

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日
2008年5月8日 (08.05.2008)

PCT

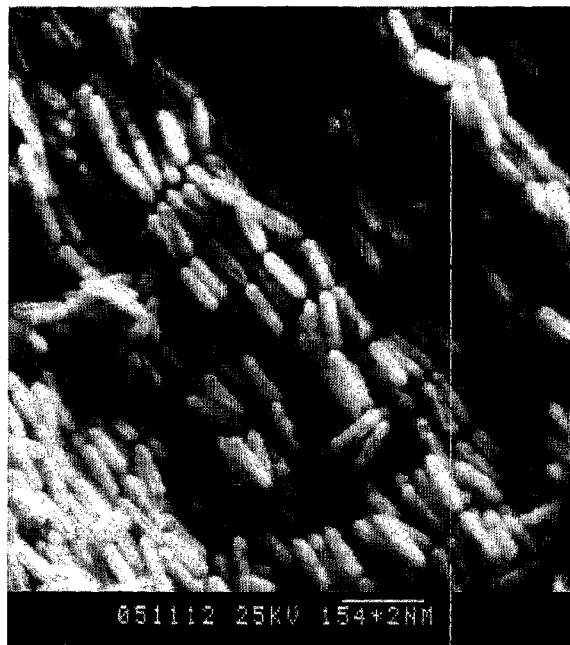
(10) 国际公布号
WO 2008/052391 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 1/14 (2006.01) *A01M 1/00* (2006.01)
A01N 63/04 (2006.01) *A01P 7/04* (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01) *C12R 1/645* (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2006/002942
- (22) 国际申请日: 2006年11月2日 (02.11.2006)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 绿色生命实验室有限公司(GREEN LIFE LABORATORY LIMITED) [CN/CN]; 中国香港特别行政区中环干诺道中168-200号信德中心西座1807室, Hong Kong (CN)。
- (72) 发明人; 及
(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 胡远扬(HU, Yuanyang) [CN/CN]; 中国湖北省武汉市武昌武汉大学东中区23栋3门302室, Hubei 430072 (CN)。董昌金(DONG, Changjin) [CN/CN]; 中国湖北省黄石市沈家营湖北师范学院63栋94号, Hubei 435002 (CN)。张珈敏(ZHANG, Jiamin) [CN/CN]; 中国湖北省武汉市武昌武汉大学珞函屯10栋1门402室, Hubei 430072 (CN)。曹旭(CAO, Xu) [CN/CN]; 中国香港特别行政区中环干诺道中168-200号信德中心西座1807室, Hong Kong (CN)。
- (74) 代理人: 永新专利商标代理有限公司北京办事处(NTD PATENT & TRADEMARK AGENCY LTD., BEIJING OFFICE); 中国北京市金融大街27号投资广场A座10层, Beijing 100032 (CN)。

[见续页]

(54) Title: METARHIZIUM ANISOPLIAE VAR. DCJHYIUM AND USES THEREOF

(54) 发明名称: 金龟子绿僵菌武汉株LJ01及其应用



A

Lj01(*M. anisopliae* var. *dcjhyium*)的孢子分布在孢子簇上形成栅栏状排列

A THE SPORES CLUSTER OF METARHIZIUM ANISOPLIA LJ01 IN AN ARRAY OF RAIL FENCE

(57) Abstract: The present invention discloses an isolated *Metarhizium anisopliae* variant (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*), which is referred as *Metarhizium anisopliae* Lj01. It is identified as a new variant of *Metarhizium anisopliae* by the morphologic, physiologic, biochemical and molecular biologic analysis (CCTCC No. M206077, GenBank accession No. DQ288247). Also disclosed are the bioinsecticide produced by said variant and the use of the variant in the extermination of pests, such as termites.

[见续页]

WO 2008/052391 A1



- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,

SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告。
- 包括按细则13之二规定在说明书以外提交的关于生物材料保藏的说明。

(57) 摘要:

本发明公开了分离的金龟子绿僵菌的变种 (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*), 称为金龟子绿僵菌武汉株 Lj01。金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 经形态、生理生化和分子生物学鉴定, 是金龟子绿僵菌的一个新变种 (CCTCC 保藏号是 M206077, GeneBank 登录号为 DQ288247)。本发明还公开了利用分离的绿僵菌武汉株 Lj01 制备的生物杀虫剂, 以及其在杀灭白蚁等害虫中的应用。

金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 及其应用

发明的领域

本发明涉及生物杀虫剂。具体而言，涉及金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 (*Meterhizium anisopliae* var. *dcjhyium*, 其保藏号是 CCTCC M206077), 还涉及包括该菌株的生物杀虫剂, 以及用其杀灭昆虫的方法。

发明背景

白蚁个体虽小却堪称世界上的主要害虫之一, 其危害几乎涉及到国民经济的各个领域, 对房屋建筑、水库堤坝、山林果园、通讯设备等的危害尤为严重。世界范围内, 除南极洲外, 各大州都有分布, 其危害面积约占陆地面积的 50%, 尤其是在热带、亚热带地区, 白蚁造成的危害更为严重, 更为突出。到目前为止, 在中国东自台湾省, 西达西藏的东南部, 南起南海诸岛, 北至辽宁省, 除黑龙江、吉林、内蒙古、宁夏、青海和新疆等省区外, 全国 25 个省、市、自治区都有白蚁分布, 其危害面积接近全国总面积的 40%。据估计, 中国白蚁危害造成的经济损失每年约 20~25 亿元人民币, 特别是长江以南各省的危害尤为严重。白蚁对文物古迹、堤坝水库等造成的毁坏则难以用经济数据进行直接统计。

白蚁的防治主要有化学防治和生物防治。采用传统的化学方法进行白蚁防治会带来一系列的环境问题，在防治白蚁的同时也破坏了生态环境，不仅污染大，蚁患可能复发，而且对白蚁的天敌（蜘蛛、蚂蚁、蜻蜓等多种禽类，兽类等）也有杀灭作用。长期大剂量使用剧毒化学农药致使白蚁对化学杀虫剂产生了一定的抗性，不但不能有效控制白蚁，而且面临三个无法解决的难题：①环境污染，残毒上升，人畜均遭毒害；②用药浓度不断提高，防治费用不断增加，不得不无休止地研制新农药；③杀伤天敌，破坏了生态平衡，引起害虫再猖獗和次虫害大爆发，导致自然界中恶性循环，这在国际上被为“三 R”（Residue, Resistance and Resurgence, 即残毒、抗性、再猖獗）。与化学农药相比，微生物杀虫剂用于白蚁防治有如下优点：①白蚁不易产生抗药性；②特异性强，对脊椎动物和人类无害；③有自然传播感染的能力；④不污染环境；⑤能保护害虫天敌。目前，国内外用于白蚁生物防治的微生物杀虫剂主要是虫生真菌白僵菌（*Beauveria*）和绿僵菌（*Metarhizium*），尤以绿僵菌使用较多。

金龟子绿僵菌（*Metarhizium anisopliae*）属于半知菌亚门绿僵菌属，其孢子萌发侵入昆虫体壁后可在血腔内大量繁殖，引起昆虫死亡。绿僵菌分生孢子附着于寄主体表，萌发产生入侵菌丝，分泌各种相应的酶，如几丁质酶、蛋白酶、脂酶等，破坏寄主体表，侵入寄主体内，产生营养菌丝，并可不断分枝。同时在生长

过程中产生一系列“环状六肽毒素”（破坏素 destruxin A-E），注入昆虫体内可立即引起虫体瘫痪及肌肉松弛，损伤细胞膜、细胞骨架、细胞核的形态和 Ca^{2+} 的平衡等。同时，入侵的菌丝在其体内繁殖和扩散蔓延，并形成网状结构，侵入到白蚁各个组织和器官之中，致使整个白蚁肌体遭受破坏。

中国专利申请号 93117629.8，发明名称：白蚁的生物防治，披露了利用真菌（*Gloeophyllum trabeum*）引诱白蚁接触绿僵菌（*M. anisopliae* ATCC 62176）来杀灭白蚁。其中所使用的绿僵菌（*M. anisopliae* ATCC 62176）对白蚁有驱避作用，所以需要利用真菌（*Gloeophyllum trabeum*）来掩盖该驱避作用。

Stimac[美国专利号 4,925,663（1990）]发现球孢白僵菌可用来控制火蚁（*Solenopsis*），大米、菌丝体和孢子（分生孢子）的混合物可被火蚁吞食或被当作诱饵搬巢中。

Stimac 等[美国专利号 5,683,689（1997）]发现生长在大米上的球孢白僵菌菌株的分生孢子可用控制蟑螂、木工蚁（Carpenter ants）和厨蚁（Pharaoh ants）。

Sugiura 等[美国专利号 5,728,573（1998）]发现萌发的真菌和昆虫体寄生的真菌如布氏白僵菌、球孢白僵菌、多形白僵菌、金

龟子绿僵菌和蜡蛤轮枝菌等真菌的休眠孢子可用于杀灭昆虫如白蚁、蟑螂、蚂蚁、球形木虱、潮虫、大百脚和头盾唇足类。

Milner 等(1997)获得了白蚁控制的美国专利第 5,595,746 号,金龟子绿僵菌分生孢子被发现并宣称其在非害虫大批出没地区作为一种白蚁驱除剂及在害虫大批出没地区作为一种白蚁控制方法。

早在 1965 年开始,国际上已开展了大量的利用白僵菌 (*B. bassiana*) 和金龟子绿僵菌 (*M. anisopliae*) 控制白蚁研究 (Culliney, T. W, Grace, J. K, 2000. Prospects for the biological control of subterranean termites, with special reference to *Coptotermes formosanus*. Bull. Entomol. Res, 90, 9-21. Grace, J. K, 1997. Biological control strategies for suppression of termites. J. Agric. Entomol. 14, 281-289), 这两种真菌被证实在实验室对白蚁有较好的防治效果, 但野外控制效果非常差 (Hänel, H, Watson, J. A. L, 1983. Preliminary field tests on the use of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Nasutitermes exitiosus*. Bull. Entomol. Res. 73, 305-313. Milner, R.J, 2003. Application of biological control agents in mound building termites-experiences with *Metarhizium* in Australia. Sociobiology 41, 419-428)。主要原因之一是白蚁对白僵菌和绿僵菌驱避性较大; 二是毒性较低; 三是社会昆虫白蚁对患病或死亡个体的清除或隔离

性 (Rath, A. C. , 2000. The use of entomopathogenic fungi for control of termites. *Biocontrol Sci. Technol.* 10, 563-581)。

1994 年在美国注册了一个以金龟子绿僵菌 (*M. anisopliae*) 为生物杀虫剂控制白蚁的商业化产品, 但不久从市场上撤了出来, 其原因也是因为缺乏毒力和野外试验的低效性。

1997 年美国专利局授与了一个基于金龟子绿僵菌 (*M. anisopliae*) 作为生物杀虫剂控制白蚁的专利 (Milner et al, US patent No. 5,595,746, 1997), 同样面临着对毒力低, 驱避性大的问题 (Wang, C. L., Powell, J. E., 2004. Cellulose bait improves the effectiveness of *Metarhizium anisophae* as a microbial control of termites. *Biological Control.* 30, 523-529)。

因此, 迫切需要寻找到对白蚁毒力强、驱避性小的新的有效生物杀虫剂, 控制日益严重的白蚁等害虫的危害。

发明概述

除非另有定义, 这里提及的所有技术的和科学的术语与这项发明所属的普通技术领域的普遍理解具有相同的意思。尽管与这里所描述的相似的或等同的方法与材料能用于目前发明的试验与测试, 但是合适的方法与材料将在下面被描述。所有出版物, 专利申请, 专利, 和这里提及的其他参考文献都通过在此引证而全

文合并于本文。一旦有所冲突，以本文中的定义为准。此外，材料，方法和实施例等都仅是说明性的，并不具有限制性。

我们发现了金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 (*Metarhizium anisopliae* var. *dcjhyium*) (保藏号是 CCTCC M206077) 对于控制和杀灭昆虫害虫是十分有效的，特别是对散白蚁属 (*Reticulitermes*)、乳白蚁属 (*Coptotermes*)、土白蚁属 (*Odontotermes*) 的白蚁是十分有效的，例如，对台湾乳白蚁 (*Coptotermes formosanus* Shiraki)、黑胸散白蚁 (*Reticulitermes chinensis* Snyder)、黑翅土白蚁 (*Odontotermes formosanus* Shiraki) 等具有良好的昆虫病源性。绿僵菌新变种武汉株 Lj01 可以在价格低廉的培养基上大量培养出来。绿僵菌新变种武汉株 Lj01 所产生的孢子可以制备成生物杀虫剂。

