

研究报告

一种捕食线虫性真菌的鉴定及生物学特性分析

古雅茹¹, 曹景鑫¹, 郝昕¹, 李树申², 李洋¹, 张月¹, 金香莲¹, 马玲^{*1}

1 东北林业大学 林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

2 宁城县林业和草原局, 内蒙古 赤峰 024000

古雅茹, 曹景鑫, 郝昕, 李树申, 李洋, 张月, 金香莲, 马玲. 一种捕食线虫性真菌的鉴定及生物学特性分析[J]. 微生物学通报, 2025, 52(6): 2557-2569.

GU Yaru, CAO Jingxin, HAO Xin, LI Shushen, LI Yang, ZHANG Yue, JIN Xianglian, MA Ling. Identification and biological characterization of a nematode-trapping fungus[J]. Microbiology China, 2025, 52(6): 2557-2569.

摘要:【背景】松材线虫病是一种对林木危害严重的森林病害, 而捕食线虫性真菌可以利用其捕食器官捕食松材线虫, 从而实现对松材线虫病的有效防治。【目的】鉴定分离出一株捕食线虫性真菌并探究其最适生长和产孢条件, 为松材线虫的生物防治提供一定的参考依据。【方法】使用 ITS2、RPB2 和 TEF1- α 序列对该菌株进行分子生物学鉴定, 同时结合其形态特征确定其具体所属种属。观察该菌株在不同温度、pH 和营养条件下的生长状况及变化规律, 明确其具体的生物学特性。【结果】形态学鉴定结果及分子生物学鉴定结果表明该捕食线虫性真菌为强力节丛孢(*Arthrobotrys robusta*)。该菌株最适生长和产孢条件有所不同。最适生长条件为 28 °C、pH 10.0–11.0、玉米粉琼脂(corn meal agar, CMA)培养基、碳源为淀粉、氮源为 KNO₃。最适产孢条件为 30 °C、pH 8.0、马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基、碳源为淀粉、氮源为蛋白胨。【结论】该捕食线虫性真菌为强力节丛孢, 对不同环境具有较强的适应能力, 在各种环境下除部分极端环境外均能良好生长, 对松材线虫具有良好的生防潜力。

关键词: 松材线虫; 强力节丛孢; 黏性菌网; 生长条件

资助项目: 中央高校基本科研业务费专项资金(2572022DP03); 国家自然科学基金(U24A20432)

This work was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2572022DP03) and the National Natural Science Foundation of China (U24A20432).

*Corresponding author. E-mail: maling63@163.com

Received: 2024-09-22; Accepted: 2025-03-07; Published online: 2025-03-31

Identification and biological characterization of a nematode-trapping fungus

GU Yaru¹, CAO Jingxin¹, HAO Xin¹, LI Shushen², LI Yang¹, ZHANG Yue¹, JIN Xianglian¹, MA Ling^{*1}

1 School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China

2 Ningcheng Forestry and Grassland Bureau, Chifeng 024000, Inner Mongolia, China

Abstract: [Background] Pine wilt disease is a serious disease that endangers forest trees. Nematode-trapping fungi can use their trapping organs to prey on *Bursaphelenchus xylophilus*, thus achieving effective control of pine wilt disease. [Objective] To isolate and identify a nematode-trapping fungus and explore its optimum growth and sporulation conditions, thus providing a reference for the biocontrol of *B. xylophilus*. [Methods] The strain was identified based on the ITS2, *RPB2*, and *TEF1- α* sequences and morphological characteristics. The growth status and variations of the strain under different temperature, pH, and nutrient conditions were observed for biological characterization of this strain. [Results] The nematode-trapping fungus was identified as *Arthrobotrys robusta*. The optimum growth and sporulation conditions of the strain were different. The optimum growth conditions were 28 °C, pH 10.0–11.0, corn meal agar (CMA) medium, starch as the carbon source and KNO₃ as the nitrogen source. The optimum sporulation conditions were 30 °C, pH 8.0, potato dextrose agar (PDA) medium, starch as the carbon source and peptone as the nitrogen source. [Conclusion] The nematode-trapping fungus *A. robusta* has strong adaptability to the environment. It can grow well in various environments except some extreme environments and demonstrates biocontrol potential against *B. xylophilus*.

Keywords: *Bursaphelenchus xylophilus*; *Arthrobotrys robusta*; adhesive networks; growth conditions

松材线虫病是一种全球范围内危害严重的森林病害。据报道, 松树体内寄生线虫可达 40 余种, 其中伞滑刃属(*Bursaphelenchus*)的松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)和拟松材线虫(*Bursaphelenchus mucronatus*)被认为是松材线虫病的主要病原物^[1-4]。现有的研究表明, 一些细菌、真菌和放线菌对松材线虫具有明显的防治作用; 其中, 真菌所占的比例最高, 高达 33 属 27 种^[5-6]。由此可见, 真菌在松材线虫防治上具有良好的前景。根据侵害方式的不同, 可将松材线虫具有生防作用的真菌分为内寄生真菌、产毒真菌和捕食线虫性真菌^[7]。内寄生真菌是通过产生特殊的孢子来寄生游离线虫, 但

目前被报道的松材线虫内寄生真菌仅有钩丝孢属(*Harposporium*)未知种和伊氏线虫菌(*Esteya vermicola*)^[8-9]。产毒真菌则是通过产生次生代谢物来杀死线虫。例如, 镰刀菌属(*Fusarium*)和曲霉属(*Aspergillus*)的部分真菌, 它们产生的次生代谢物被证实可以杀死松材线虫, 并且处理时间越长, 效果越好^[10-12]。而捕食线虫性真菌则是通过产生捕食器官如收缩环、黏性菌网等捉住线虫, 从而杀死线虫并在其体内繁殖。例如, 多头节丛孢(*Arthrobotrys polycephala*)可以通过产生黏性菌网对松材线虫进行捕捉^[13]。目前, 关于捕食线虫性真菌的研究主要集中在部分节丛孢属(*Arthrobotrys*)真菌如少孢节丛孢

(*Arthrobotrys oligospora*)上^[14]。通过对其生长特性、捕食器官及捕食能力等进行研究,可以发现捕食线虫性真菌对线虫的捕捉是一个极为复杂的过程^[15-20]。

捕食线虫性真菌的生活史通常由腐生阶段、过渡阶段和寄生阶段 3 个时期组成^[21-23]。捕食器官的形成往往标志着其生活方式从营腐生生活转变为营寄生生活。捕食线虫性真菌对线虫的捕食可分为吸引、识别和黏附、侵染及消解这 4 个步骤。在捕食器官形成的过程中,线虫的接触会促进其形成,同时,捕食器官可分泌某些物质来吸引线虫^[24]。当线虫接触到捕食器官时,便可被其捆绑或黏附,从而降低其行动力。而当线虫被捕获后,真菌会产生蛋白酶来瓦解线虫体壁,帮助真菌侵染线虫^[25]。通常,在真菌与线虫的接触点会形成侵入钉,随后会不断发育直至在虫体内形成同化菌丝,吸收虫体营养,逐步消解线虫^[26]。现有的研究结果表明,一些捕食线虫性真菌如指状德氏霉(*Drechslerella dactyloides*)和少孢节丛孢对松材线虫具有极高的捕食率^[27-29]。由此可见,捕食线虫性真菌在松材线虫生物防治上具有极高的研究价值。

本研究对一株捕食线虫性真菌进行分离鉴定,并对其生物学特性进行表征,以期为后续该菌株的研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品

样品采自浙江省杭州市临安区天目山受松材线虫侵染的马尾松^[30]。供试线虫由东北林业大学森林保护学科生物农药和分子生物学实验室提供。

1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基、水琼脂(water agar, WA)培养基及玉米粉琼脂(corn meal agar, CMA)培养基参考刘俊英等^[31]的方法配制,琼脂粉含量均为 2%,

