

海南根结线虫个体发育的研究

廖金铃 冯志新

(华南农业大学线虫研究室, 广州, 510642)

摘要 详细描述了海南根结线虫胚胎发育和胚后发育各阶段的过程和形态变化。在平均温度 26°C 时, 完成胚胎发育需 14.5~17.5 d; 在平均温度 25.4°C 时, 完成胚后发育约需 30 d。上述实验结果, 为在海南控制水稻根结线虫病, 提供了一定理论依据。

关键词 海南根结线虫; 胚胎发育; 个体发育; 生活史; 水稻

中图分类号 Q 951.3

水稻根结线虫病是海南水稻的一个重要病害(冯志新等, 1980), 它的病原线虫是海南根结线虫 *Meloidogyne hainanensis* (廖金铃等, 1995)。关于根结线虫胚胎发育国外虽已有不少记载, 但在国内尚未见系统报道。1986~1987年, 作者对海南根结线虫的胚胎发育和胚后发育过程进行了较系统的研究。

1 材料和方法

1.1 胚胎发育

取10个双孔凹玻片, 各加一滴含有 50 mg/L 链霉素硫酸盐的无菌水。从海南根结线虫卵团中获得单细胞卵, 并按 1/10 放入上述凹玻片内, 置于保湿培养皿中, 保持温度 26°C 左右, 系统观察胚胎发育的过程, 并测定所经历的时间。第 1~8 d 每隔 4 h 镜检, 第 9~19 d 每隔 0.5 d 镜检。

1.2 胚后发育

用 2% 次氯酸钠对水稻(品种为“增进”)种子进行表面消毒 15 min, 并用无菌水冲洗 3 次后, 在生物培养箱内催芽。线虫卵用 0.26% 次氯酸钠消毒 15 min, 再用无菌水冲洗 3 次, 在 28°C 下保湿培养 1 周, 获得大量的 2 龄侵染幼虫。

将催芽后的种子移至消毒的砂土中, 栽植 6 d, 选择强壮的、根数较为一致的秧苗, 按每盆 1 株移植于各盛有 150 g 消毒土的塑料盆(h 18 cm, d 10 cm)内。3 d 后, 每盆接种 500 条 2 龄侵染幼虫, 共接种 7 盆。24 h 后, 拔出并用自来水将根上土壤冲洗干净, 以除去未侵入根部的 2 龄幼虫, 再栽入含 700 g 消毒土的塑料盆中, 置于温室(平均温度 25.4°C), 每星期淋 1 次伊士宾诺水稻营养液。每隔 3 d 拔取并剪下 5 株稻根, 后用水洗净并用乳酸酚酸性品红染色(Daykin等, 1984)。检查线虫在根内发育的过程和所经历的时间。

2 结果

2.1 胚胎发育

根据观察(图 1), 成熟雌虫一般持续产卵 8~13 d, 在整个卵团里包含各个不同发育阶

段的卵,新产出的卵通常是单或双细胞阶段。卵的大小为:长 $96.20 \sim 117.00 \mu\text{m}$,宽 $44.20 \sim 52.00 \mu\text{m}$,其外层有一光滑、薄和透明的卵膜覆盖,卵膜下面有一层卵黄膜。此时,卵膜上的卵黄膜紧贴原生质下面,卵黄膜厚薄不均匀,一般上下两端的卵黄膜较厚。单细胞卵的原生质体,含有许多球状或多边形的颗粒体,单细胞卵经 $1.5 \sim 2.5 \text{ d}$ 后,沿着赤道板,在细胞质中出现一条隐约可见的界线。原生质收缩,并从卵黄膜上分开,然后,中间的界线渐变分明,持续 $8 \sim 12 \text{ h}$ 后,胚胎进入双细胞阶段(细胞 P_1 和 P_2),再经 $8 \sim 12 \text{ h}$ 后,胚胎中的细胞 P_2 首先分裂成2个细胞,胚胎进入3细胞阶段, $4 \sim 8 \text{ h}$ 后, P_2 细胞也分裂成2个细胞,胚胎进入4细胞阶段。上述第2~3次卵裂方向都是平行于第1次卵裂的平面,4个细胞几乎位于同一条轴线上。在第3次卵裂 $12 \sim 16 \text{ h}$ 后,胚胎进入6细胞阶段。这时6个细胞的轴线已不在同一平面。随着细胞继续分裂,胚胎变成具有许多细胞的细胞集团,胚胎进入囊胚期。从第1次卵裂至囊胚期需 $3 \sim 4 \text{ d}$ 。接着细胞继续分裂并重新排列,形成2层细胞,外层细胞较小,不规则,在胚胎中所占的比例较小,只占总体积的 $1/5$ 左右,内层细胞则较粗大,球形,这类细胞占据胚胎体积的大部分。此时,胚胎进入原肠期。胚胎从囊胚期发育到这一时期需 $12 \sim 16 \text{ h}$ 。

