

不同发酵条件对瓜类细菌性果斑病菌感染西瓜种子的影响

徐秀兰^{1*}, 芦钰¹, 赵子婧², 吴萍¹, 宋顺华¹, 官国义¹, 张海军¹

(1. 北京市农林科学院蔬菜研究中心, 农业部华北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 农业部都市农业(北方)重点实验室, 北京 100097; 2. 中国农业大学植物保护学院, 北京 100193)

摘要 西(甜)瓜果斑病是西瓜嗜酸菌 *Acidovorax citrulli* 侵染瓜类作物引起的典型细菌病害, 种子带菌是该病最重要的传播方式, 防止种子感染是病害预防的首要环节。本研究分析了西瓜种子不同发酵条件对种子感染病菌的影响。研究通过人工接种西瓜发酵液, 设置发酵温度为 20℃ 和 30℃, 检测在不同发酵时间下发酵液 pH、*A. citrulli* 菌量、种子外部带菌量、种子内部带菌率, 以及出苗发病率, 系统地分析比较发酵条件对西瓜嗜酸菌侵染种子的影响。结果表明: 从开始发酵到发酵 24 h, 发酵液中 *A. citrulli* 菌量快速增长并达到峰值 10^{11} cfu/mL, 随后逐渐减少; 发酵 24 h 的种子外部带菌量最高, 达到 4×10^9 cfu/mL; 发酵过程中 *A. citrulli* 可侵染种皮内部(10%)及种仁(1%); 发酵温度对种子感染 *A. citrulli* 及幼苗发病率的影响不显著; 此外, 发酵液菌量与 pH 相关性显著。以上研究结果表明: 控制发酵温度并不能够减少 *A. citrulli* 菌的种子感染, 减少发酵时间才是减少病菌增殖感染种子的防控关键。

关键词 西瓜嗜酸菌; 种子感染; 发酵

中图分类号: S 436.5 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017424

Effects of different fermentation conditions on *Acidovorax citrulli* infestation of watermelon seeds

XU Xiulan¹, LU Yu¹, ZHAO Zijong², WU Ping¹, SONG Shunhua¹, GONG Guoyi¹, ZHANG Haijun¹

(1. Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, National Engineering Research Center for Vegetables, Beijing Key Laboratory of Vegetable Germplasm Improvement, Beijing 100097, China; 2. College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract *Acidovorax citrulli*, a typical seed-borne bacterial pathogen, can infect many cucurbitaceous crops. Preventing seed infestation plays the first key role in disease management. This study analyzed the effects of fermentation conditions on *A. citrulli* infestation of watermelon seeds. Watermelon seeds were fermented under two temperatures (20℃, 30℃) in inoculated watermelon fermentation liquid. The fermentation liquid sample and seed sample were taken at different fermentation time points for the measurement of pH, bacterial cell density in the fermentation liquid, and detection of external/internal seed infestation, as well as the evaluation of seedling disease incidence. The effects of fermentation conditions on watermelon seed infestation by *A. citrulli* were systematically compared and analyzed. The results showed that *A. citrulli* in fermentation liquid proliferated rapidly and cell density reached the peak of 10^{11} cfu/mL at the first 24 h of fermentation, and then declined gradually. The maximum amount of *A. citrulli* on the exterior of seeds fermented for 24 h was 4×10^9 cfu/mL, and infestation of the interior of the seed coat (10%) and embryo (1%) were also observed in 24 h. However, fermentation temperature affected neither the seed infestation of *A. citrulli* significantly, nor the seedling disease incidence. Additionally, the bacterial amount was significantly correlated with pH value in the fermentation liquid. The present study indicated that controlling fermentation temperature could not reduce the seed infestation of *A. citrulli*. The reduction of fermentation time is a key factor for inhibiting bacterial cell growth and preventing seed infestation.