并将玉米粉用量调整为 20.00 g。碳/氮基础培养基(g/L):麦芽糖 10.00, KNO₃ 2.00, MgSO₄·7H₂O 0.50, KH₂PO₄ 0.50, Na₂HPO₄ 0.65, KCl 0.50, 琼脂粉 20.00。以上培养基的灭菌条件均为 121 °C 30 min。

菌种接种于 CMA 培养基上并于 25 °C 培养,实验时需将保存的菌种接种到新的 CMA 培养基上,25 °C 培养 7 d 后再用于实验。

1.3 主要试剂和仪器

CTAB 缓冲液(g/L): CTAB 20.00, NaCl 81.82, EDTA 7.44, Tris-HCl 12.11。乳酸酚棉蓝染色液,上海源叶生物科技有限公司。霉菌培养箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;高速离心机,艾本德股份公司;基因扩增仪,苏州东胜兴业科学仪器有限公司;微量分光光度计,杭州奥盛仪器有限公司;生物显微镜,徕卡仪器有限公司。

1.4 形态学鉴定

使用打孔器从培养 7 d 的菌落边缘切下直径为 5 mm 的菌饼,接种于 CMA 培养基上,置 25 °C 恒温培养箱中培养,待菌落直径长至培养皿的一半,将无菌玻片以 45°斜插入培养基中接着培养,直至菌丝长满。随后用干净的镊子将玻片取下,将长有菌丝的一面扣于滴有乳酚棉蓝染色液的载玻片上,于生物显微镜下进行观察。捕食器官的观察则是待菌落长满后,向其中加入诱饵线虫(松材线虫),24 h 后在显微镜下观察捕食器官的结构,拍照记录。

1.5 分子生物学鉴定

DNA 的提取采用 CTAB 法进行^[32]。ITS2 序列扩增的引物为 ITS3F (5'-GCATCGATGAA GAACGCAGC-3')和 ITS4R (5'-TCCTCCGCTTA TTGATATGC-3')。PCR 反应体系(25 μL): 2×*Taq* Premix 12.5 μL,模板(<250 ng) 1.0 μL,引物 ITS3F (10 μmol/L) 1.0 μL,引物 ITS4R (10 μmol/L) 1.0 μL, ddH₂O 9.5 μL。PCR 反应条件: 98 °C 10 min; 98 °C 10 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min; 8 °C 保存。RPB2 序

列扩增引物为 RPB26F (5'-TGGGGKWTGGTY TGYCCTGC-3')和 RPB27R (5'-CCCATWGCYT GCTTCCCCAT-3')。PCR 反应体系(25 μ L): 2 $\times$ Phanta Max Buffer 12.5 μ L, dNTP Mix 0.5 μ L, Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 0.5 μ L, 模板(25–200 ng) 1.0 μ L, 引物 RPB26F (10 μ mol/L) 1.0 μ L, 引物 RPB27R (10 μ mol/L) 1.0 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min; 8 $^{\circ}$ C 保存。TEF1- α 序列扩增引物为 AS4F (5'-CCTTCAAGTATGCCTGG GTT-3')和 AS4R (5'-TGGAGTGGGAGACGGA GA-3'); 反应体系和扩增条件与 RPB2 序列相同, 仅将退火温度改为 56 $^{\circ}$ C。产物测序由生工生物工程(上海)股份有限公司进行。测序结果上传至 NCBI 进行 BLAST 比对^[33-34]。同时, 使用 PhyloSuite 对测序结果进行串联后以贝叶斯法构建多基因联合系统发育树。

1.6 不同温度水平下供试菌株生长及产孢情况的测定

使用打孔器从培养 7 d 的菌落边缘切下直径为 5 mm 的菌饼, 接种于 CMA 培养基上, 分别于 20、25、28、30 和 35 $^{\circ}$ C 培养, 观察其生长情况, 如菌落直径、生长速率等。每个温度下设有 3 个生物学重复。同时另设一组用于产孢量的测定。具体数据的测量方法为: 在接种后 1 d 开始以十字交叉法测量菌落的直径, 连续测量 5 d。生长速率(mm/d)=(菌落当天直径-5)/天数。产孢量则于接种后 10 d 进行统计。

1.7 不同酸碱度水平下供试菌株生长及产孢情况的测定

CMA 培养基的配制方法同 1.2, 但在加入琼脂粉前需使用酸性缓冲液(0.2 mol/L NaAc:0.3 mol/L AcOH=1:9)和碱性缓冲液(1 mol/L NaOH)将培养基的 pH 值分别调节为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 和 12.0。将直径为 5 mm 的菌饼接种于上述不同 pH 的 CMA 培养基上 28 $^{\circ}$ C 培养观察, 每个 pH 设 3 个生物学重复。

同时, 另设一组于 30 $^{\circ}$ C 进行培养以测定产孢量。数据的测量方法同 1.6。

1.8 不同培养基上供试菌株生长及产孢情况的测定

将直径为 5 mm 的菌饼分别接种于 PDA 培养基、CMA 培养基和 WA 培养基上, 28 $^{\circ}$ C 培养, 观察其生长情况, 每个组别设置 3 个生物学重复。产孢量的测定于 30 $^{\circ}$ C 进行。数据的测量方法同 1.6。

1.9 不同碳、氮源下供试菌株生长及产孢情况的测定

不同碳源培养基: 以 KNO₃ 为氮源, 将基础培养基中的碳源换算成有效成分相当的葡萄糖、蔗糖、淀粉和半乳糖。不同氮源培养基: 以淀粉为碳源, 将基础培养基中的氮源换算成有效成分相当的(NH₄)₂SO₄、蛋白胨、尿素和苯丙氨酸。

生长情况和产孢量的测定分别于 28 $^{\circ}$ C 和 30 $^{\circ}$ C 进行, 方法同 1.6。

1.10 数据的统计与分析

使用 EXCEL、IBM SPSS Statistics 26 和 GraphPad 等软件对所测量的数据进行统计分析, 统计时扣除原始菌块的直径(5 mm)。

2 结果与分析

2.1 形态学特征

在 CMA 培养基上 25 $^{\circ}$ C 恒温培养 5–6 d 后, 菌落直径可达 9 cm, 菌落白色透明, 菌丝稀疏, 有隔, 常分枝, 直径为 3–7 μ m; 分生孢子梗单生, 不重育, 孢子梗向上渐细, 顶端稍膨大; 分生孢子无色, 呈倒卵形, 远端阔圆, 近端收缩, 近中部具一隔, 大小为(11.7–17.4) μ m $\times$ (5.5–8.4) μ m ($n=20$)。捕食器官为黏性菌网。具体形态特征见图 1。

