甘肃省陇东南大豆孢囊线虫的发生和分布

罗 宁[1]， 李惠霞[1*]， 郭 静[1]， 徐鹏刚[1]， 张淑玲[1]， 刘永刚[2]

（1. 甘肃农业大学植物保护学院，甘肃省农作物病虫害生物防治工程实验室，兰州 730070；
2. 甘肃省农业科学院植物保护研究所，兰州 730070）

摘要 为了解甘肃省陇东南地区大豆孢囊线虫病分布和发生程度，采用Z字形取样法，对甘肃省陇东南地区9个县(区)37个乡镇大豆孢囊线虫病的发生和分布进行调查，并根据形态特征和rDNA-ITS序列比对鉴定线虫种类。共采集土样411份，陇东地区大豆孢囊线虫检出率为87.2%，其中镇原、西峰、正宁、华池和环县的检出率最高，达100%，镇原孢囊发生量最大，平均孢囊数为11.4个/100 g土；陇南地区大豆孢囊线虫检出率为63.7%，成县和徽县分别为64.0%、63.0%，平均孢囊数分别为0.9和1.2个/100 g土。经形态学特征观测和rDNA-ITS序列比对，甘肃省陇东南采集到的孢囊线虫均鉴定为大豆孢囊线虫 *Heterodera glycines*。

关键词 大豆孢囊线虫病； 分布； 发生； 鉴定

中图分类号： S 432.45 **文献标识码：** A **DOI：** 10.16688/j.zwbh.2018253

Occurrence and distribution of *Heterodera glycines* in southeast of Gansu province

LUO Ning[1]， LI Huixia[1]， GUO Jing[1]， XU Penggang[1]， ZHANG Shuling[1]， LIU Yonggang[2]

（1. *College of Plant Protection*，*Gansu Agricultural University*，*Biocontrol Engineering Laboratory of Crop Diseases and Pests of Gansu Province*，*Lanzhou* 730070，*China*；2. *Institute of Plant Protection*，*Gansu Academy of Agricultural Sciences*，*Lanzhou* 730070，*China*）

Abstract In order to understand the occurrence and distribution of soybean cyst nematode in southeast of Gansu Province，zigzag sampling method was used to investigate soybean cyst nematodes in 37 townships of 9 counties in southeastern Gansu. The species of nematodes were identified based on the morphological observation and rDNA-ITS sequence analysis. Totally，411 samples of soil samples were collected. The results showed that the detection rate of soybean cyst nematodes in eastern Gansu was 87.2%，among which the detection rates in Zhenyuan，Xifeng，Zhengning，Huachi and Huan County were the highest，with the rates of 100%，while that in Qingcheng was the lowest by 39.3%. The highest density was found in Zhenyuan with the average cysts number of 11.4 per 100 g soil. The detection rate of soybean cyst nematodes in southern Gansu was 63.7% and those in Chengxian and Huixian were 64.0% and 63.0%，respectively，and average densities of nematodes were 0.9 and 1.2 per 100 g soil，respectively. Morphological observation and rDNA-ITS sequence analysis showed that the cyst nematodes collected in southeastern Gansu were identified as *Heterodera glycines*.

Key words soybean cyst nematode disease； distribution； occurrence； identification

大豆孢囊线虫 *Heterodera glycines* 是豆类生产上的重要线虫，在世界各主要大豆产区均有发生[1]。1899年俄国人雅切夫斯基等在我国黑龙江省西部首次发现大豆孢囊线虫病，随后巴西、日本、韩国、朝鲜、美国、加拿大、哥伦比亚、印度尼西亚、俄罗斯、埃及等国家相继报道了大豆孢囊线虫的发生[2-4]。目前，我国黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古、北京、河南、河北、山东、山西、安徽、江苏、湖北、浙江、上海、新疆、陕西、宁夏和甘肃等地已证实有大豆孢囊线虫分布[5-8]。该病一般造成大豆减产5%～10%，严重时减产达30%～50%，甚至绝产[5,9-10]，严重制约豆类作物生产安全。

收稿日期： 2018－06－12 **修订日期：** 2018－09－01
基金项目： 国家公益性行业(农业)科研专项(201503114)；甘肃省科技支撑计划(1604NKCA053-2)
* 通信作者 E-mail：lihx@gsau.edu.cn

