

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2026.04.006

引用格式:彭超,杨兰,崔文静,等.杂草致病菌株粉红螺旋聚孢霉JZ-28的分离、鉴定及除草潜力评价[J].草地学报,2026,34(4):1196—1204

PENG Chao, YANG Lan, CUI Wen-jing, et al. Isolation, Identification, and Herbicidal Potential Evaluation of Pathogenic Weed Strain *Clonostachys rosea* JZ-28[J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34(4):1196—1204

杂草致病菌株粉红螺旋聚孢霉JZ-28的分离、鉴定及除草潜力评价

彭超^{1,2}, 杨兰^{1,2}, 崔文静^{1,2}, 马永强^{1,2,3*}, 程亮^{1,2,3}, 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. 农业农村部西宁作物有害生物科学观测实验站, 青海 西宁 810016)

摘要:为筛选具有高效除草潜力的生防菌株,本研究从青海省自然感病紫花地丁(*Viola philippica*)叶片中分离出致病菌株JZ-28。通过形态学及多基因(ITS/EF-1 α /LSU)联合鉴定,确定为粉红螺旋聚孢霉(*Clonostachys rosea*)。致病性试验表明其具有强效除草活性,JZ-28在7 d可使青藏高原4种优势阔叶类杂草冬葵(*Malva verticillata*)、密花香薷(*Elsholtzia densa*)、欧洲千里光(*Senecio vulgaris*)和藜(*Chenopodium album*)的离体叶片黄化发病,活体植株试验发病率分别为83%,95%,100%,70%。评价JZ-28对青海省6种主栽作物和3种冷凉蔬菜的安全性,表明该菌株对玉米(*Zea mays*)、蚕豆(*Vicia faba*)、豌豆(*Pisum sativum*)、油菜(*Brassica napus*)4种作物和黄瓜(*Cucumis sativus*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)、茄子(*Solanum melongena*)3种冷凉蔬菜表现为安全,对青稞(*Hordeum vulgare*)、小麦(*Triticum aestivum*)表现为轻微感病。培养条件优化试验表明,蔗糖与大豆粉分别为最佳碳、氮源,可促进菌丝生长与孢子产量提高。本研究首次揭示了粉红螺旋聚孢霉作为高寒地区生物除草剂的潜力,为脆弱生态系统的杂草可持续管理提供了新的途径。

关键词:杂草防控;粉红螺旋聚孢霉;微生物除草剂

中图分类号:S451

文献标识码:A

文章编号:1007-0435(2026)04-1196-09

Isolation, Identification, and Herbicidal Potential Evaluation of Pathogenic Weed Strain *Clonostachys rosea* JZ-28

PENG Chao^{1,2}, YANG Lan^{1,2}, CUI Wen-jing^{1,2}, MA Yong-qiang^{1,2,3*}, CHENG Liang^{1,2,3}, ZHU Hai-xia^{1,2,3*}

(1. Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Qinghai University, Xining, Qinghai Province 810016, China; 2. Key Laboratory of Agricultural Integrated Pest Management of Qinghai Province, Xining, Qinghai Province 810016, China; 3. Scientific Observation and Experiment Station of Crop Pests, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Xining, Qinghai Province 810016, China)

Abstract: To screen biocontrol strains with high herbicidal potential, the pathogenic fungus JZ-28 was isolated from naturally infected leaves of *Viola philippica* in Qinghai Province. Through morphological characterization and multi-gene (ITS, EF-1 α , LSU) phylogenetic analysis, the isolate was identified as *Clonostachys rosea*. Pathogenicity assays demonstrated potent herbicidal activity of strain JZ-28, inducing chlorosis in detached leaves of four dominant broadleaf weed species from the Qinghai-Xizang Plateau (*Malva verticillata*, *Elsholtzia densa*, *Senecio vulgaris*, and *Chenopodium album*) within 7 days post-inoculation (dpi). Disease incidence rates in whole-plant assays reached 83%, 95%, 100%, and 70%, respectively. Safety evaluation on six major crops and three cool-season vegetables in Qinghai revealed that JZ-28 was safe for four crops: *Zea mays*, *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Brassica napus*, and three vegetables: *Cucumis sativus*, *Solanum lycopersicum*, and

收稿日期:2025-06-03;修回日期:2025-07-16

基金项目:国家自然科学基金项目(32460683);青海省科技厅基础研究项目(2024-ZJ-928)资助

作者简介:彭超(2001-),男,汉族,江西吉安人,硕士研究生,主要从事生物防治研究,E-mail:pengchao0201@163.com;*通信作者 Author for correspondence, E-mail: zhuhaixia0101@163.com; mayongqiang_163@163.com

Solanum melongena. Lightly Susceptible was observed in highland barley *Hordeum vulgare* and *Triticum aestivum*. These findings indicated JZ-28's potential as a broad-spectrum bioherbicide against broadleaf weeds in multiple cropping systems. Culture optimization identified sucrose and soybean meal as optimal carbon and nitrogen sources for enhancing mycelial growth and sporulation. This study provided the first evidence of *Clonostachys rosea*'s bioherbicide potential in alpine ecosystems, addressing a critical research gap in microbial herbicide development and offering sustainable weed management solutions for fragile environments.

