

蜡蚧轮枝菌昆明菌株的生物学特性研究(一)

——温度对菌落生长、产孢量和分生孢子萌发率的影响

徐力文, 周天雄*, 耿瑞梅, 杨美林

(云南农业大学植物保护学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 蜡蚧轮枝菌昆明菌株 KM9803 菌丝生长、分生孢子产生和萌发的温度范围是 5~35℃, 适温范围是 15~30℃, 最适温度范围是 23~28℃, 最适温度 25℃。当温度 20~28℃ 时, 14 h 分生孢子萌发率为 98.6%~100%。在查彼克培养基(CzA)上, 20~28℃ 15 d 平均产孢量范围是 1.3×10^9 ~ 4.9×10^9 孢子/皿, 16 h 分生孢子萌发率 93.67%~100%。25℃ 最适于产孢。

关键词: 蜡蚧轮枝菌; 菌落; 分生孢子; 产孢量; 萌发率

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X(2006)01-0042-06

A Study of Biological Character of *Verticillium lecanii* KM9803 Strain Isolated from Kunming

XU Li-wen, ZHOU Tian-xiong, GENG Rui-mei, YANG Mei-lin

(College of Plant Protection, YAU, Kunming 650201, China)

Abstract: Strain KM9803 was an aphid-derived isolate of *Verticillium lecanii* (Zimm) Viegas from *Brassica oleracea* var *capitata* L. in greenhouse of Yunnan Agricultural University in 1998. Temperature of Mycelium growth, conidiospore production and germination of this isolate occurred between 5~35℃; The suitable temperature were between 15~30℃; The suitablest were between 23~28℃ and the optimal was 25℃ for it, growth, spore production and germination. The germination rate of conidiospore within 14 h was 98.6%~100% in 20~28℃. On CzA media, sporulation yield was ranging from 1.3×10^9 to 4.9×10^9 spores/dish in 15 days in 20~28℃, while 25℃ as optimal.

Key words: *Verticillium lecanii*; mycelium growth; conidia; yield; germination rate

蜡蚧轮枝菌(*Verticillium lecanii*)是一种丝孢纲的昆虫病原真菌,有的菌株还能寄生植物病原线虫和锈菌、白粉菌等植物病原真菌。该菌在世界上最早是 NEITNER 于 1861 年在锡兰咖啡蜡蚧(*Lecanii coffeae*)上首次发现。关于该菌的应用基础研究,以英国温室作物研究所 HALL R A 博士(1976~1985)开展较早,并于 20 世纪 80 年代初主持了该菌制剂商品化的研究。自 1981 年 HALL 开发的第一个 *V. lecanii* 杀蚜剂产品 Vertalec® 商品化以来,至今已有多个国家的 8 种以上的商品分别以 Ver-

talec, Mycotal, Thripta, Vertisol, AgroBiocontrol *Verticillium* 50, Verticon, Verticillin 和 Mycolab's *Verticillium lecanii* 等名称进行生产、销售,用于温室等场所的蚜虫、粉虱和蓟马等害虫防治。

1959 年,日本学者泽田兼吉在台湾以蜡蚧头孢霉为名首次在中国分离并报道了该菌。后来,浙江农业大学(1973)、河北农业大学(1975)、贵州农学院(1976)等单位分别从蚜虫、茶树上的角蜡蚧等昆虫上分离、报道了该菌,并进行了一些初步的应用研究。20 世纪 80 年代以后,国内对该菌的报道逐渐增多(岑

定浩,1983;陈吉棣,1984;王丽英,1988等)。

我国第一个对该菌进行比较系统的研究并引起人们关注的是贵州农学院的罗小刚。1988年,该作者即在《贵州农业科学》第1期上发表了“一种重要的昆虫病原真菌——蜡蚧轮枝菌 *V. lecanii*”一文。近年来,原中国科学院上海昆虫所和中国农业大学(李国霞等)、黑龙江农科院(王克勤、李新民等)、广东省林科院(殷凤鸣等)、广东省林业厅森防站(潘务耀等)、山西农业大学(张仙红等)和中国农业科学院生物防治研究所等单位对该菌的研究报道较多。目前,该菌在我国的研究应用进展已从实验室进入制剂和田间应用试验阶段。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

