

海南省番石榴病原根结线虫种类鉴定

芮 凯¹, 陈绵才¹, 郭安平², 肖彤斌¹, 谢圣华¹, 吴凤芝¹, 廖金铃³

(1 海南省农业科学院 植物保护研究所, 海南 海口 571100; 2 中国热带农业科学院 生物技术研究所以, 海南 海口 571101; 3 华南农业大学 植物线虫研究室, 广东 广州 510642)

摘要:运用形态学方法,结合同工酶电泳和线粒体 DNA 标记技术,对采自海南省 10 市县的 28 个番石榴根结线虫种群进行鉴定,明确了 25 个种群为湛江根结线虫 *Meloidogyne zhanjiangensis*、2 个种群为番禺根结线虫 *M. panyuensis*、1 个种群为南方根结线虫 *M. incognita*,湛江根结线虫是危害海南省番石榴的优势种群. 文中对根结线虫的鉴定技术与方法作了讨论.

关键词:番石榴;根结线虫;种类;鉴定
中图分类号:S432.45 文献标识码:A 文章编号:1001-411X(2005)04-0053-06

The identification of guava root-knot nematodes in Hainan Province

RUI Kai¹, CHEN Mian-cai¹, GUO An-ping², XIAO Tong-bin¹,
XIE Sheng-hua¹, WU Feng-zhi¹, LIAO Jin-ling³

(1 Institute of Plant Protection, Hainan Province Academy of Agricultural Sciences, Haikou 571100, China;
2 Institute of Biological Sciences, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China;
3 Lab of Plant Nematology, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Twenty eight root-knot nematode populations on *Psidium guajava* were collected from Hainan Province. Based on morphology, isozyme and mtDNA, 25 populations were identified as *Meloidogyne zhanjiangensis*, 2 populations as *M. panyuensis* and 1 population as *M. incognita*. It was showed that *M. zhanjiangensis* was the predominant species. The technology and methods of identification on root-knot nematode were discussed in the paper.

Key words: *Psidium guajava*; *Meloidogyne* spp.; species; identification

根结线虫是一类在农作物上危害极大的植物寄生性线虫,根据国内外的资料,到目前为止,已描述的根结线虫有 90 多种^[1]. 番石榴是海南省栽培的一种热带珍稀特色水果,根结线虫对其危害相当严重,由于对该病害缺乏适当的防范技术,造成移栽苗至少有 60% 带病,移植 1 年以上的果园番石榴植株发病率也很高,移栽时未采取防治措施或措施不得当,1 年内可造成大量死株,能存活者亦大多长势衰弱,3 年后整园毁灭. 而所有番石榴品种对根结线虫高度敏感是该病逐年加剧的关键因素. 据对已挂果的 3 龄以上果园抽样调查,果园和植株发病率均为

100%,根结指数为 3.0 以上. 关于该病病原,国内殷友琴^[2]和陈绵才^[3]曾作过描述. 笔者运用形态学、同工酶电泳和线粒体 DNA 标记技术三者相结合的方法对海南省番石榴病原根结线虫进行了系统鉴定.

1 材料与方法

1.1 样本的采集和保存

广泛采集海南省 10 市县番石榴产区的根结线虫样本(表 1),采集时,取具“结节状”明显的新病根及根际土壤,将病根、病土接种于经消毒的盆栽感病番茄植株上,进行活体繁殖和保存,待用.

收稿日期:2005-01-24 作者简介:芮凯(1979-),男,硕士研究生. 通讯作者:陈绵才(1959-),男,研究员;
E-mail:mcchen@263.net
基金项目:海南省自然科学基金资助项目(琼科[2002]203 号);海南省科研院所科学事业费资助项目(琼科[2001]48 号)

表1 番石榴根结线虫种群样本的采集
Tab.1 Sample collection of root-knot nematode populations of *Psidium guajava*

