

# 作物環境 植物保護

## 應用 DHN 黑色素生合成基因工程提高黑殭菌抗逆境能力及致病力

曾敏南\*、鐘珮哲\*\*、曾顯雄\*\*

(\*高雄區農業改良場、\*\*國立台灣大學植物病理暨微生物學系)

應用昆蟲寄生真菌於田間害蟲防治工作已達數十年之久，然而，昆蟲寄生真菌在田間試驗的成效上常有不穩定的現象。造成應用成效不穩定之主因在於環境逆境之影響，諸如自然光中的紫外線、極端溫度及乾燥。本研究應用 dihydroxynaphthalene (DHN)-黑色素(DHN-melanin)生合成基因工程加以克服這些困境。廣泛存在於各種生物體內的黑色素普遍具有防護生物體減少紫外線傷害之功能，並具有自由基 (free radical) 吸附之能力。此外，黑色素有助於微生物提高耐受不適溫度及耐旱之功能，更是某些病原真菌的致病因子。本研究由 *Alternaria alternata* 中選殖出黑色素生合成相關基因群，包括 polyketide synthase、scytalone dehydrase 及 1,3,8-trihydroxynaphthalene reductase 之編碼基因(圖 1)。將該基因建構於可經由 *Agrobacterium tumefaciens* 媒介轉殖之穿梭載體 pCAMBIA1300 中，再轉殖至黑殭菌 (*Metarhizium anisopliae*)，使黑殭菌轉殖株(transformant)表現該基因並產生黑色素 (圖 2)。黑色素在黑殭菌轉殖株的表現經由光譜學方法、液相層析/質譜 (liquid chromatography/mass spectrometry) 及共軛焦顯微觀察等方法加以證實。研究結果顯示，DHN-黑色素生合成基因在轉殖株中被表現，並可生合成黑色素，可表現黑色素之黑殭菌轉殖株則具有比野生株顯著之抗逆境能力。以紫外線B照射分生孢子後顯示，轉殖株比野生株具有顯著的發芽速率及存活率(圖 3 C-D)，且經紫外線B照射分生孢子後，轉殖株比野生株具有顯著的致病力(圖 3 F-G)；另外，在 10°C~35°C 中，轉殖株的發芽速率相較於野生株亦有顯著的提昇。以分生孢子懸浮液接種於小菜蛾，轉殖株相較於野生株對於小菜蛾之半致死時間 (LT<sub>50</sub>) 明顯的縮短 (表 1)。

圖 1. dihydroxynaphthalene(DHN)黑色素生合成途徑之關鍵基因，(A) 1,3,8-trihydroxynaphthalene reductase, (B) scytalone reductase 及 (C) polyketide synthase 編碼基因。

