

湖南柑橘根结线虫种类鉴定及特异性 PCR 检测

何清聪^{1,2}, 王东伟^{1,2}, 张德咏^{1,2}, 刘勇^{1,2}, 王剑^{1,3}, 成飞雪^{1,2*}

(1. 湖南大学研究生学院隆平分院, 长沙 410125; 2. 湖南省农业科学院植物保护研究所, 园艺作物病虫害综合治理湖南省重点实验室, 长沙 410125; 3. 湖南省农业科学院农业经济与农业区划研究所, 长沙 410125)

摘要 根结线虫病是严重危害湖南柑橘生产的主要病害, 快速准确地进行病原线虫鉴定, 从而制定针对性的防治措施, 对柑橘产业的稳定发展至关重要。运用形态学和分子生物学技术对湖南永州地区柑橘根结线虫进行病原种类鉴定, 确定其为番禺根结线虫 *Meloidogyne panyuensis*。通过引物设计与筛选, 建立了番禺根结线虫特异性 PCR 检测技术。结果表明, 该检测方法特异性好, 灵敏度高, 操作简单, 能有效地从多种根结线虫中特异性检测出番禺根结线虫, 为柑橘病原线虫的快速检测鉴定提供技术支撑。

关键词 柑橘根结线虫; 种类鉴定; 番禺根结线虫; 特异性 PCR 检测

中图分类号: S 436.661 文献标识码: A DOI: 10.16688/j.zwbh.2019070

Identification and PCR detection of citrus root-knot nematode in Hunan province

HE Qingcong^{1,2}, WANG Dongwei^{1,2}, ZHANG Deyong^{1,2},
LIU Yong^{1,2}, WANG Jian^{1,3}, CHENG Feixue^{1,2*}

(1. Longping Branch, Graduate School of Hunan University, Changsha 410125, China; 2. Key Laboratory of Integrated Management of the Pests and Diseases on Horticultural Crops in Hunan Province, Institute of Plant Protection, Hunan Academy of Agriculture Sciences, Changsha 410125, China; 3. Hunan Agricultural Economy and Regional Planning Research Institute, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, China)

Abstract Root-knot nematode is a dangerous disease imposing significant effects on citrus growth and yield in Hunan province. The root-knot nematode was collected from infested citrus rhizome in Yongzhou, Hunan province. Based on PCR amplification and morphological observation, the root-knot nematode was identified as *Meloidogyne panyuensis*. According to rDNA-ITS sequence alignment, a set of primers was designed to develop a species-specific molecular tool for the precise identification of *M. panyuensis*. The primer reliability, specificity and sensitivity tests showed that the specific PCR was highly sensitive, specific and simple, and could effectively detect *M. panyuensis* from various root-knot nematodes. This specific and rapid PCR detection technology may be a powerful tool for improving taxonomic identification of citrus pathogen nematodes.

Key words citrus root-knot nematode; species identification; *Meloidogyne panyuensis*; specific PCR identification

根结线虫 *Meloidogyne* spp. 是植物病原线虫中寄主范围最广、危害最严重的一类线虫, 在世界各地都有分布, 是全球性的重要植物病原物, 每年造成的经济损失超过 80 亿美元^[1]。根结线虫种类繁多, 目前国际上已报道的根结线虫种类已超过 100 种。我国地处温带和亚热带, 线虫种类多, 对农林业生产危害严重。近年来, 随着线虫鉴定技术特别是分子生

物学检测技术的快速发展, 越来越多的根结线虫种类被发现。迄今为止, 在中国有记载的根结线虫种类已经超过 30 种^[2-3]。由于不同根结线虫种类对作物危害特性不同, 开展根结线虫病原种类鉴定和建立特异性的快速检测方法, 有助于明确其发生发展规律, 为有效防治根结线虫病害提供技术支撑。

柑橘是湖南地区重要经济作物, 其生产过程中

收稿日期: 2019-02-22

修订日期: 2019-03-30

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0201606); 湖南省重点研发计划(2016NK2196)

