

美和學校財團法人美和科技大學

104 年度教師產學合作計畫

結案報告書

計畫名稱：利用黑殭菌防治茶園害蟲茶小綠葉蟬

計畫編號：104-FI-DBT-IAC-R-004

計畫期間：104 年 5 月 1 日起至 104 年 7 月 31 日

計畫主持人：劉上賓

共同主持人：劉顯達、林昀生

研究助理：

經費總額：20000 元

經費來源：老爺兩茶葉有限公司

摘要

近日在台灣盛行的手搖茶飲掀起了極大的風波，經過檢驗發現，許多的茶葉均有農藥殘留過多的問題，甚至還有世紀之毒 DDT 也殘留在花茶之中，對於國人的身體健康均是極大的隱憂，所以在茶葉的栽培上，如果有可以替代化學農藥的選項，讓有機栽培的茶葉可以推廣開來，將是國人的一大福音，而生物防治正是有機栽培的明日之星，可惜目前在台灣可以選用的生物防治資材並不多。老爺兩茶葉有限公司一向致力於茶葉之有機栽培，近來茶小綠葉蟬(*Jacobiasca formosana*)在有機栽培之茶園內數量漸漸難以控制，但受限於目前台灣可以選用的微生物農藥非常有限，在有機栽培的推廣上遇到了強大的阻力。黑殭菌 (*Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*) 為一種蟲生真菌，可有效防治鞘翅目、鱗翅目等害蟲，將其開發成微生物殺蟲劑極具潛力，加上台灣目前無微生物殺蟲劑之商品，期望藉由本計畫的協助，使黑殭菌施用於田間時能發揮其防治功效，在茶園栽培之應用可以推廣，以提供未來作為蟲害防治之生物性農藥。

前言

許多本土分離之黑殭菌 (*Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*) 也可從自然被感染的可可椰子紅胸葉蟲體內分離出來。其中 MA-1 分離體對鞘翅目及鱗翅目昆蟲具有很強的致病性，但對氨基甲酸鹽類殺菌劑很敏感。利用紫外光及化學藥劑的誘變處理，可以得到抗免賴得之 MA-126 分離體，其對標的昆蟲的毒性程度與親本相同。穀類、大豆和一些農業副產品如米糠及稻桿浸出液可用為添加物，製成固態發酵培養基以大量生產孢子；酵母菌浸出液、葡萄糖液和 Sabouraud 液則用為生產菌絲之深層發酵培養基。許多用來製備以孢子和菌絲為主的真菌型殺蟲劑中之分散劑、保護劑和惰性載體，則分析其對孢子發芽及成活的影響。1986 至 1988 年在台灣南部進行兩個以 MA-1 和 MA-126 孢子製劑之小規模田間噴施試驗，會顯著降低被感染之椰子樹上的可可椰子紅胸葉蟲的族群。目前利用這類生物防治推廣計畫，已防治了 80,000 株以上的椰子樹免於蟲害。小菜蛾(*Plutella xylostella*)為台灣田間及溫室栽培十字花科蔬菜的主要害蟲，但接種每毫升 107 孢子濃度的 MA-126 懸浮液後三日，有 90% 以上的小菜蛾幼蟲死亡。當真菌菌絲經由體表氣孔侵入蟲體後，孢子發芽管會直接貫穿蟲體。目前在台灣小菜蛾綜合防治推廣計畫下，有 120 種蔬菜的網室栽培是利用 MA-126 可濕性粉劑和液劑劑型，配合低劑量的化學藥劑來防治小菜蛾。黑殭菌 MA-126 菌株，殺蟲寄主範圍廣，對鞘翅目、鱗翅目殺蟲致死力強，對同翅目及蜚蠊目害蟲之防治亦十分有效，不但可作為農業田間害蟲防治，也可作為室內衛生昆蟲之防治如蜚蠊。黑殭菌也可用於草皮地下害蟲之防治，尤其對鞘翅目之幼蟲特別有效，可以作為高爾夫球場害蟲生物防治，不施用殺蟲劑減少對球場環境之污染，更可避免球友被殘留之農藥危害。

以往利用微生物防治害蟲之研究主要以病毒及細菌為主，而蟲生真菌較少引人重視，儘管具防治

潛力之蟲生真菌約有 750種之多，卻直到1980年美國才有一種蟲生真菌正式登記註冊商品化。而事實上首先被發現寄生於昆蟲之蟲生微生物是白殭菌(*Beauveria bassiana*)，於19世紀末期，美國中西部就曾利用白殭菌來防治長椿象(*Blissus leucopterus*)。過去有人認為蟲生真菌防治害蟲其效果較不穩定，但晚近因昆蟲流行病學(epizootiology)之發展以及強致病性蟲生真菌之選擇利用，使得害蟲防治成功例子增加不少，如蘇俄有商品化之白殭菌—Boverin 防治科羅拉多馬鈴薯甲蟲(*Leptinotarsa decemlineata*)；巴西利用黑殭菌(*Metarhizium anisopliae*)防治甘蔗、牧草之泡沫蟲；世界衛生組織(WHO)亦曾資助研究黑殭菌防治蚊子試驗成功；西薩摩亞(West Samoa)利用黑殭菌防治可可椰子犀角金龜；在英國利用 *Verticillium lecanii* 防治溫室中蚜蟲；在澳洲已發展出利用 *Culicinomyces clavosporus* 防治蚊子；美國 *Hirsutella thompsoni* 於1981年5月正式通過註冊登記，為第一個在美國商品化之蟲生真菌。

