

四川省茂县花椒根结线虫病病原鉴定

王曦茁¹, 汪来发^{1*}, 杨佐忠², 刘子雄², 余明忠³

(1. 中国林业科学研究院森林生态与保护研究所, 国家林业局森林保护学重点实验室, 北京 100091;

2. 四川省森林病虫害防治检疫站, 成都 610081; 3. 四川省茂县林业局, 茂县 623200)

摘要 为明确四川省茂县花椒根结线虫的种类, 通过根结线虫雌虫和 2 龄幼虫的形态特征及雌成虫的会阴花纹、雌虫酯酶同工酶及分子生物学检测(rDNA-ITS 区和 rDNA-IGS 区), 对花椒根结线虫进行了种类鉴定。三种方法的结果均表明在茂县地区花椒上发现的根结线虫为北方根结线虫(*Meloidogyne hapla*), 这是我国首次报道在花椒上发现北方根结线虫病, 四川省是北方根结线虫新的分布区。

关键词 北方根结线虫; 鉴定; 花椒

中图分类号: S 435.73 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2014.04.016

Identification of the root-knot nematode on pepper in Mao County, Sichuan Province

Wang Xizhuo¹, Wang Laifa¹, Yang Zuozhong², Liu Zixiong², Yu Mingzhong³

(1. Key Laboratory of Forest Protection of State Forestry Administration, Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, CAF, Beijing 100091, China; 2. General Station for Forest Disease and Pest Control and Quarantine of Sichuan Province, Chengdu 610081, China; 3. Forestry Bureau of Mao County, Sichuan 623200, China)

Abstract To confirm the nematode species observed on the pepper *Zanthoxylum bungeanum* in Mao County, Sichuan Province, an investigation was performed in this region from April to September in 2011. Morphological test (perineal patterns and second-stage juveniles), biochemical study (esterase isozyme) and molecular characterization (rDNA-ITS and rDNA-IGS) were used to identify the species. The results showed that the pepper root-knot nematode belonged to *Meloidogyne hapla* Chitwood. This is the first report of *M. hapla* on *Z. bungeanum* in China and its occurrence in Sichuan Province.

Key words *Meloidogyne hapla*; identification; *Zanthoxylum bungeanum*

花椒(*Zanthoxylum bungeanum* Maxim)为芸香科花椒属落叶小乔木或灌木, 原产于我国, 是重要的木本油料和香料树种, 因适应性强, 分布广和收益大, 深受群众欢迎^[1]。我国自 1999 年实行退耕还林工程以来, 四川省在退耕地大力种植花椒, 目前已成为许多地区农业支柱产业和高半山农民增收致富的主要途径之一。2005 年以来, 四川阿坝州茂县部分乡镇的花椒幼树植株矮小, 叶片发黄、失绿, 生长缓慢, 最后植株枯死, 严重地块死亡率达到 30%~50%。花椒根及根尖处形成许多小米粒或绿豆粒大小形状不规则的根结, 随后侧根也出现大小不等、表面粗糙的形状不规则根结, 表面为褐色至深褐色, 根

结表面又长出许多细的分枝须根, 单株根结有的多达百个以上, 主要分布在 0~30 cm 土层。剖开根结见有白色梨形雌虫, 即花椒树感染了根结线虫。我国学者虽对花椒病害进行了广泛的研究^[2], 仅有一位学者提及花椒苗感染南方根结线虫[*Meloidogyne incognita* (Kofoed & White) Chitwood]^[3], 至今未见花椒根结线虫病的详细报道。随着经济发展, 作为茂县的支柱产业, 茂县的花椒栽植面积在不断扩大, 根结线虫病造成的经济损失也在逐年增加, 为了明确茂县花椒根结线虫病的病原种类, 在 2011 年 4 月—9 月间, 笔者采集四川茂县影响严重的花椒根结线虫样品, 通过花椒根结线虫形态观察测量、雌成

收稿日期: 2013-09-24

修订日期: 2013-11-15

基金项目: 科技部农业科技成果转化资金项目(2010GB24320615)

* 通信作者 Tel: 010-62889529; E-mail: nema@caf.ac.cn

虫会阴花纹、同工酶的酯酶谱带特征和分子生物学特征分析,明确了该县花椒根结线虫病的病原种类,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 花椒根结线虫的采集