序号 no.	寄主 host	采集地点 locality
1	珍珠番石榴	海南海口市谭文镇
2	珍珠番石榴	海南省农业学校
3	珍珠番石榴	海南琼山市三门坡黄岭村 A
4	珍珠番石榴	海南文昌市文城镇
5	珍珠番石榴	海南海口市灵山镇晋文村
6	珍珠番石榴	海南琼山市红旗镇吴典村
7	珍珠番石榴	海南琼山市三门坡黄岭村 B
8	珍珠番石榴	海南海口市甲子镇大昌管区
9	珍珠番石榴	海南琼山市三江镇岭下村
10	野生番石榴	海南万宁市山根镇
11	珍珠番石榴	海南文昌市会文镇湖峰村 A
12	四季番石榴	海南乐东县利国镇乐萝村 B
13	珍珠番石榴	海南琼海市塔洋镇 A
14	四季番石榴	海南乐东县利国镇 A
15	珍珠番石榴	海南三亚市台农公司
16	珍珠番石榴	海南文昌市会文镇湖峰村 B
17	珍珠番石榴	海南文昌市会文镇湖峰村 B
18	珍珠番石榴	海南临高县美台绿健庄园
19	珍珠番石榴	海南昌江县十月田镇
20	本地番石榴	海南琼海市长坡镇
21	珍珠番石榴	海南琼海市塔洋镇 B
22	珍珠番石榴	海南琼海市塔洋镇 B
23	珍珠番石榴	海南三亚市田独镇
24	珍珠番石榴	海南陵水县英州镇
25	珍珠番石榴	海南澄迈县福山镇龙德庄园
26	本地番石榴	海南白沙县芙蓉田农场
27	珍珠番石榴	海南定安县大底村
28	珍珠番石榴	海南定安县大底村

1.2 纯化培养和种类鉴定

将番石榴根结置于解剖镜下,挑取色泽淡黄、大而饱满的优质单卵块,接种到预先培育在消毒土壤、具4~5片真叶的感病番茄幼嫩根尖部,在温室中培养40~60 d.

采用形态学^[4~12]、生物化学方法^[13~15]和线粒体DNA标记技术^[16,17],比较和鉴定根结线虫种类.解剖镜下用解剖针和镊子从接种发病的番茄根结中分离雌虫和卵,二龄幼虫由卵孵化直接获得,按培育分离法原理分离雄虫^[18].解剖镜下将分离到的成熟雌虫移入硬塑料板上的蒸馏水滴中,依Hartman等^[7]的方法制作会阴花纹,在显微镜下观察会阴花纹的形态特征并拍照.观察头部特征、尾部特征等;测计体长、最大体宽、口针长、口针基部球高、口针基部球

宽、背食道腺开口至口针基部球的距离(DEGO)、排泄孔距头端的距离、交合刺长、尾长、透明尾长和 α 值等.雌虫、雄虫、幼虫各测量20条.

1.3 酯酶(Est)和苹果酸脱氢酶(Mdh)的电泳

采集番茄上的新鲜根结,挑取产卵盛期的健壮雌虫20头左右于1.5 mL离心管中,用次氯酸钠溶液消毒后,加20 μ L酶浸提液于离心管中,用与离心管相配套的研磨棒研碎,加20 μ L浸提液清洗玻棒,12 000 r/min离心10 min,取上清液35 μ L上样或于-20 $^{\circ}$ C冷冻冰箱中保存.每个孔点样35 μ L,在1 $\times$ Tris-Gly电泳缓冲液中、80 V下电泳,约需5~6 h,先在暗橱内Mdh染色5~10 min后,用蒸馏水漂洗胶片,然后进行Est染色,37 $^{\circ}$ C水浴30~45 min.在固定液[10%(φ)醋酸和10%(φ)甘油]中固定2 h以上,取出用清水漂洗,然后用数码相机拍照或制干胶保存.

1.4 线粒体DNA鉴定

DNA提取参照美国Williamson等^[19]和廖金铃^[20]的方法稍作修改,采用大量DNA提取法.利用Powers等^[17]设计的引物#C2F3和#1108,序列分别为5'-GGTCAATGTTTCAGAAATTTGTGG-3'和5'-TAC-CTTTGACCAATCACGCT-3',分别位于线粒体DNA中的COII基因和17S rRNA基因^[17].

反应体系:2.5 μ L 10 $\times$ PCR缓冲液;0.5 μ L dNTP(每一核苷酸为10 μ mol/L);1 μ L引物#C2F3;1 μ L引物#1108;0.5 μ L 5 U Taq酶;无菌水17.5 μ L;DNA悬浮液2 μ L.

