



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115927006 A

(43) 申请公布日 2023.04.07

(21) 申请号 202211304128.8

A01N 63/30 (2020.01)

(22) 申请日 2022.10.24

A01P 7/04 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

GDMCC NO. 62643 2022.07.21

(71) 申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路  
483号

申请人 广东省林业科学研究院

(72) 发明人 王德森 何余容 邱华龙 师大霞

念晓歌 范敏 李群臣

(74) 专利代理机构 广州智斧知识产权代理事务

所(普通合伙) 44649

专利代理师 朱双

(51) Int. Cl.

C12N 1/14 (2006.01)

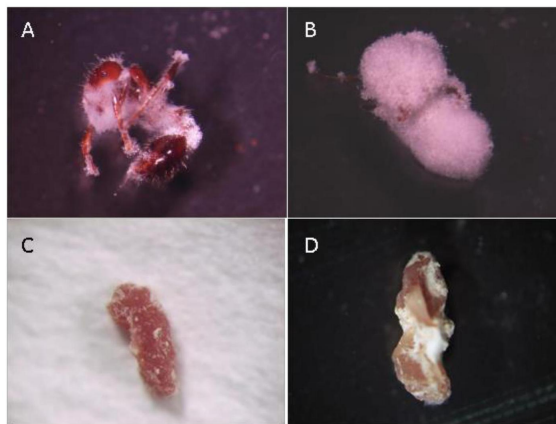
权利要求书1页 说明书8页  
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

一株球孢白僵菌及其在防治红火蚁中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一株球孢白僵菌及其在防治红火蚁中的应用。本发明从家白蚁体内分离得到一株虫生真菌菌株,通过形态和分子鉴定的方式确定为球孢白僵菌SCAU-BbFa01,其保藏编号为GDMCC NO.62643;并采用生物测定的方法评估了该菌株对不同品级红火蚁的毒性,发现该菌株具有高效感染红火蚁的特性,尤其对红火蚁幼虫和蛹感染效果显著;且在应用过程中具有无污染、无残留、生物环保等优点,在红火蚁绿色防控中应用前景良好。



1. 一株球孢白僵菌SCAU-BbFa01,其保藏编号为GDMCC NO.62643。
2. 权利要求1所述的球孢白僵菌SCAU-BbFa01在防治红火蚁中的应用。
3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,包括将权利要求1所述的球孢白僵菌SCAU-BbFa01或包含权利要求1所述的球孢白僵菌SCAU-BbFa01的培养物接触红火蚁虫体的步骤。
4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,所述的球孢白僵菌SCAU-BbFa01的培养物为球孢白僵菌SCAU-BbFa01的菌悬液,浓度为 $1 \times 10^4$ - $1 \times 10^8$ 个孢子/mL。
5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,包括将所述的球孢白僵菌SCAU-BbFa01的菌悬液喷施于红火蚁虫体的步骤。
6. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,包括将所述的球孢白僵菌SCAU-BbFa01的菌悬液拌入红火蚁生存环境土壤的步骤。
7. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,所述的红火蚁为红火蚁工蚁、幼虫或蛹。
8. 一种防治红火蚁的生防制剂,其特征在于,含有权利要求1所述的球孢白僵菌SCAU-BbFa01或包含权利要求1所述的球孢白僵菌SCAU-BbFa01的培养物。
9. 根据权利要求8所述的防治红火蚁的生防制剂,其特征在于,所述的生防制剂为球孢白僵菌SCAU-BbFa01的菌悬液,浓度为 $1 \times 10^4$ - $1 \times 10^8$ 个孢子/mL。

## 一株球孢白僵菌及其在防治红火蚁中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于微生物技术领域,具体涉及一株球孢白僵菌及其在防治红火蚁中的应用。

### 背景技术

[0002] 红火蚁是国际最具危险性入侵物种之一,1930年代以来侵入了北美洲、澳洲、亚洲等国家和地区,对农林业生产、人畜健康、生物多样性等造成严重威胁。自红火蚁2004年入侵我国以来,已在我国南方省区普遍发生。由于红火蚁扩散途径多,具有明显的种群竞争优势且繁殖力高,且在新入侵地没有天敌抑制,因此防治起来相当困难。目前对红火蚁的防治主要以化学防治为主,其不足之处是需要处理整个红火蚁危害区,否则红火蚁会再次入侵。由于使用化学药剂导致严重的“3R”问题,因此红火蚁生物防治方法受到了研究者的普遍重视。

[0003] 虫生真菌是红火蚁生存环境中的一个生物限制因子,利用虫生真菌是红火蚁生物防治的重要组成部分,而且具有可持续防治红火蚁的独特优势。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一株对红火蚁具有高致病力的球孢白僵菌,并利用其防治红火蚁。

[0005] 本发明从家白蚁体内分离得到一株对红火蚁具有高致病力的球孢白僵菌菌株SCAU- BbFa01。

[0006] 菌株SCAU-BbFa01的形态特征如下:

