

DOI: 10.11686/cyxb2017037

http://cyxb.lzu.edu.cn

李彦忠, 徐娜, 汪治刚, 史敏. 沙打旺黄矮根腐病的研究进展. 草业学报, 2017, 26(11): 196-204.

LI Yan-Zhong, XU Na, WANG Zhi-Gang, SHI Min. Review of research on yellow stunt and root rot in *Astragalus adsurgens*. Acta Prataculturae Sinica, 2017, 26(11): 196-204.

沙打旺黄矮根腐病的研究进展

李彦忠*, 徐娜, 汪治刚, 史敏

(草地农业生态系统国家重点实验室, 兰州大学草地农业科技学院, 甘肃 兰州 730020)

摘要:沙打旺仅在我国作为牧草人工栽培, 20世纪末期种植面积达6.7万hm², 此后因草地快速衰退而播种面积大幅度缩减。研究发现其早衰的主要因素是一种真菌病害, 该病害就是首次在甘肃发现的沙打旺黄矮根腐病, 目前已在甘肃、陕西、宁夏、云南、内蒙古等所有沙打旺栽培地区发现。枝条矮化、叶片黄化、根腐烂是主要症状, 病菌为沙打旺埃里砖格孢(*Embellisia astragali*), 其菌丝寄生于植株的所有组织体内, 为系统性病害。为有效防控该病害, 保护我国特有牧草, 自该病发现后在病害和其病原菌特点、病菌的分子生物学、抗病品种筛选、药剂防治等方面进行了研究, 本研究综述了自该病发现以来的研究成果, 提出了该病害在植物病理学领域的意义以及后续应加强的研究方向。

关键词:黄矮根腐病; 病原; 疯草内生真菌; 草地生产力; 病害防治

Review of research on yellow stunt and root rot in *Astragalus adsurgens*

LI Yan-Zhong*, XU Na, WANG Zhi-Gang, SHI Min

State Key Laboratory of Grassland Agro-ecosystems, College of Pastoral Agriculture Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China

Abstract: Standing milkvetch (*Astragalus adsurgens*) is a very important native perennial pasture plant in China. At the end of the 20th century it occupied more than 67000 ha, but since then has declined sharply due to the onset of fungal disease. Yellow stunt and root rot (YSRR), first detected in Gansu province, is a major factor in the decline of milkvetch pasture. YSRR is a seed-born, systemic disease that can be spread by wind and water flow. Infected plants show symptoms of yellowing and necrosis stunting in leaf blades, discoloration of stems from brown to black and, in extreme cases, plant death. This pathogenic fungus is closely related to locoweed endophytes, which are therefore useful for research on its evolutionary origins. This paper summarizes studies of YSSR pathogen, infection cycle and control methods. It also discusses prospects for further research.

Key words: yellow stunt and root rot disease; pathogen; locoweed endophyte; pasture productivity; disease management

豆科牧草因蛋白含量高在饲料中不可或缺, 我国的豆科牧草种类不多, 其中最重要的为紫花苜蓿(*Medicago sativa*), 在全国范围内广泛种植, 且已形成新型产业, 其次为红豆草(*Onobrychis viciaefolia*)、沙打旺(*Astragalus*

收稿日期: 2017-02-14; 改回日期: 2017-03-31

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31272496), 公益性行业(农业)科研经费专项项目(201303057)和高等学校学科创新引智计划(B12002)资助。

作者简介: 李彦忠(1969-), 男, 甘肃会宁人, 教授, 博士。E-mail: liyzh@lzu.edu.cn

* 通信作者 Corresponding author.

adsurgens)、三叶草(*Trifolium repens*)、柱花草(*Stylosanthes guianensis*)等,但所占份额极少,仅是我国豆科牧草的有益补充。其中沙打旺仅在我国作为牧草人工栽培,而在美国、澳大利亚等国家则被视为毒草,被划分在疯草之列^[1]。我国研究认为沙打旺含有对家畜有毒的硝基化合物,但含量甚微,对反刍动物是安全的^[2]。直立黄芪(*Astragalus adsurgens*)分布于欧亚大陆,沙打旺是其驯化栽培的品种,因“沙子越打越旺”而得名,在我国已种植了上百年,最早栽种于黄河下游^[3-4]。胡耀邦同志于 1983 年 7 月中旬到 8 月上旬考察青海省和甘肃省时发出了种草种树、发展畜牧、改造山河、治穷致富的号召^[5],在此背景下,沙打旺因具有防风固沙和饲料兼用的特点被引种到我国北方,但我国北方的有效积温无法满足沙打旺种子的成熟,为此我国育种者相继培养出黄河一号、彭阳早熟、内蒙早熟等早熟品种,解决了种子供应不足的矛盾之后,迅速推广至辽宁、内蒙古、陕西、甘肃、宁夏、新疆等地,至 20 世纪末期时栽培面积达 6.7 万 hm^2 。然而,沙打旺栽种 3~5 年后大量死亡,失去利用价值,因此被认为是短命植物^[6-7]。

沙打旺栽培种多年后出现植株矮化、叶片黄化、根部腐烂、植株死亡的症状,经过重复病原物分离和致病性接种等试验,2007 年最终确定沙打旺早衰的原因为一种新病害,即沙打旺黄矮根腐病,其病原为真菌新种。为有效控制该病害,本研究团队在此后的 10 年中持续对其病原的分子生物学、病害的防治等方面做了研究。本研究拟做一回顾总结,以便从事沙打旺研究的人员识别该病害,并警惕该病害的蔓延,做到及时防治的目的。