在四川省茂县白溪乡和叠溪镇花椒种植区采集感病花椒样品,使用随机取样法,采集长有根结的根及其周围的病土,病土采自土壤表层 5~30 cm 处,每个地块随机采 5 个点,混匀后放入同一个采集袋内,做好标记。将采集的标样带回实验室,以单卵块接种在灭菌土中培养的刚长出两片真叶的易感病番茄幼苗的土中,培养 2 个月,用于后期鉴定^[4]。

1.2 花椒根结线虫的获得

雌虫的分离和收集:单卵块繁殖 60 d 后,取被感染的番茄根,在体视显微镜下将根结表皮用镊子或针尖轻轻拨开,剖面上乳白色的光滑球状物即为根结线虫的雌虫,用解剖针轻轻拨出,放入水中待用。

2 龄幼虫的收集:单卵块繁殖 60 d 后,采集被感染的番茄根清水洗净,剪成 3 cm 小段,装入 500 mL 三角瓶中,配制体积分数 1% 次氯酸钠溶液,在上述三角瓶中倒入 200~300 mL 次氯酸钠溶液,封口后猛摇 3 min,立即用蒸馏水冲洗数次,先后过 200 目和 500 目筛,用蒸馏水反复冲洗留在 500 目筛子上的卵,最后用无菌水冲洗收集于无菌的小烧杯中。将上述卵放于 26 ℃ 无菌培养箱中孵化 3 d,得到根结线虫的 2 龄幼虫。

1.3 形态学鉴定

1.3.1 雌虫主要形态特征观察测量

观察头部特征、口针特征等。测量 20 条线虫体长、最大体宽、口针长和 DEGO(背食道腺开口至口针基部球的距离)等形态指标。

1.3.2 2 龄幼虫主要形态特征观察测量

观察头部特征、尾部特征等。共观测 20 条线虫。主要测计的指标为体长、最大体宽、口针长、DEGO 和尾长。

1.3.3 雌虫会阴花纹的制作和观察

在体视显微镜下解剖根结,挑取成熟雌虫 20 条。将雌虫移入硬塑料板上的一滴体积分数 45% 乳酸中,用解剖刀切取下尾端(虫体后部约 1/4 处),将尾端的体内组织去掉,切除尾端表皮多余的

部分,仅留下会阴花纹部分。将会阴花纹转移至一块载玻片上的纯甘油滴中,一个玻片上放 10 块会阴花纹,以 AFG 液为浮载剂,用树脂封片,制成永久玻片。在显微镜下观察会阴花纹的形态特征并拍照。

1.4 同工酶分析

取 5 μ L 浸提液(20% 蔗糖+2% TritonX-100)移至自制研磨管中,解剖镜下分离一个刚开始产卵的雌虫,转入管内浸提液中,用自制的圆头磨面小玻璃棒充分研磨,补加 10 μ L 浸提液。至 -20 ℃ 冷冻保存。参考 Esbenshade 和 Triantaphyllou 等的方方法应用垂直板聚丙烯凝胶电泳做酯酶分析^[5]。聚丙烯酰胺浓度分别为 2.5% 和 7.5%。凝胶板大小为 150 mm $\times$ 120 mm,凝胶厚度 1.5 mm,电极缓冲液是 pH 8.3 的 Tris-盐酸缓冲液。每孔加样量为 20 μ L(含浓度为 1 mg/mL 溴酚蓝溶液),电泳前 30 min 电压设在 80 V,之后将其稳定在 190 V,电泳进行约 2 h,直到溴酚蓝指示条带迁移距离达到 10 cm。酯酶染色参照胡凯基方法^[6]。显色完全后蒸馏水漂洗 3 次,在固定液(10% 醋酸+10% 甘油)中固定 3 h 以上,酯酶表型的命名参照 Esbenshade 和 Triantaphyllou 等^[5]的标准,以已鉴定的北方根结线虫(*M. hapla*)样本(中国农业大学贾克功教授提供)作为参照系判读酯酶谱型,初步确定根结线虫的种类,每个样品做 3 个重复。

