

# 分子生物技术在植物线虫鉴定中的应用

何自福 殷友琴

(华南农业大学植物线虫研究室, 广州, 510642)

**摘要** 分子生物技术迅速地发展,它已被广泛地应用于生物学各个领域。该文对国内外线虫学研究者在从事植物线虫种类鉴定研究中常用的一些分子生物技术作一归纳,并展望了这一技术在该领域中的应用前景。

**关键词** 分子生物技术; 植物线虫; 鉴定

**中图分类号** Q 959.171

在过去的 20 多年中,分子生物学的发展而产生的分子生物技术已成为研究生物学许多基本问题的重要手段。对于植物线虫学来说也不例外,近年来,研究者成功地将分子生物技术引入植物线虫鉴定中。对于植物线虫的鉴定,传统的方法是根据线虫种间的形态差异,而形态学特征受环境和地理等条件影响较大,而且有时也很难找到亲缘种间显著的形态区别特征。在实际工作中常难以准确地鉴定而产生错误。运用同工酶电泳、DNA 标记、多聚酶链式反应、限制性片段长度多态性和随机扩增多态性 DNA 等分子生物技术,直接检测线虫的基因组,排除了基因表达产物中阶段性的特异性和随环境变化而变化的多型性对种类鉴定的影响,从而快速、准确地鉴定出线虫的种类。

迄今,有关分子生物技术在植物线虫鉴定中应用的综述文章(陈其文, 1993; 周弘等, 1993),都是某一技术在某一方面的应用。本文在此基础上结合近几年有关文献,对国内外研究者在该领域中常用的一些分子生物技术作一全面的归纳。

## 1 应用现状

### 1.1 同工酶电泳

一些亲缘关系较近的线虫种,用形态学特征来鉴定有时比较困难,所以研究者试着应用分子生物技术来鉴定这些种类。Esbenshade 等(1985;1990)利用单个雌虫的酯酶和苹果酸脱氢酶的同工酶电泳图谱区分了花生根结线虫(*Meloidogyne arenaria*)、爪哇根结线虫(*M. javania*)、北方根结线虫(*M. hapla*)、南方根结线虫(*M. incognita*)、奇特伍德根结线虫(*M. chitwoodi*)、纳西根结线虫(*M. naasi*)、短小根结线虫(*M. exigua*)和禾草根结线虫(*M. graninicola*)。胡凯基(1988)利用酯酶电泳图谱也成功地区分了北方根结线虫、爪哇根结线虫、花生根结线虫和象耳豆根结线虫(*M. enterolobii*)。Tomaszewski 等(1994)用酯酶的同工酶电泳图谱鉴定出在埃及爪哇根结线虫寄生花生。世界上一些实验室已开始利用这一技术来帮助鉴定根结线虫的种类。

当然,同工酶的分析法具有其局限性,酶的表达与环境以及线虫生活阶段变化相关;单

1995-07-26 收稿

个线虫所含用于鉴定的酶量常不足;在进行种内或地理种间的鉴定时,利用同工酶电泳也还未获得成功。

## 1.2 DNA 标记

生物的性质决定于其遗传物质 DNA, DNA 是相对稳定的,不会因为生物生活阶段或环境条件变化而改变的。所以,一种线虫的 DNA 确定了其分类地位。因此可以用稳定的 DNA 标记(即 DNA 探针)来鉴定线虫。

所谓 DNA 标记,即利用放射性同位素(如 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 等)作为一种示踪物。它具有用量少、灵敏度高和具有一定的特异性等优点。Hyman 等(1991)、Piotte 等(1992)、Power 等(1993)分别报道用 DNA 标记鉴定出主要的根结线虫种类。Burrows(1990)从马铃薯白线虫(*Globodera pallida*)的基因库中分离出区分马铃薯白线虫和马铃薯金线虫(*G. rostochiensis*)的 2 个特异的 DNA 片段,通过同位素标记(即获得一 DNA 探针),可有效地鉴别出马铃薯白线虫。在敏感性试验中,少至 80 mg 的马铃薯白线虫的 DNA 或少于一条二龄幼虫的量都可获得阳性试验结果。Webster 等(1990)应用 DNA 标记对松材线虫集合种 16 个品系进行研究,开发出二种专化性探针,能有效地区别伞滑刃线虫的种。

DNA 放射标记技术的缺点是:费用高而且有放射性危害,标记好的探针在几个星期内其放射性就衰退到不能使用。所以人们又研究出用生物素来标记。

用与同位素标记核苷酸相同的方法可把生物素结合到探针中。生物素能通过特殊的方式与诸如碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶等进行交换,这些酶和相应的底物作用产生显色反应,从而检测到阳性杂交。Burrows(1988)成功地运用生物素标记的探针鉴定出马铃薯白线虫。虽然这种技术比放射性同位素标记敏感度差,但也可检测到相当于单个马铃薯白线虫的卵或幼虫的 DNA 量。由于标记特异性生物素 DNA 探针费用少,对人体无放射性危害,而且在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下数月甚至数年仍很稳定,因而它是植物线虫种类鉴定中一种比较理想的工具。

