

附球属真菌 DT-014 对杂草的 致病性及生物学特性研究

朱海霞^{1,2,3}

(1. 青海大学农林科学院, 青海 西宁 810016; 2. 青海省农业有害生物综合治理重点实验室, 青海 西宁 810016;

3. 农业部西宁作物有害生物科学观测实验站, 青海 西宁 810016)

摘要:以青海省西宁市大通县鹧子沟自然发病的大刺儿菜叶片中分离出的附球属真菌 DT-014 为研究对象, 通过发酵喷雾法接种测定其对 4 种盆栽杂草猪殃殃 (*Galium spurium* L.)、藜 (*Chenopodium album* L.)、冬葵 (*Malva verticillate* L. var. *crispa*)、密花香薷 (*Elsholtzia densa* Benth.) 的致病性和 5 种作物蚕豆 (*Vicia faba* L.)、豌豆 (*Pisum sativum* L.)、青稞 (*Hordeum vulgare* L.)、小麦 (*Triticum aestivum* L.)、油菜 (*Brassica napus* L.) 的安全性, 并通过单因素试验, 以菌落直径和其孢子悬浮液 OD_{600} 值为测量标准, 探究菌株 DT-014 的最适生长培养基、碳源、氮源、固态发酵基质。结果表明, DT-014 对藜 (*C. album*) 和猪殃殃 (*G. spurium*) 致病力较强, 其次为密花香薷 (*E. densa*), 对冬葵 (*M. crispa*) 致病力最低。DT-014 对于小麦 (*T. aestivum*)、蚕豆 (*P. sativum*)、青稞 (*H. vulgare*)、豌豆 (*P. sativum*) 相对安全, 对油菜 (*B. napus*) 有轻微影响。DT-014 的最适培养基为蛋白胨培养基, 最适碳源为葡萄糖, 最适氮源为酵母膏, 最适固态发酵基质为大豆粉。

关键词:微生物除草剂; 附球属真菌; 杂草致病性; 作物安全性; 最适培养基

中图分类号:S482.4 **文献标志码:**A

Study on herbicidal activity and biological characteristics of *Epicoccum* strain DT-014

ZHU Haixia^{1,2,3}

(1. Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016, China;

2. Key Laboratory of Comprehensive Control of Agricultural Pests, Xining, Qinghai 810016, China;

3. Xining Crop Pests Science Observation Experimental Station, Ministry of Agriculture, Xining, Qinghai 810016, China)

Abstract: Fungus DT-014 of the *Epicoccum*, which was isolated from the leaves of *Cephalanoplos setosum* (Witld.) with naturally occurring disease in Yaozigou, Datong County, Xining City, Qinghai Province, was used as the research object. The pathogenicity of the strain DT-014 to 4 potted weeds *Galium spurium* L., *Chenopodium album* L., *Malva verticillate* L. var. *Crispa*, *Elsholtzia densa* Benth. and the safety of 5 potted crops *Vicia faba* L., *Pisum sativum* L., *Hordeum vulgare* L., *Triticum aestivum* L., *Brassica napus* L. were determined by fermentation spray inoculation. The single factor experiment method was used to explore the optimal growth medium, carbon source, nitrogen source and solid-state fermentation substrate of strain DT-014 by measuring the colony diameter and the OD_{600} value of spore suspension. The experimental results showed that DT-014 had strong pathogenicity to *G. spurium* and *C. album*, followed by *E. densa* and low pathogenicity to *M. crispa*. DT-014 was relatively safe for wheat *T. aestivum*, broad bean *P. sativum*, highland barley *H. vulgare*, and pea *P. sativum*, and slightly affected *B. napus*. The optimum medium for DT-014 was peptone medium, the optimum carbon source was glucose, the optimum nitrogen source was yeast extract, and the optimum solid-state fermentation substrate was soybean powder.

