

# 高寒草甸垂穗披碱草根际孢囊线虫分离和种类鉴定

韩旭,魏雪娟,邢晓芳,傅岩深,李惠霞\*

(甘肃农业大学植物保护学院,甘肃 兰州 730070)

**摘要:**【目的】明确寄生甘肃省天祝县高寒草甸垂穗披碱草(*Elymus nutans*)的孢囊线虫种类,为草原禾草孢囊线虫控制提供理论依据,以保护高寒区草地生态资源。【方法】通过简易漂浮法分离垂穗披碱草根际孢囊线虫,对线虫形态特征观察和体值测量,采用分子生物学技术对该种群28S-rDNA D2-D3区和ITS-rDNA进行测序和聚类分析。【结果】形态观测结果显示,该线虫种群孢囊褐色、柠檬形,阴门膜孔类型为双膜孔,初步将其鉴定为禾谷孢囊线虫(*Heterodera avenae*)。分子技术鉴定结果显示,该种群与禾谷孢囊线虫聚为一支。【结论】结合形态学特征和分子生物学分析,将垂穗披碱草根际线虫种群鉴定为禾谷孢囊线虫。

**关键词:**高寒草甸;天祝县;禾谷孢囊线虫;垂穗披碱草;形态鉴定;分子鉴定

**中图分类号:**S812.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2025)01-0154-07

**DOI:**10.13817/j.cnki.cycp.2025.01.018



垂穗披碱草(*Elymus nutans*)为禾本科(Gramineae)披碱草属(*Elymus*)多年生草本植物<sup>[1-2]</sup>,广泛分布于世界范各地。在我国,主要分布于河北省、陕西省、内蒙古自治区、甘肃省、青海省、四川省、新疆维吾尔自治区和西藏自治区等地<sup>[3]</sup>。在国外,主要分布于俄罗斯、土耳其、蒙古和印度等国家<sup>[4]</sup>。垂穗披碱草种子繁殖能力、抗旱性、耐寒性、耐瘠薄性<sup>[5]</sup>及对土坡的适应能力均较强<sup>[6]</sup>,其枝条质地较柔软,无刺毛、刚毛,富含营养元素且无味,饲用价值为中等偏上。由于易于调制干草,且产量高,因此该草可作为较理想的家畜饲料<sup>[7]</sup>。通过与豆科牧草混播,能获得质量理想的人工草地<sup>[8]</sup>,因此,也是人工草地建植中的首选草种之一<sup>[9]</sup>。随着沙漠化和环境污染日益严重,垂穗披碱草

种植面积越来越大,病虫害的问题也日益凸显<sup>[10]</sup>,其中,线虫是制约垂穗披碱草产量的重要因素<sup>[11]</sup>。

植物线虫(Plant-parasitic nematodes, PPN)能够寄生根、茎和叶等多种植物组织<sup>[12]</sup>,具有危害隐蔽、发病缓慢和防治困难等特点,其中对植物最具有经济重要性的植物寄生线虫主要隶属于孢囊属(*Heterodera*)、茎属(*Ditylenchus*)、短体属(*Pratylenchus*)、球孢囊属(*Globodera*)和根结属(*Meloidogyne*)等<sup>[13]</sup>。孢囊线虫是孢囊亚科(Heteroderine)线虫的统称<sup>[14]</sup>,是一类寄主种类多、适应能力强、分布范围广和具有固着性的植物寄生线虫<sup>[15]</sup>,如禾谷孢囊线虫(*H. avenae*)<sup>[16]</sup>、甜菜孢囊线虫(*H. Schachtii*)<sup>[17]</sup>和豌豆孢囊线虫(*H. goettingiana*)<sup>[18]</sup>等。

甘肃省天祝藏族自治县(102°07'~103°46' E, 36°31'~37°55' N)位于青藏高原东北边陲,河西走廊东端,三大高原交汇地区,是垂穗披碱草的主要分布地区之一<sup>[8]</sup>。天祝县平均海拔在3 000 m以上,为大陆性高原季风和温带大陆性半干旱气候,昼夜温差大,夏季凉爽,冬季寒冷。李惠霞等<sup>[19]</sup>报道了禾谷孢囊线虫(*H. avenae*)寄生于本地区禾本科牧草,韩尚明等<sup>[20]</sup>报道了艾球孢囊线虫(*Globodera artemisiae*)寄生于本

