

莲子草假隔链格孢 SF-193 固体发酵培养基的筛选及其对空心莲子草的控制效果

聂亚锋¹, 刘长河², 李庆辉², 刘永锋¹, 刘卹洲¹, 陈志谊¹

¹江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏 南京 210014; ²南京农业大学植物保护学院, 江苏 南京 210095

摘要:【背景】空心莲子草是一种源于南美洲且正在我国不断传播的外来入侵植物。莲子草假隔链格孢是空心莲子草的强致病菌,能引起空心莲子草茎叶发病,抑制空心莲子草生长。【方法】选择以麦麸、大米、玉米芯粉、玉米粉、稻秸秆粉为基料,棉籽壳、稻秕壳和大豆粉为辅料,按照一定质量比配制固体培养基,筛选适合莲子草假隔链格孢 SF-193 大量生产的有效组分;同时研究培养基含水量和 6 种金属离子对 SF-193 菌落生长的影响。【结果】在以大米和大豆粉质量比为 3:1 和 5:1 的培养基上 SF-193 菌落面积最大,其次为大米和棉籽壳质量比为 5:1 的培养基。在含水量为 20% 和 30% 的培养基上 SF-193 菌落面积显著大于其他培养基。 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 对 SF-193 菌落生长影响较小, Zn^{2+} 对 SF-193 菌落生长具有显著的抑制作用,而 SF-193 菌落在含 Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 的培养基上不能生长。田间控草试验表明,固体发酵生产的菌粉对空心莲子草的致病性显著高于液体菌,用量为 $50\text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ 时,10 d 后空心莲子草的病情指数达 86.1。【结论与意义】利用固体培养基发酵生产的莲子草假隔链格孢对空心莲子草的防除效果显著优于液体发酵。因此,莲子草假隔链格孢 SF-193 固体发酵菌粉可能在生物防治空心莲子草方面具有重要作用。

关键词: 空心莲子草; 莲子草假隔链格孢; 固体发酵; 控制效果

Solid-state fermentation of *Nimbya alternantherae* isolate SF-193 and control of *Alternanthera philoxeroides*

Ya-feng NIE¹, Chang-he LIU², Qing-hui LI², Yong-feng LIU¹, You-zhou LIU¹, Zhi-yi CHEN¹

¹*Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014, China;*

²*College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China*

Abstract: 【Background】*Alternanthera philoxeroides* is an invasive plant which originated from South America and is currently spreading in China. *Nimbya alternantherae* isolate SF-193 is a phytopathogenic fungus which could cause foliar and stem necrosis of *A. philoxeroides* and inhibit the growth of the weed in the field. 【Method】Agricultural by-products, such as bran, rice, powder of corn cob, cornmeal, rice stover, cotton seed hull, rice husk, and soybean powder were selected as basic or auxiliary material to develop a solid-state medium for growing the pathogen isolate SF-193. Further, the effect of water and metal ion content in the solid-state medium on the growth of the fungus was investigated. 【Result】The area of colony was the largest when the isolate SF-193 was cultured on media composed of rice and soybean powder with ratios of 3:1 and 5:1, respectively, followed by the mix of rice and cotton seed hull with ratio 5:1. The colony areas of the isolate SF-193 cultured in the media containing 20% and 30% water were significant larger than those of media with different water content. Compared with control, the area of colony measured on the media with Mg^{2+} and Mn^{2+} had no significantly difference. Colony growth was inhibited on media containing Zn^{2+} , while no colony was observed on media containing Cu^{2+} and Fe^{3+} . Under field conditions, disease severity caused by the fungal powder was significantly higher than that obtained by liquid fermentation and reached 86.1 at dosage of $50\text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$. 【Conclusion and significance】The efficiency controlling of *A. philoxeroides* by using the fungal powder fermented was remarkably higher than that of the fungus fermented with liquid media. These results suggested that isolate SF-193 powder fermented by solid-state fermentation could potentially play a role in biocontrol of *A. philoxeroides*.

