

深绿木霉 T2 蛋白质 TraT2A 诱导处理对接种灰霉菌百合光响应和荧光特性的影响

梁巧兰*, 魏列新, 徐秉良, 张树武, 韩亮

(甘肃农业大学植物保护学院/甘肃省农作物病虫害生物防治工程实验室, 兰州 730070)

摘要: 为了探明深绿木霉 T2 蛋白质激发子 TraT2A 对百合叶片气孔及光响应和荧光特性的影响, 揭示 TraT2A 诱导百合抗灰霉病的生理作用机理, 以兰州百合和深绿木霉 T2 蛋白质 TraT2A 为试验材料, 测定 TraT2A 诱导处理后, 兰州百合叶片气孔开度及光响应和叶绿素荧光特性等生理指标的变化规律。结果表明 TraT2A + IB (灰霉菌) 处理后百合叶片的气孔开度减小; 试验中随着光合有效辐射 (PAR) 的增强, TraT2A + IB 处理的净光合速率 (ETR) 明显高于对照、接种 IB 和 TraT2A 处理, 叶绿素荧光特性中 PSII 的最大光量子产量 (F_v/F_m)、PSII 潜在活性 F_v/F_0 、 Φ_{PSII} 和 q_p 均显著高于其他 3 个处理, 而 NPQ 值则显著低于其他 3 个处理, 表明 TraT2A + IB 处理的 PSII 反应中心能把捕获的光能更有效地用于光合作用; 同时 TraT2A + IB 处理后 5 d 和 7 d 时百合抗灰霉病的诱导抗病效果均在 96% 以上。说明 TraT2A 诱导处理可以提高百合光合效率, 进而提高对灰霉病的抗病性。

关键词: 百合; 深绿木霉 T2; TraT2A; 气孔; 光响应; 荧光特性; 灰霉病; 诱导抗性

中图分类号: S 682.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2020) 04-0769-10

Effect of the *Trichoderma atroviride* T2 Proteinaceous TraT2A Induction Treatment on Photoresponsive and Fluorescent Characteristics of Lily Leaves inoculated *Botrytis cinerea*

LIANG Qiaolan*, WEI Liexin, XU Bingliang, ZHANG Shuwu, and HAN Liang

(College of Plant Protection, Gansu Agricultural University; Biocontrol Engineering Laboratory of Crop Diseases and Pests of Gansu Province, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Lanzhou lily and *Trichoderma atroviride* T2 proteinaceous TraT2A were used as experimental materials to explore the physiological mechanisms of TraT2A in the resistance of Lanzhou lily to gray mold. The changes in the physiological characteristics of stomata, photosynthetic-photoresponsiveness, chlorophyll fluorescence of the lily leaves were analyzed, and the resistance of the lily against *Botrytis cinerea* was measured after a combinatorial treatment of TraT2A and inoculation of *Botrytis cinerea* (IB). The results showed that the stomatal aperture of the lily leaves became smaller by the TraT2A + IB treatment. With the enhancement of photosynthetically active radiation (PAR), the electron transport rate (ETR) of TraT2A + IB treated lily leaves was significantly higher than that of the

收稿日期: 2019-09-17; **修回日期:** 2020-03-09

基金项目: 兰州市科技局项目 (2018-4-78); 甘肃省科技重大专项 (18ZD2NA010); 甘肃省农牧厅项目 (GNSW-2016-25); 甘肃农业大学学科建设基金项目 (GAU-XKJS-2018-155)

* E-mail: liangql@gsau.edu.cn

control, inoculation of *Botrytis cinerea* and TraT2A treatment. After TraT2A + IB treatment, the maximum photon yield (F_v/F_m), PS II potential activity (F_v/F_0), Φ_{PSII} and q_p of PS II were higher, and the NPQ value was lower than those of the control, IB and TraT2A, and they were significantly different. The induction effect of lily against *Botrytis cinerea* reached above 96% in 5 d and 7 d after the TraT2A + IB treatment. The results indicate that the PS II reaction center could capture light energy more effectively in photosynthesis and thus enhance the photosynthetic characteristics and the disease resistance to gray mold in the TraT2A + IB-treated Lanzhou lily.

Keywords: lily; *Trichoderma atroviride* T2; TraT2A; stomata; light response; fluorescence characteristics; gray mold; induced resistance

