贵州省大豆孢囊线虫的发生与分布

龙海波[1*]， 陈 文[2]， 裴月令[1]， 冯推紫[1]， 孙燕芳[1]

(1. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所，农业部热带作物有害生物综合治理实验室，海口 571101；2. 贵州省植物保护研究所，贵阳 550006)

摘要 大豆孢囊线虫病是威胁大豆生产的重大病害之一。2015—2016年，采用随机取样的方法对贵州省大豆孢囊线虫的发生和分布情况进行了调查。调查范围包括贵阳、六盘水、安顺、毕节、黔西南和遵义等6个地区下辖的14个县(区)，共采集土样287份。调查结果表明，贵州省大豆孢囊线虫的总检出率为28.2%，其中毕节地区的大方县和赫章县孢囊检出率最高，分别达到46.7%和45.0%，而在遵义市、贵阳市和黔西南州孢囊检出率为0。六盘水地区的水城县孢囊发生量最大，平均孢囊数为3.4个/200 g土，最大孢囊数达到17个/200 g土；安顺地区的镇宁和关岭县大豆孢囊线虫发生程度最轻，每200 g土样平均孢囊数分别为0.3和0.2个，最大孢囊数仅为2个/200 g土。分离的孢囊主要形态特征与大豆孢囊线虫一致，并且ITS序列与甘肃大豆孢囊线虫种群序列一致性达100%。根据形态学观察和ITS序列分析比对，将贵州省采集到的孢囊线虫鉴定为大豆孢囊线虫。本研究结果可为有效防控贵州省大豆孢囊线虫病提供依据。

关键词 贵州省； 大豆孢囊线虫； 发生； 分布

中图分类号： S 435.651 **文献标识码：** A **DOI：** 10.3969/j.issn.0529－1542.2017.06.030

Occurrence and distribution of *Heterodera glycines* in Guizhou Province

Long Haibo[1], Chen Wen[2], Pei Yueling[1], Feng Tuizi[1], Sun Yanfang[1]

(1. *Key Laboratory of Integrated Pest Management on Tropical Crops, Ministry of Agriculture, Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou* 571101, *China*; 2. *Guizhou Institute of Plant Protection, Guiyang* 550006, *China*)

Abstract Soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) is the most devastating and yield limiting pest of soybean in the world. A systematic survey of *H. glycines* in Guizhou Province was conducted during 2015—2016. A total of 287 soil samples were collected covering 14 counties from Guiyang, Liupanshui, Anshun, Bijie, Qianxinan and Zunyi. The results showed that the total incidence of soybean cyst nematode was 28.2%. Dafang and Hezhang showed the highest incidence of 46.7% and 45.0%, respectively. No cyst was found in Zunyi, Guiyang and Qianxinan. The highest cyst number existed in Shuicheng County, with the average density of 3.4 cysts per 200 g soil, and the max number of cysts was 17 per 200 g soil. The lowest cyst number existed in Zhenning and Guanling, with the average density of 0.3 and 0.2 cysts per 200 g soil, respectively, and both max number of cysts was only 2 per 200 g soil. Morphology of the cysts was the same as that for *H. glycines*, and the ITS sequence had 100% identity with *H. glycines* Gansu isolate in GenBank. Therefore, the cyst nematodes were identified as *Heterodera glycines* based on morphological characteristics and ITS sequences. This result can provide a basis for effective prevention of soybean cyst nematode in Guizhou Province.

Key words Guizhou Province; *Heterodera glycines*; occurrence; distribution

大豆孢囊线虫 *Heterodera glycines*（soybean cyst nematode)是一种专性、固着型内寄生植物病原线虫，其引起的大豆孢囊线虫病是大豆生产上的毁灭性病害之一[1-2]。大豆孢囊线虫于1988年在我国

收稿日期： 2017－04－30 **修订日期：** 2017－05－28
基金项目： 国家公益性行业(农业)科研专项(201503114)；中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金(1630042017024)
* 通信作者 E-mail: longhb@catas.cn

