

哈茨木霉诱导番茄叶片光合生理变化的研究

陈双臣¹, 姬德刚², 李 聪¹, 刘爱荣^{1,*}, 王洪涛², 林晓民¹

(¹河南科技大学林学院, 河南洛阳 471003; ²山东省枣庄市农业高新技术示范园区, 山东枣庄 277300)

摘 要: 采用室内对峙培养筛选与田间防效比较相结合的方法, 对哈茨木霉抑制番茄叶霉病菌的机制进行了研究。对峙培养结果显示, 5 个木霉菌菌株均覆盖或侵入了病原菌菌落, 其中菌株 TH16 和 TH54 对病菌的抑制作用较强。田间防效试验表明, 木霉菌 TH16 和 TH54 孢子悬浮液浓度在 10^8 个 \cdot mL⁻¹ 时防效最好, 分别为 69.4% 和 60.0%。接种木霉后, 番茄植株的净光合速率 (P_n)、胞间 CO₂ 浓度 (C_i)、气孔导度 (G_s)、CO₂ 光饱和同化速率 (A_{sat})、Rubisco 最大羧化 (V_{cmax})、RuBP 最大再生速率 (J_{max}) 及 Rubisco、FBPase 活性均明显增加。而接种叶霉病菌导致光合速率下降的同时伴随着 V_{cmax} 和 J_{max} 的下降。预接种木霉菌能将叶霉病菌导致的 P_n 、 A_{sat} 、 V_{cmax} 、 J_{max} 抑制消除并恢复到对照水平。接种木霉能显著增加光合相关基因的表达量, *FBPase*、*FBPA*、*SBPase* 和 *TPI* 分别较对照增加了 6.53 倍、3.51 倍、5.17 倍和 7.81 倍。研究结果表明木霉菌通过激活与光合相关酶活性及基因表达缓解了叶霉菌对番茄光合生理的抑制作用。

关键词: 番茄; 哈茨木霉; 拮抗作用; 番茄叶霉病; 光合特性

中图分类号: S 641.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 03-0489-09

Effects of *Trichoderma harzianum* on Photosynthetic Characteristics in Tomato Leaves Infected with *Fulvia fulva*

CHEN Shuang-chen¹, JI De-gang², LI Cong¹, LIU Ai-rong^{1,*}, WANG Hong-tao², and LIN Xiao-min¹

(¹Department of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China; ²Zaozhuang Agricultural Demonstration Garden, Zaozhuang, Shandong 277300, China)

Abstract: The mechanisms of antagonism between *Trichoderma harzianum* and *Fulvia fulva* in tomato leaves were analyzed using combined indoor screening and field efficacy trial. All five testing strains had distinct inhibitory effects to tomato leaf mould disease by the antagonistic experiments. The inhibitory effects of strains TH16 and TH54 were the strongest in all the tested strains. Field efficacy trial results showed that the optimal concentration of spores suspension were 10^8 per milliliter. The control effects of TH16 and TH54 were 69.4% and 60.0% respectively. Net photosynthetic rate, intercellular CO₂ concentration, stomatal conductance, light saturated rate of the CO₂ assimilation (A_{sat}), maximum carboxylation rates (V_{cmax}) and maximum RuBP regeneration rate (J_{max}) were increased significantly after the inoculation of tomato leaves with *T. harzianum*. Activities of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase Rubisco and stromal fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) and genes expression levels encoded Calvin cycle enzymes increased in tomato plants inoculated with *T. harzianum* TH16.

收稿日期: 2013 - 11 - 05; **修回日期:** 2013 - 12 - 27

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2011BAD12B03); 国家自然科学基金项目 (31101536); 山东省科技攻关计划项目 (2012GNC011111); 河南省青年骨干教师计划项目 (2011GGJS-075, 2012GGJS-078); 国家留学基金项目 (2011841011, 2011841012)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: evallyn@163.com)

However, leaf mould disease infection resulted in lower net photosynthetic rate, V_{cmax} and J_{max} value. Meanwhile, the inhibition of P_n , A_{sat} , V_{cmax} and J_{max} could be recovered in the plants infected with leaf mould disease if pre-inoculated with *T. harzianum*. The expression levels of the genes encoded Calvin cycle key enzymes could be induced in the plants inoculated with *T. harzianum*. The expression levels of *FBPase*, *FBPA*, *SBPase* and *TPI* were increased 6.53, 3.51, 5.17 and 7.81 times of the control respectively. The results showed that *T. harzianum* invoked a range of related enzymes and genes to facilitate photosynthetic metabolism against leaf mould disease.

