

蟲生真菌內生菌在植物病蟲害防治上之應用

高穗生

前言

過去 45 年，昆蟲病理學家曾對真菌病原(fungal entomopathogen)的潛力寄予厚望。雖然在田間有明確且明顯的進展，但我們仍不能克服基本的障礙(如：含水量的限制，紫外線，製劑配方)，這些障礙阻止了蟲生病原真菌被充分地商品化和被廣泛地採用。

傳統而言，蟲生真菌有兩類的科學家在進行研究；昆蟲學家和真菌學家。昆蟲學家聚焦於蟲生真菌在田間應用的實際面，而真菌學家則著重於真菌分類、作用機制和系統演化學(phylogenteics)之研究。二者之間有明顯的空白—真菌生態學(fungal ecology)，在文獻中亦曾提及此知識的鴻溝。Bruck(2005)描述蟲生真菌(entomopathogeni fungi)的研究狀況：在昆蟲寄主之外，蟲生真菌的生物學知識非常稀少甚至闕如。如果我們把焦點從實驗室生物檢定轉移到真菌生物學的研究，此種完全新穎的方法，可能使有害生物的防治有成功的機會。故而，研究朝向充分瞭解蟲生病原真菌和其扮演作為真菌內生菌(fungal endophytes)之角色，將有助於樹立此類微生物作為生物防治成功的典範。不同的蟲生真菌曾被報導為自然發生的真菌內生菌。亦可經接種到植物上，使其成為內生菌。報導亦指出蟲生真菌內生菌對害蟲、線蟲和植物病原菌造成不良的反應。

事實上，利用蟲生真菌內生菌進行植物病蟲害防治，可以克服將蟲生真菌作為傳統微生物製劑施用時，所造成的瓶頸。蟲生真菌內生菌可在植物內殺死幼蟲和抑制病原菌；不受不良的生物和非生物因子的影響；只需少許接種量即可，可減少花費。

蟲生真菌內生菌

內生菌(endophyte)為德國科學家 De Bary(1884)所創的新字，用來描述出現在

植物組織中的真菌或細菌並不會造成寄主植物產生明顯的病徵(Wilson, 1995)。真菌內生菌無處不在，主要為子囊菌亞門(Ascomycota)(Arnold and Lutzoni, 2007)。從不同的植物上可分離出許多不同屬的蟲生病原真菌之內生菌(表 1.)。某些蟲生病原真菌為自然發生的蟲生病原真菌，亦有以不同方法導入植物使之成為內生菌者(表 1.)。實驗性質地導入蟲生病原真菌至植物體內，使之成為內生菌，其目的在於針對特殊有害生物，當作生物防治劑用，大數的研究僅完成一步，即僅只導入植物體內而已(Vega, 2008)。

表 1. 不同植物之蟲生真菌內生菌

Table 1. Summary of fungal entomopathogens reported as endophytes in various plants

真菌種類(Fungal species)	植物種類(Plant)
頂孢黴屬(<i>Acremonium</i> spp.)	咖啡(<i>Coffea arabica</i> L) (coffee)
交頂孢黴(<i>Acremonium alternatum</i>)	咖啡(<i>C. arabica</i> L)
白殭菌(<i>Beauveria bassiana</i>)	玉米(<i>Zea mays</i> L)(maize)
	玉米(<i>Z.mays</i> L)
	馬鈴薯(<i>Solanum tuberosum</i> L)(potatoes)
	棉花(<i>Gossypium hirsutum</i> L.)(cotton)
	蒼耳(<i>Xanthium strumarium</i> L.)(common cocklebur)
	曼陀羅(<i>Datura stramonium</i> L.)(jimsonweed)
	番茄(<i>Lycopersicon esculentum</i> Miller)(tomato)
	可可(<i>Theobroma gileri</i> Cuatrec.)
	卡羅來納鵝耳櫪(卡羅來納千金榆)(<i>Carpinus caroliniana</i> Walter) (ironwood)
	西方白松(<i>Pinus monticola</i> D. Don)(western white pine)
	鴉片(<i>Papaver somniferum</i> L.)(opium poppy)
	棗椰(<i>Phoenix dactylifera</i> L.)(date palm)
	香蕉(<i>Musa paradisiaca</i> L)(banana)
	咖啡(<i>C. arabica</i>)
	可可(<i>Theobroma cacao</i> L.)(cocoa)
布氏白殭菌 (<i>Beauveria brongniartii</i>)	咖啡(<i>C. arabica</i>)

