

小杆线虫 *Oscheius tipulae* JL1 的鉴定及生物学特性

田成丽, 刘金文, 张金花, 李茂海, 朱 峰, 滕占伟, 刘艳伟, 李建平*

(吉林省农业科学院植物保护研究所, 公主岭 136100)

摘要: 利用大蜡螟 *Galleria mellonella* L. 诱集法, 从采自吉林省的土样中分离到小杆类昆虫病原线虫 1 种。经形态学、ITS 及 28S rDNA 序列分析鉴定, 明确了该线虫为 *Oscheius tipulae* JL1。室内生物测定结果表明: 24 h 时, 线虫 JL1 浓度为 120 IJs/larva 及以上时, 大蜡螟的死亡率达 90% 以上; 48 h 时, 浓度 40 IJs/larva 时, 大蜡螟死亡率达 93% 以上; 60 h 时, 浓度高于 20 IJs/larva 时, 大蜡螟死亡率 100%。耐热性方面, 在 38 °C 下处理 8 h, 线虫死亡率快速增加, 35 °C 处理 16 h, 线虫死亡率开始快速增加。线虫 JL1 在 35 和 38 °C 条件下, 分别至少可耐 16 和 8 h 的高温, 死亡率分别在 3.2% 和 15.3% 以下。结果表明该线虫具有较好的耐热力、侵染力和致死力, 未来有望用于害虫防治。

关键词: 小杆线虫; *Oscheius tipulae*; 侵染力; 耐热性; 大蜡螟

中图分类号: S476 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-9261(2019)06-0900-08

Identification and Biological Characteristics of *Oscheius tipulae* JL1

TIAN Chengli, LIU Jinwen, ZHANG Jinhua, LI Maohai, ZHU Feng, TENG Zhanwei, LIU Yanwei, LI Jianping*

(Institute of Plant Protection, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100, China)

Abstract: An entomopathogenic nematode isolated from soil samples collected from Jilin Province, China with the *Galleria mellonella* traps was identified as *Oscheius tipulae* JL1 strain using morphological, ITS and 28S rDNA sequence analysis. Biological assay showed that mortality of *G. mellonella* was more than 90% at 24 h exposure to nematode concentration of over 120 IJs/larva, reached 93% at 48 h exposure to nematode concentration of 40 IJs/larva, and was up to 100% at 60 h exposure to nematode concentration of over 20 IJs/larva. The nematode showed certain thermal resistance, with mortality of below 15.3% and 3.2% at 8 h exposure to 38 °C and at 16 h exposure to 35 °C, respectively. When the thermal stress was stronger, nematode mortality increased rapidly. The results show that JL1 has adequate thermal tolerance, high infectivity and pathogenicity, and is potential for utilization in insect pests control.

Key words: *Rhabditis*; *Oscheius tipulae*; infectivity; thermal tolerance; *Galleria mellonella*

化学农药的大量使用导致严重农药残留问题, 生物防治技术的应用与研发日益加速, 其中昆虫病原线虫 (entomopathogenic nematodes, EPNs) 是生防措施中的重要一环。在国内外已被广泛用于防治多种农林害虫, 尤其是地下害虫和蛀干害虫, 如蛴螬^[1,2]、黄曲条跳甲^[3]、小地老虎^[4]、韭蛆^[5]及云斑天牛^[6]等, 防治效果均达 80% 以上。

EPNs 主要包括斯氏线虫属 *Steinernema*、异小杆线虫属 *Heterorhabditis* 和 *Oscheius* 线虫属^[7]。国内外绝大多数对 EPNs 的研究和应用集中于斯氏线虫属和异小杆线虫属, 对 *Oscheius* 线虫属的研究相对较少。*Oscheius* 属中多数是自由生活线虫^[8] (Free-live nematodes, FLNs), Dillman 等^[9]的研究表明该属的绝大多数种类符合 EPNs 的典型特征, 属于 EPNs。Zhou 等^[10]研究表明 *Oscheius microvilli* 对大蜡螟的致死终浓

收稿日期: 2019-03-22

基金项目: 吉林省科技厅国际科技合作项目 (20170414024GH); 吉林省农业科技创新工程重大项目 (CXGC2017ZD007)

作者简介: 田成丽, 硕士, E-mail: tianchengliqq@163.com; *通信作者, 硕士, 研究员, E-mail: 540395958@qq.com。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2019.06.005

度为 69.1 IJs/mL。Torrini 等^[11]研究表明利用 *O. onirici* 分别侵染大蜡螟幼虫和黄粉虫幼虫 7 d 后, 其致死率分别为 46%和 58%。