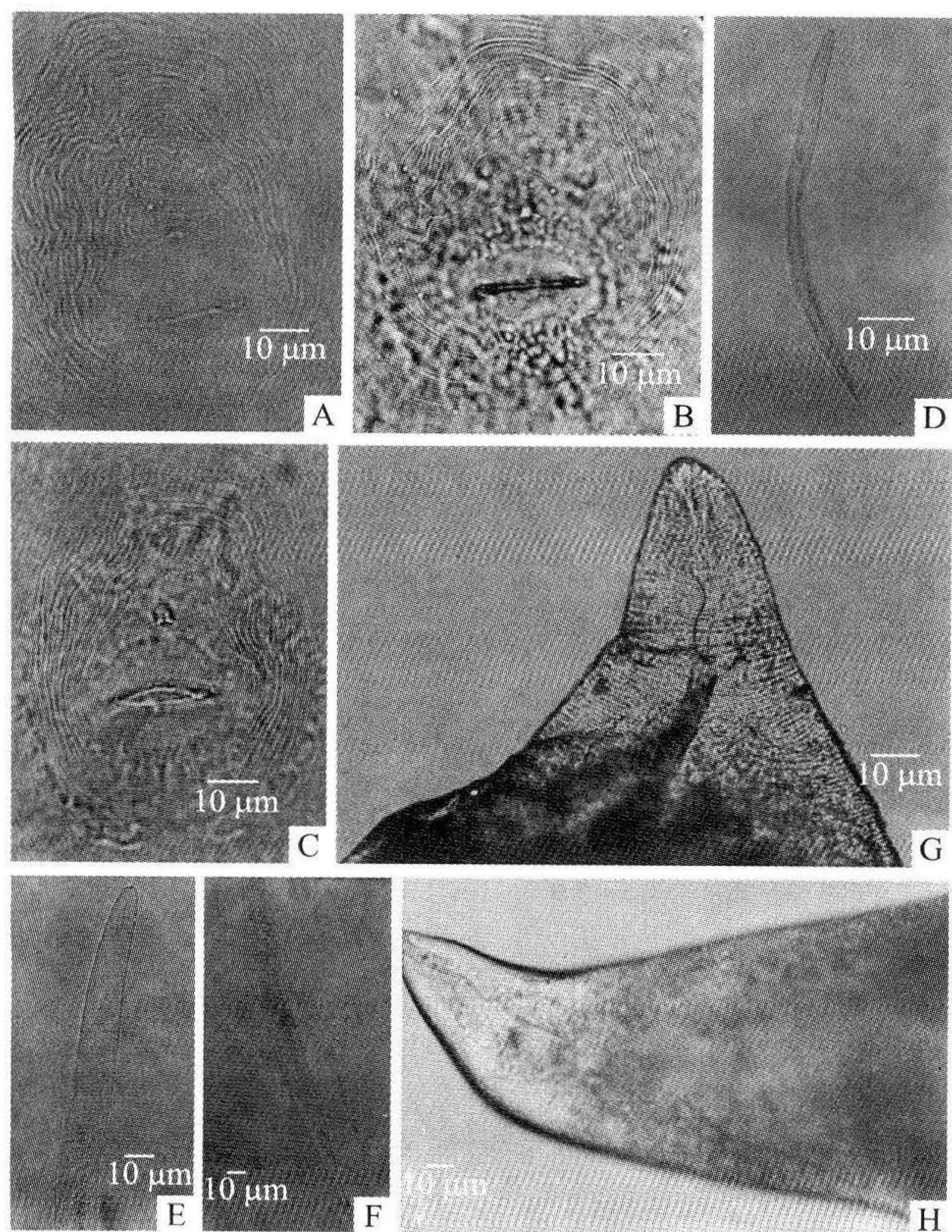
扩增条件:94 $^{\circ}$ C预变性4 min,94 $^{\circ}$ C 1 min,50 $^{\circ}$ C 1 min,70 $^{\circ}$ C 2 min,共40个循环,再在72 $^{\circ}$ C延伸5 min.

配制1.5 g/L琼脂糖凝胶,待凝胶冷却至约60 $^{\circ}$ C时,加入EB,使EB终质量浓度为0.5 μ g/mL;取15 μ L PCR扩增产物与1 μ L DNA载样缓冲液(含2.5 g/L溴酚兰,400 g/L蔗糖)混匀上样;在1 $\times$ TBE缓冲液中以8 V/cm电压电泳约30 min.在紫外灯下观察,用凝胶图象分析系统照相.

2 结果与分析

2.1 根结线虫种类鉴定

2.1.1 形态鉴定 对采自海南省番石榴主产区的28个根结线虫种群分别进行了单卵块纯化培养,发现混合种群3个(占12%),获得纯培养28个.依据根结线虫雌虫、雄虫、2龄幼虫的主要鉴别特征,通过形态特征观察和描述、主要形态特征的测量值,结合形态特征的质量和数量性状,运用比较形态学的方法,初步鉴定出3个种(图1).



