
题目（黑体 小二；英文 Times New Roman 加黑 小二）

如：木霉菌 *Trichoderma*

作者（幼圆，小四，2字人名间1个空格；英文和数字，Times New Roman）

如：陈小^{1,2}，王华^{2*}，Smith¹

单位（宋体，六号；英文 Times New Roman）

如：（1. 中国农业科学院植物保护研究所/农业部作物有害生物综合治理重点实验室，北京 100081；2. 中国科学院成都生物研究所 成都 610041）

摘要：（内容仿宋_GB2312，五号；Times New Roman）如：生物菌株B11

要概述研究目的、方法、结果和主要结论，要求突出论文的主题和应用范围，并充分反映该研究的创新之处。要有相应数据作为支持，不能只是定性的描述，里面的数据要与正文和图表中的数据保持一致，小数点后保留相同的位数。

关键词：内容（仿宋，五号，单词间用分号隔开；Times New Roman）如：生物防治；*Trichoderma*

中图分类号： 文献标识码：A 文章编号：

Title (Times New Roman 小四 加黑，单词首字母大写，介词及特定词除外)

如：**Biological Control of *Trichoderma***

Author (Times New Roman 五号，姓全部大写，名首字母大写，名字间逗号，通信作者标注)

如：CHEN Xiaoxiao^{1,2}, WANG Hua^{2*}, Smith¹

Address (单词首字母大写，Times New Roman 小五)

如：（1. Key Laboratory of Pest Management in Crops, Ministry of Agriculture/Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081; 2. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041）

Abstract: (Times New Roman 五号) 要与中文摘要保持一致，注意时态、单复数、单词等拼写正确。

Key words: (Times New Roman 五号，英文关键词与中文一一对应，用分号隔开，首字母不大写，拉丁文斜体全称，特定除外) 如：biological control; *Trichoderma*

正文（宋体 五号，英文和数字为 Times New Roman 五号）；

常见表示方法：

中文名与拉丁文名间不用括号如木霉 *Trichoderma viride*；全文中第一次出现拉丁文时应全拼，以后出现用缩写如：*T. viride*

利用作者人名引用文献时，2个作者时都应列出，如：郑爱萍和李平^[1]，Pande和Tripathi^[2]；3个及以上作者时用等，如：Sriram等^[3]，马纯等^[4]。

1 材料与方法（黑体，四号；Times New Roman）

收稿日期：年-月-日

基金项目：项目名称（项目编号）

作者简介：作者姓名（出生年-），性别，学历，职称，E-mail：；*通信作者，学历，职称，E-mail：。

1.1 标题（黑体，五号；Times New Roman）

1.1.1 标题（仿宋-GB2312，五号，Times New Roman）空 2 格与后面正文（宋体，五号，Times New Roman）接排

材料与方法中应将试验的研究对象来源、种类（品种）、特性等写全；本研究试验条件的具体概况，应包括不同处理、对照、重复次数等。方法尽可能简述，如参考他人试验或计算方法，直接引用文献即可。常见表示方法：

- ✓ 表示体积的“升”用“L”表示，表示摩尔浓度的“M”改为“mol/L”，转速“rpm”改为“r/min”。文中数值与单位之间加一个空格，除了%。
- ✓ 除长度计量单位、℃和%不能省略外，波浪号和顿号前的其他相同单位可省略。如：塑料盆（40 cm×20 cm×10 cm）；20℃~30℃；20%~30%；1~3 d；4、5、6 g/L；培养 0、12、24、48、96 h
文中及图表中涉及到运算符都用宋体，如：+、-、×、±等，且有±的要加括号如：（1.29±0.06）
饲养条件为（26±1）℃，RH（60±10）%，光周期 14L：10D。
- ✓ 文中的如有菌株、蛋白、基因等代号，其前要加上名称如：菌株 B12；数据统计的 P 要大写斜体如（*P* < 0.05）；

2 结果与分析（黑体，四号；Times New Roman）

文中数据要与图表中的数据保持一致，小数点后保留相同的位数。

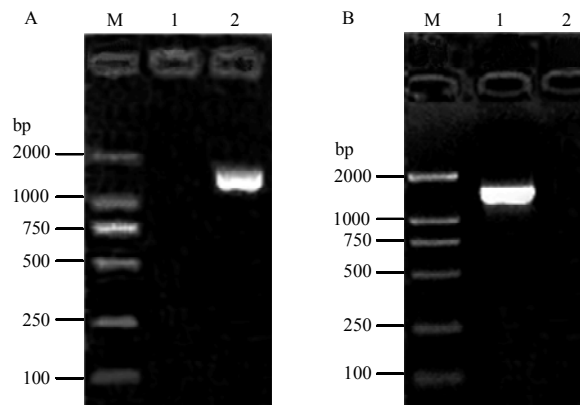
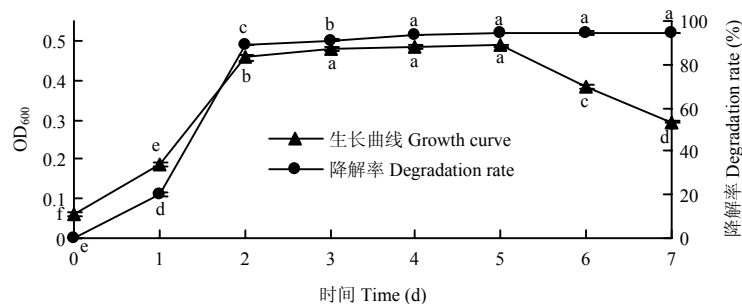


图 1 两个拮抗菌株的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of two antagonistic microbes

A: 细菌菌株NB12 基因组DNA 16S rDNA 引物的PCR扩增；PCR amplification of genomic DNA from bacterial strain NB12 with 16S rDNA primers（M: DNA Marker DL2000；1: ddH₂O；2: NB12 基因组DNA）。

B: 放线菌菌株 NA1 基因组 DNA 16S rDNA 引物的 PCR 扩增；PCR amplification of genomic DNA from actinomycete strain NA1 with 16S rDNA primers
注Note（M: DNA Marker DL2000；1: NA1 基因组DNA；2: ddH₂O）。



注：图上不同小写字母者表示 0.05 水平差异显著，下同。

Note: Data with the different lowercase letters indicated significant difference at 0.05 level. The same below.