O. tipulae 因首次从欧洲大蚊 *Tipula paludosa* 幼虫体内分离出来而得名^[12], 1971 年被 Lam 和 Webster^[13] 首次描述, 1993 年被 Sudhaus^[14] 重新描述, 该线虫是一种重要的 EPNs, 但国内外对其研究较少, 国外仅有数篇研究报道, 且多数为有关分布和分类方面的研究, 而国内尚未见报道。

EPNs 的侵染力、耐热性、致病力及对寄主的选择性在不同种类及同一种类不同品系间差异很大, 为筛选适应东北地区气候环境的耐热性好、侵染力强、致病力高的 EPNs, 本研究对从吉林省的土样中分离获得的 1 种 EPN 通过传统分类法与分子生物技术手段相结合进行了鉴定, 并测定了其生物学特性、侵染力及耐高温性, 为未来进一步开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

大蜡螟 *Galleria mellonella* L. 来自吉林省农业科学院植物保护研究所。

1.2 土样的采集与 EPN 的分离、收集

土样来自吉林省长春市 (129°57'22.40" E、48°45'36.51" N) 杂木林下 0~20 cm 表层土。每 10 m² 范围内随机 5 点采集土样, 每点各取土样约 200 g, 每点采集 3 份, 置于 10~15 °C 条件下保存^[15]。

将采集的土样混匀后装入塑料盒中, 参照 Akhurst 和 Bedding 诱集方法 B 并改进^[16], 将 5 头大蜡螟老熟幼虫埋入土壤中作为活体诱饵, 置于 25 °C 条件下避光培养, 每个土样 3 次重复。48 h 后定期查看, 将死亡的大蜡螟放入线虫收集盘^[17], 4 d 后观察是否有线虫爬出。

1.3 EPN 的扩繁和保存

2 张湿润的无菌滤纸放在直径 6 cm 的培养皿中, 加入 20 头大蜡螟, 然后将首次分离出的 EPN 再次侵染大蜡螟, 24 h 后检查大蜡螟的死亡情况。

无菌水反复多次纯化收集到的线虫, 直至清洗干净。将线虫悬浮液放入 5 °C 冰箱中短期保存, 或将线虫液倒入含有 0.1% 甲醛水溶液的海绵中放入 5 °C 的冰箱长期保存。

1.4 EPN 的形态学观察

收集侵染期幼虫及成虫各 20 条, 60 °C 水浴 30~60 s 杀死线虫, 然后用 TAF 固定液 (7 mL 三乙醇胺 + 2 mL 福尔马林 + 91 mL 无菌水) 放置 7 d 或乳酚固定 3~12 h, 加无水甘油封片^[18,19]。在 Olympus-BX53 显微镜下进行观察、用 CellSens Standard 软件进行测量与描述。

1.5 EPN 的分子鉴定

1.5.1 单条线虫 DNA 的提取 单条线虫 DNA 提取方法参照王江岭^[20], 略作改进。将供试线虫放入灭菌 dd H₂O 中清洗 3~5 次, 挑取单条线虫用刀切 2 段后放入含 8 μL ddH₂O 和 1 μL 10×PCR Buffer (Mg²⁺ free) 的 200 μL EP 管中, 离心后放入液氮中 1 min, 65 °C 加热 2 min, 反复冻融 2 次, 冷却至室温后, 加入 1 μL 蛋白酶 K, 56 °C 加热 15 min, 95 °C 加热 10 min, 离心后得到 DNA 放入 -20 °C 保存备用。

1.5.2 PCR 扩增 扩增线虫的 ITS、28S 基因的保守区 D2-D3^[21], ITS rDNA: 正向引物 TW81: 5'-GTTTC CGTAGGTGAACCTGC-3'; 反向引物 AB28: 5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3'^[22], D2-D3 基因上游引物 5-AGCGGAGGAAAAGAACTAA-3', 下游引物: 5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3'。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

25 μL PCR 反应体系为: 12.5 μL Mix Taq DNA 聚合酶, 正反引物各 1 μL, 线虫 DNA 模板 2 μL, ddH₂O 8.5 μL。反应程序参照 Ye 等^[23] 略改进: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 循环 35 次, 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离鉴定, 用 1×TAE 作电泳缓冲液, 在电压 120 V 下电泳 25 min。

1.5.3 DNA 测序及序列分析 PCR 产物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序部纯化、测序。所得序列登入 GenBank 的 blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 比对^[24], 再利用 Clustal W^[25,26] 和 MEGA 7 软件构建系统发育树, 分析待鉴定线虫与相关线虫的系统发育关系。

