

## 酯酶在根结线虫分类上应用的研究\*

胡凯基

(中国林业科学研究院林业研究所)

### 摘要

应用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,对采自我国14个省市的5种根结线虫(*Meloidogyne* spp.),共47个样本作了正向板酯酶的分析,并研究了一些可能影响测定的因素。结果表明,根结线虫种间的酯酶谱存在明显而稳定的特异性,在种内也是稳定的。对接种寄主、样本来源、生理小种、室内培养与田间自然寄生、营养等不同条件下的对比分析表明,它们均不影响种的特征性酶谱。因此将酯酶作为根结线虫分类的辅助手段是有意义的。但线虫的发育阶段不同,酯酶谱有差异。采用产卵期的雌成虫进行分析则简便、可靠。

**关键词** 根结线虫; 分类学; 酯酶

根结线虫(*Meloidogyne* spp.)是重要的植物寄生线虫,其分类的依据是形态学,包括体内外各部的结构、量度、相对比例等等。但有些形态特征有时变异较大,如分种的一个重要特征——会阴花纹。作者用一个具有典型南方根结线虫(*M. incognita*)会阴花纹模式的雌虫,将其单卵块接种于 Rutgers 蕃茄上,观察繁殖出来的第一、三代,发现分别有12.1%、7.6%的会阴花纹不呈典型的南方根结线虫模式。用一个具不典型南方根结线虫会阴花纹模式的雌虫,将其单卵块也接种于 Rutgers 蕃茄上,观察第三代,其不典型会阴花纹占16.7%。在各地采集的标本中,同一个种的会阴花纹也有很多变化。如陕西周至县桑树上的南方根结线虫,其会阴花纹和典型的南方根结线虫不太相同,它的花纹纤细,背弓很高,花纹很大。但接种到蕃茄上以后,大部分花纹有所变化,呈典型的南方根结线虫会阴花纹。由此可见环境条件、寄主等因素可能对根结线虫的某些形态特征有影响。由于根结线虫形态特征的变异和某些测量数据的种间重叠,人们希望能够找到一些新的途径和方法,对现有的分类方法进行补充。蛋白、酶的电泳分析就是这些尝试中的一种。

Dickson 等(1970)第一次将电泳技术用于根结线虫。以后 Dalmaso 等(1978)、Janati (1982)和 Esbenshade (1985)也做了类似的工作<sup>[3,4,6,8-10]</sup>。他们认为酯酶和其它一些酶及非酶蛋白在根结线虫分类上有一定价值。但 Ishibashi(1970)<sup>[6]</sup>认为寄主种类、营养条件可影响

本文于1988年6月28日收到。

\*此项工作为国家自然科学基金资助项目,是作者研究生毕业论文的一部分。导师萧刚柔先生和杨宝君先生审阅全文,并提出宝贵意见,特表谢意。

线虫的酶、蛋白的电泳谱。作者利用国内材料对根结线虫的非特异性酯酶进行电泳分析, 并着重从实际应用方面出发, 对一些可能影响酯酶谱的因素, 包括环境条件、寄主种类、寄主营养条件、线虫不同发育阶段等进行了研究, 以确定酯酶在根结线虫分类上的应用价值。

## 一、材料与方 法

### (一) 线 虫

本试验选用采自我国14个省(市)的寄生于32种植物上的5种根结线虫, 即南方根结线虫、北方根结线虫(*M. hapla*)、花生根结线虫(*M. arenaria*)、爪哇根结线虫(*M. javanica*)和象耳豆根结线虫(*M. enterolobii*), 共47个样本(见表1)。线虫种的确定依据形态特征和鉴别寄主。样本(说明的除外)均接种于原寄主种、品种上。接种寄主盆栽(培养土为消毒森林土:沙=1:1), 于温室中培养。每株1次接种5—10个卵块。卵块均来自具有种的典型会阴花纹的雌虫。