## 1.3 多聚酶链式反应(PCR)

自 1985 年 Kerry Mullis 发明 DNA 多聚酶链式反应技术以来,它已经基本上取代了传统的 DNA 克隆方法。利用 PCR 技术能够从复杂的 DNA 分子群体中选择性地复制某一段特异的序列,使其得到扩增。因而,这一技术在分子生物学中得到广泛的应用。

对含少量生物量的样品,PCR 是十分有效的,从而解决了分子生物学中有时受所得到 DNA 量限制的问题。Harris 等(1990)应用 PCR 技术对单个根结线虫幼虫的线粒体 DNA(mtDNA)进行鉴定。Beckenbach 等(1992)应用 PCR 对松材线虫集合种 19 个品系进行研究,根据 DNA 片段序列顺序型相互间的差异程度合并成 3 个组。Power 等(1993)用 PCR 技术成功地区分了南方根结线虫、花生根结线虫、爪哇根结线虫、北方根结线虫和奇特伍德根结线虫。

## 1.4 限制性片段长度多态性(RFLPs)

限制性片段长度多态性是由于个体的等位基因间碱基的代换、重排、插入和缺失等引起的。限制性内切酶能把 DNA 分子酶切成许多长短不等的片段。所产生的 DNA 片段数目和长度又反映了限制性内切酶切点在 DNA 分子上的分布。对于每一 DNA/限制性内切酶组合来说,所产生的片段是特异的,它能作为含这种 DNA 生物所特有的“指纹”。Curran 等(1985)首次应用这一技术,通过琼脂糖凝胶电泳,根据限制性片段长度的差异成功地区别了

Trichinella, Caenorhabditis, Romanomermis, Steinernema(syn. Neoaplectana) 和 Meloidogyne 线虫。1986 年, Curran 等又用 RFLPs 检测出根结线虫主要种 DNA 的差异。Vrain 等(1992)也用 RFLPs 区分了美洲剑线虫(*Xiphinema americanum*)组的 16 个种群。Wendt 等(1993)应用 RFLPs 分离了腐烂茎线虫(*Ditylenchus destructor*)、食真菌茎线虫(*D. myceliophagus*)和起绒草茎线虫(*D. dipsaci*) 5 个寄主小种。

PFLPs 技术具有敏感性高、所需 DNA 量少、快速准确等优点,所以在植物检疫方面有特殊的重要意义。

### 1.5 随机扩增多态性DNA(RAPD)

随机扩增多态性 DNA 是 1990 年由 Williams 等发明的,是一种新奇的遗传标记。其方法是用随机的 9~10 个核苷酸序列作引物,对靶子 DNA 进行 PCR 扩增,再进行电泳分离和溴化乙锭染色。多态性的产生可以由 DNA 序列中与互补寡聚核苷酸引物中一个碱基的差别形成。

RAPD 只产生显性标记,所以仅适用于自交系和回交群体的生物种类鉴定。另外, RAPD 也不能单独地用来对没有基因标记的生物进行遗传图谱分析,因为它所产生的多态性是随机的。

然而, RAPD 比 RFLPs 有一定的优点,人工合成的随机引物可在实验室间交换,这比克隆 DNA 片段作为探针要容易和迅速得多;可以免去 DNA 分子杂交的过程; RAPD 对每个分离群体中的标记所进行的 PCR 扩增和电泳具有高度的重复性,所以操作一般采用自动化。同时,由于 RAPD 分析过程中用了 PCR 技术,对少量的 DNA 也同样有效,因此,应用 RAPD 可对单个幼虫或单个胞囊进行研究。Caswell-Chen 等(1992)用 RAPD 技术区分十字花科胞囊线虫(*Heterodera cruciferae*)和甜菜胞囊线虫(*H. schachtii*),并检测到甜菜胞囊线虫的 6 个地理种群间的差异。Cenis 等(1993)用 RAPD 技术成功地区分了花生根结线虫、南方根结线虫、爪哇根结线虫和北方根结线虫。

## 2 展望

在植物线虫种类鉴定上,应用分子生物技术,将会有许多令人激动的进展。以前用形态特征来鉴定亲缘关系较近的线虫种类比较困难,应用这些技术将会使这类的问题得以解决。目前,在线虫种类鉴定上,应用分子生物技术已经取得了可喜的成绩,虽然还局限于少数几个属,但可以预言:在不久的将来,随着分子生物技术和植物线虫研究者的努力,这些技术将会成为植物线虫种类鉴定的主要手段之一,其结果将会使植物线虫的种类鉴定更加准确,方法趋于标准化。

