

使用不同营养液的琼脂法对豌豆蚜(*Acyrtosiphon pisum*)和蚕豆叶生物学特性的影响

李 杨

(遵义师范学院生物与农业科技学院, 贵州 遵义 563006)

摘 要:豌豆蚜不仅是重要的作物害虫,也是研究生物进化机制的理想材料。本研究使用豌豆蚜及其寄主蚕豆作为试验材料,对琼脂法效果进行评价。分别选择花宝、德沃多及明斯特三种营养液作为琼脂培养基基质,对蚕豆叶进行培养,结果发现使用花宝营养液的培养基对叶片生长促进效果最好。无论加入哪一种营养液,琼脂法饲养的豌豆蚜和用蚕豆苗饲养的相比,在寿命、发育时间、成虫尺寸以及繁殖力上没有显著性差异。因此,琼脂法可用于豌豆蚜的饲养实验。

关键词:豌豆蚜;蚕豆叶;饲养;生长

中图分类号:S433

文献标识码:A

文章编号:2096-5877(2023)01-0040-05

Effects of Leaf-Disc Method on the Biological Characteristics of *Acyrtosiphon pisum* and *Vicia faba* Leaf Using Different Nutrient Solutions

LI Yang

(College of Biology and Agriculture, Zunyi Normal University, Zunyi 563006, China)

Abstract: The pea aphid is not merely one of important pest on crops, but it is also an ideal material for studying biological evolution mechanisms due to its complex life cycle and multiple reproductive types. In this paper, evaluated the effectiveness of leaf-disc method using *Acyrtosiphon pisum* and its host plant *Vicia faba*, to bring about a great advance in research of control and evolution of *A. pisum*. The *V. faba* leaf was cultured in leaf-disc method with 3 different kinds of nutrient solutions (Hyponex, Dewoduo and Compo). It can be seen that Hyponex was the most suitable nutrient solution formula for *V. faba* leaf cultivation under this experimental condition. On the other hand, no significant difference was found in fecundity, longevity, body size and developmental time between leaf-disc method and *V. faba* seedling. Therefore, the present study suggests that leaf-disc method can be applied to rearing of pea aphid.

Key words: *Acyrtosiphon pisum*; *Vicia faba* leaf; Rearing; Growth

蚜虫是半翅目蚜总科昆虫的总称,目前世界上已知的种类约5000种。蚜虫寄主很广泛,包括蔬菜、果树、花卉、林木等,不仅能直接对寄主植物造成损伤,还能传播病毒病,造成产量和质量大幅下降^[1],在国内外分布均十分广泛。因此,豌豆蚜防治方法研究一直是当前世界许多国家一个基础理论和实际应用并重的重大课题。在蚜虫的相关试验中,目前主要是使用人工饲料法和活体植株法来进行饲养^[2-5]。

1908年Bogdanow用人工饲料成功饲养黑颊丽蝇(*Vomitoria Calliphora*)^[6]。1930年Hamilton用放置有人工饲料的膜对蚜虫进行饲养^[7]。1962年Mittler和Dadd研制石蜡膜系统,将配制好的人工饲料置于石蜡膜上,供蚜虫取食^[8],这一方法沿用至今。使用人工饲料成功连续繁殖多代桃蚜^[9]。人工饲料饲养蚜虫相对于传统活体植株饲养法的优点是节约饲料,便于观察蚜虫的行为活动等。但是缺点也是很突出的,通过人工饲料饲养的蚜虫,发育时间较长、个体小、繁殖率低。再加上人工饲料配制过程烦琐、成本高以及灭菌困难等问题,使得人工饲料研究进展缓慢。在室内通过活体植株来饲养的蚜虫,其状态最接近自然界的野生蚜虫。但是,活体植株的培育需要耗费大量时间,而且蚜虫时常会躲进植物茎叶的缝隙处,难以观察。

1981年Mliner发明Leaf-disc法(由于该方法

收稿日期:2020-04-23

基金项目:贵州省科技厅项目(黔科合J字LKZS[2014]21号);贵州省高层次留学人才创新创业择优资助项目(留学人才择优资助合同[2020]8号);遵义市优秀青年科技创新人才培养项目(遵优青科[2021]1号)

