

台灣二〇〇五年國際科學展覽會

科 別：微生物學

作品名稱：美麗的陷阱 - 探討線蟲捕捉菌之捕蟲機制及應用

得獎獎項：大會獎佳作

學 校：臺北市立中山女子高級中學

作 者：李虹欣

評語與建議事項：

- 1.能設計不同之實驗方法，並進行改進。
- 2.實驗結果尚無法直接證明真菌釋放之主要誘捕因子為氣體。
- 3 建議針對主要變因進行更深入的研究分析。

高中組生命科學科

研究計畫名稱：

美麗的陷阱-----探討線蟲捕捉菌之捕蟲機制及應用

學校：中山女子高級中學

作者：李虹欣

指導老師：翁乃茵老師

作者簡介



我叫李虹欣，現就讀於台北市立中山女高數理資優班二年級，由於國中就很嚮往可以參加科展的活動，希望能靠自己的觀察及討論去了解週遭的事物，但是對於國中於美術班就讀的我來說，和科學研究可以說是完全搭不上邊的，幸好上了高中後，在老師的帶領，以及自己對生物這一門學問的熱誠下，我將國中所學的繪圖技巧和這一次的研究做了結合，漸漸完成了我這一次參展的作品，未來我將會以我現今的題材發揮到生態保護上面，
做好維護自然環境的責任；
畢竟地球這樣一位大自然老師生病後，對我們都會造成很大的傷害。

* 摘要

線蟲為植物發生病蟲害感染的病源之一，而台灣的松樹，目前正面臨著松材線蟲入侵的危機。從文獻的探討中，發現線蟲有其自然界的天敵 — 線蟲捕捉菌。本實驗著重在探討線蟲捕捉菌特殊的捕捉機制。當線蟲捕捉菌附近出現線蟲時，會產生誘引線蟲的物質，並設計了一步步的實驗，去探討此誘引物質的捕蟲效能及其成分。現在，已經發現此誘引物質為一揮發性氣體。往後將會設法增加其誘引氣體的產量，並使用氣相層析儀分析之。最後希望可以將此物質應用到微生物防治上，期望能解決台灣松樹被線蟲感染的問題。

* Abstract

In Taiwan, all of the pine trees have one common problem - nematodes, which causes diseases in plants. And this experiment focuses on the nematodes' natural enemy - *nematophagous fungi* and its "peculiarly caused mechanism." When nematodes appear near *nematophagous fungi*, the latter will produce some substance to tempt the former. To investigate this alluring substance, a series of experiments are done and systematic steps are taken. The first finding is that this substance is a volatility gas. Later in this research, measures will be taken to make "*rematophagous fungi*" produce more of this gas. And "gas chromatograph" will be used to analyze this gas in the future. Finally, the possibility of applying this substance to the defensive measure of microbiology will be discussed.

美麗的陷阱-----探討線蟲捕捉菌之捕蟲機制及應用

摘要

設計實驗一步步的探討線蟲捕捉菌在附近有誘引|物時（如：線蟲），所產生的物質，進一步的模擬此物質，並利用大自然中食物鏈的相剋現象將其應用到土壤微生防治上。

壹、研究動機

可以捕捉線蟲的真菌稱為『線蟲捕捉菌』目前已知的有 300 餘種，它們棲息於富含有機質的地方，如:落葉枯枝層或土壤中，平常可以分解周遭有機物質變成小分子再吸收，行腐生生活，但附近若有線蟲出現時，則可被誘發產生各種形形色色之捕捉構造，如:捕捉網、粘著球、非收縮環或收縮環等，然後再釋放揮發性或非揮發性誘引|物質來誘引|線蟲，使它們自投羅網後再行捕捉，最後攝取一頓美食！但此誘引|物質究竟為何物？而其對線蟲們的吸引之處到底在哪？都值得我們一一探究。

貳、研究目的

- 一、了解自然界具有生物防治的代表性真菌對松材線蟲的誘引|效率
- 二、了解不同捕捉機制發達的線蟲捕捉菌對松材線蟲之誘引|效率
- 三、探討並分析線蟲捕捉菌捕捉松材線蟲時所產生的物質
- 四、嘗試以化學物質模擬其誘引|物質作為人工的誘引|線蟲之陷阱