木霉菌 (*Trichoderma*) 是自然界广泛分布的生防真菌, 至少对 18 个属 20 余种病原真菌和多种病原细菌有拮抗作用。目前国际上五大洲 60 多个国家使用 100 多种含有木霉菌成分的生物制剂产品, 年销售额达 2.5 亿美元。木霉菌主要用于防治各类植物的土传病害、部分叶部及穗部病害, 其不仅能防病, 还具有增强植物抗逆性、促进植物生长、提高营养利用效率、修复农药和化肥污染环境等功能 (陈捷 等, 2011), 生防木霉菌及其代谢物处理植物体可激发植物防御基因表达 (陈双臣 等, 2014), 病原菌侵染时使植物获得抗病性, 这种抗病性被称为诱导抗病性。上海交通大学利用哈茨木霉 H6 包衣玉米种子诱导玉米对大斑病、弯孢霉叶斑病的抗性, 说明木霉菌可通过诱导植物免疫系统基因表达, 实现对病害的防治。其诱导抗病机理主要是由于木霉菌可产生大量的 MAMPs 分子 (植物效应分子), 如丝氨酸蛋白酶、22kD 木聚糖酶、几丁质脱乙酰基酶、几丁质酶 Chit42、SnodProt 蛋白 (SnodProt1、Sm1 和 EPI)、脂肽、棒曲霉素类蛋白、无毒基因蛋白等 (Shoresh et al., 2010; 陈捷, 2015)。此外, 植物 MAPK 基因 (TIPK) 发现可受木霉菌特异性诱导 (Shoresh et al., 2006), Sm1 是 Djonovic 等 (2006) 从绿木霉分泌物中分离到的一种富含半胱氨酸的疏水蛋白 (12.6 kD), 与 *ceratao-platanin* 基因家簇有很高的同源性, 不仅对植物和微生物无毒, 还能诱导水稻、棉花和玉米活性氧的释放以及多种防御反应基因的表达。研究发现来源于深绿木霉 T2 发酵液中的蛋白 TraT2A 诱导处理后可提高百合叶片中与抗病性相关的防御酶 PAL、PPO、POD、SOD 活性、叶绿素及蜡质含量, 促进胼胝体的积累, 降低丙二醛的含量, 同时防治百合灰霉病的持效期可长达 7 d, 长于阿泰灵和速克灵 (韩亮 等, 2016; 梁巧兰 等, 2017)。

气孔是植物 CO₂ 吸收和水分散失的通道, 如果能够人工调控气孔的运动和数量, 就可以提高植物光合速率、水分利用率以及抗逆性。研究发现将玉米 C4 型磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (phosphoenol pyruvate carboxylase, PEPC) 基因导入水稻中并高效表达, 转 *pepc* 水稻的气孔密度提高, 是对照的 1.39 倍 (袁莉民 等, 2006; 钱宝云和李霞, 2013), 气孔导度增大 (Ku et al., 1999), 表现为叶片的光合特性明显改善的高光效特性 (焦德茂 等, 2001; 丁在松 等, 2007)。气孔也被认为是病原菌入侵植物的通道, 与植物抗性存在着一定的关系。如葡萄抗病类型的叶背气孔小而稀少, 气孔有白色的堆积物; 感病类型的气孔大、密集 (王国英, 1998)。光合作用是植物生长最重要的生理过程, 对病原菌胁迫非常敏感。病害发生严重时会导致叶绿体光合机构的损坏, 光合作用效率降低 (He et al., 2005)。利用叶绿素荧光技术可快速检测完整植株在病原菌胁迫和诱导抗病剂处理下光合作用的真实行为, 与气体交换指标相比, 叶绿素荧光参数能更好地反映内在特点 (Zhang, 1999)。

兰州百合 (*Lilium*) 是甘肃省的名优特产, 具有很高的营养价值、药用价值和观赏价值, 闻名国内外, 在调整甘肃省农业产业结构和提高农民收入等方面发挥着巨大作用。随着栽培面积的不断

扩大, 其病害发生日趋严重, 尤其灰霉病发病率高达 80% 以上。研发以生物防治为主的百合病害绿色防控技术措施, 对百合无公害高效优质安全生产具有重要意义。TraT2A 是从深绿木霉 *Trichoderma atroviride* T2 发酵液经过离心过滤、盐析、透析、凝胶过滤层析 (SephadexG-100 凝胶) 获得的、分子量小于 297 kD 的蛋白质类物质, 通过激发植物与抗病性相关的酶类, 可诱导其产生抗病性 (韩亮等, 2016; 梁巧兰等, 2017)。研究 TraT2A 诱导处理对百合叶片气孔数量、开度及光响应曲线和荧光参数的影响, 旨在探明 TraT2A 的诱导抗病生理机理, 为开发 TraT2A 免疫诱抗剂提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料与处理

TraT2A 蛋白质、百合灰霉菌 *Botrytis cinerea* 分离保存于实验室 4 °C 冰箱中。45 d 苗龄的百合幼苗和 60 d 鳞片扦插百合幼苗 (诱导抗病效果) 种植于温室花盆中。

试验仪器有叶绿素荧光成像系统 (Imaging-Pam, Walz, Germany)、显微镜 (Nikon ECLIPSE E200) 和测微尺等。

选取生长一致的、健康百合幼苗 40 株, 分为 4 组, 每组 10 株, 分别进行对照 (灭菌水)、接种灰霉菌 (简称 IB, 喷灭菌水后 48 h 接种 1×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 灰霉菌孢子悬浮液)、TraT2A (TraT2A 稀释 100 倍喷雾)、TraT2A + IB (喷 TraT2A 后 48 h 接种灰霉菌) 4 个处理。每处理重复 3 次, 共处理幼苗 120 株。

1.2 TraT2A 诱导处理对百合叶片气孔及合光响应和荧光特性的影响试验

1.2.1 叶片气孔特性

分别于接种灰霉菌前 1 d, 接菌后 1、3、5、7、9 d 用灭菌过的剪刀剪取百合植株上、中、下 3 个部位的叶片, 分别代表幼叶、生长中期及生长早期的叶片, 灭菌水冲洗干净, 每个处理观察 9 片叶, 每个叶片选取 3 个部位 (上、中、下) 剪取大小 $1 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$ 的小叶块, 在等量的 95% 乙醇和冰醋酸混合液中固定 24 h, 然后浸泡于饱和水合氯醛水溶液中, 待组织透明后取出, 制玻片, 在 10×40 倍显微镜下观察、记录气孔数, 测量气孔大小 (李映霞, 2004)。

