

两种分子技术检测松木中松材线虫的效果评价

叶碧欢 陈友吾 胡 杨 沈建军 胡传久 李海波*

(浙江省林业科学研究院, 杭州 310023)

摘要: 为更好地解决当前松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 检测工作中频现的假阴性问题, 通过不同分子技术检测效果的比较评价, 摸索出了一套可提高松材线虫检测准确性的技术体系。针对早期感病松木的低线虫量, 建立了线虫的最大量分离方法和基于 rDNA ITS 序列的分子检测体系, 该体系可高效检测出单条松材线虫, 准确率达 93.75%。以来自浙江省不同疫区的 96 份松木样品为检测材料, 比较了 SCAR 标记和 ITS 序列 2 种分子检测技术的阳性率。结果显示, 通过首次 PCR, ITS_I 和 ITS_{II} 序列的检测阳性率分别为 52.08% 和 55.21%, SCAR 标记的检测阳性率为 30.21%; 通过第二次或巢式 PCR, ITS_I 和 ITS_{II} 序列的检测阳性率提高到了 97.92% 和 100.00%, SCAR 标记的检测阳性率提高到了 59.38%, 表明基于 ITS 序列的检测阳性率明显高于 SCAR 标记, 且通过第二次或巢式 PCR 方法可进一步提高检测灵敏度, 降低假阴性率。因此, 通过线虫的最大量分离并基于 rDNA ITS 序列的分子检测可明显提高检测准确性, 更适用于松材线虫的常规检测。

关键词: 松材线虫; 松木; SCAR 标记; rDNA ITS

Evaluation of two molecular methods for detection of pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* in pine woods

Ye Bihuan Chen Youwu Hu Yang Shen Jianjun Hu Chuanjiu Li Haibo*

(Zhejiang Academy of Forestry, Hangzhou 310023, Zhejiang Province, China)

Abstract: The false negative problem occurs frequently in detecting pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. To explore a new technology which can significantly improve the detection accuracy, the detection capabilities of two molecular techniques were compared and evaluated. For a small number of *B. xylophilus* from the early disease-infected pine trees, the new technology established in this study was highly efficient, and could even detect single nematode with a detection accuracy of 93.75%. In addition, 96 pine samples from different epidemic areas of Zhejiang Province in China were collected and the detection capabilities of two methods using SCAR markers and rDNA ITS were compared. The results showed that the positive rates of ITS_I and ITS_{II} were 52.08% and 55.21%, respectively, which were higher than those by using SCAR markers (30.21%). The detection sensitivity could be further increased by using two round PCR/nested PCR, in which the positive rates of ITS_I and ITS_{II} were 97.92% and 100.00%, respectively, higher than those with SCAR markers (59.38%), and the probability of false negative was reduced significantly. The results indicated that the molecular detection technology based on ITS could improve the detection accuracy significantly, and was more suitable for routine detection of *B. xylophilus*.

Key words: *Bursaphelenchus xylophilus*; pine wood sample; SCAR marker; rDNA ITS

基金项目: 浙江省林业有害生物普查资助项目(2017TF020), 浙江省松材线虫病检疫鉴定资助项目(2017TF012)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: lihaibo@126.com

收稿日期: 2018-04-29

松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner) Nickle 属垫刃线虫目滑刃线虫科伞滑刃线虫属,可引起松树萎蔫病,对松木造成毁灭性打击,防治极其困难,为国际上公认的检疫性有害生物,也是我国主要的林业外来有害生物(Bolla et al., 1986; Vincent et al., 2008; Cardoso et al., 2016)。据《2018年松材线虫病疫区公告》显示,我国已有16个省(自治区)的316个市、县、区被划分为疫区,目前疫情尚未得到有效控制。因此,建立准确高效的诊断方法,用于松材线虫与其近似种,包括拟松材线虫 *B. mucronatus* 和伪伞滑刃线虫 *B. fraudulentus* 等之间的鉴别,对于松材线虫病的综合防治具有重要意义。