原肠期持续约 2 d 后,胚胎一端逐渐变得透明,它是将来发育成食道和口的区域;胚胎另一端,细胞颜色变暗,它在胚胎中所占体积较大,是将来发育成消化道和尾部的区域。此时,胚胎进入蝌蚪期。

蝌蚪期 2 d 后,胚胎变得长而细,并且可见“胎动”,从而进入 L_1 龄幼虫阶段。早期 L_1 龄幼虫虫体很短,两端钝圆,随着线虫的逐渐发育,虫体伸长,并且在卵内回迭,食道轮廓可见,线虫活泼,但口针仍未发育。

L_1 龄幼虫持续发育 $3 \sim 4 \text{ d}$ 后,变得不活动,线虫进行第1次蜕皮,进入 L_2 龄幼虫阶段。 $1.5 \sim 2.5 \text{ d}$ 后,幼虫变得活跃,且具有口针,中食道球瓣膜清楚。此时,蜕下的表皮仍附在新生成的表皮上。再经约 1.5 d 后,口针发育良好,唇区、中食道球和食道腺等食道的主要结构发达,体环细致,尾部细长,虫体在卵内盘曲约4个回迭。 L_2 龄幼虫不时用头部冲击卵壳,并破卵而出,成为 L_2 龄侵染幼虫。胚胎从单细胞阶段发育到 L_2 龄侵染幼虫需 $14.5 \sim 17.5 \text{ d}$ 。

2.2 胚后发育

据观察(图2图3表1), L_2 龄幼虫在侵入根组织至寄生取食的一段时间内,其形态与未侵染 L_2 龄幼虫相似,外形仍是线形,体长和体宽变化不大,具口针,其长度与未孵化的 L_2 龄幼虫相近。食道腔、食道前体部、中食道球及其瓣膜发达。排泄孔开口位于神经环的附近(下方)。食道腺不膨大。未见到生殖原基细胞的分裂现象。侵染 12 d 后, L_2 龄寄生幼虫的形态有较明显的变化,虫体前段,靠近中部的地方首先膨大,然后,膨大现象逐渐地向虫体后端扩展;体长

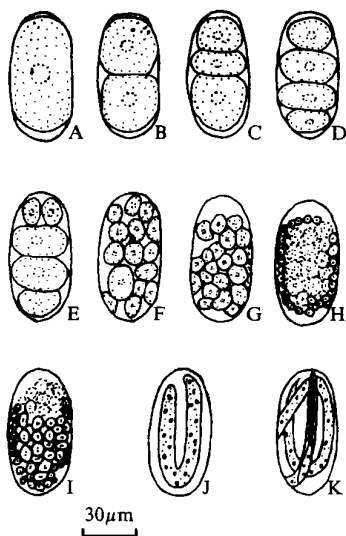


图1 海南根结线虫胚胎发育简图

(A)单胞;(B)双胞;(C)三胞;(D)四胞;(E)六胞;(F)多胞;(G)囊胚期;(H)原肠期;(I)蝌蚪期;(J) L_1 龄幼虫;(K) L_2 龄幼虫

和体宽分别为 564.0 和 $113.71\mu\text{m}$ ($n=30$, 下同); 食道前体部变得模糊不清; 中食道球的大小为 $22.17\mu\text{m} \times 18.63\mu\text{m}$; 排泄孔开口位于神经环附近; 食道腺膨大, 生殖细胞分裂和伸长。

后期 2 龄寄生幼虫口针逐渐变弱, 表皮松弛, 下面开始出现新表皮, 侵染约 18 d 后, 旧表皮脱落并附于新表皮上, 形成 3 龄幼虫。典型的 3 龄幼虫外观呈豆荚状, 虫体外面附有一层 3 龄幼虫蜕下的旧表皮, 虫体后端变圆, 体长和体宽分别为 $554.58\mu\text{m}$ 和 $118.40\mu\text{m}$, 与后期 2 龄幼虫没有显著差异, 不具口针。食道腔和中食道球瓣膜不发达, 中食道球长 $22.53\mu\text{m}$, 与后期 2 龄幼虫相近, 宽为 $19.67\mu\text{m}$, 比后期 2 龄幼虫宽。排泄孔开口位于中食道球相对的地方, 食道腺膨大。生殖腺继续分裂和伸长, 可见到明显的性别分化现象, 雄性生殖腺直伸, 雌性生殖腺则形成分枝。在第 2 次蜕皮期间, 口针的脱落

有 2 种方式: (1) 口针基部球首先消失, 然后口针锥体部、杆状部和基部球的内腔随表皮脱落; (2) 口针基部球及靠近基部球的一部分杆状部首先消失, 然后口针锥体部及一部分杆状部随表皮脱落。