### (二) 酯酶电泳分析

1. 不同种根结线虫酯酶谱的对比分析 选用来自浙江杭州柳树、山东济南一串红及河南开封芹菜上的花生根结线虫; 海南岛尖峰岭青皮象耳豆上的象耳豆根结线虫; 云南景洪蕃茄上的南方根结线虫; 山东青岛月季上的北方根结线虫及云南昆明青阳参上的爪哇根结线虫进行分析。接种寄主均为 Rutgers 蕃茄。

表 1 酯酶电泳分析所用根结线虫样本及其酯酶谱

种 名	采 集 地	寄主植物	寄 主 植 物 学 名	生理小种	酯 酶 谱
花生根结线虫	浙江杭州	柳 树	<i>Salix sp.</i>	—	A <sub>1</sub>
	山东济南	一 串 红	<i>Salvia splendens</i>	—	A <sub>3</sub>
	河南开封	芹 菜	<i>Apium graveolens</i>	2	A <sub>2</sub>
象耳豆根结线虫	海南尖峰岭	青皮象耳豆	<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	—	E <sub>2</sub>
北方根结线虫	山东青岛	月 季	<i>Rosa chinensis</i>	—	H <sub>1</sub>
	河北保定	牛 蒡	<i>Arctium lappa</i>	—	
	"	白 藏	<i>Angelica dalurica</i>	—	
	"	黄 芪	<i>Astragalus mongholicus</i>	—	
	"	射 干	<i>Belamcanda chinensis</i>	—	
	"	赤 包	<i>Thadiantha dubia</i>	—	
	"	土 贝母	<i>Bolbostemma panicalatum</i>	—	
	"	紫 苏	<i>Perilla frutescens</i>	—	
	"	远 志	<i>Polygala tenuifolia</i>	—	
	"	景田三七	<i>Sedum aizoon</i>	—	
	"	罗 勒	<i>Ocimum basilicum</i>	—	
	"	龙 葵	<i>Solanum nigrum</i>	—	
	"	半 枝莲	<i>Scutellaria barbata</i>	—	
"	大 丽菊	<i>Dahlia pinnata</i>	—		

续表 1

种 名	采 集 地	寄主植物	寄 主 植 物 学 名	生理小种	酯 酶 谱
南方根结线虫	广西南宁	鸡冠花	<i>Celosia</i> sp.	—	I <sub>1</sub>
	"	凤仙花	<i>Impatiens balsamina</i>	—	
	"	蕹菜	<i>Ipomoea aquatica</i>	—	
	"	胡萝卜	<i>Daucus carota</i>	—	
	"	姜	<i>Zingiber officinale</i>	—	
	"	辣椒	<i>Capsicum frutescens</i>	—	
	"	蕃茄	<i>Lycopersicum esculentum</i>	—	
	广西钦州	芹菜	<i>Apium graveolens</i>	—	
	广东	茄子	<i>Solanum melongena</i>	2	
	广东番禺	辣椒	<i>Capsicum frutescens</i>	—	
	广东屯昌	蕃茄	<i>L. esculentum</i>	—	
	云南景洪	"	<i>L. esculentum</i>	—	
	云南西双版纳	"	<i>L. esculentum</i>	—	
	"	"	<i>L. esculentum</i>	—	
	云南恩茅	"	<i>L. esculentum</i>	—	
	上海	仙客来	<i>Cyclamen</i> sp.	—	
	湖南洪江	芹菜	<i>A. graveolens</i>	2	
	河南新郑	"	<i>A. graveolens</i>	1	
	河南开封	黄瓜	<i>Cucumis sativus</i>	1	
	河南新郑	蕃茄	<i>Lycopersicum esculentum</i>	1	
河南开封	茄子	<i>S. melongena</i>	1		
宁夏银川	四季海棠	<i>Begonia semper</i>	—		
陕西西安	桑树	<i>Morus</i> sp.	2		
北京	四季海棠	<i>B. semper</i>	2		
黑龙江大庆	蕃茄	<i>L. esculentum</i>	1		
爪哇根结线虫	广西钦州	芹菜	<i>A. graveolens</i>	—	J <sub>1</sub>
	福建厦门	冬珊瑚	<i>Solanum pseudocapsicum</i>	—	
	云南昆明	青阳参	<i>Cynanchum otophpllum</i>	—	
	广西南宁	茄子	<i>S. melongena</i>	—	

