

# 棉花黄萎病菌拮抗酵母菌筛选及鉴定

文雨婷<sup>1</sup>,张 娟<sup>1</sup>,李 杨<sup>1</sup>,孙燕飞<sup>1</sup>,雷勇辉<sup>2\*</sup>,王 舜<sup>3</sup>

(1. 石河子大学 生命科学学院,新疆 石河子 832003; 2. 石河子大学 农学院,新疆 石河子 832003;  
3. 新疆出入境检验检疫局,新疆 乌鲁木齐 830063)

**摘要:**为获得对棉花黄萎病菌有拮抗效果的酵母菌株,以230株酵母菌为研究对象,通过平板对峙法和琼脂块法进行筛选,并利用形态特征、生理生化特性和26S rDNA序列分析对其进行鉴定。结果表明,筛选出的6株拮抗酵母菌(ZHB39、19-10、F3、S4B2-13、T1、MLY1)随着黄萎病菌孢子浓度的降低,其抑菌活性增加,当黄萎病菌孢子浓度为 $10^4$  cfu/mL时,拮抗酵母菌的抑菌圈直径最大,分别为12.50、13.83、16.33、25.17、21.83、11.17 mm,均具有较好的抑菌能力。6株拮抗酵母菌株分别被鉴定为美极梅奇酵母(*Metschnikowia pulcherrima*)、*Kazachstania* sp.、美极梅奇酵母、威克汉姆酵母(*Wickerhamomyces anomalus*)、葡萄汁有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*)、*Barnettozyma californica*。

**关键词:**棉花; 黄萎病菌; 生物防治; 拮抗; 酵母菌; 鉴定

**中图分类号:**S435.621   **文献标志码:**A   **文章编号:**1004-3268(2018)11-0066-07

## Screening and Identification of Antagonistic Yeasts against *Verticillium dahliae*

WEN Yuting<sup>1</sup>, ZHANG Yao<sup>1</sup>, LI Yang<sup>1</sup>, SUN Yanfei<sup>1</sup>, LEI Yonghui<sup>2\*</sup>, WANG Chong<sup>3</sup>

(1. College of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi 832003, China; 2. Agricultural College of Shihezi

University, Shihezi 832003, China; 3. Xinjiang Entry & Exit Inspection and Quarantine Bureau, Urumqi 830063, China)

**Abstract:** To obtain some yeasts that antagonized against *Verticillium dahliae*, 230 yeast strains were screened by plate confrontation method and agar block method, and then identified through morphologic observation, physiological and biochemical character determination and 26S rDNA sequence analysis. The study showed that 6 antagonistic yeast strains were screened out, which were named ZHB39, 19-10, F3, S4B2-13, T1 and MLY1. With the decrease of spore concentration of *Verticillium dahliae*, the 6 antagonistic yeast strains increased its antibacterial activity. And the diameters of bacteriostatic rings formed by antagonistic yeasts screened in this experiment reached the maximum when the spore concentration of *Verticillium dahliae* was  $10^4$  cfu/mL, which were respectively 12.50, 13.83, 16.33, 25.17, 21.83, 11.17 mm. All of them performed good bacteriostatic effects. The result of identification showed that the 6 strains were respectively *Metschnikowia pulcherrima*, *Kazachstania* sp., *Metschnikowia pulcherrima*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Hanseniaspora uvarum* and *Barnettozyma californica*.

**Key words:** Cotton; *Verticillium dahliae*; Biological control; Antagonism; Yeast; Identification

棉花是我国重要的经济作物之一,在我国的农业经济中占有举足轻重的地位。新疆是我国最大的

棉花产区,随着新疆棉花生产的规模化和棉花轮作模式的普及化<sup>[1]</sup>,棉花黄萎病的发生变得更加迅

收稿日期:2018-06-13

基金项目:国家自然科学基金项目(31860003);石河子大学2014年高层次人才科研启动资金专项(RCZX201427);新疆特色植物基因资源研究与利用创新团队项目(2014CC005)