1.6 EPN 的生物学特性

1.6.1 EPN 侵染力测定 利用大蜡螟末龄幼虫作为测试对象。设 6 个不同浓度线虫处理，分别为 20、40、80、120、160、200 IJs/larva，每个处理 10 头大蜡螟，重复 3 次，清水为对照。将 10 头大蜡螟分别放入铺有 2 层滤纸直径为 60 mm 培养皿中，分别滴入 1 mL 不同浓度存活率为 100% 的线虫液，置于 25 ℃、相对湿度 75% 的恒温、避光培养室内培养，每 12 h 记录大蜡螟的死亡数，大蜡螟死亡率及校正死亡率计算公式如下：大蜡螟死亡率（%）=死亡大蜡螟虫口数量/供试大蜡螟冲口数量×100；大蜡螟校正死亡率（%）=（处理大蜡螟死亡率－对照大蜡螟死亡率）/（1－对照大蜡螟死亡率）×100。

1.6.2 EPN 高温耐受性测定 参照 Glazer^[27,28]的方法测定线虫在 35、38 和 40 ℃ 下的耐受性。取新收集的存活率 100% 的线虫悬浮液 2 mL 进行测试，浓度为 1000 IJs/mL，放入直径 1.8 cm×7.5 cm 的平底指形试管中，用封口膜封口后置于水浴锅中。每个处理 3 次重复，35 ℃ 和 38 ℃ 处理每隔 1 h、40 ℃ 每隔 15 min 检查 1 次。检查时，从试管内吸取 100 μL 线虫悬浮液放入加有 1 mL 无菌水的 1.5 mL EP 管中，在 25 ℃ 恒温培养箱中放置 24 h 后，记录线虫的死亡数。

1.7 数据统计与分析

本试验涉及的数据分析均使用 Excel 2010 和 SPSS 19.0 统计分析软件完成。利用 SPSS 19.0 软件中 LSD 和 Duncan’s 多重比较法处理差异显著性。

2 结果与分析

2.1 EPN 形态鉴定

2.1.1 形态测量值 将线虫暂命名为 JL1 的形态测量值见表 1。与 Sudhaus^[14]对小杆属线虫 *O. tipulae* 的原始描述相比，除最大体宽更宽，体长和食道更长外，其余特征值均在该种原始描述的范围内。

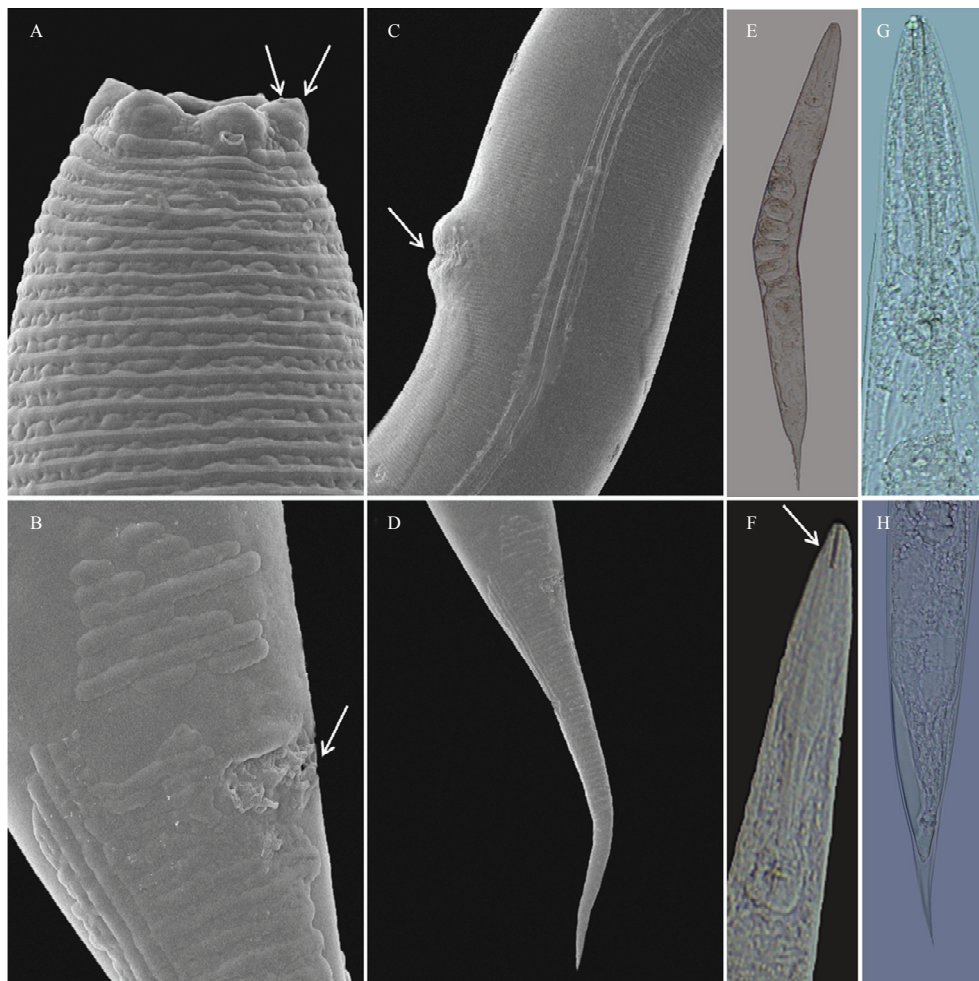
表 1 *O. tipulae*（雌雄同体）形态测量值的比较（μm）
Table 1 Comparison of *O. tipulae* (hermaphrodite) measurements (μm)