參、研究設備及器材

高溫高壓滅菌器、無菌操作臺、尺、麥克筆、膠帶、培養皿數個、線蟲、線蟲捕捉菌、微量吸管、氣體層析儀、活性炭吸附器、抽氣幫浦、錐形瓶、解剖顯微鏡。

肆、研究過程或方法

一、測定不同真菌誘引線蟲之效率

(一) 找出適當的培養基

採用有機成分不多的培養基，使各種菌種間不會因繁衍過速而使實驗結果產生誤差，並以其為培養基底然後進行接下來的實驗。

(二) 探討不同的真菌對線蟲的誘引效率

將倒好的培養基中放上：麴菌 (*Aspergillus niger*)、立枯絲核菌 (*Rhizoctonia solani*)、黑殭菌 (*Metarhizium anisopliae*) 及線蟲捕捉菌 (*Dactylaria haptospora*)。其目的為比較出在菌種間以線蟲捕捉菌對線蟲具有致命的吸引力。

二、比較不同線蟲捕捉菌誘引線蟲之效率

(一) 具不同捕捉構造之線蟲捕捉菌比較之間對線蟲的誘引效率：取線蟲捕捉菌中較具代表的不同線蟲捕捉菌，觀察它們個別對線蟲的誘引效率。

(二) 找出誘引效率最佳的捕捉構造

三、誘引物質的確認

(一) 判斷誘引物質為氣體或液體

將上一步實驗中，吸引線蟲效率最高之捕捉菌在誘引線蟲時所產生的物質，加以判斷為液體或者為氣體。

(二) 設計實驗將微量氣體抽出

設計實驗器具將氣體抽出，並設法增加其產量並增加之。

伍、研究結果

一、測定不同真菌誘引線蟲之效率

(一) 找出適當的培養基

在此採用下列幾種較常用的培養基做比較：

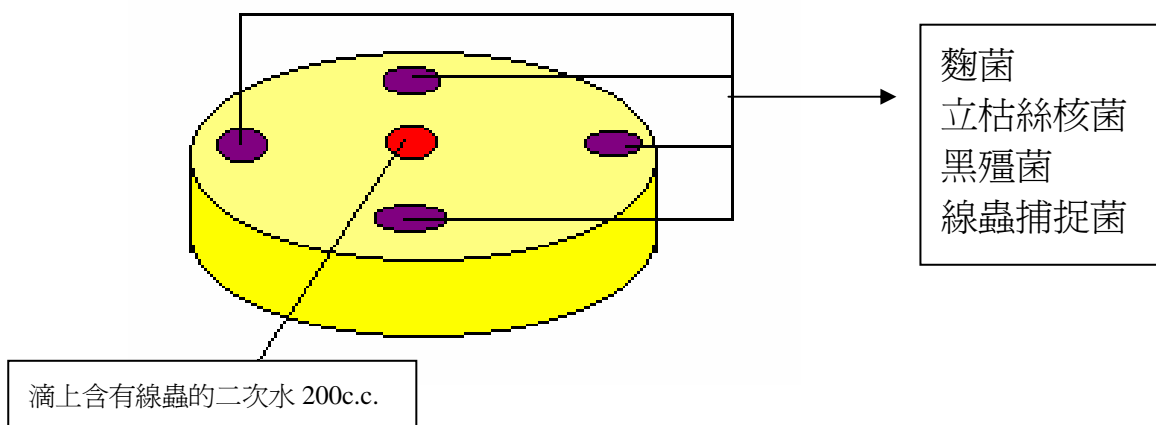
培養基名稱	成分	效果
PDA	馬鈴薯粉、洋菜粉、水	營養適中，可再做調整、比較。
PCA	紅蘿蔔粉、洋菜粉、水	營養過多，菌落繁衍太快，不易觀察。
CMA	玉蜀黍粉、洋菜粉、水	營養過多，菌落繁衍太快，不易觀察。
WA	洋菜粉、水	不夠營養，菌落繁衍太慢。

