

# 蟲生真菌淡紫菌

## *Purpureocillium takamizusanense* 生育溫度與 蜜蜂致病性之初步研究

楊又臻<sup>1</sup>、陳本翰<sup>2</sup>、劉東憲<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> 國立中興大學植物病理系

<sup>2</sup> 農業部苗栗區農業改良場

### 摘要

蟲生真菌淡紫菌 *Purpureocillium takamizusanense* (Kobayasi) S. Ban, Azuma & Hirok. Sato 為近年來生物防治荔枝椿象 *Tessaratoma papillosa* Drury 潛力蟲生真菌之一，試驗用 Pt-2 和 Pt-5 菌株分別經單孢分離自嘉義番路鄉和中埔鄉荔枝椿象遺體上。Pt-2 菌株的分生孢子經 25°C 培養 24h 後，以 1/4PDA 培養基發芽率 93.4% 最高，較少養分的 WA 仍有 61.8%。接續以 1/4 PDA 在 10 ~ 35°C 培養 24 hr 後，Pt-2 和 Pt-5 菌株在 25°C 發芽率為該溫度範圍中最高，分別是 94.8% 和 96.0%，而在 15°C 以下或 35°C 兩菌株發芽率皆明顯受到抑制，但是從 35°C 或 10°C 培養 24 hr 後轉移回 25°C，發芽率能回復到 69 ~ 98.2%，顯示高低溫都僅是暫時性抑制分生孢子發芽而非致死。Pt-2 菌株孢子發芽後移到 10% 加鈣蔬果培養基 (FV w/ Ca) 和 PDA 培養基比較 10 ~ 35°C 生長情形，以 25°C 下培養於上述兩種培養基之菌落生長最佳，菌落平均直徑分別為 4.0 和 4.1 cm。10% 加鈣蔬果培養基培養下均無法正常產孢，PDA 則在溫度高於 30°C 時菌落發展受抑制亦無法產孢，35°C 下則完全不生長。西方蜜蜂 (*Apis mellifera*) 分別以 *P. takamizusanense* Pt-2 菌株 2 ~ 8 × 10<sup>6</sup> conidia/ml 濃度於不同蜂巢西方蜜蜂進行 A 和 B 兩次接種試驗，並飼養於 30±1°C 室內環境中，培養到第 5 天時接種 Pt-2 菌株後西方蜜蜂之死亡數遽增，且第 7 天接種之死亡率分別為 100% 和 95%，且經  $\chi^2$  關聯表分析均顯示有無接種 Pt-2 菌株皆極顯著 ( $P(\chi^2) < 0.01$ )

造成蜜蜂的死亡，接種死亡之西方蜜蜂經消毒後，產孢遺體均可分離到淡紫菌 *P. takamizusanense*，顯示 Pt-2 菌株對西方蜜蜂具有致病風險

**關鍵詞：**淡紫菌 *Purpureocillium takamizusanense*、生育溫度、蜜蜂、致病性

\*通訊作者電子郵件位址：Liuth@mdares.gov.tw

## 前言

淡紫菌 *Purpureocillium takamizusanense* (Kobayasi) S. Ban, Azuma & Hirok. Sato 已有從臺灣受感染的荔枝椿象 *Tessaratoma papillosa* Drury 上分離紀錄 (羅等, 2019; 林等, 2024)，並發現對其他的昆蟲具致病性 (林等, 2024)，是具有生物防治潛力的蟲生真菌。由於微生物的感染需要適宜環境條件，且不同菌株間可能具有差異，所以需要進一步研究該菌生育溫度特性。另外，蜜蜂不同於其他昆蟲，具群體社會性生活於蜂巢中，蜂群能將巢內溫度調節在 32 ~ 36°C，通常高於周邊環境溫度 (Dunham, 1931; Goblirsch *et al.*, 2020; Rodríguez-Vásquez *et al.*, 2024)，相較於其他獨居的昆蟲，更須先了解淡紫菌的溫度條件，據以推論其對蜜蜂或蜂巢的危害風險程度。因此，本研究針對淡紫菌測試不同分生孢子發芽培養條件以評估營養供源的影響、並探討分生孢子發芽溫度和發芽後的菌絲生長溫度，以利了解該菌生育溫度。

有益菌在作為生物防治的微生物製劑前，需依據《農藥理化性及毒理試驗準則第三條附件二附表三微生物製劑農藥毒理試驗項目修正規定》：「使用於田野環境中之蜜源植物時，須提供原體對蜜蜂致病性試驗資料，成品農藥中添加之其他成分已知對蜂毒較高，須提供該成品對蜜蜂成蟲接觸急性毒性試驗資料。」(行政院農業委員會, 2021)，而與本研究最有關連的評估方式為經濟合作暨發展組織 (以下稱 OECD, Organization for Economic Cooperation and Development) 頒布 214 號指引蜜蜂急毒性接觸毒性測試方法 (OECD, 1998b) 和美國環境保護署 (以下稱 USEPA, United States Environmental Protection Agency) 化學物質安全和污染預防辦公室 (OCSPP, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention) 頒布 OCSPP 850.3020 蜜蜂急毒性接觸毒性測試方法 (USEPA, 2012)，參照上開指引皆為農藥的急毒性測試，而在缺乏針對蟲生真菌製劑的評估方法下，若淡紫菌未來施用於蜜源植物，則有直接接觸蜜蜂機會，國內仍需要有一蟲生真菌致病性測定方法提供參考。本篇研究試驗淡紫菌分生孢子接觸後是否對蜜蜂具致病性，並再分離確認之。

# 材料與方法

## 一、淡紫菌生育溫度特性之研究

### (一) 供試菌株分離：

本研究淡紫菌 (*P. takamizusanense*) Pt-2 和 Pt-5 菌株分別單孢分離自嘉義縣番路鄉和中埔鄉已死亡荔枝椿象蟲體上產生之分生孢子 (conidia)，二菌株經 BD Difco™ PDA (Potato Dextrose Agar) 於  $\alpha$  plus® Petri Dish (90×15 mm) 平板培養皿培養，其菌落、分生孢子梗、分生孢子等形態均與羅等 (2019) 所描述淡紫菌特徵相符。供試菌株之 8-10 菌絲塊 (3 - 4 mm<sup>2</sup>) 置於含有 100% 礦物油 1 ml 溶液之保存管中，室溫下保存，以 PDA 活化後使用，菌體以 PDA 平板培養置於 Firstek GC-560H 恆溫生長箱以 25°C 光週期為 12 小時光照 12 小時黑暗 (12L12D) 下經 14 ~ 30 天產生試驗所需分生孢子。

