

粗茎秦艽根结线虫病的病原鉴定

李云霞¹, 杨艳梅¹, 李朝凤², 彭昌田¹, 胡先奇^{1*}

(1. 云南农业大学植物保护学院, 省部共建云南生物资源保护与利用国家重点实验室, 昆明 650201;

2. 云南省丽江市农业科学研究所, 丽江 674100)

摘要 粗茎秦艽 *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk. 是一种重要的中药材, 近年来根结线虫病发生严重。为明确粗茎秦艽根结线虫病病原种类, 对其病原线虫进行种类鉴定, 以期为该病的防治提供理论依据, 采用雌成虫、2龄幼虫、会阴花纹形态特征及形态测量值进行形态学鉴定, 结合分子鉴定方法(比对 rDNA-ITS 和 mtDNA-CO I 序列、构建系统进化树, 序列特异性扩增区段比对)对病原线虫进行种类鉴定。结果表明, 该病原线虫雌成虫和 2 龄幼虫形态特征及测量值与北方根结线虫 *Meloidogyne hapla* 极为相似; 该病原线虫 rDNA-ITS 序列和 mtDNA-CO I 序列均与 NCBI 数据库中登录的北方根结线虫相似性达 100%; 采用北方根结线虫特异性引物, 该病原线虫能扩增出 1 500 bp 的特异性条带, 与北方根结线虫特异性条带大小相同。上述结果表明, 云南省丽江市鲁甸乡粗茎秦艽根结线虫病的病原为北方根结线虫, 为首次发现北方根结线虫危害粗茎秦艽, 研究结果为进一步制定有效防治策略提供了理论依据。

关键词 粗茎秦艽; 北方根结线虫; 病原鉴定

中图分类号: S432.45 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2021441

Pathogen identification of root-knot nematode disease of *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk.

LI Yunxia¹, YANG Yanmei¹, LI Chaofeng², PENG Changtian¹, HU Xianqi^{1*}

(1. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan, College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Lijiang Academy of Agricultural Sciences, Yunnan Province, Lijiang 674100, China)

Abstract *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk. is an important Chinese medicinal material. In recent years, root-knot nematode disease has been seriously occurred on *G. crassicaulis*. In this paper, root-knot nematode species was identified by morphological observation of female adults, second-stage juveniles and perineal pattern characteristics, morphological measurements, combined with molecular identification methods (rDNA-ITS and mtDNA-CO I sequence alignment, and sequence-specific amplified segments, phylogenetic tree construction). The results showed that morphological characteristics and measured measurements of the second-stage juveniles and female adults were similar to those of the *Meloidogyne hapla*. The rDNA-ITS and mtDNA-CO I sequences in NCBI are 100% similar to those of *M. hapla*. With specific amplification primers for *M. hapla*, a 1 500 bp specific fragment can be amplified, which had the same size as that amplified from *M. hapla*. The above results indicated that the root-knot nematode disease of *G. crassicaulis* in Ludian township, Lijiang city, Yunnan province was caused by *M. hapla*. It is the first report to find that *M. hapla* can damage *G. crassicaulis*, which provide a theoretical basis for further development of effective control strategies of the nematode disease.

Key words *Gentiana crassicaulis*; *Meloidogyne hapla*; pathogen identification

粗茎秦艽 *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk. 为龙胆科秦艽组植物, 是一种重要的中药材, 以干燥根入药, 味辛、苦, 性平, 入肝、胆、胃经, 具有祛风湿、清湿热、退虚热、抑菌、抗炎镇痛、健胃促消

收稿日期: 2021-08-13

修订日期: 2021-09-23

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0200601-4, 2018YFD0201202-05)

* 通信作者 E-mail: xqhoo@126.com

化的功效^[1-2]。粗茎秦艽主要分布于云南、贵州、四川、西藏等海拔 2 300~3 800 m 的高山草甸、山坡草地、灌丛及林缘^[3-4]。云南省丽江市为粗茎秦艽的道地产区,是我国最大的粗茎秦艽种植基地,种植面积近 1 000 hm²^[5]。

根结线虫 *Meloidogyne* spp. 是一类重要的植物病原物,分布于世界各地、适应能力和繁殖能力强,寄主范围广,超过 3 000 种,可侵染粮食、油料、纤维、烟草、茶叶、果蔬、花卉、药用植物等^[6],据报道人参、三七、西洋参、黄芪、桔梗、麦冬、栀子、灯盏花、罗汉果、地黄等百余种药用植物受根结线虫危害^[7-8],目前,根结线虫病是影响药用植物生产的主要因子之一,已经严重影响高价值药用植物栽培的发展。广西永福的罗汉果种植面积在 2010 年达 3 350 hm²,其中 80% 的地块受根结线虫危害,受害较轻者减产 20%~30%,严重者可减产 50% 以上^[9]。根结线虫病的发生不仅降低了药用植物的产量,还影响着药用成分的累积,根结线虫侵染越严重越不利于单株三七主根和须根皂苷的合成和累积^[10],陕西商洛 40% 以上的桔梗成品因根结线虫病失去了商品和药用价值,给该地区的桔梗产业造成了严重的经济损失^[11]。

