

液態培養誘導黑殭菌 (*Metarhizium anisopliae*)

產孢研究

曾敏南¹

摘要

本試驗主要目的在於利用氯化鈣(CaCl₂)及不同水勢 (water potential) 來誘導黑殭菌於液態培養環境中產生分生孢子。本試驗分別添加 7.3% 及 24% 之 polyethylene glycol (PEG 200) 於液態培養基 malt extract broth (MEB) 分別將培養基水勢調整為-2.1Mpa 及-7.0Mpa，並分別添加 20 及 40mM 氯化鈣 (CaCl₂)，於 25°C、150rpm 的環境下培養 5 天，計算分生孢子之濃度。MEB 未添加氯化鈣且未調整水勢者，培養 5 天之分生孢子濃度為 2.39×10^5 conidia/ml；另外，未調整水勢但添加 20mM 氯化鈣之培養條件下，所產生之分生孢子量最高，約 47.6×10^5 conidia/ml。本試驗結果發現，以 MEB 培養雖可產生分生孢子，但添加氯化鈣之後可明顯增加分生孢子之產量。此外，培養基水勢調整至-7.0Mpa 者，無論添加氯化鈣與否，皆無法產生分生孢子。

關鍵語：黑殭菌、氯化鈣、分生孢子、水勢

前言

不論何種生物防治法，生產大量優良品質的防治媒介是首要且必需的工作，也唯有如此才有可能成功的達到防治工作。黑殭菌對害蟲之致病力及田間實際防治工作上已有為數眾多之研究^(5,11)，並證實黑殭菌具有良好之效果，唯黑殭菌受環境逆境、量產及保存方面之瓶頸而有推廣上的困難^(3,6,18)，且這種情況在其它用來作為生物防治的微生物製劑上亦普遍存在⁽⁷⁾。黑殭菌目前雖可經由固態發酵之方式成功的獲得大量分生孢子，但採用固態發酵之方法需要大量的空間及容積用來進行生產工作，且採收分生孢子時容易粉塵飛揚，造成工作人員之不適。

黑殭菌在液態培養之環境下可能只產生大量菌絲及芽孢⁽¹⁰⁾，而所獲得之芽孢雖可運用於生物防治之工作中，但由於芽孢在保存上可能更不利於分生孢子⁽²⁾

¹行政院農業委員會高雄區農業改良場助理研究員。

²審查委員：賴博永教授，國立屏東科技大學熱帶農業研究所。

，因此利用液態培養生產分生孢子之經濟效益，可能更高於利用固態生產之方式，故發展液態環境生產分生孢子之技術，或許可改善上述缺點，並達到更佳之經濟效益。*Penicillium oxalicum*、*P. cyclopium*、*P. notatum* 以及 *Ulocladium atrum* 被用於植物病害之生物防治媒介，目前已有報告指出上述菌株可利用液態培養來生產分生孢子^(4,12,13)。近幾年亦有報告指出 *Metarhizium flavoviride* 可藉由誘導之方式在液態環境下產生分生孢子^(8,9)，故本試驗嘗試利用液態培養基之水勢 (water potential) 調整及不同濃度之氯化鈣 (CaCl_2) 的添加來誘導液態培養狀態下產生分生孢子，以期能利用更簡單快速的方式進行黑殭菌分生孢子之量產。

材料與方法

一、實驗菌株

黑殭菌 *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*，分離自採於屏東地區之鱗翅目幼蟲。菌株編號為 MA-K1。

黑殭菌培養於 SDA 斜面培養基上，於 25°C 定溫生長箱中黑暗培養 10 天後，以 10 毫升含 0.5% Tween 80 之無菌水溶液洗下，並調整濃度為 10^7 conidia/ml 備用。

二、實驗一

測試不同培養基在液態培養條件下生產黑殭菌分生孢子之效果，供試培養基有(1)malt extract broth (MEB; 15% w/v)，(2)sabouraud dextrose broth (SDA)及(3)Czapek Dox broth (Difco)。每瓶 250 毫升之振盪三角瓶中分裝待試培養基 100 毫升後，取 1 毫升事先準備好之黑殭菌分生孢子懸浮液，分別添加於液態培養基中，於 150rpm 及 25°C 之環境中震盪培養 5 天後，以 Whatman[®] No.1 濾紙過濾，並以血球計數器計算分生孢子之濃度。

