



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 115975813 B

(45) 授权公告日 2024. 08. 06

(21) 申请号 202210868399.X

(22) 申请日 2022.07.21

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115975813 A

(43) 申请公布日 2023.04.18

(83) 生物保藏信息
GDMCC No.61632 2021.04.28

(73) 专利权人 广西大学
地址 530004 广西壮族自治区南宁市西乡
塘区大学东路100号

(72) 发明人 韦继光 任立云 樊春丽 奉文让
李懋辅 韦吉锋

(74) 专利代理机构 北京众达德权知识产权代理
有限公司 11570
专利代理师 刘杰

(51) Int.Cl.

C12N 1/14 (2006.01)

A01N 63/30 (2020.01)

A01P 7/04 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 103430925 A, 2013.12.11

CN 108865900 A, 2018.11.23

审查员 王楚晗

权利要求书1页 说明书4页

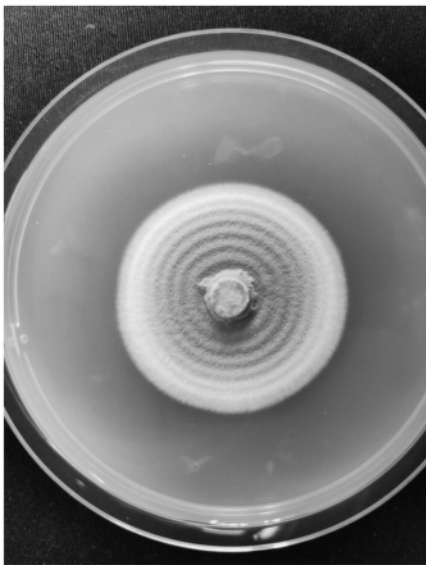
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

一种爪哇棒束孢菌株DMC01及其在防治黄野
螟上的应用

(57) 摘要

本发明属于微生物学技术领域,具体涉及的
是一种爪哇棒束孢菌株DMC01及其在防治黄野
螟上的应用。一种爪哇棒束孢菌株DMC01,其分类学
名为Isaria javanica,于2021年4月28日保藏于
广东省微生物菌种保藏中心,保藏号为GDMCC
No.61632。本发明的爪哇棒束孢DMC01对黄野螟
具有较高致病力,可有效杀死黄野螟,且具有高
僵虫率。本发明的爪哇棒束孢DMC01是一株在黄
野螟的防治上具有潜在意义的生物防治菌株。



1.一种爪哇棒束孢菌株(*Isaria javanica*)DMC01在防治黄野螟上的应用,其特征在于,所述爪哇棒束孢菌株DMC01于2021年4月28日保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏号为GDMCCNo.61632。

一种爪哇棒束孢菌株DMC01及其在防治黄野螟上的应用

技术领域

[0001] 本发明属于微生物学技术领域,具体涉及的是一种爪哇棒束孢菌株DMC01及其在防治黄野螟上的应用。

背景技术

[0002] 黄野螟属于鳞翅目螟蛾科,是土沉香生长过程中危害最严重的食叶性害虫。幼虫蚕食土沉香叶片导致叶面残缺不全,大爆发时可将虫害区域的土沉香叶片全部吃光,造成土沉香树势消减甚至死亡。

[0003] 化学农药是目前防治黄野螟最主要的方法,然而大量使用化学农药容易引起环境污染以及黄野螟的抗药性。生物防治是黄野螟防治较为理想和环保的方法,虫生真菌作为害虫的一类重要致病菌,在害虫的生物防治占有重要地位。

[0004] 申请号CN202110967746.X,公开一种土沉香黄野螟的综合防治方法,其中公开利用致病微生物对黄野螟进行生物防治,并具体公开了微生物制剂具体为松毛虫质型多角体病毒超低容量油剂或烟雾剂、高效白僵菌悬浮剂或烟雾剂、苏云金杆菌烟雾剂等。另外,也有报道公开了红绶曲霉(*aspergillus nomius*)对黄野螟具有较强的致死性且具有生长速度快和适应强等生物学特性,在黄野螟的生物防治中有潜在的应用价值。

[0005] 目前,还尚未见有利用爪哇棒束孢(*Isaria javanica*)防治黄野螟的相关报道。

[0006] 公开于该背景技术部分的信息仅仅旨在增加对本发明的总体背景的理解,而不应被视为承认或以任何形式暗示该信息构成已为本领域一般技术人员所公知的现有技术。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种爪哇棒束孢菌株DMC01及其在防治黄野螟上的应用。