图 2 培养时间对菌株 QC06 生长及降解二氯喹啉酸的影响

Fig. 2 Effect of inoculation time on the growth and the quinclorac-degrading rate of the strain QC06

图片排版注意事项：

- 图片应在正文中引用，并按照在正文中引用的顺序编号。图片请随文排版，下方应配有图号、图题和详尽的图注，使插图具有自明性。
- 图题、图注、图文、纵横坐标物理量和单位都要有中英文对照。
- 图应利用编辑中的选择性粘贴，使其可以链接到 Excel 中的源数据，图中数据应有对应标准误或标准差及差异显著性分析。
- 坐标图的标示应使用标准物理量和法定计量单位符号，若非特别需要，不建议使用彩色图例。
- 照相图要求图像清晰、层次分明、反差适中。显微镜和电镜照片应标明照片实际放大倍数或长度标尺。
- 系统进化树上的文字做成可修改的 word 图，拉丁名在前，序列号用括号括起来放在其后，注意正斜体的正确使用。
- 对于必须发彩图的文章，请在来稿时注明。

表 1 六种农药对蜡蚧轮枝菌孢子萌发的毒力

Table 1 Toxicity of six different pesticides to conidial germination of *V. lecanii*

种类及剂型 Formulations of pesticides	斜率 Slope	相关系数 (R) Correlation coefficient	LC ₅₀ 值 LC ₅₀ value (μg/mL)	95%置信限 95% confidence interval
2.5% 高渗吡虫啉可湿性粉剂 25% imidacloprid WP	0.34	0.98	27.17±0.94 cd	23.13~31.22
40% 噻霉胺悬浮剂 40% pyrimethanil SC	0.44	0.97	4.57±0.42 e	3.14~6.74
50% 丙环唑可湿性粉剂 50% propiconazol WP	0.62	0.96	20.03±0.90 d	17.22~25.01
10.8% 高效氟吡甲禾灵乳油 10.8% haloxyfop-R-methyl EC	0.54	0.98	36.80±1.73 c	29.56~44.47
48% 氟乐灵乳油 48% trifluralin EC	0.53	0.93	376.62±7.51 a	353.92~418.61
72% 2,4-滴丁酯乳油 72% 2,4-D butylate EC	0.50	0.95	247.73±10.21 b	173.58~261.47

注：数据为平均值±标准误，不同小写字母表示0.05水平上差异显著。

Note: data were presented as mean±SD, data with different lowercase letters indicated significant difference at 0.05 level.

表格排版注意事项：

- ◇ 文字表格使用三线表，请随文排版，表格应在正文中引用，并按照在正文中引用的顺序编号。
- ◇ 标题文字用黑体 8 号，数字及英文用 Times New Roman 8 号 加粗；其他文字为宋体，数字及英文用 Times New Roman；括号要用英文态 ()
- ◇ 表题、表头(第一行和第一列)和表注都要有中英文对照。

3 讨论 (黑体, 四号; Times New Roman)

应由本研究结果自然地引申出，将本研究与国内外类似研究进行比较，提升本研究结果的意义，并在此基

础上提出未来的工作思路，切忌将试验结果再罗列一遍。

参 考 文 献（黑体，五号）

参考文献格式说明：

字体为宋体、Times New Roman 六号，所有符号均为英文态。参考文献序号按文内引用的先后排序，必须是作者在论文中直接引用的，发表在正式出版物上的文献。未正式发表的文献（包括私人通信、产品说明书等）一般不作为文献引用，必要时可在文中用括号注明。不建议引用会议论文集，毕业论文也仅限近3年的。请严格按照下列格式整理文献。

- (1)参考文献的作者不超过3人时全部列出，多于3人时只列前3人，之间用英文态逗号隔开，不用“和”字或“and”，姓前名后，姓写全称，名缩写，用1个空格隔开，不加缩写点，第4位及之后用“等”或斜体的“*et al*”代替，名字列完后用英文句号。
- (2)英文文献题目除第一个单词的首字母大写及必要的大写外，其余单词均小写，题目中菌的拉丁名、基因和内切酶等正确使用斜体。请在参考文献题名后面用[J]、[M]、[D]、[P]等注明文献种类。
- (3)外国期刊名要规范完整，不用斜体，不可缩写。
- (4) 请将参考文献的卷期号正确补充完整，卷号后面若有期号用括号括起来，卷号和后面括号之间没有空格，与后面页码之间用冒号，无卷号的则年与期间不用符号（如“2010, 30(1): 1-6.”或“2010, 30: 1-6.”或“2010(1): 1-6.”）。
- (5) 图书请注明著者、书名、出版地、出版商、年份、页码，年份和页码之间用冒号。
- (6)专著中析出文献格式为：析出文献作者. 题名//专著主要责任者. 专著题名: 版本项. 出版地: 出版者, 出版年: 析出文献的页码.
- (7) 参考文献中的标点全用英文标点，其后加一空格。作者名字列完后用句点，文献题目后用句点，杂志名称和年份后都用逗号，卷期号后面用冒号，页码列完加句点，表示页码范围的短线用“-”。

参考文献格式举例：

- [1] 聂亚锋, 刘永锋, 李德全, 等. 海洋源拮抗细菌对水稻纹枯病的防治[J]. 江苏农业学报, 2007, 23(5): 420-427.
- [2] Wei L H, Xue Q Y, Wei B Q, *et al*. Screening of antagonistic bacterial strains against *Meloidogyne incognita* using protease activity[J]. Biocontrol Science and Technology, 2010, 20(7): 739-750.
- [3] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [4] 袁志明, 张用梅, 刘娥英. 温度对苏云金杆菌芽孢和毒力的影响[M]//中国微生物学会农业微生物专业委员会编. 杀虫微生物(第4卷). 武汉: 武汉大学出版社, 1994, 222-224.
- [5] Metchnikoff E. A disease of *Daphnia* caused by a yeast. A contribution to the theory of phagocytes as agents for attack on disease-causing organisms. [M]// Brock T D, ed. Milestones in Microbiology. Washington DC: ASM Press, 1999, 132-138.
- [6] 李玉萍, 赵路. 苏云金芽孢杆菌制剂微胶囊原粉及其悬浮剂的制法[P]. 中国发明专利, 1995, C185107615.9.

