

不同杂草病原真菌的分离及其 对野燕麦的致病力

朱海霞,程 亮,郭青云

(青海省农林科学院 植物保护研究所,教育部青藏高原生物技术重点实验室,青海 西宁 810016)

【摘 要】 【目的】筛选对野燕麦具有致病作用的生防菌株。【方法】从青海省罹病杂草叶片上分离病原真菌,采用离体生测法和温室盆栽接种法,评价其发酵液对野燕麦的致病性,用盆栽生测法评价其对主栽作物的安全性,并采用形态学结合分子生物学的方法,鉴定其对野燕麦致病力较强的菌株。【结果】分离获得了 XN-1、XN-3、XN-4、XN-9 和 GD-13 5 株病原真菌,其中 XN-1、XN-3 和 GD-13 的发酵液对野燕麦离体叶片表现出较强的致病力,对种子的萌发抑制作用明显,对野燕麦表现出较强的侵染力,显著抑制植株的生长发育,且对青海省主栽作物中的蚕豆和豌豆相对安全。经鉴定,XN-1、XN-3 和 GD-13 分别为链格孢(*Alternaria* sp.)、黑附球菌(*Epicoccum nigium*)和短小茎点霉(*Phoma exigua*)。【结论】XN-1、XN-3 和 GD-13 有望成为防除阔叶田野燕麦的真菌除草剂的候选菌株。

【关键词】 野燕麦;致病性;真菌除草剂

【中图分类号】 S482.4⁺9

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)04-0095-04

Isolation and pathogenicity test of different fungus strains of weeds to *Avena fatua* L

ZHU Hai-xia, CHENG Liang, GUO Qing-yun

(Institute of Plant Protection, Qinghai Academy of Agricultural and Forestry Science, Key Laboratory of
Qing-Tibet Plateau Biotechnolog in Educational Department, Xining, Qinghai 810016, China)

Abstract: 【Objective】 The study screened pathogen strains for biological control of the weed *Avena fatua* L. 【Method】 We isolated fungus strains from the infested weeds leaves in Qinghai province. Pathogenicity of strains'broth in several densities to *A. fatua* L was explored by pathogenicity test in vitro and inoculation experiment in vivo, and the safety to crops was tested using pot bioassay method. The dominant strains were identified by morphology observation and sequence analysis. 【Result】 Five pathogen strains were obtained by isolation, which were XN-1, XN-3, XN-4, XN-9 and GD-13. The broth of XN-1, XN-3 and GD-13 presented high effect of pathogenicity on the leaves of *A. fatua* L in vitro, and the inhibiting effect on germination of seeds was also obvious; These three strains expressed significant potential bioherbicidal activity, obviously inhibited the growth of plant, and were safe to broad bean and pea of major crops. XN-1, XN-3 and GD-13 were respectively identified as *Alternaria* sp., *Epicoccum nigium* and *phoma exigua*. 【Conclusion】 These strains were expected to be selected as the potential bioherbicidal candidates for mycoherbicide to broad bean and pea.

Key words: *Avena fatua* L; pathogenicity; mycoherbicide

* [收稿日期] 2010-09-15

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30860165)

[作者简介] 朱海霞(1985—),女,青海西宁人,研究实习员,主要从事杂草生物防治研究。E-mail:zhuhaixia0101@163.com

[通信作者] 郭青云(1965—),女,河南开封人,研究员,主要从事农田杂草治理研究。E-mail:guoqingyunqh@163.com

野燕麦(*Avena fatua* L.),别名燕麦草,为1年生或越年生禾本科杂草,与小麦苗期形态相似,不易识别,一般分蘖15~25个,最高可达64个,每颖结籽400~500粒,繁殖率高。野燕麦与作物争光、争水、争肥,不仅造成作物减产,而且还严重影响作物的品质^[1]。近几年来,由于农田长期使用单一除草剂,使大部分阔叶杂草得到了有效控制,导致以野燕麦为主的禾本科杂草上升为主要恶性杂草,严重威胁着农业的安全生产^[2]。目前,利用生物防治技术防除田间杂草的研究十分活跃,其中天然除草活性物质更具广阔的应用前景^[3]。研制真菌除草剂防除野燕麦,不仅可以有效防除该杂草,而且对环境安全性高,有显著的经济和社会效益。

青海省地处青藏高原东北部,海拔高,气候干燥寒冷,独特的地理气候特征导致其生态环境千差万别,杂草区系丰富多样^[4]。青海作为高原地区,在孕育了大量杂草的同时,也隐藏着丰富的病原微生物,对其进行调查研究,是微生物除草剂开发研制的基础和前提。