我们在调查过程中发现,种植于云南省丽江市的粗茎秦艽受到根结线虫病严重危害,且发生普遍,由于粗茎秦艽多年连作,其根结线虫病害呈逐年加重趋势,该病害现已成为制约丽江市粗茎秦艽产业发展的主要因素之一。迄今尚未见丽江粗茎秦艽根结线虫病研究的相关报道,为明确粗茎秦艽根结线虫病病原线虫种类,于 2020 年 6 月至 10 月 3 次到丽江市鲁甸乡调查采样,采用形态学和分子生物学方法鉴定粗茎秦艽根结线虫病病原种类。本研究结果将为制定有针对性的防治措施提供理论依据,对保持丽江粗茎秦艽产业健康发展具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 病害标本采集

2020 年 6 月至 10 月在云南省丽江市鲁甸乡采集具有明显根结的粗茎秦艽植株,该时段粗茎秦艽处于分蘖期,采集完整植株及根际土,做好标注后带回实验室进行观察、分离与鉴定,共采集 6 个标本,编号为 QJ1~QJ6。

1.2 病株田间症状观察

用自来水将病根冲洗干净,纸巾吸干水分后,在体视显微镜下观察根部症状,并拍照记录。

1.3 根结线虫的分离

2 龄幼虫:将病根冲洗干净,在体视镜下挑取单卵块放入装有 1 mL 蒸馏水的 1.5 mL 离心管中,28℃ 恒温培养箱中孵化得到 2 龄幼虫,一部分 2 龄幼虫人工接种到空心菜上保种扩繁,另一部分置于 65℃ 水浴锅中 2~3 min 杀死,用 4% 的甲醛溶液固定保存^[12],用于形态指标测量。

雌成虫:解剖根结,挑取雌成虫,用于形态学鉴定和分子生物学鉴定。

1.4 形态学鉴定

2 龄幼虫:在显微镜下进行形态观察、形态指标^[13]测量和拍照。

雌成虫:在显微镜下观察雌成虫的形态并拍照、测量其形态指标^[13]。

会阴花纹制作与观察:参照谢辉^[14]的方法进行,将单条雌成虫放在滴有 45% 乳酸的有机玻璃板上,用解剖刀切取会阴花纹部分,用细小柔软毛刷将附着在角质层上的组织清理干净,将会阴花纹移入滴有纯甘油的载玻片上,外侧朝上,盖上盖玻片在显微镜下观察会阴花纹形态并拍照。

1.5 分子生物学鉴定

1.5.1 DNA 提取

根结线虫 DNA 的提取参照 Adam 等^[15]的方法稍做改进:挑取单条雌成虫放入加有 5 μ L ddH₂O 的 200 μ L PCR 管中,用灭菌枪头刺破虫体,加入 5 μ L 细胞裂解液(1 μ L 10 $\times$ PCR Buffer (Mg²⁺, free)、0.8 μ L MgCl₂、0.05 μ L 蛋白酶 K、3.15 μ L ddH₂O),短暂离心,放入液氮中冷冻 20 min,加入 10 μ L 石蜡油,短暂离心,置于 PCR 仪中 56℃ 反应 80 min,95℃ 反应 15 min,得到根结线虫 DNA 提取液。

1.5.2 rDNA-ITS 区、mtDNA-CO I 区序列扩增

得到的 DNA 提取液选用引物 F195/V5367 扩增 rDNA-ITS 序列, F195: 5'-TTTCACTCGCCGT-TACTAAGG-3', V5367: 5'-TTGATTACGTCCCTGC-CCTTT-3'^[16],用引物 COX1F/COX1R 扩增 mtDNA-COI 序列, COX1F: 5'-GGCTGAGCATAGTAGAT-GATGTT-3', COX1R: 5'-CTACAACATAATAAG-

TATCATG-3^[17], 25 μ L PCR 反应体系: 10 $\times$ PCR Buffer (Mg²⁺, PLus) 2.5 μ L、dNTPs 2 μ L、10 μ mol/L 上、下游引物各 1 μ L、DNA 模板 2.5 μ L、Taq 酶 0.25 μ L、ddH₂O 15.75 μ L。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 或 54 $^{\circ}$ C 退火 30 s (F195/V5367 退火温度为 55 $^{\circ}$ C, COX1F/COX1R 退火温度为 54 $^{\circ}$ C), 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。PCR 反应结束后, 电泳检测 PCR 反应产物, 取 5 μ L 扩增产物、1 μ L 6 $\times$ DNA Loading buffer 混匀后点入 1.2% 琼脂糖凝胶胶孔, 110 V、180 mA 条件下电泳 30 min, 使用凝胶成像系统观察拍照。