作者简介:文雨婷(1998-),女,重庆人,在读本科生,研究方向:微生物资源利用与开发。E-mail: 2414673136@qq.com

\*通讯作者:雷勇辉(1978-),男,湖南宜章人,讲师,硕士,主要从事生物学研究。E-mail: 497976@qq.com

猛。棉花黄萎病的发病期明显提前,并且危害显著加重,已经严重地制约新疆棉花生产的可持续发展。

棉花黄萎病是由大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)引起的一种土传真菌病害,病菌具有分布广、危害重、寄主范围宽、传播途径多、存活时间久等特点<sup>[2-3]</sup>,现阶段缺乏有效防治棉花黄萎病的手段。除了对棉花黄萎病抗性的研究,生产中多使用化学农药防治棉花黄萎病,但该方法存在严重的环境破坏问题<sup>[4-5]</sup>,生物防治可降低甚至避免这些危害。前人已筛选得到许多对棉花黄萎病菌有较好防治作用的生防菌株,主要有木霉(*Trichoderma*)<sup>[6]</sup>、芽孢杆菌(*Bacillus*)<sup>[7]</sup>、假单胞菌(*Pseudomonas*)<sup>[8]</sup>、链霉菌(*Streptomyces*)<sup>[9]</sup>、毛壳菌(*Chaetomium*)<sup>[10]</sup>等。一些研究证明,从植物内部、表皮及根际分离出的微生物可以在一定程度上直接或间接降低植物病原菌的危害<sup>[11-13]</sup>,而酵母菌是植物附生微生物的重要组成部分,较其他微生物而言具有遗传稳定、抑菌谱广、抗逆性强、安全性高等特点,因此常被用作病原菌的生物控制剂<sup>[14-16]</sup>。目前,利用酵母菌防治棉花黄萎病的研究鲜有报道,同时由于生防菌剂具有明显的地域性,跨地域使用往往效果欠佳。新疆地区含有丰富的酵母菌资源,因此,以新疆地区分离的酵母菌株为对象,筛选能够抑制棉花黄萎病菌生长的酵母菌,为利用酵母菌防治棉花黄萎病提供理论依据和实践基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

菌株:石河子大学生命科学学院微生物生态实验室保存的黄萎病菌 VD911 及从新疆地区果园、甜菜地、活性污泥等土壤中或水果表皮分离纯化获得的 230 株酵母菌。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基、酵母浸出粉胨葡萄糖(YEPD)培养基、糖类发酵培养基、碳源同化培养基。

### 1.2 拮抗酵母菌的筛选

采用平板对峙法<sup>[17-18]</sup>,在 PDA 固体培养基中心放置直径为 8 mm 的黄萎病菌菌饼,将待筛选酵母菌点接于距菌饼 2.5 cm 处,以不接种酵母菌的培养基为空白对照,观察酵母菌附近黄萎病菌菌丝生长的情况。琼脂块法参照文献[19],挑取直径为 7 mm、有抑菌活性的酵母菌菌饼,分别接种于孢子浓度为  $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$  cfu/mL(挑取黄萎病菌菌丝于 PDA 液

体培养基中,培养 7 d,用 4 层纱布过滤,收集孢子滤液,计数待用)的黄萎病菌平板上,7 d 后观察拮抗酵母菌的抑菌效果并测量其抑菌圈直径,每组试验重复 3 次。

### 1.3 拮抗酵母菌形态观察及生理生化特性检测

将筛选获得的酵母菌株在 YEPD 培养基平板上划线接种,28 ℃ 培养 2~5 d 后进行菌落形态观察,记录菌落特征;将菌种接种于 YEPD 液体培养基中,28 ℃ 振荡培养 24 h,取样在显微镜下观察菌体形态。酵母菌的生理生化鉴定方法参照《The yeasts: A taxonomic study》<sup>[20]</sup>。

### 1.4 拮抗酵母菌系统发育分析

将筛选获得的酵母菌接种于 20 mL YEPD 液体培养基中,28 ℃ 培养过夜,离心收集菌体,用十六烷基三甲基溴化铵(Cetyl trimethyl ammonium bromide, CTAB)法提取 DNA 后进行 26S rDNA 的 PCR 扩增。扩增采用酵母 26S rDNA 通用引物 NL - 1: 5' - GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG - 3' 和 NL - 4: 5' - GGTCCGTGTTCAAGACGG - 3'。PCR 体系及程序参照文献[21]并加以改进。扩增体系共 25 μL: 10 × Taq Buffer 2.5 μL, 10 mmol/L dNTP 2 μL, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.5 μL, NL - 1 1 μL, NL - 4 1 μL, DNA 2 μL, Taq DNA 聚合酶 0.625 μL, ddH<sub>2</sub>O 14.375 μL。PCR 程序为: 94 ℃ 10 min; 94 ℃ 1 min, 56 ℃ 45 s, 72 ℃ 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 10 min。将扩增出的 26S rDNA 序列送上海生工生物工程有限公司测序。登录 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)用 BLAST 程序进行序列比对,下载序列,通过 MEGA 6.0 软件进行分析并构建进化树。