* 通信作者 E-mail: cfx937207@126.com

会受到多种植物线虫危害^[4-6],根结线虫就是其中危害严重的病原线虫之一^[7]。柑橘根结线虫病主要分布在澳大利亚、印度、中国、以色列和苏里南等国家。在国内,湖南、湖北、广东、广西、四川、浙江、江西、福建和台湾等省(自治区)均有发生和危害。柑橘根结线虫主要侵染柑橘新根,使新根尖端膨大或变成大小不等的根结,不能正常伸长,严重受害的甚至形成须根团,交错扭曲形成“根饼”。地上部分表现出植株矮小或树势衰退,叶片短小、逐渐黄化、脱落,顶端嫩枝凋萎。侵染柑橘的根结线虫种类多,据报道目前已发现有 14 种根结线虫危害柑橘^[8]。

不同地区柑橘根结线虫病原种类存在一定的差别,廖月华报道江西地区危害柑橘的根结线虫主要为南方根结线虫 *M. incognita* 和爪哇根结线虫 *M. javanica*,除此之外,还报道有东海根结线虫 *M. donghaiensis*、简阳根结线虫 *M. jianyangensis* 和柑橘根结线虫 *M. citri* 等^[9-11]。周志军等^[12]曾报道湖南衡东地区柑橘根结线虫病发生危害严重,但并未对其病原种类进行鉴定。近年来,随着柑橘种苗的调运,湖南地区柑橘根结线虫病害发生面积逐年增加,根结线虫严重危害到很多新建果园及苗圃。开展柑橘根结线虫病原种类鉴定,研发其特异性快速检测鉴定技术,对开展柑橘根结线虫病的抗病育种、植物检疫以及制定相应的防治策略都具有非常重要的意义。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

番禺根结线虫 *M. panyuensis* 种群从湖南省永州市农科所柑橘园采集的感病柑橘根中分离获得。根结线虫采用浅盘法^[8]分离。取带根结的柑橘根组织,剪成 2~3 cm 长度,包在纱布内,放在不锈钢线虫筛网中,放置于浅盆中,加水至淹没根。25℃保持 3~4 d,去掉筛网,浅盆内的线虫悬浮液通过 40 目和 600 目线虫筛,小流水冲洗并收集 800 目筛网上的线虫形成线虫浓集液。分离纯化的线虫部分放置于 4℃冰箱中保存备用,用于 ITS-PCR 扩增与序列测定。其余接种到预先培养在灭菌土中的花生苗上,温室扩繁保存。

1.2 病原线虫形态观察

观察雌虫、雄虫及 2 龄幼虫(J₂)的形态特征,并

测量特征值,共测量 20 条。拔取采集的感病柑橘根,以清水轻洗根,在解剖镜下用解剖针剖开根结,挑出雌虫置于装有无菌水的培养皿中。同时观察卵囊周围,将黏附的雄虫挑出置于装有无菌水的培养皿中。2 龄幼虫采用卵囊孵化法,从病根上收集卵囊,将其放置在自制的钢丝网中,钢丝网放于装有无菌水的培养皿中,室温放置 1~2 d,收集新孵化的 2 龄幼虫。收集的雌虫、雄虫和 2 龄幼虫用于形态学鉴定。线虫鉴定都采用活体观察,观察头部特征、尾部特征等,并制作成临时玻片标本。并参照冯志新等^[13-15]的方法制作会阴花纹,做成临时装片,利用 Olympus 光学显微镜(BX 51 型)观察雌虫会阴花纹。主要计测指标为体长、口针长、口针基部球宽、背食道腺开口至口针基部球的距离(DEGO)、尾长。根据线虫的形态特征及测量数据,核对有关文献资料,初步判断其种类。

1.3 ITS-PCR 序列分析

利用 ITS-PCR 技术对采集到的柑橘上的病原线虫进行分子鉴定。ITS 区序列扩增引物参考 Vrain 等^[16]及 GenBank 中根结线虫序列进行设计,F:5'-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3'和 R:5'-TTT-CACTCGCCGTTACTAAGG-3'扩增线虫的 rDNA-ITS 区,扩增片段大小约 870 bp。