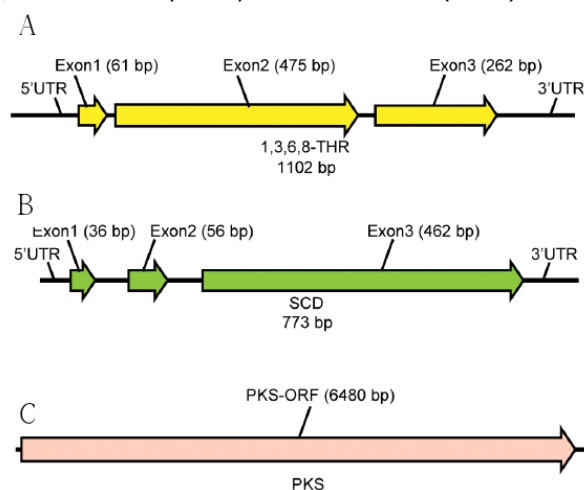


圖 2. 黑殭菌轉殖黑色素生成基因之轉殖株 *M. anisopliae* 05-169 及野生株 *M. anisopliae* 35505 之菌落型態。

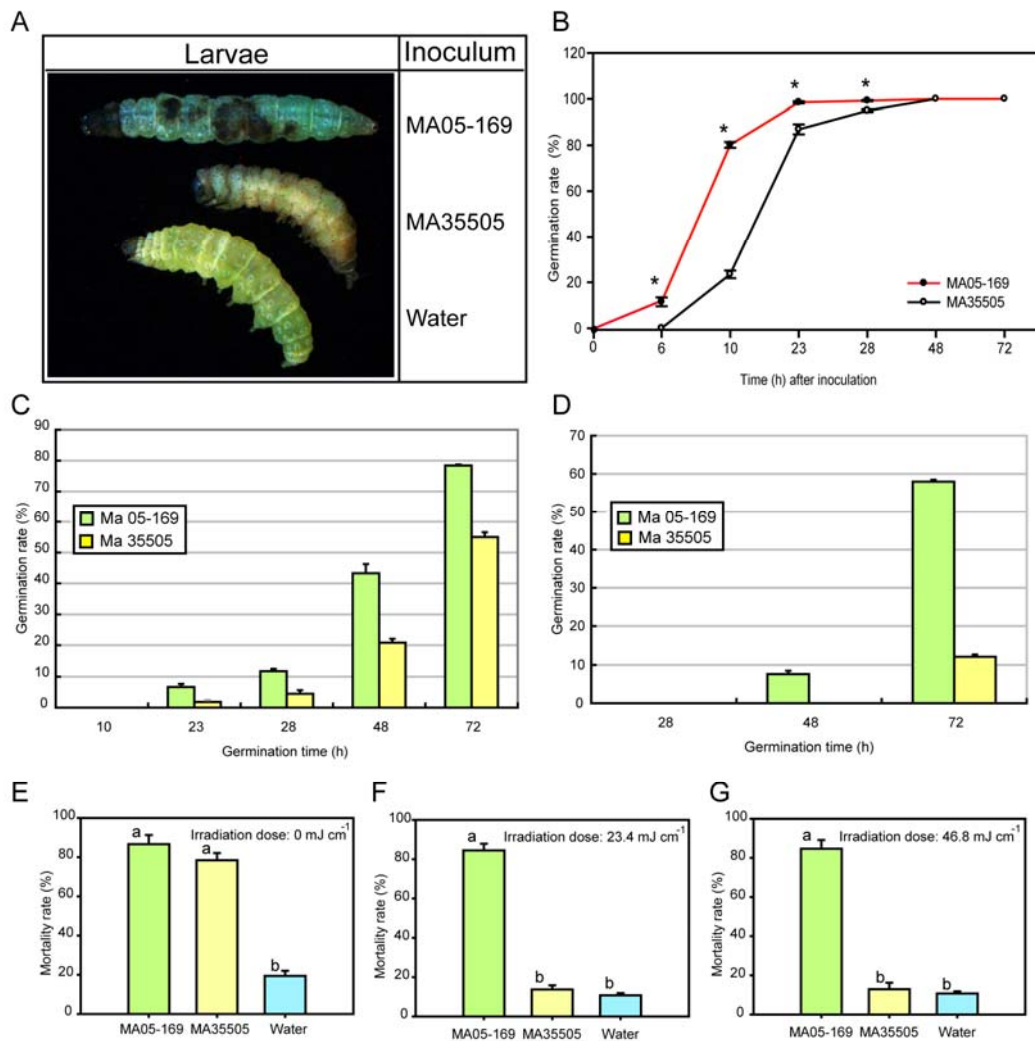
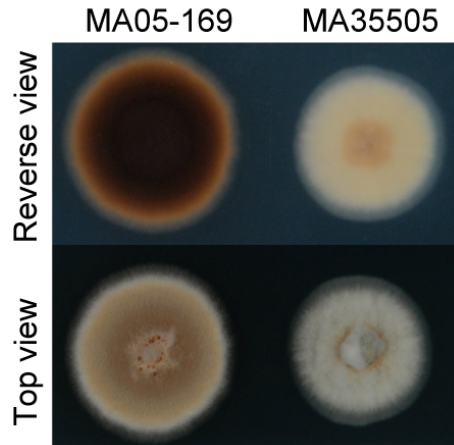


圖 3. 紫外線 B (UV-B) 幅射對黑殭菌 *Metarhizium anisopliae* 轉殖株 MA05-169 以及野生株(MA35505)發芽率以及對小菜蛾致病力影響。(A)小菜蛾幼蟲經接種轉殖株後其體壁產生黑色斑紋，接種野生株後產生體壁黃化之現象；(B)轉殖株及野生株分生孢子在未照射 UV-B 的情況下之發芽率；(C-D) 轉殖株及野生株分生孢子在不同劑量的 UV-B 照射後的發芽率；(E-G)小菜蛾在接種經不同劑量紫外線處理後的黑殭菌孢子後的死亡率。