Key words: tomato; *Trichoderma harzianum*; antagonistic effect; tomato leaf mould disease; photosynthetic characteristics

木霉 (*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, 能在植株及土壤中增殖并形成有效群体 (Verma et al., 2007; Vinale et al., 2008; Bae et al., 2011)。据统计, 木霉至少在植物体外或体内对 18 个属 29 种病原真菌表现出拮抗作用 (Reino et al., 2008)。

番茄叶霉病菌 [*Fulvia fulva* (Cooke) Cifferri.] 属于半知菌亚门枝孢属真菌, 是一种在保护地严重危害的真菌病害 (姚彬 等, 2009)。叶霉病菌由于生理小种多、致病性分化变异快的特点, 使用抗病品种很快就会导致叶霉病菌的分化, 抗病育种难度较大。目前对番茄叶霉病的防治仍以化学药剂为主, 但过多使用化学杀菌剂会危及人类身体健康, 破坏生态环境, 目前利用有益微生物来防治番茄叶霉病越来越引起人们的关注 (姜云 等, 2007)。

关于木霉对设施内番茄叶霉病的生防作用已有一些研究。Elad (1997) 的研究表明, 木霉可有效防治温室番茄叶霉病的发生。郭敏等 (2008) 研究了拟康氏木霉对叶霉病的拮抗作用, 对峙培养 5 d 时, 拟康氏木霉对番茄叶霉病菌的抑制率为 86%, 拮抗机制主要为竞争和拮抗作用。姚彬等 (2009) 的研究表明, 哈茨木霉可通过重寄生作用对番茄叶霉病菌产生抑制作用, 病菌菌丝间有少量哈茨木霉孢子, 并伴有孢子萌发, 哈茨木霉菌丝以紧贴生长和缠绕生长方式重寄生于番茄叶霉病菌菌丝。

真菌病害可导致所侵染的寄主植物的光合机构、光捕获系统和碳同化相关酶受到损害 (Mandal et al., 2009)。研究表明, 尖孢镰刀菌通过降低番茄叶片的 CO_2 光饱和同化速率 (A_{sat})、Rubisco 最大羧化 (V_{cmax})、最大光化学量子效率 F_v/F_m 以及叶面积从而降低光合生产率 (Nogués et al., 2002)。黄萎病可导致拟南芥叶绿素含量降低 71%, 而 Rubisco 蛋白在发病叶片中几乎检测不到 (Veronese et al., 2003)。霜霉病可导致黄瓜叶绿素含量和光合速率的显著降低, 从而降低生物量的积累和作物产量 (Lindenthal et al., 2005)。但针对木霉菌与叶霉病菌互作过程中番茄植株光合气体交换参数、Calvin 循环相关酶活性及基因的变化, 还未见报道。

本试验中选用 5 个哈茨木霉菌株, 筛选了对番茄叶霉病菌具有高效拮抗活性的木霉菌株, 并分析了接种木霉对叶片光合气体交换、光合相关酶活性及表达的响应差异。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于 2012 年 9 月—2013 年 4 月在河南科技大学蔬菜学实验室完成。番茄叶霉病菌 (*F. fulva*) 菌株 F5 由本课题组分离并保存。哈茨木霉菌 (*T. harzianum*) 菌株 TH4、TH9、TH16、TH46 及 TH54 由浙江大学徐同教授馈赠。供试番茄品种为‘一串红’。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。

1.2 木霉拮抗菌株的室内筛选

采用对峙培养法(刘爱荣等, 2012)。木霉菌和叶霉病病原菌于 28 °C 活化 3 d。挑取直径 5 mm 的叶霉病菌菌块, 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阴性对照, 以平板内添加 70% 甲基托布津粉剂 800 倍液处理为阳性对照, 每处理 3 次重复。28 °C 恒温培养 6 d。

1.3 木霉菌对番茄叶霉病的田间防效测定

番茄种子消毒后浸种催芽, 播种于灭菌的湿润培养基中, 幼苗两叶一心时移入营养钵中(草炭:蛭石 = 3:1)。幼苗 8~10 片真叶时, 挑选长势基本相同的番茄幼苗, 分为 8 组。其中 6 组用喷雾法将室内筛选出的对叶霉病菌拮抗作用较强的木霉菌株 TH16 和 TH54 的孢子悬浮液接种到叶片上, 孢子浓度分别为 2.75×10^9 、 2.75×10^8 和 2.75×10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$; 1 组喷清水(对照); 1 组喷 70% 甲基托布津可湿性粉剂 800 倍液。每天接种 1 次, 连续喷 3 d, 3 d 后各处理均接种叶霉病病原菌孢子悬浮液 (10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$), 接种后保持昼夜温度 28 °C/18 °C、湿度 95% 以上。每处理重复 3 次, 每重复 20 株。病原菌接种当天为试验 0 d, 4 d 后喷清水的对照组发病, 调查发病情况, 统计病情指数, 测定光合气体交换参数。叶片病情分级标准参照孟凡娟等(2006)的文献: 病情指数 = $[\Sigma(\text{各级病株数} \times \text{各级代表值}) / (\text{调查总株数} \times \text{最高级代表值})] \times 100$; 防治效果 (%) = $[(\text{对照区病情指数} - \text{处理区病情指数}) / \text{对照区病情指数}] \times 100$ 。同时取 8~10 片真叶长势一致的幼苗, 设 4 个处理: ①接种木霉菌 TH16 孢子悬浮液 (2.75×10^8 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$), 连续接种 3 d; ②接种叶霉病病原菌 F5 孢子悬浮液 (10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$), 连续接种 3 d; ③先接种木霉菌 TH16, 3 d 后再接种叶霉病病原菌 F5; ④以喷清水为对照。每处理重复 3 次, 每重复 10 株。接种病原菌 5 d 时取不同处理植株的叶片, 测定光合酶活性及基因表达。

