



Streptomyces rochei D74 菌剂对向日葵、列当及其根际微生物的影响

席娇¹, 徐腾起¹, 刘玉涛², 马永清³, 薛泉宏⁴, 林雁冰^{1*}

1 西北农林科技大学生命科学学院, 陕西 杨凌 712100

2 陕西博秦生物工程有限公司, 陕西 咸阳 713800

3 黄土高原土壤侵蚀与旱地农业国家重点实验室 西北农林科技大学水土保持研究所, 陕西 杨凌 712100

4 西北农林科技大学资源环境学院, 陕西 杨凌 712100

席娇, 徐腾起, 刘玉涛, 马永清, 薛泉宏, 林雁冰. *Streptomyces rochei* D74 菌剂对向日葵、列当及其根际微生物的影响[J]. 微生物学报, 2023, 63(2): 745-759.

XI Jiao, XU Tengqi, LIU Yutao, MA Yongqing, XUE Quanhong, LIN Yanbing. Effect of *Streptomyces rochei* D74 on sunflower, *Orobancha cumana*, and their rhizosphere microorganisms[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(2): 745-759.

摘要:【目的】研究娄彻氏链霉菌(*Streptomyces rochei*) D74 菌剂促进向日葵生长和抑制列当寄生的作用, 及其对根际微生物的影响。【方法】通过构建向日葵-列当-*S. rochei* D74 共培养体系, 观察 D74 菌株对列当寄生的影响; 采用田间小区试验, 测定 D74 菌剂接种对向日葵植物生理指标和列当出土数的影响; 测定向日葵产量指标, 研究 D74 菌剂对向日葵籽粒品质及产量的影响; 利用 16S rRNA 基因高通量测序技术和传统微生物培养方法, 分析添加 D74 菌剂对向日葵根际微生物群落结构的影响。【结果】D74 菌剂能够促进向日葵生长[茎秆重和花盘重分别显著增加($P<0.05$) 37%–40%和 21%–37%], 同时抑制 28%–46% ($P<0.05$)的列当出土; 还可以提高向日葵籽粒中粗蛋白含量 5%–9%、大粒占比约 66% ($P<0.05$)和百粒重 8%–18%, 并且通过产量测定表明, D74 菌剂可增产约 30% ($P<0.05$), 这对提高农民经济收益具有深远意义。D74 菌剂对向日葵根际微生物群落具有显著影响, 调节了群落有益微生物数量。【结论】D74 菌剂可以显著降低向日葵根部列当寄生病害的发生, 促进花盘生长, 使籽粒饱满, 具有实际应用价值和推广意义。

关键词: 娄彻氏链霉菌(*Streptomyces rochei*) D74; 向日葵; 列当; 根际微生物

资助项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助(2452019183, 2452021163)

This work was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2452019183, 2452021163).

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-29-87090162, E-mail: linyb2004@nwsuaf.edu.cn

Received: 2022-06-20; Accepted: 2022-09-04; Published online: 2022-09-30

Effect of *Streptomyces rochei* D74 on sunflower, *Orobanche cumana*, and their rhizosphere microorganisms

XI Jiao¹, XU Tengqi¹, LIU Yutao², MA Yongqing³, XUE Quanhong⁴, LIN Yanbing^{1*}

1 College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

2 Shaanxi Boqin Biological Engineering Co., Ltd., Xianyang 713800, Shaanxi, China

3 The State Key Laboratory of Soil Erosion and Dryland Farming, Institute of Soil and Water Conservation, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

4 College of Natural Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

Abstract: [Objective] To study the role of *Streptomyces rochei* D74 in promoting sunflower growth and inhibiting *Orobanche cumana* parasitism, and the effect on rhizosphere microorganisms. **[Methods]** We developed a sunflower-*O. cumana*-*S. rochei* D74 co-culture system to observe the effect of D74 on the parasitism of *O. cumana*. Through field experiment, we observed the influence of D74 on physiological indexes of sunflower and the number of epigeous *O. cumana*, and measured the yield indexes of sunflower to evaluate the influence of D74 on quality and yield of sunflower kernels. High-throughput sequencing of 16S rRNA genes and traditional microbial culture method were used to explore the effect of D74 on microbial community structure in sunflower rhizosphere. **[Results]** D74 promoted the growth of sunflower, as manifested by the increase ($P<0.05$) in stem weight (by 37%–40%) and disk weight (by 21%–37%), and inhibited ($P<0.05$) the seedling emergence of 28%–46% *O. cumana*. In addition, it raised the crude protein content in sunflower kernels by 5%–9%, percentage of large kernels by 66% ($P<0.05$), and 100-grain weight by 8%–18%. In the field, D74 elevated the yield by about 30% ($P<0.05$), which has far-reaching significance for improving farmers' economic returns. The sunflower rhizosphere microbial community was significantly affected by D74 which regulated the number of beneficial microorganisms. **[Conclusion]** D74 can significantly reduce the number of *O. cumana* in sunflower rhizosphere, promote the growth of flower discs, and increase the large kernels, which should be further applied and promoted.

Keywords: *Streptomyces rochei* D74; sunflower; *Orobanche cumana*; rhizosphere microorganisms

向日葵(*Helianthus annuus* L.)作为中国东北、西北和华北地区广泛种植的经济作物,具有十分广阔的销售市场和经济前景^[1-3]。但近年来,由于引种不当,引起了一种植物型病害,向日葵列当寄生。向日葵列当(*Orobanche cumana* Wallr.),别称毒根草,是列当科列当属,专性寄生于向日葵根部的一年生全寄生杂草。向日葵列当无叶绿素,不能独立进行光合作用,只能依靠

从向日葵根部竞争性汲取养分、水分和必要的生长因子而生长。列当种子受到向日葵根系分泌的独角金内酯类似物(strigolactones, SLs)刺激而萌发形成芽管和吸器组织,吸器与寄主根系维管束连接形成乳状突起并不断膨大生长。至此,列当成功寄生于向日葵根系。随后列当通过其次生吸器吸取寄主合成的营养物质以完成自身的生长发育,包括出土、开花、繁殖产生大量种子^[4],

每株列当约产生 17.4 万粒种子^[5]。种子在土壤中可休眠数十年仍保持萌发活性,因此对寄主植物向日葵的生长发育造成持续性危害^[6]。列当种子小而轻,易于随着农业器械和媒介动物传播,造成种植区病害面积迅速扩大,严重威胁当地农民的经济收益。据统计,巴彦淖尔市部分农田向日葵列当寄生率为 72%,严重地块向日葵列当寄生率高达 100%,导致当地向日葵减产约 40%,近万亩向日葵农田绝收,造成了严重的经济损失^[3,7]。由于列当的生长特性,在其出土被观察到时,已对向日葵造成了不可逆的损害。目前农业上常用措施有:(1) 合理轮作^[8];(2) 化学防治^[9];(3) 培育列当抗性品种^[10];(4) 人工拔除;(5) 生物防治^[11-12]。近年来生物防治措施主要集中在两个方面,一是在列当病原菌的筛选上,它们通常为镰刀霉(*Fusarium*)。例如从 *O. cumana* 中分离出来的 *F. oxysporum* f. sp. *Orthoceras* (FOO) 菌株在小规模的田间试验中,列当出土率减少 90%,向日葵籽粒产量增加了 5-11 倍^[13]。二是在抑制列当萌发和寄生方面,研究发现常见的根际微生物如假单胞菌(*Pseudomonas*)和芽孢杆菌(*Bacillus*)可以减少 *Orobanchae* 种子萌发率,抑制芽管的伸长,降低寄生数量^[14-15]。也有研究表明溶杆菌(*Lysobacter*)可促进 *O. cumana* 种子萌发,可以作为自杀萌发诱导物质,在种植宿主作物前,添加至土壤中,可显著降低 *O. cumana* 寄生^[16]。

土壤微生物作为生态系统中的重要组成部分,是生态系统的分解者,也是物质循环和能量交流的承担者。近些年,对于链霉菌研究逐渐增多,它们参与土壤有机质分解、腐殖质形成、土壤养分转化和循环等过程,促进植物 N、P 吸收^[17-19],分泌植物激素^[20],从而增加土壤肥力^[21],改善植物的营养状况,提高作物产量。它们还可以通过抑制有害微生物的生长,促进有益菌繁殖,提

