

BIOLOGIA *APHELENCHOIDES SACCHARI* HOOPER, 1958
(NEMATODA, APHELENCHOIDIDAE)

Krystyna Janowicz

Instytut Ekologii i Ochrony Środowiska Akademii Rolniczej w Szczecinie

Aphelenchoides sacchari należy do nicieni często występujących w pieczarkarniach w Polsce [3, 16, 24, 27]. Stwierdzono, że nicienie te odżywiają się strzępkami grzybni pieczarek powodując opóźnienie plonowania i obniżenie plonu owocników pieczarek sięgające 94% [17]. W związku z tym uznano za celowe zbadanie biologii *A. sacchari*.

METODYKA BADAŃ

Nicienie do obserwacji pozyskiwano ze sterylnych hodowli, w których osobniki *A. sacchari* rozwijały się na ziarnie pszenicy przerośniętym strzępkami grzybni pieczarki w kolbach Erlenmayera. Osobniki przeznaczone do hodowli sterylizowano powierzchniowo przez umieszczenie ich w 0,1%, a następnie 0,5% wodnym roztworze dwuoctanu chlorohexanu $(C_{22}H_{30}Cl_2H_{10}C_2H_4O_2)_2$ na okres 2 minut. Rozwój embrionalny badano stosując metodę Cayrola [5]. Oznaczenie blastomerów w kolejnych podziałach przyjęto wg Hyman [15] za Boverim. W badaniach przebiegu wylinek, płodności i liczby zapłodnień przyjęto metodykę Hirschmann [14]. Długość życia obserwowano na nicieniach umieszczonych w pożywce White'a wraz z grzybnią pieczarki w probówkach. Wszystkie obserwacje wykonano co najmniej w 20 powtórzeniach. Wyjątek stanowiły obserwacje liczby zapłodnień, które z powodu trudności technicznych przeprowadzono tylko w trzech powtórzeniach. Obserwacje rozwoju *A. sacchari* prowadzono w temperaturze pokojowej, przy powiększeniu obrazu 640 i 1000 x.

WYNIKI BADAŃ

A. sacchari tak jak większość przebadanych dotąd nicieni jest gatunkiem rozdzielнопłciowym. Samice odkładają jaja pojedynczo, przy czym

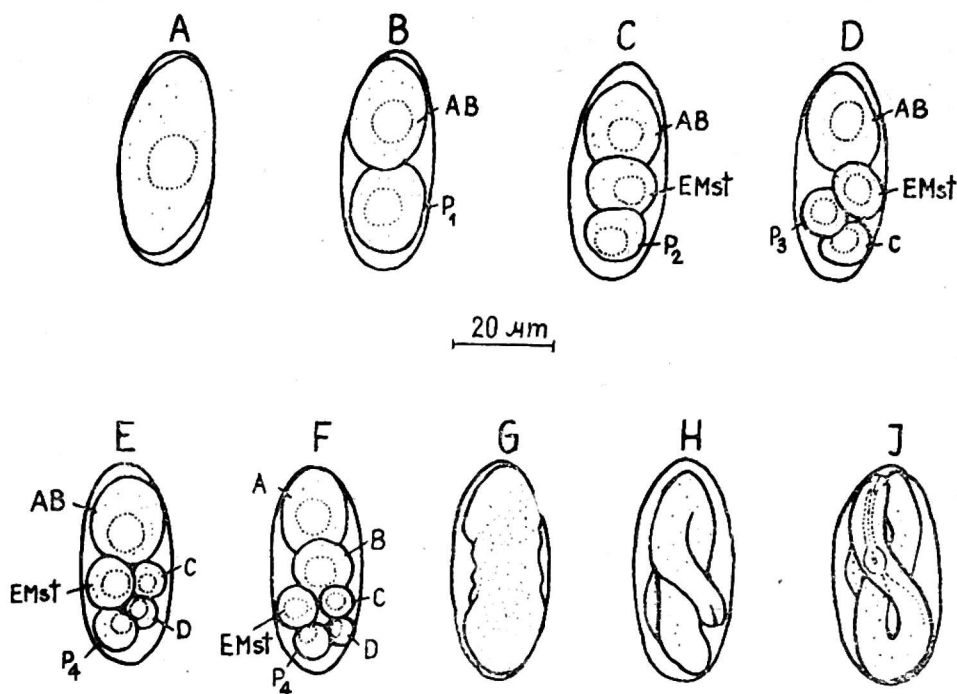
najczęściej są one przyklejane do podłoża. Średnia długość jaj wynosi 40 μm (19-57) szerokość — 19 μm (16-24). Zdarzało się, że jedna samica odkładała jaja o długości i szerokości 19 μm , a także jaja bardzo wydłużone o długości 55 μm i szerokości 19 μm , mimo dużych odchyłeń od wymiarów średnich jaja takie rozwijały się normalnie. Niekiedy samice odkładały dwa lub trzy jaja połączone biegunami, sznureczkowato. W takich przypadkach jedno lub dwa jaja nie rozwijały się. Liczba jaj połączonych biegunami wynosiła 1-2% ogólnej liczby obserwowanych jaj. Samice odkładają jaja w stadium jednej komórki (ryc. 1A). Czas trwania poszczególnych stadiów w rozwoju embrionalnym *A. sacchari* przedstawiono w tabeli 1. Dwa pierwsze blastomery tworzyły się w czasie od 50 min. do 2 godz. od momentu odłożenia jaja. Pierwszy podział przebiegał poprzecznie do długiej osi jaja. W wyniku tego podziału powstały blastomery AB i P₁ (ryc. 1B). Drugi podział miał miejsce od 2 godz. do