为了获得防除野燕麦的病原菌菌种资源,本试验采用单孢分离法对青海省不同地区罹病杂草叶片进行病原真菌分离,并通过离体和活体致病性试验,测定各分离菌株对野燕麦的侵染力,用盆栽生测法测定其对青海省主栽作物的安全性,以期筛选出对野燕麦有强致病力的优势菌株,为新型生防除草剂的开发和研制提供依据。

1 材料与方法

1.1 病原真菌的分离与纯化

取来自青海省西宁地区及贵德县的罹病杂草野燕麦、苦苣菜、藜和大刺儿菜,用体积分数75%酒精表面消毒30 s,10 g/L NaClO消毒5 min,无菌水冲洗3次。取样品病健交界处叶样,剪成长度3 mm小段,放入盛有PDA培养基的平皿中,每皿3段,25℃倒置恒温培养约2 d,待菌落长出后,用灭菌的挑针挑取菌落边缘的菌丝进行病原菌纯化。将纯化获得的病原真菌作为生防菌用于后续试验。

1.2 生防菌对野燕麦离体致病性的测定

1.2.1 生防菌发酵液对野燕麦离体叶片致病性的测定 生防菌株在PDA斜面上培养7 d后制成菌悬液,以体积分数2%的接种量接种于PDB培养液,在25℃、150 r/min振荡培养120 h,获得发酵液,将不同菌株的发酵液用无菌水分别配制成体积分数10%和50%的溶液备用。用剪刀剪取数片成

熟期健壮的野燕麦叶片,用10 g/L NaClO溶液进行表面消毒,无菌水冲洗3次后,浸泡于各菌株不同体积分数(10%,50%,100%)的发酵液中,对照(CK)叶片用无菌水处理,1 h后取出,置于铺有灭菌滤纸的灭菌培养皿中,加灭菌水5 mL保湿。每皿放置3张叶片,重复3次,整体置于25℃恒温培养箱培养5 d后调查发病率。

参考文献[5],对发病程度进行分级:0级,茎叶无任何病斑;1级,叶片上病斑零星分布,总面积小于叶片面积的1/3;2级,1/3~2/3叶片烂死;3级,2/3以上叶片烂死;4级,叶片全部烂死。

1.2.2 生防菌发酵液对野燕麦种子萌发的影响

采用培养皿滤纸发芽法进行试验。选取饱满完整的野燕麦种子,用10 g/L NaClO溶液进行表面消毒,无菌水冲洗3次。在直径为9 cm的培养皿中铺上滤纸,加入不同体积分数(10%,50%,100%)的待测生防菌发酵液5 mL,每皿置10粒种子进行发芽试验,每处理重复4次,以无菌水发芽处理作为对照。25℃条件下黑暗培养,每天打开盖子通气1 h,隔天每个培养皿补充相应处理液5 mL,采用ISTA规定的方法^[6],于第5天首次计数,之后每天记数1次,第10天进行末次计数,测定胚根、胚芽长,统计发芽率,计算抑制率,并进行差异显著性分析。

抑制率(RI)=[(对照发芽率-处理发芽率)/对照发芽率]×100%。

1.3 生防菌对野燕麦活体致病性的测定

将生防真菌在PDB培养液中扩大培养120 h后,制成密度为 10^8 mL⁻¹的发酵液备用。将野燕麦种子播入装有蛭石的温室塑料盆中,每盆50粒,共10盆。待幼苗长到2叶期时,采用叶片喷雾法接种生防菌发酵液,剂量为250 mL/盆,用手持喷雾器喷雾至茎叶上滴液为度,同时设PDB培养液为对照1,清水为对照2,接种后保湿培养。各处理发病后每隔4 d调查1次发病情况,待30 d对照病情稳定后,按照病情分级标准^[7]计算病情指数,并测定植株鲜质量。

1.4 生防菌对作物安全性的测定

将5种青海省主栽作物(禾本科植物小麦、青稞,十字花科植物油菜,豆科植物蚕豆、豌豆)的种子分别播入装有蛭石的温室塑料盆中,每种作物重复播种3盆,每盆15粒。待禾本科植物长至1叶1心或2叶、十字花科油菜长至2片真叶、豆科植物长至1片真叶期时,喷雾接种密度为 1×10^8 mL⁻¹的各生防真菌孢子悬浮液,接种量为90 mL/盆,以接种无

菌水的植株作为空白对照。接种后用塑料袋套袋保湿培养 24 h,并在其后每天喷水保湿培养,观察不同菌株对指示作物的致病性。

1.5 强致病力生防菌株的鉴定

采用形态学^[8]和分子生物学^[9-11]的方法,对致病力较强的菌株进行鉴定。

1.6 数据统计分析

所有数据采用 DPS 数据处理系统中的 Duncan’s 新复级差法进行方差分析和多重比较。

2 结果与分析

2.1 病原真菌的分离

试验共分离获得了 5 株病原真菌,根据来源将

其分别编号为 XN-1、XN-3、XN-4、XN-9 和 GD-13。其中 XN-1、XN-3 采自野燕麦叶片,GD-13 采自苦苣菜叶片,XN-4 采自藜叶片,XN-9 采自大刺儿菜叶片。

