

# 2021 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 070011

參展科別 微生物學

作品名稱 菌菌有味—真菌及塔粉綠尺蛾幼蟲食草選擇之  
探討

得獎獎項 大會獎 四等獎

就讀學校 新北市立安康高級中學

指導教師 張雅菱、莊瑞續

作者姓名 趙珮妤、陳俞安

關鍵詞 真菌、塔粉綠尺蛾 (*Herochroma cristata*)、食草

## 作者簡介



我是來自新北市立安康高中的趙珮妤，平時就喜歡親近大自然及飼養鱗翅目的幼蟲，也就是因為飼養鱗翅目的幼蟲，發現許多幼蟲都有找不到食草的問題，才讓我的人生展開了一段新的旅程—科展。做科展的過程，經歷了許多風風雨雨，卻也讓我體驗到了不同的人生，也讓我真正發現自己喜歡自然科學，決定要朝自然環境及生物領域的研究繼續邁進，開拓更多不一樣的人生道路。



我是來自新北市立安康高中的陳俞安。我雖然就讀第二類組，但我也非常喜愛生物。在升上高二後，我便加入了與生物有關的科展團隊，在加入後我學到了很多在課堂上學不到的技術，也在進行實驗的時候遭受了許多困難，開始不再是遇到問題就逃避，而是學著如何改變做實驗的過程，讓自己可以更順利的得到實驗數據，也讓這個實驗變成自己的，不再只是使用他人的研究方法。經過這一年多的科展歷程，我認為科學實驗將是我以後會繼續想要接觸的事物。

## 摘要

本研究主要探討塔粉綠尺蠖食草選擇與其葉內真菌之關係。觀察培養四種植物（烏白、鵝掌柴、白匏子與島榕）葉內真菌，以真菌生長率、菌絲與孢子形態辨識真菌種類。當我們以烏白葉內間座殼菌屬（*Diaporthe* sp.）真菌與不同植物放在一起時，幼蟲取食原為非食草的白匏子葉片，而島榕則有嘗試啃食之現象；此外，飼養過程中我們發現取食烏白的塔粉綠尺蠖幼蟲糞便較其他種幼蟲易長出真菌，進行幼蟲糞便與消化道真菌培養後，皆有與葉內真菌相似的菌體形態。我們推測烏白、葉內真菌與塔粉綠尺蠖間的交互作用關係之一可能為：烏白透過葉內真菌誘使塔粉綠尺蠖雌蛾前往產卵，經幼蟲食用葉片後所排出之糞便以作為葉內真菌傳播的媒介。

## Abstract

The research mainly investigates fungi and grass-eating choices of *Herochroma cristata* larvae. We observe and cultivate four kinds of plant-inhabiting fungi (*Sapium sebiferum*, *Schefflera octophylla*, *Mallotus paniculatus*, and *Ficus virgata*). Fungi species are determined and judged by the fungal growth rate, the shape of hyphae, and the shape of spores. When we use the *Diaporthe* sp. fungi in *Sapium sebiferum* and put them in boxes with different plants, larvae consume *Mallotus paniculatus* and attempt to bite *Ficus virgata*, but *Mallotus paniculatus* and *Ficus virgata* are not herbivorous. In addition, we find feces of *Herochroma cristata* larvae after consuming *Sapium sebiferum* leads to the higher fungal occurrences. We put feces of larvae and alimentary canal on the culture medium and find the fungi are similar to fungal endophytes of *Sapium sebiferum*. We speculate that the interaction of *Sapium sebiferum*, *Herochroma cristata* and fungal endophytes comes from fungal endophytes' strong attraction for *Herochroma cristata* to lay eggs. After larvae consume leaves, discharged feces become the way they spread fungal endophytes.

# 壹、前言

## 一、研究動機

昆蟲在我們的生活中隨處可見，而鱗翅目在昆蟲界中又佔有一席之地，鱗翅目的幼蟲需要依靠植物才得以生存。本校後山，有著豐富的生態資源，因本校後山較為陡峭，許多種類的植物我們無法調查。因此在我們研究這些從後山飛來的鱗翅目幼蟲時，時常會有找不到食草的問題，導致幼蟲無法順利成長。有關幼蟲食草專一性的成因，經我們查閱相關文獻，發現至今仍未有所定論，於是我們開始嘗試對幼蟲與食草間的關係進行探討研究，希望了解影響幼蟲食草選擇之因素，以期未來能找到緩解短暫無食草之方式。

實驗初期，在學校採集到抱卵的塔粉綠尺蛾雌蟲，隔天即產了一大批綠色的卵，經台灣產蝶蛾網查詢到的食草資訊為烏白，然而校園裡一時找不到烏白的蹤跡，只能從鄰近地區（安一路、臺大實驗農場）採集以飼養幼蟲。起初我們希望能利用組織培養，培育出烏白的癒傷組織，測試塔粉綠尺蛾是否會取食，並探究改變食草形態對幼蟲食草選擇的影響。但我們組織培養過程中發現每一次烏白葉都會長出形態相同的白色真菌。經由進一步的資料查詢後，得知這些培養出來的真菌可能是烏白的內生真菌。在高二基礎生物上 6-1 中有提到生物間的交互作用，這讓我們感到好奇，烏白葉內的內生真菌扮演何種角色？其與塔粉綠尺蛾之間是否有互動關係？黃俞菱（2018）提到內生真菌對植物而言，可以幫助它們避免受到草食動物與病害威脅的武器。有些植物內生真菌與植物共生時，會產生一些對動物或昆蟲有害的次級代謝物，當牠們吃到含有這些物質的植物時，就會感到不適，因而避免共生植物被當作食物。而我們又想到無尾熊與尤加利葉的例子，尤加利葉會產生毒素以防止被植食動物啃食，但這也導致無尾熊的專食。所以究竟塔粉綠尺蛾啃食烏白葉是否會生病以及塔粉綠尺蛾幼蟲如何找尋及分辨食草等原因，是否與植物葉內真菌有關？我們就帶這些疑問與反思展開以下的研究。

## 二、背景資料

### （一）常用的蛾類查詢網站

- 1、飛蛾資訊分享站—這是由特有生物研究保育中心架設和維護的網站，資料大多來自於「慕光之城—蛾類世界」，網站有許多蛾友提供的蛾蝶照片、採集地點及時間。蛾友也

就是在觀察蝶蛾並且會提供資訊的公民科學家。

2. 台灣產蝶蛾—簡稱蝶蛾網，英文站名取自「蝶蛾」的英文諧音 dear，與蝶蛾類群歸屬的鱗翅目學名 Lepidoptera 首三字母組成 dearlep，有親近愛好蝶蛾之意。近十年，無論蝶類與蛾類彼此之間的關係與總科級下分類群的成員關係，皆在學術研究中獲得長足進展。長遠目的是以台灣產物種與形態特徵多樣性皆非常高的蝶蛾為例，經學術研究者普及研究進展與整合文字、影像資訊，使能多元使用。

3、嘎嘎昆蟲網—原為一個美術網站，紀錄周邊看到的自然景觀，後來漸漸轉成植物、昆蟲及鳥類攝影資料庫。

## (二) 塔粉綠尺蛾 (*Herochroma cristata*)

塔粉綠尺蛾在台灣產蝶蛾網的外型描述如下：展翅長 33mm，前翅長約 17mm，整體綠色，前翅寬，前緣與外緣些微外彎，外緣呈鋸齒狀，頂角呈直角狀，中室端部具有一小黑圓斑，亞外緣區段具有兩小段紫藕色帶暈，內緣近前中段具有一暗紅色小斑塊；後翅外緣波曲，後中段亦帶些許有紫藕色帶暈。

本實驗所使用的幼蟲為 2019 年 11 月 11 日在校園中採集到的抱卵雌蟲之第二子代，幼蟲飼養皆以烏白為食草。第一子代的羽化成功率是 52%，自交產下第二子代，共計 33 隻幼蟲為本研究實驗材料。



圖一、塔粉綠尺蛾的生活史（大約 3~4 個月為一個世代）

### (三) 幼蟲食草專一性種類

有關幼蟲食草專一性之界定，陳宏彰、李玲玲（2014）根據幼蟲宿主涵蓋不同分類階層的程度，經特定演算法計算後可將親緣宿主專一性（phylogenetic host specificity）分為五種，見圖二。







圖二、寄主依宿主涵蓋不同分類階層的程度，分 5 個等級

### (四) 實驗選用的四種植物介紹

烏白為「台灣產蝶蛾」中塔粉綠尺蠖幼蟲之紀錄食草，因此我們以烏白為實驗的對照組。鵝掌柴是有蛾友在自然攝影中心上傳照片上，照片中有塔粉綠尺蠖幼蟲停棲在鵝掌柴上，因此推測塔粉綠尺蠖幼蟲可能取食鵝掌柴，所以列為實驗食草。為探討幼蟲食草選擇之影響因子，我們另外選擇兩種植物作為實驗食草—白袍子與烏榕。選擇理由分述如下：。白袍子與烏白同為大戟科（因學校沒有和烏白同為烏白屬的紅烏），而烏榕則是常見植物，並且採集容易，相關資訊整理如表一。我們也分析取用這烏白及鵝掌柴之飛蛾種類，整理如表二。

表一、實驗葉片資訊，整理資料自「教育百科」。

<p>1. 烏白 (<i>Sapium sebiferum</i> (L.) Roxb.) 大戟科；烏白屬。葉卵形，子可以製油，並可為肥皂、蠟燭的原料，也稱為「烏柏」、「鴉鴉」。</p> 	<p>2. 鵝掌柴 (<i>allotus paniculatus</i> (Lam.) Muell. -Arg.) 五加科；鴨腳木屬。掌狀複葉，叢生枝端，也稱為「江菜」。</p> 
<p>3. 白袍子 (<i>Mallotus paniculatus</i> (Lam.) Muell. -Arg.) 大戟科；野桐屬。嫩枝葉被黃褐色星狀毛，表面無毛，背面粉白色。</p> 	<p>4. 烏榕 (<i>Ficus virgata</i>) 桑科；榕屬。葉卵狀橢圓或長卵形，先端漸尖或具短尾，隱花果熟時紅褐色。</p> 

表二、以烏白與鵝掌柴為食草的蛾類

食草	取食蛾類		科別
烏白	塔粉綠尺蛾*	<i>Herochroma cristata</i>	尺蛾科
	黑腰鋸尺蛾*	<i>Cleora fraterna</i>	尺蛾科
	突角黯鈎尺蛾*	<i>Hyposidra talaca talaca</i>	尺蛾科
	癩皮瘤蛾	<i>Gadirtha inexacta</i>	瘤蛾科
	基褐綠刺蛾	<i>Parasa consocia Walker</i>	刺蛾科
	球鬚刺蛾	<i>Scopelodes contractus Walker</i>	刺蛾科
	長尾水青蛾	<i>Actias ningpoa na ningtaiwana Brechlin</i>	天蠶蛾科
	眉紋天蠶蛾	<i>Samia wangi Naumann &amp; Peigler</i>	天蠶蛾科
	雙斑黃毒蛾	<i>Arna bipunctapex</i>	裳蛾科
鵝掌柴	塔粉綠尺蛾*	<i>Herochroma cristata</i>	尺蛾科
	汗褐鋸尺蛾	<i>Cleora alienaria</i>	尺蛾科
	黑腰鋸尺蛾*	<i>Cleora fraterna</i>	尺蛾科
	突角黯鈎尺蛾*	<i>Hyposidra talaca talaca</i>	尺蛾科
	空點雙尾尺蛾	<i>Gonodontis pallida</i>	尺蛾科
	淡猗尺蛾	<i>Ectropis bhurmitra</i>	尺蛾科
	基黃粉尺蛾	<i>Pingasa ruginaria pacifica Inoue</i>	尺蛾科
	白點截角尺蛾	<i>Xerodes contiguararia Leech</i>	尺蛾科
	窄藍條裳蛾	<i>Ischyja ferrifracta</i>	裳蛾科
	褐斑毒蛾	<i>Olene dudgeoni</i>	裳蛾科
	大麗燈蛾	<i>Aglaomorpha histrio formosana</i>	裳蛾科
	乳白斑燈蛾	<i>Areas galactina formosana Okano</i>	裳蛾科
	皇蛾	<i>Attacus atlas atlas</i>	天蠶蛾科
	青枯葉蛾	<i>Trabala vishnou guttata</i>	枯葉蛾科
大褐斑枯葉蛾	<i>Paralebeda femorata mirabilis Zolotuh</i>	枯葉蛾科	

註：黃色底為學校已採集紀錄的蛾類物種，\*為烏白及鵝掌柴都取食的蛾類物種

#### (五) 植物內生真菌

蕭祺暉、邱順慶、曾顯雄 (2016) 「植物內生真菌」意指其生活史中的一部分或全部存在於植物體內，但並未引起植物顯現病徵的真菌。在自然環境中，內生真菌幾乎存在於所有裸子植物及被子植物的組織內，扮演著增加植物適應生物性或非生物性逆境能力的角色，因而常用來作為增加作物的產量、減少耗水量或擴大利用貧瘠與鹽化土地的推手。植物與葉內真菌的關係可分為腐生 (saprotism)、寄生 (parasite) 與共生 (mutualism) 三類。每種關係都會影響到動植物的生存與生活，而這都是演化的結果。