Tabela 1

Czas trwania stadiów rozwojowych *Aphelenchoides sacchari*

Stadium rozwojowe	Średni czas (w godz.)	Wahania (w godz.)
Od odłożenia jaja do I podziału	1 ⁵⁰	0 ⁵⁰ -2
Od I podziału do II podziału	2 ²⁰	2-2 ⁵⁰
Od II podziału do III podziału	2 ⁵⁰	2-3
Od III podziału do IV podziału	3 ³⁰	2-4 ⁵⁰
Od IV podziału do V podziału	3	1 ³⁰ -3 ⁵⁰
Od 6 komórek do kształtu robakowatego	30	25-38
Od kształtu robakowatego do I wylinki	16	10-25
I wylinka	24	20-30
Od zakończenia I wylinki do wylęgu	10	6-15
Okres embrionalny	93 ³⁰	69 ²⁰ -124 ³⁰
L ₂ od momentu wylęgu do II wylinki	52	48-60
II wylinka	20	18-25
L ₃ do rozpoczęcia III wylinki	58	40-70
III wylinka	18	15-28
L ₄ do rozpoczęcia IV wylinki	50	44-60
IV wylinka	20	20-25
Rozwój pozarodkowy	218	185-268
Cały rozwój	311 ³⁰	254 ²⁰ -392 ³⁰
Uzyskanie dojrzałości płciowej	bezpośrednio po IV wylince	

2 godz. i 50 min., blastomer P₁ podzielił się na P₂ i EMst (ryc. 1C). Trzeci podział następował po 2 do 3 godz. utworzyły się blastomery P₃ i C (ryc. 1D). Blastomery układały się liniowo wzdłuż długiej osi jaja. Niejednokrotnie obserwowano przemieszczanie blastomerów, które tworzyły



Ryc. 1. Rozwój embrjonalny *Aphelenchoides sacchari*; A — jajo tuż po odłożeniu, B, C, D, E i F — kolejne podziały blastometrów, G — zarodek, H — pierwsze stadium larwalne, I — drugie stadium larwalne

