

行政院農業委員會林務局委託研究計畫系列 98 林發-3.1-造

-73(01)

研究成果報告

蘇鐵白輪盾介殼蟲之真菌性天敵調查
及其在生物防治之評估

Bio-control of cycad scale insect with
fungal parasites : survey and appraisal.

曾顯雄

國立台灣大學植物病理與微生物學系

中文摘要

於台東延平鄉紅葉山區，台東蘇鐵保留區採集罹受白輪盾介殼蟲嚴重感染之台東蘇鐵之罹病枝條之枝葉，經濕室潤濕培養後，鏡檢枝葉上之白輪盾介殼蟲之若蟲、成蟲或盾狀蟲殼，並分離疑似有潛伏感染蟲體之蟲生真菌；或由其他植被蟲體上篩選不同之蟲生真菌，進行純粹培養鑑定。目前已鑑定 11 屬之 15 種之真菌，包括 *Acrodontium crateriforme*, *Acromyces ingoldii*, *Nalanthamala* sp. (= *Rubrinectria olivacea*), *Paecilomyces lilacinus*, *Tritirachium dependens*, *Simplicillium lanosiniveum* 以及最為常見之 *Fusarium coccophilum*。其中 *A. crateriforme*, *T. dependens*, *S. lanosiniveum* 及 *Fusarium coccophilum* 較具侵染寄生昆蟲之潛力，採集自自然界感染 *Fusarium coccophilum* 蟲體之分生孢子或在增殖後，以孢子懸浮液噴灑接種採自人工培養之蘇鐵枝條之白輪盾介殼蟲雌蟲上之若蟲或成蟲，或其尚未孵化之卵，於濕室室溫培養。初步接種結果顯示，*F. coccophilum* 對白輪盾介殼蟲具有寄生能力。其他蟲生真菌接種確認病原性之試驗則正進行中。

關鍵字：蘇鐵、台東蘇鐵、白輪盾介殼蟲、昆蟲寄生菌、生物防治

英文摘要

Cycad scale insects inhabiting on the infested leaves, twigs and rachid sampled from Taitung cycad national conservation areas were examined for the potential fungal insects parasites. The same practice was also applied for isolation of potential entomopathogenic fungi on insect cadavers on other plant vegetation. Fungi associated with the infested cycad scale insects or other insects cadavers were isolated by single or mass spores, or single hyphal tip isolation techniques. The obtained axenic fungal strains were identified according to their morphological characters and further verified by rDNA sequences if needed. Totally, ten genera, representing 15 species of fungi have been secured. Of them, *Acrodontium crateriforme*, *Acromyces ingoldii*, *Nalanthamala* sp. (= *Rubrinectria olivacea*), *Paecilomyces lilacinus*, *Tritirachium dependens* and *Fusarium coccophilum* have been documented with insect-infection potential. *F. coccophilum* spores either collected from naturally infected scale insect host or propagated on potato dextrose agar (PDA) or 1/4 strength PDA amended with autoclaved cycad scale corpus. The spore suspensions at 10^6 /ml were sprayed onto scale insects, incubated in moist chamber. After inoculation, daily examination was carried out for successive two weeks to access the infectivity and mortality. The preliminary results showed that *F. coccophilum* was pathogenic to the

scale insect, and produced able to sporodochia on host in one week. The other potent entomopathogenic fungi will also be subjects to test their virulence toward the scale insect shortly.

Keyword: cycad, *Cycas tailungensis*, scale insect, *Aulacaspis yasumatsui*, entomopathogenic fungi, biocontrol

壹、前言

蘇鐵白輪盾介殼蟲 (*Aulacaspis yasumatsui* Takagi) 於 2001 年在北部被發現後，除了逐漸往南部傳播感染一般庭園用之蘇鐵外，甚至傳播到台東紅葉村之台東蘇鐵(*Cycas tailungensis*)自然保留區內。根據林務局之資料了解，台東紅葉村台東蘇鐵自然保留區經現場巡視人員，於 94 年 1 月期間勘查延平事業區第 19 林班時發現遭受白輪盾介殼蟲害。94 年 5 月會同林業試驗所再次會勘後發現已有 9 成 9 感染。在 94 年發現台東蘇鐵自然保留區內受白輪盾介殼感染後亦立即展開緊急防治，分別採用以「3%加保伏粒劑」、「5%陶斯松粒劑」以及百利普芬乳劑稀釋窄域礦物油對植株進行噴灑。除此之外，亦在同年進行剪除及燒毀工作以及施放捕食性雙色出尾蟲，進行生物防治(賴,2007)。

台東蘇鐵為台灣特有種，目前已經公告列入保護的珍貴稀有植物，在生態上的意義實屬珍貴。目前蘇鐵白輪盾介殼蟲已擴散至全國成為常年性危害蘇鐵之害蟲而難以完全將其滅絕，唯有採取定期防治一途。然而，台東蘇鐵自然保留涵蓋面積約 290 公頃且為山區起伏不平之地勢。以如此廣大之面積加上山區地勢，若以化學藥劑進行定期則防治所需耗費之大量人力物力不可小覷。如果能輔以生物防治加以施放天敵 (如昆蟲寄生真菌或寄生性與捕食性昆蟲)，利用天敵可於自然界隨著寄主昆蟲繁衍的特性使白輪盾介殼蟲密度降低，如此一來應可收事半功倍之效。

以柑橘粉蝨為例，在 1920 年代，柑橘粉蝨對美國佛羅里達州的柑橘產業造成相當重要的威脅。柑橘粉蝨之若蟲吸取柑橘葉片之汁液，除了造成寄主本身營養物損失之外。在粉蝨取食過程會分泌蜜露而引發黑黴病因而影響植株之光合作用，因為這些原因造成植株之能量損失導致大量減產。自從 1930 年代早期，經由佛羅里達大學開始引用柑橘粉蝨之病原真菌 *Aschersonia aleyrodis* 及 *A.*

goldiana 進行生物防治後得到了相當有效的控制效果。至今，由於 *Aschersonia* spp. 在佛羅里達的柑橘栽培區已建立起田間棲群，因此柑橘粉蝨已被相當程度的抑制在一定的水平以下。

根據 Tzean et al. (2001) 對我國進行大面積之昆蟲寄生真菌的收集時發現，在介殼蟲上常見之蟲生真菌以 *Aschersonia* 屬之真菌為主。而 *Aschersonia* 屬之蟲生真菌，其寄主範圍主要侷限於同翅目 (Homoptera) 之介殼蟲 (scale) 及粉蝨 (white fly)。因此，本計畫將探討可感染入侵台東蘇鐵之白輪盾介殼蟲之病原真菌，檢測、篩選、並提升最具潛能致病力之病原真菌，研發最佳劑型於國內罹患白輪盾介殼蟲肆虐之林區、公園、校園釋放，以壓制其猖獗危害，恢復生態系之平衡；此外，將技轉所研發相關之生物製劑科技予以相關業者，以利其於國內外行銷推廣。