高植物防病促生能力^[22]。目前被广泛应用到番茄^[17],马铃薯^[23]和小麦^[20]等多种农作物的种植中。本实验所使用的娄彻氏链霉菌(*Streptomyces rochei*) D74,可以通过诱导玉米产生过氧化物酶等与植物抗性相关的酶活,促进植物生长^[20]。还可以在魔芋根际有效定殖,改善魔芋根际土壤微生物群落结构,增加有益菌数量,抑制土壤中有害微生物的繁殖,降低土传病害发生,从而促进魔芋根系的正常生长^[24]。进一步研究表明,*S. rochei* D74 菌剂与有机肥合理配施,能促进魔芋根系生长发育和叶片光合作用,使植株生长旺盛,从而提高魔芋的产量和球茎的经济效益^[25]。Li 等^[26]研究表明 D74 菌剂可以控制块茎植物乌头根腐病的发生,并且与根际微生物群的变化密切相关。

尽管目前国内外有不少关于 D74 菌剂提高植物抗病促生能力的研究,但主要集中于玉米、小麦和马铃薯等粮食作物上^[17],缺乏对列当防治和向日葵促生增产作用的相关研究。因此,开展 D74 菌剂对向日葵的促生增产、列当防治及其根际微生物群落改变的研究,对列当防治以及农民增收具有十分重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

向日葵(*Helianthus annuus* L.)选用列当敏感型向日葵品种“363”(内蒙古自治区,巴彦淖尔,三瑞农业科技股份有限公司)。列当种子于 2019 年采集自内蒙古自治区巴彦淖尔市磴口县,列当寄生严重的向日葵农田。使用的菌株为娄彻氏链霉菌 *S. rochei* D74,由西北农林科技大学资源环境学院微生物资源研究室薛泉宏教授提供,经前期研究表明,该菌株具有促生作用和生防特性^[20,22,24-26]。D74 菌剂由陕西博秦生物工程有限公司提供。

1.2 向日葵-列当-*S. rochei* D74 共培养

D74 菌株在高氏一号培养基^[27]中培养 7 d 后,通过高速离心和抽滤获得无细胞发酵液。向日葵种子经表面消毒后,置于穴播盘中(大小为 5 cm×5 cm×15 cm,土壤与基质的比例为 2:1),每穴中注入 20 mL 无菌蒸馏水,在人工气候室中培养(28 °C,光照和黑暗培养时间为 12 h:12 h)。在植物长出两片真叶(约 7–10 d)后,将生长均匀的幼苗从土壤中移出,用无菌水洗净根部备用。列当的种子用 1%的次氯酸钠溶液和 75%酒精进行了表面消毒^[6]后备用。在超净工作台中,将向日葵根部平铺在直径 9 cm 的玻璃纤维滤纸上,均匀地洒上 15 mg 表面消毒的列当种子,并将另一张玻璃纤维滤纸放在上面,形成一个类似三明治的形状。然后在夹层的两侧各贴上 2 张相同大小的普通滤纸,用订书机将 4 层滤纸缝合起来,防止列当种子和向日葵的根系松动。将共培养的滤纸层装入 9 cm 的 PE 自封袋中,使幼苗叶子置于外侧,加入 20 mL 的 Hoagland 营养液^[28],每 2 d 补充 1 次。置于不透明纸盒中,并用锡纸包裹,以防止根部受到光照。在人工气候室(28 °C, 12 h:12 h, 图 1)中培养 60 d,对列当的寄生情况进行观察。

1.3 大田种植实验

向日葵种子包衣处理:将向日葵种子置于稀释 300 倍的 D74 菌株无细胞发酵液中,浸泡 8–10 h,用浓度为 6 g/L 的羧甲基纤维素钠作为胶结剂喷洒于种子表面,随后将 D74 菌剂均匀包裹在种子周围,包衣量为种子质量的 4%。

向日葵种植于内蒙古巴彦淖尔市列当病害频繁的农田中,该区域耕地土壤中存在大量列当种子,适合用于 D74 菌剂对向日葵产量和抑制列当寄生的研究。设置 2 个对照组和 2 个处理组,分别为 C1 (对照)、C2 (穴施羊粪 50 g)、T1 (种子包衣处理并穴施羊粪 50 g)和 T2 [种子包衣处

理,穴施 *S. rochei* D74 与羊粪(1:100)混合物 50 g]。每个处理重复 3 个小区,每小区为 15 m×8 m。向日葵幼苗期时,每行等距选取 10 株向日葵挂牌做标记,便于后续向日葵采样和各项指标测定,种植示意图如图 1 所示。

1.4 植物指标测定及土样采集

向日葵成熟时,测定花盘鲜重,茎秆鲜重,根鲜重,花盘直径,产量和列当出土数。将花盘运输至实验室,自然风干后,测定百粒重,并根据当地收购标准,将大小粒按 36 mm×5 mm 标准分级,分别测定大小粒重量。对大粒进行粗脂肪、粗蛋白质含量测定,粗脂肪含量检测方法参考 GB2906—1982《谷物、油料作物种子粗脂肪测定方法》,粗蛋白质检测方法参考 GB5009.168—2016《食品安全国家标准食品中蛋白质的测定》。在各小区选取生长状况相近的向日葵挖出根部,分别收集根际土 5 g 用于土壤总 DNA 提取,50 g 用于可培养微生物分离筛选,根周土 500 g 用于土壤理化性质测定。

1.5 可培养微生物的分离培养和计数鉴定

先对根际土壤样品含水量进行测定,利用稀释平板法对不同土壤样品中的可培养微生物进行分离、计数和保藏。通过 LB 培养基^[29]、高氏一号培养基^[27]和 PDA 培养基^[30]分别培养细菌、放线菌和真菌。操作方法为:取 10 g 向日葵根

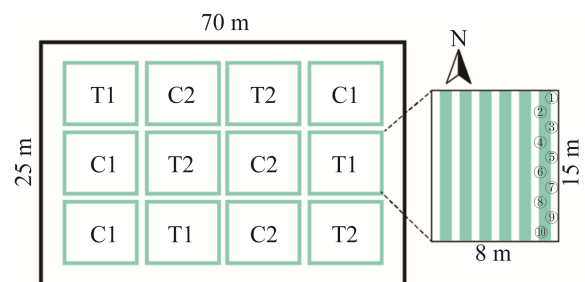


图 1 向日葵实验田种植示意图

Figure 1 Diagram of sunflower experimental field planting.

际土壤于 90 mL 无菌水中摇匀制备浓度为 10^{-1} 的土壤悬液, 梯度稀释至浓度为 10^{-4} 。移液枪吸取相应梯度 50 μ L 土壤悬液于培养基中, 小心旋转涂布器均匀涂布, 以分离细菌(涂布浓度为 10^{-3} , 10^{-4})、放线菌(10^{-3} , 10^{-4})和真菌(10^{-1} , 10^{-2}), 每梯度 3 个重复, 上述操作均在超净台中进行。涂布后将培养基置于 28 $^{\circ}$ C 培养箱中倒置培养, 细菌培养 3–5 d; 放线菌和真菌培养 7–9 d 后计数。每克干土中含有的微生物数目的计算公式如(1)所示:

$$\text{每克干土菌落数(CFU/g)} = \text{平均菌落数} \times \text{稀释倍数} \times 20 \times \text{水分系数} \quad (1)$$

可培养细菌的鉴定: DNA 提取选用碱裂解法^[31], 以 27F 和 1492R 为引物进行 PCR 扩增。50 μ L PCR 反应体系为: 2 \times SanTaq PCR Mix 预混液 25 μ L, DNA 模板 2.0 μ L, 正、反向引物 (10 μ mol/L) 2 μ L, ddH₂O 19 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。对扩增产物进行电泳检测, 合格后委托生工生物工程(上海)股份有限公司测序^[32]。将测序结果与 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行序列比对分析, 并选取同源性相近的菌株, 采用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树, 构建方法为最大似然法, 检验方法为 Bootstrap method, 比对次数为 1 000, 根据进化树统计比对结果。

