

marxianus, and 6-3 to be *Meyerozyma guilliermondii*. 【Conclusion】 Of the 3 yeast strains, 16-8 and 12-6 were strong in inhibiting the growth of the weeds of major concern in the province and could be developed as natural herbicides. The results might also lead to a broadened study on microbe-origin herbicides and related research.

Key words: Weeds; biocontrol strains; strains identification; herbicidal activity; crop safety

0 引言

【研究意义】猪殃殃、密花香薷、藜等杂草是我国农田的重要恶性杂草,繁殖能力强,蔓延扩散快,危害损失重^[1-3],生产中依赖化学除草剂控制其危害。由于化学除草剂长期连续使用及不合理使用同种或同类除草剂,导致农田杂草群落演变加速、抗药性杂草生物型数量和程度明显增加、作物药害发生频繁、农产品质量安全以及环境污染加剧等问题凸显^[4-5],杂草防治难度不断加大,农药使用量呈上升趋势。杂草生物防控已引起全球环保与植保工程科技人员的高度重视。微生物除草剂具有制作原料来源丰富、开发费用相对较低、对环境和非靶标生物安全等显著优势,其高效利用模式研发及应用对于实现农药减量使用,遏制杂草加重发生的态势,进而实现可持续的现代农业发展具有重要意义。【前人研究进展】自然界中的致病菌是微生物除草剂的来源之一^[6],目前已有多个属的真菌被研发或登记成为微生物除草剂,用于多种杂草的生物防治。目前世界范围内商品化的微生物除草剂产品有20余种^[7]。我国已成功建立多个病原菌与杂草之间的致病体系^[8-9],且研发出具有自主知识产权的微生物除草剂产品,例如鲁宝一号^[10]。朱海霞等^[11]研究发现镰刀菌 GD-5 对密花香薷及藜的致病性较强,其鲜重防效可达65%以上。链格孢 HZ-1 粉剂对密花香薷及藜在田间环境下抑制作用显著^[12]。程亮^[13]研究发现生防菌 PA-2 可通过影响猪殃殃的细胞膜透性导致其死亡而达到生物防除的目的,针对猪殃殃、密花香薷和藜等3种杂草的生防菌主要为真菌,可通过孢子直接侵入或产生代谢产物以达到控制杂草的目的。【本研究切入点】酵母菌的次生代谢物生物活性广泛,主要用于食品发酵等^[14-16],但目前应用酵母菌进行杂草防除方面的研究鲜见报道。【拟解决的关键问题】本研究通过3株酵母菌对猪殃殃、密花香薷和藜等3个青海省农田优势杂草的生物活性测定及其对青海主要农作物的安全性评价并采用形态学观察结合 ITS 序列及 26S rDNA 序列分析明确3株酵母菌的分类地位,丰富了可用于杂草防控的微生物菌种资源,为该菌株在杂草防控中的研发与应用提供基础,可有效减少化学除草剂的使用量,延缓杂草抗药性生物型的产生和

发展。

1 材料与方法

1.1 供试材料

杂草:猪殃殃(*Galium spurium* L.)、密花香薷(*Elsholtzia densa* Benth.)、藜(*Chenopodium album* L.)种子,于2020年采于青海省农林科学院试验田(36.724458°N, 101.750661°E)。

作物:燕麦(加燕2号)、小麦(青春38号)、蚕豆(青海13号)、青稞(柴青1号)、油菜(青杂11号)、豌豆(草原26号)和马铃薯(青薯9号)。

酵母菌培养采用酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(Yeast Extract Peptone Dextrose Medium, YPD):酵母膏 10.0 g·L⁻¹,蛋白胨 20.0 g·L⁻¹,葡萄糖 20.0 g·L⁻¹,琼脂 20.0 g·L⁻¹;酵母菌发酵采用 YPD 液体培养基。

1.2 土壤酵母菌分离

采用稀释涂布法分离西宁市湟中区温室辣椒根际土壤酵母菌^[17]。取90 mL 无菌水加入10 g 土样,制备成土壤悬浮液后将其稀释至10⁻³、10⁻⁴,吸取200 μL 土壤稀释液涂布于 YPD 培养基平板上,每个处理设置3个重复。于28℃培养3~5 d后挑取颜色形态不同的单菌落,在 YPD 平板上纯化培养并4℃保存。

1.3 具有除草潜力酵母菌菌株筛选

将纯化的菌株培养7 d,打取菌饼(直径0.5 cm)接种至 YPD 液体培养基中(每250 mL 三角瓶100 mL YPD),于25℃、180 r·min⁻¹培养7 d,发酵液真空抽滤后经0.22 μm 微孔滤膜过滤备用。将杂草幼苗培育至1叶1心时,选取整齐一致的健壮幼苗移栽至43 cm×25 cm×12 cm 花盆中,每盆20株,在温度25℃、光照周期12 L/12 D,环境相对湿度60%~70%的条件下培养。待杂草幼苗长至7~10叶期时,取100 mL 发酵滤液倒入小喷壶中,加入0.5%吐温-80,将滤液以250 mL·m⁻²喷施于杂草植株上,喷雾处理后的杂草植株置于上述条件的温室中培养。每处理重复4次,以只喷无菌加等量吐温-80的 YPD 培养液的植株作为对照。于处理7 d后观察杂草发病情况,参考文献[18]记录密花香薷、藜、猪殃殃的伤害程度。7 d后按下式计算伤害率和鲜重抑制率。

伤害率/% = $\frac{\text{伤害株数}}{\text{调查总株数}} \times 100$

鲜重抑制率/% = $\frac{\text{对照组鲜重} - \text{处理组鲜重}}{\text{对照组鲜重}} \times 100$

1.4 酵母菌分离菌株对主栽作物安全性测定

将酵母菌株发酵滤液以 250 mL·m⁻² 分别喷雾于 3~4 叶期的马铃薯、青稞、豌豆、小麦、燕麦、蚕豆和油菜上，培养方法同方法 1.3。以只接 YPD 培养液植株为对照，每处理重复 4 次。7 d 后调查作物受害情况，测定株高和鲜重，计算株高抑制率和鲜重抑制率。参考程亮等^[19]的方法记载作物受害程度。

