

# 松材线虫和拟松材线虫不同株系 酶电泳的研究\*

胡凯基 杨宝君

**摘要** 应用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对来自国内及日本、加拿大、法国、挪威的松材线虫及拟松材线虫株系作酶电泳的初步分析。结果表明,不同株系的苹果酸脱氢酶及纤维素酶酶谱各不相同。超氧化物歧化酶有1条在不同株系中迁移率相同的酶带。松材线虫与拟松材线虫在酯酶谱上差异明显,但培养于裂褶菌、多毛孢和葡萄孢上的来自南京黑松上的同一株系线虫的酯酶谱也显示了明显差异,表明了该酶的不稳定性。谷氨酸草酰乙酸转氨酶是唯一可区分两种线虫的酶,松材线虫只有1条迁移率0.39的带,拟松材线虫只有1条迁移率0.51的带,可用于两种线虫的生化鉴定。对可溶性蛋白质及过氧化物酶的分析,未检测到清晰可辨的酶带。

**关键词** 松材线虫、拟松材线虫、酶谱、电泳

松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhrer) Nickle)和拟松材线虫(*B. mucronatus* Mamiya et Enda)在形态、致病性方面的部分重叠及兼具两种线虫部分特性的中间类型的存在,给分类鉴定和实际工作带来很大的困难<sup>[1,2]</sup>。对两者分类地位的问题至今仍有不同的看法。为此,一些研究者转而试图从遗传、生化方面阐明其关系。De Guiran<sup>[3]</sup>、Kiyohara<sup>[4]</sup>、Myers<sup>[5]</sup>、Hotchkin<sup>[6]</sup>等先后对一些线虫株系的酶作了研究。日本研究人员还试图探讨酶谱与线虫致病性之间的关系。Webster<sup>[7]</sup>等研究了DNA探针技术用于鉴定线虫株系,并据DNA分析法认为日本的松材线虫有可能来自北美。Bolla<sup>[8]</sup>等还发现两个致病性不同的线虫株系在能量代谢途径上存在差异。本文作者利用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,对来自国内外的13个线虫株系进行了6种酶的电泳分析,以期为进一步认识松材线虫和拟松材线虫的生化特性和分类鉴定有所助益。

## 1 材料及方法

### 1.1 线虫株系

松材线虫株系为南黑(南京,黑松 *Pinus thunbergii* Parl.)、南马(南京,马尾松 *P. massoniana* Lamb.)、南华(南黑接种华山松 *P. armandi* Franch 后)、广东(深圳,马尾松)、山东(长岛,黑松)、STJ、BxBC(加拿大,针叶树木削片)、S-6(日本,黑松)。拟松材线虫为江西(江西,马尾松)、四川(四川,马尾松)、Bspfrance(法国,南欧海松 *P. pinaster* Ait.)、Q1426(加拿大,针叶树木削片)、Norway(挪威,针叶树木削片)。线虫均在裂褶菌上保种至试验。

1993-11-05 收稿。

胡凯基助理研究员,杨宝君(中国林业科学研究院森林保护研究所 北京 100091)

\* 本文为1989~1992年国家科委重点科技项目“松材线虫病的研究”部分内容。

## 1.2 线虫培养及酶液提取

所选线虫株系在长有裂褶菌(*Schizophyllum* sp.)的PDA培养基上扩大繁殖。南黑线虫同时还在多毛孢(*Pestalotia* sp.)和葡萄孢(*Botrytis cinerea* Pers.)上繁殖。漏斗法分离线虫,蒸馏水冲洗,计数后浓缩,加浸提液(4℃),在冰浴上充分研磨,离心(10 000 g)15 min,取上清液作电泳样品。对样品为与线虫等体积的无线虫的培养菌,按上述方法提取,每电泳样相当于3 000~4 000条线虫的提取液,酯酶则需10 000条。

## 1.3 电泳

为垂直板状聚丙烯酰胺凝胶电泳。分离胶浓度7%,浓缩胶3%。纤维素酯凝胶加入0.2% CMC。

## 1.4 染色

(1)酯酶:坚牢蓝R- $\alpha$ -醋酸萘酯法<sup>[9]</sup>。(2)苹果酸脱氢酶及超氧化物歧化酶:双显色法。(3)纤维素酶:碘-碘化钾法。(4)谷氨酸草酰乙酸转氨酶:见文献[9]。(5)过氧化物酶:Vc-联苯胺法。(6)可溶性蛋白:三氯乙酸-考马斯亮蓝法。

# 2 结果

## 2.1 酯酶(Esterase, Est)

南黑、山东、江西三个株系具有较复杂的电泳谱,并且株系间差异明显(见图1)。同为多毛孢上培养的南黑、山东、江西分别有13、14、10条酶带。南黑与山东有2条相同迁移率的酶带。江西株系有2条酶带,与南黑和山东共有的2条酶带迁移率相近,但染色浅。有趣的是南黑同一株系分别培养于裂褶菌、多毛孢和葡萄孢时,其酶谱在酶带数目、迁移率及染色程度上差异明显,表明了酯酶谱的不稳定性。3种培养菌的酶谱与线虫完全不同,排除了培养菌对线虫样品的污染。