1.4 光合气体交换参数测定

接种叶霉病病原菌 4 d 时用 LI-6400 型光合仪测定净光合速率 (P_n)、气孔导度 (G_s)、胞间 CO_2 浓度 (C_i) 等光合数值。光合作用 CO_2 响应曲线 (A/C_i) 根据 von Caemmerer 和 Farquhar (1981) 的方法测定。然后使用 Ethier 和 Livingston (2004) 的方法计算 V_{cmax} , A_{sat} 在光呼吸 (21% O_2) 和非光呼吸 (2% O_2) 条件下测定。

1.5 Rubisco 与 FBPase 活性的测定

接种叶霉病病原菌 5 d 时取新鲜叶片 0.5 g, 加液氮迅速研磨成粉末, 再加入提取缓冲液磨成匀浆。提取液成分: 50 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.5)、1 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ EDTA、1 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 、体积分数 12.5% 甘油、10% PVP 和 10 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ β -巯基乙醇。15 000 $\times g$ 离心 15 min, 上清液即为 Rubisco 粗提液, 整个过程在 0~4 °C 下进行。Rubisco 活性参照 Lilley 和 Walker (1974) 的方法。在 25 °C 下将 3-PGA 合成和 NADH 氧化反应耦联, 通过分光光度法进行测定。粗提液加入 0.1 mL 活化液后测定 Rubisco 总活力, 活化液包含 33 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.5)、0.67 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ EDTA、33 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 和 10 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ NaHCO_3 。FBPase 活性通过 A_{340} 条件下吸光度的增加来测定 (Scheibe et al., 1986)。

1.6 光合相关基因表达分析

接种叶霉病病原菌 5 d 时, 取 0.2 g 新鲜叶片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 12.5 μL 、cDNA 1 μL 、上下游引物各 0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。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。番茄中 *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 和 Schmittgen (2001) 的 $2^{-\Delta\Delta\text{C(T)}}$ 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	GenBank 登录号 GenBank accession No.	正向引物序列 (5'-3') Sequence of forward primer	反向引物序列 (5'-3') Sequence of reverse primer
<i>FBPase</i>	XM_004246317.1	CAAGTGGAAGGACTGGGATT	CACAGCAGCATCAATGTTTG
<i>FBPA</i>	AF332957.1	AGAGTACCTCAAGGCATGG	GAAGCTCCGACGTACTTTCC
<i>SBPase</i>	NM_001247656.1	GAAGTGGCACCGTTAGGATT	GCCTTAAGCCTTGATGAACC
<i>TPI</i>	XM_004236698.1	AGCTTATGAGCCTGTTTGGG	ATTTGCTTGAAGCCATTTC
<i>actin</i>	U60478.1	TACAATGAGCTCCGAGTTGC	CCATCACCAGAATCAAGCAC

1.7 数据处理

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

2 结果与分析

2.1 木霉菌对叶霉病原菌的抑制作用

对峙培养 2~3 d 的木霉菌, 即表现出对叶霉病原菌的抑制作用, 之后木霉菌继续扩展。被包围的叶霉病原菌边缘稍显塌陷, 长势减弱。木霉菌在与病原菌的对峙中均形成了对抗生长局面, 其中 TH16 (图 1, c) 和 TH54 (图 1, e) 菌株培养 6 d 时覆盖了叶霉病原菌菌落, 拮抗作用较强 (图 1)。甲基托布津限制了叶霉病菌的生长, 但随时间的延长, 叶霉菌落扩展明显 (图 1)。

