



肖月, 张锦花, 陈健鑫, 洪永生, 张东华, 马焕成, 伍建榕. 红火蚁病原真菌分离鉴定及致病性研究 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (6): 1502–1509.

红火蚁病原真菌分离鉴定及致病性研究

肖月^{1*}, 张锦花^{1*}, 陈健鑫¹, 洪永生¹, 张东华^{1**}, 马焕成², 伍建榕^{1,2**}

(1. 西南林业大学生物多样性保护学院, 云南省高校森林灾害预警控制重点实验室, 昆明 650224;

2. 西南林业大学林学院, 西南地区生物多样性保育国家林业局重点实验室, 昆明 650224)

摘要: 红火蚁 *Solenopsis invicta* 是世界上最具破坏力和威胁性的入侵检疫害虫之一, 对农林业生产安全、公共设施以及人体健康都造成了巨大影响。为筛选对红火蚁有致病性的病原真菌, 本研究通过组织分离法对自然罹病的红火蚁进行致病菌分离, 结合病原形态学及分子生物学的方法对病原真菌进行鉴定并采用喷雾法测定了病原真菌对红火蚁的致病力。结果表明: 从罹病红火蚁上分离出 3 株病原真菌 HHYSFJ01、HHYSFJ02 和 HHYSFJ05, 分别为红绶曲霉 *Aspergillus nomius*、淡紫拟青霉 *Purpureocillium lilacinum* 和球孢白僵菌 *Beauveria bassiana*。致病性测定, 这 3 株病原菌对红火蚁均具有较强的致病性, 且 3 株病原菌致病性间差异显著。经 1.0×10^8 孢子/mL 孢子悬浮液喷雾处理红火蚁 10 d 后, 球孢白僵菌菌株 HHYSFJ05 的致病性最强, 红火蚁工蚁的校正死亡率为 84.71%, LT_{50} 为 4.67 d; 红绶曲霉菌株 HHYSFJ01 和淡紫拟青霉菌株 HHYSFJ02 次之, 红火蚁工蚁的校正死亡率分别为 78.82% 和 73.29%, LT_{50} 分别为 4.99 d 和 5.20 d。

关键词: 红火蚁; 病原真菌; 分离鉴定; 致病力

中图分类号: Q968.1; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2022) 06-1502-08

Isolation, identification and pathogenicity of entomogenous fungi to red imported fire ant *Solenopsis invicta*

XIAO-Yue^{1*}, ZHANG Jin-Hua^{1*}, CHEN Jian-Xin¹, HONG Yong-Sheng¹, ZHANG Dong-Hua^{1**}, MA Huan-Cheng², WU Jian-Rong^{1,2**} (1. Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control in Universities of Yunnan Province, College of Biodiversity Conservation, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China; 2. Key Laboratory of Biodiversity Conservation in Southwest China, State Forestry Administration, College of Biodiversity Forestry, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract: Red imported fire ant (RIFA) was one of the most destructive and threatening intrusion inspection and quarantine pests in the world, which has a huge impact on agricultural and forestry production safety, public facilities and human health. In order to screen for entomogenous fungi that were pathogenic to RIFA, in this study, the tissue separation method was used to isolate the pathogenic bacteria of RIFA that naturally diseased, combining pathogen morphology and molecular biology methods

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31860208); 国家重点研发计划 (2019YFD100200X, 2021YFD1000500); 西南林业大学木棉纤维人工林产业化培育省级创新团队项目 (2018HC014)

* 共同第一作者: 肖月, 女, 硕士研究生, 研究方向为森林病理学, E-mail: 1471564958@qq.com; 张锦花, 女, 本科生, E-mail: 1922957569@qq.com

** 共同通讯作者 Author for correspondence: 张东华, 女, 博士, 讲师, 主要从事资源微生物利用研究, E-mail: 1391967127@qq.com; 伍建榕, 女, 博士, 教授, 主要从事森林病理和资源微生物利用研究, E-mail: 1176279044@qq.com

收稿日期 Received: 2022-07-11; 接受日期 Accepted: 2022-09-04

to identify entomogenous fungi of RIFA and using the spray method to determine the pathogenicity of RIFA entomogenous fungi. The results showed that three strains of infected RIFA parasitic fungi HHYSFJ01, HHYSFJ02 and HHYSFJ05 were isolated, namely *Aspergillus nomius*, *Purpureocillium lilacinum* and *Beauveria bassiana*. Pathogenicity determination showed that all three strains had strong pathogenicity to RIFA, and the difference of pathogenicity among the three strains was significant. After spray treatment with 1.0×10^8 conidia / mL suspension for 10 days, the strain HHYSFJ05 was more virulent to RIFA than other isolates. Strains HHYSFJ01 and HHYSFJ02 were slightly weaker, the corrected mortality rates of RIFA were 80.00% and 74.44%, LT_{50} were 4.99 d and 5.20 d.

