

# 木霉耐盐突变菌株的紫外诱变选育

张树武,徐秉良,刘佳,石成才

(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,甘肃兰州730070)

**摘要:**为了获得高效耐盐木霉突变菌株,以盐碱土中分离的一株深绿木霉 T-YM 作为原始菌株进行紫外诱变处理,并筛选了突变菌株的最佳诱变条件,利用 NaCl 溶液模拟盐胁迫条件测定了突变菌株耐盐指标生长速率、产孢量和菌丝生长量。结果表明,与对照(野生型菌株)相比,当诱变时间为 3 min 时能够显著提高深绿木霉 T-YM 突变菌株菌落生长速度和产孢量,分别增加 17.69% 和 28.82%;诱变时间为 0.5 min 和 5 min 时能够显著提高突变菌株菌丝生长量,分别增加 42.22% 和 46.67%。利用  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  NaCl 溶液模拟盐胁迫条件时,与对照相比突变菌株菌落生长速度、产孢量和菌丝干重整体高于野生型菌株,尤其当诱变时间为 3 min 时,不同浓度盐胁迫下其产孢量平均增加 51.18%,诱变时间为 0.5 min 时其菌丝干重平均增加 23.65%;NaCl 胁迫 ( $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 下,诱变处理 0.5 min 获得的正突变菌株经传代接种培养后其耐盐性较为稳定。因此,紫外诱变可作为一种选育高效耐盐木霉突变菌株的有效方法。

**关键词:**木霉菌;紫外诱变;NaCl 胁迫;生长;耐盐性

**中图分类号:**S154.3 **文献标志码:**A

## Identification of salinity tolerant mutant strain of *Trichoderma* sp. by ultraviolet mutagenesis

ZHANG Shu-wu, XU Bing-liang, LIU Jia, SHI Cheng-cai

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

**Abstracts:** In order to obtain high efficient salt tolerant mutant strains of *Trichoderma* sp., we used the original strain of *Trichoderma atroviride* T-YM, which was isolated from the salinity soil to obtain the mutant strains by ultraviolet (UV) mutagenesis, and screened the ultraviolet mutagenesis parameters for the mutant strains, as well as determined the ability of salt tolerant parameters of colony diameters, dry weight and quantity of spore production for the mutant strains under different concentrations of NaCl solution. The results showed that the colony diameters and quantity of spore production by mutant strains were significantly higher after UV mutagenesis for 3 min. than that of original strain, and the colony diameters and quantity of spore production were increased by 17.69% and 28.82%, respectively, compared with the control (original strain). The dry weight of mycelia was significantly higher at 0.5 and 5 min, and was increased by 42.22% and 46.67%, respectively. Moreover, the colony diameters, dry weight, and quantity of spore production of mutant strains were higher than that of the original strain under NaCl stress. The average quantity of spore production was increased by 51.18% at 3 min, and the dry weight of mycelia was increased by 23.65% under different concentrations of NaCl solution. At the same time, the salt-tolerance of mutant strain was relatively stable after incubation for ten generations under NaCl stress ( $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) after UV mutagenesis for 0.5 min. Therefore, UV mutagenesis can be considered as an efficient method for screening and breeding the salt tolerant strains of *Trichoderma* sp..

收稿日期:2018-06-12

修回日期:2018-09-05

**基金项目:**甘肃农业大学人才专项经费(2017RCZX-07);甘肃农业大学科技创新基金(GAU-XKJS-2018-147);甘肃农业大学国家重点实验室开放基金(GSCS-2017-1);甘肃省农牧厅生物技术专项(GNSW-2013-19);甘肃省国际科技合作专项(1604WKCA010)

