

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2022.01.008

# 根系土壤假丝酵母菌 *Candida* sp. YIN9 对 大丽轮枝菌和全齿复活线虫的抑制作用

尹晓燕, 王 羽, 牛秋红\*  
南阳师范学院生命科学与农业工程学院, 河南 南阳 473000

**摘要:**【目的】研究黄萎病抗性棉(海 7124)根际土壤中酵母菌株对棉花黄萎病病原真菌大丽轮枝菌和全齿复活线虫的拮抗效果, 为生物防治棉花黄萎病和全齿复活线虫提供理论依据。【方法】通过镜检、糖发酵实验、碳源同化实验、26S rRNA 测序对菌株的形态、生理生化特征及其系统发育关系进行鉴定, 并利用七叶苷筛选、刚果红染色、平皿对峙实验、盆栽实验、平板生测实验测试其产酶活性以及抑制大丽轮枝菌和杀线虫活性。【结果】从大批黄萎病抗性棉(海 7124)根际土壤中筛选出编号为 YIN9 的酵母菌菌株, 分类鉴定结果表明: YIN9 菌株属于假丝酵母属 *Candida*。平皿对峙实验结果表明: 菌株 YIN9 对大丽轮枝菌的抑菌率达 59%; 将菌株 YIN9 的无菌发酵滤液与大丽轮枝菌孢子共培养 12 h 后镜检发现, 用菌株 YIN9 处理的实验组, 大部分棉花黄萎病病菌孢子不能正常萌发。盆栽实验结果表明: 菌株 YIN9 对棉花黄萎病的平均防治效果为 60.02%, 可以显著降低感病棉棉花黄萎病的发病率和病情指数。此外, 与从黄萎病抗性棉根际土壤中筛选获得的其他酵母菌株相比, 菌株 YIN9 具备较高的杀线虫活性: 菌株作用全齿复活线虫 48 和 60 h 后, 线虫死亡率分别为 90% 和 100%。将菌株 YIN9 发酵液煮沸后, 其抑制大丽轮枝菌和杀线虫活性均急剧下降, 进一步测试发现, 该菌株拥有较高的蛋白酶和纤维素酶活性。【结论】YIN9 中的生防因子可能是热不稳定性物质, 具备较高的杀线虫活性, 可以显著提高感病棉对黄萎病的抗性。

**关键词:** 假丝酵母菌; 大丽轮枝菌; 线虫; 蛋白酶; 纤维素酶



开放科学标识码  
(OSID 码)

## Study on inhibition effects of *Candida* sp. YIN9 against *Verticillium dahliae* and *Panagrellus redivivus*

YIN Xiaoyan, WANG Yu, NIU QiuHong\*  
School of Life Science and Agricultural Engineering, Nanyang Normal University, Nanyang, Henan 473000, China

**Abstract:**【Aim】To study the antagonistic effects of strains from the rhizosphere soil of *Verticillium* wilt-resistant cotton (Hai 7124) against *Verticillium dahliae* and *Panagrellus redivivus*, and to provide a model for the biological control of *Verticillium* wilt and *P. redivivus*.【Method】The strains were identified through microscopic examination, sugar fermentation experiment, carbon source assimilation experiment, 26S rRNA sequencing, morphology, physiological and biochemical characteristics, and phylogenetic analyses. Masculine screening, Congo red staining, plate confrontation experiments, pot experiments, and flat bioassay experiments were used to test the enzyme production activity and inhibition of *V. dahliae* and nematocidal activity.【Result】Yeast strain YIN9 was screened from a large number of rhizosphere soils of *Verticillium* wilt-resistant cotton (Hai 7124). The results showed that the YIN9 strain belonged to *Candida*. The plate confrontation experiment showed that the inhibition rate of YIN9 on *V. dahliae* was up to 59%. After co-cultivating the sterile fermentation filtrate of strain YIN9 with *V. dahliae* spores for 12 h, the microscopic examination found that in the experimental group treated with strain YIN9, most of the spores of *V. dahliae* could not germinate normally. Pot experiments indicated that the average control effect of strain YIN9 on cotton *Verticillium* wilt was 60.02%, which could significantly reduce the incidence and disease index of *Verticillium* wilt in susceptible cotton. Moreover, compared with other yeast strains isolated from rhizosphere soil of *Verticillium* wilt-resistant cotton, the strain YIN9 showed comparatively high nematocidal activity; the average mortality of nematodes was 90% and 100% after 48 and 60 h of treatment with YIN9, respectively. After boiling the fermentation

收稿日期(Received): 2021-06-20      接受日期(Accepted): 2021-09-13  
基金项目: 国家重点研发计划(2016YFF0203201); 国家自然科学基金(NSFC31770009); 浙江省公益技术研究项目(LGF20C140001)  
作者简介: 尹晓燕, 女, 硕士研究生。研究方向: 生物防治。E-mail: 1024944402@qq.com  
\* 通信作者(Author for correspondence), E-mail: qiuHongniu723@163.com

broth of strain YIN9, both its nematocidal and inhibitory activities against *V. dahliae* decreased sharply. Further experiments showed that this strain had high protease and cellulase activities. 【Conclusion】 It was speculated that the biocontrol factor in YIN9 might be a thermally unstable substance, which showed high nematocidal activity and could significantly improve the resistance of susceptible cotton to *Verticillium* wilt.

