

# 植物罹病组织中南方、爪哇、花生根结线虫的 LAMP 快速检测

吴文涛<sup>1</sup>, 李梅云<sup>2</sup>, 许姗姗<sup>1</sup>, 薛美静<sup>1</sup>, 张靖<sup>1</sup>, 魏环宇<sup>1</sup>, 王扬<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>云南农业大学植物保护学院, 云南昆明 650201; <sup>2</sup>云南省烟草农业科学研究所, 云南昆明 650021

**摘要:**【目的】建立一种基于环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术,从植物罹病组织中直接检测3种常见的根结线虫,为根结线虫的监测和防治提供技术支持。【方法】分别采用3种根结线虫的种类特异性引物对所选择的根结线虫的DNA片段进行PCR扩增,扩增产物纯化、回收并测序。根据3种根结线虫的测序结果,针对种类特异区段,采用PrimerExplorerV4软件,分别设计3种根结线虫的LAMP引物。设计的引物组人工合成后,以提取的纯化种群线虫DNA为模板,分别进行引物组的特异性测试,筛选出分别针对3种根结线虫的最佳引物组。【结果】研究设计的3种根结线虫的LAMP特异性引物能够直接从植物根结中检测出南方、花生、爪哇3种常见根结线虫,LAMP快速检测体系为:dNTPS浓度为 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , $\text{Mg}^{2+}$ 的浓度为 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,不添加甜菜碱,反应时间为45 min。【结论】本实验建立的南方、花生、爪哇根结线虫LAMP快速分子检测方法,具有特异性强、灵敏度高、简单、快速、经济等特征,能够从罹病植物组织中快速准确地检测出南方、花生和爪哇根结线虫,具有极高的实践应用价值。

**关键词:** 环介导等温扩增; 根结线虫; 特异性; 快速检测

## Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid diagnosis of *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne arenaria* from infected plants

WU Wentao<sup>1</sup>, LI Meiyun<sup>2</sup>, XU Shanshan<sup>1</sup>, XUE Meijing<sup>1</sup>, ZHANG Jing<sup>1</sup>, WEI Huanyu<sup>1</sup>, WANG Yang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China;

<sup>2</sup>Yunnan Academy of Agricultural Sciences of Tobacco, Kunming, Yunnan 650021, China

**Abstract:**【Aim】The objective of this study is to establish a rapid diagnostic method for three species of root-knot nematode attacking plants based on the loop-mediated isothermal amplification (LAMP). This could provide technical support for monitoring and preventing the root-knot nematode infestation.【Method】The DNA fragments of the selected root-knot nematodes were amplified by PCR using species-specific primers of the three root-knot nematodes. The amplified products were purified, recovered and sequenced. Based on the sequencing results of the three root-knot nematodes, three primers were designed using PrimerExplorerV4 software for species-specific segments. The designed primer sets were artificially synthesized, and the purified primer population DNA was used as a template to test the specificity of the primer sets. The best primer sets for three root-knot nematodes were selected.【Result】The LAMP-specific primers of the three root-knot nematodes could directly detect the three common root-knot nematodes from the roots of plants, LAMP rapid detection system included  $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTPS,  $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Mg}^{2+}$ , without betaine, and at a reaction time of 45 min. The rapid detection of *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne javanica* by LAMP was assembled.【Conclusion】The method was highly specific, sensitive, and economical, which made it possible for quick and accurate detection of *M. incognita*, *M. arenaria* and *M. javanica* from the infected plant root tissues, with high actual application value.

**Key words:** LAMP; root-knot nematode; specificity; rapid detection

根结线虫 *Meloidogyne* spp. 是分布最广、危害最 重的植物寄生线虫,已引起世界各国的关注。其中

收稿日期(Received): 2018-06-11 接受日期(Accepted): 2018-07-22

基金项目: 口岸及边贸区、自贸区入侵生物本底调查与动态分布(2016YFC1202104); 国家自然科学基金(31560502, 311060361)

