

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

松材線蟲新內部寄生菌 ESTEYA VERMICOLA 之病原學，
生理學及微細構造之探討(3/3)

計畫類別： 個別型計畫

計畫編號： NSC90-2313-B-002-335-

執行期間： 90 年 08 月 01 日至 91 年 07 月 31 日

執行單位： 國立臺灣大學植物病理學系暨研究所

計畫主持人： 曾顯雄

共同主持人： 劉瑞芬

計畫參與人員： 石如茵

報告類型： 精簡報告

處理方式： 本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 6 月 27 日

中文摘要

Esteya vermicola 為松材線蟲之內部寄生性真菌天敵，具生物防治松材線蟲之潛能，為探究 *E. vermicola* 之生物防治機制，需瞭解其黏著、侵染松材線蟲之致病過程及影響菌株生長、繁殖之生理、環境因子。在病原學之顯微鏡檢顯示，*E. vermicola* 產於瓶梗上之新月型黏性孢子具內生孢子，略為凹陷之單邊具黏著層，可黏附至游經之線蟲體表，經過約 18 小時後孢子發芽，源生於內生孢子之侵入釘侵入穿透線蟲體壁，之後侵入釘膨大形成球形、次球形之囊狀體，後者脫落釋放至蟲體體腔，成長為紡錘形，節狀同化菌絲，於蟲體內生長、分枝、蔓延。黏著侵染後約 48 小時，線蟲即瀕臨死亡，菌絲突破線蟲體表直接產孢，或形成營養菌絲，向外生長再產生黏性孢子，並可黏著其他線蟲；而黏著之發生與孢子是否著生於產孢梗上關係密切，一旦孢子脫落，在空間上就較不易進行黏著。多數情況下，液體培養會以出芽方式產生大量芽生孢子，僅於特定條件下可產生黏性孢子，但由於相對產量太低，未觀察到有效黏附於線蟲之情形。而芽孢移殖於養分貧瘠之水洋菜培養基上，則可發芽產生大量之黏性孢子。芽孢亦能於松材上定殖、生長，若將芽孢引入樹體，待其殖據後於樹體木質部中應可產孢黏附松材線蟲，或可收生物防治之效。此外，在測試 *E. vermicola* 僅對地上部之植物寄生性線蟲：*Aphelenchoides besseyi*、*Aphelenchoides sp.* 及 *Bursaphelenchus xylophilus*；此外，*E. vermicola* 之生長會受到一些殺菌劑之抑制，不過多為保護型，不會滲入植株及在植物內移行，對於灌入樹體內之芽孢，應不至於造成不利影響，而對生物防治效益發生衝擊。但殺線蟲劑 Century 對 *E. vermicola* 之抑制效應顯著，故於防治松樹萎凋病時應避免同時使用。

關鍵詞：松材線蟲、真菌性天敵、松樹萎凋、生物防治

SUMMARY

More recently, a new endoparasitic fungus, *Esteya vermicola*, has been isolated from naturally infected pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, retrieved from a wilted pine tree in Yangmingshan, Taipei City. *E. vermicola* possesses a potential for biocontrol of the pinewood nematode to alleviate the devastating pine wilt disease. However, fully understanding of *E. vermicola*, particularly in the aspects of pathogenesis, physiological characters, and ecological adaptations, appears to be compulsory, and merit for study.

Ultrastructural studies show that the lunate conidium harbors an ovoid endospore, and the slightly indented side is coated with an adhesive mucilage. After adhesion to the nematode cuticle for 18 hours or more, the conidium germinates, an infection peg derived from the endospore penetrates the nematode, and forms submuscular vesicles, which later separate from the peg and flow in the body cavity of the prey. The vesicles grow, ramify, become cylindrical, septate, branched assimilative hyphae, consume and destroy the host organ and tissue, and lead to the death of the host in 48 hours. After nematode died, the trophic mycelium protrudes the cuticle, and forms a new crop of flask-shaped conidiophore and adhesive lunate conidia directly, or generates mycelium, which grows and sporulates to form adhesive conidia. The topographic position and angle of the lunate conidium seems to be crucial for attachment to nematode. The drop-off conidia seem incapable to adhere to nematode.

E. vermicola produced tremendous number of blastospores, but a trace amount of adhesive conidia in submerged culture conditions. However, a large number of adhesive conidium produced when subculture the blastospores to nutrient poor water agar. The blastospores also showed substantial growth and sporulation when inoculated onto autoclaved pinewood blocks, implicating the potential for biocontrol of pinewood nematode. This viewpoint was further strengthened by its specific infectivity to leaf and stem nematodes, i.e., *Aphelenchoides besseyi*, an *Aphelenchoides* sp., and *B. xylophilus*. Some protective fungicides and a nematicide, Century, are inhibitory to the growth of *E. vermicola*. Therefore, the coapplication of these pesticides, particularly, Century, should be avoided.

Keywords: pinewood nematode, fungal natural enemy, pinewood wilting, biocontrol

前言

松樹松材線蟲萎凋病最早於 1905 年代於日本發生，一九七九年為 Kiyohara 與 Tokushige 證實由松材線蟲感染所致，其後本病也陸續於美國、加拿大、中國大陸、香港、韓國大面積發生，而時常造成流行病，造成松樹大量枯死，不只造成莫大經濟損失，也間接影響水源涵養、景觀、生態平衡等諸多衝擊，台灣於 1985 年首次於北部桃園縣虎頭山、台北縣石門、金山一帶之琉球松、黑松也遭受松材線蟲為害，短短幾年間也造成大面積松樹枯萎死亡，感染致死率達 60~80% 以上。

松材線蟲萎凋病之病原主要係經由媒介昆蟲松斑天牛傳播，又於樹幹內之松脂管、形成層或薄壁細胞為害，故防治不易，空中噴藥，防治媒介天牛易造成環境污染，樹幹點滴灌注殺線蟲劑，只有預防之效果，而且只能小面積施作，並且所費不貲。

最近發現松斑天牛曾被白殭菌 (*Beauveria bassiana*) 寄生，另外也發現可寄生於松材線蟲之內部寄生性世界新屬、新種之真菌性天敵，並將之命名為 *Esteya vermicola*，此等真菌性天敵，不論其係寄生於松斑天牛，或松材線蟲，皆具生物防治潛能，而具探討價值。有鑑於此，遂進行松材線蟲新內部寄生菌 *E. vermicola* 之病原學、生理學及微細構造之為期三年之探討，執行前兩年之研究，已初步瞭解 *E. vermicola* 侵染松材線蟲之病原學，以及影響侵染致病能力之培養調件之培養基質之化學組成分或物理環境因子，本年度遂擬進一步探討影響此菌於自然界存活之內孢子微細構造、黏著機制，以及悠關生物防治之一些基礎性醱酵調件、寄主範圍、對常用殺蟲劑、殺菌劑抗性，以及於松材殖據之探討。