KM9803 菌株是 1989 年从云南农业大学植物保护学院大棚甘蓝上罹病蚜虫体上分离纯化而得。

1.2 KM9803 菌株的提纯复壮和保存

从大棚中罹病甘兰蚜(*Brevicoryne brassicae*)虫体上分离的菌株在马铃薯葡萄糖培养基(PDA)上用单孢分离提纯,接种到 PDA 斜面上,于 -6 ℃ 冰箱中保存,用前制成菌悬液,用甘蓝蚜复壮后,用 PDA 和 SEMA(牛奶蛋黄培养基)扩大培养。

1.3 KM9803 菌株的形态观察

1.3.1 显微观察

在灭菌的载玻片中央滴上经灭菌的 PDA 培养基,用经灭菌的盖玻片盖上,在盖玻片和载玻片间的培养基处接种蜡蚧轮枝菌(KM9803),让其沿培养基边沿向里生长。用显微镜观察,待其在盖玻片和载玻片间的培养基中长出菌丝、轮状孢子梗和孢子球时,置显微镜下进行摄影。同时,用扫描电镜对该菌的菌丝、孢子梗和分生孢子等结构部分进行观察和摄影。

1.3.2 菌落观察

将复壮后扩大培养的 KM9803 菌株用直径 10 mm 的打孔器在菌落边缘生长旺盛部位打取菌块,置灭菌后的 PDA 和 SEMA 平板中央,放入(25 ± 1)℃ 的温箱中培养,每菌株设 5 次重复,连续观察 30 d。

1.4 温度对菌落生长、产孢量、分生孢子萌发率和芽管生长的影响

1.4.1 温度对菌落生长和产孢量的影响

取冰箱中保存的菌种,置室温下活化后,用 1% 葡萄糖无菌水洗脱孢子,配成浓度为 1.0×10^8 个孢子/mL 的孢子悬浮液,在直径 9 cm 培养皿中

灭菌后的沙氏培养基(SDAY)平板上加上述孢子悬浮液 2 mL,摇荡均匀后,置(23 ± 1)℃,16 L:8 D 光照培养箱中培养 36 h 后用直径 10 mm 打孔器取培养基上菌落边沿生长旺盛的菌块,接入 9 cm 培养皿中灭菌后的查彼克(CzA)培养基中央,分别置于 5,10,15,20,23,25,28,30,33 和 35 ℃ 光照培养箱中,每个温度条件下 5 次重复,每天测量一次菌落直径,第 15 d 测定一次产孢量并测定孢子萌发率,所得结果进行统计分析。

1.4.2 温度对分生孢子萌发率的影响

用 1% 葡萄糖无菌水洗脱 23 ℃ 条件下在沙氏(SDAY)培养基上培养 7 d 的分生孢子,经 140 目筛过滤除去菌丝,用 1% 葡萄糖无菌水稀释成 1.0×10^6 孢子/mL 的孢子悬浮液。

取 5 mL 含蛋白胨 0.5%, 葡萄糖 2%, 琼脂 1.5%, 经灭菌后的培养基在直径 5 cm 培养皿中倒成平板,每皿用滴管加 1~2 滴(约 0.2 mL)孢子悬浮液,经震荡使孢子液在平板表面涂布均匀。倒置于 23 ℃,16 L:8 D 光照培养箱中,24 h 后在显微镜下观察计数 400~600 个孢子,以芽管长度超过孢子长度 1/2 为标准,记数孢子萌发率。

1.4.3 温度对分生孢子芽管生长的影响

如上法做好平板,滴上孢子悬浮液,分别倒置于 5,10,15,20,23,25,28,30,33,35 ℃ 的光照培养箱中,每温度条件设 3 次重复,24 h 内每隔 2 h 记数 1 次萌发率;每 4 h 测量 1 次芽管长度。