作者简介: 吴文涛, 男, 硕士研究生。研究方向: 植物线虫学。E-mail: 1174908234@qq.com

\* 通信作者(Author for correspondence), E-mail: wangyang626@sina.com

南方根结线虫 *M. incognita* (Kofold & White) Chitwood、花生根结线虫 *M. arenaria* Neal 和爪哇根结线虫 *M. javanica* Treub 由于寄主植物多和分布较广的特点,成为温带、亚热带和热带地区的优势种群,也是当前中国最重要的农作物病原线虫(孟庆鹏等,2004)。由根结线虫引起的病害遍布全国大部分地区,每年给农业生产造成巨大的经济损失(刘维志,2000;赵鸿等,2003)。根结线虫病为土传病害,显症晚,危害重,极难防治。关于根结线虫的防治,目前主要采用选育抗性品种、农业防治、物理防治、化学防治和生物防治等手段(孔祥义和陈锦才,2006;文廷刚等,2008)。由于在作物种植中长期使用化学药剂会使作物生产的可持续发展和安全性降低,在我国大部分地区已开始限制使用化学药剂。因此,选用抗性品种以及生物防治逐渐成为主要手段。

各种根结线虫之间存在显著的致病差异,因此对病害发生区域的有效防治依赖于对根结线虫种类准确的检测和诊断。传统的根结线虫的分类鉴定主要是形态学鉴定和同工酶电泳技术(武扬等,2005),其中,形态学鉴定方法主要依靠观察根结线虫的外部形态,包括体长、口针、尾部和会阴花纹等外部可见特征来鉴别。但是,由于许多根结线虫在外部形态上相似,要求鉴定者有丰富的经验。同工酶电泳技术虽然可以准确地鉴定根结线虫的种类,但并不适合土样当中的根结线虫的检测。反转录—环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种新的核苷酸扩增技术(Notomi *et al.*, 2000),与传统的 PCR 技术相比,LAMP 不需要热循环,实验结果肉眼即可观察,具有方便快捷、高效和特异性强等特点,目前已在植物线虫的检测中得到广泛应用。Kikuchi *et al.* (2009)、Niu *et al.* (2012)、Peng *et al.* (2012)分别建立了松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus*、象耳豆根结线虫 *Meloidogyne* spp.、香蕉穿孔线虫 *Radopholus similis* 的 LAMP 检测体系。也有研究表明,利用 SCAR 引物扩增出的多态性 DNA(RAPD)片段可以鉴定根结线虫的种类,这些 RAPD 片段可能代表着物种特异性基因并用于 LAMP 检测(Niu *et al.*, 2011)。

本研究根据 3 种根结线虫的 SCAR 特异性引物对所选择的根结线虫的 DNA 片段进行 PCR 扩增,扩增产物纯化、回收并测序。根据 3 种根结线虫的测序结果,针对种类特异区段,分别设计 3 种根结线虫

的 LAMP 引物,并对 3 种根结线虫进行检测,验证引物的特异性和灵敏度,从而建立一种从罹病植物组织中检测 3 种根结线虫的 LAMP 快速检测方法,以期为田间样本的直接检测提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试线虫

南方根结线虫从云南永胜的油橄榄上采集,花生根结线虫从云南建水的烟草上采集,爪哇根结线虫从云南普文的油藤上采集,3 种根结线虫由本实验室分类纯化,在温室扩繁保存。

### 1.2 试剂

rTaqDNA 聚合酶、dNTPs、DNA Marker(宝生物工程);Bst DNA 聚合酶大片段(NEB 公司);SYBR GreenI(Invitrogen 公司);蛋白酶 K(Roche 公司)。

### 1.3 线虫 DNA 提取

在显微镜下挑取单头供试线虫放入装有 10  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 的 0.2 mL 离心管中,加入 8  $\mu$ L 的 10 $\times$ PCR buffer 溶液(TaKaRa)、2  $\mu$ L 蛋白酶 K 溶液,采用冻融法反复冻融 6~7 次,-80  $^{\circ}$ C 下保存 30 min,65  $^{\circ}$ C 温育 90 min,95  $^{\circ}$ C 反应 10 min,反应完成后,12000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 1 min,上清液作为线虫 DNA 模板直接用于 LAMP 和 PCR 反应(万新龙等,2007)。