研究方法

微細構造之電顯學探討

將 *E. vermicola* 培養於 cornmeal agar (CMA) 於室溫約 7~14 天，再加入松材線蟲懸浮液 (1,000 隻/ml)，使其被 *E. vermicola* 感染，被感染 8，16，24，48，72 小時後，於解剖顯微鏡下鏡檢，挑取被 *E. vermicola* 侵染之線蟲，然後以戊二醛 (glutaraldehyde)，以及鉻酸 (OsO_4) 進行前固定、後固定，並以系列之酒精以及丙酮進行脫水、包埋、超薄切片，然後以穿透式電顯觀察、照像、記錄。

Esteya vermicola 之黏著機制

將 *E. vermicola* 培養於水洋菜培養基 15 天，切下兩公分見方之菌落，分別置於一未使用過之 2 % 水洋菜培養基上，分別進行以下之處理：A. 為不加任何處理之對照組；B. 以無菌水浸潤菌落後，再小心地吸除水分；C. 於解剖顯微鏡下以玻璃挑針將產孢梗及所有氣生菌絲推倒；D. 將整個菌落塊倒置，把孢子沾於水洋菜培養基上。處理完成後於每個菌落塊旁加入 10 μ l 之線蟲懸浮液 (約有 150 隻線蟲)，置於 25 $^{\circ}$ C 生長箱 5 小時後取出，計算線蟲之被黏著率。每處理隨機採取四個菌落塊，計算孢子附著率，實驗重複兩次。

螢光標定法檢測侵染線蟲之相關酵素

線蟲懸浮液滴加至 *E. vermicola* 菌落中，經約 24 及 48 小時，將被孢子黏著侵入，產生侵入釘，以及菌絲方突出體表之線蟲連同培養基一起切下，置於黑暗濕室中，以標有螢光物質之酵素基質配成的染劑進行染色，經適當的反應時間後，除去染劑，並以緩衝溶液清洗三次，置於螢光顯微鏡下觀察，並照相記錄之。檢測的相關酵素包括：

蛋白質分解酵素 (protease)

BODIPY FL casein 為酪蛋白 (casein) 與螢光物質 BODIPY FL 高度鍵結後之產物，當其被 protease 分解後，螢光物質被釋放，而可在紫外光照射下發出螢光。將 BODIPY FL casein 配製為濃度 0.05 mg/ml (0.01M Tris-HCl buffer pH 7.8) 之染劑，進行染色。

脂質分解酵素 (lipase)

ERL (Enzyme-Labeled Fluorescence) 亦為一種螢光物質，與酵素基質結合後為可溶性，待與酵素接觸被分解後，則會被釋放出來沉積於酵素作用點上，於紫外光激發下將於該特定發出螢光。實驗中以 0.05M Phosphate buffer (pH 7.2) 配製終濃度為 0.125 μ M 之 ERL-97 palmitate 染劑，來進行脂質酵素之檢測。

esterase

關於 esterase 之檢測，則以其連結有螢光物質之反應基質 ERL-97 acetate (濃度為 0.125 μ M) 來進行染色標定。

磷酸水解酵素 (phosphatase)

以 0.05M 的 phosphate buffer (pH 7.2) 配製濃度 0.125 M 之 ERL-97 phosphatase substrate 螢光染劑，進行對 phosphatase 之檢測。

***Esteya vermicola* 之生物防治初探**

***Esteya vermicola* 之寄主特異性測定**

欲將 *E. vermicola* 引入自然界，必須先行評估其對環境可能造成的影響，尤其是對於其他線蟲是否也同樣具有感染能力。受試的線蟲包括兩種葉芽線蟲 (*Aphelenchoides basseyi*、*Aphelenchoides* sp.)、南方根瘤線蟲 (*Meloidogyne incognita*)、腎形線蟲 (*Rotylenchulus reniformis*)、根腐線蟲 (*Pratylenchus coffeae*)，及其他多種以柏門氏漏斗法自土壤中分離所得，但未鑑定至屬之線蟲。將收集到的線蟲懸浮液分別加入 *E. vermicola* 菌落邊緣，使其游入菌落並與孢子接觸，24 小時後觀察線蟲被黏著之情形，三天後再檢視被黏著之線蟲是否進一步遭侵入而致死。

***Esteya vermicola* 之液體培養條件測試**

液體培養所選用的培養基，除了 PDB、1/10 PDB 外，其餘為將固體培養時之基本培養基，碳素源皆以每升 10 g 為基準，添加如下表所列之氮素源，配製成液體培養基，分裝於 250 ml 之錐形瓶，每瓶 25 ml。接種源則以 0.05 % Tween 80 自培養於 1/10 CMA 12 天之菌落洗下孢子，稀釋為懸浮液，接種於液態培養基中，接種後之孢子濃度約為每毫升 5×10^6 個，接種後置於 28℃ 培養箱中以 175 rpm 行震盪培養，逐日採樣，於光學顯微鏡下觀察產孢情形並照像紀錄之；此外，並將培養菌液經濾紙過濾除去菌絲後，以血球計數器計算孢子個數隨時間之變化情形。

***E. vermicola* 之芽孢在水洋菜培養基上之發芽情形**

為了解芽孢生長特性，取上述液體培養所得之芽孢滴加於 2% 水洋菜培養基上，逐日觀察其發芽、生長情形，並照相記錄之。

***E. vermicola* 對農業藥劑之耐受性**

基於農業藥劑使用之頻繁、廣泛，評估一生物防治劑之田間施用可行性時，農藥已成為必須考量的環境要因。測試的農藥包括：(1) 殺菌劑：免賴得 (Benomyl)、貝芬替 (Carbendazium)、四氯異丙晴 (Chlorthalonil)、氫氧化銅 (Cupric hydroxide)、邁隆 (Dazomet)、益發靈 (Dichlorofluanid)、貝芬硫琨 (Dithianon)、依得利 (Etridiazole)、鋅錳乃浦 (Mancozeb)、普拔克 (Propamocarb)、賜加落 (Pyracarbolid)、腐絕 (Thiabendazole)、鋅乃浦

(Zineb)；(2) 殺蟲劑：加保扶 (Carbofuran)、陶斯松 (Chlorpyrifos)、納乃得 (Methomyl)、百滅寧 (Kestrel)、大滅松 (Disyton)；(3) 殺線蟲劑：世紀 (Century)、新好年冬 (butyl carboforum, 丁基加保扶)；(4) 殺滿劑：大克滿 (Dicofol)。各藥劑分別以植物保護手冊上推薦之最高使用濃度為基準，訂為 1 X，配製藥劑含量分別為 10 X、1 X、1/10 X 之 CMA，各藥劑皆於 CMA 滅菌降溫後加入，混合均勻後製成固體平板培養基，以取自培養於 1/10 CMA 之 *E. vermicola* 菌落邊緣小圓盤接種於培養基中央，於 25℃ 黑暗中培養 21 天，測量菌落大小並與培養於不添加藥劑之對照組相互參照，評估各藥劑對 *E. vermicola* 菌落生長及產孢之影響。其中每個處理三重複、實驗重複二次。