[0008] 一种爪哇棒束孢菌株DMC01,其分类学名为*Isaria javanica*。

[0009] 本发明提供的种爪哇棒束孢菌株DMC01是通过采集天然感病的昆虫,分离纯化得来,经形态学和分子生物学鉴定为爪哇棒束孢*Isaria javanica*,于2021年4月28日保藏于保藏于广东省微生物菌种保藏中心,(简称GDMCC,地址:广州市先烈中路100号大院59号楼5楼,广东省微生物研究所,邮编:510070),保藏号为GDMCC No.61632。

[0010] 本发明还提供了所述爪哇棒束孢菌株DMC01在防治黄野螟上的应用,所属技术领域的人员,可以将爪哇棒束孢菌株DMC01制成微生物杀虫剂,用于防治黄野螟。

[0011] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0012] (1) 本发明对菌株进行分离纯化,通过形态学观察和分子鉴定,确定获得的菌株DMC01为爪哇棒束孢*Isaria javanica*;其次申请人还测定了其对于黄野螟的毒力,经测定发现本发明的爪哇棒束孢DMC01对具有较高致病力,可有效杀死黄野螟,且具有较高僵虫率。

[0013] (2) 本发明的爪哇棒束孢DMC01是一株在黄野螟的防治上具有潜在意义的生物防治菌株,可开发成微生物杀虫剂,为黄野螟的绿色防控提供技术支撑。

[0014] 保藏信息说明

[0015] *Isaria javanica* DMC01, 保藏编号为GDMCC No.61632, 保藏日期为2021年4月28日, 保藏单位为广东省微生物菌种保藏中心(GDMCC), 保藏地址为广州市先烈中路100号大院59号楼5楼。

附图说明

- [0016] 图1为DMC01菌株菌落形态正面图;
[0017] 图2为DMC01菌株菌落形态背面图;
[0018] 图3为显微镜下爪哇棒束孢的形态图;
[0019] 图4为DMC01菌株的系统发育图;
[0020] 图5为DMC01菌株在黄野螟上的侵染状。

具体实施方式

[0021] 下面结合具体的实施例对本发明做进一步的详细说明, 所述是对本发明的解释而不是限定。

[0022] 下述实施例中所用的材料和试剂, 如无特殊说明, 均可从商业途径得到。下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明, 均为常规方法。

[0023] 实施例

[0024] 一、爪哇棒束孢菌株DMC01的分离纯化

[0025] 采集广西壮族自治区钦州市钦廉林场的桉大毛虫僵虫虫体, 在超净台上, 将僵虫浸入75%的酒精中表面消毒30s后用0.1%升汞浸泡消毒3min, 然后依次转移到3瓶无菌水中冲洗, 取出置于灭过菌的滤纸上把虫体解剖成小块;

[0026] 将组织块放置在加入50ug/ml的链霉素的PDA培养基上, 每皿放5块, 然后置于25℃下培养, 待其长出菌丝后挑取转至菌丝放到PDA平板上进行纯化培养, 纯化培养重复3次。将筛选得到的一株真菌编号为DMC01, 并挑取纯化得到的菌丝接入PDA斜面试管中, 待菌株长满斜面试管后置于4℃的环境下作为菌种保存。

[0027] 二、爪哇棒束孢菌株DMC01鉴定

[0028] 25℃下培养的菌株, 在培养过程中对菌落进行观察, 菌落的形态如图1和图2所示。

[0029] 从图1和图2可以看出, 在PDA平板上, 菌落为圆形, 菌丝白色, 质地为厚绒毛状, 菌落背面淡黄色, 孢子层颜色为浅紫灰色。

[0030] 在显微镜下, 菌丝无色透明, 分子孢子梗上着生2-4个瓶梗形成的轮生体, 瓶梗基部椭圆形膨大, 向上逐渐变细; 分生孢子在瓶梗上生长形成孢子链; 分生孢子呈透明光滑的长椭圆形, 见图3。

[0031] 根据上述菌落形态和孢子形态等特征, 初步鉴定菌株为爪哇棒束孢 *Isaria javanica*。

[0032] 三、分子鉴定

[0033] 1. 按照康为世纪NuClean Plant Genomic DNA Kit试剂盒的说明书提取DNA, 得到爪哇棒束孢菌株DMC01的基因组DNA。