1.2.2 叶片光响应

取上述接菌后 3 d 的百合幼苗叶片 (每个处理 4 片), 在 MAXI Imaging-PAM 的 Light Curve 窗口设置光合有效辐射强度梯度分别为 0、9、20、29、40、56、75、102、133、165、204、297、370、455、580、725、922 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 相邻光照强度之间间隔 10 s, 由此可以得到 PS II 相对电子传递速率 (ETR) 随光强 PAR 增加的变化趋势。

1.2.3 叶片叶绿素荧光参数

取上述接菌后 3 d 的百合幼苗叶片 (每个处理 4 片), 从 9: 00 开始, 利用叶绿素荧光成像系统 (Imaging-Pam, Walz, Germany) 和荧光图像分析软件 (Imagingwin, Walz) 测定叶绿素荧光诱导动力学参数 [室温 (25 ± 2) °C, 光强 $3\ 000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$]。用黑布遮光, 叶片经 20 min 以上充分暗适应后, 打开弱测量光 (不大于 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 测定初始荧光 (F_0), 此时再打开一次饱和脉冲光 ($3\ 000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), 测定叶绿素的 最大荧光 F_m 。然后在光化光下达到稳定后记录其稳态荧光 (F_s), 给一次饱和和脉冲光测定 F_m' 。

计算 PS II 的最大量子产量 [$F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$, 反映植物潜在最大光合能力]、PS II 的实际

量子产量 [$\Phi_{PSII} = (F_m' - F_s) / F_m'$, 反映植物的实际光合效率]、光化学淬灭系数 [$q_p = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_0')$, 由光合作用引起的荧光淬灭]、非光化学淬灭系数 [$NPQ = (F_m - F_m') / F_m'$, 由热耗散引起的荧光淬灭] 等荧光参数值 (王振宇 等, 2006)。

1.3 TraT2A 诱导处理兰州百合抗灰霉病试验

根据以下分级标准, 观察记录 TraT2A + IB 和 IB 处理 5 d 和 7 d 的百合幼苗灰霉病发病情况, 并计算病情指数及诱导抗病效果。

病害分级标准: 0 级, 叶片未发现病斑; 1 级, 病斑的面积占总叶片面积的 1% 以下; 2 级, 病斑的面积占总叶片面积的 2% ~ 5%; 3 级, 病斑的面积占总叶片面积的 6% ~ 20%; 4 级, 病斑的面积占总叶片面积的 21% ~ 40%; 5 级, 病斑的面积占总叶片面积的 40% 以上 (梁巧兰 等, 2016)。

病情指数 = $[\sum (\text{各级病叶数} \times \text{各级代表值}) / (\text{调查总叶数} \times \text{最高级代表值})] \times 100$ 。

诱导抗病效果 (%) = $(\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}) / \text{对照病情指数} \times 100$ 。

1.4 数据统计与分析

试验数据采用 DPS v7.05 软件进行统计分析, 并通过邓肯氏新复极差法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 TrT2A 诱导处理对百合叶片气孔特性影响

随着 TraT2A 诱导处理时间延长, 45 d 苗龄百合 4 个处理的不同部位叶片平均气孔数呈现先增加后减少的变化趋势, 均在接菌后 3 d 达到最多 (图 1), 其中 TraT2A + IB 处理的百合叶片气孔数平均达到每视野 27.67 个, 比对照、IB、TraT2A 处理分别多 4.57、5.77、5.83 个, 且和对照、IB、TraT2A 处理的气孔数差异显著; 5 d 后气孔数下降并趋于稳定, 但仍然比其他 3 个处理的平均气孔数多; 7 d 时除了和接菌 IB 处理的差异不显著外, 和对照、TraT2A 处理的气孔数差异极显著; 9 d 时各处理差异不显著。

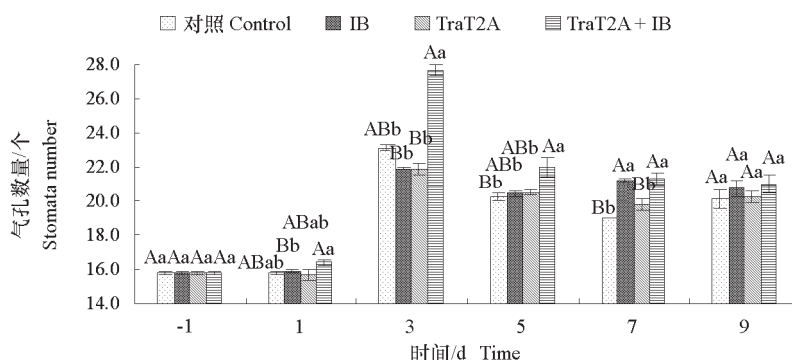


图 1 TraT2A 诱导处理对百合叶片气孔数量的影响

接种前 1 d 用 -1 表示。小写、大写字母分别表示同一时间不同处理在 0.05 和 0.01 水平的差异显著性。下同。

Fig. 1 Effect of TraT2A induced treatment on the number of lily leaf stomata

- 1 indicates 1 d before treatment. Different lowercase and uppercases indicate the difference in significance between different treatments at the same time at 0.05 and 0.01 levels respectively. The same below.

