微生物学报
Acta Microbiologica Sinica
2023, 63(11): 4245–4257
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20230189

Research Article 研究报告

稗草生防菌株 NX1 的生物学特性及致病性研究

刘璐[1]，钟加日[1,2]，朱哲远[1]，彭迪[1*]

1 湖南省农业科学院湖南省农业生物技术研究所 农药生物学与精准使用技术湖南省重点实验室，湖南 长沙 410125

2 湖南农业大学植物保护学院，湖南 长沙 410128

刘璐, 钟加日, 朱哲远, 彭迪. 稗草生防菌株 NX1 的生物学特性及致病性研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(11): 4245-4257.
LIU Lu, ZHONG Jiari, ZHU Zheyuan, PENG Di. Biological characteristics and pathogenicity of the biocontrol fungal strain NX1 for *Echinochloa crusgalli*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(11): 4245-4257.

摘　要：【目的】稗草是我国农田危害最严重的恶性杂草之一，化学除草剂的长期使用导致杂草抗药性上升、环境污染等诸多生态环境问题，因此开发绿色、环境友好的高效除草剂显得十分必要且迫切。【方法】采用常规组织分离法、形态学观察和分子生物学方法鉴定 NX1 菌株，并采用多元统计分析方法研究 NX1 菌株的致病性及其影响因素。【结果】经鉴定 NX1 菌株可能为弯孢属新种(*Curvularia* sp.)。该病原菌在 25−30 °C、pH 为 5−11 的条件下均能生长和产孢，其中，在 pH 为 9、30 °C 条件下产孢量最高。光照条件虽然不影响菌丝的生长，但连续光照条件有利于 NX1 菌株产孢。NX1 菌株在不同碳源、氮源条件下都能生长，其中对玉米粉和硝酸钠的利用效果最好。室内生防试验表明，湿度、稗草叶龄、光照时间及孢子浓度均是显著影响 NX1 菌株致病性的因素，其中湿度是最关键的因素。作物安全性试验表明，该菌株的分生孢子液对水稻、油菜、辣椒和茄安全。【结论】综上所述，菌株 NX1 对环境和营养条件要求不高，适合工业化生产及田间应用，具有开发成为生物除草剂的潜力。

关键词：稗草；弯孢菌；致病性；作物安全性

资助项目：长沙市自然科学基金(kq2202337)；湖南省农业科技创新资金(2022CX73, 2022CX134)；湖南省科技人才托举工程(2022TJ-N10)
This work was supported by the Natural Science Foundation of Changsha (kq2202337), the Agricultural Science and Technology Innovation Foundation of Hunan (2022CX73, 2022CX134), and the Science and Technology Personnel Lift Project of Hunan (2022TJ-N10).
*Corresponding author. E-mail: smileadi@126.com
Received: 2023-03-20; Accepted: 2023-07-18; Published online: 2023-07-24

Biological characteristics and pathogenicity of the biocontrol fungal strain NX1 for *Echinochloa crusgalli*

LIU Lu[1], ZHONG Jiari[1,2], ZHU Zheyuan[1], PENG Di[1*]

1 Hunan Provincial Key laboratory of Pesticide Biology and Precise Use Technology, Hunan Agricultural Biotechnology Research Institute, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, Hunan, China
2 College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China

Abstract: [Objective] *Echinochloa crusgalli* is one of the major noxious weeds in China's farmlands. The long-term use of chemical herbicides has caused eco-environmental problems, such as the enhanced weed resistance and environmental pollution. Therefore, it is urgent to develop environment-friendly high-performance herbicides. **[Methods]** The strain NX1 was identified by tissue isolation, morphological observation, and molecular biological methods, and its pathogenicity and influencing factors were studied by multivariate statistical analysis. **[Results]** The strain was probably a new species of *Curvularia*. It can grow and produce spores at 25–30 °C and pH 5–11, with the highest sporulation quantity at pH 9 and 30 °C. Although light did not affect the mycelial growth, continuous light was conducive to sporulation of the strain NX1. The strain NX1 can grow with different carbon and nitrogen sources, with the best utilization of corn meal and sodium nitrate. The laboratory biocontrol experiments showed that humidity, leaf age, light duration, and spore concentration significantly affected the pathogenicity of NX1 strain, among which humidity was the key factor. The crop safety test showed that the conidial suspension of the strain was safe to rice, rape, capsicum, and eggplant. **[Conclusion]** The strain NX1 has low requirements for environmental and nutritional conditions and is suitable for industrial production and field application. Therefore, it has the potential to be developed into a bioherbicide.

Keywords: *Echinochloa crusgalli*; *Curvularia*; pathogenicity; crop safety

稗草(*Echinochloa crusgalli*)广泛分布于我国各地，其生育期与相应作物生育期高度一致，易与田间农作物争夺水分、养分、光照和空间等条件，且生态适应性强，是我国水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)和玉米(*Zea mays*)等粮食作物上危害最严重的恶性杂草之一[1]。目前，稗草的防除主要依赖化学防治方法，该方法经济有效、简单易行，但是其长期使用会导致杂草抗药性上升，环境污染等诸多生态环境问题[2-3]。因此，开发绿色、环境友好的高效除草剂显得十分必要且迫切。

微生物源除草剂是一类利用植物病原微生物或其代谢产物开发的生物除草剂，其具有资源丰富，不易产生抗性杂草，对非靶标生物安全、经济效益好、环境相容性好等优点[4-5]。现有研究发现有近40多个属80多种微生物具有控草能力，其中最有生物控草潜能的有9个属，包括交链孢菌属(*Alternaria*)、壳单孢菌属(*Ascochyta*)、尾孢霉属(*Cercospora*)、刺盘孢菌属(*Colletotrichum*)、叶黑粉菌属(*Entyloma*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、疫霉属(*Phytophthora*)、柄锈菌属(*Puccinia*)和核盘菌属(*Sclerotinia*)[6-8]。国外有