**作者简介:**张树武(1984-),男,甘肃庆阳人,副教授,研究方向为植物病害生物防治。E-mail: zhangsw704@126.com

**通信作者:**徐秉良(1962-),教授,博士生导师,研究方向为植物病原与植物病害。E-mail: xubl@gsau.edu.cn

**Keywords:** *Trichoderma* sp.; ultraviolet mutagenesis; NaCl stress; growth; salt tolerance

土壤盐渍化已成为一个世界性问题,可造成作物严重减产,每年由于其造成的经济损失达 10 亿美元<sup>[1-3]</sup>。据报道,目前地球上已有超过 6% 的耕地严重受到盐胁迫的影响,且在干旱和半干旱地区较为严重<sup>[4]</sup>。同时,已有研究表明盐胁迫能够引起或造成植物形态特征、生理和代谢反应发生变化,以及改变植物渗透压和活性氧反应等过程,进而导致植物体内过氧化脂质和抗氧化物质失活<sup>[5]</sup>。因此,急需开发有效技术来减轻和降低盐胁迫对植物生长和发育带来的负面影响。Phang 等<sup>[6]</sup>研究表明,传统育种和转基因技术曾被广泛用于耐盐性植物品种的选育,但是传统育种存在周期长和效率低,转基因技术存在高成本等问题<sup>[7-8]</sup>。同时,目前已有许多学者尝试利用外源化合物减轻非生物胁迫对植物生长造成的负面影响,如已证明壳聚糖<sup>[1]</sup>、一氧化氮、硝酸钙<sup>[9]</sup>及茉莉酸<sup>[10]</sup>等能够显著改善和提高小麦耐盐水平,但对于其机理目前尚未明确。同时,随着近年来在该方面研究的不断深入,有关利用植物根际促生细菌和真菌诱导植物抗非生物胁迫方面已有相关的报道,如菌根真菌、根瘤菌、植物根际促生菌和内生真菌等能够改善植物生长<sup>[11]</sup>,但有关高效耐盐微生物突变菌株紫外诱变选育方面的研究和报道较少。

木霉菌(*Trichoderma* spp.)作为土壤中存在的一类真菌,广泛用于不同种类植物病害的生物防治<sup>[12-13]</sup>。此外,Mastouri 等<sup>[14]</sup>研究表明在生物和非生物胁迫下,哈茨木霉 T22 (*T. harzianum*) 菌株能够提高番茄种子的萌发率,减轻幼苗的氧化损伤,但是随着盐浓度的升高,哈茨木霉 T22 菌株活性显著降低,并且由于外界环境的影响其耐盐性效果不稳定。因此,如何提高木霉菌的耐盐性已是目前急需解决的一个问题。

因此,本试验通过利用 NaCl 溶液模拟盐胁迫逆境条件,并利用紫外诱变提高和改良深绿木霉(*Trichoderma atroviride*) T-YM 菌株耐盐性,旨在探明紫外诱变对深绿木霉 T-YM 菌株生长和耐盐性的影响,将为进一步提高其耐盐性奠定理论基础,同时对于进一步改良和扩大木霉菌的应用范围具有重要的实践意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试菌株 深绿木霉 T-YM 菌株分离于甘

肃民勤县玉米根际盐碱土壤,并保存于甘肃农业大学植物病理学实验室。

1.1.2 供试化学试剂 NaCl 分析纯 AR,无色晶体,由国药集团化学试剂有限公司生产。

### 1.2 试验方法

1.2.1 分生孢子悬浮液制备 将预先分离筛选并保存的深绿木霉 T-YM 菌株转接于 PDA 培养基,置于 25℃ 恒温培养箱中培养备用。培养 6 d 后,待其产生大量分生孢子后,向培养基表面加入 5 mL 无菌水和 1 滴吐温-80,洗脱菌落表面分生孢子并将其收集于盛有玻璃珠的 120 mL 三角瓶中,置于温度为 25℃ 和转速为 200 rpm · min<sup>-1</sup> 恒温摇床振荡 30 min,使其分生孢子分散均匀,即为分生孢子悬浮液,并经血球计数板计数,使其孢子浓度为 1 × 10<sup>6</sup> CFU · mL<sup>-1</sup>,备用。