1 沙打旺的种与品种

黄芪属(*Astragalus*)又名紫云英属,该属在全球有 2500 余种^[8],我国有 270 余种^[9-10],其中作为中药材人工栽培的有膜荚黄芪(*A. membranaceus*),草原上野生的有茎直黄芪(*A. strictus*)、变异黄芪(*A. variabilis*)等,多因对家畜有毒而被列为疯草^[11]。*Astragalus adsurgens* 是 1800 年描述的一个物种,中文名为直立黄芪、斜茎黄芪,分布于我国、前苏联、蒙古、日本、朝鲜和北美温带地区。野生的直立黄芪在我国东北、华北、西北、西南地区等地的向阳山坡灌丛及林缘地带均有分布^[10],研究较多的主要为山西五台山和宁夏云雾山的直立黄芪,又称为野生沙打旺^[12],有的匍匐于地面,故称为匍匐沙打旺^[13];栽培的直立黄芪称为沙打旺,又名麻豆秧、地丁、薄地强、马绊肠等^[3]。然而,栽培沙打旺与野生沙打旺的株型、种子成熟所需的积温、营养成分含量等诸多方面存在明显差异^[14-16],长期以来对二者的亲缘关系存在异议,有学者认为二者虽然都为双倍体,有 16 条染色体,但核型分布不同,故分类地位不同^[13],但一直未采用分子生物学技术澄清。最新的研究证明,以核糖体 RNA 内转录间隔区(rRNA ITS)构建系统发育树显示,二者属于同一物种^[17]。

沙打旺的育成品种多为早熟品种,有内蒙古早熟、彭阳早熟等,种子蛋白电泳谱带和随机扩展多态性 DNA (RAPD, random amplified polymorphic)均说明各品种与地方品种和野生品种之间的亲缘关系^[18],勾画出一些地方品种可能是一些育成品种引种到这些地区的线索。

2 病害特性

2.1 发现与命名

自 1989 年至 2004 年在甘肃省环县甜水堡连续数年播种了沙打旺,累计 8 hm^2 。植株在返青后出现叶片变黄,后期枝条矮缩,症状疑似病毒病或植原体病的病害,在拔节期的发病率接近 100%,但后来在发病植株的叶片、叶柄、茎和根部均分离到一种真菌,其中在茎中的分离率达 100%,通过蘸根接种、喷雾接种、浇孢子悬浮液接种于幼苗和成株后均出现与田间相同的症状,且根部腐烂变黑,由此将该病确定为一种新病害,根据其典型症状命名为沙打旺黄矮根腐病,英文名为 yellow stunt and root rot of standing milk-vetch,缩写为 YSRR^[19]。

内蒙古栽培的沙打旺普遍出现叶片黄化的症状,被称为早衰,早衰现象也导致沙打旺草地的利用年限仅有 3~5 年,5 年后沙打旺草地群落中的杂草开始占优势^[7],而同属于多年生牧草的紫花苜蓿,草地利用年限可达 10 年以上^[20]。之前的研究者总结了可能引起沙打旺草地衰退的原因,其一是根腐病,主要由镰刀菌(*Fusarium* spp.)引起,如周洪友等^[21]认为内蒙古赤峰沙打旺根腐病的主要病原为茄腐镰刀菌(*F. solani*)和尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*),尹亚丽等^[22]对甘肃环县沙打旺根部入侵真菌研究后发现,燕麦镰刀菌(*F. avenaceum*)和茄腐镰刀

菌是优势种;其二为沙打旺小食心虫(*Grapholita shadawana*),小食心虫以幼虫蛀茎取食沙打旺髓部,且随着草地年龄的上升为害加重,所以被认为是导致沙打旺衰退的原因之一^[23]。然而,经过系统研究后,确定草地早衰的主要原因是沙打旺埃里砖格孢导致的黄矮根腐病。对该病的研究过程中也发现了镰刀菌和小食心虫对沙打旺的生长造成影响,但镰刀菌的致病性相对沙打旺埃里砖格孢较弱,接种镰刀菌的幼苗存活率为72.07%~90.63%,接种沙打旺埃里砖格孢(*Embellisia astragali*)的幼苗存活率仅为60.64%^[24]。因此,在确定植物受害是否为病害的过程中首先应理清影响植株生长的多种因素的主次关系,查明真正的病原是关键。

2.2 症状识别要点

因为该病害在植株的不同年龄和不同生长阶段在各种组织器官上的症状均有一定差异,因此病名中的“黄化”、“矮化”和“根腐”不足以囊括所有症状,播种带菌的种子后,幼苗的子叶和真叶依次变黄,新叶扭曲,极难与干旱、叶片衰老的症状区分开来,返青后新发出的叶片也与此类似,起初黄叶仅出现在植株基部近地面处;比较明显的症状出现在后期生长出的新叶上,只要一个枝条发病,则所有叶片均整体变黄,叶片表皮内可见少量褐色的细线条,后期基部叶缘干枯;拔节后发病枝条僵硬,不能自由伸展,枝条顶端生长缓慢而侧枝丛生,侧枝与主枝同高,整株呈扫帚状,这时期早期生长出的叶片大量脱落,新叶小、黄、扭曲,茎秆表面自茎秆基部至上部逐渐变色,初褐色,后期深褐色;开花期至成熟期的主要症状为发病枝条多不开花,茎秆继续变色加深,呈黑褐色,死亡的茎、叶斑和叶片在潮湿条件下黑如煤炭,为病菌的分生孢子梗和分生孢子^[24-25]。

2.3 分布与寄主

2009年调查时除在甘肃环县之外,还在宁夏盐池、内蒙古敖汉、陕西榆林等地发生^[26]。在各地调查时未发现除沙打旺之外的其他寄主,在室内寄主范围测定中包括其他豆科牧草在内的11种植物均未发病,但可侵染紫云英(*Astragalus sinicus*),仅引起过敏性急性坏死叶斑,而不会在叶片内继续扩展^[19]。