A: 湛江根结线虫会阴花纹; B: 番禺根结线虫会阴花纹; C: 南方根结线虫会阴花纹; D: 湛江根结线虫二龄幼虫; E: 湛江根结线虫二龄幼虫前端; F: 湛江根结线虫二龄幼虫尾部; G: 湛江根结线虫雌虫前端; H: 番禺根结线虫雌虫前端

A: perineal pattern of *M. zhanjiangensis*; B: perineal pattern of *M. panyuensis*; C: perineal pattern of *M. incognita*; D: second-stage juvenile of *M. zhanjiangensis*; E: larvae head of *M. zhanjiangensis*; F: larvae tail shape of *M. zhanjiangensis*; G: female anterior of *M. zhanjiangensis*; H: female anterior of *M. panyuensis*

图1 番石榴根结线虫形态

Fig. 1 The morphology of *Meloidogyne* of *Psidium guajava*

(1) 湛江根结线虫 *M. zhanjiangensis* (序号为 1 ~ 16, 18 ~ 20, 22 ~ 27). 雌虫: 体长 705.8 (535.5 ~ 908.0) μm , 最大体宽 510.6 (375.0 ~ 702.0) μm , 颈长 185.8 (137.0 ~ 321.0) μm , 口针长 11.8 (11.5 ~ 12.3) μm , DEGO 3.4 (3.0 ~ 3.6) μm , 中食道球高 41.2 (34.6 ~ 43.2) μm , 中食道球宽 38.5 (34.0 ~ 43.5) μm , 阴门长 25.0 (22.5 ~ 28.8) μm , 肛阴距 17.5 (16.3 ~ 20.0) μm , $a = 1.4$ (1.2 ~ 1.8). 虫体球形至梨形, 颈区明显; 头区缢缩, 头帽清晰, 唇盘稍高于中唇; 口针清晰, 基部球粗大, 从杆状部基部开始向后弯曲, 排泄孔位于中食道球附近; 会阴花纹近卵圆形, 有时近方形, 背弓低至中高, 线纹细, 平滑至波浪状, 尾尖区环纹不规则, 细碎, 背、腹线纹在侧区稍有相交现象; 腹区环纹较平缓细密, 会阴花纹形态变化较大.

雄虫: 体长 1 478.0 (1 270.0 ~ 1 708.0) μm , 最

大体宽 32.6 (27.8 ~ 35.6) μm , 头端至中球中部长 90.6 (84.6 ~ 101.0) μm , 头端至排泄孔长 115.4 (98.5 ~ 138.5) μm , 口针长 22.1 (20.0 ~ 23.6) μm , DEGO 4.5 (3.8 ~ 5.3) μm , 交合刺长 30.5 (25.5 ~ 36.5) μm , $a = 45.8$ (38.9 ~ 53.0). 虫体线形, 虫体前端较细, 后端较粗, 虫体较小; 体表环纹细小, 头部稍缢缩; 口针直, 圆锥体部尖, 杆状部与基部球分界清楚; 中食道球卵圆形, 瓣膜清楚; 背食道腺开口位于口针基部球下; 交合刺细, 稍弯向腹面.

二龄幼虫: 体长 407.8 (321.5 ~ 474.6) μm , 最大体宽 13.4 (13.6 ~ 14.8) μm , 口针长 14.3 (13.8 ~ 15.2) μm , 尾长 46.5 (39.0 ~ 51.6) μm , 透明尾长 11.0 (8.3 ~ 16.8) μm , DEGO 4.0 (3.6 ~ 4.3) μm , 中食道球高 14.0 (12.0 ~ 17.0) μm , 中食道球宽 8.0 (7.5 ~ 10.2) μm , $a = 28.0$ (27.0 ~ 33.0), $c = 8.6$ (8.0 ~ 9.5). 虫体中等长, 线形, 两端渐细, 头部稍缢缩, 唇盘稍高于中唇; 口针纤细, 较长, 口针圆锥体部前端尖, 与杆状部交界处较粗, 基部球清晰; 末端较细圆; 透明尾较长, 直肠稍膨大; 背食道腺开口位于口针基部球下, 食道腺覆盖肠的前端.

(2) 番禺根结线虫 *M. panyuensis* (序号为 17, 21). 雌虫: 体长 620.5 (490.1 ~ 745.8) μm , 最大体宽 455.5 (440.5 ~ 578.0) μm , 颈长 135.5 (80.0 ~ 175.0) μm , 头端至排泄孔长 34.6 (32.0 ~ 38.0) μm , 头端至中食道球中部长 77.5 (73.6 ~ 88.2) μm , 口针长 13.0 (13.0 ~ 14.0) μm , 口针基部球高 3.0 (2.6 ~ 3.2) μm , 口针基部球宽 5.0 (4.4 ~ 5.2) μm , DEGO 10.8 (8.8 ~ 13.0) μm .

虫体球形至梨形, 有一明显的颈部; 虫体大小变异大; 头部和颈部界限不明显, 头部骨骼不发达; 头区有不完整的环纹; 颈部环纹清晰, 虫体后部环纹不明显; 排泄孔开口位于距头端第 22 个环纹约 2 个口针长度地方; 口针纤细, 基部球清晰可见; 会阴花纹近圆形至卵圆形, 线纹平滑, 背腹线纹通常连贯, 但尾尖区环纹不规则, 靠近两侧花纹多为纵纹, 较粗, 不连接; 肛阴区无线纹.