收稿日期:2024-02-23;修回日期:2024-03-21

基金资助:国家自然科学基金项目(32260654);甘肃省重点研发计划-国际合作领域(24YFWA015)

作者简介:韩旭(2000-),女,河北唐山人,硕士研究生。

E-mail:a876143164@163.com

\*通信作者,研究方向为植物线虫学。

E-mail:lihx@gsau.edu.cn

地区艾蒿 (*Artemisia argyi*),李文豪<sup>[17]</sup>鉴别了寄生于本地区微孔草 (*Microula sikkimensis*) 的微孔草孢囊线虫 (*H. microulae*) 和寄生于本地区珠芽蓼 (*Polygonum viviparum*) 的天祝棘皮孢囊线虫 (*Cactodera tianzhuensis*) 2个新种。朱锐东等<sup>[21]</sup>研究表明禾谷孢囊线虫为该地区的优势种群。目前,关于垂穗披碱草上的孢囊线虫种类尚不明确。因此,本研究对甘肃天祝高寒草甸垂穗披碱草根及根系土壤中采集到的孢囊线虫进行分离鉴定,以明确其孢囊线虫种类,为保护披碱草属植物资源提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品采集

于2021年8月采用随机取样法<sup>[22]</sup>在甘肃省天祝县高寒草甸采集褪绿、发黄、植株矮小的垂穗披碱草根及根系10 cm范围内的土壤。每个样点取5份小样,5株垂穗披碱草和1 kg土样作为1个样品,装入封口袋中并逐个编号,带回实验室于4 °C保存备用。同时详细记录采样点GPS信息和取样地的其他信息。

### 1.2 孢囊线虫的分离

采用简易漂浮法<sup>[12]</sup>分离土壤样品中的孢囊线虫。具体操作如下:首先将土样充分风干后,随机抽取100 g土样放置4 L的塑料桶,加水用木棍搅拌,使土样充分溶于水,静置2 min以上。然后将含土样溶液倒入20目、60目组合筛(20目筛子在上60目在下)中过滤。重复3次,充分冲洗20目筛网上残留的杂质,尽量保证所有的孢囊都冲至60目筛网中,再用大量水冲洗60目筛,直到过筛水变透明清晰为止,最后用水缓慢冲洗60目网筛中的分离物至尼龙纱,将分离物置于体式显微镜(奥林巴斯,东京,日本)下挑取孢囊并统计数量,将挑取的孢囊置于离心管中于4 °C冰箱保存备用<sup>[18]</sup>。用流水冲洗垂穗披碱草根,于解剖镜下观察是否有白色雌虫寄生,并用体式显微镜拍照观察<sup>[19,21]</sup>。

### 1.3 孢囊线虫形态学鉴定

挑取垂穗披碱草根际分离到的新鲜饱满的孢囊,在光学显微镜(蔡司,耶拿,德国)和体式显微镜(奥林巴斯,东京,日本)下进行形态观察、拍照并测量孢囊、阴门锥和二龄幼虫的相关数据。鉴定观察的主要形态特征包括:孢囊形状、长、宽;二龄幼虫虫体长、体宽、口针长、口针基部球宽、尾长、透明尾长;阴门锥膜

孔类型,阴门膜孔长、宽,阴门裂长,下桥的有无,泡状突的有无等<sup>[19,23]</sup>。参照谢辉<sup>[24]</sup>和段玉玺<sup>[12]</sup>的方法对测量到的形态数据进行分析,参考Perry等<sup>[25]</sup>和Subbotin等<sup>[26]</sup>关于孢囊线虫的分类描述特征对孢囊进行种类鉴定,并采用de Man公式测量和计算体值<sup>[27]</sup>。

1.3.1 阴门锥玻片的制作 参照张译文<sup>[28]</sup>的方法:用毛笔挑取饱满、完整的孢囊,放置于盛有无菌水的玻片上,用解剖刀切下虫体后端并对其进行修整。用小毛笔或昆虫针仔细清理附着于阴门锥的杂质,然后将其置于40% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>中处理5 min,再依次转入浓度为70%、95%、100%的酒精中进行脱水处理,然后将阴门锥标本移入丁香油中透明,并用树胶进行封片。将制作好的玻片在光学显微镜和体式显微镜下拍照并测量<sup>[29]</sup>。