***E. vermicola* 殖據松材線蟲後之再產孢能力**

E. vermicola 以基本培養基添加 1% 蔗糖作為碳素源、氮素源則為 0.2% 硫酸銨，25℃ 生長箱中培養十天後接入松材線蟲，2 小時後於解剖顯微鏡下將黏附約 10~15 個孢子之成熟雄蟲挑到 2% 水洋菜培養基上，兩天後再將體內幾已被菌絲殖據 (colonization) 之線蟲移植到幾乎不含任何養分之 2% agarose 平板上，每天於光學顯微鏡下計算單隻線蟲之產孢數，共觀察四天。每次實驗取十隻線蟲，實驗重複兩次。

結果

***E. vermicola* 侵染松材線蟲**

黏附之觀察

於 *E. vermicola* 菌落邊緣滴加松材線蟲 *B. xylophilus* 懸浮液，待線蟲於菌落中行走，體表觸碰到黏性孢子凹面時，孢子即黏附於其上 [圖一 (A)]，並自產孢梗脫落隨著線蟲移動。

黏性孢子必然以凹面黏附至線蟲，然而在線蟲體表上並無一定方向性 [圖一 (B)]，但以平行蟲體者居多；蟲體各部份都可能被黏著，分布情形則以頭部最多，尾端次之，身體中段最少。

黏性孢子以黏附層緊密地貼附於線蟲體表時 [圖一 (C)]，黏著物質會填滿線蟲體表環節處之凹陷 [圖一 (D)(E) 箭頭處]，自黏性孢子的橫切面，可看出黏著層包覆於黏性孢子下表面，若孢子自蟲體脫落，黏著層會殘留於線蟲表面，形成一長橢圓形墊狀痕跡，該處由於黏著層填補了線蟲體表之高低

紋路，已看不到各環節間的凹缺 [圖一 (F)(H)]。

侵染及殖據

黏性孢子黏附至線蟲體表後經過約 18 小時，會自內孢子狀構造處開始分化產生侵入釘 (infection peg)，及穿透黏著層，並壓迫線蟲體壁，於圖四 (A)(B) 中可看到初期之侵入釘，其線蟲體壁受壓迫而凹陷之情形，接著侵入釘穿透體壁之角皮及肌肉層，再漸漸膨大，最後形成菌絲體 (hyphal body)，釋放至蟲體中，而孢子則呈空孢狀。

之後，蟲體內的菌絲體開始生長，形成同化菌絲 (trophic hyphae, assimilative hyphae)，並產生分枝，於蟲體內蔓延，隨著菌絲之生長，線蟲移動漸趨緩慢，活性降低，約在黏著後 48 小時，線蟲瀕臨死亡，此時菌絲自內而外推擠壓迫線蟲，並突破體壁向外生長，或直接產孢，最後整隻線蟲完全被殖據，於體外產生大量的菌絲及孢子，突破線蟲體壁處之菌絲較為狹窄，而穿透後菌絲與體壁間仍緊緊相連，無絲毫之孔隙。

E. vermicola 之黏著機制

為了了解黏性孢子著生於孢子梗與否對於黏著之影響，於是比較不經處理的 *E. vermicola* 菌落塊與經水浸潤、推倒及沾黏至水洋菜培養基上之黏性孢子對線蟲的黏著率，結果發現不經處理者，在 5 小時內 36.5% 之線蟲被黏著，而三種處理中，以水處理後並於無菌操作台上送風吹乾菌落，黏著率僅 7%，其餘兩種處理則只有 4.5% 之黏著率，於鄧氏多變統計分析中顯示三種處理與對照組之黏著率有顯著差異，而黏著率顯著降低，而此三處理彼此間則無差異。顯示黏性孢子是否著生於瓶梗上，會對黏著效率造成顯著影響。

侵染線蟲之相關酵素

以螢光標定法檢測侵染線蟲之相關酵素：protease、lipase、esterase、phosphatase。螢光染劑標定的結果顯示，僅於黏附於線蟲體表之黏性孢子上有 esterase 之反應，而且螢光的出現侷限在內孢子狀構造處，其他螢光染劑處理結果則無反應。而檢測菌絲方突出線蟲體表時，可能之酵素亦只有 esterase 有螢光反應，較強的螢光出現於菌絲內的顆粒狀構造中。

E. vermicola 之生物防治初探

E. vermicola 之寄主範圍

基於生物有自然繁衍的特性，在生物防治中，若欲將一生物引入自然界，必須先評估其對環境可能造成之影響，須是在不影響非標的生物之前提下，能對防治的標的生物產生有效抑制作用的，方是適當的生物防治劑。由於 *E. vermicola* 為線蟲寄生菌，故測試了其對兩種葉芽線蟲 (*Aphelenchoides besseyi*、*Aphelenchoides sp.*) 南方根瘤線蟲 (*Meloidogyne incognita*)、腎形線蟲 (*Rotylenchulus reniformis*)、根腐線蟲 (*Pratylenchus coffeae*) 及其他多種自土壤中分得之未鑑定線蟲的病原性。結果如表一中所示，除了松材線蟲外，*E. vermicola* 還可黏附之至葉芽線蟲及腎形線蟲體表，但只有在松材線蟲及其親緣相近的葉芽線蟲上，黏附之孢子才能成功地侵入線蟲體表，進而造成線蟲死亡。在其他自土中分得之線蟲上，則完全無黏附之現象。

E. vermicola 之液體培養

在前述的生理條件測試中，了解到以 sucrose 作為碳素源時利於 *E. vermicola* 菌落之生長，若為 galactose 則菌落生長較差，但有利於黏性孢子之產生，而硫酸銨及 peptone 兩種氮素源則利於菌落生長及產孢，另外，低碳氮比則有助於黏性孢子之生成。所以選擇了此兩種碳素源及氮素源交叉配合，並調製不同碳氮比進行液態培養，並與不同濃度之常用培養基 PDB 相互對照，觀察產孢情形。結果如表二所示。以硫酸銨為氮素源時，當碳氮比過低，本菌即無法生長，若以 peptone 做為氮素源，則碳氮比越低，產孢量越高。在各培養條件下，大部份僅產生一種芽生孢子 (blastospores)，只有 GA100、GA10 及 PDB 1 X、PDB 10 X 尚有黏性孢子產生，在 GA100、GA10 中，芽孢產量較其他處理低，有較多之芽孢發芽形成菌絲，而在 PDB 1X 及 PDB 1/10 X 則分別於培養後第二天，第三天才會有黏性孢子出現，在此同時也可直接由培養菌液觀察到菌絲團之形成，於各濃度 PDB 中，則養分越高，產生的芽生孢子及黏性孢子量皆同時提高。