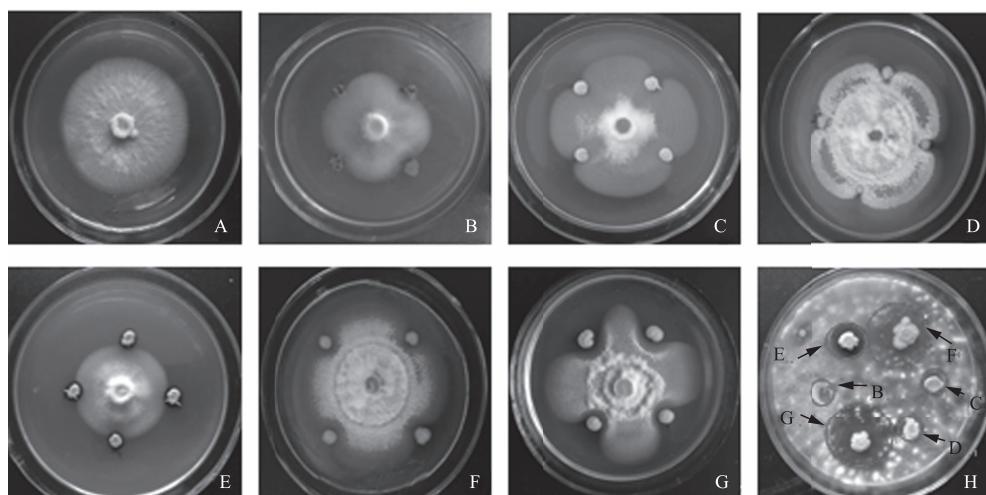
## 2 结果与分析

### 2.1 拮抗酵母菌筛选

通过对峙培养,从 230 株酵母菌筛选获得 ZHB39、19-10、F3、S4B2-13、T1、MLY1 共 6 株效果较好的拮抗酵母菌株(图 1)。随后在不同孢子浓度的黄萎病菌平板上接种拮抗酵母菌,对比其抑菌圈大小发现,随着黄萎病菌孢子浓度的降低,拮抗酵母菌的抑菌活性增加。当黄萎病菌孢子浓度为  $10^4$  cfu/mL 时,拮抗酵母菌的抑菌圈直径最大,此时 6 株拮抗酵母菌的抑菌圈直径分别为 12.50、13.83、16.33、25.17、21.83、11.17 mm。其中,S4B2-13 的抑菌活性显著优于其他 5 株酵母菌,T1 的抑菌活性显著优于 MLY1、ZHB39、19-10 和 F3,F3 的抑菌活

性显著优于 MLY1、ZHB39 和 19 - 10(表 1)。但由图 1 可知, S4B2 - 13 和 T1 产生的抑菌圈内仍有少

许黄萎病菌菌丝生长,而 F3 形成的抑菌圈中无任何黄萎病菌菌丝的生长。



A:空白对照;B:接种拮抗酵母菌株 MLY1;C:接种拮抗酵母菌株 ZHB39;D:接种拮抗酵母菌株 19 - 10;E:接种拮抗酵母菌株 F3;F:接种拮抗酵母菌株 T1;G:接种拮抗酵母菌株 S4B2 - 13;H:6 株拮抗酵母菌产生的抑菌圈大小

图 1 拮抗酵母菌筛选

表 1 拮抗酵母菌的抑菌圈直径 mm

菌株编号	棉花黄萎病菌孢子浓度/(cfu/mL)		
	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>
S4B2 - 13	18.00 ± 1.41a	21.83 ± 1.94a	25.17 ± 1.47a
T1	13.83 ± 0.98b	17.83 ± 1.83b	21.83 ± 1.94b
F3	12.83 ± 1.17b	15.83 ± 0.75c	16.33 ± 0.82c
19 - 10	10.67 ± 1.21c	12.17 ± 0.41d	13.83 ± 1.17d
ZHB39	10.17 ± 0.75c	11.33 ± 0.82de	12.50 ± 1.05de
MLY1	8.67 ± 0.82d	10.33 ± 1.21e	11.17 ± 0.98e

注:同列不同字母代表不同菌株的抑菌圈直径差异显著( $P < 0.05$ )。

## 2.2 拮抗酵母菌的形态特征

本试验共筛选获得 6 株拮抗棉花黄萎病菌的酵

母菌,其形态特征各不相同(图 2、表 2)。其中 ZHB39、T1 和 MLY1 菌落边缘整齐,而 19 - 10 边缘不整齐,F3 边缘生出类似根状的分支,S4B2 - 13 呈丝状;ZHB39 和 T1 菌落隆起呈枕状,19 - 10 呈脐凹状,F3 隆起呈脐凸状,S4B2 - 13 隆起呈扁平状,MLY1 稍拱起;ZHB39、19 - 10、F3、S4B2 - 13 和 T1 菌落不透明,而 MLY1 呈胶状。ZHB39 和 F3 的菌体形态呈椭圆形,19 - 10 呈圆形,S4B2 - 13 呈鞋形,T1 呈柠檬形,MLY1 呈长杆状。因此,从菌落和菌体的差异上认为筛选出的 6 个拮抗菌株属于不同的酵母菌。