2.4 侵染循环与发病条件

病菌主要以菌丝存在于染病植株的茎基部、根颈部和主根内,次年随新芽生长在其内不断向上扩展至地上各个部位,直到花和种子内。商品沙打旺种子中带菌率不足0.2%,但发病枝条开花后,籽粒的带菌率高达44%。植株一旦被侵染则终身带菌直至死亡。可通过带此病菌的种子越冬,种子带菌是新播沙打旺发病的主要原因,该病也以分生孢子在田间死亡植株表面越冬,次年在植株生长期侵染寄主,但存活时间不足1年,将带分生孢子病残体埋入土壤中,孢子存活时间不足6个月。接种试验证明该病为气传病害、种传病害,但不是土传病害,其也是系统性病害,无论在根部接种还是叶片接种均可扩展至其他所有组织部位,其中叶片接种后病菌先扩展至叶柄,后至茎,再后来向茎上部和下部分扩展,在茎节处促生出大量病叶的侧枝^[24]。豆科牧草黄萎病(*Verticillium* spp.)也为系统性病害^[27],但具有此类侵染方式的真菌无论在牧草病害中还是在其他植物病害中极为罕见^[28]。

由于病菌只有在植株死亡后才可产生分生孢子,而分生孢子萌发需要95%的空气相对湿度,分生孢子在水中6h均可全部萌发,因此,高湿条件不仅有利于孢子产生,也有利于孢子萌发。在降雨量大的地区该病发生更加普遍,根部腐烂也更加严重,相对而言,在干旱的砂壤土中栽培的沙打旺则发病少,危害也轻,如在宁夏盐池和陕西榆林^[26]。在甘肃环县多年的调查中未发现叶片被侵染然后扩展至茎部的情况,但在甘肃兰州的试验地,秋季大量叶片被侵染,继而病斑扩展至茎部形成黑斑^[17],前一地点为干旱未浇水的砂壤土,后者为水浇地,土壤为黄绵土,可能是两地的气候条件和栽培管理方式决定了病程的不同^[26]。

3 病菌特性

3.1 形态学和生物学特征

该病的病原在马铃薯胡萝卜琼脂培养基(PCA)上菌落白色到深褐色,边缘不整齐,分生孢子梗具有屈膝状弯曲,分生孢子呈淡橄榄绿色到黄褐色,长倒棍棒状,直或Y形、S形,无或极少1个纵隔膜或斜隔膜,属于埃里砖格孢属真菌,根据其寄主、分生孢子大小和颜色等特征将其描述为一个新种:黄芪埃里砖格孢(*Embellisia astragali*),又因为该病菌在自然条件下寄主仅有沙打旺,中文名也称沙打旺埃里砖格孢^[24]。

此菌的菌落在包括马铃薯琼脂培养基(PDA)在内的9种培养基上生长均很缓慢,菌落生长速率为1mm/d

左右,且产孢少甚至难以产孢。相对而言在 V-8、PCA 和麦秆煎液琼脂培养基(WHDA)上产孢较多^[29]。菌落生长缓慢,在此病菌分离过程中其菌落常被其他菌所覆盖或被杂菌污染,这也可能是尹亚丽等^[22]研究沙打旺根部真菌未得到此菌或被忽视的原因。分离研究此菌的过程中得到的启发是不能忽视每一种真菌,特别是生长缓慢的真菌极有可能是真正的病原菌。

3.2 分子生物学特征

利用 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GPD)、转录延伸因子 1- α (TEF-1)和 RNA 聚合酶 II 第二大亚基(RPB2)多个基因联合构建系统发育树,确定了沙打旺黄矮根腐病病菌属于 Woudenberg 等^[30]重新分类的链格孢属波浪芽管孢组(Genus *Alternaria* Section *Undifilium*),这一分支的分子进化树(MP)自展支持率为 100%,贝叶斯后检支持率为 1.00。然而,多种疯草内生真菌亦属于波浪芽管孢组,为将该病菌与疯草内生真菌区分开来,再用 GPD 和核糖体编码基因转录间隔区(ITS)两个基因构建的系统发育树揭示了该病菌与棘豆链格孢(*Alternaria oxytropis*)、*A. cinerea*、*A. fulva* 和 *A. bornmuelleri* 4 种疯草内生真菌均不是相同物种。因此,沙打旺黄矮根腐病菌被重新命名为甘肃链格孢(*A. gansuense*),由于黄芪属名“*Astragali*”被其他真菌占用,故以该病菌最初的发现地“甘肃”作为种加词^[31-32]。

3.3 与疯草内生真菌的关系

疯草是有毒的棘豆属(*Oxytropis*)和黄芪属植物的总称,能引起动物的中毒甚至死亡,主要分布在亚洲东部、欧洲西部和北美洲^[33-34]。疯草中含有有毒的生物碱——苦马豆素,是疯草毒性的主要成分^[34-35],目前普遍认为苦马豆素由疯草中的内生真菌产生^[36-37]。对疯草内生真菌的发现和研究表明始于 20 世纪末,刚开始被描述为链格孢(*Alternaria* sp.)^[38-39];2006 年,Wang 等^[40]在我国的甘肃棘豆上分离了一个内生真菌,定名为棘豆埃里砖格孢(*E. oxytropis*),这是第一个被描述到种的疯草内生真菌。疯草内生真菌分类学的发展一直不断,2009 年 Pryor 等^[41]结合分子生物学手段将疯草内生真菌划分到一个新的属,波浪芽管孢属(*Undifilium*)。2013 年疯草内生真菌被降级归到链格孢属中。