Key words: *Alternanthera philoxeroides*; *Nimbya alternantherae*; solid-state fermentation; control effect

空心莲子草 *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb 是中华人民共和国国家环境保护总局列入公布的“中国第一批外来入侵生物名单”的恶性杂草,现已广泛分布于我国北纬 44°以南、东经 97°以东海拔低且气候相对暖湿的地区,对我国农业生产、河道运输和生态环境造成了恶劣的影响(沈国军等,2005;谭万忠,1994)。我国于 1986 年从美国佛罗里达州引进曲纹叶甲 *Agasicles hygrophila* Selman & Vogt 对其进行生物防治,取得了显著成效(李宏科和王韧,1994)。但在利用微生物病原菌控制空心莲子草方面尚处于起步阶段。目前,国内外已筛选获得多种具有开发潜力的致病真菌,莲子草假隔链格孢 *Nimbya alternantherae* (Holcomb & Antonopoulos) Simmons & Alcorn 是其中一种重要的致病菌(陈志谊等,2007;向梅梅等,2002;Barreto & Torres,1999;Pomella *et al.*,2007),能使空心莲子草叶片和茎秆发病,导致植株叶片黄化、脱落,有效抑制空心莲子草的种群优势;同时,该菌寄主专化性强,对人畜无毒,对环境安全,具有开发为真菌除草剂的潜力,但有关该生防菌的规模化生产及应用尚未见报道。

自 20 世纪 60 年代起,国内外学者就已经开始研发真菌除草剂。目前,已商品化的真菌除草剂至少有 15 种(Ash,2010),成功注册或商业化应用于控制靶标杂草的有 11 种(Bailey *et al.*,2010;Charudattan,2001),包括棕榈疫霉 *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. 厚垣孢子悬浮剂 Devine (Kenney,1986)、胶孢炭疽菌合萌专化型 *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (Penz.) Penz. & Sacc. 的干孢子可湿性粉剂 Collego (Browsers,1986)、胶孢炭疽菌锦葵专化型 *C. gloeosporioides* f. sp. *malvae* (Penz.) Penz. & Sacc. 制备的真菌除草剂 BioMa1、纵沟柄锈菌 *Puccinia canaliculata* (Schw.) Lagerh. 的孢子制剂 Dr. Biosedge (Charudattan & Dinoor,2000)、胶孢炭疽菌菟丝子专化型 *C. gloeosporioides* f. sp. *cuscutae* (Penz.) Sacc. 孢子制备的鲁保一号(高昭远和干静娥,1992)、生防真菌银叶菌 *Chondrostereum purpureum* (Pers. ex Fr.) Pouzar 制备的真菌除草剂 Biochon(朱秦和强胜,2004a)及尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* Schlechtend: Fr. 制备的 Foxy 2 (Elzein *et al.*,2010)等。可见,成功注册的真菌除草剂大多数以生防真菌产生

的孢子作制剂。然而,如何将生防效果好、难以大量产孢的莲子草假隔链格孢开发为真菌除草剂成为目前空心莲子草生物防治的一个重点和难点。

固体发酵生产生防菌剂具有货架期长、便于保存和运输,且设备简单、成本低廉、易于在生产中应用推广等特点(杨希娟等,2010)。本文以农副产品为莲子草假隔链格孢固体发酵材料,筛选适合该生防菌生长的固体发酵培养基,同时评价该固体发酵生防菌对空心莲子草的控制效果,为开发不易产孢的生防菌提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株为江苏省农业科学院植物保护研究所生防研究室分离保存的对空心莲子草具有较强致病性的莲子草假隔链格孢 SF-193。

PSA 培养基:马铃薯 200 g、蔗糖 20 g、琼脂 15 g,超纯水定容至 1000 mL,pH 7.0。

固体培养基选取的材料为麦麸、玉米粉、大米、玉米芯粉、稻秸秆粉、黄豆粉、棉籽壳和稻秕壳等。

1.2 试验地点

于 2009 年 7 月 16 日进行田间试验。试验地点为江苏省扬州市里下河区生态园(经度 119.42°、纬度 32.39°)。

1.3 菌种制备

将 SF-193 菌丝块接入 PSA 平板中央,28 ℃培养 6 d,然后取新鲜的菌丝块移入 PS 培养液中,28 ℃、150 r·min⁻¹培养 4 d,以培养的菌丝液作为固体培养基大量繁殖菌种。

1.4 固体培养基的制备及接种培养

1.4.1 固体发酵培养基的筛选 以麦麸、玉米粉、玉米芯粉、稻秸秆粉、大米为基料,棉籽壳、稻秕壳、大豆粉等为辅料,分别按照质量比为 1:1、3:1、5:1、7:1、9:1 的组合互配,加入一定量的水、胡萝卜汁和马铃薯蔗糖液,搅拌均匀制备成固体培养基。每个组合重复 3 次。等量分装至直径为 15 cm 的平板(大量培养时,分装至聚丙烯袋中,每袋 600 g)中,每个平板 150 g,高温、高压灭菌 30 min,待冷却后再灭菌 1 次。将制备的菌种搅拌均匀作为接种体,每克固体培养基接入 0.04 mL 菌液。将接种体接入平板中央,置于 28 ℃培养 5 d。用刻度尺测量菌落直径,计算菌落面积。