枝孢屬(<i>Cladosporium</i> spp.)	咖啡(<i>C. arabica</i>) 海茄苳(<i>Avicennia officinalis</i>), 紅茄苳(<i>Rhizophora mucronata</i> Lam), 海桑(<i>Sonneratia caseolaris</i> L.) (mangroves)
粉紅螺旋聚孢黴(<i>Clonostachys rosea</i>)	咖啡(<i>C. arabica</i>)
棒束孢屬(<i>Isaria</i> spp.)	咖啡(<i>C. arabica</i>)
兩型輪枝菌(<i>Lecanicillium dimorphum</i> & L. c.f. <i>psalliotae</i>)	棗椰(<i>P.dactylifera</i> L.)
擬青黴菌屬(<i>Paecilomyces</i> spp.)	香蕉(<i>Musa acuminata</i> Colla)(banana) 稻米(<i>Oryza sativa</i> L.)(rice)
粉狀擬青黴菌 [<i>Paecilomyces farinosus</i> (= <i>Isaria farinosa</i>)]	卡羅來納鵝耳櫪(<i>C. caroliniana</i>)
蠟蚧輪枝菌[<i>Verticillium</i> (= <i>Lecanicillium lecanii</i>)]	天南星科(<i>Araceae</i>) 卡羅萊納鵝耳櫪(<i>C. caroliniana</i>) <i>Arctostaphylos uva-ursi</i> (L) Sprengel

真菌內生菌可在成千的植物上被偵測到，包括農業大宗物質如小麥、香蕉、大豆和番茄。真菌內生菌扮演的角色包括提供植物對抗草食性昆蟲(herbivorous insects)，植物寄生性線蟲及植物病原菌。

大多數內生菌對草食性昆蟲影響的報告，集中在內生麥角菌科之真菌(Clavicipitalean fungi)，[子囊菌亞門，肉座菌目，麥角菌科，Hypocreales: Clavicipitaceae]寄生於草坪或牧草上，這些內生麥角科之真菌，能系統性地感染禾本科(Poaceae)，燈心草科(Juncaceae)，和莎草科(Cyperaceae)。Neotyphodium 感染的多年生黑麥草(*Lolium perenne*)和高羊茅(*Festuca arundinacea*)，顯示對 6 個目超 40 多種的昆蟲有負面的影響。當不同的野生大麥受到 Neotyphodium 感染時，對兩種蚜蟲：稻麥蚜(*Rhopalosiphium padi*)和麥無網長管蚜(*Metopopophium dirhodum*)及小麥黑森癭蚊(*Mayetiola destructor*)之影響，則有所差異。當番茄植株受點枝頂孢菌(*Acremonium strictum*)內生菌感染時，將之餵食番茄夜蛾(*Helicoverpa armigera*)時，其幼蟲有顯著的負面影響。某些內生菌屬於生真菌如白殭菌屬(*Beauveria*)白殭菌(*B. Bassiona*)早已被報導為玉米、棉花、馬鈴薯、藜耳、蔓陀羅、番茄、可可的近親(*Theobroma gileri*)、卡羅來納鵝耳櫪(卡羅來納千金榆)之樹皮、西方白松之種子和松針、鴉片、棗椰、香蕉、咖啡等之內生菌。在可可及咖啡種子發芽後即以白殭菌孢子懸浮液浸泡其幼根，即可使其成功地接種其幼