株高抑制率/% = $\frac{\text{对照组株高} - \text{处理组株高}}{\text{对照组株高}} \times 100$

1.5 菌株 16-8 发酵液与氯氟吡氧乙酸混用对猪殃殃的除草活性测定

20% 氯氟吡氧乙酸乳油（美国陶氏益农公司）按推荐剂量 750、375、187.5 mL·hm⁻² 设置 3 个单用及和 16-8 菌株发酵液 250 mL·m⁻² 混用处理，以菌株 16-8 发酵液单用为对照，另设等量清水为空白对照，共计 8 个处理，每处理 10 株，每个处理 3 次重复，随机排列。于猪殃殃 3~4 叶期进行喷雾处理，记录猪殃殃受害症状，7、14 d 后调查鲜重防效。

1.6 菌株鉴定

1.6.1 形态学鉴定 取在 YPD 平板上培养 7 d 的酵母菌菌落的孢子，制成临时玻片，显微镜下观察孢子形态并拍照。

1.6.2 分子生物学鉴定 DNA 提取采用 Ezup 柱式提取试剂盒 [生工工程（上海）股份有限公司]。用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 扩增 ITS 基因序列，用 NL1(3'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') 和 NL4 (5'-GGTCCGTGT-TTCAAGACGG-3') 扩

增 26S rDNA 基因序列。PCR 反应体系（25 μL）：10× PCR buffer（含 Mg²⁺）2.5 μL，模板 DNA 0.5 μL，dNTPs 1.0 μL，上、下游引物各 0.5 μL（10 μmol·L⁻¹），5 U·μL⁻¹ Taq 酶 0.2 μL，ddH₂O 补足至 25 μL。PCR 反应条件：94 ℃ 预变性 4 min；94 ℃ 变性 45 s，55 ℃ 退火 45 s，72 ℃ 延伸 1 min，30 个循环；72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳，送至由生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序。测序所得序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对，采用 MEGA 7.0 软件以邻近法（neighbor-joining，NJ）构建系统发育树。

1.7 数据分析

试验数据采用 DPS 15.10 软件进行统计分析，显著性检验采用邓肯氏法（*P* < 0.05）。

2 结果与分析

2.1 酵母菌分离及其除草潜力

共获得 8 株不同形态和颜色的酵母菌，对杂草生长的抑制作用程度不同，其中 16-8 发酵液对猪殃殃、密花香薷和藜的伤害率分别为 90.17%、66.67% 和 95.00%，鲜重抑制率分别为 88.63%、56.90% 和 78.77%，3 种杂草的鲜重均低于对照组，差异显著（*P* < 0.05）（表 1）；12-6 菌株对猪殃殃、密花香薷和藜的伤害率分别为 87.50%、75.00% 和 43.33%，对猪殃殃的鲜重抑制率达 75.80%，密花香薷和藜的鲜重抑制率分别为 62.72% 和 43.25%，3 种杂草的鲜重与对照组相比，均差异显著（*P* < 0.05）；6-3 菌株对猪殃殃、密花香薷和藜的伤害率分别为 0%、36.67% 和 41.67%，对 3 种杂草的鲜重抑制率为 9.41%、46.29% 和 43.46%，猪殃殃和藜的鲜重与对照相比，均差异不显著（*P* > 0.05），但密花香薷鲜重低于对照组，差异显著（*P* < 0.05），从各个分离菌株看，16-8 菌

表 1 3 株酵母菌菌株发酵液对杂草幼苗生长的抑制作用
Table 1 Inhibition effect of yeast fermentation broths on growth of weed seedlings

菌株 strain	猪殃殃 <i>G. aparine</i> .			密花香薷 <i>E. densa</i>			藜 <i>C. album</i>		
	伤害率 Injury rate /%	鲜重 Fresh weight /g	鲜重抑制率 Fresh weight inhibition rate /%	伤害率 Injury rate/%	鲜重 Fresh weight/g	鲜重抑制率 Fresh weight inhibition rate/%	伤害率 Injury rate%	鲜重 Fresh weight/g	鲜重抑制率 Fresh weight inhibition rate/%
16-8	90.17	1.5±0.22	88.63 a	66.67	9.7±0.15	56.90 b	95.00	1.6±0.21	78.77 a
12-6	87.50	3.2±0.12	75.80 b	75.00	8.4±0.24	62.72 a	43.33	4.1±0.11	43.25 b
6-3	0	11.9±0.14	9.41 c	36.67	12.1±0.31	46.29 c	41.67	4.1±0.12	43.46 b
CK	0	13.1±0.23	0 d	0	22.6±0.15	0 d	0	7.3±0.15	0 c

同列数据后不同小写字母表示差异达0.05显著水平（*P* < 0.05），表3~4同。
Data with different lowercase letters on same column indicate significant different at *P* < 0.05, Same for table3-4.

株发酵液对猪殃殃和藜幼苗生长的抑制作用要高于 12-6 和 6-3 菌株发酵液，但 12-6 菌株发酵液对密花香薷幼苗生长抑制作用要高于 16-8 和 6-3 菌株发酵液。

16-8 处理后猪殃殃表现症状为植株矮小、叶片轻微失绿、发黄叶片明显萎蔫，而 12-6 处理后，猪殃殃植株表现为矮小、叶片轻微失绿发黄、萎蔫、植株茎干变细、分蘖数变少。6-3 发酵液处理 7 d 后，猪殃殃除表现植株叶片轻微萎蔫之外无其他明显症状，10 d 以后伤害症状没有恢复，继续加重（图 1-A）。12-6 处理条件下的密花香薷植株矮小，叶缘干枯新生叶片向内卷曲严重，花苞明显枯焦发黄、叶面积窄小，10 d 后病情持续加重。16-8 处理对密花香薷表现症状与 12-6 相似但伤害较轻。6-3 处理的植物略微矮小，花苞枯焦发黄较 12-6、16-8 处理较轻，10 d 以后伤害症状没有恢复，且继续加重（图 1-B）。12-6 处理藜表现为 1/2 叶片有轻微青枯症状，1/4 叶片边缘发黄干枯。16-8 处理藜表现为植物矮小、3/4 叶片青枯，1/2 叶片萎蔫失绿发黄。6-3 处理藜表现为植株略微矮小，叶片边缘有轻微发黄，10 d 以后伤害症状没有恢复，继续加重（图 1-C）

