

黑龙江省哈尔滨市苜蓿镰孢根腐病病原菌分离鉴定

朱月,任乃芃,唐佳琳,刘香萍*

(黑龙江八一农垦大学动物科技学院,黑龙江 大庆 163319)

摘要:【目的】明确黑龙江省哈尔滨市苜蓿根腐病病原菌种类。【方法】采集 38 株黑龙江省哈尔滨市农业科学院示范区苜蓿根腐病病株,经组织分离法分离致病菌,通过科赫氏法则验证其致病性并结合形态学和 rDNA-ITS 序列分析鉴定病原菌。【结果】从患有苜蓿根腐病的病根分离并选取具有代表性的 5 株真菌 KY1、J1、S1、SA1、C1,分别被鉴定为腐皮镰孢(*Fusarium solani*)、尖镰孢(*F. oxysporum*)、水稻恶苗病菌(*F. fujikuroi*)、三线镰孢(*F. tricinctum*)和层出镰孢(*Fusarium proliferatum*)。致病性测定表明 5 株真菌均为苜蓿根腐病致病菌。【结论】腐皮镰孢不仅分离率最高,为 57.45%,且致病性也较强,病情指数为 61.00,是优势病原菌。

关键词:苜蓿;根腐病;腐皮镰孢;鉴定;致病性

中图分类号:S541⁺.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2023)02-0099-08

DOI:10.13817/j.cnki.cycp.2023.02.012



紫花苜蓿(*Medicago sativa*)是优质多年生豆科牧草,在世界范围内栽培最早、分布面积最广,适应性强,营养价值高,有“牧草之王”的美誉^[1-3]。苜蓿作为我国主要优质牧草之一,对畜牧业发展尤为重要^[4-5]。近年来,国内苜蓿在所有栽培牧草中的地位日渐凸显,其种植面积逐渐扩大^[6]。随着苜蓿集约化程度不断提高,苜蓿病害的发生日趋严重^[4-5],其中根腐病已成为苜蓿单产下降和植株衰败的一个极其重要的因素^[7-8],该病一旦大面积发生会严重降低苜蓿产量,甚至需要重新建植,严重阻碍苜蓿大面积推广^[9]。根腐病是世界性病害,在国内外的各个苜蓿栽培区普遍发生,全世界每年由根腐病造成的产量损失在 20% 左

右,有些发生严重的地块甚至达到 40%^[10-12]。我国自 1991 年发现苜蓿根腐病害以来,先后在新疆^[13]、甘肃^[14]、青海^[13]、四川^[15]、内蒙古^[16]等地都有陆续报道。苜蓿根腐病在美国、加拿大、澳大利亚、俄罗斯、日本和阿根廷等^[16-21]国家也发生严重。

经大量研究发现,引起苜蓿根腐病的病原菌种类繁多^[22-25],如真菌、细菌和线虫均可导致苜蓿根腐病的发生。据报道引起我国苜蓿病害的病原有 38 种真菌,其中根腐病病原有 23 种,分为镰孢菌(*Fusarium* spp.)、丝核菌(*Rhizoctonia* spp.)、腐霉(*Pythiaceae* spp.)、疫霉(*Phytophthora* spp.)^[24,26],镰孢菌为导致根腐病的重要优势病原菌^[27],极具研究价值。但镰孢菌在真菌中具有一定的特殊性,因其形态相似且易受地区和环境的影响而存在差异,所以研究结果不尽相同^[8,25,27-29]。1999 年陈雅君等^[26]对黑龙江省 8 个地区紫花苜蓿种植区进行了根腐病的调查研究,结果表明,优势致病菌为镰孢菌、丝核菌。明确不同生态环境下苜蓿根腐病病原菌的种类和优势致病菌对苜蓿根腐病的防治尤为重要,目前,笔者对黑龙江省哈尔滨市的多个苜蓿种植基地进行调查,发现根腐病为苜蓿田间危害较为严重的病害之一,危害严重的地块发病率可达 70% 以上。因此,本研究对该地苜蓿根腐病

收稿日期:2022-02-16;**修回日期:**2022-03-21

基金项目:黑龙江省科技计划省院科技合作项目(YS20B10);黑龙江八一农垦大学研究生创新科研项目(YJSCX2021-Y01);黑龙江八一农垦大学学成、引进人才科研启动计划(XDB2014-05)、大庆市新能源领域“揭榜挂帅”科技攻关项目(2021BD05)

作者简介:朱月(1998-),女,河南省淮阳人。

E-mail:2285653497@qq.com

*通信作者。E-mail:lxp110@hotmail.com

的致病菌进行分离、鉴定及致病性测定,以期为该病的综合防治及抗性育种提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料的来源与准备