[0034] 2. 选择目的基因核糖体转录间隔序列(ITS)、延伸因子- α (EF1- α) 和 β -微管蛋白基因(β -tubulin)进行扩增, 得到PCR扩增产物。相关引物序列见下表1, PCR反应体系见下表2。

[0035] 表1相关引物的序列

	目的基因	引物名称	基因序列	序列表序号
[0036]	ITS	ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	SEQ ID No.1
		ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	SEQ ID No.2
	TUB2	Bt2a	5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3'	SEQ ID No.3
[0037]	EF1- α	Bt2b	5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3'	SEQ ID No.4
		EF1-526F	5'-GTCGTYGTYATYGGHCAYGT-3'	SEQ ID No.5
		EF1-1567R	5'-ACHGTRCCRATACCACCRATCTT-3'	SEQ ID No.6

[0038] 表2 PCR反应体系

	试剂	加入量
[0039]	10×PCR buffer	2.5μL
	Taq 酶	0.125μL
	dNTP	0.5μL
	上游引物	1μL
	下游引物	1μL
	模板 DNA	1μL
	ddH ₂ O	to 25μL

[0040] ITS和 β -tubulin的PCR反应程序:95℃变性3min;95℃变性30s、52℃退火30s、72℃延伸1min,共35个循环;72℃延伸10min。

[0041] EF1- α 的PCR反应程序:94℃变性5min;94℃变性30s、55℃退火45s、72℃延伸90s,共35个循环;72℃延伸7min。

[0042] 3.扩增产物回收纯化、连接转化并进行DNA测序,ITS、EF1- α 和 β -tubulin扩增得到其核苷酸序列分别见SEQ ID No.7至SEQ ID No.9。

[0043] 4.用Bioedit与DNAMAN软件对得到的测序结果进行处理,并在GenBank数据库中进行Blast比对,下载可信度高的相关序列,利用MEGA7.0进行序列比对,采用邻接法(Neighbor-joining)构建DMC01菌株系统发育树,构建发育树时进行自举检验,重复抽样1000次,结果见图4。

[0044] 从图4可以看出,DMC01菌株与Isaria javanica CHE-CNRCB 305以及Isaria javanica CBS 134.22在同一分支,并且其形态特征符合爪哇棒束孢Isaria javanica的特征,确定菌株DMC01为爪哇棒束孢Isaria javanica。因此,将其命名为Isaria javanica DMC01。

[0045] 四、爪哇棒束孢菌株DMC01对黄野螟的毒力测定

[0046] 1.用接种环将分离纯化得到的爪哇棒束孢菌株分生孢子刮入50mL的三角瓶里,加入20mL含有0.05%的吐温-80水溶液,充分摇匀后用血球计数板在显微镜下计数,得到初始

浓度孢子母液,将孢子液配制成 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 个/mL共4个浓度梯度,每个浓度为一个处理,以0.05%的吐温-80水溶液为对照,每个处理设3组重复,每个重复15头四龄黄野螟。

[0047] 2.将配好的各浓度孢子液以及对照处理的0.05%的吐温-80水溶液均匀喷洒在黄野螟身上,以喷至孢子液不滴下为止,然后单头将黄野螟放入养虫皿中,置于25℃培养箱内光暗各12h进行培养,每天用新鲜的土沉香叶片喂养,并每天定时观察、记录各处理的具体死亡情况,连续观察8d,发现死虫则将其移除培养皿,放入放有滤纸并灭过菌的玻璃培养皿中保湿培养,观察其是否长出菌丝,结果见图5。

[0048] 从图5可以看出,DMC01菌株侵染黄野螟后,黄野螟虫体上会长出菌丝。

[0049] 记录僵虫的头数,并计算不同浓度爪哇棒束孢DMC01对黄野螟的校正死亡率以及不同浓度爪哇棒束孢DMC01处理后的黄野螟僵虫率,结果见表3。

[0050] 表3不同浓度爪哇棒束孢DMC01对黄野螟的致病力

孢子浓度 (个/mL)	4 龄黄野螟的校正死亡率 (%)			僵虫率 (%)
	4d	6d	8d	
[0051] 1×10^5	2.22	20.45	31.82	31.11
1×10^6	11.11	54.54	90.91	91.11
1×10^7	26.67	80.09	97.73	97.78
1×10^8	28.89	100.00	100.00	100.00

