

松材线虫和拟松材线虫食道腺及其分泌物超微结构观察

张 灿¹ 张路平²

(1 中国农业大学动物医学院 2 河北师范大学生命科学学院)

摘要:该文用透射电镜观察比较松材线虫南黑株系、拟松材线虫杭九株系幼虫期和成虫期食道腺和分泌物颗粒的形态以及在生活史中的变化。结果表明二者的食道腺的结构以及在不同时期活性的变化是一致的;幼虫期亚腹食道腺发达,内有大量的分泌颗粒;成虫期背食道腺发达,内有大量的分泌颗粒。松材线虫和拟松材线虫食道腺分泌颗粒可分为两种类型,这两种类型的分泌颗粒在体积和电子密度上都存在差异。松材线虫和拟松材线虫株系间的分泌颗粒在体积上存在差异。

关键词: 松材线虫, 拟松材线虫, 食道腺, 分泌颗粒, 超微结构

中图分类号: S763.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1522(2006)03-0119-04

ZHANG Can¹; ZHANG Lu-ping². **Ultrastructural observation on esophageal glands and their secretory granules in *Bursaphelenchus xylophilus* and *Bursaphelenchus mucronatus* by TEM.** *Journal of Beijing Forestry University* (2006)28(3) 119-122 [Ch, 8 ref.]

¹ College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing, 100094, P. R. China;

² College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang, 050016, P. R. China.

The dorsal and subventral esophageal glands and their secretory granules in *Bursaphelenchus xylophilus* and *Bursaphelenchus mucronatus* were observed by transmission electron microscopy (TEM) to study their shape and changes in life cycles. Results indicated that the structure of esophageal glands and their changes in larvae and adults appeared degenerate; the subventral glands (SvG) enlarged in larvae and large numbers of secretory granules (SG) appeared. The dorsal gland (DG) enlarged in both male and female, and numbers of SG appeared in it. Two types of secretory granules formed by esophageal glands were different in size and electron-dense, and secretory granules in *Bursaphelenchus xylophilus* and *Bursaphelenchus mucronatus* were different in size.

Key words *Bursaphelenchus xylophilus*, *Bursaphelenchus mucronatus*, esophageal gland, secretory granule, ultrastructure

松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus*) 是寄生于松属树种体内的一种寄生线虫,引起松树萎蔫病,对松属树种造成毁灭性的危害,在国内外均被列为重要的检疫对象。拟松材线虫 (*Bursaphelenchus mucronatus*) 与松材线虫在形态和结构上十分相似,然而其致病性却明显不同。松材线虫引起松树萎蔫病,而拟松材线虫却不致病或仅有轻微的致病性^[1]。因此,这两类线虫已经引起世界各地学者的关注,并对松材线虫和拟松材线虫的分类、亲缘关系以及遗

传差异等方面进行了大量的研究,但对其致病机理仍不清楚^[2]。近年来,对植物寄生线虫中根结线虫 (*Meloidogyne* spp.) 和胞囊线虫 (*Heterodera* spp.) 的研究已经显示食道腺分泌物可以刺激寄主形成取食结构,在致病性方面有重要的作用^[3]。因此,本研究对松材线虫南黑株系和拟松材线虫杭九株系的食道腺进行了超微结构的观察,以期研究松材线虫和拟松材线虫的致病机理提供依据。

收稿日期:2005-01-11

http://journal.bjfu.edu.cn

基金项目:河北师范大学分子细胞生物学省重点实验室开放基金。

第一作者:张灿,博士。主要研究方向:兽医生物技术。电话:0532-86080734 Email:cleverflame@sohu.com 现工作单位地址:266109 青岛市莱阳农学院动物科技学院。

责任作者:张路平,教授。主要研究方向:寄生虫学。电话:0311-6268846 Email:luzhang@sj-user.hecninfo.net 地址:050016 河北师范大学生命科学学院。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

由中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所杨宝君研究员提供. 松材线虫: 南黑(中国南京, 黑松 *Pinus thunbergii*); 拟松材线虫: 杭九(中国杭州, 马尾松 *P. massoniana*).

1.2 实验方法

1.2.1 线虫的培养和收集

在 PDA 培养基上接种裂褶菌 (*Schizophyllum* sp.), 26℃ 温箱中培养一周左右, 至菌丝长满培养基表面, 接种线虫, 放入 26℃ 温箱中培养一周左右, 至线虫吃完菌丝, 放入冰箱中保存待用.