苗上。Fuller-Schaefer *et al.*, (2005) 報告白殭菌和黑殭菌在甜菜根部定殖。

其他的蟲生真菌如蠟蚧輪枝菌(*Lecanicillium lecanii*)在天南星科植物，蠟蚧輪枝菌和粉狀擬青黴菌(*Paecilomyces farinosus*)在卡羅來納鵝耳櫪(卡羅來納千金榆)之樹皮，擬青黴菌在香蕉和稻米，宛氏擬青黴菌(*P. varioti*)在海桑，均被報導為內生菌。枝孢屬(*Cladosporium*)之蟲生病原真菌亦被報導為羊茅屬(*Festuca*)、杜鵑花科(*Ericaceae*)、不同禾草、海桑、短柱頭菟絲子(*Cuscuta reflexa*)、牛角瓜(*Calotropis gigantea*)、冬葵子(*Abutilon indicum*)、香蕉、小麥、夏櫟(*Quercus robur*)、土耳其櫟(*Q. cerris*)、巴拉圭冬青(*Ilex paraguariensis*)、仙人掌和巴西蘋果(*Malus domestica*)之內生菌。

蟲生真菌內生菌之防蟲應用

在檢視含有內生蟲生病原真菌之植物，其內害蟲表現時，可臆測在植物組織內之真菌，由於代謝物之產生，對害蟲會造成取食阻礙(feeding deterrence)或抗生作用(antibiosis)(Vega *et al.*, 2008)。

麥角菌科真菌之內生菌對草食性昆蟲負面的效應一般歸因於真菌代謝物之產生，雖然環境因子，菌根菌(mycorrhizae)之出現和養分均會影響到內生菌對昆蟲效應之結果。這些效應甚至對第三營養級(trophic level)的寄生性天敵(parasitoid)有聯帶關係。

對蟲生真菌內生菌之前驅研究是以玉米、白殭菌和歐洲玉米螟(*Ostrinia nubilalis*)，作為模式系統。白殭菌以液態或粒劑施用到玉米植株上，可以借減少玉米螟在玉米莖上的穿孔之方式來評估生長期間對玉米螟之抑制效果。Lewis and Bing(1991)，根據報告他們懷疑對玉米螟之抑制是由於白殭菌在玉米植株內定植之故。其後的報告更利用粒劑或注射白殭菌孢子懸浮液的方式，獲得生長期間對玉米螟之抑制，認為是由於白殭菌在玉米植株內定植，成為內生菌所使然。Bing and Lewis(1992)並證實有內生菌的關係(endophytic relationship)，但內生菌白殭菌對抗玉米螟蟲之作用機制並未被討論。除了一篇報導述及玉米螟罹患真菌病外，並無玉米螟罹病報告，顯示穿孔之減少，可能由於取食阻礙或抗生作用。Cherry *et al.*(1999, 2004)在非洲，將玉米種子以白殭菌分生孢子乾粉處理，或以分生孢子懸浮液噴灑於葉液或在玉米莖注射孢子懸浮液的方式，造成內生作用來防治非洲大

螟(*Sesamia calamistis* Hampson)，發現經處理後受害蟲孔數減少，經白殭菌注射後，玉米植株上之幼蟲體重較對照組為輕，顯示取食減少，亦支持取食阻礙或抗生作用的理論。

將內生菌白殭菌引入玉米，可和其他蟲害防治策略相搭配，內生菌白殭菌可以和蘇力菌(*Bacillus thuringiensis*)及加保扶(carbofuran)之施用相搭配用以防治歐洲玉米螟。蘇力菌基因改造之玉米，也不會對白殭菌在玉米中之定殖，有可查知的影響。內生菌白殭菌也不會對捕食歐洲玉米螟之卵和幼蟲的瓢蟲(*Coleomegilla maculata*)造成死亡率。