采用单条 2 龄幼虫 PCR 扩增,单条线虫 DNA 的提取参照 Song 等^[17]的方法并稍加改进。挑取消毒清洗后的单条病原线虫 J₂ 放入内盛有 8 μL ddH₂O 和 1 μL 10×PCR buffer(Mg²⁺ free)的灭菌 0.2 mL PCR 管中,放入液氮中冷冻 1 min,置于 85℃下 2 min,重复 4~5 次;加入蛋白酶 K,使蛋白酶终浓度为 0.5 mg/mL。混匀后,65℃温育 60 min,95℃灭活 10 min,10 000 r/min 离心 1 min,取上清液为模板进行 PCR 扩增。25 μL 反应体系中其他试剂参照萨姆布鲁尔等^[18]。扩增条件为:94℃ 5 min;94℃ 45 s,52℃ 30 s,72℃ 45 s,35 个循环;72℃延伸 10 min,4℃保存。扩增产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。割胶回收 PCR 产物并进行连接、转化,筛选阳性克隆,提取质粒送至上海生工公司测序。测得的序列 GenBank 进行在线 BLAST 和聚类分析。

1.4 番禺根结线虫 *M. panyuensis* 特异性检测

1.4.1 特异性引物设计

根据获得的 ITS 序列,从 GenBank 选用不同种

类根结线虫 ITS 序列,利用 DNAMAN 软件进行比对分析,设计番禺根结线虫 ITS 区特异性检测引物, Mp-F: 5'-GTTTTTCGGCCCGCAACATGT-3', Mp-R: 5'-CACCGCCTTGCGTAAACTCC-3', 预期扩增片段大小为 409 bp。利用设计的特异性引物,采用单条线虫 PCR 扩增,扩增条件: 94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 45 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 是否出现预期的单一条带, 以检测引物的扩增效率。

1.4.2 引物特异性检测

分别提取实验室保存的南方根结线虫 *M. incognita*、北方根结线虫 *M. hapla*、象耳豆根结线虫 *M. enterolobii*、爪哇根结线虫 *M. javanica*、拟禾本科根结线虫 *M. graminicola*、柑橘半穿刺线虫 *Tylenchulus semipenetrans*、咖啡短体线虫 *Pratylenchus coffeae*、松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus*、矮化线虫 *Tylenchorhynchus* spp.、双宫螺旋线虫 *Helicotylenchus dihystra* 和燕麦真滑刃线虫 *Aphelenchus avenae* 的基因组 DNA, 将其与番禺根结线虫的基因组 DNA 分别作为扩增模板进行 PCR 扩增, 验证所设计引物的特异性。同时加入内标引物 D2A: 5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3', D3B: 5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3' 扩增线虫的 28S rDNA-D2/D3 区序列, 验证线虫 DNA 的提取质量。扩增结果利用琼脂糖凝胶电泳进行检测, 观察是否只有番禺根结线虫获得特异性扩增条带。

1.4.3 引物灵敏度检测

分别提取 15、10、5、1 条番禺根结线虫 2 龄幼虫 (J_2) 的 DNA, 并将 1 条 J_2 的 DNA 按 10 倍浓度梯度

稀释成 5 个梯度, 进行引物灵敏度检测。

1.4.4 多重 PCR 反应特异性验证

将 1 条番禺根结线虫与 1 条南方根结线虫或象耳豆根结线虫进行混合, 分别提取混合线虫的 DNA, 利用番禺根结线虫特异性引物 Mp-F/Mp-R, 南方根结线虫特异性引物 MI-F/MI-R (MI-F: GT-GAGGATTCAGCTCCCCAG 和 MI-R: ACGAG-GAACATACTTCTCCGTCC) 或象耳豆根结线虫特异性引物 Me-F/Me-R (Me-F: 5'-AACTTTTGT-GAAAGTGCCGCTG-3' 和 Me-R: 5'-TCAGTTCA-GGCAGGATCAACC-3') 进行多重 PCR 特异性检测验证。