1.5 分子生物学鉴定

1.5.1 根结线虫 DNA 提取

在解剖镜下从组织内挑取 1 头雌虫置于载玻片上,无菌水冲洗 3 次,滴 10 μ L 预冷的线虫裂解液(10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA pH 8.0, 0.25 mol/L NaCl, 1% SDS)在虫体上,用枪头压碎后从载玻片上吸取尽可能多含线虫物质的裂解液放入预先装有 10 μ L 无菌水的离心管中,加入 2 μ L 的 1 mg/mL 蛋白酶 K 并快速加入液氮中冷冻 10 min,65 ℃ 水浴 1 h,95 ℃ 水浴 10 min 使蛋白酶 K 变性,产物直接用于 PCR 扩增或者 -20 ℃ 保存备用。

1.5.2 PCR 扩增

rDNA-ITS 区扩增采用的通用引物为 V5367(5'-TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT-3')和 26S(5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3')^[7];rDNA-IGS 区扩增采用的通用引物为 5S(5'-

TTA ACT TGC CAG ATC GGA CG-3')和18S(5'-TCT AAT GAG CCG TAC GC-3')[8]。引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

PCR 体系(25 μ L)包括模板 DNA 4 μ L,10 $\times$ PCR buffer(Mg²⁺)2.5 μ L,dNTPs(2.5 mmol/L)2 μ L,上游引物(10 μ mol/L)1 μ L,下游引物(10 μ mol/L)1 μ L,Taq DNA 聚合酶(5U/ μ L)0.2 μ L,加 H₂O 至 25 μ L。rDNA-ITS 区反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,循环 35 次;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。IGS 区反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,53 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,循环 45 次;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。取 5 μ L PCR 产物采用 1.2% 琼脂糖凝胶 120 V 电泳 30 min 进行检测。

1.5.3 PCR 产物的回收

PCR 产物由 DNA 胶回收试剂盒(TaKaRa)回收、纯化,具体操作步骤参照试剂盒操作说明。

1.5.4 PCR 产物的克隆、测序及数据分析

将纯化后的 PCR 产物克隆至质粒载体 pMD18-T(TaKaRa)上,选取每种群各 3 个阳性克隆由 Invitrogen 公司测序。利用 NCBI BLAST 工具和 DNAMAN 5.0 软件,将获得的 rDNA-ITS 区和 rDNA-IGS 区序列与 GenBank 已登录的根结线虫序列进行比对分析。利用 Mega5.0 软件通过最大似然法(maximum likelihood)构建系统发育树,采用 Kimura two-parameter 模型。同时对构建的系统树作自展检验(bootstrap test)以获得分支的支持率,自展检验中重复抽样次数为1000次,以秀丽隐杆线虫

(*Caenorhabditis elegans*) (X03680) 的 ITS 和 IGS 序列作为外群。

2 结果与分析

2.1 根结线虫形态学鉴定

雌虫:体白色,梨形,颈短,头区大,无环纹,口针纤细,基球圆形和杆部有明显界线。锥部向背部稍稍弯曲,杆部末端最宽。

2 龄幼虫:蠕虫状,头不突出,无缢缩,口针基部球圆形。尾部有明显透明区,尖端狭窄。

通过对会阴花纹观察,会阴花纹为近圆的六边形到卵圆形,背弓扁平或波浪形,侧线不明显,线纹平滑到波浪形,尾端区通常有刻点(图 1)。

雌虫和 2 龄幼虫的部分测量值见表 1。参照文献[9-10],初步确定花椒根结线虫为北方根结线虫(*M. hapla*)。

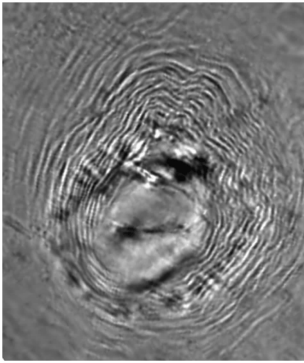


图 1 花椒根结线虫的会阴花纹
Fig.1 The perineal pattern of the pepper root-knot nematode

表 1 花椒根结线虫雌虫和 2 龄幼虫的测量值¹⁾

Table 1 Measurement of females and second-stage juveniles of the pepper root-knot nematode

虫态 Stage	L/ μ m	BW/ μ m	Stylet/ μ m	DEGO	Tail/ μ m
雌虫 Female (n=20)	592.6(449.2~730.7)	380.0(340.7~420.9)	16.4(15.2~16.5)	4.8(4.5~6.1)	—
2 龄幼虫 Second-stage juvenile (n=20)	395.8(389.0~412.2)	14.1(13.7~14.6)	11.1(10.8~12.0)	3.4(3.0~4.1)	53.0(46.5~58.0)

1) L:体长 Body length; BW:体宽 Body width; Stylet:口针长 Stylet length; DEGO:背食道腺开口至口针基部球的距离 Dorsal esophageal gland opening; Tail:尾长 Tail length.