w rezultacie układ zygzakowaty. Po 2 do 4 godz. i 50 min. powstał blastomer P_4 i D (ryc. 1E). Nie obserwowano ułożenia blastomerów w kształcie litery T. Dopiero po 8 godz. i 20 min. do 16 godz. i 30 min. od momentu odłożenia jaj następował pierwszy podział blastomeru AB (ryc. 1F). Obserwacje kolejnych podziałów były trudne do prześledzenia, ponieważ dzielące się blastomery były w ciągłym ruchu. W rezultacie podziałów zarodek przybrał postać kijanki (ryc. 1G). Po 33 godz. i 20 min. do 53 godz. i 30 min. od odłożenia jaj zarodek przekształcił się w larwę pierwszego stadium (ryc. 1H). Larwa pierwszego stadium jest ruchliwa, wewnątrz jej ciała nie wyróżniono żadnych struktur. W celu dokładniejszego przebadania larw pierwszego stadium uwalniano je sztucznie z osłon jajowych przez naciskanie jaj szkiełkiem nakrywkowym. Larwy uwolnione w ten sposób przez kilka minut poruszały się w wodzie, następnie deformowały się i ginęły. Pierwsza wylinka miała miejsce w jajku, po około 83 godz. od momentu odłożenia jaja. Przed wylinką larwy pierwszego stadium stawały się mało aktywne. Objawem początku wylinki było oddzielenie się oskórka w okolicy głowy. Czas pierwszej wylinki wahał się od 20 do 30 godz. Larwy drugiego stadium były w jajku trzykrotnie zgięte, posiadały sztylet z guziczkami, gardziel z rozszerzeniem i zastawką, początek układu rozrodczego w postaci pojedynczej komórki i odbytu (ryc. 1I). Larwy poruszały się w jajku, ich ruchy stawały się energiczniejsze w miarę zbliżania się do końca rozwoju embrjonalnego. W tym czasie obserwowano zmiany kształtów i wymiarów jaj (tab. 2).

Tabela 2

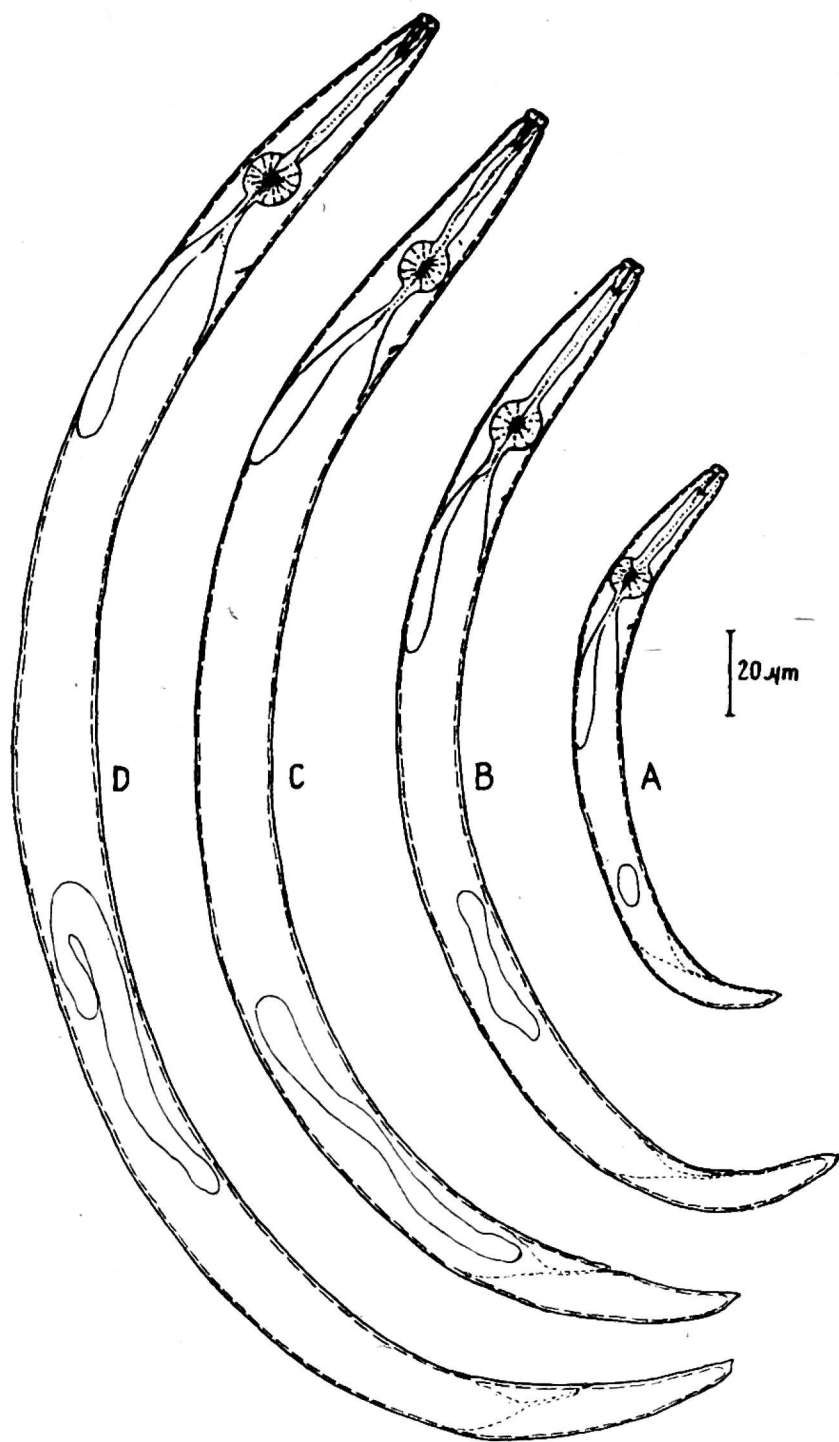
Charakterystyka statystyczna dla długości i szerokości jaj *Aphelenchoides sacchari* bezpośrednio po odłożeniu i bezpośrednio przed wylęgiem

