係。

上述實驗結果相同於 Kao *et al.* (1998) 試驗 *N. viridulus* (菌株編號：CCRC 35504) 之 API ZYM 系統酵素所檢測的磷酸酶、肽基分解酶、蛋白酶及 β -氨基葡萄糖苷酶等結果。並符合 Tzean *et al.* (1997) 所指出之蟲生真菌發芽之分生孢子及發芽管經組織化學研究所得 endoprotease、aminopeptidases、lipase、esterase 和 N-acetyl-glucosaminidase 之酵素。各酵素相對活性在不同培養表現各自不同，其中 β -氨基葡萄糖苷酶在三種培養條件中皆大量產生，所以幾丁質水解在感染過程是必須所進行的。蛋白酶在三種培養條件中活性較低，推測與 Paterson *et al.* (1994) 所指出蟲生真菌蛋白酶的分泌產生須經昆蟲體壁特定成分誘發有關。

蟲生真菌感染蟲體以貫穿寄主體表為主要方式，而昆蟲體表主要由蛋白質、脂質、酚類化合物和幾丁質等成分所組成，因此蟲生真菌感染昆蟲寄主時，主要靠發芽管或附著器來產生水解酶，以破壞寄主表皮，達到貫穿感染之目的 (Ferron, 1978)。本試驗所產生之活性與培養條件之關聯性，乃為提供進一步了解 *N. viridulus* 感染昆蟲致病作用機制上所需胞外酵素種類及順序資料。

過去有許多文獻指出綠殭菌對鱗翅目有著高侵染力 (Getzin, 1961; Ignoffo *et al.*, 1976; Boucias and Pendland, 1982; Boucias *et al.*, 1984; Devi, 1994)，但本文同屬之 *N. viridulus* 對鱗翅目之昆蟲不具侵染力。推測 *N. viridulus* 之蟲生真菌對蟬科可能具寄主專一性；野外罹病熊蟬是在爬出土壤或爬上枝幹時沾附孢子，而後感染，由圖一可看出，罹病熊蟬初期複眼會由深褐色轉呈亮橘褐色，自頭部、複眼眼縫周圍及單眼長出菌絲，胸部腹

面節間、背部節間、翅基部或足基部會先產生白色絨毛狀菌絲，隨受染時間增長，各節間及基部開始產生綠色的分生孢子。

田間栽培作物常用來防治各類病害及蟲害之化學藥劑，會影響綠殭菌孢子的存活及感染力 (Ignoffo *et al.*, 1975; Horton *et al.*, 1980; Loria *et al.*, 1983; Gardner and Storey, 1985)。Lin (2001) 以 17 種農藥對綠殭菌進行生長影響，結果相同農藥試驗與本文 *N. viridulus* 菌株相同。Liu (1992) 提出，許多礦物元素，如鋁、砷、鎂、硼、銅、鉛、錳、汞、鉬及鋅，在離子狀態時對生物之原生質具有高度毒性，有些雖為生物生長代謝上所需之必要元素，但在組織中之濃度超過生理上之需要時，反而產生毒害。銅、鋅及錳為生物生長必需之微量代謝元素，其需要量極少，故本試驗所用之殺菌劑均會抑制 *N. viridulus* 菌株之生長。

引用文獻

- Bell, J. V. 1975. Production and pathogenicity of the fungus *Spicaria rileyi* from solid and liquid media. *J. Invertebr. Pathol.* 26: 129-130.
- Boucias, D. G., and J. C. Pendland. 1982. Ultrastructural studies on the fungus *Nomuraea rileyi* infecting the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. *J. Invertebr. Pathol.* 39: 338-345.
- Boucias, D. G., D. L. Bradford, and C. S. Barfield. 1984. Susceptibility of the velvetbean caterpillar and soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) to *Nomuraea rileyi*: Effects of pathotype,