金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 (*Metarhizium anisopliae* var. *dcjhyium*) 已经被保藏于中国典型培养物保藏中心，该保藏中心的地址是中国武汉武汉大学，所保藏的金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 已经被证明是存活的，并获得了保藏号 CCTCC M206077。

根据本发明的发现，本发明的一个目的是从自然环境中分离出一种对昆虫害虫毒力强、驱避性小或无驱避性的真菌变种。

本发明的另一个目的是提供在实验室和野外对昆虫害虫杀灭效果好的生物杀虫剂。

本发明的又一个目的是从自然环境中分离出一种对白蚁毒力强、驱避性小或无驱避性的真菌变种。

本发明的又一个目的是提供在实验室和野外对黑胸散白蚁和其蚁巢杀灭效果好的生物杀虫剂。

本发明的又一个目的是提供在实验室和野外对台湾乳白蚁和其蚁巢杀灭效果好的生物杀虫剂。

本发明的又一个目的是提供在实验室和野外对黑翅土白蚁和其蚁巢杀灭效果好的生物杀虫剂。

本发明的又一个目的是提供杀灭白蚁等害虫的方法。

附图的简要说明

图 1 扫描电镜显示金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 (*M. anisopliae* var.*dcjhyium*) 的孢子分布在孢子簇上形成栅栏状排列;

图 2 扫描电镜显示金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 (*M. anisopliae* var.*dcjhyium*) 在 PDA 培养基上的孢子簇;

图 3 为扫描电镜显示生长在白蚁身上的金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 (*M. anisopliae* var.*dcjhyium*) 的菌丝体;

图 4 为扫描电镜显示生长在白蚁头部上的金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*) 的孢子簇;

图 5 金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*, CCTCC M206077) 酯酶同工酶电泳图谱。泳道 1=AB027337, 泳道 2=AB099941, 泳道 3=AF280631, 泳道 4=AB099510, 泳道 5=CCTCC M206077;

图 6 核糖体 18S rDNA 部分序列显示了金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 (CCTCC M206077) 与金龟子绿僵菌其他几个变种 (AB099510, AB099941, AF280631, and AB027337) 的差异位点 (粗体);

图 7 金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 (CCTCC M206077) 基于核糖体 18S rDNA 的系统进化树分析 (非加权配对算术平均法 3.0 版, UPGMA method of MEGA ver.3.0);

图 8 白蚁杀虫盒示意图;

图 9 白蚁杀虫盒的另一种设计的示意图;

图 10 金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 对白蚁的剂量效应。

结合这些附图以及通过下面详细的描述与权利要求书, 本发明的其他特点与优点将会是明了的。

发明的详细描述

本发明人从位于中国湖北省武汉市的武汉大学珞珈山野外蚁巢死亡的白蚁尸体上分离到了一株新的杀虫真菌，并得到了其纯培养物。

在本发明的一个实施方案中，金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 (*Metarhizium anisopliae* var. *dcjhyium*) (保藏号是 CCTCC M206077) 被分离和培养，获得了对昆虫害虫为病原性的培养物，该培养物是基本均质的。

金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 的分离、培养与鉴定

I、金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 的分离与培养

本发明人从位于中国湖北省武汉市的武汉大学珞珈山野外蚁巢死亡的白蚁尸体上分离到了一株新的杀虫真菌，并得到了其纯培养物。在改良固体 PDA 培养基 (土豆 200g, 蔗糖 20g, 蛋白胨 10g, 琼脂 20g, 水 1000ml。121℃, 1 个大气压下灭菌 1hr) 上进行恒温 (28℃) 培养。

本领域的普通技术人员可以不经创造性的劳动就可选择和确定其它的适宜本发明金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 的培养基。

II、金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*) 的鉴定

1) 金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 毒力试验比较

供试菌株：金龟子绿僵菌 (*M. anisopliae*) 五个变种[CCTCC M206077、AB099510、AB099941、AF280631 和 AB027337]分别在改良 PDA 固体培养基上 28℃ 恒温培养 10 天，孢子用 0.05% Tween-80 稀释成 $3 \times 10^7 - 3 \times 10^8$ 孢子/ml 悬液。

供试白蚁：黑翅土白蚁 (*O. formosanus* Shiraki)

玻缸底部垫一张滤纸，用湿棉球保湿，每玻缸放入 50 只供试黑翅土白蚁，实验组分别加入 1ml 浓度为 $3 \times 10^7 - 3 \times 10^8$ 孢子/ml 的 *M. anisopliae* 孢子悬液，对照组加入 1ml 0.05% Tween80，每试验 5 个重复，其试验结果如下面表 1 所示：

表 1 金龟子绿僵菌武汉株 Lj-01 (CCTCC M206077) 对黑翅土白
蚁毒力试验比较

处理	白蚁死亡率 (%)				
	3 天	6 天	9 天	12 天	15 天
0.05%Tween-80 (对照)	0.0	1.0	1.5	2.8	5.0
3×10^7 孢子/ml					
CCTCC M206077	76.8	100.0	100.0	100.0	100.0
AB099510	3.2	15.5	41.1	73.3	98.6
AB099941	5.7	20.0	56.7	94.6	100.0
AF280631	2.3	17.6	37.2	69.2	95.4
AB027337	2.0	13.4	39.5	67.8	93.2
3×10^8 孢子/ml					
CCTCC M206077	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
AB099510	6.0	21.1	53.5	86.4	100.0
AB099941	8.3	25.4	75.3	100.0	100.0
AF280631	5.7	18.6	59.2	97.1	100.0
AB027337	6.5	23.2	57.7	84.2	100.0

实验结果显示,当金龟子绿僵菌武汉株 Lj01(CCTCC M206077) 的孢子浓度为 3×10^8 孢子/ml 时,黑翅土白蚁第三天的死亡率为 100%,而金龟子绿僵菌的其它四个变种(AB099510、AB099941、AF280631 和 AB027337) 在同等孢子浓度作用于白蚁时,在第三

天时的死亡率均不超过 10%，直到第 12-15 天的死亡率才达到 100%。这说明，与金龟子绿僵菌的其它几个变种相比，金龟子绿僵菌武汉株 Lj01(CCTCC M206077)对黑翅土白蚁的毒力最强。

2) 金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 接种 3 天后产生大量绒毛状至棉絮状的白色菌落，培养 9 天出现绿色孢子，后逐渐变成黑色，孢子与白色菌丝同时大量存在；生长速度较慢；光学显微镜下孢子呈长圆柱形；扫描电镜显示圆柱形孢子成簇生长，排列成栅栏状（图 1-2）。纯培养物接种白蚁后，死亡白蚁尸身上长出菌丝和孢子丛，长圆柱形的孢子成簇排列在白蚁尸身上（图 3-4）。

3) 金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 酯酶同工酶分析

金龟子绿僵菌的 5 个变种（CCTCC M206077、AB027337、AB099510、AB099941 和 AF280631）分别接入已灭菌的 100ml 培养液中（蔗糖 10g、蛋白胨 2.5g、酵母膏 5g，水 1000ml），180rpm/min 28℃ 摇瓶培养 60h 后过滤获取菌丝体。每克菌丝体加 1ml 0.1M TBE(Tris-H₃BD₄-EDTA)浸提液，-20℃ 冰冻 24h 后研磨离心（4000r/min, 20min），取上清液置冰箱保存。用聚丙烯酰胺垂直平板电泳（浓缩胶 3%，分离胶 7%，电极缓冲液 Tris-Gly, pH8.9。点样量 50ml，电泳指示剂为溴酚兰，用稳压：120v 0.5h, 175v 2.5h）。用牢固兰 B 盐染色，电泳结果如图 5。从图 5 中可以看出，金龟子绿僵菌的 5 个变种显示出了清楚的酯酶同工酶酶谱（同工

酶是基因次级表达的产物，可以作为遗传学上的一个生化指标，利用酯酶同工酶可以进行真菌亲缘关系分析和基因定位等)。与金龟子绿僵菌的其它四个菌株 (AB099510、AB099941、AF280631 和 AB027337) 相比，金龟子绿僵菌武汉株 Lj-01 (CCTCC M206077) 显示出了一个明显不同的酯酶同工酶图谱。金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 含有 3 条酶带 (Rf 分别为 0.4490、0.5198 和 0.8367)，而金龟子绿僵菌的其它四个菌株含有 6 条酶带，其中只有一条是与金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 的公共酶带 (Rf 为 0.4490)。

4) 抽提金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*) 的总基因组 DNA，以 5'-CCAATGCCCTTCGGGGCTCA-3' 和 5'-CCACCTCTCTGGGCCAGTCC-3' 为引物，用 Taq DNA 多聚酶对 18S rDNA 进行扩增。50 μ l PCR 反应体系为：10 \times buffer 5 μ l, 25mmol/L MgCl₂ 3 μ L, 2mmol/L dNTP 5 μ L, 10 μ mol/L primer R 2.5 μ L, 10 μ mol/L primer L 2.5 μ L, 5U/ μ L Taq E 0.5 μ L, dd H₂O 26.5 μ L 和 DNA 模板 5 μ L (~10ng)，94 $^{\circ}$ C 先变性 3min，每个循环 94 $^{\circ}$ C 变性 1min，55 $^{\circ}$ C 退火 1min，72 $^{\circ}$ C 延伸 2min，共 35 个循环，最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。反应完成后，18S rDNA PCR 扩增产物进行克隆和测序 (1400 bp)。金龟子绿僵菌武汉株 Lj-01 (CCTCC M206077) 高度保守的 18S rDNA 序列输入 GenBank 进行 BLAST 比对，结果显示金龟子绿僵菌武汉株 Lj-01 (CCTCC M206077) 与金龟子绿僵菌的四个菌株 (AB099510, AB099941, AF280631 和

AB027337) 有 99% 的相似性。经 18S rDNA 序列比对, 金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 与金龟子绿僵菌的四个菌株在 18S rDNA 序列的差异性主要表现为 26 个碱基对的置换: 即 4 个 g→c, 2 个 c→g, 5 个 t→a (转换) 和 4 个 g→a, 2 个 a→g, 1 个 g→t, 1 个 t→g, 3 个 a→c 和 4 个 t→c (颠换; 图 6)。

5) 金龟子绿僵菌武汉株 Lj01(CCTCC M206077) 18S rDNA 序列用 NCBI Blast Program 进行分析, 并用非加权配对算术平均法 (UPGMA method of MEGA ver. 3.0) 作进化树比较 (图 7)。金龟子绿僵菌武汉株 Lj01(CCTCC M206077) 和金龟子绿僵菌的四个菌株 (AB027337, AB099510, AB099941 和 AF280631) 形成一个单系的群, 有 99% 的相似性, 共同构成金龟子绿僵菌 (*M. anisopliae*) 的种。

本发明的另一个实施方案中, 涉及一种生物杀虫剂, 其包括金龟子绿僵菌武汉株 Lj01。金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 的真菌本身, 其孢子, 分生孢子, 菌丝体, 都可以作为生物杀虫剂的活性成分。优选金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 真菌, 其孢子和分生孢子, 更为优选的是金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 真菌的孢子。金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 真菌的孢子的稳定性好, 便于储存, 运输和使用。

本发明的生物杀虫剂的活性成分可以是金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 的真菌本身, 其孢子, 分生孢子, 菌丝体。它们对昆虫害虫