近年来，随着大豆孢囊线虫在各地严重发生，贵州、山东、河北、新疆及黑龙江等地对大豆孢囊线虫开展了较系统的研究，但甘肃省相关研究的报道较少。叶文兴等[11]，Peng 等[12]报道在甘肃省发现大豆孢囊线虫，但有关其发生情况和危害程度尚缺乏了解。

甘肃省种植大豆区域广、历史久，陇东南是甘肃省大豆主产区，以种植春播大豆为主，多数地区小麦、玉米、大豆进行轮作，少数夏播大豆是在小麦和油菜收获后复种。目前，大豆孢囊线虫在甘肃省的分布、发生以及危害情况尚不清楚，一旦大面积发生，将严重影响甘肃地区大豆的安全生产。本研究拟对甘肃陇东南地区大豆孢囊线虫开展调查研究，以期明确大豆孢囊线虫病在该地区的分布、发生程度，并对病原线虫种类进行鉴定，为该病害的及时有效防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 田间土样的采集

用“Z”字形取样法采集大豆根际 5～20 cm 土壤，每块田取 25～30 个点，将各点土样混合成 1 份样本，约 500～1 000 g，装入塑料袋。对样本进行编号(表 1)，并用手持 GPS 定位系统准确记录采集地的经纬度、海拔高度及所属村镇等信息。相邻采集地点一般间隔为 5～10 km。

表 1 孢囊线虫样本信息

Table 1 Cyst nematode sample information

编号 Number	种群代码 Code	采集地点 Sampling site	编号 Number	种群代码 Code	采集地点 Sampling site
1	Gs-Xp	正宁西坡	13	Gs-Cr	宁县春荣
2	Gs-Ym	庆城驿马	14	Gs-Xn	宁县新宁
3	Gs-Xm	庆城玄马	15	Gs-Jz	宁县焦村
4	Gs-Tc	宁县太昌	16	Gs-Xj	西峰肖金
5	Gs-Mb	环县木钵	17	Gs-Dz	西峰董志
6	Gs-Hd	环县洪德	18	Gs-Lj	镇原临径
7	Gs-Hs	宁县和盛	19	Gs-Sx	镇原上肖
8	Gs-Mq	宁县米桥	20	Gs-Ps	成县抛沙
9	Gs-Pz	宁县平子	21	Gs-Dc	成县店村
10	Gs-Lp	宁县良平	22	Gs-Sy	徽县水阳
11	Gs-Zs	宁县早胜	23	Gs-Yn	徽县永宁
12	Gs-Sg	宁县石鼓			

1.2 孢囊的分离和计数

参照李惠霞等[13]的试验方法，随机取 100 g 风干后土样倒入塑料桶内，加入自来水搅拌使其泥浆均匀，静置 2～3 min，将上层的悬浮液依次倒入 26 目和 60 目的筛网过滤，重复 3～4 次。冲洗 26 目筛网上的残留物，使孢囊和细渣全部冲入 60 目筛网中，用小水流从正面轻轻淋洗 60 目筛。冲洗干净后，用洗气瓶冲洗 60 目网筛上的剩余物质至尼龙纱上，编号，在解剖镜下检查尼龙纱上的孢囊并计数，统计孢囊检出率。

孢囊检出率＝检测出孢囊的土样数/总土样数×100%。

1.3 孢囊线虫的形态学鉴定

从各群体中挑选饱满孢囊，参照冯志新[14]的方法在体视显微镜下用锋利的解剖刀切下阴门锥，用牙签或者昆虫针轻轻清除阴门锥内侧附着物，转移到 40% H_2O_2 中漂白处理 4 min。依次转移至 70%、95%、100% 乙醇中脱水，制作成临时玻片。参照王明祖等[15]的方法鉴定孢囊线虫的种类。

1.4 孢囊线虫 DNA 的提取

参照彭德良等[16]的方法提取线虫 DNA。挑取 1 个饱满孢囊，放入装有 14 μL 灭菌重蒸水的 Eppendorf 管中，加入 3 μL10×PCR buffer(含 Mg^{2+})和 3 μL 蛋白酶 K，在液氮中速冻 1 min。用乙醇消毒的玻璃棒快速研磨 1～2 min。－20℃冷冻 2 h，然后将 Eppendorf 管在 65℃下温育 1.5 h，95℃处理 10 min，使蛋白酶 K 变性，离心 1 min，取上清 DNA 悬浮液放入－20℃保存，备用。

