

微波诱变选育高效溶磷木霉菌株的研究

薛应钰, 叶巍, 张树武, 刘佳, 徐秉良

(甘肃农业大学植物保护学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 为了获得高效溶磷菌株, 对木霉菌 T6 菌株进行微波诱变处理, 测定并分析了微波输出功率和辐照时间等参数对诱变效果的影响。结果表明: 最佳诱变条件是微波输出功率 900 W, 辐照时间 70 s, 且在此条件下得到 8 株具有较高溶磷能力的突变菌株 T6-9、T6-33、T6-93、T6-126、T6-157、T6-188、T6-196 和 T6-203。经过多代转接培养最后得到一株遗传稳定的溶磷木霉菌株 T6-157, 该菌株在液体培养条件下溶磷量为 $204.46\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 与出发菌株相比, 溶磷量提高了 107.97%, 植酸酶活性提高了 57.35%, 且突变菌株对土传植物病原菌的拮抗能力也有所提高。

关键词: 木霉菌; 微波诱变; 溶磷能力; 拮抗作用

中图分类号: Q936 **文献标志码:** A

Screening of *Trichoderma* sp. strain for high phosphorus solubilization using microwave mutagenesis

XUE Ying-yu, YE Wei, ZHANG Shu-wu, LIU Jia, XU Bing-liang

(College of Plant Protection, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730030, China)

Abstract: In order to obtain *Trichoderma* sp. strain with high phosphorus dissolving efficiency, the original strain, *Trichoderma* T6 with low ability in dissolving phosphorus, was mutated by microwave. The microwave mutagenesis parameters were optimized, and the genetic stability, phosphate solubilizing power and antibiotic ability of the mutant were investigated. The results showed that the optimum mutagenic method was with an irradiation power at 900 W and a mutation time of 70 s. 8 stains with high phosphorus solubilizing capability named T6-9, T6-33, T6-93, T6-126, T6-157, T6-188, T6-196 and T6-203 were obtained using the optimized mutagenic method. After several generations, a strain named T6-157 with relatively stable hereditary was eventually obtained, exhibiting high phosphorus solubilizing capability. The highest phosphate solubilizing power of mutant strain T6-157 was $204.46\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, and the phosphate solubilizing power and phytase activity were increased by 107.97% and 57.35%, respectively, compared with the original strain. The antagonistic ability against the main soil-borne pathogens was higher than that of the initial strain T6.

Keywords: *Trichoderma* sp.; microwave mutagenesis; phosphate solubilization capacity; antagonistic effect

磷是限制植物生长的主要元素之一, 对氮固定、光合作用、能量转移、信号传导、生物大分子合成和呼吸作用都有着重要的影响^[1-2]。据报道, 我国 74% 的耕地土壤缺磷^[3], 一方面, 土壤中常以磷酸三钙存在的磷酸盐溶解性差, 很难被植物所吸收; 另一方面, 施入磷化肥的大部分磷素在土壤中由于与 Fe^{2+} 和 Al^{3+} 等的强烈吸附和固定作用而形成闭蓄态难溶性磷酸盐, 当季利用率在 5% ~ 25%^[4-5]。溶磷微生物 (PSMs) 能通过分泌有机酸以及与铁、铝、钙等离子结合, 增加矿物态和吸附态磷素的溶解性, 提高土壤中的可溶性磷含量, 从而可以提高植物对磷的利用效率, 使植物获得较充足的磷营养^[6-7]。目前已报道的具有溶磷能力的微生物包括细菌、真菌和放线菌等, 其中筛选的溶磷细菌数量和种类较多, 如荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)^[8] 和芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)^[9] 已投入生产应用, 但是对真菌的研究较少。因此, 挖掘和利用高效溶磷真菌种质资源是当前迫切需要解决的科学问题之

收稿日期: 2015-06-20
基金项目: 甘肃省高校基本科研业务费项目资助(甘财教[2012]129号); 甘肃省教育厅高校科研项目资助(2013A-061); 甘肃省自然科学基金项目(145RJZA095); 甘肃农业大学科技创新基金资助项目(GAU-CX1014)
作者简介: 薛应钰(1978—), 男, 甘肃镇原人, 博士, 副教授, 研究方向为植物病害生物防治。E-mail: xueyy@gsau.edu.cn。
通信作者: 徐秉良(1962—), 女, 浙江桐乡人, 博士, 教授, 研究方向为植物病害综合治理。E-mail: xubl@gsau.edu.cn。