[0007] 菌株SCAU-BbFa01在PDA培养基上3-5d可以长出白色菌丝,菌落绒状,白色,中部隆起,第6d产生淡黄色粉末状孢子。稍后菌落变成淡黄色,背面黄色。分生孢子梗粗1-2  $\mu\text{m}$ ,产孢细胞簇生于菌丝、分生孢子梗或膨大的孢囊上,瓶形,颈部明显延长成粗1 $\mu\text{m}$ 、长达20 $\mu\text{m}$ 的产孢轴,轴上具有小齿突,呈“之”字形弯曲。分生孢子球形或近球形,透明光滑,2-3 $\times$ 2-2.5  $\mu\text{m}$ 。

[0008] 菌株SCAU-BbFa01的分子鉴定:

[0009] 以菌株SCAU-BbFa01基因组DNA为模板,采用真菌通用引物ITS1

[0010] (5' -TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')/ITS4(5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行菌株rDNA-ITS序列PCR扩增,并进行测序。然后将该序列在NCBI基因库进行同源性比对分析,发现该菌株属于Beauveria属。基于系统发育分析,发现菌株属于球孢白僵菌。结合菌株的形态特征及rDNA-ITS序列分析,确定目的菌株属于白僵菌(Beauveria)属,命名为 Beauveria bassiana SCAU-BbFa01(球孢白僵菌SCAU-BbFa01)。

[0011] 因此,本发明的第一个目的是提供一株球孢白僵菌SCAU-BbFa01,其保藏编号为GDMCC NO.62643。

[0012] 本发明还提供所述的球孢白僵菌SCAU-BbFa01在防治红火蚁中的应用。

[0013] 优选,所述的应用,包括将所述的球孢白僵菌SCAU-BbFa01或包含所述的球孢白僵菌 SCAU-BbFa01的培养物接触红火蚁虫体的步骤。

[0014] 优选,所述的球孢白僵菌SCAU-BbFa01的培养物为球孢白僵菌SCAU-BbFa01的菌悬液,浓度为 $1 \times 10^4$ - $1 \times 10^8$ 个孢子/mL。

[0015] 优选,所述的应用,包括将所述的球孢白僵菌SCAU-BbFa01的菌悬液喷施于红火蚁虫体的步骤。

[0016] 优选,所述的应用,包括将所述的球孢白僵菌SCAU-BbFa01的菌悬液拌入红火蚁生存环境土壤的步骤。

[0017] 优选,所述的红火蚁为红火蚁工蚁、幼虫或蛹。

[0018] 本发明还提供一种防治红火蚁的生防制剂,其含有所述的球孢白僵菌SCAU-BbFa01或包含所述的球孢白僵菌SCAU-BbFa01的培养物。

[0019] 优选,所述的生防制剂为球孢白僵菌SCAU-BbFa01的菌悬液,浓度为 $1 \times 10^4$ - $1 \times 10^8$ 个孢子/mL。

[0020] 本发明的*Beauveria bassiana* SCAU-BbFa01(球孢白僵菌SCAU-BbFa01)具有高效感染红火蚁的特性,尤其对红火蚁幼虫和蛹感染效果显著;且在应用过程中无污染、无残留、生物环保,是一株在虫生真菌领域应用前景良好的菌株。

[0021] 保藏说明:

[0022] 本发明的*Beauveria bassiana* SCAU-BbFa01(球孢白僵菌SCAU-BbFa01)于2022年07月21日保藏于广东省微生物菌种保藏中心(GDMCC),保藏编号:GDMCC NO.62643,保藏地址:广州市先烈中路100号大院59号楼5楼,广东省科学院微生物研究所。

## 附图说明

[0023] 图1是菌株SCAU-BbFa01在PDA培养基上的菌落形态、菌丝和分生孢子的形态;其中图A为菌株SCAU-BbFa01在PDA培养基上生长10d的菌落形态,图B为菌株SCAU-BbFa01在光学显微镜下的菌丝和分生孢子形态,图C为菌株SCAU-BbFa01分生孢子梗、产孢细胞和分生孢子的详细形态。

[0024] 图2是菌株SCAU-BbFa01基于rDNA-ITS序列的系统发育树;图中括号内为相应菌株在Genbank数据库中的编号。

[0025] 图3是菌株SCAU-BbFa01侵染红火蚁的形态图;其中图A为菌株SCAU-BbFa01侵染红火蚁工蚁6d的形态图,图B为菌株SCAU-BbFa01侵染红火蚁工蚁10d的形态图,图C为菌株SCAU-BbFa01侵染红火蚁幼虫3d的形态图,图D为菌株SCAU-BbFa01侵染红火蚁蛹3d的形态图。

[0026] 图4是不同浓度SCAU-BbFa01菌株处理红火蚁工蚁/幼虫和蛹的累计死亡率随时间变化的趋势;图A为孢子悬浮液处理下工蚁的累计死亡率;图B为孢子悬浮液处理下幼虫的累计死亡率;图C为孢子悬浮液处理下蛹的累计死亡率。