2 结果与分析

2.1 柑橘根结线虫形态观察

对湖南永州柑橘上分离的根结线虫群体显微观察结果表明: 雌虫白色, 球形至梨形, 有明显的颈部, 颈部环纹清晰, 体后部环纹不明显, 排泄孔位于近中食道球处, 口针发达, 基部球粗大, 会阴花纹卵圆形, 线纹平滑, 背弓较低, 无明显侧线 (图 1a、b)。雄虫蠕虫状, 头部稍缢缩, 体表环纹明显, 具有较大的唇盘, 唇区无环纹, 口针发达, 椎体部、杆状部和基部球界限明显, 中食道球大, 椭圆形。尾部短而钝圆, 向腹部弯曲, 交合刺强壮, 稍向前弯曲 (图 1c、d)。2 龄幼虫蠕虫形, 两端较细, 体表具明显细纹, 头部与体部界限明显, 口针细长, 椎体部与基部分界明显, 尾部渐细, 端部较尖, 透明区明显 (图 1e-g)。雌虫、雄虫及 2 龄幼虫主要形态测量值见表 1, 每种虫态测量标本数为 20 个 ($n=20$)。

表 1 柑橘病原线虫主要形态测量值

Table 1 Measurements of the pathogenic nematode on citrus

虫态 Stage	体长/ μm Body length	最大体宽/ μm Maximum body diameter	口针长/ μm Stylet length	DGO/ μm Dorsal gland orifice to stylet	尾长/ μm Tail length
雌成虫 Female	617±85 (476~721)	456±35 (430~525)	13.1±0.7 (12.8~14.9)	10.3±1.5 (8.6~13.2)	—
雄成虫 Male	1 897±91 (1 730~2 023)	45.5±1.9 (44.5~50.5)	24.7±1.3 (22.0~27.5)	5.8±0.9 (4.9~6.8)	—
2 龄幼虫 Second-stage juveniles	410±17 (355~453)	16.8±1.3 (15.5~18.6)	14.5±0.8 (13.6~15.2)	4.0±0.4 (3.2~4.5)	54.4±4.8 (48.0~58.5)

2.2 柑橘根结线虫 rDNA-ITS 序列扩增与种类鉴定

2.2.1 PCR 扩增与电泳检测

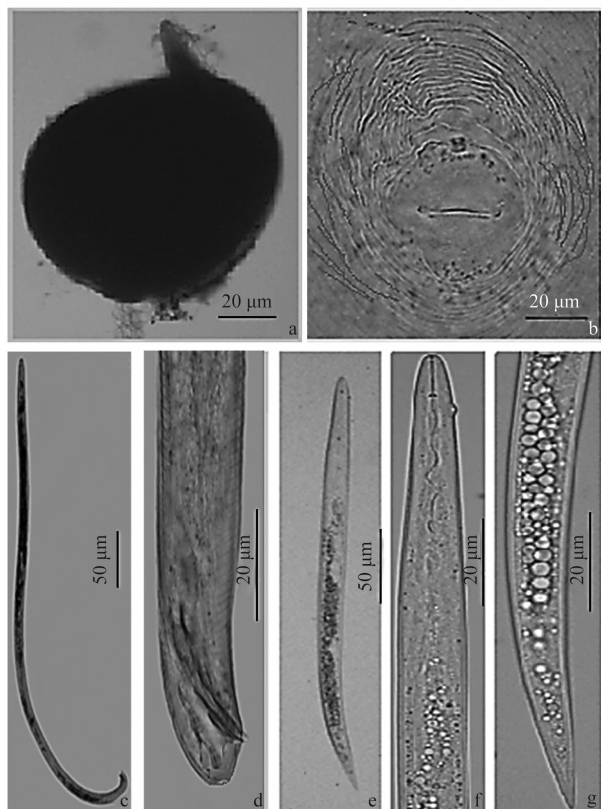
利用线虫通用引物对柑橘根结线虫的 rDNA-ITS 区进行 PCR 扩增和电泳检测, 结果表明扩增条