## 参 考 文 献

- 胡凯基. 1988. 酯酶在根结线虫分类上应用的研究. 林业科学研究, 1(6): 650 ~ 657
- 陈其文. 1993. 植物病原线虫分类的新趋向——DNA分类. 植物检疫, 7(1): 98 ~ 101
- 周 弘, 肖荣堂. 1993. RFLPs 技术在线虫鉴定上的应用. 植物检疫, 7(1): 25 ~ 26
- Beckenbach K, Smith M J, Webster J M. 1992. Taxonomic affinities and intra- and interspecific variation in *Bursaphelenchus* spp. as determined by polymerase chain reaction. J Nematology, 24(1): 140 ~ 147
- Burrows P R. 1988. The differentiation of *Globodera pallida* from *G. rostochiensis* using specific DNA probes. Nematologica, 8(34): 260
- Burrows P R. 1990. The use of DNA to identify plant parasitic nematodes. Nematological Abstracts, 59(1): 1 ~ 8
- Caswell-Chen E P, Williamson V M, Wu F F. 1992. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Heterodera cruciferae* and *H. schachtii* populations. Nematology, 24(3): 343 ~ 351
- Cenis J L. 1993. Identification of four major *Meloidogyne* spp. by random amplified polymorphic DNA(RAPD-PCR). Phytopathology, 83(1): 76 ~ 78
- Curran J, Baillie D L, Webster J M. 1985. Use of genomic DNA restriction fragment length differences to identify nematode species. Parasitology, 90(1): 137 ~ 144
- Curran J, McClure M A, Webster J M. 1986. Genotypic differentiation of *Meloidogyne* populations by detection of restriction length difference in total DNA. J Nematology, 18(1): 83 ~ 86
- Esbenshade P R, Triantaphyllou A C. 1985. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. J Nematology, 17(1): 6 ~ 20
- Esbenshade P R, Triantaphyllou A C. 1990. Isozyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. J Nematology, 22(1): 10 ~ 15
- Harris T S, Sandall L J, Powers T O. 1990. Identification of single *Meloidogyne* juveniles by polymerase chain reaction amplification of mitochondrial DNA. J Nematology, 22(4): 518 ~ 524
- Hyman B C, Peloquin J J, Platzer E G. 1991. Optimization of mitochondrial DNA-based hybridization assays to diagnostics in soil. J Nematology, 22(3): 273 ~ 278
- Piotte C P, Castagnone-Sereno P, Uijthof J, et al. 1992. Molecular characterization of species and populations of *Meloidogyne* from various geographic origins with repeated DNA homologous probes. Fundamental and Applied Nematology, 15(3): 271 ~ 276
- Power T O, Harris T S. 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. J Nematology, 25(1): 1 ~ 6
- Tomaszewski E K, Khalil M A M, El-Deeb A A, et al. 1994. *Meloidogyne javanica* parasitic on peanut. J Nematology, 26(4): 436 ~ 441

- Vrain T C, Wakarchuk D A, Levesque A C, et al. 1992. Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. *Fundamental and Applied Nematology*, 15(6): 563 ~ 573
- Webster T M, Anderson R V, Baillie D L, et al. 1990. DNA probes for differentiating isolates of the pinewood nematode species complex. *Revue de Nematologie*, 13(3):255 ~ 263
- Wendt K R, Vrain T C, Webster J M. 1993. Separation of three species of *Ditylenchus* and some host races of *D. dipsaci* by restriction fragment length polymorphism. *J Nematology*, 25(4): 555 ~ 563

## APPLICATION OF MOLECULAR BIOTECHNOLOGY IN THE IDENTIFICATION OF PLANT NEMATODES

He Zifu      Yin Youqin

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

### Abstract

The molecular biotechnology has been developed rapidly and applied widely in all kinds of field in biology. It was generalized in this paper that some molecular biotechnology was often used in the identification of plant nematode species by nematology researchers at home and abroad. The vista of the technological application in the field was prospected in the paper.

**Key words**    molecular biotechnology; plant nematode; identification

### 简 讯

研究课题“特迟熟荔枝新品种—1478 优系的选育研究”已按计划完成任务,并于 1995 年 12 月 27 日通过由农业部科技与质量标准司组织的成果鉴定。该课题是农业部“八五”重点研究项目(农 01—05—06)专题中子专题(农 01—05—06—02)的部分内容。鉴定专定一致认为“1478 优系”是我国目前选出的最迟熟新系,具有早结、丰产、稳产的栽培特点和果大外观美,肉厚多汁、甜度适中的经济性状,有较高的商品价值,对调节市场供应有一定的意义。该成果在国内迟熟荔枝选种中居领先水平。

(科研处 刘艳芹供稿)