除了黄矮根腐病菌与疯草内生真菌形态上非常相似外,病原菌在沙打旺中的分布与内生真菌在疯草中的分布情况亦相同,且沙打旺同为黄芪属植物,有低毒^[1],这些共性使得疯草和沙打旺、疯草内生真菌和沙打旺埃里砖格孢的关系颇为密切,引人注目。用疯草内生真菌特异性引物 ITS5/OR1 在沙打旺埃里砖格孢中扩增出了特异性条带,因此推测沙打旺埃里砖格孢和疯草内生真菌的亲缘关系较近^[42]。新的分类体系中沙打旺埃里砖格孢和疯草内生真菌同属波浪芽管孢组更加支持了这一结论。参与苦马豆素代谢的酵母氨酸还原酶编码基因早前从疯草内生真菌中克隆出来^[43],利用其简并引物从沙打旺黄矮根腐病菌中扩增出类似片段,相似性达到 99.5%^[32]。

3.4 生防效果

该病菌对其他病菌具有明显的拮抗作用,为其在生防上的利用奠定了理论基础。平板对峙试验表明,此菌对 9 种挑选出来试验的病原真菌均具有抑制作用,但抑制程度不同,抑制率为 42.38%~81.41%,其中,对红豆草刺盘孢(*Colletotrichum* sp.)的抑制效果最显著,对辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)的抑制效果最低。沙打旺埃里砖格孢的麦秆煎液发酵液对病原真菌的生长同样具有抑制作用,病原菌在培养基上生长缓慢、菌丝稀疏,并且能影响病菌孢子的萌发,抑制率为 19.29%~85.16%^[17]。

4 病害对草地生产力的影响

4.1 对草地建植的影响

病菌侵染幼苗,会造成植株死亡,影响草地的建植。采用蘸根接种、剪根接种、浇孢子悬浮液接种、种子接种和喷雾接种等方法将病菌接种到幼苗时,每种方法均能使幼苗发病,除喷雾接种外,其他接种方法还能造成幼苗死亡,其中种子接种 3 个月后,植株死亡率为 17.86%,而接种 8 个月时,死亡率达到 75%^[24]。

4.2 对植株生长的影响

病害造成沙打旺株高和根长整体上降低,地上病情指数与株高呈显著负相关,即地上病情指数越高,株高越低;枝条矮化的情况分为整株部分枝条矮化和全株矮化,全株矮化植株数随草地年龄增大而增加,在 4 龄时达到

最大,之后降低,矮化枝条的高度仅为健康植株高度的 $2/3\sim 3/4$ 。沙打旺经越冬后次年返青时,从茎基部和根颈部位生出新的枝条,该病害会使植株从茎基部萌发新枝条的能力下降,感病老枝条茎基部新生枝条数显著($P<0.05$)低于未染病枝条。另一方面,春季以后,在病菌的刺激下,沙打旺茎基部增生出大量矮化枝条,但矮化枝条到秋季容易死亡,不能开花、结籽。病菌的侵入会导致植株主根和根颈腐烂,再加上久旱后降雨等因素使得主根皮层开裂,有利于一些弱寄生或腐生的线虫和真菌入侵,如镰刀菌(*Fusarium* spp.)和链格孢^[24]。

4.3 对草地持久性的影响

随着草地年龄的增加,病菌多年持续侵染,使得沙打旺根部和根颈部腐烂程度逐渐加重,造成植株死亡,植株死亡率随草地年龄的增加而提高^[44]。用带菌率 0.4% 的种子播种进行试验,2龄和3龄植株的死亡率分别为 13.4% 和 71.2% ;移栽病株加播种带菌种子时,2龄和3龄的植株密度比对照下降 36% 和 57% 。沙打旺的死亡在返青期间发生得尤其严重,可能是由于植株生长时根际消耗水分过多,加上降水少,使得植株根部缺水,不能满足根的生长和芽的形成^[24]。

4.4 对草产量的影响

黄矮根腐病的发生虽然会使植株枝条增生,但全株的草产量受病害影响仍下降。与健株相比,建植3、4、6和8年的沙打旺全矮化病株的单株干重分别下降 16.95% 、 28.28% 、 51.51% 和 45.62% 。单株重量作为构成草地群体产量的基础,反映出该病害对沙打旺草地产量的影响。3龄草地发病较轻,开花初期的草产量为 6500 kg/hm^2 ,而发病严重的4、6和8龄草地的草产量分别为 3890 、 1764 和 50 kg/hm^2 ^[24]。

4.5 对饲草品质的影响

沙打旺黄矮根腐病的发生使植株的干重增加,水分减少。3龄和8龄沙打旺感病后,粗蛋白质、粗纤维和粗脂肪等含量无显著变化($P>0.05$),但可溶性糖含量显著下降($P<0.05$)。小鼠饲喂试验表明,饲喂病株和健株饲料的小鼠组织解剖时肝脏均出现病变,血清测定中谷丙转氨酶显著增大,进一步证实了病株和健株饲料中均含有毒性物质。但饲喂病株饲料的小鼠体重增加小,3周时乳酸脱氢酶、碱性磷酸酶、谷草转氨酶和尿素氮的含量均升高,说明沙打旺病株饲料的毒性高于健株饲料^[24]。相关研究表明,沙打旺中含有少量三硝基丙酸(3-NPA)和三硝基丙醇(3-NPOH)^[45],但牛、羊等反刍动物采食后硝基化合物在瘤胃中降解,因此反刍动物饲喂沙打旺后不会中毒,但单胃动物长期以沙打旺为饲料会中毒^[2,46]。

4.6 对寄主次生代谢产物的影响

健康沙打旺植株和病株的石油醚提取物成分不同,经气相色谱-质谱联用(GC-MS)试验发现,健康沙打旺中化合物类型较多,包括苯的衍生物、倍半萜、甾体、三萜和脂肪族等,而病株中的化合物结构类型较少,主要有苯的衍生物、脂肪族类和三萜类化合物^[47]。利用常规的柱层析、制备薄层层析和重结晶等手段对沙打旺病株的代谢产物进行系统分离,共得到25种化合物;在病株中发现了一种新的化合物,属于查尔酮衍生物^[48]。