### 1.4 3 种根结线虫种类特异性区段扩增

分别采用 3 种根结线虫的 SCAR 特异性引物(Zijlstra & Donkers,2000),以基因组 DNA 为模版,对所选择的根结线虫进行 PCR 扩增,扩增产物纯化、回收并测序。PCR 反应体系:10 $\times$ Buffer(含 Mg<sup>2+</sup>) 5  $\mu$ L,10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> dNTP 4  $\mu$ L,引物 rDNA1 和 rDNA2(10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)各 1  $\mu$ L,rTaq 酶(5 U  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup>,TaKaRa) 2.5 U,模板 DNA 5  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 补足至 50  $\mu$ L。爪哇和南方根结线虫的扩增条件:95  $^{\circ}$ C 5 min;95  $^{\circ}$ C 30 s,61  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 1 min,37 个循环;72  $^{\circ}$ C 10 min。花生根结线虫的扩增条件:95  $^{\circ}$ C 5 min;95  $^{\circ}$ C 30 s,54  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 1 min,37 个循环;72  $^{\circ}$ C 10 min。

### 1.5 LAMP 引物设计

根据 3 种根结线虫的测序结果,针对 SCAR 特异性引物扩增的种类特异区段,采用 PrimerExplorerV4 软件,分别设计 3 种根结线虫的 LAMP 引物。设计的引物组人工合成后,以提取的纯化种群线虫 DNA 为模板,分别进行引物组的特异性测试,筛选出分别针对 3 种根结线虫的最佳引物组。

## 1.6 LAMP 反应体系的建立

反应体系包括外引物 F3 和 B3 各  $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、内引物 FIP 和 BIP 各  $1.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、dNTPs ( $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 8.8)、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  KCl、 $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4$ 、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1% Triton x-100、8 U Bst DNA 聚合酶大片段、 $1 \mu\text{L}$  DNA 模板,用灭菌双蒸馏水补全到  $25 \mu\text{L}$ 。混合均匀后,置于  $60 \sim 65 \text{ }^\circ\text{C}$  恒温水浴中保温  $45 \text{ min}$ , $82 \text{ }^\circ\text{C}$  保温  $5 \text{ min}$ (魏洪岩等,2016)。

## 1.7 LAMP 扩增产物的检测

LAMP 扩增产物检测采用 2 种方法。(1) SYBR Green I 显色法:LAMP 反应结束后,加入  $2 \mu\text{L}$   $100\times$ SYBR Green I,混匀后紫外照射下观察颜色变化。(2)琼脂糖凝胶电泳法:取  $2 \mu\text{L}$  扩增产物在 2% 的琼脂糖凝胶上电泳,染色,结果在凝胶成像系统中观察。

## 1.8 罹病根组织的 LAMP 直接检测

从人工接种南方、花生和爪哇根结线虫的番茄根系分别取 10 个根结,将上述罹病根系的根结放入装有  $17.5 \mu\text{L}$  的  $10\times$ PCR buffer 的离心管中,加

入  $7.5 \mu\text{L}$  的蛋白酶 K ( $600 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和  $25 \mu\text{L}$  无菌水,混合均匀后离心,放入液氮中速冻,用研磨棒充分捣碎,点动离心后,将离心管放入  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下温育  $90 \text{ min}$ , $95 \text{ }^\circ\text{C}$  下反应  $10 \text{ min}$ ,冷却至室温, $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心  $1 \text{ min}$  后的上清液即可作为 DNA 模板进行 LAMP 试验和常规 PCR 检测(何旭峰等,2013)。

## 2 结果与分析

### 2.1 3 种根结线虫的特异性引物 PCR 及测序结果

采用 SCAR 特异性引物扩增获得南方根结线虫 DNA 序列长度为  $990 \text{ bp}$ ,爪哇根结线虫为  $720 \text{ bp}$ ,花生根结线虫为  $420 \text{ bp}$ (图 1)。将 SCAR 特异性引物扩增的 3 种根结线虫的特异性序列通过 blast 对比发现,本研究所用的南方根结线虫与已报道的南方根结线虫的 SCAR 标记特异区段 (JN005841、KP411873) 的相似性为 99%,花生根结线虫与已报道的花生根结线虫的 SCAR 标记特异区段 (KP234264) 的相似性为 97%,爪哇根结线虫与已报道的爪哇根结线虫的 SCAR 标记特异区段 (KP087916) 的相似性为 99%。