2019年7月10日在黑龙江省农科院国家现代农业示范区采集发病苜蓿病株38株,带回实验室进一步分离鉴定,并对田间患有根腐病的植株根部进行观察拍照(图1)。

供试苜蓿品种为驯鹿,种子来源于克劳沃(北京)生态科技有限公司。

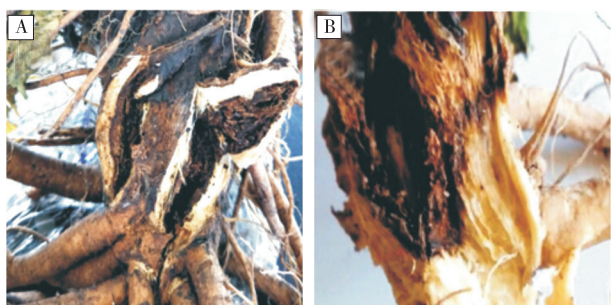


图1 紫花苜蓿镰刀菌根腐病病根

Fig. 1 The root of *Fusarium* root rot in alfalfa

注:A、B为感染根腐病菌的苜蓿根部

1.2 病原菌的分离纯化

将采集来的38株苜蓿病根洗净后晾干,于根部病健交界处剪成5 mm×5 mm的小块组织,用1%次氯酸钠处理30 s,无菌水冲洗3~5次;接种在PDA培养基平板上,培养基中加入配制好的链霉素溶液(50 mg/mL)以防细菌感染。把处理过的病块组织放在PDA培养基上25℃暗培养2~3 d,挑取组织块周围长出不同形态的菌丝于MGA培养基(蛋白胨15 g/L、磷酸二氢钾1 g/L、结晶硫酸镁0.5 g/L、孔雀石绿2.5 mg/L、琼脂粉20 g/L、无菌水至1 L,MGA培养基可减少细菌污染且有利于大小孢子产生)3次转接纯化后,待菌丝产孢后制成孢子悬液,浓度稀释至40倍物镜下每个视野1~2个孢子,在超净工作台中将水琼脂(琼脂粉20 g/L)切成5.0 cm×1.5 cm的长方形,放在灭菌的载玻片上,用无菌的三角玻璃棒蘸取适量孢子悬液,均匀涂抹在水琼脂上,25℃暗处理10~12 h后,在显微镜下将长出芽管的孢子移入新的MGA培养基上培养,获得病原菌的单孢纯化菌株,将纯化得到的菌株保存待用。

1.3 致病性鉴定

将接种在PDA液体培养基中的代表性菌株的菌丝体放入摇床上(180 r/min,25℃),在黑暗条件下培养10 d,用无菌漏斗加无菌棉花过滤,制备成孢子悬液(孢子浓度 1×10^6 个孢子/mL),摇匀后立即使用。

挑选外观健康、外形相同或相近的种子,在无菌的条件下将种子在75%酒精中灭菌2 min,然后在1%次氯酸钠中消毒5 min,用无菌水冲洗3~5次,并用无菌滤纸吸干种子表面的水分,倒入底部铺有两层滤纸的无菌培养皿内,在培养皿中加入无菌水进行催芽。待种子发芽后挑选长势一致的幼芽均匀的摆放在培养皿中,每皿20粒,每种分离物分成2组,一组作为处理组,另一组作为对照组,设3个重复。处理组每皿用移液枪注入3 mL孢子悬液,对照组每皿注入3 mL无菌水,放入(25±1)℃恒温培养箱中暗培养,每日补充无菌水。待苜蓿幼芽充分表现病症后(约14 d),测定幼芽的发病株数和发病程度,并从根部病健交界处重新进行病原菌分离。

苜蓿幼芽的病情分级标准根据以下标准进行统计:0 无明显病症;I 根部变细,根部病斑面积小于全根面积5%;II 根部出现病斑且占全根面积5%~20%;III 根部出现病斑占全根面积20%~50%;IV 根部病斑占根面积50%~100%。用以下公式计算发病率和病情指数:

发病率(Disease incidence, DI)=根部变色植株数/调查总株数×100%

病情指数(Disease severity index, DSI)

$$= \frac{\sum(\text{各级株数} \times \text{相应发病级别})}{\text{总株数} \times \text{最高发病级别}} \times 100\%$$

采用Excel 2010进行数据录入,利用SPSS 26.0软件对数据进行单因素方差分析,处理间采用Duncan's法进行多重比较,统计检验的显著水平以 $P < 0.05$ 为基准。

1.4 病原菌形态学鉴定

25℃暗培养5 d后,观察菌落的生长状况如颜色、菌丝的疏密程度和形状的变化,对是否有凸起进行记录,并测量菌落在MGA培养基上的直径(采用十字交叉法);然后挑取菌丝制成水装片,在光学显微镜下观察病原菌的形态特征并进行拍照记录。

1.5 分子生物学鉴定

在分离纯化后的 MGA 培养基上打 5 个菌饼,放入 PDA 液体培养基中,25℃震荡 4~5 d,过滤出菌丝体并用真空泵抽干水分,采用真菌基因组 DNA 提取试剂盒(购买于 OMEGA 公司)进行 DNA 提取。