1.2.2 透射电镜样品制备

用浅盆法收集线虫, 3 000 r/min 离心 5 min, 在 0.05 mol/L PBS (pH7.2) 中用 3% 戊二醛固定 2 h, 缓冲液反复冲洗, 显微镜下观察. 挑选幼虫、雌性成虫和雄性成虫各 1 000 条, 12 000 r/min 离心, 用 2% 琼脂分别包埋, 将包含有线虫的小琼脂块转移到 PBS 中, 4℃ 下过夜. 将包含有线虫的小琼脂块用电镜样品制备的常规方法处理, 做超薄切片 (70~80 nm), 透明铜网收集, 醋酸铀、柠檬酸铅染色, 电镜观察.

1.2.3 结果观察和分析

观察比较松材线虫和拟松材线虫不同发育时期的食道腺及分泌颗粒的超微结构; 随机取样, 各株系不同发育时期统计样品量大约 1 000 条, 分别测量各株系线虫幼虫期和成虫期(雌虫和雄虫)食道腺中不同类型的分泌颗粒的直径(测量不同切面分泌颗粒直径, 取最大值作为分泌颗粒的真实直径); 建立数据库, 用 STAISTICA 软件做 T 检验分析, 比较不同株系不同发育时期分泌颗粒结构和体积的变化.

2 结 果

2.1 食道腺超微结构观察

松材线虫及拟松材线虫两个株系食道腺结构相似, 他们都有 3 个单细胞的食道腺: 一个背食道腺和两个亚腹食道腺. 食道腺分布位置相似, 位于食道球后方, 成品字形围绕着肠道, 与周围的组织界限明显. 背食道腺向前延伸终止于与口针相连的食道球的后部. 食道球为一肌质球状结构, 中央为一空腔, 周围有大量辐射状肌肉, 与肠道交界处有瓣膜与肠道相通, 向前与食道相连, 食道腔直径约 0.4 μm. 食道腺与食道球相连处有端囊, 与植物线虫的结构相似(图版 I-1, 2). 在线虫不同的发育阶段, 其食道腺的形态和活性都有不同的变化, 松材线虫和拟松材线虫食道腺的变化一致: 在幼虫期, 亚腹食道腺发

达, 内有大量的分泌颗粒, 背食道腺不发达, 分泌颗粒很少(图版 I-3); 随线虫的发育, 亚腹食道腺逐渐萎缩, 分泌颗粒的量减少, 背食道腺开始发育, 到成虫期以后, 食道腺在形态上发生了很大的变化, 背食道腺高度发达, 含有大量的分泌颗粒, 而亚腹食道腺萎缩退化, 分泌颗粒的量很少(图版 I-4).

2.2 分泌颗粒的观察

在松材线虫和拟松材线虫的幼虫期和成虫期可以观察到其食道腺中含有分泌颗粒. 这些分泌颗粒具膜包被, 球形. 食道腺中密布的分泌颗粒, 根据其电子密度和体积的差异, 大致可分为两类: I 型分泌颗粒和 II 型分泌颗粒. I 型分泌颗粒电子密度高, 均质, 球形, 边界清晰; II 型分泌颗粒电子密度低或者电子透明, 均质, 形状不规则, 近似球形, 与前者相比, 体积明显大. 另外, 还有一些分泌颗粒电子密度介于前两者之间, 球形, 不均质, 内含物为絮状, 或者为层层套叠状, 各层电子密度不同, 推测为未成熟的 I 型分泌颗粒, 或者为分泌颗粒内含物排出过程的中间类型; 直径与同株系的 I 型分泌颗粒直径相近(图版 I-5, 7). 在食道腺中可以观察到分泌颗粒正在形成的过程: 分泌颗粒靠近高尔基体, 从高尔基体中产生潴泡, 分布在颗粒的周围, 正在形成的分泌颗粒内含物不均质, 电子密度较高(图版 I-5). 某些亚腹食道腺中的分泌颗粒具膜包被, 内部有电子半透明的核, 在不同的分泌颗粒中核的位置和大小各不相同(图版 I-8), 这与 Hussey^[4]的观察结果一致, 在植物线虫的食道腺中也观察到同样的结构^[5]. 松材线虫南黑株系和拟松材线虫杭九株系的线虫发育的各个时期分泌颗粒的种类相同, 形状相似, 在数量上没有差异, 但随着发育时期的不同, 分泌颗粒的体积有变化.

