

木霉融合子 Tpf-2 的定殖及其对番茄防御酶系的影响

李纪顺[#], 陈凯[#], 李玲, 赵忠娟, 杨玉忠, 杨合同^{*}

(齐鲁工业大学(山东省科学院), 山东省科学院生态研究所, 山东省应用微生物重点实验室, 济南 250103)

摘要 利用 qPCR 检测木霉融合子 Tpf-2 在番茄根际土中的定殖, 并采用生理生化法测定 Tpf-2 对番茄叶片中相关防御酶活性的影响。结果表明, 在整个番茄生育期内(0~150 d), Tpf-2 均可在番茄根际土中定殖, 相对定殖数量随时间的延长呈下降趋势, 同时接种木霉和瓜果腐霉处理组中 Tpf-2 相对定殖数量高于同期无病原菌处理组。不同处理组番茄叶片中的超氧化物歧化酶 SOD、过氧化物酶 POD 及过氧化氢酶 CAT 的活性不同, 同时接种木霉和瓜果腐霉处理组中上述 3 种酶活性增加显著, 与只接种瓜果腐霉处理组间存在极显著性差异($P < 0.01$)。综上可见, 木霉融合子 Tpf-2 的厚垣孢子定殖周期长, 定殖后可诱导番茄叶片中相关防御酶活性的提高, 本研究为揭示其生防机理及菌株应用提供了科学依据。

关键词 木霉融合子 Tpf-2; 番茄猝倒病; 瓜果腐霉; 定殖; 防御酶活性

中图分类号: S 476 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017459

The rhizosphere soil colonization of *Trichoderma* fusant Tpf-2 enhances defence enzyme activities against tomato damping-off

LI Jishun, CHEN Kai, LI Ling, ZHAO Zhongjuan, YANG Yuzhong, YANG Hetong

(Ecology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Shandong Provincial Key Laboratory of Applied Microbiology, Jinan 250103, China)

Abstract The rhizosphere soil colonization dynamics of *Trichoderma* fusant Tpf-2 chlamydospore and its systemic resistance mechanism against tomato damping-off were studied by using quantitative PCR (qPCR) and physiological and biochemical analyses. The results showed that *Trichoderma* fusant Tpf-2 could colonize rhizosphere soil during the whole tomato growth period (0–150 days); the relative colonization quantity decreased along with planting time, and the relative colonization quantity after inoculated with *Pythium aphanidermatum* exceeded that without inoculation with *P. aphanidermatum*. The activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POD) in tomato leaves were different among different treatments, and enhanced remarkably when inoculated with *Trichoderma* and *P. aphanidermatum*, significantly different from those when inoculated with *P. aphanidermatum* only ($P < 0.01$). These results indicated that the colonization of *Trichoderma* fusant Tpf-2 chlamydospore in tomato rhizosphere soils lasted for a long time, and could induce the activities of defence enzymes, which provided the scientific basis for *Trichoderma* fusant Tpf-2 application and further research on biocontrol mechanisms.

Key words *Trichoderma* fusant Tpf-2; tomato damping-off; *Pythium aphanidermatum*; rhizosphere colonization; defence enzyme activity

番茄猝倒病(tomato damping-off)是番茄苗期重要的毁灭性病害,多发生在苗床前期,感病幼苗易倒伏死亡,造成约 60% 的减产^[1-2]。病原菌为卵菌门鞭毛菌亚门中的腐霉属 *Pythium* spp. 低等真菌,常以卵孢子生存繁殖,可在土中、水中腐生或寄生存

活较长一段时间^[3-4]。防治番茄猝倒病的主要方法是采用化学杀菌剂,但由于过量和不合理使用化学农药防治病害带来的一系列健康和环境问题,安全的生物防治越来越受到重视和应用^[5-7]。

目前防治番茄猝倒病的生防菌种类主要包括芽

收稿日期: 2017-12-05

修订日期: 2018-01-31

基金项目: “十三五”国家重点研发计划(2017YFD0201102, 2017YFD0201706); 山东省科学院青年基金(2017QN009)

