

蜡蚧轮枝菌 11 个单孢菌株的生物学 及其对温室白粉虱致病性的比较和筛选

李国霞 严毓骅 王丽英

(中国农业大学昆虫学系,北京 100094)

摘要: 本文通过对北京地区蜡蚧轮枝菌 11 个单孢分离菌株的菌落生长、产孢量、分生孢子萌发率以及对温室白粉虱 2 龄若虫致病性研究比较,结果表明:上述性状特别是产孢量,在 11 个菌株中均表现有显著差异,但孢子萌发率都较高,达 94.01%~98.97%(12 h)。在同一菌株中这些性状有的表现出一致性,有的则不同。综合比较几种性状,筛选出 B3/S₁-Sub2 和 4 号两个优良菌株,它们首先具有致病性高(对 2 龄粉虱若虫的致死率 $\geq 95.76\%$, 12 d)、其次孢子萌发率高(94.24%和 98.42%)、产孢量大(5.06 和 4.38×10^9 孢子/皿)以及菌落生长速率快(3.13 和 3.00 mm/d)的特性,具有实用价值,可为今后生物制剂的生产提供菌株。

关键词: 蜡蚧轮枝菌;菌株;分生孢子;致病性;温室白粉虱

中图分类号: S476.12; Q969.6

昆虫病原真菌蜡蚧轮枝菌 *Verticillium lecanii* (Zimmerman) Viegas 寄主极为广泛,主要寄生于介壳虫、蚜虫、温室白粉虱、飞虱和蓟马等多种昆虫^[1~5]。作为微生物杀虫剂,已被世界许多国家主要应用于防治温室中的多种蚜虫和温室白粉虱 *Trialeurodes vaporariorum* Westwood^[1,2,4]。

在我国,1988 年报道^[7]在北京地区蜡蚧轮枝菌被发现严重自然侵染并在温室白粉虱和蚜虫种群中造成流行。随后的研究^[6]表明,北京地区的蜡蚧轮枝菌菌落生长,分生孢子的产生以及孢子萌发的温度范围和最适温区均较英国 Hall 的研究结果^[2]更为宽阔,具有在较低温度下菌丝就能生长,产孢和孢子萌发的特点。如在 10~15℃时,分生孢子萌发率为 43.0%~89.2%(24 h),萌发芽管长为 9.10~16.94 μm(20 h),相对更耐低温。这对于我国的冬季温室温度偏低的条件下研究应用该菌较为有利。因为我国的温室条件不同于国外可自动化控制温、湿度和光照的高大温室结构,特别是我国华北地区冬季温室和大棚通常温度偏低。为此,比较和筛选出北京地区蜡蚧轮枝菌优良菌株,将对于进一步选育来源于不同寄主和地区的菌株,提高其致病性奠定基础。本文对 11 个单孢分离菌株进行了有关生物学和对温室白粉虱致病性的试验研究,现将初步结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 蜡蚧轮枝菌来源 从北京地区被该菌自然侵染的温室白粉虱虫体上分离获得和鉴

收稿日期: 1995-01-12

定^[7]。

分离培养和保存:用单孢分离方法^[8]分离获得11个菌株。本研究所有试验均是用麦芽汁琼脂培养基(含糖8%~10%),在(23±1)℃、黑暗条件下培养的。将试管斜面或平皿培养7d的菌落保存在-20℃左右低温冰箱中。

1.1.2 温室白粉虱和供试植株 由京郊温室中(尚未喷药)采集大量温室白粉虱成虫,接种到盆栽的清洁蕃茄幼苗上,待24~48h产卵后,将成虫全部清除掉。用细网目纱笼将苗罩好,在温室条件下饲养至2龄若虫时,供生物测定。

1.2 方法

1.2.1 菌落生长和产孢量 将11个菌株B3/S₁-Sub₂1至6号株和B4/S₁-Sub₂7至11株(B3: Beijing 北京,接种经过粉虱寄主3次;S₁: Single 单孢分离1次;Sub₂: Subculture 传代培养2次)配制成 3.75×10^6 分生孢子/mL悬浮液,分别取1mL滴入培养皿内平涂均匀,培养2d后用直径为0.7cm的打孔器取新鲜菌落,置于培养皿(直径9cm)内培养。每个菌株5个重复。每日测记1次菌落直径。第16d收集分生孢子并计数产孢量。