2 结果

2.1 KM9803 菌株形态

KM9803 菌株在马铃薯培养基(PDA)上菌落圆形,正面观白色,气生菌丝初期直立绒毛状,后期密絮状,边缘稀疏。菌落从中间向四周有不明显放射状皱折,培养后期菌落中部与边缘有明显凹环,菌落背面呈奶油黄色,无可溶性色素。该菌株在牛奶蛋黄培养基(SEMA)上菌落圆形,正面观白色,较 PDA 培养基上致密,边缘致密,中期从中间向四周有明显的放射状皱折。

对 KM9803 菌株的显微观察,除具有罗小刚及岑定浩所描述的共同特征外,还具有 3~5 根轮生气生菌丝,气生菌丝无色,有隔,分支。分生孢子梗基部膨大,向上变细,从梗的顶部长出分生孢子,聚结成球状。孢子成柱状或椭圆状,末端圆而对称,大小约为 2.0~4.0 μm 。

2.2 温度对 KM9803 菌株菌落生长和产孢量的影响

表 1 温度对 KM9803 菌株菌落生长和产孢量的影响

Tab. 1 The effect of temperature on colonial growth and spore yield of KM9803 isolate

温度/℃	15 d 菌落直径/ (mm ± SE)	菌落生长速率/ (mm · d⁻¹)	15 d 平均产孢量/ (分生孢子 · 盘⁻¹)	23 ℃孢子萌发率/%	
				16 h	24 h
5	9.90 ± 0.43 aA	0.66	4.425 × 10⁷ aA	69.44	93.11
10	21.23 ± 0.54 bB	0.75	5.625 × 10⁷ bB	74.73	95.95
15	31.30 ± 0.71 cC	1.42	2.880 × 10⁸ cC	89.69	100
20	46.23 ± 0.51 dD	2.42	1.288 × 10⁹ dD	93.67	100
23	53.26 ± 0.74 eE	3.55	3.824 × 10⁹ eE	100	—
25	56.73 ± 0.67 eE	3.78	4.879 × 10⁹ fF	100	—
28	55.40 ± 0.59 eE	3.69	4.053 × 10⁹ eE	100	—
30	31.00 ± 0.84 cC	1.40	5.988 × 10⁸ gG	100	—
33	17.55 ± 0.26 bB	1.17	4.624 × 10⁸ hH	77.82	91.78
35	9.24 ± 0.55 aA	0.62	3.800 × 10⁷ iI	11.93	23.22

注:表中数据后的英文字母相同表示差异不显著;大写字母表示 5% 水平的差异显著性;小写字母表示 1% 水平的差异显著性。

KM9803 菌株在 5 ~ 35 ℃ 范围内均能生长,在查彼克 (CzA) 培养基上 5 ~ 28 ℃ 生长速率随温度升高而加快 (0.66 ~ 3.67 mm/d); 30 ~ 35 ℃ 菌丝生长速度降低; 5 ℃ 和 35 ℃ 生长情况相似。生长适温范围 15 ~ 30 ℃; 最适温度 23 ~ 28 ℃。

该菌株在 5 ~ 35 ℃ 间均可产生分生孢子,但不同温度条件下产孢量差异显著。最适于产孢的温度与最适生长温区 (23 ~ 28 ℃) 相吻合,产孢量达 3.82×10^9 ~ 4.88×10^9 /皿。与生长速率相似的 10 ℃ 和 15 ℃ 相比,后者产孢量只有 5.63×10^7 ~ 2.88×10^8 /皿。可见,不同温度下的产孢量差异程度大于菌丝生长速率的差异程度。

尽管不同温度下菌落直径和产孢量有差异,但所产分生孢子在 (23 ± 1) ℃, 24 h 的萌发率除 35 ℃ 萌发率 23.22% 以外,其余温度条件下分生孢子萌发率都达到 90% 以上 (91.78 ~ 100%)。