Key words: *Solenopsis invicta*; pathogenic fungi; isolation and identification; pathogenicity

红火蚁 *Solenopsis invicta* Buren, 隶属膜翅目 Hymenoptera 蚁科 Formicidae 火蚁属 *Solenopsis*, 原产于南美洲, 是一种极具破坏力和威胁性的入侵检验检疫害虫 (Allen and Buren, 1974; Pitts *et al.*, 1990)。红火蚁具有食性杂、繁殖能力强, 且会叮咬人畜和啃咬公共设备等危害特点。因此, 对人体健康、公共安全、农林业生产和生态环境等造成严重危害 (刘政军等, 2005; 潘运方, 2013)。2004 年 9 月, 广东吴川地区首次发现红火蚁疫情, 这也成为了红火蚁入侵我国大陆的标志 (曾玲等, 2015)。2005 年 1 月, 红火蚁被我国正式列为入境检疫性害虫 (王福祥等, 2005)。目前, 红火蚁的防治主要依赖于化学药剂, 但化学药剂的大量使用会造成环境污染, 且成本较高, 同时还会对本地种蚂蚁种群造成破坏 (宋侦东等, 2009)。昆虫病原真菌具有易培养、环境友好、害虫不易产生抗性等特点, 已被越来越多地应用于害虫生物防治实践 (刘春来, 2017)。

据报道, 国外利用病原真菌防治红火蚁研究已开展多年, 白僵菌属 *Beauveria* sp.、拟青霉属 *Paecilomyces* sp.、多毛菌属 *Hirsutella* sp. 以及耳霉属 *Conidiobolus* sp. 的一些真菌对红火蚁均有一定的防治效果 (Shah and Pell, 2003)。在国内, 据相关研究表明, 球孢白僵菌 *B. bassiana*、淡紫拟青霉 *P. lilacinus* (Thom.) Samson 和金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 对红火蚁工蚁有一定的致病力 (杨佳后等, 2009; 吕利华等, 2011; 王磊等, 2018)。尽管国内外对红火蚁的病原真菌都有相关的研究, 但可利用的昆虫病原真菌资源及生防制剂相对来说还较少, 利用昆虫病原真菌防治红火蚁在世界范围内仍是难题, 作为可开发为环境友好型生防制剂的重要资源, 筛选出对红火蚁致病力较高的菌株可为昆虫病原真菌的应用研究奠定基础。

本研究通过分离自然感病死亡红火蚁致病菌, 采用形态学和分子生物学技术鉴定致病菌并进行致病菌的致病性测定, 以期筛选出对红火蚁具有较高致病毒力的病原真菌, 为安全高效防控红火蚁提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫体的采集及分离

在云南省昆明市盘龙区西南林业大学后山树木园、东三环路旁、昆明植物园、石林、嵩明及德宏州芒市等地采集大型红火蚁蚁巢, 观察蚁巢的基本特征, 并拍照记录。采集红火蚁健康虫体及病死虫体, 参照吕利华 (2006) 等方法在室内饲养。及时对病死红火蚁致病菌进行分离、培养及纯化保存。

1.2 菌株分离及纯化

采用冯玉元 (2003) 组织分离法进行红火蚁致病菌的分离。先用 75% 乙醇溶液清洗红火蚁虫体 5 s, 然后用 0.1% 升汞溶液对虫体表面消毒 2 ~ 3 min, 最后用无菌水缓慢冲淋 3 次。表面消毒完成后, 用灭菌的镊子将红火蚁虫体按头、胸、腹不同部位分开并接种至 PDA (马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 18 g, 蒸馏水 1 000 mL) 培养基平板上, 于 25℃ 恒温培养箱中培养。组织块表面长出菌丝后及时转移到新的 PDA 培养基中, 于 25℃ 培养箱中倒置培养, 重复纯化 3 次后接种于 PDA 试管斜面, 菌落长满斜面后于 4℃ 冰箱中保存。

1.3 柯赫氏法则回接验证试验

将菌株在 PDA 平板上活化培养 10 d, 待菌落表面产生分生孢子后, 用适量 0.05% 吐温-80 的无菌水溶液洗下孢子, 配制为 1.0×10^8 孢子/mL 孢子悬浮液。在塑料杯口均匀涂抹防虫逃逸粉, 将各菌株的孢子悬浮液用喷雾法接种到健康的红火

蚁工蚁体表,以 0.05%吐温-80 的无菌水溶液处理的红火蚁工蚁为对照,每杯各菌株接种 30 头健康红火蚁工蚁,每组处理 3 个平行。将处理后的红火蚁放入塑料杯中,用无菌脱脂棉加无菌水保湿,将塑料杯杯盖盖好后,在杯盖上扎数个小孔通气。置于 25℃ 恒温培养箱内培养 10 d,每天定时观察记录各菌株对红火蚁工蚁的感染和致死情况。

待杯中所有红火蚁体表有大量菌丝生长时,用灭菌的接种环从塑料杯内长出菌丝的红火蚁体表挑取少许菌丝,移接到 PDA 培养基平板上,置于 25℃ 恒温培养箱中培养,待长出菌丝后转移到新的 PDA 培养基中进行纯化。将纯化后所得菌株和本试验原始菌株进行形态特征比对,进而确认筛选出的菌株是否为红火蚁的病原真菌。

1.4 致病菌株的鉴定

1.4.1 形态学鉴定

采用方中达 (1998) 玻片检视法,在光学显微镜下观察菌株的菌丝、产孢结构及分生孢子形态,同时观察菌落正背面颜色、形态,拍照记录。参照魏景超 (1979) 《真菌鉴定手册》进行形态鉴定。

