

哈茨木霉对黄瓜尖孢镰刀菌的抑制作用 和抗性相关基因表达

刘爱荣^{1,2} 陈双臣¹ 陈 凯¹ 林晓民¹ 王凤华¹

(1. 河南科技大学林学院, 洛阳 471003; 2. 浙江大学农业与生物技术学院, 杭州 310029)

摘要: 采用室内筛选与田间防效相结合的方法, 对哈茨木霉抑制黄瓜尖孢镰刀菌的拮抗机制进行了研究。对峙培养结果显示, 木霉菌和病原菌间均形成了较明显的抑菌圈, 对病原菌的抑菌率达 66.7% ~ 85.8%, 其中菌株 TG、TM 对枯萎病菌抑制作用较强。木霉菌可有效提高根系对病原菌的抗性, 黄瓜植株接种枯萎病菌后, 根系细胞大量死亡, 而先接种木霉菌再接种病原菌后则减小了对根系的伤害。田间防效试验结果表明, TG 和 TM 孢子悬浮液浓度在 10^8 个/mL 时防效最好, 分别为 54.9% 和 49.4%。接种木霉菌植株根系抗性基因的表达量均高于对照植株, 呈双峰趋势。在第 6 天时抗性基因表达量最高, *WRKY6*、*MYB*、*PR-1*、*PAL*、*GST* 和 *GLU* 的表达量分别为对照的 5.15、5.22、6.07、6.00、3.16 和 16.15 倍。表明木霉菌通过激活与胁迫相关的基因表达提高了对病原菌的抗性。

关键词: 哈茨木霉; 拮抗作用; 黄瓜枯萎病; 基因表达

Antagonism effect of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum* on cucumber and related genes expression analysis

Liu Airong^{1,2} Chen Shuangchen¹ Chen Kai¹ Lin Xiaomin¹ Wang Fenghua¹

(1. Department of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan Province, China; 2. Department of Plant Protection, College of Agriculture and Biological Technology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, Zhejiang Province, China)

Abstract: The antagonism mechanisms between *Trichoderma harzianum* and cucumber *Fusarium* wilt were analyzed combined with indoor selection and field efficacy. There were distinctly inhibition effects to *Fusarium* spp. in all seven testing strains through the confrontation test, the inhibition rate range from 66.7% to 85.8%. TM and TG behaved best in all the tested strains. *Trichoderma harzianum* effectively enhanced root resistance to *Fusarium* wilt. A great deal of root cell died when infection by *F. oxysporum*. But the injury caused to roots decreased if pre-inoculated with *T. harzianum*. Field efficacy trials showed that the best induced effects were obtained when the concentration of spores suspension were 10^8 per milliliter. The best control effect of TG and TM were 54.9% and 49.4% respectively. The resisted gene expression levels inoculated with *T. harzianum* were higher than that of the control. It appeared two peak values in the second day and the sixth day in the process. The expression in the six day was higher than that in the second day. The expression levels of *WRKY6*, *MYB*, *PR-1*, *PAL*, *GST* and *GLU* were 5.15, 5.22, 6.07, 6.00, 3.16 and 16.15 times of the control respectively. It showed that *T. harzianum* possessed strong competition ability and invoked a range of related genes to enhance the resistance to pathogen.

Key words: *Trichoderma harzianum*; antagonism effect; cucumber *Fusarium* wilt disease; gene expression

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划(2006BAD07B04), 国家自然科学基金(30700002), 河南省教育厅自然科学基金(2008B210002, 2009B210004)

作者简介: 刘爱荣, 女, 1976 年生, 副教授, 研究方向为植物病害生物防治, email: evallyn@163.com; 收稿日期: 2009-10-14

木霉菌 *Trichoderma* spp. 属于半知菌类常见的土壤丝孢菌, 广泛存在于土壤、根围、叶围、种子和球茎等生态环境中, 且生长速度快、产孢量大、作用谱广^[1-2]、能在植株及土壤中增殖并形成有效群体等。据统计, 木霉至少在体外或体内对 18 个属 29 种病原真菌表现出拮抗作用^[3]。

