

# 黑殭菌MA-305品系對斑飛蝨之致死機制

李 平 全

## 摘 要

自斑飛蝨 (*Laodelphax striatellus*) 由體上分離出之一種真菌由 Kock's 法則証實為蟲生病原菌 (entomopathogen)，經鑑定為黑殭菌 (*Metarhizium anisopliae* Var. *anisopliae*)；其編號 MA-805 品系，孢子大小為  $2.25 \sim 4.50 \times 5.00 \sim 10.00 \mu$ ，綠色。本省不同地區的斑飛蝨品系對本菌的感受性 (Susceptibility) 無顯著差異。利用組織切片技術、酵素測定及電子顯微鏡觀察發現 MA-805 感染斑飛蝨途徑結果發現，孢子首先附着於蟲體體壁，發芽後在菌絲端產生附着器 (Appressorium)，並分泌幾丁酶 (Chitinase)、脂肪酶 (Lipase)、蛋白酶 (Protease) 以分解體壁，再以侵入釘 (Penetration Peg) 穿入體壁進入蟲體內生長繁衍，機械性的破壞蟲體器官，同時更分泌毒素 (Toxin) 使蟲致死。本菌可分泌澱粉酶、脂肪酶、蛋白酶、幾丁酶，但不分泌果膠酶 (Pectate lyase)。

## 前 言

斑飛蝨 (*Laodelphax striatellus*) 屬同翅目飛蝨科 (Homoptera; Delphacidae)，除直接吸汁為害水稻外，並可傳播稻縞葉枯病 (邱, 1972; 李, 1975; 宋等, 1980; Hsieh, 1973)。

本蟲過去在本省未造成災害 (貢, 1963)，雖於民國58年在台中地區發現傳播縞葉枯病 (謝, 邱, 1969)，但因發生面積有限，致未被重視；雖民國70年在高屏及台中地區族群密度大幅增高，經其媒介傳播之縞葉枯病亦隨漸擴張，至73年後縞葉枯病之危害，除花東地區外，幾乎遍及全省，尤以南部高屏地區有逐年嚴重之勢 (農林廳, 1985<sup>(4)</sup>)。

斑飛蝨之防治，傳統是用農藥，但農藥使用日久除危害環境問題外，該蟲會產生抗藥性，在日本已有對有機磷劑和氨基甲酸鹽類產生抗藥之報告 (Ozaki 1969; Ozaki et al., 1984; Kassai et al. 1984 為此，利用微生物來防治害蟲，甚受重視 (侯, 1985)。

黑殭菌使斑飛蝨致病係以筆者 1984 年在高屏地區首次發現，並分離出 MA-805 品系。本試驗主要之目的在明瞭黑殭菌 MA-805 品系對斑飛蝨之病原性。

## 材料與方法

### 1. 病原菌來源、分離與形態觀察：

採自屏東地區田間的斑飛蝨，在室內飼養發病後，將蟲體浸在1.5%次氯酸鈉 (NaOCl) 溶液中經表面消毒2分鐘後，再放入無菌水中連續沖洗3分鐘後移到2%水瓊脂平板 (2% Water agar plate)，培養5~7天，俟菌絲長出時利用白金耳取一小塊長有菌絲之Agar移至SMA+Y培養基內做試管斜面培養 (嚴，韓，1968<sup>(9)</sup>)；經以Kock's postulates 証實其為蟲生真菌病原 (Entomopathogenic Fungi)，再進一步鑑定確定為黑殭菌，*Metarhizium anisopliae* Var. *anisopliae* (Tulloch, 1976)，從菌株品系中選定編號MA-805供做本試驗用。

玻片上滴MA-805孢子，在Nikon Biophot顯微鏡底下觀察形狀顏色並利用測微器 (Micrometer) 測量分生孢子之大小；使用高濕接種裝置 (Steven, 1974) 在玻片中央放一塊大小 $3 \times 3$  (mm)<sup>2</sup>的SMA+Y培養基，培養基邊緣接MA-805分生孢子蓋上蓋玻片後置入高濕接種裝置內培養，每日觀察拍照黑殭菌之生長產胞過程。

### 2. 病原菌接種斑飛蝨的方法：

斑飛蝨裝在飼蟲管 (rearing vial) 內用CO<sub>2</sub> 麻醉後，放置在預鋪濾紙之培養皿內 (直徑9cm)，用噴壺噴灑濃度 $10^6$  conidia/ml的孢子懸浮液 (Suspension) 2ml，俟蟲子復甦後用毛筆移到備有秧苗的試管內飼養。

### 3. 病原菌感染斑飛蝨之過程觀察：

將接種病原菌飼養3~7天的蟲子做成標本觀察，標本須用2.5% Glutaraldehyde 固定，再經50%，70%，80%，90%，100%的Acetone脫水，乾燥後標本粘在載物台 (stab) 上，以離子覆蓋器 (Ion coater) 鍍金膜 (Au coating)，隨後在掃描電子顯微鏡 (Hitach S-450) 下觀察及拍照；另以石臘組織切片技術做切片觀察，將菌體標本經固定、脫水、浸臘、封臘、切片 (5 $\mu$ ) 展臘、脫臘、染色、封片及乾燥等手續，用Harris hematoxylin 染色，在光學顯微鏡下觀察及拍照 (Humason; 1979)。

採集本省羅東、台中、嘉義、屏東等不同地區的斑飛蝨感染MA-805 並比較其感染率。

### 4. 黑殭菌MA-805品系分泌酵素之偵測：

應用Hankin and Anagnostakis (1975) 的方法測定是否產生澱粉分解酶 (Amylolytic enzyme)、果膠分解酶 (Pectolytic enzyme)、蛋白分解酶 (Proteolytic enzyme)、脂肪分解酶 (Lipolytic enzyme) 及幾丁分解酶 (Chitinase)。

## 結果與討論

### 1. 病原菌之形態：

MA—805 之孢子長橢圓形，大小為  $2.25 \sim 4.50 \times 5.00 \sim 10.00 \mu$ 。綠色，由分生子梗 (Conidiophore) 產生成鏈狀，同時菌絲有溶合現象，菌絲白色透明，有橫隔 (Septa)。〔圖一〕

2. 測定本省不同地區斑飛蝨品系對 MA—805 之感受性 (Susceptibility)，發現並無顯著地差異，進一步觀察本菌侵入寄主的過程，以孢子懸浮液噴在蟲體，孢子附着於體壁〔圖二(A)〕，發芽後隨即形成附着器 (Appressorium) 並分泌各種分解酵素以分解體壁 (Smith et al, 1981<sup>(21)</sup>)，產生侵入釘 (Peg) 侵入體壁；所生長之菌絲尋找適當的位置如體節、節間膜或臘孔侵入〔圖二(B)、(C)、(D)〕，侵入後在體內產生菌絲體，隨後產生菌絲伸入組織做機械性破壞〔圖三(C)、(D)〕，導至蟲體死亡；由於菌本身生長需利用蟲體內水份和養份，致使死亡之蟲體僵硬，足部緊握秧苗，觸角、節間或體壁伸出菌絲〔圖三(A)、(B)〕；〔圖四(A)〕，經 1 天後全身被覆孢子〔圖四(B)〕；此侵入方式途徑與福原 (1979<sup>(7)</sup>) 觀察黑殭菌感染叩頭蟲完全一致；本菌除了以菌絲做機械性組織傷害外並產生毒素 Destruxins 至少五種以上 (Lin et al., 1986) 以毒殺昆蟲。

