

哈茨木霉 T2-16 突变体库的构建及突变株表型分析

何 英¹, 张 屹², 肖姬玲², 朱菲莹², 魏 林³, 梁志怀^{1,2*}

(1. 湖南大学研究生院隆平分院, 长沙 410125; 2. 湖南省农业生物技术研究所, 长沙 410125;

3. 湖南省植物保护研究所, 长沙 410125)

摘 要: 为了优化高效拮抗生防菌哈茨木霉 T2-16 的 EMS 诱变条件, 构建哈茨木霉 T2-16 突变体库, 为哈茨木霉功能基因组研究奠定材料基础, 以哈茨木霉 T2-16 为试验材料, 采用单因素试验以 0~0.6 mol·L⁻¹ EMS 溶液分别处理不同浓度孢子 0~6 h, 明确适于哈茨木霉诱变的 EMS 最佳浓度、处理时间和孢子浓度。以最适参数诱变处理野生型菌株, 进行生长势、拮抗能力和生防效果比较。结果显示, 0.4 mol·L⁻¹ EMS 溶液处理浓度为 10⁶·mL⁻¹ 的孢子 4 h, 其致死率接近 70%, 诱变效果最佳。经生长势、拮抗能力和生防效果比较发现, 生长势呈正向突变占有率达 46.20%, 其中, 16 株突变菌株拮抗作用明显增强, T42 和 T62 的生防效果分别高出野生型菌株 31.64% 和 27.91%, 为研究哈茨木霉与生防相关的功能基因打下基础。

关键词: 哈茨木霉 T2-16; EMS 诱变; 突变体库; 表型分析

中图分类号: S476.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2019)06-1034-06

Construction of *Trichoderma harzianum* T2-16 mutant library and phenotypic analysis of mutant

HE Ying¹, ZHANG Yi², XIAO Jiling², ZHU Feiying², WEI Lin³, LIANG Zhihui^{1,2}

(1. Longping Branch, Graduate School of Hunan University, Changsha 410125;

2. Hunan Agricultural Biotechnology Research Institute, Changsha 410125;

3. Institute of Plant Protection of Hunan Province, Changsha 410125)

Abstract: To optimize the EMS mutagenesis conditions of *Trichoderma harzianum* T2-16, we constructed a mutant library of *T. harzianum* T2-16 to lay a material foundation for the study of the functional genome of *T. harzianum*. Using *T. harzianum* T2-16 as the experimental material, the spores were treated with 0-0.6 mol·L⁻¹ EMS solution for 0-6 h, respectively. The optimum concentration, treatment time and spore concentration of EMS mutagenesis were determined. The wild-type strains were mutagenized with the optimum parameters, and the growth potential, antagonistic ability and biocontrol effect were compared. The results showed that spores treated with 0.4 mol·L⁻¹ EMS solution at 10⁶·mL⁻¹ spore concentration for 4 h had the best mutagenic effect, with the lethal rate of about 70%. By comparing growth potential, antagonistic ability and biocontrol effect, it was found that the positive mutation rate in growth potential was 46.20%. Among them, the antagonistic effects of 16 mutant strains were significantly enhanced. The biocontrol effect of T42 and T62 was 31.64% and 27.91% higher than that of wild type strains, respectively.

Key words: *Trichoderma harzianum* T2-16; EMS mutagenesis; mutant library; phenotypic analysis

哈茨木霉 *Trichoderma harzianum* 作为一类重要的植病生防菌, 具有拮抗广谱性、适应性强和多种作用机制等特点^[1], 应用于水稻纹枯病^[2]、玉米纹枯病^[3]、黄瓜枯萎病^[4]等作物病害防治^[5]以及水稻^[6-7]、茄子^[8]

等作物促生^[9]方面的农业生产提质增效, 是当前国内外研究与应用最多的生防微生物之一。目前已有多种木霉生防制剂进行了登记与应用, 但受环境因素以及其施用菌体定殖量限制的影响, 导致其田间

收稿日期: 2019-03-04

基金项目: 湖南农业科技创新项目 (2017JC77), 国家重点研发计划 (2017YFD0200606) 和国家公益性行业 (农业) 科研专项 (201503110-03) 共同资助。