【結果】比較後，發現以馬鈴薯粉為培養基者較易觀察，並將馬鈴薯粉含量降為原來四分之一，效果最好，約三天可看到完整菌落。最佳培養基的成分如下所示：

1/4PDA	馬鈴薯粉 7.8g、洋菜粉少許、水 400g
---------------	------------------------

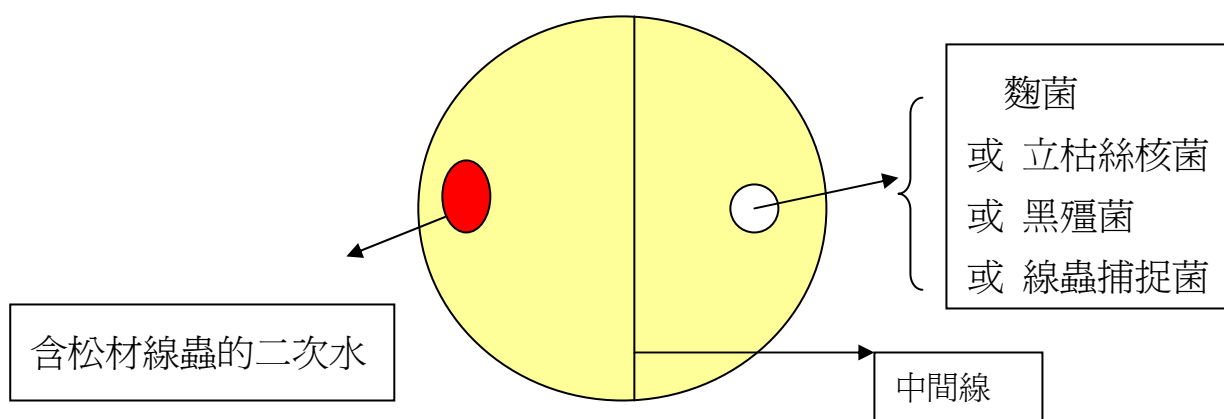
(二) 探討不同的真菌對線蟲的誘引效率

接菌方法為下圖所示，其目的為比較出在菌種間以線蟲捕捉菌對線蟲具有致命的吸引力。



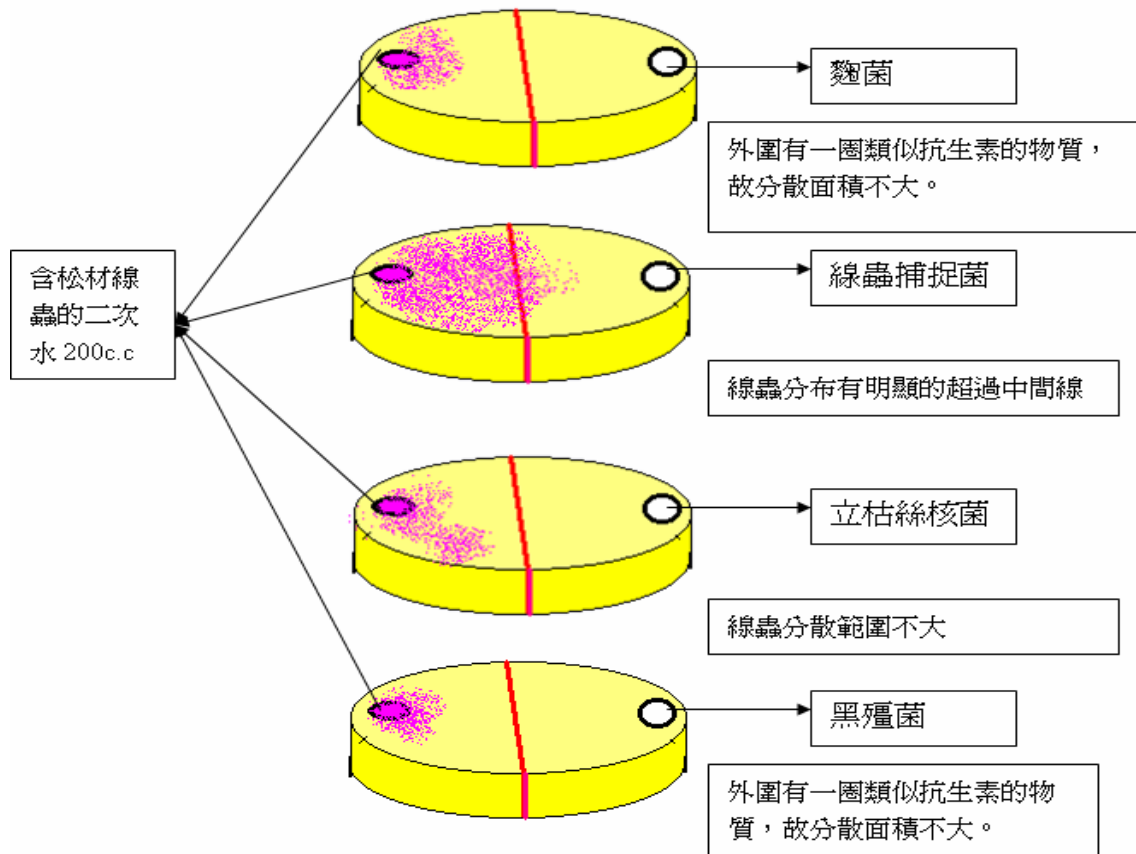
【結果】：經過此步驟發現，因為是不同種之真菌，在接菌 3 天後發現，有的接菌點產生明顯一圈的界面，疑因麴菌 (*Aspergillus niger*)、黑殭菌 (*Metarhizium anisopliae*) 都屬能產生抗生素的真菌菌種原故，故改採下面另一種接菌方式。

※在此因觀察不出各個真菌對線蟲之誘引關係，採用另一種接菌方式，如下圖示：



	3 小時	6 小時	9 小時	12 小時