2.3 温度对分生孢子萌发率的影响

用 1% 葡萄糖水配成的菌株分生孢子悬浮液在蛋白胨 - 葡萄糖 - 琼脂平板上进行萌发试验。其中分生孢子在 5 ~ 35 ℃ 条件下均能萌发,随时间延长萌发率增加。孢子萌发适宜温度 15 ~ 33 ℃; 15 ~ 30 ℃ 之间萌发率差异不大,仅萌发率达 90% 以上所需时间不同; 20 ~ 30 ℃ 之间孢子开始萌发的时间相近,都在 6 ~ 8 h。随后 10 h 内萌发率都剧增到 90% 以上,孢子萌发最适温度 23 ~ 28 ℃,从开始萌发 (6 h) 到萌发率达 94% 以上仅需 6 h

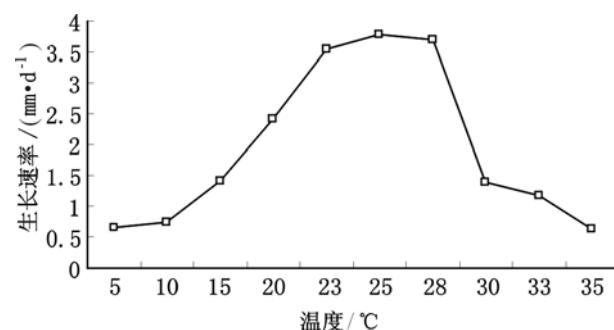


图 1 KM9803 菌株菌落生长速率随温度的变化情况

Fig. 1 The effect of temperature on colonial growth rate of KM9803 strain

(从第 6 到第 12 h); 在第 8 至第 12 h 间, 孢子萌发迅速、集中而整齐; 至第 14 ~ 16 h, 几乎全部的孢子都已萌发。35 ℃ 和 10 ℃ 条件下的萌发率相当, 都不到 10%; 33 ℃ 下经 24 h 萌发率可达 84.66%, 表明该菌株分生孢子萌发对温度有较好的适应能力, 但对 10 ℃ 以下和 35 ℃ 及更高气温适应力较差, 实际运用时适宜的环境温度范围是 15 ~ 33 ℃。

2.4 温度对分生孢子芽管生长的影响

表 3 结果显示, 温度在 20 ~ 30 ℃ 之间, 孢子萌发后芽管生长迅速。尽管萌发率差异不显著, 但 24 h 芽管长度极为悬殊; 15 ℃ 和 33 ℃ 条件下, 24 h 芽管长度仅相当于 20 ℃ 的 1/4 和 1/10; 20 ℃ 和 30 ℃ 下 24 h 芽管长度相近; 23 ℃ 和 28 ℃ 下 24 h 芽管长度也相近, 且芽管分枝发达, 测量困难; 25 ℃ 下

24 h 芽管长成的菌丝交织成网状,已不可测量。同时,还形成少量直立菌丝。15~33 ℃间,温度对芽

管生长的影响大于对萌发率的影响。

表2 不同温度下24 h 菌株分生孢子萌发率

Tab. 2 Conidial germination rate of KM9803 isolate in different temperature for 24 hour

时间 /h	累积萌发率/%									
	5 ℃	10 ℃	15 ℃	20 ℃	23 ℃	25 ℃	28 ℃	30 ℃	33 ℃	35 ℃
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0.77	0.84	4.88	3.61	2.23	0.59	0
8	0	0	1.53	3.76	9.67	27.31	36.89	7.80	4.95	0
10	0	0.49	3.76	10.6	63.5	29.96	76.51	33.64	6.09	0.7
12	0.13	0.83	5.17	47.98	94.32	96.65	94.44	53.26	9.72	0.97
14	1.26	1.72	7.01	91.35	98.64	98.76	99.82	55.79	11.06	4.79
16	2.64	4.75	36.00	96.90	99.43	100	100	90.59	18.11	6.82
18	2.98	5.03	74.07	99.23	100	100	100	93.20	42.91	6.97
20	3.71	6.88	87.59	100	100	100	100	97.97	54.18	7.24
22	4.08	7.29	95.93	100	100	100	100	100	74.46	7.49
24	5.37	9.01	98.82	100	100	100	100	100	84.66	9.51