在 TraT2A + IB 处理后 1、3、5、9 d 时气孔的长度、宽度和其他 3 个处理的之间无显著差异, 7 d 时气孔的长度显著小于其他 3 个处理, 宽度除了和对照差异不显著外, 和其他两个处理差异显著 (表 1, 图 2)。

表 1 TraT2A 诱导处理对百合叶片气孔开度的影响
Table 1 Effects of TraT2A induction on lily stomata opening degree μm

处理 Treatment	接菌前 1 d Inoculation before 1 day		接菌后 1 d Inoculation after 1 day		接菌后 3 d Inoculation after 3 days	
	长度 Length	宽度 Width	长度 Length	宽度 Width	长度 Length	宽度 Width
对照 Control	15.5 ± 4.7 Aa	5.0 ± 2.1 Aa	17.5 ± 1.8 Aa	7.0 ± 2.1 Aa	15.0 ± 1.8 Aa	5.5 ± 1.1 Aa
IB	15.5 ± 2.1 Aa	5.0 ± 1.4 Aa	15.5 ± 3.3 Aa	6.5 ± 1.4 Aa	14.5 ± 3.2 Aa	5.0 ± 0.0 Aa
TraT2A	15.5 ± 3.3 Aa	5.0 ± 1.8 Aa	14.5 ± 4.1 Aa	5.0 ± 1.8 Aa	13.5 ± 4.2 Aa	5.0 ± 1.8 Aa
TraT2A + IB	15.5 ± 3.0 Aa	5.0 ± 1.4 Aa	15.5 ± 3.1 Aa	6.0 ± 1.4 Aa	15.0 ± 3.1 Aa	4.5 ± 1.1 Aa
处理 Treatment	接菌后 5 d Inoculation after 5 days		接菌后 7 d Inoculation after 7 days		接菌后 9 d Inoculation after 9 days	
	长度 Length	宽度 Width	长度 Length	宽度 Width	长度 Length	宽度 Width
对照 Control	15.0 ± 2.5 Aa	4.5 ± 2.1 Aa	15.5 ± 1.9 ABb	3.0 ± 0.5 Cc	15.5 ± 1.9 Aa	4.5 ± 0.9 Aa
IB	13.5 ± 2.9 Aa	4.5 ± 1.1 Aa	16.4 ± 1.0 Aab	4.0 ± 0.2 Bb	14.4 ± 1.7 Aa	3.5 ± 0.4 Ab
TraT2A	14.5 ± 2.1 Aa	3.0 ± 1.1 Aa	17.5 ± 0.0 Aa	5.0 ± 0.6 Aa	15.7 ± 1.0 Aa	4.0 ± 0.5 Aab
TraT2A + IB	12.5 ± 2.5 Aa	5.0 ± 1.8 Aa	13.5 ± 1.4 Bc	2.8 ± 0.3 Cc	15.3 ± 1.7 Aa	4.0 ± 0.2 Aab

注: 小写、大写字母分别表示同一时间不同处理在 0.05 和 0.01 水平的差异显著性。下同。

Note: Different lowercase and uppercase indicate the difference in significance between different treatments at the same time at 0.05 and 0.01 levels respectively. The same below.

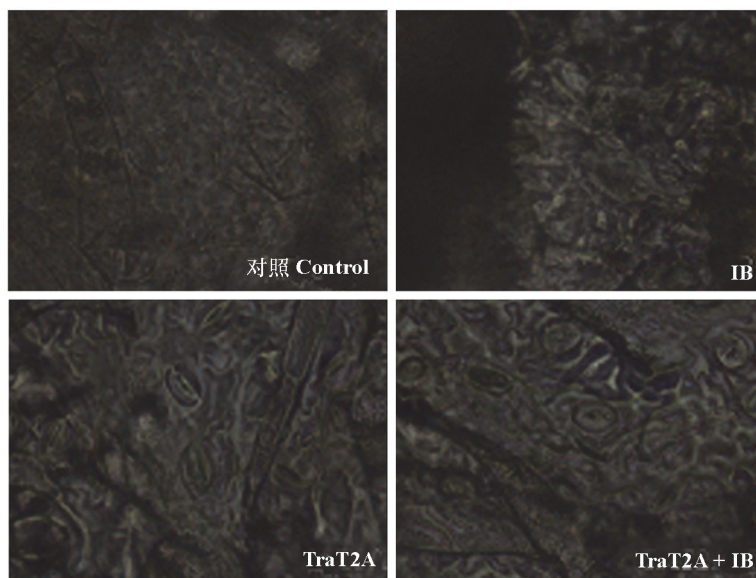


图 2 不同处理气孔形态 (接种灰霉菌后 3 d)

Fig. 2 The stomatal morphology of different treatments [*Botrytis cinerea* (IB) inoculation after 3 d]

2.2 TraT2A 诱导处理对百合叶片光响应曲线的影响

由图 3 可知, 随着光合有效辐射 (PAR) 的增强, 各处理兰州百合叶片相对电子传递速率 (ETR) 逐渐增大, 当 PAR 达到 $165 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 时 TraT2A + IB 处理的百合叶片 ETR 增速最快, 之后除了 TraT2A + IB 和 IB 处理的 ETR 持续增大外, 其他两个处理增大的趋势逐渐减弱, 当 PAR 达到 $580 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 时对照和 TraT2A 处理的 ETR 开始下降; 整体水平上 TraT2A + IB 处理的 ETR 值极显