研究报道利用棕榈疫霉菌(*Phytophora palmivora* Butl.)防控柑橘园中的杂草莫伦藤，纵沟柄锈菌(*Puccinia canaliculata*)防治油莎草，胶孢炭疽菌菟丝子专化型[*Colletotrichum gloeosporiodes* (Penz.) Sacc. f. sp. *cuscutae* Chang]防控大豆菟丝子等[9-11]。目前，国内关于杂草生防菌株筛选及抑草机理研究已有较多报道[12-16]，初步建立起了稗草-禾长蠕孢菌、紫茎泽兰-链格孢菌等微生物除草剂研究的技术体系，但还没有成功商业化的生物除草剂品种[17-18]。

自然界中的植物致病微生物是微生物除草剂的重要来源，新月弯孢菌是被发掘利用较多的一类植物病原真菌[19]。据报道新月弯孢菌能引起狗尾草、马唐、稗草和虎尾草发病，其中对稗草和虎尾草致病性强；其次生代谢产物对马唐具有较强的除草活性[20]。稗草生防菌筛选及研究的报道相对较少，有研究表明禾长蠕孢稗草专化型、尖角突脐孢菌和新月弯孢菌等对稗草致病性强，具有防除稗草的潜力[21-22]。为了进一步挖掘稗草生防菌资源，本研究团队前期从湖南省野外感病稗草叶片组织上分离、筛选出一株强致病力菌株NX1，拟通过形态学观察及分子生物学方法明确该病原菌的分类学地位，并通过对NX1菌株的生物学特性、生防效果和非靶标作物安全性的研究，明确该菌最佳的培养条件及致病条件，以期为后续稗草微生物源除草剂的开发打下坚实基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株：菌株 NX1，分离自野外感病稗草叶片并由本实验室保存。

稗草汁液培养基：30 g 新鲜稗草叶片的汁液，琼脂粉 20 g，去离子水定容至 1 L。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA)：去皮马铃薯 200 g，葡萄糖 20 g，琼脂 20 g，离子水溶解并定容至 1 L，pH 7.0，121 °C 灭菌 20 min。

察氏培养基：硝酸钠 3 g，磷酸氢二钾 1 g，硫酸镁 0.5 g，氯化钾 0.5 g，七水合硫酸亚铁 0.01 g，蔗糖 30 g，琼脂 20 g，离子水溶解并定容至 1 L，121 °C 灭菌 20 min。

1.2 菌株鉴定

形态鉴定：接种菌株NX1于PDA培养基上，28 °C 黑暗培养 10 d，期间记录其菌落形态。用移液枪吸取 200 μL 温度约为 70 °C 的稗草汁液培养基于灭菌载玻片上，迅速均匀涂布，使其冷却凝固为大小约为 15 mm×15 mm，厚度约为 2−3 mm 的琼脂方块，用接种针挑取少量菌丝接种于琼脂块中央，将载玻片放入用润湿脱脂棉保湿的培养皿中，28 °C 黑暗培养 2 d 后，用光学显微镜观察菌丝、分生孢子和分生孢子梗等形态特征并拍照，根据《中国真菌志》对菌株进行初步鉴定。

分子生物学鉴定：采用十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)法提取菌株 NX1 的全基因组 DNA，分别以引物 ITS1 (5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′)和 ITS4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′)进行 rDNA-ITS 区扩增，以引物 GPD1 (5′-GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA-3′)和 GPD2 (5′-GGGTGGAGTCGTACTTGAGCATGT-3′)进行 *GAPDH* 基因扩增，以引物 EF1983F (5′-GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT-3′)和 EF2218R (5′-ATGACACCRACRGCRACRGTYTG-3′) 进行 *TEF1-α* 基因扩增[23]。PCR 反应体系如下：2×*Taq* PCR MasterMix 20.0 μL [天根生化科技(北京)有限公司]，正向引物(10 μmol/L) 1.0 μL，反向引物(10 μmol/L) 1.0 μL，DNA 模板 2.0 μL，加 ddH_2O 补足至 40.0 μL。扩增程序如下：94 °C 3 min；94 °C 30 s，58 °C 30 s，72 °C 1 min，共 30 个循环；72 °C 5 min。PCR 产物纯化后送至生工生物工程(上海)股份

有限公司进行测序。

1.3 生物学特性测定

将直径为 6 mm 的 NX1 菌丝块接至 PDA 或不同碳源、氮源的平板上，28 °C 恒温、黑暗培养 15 d 后以十字交叉法测量菌落直径，血球计数法统计孢子数量。具体条件设置如下：(1) 光照：24 h 连续黑暗、12 h 黑暗/12 h 光照交替、24 h 连续光照；(2) 温度：15、20、25、30、35 °C；(3) pH：5、7、9、11；(4) 碳源：以察氏培养基为基础培养基，用等质量碳元素的葡萄糖、可溶性淀粉、玉米粉和甘露醇替代蔗糖，以不加碳源的察氏培养基作为对照；(5) 氮源：以察氏培养基为基础培养基，用等质量氮元素的脲(尿素)、硝酸钠、蛋白胨、硫酸铵和氯化铵代替硝酸钾，以不加氮源的察氏培养基作为对照。每个处理重复 5 次。

1.4 致病性试验

孢子悬浮液的制备：将菌株接种于 PDA 平板，28 °C、黑暗培养 14 d，使用 0.05%吐温 80 无菌水溶液刮洗平板表面菌体，将孢子悬浮液置于已灭菌三角瓶内，充分振荡后用已灭菌的脱脂棉进行过滤，再以血球计数板计数，确定孢子悬浮液浓度。以湿度、稗草叶龄、光照时间和孢子浓度为考察因素，设计 4 因素 3 水平 9 处理的正交试验(表 1)。各处理喷施 20 mL 的 NX1 孢子悬浮液，空白对照喷施 0.05%吐温 80。处理 10 d 后观察稗草植株的发病情况，并测量株高、鲜重。每处理 3 个重复。

1.5 作物安全性试验

将制备好的 NX1 孢子悬浮液(5.0×10^6 个/mL)喷施于 2 叶期水稻、油菜、辣椒和茄植株上，20 mL/盆，以喷施等量的 0.05%吐温 80 作为空白对照。处理 10 d 后观察供试植株的发病情况。