一。

近年来,研究发现木霉菌(*Trichoderma* sp.)除了作为重要的植物病害生物防治因子之外,还具有提高作物营养利用的能力^[10],如绿色木霉(*T. viride*)和哈茨木霉(*T. harzianum*)等具有溶解难溶性无机磷酸盐和金属矿物的能力^[11-12],而本课题组在前期研究中分离到一株具有溶磷和拮抗作用的木霉菌 T6 菌株,但在前期研究中发现该野生菌株溶磷能力相对较弱,采用菌种诱变育种的方法可以提高已有菌种的选育效率,弥补野生种溶磷能力弱的缺陷,筛选和提高木霉菌的溶磷能力正在受到人们的高度重视。

目前,改良微生物菌株的手段主要有诱变育种、原生质体融合和遗传改造等^[13],其中微波诱变是一种利用低能高频电磁波刺激水、蛋白质、核苷酸、脂肪和碳水化合物等极性分子快速震动,使细胞内 DNA 分子氢键和碱基堆积化学力受损, DNA 结构发生变化,从而发生遗传变异^[14]。同时,微波诱变具有设备简单、操作安全和正突变率较高,以及在短时间内能够获得大量的突变体等优点^[15]。鉴于以上优点,到目前为止国内外关于微波诱变进行木霉菌功能改良已有一些研究,并取得了显著成效。秦涛等^[16]对以产纤维素酶的绿色木霉(*T. viride*) A10 进行微波诱变,获得多次传代后遗传性状稳定、较出发菌株滤纸酶活力和羧甲基纤维素酶活力分别提高了 34.3% 和 32.4% 的突变菌株 WB6;赵靖等^[17]通过微波诱变对一株产纤维素酶的木霉菌 YM 进行了改造,筛选出 5 株纤维素酶高产菌株,其平均纤维素酶活力较原始菌株提高了 35%,其中酶活力最高的菌株 MW6 纤维素酶产量较原始型菌株提高了 40%。这些研究说明微波诱导产生的突变菌株具有增产明显、遗传稳定的优点。但是,目前使用微波诱变进行木霉菌株功能改良方面的研究主要集中于选育高产纤维素酶菌株方面,尚未见高效溶磷菌株选育的报道。

因此,本研究拟以前期分离筛选得到的具有溶磷和拮抗作用的木霉 T6 菌株为试材,通过微波诱变处理,以期获得高效溶磷和较强拮抗作用的多功能突变菌株,为今后多功能木霉制剂的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株 出发菌株木霉菌株 T6 为甘肃农业大学植物病理学实验室分离保存,具有溶解无机磷($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)和拮抗双重作用。

培养基 PDA 培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20

g,去离子水 1 000 mL,琼脂粉 10 g,用于菌种的保存活化。NBRIP 培养基:葡萄糖 10 g,磷酸钙 10 g,六水氯化镁 5.0 g,七水硫酸亚铁 0.25 g,氯化钾 0.2 g,硫酸铵 0.1 g,pH 值 7.0~7.5,固体培养基加 2% 的琼脂粉,用于解磷能力测定。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种的活化 将实验室预先分离保存的木霉菌株 T6 转接于 PDA 培养基中,置于 28℃ 恒温培养箱中培养 5 d。

1.2.2 孢子悬浮液的制备 待产生大量分生孢子后,用一定量的去离子水洗下菌落表面的木霉孢子,将孢子液收集于盛有玻璃珠的 100 mL 三角瓶中,置于 200 rpm 的摇床上振荡 30 min,使孢子分散均匀,然后用 6~7 层擦镜纸过滤,制成分生孢子悬浮液,调节孢子浓度至 $10^6 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 备用。