## 2. 酯酶谱种内稳定性分析

(1) 寄主植物对酯酶的影响 选用采自广西南宁不同寄主上的南方根结线虫 8 个样本(见表 1), 接种于各自的原寄主种类上。采自青岛月季上的北方根结线虫和云南昆明青阳参上的爪哇根结线虫分别同时接种于原寄主种和蕃茄上。采自河北保定的北方根结线虫的 13 个样本(见表 1), 直接用于酯酶分析, 未接种。

(2) 不同地理来源及不同寄主生理小种对酯酶的影响 选用采自广东、广西、云南、河南及黑龙江的蕃茄; 广东、广西的辣椒; 广东、河南的茄子及广西、湖南、河南的芹菜上的南方根结线虫共 15 个样本进行分析。寄主生理小种有 1 号、2 号两种。接种寄主相对应的分别为 Rutgers 蕃茄、辣椒、茄子、芹菜。

(3) 温室内培养及田间自然情况下同种线虫的酯酶分析 室内培养的线虫为青岛月季上的北方根结线虫, 接种寄主为 Rutgers 蕃茄。田间自然情况下的北方根结线虫来源同(1)。

(4) 寄主营养条件对酯酶谱的影响 选用云南西双版纳蕃茄上的南方根结线虫及海南岛

尖峰岭青皮象耳豆上的象耳豆根结线虫, 各接种于两盆 Rutgers 蕃茄, 其中一盆中期施肥一次, 另一盆只浇水作为对照。施肥量为尿素 5 g/株。

(5) 室内培养世代对线虫酯酶的影响 选用云南昆明青阳参上的爪哇根结线虫, 用10个卵块接种蕃茄。2个月为一代, 再从中任选10个卵块, 继续接种。对其第1、3、6代进行酯酶分析。

(6) 不同加样量对酯酶谱的影响 选用云南西双版纳蕃茄上的南方根结线虫、昆明青阳参上的爪哇根结线虫、济南一串红上的花生根结线虫、青岛月季上的北方根结线虫及海南尖峰岭青皮象耳豆上的象耳豆根结线虫, 分别接种于蕃茄上。每种根结线虫分别以1、2、4、8、16个产卵期雌虫的匀浆为一个电泳样品, 作酯酶电泳分析。

### 3. 不同发育阶段的线虫的酯酶

卵: 选用云南思茅蕃茄上的南方根结线虫、广西钦州芹菜上的爪哇根结线虫及青岛月季上的北方根结线虫分别接种于蕃茄上, 于雌虫产卵期收集卵块, 装入含50 ml、1.05% NaOC溶液的三角瓶中, 用力振荡3 min, 然后顺序通过200目及500目的筛子, 用水冲洗500目筛子上的卵, 收集并计数, 每1 000个卵为一电泳样品<sup>[7]</sup>。

二龄幼虫: 将新鲜卵块置于用小塑料盒制成的湿室中, 于28℃下培养48 h。镜检计数, 每2 000条幼虫为一电泳样品。

雌虫: 产卵期的雌虫。

### 4. 电泳<sup>[2,10]</sup>

酯酶浸提液的配制: 20%(w/v)蔗糖(或甘油), 2% Triton X-100, 定容至100 ml。

制样: 将前述得到的卵用吸管移入微型研磨管, 加一小滴浸提液(4℃), 研磨至匀浆, 再加浸提液, 使样液约10—15 μl。再移入毛细离心管, 置-15℃下待用。幼虫制样同上。雌虫为直接在解剖镜下从新鲜根上挑出完整的虫体, 其余同上。