### 3. 分泌酵素之測定：

以 Hankin and Anagnostakins (1975) 方法測定結果，MA—805 會產生 Amylase, Chitinase, Lipase 和 Protease 第四種酵素，但並無 Pectatolyase 產生 (表一) Roberts (1981) 指出昆蟲體壁的被分解須真菌產生的 Protease, Lipase 和 Chitinase 共同聯合作用，而本菌亦能產生以上四種酵素，因此有助於侵入斑飛蝨體內；Rosato et al. (1981) 曾測得 *M. anisopliae* 能分泌 Amylase, Chitinase, Lipase 和 Protease 等酵素，這與本試驗的結果完全吻合；而 Messias et al. (1983<sup>(16)</sup>) 更能用 Pyrolysis—Gas Chromatography (PGC) 方法，以 *M. anisopliae* 產生的酵素來鑑定該菌的不同品系；Legar (1986) 從 *M. anisopline* 純化出 Protease, Lipase 和 Chitinase 可見產生酵素為本菌特性之一。由所測結果 MA—805 不產生果膠分解酵素 (Pectinase)，因此推測使用在果樹害蟲防治上應無安全上之顧慮。

## 參 考 文 獻

1. 李新傳，1975，斑飛蝨傳播水稻縞葉枯病之試驗研究，台灣農業，11 (4)：95～103。
2. 宋美幼、黃振聲、謝豐國，1980，台灣主要蟲媒植物病害摘述，興大昆蟲學報，15：51～61。
3. 邱明德，1972，斑飛蝨傳播水稻縞葉枯病試驗，植保會刊，12 (1)：15～20；14 (3)：89～94。

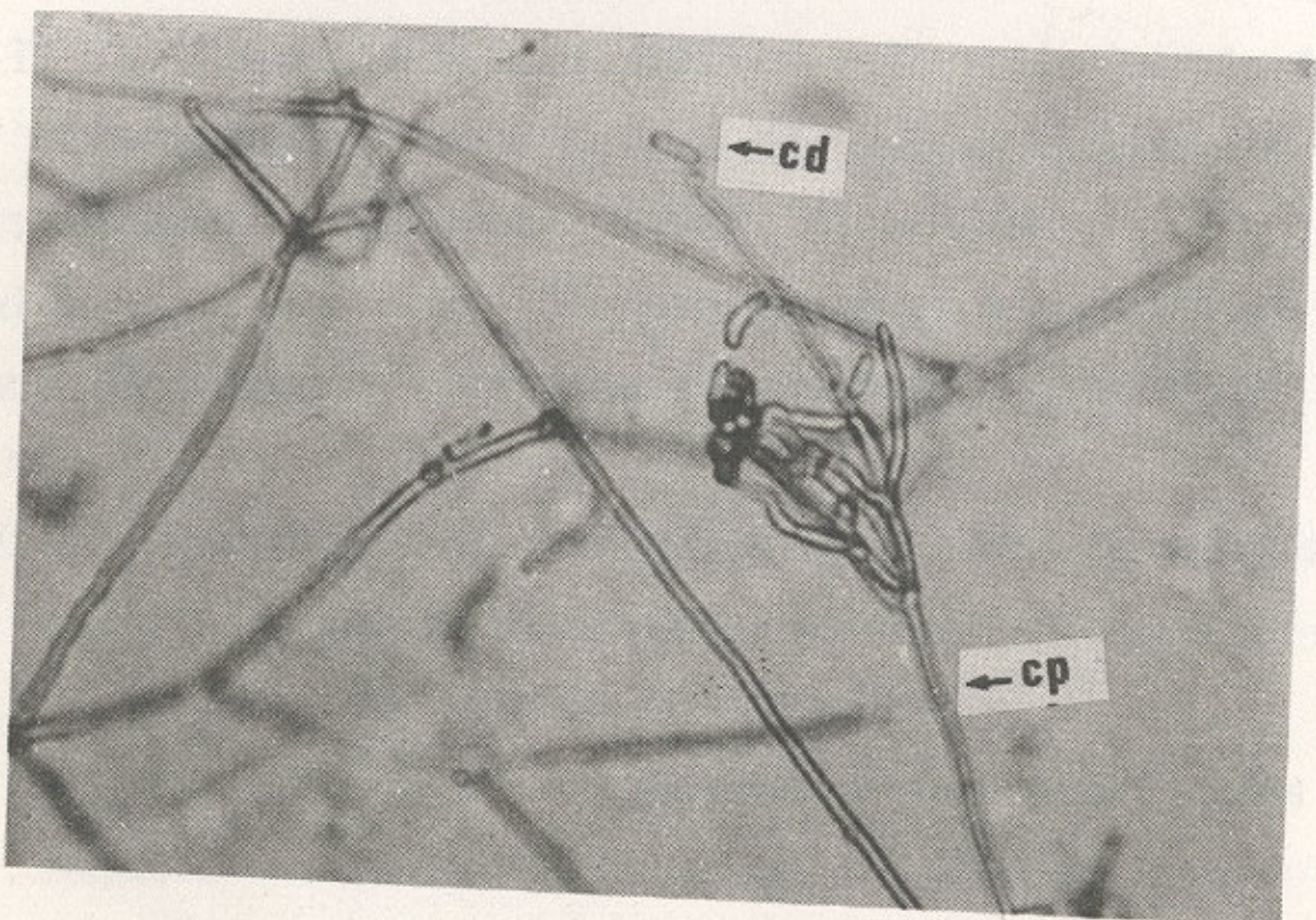
4. 省政府農林廳，1985，台灣水稻病蟲發生預測，PP. 127 ~ 137。
5. 侯豐男，1985，利用微生物防治害蟲方法簡介，台灣農業，20(5)：55 ~ 60。
6. 貢穀紳，1963，主要害蟲簡介，中興大學農學院昆蟲系，PP. 10 ~ 11。
7. 福原敏彥，1979，昆蟲病理學，學會出版センター，東京，PP. 77 ~ 103。
8. 謝式拌珏、邱人璋，1969，台灣水稻新毒素病—縞葉枯病，58年植保學會年會論文摘要，P. 175。
9. 嚴奉琰、韓美琳，1968，Cephalosporium屬真菌對黑椿象 Scotinophara lurida Burmeister 致病力之研究，植保會刊，10(1)：47 ~ 58。
10. Hankin L. and Anagnostakis, S.L. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia, 67:597 ~ 607.
11. Hsieh, C.Y. 1984. Transmission of rice stripe virus by Laodelphax striatellus Fallen in Taiwan. Plant prot. Bull. (Taiwan, R. O. C.) 15(4)：153 ~ 162.
12. Humason. G.L. 1979. Animal Tissue Techniques. W.H. Freeman and Company, San Francisco. 661 pp.
13. Kassai, T. and Ozuki, K. 1984, Effect through successive selection with fenvalerate on malathion-resistant strains of rice brown planthopper and the small plant hopper. J. Pesticide Sci. 9:73—77.
14. Legar, R. T. ST. Cooper, R.M. and Charnley, A.K. 1986. Cuticle-degrading enzyme of entomopathogenic fungi, Cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopatogens. J. Invertebr. Pathol. 47:167-177.
15. Lin, K. and Roberts, D. W. 1986. The production of destruxins by the entomogenous fungus, Metarhizium anisopliae var. majore. J. Invertebr. Pathol. 47 : 120-122。
16. Messions, C. L., Roberts, D. W. and Grefig, A. T. 1983. Pyrolysis-Gas Chromatography of the fungus Metarhizium anisopliae : An aid to strain identification. J. Invertebr. Pathol. 42 : 393-396.
17. Ozaki, K. 1969. The resistance to Organophosphorous Insecticides of rice leafhopper, Nephotettix cincticeps uhler and the smaller brown planthopper Laodelphax striatellus Fallen. Rev. Plant protc. Res. 2 : 1-14.
18. Ozaki, K. and kassai, T. 1984. The insecticidal activity of pyrethroid against insecticide-resistant strains of planthoppers, leafhoppers and housefly. J. pesticide sci. 9:61-66.
19. Roberts, D. W. 1981, Toxins of entomopathogenic fungi. In "Microbial