1.2.3 微波诱变处理 取预先制备好的分生孢子悬浮液 10 mL 倒入 50 mL 三角瓶中,将三角瓶置于盛有冰块的烧杯中,在最小功率 80 W,最大功率 1 200 W,额定微波频率 2 450 MHz 的 HairMD-2480EGC 型微波炉中进行辐照处理,辐照功率分别为 600、900 W 和 1 200 W,辐照时间为 0、10、20、30、40、50、60、70、80、90 s 和 100 s,采用冰浴法消除热效应,每累计照射 5 s 需将菌液取出,在冰上冷却 5 s 后再进行照射。然后取微波处理过的孢子悬浮液涂布于 NBRIP 固体培养基上,28℃ 恒温培养 7 d,每个处理和对照均为 3 次重复。培养 7 d 后,分别统计单菌落数、单菌落直径和溶磷透明圈直径,并计算其致死率和正突变率,确定最佳诱变条件。

致死率(%) = (对照菌落数 - 处理菌落数) / 对照菌落数 × 100

正突变率(%) = (溶磷能力提高的突变株数目 / 突变株总数) × 100

1.2.4 突变株初筛和复筛 在最佳诱变条件下对出发菌株进行微波诱变处理,将诱变处理过的孢子悬浮液稀释成一定的浓度梯度,涂布在 NBRIP 固体培养基上,28℃ 恒温培养 7 d,以溶磷圈直径(d')与菌落直径(d)比值大于原始菌株 d'/d 比值作为初筛标志进行溶磷突变株的初筛。将初筛获得的菌株和原始菌株分别接种到 PDA 培养基上,28℃ 恒温培养 5 d,配制成浓度为 $10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的孢子悬浮液,取 1 mL 孢子悬浮液接种于 NBRIP 液体培养基中,置于 28℃,150 rpm 摇床震荡培养 15 d 后测定溶磷量和植酸酶活性。

1.2.5 溶磷量和植酸酶活性的测定 溶磷能力的测定采用磷钒钼黄比色法^[18-19];植酸酶活性测定

采用 Heinonen 和 Lahti^[20]的方法。

1.2.6 溶磷突变菌株遗传稳定性测定 将酶活性和溶磷能力明显提高的 3 株木霉突变菌株分别接种于 PDA 培养基上,25℃培养 5 d 记为第 1 代。然后,每隔 5 d,以 PDA 培养基传代 1 次,接种于 NBRIP 液体培养基振荡培养 14 d,共传代 4 次,测定每代各菌株的溶磷量和植酸酶活性。

1.2.7 突变菌株拮抗试验 对尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)和立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)的拮抗作用采用对峙平板法,即将突变木霉菌株 T6-157 分别与 2 种病原菌对峙接种在 PDA 平板两端,两接种点距离中心 2 cm,菌饼直径 6 mm,以单独接种病原菌株作为对照。每个处理重复 3 次,置于 25℃恒温箱中培养 7 d,测量病原菌落中心指向木霉菌落半径的相向距离以及对照病原菌落半径,并计算其抑菌率。

抑菌率(%)=[(病原菌对照菌落半径-病原菌落中心指向木霉菌落半径的相向距离)/病原菌对照菌落半径]×100,这个公式需要考虑接种的菌饼半径。

对禾谷胞囊线虫(*Heterodera avenae*)的抑制作用,在高温灭菌的培养皿($d=6\text{ cm}$)中放入 10 个表面消毒且发育较一致的胞囊,加入 5 mL 浓度为 $1.5\times10^6\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 木霉突变菌株 T6-157 孢子悬浮液,以加入 5 mL 无菌水作为对照,处理和对照均为 3 个重复。试验在 25℃下进行,10 天后镜检各处理中胞囊被寄生和孵化情况,并按照下列公式计算胞囊寄生率和胞囊孵化的相对抑制率。

胞囊的寄生率(%)=处理胞囊寄生的数量/供试胞囊的数量×100

胞囊孵化的相对抑制率(%)=(对照孵化的线虫数量-处理孵化的线虫数量)/对照孵化的线虫数量×100

2 结果与分析

2.1 微波诱变对木霉菌 T6 活性的影响及诱变条件的确定

微波辐射功率和时间对菌体致死率的影响反映了菌种耐受微波的能力。由图 1 可以看出,不同功率的微波辐照处理对木霉菌 T6 活性的影响不同,随着辐照功率的增大和辐照时间的延长其致死率逐渐增大。在试验所选用的 600、900、1 200 W 三个辐照功率中,木霉菌 T6 在 1 200 W 功率辐照下,致死率最高;在 900 W 功率辐照下,致死率次之;在 600 W 功率辐照下,致死率最低。在 900 W 功率下,辐照