* 通信作者 E-mail: yanght@sdas.org

为并列第一作者

胞杆菌和木霉^[8-10],木霉因生长速度快、产孢能力强、分布广泛、并具有细胞壁降解酶活性和代谢产生大量的抗生性物质而得到广泛关注,但由于自然来源的木霉菌株田间应用效果不够理想,制约了其进一步推广应用^[11-13]。利用现代生物技术对菌株进行改良选育,是获得高效多功能生防菌株的有效手段^[14-15]。本实验室前期利用原生质体融合技术,选育得到1株木霉融合子 Tpf-2,该融合子综合生防性状较好,温室条件下对番茄猝倒病的防治效果达到85.0%以上,并可产生丰富的厚垣孢子^[16]。厚垣孢子是木霉在逆境下产生的一种繁殖体,该类孢子在储存、萌发及在逆境下的存活能力均远远优于分生孢子,田间应用时表现出较强的抗逆性^[17],故以木霉融合子 Tpf-2 的厚垣孢子为有效成分制备微生物制剂进行病害防治,具有较好的应用前景。

木霉与植物的互作是一个复杂的过程,生防菌能否在靶标植物体内及其根际适应并定殖存活是筛选、评价土传病害生防菌的重要指标^[18],植物体内参与生理代谢过程多种防御反应酶与植物抵抗病原菌入侵也有密切关系^[19-20]。本文以前期生防效果较好的木霉融合子 Tpf-2 为试验菌株,重点研究接种病原菌瓜果腐霉 *P. aphanidermatum* 后,融合子 Tpf-2 在番茄根际土中的定殖动态,及对番茄叶片中相关防御酶的诱导活性,旨在探索供试菌株对番茄猝倒病的生防潜力及其与番茄植株诱导抗性的关系,进而为抗番茄猝倒病生防真菌的筛选及生防机理研究提供科学依据,为制剂改进和防效评价提供支撑。

1 材料与方法

1.1 菌株与材料

供试菌株为木霉融合子 Tpf-2,生防制剂为其厚垣孢子可湿性粉剂,有效成分含量为2亿/g。病原真菌为瓜果腐霉 *P. aphanidermatum* Acu36125,购自中国农业微生物菌种保藏管理中心,病原真菌在PDA平板上培养后,用无菌打孔器打取直径5 mm的菌块备用。番茄品种为日本‘京宝’,购自济南大江种子有限公司。

1.2 试剂与仪器

Powersoil DNA Isolation Kit 试剂盒,MoBio 公司;Roche Light Cycler96 荧光定量仪,罗氏诊断产品(上海)有限公司;TransStart Top Green qPCR Super-Mix,Trans15K DNA Marker,北京全式金有限公司;DL2000 DNA Marker, TaKaRa 公司;普析 TU-1810 紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限公司。

1.3 温室试验

温室试验设4个处理:清水对照(CK)、瓜果腐霉 *P. aphanidermatum* (Pa)、木霉融合子 Tpf-2 (Tpf-2)、木霉融合子 Tpf-2+瓜果腐霉 *P. aphanidermatum* (Tpf-2+Pa)。

试验用土为大田健康土,番茄种子于25℃催芽至露白。播种时,CK处理组每盆放置10粒种子;Pa处理组每盆接入2块瓜果腐霉菌块,并放置10粒种子;Tpf-2处理组每盆放置10粒种子,种子上均匀撒入55 mg的Tpf-2制剂;Tpf-2+Pa处理组每盆接入2块瓜果腐霉菌块,并放置10粒种子,种子上均匀撒入55 mg的Tpf-2制剂。每个处理组种植21盆。

在人工气候室内于光暗周期为10 h//14 h,昼夜温度为25℃//18℃,空气相对湿度为50%~70%的条件下,对盆栽样品进行管理,各处理和对照分别于播种后15、30、45、60、90、120、150 d取样检测Tpf-2在番茄根际土中的定殖动态,并于播种后60 d取样检测番茄叶片相关防御酶活性,每次取样设3个重复。

1.4 木霉融合子 Tpf-2 在番茄根际土中的定殖动态检测

取样时,将番茄根部小心地拔出,抖掉表层土,收集根际土,放入自封袋内带回实验室,土壤微生物基因组总DNA采用PowerSoil DNA Isolation Kit试剂盒进行提取,-20℃保存备用。