## 具体实施方式

[0027] 以下实施例是对本发明的进一步说明,而不是对本发明的限制。

[0028] 实施例1:菌株SCAU-BbFa01的种类鉴定

[0029] 在家白蚁体内分离到了一株虫生真菌(编号菌株SCAU-BbFa01),在实验室条件下采用形态和分子鉴定的方式对该菌株进行种类鉴定。

#### [0030] 一、实验方案

##### [0031] 1. 菌株特性测定采用的培养基制备方法

[0032] 将分离获得的菌株接种于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基(马铃薯200g/L、葡萄糖20g/L、琼脂20g/L、蒸馏水1000mL),并置于温度 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、光周期L:D=12h:12h、相对湿度 $80\pm 5\%$ 的恒温培养箱中培养。

##### [0033] 2. 形态鉴定

[0034] 依据魏景超编著的《真菌鉴定手册》,明确菌株形态特征。参照周德庆等人编著的《微生物学实验手册》(上海:科学技术出版社)中介绍的方法对菌株进行鉴定。

##### [0035] 3. 分子鉴定

[0036] 挑取少量单菌落,利用真菌试剂盒提取菌株的基因组DNA。以基因组DNA为模板,采用真菌通用引物:ITS1:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3',ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'进行rDNA-ITS序列PCR扩增,扩增体系为50 $\mu\text{L}$ ,含有 $2\times$ Pri-113 merSTAR<sup>®</sup>Max DNA 25 $\mu\text{L}$ 、正反向引物各2 $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 19 $\mu\text{L}$ 、DNA模板2 $\mu\text{L}$ ,最后用去离子灭菌超纯水调整反应总体积为50 $\mu\text{L}$ 。扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 5min;95 $^{\circ}\text{C}$ 30s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1min,35个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 5min。PCR扩增出目的片段,送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。随后将其序列经Chromas序列拼接软件校正,在NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)基因库进行同源性比对,采用MEGA7.0软件用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树,进行系统发育分析。

#### [0037] 二、实验结果

##### [0038] 1. 菌株的形态特征

[0039] 该菌株在PDA培养基上培养,25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,3-5d可以长出白色菌丝,菌落绒状,白色,中部隆起,第6d产生淡黄色粉末状孢子。稍后菌落变成淡黄色,背面黄色。菌株的培养特性为:生长温度范围为4 $^{\circ}\text{C}$ ~32 $^{\circ}\text{C}$ ,最适生长温度为25 $^{\circ}\text{C}$ -27 $^{\circ}\text{C}$ ;生长pH范围为5.0~8.0,在偏酸的环境下生长良好,最适生长pH范围为6.0~7.0;第10d菌落直径达到35.67mm,产孢量为 $5.56\times 10^7$ 分生孢子/mL(图1)。分生孢子梗粗1-2 $\mu\text{m}$ ,产孢细胞簇生于菌丝、分生孢子梗或膨大的孢囊上,瓶形,颈部明显延长成粗1 $\mu\text{m}$ 、长达20 $\mu\text{m}$ 的产孢轴,轴上具有小齿突,呈“之”字形弯曲。分生孢子球形或近球形,透明光滑,2-3 $\times$ 2-2.5 $\mu\text{m}$ 。

##### [0040] 2. 菌株的rDNA-ITS序列分析

[0041] 采用PCR扩增目的菌株的rDNA-ITS序列片段,测序结果显示扩增片段为534bp,核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0042] 将该序列在NCBI基因库进行BLAST比对,发现目的菌株ITS序列与已报道的多个球孢白僵菌菌株对应序列的相似性均达到99%以上。选取相关序列,通过MEGA7.0构建系统发育树(图2)。

[0043] 结合菌株的形态特征及rDNA-ITS序列分析,菌株SCAU-BbFa01被鉴定为球孢白僵菌(Beauveria bassiana),因此命名为Beauveria bassiana SCAU-BbFa01(球孢白僵菌SCAU-BbFa01),并将该菌于2022年07月21日保藏于广东省微生物菌种保藏中心(GDMCC),保藏编号:GDMCC NO.62643。

[0044] 实施例2:球孢白僵菌SCAU-BbFa01菌株对红火蚁的致病力测定

## [0045] 一、实验方案

## [0046] 1. 供试菌株的处理

[0047] 球孢白僵菌SCAU-BbFa01菌株,用PDA培养基培养,用甘油试管法保存分生孢子于华南农业大学昆虫生态实验室-80℃的超低温冰箱中。实验时取出活化,将球孢白僵菌SCAU-BbFa01菌株接于PDA平板,放入25±1℃、光照周期L:D=12h:12h、相对湿度80±5%的培养箱中,培养7d。待菌落产孢后,加入20mL 0.03%吐温-80无菌水,用接种针轻刮菌丝及孢子制成菌液。将菌液倒入200mL烧杯中,用磁力搅拌器搅拌30min。待孢子完全分散后,用双层医用纱布过滤菌液,获得孢子悬浮液,即供试母液,用血球计数器计数母液的孢子浓度,配制成 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 孢子/mL 5个供试浓度的孢子悬浮液。

