

辽宁省大豆胞囊线虫生理分化研究

马朝旺,段玉玺,陈立杰,王媛媛,刘大伟

(沈阳农业大学北方线虫研究所,辽宁 沈阳 110161)

摘要:2007~2008年,对采自辽宁省14个市22个县(区)的42份大豆胞囊线虫土样,应用Golden等的方法和鉴别寄主Pickett、Peking、PI88788、PI90763和Lee,于2008年5~9月在室外避雨棚内进行盆栽生理小种鉴定。根据鉴定结果并结合文献资料,绘制出了辽宁省大豆胞囊线虫生理小种分布图。共鉴定了14份土样、3个生理小种,即1号、3号和6号生理小种,其中6号生理小种在辽宁省首次发现。1号生理小种分布在铁岭市昌图县;3号生理小种分布在大连市庄河、盘锦市大洼县、锦州市北镇、本溪满族自治县、葫芦岛市南票区、阜新蒙古族自治县、鞍山市岫岩县、沈阳市东陵区、辽阳市刘二堡镇、丹东市凤城县和抚顺市清原县;6号生理小种分布在朝阳市喀左县和营口市盖州。全省以3号生理小种分布最广,为优势小种。

关键词:大豆胞囊线虫;生理分化;鉴定

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2009)02-0285-05

Identification of Physiological Race of *Heterodera Glycines* in Liaoning Province

MA Chao-wang, DUAN Yu-xi, CHEN Li-jie, WANG Yuan-yuan, LIU Da-wei

(Shenyang Agricultural University, Nematology Institute of Northern China, Shenyang 110161, Liaoning, China)

Abstract: Forty-two populations of *Heterodera glycines* were isolated from 22 counties in 14 cities in Liaoning province, China. According to the procedure of Golden et al, five differentials, Lee, Pickett, Peking, PI88788 and PI90763 were used to identify the races in 2007-2008. A map of race distribution was constructed according to the data from this experiment and literature cited. The results showed that a total of 14 samples could be divided into three races, including race 1, race 3 described previously and race 6, which first discovered in Liaoning province. Among them, race 1 was in Tieling; race 3 was found in Dalian, Panjin, Jinzhou, Benxi, Huludao, Fuxin, Anshan, Dongling District, Liaoyang, Dandong and Fushun, and race 6 in Chaoyang and Yingkou. However, race 3 distributed widely and was still principal race in Liaoning.

Key words: *Heterodera glycines*; Race; Indicator host; Identification

大豆胞囊线虫(SCN, *Heterodera glycines*)是大豆的重要病原物,它是全世界大豆产区的重要病害之一。1899年由俄国人雅切夫斯基等在我国东北地区首次发现^[1],现在中国、朝鲜、美国、俄罗斯、阿根廷、巴西、加拿大、哥伦比亚、埃及、印度尼西亚、日本和韩国等国家普遍发生,危害严重;其靠土壤传播,是一种土传的定居性内寄生线虫,在适宜条件下,完成一个生活史只需30 d左右,繁殖力很强,形成的胞囊有极强的生活力和广泛的适应性,极难防治。我国黑龙江、辽宁、吉林、内蒙古、陕西、河北、河南、山西、山东、安徽、江苏和北京等12个省市都有该病发生,年发病面积在267万hm²以上。其中东北的

西部和北部,黄淮海产区的沿河地区危害较重,每年受害大豆一般减产5%~50%,严重时甚至绝收^[2]。大豆胞囊线虫存在生理分化现象,而线虫生理分化动态的鉴定研究是抗病品种引种、培育、推广的前提和依据。最早注意到大豆胞囊线虫存在生理分化的是Ross和Brim。1957年他们在美国北卡罗来纳州筛选抗源时,发现引自日本的抗性品种Daiichi-hienuhi和Nangatake-date不能抗病,根上有大量胞囊,推测其可能存在种系(Strain)差异^[3]。1962年, Ross根据寄主反应,确认了田纳西种群和北卡罗来纳种群的区别,证实了SCN存在生理分化^[4]。但是,在一个地区连续种植一个抗病品种之后,由于品

收稿日期:2008-10-22

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30673199);“十一五”国家科技支撑计划资助项目(2006BAD08A08);农业部行业科研资助项目(nyhyzx07-050)。