Key words *Acidovorax citrulli*; seed infestation; fermentation

收稿日期: 2017-11-06

修订日期: 2017-12-24

基金项目: 国家自然科学基金(31401704); 北京市科技新星计划(Z151100000315066); 北京市农林科学院科技创新团队建设(JNKST201621)

* 通信作者 E-mail: xuxiulan@nrcv.org

瓜类细菌性果斑病(bacterial fruit blotch, 也称果腐病)是由西瓜嗜酸菌 *Acidovorax citrulli* (曾命名 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*; *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*)引起的,可造成西甜瓜减产甚至绝收的毁灭性病害^[1-2]。病原菌 *A. citrulli* 还可侵染哈密瓜、南瓜、西葫芦、丝瓜、苦瓜、黄瓜等多种葫芦科作物^[3-4]。自 20 世纪 90 年代细菌性果斑病在美国的西瓜种植田大暴发以来,近 20 年该病在全球多个国家迅速传播。瓜类细菌性果斑病传播迅速,主要与 *A. citrulli* 通过种子传带(seed transmission)和日益频繁的国际种子贸易相关^[5]。目前果斑病在我国北京、山东、新疆、东北、江苏、海南等多个省市及地区均有危害,不仅给我国的西甜瓜生产造成严重的损失,也对西甜瓜制种业带来了很大冲击^[6]。

A. citrulli 可附着在种子表面,并可长期存活于种皮下外胚乳层。制种田田间病害监控、种子检测、种子处理是病害防控的首要环节。我国西瓜种子采收过程中,往往采用发酵方法脱去种子上连带的果胶,然而发酵过程对西瓜嗜酸菌的种子感染是否有影响还未见研究报道。本文主要通过控制不同的发酵时间和温度,研究果斑病菌在发酵过程中对西瓜种子的感染情况,揭示发酵时间和温度条件对种子带菌的影响,从而指导病害防控。

1 材料与方法

1.1 菌株培养

菌株: *Acidovorax citrulli* (编号: Xu 3-14) 分离自北京顺义西瓜发病幼苗, REP-PCR 分型为 I 型。菌株悬浮于 15% 甘油,保存在 -80℃ 冰箱中。菌株活化培养采用 PF 培养基(蛋白胨 20 g/L, 琼脂 15 g/L, 甘油 10 mL/L, 1 mol/L 磷酸氢二钾 14 mL/L, 1 mol/L 硫酸镁 24 mL/L), 于 28℃ 培养箱中培养 24~48 h。

1.2 西瓜种子发酵与接种

从制种田挑取健康成熟西瓜果实(品种: ‘京欣’), 果皮清洗消毒后, 纵切, 掏取种子, 放入灭菌的烧杯。每个烧杯放入 300 粒种子, 100 mL 西瓜汁。用摇培 24 h 的 *A. citrulli* Xu 3-14 配制菌液, 每个烧杯接种 Xu 3-14 菌液 1 mL, 其终浓度为 10^6 cfu/mL, 对照为不接菌的发酵液, 设置发酵培养温度分别为 20℃ 和 30℃, 4 个重复。烧杯放入摇床以 60 r/

min 低速发酵培养, 分别在发酵 12、24、36、48、60 h 时取样测量发酵液 pH, 并取 1 mL 发酵液进行梯度稀释, 涂布于 PF 培养基上进行分离培养, 检测 *A. citrulli* 菌量。分别在 24、48、60 h 时随机选取 100 粒种子, 冲洗 3 次, 室温自然晾干 48~72 h, 作为种子带菌检测的样本。

1.3 西瓜种子带菌检测

对不同发酵温度、不同发酵时间取出的种子进行种子带菌分析。分别检测种子外部和内部带菌量(分为种皮内部带菌率及种仁带菌率)。种子外部带菌量的检测方法: 将待检种子(50 粒/重复, 4 个重复)浸入 20 mL 磷酸钾缓冲液(80.2 mmol/L K_2HPO_4 , 19.2 mmol/L KH_2PO_4 , pH 7.4)中, 使用脉冲振荡样品前处理器(HKM shockmixer-1)以 93 次/s 速度振荡 15 s, 随后以 28℃, 120 r/min 条件摇培 4 h, 取出后再次剧烈振荡 15 s, 将浸提液转移到灭菌的 50 mL 离心管中, 8 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 将沉淀重新溶于 1 mL 灭菌水中, 作为原液。对原液进行梯度稀释, 分别吸取 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 稀释液各 100 μ L, 涂板于 PF 和半选择性培养基 mEBB 培养基上^[7-8]。28℃ 培养 3~5 d 后, 根据菌落形态挑选疑似菌落进行 PCR 鉴定。种子内部带菌率通过单粒检测进行测定, 共检测 100 粒种子: 对待检种子进行外部消毒(1% 次氯酸钠浸泡 5 min 后用灭菌蒸馏水冲洗 2 遍), 使用灭菌镊子将种皮与种仁分离、分别收集到 1.5 mL 离心管中, 加入 300 μ L 磷酸钾缓冲液, 利用旋涡振荡器充分振荡 15 s 后, 随后以 28℃, 120 r/min 条件摇培 4 h, 取出后再次剧烈振荡 15 s, 浸提液直接进行涂板及分子检测。*A. citrulli* 菌落在 PF 培养基上很小, 呈圆形, 淡黄色, 菌落表面光滑; 在 mEBB 培养基培养 3~4 d 后形成直径约为 1~2 mm 的菌落, 呈圆形, 培养 4~5 d 后, 菌落继续扩大并形成橄榄绿色的中心。菌落纯化经 PCR 确认, 并计数推算种子外部带菌量及种子内部带菌率。