[0052] 从表3可以看出,接种时间相同时,黄野螟的校正死亡率随着孢子浓度提高而提高,随着接种时间的延长,各处理组黄野螟的校正死亡率均有所提升。接种8d后, 1×10^5 个/mL处理的校正死亡率仅为31.11%,而 1×10^6 个/mL和 1×10^7 个/mL处理的校正死亡率分别为90.91%和97.73%;在 1×10^8 个/mL处理下第6d黄野螟的校正死亡率就达到了100%。

[0053] 接种8d后的黄野螟的僵虫率也随着孢子浓度提高而提高。接种后第8d, 1×10^5 个/mL处理下的僵虫率为31.11%, 1×10^6 个/mL和 1×10^7 个/mL处理下僵虫率为91.11%和97.78%, 1×10^8 个/mL处理下的僵虫率为100%。

[0054] 可以看出,本发明的爪哇棒束孢DMC01对黄野螟有高致病力。其中, 1×10^8 个/mL的孢子液可以快速有效杀死黄野螟,且具有高僵虫率。

[0055] 综上所述,本发明的爪哇棒束孢DMC01对黄野螟具有较高致病力,可有效杀死黄野螟,且具有高僵虫率,是一株在黄野螟的防治上具有潜在意义的生物防治菌株。

[0056] 前述对本发明的具体示例性实施方案的描述是为了说明和例证的目的。这些描述并非想将本发明限定为所公开的精确形式,并且很显然,根据上述教导,可以进行很多改变和变化。对示例性实施例进行选择 and 描述的目的在于解释本发明的特定原理及其实际应用,从而使得本领域的技术人员能够实现并利用本发明的各种不同的示例性实施方案以及各种不同的选择和改变。本发明的范围意在由权利要求书及其等同形式所限定。