1.3.2 二龄幼虫玻片制作 参照李文豪<sup>[17]</sup>的方法,具体操作如下:将分离的孢囊用解剖刀切开,收集其中饱满完整的卵粒,用0.1%的NaClO进行消毒,然后置于孵化液中进行孵化,以获得J2幼虫。将J2幼虫置于60 °C水浴锅中加热2 min,将热杀死后的J2幼虫用三乙醇胺-福尔马林(Triethanolamine Formalin, TAF)固定液(福尔马林:三乙醇胺:水=7:2:91)进行固定,以水作浮载剂,盖上盖玻片,在光学显微镜下观察形态特征并测量体值。

### 1.4 孢囊线虫的分子生物学鉴定

1.4.1 孢囊线虫的DNA提取 参照倪春辉等<sup>[29]</sup>的方法提取线虫DNA。随机将单条2龄幼虫挑至ddH<sub>2</sub>O中清洗3次后切破,随后转移至含10 μL线虫裂解液的200 μL PCR管中,以3 000 r/min离心2 min,置于液氮中快速冷冻1 min,85 °C水浴加热2 min,重复两次;再加入1 mg/mL的蛋白酶K 1 μL。于PCR仪中65 °C温育1 h,使蛋白酶K降解蛋白质以释放DNA,接着95 °C灭活10 min,使蛋白酶K失活,最后14 000 r/min离心2 min,取上清液于-20 °C冰箱中保存备用。

1.4.2 28S-rDNA D2-D3区和ITS-rDNA序列的PCR扩增 采用通用引物D2A/D3B扩增28S-rDNA D2-D3区,通用引物18S/26S扩增ITS-rDNA区,所用通用引物序列见表1。PCR扩增采用25 μL反应体系:上下游引物(10 μmol/L)各1 μL,

表1 垂穗披碱草根际孢囊线虫 rDNA 扩增片段及引物

Table 1 Amplified fragment and primer of rDNA of cyst nematode on *Elymus nutans*

扩增片段	引物	退火温度/°C
rDNA 28S D2-D3区	D2A(5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3')	56
	D3B(5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3')	
rDNA-ITS区	18S(5'-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3')	56
	26S(5'-TTTCACTCG CCGTTACTAAGG-3')	

PCR Taq Mix 12.5  $\mu$ L, DNA 模板 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu$ L; 反应扩增程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 5 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 后于 4 °C 保存。

1.4.3 扩增产物的克隆与测序 参考王志坤等<sup>[30]</sup>方法并改进。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 切胶, 用 DNA 凝胶回收试剂盒对其进行回收。将回收产物用 pMD 19-T Vector 载体连接后转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 冰浴 30 min, 42 °C 金属浴 45 s, 置于冰上 1 min, 后加 500  $\mu$ l 的 LB 液体培养基, 于 37 °C、180 r/min 震荡 45 min 后取 100  $\mu$ L 于含抗生素 Ampicillin (100 mg/L) 的 LB 固体培养基均匀涂布, 后于 37 °C 培养箱过夜。用无菌枪头挑取单菌落, 进行 PCR 扩增后, 将产物送至西安生工测序。

1.4.4 rDNA 序列系统发育分析 将引物 18S/26S 与 D2A/D3B 扩增测得的序列进行拼接, 在 NCBI 中下载孢囊属 (*Heterodera*)、球形孢囊属 (*Globodera*)、棘皮孢囊属 (*Cactodera*)、刻点孢囊属 (*Punctodera*) 等 28S-rDNA 和 ITS-rDNA 序列, 选择布林克曼隐皮孢囊线虫 (*Cryphodera brinkmani*, DQ328705) 作为 28S-rDNA 发育树外群, 选择阿尔尼根结线虫 (*Meloidodera alni*, AF274419) 作为 ITS-rDNA 发育树外群, 采用 MAFFT 进行序列比对, 用软件 Gblock 选择序列保守区域, 基于贝叶斯法进行系统发育分析, 用 MrBayes 以最佳模型构建系统发育树, 并用 FigTree 修正系统发育树。