参数 Parameter	<i>O. tipulae</i> JL1	<i>O. tipulae</i> 的原始描述 <i>O. tipulae</i> culture specimens ^[14]
n	20	
L	690.7~868.5 (785.9±61.2)	505~691 (603)
W	50.1~68.2 (61.1±6.4)	29~42 (33)
SL	12~19.7 (16.1±2.3)	17~20 (19)
SW	3.8~5.5 (4.8±0.6)	—
HW	9.7~13.3 (11.8±1.2)	—
ES	144.2~163.3 (154.3±6.2)	129~151 (140)
V	301.4~446.0 (387.1±43.0)	—
T	81.64~98.9 (91.6±5.5)	70~95 (83)
ABW	18.3~38.5 (24.2±6.5)	—
a	12.5~18.7 (13.2±1.5)	16.3~19.9 (18.4)
b	4.7~5.6 (5.1±0.3)	3.9~4.9 (4.3)
c	7.9~9.5 (8.6±0.5)	6.2~8.5 (7.0)
c'	2.7~5.3 (4.0±0.9)	4.2~6.4 (5.2)
V (%)	43.6~54.9 (49.2±3.4)	46.4~1.7 (48.6)

注：n=样品数；L=体长；W=最大体宽；SL=口腔长；SW=口腔宽；HW=头宽；ES=食道长；V=头端至阴门的距离；T=尾长；ABW=肛门处体宽；a=体长/体宽；b=体长/食道长；c=体长/尾长；c'=尾长/肛门处体宽；V（%）=头端至阴门的距离×100/体长。

Note: n=Number; L=Body length; W=Greatest body width; SL=Stoma length; SW=Stoma width; HW=Head width; ES=Distance from anterior end to the base of esophagus; V=Length head to vulva; T=Tail length; ABW=Anal body width; a=Body length/greatest body width; b=Body length/ES; c=Body length/tail length; c'=Tail length/Anal body width; V(%)=Length head to vulva×100/Body length.

2.1.2 形态特征描述 雌雄同体: 虫体长约 785.9 (690.7~868.5) μm , 体表光滑具环纹, 头宽约 9~13 μm , 6 个唇瓣闭合, 与体轮廓连贯; 每个唇瓣 2 个小乳突 (图 1A); 口腔管状 (图 1F), 长而窄, 长约为宽的 4 倍, 约为食道长 8%~12%。食道前体部柱形, 其后略膨大, 没有真正的中食道球 (图 1F)。阴户在虫体中部或近中部, 为一横向裂缝, 外阴唇光滑, 略凸起 (图 1C)。从阴户处向尾端虫体渐细 (图 1D), 长约肛门 (图 1B) 处体宽的 4.0 (2.7~5.3) 倍 (表 1)。雌虫: 温和杀死后, 身体略向腹部弯曲或僵直 (图 1E), 唇瓣、头部等都与雌雄同体相似, 但小于雌雄同体。侵染期幼虫: 温和杀死后虫体直线型或略向腹面弯曲。口腔、食道形态 (图 1G) 与成虫相似。尾圆锥状, 末端尖细 (图 1H)。雄虫未见。



A: 小乳突 Small sensillae; B: 肛门 Anus; C: 阴门 Vulva; D: 尾部 Tail; E: 虫体 Hermaphrodite; F: 口腔 Stoma; G: 前体部 The forebody of the female; H: 尾 Tail; 标尺 A, F=10 μm ; B=40 μm ; C, E=100 μm ; D, G, H=20 μm (A~D 为扫描电镜 Scanning electron microscopy, E~H 为光学显微镜 Optical microscope)

图 1 线虫 JL1 在扫描电镜和光学显微镜下的形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of nematode JL 1 under scanning electron microscope and optical microscope