- dosage, temperature, and host age. *J. Econ. Entomol.* 77: 247-253.
- Chen, H. J.** 2005. Pathogenicity of the Entomopathogenic Fungi, *Verticillium lecanii* and *Beauveria bassiana*, to the Silverleaf Whitefly, *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring. Master's Thesis, Graduate School of Plant Protection, National Pintung Technology University, Pintung, Taiwan. (in Chinese)
- Chen, Z. A., and Y. C. Xu.** 1988. Entomogenous fungi *Aschersonia* twin study. *Chinese J. Fungi.* 5: 37-43. (in Chinese)
- Devi, P. S. V.** 1994. Conidia production of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* and its evaluation for control of *Spodoptera litura* (Fab.) on *Ricinus communis*. *J. Invertebr. Pathol.* 63: 145-150.
- Ferron, P.** 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annu. Rev. Entomol.* 23: 409-442.
- Gardner, W. A., and G. K. Storey.** 1985. Sensitivity of *Beauveria bassiana* to selected herbicides. *J. Econ. Entomol.* 78: 1275-1279.
- Getzin, L. W.** 1961. *Spicaria rileyi* (Farlow) Charles, an entomogenous fungus of *Trichoplusia ni* (Hubner). *J. Insect Pathol.* 3: 2-10.
- Hall, R. A., and B. Papuerok.** 1982. Fungi as biological control agents of arthropods of agricultural and medical importance. *Parasitology* 84: 205-240.
- Hankin, L., and S. L. Anagnostakis.** 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* 67: 590-607.
- Horton, D. L., G. R. Carner, and S. G. Turnipseed.** 1980. Pesticide inhibition of the entomogenous fungus *Nomuraea rileyi* in soybeans. *Environ. Entomol.* 9: 304-308.
- Hsiao, W. F.** 1998. Enzymatic characterization of three entomopathogenic fungi with the API ZYM system. *Chinese J. Entomol.* 18: 203-206.
- Hsiao, W. F., and G. G. Khachatourians.** 1997. The role of extracellular enzymes in the virulence of the entomopathogenic fungus, *Verticillium lecaii*, to oat-bird cherry aphid, *Ropalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae). *Chinese J. Entomol.* 17: 227-236.
- Hsieh, Y. H.** 2000. Optimization of Fermentation Process for *Nomuraea rileyi*. Master's Thesis, Graduate School of Food Engineering, Dayeh University, Changhua, Taiwan. (in Chinese)
- Ignoffo, C. M., C. Garcia, and M. J. Kroha.** 1982. Susceptibility of larvae of *Trichoplusia ni* and *Anticarsia gemmatalis* to intrahemocoelic injections of conidia and blastospores of *Nomuraea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.* 39: 198-202.
- Ignoffo, C. M., B. Puttler, D. L. Hostetter, and W. A. Dickerson.** 1976. Susceptibility of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, and the velvetbean

- caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, to several isolates of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.* 28: 259-262.
- Ignoffo, C. M., A. H. McIntosh, C. Garcia, M. Kroha, and J. M. Johnson.** 1982. Effects of successive in vitro and in vivo passages on the virulence of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. *Entomophaga* 27: 371-378.
- Ignoffo, C. M., B. Puttler, N. L. Marston, D. L. Hostetter, and W. A. Dickerson.** 1975. Seasonal incidence of the entomopathogenic fungus *Spicaria rileyi* associated with noctuid pests of soybeans. *J. Invertebr. Pathol.* 25: 135-137.
- Kao, S. S., Y. S. Tsai, P. X. Yang, B. C. Wang, and J. Hua.** 1998. User's Guide of Commonly-Occurred Entomopathogenic Fungi in Taiwan. Mycological Monograph No.12. Food Industry Research and Development Institute, Taiwan. (in Chinese)
- Li, R. H., J. Y. Zhao, D. S. Li, and A. H. Liu.** 2007. Investigation of forest pests in Tianjin area. *Anhui Agricultural Sci. Bull.* 16: 74-75.
- Lin, S. F.** 2001. Control of Aphid by Entomopathogenic Fungi in the Greenhouse. Master's Thesis, Graduate School of Plant Protection, National Pintung Technology University, Pintung, Taiwan. (in Chinese)
- Liu, X. X.** 1992. Plant Physiology. Schiff Foundation, Taipei, Taiwan. (in Chinese)
- 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.
- Paterson, I. C., A. K. Charnley, R. M. Cooper, and J. M. Clarkson.** 1994. Specific induction of a cuticle-degrading protease of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Microbiology* 140: 185-189.
- Peng, B. C.** 1985. Pathological studies of an entomogenous fungus, *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas in aphids. Master's Thesis, Graduate School of Entomology, National Chung-Shing university, Taichung, Taiwan. (in Chinese)
- Pu, Z. L., and Z. Z. Li.** 1996. Insect Mycology. Anhui Publishing House of Science and Technology, Hefei, China. (in Chinese)
- Silva, J. C., and C. L. Messias.** 1986. Virulence of mutants and revertants of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* toward *Rhodnius prolixus*. *J. Invertebr. Pathol.* 48: 368-374.
- St. Leger, R. J., A. K. Charnley, and R. M. Cooper.** 1986. Enzymatic characterization of entomopathogens with API ZYM system. *J. Invertebr. Pathol.* 48: 375-376.
- Tang, L. C.** 1997. Infection of the Corn Earworm, *Helicoverpa armigera*, with the Entomopathogenic Muscardine