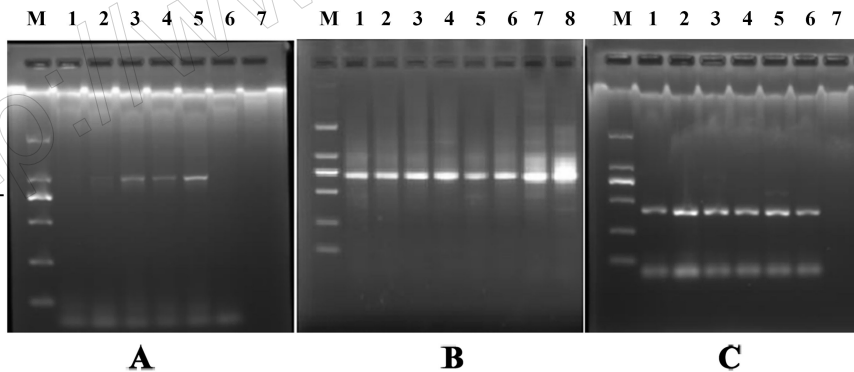


图 1 3 种根结线虫的特异性扩增

Fig.1 Specific amplification of the three root-knot nematodes

A、B、C 依次为南方、爪哇和花生根结线虫 DNA 电泳图。电泳所用 Marker 大小为  $2000 \text{ bp}$ 。

A, B, C: The electrophoretograms of DNA from *M. incognita*, *M. javanica*, and *M. arenaria*. The size of the Marker used was  $2000 \text{ bp}$ .

## 2.2 3 种根结线虫的 LAMP 引物设计

根据 3 种根结线虫的测序结果,针对 SCAR 引物扩增的种类特异区段,采用 PrimerExplorerV4 软件,分别设计 3 种根结线虫的 LAMP 引物。每种线虫各得到 4 条 LAMP 引物,包括 2 条外引物 (F3 和 B3) 和 2 条内引物 (FIP 和 BIP)。具体见表 1。

## 2.3 3 种根结线虫 LAMP 检测体系建立

采用优化的 LAMP 扩增体系,分别检测南方、

爪哇和花生 3 种根结线虫。3 种根结线虫种群的 LAMP 扩增产物采用 2 种方法均能够成功检测:(1)向 LAMP 反应产物中加入 SYBR Green I 染料,肉眼观察发现,阳性结果呈现绿色,阴性对照则呈现橘红色(图 2A、B、C);(2) LAMP 反应产物在 2% 琼脂糖凝胶上分离,阳性结果可见 LAMP 扩增的特异性的梯形条带,阴性结果则无条带(图 2D、E、F)。

表 1 南方、花生和爪哇根结线虫引物序列  
Table 1 Primer sequences of *M. incognita*, *M. arenaria* and *M. javanica*

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	作用 Function
Mi-F	-GTGAGGATTCAGCTCCCCAG-	南方根结线虫特异性检测
Mi-R	-ACGAGGAACATACTTCTCCGTCC-	<i>M. incognita</i> specific detection
MiF3	-GTGCTTCGTCTTTTGCTT-	
MiB3	-ACTTTCCTTGGAATTGGAACA-	
MiFIP	-AGGAAGTATACTATCCAAGACCCA- TTTAAAATCTGTTTCGGCACAC-	<i>M. incognita</i> LAMP
MiBIP	-TTCACAAAAACCCAATATGTCAGC- CGATATCTAGGGGTGTTTGA-	
Ma-F	-TCGGCGATAGAGGTAATGAC-	花生根结线虫特异性检测
Ma-R	-TCGGCGATAGACACTACAAACT-	<i>M. arenaria</i> specific detection
MaF3	-TGCTTCAACGCCGTATG-	
MaB3	-ATTTCTCTCCACGAGTTTCT-	
MaFIP	-CCACTTTCCTCAGCGAAATTT- GTCGTAATCAATGGGTGTC-	<i>M. arenaria</i> LAMP
MaBIP	-GTGGCTTTTCGATGTTTCGCT- TAGCCCAATTTGAGTTTTC-	
Mj-F	-GGTGGCGATTGAACTGAGC-	爪哇根结线虫特异性检测
Mj-R	-CAGGCCCTTCAGTGGAACTATAC-	<i>M. javanica</i> specific detection
MjF3	-TCGGAAATGACGAAGGTG-	
MjB3	TTATAAACCCAGCTAGGGAC-	
MjFIP	-TTAGGCTGATTTCCGATTTCCGAC- TCGGAAATGGGAACTGTC-	<i>M. javanica</i> LAMP
MjBIP	-ATGTCGGAAATCGGAATCCAG- CCCCATTTATTGGCAACAC-	