2.2 昆虫病原线虫分子生物学鉴定

PCR 扩增得到昆虫病原线虫 JL1 的 ITS 和 28S rDNA (D2-D3) 基因片段大小分别为 841 和 860 bp。分别与 GenBank 中序列比对及相应系统进化树分析, 待鉴定线虫 JL1 的 ITS 序列与 *O. tipulae* 种群 (KX036752.1 和 KT728763.1) 100%同源 (图 2); 28S 序列和 *O. tipulae* 种群 (EU195969.1) 的 100%同源 (图 3)。综合 ITS 和 28S rDNA 基因比对结果, 鉴定线虫 JL1 为 *O. tipulae* 品系。

2.3 线虫 JL1 生物学测定

2.3.1 线虫 JL1 对大蜡螟的侵染力测定 测定结果表明, 在 20~160 IJs/larva 的 6 个不同浓度处理中, 随

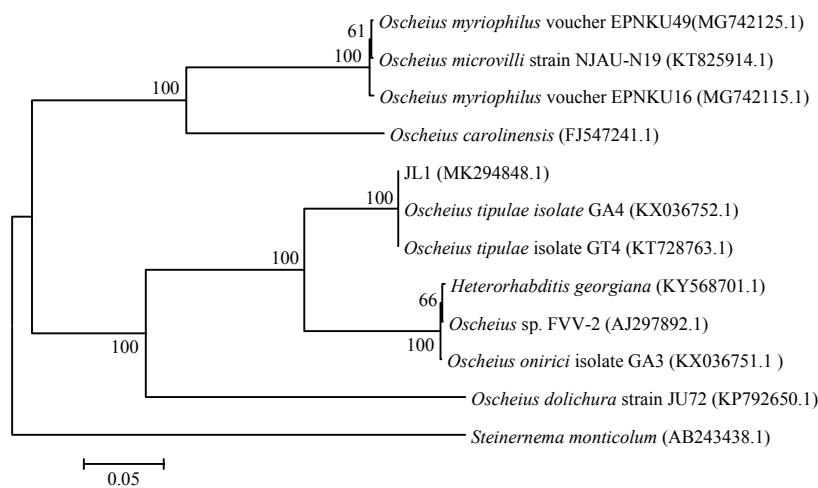


图 2 基于 ITS 基因序列构建的线虫 JL1 的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of nematode JL1 based on ITS sequences data

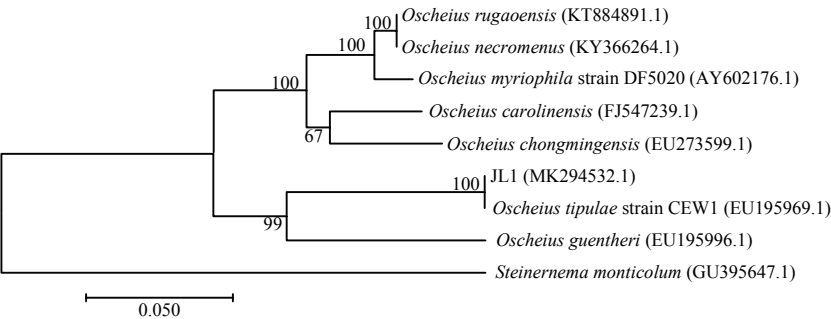
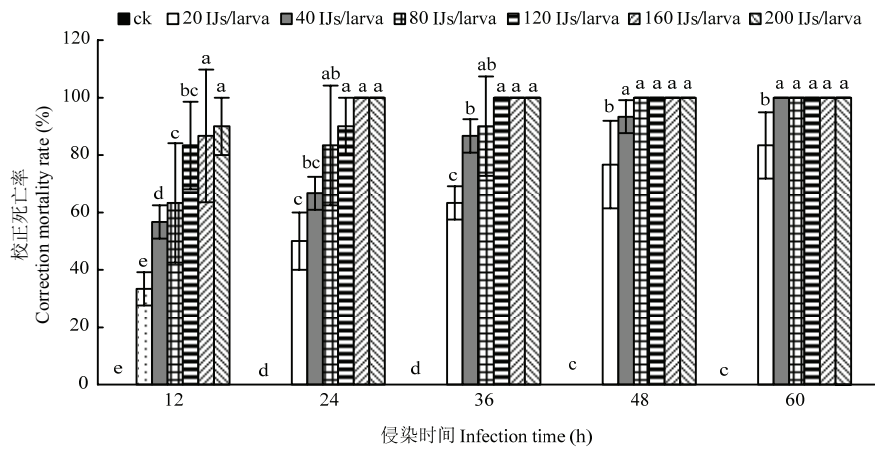


图 3 基于 D2-D3 基因序列构建线虫 JL1 的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of nematode JL1 based on D2-D3 sequences data