1.2.2 分生孢子萌发试验 将11个菌株培养9d,用1%葡萄糖无菌水收集分生孢子,制成悬浮液(每视野100个左右分生孢子)用载玻片萌发法试验。将孢子悬液直接滴在无菌载玻片上,置于底铺滤纸的培养皿内,皿内滴加3~4滴无菌水以保持100%RH。然后培养12h后镜检。每个菌株3个重复。

1.2.3 对若虫的生物测定 将11个菌株培养9d后,用0.02%曲拉通(Triton-X100)和 $0.003 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾缓冲液收集分生孢子,配制成 5×10^6 孢子/mL悬浮液。将着生有2龄粉虱若虫的蕃茄叶片摘下,用浸湿的棉团包裹叶柄,外用塑料薄膜包扎好。然后将叶片浸入(叶柄不浸入)盛有30mL孢子悬浮液的平皿内2~3s即取出,在室温下待若虫和叶表面晾干后,置于底铺滤纸的培养皿内(每皿1片叶,每叶15~50头若虫),用滴管滴入3~4滴无菌水。然后置于温箱中,每日光照10h,(26±1)℃;黑暗14h,(20±0.5)℃。每日镜检记录感染死亡率,连续12d。此外,在生物测定前1d,测试分生孢子萌发率。凡萌发率在90%以上者用于生物测定。

1.2.4 统计分析 试验结果统计后,均用新复极差法(Duncan's SSR Test)分别做多重比较进行差异显著性检验。

2 结果与讨论

2.1 菌落生长比较 11个菌株的菌落生长均存在显著差异(表1,图1)。16d菌落累计生长和每日增长速率均以B3/S₁-Sub₂6和B4/S₁-Sub₂11号最快,6号株累计生长为58.90mm,日增长3.24mm,11号株累计生长为57.25mm,日增长3.14mm;但与5号和2号株相比,差异并不显著;而显著高于其余7个菌株。B4/S₁-Sub₂8和10号株菌落生长最慢,累计生长分别为53.80mm和50.86mm,日增长率分别为2.93mm和2.74mm。

2.2 产孢量比较 菌落生长16d的分生孢子产量相比较,11个菌株间有极显著差异(表2)。产孢量的高低依次为7号株>2号株,4号株和9号株>8号株,3号株和1号株>11号株和10号株>5号株和6号株。其中最高的7号株产孢量 7.50×10^9 孢子/皿;最低的5号株和6号株分别为 1.26 和 1.06×10^9 孢子/皿。

表 1 蜡蚧轮枝菌 11 个菌株菌落日生长速率 (直径: mm/d)
Table 1 Mycelial growth rate of eleven isolates of *V. lecanii*

菌株 Isolate	最小值 Minimum	最大值 Maximum	平均±SE Mean±SE	差异显著性*	
				0.05	0.01
B3/S ₁ -Sub ₂ 6	1.82	5.50	3.24±0.22	a	A
B4/S ₁ -Sub ₂ 11	1.62	5.62	3.14±0.28	ab	AB
B3/S ₁ -Sub ₂ 5	1.74	5.67	3.14±0.23	ab	AB
B3/S ₁ -Sub ₂ 2	1.56	5.00	3.13±0.21	abc	AB
B3/S ₁ -Sub ₂ 3	1.75	4.67	3.11±0.19	bcde	AB
B4/S ₁ -Sub ₂ 9	1.08	5.36	3.04±0.29	bcdef	BC
B4/S ₁ -Sub ₂ 7	1.34	4.14	3.01±0.20	cdef	BC
B3/S ₁ -Sub ₂ 1	1.50	4.84	3.01±0.22	def	BC
B3/S ₁ -Sub ₂ 4	1.34	5.67	3.00±0.28	ef	BC
B4/S ₁ -Sub ₂ 8	1.42	4.66	2.93±0.24	f	CD
B4/S ₁ -Sub ₂ 10	0.28	4.60	2.74±0.22	f	D

*: 字母相同的表示差异不显著($P>0.05$ 或 $P>0.01$)。The same letters meant no significant difference.

