

# 食线虫真菌蠕虫埃斯特菌对植物寄生线虫的侵染特性

王婷婷<sup>1</sup> 王 暄<sup>1</sup> 王金成<sup>2</sup> 李 鸿<sup>1</sup> 李红梅<sup>1\*</sup>

(1. 南京农业大学植物保护学院, 农作物生物灾害综合治理教育部重点实验室, 南京 210095;

2. 天津出入境检验检疫局, 天津 300461)

**摘要:** 为评价食线虫真菌蠕虫埃斯特菌 *Esteya vermicola* 菌株 NKF 13222 的生防应用价值, 采用 2% 水琼脂培养基平板接种法测定了该菌株对 7 种植物寄生线虫的诱引、黏附和侵染能力, 并比较了其对不同线虫的侵染特性。结果显示, 该菌株的菌丝对松材线虫、拟松材线虫、腐烂茎线虫和水稻干尖线虫均有诱引作用, 而对南方根结线虫、禾谷孢囊线虫和穿刺短体线虫无诱引作用; 菌株的粘性分生孢子对有诱引现象的 4 种线虫都能黏附, 接种 24 h 后的黏附率达到 82% ~ 99%, 对无诱引现象的 3 种线虫不能黏附; 粘性分生孢子黏附虫体后对不同线虫的侵染力存在差异, 接种 7 d 后的松材线虫死亡率可达 98%, 而拟松材线虫、腐烂茎线虫和水稻干尖线虫死亡率分别为 43%、35% 和 9%。表明蠕虫埃斯特菌不仅是松材线虫的强内寄生真菌, 而且对其它重要植物寄生线虫也具有一定的应用潜力。

**关键词:** 食线虫真菌; 蠕虫埃斯特菌; 黏附; 侵染; 植物寄生线虫

## Infection characteristics of nematophagous fungus *Esteya vermicola* to plant parasitic nematodes

Wang Tingting<sup>1</sup> Wang Xuan<sup>1</sup> Wang Jincheng<sup>2</sup> Li Hong<sup>1</sup> Li Hongmei<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Integrated Management of Crop Diseases and Pests, Ministry of Education; College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China;

2. Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tianjin 300461, China)

**Abstract:** In order to explore the biocontrol potency of the nematophagous fungus *Esteya vermicola* strain NKF 13222, the characteristics of attraction, attachment and infection towards seven plant parasitic nematodes were evaluated by inoculating nematodes on 2% water agar plates with fungus. The results showed that the mycelia of strain NKF 13222 attracted the juveniles of *Bursaphelenchus xylophilus*, *B. mucronatus*, *Ditylenchus destructor* and *Aphelenchoides besseyi* instead of *Meloidogyne incognita*, *Heterodera avenae* and *Pratylenchus penetrans*. Lunate conidia of strain NKF 13222 were found to be attached on the bodies of four attracted nematode species 24 hours after inoculation, and their rate of attachment ranged between 82% – 99%, while no attachments were observed in case of non-attracted nematode species. The infection ability of lunate conidia varied significantly among different nematode species. The infection rates of spores for *B. xylophilus*, *B. mucronatus*, *D. destructor* and *A. besseyi* were 98%, 43%, 35% and 9% at seventh day after inoculation, respectively. The study proved that

基金项目: 国家自然科学基金(31371922), 国家公益性行业(农业)科研专项(201103018)

作者简介: 王婷婷, 女, 1989年生, 硕士研究生, 研究方向为植物病原线虫学, E-mail: ting379569444@163.com

\* 通讯作者(Author for correspondence), E-mail: lihm@njau.edu.cn

收稿日期: 2014-02-08

*E. vermicola* strain NKF 13222 not only had a high infectivity against *B. xylophilus*, but could act as an alternative biocontrol agent for some other plant parasitic nematodes.