着线虫 JL1 浓度的增加,大蜡螟死亡率和死亡速度增加。在相同浓度处理下,死亡率随线虫 JL1 侵染时间的延长而升高。侵染 12 h 时死亡率在不同浓度间差异显著,24 h 时 120 IJs/larva 以上不同浓度间死亡率无显著差异,大蜡螟死亡率达 90%以上。48 h 时 40 IJs/larva 以上的浓度间死亡率无显著差异,大蜡螟死亡率达 93%以上。60 h 时除 20 IJs/larva 浓度处理外,其他处理的大蜡螟最终 100%全部死亡(图 4)。



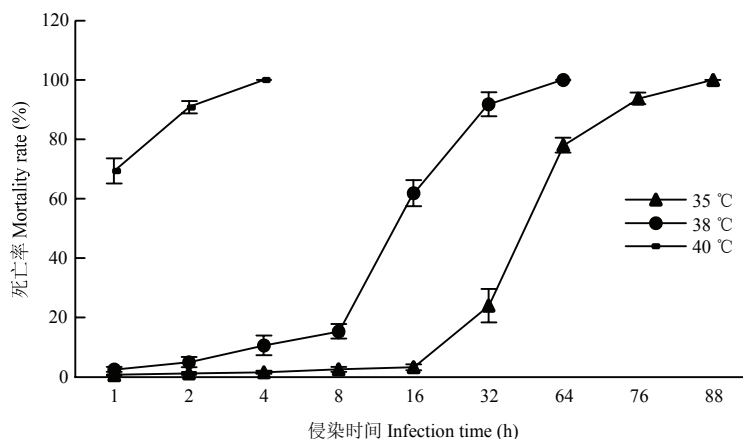
注: 数据为平均值±标准误, 不同小写字母表示 0.05 水平上差异显著。

Note: Data were presented as mean±SE, data with different lowercase letters indicated significant difference at 0.05 level.

图 4 JL1 不同浓度侵染大蜡螟幼虫的校正死亡率比较

Fig. 4 Correction mortality rate of *G. mellonella* larvae infected with different concentration of nematode JL1

2.3.2 线虫 JL1 对高温的耐受性测定 随着处理时间的增加, 线虫死亡率增加, 当达到一定时间时, 死亡率快速增加。线虫 JL1 难以耐受 40 °C, 1 h 内死亡率高达 69.3%。在 38 °C 条件下, 8 h 后线虫死亡率快速增加。35 °C 条件下, 32 h 后线虫死亡率开始快速增加。上述结果表明, 线虫 JL1 在 35 和 38 °C 条件下, 分别至少可耐 16 和 8 h 的高温, 死亡率分别在 3.2% 和 15.3% 以下 (图 5)。



注: 数据为平均值±标准误。

Note: Data were presented as mean±SE.

图 5 线虫 *O. tipulae* JL1 在不同温度下的死亡率

Fig. 5 Mortality rate of *O. tipulae* JL1 under different temperatures

3 讨论

Oscheius 属主要包括 *O. tipulae*^[15]、*O. microvilli*^[10]、*O. chongmingensis*^[29]和 *O. gingeri* 等, 除 *O. insectivorus*^[30]外, 其余都被认定为 EPNs。EPNs 的研究绝大多数集中于斯氏线虫属, 其次是异小杆线虫属, 对 *O. tipulae* 的研究报道主要集中在形态学^[31]和基因学^[32]上, 对其生理学特性及其侵染力的研究很少, 国际上仅有数篇报道, 国内未见公开研究报道。本研究对从吉林省获得的 *O. tipulae* JL1 的分类地位、侵染力及高温耐受力进行了研究。

在分类地位方面, 线虫 JL1 的形态描述与 Sudhaus^[14]对小杆属线虫 *O. tipulae* 的原始描述基本相符。通过 ITS 与 28S 序列构建的系统进化树, 线虫 JL1 与 *O. tipulae* 种群(KX036752.1、KT728763.1 和 EU195969.1) 聚类到同一分支, 且同源性均达到 100% (图 2)。综合形态学和分子生物学的结果, 线虫 JL1 为 *O. tipulae* 种群。*Oscheius* 属由 *Dolichura* 和 *Insectivora* 两个小支系构成^[33], 本研究分离到的线虫 JL1 属于 *Dolichura* 分支^[32]。

在侵染力方面, *O. tipulae* JL1 对大蜡螟具有很高的侵染力和快速致死力, 即浓度为 200 IJs/larva、24 h, 大蜡螟的校正死亡率 100%, 显著地高于同等浓度下 *Neoaplectana glaser* 和 *N. anomali* 在 36 h 对大蜡螟的死亡率 (分别为 5% 和 95%)^[34], 与小卷蛾斯氏线虫 *Steinernema carpocapsae* ItS-CAO1 对大蜡螟的死亡率相同^[35]。80 IJs/larva 浓度下, 36 h 大蜡螟的校正死亡率为 90.0%, 显著地高于 *S. longicaudum* BPS 同等浓度下 48 h 大蜡螟的死亡率 76.7%^[36]; 40 IJs/larva, 48 h 时校正死亡率 93.33%, 略高于相近浓度 *O. microvilli* n. sp. 对大蜡螟的死亡率 93.31%^[10]。