范文如下

哈茨木霉SH2303防治玉米小斑病的初步研究

马佳, 范莉莉, 傅科鹤, 余传金, 李雅乾, 陈捷*

(上海交通大学农业与生物学院/农业部都市农业南方重点实验室, 上海 200240)

摘要: 哈茨木霉 SH2303 是本实验室分离获得的 1 株具有生防效果的菌株, 该菌株能够较好的防治玉米小斑病。通过离体叶片试验确定哈茨木霉 SH2303 诱导玉米抗小斑病的持效期达 15 d。盆栽及大田试验表明, 防治玉米小斑病防效分别达到 78.1%和 56.3%。盆栽试验表明, 哈茨木霉 SH2303 处理的叶片在挑战接种小斑病菌后第 36 h, 玉米体内防御反应酶系 PAL 和 SOD 活性达到峰值。同时, 防御基因 *Pal* 和 *Sod* 的表达水平也明显上升。综合分析表明, 哈茨木霉 SH2303 的诱导抗性作用是防治玉米小斑病的重要机制之一。

关键词: 哈茨木霉 SH2303; 玉米小斑病; 诱导抗病性; 防御反应

中图分类号: S476 文献标识码: A 文章编号: 1005-9261(2014)01-0079-07

The Preliminary Study on the Control of Southern Corn Leaf Blight by *Trichoderma harzianum* SH2303

MA Jia, FAN Lili, FU Kehe, YU Chuanjin, LI Yaqian, CHEN Jie*

(Key Laboratory of Southern Urban Agriculture, Ministry of Agriculture/School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: *Trichoderma harzianum* SH2303 with high biocontrol activity against southern corn leaf blight (SCLB) was isolated from field soil. Pretreated detached maize leaves with *T. harzianum* SH2303 showed induced resistance to SCLB with a duration of 15 days. Efficacy of *T. harzianum* SH2303 against SCLB reached 78.1% and 56.3% under greenhouse and field conditions respectively when spraying spore suspension over maize seedling leaves prior to inoculation of the pathogen. The activities of phenylalanine ammonia lyase (PAL) and superoxide dismutase (SOD) in maize leaves peaked at 36 h in the *Trichoderma* treatments after pathogen challenging inoculation. RNA expression levels of *Pal* and *Sod* were also upregulated in pace with the enzyme activity. Results indicated that induced resistance might be one of the important mechanisms in the biocontrol of SCLB by *T. harzianum* SH2303.

Key words: *Trichoderma harzianum* SH2303; *Bipolaris maydis*; induced plant resistance; defensive reaction

玉米小斑病 (southern corn leaf blight, SCLB) 是世界玉米产区普遍发生的重要病害之一。目前, 对小斑病的防治主要采用种植抗性品种和化学防治等方法^[1]。其中化学防治是控制玉米病害的关键技术之一, 然而, 过度使用化学杀菌剂容易引起生态环境污染和食品安全等问题^[2]。因此生物防治已逐步发展成为玉米, 尤其是鲜食玉米的重要绿色防控技术^[3]。生物源农药, 因其具有低毒、选择性高、不易使病原菌产生抗药性等优点, 被视为生物防治作物病害的一种有效手段。

木霉菌是国际上应用非常普遍的生防真菌, 据不完全统计, 木霉菌能够对 18 个属 29 种病原真菌表现出拮抗活性^[4]。拮抗木霉菌主要通过竞争、重寄生、诱导抗性等机制实现对植物病害的防治^[5]。木霉菌诱导抗性的效果在多种植物中都有报道。1997 年, de Meyer 等^[6]首次证明了木霉菌可诱导植物系统抗性 (induced systemic resistance, ISR), 用哈茨木霉 *Trichoderma harzianum* T39 混拌土壤种植大豆后发现,

大豆叶片对植物病原真菌 *Botrytis cinerea* 和 *Colletotrichum lindemuthianum* 的抗性效果非常明显。Ahmed 等^[7]用哈茨木霉处理胡椒种子及幼苗根部后发现, 胡椒对病原菌 *Phytophthora capsici* 抗性明显提高, 受

收稿日期: 2013-05-25

基金项目: 国家现代玉米产业技术体系专项 (CARS-02)

作者简介: 马佳 (1987-), 女, 硕士研究生, E-mail: mjxingkong@126.com; *通信作者, 教授, E-mail: jiechen59@gmail.com。

损面积减少 40%。Koike等^[8]从结缕草根际分离获得一株木霉GT3-2 菌株, 该菌处理黄瓜后, 可诱导黄瓜对多种病原菌产生抗性。Howell等^[9]发现经过绿色木霉*Trichoderma viride* G-6 与G-11 处理后, 棉花对立枯丝核菌抗性显著提高, 病害减少了 78%。国内用哈茨木霉NF9 处理水稻, 诱导水稻感病品种原丰早幼苗对稻瘟病和白叶枯病的抗病性, 结果显示其抗性水平为中抗^[10]。然而利用木霉菌防治玉米小斑病的报道相对较少。本文通过研究哈茨木霉SH2303 对玉米防御反应的诱导抗性, 初步揭示该生防菌株的防病机理。

1 材料与方法

1.1 供试材料

病原菌: 玉米小斑病 O 小种 (*Bipolaris maydis* race O) 由上海交通大学植物病理学实验室保存。

木霉菌株: 哈茨木霉 *Trichoderma harzianum* SH2303 分离自农田土壤, 由上海交通大学植物病理学实验室保存。

供试玉米品种: 盆栽试验品种为“浙甜 6 号”(上海市崇明岛)、“超甜 135”(浙江省东阳市)和“海鲜玉 1 号”(江苏省海门市); 田间试验品种为当地主栽品种“海鲜玉 1 号”、“超甜 135”、“浙甜 6 号”、“粤彩糯 2 号”(广东省广州市)。

1.2 哈茨木霉 SH2303 防效测定

1.2.1 盆栽试验 玉米种子经 5%的次氯酸钠浸泡 20 min后, 用无菌水冲洗 3 遍, 置于 25 °C 恒温培养箱内培养 72 h 催芽。选取发芽一致的种子播种于 15 cm×15 cm 的花盆内, 于 25 °C 温室中培养至三叶一心期。肥沃田土(经 10 mm 孔筛过筛)与基质、有机肥按 3:1:1 (质量比) 混匀后作为盆栽土壤使用。处理方法: 有 3 个供试玉米品种分别为“浙甜 6 号”、“超甜 135”、“海鲜玉 1 号”, 每个品种设置木霉菌处理与空白对照两组, 共有 6 个不同处理, 每个处理 5 个重复, 每个重复 5 株玉米。木霉菌组: 将 1×10^6 cfu/mL 的木霉菌孢子悬浮液均匀喷施在玉米叶片上, 每株喷施 6 mL。空白对照组: 将超纯水均匀喷施在玉米叶片上, 每株喷施 6 mL。处理后植株静置 72 h, 再分别接种 1×10^6 cfu/mL 的玉米小斑病菌孢子悬浮液, 每株喷施 6 mL。25 °C、相对湿度 90% 以上保持 48 h, 5 d 后调查结果。