随着分子生物学技术的不断发展,基于随机扩增多态性DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) (Braasch et al., 1995)、限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP) (Bolla et al., 1988)、扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP) (成飞雪等, 2005)和特异序列扩增多态性(sequence characterized amplified regions, SCAR) (Meng et al., 2004)等分子标记,以及核糖体DNA (ribosomal DNA, rDNA)的内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)片段(Mochizuki et al., 2006)等多种分子检测技术已应用于松材线虫与其近似种之间的鉴定。日本学者利用ITS序列的巢式PCR扩增技术,可从感病松木中特异性地鉴别微量松材线虫(Takeuchi et al., 2005)。我国学者已开发出可特异性鉴别松材线虫的SCAR分子标记(陈凤毛等, 2011; 2012)。迄今为止,SCAR分子标记是目前检测松材线虫广为使用的技术,基于该方法构建的检测试剂盒也早已在国内基层林业部门推广使用(陈凤毛等, 2007)。尽管SCAR标记技术的开发与应用为松材线虫的鉴定提供了有效分子手段,但据基层林业部门的反馈,利用SCAR检测试剂盒检测呈阴性的松木,2~3年后仍会发病,且批次数量不少。这反映了该技术对于早期潜伏于感病松木中的微量线虫检测可能存在一定程度的假阴性问题,进而拖延了疫病防控方案的及时准确制定。鉴此,本研究旨在通过不同分子技术检测效果的比较评价,摸索出一套可提高松材线虫检测准确性的技术体系,以期为松材线虫病的早期监测与防控提供有力的技术保障。

1 材料与方法

1.1 材料

供试线虫及松木样品:松材线虫虫株分离自浙

江省丽水市云和县病死松木,在显微镜下进行形态鉴定,于接种灰葡萄孢菌 *Botrytis cinerea* 的PDA培养基上培养,于4℃保存备用;拟松材线虫来自于本实验室保存的群体。松木样品由浙江省庆元、松阳、云和、开化、龙泉、永康、江山、常山、义乌、台州、温州和淳安等市(县)林业局、森防站提供的共96份片状、块状或粉末状松木样品。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂20 g、蒸馏水1 L, 121℃高压灭菌30 min, 备用。

试剂及仪器:Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit 试剂盒,德国Qiagen公司;裂解液,天根生物科技(北京)有限公司;蛋白酶K,生工生物工程(上海)股份有限公司;其余试剂均为国产分析纯。IX71荧光倒置显微镜,日本OLYMPUS公司;DK-S26电热恒温水浴锅,上海森信实验仪器有限公司;CR21GIII高速离心机,日本HITACHI公司;MM400磨样机,德国Retsch公司;FRESCO 21微量冷冻离心机、NanoDrop 2000超微量分光光度计,美国Thermo Scientific公司;Life ECO扩增仪,杭州博日科技有限公司;DYY-12C型电泳仪,北京六一生物科技有限公司;Bio-Rad凝胶成像系统,美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

1.2.1 松木样品的采集和松材线虫的分离

采用本研究开发的500 mL样品袋的水浴浸泡法对松木样品中的松材线虫进行分离,取待测的5 cm×10 cm的松木样品3~6片或粉末样品200 g以上,用纱布包裹4层以上,置于500 mL的样品袋中,加纯净水300 mL,于37℃水浴4 h以上。取松木样品浸泡液于12 000 r/min离心5 min,去除上层清液,沉淀用4 mL纯净水悬浮,悬浮液等分为2份,其中一份备用镜检,另一份于14 000 r/min离心3 min后取沉淀物提取基因组DNA。

1.2.2 松材线虫基因组DNA的提取

单条线虫基因组DNA的提取:在显微镜下吸取单条松材线虫成虫置于2 mL离心管中,ddH₂O补齐至100 μL,加入等量裂解液、20 μL蛋白酶K,于56℃水浴30 min,于95℃下变性处理10~15 min,离心取上清液作为模板,用于PCR扩增。取1.2.1所获得的沉淀物经液氮处理,彻底粉碎,按照Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit试剂盒的操作说明提取线虫基因组DNA,利用NanoDrop 2000超微量分光光度计测定DNA浓度及纯度,于-20℃保存备用。

1.2.3 PCR扩增及电泳

本试验选取松材线虫的SCAR1、SCAR2、ITS₁

和ITS_{II}片段进行2次PCR扩增,引物信息如表1所示,均由北京擎科梓熙生物技术有限公司合成。对于单条线虫,采用ITS_{II}引物对(ZLBx_U/ZLBx_D)先后进行2次PCR,以1份拟松材线虫样品作为阳