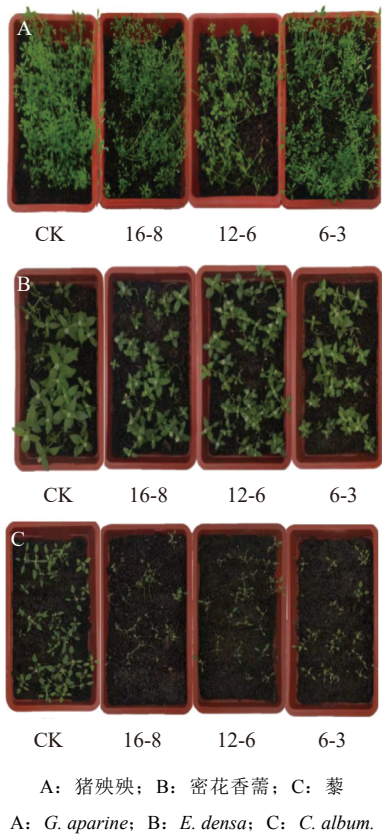


图 1 3 株酵母菌发酵液对多种杂草幼苗生长的抑制作用

Fig. 1 Inhibition effect of yeast fermentation broths on growth of weed seedlings

2.2 酵母菌菌株对主栽作物的安全性测定

由表 2 可知，接种酵母菌发酵液 7 d 后，16-8、12-6 菌株对燕麦、小麦、青稞、蚕豆、豌豆、油菜和马铃薯均没有伤害，对作物鲜重与株高影响很小，表现对作物安全。6-3 菌株对燕麦、小麦、青稞和油菜 4 种青海主栽作物无伤害，对株高与鲜重无影响，但对蚕豆及豌豆表现出对株高和鲜重有明显抑制，对蚕豆的株高和鲜重抑制率分别为 12.73% 和 14.73%，对豌豆的株高和鲜重抑制率为 10.69% 和 22.61%（表 3）。

表 2 3 株酵母菌菌株发酵液对不同作物的安全性比较

Table 2 Effect of yeast fermentation broths on crop safety

菌株 strain	燕麦 <i>Avena sativa</i>	蚕豆 <i>Vicia faba</i>	豌豆 <i>Pisum sativum</i>	小麦 <i>Triticum aestivum</i>	青稞 <i>Hordeum vulgare</i>	油菜 <i>Brassica napus</i>	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>
16-8	NS	LS	LS	NS	NS	NS	NS
6-3	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
12-6	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CK	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS表示无症状；LS表示有轻微反应；MS表示中等感病；SS表示严重感病。

NS: asymptomatic; LS: mild reaction; MS: moderately susceptible; SS: severely susceptible.

2.3 分离菌株 16-8 发酵液与氯氟吡氧乙酸混用对猪殃殃的除草活性测定

16-8 菌株发酵液与化学除草剂氯氟吡氧乙酸混用喷施 48 h 后，猪殃殃叶片出现萎蔫和部分枯死症状，72 h 时植株全部枯死；单用发酵液喷施处理 48 h 后，猪殃殃植株开始出现萎蔫症状，60 h 时部分叶片出现枯死，72 h 猪殃殃植株全部枯死；如图 2 所示，单用化学除草剂 750 mL·hm⁻² 时，7 d 时萎蔫症状明显，16-8 菌株发酵液与氯氟吡氧乙酸混用处理较其化学除草剂单用处理相比，猪殃殃叶片萎蔫严重，出现死亡植株，14 d 时抑制程度加重，21 d 时猪殃殃已全部枯死。由此可见，16-8 菌株发酵液与氯氟吡氧乙酸混用处理较其发酵液单用处理相比，猪殃殃叶片枯死症状出现早 12 h，比单用化学除草剂早 5 d。从鲜重抑制率来看，接种 20% 氯氟吡氧乙酸乳油 7 d 后，在其供试剂量下对猪殃殃的鲜重抑制率均在 65% 以下，单用 16-8 菌株发酵液处理，鲜重抑制率为 85.19%，50% 和 25% 推荐剂量化学除草剂+16-8 菌株发酵液混用的鲜重抑制率分别为 85.65% 和 83.05%；接种后 14 d，20% 氯氟吡氧乙酸乳油在推荐剂量（750 mL·hm⁻²）处理时对猪殃殃的鲜重抑制率仅为 79.42%，而单用 16-8 菌株发酵液处

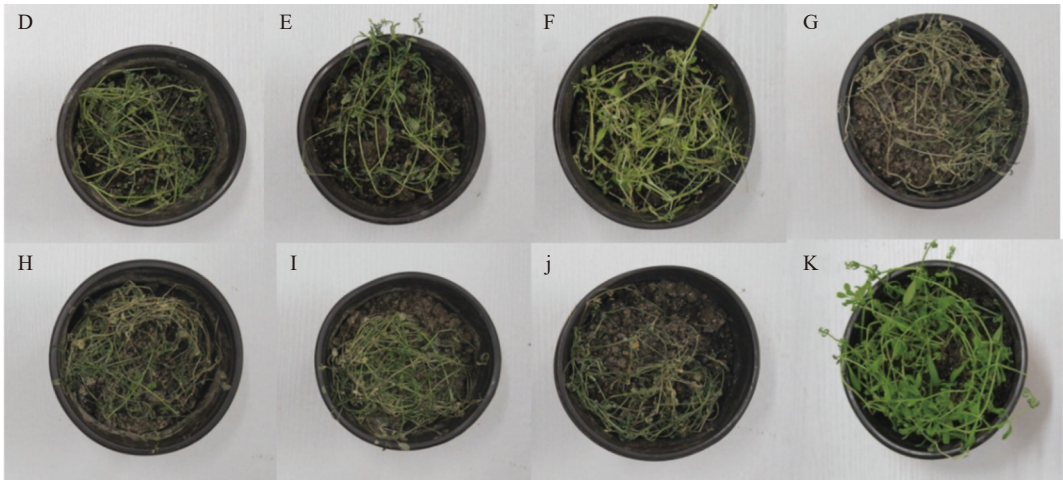
表 3 3 株酵母菌株发酵液对不同作物抑制作用
Table 3 Inhibition effect of yeast fermentation broths on crops (单位: %)