貳、材料與方法

一、台東蘇鐵輪盾介殼蟲及其他不同植物上昆蟲真菌性天敵之分離調查以及蟲生真菌採集

本次期末實驗除了來自林務局台東林管處所寄之蘇鐵保護區蘇鐵枝條樣本外，為求多元、多樣之不同蟲生真菌之分離，尚於滿月圓森林遊樂區、東眼山森林遊樂區、宜蘭五峰旗瀑布等地點，進行蟲生真菌之採集及分離等步驟。採集地點之選擇依據水源附近之森林遊樂區，較潮濕之區域。另外，採集時間主要選擇連續降雨後數日後進行。分離方法則是以消毒滅菌後之解剖刀、解剖挑針，將菌種自蟲體上移入 Water Agar，兩天後切取單菌絲，移入 1/4 強度之馬鈴薯洋菜培養基 (1/4 PDA) 或 MLA 培養基 (Modifies Leonian's agar)，25°C 下培養至產孢，以光學顯微鏡鏡檢產孢構造後，利用型態鑑定檢索，並抽取核酸利用分子生物學方法，對比 NCBI 資料庫鑑定菌種後保存。

台東紅葉山區蘇鐵自然保留區 23 林班 40 林班，採集罹受白輪盾介殼蟲嚴重危害之台東蘇鐵枝葉，將其放入已填加潤濕擦手紙之夾鍊袋中，於室溫培養

(incubation)，48-120 小時之後，於解剖顯微鏡鏡檢，若發現可能之寄生情形，立即拍照存檔，並挑起具真菌菌絲覆蓋之蟲體或產孢構造，在光學顯微鏡下觀察，鑑定可能之菌種，同時將其移植於至含 100 ppm streptomycin sulfarte 以及 chloramphenicol 之 1/4 強度之馬鈴薯洋葉培養基(1/4 PDA)或 MLA 培養基 (Modifies Leonian's agar)，室溫培養 24-72 小時後，於解剖顯微鏡下，切取單菌絲，再行移植於 1/4PDA 斜面試管培養適當時間之後，再於複合式光學顯微鏡下觀察、照像、鑑定。除了室溫潮濕培養以利真菌生長之外，也可以將採集之樣品放入添加濕擦手紙之夾鍊袋中，於 4°C 冰箱中培養，使介殼蟲弱化後再於 48-120 小時後於解剖顯微鏡下觀察、鏡檢，以上述相同方法分離疑似具寄生潛力之蟲生真菌。鑑定方式除了利用型態鑑定檢索已發表之相關分類論文或專誌鑑定至屬、種之外，有疑惑之近似種或難以鑑定之蟲生真菌也可將其培養於 PDA 或 1/4PDA 培養基抽取核酸，利用廣泛性引子對 ITS4、ITS5，利用聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)增幅 ITS1-5.85S-UTS2 rDNA，定序後上 NCBI 基因資料庫比對菌種資料，作為輔助鑑定之參考。

二、疑似蟲生真菌之繁殖和對白輪盾介殼蟲致病性之檢測

鑑定後之菌種，即針對疑似白輪盾介殼蟲之真菌性感染源進行柯霍氏法則 (Koch's postulates)進行確認。曾有研究顯示，田間大面積施放黑僵菌之劑量應在每公升 $1\sim 5 \times 10^{12}$ 之間，並以 70~100 μm 之超微體積(ultra low volume, ULV)油滴形式噴灑在目標蟲體上(Langewald et al, 1999)可得較佳之侵染防治效果。故將以無菌水將所產生之分生孢子洗下，使用血球計數器計數，將孢子懸浮液製成 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^9/\text{ml}$ 之間，每十倍增量做一次致病力之實驗。蟲生真菌之分生孢子常為疏水性，實驗室內實驗常加入 0.01% Tween 80 或 Triton X-100 於真菌性殺蟲劑內，使孢子較易附著於蟲體或葉上(Metthews, 2001)。故確認病原性之實驗應

針對不同病原菌製作不同之劑型，測試是否依柯霍氏法則，驗證此等蟲生真菌感染白輪盾介殼蟲之能力。

接種方式設計孢子懸浮液不同製劑、蘇鐵蟲體不同培養狀況、並且針對疑似蟲生真菌設計含蟲體之培養基。另外，對於疑似白輪盾介殼蟲寄生真菌，測試其基本特性，包括昆蟲體壁分解酵素檢測、生長測定、以及大量產孢之培養條件。

孢子培養基之製備，此次採用不同設計以利鏽孢菌產孢，採用的培養基配方有 MEA、MLA、1/4 強度並添加抗生素之 PDA、以及在培養基上覆蓋玻璃紙之方法。除此之外，另於培養基內添加介殼蟲體（含盾殼）以及加入穀類（米）作為營養來源，希望藉此提升蟲生真菌之致病性。除了添加介殼蟲體，也於培養基內添加蟬蛻，以及嘗試各式不同培養基以提升不同蟲生真菌之侵染能力。接種方式除了體外(*in vitro*)之接種，也於感染白輪盾介殼蟲之蘇鐵盆栽內進行活體 (*in vivo*) 之接種，於接種時，也維持高溼度之培養環境，以營造出對於蟲生真菌有利之寄生環境。另外，除了一般之孢子懸浮液噴灑外，也利用滅菌過之棉布，沾取培養基之碎塊，將含有培養基碎塊之棉布，直接覆蓋於被白輪盾介殼蟲寄生之蘇鐵葉表，進行直接接觸感染，並且藉此提供少許營養以利蟲生真菌生長、進行寄生。此次實驗因為觀察到蟲體被鏽孢菌 (*Fusarium coccophilum*) 寄生之情形，為求把握其致病力活性，故挑取被感染蟲體之分生孢子堆(sporodochia)，置於含 0.01% Tween 80 之無菌水以及 10% EAO (Emulsifiable Adjuvant Oil, mineral oil) 中，製成孢子懸浮液。以血球計數器計算孢子濃度，調整為 1×10^4 /ml 後，直接以微量吸管吸取孢子懸浮液，滴於剪下之含不同齡期白輪盾介殼蟲感染之蘇鐵枝葉後，將之放入 15 公分塑膠培養皿中，同時放入小塊潮濕擦手紙，當為 moist chamber。接種後兩日後逐日觀察是否寄生情形出現。