1.6 向日葵根际土壤总 DNA 提取及测序结果分析

使用 FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biochemicals, Solon)试剂盒, 按照操作流程提取土壤总 DNA。经 NanoDrop 8000 (Thermo Scientific)检测合格的 DNA 样品送至天津诺禾致源科技股份有限公司, 基于 IonS5TMXL 测序平台, 利用单端测序(single-end)的方法, 构建小片段文库, 使用引物 515F (5'-GTGCCAGCMGC CGCGGTAA-3')和 907R (5'-CCGTCAATTCCTT

TGAGTTT-3')对 16S rRNA 基因 V4–V5 区测序。

通过对 reads 剪切过滤, 操作分类单元 (operational taxonomic units, OTUs)聚类, 并进行物种注释及丰度分析, 揭示样品物种构成; 进一步进行 α 多样性分析和 β 多样性分析挖掘样品之间的差异^[27–30]。使用 R (4.0.0 版本) vegan 包^[33]获得多样性指数和距离矩阵结果, ggplot2 包^[34]绘制箱线图和相对丰度柱状图。Venn 包^[35]绘制韦恩图, linkET 包 (<https://github.com/Hy4m/linkET>)绘制土壤理化因子与微生物相关性图, 偏最小二乘回归分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)在 Tutools 平台完成 (<https://www.cloudtutu.com>)。

1.7 土壤理化测定

测定根周土壤样品的理化特性, 以评估土壤条件对微生物的影响。采用标准方法^[36–37]测量土壤 pH 值、有机质 (organic matter, OM)、全氮 (total nitrogen, TN)、碱解氮 (alkaline hydrolyzed nitrogen, AHN)、全磷 (total phosphorus, TP)、全钾 (total potassium, TK)、有效磷 (available phosphorus, AP)、有效钾 (available potassium, AK)、有效铜 (available copper, ACu)、有效锌 (available zinc, AZn)、全铁 (total iron, TFe)、钠 (Na)、阳离子交换量 (cation exchangeable capacity, CEC)、钠离子交换量 (cation exchangeable capacity-natrium, CEC-Na)、可溶性总盐 (soluble salts, SS)。

1.8 数据与分析

使用 GraphPad Prism 9^[38]和 Excel 2020 (microsoft corp., redmond)对收集的数据进行统计分析。计算植株生物量、产量、籽粒等相关指标和可培养的微生物数量的均值, 使用单因素方差分析 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA)和最小显著性差异法 (least-significant difference, LSD)分析对照组与处理组的差异。本研究使用序列已提交至国家微生物科学数据中心 NMDC10018190

和 NCBI 数据库 PRJNA830700, 附录数据提交至国家微生物科学数据中心 NMDCX0000133。

2 结果与分析

2.1 *S. rochei* D74 对列当寄生的影响

在共培养实验中添加 D74 无细胞发酵液后, 显著降低了处理组中列当的寄生数, 在体视显微镜下, 没有观察到列当种子寄生在向日葵根部(图 2)。而对照组中, 列当吸器可以成功地与向日葵根系连接并形成乳状突起, 吸取寄主营养物质。在处理组中, 列当种子可以正常发芽, 却没有有效连接到寄主根部, 表明放线菌成功地抑制了列当寄生。

在大田实验中对 50 株向日葵根部列当的出土数量进行统计分析。结果显示(图 3A), 通过两种方式添加菌剂(T1, T2), 与对照组(C1)相比, 向日葵根部列当的出土数分别显著减少了 45.7% 和 27.8% ($P < 0.05$), 表明 D74 菌剂能有效抑制列当

寄生, 减少向日葵养分流失, 寄主可以将充足的营养物质输送至花盘, 以满足籽粒灌浆。

2.2 D74 菌剂对向日葵植株和产量的影响

植物生物量分析结果显示, 种子包衣处理(T1, T2), 均显著增加向日葵地上部分重量(包括花盘和茎秆), 与对照组(C1)相比, 分别提高了 36.6% 和 21.3% 的花盘重, 40.4% 和 37.0% 的茎秆重(图 3B)。并且根鲜重有不同程度的增加, 说明 D74 菌剂对根系生长也有一定的促进作用, 图片已提交国家微生物科学数据中心(编号 NMDCX0000133)。同时, 测量了成熟期花盘直径, 结果显示(国家微生物科学数据中心, 图片编号 NMDCX0000133), 种子包衣或者是包衣并穴施菌肥混合物, 均能使花盘直径显著增加 13.8% (T1) 和 15.3% (T2) ($P < 0.05$) (图 3B)。综上所述, D74 菌剂可以促进农作物的生长, 增加花盘直径及重量, 为农作物的增产提供必要的物质积累。

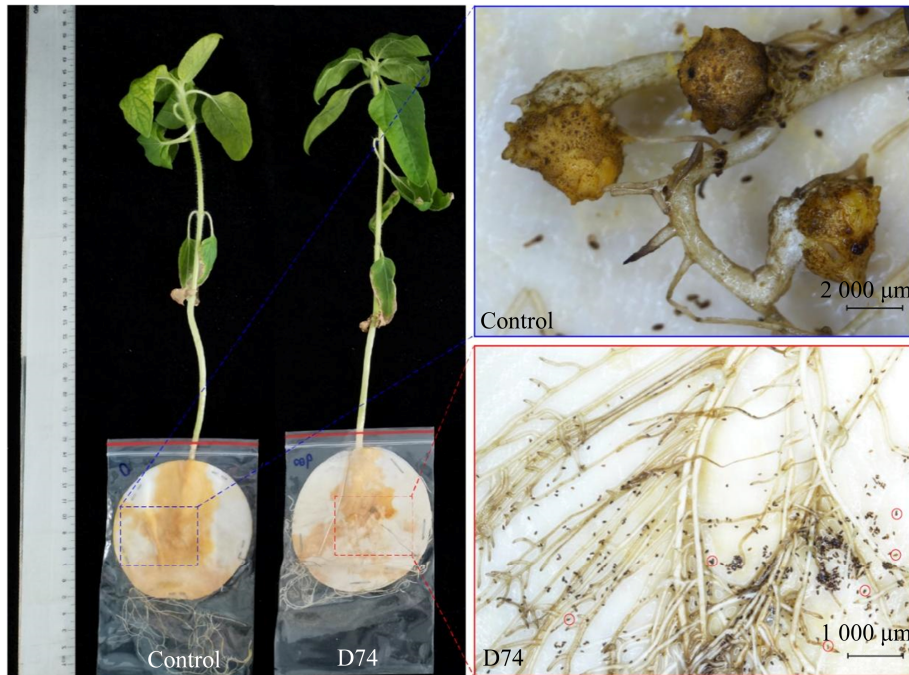


图 2 向日葵-列当-*Streptomyces rochei* D74 共培养实验及其抑制列当寄生的效果

Figure 2 Co-cultivation experiments with sunflower-*Orobanche cumana*-*Streptomyces rochei* D74 and inhibition of *O. cumana* parasitism. The red circles represent *O. cumana* seeds that germinated and failed to parasitize on the sunflower root.