麴菌	0	0	0	0
線蟲捕捉菌	0	4	7	11
立枯絲核菌	0	0	0	0
黑殭菌	0	0	0	0

將四種真菌分別接成四個培養皿，觀察哪一種真菌最先使松材線蟲分布超過中間線，即驗證最具吸引力。接菌完在 12 小時內，每隔 3 小時透過解剖顯微鏡觀察發現：(紫色點點代表線蟲擴散大致部位)



【結果】只有接線蟲捕捉菌的培養基，線蟲才有越過中間線的現象，其他培養基內的線蟲大多停留在原接線蟲處。得知線蟲捕捉菌對現蟲的誘引效率較一般真菌來的好。

二、比較不同線蟲捕捉菌誘引線蟲之效率

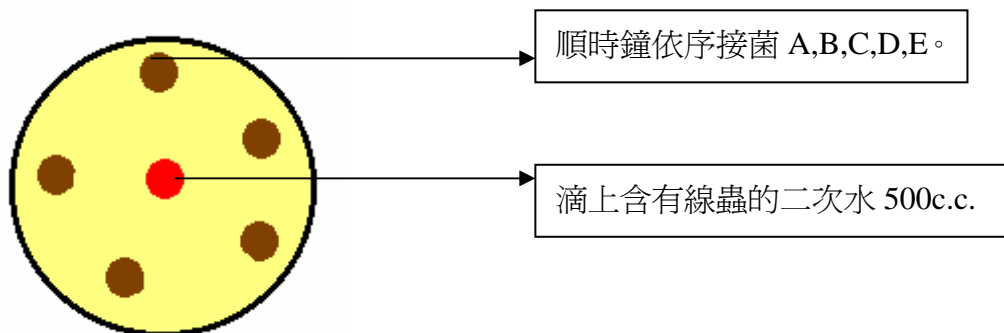
菌種編號	菌種名	特殊捕捉構造
A	<i>Moncosporium phymatopagum</i>	粘著網
B	<i>Drechlerella brochopaga</i>	收縮環
C	<i>Dactylella formasana</i>	粘著球
D	<i>Dactylaria haptospora</i>	粘著球
E	<i>Arthrobotrys dactyloides</i>	收縮環