1.5 不同地区大豆孢囊线虫群体的 rDNA-ITS 扩增及测序分析

采用 25 μL 的 PCR 扩增体系[17]：模板 DNA 2 μL、通用引物 TW81(5′-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3′)和 AB28(5′-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3′)各 1 μL、10×PCR buffer(含 Mg^{2+})2.5 μL、dNTPs 1 μL、*Taq* DNA 聚合酶 0.2 μL，ddH_2O 补足到 25 μL。扩增条件：94℃预变性 4 min；94℃ 30 s，56℃ 30 s，72℃ 1 min，循环 35 次；72℃延伸 10 min，扩增产物－20℃保存。取 5 μL 扩增产物在 1.5%琼脂糖凝胶上电泳，100 V，30 min，电泳后在紫外灯下观测、照相。将扩增产物送上海生工生物技术有限公司进行纯化测序，进行亲缘关系分析。

2 结果与分析

2.1 甘肃陇东南大豆孢囊线虫的分布

本试验采集了甘肃陇东南 9 个县(区)37 个乡镇的 411 份土壤样品，调查结果表明，295 份土壤样品含有孢囊线虫，孢囊检出率为 71.8%(表 2)。所调查的 9 县均有孢囊线虫分布，其中镇原、西峰、正宁、华池及环县的检出率最高，达 100%。宁县、徽县、成县的孢囊检出率分别达到 98.2%、63%、64%，检出率最低的是庆城，为 39.3%(表 2)。

表 2　大豆孢囊线虫在甘肃省部分地区的分布与发生

Table 2　Occurrence and distribution of *Heterodera glycines* in part of Gansu province

地区(市) Region(City)	县(区) 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
庆阳市 Qingyang	镇原 Zhenyuan	28	28	100.0
	西峰 Xifeng	13	13	100.0
	宁县 Ningxian	57	56	98.2
	正宁 Zhengning	5	5	100.0
	庆城 Qingcheng	28	11	39.3
	华池 Huachi	1	1	100.0
	环县 Huanxian	9	9	100.0
陇南市 Longnan	徽县 Huixian	92	58	63.0
	成县 Chengxian	178	114	64.0
合计 Total		411	295	71.8

2.2　甘肃陇东南孢囊线虫发生程度

由表 3 可知,甘肃陇东南调查的 9 个县(区)均有大豆孢囊线虫发生,不同地区大豆孢囊线虫密度差别较大,同一地区大豆田的孢囊线虫发生程度也存在差异。平均孢囊数为 5.9 个/100 g 土。镇原和宁县孢囊线虫发生程度最为严重,每 100 g 土样平均孢囊数分别为 11.4 个和 10.7 个,个别地块土样孢囊数超过 20 个;陇南地区的成县和徽县孢囊线虫发生程度最轻,每 100 g 土样平均孢囊数分别为 1.2 个和 0.9 个,且 35%以上的土样无孢囊检出,60%以上土样每 100 g 土中平均孢囊数在 1～5 个之间(表 3)。

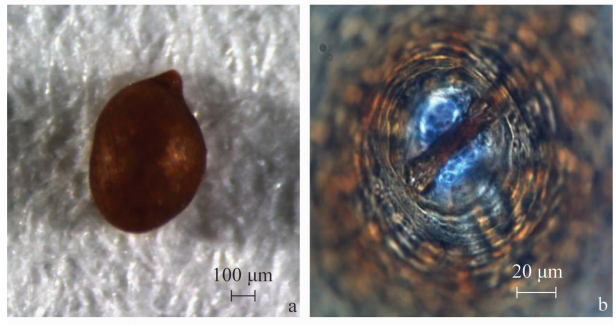
表 3　大豆孢囊线虫病在不同地区的发生程度

Table 3　Occurrence degree of *Heterodera glycines* in different regions

县 County	含不同孢囊数量土样的百分率/% Percentage of samples with different quantities of cysts						平均孢囊数/个·(100 g)$^{-1}$ Average density of cysts
	0 个	1～5 个	6～10 个	11～15 个	16～20 个	20 个以上	
镇原 Zhenyuan	0.0	25.0	39.3	21.4	7.1	10.7	11.4
西峰 Xifeng	0.0	23.1	53.8	7.7	7.7	7.7	8.6
宁县 Ningxian	1.8	28.1	33.3	17.5	5.3	14.0	10.7
正宁 Zhengning	0.0	40.0	20.0	20.0	0.0	20.0	9.2
庆城 Qingcheng	35.7	32.1	14.3	14.3	3.6	0.0	4.1
华池 Huachi	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.5
环县 Huanxian	0.0	77.8	22.2	0.0	0.0	0.0	3.0
徽县 Huixian	37.0	60.9	2.2	0.0	0.0	0.0	0.9
成县 Chengxian	36.0	60.1	3.4	0.6	0.0	0.0	1.2
平均值 Mean	12.3	49.7	20.9	9.1	2.6	5.8	5.9