10 s 木霉菌的致死率较低,仅为 3.52%;辐照 70 s 时,其致死率为 91.39%;当辐照 80 s、90 s 和 100 s 时,其致死率分别为 99.02%、99.37% 和 99.87%,接近 100%,几乎全部死亡,说明木霉 T6 菌株的孢子对微波较为敏感,致死效应明显。

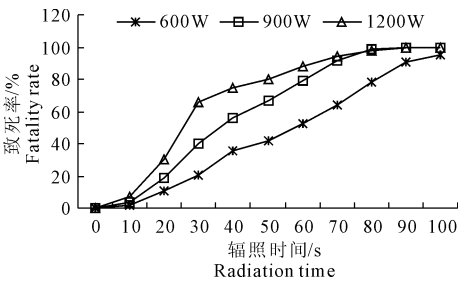


图 1 微波辐照对木霉孢子的致死率
Fig.1 Fatality rate of microwave irradiation on *Trichoderma* spores

不同功率微波辐照木霉菌后,其正突变率均随着辐照时间的延长先增加后降低,呈现出单峰趋势。输出功率为 600 W,辐照为 80 s 时达到 62.57%;输出功率提高到 900 W 时,相同处理时间内的正突变率均高于 600 W 的正突变率,70 s 时达到最大值 85.46%;当输出功率提高到 1 200 W 时,正突变率比较低,尤其辐照 30 s 后接近于 0(图 2)。可见,900 W 输出功率辐照 70 s 为木霉 T6 菌株的最佳诱变条件,正突变率达到最大值(85.46%),而此时菌株的致死率较高,为 91.39%。

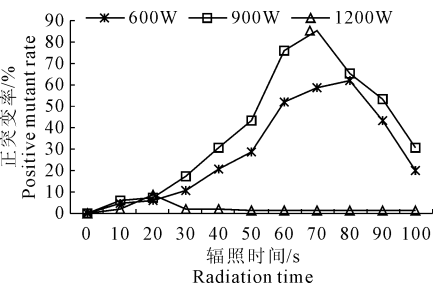


图 2 微波辐照对木霉孢子的正突变率
Fig.2 The positive mutant rate of microwave irradiation on *Trichoderma* spores

2.2 溶磷木霉突变菌株的初筛

在 900 W 和 70 s 的最佳诱变条件下,从 220 株中筛选获得解磷圈直径(d')与菌落直径(d)比值大于出发菌株 d'/d 比值的菌株 8 株,分别为 T6-9、T6-33、T6-93、T6-126、T6-157、T6-188、T6-196 和 T6-203。其中,T6-188 菌株的 d'/d 比值最大,为 1.51,与出发菌株相比,提高了 46.6%,T6-157 菌株次之,比值为 1.48,较对照提高率为 46.6%,T6-9

菌株的比值最小,较对照提高率仅为 10.7%(表 1)。

表 1 微波诱变处理后溶磷木霉突变菌株初筛结果

项目 Item	菌株 Strain								出发菌株 Initial strain
	T6-9	T6-33	T6-93	T6-126	T6-157	T6-188	T6-196	T6-203	
d'/d	1.14	1.22	1.16	1.25	1.48	1.51	1.36	1.27	1.03
提高率/% Increase efficiency	10.7	18.4	12.6	21.4	45.6	46.6	32.0	23.3	—

2.3 溶磷突变菌株的复筛

结果表明,8 株微波诱变的突变菌株的溶磷量和植酸酶活性较未经微波诱变的出发菌株都有所提高,T6-188、T6-157 和 T6-196 共 3 个菌株的溶磷量和植酸酶活性明显高于出发菌株,以 T6-188 菌株的溶磷量和植酸酶活性为最高,达 206.7 mg·L⁻¹ 和 558 nmol·L⁻¹,分别较出发菌株提高了 110.25%

和 60.81%;其次为 T6-157 菌株,溶磷量和植酸酶活性分别为 204.46 mg·L⁻¹和 546 nmol·L⁻¹,较出发菌株分别提高了 107.97%和 57.35%;T6-196 菌株的溶磷量和植酸酶活性最小,分别为 172.27 mg·L⁻¹和 481 nmol·L⁻¹,与出发菌株相比,提高了 75.23%和 38.62%(图 3)。