1.4.2 分子生物学鉴定

菌株 DNA 的提取:菌株活化培养后,挑取约 0.1 g 菌丝放入无菌 1.5 mL 离心管内,液氮速冻后研磨成粉末,采用生工 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒 (生工生物工程股份有限公司,上海) 提取真菌总 DNA,提取完成后保存于 -20℃ 备用。

rDNAITS 序列的扩增和测定:以供试真菌总 DNA 为模板,采用真菌 18rDNA 通用引物 ITS1 的碱基序列 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3',ITS4 的碱基序列 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' 进行 PCR 扩增,PCR 反应体系 (50 μ L): ddH₂O 20 μ L, Mix 25 μ L, 正向引物 1.5 μ L, 反向引物 1.5 μ L, DNA 2 μ L (White *et al.*, 1990)。反应条件: 94℃ 预变性 3 min, 进入以下循环: 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 50 s, 循环 35 次, 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后送昆明硕擎生物科技有限公司直接测序。

分子系统发育分析:双向测通的序列拼接后,在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对,选取 GenBank 中同源性较高的菌株序列,用 MEGA 5.0 和 ClustalX 1.83 软件进行多序列比对分析,以最大似

然法 (Maximum likelihood, ML) 构建系统发育树,Bootstrap 设置 1 000 次重复,以检验其可信度 (Morales *et al.*, 1995; Eapen *et al.*, 2005)。

1.5 菌株的致病性测定

将上述经回接验证后确定为红火蚁病原真菌的菌株配制成 1.0×10^8 孢子/mL 孢子悬浮液。采用喷雾法接种红火蚁,每杯各菌株接种 30 头健康红火蚁工蚁,以 0.05%吐温-80 的无菌水溶液处理的红火蚁工蚁为对照,饲以蘸有蜂蜜水的棉球,每组处理 3 个平行。将塑料杯杯盖盖好后,在杯盖上扎数个小孔通气,置于 25℃ 恒温培养箱中 10 d。每 24 h 观察红火蚁侵染情况并记录死亡的红火蚁数量,重复试验 3 次。

1.6 数据处理

根据相应公式计算红火蚁工蚁 10 d 内累计死亡率 LR_{10d} 和校正死亡率,应用 SPSS 20.0 统计软件分析和 Excel 进行数据统计及分析,计算红火蚁致死中时 LT_{50} 及各致病菌株的毒力回归方程。

死亡率 (%) = 死亡虫数 / 供试虫数 $\times 100$

校正死亡率 (%) = (处理组死亡率 - 对照组死亡率) / (1 - 对照组死亡率) $\times 100$

2 结果与分析

2.1 红火蚁病原真菌的分离

采用组织分离法对红火蚁致病菌株进行分离纯化后,从红火蚁病死虫体上共分离得到 6 株真菌,形态鉴定到种的 6 株,各菌株的编号、分类地位及主要鉴定特征如下 (见表 1)。

2.2 菌株的回接验证

经回接验证,在分离所得的 6 株真菌中,有 3 株真菌 HHYSFJ01、HHYSFJ02 和 HHYSFJ05 能够成功感染健康红火蚁,能定殖致死红火蚁。接种 10 d 后红火蚁感菌死亡率 (见图 1),其中喷洒菌株 HHYSFJ01、HHYSFJ02 及 HHYSFJ05 孢子悬浮液的塑料杯内有大量红火蚁死亡,死亡率分别为 80.00%、74.44% 和 85.56%,而菌株 HHYSFJ03、HHYSFJ04 和 HHYSFJ06 对红火蚁无致病力。将侵染红火蚁的致病真菌再分离培养,其培养性状和形态特征与原接种菌株均相同。上述结果表明,菌株 HHYSFJ01、HHYSFJ02 和 HHYSFJ05 均为红火蚁的病原真菌。

表 1 分离所得的菌株编号及其种名
Table 1 The isolated strain number and its species name

菌株编号 Strain number	种名 Species name	鉴定特征 Identification of characteristics
HHYSFJ01	红绶曲霉 <i>Aspergillus nomius</i>	菌落淡黄色至淡黄褐色，丝绒状，有放射状沟纹；分生孢子梗直立、顶端具顶囊，基部具足细胞，分生孢子。
HHYSFJ02	淡紫拟青霉 <i>Peacilomyces lilacinum</i>	菌落稀疏绒毛状，紫灰色，菌丝较细，小梗瓶状或稍膨大，轮状分枝。分生孢子串生呈链状，椭圆形。
HHYSFJ03	总状毛霉 <i>Mucorracemosus</i>	菌落絮状，灰褐色，具有接合孢子囊和接合孢子，配囊柄光滑，无附属丝。
HHYSFJ04	常现青霉 <i>Penicilliumfrequentens</i>	菌落常蓝绿色，分生孢子梗顶端生有扫帚状的分枝，分生孢子球形。
HHYSFJ05	球孢白僵菌 <i>Beauveria bassiana</i>	菌落白色、绒状；菌落背面黄色，产孢细胞基部膨大，分生孢子球形。
HHYSFJ06	尖孢镰刀菌 <i>Fusariumoxysporum</i>	大型分生孢子弯镰形，基细胞足状，细长，顶细胞渐尖，延长呈鞭状，多为 3 个隔膜，间有 5 个隔膜。