表3 温度和时间对分生孢子芽管生长的影响

Tab. 3 Effect of temperature and time on conidiospore germ growth

温 度 /℃	芽管长度 ± SE/μm				
	8 h	12 h	16 h	20 h	24 h
5	—	—	1.87 ± 0.24	1.99 ± 0.31	2.52 ± 0.47
10	—	—	2.36 ± 0.72	3.01 ± 0.39	4.29 ± 1.2122.39
15	2.15 ± 0.23	6.13 ± 0.57	8.29 ± 0.97	10.77 ± 1.02	22.39 ± 1.97
20	3.41 ± 0.38	7.57 ± 1.47	22.47 ± 1.52	55.87 ± 4.60	97.35 ± 6.40
23	4.22 ± 0.62	11.44 ± 1.16	54.14 ± 3.97	121.67 ± 10.02	257.95 ± 21.34
25	8.81 ± 0.96	14.24 ± 1.52	104.46 ± 6.34	210.71 ± 13.75	难于测量
28	9.11 ± 1.00	10.98 ± 1.26	113.33 ± 5.52	178.44 ± 16.90	233.54 ± 19.53
30	2.59 ± 0.22	46.84 ± 0.76	18.55 ± 1.86	33.07 ± 2.73	104.42 ± 10.25
33	2.01 ± 0.23	3.18 ± 0.41	4.74 ± 0.59	5.67 ± 1.11	10.55 ± 1.77
35	—	2.01 ± 0.37	2.56 ± 0.54	2.98 ± 0.77	3.01 ± 0.93

2.5 显微镜下连续观察7 d 的菌落形态变化

该菌株在5~33 ℃间,培养7 d 均可产生分生孢子梗和孢子。不同温度下轮状孢子梗产生的时问、形态、梗的数量和孢子球的大小不同。15~30 ℃都可以产生轮状孢子梗和多孢子的孢子头,而以23~28 ℃菌丝密布、轮状孢子梗发达,孢子球大而多(最大直径16.5 μm)。35 ℃下孢子萌发率不超过15%。高温对菌丝生长影响不大,但显著影响孢子的形成;30 ℃和33 ℃下4 d,菌丝茂盛程度和孢子梗数与25 ℃和28 ℃下差异不显著,但孢子头数量和大小相差悬殊,孢子梗较粗短,梗上大多为单孢,有的无孢子,出现只长梗不长孢子的情况。

表明该菌株产孢的适宜温度是23~28 ℃。

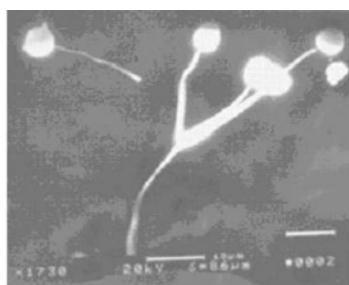
3 讨论

对蜡蚧轮枝菌昆明菌株KM9803生物学特性的研究结果表明,该菌株对温度的适应能力较强,孢子萌发、菌丝生长和孢子产生的温度范围是5~35 ℃,适温区15~30 ℃,最适温度范围23~28 ℃,最适温度25 ℃。在查彼克(CzA)培养基上25 ℃15 d产孢量达 4.879×10^9 分生孢子/皿,16 h孢子萌发率达100%。该菌株分生孢子在适温范围内萌发快而集中,有利于实际应用。环境不利时,能利用夜间短时适宜条件完成萌发侵染过程。