性对照;对于松木样品,采用SCAR1、SCAR2、ITS_I和ITS_{II}引物对先后进行首次PCR及巢式PCR或第二次PCR。

表1 本试验所采用的供试引物信息
Table 1 The information of tested primers in this study

扩增片段 Amplified fragment	用途 Use	引物序列 (5'-3') Primer sequence	大小 Size (bp)	来源 Source
SCAR1	首次 PCR First PCR	M05F2:CGGGTCATGGCTGGAGGTATCG	600	陈凤毛等,2012
	第二次 PCR	TM05R1:TGGCTCAATGGCAAATCCTTCGTA		Chen et al.,2012
SCAR2	首次 PCR First PCR	M05F2:CGGGTCATGGCTGGAGGTATCGT	860	陈凤毛等,2011
	第二次 PCR	M05R2:TCCACCGGAGTAACTAAAGC		Chen et al.,2011
ITS _I	首次 PCR First PCR	F1:TACGTGCTGTTGTTGAGTTGG	459	Takeuchi et al.,2005
		R1:GCACGGACAAACAGTGCGTAG		
	巢式 PCR Nest PCR	NF:CGTGCTGTTGTTGAGTTGGCG	372	
	NR:AGACGACTGTCAACCGTGC			
ITS _{II}	首次 PCR First PCR	ZLBx_U:ATGCGATTGGTGACTTCGGTT	724	本文开发 Developed in this study
	第二次 PCR	ZLBx_D:CCCGAAGGCTTCACGACGA		

SCAR1首次PCR扩增反应体系:2×Power Taq PCR Master Mix 10 μL、10 μmol/L M05F2/M05R1上下游引物各1.5 μL、20 ng/μL模板DNA 3 μL,加ddH₂O补足至20 μL;PCR反应程序:98℃预变性5 s;98℃变性3 s,52℃退火30 s,72℃延伸35 s,共35个循环;最后于72℃补平2 min,终止温度为4℃。SCAR2首次PCR扩增反应体系:2×Power Taq PCR Master Mix 10 μL、10 μmol/L M05F2/M05R2上下游引物各1.5 μL、20 ng/μL模板DNA 3 μL,加ddH₂O补足至20 μL;PCR反应程序:94℃预变性5 min;94℃变性45 s,49℃退火30 s,72℃延伸60 s,共40个循环;最后于72℃补平7 min,终止温度为4℃。SCAR1和SCAR2第二次PCR的扩增反应体系与首次PCR基本一致,仅模板为首次PCR产物稀释10倍。ITS_I首次PCR扩增反应体系:2×Power Taq PCR Master Mix 10 μL、10 μmol/L F1/R1上下游引物各1.5 μL、20 ng/μL模板DNA 3 μL,加ddH₂O补足至20 μL;PCR反应程序:95℃预变性2 min;前10个循环94℃变性30 s,63℃退火30 s,之后每个循环降低1℃,72℃延伸60 s;后25个循环94℃变性30 s,53℃退火30 s,72℃延伸60 s;最后于72℃补平5 min,终止温度为4℃。ITS_I巢式PCR扩增反应体系:与首次PCR基本一致,仅模板为首次PCR产物稀释10倍;PCR反应程序:95℃预变性2 min;94℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸30 s,共25个循环;最后于72℃补平5 min,终止温度为4℃。ITS_{II}首次PCR扩增反应体系:2×Power Taq PCR Master

Mix 10 μL、10 μmol/L ZLBx_U/ZLBx_D上下游引物各1.5 μL、20 ng/μL模板DNA 3 μL,加ddH₂O补足至20 μL。PCR反应程序:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,60℃退火40 s,72℃延伸1 min,共25个循环;最后于72℃补平5 min,终止温度为4℃。第二次PCR的扩增反应体系与首次PCR基本一致,仅模板为首次PCR产物稀释10倍。鉴于SCAR1、SCAR2和ITS_I三对引物均已被证实对松材线虫的扩增具有特异性,不存在假阳性的情况(Takeuchi et al.,2005;陈凤毛等,2011;2012),因此在对本研究松木样品中松材线虫的PCR检测结果中,均省略了阴性对照。

PCR产物检测:取首次和第二次PCR的扩增产物6 μL,点样于1.5%的琼脂糖凝胶上,于1×TAE缓冲液中电泳150 V 15 min,于凝胶成像系统照相。

2 结果与分析

2.1 单条松材线虫检测结果

利用本研究开发的单条线虫基因组DNA提取方法和ITS_{II}引物对16份单条松材线虫样品和1份拟松材线虫样品进行的第二次PCR扩增结果显示,该引物对可以特异性地扩增出724 bp的松材线虫ITS片段,而不能扩增拟松材线虫,且单条线虫检测的阳性率高达93.75%(图1)。说明利用本研究开发的ITS_{II}引物对可以准确检测出单条松材线虫,且不存在假阴性,表明ITS_{II}引物的特异性和检测的准确性均很高,可以进一步用于松木样品中松材线虫的检测。