(一) 具不同捕捉構造線蟲捕捉菌，比較之間對線蟲的誘引效率

由前面之數據證實線蟲捕捉菌對線蟲較具吸引力，取具有不同捕捉構造的代表性線蟲捕捉菌

來觀察之間對線蟲的誘引效率。經由觀察後得下列數據（接菌方法如下列圖示）：（為了紀錄簡單，將菌種由上而下依序編為 A,B,C,D,E。）

本實驗使用的線蟲捕捉菌菌株：



（照此方法接 15 個培養皿，以便多得數據。）

【結果】經過 12 小時後觀察其捕捉之線蟲數如下（單位：隻）：

菌種編號 \ 培養皿編號	A	B	C	D	E
1	8	10	5	0	1
2	0	2	0	0	0
3	4	2	0	1	0
4	0	0	0	0	3
5	12	8	3	2	4
6	1	7	0	0	0
7	2	7	0	0	0
8	2	5	1	1	0
9	2	0	2	0	0
10	6	1	3	2	0
11	0	0	0	0	2
12	3	0	0	0	2
13	1	2	0	0	3

14	2	2	0	0	0
15	0	1	2	0	0
共計	43	47	16	6	15

(二) 因編號 A 及 B 的數據過於接近，故再此一相同方法再作一次比較及觀察，得下列數據：

◎經過 12 小時後觀察其捕捉之線蟲數 (單位：隻)：

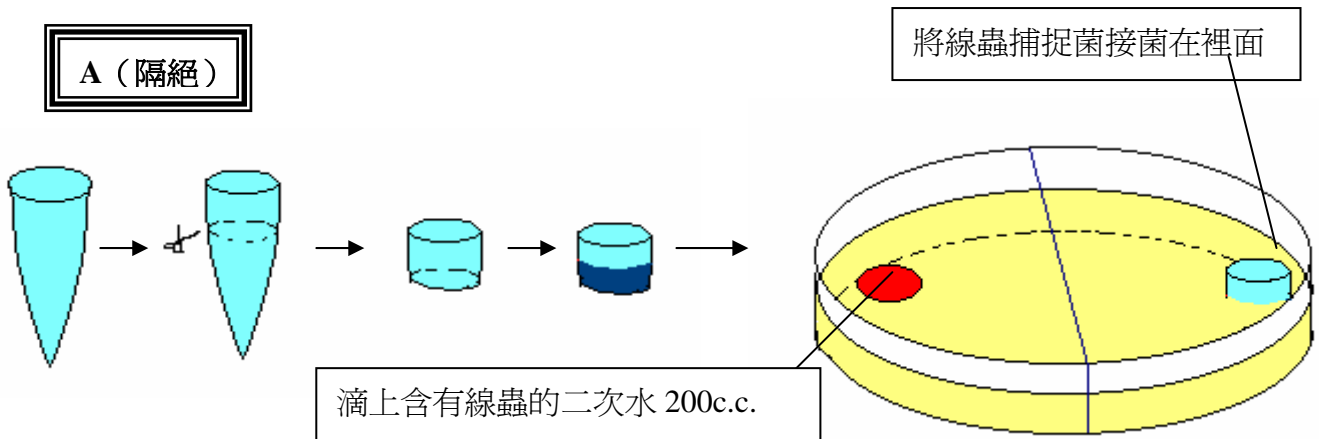
菌種編號 培養皿編號	A	B
1	6	4
2	7	11
3	9	5
4	2	1
5	12	9
6	0	0
7	15	11
8	10	6
9	9	2
10	6	1
共計	76	50

【結果】經過再一次的比較後，發現編號 A 的誘引效率確實比 B 來的多，比約為 1 : 0.65。編號 A 為捕捉網發達之菌種，為證明其是因誘引物質造成捕捉，不是因為捕捉網多與線蟲接觸面積大，而捕捉數較多；此問題與誘引物質性質在下一步驟探討。