2.2 分子生物学特征

供试菌株的 ITS2、RPB2 及 TEF1- α 序列数据均存储在国家微生物科学数据中心(National

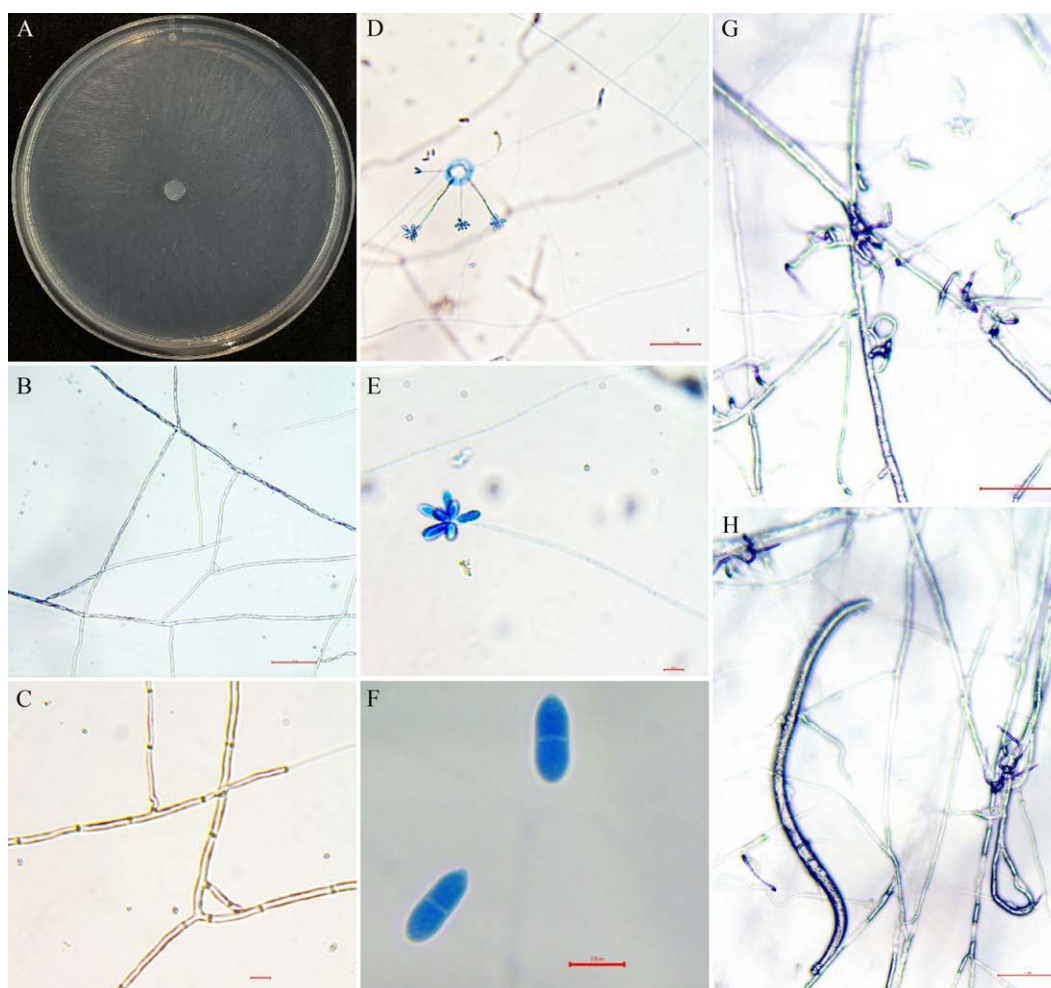


图 1 菌株在 CMA 培养基上的生长状况及部分微观特征 A: 菌株在 CMA 培养基上的菌落; B: 菌丝, 标尺=100 μm ; C: 菌丝, 标尺=10 μm ; D: 分生孢子和分生孢子梗, 标尺=100 μm ; E: 分生孢子和分生孢子梗, 标尺=10 μm ; F: 分生孢子, 标尺=10 μm ; G: 黏性菌网, 标尺=100 μm ; H: 线虫被黏性菌网捕捉, 标尺=100 μm 。

Figure 1 Growth of isolates on CMA medium and some micromorphological characteristics of the strains. A: The strain grows white and transparent colonies on CMA medium; B: Mycelia, scale bar, 100 μm ; C: Mycelia, scale bar, 10 μm ; D: Conidia and conidiophores, scale bar, 100 μm ; E: Conidia and conidiophores, scale bar, 10 μm ; F: Conidia, scale bar, 10 μm ; G: Adhesive networks, scale bar, 100 μm ; H: Nematodes are captured by the adhesive networks of the strain, scale bar, 100 μm .

Microbiology Data Center, NMDC)。序列保存号分别为 NMDCN0004TFK、NMDCN00060PO 和 NMDCN0006IH3。测序结果表明, 供试菌株 ITS2、RPB2 及 *TEF1- α* 序列的大小分别为 357、793 和 968 bp。BLAST 比对后发现, 菌株 ITS2 序列与 *Arthrobotrys* sp. Nefu01 的序列(GenBank 登录号 OQ456637.1)及强力节丛孢(*Arthrobotrys*

robusta) nefuA4 和 A07 的序列(GenBank 登录号 MZ326655.1, OQ398129.1)具有高度相似性, 一致度可达 99.71%。*RPB2* 序列与 *Arthrobotrys* sp. YNWS02-5-1 的序列 (GenBank 登录号 AY773422.1)具有高度相似性, 一致度可达 97.18%。*TEF1- α* 序列的比对结果则较差, 与中华节丛孢(*Arthrobotrys sinensis*) 105-1 序列

(GenBank 登录号 AY773387.1) 的一致度达 91.14%，但覆盖度仅 65%。将 ITS2、*RPB2* 和 *TEF1-α* 序列串联后构建系统发育树，结果表明，供试菌株与 *Arthrobotrys robusta* nefuA4 聚在一支(图 2)。结合其形态特征，将其鉴定为强力节丛孢。

2.3 强力节丛孢在不同温度下的生长和产孢情况

强力节丛孢在 25–30 °C 范围内均能良好生长，并且 28 °C 为菌丝的最适生长温度，该温度下的菌落直径与生长速率明显优于其他温度。但 28 °C 下的产孢量仅有 1.46×10^4 个，且 30 °C 的产孢量显著高于其他温度。因此，30 °C 为最适产孢温度。20 °C 时菌丝生长受到明显抑制，但仍能生长且有少量产孢。而在 35 °C 菌丝

仅在初期有少量萌发，后续逐渐停止生长(图 3，表 1)。

2.4 强力节丛孢在不同酸碱度下的生长和产孢情况

不同 pH 对强力节丛孢生长的影响如图 4 所示。在 pH 4.0–12.0 的范围内，强力节丛孢均能生长。但在极酸性 pH 4.0 和极碱性 pH 12.0 环境下，强力节丛孢的生长受到明显抑制。在 pH 5.0–11.0 的范围内，菌落直径和菌丝生长速率呈增长趋势；在 pH 8.0 时出现略微下降，但与 pH 7.0 差异并不显著；且 pH 10.0–11.0 时的菌落直径和菌丝生长速率始终显著优于其他 pH；除此之外，pH 8.0 的产孢量明显优于其他 pH (表 2)。这表明强力节丛孢对碱性环境具有一定的偏好性。