參、結果與討論

蟲生真菌分離、保存、鑑定

本次期末實驗將來自林務局台東林管處所寄之蘇鐵保護區蘇鐵枝條樣本觀察後，將所有可能疑似含有白輪盾介殼蟲寄生能力之真菌鑑定、保存後，整理所有菌株於表一。為求多元、多樣之不同蟲生真菌之分離，尚於福山植物園、滿月圓森林遊樂區、東眼山森林遊樂區、宜蘭五峰旗瀑布等地點，進行蟲生真菌之採集及分離，分離結果如表二。在分得到之菌種列表(表二)，其中 *Akanthomyces araneorum*、*Aschersonia* sp.、以及 *Paecilomyces tenuipes*、*Paecilomyces javanicus*、*Paecilomyces fumosoroseus* 等三種擬青黴菌還有蟲草菌 *Cordyceps cardinalis*，皆曾被報導過有寄生於昆蟲之能力，其型態、特徵等，皆統整於圖一、圖二、圖三。擬青黴菌為常見之蟲生真菌，也有報導指出能夠寄生鱗翅目幼蟲、蝗蟲、粉蝨等害蟲，但通常較難接種成功。而由台東林管處所提供之延平鄉紅葉山區蘇鐵自然保留區(23、40 林班)採集罹受白輪盾介殼蟲嚴重危害之台東蘇鐵枝葉，在 2009 年 12 月 14 日採集之樣品中，再次發現 *Fusarium coccophilum* 寄生於白輪盾介殼蟲之情形。此次觀察到之鐮孢菌其型態相當接近 2008 年 4 月、9 月發現之寄生於白輪盾介殼蟲之鐮孢菌。對 2009 年 12 月份發現之 *Fusarium coccophilum* 進行分離、培養、觀察後，和前人發現之不同棲地、作物介殼蟲之型態特徵比較，如表三。FC9812 和 FC9709 之型態特徵相同，但和 FC9704 (四月株) 差異較多，主要差別在於四月株其孢子大小較大，比相同之鐮孢菌長度大約大 30 μm 。由於不只一次發現於台東蘇鐵自然保護區，而且此次被感染之蟲體甚多，可以證實其寄主包括白輪盾介殼蟲 (*Aulacaspis yasumatsui*)，而且可能已經造成小型流行病，於蘇鐵葉片間傳播。為力求期大量流行病之快速發生，是有需要研發適當劑型，選擇適當施用季節，適當噴佈作業方式於蘇鐵白輪盾介殼蟲嚴重肆虐之疫區施用。另外，有觀察到蚧多囊子囊菌 *Myriangium duriaei* 寄生於白輪盾介殼蟲。*M. duriaei* 曾被 Sawada, K.(1914)報導可寄生梨樹或蘋果樹介殼蟲 (scale insect)，但這是首次被觀察到寄生於白輪盾介殼蟲。*Myriangium duriaei* 在葉片上寄生白輪盾的情形包括初期、中期以及產生成熟之子囊 (圖三、C, D,

E)。此菌之腔子囊座內其含有球型或近球型之單子囊，子囊內含有 8 個長橢圓形之子囊孢子。此菌在侵染生活史中初期蟲體被黑色菌絲覆蓋，邊緣出現白色粒狀組織化構造，之後慢慢成熟，更多白色粒狀之組織化構造出現，最後慢慢成為深色成熟之腔子囊座，於子囊座其內之組織菌絲被溶解成子囊腔，產生子囊孢子。此次採集之樣本中，觀察到許多被寄生之情形，可能也已經成為小型流行病。除了 *F. coccophilum* 以及 *M. duriaei* 之外，還有其他可能之寄生真菌如可產生瓶狀子囊殼之 *Hypocrella* sp. (圖三、H, I)。12 月來自台東之可研究樣本豐富，其上富含潛力之蟲生真菌，目前尚在培養、鑑定中。

鐮刀病菌之產孢、致病性檢測

此次實驗致力於重現自台東蘇鐵保護區分離到之 *F. coccophilum* 的病原性，重點著重於病原性之恢復和提升。因此，在培養基設計上，參考其他蟲生真菌培養條件，添加穀類以及可能寄主白輪盾介殼蟲作為營養源，如此培養出之 *F. coccophilum* 產孢於培養基內，在培養基內可以發現孢子團。另外，為了使其大量產孢用於製作孢子懸浮液，在培養基表面覆上玻璃紙，將方便收穫所有繁殖之孢子。另外也使用了常用於培養蟲生真菌之培養基 SDA(Sabouraud Dextrose Agar)，雖然其產孢結果不如預期，但菌株生長良好。以 PDA 為基底，覆蓋玻璃紙之培養方式，在培養一個月後，產孢狀況良好，可以看到鮮橘色之孢子團。以 1/4 強度 PDA 培養之結果，產孢情況則是於培養基上兩周後產生大量孢子團。接種時製作孢子懸浮液，則是需要使用解剖刀將其刮取。此狀況則是有利於發展不同於一般孢子懸浮液的接種方式。

除了培養條件改良之外，此次實驗也改良接種方法。利用產生於培養基內之孢子團，連同培養基之瓊脂塊加入無菌水中製作懸浮液，並添加 0.01% Tween 20 作為介面活性劑。將孢子懸浮液噴灑於受白輪盾介殼蟲 2~4 齡之幼蟲感染的蘇鐵葉片上後，以滅菌後之棉布，沾取含孢子團之瓊脂塊後 (Agar plugs)，覆於葉

表，再將夾鍊袋將葉片套袋，並於袋中置放潮濕擦手紙，以維持袋內溼度。於溫室中，在同一株盆栽，對其中感染幼齡幼蟲之葉表進行噴灑，其他葉片則作為對照組。兩天後每兩日進行觀察。接種之結果如表四。

在 2009 年 12 月份發現採集樣品中大量 *F. coccophilum* 感染之情形，即利用蟲體上之產孢構造製作孢子懸浮液，以微量滴管將孢子懸浮液滴在溫室蘇鐵培養之白輪盾介殼蟲，內含雌蟲、1-4 齡幼蟲、卵、雄蟲鞘，並於此蘇鐵剪枝置於濕潤之 15 公分塑膠培養皿中，在四天後觀察到實驗組蟲體上出現火焰狀構造(圖四)，初步認為 *F. coccophilum* 的確具有白輪盾介殼蟲寄生能力。除了使用添加 0.01% Tween 20 之無菌水製作孢子懸浮液外，又進行第二次接種試驗，此次使用 EAO 油劑製作孢子懸浮液，也依然使用 0.01% Tween 20 做對照。但在七天後觀察兩種劑型皆無致病之情況出現。推測可能原因為 *F. coccophilum* 老化活力喪失，或是孢子懸浮液濃度不夠，導致接種並未成功。

由於白輪盾介殼蟲含有臘質盾殼，未來提昇病原性之培養基設計，會添加含有較高油脂成份之蟲蛹或幼蟲蟲體，以誘導 *F. coccophilum* 產生分解蟲體體表幾丁質、脂質酵素之能力，以期可成功感染白輪盾介殼蟲。另外也將嘗試測試不同的蟲生真菌，是否可以感染白輪盾介殼蟲，做為另一種選擇。至於在於接種方式上，可以發現溼度和溫度為重要的感染因子，若是能夠維持並找到適合的方式，相信還是有機會能夠以真菌防治白輪盾介殼蟲危害台東蘇鐵。