著高于其他 3 个处理。

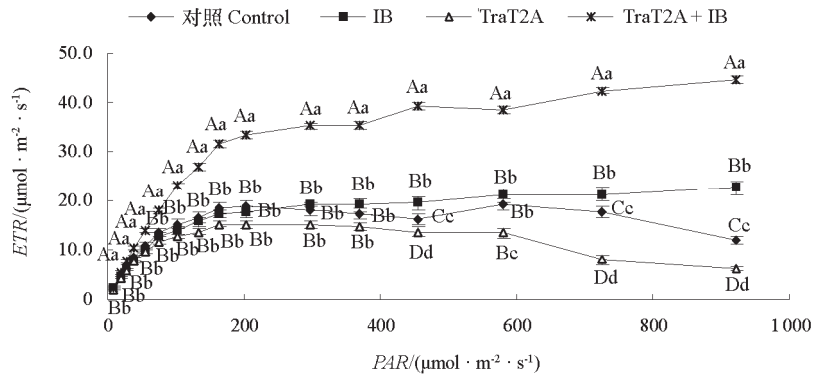


图3 TraT2A 诱导处理百合的光响应曲线
Fig. 3 Light response curves of lily induced by TraT2A

2.3 TraT2A 处理对兰州百合叶片叶绿素荧光参数的影响

2.3.1 F_v/F_m 和 F_v/F_0

在荧光诱导动力学参数的测量中，经暗适应后的功能叶，可变荧光 (F_v) 与固定荧光 (F_0) 的比值 F_v/F_0 ，可代表 PS II 潜在活性，而 F_v 与最大荧光 F_m 的比值 F_v/F_m 可代表 PS II 原初光能转化效率或 PS II 光化学的潜在效率。暗适应后的 F_v/F_m 值影响 PS II 潜在量子效率，并被认为是植物光合能力的敏感指标，健康植物叶片 F_v/F_m 位于 0.80 ~ 0.83 之间，植物经受外界胁迫或者受到伤害时该值下降明显，光抑制现象发生 (王振宇 等, 2006; 张永江, 2007)。

TraT2A + IB 处理百合的 F_v/F_m 和 F_v/F_0 均显著高于对照、IB、TraT2A 处理的，分别提高了 3.21%、1.93%、3.88% 和 13.83%、9.34%、16.02%，且与其他 3 个处理的 F_v/F_0 和 F_v/F_m 之间均存在极显著差异；其次为 IB 处理的，其 F_v/F_0 、 F_v/F_m 和对照、TraT2A 之间存在显著差异 ($P \leq 0.05$, 图 4)。说明 TraT2A + IB 处理的百合 PS II 活性中心光化学能力最佳，可以使百合 PS II 光系统潜在活性显著升高。

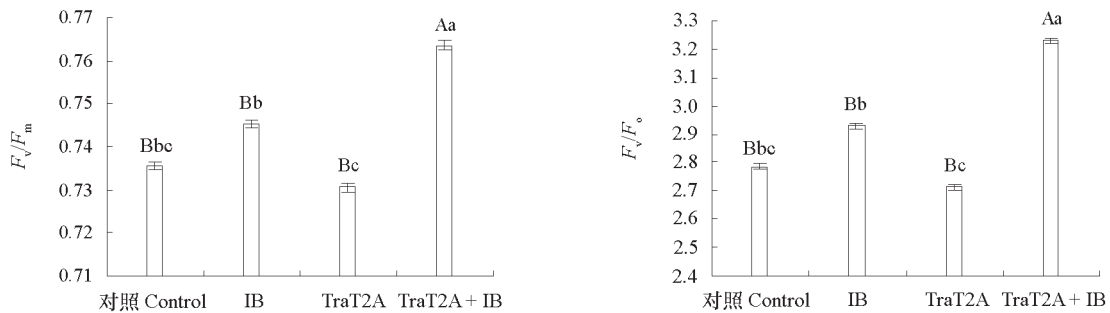


图4 TraT2A 诱导处理对百合 F_v/F_m 和 F_v/F_0 的影响
Fig. 4 F_v/F_m and F_v/F_0 of lily induced by TraT2A

2.3.2 Φ_{PSII} 、 NPQ 和 q_P 的影响

Φ_{PSII} 反映在光下 PS II 的光化学效率。TraT2A + IB 处理 5 d 时, Φ_{PSII} 和 q_P 值均显著高于其他 3 个处理, 分别比对照、IB、TraT2A 提高了 42.25%、44.86%、55.51% 和 27.62%、35.42%、42.90%; 而 NPQ 值则显著低于其他 3 个处理, 表明 TraT2A + IB 处理的 PS II 反应中心能把捕获的光能更有效地用于光合作用中 (图 5)。

