

稗草生防菌新月弯孢菌 *Culvularia lunata* 菌株 J15(2) 的安全性和致病力

韦 韬 李 静 倪汉文*

(中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193)

摘要: 为了确定生防菌新月弯孢菌 *Culvularia lunata* 菌株 J15(2) 的安全性及防除稗草的潜力, 研究了该菌株的寄主范围, 接种孢子时稗草叶龄、接种后保湿时间、接种浓度对该菌株致病力的影响, 土壤带菌对稗草出苗的影响, 以及与化学除草剂的相互作用。结果显示, 菌株 J15(2) 只能在稗草上侵染并扩展; 接种孢子后保湿 24 h 对 2 叶期稗草抑制率可达 55.6%, 对 1.5 叶期稗草抑制率可达 100%; 保湿 48 h 对 2 叶期稗草防效提高至 91.6%; 接种孢子量需达 10^{12} 孢子 / m^2 才能较好地抑制稗草生长; 土壤带菌亦可抑制稗草生长。该菌与化学除草剂精噁唑禾草灵或二氯喹啉酸混用能显著提高除稗效果, 菌株 J15(2) 3.3×10^{12} 孢子 / m^2 分别与精噁唑禾草灵有效剂量 3.83 g / m^2 、二氯喹啉酸有效剂量 250.00 g / m^2 混用, 对稗草防效分别为 99.5% 和 88.6%, 远高于这两个除草剂单用时的药效。该试验结果表明, 菌株 J15(2) 具有作为微生物除草剂的开发潜力。

关键词: 稗草; 新月弯孢菌; 致病力; 化学除草剂; 混用效果

The efficacy of *Culvularia lunata* strain J15(2) on *Echinochloa crus-galli* and its host range

Wei Tao Li Jing Ni Hanwen*

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract The pathogen *Culvularia lunata* isolated from *Echinochloa crus-galli* is a potential mycoherbicide against this weed. The objectives of this study were: 1) to evaluate the safety of the pathogen as a mycoherbicide; 2) to determine the effects of *E. crus-galli* leaf stage, dew period, inoculation concentration, soil inoculation on the pathogenicity of the pathogen and the interaction between the pathogen and chemical herbicides. The result of host range test with 36 plant species showed that *C. lunata* severely infected only *E. crus-galli* and safe on tested crops. Under 24-h dew period, the inhibition rates of *E. crus-galli* were 100% and 55.6%, respectively, when the pathogen was inoculated at the 1.5-leaf stage and at the 2-leaf stage. Under 48-h dew period, the inhibition rate was up to 91.6% at the 2-leaf stage of this weed. Good *E. crus-galli* control was achieved when inoculated conidial amount was 10^{12} spore / m^2 or higher. The growth of this weed could be inhibited when the pathogen was inoculated into soil. Greenhouse experiments showed obvious synergistic effects between *C. lunata* and herbicide fenoxaprop-o-ethyl or quinclorac on the weed.

Key words *Echinochloa crus-galli*; *Culvularia lunata*; pathogenicity; herbicide; synergism

基金项目: 国家“863”计划(2006AA10A214)

作者简介: 韦韬, 女, 1983年生, 硕士研究生, 研究方向为杂草生物防治, email: weitao0105413@126.com, Tel: 010-62731148

* 通讯作者 (Author for correspondence), email: hanwenn@cau.edu.cn

收稿日期: 2010-07-04

稗草 *Echinochloa crus-galli* 是农田恶性杂草, 广泛分布于热带和温带地区, 其根系发达, 吸肥能力强, 与水稻的伴生性强, 极难清除^[1]。目前, 稗草的防除主要依赖于化学除草剂。化学除稗在我国大面积推广和应用, 挽回了巨大的经济损失, 但又造成环境污染和杂草抗药性问题。黄炳球等^[2]于 1991—1993 年对我国 3 大栽培类型稻区内 9 个监测点的稗草抗药性水平发展动态进行监测, 结果显示, 稗草对丁草胺已产生了明显的抗药性; 连续使用丁草胺 10 年以上地区, 稗草对禾草丹 (thiobencarb) 的抗药性水平也较高, 两者之间还存在交互抗性的迹象^[3]。一些多年使用二氯喹啉酸的地方, 稗草也产生了抗药性, 如湖南、浙江、山东、辽宁等地^[4-6]; 施用高浓度二氯喹啉酸, 会抑制真菌和产氢产乙酸细菌数量, 不利于水田土壤微生物种群结构的稳定和多样性保护^[7]。因此, 人们希望开发生物除稗技术以缓解因化学除草剂使用带来的一系列问题。