### (二) 分生孢子發芽培養基篩選

試驗所需培養基處理為：(1) BD Difco™ PDA，(2) 營養減量為 1/4 PDA，並用 BD Bacto™ Agar 補足 Agar 濃度至 1.5%，(3) 10% 加鈣蔬果培養基 (FV w/ Ca)，成分為 10% 蔬果汁 (嘉紛娜 100% 橙香多酚蔬果汁 Frescafina 100% Orange Carrot Veggie Juice)、0.02% 碳酸鈣 (CaCO<sub>3</sub>, SigmaUltra C4830)、1.6% Agar，(4) 10% 蔬果培養基 (FV w/o Ca)，(5) 1.6% BD Bacto™ Agar 配製為 Water agar, WA。並將上述培養基倒入  $\alpha$  plus® Petri Dish (90×15 mm) 平板培養皿上，取 *P. takamizusanense* Pt-2 菌株於 PDA 上產生分生孢子，並以移植接種環 (inoculation loop) 沾取孢子置於 1 ml 裝有無菌水的 Eppendorf tube 中，並使用 Vortex-Genie®2 震盪 20 秒使 Eppendorf tube 內的孢子懸浮均勻分布，孢子懸浮液濃度以微量吸取法 Microsyringe method (Ko *et al.*, 1973) 計算並定量濃度至 1~ 2×10<sup>4</sup> conidia/ml 使用，並以微量吸管 (Pipet-plus) 取 10  $\mu$ l 分別滴於上述五種培養基平板上，標記滴入範圍，培養基不需以石臘膜封起，置於 Firstek GC-560H 恆溫生長箱以 25°C 光週期 12L12D 下培養 24 h 後以 Leica DM2500 機械式正立光學顯微鏡檢視發芽率，標記範圍內計數 100 個分生孢子，每個處理共計數 5 重複，不同培養基之發芽率 (Y) 經 Excel 2016 以反正弦值 (arcsine,  $\sin^{-1}$  函數 ASIN(SQRT(Y))) 轉換後，再以 SAS Enterprise Guide 7.1 軟體分析確認轉

換值呈現常態分佈後，進行變方分析 (ANOVA)，並以最小顯著差異法 (LSD, Fisher's Least significant difference) 檢定不同處理間之差異。

### (三) 不同溫度下分生孢子發芽情形

淡紫菌 Pt-2、Pt-5 菌株孢子懸浮液濃度以微量吸取法 Microsyringe method (Ko *et al.*, 1973) 計算並定量濃度至  $1\sim 2\times 10^4$  conidia/ml，再以微量吸管 (Pipet-plus) 取 10  $\mu$ l 滴於 1/4 PDA 上，並分別放入 10、15、20、25、30 和 35°C 的恆溫培養箱 (Lian Shen) 以 24 小時光照 (24 L) 條件下培養 24 h 後以 Leica DM2500 機械式正立光學顯微鏡檢視發芽率各溫度發芽率，每個溫度處理各計數 100 個孢子，每處理 5 重複，以 Excel 2016 計算發芽率平均值 (Mean) 及標準誤差 (SE, Stand error) 再以 SigmaPlot 10.0 繪製不同發芽率之柱狀圖。

### (四) 分生孢子先於 10 和 35°C 處理 24h 後再於 25°C 測試發芽活性

淡紫菌 Pt-2、Pt-5 菌株孢子懸浮液濃度同樣以微量吸取法 Microsyringe method (Ko *et al.*, 1973) 計算並定量濃度至  $(1\sim 2)\times 10^4$  conidia/ml，每一重複以微量吸管 (Pipet-plus) 取 10  $\mu$ l 滴於 1/4 PDA 上，並分別放入 10 和 35°C 的恆溫培養箱 (Lian Shen) 以 24L 條件下培養 24 h，再轉移至 Firstek GC-560H 恆溫生長箱以 25°C 光週期 12L12D 下培養 24 h，以 Leica DM2500 機械式正立光學顯微鏡檢視發芽率來判定分生孢子之活性，每個處理共計數 100 個孢子，每處理 5 重複，以 Excel 2016 計算發芽率平均值 (Mean) 及標準誤差 (SE, Stand error)。

### (五) 發芽之孢子於不同溫度菌絲生長情形

*P. takamizusanense* Pt-2 同樣以微量吸取法 Microsyringe method (Ko *et al.*, 1973) 配置濃度為  $(3\sim 5)\times 10^2$  conidia/ml 孢子懸浮液，再調整單孢分離法 (Ho and Ko, 1997) 用微量吸管 (Gilson Pipetman P2) 取 2  $\mu$ l 孢子懸浮液滴於 1/4 PDA 上以 Firstek GC-560H 恆溫生長箱以 25°C 光週期 12L12D 下培養 24 h，先使孢子發芽，再以針頭 21G  $\times$  1+1/2" (0.8 $\times$ 40 mm) 於 Leica M125 解剖顯微鏡檢視下挑取發芽的孢子，分別培養於 BD Difco™ PDA 和 10% 加鈣蔬果培養基 (FV w/ Ca) 的  $\alpha$  plus® Petri Dish (90 $\times$ 15 mm) 平板培養皿上，再將培養皿分別逢機分布放入 10、15、20、25、30 和 35°C 的恆溫培養箱 (Lian Shen) 以 24L 條件下培養，每一處理 4 重複，於培養的第 14 天以 15 公分量尺測量菌落生長直徑。

