# 环境因子对努利虫疠霉产孢和孢子萌发的影响*

李 伟[1,3] 王秀芳[2] 宣维健[3] 王红托[3] 盛承发[3**]

(1. 中国海洋大学生命科学与技术学部 青岛 266003; 2. 中国农业科学院烟草研究所 青岛 266101;
3. 中国科学院动物研究所 农业虫害鼠害综合治理国家重点实验室 北京 100080)

**Environmental factors affecting sporulation and germination of *Pandora nouryi*.** LI Wei[1,3], WANG Xiu-Fang[2], XUAN Wei-Jian[3], WANG Hong-Tuo[3], SHENG Cheng-Fa[3**] (1. *Department of Life Science and Technology, Ocean University of China*, Qingdao, 266003, China; 2. *Institute of Tobacco, Chinese Academy of Agricultural Sciences*, Qingdao 266101, China; 3. *State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100080, China)

**Abstract** For further understanding of development of *Pandora nouryi* (Remaudière & Hennebert) Hümber in aphid populations in field, the effects of environmental factors on sporulation from cadavers of *Myzus persicae* and conidial germination were studied. *P. nouryi* discharged large numbers of primary conidia over the range 8~25℃ from cadavers on the surface of water—agar. At 8℃ conidial discharge lasted for 120 hours, but most conidia were produced within 48 hours when temperature was > 15℃. Saturated humidity alone was not enough to allow for sporulation to occur freely and where RH < 95%, no conidia were discharged. Light did not affect the pattern of conidial production nor the total number of conidia. Germination percentages of conidia on the surface of water—agar were 40.50% and 66.51% at 8℃ and 30℃ respectively, which were significantly lower than that at 15~25℃ where germination was > 95%. Conidia on leaves could germinate well when RH > 74%, while no germination occurred when RH < 100% on cover slips.

**Key words** *Pandora nouryi*, sporulation, germination, environmental factor

摘 要 探讨努利虫疠霉 *Pandora nouryi* (Remaudière & Hennebert) Hümber 在田间蚜虫种群中发生与流行的规律,研究外界环境因子对感菌虫尸产孢和孢子萌发的影响。结果表明,处于水琼脂培养平板上感染努利虫疠霉的桃蚜虫尸在8~25℃的温度范围内均能产生大量的初生分生孢子,在30℃下,仅弹射极少量孢子。8℃下,孢子弹射可以持续120 h,当温度高于15℃,大部分的孢子会在48 h内完成弹射。相对湿度小于95%,虫尸停止产孢。20℃下,光照条件不会影响虫尸弹射孢子的总量。在8℃和30℃时,24 h后处于水琼脂培养平板上的孢子萌发率分别为45.23%和61.74%,显著低于15~25℃温度范围内的孢子萌发率(95%以上)。处于叶片上的真菌孢子,当相对湿度大于74%时出现萌发,但在盖玻片的表面,当湿度低于100%时未发现孢子萌发。

关键词 努利虫疠霉,产孢,孢子萌发,环境因子

努利虫疠霉 *Pandora nouryi* (Remaudière & Hennebert) Hümber 是蚜虫的一种专性致病菌[1],在我国该菌于1988年被首次报道[2],春秋两季该菌与新蚜虫疠霉 *Pandora neoaphidis* (Remaudière & Hennebert) Hümber 及其他几种虫霉菌在山东省共同引发蔬菜田桃蚜 *Myzus persicae* (Sulzer)种群真菌流行病,可以杀死30%~80%的蚜虫种群个体,并且在该省因感染努利虫疠霉而死亡的蚜虫数量比例(48.3%)超过另外一种世界性分布的蚜虫病原真菌—新蚜虫

* 中国科学院知识创新工程领域前沿项目(棉花害虫项目(ZK十五-B-07))、中国科学院动物研究所农业虫鼠害综合治理国家重点实验室开放课题(ChineseIPM0501)和中国海洋大学引进博士科研启动基金(1203-814084)资助。