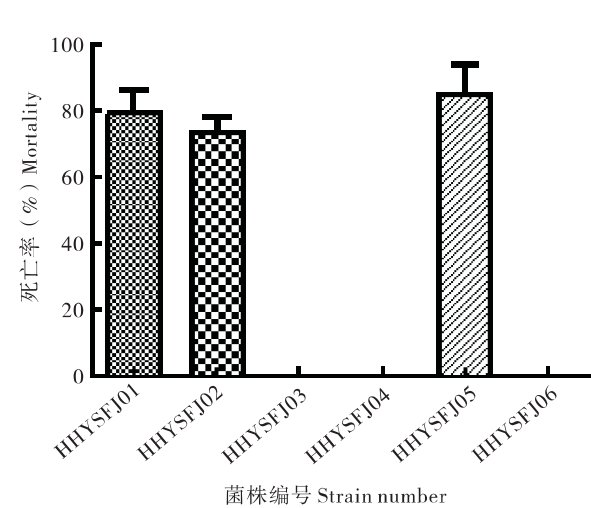


图 1 不同菌株对红火蚁的致病力

Fig. 1 Pathogenicity of different strains against workers of RIFA

2.3 致病菌株鉴定结果

2.3.1 形态鉴定

将确定为红火蚁病原真菌菌株 HHYSFJ01、HHYSFJ02、HHYSFJ05 接种于 PDA 培养基上培养，通过玻片检视法及菌落外观形态观察，菌株 HHYSFJ01、HHYSFJ02、HHYSFJ05 形态特征（图 2）如下。

菌株 HHYSFJ01：菌落正面淡黄色至黄褐色，颜色由内向外逐渐变淡，菌落丝绒状，具放射状沟纹；菌落背面呈现黄褐色，并有轻微环状纹；分生孢子梗直立、顶端具球状顶囊，分生孢子单胞球形，壁不光滑略显粗糙。

菌株 HHYSFJ02：菌落正面紫灰色，呈平绒状，背面白色或淡黄色；分生孢子梗末端膨大，具有瓶颈状不规则的分枝或轮生分枝，分生孢子单胞椭圆形，平滑。

菌株 HHYSFJ05：菌落为白色，乳白色或淡黄色，内部疏松，背面黄色或淡黄色；分生孢子梗的小枝直角分叉，分生孢子球形或近球形。

根据以上形态观察结果并参照魏景超（1979）《真菌鉴定手册》，初步判定菌株 HHYSFJ01 为红绶曲霉真菌，菌株 HHYSFJ02 为淡紫拟青霉真菌，菌株 HHYSFJ05 为球孢白僵菌真菌。

2.3.2 分子生物学鉴定

以分离菌株 HHYSFJ01、HHYSFJ02 和 HHYSFJ05 分别和与其相关的近缘菌株采用 PAUP 分子软件构建系统发育树。菌株 HHYSFJ01 与红绶曲霉（GenBank accession No MK952280）聚集在同一分支上（图 3）；菌株 HHYSFJ02 与淡紫拟青霉（GenBank accession No KY290544、MK952573）聚集在同一个分支上（图 4）；菌株 HHYSFJ05 与球孢白僵菌（GenBank accession No NR_111594）聚集在同一分支上（图 5）。Bootstrap 值大于 70% 相当于统计学概率的 95%，一般 75% 以上即认为是可信的。

因此，结合 3 株菌株上述菌落形态结构特征及 rDNA ITS 序列的分析结果，鉴定菌株 HHYSFJ01 为红绶曲霉，HHYSFJ02 为淡紫拟青霉，HHYSFJ05 为球孢白僵菌。