土传病害是一类重要的植物病害, 主要以土壤为传播媒介, 从植物的根部侵染植株, 最后引起植株整株死亡。对土传病害的防治, 目前主要以化学防治为主。由于缺乏理想的高抗品种和有效的防治药剂, 且化学药剂对环境污染的问题日益突出, 生物防治越来越引起人们的关注^[4]。关于木霉对土传病害的生防作用已有一些研究, Chacón 等^[5]研究表明, 木霉的生防作用与植物的根系密切相关, 木霉通过定殖于根系外表皮, 形成无毒的植物-木霉共生体, 调节植物新陈代谢, 从而促进根系发育、提高作物产量以及对生物、非生物胁迫的抗性; Burmeister & Hau^[6]筛选防治豆类锈病的生防菌株哈茨木霉时, 发现 2 株木霉菌孢子悬浮液预处理菜豆叶片, 可有效减轻锈病的危害, 防效达 50%, 其中 1 株木霉的孢子悬浮液经高温灭菌后, 防效与灭菌前没有明显变化。但是针对木霉菌与枯萎病菌互作过程中蔬菜植株根系细胞活力及抗性相关基因表达还未见报道。

为此, 本试验选用 7 种哈茨木霉菌株 TA、TD、TG、TH、TI、TM、TX, 筛选了对黄瓜枯萎病菌具有高效生防活性的木霉菌株, 并分析了接种木霉对根系细胞活力及抗性相关基因表达的响应差异。

1 材料与方法

1.1 材料

黄瓜尖孢镰刀菌 CCF5 *Fusarium oxysporum* 由本课题组分离并保存。哈茨木霉菌菌株 TA、TD、TG、TH、TI、TM 及 TX, 由浙江大学徐同教授馈赠。供试黄瓜品种为津研 4 号。总 RNA 微提试剂盒, 购自 AxyGEN 生物科技公司; RNA 纯化试剂盒, 购自 Qiagen 公司; 反转录试剂盒, 购自 Fermentas 公司; iQ 多色实时定量 PCR 检测系统及 iQ SYBR Green 超混合液, 购自伯乐公司; 引物由上海生工合成。聚乙烯水培箱, 购自上海美成塑料有限公司。营养液配方采用日本园试配方自行配制, 配方为 945 mg/L Ca (NO₃)₂ · 4H₂O、809 mg/L KNO₃、153 mg/L NH₄H₂PO₄、493 mg/L MgSO₄ · 7H₂O、30 mg/L Fe-EDTA、2.86 mg/L H₃BO₃、2.13 mg/L MnSO₄ ·

4H₂O、0.22 mg/L ZnSO₄ · 7H₂O、0.08 mg/L CuSO₄ · 5H₂O、0.02 mg/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O。

1.2 木霉拮抗菌株的室内筛选

采用对峙培养法^[2]。木霉菌和病原菌于 28℃ 活化 3 天。挑取直径 5 mm 的尖孢镰刀菌菌块, 接种到新制 PDA 平板左侧, 再将木霉菌块接种到平板右侧。以只接种病原菌平板作对照, 每处理 3 次重复。28℃ 恒温培养 6 天, 每天记录病原菌落指向木霉菌半径以及对照病原菌菌落半径, 计算抑菌率。

抑菌率(%) = [(病原菌对照菌落半径 - 病原菌落指向木霉菌半径) / 病原菌对照菌落半径] × 100

拮抗系数的分级标准^[7]: I 级: 木霉菌丝占平皿的 100%; II 级: 木霉菌丝占平皿的 2/3 以上; III 级: 木霉菌丝占平皿的 1/3 ~ 2/3; IV 级: 木霉菌丝占平皿的 1/3 以下; V 级: 病原菌丝占平皿的 100%。

1.3 木霉菌对黄瓜枯萎病的田间防效测定

种子消毒后浸种催芽, 播于灭菌的湿润培养基中, 两叶一心时移入聚乙烯水培箱中, 水培箱体积为 12 L, 每个水培箱盛有 10 L 营养液, 每箱 6 株, 并用电气泵通气。营养液的 pH 和电导率分别为 6.5 和 1.2 ms/cm。在昼夜温度 28/18℃ 条件下培养, 相对湿度 80% ~ 90%。幼苗 3 ~ 4 片真叶时, 采用灌根法将 10 mL 木霉菌孢子悬浮液灌入根部, 水培箱中木霉菌孢子悬浮液的终浓度分别为 10⁸、10⁷ 和 10⁶ 个/mL, 3 天后灌根接种病原菌孢子悬浮液 10 mL, 水培箱中病原菌孢子的浓度为 10⁶ 个/mL, 以清水作对照。每处理重复 3 次, 每重复 6 株。枯萎病菌在 PDA 培养基上 28℃ 培养, 6 天后制备孢子悬浮液。9 天后调查发病情况, 统计病情指数。