自 1984 年葡萄牙学者 Reis 等^[8]分离筛选出对稗草具有致病力的长蠕孢属 *Helminthosporium* 菌株开始, 世界各国的研究人员纷纷致力于研究对环境友好的微生物除稗剂, 并取得了一些成绩^[9]。在我国, 陈勇和倪汉文^[10]、姜述君等^[11]、耿锐梅等^[12]、张建萍等^[13]分别对稗草上的致病菌进行了研究。中国农业大学农学与生物技术学院杂草研究室采集到弯孢属 *Cubularia* 菌株 J15(2), 经中国科学院微生物所鉴定, 该菌株为新月弯孢菌 *Cubularia lunata*。韦韬等^[14]对该菌生物学特性进行了研究, 结果显示, 菌株 J15(2) 菌丝生长和产孢、孢子萌发的适宜温度、酸碱度范围较广, 且孢子萌发速度较快, 适作为生物除草剂开发。本试验对菌株 J15(2) 的寄主范围、致病力, 以及该菌株分别与化学除草剂精噁唑禾草灵和二氯喹啉酸混用对稗草的防治效果进行了研究, 以期明确该菌株的安全性及防除稗草的潜力。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株: 新月弯孢菌菌株 J15(2)。

供试植物: 稗草、水稻 (两优 932 鄂粳杂 1 号、珍糯、武育粳 3 号)、小麦 (永良 12 号)、马唐、剪股颖、高羊茅、早熟禾等每盆 15 株, 大麦、野燕麦、玉米每盆 3 株; 油菜、萝卜、白菜、西兰花、芥蓝、大豆、绿豆、红小豆、芸豆、花生、反枝苋、灰绿藜、烟草、番茄、

辣椒、莴苣、向日葵、棉花、苘麻、芝麻、黄瓜、甜瓜、丝瓜、西瓜、葎草、葡萄, 每盆 4 株。

供试药剂: 6.9% 精噁唑禾草灵 (fenoxaprop-P-ethyl) 水乳剂, 德国拜耳作物科学公司; 50% 二氯喹啉酸 (quinclorac) 可湿性粉剂, 江苏绿利来股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株培养和孢子悬液的制备

将菌株 J15(2) 接种于 PDA 培养基上, 28℃ 黑暗培养。14 天后用无菌水冲洗菌落表面, 获得菌株孢子悬液。

1.2.2 供试植物的培养和寄主范围测定

将试验中所用植物种子催芽露白后播种于营养土 (草炭土与蛭石 3:1 混合) 中, 以渗透法吸水。将浓度为 3×10^6 孢子/mL 的孢子悬液 (以 0.05% 吐温 20 为助剂, 下同) 用手持小喷壶分别接种于 2~3 叶期供试植物上, 观察该菌对这些植物的致病性。以喷洒 0.05% 吐温 20 为对照, 每处理重复 4 次。

供试植物发病的病情分级标准为: 0 级: 不感染; 1 级: 可感染并产生病斑, 但病斑扩展面积较小; 2 级: 植物病斑较大甚至叶片枯死。

1.2.3 对不同叶龄稗草的致病力

将浓度为 3×10^6 孢子/mL 的菌株 J15(2) 孢子悬液用手持小喷壶喷于叶龄分别为 1、1.5、2、3、4 的稗草植株上, 接种量 4mL, 约为 2.1×10^8 孢子/ m^2 , 28℃ 下保湿 24h 以喷洒 0.05% 吐温 20 为对照, 设 4 次重复。接种 10 天后检查稗草植株鲜重, 计算鲜重抑制率。