在耐热性方面, *Heterorhabditis* sp.、*S. carpocapsae* 和 *Otiorynchus sulcatus* 最适温度范围为 5~30 °C, *S. feltiae* 为 8~30 °C^[37,38]。本研究的线虫 *O. tipulae* JL1 对高温具有较高的耐受性, 在 38 °C、水浴 2 h 条件下, 线虫 JL1 的死亡率为 4.9%, 显著地低于同等处理下嗜菌异小杆线虫 *H. bacteriophora* XJZL1409 的死亡率 (99.67%)^[28], 38 °C、水浴 32 h 时线虫 JL1 的死亡率为 91.8%, 而相同处理下嗜菌异小杆线虫 *H. bacteriophora* JNR 全部死亡。

综上所述, *O. tipulae* JL1 具有较高的耐高温性、侵染力及快速致死力, 进一步开发利用价值较大。继

续开发利用尚需对该线虫的抗逆力、耐温性、繁殖力、共生菌及线虫和共生菌的人工大量培养技术等进行深入研究。

参 考 文 献

- [1] Patil J, Rangasamy V. Field evaluation of the entomopathogenic nematodes against the white grub, *Leucopholis lepidophora* Blanchard (Coleoptera: Scarabaeidae)[J]. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 2018, 28(41): 1-6.
- [2] Guo W, Yan X, Zhao C, *et al.* Efficacy of entomopathogenic *Steinernema* and *Heterorhabditis* nematodes against white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) in peanut fields[J]. Journal of Economic Entomology, 2013, 106(3): 1112-1117.
- [3] 陈瑞, 王国迪, 陈寅通, 等. 昆虫病原线虫和黄板对黄曲条跳甲的控制效果[J]. 浙江农业科学, 2018, 59(10): 1886-1887, 1891.
- [4] 李文琼, 徐正会, 周雪英, 等. 不同品系昆虫病原线虫对烟草小地老虎的致病力[J]. 环境昆虫学报, 2017, 39(5): 1025-1031.
- [5] Ma J, Chen S L, Moens M, *et al.* Efficacy of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) against the chive gnat, *Bradysia odoriphaga*[J]. Journal of Pest Science, 2013, 86(3): 551-561.
- [6] 陈贤群, 刘奇志, 曹景富, 等. 两种昆虫病原线虫防治核桃云斑天牛田间效果评价[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(4): 456-461.
- [7] Tiisetso E L, Phelelani T M, Shaun A, *et al.* Whole genome sequence of *Oscheius* sp. TEL-2014 entomopathogenic nematodes isolated from South Africa[J]. Genomics Data, 2016, 7: 259-261.
- [8] Raquel C H, Rubén B P, Francisco Á B P, *et al.* Vegetation drives assemblages of entomopathogenic nematodes and other soil organisms: Evidence from the Algarve, Portugal[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2019, 128: 150-163.
- [9] Dillman A R, Chaston J M, Adams B J, *et al.* An entomopathogenic nematode by any other name[J]. PLoS Pathogens, 2012, 8(3): e1002527.
- [10] Zhou G X, Yang H, Wang F, *et al.* *Oscheius microvilli* n. sp. (Nematoda: Rhabditidae): a facultatively pathogenic nematode from Chongming Island, China[J]. Journal of Nematology, 2017, 49(1): 33-41.
- [11] Giulia T, Giuseppe M, Beatrice C. *Oscheius onirici* sp. n. (Nematoda: Rhabditidae): a new entomopathogenic nematode from an Italian cave[J]. Zootaxa, 2015, 3937(3): 533-548.
- [12] Félix M A. The *C. elegans* Research Community, WormBook: *Oscheius tipulae*[M]. doi/10.1895/wormbook.1.119.1, <http://www.wormbook.org>. 2006, 1-7.
- [13] Lam A B Q, Webster J M. Morphology and biology of *Panagrolaimus tipulae* n.sp.(Panagrolaimidae) and *Rhabditis* (*Rhabditella*) *tipulae* n. sp. (*Rhabditidae*), from leatherjacket larvae, *Tipula paludosa* (Diptera: Tipulidae)[J]. Nematologica, 1971, 17: 201-212.
- [14] Sudhaus W. Redescription of *Rhabditis* (*Oscheius*) *tipulae* (Nematoda: Rhabditidae) associated with leatherjackets, larvae of *Tipula paludosa* (Diptera: Tipulidae)[J]. Nematologica, 1993, 39: 234-239.
- [15] Andressa L B, Juliana M O R, Cláudio M G O, *et al.* Entomopathogenic nematodes in agricultural areas in Brazil[J]. Scientific Reports, 2017, 7(45254): 1-7.
- [16] Akhurst R J, Bedding R A. Natural occurrence of insect pathogenic nematodes (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) in soil in Australia[J]. Australian Journal of Entomology, 1986, 25(3): 241-244.
- [17] White G F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures[J]. Science, 1927, 66(1709): 302-303.
- [18] 刘维志. 植物病原线虫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000, 281-304.
- [19] Kaya H K, Stock S P. Manual of Techniques in Insect Pathology: Techniques in Insect Nematology[M]. San Diego: Academic Press, 1997, 281-324.
- [20] 王江岭, 张建成, 顾建锋, 等. 单条线虫 DNA 提取方法[J]. 植物检疫, 2011, 25(2): 32-35.
- [21] Steven A N, Eugene B, Stock S P. Phylogenetic relationships of *Steinernema* Travassos, 1927 (Nematoda: Cephalobina: *Steinernematidae*) based on nuclear, mitochondrial and morphological data[J]. Systematic Parasitology, 2006, 63(3): 161-181.
- [22] Joyce S A, Reid A, Driver F, *et al.* Application of polymerase chain reaction (PCR) methods to identification of entomopathogenic nematodes[M]//COST 812 Biotechnology, ed. Genetics of Entomopathogenic Nematode-bacterium Complexes. European Commission: DG XII, 1994, 178-187.
- [23] Ye W, Giblin-Davis R M, Braasch H, *et al.* Phylogenetic relationships among *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae) inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequence data[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2007, 43(3): 1185-1197.
- [24] Altschul S F, Madden T L, Schäffer A A, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(17): 3389-3402.