** 通讯作者, E-mail: shengcf@ioz.ac.cn

收稿日期: 2006-03-24, 修回日期: 2006-10-26

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

疠霉(47.6%)[2,3]。显然,在山东省努利虫疠霉对于控制田间蚜虫种群数量发挥了重要的作用。

然而,对于该菌的研究一直未能给予足够的重视,关于环境因子如何影响田间蚜虫虫尸产孢以及该菌诱发蚜虫种群流行病的规律等关键问题均知之甚少,这势必制约利用该菌降低田间蚜虫种群的人为调控。本文报道了不同环境条件下感染努利虫疠霉的桃蚜虫尸产孢和孢子萌发情况,并对影响该菌田间种群数量的动力学和流行学因素进行初步的探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

努利虫疠霉菌株于2002年分离自泰安蔬菜田感菌的桃蚜尸体,接种在SEA培养基(80%的莎氏培养基,添加20%鸡蛋黄)上,保存于4℃的冰箱中,每隔4个月转接1次。实验前,将努利虫疠霉菌株在桃蚜虫体上连续复壮3次,以便恢复其较高的致病力。桃蚜种群饲养在油菜(*Brassicanapus* L.)(品种:京油1号)植株上,生长的环境温度为20℃,光照周期为12 h光照(12 L)与12 h黑暗(12 D)交替。实验中,所用桃蚜为出生后8~10 d的年轻成蚜。

### 1.2 实验方法

**1.2.1** 不同温度对虫尸产孢模式的影响:湿度小室的制作参照Doberski[5]的方法,采用2个大小不等的塑料杯来完成。将1个杯壁上打了多个孔的小塑料杯(容积约为100 mL)放到1个较大的塑料杯(300 mL)内,由于2个塑料杯的杯口直径等大,小塑料杯就悬空在较大的塑料杯内。盖上杯盖,并用保鲜膜封口。杯盖中央位置悬挂1根细铜丝,铜丝的另一端载有一小块2%水琼脂块,琼脂块距离正下方的杯底约6 mm。将感染努利虫疠霉的桃蚜虫尸(死亡时间小于4 h)放置在琼脂块上,虫尸正下方的小塑料杯底部放置盖玻片(18 mm×18 mm)用于收集虫尸弹射出的孢子。为使杯内获得100% RH,大约100 mL双蒸水倒入大杯中。制作好的湿度小室放到8、15、20、25和30℃,12L/12D的光照培养箱中。每6 h更换1次盖玻片,直到无孢子从虫尸上弹射。参照Milner[6]的方法计算弹射到盖玻片上的孢子数量,孢子用棉兰染色液染色,每片盖玻片显微镜随机观察10个视野(200×或400×视野),求出每个视野下孢子的平均个数(计为A),校正该视野下的面积(计为B),同时测量玻片上有孢子分布的区域面积(计为C),孢子分布区域可以近似看成圆形。然后,求出每个玻片上孢子总数量 $N=(A/B)\times C$。1个虫尸被看作1个重复,每个温度处理设置5个重复。

**1.2.2** 光周期和湿度对产孢的影响:20℃下设置24 L、24 D和12 L/12 D 3个光照周期。光源由3只30 W的白炽灯管提供,其它条件同1.2.1所述。每个光照周期设置5个重复。向湿度小室内加入不同浓度的甘油溶液,以获得5个不同的RH(51%、74%、90%、95%、97.5%)[5],加入双蒸水获得100% RH(湿度小室内的湿度已通过台湾产313温湿度计检查校正)。将虫尸放置在处于小塑料杯底部的盖玻片上,每24 h更换1次盖玻片。实验前将湿度小室放入培养箱(20℃)中保持12 h,平衡小室内的湿度。每个湿度条件设置8个重复。