- control of Pests. and Plant Disease. 1970 — 1980." ( Barges, H. D. ed.)  
Academic press, London. pp.441-459.
- 20 Rosato, Y. B., Messias, C. L. and Azevedo, J. I. 1981. Production of extracellular enzymes by isolates of *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 38 : 1 - 3.
21. Smith, R. J., Perkul, S. and Grula, E. A. 1981. Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the corn earworm (*Heliothis Zea*). *J. Invertebr. Pathol.* 38 : 335-344.
- 22 Stevens, R. B. 1974. *Mycology Guidebook*. University of washington press, Seattle and London. 703pp.
- 23 Tulloch, M. 1976. The genus *Metarhizium*. *Trans. Brit. Mycol. soc.*, 66 : 407-411.

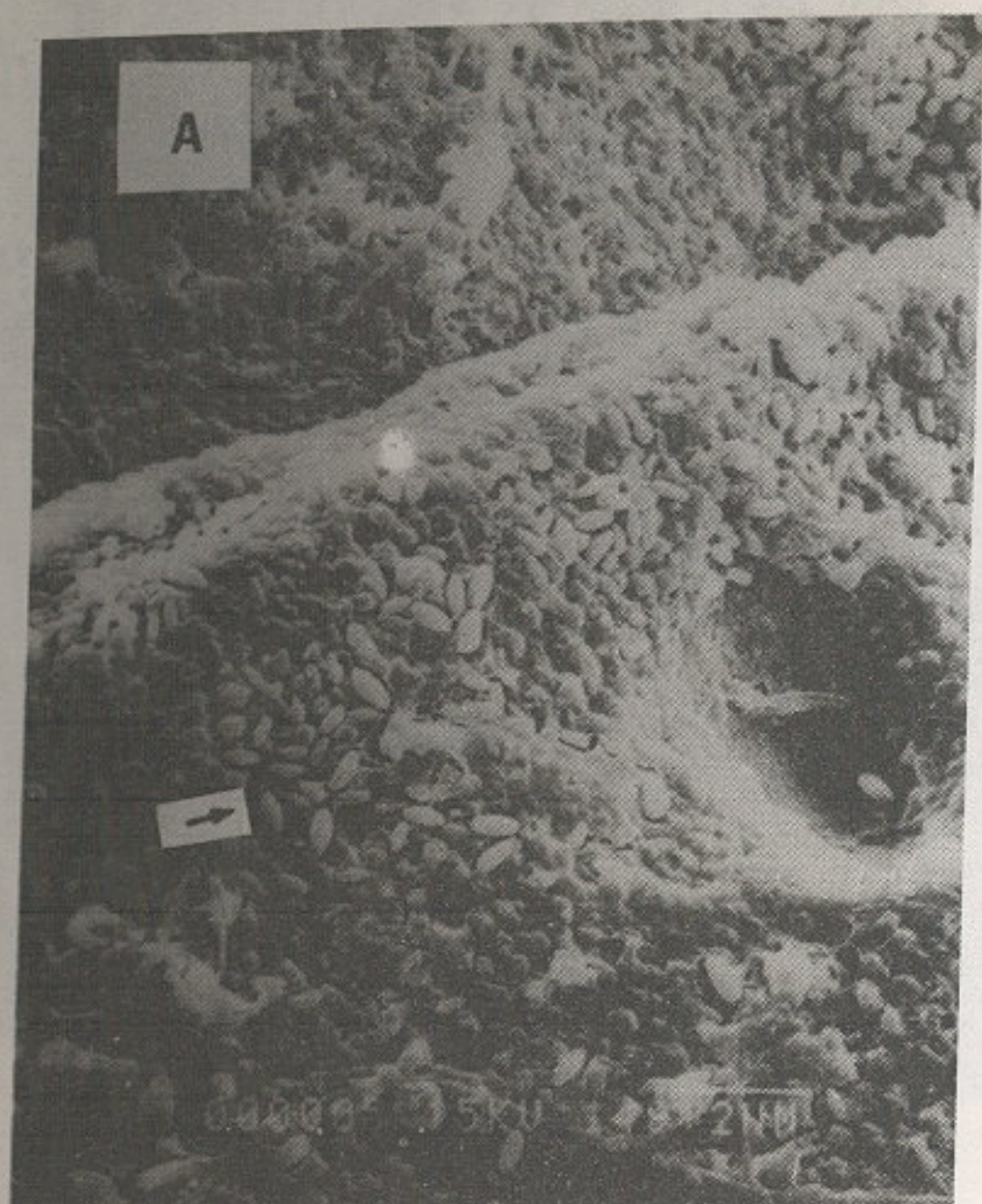
表一、黑殭菌在 Hankin & Anagnostakis 氏固體培養基上所偵測的各種酵素反應。  
 Table 1. Enzyme activities of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* detected by Hankin and Anagnostakis' solid media.