作者简介: 何 英, 硕士研究生。E-mail: 1216395814@qq.com

* 通信作者: 梁志怀, 博士, 研究员。E-mail: liangzhihui2019@163.com

应用效果不稳定^[10], 制约了其进一步的推广应用。因此, 构建木霉菌突变体库, 克隆木霉菌生防效应的功能基因, 对明确木霉菌的生防机制、菌株筛选及改良、提高田间防效等都具有重要理论意义和潜在的应用价值。

目前, 各类诱变方法广泛用于作物新种质资源的创制和微生物功能菌株的选育, 其中甲基磺酸乙酯(EMS)诱变剂具有饱和诱变机理, 以及其操作简便、突变频率高、染色体畸变少、易于筛选等特点^[11], 得到了育种家们的广泛应用与热衷研究。近年来, 水稻^[12-13]、玉米^[14]、辣椒^[15-16]、西甜瓜^[17-18]、番茄^[19]等作物均已成功利用 EMS 诱变技术完成其突变体库的构建, 对加快新品种的创制具有重要的推动作用。与此同时, 微生物中疫霉菌^[20]、黑曲霉^[21]、球毛壳菌^[22]、产紫杉烷真菌^[23]等也相应获得了 EMS 诱变体系。但是, EMS 诱变技术构建木霉菌突变体库还鲜有报道。目前, 木霉菌构建突变体库、诱变育种主要通过物理(ARTP 技术和射线)诱变, 成功率不高; 而转座子法(插入缺失)因抗生素不敏感等原因, 导致哈茨木霉诱变效果不理想。因此, 建立木霉菌的高效 EMS 诱变技术体系显得尤为重要。

本研究以哈茨木霉 T2-16 为材料, 通过分析不同木霉菌孢子浓度、EMS 处理浓度以及诱变处理时间对木霉菌 T2-16 致死率的影响, 确定适宜的诱变方案, 并构建木霉菌 T2-16 的突变体库; 同时对突变菌株的菌落颜色、菌丝致密程度、菌落生长速度、产孢量等表型特征进行分析, 并对其生长势、拮抗能力和生防效果进行比较, 旨在为木霉菌 T2-16 的功能基因挖掘及其应用研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株与西瓜品种 哈茨木霉 T2-16, 由本实验室分离鉴定且保存; 尖孢镰刀菌西瓜专化型 1 号生理小种 Fon-1 由北京市农林科学院蔬菜研究中心许勇研究员惠赠; 西瓜品种为早佳“8424”, 购于新疆农人种子科技有限公司。

1.1.2 培养基 PDA 培养基: 新鲜马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 15 g、水 1 L, pH 自然; 液体培养基为不加琼脂。

1.1.3 试剂 EMS 购自美国 Sigma 公司, 利用磷酸缓冲液(pH 7.0)配置成 EMS 磷酸缓冲液; NaH₂PO₄、Na₂HPO₄、Na₂S₂O₃ 等试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 木霉菌孢子悬浮液的制备 在无菌条件下, 利用磷酸缓冲液(pH 7.0)冲洗 PDA 培养基培养 7 d 的木霉菌孢子获取菌悬浮原液, 4 层灭菌的擦镜纸过滤并涡旋震荡, 血球计数板计数, 备用。

1.2.2 EMS 诱变处理及条件优化 取 50 μL 木霉菌孢子悬浮液和不同浓度的 EMS 磷酸缓冲液 100 μL 充分混匀, 28℃避光震荡培养 1~6 h, 加入 50 μL 的 10%的 Na₂S₂O₃ 溶液终止反应。稀释度为 10⁻², 取 100 μL 处理后的孢子液涂布于 PDA 培养基上, 待稀释液被培养基充分吸收后, 放在 28℃培养箱中培养 2~3 d。对照组用磷酸缓冲液代替 EMS, 其余操作同上。根据对照组和试验处理的诱变孢子生长情况计算诱变致死率, 致死率=(野生型-突变型)/野生型×100%, 筛选 EMS 诱变最佳条件, 致死率控制在 70%左右, 正突变偏高, 选取致死率 70%左右的 EMS 诱变条件为最佳诱变条件。