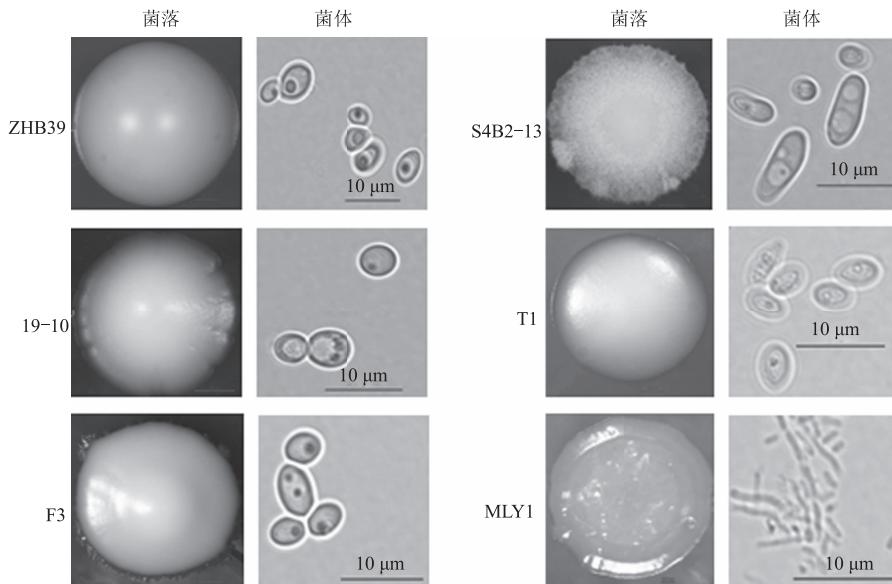


图 2 拮抗酵母菌的菌落和菌体形态

表 2 拮抗酵母菌菌落形态及相近物种序列相似性分析

菌株编号	菌落及菌体形态	相近物种	检索号	遗传相似性/%	E 值
ZHB39	菌落乳白色圆形,不透明,隆起呈枕状;菌体椭圆形	美极梅奇酵母 ( <i>Metschnikowia pulcherrima</i> )	JN051396	99	0
19-10	菌落乳白色不规则,不透明,中间下凹呈脐凹状,边缘波状;菌体圆形	<i>Kazachstania zonata</i>	KP966897	99	0
F3	菌落红色假根状,不透明,中间凸起呈脐凸状;菌体椭圆形	美极梅奇酵母	KY108498	98	0
S4B2-13	菌落白色丝状,不透明,隆起呈扁平状;菌体鞋形	威克汉姆酵母 ( <i>Wickerhamomyces anomalus</i> )	JN248608	100	0
T1	菌落乳白色圆形,不透明,隆起呈枕状,边缘整齐;菌体柠檬形	葡萄汁有孢汉逊酵母 ( <i>Hanseniaspora uvarum</i> )	JQ678688	99	0
MLY1	菌落浅黄色圆形,胶状,稍拱起,边缘整齐;菌体长杆状	<i>Barnetozyma californica</i>	KT225561	100	0

### 2.3 拮抗酵母菌系统发育分析

对 6 株拮抗酵母菌进行 26S rDNA 的 PCR 扩增,获得大小为 500~600 bp 的目的片段,登录 NCBI 网站用 BLAST 程序进行序列比对,发现 ZHB39、19-10、F3、S4B2-13、T1 和 MLY1 的相近物种分别为美极梅奇酵母 (*Metschnikowia pulcherrima*)、*Kazachstania zonata*、美极梅奇酵母、威克汉姆酵母 (*Wicker-*

*hamomyces anomalus*)、葡萄汁有孢汉逊酵母 (*Hanseniaspora uvarum*) 和 *Barnetozyma californica*,其遗传相似性均大于 98%,且 E 值均为 0(表 2)。对拮抗酵母菌和其相似物种利用 MEGA 6.0 软件构建系统发育树,如图 3 所示,19-10 与 *Kazachstania* 属的酵母菌聚集于一个大的遗传分支,但与该属中的标准株距离较远;F3 和 ZHB39 与梅奇酵母属 (*Metschnikowia*)