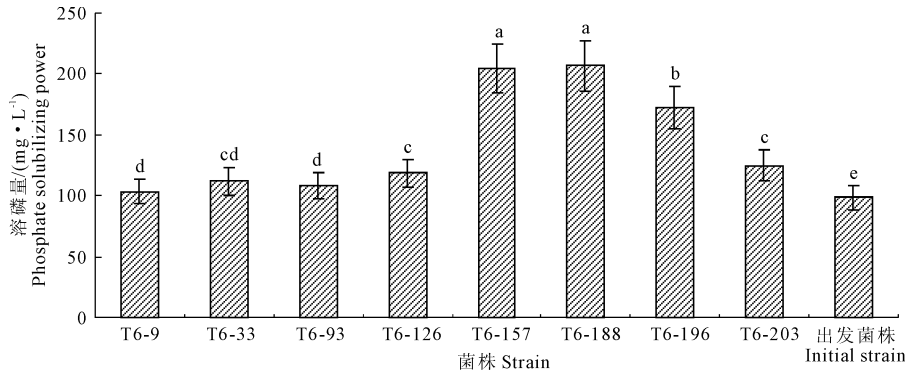


图 3 8 株突变菌株液体培养条件下的解磷能力

Fig.3 Phosphate solubilizing power of 8 *Trichoderma* mutant strains in liquid culture

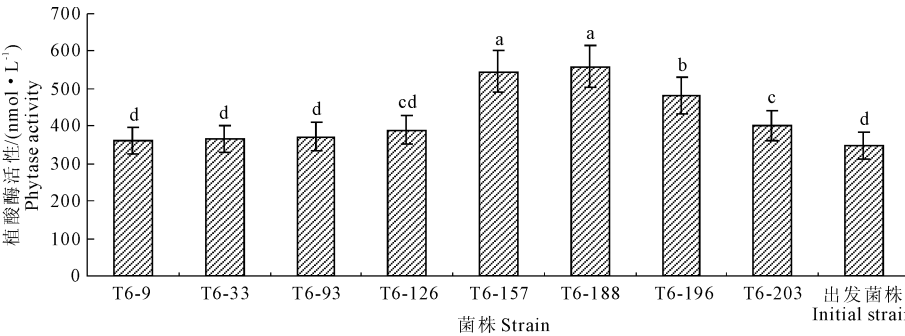


图 4 8 株木霉突变菌株在液体培养条件下植酸酶活性测定结果

Fig.4 Phytase activity of 8 *Trichoderma* mutant strains in liquid culture

2.4 溶磷突变菌株遗传稳定性

由表 2 可知,T6-188 和 T6-196 菌株都不稳定,尤其是 T6-188 菌株在培养 1 代后的溶磷量和植酸酶活性很高,保持在原来水平,但在不断转接培养过程中,其溶磷量和植酸酶活性不断下降,培养 5

代后的溶磷量和植酸酶活性仅为 174.75 mg·L⁻¹和 326 nmol·L⁻¹;而突变菌株 T6-157 相对比较稳定,培养 5 代后的溶磷量和植酸酶活性都基本保持不变,分别仍然保持在 204.93 mg·L⁻¹和 552 nmol·L⁻¹。

表 2 突变菌株溶磷能力的遗传稳定性

Table 2 The stable hereditary characteristics of *Trichoderma* mutant strains

培养代数 Culture generation	溶磷量/(mg·L ⁻¹) Phosphorus-dissolving quantity			植酸酶活性/(nmol·L ⁻¹) Phytase activity		
	T6 – 157	T6 – 188	T6 – 196	T6 – 157	T6 – 188	T6 – 196
1	202.71	204.17	172.28	549	561	480
2	204.83	190.33	167.32	570	514	394
3	204.38	186.72	170.65	589	502	427
4	204.91	175.81	166.29	561	347	361
5	204.93	174.75	171.35	552	326	459

2.5 溶磷突变菌株拮抗效果

从表 3 可知,通过微波诱变得到的木霉 T6 – 157 菌株对 2 种病原菌和小麦禾谷胞囊线虫的拮抗能力有了进一步的提高。突变菌株 T6 – 157 与出发菌株 T6 相比,对尖孢镰刀菌和立枯丝核菌的抑制率