前期试验表明,木霉融合子 Tpf-2 的 *Tef1* 区与已知木霉种类的 *Tef1* 区差异较大,同源性低于95.0%,本文以Tpf-2的 *Tef1* 区设计特异基因片段引物, Tef1F: 5'-GTTTTTCGTCACCCCGCTTCC-3', Tef1R: 5'-GTGGCAGAGCAGGGCAAAAGA-3', 以微管蛋白 β tubulin 基因为内参,基因片段引物为 TubF: 5'-GAAGATGTCGTCCACCTTTATT-3', TubR: 5'-GTGAACTCCATCTCGTCCAT-3'。以不同土壤DNA样品为模板,首先利用常规PCR检测引物的特异性,并通过qPCR检测木霉融合子 Tpf-2 的定殖动态,每个样品重复3次。

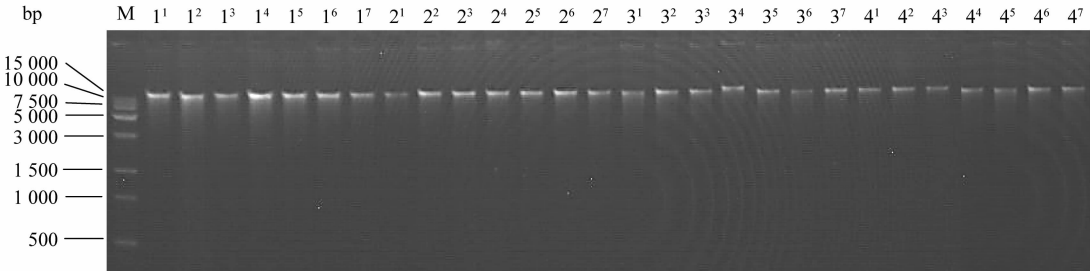
qPCR采用20 μ L反应体系:2 $\times$ TransStart Top Green qPCR SuperMix 10 μ L,10 μ mol/L引物各0.4 μ L,DNA模板1 μ L,ddH₂O 8.2 μ L。qPCR扩增条件:94℃预变性30 s;94℃变性5 s,60℃退火15 s,72℃延伸10 s,40个循环;按0.1℃/s升温速率从65℃升至95℃,每升高0.5℃检测1次荧光信号,进行熔解曲线分析。以木霉融合子 Tpf-2 处理组播种后150 d取样样品为标准样品,利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算样品中目的基因的相对定量结果^[21],其中 $\Delta Ct =$

$Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{试验样品} - \Delta Ct_{标准样品}$ 。

1.5 木霉融合子 Tpf-2 诱导番茄叶片防御酶活性检测

番茄幼苗期是番茄发育的重要时期,这一阶段子叶和真叶生长得好坏直接影响番茄进一步的生长发育,本试验选取种植 60 d 的番茄叶片进行防御酶活性检测,主要检测超氧化物歧化酶 SOD、过氧化物酶 POD 及过氧化氢酶 CAT 活性的变化^[22-24],每个处理设 3 个重复。

酶活性计算:SOD 活性单位以抑制氮蓝四唑(NBT)光化还原 50%所需酶量为 1 个酶活单位(U),SOD 总活性以鲜重酶单位每克表示($U \cdot g^{-1}$);POD 以每分钟吸光度变化值(ΔA_{470})表示酶活力的大小($U \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$);CAT 以每分钟吸光度变化值(ΔA_{240})表示酶活性大小($U \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$)。



图中数字表示不同处理。1: 对照CK; 2: 瓜果腐霉*P. aphanidermatum*处理; 3: 木霉融合子Tpf-2处理; 4: 木霉融合子Tpf-2+瓜果腐霉*P. aphanidermatum*处理。上标数字1、2、3、4、5、6、7分别表示取样时间为播种后15、30、45、60、90、120、150 d。M: Trans 15K DNA Marker
The numbers indicate different treatments. 1: Control; 2: *P. aphanidermatum*; 3: Tpf-2; 4: Tpf-2 and *P. aphanidermatum*. The superscript numbers 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 indicate different sampling times after planting for 15, 30, 45, 60, 90, 120 and 150 days, respectively. M: Trans 15K DNA Marker

图 1 土样 DNA 电泳图谱
Fig. 1 The electrophoretogram of soil DNA

2.1.2 引物特异性检测

用设计的目的基因引物 Tef1F/Tef1R 及内参基因引物 TubF/TubR 对第一次取样(15 d)的土样 DNA 样品进行 PCR 扩增,结果见图 2。用内参基因引物 TubF/TubR 扩增时,4 个处理中均扩增出大小 144 bp 的条带,说明所有土样中均有真菌 DNA 的存在。用目的基因引物 Tef1F/Tef1R 扩增时,CK 和 Pa 中未扩增到条带,而 Tpf-2 和 Tpf-2+Pa 则扩增出大小 159 bp 的目的条带,说明设计的目的基因引物具有特异性和高度准确性,可以利用该引物进行后续的定量分析检测。