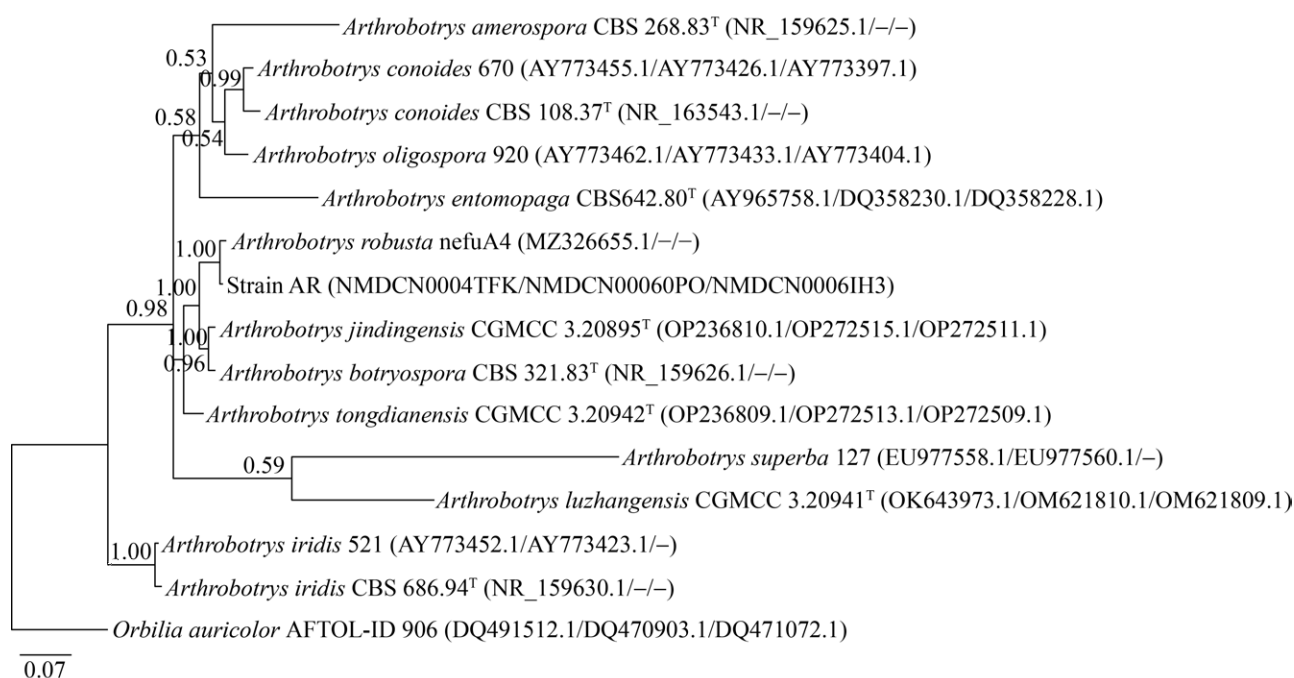


图2 基于菌株 AR 的 ITS2、*RPB2* 和 *TEF1-α* 序列构建的系统发育树 分支处数值为 bootstrap 值(>0.50); 括号内依次为对应菌株的 ITS2、*RPB2* 和 *TEF1-α* 序列的接受号, -: 未找到相关序列信息; 标尺 0.07 代表 7% 的进化差异。

Figure 2 Phylogenetic tree constructed based on ITS2, *RPB2* and *TEF1-α* sequence of strain AR. The value at the branch is the bootstrap value (>0.50); The accession numbers of ITS2, *RPB2* and *TEF1-α* sequences of the corresponding strains were in the brackets; -: No relevant sequence information was found; The scale 0.07 represents 7% evolutionary divergence.

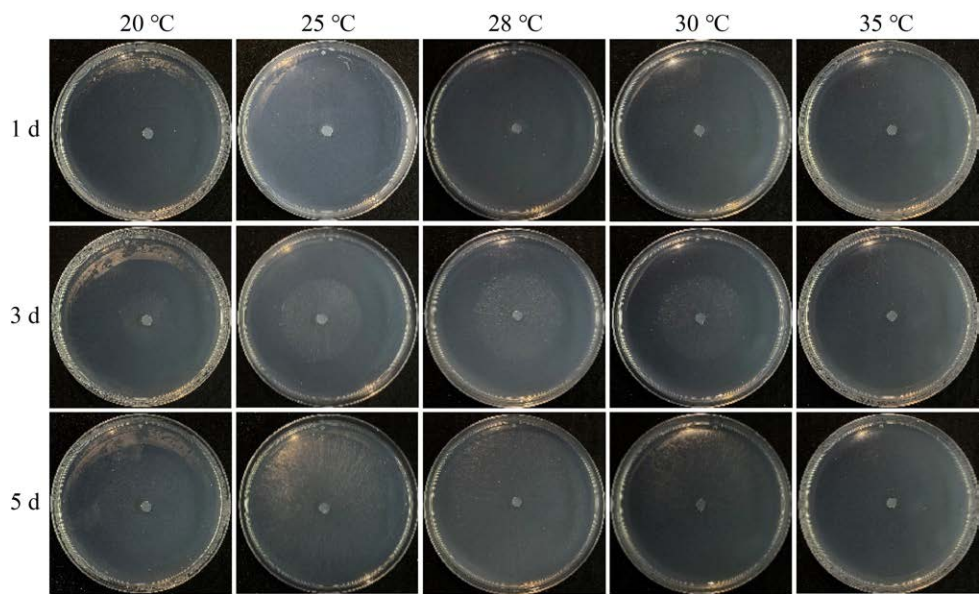


图 3 强力节丛孢在不同温度下的生长情况
Figure 3 Growth of *Arthrobotrys robusta* at different temperatures.

表 1 强力节丛孢在不同温度下的菌落直径、菌丝生长速率和产孢量
Table 1 The colony diameter, growth rate, and spore yield of *A. robusta* at different temperatures

温度 Temperature (°C)	菌落直径 Colony diameter (mm)	生长速率 Growth rate (mm/d)	产孢量 Spore yield (×10 ⁴)
20	51.58±0.29d	10.32±0.06d	0.28±0.03c
25	70.12±0.13c	14.02±0.03c	1.56±0.06b
28	77.78±0.23a	15.56±0.05a	1.46±0.10b
30	72.58±0.28b	14.52±0.06b	10.80±0.00a
35	1.58±0.08e	0.32±0.02e	—

—: 未产孢；不同小写字母表示差异显著。下同。
—: No sporulation; Different lowercase letters indicate significant differences. The same below.

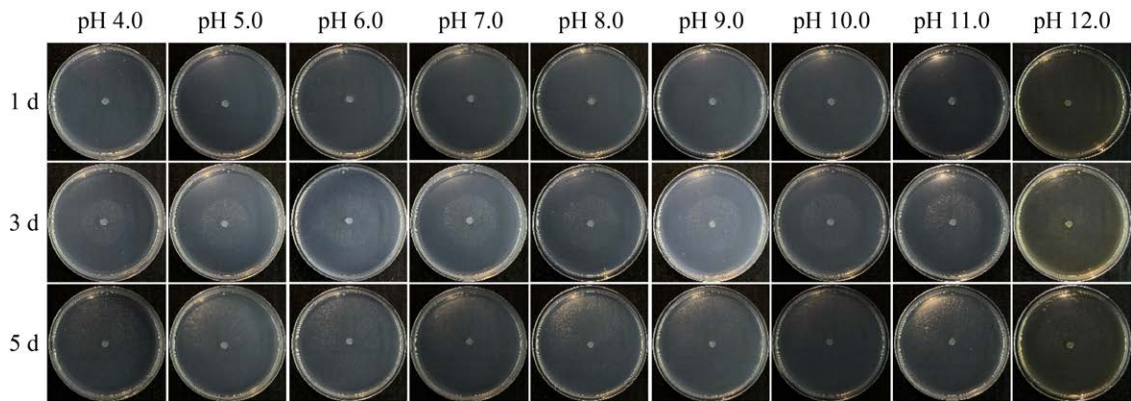


图 4 强力节丛孢在不同 pH 下的生长情况
Figure 4 Growth of *A. robusta* at different pH.