分别提高了 11.83% 和 10.39%,且突变菌株 T6 – 157 与出发菌株 T6 的抑菌率差异显著($P < 0.05$);对禾谷胞囊线虫胞囊的寄生率和胞囊孵化相对抑制率分别由原来的 91.2% 和 90.8% 提高到了 92.3% 和 91.5%,但差异不显著($P < 0.05$)。

表 3 溶磷木霉突变菌株 T6 – 157 对土传病原菌的拮抗作用

Table 3 The antagonistic effect of phosphate solubilizing *Trichoderma* mutant strain T6 – 157 against soil borne pathogens

菌株 Strain	尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i>		立枯丝核菌 <i>Rhizoctonia solani</i>		禾谷胞囊线虫 <i>Heterodera avenae</i>	
	距离/mm Distance	抑制率/% Inhibition rate	距离/mm Distance	抑制率/% Inhibition rate	寄生率/% Parasitic rate	孵化率/% Hatching rate
T6 – 157	5.6	93.12 ± 7.03 a	6.4	94.23 ± 6.57 a	92.3 ± 8.12 a	91.5 ± 5.38 a
出发菌株 Initial strain	6.7	83.27 ± 5.86 b	7.3	85.36 ± 5.43 b	91.2 ± 7.55 a	90.8 ± 6.27 a

注:不同字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著。
Note: Different letters in the same column indicate significant differences at $P < 0.05$.

3 讨 论

微波诱变作为一种新型诱变方法,由于其能够在短时间内得到优良高效、性质稳定的突变株,且与传统的诱变育种手段相比,可以大幅提高菌种单位,减少突变率低和突变谱窄等弊端,目前在微生物菌种改良方面已广泛应用^[21]。本研究通过微波诱变处理,获得了 1 株遗传稳定的高效溶磷木霉菌株 T6,其液体培养条件下的溶磷量为 204.46 mg·L⁻¹,与出发菌株相比溶磷能力提高了 107.97%,与杨合同等^[22]分离到的木霉 T13 – 8 和 T – 23 菌株的溶磷能力基本一致,高于张曼曼等^[23]从土壤中分离到的拟康氏木霉(*T. koningiopsis*) T – 404 菌株的溶磷能力。因此,利用微波诱变对木霉高效溶磷菌株进行选育具有可行性。

诱变过程中诱变结果受菌种特性、诱变条件等多种因素的影响。李剑峰等^[20]研究发现微波输出功率和诱变时间分别为 600 W 和 30 s 时可以获得苜蓿根瘤菌(*Rhizobium meliloti*)高效溶磷突变株,其溶磷能力较原始菌株提高了 112.59%。本试验证明

木霉 T6 菌株在微波输出功率 900 W、辐照时间 70 s 的条件可以获得高效溶磷能力的突变株,这主要是因为微波诱变过程中微波对细胞内物质形成的损伤程度不同,造成了不同的微生物对微波的反应有差别^[24]。另外,由于微波的生物效应分为热效应和非热效应。热效应可以导致实验菌株的死亡,此时微波对实验菌株的致死率明显,而对微生物产生诱变作用的主要是非热效应^[25]。因此,为了极大限度地消除微波的热效应,本研究在对孢子悬浮液进行辐照过程中采用间歇诱变的方法,即每累计照射 5 s 将孢子悬浮液取出,在冰上冷却 5 s 后再进行照射,使孢子悬液在诱变过程中系统温度始终处在较低水平,提高了对菌株的诱变效率,也凸显了非热效应的诱变效应。

本试验通过对微波诱变获得的 1 株具有高效稳定溶磷能力木霉突变菌株拮抗活性的测定,表明其对立枯丝核菌(*R. solani*)、禾谷镰刀菌(*F. oxysporum*)和禾谷胞囊线虫(*H. avenae*)等主要土传病害病原菌的拮抗能力并无消减。这说明木霉菌 T6 菌株对微波辐照敏感,诱变效果较好,可以通过微波辐

照处理对野生木霉菌株进行改良,获得高效优质的溶磷木霉突变菌株。同时,以物理诱变方式增强其溶磷效果,使目的菌株同时具备溶磷和拮抗的双重能力,弥补现有木霉菌剂效果单一的缺陷,扩大了木霉菌的应用范围。因此,微波诱变在多功能木霉菌菌种的选育中具有较大的推广价值和广阔应用前景,但在木霉 T6 菌株复合诱变提高其溶磷能力和对所获得的突变菌株 T6-157 田间应用效果等方面有待继续深入研究。

参 考 文 献:

[1] Femondez L A, Zalba P, Gomez M A, et al. Phosphate solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under greenhouse conditions[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2007, 43(6): 805-809.