鲜重抑制率 (%) = [(对照鲜重 - 处理鲜重) / 对照鲜重] × 100

1.2.4 保湿时间和接种浓度对致病力的影响

将浓度为 4×10^6 孢子/mL 的 J15(2) 孢子悬液 (含 0.05% 吐温 20) 用手持小喷壶喷于 2 叶期稗草植株上, 接种量 4mL, 约为 2.8×10^8 孢子/ m^2 , 28℃ 下分别保湿 0、12、24、48h 后移入温室培养, 以喷洒 0.05% 吐温 20 为对照, 设 4 次重复。接种 10 天后检查稗草植株鲜重, 计算鲜重抑制率。

设置 5 个菌孢子悬液浓度梯度: 2×10^7 、 4×10^6 、 8×10^5 、 1.6×10^5 、 3.2×10^4 孢子/mL, 用手持小喷壶将孢子悬液喷于 2 叶 1 心期稗草植株上, 28℃ 下保湿 48h 以 0.05% 吐温 20 为对照, 设 4 次重复。接种 10 天后检查稗草植株鲜重, 计算鲜重抑制率。

1.2.5 土壤处理对稗草生长的影响

营养土 121℃ 灭菌 2h, 待冷却后在约 1 dm³ 的灭菌营养土中混入浓度为 10⁸ 孢子 /mL 的孢子悬液 10mL, 分装于 4 个小塑料盆中, 每小盆播种催芽露白稗草种 20 粒。以无菌营养土播种为对照, 设 4 次重复, 温室中培养。播种后第 21 天检查稗草植株鲜重, 计算鲜重抑制率。

1.2.6 与化学除草剂的交互

单剂处理: 6.9% 精噁唑禾草灵水乳剂有效剂量 0.427 1.28 3.83 11.5 34.5 g/lm²; 50% 二氯喹啉酸可湿性粉剂有效剂量 3.09 9.26 27.8 83.3 250 g/lm²; 菌株 J15(2) 3.3 × 10¹² 孢子 /lm²。

混剂处理: 6.9% 精噁唑禾草灵水乳剂与菌株 J15(2) 混用: 精噁唑禾草灵单用各浓度分别与菌株 J15(2) 孢子相混, 孢子浓度同菌株单用。50% 二氯喹啉酸可湿性粉剂与菌株 J15(2) 混用: 二氯喹啉酸单用各浓度分别与菌株 J15(2) 孢子相混, 孢子浓度同菌株单用。设清水为对照, 共 22 个处理, 每处理 4 次重复。处理后放入 28℃ 温箱保湿 24 h, 然后放入 28℃ 温箱培养, RH 70%。药剂处理后 10 天测量稗草植株鲜重, 用 Gowling 法判断联合作用类型。

1.3 数据分析

利用 SAS 统计软件 ANOVA 和 GLM 分析不同处理间的差异显著性和相关性。

2 结果与分析

2.1 新月弯孢菌菌株 J15(2) 寄主范围

在供试的植物中, 菌株 J15(2) 在稗草上产生的病斑超过叶片的一半, 甚至造成整株枯死, 病情级数为 2; 在玉米和烟草幼苗上产生病斑, 但病斑小且不扩展, 不影响新叶生长, 病情级数为 1; 在其余植物上均未见病斑。结果表明, 该菌的寄主范围相对专一。

2.2 对不同叶龄稗草的致病力

菌株 J15(2) 对不同叶龄稗草的致病力有显著差异 (图 1), 其中对 1~1.5 叶期稗草的致病力最高, 接种 10 天后植株 100% 死亡; 对 2 叶期稗草的致病力为 55.6%; 对 3 叶期稗草的致病力下降为 29.1%, 对 4 叶期稗草的致病力只有 15.4%。

2.3 保湿时间和接种浓度对致病力的影响

在 0~48 h 范围内, 保湿时间与对稗草的抑制率呈显著正相关 (图 2)。接种菌株 J15(2) 孢子后, 不保湿直接放置于温室中生长, 10 天后, 90% 的