东北地区首次发现，目前在中国、俄罗斯、美国、加拿大、巴西、阿根廷等世界主要大豆种植国家广泛分布，每年造成数十亿美元的经济损失[3-4]。在中国，黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古、北京、安徽、江苏、山东、山西、河北、河南、浙江、陕西、宁夏、甘肃和新疆等近20余个省（自治区、直辖市）均已有SCN的发生报道[5-9]，发生面积超过200万hm^2，其中以东北和黄淮海大豆产区发生最为严重，一般引起大豆减产30%～50%，严重时甚至可导致绝产[10]。据报道，大豆孢囊线虫在我国不仅危害大豆，还可侵染烟草、地黄和泡桐等经济作物[11-13]。

贵州位于云贵高原东部，属于典型的喀斯特地貌山地省，大豆种植区域广，从海拔200～2 300 m均有分布，资源十分丰富[14]。由于独特的地理环境，贵州大豆的种植方式主要是与玉米等作物进行间、套作[15]。尽管贵州大豆种植历史悠久，但一直未有大豆孢囊线虫病害调查和发生分布的研究。2015年7月，笔者在对贵州省作物孢囊线虫种类进行调查时首次在六盘水市的水城县分离到大豆孢囊线虫。随后，笔者对贵州的贵阳市、毕节市、黔西南州和安顺市等地区的大豆孢囊线虫进行了系统的采样调查，以期明确大豆孢囊线虫在贵州的分布范围、发生程度和危害特点，为该病害的及时有效治理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 取样调查

2015－2016年，对贵州省的贵阳、六盘水、安顺、毕节、黔西南和遵义等6个地级市下辖的14个县（区）共287个地块进行了调查。采用5点取样法对每一地块土壤进行取样，挖取表土下20 cm左右土壤，每块地取1～2 kg装于塑料自封袋，标注采集信息带回实验室分离孢囊。

1.2 孢囊分离

参照黄文坤等[16]描述的方法进行。采集的土壤样品经自然风干，混匀后每份称取200 g土壤置于塑料桶中加水冲洗，充分搅动后将泥浆悬浮液依次经20目（0.83 mm孔径）和100目（0.15 mm孔径）筛网过滤。收集100目筛网残渣用清水冲洗干净，转移至定性滤纸上，体式显微镜下观察并挑取孢囊计数。

1.3 孢囊形态学鉴定

每样点随机挑取1～2个饱满的孢囊，取部分孢囊切取阴门锥，将切下的阴门锥制成临时玻片，在显微镜下直接观察。按照王明祖等[17]的方法对孢囊线虫种类进行初步鉴定。

1.4 rDNA-ITS序列扩增

在形态学鉴定的基础上，随机挑取10个饱满孢囊，参照亓晓莉等[18]方法提取单个孢囊线虫的DNA。利用通用引物TW81（GTTTCCGTAGGTGAACCTGC）和AB28（ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT）扩增孢囊线虫的rDNA-ITS序列[19]。PCR总体系为50 μL，其中10×PCR Buffer 5 μL，dNTPs 4 μL，Mg^{2+} 3 μL，上下游引物各1 μL，r*Taq*酶（TaKaRa）0.25 μL，DNA模板5 μL，灭菌双蒸水30.75 μL。反应条件：94℃预变性5 min；然后94℃ 30 s，55℃退火1 min，72℃延伸1 min，共35个循环；最后72℃延伸10 min。PCR产物经切胶纯化、连接、转化，最后挑取阳性克隆送华大基因公司测序。

2 结果

2.1 贵州孢囊线虫的分布状况

共采集了贵州省14个县（区），52个乡镇287份田间土样，其中共有81份土样分离到孢囊线虫，检出率为28.2%（表1）。由表1可知，在毕节、六盘水和安顺采集的土样中都检测到孢囊，其中毕节地区的大方县和赫章县孢囊检出率最高，分别达到46.7%和45.0%。其次，六盘水的水城县孢囊检出率也达到了42.9%。而在遵义市、贵阳市和黔西南州采集的74份土样中均未检测到孢囊线虫（表1）。

2.2 孢囊线虫的发生程度

由表2可知，贵州检测出孢囊的地区总体孢囊发生程度均较轻，但不同地块的孢囊密度差别较大。其中，安顺地区的镇宁和关岭孢囊线虫发生程度最轻，每200 g土样平均孢囊数分别为0.3个和0.2个，最大孢囊数仅为2个/200 g土。六盘水地区的水城县孢囊量最大，平均孢囊数为3.4个/200 g土，最大孢囊数达到17个/200 g土。毕节地区的孢囊量居中，每200 g土样平均孢囊数在0.8～1.8个之间，其中大方县最大孢囊数也达到了11个/200 g土，但黔西县最大孢囊数仅为3个/200 g土（表2）。