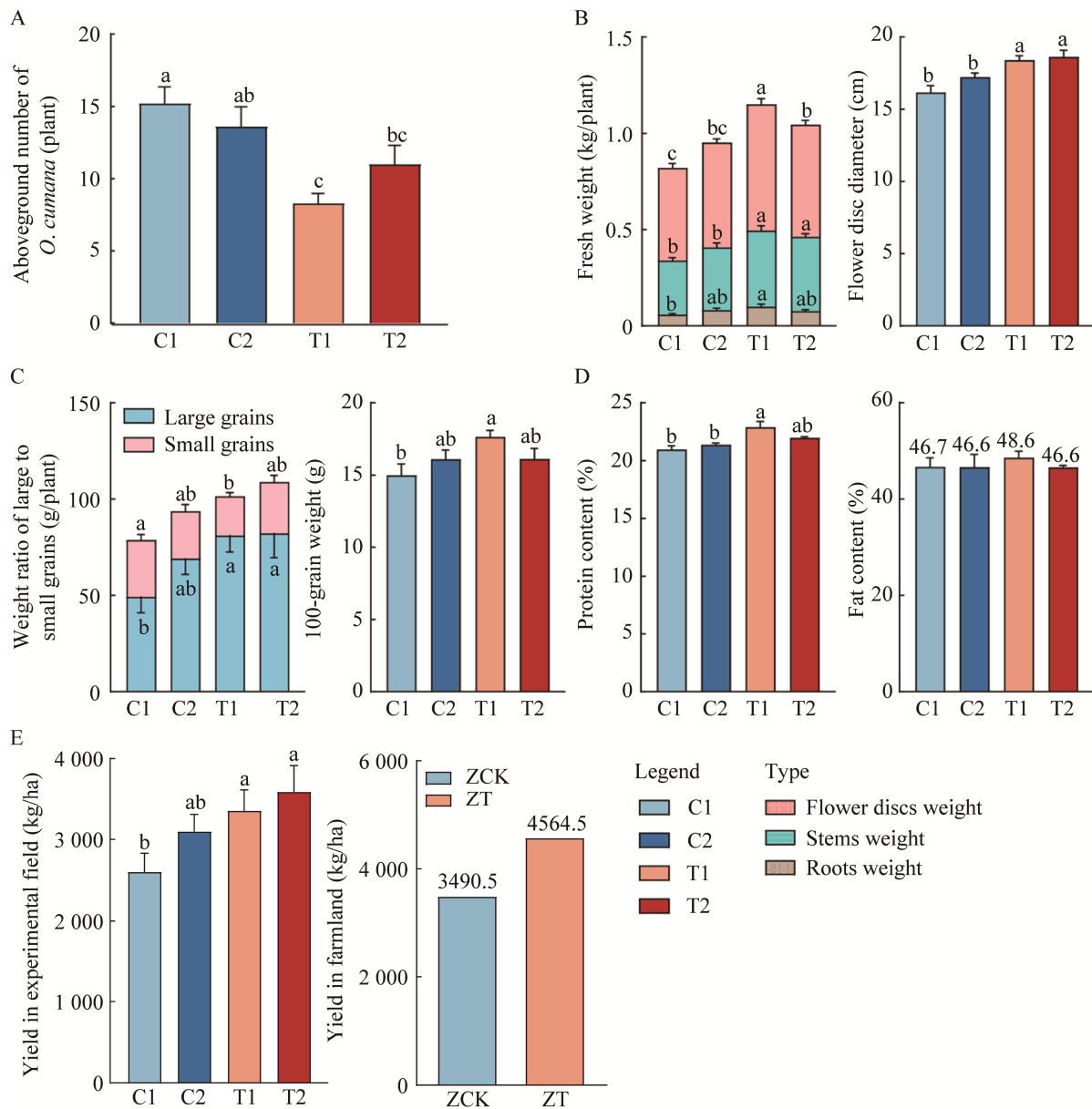


图 3 D74 菌剂在农田中的应用效果

Figure 3 Effects of D74 agent of *Orobancha cumana* number. A: Vegetative growth. B: Grain growth. C: Protein and fat content of host. D: Yield. E: Error bars indicate the standard error, and lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

对每个试验小区的产量进行测量,结果显示(图 3E)有机肥和菌剂都可以增加向日葵的产量,其中最为显著的是 T1 和 T2 处理,分别增产了 28.9%和 38.3% ($P < 0.05$),其次是有机肥处理组 C2 增加了 19.1%。同时,也对实验田以外的农田施用 D74 菌剂后的增产情况进行调查,数据

表明添加菌剂后,向日葵籽粒产量提高了 30.8%,与小区实验增产效果一致,表明 D74 菌剂对提高作物产量具有稳定而显著的效果。

2.3 D74 菌剂对籽粒质量的影响

对于向日葵来说,最具经济价值的部位是籽粒。其品质与收购价格密切相关,因此,根据收

购标准(36 mm×5 mm), 将每个花盘的向日葵脱粒后, 进行分级称重, 结果表明(图 3C), 添加有机肥和菌剂都可以使向日葵籽粒产量增加。其中最为显著的是处理组 T1 和 T2 相较于对照组 C1 大粒重分别增加 64.6%和 66.8% ($P<0.05$)。通常, 大粒价格是小粒的 4–6 倍, 这对于提高农民经济收益来说, 具有较大意义。分析大粒的百粒重, 可以发现 T1 处理对籽粒百粒重增加较显著 ($P<0.05$), 相较于 C1 提升了 17.8%, T2 处理提升了 7.5%。

籽粒的品质与口感通常取决于其蛋白质和脂肪的含量, 因此测定了籽粒中粗蛋白和粗脂肪的含量。结果表明(图 3D), 菌剂处理后, T1 组中粗蛋白含量显著提升 ($P<0.05$) 9.3%, T2 提升 4.9%。而对于粗脂肪来说, 菌剂 T1 处理比对照 C1 脂肪含量增加 4.07%, 其他处理均不明显。说明菌剂对于植物蛋白的合成具有促进作用, 这可能与 D74 菌剂可以促进作物生长, 增加生物量积累相关, 而对于粗脂肪含量的影响并不明显。

2.4 D74 菌剂对微生物的影响

2.4.1 对向日葵根际微生物群落结构的影响

对不同处理的向日葵根际微生物进行 α 多样性分析, *chao1* 指数结果(图 4A, 4B)表明, 添加有机肥(C2)可以增加土壤中细菌和真菌数量, 对向日葵种子包衣, 提高了根际细菌数量, 降低了根际真菌数量。当同时对种子进行包衣处理并穴施菌肥混合物(T2), 会使向日葵根际细菌数量减少, 真菌略微增加。对各处理组中菌群 OTU 数进行分析, 构建 Venn 图可知(图 4C, 4D), 处理组和对照组共有细菌和真菌的 OTU 数分别为 2 508 个和 682 个, D74 菌剂处理(T1, T2)后, 与非菌剂处理(C1, C2)特有的细菌和真菌的 OTU 分别为 111、110 个和 89、61 个。4 种根际土壤中, 特有 OTU 数分别为 302、201、268 和 216 个; 特有真菌的 OTU 数分别为 170、234、

185 和 198 个。

对于微生物群落结构的组成, 在门水平上进行分析比较(图 4E, 4F)。4 种根际土壤(C1、C2、T1 和 T2)中细菌的优势门(相对丰度>10%)均为变形菌门(*Proteobacteria*, 占比分别为 38.01%、44.65%、41.62% 和 49.41%)、放线菌门(*Actinobacteria*, 占比分别为 23.29%、11.66%、13.19%和 13.15%)和酸杆菌门(*Acidobacteria*, 占比分别为 11.28%、11.85%、12.68%和 10.06%); 其次分别为绿弯菌门(*Chloroflexi*, 占比分别为 8.68%、10.22%、9.38%和 7.85%), 拟杆菌门(*Bacteroidetes*, 占比分别为 5.92%、5.57%、4.86%和 5.54%)和浮霉菌门(*Planctomycetes*, 占比分别为 4.08%、3.82%、4.06%和 3.15%)。其中变形菌门在 T2 处理组中显著性增加(tukey's multiple comparisons test, $P<0.05$), 而放线菌门在 C2 处理中显著降低。厚壁菌门(*Firmicutes*)在 T1 处理中相对丰度为 3.98%, 高于其他 3 组(C1 0.79%, C2 0.13%, T2 0.94%)。厚壁菌门中的芽孢杆菌在寄生植物的根际可能发生与抵御病原菌入侵的类似机制, 从而抵御列当寄生。在真菌中, 优势门分别为子囊菌门(*Ascomycota*, 占比分别为 37.70%、19.94%、23.63%和 31.13%), 担子菌门(*Basidiomycota*, 占比分别为 4.67%、27.61%、19.57% 和 3.73%)。其次为被孢霉门(*Mortierellomycota*, 占比分别为 1.31%、14.96%、5.17%和 5.18%)和球囊菌门(*Glomeromycota*, 占比分别为 1.61%、1.47%、1.11%和 7.02%)。通过构建偏最小二乘回归分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) (图 4G, 4H), 前两个成分对于细菌和真菌群落的解释量分别为 25%和 22%。不同处理可引起细菌群落结构组成差异, 其中使用 D74 菌剂对种子包衣处理(T1), 对细菌群落影响最大。而包衣并穴施菌肥混合物(T2), 对真菌群落影响较大。