采用真菌通用引物 ITS1(5'-TCCGTAAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 进行 PCR 扩增,PCR 扩增反应体系为 25 μ L,包括 2 $\times$ power Taq PCR masterMix 12.5 μ L、ITS1 (10 μ mol/L) 0.3 μ L、ITS4 (10 μ mol/L) 0.3 μ L、DNA 模板 (10 ng/ μ L) 3 μ L、ddH₂O 8.9 μ L。扩增的程序为:94℃预变性 3 h,94℃变性 30 min,56℃退火 30 min,72℃延伸 1 h,共 35 个循环;最后 72℃延伸 10 min;PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳确认有条带后送往上海生工生物工程有限公司进行测序。

在数据库 NCBI 中进行 BLAST 分析,登录 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>),将所得到的序列进行相似性对比,记录比对结果,通过 MAGA7.0 构建分子发育树。

2 结果与分析

2.1 病原菌的分离纯化

从 38 个供试苜蓿根部中分离出 47 株镰孢菌,从菌落形态、大小孢子形态及厚垣孢子有无等形态特征将分离获得的分离物分为 5 类,每类镰孢菌分别选择其中具有代表性的菌株各 1 株,分别命名为 KY1、J1、S1、SA1 和 C1。

2.2 分离物的致病性测定

通过幼芽回接试验,各代表性菌株接种幼根均可致苜蓿发病,但 5 个株系发病率差异均不显著(表 1)。

其中 S1 的致病性较强 ($P<0.05$),发病率为 94.00%,病情指数为 91.50;J1 致病性最弱,发病率为 100.00%,病情指数为 42.50。C1、SA1 和 KY1 的发病率分别为 98.00%、100.00% 和 96.00%;病情指数分别为 49.00、85.50 和 61.00。将发病根部进行病原菌再分离,并与初接菌做对比,发现再分离菌与初接菌为同一种菌,符合柯赫氏法则;因此, KY1、J1、S1、SA1 和 C1 为苜蓿根腐病的致病菌。

表 1 不同病原分离物的致病性

Table 1 Pathogenicity of different pathogen isolates

株系	发病率/%	病情指数/%
KY1	96.00 $\pm$ 0.04 ^a	61.00 $\pm$ 0.04 ^{bc}
J1	100.00 $\pm$ 0.00 ^a	42.50 $\pm$ 0.05 ^c
S1	94.00 $\pm$ 0.06 ^a	91.50 $\pm$ 0.08 ^a
SA1	100.00 $\pm$ 0.00 ^a	85.50 $\pm$ 0.21 ^{ab}
C1	98.00 $\pm$ 0.02 ^a	49.00 $\pm$ 0.03 ^c

注:同列不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)

2.3 病原菌的形态学鉴定

KY1、J1、S1、SA1 和 C1 菌株根据 MGA 培养基上的形态特征,进行了初步鉴定。

2.3.1 KY1 菌株的形态特征 在 MGA 培养基上,气生菌丝稀松为白色,丝绒状或棉絮状菌落,菌落圆形边缘整齐,25℃培养 5 d 后,菌落直径 4.7~5.0 cm,生长速率 0.78~0.84 cm/d,小型分生孢子大小 (8~19) μ m $\times$ (3~7) μ m,多数为卵圆形、椭圆形、肾形;大型分生孢子大小 (35~49) μ m $\times$ (3~7) μ m,分生孢子呈镰刀形、月牙形(图 2),该菌株初步鉴定为腐皮镰孢 (*F. solani*)。

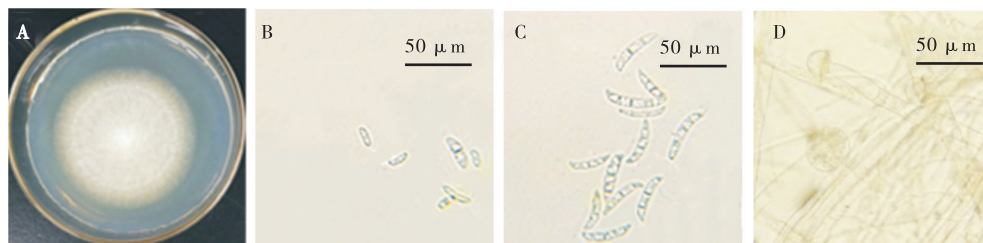


图 2 KY1 菌株在 MGA 培养基上的单菌落正面形态特征

Fig. 1 The frontal morphological characteristics of a single colony of KY1 strain on MGA medium

注:A 菌株在 MGA 培养基上 5 d 后的菌落正面;B 小型分生孢子;C 大型分生孢子;D 菌丝

2.3.2 J1菌株的形态特征 在MGA培养基上,气生菌丝为白色,致密的丝绒状,边缘整齐菌丝疏松,生长旺盛,单个菌落为圆形呈放射状;25℃培养5 d后,菌落直径2.75~3.6 cm,生长速率0.39~0.56 cm/d,大型分生孢子大小 $(32\sim45)\mu\text{m}\times(5\sim12)\mu\text{m}$,2~5个隔,顶部渐尖、镰刀状弯曲;小型分生孢子大小 $(7\sim14)\mu\text{m}\times(3\sim5)\mu\text{m}$,0~1个隔,孢子中部膨大呈长椭圆形(图3),该菌株初步鉴定为尖镰孢(*F. oxysporum*)。