肆、表與圖

表一、台東蘇鐵白輪盾介殼蟲蟲體所分離鑑定之真菌

Table 1. Fungi isolated from the scale insect cadaver on Taitung cycads

Fungi species	Acc. No.	Collection time	Bioactivity*		
			EPF	PPF	SF
<i>Alternaria zinniae</i>	A009-1	9806	-	-	+
<i>Acrodontium crateriforme</i>	AC9805	9611	+	-	+
<i>Acromyces ingoldii</i>	AI9805	9611	+	-	+
<i>Alternaria</i> sp.	A064	9803	-	+	-
<i>Bionectria ochroleuca</i>	98070603	9804	±	-	+
<i>Cladosporium colocasiae</i>	A020	9802	-	+	-
<i>Cosmospora cupularis</i>	GG01	9803	±	-	+
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	TD012	9712	-	-	+
<i>Dothideomycete</i> sp.	98070201	9711	-	-	+
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	TD	9801	-	-	+
<i>Fusarium coccophilum</i>	FC9804	9704	+	-	-
<i>Fusarium coccophilum</i>	FC9809	9709	+	-	-
<i>Fusarium coccophilum</i>	FC9912	9812	+	-	-
<i>Fusarium equiseti</i>	A065	9806	-	-	+
<i>Fusarium koshuensis</i>	A046	9807	-	-	+
<i>Fusarium proliferatum</i>	A051	9803	-	+	+
<i>Gibberella moniliformis</i>	A008	9806	+	-	+
<i>Gibberella</i> sp.	A063	9806	+	-	+
<i>Helminthosporium solani</i>	TD029	9602	-	+	-
<i>Hypocreales</i> sp. LM512	A017-1	9806	+	-	-
<i>Hypholoma appendiculatum</i>	TD023	9807	-	-	+
<i>Myriangium duriaei</i>	DecA01	9812	+	-	-
<i>Ophiosphaerella agrostis</i>	A059	9806	-	+	+
<i>Rubrinectria olivacea</i>	RO9611	9611	+	-	+
<i>Pestalotiopsis planimi</i>	A047	9806	-	+	+
<i>Pestalotiopsis theae</i>	A034	9805	-	+	+
<i>Pestalotiopsis virgatula</i>	A046	9805	-	+	+
<i>Pestalotiopsis vismiae</i>	A021	9805	-	+	+
<i>Simplicillium lanosiniveum</i>	SL9612	9612	+	-	-
<i>Tritirachium dependens</i>	TD9611	9611	+	-	+
<i>Verticillium fungicola</i> var	VF9611	9611	+	-	+

fungicola

*Abbreviation EPF : entomopathogenic fungi ; PPF : plant pathogenic fungi ;
SF : saprophytic fungi + : present ; - : absent

表二、由台灣各地不同罹病昆蟲蟲體所採集分離鑑定之蟲生真菌

Table 2. Entomopathogenic fungi isolated from insects cadavers collected from different locations in Taiwan

Fungi species	Host	Acc. No.	Collection	
			Location	Time
<i>Akanthomyces aranearum</i>	unknown	F09	Fusan	9809
<i>Aschersonia sp.</i>	scale insect	DJSII006	Dajaushi	9807
<i>Cordyceps cardinalis</i> (<i>Tolypocladium sp.</i>)	unknown	T7	Sanshia	9809
<i>Cyphellophora laciniata</i>	wite fly	A01	Ilan	9807
<i>Fusarium coccophilum</i>	scale insect	FC01	Taitun	9812
<i>Gibellula pulchra</i>	spider	G01	Taipei	9812
<i>Myriangium duriaei</i>	scale insect	DecA	Taitun	9812
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	spider	B03	Ilan	9807
<i>Paecilomyces javanicus</i>	caterpillar	M05	Sanshia	9809
<i>Paecilomyces tenuipes</i>	caterpillar	D200D1	Ilan	9807

表三、台東蘇鐵白輪盾介殼蟲之寄生性鐮孢菌 *Fusarium coccophilum*
和相同物種寄生不同棲地作物之介殼蟲之鐮孢菌型態、特徵比較

Table 3. Comparison of the growth rate, colony and morphological characteristics of *Fusarium coccophilum* isolated from infested scale insect *Aulacaspis yasumatsui* on Taitung cycads and also from other infested scale insects cadavers reported elsewhere

Characteristics	Isolates			
	C. Booth ^a 1971	Huang & Sun ^b 1986	Tzean & Tsai ^c 2008.04	Tsai & Tzean ^c 2009.12
Host	Scale insect	<i>Coccus viridis</i>	<i>Aulacaspis yasumatsui</i>	<i>Aulacaspis yasumatsui</i>
Growth rate	Slow growing	Slow growing	Slow growing	Slow growing
Colony	Floccose white pink to pale orange	Birght orange sprorodochial layers formed on the sparse aerial mycelium	Yellowish red sprorodochial layers formed on the sparse aerial mycelium	Floccose light orange to pale orange
Conidiogenesis	Sporodochia	Sporodochia	Sporodochia	Sporodochia
Conidia	Hyaline cylindrical slightly curved	Cylindrical slightly curved thick-walled	Cylindrical slightly curved thick-walled	Cylindrical slightly curved
Macroconidia	80-100µm X	87.5-112.5µm X	133-175µm X	85-110µm X
Septa	6-7µm 6-10	6.3-7.5µm 5-9	5~6.5µm 5-11	5-7µm 5-10
Microconidia				
And	Absent	Absent	Absent	Absent
Chlamydo spores				

^a C. Booth. 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute.

^b 黃振文、孫守恭。 1997。 台灣產鐮孢菌。 世維出版社。

^cIn this study.