表 2 强力节丛孢在不同 pH 下的菌落直径、菌丝生长速率和产孢量

Table 2 The colony diameter, growth rate, and spore yield of *A. robusta* at different pH levels

酸碱度 pH	菌落直径 Colony diameter (mm)	生长速率 Growth rate (mm/d)	产孢量 Spore yield ($\times 10^4$)
4.0	65.13 $\pm$ 0.13f	13.03 $\pm$ 0.03f	6.61 $\pm$ 0.10bcd
5.0	71.28 $\pm$ 0.10e	14.26 $\pm$ 0.02e	6.47 $\pm$ 0.22bcd
6.0	72.97 $\pm$ 0.19d	14.59 $\pm$ 0.04d	5.61 $\pm$ 0.14d
7.0	73.78 $\pm$ 0.13c	14.76 $\pm$ 0.03c	8.16 $\pm$ 0.22b
8.0	73.60 $\pm$ 0.09c	14.72 $\pm$ 0.02c	11.59 $\pm$ 1.03a
9.0	75.73 $\pm$ 0.13b	15.15 $\pm$ 0.03b	7.46 $\pm$ 0.57bc
10.0	77.33 $\pm$ 0.33a	15.47 $\pm$ 0.07a	6.08 $\pm$ 0.05cd
11.0	77.53 $\pm$ 0.15a	15.51 $\pm$ 0.03a	3.42 $\pm$ 1.25e
12.0	59.75 $\pm$ 0.22g	11.95 $\pm$ 0.04g	3.10 $\pm$ 0.73e

2.5 强力节丛孢在不同培养基上的生长和产孢情况

不同培养基对强力节丛孢的生长和产孢具有显著影响。PDA 培养基上的菌落白色微黄, 菌丝浓密且发达, 生长速率最慢, 产孢量最多; CMA 培养基上的菌落呈白色, 菌丝较为稀疏, 菌落直径和生长速率显著优于其他 2 种培养基, 产孢量显著低于 PDA 培养基; WA 培养基上的菌落也为白色, 菌丝极为稀疏, 难以观察, 生长速率适中, 但几乎不产孢(图 5, 表 3)。由此可见, 少量的营养物质即可满足强力节丛孢基本的生长繁殖, 并且高营养的环境有利于其产孢。

2.6 强力节丛孢在不同碳源下的生长和产孢情况

强力节丛孢对 5 种供试碳源的利用情况具有显著差异。在以淀粉为碳源的培养基上, 菌落直径最大, 生长速率最快, 产孢量最多; 麦芽糖、蔗糖、葡萄糖培养基次之(三者间具显著差异); 半乳糖培养基最差, 并且不产孢(图 6, 表 4)。由此可以判断, 强力节丛孢对多糖的利用率优于双糖和单糖, 并且无法良好利用半乳糖。

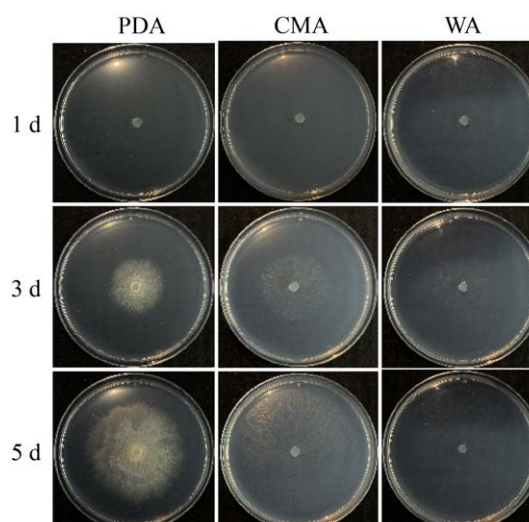


图 5 强力节丛孢在不同培养基上的生长情况
Figure 5 Growth of *A. robusta* at different medium.

表 3 强力节丛孢在不同培养基上的菌落直径、菌丝生长速率和产孢量

Table 3 The colony diameter, growth rate, and spore yield of *A. robusta* at different media

培养基 Medium	菌落直径 Colony diameter (mm)	生长速率 Growth rate (mm/d)	产孢量 Spore yield ($\times 10^4$)
PDA	59.97 $\pm$ 0.29c	11.99 $\pm$ 0.06c	24.06 $\pm$ 4.52a
CMA	69.28 $\pm$ 0.45a	13.86 $\pm$ 0.09a	7.02 $\pm$ 1.25b
WA	63.87 $\pm$ 0.59b	12.77 $\pm$ 0.12b	0.10 $\pm$ 0.03c

2.7 强力节丛孢在不同氮源下的生长和产孢情况

强力节丛孢在 5 种供试氮源培养基上均能良好生长。在 KNO_3 培养基上菌落直径最大, 生长速率最快, 蛋白胨、苯丙氨酸培养基次之(两者间无差异显著性)。并且不同氮源培养基上的产孢情况也有显著差异。蛋白胨培养基上产孢最多, 可达 27.64×10^4 个。苯丙氨酸培养基次之。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 培养基上菌丝虽能生长, 但几乎不产孢(图 7, 表 5)。

3 讨论

捕食线虫性真菌是一类重要的生物资源, 它的分类一直是国内外学者的重要研究方向。

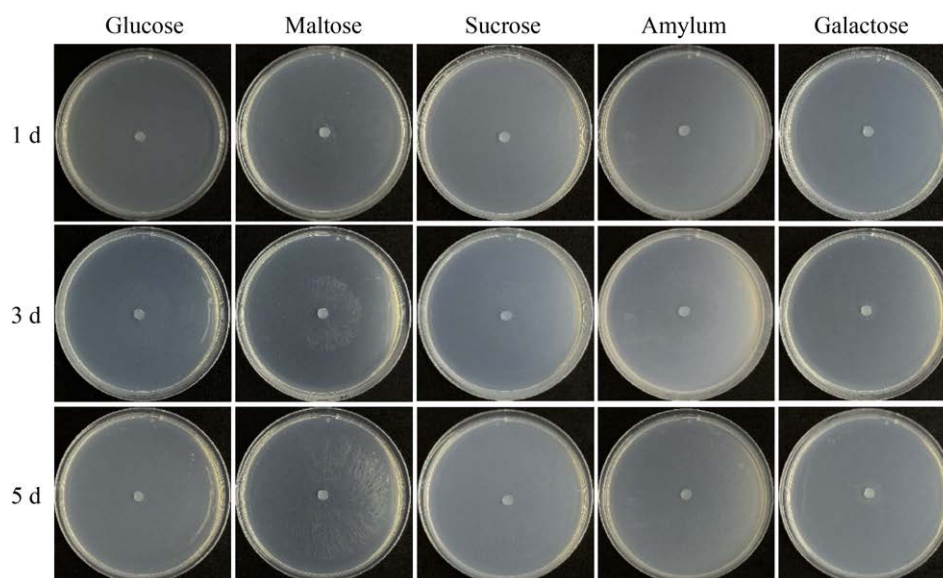


图 6 强力节丛孢在不同碳源上的生长情况

Figure 6 Growth of *A. robusta* at different carbon source.

表 4 强力节丛孢在不同碳源下的菌落直径、菌丝生长速率和产孢量

Table 4 The colony diameter, growth rate, and spore yield of *A. robusta* at different carbon source

碳源	菌落直径	生长速率	产孢量
Carbon source	Colony diameter (mm)	Growth rate (mm/d)	Spore yield ($\times 10^4$)
Glucose	58.85 $\pm$ 0.00d	11.77 $\pm$ 0.00d	0.25 $\pm$ 0.03d
Maltose	64.13 $\pm$ 0.23b	12.83 $\pm$ 0.05b	2.52 $\pm$ 0.02b
Sucrose	61.58 $\pm$ 0.21c	12.32 $\pm$ 0.04c	1.29 $\pm$ 0.10c
Amylum	70.60 $\pm$ 0.36a	14.12 $\pm$ 0.07a	9.03 $\pm$ 0.47a
Galactose	11.75 $\pm$ 0.25e	2.35 $\pm$ 0.05e	–

在捕食线虫性真菌的早期分类中，主要依托于一些形态学上的特征如分生孢子的形态、大小、分隔、着生方式、分生孢子梗顶端的瘤结、捕食器官和厚垣孢子等。但由于不同学者对不同形态特征重视程度的不同，常常会产生一些争议，同物异名现象严重^[35]。后期，随着系统发育学的发展，部分学者意识到相较于其他形态特征，捕食器官能更好地反映不同属之间的差异，能更好地实现捕食线虫性真菌的分类^[36-38]。同时，一些分子生物学特征如 28S rRNA 基因、ITS 和 18S rRNA 基因的支持，使得其分类更为