## [0048] 2. 供试昆虫及处理

[0049] 试验用的红火蚁巢采自华南农业大学草坪,用滴水法将蚁巢与土壤分离后饲养于40 cm×30cm×10cm塑料盒中,以25%的蜂蜜水和黄粉虫幼虫饲养。供试虫体为室内饲养不超过1个月的工蚁、幼虫及蛹。将红火蚁工蚁、幼虫及蛹放入塑料杯中(底部直径7cm,顶部直径9cm,高6.5cm),用微型喷壶均匀喷施供试浓度的孢子悬浮液。处理后的工蚁、幼虫及蛹分别放到底部有石膏保湿的塑料小盒(底部直径7cm、顶部直径9cm,高6.5cm)中,每盒100头。对处理后的幼虫或蛹,同时加入未经处理的同巢红火蚁工蚁50头作为育幼蚁,为其提供食物和照顾。用针在盒盖上扎若干小孔,以便透气,在塑料盒内壁涂少量滑石粉,防红火蚁逃逸。用棉花球蘸取浓度为25%的蜂蜜水饲喂工蚁。将各处理置于培养箱(25±1℃,光周期L:D=12h:12h、相对湿度80±5%)中观察,连续观察10d。每日检查并记录处理工蚁、幼虫、蛹及育幼工蚁的死亡数,将死亡虫体挑到铺有湿滤纸的培养皿(直径9cm)中,保湿培养。根据虫尸是否有菌丝生长来确定其死亡原因,计算每个处理的虫体累计死亡率。另以含有0.03%吐温-80的无菌水作为对照。每处理重复3次(3巢红火蚁)。

## [0050] 二、实验结果

[0051] 测定结果表明:SCAU-BbFa01菌株对红火蚁工蚁、幼虫及蛹都有较强的致病力(图3),在不同浓度( $1 \times 10^4$ - $1 \times 10^8$ 孢子/mL)的孢子悬浮液处理后10d,工蚁的累计死亡率为18.31%-100%,幼虫的累计死亡率为42.68%-100%,蛹的累计死亡率为59.75%-100%(图4和表1)。SCAU-BbFa01菌株除感染被接种的幼虫和蛹外,还能通过接触传染给未接种的育幼工蚁,喂食幼虫和蛹的育幼工蚁第10d累计死亡率分别为9.33%-44.67%和9.36%-36%。

[0052] 表1红火蚁各品级感染球孢白僵菌SCAU-BbFa01后的累计校正死亡率(10d)

品级	不同浓度下(个孢子/mL) 累计校正死亡率(%)				
	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^8$
[0053] 工蚁	18.31±4.46c	54.18±3.76b	57.75±4.58b	96.06±0.91a	100±0.00a
幼虫	42.68±2.94cd	57.31±8.68c	74.39±3.33b	87.80±3.85b	100±0.00a

	蛹	59.75±4.01c	81.71±4.01b	90.24±2.22a	95.12±1.11a	100±0.00a
	育幼工蚁	9.33±0.67d	15.33±0.67c	22.00±2.00b	24.67±2.67b	44.67±1.76a
[0054]	(喂食幼虫)					
	育幼工蚁	9.36±0.33bc	12.67±0.88bc	14.67±1.20b	16.67±2.03b	36.00±1.73a
	(喂食蛹)					

[0055] 注:同行中相同字母者表示在0.05水平上差异不显著(DMRT法)

[0056] 球孢白僵菌SCAU-BbFa01菌株对红火蚁各品级的致死中浓度结果如表2所示,工蚁、幼虫和蛹接种后第10d的 $LC_{50}$ 分别为 $1.05 \times 10^5$ 个孢子/mL、 $2.01 \times 10^4$ 个孢子/mL和 $1.89 \times 10^3$ 个孢子/mL。

[0057] 表2球孢白僵菌SCAU-BbFa01菌株对红火蚁各品级的致死中浓度(10d)

品级	回归方程	卡方值	P 值	$LC_{50}$ (95%CI) 个孢子/mL
[0058] 工蚁	$Y=0.72X-3.63$	58.19	0.001	$1.05 \times 10^5(3.01 \times 10^4-7.13 \times 10^5)$
幼虫	$Y=0.43X-1.86$	10.79	0.01	$2.01 \times 10^4(4.88 \times 10^3-1.88 \times 10^5)$
蛹	$Y=0.51X-1.67$	1.90	0.59	$1.89 \times 10^3(2.85 \times 10^2-5.79 \times 10^3)$