雄虫: 体长 1 900.5 (1 780.0 ~ 2 010.5) μm ; 最大体宽 45.0 (43.5 ~ 52.5) μm ; 头端至排泄孔长 158.2 (130.0 ~ 198.5) μm ; 头端至中食道球中部长 95.0 (85.0 ~ 103.5) μm ; 口针长 25.0 (22.5 ~ 27.0) μm ; 口针基部球高 2.5 (2.5 ~ 3.0) μm ; 口针基部球宽 5.0 (4.0 ~ 6.0) μm ; DEGO 6.0 (5.0 ~ 7.0) μm ; 中食道球高 18.8 (18.5 ~ 21.2) μm ; 中食道球宽 16.5 (14.6 ~ 17.0) μm ; $a = 40.6$ (33.8 ~ 44.0). 虫体较粗大, 线形, 两端渐细; 头部稍微缢缩, 头骨骼发

达,具有较大的唇盘;体表环纹粗,唇区无环纹;口针强大,顶端尖,口针圆锥体部、杆状部和3个基部球界限明显;食道前体部管状,中食道球大,椭圆形;食道腺覆盖肠的前端;尾部稍微向腹部弯曲,端部钝圆;交合刺强壮。

二龄幼虫:体长 408.0 (353.5 ~ 452.0) μm ;最大体宽 16.5 (15.5 ~ 18.5) μm ;尾长 54.0 (48.0 ~ 55.0) μm ;透明尾长 9.5 (8.0 ~ 10.5) μm ;头端至中食道球中部长 61.0 (55.5 ~ 67.0) μm ;头端至排泄孔长 77.5 (77.5 ~ 82.0) μm ;口针长 14.8 (14.0 ~ 15.2) μm ;中食道球高 14.5 (12.6 ~ 15.2) μm ;中食道球宽 10.5 (8.5 ~ 12.0) μm ;DEGO 4.0 (3.2 ~ 4.6) μm ; $a = 24.0$ (20.0 ~ 30.5); $c = 7.5$ (6.0 ~ 8.5)。虫体线形,两端渐细,尾部比头端细;体表具细小环纹,头部无环纹,尾部环纹不规则;头部和身体界限明显;唇盘稍微高于中唇,口针不太直,有3个和杆部界限明显的基部球;食道覆盖肠的前端;尾部渐细、端部尖、具明显透明区。

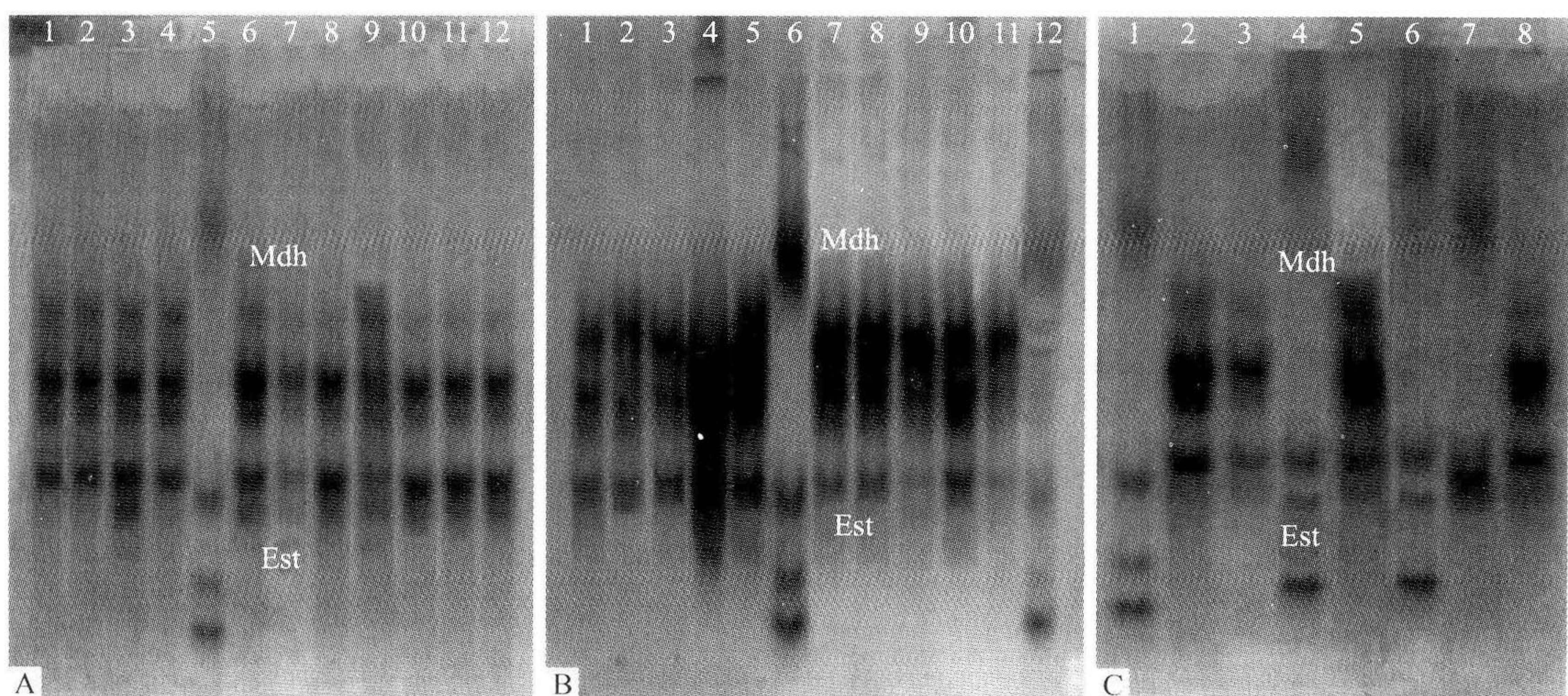
(3)南方根结线虫 *M. incognita* (序号为28)。雌虫:体长 580 (483.5 ~ 698.5) μm ;最大体宽 401.5 (316.5 ~ 538) μm ;口针长 13.5 (12.8 ~ 15.6) μm ;DEGO 3.2 (2.5 ~ 4.5) μm ;中食道球高 51.5 (32.0 ~ 60.2) μm ;中食道球宽 40.5 (29.0 ~ 48.5) μm ;中食道球瓣膜长 15.5 (14.0 ~ 16.5) μm ;中食道球瓣膜宽 12.5 (11.0 ~ 13.5) μm 。虫体膨大,呈球形或洋梨形,有明显突出的颈部;唇区稍突起,略呈帽状;排