若於光學顯微鏡下仔細觀察，液體培養產生的芽生孢子形態並不均一，大部份為長橢圓形，亦有圓形，卵形等 [圖二 (A)]，可經由出芽方式再產生芽孢 [圖二 (B)]，或發芽後形成細長之柄，並於其上產生黏性孢子 [圖二 (C)]，亦有一個芽孢雙邊發芽，分別產生兩種產孢細胞，並著生不同分生孢子者 [圖二 (D)]，或行出芽產生其他芽孢後，再分化產生瓶梗狀產孢構造，再產生黏性孢子 [圖二 (E)]，十分地富於變化。而對 PDB 1X 培養菌液中生長之菌絲進行鏡檢，可觀察到菌絲所呈現的外形為波浪狀 [圖二 (F) 箭頭]，而黏性孢子不一定著生於特化的瓶梗上，亦可於無特別開口之柄上產生 [圖二 (F) 箭號]。

E. vermicola 之芽孢在水洋菜培養基上之發芽

欲進一步了解芽孢之生長特性，將前述液體培養產生之芽孢接種於水洋菜培養基，芽孢可能會繼續出芽而在培養基上聚集，產生芽孢堆；或於芽孢上直接產生黏性孢子，有些則發芽延伸成為菌絲，病於其上著生瓶梗，再產生黏性孢子，之後約經過 7 天，培養基上產生的幾乎全為年性孢子。

E. vermicola 殖據松材線蟲

將被 *E. vermicola* 感染後已無活力之瀕死線蟲挑至 agarose plate 上，於解剖顯微鏡下觀察其產孢，於第 24 小時平均每隻線蟲體外約有 30 個黏性孢子產生，大部份為直接著生於突出體壁之分生孢梗，至第 48 小時，蟲體外的菌絲更多，病可見氣生菌絲與大量黏性孢子產生，平均每隻線蟲體外已有 108.4 個黏性孢子，其後第三、第四天，孢子之生成量大致呈線性上升，但逐漸趨緩，第四天時平均每隻線蟲體外產生的黏性孢子數達到最高量，平均約有 200 個，而其中最高者，則高達 380 個，至第五天時，每隻線蟲上之產孢數降至 100 個左右，並看到蟲體角皮層被脹破，附近布滿芽生孢子之情形。

E. vermicola 對其他農業藥劑之耐受性

在測試的 13 種殺菌劑、5 種殺蟲劑及殺線蟲劑、**藥劑**度為田間推薦濃度之 10 倍時，*E. vermicola* 完全無法生長，如果將添加的濃度降至 1X，1/10X，則在殺菌劑 Benomyl、Carbendazium、Dazomet、Dichlorofluanid、Dithianon、Mancozeb、Thiabenclazole、Zineb 上，*E. vermicola* 依然無法生長，若培養基中所添加的其他殺菌劑 Chlorothalonil、Copper hydroxide、Etridiazole 則 *E. vermicola* 雖可生長，但仍然受到不同程度的抑制作用。而 1/10 X 的 Propamocarb，Pyracarbolid，反而有促進生長之效用。

另外，1X 及 1/10 X 的殺蟲劑、殺線蟲劑、殺虫劑，除了 Chlorpyrifos 及 Century 之抑制作用顯著外，*E. vermicola* 在添加其他藥劑的培養基上都可以維持一定程度之生長，不會完全受到抑制 (表三)。

討論

E. vermicola 侵染松材線蟲之過程

在侵染過程研究較清楚、亦同屬於內部寄生型之 *Drechmeria coniospora* 及 *Verticillium balanoides*，其侵染過程中，附著器之形成扮演了決定性的角色 (Dijksterhuis *et al.*, 1990; Sjollem *et al.*, 1993)。然而黏附至松材線蟲體表之 *E. vermicola* 黏性孢子，於侵染線蟲時，直接由內孢子結構

造產生細小之侵入釘，貫穿寄主體表，其間可能涉及酵素及機械力量兩者之相互輔助，但並未有其他感染構造之分化；而侵入後，侵入釘逐漸膨大並與原孢子分離，形成菌絲體 (hyphal bodies) 游離於線蟲體腔，並生成節狀之紡錘形同化菌絲，在蟲體內分枝、蔓延，與其他線蟲寄生菌，如 *Arthrobotrys oligospora* 及 *V. balanoides* 侵入後形成感染球 (infection bulb)，再由此構造產生感染菌絲之情形亦有所不同。Dijksterhuis 等人 (1991) 推測，*D. coniospora* 侵入前產生的附著器，其意義在於：此菌是以產生於分生孢子一端之黏著芽黏附於線蟲體表，兩者接觸界面相當有限，須藉由附著器之形成，以提高接觸面積，增進其附著之緊密度，方能提高入侵效率。而反觀 *E. vermicola* 其黏性孢子呈新月型，又特定以凹面貼附於線蟲體表，兩者的接觸面積本來就較大，而且黏著層附著的範圍涵蓋了整個孢子凹面，侵入釘卻只占內孢子構造所在區域的一小部分，加上產生之侵入釘十分精巧細緻，對兩者黏附的界面影響並不大，故在侵入時，孢子與蟲體間仍能維持良好的接觸及黏附，不至因侵入釘推擠線蟲角皮之反作用力太強而造成孢子脫落。可知 *E. vermicola* 黏性孢子本身的構造就已發展出適於直接侵入的模式，不須另外產生附著器等特化構造來協助其感染。

而侵入後一開始所形成游離的菌絲體，會因為線蟲之移動而在蟲體中產生部分之位移，有利於 *E. vermicola* 快速殖據蟲體。

綜合整個侵染過程，與其他大部分線蟲寄生菌相似之處有：一. 黏著層產生於黏著線蟲之前，黏著後，更多之黏液被分泌出來，以鞏固孢子之附著；二. 蟲體內延伸之同化菌絲內含一些儲存性物質，可能為 lipid 或 glycogen；三. 當菌絲蔓延至一定程度，突出線蟲體壁後，菌絲與死亡之線蟲角皮仍緊密相連，使菌本身在取得線蟲養分增加自身繁殖體並向外擴展的同時，死亡線蟲之內容物不會因菌體突出之孔洞而漏失，而能徹底利用寄主的每一分養分。