离心: 电泳前, 将所制样品于13 000 g下离心15 min(4℃), 取其中层清液作为电泳样品。

电泳: 凝胶厚约1 mm, 分离胶、浓缩胶浓度分别为7%、3%。电泳初期0.5 h, 电压为80 v, 随后调至200—300 v。电泳于4℃下进行, 电泳毕于37℃下染色约1 h, 染色后的凝胶保存于7%的乙酸溶液中。染色液的配制: 先后将EDTA 30 mg, 坚牢兰 RR 60 mg溶于100 ml、pH 7.2的磷酸缓冲液中, 再将40 mg α-醋酸萘酯溶于2 ml 丙酮中, 逐滴加入到缓冲液中, 并同时搅拌, 然后将染液过滤, 除去不溶物即可。染液在用前0.5 h时配制。

由于凝胶电泳迁移率变化的问题, 因此在每次电泳时都加入采自青岛月季上的北方根结线虫的样品, 作为内部对照。

在所有的电泳分析中, 每个样本至少连续分析两个世代, 每个世代至少重复电泳3次。除不同发育阶段及加样量变化的分析外, 均采用产卵期的雌虫, 每两个雌虫为一电泳样品。

## 二、结 果

### (一) 不同种根结线虫的酯酶谱有明显差异

根结线虫的酯酶谱大致可分为2个区域: 校正迁移率(将作内部对照的北方根结线虫的

唯一主要带定为0.50，其余各带与之相比即可。以下简称迁移率) 0.00—0.30, 0.30—1.00。其中具有种的特征性的酶带在后一区域。前一区域无确定酶带。每种根结线虫各主要酯酶带的迁移率见表2。

从电泳分析的结果可以看出，不同种根结线虫各自有特异而稳定的酯酶型(图1、图版I-1)。酶谱的特异性表现在酶带的数目、迁移率及染色程度各有不同。其中花生根结线虫有3种类型的酯酶谱。

**(二) 同种根结线虫的酯酶谱是稳定的**

1. 对来自同一地区而接种寄主不同的南方根结线虫样本的分析表明, 这些不同的样本无一例外地具有迁移率 0.47 的特征性酶带, 并不因寄主植物不同而产生差异。尤其是对寄主植物亲缘关系相差极大的北方根结线虫13个样本的分析, 更表明了这一点(见图版I-6)。

**表 2 不同种根结线虫各主要酯酶带校正迁移率**

花生根结线虫	象耳豆根结线虫	北方根结线虫	南方根结线虫	爪哇根结线虫
0.50	0.35	0.50	0.47	0.74
0.54	0.44	—	—	0.55
0.57	—	—	—	0.59

2. 结果表明, 同种根结线虫寄生于不同地区的相同寄主上时, 其酯酶谱不变。同种根结线虫的不同生理小种的酯酶谱一致(图版I-4)。

3. 室内培养及来自田间自然条件下的北方根结线虫均具有迁移率0.50的酶带, 未受培养条件的影响。

4. 南方根结线虫及象耳豆根结线虫分别寄生于营养条件不同的寄主时, 酯酶谱不受影响(图版I-2)。

5. 同种根结线虫不同培养世代的酯酶谱无差异。

6. 酯酶谱同加样量有关, 随加样量成倍增加, 一些在加样量少时检测不出的带开始出现。象耳豆根结线虫在加样量达到8、16个雌虫时, 多出两条迁移率0.58、0.60的浅色带。共同的变化趋势是, 随加样量增加, 各酶带染色加深、区域增大, 并有逐步融合之势。但在1—16个雌虫的范围内, 仍基本保持种的特征性酶谱(图版I-5、8、9)。