带在 870 bp 左右, 与预期片段大小一致 (图 2)。

2.2.2 序列测定与系统发育分析

将扩增的产物进行割胶回收、克隆与序列测定, 并将测定结果在 GenBank 上进行在线 BLAST, 结

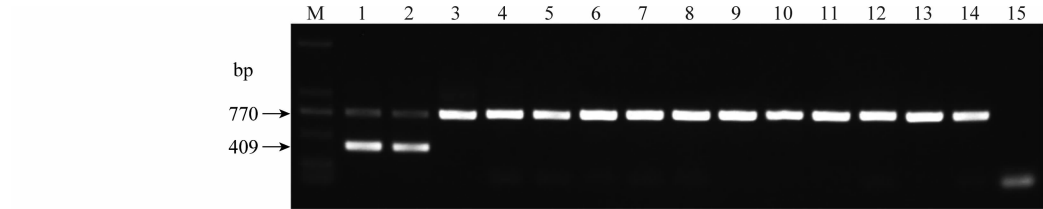
果显示与番禺根结线虫同源性最高,达 99.9%。从其聚类分析图也可以看出,其与番禺根结线虫亲缘关系最近(图 3),结合线虫形态学鉴定结果,表明柑橘根中分离到的病原线虫为番禺根结线虫 *Meloidogyne panyuensis*。



a: 雌虫整体; b: 雌虫会阴花纹; c: 雄虫整体; d: 雄虫尾部; e: 2龄幼虫整体; f: 2龄幼虫头部; g: 2龄幼虫尾部
a: Female; b: Perineal pattern; c: Male; d: Tail of male; e: Second-stage juvenile; f: Anterior body of second-stage juvenile; g: Tail of second-stage juvenile

图 1 柑橘病原线虫形态

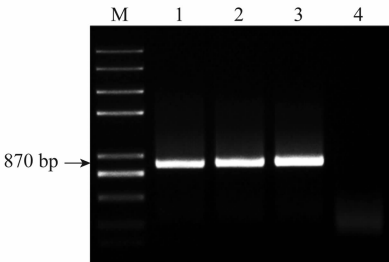
Fig. 1 Morphological characters of the pathogenic nematode on citrus



M: 2000 DNA Marker; 1: 番禺根结线虫(柑橘); 2: 番禺根结线虫(柑橘); 3: 南方根结线虫(辣椒); 4: 南方根结线虫(罗汉果); 5: 象耳豆根结线虫(辣椒); 6: 北方根结线虫(柑橘); 7: 爪哇根结线虫(大麻); 8: 拟禾本科根结线虫(水稻); 9: 柑橘半穿刺线虫(柑橘); 10: 咖啡短体线虫(苜蓿); 11: 松材线虫(马尾松); 12: 矮化线虫(苜蓿); 13: 双宫螺旋线虫(柑橘); 14: 燕麦滑刃线虫(柑橘); 15: 阴性对照
M: 2000 DNA Marker; 1: *M. panyuensis* (*Citrus reticulata*); 2: *M. panyuensis* (*Citrus reticulata*); 3: *M. incognita* (*Capsicum annuum*); 4: *M. incognita* (*Siraitia grosvenorii*); 5: *M. enterolobii* (*Capsicum annuum*); 6: *M. hapla* (*Citrus reticulata*); 7: *M. javanica* (*Cannabis sativa*); 8: *M. graminicola* (*Oryza sativa*); 9: *Tylenchulus semipenetrans* (*Citrus reticulata*); 10: *Pratylenchus coffeae* (*Boehmeria nivea*); 11: *Bursaphelenchus xylophilus* (*Pinus massoniana* Lamb); 12: *Tylenchorhynchus* spp. (*Boehmeria nivea*); 13: *Helicotylenchus dihystra* (*Citrus reticulata*); 14: *Aphelenchus avenae* (*Citrus reticulata*); 15: Negative control

图 4 番禺根结线虫 PCR 特异性检测

Fig. 4 Specificity detection of PCR assay for *Meloidogyne panyuensis*



M: Trans2K Plus DNA Marker; 1-3: 待鉴定线虫DNA; 4: 阴性对照
M: Trans2K Plus DNA Marker; 1-3: Unidentified nematodes; 4: Negative control

图 2 待鉴定线虫 ITS 区 PCR 扩增产物
1%琼脂糖电泳结果

Fig. 2 1% agarose electrophoresis of PCR products of rDNA-ITS region from unidentified nematodes