准确。目前，大多数捕食线虫性真菌为圆盘菌科(Orbiliaceae)真菌；根据其捕食器官及分子生物学特征，可将其分为 3 个属，分别为节丛孢属，捕食器官为黏性菌网；德氏霉属(*Drechslerella*)，捕食器官为收缩环；以及亚隔指孢属(*Dactylellina*)，捕食器官为黏球，部分种具非收缩环或黏性分枝^[39-40]。在本研究中，观察到该真菌分离株分生孢子梗单生，不重育，孢子梗向上渐细，顶端稍膨大；分生孢子无色，呈倒卵形，近中部具一隔。并且在线虫的诱导下，其菌丝会特化成具有捕食功能的三维黏性菌网。这些特征均与《中国真菌志》中描述的强力节丛孢的形态特征符合^[41]。多孢节丛孢(*Arthrobotrys superba*)为节丛孢属的模式种，强力节丛孢与之在形态上具有极大的相似性，主要区别为强力节丛孢分生孢子梗不重育。研究发现，在系统发育分析上，强力节丛孢与叶状枝节丛孢(*Arthrobotrys cladodes*)聚在一支，而多孢节丛孢与少孢节丛孢等聚在一支，强力节丛孢与多孢节丛孢亲缘关系较远^[42]。本研究中测序发现，该菌株的 ITS2、RPB2 和 *TEF1- α* 序列大小分别为 357、793 和 968 bp。在使用贝叶斯法对串联

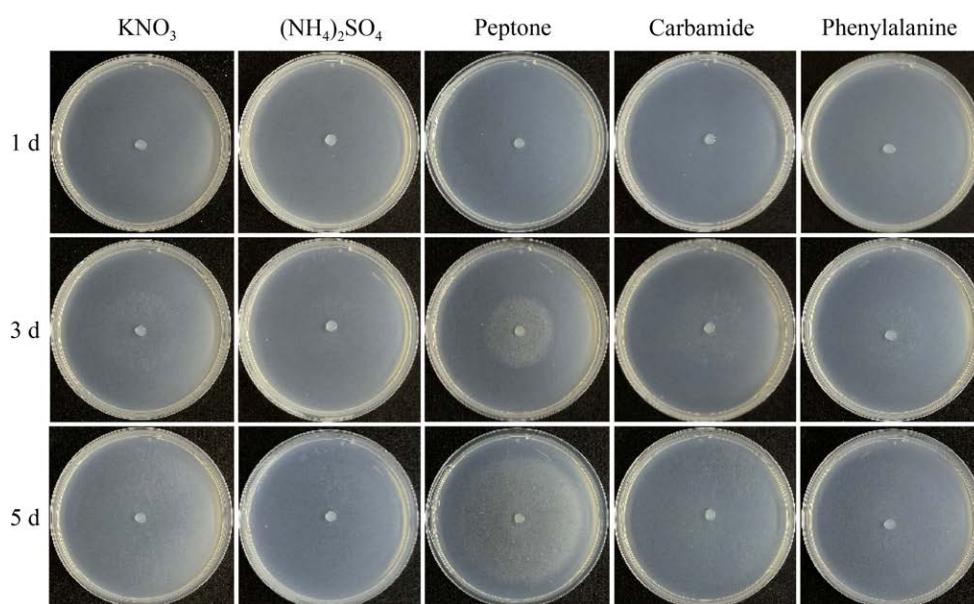


图 7 强力节丛孢在不同氮源上的生长情况

Figure 7 Growth of *A. robusta* at different nitrogen source.

表 5 强力节丛孢在不同氮源下的菌落直径、菌丝生长速率和产孢量

Table 5 The colony diameter, growth rate, and spore yield of *A. robusta* at different nitrogen source

氮源 Nitrogen source	菌落直径 Colony diameter (mm)	生长速率 Growth rate (mm/d)	产孢量 Spore yield ($\times 10^4$)
KNO ₃	67.35 $\pm$ 0.61a	13.47 $\pm$ 0.12a	2.45 $\pm$ 0.44c
(NH ₄) ₂ SO ₄	53.40 $\pm$ 0.40d	10.68 $\pm$ 0.08d	0.08 $\pm$ 0.00d
Peptone	65.50 $\pm$ 1.39b	13.10 $\pm$ 0.28b	27.64 $\pm$ 1.09a
Carbamide	61.65 $\pm$ 0.52c	12.33 $\pm$ 0.1c	0.18 $\pm$ 0.06d
Phenylalanine	64.17 $\pm$ 0.63b	12.83 $\pm$ 0.13b	9.88 $\pm$ 0.54b

基因进行系统发育分析后发现, 该菌株与 *Arthrotrrys robusta* nefuA4 聚在一支, 自展值为 1.00。这进一步证实了该菌株为节丛孢属的强力节丛孢(*A. robusta*)。除此之外, 在 BLAST 结果中发现, 该菌株 ITS2 序列与部分圆盘菌属(*Orbilia*) 真菌的序列具有一定的相似性, 这可能是由于圆盘菌属与节丛孢属之间存在着有性型和无性型的对应关系^[43-45]。

强力节丛孢 1951 年首次报道于英国^[46]。目前, 我国北京、云南、贵州、河北、安徽、西

安、辽宁、吉林、黑龙江、内蒙古等地均有分布, 其广泛的分布范围进一步表明了强力节丛孢有着极大的研究价值^[41]。温度、酸碱度及营养条件等环境因素对菌株的生长和繁殖至关重要, 探究该菌株的最适生长温度、酸碱度及不同营养条件下的生长和产孢状况是后续开展研究的基础。现有研究表明, 食线虫菌株的最适生长和繁殖温度为 25 °C 左右^[47]。本研究中, 强力节丛孢在 25–30 °C 的温度范围内均可以良好生长, 并且在 28 °C 生长速率最快, 这与现有研究结果相符。但其最适产孢温度为 30 °C 而非 28 °C, 出现这一现象的原因可能是适当的高温为菌株提供了一定的压力, 从而促进其产孢。酸碱度也是影响真菌生长的重要环境因素。真菌通常喜欢在偏酸性的环境下生长, 但在碱性环境下也能生长。例如, 少孢节丛孢在 pH 7.0–8.0 的条件下生长良好, 并且以微酸性环境中生长最适^[48]。本研究结果表明, 在 pH 5.0–11.0 的范围内, 强力节丛孢均能良好生长, 并且 pH 10.0 和 11.0 的生长速率显著优于其他 pH。除此之外, pH 8.0 的产孢量最高。由此可

见, 强力节丛孢对酸性和碱性环境均有一定的耐受性, 并且对碱性环境有着较强的偏好性。强力节丛孢在不同培养基上的产孢量随着营养丰富度的提高而增多, 生长速率的变化情况则不同。该菌株在 CMA 培养基上生长速率最快, WA 次之, PDA 最慢。由此可见, 营养丰富度并不是影响菌株生长速率的唯一因素, 这与已有的研究结果一致^[49]。产生这一现象的原因可能是不同培养基中所含的营养物质不同, 并且强力节丛孢对不同物质的吸收利用水平有所差异^[50]。这一猜想可在后续碳、氮源影响强力节丛孢生长和产孢的研究中得到验证。不同碳、氮源对强力节丛孢的生长和产孢会产生显著影响。对碳源的研究结果表明, 淀粉是强力节孢的最佳生长和产孢碳源。强力节丛孢无法良好地利用半乳糖, 这可能是因为强力节丛孢无法很好地将其转化成磷酸化的葡萄糖衍生物。而在对氮源的研究中发现, 强力节丛孢在 5 种供试氮源上均可良好生长, 其最佳生长和产孢氮源分别为 KNO_3 和蛋白胨。在以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源的培养基上生长和产孢情况最差, 推测可能是因为分解铵态氮的过程中会产生大量 H^+ , 使培养基的 pH 下调, 从而影响强力节丛孢的生长与产孢。

