

T/LNIQA

辽宁出入境检验检疫协会团体标准

T/LNIQA 007—2023

农田土壤线虫多样性监测技术规范

Technical protocols for monitoring soil nematode diversity in agricultural fields



2023 - 03 - 06 发布

2023 - 03 - 06 实施

辽宁出入境检验检疫协会 发布



目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 监测时间与频次	2
5 监测过程	2
6 线虫多样性监测报告	5
附录 A （规范性）农田土壤线虫统计表	8
附录 B （规范性）线虫监测统计表	9
参考文献	10



前 言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由辽宁出入境检验检疫协会提出并归口。

本文件起草单位：中国检验认证集团辽宁有限公司、中国科学院东北地理与农业生态研究所、中国科学院沈阳应用生态研究所、中检生态环境科技（辽宁）有限公司。

本文件主要起草人：吕莹、张士秀、万雪、杜晓芳、侯娜、闫平平、曹文军、吴斌、李英滨。



农田土壤线虫多样性监测技术规范

1 范围

本文件规定了农田土壤线虫的分离、提取、鉴定、统计的技术方法。
本文件适用于农田土壤线虫数量、分布、种群结构调查及多样性监测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本使用与本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 15618 土壤环境质量农用地土壤污染风险管控标准（试行）

GB/T 33469 耕地质量等级

GB/Z 41358 土壤健康综合表征的生物测试方法

HJ/T 166 土壤环境监测技术规范

HJ 964 环境影响评价技术导则-土壤环境（试行）

NY/T 395 农田土壤环境质量监测技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

农田土壤 farmland soil

用于种植各种粮食作物、蔬菜、水果、纤维和糖料作物、油料作物、花卉、药材、草料等作物的农业用地土壤。

3.2

土壤线虫 soil nematode

在土壤中普遍存在的一类较低等的异养多细胞真核生物，隶属于无脊椎动物中的线虫动物门线虫纲，无色，无节，缺乏附属物，体壁由角质层、表皮和肌肉组成，为假体腔动物。

3.3

植物寄生线虫 plant parasites

能寄生于植物的各种组织，使植物发育不良，并且在感染寄主的同时会传播其他植物病原，造成植物出现疾病症状的一类线虫。

3.4

食细菌线虫 bacterivores

主要取食于在植物根际周围生长的细菌、腐生细菌、病原细菌，对土壤资源状况的变化响应灵敏的一类线虫。

3.5

食真菌线虫 fungivores

主要以植物根际周围的真菌、腐生真菌、病原真菌和菌根真菌为食的一类线虫。

3.6

捕食/杂食线虫 omnivore-predators

可以捕食所有其他线虫类群和附着体，或以食细菌、食真菌、植食线虫、细菌、鞭毛虫等为食的一类线虫。

3.7

自由生活线虫 free living nematode

与植物没有寄生关系，营自由生活的土壤线虫，主要包括食细菌线虫、食真菌线虫和捕食/杂食性线虫。

3.8

线虫生活史策略 c-p 值 colonizer-persister (c-p) values of nematode

土壤线虫根据其生活史策略划分为五个类群，赋予不同的c-p值（1~5）。c-p值为1的线虫，典型的r-对策者和机会主义者，其生活史周期短、繁殖率高、对环境干扰适应性强，经常出现在高度扰动的系统中。c-p值为2的线虫，为机会主义者，生活史周期较短，繁殖率较高，具有耐环境胁迫等特点。c-p值为3的线虫，生活史周期较长，对环境胁迫较敏感，抗扰动能力较差。c-p值为4的线虫，生命周期长，繁殖力较低，对环境压力更为敏感。c-p值为5的线虫具有相对较长的生命周期、较低的繁殖力及对干扰的高度敏感性，经常出现在稳定的土壤生态系统中。