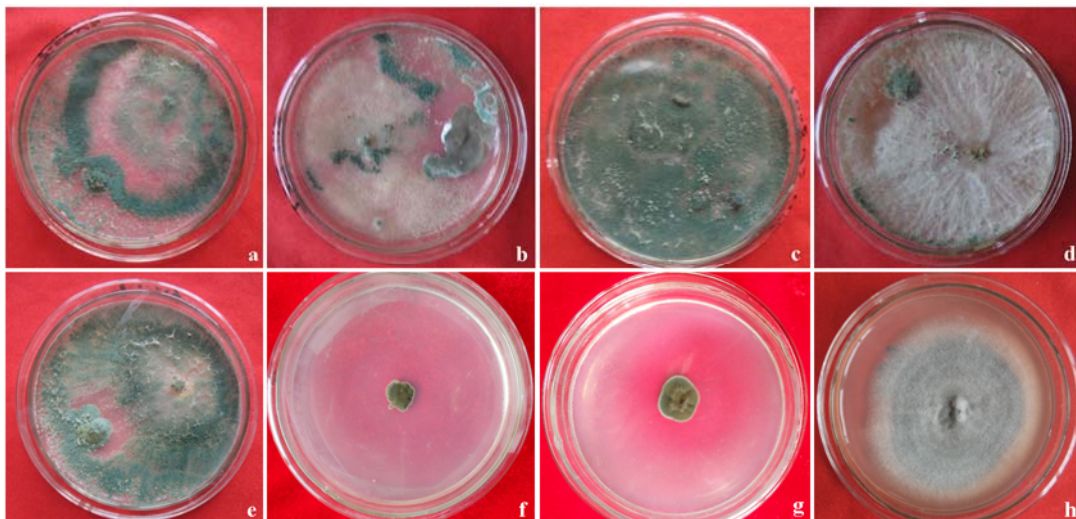


图 1 木霉菌 TH4、TH9、TH16、TH46 和 TH54 与叶霉病原菌 F5 的对峙培养

a: TH4, 6 d; b: TH9, 6 d; c: TH16, 6 d; d: TH46, 6 d; e: TH54, 6 d; f: 阳性对照, 3 d; g: 阳性对照, 6 d; h: 阴性对照, 6 d。

Fig. 1 Confronting incubation of *Trichoderma harzianum* (TH4, TH9, TH16, TH46, TH54) and *Fulvia fulva*

a: TH4, 6 d; b: TH9, 6 d; c: TH16, 6 d; d: TH46, 6 d; e: TH54, 6 d;

f: Positive control, 3 d; g: Positive control, 6 d; h: Negative control, 6 d.

2.2 木霉菌对番茄叶霉病的田间防治效果

田间防效结果表明, 室内筛选出的两个菌株 TH16 和 TH54, 其孢子悬浮液浓度为 10^8 个 \cdot mL⁻¹ 时田间防效最好, 分别为 69.4% 和 60.0%, 病情指数分别为 21.7 和 29.7, 优于常用化学药剂甲基托布津。随着哈茨木霉孢子悬浮液浓度的降低, 其病情指数逐渐增加, 防病效果逐渐减弱 (表 2)。

表 2 木霉菌对番茄叶霉病菌的田间防治效果

Table 2 Field efficacy trials of *Trichoderma harzianum* against tomato *Fulvia fulva*

菌株 Strain	孢子浓度 (个 \cdot mL ⁻¹) Spore concentration	病情指数 Disease index	防效/% Control effect
TH16	2.75×10^9	32.9 c	55.7 b
	2.75×10^8	22.7 d	69.4 a
	2.75×10^7	43.2 b	41.8 d
TH54	2.75×10^9	35.5 c	52.2 c
	2.75×10^8	29.7 c	60.0 b
	2.75×10^7	45.3 b	38.9 d
H ₂ O (对照 Control)		74.2 a	-
70% 甲基托布津 70% thiophanate-methyl		31.4 c	57.7 b

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.