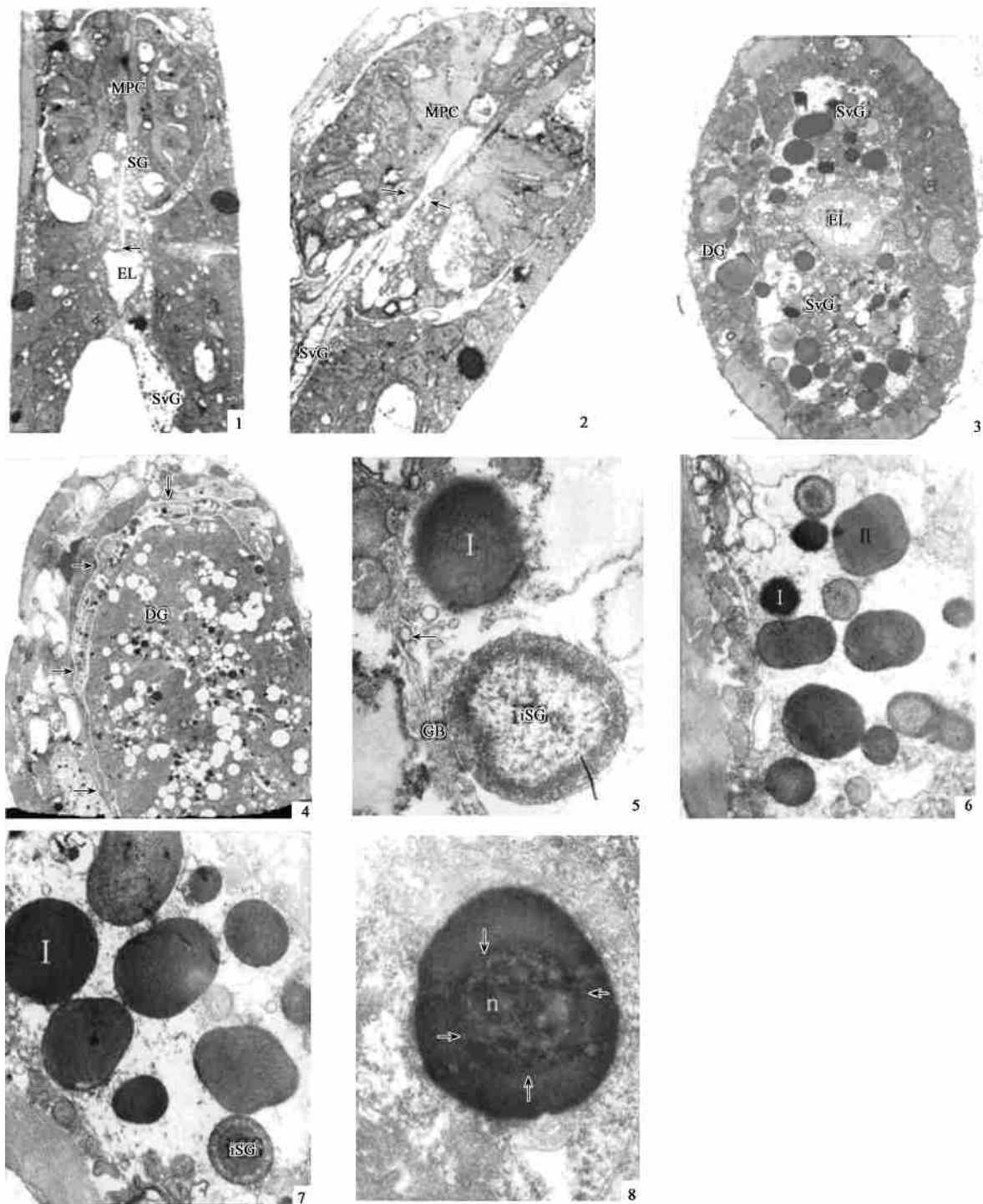
2.3 松材线虫和拟松材线虫株系间不同发育时期分泌颗粒的比较

松材线虫南黑株系的 I 型分泌颗粒和 II 型分泌颗粒幼虫期明显大于成虫期, 差异显著 ($T_{41} = 3.4027$, $P = 0.0081$); 拟松材线虫杭九株系 I 型分泌颗粒幼虫期明显大于成虫期, 差异显著 ($T_{35} = 2.9027$, $P = 0.0071$), II 型分泌颗粒幼虫期与成虫期没有明显的差异 ($T_{31} = 1.4027$, $P = 0.1001$).