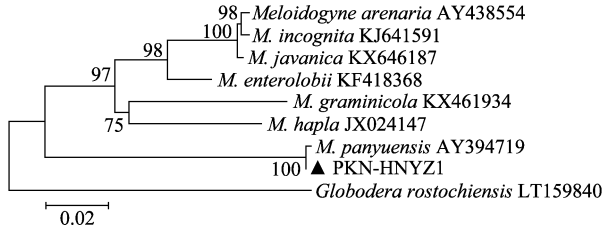


图 3 基于根结线虫 rDNA-ITS 区序列构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic analysis of *Meloidogyne* species based on rDNA-ITS sequences

2.3 番禺根结线虫特异性检测

2.3.1 引物特异性检测

以番禺根结线虫和 11 种其他植物线虫 DNA 为模板进行 PCR 扩增,验证所设计引物 Mp-F/Mp-R 的特异性,以内标引物 D2A/D3B 检测线虫的提取质量, rDNA-ITS 区的特异性扩增片段大小为 409 bp, 28S rDNA-D2/D3 区的片段扩增大小为 770 bp,检测结果表明,2 个番禺根结线虫样本经特异性引物扩增均获得约 409 bp 大小的特异性条带,而其他线虫只扩增得到约 770 bp 大小的条带(图 4)。

2.3.2 引物灵敏度检测

分别以 15 条、10 条、5 条、1 条、 10^{-1} 条、 10^{-2} 条、 10^{-3} 条、 10^{-4} 条、 10^{-5} 条 J_2 的 DNA 为模板进行 PCR 扩增,结果显示当扩增模板 DNA 大于 1 条线虫时,能扩增到明亮的条带,将单条 J_2 的 DNA 稀释 10 倍后也能检测到目的条带(图 5),表明引物具有较高的灵敏度。

2.3.3 多重 PCR 检测验证

多重 PCR 检测结果表明:利用不同引物组合物进行 PCR 扩增,不管模板中是否含有其他种类线虫 DNA,只要 DNA 模板中含有番禺根结线虫 DNA,能扩增到明亮的目的条带(图 6)。表明建立的番禺

根结线虫特异性检测鉴定方法能有效的对番禺根结线虫进行特异性检测鉴定。

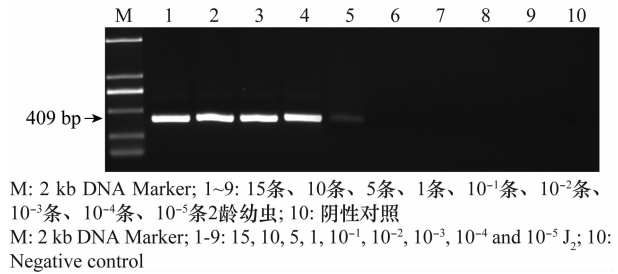


图 5 番禺根结线虫特异性 PCR 的灵敏度检测

Fig. 5 Sensitivity assessment of specific PCR for detection of *Meloidogyne panyuensis*