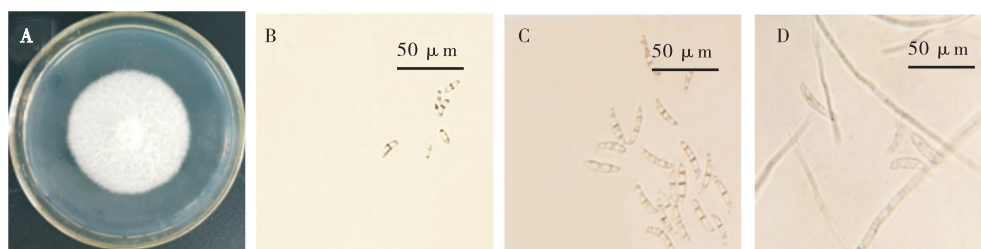


图3 J1菌株在MGA培养基上的单菌落正面形态特征

Fig. 3 The frontal morphological characteristics of a single colony of J1 strain on MGA medium

注:A:菌株在MGA培养基上10 d后的菌落正面;B:小型分生孢子;C:大型分生孢子;D:菌丝

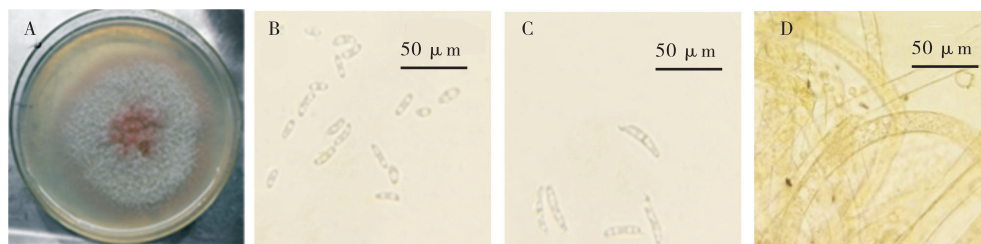


图4 S1菌株在MGA培养基上的单菌落正面形态特征

Fig. 4 The frontal morphological characteristics of a single colony of S1 strain on MGA medium

注:A:菌株在MGA培养基上10 d后的菌落正面;B:小型分生孢子;C:大型分生孢子;D:菌丝

2.3.4 SA1菌株的形态特征 在MGA培养基上菌丝白色棉絮状,生长旺盛,呈辐射状,25℃培养5 d后,菌落直径2.25~2.7 cm,生长速率0.33~0.42 cm/d,分生孢子大小 $(8\sim14)\mu\text{m}\times(4\sim6)\mu\text{m}$,0~1个隔,分生

孢子呈椭圆形或卵圆形、棒状;分生孢子大小 $(24\sim35)\mu\text{m}\times(3\sim5)\mu\text{m}$,1~2个隔,分生孢子呈长椭圆形或镰刀形(图5),该菌株初步鉴定为三线镰孢(*F. tricinctum*)。

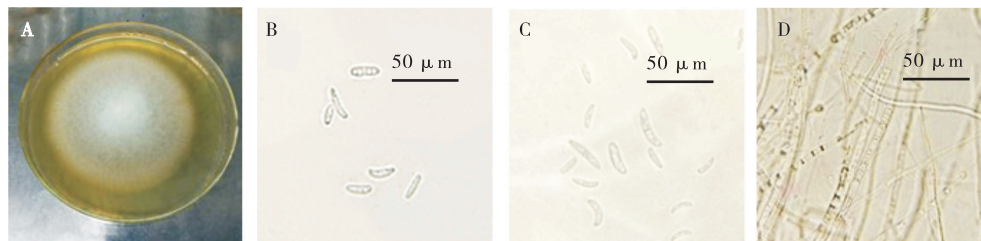


图5 SA1菌株在MGA培养基上的单菌落正面形态特征

Fig. 5 The frontal morphological characteristics of a single colony of SA1 strain on MGA medium

注:A:菌株在MGA培养基上15 d后的菌落正面;B:小型分生孢子;C:大型分生孢子;D:菌丝

2.3.5 C1菌株的形态特征 在MGA培养基上气生菌丝黄色至白色绒毛状,边缘菌丝生长疏松,有明显

轮纹,菌丝白色中央凸起,基底淡黄色;生长5 d,菌落直径为 $(1.8\sim2.8)\text{cm}$,生长速率 $(0.2\sim0.4)\text{cm/d}$,大

型分生孢子大小 $(37\sim 53)\mu\text{m}\times(5\sim 10)\mu\text{m}$,一端尖锐呈镰刀状,整体较直、细长;小型分生孢子大小 $(11\sim$

$27)\mu\text{m}\times(6\sim 10)\mu\text{m}$,两端较钝呈长圆形(图 6),该菌株初步鉴定为层出镰孢(*F. proliferatum*)。