- Fungus, *Nomuraea*, Isolation from Taiwan. Doctor Thesis, Graduate School of Entomology, National Chung-Shing University, Taichung, Taiwan. (in Chinese)
- Tzean, S. S., L. S. Hsieh, and W. J. Wu.** 1997. Atlas of Entomopathogenic Fungi from Taiwan. Council of Agriculture, Executive Yuan, Taiwan.
- Tzean, S. S., L. S. Hsieh, J. L. Chen, and W. J. Wu.** 1992. *Nomuraea viridulus*, a new entomogenous fungus from Taiwan. *Mycologia* 84: 781-796.
- Urtz, B. E., and W. C. Rice.** 2000. Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Beauveria bassiana*. *Mycol. Res.* 104: 180-186.
- Wang, B. T., and F. Y. Yen.** 1973. Pathological study of *Metarhizium anisopliae*. Chinese National Taiwan University College of Agriculture Report 13: 31-46.
- Yang, X. F., T. X. Wang, J. Y. Li, and L. H. Yang.** 2001. The correspond relation between honey-secreting of *Vitex Negundo* Var. *Heterophylla* and the beginning chirp of *cryptotympana atraya*. *J. Henan Normal Univ.* 29: 65-67.

收件日期：2009年12月4日

接受日期：2010年4月28日

Biological Characteristics of the Entomopathogenic Fungus, *Nomuraea viridulus*

Hsin-Yi Peng, Chiao-Chih Chien, and Wen-Feng Hsiao*

Department of Bioresources, National Chiayi University, Chiayi City 60004, Taiwan

ABSTRACT

This study investigated the biological characteristics of entomopathogenic fungus, *Nomuraea viridulus*. The mycelial growth of *N. viridulus* range from 15 to 35°C and the optimum temperature for sporulation and germination was found at 25°C. The optimum growth of this fungus was when it was cultured on SMA+Y medium; at pH 7, with maltose as the carbon source, and peptone as the nitrogen source, respectively. Hydrolyte enzymes such as protease, lipase, chitinase and amylase, were present when tested with a specific culture media at 25°C. However, the activities of lipase (C14), trypsin, chymotrypsin, β -glucuronidase, α -glucosidase and α -fucosidase were not detected using the API ZYM assay. *Nomuraea viridulus* did not grow on media containing fungicides such as 50% benomyl WP, 22.7% dithianon SC, 50% prochloraz Mn WP or 65% Dodine WP, or those containing insecticides such as 85% carbaryl WP or 50% cartap WP. However, when inoculated with more than 2×10^6 conidia/mL, the fungus appeared on media containing the insecticides, e.g., 2% abamectin EC, 40.64% carbofuran SC, 2.8% cyhalothrin EC, 40% carbosulfan WP or 44% dimethoate EC, at 12 days after inoculation. When cultured on media containing 90% methomyl WP, 9.6% imidacloprid SL, 4.95% fipronil FP, or 99% narrow range oil EC resulted in a poor production of conidia. Only one cicada, *Cryptotympana atrata*, among 11 insects assayed was infected with *N. viridulus* causing ca. 25% mortality, indicating that *N. viridulus* has a narrow host range.

Key words: *Nomuraea viridulus*, enzymes, insecticides, fungicides

* Corresponding email: wfhsiao@mail.ncyu.edu.tw