作者简介:马朝旺(1981-),男,硕士研究生,主要从事大豆胞囊线虫研究。E-mail:chaowang618@163.com。

通讯作者:段玉玺,教授,博士生导师。E-mail:duanyx6407@163.com。

种的选择压力的作用使线虫的群体发生变异,使少数能在抗病品种上繁殖的线虫个体的数量逐渐增加,遂使抗病品种丧失抗性。1986 ~ 1991 年,刘维志,段玉玺等将大豆胞囊线虫 3 号生理小种在哈尔滨小黑豆等抗病品种上连续强迫繁殖 9 ~ 10 代,重新鉴定选择后的线虫群体的生理小种类型,验证出选择后的线虫群体发生明显变异^[5]。2001 年,陈品三等对黑龙江(安达、绥化)和山东(东营和胶州)的四个重病区的 SCN 种群生理小种分化的试验研究:安达种群由以前的单一 3 号小种演化为 3 号和 1 号;绥化种群由以前的 3 号演化为 1、3 号和 6 号;东营种群由以前的 5 号演化为 1 号和 5 号;胶州种群由以前的 7 号演化为 1 号生理小种^[6]。2007 年,田中艳等连续种植抗线 2 号小种的大豆品种 13 年,使原来的 SCN 3 号生理小种变异为 4 号和 14 号生理小种^[7]。为了摸清目前辽宁省大豆产区的大豆胞囊线虫生理分化动态及致病特点,为抗病育种和线虫防治工作提供科学依据,自 2007 年开始调查并开展生理小种鉴定工作。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试土样的采集和线虫的繁殖 从辽宁省 14 个市 22 个县(区)共采集土样 42 份,在大豆田挖取大豆根围土表 5 ~ 10 cm 处土壤,每个地块 5 点

随机采集土样 5 ~ 15 kg。将采回的土样根据土壤粘性不同掺入一定比例的砂子(热力消毒),放入直径 23 ~ 25 cm 的瓦盆中用感病品种繁殖线虫,相互隔离。为了防止大豆品种对线虫的选择作用,采用在一个瓦盆中同时播种五个感病品种的方法,分别是 Lee、辽 15、铁丰 18、丹豆 4 号和开育 8 号(沈阳农业大学北方线虫研究所保存)。

1.1.2 鉴别寄主品种 采用 Golden 等使用的一套鉴别寄主:Pickett、Peking、PI88788、PI90763 和 Lee 5 个品种,其中 Lee 为感病对照品种。种子由沈阳农业大学北方线虫研究所提供。

1.1.3 盆栽容器和土壤灭菌 为使大豆生长 30 ~ 50 d,根的生长既不受限制,又便于观察显囊期,使用直径 12.5 cm × 8.5 cm 的透明塑料杯。土壤(土壤和砂子体积比 2 : 1)用线克(35% 水剂,沈阳丰收农药有限公司)800 倍液灭菌(每隔 4 ~ 5 cm 土层喷一层药液,用塑料薄膜密封 5 ~ 10 d 后,风干 10 ~ 15 d,装袋保存于室内)。

1.2 方法

1.2.1 生理小种划分的标准 鉴定大豆胞囊线虫生理小种的主要依据时看其在一套鉴别品种上的繁殖情况,即根上形成的胞囊数量。根据 Golden、Riggs 和 Schmitt 的标准,通过大豆胞囊线虫在鉴别品种根上的寄生情况划分以下生理小种类型^[8]。

1.2.2 供试幼苗的准备 先将鉴别寄主品种种子

表 1 Golden(1970)、Riggs 和 Schmitt(1988)的大豆胞囊线虫生理小种分类系统

Table 1 Races of the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*, according to the race determination schemes of Golden et al. (1970) and Riggs and Schmitt (1988)

生理小种 Race	鉴别寄主品种上的反应 Reaction				生理小种 Race	鉴别寄主品种上的反应 Reaction			
	Pickett	Peking	PI88788	PI90763		Pickett	Peking	PI88788	PI90723
1	-	-	+	-	9	+	+	-	-
2	+	+	+	-	10	+	-	-	+
3	-	-	-	-	11	-	+	+	-
4	+	+	+	+	12	-	+	-	+
5	+	-	+	-	13	-	+	-	-
6	+	-	-	-	14	+	+	-	+
7	-	-	+	+	15	+	-	+	+
8	-	-	-	+	16	-	+	+	+

确定抗病和感病的标准是:鉴别品种平均每株雌虫数与感病对照品种 Lee 每株平均雌虫之比 ≥ 10% 时为感病(+), 10% < 时为抗病(-)。

Race determination is made on the basis of the pattern of “ + ” and “ - ” ratings for each race. A “ + ” rating is given if the number of females produced by an *H. glycines* population on each soybean differential is equal to or greater than 10% of the number produced on the standard susceptible cultivar Lee. If the number of females is less than 10% , a “ - ” rating is given.