的驱避性小，甚至没有驱避性。特别是，本发明的生物杀虫剂对白蚁的驱避性小，甚至没有驱避性。

本发明的又一个实施方案中，本发明的生物杀虫剂是一种白蚁杀灭剂，其包括金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 的真菌本身，或其孢子，或分生孢子，或其菌丝体，或它们的任意组合作为活性成分，优选金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 的真菌和其孢子，更优选的是其孢子。本发明的白蚁杀灭剂对白蚁的驱避性小，甚至没有驱避性。本发明的白蚁杀灭剂可以有效地杀灭众多种类的白蚁，例如，能杀灭包括但不限于台湾乳白蚁 (*Coptotermes formosanus* Shiraki)、黑胸散白蚁 (*Reticulitermes chinensis* Snyder)、黑翅土白蚁 (*Odontotermes formosanus* Shiraki)、黄翅大白蚁 (*Macrotermes barneyi* Light)、截头堆砂白蚁 (*Cryptotermes domesticus* Haviland)、欧洲木白蚁 (*Kaloterms flavicollis* Fabr.)、堆砂白蚁 (*Cryptotermes brevis* Walker)、桑特散白蚁 (*Reticulitermes santonensis* Feytaud)、印巴结构木异白蚁 (*Heterotermes indicola* Wasmann)、黄胸散白蚁 (*Reticulitermes flavipes* Kollar)、美国散白蚁 (*Reticulitermes Hesperus* Banks)、北美湿木白蚁 (*Zootermopsis angusticollis* Hagen)、印度象白蚁 (*Nasutitermes moratus* Silvestri)、曲颚乳白蚁 (*Coptotermes curvignathus* Holmgren)、小楹白蚁 (*Incisitermes minor* Hagen)、地下散白蚁 (*Reticulitermes virginicus*

Banks)、养菌白蚁(*Macrotermes michaelseni* Sjostedt)和可可大白蚁(*Macrotermes bellicosus* Smeathman)等。

本发明的生物杀虫剂对昆虫毒性强。具体而言,本发明的金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 的真菌本身,孢子,分生孢子,菌丝体,培养物,或它们的任意混合物等,都对昆虫具有很强的病源性。在不受任何机理限制的条件下,本发明的金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 是能够寄生于多种害虫的一类真菌,具有触毒和胃毒活性,通过体表或取食作用进入害虫体内,在害虫体内不断繁殖通过消耗营养、机械穿透、产生毒素,并不断在害虫种群中传播,使害虫致死。

侵染方式 金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 的分生孢子首先附着于寄主体表,一旦能正常萌发生长,则产生入侵菌丝,发生入侵,最终导致寄主死亡。在这个过程中,金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 形成特殊结构,如附着孢等,同时分泌各种相应的酶,如几丁质酶、蛋白酶、脂酶等,破坏寄主体表,侵入寄主体内,产生营养菌丝,并可不断分枝。

附着胞是附着在寄主表皮上的分生孢子,其萌发后形成芽管,芽管对表皮有很强的定向性。穿透昆虫表皮需要产生一系列精确的识别结构,如附着胞、侵染钉和穿透菌丝,使病原菌在寄主表皮上一个小的范围内有效的集中物理(机械)和溶解能量,这种

结构的产生有助于病原菌的入侵。附着胞内含大量的线粒体、高尔基体、内质网和核糖体，可旺盛地合成和分泌水解酶。

酶：白蚁的表皮主要由蛋白质、几丁质和脂类构成，其中，主要成分是蛋白质、几丁质微纤维，它们是绿僵菌最初侵染和入侵的位点。产生各种胞外酶是绿僵菌具有的降解寄主体表的策略之一，菌丝入侵的时候产生相应的酶（蛋白质、几丁质和脂类降解酶）来降解这些物质，以便菌丝侵入，同时，为菌丝的进一步生长提供营养物质。

毒素的合成与菌丝的蔓延 目前认为，真菌毒素是通过干扰寄主细胞的免疫系统而起作用的。绿僵菌在生长过程中会产生一系列的“环状六肽毒素”（破坏素 destruxin），注入白蚁体内可立即引起虫体瘫痪及肌肉松弛，损伤细胞膜、细胞骨架、细胞核的形态和 Ca^{2+} 的平衡等。同时，入侵的菌丝在其体内繁殖和扩散蔓延，并形成网状结构，侵入到白蚁各个组织和器官之中，致使整个白蚁遭受破坏。

金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 (*M.anisopliae* var. *dcjhyium*) 除具有绿僵菌上述的特征外，同时还具有：①毒力强；②对白蚁驱避性小；③杀灭白蚁快、防治效果好等优点。金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 能很好地适应蚁巢的生活条件（营养、温度、湿度、 CO_2 浓度等），具有致使白蚁发病的能力，在很短时间（30—50 天）内，

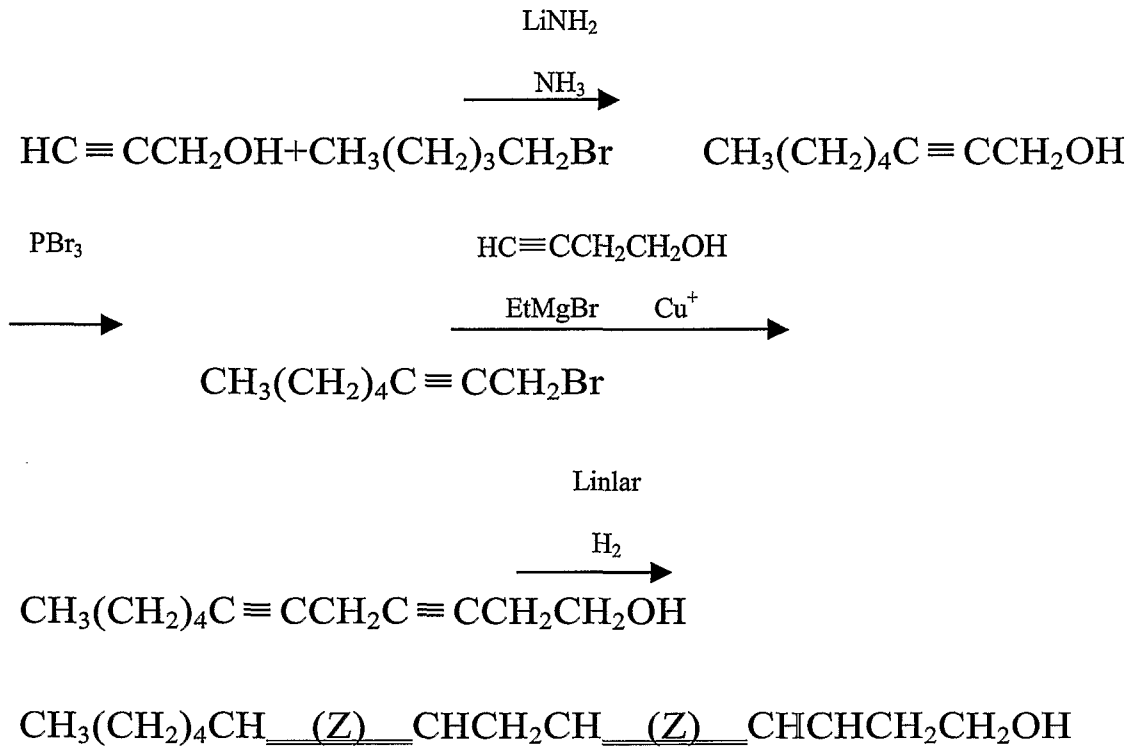
能使蚁巢中白蚁种群所有的个体被其感染致死，达到彻底杀灭全巢白蚁的目的。

本发明的又一个实施方案中，涉及一种生物杀虫剂，其包括金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 真菌，或其孢子，或其分生孢子，或其菌丝，或它们的任意混合物，此外，还进一步包括昆虫信息素。

白蚁示踪信息素是指由白蚁个体分泌到体外，在白蚁种群内的个体之间相互联系和传递信息的化学物质，白蚁种群需要借助信息素进行防卫、筑巢、觅食以及个体识别等活动。信息素类似物是指从白蚁以外的来源获取（如人工合成）并同白蚁示踪信息素具有相似活性的化学物质，用信息素类似物引诱和防治白蚁具有高效、无毒、无污染、不伤益虫等优点，具有很大的应用前景。白蚁隐居地下 2-5m 深处，引诱白蚁的人工信息素的合成对充分发挥金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 防治白蚁的效果起到了很好的辅助作用。经过努力，已经完成了黑翅土白蚁示踪信息素类似物 (Z,Z)-3,6-十二碳二烯醇-1 的化学合成。

以丙炔醇和正溴戊烷为原料，在氨基锂的作用下合成 2-辛炔醇-1，后者在三溴化磷作用下进行溴代反应。然后在亚铜离子为催化剂和乙基溴美的作用下跟 3-丁炔醇-1 反应生成 3,6-十二碳二炔醇，最后通过 Lindlar 催化剂进行选择性的顺式加氢。总产率为

42%。最后产物为无色油状液体。GC 纯度为 94.3%。合成途径如下：



人工合成的白蚁信息素的生物活性分别用 Figure-Y 法和 Student test 进行检测，结果显示，在最佳浓度条件下，黑翅土白蚁对天然信息素提取物和人工合成信息素反应没有显著差别。表明人工合成 (Z,Z)-3,6-十二碳二烯醇-1 具有理想的活性。

本发明的再一个实施方案中，涉及一种生物杀虫剂，其包括金龟子绿僵菌武汉株 Lj01，昆虫信息素，还进一步包括昆虫诱饵。

本发明的生物杀虫剂中可以采用昆虫诱饵包括各种食物引诱剂。各种适宜的食用引诱剂包括但不限于玉米粉、松花粉、甘蔗渣、凤尾草、蔗糖、蛋白质、酵母、糖蜜、松朽木粉、泡桐朽木粉、黑木耳粉、谷氨酸钠，L-亮氨酸、天冬氨酸、维生素 B、糊精、饴糖等。其中，玉米粉、松花粉、甘蔗渣、黑木耳粉、蔗糖效果更好。食物引诱剂对白蚁的引诱作为示踪信息素对白蚁引诱的一种补充。本领域的普通技术人员可以根据具体的情况选择适宜的诱饵。

本发明的生物杀虫剂中还可以采用各种辅剂，例如，各种填充剂，例如，包括但不限于松树锯末屑、天然动物或植物蛋白、淀粉、糊精、糖粉、乳糖、微晶纤维素、可溶性淀粉、无机盐类、甘露醇等。其中，松树锯末屑，微晶纤维素、天然动、植物蛋白更好。本领域的普通技术人员可以根据具体的情况选择适宜的填充剂。

此外，本发明的生物杀虫剂中适用的辅剂还包括各种粘合剂，例如，包括但不限于纤维类粉、卵磷脂或玉米淀粉、淀粉浆、羧甲基纤维素钠（CMC-Na），羟丙基纤维素（HPC）、甲基纤维素（MC）、乙基纤维素（EC），羟丙基甲基纤维素（HPMC）、明胶、聚乙烯吡咯烷酮（PVP）等。其中，羧甲基纤维素钠（CMC-Na）、

卵磷脂和玉米淀粉效果更好。本领域的普通技术人员可以根据具体的情况选择适宜的粘合剂。

经室内毒力试验和野外白蚁防治试验证实，以金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 作为杀虫剂活性成分、昆虫信息素作为引诱剂，辅以食物引诱的本发明的白蚁杀灭剂，可用于所有白蚁的生物防治，并对白蚁种群有很好的防治和杀灭效果，例如，杀灭的白蚁包括但不限于台湾乳白蚁 (*Coptotermes formosanus* Shiraki)、黑胸散白蚁 (*Reticulitermes chinensis* Snyder)、黑翅土白蚁 (*Odontotermes formosanus* Shiraki)、黄翅大白蚁 (*Macrotermes barneyi* Light)、截头堆砂白蚁 (*Cryptotermes domesticus* Haviland)、欧洲木白蚁 (*Kaloterms flavicollis* Fabr.)、堆砂白蚁 (*Cryptotermes brevis* Walker)、桑特散白蚁 (*Reticulitermes santonensis* Feytaud)、印巴结构木异白蚁 (*Heterotermes indicola* Wasmann)、黄胸散白蚁 (*Reticulitermes flavipes* Kollar)、美国散白蚁 (*Reticulitermes Hesperus* Banks)、北美湿木白蚁 (*Zootermopsis angusticollis* Hagen)、印度象白蚁 (*Nasutitermes moratus* Silvestri)、曲颚乳白蚁 (*Coptotermes curvignathus* Holmgren)、小楹白蚁 (*Incisitermes minor* Hagen)、地下散白蚁 (*Reticulitermes virginicus* Banks)、养菌白蚁 (*Macrotermes michaelsoni* Sjostedt) 和可可大白蚁 (*Macrotermes bellicosus* Smeathman) 等。

令人惊奇的是，本发明的生物杀虫剂还对很多种其它害虫具有很强的昆虫病源性。除了各种白蚁之外，本发明的生物杀虫剂还可用于红火蚁 (*Solenopsis invicta*)、木工蚁 (Carpenter ants)、厨蚁 (Pharoach ants)、蝗虫 (Locust)、松毛虫 (*Dendrolimus*) 和蟑螂 (cockroach) 等害虫的生物防治。