表 4 连续观察 7 d 的菌落形态

Tab. 4 The colonial morphologies after conidial germination for 7 days

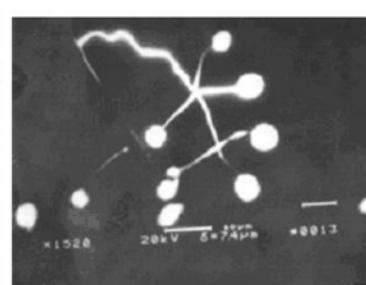
温度	1 d	1.5 d	2 d	4 d	5 d	6 d	7 d
5 °C	接种的分生孢子萌发率 5.37%, 芽管长度 (2.52 ± 0.47) μm	接种在 PDA 表面的分生孢子萌发率 13.31%, 芽管短小	接种在 PDA 表面的分生孢子萌发率 70.77%, 芽管短小	接种的分生孢子萌发率达 95% 以上, 芽管交织成网状	直立菌丝多, 芽管长度 30 μm 左右	未见孢子梗	出现少量单生孢子梗和孢子, 尚无轮状孢子梗
10 °C	接种的分生孢子萌发率 9.01%, 芽管长度 (4.29 ± 1.21) μm	接种的分生孢子萌发率达 90.74%, 芽管短小	接种的分生孢子全部萌发, 芽管长度达 26.05 ± 2.87 μm	分生孢子萌发长出分枝	菌落上长出直立菌丝	出现少量孢子梗和单孢, 未见轮状孢子梗	出现少量轮状孢子梗和多孢子头
15 °C	接种的分生孢子萌发率达 98.82%, 芽管长度达 (22.39 ± 1.97) μm	芽管形成分枝	分枝发达交织成网状	菌丝密布直立, 尚未见孢子梗	梗和多孢子, 孢子梗有少量达	轮状孢子梗发成轮状	菌落继续生长
20 °C	孢子全部萌发, 芽管出现分枝	出现直立菌丝, 尚无孢子梗	出现少量孢子梗和单孢	可见轮状孢子梗和多孢子头	轮状孢子梗且发达	菌落继续生长	孢子头直径 8.0 ~ 11.5 μm
23 °C	孢子全部萌发, 芽管分枝发达, 长度部分梗无孢子或为难于测量	出现轮状孢子梗, 部分梗无孢子或为单孢	轮状孢子梗发达, 明显出现多孢子团	菌落继续生长	菌落继续生长	菌落继续生长	孢子头直径 9.5 ~ 12.5 μm
25 °C	孢子全部萌发, 芽管分枝发达, 交织成网状并出现直立菌丝	开始出现孢子梗和少量单孢子	出现轮状分生孢子梗, 但较稀疏	论状分生孢子梗发达, 孢子头大而多	菌落继续生长	菌落继续生长	孢子头直径 8.5 ~ 11.5 μm
28 °C	孢子全部萌发, 芽管分枝发达, 难于测量	可见稀疏孢子梗 (极少量轮状) 和单孢	轮状孢子梗发达, 多孢子头多	孢子梗较 25°C 条件下稀疏, 孢子头也较小	菌落继续生长	菌落继续生长	孢子头直径 8.5 ~ 11.5 μm
30 °C	孢子全部萌发, 芽管长未见分枝	出现直立菌丝	直立菌丝密布, 孢子梗短, 有少量孢子	孢子梗较 28 °C 条件下稀疏, 孢子头也较小	菌落继续生长	孢子头直径 6.5 ~ 9.5 μm	孢子头直径 4.0 ~ 5.5 μm
33 °C	分生孢子萌发率 84.66%, 芽管长度 (10.55 ± 1.77) μm	芽管出现分枝	出现稀疏直立菌丝	出现大量孢子梗, 但未见轮状着生, 梗上无孢或有单孢	梗虽多, 但孢子头小	菌落继续生长	孢子头直径 4.0 ~ 5.5 μm



(1) 轮状孢子梗和孢子球(1730×)



(2) 分生孢子(2540×)



(3) 轮状孢子梗和孢子球(1520×)

图 2 蜡蚧轮枝菌昆明菌株 KM9803 的扫描电子显微镜照片

Fig. 2 Microphotographs of *Verticillium lecanii* KM9803 isolate under scanning electron microscopy