Key words: Weed control; *Clonostachys rosea*; Microbial herbicides

农田杂草是农业生产中的重要制约因素,我国每年因杂草危害导致的农作物产量损失约10%~15%,联合国世界粮农组织FAO统计数据显示,全世界每年因杂草带来的损失高达210亿美元^[1]。随着抗草甘膦转基因作物的研发与广泛应用,草甘膦使用量急剧上升。该除草剂在全球农药市场中所占份额接近20%,年销售额突破20亿美元^[2]。目前化学除草剂除草是农业生产中杂草治理的主要手段,可以快速抑制甚至杀死杂草。然而,长期使用化学除草剂会带来一系列环境与生态问题,影响人畜健康,已经引起广泛关注^[3]。近年来,各国大力推广绿色农药,在多种新型农药中,微生物农药以靶标性强、环境相容性高的特点成为杂草绿色防控的重要研究热点^[4]。研究显示,生物农药在2000年占据全球农药市场0.2%,2009年到3.7%,全球市场在2010年的产值超过20亿元,市场占有率已经达到4%左右^[5]。有研究发现,病原真菌通过侵染杂草组织破坏其生理功能,诱导杂草致病死亡^[6],为开发高效、低风险的生物除草剂提供新思路。然而,针对高寒和干旱等特殊生态区的生物除草剂资源仍较为匮乏,亟待进一步挖掘。

杂草生防领域研究较多的微生物资源为链格孢属(*Alternaria*)^[7]、炭疽菌属(*Colletotrichum*)^[8]、镰刀菌(*Fusarium*)^[9]、弯孢属(*Curvularia*)^[10],对靶标草有较强的控制作用,且对于农作物具备一定的安全性。粉红螺旋聚孢霉(*Clonostachys rosea*)在防治番茄灰霉病(*Botrytis cinerea*)^[11]、南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*)^[12]、黄瓜枯萎病(*Fusarium oxysporum*)^[13]等方面研究较多,在杂草生防领域基本没有研究。

青海省地处青藏高原,其独特的低温、强紫外线环境孕育了丰富的杂草种群及潜在生防微生物资源。青海省农业有害生物综合治理重点实验室近年来致力于挖掘高原上杂草生防微生物资源,深入探索其防治效果,增加微生物除草剂可供选择的微生物资源。本研究以青海省黄南藏族自治州尖扎县自然感病的紫花地丁(*Viola philippica*)叶片为

材料,分离纯化杂草致病菌株JZ-28,测定该菌株对青藏高原冬葵(*Malva verticillata*)、密花香薷(*Elsholtzia densa*)、欧洲千里光(*Senecio vulgaris*)和藜(*Chenopodium album*)4种田间常见阔叶杂草离体叶片和盆栽的致病性,评价JZ-28对青海省6种主栽作物和3种冷凉蔬菜的安全性,通过形态学和分子生物学明确其分类地位,初步探索菌株培养条件的最适碳氮源,为开发适用于高寒生态区的生物除草剂提供理论参考和实践依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

在青海省黄南藏族自治州尖扎县康扬镇(35.94°N, 101.85°E)采集自然感病紫花地丁叶片。感病紫花地丁叶片症状表现为叶边缘出现类圆形病斑,病斑边缘深褐色且有黄色晕圈,中心淡褐色并干枯。

1.2 菌株的分离与纯化

根据方中达^[14]的组织分离法分离、纯化致病菌株。即用无菌水冲洗干净感病叶片,用灭菌剪刀取感病叶片病健交界处5 mm×5 mm的组织数块。在无菌工作台中依次在3%~5% NaClO溶液中消毒5~15 min,无菌水冲洗3次,70% C₂H₅OH溶液浸没30 s,无菌水冲洗3次,在干燥无菌滤纸上干燥后,接种在PDA培养基平板上,密封平板后放置于28℃培养箱培养5 d后,挑取菌落边缘菌丝接种于PDA培养基中纯化菌株并编号。

1.3 菌株鉴定与进化树构建

1.3.1 形态学鉴定 将分离纯化的菌株在PDA培养基28℃培养箱中培养7 d后,在光学显微镜下观察菌株的孢子和菌丝形态,并结合《真菌鉴定手册》^[15]综合鉴定菌株所属。

1.3.2 分子生物学及系统发育树构建 该菌株基因组DNA的提取与含量测定、基因ITS、LSU、EF-

1 α 区的PCR扩增与测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。ITS通用引物由生工提供,为ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'和ITS4-R: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'; LSU基因扩增引物由生工参考文献设计合成,为LSU1: 5'-TTTGAAATCTGGCGCAAGCC-3'和LSU2: 5'-TCCGAGAACATCAGGATCGG-3'^[16]; *EFI*基因扩增引物为EFI-728: 5'-CATCGAGA-AGTTCGAGAAGG-3'和EFI-986R: 5'-TACTT-GAAGGAACCCTTACC-3'^[17]。

通过NCBI BLAST检索和下载与JZ-28序列同源性高的DNA序列,按ITS-*EF*-1 α -LSU的顺序进行序列拼接,利用MEGA11软件最大似然法(Maximum likelihood, ML)构建系统发育树,Bootstrap检验的重复次数为1000,确定菌株的分类地位。

1.4 离体叶片致病性测定

在田间采集新鲜、完整、无病虫害的藜、密花香薷、冬葵、欧洲千里光叶片,超纯水洗净,晾干叶片表面水分后,整齐摆放在铺有滤纸的直径85 mm的平板中,用超纯水润湿滤纸。将分离纯化后得到的菌株接种在PDA培养基上,在28℃培养箱中培养至菌丝长满平板后,从菌落最外层取菌饼。将菌饼长菌丝一面贴叶面接种在藜、密花香薷、冬葵、欧洲千里光等杂草叶片中央,空白PDA培养基平板取圆饼,接种在4种杂草叶片上作为空白对照组,完成后放置在27℃培养箱中培养,7 d后调查发病情况。

1.5 盆栽杂草致病性测定

按照50 mL:1个菌饼的比例,在250 mL PDB液体培养基中接入5个菌饼,在180 r·min⁻¹, 25℃摇床中震荡培养7 d,将培养好的发酵液用4层纱布过滤菌丝和菌饼后得到发酵滤液,在250 mL发酵滤液中加入1~4滴吐温-80作为附着剂备用。移栽田间植株完整且无病虫害的藜、密花香薷、冬葵、欧洲千里光幼苗至盆栽中,放于温室(25±1)℃培养至植株生长正常。连续3 d上午、下午用喷壶喷雾接种菌液于盆栽杂草上,250 mL PDB培养基加入3~4滴吐温-80喷施杂草作为空白对照组,接种量为25~30 mL·盆⁻¹,接种后用0.06 mm厚的白色塑料薄膜覆盖盆栽为植株保湿,每处理重复三次。观察接种菌液后杂草发病情况,在7 d后调查发病程度,计算发病率。

$$\text{发病率}(\%) = \frac{\text{发病株数}}{\text{总株数}} \times 100$$

1.6 作物安全性的测定

将青海省玉米(*Zea mays*)、蚕豆(*Vicia faba*)、豌豆(*Pisum sativum*)、油菜(*Brassica napus*)、青稞(*Hordeum vulgare*)、小麦(*Triticum aestivum*)6种主栽作物和黄瓜(*Cucumis sativus*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)、茄子(*Solanum melongena*)3种冷凉蔬菜的种子分别播至花盆中,于温室(25±1)℃培养至3~4叶期。采用喷雾接种法处理植株,每盆接种量为25~30 mL,连续接种3次,以接种无菌水的健康植株作为对照。接种后植株覆盖0.06 mm塑料薄膜保湿12 h,温室(25±1)℃继续培养。每个处理设置3次重复,第7天观察记录植株发病情况,按表2标准分级标注发病情况^[18]。