1.6 数据统计和分析

将测序获得的 NX1 菌株的 ITS、*GAPDH* 和 *TEF1-α* 序列与 GenBank 中序列进行 BLAST 比对分析，选取同源性高的菌株序列作为参考序列，参照 Kee 等[24]方法在 MEGA 7.0 软件中采用邻近法(neighbor-joining, NJ)构建系统发育树。ITS、*GAPDH* 和 *TEF1-α* 序列已提交至 GenBank，登录号为 OR037386、OR085376 和 OR085377。

叶片发病程度分级标准如下：0 级：叶片无任何病斑；1 级：叶片上有病斑零星分布；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[25]。按公式(1)计算病情指数，按公式(2)计算株高抑制率，按公式(3)计算鲜重抑制率[26]：

表 1 正交试验设计表

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

Treat	Combination	A Humility (%)	B Leaf age	C Light time (h)	D Spore concentration (spores/mL)
T1	$A_1B_1C_1D_1$	55	1 leaf	24	1.0×10^6
T2	$A_1B_2C_2D_2$	55	2 leaf	0	5.0×10^6
T3	$A_1B_3C_3D_3$	55	3 leaf	12	1.0×10^7
T4	$A_2B_1C_2D_3$	75	1 leaf	0	1.0×10^7
T5	$A_2B_2C_3D_1$	75	2 leaf	12	1.0×10^6
T6	$A_2B_3C_1D_2$	75	3 leaf	24	5.0×10^6
T7	$A_3B_1C_3D_2$	85	1 leaf	12	5.0×10^6
T8	$A_3B_2C_1D_3$	85	2 leaf	24	1.0×10^7
T9	$A_3B_3C_2D_1$	85	3 leaf	0	1.0×10^6

$$病情指数=\frac{\sum 病级叶片数\times 对应级别数}{调查叶片总数\times 最高级别数}\times 100 \quad (1)$$

$$株高抑制率(\%)=(对照株高-处理株高)/对照株高\times 100 \quad (2)$$

$$鲜重抑制率(\%)=(对照鲜重-处理鲜重)/对照鲜重\times 100 \quad (3)$$

试验数据采用 Microsoft Excel 2010 和 DPS (V9.5)软件进行统计分析，用最小显著差数(least significant difference, LSD)法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

菌株 NX1 在 PDA 培养基上活化培养 2 d 后可看出菌落为黑色，产生大量菌丝。菌丝有多个分支，顶端生长有 2−5 个分生孢子，呈深褐色。分生孢子具有 3 个颜色较深的隔膜，自基部数至第 3 个细胞膨大，并使孢子呈弯曲状，长 12−15 μm，宽 6−10 μm (图 1)。通过形态学初步鉴定菌株 NX1 为弯孢属(*Curvularia* sp.)。

采用 ITS 序列不能很好地鉴定到种，因此本研究采用多位点序列分析构建系统发育树。将菌株 NX1 的 ITS 序列在 NCBI 上进行 BLAST 比对，发现该菌株与新月弯孢菌(*Curvularia lunata*) MF170673.1 的同源性最高，相似性为 99.31%；而菌株 NX1 的 *GAPDH* 序列和 *TEF1-α* 序列分别与 *Curvularia plantarum* MT628902.1 和 MZ224022.1 同源性最高，相似性为 99.27%和 99.67%。基于 ITS-*GAPDH*-*TEF1-α* 序列构建系统发育树，结果显示菌株 NX1 单独为一个分支，未与其他已知的弯孢属种群聚类在一起，表明该菌株可能为弯孢属中新的种(图 2)。

2.2 生物学特性

菌株 NX1 在 25−30 °C 菌丝生长最好，15 d 后菌落直径达到 8.37−8.40 cm，显著高于其他温度；在 20、35 °C 菌丝生长较好，菌落直径分别为 8.18、8.20 cm；在 15 °C 菌丝生长较慢，菌落直径为 7.18 cm (表 2)。在 15、20、25、30、35 °C 培养时，菌株产孢量分别为 0.17×10^5、14.33×10^5、30.50×10^5、50.38×10^5、1.72×10^5 个/mL，其中 30 °C 产孢量显著高于其他温度培养的产孢量。综上所述，30 °C 最适 NX1 菌株生长和产孢。

菌株 NX1 在 pH 为 5−11 的 PDA 平板上皆可以生长，15 d 后菌落直径达到 8.33−8.50 cm，表明 pH 对菌株 NX1 的菌丝生长影响较小(表 2)。在 pH 为 5、7、9、11 培养基上，产孢量分别为 7.33×10^5、3.39×10^5、9.67×10^5、6.67×10^5 个/mL，其中 pH 为 9 时产孢量最高。由此可见，在 pH 为 9 的培养条件下有利于 NX1 菌株产孢。

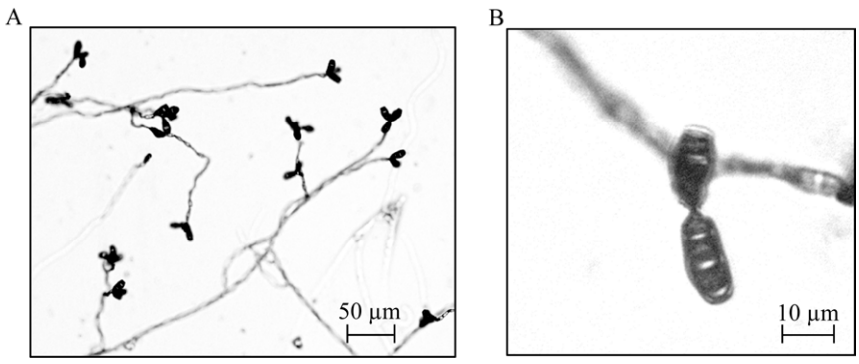

图 1 生防菌株 NX1 的形态特征

Figure 1 Morphological characteristics of biocontrol strain NX1. A: Conidiophores and conidia. B: Conidia.