1.4.2 固体培养基含水量对 SF-193 生长的影响
选择最佳配比的固体培养基,分别测定含水量为 0、5%、10%、20%、30%、40% 和 50% 对 SF-193 菌株生长的影响。每个处理重复 3 次。培养基灭菌、接种方法和培养条件同 1.4.1。分别在培养 1、2、3、5、7 d 时测量菌落直径,计算菌落面积。

1.4.3 固体培养基中金属离子对 SF-193 生长的影响
选择最佳配比的固体培养基,向培养基中分别加入含量均为 5% 的 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$,测定 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 6 种金属离子对菌株生长的影响。以加水的培养基作为对照,每个处理重复 3 次。培养基灭菌、接种方法和培养条件同 1.4.1。分别在培养 1、2、3、5、7 d 时测量菌落直径,计算菌落面积。

1.5 固体菌粉对空心莲子草的防除效果

对筛选获得的固体培养基接种,常温下培养 7 d 后,用粉碎机将长满生防菌 SF-193 的固体菌粉碎,菌粉颗粒大小为 80 ~ 200 目,获得固体菌剂,固体菌剂中的含菌量约为 $0.6 \text{ kg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。在空心莲子草生长茂盛区域划分若干个 2 m^2 的小区,分别以 20、30、50 $\text{g} \cdot \text{m}^{-2}$ 的菌量将菌粉均匀撒于试验小区内,第 5、10 和 15 天调查病情指数,以菌丝发酵液 5 倍稀释为对照。每个处理设 3 次重复。

1.6 病害严重度的调查方法

采用五点取样法(王晓燕等,2007),每个小区取 5 个点,每点随机调查 20 株空心莲子草,每个小区共调查 100 株,根据每株叶片、茎秆上的发病程度确定病级,计算病情指数。

植株病害分级标准:0 级为叶片上无病斑;1 级为叶片上 1 ~ 4 个病斑;2 级为叶面病斑覆盖率小于 40%,叶片无黄化;3 级为叶面病斑密集,病斑覆盖率小于 60%,叶片局部黄化;4 级为叶面病斑覆盖率大于 80%,病斑聚集成大面积坏死斑,叶片 80% 以上黄化,茎秆有零星的红色病斑;5 级为大部分叶片呈火烧状卷曲枯死或脱落,茎秆普遍发病,呈红色;6 级为叶片全部枯死或脱落,茎秆病斑连成片形成焦状病斑(聂亚锋等,2008)。空心莲子草植株病情指数按照以下公式进行计算:

病情指数 = $(\sum_{i=0}^6 n_i \cdot i / N \cdot 6) \times 100$

式中, i 表示病级, n 表示植株发病为 i 级的株数, N 表示调查总株数,6 表示植株发病最高级。

1.7 数据统计与分析

固体培养基筛选试验数据采用完全随机区组多因子有重复 LSD 法进行分析,其中,基料(麦麸、玉米粉、玉米芯粉、稻秸秆粉、大米)为 A 因子,辅料(棉籽壳、稻秕壳、大豆粉)为 B 因子,质量比(1:1、3:1、5:1、7:1、9:1)为 C 因子;固体培养基含水量和金属离子对 SF-193 菌落生长影响的数据、固体菌粉防效数据采用完全随机区组二因子有重复 LSD 法进行分析。

2 结果与分析

2.1 固体发酵培养基的筛选

固体培养基筛选结果(表 1)表明,大米、大豆粉和棉籽壳有利于生防菌 SF-193 的生长,玉米芯粉、玉米粉、稻秸秆粉和稻秕壳不适合 SF-193 生长。其中,在大米和大豆粉质量比为 3:1 和 5:1 的培养基上 SF-193 菌落面积最大,其次为大米和棉籽壳质量比为 5:1 的培养基。在各固体培养基中加入水、胡萝卜汁、马铃薯蔗糖液对 SF-193 菌落生长无显著影响(数据未列出)。3 种因子各水平间差异显著性检验结果(表 2)表明,大米最适合作为固体发酵培养基基料,大豆粉和棉籽壳适合作为辅料,最适质量比为 3:1。但综合考虑表 1 数据和生产成本,本文选择大米、大豆粉和棉籽壳的质量比为 5:1:1 作为 SF-193 生长的固体培养基。