浸水 4 ~ 6 h,吸水膨胀后播入经热力消毒的蛭石中,待大豆子叶展开时,移栽幼苗。

1.2.3 卵悬液的制备 采用淘洗过筛法分离新鲜胞囊。称取 500 g 土样倒入塑料盆中,搅拌均匀后静置 3 ~ 5 min,将上清液倒入 28 目和 60 目筛子,重复 3 次。用水将 60 目筛子上的分离物淋洗到 200 目的脱脂棉筛网上,在体视解剖镜下挑取饱满的胞囊于培养皿中压碎,释放出卵和 2 龄幼虫。将卵悬液定容至每毫升不低于 400 个卵和 2 龄幼虫。

1.2.4 接种 将灭菌的土壤和砂子混合物装入塑料杯中,每杯约 450 mL。先向杯中轻轻淋水,待土面不粘时,用玻璃棒在杯的中间扎一个深约 3 ~ 4 cm 的小孔,将豆苗移入小孔中。每塑料杯 1 株,每个品种播种 3 杯。在大豆幼苗播入塑料杯后第二天接种,先用玻璃棒在豆苗的旁边扎一个深约 3 ~ 4 cm 的小孔,然后每孔注入 10 mL 卵悬液(接种量每株大约 4000 ~ 6000 个卵和 2 龄幼虫),试验重复一次。将接种后的塑料杯置于室外避雨棚内,每

天浇水一次,正常管理。

1.2.5 镜检 大豆生长 29 ~ 37 d 时,待 Lee 根部出现大量白色胞囊时,将材料带回室内用体式解剖镜镜检。先剪去苗上部,将塑料杯中的土壤倒入盆中,用高压水枪淋洗根部和塑料杯中的胞囊,用放大镜检查根部无胞囊时弃根和塑料杯。采用淘洗过筛法分离胞囊,用水将 60 目筛子上的分离物淋洗到 200 目的脱脂棉筛网上,在体视解剖镜下镜检计数。

1.2.6 确定生理小种类型和绘制小种分布图 根据 Golden、Riggs 和 Schmitt(1988)的鉴别模式确定生理小种类型,并将各采样点的小种类型标在地图上。

2 结果与分析

2.1 大豆胞囊线虫生理小种的鉴定结果

在采集到的 42 份土样中,有些土样因胞囊量少,需重新繁殖和鉴定,将各市县有代表性的 14 份土样进行鉴定,结果见表 2。

表 2 辽宁省大豆胞囊线虫生理小种鉴定
Table 2 Result of identification of SCN races of Liaoning Province