[0059] 球孢白僵菌SCAU-BbFa01菌株对红火蚁各品级的致死中时如表3所示,随着真菌孢子悬浮液浓度的增加,供试红火蚁的 $LT_{50}$ 值递减,在 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^8$ 个孢子/mL的范围内,工蚁的 $LT_{50}$ 从13.54d降到2.75d,幼虫的 $LT_{50}$ 从9.18d降到1.26d。蛹的 $LT_{50}$ 从4.66d降到0.84d。

[0060] 表3球孢白僵菌SCAU-BbFa01菌株对红火蚁各品级的致死中时

品级	孢子浓度	回归方程	卡方值	P 值	$LT_{50}$ (d) (95% CI)
	$1 \times 10^4$	$Y=0.17X-2.27$	15.11	0.06	13.54(12.14-15.74)
	$1 \times 10^5$	$Y=0.22X-1.69$	138.95	0.001	7.66 (6.55-9.42)
[0061] 工蚁	$1 \times 10^6$	$Y=0.21X-1.60$	138.07	0.001	7.26(6.17-8.83)
	$1 \times 10^7$	$Y=0.50X-1.92$	689.51	0.0001	3.81 (1.57-5.35)
	$1 \times 10^8$	$Y=1.31X-3.55$	13.9	0.084	2.75(2.59-2.82)
	$1 \times 10^4$	$Y=0.04X-0.34$	4.72	0.79	9.18 (6.74-23.24)
幼虫	$1 \times 10^5$	$Y=0.07X-0.31$	6.77	0.56	4.25 (2.64-5.39)
	$1 \times 10^6$	$Y=0.11X-0.26$	3.57	0.89	2.33 (0.90-3.28)

	$1 \times 10^7$	$Y=0.17X-0.26$	7.72	0.46	1.56(0.53-2.31)
	$1 \times 10^8$	$Y=0.32X-0.41$	5.36	0.72	1.26(0.67-1.72)
	$1 \times 10^4$	$Y=0.10X-0.46$	10.07	0.26	4.66 (3.66-5.50)
[0062]	$1 \times 10^5$	$Y=0.16X-0.35$	15.01	0.06	2.12(0.41-3.18)
蛹	$1 \times 10^6$	$Y=0.16X+0.11$	14.08	0.08	1.13 (0.69-1.55)
	$1 \times 10^7$	$Y=0.18X+0.25$	17.5	0.03	0.92 (0.61-1.23)
	$1 \times 10^8$	$Y=0.46X-0.28$	1.47	0.99	0.84 (0.55-1.13)

[0063] 本实验结果表明,球孢白僵菌SCAU-BbFa01菌株对红火蚁有很强的致病力,这从其红火蚁3个品级的致死中浓度和致死中时两方面表现均可以得出。接种球孢白僵菌SCAU-BbFa01菌株10d后红火蚁工蚁、幼虫和蛹的 $LC_{50}$ 分别为 $1.05 \times 10^5$ 个孢子/mL、 $2.01 \times 10^4$ 个孢子/mL和 $1.89 \times 10^3$ 个孢子/mL。在处理浓度为 $1 \times 10^7$ 个孢子/mL时,工蚁、幼虫和蛹的 $LT_{50}$ 分别为3.81d、1.56d和0.92d,即球孢白僵菌SCAU-BbFa01菌株对红火蚁蛹的致病力最强,其次是红火蚁幼虫,再次是红火蚁工蚁。球孢白僵菌SCAU-BbFa01菌株不仅对处理的红火蚁工蚁、幼虫和蛹有致死作用,而且对与其接触的育幼工蚁也具有一定的致死作用。说明球孢白僵菌SCAU-BbFa01菌株对红火蚁具有显著的高致病力。

[0064] 实施例3:球孢白僵菌SCAU-BbFa01菌株在红火蚁人工蚁巢中的传递能力

[0065] 红火蚁是一种社会性昆虫,彼此间接触紧密,这将有利于病原真菌在蚁巢中的传播。然而染菌的蚂蚁有远离蚁巢的倾向以便减少病原真菌的传播,已观察到红火蚁染病的个体远离蚁巢的现象。本实施例中将人为感染球孢白僵菌SCAU-BbFa01的红火蚁放入健康的红火蚁蚁巢,观察蚁巢中健康红火蚁的死亡情况,研究菌株在蚁巢中的水平传递情况。

[0066] 一、实验方案

[0067] 1. 球孢白僵菌SCAU-BbFa01孢子悬浮液的制备

[0068] 将接种在PDA平板上的球孢白僵菌SCAU-BbFa01菌株置于 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、光周期L:D=12h:12h、相对湿度 $80 \pm 5\%$ 的培养箱中,培养7d,然后配制成 $1 \times 10^8$ 个孢子/mL浓度的孢子悬浮液。