2.1.3 木霉融合子 Tpf-2 的定殖动态

利用荧光定量 qPCR 检测木霉融合子 Tpf-2 厚垣孢子在番茄根际土中的定殖动态,结果见图 3。整个番茄生育周期内(0~150 d),Tpf-2 和 Tpf-2+Pa 处理组中均检测到木霉融合子 Tpf-2 的定殖,说明木霉融合子 Tpf-2 的厚垣孢子可在番茄根际土中长期存活。两种处理下,木霉融合子 Tpf-2 的相对定殖数量随着时间的延长呈下降趋势,并且在同一取

1.6 统计方法

用 SPSS 19.0 统计软件中的邓肯氏(Duncan's)方法对数据进行分析,结果为 3 次重复的平均值±标准差,以不同大写字母表示在 0.01 水平上存在极显著性差异,以不同小写字母表示在 0.05 水平上存在显著性差异。

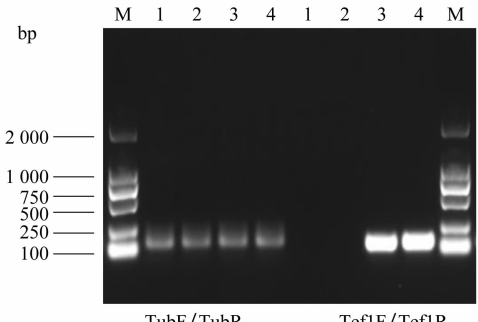
2 结果与分析

2.1 木霉融合子 Tpf-2 的定殖动态检测

2.1.1 土样 DNA 提取与检测

利用 PowerSoil DNA Isolation Kit 试剂盒提取土样中的 DNA,琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 条带,结果见图 1,不同处理,不同取样时间采集的各土样中均可提取到微生物总 DNA。

样时间点上,Tpf-2+Pa 处理组中木霉融合子 Tpf-2 的定殖数量高于 Tpf-2 处理组的定殖数量,说明瓜果腐霉刺激了木霉融合子 Tpf-2 的定殖。



TubF/TubR Tef1F/Tef1R
1~4分别为对照CK、Pa、Tpf-2、Tpf-2+Pa播种15 d后的土壤样品;
M: DL2000 DNA Marker
1-4: Soil samples collected from different treatments with CK, Pa, Tpf-2 and Tpf-2+Pa after planting 15 day. M: DL2000 DNA Marker

图 2 目的基因引物与内参基因引物对不同处理土样 DNA 的 PCR 扩增图谱

Fig. 2 Amplification of DNA from different treatments by specific primers Tef1F/Tef1R or internal reference primers TubF/TubR