我國地處亞熱帶，害蟲問題也特別嚴重，多年來我國農業生產上對化學殺蟲劑得過分依賴與不當使用，所造成環境污染、抗藥性、殘毒等問題，近年來常為社會大眾所詬病，近日在台灣盛行的手搖茶飲掀起了極大的風波，經過檢驗發現，許多的茶葉均有農藥殘留過多的問題，甚至還有世紀之毒 DDT 也殘留在花茶之中，對於國人的身體健康均是極大的隱憂，所以在茶葉的栽培上，如果有可以替代化學農藥的選項，讓有機栽培的茶葉可以推廣開來，將是國人的一大福音。茶園的害蟲種類繁多，如茶避債蛾、台灣避債蛾、茶蠶、茶小綠葉蟬等等，以茶小綠葉蟬為例，成蟲將卵產於幼梢組織內，若蟲、成蟲以口器插入幼嫩組織內，吸收營養，使茶芽發育受阻，被害幼嫩葉呈黃綠色，嚴重時茶芽捲縮不長，葉呈船形、節間縮短，葉緣變褐色甚至落葉，以5~7月發生最為嚴重。老爺兩茶葉有限公司一向致力於茶葉之有機栽培，近來小綠葉蟬(*Jacobiasca formosana*)在有機栽培之茶園內數量漸漸難以控制，但受限於目前台灣可以選用的微生物農藥非常有限，在有機栽培的推廣上遇到了強大的阻力。為解決此一問題，病蟲害綜合管理(IPM)策略得發展應用為一必然趨勢，生物農藥(Biological Pesticide)則為其傳統化學農藥的最佳代替。隨著環保意識的高漲以及全球性對整體地球生態永續性的重視，生物農藥之研究發展以為時勢之所趨。有鑑於化學農藥所造成的環境問題，各地對於微生物防治病蟲害之研究逐漸受到重視。微生物殺蟲劑具寄主專一性、對環境生態影響小且害蟲不易產生抗藥性，因此具害蟲致病力之病原菌種類、變種、品系等不斷地被發覺、研究及應用。蟲生真菌黑殭菌(*Metarhizium anisopliae*)對多種害蟲均能成功防治，為生物防治之利器。

研究材料與方法

一、確認黑殭菌產品之菌種保存

微生物培養要成功之先決條件為菌種之來源，因此菌種的保存為首要因素。有良好的菌種保存方式，才能確保菌種優良的特性被保存，使每次的接種源皆能有相同的良好效果。

二、黑殭菌菌種生物活性指標的建立

隨著微生物繼代培養的結果，往往會導致有些特性會消失，尤其是微生物作為應用生物防治用時，特別更是要考量到生物活性方面，以免生產到最後之微生物農藥商品的防治效果降低或失效，所以每次進行發酵培養時，所接入的菌種之生物活性能力就顯的格外重要。因此建立一套標準的生物活性指標，作為每次接種源的種菌篩選與把關為首要解決之問題。

三、黑殭菌太空包量產

將太空包量產之黑殭菌提供給老爺兩茶葉有限公司作為田間試驗，觀察黑殭菌對茶小綠葉蟬等茶園害蟲之實際防治效果。

生技系提供黑殭菌液體噴灑於老爺兩嘉義光華茶園(石桌)約 1.5 分地，每月噴灑 2 次，每次 2000ml，5 月及 6 月噴灑 4 次後，於 7 月調查防治效果。



成果

1. 確認黑殭菌產品之菌種保存

- 80°C 低溫冷凍及液態氮保存及加礦物油常溫保存，兩種技術三種狀態保存之菌種，檢測

1. 菌絲生長速率 2. 產孢率 3. 黑殭菌菌種生物活性及殺蟲效率，其結果為以低溫冷凍及液態氮保存

效果為佳，放置九個月後之黑殭菌菌種（原原種及原種）可維持與原菌種之特性。

2. 輔導黑殭菌菌種生物活性指標的建立

利用小菜蛾（Diamond-back Moth, *Plutella xylostella*）四齡幼蟲作為黑殭菌菌種生物活性指標，測試LD⁵⁰，結果發現此生物活性指標呈現與黑殭菌菌種活性正相關。