回收 PCR 扩增产物, 回收产物连接到 pMDTM18-T 载体, 连接产物转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 转化后的细胞液中加入 50 μ L SOD 培养基, 37 $^{\circ}$ C, 200 r/min 振荡培养 1 h。取 150 μ L 菌液涂布在 LB(氨苄青霉素) 固体培养基上, 过夜培养, 挑取单菌落进行 PCR 鉴定, 将阳性克隆委托擎科生物科技有限公司测序, 测序结果在 GenBank 中 BLAST 比对分析^[12]。

1.5.3 SCAR 特异性片段扩增

使用北方根结线虫的特异性引物 Mh-F/Mh-R 扩增, Mh-F: 5'-GGCTGAGCATAGTAGATGAT-

GTT-3', Mh-R: 5'-ACCCATTAAAGAGGAGTTTTT-GC-3'^[18]。PCR 反应体系同 1.5.2。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 61 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。PCR 反应结束后, 取 5 μ L 扩增产物、1 μ L 6 $\times$ DNA Loading buffer 混匀后点入 1.2% 琼脂糖凝胶胶孔, 110 V、180 mA 条件电泳 30 min, 使用凝胶成像系统观察拍照。

1.6 系统发育树构建

将测序结果提交至 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 核酸数据库进行 BLAST 比对。采用 MAGA 6.0 软件的邻接法 (neighbor-joining, NJ) 以 1 000 进行 bootstrap 校验, 构建基于 rDNA-ITS 和 mtDNA-CO I 的系统发育树, 分析病原线虫的亲缘关系^[19]。

2 结果与分析

2.1 粗茎秦艽根结线虫病田间症状

被线虫侵染的粗茎秦艽叶片黄化, 长势不良, 根部膨大, 形成根结, 侵染严重时, 根上形成串珠状根结及大根结, 主根也出现根结, 根结处有白色卵块溢出, 部分卵块在溢出根表皮前有浅红色胶状物包裹(图 1)。



a: 地上部症状; b: 地下部症状; c: 根结; d: 卵块
a: Aboveground symptom; b: Subterranean symptom; c: Root knot; d: Egg mass

图 1 粗茎秦艽根结线虫病田间症状

Fig. 1 Field symptoms of *Gentiana crassicaulis* root-knot nematode disease

2.2 病原线虫形态学特征

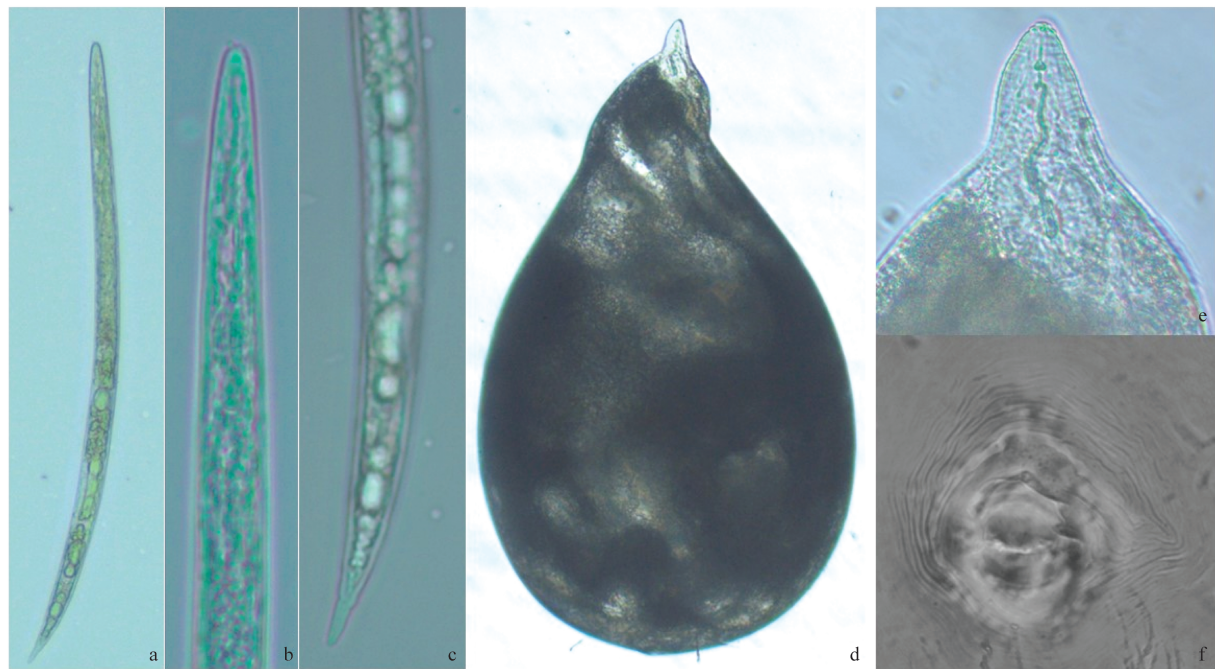
2 龄幼虫头冠狭小, 头区无环纹, 透明尾有明显界限, 尾端通常无纹, 少数尾端有缢缩, 尾尖阔圆或尖(图 2a~c), 形态测量数据见表 1。雌成虫虫体梨形, 颈短, 颈部与体分界不明显, 口针纤细, 口针基部球球形或扁球形, 中食道球卵圆形或圆形, 中食道球