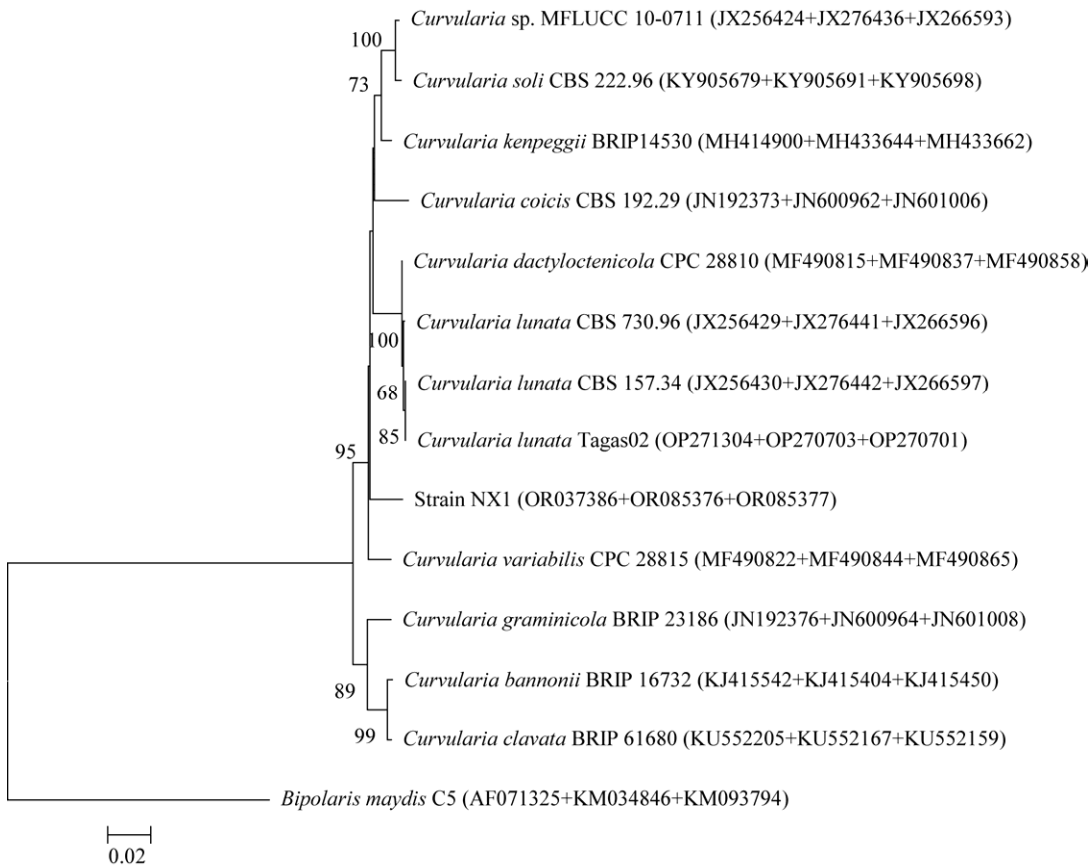

图 2　基于 ITS-*GAPDH*-*TEF1-α* 序列构建的菌株 NX1 的系统发育树

Figure 2　Phylogenetic tree of strain NX1 based on ITS-*GAPDH*-*TEF1-α* sequences. Numbers at nodes indicate levels of bootstrap support (%) based on 1 000 resampled datasets, and only those branches with greater than 60% bootstrap support are labeled. The accession numbers of ITS, *GAPDH*, and *TEF1-α* sequences were indicated in parentheses.

在连续光照、连续黑暗、12 h 光暗交替条件下培养 15 d，菌落平均直径均为 8.50 cm，无显著差异(表 2)。在 24 h 连续光照处理下，菌株 NX1 的产孢量为 451.11×10^5 个/mL，显著高于连续黑暗、12 h 光暗交替条件下的产孢量。由此可见，光照条件虽然不影响菌丝的生长，但连续光照条件有利于 NX1 菌株产孢。

NX1 菌株在 5 种不同碳源培养基质条件下都能够生长，但对不同碳源的利用程度不同。其中玉米粉作为碳源时菌株生长较慢，培养 15 d 后菌落直径为 7.77 cm，显著低于葡萄糖、可溶性淀粉、甘露醇和蔗糖作为碳源时菌株生长速度(图 3)。但是，葡萄糖、可溶性淀粉和玉米粉作为碳源时，产孢量分别为 30.00×10^5、30.00×10^5、43.89×10^5 个/mL，无显著差异(表 2)。甘露醇和蔗糖作为碳源时产孢量显著低于其他碳源培养基质。

NX1 菌株在 5 种不同氮源培养基质条件下都能够生长，但对不同氮源的利用程度不同。其中硫酸铵和氯化铵作为氮源时菌株生长缓慢，培养 15 d 后菌落直径仅为 3.80、3.85 cm，显著低于硝酸钠、蛋白胨和脲作为氮源时菌株生长速度(图 3)。硝酸钠作为氮源时，产孢量为 1.85×10^5 个/mL，显著高于其他氮源培养基质(表 2)。由此可见，NX1 菌株对硝酸钠的利用效果最好。

表 2 菌株 NX1 在不同培养条件下的生长速率及产孢量

Table 2 The growth rate and spore yield of strain NX1 under different culture conditions

Factors	Value	Diameter (cm)	Concentration (10^5 spores/mL)
T/°C	15	7.18±0.20c	0.17±0.12d
	20	8.18±0.05b	14.33±1.40c
	25	8.37±0.05a	30.50±3.00b
	30	8.40±0.00a	50.38±2.50a
	35	8.20±0.00b	1.72±0.83d
pH	5	8.33±0.08b	7.33±2.12b
	7	8.50±0.00a	3.39±1.05c
	9	8.50±0.00a	9.67±3.49a
	11	8.50±0.00a	6.67±2.09b
Light (h)	0	8.50±0.00a	42.50±13.69c
	12	8.50±0.00a	121.67±35.12b
	24	8.50±0.00a	451.11±83.36a
Carbon	Glucose	8.08±0.05a	30.00±0.00a
	Soluble starch	8.30±0.00a	30.00±0.00a
	Corn meal	7.77±0.29b	43.89±15.96a
	Mannitol	8.27±0.14a	10.83±4.92b
	Sucrose	8.23±0.05a	10.00±4.08b
	Carbon-deficient	7.38±0.26c	34.44±11.30a
Nitrogen	Sodium nitrate	8.22±0.04b	1.85±0.81a
	Peptone	8.50±0.00a	0.23±0.06b
	Urea	8.15±0.10b	0.88±0.25b
	Ammonium sulfate	3.85±0.15c	–
	Ammonium chloride	3.80±0.11c	–
	Nitrogen-deficient	8.50±0.00a	0.03±0.01b

Data are means±SD (n=5). Different lower-case letters in the same line show significant differences of the mean by LSD test (P<0.05). –: Not detected.