**(三) 不同发育阶段线虫的酯酶谱不同**

南方根结线虫的卵样中未见有主要酯酶带, 幼虫则有一条同雌成虫相似的带, 但酶带的染色程度及范围均低于雌成虫, 同时也没有雌成虫具有的一些浅色带(图版I-3)。爪哇根结线虫、北方根结线虫的变化趋势同南方根结线虫相类似。共同的特点是卵样中未检出主要酯酶带, 幼虫具有同雌成虫类似的酶谱, 也具有种间特异性。

上述各项试验外的样本的结果见表1和图版I-7。

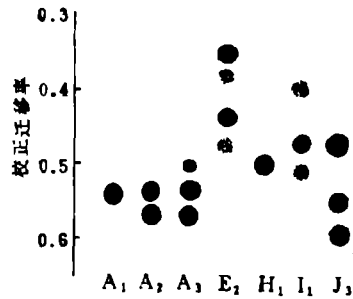


图1 示5种根结线虫的酯酶谱

A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>为花生根结线虫, E<sub>2</sub>为象耳豆根结线虫, H<sub>1</sub>为北方根结线虫, I<sub>1</sub>为南方根结线虫, J<sub>2</sub>为爪哇根结线虫

● 为主要酯酶带, ○ 为次带

### 三、讨 论

通过对根结线虫 5 个种 47 个样本的酯酶电泳分析，证明不同种根结线虫的非特异性酯酶谱是不同的；同时，同一种根结线虫的酯酶谱是稳定的，未受寄主、环境条件、培养世代、寄主营养条件等因素的影响。另外，根结线虫的酯酶谱和以形态特征为依据的分类系统是一致的。因此非特异性酯酶电泳分析是种较好的分类方法，尤其是对一些主要形态特征变异较大的群体。如河南禹县楸树上的花生根结线虫，其会阴花纹变异很大，有两条类似侧线的结构，极易误为爪哇根结线虫；电泳分析表明，其酯酶谱属于花生根结线虫，对其它特征的深入研究，也确认其为花生根结线虫。由于有关线虫生化分类的研究还不多，因而目前只能作为形态学分类的辅助方法，但从其分析客观、迅速和其它一些形态学方法所没有的优点以及生化分类的理论上，是很有发展前途的。

在电泳分析中常常存在酶带迁移率变化的问题。在本研究中，各酶带的实际迁移率略大于已有的报道，但若以内部对照——北方根结线虫的唯一主带定为 0.50，则各带的校正迁移率同已有的报道完全一致<sup>[1,10]</sup>。因此，采用校正迁移率更为可靠。由于各带的校正迁移率是恒定的，如南方根结线虫的主要酶带的校正迁移率为 0.47，北方根结线虫为 0.50，那么，进行酯酶电泳分析时，只要用任一已知种作内部对照，即可由其校正迁移率推算出未知种（样本）的校正迁移率，从而提高不同电泳间、不同研究者间电泳结果的可比性。

线虫的发育阶段不同，酯酶谱不同，相对地讲，雌成虫的酯酶谱明显、稳定，并且制样简便，因此，今后的研究宜采用雌成虫作电泳分析。

从对不同加样量的对比分析中可以看出，1—16 个雌虫的电泳样品均可表现出种的特征性酯酶谱，因此，用许多单个雌虫的样品进行电泳，根据酯酶谱就可将混合侵染样本中的不同种纯化分离，这对于在混合侵染情况下由于形态变异而使形态学分类变得困难时显得尤为有用。作为常规分析，1—4 个雌虫为一电泳样品较为简便、准确。