2.3　孢囊线虫的形态学鉴定

孢囊呈梨形或柠檬形,颜色浅褐色至深褐色(图 1a),长度为 663.1 μm(547.0～752.1 μm);宽度为 457.5 μm(343.3～565.0 μm);阴门锥下方有较多明显的长形泡状突,具有双半膜孔,两膜孔间有发育良好的下桥(图 1b),阴门膜孔长度 41.4 μm(38.8～43.3 μm);膜孔宽度 40.3 μm(39.3～41.1 μm);阴门裂长 42.4 μm(36.3～47.8 μm);下桥长 89.3 μm(82.1～101.8 μm)。本试验研究结果与刘维志等[6]的测量结果基本一致,将其初步鉴定为大豆孢囊线虫 *H. glycines*。



a: 孢囊; b: 阴门锥

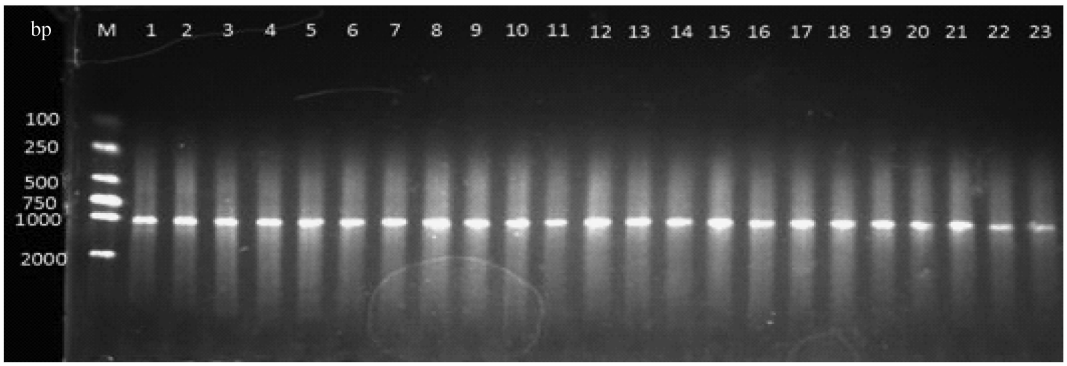
a: Cyst of *Heterodera glycines*; b: Vulval cone

图 1　大豆孢囊线虫的形态

Fig. 1　Morphology of *Heterodera glycines*

2.4 不同地区大豆孢囊线虫群体 rDNA-ITS 序列分析

对甘肃省陇东南采集的孢囊线虫群体的 rDNA-ITS 进行 PCR 扩增，均扩增出约 1 000 bp 的 DNA 片段（图 2）。选择具有代表性群体在 GenBank 中进行同源性比对分析，结果表明采自陇东西坡（Gs-Xp，MH371304）、玄马（Gs-Xm，MH371375）、洪得（Gs-Hd，MH371378）、焦作（Gs-Jz，MH375356）、肖金（Gs-Xj，MH375357）、上肖（Gs-Sx，MH375358）、陇南抛沙（Gs-Ps，MH375376）的孢囊线虫群体 rDNA-ITS 序列与来自美国的大豆孢囊线虫群体（Clone3460）ITS 序列（KY794755）相似度达 99%；而陇东焦作、陇南抛沙两个群体的 rDNA-ITS 序列与来自我国山东的大豆孢囊线虫群体（YS1）ITS 序列（JQ068764）、伊朗大豆孢囊线虫群体（Did38）ITS 序列（JX024210）相似性达 100%。综上，根据形态观察和 ITS 序列分析，确定甘肃省陇东南地区寄生在大豆上的孢囊线虫均为大豆孢囊线虫 *H. glycines*。



