

松材线虫个体发育研究

叶为民^{*} 冯志新

(线虫研究室)

摘要 松材线虫病在广东深圳发生严重。25℃, 松材线虫从产卵到二龄幼虫孵化的胚胎发育为 30 h, 在盘多毛孢菌上培养, 从二龄幼虫发育到三龄幼虫需要 5 天, 幼虫通过 4 次脱皮发育到成虫, 第 1 次在卵内。详细描述了胚胎发育和胚后发育各阶段的过程和形态变化。松材线虫各龄期的区分以热杀时虫体形态、体长作为依据, 二龄幼虫、三龄幼虫、雄虫分别为“L”、“I”、“J”形, 四龄幼虫和雌虫为开阔“C”形, 但雌虫生殖器官发育成熟。二龄、三龄、四龄、雄虫的体长分界值依次为 359.4 μm, 444.9 μm, 574.5 μm。观察生殖腺位置、结构和发育程度也是重要依据。

关键词 松材线虫; 胚胎发育; 生活史; 分龄

松材线虫病是松树特大的毁灭性病害, 目前在日本、美国、加拿大和我国局部地区发生。关于松材线虫 (*Bursaphelenchus xyphilus* (Steiner & Buhrer, 1934) Nickle, 1970) 的个体发育, 国内至今尚无报道, 为此我们从深圳枯死马尾松 (*Pinus massoniana*) 内分离的松材线虫, 进行了胚胎发育、生活史和分龄的研究, 以期为此病的防治提供一定的理论依据。

1 材料与方法

松材线虫于 1988 年 8 月采自深圳莲塘的马尾松内, 经 0.1% HgCl₂ 消毒 5 min 后, 在盘多毛孢菌 (*Pestalotia* sp.) 上 25℃ 培养。

胚胎发育: 将产卵雌虫吸入凹玻片的水滴中产卵, 产卵后立即将单胞卵转到另一凹玻片的生理盐水中, 25℃ 恒温保湿培养。在双目显微镜下, 连续观察卵的胚胎发育过程。

胚后发育: 将盘多毛孢菌接种到直径为 6 cm 培养皿的 PDA 上, 1 星期长满菌丝后, 每皿接 500 条二龄幼虫, 25℃ 培养。每隔 24 h 分离线虫, 热杀后用 TAF 固定, 在双目显微镜下观察、测量、描述线虫的发育。

2 结果

2.1 胚胎发育

据我们观察 (如图 1), 刚产的卵为单细胞, 长椭圆形, 大小平均为 56.0 μm × 23.1 μm (长 46.8~61.1 μm, 宽 19.5~26.0 μm, n=50)。外有一光滑、薄而透明的卵壳, 下紧贴一层更薄的卵黄膜, 膜内原生质稠密, 有很多球状颗粒体。

第 1 次卵裂发生在产卵后约 1 h, 进行不均等的分裂而形成较大的 P₁ 细胞和较小的 S₁

^{*} 现在深圳动植物检疫局中心检验室工作

1992-10-15 收稿

细胞。10 min 后, P_1 细胞逐渐伸向 S_1 细胞, 而使两细胞一端交互重叠排列。随后可见 P_1 细胞中间出现隔膜而形成 P_2 和 EMST 子细胞, EMST 细胞逐渐与 P_2 细胞分离向 S_1 端移动, 形成三胞阶段。被挤压的 S_1 细胞也向 P_1 细胞方向生长, 并出现隔膜形成 A 和 B 子细胞, A 细胞逐渐与 B 细胞分离向 P_2 靠近, 形成明显的十字形四细胞阶段, 从三胞到四胞仅需要 10 min。随后细胞继续分裂为 5 胞、6 胞、7 胞、8 胞, 各胞分裂盛期均可见较大的细胞核, 从 2 胞到 8 胞需要 1.5 h。此后, 因较多的细胞交替快速分裂, 进一步卵裂是难以追踪的, 直至发育为多胞的桑椹期卵。