作者简介:李 杨(1985-),男,副教授,博士,从事农业有害生物防治研究。

使用琼脂为主要原料,所以本文称之为琼脂法)饲养蚜虫。主要步骤是按照一定配方配制好营养液,加入1%的琼脂,并将营养液加热至沸腾。放入容器内,当溶液冷却凝固之后,把植物叶片贴在培养基表面,接上蚜虫,并倒置^[10]。这一方法很大程度上方便了蚜虫饲养。

豌豆蚜(*Acyrtosiphon pisum*)原产于欧洲南部,伴随着农业传播等一系列人类活动,分布范围日益扩大,现在几乎全世界的温带地区都有豌豆蚜虫的存在^[11]。豌豆蚜在我国分布十分广泛,它的主要寄主是豆科植物(豌豆、蚕豆、苜蓿等),每年对我国农业造成的损失十分巨大^[12],由于其具有复杂生活史及多样生殖方式,也是研究生物进化机制的理想材料,为更好地防治豌豆蚜,对其生态学特性进行系统而深入的研究是很有必要的,同时为了试验数据精准,好的试验方法是至关重要的,琼脂法虽然相对简便,但是原方法的营养液配制麻烦,目前国内外对其效果进行评价的研究并不多,本研究选择目前市面上较常见的几种营养液作为基质,以豌豆蚜及其寄主蚕豆作为试验材料,对蚕豆叶片生长及豌豆蚜的饲养效果进行评价,可为豌豆蚜的相关研究提供理论依据,并为其他类似研究提供方法借鉴。

1 材料与方 法

1.1 材 料

本试验用的蚜虫是2019年4月在贵州省遵义市播州区蚕豆植株上采集的豌豆蚜的1个克隆。

1.2 寄 主 植 物

本研究中使用的蚕豆苗和植株都是人工气候箱((20±1)℃、L:D=16:8、湿度50%~60%、光照强度5~7 W/m²)中种植的。使用的蚕豆叶片都是从生长期为11~14 d的蚕豆植株上采集的。

1.3 试 验 方 法

所有试验都在固定条件(同上)下进行。

1.3.1 琼脂培养基的制备

本试验使用直径12 cm,高5 cm的圆形透明塑料容器作为培养基容器,将营养液按照一定浓度配制好(本试验中所有营养液浓度皆为1 000倍),加入1%的琼脂粉,放入微波炉加热至沸腾。放置在磁力搅拌器上搅拌,当温度降至55℃后,将90 mL溶液倒入准备好的容器中,在室温下冷却凝固。之后将蚕豆叶片正面贴到琼脂表面备用。

1.3.2 不同营养液对蚕豆叶片的影响

从蚕豆植株顶芽下部采集60片叶子,用消毒

剪刀裁剪成长×宽=3 cm×2 cm的长方形,随机分成5组,每组12片,其中1组作为对照放入烘干机中烘干,用分析天平测量干重,其他组用分析天平测量鲜重后,将叶片拍照导入电脑,用Image J测量叶面积^[13]。准备含有1 000倍花宝、德沃多、明斯特及蒸馏水的培养基各4个,每个培养基上放置3片剪好的叶子,移入人工气候箱培养。7 d后测量所有叶片的干重、鲜重以及面积。

1.3.3 不同营养液对豌豆蚜生长的影响

将15头1龄豌豆蚜幼虫(出生24 h内)放入载有1片蚕豆叶的培养基(溶液为1 000倍花宝溶液),作为第1代,在人工气候箱中饲养。每3天往培养基加一片新鲜蚕豆叶,记录发育至成虫时间,将成虫做成显微镜标本,拍照后将照片导入电脑,用Image J测量后足腿节和胫节长度之和。将第1代产出的1龄幼虫移到新培养基中作为第2代继续饲养,一直养到第3代,用同样方法测量第2代和第3代的发育时间及成虫后足腿节和胫节长度之和。分别将溶液更换成1 000倍德沃多和明斯特,再分别饲养1次(各处理重复15次)。