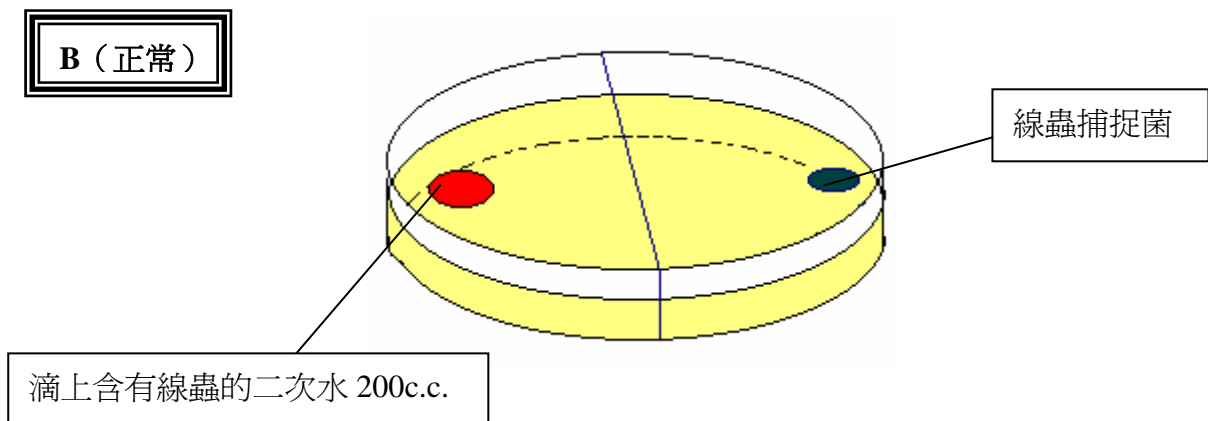
三、誘引物質的確認

(一) 判斷誘引物質為氣體或液體

再進行用儀器分析物質之前，先將物體做初步的判斷，實驗方法如下圖所示：



(將滴定管的前端減去，留下後方類似圓環的部位，在一端用透膜將之緊密包住，最後置於培養基的一端，並將線蟲捕捉菌接菌在裡面；同時在另一邊滴上 200c.c. 含松材線蟲的二次水。)



(另一邊準備一皿和之前比較誘引效率時一樣的接菌方式，其目的是為了與上面做比較。)

觀察這兩個培養基對松材線蟲的誘引關係後，做出下列表格：

(間隔 3 小時觀察線蟲超過中間線數量，共五組)

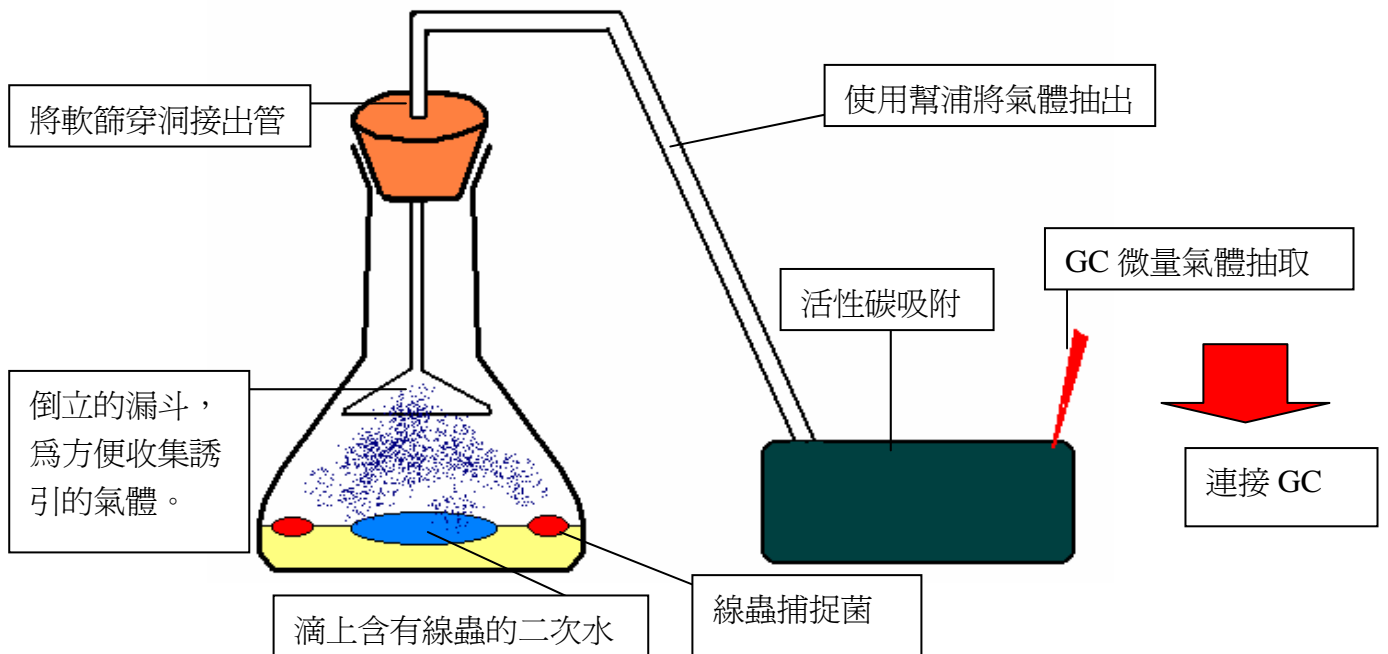
培養基名稱	3 小時後	6 小時後	9 小時後	12 小時後
A1 (隔絕)	0	4	8	14