4.7 致病机理

钙调素是一种可溶性球蛋白,可与钙离子特异结合,它是钙离子介导的信号通路中的重要分子,参与调控植物病原真菌致病性调控,对于研究病原真菌的致病机理具有重要作用^[49]。目前已经完成了对钙调素基因的克隆,为研究钙调素基因对沙打旺黄矮根腐病菌的生长、发育、代谢及致病性的调控奠定了基础^[50]。

5 防治研究

5.1 药剂防治

由于草地本身的特点以及经济、环境及食品安全等因素,严重制约了化学杀菌剂的应用,播种前的种子处理是草地生产中应用杀菌剂的唯一方式^[51]。室内药效评价表明,百菌清、甲霜灵、代森锰锌、甲基硫菌灵和三唑酮5种杀菌剂均能抑制沙打旺埃里砖格孢菌落生长和孢子萌发^[52];温室条件和田间条件下,5种杀菌剂分别拌种后沙打旺黄矮根腐病的发病率均有所下降^[53]。植物源杀菌剂是具有低毒和易降解等特性的新型生物杀菌剂^[54],药用植物提取液如防风(*Saposhnikovia divaricate*)、核桃(*Juglans regia*)青皮和大蒜(*Allium sativum*)对沙打旺黄矮根腐病菌有明显的抑制作用($P<0.05$),也对沙打旺种子萌发有显著的抑制作用($P<0.05$),所以用防风、核

桃青皮和大蒜提取液进行沙打旺黄矮根腐病的田间防治有一定的应用前景,但不适宜进行药剂拌种^[55]。

对于沙打旺黄矮根腐病,虽然药剂拌种可达到一定效果,但因其可随气流传播,且在茎基部和根部越冬,返青后菌丝向上扩展,故药剂防治的效果不好^[24]。

5.2 抗病品种及其抗病机理

该系统性病害最佳的防治出路在抗病育种上,利用抗病品种防治牧草病害也是最经济、最有效的措施^[51]。沙打旺 9 个品种的田间自然发病试验表明,内蒙早熟和陕西榆林的抗病性强且产量高,而中沙一号虽然是低抗品种,但其作为饲草品质更优良且早熟。沙打旺埃里砖格孢对不同品种沙打旺均可侵染,但不同品种的抗病性存在一定差异^[56],对沙打旺种子贮藏蛋白的研究和分析表明,不同沙打旺品种之间的遗传差异较大,有助于进一步研究沙打旺的抗病机理^[17]。

5.3 种子带菌检验

种带真菌检测的方法可以是传统的病菌分离方法,也可以借助分子生物学手段完成。利用特异性引物和聚合酶链式反应技术(PCR)可以快速、准确、稳定地检测种子带菌。根据沙打旺黄矮根腐病菌的质膜 ATP 酶基因序列设计了一对特异性引物 Aatp 和 AatpR,能较好的区分该病菌的近缘种和沙打旺及其种子上的常见真菌,检测带病菌样品的最低限为 5 pg/ μ L^[57-58]。

5.4 化学物质干扰

NO 是植物响应生物胁迫或非生物胁迫的信号分子, H_2O_2 是多种防御反应中的信号分子,植物中的 NO 和 H_2O_2 协同防御病害^[59]。黄贝梅等^[60]通过室内盆栽试验发现,感病沙打旺品种接种沙打旺黄矮根腐病菌后,NO 能够调控沙打旺内源 H_2O_2 含量,且其调控能力与 H_2O_2 浓度相关;施加外源性 NO 可以提高沙打旺抗病性,而 NO 诱导的防御反应需要 H_2O_2 存在。

6 展望

目前我国利用的沙打旺品种主要是地方品种和育成品种,共有注册育成沙打旺品种 9 个,皆以早熟和丰产为育种目标,尚未有抗病品种育成^[56]。沙打旺不同品种间存在一定的抗性差异、产量和品质差异,要利用不同类型的优良品种进行抗病品种的选育,从而得到抗病性和农艺性状俱佳的沙打旺品种。不过沙打旺是异花授粉植物,选育抗病品种需要漫长的过程。

沙打旺埃里砖格孢为病原菌,而疯草内生真菌为内生真菌,二者为什么会如此相似,其进化关系如何,按照内生真菌的理论,其一,病原菌转化为内生真菌;其二,植物进化一开始一些微生物进入后进化成内生真菌,但目前尚未查明。禾草内生真菌中相关的研究较疯草内生真菌多。一般认为,禾草内生真菌起源于禾草病原真菌,禾草内生真菌与禾草协同进化,形成互利共生体^[61-63]。但是对于禾草内生真菌的进化历程尚不清楚,Saikkonen 等^[64]认为它们的进化是非常复杂的,受多物种、多层次、多方向的随机生物因素和非生物因素的影响。沙打旺黄矮根腐病菌与疯草内生真菌形态学、生物学和亲缘关系非常相似,这一发现或许为揭示内生真菌与病原菌进化的关系提供了契机,利用最新的基因组学、比较基因组学和转录组学等多组学结合的技术^[65],有可能最终能回答关于内生真菌进化的诸多问题。

参考文献 References:

- [1] Cook D, Ralphy M H, Welch K D, *et al.* Locoweed poisoning in livestock. *Rangelands*, 2009, 31(1): 16-21.
- [2] Zheng S Z, Sun L P, Chen H, *et al.* The content determination of microtoxin in *Astragalus adsurgens* Pall. *Journal of Northwest Normal University (Natural Science Edition)*, 1992, 28(2): 34-38.
郑尚珍, 孙丽萍, 陈颢, 等. 沙打旺中微量毒素的含量分析. *西北师范大学学报(自然科学版)*, 1992, 28(2): 34-38.
- [3] Su S F. *Astragalus adsurgens*[M]. Beijing: Agricultural Press, 1985.
苏盛发. 沙打旺[M]. 北京: 农业出版社, 1985.
- [4] Su S F. Study on forage nutritive value of *Astragalus adsurgens*. *Liaoning Agricultural Sciences*, 1980, (6): 22-28.
苏盛发. 沙打旺饲用营养价值的研究. *辽宁农业科技*, 1980, (6): 22-28.
- [5] Hu Y B. Instructions about planting grass and trees and developing animal husbandry. *China Herbivores*, 1984, (1): 4.