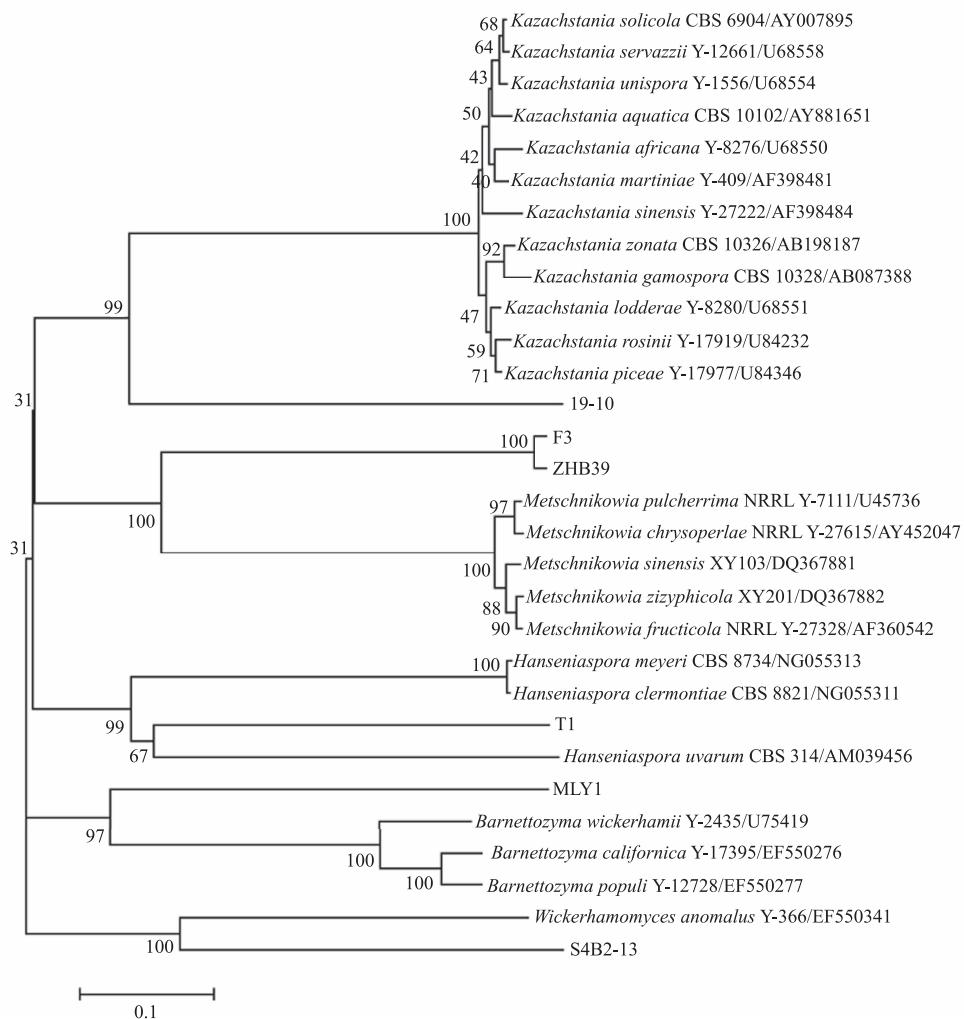


图 3 基于 26S rDNA 序列构建的拮抗酵母菌株的系统发育树

的酵母菌聚集于一个大的遗传分支，并且 F3 和 ZHB39 又形成一个相对独立的遗传分支，亲缘关系较近，但与该属的标准株距离较远；T1 与汉逊酵母属 (*Hanseniaspora*) 的酵母菌聚集于一个大的遗传分支，并与葡萄汁有孢汉逊酵母在该遗传分支中进一步形成一个相对独立的遗传分支；MLY1 与 *Barnetozyma* 属的酵母菌聚集于一个大的遗传分支，但与该属中的标准株距离较远；S4B2-13 与威克汉姆酵母聚集于一个遗传分支。因此，初步认为 ZHB39、19-10、F3、S4B2-13、T1 和 MLY1 这 6 株拮抗酵母菌分别为梅奇酵母菌 (*Metschnikowia* sp.)、*Kazachstania* sp.、梅奇酵母菌、威克汉姆酵母、葡萄汁有孢汉逊酵母和 *Barnetozyma* sp.。

#### 2.4 拮抗酵母菌的生理生化特性

根据 6 株酵母菌的系统发育分析结果，并参照《The yeasts: A taxonomic study》<sup>[20]</sup> 手册，进一步对 6 株酵母菌进行相关生理生化特性检测，对其种属地位进行最终确定。糖发酵试验表明，6 株拮抗酵母菌均可利用葡萄糖进行发酵，但 S4B2-13 还能利用蔗糖进行发酵，19-10 还能利用蔗糖、麦芽糖和棉籽糖进行发酵（表 3）。碳源利用试验结果表明（表 4），ZHB39 和 F3 均能利用葡萄糖、蔗糖、半乳糖、海藻糖、乙醇、甘油、D-甘露醇、麦芽糖、松三糖、甲基-吡喃葡萄糖、纤维二糖、水杨苷、D-山梨醇、琥珀酸钠、柠檬酸盐、葡萄糖酸盐、D-葡萄糖胺和鲸蜡烷等碳源进行同化作用，19-10 能利用葡萄糖、菊粉、蔗糖、棉籽糖和麦芽糖等碳源进行同化作用，S4B2-13 能利用葡萄糖、蔗糖、棉籽糖、海藻糖、

乙醇、甘油、赤藓糖醇、麦芽糖、松三糖、甲基-吡喃葡萄糖、可溶性淀粉、纤维二糖、水杨苷、D-甘露醇、D-山梨醇、乳酸钠、琥珀酸钠和柠檬酸盐等碳源进行同化作用，T1 能利用葡萄糖、纤维二糖和水杨苷等碳源进行同化作用，MLY1 能利用葡萄糖、乙醇、甘油、D-甘露醇、纤维二糖、水杨苷、L-山梨糖、D-木糖、乳酸钠、琥珀酸钠和葡萄糖酸盐等碳源进行同化作用。温度、高渗、尿素酶、无维生素等生理生化特性检测结果表明（表 5），除 MLY1 最适生长温度为 28 ℃ 外，其余酵母菌均为 38 ℃；6 株酵母菌均能在 50% 葡萄糖培养基中生长，不能在无维生素培养基中生长；ZHB39、19-10、F3 能产生弱的尿素酶反应，MLY1 产生强尿素酶反应，S4B2-13 和 T1 不能进行尿素酶反应。经鉴定，19-10 是 *Kazachstania* sp.，S4B2-13 是威克汉姆酵母，T1 是葡萄汁有孢汉逊酵母，MLY1 是 *Barnetozyma californica*，ZHB39 和 F3 是美极梅奇酵母。6 株拮抗酵母菌的一些生理生化特性如温度、尿素酶反应等与《The yeasts: A taxonomic study》<sup>[20]</sup> 上记录的略有差异，推测可能是同一个种不同亚种之间的区别。