### 参 考 文 献

- [1] Eisenback, J. D. et al., 1981, (杨宝君译, 1986), 四种最常见根结线虫分类指南, 云南人民出版社, 1—49.
- [2] 袁晓华等, 1983, 植物生理生化实验, 高等教育出版社, 233—245.
- [3] Dickson, D. W. et al., 1970, Comparative disc-electrophoretic protein analyses of selected *Meloidogyne*, *Ditylenchus*, *Heterodera*, and *Aphelenchus* spp., *Journal of Nematology*, 2(4), 286—293.
- [4] Dickson, D. W. et al., 1971, Dehydrogenases, acid and alkaline phosphatases and esterases for chemotaxonomy of selected *Meloidogyne*, *Ditylenchus*, *Heterodera*, and *Aphelenchus* spp., *Journal of Nematology*, 3(1), 1—16.
- [5] Ishibashi, N., 1970, Variations of the electrophoretic protein patterns of Heteroderidae (Nematodea: Tylenchida) depending on the developmental stages of the nematode and on growing conditions of the host plants, *Appl. Ent. Zool.*, 5(1), 23—32.
- [6] Husser, R. S. et al., 1972, Disc-electrophoretic studies of soluble proteins and enzymes of *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*, *Journal of Nematology*, 4(3), 183—189.
- [7] Husser, R. S. et al., 1973, A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne*

- spp., including a new technique, *Plant Disease Reporter*, 57(12):1025—1028.
- [ 8 ] Dalmasso, A. et al., 1978, Molecular polymorphism and phylogenetic relationship in some *Meloidogyne* spp.: Application to the taxonomy of *Meloidogyne*, *Journal of Nematology*, 10(4):323—332.
- [ 9 ] Janati, A. et al., 1982, Nouvelles donnees sur l'utilisation des isoesterases pour l'identification des *Meloidogyne*, *Revue de Nematology*, 5(1):147—154.
- [10] Esbenshade, P. R. et al., 1985, Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species, *Journal of Nematology*, 17(1):6—20.

## STUDY ON THE APPLICATION OF ESTERASE PHENOTYPES IN THE TAXONOMY OF *MELOIDOGYNE* SPP.

Hu Kaiji

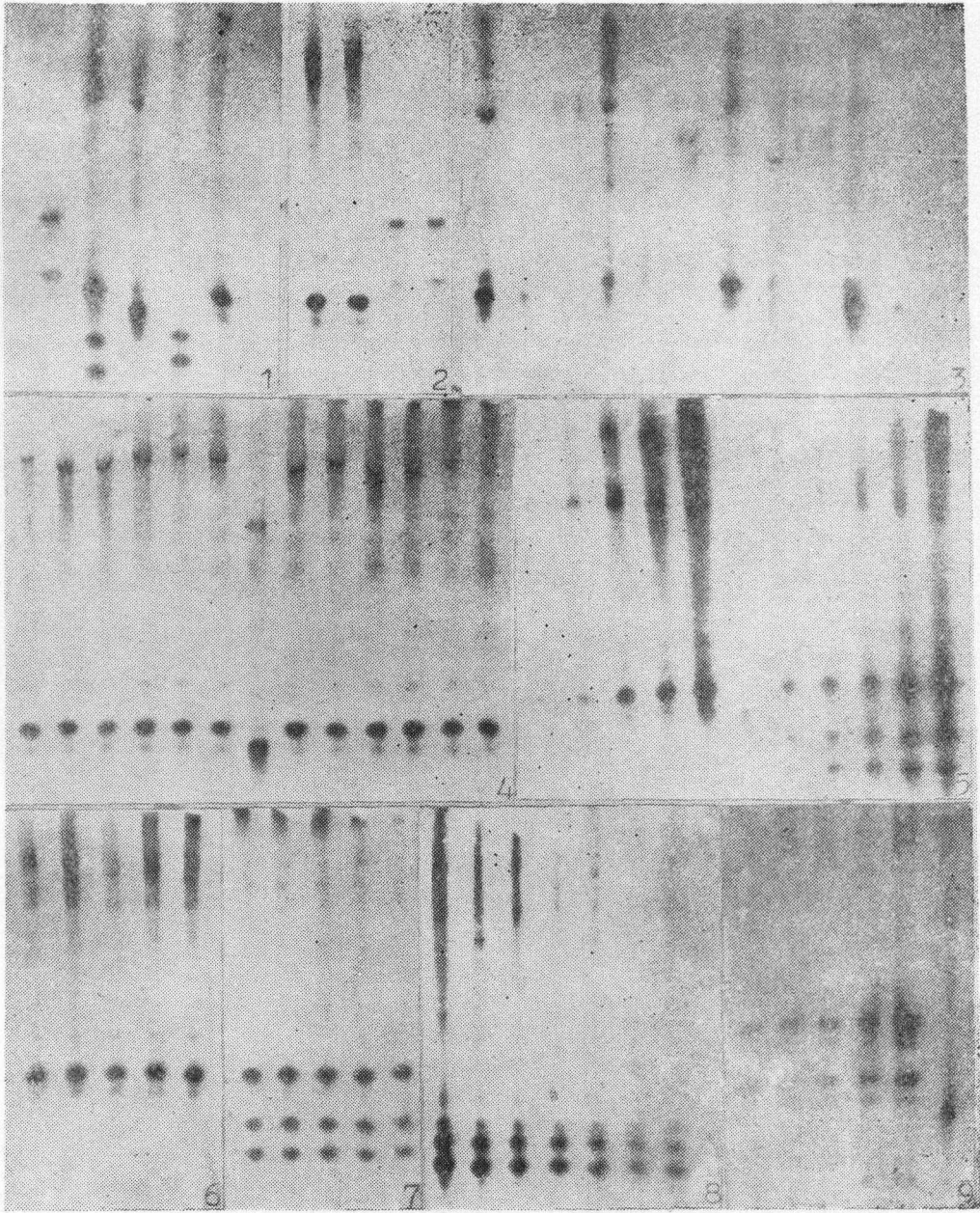
(*The Research Institute of Forestry CAF*)