在趙葵、郟熙陽、邱立友 (2019) 提到許多真菌與植物會有緊密的相互作用，有些是



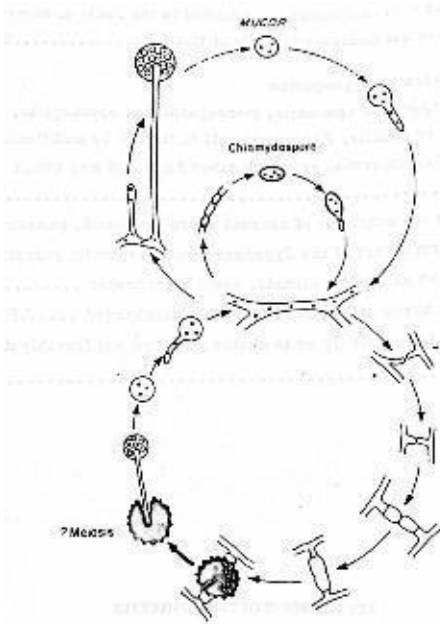
有益的，有些則是有害的。菌根真菌和絕大多數病原真菌在侵入植物體內時往往產生多種植物激素，如生長素 (AUX)、細胞分裂素 (CK)、乙烯 (ET)、茉莉酸 (JA) 和水楊酸 (SA) 等，以擾亂植物體內這些內源激素的水平，削弱植物的防禦。同時真菌和植物合成的植物激素也對真菌產生生理調節功能。這些資訊讓我們對我們所培養的真菌感到好奇，真菌、葉片及幼蟲中間存在何種交互作用關係呢？

## (六) 真菌分類

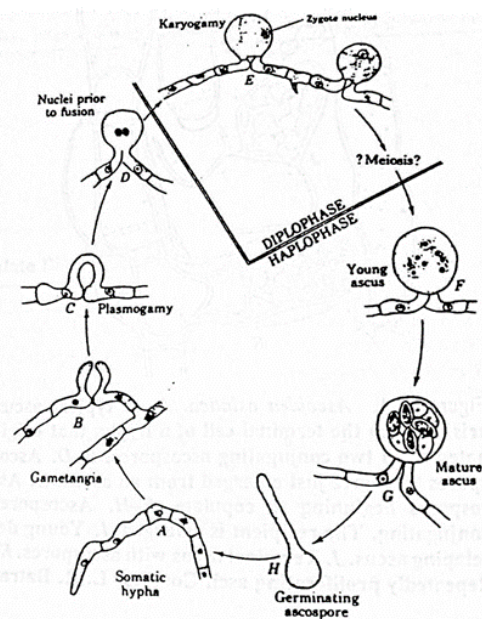
一般將常見真菌分成四大類：接合菌、子囊菌和擔子菌、不完全菌。以下根據這四種分類就形態、生殖方式和生態分佈或習性做概論性的介紹。以下資料整理自國立台灣大學植物病理學系應用真菌實驗室 (2000)。

### 1、接合菌亞群 (*Zygomycotina*)

生活棲息場所陸地為主，有性生殖由兩配子囊體互相接觸癒合發育結合子囊及結合子；無性生殖以生長發育分化之孢子囊柄、末端、中間或側翼著生孢子囊和內生之孢子囊孢子來完成，其生活史見圖三。



圖三、接合菌亞群的生活史



圖四、子囊菌亞群的生活史

### 2、子囊菌亞群 (*Ascomycotina*)

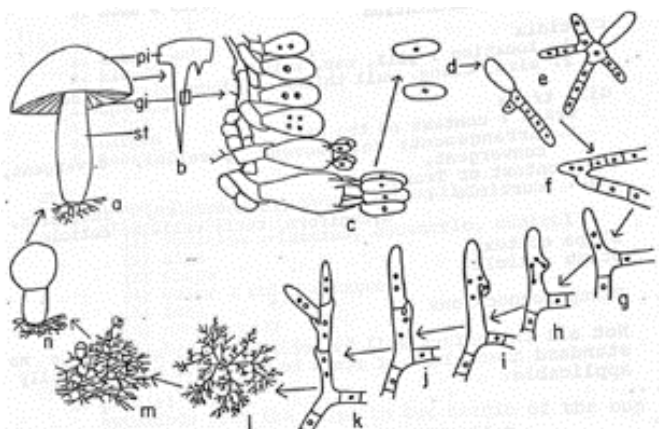
子囊菌可以在有些歧異的生態棲息場所發現，有些於有機質、枯枝敗葉、糞便、土壤、營腐生活，有些甚至可以與高等植物共生，而形成菌根，這種皆於地表下形成子實體。有些子囊菌會生活在海洋，在海底的腐植質或枝條營腐生生活，另外有很多的子囊

菌可以寄生於維管束植物，造成很嚴重的病害。有些子囊菌的無性生殖可以破壞神經系統造成行為失常、幻覺或壞疽……等，其生活史見圖四。

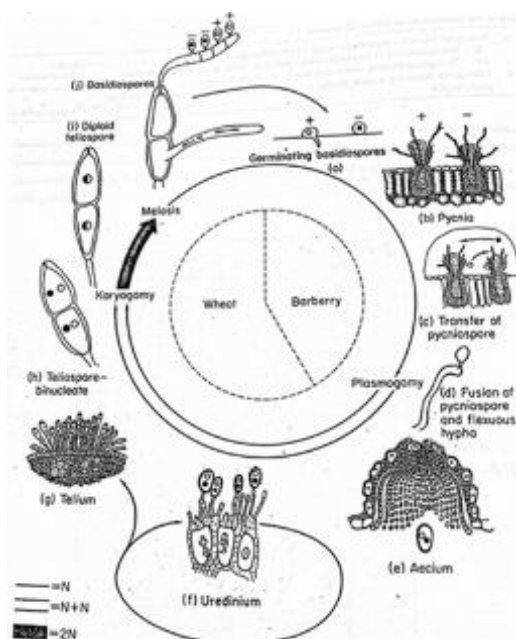
子囊菌的最大特色為產生子囊，子囊內有八個子囊孢子，不過有時會是四個、六個或七個，甚至有時會有上百或上千個，這源於有絲分裂的次數和有些細胞核分裂所致，子囊菌的無性世代一般皆以分生孢子世代呈現，不過不是每個子囊菌都有兩個世代，有些只有有性世代，有些只有無性世代。

### 3、擔子菌亞群 (*Basidiomycotina*)

子囊菌和擔子菌一般形態構造較為複雜，故被認為高等菌類。隸屬於此群的某些蕈類已經馴化，可人工大量栽培，以供食用；某些菇類可以和森林作物共生形成菌根有利這些作物的生長，另外一個擔子菌為農業、園藝尤其是禾本科作物的重要病源，常會造成可觀的經濟損失；有些木材腐朽菌常造成白腐或褐腐，另有些蕈類含有劇毒，誤食常導致嘔吐、迷幻或死亡，生活史見圖五。



圖五、擔子菌亞群的生活史



圖六、不完全菌亞門的生活史

### 4、不完全菌亞門 (*Deuteromycotina*)

這是一群有性世代尚未被發現的菌類，許多的動植物病原菌都以無性之不完全世代為重要的感染源，菌體在夏秋兩季繁衍和散播，具有生物重要性，生活史見圖六。

### 三、研究目的

- (一) 尋找塔粉綠尺蛾幼蟲之食草
- (二) 研究觀察塔粉綠尺蛾幼蟲食草內的真菌
- (三) 進行真菌的離體培養，並辨識塔粉綠尺蛾食草內真菌之種類
- (四) 探究葉內真菌對幼蟲食草選擇的影響
- (五) 探究烏白、內生真菌與塔粉綠尺蛾幼蟲之交互作用關係

## 貳、研究方法或成果

### 一、研究器材及設備

#### (一) 工具

解剖刀、解剖針、電子秤、培養皿、酒精燈、打火機、燒杯、量筒、滴管、解剖用剪刀、保鮮膜、鋁箔紙、接種環、parafilm 封口蠟膜、紗布、濾紙、抽氣過濾裝置、錐形瓶、血清瓶、玻棒、磁石（電磁攪拌器使用）、尖嘴鑷、廣口瓶、離心管、滅菌膠帶、1.5ml 的無菌凍存管、微量吸管（tip）、微量移液器、電子式本生燈、2 號昆蟲針、自製食草氣味盒（含昆蟲飼養盒、紗布、培養皿，示意圖請見圖十一）

#### (二) 設備

HOMA 複式顯微鏡、NIKOND7500 相機、PH 計、高溫高壓滅菌鍋、無菌操作台、電磁攪拌器、冰箱、微波爐、烘箱、養殖箱、度量用具 - 自動秤、軟體（Motic 軟體、愛筆思畫 x、Image J）、氣相層析質譜儀（由大學端提供）、相位差顯微鏡（由大學端提供）

#### (三) 藥品

1、WPM 培養基配方：24.1%WPM（woody plant medium）、2%寒天末（Agar）、3%蔗糖（ $C_{12}H_{22}O_{11}$ ），以 0.1M KOH 與 0.1M HCl 調整 PH 值至 5.6 - 5.8

2、沙保羅氏培養基配方：4%葡萄糖（ $C_6H_{12}O_6$ ）、1%蛋白胨（peptone）、2%寒天末（Agar），以 0.1M KOH 與 0.1M HCl 調整 PH 值至 5.6 - 5.8

3、PDA 培養基配方：2.4%PDA、2%寒天末（Agar），以 0.1M KOH 與 0.1M HCl 調整 PH 值至 5.6 - 5.8

4、消毒藥品：75%乙醇、95%乙醇、12%次氯酸鈉、TWEEN - 20

## 二、實驗流程圖



圖七、本研究實驗流程圖

## 三、前置實驗 - 癒傷組織培育

將植物（烏白、桂花）的葉片表面清洗乾淨後，以 75% 的乙醇淨洗 10 秒，將葉片以 2% 的次氯酸鈉加入少量的 TWEEN - 20 進行表面消毒 10 - 15 分鐘，再以無菌水沖洗數次，將消毒後的葉片切成 1 平方公分，接種於含 0.2% 水晶洋菜、3% 蔗糖、pH 值為 5.6 - 5.8 之 WPM 培養基。置入溫度 25°C 生長箱培養。

## 四、幼蟲食草選擇

在四個飼養盒中，分別放入 5 隻塔粉綠尺蛾之 3 - 4 齡的幼蟲，再放入 2 公克的葉片（烏白、鵝掌柴、白匏子、烏榕），每隔 24 小時測量其糞便重量並將葉片補至 2 公克，連續紀錄 5 天。

## 五、葉內真菌觀察

分別將各種葉片（烏白、鵝掌柴、白匏子、烏榕）的表面以肥皂清洗乾淨（圖八 - A），進行徒手切片成細絲（圖八 - C）後放置於懸滴玻片，滴加 1ml 的沙保羅氏液態培養基，蓋上蓋玻片，用複式顯微鏡觀察 2 天（圖八 - D）。

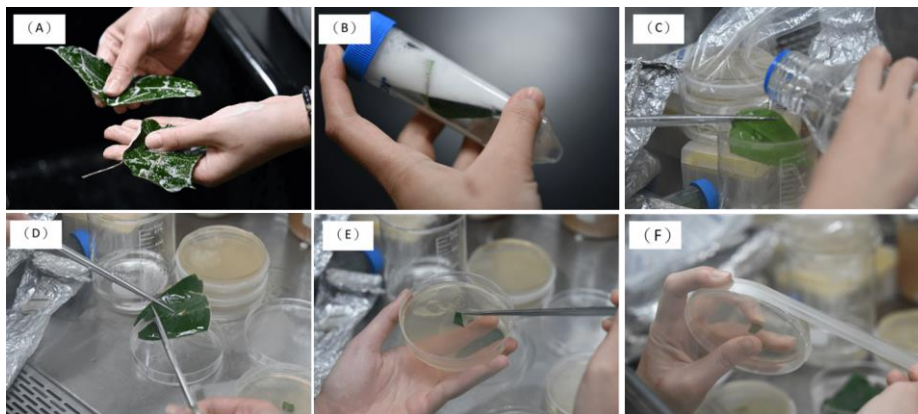


圖八、植物葉內真菌觀察實驗流程圖。圖（B）紅色虛線表示切片方向。

## 六、真菌離體培養生長形態

### (一) 真菌生長形態觀察

- 1、將植物(烏白、鵝掌柴、白匏子、烏榕)的葉片表面清洗乾淨(圖九-A)
- 2、以 75% 的乙醇淨洗 10 秒
- 3、將葉片以 2% 的次氯酸鈉少量的 TWEEN-20 進行表面消毒 10-15 分鐘(圖九-B)
- 4、無菌操作台內，以無菌水沖洗數次(圖九-C)
- 5、將消毒後的葉片切成 1 平方公分(圖九-D)
- 6、接種於沙保羅氏固態培養基(4% 葡萄糖、1% 蛋白胨、2% Agar、pH 為 5.6)(圖九-E)
- 7、將培養基用 parafilm 封口蠟膜密封(圖九-F)
- 8、置入植物生長箱，25°C 培養。