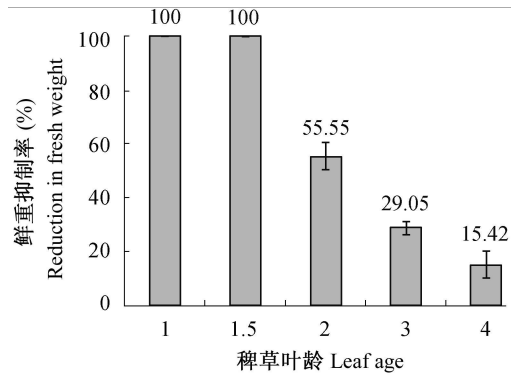


图 1 新月弯孢菌菌株 J15(2) 对不同叶龄稗草生长的影响

Fig 1 The effect of strain J15(2) on the growth of *Echinochloa crus-galli* at different leaf ages

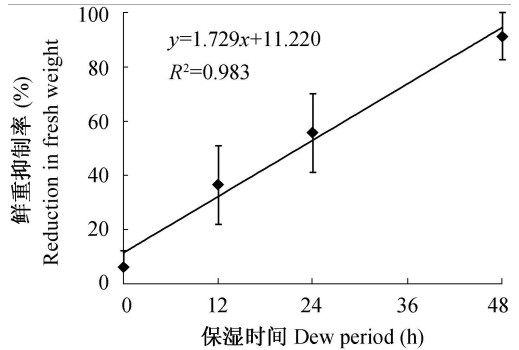


图 2 不同保湿时间新月弯孢菌菌株 J15(2) 对稗草生长的影响

Fig 2 The effect of strain J15(2) on the growth of *Echinochloa crus-galli* under different dew periods

稗草植株可见病斑, 但植株鲜重抑制率低, 只有 6.2%。保湿 12 h 后再移到温室中生长的处理, 对稗草的鲜重抑制率达到 36.6%; 保湿 24 h 后对稗草鲜重抑制率为 55.0%; 当保湿时间延长到 48 h, 该菌对稗草的防效明显提高, 其鲜重抑制率达到 91.5%。

菌株 J15(2) 对稗草的致病力在孢子悬液浓度为 $3.2 \times 10^4 \sim 2 \times 10^7$ 孢子 /mL 范围内呈显著正相关。接种 J15(2) 孢子悬液浓度对数与稗草的鲜重抑制率之间呈线性关系 (图 3)。

2.4 土壤处理对稗草生长的影响

播种后 21 天稗草达到 3 叶期, 混菌土不影响稗草出苗, 但抑制植株生长。对照植株鲜重为 0.51 g, 处理植株鲜重为 0.27 g, 鲜重抑制率为 47.6%。统计分析结果显示, 向土壤中施加菌株 J15(2) 显著抑制稗草的生长。

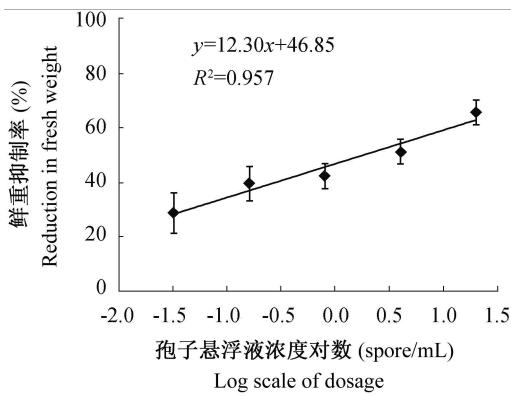


图 3 新月弯孢菌菌株 J15(2)孢子浓度对稗草生长的影响

Fig 3 The effect of the conidial concentration of strain J15(2) on the growth of *Echinochloa crus-galli*

2.5 与化学除草剂的互作

单用菌株 J15(2) 3.3×10^{13} 孢子 / hm^2 对 3 叶期

稗草生长抑制率为 29.86%；单用精噁唑禾草灵, 各试验剂量对稗草生长的抑制率分别为 3.3%、11.5%、41.7%、91.9%、98.6%；单用二氯喹啉酸, 各剂量对稗草的生长抑制率分别为 12.3%、13.7%、23.2%、42.7%、56.4%。将菌株 J15(2)分别与上述 2 种除草剂混用, 其联合作用效果如表 1 所示。