## 二、淡紫菌分生孢子對蜜蜂致病性測試

### (一) 孢子懸浮液噴霧接種後蜜蜂存活情形

本研究使用之西方蜜蜂 (*Apis mellifera*) 係飼養在苗栗區農業改良場 (苗栗縣公館鄉)，並分別接種 2 次 Pt-2 菌株之分生孢子，以驗證接觸毒理反應。測試方法參照國際已有方法：OECD No.214 指引蜜蜂急毒性接觸毒性測試方法 (OECD, 1998b) 和 USEPA 頒布 OCSPP 850.3020 指引蜜蜂急毒性接觸毒性測試方法 (USEPA, 2012)。根據上述指引方式於本研究試驗方法詳述如下：供試西方蜜蜂以凍暈方式處理，於接種前取 1L 半透明塑膠盒，覆滿碎冰至 8 分滿，將蜂巢片上的西方蜜蜂抖落於碎冰上，蓋上塑膠盒以避免西方蜜蜂飛出，再置於  $-18^{\circ}\text{C}$  中 20 ~ 30 分鐘，凍暈之西方蜜蜂每 10 隻裝入直徑 11.8 cm 高 6 cm PET 材質之塑膠杯中。接種處理組所需的分生孢子使用 *P. takamizusanense* Pt-2 菌株，以移植接種環 (Inoculation loop) 沾取孢子於 BD Difco™ PDA (Potato Dextrose Agar) 於  $\alpha$  plus® Petri Dish (90×15 mm) 平板培養皿劃滿，置於 Firstek GC-560H 恆溫生長箱以  $25^{\circ}\text{C}$  光週期 12L12D 下培養 14 天得到新鮮的分生孢子，取 2 培養皿刮取孢子至 250 ml 由 Milli-Q® 產生的超純水，孢子懸浮液經 60 mesh (0.25 mm) 孔徑鋼製網篩過濾去除未均勻分散雜質，過濾後以前述微量吸取法 Microsyringe method (Ko *et al.*, 1973) 定量孢子懸浮液濃度，兩次接種濃度分別為  $8\times 10^6$  和  $2\times 10^6$  conidia/ml，並裝入鋼制定壓噴瓶 (Firstinfo Tools No. A1631) 中，接用噴嘴 (Firstinfo Tools No. A1631D)，再充入空氣定壓至 30 Psi，將裝有 10 隻西方蜜蜂的塑膠杯，每 1 杯噴灑孢子懸浮液 2 秒約 1.6 ml，對照組則是以同樣的方式噴 2 秒無菌水 (Milli-Q water)，接種後再以 11.8 cm 的 100 mesh 尼龍網 PP 蓋 (BugDorm Ver.2012) 蓋住，以吸附 30% 蜂蜜之 5 ~ 6 條 2 cm 長直徑 0.7cm 棉條置於尼龍網蓋上供西方蜜蜂取食，置於  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  室內空間進行試驗，為確保致病性結果具再現性，共進行 2 次接種，為區別為不同批次，以下稱 A 試驗與 B 試驗。A 試驗處理組西方蜜蜂總數為 10 隻，對照 10 隻。B 試驗重複增加西方蜜蜂數量，取自與 A 試驗不同蜂巢，接種處理西方蜜蜂總數為 20 隻，對照 30 隻。觀察至 7 天中每日存活及死亡總數。以 SigmaPlot 10.0 繪製每日死亡率之趨勢曲線圖，並於第 7 天統計接種和無菌水 (對照) 之死亡和存活數，以 Excel 2016 的函數 CHIINV 進行卡方  $\chi^2$  關聯表分析是否具有極顯著 ( $P<0.01$ ) 差異 (呂等, 2006)。

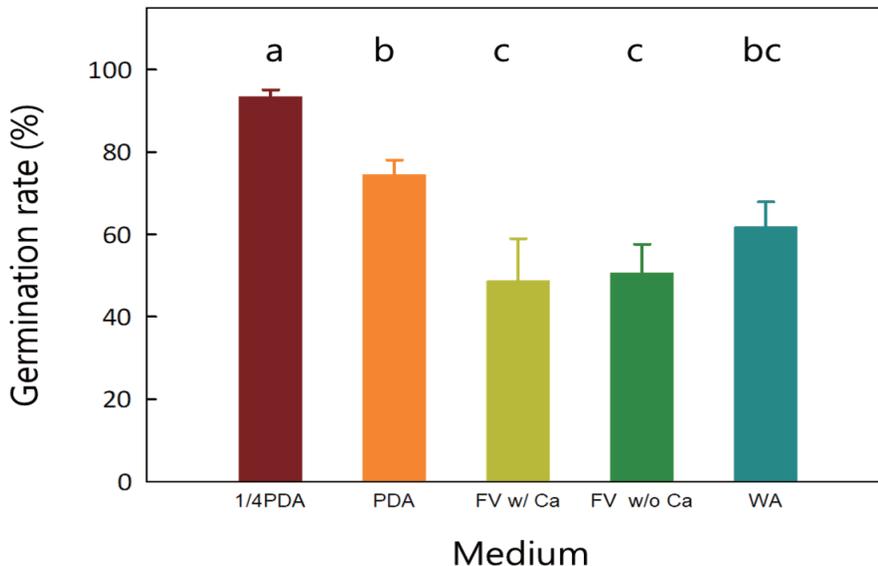
## (二) 接種 *P. takamizusanense* Pt-2 之西方蜜蜂遺體產孢與分離

將接種 *P. takamizusanense* Pt-2 菌株的死亡個體取出，以 0.58% (v/v) 的次氯酸鈉 (新奇漂白水 NaClO) 清洗 20 秒，再以無菌水清洗之，以 Whatman® 滅菌濾紙吸乾體表水分，以夾鏈袋密封蟲體置於 Firsttek GC-560H 恆溫生長箱以 25°C 光週期 12L12D 下培養至產生分生孢子，以單一孢子分離後培養於 BD Difco™ PDA，以菌落、分生孢子梗、分生孢子等形態鑑定是否與 *P. takamizusanense* Pt-2 菌株一致。