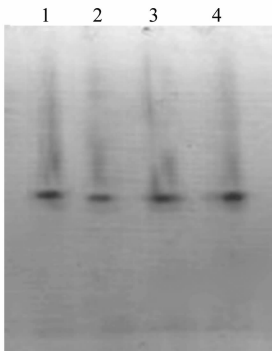
2.2 酯酶同工酶酶谱

将分离纯化的根结线虫种群进行同工酶分析,电泳结果显示分离纯化的种群根结线虫雌成虫的酯酶同工酶谱均出现一条酯酶带,酯酶谱带类型为 H1,迁移率为 0.5(图 2),这与已知的北方根结线虫酯酶同工酶谱相同[5],因此可以断定侵染花椒的根结线虫为北方根结线虫单一种群(*M. hapla*)。

2.3 分子生物学特征

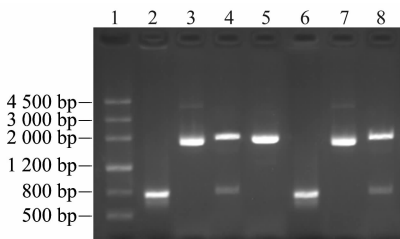
2.3.1 PCR 扩增及重组质粒 DNA 酶切鉴定

通过通用引物对花椒根结线虫的 rDNA-ITS 区和 rDNA-IGS 区进行 PCR 扩增,片段长度在 770 bp 左右(图 3),同北方根结线虫的序列长度基本一致。重组质粒经酶切后都得到 1 个目的片段大小相似的片段(图 3),这说明质粒为目的片段 PCR 扩增产物的重组克隆。



1: 北方根结线虫(对照); 2~4: 花椒根结线虫
1: *M. hapla* (control); 2-4: The pepper root-knot nematode

图 2 花椒根结线虫酯酶电泳谱型
Fig. 2 Phenotype of esterase isozyme
(Est) of the pepper root-knot nematode



1: DNA marker Ⅲ; 2: 花椒根结线虫ITS的PCR扩增结果;
3: 含ITS的重组质粒; 4: 重组载体经HindⅢ和EcoRI双酶切;
5: pMD18-T 空载体对照; 6: 花椒根结线虫IGS的PCR扩增结果;
7: 含IGS的重组质粒; 8: 重组载体经HindⅢ和EcoRI双酶切
1: DNA marker Ⅲ; 2: PCR amplification result of the pepper
root-knot nematode ITS; 3: Recombinant plasmid with ITS ;
4: Double digestion of recombinant plasmid using HindⅢ and
EcoRI ; 5: pMD18-T empty vector; 6: PCR amplification result
of the pepper root-knot nematode IGS; 7: Recombinant plasmid
with IGS; 8: Double digestion of recombinant plasmid using
HindⅢ and EcoRI

图 3 花椒根结线虫 ITS 区和 IGS 区的 PCR 扩增
及产物重组质粒的酶切鉴定结果

Fig. 3 The PCR identification results of the pepper
root-knot nematode ITS and IGS fragments

2.3.2 序列分析及同源性结果比较

测序结果表明, rDNA-ITS 区目的片段长度为 768 bp, 其中 ITS1-5.8S-ITS2 区序列长度为 477 bp, 在 GenBank 中进行 BLAST 和 DNAMAN 6.0 比对分析, 发现 ITS1-5.8S-ITS2 区序列与北方根结线虫 (AY268108、AY281854 和 JX024147) 序列只有 1 个碱基差异, 序列相似性为 99.79%; rDNA-IGS 区目的片段长度为 768 bp, 其中 IGS2 区序列长度为 562 bp, 与在美国分离获得北方根结线虫 HI 种群 (AY528418) 只有 2 个碱基差异, 序列相似性为 99.64%。将本研究中获得 ITS 和 IGS 序列与 GenBank 中下载的已知根结线虫序列进行比对分析, 用