3.9

类群 group

具有某些共同特性的动植物群体（多指同一物种中再细分的不同种类）。

3.10

群落 community

在一定时间内一定空间内的分布各物种的种群集合。

3.11

优势属 dominant genera

属中线虫个体数量占每个样本采集的线虫总体数量10%及以上的属。

3.12

功能团 guild

将线虫划分为BF_n、FF_n、CA_n和OM_n类群，每个类群为一个功能团，n=1~5，代表线虫的c-p值；BF代表食细菌性线虫，FF代表食真菌性线虫，CA代表捕食性线虫，OM代表杂食性线虫。

4 监测时间与频次

根据监测目的设置监测时间和频次。宜根据农作物的生长周期和季节变化，按作物生长的不同阶段或季节选择合适的时间进行监测，应避免降雨、施肥、灌溉和喷洒农药等特殊时期。

5 监测过程

5.1 土壤样品采集

土壤背景、农田土壤环境、农田土壤污染事故监测的布点采样按HJ/T 166中第5章和第6章或NY/T 395中4.3.1和4.4描述的进行，涉及化工、冶金、矿山采掘、农林、水利等可能对土壤环境产生影响的建设项目采样按HJ 964中第7章描述的进行。针对科研、教学项目的试验，土壤采样则根据试验目的和样地面积选取合适的取样样点数量以及确定样点的分布，常规取样按五点法，“S”或“W”型等方法进行随机取样。

在采集土壤样品时应注意，土壤线虫在耕作层（A层）和犁底层（P层）分布最多，宜采耕作层（A层）和犁底层（P层）土壤。根据不同采集目的，也可采集 0~100 cm 土层调查土壤线虫的垂直分布。

5.2 线虫分离与提取

实验室在接到土壤样品后宜立即进行线虫分离与提取。若不能及时分离提取，可将样品暂时保存于 4℃ 冰箱中，在一周内完成提取。

线虫的分离与提取需要100 g鲜土/样品，线虫分离与提取可用漏斗法（具体分离方法见GB/Z 41358中5.3.5）。

5.3 线虫的鉴定

将提取的线虫置于解剖镜下观察、计数，确定线虫总数。随机抽取100条线虫在显微镜下进行形态学鉴定，对于线虫数量小于100的样品则需全部鉴定。线虫的鉴定参照《中国土壤动物检索图鉴》、《Soil Nematodes of Grasslands in Northern China》、线虫分类网站 <http://nematode.unl.edu/wormgen.htm> 鉴定到属，记录下每一属线虫的数量（参见附录A）。

5.4 线虫指数计算

5.4.1 线虫香农-威纳多样性指数按式（1）计算：

$$H' = -\sum P_i \times (\ln P_i) \dots\dots\dots (1)$$

式中：

H' ——线虫香农-威纳多样性指数；

P_i ——一种 i 的个体在全部个体中的比例。

5.4.2 线虫 Margalef 丰富度指数按式（2）计算：

$$SN = \frac{S-1}{\ln N} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

SN ——线虫 Margalef 丰富度指数；

S ——鉴定的属的个数；

N ——线虫总数。

5.4.3 线虫 Simpson 优势度指数按式（3）计算：

$$\lambda = \sum P_i^2 \dots\dots\dots (3)$$

式中:

λ ——线虫 Simpson 优势度指数。

5.4.4 线虫 Pielou 均匀度指数按式 (4) 计算:

$$J = \frac{H'}{\ln S} \dots\dots\dots (4)$$

式中:

J ——线虫 Simpson 优势度指数。

5.4.5 线虫营养多样性指数按式 (5) 计算:

$$TD = \frac{1}{\sum P_i^2} \dots\dots\dots (5)$$

式中:

TD ——线虫营养多样性指数;

P_i ——各营养类群线虫数量与线虫总数的比值。

5.4.6 线虫通路指数按式 (6) 计算:

$$NCR = \frac{BF}{BF+FF} \dots\dots\dots (6)$$

式中:

NCR ——线虫通路指数;

BF ——食细菌线虫数量;

FF ——食真菌线虫数量。

5.4.7 自由生活线虫成熟度指数按式 (7) 计算:

$$MI = \sum v_i \times f_i \dots\dots\dots (7)$$

式中:

MI ——自由生活线虫成熟度指数;

v_i ——第 i 类群线虫的 c-p 值;

f_i ——第 i 类群自由生活线虫数量与线虫总数的比值。

5.4.8 植物寄生线虫成熟度指数按式 (8) 计算:

$$PPI = \sum v_i \times f_i' \dots\dots\dots (8)$$

式中:

PPI ——植物寄生线虫成熟度指数;

f_i' ——第 i 类群植物寄生线虫的数量与线虫总数的比值。

5.4.9 线虫瓦斯乐斯卡指数按式 (9) 计算:

$$WI = \frac{FF + BF}{PP} \dots\dots\dots (9)$$

式中：

WI ——线虫瓦斯乐斯卡指数；

PP ——植物寄生线虫数量。

5.4.10 线虫富集指数按式（10）计算：

$$EI = 100 \times \frac{3.2 \times BF_1 + 0.8 \times FF_2}{3.2 \times BF_1 + 0.8 \times FF_2 + 0.8 \times (BF_2 + FF_2)} \dots\dots\dots (10)$$

式中：

EI ——线虫富集指数；

BF_1 ——食细菌线虫中 c-p 值为 1 的线虫数量；

FF_2 ——食真菌线虫中 c-p 值为 2 的线虫数量。

5.4.11 线虫结构指数按式（11）计算：

$$SI = 100 \times \frac{BF_n \times W_n + FF_n \times W_n + OP_n \times W_n}{BF_n \times W_n + FF_n \times W_n + OP_n \times W_n + 0.8 \times (BF_2 + FF_2)} \dots\dots\dots (11)$$

式中：

SI ——线虫结构指数；

n ——土壤线虫 c-p 值， $n=3\sim 5$ ；

W ——不同 c-p 值线虫的系数， $W_3=1.8$ ， $W_4=3.2$ ， $W_5=5.0$ ；

BF_n ——c-p 值为 n 的食细菌线虫数量；

FF_n ——c-p 为 n 的食真菌线虫数量；

OP_n ——c-p 值为 n 的捕食/杂食性线虫数量。

5.4.12 线虫基础指数按式（12）计算：

$$BI = 100 \times \frac{0.8 \times (BF_2 + FF_2)}{BF_n \times W_n + FF_n \times W_n + OP_n \times W_n + 3.2 \times BF_1 + 0.8 \times FF_2 + 0.8 \times (BF_2 + FF_2)} \dots\dots\dots (12)$$

式中：

BI ——线虫基础指数。

6 线虫多样性监测报告

6.1 试验设计

针对科研、教学项目的试验，具体描述试验设计。

6.2 采样过程描述

包括采样时间、样地土壤类型、气候、地上植被类型、采样方法、样品数量等因素。

6.3 监测结果与表述

6.3.1 香农-威纳多样性指数 (H') 反映组成土壤线虫群落的异质性， H' 值越大表明多样性越大。

6.3.2 Margalef 丰富度指数 (SN) 描述土壤线虫群落的稳定性及其种类的丰富性, SN 值越大表明土壤线虫群落种类越丰富。

6.3.3 Simpson 优势度指数 (λ) 反映土壤线虫群落中优势属的分布情况, λ 值越大表明土壤线虫优势属在群落中发挥更大的作用。

6.3.4 均匀度指数 (J') 反映土壤线虫群落各物种个体数目分配的均匀程度, J' 值越大表明各物种个体数目分配越均匀。

6.3.5 营养多样性指数 (TD) 反映土壤线虫营养类群的相对多度和均匀程度, TD 值越大表明土壤线虫食性多样性越高, 食物源越丰富。

6.3.6 线虫通路指数 (NCR) 用于评价土壤有机质分解过程中主导途径的指标。 $NCR > 0.5$ 表明土壤有机质的分解过程以细菌为主, $NCR < 0.5$ 表明土壤有机质的分解过程以真菌为主。