1.2.2 田间试验 试验在 4 个地区进行, 分别为广东省广州市、江苏省海门市、浙江省东阳市和上海市崇明岛。各地区试验田均分为 6 个小区, 每个小区约 100 株玉米, 设木霉菌和对照两组处理, 每组各包含 3 个小区重复, 随机排列。处理方法: 处理组每株玉米喷施浓度为 1×10^6 cfu/mL 的木霉菌孢子悬浮液 90 mL。对照组喷施相同体积的清水。施药时间: 在玉米大喇叭口期喷药 1 次, 间隔 7 d 后再喷 1 次药。施药前调查各处理发病基数, 在玉米成熟期再次调查病情指数。

玉米小斑病病情分级标准为 0 级: 免疫, 全株叶片无病斑; 1 级: 仅在植株下部叶片有少量病斑, 病斑占叶面积少于 10%; 3 级: 植株下部叶片有中量病斑, 占叶面积 10%~30%; 中部叶片有少量病斑, 占叶面积少于 10%; 5 级: 植株下部叶片病斑较多, 占叶面积 30%~50%; 中部叶片有中量病斑, 占叶面积的 10%~30%; 植株上部叶片有少量病斑, 占叶面积少于 10%; 7 级: 植株上部 and 下部叶片均有大量病斑, 病斑相连, 占叶面积 50%~70%; 9 级: 全株叶片基本为病斑覆盖, 叶片枯死^[11]。

发病率 (%) = (发病株数/调查总株数) × 100%

病情指数 = \sum (各级病叶数 × 各级代表值) / (调查总叶数 × 最高级代表值) × 100;

病指增长率 (%) = (防治后病情指数 - 防治前病情指数) / 防治前病情指数 × 100%;

校正防效 (%) = (对照病指增长率 - 处理病指增长率) / 对照病指增长率 × 100%^[12]。

1.3 哈茨木霉 SH2303 持效期的测定

玉米材料准备及处理方法同“浙甜 6 号”盆栽试验。分别将木霉 SH2303 处理后 1、4、8、11、15 d 的叶片剪下, 置于培养皿(直径 18 cm)内的滤纸上, 滤纸预先用无菌 6-BA (6-benzylaminopurine) 溶液湿润。用打孔器(直径 7 mm)从培养 7 d 的玉米小斑病菌培养基上打取菌饼, 将菌饼接种于每个处理对应的位置上, 黑暗条件下培养 48 h, 调查各处理叶片的侵染情况。

1.4 防御反应酶活性的测定

1.4.1 处理设置 试验材料为三叶一心期的“浙甜 6 号”玉米幼苗，设置 4 个处理：清水对照（CK），挑战接种小斑病菌（B），木霉SH2303 诱导处理（SH2303），木霉SH2303 诱导处理后 72 h 接种小斑病菌（SH2303+B）。每个处理 5 盆玉米，每盆 5 株幼苗，各处理重复 3 次。处理方法：将 1×10^6 cfu/mL 的木霉菌孢悬液均匀喷施在处理SH2303 和SH2303+B的玉米叶片上，每株喷施 6 mL；同一时间将无菌水均匀喷施在CK和处理B的玉米叶片上，每株喷施 6 mL。木霉SH2303 诱导接种 72 h 后，在处理B和SH2303+B的玉米叶片上挑战接种 1×10^6 cfu/mL 的小斑病菌孢悬液，每株喷施 6 mL。接种小斑病菌后，分别于 0、12、24、36、48、72、96、120 h 采集各处理叶片 2~3 g，液氮速冻后保存于 -80 °C，供防御反应相关酶系测定。0~48 h 叶片样品用于防御反应相关基因的表达分析。

1.4.2 粗酶液的制备 参照Lamb和Rubery^[13]的方法进行。从 -80 °C 中取出叶片样品，剪去叶尖及叶脉，取叶片中上部 1.0 g，加 4.0 mL 0.2 mol/L pH 8.8 硼酸钠缓冲液（含 5 mmol/L 巯基乙醇，1 mmol/L EDTA）。加少许石英砂研磨成匀浆，转入离心管中，Vortex 充分混匀 5 min。4 °C、13600 r/min 离心 30 min，上清液即是超氧化物歧化酶（SOD）和苯丙氨酸解氨酶（PAL）的粗提取液。保存于 -80 °C 超低温冰箱中。

1.4.3 酶活力测定 超氧化物歧化酶（SOD）采用邹琦^[14]的SOD抑制氮蓝四唑（NBT）光化还原法进行测定。苯丙氨酸解氨酶（PAL）测定：将粗酶提取液用 0.05 mol/L pH 8.8 硼酸钠缓冲液稀释 5 倍后，以L-苯丙氨酸为底物，于波长 290 nm 下测定吸光值。以每小时使OD 值增加 0.01 的酶量定为 1 个酶活单位（U），计算酶的比活性^[15]。

1.5 相关防御基因的表达分析

RNA提取采用Trizol 试剂（Invitrogen公司），所有容器用 0.1% 焦炭酸二乙酯（diethyl pyrocarbonate, DEPC）水处理，以消除RNA酶的污染。RNA的完整性通过 1.2% 琼脂糖凝胶（EtBr）电泳检测，RNA 浓度的测定在Eppendorf Biophotometer 分光光度计上进行，并通过 OD_{260} / OD_{280} 验证纯度^[16]。

采用TaKaRa消化及反转录试剂盒进行基因组DNA的消除及第一链cDNA的合成（TaKaRa Code: DRR047A）。半定量sqRT-PCR反应体系 20 μ L：cDNA模板 1 μ L，*rTaq*酶（TaKaRa公司）10 μ L，上、下游引物（10 μ mol/L）各 0.5 μ L，最后加灭菌ddH₂O补足。PCR扩增程序为 95 °C 预变性 3 min；95 °C 变性 30 s，55 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 30 s，33 个循环；72 °C 延伸 5 min。引物由上海捷瑞生物公司合成（表 1）。