随着细胞的不断分裂, 卵内外围排列着一层较小的细胞, 包围着中间的大细胞群, 此时已进入囊胚期, 这标志着细胞分化的开始, 小细胞为外胚层, 大细胞为内胚层, 从 2 胞到囊胚期需要 6~7 h。囊胚期后, 胚胎进入原肠期, 此时细胞数目更多, 难以辨别出原肠的结构。

原肠期末, 卵两边出现快慢不等的细胞分裂, 分裂较快的一边, 细胞小, 颜色深, 另一边则细胞大而透明。从卵的发育进程看, 透明的部分将来发育为唇区及食道, 而色深的部分发育为虫体尾部。

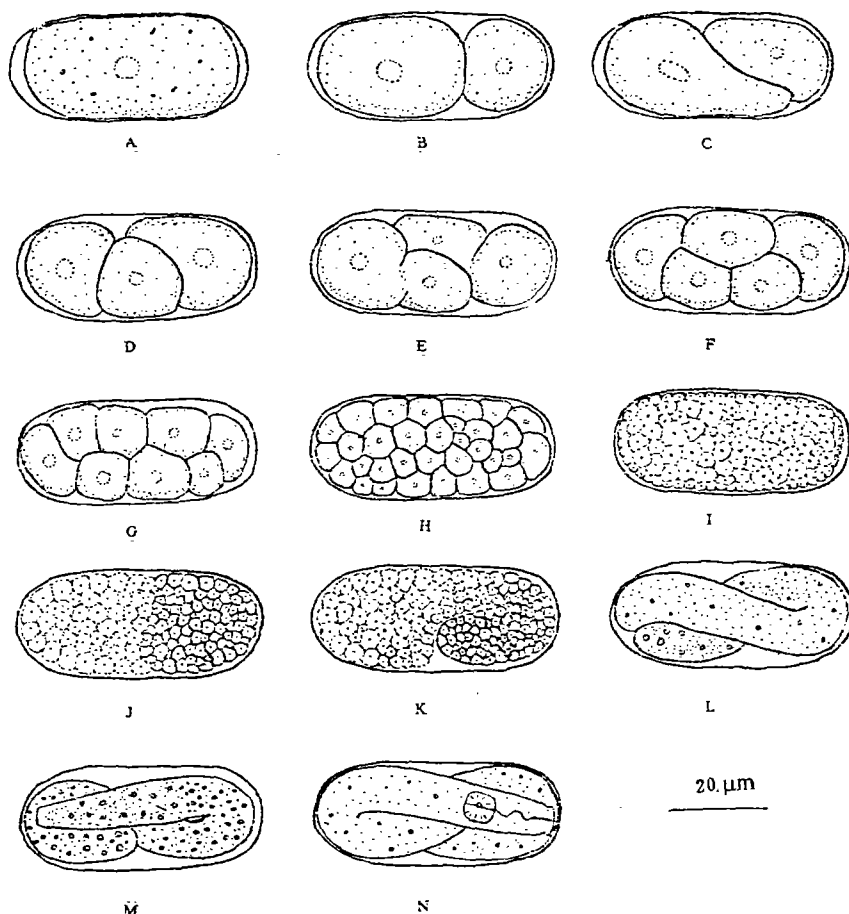


图1 松材线虫胚胎发育简图

- A: 单胞 B: 双胞 C: 双胞后期 D: 三胞 E: 四胞 F: 五胞
G: 八胞 H: 桑椹期 I: 囊胚期 J: 原肠期末 K: 蝌蚪期
L: 蠕虫期 M: 一龄幼虫期 N: 二龄幼虫期

八细胞后 6~8 h, 卵 1/3 处一侧, 胚向内凹陷, 这是蝌蚪期的开始, 凹陷部分不断延长, 可辨认出尾的形状。1.5 h 后达到卵端, 成为二折的结构。此时, 尾端已开始轻微、间歇的摆动、收缩, 胚胎进入蠕虫期, 胚胎在蠕虫期, 虫体蠕动加快, 变细、伸长, 达到三折, 二折后约 3 h, 进入四折状态的一龄幼虫。一龄幼虫前端圆形突出, 无角质化的唇区及缢缩, 口针和中食道球尚未分化, 体内充满球状颗粒, 角质膜很薄。