6.3.7 MI 指数是自由生活线虫 r-选择和 k-选择的比例, 反映线虫的生活周期、繁殖能力和抗干扰能力的强弱。 MI 值范围为 1~4, MI 值越小表明土壤生态系统受到干扰程度越大, c-p 值 1~2 的线虫丰富。 PPI 指数是示植物寄生线虫 r-选择和 k-选择的比例, 反映植物寄生线虫的抗干扰能力和繁殖能力。 PPI 值越大表明土壤生态系统越容易受到植物寄生线虫的影响, 土壤健康状况越差。 PPI/MI 比值反映土壤生态系统对外界干扰恢复程度。 PPI/MI 值越大表明土壤线虫群落受到干扰程度越高。

6.3.8 瓦斯乐斯卡指数 (WI) 反映土壤线虫群落的结构组成与土壤健康程度、土壤食物网的矿化途径。 $WI > 1$ 时, 值越大, 土壤健康状况越好, 表明矿化过程主要是由食细菌线虫和食真菌线虫参与; $WI < 1$ 时, 值越小, 土壤健康程度越差, 表明矿化途径是从植物到植物寄生线虫; $WI = 1$, 说明土壤中有益的自由生活线虫数量与有害的植物寄生线虫数量相同, 土壤健康状况一般。

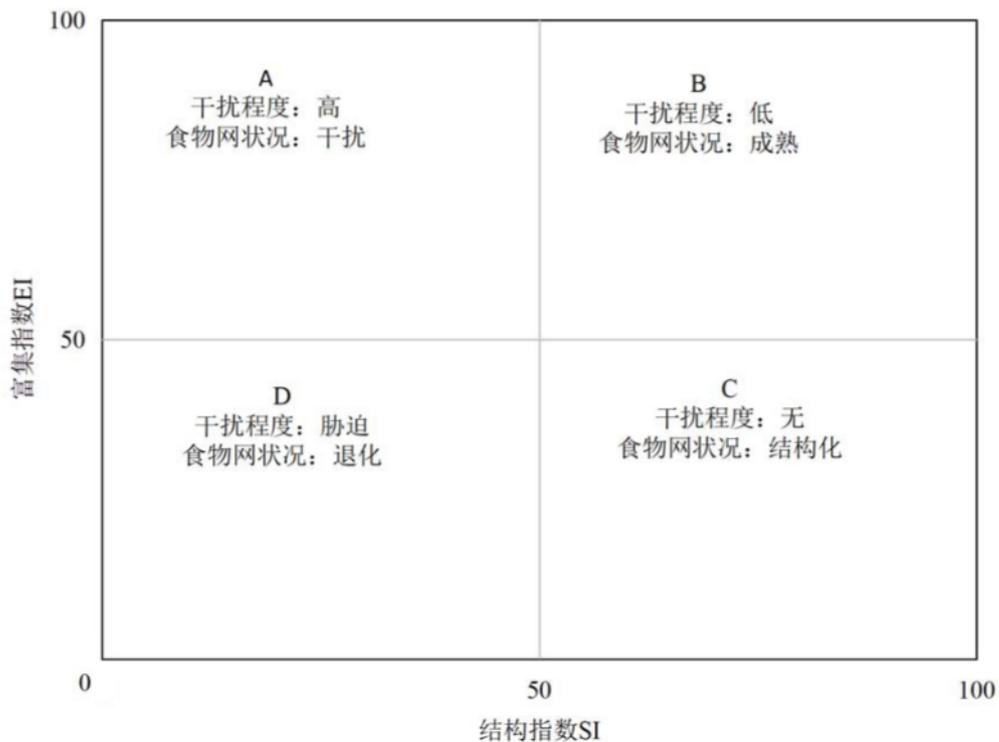


图1 线虫区系分析图

6.3.9 EI 反映线虫对可利用资源的响应，随土壤养分有效性（特别是氮）的增加而增加。 EI 值越大表明土壤线虫可利用的养分资源越丰富，对作物生长有正向影响； SI 用于指示土壤食物网的复杂性， SI 越大，表明土壤食物网的复杂程度越高，生态系统中食物网营养连接更强，土壤环境越稳定。 BI 反映土壤食物网基础成分的变化， BI 值越小表明食细菌线虫优势度越高，土壤养分越丰富。 BI 值越大，表明土壤生态系统健康程度越低。以线虫群落的结构指数（ SI ）为横坐标，富集指数（ EI ）为纵坐标，绘制线虫区系分析图，划分 A、B、C、D 共 4 个象限，反映土壤养分富集状况及食物网受干扰程度。