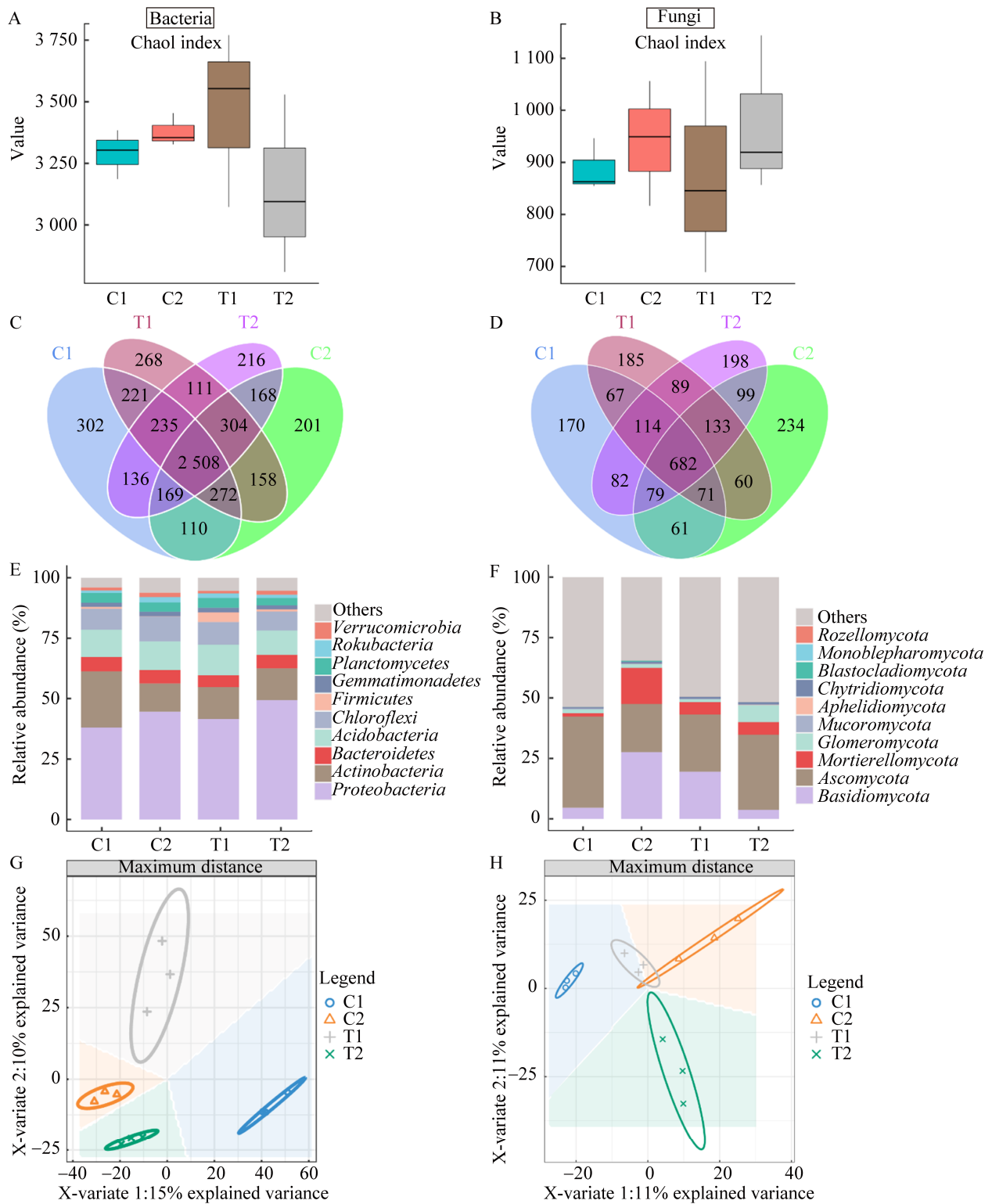


图 4 D74 菌剂对根际微生物多样性的影响

Figure 4 The effect of D74 agent on rhizosphere microbial diversity. Chaol index (A, B), venn diagram (C, D), community composition on phylum level (E, F) and PLS-DA (G, H) of bacteria and fungi.

添加 D74 对微生物细菌和真菌群落均有一定影响,同时土壤理化性质会影响微生物的生长,而不同的微生物会由于生态位竞争而相互影响,形成不同的群落,群落差异进一步影响列当寄生^[16]。通过曼特尔检验(Mantel test)对相对丰度前 10 的科水平物种与土壤多种理化性质进行相关性分析。结果如(图 5A, 5B)所示,对于细菌群落来说, *Bacillaceae* 与土壤中 AHN 和 AZn 显著正相关,与 TP 和 TK 负相关,同时 TP 与 TK 之间为显著正相关。而土壤中 AP 含量与 *Flavobacteriaceae*、*Anaerolineaceae* 和 *unidentified_Acidobacteria* 丰度呈显著正相关,同时 AP 含量与土壤 pH 负相关,也就是说土壤中 AP 含量越高, pH 越低。土壤 CEC-Na 和 SS 分别与 *Burkholderiaceae* 和 *Xanthomonadaceae* 丰度显著负相关。对于真菌群落来说,土壤 AZn 含量与 *Pleiosporaceae* 和 *Sporormiaceae* 丰度负相关, TFe 与 *Glomeraceae* 正相关。

2.4.2 对可培养微生物的影响

由可培养微生物分离计数结果可知,不同处理向日葵根际土壤每克干土中细菌、放线菌和真菌的数量存在显著性差异($P<0.05$)。添加有机肥可以降低土壤中细菌的可培养数量,而种子包衣

增加了根际中可培养细菌数量,其中 T1 处理组根际可培养细菌数量(4.37×10^7 CFU/g)显著高于种子不包衣处理(C2 4.95×10^6 CFU/g)。对于放线菌来说,种子包衣并穴施有机肥(T1 6.04×10^6 CFU/g)可以显著增加土壤中放线菌的数量(C2 2.41×10^6 CFU/g)。种子包衣并穴施菌肥混合物(T2)降低了土壤中细菌和放线菌的数量,而增加了真菌数量。可能高浓度 D74 菌株与根际土壤中细菌发生生态位竞争,抑制了其他细菌的生长。对于真菌的数量而言,穴施有机肥和菌剂 D74 都可以增加土壤中真菌的数量,在双重处理下,达到显著性增加。与对照 C1 相比,种子包衣并穴施菌肥混合物(T2),放线菌与真菌的数量比(A/F)和细菌与真菌的数量比(B/F)显著降低,而单独对种子包衣处理,则显著增加 A/F 和 B/F 的比值(图 6)。上述结果表明,添加菌剂或者有机肥,均可引起土壤中可培养微生物数量改变,进而导致群落结构变化。

对可培养细菌分离和菌种鉴定,在 4 种不同处理的根际土壤中,共分离到可培养细菌 140 株,通过与 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) nucleotide BLAST 进行序列比对。统计结果并发现(表 1),这些细菌分布于 4 个门 *Actinobacteria*、

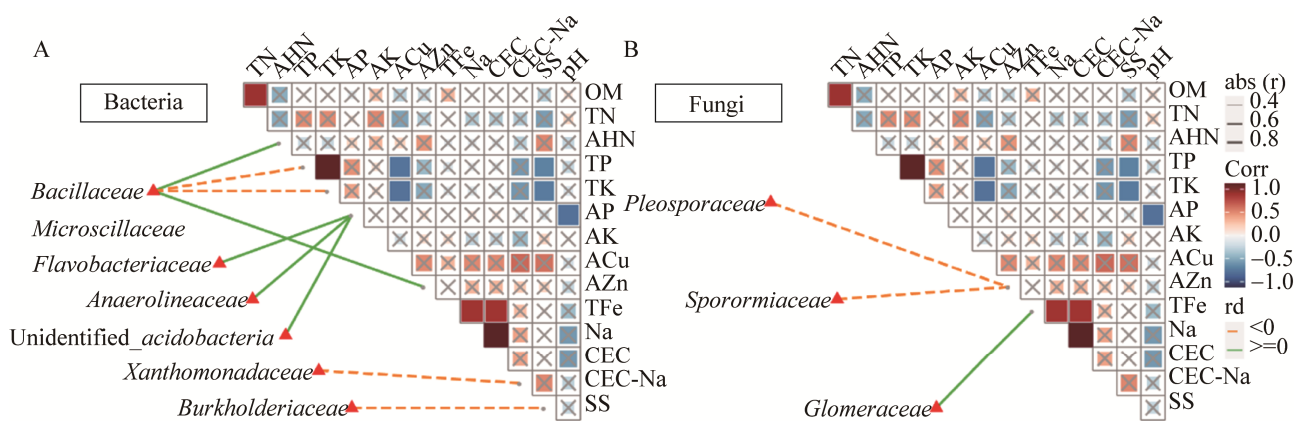


图 5 土壤理化性质对微生物群落结构的影响

Figure 5 The influence of soil physical and chemical properties on rhizosphere microbial community structure.