1.2.2 深绿木霉 T-YM 菌株紫外诱变处理 诱变处理前 30 min 打开紫外灯(10 W)使其功率稳定。将配制好的深绿木霉 T-YM 菌株分生孢子悬浮液(1 × 10<sup>6</sup> CFU · mL<sup>-1</sup>)加入经灭菌处理的 1.5 mL 离心管中,每管加入 1 mL 孢子悬浮液。然后,置于紫外灯(10 W) 10 cm 处分别处理 0.5、1、3、5 min 和 7 min。试验以等量未经诱变的原始菌株分生孢子悬浮液作为对照,每个处理和对照均重复 6 次。

1.2.3 紫外诱变对深绿木霉 T-YM 菌落生长和产孢量的影响 采用单孢分离法,对经紫外诱变处理的深绿木霉 T-YM 和原始菌株分生孢子悬浮液进行单孢分离,然后将分离的单个孢子接种于 PDA 平板表面,并置于温度为 25℃,光照为 16 h 的恒温培养箱中培养,每个处理和对照均重复 6 次。培养 3 d 后,将经不同时间紫外诱变处理后生长较好的突变菌株,利用打孔器(Φ = 5 mm)在其菌落边缘打取菌饼,并转接于新的 PDA 培养基,置于温度为 25℃ 和光照为 16 h 的培养箱培养 2 d 后,采用“十字交叉法”测量菌落直径,每隔 1 d 测定和观察 1 次,并于接种培养 7 d 时测定其产孢量。试验以接种原始菌株作为对照,每个处理和对照均重复 6 次。

1.2.4 紫外诱变对深绿木霉 T-YM 菌丝生长的影响 配制相同浓度的原始和诱变后经单孢分离且生长较好的突变菌株分生孢子悬浮液(1 × 10<sup>6</sup> CFU · mL<sup>-1</sup>),并吸取 1 mL 孢子悬浮液接种于 60 mL PDB 液体培养基中,置于温度为 25℃,转速为 180 rpm · min<sup>-1</sup> 的恒温摇床振荡培养 5 d,并经无菌滤纸

过滤后收集菌丝。然后,经 60℃ 恒温烘干,计算其菌丝干重。以接种等量原始菌株孢子悬浮液作为对照,试验每个处理和对照均重复 6 次。

1.2.5 紫外诱变对深绿木霉 T-YM 菌株耐盐性的影响 待 PDA 培养基(每三角瓶 120 mL)冷却到 50℃~60℃ 时,分别加入 NaCl 晶体,并使 NaCl 溶液浓度分别为 0、10、20、30、40 mg·mL<sup>-1</sup> 和 50 mg·mL<sup>-1</sup>。充分摇匀后,均匀倒入 6 个培养皿中制成平板。然后,将获得的突变菌株经单孢分离并纯化培养 5 d 的菌落经灭菌的打孔器(Φ=5 mm)制取菌饼接种于含有不同浓度 NaCl 溶液的 PDA 平板中央。将各处理和对照均置于 25℃ 和 16 h 光照条件的恒温培养箱内培养,试验以原始菌株作为对照,每个处理和对照均重复 6 次。培养 2 d 后,采用“交叉法”测量菌落直径,每隔 1 d 测定 1 次,并于培养第 7 天测量其产孢量。

待 PDB 培养基(每三角瓶 60 mL)冷却到 50℃~60℃ 左右时,分别加入 NaCl 晶体,并使 NaCl 溶液浓度分别为 0、10、20、30、40 mg·mL<sup>-1</sup> 和 50 mg·mL<sup>-1</sup>。配制相同浓度的原始和诱变后经单孢分离并纯化的突变菌株分生孢子悬浮液(1×10<sup>6</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>),并吸取 1 mL 孢子悬浮液接种于 60 mL PDB 液体培养基中,置于温度为 25℃,转速为 180 rpm·min<sup>-1</sup> 的恒温摇床振荡培养 5 d,并经无菌滤纸过滤后收集菌丝。然后,经 60℃ 恒温烘干称重,计算菌丝干重。试验以接种等量原始菌株孢子悬浮液作为对照,试验每个处理和对照均重复 6 次。