## 2.2 苹果酸脱氢酶(Malate dehydrogenase MDH)

13个线虫株系的酶电泳谱的上半部只有近于连续的染色区域,无清晰可辨识之酶带。在近底部有数条主带及染色浅的次带。1条迁移最快的主带为各个株系所共有。各株系的酶谱有差异。南黑株系培养于前述3种真菌时,其酶谱也不同。葡萄孢上培养的一线虫多出1条染色深、迁移慢的带,另有2带比其它菌上的线虫的酶带色浅。从电泳结果看,个别株系的个别酶带也有不稳定现象(见图1)。

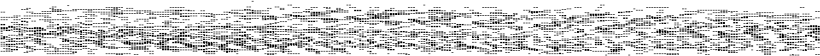
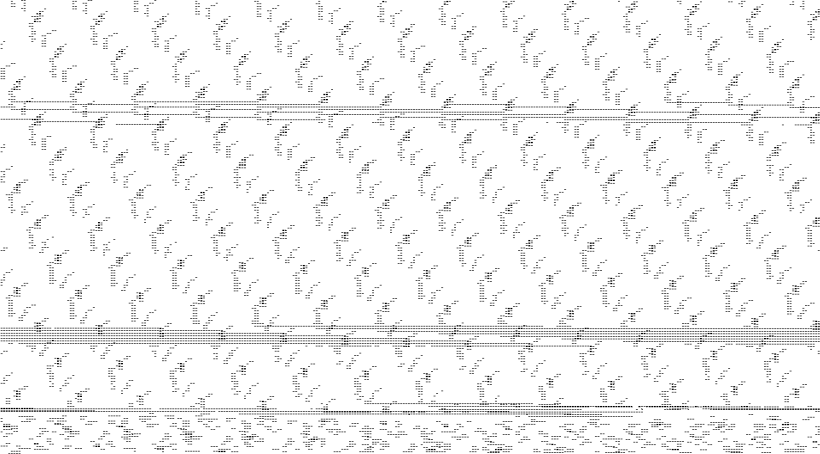
## 2.3 超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)

酶谱简单。在山东、南黑、南马、广东、南华、STJ、江西及四川上只有1条迁移较慢的主带。培养于3种真菌上的南黑株系也没有差异。用作对照样品的3种培养菌的酶谱与线虫酶谱完全不同,再次表明样品分离、提取过程中不存在培养菌对线虫样品的干扰。

## 2.4 纤维素酶(Cellulase)

在11个线虫株系中,共显示出迁移率不同的7条酶带。除迁移最快的1条和最慢的2条外,差异主要表现在中间的4条酶带上。松材线虫多具迁移较快的第4带(以上向下)及迁移较快的第6带,拟松材线虫多具第5带。没有种内各株系共有又可与另种线虫区别的酶带(见图1)。

## 2.5 谷氨酸草酰乙酸转氨酶(Glutamate-oxaloacetate transaminase, GOT)



该酶是上述几种酶中,唯一稳定且种间不同的酶(见图1)。这一结果同 Kiyohara 等<sup>[4]</sup>对松材线虫和拟松材线虫各4个株系的电泳分析结果一致。

## 2.6 过氧化物酶(Peroxidase)、可溶性蛋白质(Soluble proteins)

未显示出清晰可辨识之酶带。

## 3 讨 论

De Guiran<sup>[3]</sup>用来自日本的松材线虫和拟松材线虫各1株系和法国线虫做酶电泳分析,发现3个线虫株系有简单的酯酶及苹果酸脱氢酶谱,并可相互区别之。Kiyohara<sup>[4]</sup>对来自日本、美国的松材线虫和拟松材线虫各4个株系做了酶电泳分析,发现这些株系在苹果酸脱氢酶酶谱上几乎完全相同。酯酶谱在各株系间有明显差异,但不具种间特异性。唯有天冬氨酸转移酶(原文中为 Aspartate transaminase isozymes,但每处的简称均写作 GOT,此实为谷氨酸草酰乙酸转氨酶之简称)种内一致,种间可区别之。

在本研究中酯酶谱同 Kiyohara 等<sup>[4]</sup>结果比较接近。同一株系在不同菌上培养后也有变化,显示了不稳定性。苹果酸脱氢酶酶谱相对简单一些,株系间有差异,且只有近底部有可辨识之酶带,这同 De Guiran 等<sup>[3]</sup>的结果相近。在所分析的7种酶、蛋白中,唯有谷氨酸草酰乙酸转氨酶具有种内同一性和种间特异性,且酶带数目及迁移程度同 Kiyohara 等<sup>[4]</sup>的结果一致。这表明该类酶具有稳定性和可靠性,因而可初步确定用于松材线虫和拟松材线虫的生化鉴定。同时,这种一致性也表明,其它酶的差异不是不同研究者间的系统性差异,而可能是线虫本身具有这种差别。其原因可能是多方面的,如线虫株系间的遗传分化;生长发育包括食物条件的影响;有的酶可能与线虫发育期有关,因而也就与线虫的龄期与各龄期所占比例等有关。本研究中,个别株系重复试验时也会出现一些差异,就可能与上述原因有关。