表 3 拮抗酵母菌糖发酵检测结果

菌株编号	葡萄糖	半乳糖	蔗糖	麦芽糖	乳糖	棉籽糖	海藻糖
ZHB39	+	v	-	-	-	-	-
19-10	+	-	+	+	-	+	-
F3	+	v	-	-	-	-	-
S4B2-13	+	v	+	v	-	v	-
T1	+	-	-	-	-	-	-
MLY1	+	-	-	-	-	-	-

注：+ 代表发酵；v 代表部分发酵，部分不发酵；- 代表不发酵。

表 4 拮抗酵母菌碳源利用试验结果

碳源	菌株编号					
	ZHB39	19-10	F3	S4B2-13	T1	MLY1
葡萄糖	+	+	+	+	+	+
菊粉	—	+	—	—	—	—
蔗糖	+	w	+	+	—	v
棉籽糖	—	+	—	+	—	—
蜜二糖	—	—	—	—	—	—
半乳糖	+	—	+	v	—	—
乳糖	—	—	—	—	—	—
海藻糖	+	—	+	+	—	v
麦芽糖	+	+	+	+	—	v
松三糖	+	—	+	+	—	—
甲基-吡喃葡萄糖	+	—	+	+	—	v
可溶性淀粉	—	—	—	+	—	—
纤维二糖	+	—	+	+	+	+
水杨苷	+	—	+	+	+	+
L-山梨糖	v	—	v	—	—	+
L-鼠李糖	—	n	—	—	—	v
D-木糖	v	—	v	v	—	+
L-树胶醛糖	—	—	—	—	—	—
碳源	菌株编号					
	ZHB39	19-10	F3	S4B2-13	T1	MLY1
D-核糖	v	—	v	v	—	—
甲醇	—	n	—	—	—	—
乙醇	+	—	+	+	—	+
甘油	+	—	+	+	—	+
赤藓糖醇	—	—	—	+	—	—
核糖醇	v	—	v	v	—	—
半乳糖醇	—	—	—	—	—	—
D-甘露醇	+	—	+	+	—	+
D-树胶醛糖	—	—	—	—	—	—
D-山梨醇	+	—	+	+	v	v
肌醇	—	—	—	—	—	—
乳酸钠	v	—	v	+	—	+
琥珀酸钠	+	—	+	+	—	+
柠檬酸盐	+	—	+	+	—	v
葡萄糖酸盐	+	—	+	v	v	+
葡萄糖醛	v	—	v	—	—	—
D-葡萄糖胺	+	—	+	—	n	—
鲸蜡烷	+	n	+	—	n	—

注：+ 代表强同化；w 代表弱同化；v 代表部分同化，部分不同化；— 代表不同化；n 代表无数据。

表 5 拮抗酵母菌部分生理生化特性检测结果

菌株编号	最适生长温度/℃	在 50% 葡萄糖中生长	尿素酶反应	无维生素
ZHB39	38	+	w	-
19 - 10	38	+	w	-
F3	38	+	w	-
S4B2 - 13	38	+	-	-
T1	38	+	-	-
MLY1	28	+	+	-

注: + 代表生长或反应; w 代表弱生长或弱反应; - 代表不生长或不反应。

### 3 结论与讨论

本研究共获得 6 株拮抗棉花黄萎病菌的酵母菌, 分别为 ZHB39、19 - 10、F3、S4B2 - 13、T1 和 MLY1, 经鉴定, 19 - 10 是 *Kazachstania* sp., S4B2 - 13 是威克汉姆酵母 (*Wickerhamomyces anomalus*), T1 是葡萄汁有孢汉逊酵母 (*Hanseniaspora uvarum*), MLY1 是 *Barnettozyma californica*, ZHB39 和 F3 是美极梅奇酵母 (*Metschnikowia pulcherrima*)。6 株拮抗酵母菌在黄萎病菌孢子浓度为  $10^4$  cfu/mL 时, 抑菌圈直径最大, 分别为 12.50、13.83、16.33、25.17、21.83、11.17 mm, 均具有较好的抑菌能力。