## 2 结果与分析

### 2.1 症状观察

受孢囊线虫侵染垂穗披碱草, 植株发育不良, 株苗矮黄, 茎叶卷曲, 叶片略有干枯, 须根增多。根部有白色雌虫 (图 1)。

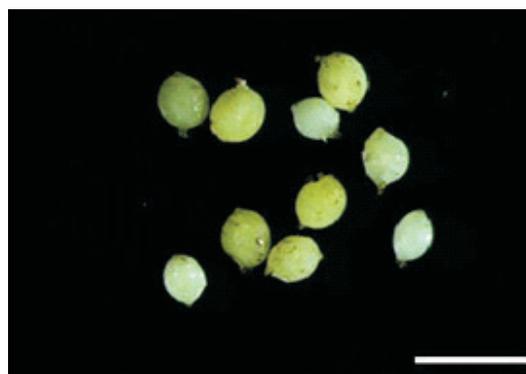


图1 垂穗披碱草根际孢囊线虫雌虫

Fig. 1 Rhizosphere cyst nematode female of *Elymus nutans*

注: 比例尺: 1 mm

### 2.2 孢囊线虫的形态学鉴定

在垂穗披碱草根系及周围土壤分离出的孢囊线虫形态特征如下: 二龄幼虫虫体为线型, 热杀死后呈直线状 (图 2-A); 其唇区圆形, 头部有明显缢缩, 基部球较大, 口针强壮 (图 2-B, C); 尾部圆锥形, 透明尾较长, 末端较尖锐 (图 2-D); 孢囊呈褐色, 柠檬形, 颈部明显, 角质层厚, 有突出的阴门锥 (图 2-E); 阴门膜孔类型为双膜孔 (图 2-F)。孢囊线虫主要形态测量值见表 2。

### 2.3 孢囊线虫的分子生物学鉴定

2.3.1 28S-rDNA D2-D3 区序列分析 垂穗披碱草上的孢囊线虫的 28S-rDNA D2-D3 区序列长度为 743 bp。将 28S-rDNA 的 2 个扩增产物分别编号为: Tianzhu 1, Tianzhu 2, Tianzhu 1, Tianzhu 2 与 3 个线虫种群 (LT159826、LT159824、MG551854) 的序列相似度较高, 相似性分别为 100.00%、99.87%、99.73%。系统发育树显示, 16 个序列汇聚成 3 个大分支。Tianzhu 1、Tianzhu 2 与孢囊线虫复合种群中禾谷孢囊线虫种群 (MG551854), 甜菜孢囊线虫种群 (JQ040527、JQ040526), 大豆孢囊线虫种群 (GU595452、KP324916) 汇聚为一支, 置信度为 100%。艾球孢囊线虫 (MT233316、KU845472), 刻点

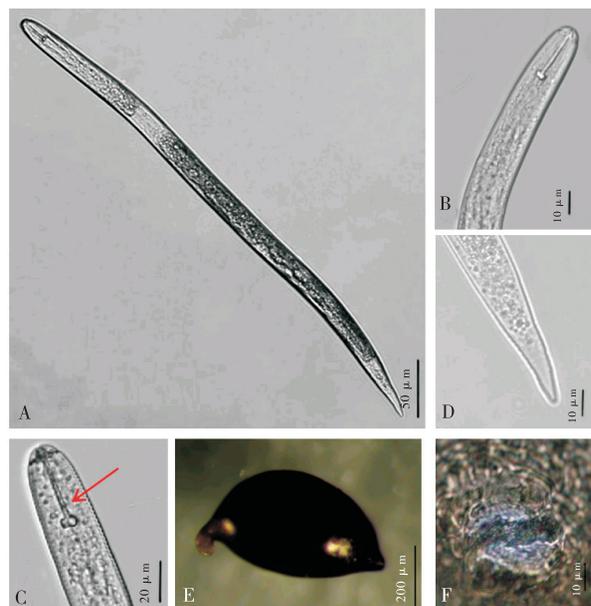


图2 垂穗披碱草根际孢囊线虫形态特征图

Fig. 2 Morphological Characteristics of Rhizosphere Cyst Nematodes in *Elymus nutans*

注:A:二龄幼虫整体;B:二龄幼虫体前端;C:二龄幼虫口针;D:二龄幼虫体末端;E:孢囊整体;F:阴门膜孔(比例尺:A = 50  $\mu\text{m}$ , B、D、F=10  $\mu\text{m}$ , C=20  $\mu\text{m}$ , E=200  $\mu\text{m}$ )

孢囊属线虫种群(MN123248、MN123247)与仙人掌孢

囊属(MK619472、MT328179)聚为一支,置信度为72%。Tianzhu 1、Tianzhu 2分别与禾谷孢囊线虫种群(LT159826、LT159824)汇聚为一个分支,置信度为100%(图3)。