样品 代码 Codes of specimens	采样地点 Location	Lee 上 SCN 平均数 Average of the No. of SCN	Pickett			Peking			PI88788			PI90763			生理 小种 类型 Race
			SCN 平均数 Average of the No. of SCN	寄生 指数 IP	反应 Reaction	SCN 平均数 Average of the No. of SCN	寄生 指数 IP	反应 Reaction	SCN 平均数 Average of the No. of SCN	寄生 指数 IP	反应 Reaction	SCN 平均数 Average of the No. of SCN	寄生 指数 IP	反应 Reaction	
SCN01	铁岭市昌图县 Tieling	134.67	2.33	1.73	-	0	0	-	14.33	10.64	+	5.67	4.21	-	1
SCN02	抚顺市清原县 Fushun	124.00	2.00	1.61	-	0.33	0.27	-	3.00	2.42	-	0.67	0.54	-	3
SCN03	朝阳市喀左县 Chaoyang	359.33	39.00	10.85	+	25.00	6.96	-	15.33	4.27	-	6.33	1.76	-	6
SCN04	辽阳市刘二堡镇 Liaoyang	150.33	0.67	0.45	-	0.67	0.45	-	4.00	2.66	-	0.33	0.22	-	3
SCN05	丹东市凤城县 Dandong	151.33	3.67	2.43	-	0	0	-	1.00	0.66	-	1.00	0.66	-	3
SCN06	营口市盖州 Yingkou	110.00	12.00	10.91	+	0	0	-	0.67	0.61	-	1.33	1.21	-	6
SCN07	大连市河口市 Dalian	161.00	6.67	4.14	-	0.67	0.42	-	2.00	1.24	-	1.00	0.62	-	3
SCN08	盘锦市大洼县 Panjin	171.33	0.67	0.39	-	0	0	-	1.33	0.78	-	1.67	0.97	-	3
SCN09	锦州市北镇 Jinzhou	166.67	1.67	1.00	-	0.33	0.20	-	2.00	1.20	-	1.67	1.00	-	3
SCN10	本溪满族自治县 Benxi	151.33	5.33	3.52	-	1.00	0.66	-	0.67	0.44	-	2.00	1.32	-	3
SCN11	葫芦岛市南票区 Huludao	141.67	0.67	0.47	-	0	0	-	6.67	4.71	-	1.33	0.94	-	3
SCN12	阜新蒙古族自治县 Fuxin	111.00	2.67	2.41	-	0.33	0.30	-	6.67	6.01	-	0.33	0.30	-	3
SCN13	鞍山市岫岩县 Anshan	133.33	3.67	2.75	-	0	0	-	2.00	1.50	-	1.00	0.75	-	3
SCN14	沈阳市东陵区 Shenyang	144.00	4.00	2.78	-	0.67	0.47	-	1.67	1.16	-	0.67	0.47	-	3

结果表明:在已鉴定的 14 份土样中,共鉴定出辽宁省存在 3 个生理小种,即 1 号、3 号和 6 号小种。其中 1 号生理小种分布在辽宁省铁岭市昌图县。3 号生理小种分布在辽宁省抚顺市清原县、辽阳市刘二堡镇、丹东市凤城、营口市盖州、大连市庄河、盘锦市大洼县、锦州市北镇、本溪满族自治县、葫芦岛市南票区、阜新满族自治县、鞍山市岫岩县和沈阳市东陵区。6 号生理小种分布在辽宁省朝阳市喀左县和营口市盖州,且该小种在辽宁省首次发现。

2.2 大豆胞囊线虫生理小种分布区域

基于研究结果,且在前人的研究基础上^[9-10],绘制出辽宁省大豆胞囊线虫生理小种分布示意图(图 1)。

图 1 中,1 号生理小种有 7 个分布区域:铁岭市昌图县、沈阳市康平县西关乡、阜新市彰武县、锦州市黑山县、鞍山市千山区、大连市金州区和旅顺口区。6 号生理小种在辽宁省首次发现,有 2 个分布区域,分别是朝阳市喀左县和营口市盖州。3 号生理小种在辽宁省分布最为广泛,有 15 个分布区域,除未在朝阳市发现外,其它各市均有分布。

辽宁省 14 个市的大豆胞囊线虫分布区域中,1 个地区为 1 号生理小种,占 7.14 %;2 个地区为 6 号生理小种,占 14.29 %;11 个地区为 3 号生理小种,占 78.57 % (表 3)。所以,3 号生理小种为辽宁省的优势小种,该地区的抗线虫育种应该以抗 3 号生理小种为主要育种目标。