将本发明生物杀虫剂施用于这些害虫的巢穴或其路径的附近，可以控制和杀死这些害虫。

在本发明又一个实施方案中，本发明的金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 作为活性成分所制备的生物杀虫剂，可以是常用的各种剂型。

金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 生物杀虫剂常用的剂型包括但不限于粉剂、油悬剂、诱杀块 (杀虫盒)、微囊剂、油烟雾剂、火箭抛撒剂、紫外线防护剂、水悬乳剂、纳米剂等。其中诱杀块 (杀虫盒)、火箭抛撒剂和粉剂效果更好。本领域的普通技术人员可以根据具体的情况选择适宜的剂型。

①粉剂：将金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 孢子粉通过适当的载体吸附，制成其孢子粉剂。

②油悬剂：将金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 孢子粉悬浮于矿物油中，并添加适量的增效剂 ($MgCl_2$ 、 $MgSO_4$ 和 Na_2CO_3 等)，制备成其油悬剂。

③诱杀块(杀虫盒): 金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 孢子粉作为活性成分, 昆虫信息素作引诱剂, 再添加适量的食物引诱剂, 填充剂和粘合剂, 可制成诱杀块。将如此制备的诱杀块放入适当的装置中, 可制备成杀虫盒。

④微囊剂: 微胶囊制剂是指将金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 孢子粉包在囊壁物质(如淀粉、无机盐等)中制成几微米至几百微米的微小球体, 靠改变囊壁厚度和孔径大小控制药物释放速度。

⑤油烟雾剂: 将金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 孢子粉悬浮于 0 号柴油中, 采用脉冲式烟雾机进行烟雾雾化, 经喷嘴进行喷射, 金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 孢子仍保持毒力和活性, 能直接对松毛虫等致死。

⑥火箭抛撒剂: 将金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 孢子粉进行复配后, 装入火箭弹头, 装菌量为 $600\text{g} \pm 50\text{g}$, 弹头将孢子粉带到空中爆炸抛撒落后, 分布在防治目标的叶面上。

⑦紫外线防护剂: 金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 孢子粉中加入木质素及蔗糖溶液, 可以防止紫外线的伤害(阳光中的紫外线是降低金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 孢子制剂防治效果的首要因素), 提高残效期。

⑧水悬乳剂：将金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 孢子粉加入 0.05%Tween80 溶液中制成水悬乳剂。

⑨纳米剂型：将金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 孢子粉加入适当的载体（如淀粉、矿物盐等）通过纳米技术进行纳米化，制成纳米剂型。

在本发明又一个实施方案中，提供了使用本发明的金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 生物杀虫剂防治和杀灭昆虫害虫的方法。

本发明的金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 生物杀虫剂的使用方法包括但不限于喷洒、杀虫盒诱杀、蚁巢直接灌注，采用脉冲式烟雾机进行烟雾雾化，飞机撒药和火箭抛撒等。

本发明还提供了一种对室内和野外的白蚁而言十分有效和易于使用的装置。该装置如图 8 所示。这是一种杀虫盒，其可以是一个如图 8 所示的整体结构，基本上是长柱体，在其一端是尖锐端，易于将该装置埋入地下，其另一端是非尖锐端，并有中空部分，其中可以放置本发明的生物杀虫剂。根据实际情况的需要，在尖锐端部分也可以设置中空部分，放置本发明的生物杀虫剂。

在本发明的另一个实施方案中，如图 9 所示，这种杀虫盒分为两个部分，其中一个部分具有尖锐端，另一个部分具有非尖锐端，并有中空部分，其中可以放置本发明的生物杀虫剂，所述的

尖锐端和非尖锐端之间设置有相互锁紧结构，将两个部分结合为一体。如果需要在室内使用该杀虫盒时，只需要使用非尖锐端部分即可。该非尖锐端还可以配置两面贴等辅助装置，易于将该非尖锐端粘附在选定的位置。如果需要在室外使用该杀虫盒时，只要将这两个部分通过所述的相互锁紧装置连接固定起来，就可以方便地埋入地下。

对于上述的本发明的杀虫盒而言，本领域的普通技术人员可以在不脱离本发明的精神的条件下，进行各种修饰，修改。这些修饰和修改都是本发明的权利要求书所限定的保护范围内的。

如上所述，本发明的生物杀虫剂还具有对蝗虫、松毛虫和蟑螂等害虫的杀灭作用。对于蝗虫和松毛虫而言，采用飞机撒药和火箭抛撒等措施效果更好。

下面的实施例进一步描述了本发明，但它们都不是对本发明的限制。本发明的范围由权利要求书所限定。

实施例

实施例 1

供试菌株:金龟子绿僵菌新变种武汉株 Lj01(*M. anisopliae* var. *dcjhyium*) 在改良 PDA 固体培养基 (新鲜马铃薯 200g、蔗糖 20g、

蛋白胨 10g, 琼脂 20g, 水 1000 mL。121℃ 1 个大气压灭菌 30min 后倒平板) 上, 28℃ 下恒温培养 10 天, 孢子用 0.05% Tween - 80 稀释成 $3 \times 10^7 - 3 \times 10^8$ 孢子/ml 悬液。

供试白蚁: 黑翅土白蚁(*Odontotermes formosanus* Shiraki)

供试信息素: 人工合成黑翅土白蚁示踪信息素类似物(Z,Z) - 3,6-十二碳二烯醇 - 1(DDE - OH), 浓度为 0.2 ~ 10ng/ml.

① 实验室毒力试验

玻缸底部垫一张滤纸, 用湿棉球保湿, 每玻缸放入 100 只供试白蚁, 黑翅土白蚁示踪信息素类似物 DDE - OH 与绿僵菌新变种 *M.anisopliae* var. *dcjhyium* 的孢子悬液和 0.05% Tween 80 混合, 信息素的最终浓度分别调节为 0.2 ~ 100 ng/ml。实验组每玻缸分别加入 1ml 浓度为 $3 \times 10^7 - 3 \times 10^8$ 孢子/ml 的 *M.anisopliae* var. *dcjhyium* 孢子悬液(含 DDE-OH), 对照组加入 1ml 0.05% Tween 80(含 DDE - OH), 每试验 5 个重复, 其试验结果如下面的表 2 所示。

表2 金龟子绿僵菌武汉株 Lj-01 对黑翅土白蚁实验室毒力试验
结果

处 理		白蚁死亡率(%)			
Lj-01	DDE-OH(ng/ml)	1 天	2 天	3 天	4 天
对照 (0.05%Tween-80)	0	0.0	1.0	3.0	3.0
	0.2	0.0	1.0	3.0	3.0
	2	0.0	1.0	3.0	3.0
	4	0.0	1.0	3.0	3.0
	6	0.0	1.0	3.0	3.0
	8	0.0	1.0	3.0	3.0
	10	0.0	1.0	3.0	3.0
	20	0.0	1.0	3.0	3.0
	50	0.0	1.0	3.0	3.0
	100	0.0	1.0	3.0	3.0
3×10^7 孢子/ml	0	23.6	51.4	76.8	100.0
	0.2	24.8	53.8	79.9	100.0
	2	26.9	59.2	83.6	100.0
	4	30.5	66.7	89.5	100.0
	6	38.0	79.5	96.3	100.0
	8	36.6	72.3	91.1	100.0
	10	29.3	67.4	80.5	100.0
	20	18.4	46.6	63.3	92.7
	50	13.2	25.7	47.5	72.6
	100	8.9	17.5	32.6	49.3
3×10^8 孢子/ml	0	38.8	93.3	100.0	
	0.2	39.9	95.0	100.0	
	2	45.3	98.8	100.0	
	4	56.0	100.0	100.0	
	6	63.7	100.0	100.0	
	8	57.3	100.0	100.0	
	10	52.1	96.5	100.0	
	20	31.5	66.7	89.8	100.0
	50	20.7	48.6	71.2	87.7
	100	13.3	27.4	43.7	62.0

从上述实验室毒力试验结果可以看出，DDE-OH 浓度为 6ng/ml 时对黑翅土白蚁的引诱效果最好。金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 孢子浓度为 3×10^8 孢子/ml 时，对黑翅土白蚁的杀灭效果最好。当金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 的浓度为 3×10^8 孢子/mL，DDE-OH 浓度为 6ng/mL 时，第一天对黑翅土白蚁的杀灭率为 63.7%，第二天对黑翅土白蚁的杀灭率为 100%。

② 野外毒力试验

在野外预先选好 3 个黑翅土白蚁蚁巢，在每个蚁巢周围或蚁路上每隔 1-2m 距离分别埋入本发明的白蚁杀虫盒，每个杀虫盒含 3×10^8 个金龟子绿僵菌 Lj01 孢子，6 ng 信息素 DDE-OH、食物引诱剂、填充剂和食物粘合剂。6 周后挖开蚁巢，观察发现三个蚁巢的白蚁都已全部死亡。实验结果显示，通过信息素 DDE-OH 和食物引诱剂共同作用，吸引黑翅土白蚁的工蚁外出取食，通过体表或口腔把杀虫真菌金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 的孢子带回蚁巢中，孢子萌发，菌丝长满蚁巢菌圃，白蚁个体之间互相感染，造成传染病流行，最终金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 杀灭整个蚁巢的白蚁。

实施例 2

金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 杀灭白蚁的剂量效应试验

供试菌株：金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 在改良 PDA 固体培养基上 28℃ 恒温培养 10 天，孢子用 0.05% Tween-80 稀释成 3×10^2 — 3×10^{13} 孢子/ml 悬液。

供试白蚁：黑翅土白蚁(*Odontotermes formosanus* Shiraki)、台湾乳白蚁 (*Coptotermes formosanus* Shiraki) 和黑胸散白蚁 (*Reticulitermes chinensis* Snyder)。

每种白蚁取 12 个玻缸，底部垫一张滤纸，用湿棉球保湿，每玻缸放入 100 只供试白蚁，并分别加入 1ml 浓度为 3×10^2 — 3×10^{13} 孢子/ml 悬液，每试验 3 个重复，观察记录每种浓度处理下白蚁半数死亡所需时间 (LT₅₀)。实验结果如下面的表 3 所示。

表 3 金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 对白蚁的剂量效应

孢子浓度 (孢子/ml)	LT ₅₀ (h)		
	<i>O. formosanus</i>	<i>C. formosanus</i>	<i>R. chinensis</i>
3×10^2	178.0	189.4	216.6
3×10^4	89.7	75.5	93.0
3×10^6	64.5	49.6	69.3
3×10^7	46.8	28.1	49.2
3×10^8	40.0	20.9	33.4
3×10^9	40.0	20.7	33.3
3×10^{11}	40.0	20.8	33.5
3×10^{13}	39.9	21.0	33.4

金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 对白蚁的剂量效应作图，如图 10 所示。从实验结果可看出， 3×10^8 孢子/ml 是金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 杀灭白蚁的最佳浓度。

实施例 3

供试菌株：金龟子绿僵菌新变种武汉株 Lj01，在改良 PDA 固体培养基上 28℃ 恒温培养 10 天，孢子用 0.05% Tween-80 稀释成 3×10^7 — 3×10^8 孢子/ml 悬液。

供试白蚁：台湾乳白蚁（家白蚁）*Coptotermes formosanus* Shiraki

① 实验室毒力试验

取 15 个玻缸，底部垫一张滤纸，用湿棉球保湿，每玻缸放入 100 只供试台湾乳白蚁（家白蚁），实验组每玻缸分别加入 1ml 浓度为 3×10^7 — 3×10^8 孢子/ml 悬液，对照组加入 1ml 0.05% Tween-80，每试验 5 个重复，毒力试验结果如下面的表 4 所示。

表 4 金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 对台湾乳白蚁的实验室毒力试验结果

处 理	白蚁死亡率 (%)			
	1 天	2 天	3 天	4 天
0.05% Tween-80 (对照)	1.0	2.0	3.6	5.0
3×10^7 孢子/ml	42.6	75.5	100.0	
3×10^8 孢子/ml	57.7	100.0		

实验室毒力试验结果显示，浓度为 3×10^8 孢子/ml 的金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 的孢子对台湾乳白蚁有很好的杀灭效果。