圖九、植物葉內真菌離體培養實驗操作流程圖。

### (二) 菌絲染色

- 1、將離體培養的菌絲抽出
- 2、放置玻片上過火 20 秒
- 3、滴上結晶紫等待 1 分鐘，後用水沖洗
- 4、滴上脫色液等待 30 秒後，以無菌水沖洗乾淨
- 5、蓋上蓋玻片後拿到複式顯微鏡下觀察菌絲形態，並各取二到三個位點測量菌絲直徑

### (三) 菌體面積測量

以微量吸量管尖(直徑約 0.8 公分)擷取一塊含真菌之培養基圓錠，在沙保羅氏固態

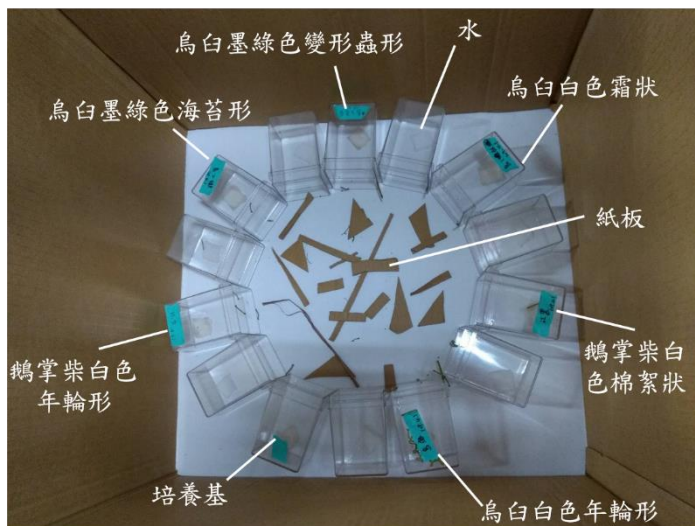
培養基生長五天的真菌（二重複），拍照以後以 Image J 測量面積。

#### （四）孢子形態觀察

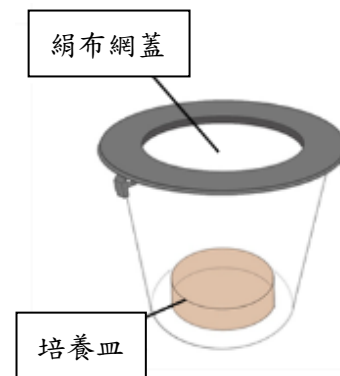
將離體培養後的真菌接到松針上，等待真菌產生孢子後，用鑷子挑出一些菌絲並放在玻片上蓋上蓋玻片後，以光學複式顯微鏡觀察孢子形態。

#### 七、氣味選擇實驗

將不同真菌培養液（烏白四種、鵝掌柴二種葉內真菌）各取 1mL 滴加在 4 平方公分的紗布上，以沙保羅液態培養基與無菌水為對照組。將處理好之紗布放入透明方盒中，所有方盒排成圓形後，再將 30 隻塔粉綠尺蠖 3~4 齡幼蟲放在圓形中間，並給予數片紙板以提供幼蟲附著，經 14 小時後觀察記錄塔粉綠尺蠖幼蟲所在的位置。



圖十、氣味選擇實驗裝置圖



圖十一、自製食草氣味盒示意圖，培養皿內放置（含真菌）培養基，上面覆蓋紗布以避免幼蟲直接接觸啃食。

#### 八、食草氣味改變方法，方法參考自黃怡亭、沈俊廷、沈洛伊（2015）

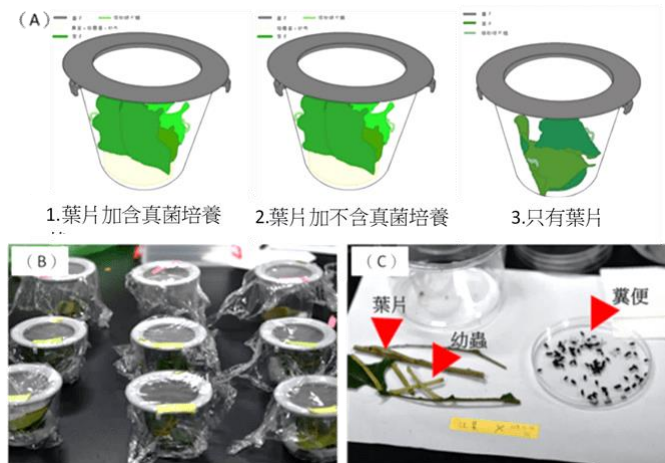
（一）將含真菌及不含真菌之沙保羅氏固態培養基切成四等分。

（二）取一等分放在培養皿上，並用紗布覆蓋於培養皿上。

（三）將包好的培養皿放入昆蟲飼養盒中。

（四）測量 2 公克的葉片（鵝掌柴、烏榕、白袍子）及 5 隻 3 齡~4 齡塔粉綠尺蠖幼蟲放入昆蟲飼養盒中，整體裝置以保鮮膜包覆。

（五）每日測量塔粉綠尺蠖之糞便重量，並補充葉片至 2 公克，持續進行五天。



圖十二、塔粉綠尺蛾幼蟲食草選擇實驗裝置圖。圖(A)自製食草氣味盒示意圖，圖(B)為實驗時的樣子，圖(C)為在秤量糞便重量時的樣子

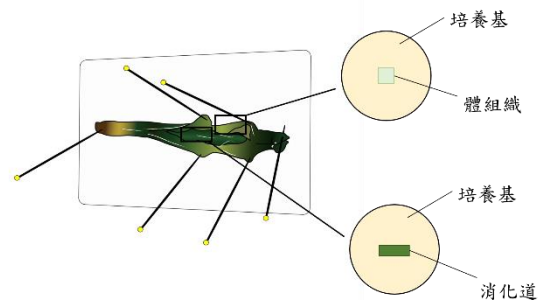
### 九、幼蟲真菌培養

(一) 消化道的真菌培養，方法參考自曾依晴(2009)

- 1、將死亡後的塔粉綠尺蛾幼蟲放入1%的次氯酸鈉中10秒取出，重複三次之後用無菌水沖洗
- 2、放在殺菌過(75%酒精消毒並放入無菌操作台用紫外燈殺菌30分鐘)的珍珠板上用2號昆蟲針將頭尾固定
- 3、用解剖剪刀自肛門開始將皮剪開，並將皮用昆蟲針固定在兩側
- 4、用另一支解剖剪刀將腸道剪下一段，用鑷子態培養基中培養。另有將消化道搗碎處理後以L形玻棒塗佈於培養基培養。放入沙保羅氏固態培養基中培養
- 5、用剪皮的那支剪刀剪下一塊約1平方公分未沾有腸子中的體液的體組織，放在沙保羅氏固態培養基中培養



圖十三、幼蟲解剖圖，紅色箭頭所指處消化道



圖十四、將蟲剖開後的示意圖，分別截取一段消化道與一塊體組織進行真菌離體培養。

## (二) 幼蟲糞便的真菌培養

將取食不同植物之塔粉綠尺蛾幼蟲糞便，以 75% 乙醇噴灑消毒後，放在沙保羅氏固態培養基上進行培養。

### 十、酸鹼值測試

將從烏白及鵝掌柴中培養出來的真菌分別放入 PH 值 4、5、5.6、6、7、8、9、10 的沙保羅氏液態培養基中培養 14 天，並抽氣過濾後放入烘箱 2 天，再將其真菌取出測量其重量。



圖十五、為 PH 值 4、5、5.6、6、7、8、9、10 的沙保羅氏液態培養基，PH 值越小的培養基顏色變越淺，PH 值越大的則越深。

### 十一、氣相層析質譜儀 (GC-MS) 分析揮發性化學物質 (VOCs)

將烏白年輪形真菌以沙保羅氏固態培養基培養 5 天當成實驗組，在將空白的沙保羅氏固態培養基當成對照組，放入氣相層析質譜儀進行實驗並加以分析結果。

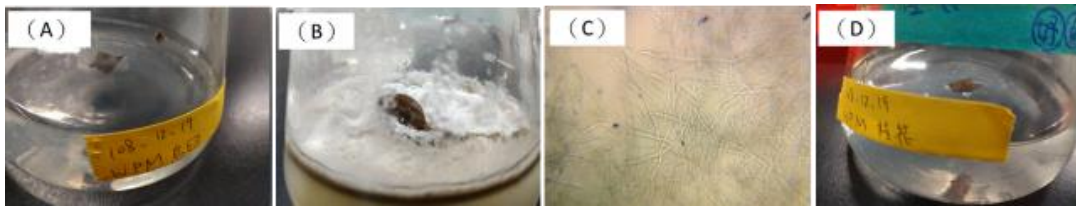
## 參、研究結果與討論

### 一、研究結果

#### (一) 前置實驗 - 烏白癒傷組織之培養

烏白葉片組織培養，在第三天可見由葉片周圍開始出現白色黴菌，參考圖十六 - (A)。持續培養十二天後，整個培養基全是白色黴菌，見圖十六 - (B)。挑取白色黴菌部分以顯微鏡觀察，可見全為菌絲，見圖十六 - (C)。然而同時間一同培養的桂花嫩葉卻沒有真菌生長，可見由烏白培養葉出的白色真菌非實驗操作汙染所致，而是由葉片內原有真菌長出。





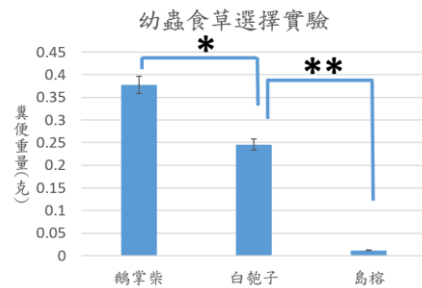
圖十六、前置實驗組織培養結果。圖 (A) 為種植兩天的烏白嫩葉；圖 (B) 種植 12 天的烏白嫩葉；圖 (C) 顯微鏡下烏白組織培養產生之白色真菌，圖中可見菌絲；圖 (D) 同時間種植的桂花嫩葉，經過 12 天培養後培養基無真菌生長。

## (二) 幼蟲食草選擇

由葉片啃食狀況及每日蒐集糞便可知，幼蟲連續五天皆有取食鵝掌柴與白匏子，但鵝掌柴的取食狀況較白匏子為佳。而烏榕葉片幾乎沒有啃食痕跡。在後來的飼養過程中，發現塔粉綠尺蛾的幼蟲可以食用鵝掌柴完成其一生，但較年幼的幼蟲是無法食用白匏子的，否則會造成其死亡。所以我們確定鵝掌柴也能成為塔粉綠尺蛾的食草，白匏子則為非主要食草。

表三、幼蟲食草選擇實驗數據

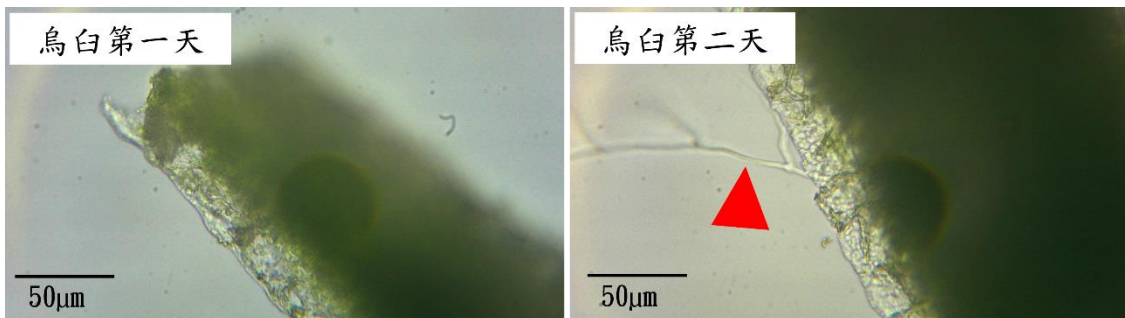
	白匏子	鵝掌柴	烏榕
第一天	0.29	0.32	0.00
第二天	0.16	0.36	0.01
第三天	0.16	0.35	0.00
第四天	0.28	0.45	0.00
第五天	0.34	0.41	0.05
平均	0.25	0.38	0.01



圖十七、幼蟲食草選擇實驗結果(以 T-test 進行統計分析，\*表示  $P < 0.05$ ，\*\*表示  $< 0.01$ )