表1 作物安全性供试作物

Table 1 Safety evaluation crop

作物类型 Crop type	供试作物 Tested Crop	作物品种 Crop varieties
主栽作物 Main crops planted	玉米 <i>Zea mays</i>	‘昕糯628’
	蚕豆 <i>Vicia faba</i>	‘青蚕14’
	豌豆 <i>Pisum sativum</i>	‘甜脆豌豆’
	油菜 <i>Brassica napus</i>	‘青杂9号’
	青稞 <i>Hordeum vulgare</i>	‘昆仑14’
	小麦 <i>Triticum aestivum</i>	‘高原448’
冷凉蔬菜 Cold vegetables	茄子 <i>Solanum melongena</i>	‘紫长茄’
	番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	‘白果强丰’
	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	‘一叶一瓜瓜满架’

表2 发病程度分级

Table 2 Grading of disease severity

分级 Grading	病斑表现 Lesion manifestation
无症状 (No symptom, NS)	无病斑, 植株正常生长
轻微反应 (Lightly susceptible, LS)	叶片分布零星斑点, 生长略受抑制
中等感病 (Moderately susceptible, MS)	1/5~1/4的叶面积出现病斑, 生长受抑制
严重感病 (Severely susceptible, SS)	1/4以上叶片面积出现病斑, 生长受到严重抑制

1.7 病原菌最适碳氮源的筛选

试验选取可溶性淀粉(C₁)、麦麸(C₂)、蔗糖(C₃)、玉米粉(C₄)及小麦粉(C₅)作为碳源替代物,按培养基的2%替换马铃薯固体培养基PDA中的碳源葡萄糖(C₆),充分搅拌均匀后,配制为6种不同碳源的培养基。培养基经121℃高压灭菌20 min,超净工作台内均匀分装至一次性培养皿(Φ =85 mm)中

静置凝固。选取活化后生长旺盛的菌饼($\Phi=8\text{ mm}$)接种于培养基中心,置于 28°C 恒温培养箱中暗培养。分别于接种后第1,3,5,7天测定菌落直径,并于第7天向培养基中加入10 mL 无菌水,以载玻片刮取菌丝体,经四层无菌纱布过滤后获得孢子悬浮液。酶标仪于600 nm 波长下测定吸光度值(OD_{600}),选取最适碳源,每个处理组设置3个生物学重复。

以外加氮源形式,分别将等质量大豆粉(N_1)、酵母浸粉(N_2)、蛋白胨(N_3)、硝酸钠(N_4)、硫酸铵(N_5)及尿素(N_6)按2% 质量体积比添加至基础PDA培养基中搅拌均匀,以未外加氮源的PDA培养基作为空白对照组(CK)。培养基配制、灭菌及接种操作同上。培养1,3,5,7 d 分别测量菌落直径,在7 d 按上述方法制备孢子悬浮液并测定 OD_{600} 值,以此筛选最优氮源,所有试验均设3次重复。

1.8 数据处理

运用 Excel 2019 软件进行数据统计及植株发病率绘图,最适碳氮源的菌落直径及 OD_{600} 值的差异性运用 DPS 9.01 软件 LSD 最小显著差异法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定与进化树构建

2.1.1 形态学鉴定 JZ-28 菌株在PDA培养基上呈现出独特的生长形态,菌丝体整体形态为绒毛状,菌落边缘锯齿状不平整,菌丝致密,初期白色,后期呈现黄色会使培养基颜色变黄。显微镜下观察,JZ-28 菌株的孢子梗细长、直立,有明显的分枝。分生孢子生于孢子梗顶端,孢子形态呈近圆体,大小不一(图1)。

2.1.2 分子水平鉴定与系统发育树构建 通过PCR 扩增及测序,分别获得JZ-28 菌株ITS、*EF-1 α* 、LSU 基因的扩增序列,其片段大小分别为544,246 和611 bp,测序序列提交 GenBank,登录号分别为PV643195,PV683295,PV707045。基于JZ-28 菌株ITS、*EF-1 α* 、LSU 基因序列的系统发育分析表明(图2),JZ-28 菌株与*Clonostachys rosea* 聚在同一进化分枝,支持率达到100%。基于病原菌的形态学特征及系统发育树分析结果,菌株JZ-28 被鉴定为粉红螺旋聚孢霉(*Clonostachys rosea*)。

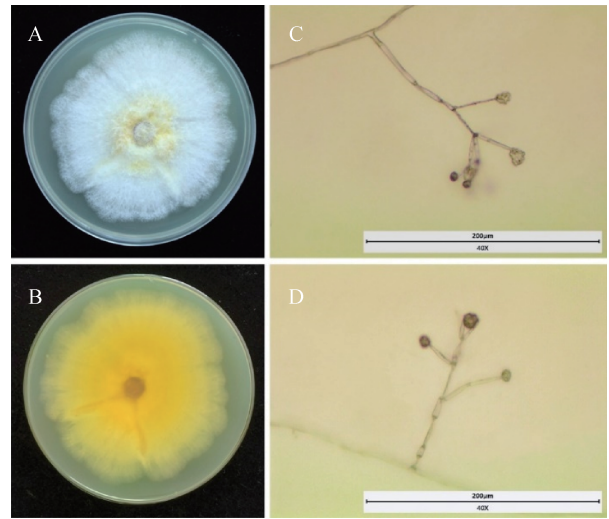


图1 JZ-28 菌株形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of strain JZ-28

注:A,正面形态;B,背面形态;C和D分别为分生孢子和孢子梗形态
Note: A, Surface view; B, Reverse view; C and D, Conidia and conidiophore morphology