表 1　大豆孢囊线虫在贵州不同地区的发生与分布情况

Table 1　Occurrence and distribution of *Heterodera glycines* in different regions in Guizhou

地区(市) Region (City)	县 County	采集土样数/份 Number of sample	检出孢囊土样数/份 Number of sample with cyst	孢囊检出率/% Cyst detection ratio
六盘水 Liupanshui	水城 Shuicheng	35	15	42.9
	盘县 Panxian	22	8	36.4
毕节 Bijie	纳雍 Nayong	20	5	25.0
	大方 Dafang	45	21	46.7
	赫章 Hezhang	40	18	45.0
	黔西 Qianxi	26	10	38.5
黔西南 Qianxinan	晴隆 Qinglong	16	0	0
	安龙 Anlong	16	0	0
	贞丰 Zhenfeng	18	0	0
	兴义 Xingyi	12	0	0
安顺 Anshun	镇宁 Zhenning	10	2	20.0
	关岭 Guanling	15	2	13.3
贵阳 Guiyang	花溪 Huaxi	9	0	0
遵义 Zunyi	遵义 Zunyi	3	0	0

表 2　大豆孢囊线虫在贵州不同地区的发生程度

Table 2　Occurrence degree of *Heterodera glycines* in different regions in Guizhou

县 County	含不同孢囊数量地块的百分率/% Percentage of samples with different quantities of cysts					最大孢囊数/个·(200 g 土)$^{-1}$ Max number of cysts	平均孢囊数/个·(200 g 土)$^{-1}$ Average density of cysts
	0	1～5	6～10	10～15	16～20		
水城 Shuicheng	57.1	20.0	5.7	8.6	8.6	17	3.4
盘县 Panxian	63.6	27.3	9.1	0.0	0.0	9	1.1
纳雍 Nayong	75.0	15.0	10.0	0.0	0.0	7	1.0
大方 Dafang	53.3	35.6	8.9	2.2	0.0	11	1.8
赫章 Hezhang	55.0	37.5	7.5	0.0	0.0	10	1.5
黔西 Qianxi	61.5	38.5	0.0	0.0	0.0	3	0.8
镇宁 Zhenning	80.0	20.0	0.0	0.0	0.0	2	0.3
关岭 Guanling	86.7	13.3	0.0	0.0	0.0	2	0.2

2.3　孢囊线虫的鉴定

分离的孢囊的主要形态特征与大豆孢囊线虫一致(图 1)。孢囊深褐色或黄色,柠檬形,阴门锥和颈部都有明显的突出;阴门锥下方有较多不规则的泡状突,排列不整齐,下桥发达。阴门膜孔为双半膜孔(图 1)。进一步应用通用引物 TW81 和 AB28 扩增孢囊线虫 18S 和 28S rDNA 之间的 ITS 序列,均获得了大小约为1 000 bp的电泳条带(图 2)。测序结果表明,回收片段长度均为 1 030 bp。其中,选择毕节大方种群(GZDF1,GenBank 登录号 KY964273)进行同源性搜索比对,结果显示该序列与 GenBank 中来自我国甘肃地区的大豆孢囊线虫种群(Hg-GS4)ITS 序列(GU595427)具有 100%的一致性(*E*-value=0)。因此,根据形态学特征和 ITS 序列,将在贵州分离的孢囊种类鉴定为大豆孢囊线虫。

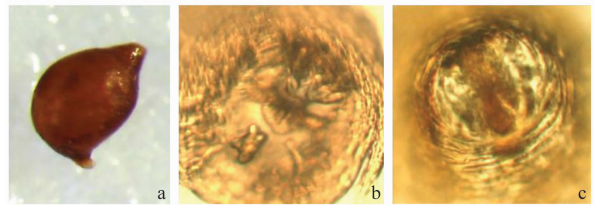


图 1　大豆孢囊线虫的孢囊(a)及阴门锥(b, c)形态

Fig. 1　Morphological characteristic of cyst (a) and vulval cone (b, c) of *Heterodera glycines*