1.4 西瓜出苗发病检测

对不同发酵温度下发酵不同时间的种子(50 粒/重复, 4 个重复)进行出苗检测。以灭菌的细沙为发芽基质, 25℃ 恒温条件培养 3 d 后, 继而在 25℃ 培养 8 h, 20℃ 培养 16 h, 保持培养箱湿度 > 70%。培养第 5 天起, 每天观察子叶是否有水浸状病斑出现, 出现症状后记录发病数量, 为避免在高湿条件下

幼苗之间的病害传播,及时将发病株取出进行荧光定量 PCR 检测确认。

1.5 培养菌落及病株的荧光定量 PCR 检测

将种子带菌检测分离培养到的典型菌落用无菌水制成 10^8 cfu/mL 菌液($OD_{600}=0.15$),放入 -20°C 冻融后取 $1\ \mu\text{L}$ 作为反应模板。另取发病苗病健交界部位组织,放入无菌水中研磨,振荡,取 $1\ \mu\text{L}$ 作为反应模板。以 *A. citrulli* Xu 3-14 为阳性对照,配制不同浓度梯度菌悬液作为 PCR 反应模板,以 C_q 值为 x 轴,荧光值为 y 轴绘制标准曲线。阴性对照为无菌水。荧光定量 PCR 引物和探针序列^[9]为 BOX-AACF: GCG TAT GAG TCC CG AAG AA AT; BOXAACR2: GCA TGC CTT GTA TTC AGC TAT; AAC probe: 6-FAM-CCG AAA TCC GTA TTG GAC GGA TCG AA-BHQ1。扩增体系为 $25\ \mu\text{L}$,包括: $2\times$ Probe Master Mix $12.5\ \mu\text{L}$; AAC probe ($20\ \mu\text{mol/L}$) $0.30\ \mu\text{L}$; BOXAACF ($20\ \mu\text{mol/L}$) $0.35\ \mu\text{L}$; BOXAACR2 ($20\ \mu\text{mol/L}$) $0.35\ \mu\text{L}$; 灭菌 H_2O $10.5\ \mu\text{L}$; 样品模板 $1\ \mu\text{L}$ 。反应扩增条件: 95°C 3 min; 95°C 15 s, 60°C 20 s, 40 个循环; 40°C 5 min。反应使用 Roche 罗氏 LightCycler[®] 480II 仪器进行,使用仪器配套软件进行数据分析。判定 $C_q\leq 35$ 为阳性样品, $C_q>35$ 为阴性样品。

1.6 试验设计与数据分析

整个试验重复 2 次。数据采用 SAS 8.1 和 Minitab 17 软件进行方差及相关性分析。

2 结果与分析

2.1 不同发酵条件下发酵液 pH 与 *A. citrulli* 菌量的变化

在西瓜发酵过程中,不同温度条件下(20°C , 30°C),发酵液的 pH 变化趋势一致。发酵液初始 pH 为 6.5,发酵 36 h 内 pH 迅速降低,而后降低趋于缓慢。然而低温条件下发酵液的 pH 显著高于高温条件下的发酵液。发酵 60 h,发酵液 pH 降低到 4.0(图 1)。不同温度条件下,发酵液中 *A. citrulli* 菌量变化则呈现先上升后下降的变化趋势,菌量均在发酵 24 h 后达到峰值 10^{10} cfu/mL,24 h 后菌量呈现下降趋势(图 2),发酵 60 h 菌量降低到 10^6 cfu/mL。不接菌的发酵液中未检测出 *A. citrulli*。