菌株 strain	燕麦 <i>A. sativa</i>		蚕豆 <i>V. faba</i>		豌豆 <i>P. sativum</i>		小麦 <i>T. aestivum</i>	
	株高抑制率	鲜重抑制率	株高抑制率	鲜重抑制率	株高抑制率	鲜重抑制率	株高抑制率	鲜重抑制率
	Inhibition rate of plant height	Fresh weight inhibition rate	Inhibition rate of plant height	Fresh weight inhibition rate	Inhibition rate of plant height	Fresh weight inhibition rate	Inhibition rate of plant height	Fresh weight inhibition rate
6-3	0.25±1.35 b	1.08±0.46 b	12.73±0.88a	14.73±2.43 a	10.69±0.13 a	22.61±0.43 a	0.17±0.31 c	3.20±0.17 a
12-6	0.53±1.13 a	3.71±0.21 a	0.03±0.39c	2.34±0.37 c	0.05±0.29 b	0.44±0.40 b	1.26±0.57 a	0.58±0.31c
16-8	0.02±0.55 c	0.04±0.16 c	1.54±0.67b	5.71±1.66 b	0.16±0.67b	9.46±0.71c	1.16±0.17 ab	2.15±0.25 b

菌株 strain	青稞 <i>H. vulgare</i>		油菜 <i>B. napus</i>		马铃薯 <i>S. tuberosum</i>	
	株高抑制率	鲜重抑制率	株高抑制率	鲜重抑制率	株高抑制率	鲜重抑制率
	Inhibition rate of plant height	Fresh weight inhibition rate	Inhibition rate of plant height	Fresh weight inhibition rate	Inhibition rate of plant height	Fresh weight inhibition rate
6-3	0.12±0.52 a	3.51±0.37 a	8.26±0.07 a	0.01±0.01 a	0.20±0.55c	5.66±5.53 a
12-6	0.01±0.17b	1.56±0.35 b	0.13±0.15 c	0.00±0.06 a	0.49±0.14 b	1.58±13.57 c
16-8	0.07±0.41 c	0.21±0.39 c	2.62±0.33 b	0.01±0.04 a	0.68±0.33 a	2.74±6.76 b

理，鲜重抑制率为 89.65%，50% 和 25% 推荐剂量化学除草剂+16-8 菌株发酵液混用的鲜重抑制率分别为 91.61% 和 88.60%，对鲜重进行方差分析可知，单用

化学除草剂与混用以及单用 16-8 菌株发酵液之间比较，存在显著性差异，但单用 16-8 菌株发酵液与混用处理之间比较，差异不显著（表 4）。



D: 氯氟吡氧乙酸推荐剂量; E: 氯氟吡氧乙酸 50% 推荐剂量; F: 氯氟吡氧乙酸 25% 推荐剂量; G: 氯氟吡氧乙酸推荐剂量+16-8 菌株发酵液; H: 氯氟吡氧乙酸 50% 推荐剂量+16-8 菌株发酵液; I: 氯氟吡氧乙酸 25% 推荐剂量+16-8 菌株发酵液 J:16-8 菌株发酵液; K: 清水对照。
D: fluroxypyr at recommended dose; E: fluroxypyr at half recommended dose; F: fluroxypyr at 25% of recommended dose; G: recommended dose+16-8 fermentation broth; H: 50% of recommended fluroxypyr dose+16-8 fermentation broth; I: 25% of recommended fluroxypyr dose+16-8 fermentation broth J: 16-8 fermentation broth alone; K: water control.

图 2 除草剂和 16-8 菌株混用后 7 d 的除草效果
Fig. 2 Efficacy of herbicide, 16-8 or herbicide+16-8 on weeds 7 d after treatment

2.4 菌株的鉴定

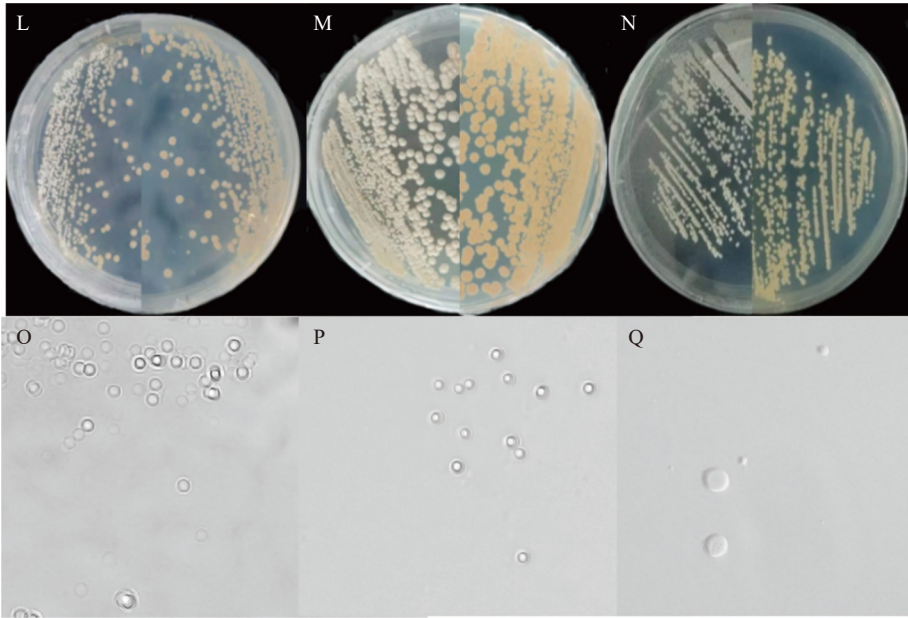
2.4.1 形态学鉴定 菌株 16-8 在 YPD 培养基上以单菌落出现，菌落边缘整齐，表面干燥，中间凸起，圆形，颜色为灰白色（图 3-L）。镜检结果发现菌体呈现为圆形、卵圆形（图 3-O）。菌株 12-6 在 YPD 培养基上以单菌落出现，菌落边缘不规则，表面凸