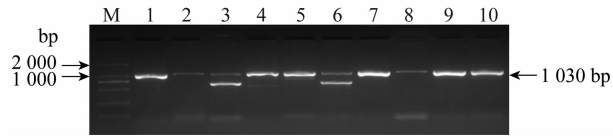


图 2　大豆孢囊线虫 rDNA-ITS 扩增片段电泳检测

Fig. 2　PCR amplification of rDNA-ITS sequences of *Heterodera glycines*

3　讨论

大豆孢囊线虫通常以孢囊的形式在土壤中越冬

越夏，卵块在孢囊的保护下具有很强的抗逆性，能在缺少寄主的条件下存活数年，直至遇到适宜的条件再孵化成2龄幼虫侵染寄主[20]。因此，大豆孢囊线虫病是一种毁灭性的土传病害，一旦发生，极难治理。我国大豆孢囊线虫发生率最高的地区在东北和黄淮海地区，检出率在50%以上[5]。孙玉秋等[21]调查了黑龙江35个市县的112份土样，发现大豆孢囊线虫的发生率达到100%。黑龙江省每年因大豆孢囊线虫病危害造成的大豆减产达4亿公斤，经济损失达14亿～18亿元[22]。此外，张俊立等对河北省大豆孢囊线虫的分布和危害进行了调查，结果表明大豆孢囊线虫病的总发生率也达到了73.93%[6]。本研究表明，贵州省大豆孢囊线虫的发生分布主要集中在贵州省西北部。尽管总检出率仅为28.2%，但毕节和六盘水的一些地块检出率超过40%，表明两地大豆孢囊线虫发生已较为普遍。值得注意的是，大豆孢囊线虫还可寄生烟草[19]，而贵州是我国重要的烟叶生产大省，需引起高度重视，防止大豆孢囊线虫进一步传播扩散。

大豆孢囊线虫的危害水平与田间初始孢囊密度（或卵块密度）密切相关。在美国，大豆孢囊线虫的防控阈值大约为每100 cm^3 土中有100个卵[20]。大豆孢囊线虫的单孢囊卵量一般为200～600个[23]。周书其等[24]通过人工室内接种测定了不同孢囊密度对大豆产量的危害损失率，结果表明，100 g土中接种1个孢囊，大豆产量损失15%；接种10个孢囊，大豆减产36%，而接种30个和100个孢囊，减产分别达到了48%和75%。由此可见，每100 g土壤中含有1个饱满孢囊即可导致大豆产量损失。本研究表明，贵州地区总体孢囊发生程度较轻，但不同地块的孢囊密度差别较大。孢囊发生量最大的地区在水城县，平均孢囊数为3.4个/200 g土，单份土样最大孢囊数达到了17个/200 g土（表2）。可以推测，大豆孢囊线虫已对当地大豆造成了一定程度的产量损失。而且，贵州大豆通常种植在坡地、山地，灌溉条件差，栽培粗放，植株抵抗力差，大豆孢囊线虫的危害可能比平原地区更为严重。

目前，防治大豆孢囊线虫的主要措施有轮作、种植抗性品种和使用化学药剂[25]。化学杀线剂使用成本较高，并不适宜在贵州山区推广应用。同时，大豆孢囊线虫病是积年流行性病害，即使采取与非寄主作物轮作的措施，1～2年后重新种植寄主植物，大豆孢囊线虫仍能大量繁殖。此外，大豆孢囊线虫种群拥有丰富的遗传多样性，理论存在的生理小种有16个[26]，增加了抗性育种的难度。本研究初步明确了大豆孢囊线虫在贵州省的分布和发生程度，还需深入开展大豆孢囊线虫病的发生规律调查、明确生理小种、筛选抗病品种及高效低毒杀线剂，确保贵州大豆产业的可持续发展。

参考文献

[1] Noel G R. The soybean cyst nematode [C]//Lamberti F, Taylor C E. Cyst nematodes. New York: USA. Plenum Press, 1986: 257－268.

[2] 刘维志. 植物病原线虫学[M]. 北京：中国农业出版社，2000：281－293.

[3] Jones J T, Haegeman A, Danchin E G J, et al. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology [J]. Molecular Plant Pathology, 2013, 14(9): 946－961.