Enzyme	Reaction
Amylase	+
Chitinase	+
Lipase	+
Pectinase	-
Protease	+

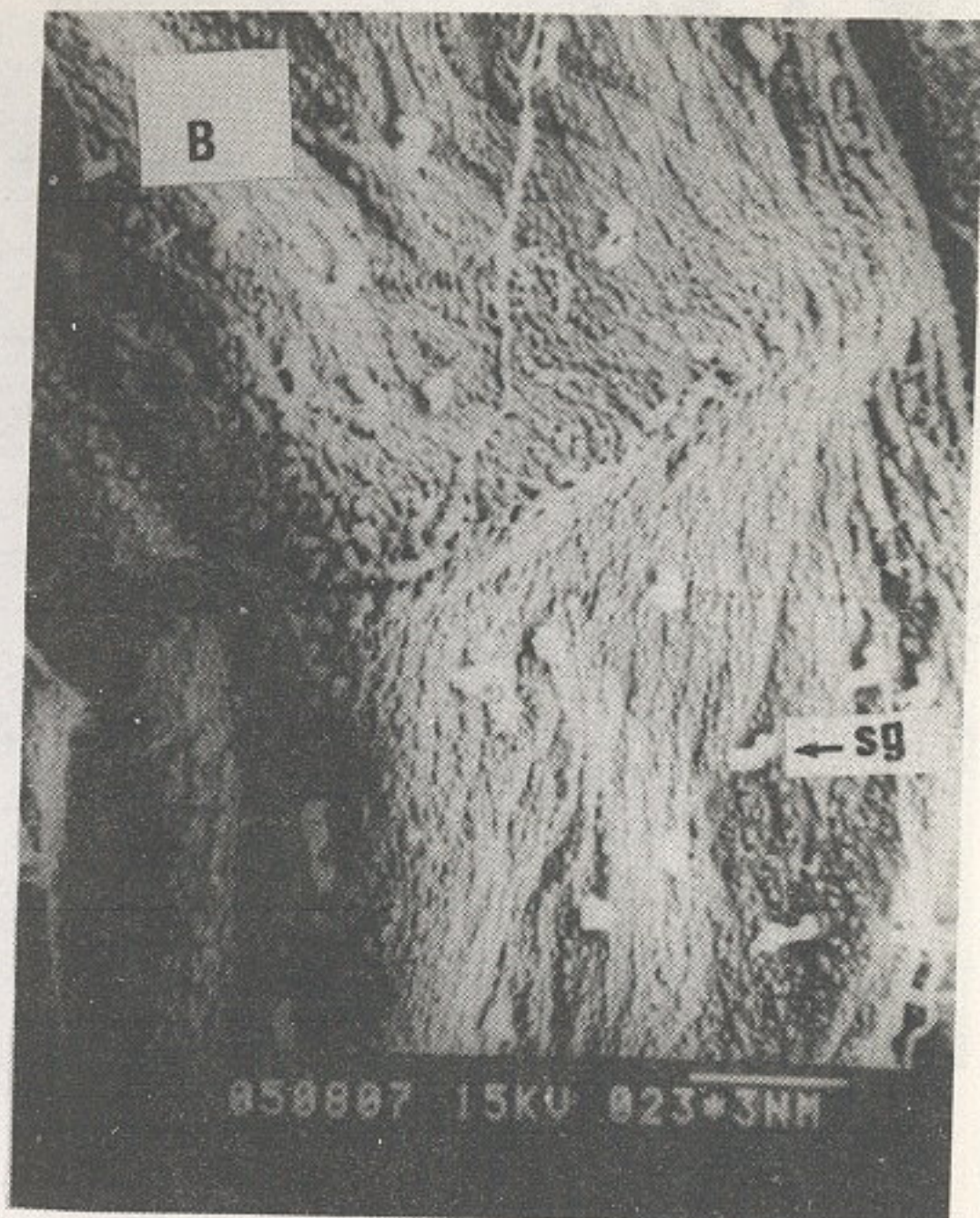
“+” : Positive :      “-” : negative.



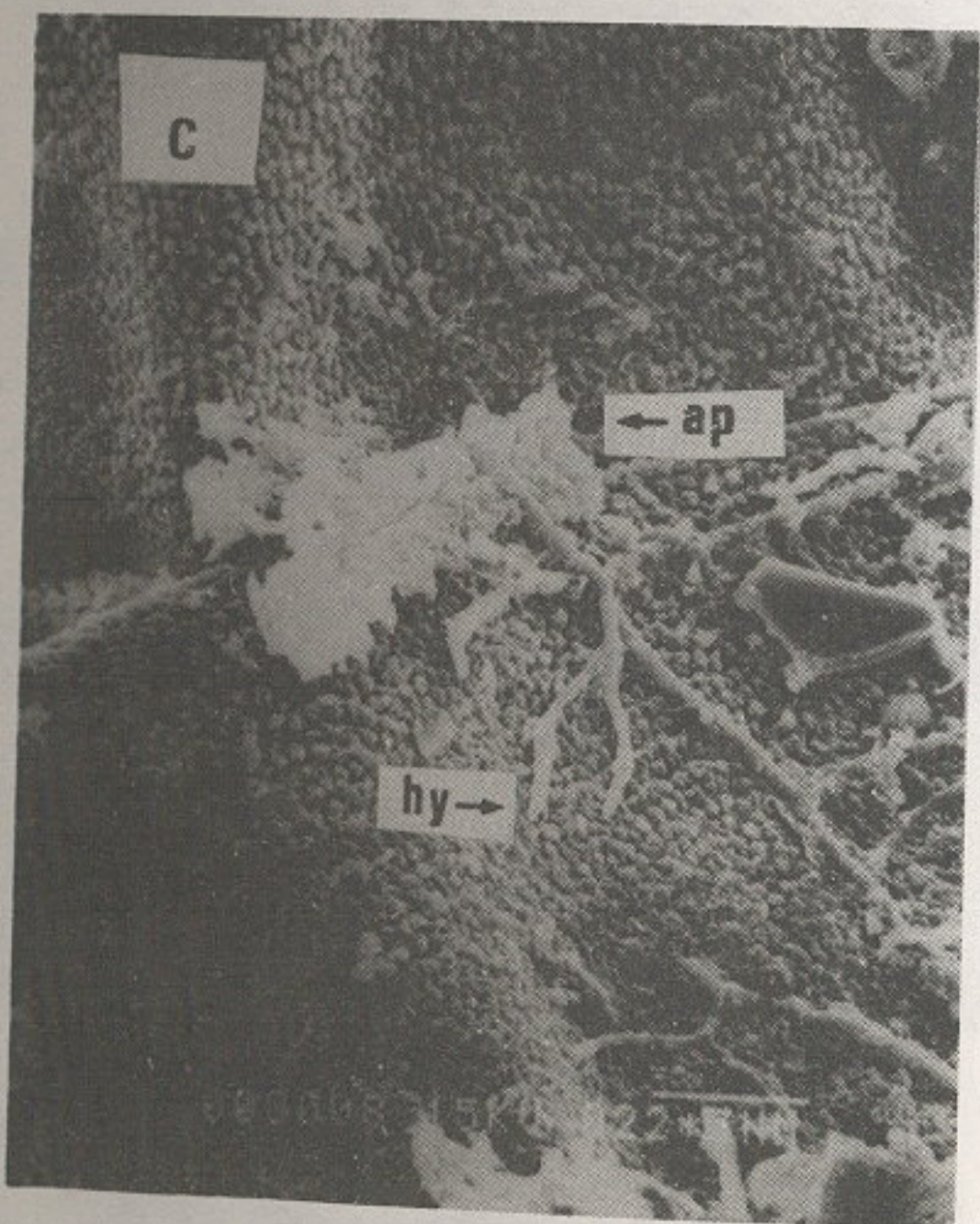
圖一：黑殭菌之形態 cd : conidia.  
 hy : hypha. cp: conidiophore.  
 ( LM. 800x )