**Key words:** nematophagous fungus; *Esteya vermicola*; attachment; infection; plant parasitic nematodes

植物寄生线虫是农作物、蔬菜、果树、林木、花卉及药材的重要病原生物,传播广泛,危害严重,常给农林业生产带来巨大的经济损失<sup>[1]</sup>,全球每年因植物病原线虫造成的直接经济损失高达 1 570 亿美元<sup>[2]</sup>。化学杀线剂虽然对植物寄生线虫有良好的防治效果,但存在破坏生态环境、危害人畜安全、长期使用易产生线虫抗药性等问题,使其应用受到限制,而采用生物防治手段防治线虫病害,可以保护生态环境,保证农业可持续发展<sup>[3]</sup>。国内外已有许多植物线虫病害生物防治方面的研究,并筛选出大量的生防微生物,如细菌、真菌、放线菌、原生动物、捕食性线虫等<sup>[4]</sup>,其中食线虫真菌是自然界中线虫种群控制的重要因子<sup>[5]</sup>,利用食线虫真菌资源开发生物杀线虫剂的研究日益受到重视。

食线虫真菌能寄生、捕捉、定殖和毒害线虫,依据侵害线虫的习性又分为捕食线虫真菌、内寄生真菌、机会真菌和产毒真菌 4 大族群<sup>[5]</sup>。内寄生真菌是指通过成囊孢子、粘性分生孢子和吞食孢子等特殊的孢子寄生游离活动线虫的一类真菌<sup>[5]</sup>,其中,蠕虫埃斯特菌 *Esteya vermicola* Liou, Shih & Tzean 是 1999 年首次由台湾报道寄生松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 的内寄生真菌<sup>[6]</sup>,隶属半知菌亚门 Deuteromycotina 丝孢纲 Hyphomycetes 埃斯特属 *Esteya*,对松材线虫具有较强的侵染力。随后捷克和韩国也先后分离到该菌并进行了研究<sup>[7-8]</sup>,证明蠕虫埃斯特菌具有较高的生防开发潜力。2011 年 5 月本研究室从巴西进境木质包装材料中截获的鲁尔夫伞滑刃线虫 *B. rainulfi* Braasch & Burgermeister<sup>[9]</sup> 体内分离得到一株内寄生真菌(编号 NKF 13222),经形态学特征比较和分子特征分析,鉴定为蠕虫埃斯特菌 *E. vermicola*<sup>[10]</sup>。为探索蠕虫埃斯特菌菌株 NKF 13222 的生防应用价值,本试验采用 2% 水琼脂培养基平板接种法测定了该菌株对 7 种重要植物寄生线虫的诱引、黏附和侵染能力,旨在为其作为一种潜在的生防资源提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基;葡萄糖 18 g、马铃薯 200 g、琼脂

17 g、水 1 000 mL;0.2% 水琼脂(water agar, WA)培养基:琼脂 20 g、水 1 000 mL。按标准方法配制后高压蒸汽灭菌备用。

供试菌株:蠕虫埃斯特菌菌株 NKF 13222 经 PDA 培养基单孢子纯化培养后,于 PDA 培养基扩繁,保存于南京农业大学植物线虫研究室 4 ℃ 冰箱。灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 菌株源自本研究室菌株保藏。

供试线虫:共选用 7 种植物寄生线虫,其中,水稻干尖线虫 *Aphelenchoides besseyi*、松材线虫 *B. xylophilus*、拟松材线虫 *B. mucronatus* 均由本研究室保藏,在长满灰葡萄孢的 PDA 培养基上生长 1~2 周后,用贝曼漏斗法分离线虫,24 h 后收集线虫悬浮液;腐烂茎线虫 *Ditylenchus destructor* 分离自江苏徐州发病甘薯块根,在新鲜紫薯内重新培养,用浅盘法分离 24 h 后,收集线虫悬浮液;禾谷孢囊线虫 *Heterodera avenae* 的孢囊分离自江苏沛县田间采集的病土,用漂浮过筛法分离,收集孢囊并置于铺有湿润滤纸的灭菌培养皿中,于 5 ℃ 冰箱中放置 8 周,再转移至 15 ℃ 恒温培养箱中,孵化出 2 龄幼虫备用;南方根结线虫 *Meloidogyne incognita* 来自于本研究室温室番茄保存虫种,分离自番茄根部卵块,置于 25 ℃ 恒温培养箱孵化 2 d 后,收集并制备 2 龄幼虫悬浮液;穿刺短体线虫 *Pratylenchus penetrans* 由天津出入境检验检疫局提供,分离自玉米根围土壤。所有收集的线虫悬浮液均用 0.5% NaClO 消毒 2 次,用清水洗涤 3 次后备用。

仪器:Leica MZ95 体视显微镜,德国 Leica Microsystems IR GmbH 公司;Olympus BX51 显微镜,日本 Olympus 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌株 NKF 13222 对线虫的诱引能力