**Key words:** *Candida*; *Verticillium dahliae*; nematode; protease; cellulase

大多数酵母菌属于单细胞真菌,多用于发酵面包、啤酒和葡萄酒等。酵母在发酵工业、食品工业、医学、科学研究和农业等多个领域均得到了广泛应用。近年来,酵母还被用作针对水果、蔬菜和其他作物的多种疾病的潜在生物防治剂(Díaz *et al.*, 2020; Mannino *et al.*, 2020; Zhimo *et al.*, 2021)。已有研究表明,酵母菌通过增溶磷酸盐促进植物生长(Annadurai *et al.*, 2021)、帮助植物抵抗病原菌(Satianpakiranakorn *et al.*, 2020)。

棉花 *Gossypium* spp. 是人类最大的天然纤维来源,也是重要的油料作物,在国民经济中具有重要地位(赵君洁等, 2017)。在我国,棉花黄萎病是棉花生产上危害最为严重的病害,该病是由大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae* Kleb. 引起的一种土传维管束病害,通过根部侵染宿主微管组织引发,严重影响棉花的产量与品质。其微菌核的萌发与细胞壁的代谢过程息息相关,而葡聚糖  $\beta$ -1,3-糖苷酶在细胞壁消解途径中起着关键作用(孙瑶等, 2017)。大丽轮枝菌的细胞壁主要由葡聚糖和几丁质构成,葡聚糖酶和几丁质酶共同作用可以破坏大丽轮枝菌菌丝体顶端细胞壁,使菌丝体顶端膨胀、破碎,最终死亡(张迎春等, 2020)。

植物寄生线虫是目前世界上分布最广、对农作物危害最重的害虫,每年对全球经济造成巨大损失,也是全世界植保界最关心、最不易解决的难题(任万兰等, 2020)。近年来,随着人们环保意识的增强,人们逐渐抵制利用化学药剂防治线虫及棉花黄萎病。除了继续研究低毒、低残留、高选择性的化学农药外,人们更关注开发生防制剂来补充或替代化学农药。在微生物家族中,因酵母菌具备生长周期短、抗逆能力强、培养难度低、对宿主的毒性极弱等特点,且酵母菌的工业化生产技术较为成熟,研究开发酵母菌杀线虫剂已经成为一种趋势(王晓妍等, 2020; 朱莲英, 2013; Mukherjee *et al.*, 2020; Yuan *et al.*, 2020)。本研究从大量植物根际土壤酵母菌中筛选得到 YIN9 菌株,分析菌株形态并从分子水平对其进行鉴定。以全齿复活线虫 *Panagrellus red-*

*ivivus* 为靶标研究该菌株的杀线虫活性,以及测试该菌株抑制棉花黄萎病的活性,并对其生防因子进行初步探究,以期开发酵母生防菌剂提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以河南省南阳师范学院西区黄萎病抗性棉(海7124)根际土壤为供试土样,从供试土样中分离供试菌株。全齿复活线虫由云南大学、云南省省部共建的生物资源保护与利用重点实验室分离并保存。棉花黄萎病病原菌大丽轮枝菌 V991,由河南大学植物逆境国家重点实验室蔡应繁教授惠赠。供试棉花品种为感病棉品种 TM-1。供试培养基包括低营养无机盐固体培养基、低营养无机盐液体培养基、PDA 培养基、YM 培养基、糖发酵基础培养基、酵母菌筛选培养基、固体刚果红培养基、七叶苷筛选培养基。

### 1.2 方法

1.2.1 酵母菌种分离、筛选与培养 将土壤样本经过富集培养得到大量菌株,按梯度稀释成  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  浓度,涂布在酵母菌筛选培养基上,在 25 ℃ 培养箱中培养 1 d,分离筛选出酵母菌。将从植物根际土壤筛选分离的酵母菌接种到 PDA 培养基上,密封,25 ℃ 恒温箱中培养 7 d 后,观察分析其菌落颜色、形态差异,并将不同的酵母菌在 PDA 平板上进行纯化后保存备用。在无菌条件下,接种纯化后的菌株到 100 mL 的 PDA 培养基中,25 ℃、220 r·min<sup>-1</sup> 恒温摇床振荡培养 3 d。

1.2.2 供试线虫的制备 采用简易贝曼漏斗将线虫从培养基中清洗出来:将漏斗置于铁架台上,用 6 张洁净的擦镜纸交叉叠放于漏斗中(擦镜纸低于漏斗口),漏斗下端连上乳胶管,用夹子封住乳胶管下端口,按需求量挑取线虫放入漏斗中,加入适量蒸馏水,使线虫沉到漏斗底部,打开止水夹,线虫便随水流至试管,得到线虫悬液。

1.2.3 全齿复活线虫生防酵母菌的筛选 将事先灭过菌的玻璃纸平铺在制备好的低营养无机盐培

培养基平板上,并将酵母菌菌株均匀涂布于玻璃纸上,待菌株培养到长满菌苔后,在玻璃纸中间加入线虫悬浮液 200  $\mu\text{L}$  (约 300 条)。每隔 12 h 用解剖镜观察线虫的存活情况,并用光学显微镜观察线虫体壁产生的变化。计算死亡率,死亡率/%=(死线虫数/300) $\times 100$ 。

**1.2.4 高活性菌株鉴定 形态特征观察:**在 YM 培养基平板上接种筛选出的高活性菌株,25  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 2~3 d,观察其菌落形态、颜色,并用显微镜观察其细胞具体形态特征(梁苏育和袁峰,2021)。