2.2 固体培养基含水量对 SF-193 生长的影响

在大米、大豆粉和棉籽壳质量比为 5:1:1 的培养基上测定培养基含水量对 SF-193 生长的影响。结果(表 3)表明,SF-193 菌落面积随含水量的增多而增大,但含水量高于 30% 时,菌落面积减小。当培养基含水量为 20% 和 30% 时,SF-193 菌落面积最大且无显著差异,其次为含水量为 10% 的培养基,培养基中含水量低于 10% 或高于 30% 均不适合该菌株生长。随着培养时间的延长,SF-193 菌落面积逐渐增大。培养 1 d 时,SF-193 在各培养基上的菌落面积无显著差异;培养 2 d 后,在含水量为 20% 和 30% 的培养基上菌落面积显著大于其他培养基;培养 7 d 时菌落面积达到最大。含水量为 0 时 SF-193 菌落生长缓慢,培养 7 d 时的菌落面积与培养 1 d 时的菌落面积无显著差异。

表 1 SF-193 在基料和辅料不同组合培养基上生长的菌落大小

Table 1 Area of colony of SF-193 grew on the solid-state media composed of different basic material and auxiliary material		菌落面积 Area of colony at different basic and auxiliary material ratios/cm ²				
基料 Basic material	辅料 Auxiliary material	1:1	3:1	5:1	7:1	9:1
麸皮 Bran	棉籽壳 Cotton seed hull	53.30 ± 5.44	57.23 ± 4.72	56.76 ± 4.00	44.72 ± 6.62	36.39 ± 4.57
	稻秕壳 Rice Husk	3.98 ± 1.25	11.83 ± 2.47	23.33 ± 4.72	30.94 ± 4.73	41.87 ± 3.01
	大豆粉 Soybean powder	89.41 ± 19.10	89.04 ± 12.11	82.26 ± 5.21	55.49 ± 6.10	35.31 ± 3.83
大米 Rice	棉籽壳 Cotton seed hull	109.41 ± 8.44	112.48 ± 7.17	122.76 ± 8.64	79.11 ± 6.62	50.28 ± 3.30
	稻秕壳 Rice Husk	12.99 ± 0.97	21.53 ± 2.08	32.50 ± 1.55	40.73 ± 2.96	47.40 ± 3.75
	大豆粉 Soybean powder	144.55 ± 7.47	156.96 ± 12.24	153.19 ± 7.96	103.98 ± 9.99	81.22 ± 6.48
玉米芯粉 Powder of corn cob	棉籽壳 Cotton seed hull	30.43 ± 6.61	39.22 ± 2.32	14.76 ± 1.40	8.74 ± 1.07	8.40 ± 1.08
	稻秕壳 Rice Husk	10.95 ± 0.90	11.77 ± 1.52	8.73 ± 0.81	7.42 ± 1.20	6.64 ± 1.23
	大豆粉 Soybean powder	77.04 ± 6.86	73.90 ± 4.06	49.43 ± 2.90	28.08 ± 4.73	22.62 ± 0.98
玉米粉 Cornmeal	棉籽壳 Cotton seed hull	30.83 ± 0.57	28.00 ± 2.88	20.17 ± 1.67	16.01 ± 3.29	11.15 ± 0.90
	稻秕壳 Rice Husk	10.58 ± 1.21	11.16 ± 1.25	8.23 ± 1.04	7.10 ± 1.27	4.66 ± 0.59
	大豆粉 Soybean powder	61.74 ± 2.91	58.98 ± 2.85	33.56 ± 3.34	25.22 ± 1.35	11.95 ± 0.61
稻秸秆粉 Rice stover	棉籽壳 Cotton seed hull	21.05 ± 3.32	19.65 ± 1.57	18.12 ± 2.02	12.36 ± 0.95	8.92 ± 1.12
	稻秕壳 Rice Husk	8.94 ± 1.64	9.27 ± 0.83	6.32 ± 0.91	3.06 ± 0.66	2.66 ± 0.58
	大豆粉 Soybean powder	57.67 ± 4.71	55.84 ± 2.03	36.68 ± 2.22	26.72 ± 1.40	17.86 ± 1.57

数据为平均值 ± 标准差。下同。
The datas are Mean ± SD in the table. The same as below.