泄孔在口针基部球水平处;会阴花纹呈椭圆或近圆形,背弓较高,背弓顶部圆或平,有时呈梯形,背纹紧密。

雄虫:体长 1 340.0 (1 007.5 ~ 1 674.0) μm ;最大体宽 35.1 (33.2 ~ 40.0) μm ;口针长 24.5 (22.5 ~ 40.0) μm ;DEGO 2.2 (1.5 ~ 3.0) μm ; $a = 41.5$ (30.5 ~ 50.6)。虫体线形,头冠高,唇盘大、中央凹陷,头部常有2~3个完整的环纹;口针锥体部尖端钝圆,杆部为圆柱形,在近基部球处较窄,基部球与杆部界限明显。

二龄幼虫:体长 390 (352 ~ 478) μm ;口针长 10.5 (9.5 ~ 12.0) μm ;尾长 47.5 (43.0 ~ 50.2) μm ;透明尾长 14.5 (11.5 ~ 21.5) μm ; $a = 8.5$ (8.1 ~ 9.5)。虫体线形,头冠前端平,较宽大,口针锥和基杆中度大小,口针基部球突出,向后渐圆,向背面倾斜。

2.1.2 同工酶电泳 运用常规聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,对纯化培养的28个种群雌虫的酯酶、苹果酸脱氢酶进行电泳分析(图2)。参照 Esbensen 等^[13-15]的研究报道,28个种群中,2个种群(17,21号)的酯酶谱型为 S1-M1-F1,苹果酸脱氢酶谱型为 N1p,与已报道的番禺根结线虫相同。1个种群(28号)的酯酶谱型为 I1,苹果酸脱氢酶谱型为 N1,与已报道的南方根结线虫相同^[13-15,20],其他25个种群的酯酶谱型为 VS1-S1,苹果酸脱氢酶谱型为 N1a,与已报道的湛江根结线虫相同。



A:5 为参考种群爪哇根结线虫,其余为湛江根结线虫;B:6 和 12 为参考种群爪哇根结线虫,其余为湛江根结线虫;C:1 为参考种群爪哇根结线虫,4 和 6 为番禺根结线虫,7 为南方根结线虫,其余为湛江根结线虫。

A:5 is control *M. javanica*, others are *M. zhanjiangensis*; B:6 and 12 are control *M. javanica*, others are *M. zhanjiangensis*; C:1 is control *M. javanica*, 4 and 6 are *M. panyuensis*, 7 is *M. incognita*, others are *M. zhanjiangensis*.