2.3 木霉菌对番茄叶片光合参数的影响

如图 2 所示, 接种木霉 TH16 后, 与只喷清水对照相比, 番茄植株的净光合速率 (P_n)、胞间

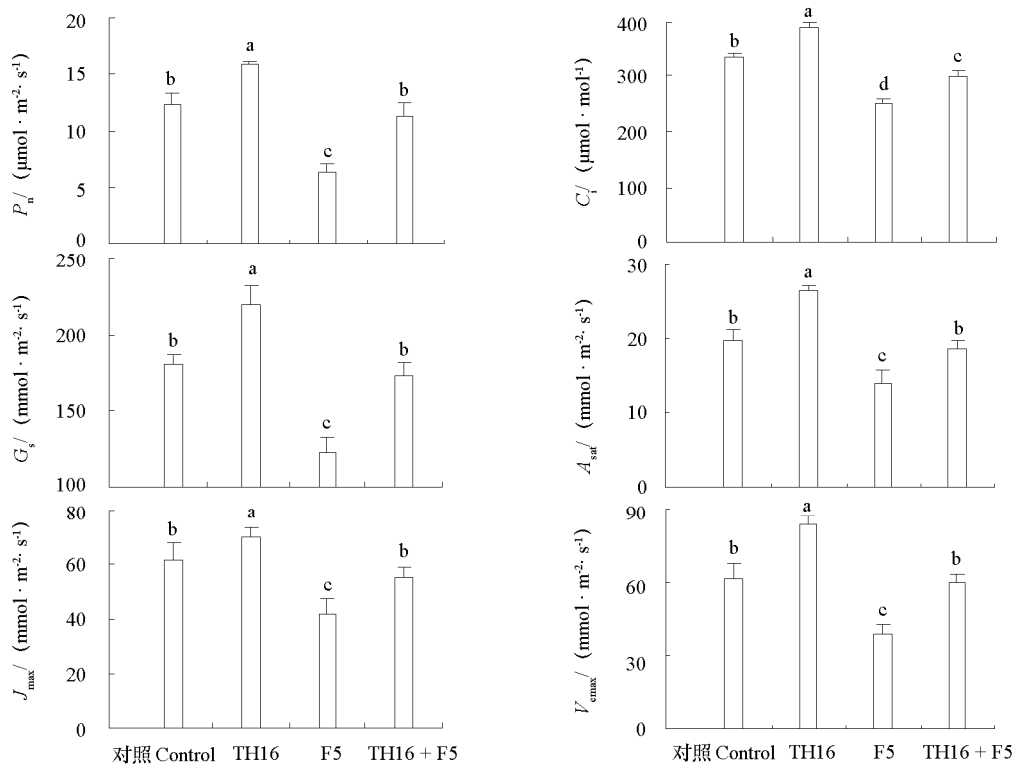


图 2 木霉菌 (TH16) 对接种叶霉病菌 (F5) 后番茄叶片光合参数的影响

Fig. 2 Effects of *Trichoderma harzianum* (TH16) on photosynthesis parameter in tomato leaves infected by *Fulvia fulva* (F5)

CO₂ 浓度 (C_i)、气孔导度 (G_s)、CO₂ 光饱和同化速率 (A_{sat}) 均明显增加, 分别较对照增加 28.52%、15.70%、21.84% 和 34.80%。接种叶霉病菌 F5 后导致了番茄 P_n 、 C_i 、 G_s 和 A_{sat} 的明显下降。先接种木霉再接种叶霉病菌 F5 (TH16 + F5), 可减少叶霉对光合参数的抑制作用。

通过分析 A/C_i 曲线计算了 Rubisco 最大羧化 (V_{cmax}) 和 RuBP 最大再生速率 (J_{max}), 表明接种木霉 TH16 引起番茄叶片 V_{cmax} 、 J_{max} 显著增加, 而接种叶霉病菌 F5 导致光合能力下降的同时伴随着 V_{cmax} 和 J_{max} 的下降, 分别较对照下降了 37.27% 和 31.36%, 在接种病原菌之前预接种木霉菌 (TH16 + F5) 即能将 V_{cmax} 和 J_{max} 恢复到对照水平。

2.4 木霉菌对番茄叶片 Rubisco 及 FBPase 活性的影响

如图 3 所示, 接种木霉 TH16 后, Rubisco 总活力与初始活力较清水对照均显著增加。相反, 接种叶霉病菌 F5 后抑制了 Rubisco 酶活性, 与对照相比, Rubisco 酶总活力与初始活力分别下降了 38.11% 和 27.17%。先接种木霉再接种叶霉 (TH16 + F5), 能减弱或消除叶霉对 Rubisco 酶活性的抑制。同样接种木霉 TH16 也对卡尔文循环中的 FBPase 酶活性产生了影响, 接种叶霉病菌 F5 抑制了 FBPase 酶活性, 先接种木霉再接种叶霉 (TH16 + F5), 同样能消除叶霉 F5 对 FBPase 酶活性的抑制, FBPase 酶总活力与初始活力较只接种叶霉 F5 分别增加了 1.15 倍、1.11 倍。