- [25] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0[J]. Bioinformatics, 2007, 23(21): 2947-2948.
- [26] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice[J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22(22): 4673-4680.
- [27] Glazer I, Liran N, Poinar G O, *et al.* Identification and biological activity of newly isolated *Heterorhabditid* populations from Israel[J]. Fundamental of Applied Nematology, 1993, 16(5): 467-472.
- [28] 刘红兵, 刘奇志. 来自新疆的昆虫病原线虫的鉴定及生物学特性的研究[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(1): 106-111.
- [29] Jarosová A, Puza V, Zurovcová M. The complete mitochondrial genome of the facultative entomopathogenic nematode *Oscieus chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae)[J]. Mitochondrial DNA, 2016, 27(5): 3109-3110.
- [30] Rashid P, Eapen S J, Devasahayam S, *et al.* A new species of entomopathogenic nematode *Oscieus gingeri* sp. n. (Nematoda: Rhabditidae) from ginger rhizosphere[J]. Phytopathology and Plant Protection, 2013, 46(5): 526-535.
- [31] Marie L, Dichtel D, Marie A F. The two steps of vulval induction in *Oscieus tipulae* CEW1 recruit common regulators including a MEK kinase[J]. Developmental Biology, 2004, 265(1): 113-126.
- [32] Marie A F, Andy V, Jacques V. Three biological species closely related to *Rhabditis (Oscieus) pseudodolichura* Koerner in osche, 1952[J]. Journal of Nematology, 2001, 33(2-3): 104-109.
- [33] Sudhaus W, Hooper D J. Rhabditis (*Oscieus*) *guentheri* sp.n., an unusual species with reduced posterior ovary, with observations on the *Dolichura* and *Insectivora* groups (Nematoda: Rhabditidae)[J]. Nematologica, 1994, 40(1-4): 508-533.
- [34] George O P Jr, Eugene M K. *Neoplectana glaseri* and *N. anomaly*: sibling species or parallelism?[J]. Revue Nématol, 1988, 11(1): 13-191.
- [35] Torrini G, Landi S, Tarasco E, *et al.* Evaluation of *Steinernema carpocapsae* survival and infectivity after cryopreservation[J]. BioControl, 2016, 61: 461-469.
- [36] 刘奇志, 张丽娟, 王玉柱, 等. 昆虫病原线虫 (*Steinernema longicaudum* BPS 品系) 生物学测定[J]. 中国农学通报, 2009, 25(2): 236-239.
- [37] 吴文丹, 尹姣, 曹雅忠, 等. 我国昆虫病原线虫的研究与应用现状[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(6): 817-822.
- [38] Mahfouz M M, Tarique H A, James C. Biocontrol Agents: Entomopathogenic and Slug Parasitic Nematodes[M]. Boston: CAB International, 2017, 96-97.