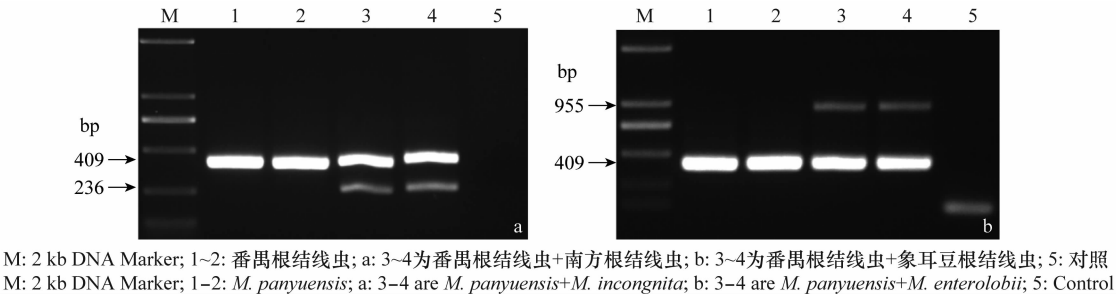


图 6 多重 PCR 检测鉴定番禺根结线虫

Fig. 6 Multiplex-PCR for detection of *Meloidogyne panyuensis*

3 结论与讨论

柑橘是湖南主要经济作物,种植过程中病虫害危害严重,植物寄生线虫是柑橘上的重要病原物,一些重要植物寄生线虫会引起果树生产迟缓、衰退,导致产量和品质严重下降。全球范围内发现侵染危害柑橘的线虫有 40 多种,其中危害最严重的有柑橘半穿刺线虫 *T. semipenetrans*、香蕉穿孔线虫 *Radopholus similis*、根腐线虫 *Pratylenchus* spp. 和根结线虫 *Meloidogyne* spp.。在我国,柑橘根结线虫危害严重,种类多。已报道的侵染柑橘的根结线虫有 14 种,其中 13 种根结线虫在中国有分布^[5]。随着农业结构的调整和机械化生产的发展,根结线虫病害扩散蔓延迅速,发生逐年加重,情况复杂多变,往往多种病害、多种线虫混合侵染危害。而植物线虫病原种类鉴定是从事线虫病害研究的前提和基础。如何快速准确地进行病原线虫鉴定,从而制定有针对性的防治措施,以确保柑橘产业的稳定发展至关重要。本研究针对采自湖南永州地区柑橘上的根结线虫病原种类进行鉴定。经形态学和分子生物鉴定表明该

病原线虫为番禺根结线虫。番禺根结线虫最早在广东省番禺县的花生上分离获得^[19],此后,该线虫在海南的番石榴和胡椒上也被检测到^[20-21]。这是首次在湖南地区发现该线虫危害柑橘,之前未见有番禺根结线虫侵染柑橘的相关研究报道。

传统的根结线虫鉴定方法主要是根据形态特征测量值、雌虫会阴花纹、鉴别寄主反应等。然而由于环境条件和寄主的不同,形态测量值会有较大变化,不同种间根结线虫形态测量值重叠现象严重,同种根结线虫雌虫会阴花纹也有较大差异,所以,单纯通过形态特征鉴定很容易出现错误诊断。寄主鉴别反应对 4 种常见的根结线虫十分可靠,但是不能用于其他种的鉴定,且工作量大,鉴别寄主试验周期长,也未能对混合种群作出直接的判断。特别是随着根结线虫的新寄主和新种类的不断发现,使得常规形态学鉴定和诊断变得越加困难,已经不能满足现在快速而准确鉴定的要求。同工酶电泳分析是一种快速准确的鉴定方法,但是由于细胞中的蛋白表达受线虫发育和环境因素的影响较大,给鉴定带来一定的困难,此外,同工酶鉴定技术很难实现单条 J_2 的

准确鉴定。随着分子生物学技术的发展,基于 DNA 差异和 PCR 技术的分子生物学鉴定方法目前已经成为植物线虫新种鉴定与揭示种间差异的重要手段^[22]。ITS 是核糖体 DNA 中内转录间隔区,拷贝数多,同时包含保守和变异序列,并且受外界环境因素的影响较小,具有种内高度保守而种间具有不同程度变异的特点,是植物线虫 PCR 分类鉴定中广泛应用的理想遗传靶标。采用 PCR 方法对根结线虫某段具有种特异性的 DNA 进行序列分析,能快速准确地鉴定根结线虫种类。本研究建立了番禺根结线虫 ITS 区特异性 PCR 快速检测技术体系,采用了线虫 rDNA 的内转录间隔区序列设计引物,能够高效地从多种根结线虫中特异性扩增出番禺根结线虫 ITS 区序列片段。该特异性 PCR 检测技术与传统的形态学或同工酶电泳技术方法相比,具有操作简单、特异性强以及灵敏度高的特点,其灵敏度甚至达到了 0.1 条 J₂,完全实现了单条番禺根结线虫特异性快速检测。该方法的建立有效弥补了传统鉴定方法的不足与缺陷,为柑橘根结线虫病的检测及防治预警提供有效的技术支撑。

参考文献

- [1] MANTELIN S, BELLAFIORE, S, KYNDT T. *Meloidogyne graminicola*: a major threat to rice agriculture [J]. Molecular Plant Pathology, 2017, 18(1): 3–15.
- [2] HUNT D J, HANDOO Z A, PERRY R N, et al. Taxonomy, identification and principal species [J]. Root-Knot Nematodes, 2010: 55–97.
- [3] HU Maoxiu, ZHUO Kan, LIAO Jinling. Multiplex PCR for the simultaneous identification and detection of *Meloidogyne incognita*, *M. enterolobii*, and *M. javanica* using DNA extracted directly from individual galls [J]. Phytopathology, 2011, 101(11): 1270–1277.
- [4] 高小倩. 福建省柑橘线虫病害的诊断与防治[D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
- [5] 吴尧. 福建省柑橘根部 1 种根结线虫新种的鉴定[D]. 福州:

福建农林大学, 2011.