瓣卵圆形(图 2d、e), 形态测量数据见表 1。雌成虫会阴花纹整体呈卵圆形, 背弓中等高或低平, 线纹平滑至波浪形, 侧线不明显, 背线与腹线相遇呈一定角度, 从而露出侧线的痕迹, 有时线纹向一侧或两侧形成翼, 尾区有刻点(图 2f), 故将其初步鉴定为北方根结线虫 *Meloidogyne hapla*。

表 1 粗茎秦艽根结线虫 2 龄幼虫和雌成虫的形态测量值¹⁾

形态指标/ μm Morphological index	丽江种群 Population of Lijiang		Chitwood 1949 ^[20]		赵洪海 1999 Zhao Honghai 1999 ^[13]	
	2 龄幼虫 J ₂ ($n=20$)	雌成虫 ($n=20$) Female adult	2 龄幼虫 J ₂ ($n=20$)	雌成虫 ($n=20$) Female adult	2 龄幼虫 J ₂ ($n=20$)	雌成虫 ($n=20$) Female adult
L	370.07±13.73(338.87~398.45)	723.70±66.77(612.55~851.46)	337(312~355)	612(419~845)	374.0(340.0~390.0)	721.4(530.0~1158.8)
W	11.88±0.81(10.48~13.28)	417.51±39.04(341.31~480.91)	—	430(311~561)	14.3(13.0~15.2)	463.8(342.0~582.0)
ST	13.05±0.50(12.12~14.35)	10.35±1.24(8.11~12.86)	9.7(7.9~10.9)	11(10~13)	11.3(10.5~11.8)	13.8(12.8~15.0)
DGO	5.88±7.908(61.92~40.95)	4.95±0.77(3.70~7.02)	—	5(4~6)	3.7(3.0~4.8)	5.0(3.8~6.3)
STKW	1.23±0.20(0.79~1.57)	2.79±0.35(2.03~3.59)	—	2(2~3)	1.3(1.0~1.8)	2.9(2.5~3.3)
STKH	1.19±0.17(0.80~1.48)	1.97±0.49(1.32~3.55)	—	—	1.2(1.0~1.3)	1.7(1.5~2.3)
MEL	10.32±1.14(8.74~12.89)	38.09±3.94(31.00~47.74)	—	36(31~42)	11.5(10.0~12.5)	45.9(42.5~52.5)
MEW	6.68±0.49(5.94~7.70)	37.11±4.45(28.29~46.88)	—	31(26~37)	8.0(7.0~10.0)	41.1(37.5~46.3)
MEV-HE	53.60±2.19(7.72~57.49)	73.51±7.31(59.25~89.11)	—	—	53.9(51.3~88.8)	62.1(56.3~70.0)
TALL	43.64±4.21(29.88~49.95)	—	43(33~48)	—	48.0(42.5~52.5)	—
TTL	11.53±1.30(8.40~13.41)	—	—	—	12.3(8.8~15.8)	—
Wa	9.62±0.692(8.30~10.71)	—	—	—	—	—

1) L: 体长; W: 体宽; ST: 口针长; DGO: 背食道腺开口到口针基部球距离; STKW: 口针基部球宽; STKH: 口针基部球高; MEH: 中食道球长; MEW: 中食道球宽; MEV-HE: 中食道球瓣到头端距离; TALL: 尾长; TTL: 透明尾长; Wa: 肛门处虫体宽; —: 文献中未记载数据及雌成虫不需测量数据。
L: Body length; W: Body width; ST: Stylet length; DGO: Distance from dorsal esophageal gland opening to the stylet knot; STKW: Stylet knob width; STKH: Stylet knob height; MEH: Metacarpus length; MEW: Metacarpus width; MEV-HE: Anterior end to center of metacarpus; TALL: Tail length; TTL: Hyaline tail length; Wa: Anal body diameter; —: Data not recorded in the article and female adults do not need to be measured.