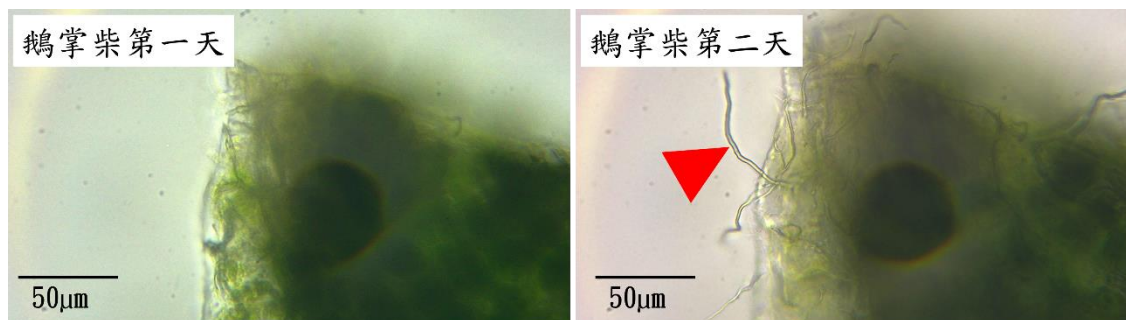
## (三) 葉內真菌觀察

### 1、烏白葉內真菌之觀察



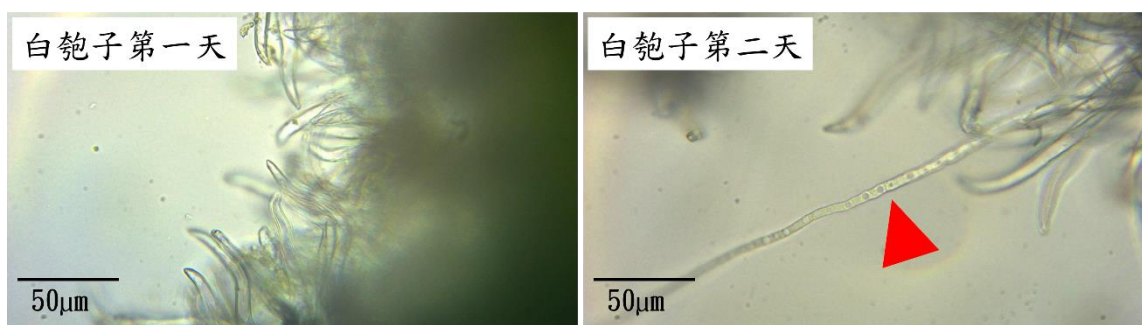
圖十八、烏白葉徒手切片觀察。左圖為剛完成切片在顯微鏡下的狀態；右圖為培養 24 小時後的觀察，可見有真菌菌絲自葉片中長出。

## 2、鵝掌柴葉內真菌之觀察



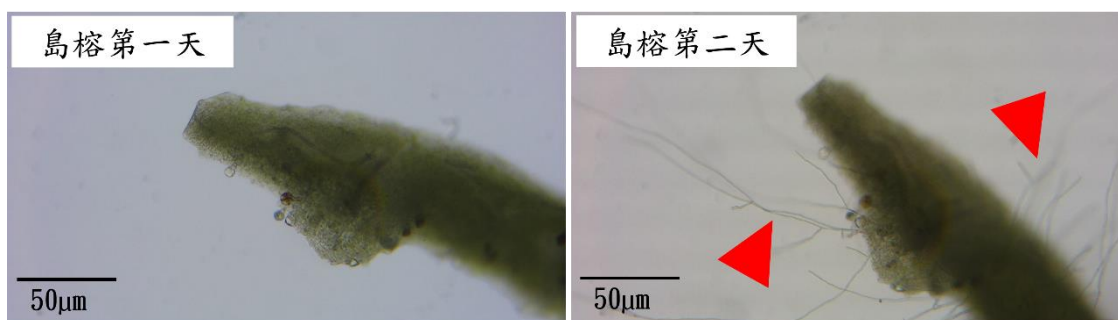
圖十九、鵝掌柴葉徒手切片觀察。左圖為剛完成切片在顯微鏡下的狀態；右圖為培養 24 小時後的觀察，可見有真菌菌絲自葉片中長出。

## 3、白匏子葉內真菌之觀察



圖二十、白匏子葉徒手切片觀察。左圖為剛完成切片在顯微鏡下的狀態，圖中毛狀物為下表皮之星狀柔毛；右圖為培養 24 小時後的觀察，可見有真菌菌絲自葉片中長出。

## 4、島榕葉內真菌之觀察



圖二十一、島榕葉徒手切片觀察。左圖為剛完成切片在顯微鏡下的狀態；右圖為培養 24 小時後的觀察，可見有許多的真菌菌絲自葉片中長出。

#### (四) 真菌離體培養

##### 1、塔粉綠尺蠖食草的真菌培養 - 烏白

(1) 本研究所用烏白葉採自新店區安一路烏白植株。葉內真菌離體培養結果見圖二十二。結果可見烏白葉內有不同種類真菌。(紅色箭頭 1-4 表示不同種類真菌)

(2) 將圖二十二培養出來的 4 種不同真菌，進行繼代純種培養，結果如圖二十三到圖二十六。結果可見四種真菌在培養基上的生長形態不同：圖二十二 1 號取樣生培養出的真菌形態為墨綠色海苔形真菌，見圖二十三-(A)；圖二十二 2 號取樣培養出的真菌形態為白色霜狀形真菌，見圖二十四-(A)；圖二十二 3 號取樣培養出的真菌形態為白色年輪形真菌，見圖二十五-(A)；圖二十二 4 號取樣培養出的真菌形態為墨綠色變形蟲形(外圈呈羽毛狀)真菌，見圖二十六-(A)。

(3) 定量培養五天後四種菌所涵蓋面積推測生長速度快慢：白色霜狀形真菌 > 白色年輪形真菌 > 墨綠色變形蟲形真菌 > 墨綠色海苔形真菌，結果整理於表四。四種真菌有不同的生長形態，培養基剖面圖來看，以白色霜狀形真菌菌體生長較高且蓬鬆，圖二十四-(B)，而墨綠色海苔形與墨綠色變形蟲形則較為黏與稠密，見圖二十三與圖二十六-(B)。

(4) 觀察並量測四種真菌菌絲大小分別為 > 墨綠色變形蟲形真菌墨綠 > 色海苔形真菌 > 白色霜狀形真菌 > 白色年輪形真菌，結果整理於表四。

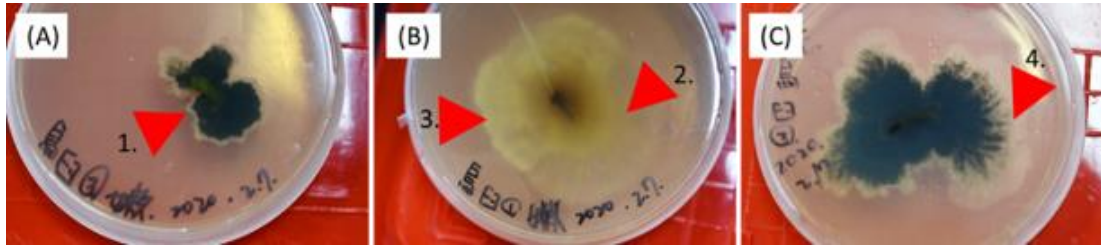
(5) 四種真菌孢子形態皆不相同，而依此可作為初步鑑定的依據，整理總表請見表四：

5-1 由圖二十三-(D) 墨綠色海苔形真菌孢子為卵形，末端有一根類似尾巴的構造，初步辨識為葉點黴屬真菌。

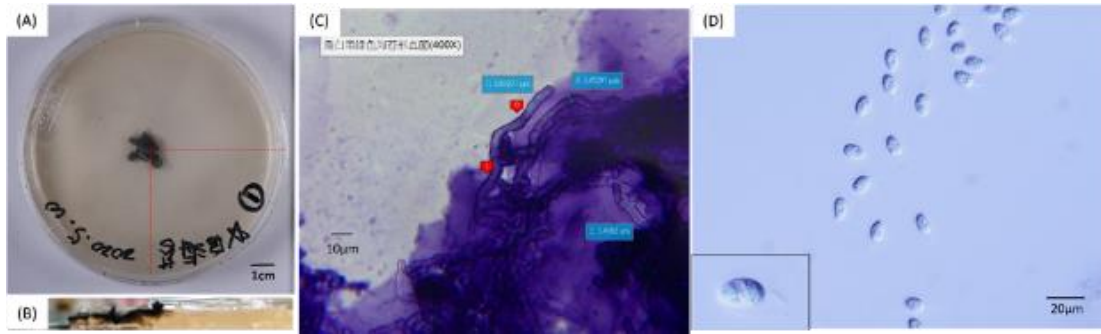
5-2 由圖二十四-(D) 白色霜狀形真菌孢子為鐮刀狀，初步辨識為炭疽刺盤孢菌屬真菌。

5-3 由圖二十五-(D) 白色年輪形真菌孢子  $\alpha$  為卵形， $\beta$  為絲狀線形，初步辨識為間座殼菌屬真菌。

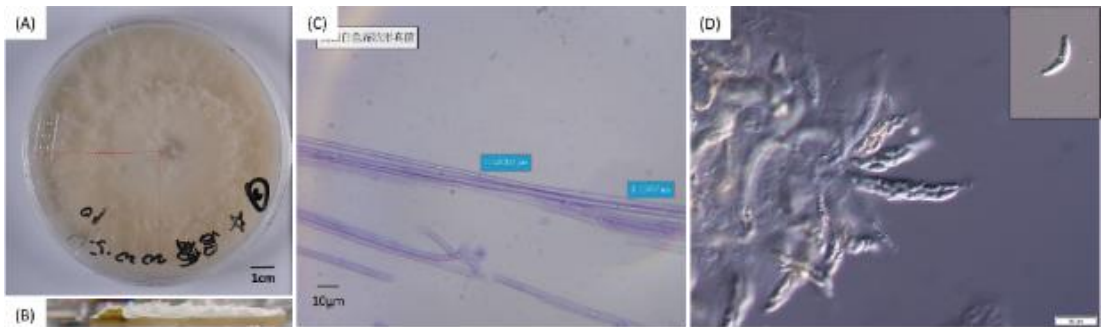
5-4 由圖二十六-(D) 墨綠色變形蟲形真菌為橢圓形，會整齊排列，初步辨識為炭疽刺盤孢菌屬真菌。



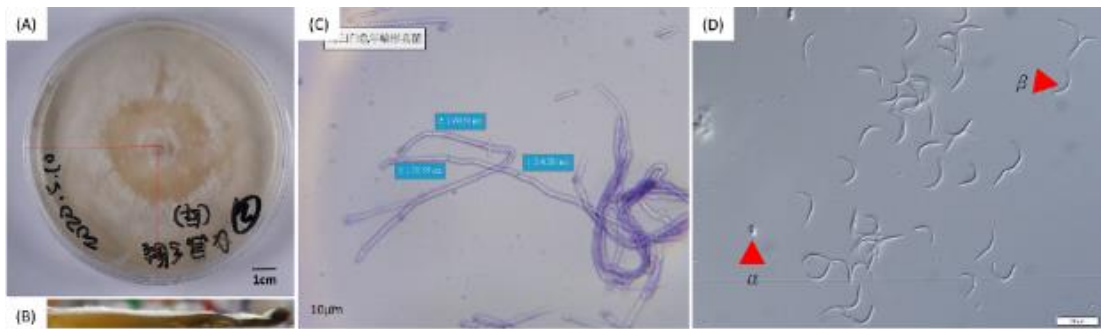
圖二十二、烏白葉真菌的離體培養結果。分別取烏白不同葉片進行培養，圖(A)、圖(B)為嫩葉培養，圖(C)為成熟葉培養。



圖二十三、圖(A)為墨綠色海苔形的菌體形態，圖(B)為此真菌的剖面圖，圖(C)菌絲染色後，在複式顯微鏡下的菌絲形態，紅色指標處表示可見菌絲內隔板，圖(D)為其孢子形態為卵形，後面可見一根類似尾巴的構造。

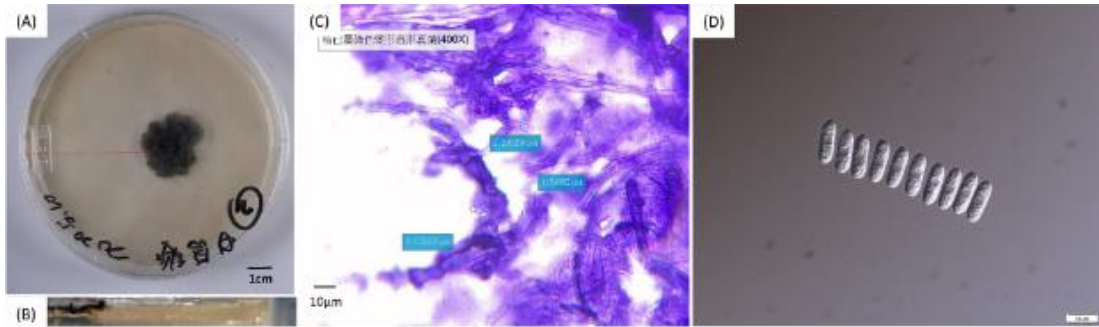


圖二十四、圖(A)為白色霜狀形的菌體形態，圖(B)為此真菌的剖面圖，圖(C)菌絲染色後，在複式顯微鏡下的菌絲形態，此菌絲較為纖細，未見隔板，圖(D)為其孢子形態，為鐮刀狀。