同时,将1头1龄豌豆蚜幼虫(出生24 h内)移到蚕豆苗(发芽后2~5 d)上作为第1代,在人工气候箱中饲养。变成成虫之后,记录发育时间,做成显微镜标本,用Image J测量后足腿节和胫节长度之和。将第1代产出的1龄幼虫移到新的蚕豆苗上作为第2代继续饲养,一直养到第3代,用同样方法测量第2代和第3代的发育时间以及成虫后足腿节和胫节长度之和(各处理重复15次)。比较使用不同营养液的琼脂法和蚕豆苗所饲养的豌豆蚜是否存在差异。

分别准备营养液为花宝、德沃多和明斯特1 000倍溶液的培养基以及蚕豆苗各1个,分别接上1龄幼虫1头,每隔3 d,给培养基添1片叶子,去除枯萎叶片,15 d更换1个培养基。用蚕豆苗饲养的每隔8 d更换一次苗。从成虫产子开始,每天记录新生幼虫数量,然后将幼虫去除,一直到成虫死亡,记录成虫寿命(各处理重复12次)。

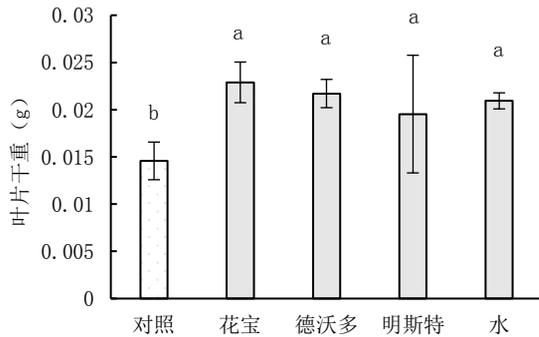
1.4 数 据 分 析

采用SPSS V22软件对相关数据进行单因素方差分析,采用Tukey-kramer test进行多重比较,采用R V3.62软件进行双因素方差分析。

2 结 果 与 分 析

2.1 不同营养液对蚕豆叶片干重的影响

7 d后各试验区的蚕豆叶干重结果见图1。单



注:不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),下同

图1 琼脂法对蚕豆叶片干重影响

因素方差分析发现,试验区之间具有显著性差异($F_{(4,59)}=12.44, P<0.001$)。通过 Tukey-kramer test 分析可知,用琼脂法培养的蚕豆叶,无论是水处理区还是各营养液处理区,其干重都显著大于对照(花宝-对照 $P<0.001$; 德沃多-对照 $P<0.001$; 明斯特-对照 $P=0.003$; 水-对照 $P<0.001$)。7 d后4种溶液间干重无显著性差异($P=0.086$)。也就是说琼脂法能让离体蚕豆叶继续“生长”。

2.2 不同营养液对蚕豆叶片鲜重的影响

使用单因素方差分析后发现,试验区间具有显著性差异($F_{(7,95)}=98.63, P<0.001$)。Tukey-kramer test 分析结果如图2所示,试验前所有试验区的叶片鲜重之间无显著性差异($P=0.947$)。7 d后花宝试验区的叶片鲜重值最大,为0.166 g,德沃多试验区和明斯特试验区的鲜重分别为0.158、0.156 g,两者间无显著性差异($P=0.966$),都显著大于水试验区的鲜重(德沃多-水 $P<0.001$; 明斯特-水 $P<0.001$)。也就是说,琼脂法在一定时间内能保持离体蚕豆叶片的鲜度,加入营养液比单纯用水效果更好,且花宝营养液效果最好。