2.2 不同发酵条件下西瓜种子带菌检测结果

种子外部检测结果表明,随着发酵时间的延长,

不同温度条件下的种子外部带菌量均呈现逐渐下降趋势(表 1)。两个发酵温度下,发酵 24 h 的种子外部带菌量均达到了 10^8 cfu,而发酵 48 h 和 60 h 的种子外部带菌量均大幅下降,降到了 10^5 cfu 左右。然而种子内部的病菌感染率只有在 30°C 发酵温度下有显著增高。 20°C 发酵条件下种皮带菌率维持在 10% 左右。此外, 30°C 发酵条件下,随着发酵时间的延长种仁带菌率略有上升,两个温度条件下相比,24 h 种仁感染率较为接近,平均为 1.35%;而 48 h 时 30°C 下种仁带菌率显著增高到 5.5%, 20°C 条件下在 60 h 也接近 5%。根据梯度涂板稀释培养菌落数计算,内部种皮的平均带菌量为 1.2×10^3 cfu/粒,种仁的带菌量为 1.5×10^3 cfu/粒。不接菌发酵液对照种子未检测出 *A. citrulli*。

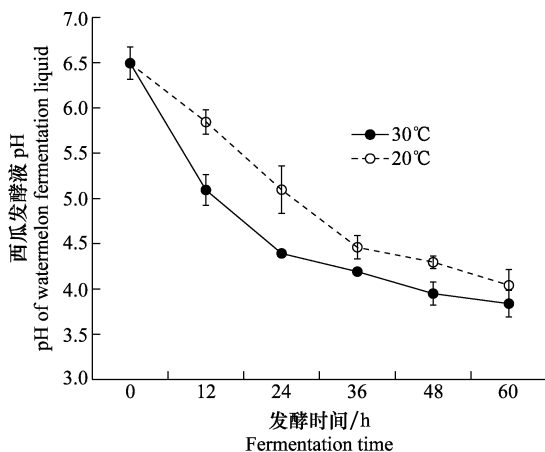


图 1 不同发酵温度条件下西瓜发酵液 pH 的动态变化
Fig. 1 Kinetic changes in pH values of the watermelon fermentation liquid in 60 hours under different temperatures

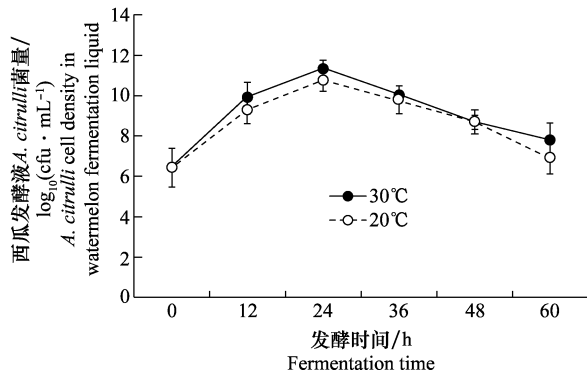


图 2 不同发酵温度条件下西瓜发酵液中 *Acidovorax citrulli* 菌量的动态变化

Fig. 2 The kinetic changes in the bacterial cell density of *Acidovorax citrulli* in watermelon fermentation liquid in 60 hours under different temperatures

表 1 不同发酵条件下的西瓜种子携带 *Acidovorax citrulli* 菌分析比较¹⁾

Table 1 Comparison of *Acidovorax citrulli* infestation in watermelon seeds under different fermentation conditions

发酵时间/h Fermentation time	种子外部带菌量/ $\log_{10}(\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1})$ Bacterial amount on the exterior of seeds		内部种皮感染率/% Infestation rate in the interior of seed coat		种仁感染率/% Embryo infestation rate	
	20℃	30℃	20℃	30℃	20℃	30℃
24	(8.6±0.3)a	(7.9±0.2)a	(10.8±3.6)a	(9.6±1.7)b	(1.4±0.9)a	(1.3±0.8)a
48	(7.7±0.1)b	(6.9±0.7)b	(13.2±4.1)a	(15.8±0.8)a	(1.4±0.9)a	(5.5±0.9)a
60	(4.6±0.3)c	(5.0±0.7)c	(10.3±1.6)a	(13.8±1.8)a	(4.8±2.5)a	(4.1±2.2)a

1) 同一列中具有相同字母的数值表示在 0.05 水平差异不显著。
Values followed with the same letter listed in the same column indicate no significant difference at 0.05 level.