**生理生化特征鉴定:**测试葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、半乳糖、乳糖、木糖、阿拉伯糖和棉籽糖 9 种糖的发酵结果(陶森等,2019)。将菌株接种在分别含有 5% 的葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、半乳糖、木糖、L-鼠李糖、L-阿拉伯糖、琥珀酸、可溶性淀粉、柠檬酸、肌醇的培养基中,25  $^{\circ}\text{C}$  条件下培养 2~4 周后观察培养基是否浑浊,实验重复 2~3 次(陈兴民等,2016)。

**酵母菌 DNA 的提取:**用珠磨法提取酵母菌 DNA。将筛选出的高活性酵母菌菌株接种到 YM 培养基中,25  $^{\circ}\text{C}$  培养 16~18 h,收集菌液 1.5 mL,12000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 1 min,弃上清液。得到的菌体用 TE 缓冲液洗涤 2 次后,溶于 200  $\mu\text{L}$  TE 缓冲液中,加入 50 mg 玻璃珠(直径 0.3~0.5 mm)和 100  $\mu\text{L}$  酚-氯仿(体积比 25:24),漩涡振荡 3 min;12000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 2 min,取上清液 300  $\mu\text{L}$ ,加入等体积酚-氯仿(体积比 25:24),抽提后 12000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min;取上清液,加入 0.5  $\mu\text{L}$  核糖核酸酶 A,37  $^{\circ}\text{C}$  水浴 30 min;加入 2 倍体积无水乙醇,-20  $^{\circ}\text{C}$  静置 30 min;10000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,沉淀物用 70%乙醇洗 2 次,自然干燥后,溶于 20  $\mu\text{L}$  TE 缓冲液,保存(赵宏宇等,2011)。

**26S rRNA 序列分析:**26S rRNA 的 PCR 扩增反应体系为 Mixture (10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 25  $\mu\text{L}$ 、正向引物 NL1 (10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 1.0  $\mu\text{L}$ 、反向引物 NL4 (10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 1.0  $\mu\text{L}$ 、模板 DNA 3.0  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 20  $\mu\text{L}$ ,总体积 50  $\mu\text{L}$ 。扩增条件为 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 1 min,94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min,51.3  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 90 s,30 个循环,4  $^{\circ}\text{C}$  保藏(管庆林等,2021)。取 5  $\mu\text{L}$  PCR 扩增后的产物,在 0.8%琼脂糖凝胶水平电泳,在 100 V DYY-7C 电泳仪上电泳 30~60 min,溴化乙锭(EB)染色 10 min 左右,用凝胶成像系统对

DNA 凝胶样品进行图像采集,检查有无条带(王丽群,2021)。

**测序及序列比对:**获得扩增 26S rRNA 产物,提供相同的引物送至北京生物工程公司进行测序。获得的序列在 GenBank 数据库中比对,确定菌株的系统发育地位(乔传丽等,2017)。

**1.2.5 抑制大丽轮枝菌活性测试** 采用平板对峙法测试抑制大丽轮枝菌活性:接种直径为 1 cm 的大丽轮枝菌菌块于 PDA 培养基平板中央,25  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱倒置培养 3 d 备用。待测菌株 37  $^{\circ}\text{C}$ 、220  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  摇瓶培养 12 h,取 100  $\mu\text{L}$  菌液均匀涂布于 LB 平板,37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 12 h,用直径 1 cm 的打孔器打出细菌菌饼,两侧对称放置在接种大丽轮枝菌的 PDA 平板上,25  $^{\circ}\text{C}$  恒温对峙培养 10 d,测量抑菌直径并计算抑菌率,3 次重复。抑菌率/%=[(对照组真菌菌落生长直径-处理组真菌菌落生长直径)/对照组真菌菌落生长直径] $\times 100$ (王丽丽等,2017)。

**1.2.6 盆栽实验验证** 用 YIN9 菌液浸泡 TM-1 棉种发芽。选用优质土壤,消毒后作为栽培基质,盆栽棉花至长出 2 片真叶。实验处理 a 为清水灌根作对照;处理 b 为接种大丽轮枝菌病菌(棉花伤根后用浓度为  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$  的大丽轮枝菌孢子悬液浸泡 1 min);处理 c 为接种大丽轮枝菌病菌 2 d 后,再用 YIN9 发酵滤液浇灌棉花根部。

处理 30 d 后进行病害调查统计,并计算发病率、病情指数和防治黄萎病效果。病情分级标准:0 级,棉株健康,无病叶,生长正常;1 级,棉株 1/4 以下叶片发病,变黄萎焉;2 级,棉株 1/4 以上、1/2 以下叶片发病,变黄萎焉;3 级,棉株 1/2 以上、3/4 及其以下叶片发病,变黄萎焉;4 级,棉株 3/4 以上叶片发病,或叶片全部脱落,棉株枯死。

发病率/%=(病株数/调查总株数) $\times 100$ ;

病情指数/%=[ $\sum$ (各级发病数 $\times$ 相应级数)/(调查总株数 $\times$ 最高级数)] $\times 100$ ;

防治效果/%=[(对照病情指数-处理病情指数)/对照病情指数] $\times 100$ (李文鹏等,2020)。

**1.2.7 高活性菌株的生防因子探究** 菌株培养:接种筛选出的高活性菌株到液体培养基中,25  $^{\circ}\text{C}$  摇床培养 2 d,转速为 220  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