Keywords: microbial herbicides; *Epicoccum*; pathogenicity of weeds; crop safety; optimal culture medium

农田杂草直接或者间接影响着农作物的质量、产量及品质^[1],是农业生产中造成作物减产的主要原因之一。杂草控制是农业生产过程中的关键问题^[2],杂草在生长过程中与农作物争夺光照、水分以及肥料,影响光合作用,侵占空间资源,干扰农作物的生长过程,从而降低了作物的产量和品质。研究表明,杂草每年给美国水稻生产带来的损失大约为其潜在产量的 17%,经济损失约 2 亿美元;泰国水稻生产中每年杂草会造成 25%~75% 的产量损失^[3]。杂草控制已经成为了当代农业生产过程中备受关注的问题。长期以来,人们尝试多种方法控制农、林、牧、水域等不同发生区的杂草,20 世纪 40 年代内吸式传导型化学除草剂 2,4-D 的开发与应用开启了杂草防除的新时代,美国除草剂用量从 1964 年占农药总量的 37% 上升至 1984 年的 66%,显著超过杀虫剂和杀菌剂的施用量^[4]。化学除草剂虽然效果显著,却导致了一系列生态问题,其弊端也日益显现^[5-6]。

生物除草剂不仅能够有效控制杂草危害,还能够保证作物的稳产、高产,既可以实现生态环境的保护,也使公共健康和食品安全得到了保障。研发推广微生物除草剂逐渐成为热点领域。在国内,我国于 1960 年首次实现了‘鲁保一号’真菌除草剂的商业化,其主要是用病原胶胞炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)对蔬菜、亚麻、瓜、大豆田的菟丝子进行防除,达到了 80% 以上的防除效果^[7]。在国外,日本制果公司通过细胞融合的手段,将一种从链霉菌中分离出的名为双丙氮磷^[8]的抗生素制作成了放线菌除草剂,这是世界上第一种具有内吸作用的除草剂^[9];日本开发的 Camperico 也是世界上比较出名的细菌除草剂^[10]。截至 2012 年,能商品化的微生物除草剂已有 20 余种,已开发过或具有开发潜力的除草生防菌超过 60 种^[11]。

微生物除草剂的研究起步较晚,一些关键技术还没有解决,真正商品化的很少,多数只是作为化学除草剂的补充^[12-13]。微生物除草剂的研发仍存在不少技术瓶颈^[14],一方面微生物作为活体极易受周围环境影响,使其防治效果减弱,对于真菌类的微生物除草剂而言,湿度是最容易影响其防治效果的环境因素^[15];另一方面,寄主单一也是微生物除草剂一大弱点,相对于化学除草剂而言,微生物除草剂往往因其不具广谱性而难以达到预想的除草效果^[16]。微生物除草剂的开发是新型除草剂研究的重要方向,潜力菌株的广泛发掘、商品菌剂的开发等研究也使微生物除草剂的应用日益专业化和

规范化^[17]。

为进一步筛选出高效、广谱的微生物资源以开发微生物菌剂,本研究以青海省西宁市大通县采集的杂草病株上分离出的附球属菌株 DT-014 为研究对象,分析其对青海主要阔叶类杂草的致病力和对青海省主栽作物的安全性,同时对菌株 DT-014 的最适生长培养基、碳源、氮源、固态发酵基质进行筛选,探究其最适培养条件,以期为微生物除草剂的研究与生产提供理论指导和数据支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株:生防菌株 DT-014(4℃ 冰箱试管斜面保存),由青海省农林科学院植物保护研究所实验室提供。

供试杂草:猪殃殃(*G. spurium*)、藜(*C. album*)、冬葵(*M. crispa*)、密花香薷(*E. densa*)。

供试作物种子:小麦(*T. aestivum*)‘青春 587’、蚕豆(*V. faba*)‘青海 9 号’、油菜(*B. napus*)‘青杂 5 号’、豌豆(*P. sativum*)‘草原 224’、青稞(*H. vulgare*)‘北青 8 号’。

1.2 试验培养基

(1)PDA 固体培养基:去皮马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂粉 18 g、蒸馏水 1 L,自然 pH 值。

(2)PDA 液体培养基:去皮马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、蒸馏水 1 L,自然 pH 值。