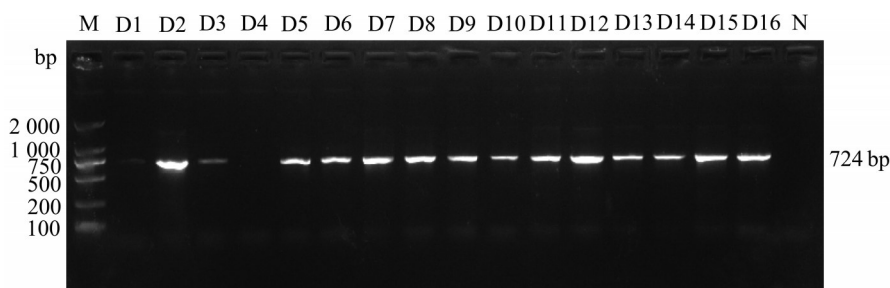


图1 利用ITS_{II}引物对对单条松材线虫的第二次PCR扩增

Fig. 1 The nested PCR of single *Bursaphelenchu xylophilus* by ITS_{II} primers

M: Marker DL 2000; D1~D16: 单条松材线虫样品; N: 阴性对照。M: Marker DL 2000; D1~D16: samples of single *B. xylophilus*; N: negative control.

2.2 SCAR和ITS首次PCR检测效果比较

对96份松木样品进行松材线虫基因组进行首次PCR扩增,电泳结果显示,除SCAR1标记(600 bp)的特异性条带外(图2-A),也存在较多非特异性条带,其中24份样品首次PCR扩增的电泳结果表明,检测样品阳性率仅为30.21%(29/96);SCAR2标记(860 bp)的首次PCR结果均呈阴性(表2)。

同时,利用F1/R1引物对和ZLBx_U/ZLBx_D引物对分别扩增ITS_I(459 bp)(图2-B)和ITS_{II}特异片段(724 bp)(图2-C),结果显示,F1/R1引物对检测出50个样品含有松材线虫,阳性率为52.08%;ZLBx_U/ZLBx_D引物对检测出53个样品含有松材线虫,阳性率为55.21%(表2)。