**1.2.3** 孢子萌发:在生长了15 d的努利虫疠霉菌落边缘选取一小块菌块,放入培养皿盖上,然后这些载有正在产孢菌块的皿盖被扣在2%水琼脂培养平板上,任其产孢15 min,产孢后将几片盖玻片轻轻地放在水琼脂平板上,防止次生孢子的产生而影响结果的检查。接收孢子的培养平板在接收孢子前已在相应的温度条件下放置了24 h,以保证其在一开始接收弹射的孢子时就保持着相应的温度。然后,将培养平板放入相应的已设置好温度的培养箱中,24 h后检查孢子萌发情况。

设置盖玻片和油菜(品种:京油1号)叶片2种基物,比较着落在二者表面的孢子在不同湿度条件下(20℃)的萌发情况。2个直径为20 cm的培养皿盖倒扣在一起,封口膜封住边缘缝隙,用作控制湿度的小室。下皿盖内铺有浸泡不同浓度甘油溶液的滤纸,以获得相应的RH

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

(51%, 74%, 90%, 97.5%), 浸泡双蒸水的滤纸可以获得 100% RH。油菜叶柄包裹有浸满 Hoagland-snyder 植物营养液的棉花团, 维持叶片生长所需要的营养。为防止棉花团中营养液挥发影响湿度小室内的湿度, 用保鲜膜将棉花团包住。实验前, 叶片需用蒸馏水冲洗 3 次, 然后室内自然晾干。接收有孢子的盖玻片和叶片放到湿度小室内, 培养 24 h。为防止次生孢子干扰结果的检查, 在玻片和叶片的正上方 3 mm 处放置盖玻片以收集弹射出的次生孢子。24 h 后叶片上的未萌发的初生孢子(数量计为 P)、萌发的孢子留下的孢子印痕(M)和长出芽管的孢子(G)用透明胶带转移到载玻片上, 棉兰染色观察孢子萌发情况。统计 150 ~300 个孢子, 计算萌发率 R(%)=[(M+G)/(P+M+G)] × 100。

### 1.3　数据处理

孢子数量和孢子萌发率分别经 Lg 和反正弦平方根转换, SPSS(10.0)[7] 软件包中单因素方差分析(One-way ANOVA)和多因素方差分析(GLM-Univariate Analysis)处理数据。在进行 ANOVA 方差分析和多重比较前, 对各个变量的方差齐次性进行了 Levine's 检验。Dunnett's T3 和 LSD 被分别用于变量方差异质性存在和无异质性条件下的多重比较。

## 2　结果与分析

### 2.1　温度对产孢的影响

在不同温度下, 感染努利虫疠霉的桃蚜尸体产孢模式不同(图 1)。所设置 5 个温度处理下的虫尸总的产孢量存在极显著差异(图 2, $F_{(4, 20)}=12.38$, $P<0.001$)。在 8 ℃下, 虫尸开始产孢的时间推迟到蚜虫死亡后的 10 ~16 h, 而其它几个温度下, 虫尸均在蚜虫死亡后的 4 ~10 h 内弹射孢子。产孢所持续的时间随着温度的降低而延长, 8 ℃时持续产孢时间长达 120 h, 30 ℃时产孢量急剧减少, 总孢子量为 10 602 (295, 23 690), 产孢时间短, 24 h 后基本停止产孢。在 8 ~25 ℃范围内, 产孢速率随着温度的升高而加快, 主要表现在以下 2 个方面: (1)随着温度升高, 产孢的高峰期逐渐提前, 8 ℃时产孢高峰出现在蚜虫死亡的 48 h 左右, 而其它温度下, 产孢高峰在蚜虫死亡后的 12 ~16 h 就迅速出现; (2)在虫尸产孢的前 24 h 内所弹射的初生孢子数量占总量的比例随温度的升高而增加, 8 ℃仅为 4.26%, 15 ℃为 61.87%, 20 ℃为 92.01%, 25 ℃为 92.84%, 可见, 当温度高于 15 ℃时, 一半以上的孢子可以在 24 h 内从虫尸迅速弹射扩散到环境中。