近年来, 有许多关于酵母菌防治植物病害的研究报道, 尤其在酵母菌对水果采后病害的防治中, 斯莎莎等<sup>[22]</sup>筛选出 1 株抑制草莓灰霉病和根霉病的拮抗酵母菌卡利比克毕赤酵母 (*Pichia caribbica*), 并且发现在一定条件下, 灰霉病和根霉病的腐烂率可被完全抑制; 高云慨等<sup>[23]</sup>研究表明, 季也蒙毕赤酵母 (*Meyerozyma guilliermondii*) 可有效抑制芒果炭疽病。已报道的拮抗酵母菌主要有红酵母菌 (*Rhodotorula* sp.)<sup>[24]</sup>、葡萄汁有孢汉逊酵母菌<sup>[25]</sup>、梅奇酵母菌 (*Metschnikowia* sp.)<sup>[26]</sup>、柠檬克勒克酵母菌 (*Kloeckera apiculata*)<sup>[27]</sup>、隐球酵母菌 (*Cryptococcus* sp.)<sup>[28]</sup>、假丝酵母菌 (*Candida* sp.)<sup>[29]</sup>等。而关于 *Kazachstania* sp. 和 *Barnettozyma californica* 防治植物病害的研究几乎没有报道, 威克汉姆酵母菌多用于发酵, 也几乎没有关于防治植物病害的研究, 本研究发现 *Kazachstania* sp.、威克汉姆酵母菌、*Barnettozyma californica* 对于棉花黄萎病菌有一定的抑制作用, 这对酵母菌防治植物病害的研究具有重要意义。在酵母抑制植物病原菌的研究中, 张建等<sup>[30]</sup>发现, 德巴利酵母菌 (*Debaryomyces* sp.) I8 对蟠桃根腐病菌的抑菌圈直径为 17.20 mm; 任少东等<sup>[31]</sup>发现, 拮抗酵母菌对致病菌的平均抑菌圈直径为 20~30 mm。在生防菌抑制棉花黄萎病菌的研究中, 陈丽华等<sup>[32]</sup>试验结果表明, 内生芽孢杆菌 LH-

L3 对棉花黄萎病菌的抑菌圈直径为 25.00 mm; 刘海洋等<sup>[33]</sup>试验结果表明, 甲基营养型芽孢杆菌 AL7 的脂肽粗提取物对棉花黄萎病菌的抑菌圈直径为 36.1 mm; 金利容等<sup>[34]</sup>试验结果表明, 内生恶臭假单胞菌 HB3S - 20 菌株对棉花黄萎病菌的抑菌圈直径为 13.70 mm。本试验筛选出的拮抗酵母菌 S4B2 - 13 对棉花黄萎病菌的抑菌圈直径为 25.17 mm, T1 对棉花黄萎病菌的抑菌圈直径为 21.83 mm, 均具有较强的抑菌效果, 可进一步进行盆栽试验验证。

本研究共获得 6 株拮抗棉花黄萎病菌的酵母菌株, 其中 ZHB39 和 F3 均属于美极梅奇酵母, 但两者间的抑菌能力有差异, 并且菌落形态也不相同, 推测 ZHB39 和 F3 可能属于同种间不同亚种, 因此, 下一步应对其抑制黄萎病菌的有效成分进行检测和确定。19 - 10 的生理生化特性与 *Kazachstania* sp. 中相似种的生理生化特性均有差异, 故很有可能是新菌种, 还需进一步进行 5.8S - ITS 序列分析和更多理化因子测定。对于拮抗酵母的拮抗因子和抑菌效果, 还需要进一步进行代谢产物分离检测和相应的盆栽及大田试验。

### 参考文献:

- [1] 喻树迅,周亚立,何磊.新疆兵团棉花生产机械化的发展现状及前景[J].中国棉花,2015,42(8):1-4,7.
- [2] 热艳古丽·亥尼.对目前棉花抗黄萎病机制的分析[J].江西农业,2016(7):9.
- [3] 许爱玲,段国琪,张战备,等.山西棉田黄萎病菌致病力差异研究[J].山西农业科学,2013,41(2):172-174.
- [4] 杨璨,孙全,王微娜,等.海岛棉单萜合酶基因克隆及其受黄萎病诱导的表达分析[J].南方农业学报,2016,47(5):604-610.
- [5] 张兴好.浅谈农药的危害性及绿色植保技术[J].农民致富之友,2017(2):55.
- [6] 张海军,李泽方.绿色木霉 GY20 对棉花黄萎病菌的抑制机理及温室防效[J].江西农业学报,2011,23(7):127-128,132.
- [7] 张冬冬,李术娜,郭晓军,等.一株棉花黄萎病拮抗芽孢细菌的分离鉴定及活性检测[J].棉花学报,2012,24(4):358-362.
- [8] Martínez-García P M, Ruano-Rosa D, Schilirò E, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas fluorescens* strain PICF7, an indigenous root endophyte from olive (*Olea europaea* L.) and effective biocontrol agent against *Verticillium dahliae*[J]. Standards in Genomic Sciences, 2015,10(1):10.
- [9] Cao P, Liu C, Sun P, et al. An endophytic *Streptomyces* sp. strain DHV3-2 from diseased root as a potential bio-