经重复试验,多数酶在每样相当3000~4000条线虫时即可获得清晰酶谱。可溶性蛋白未见清晰酶带似与加样量无关,因 De Guiran<sup>[3]</sup>在加样量达10万条时,同样未能获得清晰酶带。

Odani 等<sup>[10~12]</sup>报道,松材线虫和拟松材线虫可分泌纤维素酶,并且线虫的浸泡液可在松苗上产生松材线虫病典型的早期症状。据此认为纤维素酶可能在病害发生发展过程中发挥着重要作用。本研究中,各线虫株系均具较高的纤维素酶活性,并且株系间酶谱有差异。这些同功酶的定性分析与线虫致病性间的关系尚待深入研究。即便是谷氨酸草酰乙酸转氨酶,也需扩大线虫株系范围,确定其适用性。由于已研究的酶仅是线虫多种酶系统中的一小部分,因此对多种来源的线虫,包括具尾尖的松材线虫、无致病性的松材线虫株系,致病性较高的拟松材线虫及能与两种线虫同时杂交的中间类型等进行多种酶系统的分析,一定有助于澄清两线虫在致病性、遗传及分类地位上的问题。

## 参 考 文 献

- 1 Bolla R I, Weaver C, Koslowski P, et al. Characterization of a nonparasitic isolate of *Bursaphelenchus xylophilus*. J. Nematol., 1987, 19(3): 304~310.
- 2 Wingfield M J, Blanchette A, Kondo E. Comparison of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* from pine and balsam fir. Eur. J. For. Path., 1983, 13: 360~372.
- 3 De Guiran G, Lee M J, Dalmaso A, et al. Preliminary attempt to differentiate pinewood nematode (*Bursaphelenchus* spp.) by enzyme electrophoresis. Revue Nematol., 1985, 8(1): 88~91.
- 4 Kiyohara T, Bolla R I. Pathogenic variability among populations of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xy-*

- lophilus*. Forest Science, 1990, 36(4):1061~1076.
- 5 Myers R F, Hajdukiewicz P T. Partition of *Bursaphelenchus* isolates utilizing isozyme patterns and reciprocal interbreeding. 5th Inter. Congr. Pl. Path. 1988, 354.
  - 6 Hotchkiss P G, Giblin R M. Comparison of electropherogram from *Bursaphelenchus* spp. (Aphelenchoidae). Revue Nematol. , 1984, 7(3):319~320.
  - 7 Webster J M, Anderson R V, Baillie D L, et al. DNA probes for differentiating isolates of the pinewood nematode species complex. Revue Nematol. , 1990, 13(3):255~263.
  - 8 Bolla R I, Koslowski P, Fitzsimmons K. Carbohydrate catabolism in populations of *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus*. J. Nematol. , 1988, 20(2):252~259.
  - 9 Esbenshade P R, Triantaphyllou A C. Electrophoresis methods for the study of root-knot nematode enzymes. An advanced treatise on Meloidogyne. 1985, 2:115~123.
  - 10 Odani K, Sasaki S, Yamamoto N, et al. Differences in dispersal and multiplication of two associated nematodes, *Bursaphelenchus xylophilus* and *Bursaphelenchus mucronatus* in pine seedlings in relation to the pine wilt disease development. J. Jpn. For. Soc. , 1985, 67(10):398~403.
  - 11 Mori T, Inoue T. Pine-wood nematode-induced ethylene production in pine stems and cellulase as an inducer. J. Jpn. For. Soc. , 1986, 68(2):43~50.
  - 12 Yamamoto N, Odani K, Sasaki S, et al. Cellulase exudation by the pine wood nematode—detection of activity in its crawling track. J. Jpn. For. Soc. , 1986, 68(6):237~240.

## Preliminary Comparison of *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* Utilizing Enzyme Electrophoresis

Hu Kaiji     Yang Baojun

**Abstract** The enzyme electrophoregrams of *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* that were collected from China, Japan, Canada, France and Norway were analysed. The phenotypes of Malate dehydrogenase (MDH) and Cellulase vary among isolates. Super-oxide dismutase (SOD) shows a similar pattern with just one main band which migrates slowly. Esterase (Est) is different between *B. xylophilus* and *B. mucronatus* but the phenotype of an isolate from *Pinus thunbergii* in Nanjing, China shows great difference within the isolate after being cultured on *Schizophyllum* sp. , *Pestalotia* sp. , and *Botrytis cineria* , separately. Peroxidase and soluble proteins were also analysed but gave less clear results. Glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT) isozyme patterns, however, can be used for differentiating between *B. xylophilus* and *B. mucronatus*. Both nematodes have only one band which is identical intraspecies and different interspecies on the basis of Rf. This result coincides with that of Kiyohara and Bolla's (1990).

**Key words** *Bursaphelenchus xylophilus*, *B. mucronatus*, enzyme, electrophoresis