起颜色呈现乳白色（图 3-M）。显微镜下观察发现该菌呈现圆形、椭圆形初步鉴定为酵母菌（图 3-P）。菌株 6-3 在 YPD 培养基上其菌落乳白色，菌落边缘规则不透明，极容易被挑起（图 3-N）。镜检结果发现该菌形态为圆形、椭圆形（图 3-Q）。

2.4.2 分子生物学鉴定 以 16-8、12-6 和 6-3 菌株基

表 4 氯氟吡氧乙酸与 16-8 菌株发酵液混用对猪殃殃的防效
Table 4 Efficacy of 16-8 fermentation broth per se or in combination with fluroxypyr on controlling *G. aparine*

处理 Treatment	剂量Dosage/ (mL·hm ⁻² +mL·m ⁻²)	处理后7 d After treatment 7 d		处理后14 d After treatment 14 d	
		鲜重 Fresh weight/g	鲜重抑制率 Fresh weight inhibition rate/%	鲜重 Fresh weight/g	鲜重抑制率 Fresh weight inhibition rate/%
氯氟吡氧乙酸乳油（推荐剂量） Fluroxypyr EC at the recommended dose	750+0	2.45±0.13	62.60 b	1.57±0.04	79.42 b
氯氟吡氧乙酸乳油（50%推荐剂量） Fluroxypyr EC at 50 % of the recommended dose	375+0	3.02±0.37	53.89 bc	2.27±0.19	70.25 c
氯氟吡氧乙酸（25%推荐剂量） Fluroxypyr EC at 25 % of the recommended dose	187.5+0	3.55±0.26	45.80 c	2.84±0.12	62.78 d
氯氟吡氧乙酸乳油（推荐剂量）+16-8发酵液 Fluroxypyr EC at the recommended dose +16-8 strain fermentation broth	750+250	0.78±0.10	88.09 a	0.51±0.07	93.32 a
氯氟吡氧乙酸+16-8发酵液 Fluroxypyr EC at 50 % of the recommended dose +16-8 strain fermentation broth	375+250	0.94±0.01	85.65 a	0.64±0.03	91.61 a
氯氟吡氧乙酸+16-8发酵液 Fluroxypyr EC at 25 % of the recommended dose +16-8 strain fermentation broth	187.5+250	1.11±0.25	83.05 a	0.87±0.20	88.60 a
16-8发酵液16-8 strain fermentation broth	0+250	0.97±0.13	85.19 a	0.79±0.11	89.65 a
清水对照 Water control	0+0	6.55±0.39	0 d	7.63±0.25	0 e



L: 16-8 菌落形态（左，正面；右，反面）；M: 12-6 菌落形态（左，正面；右，反面）；N: 6-3 菌落形态（左，正面；右，反面）；O: 16-8 孢子形态；P: 12-6 孢子形态；Q: 6-3 孢子形态。
L: front-view of 16-8 colony (left); back-view of 16-8 colony (right); M: front-view of 12-6 colony (left); back-view of 12-6 colony (right); N: front-view of 6-3 colony (left); back-view of 6-3 colony (right); O: morphology of 16-8 spores; P: morphology of 12-6 spores; Q: morphology of 6-3 spores.

图 3 分离菌株菌落形态及其孢子显微观察
Fig. 3 Colony morphology and microscopic images of 6-3, 12-6, and 16-8 spores

因组为模板,对分离菌株的 ITS 及 26S rDNA 基因片段进行 PCR 扩增与测序。进一步联合 ITS、26S rDNA 基因序列构建系统发育树,结果显示(图 4),菌株 16-8 与 *Pichia kudriavzevii* 处于系统发育树的同一最小分支,菌株 12-6 与 *Kluyveromyces marxianus* 处于

系统发育树的同一最小分支,菌株 6-3 与 *Meyerozyma guilliermondii* 处于系统发育树的同一最小分支。将 16-8、12-6 和 6-3 序列在 NCBI 上 BLAST 进行同源对比,并结合形态学分析结果将 16-8 鉴定为库德里阿兹威毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*),12-6 与马克斯