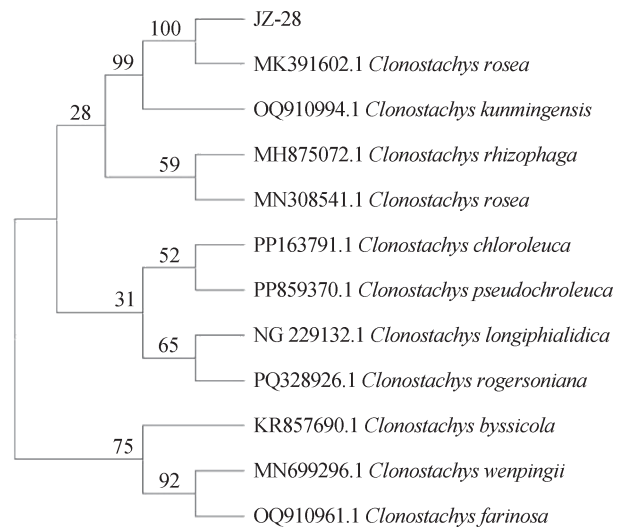


图2 基于JZ-28 菌株ITS、*EF-1 α* 、LSU 基因序列构建的系统发育进化树

Fig. 2 Phylogenetic analysis of strain JZ-28 based on ITS、*EF-1 α* and LSU gene sequences

2.2 离体叶片致病性

由图3可知,该菌株在4种杂草离体叶片上的发病程度随时间变化而加重,接种7 d 后,JZ-28 菌株对4种杂草离体叶片表现出程度不一的致病性。该菌株接种在冬葵叶片后,初期冬葵叶片局部出现黄化,7 d 后整片叶子黄化变色。密花香薹叶片初期沿菌饼产生菌丝,第7天叶片表面变色萎焉甚至干枯。欧洲千里光初期菌丝沿菌饼向外生长,叶片逐步布满菌丝并全叶黄化。藜初期菌丝快速向外扩展,再发展为以菌饼为中心的黄化褪色。试验结果显示,JZ-28

菌株对这 4 种杂草离体叶片均表现出侵染致病性。

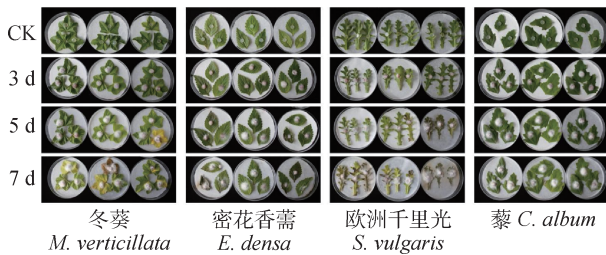


图 3 JZ-28 菌株对冬葵、密花香薷、欧洲千里光、藜 4 种杂草离体叶片的致病性

Fig. 3 Pathogenicity of strain JZ-28 on detached leaves of four weed species: *M. verticillata*, *E. densa*, *S. vulgaris*, and *C. album*

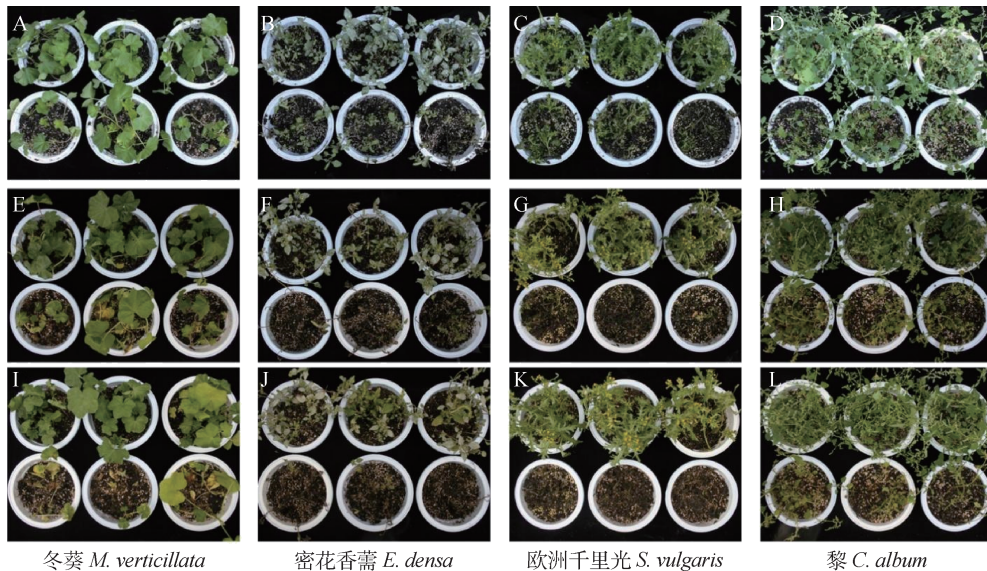


图 4 JZ-28 菌株对冬葵、密花香薷、欧洲千里光、藜 4 种杂草的致病性 (接种 7 d)

Fig. 4 Pathogenicity of strain JZ-28 on four weed species: *M. verticillata*, *E. densa*, *S. vulgaris*, and *C. album* (7 days post inoculation)
注: A, E, I 分别为菌株对杂草冬葵第 3, 5, 7 天侵染情况; B, F, J 分别为菌株对杂草密花香薷第 3, 5, 7 天侵染情况; C, G, K 分别为菌株对杂草欧洲千里光第 3, 5, 7 天侵染情况; D, H, L 分别为菌株对杂草藜第 3, 5, 7 天侵染情况; 每张照片第 1 行作为对照组, 第 2 行作为处理组