Czas dokonania pomiaru jaj	Długość			Szerokość		
	$S_x \mu\text{m}$	$S_x \mu\text{m}$	W%	$S_x \mu\text{m}$	$S_y \mu\text{m}$	W%
Bezpośrednio po odłożeniu	39,4	6,2	16,0	19,1	1,6	8,2
Bezpośrednio przed wylęgiem	40,2	5,2	12,9	22,0	1,6	7,1

Przed wylęgiem larwy uderzały sztyletem w błonę przy czym, najczęściej nakłuwany był odcinek w okolicy biegunowej, widoczna była przy tym pulsacja zastawki w rozszerzeniu gardzieli. Larwy wylęgały się z jaj, w miejscu, na które przypadło najwięcej nakłuć. Było to wieczko, które znajdowało się na jednym z biegunów jaja. Podczas wylęgu wydobywała się najpierw przednia część larwy, na około $\frac{1}{3}$ długości ciała. Trwało to około 1 sekundy. Pozostała część larwy uwalniała się w czasie od 5 do 15 minut. Bezpośrednio po wylęgu larwy poruszały się swobodnie, a umieszczone w pożywce z grzybnią pieczarki od razu przystępowały do żerowania. Rozwój embrionalny *A. sacchari* trwał od 69 godz. i 20 min. do 124 godz. i 30 minut.

Czas rozwoju poszczególnych stadiów larwalnych przedstawiony został w tabeli 1. Larwy *A. sacchari* przed wylinkami były nieruchome, ciało ich przybierało ciemniejszą barwę. Po oddzieleniu się starej kutikuli wykonywały delikatne, wahadłowe ruchy głową. W oddzielonym, starym oskórku widoczny był szkielet głowy i przednia część sztyletu, natomiast układ pokarmowy i rozrodczy w tym czasie są niewidoczne. Krótko przed zrzuceniem starego oskórka larwy wykonywały wewnątrz starego oskórka energiczne ruchy obracając się często o 360° wzdłuż długiej osi ciała w tym czasie sztylet z guziczkami i gardziel były wyraźne. Larwy uderzały sztyletem w stary oskórek na wysokości podstawy sztyletu poprzedniego stadium. Stary oskórek był rozrywany poprzecznie w miejscu, które znajdowało się w odległości odpowiadającej około jednej szerokości ciała od przedniego końca. Oskórek był zrzucany w całości, a wraz z oskórkiem zrzucone zostały: rusztowanie głowy, przednia część sztyletu i wyściółka odbyticy. Różnice w budowie układu rozrodczego między larwami męskimi i larwami żeńskimi obserwowano pod koniec trzeciego stadium. Rozwój narządów rozrodczych *A. sacchari* przedstawiono na rysunku 2.