图2 番石榴根结线虫种群的同工酶电泳图谱

Fig. 2 phenotypes of malate dehydrogenase (Mdh) and esterases (Est) helpful in differentiating three species of *Meloidogyne* of *Psidium guajava*

2.1.3 线粒体 DNA 在鉴定中的应用 对 28 个种群进行线粒体 DNA 扩增的结果见图 3。由图 3 可见,有 25 个种群的扩增片段长是 0.7 kb, 2 个种群的扩增片段长是 0.5 kb(17, 21 泳道), 1 个种群的扩增片段长是 1.7 kb(28 泳道), 参照 Powers 等^[21] 的关于根

结线虫线粒体 DNA 鉴定标准和廖金铃^[20] 的 2 个新种的鉴定结果, 这 3 个不同扩增片段长度的种群分别为湛江根结线虫、番禺根结线虫和南方根结线虫, 这一结果与本文形态学和同工酶试验结果相吻合。

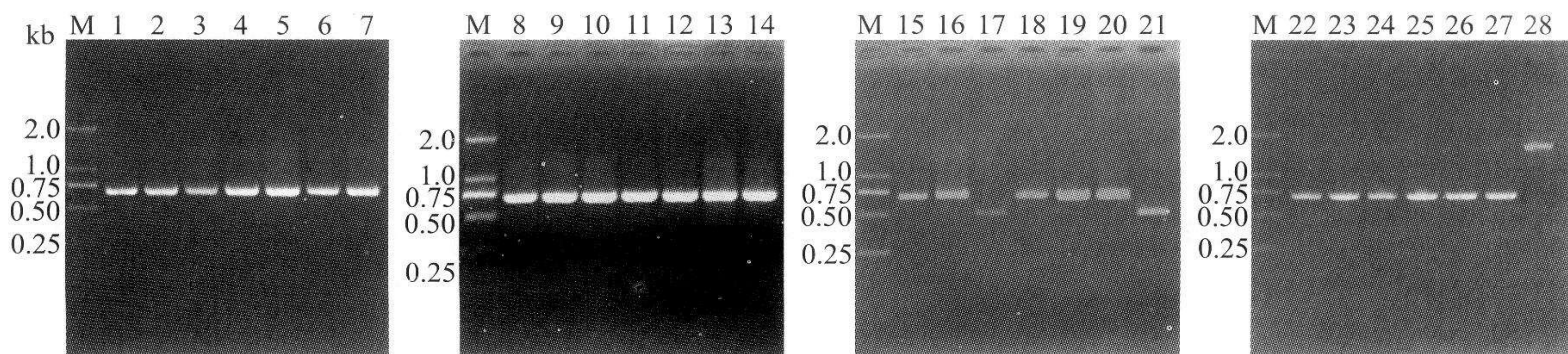


图 3 番石榴根结线虫线粒体 DNA 扩增片段电泳图谱序号(序号 1~28 表示的种群见表 1)

Fig. 3 Electrophoretogram of mtDNA of *Meloidogyne* of *Psidium guajava*

2.2 鉴定结果

据形态学鉴定、同工酶图谱分析、线粒体 DNA 扩增片段分析, 对照文献资料, 最终有 25 个种群鉴定为湛江根结线虫 *Meloidogyne zhanjiangensis* n. sp Liao(2001), 占鉴定总数的 89.3%; 2 个种群鉴定为番禺根结线虫 *M. panyuensis* Liao(2001), 占 7.1%; 1 个种群鉴定为南方根结线虫 *M. incognita* (Kofoid and White, 1919) Chitwood(1949), 占 3.6%。这一结果表明, 海南省番石榴根结线虫的优势种群为湛江根结线虫。

3 讨论与结论

经过对会阴花纹形态特征的仔细对比观察, 发现其在种内和种间变化都较大, 不宜单独作为鉴定特征进行鉴定。

利用线虫的比较形态学、同工酶电泳和线粒体 DNA 相结合的方法进行根结线虫的分类鉴定, 是近年来在国际根结线虫分类领域出现的一个先进的方法, 它在分类上的客观性和准确性已得到国际的公认。目前国内外鲜见对番石榴根结线虫进行系统分类鉴定研究的报道。当前国内多认为南方地区根结线虫的优势种群为南方根结线虫 1 号小种, 笔者目前的研究结果与以往单独依靠形态学进行分类鉴定的研究结果有很大的不同, 说明这种系统性的研究是必要的和可信的。

来自海南省 10 市县的 28 个根结线虫纯化种群, 根据线虫形态学、同工酶电泳和线粒体 DNA 扩增片段大小, 最终确定番石榴根结线虫种类为湛江根结线虫、番禺根结线虫和南方根结线虫, 其中前 2 种为近 2 年鉴定的新种。在所鉴定的 28 个纯化种群中, 有 25 个种群为湛江根结线虫, 2 个为番禺根结线