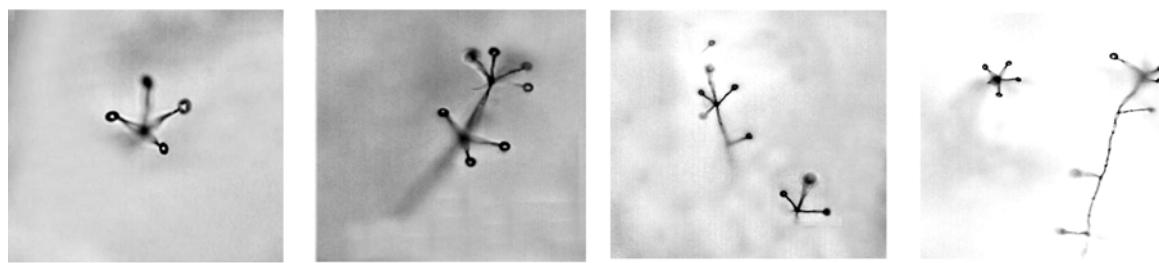


图3 光学显微镜下拍摄的照片(示轮状分生孢子梗和孢子球)

Fig. 3 Microphotographs of *Verticillium lecanii* KM9803 isolate under microscope, they showed Head of conidia and verticillate phialides (400 \times)

[参考文献]

- [1] 陈吉棣. 蜡蚧轮枝菌及其在生防中的应用[J]. 生物防治通报, 1985, 1(4): 32-37.
- [2] 王拱辰, 陈鸿達. 寄生于鞘锈菌头孢霉属一新变种和寄生蚜虫轮枝菌的研究[J]. 浙江农业大学学报, 1986, 12(3): 254-263.
- [3] 梁宗琦. 昆虫病原真菌的综合开发研究[A]. 中国虫生真菌研究与应用(第1卷)[C]. 北京: 学术期刊出版社, 1998.
- [4] 罗小刚. 一种重要的昆虫病原真菌——蜡蚧轮枝菌 *V. lecanii* [J]. 贵州农业学, 1988, (1): 57-64.
- [5] 罗小刚. 昆虫病原真菌(*V. lecanii*)的研究[J]. 贵州农学院丛刊, 1991, (1): 52-65.
- [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[J]. 生物防治通报, 1991, 7(3): 115-119.
- [7] 潘务耀, 叶燕华, 殷凤鸣, 等. 芽枝状枝孢霉和蜡蚧轮枝菌初报[J]. 森林病虫通讯, 1994, (1): 14-15.
- [8] 岑定浩. 蜡蚧轮枝菌的培养性状和田间发生规律[J]. 昆虫天敌, 1994, 16(1): 14-16.
- [9] 李国霞, 高希武, 刘青春, 等. 蜡蚧轮枝菌的发酵培养及其代谢产物对害虫毒杀作用的初步研究[J]. 北京农业大学学报, 1995, 21(4): 409-415.
- [10] 谢明, 邱卫亮, 万方浩. 温度对蜡蚧轮枝菌菌马菌株生长及产孢的影响[A]. 微生物农药及其产业化[C]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [11] 张仙红, 贺运春, 于桂风, 等. 昆虫病原真菌蜡蚧轮枝菌生物学特性初步研究[J]. 山西农业大学学报, 2000, 20(3): 221-224.
- [12] EASWARAMOORTH Y S, S JAYARAJ. The effect of temperature, PH, and media on the growth of the fungus *Cephalosporium lecanii* [J]. Invert Pathol, 1977, 29: 399-400.
- [13] FENG K C, LIU B L, TZENG Y W. *Verticillium lecanii* spore production in solid-state and liquid-state fermentations[J]. Bioprocess Engineering, 2000, 23(1): 25-29.
- [14] HALL R A. Effect of repeated subculturing on agar and passaging through an insect host on pathogenicity, morphology, and growth rate of *Verticillium lecanii* [J]. J. Invert. Pathol, 1980, 36: 216-222.
- [15] HIRT W H, TRILTSCH, H SERMANN. Growth and survivability of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* in the soil [A]. In Smith, P. H. (ed.). Proceedings, Fourth European Meeting on Microbial Control of Pests[C]. IOBC Working Group on Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes, Zurich, Switzerland, IOBC Bull, 1993. 226-229.
- [16] KHALIL S K, BARTOS J, TABORSKY V. Effect of temperature, PH of the medium and sugar in the germination of spores, development of mycelium and sporulation of the entomopathogenic fungus, *Verticillium lecanii* [J]. Agric. Trop. et Subtr., Univertitas Agriculture Praga, 1983, 16: 255-274.