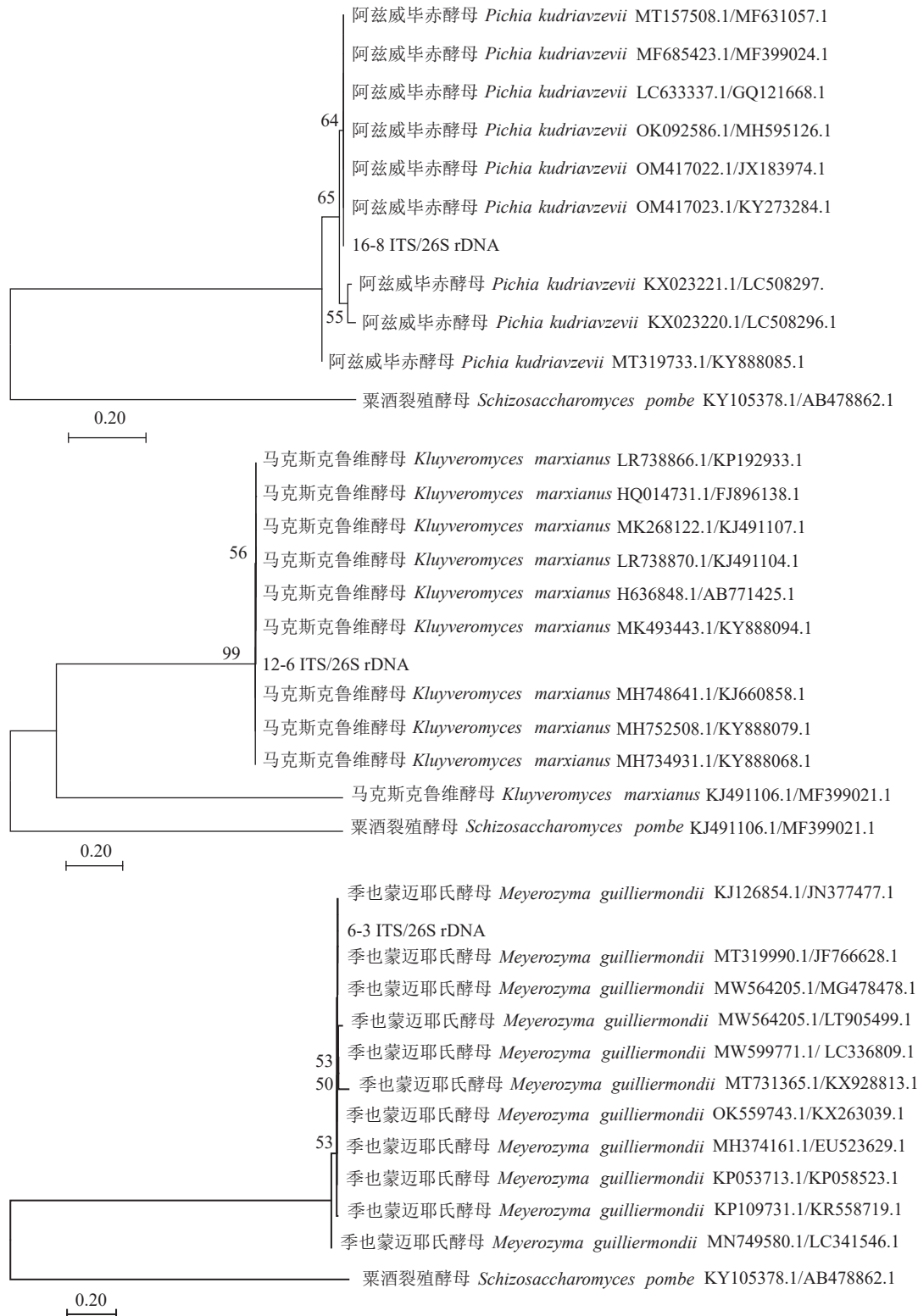


图 4 3 个菌株(16-8、12-6 和 6-3)基于 ITS 及 26S rDNA 基因构建的邻接法系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic NJ trees based on ITS rDNA and 26S rDNA sequences of Strains 16-8, 12-6, and 6-3

克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*) 6-3 与季也蒙迈耶氏酵母 (*Meyerozyma guilliermondii*)。

3 讨论与结论

近年来, 微生物的次生代谢产物被开发为除草剂的研究广受关注, 有研究表明, 微生物毒素具有开发为除草剂的巨大潜力^[20-22]。姜述君等^[23]研究表明, 来源于画眉草弯孢霉发酵液中的化合物 α , β -dehydrocurvularin 会影响马唐叶片新陈代谢继而导致叶片坏死。Chen 等^[24]研究结果表明, 灰黄青霉的次级代谢产物能有效抑制列当种子的萌发, 从而达到防除恶性寄生性杂草列当的目的。本研究发现 3 株酵母菌发酵液对供试杂草的株高和鲜重有明显的抑制作用, 喷雾处理 7 d 后, 16-8 菌株对猪殃殃、密花香薷和藜的伤害率分别为 90.17%、66.67% 和 95.00%, 鲜重抑制率分别为 88.63%、56.90% 和 78.77%, 因此该菌株的发酵液有较好的开发为微生物除草剂的潜力。但目前对发酵液中的具体除草活性物质尚不清楚, 有待进一步研究。

在微生物除草剂的筛选过程中首要考虑就是安全性问题^[25-26]。本研究结果表明, 6-3 和 12-6 菌株发酵液对测试的作物安全, 无不良影响。16-8 菌株发酵液除对蚕豆和豌豆株高和鲜重有轻微的影响外, 对其他 5 种作物表现为安全。为全面评价这些菌株的安全性, 还应进一步加大其他作物的安全性评价。

微生物在杂草综合治理中可以有多种不同的应用方式。由于大多数微生物菌株只针对一种杂草, 所以将其与化学除草剂结合使用在理论上是可行的。微生物菌株 *Myrothecium verrucaria* 与化学除草剂共同使用可以有效地提高其活性^[27]。Song 等^[28]采用 *Pyricularia setariae* 与 1/10 推荐剂量的烯禾啶混用可以更有效地防治狗尾草。同样, *Phoma proboscis* 与亚致死剂量的 2,4-D 混用可以更有效地防治 *Convolvulus arvensis*^[29]。与单独使用相比, *Colletotrichum coccodes* 与噻苯隆混用可以提高真菌的侵染和苘麻的防除效果^[30]。许多化学除草剂仅对刚刚出苗的圆叶锦葵有效, 而如果 *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *malvae* 与除草剂结合使用, 防效可持续至第 4~5 片真叶期。与单独使用真菌或噻草酮或咪唑乙烟酸相比, 二者混用可以极大地提高防治效果, 并减少所需药量^[31]。本研究发现: 当 16-8 菌株发酵液与 25%~50% 推荐剂量的氯氟吡氧乙酸混用时, 对猪殃殃的鲜重抑制率仍高达 88.60%~91.61%, 与单独使用 16-8 菌株发酵液的鲜重抑制率相当, 表明混用能够提高单独使用除草剂或菌株发酵液的防除效果。因此,

可选用微生物菌株与化学农药的复配用于杂草的防除, 但在田间的防治效果有待进一步试验, 包括使用剂量、使用方法及最佳使用时间等。同时通过探索与农业防治等其他措施的配合来实现持续、高效的除草目的。