蠕虫期后 4 h, 一龄幼虫活动减少, 角质膜变得松弛, 线虫进行第 1 次脱皮, 形成二龄幼虫。二龄幼虫已开始器官分化, 角质膜加厚, 形成有较小缢缩、角质化的唇区, 口针强, 基部球明显, 中食道球发达, 瓣膜清楚, 食道管弯曲, 肠是空的、透明, 尾钝圆。二龄幼虫在卵壳内不断蠕动、扭曲、翻转, 并不时用唇区挤压卵两端, 以致与唇部接触的卵壳随之突起, 卵形改变, 试图冲破卵壳。整个过程口针并不伸出, 约经 3~4 h 的冲击后, 线虫唇区冲破卵壳的一端, 在水中自由蠕动。从刚产下的单胞卵到二龄幼虫孵化约需 30 h。

2.2 胚后发育

根据我们的试验, 松材线虫二龄幼虫孵化后, 经 3 次脱皮发育为成虫。从二龄幼虫到二龄幼虫完成一代需要 5 天时间, 其中四龄幼虫发育时间较长, 约 2 天; 成虫形成后 1 天之内即可产卵, 以后世代重叠。二龄幼虫接种在真菌培养基后, 发育很快。接种后 1 天, 就有 30% 的二龄幼虫发育成三龄幼虫; 第 2 天出现四龄幼虫, 占 35%, 三龄幼虫占 60%; 第 3 天四龄幼虫多达 95%, 5% 为三龄幼虫; 第 4 天出现成虫, 占 33%, 并已产卵, 其余均为四龄幼虫, 第 5 天又重新出现二龄幼虫, 此后线虫世代重叠明显。

测量刚孵化的二龄幼虫 ($n=15$); $L=214.1 \pm 2.48 \mu\text{m}$ ($189.8 \sim 223.6 \mu\text{m}$), $st=10.0 \pm 0.36 \mu\text{m}$ ($5.2 \sim 10.4 \mu\text{m}$), $a=20.3 \pm 0.33$ ($17.0 \sim 21.5$), $b=5.1 \pm 0.05$ ($4.7 \sim 5.4$), $c=17.0 \pm 0.55$ ($12.8 \sim 21.0$)。二龄幼虫热杀时呈“L”形。此时虫体, 颜色很淡, 肠内空而透明。唇区低平, 稍缢缩, 口针强, 基部球明显; 中食道球发达, 大于体宽的 2/3, 瓣膜清楚, 食道管弯曲, 食道腺难以分辨, 尾钝圆, 未见尾尖突; 生殖原基尚未分化。随着线虫的取食活动, 在肠内充满颗粒状营养物, 体色变深, 至二龄脱皮时, 除口针变化较小外, 体长、体宽、虫体前端至食道肠交接处之长、尾长都有极为显著的增长 (表 1), 增加幅度分别为 $145.3 \mu\text{m}$ 、 $3.6 \mu\text{m}$ 、 $16.6 \mu\text{m}$ 、 $5.9 \mu\text{m}$, 在整个幼虫发育阶段是增长最快的时期。此时, 生殖原基仍未分化, 有时在线虫脱皮时, 可见有单胞的生殖原基形成。

二龄幼虫持续 1 天后, 进行第 2 次脱皮成三龄。三龄幼虫热杀时呈“I”形或稍向腹面弯曲, 其它形态与二龄相似。至三龄脱皮时, 体长已增长 $444.9 \mu\text{m}$, 比幼虫刚孵化时增长一倍多, 其它测量值与二龄脱皮时相比, 增加不大, 表明三龄幼虫在胚后发育阶段是生长最慢的时期。在这一龄期生殖系统已开始分化, 在虫体中后部 58.3% ($49.1\% \sim 71.5\%$) 近腹面处, 有一单细胞, 卵圆形生殖原基, 长为 $18.9 \mu\text{m}$ ($10.4 \sim 26.0 \mu\text{m}$)。