菌株 NKF 13222 和灰葡萄孢菌株共同接种在 PDA 平板上,25 ℃ 培养 1 周后,各自菌落生长良好,没有产生拮抗抑菌圈,说明二者能在 PDA 平板上亲和生长。选取直径约为 1 cm 的菌丝块,接种在直径为 9 cm 的 WA 平板上。试验设 3 组菌株处理:①将灰葡萄孢菌丝块接种到新鲜 WA 平板的中央;②将菌株 NKF 13222 菌丝块接种到新鲜 WA 平板的中央;③将灰葡萄孢菌丝块和菌株 NKF 13222 菌丝块同时接种到新鲜的 WA 平板中,菌丝块之间相距

5 cm,与培养皿边缘相距 1 cm。以琼脂块接种到 WA 平板为对照处理。所有接种菌丝块平板封口后置于 25 °C 黑暗培养 24 h,便于菌丝释放渗出性物质。随后在第①~②组平板内,距接种菌块 2 cm 处分别加入各线虫悬浮液 10  $\mu$ L(约 150 条线虫),在第③组平板内 2 菌块等距中间处,各加入 10  $\mu$ L 线虫悬浮液。密封后的平板置于 25 °C 黑暗培养 24 h 后,在体视显微镜下用挑针轻轻将菌块移走,统计游动到菌块下的线虫数量。试验 3 次重复。

### 1.2.2 菌株 NKF 13222 粘性分生孢子的黏附能力

将纯培养于 PDA 平板上的菌株 NKF 13222 接种到新鲜的 2% WA 平板上,25 °C 培养箱中培养 8~10 d 长出直径约为 2.5 cm 的菌落。在超净工作台内,分别将 7 种供试线虫的悬浮液 20  $\mu$ L(约 300 条线虫)均匀接种至菌落四周。接种后于 8、16、24 h 随机从各平板中挑取 50 条线虫至载玻片上,置于显微镜下观察菌株 NKF 13222 粘性分生孢子对线虫的黏附情况并拍照,统计被孢子黏附的线虫数量,记录线虫体壁的粘性分生孢子量及粘性强度,分别计算 8、16、24 h 的黏附率。黏附率 = 被黏附线虫数量/接种线虫总数  $\times$  100%。

### 1.2.3 菌株 NKF 13222 粘性分生孢子的侵染能力

菌落平板培养方法和线虫接种方法同上,每种线虫接种 3 个菌落平板,以不同线虫接种到 2% WA 平板上为对照,设 3 次重复。接种后于 3、5、7 d 分别随机挑取各平板内 50 条线虫,在显微镜下观察侵染

和致死情况并拍照,计算线虫侵染率。当菌丝在线虫体内生长并穿透线虫体壁向外生长产孢,且在物理刺激下线虫没有任何反应时,判断线虫为死亡。侵染率 = (被侵染线虫死亡个数 - 对照组线虫死亡个数)/接种线虫总数  $\times$  100%。

### 1.3 数据分析

所有数据均用 DPS 7.05 软件和 SPSS 11.5 软件进行统计分析,采用 One-way ANOVA 进行方差分析,Tukey 检验法比较差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株 NKF 13222 对线虫的诱引能力

24 h 后,菌株 NKF 13222 诱引松材线虫、拟松材线虫、腐烂茎线虫和水稻干尖线虫的数量明显高于南方根结线虫、小麦孢囊线虫和穿刺短体线虫,而灰葡萄孢菌株诱引 7 种线虫的数量差异不显著(表 1)。在菌株 NKF 13222 和灰葡萄孢菌株同时存在的情况下,松材线虫、拟松材线虫、腐烂茎线虫和水稻干尖线虫具有明显的偏向性,游动到菌株 NKF 13222 菌块下的线虫数量,显著高于游动到灰葡萄孢菌块下的线虫数量,表明菌株 NKF 13222 对这 4 种线虫具有较强的诱引能力,而其它 3 种线虫的游动数量对 2 个菌株无显著差异。与对照处理相比,2 个菌株共同存在处理的 7 种线虫,游动到灰葡萄孢菌块下的线虫数量与游动到琼脂块下的线虫数量之间无显著差异。

表 1 蠕虫埃斯特菌与灰葡萄孢菌 24 h 对线虫的诱引条数

Table 1 Number of nematodes attracted by *Esteya vermicola* and *Botrytis cinerea* after 24 hours