[2] Vessey J K, Heisnger K G. Effect of *Penicillium bilaii* inoculation and phosphorus fertilization on root and shoot parameters of field-grown pea [J]. *Canadian Journal of Plant Science*, 2001, 81(3):361-366.

[3] Zaidi A, Kham M S, Ahemad M, et al. Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes [J]. *Microbial Strategies for Crop Improvement*, 2009, (10):23.

[4] K. Saravanakumar, V. Shanmuga Arasu, K. Kathiresan. Effect of *Trichoderma* on soil phosphate solubilization and growth improvement of *Avicennia marina*[J]. *Aquatic Botany*, 2013, 104: 101-105.

[5] 赵小蓉,林启美.微生物解磷的研究进展[J].*土壤肥料*, 2001, (3):7-11.

[6] Rekha R, Lakshmi T. Effect of abiotic stress on phosphate solubilization by biocontrol fungus *Trichoderma sp.* [J]. *Current Microbiology*, 2011, 62: 1521-1526.

[7] 张宝贵,李贵桐.土壤生物在土壤磷有效化中的作用[J].*土壤学报*, 1998, 35(1): 104-111.

[8] Sah U S, Natarajan N, H Ari K. Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields[J]. *Field Crops Research*, 2002, 77: 43-49.

[9] 陈廷伟.解磷巨大芽孢杆菌分类名称、形态特征及解磷性能述评[J].*土壤肥料*, 2005, (1):7-9.

[10] Harman G E, Howeller, Viterboa, et al. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts [J]. *Nature Review Microbiol*, 2004, (2):43-56.

[11] Anusuyda, Jayara J. Solubilization of phosphorus by *Tichoderma viride*[J]. *Current Science*, 1998, 74:464-465.

[12] Altomarec, Norvellwa, Bjokmant, et al. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant growth promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai [J]. *Environmental Microbiology*, 1999, 65:2926-2933.

[13] 杨合同,唐文华,李纪顺,等.绿色木霉 LTR-2 菌株的紫外线诱变改良[J].*中国生物防治*, 2004, 20(3):82-186.

[14] 李 豪,车振明.微波诱变微生物育种的研究[J].*山西食品工业*, 2005, (2):5-6.

[15] 李永泉,贺菽蓉.微波诱变和激光诱变相结合选育金霉素链霉菌的研究[J].*生物工程学报*, 1998, 14(4):445-448.

[16] 秦 涛,李忠玲,张 强,等.绿色木霉产纤维素酶菌种的优化及酶学性质研究[J].*贵州农业科学*, 2010, 38(6):110-111.

[17] 赵 靖,张 荟,杨 静.微波诱变选育纤维素酶高产木霉 [J].*广州化工*, 2014, 42(16):89-90, 161.

[18] 岳 斌,王宝维,张名爱,等.鹅源草酸青霉溶磷效果及对鹅磷代谢的影响[J].*青岛农业大学学报(自然科学版)*, 2008, 25(1):34-37.

[19] Fiske C H, Subbarow Y. Method for the colorimetric determination of phosphate[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1925, 66:375-400.

[20] Heinonen J K, Lahti R J. A new and convenient calorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase [J]. *Analytical Biochemistry*, 1981, 113: 313-317.

[21] 李宏宇,鲁国东,王明海.稻瘟病菌微波诱发突变体的分析 [J].*菌物系统*, 2003, 22(4):639-644.

[22] 杨合同,于雪云,魏艳丽,等.多功能植病生防木霉的分离筛选与鉴定[J].*山东科学*, 2009, 22(5):211-214.

[23] 张曼曼,邓春生,马金奉,等.多功能木霉的筛选及鉴定[J].*农业环境科学学报*, 2012, 31(8):1571-1575.

[24] 徐 伟,王 鹏,张 兴,等.微波诱变高产 L-乳酸细菌的选育与表征[J].*天津大学学报*, 2009, 42(6):544-548.

[25] 李永泉.微波诱变选育木聚糖酶高产菌[J].*微波学报*, 2001, 17(1):40-43.