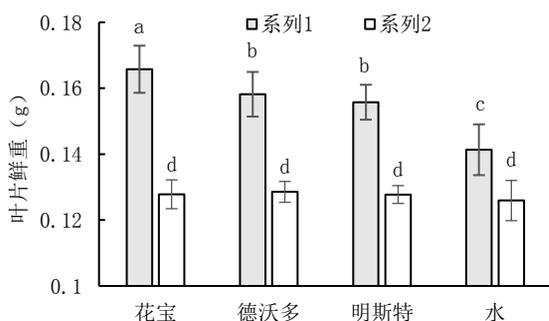


图2 琼脂法对蚕豆叶片鲜重的影响

2.3 不同营养液对蚕豆叶面积的影响

使用单因素方差分析后发现,试验区间具有显著性差异($F_{(7,95)}=103.48, P<0.001$)。Tukey-kramer test 分析结果如图3所示。在叶面积方面,

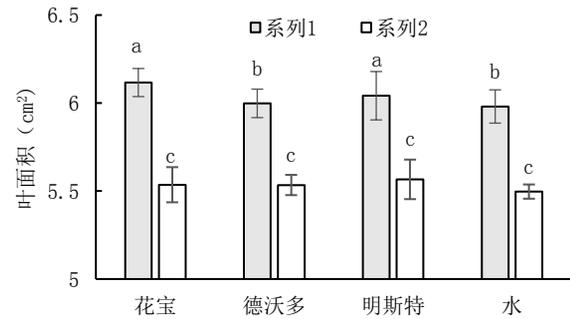


图3 琼脂法对蚕豆叶面积的影响

由于裁剪模板尺寸一样,所以各试验区的初始面积间无显著性差异($P=0.595$)。7 d后花宝试验区 and 明斯特试验区间无显著性差异($P=0.498$),分别为6.117、6.042 cm^2 ,花宝试验区的叶面积显著高于德沃多试验区和水试验区(花宝-德沃多 $P=0.046$; 花宝-水 $P=0.012$),后两者无显著性差异($P=0.735$)。不管哪个试验区,叶面积都比试验前有显著性增加(花宝 $P<0.001$; 德沃多 $P<0.001$; 明斯特 $P<0.001$; 水 $P<0.001$)。

2.4 琼脂法对豌豆蚜发育时间及成虫尺寸的影响

由双因素方差分析可知,在豌豆蚜从1龄到成虫的发育时间及成虫尺寸上,使用不同营养液的琼脂法和蚕豆苗饲养法间及世代间都无显著性差异。发育时间双因素为:方法和世代。方法: $F_{(3,168)}=0.56, P=0.64$; 世代: $F_{(2,168)}=2.07, P=0.13$; 方法和世代间的交互作用: $F_{(6,168)}=1.12, P=0.35$ 。后足长双因素为:方法和世代。方法: $F_{(3,168)}=1.03, P=0.38$; 世代: $F_{(2,168)}=2.11, P=0.12$; 方法和世代间的交互作用: $F_{(6,168)}=1.79, P=0.10$ 。各世代的后足长和发育时间见图4、图5。

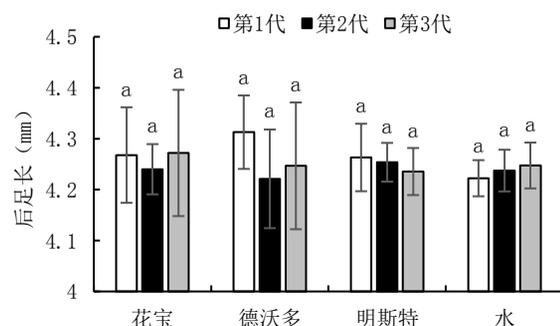


图4 琼脂法对豌豆蚜后足长的影响

2.5 琼脂法对豌豆蚜单雌产子量以及寿命的影响

单因素方差分析后发现,在产子数和寿命上各试验区间无显著性差异(产子数: $F_{(3,47)}=2.67, P=0.059$; 寿命: $F_{(3,47)}=1.39, P=0.258$)。各试验区的单雌产子数和寿命的结果见图6、图7。