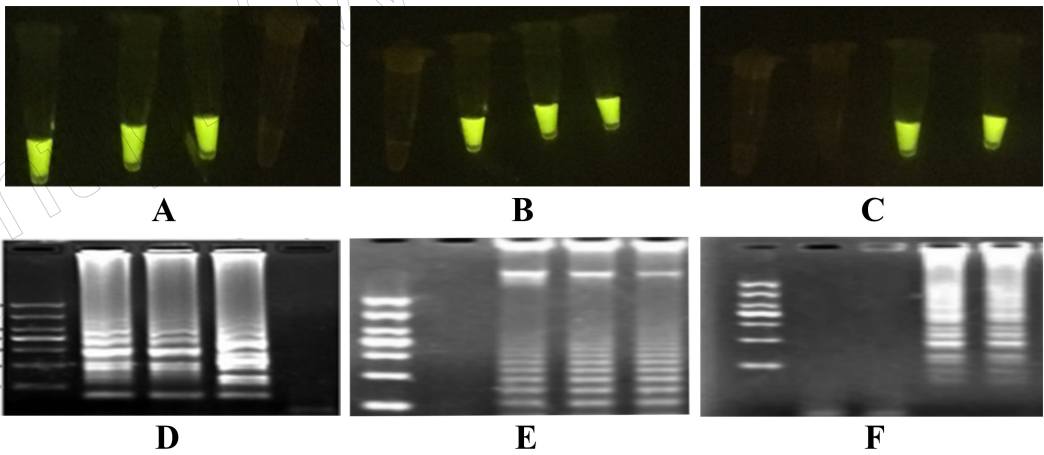


图 2 南方、花生和爪哇根结线虫 LAMP 体系建立及扩增产物检测

Fig.2 Detection results of *M. incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* by LAMP

A、B、C 依次为南方、花生和爪哇根结线虫的荧光染料检测结果；D、E、F 依次为南方、花生和爪哇根结线虫的凝胶电泳检测结果。电泳所用 Marker 大小为 1000 bp。

A, B, C: Results of fluorescent dye detection of *M. incognita*, *M. arenaria* and *M. javanica*; D, E, F: Gel electrophoresis results of *M. incognita*, *M. arenaria* and *M. javanica*. The size of Marker used in gel electrophoresis is 1000 bp.

### 2.4 罹病番茄根组织中 3 种根结线虫的 LAMP 直接检测

从分别侵染南方、爪哇和花生 3 种根结线虫的番茄中随机采 10 个根结进行 LAMP 检测, 结果发现, 南方根结线虫 LAMP 检测的 9 个根结为阳性

(图 3), 花生根结线虫 7 个根结显示阳性(图 4), 爪哇根结线虫 5 个根结显示阳性, PCR 检测结果同步(图 5)。由此确定本研究建立的 3 种 LAMP 检测体系能够直接从根结中检测到南方、爪哇、花生根结线虫, 具有很高的实际应用价值。