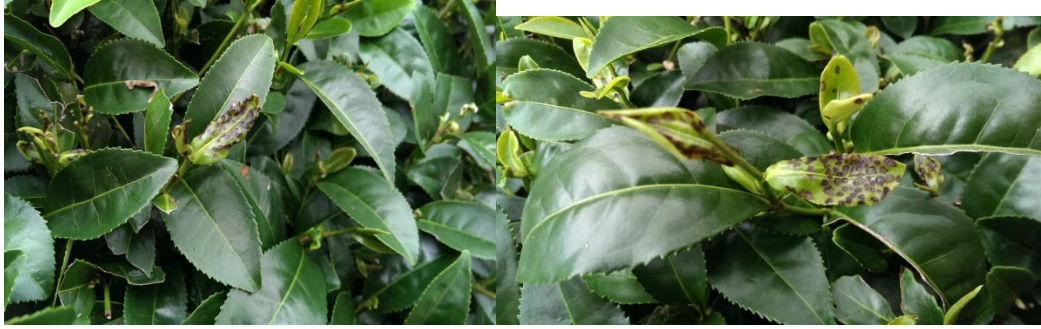
3. 改進黑殭菌發酵培養技術

探討黑殭菌以固體發酵設備之量產，微粒劑量產之固體發酵及平面量產之固體發酵三種技術，結果發現以固體發酵設備之量產可有較高之產量。唯固體發酵設備現為原型，要發展成為商業化工業幾之設備仍要有供氧通氣，溫度調節，濕度調節及旋轉攪拌等重要參數配合設計。黑殭菌微粒劑量產之固體發酵不失為新方法，相當可行，濕度調節及水分控制為成功之要件，尚待進一步探討。

4. 量產之黑殭菌對於防治茶小綠葉蟬等茶園害蟲有明顯效果，使得茶園之有機栽培得以進一步推廣，減少化學農藥的依賴，讓國人在享受茶飲時可以有安全健康的選擇。

使用黑殭菌前之茶葉損傷眾多：





使用黑殭菌後茶葉之保護效果良好:



參考文獻

- Allard, G. B., Chase, C. A., Heale, J.B., Isaac, J. E., and Prior, C. 1990. Field evaluation of *Metarhizium anisopliae* Deuteromycotina:Hyphomycetes as a mycoinsecticide for control of sugarcane froghopper, *Aeneolamia variasaccharina* (Hemiptera: Cercopidae). J. Invertebr. Pathol. 55:41-46.
- Burges, H. D. 1981. Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. Academic Press. London, 949 pp.
- Caltagirone, L. E. 1981. Landmark examples in classical biological control. Ann. Rev. Entomol. 26:213-232.
- Daoust and Roberts. 1983. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia effect of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against mosquitoes. J. Invertebr. Pathol. 41 143-150.
- Daoust, R. A., Ward, M. G., and Roberts, D. W. 1982. Effect of formulation on virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia against mosquito larvae. J. Invertebr. Pathol. 40:228- 236.
- Daoust, R. A., Ward, M. G., and Roberts, D. W. 1983. Effect of formulation on viability of *Metarhizium anisopliae* conidia. J. Invertebr. Pathol. 41:151-160.
- Ferron, P. 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. Ann. Rev. Entomol. 23:409-442.
- Ferron, P., Robert, P. H., and Deotte, A. 1975. Susceptibility of *Oryctes rhinoceros* adults to *Metarhizium anisopliae* . J. Invertebr. Pathol. 25:313-319.
- Holdom, D.G., and Klashort, G. Van De 1986. Inexpensive culture media and methods for *Nomuraea rileyi*. J. Invertebr. Pathol. 48:246-248.
- Ignoffo, C. M. 1985. Manipulating enzootic-epizootic diseases of arthropods. P:243-262.
- Jimenez, J., and Gillespie, A. T. 1990. Use of the optical brightener Tinopal BOPT for the rapid determination of conidial viabilities in entomogenous deuteromycetes. Mycol. Res. 94:279-283.
- Kleespies, R. G. 1992 Production of blastospores by three strains of *Metarhizium anisopliae* (Metch.) sorokin in submerged culture. Biocontrol Science and Technology. 2: 127-135.
- Liu, S. D., Chang, Y. C., and Huang, Y. S. 1990. Application of entomopathogenic fungi as biological control of *Leucaena psyllid*, *Heteropsylla cubana* Crawford (Homoptera: Psyllidae) in Taiwan. Plant Prot. Bull. 32:49-58.

- Liu, S. D., Lin, S. C., and Shiau, J. F. 1989. Microbial control of coconut leaf beetle *Brontispa longissima* with green muscardine fungus, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. J. Invertebr. Pathol. 53:307-314.
- Martin, S. M. 1964. Conservation of microorganisms. Ann. Rev. Microbiol. 18: 1-16.
- Pereira, R.M., and Roberts, D. W. 1990. Dry mycelium preparations of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. J. Invertebr. Pathol. 56:39-46.
- Prior, C. 1985. The infectivity of *Metarhizium anisopliae* to two insect pests of coconuts. J. Invertebr. Pathol. 45:187-194.
- Studdert, J. P., and Kaya, H. K. 1990. Effect of water potential, temperature, and claycoating on survival of *Beauveria bassiana* conidia and in a loam and peat soil. J. Invertebr. Pathol. 55:417-427.
- Tan, C. S. and J. A. Stalpers. 1991. Free-drying of fungal hyphae. Mycologia 83(5): 654-657.

劉顯達 2005 黑殭菌量產之固體發酵設備 2005.1-2022.6 中華民國發明專利 第 226369 號