4 结论

本研究从感病马尾松上分离出一株强力节丛孢, 探究了温度、pH、培养基、碳源和氮源对其生长的影响, 结果表明, 强力节丛孢对不同环境具有较强的适应能力, 在各种环境下除部分极端环境以外均能良好生长。由此可见, 强力节丛孢对松材线虫具有良好的生防潜力, 后续可对其进行更为深入的研究。

作者贡献声明

古雅茹: 研究构思与设计、数据收集及论文撰写; 曹景鑫: 研究构思与设计、数据收集; 郝昕: 数据收集及分析; 李树申: 数据收集;

李洋: 数据分析; 张月、金香莲: 数据整理; 马玲: 研究构思与设计、项目管理、资金支持、论文修订。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] 叶建仁, 吴小芹. 松材线虫病研究进展[J]. 中国森林病虫, 2022, 41(3): 1-10.
YE JR, WU XQ. Research progress of pine wilt disease[J]. Forest Pest and Disease, 2022, 41(3): 1-10 (in Chinese).
- [2] 严正梅, 谈家金. 我国松树体内线虫种类及其分布[J]. 中国森林病虫, 2019, 38(5): 38-42.
YAN ZM, TAN JJ. Species and geographical distribution of parasitic nematode in pine in China[J]. Forest Pest and Disease, 2019, 38(5): 38-42 (in Chinese).
- [3] 张立华, 林瑞峰, 黄东东, 张友仲, 赖家厚, 刘雷雷, 章书声. 松材线虫病病原线虫鉴定研究进展[J]. 生物灾害科学, 2023, 46(2): 236-241.
ZHANG LH, LIN RF, HUANG DD, ZHANG YZ, LAI JH, LIU LL, ZHANG SS. Progress in the identification of pathogenic nematodes of pine wood nematode diseases[J]. Biological Disaster Science, 2023, 46(2): 236-241 (in Chinese).
- [4] 徐红梅, 陈京元, 王义勋, 王瑞文. 拟松材线虫研究进展[J]. 湖北林业科技, 2015, 44(6): 40-44.
XU HM, CHEN JY, WANG YX, WANG RW. Progress of *Bursaphelenchus mucronatus*[J]. Hubei Forestry Science and Technology, 2015, 44(6): 40-44 (in Chinese).
- [5] DOU GM, YAN DH. Research progress on biocontrol of pine wilt disease by microorganisms[J]. Forests, 2022, 13(7): 1047.
- [6] PIRES D, VICENTE CSL, MENÉNDEZ E, FARIA JMS, RUSINQUE L, CAMACHO MJ, INÁCIO ML. The fight against plant-parasitic nematodes: current status of bacterial and fungal biocontrol agents[J]. Pathogens, 2022, 11(10): 1178.
- [7] 徐红梅, 赵青, 殷涛. 以松材线虫为靶标生物防治技术研究[J]. 湖北林业科技, 2018, 47(1): 51-55.
XU HM, ZHAO Q, YIN T. Advances in biological control targeting on *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. Hubei Forestry Science and Technology, 2018, 47(1): 51-55 (in Chinese).
- [8] LIOU JY, SHIH JY, TZEAN SS. *Esteya*, a new nematophagous genus from Taiwan of China, attacking the pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*)[J]. Mycological Research, 1999, 103(2): 242-248.
- [9] WANG CY, FANG ZM, WANG Z, GU LJ, SUN BS, ZHANG DL, SUNG CK. High infection activities of two *Esteya vermicola* isolates against pinewood nematode[J]. African Journal of Microbiology Research, 2009, 3(10): 581-584.

- [10] HAYASHI A, FUJIOKA S, NUKINA M, KAWANO T, SHIMADA A, KIMURA Y. Fumiquinones A and B, nematicidal quinones produced by *Aspergillus fumigatus*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2007, 71(7): 1697-1702.
- [11] KWON HR, SON SW, HAN HR, CHOI GJ, JANG KS, CHOI YH, LEE S, SUNG ND, KIM JC. Nematicidal activity of bikaverin and fusaric acid isolated from *Fusarium oxysporum* against pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. The Plant Pathology Journal, 2007, 23(4): 318-321.
- [12] SHIMADA A, FUJIOKA S, KOSHINO H, KIMURA Y. Nematicidal activity of beauvericin produced by the fungus *Fusarium bulbicola*[J]. Zeitschrift Fur Naturforschung C, Journal of Biosciences, 2010, 65(3/4): 207-210.
- [13] 柴希民, 蒋平. 松材线虫的天敌[J]. 森林病虫通讯, 1999, 18(3): 32-33.
CHAI XM, JIANG P. Natural enemies of *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. Forest Pest And Disease, 1999, 18(3): 32-33 (in Chinese).
- [14] 裴正非, 潘瀚桑. 杀线虫真菌节丛孢属(*Arthrobotrys*) 研究进展[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2003, 31(S1): 173-178.
PEI ZF, PAN CS. Advances of studies of nematophagous fungi *Arthrobotrys*[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2003, 31(S1): 173-178 (in Chinese).
- [15] BALAN J, LECHEVALIER HA. The predaceous fungus *Arthrobotrys dactyloides*: induction of trap formation[J]. Mycologia, 1972, 64(4): 919-922.
- [16] CHEN YL, GAO Y, ZHANG KQ, ZOU CG. Autophagy is required for trap formation in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*[J]. Environmental Microbiology Reports, 2013, 5(4): 511-517.
- [17] WAHANE N, SANYAL PK, PAL S. Influence of temperature and light on growth, capture and predation of *Haemonchus contortus* by *Arthrobotrys oligospora*[J]. Journal of Veterinary Parasitology, 2018, 32(1): 1.
- [18] WAHANE N, SANYAL PK, PAL S. Assessment of *in vitro* growth and predation of *Arthrobotrys oligospora* to *Haemonchus contortus* under the influence of media type and age of *Mycelium*[J]. Indian Journal of Small Ruminants, 2018, 24(2): 298.
- [19] PENG H, LU HQ, DONG XY, LIANG X, SHENG KL, WANG JM, KONG XW, ZHA XD, WANG YZ. Deletion of a putative GPI-anchored protein-encoding gene Aog185 impedes the growth and nematode-trapping efficiency of *Arthrobotrys oligospora* by disrupting transmembrane transport homeostasis[J]. Cellular Microbiology, 2022, 2022(1): 8738290.
- [20] ZHOU DX, ZHU YM, BAI N, YANG L, XIE MH, YANG JL, ZHU MC, ZHANG KQ, YANG JK. AoATG5 plays pleiotropic roles in vegetative growth, cell nucleus development, conidiation, and virulence in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*[J]. Science China Life Sciences, 2022, 65(2): 412-425.
- [21] NORDBRING-HERTZ B, JANSSEN HB, TUNLID A. Nematophagous Fungi[M]//The Encyclopedia of Life Sciences, Chichester: John Wiley & Sons, Inc., 2011: 1-13.
- [22] van OOIJ C. Hungry fungus eats nematode[J]. Nature Reviews Microbiology, 2011, 9(11): 766-767.
- [23] YANG JK, WANG L, JI XL, FENG Y, LI XM, ZOU CG, XU JP, REN Y, MI QL, WU JL, LIU SQ, LIU Y, HUANG XW, WANG HY, NIU XM, LI J, LIANG LM, LUO YL, JI KF, ZHOU W, et al. Genomic and proteomic analyses of the fungus *Arthrobotrys oligospora* provide insights into nematode-trap formation[J]. PLoS Pathogens, 2011, 7(9): e1002179.
- [24] VIDAL-DIEZ de ULZURRUN G, HSUEH YP. Predator-prey interactions of nematode-trapping fungi and nematodes: both sides of the coin[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(9): 3939-3949.
- [25] YANG Y, YANG EC, AN ZQ, LIU XZ. Evolution of nematode-trapping cells of predatory fungi of the *Orbiliaceae* based on evidence from rRNA-encoding DNA and multiprotein sequences[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(20): 8379-8384.
- [26] HIGGINS ML, PRAMER D. Fungal morphogenesis: ring formation and closure by *Arthrobotrys dactyloides*[J]. Science, 1967, 155(3760): 345-346.
- [27] 莫明和, 周薇, 赵明莲, 张克勤. 节丛孢属丝孢菌对松材线虫和拟松材线虫的捕食[J]. 微生物学通报, 2002, 29(3): 13-16.
MO MH, ZHOU W, ZHAO ML, ZHANG KQ. Capacity of *Arthrobotrys* spp. to capture nematodes *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* *in vitro*[J]. Microbiology China, 2002, 29(3): 13-16 (in Chinese).
- [28] 鄢小宁, 郑服丛, 伍素娟. 松材线虫捕食真菌: 少孢节丛孢 HNQ11 菌株初步研究[J]. 热带作物学报, 2006, 27(2): 90-94.
YAN XN, ZHENG FC, WU SJ. Preliminary study of strain HNQ11, a pinewood nematode trapping fungus[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2006, 27(2): 90-94 (in Chinese).
- [29] WANG Z, WANG CY, GU LJ, SUN BS, ZHANG DL, LIU L, LEE MR, WANG CL, LI Z, MO EK, SUNG CK. Variabilities of two *Drechslerella dactyloides* isolates in Korea and high predacity against *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. Current Microbiology, 2011, 62(2): 472-478.
- [30] HAO X, CHEN J, LI YX, LIU XF, LI Y, WANG BW, CAO JX, GU YR, MA W, MA L. Molecular defense response of *Bursaphelenchus xylophilus* to the nematophagous fungus *Arthrobotrys robusta*[J]. Cell, 2023, 12(4): 543.
- [31] 刘俊英, 许文博, 田沛. 分离自羊茅属植物的内生真菌菌株在不同培养基上的生长速度多样性[J]. 草业科学, 2024, 41(7): 1650-1659.
LIU JY, XU WB, TIAN P. Study on the diversity of growth rate of endophytes isolated from Fescue spp. on different media[J]. Pratacultural Science, 2024, 41(7): 1650-1659 (in Chinese).
- [32] KUHAD RC, KAPOOR RK, LAL R. Improving the yield and quality of DNA isolated from white-rot fungi[J]. Folia Microbiologica, 2004, 49(2): 112-116.
- [33] TATUSOVA T. Update on genomic databases and resources at the national center for biotechnology information[J]. Methods in Molecular Biology, 2016, 1415: 3-30.