**粗蛋白提取:**6000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、10 min 条件离心发酵培养物,取上清液,按 0%~90%饱和度加入硫酸铵,于 4  $^{\circ}\text{C}$  静置 2 h,然后 8500  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 30

min, 弃上清液。向沉淀中加入适量浓度为 50 mmol · L<sup>-1</sup> 的磷酸缓冲液, 使沉淀重新溶解, 然后装入 21 mm 透析袋(截留分子质量 MW: 8000~14000 u), 在干净的烧杯中加入透析袋中溶液 15 倍体积的 50 mmol · L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液, 将透析袋放入烧杯中透析 4 次, 每次大约 3 h, 最终取得透析袋中溶液(王青华等, 2020)。收集透析袋中的溶液, 保存备用。

蛋白类物质活性测试: 在无菌环境中用灭过菌的打孔器在牛奶板上打孔, 在孔中加入 100 μL 上述提取的蛋白液, 同时以 PBS 溶液作空白对照, 在恒温培养箱中 37 ℃ 培养 12 h 后取出观察。

生防因子测试: 以适量液体培养基为对照 1 溶液; 以 50 mmol · L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液为对照 2 溶液; 以透析溶液作为对照 3 溶液; 将透析袋中的溶液煮沸灭活作为对照 4 溶液。在 1.5 mL 离心管中加入 200 μL 的实验用药剂, 吸取 10 μL 事先制备好的线虫悬浮液(约 150 条线虫)加入到离心管中, 25 ℃ 下将离心管水平放置, 分别在处理后 24、48、60 h 观察线虫的死亡情况并计算死亡率, 在光学显微镜下观察线虫体壁出现的变化。鉴定线虫是否死亡(薛美静等, 2019): 取 15 滴浓度为 5% NaCl 溶液加入待鉴定的离心管中, 静置大约 2 min 后观察, 死虫虫体僵直不动, 活虫虫体则卷曲或扭动。用 4 种对照药剂分别处理, 每个处理重复 3 次。死亡率/% = (死线虫数/150) × 100。

七叶苷平板测试 β-葡聚糖酶活性: 将筛选得到的拮抗菌株划线转接于 YM 培养基 25 ℃ 恒温培养 24 h, 挑单菌落点接在七叶苷平板中央, 25 ℃ 恒温培养 48 h, 如果平板变黑, 说明菌株能产 β-葡聚糖酶。

刚果红平板测试纤维素酶活性: 将筛选得到的拮抗菌株划线转接于 YM 培养基 25 ℃ 恒温培养 24 h, 观察单菌落, 刚果红平板上点上单菌落, 25 ℃ 恒温培养 48 h, 用 1 mol · L<sup>-1</sup> 的 NaCl 溶液脱色, 如果出现透明圈, 说明菌株能产纤维素酶。

## 2 结果与分析

### 2.1 全齿复活线虫生防酵母菌的分离和筛选

从黄萎病抗性棉(海 7124)根际土壤中分离得到 55 株酵母菌, 并筛选出对线虫有致死性的菌株 17 株, 以杀线虫活性最高的 YIN9 菌株作为供试菌株。

### 2.2 YIN9 酵母菌的鉴定

2.2.1 表型特征 在 YM 平板培养基上观察到呈饱满圆形的菌落形状, 表面光滑湿润, 菌苔颜色为白色(图 1A)。在显微镜下观察到其圆形或椭圆形的细胞形状, 多边芽殖, 能形成假菌丝(图 1B)。

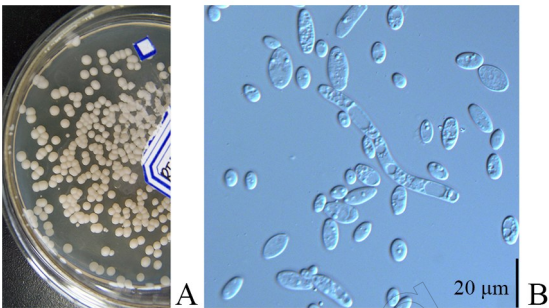


图 1 酵母菌 YIN9 的形态特征  
Fig.1 Morphological characteristics of yeast YIN9  
A: 菌落特征; B: 细胞形态。  
A: Colony characteristics; B: Cell morphology.

2.2.2 YIN9 26S rRNA 序列分析 以 YIN9 菌株的基因组为模板, 用 NL1 和 NL4 作为引物做 PCR 扩增, 得到的 26S rRNA 序列(图 2)。YIN9 菌株的 26S rRNA 的 GenBank 登录号为 MZ664336。将得到 YIN9 菌株的 26S rRNA 序列分别与 GenBank 中的序列进行比对, 菌株 YIN9 与 *Candida tropicalis* (EU543686) 的相似度达到 98%, 基于其 26S rRNA 构建的系统发育树表明 YIN9 菌株与 *Candida tropicalis* (EU543686) 亲缘关系最近, 证明菌株 YIN9 属于假丝酵母菌属 *Candida* sp.(图 3)。