M: DL2000; 1~23: Gs-Xp、Gs-Ym、Gs-Xm、Gs-Tc、Gs-Mb、Gs-Hd、Gs-Hs、Gs-Mq、Gs-Pz、Gs-Lp、Gs-Zs、Gs-Sg、Gs-Cr、Gs-Xn、Gs-Jz、Gs-Xj、Gs-Dz、Gs-Lj、Gs-Sx、Gs-Ps、Gs-Dc、Gs-Sy、Gs-Yn

图 2 甘肃省 23 个大豆孢囊线虫群体 rDNA-ITS 序列 PCR 扩增产物

Fig. 2 PCR amplification products of rDNA-ITS sequences of 23 soybean cyst nematodes populations in Gansu province

3 讨论

大豆孢囊线虫属于孢囊线虫属 *Heterodera*，是一种土传的定居性内寄生线虫，也是具有毁灭性危害的植物线虫。大豆孢囊线虫可在显微镜下通过观察孢囊形态进行鉴别，成熟的孢囊为柠檬形或梨形，浅褐色至深褐色，颈部和尾部有明显突出，阴门锥双半膜孔，阴门裂较长，两膜孔间的下桥明显[18]。本试验采集的孢囊线虫经形态学鉴定和 rDNA-ITS 序列分析表明均是大豆孢囊线虫，与叶文兴等[12]的鉴定结果一致。

大豆孢囊线虫可通过跨区作业的收割器械，水流及沙尘暴等传播。甘肃与青海、陕西、宁夏和新疆四省相邻，而新疆、陕西和宁夏均发现大豆孢囊线虫病[19]。2003 年，张俊立等[20]在河北省采集大豆根际土壤样品 65 份，大豆孢囊线虫检出率高达 73.93%。宋美静等[21]对全国 20 个省（自治区）的大豆孢囊线虫进行调查，结果总检出率达 69.4%，其中东北和黄淮海地区发生率最高，沧州、长春和黑河地区检出率高达 100%。黑龙江省 35 个地区大豆孢囊线虫的发生率高达 100%，每年造成的损失高达数十亿元[22]。龙海波等[23]对贵州省大豆孢囊线虫的发生和危害进行调查，结果表明总检出率仅为 28.2%，但大方县和赫章县发生严重，检出率超过 40%。本试验表明，甘肃省大豆主产地区大豆孢囊线虫的发生较普遍，陇东地区大豆孢囊线虫的检出率为 87.2%，陇南地区大豆孢囊线虫的检出率为 63.7%。在本试验中，庆阳地区大豆孢囊检出率高于陇南，可能是由于陇南降雨量远大于庆阳，而大豆孢囊最适宜孵化的土壤含水量为 10%～25%[24]，土壤含水量过高会抑制孢囊线虫的繁殖；陇南地区长期实施小麦、马铃薯、玉米和大豆轮作种植，也是导致大豆孢囊线虫发生率低的原因。

大豆是甘肃陇东南地区主要经济作物，目前甘肃省种植面积保持在 13.33 万～15.33 万 hm^2，陇东地区面积最大，达到 10 万 hm^2[25]。本研究表明，陇东地区检出率为 87.2%，由此可推算出仅陇东地区大豆孢囊线虫病的发生面积约为 8.7 万 hm^2。甘肃省地处黄土、青藏和蒙古三大高原交汇地带，气候类型多样，且位于黄河上游，沙尘和黄河灌溉水加剧了大豆孢囊

线虫的传播和蔓延。陇南地区气候温和，属东亚季风气候；陇东地区属半干旱区，年均降水量 500 mm，是典型大陆性气候，适宜大豆孢囊线虫病发生。

大豆孢囊线虫病是一种积年流行病害，且病情逐年加重。在实际生产中种植抗耐病品种轮作、喷施化学药剂及生物防治等措施均对大豆孢囊线虫病有一定的防治作用[26]，但这些措施都存在局限性，轮作周期长，在有限的耕地资源内不易实现，生物防治在大田中不稳定，易受环境影响，常用杀线剂成本较高且污染环境，农户难以接受。大豆孢囊线虫理论上存在 16 个生理小种[27]，连续种植抗病品种会改变生理小种，导致育种的难度增加。因此，应进一步研究甘肃省大豆孢囊线虫的侵染规律、生理小种类型，探明该病害防治关键期，通过田间试验筛选出生防制剂和高效低毒的杀线剂，为今后甘肃省大豆孢囊线虫的防治奠定基础。

参考文献

[1] 陈双. 大豆孢囊线虫生理小种鉴定及其致病性研究[D]. 哈尔滨：黑龙江大学，2015.