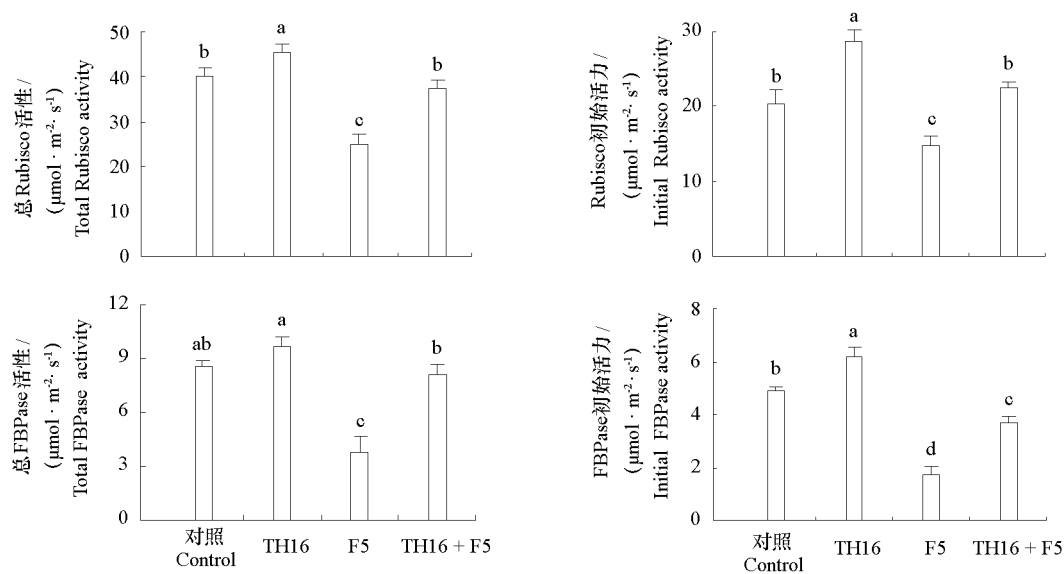


图 3 木霉菌 (TH16) 对接种叶霉病菌 (F5) 的番茄叶片 Rubisco 和 FBPase 活性的影响
Fig. 3 Effects of *Trichoderma harzianum* (TH16) on the activities of Rubisco and FBPase in tomato leaves inoculated by *Fulvia fulva* (F5)

2.5 木霉菌对番茄叶片 Calvin 循环基因表达的影响

为了进一步研究木霉调控接种叶霉病菌后 J_{max} 的机理, 测定了木霉对参与 RuBP 再生的 4 个基因表达的影响。

如图 4 所示, 接种木霉 TH16 后, 4 个基因的表达量均较清水对照显著增加。相反, 接种叶霉病菌 F5 后 $FBPase$ 、 $FBPA$ 、 $SBPase$ 和 TPI 的表达量分别较对照降低 67.79%、63.30%、62.06% 和 79.65%。先接种木霉再接种叶霉 (TH16 + F5), 能抵消叶霉病菌所导致的 Calvin 循环基因表达量

降低, 而且 *FBPase*、*FBPA*、*SBPase* 和 *TPI* 分别较只接种叶霉 F5 增加了 6.53 倍、3.51 倍、5.17 倍和 7.81 倍。

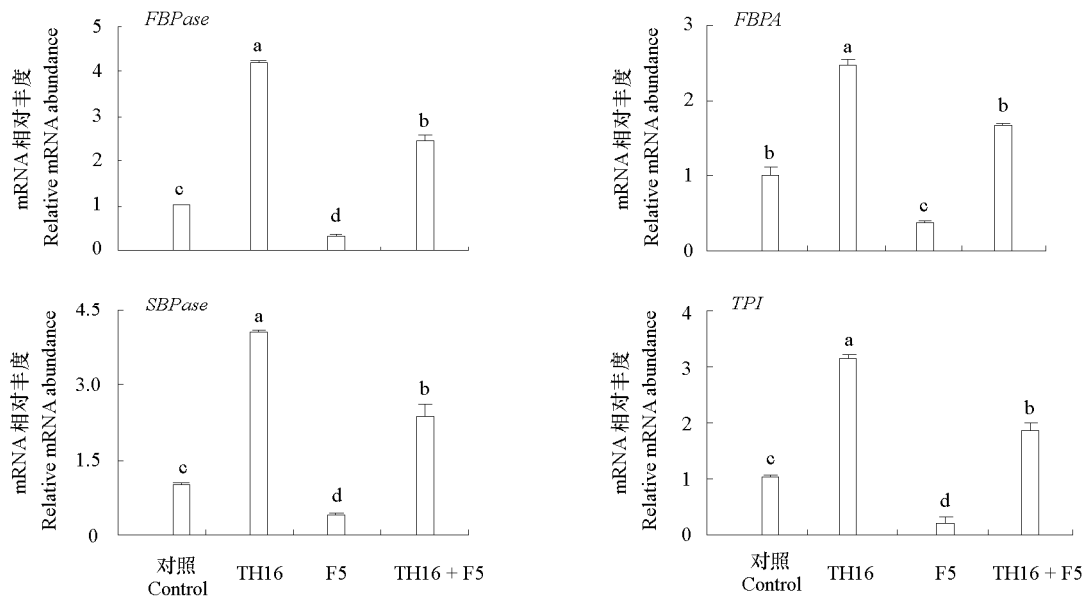


图 4 木霉菌 (TH16) 对接种叶霉菌 (F5) 的番茄叶片 Calvin 循环基因转录水平的影响
Fig. 4 Effects of *Trichoderma harzianum* (TH16) on gene expression in tomato leaves inoculated by *Fulvia fulva* (F5)

3 讨论

番茄叶霉病是叶部病害, 叶部病害的发生会对植物的光合作用产生抑制作用 (Robert et al., 2005; Gruber et al., 2012)。木霉可通过重寄生、抗生溶菌作用、竞争作用、诱导抗性及其促进植物生长等机制抑制真菌病害 (Lievens et al., 2007; Bae et al., 2011)。本试验中研究了 5 个哈茨木霉菌株对叶霉病菌的拮抗作用, 并筛选得到较理想的拮抗木霉菌株 TH16 和 TH54, 研究结果表明哈茨木霉可有效减轻叶霉病菌对番茄光合生理的抑制作用。