病情分级: 0 级: 无病症; 1 级: 茎、叶轻微症状; 2 级: 植株轻度萎蔫, 茎出现坏死斑; 3 级: 植株中度萎蔫, 叶片下垂黄化; 4 级: 植株严重萎蔫, 倒伏枯死^[8]。发病后调查病情指数, 计算防治效果。

病情指数 = [∑ (各级病株数 × 各级代表值) / 调查总株数 × 最高级代表值] × 100

防治效果(%) = [(对照区病情指数 - 处理区病情指数) / 对照区病情指数] × 100

1.4 木霉菌对黄瓜植株根系细胞活力的影响

根系细胞活力测定参照 Ezaki 等^[9]的方法, 以 1.3 中方法进行水培, 接种木霉菌 TG 3 天后再接种枯萎病菌, 在接种枯萎病菌后当天和 3、6、9 天分别选取处理和对照的黄瓜幼苗根尖用 12.5 μg/mL 二

乙酸荧光素和 5 $\mu\text{g/mL}$ 碘化丙啶复合染料在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下染色 10 min, 无菌超纯 H_2O 洗涤 1 min, 将根置于载玻片上, 在 Leica TCS SP5 激光共聚焦扫描显微镜下镜检, 激发光 488 nm、透射光 515 nm。

1.5 抗性相关基因表达分析

幼苗 2~3 片真叶时, 用木霉菌 TG 孢子悬浮液 (10^8 个/mL) 灌根, 以清水作对照 (CK)。接种处理当天和 1、2、3、6、9 天后, 取根系样品迅速用液氮保存进行 RNA 提取和基因表达分析。总 RNA 用总 RNA 微提试剂盒提取, 以 RNA 纯化试剂盒进行纯

化。用反转录试剂盒合成 cDNA 的第一条链, 作为 RT-PCR 的模板。实时定量 PCR 在 iQ 多色实时定量 PCR 检测系统中进行。25 μL 反应体系中包含: iQ SYBR Green 超混合液 12.5 μL 、cDNA 1 μL 、上下游引物各 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 40 个循环。荧光数据在每个循环的退火末期采集。黄瓜中 *actin* 基因的荧光值作为计算的内标, 相对基因表达水平的计算参照 Livak & Schmittgen^[10] 的 $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ 法, 重复 3 次。用于扩增基因的特异引物序列见表 1。

表 1 实时定量 PCR 分析的基因和引物

Table 1 Genes and primers used in real-time PCR analysis

基因 Gene	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer
<i>WRKY6</i>	5'-GGAAATGGGATCTAGAGTTGC-3'	5'-TGGGATTGGGACTATTCTTCA-3'
<i>MYB</i>	5'-TACAGCTCCTGCTTCTGGTG-3'	5'-GGCACGTTTCCTTTGATACCT-3'
<i>PR-1</i>	5'-AACTCTGGCGGACCTTAC-3'	5'-GACTTCCTCCACACTACT-3'
<i>PAL</i>	5'-ACGGTTTGCCCTTCTAAT-3'	5'-CATCCTGGTTGTGTGGC-3'
<i>GST</i>	5'-TTTGAGGAGGTGAAGGTAA-3'	5'-ACGCACAAGAAATGTAGAT-3'
β -1,3-Glucanase (<i>GLU</i>)	5'-TTCCGACGGATCGTTAAGTTACC-3'	5'-CCACCCACTCTCTGATATCACG-3'

1.6 数据处理

应用 DPS v 7.05 软件进行数据分析, 采用 Duncan 氏法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 木霉菌对枯萎病原菌的抑制作用

对峙培养 2~3 天木霉菌即表现出对病原菌的抑制作用, 之后木霉菌继续扩展。被包围的病原菌边缘稍显塌陷, 长势减弱。木霉菌和病原菌之间形成了较明显的抑菌圈, 大部分木霉菌在与病原菌的对峙中形成了对抗生长局面, 第 6 天时与枯萎病菌形成了明显的抑菌圈。其中 TG 和 TM 菌株覆盖或侵入了枯萎病原菌 CCF5 菌落, 拮抗作用较强 (图 1)。