2.3 不同发酵条件下西瓜种子的幼苗发病率

在不同发酵温度下发酵不同时间的种子出苗后均有不同程度的发病(图 3),但发病率差异不显著,均在 10%左右。20℃条件下,在同等发酵时间取出的种子发病率相较于 30℃略低。在 30℃条件下,发酵 48 h 后,种子发病率达到峰值,为 11.7%,而在 20℃条件下,种子发病率的最高值发生在发酵 60 h 后,为 10.1%。结果表明西瓜种子发酵过程中,发酵液混入微量 *A. citrulli* 菌情况下,会导致西瓜幼苗发病,发病率接近 10%。虽然 20℃条件下发病率略低,发酵温度对种子出苗发病率的影响并不显著。不接菌发酵液对照种子幼苗生长正常,无发病。

2.4 发酵条件与种子内外感菌程度的相关性分析

两次独立试验结果趋势一致,综合分析,发现西瓜种子发酵过程中发酵温度对于 *A. citrulli* 感染种子没有显著影响,而发酵时间对种子外部带菌量有

显著影响。发酵温度、时间对种子内部带菌和出苗发病率没有显著影响,温度与时间的互作也不显著(表 2)。

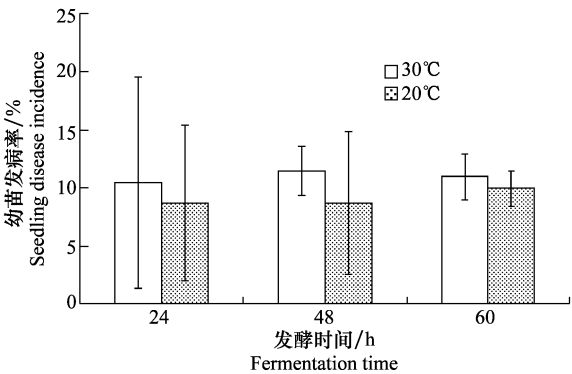


图 3 不同发酵时间、温度条件下收获的西瓜种子出苗发病率比较

Fig. 3 Disease incidence of watermelon seedlings germinated from the seed harvested under different fermentation times and temperatures

表 2 发酵温度和发酵时间对 *Acidovorax citrulli* 感染种子影响的显著性分析¹⁾

Table 2 Significance analysis of the effects of fermentation time and temperature on *Acidovorax citrulli* infestation in watermelon seeds

影响因素 Factor	P 值 P value			
	种子外部带菌量 Bacterial amount on the exterior of seed	种皮内部带菌率 Infestation rate in the interior of seed coat	种仁带菌率 Embryo infestation rate	出苗发病率 Seedling disease incidence
发酵温度	0.233 6	0.910 0	0.656 1	0.393 3
发酵时间	<0.000 1*	0.866 7	0.459 7	0.670 9
发酵时间×发酵温度	0.133 8	0.840 4	0.849 5	0.908 1

1) * 表示显著($P<0.05$)。
* indicates significant difference ($P<0.05$).

对发酵液 pH、发酵液菌量、种子外部带菌量、种子内部带菌率和出苗发病率各个指标之间的相关性进行分析,发现发酵液 pH、发酵液中的菌量和种子内部带菌量有显著相关性($P<0.05$)。其中发酵液 pH 与发酵液菌量的相关系数较高($R^2=0.843$,图 4),回归曲线显示发酵液 pH 偏低时(5.0~6.0)适宜 *A. citrulli* 生长,而 pH 低于 4.0 时 *A. citrulli* 生长有停滞消亡的趋势。

3 讨论

本研究首次比较系统地监测了不同温度条件下,西瓜发酵过程中发酵液中西瓜嗜酸菌的增殖动态,分析了不同发酵条件对种子感染病菌的影响。研究表明,发酵液中西瓜嗜酸菌迅速增殖,并在发酵 24 h 时可以侵染至种子内部种皮与种仁,发酵温度对 *A. citrulli* 侵染种子的影响不大。