通过对这 3 株菌株进行平板上菌落形态、显微镜下孢子形态观察, 结合分子鉴定, 确定这 3 个分离菌株均为酵母菌。近年来, 关于酵母菌生物活性的报道越来越多。*Pichia kudriavzevii* OT38 接入土壤 15 d 以后提高了土壤生物炭、脱氢酶活性以及胶体多糖等含量, 可以作为土壤改良剂利用^[32]。*Kluyveromyces marxianus* HP-10 菌株悬浮液通过营养和空间的竞争以及诱导抗病性相关酶的活性, 较好地抑制了柑橘采后绿霉病菌, 保证了果实的品质^[33]。采后用 *Meyerozyma guilliermondii* SQUCC-33Y 处理草莓果实可以显著降低由 *Alternaria alternata* 引起的果实腐烂病斑, 该拮抗酵母菌可作为一种生物杀菌剂用于防治 *A.alternata* 引起的草莓采后果实腐烂病^[34]。有研究发现, 酵母菌的次生代谢物生物活性广泛, 但目前尚未见其在除草方面的报道。本研究首次报道酵母菌发酵液具有优异除草潜力, 今后可加深对菌株 16-8 的研究, 分析其代谢产物中具有除草潜力的活性成分。本研究拓展了具有除草潜力的微生物资源, 为微生物除草剂的开发利用提供菌株资源。

参考文献:

- [1] 魏有海, 郭青云, 郭良芝, 等. 青海保护性耕作农田杂草群落组成及生物多样性 [J]. 干旱地区农业研究, 2013, 31 (1): 219-225.
WEI Y H, GUO Q Y, GUO L Z, et al. The community composition and biodiversity of weeds in conservation tillage system in Qinghai Province [J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2013, 31 (1): 219-225. (in Chinese)
- [2] 侯璐, 魏有海, 郭良芝, 等. 青海省东部地区马铃薯田培土前后杂草群落组成的比较分析 [J]. 青海大学学报, 2021, 39 (5): 23-28.
HOU L, WEI Y H, GUO L Z, et al. Comparative analysis of weed community composition before and after soil cultivation in *Solanum tuberosum* L. field in eastern Qinghai [J]. *Journal of Qinghai University*, 2021, 39 (5): 23-28. (in Chinese)
- [3] 翁华, 魏有海, 郭良芝, 等. 青海省春麦田杂草种类组成及群落特征 [J]. 作物杂志, 2013 (3): 116-120.
WENG H, WEI Y H, GUO L Z, et al. Species composition and characterization of weed community in spring wheat field in Qinghai [J]. *Crops*, 2013 (3): 116-120. (in Chinese)
- [4] 崔海兰, 王藏月, 徐林林, 等. 猪殃殃对 AHAS 抑制剂靶标抗性的快速分子检测 [J]. 植物保护学报, 2016, 43 (6): 1049-1054.
CUI H L, WANG C Y, XU L L, et al. Rapid molecular detection of the resistance of *Galium aparine* var. *tenerum* to AHAS inhibitors [J].

- Journal of Plant Protection*, 2016, 43 (6) : 1049–1054. (in Chinese)
- [5] 李香菊. 近年我国农田杂草防控中的突出问题与治理对策 [J]. *植物保护*, 2018, 44 (5) : 77–84.
- LI X J. Main problems and management strategies of weeds in agricultural fields in China in recent years [J]. *Plant Protection*, 2018, 44 (5) : 77–84. (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] 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 S G, 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)
- [8] 张亚鑫, 肖婉, 张峥, 等. 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 Y X, XIAO W, ZHANG Z, et al. 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)
- [9] 邹德勇, 杨智越, 杜春梅. *Phaeosphaeria* sp. HD-06菌株对马唐的致病性分析及初步鉴定 [J]. *植物保护*, 2020, 46 (4) : 98–104.
- ZOU D Y, YANG Z Y, DU C M. Pathogenicity of *Phaeosphaeria* sp. HD-06 against *Digitaria sanguinalis* and the preliminary identification of the strain [J]. *Plant Protection*, 2020, 46 (4) : 98–104. (in Chinese)
- [10] 李健, 李美, 高兴祥, 等. 菟丝子生防菌“鲁保一号”生物学特性及T-DNA插入突变体库的构建 [J]. *草业学报*, 2017, 26 (1) : 142–148.
- LI J, LI M, GAO X X, et al. Biological characteristics of Lubao No. 1 biological control agent (*Colletotrichum gloeosporioides*) and construction of a T-DNA insertional mutant library [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2017, 26 (1) : 142–148. (in Chinese)
- [11] 朱海霞, 马永强, 郭青云. 层出镰孢菌GD-5固态发酵培养条件及对藜和密花香薷的除草活性 [J]. *植物保护学报*, 2018, 45 (5) : 1154–1160.
- ZHU H X, MA Y Q, GUO Q Y. Solid culture conditions of *Fusarium proliferatum* GD-5 and its herbicidal activity to weeds *Chenopodium album* and *Elsholtzia densa* [J]. *Journal of Plant Protection*, 2018, 45 (5) : 1154–1160. (in Chinese)
- [12] 朱海霞, 马永强, 郭青云. 极细链格孢菌剂的初步研制及其除草作用研究 [J]. *植物保护*, 2018, 44 (5) : 212–216, 230.
- ZHU H X, MA Y Q, GUO Q Y. Development of the biocontrol agents of *Alternaria tenuissima* HZ-1 and its herbicidal activity [J]. *Plant Protection*, 2018, 44 (5) : 212–216, 230. (in Chinese)
- [13] 程亮. 生防菌粗毒素对猪殃殃防御酶及叶片细胞膜透性的影响 [J]. *现代农业科技*, 2015 (11) : 136–138.
- CHENG L. Effect of crude toxins from biocontrol fungi on defensive enzymes activity and membrane permeability of *Galium aparine* L [J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2015 (11) : 136–138. (in Chinese)
- [14] 王德培, 胡阳, 焦富. 库德里阿兹威氏毕赤酵母在发酵工业中的研究进展 [J]. *酿酒科技*, 2021 (6) : 95–101.
- WANG D P, HU Y, JIAO F. Research progress in the application of *Pichia kudriavzevii* in industrial fermentation [J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2021 (6) : 95–101. (in Chinese)
- [15] 岳寿松, 边斐, 张燕, 等. 马克斯克鲁维酵母菌的分离鉴定与所产乳糖酶学性能研究 [J]. *山东农业科学*, 2018, 50 (11) : 66–70, 101.
- YUE S S, BIAN F, ZHANG Y, et al. Isolation and identification of *Kluyveromyces marxianus* strain and properties of its product of β -galactosidase [J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2018, 50 (11) : 66–70, 101. (in Chinese)
- [16] 张颖, 刘同杰, 公丕民, 等. 抗真菌乳酸菌的筛选及其在酸奶发酵中的应用 [J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47 (19) : 84–89.
- ZHANG Y, LIU T J, GONG P M, et al. Screening and application of antifungal lactic acid bacteria in yogurt fermentation [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47 (19) : 84–89. (in Chinese)
- [17] 宋玉婕, 杨从军. 塔宾曲霉L-27菌株的分离鉴定及其发酵液除草潜力 [J]. *微生物学通报*, 2021, 48 (10) : 3682–3689.
- SONG Y J, YANG C J. Isolation and identification of *Aspergillus tubingensis* L-27 strain and herbicidal potential of its fermentation broth [J]. *Microbiology China*, 2021, 48 (10) : 3682–3689. (in Chinese)
- [18] 朱云枝, 强胜. 真菌菌株QZ-2000对马唐(*Digitaria sanguinalis*)致病力的影响因子 [J]. *南京农业大学学报*, 2004, 27 (2) : 47–50.
- ZHU Y Z, QIANG S. Influence of some factors on pathogenicity of strain QZ-2000 to *Digitaria sanguinalis* [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2004, 27 (2) : 47–50. (in Chinese)
- [19] 程亮, 郭青云. 内生真菌HL-1的除草活性及对作物的安全性 [J]. *江苏农业学报*, 2015, 31 (5) : 1012–1016.
- CHENG L, GUO Q Y. Herbicidal activity of fungal endophyte HL-1 against weeds and its safety to crops [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2015, 31 (5) : 1012–1016. (in Chinese)
- [20] 张红梅, 陈玉湘, 徐士超, 等. 生物源除草活性物质开发及应用研究进展 [J]. *农药学报*, 2021, 23 (6) : 1031–1045.
- ZHANG H M, CHEN Y X, XU S C, et al. 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)
- [21] 姜述君, 强胜, 朱云枝. 画眉草弯孢霉菌除草活性化合物的分离鉴定及其生物活性测定 [J]. *植物保护学报*, 2006, 33 (3) : 313–318.
- JIANG S J, QIANG S, ZHU Y Z. Isolation, purification, identification, and bioassay of helminthosporin with herbicidal activity from *Curvularia eragrostidis* [J]. *Journal of Plant Protection*, 2006, 33 (3) : 313–318. (in Chinese)
- [22] 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 [J]. *植物保护学报*, 2007, 34 (3) : 283–288.
- JIANG S J, FAN W Y, JU S J, et al. The pathogenicity of strain AAEC05-3 and its phytotoxin to *Echinochloa crus-galli* [J]. *Journal of Plant Protection*, 2007, 34 (3) : 283–288. (in Chinese)