各菌株对黄瓜枯萎病菌的抑制作用存在差异, 当木霉菌接种 6 天时, 对病原菌的抑菌率在 66.7%~85.8% 之间。其中木霉菌 TG 对枯萎菌 CCF5 具有较强的抑制作用, 抑菌率为 85.8%, 拮抗系数为 I~II 级; TM 菌株的防效次之; TA、TD、TI、TH 和 TX 与病原菌呈对峙生长 (表 2)。

2.2 木霉菌对黄瓜枯萎病的田间防治效果

结果显示, TG 和 TM 孢子悬浮液浓度为 10^8 个/mL 时防效最好, 分别为 54.9% 和 49.4%, 病情指数分别为 23.5 和 29.6。随着孢子悬浮液浓度的降低,

其防病效果逐渐减弱, 病情指数逐渐增加 (表 3)。

2.3 木霉菌对黄瓜根系细胞活力的影响

采用 FDA-PI 染色法检测根系细胞活力的变化。FDA 染色后, 具有活力的细胞呈现绿色荧光; 当细胞死亡时, FDA 会从细胞中渗漏, 表现为荧光亮度减弱, 呈现红色。接种枯萎病菌的黄瓜植株根系, 黄瓜根尖中的荧光亮度随处理时间的延长呈下降趋势, 荧光从绿色逐渐变为红色, 表明根系细胞大量死亡。而先接种木霉菌 TG 再接种病原菌的植株, 根系细胞活力的凋亡则明显较轻, 表明木霉菌可提高根系对枯萎病菌的抗性 (图 2)。

2.4 木霉菌对黄瓜根系抗性基因表达的影响

取接种木霉菌当天和 1、2、3、6、9 天的黄瓜根系分析抗性基因表达。接种木霉菌植株根系基因的表达量均高于对照植株。接种木霉菌 1 天即引起了 β -1,3-葡聚糖酶基因 *GLU* 的表达, 2 天引起了参与植物抗病防御转录因子 (*WRKY6*、*MYB*)、抗病防御蛋白 (*PR-1*、*PAL*)、解毒酶 (*GST*) 等一系列基因的表达。处理第 3 天, 这一系列基因的表达量显著下降, 但到第 6 天时, 表达量又出现了一个峰值, 并且第 6 天的表达量高于第 2 天。*WRKY6*、*MYB*、*PR-1*、*PAL*、*GST* 和 *GLU* 的表达量分别为对照的 5.15、5.22、6.07、6.00、3.16 和 16.15 倍 (图 3)。

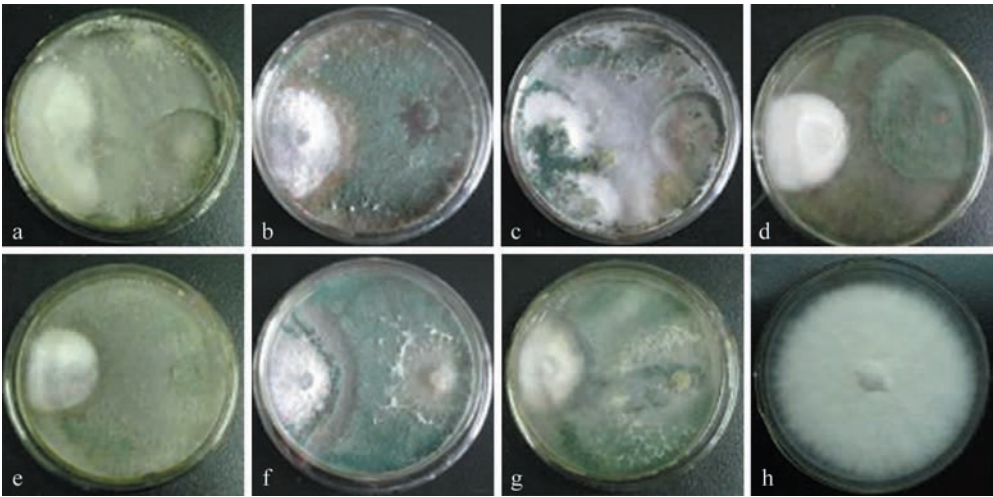


图 1 木霉菌与枯萎病原菌 CCF5 的对峙培养

Fig.1 Confronting incubation of *Trichoderma harzianum* on cucumber *Fusarium* wilt

注: a 为 TA 菌株;b 为 TD 菌株;c 为 TG 菌株;d 为 TH 菌株;e 为 TI 菌株;f 为 TM 菌株;g 为 TX 菌株;h 为对照。Note: a. TA strain; b. TD strain; c. TG strain; d. TH strain; e. TI strain; f. TM strain; g. TX strain; h. CK.