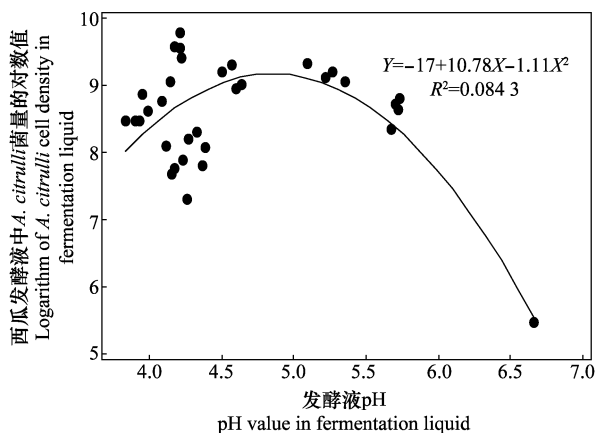


图4 发酵液 pH 与发酵液 *Acidovorax citrulli* 菌量的相关回归曲线

Fig. 4 Regression analysis between pH value and *Acidovorax citrulli* cell density in fermentation liquid

已有研究报道认为 *A. citrulli* 感染西瓜种子的途径有两类: (1) 发病果实引起种子带菌。Rane 和 Latin^[10] 发现田间自然发病与人工接种后表现症状的果实采收的种子种皮和内部胚可携带病菌, 而无症状表现的果实采收的种子则没有传带 *A. citrulli*。(2) 不发病潜伏感染的果实也可产生带菌的种子。近年来美国 Walcott 研究组发现: 温室条件下接种花的雌蕊柱头, 虽然果实不表现症状, 但果瓢和种子均带菌^[11-13]。通过以上研究推断通过雌花的柱头感染 *A. citrulli* 是田间产生无症状果实, 造成种子内部带菌, 引起病害流行的原因。然而值得注意的试验细节是花接种的浓度在 $10^7 \sim 10^9$ cfu/mL, 在田间无病害症状表现或病害大规模流行的情况下, 这样高浓度的菌量落到雌蕊的几率很小, 在这样的制种田采收到的带菌种子, 其实际感染源有待讨论。

然而西瓜种子除了在发育过程中会受到感染以外, 也有可能在采收和制种过程中受到感染。从西瓜果实取出果瓢和种子后, 一般经 24 ~ 48 h 发酵, 清洗, 干燥的过程。制种者将包裹着种子的瓜肉堆积, 通过发酵, 使西瓜果肉与种子彻底脱离, 便于种子的收集, 也有利于种子内部代谢, 便于种子萌发^[14]。然而西瓜采收过程中, 易混入土壤, 杂草或潜伏感染的果实。虽然 Hopskin 等^[15] 报道认为发酵使 pH 降低, 并不适合病原菌生存, 本项研究也发现发酵液的 pH 逐渐降低, 然而发酵前期 *A. citrulli* 快速繁殖, 大大增加了对健康西瓜种子的感染几率, 不仅是种子外部的附着, 也伴随着内部种皮与种仁

的侵染。发酵 24 h 后种皮内部带菌率 10%, 种仁带菌率 1%, 由此推测病菌通过气孔, 种脐进入种子内部。

现有种子处理方式, 无论物理方法或是化学方法, 主要针对种子外部携带真菌及细菌, 对于种子内部带菌目前没有十分有效的种子处理方法。发酵作为西瓜种子采收的步骤增加了细菌性果斑病的感染几率, 为了从初侵染源防控这一重要的检疫性病害的种子传带, 建议在发酵过程中使用果胶酶以缩短发酵时间, 或者加入适当的化学药剂杀菌。