1.2.6 耐盐性突变菌株复筛及其耐盐遗传稳定性测定 将经紫外诱变获得的耐盐性较强的深绿木霉 T-YM 正突变菌株(诱变时间为 0.5 min 和 NaCl 浓度为 10 mg·mL<sup>-1</sup>) 参考 1.2.5 方法接种于培养基进行传代培养,并以传代培养后突变菌株的菌落直径、产孢量和菌丝干重作为测定指标评价其耐盐遗传稳定性。试验每个处理和对照均重复 6 次。突变菌株传代培养菌落直径测定时间以接种培养 4 d 为 1 代,共传代培养 10 次;产孢量测定时间以培养 7 d 为 1 代,共传代培养 10 次;菌丝干重测定时间以培养 5 d 为 1 代,共传代培养 10 次。

### 1.3 数据处理

采用 Excel 2003 和 SPSS 16.0 软件分别进行数据处理、图表绘制和方差分析。采用单因素方差分析和 Duncan 氏新复极差法统计各处理平均数的差异和进行差异显著性检验( $P<0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 紫外诱变对深绿木霉 T-YM 菌落生长的影响

表 1 表明,紫外诱变处理获得的深绿木霉 T-YM 突变菌株在活化培养第 1 天和第 2 天时,在不同诱变时间下其生长存在明显的差异。与野生型菌株相比,突变菌株在培养第 1 天和第 2 天时,当诱变时间为 3 min 时能够显著提高突变菌株的菌落生长速度,其生长速率与对照相比分别提高了 22.45% 和 12.92%,但当紫外诱变时间为 7 min 时,突变菌株菌落生长速度与对照相比显著降低,其生长速率在诱变处理后培养第 1 天和第 2 天时分别降低 30.61% 和 6.96%。然而,诱变处理培养后第 3 天,不同诱变时间下所获得的突变菌株生长速率与对照相比均无显著差异。

### 2.2 紫外诱变对深绿木霉 T-YM 菌株产孢量和菌丝生长量的影响

表 2 表明,与野生型菌株相比,当紫外诱变时间为 0.5~5.0 min 时,其对深绿木霉 T-YM 突变菌株产孢量和菌丝生长量均具有显著促进作用,但当诱变时间为 7.0 min 时,突变菌株产孢量降低,但与野生型菌株相比差异不显著。液体培养 5 d,当紫外诱变时间为 0.5 min 和 5 min 时,能够显著增加深绿木霉 T-YM 突变菌株菌丝干重,且与对照相比,其菌丝干重分别增加 42.22% 和 46.67%;液体培养 7 d,当紫外诱变时间为 3 min 时,突变菌株产孢量增加最为显著,其产孢量与对照相比增加 28.82%。

表 1 紫外诱变对深绿木霉 T-YM 菌落生长的影响

Table 1 Effect of ultraviolet mutagenesis on the growth rates of *Trichoderma atroviride* T-YM

诱变时间/min Ultraviolet mutagenesis time	菌落直径 Colony diameter/cm		
	1 d	2 d	3 d
0.0	0.98b	5.03c	9.0a
0.5	1.10ab	5.35b	9.0a
1.0	0.85bc	5.23bc	9.0a
3.0	1.20a	5.68a	9.0a
5.0	0.98b	5.45ab	9.0a
7.0	0.68c	4.68d	9.0a

注:表中数据均为 6 个重复的平均值。数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在  $P<0.05$  水平差异显著,下同。

Note: The data in the table are means of six replicates. Different letters in the same column mean significant difference at  $P<0.05$  level by Duncan's new multiple range test, respectively. The same below.