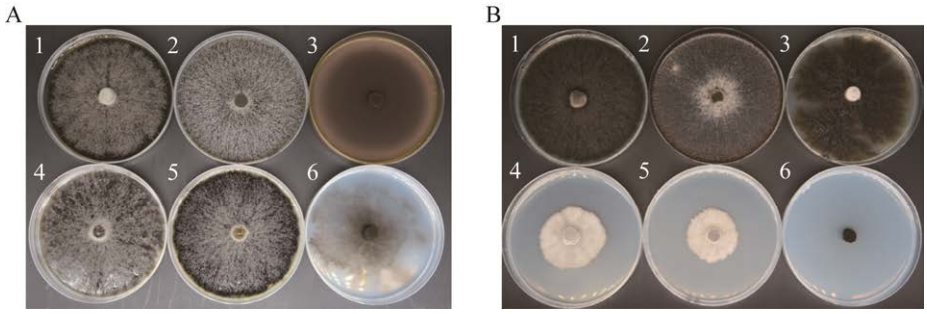

图 3 不同碳源(A)、氮源(B)条件下 NX1 菌落生长形态

Figure 3 Growth morphology of NX1 colony under different carbon (A) and nitrogen sources (B). A: 1, Glucose; 2, Soluble starch; 3, Corn meal; 4, Mannitol; 5, Sucrose; 6, Carbon-deficient. B: 1, Sodium nitrate; 2, Peptone; 3, Urea; 4, Ammonium sulfate; 5, Ammonium chloride; 6, Nitrogen-deficient.

2.3 影响致病效果的因素

本研究选取了湿度、光照、稗草叶龄及孢子浓度 4 个因素，设计正交试验考察各因素对 NX1 菌株致病性的影响。结果表明：经 NX1 孢子悬浮液喷施处理后稗草表现出不同程度的致病性。各处理病情指数介于 31.77−62.53 之间，其中 T7 处理(85%湿度、1 叶期稗草、12 h 光暗交替、孢子浓度 5.0×10^6 个/mL)防效最高，显著高于其他处理(表 3)。各处理的株高防效和鲜重防效均低于 10%，表明NX1孢子悬浮液喷施对稗草生长的影响较小。

从方差分析结果可知(表 4)，湿度、光照时间、稗草叶龄和孢子浓度均对病情指数有极显著影响($P<0.01$)；稗草叶龄和孢子浓度对株高有极显著影响($P<0.01$)，湿度和光照时间对株高无显著影响(NS)；湿度、光照时间、稗草叶龄和孢子浓度均对鲜重均无显著影响(NS)。

表 3 NX1 菌株对稗草的防控效果

Table 3 Control effect of strain NX1 on barnyard grass

Treat	Height inhibition (%)	Weight inhibition (%)	Disease index
T1	1.56±1.25b	2.37±2.75ab	34.36±2.61e
T2	2.34±1.80b	5.39±3.35a	44.95±3.47d
T3	−1.50±1.06c	−5.02±9.64b	48.25±0.65cd
T4	0.47±1.28bc	−0.25±7.04ab	31.77±4.70e
T5	5.61±2.03a	7.55±2.58a	49.28±5.02cd
T6	1.08±1.25bc	3.48±2.32ab	53.55±1.84bc
T7	2.12±2.95b	−0.94±9.60ab	62.53±4.51a
T8	0.25±1.12bc	5.26±3.37a	53.41±1.28bc
T9	0.14±0.90bc	2.69±2.26ab	56.23±2.26b

Data are means±SD (n=3). Different lowercase letters in the same row show significant differences of the mean by LSD test ($P<0.05$).

表 4 正交试验方差分析

Table 4 Analysis of variance of orthogonal test

Variables	ANOVA	Humility	Leaf age	Light time	Spore concentration
Disease index	Sum of square	1 151.06	443.75	385.69	417.24
	F value	53.35	20.57	17.87	19.34
	P value	0.000 1	0.000 1	0.000 1	0.000 1
	Significance	**	**	**	**
Height inhibition	Sum of square	14.72	35.89	7.32	36.16
	F value	2.75	6.71	1.37	6.76
	P value	0.090 5	0.006 6	0.279 5	0.006 5
	Significance	NS	**	NS	**
Weight inhibition	Sum of square	32.47	193.58	46.86	81.43
	F value	0.518	3.088 6	0.747 7	1.299 3
	P value	0.604 3	0.070 3	0.487 6	0.297 1
	Significance	NS	NS	NS	NS

**: $P<0.01$ extremely significant difference; NS: No significant difference.

从表 5 可看出，各因素对菌株 NX1 在稗草上的病情指数影响顺序为：光照时间(C)>孢子浓度(D)>湿度(A)>稗草叶龄(B)，对于湿度(A)因素而言，k3>k2>k1；对于稗草叶龄(B)因素而言，k2>k3>k1；对于光照时间(C)因素而言，k3>k1>k2；对于孢子浓度(D)因素而言，k2>k1>k3。以菌株 NX1 对稗草的病情指数为考察指标，可将最佳致病条件确定为 $A_3B_2C_3D_2$，即在黑暗、85%湿度条件下，以浓度为 5.0×10^6 个/mL 的孢子悬浮液喷施于 2 叶期稗草。各因素影响菌株 NX1 对稗草株高抑制率的顺序为：孢子浓度(D)>稗草叶龄(B)>光照时间(C)>湿度(A)。对于稗草叶龄(B)因素而言，NX1 菌株为 k3 时最大；对于孢子浓度(D)因素而言，NX1 菌株为 k1 时最大。结合方差分析结果，以株高为考察因素，最佳组合为 AB_3CD_1，即以浓度为 1.0×10^6 个/mL 的孢子悬浮液喷施于 3 叶期稗草。各因素影响菌株 NX1 对稗草鲜重抑制率的顺序为稗草叶龄(B)>光照时间(C)>孢子浓度(D)>湿度(A)，结合方差分析结果，各因素均无显著影响。