表 1 Semi-quantitative RT-PCR 反应的引物

Table 1 Primers of semi-quantitative RT-PCR

基因 Gene	NCBI 登录号 Accession No.	引物序列 Sequence of primers
苯丙氨酸解氨酶基因 <i>Pal</i>	LOC542258	5'-CTGGACTACGGCTTCAAG-3'和 5'-GTAGGTGGACGACATGAG-3'
超氧化物歧化酶基因 <i>Sod</i>	NM001112234.1	5'-TGGTGAAGGCTGTTGCTGTGC-3'和 5'-TGGCGGTCTCATCTTCTGGT-3'
内参基因 <i>Actin</i>	DQ492681	5'-GGTCTATTCCAGCCATCCTTCATTG-3'和 5'-TCTCCTTGCTCATGCGGTCAC-3'

1.6 数据统计与分析

试验数据采用 Excel 和 DPS 软件进行统计与分析。

2 结果与分析

2.1 盆栽试验防治效果

哈茨木霉 SH2303 对玉米小斑病的防效普遍较高，均为 60% 以上，但对不同品种玉米的防效不同。对“浙甜 6 号”玉米的防效最高，为 78.1%，对“海鲜玉 1 号”的防效相对较差，为 61.3%（图 1）。

2.2 田间试验防治效果

哈茨木霉 SH2303 对玉米小斑病的防效在东阳、海门及上海地区均高于广州地区。其防效在上海最高，为 56.3%；在广州最低，为 42.0%。结合盆栽试验结果，哈茨木霉 SH2303 防治“浙甜 6 号”小斑病的效果最佳，所以选择该品种进行哈茨木霉 SH2303 拮抗玉米小斑病的持效期试验（图 2）。

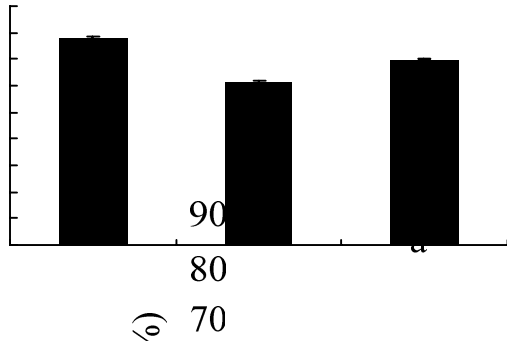


图 1 哈茨木霉 SH2303 对玉米小斑病盆栽试验的防效
Fig. 1 Efficacy of *T. harzianum* SH2303 on *B. maydis* in pot experiment

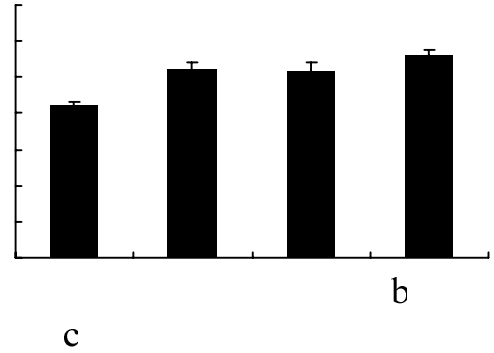


图 2 哈茨木霉 SH2303 对玉米小斑病大田防效
Fig. 2 Efficacy of *T. harzianum* SH2303 on *B. maydis* in field experiment

2.3 哈茨木霉 SH2303 的持效期

哈茨木霉 SH2303 处理玉米叶片后间隔 1 d 接种小斑病菌的菌饼，叶片并未出现明显病斑，但接种菌饼处叶片褪绿变黄；离体玉米叶片随着挑战接种时间的推移（间隔 4、8 和 11 d），病斑逐渐明显、扩大，但色泽较浅；对照组中在接种部位出现褐色坏死现象，病斑色泽和面积明显高于木霉菌处理（图 3），说明在一定条件下，哈茨木霉处理可抑制小斑病菌的侵染。在间隔 15 d 时处理组和对照组发病程度相同，病斑长度一致，由此推测哈茨木霉 SH2303 防治玉米小斑病的持效期大致在 13 d 左右（图 3、图 4）。

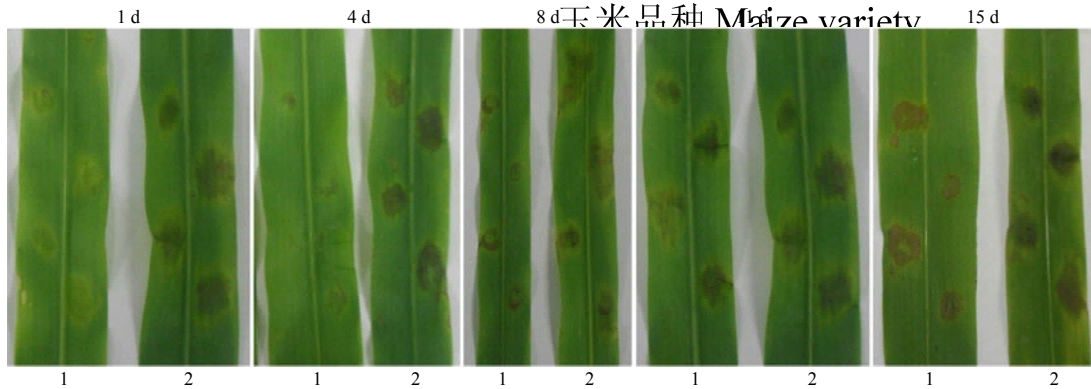


图 3 哈茨木霉 SH2303 诱导玉米抗小斑病菌离体试验

Fig. 3 The maize leaves pretreated with *T. harzianum* SH2303 were inoculated with *B. maydis* at different times

1: 哈茨木霉 SH2303 处理 Treatment with *T. harzianum* SH2303; 2: 对照 CK

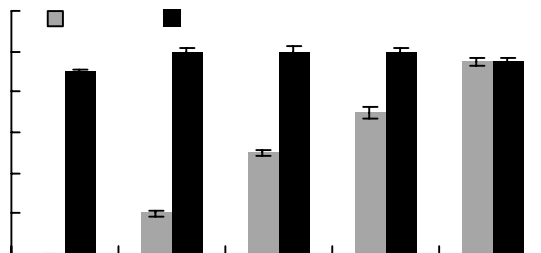


图 4 哈茨木霉 SH2303 处理后玉米叶片不同时间接种玉米小斑病菌的病斑长度

Fig. 4 Lesion size of maize leaves pretreated with *T. harzianum* SH2303 were inoculated with *B. maydis* at different time