已有研究表明, 叶部病害主要通过降低光合叶面积, 削弱植物同化作用和养分吸收以及破坏光合元件间的电子传递, 降低光合相关蛋白的表达从而影响植物光合能力 (Dallagnola et al., 2013)。真菌病害还可以通过改变叶绿体结构, 降低叶绿体含量和光合相关的酶活性从而抑制光合能力 (Ou, 1985; Dallagnola et al., 2013)。小麦赤霉病的发生程度与光合效率高度相关 (Bauriegel et al., 2011)。Gruber 等 (2012) 的研究表明, 酸樱桃叶斑病导致净光合速率显著降低, 通过分析 2007—2009 年间叶斑病害的发生程度, 发现叶斑病对光合生理的破坏作用与 G_s 、 V_{cmax} 、 J_{max} 状态的失衡有关。木霉可通过调节逆境下的氧化还原信号状态及相关途径的基因表达, 从而提高植物光合效率 (Mastouri et al., 2010)。

本试验中, 番茄植株在接种叶霉病菌后, P_n 、 C_i 、 G_s 、 A_{sat} 、 V_{cmax} 、 J_{max} 及 Rubisco、FBPase 活性均明显降低, 表明叶霉病菌导致的光合能力下降既与气孔导度降低、 CO_2 供应受阻有关, 也与叶肉细胞光合活性降低导致光合速率下降的非气孔因素相关。而预接种木霉菌能将叶霉病菌导致的光合能力抑制消除, 使其到对照水平。光合作用的增加则依赖于单位面积的光合速率和光合有效面积。这表明, 木霉可有效增加光合有效面积从而增加光合生产率。同时, 接种木霉引起卡尔文循环关键

基因的表达,并能持续较长时间,包括 *FBPase*, *FBPA*, *SBPase* 和 *TPI* 等,其中 *TPI* 和 *FBPA* 催化两分子磷酸丙糖形成 *FBP* 的反应,*FBPase* 和 *SBPase* 分别催化 *FBP* 和 *SBP* 水解形成 *Fru6P* 和 *Sed7P* 的过程。这表明木霉通过激活与光合相关的基因表达提高了植株病害胁迫下的光合能力,这与前人研究结果 (Ölcer et al., 2001; Shores et al., 2010) 一致。鉴于木霉的生防效果与植物叶片光合生理关系密切,叶片光合速率可作为筛选木霉生防菌株的参考指标。

目前木霉菌在试验室、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,但距大田推广还有较大的差距。主要是田间环境条件复杂,如土壤物理化学因素、土壤微生物、植物根系和气象因素等(张广志和文成敬,2005)。本试验结果为开发哈茨木霉生防制剂提供了依据,但有关 TH16 和 TH54 防治田间番茄叶霉病菌的施用方法、次数和剂量以及对番茄植株生长和产量的影响尚待进一步探讨。

References

- Bae H, Roberts D P, Lim H S, Strem M, Park S C, Ryu C M. 2011. Endophytic *Trichoderma* isolates from tropical environments delay disease and induce resistance against phytophthora capsici in hot pepper using multiple mechanisms. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 24: 336 - 351.
- Bauriegel E, Giebel A, Herppich W B. 2011. Hyperspectral and chlorophyll fluorescence imaging to analyse the impact of *Fusarium culmorum* on the photosynthetic integrity of infected wheat ears. *Sensors*, 11: 3765 - 3779.
- Dallagnola L J, Rodrigues F A, Chaves A R M, Valea F X R, DaMatta F M. 2013. Photosynthesis and sugar concentration are impaired by the defective active silicon uptake in rice plants infected with *Bipolaris oryzae*. *Plant Pathology*, 62: 120 - 129.
- Elad Y. 1997. Use of *Trichoderma harzianum* T39 against moisture-enhanced foliar diseases in greenhouse crops. *Phytoparasitica*, 25: 362.
- Ethier G J, Livingston N J. 2004. On the need to incorporate sensitivity to CO₂ transfer conductance into the Farquhar-von Caemmerer-Berry leaf photosynthesis model. *Plant Cell Environment*, 27: 137 - 153.
- Gruber B R, Kruger E L, McManus P S. 2012. Effects of cherry leaf spot on photosynthesis in tart cherry 'Montmorency' foliage. *Phytopathology*, 102: 656 - 661.
- Guo Min, Liu Chun-yan, Chen Kao-shan. 2008. Inhibition of *Trichoderma pseudokoningii* against fungal pathogens of tomato and its efficacy for control of grey mold. *Anhui Agri Sci Bull*, 14 (21): 156 - 157. (in Chinese)
- 郭敏, 柳春燕, 陈靠山. 2008. 拟康氏木霉对蔬菜病原真菌的拮抗作用及对番茄灰霉病的防效的初步研究. *安徽农学通报*, 21: 156 - 157.
- Lievens B, Claes L, Vakalounakis D J, Vanachter A C, Thomma B P. 2007. A robust identification and detection assay to discriminate the cucumber pathogens *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and f. sp. *radicis-cucumerinum*. *Environmental Microbiology*, 9 (9): 2145 - 2161.
- Lilley R M, Walker D A. 1974. An improved spectrophotometric assay for ribulose biphosphate carboxylase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 358: 226 - 229.
- Lindenthal M, Steiner U, Dehne H W, Oerke E C. 2005. Effect of downy mildew development on transpiration of cucumber leaves visualized by digital infrared thermography. *Phytopathology*, 95: 233 - 240.
- Liu Ai-rong, Chen Shuang-chen, Jin Wen-juan, Yu Bei-bei, Wang Feng-hua, He Chao-xing. 2012. Effects of *Trichoderma harzianum* on secondary metabolites in cucumber roots infected with *Fusarium oxysporum*. *Chinese Journal of Biological Control*, 4: 545 - 551. (in Chinese)
- 刘爱荣, 陈双臣, 晋文娟, 于贝贝, 王凤华, 贺超兴. 2012. 哈茨木霉对接种尖孢镰刀菌后黄瓜根系次生代谢物的影响. *中国生物防治学报*, 4: 545 - 551.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods*, 25 (4): 402 - 408.
- Mandal K, Saravanan R, Maiti S, Kothari I L. 2009. Effect of downy mildew disease on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in *Plantago ovata* Forsk. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 116 (4): 164 - 168.
- Mastouri F, Bjorkman T, Harman G E. 2010. Seed treatments with *Trichoderma harzianum* alleviate biotic, abiotic and physiological stresses in