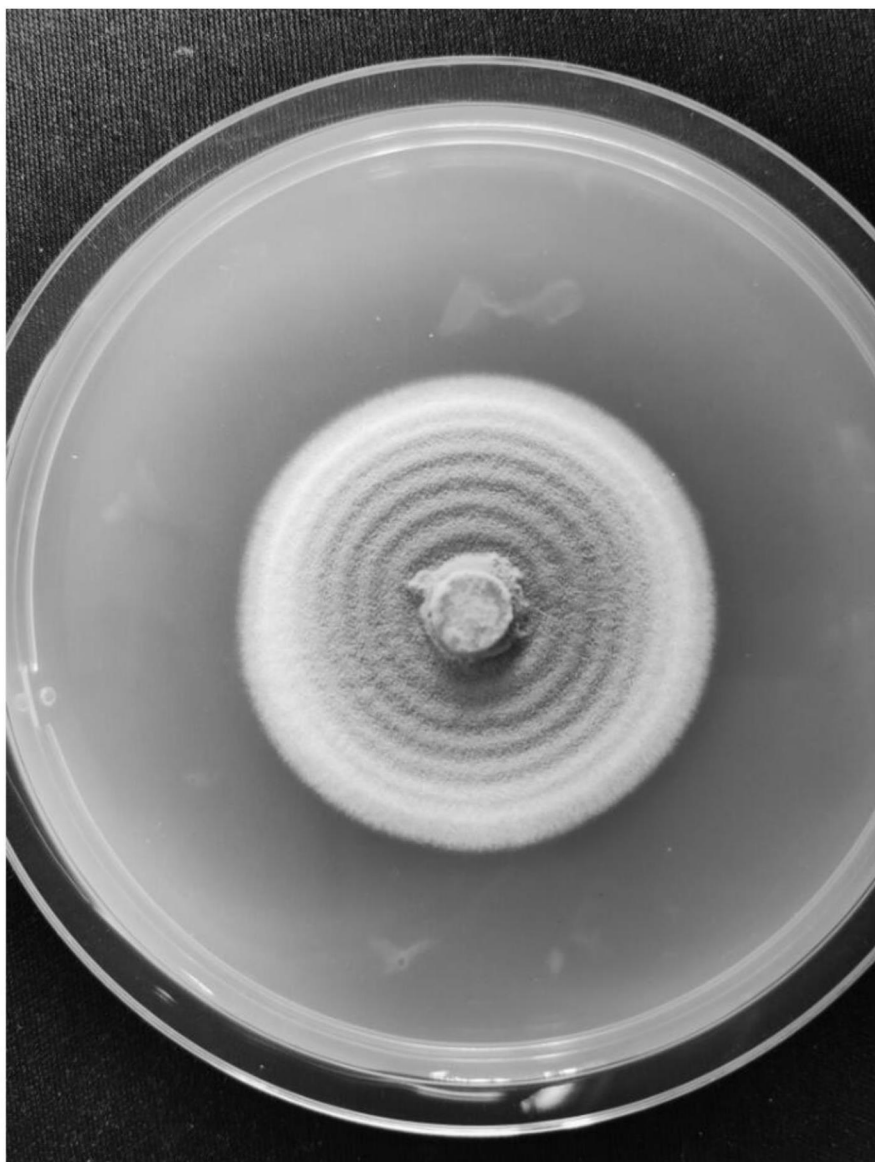


图1

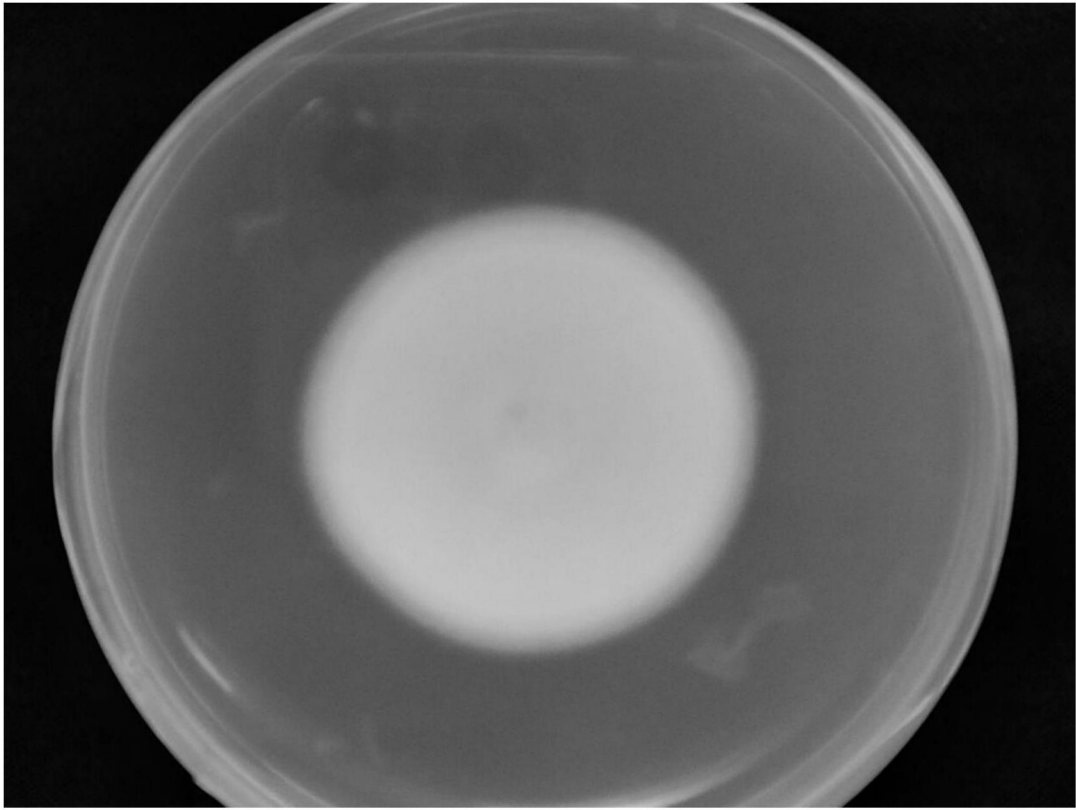


图2