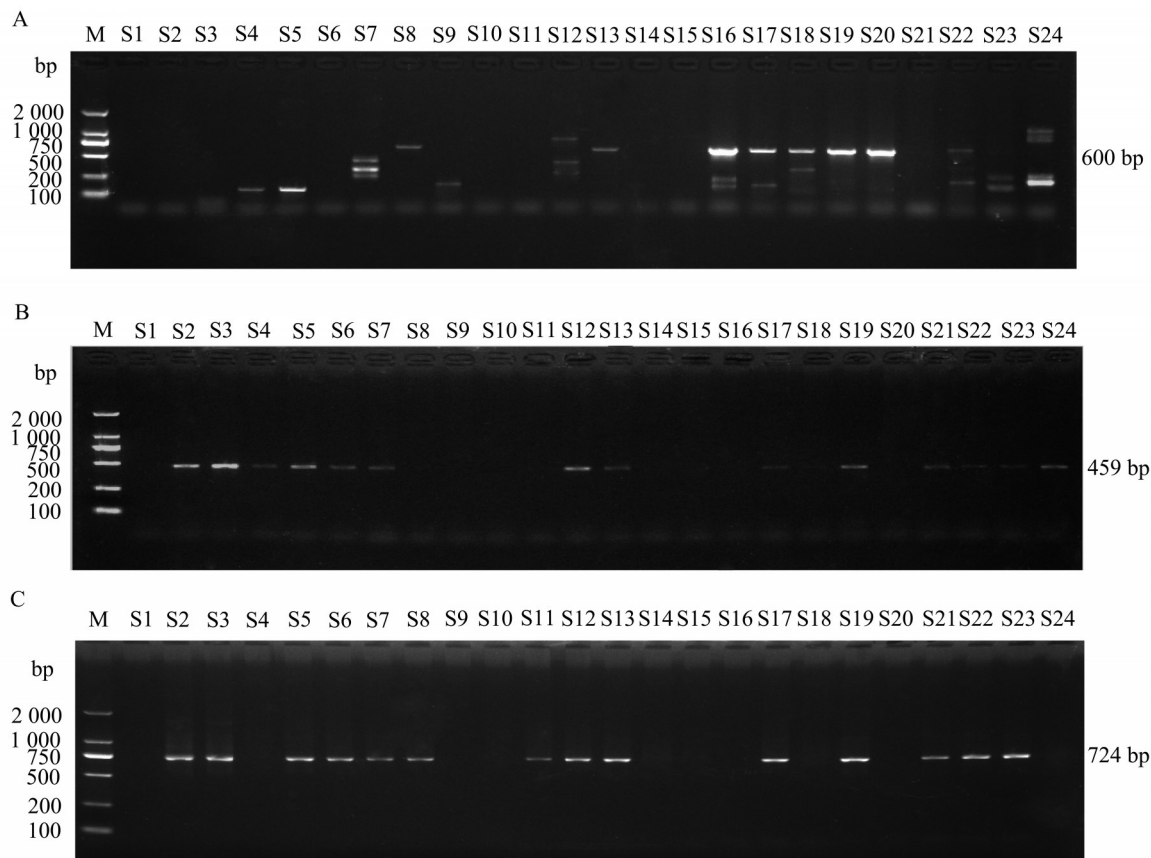


图2 松材线虫SCAR1(A)、ITS_I(B)、ITS_{II}(C)特异片段的首次PCR扩增

Fig. 2 First PCR amplification of specific fragments of SCAR1 (A), ITS_I (B), ITS_{II} (C) from *Bursaphelenchu xylophilus*

M: Marker DL 2000; S1~S24: 松材线虫样品。M: Marker DL 2000; S1~S24: samples of *B. xylophilus*.

表2 不同分子方法检测松木样品中松材线虫的阳性率结果

Table 2 Statistics of the positive rates for *Bursaphelenchu xylophilus* in tested pine wood samples by using two methods

扩增片段 Amplified fragment	首次 PCR First PCR	第二次 PCR/巢式 PCR Second PCR/Nested PCR
SCAR1	30.21	59.38
SCAR2	0.00	0.00
ITS _I	52.08	97.92
ITS _{II}	55.21	100.00

2.3 SCAR 和 ITS 第二次/巢式 PCR 检测效果比较

第二次 PCR/巢式 PCR 扩增结果显示, SCAR1 第二次 PCR 检测的阳性率由 30.21% 提高至 59.38%, 仍有 39 份样品呈阴性(图 3-A); SCAR2 第二次 PCR 检测的 96 份样品仍均为阴性(表 2)。ITS_I 的巢式 PCR 和 ITS_{II} 的第二次 PCR 检测阳性率分别由 52.08% 和 55.21% 提高至 97.92% 和 100.00% (图 3B~C, 表 2)。表明通过第二次 PCR 或巢式 PCR, 均可显著提高 SCAR 和 ITS 技术检测的灵敏度, 且 ITS 检测技术提高的幅度更大, 检测效果更好。

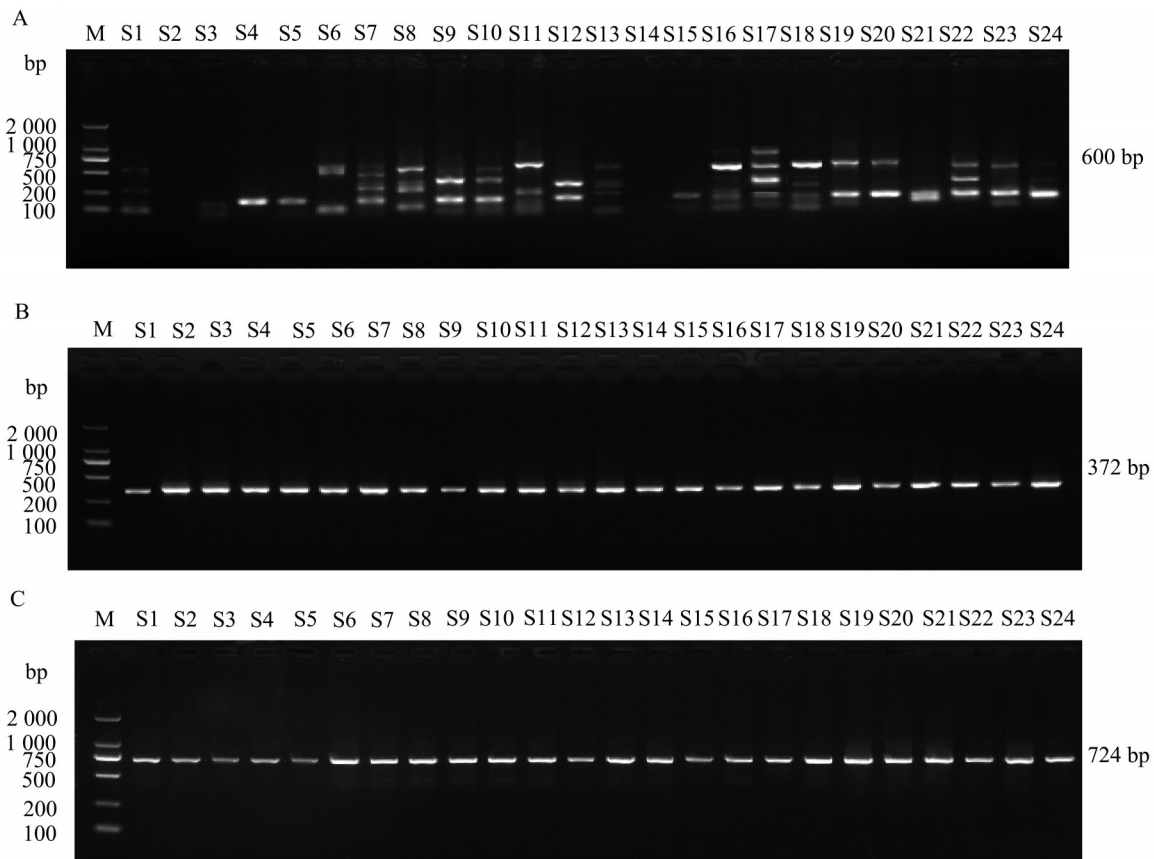
图3 松材线虫 SCAR1、ITS_I、ITS_{II} 特异片段的第二次 PCR/巢式 PCR 扩增