参考文献

- [1] 赵廷昌, 孙福在, 王兵万. 西瓜细菌性果斑病研究进展[J]. 中国植保导刊, 2001, 21(3): 37-38.
- [2] WALCOTT R R, LANGSTON D B, SANDERS F H, et al. Natural outbreak of a bacterial fruit rot of cantaloupe in Georgia caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* [J]. Plant Disease, 2000, 84: 372.
- [3] HOPKINS D L, THOMPSON C M. Seed transmission of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in cucurbits [J]. HortScience, 2002, 37: 924-926.
- [4] 赵廷昌, 孙福在, 王兵万, 等. 哈密瓜细菌性果斑病原菌鉴定[J]. 植物病理学报, 2001, 31(4): 357-364.
- [5] BURDMAN S, WALCOTT R. *Acidovorax citrulli*: generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry[J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13: 805-815.
- [6] 许勇, 张兴平, 宫国义, 等. 细菌性果腐病与瓜类作物健康种子生产及检测技术(上)[J]. 中国西瓜甜瓜, 2003(6): 36-37.
- [7] SCHAAD N W, SECHLERX A. An improved semiselective agar medium for *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* [J]. Phytopathology, 1999, 89: S68.
- [8] FENG J, LI J, WALCOTT R R, et al. Advances in detection of *Acidovorax citrulli*, the causal agent of bacterial fruit blotch of cucurbits [J]. Seed Science and Technology, 2013, 41(1): 1-15.
- [9] HA Y, FESSEHAIE A, LING K S, et al. Simultaneous detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and *Didymella bryoniae* in cucurbit seedlots using magnetic capture hybridization and real-time polymerase chain reaction [J]. Phytopathology, 2009, 99: 666-678.
- [10] RANE K K, LATIN R X. Bacterial fruit blotch of watermelon: Association of the pathogen with seed[J]. Plant Disease, 1992, 76: 509-512.
- [11] WALCOTT R R, GITAITIS R D, CASTRO A C. Role of blossoms in watermelon seed infestation by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* [J]. Phytopathology, 2003, 93: 528-534.