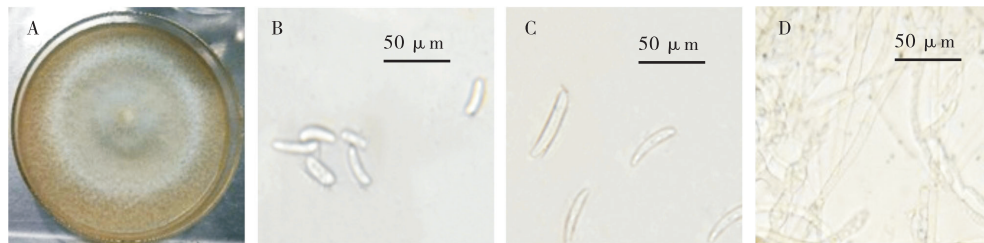


图 6 C1 菌株在 MGA 培养基上的单菌落正面形态特征

Fig. 6 The frontal morphological characteristics of a single colony of C1 strain on MGA medium

注:A:菌株在 MGA 培养基上 20 d 的菌落正面;B:小型分生孢子;C:大型分生孢子;D:菌丝

2.4 rDNA-ITS 序列的系统发育分析

用 rDNA-ITS 通用引物 ITS1/ITS4 对分离得到的 47 株菌株基因组 DNA 进行 PCR 扩增后测序,获得 500~600 bp 的 DNA 片段(图 7)。

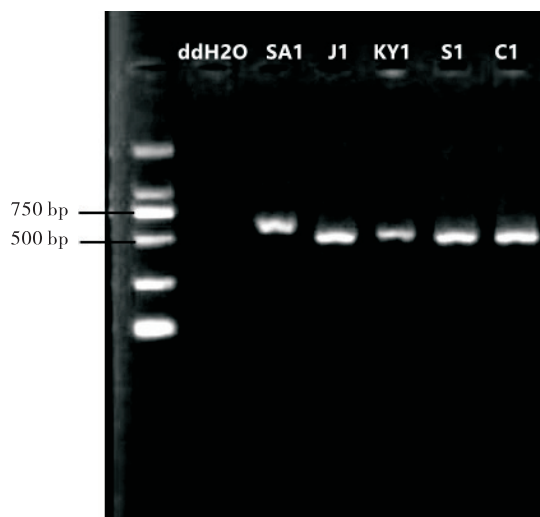


图 7 苜蓿根腐病原菌的 rDNA-ITS 片段 PCR 扩增图谱

Fig. 7 PCR amplification map of rDNA-ITS fragment of alfalfa root rot pathogen

注:1~6 分别为 ddH₂O, SA1, J1, KY1, S1, C1

所得序列在 NCBI 网站 GenBank 上进行同源性对比,并利用 5 个类别的代表性菌株 SA1、J1、KY1、S1、C1 采用 Mega 7.0 邻接法构建菌株系统发育树(图 8)。KY1 菌株的有效序列长度为 540 bp,与腐皮镰孢 *F. solani*(登录号为 KU527789.2、MH536522.1)序列同源性为 99%~100%,且在发育树上聚在一起。J1 菌株的有效序列长度为 518 bp,与尖镰孢 *F. oxysporum*(登录号为 KY073258.1、EF611088.1 和 JF807396.1)序列的 ITS 序列同源性为 99%~100%,且在发育树上聚在一起;S1 菌株的有效序列长度为 537 bp,与水稻恶苗病菌 *F. fujikuroi*(登录号为

MN747995.1)序列的同源性为 99.81%,且在发育树上聚在一起;SA1 菌株的有效序列长度为 565 bp,与三线镰孢 *F. tricinctum*(登录号为 MK788249.1、MK843921.1)序列的 ITS 序列同源性为 99%~100%,且在发育树上聚在一起;C1 菌株的有效序列长度为 535 bp,与层出镰孢 *F. proliferatum*(登录号为 MF510820.1)序列的 ITS 序列的同源性为 99.81%,且在发育树上聚在一起。

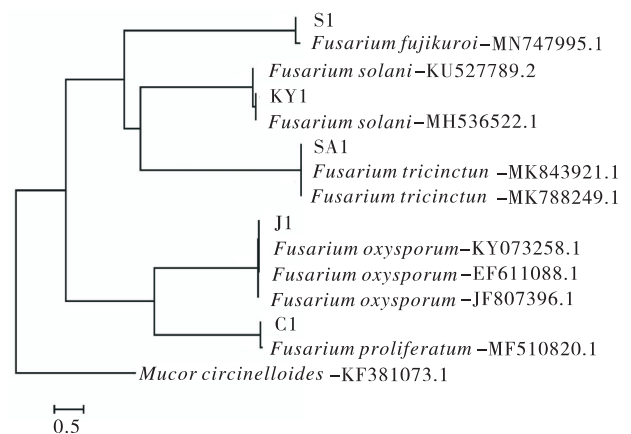


图 8 镰孢菌根腐病原菌系统发育树

Fig. 8 Phylogenetic tree of the pathogen of *Fusarium* root rot

注:分支处数字代表分类单位聚集在一起的几率及进化树的自展值(>50%)

