

蟲生真菌殺蟲劑之製備

(實習)

蔡勇勝、高穗生、洪德惠、楊芃

農業藥物毒物試驗所 生物藥劑組

我國秦漢時代之神農本草經已有白殭蠶味鹹的記載。明朝李時珍所著本草綱目也有冬蟲夏草、蟬茸、殭菌可以入藥的記載。1726年西洋始有冬蟲夏草之記載。在台灣1914年日人澤田氏即曾以蠅霉來防治家蠅。1924年安川氏大量繁殖黑殭菌，從事大規模田間防治金龜子試驗，據報告，病原撒佈後，可引起田間棲群死亡率高達86%，為台灣利用蟲生病原真菌防治害蟲之濫觴。

事實上，許多真菌對鱗翅目幼蟲、蚜蟲、甲蟲幼蟲、蝗蟲和刺吸口器之半翅目害蟲，扮演極重要的自然防治角色。大多數具有防治潛力的真菌殺蟲劑集中在綠菌綱，特別是世界種白殭菌和黑殭菌，另有其他屬真菌如蠟蚧輪枝菌和多毛菌。

白殭菌寄主範圍廣，而且致病力強，可寄生15個目149個科的700多種昆蟲及類。按種數排列，昆蟲寄主範圍分佈最多的種、科依次是夜蛾、瓢蟲、天牛、尺蠖蛾等。白殭菌和卵孢白殭菌為兩種研究較徹底的昆蟲病原真菌。在蘇聯及中國大陸已被大量的使用。

黑殭菌的寄主範圍亦廣，能寄生7個目，超過200種以上的昆蟲。主要寄主為鞘翅目，共有134種昆蟲，主要為象鼻蟲科、叩頭蟲科和金龜子科，至於雙翅目和膜翅目則少受感染。

綠殭菌能自然發生於許多鱗翅目害蟲上，可寄生30多種鱗翅目害蟲，特別對夜蛾科害蟲的致

病力最強，且常引發流行病。

蠟蚧輪枝菌最早於1861年被描述感染粉蝨、蚜蟲、和介殼蟲。本菌為歐洲第一個商品化的真菌，英國自1981年起即以Vertalec之名來防治蚜蟲，後來以Mycotal為名，防治溫室中的粉蝨。

多毛菌已報導記載的有80餘種，經整理後至少有60多個種和變種，它們能寄生多種昆蟲、類和線蟲。

大多數蟲生病原真菌的感染過程可粗略地分成10個階段：(一)分生孢子附著寄主表皮，(二)分生孢子昆蟲表皮上萌發，(三)穿透表皮，(四)菌絲在血腔內生長，(五)毒素產生，(六)寄主死亡，(七)菌絲侵入寄主所有器官，(八)菌絲穿出昆蟲表皮，(九)產生侵染單位(孢子)，(十)侵染單位再擴散。

因成熟孢子能再感染健康蟲隻，在適宜環境條件配合下，甚至可以在田間引發流行，有效降低田間害蟲密度。在藥毒所，黑殭菌、白殭菌、蠟蚧輪枝菌以米飯大量生程之流程業已建立。另外，米飯中添加少許營養物亦可以大量生產綠殭菌。以黑殭菌、白殭菌、綠殭菌之孢子懸浮液進行害蟲防治之效果已受肯定。茲將蟲生真菌之分離和生產的步驟示範如下：

(一)基本配備

無菌操作台(必需配備)、殺菌釜、(必需配備)、培養箱、顯微鏡。

(二)分離、接種材料

移植環、變性酒精、酒精燈、展著劑、燒杯、太空包、套環

、棉花、血球計數器、載玻片、蓋玻片。

(三)培養基之配製

1.菌種分離用培養基(平板)之配製：選擇適合菌種培養之培養基種類，稱得所需要量，分別加入適當的水量放入玻璃瓶中，置於殺菌釜內消毒(殺菌條件：溫度 121°C 、壓力 1.4 公斤/平方公分)約 $15\sim 20$ 分鐘，消毒完成後取出，待溫度降至 60°C 左右，再倒入 9 公分的培養皿，輕輕左右搖晃使其均勻分佈，冷凝後即形成平板。

2.菌種培養用培養基(斜面)之配製：以適當的培養基與定比例純水混合後，加熱使其完全溶解後，立刻以分注器注入玻璃試管中(試管長 18 公分、寬 1.8 公分，每支試管 10 毫升的培養基)，蓋好橡皮塞送進消毒鍋，待消毒鍋壓力下降歸零時，即取出玻璃試管，開口處以木板稍微墊高排放，凝固後即形成斜面。

(四)分離

被蟲生真菌感染死亡之蟲體，經一定時間後會佈滿病原之繁殖體(孢子)，故可用移植環輕沾感病蟲體，輕輕敲擊平板側緣方式進行分離(移植環在使用前、後均應以酒精燈燒烤滅菌)，平板在幾天後會單一菌落長出，將此單一菌落以移植環移至斜面培養基上，標上接種日期，置於適當光照、溫度之培養箱培養 $10\sim 14$ 天，即可保存待用。

另外一種分離法就是以移植環輕沾蟲體，然後輕輕在平板培養基表面重複畫線，以獲得單一

菌落，再行接種至斜面培養基上，同樣標上日期，置於適溫培養箱中培養。

(五)大量生產培養基之配製

取在來米 2.4 公斤加入 1.2 公升的水，以電鍋煮過(外鍋水 250 毫升，電鍋開關off後，先打開鍋蓋稍微翻攪米粒，再蓋上鍋蓋，燜約 5 分鐘後，取出披開待涼，再裝進耐熱太空布袋內(每包約 300 公克的米飯培養基)，套上套環，塞住棉花，將這些含米之太空包隨後送進殺菌釜內殺菌(太空包之棉花應避免上下堆疊，以減少污染機會)，降溫後備用。

(六)接種及濃度計算

接種：以已添加展著劑的無菌水，將長在斜面培養基之蟲生真菌孢子洗出(加水振盪)，倒入滅菌過且有封蓋之燒杯，並將孢子濃度調至 1×10^8 分生孢子/毫升(濃度的計算：孢子懸浮液經振盪均勻後，用微量滴管取出，滴在血球計數器上，蓋上蓋玻片，然後置於顯微鏡下觀察計算其濃度)，用殺菌過塑膠滴管吸取 2 毫升注入太空米包中，再以棉花塞住袋口即完成量產接種工作。

(七)培養

已接種之太空包在標上接種日期後，即可置於適當光照、溫度之培養箱培養 $10\sim 14$ 天，待其產孢備用。

(八)應用

太空包經 $10\sim 14$ 天培養，待米粒上長滿孢子後即可使用。施用時先將米粒到入砂網，在含展著劑之清水中搓揉，經過濾洗出之

孢子即可以噴霧器直接噴施於作物上。另為確保防治效果，蟲生真菌之施用濃度應在 3×10^7 分生孢子/毫升以上(產孢良好之太空包一

包約300公克，可加水16公升稀釋使用)，另施用時間、部位亦應注意。