2.4 哈茨木霉 SH2303 对玉米叶片防御反应酶系的影响

处理 SH2303+B 的 SOD 活性在接种小斑病菌后第 36 h 达到峰值，比同时期的处理 SH2303 增加了 16.36%，比同时期的 B 处理增加了 66.3%，且其在第 120 h SOD 活性是 B 处理的 1.17 倍。处理 B 的玉米叶片在接种后第 24 h SOD 活性达到最高，且其活性仅在 24~36 h 显著高于 CK ($P < 0.05$)，其他时间段与 CK 差异不显著 ($P > 0.05$)。说明哈茨木霉 SH2303 诱导处理对玉米叶片中 SOD 酶的表达有促进作用，接种小斑病菌能够使该酶活性进一步提高 (图 5)。

从图 6 可以看出，两个处理 SH2303+B 和 SH2303 的 PAL 活性上升速度明显高于处理 B，处理 SH2303+B 和 B 均在挑战接种小斑病菌后第 36 h 达到高峰，但此时处理 SH2303+B 的 PAL 活性显著高于 B 处理 ($P < 0.05$)。SH2303 处理在各时间段 PAL 活性均显著高于处理 B 和 CK，而处理 SH2303+B 在接种小斑病菌后第 36 h PAL 活性则显著高于同时期的处理 SH2303，说明哈茨木霉 SH2303 的诱导此时起到一种使玉米叶片敏化的作用 (priming action) [17]，而要使该酶活表达进一步提高则需要小斑病菌的刺激。因此，第 36 h 的 PAL 酶活高峰是由哈茨木霉 SH2303 和病菌侵染共同作用的结果。随着处理后时间的延长各处理酶活下降，但处理 SH2303 的酶活性仍明显高于处理 B 和 CK，说明哈茨木霉 SH2303 对玉米叶片防御反应酶系的诱导作用是明显的。

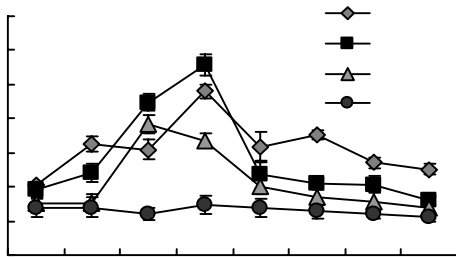


图 5 哈茨木霉 SH2303 诱导处理对玉米叶片 SOD 活性的影响

Fig. 5 Effects of *T. Harzianum* SH2303 on SOD activities in maize leaves after challenging inoculation

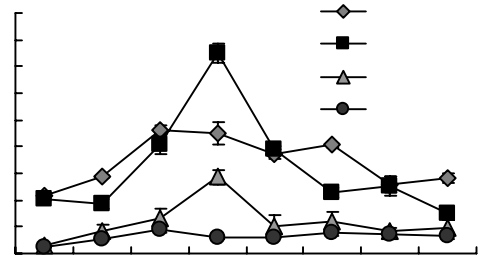


图 6 哈茨木霉 SH2303 诱导处理对玉米叶片 PAL 活性的影响

Fig. 6 Effects of *T. Harzianum* SH2303 on PAL activities in maize leaves after challenging inoculation

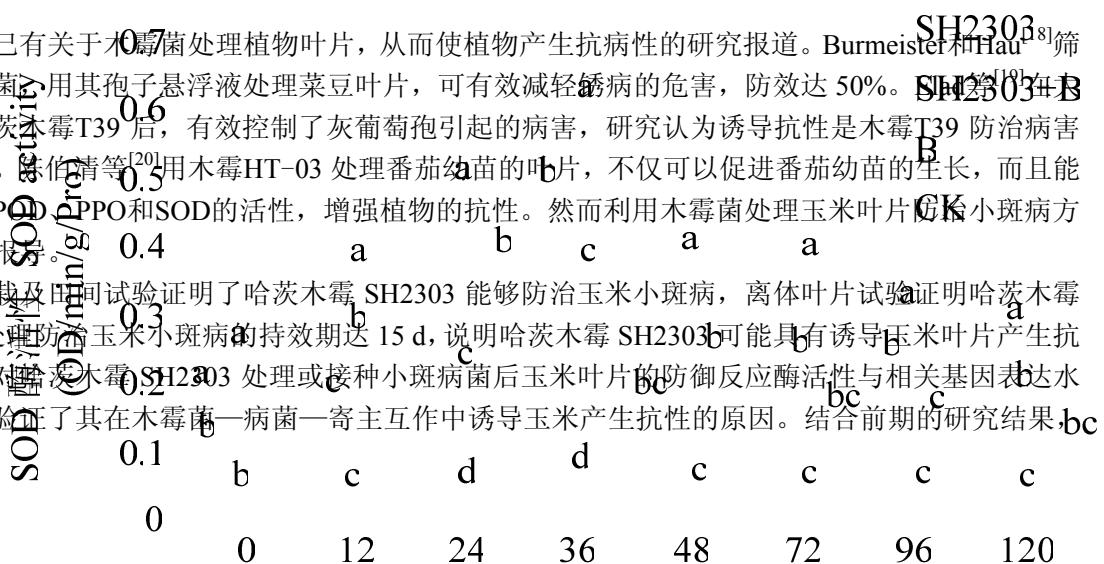
2.5 哈茨木霉 SH2303 对玉米防御相关基因表达水平的影响

处理 SH2303、SH2303+B 和 B 在 0~48 h，基因 *Pal*、*Sod* 的表达量变化明显，且基因 *Pal* 表达的增幅明显高于 *Sod* 基因。处理 SH2303+B 在挑战接种病原菌后第 36 h 左右基因 *Pal* 和 *Sod* 的表达量达到最高，与对应的防御反应酶活性的变化大致相同。处理 SH2303 和 SH2303+B 的基因 *Pal* 和 *Sod* 表达量都高于 CK 和处理 B。CK 的基因 *Pal* 和 *Sod* 在各时间点上无明显变化 (图 7)。结合 PAL 和 SOD 酶活性测定的结果可知，哈茨木霉 SH2303 能够影响玉米叶片中基因 *Pal* 和 *Sod* 的表达。