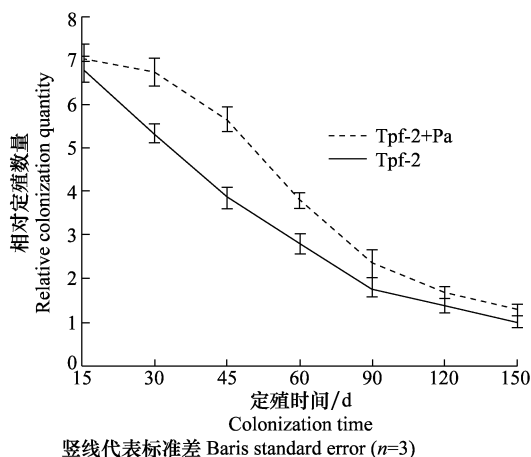


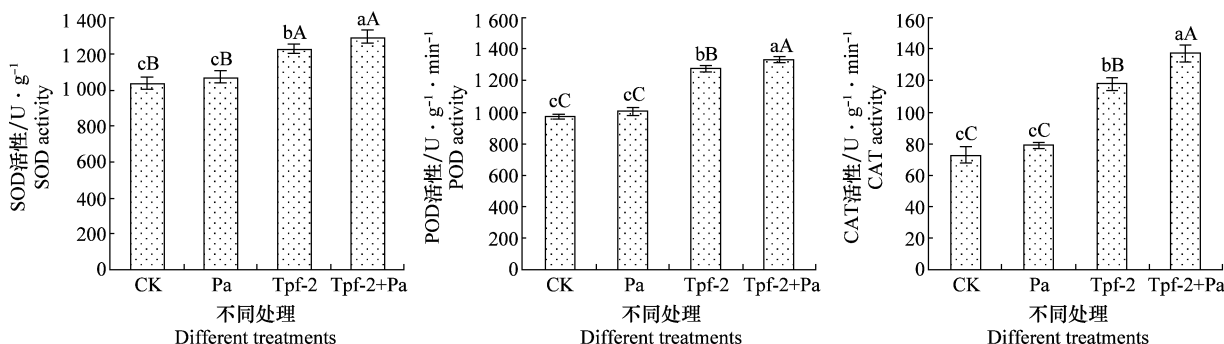
图3 木霉融合子 Tpf-2 在番茄根际土中的 qPCR 结果

Fig. 3 qPCR analysis of *Trichoderma* fusant

Tpf-2 colonization in tomato rhizosphere soils

2.2 木霉融合子 Tpf-2 诱导番茄叶片防御酶活性结果

番茄幼苗期(60 d)叶片中 3 种防御酶 SOD、POD 及 CAT 在不同处理下的活性变化如图 4 所示。



CK: 清水对照; Pa: 只接种瓜果腐霉 *P. aphanidermatum*; Tpf-2: 只接种木霉融合子 Tpf-2; Tpf-2+Pa: 同时接种瓜果腐霉 *P. aphanidermatum* 和木霉融合子 Tpf-2。数据为 3 次重复的平均值, 采用邓肯氏方法进行分析, 竖线代表标准差, 不同小写字母表示在 0.05 水平上存在显著性差异, 不同大写字母表示在 0.01 水平上存在极显著性差异

CK: Treated with distilled water; Pa: Treated with *P. aphanidermatum*; Tpf-2: Treated with *Trichoderma* fusant Tpf-2; Tpf-2+Pa: Treated with *P. aphanidermatum* and *Trichoderma* fusant Tpf-2. Data are the means of three repetitions with standard error ($n=3$); different lowercase and uppercase letters indicate significant difference ($P<0.05$ or $P<0.01$) among the treatments by Duncan's new multiple range test

图4 木霉融合子 Tpf-2 诱导对番茄叶片防御酶活性的影响

Fig. 4 Defense enzyme activities of tomato leaf after inoculated with *Trichoderma* fusant Tpf-2

3 讨论

能否在植物上成功定殖是评价生防菌的一个重要指标,传统方法是对其进行平板稀释计数,但是此方法费时费工,并且灵敏度不高。而实时荧光定量 PCR(real-time fluorescent quantitative PCR, qPCR)技术因其操作简单,特异性高等优点被应用到环境中不同木霉菌的检测^[25-26]。

本试验用到的生防菌株为木霉融合子 Tpf-2,经序列分析表明,该融合子的 *Tef1* 区与已知木霉其

与对照 CK 相比,其他 3 组处理均能提高番茄叶片中 SOD、POD 及 CAT 的活性,但 Pa 处理组与 CK 在 0.05 水平上无显著性差异,说明瓜果腐霉 *P. aphanidermatum* 对 3 种防御酶的活性影响不大。

Tpf-2 及 Tpf-2+Pa 处理组与 CK 及 Pa 处理组间存在极显著性差异 ($P<0.01$),说明木霉融合子 Tpf-2 可显著提高番茄叶片中 SOD、POD 及 CAT 的活性。

4 组处理中, Tpf-2+Pa 处理组的 SOD、POD 及 CAT 酶活性影响效应最大,对 SOD 的诱导效果与 Tpf-2 处理组间存在显著性差异 ($P<0.05$),说明病原真菌 *P. aphanidermatum* 的存在,可显著提高木霉融合子 Tpf-2 对番茄叶片 SOD 酶的诱导效果;对 POD 和 CAT 的诱导效果, Tpf-2 与 Tpf-2+Pa 处理组间存在极显著性差异 ($P<0.01$),说明在瓜果腐霉 *P. aphanidermatum* 存在的情况下,木霉融合子 Tpf-2 可极显著诱导番茄叶片 POD 和 CAT 活性的提高。