### 2.3 YIN9 菌株抑制大丽轮枝菌活性测试结果

平板对峙实验结果(图 4)表明, YIN9 菌株对大丽轮枝菌的菌丝生长有明显抑制作用, 菌株 YIN9 对大丽轮枝菌的抑菌率达 59%。将菌株 YIN9 的无菌发酵滤液与大丽轮枝菌孢子共培养 12 h 后镜检发现, 用菌株 YIN9 处理的实验组, 大部分棉花黄萎病菌孢子不能正常萌发, 孢子短、厚、膨大, 有聚集现象, 菌丝生长明显下降。而未经菌株 YIN9 处理的对照组大丽轮枝菌孢子正常萌发, 菌丝生长旺盛。以上结果说明, 酵母菌 YIN9 菌株能明显抑制大丽轮枝菌生长。

### 2.4 盆栽实验结果

盆栽实验结果(图 5)显示, YIN9 酵母菌菌液对棉花黄萎病有较好的防治效果。大丽轮枝菌侵染棉花对照组 2 周后植株萎蔫矮小, 叶片泛黄卷曲并且边缘出现烧焦状干枯, 一些叶片用手轻触即可

掉落,发病明显。而用酵母菌 YIN9 处理的棉花组长势较好,染病现象不明显,植株也较高,长势较为茂盛。菌株 YIN9 对棉花黄萎病的平均防治效果为 60.02%。可见,拮抗菌株 YIN9 能显著提高感病棉品种 TM-1 对黄萎病的抗性。

AGCGGTTATTGCCTTAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTCAGAGTCCGAGTTGTAATTT  
GAAGAAGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGAACAGAACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCATGAGATG  
ATCCAGGCCTATGTAAAGTTTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTA  
AATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTG  
AAATTGTTGAAAGGGAAGGCGTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACTTCTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTATCGGGC  
CAGCATCAGTTTGGGCGGTAGGAGAATTGCGTTGGAATGTGGCAGCGCTTCGGTTGTGTATTATAGCCTTCGTCGATACTGCCAG  
CCTAGACTGAGGACTGCGGTTTATACCTAGGATGTTGCATAATGATCTTAAGTCGCCCCGTCTTGAAACACGGAACCAA

图 2 YIN9 26S rRNA 序列  
Fig.2 YIN9 26S rRNA sequence

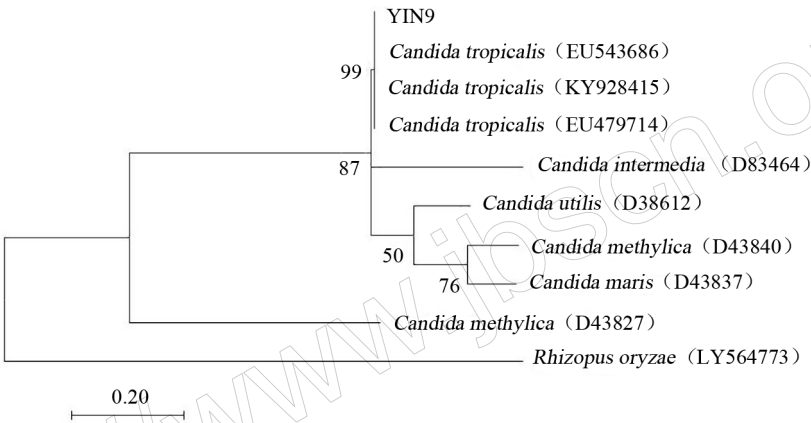


图 3 基于 26S rRNA 基因序列构建的 YIN9 系统发育树  
Fig.3 Phylogenetic tree of YIN9 based on 26S rRNA gene sequence

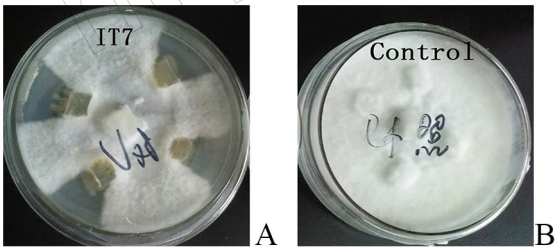


图 4 菌株 YIN9 对大丽轮枝菌的抑制效果

Fig.4 Inhibitory effect of strain YIN9 against *V. Dahlia*

A: 用 YIN9 处理的大丽轮枝菌; B: 对照组大丽轮枝菌。

A: *V. Dahlia* treated with YIN9; B: Control group of *V. Dahlia*.

2.5 YIN9 菌株生防因子探究结果

由表 1 可知: YIN9 菌株处理 48 h 后, 线虫的平均死亡率达 90%; 处理 60 h 后, 线虫的平均死亡率达 100%。用液体培养基(对照 1)、50 mmol · L<sup>-1</sup>磷酸缓冲液(对照 2)、透析溶液(对照 3)和煮沸灭活后的透析溶液(对照 4)处理全齿复活线虫后, 线虫的死亡率不高, 且线虫体壁没有溶解。而以透析袋

中的蛋白处理全齿复活线虫 48 h 后, 线虫的死亡率达 90%, 且线虫体壁出现溶解。这说明 YIN9 杀线虫的主要活性成分是一种蛋白类物质。

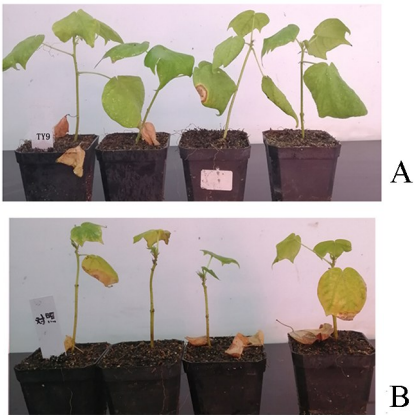


图 5 接种 2 周后菌株 YIN9 对棉花黄萎病的拮抗效果  
Fig.5 Antagonistic effects of the strain YIN9 on *Verticillium* wilt of cotton two weeks later

A: 用 YIN9 处理的棉花; B: 对照组棉花。

A: Cotton treated with YIN9; B: Control group of cotton.