2.2 生防菌对野燕麦离体叶片的致病性及种子萌发的影响

2.2.1 对离体叶片的致病性 研究结果(表 1)表明,不同体积分数的菌株发酵液对野燕麦离体叶片均表现出不同程度的致病作用,表明各菌株的发酵液中均含有杀草物质;其中 XN-1、XN-3 及 GD-13 菌株的致病力较强,其体积分数 10%发酵液的发病率≥50%,显著高于其他 2 个菌株,表明这 3 株菌在离体条件下对野燕麦有较强的侵染力。

表 1 5 个菌株发酵液对野燕麦离体叶片的致病作用

Table 1 Pathogenicity of the broth of 5 strains to *A. fatua* in vitro

菌株 Strain	发病率/% Disease incidence		
	发酵原液 Broth	体积分数 50%原液 50% broth	10%原液 10% broth
XN-1	80 a	70 a	50 b
XN-3	70 ab	60 ab	60 a
XN-4	40 c	30 c	30 d
XN-9	60 b	40 bc	40 c
GD-13	70 ab	50 b	50 b

注:同列数据后标不同小写字母表示在 $P=0.05$ 水平上差异显著,下表同。

Note:The data in the same column followed by different letters are significantly different at $P=0.05$ level. Next tables are the same.

2.2.2 对种子萌发的影响 由表 2 可以看出,不同病原菌发酵液对野燕麦种子萌发的抑制效果不同,经不同体积分数发酵液处理后,绝大部分野燕麦种子不能正常发芽。用原液处理后,菌株 XN-1、XN-9 和 GD-13 对野燕麦种子的萌发有明显抑制作用,种子发芽率较低,其中以菌株 GD-13 的表现最为突

出,发芽率为 0,抑制率达 100%;菌株 XN-3 对野燕麦种子萌发虽然有一定的抑制作用,但与其他菌株相比较差。体积分数 10% XN-9 菌株发酵液对野燕麦种子胚芽的生长表现出促进作用,其他处理的胚芽长均显著小于对照。所有处理的胚根长均显著小于对照。

表 2 5 个菌株发酵液对野燕麦种子萌发的影响

Table 2 Effects of 5 strains broth on germination of *A. fatua* L seeds

菌株 Strain	胚芽长/mm Plumule length			胚根长/mm Radicle length			发芽率/% Germination rate			抑制率/% Inhibiting rate		
	原液 Broth	50%原液 50% Broth	10%原液 10% Broth	原液 Broth	50%原液 50% Broth	10%原液 10% Broth	原液 Broth	50%原液 50% Broth	10%原液 10% Broth	原液 Broth	50%原液 50% Broth	10%原液 10% Broth
XN-1	2.5 d	10.4 c	31.6 b	1.4 d	9.5 c	28.5 c	10.0 bc	20.0 c	80.0 a	88.9 b	77.8 bc	11.1 d
XN-3	14.8 b	34.4 b	27.2 c	14.8 c	21.6 b	29.6 c	40.0 ab	50.0 b	50.0 c	55.6 d	44.4 d	44.4 b
XN-4	13.2 b	10.6 c	25.5 d	24.8 b	4.4 cd	19.4 d	40.0 ab	10.0 d	50.0 c	55.6 d	88.9 b	44.4 b
XN-9	8.0 c	32.4 b	51.4 a	11.2 c	18.0 bc	32.5 b	20.0 b	40.0 b	60.0 b	77.8 c	55.6 c	33.3 c
GD-13	0 d	0 d	23.2 e	0 d	0 d	13.2 e	0 c	0 d	20.0 d	100 a	100 a	77.8 a
CK		48.2 a			52.6 a			90.0 a				—

2.3 不同生防菌株发酵液对野燕麦活体的致病性

由表 3 可以看出,在温室条件下,5 个生防菌株对野燕麦的致病力表现出明显差异,野燕麦植株经 XN-1、XN-3 和 GD-13 发酵液处理后,病株率均达 100%,显著高于其余菌株;3 个菌株的病情指数与

其余 2 个菌株相比差异明显,其中 XN-3 的侵染力最强。与对照相比,5 个菌株发酵液处理均可显著降低野燕麦的鲜质量,其中 XN-1、XN-3 和 GD-13 发酵液的作用效果更明显,其鲜质量抑制率均大于 55%,说明这 3 个菌株在活体条件下对野燕麦均有