- [34] STOVER NA, CAVALCANTI ARO. Using NCBI BLAST[J]. Current Protocols Essential Laboratory Techniques, 2017, 14(1): 11.1.1-11.1.34.
- [35] 张颖, 李国红, 张克勤. 食线虫真菌资源研究概况[J]. 菌物学报, 2011, 30(6): 836-845.
- [36] ZHANG Y, LI GH, ZHANG KQ. A review on the research of nematophagous fungal species[J]. Mycosystema, 2011, 30(6): 836-845 (in Chinese).
- [37] RUBNER A. Revision of predacious hyphomycetes in the *Dactylella-Monacrosporium* complex[J]. Studies in Mycology, 1996, 1996(39): X-129.
- [38] PFISTER DH. Castor, Pollux and life histories of fungi[J]. Mycologia, 1997, 89(1): 1-23.
- [39] AHREN D, URSING BM, TUNLID A. Phylogeny of nematode-trapping fungi based on 18S rDNA sequences[J]. FEMS Microbiology Letters, 1998, 158(2): 179-184.
- [40] LI Y, HYDE KD, JEEWON R, CAI L, VIJAYKRISHNA D, ZHANG KQ. Phylogenetics and evolution of nematode-trapping fungi (*Orbiliiales*) estimated from nuclear and protein coding genes[J]. Mycologia, 2005, 97(5): 1034-1046.
- [41] ZHANG KQ, HYDE KD. Nematode-Trapping Fungi[M]. 1. Dordrecht: Springer, 2014: 41-46.
- [42] 张克勤, 莫明和. 中国真菌志. 第三十三卷. 节丛孢及相关属[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 53-55.
- [43] ZHANG KQ, MO MH. Flora Fungorum Sinicorum. Vol.33. *Arthrobotrys* et Genera Cetera Cognata[M]. Beijing: Science Press, 2006: 53-55 (in Chinese).
- [44] JIN Y, LIU JW, LIU JK, MAHARACHCHIKUMBURA SSN. *Arthrobotrys chinensis*, a novel fungal species on marbled bamboo (*Chimonobambusa marmorea*) leaves in Sichuan Province, China[J]. New Zealand Journal of Botany, 2024: 1-12.
- [45] DRECHSLER C. Some hyphomycetes that prey on free-living terricolous nematodes[J]. Mycologia, 1937, 29(4): 447-552.
- [46] PFISTER DH. *Orbilina fimicola*, a nematophagous discomycete and its *Arthrobotrys anamorph*[J]. Mycologia, 1994, 86(3): 451-453.
- [47] PFISTER DH, LIFTIK ME. Two *Arthrobotrys anamorphs* from *Orbilina auricolor*[J]. Mycologia, 1995, 87(5): 684-688.
- [48] DUDDINGTON CL. Two new predacious hyphomycetes[J]. Transactions of the British Mycological Society, 1951, 34(4): 598-603.
- [49] 张克勤, 刘杏忠, 李天飞. 食线虫菌物生物学[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2001: 106-107.
- [50] ZHANG KQ, LIU XZ, LI TF. Biology of Nematophagous Fungi[M]. Beijing: China Science & Technology Press, 2001: 106-107 (in Chinese).
- [51] 秦泽荣, 缪作清, 刘杏忠, 陈刚, 王彦兵, 张海洋. 温度和 pH 值对节丛孢属食线虫真菌生长的影响观察[J]. 华北农学报, 1999, 14(3): 141-144.
- [52] QIN ZR, MIAO ZQ, LIU XZ, CHEN G, WANG YB, ZHANG HY. Observation of effect of temperature and pH value on growth of nematophagous fungi (*Arthrobotrys* spp.)[J]. Acta Agriculturae Boreall-Sinica, 1999, 14(3): 141-144 (in Chinese).
- [53] 刘伟, 许强, 黎晓珊, 李清, 陈明月, 韩元, 彭建伟, 陈春蓉, 王帆, 蔡葵蒸, 马忠仁. 两株少孢节丛孢菌在不同培养基中的形态学差异及生长特性[J]. 动物医学进展, 2016, 37(8): 60-64.
- [54] LIU W, XU Q, LI XS, LI Q, CHEN MY, HAN Y, PENG JW, CHEN CR, WANG F, CAI KZ, MA ZR. Morphological differences and growth characteristics of two *Arthrobotry oligospora* strains in different media[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2016, 37(8): 60-64 (in Chinese).
- [55] 王瑞, 杨晓野, 杨莲茹, 刘珍莲, 韩海宾, 张晓东, 鹿艳艳, 李鑫. 不同碳氮源及其比例和培养基初始 pH 值对少孢节丛孢菌菌丝生长的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2008(9): 11-14.
- [56] WANG R, YANG XY, YANG LR, LIU ZL, HAN HB, ZHANG XD, LU YY, LI X. Effects of carbon and nitrogen sources, carbon-to-nitrogen ratio and initial pH of medium on the growth of *Arthrobotrys oligospora*[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2008(9): 11-14 (in Chinese).