Note: A, E, I, Infection progression of strain JZ-28 on *M. verticillata* at 3, 5, 7 d; B, F, J, Infection on *E. densa*; C, G, K, Infection on *S. vulgaris*; D, H, L, Infection on *C. album*; Upper row, Control group; Lower row, Treatment group

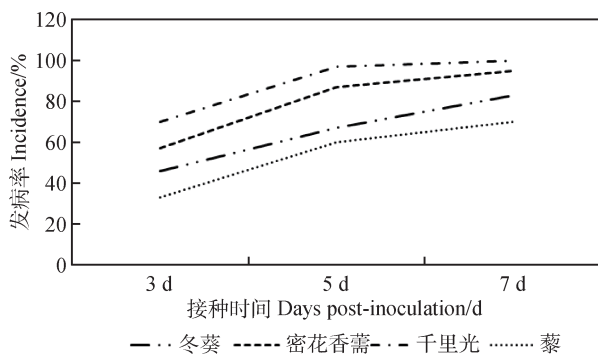


图 5 接种 7 天内 JZ-28 菌株对冬葵、密花香薷、欧洲千里光、藜 4 种盆栽杂草发病率的变化趋势

Fig. 5 Temporal dynamics of disease incidence in four potted weed species (*M. verticillata*, *E. densa*, *S. vulgaris*, and *C. album*) inoculated with strain JZ-28 during 7 day post-inoculation period

2.3 盆栽杂草致病性

据图 5 可知, 接种 7 d 后, 菌株对 4 种杂草的致病率随时间推移均呈上升趋势, 至第 7 天达到峰值, 菌株对欧洲千里光的致病率最高, 达到 100%, 其他 3 种杂草的发病率在 70% 以上, 试验的冬葵、密花香薷、欧洲千里光、藜 4 种杂草发病率分别为 83%、95%、100%、70%。致病效果见图 4, JZ-28 菌株对 4 种杂草均有较高致病性。冬葵表现为叶子黄化、植株倒伏, 最后干枯死亡; 密花香薷表现为叶子卷曲、干枯掉落, 最后植株整株枯死; 欧洲千里光表现为植株黄化猝倒, 最后整株干枯死亡; 藜表现为叶片大量黄化, 植株整体黄化萎蔫, 最后植株倒伏、死亡。

2.4 作物安全性测定

接种 JZ-28 菌株 7 d 发酵液后, 对玉米、油菜、黄瓜、番茄、茄子、蚕豆、豌豆表现为安全, 对小麦、青稞表现为 LS 轻微反应, 少量叶尖发黄 (图 6)。玉米、油菜、黄瓜、番茄、茄子、蚕豆、豌豆与 CK 相比, 长势和叶色上均无明显差异, 安全等级为 NS。

2.5 最适碳氮源的筛选

菌株 JZ-28 被接种于不同碳源培养基中进行培养, 分别于 1, 3, 5, 7 d 测量菌落直径, 并计算 3 次生物学重复的平均值。培养 7 d 后, 通过酶标仪测定孢子悬浮液在 600 nm 波长处的吸光度值 (OD_{600})。

如表 3 和图 7 所示,不同碳源培养基中菌落直径及 OD₆₀₀ 值均存在差异。菌株 JZ-28 在 C₅(小麦粉)培养基中生长速度最快,但是其生长状态和 OD₆₀₀ 值

远远比不过 C₃(蔗糖)培养基,具有极显著差异。综合菌丝生长速率、菌株生长状态与孢子 OD₆₀₀ 值指标,蔗糖确定为菌株 JZ-28 的最适碳源。

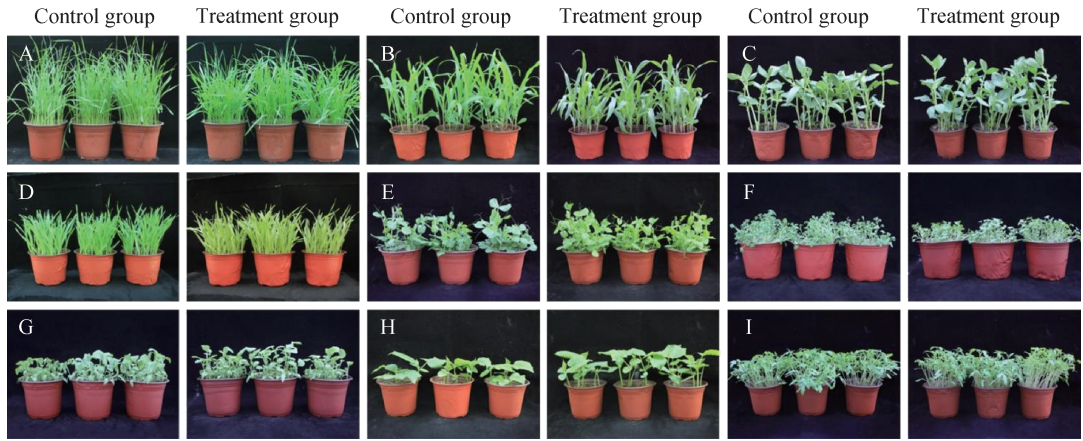


图 6 JZ-28 菌株对 9 种作物安全性

Fig. 6 Safety assessment of strain JZ-28 on nine crop species

注: A. 小麦‘高原 448’(左为对照, 右为处理, 下同); B. 玉米‘昕糯 628’; C. 蚕豆‘青蚕 14’; D. 青稞‘昆仑 14’; E. 豌豆‘甜脆豌豆’; F. 油菜‘青杂 9 号’; G. 茄子‘紫长茄’; H. 黄瓜‘一叶一瓜瓜满架’; I. 番茄‘白果强丰’

Note: A. *Triticum aestivum* ‘Gaoyuan 448’ (Left, Control; Right, Treated; and the same below); B. *Zea mays* ‘Xinnuo 628’; C. *Vicia faba* ‘Qingcan 14’; D. *Hordeum vulgare* ‘Kunlun 14’; E. *Pisum sativum* ‘Tiancui Wandou’; F. *Brassica napus* ‘Qingza 9’ G. *Solanum melongena* ‘Zichangjie’; H. *Cucumis sativus* ‘Yiye Yigua Guamanjia’; I. *Solanum lycopersicum* ‘Baiguo Qiangfeng’