[4] Klink V P, Overall C C, Alkharouf N W, et al. A time-course comparative microarray analysis of an in compatible and compatible response by *Glycine max* (soybean) to *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode) infection [J]. Planta, 2007, 226(6): 1423－1447.

[5] 宋美静，朱晓峰，王东，等. 我国大豆主产区大豆胞囊线虫群体分布及致病性分化研究[J]. 大豆科学，2016，35(4)：630－636.

[6] 张俊立，彭德良，曹克强. 河北省大豆孢囊线虫分子鉴定及其分布[J]. 植物保护，2005，31(1)：40－43.

[7] 李克梅，日孜旺古丽，董艳秋. 新疆大豆孢囊线虫病的初步研究[J]. 植物保护，2014，40(2)：132－134.

[8] 孔祥超，李红梅，耿甜，等. 大豆种质资源对大豆孢囊线虫3号和4号生理小种的抗性鉴定[J]. 植物保护，2012，38(1)：146－150.

[9] Zheng J, Zhang Y, Li X, et al. First report of the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*, on soybean in Zhejiang, Eastern China [J]. Plant Disease, 2009, 93(3): 319.

[10] 阮维斌，王敬国，张福锁. 根际微生态系统中的大豆孢囊线虫[J]. 植物病理学报，2002，32(3)：200－213.

[11] 程子超，赵洪海，李建立，等. 山东省寄生烟草的孢囊线虫种类鉴定及种内群体间rDNA-ITS-RFLP分析[J]. 植物病理学报，2012，42(4)：387－395.

[12] 陈金堂，李知. 为害地黄的大豆孢囊线虫的初步研究[J]. 植物病理学报，1981，11(1)：37－44.

[13] 张东升. 大豆胞囊线虫侵染泡桐和豌豆的研究[J]. 植物病理学报，1995，25(3)：275－278.

[14] 杨春杰，陈佳琴，朱星陶，等，贵州大豆种质资源的表型多样性[J]. 贵州农业科学，2015，43(10)：46－49.

[15] 朱星陶，陈佳琴，强兴明，等. 贵州大豆生产现状及产业技术需求与对策[J]. 贵州农业科学，2012，40(10)：208－213.

[16] 黄文坤，叶文兴，王高峰，等. 宁夏地区禾谷孢囊线虫的发生与分布[J]. 华中农业大学学报，2011，30(1)：74－77.

（下转186页）

yellows symptoms (abstract in Japanese)[J]. Japanese Journal Phytopathology, 2002, 68: 258.
[5] Deng Jianxin, Lee J H, Paul N C, et al. Occurrence of leaf blight on cosmos caused by *Alternaria cosmosa* in Korea[J]. Plant Pathology Journal, 2015, 31(1): 78-82.
[6] Groenewald J Z, Nakashima C, Nishikawa J, et al. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses [J]. Studies in Mycology, 2013, 75: 115-170.
[7] Kwon J H, Kang S W, Son K E, et al. Anthracnose of cosmos caused by *Colletotrichum acutatum* in Korea [J]. Plant Pathology Journal, 1999, 15: 172-174.
[8] Udayanga D, Liu Xingzhong, Crous P W, et al. A multi-locus phylogenetic evaluation of *Diaporthe* (*Phomopsis*)[J]. Fungal Diversity, 2012, 56(1): 157-171.
[9] 李河, 周国英, 徐建平. 一种新油茶炭疽病原多基因序列鉴定[J]. 植物保护, 2015, 41(2): 92-96.
[10] 宋博, 徐兵强, 朱晓锋, 等. 南疆红枣黑斑病病原鉴定及其保守基因序列分析[J]. 植物病理学报, 2017, 47(3): 411-415.
[11] Simmons E G. *Alternaria*: an identification manual [M]. CBS Fungal Biodiversity Centre Utrecht Press (Netherlands), 2007.
[12] Vrandečić K, Jurković D, Ćosić J, et al. First report of foliar and stem blight on sunflower caused by *Alternaria helianthiinficiens* in Croatia [J]. Plant Disease, 2012, 96(11): 1698.
[13] 孙霞. 链格孢属真菌现代分类方法研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2006.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 176 页)