此外，黏著於體表但未侵入線蟲之孢子，有的會從側邊發芽並繼續生長，此現象的發生與環境之養分條件有關，當外界養分條件佳時，此類情形較為明顯。

***E. vermicola* 之黏著機制**

對於寄生或共生的真菌而言，黏附作用是其與寄主或宿主建立交互作用的先決步驟，而黏附作用的完成，常包括附著與辨識兩階段，即接觸後確認為寄主後，才有後續感染、殖據的進程 (Tunlid et al., 1992)。對於線蟲寄生菌與寄主線蟲間以 lectin-carbohydrate 做為辨識分子的基本假設，1979 年以來在 *Arthrobotrys oligospora* 等捕捉型寄生菌及 *Drechmeria*

coniospora 上以醣基處理捕捉或黏著構造之抑制實驗，已陸續得到一些可能為辨識分子的訊息。在 *E. vermicola* 上原擬採相似之方法，探究 lectin 模式是否亦存於 *E. vermicola* 與寄主 *B. xylophilus* 間，但是根據前述對本菌於 galactose 為碳素源、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 為氮素源之培養基上培養結果得知，其自菌絲上產生新的黏性孢子需 8-10 小時，若自己分化完成之分生孢子梗上產孢，則只須 5-6 小時，所以為了避免各類醣溶液處理後，才產生之孢子會影響黏著率之判定，故必須於處理完後五小時內完成觀察，然而即使是完全未經處理之菌落塊，滴加線蟲後五小時之黏著率亦僅達 36.5 %；加水處理者，更驟降至 7 %。由於在 TEM 材料製備過程中，經過蒸餾水、各種固定液、緩衝溶液之處理後之孢子仍有黏著層存在，故該黏著物質應非水溶性，於解剖顯微鏡下觀察，則發現加水處理的另一個影響是導致菌落之氣生菌絲坍塌，許多黏性孢子自瓶梗上掉落才造成黏著率下降，為證實此點，試以挑針將菌落內氣生菌絲及孢子梗推倒，或以刀背刮下黏性孢子，再沾黏至水洋菜培養基上，結果發現黏著率降至 4.5 %。既然未經任何溶液處理，僅將氣生菌絲與孢子梗推倒，孢子黏著率即顯著降低，可見 *E. vermicola* 的黏性孢子是否著生於瓶梗，對黏著率影響很大；另外，沾黏至水洋菜培養基之孢子仍有 4.5% 之黏著率，顯示離開分生孢梗之孢子仍具黏著能力，著生於分生孢子梗上之意義，應是在於其能讓孢子的黏著面展現於空間中。由於瓶梗的高度恰約為蟲體體軀高度之半，因此其上著生之黏附性孢子，在空間上處於最有利於黏著線蟲之位置，相似的狀況亦見於另一內部寄生菌 *Hirsutella rhossiliensis*，該菌自產孢梗上掉落之孢子就會失去病原性，無法感染寄主 (Mcinnis and Jaff, 1989)。

侵染線蟲之相關酵素

在本實驗中僅以標有螢光之酵素基質，對被孢子黏著之線蟲及侵染後之線蟲進行酵素之檢測。檢測結果發現只有在黏性孢子之內孢子狀構造，以及方突出體表處之菌絲發出螢光，顯示有 esterase 之活性，而 phosphatase 之檢測結果，發現無論有無被 *E. vermicola* 寄生之蟲體皆發出很強的螢光，故無法探討菌體自身是否具此酵素活性，其餘在 protease, lipase 的偵測上，都沒有螢光反應出現。此現象可能由於 1. 於侵入或突出體表時，確無這些酵素之參與；2. 這些酵素參與侵染的時間過於短暫，染色時所挑取的線蟲樣本可能錯過該時機；3. 染劑未能進入 *E. vermicola* 侵染線蟲時之侵入點處，以及由孢子與線蟲體表緊密相連所形成的密閉空間。esterase 於內孢子狀構造處有正反應，則可能是因為其反應基質 ERL-97acetate 在分子量上較小或是結構上之不同，使之能夠滲入黏性孢子，與其中之 esterase 反應後，才發出螢光。esterase 之存在則表示與 lipid 之分解有關，而己知線蟲體表之架構上含有 lipid，故此結果顯示侵入前黏性孢子內就已預存了 esterase，可能和孢子之黏性有關或有利侵入作用。而

菌絲突出體表時，除機械力量外，可能亦需有 esterase 之參與角質或體壁之分解。

Esteya vermicola 之生物防治初探

E. vermicola 之寄主特異性

於受試之六種植物寄生性線蟲，及土中分離之多種腐生或寄生性線蟲中，*E. vermicola* 黏著情形僅見於 *Bursaphelenchus xylophilus*、*Aphelenchoides besseyi*、*Aphelenchoides* sp.、*Rotylenchulus reniformis*。其中 *Rotylenchulus reniformis* 被黏著後，並無侵入之現象。顯見此菌有一定之寄主範圍，對寄主之選擇上較具特異性，而由 *R. xylophilus* 雖被黏附但無法侵入之情形，知其黏附過程應包括黏著及辨識寄主兩個階段，*R. xylophilus* 並非其寄主，故無進一步地侵入現象。此外，基於 *E. vermicola* 於線蟲間即有如此高之寄主專一性，其對其他親源相去更遠、包括人類在內之非標的生物，潛在之衝擊就更小，應不致造成不良之副作用。

E. vermicola 之液體培養

在各測試的培養條件中，發現其與固體培養之產孢狀況有所差別。振盪培養的情況下，此菌多產生芽生孢子。而會產生黏性孢子的 PDB、1/10 PDB 培養基中產生的芽生孢子量、黏性孢子、菌絲量皆會隨養分之稀釋而減少，與其他內部寄生型線蟲寄生菌 *Drechmeria coniospora*、*Verticillium balanoides*、*Harposporium anguillulae* 養分高時菌絲生長快、貧瘠時產孢多之情形不同 (Lohmann *et al.*, 1989.)。而關於 *E. vermicola* 在嘗試了多種不同液體培養之條件後，仍然無法得到大量之黏性孢子，推究其原因，可以發現一般運用液體培養成功產生大量分生孢子者，例如 *Drechmeria coniospora*、*Verticillium balanoides*，其產孢時，同一產孢細胞可產生大量之分生孢子，只要成功地找出可產生分生孢子梗之條件，就有機會自液體培養中得到大量之分生孢子 (Gam, 1985)。然而在 *E. vermicola*，其一個分生孢子梗僅能產生單一個黏性孢子，即使該孢子成熟掉落後，亦不會有第二個孢子再產生。基於此項產孢特性，就限制了自液體培養中得到大量黏性孢子的可能性。若欲從液體培養得到大量之黏著孢子，可能還要進行更多的嘗試。