② 野外毒力试验

在野外选择台湾乳白蚁（家白蚁）*C. formosanus* 3 个蚁巢，将蚁巢挖开一个小洞，分别灌入浓度为 3×10^8 孢子/ml 的金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 孢子悬液 100ml，并将蚁巢封好。4-6 周后挖开蚁巢，观察发现金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 菌丝已长满蚁巢菌圃，孢子大量形成，每个蚁巢的白蚁都已全部死亡。

实施例 4

供试菌株：金龟子绿僵菌新变种武汉株 Lj01，在改良 PDA 固体培养基上 28℃ 恒温培养 10 天，孢子用 0.05% Tween-80 稀释成 $3 \times 10^7 - 3 \times 10^8$ 孢子/ml 悬液。

供试白蚁：黑胸散白蚁 *Reticulitermes chinensis* Snyder

① 实验室毒力试验

取 15 个玻缸，底部垫一张滤纸，用湿棉球保湿，每玻缸放入 100 只供试黑胸散白蚁，实验组每玻缸分别加入 1ml 浓度为 3×10^7 - 3×10^8 孢子/ml 悬液，对照组加入 1ml 0.05% Tween-80，每试验 5 个重复，毒力试验结果如下面的表 5 所示。

表 5 金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 对黑胸散白蚁的实验室毒力试验结果

处 理	白蚁死亡率 (%)			
	1 天	2 天	3 天	4 天
0.05% Tween-80 (对照)	0.0	0.5	2.0	2.5
3×10^7 孢子/ml	21.9	48.7	69.4	100.0
3×10^8 孢子/ml	35.9	89.4	100.0	

实验室毒力试验结果显示，浓度为 3×10^8 孢子/ml 的金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 孢子对黑胸散白蚁有很好的杀灭效果。

② 野外毒力试验

在野外选择黑胸散白蚁 *R. chinensis* 3 个蚁巢，将蚁巢挖开一个小洞，分别灌入浓度为 3×10^8 孢子/ml 的金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 孢子悬液 100ml，并将蚁巢封好。4—6 周后挖开蚁巢，观察

发现金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 菌丝已长满菌圃，孢子大量充满整个蚁巢，蚁巢中的白蚁全部死亡。

实施例 5

供试菌株：金龟子绿僵菌新变种武汉株 Lj01，在改良 PDA 固体培养基上 28℃ 恒温培养 10 天，孢子用 0.05% Tween—80 稀释成 $3 \times 10^7 - 3 \times 10^8$ 孢子/ml 悬液。

供试白蚁：截头堆砂白蚁 *Cryptotermes domesticus* Haviland

① 实验室毒力试验

取 15 个玻缸，底部垫一张滤纸，用湿棉球保湿，每玻缸放入 100 只供试截头堆砂白蚁 *C. domesticus*，实验组每玻缸分别加入 1ml 浓度为 $3 \times 10^7 - 3 \times 10^8$ 孢子/ml 悬液，对照组加入 1ml 0.05% Tween—80，每试验 5 个重复，毒力试验结果如下面表 6 所示。

表 6 金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 对截头堆砂白蚁实验室毒力试验结果

处理	白蚁死亡率 (%)			
	1 天	2 天	3 天	4 天
0.05% Tween-80 (对照)	0.0	1.2	2.0	4.0
3×10^7 孢子/ml	29.7	52.5	74.0	100.0
3×10^8 孢子/ml	36.0	80.5	100.0	

实验室毒力试验结果显示，浓度为 3×10^8 孢子/ml 的金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 孢子对截头堆砂白蚁有很好的防治效果。

② 野外毒力试验

选择截头堆砂白蚁 *C. domesticus* 3 个野外蚁巢，将蚁巢挖开一个小洞，分别灌入浓度为 3×10^8 孢子/ml 的金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 孢子悬液 100ml，并将蚁巢封好。加入白蚁杀灭剂后第 6 周挖开蚁巢，观察发现金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 的菌丝和孢子已充满整个蚁巢，蚁巢中的白蚁全部死亡。

实施例 6

金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 对住宅室内乳白蚁（家白蚁）的防治效果

供试菌株：金龟子绿僵菌武汉株 Lj01，孢子浓度为 3×10^8 孢子/ml。

供试白蚁：一居民住宅室内乳白蚁（家白蚁） *Coptotermes formosanus* Shiraki

一有十年居住历史的居民住宅室内发生了乳白蚁（家白蚁）危害，衣柜、木地板、木门、天花板上发现了乳白蚁 *C. formosanus*

肆虐。我们在衣柜、木地板、门和天花板上的蚁路上，安置了 6-8 个杀蚁盒，每个杀蚁盒含有杀蚁真菌金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 3×10^8 个孢子、食物引诱剂、填充剂和食物粘合剂等。一个月后，住宅室内再未见白蚁危害，室内的白蚁全部被消灭，并可见一些已经死亡的白蚁，死亡的白蚁尸身上长满了金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 的菌丝和孢子。

实施例 7

金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 对堆砂白蚁的毒力试验

供试菌株：金龟子绿僵菌武汉株 Lj01，在改良 PDA 固体培养基上 28°C 恒温培养 10 天，孢子用 0.05% Tween-80 稀释成 3×10^7 - 3×10^8 孢子/ml 悬液。

供试白蚁：堆砂白蚁 *Cryptotermes havilandi* Holmgren

取 15 个玻缸，底部垫一张滤纸，用湿棉球保湿，每玻缸放入 50 只供试堆砂白蚁，实验组每玻缸分别加入 1ml 浓度为 3×10^7 - 3×10^8 孢子/ml 的孢子悬液，对照组加入 1ml 0.05% Tween-80，每试验 5 个重复，实验室毒力试验结果如下面表 7 所示。

表 7 金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 对堆砂白蚁的实验室毒力试验结果

处理	白蚁死亡率 (%)			
	1 天	2 天	3 天	4 天
0.05% Tween-80 (对照)	0.0	0.0	2.3	3.5
3×10^7 孢子/ml	27.5	46.0	68.4	100.0
3×10^8 孢子/ml	35.0	78.6	100.0	

毒力试验结果显示，金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 对堆砂白蚁 *C. havilandi* 有很好的杀灭作用。

实施例 8

金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 对印度象白蚁的毒力试验

供试菌株：金龟子绿僵菌武汉株 Lj01，在改良 PDA 固体培养基上 28℃ 恒温培养 10 天，孢子用 0.05% Tween-80 稀释成 3×10^8 孢子/ml 悬液。

供试白蚁：印度象白蚁 *Nasutitermes moratus* Silvestri

取 6 个玻缸，底部垫一张滤纸，用湿棉球保湿，每玻缸放入 100 只供试印度象白蚁，实验组每玻缸分别加入 1ml 浓度为 3×10^8 孢子/ml 的孢子悬液，对照组加入 1ml 0.05% Tween-80，每试验 3 个重复，实验室毒力试验结果如下面表 8 所示。

表 8 金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 对印度象白蚁的实验室毒力
试验结果

处理	白蚁死亡率 (%)			
	1 天	2 天	3 天	4 天
0.05% Tween-80 (对照)	0.0	0.0	1.3	1.8
3×10^8 孢子/ml	21.7	69.6	95.0	100.0

毒力试验结果显示, 金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 对印度象白蚁 *N. moratus* 有很好的杀灭效果。

实施例 9

金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 对黄胸散白蚁的毒力试验

供试菌株: 金龟子绿僵菌武汉株 Lj01, 在改良 PDA 固体培养基上 28℃ 恒温培养 10 天, 孢子用 0.05% Tween-80 稀释成 3×10^7 - 3×10^8 孢子/ml 悬液。

供试白蚁: 黄胸散白蚁 *Reticulitermes flavipes* Kollar

取 15 个玻缸, 底部垫一张滤纸, 用湿棉球保湿, 每玻缸放入 100 只供试黄胸散白蚁, 实验组每玻缸分别加入 1ml 浓度为 3×10^7 - 3×10^8 孢子/ml 的孢子悬液, 对照组加入 1ml 0.05% Tween-80, 每试验 3 个重复, 实验室毒力试验结果如下面表 9 所示。

表 9 金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 对黄胸散白蚁的实验室毒力
试验结果

处理	白蚁死亡率 (%)			
	1 天	2 天	3 天	4 天
0.05% Tween-80 (对照)	0.0	0.0	1.8	2.4
3×10^7 孢子/ml	19.5	43.9	72.3	100.0
3×10^8 孢子/ml	36.7	87.0	100.0	

毒力试验结果显示, 金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 对黄胸散白蚁 *R. flavipes* 有很好的杀灭作用。

实施例 10

金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*) 对红火蚁的毒力试验

红火蚁的拉丁名为 “*Solenopsis invicta*”, 意思是 “无敌的蚂蚁”, 主要攻击对象是人类或其他动物, 而且难以防范。它们通常采取集体行动, 反复用身上的刺来攻击同一目标, 受攻击后身上就会产生像丘疹一样的红点, 火烧般的痛。在美国, 它们每年破坏损失达到 10 亿英镑。从 30 年代开始, 美国南部地区至今已有

84人丧命于红火蚁。在中国南部，已发现了大量红火蚁的存在。已严重威胁着人类和牲畜的安全。

供试菌株：金龟子绿僵菌武汉株 Lj01(*M. anisopliae* var. *dcjhyium*)，在改良 PDA 固体培养基上 28℃ 恒温培养 10 天，孢子用 0.05% Tween-80 稀释成 3×10^8 孢子/ml 悬液。

供试害虫：红火蚁 (*Solenopsis invicta*)

试验取 4 个小塑料桶，在中国南方（如深圳）红火蚁肆虐的地区野外选取 4 个红火蚁蚁巢，用铁铲将红火蚁和巢土一起铲入小桶中，每桶取一巢红火蚁，约有 1.8-2.0 万只。每小桶分别加入 200ml 浓度为 3×10^8 孢子/ml 的 Lj01 孢子悬液，并用致密的铁丝网将桶口封好，以防红火蚁逃逸桶口。对照采用一个小塑料桶，只加红火蚁和巢土，不加 Lj01 孢子悬液，并加 200ml 灭菌的 0.05% Tween-80 水溶液作对照，同时用铁丝网封口。试验和对照组放在室温（25℃）培养。

试验结果：观察发现，培养到第六天试验组已开始有红火蚁死亡，桶内蚁巢巢土上有白色的金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 菌丝和孢子，第九天开始有大量红火蚁死亡，桶内出现大量金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 菌丝和孢子，第十三天试验组桶内红火蚁已全部死

亡，而对照桶内红火蚁仍然成活，未发现有死亡的红火蚁出现。这说明金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 对红火蚁有很好的杀灭作用。

实施例 11

金龟子绿僵菌武汉株 Lj01(*M. anisopliae* var.*dcjhyium*)对蝗虫的毒力试验

供试菌株：金龟子绿僵菌武汉株 Lj01(*M. anisopliae* var.*dcjhyium*)，在改良 PDA 固体培养基上 28℃ 恒温培养 10 天，孢子用 0.05% Tween-80 稀释成 3×10^7 - 3×10^8 孢子/ml 悬液。

供试害虫：蝗虫 (locust)

试验取 9 只小塑料桶，底部分别铺一层滤纸，用湿棉球保湿，每小桶放入 30 只蝗虫。实验组每小桶分别加入 10ml 浓度为 3×10^7 - 3×10^8 孢子/ml 的 Lj01 孢子悬液，对照组加入 10ml 0.05% Tween-80，每试验 3 个重复，实验室毒力试验结果如下面表 10 所示。

表 10 金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 对蝗虫实验室毒力试验结果

处理	蝗虫死亡率 (%)				
	3 天	6 天	9 天	12 天	15 天
0.05% Tween-80 (对照)	0.0	0.0	1.8	2.3	3.0
3×10^7 孢子/ml	0.0	15.6	39.7	88.0	100.0
3×10^8 孢子/ml	3.4	32.5	77.4	100.0	

毒力试验结果显示,金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 对蝗虫(locust)有很好的杀灭作用。10ml 浓度为 3×10^8 孢子/ml Lj01 处理蝗虫后,第 9 天的死亡率为 77.4%, 第 12 天的死亡率为 100%。

实施例 12

金龟子绿僵菌武汉株 Lj01(*M. anisopliae* var.*dcjhyium*)对松毛虫的毒力试验

供试菌株: 金龟子绿僵菌武汉株 Lj01(*M. anisopliae* var.*dcjhyium*), 在改良 PDA 固体培养基上 28℃ 恒温培养 10 天, 孢子用 0.05% Tween-80 稀释成 3×10^8 孢子/ml 悬液。