三、實驗二

測試以 malt extract broth (以下簡稱 MEB) 為培養基並調整不同水勢及添加 CaCl_2 對液態培養產生黑殭菌分生孢子之影響。配製 15% w/v 之 MEB，每瓶 250 毫升之振盪三角瓶中之待試培養基為 100 毫升，分別作以下之處理：

- a.MEB 不經水勢調整
- b.MEB 不經水勢調整+ 20mM CaCl_2
- c.MEB 不經水勢調整+ 40mM CaCl_2
- d.MEB 添加 7.3% (w/v) PEG 200 調整水勢為 -2.1Mpa

- e.MEB 經 PEG 200 調整水勢為-2.1Mpa + 20mM CaCl₂
- f.MEB 經 PEG 200 調整水勢為-2.1Mpa + 40mM CaCl₂
- g.MEB 添加 24% (w/v) PEG 200 調整水勢為-7.0Mpa
- h.MEB 添加 24% PEG 200 調整水勢為-7.0Mpa + 20mM CaCl₂
- i.MEB 添加 24% PEG 200 調整水勢為-7.0Mpa + 40mM CaCl₂

培養基製作分裝完成後，取 1 毫升事先準備好之黑殭菌分生孢子懸浮液，分別添加於液態培養基中，於 150rpm 及 25°C 之環境中震盪培養 5 天後，以 Whatman® No.1 濾紙過濾，並以血球計數器計算分生孢子之濃度。

四、實驗三

以市售白米為培養基質⁽¹⁾。以量杯量取體積 50 毫升之市售白米，置於 250 毫升之廣口瓶中，並加入 40 毫升蒸餾水 (米：水=1：0.8)。經高溫高壓滅菌後，以噴霧器 (SPARMAX® Air Brush DH-101) 均勻接種 1 毫升事先準備好之黑殭菌分生孢子懸浮液，置於 25°C 恆溫箱中黑暗培養，分別於培養 7 及 14 天後計算分生孢子濃度。計算分生孢子濃度時先置入含 0.5 % Tween 80 之無菌水溶液 100 毫升，強烈振盪一分鐘後，倒出以 Whatman® No.1 濾紙過濾，再以血球計數器計算分生孢子之濃度。

結 果

經測試三種培養基發現，只有在養份貧乏之 MEB 培養基中可發現分生孢子產生，因此另外二種培養基並不適合於本實驗之培養目的，故實驗二採用 MEB 進行試驗。

在未調整水勢之條件下，約培養 4 天後即可生成大量之圓形菌絲團粒 (mycelium pellet)，菌絲團粒之直徑約 1mm。培養至第 7 天，則可生成直徑約 2~3mm 左右。另外水勢調整至-2.1Mpa 者，則不生成圓形菌絲團，而大量形成長度約 2mm 之菌絲片段 (菌絲具分枝，非完全為單一片段)，培養至第 7 天經觀察發現整個培養基中已佈滿上述菌絲片段，成為濃稠狀之菌絲懸浮液。水勢調整為-7.0Mpa 者，在培養至第 4 天時並無明顯之菌絲生長情形，持續觀察可發現在該環境條件下菌絲雖可生長，但速度緩慢。培養至第 7 天時，方產生菌絲團塊，直徑約 1.5mm。添加 20mM 氯化鈣之條件下所產生之菌絲形態亦與前述者相同，但菌絲經顯微鏡觀察發現，添加 20mM 氯化鈣者，黑殭菌菌絲表面產生針狀之似結晶物。未經調整水勢及調整水勢至-2.1Mpa 之培養條件下，培養至第 3 天即可發現產生分生孢子梗及分生孢子。

本研究中，經觀察黑殭菌分生孢子形態後，發現經液態培養後可產生兩種形態之分生孢子，其一為短橢圓形，長寬約 4.7×2.8 μm (圖 1)；另一為長橢圓

形，長寬約 $9.3 \times 2.2 \mu\text{m}$ (圖 2A)；短橢圓形孢子著生於菌絲側邊所產生之短柄上。長橢圓形孢子則著生於菌絲末端所產生之瓶梗構造上(圖 2B)，與氣生組織所產生者相同，分生孢子著生於分生孢子梗末端。該兩者構造中，分生孢子梗只發現於添加 20mM 氯化鈣之培養條件者，而未添加氯化鈣者只產生短柄著生分生孢子。