他种类的 *Tef1* 区序列差别较大,故以此设计特异引物对目的样品进行 PCR 扩增和定量分析,排除了土壤中其他木霉及其他真菌的干扰,保证了分析结果的准确性和可靠性。

相对定量结果表明:木霉融合子 Tpf-2 厚垣孢子可在番茄根际土中长期定殖,定殖周期不低于 150 d,较以前报道的分生孢子的定殖时间不超过 100 d^[27] 大幅延长。Tpf-2 和病原菌联合处理后, Tpf-2 定殖数量较不加病原菌的处理组呈增加趋势,说明病原菌可刺激 Tpf-2 的定殖量,为病害防治

奠定了基础。前人报道指出,棘孢木霉 *T. asperellum* 在黄瓜根际的数量经历了低—高一低的动态变化,棘孢木霉施入土壤后有一个适应过程,一旦适应后,其定殖数量能够迅速上升^[28]。本试验中 Tpf-2 厚垣孢子相对定殖数量随时间的延长呈降低趋势,说明 Tpf-2 厚垣孢子在番茄根际土中并没有产生明显的繁殖现象,本结论与文献报道的有所不同,具体原因有待进一步探讨。

木霉是一类能够诱导植物产生系统抗病性的生物因子,诱导宿主植物产生一系列局部或系统防御反应。防御反应与超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)等的活性提高关系密切^[29-31]。木霉融合子 Tpf-2 可显著提高番茄叶片中 SOD、POD 及 CAT 的活性,在瓜果腐霉存在的情况下其诱导效果更显著,说明木霉在番茄遭受病原菌入侵后,能够对番茄中与抗病相关的 3 种酶 CAT、SOD 及 POD 活性的提高起到一定的诱导作用,从而间接使得植物体获得抗病作用。

综上所述,木霉融合子 Tpf-2 能够成功定殖在番茄根际,并且能有效诱导植物内在的生防反应物质,提高植物的抗病性。该研究为新的生防菌剂的开发研究奠定了一定的基础,有助于新型菌剂的开发利用。