按照上述诱变方法, 对 EMS 处理浓度(0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 和 0.6 mol·L⁻¹)、诱变处理时间(1、2、3、4、5 和 6 h)和木霉菌孢子浓度(10⁴、5×10⁴、10⁵、5×10⁵、10⁶ 和 5×10⁶·mL⁻¹)等影响转化效率的主要因子进行单因子条件试验。每个处理设置 3 组重复。

1.2.3 突变菌株形态及稳定性观察 以野生型菌株 T2-16 为对照组, 用直径为 5 mm 的打孔器分别打取野生型菌株 T2-16 和突变菌株菌落边缘的菌丝体, 分别接种于 PDA 固体培养基中, 28℃培养, 每 24 h 测定菌落的直径, 直至长满整个平板, 观察突变体菌丝的形态、颜色、生长速度、及产孢量等性状, 筛选出表型显著变化的突变菌株; 用菌丝尖端接种法连续转接 4 代, 观察其生长形态是否能稳定遗传。

1.2.4 突变菌株拮抗能力检测 将保存的突变菌株及尖孢镰刀菌 Fon-1 分别接种于 PDA 培养基上活化培养 72 h, 用直径为 5 mm 的打孔器打取突变菌株和尖孢镰刀菌 Fon-1 菌落边缘的菌丝体, 分别对接在直径为 90 mm 的 PDA 平板两端, 两个菌块分别距离培养基中心 25 mm, 以野生型菌株 T2-16 为对照组, 3 次重复。28℃培养, 观察拮抗效果, 5 d 后计算相对抑制率^[24]。

$$\text{相对抑制率(\%)} I_r = (R^2 - R_i^2) / R^2 \times 100$$

R: 与原始木霉菌菌株 T2-16 对峙培养时 Fon-1 的生长半径; R_i: 与木霉菌 T2-16 突变体对峙培养时 Fon-1 的生长半径。

1.2.5 突变菌株对西瓜枯萎病的防治效果 分别将野生型 T2-16 菌株和突变菌株接种于 PDA 液体培养基中, 28℃、150 r·min⁻¹ 摇床培养 5 d, 用 4 层灭菌

的擦镜纸过滤,血球计数板计数,备用。采取西瓜5年连作土壤,用于盆栽试验,每盆加入15 kg连作土后,分别加入 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}$ 孢子悬浮液1 500 mL至最终浓度为每克土含 1×10^5 个孢子,25℃覆膜培养2 d,3次重复。挑取饱满、整齐度一致的早佳“8424”西瓜种子,10% NaClO溶液消毒5 min,清水冲洗10 min。催芽后挑选出芽一致的西瓜种子播种,置于大棚内,调查其枯萎病发病率。

1.2.6 数据分析 采用Excel 2003进行平均值和标准差的计算;采用SPSS 13.0软件进行多重比较。

2 结果与分析

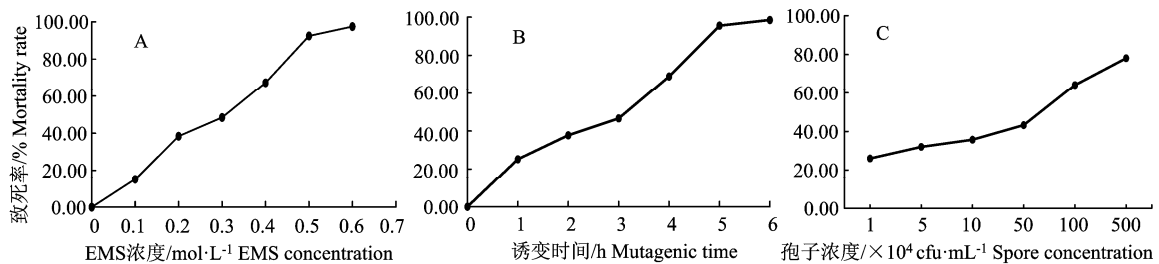
2.1 哈茨木霉 T2-16 EMS 诱变条件的优化

EMS诱变过程中,致死率越高,突变率越高,但过高的致死率会导致负向突变率增多,且易发生回复突变。根据文献[21-23],致死率在70%左右菌株的正突变率较高。因此,本研究以EMS诱变影响因子处理T2-16孢子致死率为70%为最宜处理条件。结果表明(图1),以木霉孢子浓度为 $10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 为诱变受体,利用浓度为 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的EMS磷酸缓冲液处理4 h时,木霉孢子T2-16致死率控制在70%