3 讨论

目前国内外已有关于木霉菌处理植物叶片，从而使植物产生抗病性的研究报道。Burmeister 和 Hau 筛选得到 2 株木霉菌，用其孢子悬浮液处理菜豆叶片，可有效减轻锈病的危害，防效达 50%。豆叶片上接种哈茨木霉 T39 后，有效控制了灰葡萄孢引起的病害，研究认为诱导抗性是木霉 T39 防治病害的重要机制之一。林作清等用木霉 HT-03 处理番茄幼苗的叶片，不仅可以促进番茄幼苗的生长，而且能够明显提高番茄 POD、PPO 和 SOD 的活性，增强植物的抗性。然而利用木霉菌处理玉米叶片小斑病方面的研究却未有报导。

本文通过盆栽及田间试验证明了哈茨木霉 SH2303 能够防治玉米小斑病，离体叶片试验证明哈茨木霉 SH2303 的一次处理防治玉米小斑病的持效期达 15 d，说明哈茨木霉 SH2303 可能具有诱导玉米叶片产生抗性的效应。通过对哈茨木霉 SH2303 处理或接种小斑病菌后玉米叶片的防御反应酶活性与相关基因表达水平变化的分析，验证了其在木霉菌—病菌—寄主互作中诱导玉米产生抗性的原因。结合前期的研究结果



处理时间 Time after treatment (h)

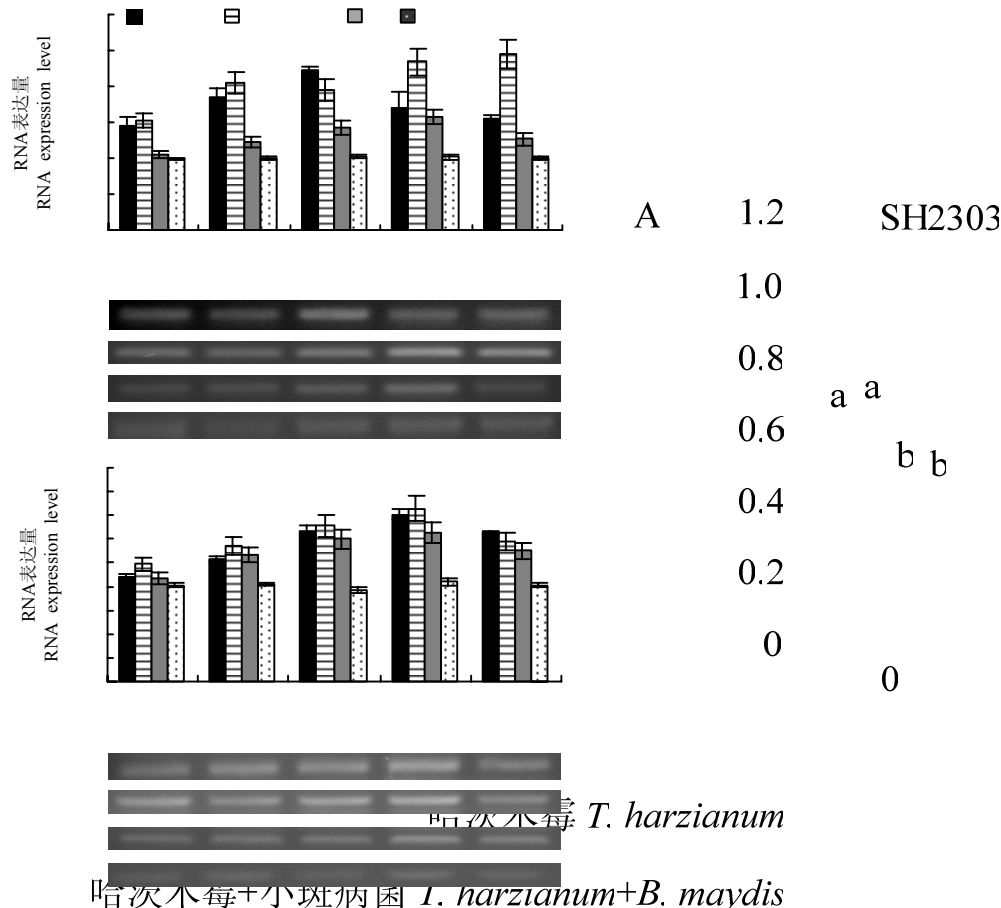


图 7 不同处理对玉米叶片防御相关基因表达的影响 (A: *Pal*; B: *Sod*)

Fig. 7 Semi-quantitative RT-PCR of defense-related genes of maize leaves with different treatments inoculated by *B. maydis* (A: *Pal*; B: *Sod*)

注: 内参的表达量为 1。Note: RNA expression level of internal reference was set as 1.

推测木霉菌防治玉米小斑病的机制可能是多种因子的综合效应: 首先由于木霉菌在玉米叶片表面的繁殖速度很快, 超过病原菌的生长速度, 因此木霉菌可快速占领空间, 从而抑制病原菌的定殖; 木霉菌一旦与病菌接触后可直接重寄生病原菌菌丝, 从而抑制病原菌的生长和侵染; 与此同时, 木霉菌可诱导玉米叶片发生防御反应, 产生抑菌物质, 进一步提高玉米叶片的抗侵染能力。

大量研究表明, 木霉菌处理植物后, 植物会产生多种反应, 如木质素积累, 植保素含量产生变化, 病程相关蛋白表达上升甚至植物激素 (如SA、JA) 含量改变等^[21]; 同时木霉菌产生的细胞壁降解酶 (如几丁质酶、葡聚糖酶、蛋白酶等) 能够降解病原真菌细胞壁, 并释放出低分子量化合物, 诱导植物防御反应相关酶的合成^[22]。Djonovic等^[23]从绿色木霉中分离纯化出的蛋白质激发子Sm1可以引起玉米的防御反应, 诱导玉米根部和叶部的苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 基因的表达明显提高。PAL是酚类次生物质合成代谢的关键酶, 由该酶催化的苯丙烷途径能够合成黄酮、异黄酮、香豆酸酯类的植保素和木质素前体等次生酚类物质, 可高效抑制病原菌生长^[24]。在植物中SA与苯丙氨酸代谢密切相关, PAL是苯丙氨酸代谢途径中的第一个关键酶, 苯丙氨酸在PAL的催化下生成肉桂酸, 经羟基化和氧化作用肉桂酸生成SA^[25], 通过SA的形成和积累, 激活了超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性, SOD是植物体内一种防御相关酶, 在细胞保护酶系统中的作用是清除氧自由基^[26]。这些防御相关基因的表达和酶活性的增强与植物诱导抗性作用密切相关。