### Abstract

The author used polyacrylamide gel electrophoresis method to compare the esterase isozymes of 47 isolates of 5 *Meloidogyne* spp. originated from 14 provinces (cities) in China. Some factors which maybe affect enzyme phenotypes were also studied. The result showed that the esterase phenotypes of egg-laying female were evident, stable and species specific. It was stable intro species too. Comparison of studies on inoculated plants, origin of isolates, physiological races, culture in greenhouse and from plants infected naturally, different nutritions etc. showed that all of them didn't affect the species specific phenotypes. So the esterase phenotypes could be used as a taxonomic criteria.

Since the phenotypes were not the same in different developmental stages for the same species, it was suggested that use of egg-laying females for identification is simple and reliable.

**Key words:** *Meloidogyne* spp.; taxonomy; esterase



图版说明(胡凯基)

1. 5种根结线虫的酯酶谱。从左至右依次为象耳豆根结线虫、爪哇根结线虫、北方根结线虫、花生根结线虫、南方根结线虫。2. 不同寄主营养条件下南方根结线虫及象耳豆根结线虫的酯酶谱。从左至右依次为南方根结线虫(施肥、对照)、象耳豆根结线虫(施肥、对照)。3. 不同发育阶段的线虫的酯酶谱。从左至右为雌虫、幼虫、卵(北方根结线虫)、雌虫、幼虫、卵、雌虫、幼虫、卵(南方根结线虫)。4. 来自不同地区相同寄主植物上的南方根结线虫的酯酶谱。5. 不同加样量下线虫的酯酶谱。从左至右依次为1、2、4、8、16个雌虫(南方根结线虫)、北方根结线虫(对照)、1、2、4、8、16个雌虫(爪哇根结线虫)。6. 来自同一地区不同寄主植物上的南方根结线虫的酯酶谱。7. 爪哇根结线虫不同样本的酯酶谱。8. 花生根结线虫不同加样量下的酯酶谱。从左至右依次为16、8、8、4、4、2、1个雌虫。9. 象耳豆根结线虫不同加样量下的酯酶谱。从左至右依次为1、2、4、8、16雌虫(象耳豆根结线虫)、北方根结线虫(对照)。