左右,正向突变效率较高。因此,本研究以 $10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 木霉孢子浓度为诱变受体,经 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EMS浓度处理4 h,构建高效、稳定的木霉T2-16诱变体系及突变体库。

2.2 哈茨木霉 T2-16 突变体库的构建

本研究利用EMS诱导构建哈茨木霉T2-16突变体库,共得到突变菌株418个。在PDA固体培养基上进行形态观察发现EMS诱变使得生长速率、菌丝形态、色素产生、产孢量等方面变化的4大类别突变菌株(表1),其中,表型明显改变的突变菌株15株。野生型哈茨木霉在PDA平板上为致密丛束状,有瘠状同心轮纹,培养72 h时菌落为绿色。对于一些突变子来说,它们表现出明显的菌落形态变化(图2),如突变子T120的菌丝呈束状,比T2-16的菌落疏松,分生孢子产生延迟并为浅绿色;突变子T240呈轮射状向外生长,主要在基内蔓延,孢子产生很少,菌落呈白色;突变子T383菌丝生长较弱,菌落稀疏,孢子产生延迟和减少,颜色为白色。通过连续培养4代的形态观察,发现突变菌株能保持良好的遗传稳定性。因此,本研究成功构建了哈茨木霉T2-16突变体库。



A. EMS 浓度 EMS concentration; B. 诱变时间 Mutagenic time; C. 孢子浓度 Spore concentration

图1 不同影响因子对EMS诱变致死率的影响

Figure 1 Effects of different influencing factors on the lethality of EMS mutagenesis

表1 哈茨木霉 T2-16 突变菌株菌落形态类型

Table 1 Colony morphology types of *T. harzianum* T2-16 mutant strains

类别 Category	生长速度 Growth rate	菌丝形态 Mycelial morphological characteristic	菌落颜色 Colony color	产孢量 Sporulation capacity	占比率/% Proportion
第1类 I	快	致密丛束状,有瘠状同心轮纹	绿色,颜色较深	大	46.20
第2类 II	较快	束状稀疏,有瘠状同心轮纹	绿色,颜色较浅	较少	53.10
第3类 III	较慢	稀疏,堆积向上生长	白色	少	0.48
第4类 IV	慢	稀薄,呈轮射状向外生长,主要在基内蔓延	白色	少	0.24

2.3 哈茨木霉 T2-16 突变菌株的生长势和拮抗能力比较

木霉主要是通过空间竞争或寄生等方式以达到拮抗效应,拮抗能力则是衡量生防菌生防能力的重要因素。本研究利用野生型T2-16、突变菌株与尖孢镰刀菌Fon-1的对峙培养,计算突变菌株的生

长势和相对抑制率。

2.3.1 生长势比较 对418个突变子进行生长速度的测定,发现与野生型T2-16相比,各突变菌株表现的生长速率不同(表2)。共获得18株生长速率变化幅度超过10%的突变菌株,其中,T267号突变菌株生长速度增加幅度最大,达到19.70%;

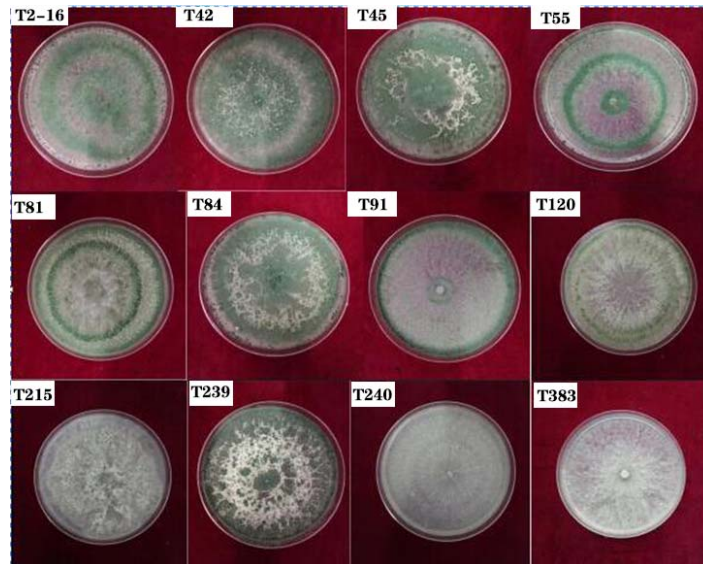


图 2 哈茨木霉 T2-16 及部分突变株的菌落形态 (28°C 培养 120 h)