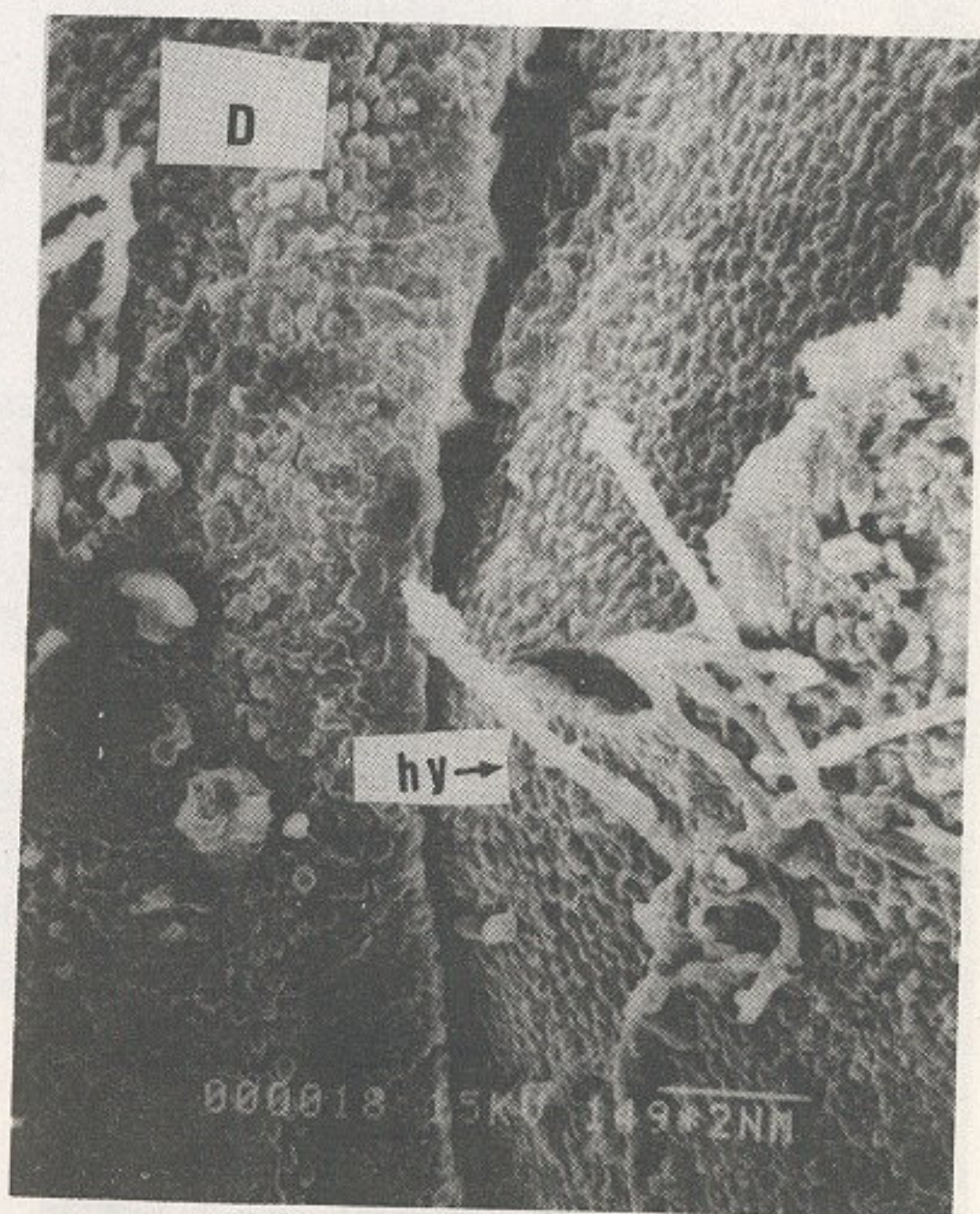
圖二：(A) 斑飛蠅蟲體上之孢子  
(箭頭)



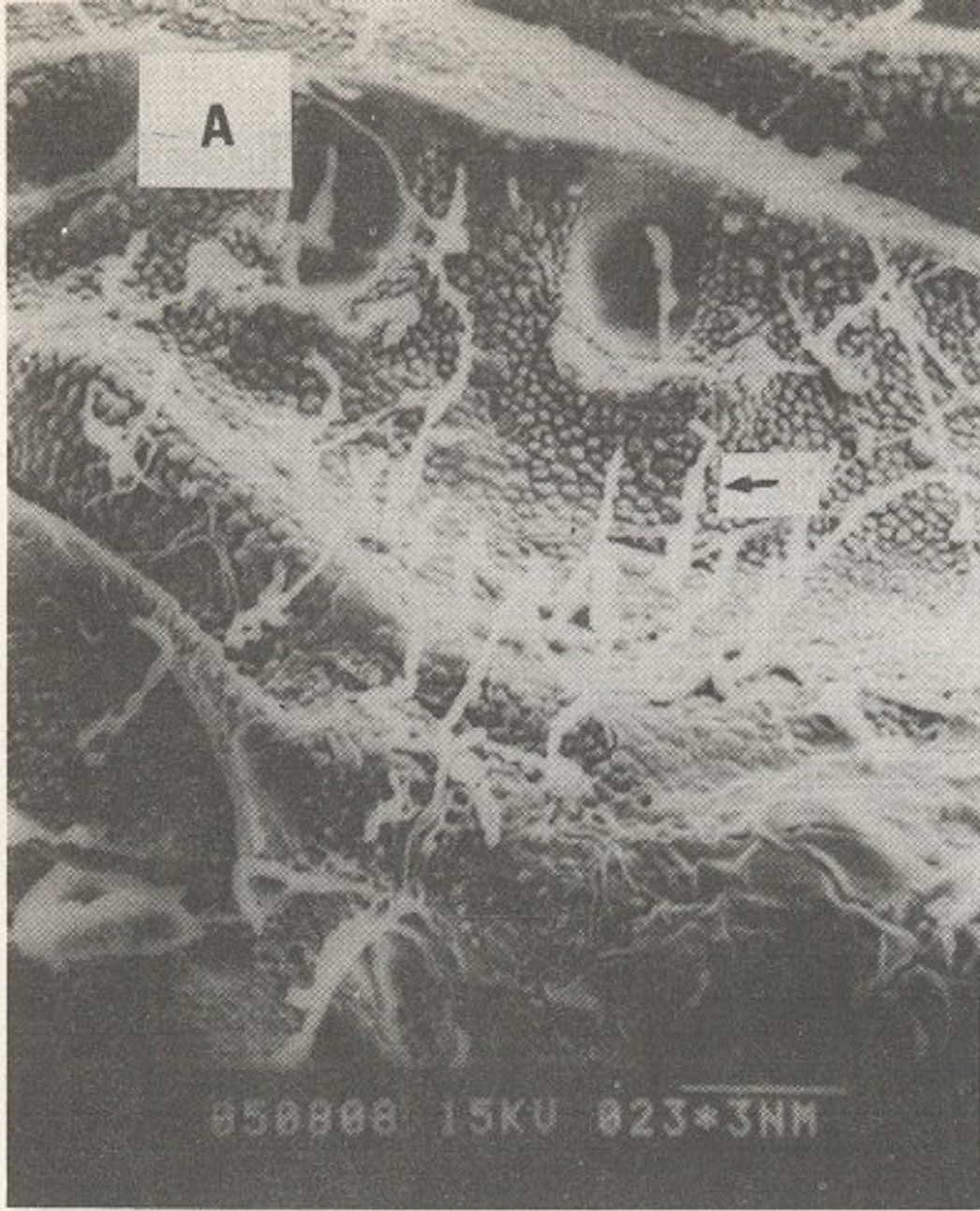
(B)  
黑殭菌孢子在體表發芽情形  
sg : spore germination.