- control agent against *Verticillium dahliae* and growth elicitor in tomato (*Solanum lycopersicum*) [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2016, 109 (12): 1573-1582.
- [10] 张芸, 冯自力, 冯鸿杰, 等. 内生球毛壳属真菌 CEF - 082 对棉花黄萎病的控制作用 [J]. 植物病理学报, 2016, 46 (5): 697-706.
- [11] Rocha A C S, Garcia D, Uetanabaro A P T, et al. Foliar endophytic fungi from *Hevea brasiliensis* and their antagonism on *Microcyclus ulei* [J]. Fungal Diversity, 2011, 47 (1): 75-84.
- [12] Wang B, Yuan J, Zhang J, et al. Effects of novel bioorganic fertilizer produced by *Bacillus amyloliquefaciens* W19 on antagonism of *Fusarium* wilt of banana [J]. Biology and Fertility of Soils, 2013, 49 (4): 435-446.
- [13] Liu K, Garrett C, Fadamiro H, et al. Antagonism of black rot in cabbage by mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) [J]. BioControl, 2016, 61 (5): 605-613.
- [14] Zhang D P, Lu C G, Zhang T T, et al. *Candida pruni* sp. nov. is a new yeast species with antagonistic potential against brown rot of peaches [J]. Archives of Microbiology, 2014, 196 (7): 525-530.
- [15] De Melo E A, De Lima R, Mariano R, et al. Efficacy of yeast in the biocontrol of bacterial fruit blotch in melon plants [J]. Tropical Plant Pathology, 2015, 40 (1): 56-64.
- [16] Ou C, Liu Y, Wang W, et al. Integration of UV-C with antagonistic yeast treatment for controlling post-harvest disease and maintaining fruit quality of *Ananas comosus* [J]. BioControl, 2016, 61 (5): 591-603.
- [17] 张妙宜, 陈志杰, 陈宇丰, 等. 1 株拮抗细菌的分离鉴定及其对香蕉枯萎病等病原菌的抑制活性测定 [J]. 热带作物学报, 2017, 38 (11): 2151-2159.
- [18] 张梦君, 黎继烈, 申爱荣, 等. 亚麻立枯病拮抗菌的筛选、生防效果及发酵条件优化 [J]. 微生物学通报, 2017, 44 (5): 1099-1107.
- [19] 来娜娜, 朱文豪, 刘政, 等. 新疆棉花黄萎病拮抗放线菌的分离与筛选 [J]. 江苏农业科学, 2015, 43 (1): 119-121.
- [20] Kurtzman C P, Fell J W, Boekhout T. The yeasts: A taxonomic study [M]. 5th ed. London: Elsevier Science, 2011: 1-107.
- [21] 胡芹, 杨晓红, 郭冬琴, 等. 橙汁中两株条件致病酵母菌形态及分子鉴定 [J]. 食品科学, 2011, 32 (9): 231-235.
- [22] 靳莎莎, 庞水秀, 赵利娜, 等. 一株拮抗酵母的筛选鉴定及其对草莓采后病害的生防效果(英文) [J]. 食品科学, 2013, 34 (13): 202-208.
- [23] 高云慨, 张荣意, 钟利文, 等. 1 株新分离拮抗酵母菌株对芒果炭疽病生防效果及其分类鉴定 [J]. 热带生物学报, 2015, 6 (1): 47-52.
- [24] Hu H, Yan F, Wilson C, et al. The ability of a cold-adapted *Rhodotorula mucilaginosa* strain from Tibet to control blue mold in pear fruit [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2015, 108 (6): 1391-1404.
- [25] 周海莲. 葡萄有孢汉逊酵母 (*Hanseniaspora uvarum*) 对灰霉病抑制机理的探讨 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [26] 王亮, 薛梦林, 施俊凤, 等. 梅奇酵母 XY201 菌株对采后冬枣黑斑病和青霉病的抑制效果 [J]. 园艺学报, 2010, 37 (10): 1583-1590.
- [27] Liu P, Cheng Y, Yang M, et al. Mechanisms of action for 2-phenylethanol isolated from *Kloeckera apiculata* in control of *Penicillium* molds of citrus fruits [J]. BMC Microbiology, 2014, 14 (1): 242.
- [28] 胡浩. 西藏罗伦隐球酵母对水果采后病害的防治效果及相关机理研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- [29] 郑芳园. 间型假丝酵母 C410 产生挥发性抗真菌物质的条件优化及其对草莓储藏期病害的防治研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
- [30] 张建, 李宝坤, 毛晓英. 蟠桃根腐病拮抗酵母菌的筛选与鉴定 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36 (35): 15557-15558, 15570.
- [31] 任少东, 王群霞, 任晓镤. 南疆鲜枣采后病害拮抗酵母菌的筛选及初步鉴定 [J]. 轻工标准与质量, 2014 (2): 46-48.
- [32] 陈丽华, 袁德超, 吴毅歆, 等. 棉花黄萎病生防内生芽孢杆菌 LH - L3 的分离鉴定 [J]. 棉花学报, 2017, 29 (6): 550-559.
- [33] 刘海洋, 王琦, 王伟, 等. 拮抗菌 AL7 的鉴定及其生防特性的初步研究 [J]. 植物保护, 2018, 44 (2): 53-60.
- [34] 金利容, 万鹏, 黄薇. 棉花内生细菌 HB3S - 20 对棉花黄萎病的生防效果评估及其鉴定 [J]. 河南农业科学, 2018, 47 (3): 70-75.