表 4 和图 8 表明,不同氮源培养基对 JZ-28 菌株的菌落直径及 OD₆₀₀ 值具有显著影响。N₁(大豆粉)处理组的菌丝生长速率和 OD₆₀₀ 值均极显著高于其他外加氮源组。菌株在 N₆(尿素)处理组中没有生

长,说明尿素对 JZ-28 菌株不具有促进生长的作用,甚至有一定的抑制作用。JZ-28 菌株在 N₁培养基中表现出最优的生长状态,大豆粉确定为菌株 JZ-28 的最适氮源。

表 3 不同碳源培养基上 JZ-28 的菌落直径及 OD₆₀₀ 值

Table 3 The colony diameter and OD₆₀₀ value of JZ-28 on different carbon source media

碳源处理 Carbon source treatment	菌落直径 Colony diameter/mm				OD ₆₀₀ 均值 Mean value of OD ₆₀₀
	1 d	3 d	5 d	7 d	
C ₁ 可溶性淀粉 Amylogen	13 ^a	24 ^b	38 ^{bc}	48 ^{cd}	0.76 ^b
C ₂ 麦麸 Wheat bran	12 ^a	25 ^{ab}	40 ^{abc}	51 ^{bc}	0.25 ^c
C ₃ 蔗糖 Saccharose	13 ^a	26 ^{ab}	35 ^{bc}	51 ^{bc}	0.84 ^a
C ₄ 玉米粉 Corn meal	12 ^a	27 ^a	41 ^{ab}	54 ^{ab}	0.36 ^c
C ₅ 小麦粉 Wheat meal	12 ^a	26 ^{ab}	43 ^a	55 ^a	0.34 ^d
C ₆ 葡萄糖 Amylaceum	13 ^a	24 ^b	34 ^c	47 ^d	0.40 ^c

注: 同列不同小写字母表示处理组间在 5% 水平上差异显著 ($P < 0.05$), 下同

Note: Different lowercase letters in the same column (alter data) indicate significant difference at the 5% level ($P < 0.05$), the same as below

表 4 不同氮源培养基上 JZ-28 的菌落直径及 OD₆₀₀ 值

Table 4 The colony diameter and OD₆₀₀ value of JZ-28 on different nitrogen source media

氮源处理 Nitrogen source treatment	菌落直径 Colony diameter/mm				OD ₆₀₀ 均值 Mean value of OD ₆₀₀
	1 d	3 d	5 d	7 d	
N ₁ 大豆粉 Soybean meal	13 ^a	26 ^a	38 ^b	57 ^a	0.73 ^a
N ₂ 酵母浸粉 Yeast powder	13 ^a	25 ^{ab}	41 ^a	52 ^b	0.14 ^d
N ₃ 蛋白胨 Peptone	13 ^a	26 ^a	35 ^c	48 ^c	0.29 ^c
N ₄ NaNO ₃	13 ^a	23 ^b	32 ^d	38 ^d	0.12 ^d
N ₅ (NH ₄) ₂ SO ₄	13 ^a	23 ^b	35 ^c	49 ^{bc}	0.12 ^d
N ₆ 尿素 Urea	9 ^b	9 ^c	9 ^c	12 ^c	0.04 ^e
PDA	13 ^a	24 ^{ab}	34 ^{cd}	47 ^c	0.40 ^b

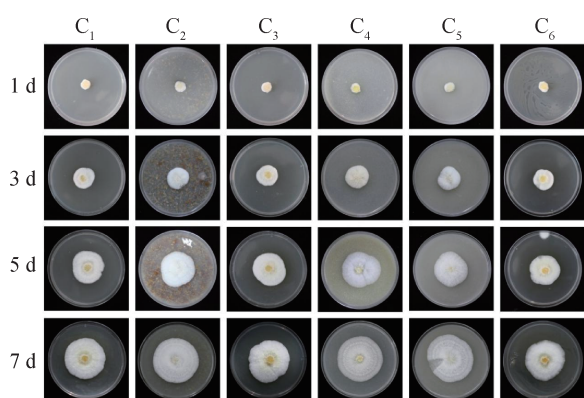


图7 菌株JZ-28在不同碳源培养基不同时间的生长状态

Fig. 7 Growth dynamics of strain JZ-28 in media with different carbon sources at various time points

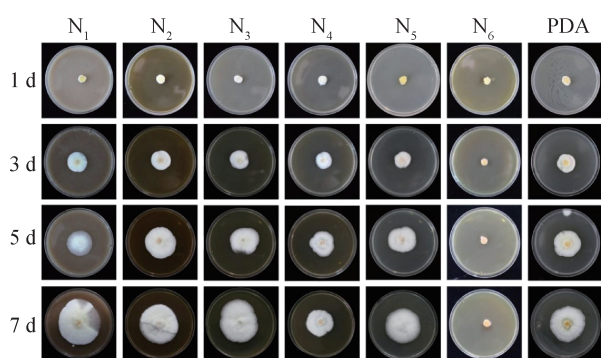


图8 菌株JZ-28在不同氮源培养基不同时间的生长状态

Fig. 8 Growth dynamics of strain JZ-28 in media with different nitrogen sources at various time points

3 讨论

从自然感病的杂草叶片中分离和筛选具有生防效果的致病菌是杂草生防领域获取生防菌的有效途径之一^[19]。与本研究相比,粉红螺旋聚孢霉广泛应用于植物病害和线虫的生物防治,如粉红螺旋聚孢霉菌株IK726制作的生物防治药剂进行种子包衣可以有效控制油菜根肿病(*Plasmodiophora brassicae*)造成的伤害,显示出很好的防治效果^[20],对感染番茄灰霉病的植株防效可以达到90%以上^[21]。此外,放线菌5406和粉红螺旋聚孢霉GR02复配成生物菌剂,对西瓜枯萎病(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)的防效可以达到68.24%^[22],在自然感染线虫土壤中接种粉红螺旋聚孢霉,线虫数量减少40%~73%^[23]。粉红螺旋聚孢霉通过油菜茉莉酸、苯丙素和乙烯生物合成途径中涉及的相关基因上调诱导植物抗性,抑制油菜根肿病病原菌的生长^[24],或者产生 β -1,3-葡聚糖酶来降解黄瓜根腐病(*Fusarium*)和猝倒病(*Pythium*)的菌丝体细胞壁,从