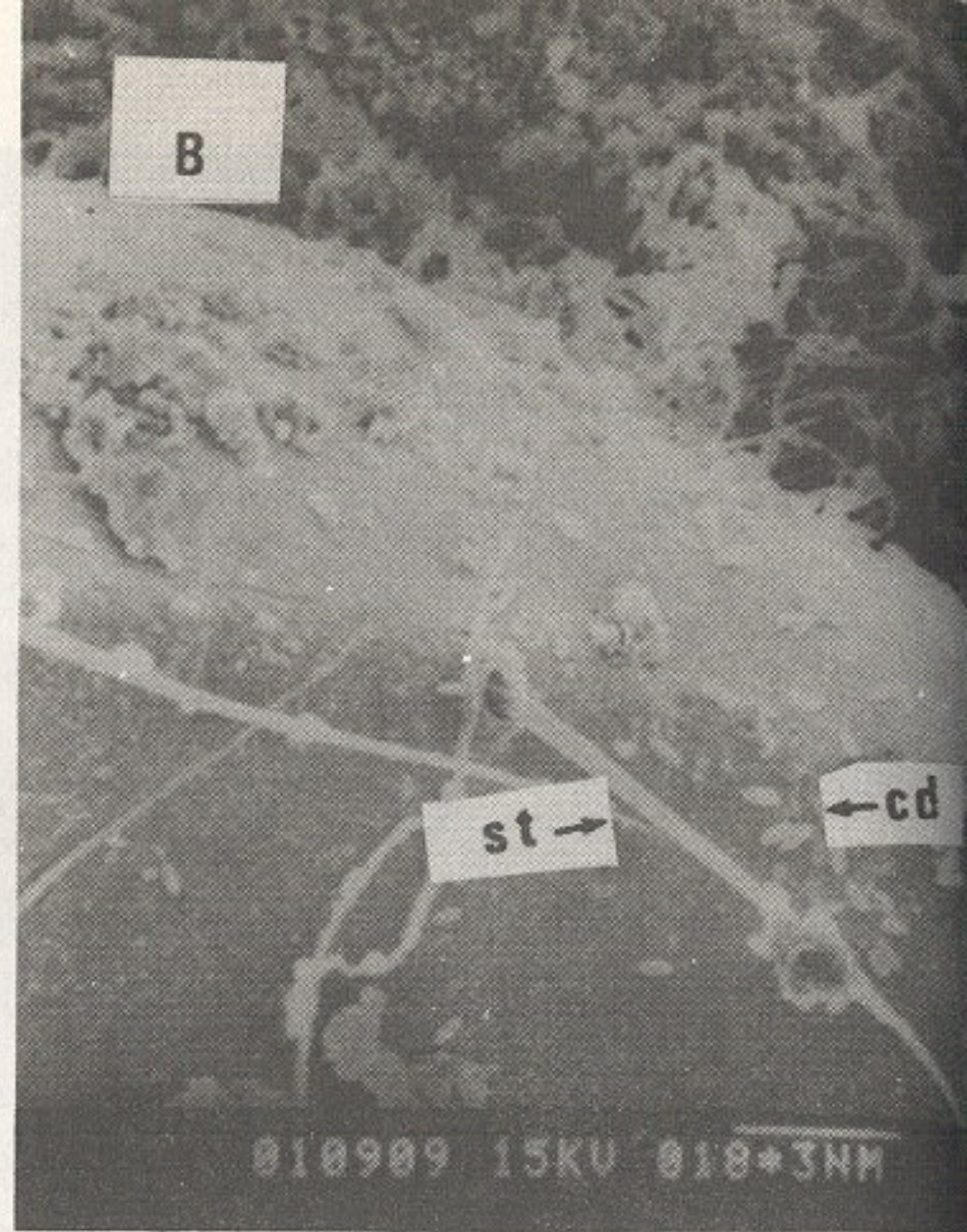
(C)  
附著板上長出游離菌絲  
ap : appresorium.  
hy : hypha