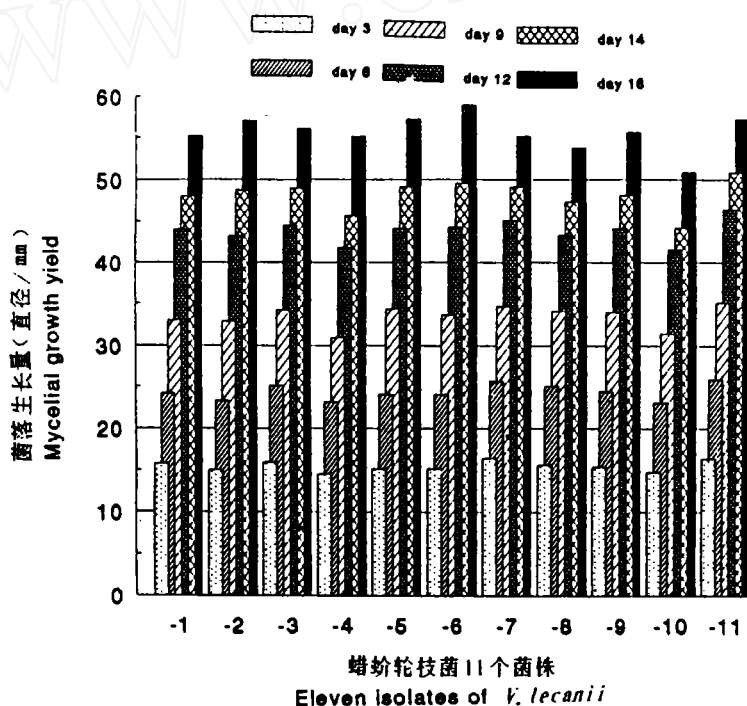


图 1 蜡蚧轮枝 11 个菌株的菌落生长量(直径/mm)

Fig. 1 Mycelial growth of eleven isolates of *V. lecanii*

2.3 分生孢子萌发率比较 11 个菌株的分生孢子萌发率均较高,达 94.01%以上(表 3)。菌株间虽存在差异显著性,但在 $\alpha=0.01$ 水平上,除 6 号株的萌发率显著高于 10 号株,2 号株和 7 号株外,其余菌株间均无显著差异。

2.4 对温室白粉虱 2 龄若虫的致病性比较 实验室生物测定结果表明(图 2), 11 个菌株对 2 龄若虫的致死率除 3, 9, 10, 7 和 1 号株明显较低外, 其余 7 个菌株间均无显著差异(Duncan's SSR 测验, $\alpha = 0.05$)。试验第 9 d, 有 9 个菌株(除 9 和 10 号株外)对若虫的侵染致死率达 80% 以上, 有 5 个株达 90% 以上; 第 12 d 则有 7 个株对若虫致死率达 90% 以上, 有 5 个株达 95% 以上。

表 2 蜡蚧轮枝菌 11 个菌株的产孢量(16d)

Table 2 Sporulation yields of eleven isolates of *V. lecanii* (16 days)

菌株 Isolate	平均产孢量(分生孢子/皿) Mean of sporulation yields in 16 days (conidia/dish)	差异显著性*	
		0.05	0.01
B4/S ₁ -Sub ₂ 7	7.50×10 ⁹	a	A
B3/S ₁ -Sub ₂ 2	5.06×10 ⁹	b	B
B3/S ₁ -Sub ₂ 4	4.38×10 ⁹	b	B
B4/S ₁ -Sub ₂ 9	4.34×10 ⁹	b	B
B4/S ₁ -Sub ₂ 8	3.26×10 ⁹	c	C
B3/S ₁ -Sub ₂ 3	2.97×10 ⁹	cd	CD
B3/S ₁ -Sub ₂ 1	2.89×10 ⁹	cd	CD
B4/S ₁ -Sub ₂ 11	2.27×10 ⁹	de	DE
B4/S ₁ -Sub ₂ 10	1.88×10 ⁹	e	E
B3/S ₁ -Sub ₂ 5	1.26×10 ⁹	f	F
B3/S ₁ -Sub ₂ 6	1.06×10 ⁹	f	F

* : 字母相同的表示差异不显著($P > 0.05$ 或 $P > 0.01$)。

The same letters meant no significant difference.