2.4 松材线虫和拟松材线虫不同发育时期分泌颗粒的比较

2.4.1 幼虫期分泌颗粒的比较

在幼虫期, 松材线虫南黑株系食道腺的 I 型分泌颗粒与拟松材线虫杭九株系的 I 型分泌颗粒差异不显著 ($T_{22} = 1.6917$, $P = 0.1048$); II 型分泌颗粒二者差异显著, 南黑株系 II 型分泌颗粒直径明显大于



1. 南黑幼虫纵切(4 000×):示食道球入口(↑)、分泌颗粒(SG)、食道球(MPC)、肠腔(EL); 2. 南黑幼虫纵切(3 500×):示端囊(↑)、食道球(MPC)、亚腹食道腺(SvG); 3. 杭九幼虫食道腺横切(3 500×):示背食道腺(DG)、亚腹食道腺(SvG)、肠腔(EL); 4. 南黑雌虫横切(3 000×):示背食道腺细胞界限(↑)、背食道腺(DG); 5. 杭九幼虫分泌颗粒(25 000×):示高尔基体(GB)分泌的潜泡(↓)、未成熟的分泌颗粒(iSG)和 I 型分泌颗粒(I); 6. 杭九幼虫分泌颗粒(10 000×):示 I 型分泌颗粒(I)和 II 型分泌颗粒(II); 7. 南黑幼虫分泌颗粒(12 000×):示 I 型分泌颗粒(I)和未成熟的分泌颗粒(iSG); 8. 南黑雄虫分泌颗粒(50 000×):示分泌颗粒电子密度不均一的核(n)、(↓)示核的边界
图版 I 南黑株系和杭九株系食道腺及其分泌颗粒的超微结构的比较

PLATE I Comparison of the ultrastructure of esophageal glands and their secretory granules in *P. thunbergii* and *P. massoniana*

杭九株系 II 型分泌颗粒 ($T_{25}=2.923\ 0, P=0.007\ 2$).

颗粒差异不显著 ($T_{52}=1.487\ 8, P=0.142\ 8$).

2.4.2 成虫期分泌颗粒的比较

在成虫期,南黑株系 I 型分泌颗粒明显大于杭九株系 I 型分泌颗粒 ($T_{51}=4.402\ 7, P=0.000\ 1$); 南黑线虫食道腺的 II 型分泌颗粒与杭九的 II 型分泌

3 讨 论

目前很多学者对植物线虫食道腺在生活史中的变化以及食道腺内含物的成分做了大量的研究工

作,结果表明植物线虫的食道腺在取食过程中起重要作用,食道腺及其分泌颗粒在其寄生生活过程中发生一系列的变化.植物线虫幼虫期亚腹食道腺发达,活性最高,在与寄主建立取食关系以后,亚腹食道腺开始萎缩,活性逐渐降低,而背食道腺在确立取食关系以后,几天内其活性达到一个高峰,并在随后的整个生活周期中,保持高活性^[6].植物线虫食道腺的分泌颗粒在寄生过程中有变化,两种腺体形成的分泌颗粒的数量、形态和大小都有区别.在寄生前J2期幼虫亚腹食道腺中包含大量的分泌颗粒,有不规则的中央核;而在背食道腺中很少有分泌颗粒出现,颗粒小,电子密度高.寄生关系确立之后,亚腹食道腺的分泌颗粒减少,体积变小,密度增加;背食道腺的分泌颗粒数量增加,体积增大,电子密度减小^[7].对松材线虫南黑株系和拟松材线虫杭九株系食道腺在不同发育时期超微结构的观察表明,其食道腺及分泌颗粒的活性发生相似的变化.幼虫期亚腹食道腺发达,内含大量的分泌颗粒,背食道腺不发达,分泌颗粒的量很少;成虫期背食道腺分泌颗粒的数量增加,亚腹食道腺萎缩,分泌颗粒的数量减少.这表明松材线虫南黑株系和拟松材线虫杭九株系食道腺及其分泌颗粒在不同发育时期的变化和植物线虫食道腺以及分泌颗粒的变化是一致的.尽管松材线虫和拟松材线虫与植物线虫的寄生方式不同,但其食道腺的发育是一致的,因此推测松材线虫南黑株系和拟松材线虫杭九株系的食道腺和植物线虫的食道腺的功能是相似的,在幼虫期亚腹食道腺起主要作用,而到成虫期背食道腺起主要作用.本实验结果是否能够代表松材线虫和拟松材线虫的食道腺发育特点,还需要对其他株系进行类似的观察以确定结果的准确性.