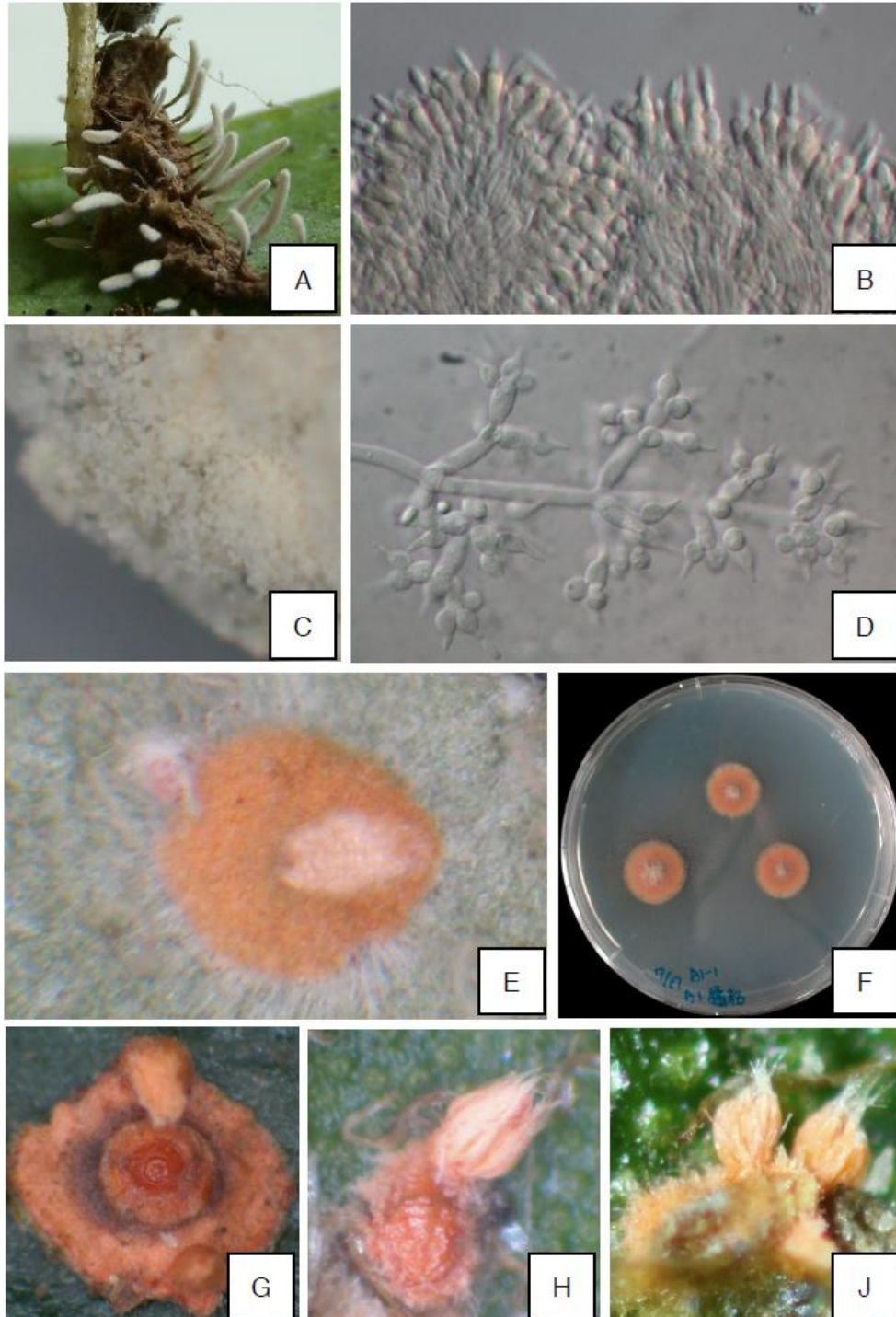
表四、不同培養源或分離株之鐮孢菌 *Fusarium coccophilum*

接種蘇鐵白輪盾介殼蟲之病原性檢測

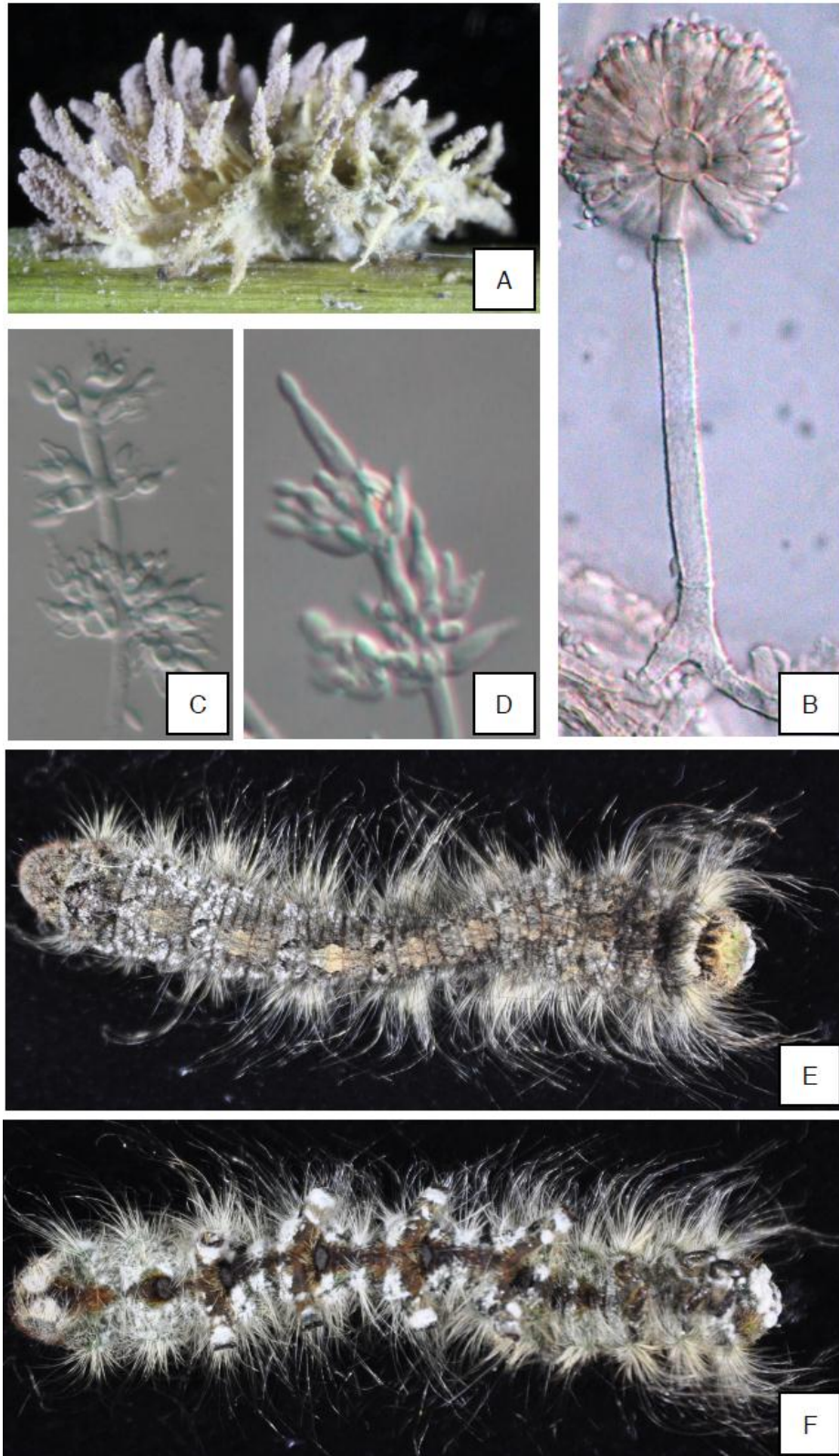
Table 4. Pathogenicity test of *Fusarium coccophilum* to Taitung scale insect *Aulacaspis yasumatsui*, cultivated under different conditions, or retrieved from naturally infested scale insect cadavers

<i>Fusarium coccophilum</i> isolate	Medium	Inoculation method	Result E/C ^a
FC9705	PDA	Dipping	-/-
FC9705	¼ PDA	Agar plugs	-/-
FC9705	Rice + scales 1/4PDA w/gp	Suspension Spray	-/-
FC9705	MEA	Spray	-/-
FC9709	¼ PDA	Spray on WA	-/-
FC9709	MLA	Dipping	-/-
FC9812 ^b	Direct from insect	Dipping	+/-
FC9812 ^c	Direct from insect	EAO ^d Dipping	-/-