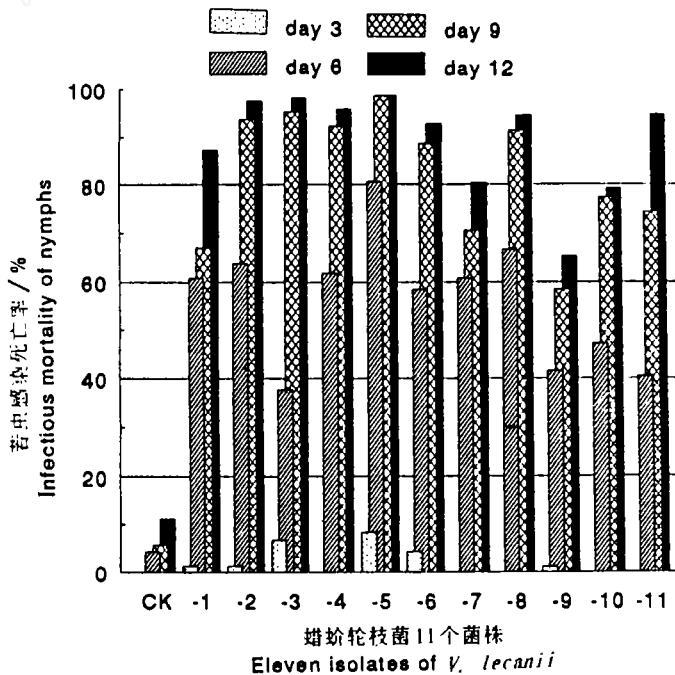


图 2 蜡蚧轮枝菌 11 个菌株对室温白粉虱 2 龄若虫的致病性
Fig. 2 Pathogenicity of the second instar nymphs of *T. vaporariorum* infected by eleven isolates of *V. lecanii*
(CK = 对照 control; -1……-11 = B3/S₁-Sub₂ 1……B4/S₁Sub₂ 11)

这一分析结果与最初的试验结果^[5]仅用方差分析(经 $\log(x+1)$ 数据转换后的 F 测验)的统计分析结果略有不同。主要原因可能是其一,最初试验的统计中样本含量较多,数据的大小变异较大;其二,统计分析方法直接采用 Duncan's 测验和用 $\log(x+1)$ 数据转换后的 F 测验方法有所不同所致。

由上述试验结果,可初步看出:1)菌落生长、产孢量、孢子萌发率和对粉虱若虫的致病性,在 11 个菌株中表现有所不同,特别是产孢量表现出极大的差异。2)在同一菌株中这些性状有的表现出一定的相关性。如 1 号株的 4 种性状均大致表现居中;10 号株则均表现偏低。菌落生长、孢子萌发率和致病性在 6 号,5 号和 11 号株中均表现出一致性,都很高。但是有的性状在同一菌株中却表现的完全不同。如 6 号和 5 号株虽然其它性状均表现很高,但产孢量却极显著最低;而 7 号株的产孢量虽然最高,但致病性偏低。3)就上述 4 种性状综合比较,在筛选优良菌株中,以致病性和产孢量的高低最为重要,其次为孢子萌发率和菌落生长速率。在本试验研究中,由于孢子萌发率均在 94.01% 以上,故应着重比较致病性和产孢量,并兼顾考虑菌落生长速率。因此,蜡蚧轮枝菌 B3/S₁-Sub₂ 2 和 4 号菌株较为优良,具有致病性强、孢子萌发率高,产孢量高和菌落生长快的特点。3 号株也可以作为后备考虑。对于 5,6 和 11 号菌株将有待于今后进一步选育,提高其产孢量。

表 3 蜡蚧轮枝菌 11 个菌株分生孢子的萌发率 (12 h)