E. vermicola 於水洋菜培養基上之發芽情形

將芽孢置於水洋菜培養基上，發現有黏性孢子直接產於芽孢，而不經過營養生長之時期，此現象稱為 microcycle conidiation。黏性孢子同時亦為 *E. vermicola* 之黏著構造，在其他線蟲寄生菌上，亦有直接自分生孢子產生

捕捉構造之情形，例如 *Arthrobotrys oligospora* 之分生孢子於牛糞之誘導上，於分生孢子上直接產生捕捉構造，推測為存活之構造，而在生態上之意義，則如同黏著性孢子，可於黏著後隨線蟲游走，增進自身族群之傳播，或增加短期內之捕捉率(Dackman and Nordbring-Hertz *et al.* 1992；Saxena and Mittal, 1995.)。

E. vermicola 殖據線蟲後之產孢情形

受 *E. vermicola* 黏附之線蟲，於 agarose 培養基上 4 天可產生約 200 個黏性孢子；而 *Drechemeria coniospora* 寄生線蟲後，則可產生約 5,000-10,000 個孢子，但此孢子產生後聚集成群，不會立刻分化產生可黏附線蟲之黏著芽，須仰賴土壤動物之移動或是水分流動的力量助其分散後，孢子才會成熟而具感染力 (Boogert *et al.*, 1992)，其在生態上採行的策略與 *E. vermicola* 並不相同，故侵染單隻線蟲後的產孢量才有如此大之差異。而另一黏著模式較為相近的線蟲寄生菌 *Hirsutella rhossiliensis* 產孢量與 *E. vermicola* 就較接近，25℃ 下 6 天，約可產生 400 個孢子。

E. vermicola 對其他農業藥劑之耐受性

於化學藥劑過度始用的今日，農藥已成為生物製劑引入田間所必須評估的環境因子之一；即使在未來，也只能企冀將化學藥劑之用量減至最低，配合其他方針進行綜合防治。所以欲將一菌株作為生物防治劑，則其與其他藥劑之相容性亦須加以測試。在測試的藥劑中，殺蟲劑、殺線蟲劑、殺菌劑，由於作用機制相去較多，故只有少數藥劑於濃度較高時有抑制作用；而 *E. vermicola* 對於殺菌劑之耐受性似乎不高，但由於 *E. vermicola* 防治對象為松樹萎凋病，若注入樹體中可能接觸到保護性藥劑的抑制之機會較少，而此菌又恰對其中對於一些滲透性、能為植物吸收、並於植物體內移行的殺菌劑，有一定的抗性，其生長不會完全受阻。

Esteya vermicola 為第一個在松材線蟲上發現之內部寄生型菌真菌，根據目前之實驗結果，發現此菌在營養狀況差及培養基特定種類氮源含量高時，會產生較多的黏附型孢子，而培養基養分高時則所產生的幾乎都為不具黏著力的桿狀孢子。推測其在自然界中的適應機制為：當環境養分高時，菌絲生長快並大量地產生桿狀孢子來擴展其族群；而當環境中養分缺乏時，就會誘使此菌產生較多黏附型孢子，若有寄主線蟲存在環境中，即可增加黏著並寄生的機會，所以 *E. vermicola* 其具此種黏著型孢子，相當於擁有另一個養分來源管道，可增加其在自然界中之生存競爭力。另外，當環境中特定的氮素源種類濃度高時，也會誘使黏附型孢子大量產生，或是所產生的孢子黏著效率會較強；侵染線蟲後所產生的孢子亦絕大多數為黏著型，

故線蟲之存在對黏附型之孢子有正面之激發作用。而當孢子黏著至線蟲體表後並不會馬上發芽產生侵入釘，而可隨線蟲移動，無形中即增加了傳播之機會。此等特性若未來應用於松樹萎凋病之防治時，一般狀況下此菌可行腐生，若有線蟲存在時則誘使產生較多黏附型孢子，黏附線蟲後可隨線蟲移動而後侵入蟲體，利用蟲體之養分並產生更大量之黏附型孢子，可較快擴大感染面積，期能將增長中的線蟲族群壓制，而收防治之效。

參考文獻

- Barron, G. L., and Thorn, R. G. 1987. Destruction of nematodes by species of *Pleurotus*. Can. J. Bot. 65 : 774-778.
- Dackman, C., and Nordbring-Hertz, B. 1992. Conidial traps- a new survival structure of the nematode-trapping fungus *Arthobotrys oligospora*. Mycol. Res. 96 : 194-198.
- Dijksterhuis, J., Harder, W., Wyss, U., and Veenhuis, M. 1991. Colonization and digestion of nematodes by the endoparasitic nematophagous fungus *Drechmeria coniospora*. Mycol. Res. 95 : 873-878.
- Dijksterhuis, J., Sjollem, K. A., Veenhuis, M., and Harder, W. 1994(a). Competitive interactions between two nematophagous fungi during infection and digestion of the nematode *Panagrellus redivivus*. Mycol. Res. 98 : 1458-1462.
- Dijksterhuis, J., Veenhuis, M., and Harder, W. 1990. Ultrastructural study of adhesion and initial stages of infection of nematodes by conidia of *Drechmeria coniospora*. Mycol. Res. 94 : 1-8.
- Estey, R. H., and Tzean, S. S. 1981. An ultrastructural examination of nematode penetration by nematode-trapping fungi. Can. J. Plant Sci. 61 : 785-789.
- Jackson, M. A., and Slininger, P. J. 1993. Submerged culture conidial germination and conidiation of the bioherbicide *Colletotrichum truncatum* are influenced by the amino acid composition of the medium. J. Industrial Microbiol. 12 : 417-422.
- Jansson, H. B. 1993. Adhesion to nematodes of conidia from the nematophagous fungus *Drechmeria coniospora*. J. Gen. Microbiol. 139 : 1899-1906.
- Jansson, H. B., Jeyaprakash, A., and Zuckerman, B. M. 1985. Differential adhesion and infection of nematodes by the endoparasitic fungus *Meria coniospora*

(*Deuteromycetes*). Appl. Environ. Microbiol. 49 : 552-555.

Jatala, P. 1986. Biological control of plant-parasitic nematodes. Annu. Rev. Phytopathol. 24 : 453-489.

Jenkins, N. E., and Prior, C. 1993. Growth and formation of true conidia by *Metarhizium flaoviride* in a simple liquid medium. Mycol. Res. 97 : 1489-1494.

Lane, B. S., and Trinci, A. P. J. 1991(a). Endogeneous reserves and survival of blastospores of *Beauveria bassiana* harvested from carbon-and nitrogen-limited batch cultures. Mycol. Res. 95 : 821-828.

Lohmann, U., and Sikora, R. A. 1989. Mass production of the endoparasitic fungi *Drechmeria coniospora*, *Verticillium balanoides* and *Harposporium anguillulae* in liquid culture. Nematologica 35 : 97-104.