B1 (正常)	1	3	9	15
A2 (隔絕)	2	2	7	11
B2 (正常)	3	6	6	11
A3 (隔絕)	0	4	5	14
B3 (正常)	0	5	6	10
A4 (隔絕)	2	3	7	9
B4 (正常)	1	4	9	13
A5 (隔絕)	2	6	10	11
B5 (正常)	4	5	12	16

【結果】從數據中可以發現，兩個培養基對線蟲的誘引效率相當，而液體不可在空氣中直接誘引，需藉由直接與培養基接觸來擴散，故得證其誘引物為氣體。

(二) 設計實驗將微量氣體抽出

由上面實驗已知誘引物為氣體，並設計實驗儀器將之抽取出來。



【結果】因收集到的氣體不足以做氣體層析，所以目前正設法增加其產量。

陸、討論

- 一、由找出最適當培養基以培養線蟲捕捉菌的過程中，發現最適當的培養基：以馬鈴薯粉為培養基者較易觀察，並將馬鈴薯粉含量降為原來 1/4，效果最好。
因為：本實驗將較常用的培養基，如 PDA（成分：馬鈴薯粉、洋菜粉、水）、PCA（成分：胡蘿蔔粉、洋菜粉、水）、CMA（成分：玉蜀黍粉、洋菜粉、水）、WA（成分：洋菜粉、水）都接上實驗需要用的菌株後，發現以 1/4PDA 在接菌 3 天後可以看到完整菌落，故使用 1/4PDA，其成份含量馬鈴薯粉 3.9g、洋菜粉少許（只用來增加培養基硬度，不影響濃度）、水 400g。
- 二、探討不同的真菌對線蟲的誘引效率時，發現只有接線蟲捕捉菌的培養基，線蟲才有越過中間線的現象，其他培養基內的線蟲大多停留在原接線蟲處。得知線蟲捕捉菌對現蟲的誘引效率較一般真菌來的好。此外，氣體均勻散佈與線蟲均勻散佈的關係，推測是因為：其揮發性氣體在體積不大的培養皿中較容易均勻分布，皿中各部位氣體濃度大致相同，而導致線蟲的分布能均勻散佈。
- 三、根據文獻的探討，線蟲捕捉菌有各種捕蟲構造，如：捕捉網、黏著球、非收縮環、收縮環等，各個機制捕捉線蟲的能力都不同，所以本實驗中亦探討不同捕捉構造的線蟲捕捉菌對線蟲誘引效率的比較，實驗後發現捕捉網發達的線蟲捕捉菌的誘引效率最好，和文獻結果大致相同；但為了確定誘引能力只和線蟲捕捉菌產生的誘引物質有關，而不是捕捉構造，因此設計了第三步的實驗。
- 四、在實驗三--誘引物質的確認，本步驟使用塑膠管做了實驗，發現可以排除誘引物質為液體，擴散後造成誘引的可能性：為了確定圓環的裝置可以有效阻隔液體的擴散，再用鐵管做了一次相同的實驗，亦得到同樣的結果，故證明誘引物質應為氣體而非液體。
- 五、從實驗三得知誘引物質為氣體後，想進一步分析其成份，但因為其產量不多，故在做氣體層析方面，面臨到了需要增加線蟲捕捉菌誘引線蟲時，所產生的誘引氣體量；為了能確切收集到誘引氣體，設計了一個實驗裝置：倒立的漏斗是為了集