[0069] 2. 试验设计

[0070] 用喷雾法处理一部分红火蚁工蚁,将处理后的虫体置于 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、光周期L:D=12h:12h、相对湿度 $80 \pm 5\%$ 的恒温培养箱中培养24h,取活虫体作为供试虫体。将接菌工蚁和未接菌工蚁以不同比例混合饲养,试验设置6个梯度,使每组处理中接菌红火蚁数量分别占红火蚁总数的0%、5%、15%、50%、85%、100%,每个处理总蚁数为100头,重复5次,将混合后的红火蚁放入底部有石膏保湿的塑料杯(底部直径7cm、顶部直径9cm,高6.5cm),置于 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、光周期L:D=12h:12h、相对湿度 $80 \pm 5\%$ 的恒温培养箱,用棉花球吸取25%的蜂蜜水喂食红火蚁。15d后检查不同处理中红火蚁的总存活率和球孢白僵菌SCAU-BbFa01从接菌工蚁到未接菌工蚁的传染率。传染率=(未接菌红火蚁中被染菌死亡的虫数/未接菌红火蚁数量) $\times 100\%$ 。

[0071] 二、实验结果



[0072] 将接菌的红火蚁和未接菌的红火蚁以不同比例混合15d后,不同处理中未接菌红火蚁受球孢白僵菌SCAU-BbFa01菌株侵染率存在显著差异(表4)。在红火蚁总数一致的前提下,随着接菌红火蚁比例的增加,红火蚁的总存活率呈逐渐下降的趋势,而传染率则呈逐渐上升的趋势。在接菌的红火蚁数量占红火蚁总数85%的情况下,球孢白僵菌SCAU-BbFa01在红火蚁工蚁之间的传染率达到了100%。当接菌的红火蚁数量占红火蚁总数5%、15%、50%时,球孢白僵菌SCAU-BbFa01在红火蚁工蚁之间的传染率分别为69.68%、76.71%和82.00%。

[0073] 表4不同处理条件下球孢白僵菌SCAU-BbFa01菌株在蚁巢中的传递能力

	接菌工蚁比例*	工蚁总存活率(%)	未接菌工蚁传染率(%)
	0%(CK)	94.40±0.68a	0.00±0.00e
	5%	28.80±1.36b	69.68±1.43d
[0074]	15%	19.80±1.32c	76.71±1.55c
	50%	9.00±0.95d	82.00±1.90b
	85%	0.00±0.00e	100.00±0.00a
	100%	0.00±0.00e	——

[0075] \*接菌工蚁比例为接菌工蚁分别占红火蚁总数的百分率。同列中相同字母者表示在0.05水平上差异不显著(DMRT法)

[0076] 实施例4:球孢白僵菌SCAU-BbFa01菌株在土壤中对红火蚁的致死情况

[0077] 红火蚁生活在土壤中,国外有试验结果显示白僵菌的土壤处理效果比孢子直接接触红火蚁的差,主要因为土壤阻碍了孢子与红火蚁的接触,同时土壤中大量微生物的存在可能会对白僵菌产生抑菌作用。从而导致现有白僵菌防治红火蚁的田间实验防治效果并不理想。本实施例采用室内研究的方法,探究在灭菌土壤和未灭菌土壤中球孢白僵菌SCAU-BbFa01对红火蚁的致病情况。

[0078] 一、实验方案

[0079] 1. 土壤灭菌

[0080] 实验所用土壤采自广州番禺南沙红火蚁蚁巢。将蚁巢表面的石块、杂草去除,经16目/寸的筛子过滤土壤,供实验用。过筛后的土壤平铺于40cm×30cm的搪瓷盘,放入干燥箱内,150~170℃条件下灭菌4-5h。

[0081] 2. 孢子粉的称取

[0082] 用接种针轻轻刮取PDA平板培养7d的球孢白僵菌SCAU-BbFa01菌株,不要刮到培养基,在电子天平上分别称取0.1g、1g两个供试浓度的孢子粉。经测量,每克孢子粉约 $8.5 \times 10^9$ 个孢子。

[0083] 3. 红火蚁工蚁个数的估计

[0084] 将从蚁巢中分离出的、于室内饲养的红火蚁工蚁经CO<sub>2</sub>麻醉,在电子天平上称取5次1g重量的工蚁,数出工蚁个数,记录每次的结果,计算每克工蚁的平均个数为850±10头。

## [0085] 4. 试验设计

[0086] 将称好的0.1g、1g孢子粉,拌入100g土壤中,同时加入10mL无菌水,在塑料杯(底部直径7cm、顶部直径9cm,高6.5cm)中混匀后,加入1g红火蚁工蚁,用棉花球吸取25%的蜂蜜水喂食红火蚁。土壤分为灭菌土壤处理和未灭菌土壤处理。设未拌入孢子粉的土壤处理为对照,每个处理3次重复。将处理后的虫体置于 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温、光周期 L:D=12h:12h、相对湿度 $80\pm 5\%$ 的培养箱中,培养15d后数出存活的红火蚁数量,计算虫体死亡率,并对死亡红火蚁进行保湿培养,体表有白僵菌菌丝、孢子产生的为被白僵菌侵染致死的红火蚁,计算虫体的侵染率。侵染率=(被白僵菌侵染致死的红火蚁数量/死亡的红火蚁总数) $\times 100\%$ 。