松材线虫南黑株系和拟松材线虫杭九株系幼虫期亚腹食道腺发达,分泌颗粒主要位于亚腹食道腺中,成虫期背食道腺发达,分泌颗粒主要位于背食道腺中.食道腺中分泌颗粒分为两类:I型分泌颗粒和II型分泌颗粒,两者差异极为显著,推测具有不同的功能.实验结果表明松材线虫南黑株系和拟松材线虫杭九株系在幼虫期和成虫期分泌颗粒有差异,说明幼虫期亚腹食道腺中的分泌颗粒和成虫期背食道腺中的分泌颗粒不同,可能有不同的功能;在成虫期雌雄线虫的分泌颗粒无显著的差异,说明分泌颗粒的种类不受性别因素的影响,线虫的发育过程中

食道腺的作用不受性别的限制.松材线虫南黑株系和拟松材线虫杭九株系的分泌颗粒在幼虫期和成虫期都有差异,而拟松材线虫没有致病性,这表明分泌颗粒在体积上的变化与其发育有关,而与松材线虫的致病性无关.

松材线虫和拟松材线虫的致病性存在很大的差别,松材线虫致病机理的假说认为松材线虫的食道腺分泌颗粒在致病过程中具有重要的作用^[8].实验结果表明松材线虫南黑株系和拟松材线虫杭九株系食道腺分泌颗粒存在显著差异,幼虫期II型分泌颗粒差异显著,成虫期I型分泌颗粒差异显著.松材线虫南黑株系和拟松材线虫杭九株系分泌颗粒在形态上的差异表明分泌颗粒在松材线虫和拟松材线虫中可能有不同的作用.但只是从形态上不能判断这两种分泌颗粒是引起松树发病的原因,需要进一步分析分泌颗粒的成分,以确定分泌物是否与松材线虫引起松树发病有关.

参 考 文 献

- [1] DE GUIRAN G, LEE M J, DALMASSO A, et al. Preliminary attempt to differentiate pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) by enzyme electrophoresis [J]. *Revue Nematol*, 1985, 8 (1): 88-91.
- [2] ROBERTSON I, ROBERTSON W M, JONES J T. Direct analysis of the secretion of the potato cyst *Globodera rostochiensis* [J]. *Parasitology*, 1999, 119(2): 167-176.
- [3] SIJMONS P C, ATKINSON H J, WYSS U. Parasitic strategies of root nematodes and associated host cell responses [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 1994, 32: 235-259.
- [4] HUSSEY R S, MIMS C W. Ultrastructure of esophageal glands and their secretory granules in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* [J]. *Protoplasma*, 1990, 156: 9-18.
- [5] RICARDO S M, BALDWIN J G. Changes in esophageal gland activity during the life cycle of *Nacobbus aberrans* (Nemata: Pratylenchidae) [J]. *Journal of Nematology*, 1998, 30 (3): 275-290.
- [6] ENDO B Y. Ultrastructure of esophageal gland and its secretory granules in juveniles of *Heterodera glycines* [J]. *Journal of Nematology*, 1987, 19(4): 469-483.
- [7] BIRD A F. Changes in the dimensions of the oesophageal glands in root-knot nematodes during the onset of parasitism [J]. *Journal of Parasitology*, 1983, 13(4): 343-348.
- [8] MAMIYA Y, ENDA N. *Bursaphelenchus mucronatus* (Nematoda: Aphelenchoididae) from pine wood and its biology and pathogenicity to pine tree [J]. *Nematologica*, 1979, 25: 353-361.

(责任编辑 董晓燕)