表 1. 可表現黑色素之黑殭菌轉殖株 *M. anisopliae* 05-169 及野生株(*M. anisopliae* 35505)對小菜蛾(*Plutella xylostella*)之半致死時間

	Isolates	
	MA05-169	MA35505
LT <sub>50</sub> (hours)	46.43	56.05
95% Confidence limits (lower-upper)	44.01-48.88	54.08-58.16

## 作物疫病蟲害非農藥防治資材與技術之研發

陳明昭

印度棗及蓮霧栽培管理過程中常見之蟲害有東方果實蠅、蚜蟲、粉介殼蟲類、粉蝨類、毒蛾類、薊馬、葉蟬等蟲蟎害發生；其中又以粉介殼蟲類開花、套袋後發生嚴重，不易防治，故尋找非農藥之防治資材，協同藥劑防治解決粉介殼蟲乃重要課題。田間調查結果發現，因 100 年 11 月及 12 月連續大雨造成果樹蟲害發生率降低許多，調查發現高屏地區之印度棗及蓮霧粉介殼蟲發生危害率約 2~5% 左右。

除此之外，於實驗室內分別以南瓜大量飼養印度棗及蓮霧上之粉介殼蟲，以食用南瓜為大量飼養粉介殼蟲及供試驗篩選用，每處理接種 20 隻粉介殼蟲，3 重複，以礦物油、窄域油、葵花油(以無患子 9:1 乳化)及矽藻土等資材各稀釋 100 倍、200 倍、300 倍、400 倍、500 倍和不浸藥處理(CK，以清水為處理)，以浸藥方式(Dipping)浸置 10 秒鐘，浸置後 3 天、後 7 天觀察其存活數，進行室內篩選比較。防治率計算=  $CK - \text{處理後若蟲存活數} / CK$ 。至於田間試驗乃按照農藥委託試驗方式進行，於高雄市阿蓮區王瑞延農友印度棗園試驗，各處理為礦物油 200 倍、窄域油 200 倍、葵花油 200 倍、矽藻土 200 倍、礦物油 200 倍+矽藻土 200 倍、窄域油 200 倍+矽藻土 200 倍、葵花油 200 倍+矽藻土 200 倍及 C.K.(不施藥處理)等，每處理 2 株，機選取 5 枝條調查其葉片、枝條及果實上之粉介殼蟲數，每星期噴藥一次，連續 2 次，噴藥後 3 天、7 天、14 天、21 天各調查蟲數及其防治效果。防治率(%)=  $(1 - \text{施藥後處理區蟲數} \times \text{施藥前對照區蟲數} \div \text{施藥前處理區蟲數} \times \text{施藥後對照區蟲數}) \times 100$ 。

試驗結果顯示，以窄域油、礦物油、葵花油(以無患子乳化)及矽藻土等資材各稀釋 100 倍、200 倍、300 倍、400 倍、500 倍等濃度對粉介殼蟲之防治效果評估，結果顯示不論是窄域油、礦物油、葵花油均以浸置 7 天後 100 倍最好，而各處理 400 倍、500 倍時各處理其防治效果均不佳。至於田間試驗方面，結果顯示於第一次噴藥各處理前各處理之蟲數平均為 50.71 隻，而 C.K.(不施藥處理)粉介殼蟲為 47 隻；第 2 次處理前各處理之蟲數平均為 28.86 隻，而 C.K.(不施藥處理)粉介殼蟲為 51 隻；於第 2 次礦物油 200 倍處理後 3 天、7 天、14 天、21 天防治率為 61.44%~76.42%；窄域油 200 倍為 46.09%~63.55%；葵花油 200 倍為 55.37%~73.86%；矽藻土 200 倍為 28.30%~68.56%；礦物油 200 倍+矽藻土 200 倍為 77.40%~87.37%；窄域油 200 倍+矽藻土 200 倍為 67.02%~78.77%；葵花油 200 倍+矽藻土 200 倍為 67.44%~85.11%；綜上而言利用礦物油、窄域油、葵花油及矽藻土等非農藥資材經室內篩選及田間試驗結果顯示以