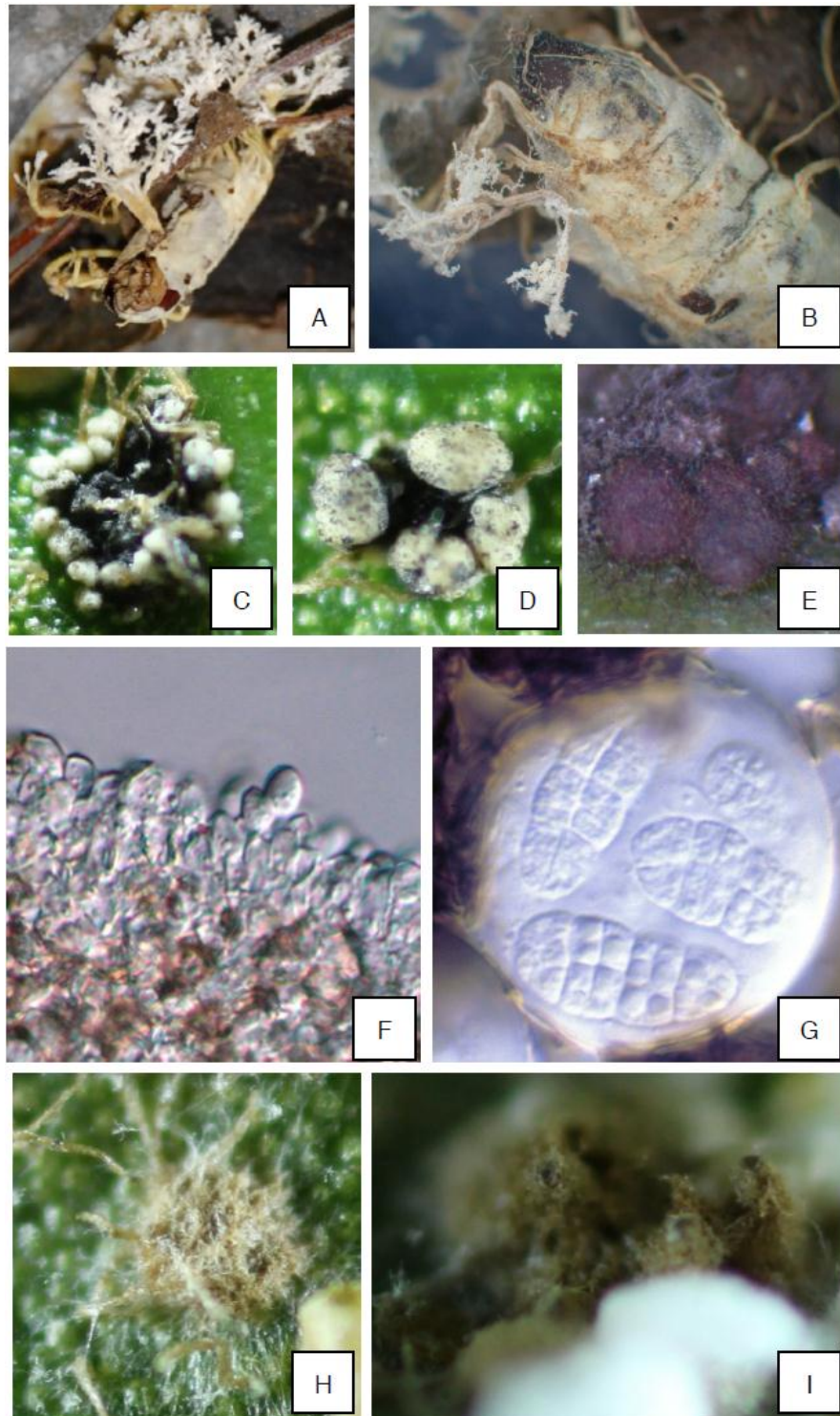
- a. 本試驗包含重複三次之接種試驗結果，每次測驗對象包括母蟲、卵、1-4 齡幼蟲、雄蟲鞘。E: 接種組 C: 無菌水對照組。
- b. 本實驗直接取用自觀察後三日之蟲體上 *Fusarium coccophilum* 製成孢子懸浮液。
- c. 本實驗直接取用自觀察後十日之蟲體上 *Fusarium coccophilum* 製成孢子懸浮液。
- d. 本實驗直接取用自觀察後十日之蟲體上 *Fusarium coccophilum*，但孢子懸浮液為油劑劑型(EAO, Emulsifiable adjuvant oils)。



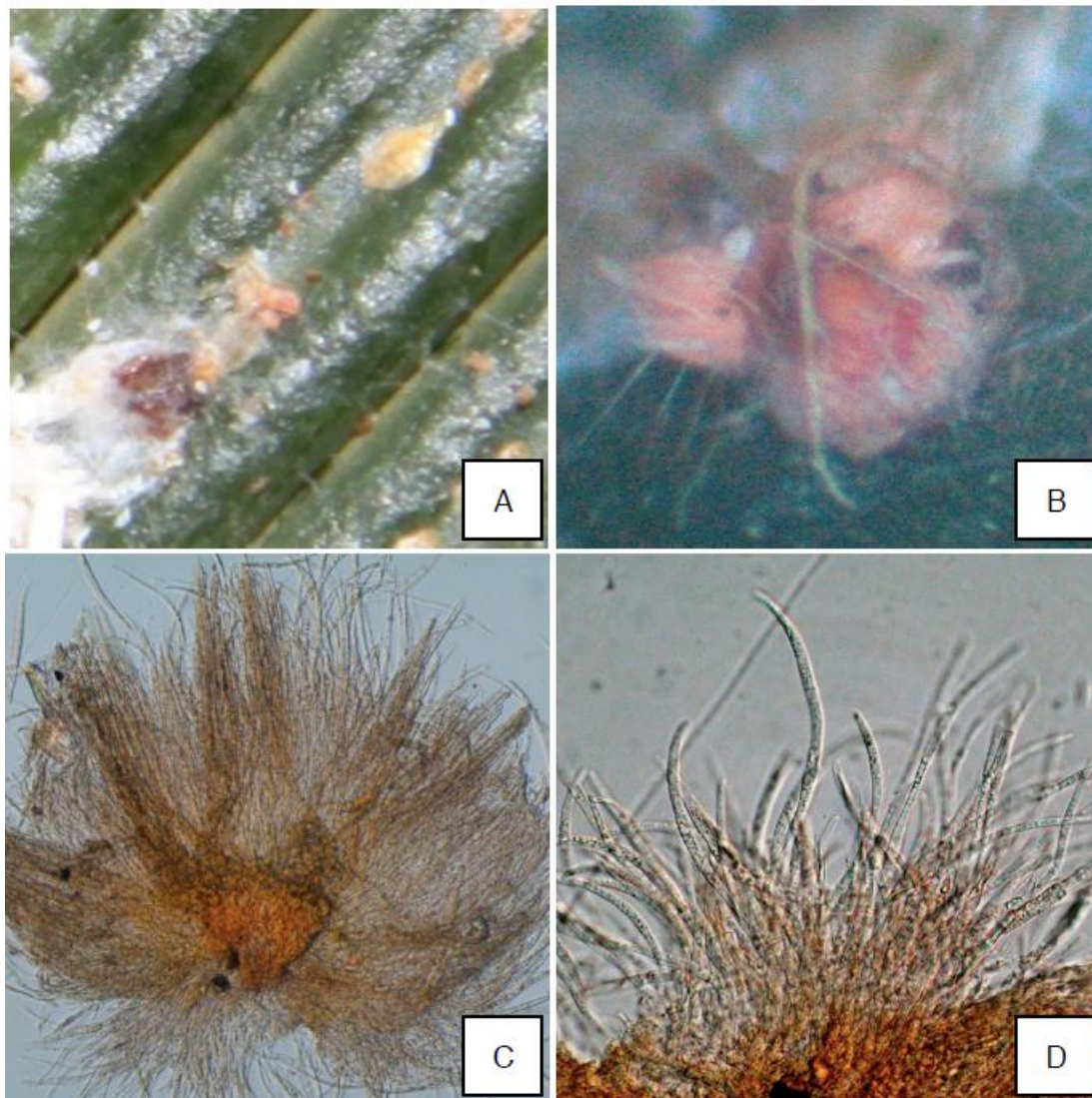
圖一、由國內不同棲地植物昆蟲蟲體所分離之蟲生真菌型態特徵。(A) 寄生於蜘蛛之 *Akanthomyces aranearum* 之外觀型態及 (B) 光學顯微鏡下產孢構造。(C) 寄生於蟲蛹之 *Cordyceps cardinalis* (*Tolypocladium* sp.) 之外觀型態及 (D) 及光學顯微鏡下產孢構造。(E) 採自五峰旗瀑布, 柑桔刺粉蝨蟲體上所分離之 *Cyphellophora laciniata*; (F-J) 寄生於台東蘇鐵白輪盾介殼蟲不同採集季節之分生孢子堆型態特徵 (F) 培養基上菌落生長情形。(G-J) *F.coccophilum* 之分生孢子堆。(G) 97 年 4 月 (H) 97 年 9 月 (J) 98 年 12 月。