较强的致病性,可作为生防除草剂候选菌株继续研究。

表 3 5 个菌株发酵液对野燕麦活体的致病力

Table 3 Pathogenicity of 5 strains broth to *A. fatua* in vivo

菌株 Strain	病株率/% Disease plant rate	病情指数 Disease index	鲜质量/g Fresh weight	鲜质量抑制率/% Inhibiting rate of fresh weight
XN-1	100 a	68.34 a	1.82 c	57.48 ab
XN-3	100 a	69.25 a	1.67 d	60.98 a
XN-4	76.00 b	40.00 b	1.92 c	55.14 b
XN-9	12.00 c	30.00 c	3.62 b	15.42 c
GD-13	100 a	56.76 ab	1.63 d	61.92 a
CK	—	—	4.28 a	—

2.4 不同生防菌株对青海省主栽农作物的安全性

由表 4 可以看出,5 个菌株对蚕豆和豌豆相对安全,其发病水平较其他作物低,其中对豌豆的侵染力最弱,除菌株 XN-3 外,其余菌株对豌豆均表现为不感病;5 个菌株对青稞安全性较低,具有较强的侵

染力。由表 4 还可知,XN-1 菌株对小麦和青稞敏感,表现为中度感病,XN-3 菌株对青稞和油菜侵染力较强,亦表现为中度感病;其余 3 种菌株对 5 种作物的侵染程度较弱,表现为轻度感病或不感病,其中 XN-4 菌株对不同作物的安全性最高。

表 4 5 个菌株发酵液对青海省主栽农作物的安全性

Table 4 The safety of broth of 5 strains to major crops in Qinhai Province

作物 Crops	XN-1	XN-3	XN-4	XN-9	GD-13	CK
小麦 Wheat	MS	LS	LS	LS	LS	NS
青稞 Highland barley	MS	MS	LS	LS	LS	NS
蚕豆 Bean	LS	LS	NS	LS	LS	NS
豌豆 Pea	NS	LS	NS	NS	NS	NS
油菜 Cole	LS	MS	NS	NS	LS	NS

注:NS 为不感病;LS 为轻度感病,叶片上有零星病斑;MS 为中度感病,1/5~1/4 的叶片面积出现病斑;SS 为高度感病,1/4 以上的叶面积出现病斑,生长受严重抑制。

Note: NS means not sensitive; LS means light sensitive; MS means middle sensitive, 1/5—1/4 of leaf area shows disease symptom; SS means serious sensitive, more than 1/4 of leaf area shows symptom, the growth was seriously inhibited.

2.5 强致病力菌株的鉴定

采用菌落形态观察结合现代分子生物学方法,鉴定对野燕麦具有较强致病力的 XN-1、XN-3 和 GD-13,结果显示,XN-1、XN-3 和 GD-13 分别为链格孢(*Alternaria* sp.)、黑附球菌(*Epicoccum nigrum*)和短小茎点霉(*Phoma exigua*)。

3 讨 论

利用病原微生物防除杂草是杂草生物防治的一条重要途径,通过广泛采集并筛选不同生境下的杂草微生物资源,开发微生物菌剂,替代或部分替代化学农药,可实现更科学、理性地防治杂草的目的^[12-13]。生物除草剂候选菌株筛选的主要标准是致病力的强弱和对作物的安全程度^[14-15]。本试验结果表明,从青海省西宁和贵德地区分离到的 5 个菌株对野燕麦的致病力存在较大差异,其中菌株 XN-1、XN-3 和 GD-13 对野燕麦均表现出较强的致病力,且对青海省主栽作物中的蚕豆和豌豆相对安全,可作为后续研究的候选菌株,有望用于阔叶田野燕麦生物防治的潜在真菌资源。另外,为了进一步评估

3 株菌的生防价值,有必要对初步确定的有潜力的生防菌进行防效稳定性和生物学特性等方面的研究。

[参考文献]

[1] 陈树宏,张建明,王爱兵,等. 春小麦田野燕麦危害现状及综合防治 [J]. 天津农林科技,2008,8(4):22-23.
Chen S H, Zhang J M, Wang A B, et al. Occurrence and integrated control of wild oat in spring wheat field [J]. Science and Technology of Tianjin Agriculture and Forestry, 2008, 8(4): 22-23. (in Chinese)

[2] 刘亚光,李柏树,赵 滨. 哈尔滨地区田间禾本科杂草生物学特性及群落结构的调查 [J]. 东北农业大学学报,2004,35(11):1-5.
Liu Y G, Li B S, Zhao B. The bio-attributes and community of grass family weeds in Harbin [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2004, 35(11): 1-5. (in Chinese)

[3] Pomella A W V, Barreto R W, Charudattan R. *Nimbya alternantherae* a potential biocontrol agent for alligatorweed, *Alternanthera philaceroide*s [J]. Biocontrol, 2007, 52: 271-288.