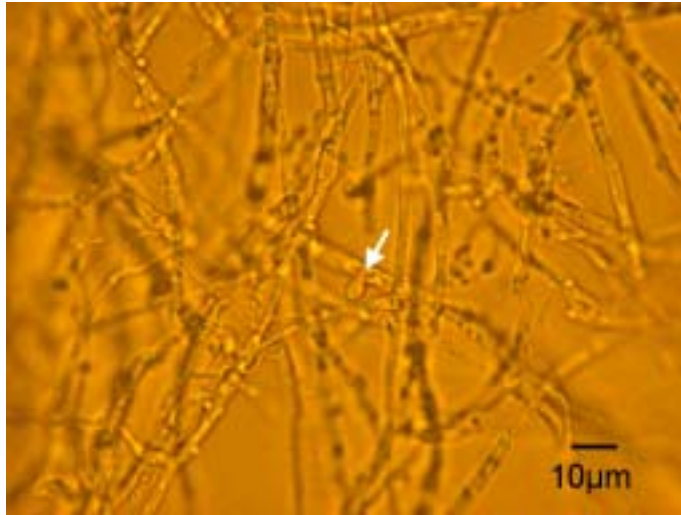


圖 1. 光學顯微鏡觀察 *M. anisopliae* var. *anisopliae* 於未經水勢調整及未添加氯化鈣之液態培養基中所產生之孢子
Fig 1. Light microscopy of the conidia of *M. anisopliae* var. *anisopliae* incubated in unmodified and non-calcium medium after 5 days. 400x

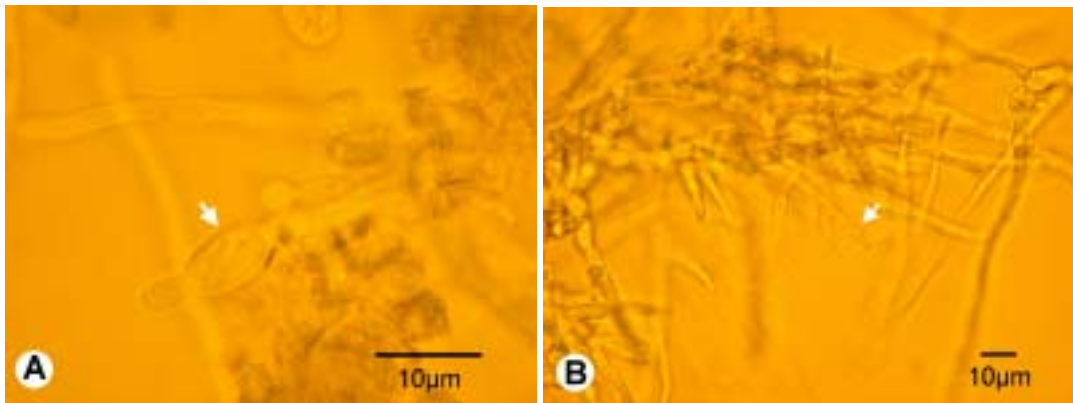


圖 2(A, B). 光學顯微鏡觀察 *M. anisopliae* var. *anisopliae* 於添加 20mM 氯化鈣之液態培養基中所產生之分生孢子梗及孢子
Fig 2(A, B). Light microscopy of the conidiophore, phialide and conidia of *M. anisopliae* var. *anisopliae* incubated in the medium includes 20mM calcium after 5 days. (A) conidia of *M. anisopliae*, 10,00x, (B) conidiophore and phialide of *M. anisopliae*, 400x

本試驗結果發現以單純之 MEB 進行液態培養即可產生分生孢子，濃度為 2.39×10^5 conidia/ml；但以添加 20mM 氯化鈣，且未調整水勢之培養條件下所產生之分生孢子量為最高，約 47.6×10^5 conidia/ml(圖 3)，其產孢量為未添加氯化鈣之培養條件的 19.9 倍，但當氯化鈣濃度為 40mM 時，則產孢量明顯受抑制，僅為 17.6×10^5 conidia/ml。此種情形在水勢調整為 -2.1Mpa 之條件中亦有發現，不添加氯化鈣與添加氯化鈣 20mM 者產孢量同為 2.4×10^5 conidia/ml，但添加 40mM 氯化鈣者，則完全不產孢。水勢調整至 -7.0Mpa 者，不論是否添加氯化鈣，皆無法產孢。