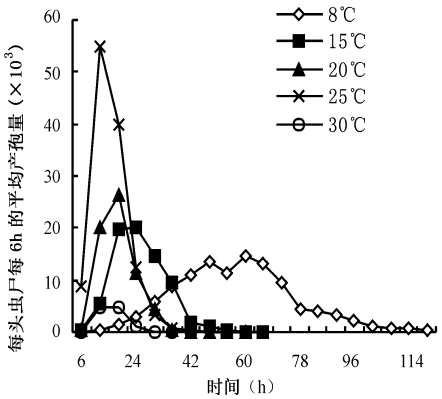


图 1　感染努利虫疠霉桃蚜虫尸在不同温度下的产孢

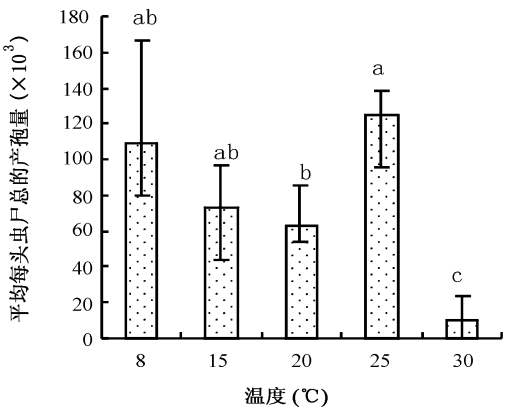


图 2　不同温度下感染努利虫疠霉的桃蚜虫尸产孢量(不同字母表示在 0.05 水平上存在显著性差异)

### 2.2　光照和湿度对产孢的影响

20 ℃下, 光照对产孢节律和产孢量($F_{(2, 12)}=0.157$, $P=0.857$)无明显影响, 但是光照可以轻微地刺激孢子的弹射速率(图 3)。虫尸在

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.n

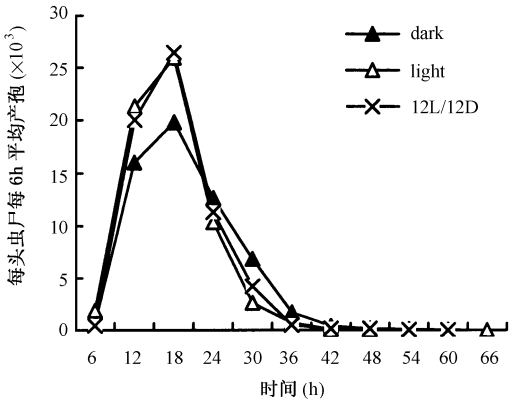


图 3 不同光照条件下桃蚜虫尸产孢情况

100%RH 条件下的产孢量个体之间差别较大，平均每个虫尸的产孢量为 13 397（2 011，30 154），其中有 2 头未能产孢，平均持续产孢时间为 96～120 h。可见，100%RH 不能满足努利虫疠霉正常产孢的湿度要求，产孢量显著地少于位于琼脂表面虫尸的产孢量（$F_{(1,10)}=17.57$，$P=0.002$）。97.5% RH 下，8 头虫尸中仅有 5 头可以产生少量孢子，平均每个虫尸的产孢量为 9 416（2 386，19 611）。RH 低于 95%时，虫尸不能弹射孢子，显微镜检查虫体表面发现有 6 头蚜虫尸体的表面有突出体壁的分生孢子梗；当 RH 低于 74%时，显微镜检查未发现蚜虫表面有分生孢子梗的存在，说明分生孢子梗穿透蚜虫体壁需要一定的湿度条件。

表 1 努利虫疠霉孢子在两种基物及不同湿度条件下的萌发情况（24 h）

| 相对湿度（%） | 基物类型和萌发率（%）（±*SE*） | |
|---|---|---|
| | 盖玻片 | 油菜叶片 |
| 51 | 0 | 0 |
| 74 | 0 | 9.39±2.72 |
| 90 | 0 | 71.65±10.33 |
| 95 | 0 | 88.11±5.00 |
| 100 | 0.85±0.36 | 94.55±1.20 |