(3)PSA 培养基:去皮马铃薯 200 g、蔗糖 20 g、琼脂粉 18 g、蒸馏水 1 L,自然 pH 值。

(4)蛋白胨培养基:去皮马铃薯 200 g、蛋白胨 25 g、琼脂粉 18 g、蒸馏水 1 L,自然 pH 值。

(5)燕麦片培养基:去皮马铃薯 200 g、燕麦片 15 g、琼脂粉 18 g、蒸馏水 1 L,自然 pH 值。

(6)淀粉培养基:去皮马铃薯 200 g、淀粉 15 g、琼脂粉 18 g、蒸馏水 1 L,自然 pH 值。

1.3 试验试剂

(1)碳源:葡萄糖、蔗糖、麦麸、可溶性淀粉、小麦粉、果糖。

(2)氮源:蛋白胨、硝酸钾、硝酸钠、硝酸铵、酵母膏、大豆粉。

(3)DT-014 发酵液:取生长情况良好的 DT-014 培养基,在每个培养基上用直径 8 mm 的菌饼打孔器分别打取菌饼,每份 PDA 液体培养基中接种 7 个菌饼,培养基放置于 25℃、150 r·min⁻¹ 的摇床中培养 7 d 后,将培养液真空抽滤,滤液再用微孔滤膜过滤,得到不包含菌体的发酵滤液。

(4) 固态发酵基质: 菜籽饼、珍珠岩、麦秆糠、大豆粉。

1.4 试验方法

1.4.1 菌种的活化 在 4℃ 冰箱试管斜面保存的 DT-014 菌株中选出菌丝生长较旺盛的一支, 将其接种到提前配置好的 PDA 培养基上, 置于生化恒温培养箱中培养 5~7 d, 重复该步骤 3~4 次, 直到得到生长良好的菌株。

1.4.2 菌株发酵液的制备 选择在培养基上培养 7 d、生长良好的菌株, 用菌饼打孔器(直径为 8 mm) 打取菌饼并接种至 PDA 液体培养基(200 ml · 瓶⁻¹) 中, 每瓶接种 5 个菌饼, 于 25℃、180 r · min⁻¹ 的摇床中培养 7 d 后取出, 得到菌种的发酵液。

1.4.3 生防菌株致病性的测定 将猪殃殃、藜、冬葵、密花香薷 4 种杂草种子种植于 15 cm 的花盆内, 待其正常生长至 4~6 叶期, 将待测菌种的发酵滤液均匀喷洒在盆栽杂草上, 每盆杂草喷洒 20 ml 后置于 25℃ 的温室保湿, 每个处理重复 3 次; 同时以只接种无菌 PDA 培养液的杂草作为对照。培养 7 d 后, 观察杂草的发病情况, 统计杂草的发病率、鲜重效。

1.4.4 生防菌株对作物安全性的测定 选定的作物为在温室培养至 4~7 叶期的盆栽蚕豆、豌豆、油菜、青稞、小麦, 将待测菌种的发酵滤液均匀喷洒在供试作物上, 每盆喷洒 10 ml, 每次试验重复 3 次; 以只接种无菌 PDA 培养液的作物盆栽作为对照。在 25℃ 温室培养 7 d 后, 观察作物的发病情况。发病情况分级如下: NS 表示无症状(无病斑, 植株正常生长); LS 表示有轻微反应(叶片分布零星斑点); MS 表示中等感病(20%~25% 的叶面积出现病斑, 生长受抑制); SS 表示严重感病(25% 以上的叶片面积出现病斑, 生长受到严重抑制)。

1.4.5 最适培养基的筛选 分别选取灭菌后的 PDA、PSA、蛋白胨、燕麦片、淀粉平板培养基, 将菌株 DT-014 接种到不同的培养基上, 倒置于恒温培养箱培养 7 d 后, 观察菌落形态及生长状况, 用十字测量法测定不同培养基上菌落的直径, 取平均值作为测量值。培养 12 d 后, 每个培养皿中加入 10 ml 无菌水, 用干净的玻璃片刮下菌丝, 4 层纱布过滤后, 获得其孢子悬浮液, 用 Uvmini-1240 分光光度计测量 OD_{600} 值, 每个处理 3 次重复, 根据菌株在不同培养基生长后的直径和 OD_{600} 值筛选出最适合其生长的培养基。