6.4 结果论述

将线虫各个指数导入到数据统计软件中进行差异显著性、相关性、主成分等统计分析，在分析时可将线虫数据与土壤理化指标、地上植被指标相结合，结合 GB/Z 41358 中 5.3.7 与 5.3.8、GB 15618 中表 1~3、HJ 964 中附录 D、GB/T 33469、HJ/T 166 等相关标准对土壤污染情况、土壤养分情况、土壤线虫多样性、土壤线虫群落结构、土壤养分分解途径进行综合论述。



附 录 A
(规范性)
农田土壤线虫统计表

表A.1规定了线虫统计的填写方法。

表A.1 农田土壤线虫统计表

线虫科名						
线虫属名						
c-p 值						
营养类群						
数 量						
序号						

注1：在制表时将同一营养类群、同一 c-p 值和同一科的线虫属相邻有助于计算线虫多样性和各个指数。

附 录 B
(规范性)
线虫监测统计表

表B.1规定了线虫监测统计的展示方法。

表B.1 线虫监测统计表

序号	线虫 总数	营养类群				功能团						
		<i>BF</i> 数量	<i>FF</i> 数量	<i>PP</i> 数量	<i>OP</i> 数量	<i>c-p1</i> 数量	<i>c-p2</i> 数量	<i>c-p3</i> 数量	<i>c-p4</i> 数量	<i>c-p5</i> 数量	<i>c-p1~2</i> 数量	<i>c-p3~5</i> 数量
序号	<i>H'</i>	<i>SN</i>	λ	<i>J</i>	<i>TD</i>	<i>NCR</i>	<i>MI</i>	<i>PPI</i>	<i>EI</i>	<i>SI</i>	<i>BI</i>	<i>WI</i>

参 考 文 献

- [1] 尹文英. 中国土壤动物检索图鉴[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [2] Bongers, T. De Nematoden van Netherland[M]. Utrecht: NatuurhistorischeBibliotheek van de KNNV, Nr. 46. StichtingUitgeverij van de KoninklijkeNederlandseNatuurhistorischeVereniging, 1988.
- [3] Li, Q., Liang, W.J., Zhang, X.K., Mahamood, M. Soil Nematodesof Grasslands in Northern China[M]. Hangzhou: Zhejiang University Press and London, Academic Press, 2017.
- [4] Shannon, C.E., Weaver, W. The mathematical theory of communication[M]. Urbana and chicago: University of Illinois Press, 1949.
- [5] Simpson, E.H. Measurement of diversity[J]. Nature 1949, 163:668.
- [6] Bongers, T. 1990. The maturity index: An ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition[J]. Oecologia 1990, 83: 14-19.
- [7] Ferris, H., Bongers, T., de Goede, R. A framework for soil food web diagnostics: Extension of the nematode faunal analysis concept[J]. Applied Soil Ecology 2001, 18: 13-29.
- [8] Herrera, C.M. A trophic diversity index for presence-absence food data[J]. Oecologia 1976, 25: 187-191.
- [9] Wasilewska, L. 1994. The effect of age of meadows on succession and diversity in soil nematode communities[J]. Pedobiologia 1994, 38: 1-11.
- [10] Yeates, G.W. Nematodes as soil indicators: Functional and biodiversity aspects[J]. Biology and Fertility of Soils 2003, 37: 199-210.
- [11] Yeates, G.W, Bongers, T., de Goede, R.G., Freckman, D.W., Georgieva, S.S. Feeding habits in soil nematode families and genera—An outline for soil ecologists[J]. Journal of Nematology 1993, 25: 315–331.