2.5 各菌种分离率

根据形态学及分子生物学鉴定结果将分离获得的 47 株镰孢菌菌株鉴定为 5 个镰孢菌菌种。5 种镰孢菌分离率见图 9,各菌种的分离率在 0~57.45% 之间;腐皮镰孢分离率最高,含 KY1 等 27 个菌株,占总数的 57.45%,且病情指数为 61.00%(表 1),确定腐皮镰孢为该地区的优势致病菌;其次是尖镰孢含 J1 等 10 株,分离率为 21.28%;水稻恶苗病菌含 S1 等 4 株,分离率

为8.51%;三线镰孢含SA1等3株,层出镰孢含C1等3株,二者均占总数的6.38%。

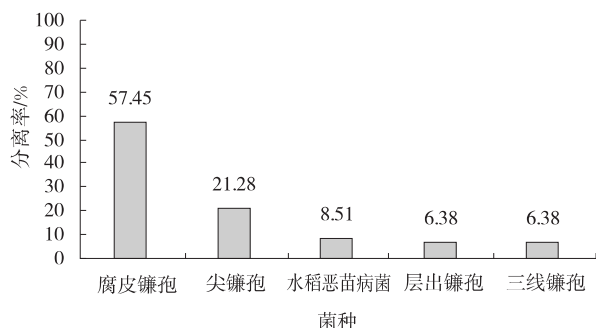


图9 5种镰孢菌菌种的分离率

Fig. 9 Isolation rate of 5 species

3 讨论

本研究从苜蓿根腐病病株中分离并选取5株具有代表性的真菌KY1、J1、S1、SA1和C1,经鉴定分别为腐皮镰孢(*F. solani*)、尖镰孢(*F. oxysporum*)、水稻恶苗病菌(*F. fujikuroi*)、三线镰孢(*F. tricinctum*)和层出镰孢(*F. proliferatum*)。仅通过形态学鉴定镰孢菌具有一定的难度和不确定性,采用分子生物学鉴定可以弥补传统分类鉴定方法中的不足,对病原菌进行快速准确的鉴定^[30]。rDNA-ITS介于18S rDNA、5.8S rDNA和28S rDNA之间的区域,该区域进化速度较编码区块,被普遍用来进行真菌种间或种内的遗传相似性的分子系统研究^[31-33]。本研究采用形态学与rDNA-ITS序列分析相结合的方法进行鉴定,可以对形态学鉴定的不足之处进行补充和查漏,从而避免了因种间高度的相似而带来的鉴定错误。但ITS对亲缘关系较近的种分辨率不够高,而EF-1 α 则可以较好地表现镰孢菌在种一级的关系^[34],具有更高的分辨能力,更适合作为系统进化研究的遗传标记。在今后镰孢菌鉴定中可采用该方法,为该病害研究提供科学依据。丛丽丽等^[8]采用rDNA-ITS和TEF-1 α 序列对镰孢菌菌种鉴定,增加鉴定结果的准确性。

研究表明镰孢菌的5个种对苜蓿均具有致病性,但不同菌株之间致病能力差异明显,其中水稻恶苗病菌对苜蓿致病力最强,发病率为94.00%,病情指数为91.50,是引起哈尔滨市苜蓿镰刀菌根腐病的主要致病菌;水稻恶苗病菌是引起水稻恶苗病的主要致病菌^[35];这与本研究结果一致。Li^[36]研究表明麦根腐平脐蠕孢菌(*Bipolaris sorokiniana*)是引起哈尔滨市

苜蓿根腐病的病原。杨剑锋等^[37]研究表明变红镰孢菌是引起呼和浩特市苜蓿根腐病的优势致病种。这表明地域环境、生态条件、土壤类型和种植结构等因素不同,苜蓿根腐病的发病程度和病原菌群体结构组成也存在较大差异^[37-38]。三线镰孢和腐皮镰孢对苜蓿致病力较强,发病率分别为100%和96.00%,病情指数分别为85.50和61.00,原因可能是:大量病原菌丝堆积在植物内表皮层细胞壁和质膜上形成凸起结构,使植物细胞内部通透性变小导致植物细胞完整性被破坏,从而影响植株水分和营养物质运输^[39]。腐皮镰孢为多种植物根腐病的优势病原,但其致病力相对中等^[30,40]。层出镰孢和尖镰孢对苜蓿致病力较弱,发病率分别为98.00%和100.00%,病情指数分别为49.00和42.50,层出镰孢多认为其致病力较弱或无致病性^[8];但张静妮等^[41]研究表明尖镰孢是引起内蒙古西部地区苜蓿根腐病的优势病原菌且致病性最强。原因可能是:在不同地域环境和生态条件下尖镰孢需要其它镰孢菌复合侵染才能致病或提高致病力。

根腐病广泛发生在大豆、燕麦、马铃薯、番茄和草莓等^[42-45]植物上,严重影响其质量和产量,因此根腐病的防治尤为重要,目前该病害的防治方法多种,农业措施、化学防治和品种抗病性研究最为普遍。今后研究,应着重筛选和培育抗病品种,本研究为后续苜蓿根腐病防治研究奠定了基础。