a: 2龄幼虫整体外观; b: 2龄幼虫头部; c: 2龄幼虫尾部; d: 雌成虫整体外观; e: 雌成虫头部; f: 雌成虫会阴花纹
a: Overall appearance of the second-stage juvenile; b: Head of the second-stage juvenile; c: Tail of second-stage juvenile; d: Overall appearance of female adult; e: Female adult head; f: Perineal pattern of female adult

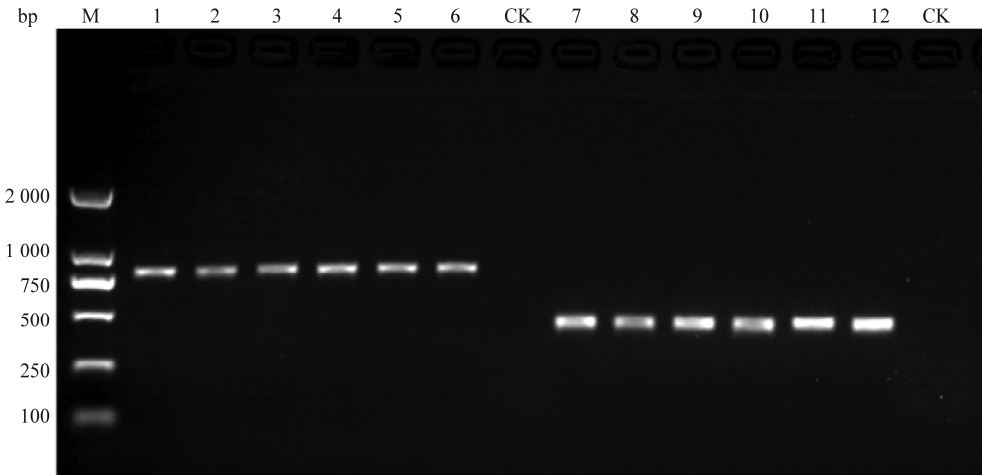
图 2 粗茎秦艽根结线虫病原形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of pathogenic nematode of *Gentiana crassicaulis*

2.3 分子生物学鉴定

使用通用引物 V5367/F195 对粗茎秦艽病原线虫 rDNA-ITS 区进行 PCR 扩增,6 份标本中分离到的根结线虫均能扩增出约 770 bp 的目的条带,使用

通用引物 COX1R/COX1F 扩增粗茎秦艽病原线虫 mtDNA-CO I 区,6 份标本中分离到的根结线虫均能扩增出大小约 410 bp 的目的条带(图 3)。使用北方根结线虫的特异引物 Mh-F/Mh-R 扩增 6 份标本



M: DL2000 DNA marker; CK: 阴性对照; 1~6: QJ1~QJ6根结线虫rDNA-ITS序列扩增片段; 7~12: QJ1~QJ6根结线虫mtDNA-CO I 序列扩增片段
M: DL2000 DNA marker; CK: Negative control; 1-6: rDNA-ITS sequence amplified from root-knot nematodes QJ1-QJ6; 7-12: mtDNA-CO I sequence amplified from root-knot nematodes QJ1-QJ6

图 3 6 份粗茎秦艽样本中根结线虫 rDNA-ITS 序列、mtDNA-CO I 序列扩增片段电泳结果

Fig. 3 Electrophoresis results of PCR product of rDNA-ITS and mtDNA-CO I sequences from root-knot nematode on six samples of *Gentiana crassicaulis*

中分离到的根结线虫均能扩增出约为 1 500 bp 的特异性片段(图 4), 综上, 将危害粗茎秦艽的根结线虫鉴定为北方根结线虫。

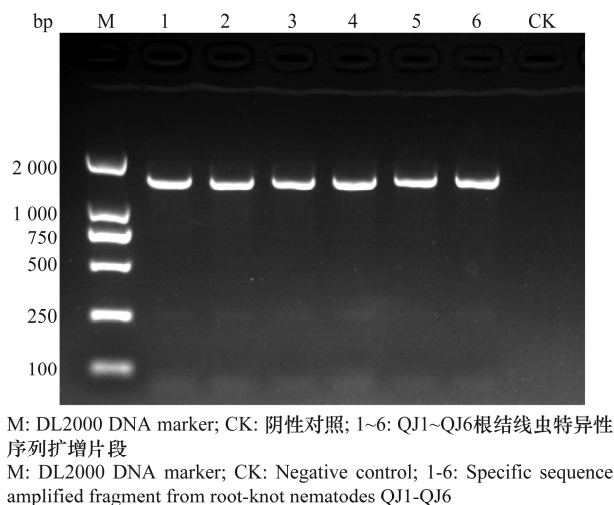


图 4 6 份粗茎秦艽样本中根结线虫 SCAR 扩增片段电泳结果

Fig. 4 Electrophoresis results of PCR product from SCAR root-knot nematode on six samples of *Gentiana crassicaulis*