表 2 3 种因子各水平间差异显著性检验

Table 2 Significance test of the difference among 3 factor levels					
因子 A Factor A	均值 Mean	因子 B Factor B	均值 Mean	因子 C Factor C	均值 Mean
大米 Rice	84.61 ± 47.84a	大豆粉 Soybean powder	65.15 ± 40.89a	3:1	50.46 ± 42.35a
麸皮 Bran	47.46 ± 25.89b	棉籽壳 Cotton seed hull	40.41 ± 33.32b	1:1	48.19 ± 41.44b
玉米芯粉 Powder of corn cob	26.54 ± 23.27c	稻秕壳 Rice husk	15.38 ± 13.04c	5:1	44.45 ± 42.66c
玉米粉 Cornmeal	22.62 ± 17.43d			7:1	32.65 ± 28.27d
稻秸秆粉 Rice stover	20.34 ± 17.06e			9:1	25.82 ± 22.00e

同列数据后附不同小写字母者表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。
Different small letters in the same column indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$) .

表 3 SF-193 在不同含水量固体培养基上生长的菌落大小

Table 3 Area of colony of SF-193 grew on the solid-state media with different water content					
含水量 Water content/%	菌落面积 Area of colony after cultivated different times/cm ²				
	1 d	2 d	3 d	5 d	7 d
0	0.41 ± 0.22a (a)	0.56 ± 0.21d (a)	0.56 ± 0.21e (a)	0.74 ± 0.18e (a)	0.74 ± 0.18e (a)
5	1.13 ± 0.63a (d)	3.80 ± 0.35cd (cd)	10.99 ± 1.93de (c)	23.76 ± 1.51d (b)	58.53 ± 2.81d (a)
10	2.18 ± 1.01a (d)	11.76 ± 1.28bc (d)	34.59 ± 3.16c (c)	82.27 ± 5.66b (b)	135.01 ± 15.44b (a)
20	3.26 ± 0.49a (e)	15.48 ± 2.10ab (d)	45.75 ± 1.84b (c)	114.98 ± 5.70a (b)	159.79 ± 3.42a (a)
30	4.05 ± 0.54a (e)	24.36 ± 2.19a (d)	60.48 ± 7.56a (c)	116.95 ± 8.83a (b)	165.81 ± 1.32a (a)
40	2.75 ± 0.44a (d)	6.08 ± 1.70bcd (d)	18.39 ± 2.30d (c)	47.01 ± 4.28c (b)	85.06 ± 9.16c (a)
50	1.50 ± 0.53a (d)	3.94 ± 0.72cd (d)	16.40 ± 1.79d (c)	41.08 ± 1.74c (b)	66.97 ± 4.41d (a)

同列数据后附不同小写字母者表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$) ;同行数据后括号内不同小写字母表示不同时间间差异显著 ($P < 0.05$)。
Different small letters in the same column indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$) ; Different small letters in bracket within the same row indicate significant difference among times ($P < 0.05$) .

2.3 金属离子对 SF-193 生长的影响

在大米、大豆粉和棉籽壳质量比为 5:1:1 的培养基上测定 6 种金属离子对 SF-193 菌落生长的影响。结果(表 4)表明,SF-193 在含不同金属离子的培养基上菌落面积存在显著差异。其中,Mg²⁺ 和 Mn²⁺ 对 SF-193 菌落生长的影响较小,培养 7 d 时菌落面积与对照无显著差异,在培养 2、3、5 d 时存在显著差异;SF-193 在含 Zn²⁺、Ca²⁺ 的培养基上菌

落面积显著小于对照,但 Zn²⁺ 对 SF-193 菌落生长的抑制作用强于 Ca²⁺;SF-193 在含 Cu²⁺ 和 Fe³⁺ 的培养基上不能生长。随着培养时间的延长,SF-193 在各金属离子培养基上的菌落面积均增大。与对照相比,培养 1 d 时,SF-193 在各金属离子培养基上的菌落面积无显著差异;培养 2、3、5 d 时,SF-193 在各金属离子培养基上的菌落面积显著小于对照。

表4 SF-193 在含6种金属离子固体培养基上生长的菌落大小
Table 4 Area of colony of SF-193 grew on the solid-state media contained 6 metal ion