4 结论

本研究结合形态学和分子生物学鉴定,共分离获得47个菌株,分别属于腐皮镰孢(*F. solani*)、水稻恶苗病菌(*F. fujikuroi*)、尖镰孢(*F. oxysporum*)、三线镰孢(*F. tricinctum*)和层出镰孢(*F. proliferatum*)5个种。其中腐皮镰孢分离率最高,是采样区优势致病菌。此外,5种真菌均能使苜蓿致病。

参考文献:

- [1] 赵美荣,申玉华,李永春,等. 紫花苜蓿抗逆基因工程研究进展[J]. 草地学报,2014,22(2):243-248.
- [2] Wang S R, Wang Y, Shen L, et al. The cultivation technique and utilization of *Medicago sativa* L. [J]. Forest Investigation Design, 2012 (4):93-95.
- [3] Hill Jr R R, Shenk J S, Barnes R F. Breeding for yield and quality [J]. Alfalfa and alfalfa improvement, 1988, 29:

- 809—825.
- [4] 张春梅,王成章,胡喜峰,等. 紫花苜蓿的营养价值及应用研究进展[J]. 中国饲料,2005(1):15—17.
- [5] 李栋. 中国苜蓿产业发展的现状和面临的问题及对策分析[J]. 中国畜牧兽医,2012,39(12):208—211.
- [6] 刘志英,李西良,齐晓,等. 1950 年以来中国学者对苜蓿属的研究:历史脉络与启示[J]. 草业学报,2015,24(10):58—69.
- [7] 曹丽霞,赵存虎,孔庆全,等. 紫花苜蓿根腐病病原及防治研究进展[J]. 内蒙古农业科技,2006(3):36—37+51.
- [8] 丛丽丽,康俊梅,张铁军,等. 苜蓿镰刀菌根腐病病原菌的分离鉴定与致病性分析[J]. 草地学报,2017,25(4):857—865.
- [9] 刘海波,王永雄. 紫花苜蓿根腐病研究进展[J]. 草原与草坪,2006(3):3—6+13.
- [10] 李万苍,李文明,孟有儒. 苜蓿根腐病菌(*Fusarium solani*) 生物学特性研究[J]. 草业学报,2005(4):106—110.
- [11] 胡清泉. 紫花苜蓿根腐病的发生现状与防治措施[J]. 内蒙古草业,2009,21(1):37—40.
- [12] 郭玉霞,管永卓,张金锋,等. 根腐病原镰刀菌—苜蓿品种—土壤水分互作对种苗生长的影响[J]. 草地学报,2015,23(3):623—631.
- [13] 南志标,员宝华. 新疆阿勒泰地区苜蓿病害[J]. 草业科学,1994,11(4):14—18.
- [14] 李敏权. 苜蓿根和根颈腐烂病原致病性及品种抗病性研究[J]. 中国草地,2003,25(1):39—43.
- [15] 陈雅君,刘学敏,崔国文,等. 紫花苜蓿根腐病的研究进展[J]. 中国草地,2000(1):51—56.
- [16] 曹丽霞,赵存虎,白全江,等. 内蒙古中部地区苜蓿根腐病病原研究[J]. 华北农学报,2008,23(6):105—107.
- [17] Leath K T. *Fusarium* root rot of forage species: pathogenicity and host range[J]. Phytopathology, 1978, 68(6):826—831.
- [18] Snyder W C, Hansen H N, Sambucinum Fuckel F. *Fusarium* species associated with crown rot of alfalfa in Nevada[J]. Plant disease, 1991, 75(1):51—56.
- [19] Hwang S F, Howard R J, Moskaluk E. Crown and root rot of alfalfa in southern Alberta[J]. Canadian plant disease survey, 1989, 69(1):9—11.
- [20] Seif El-Nasr H I, Leath K T. Crown and root fungal diseases of alfalfa in Egypt[J]. Plant disease, 1983, 67(5):509—511.
- [21] Uddin W, Knous T R. *Fusarium* species associated with crown rot of alfalfa in Nevada[J]. Plant disease, 1991, 75(1):51—56.
- [22] 安欢乐. 甘肃省紫花苜蓿根腐病的病原研究[D]. 兰州:兰州大学,2016.
- [23] 刘若,王宝全,才老,等. 榆中北山苜蓿的真菌病害[J]. 草与畜杂志,1987(5):7—10.
- [24] 刘若,南志标. 天祝永丰滩草原植物的真菌病害[J]. 中国草业科学,1987(1):14—18.
- [25] 孟嫣,李敏权. 苜蓿根和根颈腐烂病原及防治研究进展[J]. 草业科学,2005(5):89—92.
- [26] 陈雅君,崔国文. 黑龙江省紫花苜蓿根腐病调查及病原分离[J]. 中国草地,2001(3):79—80.
- [27] 杨剑锋,张园园,王娜,等. 苜蓿根腐病原菌的分离鉴定及苜蓿品种的抗性评价[J]. 中国草地学报,2020,42(3):52—60.
- [28] 孔前前,阮柳,刘东霞,等. 河北苜蓿镰孢菌根腐病病原生物学特性研究[J]. 中国农业大学学报,2018,23(8):59—76.
- [29] Cormack M V. *Cylindrocarponehrenbergi* Wrand other species as root parasites of alfalfa and sweet clover in Alberta[J]. Canadian Journal of Research, 1937, 15(9):403—424.
- [30] 杨琰珊,姚拓,张建贵,等. 燕麦根腐病原真菌分离鉴定及致病性研究[J]. 草原与草坪,2021,41(2):60—69.
- [31] 陈红梅,李金花,柴兆祥,等. 35 个马铃薯品种对镰刀菌干腐病优势病原的抗病性评价[J]. 植物保护学报,2012,39(4):308—314.
- [32] 侯丽冰,贺伟,刘小勇,等. 我国几种松干锈菌亲缘关系的 ITS 序列分析[J]. 北京林业大学学报,2002(Z1):179—186.
- [33] Schoch C L, Seifert K A, Huhndorf S, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (rDNA—ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi[J]. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2012, 109(16):6241—6246.
- [34] 胡兰,姜钰,徐秀德. 基于形态学和 EF-1 α 序列特征的我国高粱子粒寄藏镰孢菌种群鉴定[J]. 作物志,2013(4):129—132.
- [35] Ednar G W, Jens L S, Lubeck M, et al. *Fusarium* spp. Associated with rice bakanae: ecology, genetic, diversity, pathogenicity and toxigenicity [J]. Environmental Microbiology, 2010, 12(3):649—657.