2.4 作物安全性分析

水稻、油菜、茄和辣椒植株经 NX1 孢子悬浮液处理后，并无任何不良反应，植株叶片上未见到与稗草叶片上相同或类似的病斑，病情指数为 0，且对作物的后续生长无抑制作用(图 4)。这表明 NX1 菌株对水稻、油菜、辣椒和茄表现为安全。

表 5 极差分析及最佳致病组合

Table 5 Range analysis and optimal pathogenic combination

Variables	Factor	k1	k2	k3	R
Disease index	A Humility	44.07	44.78	54.42	10.45
	B Leaf age	44.59	51.48	47.20	6.89
	C Light time	51.49	38.15	53.64	15.49
	D Spore concentration	47.12	55.41	40.75	14.66
	Factor priority	C>D>A>B			
Height inhibition (%)	A Humility	0.97	0.22	1.25	1.03
	B Leaf age	−0.38	−0.32	3.14	3.52
	C Light time	0.06	2.91	−0.53	3.44
	D Spore concentration	3.64	−1.05	−0.15	4.69
	Factor priority	D>B>C>A			
Weight inhibition (%)	A Humility	0.88	−0.44	−0.01	1.32
	B Leaf age	−1.95	−0.78	3.14	5.09
	C Light time	−1.06	2.75	−1.26	4.01
	D Spore concentration	1.97	−0.84	−0.72	2.81
	Factor priority	B>C>D>A			

k: The sum of the indicators at each level of each factor; R: Range.

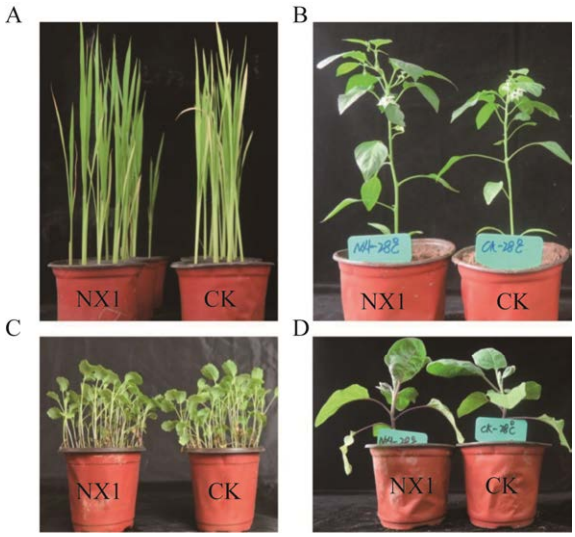

图 4　NX1 菌株对作物安全性评价

Figure 4　Safety evaluation of NX1 strain on crops. A: Rice. B: Pepper. C: Rape. D: Eggplant.

3　讨论与结论

杂草的多重抗性与化学除草剂作用模式之间的矛盾日益加剧，对农田杂草防除构成了巨大的威胁，研发广谱、高效、环境友好的新型除草剂迫在眉睫[27]。微生物除草剂具有资源丰富，不易产生抗性杂草，对非靶标生物相对安全、环境友好、残留少和安全性高等优点，亦可以满足全球对有机农产品长期增长的需求[28]。

本研究从感病稗草叶片上分离到一株强致病性菌株，经形态学和分子学鉴定为弯孢属。ITS 序列比对发现该菌株与 *Curvularia lunata* 相似性最高，而 *GAPDH* 序列和 *TEF1-α* 序列比对发现该菌株与 *Curvularia plantarum* 相似性最高。系统发育树结果显示菌株 NX1 未与已知种聚类在一起，推测其可能为弯孢属中的新种，后续需要进一步分析证实。新月弯孢菌易受环境等外界因素的影响，不同致病菌株之间甚至相同致病型菌株在不同培养条件下均存在明显的生理分化[21]。常佳迎等[29]的研究发现新月弯孢模式菌株的菌丝生长和产孢最适温度分别为 30 °C 和 35 °C，2 株新月弯孢变种菌株的菌丝生长和产孢最适温度均为 30 °C。本研究中稗草弯孢菌 NX1 菌株生长和产孢最适温度为 30 °C，与之前研究结果一致。光照对弯孢菌株菌丝生长有一定的刺激作用，在连续光照条件下有利于 NX1 菌株产孢。而本课题组从稗草上分离到的另一株弯孢菌 NX2A 更适合在连续黑暗条件下生长和产孢[25]。pH 为 9 时产孢量最高，表明 NX1 菌株在偏碱性条件下更适合产孢。另外，该菌株在 PDA 培养基上菌落生长和产孢均较好，在以葡萄糖、可溶性淀粉和玉米粉为碳源、以硝酸钠为氮源的培养基上产孢最佳，表明该菌株适合大规模培养，是一种具有应用潜力的杂草生防菌。

据报道，稗草的病原真菌主要有新月弯孢菌、禾长蠕孢菌、尖角突脐孢菌等，但这些生防菌都没有成功登记和商品化[21-22]。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，因此生防效果往往不稳定[3]。本研究结果表明，在不同的环境条件下，NX1 菌株均对稗草具有良好的防效。湿度、稗草叶龄、光照时间及孢子浓度均是显著影响 NX1 菌株致病性的因素，其中湿度是最关键的影响因素。湿度可通过真菌分生孢子萌发、侵染等过程，从而影响生防效果的发挥[6]。NX1 菌株对稗草株高和鲜重的影响较小(表 4)，在 T3 处理条件下株高和鲜重抑制率为负值，表明在特定的环境条件下喷施 NX1 孢子对稗草生长有轻微的促进作用。新月弯孢菌是被发掘利用较多的一类植物病原真菌，可引起水稻、玉米等的叶斑和苗枯病，这些病害在一定的条件下可能会变成某些作物的重要病害[30-31]。而本研究中的 NX1 菌株接种于水稻、油菜、辣椒和茄等大田作物上，不产生病斑、且不影响作物生长，可见对常见作物安全性较高。综上所述，菌株 NX1 对稗草具有良好防效，对环境条件要求不高，同时对其他常见作物安全，因此具有开