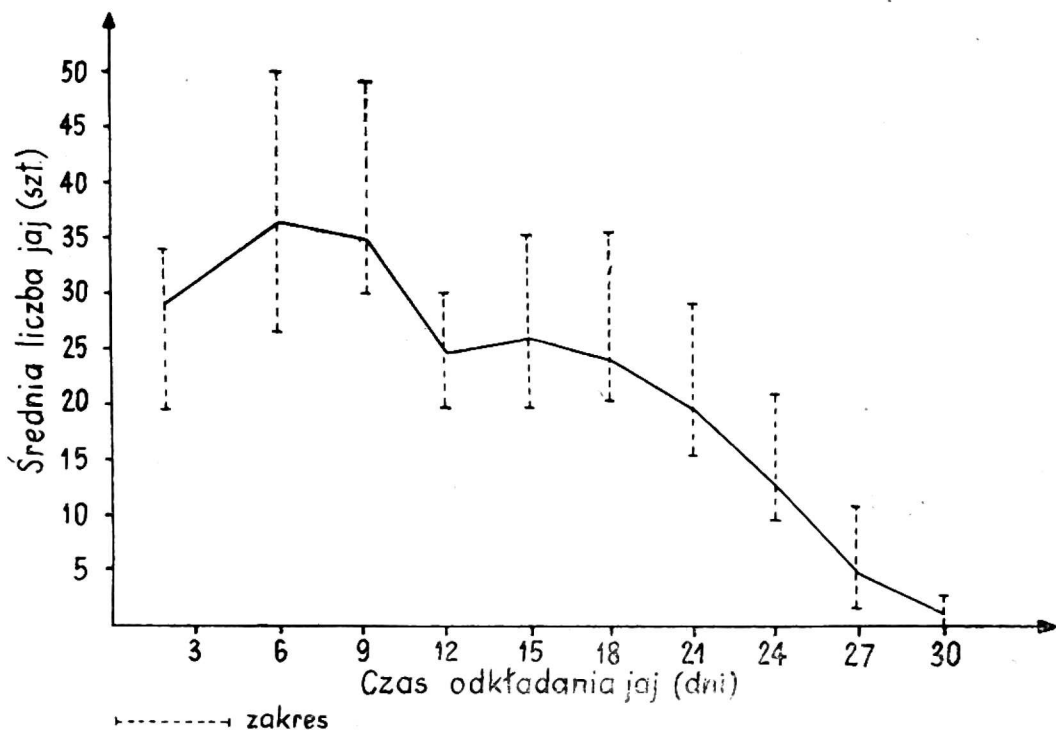
Osobniki *A. sacchari* uzyskują dojrzałość płciową bezpośrednio po czwartej wylince. Obserwowano kopulacje po około 20 minutach po ostatniej wylince. Podczas kopulacji samiec wprowadzał spikule do poch-



Ryc. 2. Rozwój narządów rozrodczych *Aphelenchoides sacchari*; A — L₂ bezpośrednio po wylęgu, B — L₃ bezpośrednio po drugiej wylince, C — L₄ męska bezpośrednio po trzeciej wylince, D — L₄ żeńska bezpośrednio po trzeciej wylince

wy na około $\frac{1}{3}$ ich długości. Proces wprowadzania plemników trwał 15 sek. i przebiegał w trzech fazach (falami), tzn. plemniki wprowadzane były do spermateki co kilka sekund. Po około 2 do 5 godz. po zapłodnieniu obserwowano wędrowkę jaj w jajowodzie samicy. Stwierdzono sześciokrotne zapłodnienie jednej samicy. Przy ciągłej obecności samców, średnia liczba odłożonych jaj przez jedną samicę wynosiła 222, przy wahaniami od 166 do 296. Samice odkładały jaja bez przerwy przez 28 do 30 dni. Jeżeli w ciągu tego okresu samica nie odłożyła wszystkich jaj,

to mimo, że w jej narządach rozrodczych znajdowały się oocyty, dalszego odkładania jaj nie obserwowano. Przebieg odkładania jaj przedstawiony został na rysunku 3. Częstotliwość odkładania jaj wahała się od 1 godz.