1.4.6 最适碳氮源的筛选 选取葡萄糖(C1)、蔗糖(C2)、麦麸(C3)、可溶性淀粉(C4)、小麦粉(C5)、

果糖(C6) 作为不同碳源, 以培养基质量的 2% 为添加量分别替换 PDA 固体培养基的碳源; 选取蛋白胨(N1)、硝酸钾(N2)、硝酸钠(N3)、硝酸铵(N4)、酵母膏(N5)、大豆粉(N6) 作为不同氮源, 以培养基质量的 2% 为添加量加入 PDA 固体培养基中。将菌株 DT-014 接种到不同碳、氮源培养基中, 每个处理 3 次重复。培养基放入恒温培养箱培养 7 d 后, 观察每个培养基上菌落的生长情况, 根据菌落直径和 OD_{600} 值(测量方法同 1.4.5 小节) 筛选最适碳、氮源。

1.4.7 最适固态发酵基质的筛选 选取菜籽饼、珍珠岩、麦秆糠、麦麸为固态发酵基质, 菜籽饼添加量为 20 g · 瓶⁻¹, 珍珠岩、麦秆糠、大豆粉添加量均为 15 g · 瓶⁻¹, 再加入适量无菌水, 充分搅拌均匀, 每个三角瓶内加入该菌种最适生长的碳源和氮源, 灭菌后接入 10 ml · 瓶⁻¹ 的菌株发酵液, 恒温培养 14 d, 测量其 OD_{600} 值, 筛选出菌株 DT-014 最适生长的固态发酵基质。

1.4.8 统计学方法 使用 SPSS 中的 LSD 法进行数据的显著性差异分析。

2 结果与分析

2.1 菌种形态

如图 1 所示, DT-014 在 PDA 培养基上菌落疏松, 呈圆形, 菌丝初期白色, 后呈黄色, 最后呈褐色。

从图 2 和表 1 可以看出, 菌株 DT-014 发酵液喷施于藜和猪殃殃 7 d 后, 杂草植株迅速萎蔫坏死, 发病率和鲜重效均在 90% 以上, 说明该菌株对藜和猪殃殃具备较强致病力。而用 DT-014 发酵菌液喷施密花香薷使其部分叶片枯萎, 发病率为 78.17%。冬葵仅仅表面出现病斑, 后期病情不扩散, 说明 DT-014 对冬葵的致病力较弱。

2.2 菌株对作物的安全性测试

由表 2 可以看出, 菌株 DT-014 发酵滤液喷洒的盆栽作物中, 小麦、蚕豆、豌豆、青稞均未受明显影响, 而油菜叶表面有少量病斑, 后期病斑不扩散。

2.3 最适培养基的筛选

由表 3 可以看出, DT-014 在 PDA、PSA、蛋白胨和燕麦片等培养基上的菌落直径间无显著差异。PDA 培养基上的菌落直径最大, 但其 OD_{600} 值显著低于其他培养基; 蛋白胨培养基上的 OD_{600} 值显著高于其他培养基, 故 DT-014 的最适培养基为蛋白胨培养基。

2.4 最适碳、氮源的筛选

由表 4 可以知, 在接种 DT-014 的不同碳源培养基中, 菌落直径没有显著差异, C1 的菌落直径虽

然较小,但其 OD_{600} 值最大;C5 的菌落直径较大,其 OD_{600} 值最小; $P<0.01$ 水平下,C1 与 C5 的 OD_{600} 具有显著差异,C2、C3、C4 和 C6 间差异不显著。故 DT-014 的最适碳源为 C1 葡萄糖,C5 小麦粉的效果最差。

由表 5 可知,除 N4 外,其他氮源培养基之间菌落直径无显著差异,而 N4 培养基上生长的菌落 OD_{600} 值最低;DT-014 在 N5 培养基上的 OD_{600} 值最大,且显著高于其他处理。因此,DT-014 的最适氮源为 N5 酵母膏,N4 硫酸铵的效果最差。



图 1 DT-014 在培养基上的菌落形态

Fig.1 Colony morphology of DT-14 on culture medium



(A)藜 *C. album*



(B)密花香薷 *E. densa*



(C)猪殃殃 *G. spurium*



(D)冬葵 *M. verticillate*

注:各图中上行盆栽为对照样品,下行盆栽为处理样品。

Note: The top row is control, the bottom row is treatments in each figure.