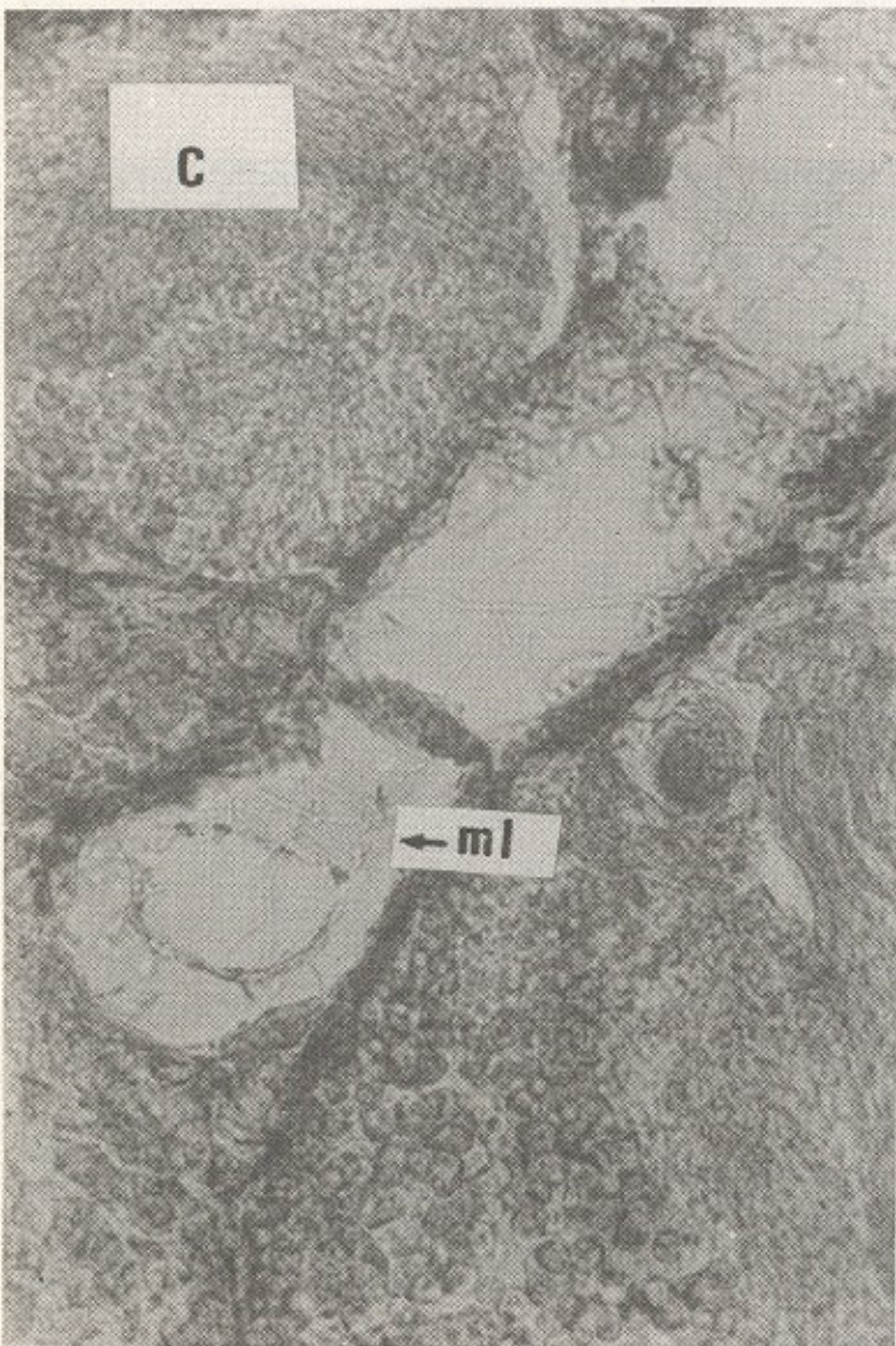
(D)  
斑飛蠅體壁上的黑殭菌產生  
菌絲 • hy : hypha



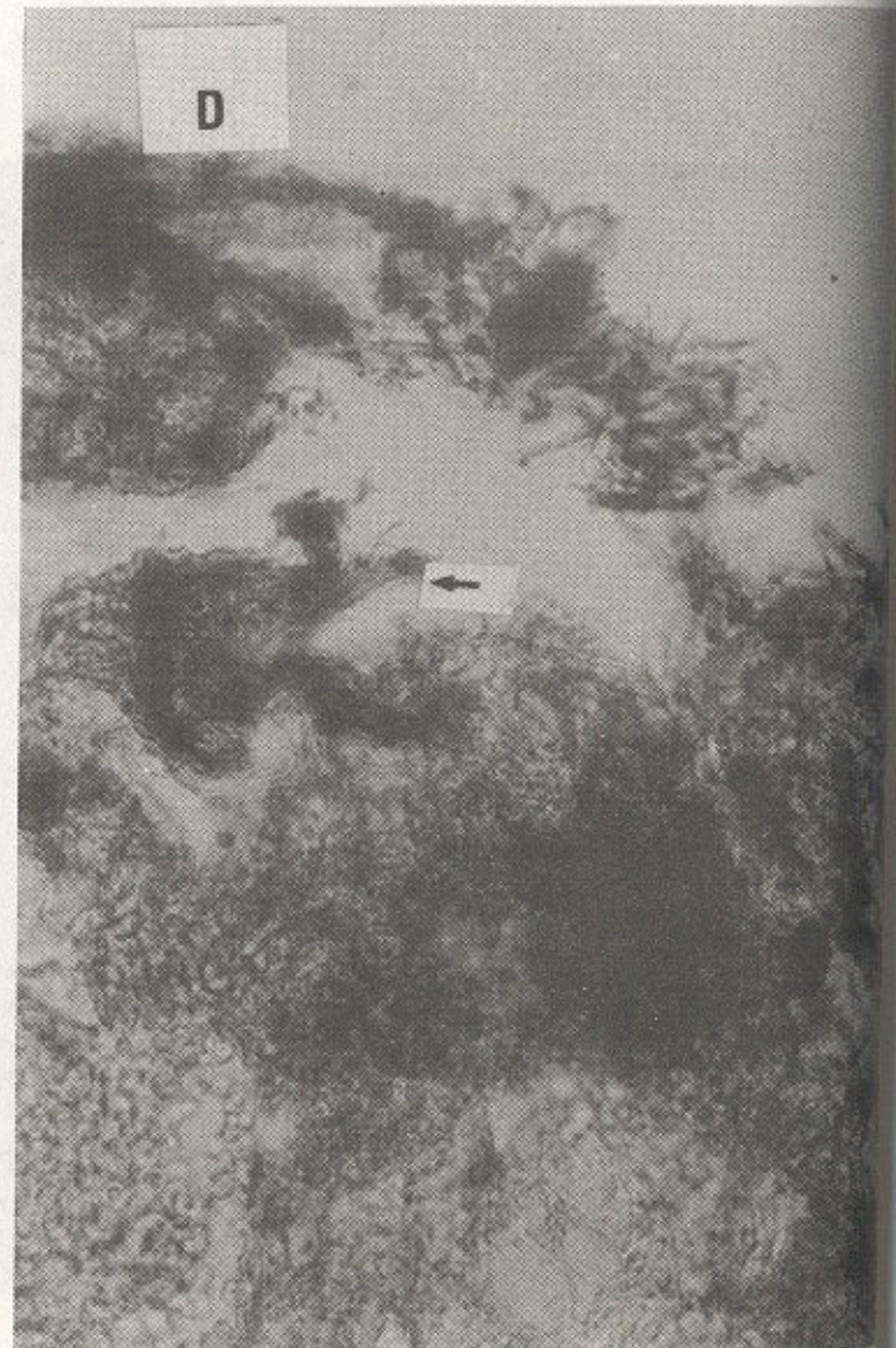
圖三：(A) 黑殭菌分生孢子柄從罹病蟲體上突出。(箭頭)