## 2.3 孢子萌发

孢子在不同的基物类型（玻片和叶片）、温度、湿度等条件下的萌发率存在极显著性差异（$F_{(1,30)}=71.15$，$P<0.001$；$F_{(4,25)}=67.19$，$P<0.001$；$F_{(4,30)}=8.7$，$P<0.001$）。当 RH＞74%，附着于叶片上的孢子就可以萌发，萌发率随湿度升高而增大（表 1）。然而，在玻片上的孢子当 RH＜100%时不能萌发。15～25 ℃范围，24 h 后孢子在琼脂培养基平板上的萌发率大于 95%，在 8 ℃和 30 ℃条件下，萌发率分别为 45.23%和 61.74%，显著低于 15～25 ℃时的孢子萌发率。

## 3 讨论

本研究表明，努利虫疠霉有一个较宽的产孢温度范围，8～25 ℃范围内均可以产生大量的初生分生孢子。这与适宜 *Entomophthora thaxteriana*（Petch）Hall & Bell 产孢的温度范围[6,8]相似，但不同于 *Zoophthora phalloides* Batko[9]和 *Entomophthora planchoniana* Cornu[6,10]。研究结果与努利虫疠霉在田间桃蚜种群中发生与流行的特点相吻合。努利虫疠霉在春季早期较冷的阶段和夏季早期较温暖的阶段发生较为普遍，这期间田间感染该菌的桃蚜数量明显多于其他几种虫霉如新蚜虫疠霉[2,3]。

在 8～25 ℃范围，产孢所持续的时间随温度降低而延长，作者认为这种产孢模式是努利虫疠霉在环境压力下对蚜虫寄主种群数量变化的一种适应性反应。刘树生报道桃蚜可以在 5～29 ℃范围内生长发育，并且生殖力和生殖率会随着温度的升高而增大[10]。在温度较低的季节，桃蚜发育速率较慢，此时的蚜虫种群密度小，努利虫疠霉只有保持较长的产孢时间才能有更多的与寄主接触的机会，达到在寄主群体中成功传播的目的。温度高的季节，蚜虫密度大、繁殖快、种群数量多，在较短的时间内将孢子弹射出去，有利于接触到更多的寄主个体，提高传播扩散的效率。因而，随着温度的升高，努利虫疠霉产孢高峰期逐渐提前。

大多数前人的研究认为虫霉目真菌在 100%RH 条件下可以自由产孢[10,12]。然而，本研究表明 100%RH 不能满足感染努利虫疠霉的桃蚜虫尸完全产孢的要求，更高的湿度条件（如在本研究中由于水分不断从琼脂培养平板上挥发出来，固定在上面的蚜虫虫尸就可以获

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

取更高的湿度)十分必要。Butt 等研究了新蚜虫疠霉感染豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* Harris 的超微过程,认为虫霉目真菌在寄主死亡后从寄主体内长出的假囊状体具有协助真菌捕获水分的功能[13]。感染努利虫疠霉死亡的蚜虫虫尸体壁囊状体非常稀少[1,2],这或许可以在一定程度上解释本研究的实验结果。*Conidiobolus coronatus* (Costantin) Batko[14], *E. thaxteriana*[8] 和 *Entomophaga grylli* (Fresenius) Batko[12] 等虫霉菌孢子弹射有明显的光周期性,在光照期内弹射的孢子数量远大于黑暗期。但是,Glare 等研究发现在连续的黑暗或光照条件下,感染 *Z. phalloides* 的桃蚜虫尸的总产孢量和产孢节律均无显著性差异[9]。在对 *Entomophthora schizophorae* Keller & Wilding 的研究中得到相似的结论[15]。本研究表明,光照对努利虫疠霉的产孢无明显的影响。进一步证实了 Wilding 的观点,不同种类的病原真菌对光照的反应差异较大[8]。