表 2 木霉菌对枯萎病菌的抑菌效果

Table 2 Inhibition effect of *Trichoderma harzianum* against cucumber *Fusarium* wilt

菌株 Strain	抑菌率(%) Inhibition rate	拮抗系数 Antagonism coefficient	菌株 Strain	抑菌率(%) Inhibition rate	拮抗系数 Antagonism coefficient
TA	75.8 b	II ~ III	TX	75.7 b	II ~ III
TG	85.8 a	I ~ II	TD	75.1 b	II ~ III
TI	66.7 c	III	TH	76.5 b	II ~ III
TM	79.1 ab	II ~ III			

注:数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差测验在 $P_{0.05}$ 水平上差异显著。Note: Data followed by different letters show significant difference at $P_{0.05}$ by Duncan's multiple range test.

表 3 木霉菌对黄瓜枯萎病菌的田间防治效果

Table 3 Field efficacy trials of *Trichoderma harzianum* against cucumber *Fusarium* wilt

菌株 Strain	孢子浓度(个/mL) Spore concentration	病情指数 Disease index	防效(%) Control effect	菌株 Strain	孢子浓度(个/mL) Spore concentration	病情指数 Disease index	防效(%) Control effect
TG	10^8	23.5 d	54.9 a	TM	10^8	29.6 d	49.4 a
	10^7	35.8 c	40.5 b		10^7	42.5 c	40.6 b
	10^6	45.9 b	19.9 c		10^6	51.5 b	17.3 c
	H ₂ O	67.2 a	—		H ₂ O	68.5 a	—

注:数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差测验在 $P_{0.05}$ 水平上差异显著。Note: Data followed by different letters show significant difference at $P_{0.05}$ by Duncan's multiple range test.

3 讨论

土传病害被认为是作物产生连作障碍的主要原因,它能显著抑制植株生长并最终降低作物的产量和品质^[11-12]。木霉是一种防治作物土传病害的生防菌,它可通过重寄生、抗生溶菌作用、竞争作用、诱

导抗性^[8, 13]及促进植物生长等机制抑制真菌病害。本试验研究了 7 种哈茨木霉对土传病害病原菌黄瓜尖孢镰刀菌的拮抗作用,并筛选得到较理想的拮抗木霉菌株 TG 和 TM。

Ulker & Somssich^[14] 和 Roldan Serrano 等^[15] 研究表明,病原菌侵染和外源物质刺激能诱导植物

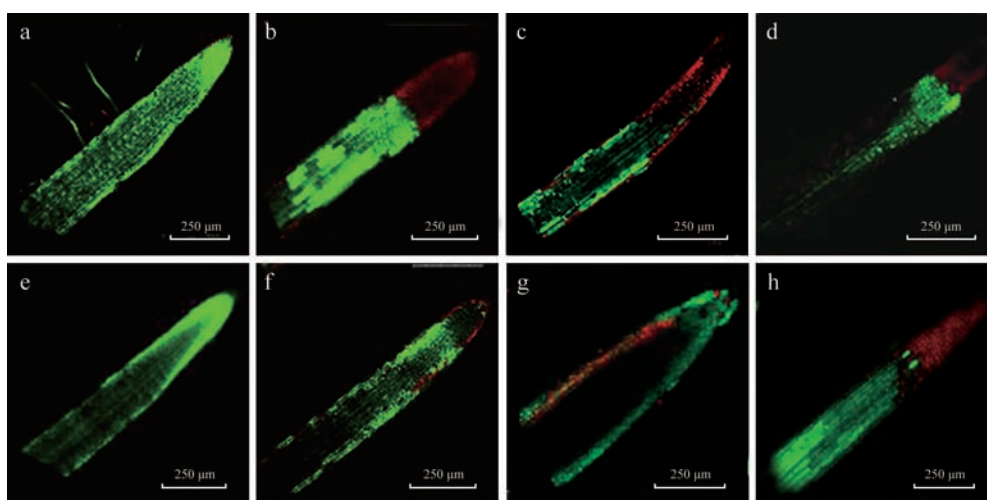


图2 木霉菌对黄瓜植株根系细胞生活力的影响

Fig. 2 Effect of root cell viability infection by *Fusarium oxysporum* inoculation with *Trichoderma harzianum*