## 結果

### 一、淡紫菌生育溫度特性之研究

#### (一) 分生孢子發芽培養基篩選



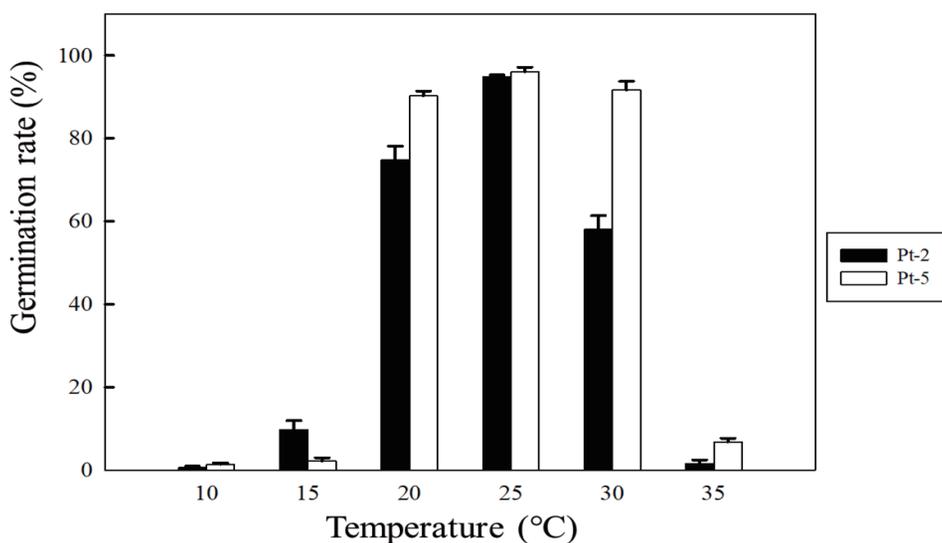
圖一、淡紫菌 *P. takamizusanense* Pt-2 菌株之分生孢子於不同培養基在 25°C 培養 24 h 的平均發芽率 ± 標準誤差 (n = 5)，平均以反正弦值 (arcsine,  $\sin^{-1}$ ) 轉換後進行最小顯著差異法 (LSD, Fisher's Least significant difference) 分析，不同字母表示處理間具顯著差異 ( $P < 0.05$ )

Fig. 1. The mean germination rate ( $\pm$  standard error, n = 5) of *P. takamizusanense* Pt-2 conidia after 24 hours of incubation at 25°C on different media. Mean values were arcsine-transformed and analyzed using Fisher's Least Significant Difference (LSD) test. Different letters indicate significant differences between treatments ( $P < 0.05$ )

淡紫菌 *P. takamizusanense* Pt-2 菌株之分生孢子經培養於 PDA、1/4 PDA、WA、10% 加鈣蔬果培養基 (FV w/ Ca)、10% 蔬果培養基 (FV w/o Ca) 等 5 種不同培養基，結果顯示以 1/4 PDA 平均發芽率 93.4% 顯著 ( $P < 0.05$ ) 最優，其次為 PDA 的 74.4% 並和 WA 的 61.8% 無顯著差異 ( $P \geq 0.05$ )，最差者為加鈣 10% 蔬果培養基 (FV w/ Ca) 為 48.6% 並和 10% 蔬果培養基 (FV w/o Ca) 的 50.6% 亦與 WA 61.8% 無顯著差異 (圖一)。

## (二) 不同溫度下分生孢子發芽情形

淡紫菌 *P. takamizusanense* Pt-2 和 Pt-5 菌株之分生孢子經 10、15、20、25、30 和 35°C 等溫度培養 24h 後，顯示兩菌株都於 25°C 溫度培養下最合適發芽，結果分別為 Pt-2 94.8% 和 Pt-5 96.0%，而 20 和 30°C 兩菌株都有半數 (50%) 以上發芽率，Pt-5 菌株於 20 和 30°C 發芽率分別是 90.2% 和 91.6%，Pt-2 菌株則是 74.8% 和 58.0%，而兩菌株於 15 和 10°C 發芽率均低於 50%，其中 Pt-2 和 Pt-5 菌株分別是 0.6% 和 1.4%，同樣兩菌株於 35°C 發芽率均低於半數 (50%)，Pt-2 和 Pt-5 菌株分別是 1.6% 和 6.8% (圖二)。



圖二、淡紫菌 *P. takamizusanense* Pt-2 和 Pt-5 菌株之分生孢子培養在 1/4PDA 上置於不同溫度培養 24h 後之發芽情形，數值為平均值 ± 標準誤差 (n = 5)

Fig. 2. Germination of *P. takamizusanense* Pt-2 and Pt-5 conidia after 24 hours of incubation on 1/4 PDA at different temperatures. Data are presented as mean ± standard error (n = 5)

### (三) 分生孢子於 10 和 35°C 處理 24h 後再於 25°C 測試發芽活性

由圖 (二) 結果可知 10 和 35°C 下培養的分生孢子難以發芽，為了解分生孢子是否只是暫時性地受抑制，淡紫菌 *P. takamizusanense* Pt-2 和 Pt-5 菌株之分生孢子經 10 和 35°C 培養在 1/4PDA 24h 後再放到 25°C 活化培養 24h，結果如表一，Pt-5 菌株在 10 和 35°C 之發芽率分別為 98.2% 和 98.0% 與原在 25°C 下培養的 96.0% 相近，而 Pt-2 菌株則分別是 69.0% 和 72.4% 則低於其在 25°C 下之 94.8% (表一)。

表一、淡紫菌 *P. takamizusanense* Pt-2 和 Pt-5 菌株之分生孢子經 10 和 35°C 培養後以 25°C 活化反應

Table 1. Germination of *P. takamizusanense* Pt-2 and Pt-5 conidia after 24-hour activation at 25°C following incubation at 10°C and 35°C