- germinating seeds and seedlings. *Phytopathology*, 100: 1213 - 1221.
- Meng Fan-juan, Xu Xiang-yang, Li Jing-fu, Hong Rui. 2006. Differentiation of new physiological races of tomato leaf mold (*Fulvia fulva*) in Northeastern three provinces. *China Vegetables*, (1): 21 - 33. (in Chinese)
- 孟凡娟, 许向阳, 李景富, 洪 瑞. 2006. 东北三省新的番茄叶霉病菌生理小种分化初报. *中国蔬菜*, (1): 21 - 33.
- Nogués S, Cotxarrera L, Alegre L, Trillas M I. 2002. Limitations to photosynthesis in tomato leaves induced by *Fusarium* wilt. *New Phytologist*, 154: 461 - 470.
- Ölcer H, Lloyd J C, Raines C A. 2001. Photosynthetic capacity is differentially affected by reductions in sedoheptulose-1,7-bisphosphatase activity during leaf development in transgenic tobacco plants. *Plant Physiology*, 125 (2): 982 - 989.
- Ou S H. 1985. Rice diseases. Slough, UK: Commonwealth Agricultural Bureau.
- Reino J L, Guerrero R F, Hernandez-Galan R, Collado I G. 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*, 7: 89 - 123.
- Robert C, Bancal M O, Ney B, Lannou C. 2005. Wheat leaf photosynthesis loss due to leaf rust, with respect to lesion development and leaf nitrogen status. *New Phytol*, 165: 227 - 241.
- Scheibe R, Fickenscher K, Ashton A R. 1986. Studies on the mechanism of the reductive activation of NADP-malate dehydrogenase by thioredoxin m and low molecular weight thiols. *Biochim Biophys Acta*, 870: 191 - 197.
- Shoresh M, Harman G E, Mastouri F. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu Rev Phytopathol*, 48: 21 - 43.
- Verma M, Brar S K, Tyagi R D, Surampalli R Y, Valéro J R. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, 37: 1 - 20.
- Veronese P, Narasimhan M L, Stevenson R A, Zhu J K, Weller S C, Subbarao K V, Bressan R A. 2003. Identification of a locus controlling Verticillium disease symptom response in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 35 (5): 574 - 587.
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti E L, Roberta M, Woo S L, Lorito M. 2008. Trichoderma-plant-pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry*, 40: 1 - 10.
- von Caemmerer S, Farquhar G D. 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta*, 153: 367 - 387.
- Yao Bin, Wang Ao-xue, Li Jing-fu. 2009. Study on the inhibition of *Trichoderma harzianum* on four tomato pathogenic fungi. *Journal of Northeast Agricultural University*, 40 (5): 26 - 31. (in Chinese)
- 姚 彬, 王傲雪, 李景富. 2009. 哈茨木霉对 4 种番茄病原真菌抑制作用的研究. *东北农业大学学报*, 40 (5): 26 - 31.
- Zhang Guang-zhi, Wen Cheng-jing. 2005. Biocontrol of maize sheath blight with *Trichoderma* spp. *Acta Phytophylacica Sinica*, 32 (4): 353 - 356. (in Chinese)
- 张广志, 文成敬. 2005. 木霉对玉米纹枯病的生物防治. *植物保护学报*, 32 (4): 353 - 356.