2.3.2 ITS-rDNA 序列分析 测序结果显示,垂穗披碱草孢囊线虫 ITS-rDNA 序列长度为 1 196 bp。将其 ITS-rDNA 2 个扩增产物分别编号为:Tianzhu 3, Tianzhu 4。BLAST 比对结果显示, Tianzhu 3, Tianzhu 4 与 3 个线虫种群(KR704309、MG550972、KF225722)的序列相似度较高,相似性分别为 99.90%、98.87%、99.12%。系统发育树分析结果表明, Tianzhu 3, Tianzhu 4 与禾谷孢囊线虫种群(KR704309)汇聚为一个分支,并与孢囊线虫复合种群中禾谷孢囊线虫种群(MG550972、KF225722),美国菲利普孢囊线虫种群(GU079654、KM504378)聚为一支,置信度为 100%(图 4)。

结合以上孢囊线虫的形态学特征和分子生物学分析结果,将甘肃天祝垂穗披碱草根系的孢囊线虫种群鉴定为禾谷孢囊线虫。

表2 甘肃天祝县垂穗披碱草孢囊线虫种群形态测量值

Table 2 Morphometrics of cysts, vulval cones, second stage juveniles of *H. avenae* in *Elymus nutans* from Tianzhu Gansu, and other populations reported

形态特征	垂穗披碱草孢囊线虫种群/ $\mu\text{m}$	张译文等 <sup>[28]</sup> 研究报告/ $\mu\text{m}$	李惠霞等 <sup>[19]</sup> 研究报告/ $\mu\text{m}$	陈品三等 <sup>[31]</sup> 研究报告/ $\mu\text{m}$
孢囊长	584.93 $\pm$ 46.93(420.45~697.35)	600(445~720)	584(472~691)	709(601~913)
孢囊宽	363.23 $\pm$ 16.49(207.70~506.61)	397(269~474)	451(264~519)	523(436~612)
长/宽	1.46 $\pm$ 0.07(1.30~1.76)	—	—	—
阴门膜孔长	41.47 $\pm$ 1.95(34.23~50.27)	43(31~49)	29(25~32)	45~53
阴门膜孔宽	21.84 $\pm$ 1.56(18.96~25.32)	20(15~26)	14(12~17)	22~24
阴门裂长	9.75 $\pm$ 1.64(7.04~12.09)	9(7~11)	9(7~11)	13~16
二龄幼虫数	25	—	—	—
体长	463.18 $\pm$ 33.33(373.46~531.25)	520(477~579)	382(314~421)	550(477~602)
体宽	23.88 $\pm$ 0.82(19.86~26.57)	24(20~31)	23(19~27)	23(22~25)
口针长	23.57 $\pm$ 0.70(21.45~27.48)	22(19~29)	37(28~59)	24(21~26)
唇区高	4.77 $\pm$ 0.41(3.88~6.90)	—	—	—
唇区宽	10.69 $\pm$ 0.57(8.02~12.74)	—	—	—
肛门处体宽	14.94 $\pm$ 0.89(13.31~16.30)	—	—	—
尾长	56.70 $\pm$ 3.41(49.86~61.96)	52(37~65)	37(28~59)	66(58~72)
透明尾长	35.91 $\pm$ 2.83(32.26~41.14)	37(28~42)	27(19~37)	41(36~46)
受精卵长	121.90 $\pm$ 0.28(109.94~127.63)	122(103~151)	108(97~121)	133(120~141)
受精卵宽	49.12 $\pm$ 0.16(45.08~52.37)	47(42~54)	48(40~56)	46(37~50)

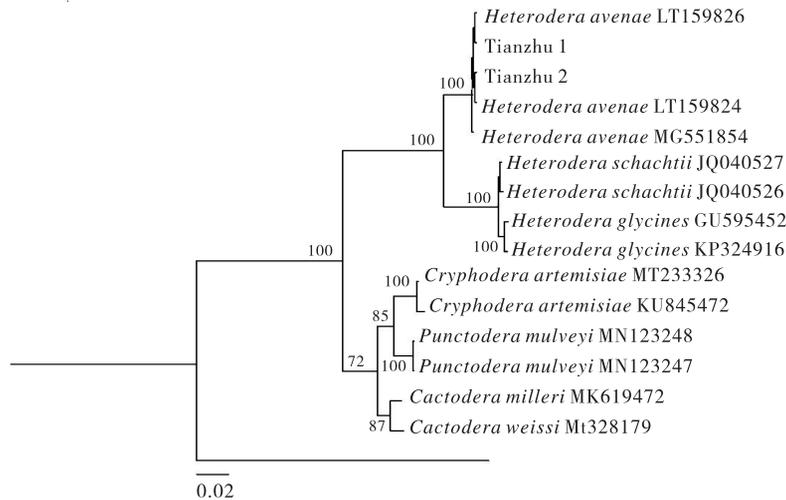


图3 基于 GTR+I+G 模型下垂穗披碱草孢囊线虫种群 28S 核糖体 DNA 部分序列系统发育树  
 Fig. 3 Phylogenetic tree of cyst nematode population of *Elymus nutans* based on the 28S-rDNA sequences using GTR+I+G model