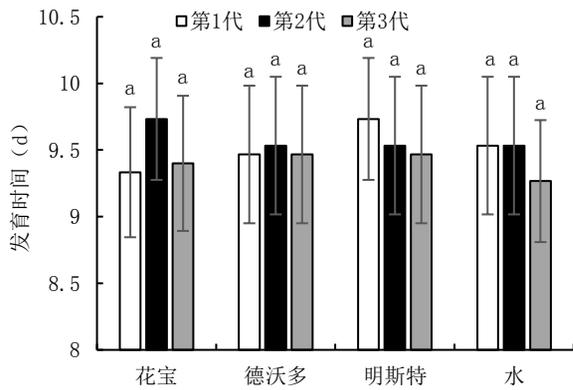


图5 琼脂法对豌豆蚜发育时间的影响

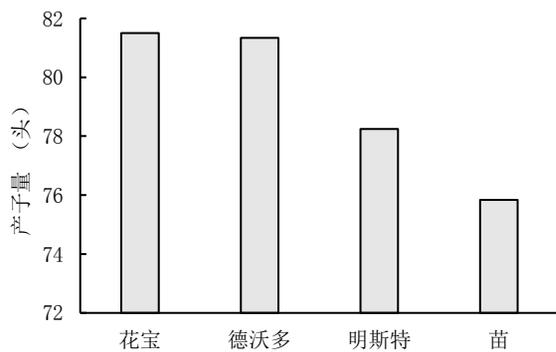


图6 琼脂法对豌豆蚜繁殖能力的影响

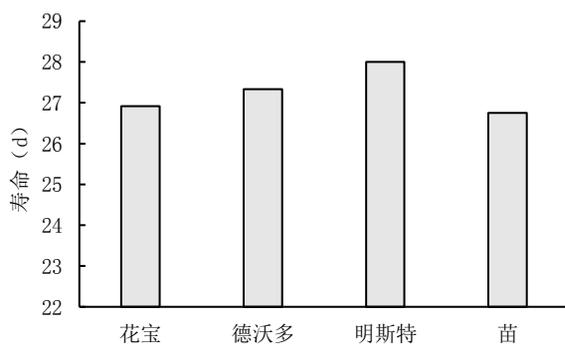


图7 琼脂法对豌豆蚜寿命的影响

3 讨论

本研究所使用的方法是对 Minler 发明的 Leaf-disc 法的改进,所需原材料便宜,入手难度低,且制作方法简单,通过大量饲养实验结果表明:在 20 °C 条件下,1 个培养基的使用时间可长达 15 d 左右。因此,本方法可大大提高相关试验效率。且本方法兼顾人工饲料法和活体植株饲养法的优点(例如:饲养方便,能提供昆虫所需的营养成分等),同时摒弃了它们各自的缺点(如:人工饲料制作麻烦,活体植株饲养时观察困难等)。可解决很多蚜虫相关试验的问题(例如个体数的精确定量,活体植株饲养蚜虫时的逃逸问题等),从而对蚜虫的行为活动以及个体数量进行准确的

观察和记录。除豌豆蚜,还有学者利用琼脂法进行其他蚜虫的相关试验^[14-15]。

在本研究中,将蚕豆叶放置在琼脂培养基上,无论是否加入营养液,7 d 后所有试验区的蚕豆叶的干重、鲜重以及叶面积都有显著增加。不同营养液对蚕豆叶片生长的影响有差异,花宝营养液无论在叶面积还是鲜重上,增加量都是最大的,也就是说在使用本方法进行饲养蚜虫时,推荐使用花宝营养液来进行试验。本研究结果表明:琼脂法能在一定时间内让蚕豆叶片保持存活,使其继续“生长”,导致这一现象的原因可能和叶片光合作用有关。叶片离开植株之后,维管束汁液供给停止,为什么离体叶片能给蚜虫提供营养,它又是如何给蚜虫提供营养物质的,在以后的工作中将继续探究。

在本研究中,使用不同供试营养液的培养基和蚕豆苗分别饲养豌豆蚜。结果发现,不同方法饲养的豌豆蚜成虫尺寸、发育时间、寿命及繁殖力都无显著性差异,也就是说使用琼脂法饲养的豌豆蚜虫在生物学特征方面和普通蚕豆植株饲养并无显著差异,该方法没有产生引起豌豆蚜发育时间和产子量变化的现象。有报道称,离体植物对昆虫的防御力会减弱,使得昆虫更容易取食^[16]。因此,使用本方法后,豌豆蚜内在的生化特性方面是否会产生差异将在以后的工作中继续研究。本试验中以豌豆蚜的寄主之一蚕豆作为研究对象,其他寄主植物,如:红车轴草、苜蓿、豌豆等是否也是一样的结果还不得而知,这也是在以后工作中的一项重要任务。