## [0087] 二、实验结果

[0088] 15d后各处理组与对照组的工蚁死亡情况见表5。土壤表层可见到被搬运成堆的死亡工蚁,经拌菌处理的死亡工蚁虫体表面有白僵菌,对照组的死亡工蚁体表无白僵菌长出。试验结果表明,经灭菌土壤拌菌处理的红火蚁工蚁死亡率显著高于未灭菌土壤拌菌处理,而两组对照之间差异不显著。在同一种土壤处理下,不同浓度孢子粉处理的红火蚁工蚁死亡率也不同,高浓度孢子粉处理的红火蚁死亡率显著高于低浓度处理,而这两者都显著高于对照。

[0089] 虽然由于土壤阻碍了孢子与虫体的直接接触,因此其致病作用相对减弱。但是尽管如此,球孢白僵菌SCAU-BbFa01在未灭菌土壤中处理后对红火蚁工蚁的致死率也能达到62.27%。以上结果表明,在土壤中球孢白僵菌SCAU-BbFa01仍能对红火蚁产生致病作用,说明此菌株具有一定的实际应用潜力。

[0090] 表5球孢白僵菌SCAU-BbFa01菌株土壤处理后红火蚁工蚁死亡率(%)

孢子剂量	死亡率(%)	
	灭菌土壤	未灭菌土壤
[0091] 0.1 g 孢子/100g	82.00 $\pm$ 0.48bA	54.63 $\pm$ 2.08bB
1 g 孢子/100g	93.22 $\pm$ 0.90aA	62.27 $\pm$ 0.64aB
CK	28.71 $\pm$ 2.64cA	31.96 $\pm$ 2.84cA

[0092] 注:表中同列数据小写字母相同表示在0.05水平上差异不显著(DMRT法),同行数据大写字母相同表示处理与对照在0.05水平上差异不显著。

[0093] 结果表明,对于红火蚁这种社会性昆虫,球孢白僵菌SCAU-BbFa01菌株可以通过红火蚁个体之间体壁的接触在蚁巢中成功传递,显示出球孢白僵菌SCAU-BbFa01菌株在红火蚁防控实际应用中具有巨大的潜力。