4 龄幼虫表皮逐渐变得松弛, 下面出现新表皮, 3 龄幼虫的旧表皮脱落并附在新表皮上。侵染约 21 d 后, 形成 4 龄幼虫。4 龄幼虫的外形与 3 龄幼虫相似, 仍呈豆荚状, 体长与 3 龄幼虫相比, 变化不大, 但体宽达 $131.99\mu\text{m}$, 明显大于 3 龄幼虫。体后端变得更圆, 同时, 中食道球增大, 食道腺膨大, 生殖腺继续伸长。

4 龄幼虫侵染约 24 d 后, 变成早期雌虫。这时, 虫体继续膨大, 仍包于外表皮中 (包括第 2~3 龄阶段蜕下的表皮)。但口针重新形成, 食道腔变得明显, 中食道球瓣膜发达, 食道腺继续膨大, 排泄孔开口位于食道前体部相对的位置, 生殖腺继续延长, 出现盘曲, 并可见会阴结构。

随着线虫的继续生长和发育, 附在虫体上的外表皮脱落。在实验中, 也曾观察到有些个体在其 3 龄、4 龄阶段, 就已将旧表皮蜕下了。侵染约 30 d 后, 在虫体会阴区的粘性基质中出现了卵, 线虫进入产卵阶段。此时, 体长为 $676.00\mu\text{m}$, 宽 $405.41\mu\text{m}$, 均极显著地大于 4 龄幼虫, 特别是体宽, 比 2 龄侵染幼虫增大 30 倍, 比 4 龄幼虫增大约 1 倍。同时, 雌虫具明显的颈部, 口针发达, 唇区骨架明显, 排泄孔位于与食道前体部相对的地方, 中食道球大小达 $39.02\mu\text{m} \times 34.54$

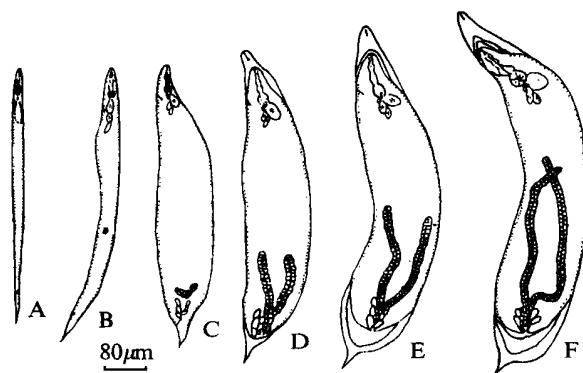


图 2 海南根结线虫胚后发育简图

(A) 2 龄侵染幼虫; (B) 3 龄寄生幼虫 (早期); (C) 3 龄寄生幼虫 (后期); (D) 4 龄幼虫; (E) 4 龄幼虫; (F) 早期雌虫



图 3 海南根结线虫成熟雌虫
(50 $\times$)

μm , 极显著地大于 4 龄幼虫, 中食道球具有强大而硬化的瓣膜, 食道腺肥大, 生殖腺高度分化和盘曲, 占据体腔的大部分空间。

表 1 各龄线虫一些形态测量值比较¹⁾ μm

龄 期	体 长	最大体宽	中食道球长	中食道球宽
产卵雌虫	676.00 aA	405.41 aA	39.02 aA	34.54 aA
4龄幼虫	566.89 bB	131.99 bB	23.56 bB	21.28 bB
3龄幼虫	554.58 bB	118.41 cC	22.53 cC	19.67 cC
后期 2龄幼虫	564.03 bB	113.71 cC	22.17 cC	18.63 dC
2龄侵染幼虫	481.98 cC	14.82 dD	11.29 dD	7.67 eD

1) 用邓肯氏法检验, 纵列小写字母相同者, 表示在 5% 水平上差异不显著; 纵列大写字母相同者, 表示在 1% 水平上差异不显著。n= 30

海南根结线虫雄虫的发育过程较简单, 且与其它根结线虫的情况基本相似。此处不再作专门描述。

海南根结线虫从侵染到雌虫产卵约需 30 d。其中, 2 龄侵染幼虫经蜕皮, 进入 3 龄幼虫约需 18 d; 3 龄幼虫经 4 龄及蜕皮, 进入早期雌虫约需 6 d; 再经 6 d 左右进入产卵期。一般雄虫出现 6 d 后, 雌虫才进入产卵期。线虫在各个不同发育时期, 其形态结构发生变化。其中, 体长、体宽、中食道球大小、排泄孔开口位置、食道腺、生殖系统的变化最为明显。