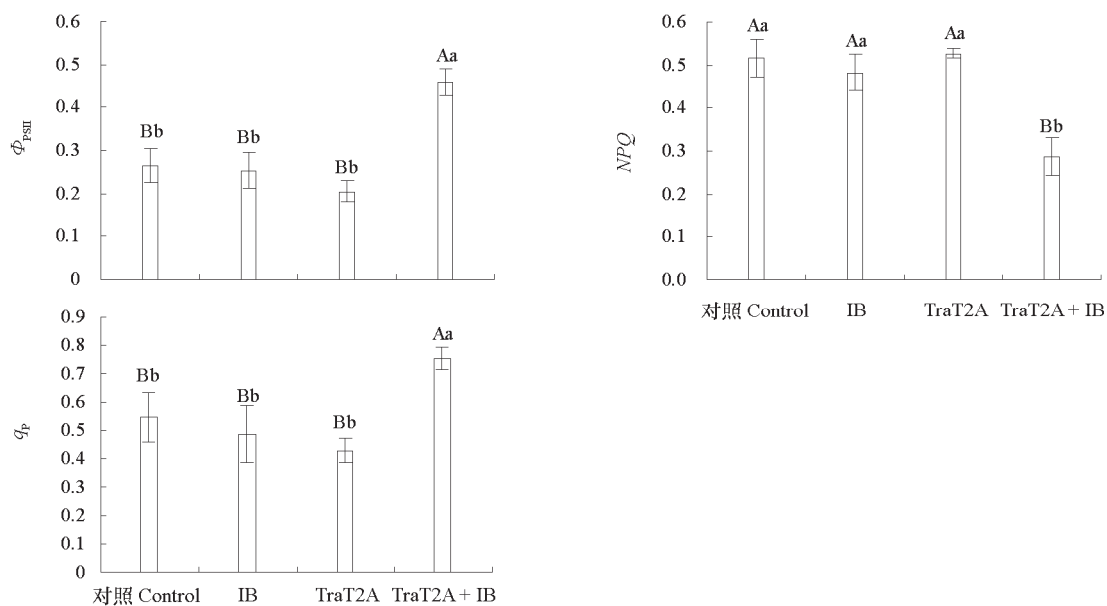


图 5 TraT2A 诱导处理对百合 Φ_{PSII} 、 NPQ 、 q_P 的影响
Fig. 5 Effect on Φ_{PSII} , NPQ and q_P of lily induced by TraT2A

2.4 TrT2A 诱导处理对百合抗灰霉病的影响

60 d 鳞片扦插百合幼苗经 TraT2A 100 倍液诱导处理 5、7 和 9 d 时, 对抗灰霉病的诱导效果分别为 100%、96.65% 和 44.61% (表 2, 图 6)。

表 2 TraT2A 诱导处理百合抗灰霉病效果

Table 2 The effect of TraT2A induced resistance to lily against *Botrytis cinerea*

处理 Treatment	平均病情指数 Average disease index			诱导抗病效果/% Effect of induced resistance		
	5 d	7 d	9 d	5 d	7 d	9 d
TraT2A + IB	0	0.33	7.55	100.00	96.65	44.61
IB	4.33	9.87	13.63			

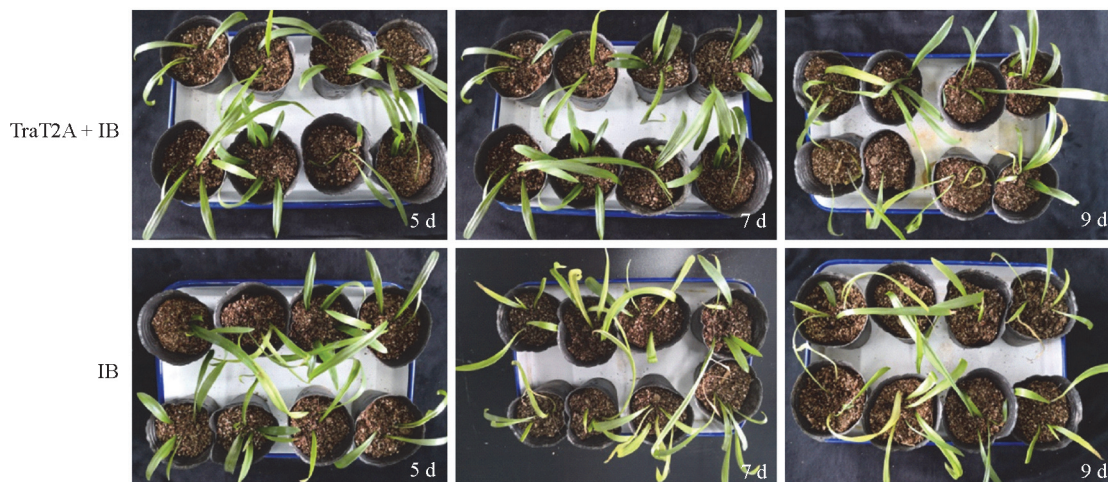


图 6 TraT2A 诱导百合抗灰霉病效果
Fig. 6 Induced resistance effect of lily against gray mold by TraT2A