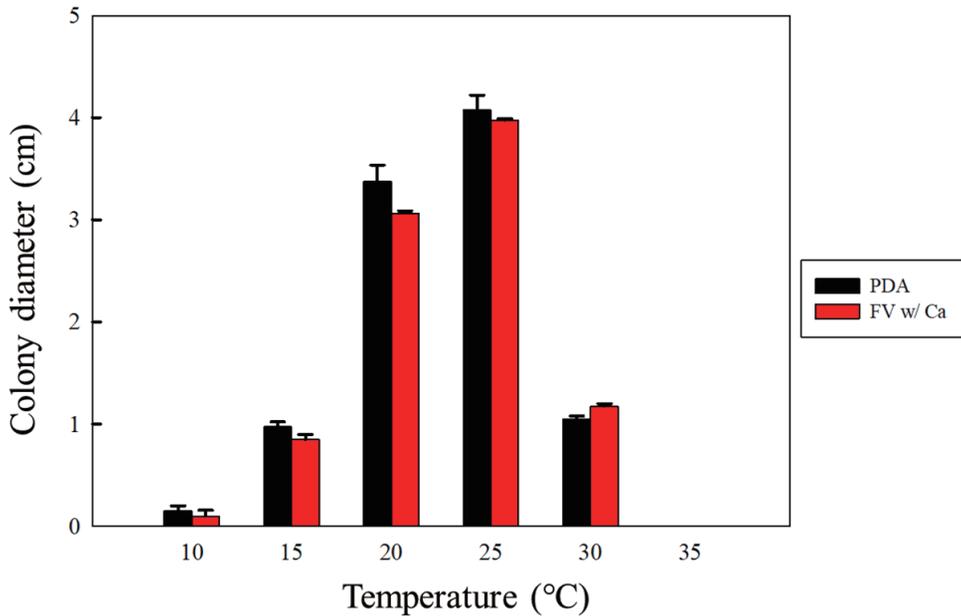
Temperature (°C)	Germination rate (%) <sup>y</sup>	
	Pt-2	Pt-5
25	94.8 ± 0.5	96.0 ± 1.1
10 → 25 <sup>x</sup>	69.0 ± 4.4	98.2 ± 0.7
35 → 25	72.4 ± 3.8	98.0 ± 1.1

<sup>x</sup>"→" indicates the transfer temperature after incubation.

<sup>y</sup>Data are presented as mean ± standard error (n = 5).

### (四) 發芽之孢子於不同溫度下菌絲生長情形

淡紫菌 *P. takamizusanense* Pt-2 發芽之分生孢子分別培養於 PDA 和 10% 加鈣蔬果培養基 (FV w/ Ca) 上置於不同溫度培養 14 天後，兩種不同培養基的菌落發育情形皆有同樣的趨勢，菌落直徑均以 25°C 最佳，PDA 和 10% 加鈣蔬果培養基菌落直徑分別為 4.1 和 4.0 cm，次之則為 20°C，分別是 3.4 和 3.1 cm，而 15 或 30°C 下則生長受到限制，15°C 分別為 1.0 和 0.9 cm，30°C 分別為 1.1 和 1.2 cm，10°C 僅有些許生長分別為 0.2 和 0.1 cm，35°C 則兩培養基都完全不生長 (0 cm) (圖三)。培養在 10% 加鈣蔬果培養基 (FV w/ Ca) 14 天各溫度下均無法正常產孢 (分生孢子)，而 PDA 則是在 15、20、25°C 下可以正常產孢，其他溫度則未見產孢現象。



圖三、淡紫菌 *P. takamizusanense* Pt-2 發芽之分生孢子分別培養在 1/4PDA 和 10% 加鈣蔬果培養基 (FV w/ Ca) 上置於不同溫度培養 14 天後菌落生長情形，數值為平均值 ± 標準誤差 (n = 4)

Fig. 3. Colony diameter of *P. takamizusanense* Pt-2 after 14 days of incubation at different temperatures on 1/4 PDA and 10% calcium-supplemented fruit and vegetable medium (FV w/ Ca). Data are presented as mean ± standard error (n = 4)

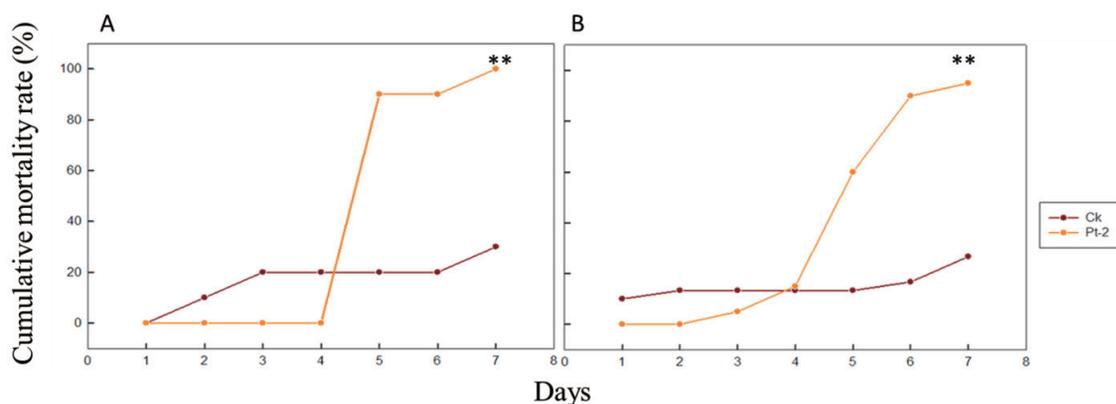
## 二、淡紫菌分生孢子對蜜蜂致病性測試

### (一) 孢子懸浮液噴霧接種後西方蜜蜂存活情形

接種淡紫菌 *P. takamizusanense* Pt-2 之分生孢子的西方蜜蜂，以 OCSPP 850.3020 和 OECD N.214 指引之接觸急毒性觀察時間只需 96 h (USEPA, 2012; OECD, 1998)，即接種後第 4 天記錄蜜蜂之死亡率，A 試驗 Pt-2 為 0%，對照組無菌水為 20%，B 試驗 Pt-2 為 15%，對照組為 13%，接種處理之西方蜜蜂死亡並未高於對照組，但於第五天後 A 試驗接種 Pt-2 之死亡率為 90%，對照組維持 20%，B 試驗接種死亡率為 60%，對照組為 13%，均已有高於對照組現象。第 7 天的死亡率 A 試驗 Pt-2 接種者為 100%，對照組為 30%，B 試驗接種為 95%，對照組為 27%，兩次接種結果的趨勢相近 (圖四)。

利用  $\chi^2$  分析關聯表驗證接種 *P. takamizusanense* Pt-2 菌株是否對西方蜜蜂致病

性，計算第 7 天接種 Pt-2 (處理) 與無菌水 (對照) 的死亡數與存活數，A 試驗接種  $\chi^2 = 10.8^{**} > \chi^2_{(0.01,1)} = 6.6$  (表二)，B 試驗接種  $\chi^2 = 22.6^{**} > \chi^2_{(0.01,1)} = 6.6$  (表三)，兩次接種不同蜂群的結果顯示有無接種 Pt-2 對死亡或存活數均造成極顯著差異 ( $P < 0.01$ )。