- [23] 姜述君, 强胜. 马唐生防菌画眉草弯孢霉毒素 α 、 β -dehydrocurvularin对马唐叶绿体功能的影响[J]. *植物病理学报*, 2005, 35 (4): 312–316.
- JIANG S J, QIANG S. The effect of α , β -dehydrocurvularin, a toxin from a bioherbicidal candidate *Curvularia eragrostidis*, on chloroplast function of *Digitaria sanguinalis* [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2005, 35 (4): 312–316. (in Chinese)
- [24] CHEN J, WEI J, GAO J M, et al. Allelopathic inhibitory effects of *Penicillium griseofulvum* produced patulin on the seed germination of *Orobancha cumana* Wallr. and *Phelipanche aegyptiaca* Pers [J]. *Allelopathy Journal*, 2017, 41 (1): 65–80.
- [25] 顾琼楠, 欧翔, 褚世海, 等. 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 Q N, OU X, CHU S H, et al. 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)
- [26] TAN M, DING R Y, HUANG Q, et al. Evaluation of *Bipolaris panicle-miliacei* as a bioherbicide against *Microstegium vimineum* [J]. *Biocontrol Science and Technology*, 2022, 32 (2): 178–195.
- [27] WEAVER M A, JIN X, HOAGLAND R E, et al. Improved bioherbicidal efficacy by *Myrothecium verrucaria* via spray adjuvants or herbicide mixtures [J]. *Biological Control*, 2009, 50 (2): 150–156.
- [28] SONG T, CHU M G, ZHANG J P, et al. Transcriptome analysis identified the mechanism of synergy between sethoxydim herbicide and a mycoherbicide on green foxtail [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 21690.
- [29] HEINY D K. Field survival of *Phoma proboscis* and synergism with herbicides for control of field bindweed [J]. *Plant Disease*, 1994, 78 (12): 1156.
- [30] WYMORE L A, WATSON A K, GOTLIEB A R. Interaction Between *Colletotrichum coccodes* and thidiazuron for control of velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) [J]. *Weed Science*, 1987, 35 (3): 377–383.
- [31] GRANT N T, PRUSINKIEWICZ E, MORTENSEN K, et al. Herbicide interactions with *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* bioherbicide for round-leaved mallow (*Malva pusilla*) control [J]. *Weed Technology*, 1990, 4 (4): 716–723.
- [32] RAMYA P, GOMATHI V, DEVI R P, et al. *Pichia kudriavzevii*-a potential soil yeast candidate for improving soil physical, chemical and biological properties [J]. *Archives of Microbiology*, 2021, 203 (7): 4619–4628.
- [33] 罗建军, 耿鹏, 胡美英, 等. 1株拮抗酵母菌对柑橘绿霉病菌的抑制作用[J]. *华中农业大学学报*, 2013, 32 (1): 54–58.
- LUO J J, GENG P, HU M Y, et al. Inhibitive activity of *Kluyveromyces marxianus* on *Penicillium digitatum* sacc [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2013, 32 (1): 54–58. (in Chinese)
- [34] AL-RAHBI B A A, AL-SADI A M, AL-MAHMOOLI I H, et al. *Meyerozyma guilliermondii* SQUCC-33Y suppresses postharvest fruit rot of strawberry caused by *Alternaria alternata* [J]. *Australasian Plant Pathology*, 2021, 50 (3): 349–352.

(责任编辑: 黄爱萍)