发为稗草生防菌的潜力。

获得一个有潜力开发为生物除草剂的生防菌株是开发生物除草剂的前提和基础[32]，但离成功开发一个商用的生物除草剂仍有许多工作要做。如 NX1 菌株发酵培养条件的优化，如何进一步提高该菌株的产孢量及致病能力等，都需要深入的研究。另外，可对 NX1 菌株发酵液中的除草活性物质进行提取及鉴定，明确除草活性成分的生物合成途径及关键代谢基因的功能，为生物除草剂新靶点的开发和创制提供理论依据和科学参考。

参考文献

[1] 董立尧, 高原, 房加鹏, 陈国奇. 我国水稻田杂草抗药性研究进展[J]. 植物保护, 2018, 44(5): 69-76.
DONG LY, GAO Y, FANG JP, CHEN GQ. Research progress on the herbicide-resistance of weeds in rice fields in China[J]. Plant Protection, 2018, 44(5): 69-76 (in Chinese).

[2] POWLES SB, YU Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides[J]. Annual Review of Plant Biology, 2010, 61: 317-347.

[3] 屈洋, 冯佰利. 杂草生物控制技术研究进展[J]. 中国农学通报, 2019, 35(4): 108-115.
QU Y, FENG BL. Weed biological control technology: research progress[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2019, 35(4): 108-115 (in Chinese).

[4] HARDING DP, RAIZADA MN. Controlling weeds with fungi, bacteria and viruses: a review[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 659.

[5] 强胜. 中国杂草生物学研究的新进展[J]. 杂草学报, 2018, 36(2): 1-9.
QIANG S. New progresses on studies of weed biology in China[J]. Weed Science, 2018, 36(2): 1-9 (in Chinese).

[6] HERSHENHORN J, CASELLA F, VURRO M. Weed biocontrol with fungi: past, present and future[J]. Biocontrol Science and Technology, 2016, 26(10): 1313-1328.

[7] MORIN L. Progress in biological control of weeds with plant pathogens[J]. Annual Review of Phytopathology, 2020, 58: 201-223.

[8] 何亚文, 李广悦, 谭红, 康前进, 葛蓓孛, 赵杨扬, 张克诚, 蒋细良, 刘凤权, 李亚宁, 张红艳, 白林泉, 向文胜, 邱德文, 杨自文, 邓子新. 我国生防微生物代谢产物研发应用进展与展望[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(3): 537-548.
HE YW, LI GY, TAN H, KANG QJ, GE BB, ZHAO YY, ZHANG KC, JIANG XL, LIU FQ, LI YN, ZHANG HY, BAI LQ, XIANG WS, QIU DW, YANG ZW, DENG ZX. Progress and prospect of microbial metabolite pesticides research, development and application in China[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2022, 38(3): 537-548 (in Chinese).

[9] MANOHAR B, SEEMA, SUSHMITA, SINHA A, PANDIT SK. Biotechnology applications in weed management[J]. Current Journal of Applied Science and Technology, 2018, 31(2): 1-4.

[10] PENG Y, LI SJ, YAN J, TANG Y, CHENG JP, GAO AJ, YAO X, RUAN JJ, XU BL. Research progress on phytopathogenic fungi and their role as biocontrol agents[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 670135.

[11] REICHERT JÚNIOR FW, SCARIOT MA, FORTE CT, PANDOLFI L, DIL JM, WEIRICH S, CAREZIA C, MULINARI J, MAZUTTI MA, FONGARO G, GALON L, TREICHEL H, MOSSI AJ. New perspectives for weeds control using autochthonous fungi with selective bioherbicide potential[J]. Heliyon, 2019, 5(5): e01676.

[12] 韩川. 用于微生物除草剂的杂草病原真菌的筛选与评价[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2012.
Han C. The selection and evaluation of pathogenic fungi for microbial herbicide[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012 (in Chinese).

[13] ZHU HX, MA YQ, GUO QY, XU BL. Biological weed control using *Trichoderma polysporum* strain HZ-31[J]. Crop Protection, 2020, 134: 105161.

[14] 陆俞萍, 肖婉, 房婉萍, 强胜, 陈世国. 几种茶园杂草生防菌的分离鉴定[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(3): 564-574.
LU YP, XIAO W, FANG WP, QIANG S, CHEN SG. Isolation and identification of main weed pathogens in tea garden[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2021, 37(3): 564-574 (in Chinese).

[15] 牛学礼, 杨锦玉, 黄俊文, 章武. 牛筋草叶斑病病原菌的分离鉴定及其除草活性[J]. 分子植物育种, 2022, 20(3): 935-942.
NIU XL, YANG JY, HUANG JW, ZHANG W. Isolation and identification of a pathogen of *Eleusine indica* leaf spot and its herbicidal activity[J]. Molecular Plant Breeding, 2022, 20(3): 935-942 (in Chinese).

[16] 李伟佳. 抑草活性菌株的筛选及其作用机理的初探[D]. 西宁: 青海大学硕士学位论文, 2020.
LI WJ. Screening of strains with inhibitory activity against weed and its preliminary inhibitory mechanisms[D]. Xining: Master's Thesis of Qinghai University, 2020 (in Chinese).

[17] 康烨. 紫茎泽兰致病型链格孢菌致病毒力因子的研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2017.
KANG Y. Study on the virulence factors of *Alternaria Alternata* croftonweed pathotype infection of its host[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2017 (in Chinese).