Figure 2 Colony morphology of *T. harzianum* T2-16 and mutant strains (cultured at 28°C for 120 h)

表 2 部分突变菌株菌落生长直径及与野生型 T2-16 相比的变化幅度 (28°C 培养 48 h)

Table 2 Growth diameters of colony of some mutant strains and the growth rates compared with wild type (cultured at 28°C for 48 h)

编号 Number	菌落直径/mm Colony diameter	变化幅度/% Rangeability	编号 Number	菌落直径/mm Colony diameter	变化幅度/% Rangeability
T2-16	66.3±0.6	/	T2-16	66.3±0.6	/
T267	79.1±0.1	19.70	T81	32.5±0.3	-50.76
T45	77.8±0.6	18.18	T120	36.1±0.1	-45.45
T239	76.9±0.7	16.67	T240	42.8±0.2	-34.85
T365	74.5±0.1	12.88	T62	44.3±0.6	-33.33
T41	74.1±0.4	12.12	T105	44.3±0.3	-33.33
T42	74.1±0.6	12.12	T89	46.2±0.7	-30.30
T84	73.5±0.1	11.36	T66	47.9±0.2	-27.27
T363	73.5±0.2	11.36	T83	50.2±0.6	-24.24
T86	73.2±0.6	10.61	T91	50.2±0.4	-24.24
T142	73.2±0.3	10.61	T216	51.3±0.1	-22.73

注: 数据为平均值±标准差

Note: The data are presented as mean±SD

而负增长表型最大的幅度达到了 50.76%。这可能是由于哈茨木霉 T2-16 是 1 株优良的生防菌株, 正向变异拓展幅度较小。

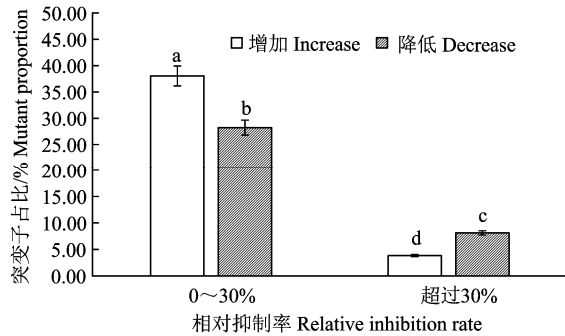
2.3.2 拮抗能力比较 通过对突变体库进行大量的平板对峙实验, 筛选出了拮抗性能发生变异的突变菌株。与野生型 T2-16 相比, 以相对抑制率增加或降低 30% 以上的菌株为拮抗作用典型突变菌株。如图 3 所示, 试验共得到拮抗作用典型突变菌株 50 株, 占 11.96%, 说明 EMS 诱变效果良好。其中, 拮抗作用显著增强的典型突变株 16 株, 占 3.83%, 拮抗作用显著减弱的典型突变株 34 株, 占 8.13%。图 4 为拮抗作用典型突变菌株的拮抗特征, 结果显示, T45 号、T84、T62 和 T42 号等突变菌株的抑制

活性明显强于野生型 T2-16, 这些突变体菌丝生长速度快, 具有空间竞争优势, 并迅速寄生在尖孢镰刀菌 *Fon-1* 菌落上面, 抑制病原菌丝生长; T81 号、T55 号等突变菌株对尖孢镰刀菌 *Fon-1* 的抑制能力和重寄生能力显著降低, 这可能与它们产生的代谢产物、寄生能力以及菌落生长速度有关。拮抗突变株的获得为拮抗性能相关基因的分离奠定了基础, 对提高木霉菌的抗病性能具有重要的指导意义。

2.4 哈茨木霉 T2-16 突变菌株对西瓜枯萎病的防治效果

播种后第 25 天, CK、T81、T240 处理中西瓜开始发枯萎病, 随后各处理均开始出现不同程度的发病症状。待第 45 天时 (图 5), 各处理枯萎病发

病趋于稳定, 其中 T81 和 T240 处理的植株发病率分别为 36.30% 和 38.65%, 显著高于野生型 T2-16 处理发病率 23.35%; 反之, T42 和 T62 处理中的枯萎病发病率分别为 11.25% 和 12.70%, 其防治效果分别高出野生型菌株 31.64% 和 27.91%。由此可以看出, EMS 诱变对木霉菌 T2-16 防治西瓜枯萎病的效果造成明显差异。