供试害虫: 松毛虫 (*Dendrolimus*)

试验取 6 只小塑料桶, 底部分别铺一些新鲜的松树枝, 每小桶放入 50 条松毛虫到新鲜的松针上。实验组每小桶分别喷入 10ml 浓度为 3×10^8 孢子/ml 的 Lj01 孢子悬液, 对照组往松针上喷入 10ml 0.05% Tween-80, 每试验 3 个重复, 实验室毒力试验结果如下面表 11 所示。

表 11 金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 对松毛虫的实验室毒力试验结果

处理	松毛虫死亡率 (%)			
	3 天	6 天	9 天	12 天
0.05% Tween-80 (对照)	0.0	0.0	2.1	3.2
3×10^8 孢子/ml	8.9	41.3	94.6	100.0

毒力试验结果显示, 金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 对松毛虫 (*Dendrolimus*) 有很好的杀灭作用。10ml 浓度为 3×10^8 孢子/ml Lj01 孢子悬液处理松毛虫第 9 天后, 松毛虫的死亡率达到 94.6%。

实施例 13

金龟子绿僵菌武汉株 Lj01(*M. anisopliae* var.*dcjhyium*)对蟑螂的毒力试验

供试菌株: 金龟子绿僵菌武汉株 Lj01(*M. anisopliae* var.*dcjhyium*), 在改良 PDA 固体培养基上 28℃ 恒温培养 10 天, 孢子用 0.05% Tween-80 稀释成 3×10^8 孢子/ml 悬液。

供试害虫: 德国小蠊 (*Blattella germanica*)

分别取小桶(上面有盖, 能通气)6只, 每只小桶底部铺一层滤纸, 用湿棉球保湿, 各加入蟑螂(德国小蠊)30只, 桶底部各放入新鲜去皮土豆 2 块。实验组在桶底新鲜土豆块上每桶滴加 10ml 浓度为 3×10^8 孢子/ml 的金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 孢子, 对照组滴加 10ml 0.05% 的 Tween-80。各 3 个重复。定期进行观察, 蟑螂的死亡情况如下表 12 所示。

表 12 金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 对蟑螂的毒力实验结果

处理	蟑螂死亡率 (%)				
	9 天	11 天	13 天	15 天	17 天
0.05 % Tween-80 (对照)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3×10^8 孢子/ml	0.0	6.7	24.5	75.0	100.0

从实验结果可以看出，金龟子绿僵菌武汉株 Lj01(*M. anisopliae* var.*dcjhyium*)对德国小蠊 (*B. germanica*) 有较好的杀灭作用。金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 能进行蟑螂的生物防治。

虽然这里已经详细叙述了本发明的具体的方面，采用了各种实施例来说明本发明，但是，这些都是出于说明目的，并不在任何方面限定本发明的权利要求书的范围。特别地，在不偏离权利要求书中定义的本发明的精神和范围的前提下，可以有对本发明的各种替代，改变，和修正。此外，未要求的发明也是预期的。申请者保留在随后的权利要求中追加这些发明的权利。

权利要求书

1. 一种分离的、基本均质的金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 (*Meterhizium anisopliae* var. *dcjhyium*), 其特征就在于如保藏号是 CCTCC M206077 的菌株。
2. 根据权利要求 1 的金龟子绿僵菌武汉株 Lj01, 其是昆虫病源性的真菌。
3. 根据权利要求 1 的金龟子绿僵菌武汉株 Lj01, 其对于黑胸散白蚁 (*Reticulitermes chinensis* Snyder) 为昆虫病源性的。
4. 根据权利要求 1 的金龟子绿僵菌武汉株 Lj01, 其对于台湾乳白蚁 (*Coptotermes formosanus* Shiraki) 为昆虫病源性的。
5. 根据权利要求 1 的金龟子绿僵菌武汉株 Lj01, 其对于黑翅土白蚁 (*Odontotermes formosanus* Shiraki) 为昆虫病源性的。
6. 根据权利要求 1 的金龟子绿僵菌武汉株 Lj01, 其对于下组中的一种或一种以上的昆虫为病源性的: 黄翅大白蚁 (*Macrotermes barneyi* Light)、截头堆砂白蚁 (*Cryptotermes domesticus* Haviland)、欧洲木白蚁 (*Kaloterms flavicollis* Fabr.)、堆砂白蚁 (*Cryptotermes brevis* Walker)、桑特散白蚁

(*Reticulitermes santonensis* Feytaud)、印巴结构木异白蚁(*Heterotermes indicola* Wasmann)、黄胸散白蚁(*Reticulitermes flavipes* Kollar)、美国散白蚁(*Reticulitermes hesperus* Banks)、北美湿木白蚁(*Zootermopsis angusticollis* Hagen)、印度象白蚁(*Nasutitermes moratus* Silvestri)、红火蚁(*Solenopsis invicta*)、木工蚁(Carpenter ants)、厨蚁(Pharoach ants)、蝗虫(Locust)、松毛虫(*Dendrolimus*)和蟑螂(cockroach)。

7. 一种被从其天然生存环境中分离出来并被培养的昆虫杀灭有效量的金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*), 其保藏号是 CCTCC M206077。
8. 根据权利要求 7 的昆虫杀灭有效量的金龟子绿僵菌武汉株 Lj01, 其是昆虫病源性的真菌。
9. 根据权利要求 7 的昆虫杀灭有效量的金龟子绿僵菌武汉株 Lj01, 其对于黑胸散白蚁 (*Reticulitermes chinensis* Snyder) 为昆虫病源性的。
10. 根据权利要求 7 的昆虫杀灭有效量的金龟子绿僵菌武汉株 Lj01, 其对于台湾乳白蚁 (*Coptotermes formosanus* Shiraki) 为昆虫病源性的。

11. 根据权利要求 7 的昆虫杀灭有效量的金龟子绿僵菌武汉株 Lj01, 其对于黑翅土白蚁 (*Odontotermes formosanus* Shiraki) 为昆虫病源性的。
12. 根据权利要求 7 的昆虫杀灭有效量的金龟子绿僵菌武汉株 Lj01, 其对于下组中的至少一种昆虫为病源性的: 黄翅大白蚁 (*Macrotermes barneyi* Light)、截头堆砂白蚁 (*Cryptotermes domesticus* Haviland)、欧洲木白蚁 (*Kaloterms flavicollis* Fabr.)、堆砂白蚁 (*Cryptotermes brevis* Walker)、桑特散白蚁 (*Reticulitermes santonensis* Feytaud)、印巴结构木异白蚁 (*Heterotermes indicola* Wasmann)、黄胸散白蚁 (*Reticulitermes flavipes* Kollar)、美国散白蚁 (*Reticulitermes hesperus* Banks)、北美湿木白蚁 (*Zootermopsis angusticollis* Hagen)、印度象白蚁 (*Nasutitermes moratus* Silvestri)、红火蚁 (*Solenopsis invicta*)、木工蚁 (Carpenter ants)、厨蚁 (Pharaoh ants)、蝗虫 (Locust)、松毛虫 (*Dendrolimus*) 和蟑螂 (cockroach)。
13. 一种生物杀虫剂, 其特征在于包括昆虫杀灭有效量的如权利要求 1 至 12 中任何一项所述的金龟子绿僵菌武汉株 Lj01。

14. 根据权利要求 13 的生物杀虫剂，其中所述的金龟子绿僵菌武汉株 Lj01 是该真菌的菌体、孢子、菌丝体、或它们的任意组合。
15. 根据权利要求 13 或 14 的生物杀虫剂，进一步包括昆虫信息素。
16. 根据权利要求 15 中的生物杀虫剂，进一步包括昆虫食物引诱物。
17. 根据权利要求 16 的生物杀虫剂，进一步包括辅剂。
18. 一种昆虫杀灭方法，所述的昆虫是下组中的至少一种：台湾乳白蚁 (*Coptotermes formosanus* Shiraki)、黑胸散白蚁 (*Reticulitermes chinensis* Snyder)、黑翅土白蚁 (*Odontotermes formosanus* Shiraki)、黄翅大白蚁 (*Macrotermes barneyi* Light)、截头堆砂白蚁 (*Cryptotermes domesticus* Haviland)、欧洲木白蚁 (*Kaloterms flavicollis* Fabr.)、堆砂白蚁 (*Cryptotermes brevis* Walker)、桑特散白蚁 (*Reticulitermes santonensis* Feytaud)、印巴结构木异白蚁 (*Heterotermes indicola* Wasmann)、黄胸散白蚁 (*Reticulitermes flavipes* Kollar)、美国散白蚁 (*Reticulitermes hesperus* Banks)、北美湿木白蚁 (*Zootermopsis angusticollis* Hagen)、印度象白蚁

(*Nasutitermes moratus* Silvestri)、红火蚁(*Solenopsis invicta*)、木工蚁(Carpenter ants)、厨蚁(Pharoach ants)、蝗虫(Locust)、松毛虫(*Dendrolimus*)和蟑螂(cockroach),其特征在于向所述的昆虫的生存环境施放如权利要求13所述的包括金龟子绿僵菌武汉株LJ01的生物杀虫剂。

19. 根据权利要求18的昆虫杀灭方法,其中所述的金龟子绿僵菌武汉株Lj01是该真菌的菌体、孢子、菌丝体、或它们的任意组合。

20. 金龟子绿僵菌武汉株Lj01(其保藏号是CCTCC M206077)在制备昆虫杀灭剂中的应用。

21. 一种昆虫杀灭装置,基本为长柱体,其特征在于所述的长柱体包括:

尖锐端,所述尖锐端基本为楔形;