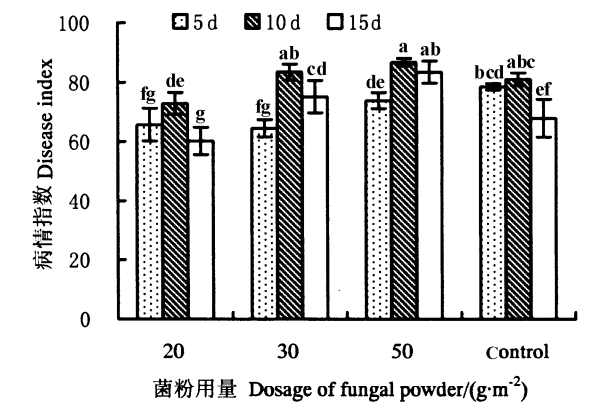
金属离子 Metal ion	菌落面积 Area of colony after cultivated different times/cm ²				
	1 d	2 d	3 d	5 d	7 d
Zn ²⁺	0.00 ± 0.00a(c)	0.32 ± 0.11c(c)	2.05 ± 0.69d(c)	8.22 ± 0.78d(b)	33.20 ± 2.67d(a)
Ca ²⁺	2.58 ± 0.77a(e)	13.44 ± 1.64b(d)	33.17 ± 1.02c(c)	83.36 ± 6.47c(b)	147.34 ± 2.15c(a)
Mg ²⁺	3.36 ± 0.38a(e)	14.14 ± 2.46b(d)	41.08 ± 1.74b(c)	102.22 ± 11.31b(b)	154.60 ± 3.37ab(a)
Mn ²⁺	3.37 ± 0.49a(e)	14.58 ± 2.47b(d)	40.41 ± 4.63b(c)	113.06 ± 3.77a(b)	152.43 ± 5.08bc(a)
Cu ²⁺	0.00 ± 0.00a(a)	0.00 ± 0.00c(a)	0.00 ± 0.00d(a)	0.00 ± 0.00e(a)	0.00 ± 0.00e(a)
Fe ³⁺	0.00 ± 0.00a(a)	0.00 ± 0.00c(a)	0.00 ± 0.00d(a)	0.00 ± 0.00e(a)	0.00 ± 0.00e(a)
对照(水) Control (water)	3.38 ± 0.69a(e)	21.55 ± 2.49a(d)	49.06 ± 4.43a(c)	117.11 ± 6.75a(b)	159.08 ± 6.80a(a)

同列数据后附不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$);同行数据后附括号内不同小写字母表示不同时间间差异显著($P<0.05$)。
Different small letters in the same column indicate significant difference among treatments ($P<0.05$); Different small letters in bracket within the same row indicate significant difference among times ($P<0.05$).

2.4 固体发酵生防菌 SF-193 对空心莲子草的控制效果

以液体发酵的菌液为对照,结果(图1)表明,以液体发酵菌液接种5 d后,空心莲子草的病情指数为78.1;固体菌粉用量为50 g·m⁻²时,病情指数为72.9;接种10和15 d后,固体菌粉用量为30和50 g·m⁻²的病情指数高于5倍稀释菌液,其中,用量为50 g·m⁻²的病情指数分别为86.1和83.9,而液体菌分别为81.2和67.9。将发酵的固体菌粉大面积撒于空心莲子草生长茂盛区域(图2A),7 d后该区域空心莲子草感病,叶片变黄、脱落(图2B、C),10 d后茎秆普遍发病,病斑连成片形成焦状病斑(图2D)。图2E区域在2009年3~4月为其他杂草,2009年6月被空心莲子草覆盖(图2F),喷撒SF-193菌粉后对空心莲子草具有显著的控制效果(图G、H)。因此,固体发酵生产的SF-193菌粉对

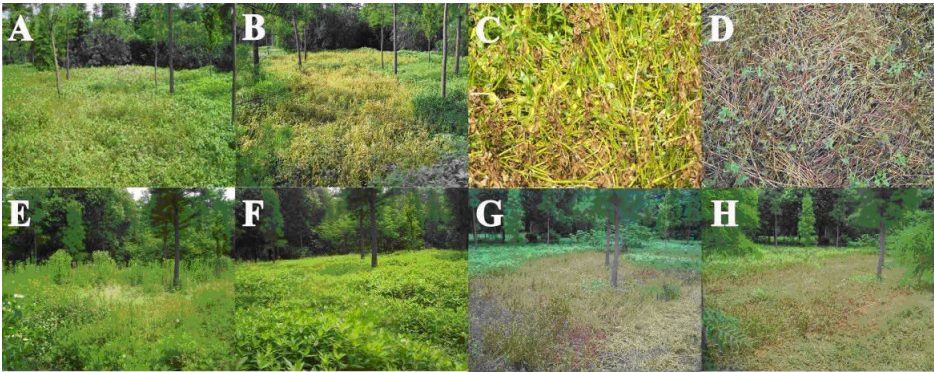
空心莲子草表现出致病性强且植株感病时间长等优点,比液体菌更具应用优势。



Control: 菌丝液5倍稀释。不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。
Control: Mycelial suspensions diluted 1:5 with water. Different small letters indicate significant difference ($P<0.05$).