- 胡耀邦. 胡耀邦同志关于种草种树、发展畜牧的十点指示. 中国草食动物, 1984, (1): 4.
- [6] Sun Q Z. Review of some characteristics of *Astragalus adsurgens*. Journal of Forage & Feed, 1990, (4): 25-26, 29.
孙启忠. 沙打旺某些特性的研究概述. 牧草与饲料, 1990, (4): 25-26, 29.
- [7] Sun Q Z, Gui R. Research on decline law and recovery technique of *Astragalus adsurgens* meadow on Kerqin sand land. Acta Agrestia Sinica, 2000, 8(4): 253-261.
孙启忠, 桂荣. 科尔沁沙地沙打旺草地早衰规律与恢复技术研究. 草地学报, 2000, 8(4): 253-261.
- [8] Wojciechowski M F. *Astragalus* (Fabaceae): A molecular phylogenetic perspective. Brittonia, 2005, 57(4): 382-396.
- [9] Hua L M. Study on Phaca (Linn.) Bunge of *Astragalus* Linn. from Gansu. Pratacultural Science, 1999, 16(5): 15-20.
花立民. 甘肃黄芪属 *Astragalus* Linn. 黄芪亚属 Subgen. Phaca (Linn.) Bunge 植物研究. 草业科学, 1999, 16(5): 15-20.
- [10] Editorial Committee of Flora of China of Chinese Academy of Science. Flora of China; Volume of 42[M]. Beijing: Science Press, 1998.
中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第 42 卷 (第 2 分册)[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [11] Zhao B Y, Fan Y Y, Fan Z F, *et al.* The damage of locoweed in Western China and control the locoism. Grass-Feeding Livestock, 2006, (103): 12-15.
赵宝玉, 樊月圆, 樊泽峰, 等. 我国西部草原疯草危害及其动物中毒病的控制. 食草家畜, 2006, (103): 12-15.
- [12] Wang Z Q, Li C, Su J K. Comparison study on several quality characters of wild and cultivated *Astragalus adsurgens* Pall. Acta Agrestia Sinica, 2001, 9(2): 133-136.
王兆卿, 李聪, 苏加楷. 野生与栽培型沙打旺品质性状比较. 草地学报, 2001, 9(2): 133-136.
- [13] Wan L M, Zhang X M. The karyotype analyses of cultivated erect milkvetch [CEM] and wild erect milkvetch [WEM]. Journal of Shanxi Teachers University (Natural Science Edition), 1997, 11(3): 52-55.
万黎明, 张晓明. 栽培沙打旺与野生沙打旺的核型分析. 山西师范大学学报 (自然科学版), 1997, 11(3): 52-55.
- [14] Liu J X. Comparison of palatability between creeping type *Astragalus adsurgens* Pall. and *A. adsurgens* CV. Pratacultural Science, 1992, (6): 14.
刘建秀. 野生匍匐型沙打旺和栽培沙打旺适口性比较研究. 草业科学, 1992, (6): 14.
- [15] Liu Y Y, Liu J J, Liu J X. Preliminary study on reason of normal ripening of creeping type of *Astragalus adsurgens* Pall under low temperature. Agricultural Research in the Arid Areas, 2000, 18(4): 88-93.
刘愿英, 刘建军, 刘建秀. 野生匍匐型沙打旺低温下正常开花结实原因探讨. 干旱地区农业研究, 2000, 18(4): 88-93.
- [16] Liu Y Y, Liu J J, Liu J X. Study on feed value of creeping type of *Astragalus adsurgens* Pall. Agricultural Research in the Arid Areas, 2000, 18(3): 110-116.
刘愿英, 刘建军, 刘建秀. 野生匍匐型沙打旺饲用价值的研究. 干旱地区农业研究, 2000, 18(3): 110-116.
- [17] Zeng C Y. Study on the Resistance Mechanism of Nine *Astragalus adsurgens* Varieties to Yellow Stunt and Root Rot and Comprehensive Evaluation for Germplasm Characteristics[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2016.
曾翠云. 沙打旺 9 个品种对沙打旺黄矮根腐病的抗性机理研究及种质特性综合评价[D]. 兰州: 兰州大学, 2016.
- [18] Li R F, Li C, Su J K. Genetic diversity of *Astragalus adsurgens* Pall. germplasm by RAPD analysis. Acta Agrestia Sinica, 2001, 11(12): 1274-1281.
李瑞芬, 李聪, 苏加楷. 沙打旺种质资源遗传多样性 RAPD 分析. 草地学报, 2001, 11(12): 1274-1281.
- [19] Li Y Z, Nan Z B. Symptomology and etiology of a new disease, yellow stunt, and root rot of standing milkvetch caused by *Embellisia* sp. in Northern China. Mycopathologia, 2007, 163(6): 327-334.
- [20] Liu P S, Jia Z K, Li J, *et al.* A study on optimal duration of *Medicago sativa* growth in *M. sativa*-grain crop rotation system in arid region of Southern Ningxia. Acta Prataculturae Sinica, 2008, 17(3): 31-39.
刘沛松, 贾志宽, 李军, 等. 宁南旱区草粮轮作系统中紫花苜蓿适宜利用年限研究. 草业学报, 2008, 17(3): 31-39.
- [21] Zhou H Y, Yang H T, Tang W H. Occurrence of *Fusarium* root rot in *Astragalus adsurgens* and identification of the pathogens. Acta Agrestia Sinica, 2004, 12(4): 285-297.
周洪友, 杨合同, 唐文华. 沙打旺根腐病发生及病原菌鉴定. 草地学报, 2004, 12(4): 285-297.
- [22] Yin Y L, Nan Z B, Li C J, *et al.* Studies on the root-invading fungi of *Astragalus adsurgens*. Grassland and Turf, 2006, 114(1): 45-48.
尹亚丽, 南志标, 李春杰, 等. 沙打旺根部入侵真菌的研究. 草原与草坪, 2006, 114(1): 45-48.
- [23] Nie S M, Sun Q Z, Yan Z J, *et al.* Study on the factor of standing milkvetch pasture decline. Inner Mongolia Prataculture, 2002, 14(3): 36-38.
聂素梅, 孙启忠, 闫志坚, 等. 影响沙打旺生长衰退诸因素试验研究. 内蒙古草业, 2002, 14(3): 36-38.
- [24] Li Y Z. Studies of Yellow Stunt and Root Rot of Standing Milk-vetch (*Astragalus adsurgens* Pall.)[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2007.