非尖锐端,所述的非尖锐端具有中空的部分。

22. 根据权利要求21所述的昆虫杀灭装置,其中所述的中空部分内包括有如权利要求13-17中任何一项所述的生物杀虫剂。



图 1 Lj01(*M. anisopliae* var. *dechyium*)的孢子分布在孢子簇上形成栅栏状排列

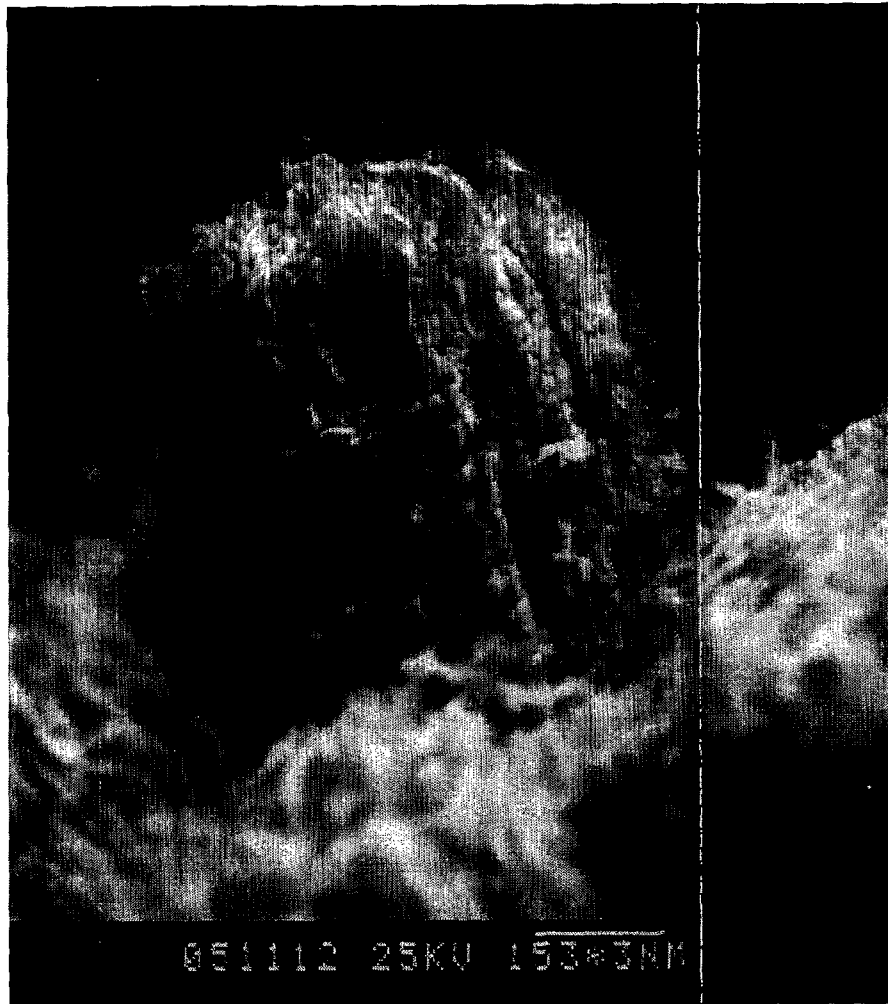


图 2 PDA 培养基上 Lj01(*M. anisopliae* var. *dejhylum*)的孢子簇

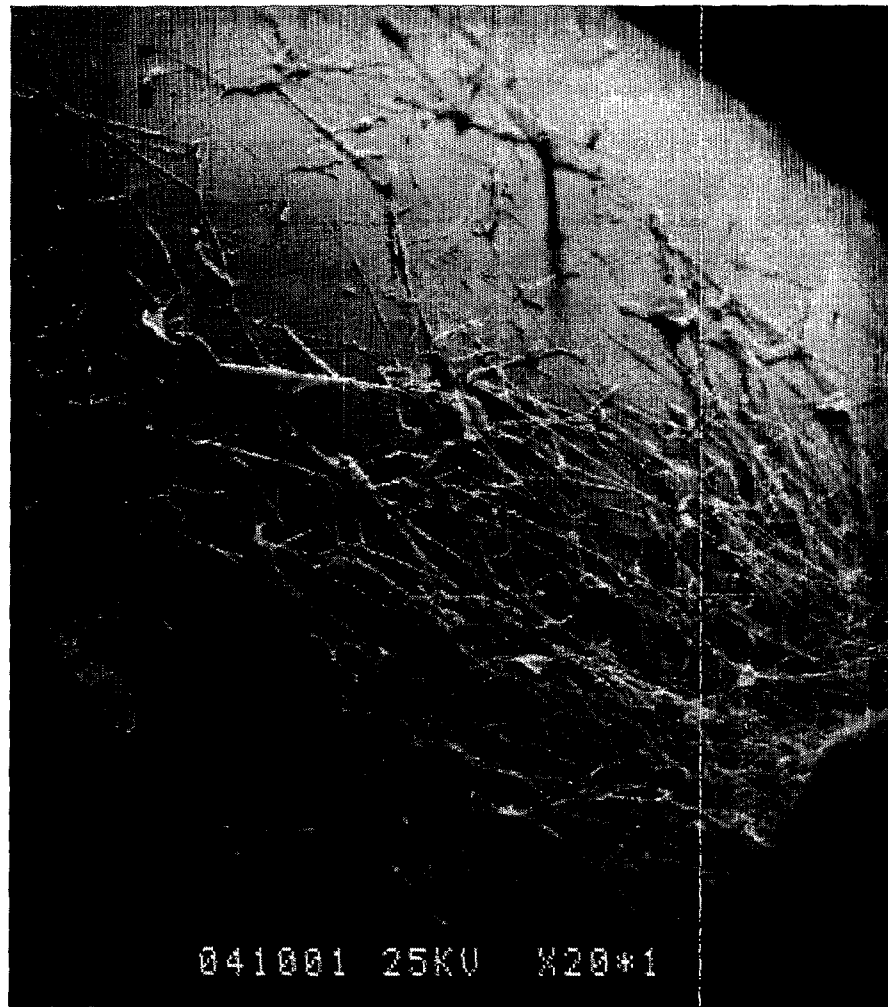


图3 生长在白蚁身上的 Lj01(*M. anisopliae* var. *dcjhyium*)的菌丝体

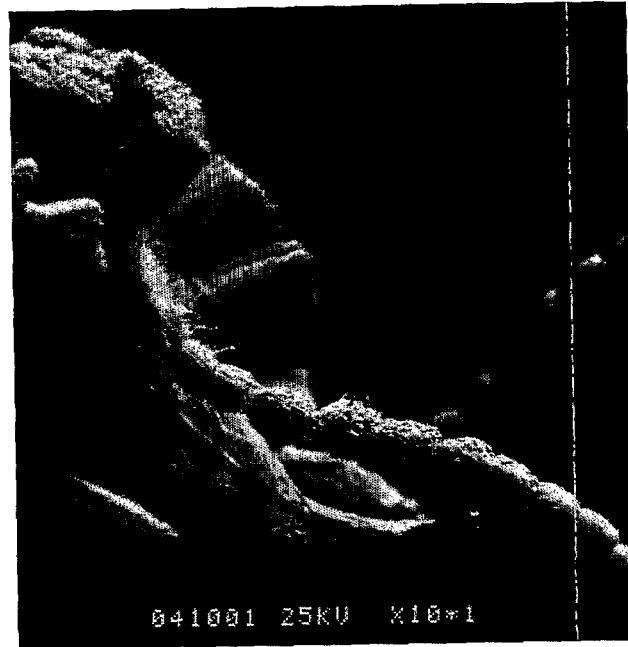


图 4 白蚁头部 Lj01(*M. anisopliae* var. *dejhylum*)的孢子簇

5/9

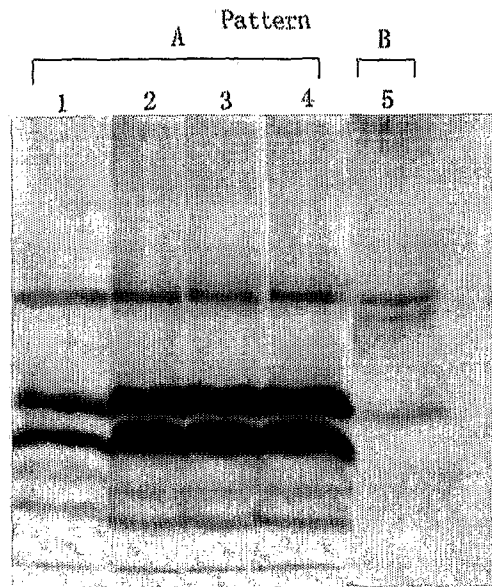


图 5 Lj01(*M. anisopliae* var. *dejhium*, DQ288247)酯酶同工酶电泳图谱

Lane 1= AB027337, Lane 2=AB099941, Lane 3=AF280631,
Lane 4=AB099510, Lane 5=DQ288247.

DQ288247	acgc ggg cttcttagagggactatcggctcaagccgatggaagttgaggcaataacaggctctg	1177
AB099510	acgc ggg cttcttagagggactatcggctcaagccgatggaagttgaggcaataacaggctctg	1479
AB099941	acgc ggg cttcttagagggactatcggctcaagccgatggaagttgaggcaataacaggctctg	1480
AF280631	acgc ggg cttcttagagggactatcggctcaagccgatggaagttgaggcaataacaggctctg	1492
AB027337	acgc agg cttcttagagggactatcggctcaagccgatggaagttgaggcaataacaggctctg	1492
DQ288247	tgatgcccttagatgttctggccgcacgcgcgctacactgacggagccagcgagtaatt	1237
AB099510	tgatgcccttagatgttctggccgcacgcgcgctacactgacggagccagcgagtaatt	1439
AB099941	tgatgcccttagatgttctggccgcacgcgcgctacactgacggagccagcgagtaatt	1440
AF280631	tgatgcccttagatgttctggccgcacgcgcgctacactgacggagccagcgagtaatt	1452
AB027337	tgatgcccttagatgttctggccgcacgcgcgctacactgacggagccagcgagtaatt	1452
DQ288247	ccttg ccg gaaggccc cg gtaatc aaa ttaa cg c cc gtc tc g cc a gg a gg cagc g ta g	1297
AB099510	ccttg g ccggaaggccc gg gtaatc ttg ttaa act ccg tc g tg ct g gg g atagagcattg	1499
AB099941	ccttg g ccggaaggccc gg gtaatc ttg ttaa act ccg tc g tg ct g gg g atagagcattg	1500
AF280631	ccttg g ccggaaggccc gg gtaatc ttg ttaa act ccg tc g tg ct g gg g atagagcattg	1512
AB027337	ccttg g ccggaaggccc gg gtaatc ttg ttaa act ccg tc g tg ct g gg g atagagcattg	1512
DQ288247	gcc acaatc	1307
AB099510	ca attatgc	1509
AB099941	ca attatgc	1510
AF280631	ca attatgc	1522
AB027337	ca attatgc	1522

图 6 核糖体 18S rDNA 部分序列显示了金龟子绿僵菌新变种武汉株 Lj01 (DQ288247) 与金龟子绿僵菌其他几个变种(AB099510, AB099941, AF280631, and AB027337)的差异位点 (粗体)

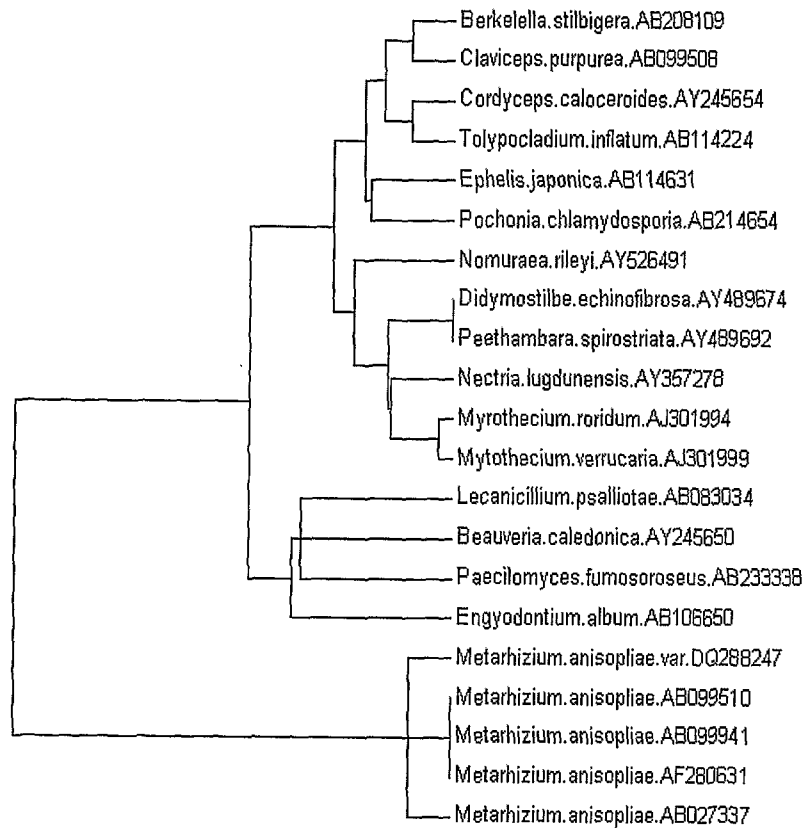


图 7 Lj01 (*M.anisopliae* var. *dcjhyium*, DQ288247) 基于核糖体 18S rDNA 的系统进化树分析 (UPGMA method of MEGA ver.3.0)