圖四、接種淡紫菌 *P. takamizusanense* Pt-2 之西方蜜蜂 A 試驗 (A) 和 B 試驗 (B) 的累計死亡率趨勢圖，\*\* 代表接種第 7 天死亡情形與對照相比以  $\chi^2$  關聯表分析具極顯著 ( $P < 0.01$ ) 差異

Fig. 4. Cumulative mortality trends of *Apis mellifera* inoculated with *P. takamizusanense* Pt-2 in Trial A (A) and Trial B (B). \*\* indicates a highly significant difference ( $P < 0.01$ ) in mortality on day 7 post-inoculation compared to the control group, as determined by  $\chi^2$  contingency table analysis

表二、A 試驗接種 *P. takamizusanense* Pt-2 驗證西方蜜蜂致病性卡方  $\chi^2$  分析關聯表  
Table 2. Chi-square ( $\chi^2$ ) test of independence using contingency tables in Trial A to evaluate the pathogenicity of *P. takamizusanense* Pt-2 in *A. mellifera*

Treatment	Observed (Expected)		value of treatment	
	Death	Survival	Survival	Total
Ck (Sterile water)	3 (6.5)	7 (3.5)		10
Pt-2 conidia	10 (6.5)	0 (3.5)		10
Total	13	7		20

表三、B 試驗接種 *P. takamizusanense* Pt-2 驗證西方蜜蜂致病性卡方  $\chi^2$  分析關聯表  
 Table 3. Chi-square ( $\chi^2$ ) test of independence using contingency tables in Trial B to evaluate the pathogenicity of *P. takamizusanense* Pt-2 in *A. mellifera*

Treatment	Observed (Expected) value of treatment		
	Death	Survival	Total
Ck (Sterile water)	8 (16.2)	22 (13.8)	30
Pt-2 conidia	19 (10.8)	1 (9.2)	20
Total	27	23	50

(二) 接種 *P. takamizusanense* Pt-2 之西方蜜蜂遺體產孢與分離

A 試驗和 B 試驗接種 *P. takamizusanense* Pt-2 的西方蜜蜂遺體上經消毒於 25°C 培養後，均有大量淡紫菌分生孢子產孢 (圖五 A、B)，形態上鏡檢與淡紫菌一致，經過單孢分離於 PDA 可得到和原來接種 Pt-2 菌株相同的菌落形態 (圖五 C)。



圖五、接種 *P. takamizusanense* Pt-2 的西方蜜蜂遺體經消毒於 25°C 培養後，產生的淡紫菌分生孢子 (A、B)，單孢分離後於 PDA 培養的菌落 (C)，尺標為 5 mm。

Fig. 5. *Apis mellifera* cadavers inoculated with *P. takamizusanense* Pt-2, disinfected and incubated at 25°C, producing *P. takamizusanense* conidia (A, B). Single-spore isolates cultured on PDA (C). Scale bars = 5 mm

## 討論

由篩選適合分生孢子發芽的培養基可發現，基質養分不同會造成發芽率有顯著的差異，只有些許養分的 WA 仍有 61.8% 發芽 (圖一)。淡紫菌 *P. takamizusanense* Pt-2 和 Pt-5 菌株皆於 25°C 時發芽率最好，而在其他溫度下發芽率則表現不一樣，尤其在致病性試驗有關連的溫度，Pt-2 菌株在 30°C 的發芽率僅 58%，較 Pt-5 菌株的 91.6% 對高溫敏感 (圖二)，而適合一般外在環境的 20 ~ 30°C，Pt-2 和 Pt-5 菌株都於此溫度範圍下有半數以上發芽率 (圖二)。雖然 35°C 和 10°C 的高低溫可以抑制孢子發芽，但兩菌株的孢子都能回到 25°C 有回復發芽能力，以 Pt-5 菌株回復較高，發芽率皆仍皆有 98%，較 Pt-2 菌株的 69.0% 和 72.4% 回復要好，由此可知多數的分生孢子不會因為經過 24 h 高低溫處理而失去發芽活性。Pt-2 菌株已發芽的菌絲，在不同溫度下之 PDA 和 10% 加鈣蔬果培養基菌落大小呈現相近和一致的趨勢 (圖三)，不像分生孢子發芽率有顯著差距 (圖一)，仍以 25°C 生長最好，優於其他溫度，但 30°C 下則生長受到限制，35°C 發芽的菌絲已無法生長。由於淡紫菌將來可能於果園或菜園等環境使用，若接觸到菌體的話外勤蜂雖每日能回到 32 ~ 36°C 蜂巢中，這樣的巢內溫度應能和上述測試結果一樣能抑制淡紫菌的生長，原因是從試驗的 30°C 條件下得知，即使在 PDA 也難以正常產孢，10% 加鈣蔬果培養基亦無產孢，且蜂巢內部不如培養基有充足合適微生物發育養分 (Dunham, 1931; Goblirsch *et al.*, 2020; Rodríguez-Vásquez *et al.*, 2024)，可據以推測巢內不適合淡紫菌的生長或分生孢子產孢傳播，較無蜂巢內危害風險，但仍需進一步試驗確認之，反而是工蜂再次出勤時的環境，仍有機會處在適合淡紫菌發展的 20 ~ 30°C 範圍內，因此成體工蜂未來需列入被評估的對象。雖然 Pt-2 菌株在 30°C 的發芽和菌絲生長速度已經不如 25°C (圖二和三)，理應在 30°C 下兩次接種試驗不致對蜜蜂個體有嚴重影響，但在西方蜜蜂都在培養 5 天後突然出現高死亡率現象，表示 30°C 仍有致病感染風險，且於第 7 天死亡率已高達 95~100%，故本研究沒有再測試 30°C 發芽率仍有 9 成以上的 Pt-5 菌株，其可能對蜜蜂至第 7 天有同樣高死亡率之效果。蟲生真菌的白殭菌 *Beauveria bassiana* 也有類似的現象，蜜蜂在以餵食方式感染後於 35°C 下會有顯著死亡，但是將分生孢子接種在蜂巢內的蜜蜂死亡率卻很低，幼蟲發育和蜂群也無