[18] 庄超, 张羽佳, 唐伟, 宋小玲, 余柳青, 张建萍, 强胜. 齐整小核菌和禾长蠕孢菌稗草专化型复配防除直播稻田杂草的试验研究[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(2): 242-249.
ZHUANG C, ZHANG YJ, TANG W, SONG XL, YU LQ, ZHANG JP, QIANG S. Field evaluation of cooperative application of *Sclerotium rolfsii* and *Helminthosporium gramineum* rabenh. f. sp. *echinochloae* to control weeds in dry direct-seeded rice[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2015, 31(2): 242-249 (in Chinese).

[19] 张亚鑫, 肖婉, 张峥, 韦佳佳, 强胜, 陈世国. 稻田稗属杂草致病菌的分离与鉴定[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(6): 1276-1287.
ZHANG YX, XIAO W, ZHANG Z, WEI JJ, QIANG S, CHEN SG. Isolation and identification of plant pathogens of barnyard grass in the paddy fields[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2021, 37(6): 1276-1287 (in Chinese).

[20] 杨叶, 胡美姣, 王兰英. 马唐草新月弯孢生物学特性及其代谢产物活性测定[J]. 中国生物防治, 2009, 25(2): 154-159.
YANG Y, HU MJ, WANG LY. Characteristics and herbicidal activity of metabolite produced by *Curvularia lunata* from *Digitaria sanguinalis*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2009, 25(2): 154-159 (in Chinese).

[21] 韦韬, 李静, 倪汉文. 稗草生防菌新月弯孢菌 *Culvularia lunata* 菌株 J15(2)的安全性和致病力[J]. 植物保护学报, 2011, 38(1): 81-85.
WEI T, LI J, NI HW. The efficacy of *Culvularia lunata* strain J15(2) on *Echinochloa crus-galli* and its host range[J]. Journal of Plant Protection, 2011, 38(1): 81-85 (in Chinese).

[22] 李健, 李美, 高兴祥, 房锋, 董连红. 稗草生防菌 BC-1 的分离及生物学特性研究[J]. 草业学报, 2016, 25(8): 164-171.
LI J, LI M, GAO XX, FANG F, DONG LH. Isolation and biological characteristics of the biological control fungi BC-1 for *Echinochloa* crusgalli[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2016, 25(8): 164-171 (in Chinese).

[23] WEI TP, LUO MY, ZHANG H, JIA WY, ZENG Y, JIANG YL. *Curvularia verruculosa* as new causal pathogen of common bean leaf spot disease in China[J]. Crop Protection, 2022, 162: 106091.

[24] KEE YJ, ZAKARIA L, MOHD MH. *Curvularia asianensis* and *Curvularia eragrostidis* associated with leaf spot of *Sansevieria trifasciata* in Malaysia[J]. Journal of Phytopathology, 2020, 168(5): 290-296.

[25] 钟加日, 刘璐, 曾颖, 朱哲远, 柏连阳, 彭迪. 稗草生防菌 NX2A 的鉴定、安全性及对稗草的致病条件[J]. 南方农业学报, 2022, 53(2): 469-476.
ZHONG JR, LIU L, ZENG Y, ZHU ZY, BAI LY, PENG D. The identification, safety, and efficacy of the biocontrol fungi NX2A for *Echinochloa crusgalli*[J]. Journal of Southern Agriculture, 2022, 53(2): 469-476 (in Chinese).

[26] 顾琼楠, 欧翔, 褚世海, 黄启超, 陈安安, 李儒海. 牛筋草生防菌 NJC-16 的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(4): 817-825.
GU QN, OU X, CHU SH, HUANG QC, CHEN AA, LI RH. Isolation, identification, and biological characteristics of the biocontrol fungi NJC-16 for *Eleusine indica*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2021, 37(4): 817-825 (in Chinese).

[27] 周文冠, 孟永杰, 陈锋, 帅海威, 刘建伟, 罗晓峰, 杨文钰, 舒凯. 除草剂研发及其复混使用的现状与展望[J]. 草业科学, 2018, 35(1): 93-105.
ZHOU WG, MENG YJ, CHEN F, SHUAI HW, LIU JW, LUO XF, YANG WY, SHU K. Current status and

research progress of development and tankmix application of herbicides[J]. Pratacultural Science, 2018, 35(1): 93-105 (in Chinese).

[28] 张红梅, 陈玉湘, 徐士超, 王婧, 蒋建新, 赵振东. 生物源除草活性物质开发及应用研究进展[J]. 农药学学报, 2021, 23(6): 1031-1045.
ZHANG HM, CHEN YX, XU SC, WANG J, JIANG JX, ZHAO ZD. Research progress on development and application of bio-sourced herbicidal active substances[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2021, 23(6): 1031-1045 (in Chinese).

[29] 常佳迎, 田兰芝, 刘树森, 石洁, 杨文香, 郭宁. 新月弯孢变种的生物学特性及其对药剂的敏感性[J]. 植物保护学报, 2020, 47(5): 1038-1047.
CHANG JY, TIAN LZ, LIU SS, SHI J, YANG WX, GUO N. Biological characteristics of fungal pathogen *Curvularia lunata* varieties and its sensitivity to fungicides[J]. Journal of Plant Protection, 2020, 47(5): 1038-1047 (in Chinese).

[30] 王新华, 高金欣, 高士刚, 刘铜, 陆志翔, 李雅乾, 陈捷. 玉米新月弯孢叶斑病研究进展[J]. 植物病理学报, 2019, 49(4): 433-444.
WANG XH, GAO JX, GAO SG, LIU T, LU ZX, LI YQ, CHEN J. Research progress on maize *Curvularia* leaf spot caused by *Curvularia lunata*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2019, 49(4): 433-444 (in Chinese).

[31] KHIRALLA A, SPINA R, SALIBA S, LAURAIN-MATTAR D. Diversity of natural products of the genera *Curvularia* and *Bipolaris*[J]. Fungal Biology Reviews, 2019, 33(2): 101-122.

[32] 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 SG, QIANG S. The status and future directions of bioherbicide study and development[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2015, 31(5): 770-779 (in Chinese).