[2] LIU Xingzhong，LI Jianqiang，ZHANG Dongsheng. History and status of soybean cyst nematode in China [J]. International Journal of Nematology，1997，7(1)：18 - 25.

[3] 马朝旺，段玉玺，陈立杰，等. 辽宁省大豆孢囊线虫生理分化研究[J]. 大豆科学，2009，28(2)：285 - 289.

[4] MAAFI Z，SALATI T M，RIGGS R D. Distribution，population density，race and type determination of soybean cyst nematode，*Heterodera glycines*，in Iran [J]. Nematology，2008，10(6)：919 - 924.

[5] 刘维志. 植物病原线虫学[M]. 北京：中国农业出版社，2000：281 - 294.

[6] 刘维志，刘畔，段玉玺，等. 中国大豆孢囊线虫的形态学观察[J]. 沈阳农业大学学报，1994，25(2)：164 - 167.

[7] ZHENG Junye，ZHANG Youni，LI Xianpei. First report of the soybean cyst nematode，*Heterodera glycines*，on soybean in Zhejiang，Eastern China [J]. Plant Disease，2009，93(3)：319.

[8] 李克梅，日孜枉古丽，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.

[9] 张玉华. 大豆孢囊线虫病的危害与防治[J]. 大豆通报，1995(5)：26 - 27.

[10] 王守义. 抗大豆孢囊线虫病种质资源的筛选与创新[J]. 大豆通报，1995(4)：13 - 14.

[11] 叶文兴，彭德良，黄文坤，等. 甘肃首次发现大豆孢囊线虫(*Heterodera glycines*)[C]//中国植物保护学会. 病虫害绿色防控与农产品质量安全——中国植物保护学会 2015 年学术年会论文集，2015：1.

[12] PENG Deliang，PENG Huan，WU Duqing，et al. First report of soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) on soybean from Gansu and Ningxia China [J]. Plant Disease，2015，100(1)：229.

[13] 李惠霞，刘永刚，朱锐东，等. 甘肃省小麦禾谷孢囊线虫的发生及分布[J]. 植物保护，2016，43(3)：170 - 174.

[14] 冯志新. 植物线虫学[M]. 北京：中国农业出版社，2001：132 - 135，176.

[15] 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.

[16] 彭德良，SUBBTIN S，MOENS M. 小麦禾谷孢囊线虫(*Heterodera avenae*)的核糖体基因(rDNA)限制性片段长度多态性研究[J]. 植物病理学报，2003，33(4)：323 - 329.

[17] SZALANSKI A，SUI D D，HARRIS T S，et al. Identification of cyst nematodes of agronomic and regulatory concern with PCR-RFLP of ITS1 [J]. Journal of Nematology，1997，29(4)：255 - 267.

[18] PERRY R N，MOENS M. Plant nematology [M]. 简恒，译. 北京：中国农业大学出版社，2011：97 - 98.

[19] 宋美静. 我国大豆孢囊线虫群体致病性分化及其辅助鉴别寄主的发掘[D]. 沈阳：沈阳农业大学，2016.

[20] 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.

[21] 宋美静，朱晓峰，王东，等. 我国大豆主产区大豆孢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.

[22] 孙玉秋，徐艳丽，李春杰，等. 黑龙江省大豆孢囊线虫种群分布和卵密度研究[J]. 大豆科学，2011，30(2)：250 - 253.

[23] 龙海波，陈文，裴月令，等. 贵州省大豆孢囊线虫的发生与分布[J]. 植物保护，2017，43(6)：173 - 176.

[24] 孙晶双，郑雅楠，段玉玺，等. 温度、光照和土壤含水量对大豆孢囊线虫休眠卵孵化的影响[J]. 大豆科学，2009，28(4)：690 - 692.

[25] 刘冰. 大豆孢囊线虫病的发生条件及防治措施[J]. 现代农业科技，2011(3)：186.

[26] RIGGS R D，SCHMITT D P，Noel G R. Variability in race tests with *Heterodera glycines* [J]. Journal of Nematology，1988，20：565 - 572.

（责任编辑：杨明丽）