特別異常 (Alves *et al.*, 1996), Peng *et al.* (2020) 發現雖然 *B. bassiana* 在 25°C 時感染造成外勤蜜蜂有高死亡率，但是在田間使用 *B. bassiana* 後對周遭蜂巢採樣卻沒有任何感染發生，蜂群也有穩定成長，因此認為在 35°C 蜂巢環境是抑制 *B. bassiana* 分生孢子發展的主要原因。又本試驗致病性只有評估到蜜蜂個體，並非是蜂巢內的感染情形，評估對蜂群之風險則需進一步設計試驗確認。當蜜蜂受到真菌性病原的球囊菌 *Ascosphaera apis* 感染時，會再提高巢內的 0.6°C，以減少該菌引起巢內的白垩病發生 (Goblirsch *et al.*, 2020)。而蜜蜂個體會有發熱現象以降低感染球囊菌，發熱反應間斷發生於下午或晚間，而並非連續不斷發熱 (Bonoan *et al.*, 2020)。所以蜜蜂的巢內群體升溫的免疫現象和個體的升溫，是主要幾種能抵禦蜂群被外來病原菌感染的原因。

歐洲聯盟執行委員會 (European Commission) 將微生物農藥歸類在植物保護產品 (Plant protection products, PPP)，所以跟蜜蜂直接有關的檢測方式是參照 OECD No.213 指引蜜蜂口服急毒性測試方法 (OECD, 1998a) 和 OECD No.214 指引蜜蜂接觸急毒性測試方法 (OECD, 1998b)，在美國則是 OCSPP 850.3020 指引蜜蜂接觸急毒性測試方法 (USEPA, 2012)，這幾項指引對藥效的急毒性評估時間同樣都是在 48 h 致死率，該期間內蜜蜂死亡數達 10% 以上才有必要延長觀察至 96 h。但是 OECD 本身於 2012 年指出，OECD No.213 和 OECD No.214 兩個方法的時間只有 2 天，不足以確定微生物防治製劑造成蜜蜂的致病性；而 Karaoğlan *et al.* (2024) 同樣地認為 OECD No.214 和 OCSPP 850.3020 指引皆需要延長觀察超過 20 天；Borges *et al.* (2021) 亦認為若是微生物農藥以 OECD No.231/214 指引觀察 48 h 太短以致於無法有效發現致病性的逆反應，建議應該針對個別製劑制定致病性的測試時間。而在本研究以孢子懸浮液噴霧接種西方蜜蜂後觀察到第 4 天存活情形即 96 h 都還未出現異常狀態，直至第 5 天後 2 次接種 Pt-2 菌株時才有西方蜜蜂突然死亡的現象 (圖四)，並且在第 7 天與對照無菌水以卡方  $\chi^2$  分析關聯表兩次結果都有極顯著差異 ( $P < 0.01$ )，故以上述指引 (OECD No.214; OCSPP 850.3020) 96 h 的評估時間內，接種 Pt-2 菌株能由目視觀察得知雖未對西方蜜蜂具有急毒性風險 (圖四)，但以兩次試驗 7 天的結果，以及接種死去遺體能產孢分離確定淡紫菌的感染情形 (圖五)，顯示 Pt-2 菌株具有對蜜蜂致病性的風險 (表二、表三)，即證實蟲生真菌製劑的致病性不同於一般

農藥的急毒性反應，需要長期的觀察，以完整評估其風險。

淡紫菌同為蟲生真菌的白殭菌 *B. bassiana* 和黑殭菌 *Metarhizium anisopliae* 有被提及作為微生物農藥防治蜂巢內蜂蟹蟎 *Varroa destructor* (Sinia and Guzman-Novoa, 2018)，但由於白殭菌  $10^6$  cfu/ml 的孢子濃度會造成蜜蜂壽命降低 (Vandenberg, 1990)，有危害風險仍被其他學者建議在使用之前還需要更多的測試和科學文獻資料 (Jack and Ellis, 2021)，根據以上國際學者看法，建議微生物製劑尤其是蟲生真菌者，對蜜蜂評估仍需有長期的觀察資料較為妥適，在未確立分離菌種是否有對蜜蜂或是蜂群之影響時，若有防治其他昆蟲需求，可藉由加註說明或於非花期使用，以減少蟲生真菌對蜜蜂危害風險。本研究可考慮取代現階段常用的急毒性測試，作為日後評估蟲生真菌製劑對蜜蜂致病性反應的參考方法之一。

## 誌謝

感謝劉名硯先生、陳碧君小姐、謝淑園小姐和鍾錚顛小姐協助試驗完成。

## 引用文獻

- 行政院農業委員會。2021。農藥理化性及毒理試驗準則第三條附件二附表三微生物製劑農藥毒理試驗項目修正規定。行政院農業委員會農防字第 1101490216 號令修正發布第 3 條附件 1、附件 2。
- 呂秀英、魏夢麗、呂椿棠。2006。用 Excel 解決農業研究資料統計分析的方法 (三) —  $\chi^2$  檢定。農業試驗所技術服務 66：23-26。
- 林慧婷、陳盈丞、蔡小涵。2024。蟲生真菌 - 淡紫菌 TNZZS6 防治荔枝椿象之應用潛力。臺南區農業專訊 129：19-23。
- 羅佩昕、于逸知、白桂芳。2019。臺灣產蟲生真菌 *Purpureocillium takamizusanense* 感染荔枝椿象 (*Tessaratoma papillosa*) 初報。植物醫學 61：27-30。
- Alves, S. B., L. C. Marchini, R. M. Pereira, and L. L. Baumgratz. 1996. Effects of some insect pathogens on the Africanized honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). J. Appl. Entomol. 120: 559–564. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1996.tb01652.x>