[17] 王明祖, 彭德良, 武学勤. 小麦孢囊线虫病的研究 I. 病原鉴定[J]. 华中农业大学学报, 1991, 10(4): 352-356.
[18] 亓晓莉, 彭德良, 彭焕, 等. 基于 SCAR 标记的小麦禾谷孢囊线虫快速分子检测技术[J]. 中国农业科学, 2012, 45(21): 4388-4395.
[19] Subbotin S A, Peng Deliang, Moens M. A rapid method for the identification of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* using duplex PCR [J]. Nematology, 2001, 3(4): 365-371.
[20] Davis E L, Tylka G L. Soybean cyst nematode disease [J]. The Plant Health Instructor. 2000, DOI: 10.1094/PHI-I-2000-0725-0.
[21] 孙玉秋, 许艳丽, 李春杰, 等. 黑龙江省大豆胞囊线虫种群分布和卵密度研究[J]. 大豆科学, 2011, 30(2): 250-253.
[22] 刘海勤, 刘泉成, 赵洪海. 大豆孢囊线虫大豆和烟草群体寄生性比较分析[J]. 植物保护, 2016, 42(2): 68-73.
[23] 许艳丽, 王丽芳, 战丽莉. 大豆胞囊线虫病研究进展(续一)[J]. 大豆科技, 2010(1): 21-24.
[24] 周书其, 王振荣, 高同春, 等. 大豆孢囊线虫危害大豆损失率研究[J]. 植物病理学报, 1990, 20(2): 116.
[25] 车延平. 大豆孢囊线虫的研究进展及其防治现状[J]. 黑龙江科技信息, 2002(10): 25.
[26] Riggs R D, Schmitt D P. Complete characterization of the scheme for *Heterodera glycines* [J]. Journal of Nematology, 1988, 20(3): 392-395.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 181 页)

[2] 檀国印, 杨志玲, 袁志林, 等. 白术真菌病害的分离鉴定[J]. 浙江农业学报, 2013(5): 1050-1055.
[3] 李小霞, 肖仲久, 李黛, 等. 白术白绢病病原菌的分子鉴定[J]. 贵州农业科学, 2011(12): 126-128.
[4] 鲁鹏, 肖仲久, 李小霞, 等. 白术白绢病菌的生物学特性及杀菌剂对其室内毒力测定[J]. 贵州农业科学, 2010(8): 90-93.
[5] 潘兰兰, 郑永利, 吕先真. 白术主要病害的发生及综合治理[J]. 浙江农业科学, 2006(3): 315-318.
[6] 俞永信. 白术铁叶病初步研究[J]. 浙江农业科学, 1974(1): 39-42.
[7] 臧少先, 安信伯, 石丽军, 等. 白术根腐病症状类型及病原鉴定[J]. 河北农业大学学报, 2005(3): 73-76.
[8] 张礼维. 贵州白术根腐病病原鉴定及防治研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2015.
[9] 刘凡. 白术根腐病病原鉴定、生物学特性和防治研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2012.
[10] 桑维钧, 练启仙, 宋宝安, 等. 贵州省白术真菌病害种类调查及防治[J]. 贵州农业科学, 2006(3): 40-41.
[11] 黄力刚. 白术主要病害的发生与防治[J]. 现代农业科技, 2005(2): 19-20.
[12] 宋涛. 药用植物白术主要病害的综合防治[J]. 吉林农业, 2015(9): 96.
[13] 沈立荣, 庞阿土, 陈集双. 白术纹枯病研究初报[J]. 植物保护, 1993, 19(3): 28-29.
[14] 胡琼波. 白术白绢病发生规律与防治研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2002.
[15] 张璨. 几种杀菌剂对西藏设施蔬菜立枯病菌的室内毒力测定[C]//中国植物病理学会. 中国植物病理学会 2012 年学术年会论文集, 2012: 492.
[16] Grichar W J. Management of stem rot of peanuts (*Arachis hypogaea*) caused by *Sclerotium rolfsii* with fungicides [J]. Crop Protection, 1995, 14(2): 111-115.
[17] 张献强, 黎起秦, 甘启范, 等. 防治茉莉白绢病的药剂筛选研究[J]. 安徽农业科学, 2010(10): 5152-5154.

(责任编辑: 杨明丽)