實驗三利用市售白米進行黑殭菌培養，培養後第 5 天白色菌絲上已呈現淡綠色色澤，顯示黑殭菌已開始產孢，培養後第 7 天分生孢子濃度為 3.12×10^5 ，第 14 天為 3.57×10^8 。

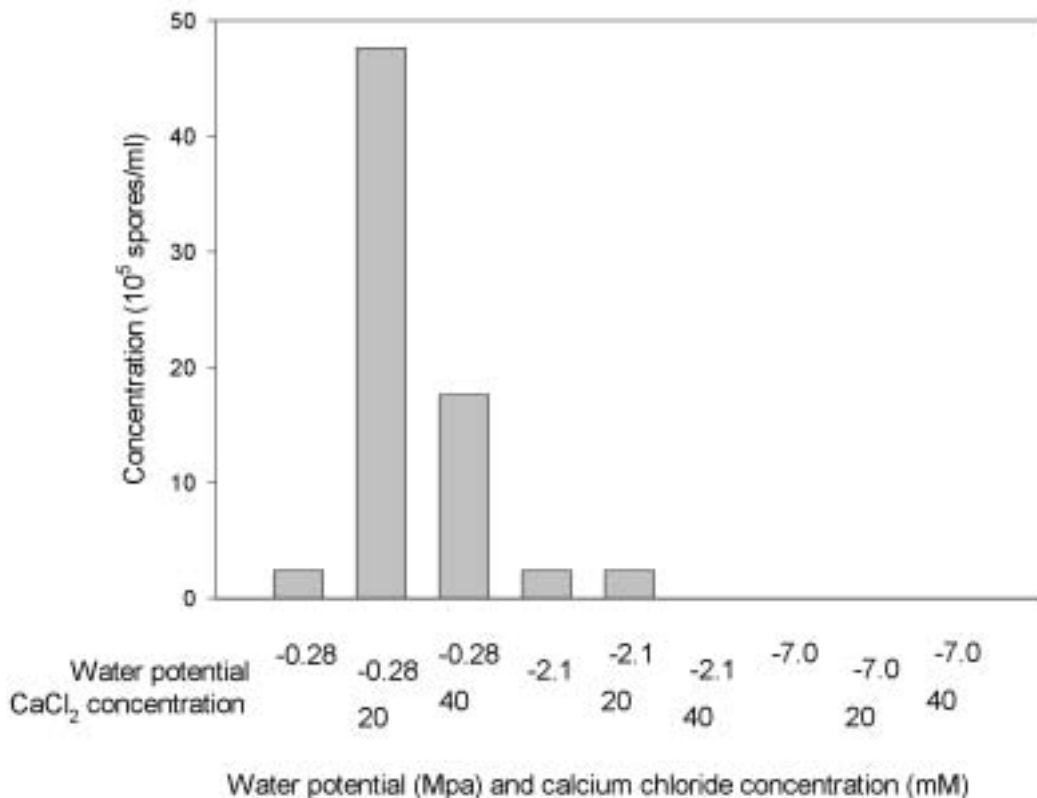


圖 3. 水份活性及氯化鈣濃度對黑殭菌(*Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*) 在液態培養條件下產孢之影響

Fig 3. Effect of water potential (Ψ) and calcium chloride (CaCl_2) concentration on submerged conidiation by *M. anisopliae* var. *anisopliae* in unstressed (-2.08 Mpa), and polyethylene glycol(PEG 200) modified (-2.1 Mpa and -7.0 Mpa) malt extract broth after 5 days at 25°C and 150 rpm

討 論

本實驗結果發現添加氯化鈣於 MEB 培養基中，雖可明顯提高黑殭菌分生孢子之產量，然而將氯化鈣添加於經過調整水勢(-2.1 Mpa)之液態培養基中，雖可產生分生孢子，但其產量卻相當低，猜測其原因可能是菌株對 PEG 200 敏感性較高，使得 PEG 200 對黑殭菌產生毒害所造成，因為 Frey and Magan (2001) 利用甘油 (glycerol) 來調整水勢。培養基之水勢調整為-2.1Mpa 卻可明顯提高 *Ulocladium atrum* 分生孢子之產量。此外，在本試驗結果中，未調整水勢之 MEB 加上 40 mM CaCl₂ 則孢子產量大減，可能是 Ca²⁺ 濃度過高，反而造成抑制之效果；同樣 Frey and Magan (2001)，添加 20 及 40mM CaCl₂ 皆可提高孢子量，然而添加 40mM CaCl₂ 者之孢子量與添加 20mM CaCl₂ 相較之下則大幅減少。故本試驗中，可能因為過高之氯化鈣濃度(40mM)以及菌絲對 PEG 200 之敏感性造成加乘作用，導致在-2.1Mpa、40mM CaCl₂ 之培養條件下完全不產生分生孢子。