- Bonoan, R. E., P. M. Iglesias Feliciano, J. Chang, and P. T. Starks. 2020. Social benefits require a community: the influence of colony size on behavioral immunity in honey bees. *Apidologie* 51: 701–709. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00754-5>.
- Borges, S., A. T. Alkassab, E. Collison, S. Hinarejos, B. Jones, E. McVey, I. Roessink, T. Steeger, M. Sultan, and J. Wassenberg. 2021. Overview of the testing and assessment of effects of microbial pesticides on bees: strengths, challenges and perspectives. *Apidologie* 52: 1256–1277. <https://doi.org/10.1007/s13592-021-00900-7>.
- Dunham, W. E. 1931. Hive temperatures for each hour of a day. *The Ohio Journal of Science* 31: 181-188.
- Ho, W. C., and W. H. Ko. 1997. A simple method for obtaining single-spore isolates of fungi. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 38: 41-44.
- Jack, C. J., and J. D. Ellis. 2021. Integrated pest management control of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), the most damaging pest of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) colonies. *Journal of Insect Science* 21: 1-32. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iab058>.
- Karaođlan, B., A. T. Alkassab, S. Borges, T. Fisher, C. Link-Vrabie, E. McVey, L. Ortego, and M. Nuti. 2024. Microbial pesticides: challenges and future perspectives for non-target organism testing. *Environmental Sciences Europe* 36: 1–40. <https://doi.org/10.1186/s12302-024-00899-4>.
- Ko, W. H., L. L. Chase, and R. K. Kunitomo. 1973. A microsyringe method for determining concentration of fungal propagules. *Phytopathology* 63: 1206–1207.
- Goblirsch, M., Warner, J. F., Sommerfeldt, B. A., & Spivak, M. (2020). Social fever or general immune response? Revisiting an example of social immunity in honey bees. *Insects* 11: 528. <https://doi.org/10.3390/insects11080528>.
- OECD. 2012. OECD guidance to the environmental safety evaluation of microbial biocontrol agents, Series on Pesticides and Biocides, No. 67. OECD Publishing. Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264221659-en>.
- OECD. 1998a. Test No. 213: Honeybees, Acute Oral Toxicity Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing. Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264070165-en>.
- OECD. 1998b. Test No. 214: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing. Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264070189-en>.

- Peng, G., S. M. Tong, D. Zeng, Y. Xia, and M. G. Feng. 2020. Colony heating protects honey bee populations from a risk of contact with wide-spectrum *Beauveria bassiana* insecticides applied in the field. *Pest Manag. Sci.* 76: 2627–2634. <https://doi.org/10.1002/ps.5803>.
- Rodríguez-Vásquez, S., A. A. G. Bejar, A. Romo-Chacón, J. García-Hernández, H. González-Ríos, and J. A. Orozco-Avitia. 2024. Hive temperature regulation by honeybees in response to extreme conditions. *Agrociencia* 53: 1–15. <https://doi.org/10.47163/AGROCIENCIA.V58I3.3082>.
- Sinia, A., and E. Guzman-Novoa. 2018. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* GHA and *Metarhizium anisopliae* UAMH 9198 alone or in combination with thymol for the control of *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Journal of Apicultural Research* 57: 308–316. <https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1430983>.
- USEPA. 2012. OCSPP 850.3020: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test. Office of chemical safety and pollution prevention. EPA 712-C-019.
- Vandenberg, J. D. 1990. Safety of four entomopathogens for caged adult honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* 83: 755–759. <https://doi.org/10.1093/jee/83.3.755>.

# Preliminary study on the growth temperature and pathogenicity to bees of the entomopathogenic fungus *Purpureocillium takamizusanense*

You-Zhen Yang<sup>1</sup>, Pen-Han Chen<sup>2</sup>, Tung-Hsen Liu<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University.

<sup>2</sup> Miaoli District Agricultural Research and Extension Station, Ministry of Agriculture.

## ABSTRACT

The entomopathogenic fungus *Purpureocillium takamizusanense* (Kobayasi) S. Ban, Azuma & Hirok. Sato was considered as a potential biocontrol agent for the lychee stink bug *Tessaratoma papillosa* Drury. In this study, Pt-2 and Pt-5 strains were isolated through single-spore separation from the cadavers of *T. papillosa* collected in Fanlu Township and Zhongpu Township, Chiayi, Taiwan, respectively. After culturing the conidia of the Pt-2 strain at 25°C for 24 hours, the germination rate reached its highest at 93.4% on a 1/4 PDA medium, while it was still 61.8% on WA, a less nutrient-rich medium. Further incubation on 1/4 PDA at temperatures ranging from 10°C to 35°C for 24 hours showed that both Pt-2 and Pt-5 strains had the highest germination rates at 25°C, at 94.8% and 96%, respectively. However, at temperatures below 15°C or at 35°C, germination was significantly inhibited. Nevertheless, when cultures incubated at 35°C or 10°C for 24 hours were transferred back to 25°C, the germination rate recovered to 69–98.2%, indicating that high and low temperatures only temporarily inhibited conidial germination rather than being lethal. When Pt-2 strain conidia were transferred to a 10% calcium-supplemented fruit and vegetable medium (FV w/ Ca) and PDA to compare growth performance at 10°C to 35°C, the best colony growth occurred at 25°C, with an average colony diameter of 4.0 cm on FV w/ Ca and 4.1 cm on PDA. The 10% FV w/ Ca medium did not support proper sporulation, while on PDA, colony growth was inhibited at temperatures above 30°C, preventing sporulation

entirely. No growth was observed at 35°C. To assess pathogenicity to *Apis mellifera* honey bees, two inoculation experiments (Trail A and B) were conducted using *P. takamizusanense* Pt-2 at concentrations of  $2-8 \times 10^6$  conidia/ml. The bees were reared in an indoor environment at  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ . By the fifth day, mortality rates of the Pt-2-inoculated bees increased sharply, and by the seventh day, mortality rates were 100% and 95% for the Trail A and B, respectively. A chi-square test revealed a highly significant correlation ( $P(\chi^2) < 0.01$ ) between Pt-2 inoculation and bee mortality. Furthermore, after disinfection, *P. takamizusanense* was successfully reisolated from the cadavers of the infected bees, confirming that the Pt-2 strain poses a potential pathogenic risk to *A. mellifera*.

**Keywords:** *Purpureocillium takamizusanense*, Growth temperature, Honey Bees, Pathogenicity

\* Corresponding author, email: Liuth@mdares.gov.tw