Vega *et al.*(2008)於夏威夷、哥倫比亞、墨西哥及波多黎各之咖啡樹調查真菌內生菌時，發現有許多蟲生真菌屬：包括頂孢黴屬、白殭菌屬、枝孢屬、螺旋聚孢黴屬及擬青黴菌屬的真菌。其中白殭菌和粉紅螺旋聚孢黴對咖啡果小蠹蟲(*Hypothenemus hampei* Ferrari)具病原性。Akello *et al.*(2007)之研究顯示，白殭菌內生菌能顯著地使香蕉球莖象鼻蟲(*Cosmopolites sordidus*)幼蟲減少 27.0~54.0%(內部的根狀莖)5.1~12.0%(假莖基部)和 26.5~40%(周圍根狀莖)之損失。

白殭菌對植物病原菌的抑菌活性及 作為內生菌之植物病害防治應用

近年來已證實白殭菌被視為具有雙重功能的微生物，能對付害蟲和植物病原菌。白殭菌的分離株在生體外(*in vitro*)的測試，顯示能抑制許多土媒和葉面病原菌之菌株生長，這些病原菌包括小麥全蝕病菌(*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*)(Renwick *et al.*, 1991)、蜜環菌(*Armillaria mellea*)和褐座堅殼菌(*Rosellinia necatrix*)(Reisenzein and Tiefenbrunner,1997)、尖鏟胞菌(*Fusarium oxysporum*)(Reisenzein and Tiefenbrunner,1997；Brak *et al.*, 1996)、蝴蝶蘭灰黴菌(*Botrytis cinerea*)(Brak *et al.*, 1996)、和立枯絲枯菌(*Rhizoctonia solani*)(Lee *et al.*, 1999)。除了能抑制菌絲生長外，白殭菌，尚可引起植物病原菌之細胞溶解如終極腐黴菌(*Pythium ultimum*)、德巴利腐黴菌(*P. debaryanum*)和小麥穎枯病菌(*Septoria nodorum*)(Vesely and Koubova, 1994)。自1800株根圈微生物中篩選出白殭菌，在盆栽測試時對小麥全蝕病菌具有良好和一致的防治效果(Renwick *et al.*, 1991)。在溫室和田間試驗顯示，將白殭菌施用到洋蔥球莖時能明顯地減少洋蔥黃萎病(*F.*

oxysporum f. sp. *Cepae*)(Flori and Roberti, 1993)。白殭菌可以保護番茄，不受立枯絲枯菌(Bishop, 1999；Seth, 2001；Ownley *et al.*, 2000；Ownley *et al.*, 2004)和薑軟腐病菌(*Pythium myriotylum*)(Clark, 2006；Clark *et al.*, 2006)造成苗期病害。白殭菌11~98分離株之孢子，與甲基纖維素溶液(methylcellulose solution)混合，施用到番茄種子，晾乾。經包覆之種子再種植到經人為接種立枯絲枯菌或薑軟腐病菌之土壤中。當種子以白殭菌(2×10^5 conidia/seed)處理，種植在經感染薑軟腐病菌之土壤中，其成活率和植物生長均有增加(Clark, 2006；Clark *et al.*, 2006)。在高病原菌壓力下，種子經白殭菌11~98(1×10^6 conidia/seed)處理，由立枯絲枯菌造成之猝倒，有顯示的減少。在土壤以立枯絲枯菌感染後再種植未經種子處理的山之春(Mountain Spring)番茄栽培種，成活率在18~27%，土壤未經立枯絲枯菌感染，再種植未經處理之種子，成活率77~82%，而經由白殭菌處理之種子，種植到感染立枯絲枯菌之土壤，其成活率為62~77%(Ownley *et al.*, 2004)。在土壤以立枯絲枯菌感染後，再種植未經種子處理的山之榮耀(Mountain Pride)番茄栽培種，其成活率為47~50%，土壤未經感染，再種植未經處理之種子，成活率為83~97%，而經白殭菌處理之種子，種植到感染立枯絲枯菌之土壤，其成活率為73~75%(Ownley *et al.*, 2004)將番茄種子以白殭菌孢子處理，能使種苗的損失降低至最低且結果一致(Ownley *et al.*, 2004；Seth 2001)。將棉花種子以白殭菌處理，對抗立枯絲枯菌，其幼苗的存活和高度均有增加(Griffin *et al.*, 2005；Griffin, 2007)。棉花和番茄種子以白殭菌11~28處理後，可偵測到其幼苗已有白殭菌的內生定殖(endophytic colonization)(Ownley *et al.*, 2004；Griffin, 2007)。Ownley *et al.*(2008)亦證實種子施用白殭菌11~28，會使得番茄和棉花幼苗產生內生定殖，能防治植物病原真菌立枯絲枯菌和薑軟腐病。在棉花幼苗經白殭菌11~28處理後誘發其對地毯草黃單孢菌(*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvarcerum*)之系統抗病性。在寄生生物檢定試驗發現白殭菌11~28之菌絲纏薑軟腐病菌之菌絲。