圖二、由國內不同棲地植被昆蟲蟲體所採集及分離所得之蟲生真菌。(A) 寄生於蜘蛛上之 *Gibellula pulchra* 及 (B) 其產孢構造。(C) *Paecilomyces fumosoroseus* 之光學顯微鏡下產孢構造。(D) *Paecilomyces javanicus* 及其鱗翅目昆蟲寄主 (E) 鱗翅目幼蟲之正面 (F) 反面之巨觀型態。



圖三、由國內不同棲地植被所分離之蟲生真菌型態構造。(A-B)擬青黴菌 *Paecilomyces tenuipes* 寄生於鱗翅目幼蟲之巨觀型態。(C-E) 分別為蚧多囊菌 *Myriangiium duriaei* 寄生於白輪盾介殼蟲之初期、中期及成熟之子囊之型態。(F) 為 *M. duriaei* 尚未產生有性世代之組織化菌絲。(G) *M. duriaei* 近球型子囊內含 8 個多縱橫隔膜紡錘型或近長橢圓形之成熟子囊孢子。(H) 具有寄生白輪盾介殼蟲潛力之未知真菌以及 (I) 其可能之有性世代瓶狀子囊殼構造。



圖四、接種 *Fusarium coccophilum* 後被感染之白輪盾介殼蟲。(A)解剖顯微鏡下之巨觀型態構造; (B) 前圖放大微觀構造; (C)光學顯微鏡下分生孢子堆 (sporodochia); (D) 鐮刀狀多隔膜之分生孢子。

誌謝

非常感謝行政院農委會林務局及林務局台東林管處同仁，長年對於昆蟲寄生真菌防治台東蘇鐵白輪盾介殼蟲之調查、評估，提供經費、人力及物力的大力支援，使研究得以順利執行。

參考文獻：

黃振文、孫守恭，1997。台灣產鐮孢菌。台中世維出版社。

陶家駒。1989。臺灣省蚧蟲名錄。臺中區農業改良場研究彙報 22: 57-70。

Asensio, L., Lopez-Llorca, L. V., and Lopez-Jimenez, J. A. 2005. Use of light, scanning electron microscopy and bioassays to evaluate parasitism by entomopathogenic fungi of the red scale insect of palms (*Phoenicococcus marlatti* Ckll., 1899). *Micron* 36: 169-175.

Bateman, R. P. and Alves R. T. 2000. Delivery system for Mycoinsecticides Using Oil-based Formulations. *Aspects of Applied Biology* 57:163 -170

Bartlett, B. R. 1978. Introduced Parasites and Predators of Arthropod Pests and Weeds: A World Review. *Agric. Res. Service, USDA, Agric. Handbook* 480: p.106; 111.

Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, U.K.

Broome, T. The Asian cycad scale. Palm & Cycad Societies of Florida, Inc.

<http://www.plantapalm.com/vce/horticulture/asiancycadscale.htm>

Bruce A. Auld, Shane D. Hetherington and Heather E. Smith, 2003. Advanced in bioherbicide formulation. *Weed Biology and Management* 3: 61 – 67

Broome, T. 1998. The Coontie of Florida. In: *Cycad Encyclopedia*, Chapter 7, The Cootie of Florida. <http://www.plantapalm.com/vce/cycadsof/coontie.htm>

Broome, T. 2002a. The Asian Cycad Scale. From the Cycad Society Newsletter.

<http://www.plantapalm.com/vce/horticulture/asiancycadscale.htm>

Broome, T. 2002b. What is a Cycad? From the Cycad Society Newsletter.

<http://www.plantapalm.com/vce/horticulture/asiancycadscale.htm>

Cornell University, 1997. Boyce Thompson Bugs Insects.

http://www.cals.cornel.edu/CALS_News/v4i1/bti.html

Evans, G.A. and Pedata, P.A. 1997. Parasitoids of *Comstockiella sabalis* in Florida and Description of a new Species of the Genus *Coccobius*. Florida Entomologist, 80: 328-334.

Evans, H.C. And Prior. C. 1990. Entomopathogenic Fungi. In: World Crop Pests. Volume 4B. Armored Scale Insects. (Edited by D.Rosen.): pp1-17.

Finnemore, H.J. 2000. An overview of the South African Mango Industry (Past & Future). <http://www.up.ac.za/academic/agrirural/mango/sa.html>

Germain, J.F. (2002) *Aulacaspis yasumatsui* Takagi : un risque pour les cycas. PHM – Revue Horticole, no. 440, 43-44.

Gempler. 2001. Bug continues to infect Florida Ornamentals. Comments in: Gempler's IPM Solutions, December, 2001: 3 pp.

Hamon, A. Cycad aulacaspis scale, *Aulacaspis yasumatsui*

<http://doacs.state.fl.us/~pi/enpp/ento/aulacaspis.html>

Heu, R.A. and Chun, M.E. Sago Palm Scale - New Pest Advisory no. 99-01 - State of Hawaii Department of Agriculture. <http://www.hawaiiag.org/hdoa/npa.htm>

Howard, F.W., Hamon, A., McLaughlin, M., Weissling, T., Yang, S-L. 1999. *Aulacaspis yasumatsui* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Diaspididae), a scale insect pest of cycads recently introduced into Florida. Florida Entomologist 82 (1): 14-27.

Hodgson, C. and Martin, J. H. 2001. Three noteworthy scale insects (Hemiptera: Coccoidea) from Hong Kong and Singapore, including *Cribropulvinaria tailungensis*, new genus and species (Coccidae), and the status of the cycad-feeding *Aulacaspis yasumatsui* (Diaspididae). Raffles bulletin of zoology 49: 227-250.

Humber, R. A. 1998. Entomopathogenic fungal identification.

<http://arsef.fpsnl.cornell.edu/mycology/corner/APSwkshp.pdf>

- Kassa A., Stephan D., Vidal S. and Zimmermann, G. 2004. Laboratory and field evaluation of different formulations of *Metarhizium anisopiae* var. *acridum* submerged spores and aerial conidia for the control of locusts and grasshopper. *BioControl* 49: 63 - 81
- Langewald, J., Ouambama, Z., Mamadou, A., and Peveling, R. 1999. Comparison of an organophosphate Insecticide with a mycoinsecticide for the control of *Oedaleus senegalensis* (Orthoptera:Acrididae) and other Sahelian grasshoppers at an operational scale. *Biocontrol. Sci Technol* 9(2):199-214.
- Matthews, G. 2001. Can biological agents be sprayed like chemical pesticides? *Pesticide Outlook*. 60-61.
- Mains, E. B. 1959a. North American species of *Aschersonia parasitic* on Aleyrodidae. *J. Insect Pathol.* 1: 43-47.
- Mains, E. B. 1959b. Species of *Aschersonia* (Sphaeropsidales). *Lloydia* 22: 215-221.
- Plant pest notice. Central Science Laboratory.
<http://www.defra.gov.uk/planth/pestnote/2006/cycad.pdf>
- Rasulo, T. R. and Brooks, R. F. 2004. Whitefly pests of Florida citrus. Entomology and nematology department, Florida cooperative extension service, institute of food and agricultural sciences, university of Florida. <http://edis.ifas.ufl.edu/>
- Samson, R.A., Wans, H. C., and Latge, J. P. 1988. Atlas of Entomopathogenic fungi. Springer-Verlag. NY. USA.
- Takagi, S. 1977. A new species of *Aulacaspis* associated with a cycad in Thailand (Homoptera: Coccoidea). *Insecta matsumurana new series* 11:63-72.
- Tang, W., Yang, S.-L., Vatcharakorn, P. 1997. Cycads of Thailand. Nong Nooch tropical garden and the cycad conservation company, Bangkok. 34 pp.
- Tzean, S. S., Hsieh, L. S., and Wu, W. J. 1997. Atlas of entomopathogenic fungi from Taiwan. p. 102-115.
- Takagi, S. 1977. A new species of *Aulacaspis* associated with cycad in Thailand

(Homoptera: Coccoidea). Insecta Matsumurana New series 11: 63-72.