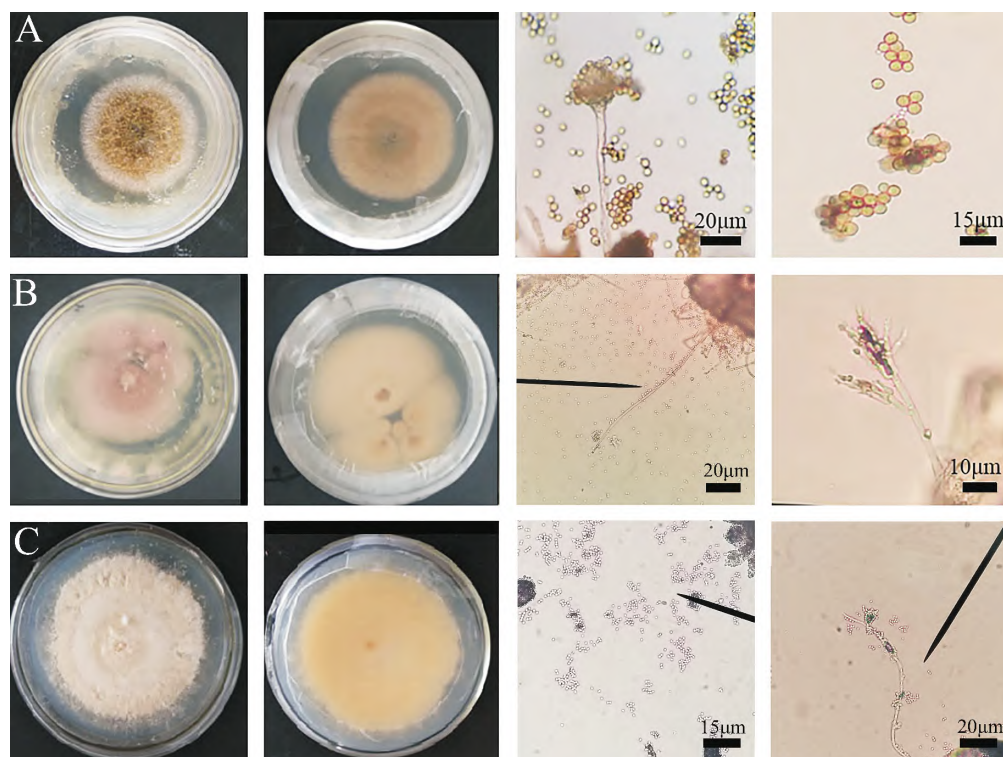


图2 菌株 HHYSFJ01、HHYSFJ02 及 HHYSFJ05 的菌落形态与产孢结构

Fig. 2 Colony morphology and sporulation structure of strains HHYSFJ01, HHYSFJ02 and HHYSFJ05

注: A, 菌株 HHYSFJ01; B, 菌株 HHYSFJ02; C, 菌株 HHYSFJ05。Note: A, Strain HHYSFJ01; B, Strain HHYSFJ02; C, Strain HHYSFJ05.

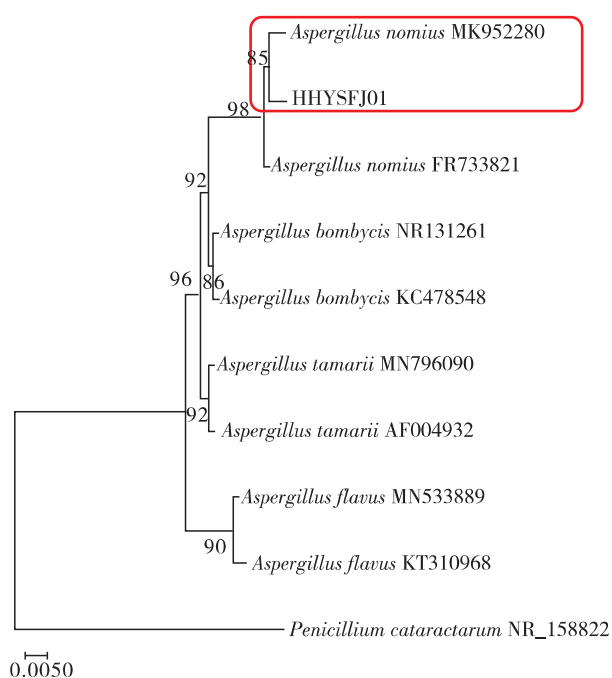


图3 基于 rDNAITS 序列构建分离菌株 HHYSFJ01 及其近缘类群的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of isolated strain HHYSFJ01 and its related groups based on rDNA ITS sequence

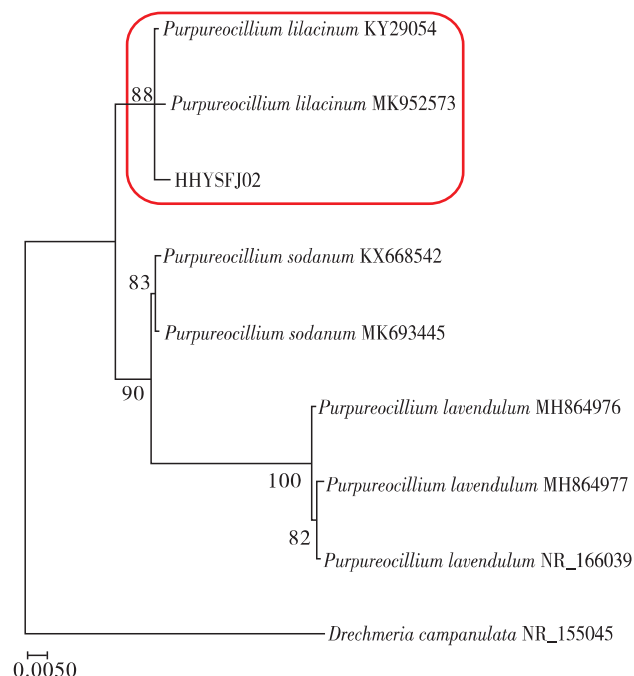


图4 基于 rDNAITS 序列构建分离菌株 HHYSFJ02 及其近缘类群的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of isolated strain HHYSFJ02 and its related groups based on rDNA ITS sequence