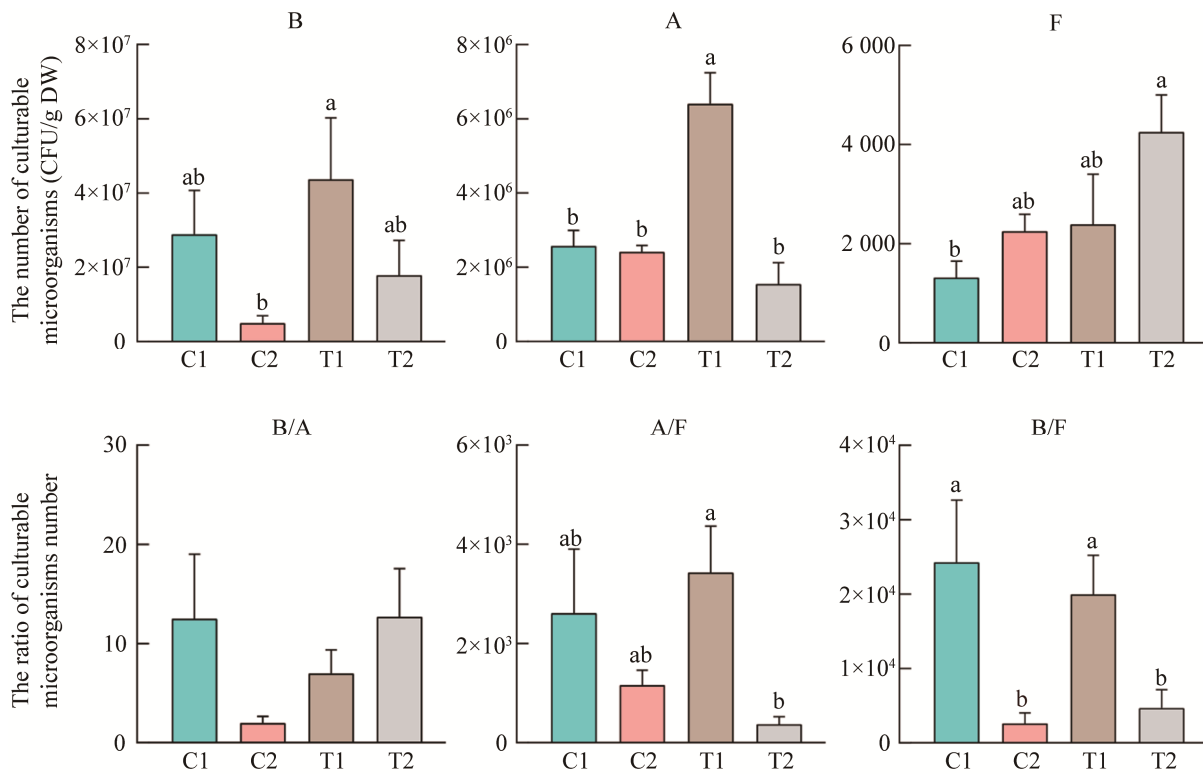


图 6 可培养微生物的分离鉴定及细菌筛选结果

Figure 6 Isolation and identification of culturable microorganisms. Error bars indicate the standard error, and lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

表 1 不同处理对向日葵根际可培养细菌的影响

Table 1 Effect of different treatments on culturable bacteria from sunflower rhizosphere

Phylum	Genus	Number of strains				
		C1	C2	T1	T2	Total
<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacterium</i>	0	1	4	3	8
	<i>Arthrobacter</i>	2	2	4	2	10
	<i>Pseudarthrobacter</i>	1	3	2	4	10
	<i>Streptomyces</i>	0	1	1	0	2
	<i>Kocuria</i>	0	0	1	0	1
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Chryseobacterium</i>	1	0	0	0	1
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus</i>	4	7	6	3	20
	<i>Brevibacterium</i>	0	3	4	2	9
	<i>Fictibacillus</i>	0	0	1	0	1
<i>Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	3	3	4	6	16
	<i>Ensifer</i>	0	0	1	4	5
	<i>Paracoccus</i>	1	4	0	0	5
	<i>Phyllobacterium</i>	1	0	0	0	1
	<i>Rhizobium</i>	1	3	1	4	9
Total of genus	14	8	9	11	8	36
Total of strains		14	27	29	28	98

Bacteroidetes、*Firmicutes* 和 *Proteobacteria* 和 14 个属, 并且在 4 种土壤中筛选到的优势菌株为 *Bacillus*。在 C1、C2、T1 和 T2 四组土壤中筛选出的可培养细菌分布在 8、9、11 和 8 个属中, T1 处理可培养得到的属种类高于其他 3 个处理。其中, 副球菌属(*Paracoccus*)是无 D74 菌剂添加的 C1 和 C2 组中特有的细菌类型, 而添加菌剂的 T1 和 T2 处理组特有的细菌是剑菌属(*Ensifer*)。这些具有显著富集差异的菌株, 可能参与了列当寄生的过程, 或者通过代谢物干扰了列当的寄生。

3 讨论

在向日葵-列当-*S. rochei* D74 共培养实验中, 明显观察到添加 D74 无细胞发酵滤液可以显著抑制发芽的列当种子与寄主根系维管束连接, 使其不能成功寄生。使用 D74 菌剂在向日葵种子表面进行包衣可以减少真菌数量, 降低植物根际病害发生。然而当 D74 使用浓度加大时, D74 会与原位微生物产生生态位的竞争作用, 使得根际细菌、放线菌数量下降, 导致群落失衡, 引起真菌数量增加。在扩增子测序中, *Firmicutes* 在 T1 处理中相对丰度显然高于其他 3 组(C1、C2 和 T2), 这可能与其抗病性有关^[39]。在其他研究中, 观察到寄主对于列当的抵抗, 与其抵御病原菌入侵的机制类似, 会引起植物细胞壁的增厚^[40], 寄主产生次级代谢产物, 增强免疫^[41], 寄主发生超敏反应 (hypersensitive response, HR)^[41], 在感染部位引起细胞坏死, 以阻止异物进一步入侵。同时会引起系统获得性抗性 (acquired systemic resistance) 的增强^[42-43], 病程蛋白 (PR proteins) 表达增加^[44], 来抵抗列当寄生。

土壤理化性质分析结果显示, 对于微生物来说, 土壤中不同元素的含量对微生物的群落有直接影响^[45], 微生物对于土壤中营养元素的选择

具有偏好性, 有些微生物可以在氮源丰富的土壤中生存, 而另外一些, 比如固氮菌却可以在无氮环境中正常生长。土壤中的各元素含量不仅对微生物具有影响, 对元素间也有相互的制约。例如, 有机质主要是由土壤中正在分解的残留物, 或负责分解残留物的生物所产生的副产品, 以及微生物本身和腐殖质转化而成^[46]。因此当土壤中总氮(TN)含量增加, 土壤有机质含量(OM)也会增加, 表现出显著正相关^[47]。研究表明, 土壤肥力可以影响寄主分泌的发芽诱导物质, 从而改变列当的萌发与寄生^[48], 在玉米农田中施加氮肥和磷肥后, 宿主根和根际土提取物诱导的向日葵列当萌发显著减少^[49]。在高氮肥土壤条件下, 列当表现出逆适应现象, 种子不能顺利萌发生长^[50]。在向日葵、列当、菌剂与原位微生物的复杂关系中, 添加菌剂相当于人为扰动了土壤原位微生物的群落结构, 随之群落进行动态平衡调节, 使其结构发生变化, 例如在处理组中, *Bacillaceae* 和 *Rhizobiaceae* 菌丰度增加, 而 *Microscillaceae*、*Flavobacteriaceae* 和 *Nectriaceae* 菌丰度减少。这些微生物的变化, 也可能是引起列当寄生改变的一个不可忽略的因素。