圖二十五、圖(A)為白色年輪形的菌體形態，圖(B)為此真菌的剖面圖，圖(C)菌絲染

色後，在複式顯微鏡下的菌絲形新用態，此菌絲較為纖細，未見隔板，圖 (D) 為其孢子形態， $\alpha$  為卵形， $\beta$  為絲狀線形。



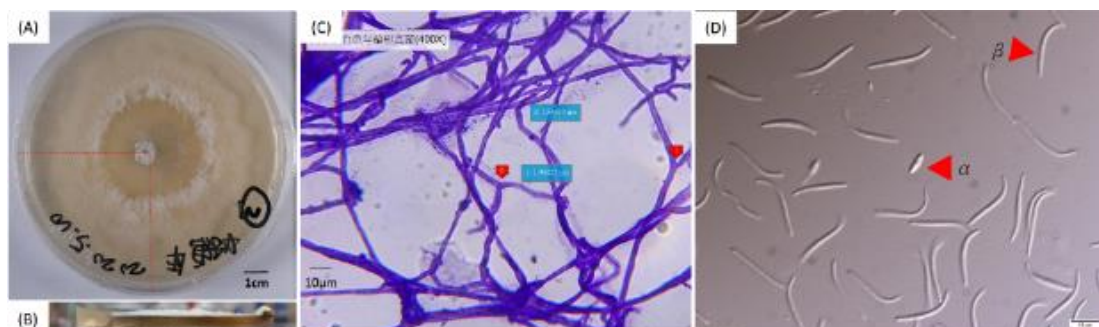
圖二十六、圖 (A) 為墨綠色變形蟲形的菌體形態，圖 (B) 為此真菌的剖面圖，圖 (C) 菌絲染色後，在複式顯微鏡下的菌絲形態，菌絲較為粗，且無隔板，圖 (D) 為其孢子形態，為橢圓形，會整齊排列。

## 2、塔粉綠尺蛾食草的真菌培養 - 鵝掌柴

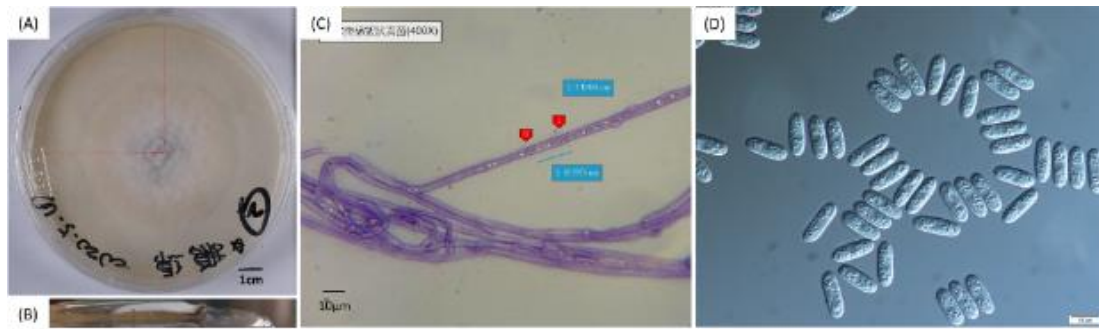
(1) 本研究所用鵝掌柴葉片採自新店區安康森林公園內植株。結果可見鵝掌柴葉內有兩種不同真菌，一種為白色年輪形真菌，一種為白色棉絮狀真菌。

(2) 鵝掌柴白色年輪形真菌雖與烏白白色年輪形真菌生長形態相似，但鵝掌柴白色年輪形真菌菌絲直徑較大，且分生孢子形態有  $\alpha$ 、 $\beta$  兩種，見圖二十七 - (D)。初步辨識應為炭疽刺盤孢菌屬真菌。

(3) 鵝掌柴棉絮狀真菌菌絲生長如白色棉絮，由圖二十八 - (B) 菌體剖面圖可見，此真菌菌絲生長較膨，孢子形態為橢圓形，初步辨識為炭疽刺盤孢菌屬真菌。



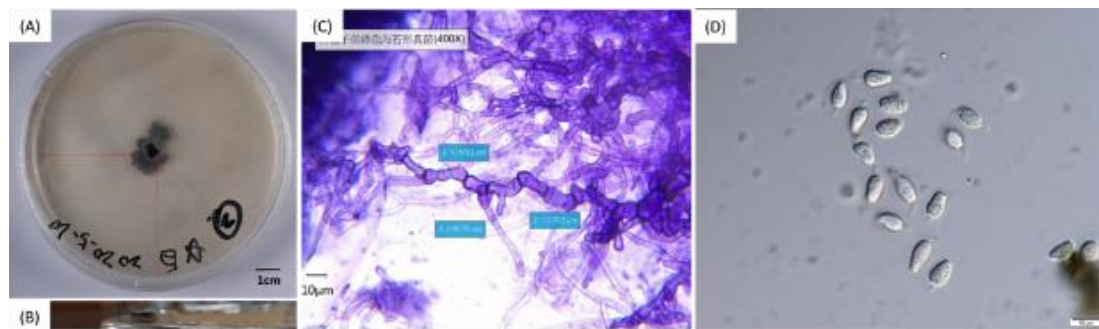
圖二十七、圖 (A) 為鵝掌柴年輪形的菌體形態，圖 (B) 為此真菌的剖面圖，圖 (C) 菌絲染色後，在複式顯微鏡下的菌絲形態，紅色指標為菌絲分岔處，圖 (D) 為其孢子形態， $\alpha$  為橢圓形， $\beta$  為絲狀線形。



圖二十八、圖 (A) 為鵝掌柴棉絮狀的菌體形態，圖 (B) 為此真菌的剖面圖，圖 (C) 為其菌絲染色，在複式顯微鏡下的菌絲結構，紅色指標為菌絲隔板，圖 (D) 為其孢子形態為橢圓形。

### 3、非塔粉綠尺蠖食草的真菌培養 - 白孢子

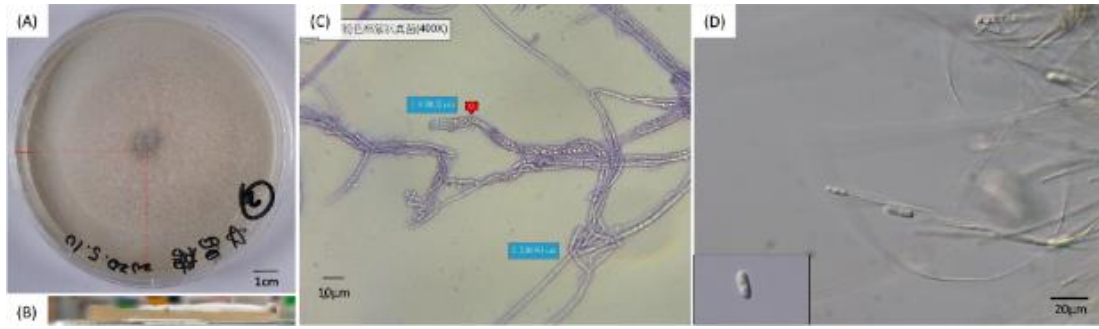
本研究培養白孢子內生真菌僅一種，其菌體形態、生長速度、菌絲與孢子形態皆與烏白墨綠色海苔形真菌一致。見圖二十九，初步辨識為葉點黴屬真菌。



圖二十九、圖 (A) 為白孢子海苔形的菌體形態，圖 (B) 為此真菌的剖面圖，圖 (C) 為其菌絲染色，在複式顯微鏡下的菌絲結構，菌絲直徑不一，部分較為粗大，有明顯分隔且壁厚，圖 (D) 為其孢子形態為卵形，後面可見一根類似尾巴的構造。

### 4、非塔粉綠尺蠖食草的真菌培養 - 島榕

本研究培養島榕內生真菌僅一種，見圖三十，菌體形態為帶粉色之棉絮狀，菌絲細但末端有膨大特化現象。孢子外形為橢圓形，初步辨識為炭疽刺盤孢菌屬真菌。雖然與鵝掌柴棉絮狀真菌相似，但菌體顏色與生長速度不同，推測應為同屬不同種真菌。



圖三十、圖 (A) 為烏榕粉色棉絮狀的菌體形態，圖 (B) 為其菌的剖面圖，圖 (C) 為其菌絲染色，在複式顯微鏡下的菌絲結構，紅色指標為隔板，隔板後菌絲直徑較大且開始有分支突起，圖 (D) 為其孢子形態為橢圓形。

表四、葉內真菌依生長形態、菌絲直徑、生長面積與初步鑑定結果整理表

植物	形態	面積(cm <sup>2</sup> )	菌絲直徑(μm)	孢子形態	真菌的生態地位
烏白	墨綠色海苔形	2.84±1.03	3.74±1.23	卵形	葉點黴屬( <i>Phyllosticta</i> sp.)
	墨綠色變形蟲形	2.93±1.02	3.85±2.31	橢圓形	炭疽刺盤孢菌屬( <i>Colletotrichum</i> sp.)
	白色霜狀形	59.38±7.03	1.17±0.24	鐮刀狀	
	白色年輪形	43.07±3.69	1.99±0.36	$\alpha$ 為卵形, $\beta$ 為絲狀線形	間座殼菌屬( <i>Diaporthe</i> sp.)
鵝掌柴	白色年輪形	25.99±11.91	1.87±0.03	$\alpha$ 為橢圓形, $\beta$ 為絲狀線形	
鵝掌柴	白色棉絮狀	19.67±0.25	3.40±0.21	橢圓形	炭疽刺盤孢菌屬( <i>Colletotrichum</i> sp.)
白飽子	墨綠色海苔形	2.80±1.28	4.35±0.20	卵形	葉點黴屬( <i>Phyllosticta</i> sp.)
烏榕	粉色棉絮狀	41.27±5.93	3.69±1.15	橢圓形	炭疽刺盤孢菌屬( <i>Colletotrichum</i> sp.)

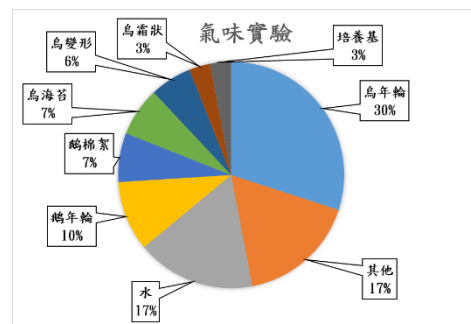
註：正負號的數值為誤差值

### (五) 氣味選擇實驗

本實驗結果發現不同真菌培養液氣味對塔粉綠尺蛾幼蟲的吸引程度最高者為烏白年輪形真菌（間座殼菌屬），佔 30%，其次是鵝掌柴白色年輪形真菌（炭疽刺盤孢菌屬），佔 10%。

表五、真菌氣味選擇實驗之結果

菌	數量
烏白白色年輪形真菌	9隻
水	5隻
鵝掌柴白色年輪形真菌	3隻
死亡	3隻
烏白墨綠色海苔形真菌	2隻
烏白墨綠色變形蟲形真菌	2隻
鵝掌柴棉絮狀真菌	2隻
未選擇	2隻
烏白白色霜狀形真菌	1隻
培養基	1隻



圖三十一、真菌氣味選擇實驗之結果

### (六) 食草氣味改變

以烏白白色年輪形真菌（炭疽刺盤孢菌屬）為實驗真菌進行氣味改變實驗，數據見表六。依據不同植物進行製圖，得到以下結果：

1、以真菌氣味處理鵝掌柴葉片，幼蟲取食結果見圖三十二。由圖可知不同處理對幼蟲取食程度依序為：鵝掌柴+培養基 > 鵝掌柴+含真菌培養基 > 鵝掌柴。

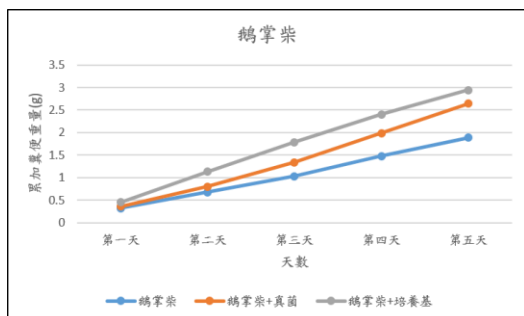
2、以真菌氣味處理白匏子葉片，幼蟲取食結果見圖三十三。由圖可知不同處理對幼蟲取食程度依序為：白匏子 > 白匏子+培養基 > 白匏子+含真菌培養基。