线虫种类 Nematode species	蠕虫埃斯特菌 <i>E. vermicola</i>	灰葡萄孢菌 <i>B. cinerea</i>	蠕虫埃斯特菌/灰葡萄孢菌 <i>E. vermicola</i> / <i>B. cinerea</i>	灰葡萄孢菌/蠕虫埃斯特菌 <i>B. cinerea</i> / <i>E. vermicola</i>	琼脂块 Agar piece
松材线虫 <i>B. xylophilus</i>	118 $\pm$ 15 a	32 $\pm$ 7 b	102 $\pm$ 8 a	23 $\pm$ 10 bc	5 $\pm$ 1 c
拟松材线虫 <i>B. mucronatus</i>	133 $\pm$ 12 a	25 $\pm$ 3 b	113 $\pm$ 20 a	17 $\pm$ 7 b	4 $\pm$ 2 b
腐烂茎线虫 <i>D. destructor</i>	115 $\pm$ 13 a	26 $\pm$ 7 b	115 $\pm$ 12 a	12 $\pm$ 2 b	7 $\pm$ 1 b
水稻干尖线虫 <i>A. besseyi</i>	130 $\pm$ 14 a	30 $\pm$ 6 b	118 $\pm$ 8 a	18 $\pm$ 5 bc	7 $\pm$ 2 c
南方根结线虫 <i>M. incognita</i>	11 $\pm$ 6 a	16 $\pm$ 7 a	10 $\pm$ 8 a	14 $\pm$ 8 a	9 $\pm$ 4 a
燕麦孢囊线虫 <i>H. avenae</i>	16 $\pm$ 7 a	15 $\pm$ 5 a	12 $\pm$ 4 a	15 $\pm$ 4 a	8 $\pm$ 2 a
穿刺短体线虫 <i>P. penetrans</i>	16 $\pm$ 8 a	13 $\pm$ 4 a	15 $\pm$ 7 a	13 $\pm$ 6 a	10 $\pm$ 3 a

表中数据为平均数  $\pm$  标准差。同行数据后不同字母表示经 Tukey 法检验在  $P < 0.05$  水平差异显著。Data in the table are mean  $\pm$  SD. Different lowercase letters in the same row indicate significant difference at  $P < 0.05$  level by Tukey test.

### 2.2 菌株 NKF 13222 粘性孢子对线虫的黏附能力

菌株 NKF 13222 粘性分生孢子可以黏着在线虫的各个部位,但以头部最多(图 1-a~d),尾部次之(图 1-e~h),身体中段最少,其中粘性分生孢子

对松材线虫(图 1-a, e)、拟松材线虫(图 1-b, f)、腐烂茎线虫(图 1-c, g)和水稻干尖线虫(图 1-d, h)虫体体壁均有黏附性,而对南方根结线虫(图 1-i)、小麦孢囊线虫(图 1-j)和穿刺短体线虫(图 1-k)则无



图 1 蠕虫埃斯特菌粘性分生孢子对不同线虫虫体的黏附能力

Fig. 1 Attachment of lunate conidia of *Esteya vermicola* to the bodies of different nematodes

a ~ d: 分别为松材线虫、拟松材线虫、腐烂茎线虫、水稻干尖线虫的头部; e ~ h: 分别为松材线虫、拟松材线虫、腐烂茎线虫、水稻干尖线虫的尾部; i ~ k: 分别为南方根结线虫、小麦孢囊线虫和穿刺短体线虫。a ~ d: Head region of *B. xylophilus*, *B. mucronatus*, *D. destructor* and *A. besseyi*; e ~ h: tail regions of *B. xylophilus*, *B. mucronatus*, *D. destructor* and *A. besseyi*; i ~ k: body of *M. incognita*, *H. avenae* and *P. penetrans*, respectively.

黏附现象。粘性分生孢子对松材线虫和拟松材线虫的粘性最强,黏附到线虫体壁上的孢子没有发现脱落现象,而黏附到腐烂茎线虫和水稻干尖线虫虫体壁上的孢子粘性较弱,水稻干尖线虫体壁上粘性分生孢子脱落现象明显。