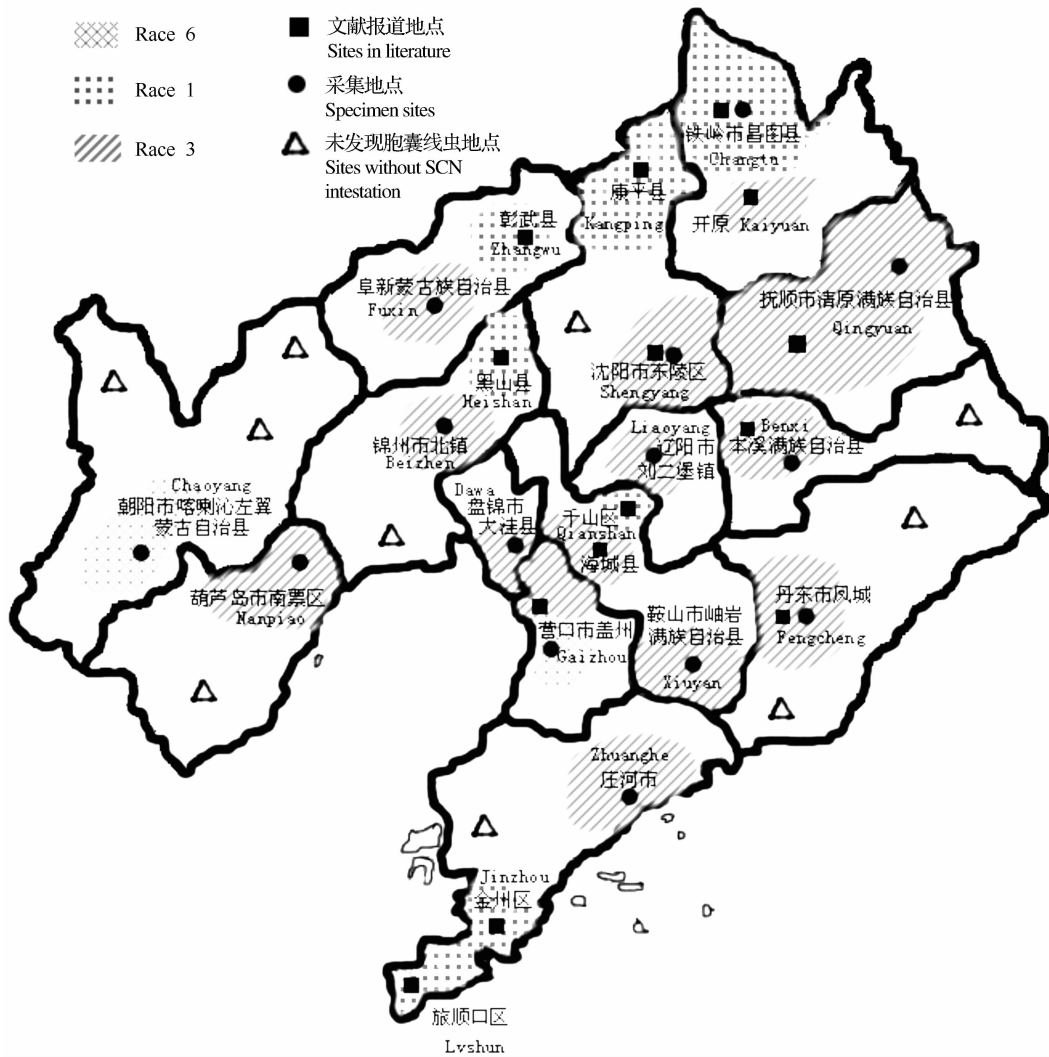


图 1 辽宁省大豆胞囊线虫生理小种分布示意图
Fig. 1 SCN race distribution in Liaoning Province

表 3 辽宁省各生理小种分布比例
Table 3 Proportion of races in Liaoning province

生理小种类型	地点数目	比例
Race	No. of sites	Proportion/%
1	1	7.14
6	2	14.29
3	11	78.57

3 讨论

3.1 辽宁省大豆胞囊线虫的鉴定工作

1984 年,刘维志等在东北地区收集 16 份线虫土样,共鉴定出 2 个生理小种,即 1 号和 3 号小种^[9]。其中 1 号生理小种分布在辽宁省的昌图县、康平县、黑山县、彰武县和鞍山市,3 号生理小种分布在辽宁省的沈阳市(东陵区)、本溪市、海城市和营口市。1989 年,刘维志等再次收集辽宁省 6 个市县的线虫土样,鉴定出 2 个生理小种,即 1 号和 3 号小种^[10]。其中 1 号生理小种分布在大连市的金州区和旅顺口区,3 号生理小种分布在沈阳市的苏家屯、抚顺市、开原市和凤城市。本研究是在刘维志先生的基础上,近 20 年后对辽宁省整个区域进行了全面系统的研究,确定 6 号生理小种为辽宁省新记录种,并扩大了 3 号生理小种在辽宁省的分布范围。

3.2 鉴定方法的选择

确定一个线虫区系的生理小种地位,主要根据其在一套鉴别寄主上的繁殖能力,通常用胞囊数量表示,这是易受环境条件影响的数量指标。特别是在临界点上两个繁殖量的差异很小时,比如 9% 和 10%,这时难以确定这些反应的差异,这是定量研究植物抗病性时经常遇到的问题,因此,需要选择一个合适的标准。目前,国外很多线虫学家和大豆育种学家采用了一种新的分类鉴定系统——HG 类型^[11-12],但国内很少有人采用,使得国内在生理小种鉴定工作水平上很难与国际接轨。