从表 1 可以看出, 与菌株 J15(2)混用可明显减少精噁唑禾草灵和二氯喹啉酸的用量。当 $3.83 \text{ g}/\text{hm}^2$ 的精噁唑禾草灵与 3.3×10^{13} 孢子 / hm^2 的 J15(2)混用, 对稗草防效的增效作用很明显; 单独使用较高剂量的精噁唑禾草灵 ($11.50 \sim 33.50 \text{ g}/\text{hm}^2$), 其对稗草已产生 90% 以上的防效, 因而与菌株 J15(2)混用增效作用不明显。低剂量二氯喹啉酸 (小于 $9.26 \text{ g}/\text{hm}^2$) 与菌株 J15(2)混用增效作用不明显, 当二氯喹啉酸有效剂量在 $27.80 \sim 250.00 \text{ g}/\text{hm}^2$ 之间与菌株 J15(2)混用, 增效达 10% 以上。

表 1 利用 Gowling 法判断 2 种除草剂与新月弯孢菌菌株 J15(2)联合作用类型

Table 1 Interaction of *Cubularia lunata* strain J15(2) with herbicides fenoxaprop-P-ethyl or quinclorac

处理药剂 Treatment	剂量 Dosage (g/hm^2)	E (%)	E_0 (%)	$E-E_0$ (%)	处理药剂 Treatment	剂量 Dosage (g/hm^2)	E (%)	E_0 (%)	$E-E_0$ (%)
精噁唑禾草灵 + 菌株 J15(2)	0.43	39.8	32.2	7.6	二氯喹啉酸 + 菌株 J15(2)	3.09	30.3	38.5	-8.2
Fenoxaprop-P-ethyl + strain J15(2)	1.28	47.4	38.0	9.4	Quinclorac + strain J15(2)	9.26	37.9	39.5	-1.6
	3.83	99.5	50.1	40.4		27.80	65.2	46.2	19.1
	11.50	100.0	94.4	5.6		83.30	70.3	59.8	10.5
	34.50	100.0	99.0	1.0		250.00	88.6	39.4	19.2

注: E 为处理植株实际鲜重抑制率; E_0 为根据 Gowling 法计算得出理论上混用处理植株鲜重抑制率。当 $E-E_0 < -10\%$ 为拮抗作用; 当 $E-E_0 > 10\%$ 为增效作用; $-10\% < E-E_0 < 10\%$ 为加成作用。Note: E means actual biomass control rate; E_0 means theoretic biomass control rate; $E-E_0 < -10\%$ means antagonism; $E-E_0 > 10\%$ means synergism; $-10\% < E-E_0 < 10\%$ means additivity.

3 讨论

真菌除草剂的施用, 人为地增加了环境中杂草病原菌的数量, 因此所使用的病原菌的安全性是首要问题。本试验选择了包括禾本科 10 种植物在内的 12 科 36 种植物进行寄主范围筛选, 试验结果表明, 新月弯孢菌菌株 J15(2)的杀草谱较窄, 只对稗草有抑制作用。Chandranohan & Charudattan^[15]报道, 利用内脐蠕孢属 *Drechslera* 的 *D. gigantea*、长喙突脐孢 *Exserohilum longirostratum* 及喙突脐孢 *E. rostratum* 的孢子混配可同时有效防治牛筋草 *Eleusine indica* (L.) Gaertn.、大黍 *Panicum maximum* Jacq.、得克萨斯黍 *P. texanum* L.、假高粱 *Sorghum halepense* (L.) Pers.、马唐 *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.、刺

蒺藜草 *Cenchrus echinatus* L 和金狗尾草 *Setaria glauca* (L.) Beauv., 扩大了微生物除草剂的杀草谱。因此可以考虑在对作物安全的前提下, 将菌株 J15(2)与其它杂草生防菌混配, 综合各菌优势, 实现对农田杂草的综合治理。

在田间条件下, 微生物对寄主植物的抑制作用受到环境的影响, 其中湿度是影响真菌分生孢子萌发、侵染的重要因素。本试验结果显示, 高湿环境可提高菌株 J15(2)对稗草的防效。下一步的田间试验应避免在旱地进行, 以使菌株充分发挥作用。并且应在稗草 2 叶期前施用, 不仅可有效抑制已出苗的稗草, 还可在田间建立菌株种群, 继续侵染后期出苗的稗草, 达到长期抑制稗草的效果。