- 李彦忠. 沙打旺黄矮根腐病(*Embellisia astragali* nov. sp. Li and Nan)研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2007.
- [25] Li Y Z, Nan Z B. First report of yellow stunt and root rot of standing milkvetch caused by *Embellisia* sp. from China. *Plant Pathology*, 2008, 57(4): 780.
- [26] Li Y Z, Nan Z B, Zhang Z X, *et al.* Distribution of and damage caused by yellow stunt and root rot of *Astragalus adsurgens* in five northern provinces of China. *Acta Prataculturae Sinica*, 2011, 20(2): 39-45.
李彦忠, 南志标, 张志新, 等. 沙打旺黄矮根腐病在我国北方 5 省区的分布与危害. *草业学报*, 2011, 20(2): 39-45.
- [27] Hou T J, Huang H, Acharya S. Chinese alfalfa varieties' resistance to *Verticillium* wilt. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1993, 24: 328.
侯天爵, Huang H, Acharya S. 中国苜蓿品种对黄萎病抗病性鉴定(简报). *植物病理学报*, 1993, 24: 328.
- [28] Liu R. *Grassland Protection*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1998.
刘若. *草原保护学: 第三分册 牧草病理学*[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [29] Li Y Z, Nan Z B. Nutritional study on *Embellisia astragali*, a fungal pathogen of milkvetch (*Astragalus adsurgens*). *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2009, 95(3): 275-284.
- [30] Woudenberg J H C, Groenewald J Z, Binder M, *et al.* *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*, 2013, 75: 171-212.
- [31] Liu J L, Li Y Z, Creamer R. A re-examination of the taxonomic status of *Embellisia astragali*. *Current Microbiology*, 2016, 72(4): 404-409.
- [32] Liu J L. *Study on Molecular Biology of Embellisia astragali*[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2016.
刘建利. 沙打旺黄矮根腐病菌分子生物学研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2016.
- [33] Cui Z, Li Y Z. An overview of study on legume plant locoweed endophyte. *Pratacultural Science*, 2014, 31(9): 1686-1695.
崔振, 李彦忠. 豆科植物疯草中内生真菌及其作用. *草业科学*, 2014, 31(9): 1686-1695.
- [34] Molyneux R J, James L F. Loco intoxication; indolizidine alkaloids of spotted locoweed (*Astragalus lentiginosus*). *Science*, 1982, 216: 190-191.
- [35] Ralphs M H, Welsh S L, Gardner D R. Distribution of locoweed toxin swainsonine in populations of *Oxytropis lambertii*. *Journal of Chemical Ecology*, 2002, 28(4): 701-707.
- [36] Braun K, Romero J, Liddell C, *et al.* Production of swainsonine by fungal endophytes of locoweed. *Mycological Research*, 2003, 107(8): 980-988.
- [37] Yu Y T, Wang J H, Wang Y, *et al.* Identification of swainsonine-producing fungal endophytes from three species of locoweeds in Tibet. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(10): 3662-3671.
余永涛, 王建华, 王妍, 等. 西藏 3 种疯草中合成苦马豆素内生真菌的鉴定. *中国农业科学*, 2009, 42(10): 3662-3671.
- [38] Braun K. *Fungal Endophyte Infection and Swainsonine Toxicity in Locoweed*[D]. Las Cruces, NM: New Mexico State University, 1999.
- [39] Braun K, Cook T, Liddell C M. Locoism of cattle caused by a species of *Alternaria*. *Phytopathology*, 1997, 87: S11-S12.
- [40] Wang Q, Nagao H, Li Y L, *et al.* *Embellisia oxytropis*, a new species isolated from *Oxytropis kansuensis* in China. *Mycotaxon*, 2006, 95(1): 255-260.
- [41] Pryor B M, Creamer R, Shoemaker R A, *et al.* *Undifilum*, a new genus for endophytic *Embellisia oxytropis* and parasitic *Helminthosporium bornmuelleri* on legumes. *Botany-botanique*, 2009, 87(2): 178-194.
- [42] Li Y Z, Creamer R, Baucom D, *et al.* Pathogenic *Embellisia astragali* on *Astragalus adsurgens* is very closely related to locoweed endophyte. *Phytopathology*, 2011, 101: S102-S103.
- [43] Mukherjee S, Dawe A L, Creamer R. Potential role for saccharopine reductase in swainsonine metabolism in endophytic fungus, *Undifilum oxytropis*. *Fungal Biology*, 2012, 116(8): 902-909.
- [44] Li Y Z, Nan Z B, Hou F J. The roles of an *Embellisia* sp. causing yellow stunt and root rot of *Astragalus adsurgens* and other fungi in the decline of legume pastures in northern China. *Australasian Plant Pathology*, 2007, 36: 397-402.
- [45] Wang J, Lei Z Y, Feng X Q. The determination of trace 3-nitropropionic acid in prairie milkvetch (*Astragalus adsurgens*) by gas chromatography. *Chinese Journal of Grassland*, 1992, 3: 69-72.
汪徽, 雷祖玉, 冯学勤. 沙打旺中微量 3-硝基丙酸的气相色谱测定. *中国草地*, 1992, 3: 69-72.
- [46] Williams M C, James L F. Toxicity of nitro-containing *Astragalus* to sheep and chicks. *Journal of Range Management*, 1975, 28(4): 260-263.
- [47] Wei S L. *Studies on the Secondary Metabolite of Two Excellent Forage Grasses*[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2009.
魏石磊. 两种优良牧草的次级代谢产物研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2009.
- [48] Chen J, Li Y, Yang L Q, *et al.* Biological activities of flavonoids from pathogenic-infected *Astragalus adsurgens*. *Food Chemistry*, 2012, 131(2): 546-551.
- [49] Lengeler K B, Davidson R C, Dsouza C, *et al.* Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Mi-*