参考文献

- [1] VOS C M, YANG Y, CONINCK B D, et al. Fungal (-like) biocontrol organisms in tomato disease control[J]. *Biological Control*, 2014, 74(7): 65–81.
- [2] DEAN R, VAN KAN J A, PRETORIUS Z A, et al. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(4): 414–430.
- [3] 向新华, 许艳丽. 腐霉菌及其病害研究进展[J]. *大豆科技*, 2012(5): 20–26.
- [4] MUTHUKUMAR A, UDHAYAKUMAR R, NAVEENKUMAR R. Eco friendly management of damping-off of solanaceous crops caused by *Pythium* species [M]// KUMAR P, KUMAR G V, KUMAR T A. Current trends in plant disease diagnostics and management practices. Springer International Publishing, 2016: 49–90.
- [5] SINGH S, YADUMAN R. Effect of plant extracts on damping-off disease of tomato[J]. *Annals of Plant Protection Sciences*, 2016, 24(1): 128–131.
- [6] ZALTE A, GADE R M, SHITOLE A V, et al. Management of tomato damping off by using plant growth promoting microorganisms [J]. *Journal of Plant Disease Sciences*, 2013, 8(2): 200–203.
- [7] 王卫平, 洪春来, 姚燕来, 等. 拮抗菌共培养制备育苗基质对防治番茄猝倒病试验效果初探[J]. *天津农业科学*, 2015, 21(5): 120–123.
- [8] SHARMA R, WALIA A, CHAUHAN A, et al. Multi-trait plant growth promoting bacteria from tomato rhizosphere and evaluation of their potential as bioinoculants [J]. *Applied Biological Research*, 2015, 17(2): doi 10. 5958/0974 - 4517. 2015. 00019. 1.
- [9] JANAHIRAMAN V, RANGASAMY A, KWON S W, et al. Control of wilt and rot pathogens of tomato by antagonistic pink pigmented facultative methylotrophic *Delftia lacustris* and *Bacillus* spp. [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: doi 10. 3389/fpls. 2016. 01626.
- [10] 段丽峰, 刘国辉, 魏凌恺, 等. 哈茨木霉菌 3 亿 CFU/g 可湿性粉剂对番茄立枯病和猝倒病防治效果[J]. *农药科学与管理*, 2013, 34(9): 60–62.
- [11] TIWARI R, TRIPATHI A. The multifaceted role of the *Trichoderma* system in biocontrol [M]// SHARMA N. Biological controls for preventing food deterioration: strategies for pre- and postharvest management. Lucknow, India: John Wiley & Sons, Ltd, 2014: 183–210.
- [12] 陈捷. 木霉菌生物学与应用研究——回顾与展望[J]. *菌物学报*, 2014, 33(6): 1129–1135.
- [13] LOPEZ-BUCIO J, PELAGIO-FLORES R, HERRERA-ESTRELLA A. *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus [J]. *Scientia Horticulturae*, 2015, 196: 109–123.
- [14] 李纪顺, 陈凯, 王貽莲, 等. 哈茨木霉 LTR-2 双价基因重组菌株的构建及其防治效果[J]. *中国生物防治学报*, 2015, 31(3): 346–352.
- [15] 张淑君, 李伟庆, 牟志美, 等. 应用原生质体融合技术构建纤维素发酵产油脂菌株的试验[J]. *蚕业科学*, 2017, 43(2): 296–303.
- [16] 陈凯, 李纪顺, 李玲, 等. 利用原生质体融合技术选育高效拮抗番茄猝倒病的木霉工程菌株[J]. *中国生物防治学报*, 2017, 33(1): 94–102.
- [17] 张晶晶, 黄亚丽, 马宏, 等. 木霉厚垣孢子可湿性粉剂的研制[J]. *植物保护*, 2016, 42(5): 103–109.
- [18] RUANO-ROSA D, PRIETO P, RINCON A M. Fate of *Trichoderma harzianum* in the olive rhizosphere: time course of the root colonization process and interaction with the fungal pathogen *Verticillium dahliae* [J]. *BioControl*, 2016, 61(3): 269–282.
- [19] SZCZECHE M, NAWROCKA J, FELCZYNSKI K, et al. *Trichoderma atroviride* TRS25 isolate reduces downy mildew and induces systemic defence responses in cucumber in field conditions [J]. *Scientia Horticulturae*, 2017, 224: 17–26.
- [20] 张丽莉, 杨依军, 马力, 等. 一株生防木霉菌株的鉴定及其对番茄保护酶的诱导作用[J]. *东北农业大学学报*, 2011, 42(1): 89–93.

性害虫幼虫的分龄构造有头壳宽(头宽或头口宽)、前胸背板宽、额宽(触角孔间距)、上颚长、上颚宽、主单眼间距等。使用最多的是头壳宽,是由于头壳骨化强而形态较稳定,但是头壳常缩于体内,严重影响测量的准确性。上颚虽然骨化程度强,但是形状不规则,不易测量。前胸背板宽指前胸背板“凸”形斑宽度,触角孔间距指头壳上触角基部坚硬的触角环之间的最短距离,这两项指标具有骨化程度强、特征明显、易于观察、无伸缩等优点,是最合理可靠的分龄指标。因此本研究以前胸背板和触角孔间距作为划分虫龄的指标,线性回归分析合理,说明这两项指标作为划分柠条绿虎天牛幼虫虫龄的标准是可行且可靠的。

为了方便野外快速判断柠条绿虎天牛虫龄,本研究还对体长指标进行了探索,但 Crosby 指数大于 10%,虫龄分组不合理。天牛幼虫体躯具有伸缩性,导致个体之间体长变异较大,对体长测量的准确性有所影响,另外体长的增长是连续的,各龄幼虫间体长有重叠现象,因此不宜作为虫龄划分的指标和依据。

不同虫龄阶段的柠条绿虎天牛幼虫前胸背板宽和触角孔间距值呈明显的几何级数变化,研究结果表明幼虫前胸背板宽和触角孔间距依据发育时间呈现 7 个峰形,说明柠条绿虎天牛幼虫可分为 7 龄。

参考文献

[1] 曹川健. 柠条绿虎天牛生物生态学特性及监测技术研究[D].