Ryc. 3. Dynamika odkładania jaj u *Aphelenchoides sacchari*

i 15 min. do 2 godz. w pięciu pierwszych dniach płodności od 2 godz. do 3 godz. i 50 min. w dwudziestu następnych dniach. W dwóch końcowych dniach płodności przerwy w odkładaniu jaj dochodziły do 8 godzin. Obserwowano kilkakrotnie zjawisko *Endotokia matricida*, zjawisko rozwoju larw wewnątrz jamy ciała miało miejsce u samic starszych, tj. po kilkunastu dniach po ostatniej wylince. Larwy przeżywały w jamie ciała martwej samicy do 25 dni od wylęgu. W ciągu tego czasu nie stwierdzono wylinek i larwy ginęły w drugim stadium rozwojowym. Długość życia samic *A. sacchari* wahała się w granicach od 35 do 80 dni, średnio 52 dni. Samce żyły od 35 do 110 dni, średnio 68 dni.

DYSKUSJA WYNIKÓW I WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że *A. sacchari*, tak jak większość przebadanych nicieni, jest gatunkiem rozdzielnopłciowym a zapłodnienie jest niezbędnym warunkiem rozrodu. Jaja *A. sacchari* cechuje duża zmienność wymiarów i kształtów co sugeruje, że cecha ta jest nieprzydatna przy identyfikacji gatunku. W rozwoju embrionalnym nie stwierdzono ułożenia blastomerów w kształcie litery T, które Hyman [15] za Boverim podaje jako typowy przykład bruzdkowania jaj

wszystkich nicieni, co później wprowadzono do licznych podręczników zoologii. Blastomery przyjmowały układ liniowy, który jest charakterystyczny dla przebadanych nicieni z rzędu *Tylenchida* [4, 11, 12, 23, 28, 29]. Dotychczasowe dane pozwalają sądzić, że układ blastomerów przypominający literę T jest raczej wyjątkowy i dlatego nie powinien stanowić typowego przykładu bruzdkowania jaj nicieni. U większości przebadanych gatunków nicieni dwa pierwsze blastomery są równej wielkości, natomiast u *A. sacchari* obserwowano różnice wielkości tych blastomerów. Podobne zjawisko obserwował Drozdovskij [6] u kilku gatunków z rodzaju *Aphelenchoides*. Być może, różnice w wielkości dwóch pierwszych blastomerów są typowe dla tego rodzaju, ale taki wniosek musiałby być poparty większą liczbą badań porównawczych. Rozwój embrionalny *A. sacchari* jest asynchroniczny. Asynchroniczność podziałów stwierdzono również u kilku innych gatunków nicieni z rzędu *Tylenchida* [1, 4, 5, 18, 22, 26, 29]. Zachowanie się larw przed wylęgiem jest zgodne z danymi Andersona i Darlinga [1], Bruna i Cayrola [2], Cayrola [5], Dropkina, Martina i Johnsona [7], Rhoadesa i Linforda [20], Romana i Hirschmann [21] oraz Rowse [22], natomiast nakłuwanie otoczki jajowej związane jest najprawdopodobniej z wprowadzaniem substancji enzymatycznych rozpuszczających otoczkę i ułatwiających wylęg. Rozwój embrionalny *A. sacchari* jest krótki, trwa średnio 3 doby 21 godz. i 30 minut, jest to okres krótszy niż u większości nicieni z rzędu *Tylenchida*, u których rozwój embrionalny trwa od 6 do 17 dni. Obserwacje rozwoju embrionalnego *A. sacchari* potwierdzają dotychczasowe dane, według których najkrótszy rozwój w rzędzie *Tylenchida* mają przedstawiciele rodzin *Aphelenchoididae* i *Aphelenchidae*; okres ten trwa od 24 godzin do 5 dni [2, 7, 10, 12, 13, 18, 25]. Rozwój embrionalny *A. sacchari* jest najbardziej zbliżony do rozwoju embrionalnego *A. fragariae*, który opisany został przez Drozdovskiego [6].