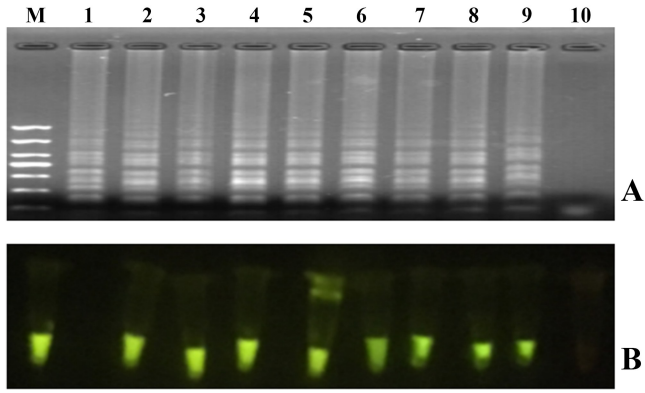


图3 南方根结线虫的 LAMP 直接检测

Fig.3 LAMP direct detection of *M. incognita*

A: 电泳检测结果; B: 荧光染料检测结果。

A: The results of electrophoresis detection; B: The results of fluorescent dye detection.

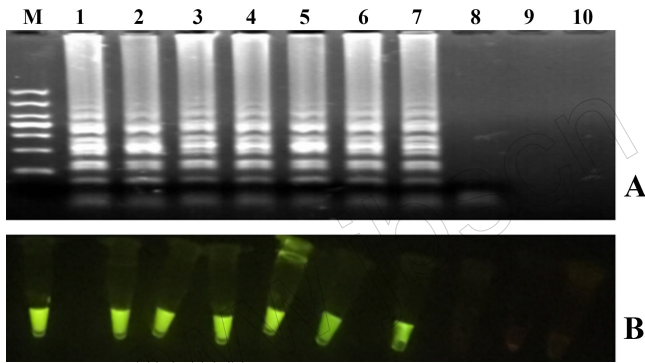


图4 花生根结线虫的 LAMP 直接检测

Fig.4 LAMP direct detection of *M. arenaria*

A: 电泳检测结果; B: 荧光染料检测结果。

A: The results of electrophoresis detection; B: The results of fluorescent dye detection.

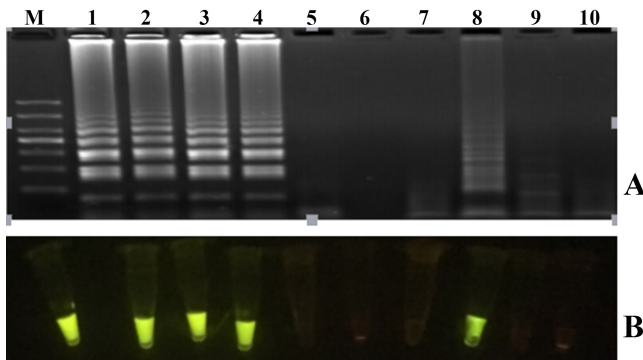


图5 爪哇根结线虫的 LAMP 直接检测

Fig.5 LAMP direct detection of *M. javanica*

A: 电泳检测结果; B: 荧光染料检测结果。

A: The results of electrophoresis detection; B: The results of fluorescent dye detection.

### 3 讨论与结论

根结线虫的鉴定主要分为形态学鉴定和分子鉴定2种方法,其中形态学鉴定主要是会阴花纹和同工酶电泳方法,而土壤当中大部分是幼虫,限制了2种方法的应用。国内外报道的分子鉴定方法主要是PCR-PFLP分析法(王焱等,2007; Powes *et*

*al.*, 1993),但这种方法需要对PCR产物进行酶切,要耗费较多时间,对操作要求较高,不适合快速鉴定。另外一种分子鉴定方法是RAPD-PCR, Blok *et al.* (1997)利用此方法鉴定了南方、花生、爪哇3种根结线虫,但RAPD-PCR鉴定过程中对反应条件具有极高的要求(白万明等,1996; Orui, 1999)。而

本研究建立的直接从植物根结中检测南方、花生、爪哇根结线虫 LAMP 检测方法,具有快速、便捷、简单、特异性等特点。只需要 1 h 即可完成反应,与常规 PCR 相比可以节省大量时间,实验过程中不需要 PCR 仪、凝胶电泳仪和照胶仪,仅使用水浴锅即可完成检测,操作较为简单,通过加入荧光染料,直接用肉眼观察即可判定结果。但是在反应完成后加入荧光染料的过程中,容易产生气溶胶,造成实验室污染和假阳性,影响 LAMP 检测结果的准确性,所以应在通风橱中进行实验,并在反应液中加入少量石蜡油密封避免假阳性的出现。该检测方法对 3 种常见根结线虫的发生分布和监测具有重要的意义,在农业生产中具有很大的应用前景。