3 讨论和结论

(1) 根据实验结果, 海南根结线虫完成胚胎发育需 14.5~ 17.5 d。其发育过程与纳西根结线虫 *M. naasi* Franklin 和加利福尼亚根结线虫 *M. californiensis* Abdel~ Rahman & Maggenti 基本一致 (Siddiqui et al, 1970; Fawzia et al, 1987)。但第 3 次卵裂的方向平行于第 1 2 次卵裂的平面, 与纳西根结线虫不同。

(2) 海南根结线虫胚后发育过程形态变化与许多根结线虫基本相似。但 2 龄幼虫蜕皮时, 口针的脱落方式有 2 种, 与南方根结线虫 *M. incognita* (Kofoid and white) Chitwood 纳西根结线虫的 2 龄幼虫口针单纯一种脱落方式的结论不一致 (Siddiqui et al, 1970; Triantaphyllou et al, 1960)。其次, 2 龄幼虫与未孵化前 2 龄幼虫的口针长度接近; 4 龄幼虫的体宽, 中食道球大小比 3 龄幼虫明显增大, 这些现象也与纳西根结线虫有较大的差别。

(3) 海南根结线虫完成胚后发育所经历的时间约 30 d, 与寄生水稻的拟禾本科根结线虫 *M. graminicola* Golden and Birchfield 和水稻根结线虫 *M. oryzae* Maas, Sanders and Dede 的情况近似 (Rao et al, 1973; Segeren et al, 1984)。但 2 龄幼虫所经历的时间比拟禾本科根结线虫长, 前者 18 d, 后者只 6 d。

(4) 研究结果表明: 在秧田期, 由于早稻育秧期较短, 温度较低, 因而线虫一般只发育至 3 龄或 4 龄阶段。随着秧苗移入本田, 秧苗老根逐渐死亡, 秧苗根上线虫终止发育。但晚稻秧苗由于秧期较长, 温度较高, 因而线虫可以完成生活史, 并在秧苗中带有大量的卵和 2 龄幼虫, 成为本田水稻的初侵染源之一。因此, 在晚稻的防治要注意不要把带虫秧苗引入无病田。此外, 据室内试验结果, 海南根结线虫从卵发育到下一代卵需 44.5~ 47.5 d, 由此推断线虫在水稻生育期大约有 2 个世代, 这与田间调查得到的情况是基本一致的。此线虫在田间有 2 个

侵染高峰期;第 1 个高峰期出现在水稻分蘖初期,第 2 个高峰期出现在幼穗分化期。因此上述 2 个时期是控制此病的关键时期,尤其是水稻分蘖初期,新根数量多,线虫侵染量大,要切实抓住这一时期防病。

参 考 文 献

- 冯志新,关燕如,黎少梅. 1980. 水稻根结线虫病的研究. 华南农学院学报, 1(1): 73~ 81
- 廖金铃,冯志新. 1995. 根结线虫属一新种——海南根结线虫. 华南农业大学学报, 16(3): 34~ 39
- Daykin M E, Hussey R S. 1984. Staining and histopathological techniques in Nematology. In: Barker K R, Carter C C, Sasser J N, eds. An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Vol II. North Carolina: North Carolina State Univ. Graphics, 39~ 48
- Fawzia A R, Maggenti A R. 1987. Embryonic and postembryonic development of *Meloidogyne californiensis* Abdel- Rahman & Maggenti, 1987. J Nematology, 19(4): 505~ 508
- Rao Y S, Israel P. 1973. Life history and bionomics of *Meloidogyne graminicola*, the rice root-knot nematode. Indian Phytopathology, 26: 333~ 336
- Segeren H A, Sanchit M L. 1984. Observation on *Meloidogyne oryzae* Mass, Sanders and Dede 1978 in irrigated rice in Surinaam. Surinaamse Landbouw, 32(2): 51~ 59
- Siddiqui I A, Taylor D P. 1970. The biology of *Meloidogyne nassi*. Nematologica, 16: 133~ 143
- Triantaphyllou A C, Hirschmann H. 1960. Postinfection development of *Meloidogyne incognita* Chitwood, 1949 (Nematoda: Heteroderidae). Ann Inst Phytopath Benaki N S, 3: 3~ 11

STUDY ON ONTOGENY OF THE NEMATODE *Meloidogyne hainanensis*

Liao Jinling Feng Zhixin

(Lab. of Plant Nematology, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

The morphology and embryonic and post-embryonic development of the nematode *Meloidogyne hainanensis* Liao & Feng were described and illustrated in detail in the paper. Studies indicated that the nematode completed its embryogenesis in 14.5 to 17.5 days at 26 °C. The development durations for the juvenile in the second-stage and the third & fourth-stage were 18 and 6 days respectively. The required time for adult female development from early stage to oviposition was about 6 days. The research result provided a certain theoretical basis for controlling the rice root-knot nematode disease in Hainan Province.

Key words *Meloidogyne hainanensis*; ontogeny; embryonic development; life cycle; rice