Proces linienia przebiega w sposób typowy dla nicieni z rzędu *Tylenchida* [1, 2, 13, 21, 28]. Podczas kolejnych linień *A. sacchari*, oskórek był rozrywany poprzecznie i zrzucany w całości. Podobny sposób zrzucania starego oskórka obserwowali Hechler i Taylor [13] u kilku gatunków z rodzaju *Seinura*, Fischer [9] u *Paratylenchus nanus* oraz Lamberti [19] u *Longidorus africanus*. U *A. sacchari*, tak jak u większości przebadanych dotąd nicieni z rzędu *Tylenchida*, różnice w budowie gonad między osobnikami męskimi i żeńskimi były widoczne w trzecim stadium larwalnym. Mimo wielokrotnych prób nie zaobserwowano linienia larw znajdujących się w wodzie, także larwy które wylęły się w jamie ciała samicy nie przechodziły wylinek. Fakty te pozwalają przypuszczać, że w procesie linienia ważną rolę odgrywają warunki środowiska. Osobniki *A. sacchari* uzyskują dojrzałość płciową bezpośrednio po czwartej wylin-

ce; jest to zjawisko rzadko notowane u nicieni pasożytów roślin, ponieważ z dotychczasowych obserwacji przedstawicieli różnych grup *Tylenchida* wynika, że okres od czwartej wylinki do odłożenia pierwszych jaj trwa od 1 do 8 dni [3, 8, 12, 18, 23, 29]. Po 2 do 5 godzinach po czwartej wylince obserwowano przesuwanie się jaj w jajowodzie samicy. Cykl rozwojowy *A. sacchari* (od jaja do jaja) trwa średnio 12 dób 23 godz. i 30 minut. Wyniki obserwacji potwierdzają dotychczasowe dane dotyczące rozwoju przedstawicieli z rodziny *Aphelenchoididae*, u których cykl rozwojowy jest krótszy niż u innych *Tylenchida* i trwa od 2 do 13 dni [7, 8, 10, 11, 12]. U większości przebadanych gatunków z tego rzędu cykl rozwojowy trwa od 20 do 40 dni. W okresie płodności, który u samicy *A. sacchari* trwa od 28 do 30 dni obserwowano sześciokrotne zapłodnienie jednej samicy. Fakt, że przy ciągłej obecności samców liczba odłożonych jaj jest większa pozwala przypuszczać, że normalnie zapłodnień jest więcej. Wyniki obserwacji dotyczące płodności *A. sacchari* pozwalają zaliczyć badany gatunek do nicieni charakteryzujących się wysoką płodnością, ponieważ samice odkładają średnio 222 jaja. Wysoka płodność w powiązaniu z krótkim cyklem rozwojowym wskazuje na dużą dynamikę rozwojową badanego gatunku. Być może jest to cecha charakterystyczna dla całego rodzaju *Aphelenchoides*, ale brak jest badań u innych gatunków, co pozwoliłoby na wyciągnięcie takiego wniosku. Wysoka dynamika rozwojowa i fakt pasożytnictwa tych nicieni na grzybni pieczarki [17] pozwalają uznać *A. sacchari* jako szkodnika o dużym znaczeniu gospodarczym.

LITERATURA

1. Anderson R. V., Darling H. M.: 1964, Proc. Hem. Soc., Washington, 31, 240-256.
2. Brun J., Cayrol J. C.: 1970, Nematologica, 16, 523-531.
3. Brzeski M. W., Jankowska J.: 1966, Rocz. Nauk rol., 91A, 245-254.
4. Brzeski M. W., McCallum D. K., Laughlin C. W.: 1971, Journ. Nematol. 3, 261-263.
5. Cayrol J. C.: 1958, Contribution a L'etude de la biologie du nematode mycophage *Ditylenchus myceliphagus*, J. B. Goodey (*Nematoda-Tylenchida*). These presentee ale Facultete des sciences Universite de Nice, 196.
6. Drozdovskij E. M.: 1967, Trudy Gelmint. Lab., 18, 22-29.
7. Dropkin V. H., Martin G. C., Johnson R. W.: 1958, Nematologica, 3, 115-126.
8. Esser R. P.: 1966, Nematology circular 7. Florida Depart. Agric., Div. Plant Ind.
9. Fisher J. M.: 1966, Journ. Australian Inst. Agric. Sci, 19, 1073-1079.
10. Franklin H. T., Hooper D.: 1962, Nematologica, 8, 136-142.
11. Hechler H. C.: 1963, Proc. helm. Soc. Washington, 30, 182-195.
12. Hechler H. C., Taylor D. P.: 1966, Proc. helm. Soc. Washington, 33, 71-83.
13. Hechler H. C., Taylor D. P.: 1966, Proc. helm. Soc. Washington, 33, 90-96.
14. Hirschmann H.: 1962, The life of *Ditylenchus trifomis* (*Nematoda: Tylenchi-*

