黑殭菌抗逆境特性之改善

曾敏南

黑殭菌（*Metarhizium anisopliae*）為昆蟲寄生真菌（entomopathogenic fungi），其寄主範圍廣泛，可多達 200 餘種（species）昆蟲。自 1878 年發現以來，曾被使用於許多有害昆蟲做為生物防治藥劑。然而許多不適合之田間環境條件，如高溫、乾燥及紫外線之傷害，可大幅降低昆蟲寄生真菌之防治效果。如果能改善黑殭菌對不良環境條件之耐受性，提昇其田間存活率，應可有效提高黑殭菌田間之應用效果。

本實驗利用紫外線照射的誘變方法，篩選耐高溫（36℃）之黑殭菌突變菌株。經誘變後，選出可於 36℃ 中存活之菌株，並進一步檢測各突變株產生 protease、lipase、chitinase 及 amylase 之酵素活性，及其生長速率，最後獲得 *M. anisopliae* 3615 耐高溫生長較快速之突變菌株。經形態特徵之觀察，突變株 *M. anisopliae* 3615 與野生株 *M. anisopliae* 3621 在菌落外觀上具有明顯之差異，前者在菌落培養之早期，即可發現由菌落中央向外呈現許多凹痕且菌落色澤在培養後期呈現灰褐色；後者菌落平滑且並呈現墨綠色澤；而光學顯微鏡之觀察，兩者之產孢構造並無差異。

在生長條件之評估上，於所有之溫度條件，突變株之生長速率均比野生株來得快（表 1）。突變株與野生株在 32℃ 以下之生長條件時，孢子發芽率並無差異，但突變株之分生孢子在 34 及 36℃ 高溫條件下，其發芽快，且發芽率明顯比野生株高（圖 1）。更有意義的是，突變株分生孢子培養於 36℃ 中，第 7 天可形成直徑約 0.3 公分之菌落，而野生株之孢子雖可發芽，卻無菌落形成。在 36℃ 中突變株雖然菌落生長緩慢，卻顯示可於此逆境下存活。諸多氮源中，以 soy peptone 對突變株生長及產孢之促進效果最為良好，其次為 KNO_3。此外，8 種碳源中，以 dextrose 及 mannose 對突變株生長及產孢最佳，L-sorbose 則明顯抑制生長並完全抑制產孢；在產孢方面，除 L-sorbose 外，所有碳素源均有助於產孢。而維生素中只有 niacin 對突變株生長有不良影響，其餘均無顯著差異；而且除了 niacin 之外，所有維生素均有促進產孢之效果。

針對班飛蝨（*Laodelphax striatellus*）、亞洲棕榈象鼻蟲（*Rhabdoscelus lineatocollis*）、斜紋夜蛾（*Spodoptera litura*）、條背土蝗（*Patanga succincta*）及紅斑獵椿象（*Eocanthecona furcellate*）檢測致病性之結果，突變株 *M. anisopliae* 3615 對亞洲棕榈象鼻蟲及紅斑獵椿象完全不具致病能力，對班飛蝨之成蟲致病力最佳，接種後第 7 天之死亡率為 78％。對條背土蝗之致死速率雖緩慢，但接種後明顯影響其取

食行為。在初步進行的劑型（formulation）探討之中，試驗 5 種蔬菜油（包括橄欖油、花生油、芝麻油、葵花子油及麥胚芽油）及 1 種礦物油對突變株孢子發芽影響。所有油質對孢子第 6 小時之發芽率均具明顯之促進效果，比懸浮於 0.5% Tween 80 水溶液中高出 6~12 倍不等，其中又以麥胚芽油最佳，花生油次之。此外，懸浮於水中分生孢子受光波長 280~320nm 紫外線照射 8 分鐘後，發芽完全受抑制；但添加麥胚芽油後，照射 2 小時後，培養 24 小時發芽率仍達 100%。

表 1、溫度對黑殭菌野生菌株 *M. anisopliae* 3621 及突變菌株 *M. anisopliae* 3615 生長之影響

Colony diameter (cm)	Temperature (℃)						
	20	25	28	30	32	34	36
M. anisopliae 3621	2.5	5.30	5.47	5.10	3.47	1.1	0.5
M. anisopliae 3615	4.4	6.27	6.33	5.87	4.93	1.7	0.8

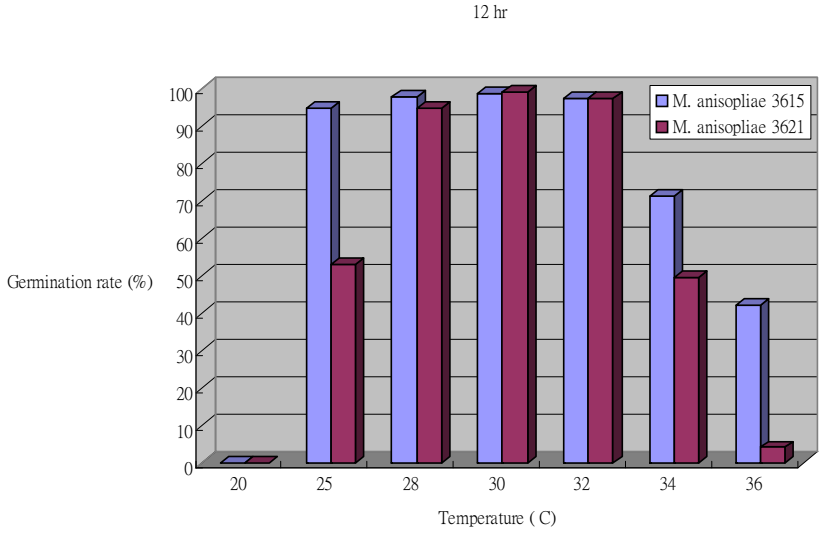

圖 1、溫度對 *M. anisopliae* 3615 (突變株)及 *M. anisopliae* 3621 (野生株)培養 12 小時後孢子