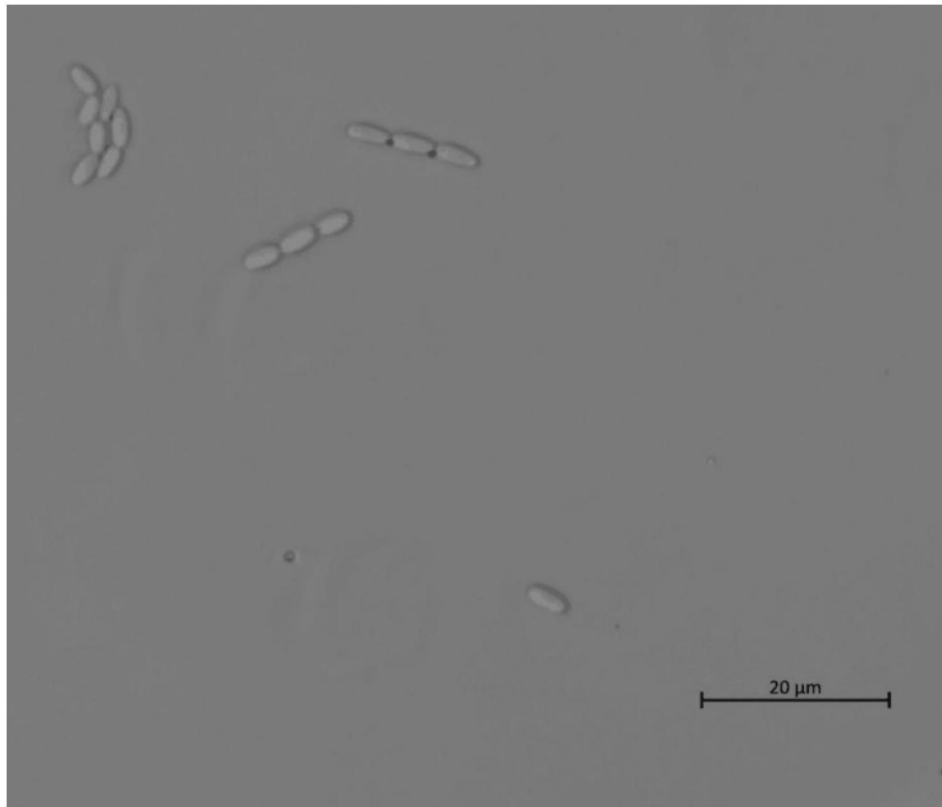


图3

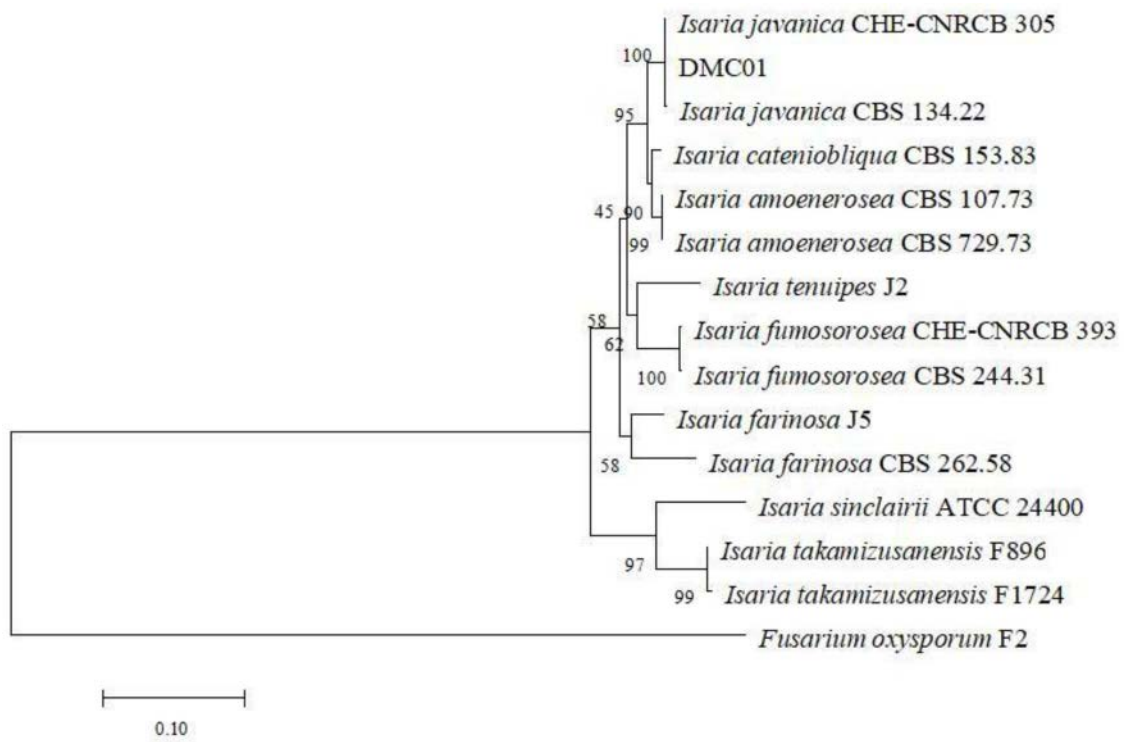


图4



图5