本研究发现在一定时间内经木霉SH2303诱导的处理其PAL和SOD活性以及*Pal*和*Sod*基因的表达明显高于未经木霉处理的对照, 值得指出的是, 木霉SH2303单独处理植物后诱导防御反应酶系活性增加的水平, 低于木霉SH2303诱导并挑战接种病原菌的处理, 说明木霉菌可使植物组织进入一种激发状态 (priming), 随后一旦遇到病原菌的侵染则可激发更为强烈的防御反应^[27], 此时酶活的增加是由两者协同

小斑病菌 *B. maydis*

对照 CK

作用的结果。王淑霞等^[28]研究表明用哈茨木霉Tr-92 处理黄瓜并接种灰霉病菌后, 相关酶活的增加要高于单独接种木霉或单独接种病原菌的处理, 与本研究结果相似。因此推断木霉SH2303 诱导玉米产生系统抗性是防治玉米小斑病的重要机制之一。后续试验需要在成株期检测木霉菌处理或接种病原菌后SA、植保素和木质素的含量变化以及几丁质酶、蛋白酶等活性变化, 并研究其与叶片抗病菌侵染能力的对应关系, 从而全面揭示哈茨木霉SH2303 防治玉米小斑病的持效性机制。

参 考 文 献

- [1] 潘彩霞, 徐立, 李兵, 等. 玉米小斑病的危害和防治[J]. 中国农村小康科技, 2010, 12: 54-55, 65.
- [2] 张敬虎. 正确认识化学农药的毒性及残留问题[J]. 科技情报开发与经济, 2007, 17(22): 133-134.
- [3] Huang C J, Yang K H, Liu Y H, *et al.* Suppression of southern corn leaf blight by a plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus* C1L[J]. *Annals of Applied Biology*, 2010, 157(1): 45-53.
- [4] 杨合同, 唐文华, Ryder M. 木霉菌与植物病害的生物防治[J]. 山东科学, 1999, 12(4): 7-15.
- [5] 王英姿, 纪明山, 祁之秋, 等. 利用木霉菌生物防治黄瓜枯萎病研究进展[J]. 北方园艺, 2008, 10: 81-82.
- [6] de Meyer G, Bigirimana J, Elad Y, *et al.* Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 1998, 104(3): 279-286.
- [7] Ahmed A S, Sánchez C P, Candela M E. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2000, 106(9): 817-824.
- [8] Koike N, Hyakumachi M, Kageyama K, *et al.* Induction of systemic resistance in cucumber against several diseases by plant growth-promoting fungi: lignification and superoxide generation[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2001, 107(5): 523-533.
- [9] Howell C R, Hanson L E, Stipanovic R D, *et al.* Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*[J]. *Phytopathology*, 2000, 90(3): 248-252.
- [10] Jean-Berchmans N, 徐同, 宋凤鸣, 等. 哈茨木霉 NF9 菌株对水稻的诱导抗病性[J]. 中国生物防治, 2003, 19(3): 111-114.
- [11] 张婷, 朱洁伟, 武向文, 等. 拮抗木霉菌对玉米弯孢叶斑病的诱导抗性作用[J]. 上海交通大学学报, 2011, 29(4): 38-41.
- [12] 房锋, 纪春涛, 聂乐兴, 等. 3 种种衣剂对玉米种子保护作用及产量影响[J]. 农药科学与管理, 2008, 29(11): 38-42.
- [13] Lamb C J, Rubery P H. Phenylalanine ammonia-lyase and cinnamic and 4-hydroxylase: product repression of the level of enzyme activity in potato tuber discs[J]. *Planta*, 1976, 130(3): 283-290.
- [14] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000, 163-165.
- [15] 郭红边, 陈捷, 高增贵, 等. 不同诱抗剂诱导玉米对灰斑病的抗性及其与 PAL 的关系[J]. 沈阳农业大学学报, 2000, 31(5): 465-467.
- [16] 唐俊, 孙文良, 伍柯瑾, 等. 木霉菌发酵液蛋白对玉米弯孢菌叶斑病的诱导抗性作用[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(18): 8563-8564, 8566.
- [17] Conrath U, Beckers G J M, Flors V, *et al.* Priming: getting ready for battle[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2006, 19(10): 1062-1071.
- [18] Burmeister L, Hau B. Control of the bean rust fungus *Uromyces appendiculatus* by means of *Trichoderma harzianum*: leaf disc assays on the antibiotic effect of spore suspensions and culture filtrates[J]. *Biocontrol*, 2009, 54(4): 575-585.
- [19] Elad Y, Kapat A. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 1999, 105(2): 177-189.
- [20] 陈伯清, 屈海泳, 刘连妹, 等. 木霉 HT-03 对番茄幼苗生长发育的影响[J]. 中国蔬菜, 2007, 4: 19-21.
- [21] 陈捷, 朱洁伟, 张婷, 等. 木霉菌生物防治作用机理与应用研究进展[J]. 中国生物防治学报, 2011, 27(2): 145-151.
- [22] 李淼, 产祝龙, 檀根甲, 等. 木霉菌防治植物真菌病害研究进展[J]. 生物技术通讯, 2009, 20(2): 286-290.
- [23] Djonovic S, Vargas W A, Kolomiets M V, *et al.* A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize[J]. *Plant Physiology*, 2007, 145(3): 875-889.
- [24] 曾东慧. 生防菌系统诱导果蔬采后抗性的机制及其信号转导途径[J]. 现代农业科技, 2009, 15: 69-70, 72.
- [25] Ward E R, Uknes S J, Williams S C, *et al.* Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance[J]. *The Plant Cell*, 1991, 3(10): 1085-1094.
- [26] 姜慧芳, 任小平. 干旱胁迫对花生叶片 SOD 活性和蛋白质的影响[J]. 作物学报, 2004, 30(2): 169-174.
- [27] Tucci M, Ruocco M, de Masi L, *et al.* The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2011, 11(4): 341-354.
- [28] 王淑霞, 张丽萍, 黄亚丽, 等. 哈茨木霉 Tr-92 诱导黄瓜对灰霉病系统抗性的研究[J]. 中国生物防治学报, 2013, 29(2): 242-247.