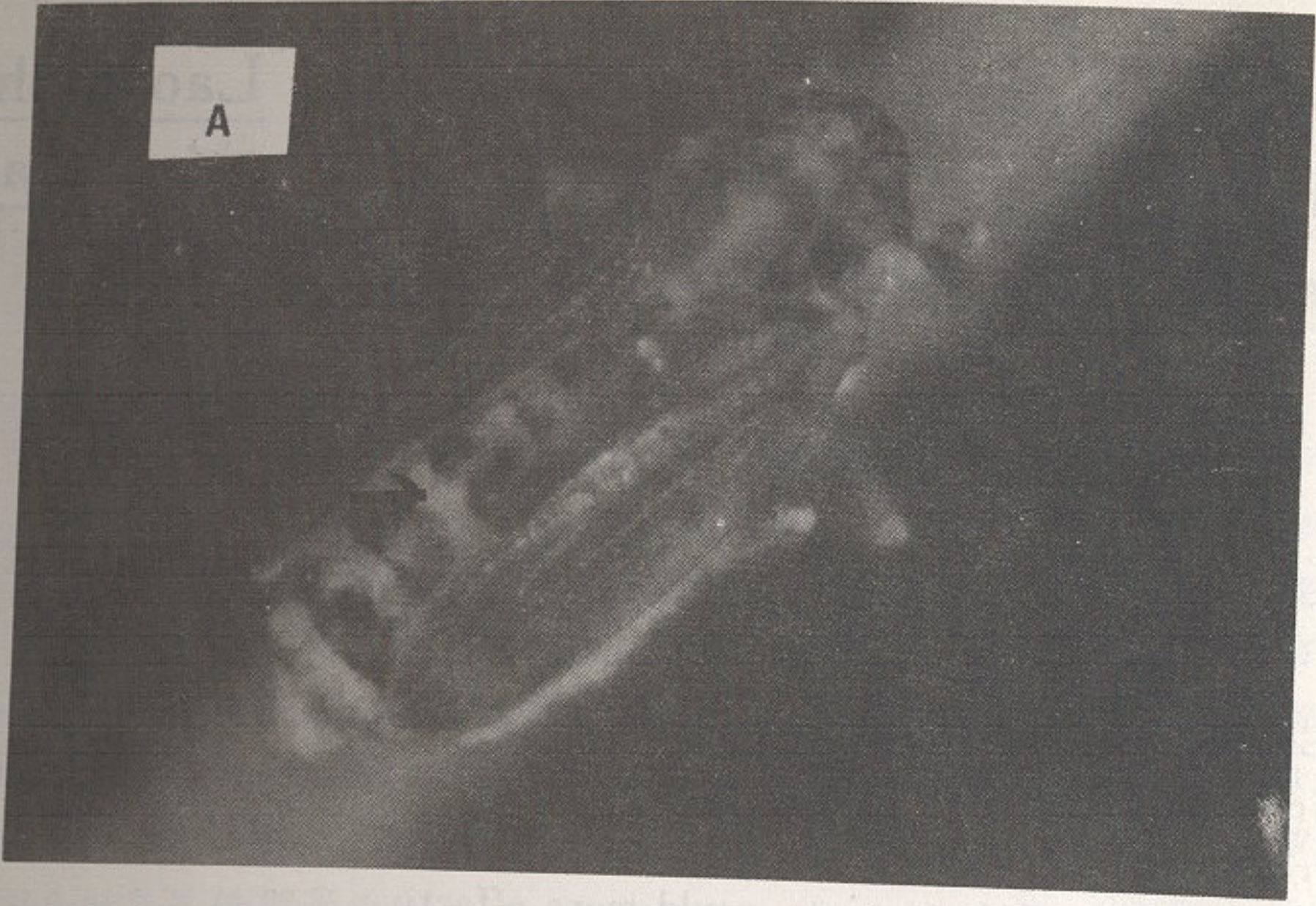
(B) 罹病蟲體上被覆菌絲和孢子。st : seta. cd : conidia my : mycelium.



(C) 黑殭菌在血體腔產生菌絲  
ml : mycelium.  
( section : 400x )

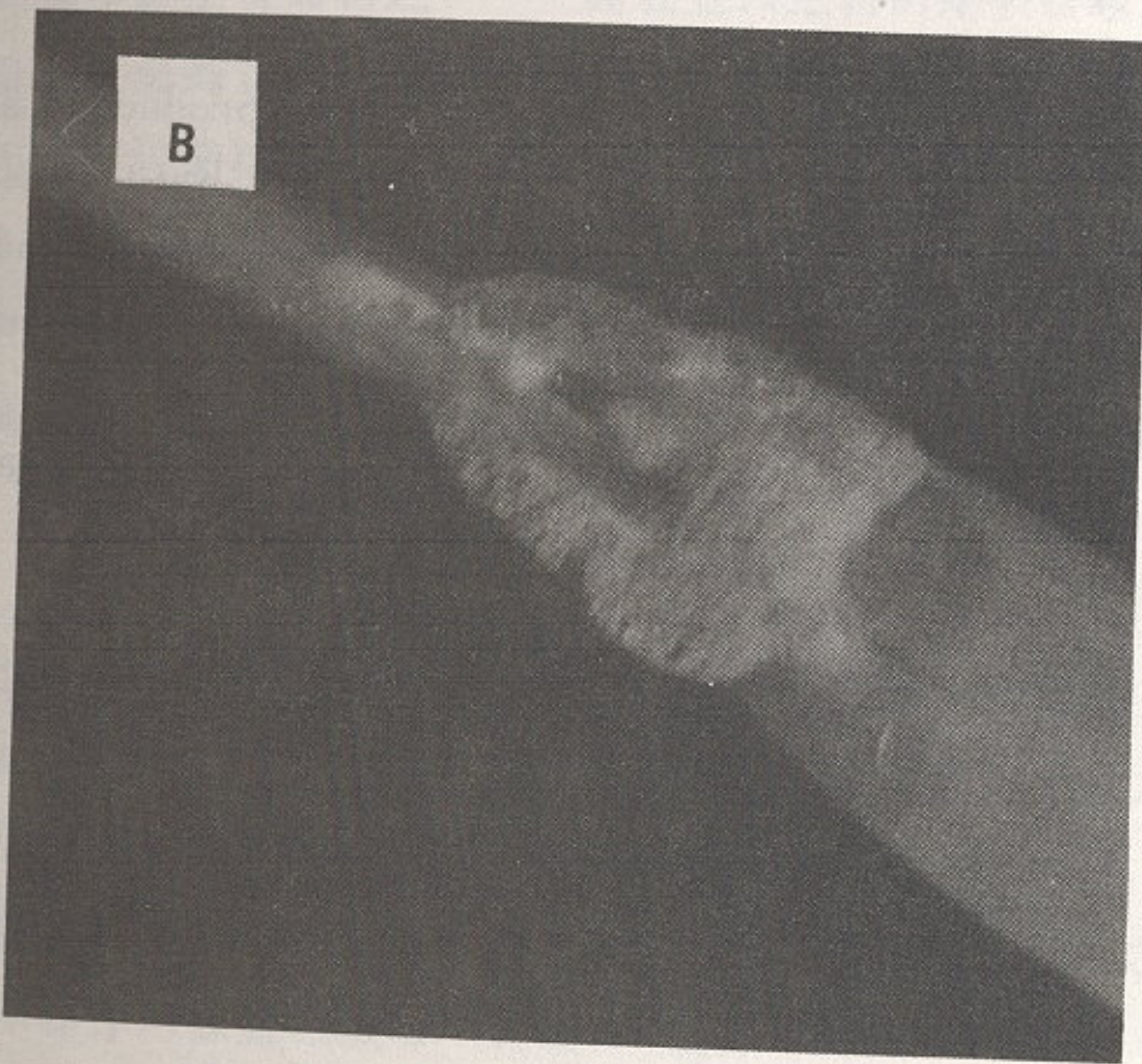


(D) 黑殭菌菌絲侵害體內組織情形。(箭頭)  
( section : 300x )



圖四：(A)

受黑殭菌感染之斑飛蠅成蟲。



(B)

被覆黑殭菌孢子之斑飛蠅。