D74 菌剂具有促进作物生长、增产的作用^[20,22,25], 本实验中, 促生效果仍然明显(图 3B)。加之使用菌剂, 列当寄生数量减少(图 3A), 使其自身营养物质的流失转移降低, 充分保证了寄主生殖发育所需的营养物质, 因此双重作用显著增加向日葵的花盘重, 同时提高了籽粒中大粒占比和百粒重(图 3)。为了确保使用菌剂, 不会影响籽粒口感, 测定了籽粒粗蛋白含量和粗脂肪含量, 结果显示添加菌剂可以显著增加籽粒蛋白含量, 而对粗脂肪含量影响较小。在实验田和当地农民管理的农田中对产量进行评估, 均表明使用菌剂可显著提高约 30% 的产量, 这意味着使用菌剂可以提高农民的经济收益。

4 结论

通过添加 D74 菌剂, 显著降低向日葵根部列当寄生病害的发生, 减少寄主自身养分流失。同时作为促生菌, 促进作物有机质积累, 花盘生长, 使籽粒饱满, 增加花盘中大粒占比, 百粒重和籽粒蛋白质含量, 最重要的是显著增产达到 30%, 提高农业经济收益, 并为研究防治列当提供新策略。

参考文献

- [1] 陈树林, 魏良民, 扬新东, 李晓雷, 马献伟, 张芳. 当前我国食葵生产和品种应用状况分析[J]. 种子世界, 2006(1): 31-33.
CHEN SL, WEI LM, YANG XD, LI XL, MA XW, ZHANG F. Current status of edible sunflower production and variety extension in China[J]. Seed World, 2006(1): 31-33 (in Chinese).
- [2] 王鹏飞. 不同施肥量对向日葵产量相关性状的影响及经济效益分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2016.
WANG PF. Different fertilizer on the sunflower yeild related traits and economic benefit analysis[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [3] 白全江, 云晓鹏, 高占明, 徐利敏, 李玉民, 张红乐, 杜磊, 李笑硕. 内蒙古向日葵列当发生危害及其防治技术措施[J]. 内蒙古农业科技, 2013, 41(1): 75-76, 84.
BAI QJ, YUN XP, GAO ZM, XU LM, LI YM, ZHANG HL, DU L, LI XS. The occurrence and control techniques of sunflower broomrapes in Inner Mongolia[J]. Inner Mongolia Agricultural Science and Technology, 2013, 41(1): 75-76, 84 (in Chinese).
- [4] ABBES Z, KHARRAT M, DELAVAUULT P, CHAÏBI W, SIMIER P. Nitrogen and carbon relationships between the parasitic weed *Orobanche foetida* and susceptible and tolerant faba bean lines[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2009, 47(2): 153-159.
- [5] 王焕, 赵文团, 陈连芳, 马永清, 支金虎, 王德胜. 列当(*Orobanche* spp. and *Phelipanche* spp.)种子的采集与预处理方法[J]. 杂草学报, 2016, 34(1): 22-25.
WANG H, ZHAO WT, CHEN LF, MA YQ, ZHI JH, WANG DS. Collection and preconditioning of broomrape (*Orobanche* spp. and *Phelipanche* spp.) seeds[J]. Journal of Weed Science, 2016, 34(1): 22-25 (in Chinese).
- [6] MA YQ, JIA JN, AN Y, WANG Z, MAO JC. Potential of some hybrid maize lines to induce germination of sunflower broomrape[J]. Crop Science, 2013, 53(1): 260-270.
- [7] 郭振国, 陈杰, Muhammad Rashid Nizamani, 陈连芳, 马永清. 生防菌对向日葵列当的防除作用的初步研究[J]. 中国农业大学学报, 2018, 23(6): 59-69.
GUO ZG, CHEN J, NIZAMANI MR, CHEN LF, MA YQ. Preliminary study on the bio-control effect of microorganism on sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.)[J]. Journal of China Agricultural University, 2018, 23(6): 59-69 (in Chinese).
- [8] 王恺. 轮作种植模式对列当的防除作用及其机理[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2019.
WANG K. Effects and mechanisms of crop rotation regime on controlling *Orobanche* spp.[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A & F University, 2019 (in Chinese).
- [9] PARKER C, RICHES CR. Parasitic weeds of the world: biology and control[M]. Wallingford, Oxon: CAB International, 1993.
- [10] DURIEZ P. Caractérisation génétique, moléculaire et physiologique du locus Or7 de résistance à *Orobanche cumana* chez le tournesol[D]. France: Doctoral Dissertation of Université Paul Sabatier-Toulouse III, 2019.
- [11] ALI HA, HB ELAMIN, HA DIRAR. Biological control of *Striga hermonthica* del. bendth: screening for bacteria scavenging strigol[J]. American Journal of Biochemistry, 2013, 3(4): 89-92.
- [12] CHEN J, XUE QH, MCERLEAN CSP, ZHI JH, MA YQ, JIA XT, ZHANG M, YE XX. Biocontrol potential of the antagonistic microorganism *Streptomyces enissocaealis* against *Orobanche cumana*[J]. BioControl, 2016, 61(6): 781-791.
- [13] SHABANA YM, MÜLLER-STÖVER D, SAUERBORN J. Granular Pesta formulation of *Fusarium oxysporum* f.sp. *orthoceras* for biological control of sunflower broomrape: efficacy and shelf-life[J]. Biological Control, 2003, 26(2): 189-201.
- [14] ZERMANE N, SOUISSI T, KROSCHER J, SIKORA R. Biocontrol of broomrape (*Orobanche crenata* Forsk. and *Orobanche foetida* Poir.) by *Pseudomonas fluorescens* isolate Bf7-9 from the faba bean rhizosphere[J]. Biocontrol Science and Technology, 2007, 17(5): 483-497.
- [15] BARGHOUTH S, SALMAN M. Bacterial inhibition of *Orobanche aegyptiaca* and *Orobanche cernua* radical elongation[J]. Biocontrol Science and Technology, 2010, 20(4): 423-435.