一般认为虫霉目真菌孢子萌发要求饱和的相对湿度[16,17],但是作者认为孢子所附着的基物应予以充分考虑,因为不同性质的基物对孢子存活会产生显著的影响[15,16]。在叶片上的孢子,当 RH > 74%,孢子就可以萌发,而在玻片上即使 100% RH,也仅有少数的孢子萌发。并且,在 RH = 51%条件下,附着于叶片上的努利虫疠霉孢子放置 48 h,再转移到 100% RH 后仍有一部分孢子可以萌发。Griggs 等报道在无 2%水琼脂培养基包裹的玻片上 *Zoophthora radicans* (Brefeld) Batko 孢子很快死亡[18]。我们也发现将各个湿度条件下附着在玻片上的孢子,在 12 h 后转移到莎氏培养基上,萌发率不超过 1%,可以用于解释实验中附着在玻片上的孢子萌发率低的现象。

## 参 考 文 献


1 李增智. 中国真菌志第 13 卷(虫霉目). 北京: 科学出版社, 2000. 100~101.
2 王未名, 赵谨, 陆文华. 见: 中国虫生真菌研究与应用(第 1 卷). 北京: 学术期刊出版社, 1988. 153~155
3 李伟, 王秀芳, 李照会, 许维岸, 盛承发. 昆虫知识, 2004, **41**(4): 350~354.
4 李伟, 宜维健, 王红托, 盛承发, 苗长忠. 昆虫知识, 2005, **42**(1): 31~35.
5 Doberski J. W. *Compar. J. Invertebr. Pathol.*, 1981, **37**: 195~200
6 Milner R. J. *J. Invertebr. Pathol.*, 1981, **38**: 419~425.
7 SPSS Inc. Release 10.0 Version for Windows. 1999.
8 Wilding N. *J. Gen. Microbiol.*, 1971, **69**: 417~422
9 Glare T. R., Milner R. J., Chilvers G. A. *J. Invertebr. Pathol.*, 1986, **48**: 275~283
10 Yu Z., Nordin G. L., Brown G. C., Jackson D. M. *Environ. Entomol.*, 1995, **24**: 962~966.
11 刘树生. 昆虫学报, 1991, **4**(2): 189~197.
12 Pady S. M., Kramer C. L., Long D. L., McBride T. D. *Ann. Appl. Biol.*, 1971, **67**: 145~151.
13 Butt T. M., Beckett A., Wilding N. *Can. J. Bot.*, 1990, **68**: 2153~2163
14 Callaghan A. A. *Transac. Bri. Mycol. Soc.*, 1969, **53**: 87~97.
15 Kalsbeek V, Pell J. K., Steenberg T. *J. Invertebr. Pathol.*, 2001, **77**: 149~157.
16 Furlong M. J., Pell J. K. *J. Invertebr. Pathol.*, 1997, **69**: 223~233
17 Pell J. K., Eilenberg J., Hajek A. E., Steinkraus D. C. In: Butt T. M., Jackson C., Magan N. (eds.), Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential. CABI publishing. London, UK. 2001. 71~153
18 Griggs M. H., Vandenberg J. D., Sawyer A. J. *J. Invertebr. Pathol.*, 1999, **73**: 315~320


# 中华真地鳖雌虫产卵习性及其卵的发育*


金 涛[1,2**] 吴振廷[1] 唐庆峰[1] 王学林[1] 吴尚澧[3]

(1. 安徽农业大学植物保护学院 合肥 230036; 2. 华南农业大学资源环境学院 广州 510642;
3. 安徽亳州兴邦科技开发有限公司 亳州 236800)


**The female oviposition pattern and egg development of *Eupolyphaga sinensis*.** JIN Tao[1,2**], WU Zhen-Ting[1], TANG Qing-Feng[1], WANG Xue-Lin[1], WU Shang-Li[3] (1. *Department of Plant Protection, Anhui Agricultural University*, Hefei 230036, China; 2. *College of Resources and Environment, South China Agricultural University*,

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n