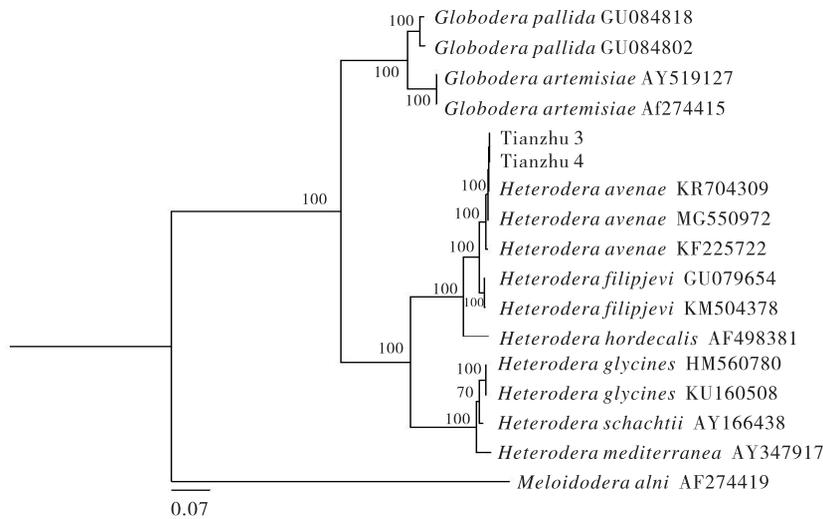


图4 基于 GTR+I+G 模型下垂穗披碱草上孢囊线虫种群核糖体 DNA ITS 序列系统发育树  
 Fig. 4 Phylogenetic tree of cyst nematode population of *Elymus nutans* based on the ITS-rDNA sequences using GTR+I+G model

### 3 讨论

将本研究种群与其他禾谷孢囊线虫种群的形态学测量值进行比对分析发现,本研究中的孢囊线虫种群与前人研究中<sup>[31-35]</sup>对禾谷孢囊线虫形态的描述基本一致。部分测量值存在差异主要表现为孢囊长 $[(584.93 \pm 46.93) \mu\text{m}]$ 、孢囊宽 $[(363.23 \pm 16.49) \mu\text{m}]$ 略小,J2体长 $[(463.18 \pm 3.33) \mu\text{m}]$ 与口针长 $[(23.57 \pm 0.70) \mu\text{m}]$ 略短,尾长也略有差异。甘肃省天祝县高寒地区海拔较高,年平均气温仅为 $3.6^{\circ}\text{C}$ ,气候高寒阴湿<sup>[36]</sup>,推测线虫体值的差异可能是受地理位置和气候特征的影响。形态鉴定是孢囊线虫种类

鉴定中,最为直观、简便和常用的方式。但由于线虫常会出现种内变异,且易受样本质量的影响,因此,目前仅靠形态学难以完全鉴定,尤其在近缘种间,也难以辨别其亲缘关系。分子生物学检测由于不依赖环境等方面的影响,已成为研究植物寄生线虫种类鉴定的常用手段,因此,依据本研究中的 28S-rDNA 树和 ITS-rDNA 树,将该种群鉴定为禾谷孢囊线虫准确、可靠。

禾谷孢囊线虫又称燕麦孢囊线虫<sup>[12]</sup>,主要危害小麦等禾谷类作物,造成植株矮黄、生长衰弱,地下根系及分蘖减少<sup>[37]</sup>。该类线虫发生严重时,可造成 30%~70% 产量损失<sup>[31]</sup>,是禾本科作物产量的一大威胁。孢