目前已有實驗證據顯示，Ca²⁺確實有誘導真菌產孢子作用存在^(14,15,16)，例如 Pascual *et al.* (1997)描述添加 20mM CaCl₂ 於液態培養基中，可誘導 *Penicillium oxalicum* 產生分生孢子。在本試驗結果中雖發現可藉由添加 CaCl₂ 而達到誘導黑殭菌於液態環境中產孢的目的，但所產生之濃度並不高，可能還需配合培養基中碳氮比之調整，才可有較高之產量。同樣 Pascual *et al.* (1997) 分別將含氮量為每公升 0.5、1.0、1.5 及 3.2g 之培養基添加 20mM CaCl₂，接種 *P. oxalicum* 後振盪培養 7 天，所獲得之結果為氮含量 1.0g/l 之條件下產孢量最佳，而含氮量最高者(含 3.2g/l)之分生孢子產量為最低。此外，水份逆境對於液態環境下產孢的影響，目前並不清楚，僅知道可能對於某些表面蛋白質造成影響。其中，普遍存在真菌中之 hydrophobin 可產生忌水單元，並藉由自我組合 (self-assembly) 的方式，於菌絲及分生孢子(或有性世代之孢子)表面形成忌水層⁽¹⁷⁾，在 *Beaveria bassiana* 上則觀察到 hydrophobin 可在氣生菌絲及分生孢子之 rodlet layer 上形成忌水層，但在芽生孢子或液態培養中產生之分生孢子上則不存在，界面活性劑可能對忌水單元產生影響。

本試驗結果顯示，黑殭菌在培養三天後於絲側邊及末端產生分生孢子梗，Frey and Magan (2001) 以液態方式培養 *U. atrum* 之分生孢子時，亦可發現分生孢子梗並於末端著生分生孢子。在本次試驗之結果，液態培養所產生之產孢構造之形態特徵與固態培養下所產生之產孢構造並無差異，同樣具有分生孢子梗，並於分生孢子梗上著生瓶梗，再於瓶梗末端著生分生孢子，唯本試驗觀察結果並未發現孢子之著生方式有如固態培養時，產生長鏈狀或柱狀孢子束，此可能是因為在液態培養當中，因振盪之故而斷落。

由市售白米培養黑殭菌之產孢量與液態培養 (添加 20mM 氯化鈣) 之產孢

量相比較，在短時間內以液態培養所產生之產孢量較高，液態培養 5 天後孢子濃度已達 10^6 conidia/ml 以上，固態培養第 7 天孢子濃度為 3.12×10^5 conidia/ml，但固態培養的時間如果增長則產孢量可持續增加，在培養第 14 天時已達到 10^8 (conidia/ml) 以上。李、侯 (1989) 報告指出以糙米培養黑殭菌 54 天，可獲得 10^{10} conidia/ml 以上的產孢量。但整體而言，以液態培養可在較短時間比固態培養獲得更大量的孢子。