图 2 DT-014 对盆栽杂草的致病性

Fig.2 Pathogenicity of DT-014 to potted weeds

表 1 菌株 DT-014 发酵滤液对不同杂草的致病力

Table 1 Pathogenicity of fermentation filtrate of strain DT-014 to different weeds/%

杂草种类 Weed type	发病率 Disease incidence	鲜重效 Disease index
藜 <i>C. album</i>	96.43±0.74aA	98.20±0.32aA
密花香薷 <i>E. densa</i>	78.17±0.54bB	80.40±3.48bB
猪殃殃 <i>G. spurium</i>	98.26±0.62aA	96.23±1.32aA
冬葵 <i>M. verticillate</i>	71.65±6.54bB	61.17±4.00cC

注:同列不同小写字母代表差异显著($P<0.05$),不同大写字母代表差异极显著($P<0.01$)。下同。

Note: Different lowercase letters in the same column represent significant differences ($P<0.05$), while different uppercase letters represent extremely significant differences ($P<0.01$). The same below.

表 2 DT-014 在作物上的发病情况

Table 2 Incidence of DT-014 on crops

供试作物 Test crop	感病程度 Disease severity
小麦 <i>T. aestivum</i>	NS
蚕豆 <i>V. faba</i>	NS
油菜 <i>B. napus</i>	LS
豌豆 <i>P. sativum</i>	NS
青稞 <i>H. vulgare</i>	NS

表 3 DT-014 在不同培养基上的菌落直径和 OD_{600} 值

Table 3 Colony diameter and OD_{600} values of DT-014 on different media

培养基 Medium	菌落直径/cm Colony diameter	OD_{600}
PDA	7.84±0.06aA	0.10±0.01cC
PSA	7.24±0.76aA	0.22±0.02bB
蛋白胨 Peptone	7.11±0.10aA	2.10±0.03aA
燕麦片 Oatmeal	7.00±0.01aA	0.15±0.02bcBC
淀粉 Starch	5.58±0.08bB	0.19±0.04bBC

2.5 最适固态发酵基质的确定

从表 6 可以看出,以大豆粉为固态发酵基质时,DT-014 菌液的 OD_{600} 值最高,与其他基质相比差异显著,生长状况最好;以麦秆糠为固态发酵基质时 OD_{600} 值最小。因此 DT-014 的最适固态发酵基质为大豆粉。

表 4 DT-014 在不同碳源培养基上的菌落直径和 OD_{600} 值
Table 4 Colony diameter and OD_{600} values of DT-014 on different carbon source media

碳源 Carbon source	菌落直径/cm Colony diameter	OD_{600}
C1	7.89±0.29aA	0.83±0.11aA
C2	8.07±0.39aA	0.72±0.26aAB
C3	8.37±0.16aA	0.31±0.09bAB
C4	8.22±0.14aA	0.38±0.03bAB
C5	8.12±0.79aA	0.23±0.05bB
C6	7.63±0.31aA	0.59±0.09abAB

表 5 DT-014 在不同氮源培养基上的菌落直径和 OD_{600} 值
Table 5 Colony diameter and OD_{600} values of DT-014 on different nitrogen source media

氮源 Nitrogen source	菌落直径/cm Colony diameter	OD_{600}
N1	8.10±0.08aA	0.31±0.01bAB
N2	8.26±0.26aA	0.22±0.06bBC
N3	7.84±0.19aA	0.24±0.04bBC
N4	5.24±0.10bB	0.10±0.01cC
N5	7.48±1.18aA	0.42±0.06aA
N6	8.47±0.43aA	0.28±0.03bAB

表 6 不同固态发酵基质上生长的 DT-014 菌液的 OD_{600} 值
Table 6 OD_{600} values of DT-014 growing on different solid-state fermentation substrates