Table 3 Conidial germination rate of eleven isolates of *V. lecanii*

菌株 Isolate	观察孢子数(个) Number of conidia examined	萌发率±SE(%) Germination rate	差异显著性*	
			0.05	0.01
B3/S ₁ -Sub ₂ 6	462	98.97±0.54	a	A
B3/S ₁ -Sub ₂ 5	539	98.61±0.30		AB
B3/S ₁ -Sub ₂ 4	592	98.52±0.48	a	AB
B3/S ₁ -Sub ₂ 3	479	96.80±1.24	ab	AB
B4/S ₁ -Sub ₂ 11	618	96.51±0.37	b	AB
B4/S ₁ -Sub ₂ 8	493	96.35±0.33	bc	AB
B4/S ₁ -Sub ₂ 9	1251	95.68±0.32	bc	AB
B3/S ₁ -Sub ₂ 1	903	95.57±2.68	bc	AB
B4/S ₁ -Sub ₂ 10	389	95.12±0.31	bc	B
B3/S ₁ -Sub ₂ 2	1025	94.24±2.81	c	B
B4/S ₁ -Sub ₂ 7	651	94.01±0.87	c	B

*: 字母相同的表示差异不显著($P>0.05$ 或 $P>0.01$)。

The same letters meant no significant difference.

参 考 文 献

- Hall R A. Control of whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* and cotton aphids, *Aphis gossypii* in glasshouse by two isolates of the fungus, *Verticillium lecanii*. *Ann appl Biol*, 1982, 101:1~11
- Hall R A. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticides against aphids and scales. In: Burges H D, [eds]. *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970—1980*. Academic Press, 1981, 483~498

- 3 Gillespie A T. The potential of entomogenous fungi as control agents for onion thrips, *Thrips tabaci* Monograph, British Crop Protection Council, 1986, 34: 237~243
- 4 Rombach N C, Gillespie A T. Entomogenous hyphomycetes for insect and mite control on greenhouse crops. Biocontrol News and Information, 1988, 9: 7~18
- 5 李国霞, 严毓骅, 王丽英. 利用蜡蚧轮枝菌防治温室白粉虱的研究. 见: 朱国仁等主编. 主要蔬菜病虫害综合防治进展. 北京: 中国农业科学出版社, 1992, 119~124
- 6 李国霞, 严毓骅, 王丽英. 温度和营养对北京地区蜡蚧轮枝菌生长发育的影响. 生物防治通报, 1991, 7(3): 115~119
- 7 王丽英, 严毓骅. 北京温室白粉虱上蜡蚧轮枝菌的自然流行. 植物保护学报, 1988, 15(4): 233
- 8 Veen K H. A technique for monospore cultures and the determination of nucleus numbers. J Inverteb Pathol, 1967, 9: 276~278

The Biology of Eleven *Verticillium lecanii* Isolates Cultured with Monospores and the Comparison and Selection of Their Pathogenicity against *Trialeurodes vaporariorum*

Li Guoxia Yan Yuhua Wang Liying
(Dept. of Entomology, CAU, Beijing 100094)

Abstract: The preliminary study showed that significant differences exist in the mycelial growth, germination rate of conidia and pathogenicity against the second instar nymphs of *Trialeurodes vaporariorum* westwood, especially in sporulation yields among eleven *Verticillium lecanii* (Zimm.) viegas isolates. These characteristics of the fungus are consistent in some isolates, but different in the others. However conidial germination rate of all isolates were high, ranging from 94.01% to 98.97% (12 h). The isolates B3/S₁-Sub₂2 and 4 were selected based on Comprehensive comparisons in eleven isolates. Both isolates B3/S₁-Sub₂2 and 4 had high pathogenicity (over 95.76% mortality for the 2nd instar nymphs of whitefly), high germination rate of conidia (94.24% and 98.42% rep.), more sporulation yields (5.06 and 4.83 × 10⁹ spores/dish) and rapid mycelial growth (3.31 and 3.00 mm/day).

Key words: *Verticillium lecanii*; isolates; conidia; pathogenicity; *Trialeurodes vaporariorum*