中收集氣體；外接管接上幫浦，增加抽取的效率；接上活性碳吸附器，是希望能吸附有機氣體；最後接上 GC（氣體層析儀）做氣體層析。

六、然而,上述方法可能會面臨的問題是起的量不夠,因此實驗最後設法增加其氣體產量如：改變培養基成分，增加營養量，使線蟲捕捉菌能有效生產，達到單位產量最高狀態；或是改變收集氣體時的氣壓，使收集到的氣體含量較純，干擾性的氣體含量降到最低.....等，以收集更多的氣體。

柒、結論

線蟲為植物發生病蟲害感染的病源之一，而台灣的松樹，目前正面臨著松材線蟲入侵的危機。從文獻的探討中，發現線蟲有其自然界的天敵 — 線蟲捕捉菌。本實驗著重在探討線蟲捕捉菌特殊的捕捉機制。當線蟲捕捉菌附近出現線蟲時，會產生誘引線蟲的物質，並設計了一步步的實驗，去探討此誘引物質的捕蟲效能及其成分。現在，已經發現此誘引物質為一揮發性氣體。往後將會設法增加其誘引氣體的產量，並使用氣相層析儀分析之。最後希望可以將此物質應用到微生物防治上，期望能解決台灣松樹被線蟲感染的問題。

捌、參考資料及其他

- 一、李家維、徐歷鵬、崔文慧、張立雪、黃璧祈、葉開溫、鍾楊聰。2002。生物學 CAMPBELL 上下冊。
- 二、楊秋忠、趙維良、廖啓成、黃山內、曾顯雄、許文輝。2003。台灣土壤微生物之收集應用。
- 三、施河。2000。高中二年級生命科學學期用書上下冊。
- 四、曾顯雄、劉俊揚、劉桂郁、袁國芳。1997。台灣產線蟲捕捉菌圖譜。
- 五、曾顯雄。1989。線蟲之生物防治趨勢。植物線蟲病害防治研討會專輯。
- 六、霍格蘭、竇德生。2002。觀念生物學上下冊。
- 七、其他：文獻探討

文中討論並說明農業應用的生物性肥料、土壤改良經濟生物防治劑，將之應用於環境應用、工業技術上。而相關線蟲捕捉菌所應用的生物防治劑中指出線蟲為植物四大病源之一，常可造成可觀之經濟損失。而化學藥劑常可收到立竿見影之效，但是長久下來，往往會造成一些副作用，破壞了生態係之平衡，造成次要病源之猖獗，殘留藥劑造成水源土壤之污染、人畜中毒、抗藥性品係之迅速產生，使推廣不久的藥劑失去療效；由於這些體驗，一物剋一物的生物防治法理念應運而生。而相關線蟲之防禦方法也有提到有些真菌體內常會含有一些有毒物質或抑制劑來使線蟲捕食後死亡，也有些真菌如：線蟲捕捉菌，會產生誘引物使其被捕捉，宛如一個天生的陷阱；故針對於此想對其產生物質詳加探討，期望可用於土壤微生物防治上。

【楊秋忠.趙維良.廖啓成.黃山內.曾顯雄.許文輝.2003.台灣土壤微生物之收集應用.p77-102】