图1 SF-193 菌粉对空心莲子草的致病作用

Fig. 1 The disease severities of *A. philoxeroides* treatment with powder of isolate SF-193



A:撒菌粉于未发病的空心莲子草;B:7 d 后的防控效果;C:空心莲子草叶片发病症状;D:10 d 后空心莲子草茎秆发病症状;E:3~4 月该区域主要为杂草;F:6 月空心莲子草覆盖整个区域;G:喷施 SF-193 固体菌粉 10 d 后对空心莲子草的防除效果;H:30 d 后的效果。
A: Powder of isolate SF-193 was spreaded on the plant of *A. philoxeroides* by hand; B: Disease symptoms after treatment for 7 days; C: Disease symptoms of the plant leaf; D: Disease symptoms after treatment for 10 days; E: Other weeds in this area in March and April; F: *A. philoxeroides* occupied this area in June; G: The efficiency of *A. philoxeroides* treatment with powder of SF-193 sprinkled after 10 days; H: The efficiency of *A. philoxeroides* after sprinkling powder of SF-193 for 30 days.

图2 大面积撒 SF-193 菌粉对空心莲子草的控制作用

Fig. 2 The efficacy of *A. philoxeroides* treatment with powder of isolate SF-193 in a large area filling the weed

3 讨论

利用植物病原真菌控制外来入侵杂草是一条重要的生防途径,将真菌繁殖体(孢子或菌丝体)或其代谢产物加工成一定的剂型,可大大提高其用于防治杂草的有效性(李新等,2009)。然而,在真菌除草剂工业化的大批量生产中,由于考虑到产品的成本问题,在保证产品的品质和数量不受影响的情况下,往往利用一些价廉、易得、量丰的农业粗制品作培养基,如黄豆粉、麦麸、米糠、玉米粉等(朱秦和强胜,2004b)。本文通过大量筛选初步获得了生防真菌 SF-193 固体发酵培养基,其最佳配比为大米:大豆粉:棉籽壳 = 5:1:1,而玉米粉、玉米芯粉、稻秕壳、稻秸秆粉等不利于 SF-193 生长。然而,棉籽壳在固体菌块粉碎过程中常出现棉絮,不利于粉碎,且易堵塞粉碎机,进而降低了生产效率。固体培养基含水量在菌株生长和生产过程中具有重要的作用。研究表明,适合 SF-193 固体发酵的培养基含水量为 20%~30%,含水量低于 10% 或高于 30% 不利于菌株生长;同时在菌粉生产过程中发现,含水量高于 10% 时容易导致粉碎机堵塞,而含水量为 10% 的培养基有利于生产菌粉。研究还发现,金属离子对 SF-193 的生长有一定的影响, Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 可导致菌株停止生长,其他离子均有不同程度的抑制作用;随着培养时间的延长, SF-193 对金属离子表现一定的耐受性,如在含 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 的培养基上,培养 2、3 和 5 d 时的菌落面积与对照存在显著差异,但培养 7 d 时菌落面积与对照无显著差异。综上分析,本文将生防真菌 SF-193 固体发酵培养基调整为每千克培养基中含大豆粉 15%、大米 75%、水 10%,该培养基既不影响菌株生长,又解决了粉碎过程中粉碎机堵塞的问题。

在田间试验中,该固体培养基发酵获得的菌粉对空心莲子草的控制作用显著高于液体发酵菌液,且持效期较长,同时操作方便、简单,因此具有较好的应用前景。然而,成功应用的真菌除草剂大多数以真菌产生的孢子作制剂,因为孢子在稳定性、活力、侵染力和寿命上都比真菌其他部分更优越(Boyette *et al.*, 1991)。对于液体培养不易产孢的真菌如百日草链格孢菌 *Alternaria zinniae* Pape., 由于固体发酵占地面积大、生产周期长、孢子产量低而

不适应工业化大规模生产,但通过固—液相结合法,以液体发酵生产菌体,用日光灯诱导产孢获得成功(强胜等,1997; Auld, 1993)。莲子草假隔链格孢 SF-193 液体发酵不能产孢,通过固体发酵培养虽然获得了大量菌丝,提高了防治效果,但如何实现其在固体培养基上的大量产孢及提高其货架期将是下一步研究的重点和难点。