3 讨论

本研究中 TraT2A 诱导处理过的百合叶片气孔有明显的闭合现象，可阻止灰霉菌的侵入。在农业生产实践中，利用诱导抗病性可以减轻或防止病害的发生，促进作物的健康生长，提高作物产量，叶绿素荧光分析是以光合作用理论为基础、利用体内叶绿素作为天然探针，研究和探测植物光合生理状况及各种外界因子对其细微影响的新型植物活体测定和诊断技术，具有灵敏度高、快速、简单实用以及包含光合内部结构大量重要信息等特点（王振宇等，2006）。叶绿素荧光技术能精确测定和研究光合系统 II（PS II）的动态变化，可灵敏客观地探测各种外界因子对光合作用的影响，在研究作物抗逆境能力，如耐冷性、耐热性、耐旱性及耐盐性等方面显示出较好的应用前景（Murchie & Lawson, 2013）。叶绿素荧光参数已成为拟南芥、玉米等植物的重要耐低温筛选指标（Fracheboud et al., 1999; Anamika et al., 2014），但是该技术在植物诱导抗病性方面鲜见报道。本研究中通过叶绿素荧光技术探讨了 TraT2A 诱导处理对百合荧光特性的影响，结果表明在一定范围内随着光合有效辐射（PAR）的增强，TraT2A + IB 处理的百合电子传递速率（ETR）明显高于对照、IB、TraT2A 处理，PAR 为 $455 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 时，ETR 达到最大值，分别为 39.30 、 21.03 、 19.33 、 $13.56 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ；TraT2A + IB 处理后百合 PS II 的最大光量子产量（ F_v/F_m ）和 PS II 潜在活性分别比对照、IB、TraT2A 处理升高了 3.21%、1.93%、3.88% 和 13.83%、9.34%、16.02%，PS II 光系统潜在活性显著升高， Φ_{PSII} 和 q_p 值高于对照、IB 和 TraT2A 处理，NPQ 值低于这 3 个处理；同时在 5 d、7 d 时 TraT2A + IB 处理的诱导抗病效果分别 100% 和 96.65%。这进一步表明叶绿素荧光参数不仅可作为诱抗剂筛选指标，也可作为诱抗剂诱导抗病机理的研究指标。

本试验中仅对 TraT2A 诱导处理后百合幼苗叶片气孔数、开度及光响应、叶绿素荧光参数等的变化进行了研究，发现 TraT2A 诱导处理并接种灰霉病菌后，百合叶片的气孔数增加、开度减小；随着光合有效辐射（PAR）的增强，TraT2A + IB 诱导处理的相对电子传递速率（ETR）增加快速，且明显高于对照、IB、TraT2A 处理；叶绿素荧光特性中 PS II 的最大光量子产量（ F_v/F_m ）、PS II 潜在活性 F_v/F_0 、 Φ_{PSII} 和 q_p 均显著高于其他 3 个处理；而 NPQ 值则显著低于其他 3 个处理；TraT2A +

IB 处理后 5 d 和 7 d 对百合抗灰霉病的诱导抗病效果均在 96% 以上。而对不同抗性百合品种诱导后气孔密度及数量变化、张开度与灰霉病发生的关系, 叶绿素荧光特性和百合产量、品质之间联系以及与光合作用相关的酶类及抗病物质的关系等问题尚未涉及, 还有待于进一步探讨。