接种 8 h 后松材线虫和拟松材线虫的孢子黏附率均较高,二者之间差异不显著,而与腐烂茎线虫和水稻干尖线虫的黏附率之间差异显著(表 2),随着

时间的延长,孢子黏附率均增加,24 h 后这 4 种线虫的孢子黏附率均很高,松材线虫几乎所有虫体的体壁都被孢子黏附,黏附率达 99%,其它 3 种线虫的黏附率也较高。4 种线虫的孢子黏附率之间存在显著性差异,蠕虫埃斯特菌粘性分生孢子对 4 种植物寄生线虫都表现出较强的黏附能力。而南方根结线虫、小麦孢囊线虫和穿刺短体线虫这 3 种植物寄生线虫在接种 8、16 和 24 h 后均没有观察到孢子吸附现象。

表 2 蠕虫埃斯特菌粘性分生孢子对线虫的黏附率和侵染率

Table 2 Attachment and infection rates of *Esteya vermicola* lunate conidia to nematodes

%

线虫种类 Nematode species	黏附率 Attachment rate			侵染率 Infection rate		
	8 h	16 h	24 h	3 d	5 d	7 d
松材线虫 <i>B. xylophilus</i>	83 ± 0.12 a	93 ± 0.03 a	99 ± 0.01 a	34 ± 0.07 a	80 ± 0.01 a	98 ± 0.02 a
拟松材线虫 <i>B. mucronatus</i>	82 ± 0.03 a	90 ± 0.02 a	93 ± 0.02 b	10 ± 0.01 b	29 ± 0.04 b	43 ± 0.08 b
腐烂茎线虫 <i>D. destructor</i>	65 ± 0.05 b	79 ± 0.04 b	89 ± 0.02 c	8 ± 0.01 bc	23 ± 0.03 b	35 ± 0.05 b
水稻干尖线虫 <i>A. besseyi</i>	47 ± 0.05 c	67 ± 0.04 c	82 ± 0.02 d	0 ± 0.00 c	3 ± 0.01 c	9 ± 0.01 c

表中数据为平均数 ± 标准差。同列数据后不同字母表示经 Tukey 法检验在  $P < 0.05$  水平差异显著。Data in the table are mean ± SD. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference at  $P < 0.05$  level by Tukey test.

### 2.3 菌株 NKF 13222 粘性孢子的侵染能力与特性

菌株 NKF 13222 粘性分生孢子对松材线虫、拟松材线虫和腐烂茎线虫、水稻干尖线虫分别在 3、5 和 7 d 的侵染率间存在显著差异,其中对拟松材线虫和腐烂茎线虫的侵染速度比较相近,二者之间没有显著差异(表 2)。接种 3 d 后,松材线虫死亡率达 34%,拟松材线虫和腐烂茎线虫的死亡率分别为 10% 和 8%,没有发现水稻干尖线虫死亡,而接种 5 d 后才有 3% 水稻干尖线虫死亡,此时松材线虫已经有 80% 虫体死亡。7 d 后有 98% 的松材线虫死亡,而水稻干尖线虫仅有 9% 的虫体死亡。

在显微镜下观察菌株 NKF 13222 粘性分生孢子侵染线虫虫体,发现黏附到线虫体壁上的粘性分生孢子萌发产生侵入钉(图 2-a1 ~ d1),通过侵入钉侵入线虫体内。松材线虫和拟松材线虫体壁上的粘性分生孢子在黏附 16 h 后即可可见萌发(图 2-a1 ~ b1),而黏附在腐烂茎线虫和水稻干尖线虫体壁上的孢子 1 d 后才可见萌发(图 2-c1 ~ d1),由于孢子对水稻干尖线虫体壁的粘性较低,萌发后的粘性分生孢子容易脱落离开线虫体壁,只有少量的孢子能侵入到线虫体壁内,大部分线虫一直呈现被孢子黏附的状态(图 2-d1),而被孢子侵染的虫体较少。

粘性分生孢子萌发的侵入钉突破线虫体壁,侵入线虫体内后形成同化菌丝(图 2-a2 ~ d2),同化菌丝在线虫体内繁殖生长需要吸取线虫体内营养,降低了线虫活性,致使线虫活动减缓。同化菌丝在松材线虫体内繁殖速度最快(图 2-a2),侵入 48 h 后线虫即可死亡,拟松材线虫次之(图 2-b2),而在腐烂茎线虫(图 2-c2)和水稻干尖线虫(图 2-d2)虫体内生长速度较慢,并且同化菌丝在水稻干尖线虫体内产生分支较少,菌丝蔓延速度缓慢,侵入 5 d 后才可见有线虫死亡。