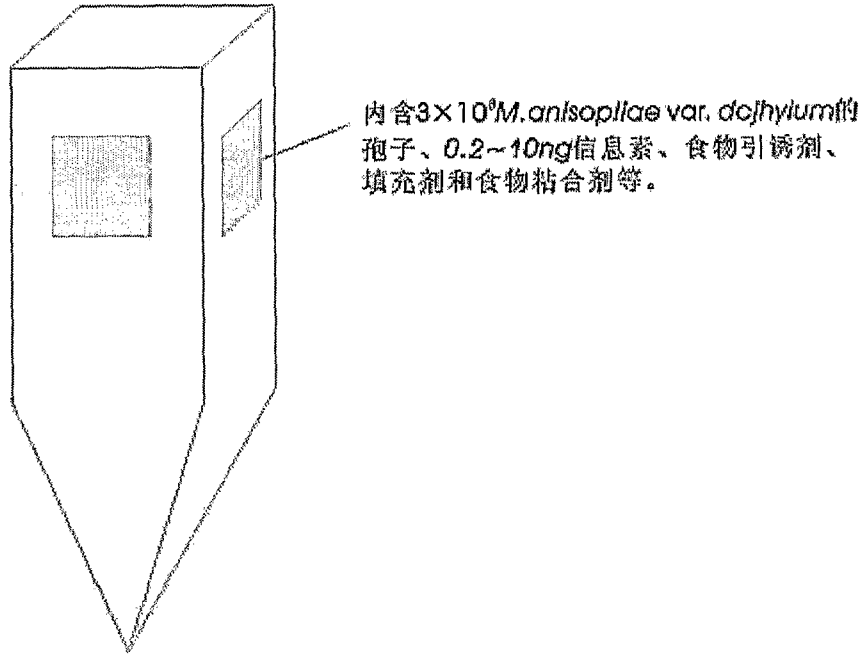


图 8 白蚁杀虫盒示意图

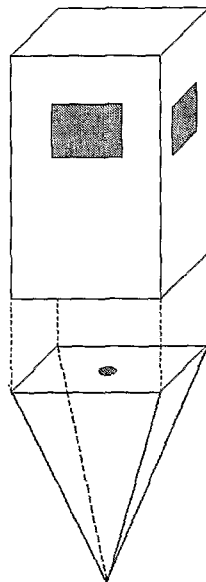


图 9

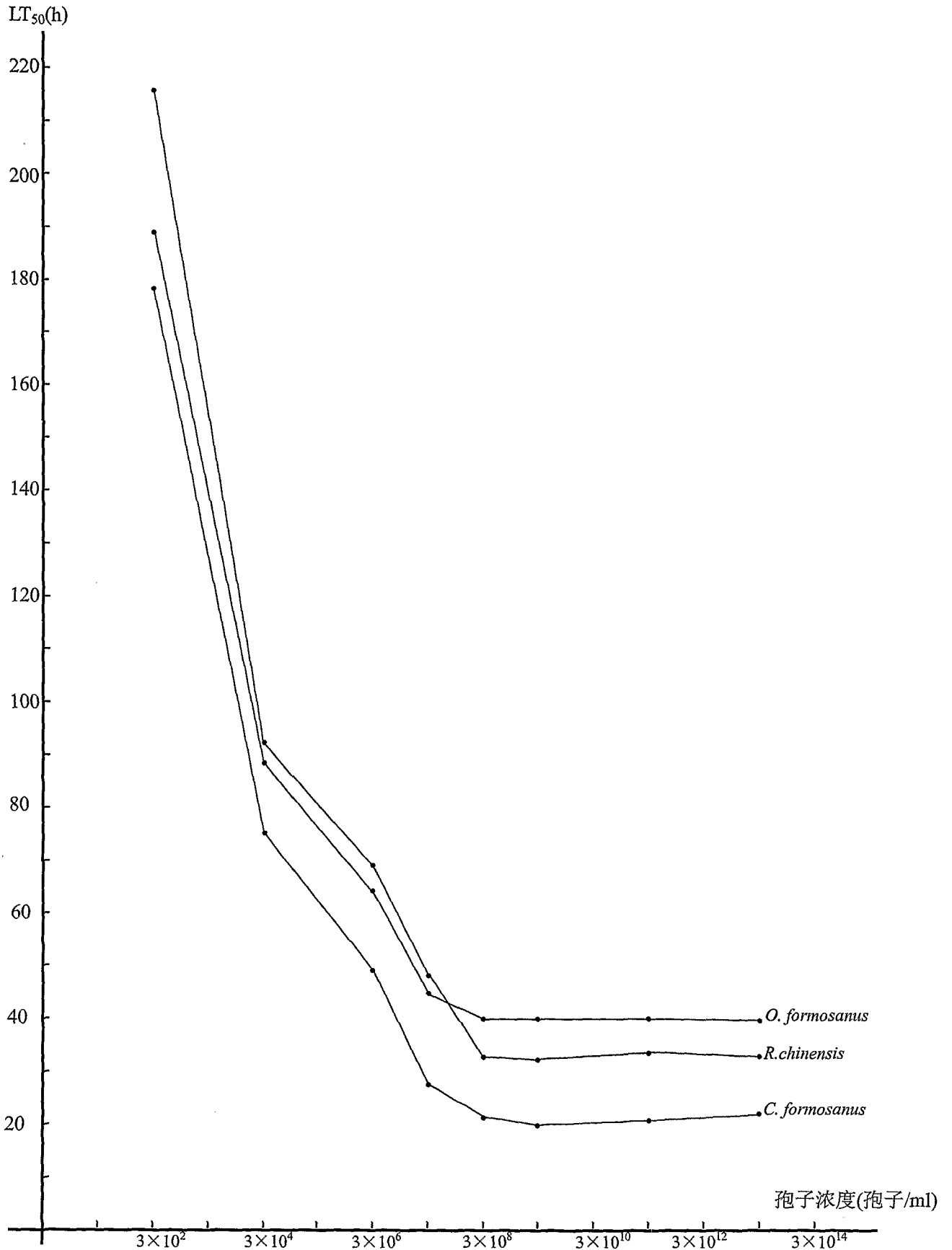



图 10 Lj01 (*M. anisopliae* var. *dejhylum*) 对白蚁的剂量效应

关于微生物保藏的说明
(PCT 细则 13 之二)

A. 对说明书第 <u>6</u> 页, 第 <u>12</u> 行所述的微生物的说明。	
B. 保藏事项 其它保藏在补充页中 <input type="checkbox"/>	
保藏单位名称 中国典型培养物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 中国湖北省武汉市武汉大学 (邮编 430072)	
保藏日期 2006 年 8 月 14 日	保藏编号 CCTCC NO: M206077
C. 补充说明 (必要时) 本栏有补充页 <input type="checkbox"/>	
D. 本说明是为下列指定国作的 (如果说明不是为所有指定国而作的)	
E. 补充说明 (必要时)	
下列说明将随后向国际局提供 (写出说明的类别, 例如: “保藏的编号”)	

由受理局填写
<input checked="" type="checkbox"/> 本页已经和国际申请一起收到

受权官员

由国际局填写
<input type="checkbox"/> 国际局收到本页日期
受权官员

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2006/002942

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
See extra sheet		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C12N A01N A01M C12R A01P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
WPI; EPODOC; PAJ; CNKI; CNPAT(CPRS);CA;BA METARHIZIUM ANISOPLIAE TERMITE etc.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN1085041A(UNIV FLORIDA et al) 13 April 1994 (13.04.1994) See figures 1 and 2; line 18, page 12 to line 4, page 15; example 3	21
A	WO03038065A1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY et al) 08 May 2003(08.05.2003) See the whole document	1-20
A	JP2001327237A (NITTO DENKO CORP) 27 November 2001(27.11.2001) See the whole document	1-22
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&”document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 04 July 2007 (04. 07. 2007)		Date of mailing of the international search report 19 · JUL 2007 (19 · 07 · 2007)
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451		Authorized officer Telephone No. 86-10-62085300

DING Hebing
丁慧萍

丁慧萍印

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2006/002942

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Invention 1(claims 1-20 and 22): *Metarhizium anisopliae* Ij01(CCTCC No. M206077), a bioinsecticide containing the fungus, a method for exterminating insect, the use of the fungus in the preparation of insecticide, and an insect extermination apparatus comprising the fungus.

Invention 2(claims 21-22): an insect extermination apparatus.

Wherein, claims 1-20 and claim 21 apparently do not have the same or corresponding technical feature, and thus do not have the same or corresponding special technical feature. They do not meet the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2006/002942

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N1/14(2006.01)i

A01N63/04(2006.01)i

C12N15/00(2006.01)i

C12N15/11(2006.01)i

A01M1/00(2006.01)i

A01P7/04(2006.01)i

C12R1/645(2006.01)i

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2006/002942

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN1085041A	13.04.1994	WO9323998A	09.12.1993
		CA2134335A	09.12.1993
		AU4523493A	30.12.1993
		CN1112845C	02.07.2003
		ZW6893A	23.11.1994
		ZA9303769A	15.02.1995
		EP0643554A	22.03.1995
		JP9501041T	04.02.1997
		AU680827B	14.08.1997
		AU4509097A	19.02.1998
		BR9306474A	30.06.1998
		IL105772A	15.07.1998
		SG54226A	16.11.1998
		KR0181982B	01.04.1999
		AU708025B	29.07.1999
		JP3024651B2	21.03.2000
		CN1257651A	28.06.2000
		EP1142475A2	10.10.2001
		US6370812B	16.04.2002
		AT217146T	15.05.2002
		US6397516B	04.06.2002
		DE69331904D	13.06.2002
		US2002144453A	10.10.2002
PT643554T	31.10.2002		
ES2174850T	16.11.2002		
AT335399T	15.09.2006		
DE69334057D	21.09.2006		
US2006254123 A	16.11.2006		
WO03038065A	08.05.2003	KR20030035707A	09.05.2003
JP2001327237A	27.11.2001	US2005019309 A	27.01.2005
		None	

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2006/002942

A. 主题的分类
参见附加页
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)
C12N A01N A01M C12R A01P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))
WPI; EPODOC; PAJ; CNKI; CNPAT(CPRS); CA; BA
绿僵菌 白蚁 杀虫 杀昆虫 METARHIZIUM ANISOPLIAE TERMITE 等

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN1085041A(佛罗里达大学 等) 13.4 月 1994 (13.04.1994) 参见图 1 和 2; 说明书第 12 页第 18 行—第 15 页第 4 行; 实施例 3	21
A	WO03038065A1 (韩国生命科学和生物技术研究所 等) 08.5 月 2003(08.05.2003) 参见全文	1-20
A	JP2001327237A (日东电工株式会社) 27.11 月 2001(27.11.2001) 参见全文	1-22

其余文件在 C 栏的续页中列出。 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利
“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件
“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件
“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性
“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性
“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期
04. 7 月 2007 (04. 07. 2007)

国际检索报告邮寄日期
19·7月2007 (19·07·2007)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:
中华人民共和国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088
传真号: (86-10)62019451

受权官员



电话号码: (86-10)62085300

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2006/002942

第 II 栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第 1 页第 2 项)

根据条约第 17 条(2)(a), 对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. 权利要求:
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题, 即:

2. 权利要求:
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索,
具体地说:

3. 权利要求:
因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则 6.4(a)第 2 句和第 3 句的要求撰写。

第 III 栏 缺乏发明单一性的意见(续第 1 页第 3 项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

发明 1 (权利要求 1-20 和 22): 保藏号为 CCTCC M206077 的金龟子绿僵菌武汉株 Lj01、包含该真菌的生物杀虫剂、一种昆虫杀灭方法、该真菌制备昆虫杀虫剂的应用、包含该真菌的昆虫杀灭装置。

发明 2(权利要求 21 和 22): 昆虫杀灭装置。

其中, 权利要求 1-20 与权利要求 21 明显不包含相同或相应的技术特征, 因而也不可能包含相同或相应的特定技术特征, 因此权利要求 1-20 与 21 之间不存在技术关联, 不满足发明单一性的要求。

1. 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索, 本单位未通知缴纳任何附加费。
3. 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。
具体地说, 是权利要求:

4. 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明; 包含该发明的权利要求是:

关于异议的说明: 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 适用时, 缴纳了异议费。
 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
 缴纳附加检索费时未提交异议书。

A. 主题的分类

C12N1/14(2006.01)i

A01N63/04(2006.01)i

C12N15/00(2006.01)i

C12N15/11(2006.01)i

A01M1/00(2006.01)i

A01P7/04(2006.01)i

C12R1/645(2006.01)i

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2006/002942

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN1085041A	13.04.1994	WO9323998A	09.12.1993
		CA2134335A	09.12.1993
		AU4523493A	30.12.1993
		CN1112845C	02.07.2003
		ZW6893A	23.11.1994
		ZA9303769A	15.02.1995
		EP0643554A	22.03.1995
		JP9501041T	04.02.1997
		AU680827B	14.08.1997
		AU4509097A	19.02.1998
		BR9306474A	30.06.1998
		IL105772A	15.07.1998
		SG54226A	16.11.1998
		KR0181982B	01.04.1999
		AU708025B	29.07.1999
		JP3024651B2	21.03.2000
		CN1257651A	28.06.2000
		EP1142475A2	10.10.2001
		US6370812B	16.04.2002
		WO03038065A	08.05.2003
US6397516B	04.06.2002		
DE69331904D	13.06.2002		
US2002144453A	10.10.2002		
PT643554T	31.10.2002		
ES2174850T	16.11.2002		
AT335399T	15.09.2006		
DE69334057D	21.09.2006		
US2006254123 A	16.11.2006		
KR20030035707A	09.05.2003		
JP2001327237A	27.11.2001	US2005019309 A	27.01.2005
		无	