crobiology and Molecular Biology Reviews, 2000, 64(4): 746-785.

- [50] Liu J L, Li Y Z. Cloning of calmodulin gene from *Embellisia astragali*. Pratacultural Science, 2015, 32(5): 719-724.
刘建利, 李彦忠. 沙打旺黄矮根腐病菌钙调素基因的克隆. 草业科学, 2015, 32(5): 719-724.
- [51] Nan Z B. Establishing sustainable management system for diseases of pasture crops in China. Acta Prataculturæ Sinica, 2000, 9(2): 1-9.
南志标. 建立中国的牧草病害可持续管理体系. 草业学报, 2000, 9(2): 1-9.
- [52] Li X L, Li Y Z. Efficacy testing of five fungicides against the pathogen of yellow stunt and root rot of *Astragalus adsurgens* in laboratory. Pratacultural Science, 2013, 30(10): 1523-1530.
李兴龙, 李彦忠. 5种杀菌剂对沙打旺黄矮根腐病菌的室内毒力测定. 草业科学, 2013, 30(10): 1523-1530.
- [53] Li X L. Study on Fungicide Seed-treatment Control Yellow Stunt and Root Rot (*Embellisia astragali*) of *Astragalus adsurgens*[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2014.
李兴龙. 杀菌剂拌种防治沙打旺黄矮根腐病(*Embellisia astragali*)研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2014.
- [54] Yang Y P, Li A L. Research advances on botanical fungicides. Review of China Agricultural Science and Technology, 2006, 8(1): 49-53.
杨玉萍, 李艾莲. 植物源杀菌剂研究进展. 中国农业科技导报, 2006, 8(1): 49-53.
- [55] Zeng C Y, Zhu X Y, Cui Z, *et al.* Antifungal activity of plant extracts against *Embellisia astragali*, the fungal causal agent of yellow dwarf and root-rot disease of standing milkvetch. Crop & Pasture Science, 2015, 66: 735-739.
- [56] Yu B H. Evaluation of Resistance of Standing Milkvetch (*Astragalus adsurgens*) Varieties to *Embellisia astragali*[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2011.
俞斌华. 沙打旺(*Astragalus adsurgens*)品种对黄矮根腐病(*Embellisia astragali*)的抗性评价[D]. 兰州: 兰州大学, 2011.
- [57] Li Y Z, Liu J L, Nan Z B, *et al.* A species-specific primer pair and detection method of yellow stunt and root rot (*Embellisia astragali*) of *Astragalus adsurgens*; China, CN104498589A[P]. 2015-04-08.
李彦忠, 刘建利, 南志标, 等. 沙打旺黄矮根腐病一对特异性分子检测引物及检测方法: 中国, CN104498589A[P]. 2015-04-08.
- [58] Liu J L, Li Y Z, Nan Z B. Design of species-specific PCR method for the detection of pathogen *Embellisia astragali* in standing milk vetch seeds. Letters in Applied Microbiology, 2015, 60(4): 372-378.
- [59] Neill S J, Desikan R, Clarke A, *et al.* Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. Journal of Experimental Botany, 2002, 53: 1237-1247.
- [60] Huang B M, Nan Z B. The impacts of interaction between NO and H₂O₂ on *Astragalus adsurgens* response to *Embellisia astragali*. Pratacultural Science, 2014, 31(6): 1028-1032.
黄贝梅, 南志标. NO和H₂O₂在沙打旺抗黄矮根腐病反应中的互作. 草业科学, 2014, 31(6): 1028-1032.
- [61] Carroll G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. Ecology, 1988, 69(1): 2-9.
- [62] Clay K, Schardl C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. American Naturalist, 2002, 160(S4): S99-S127.
- [63] Siegel M R, Latch G C M, Johnson M C. Fungal endophytes of grasses. Annual Review of Phytopathology, 1987, 25: 293-315.
- [64] Saikkonen K, Wäli P, Helander M, *et al.* Evolution of endophyte-plant symbioses. Trends in Plant Science, 2004, 9(6): 275-280.
- [65] Kaul S, Sharma T, Manoj K D. "Omics" tools for better understanding the plant-endophyte interactions. Frontiers in Plant Science, 2016, 7(2): 1-9.