表 1 YIN9 对全齿复活线虫的毒杀效果  
Table 1 Toxic effect of YIN9 to *P. redivivus*

| 菌株样品 Samples                       | 死亡率 Mortality/% |      |      | 线虫变化 Nematode change                                      |                    |                          |
|------------------------------------|-----------------|------|------|-----------------------------------------------------------|--------------------|--------------------------|
|                                    | 12 h            | 48 h | 60 h | 12 h                                                      | 48 h               | 60 h                     |
| YIN9                               | 60              | 90   | 100  | 体壁粗糙,开始出现溶解<br>Body walls are rough and begin to dissolve | 虫体僵直 Instiff stiff | 部分溶解<br>Part dissolution |
| 对照 1 Control 1                     | 5               | 20   | 10   | 未溶解 Undissolved                                           | 无变化 Uniformity     | 未溶解 Undissolved          |
| 对照 2 Control 2                     | 5               | 15   | 10   | 未溶解 Undissolved                                           | 无变化 Uniformity     | 未溶解 Undissolved          |
| 对照 3 Control 3                     | 5               | 20   | 10   | 未溶解 Undissolved                                           | 无变化 Uniformity     | 未溶解 Undissolved          |
| 对照 4 Control 4                     | 10              | 30   | 20   | 未溶解 Undissolved                                           | 无变化 Uniformity     | 未溶解 Undissolved          |
| 透析袋中的蛋白<br>Protein in dialysis bag | 50              | 90   | 70   | 体壁粗糙,开始出现溶解<br>Body walls are rough and begin to dissolve | 虫体僵直 Instiff stiff | 部分溶解<br>Part dissolution |

如图 6 所示,经过牛奶板测试,含有蛋白液的孔周围出现透明的晕圈,说明孔周围牛奶中的蛋白质被降解,可以初步判断 YIN9 菌株杀线虫生防活性因子是一种蛋白类物质。

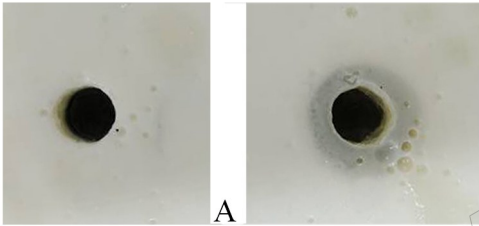


图 6 蛋白类物质活性测试  
Fig.6 Protease activity test

A:PBS 溶液;B:透析袋中蛋白液。  
A: PBS liquid; B: Protein liquid in dialysate bag.

由图 7 可见,与对照组线虫相比,用蛋白溶液处理的线虫和用 YIN9 处理的线虫体壁发生溶解的过程十分明显。由于线虫体壁被 YIN9 菌株产生的一种蛋白类物质溶解,导致线虫体内物质大量外泻,最终造成线虫死亡。

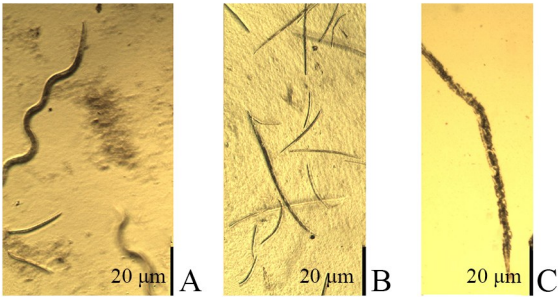


图 7 菌株 YIN9 对全齿复活线虫的活性测试  
Fig.7 Killing of nematodes of different samples

A:对照组线虫;B:用蛋白溶液处理的线虫;  
C:用 YIN9 处理的线虫。  
A: Control group of nematodes; B: Nematodes treated with protein solution; C: Nematodes treated with YIN9.

2.6 纤维素酶和 β-葡聚糖酶活性测试结果

刚果红能和培养基中的纤维素形成红色复合物。纤维素酶分解纤维素后,不能形成刚果红-纤维素复合物,培养基中会出现环绕纤维素分解菌的透明圈。YIN9 菌株在刚果红平板上能形成明显的透明圈(图 8A)。进一步发现,YIN9 菌株能产 β-葡聚糖酶,把七叶苷分解为葡萄糖和七叶素,然后七叶素与培养基中枸橼酸铁的二价铁离子发生反应,生成黑色的化合物,使培养基呈黑色。其他菌株(Y6)不产 β-葡聚糖酶,无法分解七叶苷,培养基不变色(图 8B)。



图 8 拮抗菌株 YIN9 纤维素酶和 β-葡聚糖酶活性检测结果  
Fig.8 Cellulase activity and detection of β-glucanase activity of antagonistic strain YIN9

A:YIN9 在刚果红平板上纤维素酶活性检测结果;  
B:YIN9 在七叶苷平板上 β-葡聚糖酶活性检测结果。  
A: Cellulase activity of YIN9 on congo red plate;  
B: Detection of β-glucanase activity of YIN9 on aescin plate.