同化菌丝在线虫体内大量繁殖,当体内营养消耗殆尽后,线虫濒临死亡,体内菌丝则突破线虫体表

直接产生分生孢子,也可形成营养菌丝,向外生长,再产孢(图 2-a3 ~ d3)。同化菌丝在松材线虫和拟松材线虫尸体外通常产生新月型的粘性分生孢子(图 2-a3 ~ b3),而在腐烂茎线虫和水稻干尖线虫尸体外既可产生新月型粘性分生孢子,又可产生杆状分生孢子(图 2-c3 ~ d3)。

### 3 讨论

迄今为止,世界范围内报道的内寄生线虫真菌有 150 多个物种,我国报道有 20 余种,代表属有掘氏梅里霉属 *Drechmeria*、钩丝孢属 *Harposporium*、被毛孢属 *Hirsutella*、串孢壶菌属 *Myzocyttium*、毒虫霉属 *Nematocytus* 和拟青霉属 *Paecilomyces* 等<sup>[11]</sup>,其中掘氏梅里属、被毛孢属和钩丝孢属的部分种,可形成粘性分生孢子<sup>[6]</sup>。本试验对蠕虫埃斯特菌菌株 NKF 13222 侵染特性的研究表明,该菌株对松材线虫、拟松材线虫、水稻干尖线虫和腐烂茎线虫有明显的诱引力,而对南方根结线虫、燕麦孢囊线虫和穿刺短体线虫没有明显的诱引力,推测食线虫真菌的菌丝能释放某些化学物质信号,导致线虫的游动偏向性,而这些线虫体内可能存在着感受这些来自真菌释放的分子信号,而这种互相识别能力的获得,可能源自这些线虫在长期进化过程中的真菌基因水平漂移<sup>[12]</sup>。

蠕虫埃斯特菌能产生短杆状和新月状 2 种类型孢子,在淀粉营养丰富的 PDA 培养基上主要产生短杆状分生孢子,不具有侵染性,而在淀粉营养缺乏的 WA 培养基上主要产生新月形粘性分生孢子,能黏附到线虫体壁,产生侵入钉侵入线虫体内进而消化掉线虫体内内含物,致使松材线虫死亡<sup>[5]</sup>。本研究表明蠕虫埃斯特菌新月型粘性分生孢子对松材线虫、拟松材线虫、水稻干尖线虫和腐烂茎线虫的黏附和侵染能力存在差异,粘性分生孢子对这些线虫的侵染也表现出不同的特性,粘性分生孢子能牢固黏附松材线虫的体壁并快速萌发侵入线虫体内,而黏