### 2.3 NaCl 胁迫下紫外诱变对深绿木霉 T-YM 菌株生长速率的影响

表 3 表明,不同浓度 NaCl 溶液胁迫下,不同紫外诱变时间对深绿木霉 T-YM 突变菌株菌落生长均具有明显的影响。培养 4 d 时,不同诱变时间处理的菌落生长速度随着 NaCl 溶液浓度增加,整体呈

表 2 紫外诱变对深绿木霉 T-YM 菌丝干重和产孢量的影响

Table 2 Effect of ultraviolet mutagenesis on the dry weight of mycelia and the quantities of spore production of *Trichoderma atroviride* T-YM

诱变时间/min Ultraviolet mutagenesis time	菌丝干重/g Dry weight of mycelia	产孢量/ $10^7$ CFU · mL <sup>-1</sup> Quantities of spores production
0.0	0.090b	21.55c
0.5	0.128ab	23.10b
1.0	0.101b	23.75b
3.0	0.096b	27.76a
5.0	0.132a	23.50b
7.0	0.090b	21.50c

注:表中数据均分别为处理后第 5 天和第 7 天时菌丝生长量和产孢量的平均值。

Note: The data in the table are means of six replicates for the dry weight of mycelia and quantity of spore production at 5 and 7 days after treatment, respectively.

表 3 NaCl 胁迫下紫外诱变对深绿木霉 T-YM 菌落生长的影响

Table 3 Effect of ultraviolet mutagenesis on the colony growth of *Trichoderma atroviride* T-YM under NaCl stress

NaCl 浓度/(mg · mL <sup>-1</sup> ) NaCl concentrations	菌落直径 Colony diameter/cm					
	0.0 min	0.5 min	1.0 min	3.0 min	5.0 min	7.0 min
0	9.00a	9.00a	9.00a	9.00a	9.00a	9.00a
10	9.00a	9.00a	9.00a	9.00a	9.00a	9.00a
20	7.95b	9.00a	9.00a	9.00a	8.70a	8.08ab
30	6.40c	6.98b	6.90b	7.05b	7.00b	6.70b
40	4.15d	4.50c	4.30c	6.68c	5.20c	5.25c
50	3.25d	3.43c	3.33d	3.50d	3.55d	3.05d

注:表中数据均为接菌第 4 天后 6 个重复的平均值。

Note: The data in the table are means of six replicates at 4 days after inoculation.

表 4 NaCl 胁迫下紫外诱变对深绿木霉 T-YM 菌株产孢量的影响/( $10^6$  CFU · mL<sup>-1</sup>)

Table 4 Effect of ultraviolet mutagenesis on quantity of spore production of *Trichoderma atroviride* T-YM under NaCl stress

NaCl 浓度/(mg · mL <sup>-1</sup> ) NaCl concentration	产孢量 Quantity of spore production/( $10^6$ CFU · mL <sup>-1</sup> )					
	0.0 min	0.5 min	1.0 min	3.0 min	5.0 min	7.0 min
0	287.50b	290.00b	297.50b	317.50b	305.00b	278.00a
10	310.00a	322.50a	330.00a	327.50a	315.00a	217.50b
20	1.65c	1.90c	1.90c	2.15c	1.95c	0.90c
30	1.33c	1.41d	1.43c	1.54d	1.33d	0.76c
40	0.60d	0.69e	0.73d	0.78e	0.65e	0.55d
50	0.28e	0.33f	0.35e	0.39f	0.35f	0.35e

注:表中数据均为接菌第 7 天后 6 个重复的平均值。

Note: The data in the table are means of six replicates at 7 days after inoculation.