2.4 病原线虫 PCR 产物序列分析及系统发育树构建

6 份标本中分离到的根结线虫 rDNA-ITS 序列在 BLAST 中比对, 结果均与北方根结线虫(登录号为 MT249016.1、KJ572385.1、MT951634.1)相似, 相似性为 100%, mtDNA-CO I 区序列在 BLAST 中比对, 结果均与北方根结线虫(登录号为 MT251177.1、JX683718.1、AY268113.1、MH128567.1、MH399801.1、JX683718.1)相似, 相似性为 100%。

6 份标本上分离到的根结线虫 rDNA-ITS 序列以 100%的支持率与 GenBank 中已登录的北方根结线虫(登录号为 MT249016.1、KJ572385.1、MT951634.1)聚为一支, mtDNA-CO I 区序列以 99%的支持率与 GenBank 中已登录的北方根结线虫(登录号为 MT251177.1、JX683718.1、AY268113.1、MH128567.1、MH399801.1、JX683718.1)聚为一支, 故将其鉴定为北方根结线虫(图 5)。

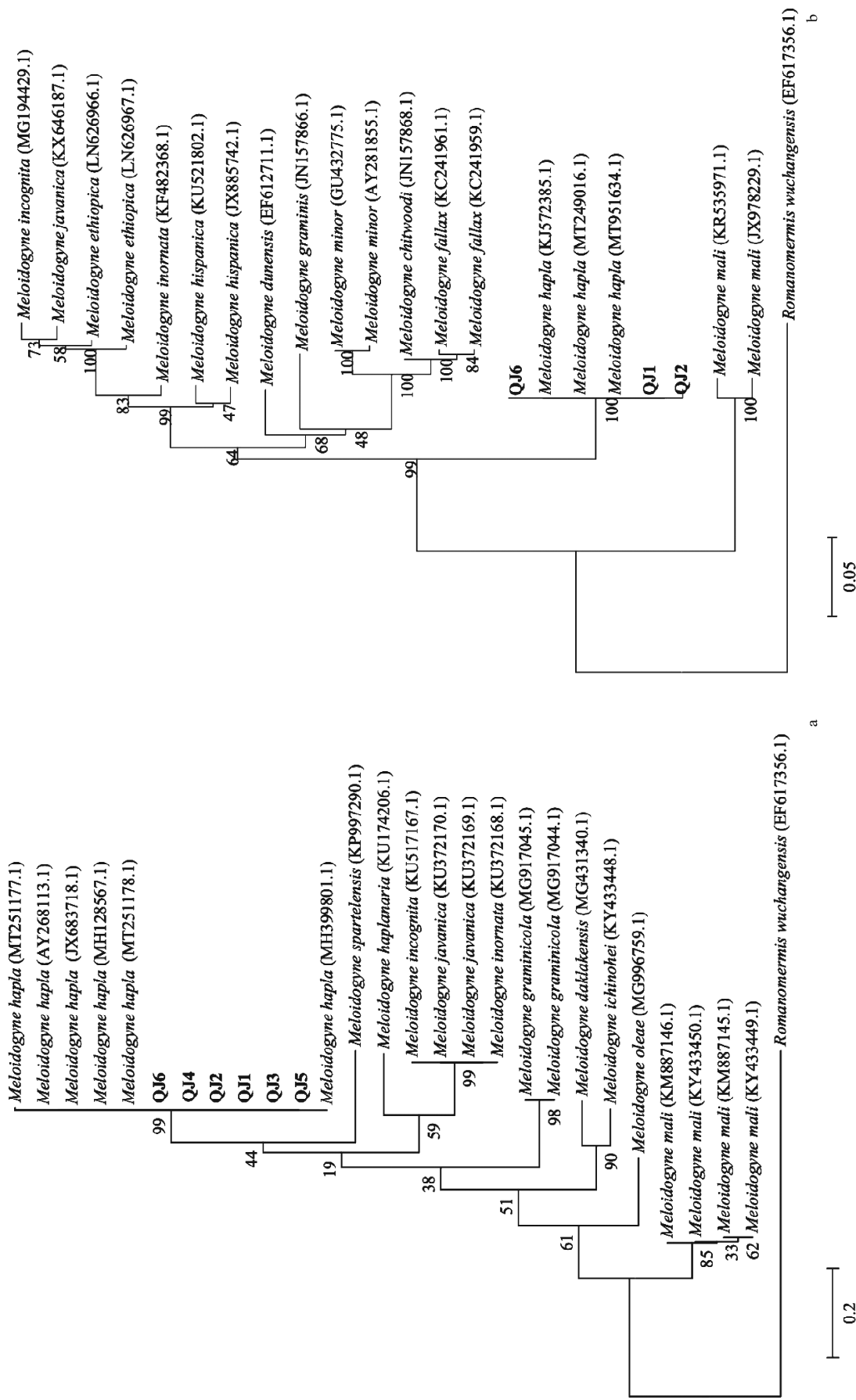
3 结论与讨论

本研究通过形态学和分子生物学方法将粗茎秦艽根结线虫病的病原鉴定为北方根结线虫, 属国内在粗茎秦艽上的首次报道, 研究结果为制定粗茎秦艽根结线虫病的防治方案提供了理论依据。