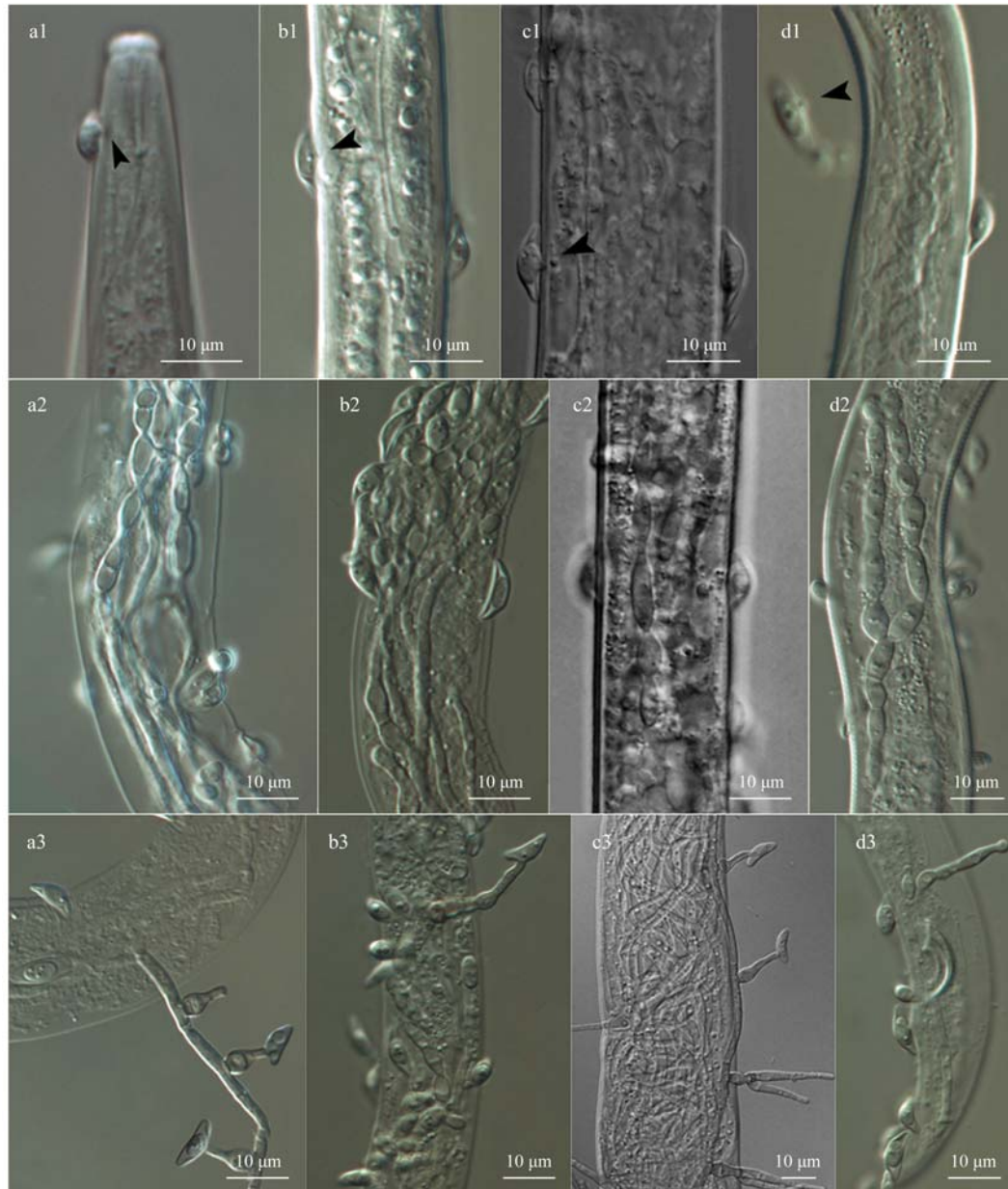


图 2 蠕虫埃斯特菌粘性孢子对不同植物寄生线虫的侵染能力

Fig. 2 Germination of infection pegs by the lunate conidia of *Esteya vermicola*

a1 ~ d1: 蠕虫埃斯特菌粘性孢子萌发产生侵入钉, 箭头表示侵入钉; a2 ~ d2: 蠕虫埃斯特菌粘性孢子侵入线虫体内形成同化菌丝; a3 ~ d3: 同化菌丝突破线虫体壁向外产生分生孢子; a: 松材线虫; b: 拟松材线虫; c: 腐烂茎线虫; d: 水稻干尖线虫。a1 - d1: Germination of infection pegs (arrowhead) by the lunate conidia of *Esteya vermicola*; a2 - d2: formation of assimilative hyphae by lunate conidia after invasion into nematode body; a3 - d3: production of conidia by assimilative hyphae penetrating the nematode body; a: *B. xylophilus*; b: *B. mucronatus*; c: *D. destructor*; d: *A. besseyi*.

附于拟松材线虫和腐烂茎线虫体壁的孢子, 萌发和侵入的速度则较慢。粘性分生孢子不能牢固黏附水稻干尖线虫的体壁并且很难萌发, 推测蠕虫埃斯特菌粘性分生孢子的这种侵染力差异表现, 可能与不同线虫体壁角质层的表面蛋白组成不同有关<sup>[13]</sup>, 因此, 菌株 NKF13222 对不同植物寄生线虫具有黏附和侵染差异的原因还有待进一步深入研究。

Wang 等<sup>[8,14]</sup>采用平板菌落测定法证明了蠕虫埃斯特菌对松材线虫有诱引作用; 在圆盘试验中证明该菌对松树苗、被侵染死亡的松树块以及被侵染 15 d 和 30 d 的松苗中松材线虫均有诱引作用<sup>[15]</sup>。本试验采用相同的测定方法揭示了蠕虫埃斯特菌菌株 NKF 13222 不仅对松材线虫具有强侵染力, 而且对拟松材线虫、腐烂茎线虫和水稻干尖线虫都具有