3、以真菌氣味處理烏榕葉片，幼蟲取食結果見圖三十四。由圖可知不同處理對幼蟲取食程度依序為：烏榕+培養基 > 烏榕+含真菌培養基 > 烏榕。實驗中我們發現，雖然幼蟲對烏榕的取食量並不多，但幼蟲對於以真菌氣味或培養基氣味處理之烏榕葉片，起初有嘗試啃咬的現象，但可能啃食後發現與食草感覺不同而又將葉渣吐出。

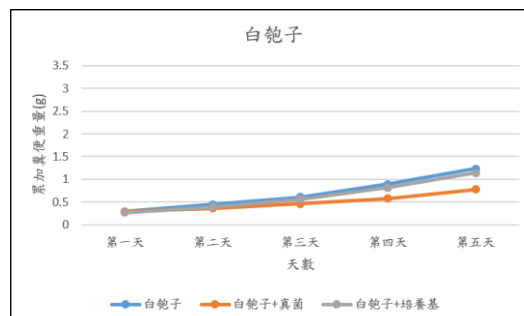
表六、探究真菌對幼蟲食草選擇的影響實驗記錄。

	第一天	第二天	第三天	第四天	第五天	平均
白匏子	0.29	0.16	0.16	0.28	0.34	0.246
白匏子+培養基	0.27	0.12	0.17	0.26	0.32	0.228
白匏子+真菌	0.29	0.07	0.1	0.12	0.2	0.156
鵝掌柴	0.32	0.36	0.35	0.45	0.41	0.378
鵝掌+柴加培養	0.45	0.68	0.66	0.61	0.54	0.588
鵝掌柴+真菌	0.36	0.44	0.54	0.65	0.65	0.528
烏榕	0	0.01	0	0	0.05	0.012
烏榕+培養基	0.03	0.03	0.09	0.11	0.04	0.06
烏榕+真菌	0.02	0.02	0.03	0.12	0.05	0.048

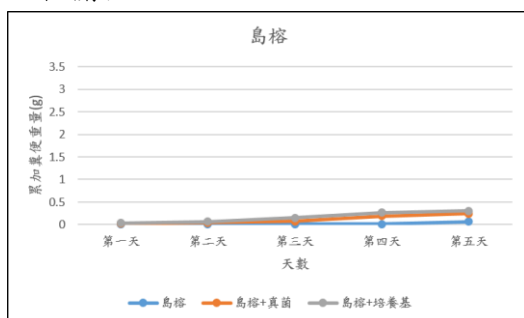
註：數字為每天蒐集到糞便重量，單位：公克



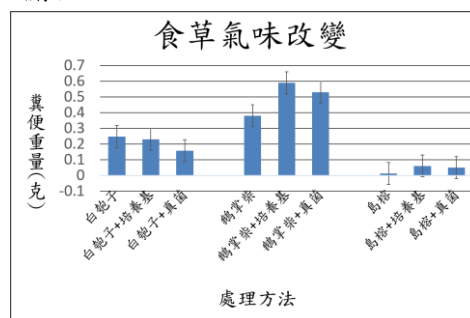
圖三十二、鵝掌柴以不同氣味處理與幼蟲取食之相關性



圖三十三、白匏子以不同氣味處理與幼蟲取食之相關性



圖三十四、烏榕以不同氣味處理與幼蟲取食之相關性



圖三十五、幼蟲排便量與三种植物的統計 (以 T-test 進行統計分析, \*表示  $P < 0.05$ , \*\*表示  $< 0.01$ )



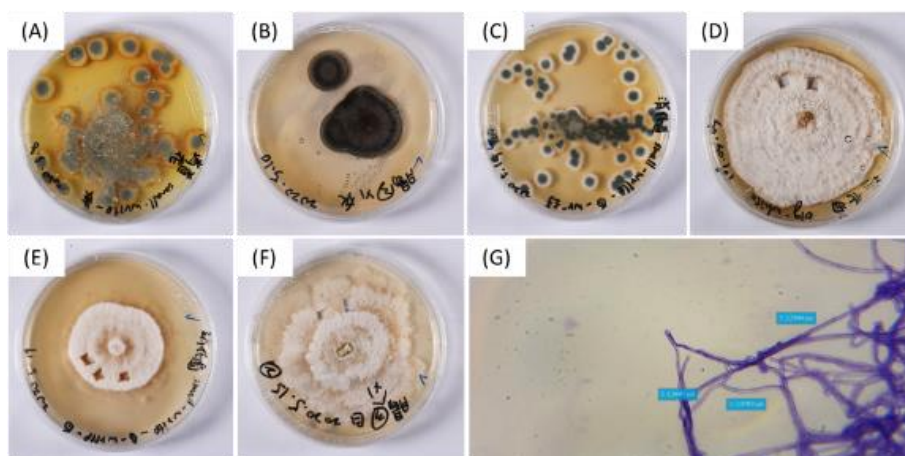
## (七) 幼蟲真菌培養

### 1、消化道真菌培養

圖三十六為食烏白之幼蟲消化道真菌初始培養五天後結果。由結果可見消化道內有多種真菌存在，接著從中挑選不同真菌進行繼代培養，最後分離出六種真菌，見圖三十七。其中圖三十七 - (F) 菌體形態與烏白年輪形真菌相似，我們進一步取菌絲染色後觀察，量測菌絲平均直徑為直徑為  $2.48 \pm 0.72 \mu\text{m}$ ，待產孢進行孢子辨識後將可確認是否同為間座殼菌屬真菌。



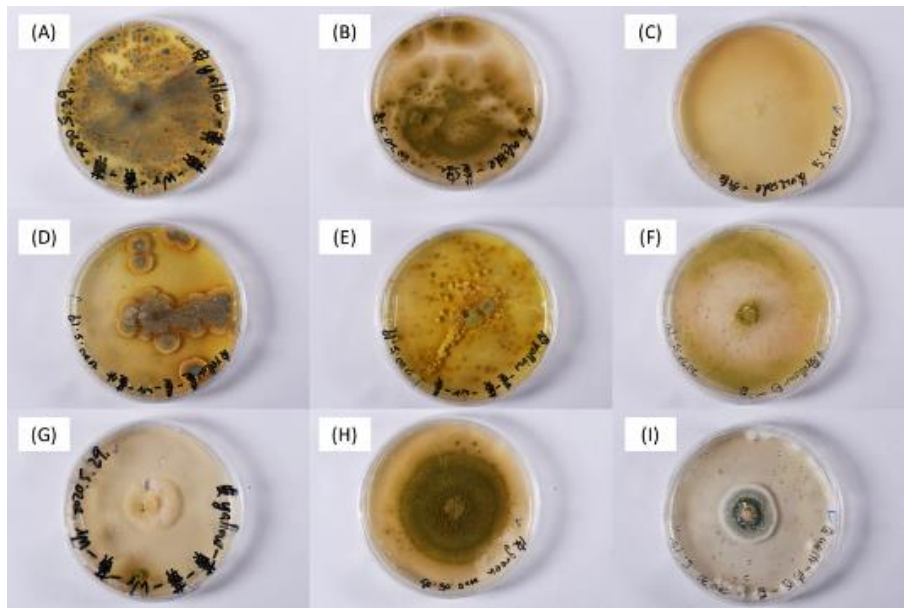
圖三十六、消化道初始培養五天之結果。圖 (A) 為整段完整消化道培養，圖 (B) 為取出消化道後將其搗碎，塗佈培養結果，圖 (C) 為搗碎消化道，以無菌水稀釋 10 倍後塗佈培養結果。



圖三十七、圖 (A) ~ 圖 (F) 為用消化道分離出的六種菌。圖 (G) 為圖 (E) 之菌經過染色後觀察結果。菌絲平均直徑為  $2.48 \pm 0.72 \mu\text{m}$ 。

### 2、體組織真菌培養

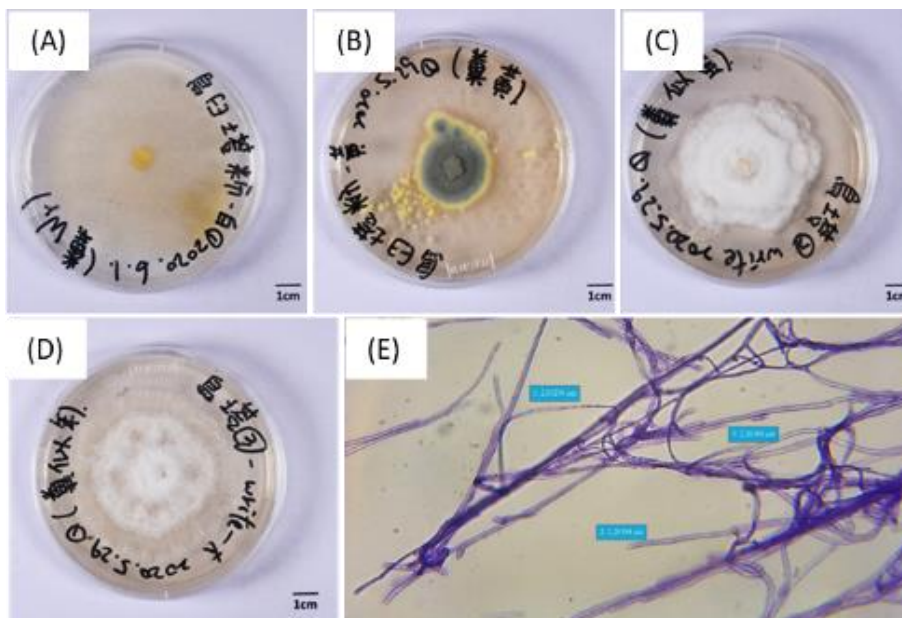
為了區別葉內真菌被幼蟲食入後是否會影響蟲體，在進行幼蟲消化道解剖時，我們另外取一片體組織進行真菌培養，經數次繼代培養後，共分離出九種真菌，整理於圖三十九。結果發現，體組織之真菌皆無與葉內真菌相似的菌體形態，可知本研究所探討之葉內真菌被幼蟲食入後，並不會侵入幼蟲體內而成為蟲生真菌。



圖三十八、將體組織所長出來的真菌，進行繼代純種培養後的真菌

### 3、糞便真菌培養

由結果可見糞便中有多種真菌存在，最後分離出四種真菌，見圖三十九。其中圖三十九 - (D) 菌體形態與烏白年輪形真菌相似，我們進一步取菌絲染色後觀察，量測菌絲平均直徑為直徑為  $2.47 \pm 0.31\mu\text{m}$ ，待產孢進行孢子辨識後將可確認是否同為間座殼菌屬真菌。



圖三十九、圖 (A) ~ 圖 (D) 為用糞便分離出的四種菌。圖 (E) 為圖 (D) 之菌經過染色後觀察結果。菌絲平均直徑為  $2.47 \pm 0.31\mu\text{m}$ 。

### (八) 酸鹼值測試

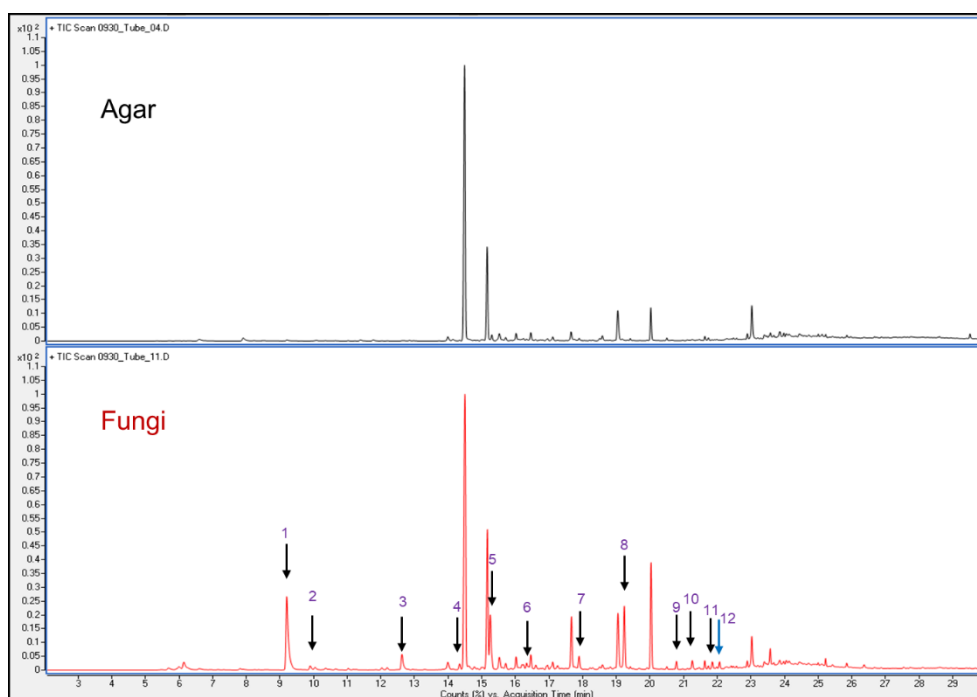
將菌絲濾出後測量培養液的酸鹼值發現培養液皆會變酸，由此可發現真菌確實有在生長，而我們也發現烏白年輪形真菌較適合在鹼性的環境中生長。