北方根结线虫是世界上最常见的 4 种根结线虫之一^[21], 通常分布于北方冷凉地区。在云南, 北方根结线虫主要分布在海拔 1 700 m 以上的地区, 根据现有报道, 昆明、蒙自、大理等地均发现有北方根结线虫的分布^[22-23]。多数药用植物种植在高海拔地区, 气候冷凉, 这些区域恰巧适合北方根结线虫生存。前人调查研究发现附子、三七、人参、白术、甘草、决明、党参等药用植物都受到北方根结线虫危害^[24-26]; 在河北省安国县有 62 种药用植物被北方根结线虫危害^[27]; 据统计我国 14 个省、市、自治区有 100 余种药用植物受到根结线虫的危害, 其中 70 余种药用植物受到北方根结线虫危害^[7]。丽江市鲁甸乡海拔在 2 100 m 以上, 年平均气温 11℃, 霜期 180 d 左右, 年平均气温较低, 该地区地理环境适宜北方根结线虫生存, 在调查研究中也仅发现北方根结线虫危害, 这和前人的研究报道是一致的。

是否存在其他种类根结线虫为害粗茎秦艽, 是一个值得探索的问题。本研究所采集的标本仅局限于丽江市鲁甸乡粗茎秦艽种植区, 要评估该病的发生范围, 还需扩大样本采集区域, 进一步开展相应工作。

根结线虫病的发生为害将严重影响粗茎秦艽的生产, 应加强粗茎秦艽根结线虫病的防控。鉴于粗茎秦艽为药用植物, 采用绿色综合防治策略是粗茎秦艽产业可持续发展和环境保护的有效途径。建议在粗茎秦艽种植过程中注重育苗地的选择及管理, 防止种苗携带根结线虫病; 与菊科、禾本科等根结线虫非寄主植物轮作, 可明显降低土壤中根结线虫虫口数量^[28]; 施用淡紫拟青霉 *Paecilomyces lilacinus* 等微生物菌剂可通过改变根系微生态, 促进植株生长, 抑制根结线虫的侵染, 同时这些微生物还能寄生在根结线虫卵和幼虫体内使其死亡^[29]; 施用生物活性有机肥可改良土壤, 增加植株株高、茎粗和地上部分生物量, 并对根结线虫病有良好抑制效果^[30]。药用植物的特殊性决定了粗茎秦艽的质量尤为重要, 为使粗茎秦艽达到高效、安全、绿色无污染的标准, 在粗茎秦艽根结线虫病防治方面, 科学地将农业防治、物理防治、化学防治和生物学防治等方法相结合, 以达到专一性强、操作简单并且对人畜环境无害等要求。



QJ1-QJ6: 分别从QJ1-QJ6中分离得到根结线虫
QJ1-QJ6: Root-knot nematodes isolated from QJ1-QJ6, respectively

图5 基于mtDNA-CO I (a)和rDNA-ITS(b)构建的6份粗茎秦艽根结线虫与其他根结线虫的系统发育树
Fig.5 Phylogenetic analysis of root-knot nematodes based on the mtDNA-CO I (a) and rDNA-ITS (b) fragment sequences