Maximum likelihood 法分别构建了系统发育树: 图 4 为基于 ITS 序列构建的根结线虫系统发育树, 花椒根结线虫与北方根结线虫位于同一大分支, 支持率为 98%, 从树的分支状况来看, 4 种根结线虫可分为两组, 第 I 组包括所有的北方根结线虫, 第 II 组包括南方根结线虫、花生根结线虫和爪哇根结线虫。组间相隔较远, 分支间的支持率大于 98%, 系统发育关系比较清晰。图 5 为基于 IGS 序列构建的根结线虫系统发育树, 花椒根结线虫与北方根结线虫位于同一大分支, 支持率为 98%; 与基于 ITS 序列的系统发育树相对应, 常见的 4 种根结线虫也可分为两组: 第 I 组包括所有的北方根结线虫, 而其他 3 种根结线虫全部位于 II 组, 组间相隔较远, 两个大分支间支持率大于 98%, 北方根结线虫所在分支与南方根结线虫、花生根结线虫和爪哇根结线虫形成的分支间系统发育关系清晰, 说明花椒根结线虫为北方根结线虫。

3 结论与讨论

由于寄主和环境等因素的影响, 根结线虫种内和种间的形态常常有较大的变化, 因此, 单纯依赖一种方法鉴定很难做到快速、准确。应用 rDNA-ITS 和 rRNA-IGS 克隆、序列测定分析及比对, 已成功地应用于根结线虫的鉴定^[11-12]。本文根据花椒根结线虫雌虫和 2 龄幼虫的形态特征及雌成虫的会阴花纹, 雌虫酯酶同工酶分析及分子生物学的检测 (rDNA-ITS 区和 rRNA-IGS 区), 结果表明四川茂县地区花椒根结线虫的病原为北方根结线虫。在鉴定中, 采用形态学、生物化学和分子生物学特征分析进行综合鉴定的方法, 从而避免了用一种方法鉴定可能出现的误差。这是首次报道北方根结线虫引起的花椒新病害, 同时也是首次报道北方根结线虫在我国四川省的分布。

近些年来的调查发现, 花椒根结线虫病的发生在逐步扩展, 但因为其危害具有隐蔽性, 还未被关注和引起足够重视。茂县位于四川省西北部, 阿坝藏族羌族自治州的东南缘, 是岷江上游的高山峡谷地带。许多花椒栽植在退耕地及半高山坡上, 海拔在 1 500~2 000 m, 冬冷夏凉、昼夜温差大、7 月平均温度 20.9℃, 低于北方根结线虫分布南限温度 (7 月份平均温度为 26.7℃)^[13], 因此在这样的生态环境下, 北方根结线虫是可以生存的。在以前的报道中, 四川省危害植物的根结线虫为常见的南方根结线虫

(*M. incognita*)、爪哇根结线虫(*M. javanica*)和花生根结线虫(*M. arenaria*)等^[14],未见北方根结线

虫的报道,北方根结线虫是由于苗木运输传进四川,还是原已存在,还有待进一步的研究。

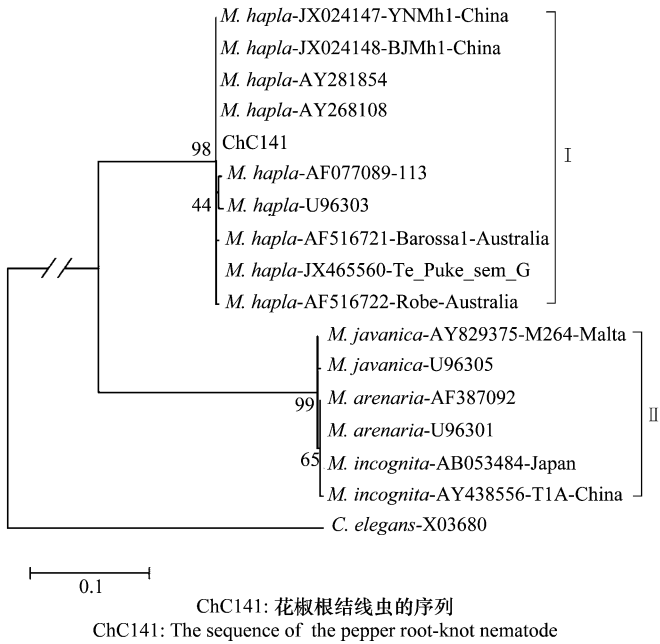


图 4 根结线虫不同种群 ITS 序列的聚类分析 (NJ)