表七、酸鹼值測試總表

		PH4	PH5	PH5.6	PH6	PH7	PH8	PH9	PH10
烏白白色 年輪形	重量 (g)	0.085	0.057	0.085	0.088	0.099	0.103	0.125	0.145
	ph值	3.97	3.98	4.13	4.26	4.19	5.14	4.83	4.85
烏白白色 霜狀	重量 (g)	0.108	0.056/0.061		失敗	0.087	0.056	0.096	0.08
	ph值	3.55	3.84	3.83	失敗	4.55	5.32	5.12	4.93
烏白墨綠色 海苔形	重量 (g)	0.074	0.049	0.052	0.039	0.051	0.018	0.033	0.048
	ph值	3.71	4.94	4.84	4.55	4.86	5.15	5.12	5.61
烏白墨綠色 變形蟲形	重量 (g)	0.035	0.05	0.031	0.044	0.067	0.056	0.055	0.047
	ph值	3.94	4.4	5.16	4.64	4.46	5.13	5.55	5.25
鵝掌柴白色 年輪形	重量 (g)	0.021	0.058	0.035	0.079	0.031	0.059	0.042	0.031
	ph值	3.97	4.95	5.63	5.11	5.38	4.97	5.43	4.64
鵝掌柴白色 棉絮狀	重量 (g)	0.126	0.125	0.128	0.11	0.104	0.099	0.163	0.082
	ph值	3.61	4.79	5.32	4.09	4.52	4.87	4.51	5.2

### (九) GC-MS 分析 VOCs

烏白白色年輪形真菌揮發性化學物質經氣相色譜質譜分析結果如圖四十所示，共計 12 筆資料，整理如表八，但其中四種無文獻資料。Peak12 是  $\alpha$ -muurolene，而據 Dong-Hui Yan 等 (2018) 指出  $\alpha$ -muurolene 具有抗真菌活性。



圖四十、GC-MS 質譜圖

表八、烏白白色年輪形真菌揮發性化學物質成分表

Peak no.	Identified compound	M. wt.	M. f.	Base peak	Main fragments m/z
1	Ethane, 1,1-diethoxy	118	C6H14O2	45	61,73,89,103,117
2	Butane, 1-(ethenyloxy)-3-methyl	114	C7H14O	43	55,70,99,114
3	Butylphosphonic acid, di(2-phenylethyl)ester	346	C20H27O3P	104	39,51,63,78,91
4*	(R)-9-[(S)-2-(Hydroxymethyl)pyrrolidin-1-yl]-3-methyl-3,4-dihydro-2H-benzo(b)(1,4,5)oxathiazepine 1,1-dioxide	312	C14H20N2O4S	281	43,55,69,93,108,126,177,191,207,249,265
5*	3,5-Methanocyclopentapyrazole, 3,3a,4,5,6,6a-hexahydro-3a,4,4-trimethyl-	164	C10H16N2	93	41,57,71,77,107,121,136
6	Nonanal	142	C9H18O	57	41,70,82,98,114,136,267
7	Borinic acid diethyl-, 5-hexynyl ester	166	C10H19BO	109	41,57,70,81,95,128,152
8*	Methylphosphonic acid, fluoroanhydride, 2,2-dimethylhexyl ester	210	C9H20FO2P	43	55,71,81,99,112,127,152
9	1,8-Cyclotetradecadiyne	188	C14H20	105	41,65,79,91,119,131,147,159,173,188
10	5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-[E]-	194	C13H22O	43	55,69,93,107,136,151,161,176,194
11*	1,4-Methanocycloocta[d]pyridazine	204	C13H20N2	119	41,55,67,79,93,105,133,147,161,175,189,204
12	alpha Muurolene	204	C15H24	105	41,55,69,81,93,119,133,147,161,175,189,204,220

註、\*表示未查到文獻之化學物質

## 二、討論

### (一) 葉片內的真菌是病源還是內生真菌

從實驗三葉內真菌之觀察和實驗四真菌離體培養的結果可發現，本研究選用的四個植物葉片內，皆有真菌存在，但這些真菌是病源菌還是內生真菌。

依張東柱（2010）對病原菌的定義是為害葉部的真菌多屬小型真菌，因此在受害葉片上，可以看到細小的真菌子實體，一般需用放大鏡才能觀察子實體的外觀，有時僅能看到菌絲體或無性世代的構造。葉部病害的發病大多自下位葉開始發病，如果環境適合發病，會逐漸擴散，或僅局限於部份樹冠。受害葉片會出現病徵，如葉片變色、腐爛或變形，未成熟葉片提前落葉等。

潘峰、吳衛（2015）內生真菌是指部分生活在健康植物組織內部，而不使宿主植物表現出明顯感染症狀的真菌。目前已從藻類、苔蘚植物、蕨類植物、裸子植物和被子植物中均分離得到過內生真菌。而我們在採集葉片和進行感染葉子實驗（見附錄）時，皆未發現葉片上有明顯的病徵，因此我們推測這些葉內真菌是植物的內生真菌而非病源菌。

### (二) 為什麼烏白葉內生真菌不會抑制塔粉綠尺蠖幼蟲去食用

曾敏南、陳昱初（2014）提出許多種的內生真菌都可以幫植物抵禦有害昆蟲或某些食草動物，而且其作者在後還有寫到，這些內生真菌主要是透過產生真菌毒素而達到毒害昆蟲的目的。黃俞菱（2018）提到植物內生真菌，會產生一些對動物或昆蟲有害的次級代謝物，當牠們吃到含有這些物質的植物時，就會感到不適，因而避免共生植物被當作食物。本研究發現烏白可抵禦其他植食昆蟲去食用，但卻無法抵禦塔粉綠尺蠖幼蟲去食用，在此

我們想到了無尾熊與尤加利葉的例子，尤加利葉會釋放毒素，導致其他植食動物不去食用，而無尾熊卻可食用尤加利葉不被其毒素影響，因此我們推測塔粉綠尺蛾幼蟲與無尾熊的例子相似。

### （三）烏白內生真菌的氣味是否會吸引塔粉綠尺蛾幼蟲

本研究進行的氣味選擇實驗之結果，可發現塔粉綠尺蛾幼蟲會被植物內生真菌氣味所影響，而且不同的真菌對幼蟲的吸引力也不同，其中以烏白內生真菌中的間座殼菌屬 (*Diaporthe* sp.) 真菌吸引力最大。Enakshi Ghosh & Radhika Venkatesan (2019) 提到植食昆蟲與植物長期演化下，植食昆蟲已逐漸「嗅出」植物所散發的特定化學分子。因此本研究推測植食昆蟲不只能嗅出植物所散發的特定化學分子也能嗅出植物內生真菌所散發的特定化學分子。

### （四）內生真菌是否為塔粉綠尺蛾幼蟲選擇食草的因素

在實驗二幼蟲食草選擇的結果中，我們發現塔粉綠尺蛾幼蟲幾乎不食用烏榕，而當我們進行實驗六食草氣味改變實驗後，發現烏榕葉與含間座殼菌屬 (*Diaporthe* sp.) 的真菌培養基共同放置於飼養盒時，幼蟲就會有啃食的現象。間座殼菌屬 (*Diaporthe* sp.) 的真菌也會增加幼蟲對鵝掌柴的攝食狀況。

### （五）沙保羅氏培養基的氣味是否會影響塔粉綠尺蛾幼蟲的食用量

在實驗六食草氣味改變的結果中，發現有加不含真菌培養基的飼養盒中的食用量也比只有放置葉片的飼養盒中的食用量還多。由於沙保羅氏培養基的主要成分為蛋白胨及葡萄糖，而蛋白胨的味道最重，因此推測蛋白胨是會影響塔粉綠尺蛾幼蟲對葉片的食用量。

### （六）塔粉綠尺蛾幼蟲在食用葉片後，葉內真菌是否會留在體內

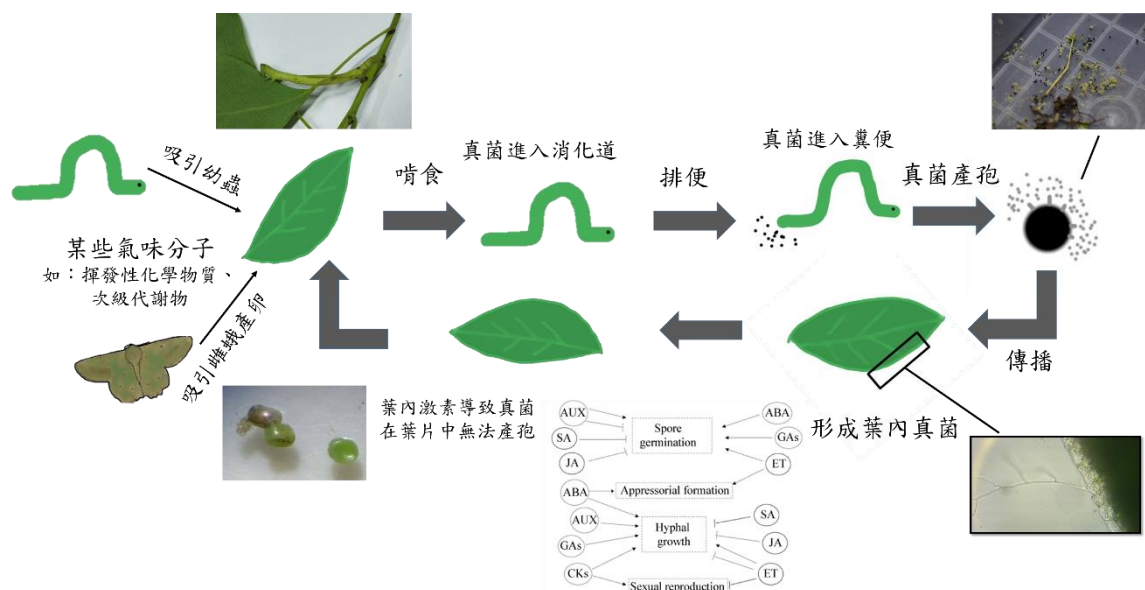
本研究實驗七幼蟲真菌培養時，將體組織切塊和消化道剪斷分別種入沙保羅氏培養基中後，發現體組織長出了很多麴菌，而消化道雖然也有長出麴菌，但亦有長出與葉內真菌相似の間座殼菌屬 (*Diaporthe* sp.) 真菌。在同實驗中進行糞便的真菌培養時，結果與消化道的真菌培養結果相似。因此我們推測塔粉綠尺蛾在食用葉片後，間座殼菌屬葉內真菌其孢子不易被消化道消化，進而跟著糞便一起排出。

### （七）塔粉綠尺蛾幼蟲是否會幫助葉的內生真菌傳播

蕭祺暉等人提到內生真菌主要通過兩種形式傳播：一是通過菌絲生長進入子房和胚株，經由宿主的種子傳播；另一是產生孢子，通過風、降水、從植物表皮的氣孔、皮孔等途徑侵入進而定居在植物莖部，是否有可能由動物、昆蟲、線蟲、傷口等途徑侵入，則有待進一步探討。趙葵等人也提到植物激素會抑制真菌產孢。加上我們在進行葉片切片觀察時，也的確皆未發現孢子。而且本研究在塔粉綠尺蠖幼蟲體內及糞便中，皆可培養出內生真菌，因此推測葉的內生真菌可能需要透過塔粉綠尺蠖幼蟲藉由啃食葉片將菌絲帶出植物體外，避免受到植物激素抑制，而能讓內生真菌順利產孢進行傳播完成生活史。

(八) 烏白的葉內生真菌與塔粉綠尺蠖之間是否已共同演化出穩定的共存關係

本研究所採用植物葉片皆為健康植株，且塔粉綠尺蠖幼蟲並未出現病徵。在培養烏白葉的內生真菌、塔粉綠尺蠖幼蟲的消化道真菌和糞便真菌皆有相同菌體形態的真菌，並且 Mustapha F. A. Jallow & Dereje Dugassa Gobena & Stefan Vidal (2008) 的實驗結果顯示，在番茄中接種內生真菌 (*Acremonium strictum*) 10~18 天後，雌蛾 (*Helicoverpa armigera*) 會較喜歡在其葉片上產卵。因此我們推測烏白、內生真菌和塔粉綠尺蠖這三者之間的關係可能為：烏白葉的內生真菌會釋放特定化學分子如 VOC (volatile organic compound) 或次級代謝物，吸引塔粉綠尺蠖成蟲去烏白葉片上產卵，幼蟲被烏白葉的內生真菌吸引後，開始食用烏白葉，內生真菌因此可離開植物進入幼蟲消化道，進而排出糞便使真菌順利產孢傳播到新的烏白葉片上，以此循環。