Lopez-Llorca, L. V., and Robertson, W. M. 1992(a). Immunocytochemical localization of a 32-kDa protease from the nematophagous fungus *Verticillium suchlasporium* in infected nematode eggs. Exp. Mycol. 10 : 261-267.

Mcinnis, T. M., and Jaffee, B. A. 1989. An assay for *Hirsutella rhossiliensis* spore and the importance of phialides for nematode inoculation. J. Nematol. 21 : 229-234.

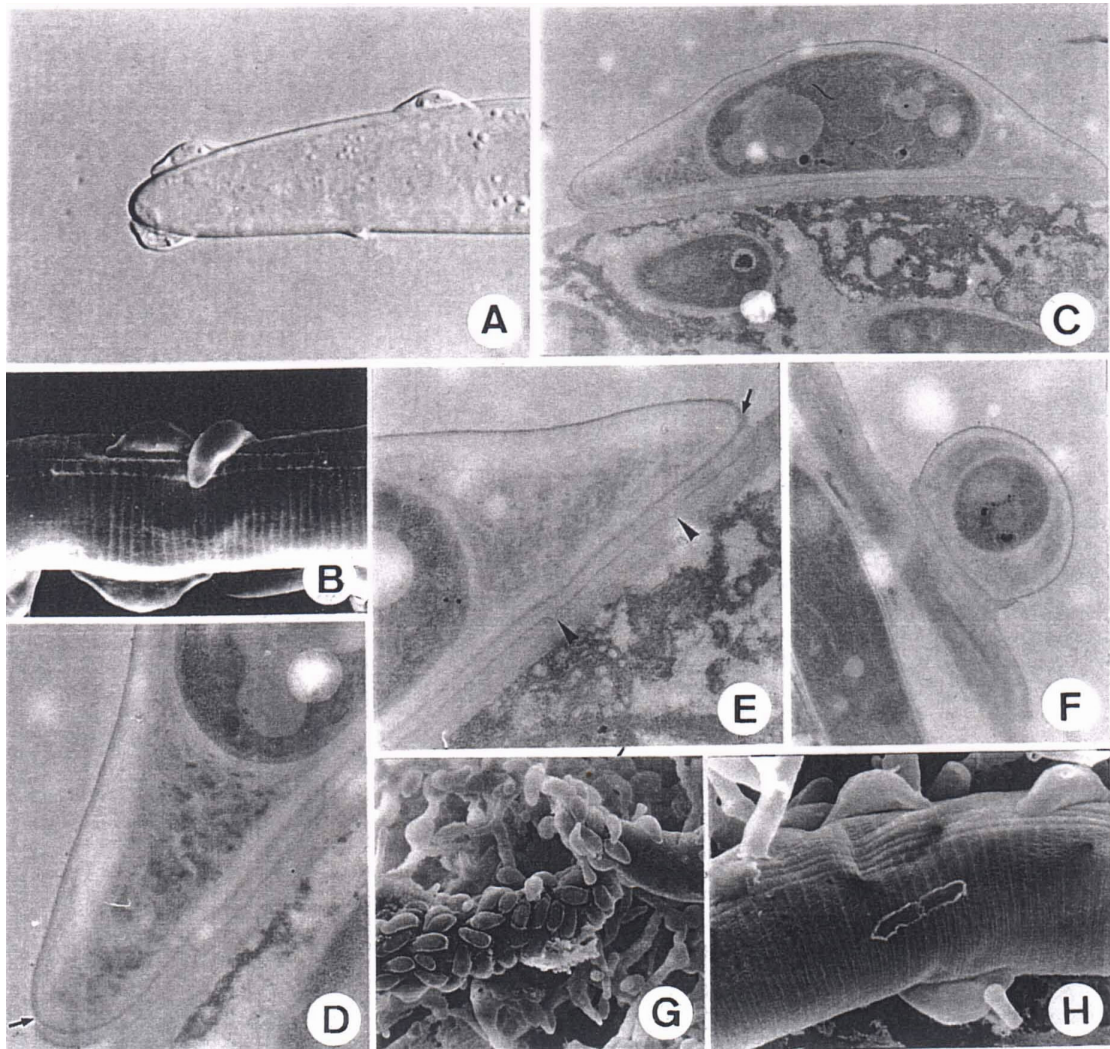
Saikawa, M. 1982. An electron microscope study of *Meria coniospora*, an endozoic nematophagous Hyphomycetes. Can. J. Bot. 60 : 2019-2023.

Saxena, G., and Mittal, N. 1995. Trap formation by conidia of nematode-trapping *Monacrosporium* spp. Mycol. Res. 99 : 839-840.

Sjollema, K. A., Dijksterhuis, J., Veenhuis, M., and Harder, W. 1993. An electron microscopical study of the infection of the nematode *Panagrellus redivivus* by the endoparasitic fungus *Verticillium balanoides*. Mycol. Res. 97 : 479-484.

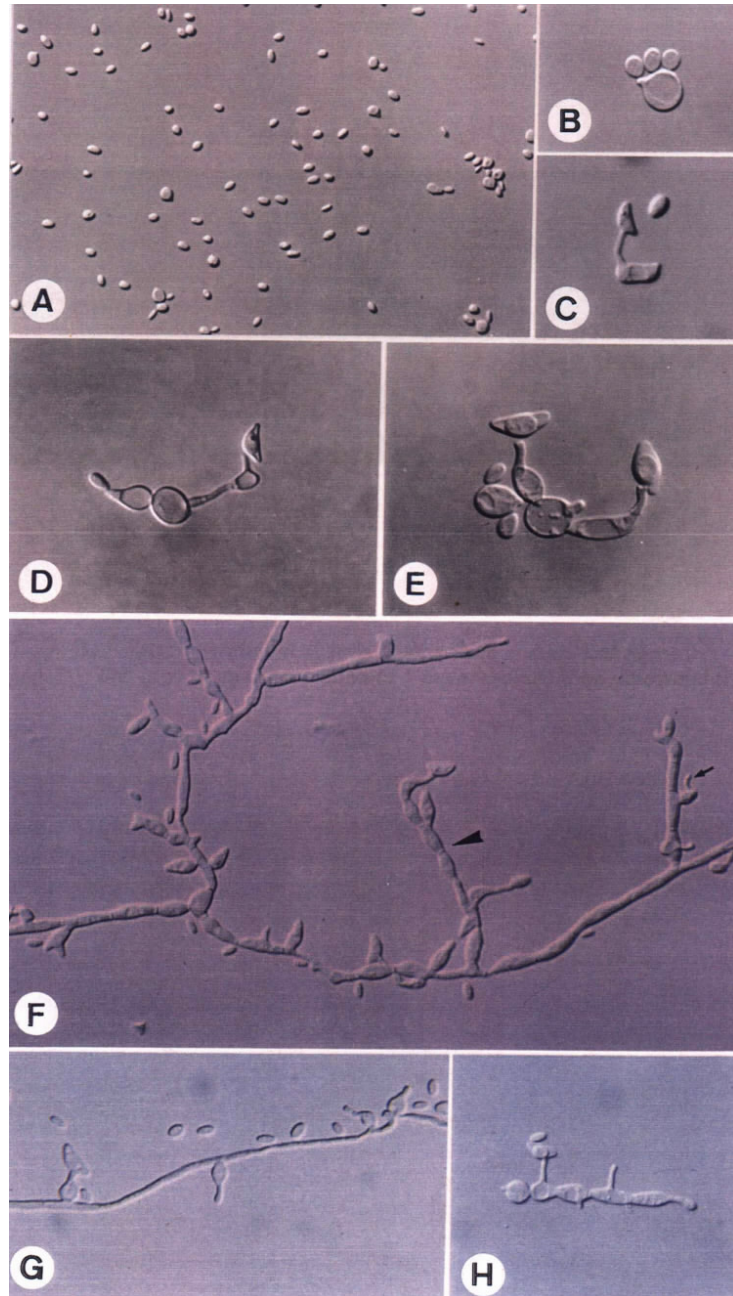
Tunlid, A., Jansson, H. B., and Nordbring-Hertz, B. 1992. Fungal attachment to nematodes. Mycol. Res. 96 : 401-412.