Fig. 3 Second PCR amplification of SCAR1 specific fragment from *Bursaphelenchu xylophilus*

A: 松材线虫 SCAR1 特异片段第二次 PCR 扩增; B: 松材线虫 ITS_I 特异片段巢式 PCR 扩增; C: 松材线虫 ITS_{II} 特异片段第二次 PCR 扩增; M: marker DL 2000; S1~S24: 松材线虫样品。A: Second PCR amplification of SCAR1 specific fragment from *Bursaphelenchu xylophilus*; B: nested PCR of the ITS_I specific fragment of *B. xylophilus*; C: second PCR of the ITS_{II} specific fragment of *B. xylophilus*; M: marker DL 2000; S1~S24: samples of *B. xylophilus*。

3 讨论

准确快速地检测松材线虫对于松树萎蔫病的防控至关重要。因拟松材线虫等近缘种的干扰, 分子检测技术已成为松材线虫检测的重要手段。从松木中对松材线虫进行有效分离是分子检测的前提条件。贝尔曼漏斗法是目前较常用的方法, 但每次仅

可处理约 20 g 小体积样品, 且处理时间较长(>20 h) (林静雯, 2008)。若直接从待测松木木屑中提取 DNA, 则可处理的松木量更少(<1 g) (Francois et al., 2007)。这 2 种方法由于受可处理样品量的限制, 并不适用于含微量松材线虫早期感病松木。本研究开发的检测体系是采用 500 mL 样品袋的水浴

浸泡法,可一次性处理大量松木样品(>200 g),且处理时间仅需 4 h。该方法不仅可较快地获得大量线虫,同时也避免了木屑样品对 DNA 提取和 PCR 扩增的干扰,为后续分子检测的准确性提供可靠的材料保障。

作为形态学鉴定的辅助手段,PCR 技术在植物病原菌的检测中得到了广泛应用。在松材线虫检测技术中,常规 PCR、巢式 PCR、实时荧光定量 PCR 以及环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)等方法都呈现出其各自的优势和限制(林静雯, 2008; Kikuchi et al., 2009; 吴禹熹等, 2016)。相对而言,基于常规 PCR 技术的 SCAR 标记和 ITS 序列检测稳定性好,更易操作和普及,具有特异性的 SCAR 标记是我国松材线虫常规检测中广为使用的分子技术(Meng et al., 2004; 陈凤毛等, 2011; 2012),具有高度种间变异的 rDNA ITS 序列也被应用于线虫近缘种间的分子鉴定(Burgermeister et al., 2005; Takeuchi et al., 2005; Filipiak et al., 2017)。本研究利用开发的单条线虫基因组 DNA 提取方法和 ITS_{II}引物对可高效检测出单条松材线虫,准确率高达 93.75%。同时,本试验对 SCAR 标记和 ITS 序列 2 种分子技术检测进行评价,结果发现与 ITS 序列检测相比,基于 SCAR 标记对松木中松材线虫的检测存在很高的假阴性率(>40%),这与基层林业部门的反馈一致,说明 ITS 序列更适用于对微量松材线虫的检测。本研究采用的 SCAR 标记 M₀₅-X₆₀₀ 来源于 RAPD 特异片段的转化,在松材线虫基因组内,该 SCAR 标记以单拷贝形式存在(陈凤毛等, 2012)。ITS 序列是中等串联重复的 rRNA 基因簇的多拷贝基因(马婷婷等, 2011),在基因组内的总量远远高于 SCAR 标记,因此 ITS 序列比 SCAR 标记具有更高的扩增效率,因而仅需要很少的模板 DNA 量就能达到分析鉴定的要求。何洁和顾建锋(2016)也认为 ITS 序列是松材线虫组最佳的 DNA 条形码基因。因此,基于 ITS 序列可以明显提高松材线虫检测的准确性。