三龄幼虫持续 1 天后, 脱皮为四龄。四龄幼虫热杀死后, 虫体向腹面弯曲, 呈开阔“C”形。此时是线虫生长的高峰期, 身体增长迅速, 体长, 口针长、体宽、虫体前端至食道肠交接处之长、尾长分别为三龄脱皮幼虫增加 $129.6 \mu\text{m}$, $1.5 \mu\text{m}$ 、 $1.7 \mu\text{m}$ 、 $8.6 \mu\text{m}$ 、 $5.0 \mu\text{m}$ 。唇区更高, 缢缩明显; 中食道球膨大, 几乎充满体腔。生殖腺迅速向前、后伸长, 其前端达到虫体 53.6% ($38.5 \sim 63.6\%$), 长度为 $92.1 \mu\text{m}$ ($52 \sim 104 \mu\text{m}$)。四龄后期性分化明显。雌幼虫在虫体 75.1% ($73.1\% \sim 77.3\%$) 处呈现阴道结构, 雄幼虫在脱皮中, 交合刺逐渐形成。四龄幼虫发育时间较长, 2 天后脱皮为成虫。

成虫形成后, 1 天之内开始交配、产卵, 此后, 虫体仍会继续生长, 由于所测线虫发育

天数不同,因而各项测量值变幅较大(表1)。雌虫热杀死时,虫体向腹面弯曲,呈开阔“C”形。生殖系统发育完全,生殖腺前端已延伸到虫体25.4%(17.5%~35.2%)处,长度为479.9 μm (419.7~562.7 μm),卵母细胞单行排列,子宫内可见卵,后阴子宫囊内常有球状精子,有阴门盖,并自阴门后虫体变细。雄虫热杀死时呈“J”形。生殖腺系统发育完全,生殖前端位于虫体41.0%(25.7%~44.1%)处,长为344.6 μm (273.0~427.4 μm),精巢前伸,偶尔前端转折,输精管内有球状精子,并形成交合刺和抱片,尾尖形。

关于幼虫脱皮,二龄、三龄、四龄的过程十分相似。脱皮时,虫体蠕动减少,放松伸直,经过1~2 h的静止之后,口针消失,唇区向后收缩,逐渐与角质膜分离。随着虫体的不断收缩,前端、后端角质膜明显向外突出。脱皮末期,角质膜断裂,与虫体分离,形成了新的角质膜及口针、唇区骨架、排泄管、直肠,脱下的角质膜上保留着上一龄幼虫的这些结构。四龄幼虫脱皮时,出现了生殖器官的分化。雌幼虫在虫体75.2%处呈现阴道的结构,脱皮之后形成阴门盖,尾圆筒形,末端宽圆。雄幼虫脱皮时,在肛门处形成交合刺,尾由圆筒形变为圆锥形。

据我们的观察,松材线虫不同龄期可以根据:热杀死时虫体形态,体长,生殖腺位置、长度和结构加以区别。热杀时,二龄幼虫、三龄幼虫、雄虫分别呈“L”、“I”、“J”形,四龄幼虫和雌虫同为开阔“C”形(图2)。我们测量了大量不同发育时期的线虫,结果表明:各脱皮状态幼虫体长平均值,可作为分龄标准。表2显示:二龄、三龄、四龄幼虫及雌虫的平均体长 $\pm$ 标准差恰好完全分开,没有交叠,而且各龄脱皮幼虫体长平均值,正位于相邻龄期的体长交界点上。虽雄虫体长与四龄幼虫、四龄脱皮幼虫、雌虫体长值交叠,因有明显的交合刺,而正确把它区别开来。各龄期还有少数线虫,其体长超出平均体长 $\pm$ 标准差范围,则应结合热杀死时虫体形态、生殖腺加以判断。二龄幼虫常无生殖腺,三龄幼虫生殖腺单细胞,椭圆形,四龄幼虫生殖腺较长,成虫生殖系统发育完全,并有外生殖器。

3 讨论和结论

个体发育结果表明:松材线虫与其它许多植物线虫表现出大致相同的模式^[1,8],整个发育期间有4次脱皮,第1次在卵内完成。

松材线虫在盘多毛孢菌上,25℃从二龄幼虫发育到三龄幼虫需要5天,这一时期正是线虫生殖系统迅速生长和分化的阶段,从产卵到孵化的胚胎发育为30 h,与Mamiya^[5]报道在灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)上的结论一致。