- [11] 胡熙熹,肖铁光,徐舟,等. 异色瓢虫对取食转 Bt 基因棉花的扶桑绵粉蚧的捕食功能反应[J]. 作物研究, 2013, 27(3): 273-274.
- [12] 李伟,张艳峰,谢映平,等. 异色瓢虫对日本龟蜡蚧虫体挥发物的趋性反应[J]. 环境昆虫学报, 2016, 38(2): 329-336.
- [13] 盖英萍,冀宪领,刘玉升,等. 异色瓢虫对中国梨木虱若虫的捕食作用[J]. 植物保护学报, 2001, 28(3): 285-286.
- [14] 沈平,常承秀,朱惠英,等. 异色瓢虫成虫对槐豆木虱的捕食作用[J]. 植物保护, 2009, 35(1): 66-69.
- [15] 巫鹏翔,马宝旭,徐婧,等. 异色瓢虫成虫对枸杞木虱的捕食作用[J]. 植物保护学报, 2017, 44(4): 582-588.
- [16] 沈志成,胡萃,龚和. 取食雄蜂蛹粉对龟纹瓢虫和异色瓢虫卵黄发生的影响[J]. 昆虫学报, 1992, 35(3): 273-278.
- [17] ETTIFOURI M, FERRAN A. Influence of larval rearing diet on the intensive searching behaviour of *Harmonia axyridis* (Col.: Coccinellidae) larvae [J]. Entomophaga, 1993, 38(1): 51-59.
- [18] 郭建英,万方浩. 三种饲料对异色瓢虫和龟纹瓢虫的饲喂效果[J]. 中国生物防治, 2001, 17(3): 116-120.
- [19] 张帆,杨洪,张君明,等. 三种代饲料对异色瓢虫饲养效果评价[C]//成卓敏. 农业生物灾害预防与控制研究. 北京: 中国农业科技出版社, 2005.
- [20] SIGHINOLFI L, FEBVAY G, DINDO M L, et al. Biological and biochemical characteristics for quality control of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera, Coccinellidae) reared on a liver-based diet [J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2008, 68(1): 26-39.
- [21] 邓德嵩. 异色瓢虫人工饲料喂养和低温保存试验[J]. 昆虫知识, 1982, 19(4): 11-12.
- [22] NIJIMA K, NISHIMURA R, MATSUKA M. Nutritional studies of an aphidophagous coccinellid, *Harmonia axyridis*. III. Rearing of larvae using a chemically defined diet and fractions of drone honeybee powder [J]. Bulletin of the Faculty of Agriculture, Tamagawa University, 1997, 17(1): 45-51.
- [23] 杨洪,熊继文,张帆. 异色瓢虫人工饲料研究进展[J]. 山地农业生物学报, 2003, 22(2): 169-172.
- [24] 张岫,毛建军,曾凡荣. 非昆虫源人工饲料对异色瓢虫生物学特性的影响[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(1): 35-40.
- [25] BERKVEN N, BONTE J, BERKVEN D, et al. Influence of diet and photoperiod on development and reproduction of European populations of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) [J]. BioControl, 2008, 53(1): 211-221.
- [26] 张岩,秦秋菊,陈洁,等. 五种蚜虫对异色瓢虫生长发育和繁殖的影响[J]. 植物保护学报, 2008, 35(5): 394-398.
- [27] 张伟,何运转,黎丹,等. 光周期和食物对异色瓢虫生长发育的影响[J]. 河北农业大学学报, 2013, 36(1): 81-85.
- [28] SANTOS A A, ALMEIDA L M, CASTRO-GUEDES C F, et al. Life table analysis and consumption capacity for *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae), feeding on *Cinara atlantica* (Hemiptera: Aphididae) [J]. Florida Entomologist, 2014, 97(4): 1702-1709.
- [29] CASTRO-GUEDES C F, ALMEIDA L M, PENTEADO S R C, et al. Effect of different diets on biology, reproductive variables and life and fertility tables of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) [J]. Revista Brasileira De Entomologia, 2016, 60(3): 260-266.
- [30] 曾凡荣,陈红印. 天敌昆虫饲养系统工程[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2009: 18-31.
- [31] MCCORNACK B P, KOCH R L, RAGSDALE D W. A simple method for in-field sex determination of the multicolored Asian lady beetle *Harmonia axyridis* [J]. Journal of Insect Science, 2007, 7(10): 1-12.
- [32] 赵志模,周新远. 生态学引论[M]. 重庆: 科学技术文献出版社, 1984: 16-18.
- [33] 张昌荣,邹军锐,莫利锋. 四种猎物对南方小花蝽生长发育和繁殖的影响[J]. 生态学报, 2012, 32(18): 5646-5652.
- [34] ZHANG S Z, ZHANG F, HUA B Z. Suitability of various prey types for the development of *Propylea japonica* (Coleoptera: Coccinellidae) [J]. European Journal of Entomology, 2007, 104(1): 149-152.
- [35] ZHANG S Z, LI J J, SHAN H W, et al. Influence of five aphid species on development and reproduction of *Propylea japonica* (Coleoptera: Coccinellidae) [J]. Biological Control, 2012, 62(3): 135-139.
- [36] TANG L D, WU J H, ALI S, et al. The influence of different aphid prey species on the biology and life table parameters of *Propylea japonica* [J]. Biocontrol Science and Technology, 2013, 23(6): 624-636.
- [37] OMKAR, SRIVASTAVA S. Influence of six aphid prey species on development and reproduction of a ladybird beetle, *Coccinella septempunctata* [J]. Biocontrol, 2003, 48(4): 379-393.
- [38] 唐良德,李飞,赵海燕,等. 六斑月瓢虫取食不同猎物的生长发育及繁殖特性[J]. 生态学报, 2017, 37(17): 5765-5770.

(责任编辑:田 喆)

(上接 64 页)

- [12] LESSL J T, FESSEHAIE A, WALCOTT R R. Colonization of female watermelon blossoms by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and the relationship between blossom inoculum dosage and seed infestation [J]. Journal of Phytopathology, 2007, 155: 114-121.
- [13] DUTTA B, AVCI U, HAHN M G, et al. Location of *Acidovorax citrulli* in infested watermelon seeds is influenced by the pathway of bacterial invasion [J]. Phytopathology, 2012, 102: 461-468.
- [14] 周建生,默瑞宏,陈增军. 杂交西瓜种子采收方法及注意事项[J]. 河北农业科技, 2004(4): 19.
- [15] HOPKINS D L, THOMPSON C M, HILGREN J, et al. Wet seed treatment with peroxyacetic acid for the control of bacterial fruit blotch and other seedborne diseases of watermelon [J]. Plant Disease, 2003, 87: 1495-1499.

(责任编辑:田 喆)