### 参考文献

- 白万明, 吴建宇, 胡先奇, 喻盛甫, 1996. RAPD-PCR 技术在根结线虫分类鉴定中的应用. *云南农业大学学报*, 11(4): 216-220.
- 何旭峰, 彭焕, 丁中, 贺文婷, 黄文坤, 彭德良, 2013. 植物罹病组织中象耳豆根结线虫的 LAMP 快速检测方法. *中国农业科学*, 46(3): 534-544.
- 孔祥义, 陈绵才, 2006. 根结线虫病防治研究进展. *热带农业科学*, 26(2): 83-88.
- 刘维志, 2000. 植物病原线虫学. 北京: 中国农业出版社.
- 孟庆鹏, 龙海, 徐建华, 2004. 南方、爪哇和花生根结线虫的快速灵敏的 PCR 鉴定方法. *植物病理学报*, 34(3): 204-210.
- 万新龙, 李建洪, 彭德良, 2007. 根结线虫 rDNA-ITS 片段的克隆与序列分析. *华中农业大学学报*, 26(5): 624-628.
- 王焱, 季镭, 余本渊, 林茂松, 叶建仁, 2007. 3 种松材线虫分子检测技术的比较分析. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 31(4): 128-132.
- 魏洪岩, 顾建锋, 王暄, 乐秀虎, 李红梅, 2016. 山茶根结线虫的环介导等温扩增快速检测技术研究//中国植物病理学会病原线虫专业委员会, 海南省农业科学院农业环境与植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室. 第十二届全国植物线虫学术研讨会论文集: 192.
- 文廷刚, 刘凤淮, 杜小凤, 吴传万, 王伟中, 2008. 根结线虫病发生与防治研究进展. *安徽农学通报*, 14(9): 183-185.
- 武扬, 郑经武, 商晗武, 洪文英, 2005. 根结线虫分类和鉴定途径及进展. *浙江农业学报*, 17(2): 106-110.
- 赵鸿, 彭德良, 朱建兰, 2003. 根结线虫的研究现状. *植物保护*, 29(6): 6-9.
- BLOK V C, PHILLIPS M S, MCNICOLJ W, FARGETTE M, 1997. Genetic variation in tropical *Meloidogyne* spp. as shown by RAPDs. *Fundamental and Applied Nematology*, 20(2): 127-133.
- 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. *Phytopathology*, 99(12): 1365-1369.
- NIU J H, JIAN H, GUO Q X, CHEN C L, WANG X Y, LIU Q, GUO Y D, 2012. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays based on 5S rDNA-IGS2 regions for detecting *Meloidogyne enterolobii*. *Plant Pathology*, 61(4): 809-819.
- NIU J H, GUO Q X, JIAN H, CHEN C L, YANG D, LIU Q, GUO Y D, 2011. Rapid detection of *Meloidogyne* spp. by LAMP assay in soil and roots. *Crop Protection*, 30(8): 1063-1069.
- NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, YONEKAWA T, WATANABE K, AMINO N, HASE T, 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12): e63.
- ORUI Y, 1999. Species Identification of *Meloidogyne* spp. (Nematoda: Meloidogynidae) in Japan by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR). *Japanese Journal of Nematology*, 29(2): 7-15.
- PENG H, PENG D L, HU X Q, HE X F, WANG Q, HUANG W K, HE W T, 2012. Loop-mediated isothermal amplification for rapid and precise detection of the burrowing nematode, *Radopholus similis*, directly from diseased plant tissues. *Nematology*, 14(8): 977-986.
- POWERS T O, HARRIS T S, HYMAN B C, 1993. Mitochondrial DNA sequence divergence among *Meloidogyne incognita*, *Romanomermis culicivora*, *Ascaris suum*, and *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Nematology*, 25(4): 564.
- ZIJLSTRA C, DONKERS D, 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterised amplified region (SCAR) based PCR assays. *Nematology*, 2(8): 847-853.

(责任编辑: 郑姗姗, 郭莹)

<http://www.jbscn.org>