松材线虫第1次卵裂,形成大小不等的两个分裂球,与*Seimura tenuicaudata* (de Man) J. B. Goodey, 1960等^[2,4]一致,第2,3次卵裂方向,与卵长轴成一定角度,使四胞阶段的细胞成十字型交叉排列,这种方式仅与*Meloidogyne nassi* Franklin, 1965^[7]相同,而其它植物寄生线虫卵四胞阶段的细胞成串排列^[1,2]。松材线虫的孵化,靠虫体不停蠕动,用唇区

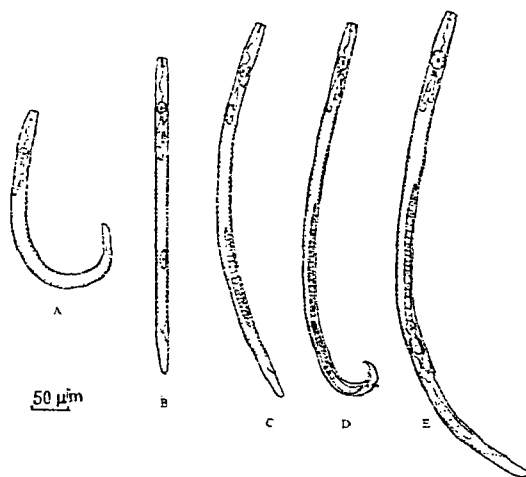


图2 松材线虫热杀死虫体形态

A:二龄幼虫“L”形 B:三龄幼虫“I”形 C:四龄幼虫开阔“C”形 D:雄虫“J”形 E:雌虫开阔“C”形

表1 松材线虫胚后发育各阶段虫体测量值

测量项目	L(μm)	st(μm)	a	b	c	v(%)	SP(μm)	n(条)
二龄幼虫	292.5±5.61* (187.2~358.8)**	10.5±0.08 (10.4~13.0)	22.6±0.25 (18.2~29.5)	5.8±0.08 (4.3~7.7)	17.7±0.21 (13.0~22.2)			100
二龄脱皮幼虫	359.4±5.46 (332.8~371.8)	10.6±0.22 (10.4~13.0)	25.9±1.19 (19.3~32.8)	6.2±0.19 (5.1~7.1)	19.6±0.75 (14.6~23.7)			13
三龄幼虫	399.1±3.90 (343.2~475.8)	11.2±0.14 (10.4~15.6)	27.6±0.39 (22.2~35.2)	6.8±0.08 (5.6~8.0)	19.2±0.38 (14.0~26.5)			95
三龄脱皮幼虫	444.9±9.36 (390.0~488.8)	10.4±0 (0~10.4)	27.9±0.76 (23.0~32.8)	7.5±0.16 (6.7~8.2)	21.2±0.63 (18.6~23.4)			10
四龄幼虫	512.8±6.16 (413.4~634.4)	13.1±0.15 (10.4~15.6)	31.6±0.35 (23.3~39.3)	8.0±0.08 (6.6~9.7)	22.7±0.28 (18.5~27.3)	75.1±0.43 (73.1~77.3)		115 四龄雌虫 n=11
四龄脱皮幼虫	574.5±10.94 (499.2~655.2)	13.7±0.26 (0~15.6)	32.4±1.56 (23.4~40.6)	8.5±0.19 (7.0~10.6)	23.2±0.55 (18.9~28.0)	75.2±0.52 (73.0~80.3)		22 四龄脱皮雌虫 n=15
雌虫	663.2±10.84 (501.8~852.8)	14.2±0.19 (10.4~15.6)	35.1±0.41 (30.9~39.5)	10.0±0.16 (8.4~11.8)	26.0±0.40 (21.6~31.6)	74.1±0.56 (68.8~82.4)		60
雄虫	603.5±11.40 (488.8~842.4)	13.7±0.21 (10.4~15.6)	35.7±0.62 (26.9~45.3)	9.3±0.14 (8.2~10.9)	20.8±0.31 (17.2~25.5)		25.5±0.27 (20.8~31.2)	60