图中不同小写字母表示 0.05 水平差异显著, 下同
Data with different lowercase letters indicate significant difference at the 0.05 level, and the same below

图 3 哈茨木霉 T2-16 突变菌株的相对抑制率分析

Figure 3 Relative inhibitory rate analysis of *T. harzianum* T2-16 mutant strain

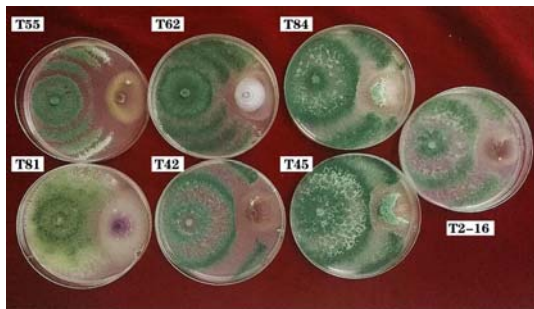


图 4 哈茨木霉 T2-16 突变菌株对尖孢镰刀菌 *Fon-1* 的拮抗效果 (28°C 培养 120 h)

Figure 4 Antagonistic effect of *T. harzianum* T2-16 mutant strain against *Fusarium oxysporum* *Fon-1* (cultured at 28°C for 120 h)

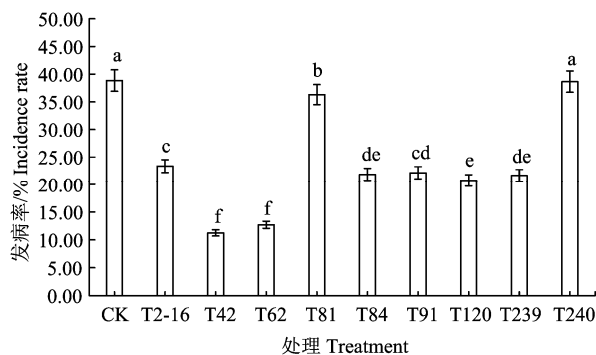


图 5 野生型和部分突变子处理对西瓜枯萎病发病率影响
Figure 5 The effects of wild type and mutant on the incidence rate of watermelon wilt

3 讨论

EMS 诱变技术目前已经成功在多种作物上得到了广泛应用, 对现代分子生物学研究和新品种创制起着重要的推动作用。而 EMS 在微生物育种方面, 仅仅限于个别菌株诱变育种成功, 木霉菌尚未建立有效的 EMS 诱变体系。本研究以真菌成功诱变体系中的 70% 致死率达到最好诱变效果为参考, 采用单因素试验筛获得了以 $10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 木霉孢子浓度为诱变受体, 经 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EMS 浓度处理 4 h 的诱变体系, 与球毛壳菌^[22]、产紫杉烷真菌^[23]的 EMS 诱变条件相一致, 球毛壳菌与木霉均为重要的生防真菌。因此, 试验成功地建立了高效、稳定的木霉 T2-16 诱变体系及突变体库, 并进一步对突变体库生长势和拮抗效应进行了初步检测, 为后续进一步研究生防木霉菌 T2-16 重要基因功能、抗病分子机制以及生防菌与寄主之间互动与调控等方面奠定基础。