早期感病的松木中仅含有微量松材线虫,因而可提取到的松材线虫 DNA 量也非常有限,这就对常规 PCR 的敏感性提出了更高要求。在常规 PCR 基础上,通过第二次 PCR 或巢式 PCR 可以进一步放大扩增信号,提高检测灵敏度。高新明等(2011)认为巢式 PCR 较常规 PCR 明显提高番石榴焦腐病菌 *Botryosphaeria rhodina* 的检测灵敏度。Lin et al.

(2010)以 DNA 拓扑异构酶 I 基因为目标基因的巢式 PCR 检测体系也已成功应用于松材线虫等 40 余种线虫的鉴定,可检测到 50 fg 的模板 DNA 或单条线虫。本研究也获得类似结果,通过 SCAR 标记和 ITS 序列的 2 次 PCR 扩增,对松木样品中松材线虫检测阳性率由首次 PCR 的 30.21%~55.21% 提高至 59.38%~100.00%,明显降低了假阴性比例,提高了检测的准确性,而且 ITS 序列 2 次 PCR 扩增提高的幅度更大,检测效果更好。

本研究建立的松材线虫检测体系其特色在于线虫的最大量分离和 rDNA ITS 序列的 2 次 PCR 高效扩增,这是避免假阴性结果、提高松材线虫检测准确性的关键要素。但该检测体系的应用需要大容量高速离心机、PCR 仪、电泳仪等设备,而且耗时相对较长(>10 h),还需要熟练的专业技术人员,因而该方法适合于省、市级森防检疫机构使用。为使得该检测体系适于基层林业部门推广运用,后续需要研究改进线虫的大量分离技术,以及高效检测试剂盒的开发,从而实现利用简易设备即可完成对松材线虫的快速便捷检测。

参 考 文 献 (References)

- Bolla RI, Weaver C, Winter RE. 1988. Genomic differences among pathotypes of *Bursaphelenchus xylophilus*. *Journal of Nematology*, 20(2): 309-316
- Bolla RI, Winter REK, Fitzsimmons K, Linit MJ. 1986. Pathotypes of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Journal of Nematology*, 18(2): 230-238
- Braasch H, Burgermeister W, Pastrik KH. 1995. Differentiation of three *Bursaphelenchus* species by means of RAPD-PCR. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, 47: 310-314
- Burgermeister W, Metge K, Braasch H, Buchbach E. 2005. ITS-RFLP patterns for differentiation of 26 *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae) and observations on their distribution. *Russian Journal of Nematology*, 13(1): 29-42
- Cardoso JM, Anjo SI, Fonseca L, Egas C, Manadas B, Abrantes I. 2016. *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* secretomes: a comparative proteomic analysis. *Scientific Reports*, 6: 39007
- Chen FM, Ye JR, Wu XQ, Huang L, Tan JJ. 2012. SCAR marker and detection technique of *Bursaphelenchus xylophilus*. *Scientia Silviculturae Sinicae*, 248(3): 88-94 (in Chinese) [陈凤毛, 叶建仁, 吴小芹, 黄麟, 谈家金. 2012. 松材线虫 SCAR 标记与检测技术. *林业科学*, 248(3): 88-94]
- Chen FM, Ye JR, Wu XQ, Tan JJ, Huang L. 2011. Two kinds of applied molecular skills to detect *Bursaphelenchus xylophilus*. *Journal of Beijing Forestry University*, 33(4): 149-152 (in Chinese) [陈凤毛, 叶建仁, 吴小芹, 谈家金, 黄麟. 2011. 松材线虫两种实用分子检测技术. *北京林业大学学报*, 33(4): 149-152]