3 讨论

自然界中广泛存在各种酵母菌,目前已知的大部分酵母菌对人体是无毒的。酵母菌在发酵工程中发挥着非常重要的作用,如酿酒、食品等。近年来,研究人员利用多种酵母菌开发了各种生防试剂。据报道,酵母菌作为生防菌大多数被用来防治真菌和细菌对果蔬造成的病害等(Pesce *et al.*, 2018),如:范先敏(2017)从 102 株酵母菌中筛选出 7 株对桃褐腐病菌具有显著抑制作用的酵母菌株;罗珊珊

(2015)从不同品种芒果 *Mangifera indica* L.表皮及伤口、叶片及根际土壤中筛选出了一株拮抗酵母菌 T18,对芒果炭疽病表现出明显的抑制作用。但是,关于酵母菌在防治线虫和防治棉花黄萎病方面的报道却很少(王晨等,2017),已有的研究主要集中在研发含酵母菌复合防治剂来防治线虫和棉花黄萎病。如:彭勇和彭瑞芳(2020)公开了一种利用酵母和厚孢轮枝菌生防菌复合菌剂防治根结线虫的发明专利;凌新萍等(2020)发现利用木霉菌、淡紫拟青霉菌和酵母菌 3 种微生物代谢后的产物、各种发酵产物及 3 种微生物相互配合能有效防治农作物线虫病;而含有淡紫拟青霉、酿酒酵母菌、地衣芽孢杆菌、侧孢短小芽孢杆菌、胶质芽孢杆菌的发酵菌群添加番茄碱几丁质酶钛具有防治根结线虫的功效(王猛,2016);张志红等(2010)研究 4 株芽孢杆菌与 1 株酵母菌组合后对甲壳素的降解效果,以及甲壳素降解液防治番茄南方根结线虫病的效果,结果表明,所有菌株组合后的降解效果最好,其降解液的黏度最低,几丁质酶活性最高。方治(2016)从土壤样品中分离得到多株防治蔬菜根结线虫病的真菌,其中 3 株是隐球酵母科真菌。

本研究成功筛选出了一株既能抑制大丽轮枝菌活性又能杀线虫的假丝酵母 YIN9 菌株,对其主要的生防因子进行初步探究,结果发现,该酵母菌的发酵液煮沸后,其杀虫和抑制病原真菌大丽轮枝菌的活性均丧失,从而推测其主要的生防因子为热不稳定性物质,有可能是蛋白类物质。进一步对其各种酶活进行测试发现,酵母菌 YIN9 具有蛋白酶、纤维素酶和  $\beta$ -葡聚糖酶活性。据此推测,该酵母菌的作用机理是菌株产生了一种蛋白类物质,能够将线虫和真菌的体壁分解并破坏,从而达到抑制效果。由于酵母菌对宿主的毒性小、生长快、易于培养,并且工业化生产技术基本成熟,可以考虑将其开发成一种生防药剂,用于植物寄生线虫和棉花黄萎病的生物防治。本研究只是初步探究了 YIN9 菌株的作用机理,要想将该菌株大规模用于田间应用,还需要对其安全性、稳定性、作用机制以及规模化防效进行更深一步的研究。

## 参考文献

陈兴民,刘军,李建国,王君怡,龚成侨,付加芳,栾静,2016. 酵母菌的分离培养及发酵实验方法. 生物学通报,

51(5): 43-44, 64.

范先敏,2017. 猕猴桃软腐病拮抗菌筛选及初步拮抗机理研究. 硕士学位论文. 武汉:华中农业大学.

方治,2009. 蔬菜根结线虫生防真菌的筛选、鉴定及应用研究. 硕士学位论文. 武汉:华中农业大学.

管庆林,周笑犁,赵姗,耿瑞鸿,2021. 番茄自然发酵液中酵母菌的分离鉴定及其特性研究. 食品工业科技, 42(3): 96-100, 107.

李文鹏,陶冶,赵素雅,牛秋红,2020. 芽孢杆菌 HT-7 对棉花黄萎病菌的拮抗作用及拮抗因子初探. 河南农业科学, 49(8): 84-93.

梁苏育,袁峰,2021. 研讨标准菌株传统质控表型鉴定方法的重要性. 河南预防医学杂志, 32(1): 39-42, 45.

凌新萍,孙明明,周平运,崔奇,杨党伟,2020. 一种用于防治线虫病的农用微生物菌剂及其制备方法: CN202010035681.0. (2020-05-29).

罗姗姗,2015. 采后芒果炭疽病拮抗酵母菌的筛选鉴定及生防效果评价. 硕士学位论文. 海口:海南大学.

彭勇,彭瑞芳,2020. 一种利用生防菌防治根结线虫的复合菌剂及其制备方法: CN202010155905.1. (2020-07-10).

乔传丽,蒋彩虹,金丹,蒋艾廷,卢士玲,李王强,李宝坤,2017. 新疆传统发酵酸奶中酵母菌的分离鉴定及系统发育分析. 中国酿造, 36(4): 67-71.

任万兰,张驰,周娇,侯有明,赵莉茜,2020. 松材线虫 *gallectin-1* 基因的克隆、原核表达和表达模式分析. 生物安全学报, 29(2): 99-105, 122.

孙瑶,杨晓杰,侯甲男,唐中杰,赵元明,谢德意,李武,赵付安,吕淑平,聂利红,段铮铮,于跃波,王红卫,房卫平,2017. 一种新型的大丽轮枝菌葡聚糖-1,3- $\beta$ -糖苷酶的表达和性质研究//中国农学会棉花分会 2017 年年会暨第九次会员代表大会论文汇编. 郑州:中国棉花杂志社: 152-153.