固态基质 Solid substrate	OD_{600}
菜籽饼 Rapeseed cake	1.14±0.08bB
珍珠岩 Perlite	1.16±0.08bB
麦秆糠 Straw bran	0.95±0.06cB
大豆粉 Soybean powder	1.42±0.05aA

3 讨论与结论

微生物除草剂研究虽然起步较晚,但已成为当前除草剂的热点内容,为了保证微生物除草剂的应用和推广,具有除草剂潜力的微生物应该满足两个条件^[18]:一方面,能人工培养出数量多且持久有效的微生物;另一方面,对目标杂草具有高致病性,且对于农作物具有较高的安全性。本研究分离出的菌株 DT-014 经离体盆栽致病性测试后,发现其对于猪殃殃和密花香薷具有较高致病力;作物安全性试验表明 DT-014 对于小麦、蚕豆、豌豆、青稞等作物相对安全,对于油菜有轻微危害,符合微生物除草剂的致病性和安全性原则,表明 DT-014 具有成为阔叶杂草微生物除草剂的潜力。

进一步采用单因素试验对菌株 DT-014 的生物

学特性进行探究,发现不同培养基、碳源、氮源、固体发酵基质对该菌株的产孢均有明显影响,并经过筛选得到最适合 DT-014 菌株的碳源、氮源和固态发酵基质。受朱海霞等^[19]、吴龙月等^[20]研究的启发,本试验仍需进一步探究温度、光照、pH、培养基含水量、菌种接种量等条件对 DT-014 菌株生长和发酵的影响,并通过正交试验筛选出最适合 DT-014 菌株生长发酵的营养条件和环境条件组合。

通过致病性的测定、作物安全性测试和单因素试验表明,附球属真菌 DT-014 对藜和猪殃殃具有较高致病力,其次为密花香薷,对冬葵的致病力较弱;DT-014 对于小麦、蚕豆、豌豆、青稞未表现出明显危害,具有相对安全性,而对于油菜则表现出轻微的危害;DT-014 的最适培养基为蛋白胨培养基,最适碳源为葡萄糖,最适氮源为酵母膏,最适固态发酵基质为大豆粉。

参考文献:

- [1] BASTIAANS L, PAOLINI R, BAUMANN D T. Focus on ecological weed management: what is hindering adoption? [J]. Weed Research, 2008, 48(6): 481-491.
- [2] 陈世国, 强胜. 生物除草剂研究与开发的现状及未来的发展趋势 [J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(5): 770-779.
CHEN S G, QIANG S. The status and future directions of bioherbicide study and development [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2015, 31(5): 770-779.
- [3] 向彦, 贺浩华, 傅军如. 水稻化感作用的研究进展 [J]. 中国生态农业学报, 2005, 13(3): 108-111.
XIANG Y, HE H H, FU J R. Research progress of allelopathy in rice [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2005, 13(3): 108-111.
- [4] 苏少泉. 杂草防治的发展趋向 [J]. 世界农业, 1996, (7): 30-31.
SU S Q. Development trend of weed control [J]. World Agriculture, 1996, (7): 30-31.
- [5] 徐衡. 向日葵对反枝苋的化感作用研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2005.
XU H. The study on allelopathy of sunflower to *Amaranthus retroflexus* L. [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2005.
- [6] CUTLER H G. Perspectives on discovery of microbial phytotoxins with herbicidal activity [J]. Weed Technology, 1988, 2(4): 525-532.
- [7] 陈勇强, 但汉斌, 郭富常. 国外微生物除草剂的研究及应用现状 [J]. 天津农业科学, 1998, 4(2): 5-9.
CHEN Y Q, DAN H B, GUO F C. The current situation of application and research on microbial weedicides in abroad [J]. Tianjin Agricultural Sciences, 1998, 4(2): 5-9.
- [8] 龙建友, 钱勇, 师宝君, 等. 一株放线菌代谢产物除草活性的初步研究 [J]. 微生物学杂志, 2006, 26(1): 106-108.
LONG J Y, QIAN Y, SHI B J, et al. Herbicidal activity of metabolite of a actinomyces strain Z₄₀ [J]. Journal of Microbiology, 2006, 26(1): 106-108.