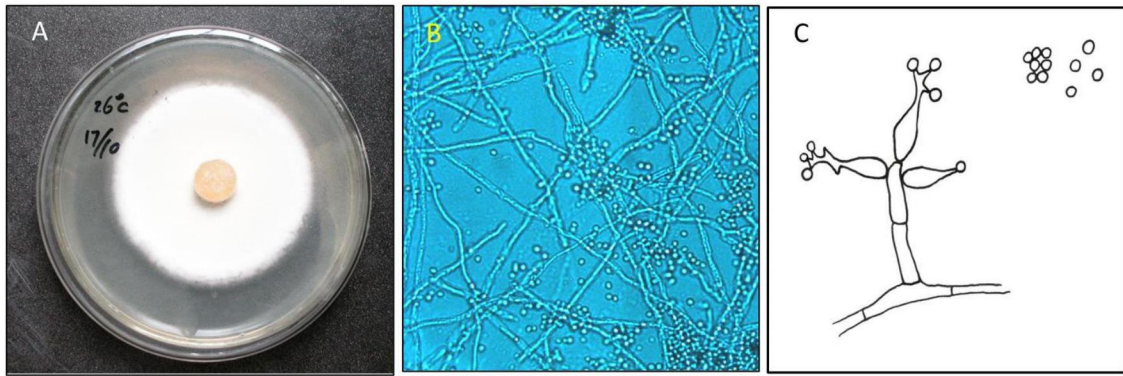


图1

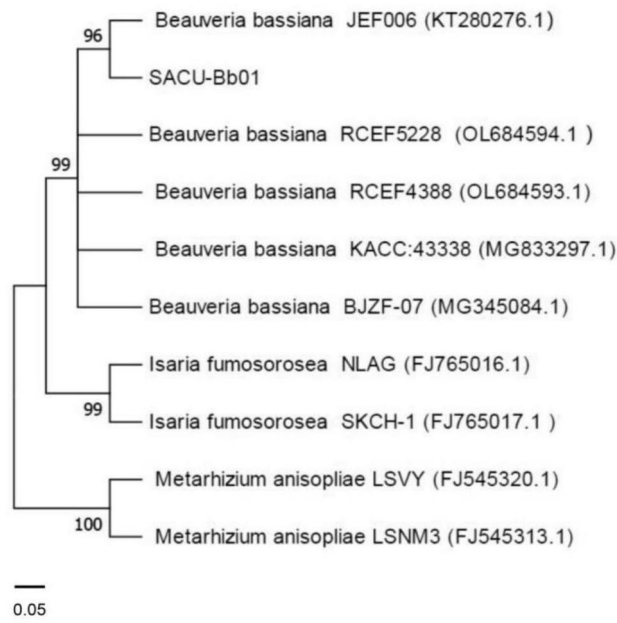


图2

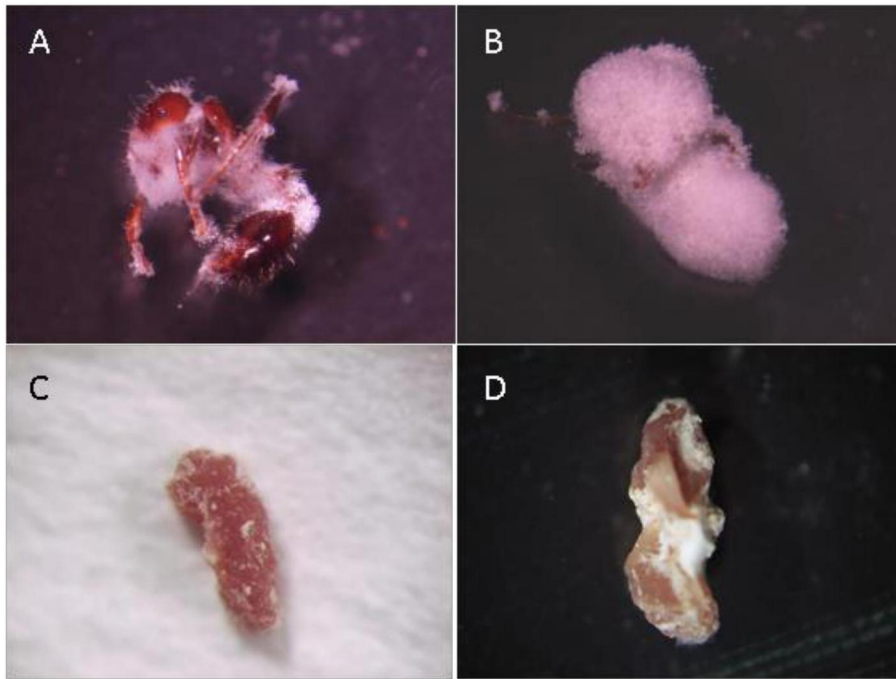


图3

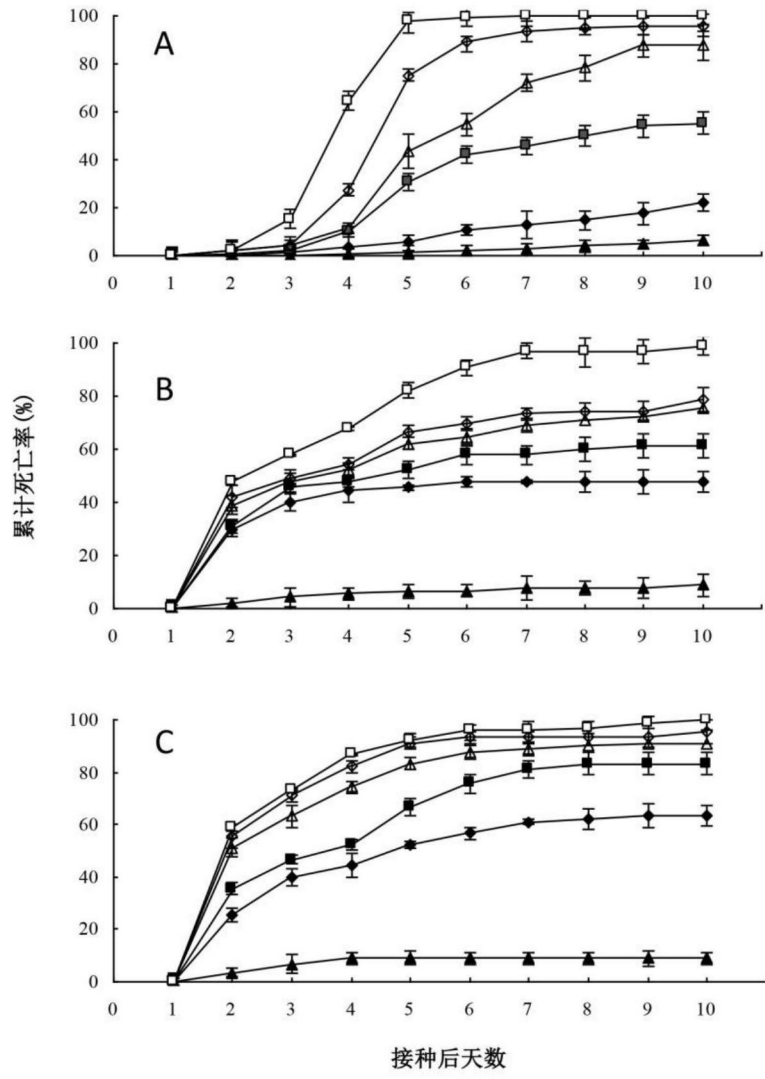


图4