陶森,王雅玲,叶林,孙力军,房志家,黄文妍,毕思远,钟礼培,励建荣,2019. 腌鱼中耐盐酵母菌的分离鉴定及其生理生化特性. 食品工业科技, 40(2): 136-141, 147.

王晨,卢彩鸽,刘德文,刘伟成,刘娅,张殿朋,2017. 桃采后褐腐病生防酵母菌的筛选及鉴定. 河南农业科学, 46(5): 90-94.

王丽丽,蔡超,罗明,顾爱星,王慧,李克梅,2017. 马铃薯黄萎病研究现状. 生物安全学报, 26(1): 30-38.

王丽群,2021. 传统酸面团中优势酵母菌的分离及鉴定. 黑龙江农业科学(6): 93-97.

王猛,2016. 一种含番茄碱几丁质酶钛的根结线虫复合防治剂: CN201510696077.1. (2016-03-09).

王青华,唐旭,孙晓晖,万婧倩,黄仕新,徐长安,2020. 深海贝莱斯芽孢杆菌 DH82 的抑菌活性物质初步分离纯化

- 及其抑菌谱检测. 应用海洋学学报, 39(1): 20–26.
- 王晓妍, 张栋园, 李宁, 崔新仪, 2020. 草莓灰霉菌生防酵母菌的筛选及生防效果测定. 天津农业科学, 26(9): 1–4, 10.
- 薛美静, 李英, 张靖, 高泽文, 吴文涛, 王扬, 喻盛甫, 2019. 拟松材线虫纤维素酶活性与其致病性关系. 生物安全学报, 28(3): 181–188.
- 赵宏宇, 李珺, 赵玥, 王馨, 蔡禄, 2011. 4种酵母基因组提取方法的比较. 食品科学, 32(9): 170–173.
- 赵君洁, 曾卫军, 李艳红, 葛风伟, 杜钰, 袁琳琳, 赵歉歉, 王敏, 谢红桃, 白若翔, 韩生成, 赵和平, 赵惠新, 2017. 大丽轮枝菌拮抗芽孢菌株的分离、鉴定及两株菌抑菌特性研究. 北京师范大学学报(自然科学版), 53(3): 294–300.
- 张迎春, 孙天歌, 张小雪, 梁其干, 李艳军, 孙杰, 2020. 大丽轮枝菌  $\beta$ -1,4-内切木聚糖酶基因的鉴定及生物信息学分析. 西北农业学报, 29(5): 776–786.
- 张志红, 冯宏, 李华兴, 张新明, 袁英英, 2010. 甲壳素降解液防治番茄南方根结线虫病. 中国蔬菜(16): 58–61.
- 朱莲英, 吴凤芝, 赵志祥, 王会芳, 陈绵才, 2013. 相似穿孔线虫拮抗细菌的筛选及分子鉴定. 生物安全学报, 22(1): 23–27.
- ANNADURAI B, THANGAPPAN S, KENNEDY Z J, PATIL S G, UTHANDI S, 2021. Co-inoculant response of plant growth promoting non-rhizobial endophytic yeast *Candida tropicalis* VYW1 and *Rhizobium* sp. VRE1 for enhanced plant nutrition, nodulation, growth and soil nutrient status in Mungbean (*Vigna mungo* L.). *Symbiosis*, 83(1): 115–128.
- DÍAZ M A, PEREYRA M M, PICON-MONTENEGRO E, MEINHARDT F, DIB J R, 2020. Killer yeasts for the biological control of postharvest fungal crop diseases. *Microorganisms*, 8(11): 1680.
- MANNINO G, CAMPOBENEDETTO C, VIGLIANTE I, CON-TARTESE V, BERTEA C M, 2020. The application of a plant biostimulant based on seaweed and yeast extract improved tomato fruit development and quality. *Biomolecules*, 10(12): 1662.
- MUKHERJEE A, VERMA J P, GAURAV A K, CHOUHAN G K, HESHAM E L, 2020. Yeast a potential bio-agent: future for plant growth and postharvest disease management for sustainable agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(4): 1497–1510.
- PESCE V M, NALLY M C, CARRIZO G P, ROJO C, PÉREZ B A, TORO M E, CASTELLANOS D F L I, VAZQUEZ F, 2018. Antifungal activity of native yeasts from different micro-environments against *Colletotrichum gloeosporioides* on ripe olive fruits. *Biological Control*, 120: 43–51.
- SATIANPAKIRANAKORN P, KHUNNAMWONG P, LIM-TONG S, 2020. Yeast communities of secondary peat swamp forests in Thailand and their antagonistic activities against fungal pathogens cause of plant and postharvest fruit diseases. *PLoS ONE*, 15(3): e0230269.
- YUAN S A, ZWB C, DZ D, QI W B, 2020. Oxidative stress adaptation of the antagonistic yeast, *Debaryomyces hansenii*, increases fitness in the microenvironment of kiwifruit wound and biocontrol efficacy against postharvest diseases. *Biological Control*, 152: 104428.
- ZHIMO V Y, KUMAR A, BIASI A, SALIM S, DROBY S, 2021. Compositional shifts in the strawberry fruit microbiome in response to near-harvest application of *Metschnikowia fructicola*, a yeast biocontrol agent. *Postharvest Biology and Technology*, 175: 111469.

(责任编辑: 郑珊珊)