References

- Anamika M, Arnd G H, Kumud B M. 2014. Chlorophyll fluorescence emission can screen cold tolerance of cold acclimated *Arabidopsis thaliana* accessions. *Plant Methods*, 10: 38.
- Chen Jie. 2015. Advances on *Trichoderma*-induced plant resistance against diseases. *Chinese Journal of Biological Control*, 31 (5): 733 - 741. (in Chinese)
- 陈 捷. 2015. 木霉菌诱导植物抗病性研究新进展. *中国生物防治学报*, 31 (5): 733 - 741.
- Chen Jie, Zhu Jie-wei, Zhang Ting, Wang Bing-li. 2011. Progress on mechanism and applications of *Trichoderma* as a biocontrol microbe. *Chinese Journal of Biological Control*, 27 (2): 145 - 151. (in Chinese)
- 陈 捷, 朱洁伟, 张 婷, 王秉丽. 2011. 木霉菌生物防治作用机理与应用研究进展. *中国生物防治学报*, 27 (2): 145 - 151.
- Chen Shuang-chen, Ji De-gang, Li Cong, Liu Ai-rong, Wang Hong-tao, Lin Xiao-min. 2014. Effects of *Trichoderma harzianum* on photosynthetic characteristics in tomato leaves infected with *Fulvia fulva*. *Acta Horticulturae Sinica*, 41 (3): 489 - 497. (in Chinese)
- 陈双臣, 姬德刚, 李 聪, 刘爱荣, 王洪涛, 林晓民. 2014. 哈茨木霉诱导番茄叶片光合生理变化的研究. *园艺学报*, 41 (3): 489 - 497.
- Ding Zaisong, Zhao Ming, Jing Yuxiang, Li Liang-bi, Kuang Ting-yun. 2007. Effect of overexpression of maize *ppc* gene on photosynthesis in transgenic rice plants. *Acta Agronomica Sinica*, 33 (5): 717 - 722. (in Chinese)
- 丁在松, 赵 明, 荆玉祥, 李良璧, 匡廷云. 2007. 玉米 *ppc* 基因过表达对转基因水稻光合速率的影响. *作物学报*, 33 (5): 717 - 722.
- Djonovic S, Pozo M J, Dangott L J, Howell C R, Kenerley C M. 2006. Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19 (8): 838 - 853.
- Fracheboud Y, Leipner J, Stamp P, Haldimann P. 1999. Chlorophyll fluorescence as a selection tool for cold tolerance of photosynthesis in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany*, 50 (338): 1533 - 1540.
- Han Liang, Liang Qiao-lan, Zhou Qi-yu. 2016. Resistance of Lanzhou lily to *Botrytis cinerea* induced by protein extract TraT2A from *Trichoderma atroviride* T2 fermentation liquid. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 32 (20): 44 - 50. (in Chinese)
- 韩 亮, 梁巧兰, 周其宇. 2016. 深绿木霉 T2 发酵液蛋白提取物 TraT2A 诱导兰州百合抗灰霉病研究. *中国农学通报*, 32 (20): 44 - 50.
- Jiao De-mao, Li Xia, Huang Xue-qing, Chi Wei, Kuang Ting-yun, Gu Sen-ben. 2001. Photosynthetic CO₂ assimilation and chlorophyll fluorescence in transgenic *PEPC* rice. *Chinese Science Bulletin*, 46 (5): 414 - 418. (in Chinese)
- 焦德茂, 李 霞, 黄雪清, 迟 伟, 匡廷云, 古森本. 2001. 转 *PEPC* 基因水稻的光合 CO₂ 同化和叶绿素荧光特性. *科学通报*, 46 (5): 414 - 418.
- Ku M S, Agarie S, Nomurn M, Fukayama H, Tsuchida H, Ono K, Hirose S, Toki S, Miyao M, Matsuoka M. 1999. High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic riceplants. *Nature Biotechnology*, 17: 76 - 80.
- Li Ying-xia. 2004. Preliminary study on the mechanism of wheat resistance to powdery mildew [M. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 李映霞. 2004. 小麦抗白粉病机理的初步研究 [硕士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Liang Qian-lan, Han Liang, Zhou Qi-yu. 2016. Study on induced resistant of protein isolate from fermentation broth of *Trichoderma atroviride* T2. *Grassland and Turf*, 36 (3): 28 - 34. (in Chinese)
- 梁巧兰, 韩 亮, 周其宇. 2016. 深绿木霉 T2 发酵液蛋白分离物诱导抗病作用研究. *草原与草坪*, 36 (3): 28 - 34.
- Liang Qian-lan, Zhang Na, Wei Lie-xin, Xu Bing-liang. 2017. Effect of *Trichoderma atroviride* proteinaceous TraT2A induced Lanzhou lily resistant to gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Chinese Journal of Biological Control*, 33 (4): 545 - 551. (in Chinese)
- 梁巧兰, 张 娜, 魏列新, 徐秉良. 2017. 深绿木霉蛋白质 TraT2A 诱导兰州百合抗灰霉病的作用. *中国生物防治学报*, 33 (4): 545 - 551.
- Murchie E H, Lawson T. 2013. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of*

- Experimental Botany, 64 (13): 3983 - 3998.
- Qian Bao-yun, Li Xia. 2013. New research progress on the regulation of stomatal movement in plant. *Bulletin of Botanical Research*, 33 (1): 120 - 128. (in Chinese)
- 钱宝云, 李霞. 2013. 植物气孔运动调节的新进展. *植物研究*, 33 (1): 120 - 128.
- Shoresh M, Gal-On A, Leibmann D, Chet I. 2006. Characterization of mitogenactivated protein kinase gene from cucumber required for *Trichoderma* conferred plant resistance. *Plant Physiology*, 142: 1169 - 1179.
- Shoresh M, Harman G E, Mastouri F. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology*, 48: 21 - 43.
- Wang Guo-ying. 1988. Stomata and downy mildew resistance in grape leaves. *Journal Fruits Science*, (3): 120 - 121. (in Chinese)
- 王国英. 1988. 葡萄叶片气孔与霜霉病抗性. *果树科学*, (3): 120 - 121.
- Wang Zhen-yu, Lu Jin-yin, Xu Bing-cheng, Li Feng-min. 2006. Effects of root excision on fluorescent properties and yield of winter wheat. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 26 (2): 276 - 281. (in Chinese)
- 王振宇, 吕金印, 徐炳成, 李凤民. 2006. 断根对冬小麦荧光特性和产量的影响. *西北植物学报*, 26 (2): 276 - 281.
- Yuan Li-min, Qiu Ming, Wang Peng, Wang Zhi-qin, Yang Jian-chang. 2006. Structure characteristics of stomata in leaves and vascular bundles in culms of transgenic rice expressing C4 photosynthesis enzymes. *Scientia Agricultura Sinica*, 39 (5): 902 - 909. (in Chinese)
- 袁莉民, 仇明, 王朋, 王志琴, 杨建昌. 2006. C4 转基因水稻秧苗叶片气孔与叶鞘维管束结构特征. *中国农业科学*, 39 (5): 902 - 909.
- Zhang S R. 1999. A discussion on chlorophyll fluorescence kinetics parameters and their significance. *Chinese Bulletin of Botany*, 16 (4): 444 - 448.
- Zhang Yong-jiang. 2007. Chlorophyll fluorescence analysis technology and its application in the study of crop stress physiology//Chinese Crop Society. Research advances in physiology of crop adversity—Proceedings of the 10th symposium on crop physiology in China: 289 - 296. (in Chinese)
- 张永江. 2007. 叶绿素荧光分析技术及在作物胁迫生理研究中的应用//中国作物学会. 作物逆境生理研究进展——中国作物生理第十次学术研讨会文集: 289 - 296.