圖四十二、葉內真菌、葉片及塔粉綠尺蠖三者的關係圖。

## 肆、結論與應用

### 一、結論

- (一) 本研究可以確認除了烏白外鵝掌柴也可以是塔粉綠尺蠖幼蟲的主要食草，白孢子和以真菌氣味處理的烏榕雖然能讓塔粉綠尺蠖幼蟲嘗試取食，卻無法供應牠一生所需的養分。
- (二) 本研究所採集的植物其葉內皆有內生真菌，烏白內有 4 種真菌，鵝掌柴內有 2 種真菌，白孢子與烏榕內各有 1 種真菌。
- (三) 本研究初步辨識塔粉綠尺蠖食草內真菌如下：4 種烏白葉內真菌包含葉點黴屬、炭疽刺盤孢菌屬及間座殼菌屬；2 種鵝掌柴葉內真菌皆為炭疽刺盤孢菌屬真菌；這三個屬真菌在台灣生物多樣性資訊入口網，查詢出葉點黴屬 90 種、間座殼菌屬 7 種、炭疽刺盤孢菌屬 64 種，皆無寄生/共生於烏白或鵝掌柴的紀錄。
- (四) 由食草氣味改變實驗可知，經真菌氣味處理之鵝掌柴及烏榕，幼蟲的食用狀況皆有比未處理的葉片多，所以葉的內生真菌可能是塔粉綠尺蠖幼蟲選擇食草的因素。
- (五) 本研究所探討之葉內真菌被幼蟲食入後，並不會侵入幼蟲體內而成為蟲生真菌。
- (六) 透過本研究，我們發現烏白葉、內生真菌與塔粉綠尺蠖之間可維持穩定的共存關係。

### 二、應用

- (一) 由於環境變遷與人類活動，地球上許多的物種都受到影響，昆蟲的鱗翅目也在其中。若我們研究的假說成立，可利用食草內的葉內真菌來吸引雌蛾產卵，也能利用讓含真菌的食草提高幼蟲存活率，藉此應用於特定物種的復育。
- (二) 我們的實驗成果亦可運溶於病蟲害的防治，找出害蟲喜歡的真菌氣味，即可在菜園適當位置培養真菌或釋放氣味，減少害蟲在作物上產卵的機會來降低農損。

### 三、未來展望

- (一) 釐清烏白內間座殼菌屬 (*Diaporthe* sp.) 的生態角色

烏白白色年輪形真菌目前經過孢子形態辨識與初步 DNA 定序結果，確認為 *Diaporthe* sp. 真菌，不過在比對基因序列資料庫 (Index Fungorum) 時，無法確認其為何種。這可能是研究此屬真菌的資料不足，以致於無法得到合適的親緣關係樹。未來我們將持續地進行

烏白葉內真菌離體培養，找出更多同屬真菌來進行分析比對。

## (二) 檢測真菌氣味分子的種類

Enakshi Ghosh (2019) 提到植食昆蟲與植物長期演化下，植食昆蟲已逐漸「嗅出」植物所散發的特定化學分子。Franziska Eberl, Maite Fernandez de Bobadilla, Michael Reichelt, Almuth Hammerbacher, Jonathan Gershenzon and Sybille B. Unsicker (2020) 提及很少人有研究葉內微生物和植食昆蟲的相互作用，且鱗翅目幼蟲的取食行為與真菌組織和受真菌感染之葉片內高濃度的甘露醇所影響。我們在實驗中也發現幼蟲會被真菌的氣味吸引，因此我們想要藉由氣相色譜質譜 (GC-MS) 來檢測這些內生真菌釋放的化學氣味分子，進而了解真菌在幼蟲取食專一性上所扮演的角色。本研究 GC-MS 的結果發現烏白白色年輪形真菌中有  $\alpha$ -muurolene 這種化學分子，而在文獻中曾指出  $\alpha$ -muurolene 具有抗真菌活性，可能在抑制病原菌生長扮演重要的角色，這是否與我們位在採集的葉片上發現病徵有關。

## 伍、參考文獻

- 一、倪蕙芳、許淑麗、陳瑞祥、楊宏仁 (2010)。台灣地區土壤中木黴菌株對植物病原菌拮抗能力之篩選。台灣農業研究，59，29-41。
- 二、高茂園 (2012)。紅莖椒草及沉香藥用植物增殖系統之建立。中興大學生命科學系碩士論文，臺中。
- 三、國立台灣大學植物病理學系應用真菌實驗室 (2000)。真菌學=Mycology/國立台灣大學植物病理學系應用真菌實驗室[編](第一冊)。臺北市:國立台灣大學。
- 四、張東柱 (2011)。真菌性樹木病害之鑑定診斷與防治原則。林業研究專訊，17-2。
- 五、陳宏彰、李玲玲 (2014)。讓我們來談談宿主專一性。自然保育季刊，86。
- 六、黃怡亭、沈俊廷、沈洛伊 (2015) 植物健康的無形殺手-以細菌氣味開發生物農藥。第五十六屆中小學科學展覽會最佳創意獎作品專輯。
- 七、黃俞菱 (2018)。是敵?是友?真菌與植物。國立自然科學博物館館訊，368，1-6。
- 八、曾依晴 (2009) 從麵包蟲體內分離出可分解保麗龍之菌種。2009 年臺灣國際科學展覽會優勝作品專輯。
- 九、曾敏南、陳昱初 (2014)。內生蟲生真菌做為害蟲防治媒介之評估。高雄區農業改良場研究彙報，25-1。

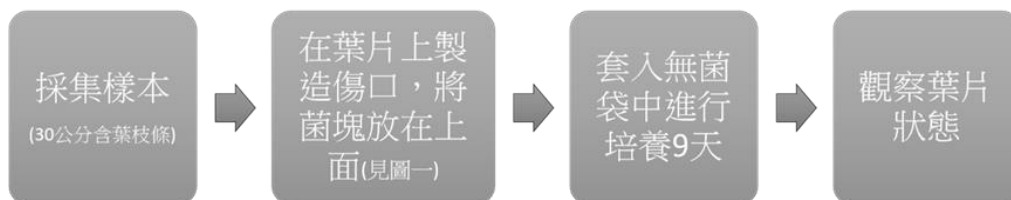


- 十、趙葵、郜熙陽、邱立友 (2019) 。真菌激素研究進展。 *微生物學通報* , 46 , 3102-3109 。
- 十一、潘峰、吳衛 (2015) 內生真菌植物活性成分快速檢測方法。 *中國科技論文在線精品論文* , 8 , 1984-1994 。
- 十二、蕭祺暉、邱順慶、曾顯雄 (2016) 。植物內生真菌的角色。 *科學發展* , 520 。
- 十三、謝瑞忠 (1999) 。杉木心材精油化學成分研究。 *台灣林業科學* , 14(2) , 165-176 。
- 十四、自然攝影中心。 <http://nc.biodiv.tw>
- 十五、教育百科。 <https://pedia.cloud.edu.tw>
- 十六、嘎嘎昆蟲網。 <http://gaga.biodiv.tw>
- 十七、臺灣飛蛾資訊分享站。 <http://twmoth.tesri.gov.tw>
- 十八、臺灣產蝶蛾。 <http://dearlep.tw>
- 十九、Dong-Hui Yan, Xiaoyu Song, Hongchang Li, Tushou Luo, Guiming Dou and Gary Strobel (2018) .Antifungal Activities of Volatile Secondary Metabolites of Four *Diaporthe* Strains Isolated from *Catharanthus roseus*. *Journal of fungi*, 4, 65.
- 二十、Enakshi Ghosh and Radhika Venkatesan (2019) .Plant Volatiles Modulate Immune Responses of *Spodoptera litura*. *Journal of Chemical Ecology*, 45, 715 - 724.
- 二十一、Hsin-Yi Peng, Chiao-Chih Chien and Wen-Feng Hsiao (2010) . Biological Characteristics of the Entomopathogenic Fungus, *Nomuraea viridulus*. *Formosan Entomol*, 30, 145-165.
- 二十二、JULIAN A. T. DOW (1992) . PH GRADIENTS IN LEPIDOPTERAN MIDGUT. *J. exp. Biol*, 172, 355-375.
- 二十三、Mustapha F.A. Jallow, Dereje Dugassa Gobena and Stefan Vidal (2008) . Influence of an endophytic fungus on host plant selection by a polyphagous moth via volatile spectrum changes. *Arthropod-Plant Interactions*, 2 , 53 - 62.
- 二十四、Franziska Eberl, Maite Fernandez de Bobadilla, Michael Reichelt, Almuth Hammerbacher, Jonathan Gershenzon and Sybille B. Unsicker (2020) . Herbivory meet fungivory : insect herbivores feed on pathogenic fungi for their own benefit. *Ecology Letters*, 23, 1073-1084

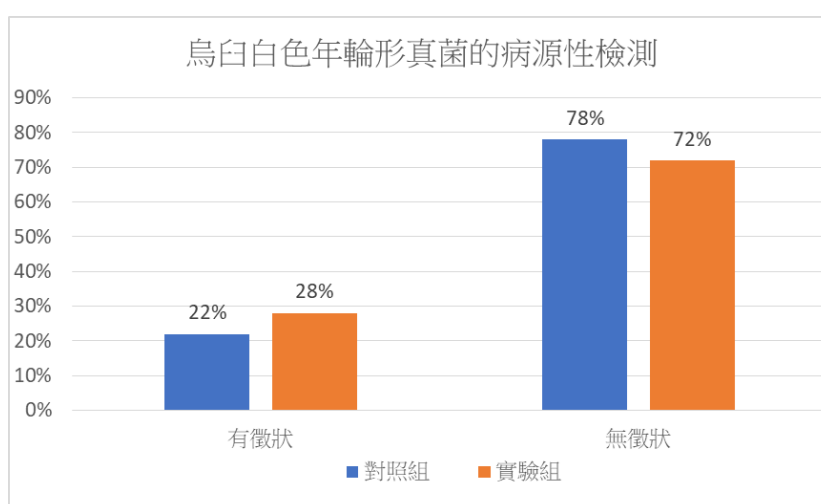
## 陸、附錄

實驗名稱：烏白白色年輪形真菌的病源性檢測

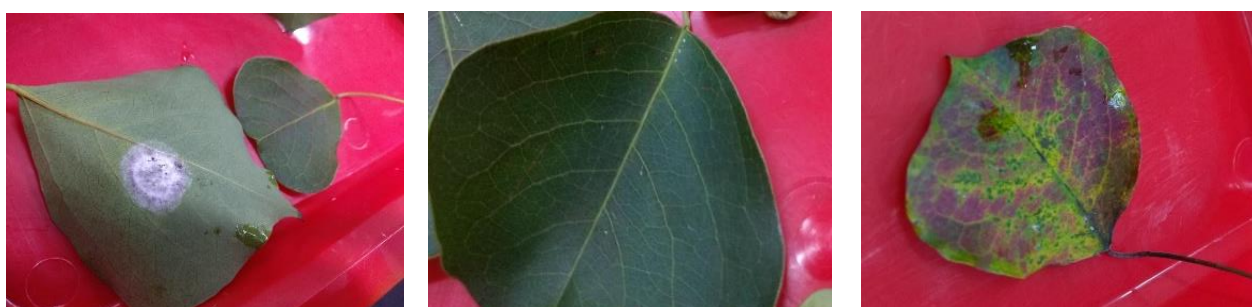
操作方法：



以烏白白色年輪形真菌（炭疽刺盤孢菌屬）為實驗真菌進行本實驗，數據見圖一。



圖一、烏白白色年輪形真菌的病源性檢測實驗的數據圖



圖二、真菌接種到葉片 9 日後的照片(左)，無徵狀之葉片(中)，有徵狀之葉片。

(有徵狀代表其葉片上有長出黑點白點，葉片的顏色變成黑、紅、黃。)

實驗結果：由圖一的數據中我們發現對照組與實驗組的數據差異不大，由本實驗可以得知烏白葉片不會因烏白白色年輪形真菌而有病徵，所以烏白白色年輪形真菌屬於烏白的葉內真菌。

## 【評語】 070011

1. 本研究材料為由校園中採集到的抱卵雌蟲並繼續培養進行的實驗，並由塔粉綠尺蛾對不同植物的食性，及由葉片菌絲之觀察設計一系列實驗，結果推論烏白透過葉內真菌誘使塔粉綠尺蛾雌蛾前往產卵，經幼蟲食用葉片後所排出之糞便以作為葉內真菌傳播的媒介，說明烏白的內生真菌和昆蟲的共生關係。研究題材非常有趣，符合高中科展的精神與創意。
2. 部分圖表解析度不佳應改進。
3. 表六、探究真菌對幼蟲食草選擇的影響實驗記錄。秤取糞便重量代表的意義需說明。
4. 所得各種不同菌絲，可否進一步鑑定真菌種類，單純外觀型態很難判斷。
5. 本研究有初步的分析結果，但結論仍多屬推測，缺乏更明確的證據。
6. 研究結果具本土特性，主題清楚且聚焦。
7. 實驗設計周全，適當完整。
8. 研究結果烏白植物、共生真菌及塔粉綠尺蛾的三角共生關係提供了獨特的理論。
9. 未來進一步構想具創新性。