注: a~d 为只接种枯萎病菌对照: a. 当天; b. 3 天; c. 6 天; d. 9 天。e~h 为先接种木霉菌后接种枯萎病菌: e. 当天; f. 3 天; g. 6 天; h. 9 天。Note: a~d. Control: a. the day after inoculation; b. 3 d; c. 6 d; d. 9 d. e~h were inoculated with *Trichoderma harzianum*; e. the day after inoculation; f. 3 d; g. 6 d; h. 9 d.

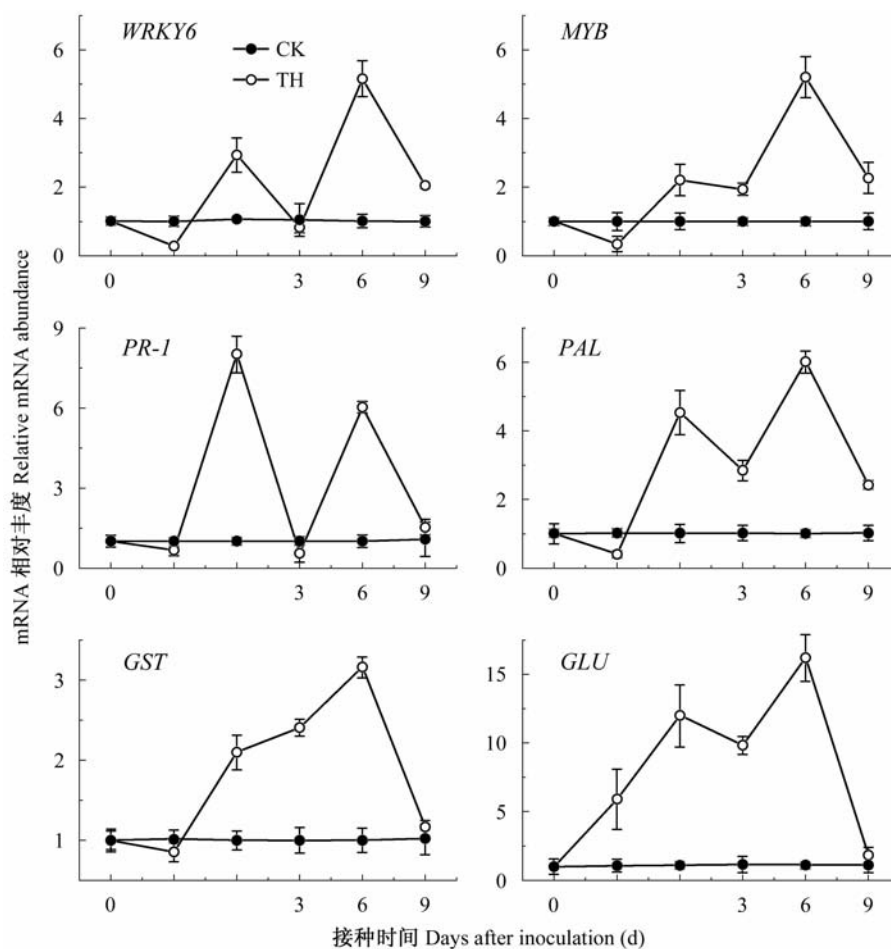


图3 木霉菌对黄瓜根系中抗性基因转录水平的影响

Fig. 3 The effect of *Fusarium oxysporum* inoculation with *Trichoderma harzianum* on gene expression in cucumber roots