参考文献

- [1] 蔡秋生, 张志红, 高慧琴. 秦艽药理作用及临床应用研究进展[J]. 甘肃中医学院学报, 2010, 27(6): 55-58.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 282.
- [3] 梁晋如, 朱砂, 张新新, 等. 粗茎秦艽的研究概况及展望[J]. 中药材, 2012, 35(3): 495-499.
- [4] 聂燕琼, 李海彦, 孙娜, 等. 粗茎秦艽资源研究进展[J]. 中国现代中药, 2012, 14(5): 37-40.
- [5] 宋九华. 丽江粗茎秦艽主要品质指标及其与土壤特征的相关性研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2015.
- [6] 刘维志. 植物病原线虫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [7] 林丽飞, 邓裕亮, 江楠, 等. 我国药用植物根结线虫病的分布与危害[J]. 云南农业大学学报, 2004, 19(6): 666-669.
- [8] 陆秀红, 黎达境, 黄金玲, 等. 栀子根结线虫病的病原鉴定[J]. 热带作物学报, 2021, 42(8): 2356-2361.
- [9] 尹庆璋, 梁秀荣, 游玉明, 等. 罗汉果根结线虫病的发生与防治[J]. 广西农学报, 2010, 25(5): 24-25.
- [10] 王柱华, 王文鹏, 吴文涛, 等. 根结线虫不同侵染程度对三七生物量及皂苷含量的影响[J]. 中药材, 2021, 44(6): 1291-1296.
- [11] 唐养璇, 张慧. 陕西商洛地区桔梗根结线虫发生规律与防治试验[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2006, 34(11): 199-202.
- [12] 杨艳梅, 刘沛, 董涵, 等. 云南省紫茎泽兰根结线虫病病原种类鉴定[J]. 植物保护学报, 2020, 47(3): 657-665.
- [13] 刘维志. 植物线虫志[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 39.
- [14] 谢辉. 植物线虫分类学[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2000: 34.
- [15] ADAM M A M, PHILLIPS M S, BLOK V C. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) [J]. Plant Pathology, 2010, 56(1): 190-197.
- [16] VRAIN T, WAKARCHUK D, LAPLANTELEVESQUE A, et al. Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group [J]. Fundamental & Applied Nematology, 1992, 15(6): 563-573.
- [17] TRINH Q P, LE T M L, NGUYEN T D, et al. *Meloidogyne daklakensis* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a new root-knot nematode associated with Robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) in the Western Highlands, Vietnam [J]. Journal of Helminthology, 2019, 93(2): 242-254.
- [18] DONG K, DEAN R A, FORTNUM B A, et al. Development of PCR primers to identify species of root-knot nematodes: *Meloidogyne arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* and *M. javanica* [J]. Nematropica, 2001, 31(2): 271-280.
- [19] 杨意伯, 张绍升. 龙眼和番石榴根际的短针中环线虫鉴定[J]. 热带作物学报, 2016, 37(7): 1370-1376.
- [20] LUC M, TAYLOR D P. *Meloidogyne hapla* [C]// CIH descriptions of plant-parasitic nematodes, 1977: 1-4.
- [21] 赵鸿, 彭德良, 朱建兰. 根结线虫的研究现状[J]. 植物保护, 2003, 29(6): 6-9.
- [22] 喻盛甫, 杨宝君, 王秋丽. 云南植物根结线虫种类调查与鉴定[J]. 云南农业大学学报, 1990, 5(4): 212-217.
- [23] 周银丽, 杨伟, 余光海, 等. 中国云南省石榴根结线虫的种类初报[J]. 华中农业大学学报, 2005, 24(4): 351-354.
- [24] 喻盛甫, 罗文富, 胡先奇, 等. 三七根腐病中线虫病病原问题的研究[J]. 云南农业大学学报, 1998, 13(3): 22-25.
- [25] 钱振官, 何重缘. 附子北方根结线虫(*Meloidogyne hapla*)的生物学和防治[J]. 上海农业学报, 1996, 12(2): 81-86.
- [26] 胡先奇, 王扬, 喻盛甫. 云南药用植物根结线虫病调查[J]. 中药材, 2001(12): 851-853.
- [27] 赵来顺, 杨彦杰. 北方根结线虫中草药寄主初步调查[J]. 植物病理学报, 1990, 20(2): 81-82.
- [28] 高月, 徐江, 郭笑彤, 等. 药用植物根结线虫病害及防治策略[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(15): 2762-2767.
- [29] 肖顺, 张绍升, 刘国坤. 淡紫拟青霉对根结线虫的防治作用[J]. 福建农业大学学报, 2006, 35(5): 463-465.
- [30] 东晔, 李云霞, 刘沛, 等. 生物活性有机肥“红土运”对番茄根结线虫病抑制的初步研究[J]. 广东农业科学, 2021, 48(6): 72-77.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 255 页)

- [17] AKBERGENOV R, SI-AMMOUR A, BLEVINS T, et al. Molecular characterization of geminivirus-derived small RNAs in different plant species [J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(2): 462-471.
- [18] MILLER W A, SHEN Ruizhong, STAPLIN W, et al. Non-coding RNAs of plant viruses and viroids: sponges of host translation and RNA interference machinery [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2016, 29(3): 156-164.
- [19] MI Shijun, CAI Tao, HU Yugang, et al. Sorting of small RNAs into *Arabidopsis* argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide [J]. Cell, 2008, 133(1): 116-127.
- [20] YE Ruiqiang, WANG Wei, IKI T, et al. Cytoplasmic assembly and selective nuclear import of *Arabidopsis* ARGONAUTE4/siRNA complexes [J]. Molecular Cell, 2012, 46(6): 859-870.

(责任编辑: 田 喆)