- [16] XI J, LEI BL, LIU YX, DING ZB, LIU JX, XU TQ, HOU LJ, HAN SQ, QIAN X, MA YQ, XUE QH, GAO JM, GU J, TIEDJE JM, LIN YB. Microbial community roles and chemical mechanisms in the parasitic development of *Orobanche cumana*[J]. *iMeta*, 2022, 1(3): e31.
- [17] DIAS MP, BASTOS MS, XAVIER VB, CASSEL E, ASTARITA LV, SANTARÉM ER. Plant growth and resistance promoted by *Streptomyces* spp. in tomato[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2017, 118: 479-493.
- [18] 郭静静, 郭磊磊, 赵云岫, 葛峰, 戴亦军. 固氮菌 (*Ensifer meliloti* 1021)降解苯甲腈及其代谢酶的基因克隆和表达[J]. *生态与农村环境学报*, 2019, 35(2): 248-254.
GUO JJ, GUO LL, ZHAO YX, GE F, DAI YJ. Degradation of benzonitrile by the nitrogen-fixing bacterium *Ensifer meliloti* 1021 and the cloning and over-expression of the genes encoding the corresponding metabolic enzymes[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2019, 35(2): 248-254 (in Chinese).
- [19] KAUR T, MANHAS RK. Antifungal, insecticidal, and plant growth promoting potential of *Streptomyces hydrogenans* DH16[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2014, 54(11): 1175-1185.
- [20] 马军妮. 放线菌对玉米小麦的促生抗旱作用及机理研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2016.
MA JN. The study on promotion, drought resistance and mechanism about actinomycetes of maize and wheat[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2016 (in Chinese).
- [21] 岳书云, 范浩灵, 范伟玲. 微生物与土壤肥力的关系探讨[J]. *南方农机*, 2020, 51(2): 56.
YUE SY, FAN HL, FAN WL. Discussion on the relationship between soil fertility and microbial fertility[J]. *China Southern Agricultural Machinery*, 2020, 51(2): 56 (in Chinese).
- [22] 段佳丽, 薛泉宏, 舒志明, 王东胜, 何斐. 放线菌 Act12 与腐植酸钾配施对丹参生长及其根域微生态的影响[J]. *生态学报*, 2015, 35(6): 1807-1819.
DUAN JL, XUE QH, SHU ZM, WANG DS, HE F. Effects of combined application of actinomycetes Act12 bio-control agents and potassium humate on growth and microbial flora in rooting zone of *Salvia miltiorrhiza* Bge[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(6): 1807-1819 (in Chinese).
- [23] BAZ M, LAHBABI D, SAMRI S, VAL F, HAMELIN G, MADORE I, BOUARAB K, BEAULIEU C, ENNAJI MM, BARAKATE M. Control of potato soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* and *Pectobacterium atrosepticum* by Moroccan actinobacteria isolates[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28(1): 303-311.
- [24] 何斐, 张忠良, 崔鸣, 薛泉宏. 生防放线菌剂对魔芋根域微生物区系的影响[J]. *应用与环境生物学报*, 2015, 21(2): 221-227.
HE F, ZHANG ZL, CUI M, XUE QH. Effect of biocontrol actinomycetes agents on microflora in the root-zone of *Amorphophallus konjac* orphophallus konjac K. Koch ex N.E.Br K.Koch ex N.E.Br[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2015, 21(2): 221-227 (in Chinese).
- [25] 张忠良, 何斐, 马军妮, 薛泉宏, 楚金强. 放线菌剂及其与有机肥配施对魔芋的促生作用[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2016, 44(3): 173-180, 187.
ZHANG ZL, HE F, MA JN, XUE QH, CHU JQ. Growth-promoting effect of actinomycetes agents and organic fertilizer on *Amorphophallus konjac*[J]. *Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition*, 2016, 44(3): 173-180, 187 (in Chinese).
- [26] LI YL, GUO Q, HE F, LI YZ, XUE QH, LAI HX. Biocontrol of root diseases and growth promotion of the tuberous plant *Aconitum carmichaelii* induced by actinomycetes are related to shifts in the rhizosphere microbiota[J]. *Microbial Ecology*, 2020, 79(1): 134-147.
- [27] KUMAR RR, JADEJA VJ. Isolation of actinomycetes: a complete approach[J]. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2016, 5(5): 606-618.
- [28] SOUSA GV, TELES VLG, PEREIRA EG, MODOLO LV, COSTA LM. Interactions between As and Se upon long exposure time and effects on nutrients translocation in golden flaxseed seedlings[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 402: 123565.
- [29] WANG CH, KOCH AL. Constancy of growth on simple and complex media[J]. *Journal of Bacteriology*, 1978, 136(3): 969-975.
- [30] 杨薇红, 童斌, 张小华, 陈赓, 高强, 徐中. 发芽马铃薯 PDA 培养基对几种霉菌培养效果的影响[J]. *农产品加工*, 2017(5): 22-24, 28.
YANG WH, TONG B, ZHANG XH, CHEN G, GAO Q, XU Z. Influence on culture effect of several moulds of germination of potato PDA medium[J]. *Farm Products Processing*, 2017(5): 22-24, 28 (in Chinese).

- [31] 迟原龙, 唐垚, 金璐, 张凤, 姚开, 何强. 采用碱裂解法提取 DNA 鉴定细菌和酵母菌[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(2): 177-180.
CHI YL, TANG Y, JIN L, ZHANG F, YAO K, HE Q. Identification of bacteria and yeasts by using an alkaline lysis method for DNA extraction[J]. Food Research and Development, 2018, 39(2): 177-180 (in Chinese).
- [32] 刘佳茜, 侯丽君, 刘婷婷, 王沛媛, 高祥, 林雁冰. PBAT 地膜降解菌的筛选及其降解特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(1): 129-136.
LIU JX, HOU LJ, LIU TT, WANG PY, GAO X, LIN YB. Isolation of PBAT plastic-degrading bacteria and their degradation characteristics[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2021, 40(1): 129-136 (in Chinese).
- [33] DIXON P. VEGAN, a package of R functions for community ecology[J]. Journal of Vegetation Science, 2003, 14(6): 927-930.
- [34] GÓMEZ-RUBIO V. ggplot2-elegant graphics for data analysis (2nd edition)[J]. Journal of Statistical Software, 2017, 77(book review 2): 1-3.
- [35] CHEN HB, BOUTROS PC. VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R[J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12: 35.
- [36] SUN M, XIAO TF, NING ZP, XIAO EZ, SUN WM. Microbial community analysis in rice paddy soils irrigated by acid mine drainage contaminated water[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(6): 2911-2922.
- [37] JIAO S, YANG YF, XU YQ, ZHANG J, LU YH. Balance between community assembly processes mediates species coexistence in agricultural soil microbiomes across eastern China[J]. The ISME Journal, 2020, 14(1): 202-216.
- [38] BERKMAN SJ, ROSCOE EM, BOURRET JC. Comparing self-directed methods for training staff to create graphs using Graphpad Prism[J]. Journal of Applied Behavior Analysis, 2019, 52(1): 188-204.
- [39] 吴思梦. 柑橘抗/感溃疡病品种内生细菌菌群差异与寄主抗病的相关性研究[D]. 南昌: 江西农业大学硕士学位论文, 2018.
WU SM. Relativity study between endophytic bacteria flora of different orange varieties and resistance or susceptibility of host to *Citrus* canker[D]. Nanchang: Master's Thesis of Jiangxi Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [40] ELLINGER D, VOIGT CA. Callose biosynthesis in *Arabidopsis* with a focus on pathogen response: what we have learned within the last decade[J]. Annals of Botany, 2014, 114(6): 1349-1358.
- [41] PIASECKA A, JEDRZEJCZAK-REY N, BEDNAREK P. Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals[J]. The New Phytologist, 2015, 206(3): 948-964.
- [42] DURRANT WE, DONG X. Systemic acquired resistance[J]. Annual Review of Phytopathology, 2004, 42: 185-209.
- [43] SPOEL SH, DONG XN. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells[J]. Nature Reviews Immunology, 2012, 12(2): 89-100.
- [44] BREEN S, WILLIAMS SJ, OUTRAM M, KOBE B, SOLOMON PS. Emerging insights into the functions of pathogenesis-related protein 1[J]. Trends in Plant Science, 2017, 22(10): 871-879.
- [45] 张全军, 于秀波, 钱建鑫, 熊挺. 鄱阳湖南矶湿地优势植物群落及土壤有机质和营养元素分布特征[J]. 生态学报, 2012, 32(12): 3656-3669.
ZHANG QJ, YU XB, QIAN JX, XIONG T. Distribution characteristics of plant communities and soil organic matter and main nutrients in the Poyang Lake Nanji Wetland[J]. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(12): 3656-3669 (in Chinese).
- [46] PRESCOTT CE, VESTERDAL L. Decomposition and transformations along the continuum from litter to soil organic matter in forest soils[J]. Forest Ecology and Management, 2021, 498: 119522.
- [47] 张丽娅, 马志林. 南水北调中线渠坡不同季节不同盖度草地土壤氮素和有机质变化[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(3): 219-223.
ZHANG LY, MA ZL. Changes of soil nitrogen and organic matter contents of grassland with different coverage in different seasons in middle lineslope of south-to-north water transfer project[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2019, 47(3): 219-223 (in Chinese).
- [48] FERNÁNDEZ-APARICIO M, WESTWOOD JH, RUBIALES D. Agronomic, breeding, and biotechnological approaches to parasitic plant management through manipulation of germination stimulant levels in agricultural soils[J]. Botany, 2011, 89(12): 813-826.
- [49] YE XX, ZHANG M, MCERLEAN CSP, MA YQ. Nitrogen and phosphorus supply strongly reduced the control efficacy of maize against sunflower broomrape[J]. Archives of Agronomy and Soil Science, 2021: 1-15.
- [50] BRITTO DT, KRONZUCKER HJ. NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review[J]. Journal of Plant Physiology, 2002, 159(6): 567-584.