WRKY、*PR*、*PAL* 等抗性相关基因的表达。Roldan Serrano 等^[15]和 Shores 等^[16]在柠檬、烟草、黄瓜和向日葵中研究表明,*PR-1*、*PAL* 等基因的表达量与植物抗性提高密切相关。关于木霉诱导植物抗病性的分子机制也有一些研究报道,Alfano 等^[4]对钩状木霉 *T. hamatum* 提高番茄感染黄单孢杆菌的能力进行了研究,发现钩状木霉 382 可通过激活与新陈代谢相关的基因表达诱导植物抗病防御系统的变化。Chacón 等^[5]对木霉在番茄根系定殖后引起的基因转录谱分析表明,木霉与根系的互作引起了氧化还原反应、类脂物代谢、糖类或氨基酸的运输、解毒作用相关的基因表达上调。本试验中,黄瓜植株在接种木霉后的 1~2 天内引起一系列抗性相关基因和转录因子的表达,包括 *WRKY6*、*MYB*、*PR-1*、*PAL*、*GLU*、*GST* 等,并能持续较长时间,表明木霉通过激活与胁迫相关的基因表达提高了植株对病原菌的抗性。值得注意的是, β -1, 3-葡聚糖酶 *GLU* 的表达提高了 16.15 倍。黄瓜根系细胞活力检测结果表明,木霉与根系的互作可有效地提高根系对枯萎病菌的抗性。鉴于木霉的生防效果与植物根系关系密切,根系细胞活力可作为筛选木霉生防菌株的参考指标。

目前木霉菌在实验室、温室控制条件下或田间小型试验中已获得较好的防治效果,但与大田推广还有较大的差距。田间环境条件复杂,如土壤物理化学因素、土壤微生物、植物根系和气象因素等^[17]。本试验结果为开发哈茨木霉菌株 TG 和 TM 为生防剂提供了依据,但有关 TG 和 TM 防治田间黄瓜枯萎病菌的施用方法、次数和剂量等还有待进一步探讨。

参 考 文 献 (References)

- [1] Yang L M, Yang Q, Liu P G, et al. Expression of the HSP24 gene from *Trichoderma harzianum* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Thermal Biology*, 2008, 33(1): 1-6
- [2] 刘限,高增贵,庄敬华,等. 木霉菌转化体对番茄灰霉病的防治效果. *植物保护学报*, 2006, 33(4): 445-446
- [3] Distefano G, Malfa S, la Vitale A, et al. Defence-related gene expression in transgenic lemon plants producing an antimicrobial *Trichoderma harzianum* endochitinase during fungal infection. *Transgenic Research*, 2008, 17(5): 873-879
- [4] Alfano G, Lvey M L L, Cakir C, et al. Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum*. *Phytopathology*, 2007, 97(4): 429-437
- [5] Chacón M R, Rodríguez-Galán O, Benítez T, et al. Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *International Microbiology*, 2007, 10(1): 19-27
- [6] 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. *BioControl*, 2009, 54(4): 575-585
- [7] Bell D K, Wells H D, Markham C R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 1982, 72(4): 379-382
- [8] 高智谋,曹君,潘月敏,等. 哈茨木霉 TH-1 对棉花枯萎病菌和黄萎病菌的拮抗机制研究. *棉花学报*, 2007, 19(3): 168-172
- [9] Ezaki B, Gardner R C, Ezaki Y, et al. Expression of aluminum-induced genes in transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. *Plant Physiology*, 2000, 122(3): 657-665
- [10] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [11] Gremel G, Dorrer M, Schmoll M. Sulphur metabolism and cellulose gene expression are connected processes in the filamentous fungus *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*). *BMC Microbiology*, 2008, 8(1): 174-192
- [12] Sivan A, Chet I. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. *Phytopathology*, 1989, 79(2): 198-203
- [13] Lievens B, Claes L, Vakalounakis D J, et al. A robust identification and detection assay to discriminate the cucumber pathogens *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and f. sp. *radicis-cucumerinum*. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(9): 2145-2161
- [14] Ulker B, Somssich I E. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function (Special issue: Cell signaling and gene regulation). *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, 7(5): 491-498
- [15] Roldan Serrano A, Luna del Castillo J, Jorin Novo J, et al. Chitinase and peroxidase activities in sunflower hypocotyls: effects of BTH and inoculation with *Plasmopara halstedii*. *Biologia Plantarum*, 2007, 51(1): 149-152
- [16] Shores M, Yedidia I, Chet I. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology*, 2005, 95(1): 76-84
- [17] 张广志,文成敬. 木霉对玉米纹枯病的生物防治. *植物保护学报*, 2005, 32(4): 353-356