由于哈茨木霉 T2-16 是一株生防效应很好的生防菌株, 因此构建哈茨木霉 T2-16 的突变体库要求兼顾变异拓展幅度和正向突变效率, 如此才能做好该菌的抗病机理研究, 又可提升其应用能力。范亮波^[24]利用农杆菌介导获得哈茨木霉 Th-33 突变体库并获得产孢能力突变株。本实验室前期试验中因哈茨木霉 T2-16 对抗生素不敏感等原因, 导致哈茨木霉通过转座子法诱变效果不理想。而 EMS 诱变剂具有饱和和诱变机理, 以及其操作简便、突变频率高的特点, 因此, 本研究利用 EMS 诱变技术对木霉菌 T2-16 进行诱变处理, 构建木霉菌 T2-16 突变体库。经生长势、拮抗力和生防效应分析发现, 一些突变子在产孢量、菌落颜色、菌落扩展速度、拮抗能力、生防效果等方面产生了明显的变化。稳定性遗传的 418 株突变菌株中在生长势呈正向突变占有率达 46.20%, 相对抑制率变化幅度超过 30% 的典型突变菌株占 11.96%。其中, 突变菌 T267 较野生型 T2-16 的生长势提高 19.70%、拮抗抑菌效应提高 40.83%; 相反地, 突变菌 T81 号生长速度较野生型 T2-16 降低 50.16%, 其对尖孢镰刀菌 *Fon-1* 的抑制能力也显著降低。这结果与木霉菌的生防效应主要体现在空间营养竞争和寄生两大方式的协同作用相吻合。同时, 范亮波^[24]在木霉菌 Th-33 突变体库中也发现 2 株木霉突变体的产孢能力与其拮抗能力同时减弱现象, Elamathi 等^[25]发现木霉通过重寄生作用抑制病原菌生长, 从而达到防病作用。与此同时, 鉴于目前木霉生防功能基因及机理鲜有报道, 本研

究通过盆栽防效试验发现, 各突变菌株对西瓜枯萎病的生防效应也发生了显著变化, 其中 T42 和 T62 处理的植株其生防效果分别高出野生型菌株 31.64% 和 27.91%; 反之, T81 和 T240 处理的植株其生防效果几乎为 0。表明木霉生长势、重寄生能力、拮抗能力与生物防治效果具有正相关性。李国田^[26]也研究发现木霉菌可以通过抑菌作用或者重寄生作用或者二者共同作用来提高木霉的生物防治效果, 木霉抑菌能力、重寄生能力与生物防治效果具有正相关性。究其原因, 我们推测其菌丝生长、分生孢子、寄生能力控制基因与生防功能基因可能存在相关性, 但是需要进一步研究证实。

目前, 已经报道有影响木霉菌产孢、生长等功能基因包括 BLR 复合物基因、*ntl* 基因、漆酶基因、几丁质合成酶 *ThChsC* 基因和 *Ga* 基因等^[27-29]。与此同时, 钟耀华^[30]在研究瑞氏木霉 T-DNA 标签的突变子时, 发现两株色素能力发生变异的菌株产生类胡萝卜素和 β 胡萝卜素的能力发生变化。本研究在突变体库中也发现了产色素变浅绿色、白色等其他形态变化, 该类性状的功能基因是否和其他种已报道的基因一致呢? 这为下一步木霉菌相关性状的功能基因的挖掘与其生防机理研究提供了基础。

参考文献:

- [1] 李昕玥. 哈茨木霉 TH-33 C2H2 型转录因子 *THA09974* 的功能研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.
- [2] 梁志怀, 魏林, 陈玉荣, 等. 哈茨木霉在水稻体内的定殖及其对水稻纹枯病抗性的影响[J]. 中国生物防治, 2009, 25(2): 143-147.
- [3] 夏海, 吴琼, 陆志翔, 等. 有效霉素 A 对棘孢木霉的影响及协同防治玉米纹枯病作用[J]. 微生物学通报, 2018, 45(1): 1-10.
- [4] 张春秋, 马光恕, 廉华, 等. 木霉对黄瓜幼苗生理特性及枯萎病防治效果的影响[J]. 植物保护, 2018, 44(5): 238-246.
- [5] GUZMÁN-VALLE P, BRAVO-LUNA L, MONTES-BELMONT R, et al. Induction of resistance to *Sclerotium rolfsii* in different varieties of onion by inoculation with *Trichoderma asperellum*[J]. Eur J Plant Pathol, 2014, 138(2): 223-229.
- [6] 梁志怀, 魏宝阳, 魏林, 等. 哈茨木霉在水稻体内的定殖及对水稻生理生化特性的影响[J]. 湖南农业科学, 2008(4): 51-53.
- [7] 李松鹏. 两株水稻根际木霉菌株生物学特性及生防潜能研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
- [8] SGHIR F, TOUATI J, MOURIA B, et al. Effect of *Trichoderma harzianum* and *endomycorrhizae* on growth and *Fusarium* wilt of tomato and eggplant[J]. World J Pharm Life Sci, 2016, 2(3): 69-93.
- [9] HARMAN G E. Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity[J]. New Phytol, 2011, 189(3): 647-649.
- [10] 彭可为, 李婵. 木霉菌的生物防治研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(2): 780-782.
- [11] OKAGAKI R J, NEUFFER M G, WESSLER S R. A deletion common to two independently derived waxy mutations of maize[J]. Genetics, 1991, 128(2): 425-431.
- [12] FENG Z M, ZHANG L, YANG C Y, et al. EF8 is involved in photoperiodic flowering pathway and chlorophyll biogenesis in rice[J]. Plant Cell Rep, 2014, 33(12): 2003-2014.
- [13] KULKARNI K P, VISHWAKARMA C, SAHOO S P, et al. A substitution mutation in OsCCD7 cosegregates with dwarf and increased tillering phenotype in rice[J]. J Genet, 2014, 93(2): 389-401.
- [14] 樊双虎, 郭文柱, 路小铎, 等. 玉米 EMS 突变体库构建及突变体初步鉴定[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(11): 3162-3165.
- [15] 王春语, 朱振兴, 李丹, 等. 高粱 EMS 诱变及突变体筛选、鉴定[J]. 生物技术通报, 2014(9): 78-83.
- [16] 周书栋, 杨博智, 欧立军, 等. 辣椒突变体库的构建及突变群体表型变异分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2017, 43(1): 31-36.
- [17] 徐美红, 陆文玉, 金明弟, 等. 七宝黄金瓜 EMS 诱变群体的构建[J]. 分子植物育种, 2015, 13(3): 601-604.
- [18] 侯艳, 朱子成, 朱娜娜, 等. EMS 诱变西瓜突变体库的构建及表型分析[J]. 西北植物学报, 2016, 36(12): 2411-2420.
- [19] SAITO T, ARIIZUMI T, OKABE Y, et al. TOMATOMA: A novel tomato mutant database distributing micro-tom mutant collections[J]. Plant Cell Physiol, 2011, 52(2): 283-296.
- [20] 哈霞, 胡中慧, 王蕾, 等. 大豆疫霉菌的 EMS 化学诱变[J]. 菌物学报, 2010, 29(2): 222-227.
- [21] 杜国军, 程红, 彭凯, 等. 高产果胶酶的黑曲霉化学诱变选育[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(4): 348-350.
- [22] 李茹. 球毛壳菌(*Chaetomium globosum*)的 EMS 诱变育种及 NK-101 生长条件的优化[D]. 天津: 南开大学, 2013.
- [23] 朱庆磊. 产紫杉烷真菌 *Pestalotiopsis malicola* 的 EMS 诱变育种及 NK-36b 的细胞水平遗传分析[D]. 天津: 南开大学, 2012.
- [24] 范亮波. 哈茨木霉菌 Th-33T-DNA 插入突变体库的构建及表型突变株的分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.
- [25] ELAMATHI E, MALATHI P, VISWANATHAN R, et al. Expression analysis on mycoparasitism related genes during antagonism of *Trichoderma* with *Colletotrichum falcatum* causing red rot in sugarcane[J]. J Plant Biochem Biotechnol, 2018, 27(3): 351-361.
- [26] 李国田. 土壤杆菌介导的绿色木霉插入突变及重复寄生与生物防治能力的关系[D]. 淄博: 山东理工大学, 2007.
- [27] CASTELLANOS F, SCHMOLL M, MARTINEZ P, et al. Crucial factors of the light perception machinery and their impact on growth and cellulase gene transcription in *Trichoderma reesei*[J]. Fungal Genet Biol, 2010, 47(5): 468-476.
- [28] CASAS-FLORES S, RIOS-MOMBERG M, BIBBINS M, et al. BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photocondensation and mycelial growth in *Trichoderma atroviride*[J]. Microbiology, 2004, 150(11): 3561-3569.
- [29] MUKHERJEE P K, LATHA J, HADAR R, et al. Role of two G-protein alpha subunits, TgaA and TgaB, in the antagonism of plant pathogens by *Trichoderma virens*[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(1): 542-549.
- [30] 钟耀华. 农杆菌介导的瑞氏木霉 T-DNA 插入突变及生长代谢突变子分析[D]. 济南: 山东大学, 2007.