(上接 69 页)

- [21] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [22] 张蜀秋. 植物生理学实验技术教程[M]. 北京: 科学出版社, 2011.
- [23] CHEN F, WANG M, ZHENG Y, et al. Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* B579 [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 26(4): 675–684.
- [24] GULER N S, PEHLIVAN N, KARAOGLU S A, et al. *Trichoderma atroviride* ID20G inoculation ameliorates drought stress-induced damages by improving antioxidant defence in maize seedlings [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2016, 38(6): 1–9.
- [25] CAI F, CHEN W, WEI Z, et al. Colonization of *Trichoderma harzianum* strain SQR-T037 on tomato roots and its relationship to plant growth, nutrient availability and soil microflora [J]. *Plant Soil*, 2015, 388(1): 337–350.
- [26] 贺字典, 吴素霞, 宋晓飞, 等. 生防菌与茄病镰刀菌在黄瓜根际动态变化[J]. *中国生物防治学报*, 2016, 32(3): 357–364.
- [27] 张树武, 徐秉良, 薛应钰, 等. 长枝木霉 T6 菌株对黄瓜南方根

北京: 北京林业大学, 2010.

- [2] 刘鑫海. 柠条绿虎天牛植物源引诱剂开发[D]. 北京: 北京林业大学, 2011.
- [3] ZONG Shixiang, XIE Guanglin, WANG Wenkai, et al. A new species of *Chlorophorus* Chevrolat (Coleoptera: Cerambycidae: Cerambycinae) from China with description of biology [J]. *Zootaxa*, 2012, 3157: 54–60.
- [4] LOERCH C R, CAMERON E A. Determination of larval instars of the bronze birch borer, *Agrilus anxius* (Coleoptera: Buprestidae) [J]. *Annals of the Entomological Society of America*, 1983, 76(6): 948–952.
- [5] 陈永年, 潘桐. 也谈昆虫幼虫头宽及摄食量的增长规律[J]. *昆虫知识*, 1988 (4): 235–240.
- [6] 王小艺, 杨忠岐, 刘桂军, 等. 白蜡窄吉丁幼虫的龄数和龄期测定[J]. *林业科学*, 2005, 41(3): 575–584.
- [7] DYAR H G. The number of molts of lepidopterous larvae [J]. *Psyche*, 1890, 5: 420–422.
- [8] 柳建定, 李百万, 王菊英, 等. 松褐天牛龄级划分方法初探[J]. *浙江林业科技*, 2008, 28(4): 84–86.
- [9] 任骥. 松褐天牛室内饲养、幼虫龄期及成虫产卵特性的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2014.
- [10] 张海滨, 王建伟, 朱小峰, 等. 星天牛幼虫龄期的划分[J]. *应用昆虫学报*, 2011, 48(3): 688–694.
- [11] 王小艺, 杨忠岐, 唐艳龙, 等. 栗山天牛幼虫龄数和龄期的测定[J]. *昆虫学报*, 2012, 55(5): 575–584.
- [12] 于永浩, 岑冠军, 韦德卫, 等. 基于 Crosby 生长法则的蔗根土天牛幼虫龄期划分[J]. *南方农业学报*, 2012, 43(10): 1485–1489.
- [13] 潘龙, 李珏闻, 骆有庆. 青杨脊虎天牛幼虫龄期的划分[J]. *东北林业大学学报*, 2015, 43(1): 110–113.

(责任编辑: 田 喆)

结线虫的防治及其根际定殖作用[J]. *应用生态学报*, 2016, 27(1): 250–254.

- [28] 贺字典, 宋士清, 高玉峰, 等. 棘孢木霉 *Trichoderma asperellum* 在土壤中定殖量的荧光定量 PCR 检测[J]. *植物保护学报*, 2016, 43(4): 552–558.
- [29] SINGH U B, MALVIYA D, WASIULLAH, et al. Bio-protective microbial agents from rhizosphere eco-systems trigger plant defense responses provide protection against sheath blight disease in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Microbiological Research*, 2016, 192: 300–312.
- [30] MALOLEPSZA U, NAWROCKA J, SZCZECHE M. *Trichoderma virens* 106 inoculation stimulates defence enzyme activities and enhances phenolic levels in tomato plants leading to lowered *Rhizoctonia solani* infection [J]. *Biocontrol Science and Technology*, 2017, 27(2): 180–199.
- [31] NENVATH B, PANDA P, SAXENA A, et al. Studies on induction of defense related enzymes against *Macrophomina phaseolina* in Pigeon pea by phylloplane *Trichoderma* spp. [J]. *Annual Plant Protection Science*, 2015, 23(2): 332–336.

(责任编辑: 田 喆)