一定的侵染力。杜婷等<sup>[16]</sup>采用浸渍法测定该菌 3 个韩国菌株的离体孢子悬浮液对松材线虫的侵染活力,发现离体孢子虽然仍具有粘附作用,但对松材线虫的侵染力明显下降。采用菌落测定法时,粘附和杀死线虫的新月形孢子仍然着生于产孢梗上,且孢子只能凹面黏附到线虫体表,而脱落后的新月形孢子直接粘附到线虫体表的机率是未知的,这可能是离体孢子在测定时表现侵染力下降的原因之一。孢子自分生孢子梗上脱落后失去感染寄主能力的现象,在内寄生真菌洛斯里被毛孢 *Hirsutella rhossiliensis* 中也存在<sup>[17]</sup>。Wang 等<sup>[18]</sup>用蠕虫埃斯特菌孢子悬浮液进行松树树体试验,在温室内喷洒孢子悬浮液 1 个月后的 4 龄松苗接种松材线虫,发现松苗存活系数比对照高 10 倍,表明喷洒该菌孢子悬浮液能在一定程度上保护松树免于发生松萎蔫病,但该菌表现的侵染特性差异,致使其工业化开发利用还需要通过开展大量的生物学特性及侵染机制研究来提供理论基础。

#### 参 考 文 献 (References)

- [1] 冯志新. 植物线虫学. 北京: 中国农业出版社, 2001
- [2] Abad P, Gouzy J, Aury J M, et al. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(8): 909–915
- [3] 黄大昉. 生防微生物生物技术研究与发展. *植物保护*, 2003, 29(5): 3–4
- [4] 张颖, 李国红, 张克勤. 食线虫真菌资源研究概况. *菌物学报*, 2011, 30(6): 836–845
- [5] 袁虹霞, 陈莉, 张飞跃, 等. 小麦禾谷孢囊线虫生防真菌的筛选与鉴定. *植物保护学报*, 2011, 38(1): 52–58
- [6] Liou J Y, Shih J Y, Tzean S S. *Esteya*, a new nematophagous genus from Taiwan, attacking the pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Mycological Research*, 1999, 103: 242–248
- [7] Kubátová A, Novotny D, Prášíl K, et al. The nematophagous hyphomycete *Esteya vermicola* found in the Czech Republic. *Czech Mycology*, 2000, 52: 227–235
- [8] Wang C Y, Fang Z M, Sun B S, et al. High infectivity of an endoparasitic fungus strain, *Esteya vermicola*, against nematodes. *The Journal of Microbiology*, 2008, 46(4): 380–389
- [9] Braasch H, Burgermeister W. *Bursaphelenchus rainulfi* sp. n. (Nematoda: Parasitaphelenchidae), first record of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 from Malaysia. *Nematology*, 2002, 4(8): 971–978
- [10] Wang X, Wang T T, Wang J C, et al. Morphological, molecular and biological characterization of *Esteya vermicola*, a nematophagous fungus isolated from intercepted wood packing materials exported from Brazil. *Mycoscience*, 2014, 55(5): 367–377
- [11] 李娟, 张克勤. 食线虫微生物防控病原线虫的研究. *中国生物防治学报*, 2013, 29(4): 481–489
- [12] Jones J T, Furlanetto C, Kikuchi T. Horizontal gene transfer from bacteria and fungi as a driving force in the evolution of plant parasitism in nematodes. *Nematology*, 2005, 7(5): 641–646
- [13] Shinya R, Morisaka H, Takeuchi Y, et al. Comparison of the surface coat proteins of the pine wood nematode appeared during host pine infection and *in vitro* culture by a proteomic approach. *Phytopathology*, 2010, 100(12): 1289–1297
- [14] Wang C Y, Fang Z M, Wang Z, et al. High infection activities of two *Esteya vermicola* isolates against pinewood nematode. *African Journal of Microbiology Research*, 2009, 3(10): 581–584
- [15] Wang C Y, Wang Z, Lee M L, et al. Attraction of pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, to the endoparasitic fungus *Esteya vermicola*. *African Journal of Microbiology Research*, 2009, 3(11): 782–786
- [16] 杜婷, 张永安, 王玉珠, 等. 内寄生真菌 *Esteya vermicola* 对松材线虫侵染活力的测定. *林业科学研究*, 2014, 27(2): 174–178
- [17] McInnis T M, Jaffee B A. An assay for *Hirsutella rhossiliensis* spores and the importance of phialides for nematode inoculation. *Journal of Nematology*, 1989, 21(2): 229–234
- [18] Wang C Y, Fang Z M, Wang Z, et al. Biological control of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* by application of the endoparasitic fungus *Esteya vermicola*. *BioControl*, 2011, 56(1): 91–100

(责任编辑:高峰)