而达到控制病害的目的^[25]。在杂草生防领域,粉红螺旋聚孢霉防治杂草的研究未见报道,本研究首次聚焦于粉红螺旋聚孢霉防治杂草领域,针对青藏高原高寒生态区的杂草防控,系统评估了分离鉴定的JZ-28对青藏高原冬葵、密花香薷、欧洲千里光和藜4种优势杂草的致病力,JZ-28在杂草上表现出较好的防控效果,创新了杂草生物防治领域的生防资源,为其他粉红螺旋聚孢霉防控杂草的研究提供了参考。

微生物除草剂菌株的筛选要求是对杂草致病性强,对作物安全,以及生产容易,菌株JZ-28均符合以上条件,具备田间应用潜力。对青海省玉米、油菜、蚕豆、豌豆、青稞、小麦6种主栽作物和番茄、茄子、黄瓜3种冷凉蔬菜进行安全性评估,除青稞和小麦有轻微感病外,其他作物表现安全。对菌株JZ-28的最适碳氮源进行了初步筛选,分别为蔗糖和大豆粉,可进一步优化发酵工艺,提高孢子产量和田间稳定性。我国研制的微生物除草剂‘鲁保1号’防治菟丝子(*Cuscuta chinensis*),防效达85%以上,以及‘F-798’防治埃及列当(*Orobancha coerulescens*),防控效果达到95%以上^[26];假隔链格孢(*Nimbya alterantherae*)SF-193田间对空心莲子草(*Alternanthera philoxeroides*)的病情指数达到67.7^[27];加拿大Philombios公司利用胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)锦葵专化型的孢子开发的Biomal可用于防除圆叶锦葵(*Malva sinensis*)、苘麻(*Abutilon theophrasti*)等杂草^[28];微生物除草剂可减少土壤污染和杂草抗药性风险,符合绿色农业的发展趋势,农业农村部2020年颁布《关于推进实施农药登记审批绿色通道管理措施的通知》(农农(农药)[2020]78号)明确将微生物农药纳入优先审批范围,这一政策导向预示着微生物除草剂的研发周期将显著缩短,其市场渗透率有望持续提升。这些研究和政策表明,微生物除草剂大有可为,应用前景广阔。

4 结论

本研究从自然感病的紫花地丁叶片中分离出菌株JZ-28,通过对其形态学特征与分子生物学鉴定,确定其为粉红螺旋聚孢霉(*Clonostachys rosea*)。该菌株对青藏高原藜、密花香薷、冬葵、欧洲千里光4种优势阔叶杂草表现出高效致病性,活体植株致

病率达70%以上,其中对欧洲千里光致病率达100%。安全性评价表明其对玉米、油菜、蚕豆、豌豆、番茄、茄子、黄瓜安全,对青稞和小麦表现轻微感病(LS级)。蔗糖和大豆粉分别为其最优碳氮源。JZ-28展现开发为4种靶向阔叶类杂草的微生物除草剂潜力,其在高寒生态区的应用填补了粉红螺旋聚孢霉生防研究的空白,为脆弱生态系统杂草防控提供新策略。下一步将针对菌株JZ-28的最适培养条件、菌草相互作用机制、剂型和田间防效等方面进行深入探究,为该菌株作为阔叶杂草类的微生物除草剂商品化提供依据。