3.3 大豆胞囊线虫分布的地域性差异

田间线虫是一个群体,在鉴别品种上繁殖能力是线虫寄生性基因频率的表现。由于线虫的活动范围小,因此,线虫大多数是近亲繁殖,在一定地区内,线虫种群是相对稳定的,线虫的生理小种分布是有地域性的。在研究中,3 号生理小种分布范围最广,可能是由于最近几年农业产业结构的调整,很多地区减少了大豆的种植面积,使致病力较弱的 3 号小种上升为优势小种。6 号小种分布在朝阳市喀左县和营口盖州市,可能是由于这些地区长期种植某些类型的大豆品种,其长期对线虫选择的结果。因此,

应该不断监测大豆胞囊线虫生理小种的变异情况,在生产上要注意轮换使用抗病品种。在生理小种鉴定和品种抗性鉴定工作中,繁殖线虫时不宜仅用一个感病品种,以免发生选择作用。

参考文献

- [1] 刘维志. 植物病原线虫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000. (Liu W Z. Plant nematology [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2000.)
- [2] 阮维斌, 王敬国, 张福锁. 根际微生态系统中的大豆胞囊线虫[J]. 植物病理学报, 2002, 32(3): 200-213. (Ruan W B, Wang J G, Zhang F S. The soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) in rhizosphere micro-ecologic system[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2002, 32(3): 200-213.)
- [3] Ross J P, Brim C A. Resistance of soybeans to the soybean cyst nematode as determined by a double-row method[J]. Plant Disease Reporter, 1957, 41(12): 923-924.
- [4] Ross J P. Physiological strains of *Heterodera glycines*[J]. Plant Disease Reporter, 1962, 46(11): 766-769.
- [5] 刘维志, 刘晔, 段玉玺, 等. 抗病品种对大豆胞囊线虫的选择作用[J]. 植物保护学报, 1993, 20(2): 135-137. (Liu W Z, Liu Y, Duan Y X, et al. Selection effect of resistant soybeans on the race 3 of soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) [J]. Acta Phytophylacica Sinica, 1993, 20(2): 135-137.)
- [6] 陈品三, 齐军山, 王寿华, 等. 我国大豆胞囊线虫生理分化动态的鉴定和检测研究[J]. 植物病理学报, 2001, 31(4): 336-341. (Chen P S, Qi J S, Wang S H, et al. Studies on identification and monitoring of physiologic variation of soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) in China[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2001, 31(4): 336-341.)
- [7] 田中艳, 高国金, 等. 大豆胞囊线虫生理小种变异的研究[J]. 大豆科学, 2007, 26(2): 290-292. (Tian Z Y, Gao G J, et al. Study on the variation of soybean cyst nematode[J]. Soybean Science, 2007, 26(2): 290-292.)
- [8] Riggs R D, Schmitt D P, Noel G R. Variability in race tests with *Heterodera glycines*[J]. Journal of Nematology, 1988, 20(4): 565-572.
- [9] 刘维志, 刘晔, 陈品三. 东北地区部分市县大豆胞囊线虫生理小种的鉴定结果初报[J]. 沈阳农学院学报, 1984, 2: 75-78. (Liu W Z, Liu Y, Chen P S. Identification of race in soybean cyst nematode of the part of northern China[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 1984, 2: 75-78.)
- [10] 刘晔, 刘维志. 大豆胞囊线虫的生理小种鉴定结果[J]. 沈阳农业大学学报, 1989, 20(1): 41-44. (Liu Y, Liu W Z. Identification of race in soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) (Second Report)[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 1989, 20(1): 41-44.)
- [11] 许艳丽, T. L. Niblack. 大豆胞囊线虫群体遗传多样性新的分类方法[J]. 大豆科学, 2002, 21(4): 301-304. (Xu Y L, T. L. Niblack. A new classification scheme for genetically diverse populations of *Heterodera glycines*[J]. Soybean Science, 2002, 21(4): 301-304.)
- [12] Niblack T L, Arelli P R, Noel G R, et al. A revised classification scheme for genetically diverse populations of *Heterodera glycines* [J]. Journal of Nematology, 2002, 34(4): 279-288.