Wingfield, M. J., Blanchette, R. A., Nicholls, T. H., and Bobbins, K. 1989. The pine wood nematode : a comparison of the situation in the United States and Japan. Can. J. For. Res. 12 : 71-75.



圖一 (A-H)、*Esteya vermicola* 新月型孢子黏附松材線蟲，*Bursaphelenchus xylophilus* 體表之光學、穿透式以及掃描式電顯鏡檢。

(A-H). Light, scanning and transmission electron microscopy of the adhesion of lunate conidia of *Esteya vermicola* to the cuticle of pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. A layer of adhesive mucilage layer is visible between the interface of conidia and cuticle (D-E, arrows). A:×1,000 ; B:×2,500 ; C:×8,000 ; D,E:×20,000 ; F:×10,000 ; G:×1,000 ; H:×2,500



圖二 (A-H)、*Esteya vermicola* 於液態及固態培養之產孢情形。

(A-H). The sporulation of *Esteya vermicola* in liquid broth (PDB) and solid media (2 % WA). (A) blastospores, $\times 250$, (B) subglobose, none adhesive conidia produced from the germinated, swollen blastospores, $\times 1,000$, (C-F) the production of flask-shaped conidiophores and lunate adhesive conidia directly from the germinated blastospores via microcycleic cycle (C-E), or via normal cycle (F), arrow head and arrow indicatory the constriction of hyphae and conidiogeneous cell, respectively, C: $\times 575$; D,E: $\times 1,000$; F: $\times 500$, sporogenesis of subcultured blastospores on 2 % water agar (G-H) $\times 400$.

表一、*Esteya vermivola* 對不同線蟲之黏附及侵染情形

Differential response of nematodes to the attachment and infection by lunate conidia of *E. vermivola*.

Nematodes	Lunate conidia	
	Attachment	Infection
<i>Aphelenchoides besseyi</i>	+	+
<i>Aphelenchoides sp.</i>	+	+
<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	+	+
<i>Meloidigyne incognita</i>	—	—
<i>Rotylenchulus reniformis</i>	+	—
<i>Pratylenchus coffeae</i>	—	—

+ : attachment or infection

— : no attachment or infection

表二、 *Esteya vemicola* 在不同液體培養基下產生芽生及黏性孢子之情形
The effect of different nutrient broth on the production of blastospores and adhesive conidia of *Esteya vemicola*.

Nutrients	blastospores	adhesive conidia
GA100*	2.59×10^8	L
GA10	7.18×10^7	L
GA0.1		
GP100	6.49×10^8	N
GP10	9.56×10^9	N
GP0.1	7.88×10^9	N
SA100	4.41×10^8	N
SA10	4.80×10^8	N
SA0.1		
SP100	4.23×10^8	N
SP10	8.95×10^8	N
SP0.1	4.39×10^9	N
PDB1X	6.82×10^9	L
PDB1/10X	8.90×10^8	L
PDB1/100X	1.30×10^8	N

G : galactose

A : ammonium sulfate

S : sucrose

P : peptone

“GA 100” indicates “galactose / ammonium =100’

: none growth

N : adhesive conidia absent

L : adhesive conidia present

表三、 *Esteya vermicola* 與其他農業藥劑之相容性

Tolerance of *Esteya vermicola* to pesticides at different concentration

Pesticides	中文普通名	Concentration		
		10 X	1 X	1/10 X
Fungicides				
Benomyl	免賴得	0*	0	0
Carbendazium	貝芬替	0	0	0
Chlorthalonil	四氯異丙晴	0	0.75 ± 0.04 i	1.15 ± 0.04 j
Copric hydroxide	氫氧化銅	0	4.41 ± 0.22 f	6.02 ± 0.04 g
Dazomet	邁隆	0	0	0
Dichlorofluanid	益發靈	0	0	0
Dithianon	貝芬硫琨	0	0	0
Etridiazole	依得利	0	4.68 ± 0.12 e	7.34 ± 0.11 e
Mancozeb	鋅錳乃浦	0	0	0
Propamocarb	普拔克	0	7.75 ± 0.06 a	7.79 ± 0.19 bc
Pyracarbolid	賜加落	0	2.88 ± 0.12 h	8.16 ± 0.05 a
Thiabendazole	腐絕	0	0	0
Zineb	鋅乃浦	0	0	0
Insecticides				
Carbofuran	加保扶	0	6.10 ± 0.09 b	7.92 ± 0.10 b
Chlorpyrifos	陶斯松	0	0	4.18 ± 0.06 i
Methomyl	納乃得	0	4.20 ± 0.05 g	7.51 ± 0.02 de
	大滅松	0	2.95 ± 0.13 h	6.54 ± 0.07 f
Kestrel	百滅寧	0	4.57 ± 0.03 ef	7.31 ± 0.01 e
Nemotocides				
Marshal	新好年冬	0	5.63 ± 0.07 c	7.38 ± 0.12 e
Centry	世紀	0	0	5.71 ± 0.34 h
Acaricide				
Dicofol	大克滿	0	4.93 ± 0.14 d	5.75 ± 0.29 h
Contral			7.64 ± 0.05 a	7.64 ± 0.05 cd

1. The data in every column is the MEAN ± SD of three replicas.

* : colony diameter (cm)