囊线虫病作为一种重要的禾谷类作物根部病害,由于难以辨认、评估和控制,在农业种植中的经济重要性常常被严重低估<sup>[38]</sup>。我国于1989年首次在湖北天门县发现禾谷孢囊线虫<sup>[31]</sup>,2006年在甘肃省首次发现<sup>[22]</sup>,此后陆续在燕麦、大麦等麦类作物、嵩草、矮嵩草及醉马草等高寒草原草上发现。明确垂穗披碱草孢囊线虫种类,进一步研究其对垂穗披碱草造成的危害,及其与麦类作物孢囊线虫群体的遗传多样性,可为禾谷孢囊线虫的有效防控奠定基础。

## 4 结论

本研究结合形态学测量及核糖体DNA的28S和ITS基因序列的分子生物学分析,将垂穗披碱草根际的孢囊线虫种群鉴定为禾谷孢囊线虫。研究结果可为高寒草甸垂穗披碱草孢囊线虫发生危害的研究及防控措施的制定提供理论基础。

### 参考文献:

- [1] 龙建廷,高献磊,包赛很那,等.垂穗披碱草抗逆性研究进展[J].草学,2022,3:1-8.
- [2] 周华坤,赵新全,赵亮,等.高山草甸垂穗披碱草人工草地群落特征及稳定性研究[J].中国草地学报,2007(2):13-25.
- [3] 邱涌森,郑玉莹,谢文刚.我国垂穗披碱草遗传育种研究进展[J].中国草地学报,2022,44(2):98-106.
- [4] 陈智华,苗佳敏,钟金城,等.野生垂穗披碱草种质遗传多样性的SRAP研究[J].草业学报,2009,18(5):192-200.
- [5] 陈仕勇,陈智华,周青平,等.青藏高原垂穗披碱草种质资源形态多样性分析[J].中国草地学报,2016,38(1):27-33.
- [6] 乔安海,韩建国,巩爱岐,等.氮肥对垂穗披碱草种子产量和质量的影响[J].草地学报,2006,(1):48-51,56.
- [7] 王明涛,雷变霞,赵玉红,等.垂穗披碱草人工草地建植和管理措施对土壤真菌群落的影响[J].草地学报,2023,31(6):1728-1734.
- [8] 朱志红,刘建秀,郑伟.资源获得性和种内竞争对垂穗披碱草生长繁殖的影响[J].西北植物学报,2005,(10):2056-2061.
- [9] 何永涛,胡宇,段慧荣,等.披碱草属4个牧草品种苗期抗旱性综合评价[J].中国草地学报,2023,45(1):77-87.
- [10] 龙建廷,王尧薇,高国荣,等.干旱胁迫及SA、GA浸种对砂培西藏野生垂穗披碱草种子萌发的影响[J].种子,2023,42(2):108-115,120.
- [11] 张译文.甘肃高寒草原牧草孢囊线虫的种类及多样性研究[D].兰州:甘肃农业大学,2018.
- [12] 段玉玺.植物线虫学[M].北京:科学出版社,2011.
- [13] Turner S J, Rowe J A. Plant nematology [M]. CABI, 2006:91-122.
- [14] 韩变,李惠霞,刘永刚,等.青海省当归茎线虫种类鉴定[J].西北农业学报,2022,31(8):1058-1066.
- [15] 耿晶晶,杨艺萌,尹添,等.大豆孢囊线虫侵染绿豆的国内首次报道[J].山西农业大学学报(自然科学版),2022,42(1):90-97.
- [16] Smiley R W, Whittaker R G, Gourlie J A, et al. Plant-Parasitic Nematodes Associated with Reduced Wheat Yield in Oregon: *Heterodera avenae* [J]. J Nematol, 2005,37(3):297-307.
- [17] 李文豪.甘肃天祝高寒草甸两个孢囊线虫新种鉴定及生物学特性研究[D].兰州:甘肃农业大学,2021.
- [18] Veronico P, Melillo M T, Saponaro C, et al. A polygalacturonase-inhibiting prote in with a role in pea defence against the cyst nematode *Heterodera goettingiana*. [J]. Molecular Plant Pathology. 2011, 12(3): 275-87.
- [19] 李惠霞,彭焕,彭德良,等.甘肃省高寒草原牧草孢囊线虫的鉴定[J].草业学报,2015,24(8):174-180.
- [20] 韩尚明,李文豪,李惠霞,等.甘肃省孢囊线虫新记录种:艾球孢囊线虫[J].草业科学,2020,37(12):2567-2573.
- [21] 朱锐东.甘肃天祝草原孢囊线虫种类鉴定和生态分布研究[D].兰州:甘肃农业大学,2015.
- [22] 柳永娥.甘肃省禾谷孢囊线虫病原学及发生动态研究[D].兰州:甘肃农业大学,2013.
- [23] 俞翔,吴慧平,马骥,等.安徽颍上县禾谷类孢囊线虫发生与危害[J].植物保护,2012,38(5):124-127,133.
- [24] 谢辉.植物线虫分类学[M].北京:高等教育出版社,2005.
- [25] Perry R N, Moens M. Plant nematology [M]. CABI, 2013.
- [26] Subbotin S A, Mundoocampo M, Baldwin J G, et al. Systematics of cyst nematodes (Nematodes: *Heteroderinae*) [J]. Plant Pathology, 2012, 61(2):424.
- [27] Rahi G S, Rich J R, Hodge C. Effect of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* on leaf water potential and water