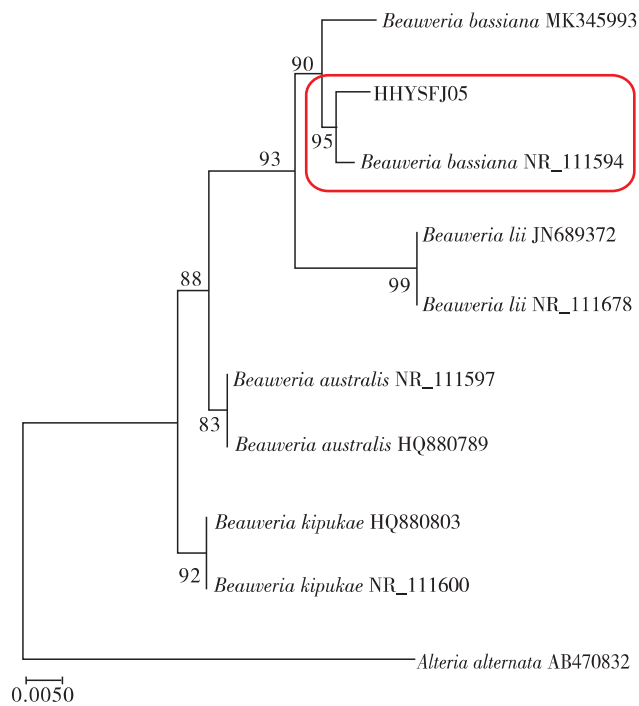


图5 基于 rDNA ITS 序列构建分离菌株 HHYSFJ05 及其近缘类群的系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree of isolated strain HHYSFJ05 and its related groups based on rDNA ITS sequence

2.4 菌株对健康红火蚁工蚁的致病性

2.4.1 红火蚁被病原真菌感染后的症状

接种感染后的红火蚁表现出反应迟钝、行动迟缓、虫体微缩等症状,且不同菌株侵染红火蚁的方式有所不同(图6)。菌株 HHYSFJ01 主要侵染红火蚁工蚁的体节薄弱处,菌株 HHYSFJ02 和 HHYSFJ05 主要从红火蚁头部进行侵染。被侵染的红火蚁体表均长出一些菌丝,随着孢子萌发和菌丝的不断生长,红火蚁被大量菌丝覆盖。

2.4.2 病原真菌对红火蚁的致病力测定

通过菌株 HHYSFJ01、HHYSFJ02、及 HHYSFJ05 对健康红火蚁工蚁的致病力测定(表2),得出不同菌株处理组与对照组之间呈显著差异。在 1.0×10^8 孢子/mL 接种浓度下,球孢白僵菌菌株 HHYSFJ05 处理组 LT_{50} 最小,为 4.67 d,红绶曲霉菌株 HHYSFJ01 处理组 LT_{50} 为 4.99 d,而淡紫拟青霉菌株 HHYSFJ02 处理组 LT_{50} 为 5.20 d。结果表明,不同菌株对健康红火蚁工蚁均有一定的致病性,但致病力存在差异,各菌株的致病力由强到弱依次为 HHYSFJ05、HHYSFJ01、HHYSFJ02。

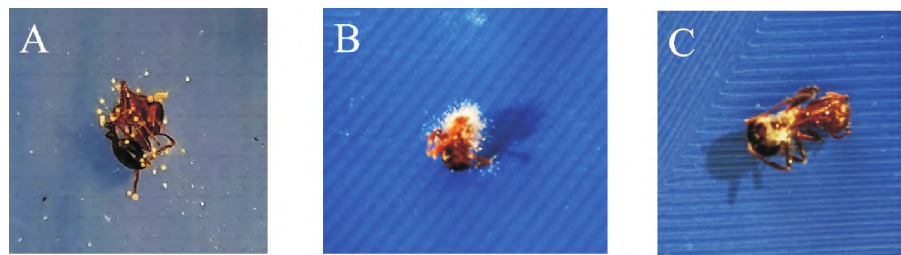


图6 健康红火蚁工蚁被不同菌株感染后的症状

Fig.6 Symptoms of healthy RIFA worker ants infected by different strains

注: A, 菌株 HHYSFJ01; B, 菌株 HHYSFJ02; C, 菌株 HHYSFJ05。Note: A, Strain HHYSFJ01; B, Strain HHYSFJ02; C, Strain HHYSFJ05.

表2 菌株 HHYSFJ01、HHYSFJ02 及 HHYSFJ05 对健康红火蚁工蚁的致病力测定结果 (10 d 后)

Table 2 Pathogenicity of strains HHYSFJ01, HHYSFJ02 and HHYSFJ05 on healthy RIFA worker ants (after 10 days)

菌株 Strains	LR _{10 d}	校正死亡率 (%) Adjusted mortality	毒力回归方程 Virulence regression equation	LT ₅₀ (d) (95% CL)
HHYSFJ01	24.00 ± 1.16 a	78.82	Y = 2.169x - 1.514	4.99 (3.85 ~ 6.31)
HHYSFJ02	22.33 ± 0.67 a	73.29	Y = 2.040x - 1.461	5.20 (3.98 ~ 6.73)
HHYSFJ05	25.67 ± 1.45 a	84.71	Y = 2.405x - 1.610	4.67 (3.66 ~ 5.75)
CK	1.67 ± 0.18 b	—	—	—

注: LR_{10 d} 为 3 次重复的平均值 ± 标准误; 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$); LT₅₀ 为 50% 红火蚁死亡所需的时间。

Note: Data of LR_{10 d} were the means ± SE of three replicates; different lowercase letters indicated that the difference was extremely significant ($P < 0.05$); LT₅₀ was the time causing 50% mortality of RIFA worker ants.