- da) with emphasis on post-embryonic development. Proc. helm. Soc. Washington, 22, 30-43.
15. Hyman L. H.: 1951, The Invertebrates, 350. New York, McGraw-Hill.
 16. Jankowska J.: 1965, Biul. Prod. Piecz., 1, 26-29.
 17. Janowicz K.: 1973, Materiały Ogólnopolskiego Zjazdu Warzywniczego w Skiernewicach, 87-88.
 18. Jairajpuri S. H.: 1968, Labdev Journ. of Sci. Techn., 6B, 27-34.
 19. Lamberti F.: 1969, Journ. Nematol., 1, 94-95.
 20. Rhoades H. L., Linford M. B.: 1961, Proc. helm. Sci. Washington, 28, 185-190.
 21. Roman J., Hirschmann H.: 1969, Proc. helm. Sci. Washington, 36, 164-174.
 22. Rowse T. W.: 1969, Journ. Nematol., 1, 26.
 23. Sivakumar C. V.; Seshadri A. S.: 1971, Indian Journ. Nematol., 1, 7-20.
 24. Smyk E., Konieczny E.: 1966, Biul. Prod. Piecz., 1, 20-32.
 25. Wallace H. R.: 1960, Nematologica, 5, 315-321.
 26. Wang L. H.: 1971, Journ. Nematol., 3, 101-107.
 27. Wilski A.: 1968, Pr. Nauk. IOR, 10, 193-202.
 28. Van Weerd L. C.: 1960, Nematologica, 5, 43-52.
 29. Yuksel H.: 1960, Nematologica, 5, 289-296.

Крыстына Яновіч

БИОЛОГИЯ APHELENCHOIDES SACCHARI HOOPER, 1958
(HEMATODЫ APHELENCHOIDIDAE)

Резюме

Исследования по биологии нематоды *Aphelenchoides sacchari* проводились на мицелии *Agaricus bisporus*, выращенном на питательной среде Уайта. Отрезки агара вводили в камеру Тигема и исследовали микроскопически. Установлено, что *A. sacchari* является раздельнополым видом. Самки сносят 222 яичка в течение с своей жизни. Эмбриональная стадия продолжается 3 дня и 8 часов. Нематоды принадлежащие к виду *A. sacchari* достигают половой зрелости непосредственно после 4-ой линьки. Период послеэмбрионального развития составляет в среднем 8 дней до досижения половой зрелости. Период развития одного поколения (от яичка до яичка) составляет в среднем 12 дней. Период плодовитости самок составляет в среднем 28-30 дней, в течение которых они подвергаются 6-кратному оплодотворению.

Период жизни нематод вида *A. sacchari* не превышает в общем 60 дней, причем самцы живут несколько более долго.

Krystyna Janowicz

BIOLOGY OF APHELENCHOIDES SACCHARI HOOPER, 1958
(APHELENCHOIDIDAE NEMATODES)

Summary

The investigations on the biology of the *Aphelenchoides sacchari* nematode were carried out on the mycelium of *Agaricus bisporus*, developed on the White's

nutrient medium. The sectors of agar were introduced into the Tiegham's chamber and investigated microscopically. It has been found that *A. sacchari* is a species of differentiated sex. Females lay 222 eggs during their lifetime. The embryonal stage is 3 days and 8 hours. The nematodes of the *A. sacchari* species reach their sexual maturity directly after the fourth molting. The postembryonal period lasts, on the average, 8 days, till reaching the sexual maturity. The development period of one generation (from egg to egg) is, on the average, 12 days. The fertility period of females is 28-30 days, at what time they undergo sixfold impregnation. The life period of nematodes of the *A. sacchari* species does not exceed usually 60 days, males living somewhat longer.