Fig. 4 NJ tree of 16 *Meloidogyne* isolates based on ITS sequences of *M. hapla*

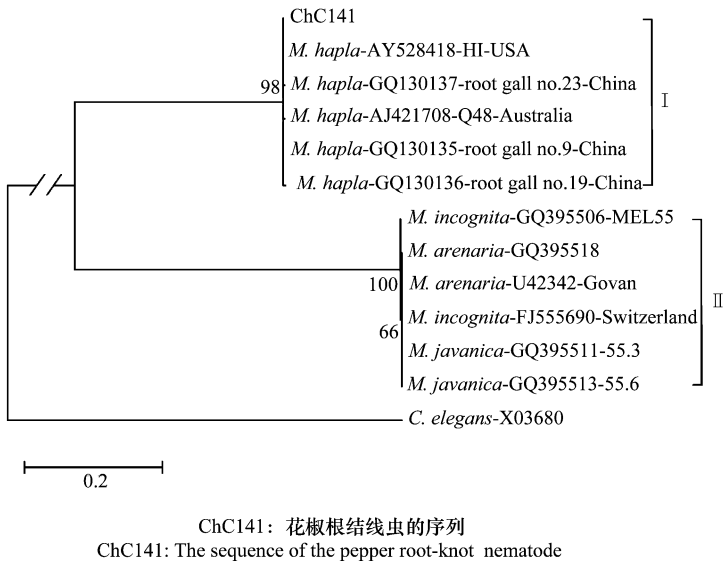


图 5 根结线虫不同种群 IGS 序列的聚类分析 (Maximum likelihood)

Fig. 5 Maximum likelihood tree of 12 *Meloidogyne* isolates based on IGS sequences

根据根结线虫病发生和流行的特点,目前花椒根结线虫病的发生范围仍很有限,建议建立无病种苗生产基地和进行植物检疫,发病区内种苗不得运输或携带到非发病区种植;选用无病地块的健壮、无病种苗;对已感病的苗木实行就地销毁;清除植株病残体及附近杂草,控制该病的扩展蔓延。

参考文献

[1] 曾京京. 我国花椒的栽培起源和地理分布[J]. 中国农史, 2000, 19(4): 68-75.
[2] 李笃肇. 花椒苗根结线虫病的发生与防治[J]. 特种经济动植物, 2004(12): 33.

011 对多种植物病原菌具有很好的抑菌效果,制备的内生短短芽胞杆菌 011 可湿性粉剂,迄今文献中未见研究报道。为下一步开发短短芽胞杆菌可湿性粉剂的配方筛选奠定了基础。

参考文献

- [1] 曾智,孙运军,钱荣华. 我国微生物农药的研究应用现状与前景[J]. 农业现代化研究,2008,29(2):254-256.
- [2] 喻子牛. 微生物农药及其产业化[M]. 北京:科学出版社,2000:1-12.
- [3] 邹芳慧,陈志强,任卫东. 面向二十一世纪的生物农药[J]. 化学工程师,2003(6):44-45.
- [4] 顾宝根,姜辉. 我国生物农药的现状与问题[J]. 微生物农药及其产业化,2000(5):46-47.
- [5] 侯美玲,辛媛媛,郝志敏,等. 玉米内生芽胞杆菌的抗菌活性物质及其拮抗玉米大斑病菌机理的初步研究[J]. 农业生物技术学报,2012,20(9):1018-1027.
- [6] 奚家勤,林碧莲,莫明和,等. 烟草内生细菌 ZY-9-13 菌株的鉴定及其对植物病原真菌的拮抗性[J]. 西南农业学报,2013,26(2):612-616.
- [7] Shi J, Liu A, Li X, et al. Control of *Phytophthora nicotianae* disease, induction of defense responses and genes expression of papaya fruits treated with *Pseudomonas putida* MGPI [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013,93(3):568-574
- [8] 陈志宜,刘鄯洲,乔俊卿,等. 利用芽胞杆菌生防菌防控土传病害引起的设施蔬菜连作障碍[J]. 中国蔬菜,2012(8):29-30.
- [9] 易有金,尹华群,罗宽,等. 烟草内生短短芽胞杆菌的分离鉴定