3 结论与讨论

昆虫病原真菌具有易于培养、不易产生抗性、对环境友好等优点。但在进行昆虫病原真菌的鉴定时,若单纯依靠形态学来完成鉴定很容易受到其他因素的干扰导致误判。因此,本研究在用光学显微镜观察其形态结构的基础上,结合分子生物学方法进行虫生真菌种类的鉴定,使鉴定结果更加可靠。其中球孢白僵菌和淡紫拟青霉均为有历史记载的红火蚁病原真菌,在红火蚁生物防治方面具有良好的应用前景,而红绶曲霉则首次在红火蚁虫体上分离获得,具有进一步研究的价值。

昆虫病原真菌致病力是衡量生防菌株防治潜力的重要指标之一,死亡率越高且 LT_{50} 越小,则致病力越强(雷妍圆等,2020)。本研究对筛选的3株红火蚁病原真菌进行致病力测定,当3株病原真菌在接种浓度为 1.0×10^8 孢子/mL 时,对红火蚁工蚁均有一定的致病力,但不同菌株对红火蚁的致病力不同。其中,球孢白僵菌菌株 HHYSFJ05 的致病力最强,对红火蚁工蚁的校正死亡率为 84.71%,且 LT_{50} 也最小,为 4.67 d。其致病力与杨佳后等(2009)研究报道的4株白僵菌菌株相一致,而低于吕利华等(2011)研究的白僵菌菌株 Bb04,菌株 Bb04 的累计死亡率为 100%, LT_{50} 为 2.55 d。说明球孢白僵菌菌株 HHYSFJ05 在防治红火蚁方面有较好的应用前景。红绶曲霉菌株 HHYSFJ01 对红火蚁工蚁的校正死亡率为 78.82%, LT_{50} 为 4.99 d。该菌对红火蚁有较强的致病力,为首次在国内红火蚁体上寄生并且具有较高致死力的虫生真菌,同时红绶曲霉目前未见对植物产生严重危害的相关报导,生物安全性评价较高,具有进一步研究的价值。淡紫拟青霉菌株 HHYSFJ02 对红火蚁工蚁的校正死亡率为 73.29%, LT_{50} 为 5.20 d。其致病力高于刘晓燕等(2010)在红火蚁自然种群中分离出的淡紫拟青霉菌株处理的红火蚁最高累计死亡率,为 70.60%。淡紫拟青霉对半翅目及鞘翅目的一些昆虫和线虫具有控制作用,对有害生物的防治起着重要作用(赵培静等,2007; Luangsa-ard *et al.*, 2011)。

相较于红火蚁的室内防效,虫生真菌在田间的致病力不可控因素较多,需要克服自然环境中可能受到温度、湿度、紫外线和其它生物/非生物因子导致防治效果不稳定的问题(Williams *et al.*,

2001)。红火蚁工蚁所具有的防御及清理巢穴行为,也阻碍了虫生真菌对红火蚁的侵染(贺虹等,2009;邱华龙等,2014)。此外,本研究是在室内条件下初步筛选到对红火蚁具有较高毒力的球孢白僵菌菌株,如何进行红火蚁生防菌的田间防治有待进一步探讨研究。

参考文献 (References)

- Allen GE, Buren W. Microsporidian and fungal diseases of *Solenopsis invicta* Buren in Brazil [J]. *Journal of the New York Entomological Society*, 1974, 82: 125–130.
- Eapen SJ, Beena B, Ramana KV. Tropical soil microflora of spice – based cropping systems as potential antagonists of root – knot nematodes [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2005, 88 (3): 218–225.
- Fang ZD. Plant Disease Research Methods [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1998: 62–155. [方中达. 植物研究方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 62–155]
- Feng YY. Methods for the study of pest pathogenic fungi [J]. *Forestry Survey Planning*, 2003, 2: 102–104. [冯玉元. 害虫病原真菌的研究方法 [J]. 林业调查规划, 2003, 2: 102–104]
- He H, Wang YG, Nan XN, *et al.* Advances in studies on the relationship between ants and fungi [J]. *Forestry Science*, 2009, 45 (10): 141–147. [贺虹, 王云果, 南小宁, 等. 蚂蚁和真菌关系的研究进展 [J]. 林业科学, 2009, 45 (10): 141–147]
- Lei YY, Lv LH, Wang YH, *et al.* Study on pathogenicity of a cordyceps fumosorosea against *Spodoptera frugiperda* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2020, 42 (1): 68–75. [雷妍圆, 吕利华, 王裕华, 等. 一株玫烟色虫草对草地贪夜蛾的致病性研究 [J]. 环境昆虫学报, 2020, 42 (1): 68–75]
- Liu CL. Application of entomopathogenic fungus in biological control of agricultural and forestry pests [J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2017, 3: 8–73. [刘春来. 昆虫病原真菌在农林害虫生物防治中的应用 [J]. 黑龙江农业科学, 2017, 3: 8–73]
- Liu XY, Lv LH, He YR. Isolation, identification and pathogenicity of naturally parasitic red imported fire ants (*Solenopsis invicta*) pathogenic fungi [J]. *Biological Control in China*, 2010, 26 (3): 373–377. [刘晓燕, 吕利华, 何余容. 自然寄生红火蚁病原真菌的分离、鉴定及其对红火蚁的致病力 [J]. 中国生物防治, 2010, 26 (3): 373–377]
- Liu ZJ, Liu ZB, Liu ZJ. Harm of red imported fire ant *Solenopsis invicta* and effective control methods abroad [J]. *Pesticide Science and Management*, 2005, 26 (7): 29–31. [刘政军, 刘治波, 刘志俊. 红火蚁的危害及国外有效防治方法 [J]. 农药科学与管理, 2005, 26 (7): 29–31]
- Luangsa-ard J, Houbraken J, Doorn TV, *et al.* *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, 321 (2): 141–149.
- Lv LH, Feng X, Chen HY, *et al.* The methods of field collection and laboratory breeding of red imported fire ant were introduced [J]. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2006, 43 (2): 265–267. [吕