- [36] Li Y G, Meng L, Gong L, *et al.* Occurrence of *Bipolaris* root rot caused by *Bipolaris sorokiniana* on alfalfa in China. *Plant Disease*, 2019, 103(10):2691.
- [37] 杨剑锋, 王乐, 张园园, 等. 呼和浩特市苜蓿根腐病病原菌鉴定及致病性测定[J]. *植物保护学报*, 2022, 49(4): 1093—1101.
- [38] 王喜刚, 杨波, 郭成瑾, 等. 宁夏回族自治区马铃薯镰刀菌根腐病病原菌的分离鉴定与致病性测定[J]. *植物保护学报*, 2020, 47(3):609—619.
- [39] 张艳东. 桑树根腐病致病机理及拮抗菌的筛选研究[D]. 镇江:江苏科技大学, 2013.
- [40] 方香玲, 张彩霞, 南志标. 紫花苜蓿镰刀菌根腐病研究进展[J]. *草业学报*, 2019, 28(12):169—183.
- [41] 张静妮, 王铁梅, 刘自学, 等. 内蒙古西部地区苜蓿根腐病病原菌鉴定[C]. 第三届(2014)中国草业大会论文集. 2014:179—184.
- [42] 王梦蕊, 刘淑梅, 侯丽霞, 等. 番茄颈腐根腐病抗性鉴定技术的建立及抗性种质资源筛选[J]. *中国农业科学*, 2022, 55(4):707—718.
- [43] 夏艳秋, 郑宇慧, 严浩, 等. 江苏省连云港市草莓根腐病病原菌的分离及鉴定[J]. *江苏农业科学*, 2022, 50(2): 85—90.
- [44] 金艳丽, 姚拓, 兰晓君, 等. 燕麦根腐病拮抗菌的筛选及抑菌特性研究[J]. *草地学报*, 2022, 30(5):1095—1101.
- [45] 凤舞剑, 朱强, 白耀博, 等. 草莓根腐病病原菌分离与鉴定[J]. *蔬菜*, 2021(12):40—45.

Isolation and identification of pathogens of *Fusarium* root rot on alfalfa in Harbin City, Heilongjiang Province

ZHU Yue, REN Nai-peng, TANG Jia-lin, LIU Xiang-ping*

(College of Animal Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract:【Objective】To clarify the pathogenic species of *Fusarium* root rot of alfalfa in Harbin City, Heilongjiang Province. 【Method】Thirty-eight alfalfa root rot disease strains were collected from the demonstration area of Harbin Academy of Agricultural Sciences in Heilongjiang Province, and the pathogenic fungi were isolated by tissue separation method, verified by Koch's rule and identified by morphology and rDNA-ITS sequence analysis. 【Result】The five representative fungal strains, KY1, J1, S1, SA1 and C1, were isolated and selected from alfalfa roots and identified as *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. fujikuroi*, *F. tricinctum* and *F. proliferatum*, respectively. The pathogenicity test showed that all the five fungi were pathogenic for alfalfa root rot. 【Conclusion】*F. solani* not only had the highest isolation rate (57.45%), but also had strong pathogenicity, with a disease index of 61.00, which was the dominant pathogen. The alfalfa root rot caused by *F. fujikuroi* was reported for the first time in China.

Key words: alfalfa; root rot; *Fusarium solani*; identification; pathogenic