- use of tobacco[J]. *Journal of Nematology*, 1988, 20(4): 516–522.
- [28] 张译文,李惠霞,陈秀菊,等. 寄生醉马草的孢囊线虫种类鉴定[J]. *草业科学*, 2019, 36(5): 1283–1291.
- [29] 倪春辉,李惠霞,李文豪,等. 不同基因型腐烂茎线虫群体杂交后代分子特征比较[J]. *生物技术通报*, 2021, 37(7): 118–126.
- [30] 王志坤,常健敏,李丹丹,等. 大豆 GmWR11a 基因克隆及生物信息学分析[J]. *东北农业大学学报*, 2013, 44(7): 11–16.
- [31] 陈品三,王明祖,彭德良. 我国小麦禾谷孢囊线虫(*Heterodera avenae* Wollenweber)的发现与鉴定初报[J]. *中国农业科学*, 1991(5): 89.
- [32] 陈品三,王明祖,彭德良. 我国小麦禾谷孢囊线虫(*Heterodera avenae* Wollenweber)鉴定研究[J]. *植物病理学报*, 1992(4): 53–57.
- [33] 李秀花,高波,王容燕,等. 河北省禾谷孢囊线虫种群密度和冬小麦产量损失的关系[J]. *植物保护学报*, 2015, 42(1): 124–129.
- [34] Yadav T C, Bahetic B L, Nama C P. Pathogenicity and management of cereal cyst nematode, *Heterodera avenae* on wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Annals of Plant Protection Sciences*, 2022, 30(1): 83–89.
- [35] Li H, Liu G, Zhang D X, *et al.* Wheat Root Protection From Cereal Cyst Nematode (*Heterodera avenae*) by Fluopyram Seed Treatment [J]. *Plant disease*, 2021, 105(9): 2466–2471.
- [36] 刘明春,马兴祥,尹东,等. 天祝草甸、草原草场植被生物量形成的气象条件及预测模型[J]. *草业科学*, 2001(3): 65–67, 69.
- [37] 王明祖,黎少波,刘涛玉,等. 小麦禾谷孢囊线虫湖北群体活动期特性[J]. *植物保护学报*, 1998, (1): 37–40.
- [38] Ahmed Shahid. 禾谷孢囊线虫(*Heterodera avenae*)生物防治菌的筛选[D]. 北京: 中国农业大学, 2018.

## Extraction and identification of cyst nematodes in *Elymus nutans* rhizosphere in alpine meadow

Han Xu, Wei Xue-juan, Xing Xiao-fang, Fu Yan-shen, Li Hui-xia\*  
(College of Plant Protection, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** [Objective] The aim of the study is to clarify the species of cyst nematodes parasitizing *Elymus nutans* Griseb. in the alpine meadow of Tianzhu county, Gansu province, and to provide theoretical basis for controlling the cyst nematode on grass, so as to protect the ecological resources of alpine grassland. [Method] The simple floating method was used to isolate the cyst nematodes. The morphological characteristics of nematodes were observed and measured, and molecular biology techniques were used to sequence and cluster the 28S–rDNA D2–D3 region and ITS–rDNA of the population. [Result] The cysts were brown with large lemon-shaped and bifenestrate vulva cones. The nematodes were initially identified as *Heterodera avenae* based on diagnostic characters. Molecular identification results showed that sequences were clustered with those of *H. avenae*. [Conclusion] Therefore, by morphological and molecular identification, the nematode population parasitizing on *E. nutans* was identified as *H. avenae*.

**Key words:** alpine meadow; Tianzhu Country; *Elymus nutans*; *Heterodera avenae*; morphological identification; molecular identification

(责任编辑:康宇坤)