虫, 1 个为南方根结线虫。在所采集的 25 个原始种群中, 3 个为混合种群, 其中 2 个为湛江根结线虫与番禺根结线虫的混合种群, 1 个为湛江根结线虫与南方根结线虫的混合种群。可见湛江根结线虫是寄生于海南番石榴上的优势种群, 这为今后开展根结线虫病的综合防治, 特别是对根结线虫抗性资源的筛选工作提供了重要依据。

参考文献:

- [1] KARSSSEN G. The plant-parasitic nematode genus *Meloidogyne* Goldi, 1892 (Tylenchida) in Europe [M]. Gent: University of Gent, 1999. 1 - 161.
- [2] 殷友琴, 杨宝君, 王秋丽. 30 种作物根结线虫病的病原鉴定[J]. 华南农业大学学报, 1994, 15(1): 22 - 26.
- [3] 陈绵才, 肖彤斌, 谢圣华. 海南省主要栽培果树根结线虫病及其防治[J]. 热带农业科学, 2004, 24(6): 8 - 12.
- [4] EISENBACK J D. Detailed morphology and anatomy of second-stage juveniles, males and females of genus *Meloidogyne* (root-knot nematodes) [A]. SASSER J N, CARTER C C. An advance treatise on *Meloidogyne* (Vol I) — Biology and control [C]. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1985. 46 - 77.
- [5] EISENBACK J D. Diagnostic characters useful in the identification of the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp) [A]. SASSER J N, CARTER C C. An advance treatise on *Meloidogyne* (Vol I) — Biology and control [C]. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1985. 95 - 112.
- [6] EISENBACK J D, TRIANTAPHYLLOU H H. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races [A]. NICKLE W R. Manual of agricultural nematology [C]. New York: Marcel Dekker, INC, 1991. 191 - 274.
- [7] HARTMAN K M, SASSER J N. Identification of *Meloido-*

- gyne species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology [A]. BARKAR K R, CARTER C C, SASSER J N. An advance treatise on *Meloidogyne* (Vol II)——Methodology [C]. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1985. 69 – 78.
- [8] HIRSCHMANN H. The genus *Meloidogyne* and morphological characters differentiating its species [A]. SASSER J N, CARTER C C. An advance treatise on *Meloidogyne* (Vol I)——Biology and control [C]. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1985. 79 – 93.
- [9] 刘维志, 刘 晔, 周国梁, 等. 植物线虫学研究技术 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1995. 200 – 202.
- [10] 王明祖. 中国植物线虫研究 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998. 195 – 208.
- [11] 谢 辉. 植物线虫分类学 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2000. 20 – 80.
- [12] TAYLOR L, SASSER J N. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species) [M]. Carolina: North Carolina State University, 1978. 1 – 111.
- [13] ESBENSHADE P R, TRIANTAPHYLLOU H H. Use of enzyme phenotype for identification of *Meloidogyne* species (Nematoda: Tylenchida) [J]. Journal of Nematology, 1985, 17(1): 6 – 20.
- [14] ESBENSHADE P R, TRIANTAPHYLLOU A C. Electrophoretic methods for the study of root-knot nematodes [M]. Carolina: North Carolina State University, 1985. 115 – 123.
- [15] ESBENSHADE P R, TRIANTAPHYLLOU H H. Isozyme phenotype for identification of *Meloidogyne* species [J]. Journal of Nematology, 1990, 22(1): 10 – 15.
- [16] HARRIS T S, SANDALL L J, POWERS T O. Identification of single *Meloidogyne* juveniles by polymerase chain reaction amplification of mitochondrial DNA [J]. Journal of Nematology, 1990, 22(4): 518 – 524.
- [17] STANTON J, HUGALL A, MORITZ C. Nucleotide polymorphisms and an improved PCR-based mtDNA diagnostic for parthenogenetic root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp) [J]. Fundamental and Applied Nematology, 1997, 20(30): 261 – 268.
- [18] 方中达. 植病研究方法 [M]. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 1998. 308 – 309.
- [19] WILLIAMSON V M, CASWELL CHEN E P, WESTERDAHL B B, et al. A PCR assay to identify and distinguish single juvenile of *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi* [J]. Journal of Nematology, 1997, 29(1): 9 – 15.
- [20] 廖金铃. 根结线虫的鉴定及其 DNA 多态性研究 [D]. 广州: 华南农业大学资源环境学院, 2001.
- [21] POWERS T O, HARRIS T S. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species [J]. Journal of Nematology, 1993, 25(1): 1 – 6.

【责任编辑 周志红】