将微生物与化学除草剂复配是杂草防治研究的

一个方向。如 Lohuis^[16] 和 Jr Smith^[17] 分别将稗草生防菌与莠去津 (atrazine) 混配, 在莠去津低剂量时取得了对于稗草较好的防治效果。在美国, Roberts 等^[18] 将欧文氏菌 *E. carotovora* subsp. *carotovora* Begey 与 2 种 1/4 用量的化学除草剂三氯吡氧乙酸 (triclopyr) 和麦草畏 (dicamba) 混用防治该菌的寄主植物热带刺茄 *Solanum viarum* Dunal 取得了比单用菌或单用化学除草剂更好的防治效果。本试验结果表明, 将菌株 J15(2) 分别与精噁唑禾草灵、二氯喹啉酸混用, 可明显降低 2 种除草剂的用量, 但其田间使用效果还有待进一步研究。

参 考 文 献 (References)

- [1] 李扬汉. 中国杂草志. 北京: 中国农业出版社, 1998: 114
- [2] 黄炳球, 林韶湘, 肖整玉. 我国稻区稗草对丁草胺抗性现状. 植物保护学报, 1995, 22(3): 281-286
- [3] 黄炳球, 肖整玉, 林韶湘. 我国稻区稗草对禾草丹的抗性现状. 华南农业大学学报, 1995, 16(3): 17-21
- [4] 李拥兵, 吴志华, 陈萱, 等. 我国南方稻区稗草对二氯喹啉酸的抗性测定. 农药学报, 2003, 5(4): 88-92
- [5] 吴声敢, 王强, 赵学平, 等. 浙江省稻田稗草对二氯喹啉酸的抗性. 农药, 2006, 45(12): 859-861
- [6] 祝智辉. 水田稗草对二氯喹磷酸已产生明显抗性. 山东农药信息, 2005(7): 31
- [7] 吕镇梅, 闵航, 叶央芳. 除草剂二氯喹啉酸对水稻田土壤中微生物种群的影响. 应用生态学报, 2004, 15(4): 605-609
- [8] Reis EM, Argenta JA, de Veloso JAR O. Sporulation of *Helminthosporium* spp. on senescent tissues of some weed grasses and soybean under natural conditions. Fitopatologia Brasileira 1985, 10(3): 643-648
- [9] 黄世文, 余柳青, 罗宽. 稻田杂草生物防治研究现状、问题及展望. 植物保护, 2004, 30(5): 5-11
- [10] 陈勇, 倪汉文. 尖角突脐孢对稻田稗草的防除效果. 植物保护学报, 2001, 28(1): 73-76
- [11] 姜述君, 范文艳, 鞠世杰, 等. 狭卵链格孢菌株 AAEC05-3 及其毒素对稗草的致病性. 植物保护学报, 2007, 34(3): 283-288
- [12] 耿锐梅, 傅扬, 张文明, 等. 麦根腐平脐蠕孢和薏苡平脐蠕孢防治稻田稗草的生物活性和安全性. 中国水稻科学, 2008, 22(3): 307-312
- [13] 张建萍, 朱凯, 杨爽, 等. 稗草生防潜力菌 *Helminthosporium gramineum* f. sp. *edinochloae* 的原生质体制备和再生. 浙江农业学报, 2010, 22(1): 14-19
- [14] 韦韬, 李静, 倪汉文. 稗草生防菌新月弯孢菌株 J15(2) 的生物学特性. 中国生物防治, 2009, 25(1): 54-59
- [15] Chandramohan S, Charudattan R. Control of seven grasses with a mixture of three fungal pathogens with restricted host ranges. Biological Control, 2001, 22(3): 246-255
- [16] Lohuis H. Biological weed control still in its infancy. PSP Pflanzenschutz Praxis, 1990, 3: 22-23
- [17] Jr Smith R J. Biological control as components of integrated weed management for rice in the United States // Proceedings of International Symposium on Biological Control and Integrated Management of Paddy and Aquatic Weeds in Asia. Tsukuba, Japan: National Agricultural Research Center, October 20-30, 1992: 335-351
- [18] Roberts P D, Urs R R, Wiersma H J et al. Effect of bacterium-herbicide combinations on tropical soda apple. Biological Control, 2002, 24: 238-244