- 利华, 冯夏, 陈焕瑜, 等. 介绍红火蚁的野外采集和实验室饲养的方法 [J]. 昆虫知识, 2006, 43 (2): 265–267]
- Lv LH, Liu XY, Xie MQ, *et al.* Screening of high virulence strains of entomogenous fungi of parasitic red imported fire ant [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2011, 32 (4): 35–39. [吕利华, 刘晓燕, 谢梅琼, 等. 寄生红火蚁虫生真菌高致病力菌株的筛选 [J]. 华南农业大学学报, 2011, 32 (4): 35–39]
- Morales VM, Jasalavich CA, Pelcher LE, *et al.* Phylogenetic relationship among several *Leptosphaeria* species based on their ribosomal DNA sequences [J]. *Mycological Research*, 1995, 99 (5): 593–603.
- Pan YF. Harm of red imported fire ant to water conservancy and hydropower project and its control countermeasures [J]. *Guangdong Water and Hydropower*, 2013, 9: 1–7, 17. [潘运方. 红火蚁对水利水电工程的危害及其防治对策 [J]. 广东水利水电, 2013, 9: 1–7, 17]
- Pitts JP, McHugh JV, Ross KG. Cladistic analysis of the fire ants of the *Solenopsis saevissima* species-group (Hymenoptera: Formicidae) [J]. *Null*, 2005, 34 (5): 493–505.
- Qiu HL, Lv LH, Zhang CY, *et al.* Defense behavior of red imported fire ant workers against pupae infected by *Metarhizium anisopliae* [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25 (9): 2658–2664. [邱华龙, 吕利华, 张春阳, 等. 红火蚁工蚁对绿僵菌侵染蛹的防御行为 [J]. 应用生态学报, 2014, 25 (9): 2658–2664]
- Shah PA, Pell JK. Entomopathogenic fungi as biological control agents [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 61 (5): 413–423.
- Song ZD, Xu YJ, Lu SY, *et al.* Effects of chemical control on red imported fire ants and native ants in green belt [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29 (11): 8. [宋侦东, 许益鏖, 陆水跃, 等. 化学防治对绿化带中红火蚁及本地蚂蚁的影响 [J]. 生态学报, 2009, 29 (11): 8]
- Wang FX, Lin FR, Zhu JQ. Quarantine and control of red imported fire ant [J]. *Plant Quarantine*, 2005, 3: 150–153. [王福祥, 林芙蓉, 朱景全. 红火蚁的检疫与控制 [J]. 植物检疫, 2005, 3: 150–153]
- Wang L, Xu YJ, Li ZL, *et al.* Pathogenicity of three strains of *Metarhizium anisopliae* against red imported fire ants [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2018, 40 (4): 103–107. [王磊, 许益鏖, 李梓琳, 等. 三株金龟子绿僵菌对红火蚁的致病力测定 [J]. 环境昆虫学报, 2018, 40 (4): 103–107]
- Wei JC. The Fungal Identification Manual [M]. Shanghai: Shanghai Science Technology Press, 1979: 92–519. [魏景超, 真菌鉴定手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 92–519]
- White TJ, Bruns T, Lee S, *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [J]. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 1990, 18 (1): 315–322.
- Williams DF, Collins HL, Oi DH. The red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae): An historical perspective of treatment programs and the development of chemical baits for control [J]. *American Entomologist*, 2001, 47 (3): 146–159.
- Yang JH, Sun F, Liao HK, *et al.* Bioassay of four *Beauveria bassiana* strains against red imported fire ants [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2009, 31 (1): 46–51. [杨佳后, 孙钊, 廖坤宏, 等. 4 株球孢白僵菌对红火蚁毒力的生物测定 [J]. 环境昆虫学报, 2009, 31 (1): 46–51]
- Zeng L, Lu YY, He XF, *et al.* Identification and damage investigation of red imported fire ants in mainland China [J]. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2005, 42 (2): 144–148, 230–231. [曾玲, 陆永跃, 何晓芳, 等. 入侵中国大陆的红火蚁的鉴定及发生为害调查 [J]. 昆虫知识, 2005, 42 (2): 144–148, 230–231]
- Zhao PJ, Ren WB, Miao CD, *et al.* Research progress and prospect of *Paecilomyces lilacinus* [J]. *Anhui Agricultural Sciences*, 2007, 30: 9672–9674, 9739. [赵培静, 任文彬, 缪承杜, 等. 淡紫拟青霉研究进展与展望 [J]. 安徽农业科学, 2007, 30: 9672–9674, 9739]