Weissling, T.J., Howard, F.W., Hamon, A. Featured Creatures. Cycad Aulacaspis scale. http://creatures.ifas.ufl.edu/orn/palms/cycad_scale.htm

Williams, J.R. 1970. Studies on the biology, ecology and economic importance of the sugar-cane scale insect, *Aulacaspis tegalensis*, in Mauritius. Bull. Entomol. Res 60: 61-95.

委員意見回覆表

一、期中簡報委員意見回覆表

審查委員	審查意見	意見回覆
陳隆鐘教授	1. 請對目前推測之 <i>Fusarium cocophilum</i> -like 菌加以鑑定並對其生理、生態特性再加以研究。	已於不同季節繼續採集三次，鐮孢菌 <i>Fusarium</i> sp. 所感染之白輪盾介殼蟲蟲體，已經由形態、特徵鑑定以及分子標記比對，確定此鐮孢菌為 <i>Fusarium cocophilum</i> 。
	2. 請對該菌之生物學生理學特性及培養特性，再加以研究。	目前已正進行其生理、培養其特性之試驗。
張東柱	進度符合預期。	
何小曼	1. 計畫進行至目前，由各地點收集蘇鐵病株已分離到多種寄生性真菌，進行其對白輪盾介殼蟲之致病性，期待在期末應有良好成果。	目前已由原寄生於台東蘇鐵之白輪盾介殼蟲蟲體所分離之鐮孢菌 <i>Fusarium cocophilum</i> 之分生孢子，回接飼養於溫室蘇鐵之白輪盾介殼蟲，部分白輪盾介殼蟲已被感染，並於7天後產生與鐮孢菌相同之分生孢子堆以及分生孢子，已明確證明其病原性。
	2. 計畫進行良好。	

二、期末簡報委員意見回覆表

審查委員	審查意見	意見回覆
陳隆鐘教授	1. 該計畫執行過程中，已得相當多重要之蟲生真菌，唯寄生能力鑑定是很重要的指標。除此，可能於培養過程中菌株因離開昆蟲之天然寄主後，容易衰退。因此，研究過程中是否可以避免這些干擾因子，以利接種感染成功。	的確繼代培養後，所蒐集之疑似昆蟲寄生菌，回接時病原性無法再現，職是之故，最近以白輪盾介殼蟲蟲體上所產生之分生孢子直接接種飼養於溫室，台東蘇鐵之白輪盾介殼蟲，一星期後，已可感染部分枝白輪盾介殼蟲，並產生分生孢子堆，也證明此鏽孢菌 <i>Fusarium cocophilum</i> 具生物防治潛能。
	2. 由分離之多樣性菌株中，是值得可以開發真菌防治白輪盾介殼蟲之研究。	其它最近發現之子囊菌 <i>Myriangiium duriaei</i> ，以往被報導可寄生於茶樹、梨、蘋果樹之介殼蟲，此次也發現可寄生於蘇鐵之白輪盾介殼蟲，目前正純粹培養，驗證明其致病性。
張東柱	1. 從現有分離的菌種，似乎沒有一種真菌對白輪盾介殼蟲有較強的致病性，如要有較好的防治效果，可能需要找尋新的菌株。	最近已由台東蘇鐵罹患白輪盾介殼蟲蟲體，檢測出至少三種以上之昆蟲寄生菌，包括以前檢測出之鏽孢菌 <i>Fusarium cocophilum</i> ，以及另外一種以往被報告可寄生於茶樹、梨、蘋果樹之介殼蟲，以及粉蝨之子囊菌 <i>Myriangiium duriaei</i> 。被 <i>F. cocophilum</i> 感染之白輪盾介殼蟲蟲體甚多，蒐集蟲體上之孢子堆(sporodochia)之分生孢子，回接於溫室蘇鐵上人工飼養之白輪盾介殼蟲，一星期後，即可再由罹病之白輪盾介殼蟲體再度產生與鏽孢菌 <i>F. cocophilum</i> 形態、構造相同之分生孢子堆，此也證實 <i>F. cocophilum</i> 之病原性；此外 <i>M. duriaei</i> 和其它之疑似之昆蟲病原真菌，將陸續以類似之流程進行接種試驗，待確認病原性之後，再進行相關之生理、培養特性，以及可能時，劑型之研發以及施用季節、方式等探討。
	3. 成果良好，建請結案。	

<p>何小曼</p>	<p>1. 本研究目標為針對台灣不同生態棲地中之介殼蟲及其他昆蟲，進行蟲生真菌的採集，再用以對蘇鐵白輪盾介殼蟲測試致病性。已於台東蘇鐵保留區、採集罹受白輪盾介殼蟲嚴重感染枝條進行分離，另外亦於數個不同地點進行蟲生真菌之分離。</p>	<p>目前已驗證鐮孢菌<i>F. cocophilum</i>對白輪盾介殼蟲具寄生能力；此外，最近新發現之另一種子囊菌<i>Myriangium duriaei</i>，也可寄生於白輪盾介殼蟲，此菌以往曾被Sawada, K.於1930年代於第一冊之台灣真菌目錄中有過記載可寄生於茶樹、梨或蘋果樹之介殼蟲，目前已分離此菌，進行培養，將盡速接種驗證其病原性，如有可能將聯同<i>F.</i></p>
	<p>2. 本研究至今已分離、純化、培養、鑑定出11層15種真菌，並發現其中有四種為較具侵染寄生昆蟲之潛力者。</p>	<p><i>cocophilum</i>一併研發其劑型，施用季節、方式等相關議題。</p>
	<p>3. 進行田間調查結果，發現其中之<i>Fusarium</i> sp. 似對白輪盾介殼具有寄生能力，後續則需更進一步重複接種，以確認病原性。</p>	
	<p>4. 尚有其他疑似具寄生能力之蟲生真菌則仍進行檢測中。</p>	
	<p>5. 台東蘇鐵係台灣特有種，亦為珍稀植物，急需保護。而台東蘇鐵自然保留區面積廣大，若以化學製劑進行防治，除耗費大量人力物力外，也造成環境汙染。故宜施放天敵，以控制病蟲數量。本研究已分離似具有寄生白輪盾介殼蟲之真菌，成果相當良好，後續研究仍持續進行中。</p>	