参考文献:

- [1] Philippe G, Laurence B, Christine R, et al. Compatible plant-aphid interactions: How aphids manipulate plant responses interactions compatibles plantes-pucerons: comment les pucerons manipulent les réponses des plantes[J]. Comptes Rendus Biologies, 2010, 333(6-7): 516-523.
- [2] 唐仕娟,苗金贝,陈艳琳,等.齐墩果酸对豌豆蚜生长发育及繁殖的影响[J].草业科学,2019,36(10):2667-2674.
- [3] 张廷伟,陈万斌,刘长仲,等.光周期对红色型豌豆蚜性蚜分化的诱导[J].生态学杂志,2017,36(10):2874-2879.
- [4] 杨振宇,闫日红,王曙明,等.美国引进(PI)大豆抗蚜资源的抗性评价[J].东北农业科学,2017,42(2):14-16.
- [5] 国淑梅,牛贞福,张凯,等.45%烯肟·苯醚·噻虫嗪悬浮种衣剂对冬小麦主要病虫害田间防效研究[J].东北农业科学,2016,41(6):82-85.
- [6] Bogdanow E A. About the dependence of the growth of larvae of bacteria and enzymes and about variability and inheritance in the flesh flies[J]. Archives of Anatomy and Physiology, 1908

- (Supplement): 173-200.
- [7] Hamilton M A. Notes on the culturing of insects for virus work [J]. *Annals of Applied Biology*, 1930, 17(3): 487-492.
- [8] Mittler T E, Dadd R H. Artificial feeding and rearing of the aphid, *Myzus persicae* (Sulzer), on a completely defined synthetic diet[J]. *Nature*, 1962, 195(7): 404.
- [9] Vanemden H F, Bashford M A. The effect of leaf excision on the performance of *Myzus persicae* and *Brevicoryne brassicae* in relation to the nutrient treatment of the plants[J]. *Physiological Entomology*, 1976, 1(1): 67-71.
- [10] Milner R J. A modified leaf disc method for rearing aphids[J]. *Australian Invertebrate Pathology Newsletter*, 1981, 2(2): 45-46.
- [11] 武德功, 贺春贵, 刘长仲, 等. 不同苜蓿品种对豌豆蚜的生化抗性机制[J]. *草地学报*, 2011, 19(3): 497-501.
- [12] 吕 宁, 刘长仲. 不同抗生素对豌豆蚜生物学特性的影响[J]. *中国生态农业学报*, 2014, 22(2): 208-216.
- [13] Abràmoff M D, Magalhães P J, Ram S J. Image processing with ImageJ[J]. *Biophotonics International*, 2004(11): 36-42.
- [14] 李伟伟, 安广池, 乔格侠, 等. 青檀新害虫—青檀绵叶蚜(半翅目: 蚜科)的生物学特性[J]. *林业科学*, 2015, 51(8): 127-133.
- [15] Chen F J, Wu G, Ce F. Impacts of elevated CO₂ on the growth, development and reproduction of cotton aphid *Aphis gossypii* (Glover)[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(10): 2601-2606.
- [16] Num K J, Hardie J. Reproduction and probing behaviour of the birdcherry-oat aphid *Rhopalosiphum padi* on detached leaves and leaves on intact seedlings of the winter host, bird cherry *prunus padus*[J]. *Physiological Entomology*, 2012, 37(2): 196-200.