参考文献

- 林志谊,王晓艳,罗楚平. 2007. 空心莲子草病原真菌的分离筛选及其菌株 SF-193 种的鉴定. 中国生物防治, 23(4): 353–357.
- 高昭远,干静娥. 1992. 菟丝子的生物防除——“鲁保一号”的研究进展. 生物防治通报, 8(4): 173–175.
- 李宏科,王韧. 1994. 空心莲子草叶甲的越冬保护和大量繁殖释放研究. 生物防治通报, 10(1): 11–14.
- 李新,谢明,谭万忠,万方浩. 2009. 杂草生防真菌的研究进展. 中国生物防治, 25(1): 83–88.
- 聂亚锋,林志谊,刘永峰,罗楚平,刘卹洲. 2008. 假隔链格孢 (*Nimbya alternantherae*) SF-193 防除空心莲子草田间高效使用技术的研究. 植物保护, 34(3): 109–113.
- 强胜,郭爱民,李扬汉. 1997. 大批量生产百日草链格孢菌孢子的技术. 中国生物防治, 13(4): 169–172.
- 沈国军,徐正浩,俞谷松. 2005. 空心莲子草的分布、危害与防除对策. 植物保护, 31(3): 14–18.
- 谭万忠. 1994. 空心莲子草在我国的水平和垂直分布. 杂草学报, 8(2): 30–33.
- 王晓艳,林志谊,刘永峰,李永丰,刘卹洲. 2007. 生防菌 SF-193 对空心莲子草防除效果及其影响因子的研究. 中国生物防治, 13(1): 15–18.
- 向梅梅,曾永三,刘任,陈圣清,蔡军宏,游明龙. 2002. 莲子草假隔链格孢的寄主范围及对空心莲子草的控制作用. 植物病理学报, 32(3): 286–287.
- 杨希娟,蔡晓剑,陈占全. 2010. 防治辣椒疫病的生防放线菌固体发酵培养基优选试验. 北方园艺, (2): 79–182.
- 朱秦,强胜. 2004a. 真菌除草剂及其大批量生产工艺研究现状. 杂草科学, (4): 1–4.
- 朱秦,强胜. 2004b. 真菌除草剂的剂型及应用研究现状. 农药, 43(8): 337–341.
- Ash G J. 2010. The science, art and business of successful bioherbicides. *Biological Control*, 52: 230–240.
- Auld B A. 1993. Mass production of fungi for biopesticides. *Plant Protection Quarterly*, 8(1): 7–9.

- Bailey K L, Boyetchko S M and Langle T. 2010. Social and economic drivers shaping biological control: a Canadian perspective on the factors affecting the development and use of microbial biopesticides. *Biological Control*, 52:222 – 229.
- Barreto R W and Torres A N L. 1999. *Nimbya alternantherae* and *Cercospora alternantherae*: two new records of fungal pathogens on *Alternanthera philoxeroides* (allegatorweed) in Brazil. *Australasian Plant Pathology*, 28:103 – 107.
- Boyette C D, Quimby P C, Jr, Connick W J, Jr, Daigle D J and Fulgham F E. 1991. Progress in the production, formulation, and application of mycoherbicides // Tebeest D O. *Microbial Control of Weed*. New York: Chapman and Hall, 209 – 222.
- Browsers R C. 1986. Commercialization of collego TM—an industrialist's view. *Weed Science*, 34s:24 – 25.
- Charudattan R and Dinoor A. 2000. Biological control of weeds using plant pathogens accomplishments and limitations. *Crop Protection*, 19:691 – 695.
- Charudattan R. 2001. Biological control of weeds by means of plant pathogens: significance for integrated weed management in modern agro-ecology. *Biocontrol*, 46:229 – 260.
- Elzein A, Heller A, Ndambi B, Mol M D, Kroschel K and Cadisch G. 2010. Cytological investigations on colonization of sorghum roots by the mycoherbicide *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae* and its implications for striga control using a seed treatment delivery system. *Biological Control*, 53:249 – 257.
- Kenney D S. 1986. Devine ®—the way it development—an industrialist's view. *Weed Science*, 34s:15 – 16.
- Pomella A W V, Barreto R W and Charudattan R. 2007. *Nimbya alternantherae* a potential biocontrol agent for alligatorweed, *Alternanthera philoxeroides*. *Biocontrol*, 52:271 – 288.

(责任编辑:杨郁霞)