- Chen FM, Ye JR, Wu XQ, Tang J. 2007. Development of quick detection kit for *Bursaphelenchus xylophilus*. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 31(4): 133–135 (in Chinese) [陈凤毛, 叶建仁, 吴小芹, 汤坚. 2007. 松材线虫快速检测试剂盒研制. 南京林业大学学报(自然科学版), 31(4): 133–135]
- Cheng FX, Cheng XY, Xie BY, Li YN, Xie PZ, Chen XS, Xu RM. 2005. Use of the amplified fragment length polymorphism technique for genetic diversity analysis of the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). Acta Phytopathologica Sinica, 35(5): 410–419 (in Chinese) [成飞雪, 成新跃, 谢丙炎, 李一农, 谢培振, 陈祥盛, 徐汝梅. 2005. 松材线虫种群遗传多样性 AFLP 标记的建立及其应用. 植物病理学报, 35(5): 410–419]
- Filipiak A, Wiczorek P, Tomalak M. 2017. Multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection and identification of *Bursaphelenchus xylophilus*, *B. mucronatus* and *B. fraudulentus* - three closely related species within the *xylophilus* group. Nematology, 19(9): 1–10
- Francois C, Castagnone C, Boonham N, Tomlinson J, Lawson R, Hockland S, Quill J, Vieira P, Mota M, Castagnone-Sereno P. 2007. Satellite DNA as a target for *TaqMan* real-time PCR detection of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. Molecular Plant Pathology, 8(6): 803–809
- Gao XM, Li BJ, Lan CZ, Weng QY, Chen QH. 2011. Analysis of ITS sequence and PCR detection of *Botryosphaeria rhodina*. Journal of Plant Protection, 38(3): 227–232 (in Chinese) [高新明, 李本金, 兰成忠, 翁启勇, 陈庆河. 2011. 番石榴焦腐病菌的 ITS 分析及 PCR 检测. 植物保护学报, 38(3): 227–232]
- He J, Gu JF. 2016. Screening DNA barcode markers for the *xylophilus* group of the genus *Bursaphelenchus*. Plant Quarantine, 30(1): 14–20 (in Chinese) [何洁, 顾建锋. 2016. 松材线虫组 DNA 条形码筛选. 植物检疫, 30(1): 14–20]
- Kikuchi T, Aikawa T, Oeda Y, Karim N, Kanzaki N. 2009. A rapid and precise diagnostic method for detecting the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* by loop-mediated isothermal amplification. Nematology, 99(12): 1365–1369
- Lin H, Xu XL, Wu XQ, Chen FM, Li C, Ye JR. 2010. A nested PCR assay targeting the DNA topoisomerase I gene to detect the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. Phytoparasitica, 38(4): 369–377
- Lin JW. 2008. Study on early diagnosis and rapid detection of *Bursaphelenchus xylophilus* and differential proteome analysis of *B. xylophilus* and *B. mucronatus*. Master Thesis. Xiamen: Xiamen University (in Chinese) [林静雯. 2008. 松材线虫的早期诊断、快速检测技术及松材线虫与拟松材线虫的差异蛋白质组研究. 硕士学位论文. 厦门: 厦门大学]
- Ma TT, Chen G, Liu CX. 2011. Characteristics and application of ITS in entomology. Chinese Journal of Applied Entomology, 48(3): 710–715 (in Chinese) [马婷婷, 陈光, 刘春香. 2011. ITS 序列的特点及其在昆虫学研究中的应用. 应用昆虫学报, 48(3): 710–715]
- Meng QP, Long H, Xu JH. 2004. PCR assays for rapid and sensitive identification of three major root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. Acta Phytopathologica Sinica, 34(3): 204–210
- Mochizuki R, Endoh D, Onuma M, Fukumoto S. 2006. PCR-based species-specific amplification of ITS of *Mecistocirrus digitatus* and its application in identification of GI nematode eggs in bovine faeces. Journal of Veterinary Medical Science, 68(4): 345–351
- Takeuchi Y, Kanzaki N, Futai K. 2005. A nested PCR based method for detecting the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, from pine wood. Nematology, 7(5): 775–782
- Vincent B, Altemayer V, Roux-Morabito G, Naves P, Sousa E, Lieutier F. 2008. Competitive interaction between *Bursaphelenchus xylophilus* and the closely related species *Bursaphelenchus mucronatus*. Nematology, 10(2): 219–230
- Wu YX, Li PJ, Wang J, Yang FL. 2016. Loop-mediated isothermal amplification method and its application in pathogen detection. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 43(2): 389–393 (in Chinese) [吴禹熹, 李璞君, 王娟, 杨发龙. 2016. LAMP 方法及其在病原微生物检测中的应用. 中国畜牧兽医, 43(2): 389–393]

(责任编辑:王璇)