誌 謝

本文承蒙國立屏東科技大學熱帶農業研究所賴所長博永詳予斧正潤飾，謹致謝忱。

參考文獻

1. 李平全、侯豐男. 1989 黑殭菌培養及大量生產之研究. 植物保護學會會刊 31: 10-20.
2. Altre, J. A., and Vandenberg, J. D. 2001. Comparison of blastospores of two *Paecilomyces fumosoroseus* isolates: In vitro traits and virulence when injected into fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. J. Invertebr. Pathol. 78: 170-175.
3. Alves, R. T., Bateman, R. P., Prior, C. and Leather, S. R. 1998. Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. Crop Protection 17: 675-679.
4. Frey, S., and Magan, N. 2001. Production of the fungal biocontrol agent *Ulocladium atrum* by submerged fermentation: accumulation of endogenous reserves and shelf-life studies. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56: 372-377.
5. Genthner, F. J., Chancy, C. A, Couch, J. A., Foss, S. S., Middaugh, D. P., George, S. E., Warren, M. A., and Bantle, J. A. 1998. Toxicity and pathogenicity testing of the insect pest control fungus *Metarhizium anisopliae*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35: 317-324.
6. Hedgecock, S., Moor, D., Higgins, P. M., and Prior, C. 1995. Influence of moisture content on temperature tolerance and storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in an oil formulation. Biocontrol Sci. and Technol. 5: 371-377
7. Hjeljord, L. G., Stensavand, A., and Tronsmo, A. 2000. Effect of temperature and nutrient stress on the capacity of commercial *Trichoderma reuteri* to control *Botrytis cinerea* and *Mucor piriformis* in greenhouse strawberries. Biol. Control.

- 19: 149-160.
- 8.Jenkins, N. E., and Prior, C. 1993. Growth and formation of true conidia by *Metarhizium flavoviride* in a simple liquid medium. Mycol. Res. 97: 1489-1492.
 - 9.Jenkins, N. E., and Thomas, M. B. 1996. Effect of formulation and application method on the efficacy of aerial and submerged conidia of *Metarhizium flavoviride* for locust and grasshopper control. Pestic. Sci. 299-306.
 - 10.Kleespies, R. G. and Zimmermann, G. 1998. Effect of additives on the production, viability and virulence of blastospores of *Metarhizium anisopliae*. Biocontrol Sci. and Technol. 8: 207-214.
 - 11.Moorhouse, E. R., and Gillespie, A. T. 1993. Application of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. conidia to control *Otorhynchus sulcatus* (F.)(Coleoptera: Curculionidae) larvae on glasshouse pot plants. Ann. Appl. Btol. 122: 623-636.
 - 12.Morton, A. G., England, D. J. F., and Towler, D. A. 1958. The physiology of sporulation in *Penicillium griseofulvum* dierckx. Trans. Br. Mycol. Soc. 41: 39-51.
 - 13.Pascual, S., Melgarejo, P., and Magan, N. 1997. Induction of submerged conidiation of the biocontrol agent *Pencillium oxalicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48: 389-392.
 - 14.Pitt, D., and Poole, P. C. 1981. Calcium-induced conidiation in *Penicillium noatum* in submerged culture. Trans. Br. Mycol. Soc. 76: 219-230.
 - 15.St. Leger, R. J., Butt, T. M., Staples, R. C., and Roberts, D. W. 1990. Second messenger involvement in differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. J. Gen. Microbial. 136: 1779-1789.
 - 16.Ugalde, U., and Pitt, D. 1983. Morphology and calcium-induced conidiation of *Penicillium cyclopium* in submerged culture. Trans. Br. Soc. 80: 319-325.
 - 17.Wosten, A. B. H., Richter, M., and Willey, J. M. 1999. Structural proteins involved in emergence of microbial aerial hyphae. Fungal Genet. Boil. 27: 153-160.
 - 18.Zimmermann, G. 1982. Effect of high temperature and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. J. Invertebr. Pathol 40: 36-40.

The induction of submerged conidiation of *Metarhizium anisopliae* study

Ming-Nan Tseng¹

Abstract

This study was to determine the induction of submerged conidiation of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, using an malt extract broth. Polyethylene glycol (PEG) 200 was added at 7.3% and 24% (w/v) to achieve the water potential (Ψ) of the final broth at -2.1 Mpa and -7.0 Mpa, respectively. Also, calcium chloride (CaCl_2) was added at 20 and 40 mM, respectively. Samples of *M. anisopliae* var. *anisopliae* incubated at 25°C on a rotary shaker at 150 rpm for 5 days. Conidia yields were at 2.39×10^5 conidia/ml in unmodified and non-calcium medium after 5 days. Adding calcium chloride at 20 mM to unmodified MEB increased the production of *M. anisopliae* conidia to 47.6×10^5 conidia/ml. However, no conidia were produced in -7.0 Mpa broth with or without calcium chloride.

Key words: *Metarhizium anisopliae*; Calcium chloride; Conidia; Water potential

¹Assistant researcher, Kaohsiung District Agricultural Research and Extension Station, Pingtung, Taiwan, R. O. C.