(责任编辑: 王 昱)

(上接第 18 页)应以白壳小薏苡为主, 经过多次鉴定找到具有抗黑穗病能力, 更适合当地种植的品种; 也可以作为亲本, 选育新品种。但白壳大薏苡和黑壳薏苡也有自身的优势, 生物产量大, 可以用来选育饲用薏苡种质。

4 结 论

本研究对从农户家中直接收集的 10 份薏苡种质资源的生育期、3 个形态性状、4 个产量性状进行分析, Shannon wiener 指数变化较大, 说明这些种质资源遗传多样性丰富。通过对 10 份种质的鉴定, 发现黑壳薏苡虽然产量较高, 但是其外壳较厚, 整体出仁率不高, 生育期长; 白壳大薏苡产量高, 容易倒伏, 遇到阴雨天气容易减产, 甚至绝收。相比之下, 白壳小薏苡主茎矮, 分蘖多, 具有一定抗黑穗病能力, 尤其是白壳小薏苡 2(壳硬)的整体产量较高, 更适合本地区种植, 可作为亲本选育良种。

参考文献:

- [1] 刘春兰, 周宜君, 周恒彦, 等. 薏苡的开发和利用[J]. *中央民族大学学报(自然科学版)*, 2001, 10(2): 182-185.
- [2] 赵晓明. 薏苡[M]. 北京: 中国林业出版社, 2000: 59-62.
- [3] 杨丽娟, 张继武, 梁晓艳. 中国薏苡种质资源研究进展[J]. *黑龙江八一农垦大学学报*, 2015(5): 66-68.
- [4] 金月龄, 张 鹏, 冯明友, 等. 薏苡品种安薏 1 号的选育及栽培技术[J]. *中国种业*, 2017(3): 66-67.
- [5] 沈宇峰, 沈晓霞, 俞旭平, 等. 薏苡新品种“浙薏 1 号”的特
- 征及栽培技术[J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(3): 738-739.
- [6] 孙 健, 沈晓霞, 沈宇峰, 等. 薏苡新品种“浙薏 2 号”的选育和品质分析[J]. *中国现代中药*, 2017, 19(3): 332-336.
- [7] 雷春旺. 薏苡新品种“翠薏 1 号”特征特性及烟后高产栽培技术[J]. *福建农业科技*, 2014, 45(9): 34-36.
- [8] 刘武仁, 边少锋, 郑金玉, 等. 玉米秸秆还田方法试验研究初报[J]. *吉林农业科学*, 2002, 27(6): 38-40.
- [9] 李万良, 刘武仁. 玉米秸秆还田技术研究现状及发展趋势[J]. *吉林农业科学*, 2007, 32(3): 32-34.
- [10] 张春兰, 张国兵, 汪 灿, 等. 贵州薏苡主要病虫害的发生特点及防治方法[J]. *农技服务*, 2018, 35(2): 93-94, 98.
- [11] 杨志清, 农明英, 高尚洪, 等. 不同薏苡品种(系)生产力水平分析[J]. *中国农学通报*, 2015, 31(3): 133-138.
- [12] 叶贵凯, 王忠平, 陈建祥, 等. 黔东南地区薏苡引进品种(系)比较试验[J]. *湖南农业科学*, 2015(4): 4-6.
- [13] 周明强, 杨成龙, 班秀文, 等. 基于 SSR 分子标记的 8 个薏苡新材料鉴定与品种比较试验[J]. *中国农学通报*, 2018, 34(31): 27-31.
- [14] 石 明, 李祥栋, 秦礼康. 薏苡种质资源描述规范和数据标准[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017: 24-38.
- [15] 王 萍, 李秀芬, 姜丽霞, 等. 气候变化背景下黑龙江省主栽作物稳产类型区划[J]. *东北农业科学*, 2019, 44(4): 85-88.
- [16] 田 稼, 郑殿升. 中国作物遗传资源[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994: 312-315.
- [17] 杜家会, 李家锐, 郭银萍, 等. 贵州黔西南薏苡产业化发展的现状、存在问题与改进对策建议[J]. *东北农业科学*, 2018, 43(2): 49-53.
- [18] 李春花, 王艳青, 卢文洁, 等. 云南薏苡种质资源农艺性状的主成分和聚类分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2015, 16(2): 277-281.

(责任编辑: 王 昱)