殺蟲抑菌可能的原因

白殭菌屬能產生數種代謝產物包括白殭菌黃色素(bassianin)、白殭素(beauvericin)、球孢交質(bassianolide)、膽固醇酰基酶抑制劑(beauveriolide)、白殭蝗毒素(bassiacridin)、卵孢菌素(oosporein)及軟白殭菌素(tenellin)。白殭菌素對

熱帶家蚊(*Culex pipiens* L.)有毒，會破壞其中腸的表皮，溶解其核糖體(ribosomes)，對埃及斑蚊(*Aedes aegypti*)和紅頭麗蠅(*Calliphora erythrocephala*)，亦有毒。但白殭菌素對玉米穗蟲(*Helicoverpa zea*)無毒，但球孢交質則會造成短暫之弛緩(atony)。玫烟色擬青黴菌(*P. fumosoroseus*)亦會產生白殭菌素和膽固醇酰基酶抑制劑。蠟蚧輪枝菌也能產生球孢交質。棒束孢屬真菌產生之代謝產物為棒束孢素(isarin)。細腳擬青黴菌(*P. tenuipes*)則產生細腳擬青黴素(tenuipesine)。由於蟲生真菌產生此類的代謝產物故對害蟲有效，同時兼有抑制真菌和細菌的功能。Lee *et al.*(2005)調查47種蟲生真菌有81%能產生抗芽孢桿菌(*Bacillus*)之物質，64%能產生抗葡萄球菌(*Staphylococcus*)物質。卵孢菌素和白殭素亦具有抗細菌之效果。

結論

要在蟲生真菌內生菌的研究有快速的進展，則必需就更多農作物之真菌內生菌進行取樣調查。同時要同進行人為接種和後續蟲生真菌能否定殖的研究。再者，蟲生真菌在整個植物上的分佈亦為相當重要的資料，要測其出現為系統性或是局部性，是否可經由種子作垂直傳送(vertical transmission)。如果蟲生真菌之防蟲抑菌之原因是由於代謝物的產生，那麼接種蟲生真菌到重要作物時，就需考慮到產生的代謝物可能進入到食物鏈時，所肇致的問題，此項議題值得更深入的探討。

參考文獻

1. 高穗生、謝奉家. 2007. 生物農藥之新進展. 台灣昆蟲特刊第九號(台灣植物保護發展願景研討會專刊)：249-264.
2. Ownley, B. H., Griffin, M. R., Klingeman, W. E., Gwinn, K. D., Moulton, J. K. and Pereira, R. M. 2008. *Beauveria bassiana* : Endophytic colonization and plant disease control. J. Invertebr. Pathol. 98 : 267-270.
3. Vega, F. E. 2008. Insect pathology and fungal endophytes. J. Invertebr. Pathol. 98 : 277-279.
4. Vega, F. E., Posada, F., Aime, M. C., Pava-Ripoll, M., Infante, F. and Rehner, S. A. 2008. Biol. Control 46 : 72-82.