(上接 88 页)

- [3] 张炳炎. 花椒病虫害诊断与防治原色图谱[M]. 北京:金盾出版社,2006:1-191.
- [4] 汪来发,杨宝君,李传道. 华东地区根结线虫的调查[J]. 林业科学研究,2001,14(5):484-489.
- [5] Esbenshade P R, Triantaphyllou H H. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species (Nematoda: Tylenchida) [J]. Journal of Nematology,1985,17:6-20.
- [6] 胡凯基. 酯酶在根结线虫分类上应用的研究[J]. 林业科学研究,1988(6):650-656.
- [7] Vrain T C, Wakarchuk D A, Levesque A C, et al. Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group [J]. Fundamental and Applied Nematology,1992,15(6):563-573.
- [8] Vahidi H, Curran J, Nelson D W, et al. Unusual sequences, homologous to 5S RNA, in ribosomal DNA repeats of the nematode *Meloidogyne arenaria* [J]. Journal of Molecular Evolu-

tion,1988,27:222-227.

- [10] 王宇婷,易有金,夏波,等. 内生短短芽胞杆菌 011 菌发酵滤液抑菌活性研究[J]. 植物保护,2013,39(4):29-33.
- [11] 王美林,王会福. 1000 亿活芽孢/枯草芽胞杆菌可湿性粉剂对草莓炭疽病的田间药效研究[J]. 上海农业科技,2012(2):137-138.
- [12] 王剑,王楠,高观朋,等. 200 亿芽孢/g 枯草芽胞杆菌可湿性粉剂的研制[J]. 农药,2010,9(7):486-489.
- [13] 陈永兵,吴若萍,兰海姑. 芽胞杆菌可湿性粉剂防治番茄青枯病田间药效研究[J]. 上海农业科技,2005(3):97-97.
- [14] 刘晓刚,闫东林,苏聪莉,等. 1000 亿活芽孢/克枯草芽胞杆菌可湿性粉剂防治番茄灰霉病药效试验[J]. 上海蔬菜,2012(3):76-77.
- [15] 方中达. 植病研究方法[M]. 第 3 版. 北京:中国农业出版社,1998.
- [16] Deacon J W, Berry L A. Biocontrol of soil-borne plant pathogens: concepts and their application [J]. Pesticide Science, 1993,37:417-426
- [17] 李慧,王平,肖明. 硅藻土和滑石粉作为荧光假单胞菌 P13 菌剂的载体研究[J]. 中国生物防治,2009,25(3):239-244.
- [18] Jayaraman Jayaraj, Parthasarathi T, Radhakrishnan N V. Characterization of a *Pseudomonas fluorescens* strain from tomato rhizosphere and its use for integrated management of tomato damping-off [J]. BioControl,2007,52:683-702.
- [19] 郭荣君,侯著贤,李世东. 载体和助剂对芽胞杆菌 B006 和 BH1 菌体存活的影响[C]//成卓敏. 粮食安全与植保科技创新. 北京:中国农业科学技术出版社,2009:1090.
- [9] 艾森拜克 J D,赫什曼 H,萨塞 J N,等. 四种最常见根结线虫分类指南(附图检索)[M]. 杨宝君译. 昆明:云南人民出版社,1986:17-28.
- [10] 谢辉. 植物线虫分类学[M]. 第 2 版. 北京:高等教育出版社,2005:243-247.
- [11] Blok V C, Phillips M S, Fargette M J. Intergenic region of *Meloidogyne mayaguensis* and other major tropical root-knot nematodes [J]. Journal of Nematology,1997,29(1):16-22.
- [12] 万新龙,李健洪,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,2007,05(26):624-628.
- [13] 泰勒 A L,萨塞 J N. 植物根结线虫[M]. 杨宝君,曾大鹏,译. 北京:科学出版社,1983:67-121.
- [14] 李笃肇,郑志平,李清泽. 四川省植物病原根结线虫种的记述[J]. 西南农业大学学报,1986(4):19-21.