参考文献

- [1] 于金凤,王金信,陈茂学,等. 麦田混生杂草生态经济阈值的研究[J]. 植物保护,2002(5):13-15
YU J F, WANG J X, CHEN M X, et al. Studies on eco-economic thresholds of mixed-growing weeds in wheat fields [J]. Plant Protection, 2002(5):13-15
- [2] JOSE R P, GERRIT S, TONI V, et al. Genetically engineered crops: from idea to product [J]. Annual Review of Plant Biology, 2014, 65(1):769-790
- [3] 潘浪,刘敏,刘伟堂,等. 我国杂草科学学科发展现状与展望[J]. 植物保护,2023,49(5):295-302,389
PAN L, LIU M, LIU W T, et al. Current situation and prospects of weed science in China [J]. Plant Protection, 2023, 49(5):295-302,389
- [4] 张金新,刘颖,张蜀香,等. 植物病原真菌抑制杂草的活性筛选及菌株CY-H的活性代谢产物[J]. 微生物学报,2020,60(3):582-589
ZHAN J X, LIU Y, ZHANG S X, et al. Screening of herbicidal activities of plant pathogenic fungi and active metabolites of strain CY-H [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(3):582-589
- [5] 邱德文. 生物农药研究进展与未来展望[J]. 植物保护,2013,39(5):81-89
QIU D W. Research progress and prospect of bio pesticides [J]. Plant Protection, 2013, 39(5):81-89
- [6] 谢文,李力. 利用植物病原真菌除草的研究进展[J]. 福建农业科技,2024,55(9):1-7
XIE W, LI L. Research progress on weed control by using plant pathogenic fung [J]. Fujian Agricultural Science and Technology, 2024, 55(9):1-7
- [7] 朱海霞,马永强. 除草活性菌株细链格孢菌(*Alternaria tenuissima*)发酵工艺研究[J]. 甘肃农业大学学报,2020,55(1):63-71
ZHU H X, MA Y Q. Study on fermentation optimization of herbicidal activity strain *Alternaria tenuissima* [J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2020, 55(1):63-71
- [8] 徐兆林. *Colletotrichum gloeosporioides* BWH-1次级代谢产物的分离、鉴定和生物活性研究[D]. 广州:华南农业大学,2020:48
XU Z L. Secondary metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides* BWH-1: isolation, identification and biological activities study [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2020:48
- [9] EVIDENTE A, ABOUZEID M A, ANDOLFI A, et al. Recent achievements in the bio-control of *Orobanche* infesting important crops in the mediterranean basin [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2011, 1:461-483
- [10] KRUPSKA J, WATSON A K. *Curvularia eragrostidis* isolates (Dematiaceae) for biocontrol of crabgrass (*Digitaria* spp.) in Canada [J]. Biocontrol Science and Technology, 2021, 31(9):924-950
- [11] 吴海霞,袁梦蕾,江娜,等. 粉红螺旋聚孢霉高效生防菌株的筛选与评价[J]. 植物保护,2021,47(3):54-60,95
WU H X, YUAN M L, JANG N, et al. Screening and evaluation of highly efficient biocontrol strains of *Clonostachys rosea* [J]. Plant Protection, 2021, 47(3):54-60,95
- [12] 张洁,郭雪萍,夏明聪,等. 粉红螺旋聚孢霉 NF-06 固体发酵条件优化及对南方根结线虫的防治效果[J]. 中国生物防治学报,2020,36(1):105-112
ZHANG J, GUO X P, XIA M C, et al. Optimization of solid state fermentation conditions of *Clonostachys rosea* NF-06 and its control efficiency on *Meloidogyne incognita* [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2020, 36(1):105-112
- [13] 田甜,孙漫红,李世东. 棉隆与粉红螺旋聚孢霉 67-1 协同防治黄瓜枯萎病的研究[J]. 中国生物防治学报,2014,30(4):503-510
TIAN T, SUN M H, LI S D. Management of cucumber *Fusarium* wilt via Combinative application of Dazomet and *Clonostachys rosea* 67-1 [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2014, 30(4):503-510
- [14] 方中达. 植病研究法 [M]. 北京:中国农业出版社,2007:122-140
FANG Z D. Plant pathology research methods [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2007:122-140
- [15] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海:上海科学技术出版社,1979:141-159
WEI J C. Manual of fungal identification [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1979:141-159
- [16] 姜宁,王永鹏,薛寒,等. 采自珠穆朗玛峰冻土的螺旋聚孢霉属 1 新种 [J/OL]. <https://link.cnki.net/doi/10.13341/j.jfr.2024.1804>, 2025-01-03/2025-05-30
JANG N, WANG Y P, XUE H, et al. A new species of *Clonostachys* from frozen soil in mount Qomolangma, China [J/OL]. <https://link.cnki.net/doi/10.13341/j.jfr.2024.1804>, 2025-01-03/2025-05-30
- [17] 李欢,朱海霞. 链格孢菌株 HY-063 的分离鉴定及除草潜力 [J]. 植物保护,2022,48(6):289-297,325
LI H, ZHU H X. Isolation and identification of *Alternaria alternata* strain HY-063 and its herbicidal potential [J]. Plant Protection, 2022, 48(6):289-297,325

- [18] 朱海霞. 附球属真菌 DT-014 对杂草的致病性及生物学特性研究[J]. 干旱地区农业研究, 2024, 42(1): 237-241, 251
ZHU H X. Study on herbicidal activity and biological characteristics of *Epicoccum* strain DT-014[J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2024, 42(1): 237-241, 251
- [19] REICHERT JÚNIOR F W, SCARIOT M A, FORTE C T, et al. New perspectives for weeds control using autochthonous fungi with selective bioherbicide potential[J]. Heliyon, 2019, 5(5): e01676
- [20] ANDERSEN C B, JØRGENSEN H J L, MANZOTTI A, et al. Seed coating with the fungal biocontrol agent *Clonostachys rosea* controls clubroot in oilseed rape[R]. International Organisation for Biological Control, 2018, 136: 157-163
- [21] BORGES Á V, SARAIVA R M, MAFFIA L A. Maffia. Bio-control of gray mold in tomato plants by *Clonostachys rosea* [J]. Tropical Plant Pathology, 2015, 40(2): 71-76
- [22] 孙于森, 吴慧玲, 张涛涛, 等. 5406 放线菌对西瓜的促生作用及对西瓜枯萎病的防控[J]. 科学技术与工程, 2021, 21(15): 6242-6248
SUN Y M, WU H L, ZHANG T T, et al. The growth promoting effect of 5406 actinomycetes on watermelon and the control of watermelon *Fusarium* wilt [J]. Science Technology and Engineering, 2021, 21(15): 6242-6248
- [23] IQBAL M, DUBEY M, MCEWAN K, et al. Evaluation of *Clonostachys rosea* for control of plant-parasitic nematodes in soil and in roots of carrot and wheat[J]. Phytopathology, 2018, 108(1): 52-59
- [24] ASKEW D J, LAING M D. An adapted selective medium for the quantitative isolation of *Trichoderma* species [J]. Plant Pathology, 1993, 42(5): 686 - 690.
- [25] CHATTERTON S, PUNJA Z K. Chitinase and beta-1,3-glucanase enzyme production by the mycoparasite *Clonostachys rosea* f. *catenulata* against fungal plant pathogens[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2009, 55(4): 356-367
- [26] 高昭远, 干静娥, 张立洁, 等. 我国利用植物病原微生物防除杂草研究的回顾与现状[J]. 中国农学通报, 1995, (1): 31-34, 37
GAO Z Y, GAN J E, ZHANG L J, et al. A review and current status of weed control using phytopathogenic microorganisms in China[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 1995, (1): 31-34, 37
- [27] 聂亚锋, 陈志谊, 刘永锋, 等. 假隔链格孢 SF-193 的产孢特性及其分生孢子对空心莲子草的致病力[J]. 中国生物防治, 2009, 25(3): 260-266
NIE Y F, CHENG Z Y, LIU Y F, et al. Conidial production of *Nimbya alternantherae* SF-193 and its pathogenicity to *Alternanthera philoxeroides*, 2009, 25(3): 260-266
- [28] 欧善生, 张慎举. 生物农药与肥料[M]. 北京: 化学出版社, 2019: 31-32
OU S S, ZHANG S J. Biopesticides and biofertilizers [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2019: 31-32

(责任编辑 付 宸)