- [6] 宋志强, 成飞雪, 程菊娥, 等. 湖南省永州地区柑橘慢衰病与黄龙病病原鉴定及分布调查植物保护[J]. 植物保护, 2016, 42(4): 189–193.
- [7] 廖月华, 邓舒平. 柑桔根结线虫病研究初报[J]. 江西农业大学学报, 1990(2): 5–9.
- [8] 刘维志. 植物病原线虫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [9] 张绍升, 许猛义. 福建柑桔根结线虫种类及其防治研究[J]. 中国柑桔, 1994(1): 9–11.
- [10] 杨宝君, 陈荟. 寄生在柑桔根上的根结线虫新种—简阳根结线虫[J]. 植物病理学报, 1990(4): 259–264.
- [11] 朱伟生, 陈荟, 兰晓瑜, 等. 四川柑桔园线虫种类调查初报[J]. 中国南方果树, 1991(4): 14–15.
- [12] 周志军. 柑桔根结线虫病在湖南衡东严重发生[J]. 植物保护, 1991, 17(5): 17.
- [13] 方中达. 植病研究方法[M]. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [14] 冯志新. 植物线虫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [15] 张靠稳, 贾振华. 根结线虫会阴花纹的染色方法[J]. 北方园艺, 2008(3): 207–208.
- [16] VRAIN T, WAKARCHUK D, LAPLANTELEVESQUE A, et al. Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphisms in the *Xiphinema americanum* group [J]. Fundamental & Applied Nematology, 1992, 15(6): 563–573.
- [17] SONG Zhiqiang, CHENG Jue, CHENG Feixue, et al. Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Tylenchulus semipenetrans* using DNA extracted from soil [J]. The Plant Pathology Journal, 2017, 33(2): 184–192.
- [18] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 北京: 化学工业出版社, 2008.
- [19] LIAO Jinling, YANG Weicai, FENG Zhixin, et al. Description of *Meloidogyne panyuensis* sp. n. (Nematoda: Meloidogynidae), parasitic on the peanut, *Arachis hypogaea* L. in China [J]. Russian Journal of Nematology, 2003, 13(2): 107–114.
- [20] 芮凯, 陈绵才, 郭安平, 等. 海南省番石榴病原根结线虫种类鉴定[J]. 华南农业大学学报, 2005, 26(4): 53–58.
- [21] 万新龙, 李建洪, 彭德良. 根结线虫 rDNA-ITS 片段的克隆与序列分析[J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(5): 624–628.
- [22] 廖金铃. 根结线虫的鉴定及其 DNA 多态性研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2001.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 178 页)

- [26] 谢建军, 钟国华, 陈新芳, 等. 亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Guenée) 幼虫化学感受器种类与分布的形态学研究[J]. 电子显微学报, 2006, 2(1): 71–75.
- [27] 向玉勇, 孔丹丹, 刘同先, 等. 小地老虎雌蛾触角及幼虫头部感受器扫描电镜观察[J]. 昆虫学报, 2016, 59(12): 1340–1347.
- [28] 马瑞燕, 杜家纬. 昆虫的触角感器[J]. 应用昆虫学报, 2000, 37(3): 179–183.
- [29] BARSAGADE D D, KHURAD A M, CHAMAT M V. Micro-

scopic structure of mouth parts sensilla in the fifth instar larvae of eri silkworm, *Philosamia ricini* (Lepidoptera: Saturniidae) [J]. Journal of Entomology and Zoology Studies, 2013, 1(3): 15–21.

- [30] CLARK J V. Feeding deterrent receptors in the last instar African armyworm *Spodoptera exempta*: a study using salicin and caffeine [J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 1981, 29(2): 189–197.

(责任编辑: 田 喆)