* 平均数±标准误 ** 极小值~极大值

表2 松材线虫发育阶段体长值

发育时期	体长 (μm)	极小值~极大值
二龄幼虫*	236.4	187.2~358.8
二龄脱皮幼虫**	292.5	332.8~371.8
三龄幼虫	348.6	343.2~475.8
三龄脱皮幼虫	359.4	390.0~488.8
四龄幼虫	361.1	413.4~634.4
四龄脱皮幼虫	437.1	499.2~655.2
雌虫	444.9	501.2~852.2
雄虫	446.7	515.2~842.4

*: 3个数据依次为平均体长±标准差, 平均体长, 平均体长±标准差。

**: 1个数据为脱皮虫体平均体长

挤破卵壳一端而出来, 整个过程未见口针穿刺。

同形线虫各龄期的区分, 过去曾以体长、生殖腺结构和发育程度^[3]、侧线数目^[3]、排泄孔位置^[8]等为依据, 因此在鉴别上常常是比较困难的。我们试用了以热杀死时虫体形态及体长来区分松材线虫各个龄期, 简便、直观而准确, 二龄幼虫、三龄幼虫、雄虫分别为“L”、“I”、“J”形, 四龄幼虫和雌虫为开阔“C”形, 但雌虫生殖器官发育成熟。二龄、三龄、四龄幼虫、雄虫的体长分界值依次为 359.4 μm , 444.9 μm , 574.5 μm 。由于线虫的发育是一个连续的过程, 各龄期线虫的体长还有变化, 观察其生殖腺位置、结构和发育程度也是重要依据。

参 考 文 献

- 1 Clark S A. The development and life history of the false root-knot nematode, *Nacobbus serendipiticus*. Nematologica. 1967. 13: 91~101
- 2 Fassuliotis G. Feeding. embryology of the Columbia lance nematode, *Hoplotaimus columbus*. J Nematol. 1975, 7 (2): 152~158
- 3 Hechler H C. The development of *Aphelenchus avenae* Bastian. 1965 in fungus culture. Proc Helminth Soc Wash. 1962. 29 (2): 162~167
- 4 Hechler H C. Description. developmental biology. and feeding habits of *Seinara tenuicaudata* (De Man) J. B. Goodey. 1960 (Nematoda: Aphelenchoididae). a nematode predator. Proc Helminth Soc Wash. 1963. 30 (2): 182~195
- 5 Mamiya Y. The life history of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus lignicola*. Jpn J Nematol. 1975. 5: 16~25
- 6 Perry R R. Separation of stages of *Ditylenchus dipsaci* and *D. myceliophagus* by body length. Nematologica. 1976. 22 (4): 446~450
- 7 Siddiqui I A. & Taylor D P. The biology of *Meloidogyne nasii*. Nematologica. 1970. 16: 133~143
- 8 Zuckerman B M. & Strich-Harari D. The life stages of *Helicotylenchus multicinctus* in banana roots. Nematologica. 1963. 9: 347~353

EMBRYOLOGY AND LIFE HISTORY STUDIES ON PINE WOOD NEMATODE, *BURSAPHELENCHUS XYLOPHILUS*

Ye Weimin* Feng Zhixin
(Lab. of Nematology)

Abstract The destructive Pine Wilt Disease was found occurring in Shenzhen, China. Studies on the developmental stages of *Bursaphelenchus xylophilus* indicate that the life cycle was completed from egg to egg in 5 days on *Pestalotia* sp. at 25°C. through four molts. the first of which occurred within the egg. The average time required from egg-laying to hatching was 30 hours in water at 25°C.

Using the shape of heat-killed nematode as the initial guide to the identification of the different stages of *B. xylophilus*, a relationship between stage and body length. genital primordia has been established; this enabled individuals to be allocated to their stage with relative ease.

Morphology, embryonic and post-embryonic development. the egg and larval stages are described and figured.

Key words *Bursaphelenchus xylophilus*; Embryology; Life cycle; Separation of stages

* Present address: Shenzhen Animal & Plant Quarantine Bureau, 40 Heping Road, Shenzhen 518001, P. R. China