降低趋势,但与对照(野生型菌株)相比,在不同浓度 NaCl 溶液(10~50 mg · mL<sup>-1</sup>)胁迫下,紫外诱变处理的菌落直径基本高于野生型菌株。当 NaCl 溶液浓度为 0~10 mg · mL<sup>-1</sup>时,突变菌株生长速率与野生型菌株无显著差异,但当 NaCl 溶液浓度为 20~50 mg · mL<sup>-1</sup>时,突变菌株生长速率均显著高于野生型菌株,且在诱变处理 3 min 时,其生长速率显著高于其它诱变时间获得的突变菌株。

### 2.4 NaCl 胁迫下紫外诱变对深绿木霉 T-YM 菌株产孢量的影响

表 4 表明,与野生型菌株相比,NaCl 溶液胁迫下,不同紫外诱变时间对深绿木霉 T-YM 突变菌株的产孢量具有一定程度的影响,而且 NaCl 溶液浓度对诱变和野生型菌株的产孢量具有较明显的影响。当 NaCl 溶液浓度为 10~50 mg · mL<sup>-1</sup>时,其产孢量随着 NaCl 溶液浓度增加显著降低。当诱变时间为 0.5~5.0 min 时,10 mg · mL<sup>-1</sup> NaCl 处理的产孢量显著高于野生型菌株,但当诱变时间为 7.0 min 时,其产孢量显著低于野生型菌株。当 NaCl 浓度增加至 20 mg · mL<sup>-1</sup>以上时,原始菌株和突变菌株产孢量均急骤下降。

## 2.5 NaCl 胁迫下紫外诱变对深绿木霉 T-YM 菌株菌丝干重的影响

表 5 表明,与野生型菌株相比,10 mg · mL<sup>-1</sup> NaCl 溶液胁迫下,培养后不同诱变时间获得的突变菌株菌丝干重整体高于野生型菌株,尤其诱变时间为 3 min 时增加最为显著。随着 NaCl 溶液浓度增加,突变菌株和野生型菌株菌丝干重呈降低趋势。

表 5 NaCl 胁迫下紫外诱变对深绿木霉 T-YM 菌株菌丝干重的影响/g

Table 5 Effect of ultraviolet mutagenesis on the mycelia dry weight of *Trichoderma atroviride* T-YM under NaCl stress

NaCl 浓度/(mg · mL <sup>-1</sup> ) NaCl concentrations	菌丝干重 Dry weight of mycelia/g					
	0.0 min	0.5 min	1.0 min	3.0 min	5.0 min	7.0 min
0	0.094b	0.132b	0.110b	0.100a	0.110a	0.091b
10	0.097a	0.140a	0.113a	0.110a	0.109a	0.100a
20	0.089c	0.128b	0.101b	0.096a	0.102a	0.090b
30	0.067c	0.101c	0.100b	0.082b	0.100a	0.060c
40	0.034d	0.064c	0.062c	0.056b	0.060b	0.050c
50	0.024e	0.044d	0.040c	0.036c	0.044c	0.030d

注:表中数据均为接菌第 5 天后 6 个重复平均值。

Note: The data in the table are means of six replicates at 5 days after inoculation.

## 表 6 NaCl 胁迫下紫外诱变对深绿木霉 T-YM 菌株耐盐遗传稳定性的影响

Table 6 Effect of ultraviolet mutagenesis on the genetic stability of *Trichoderma atroviride* T-YM under NaCl stress

培养代数 Cultural generation	菌落直径 Colony diameter/cm	菌丝干重 Dry weight of mycelia/g	产孢量 Quantities of spores production /(10 <sup>6</sup> CFU · mL <sup>-1</sup> )
1	9.00a	0.131a	312.48a
2	9.00a	0.134a	320.25a
3	9.00a	0.129a	318.18a
4	9.00a	0.128a	331.79a
5	9.00a	0.133a	311.34a
6	9.00a	0.126a	334.80a
7	9.00a	0.128a	319.00a
8	9.00a	0.120a	316.40a
9	9.00a	0.128a	326.53a
10	9.00a	0.119a	317.58a

注:表中菌落直径、产孢量和菌丝干重数据均为接菌第 4 天、第 7 天和第 5 天后 6 个重复的平均值。

Note: The data of colony diameter, quantities of spores production, and dry weight of mycelia in the table are means of six replicates at 4 days, 7 days, and 5 days after inoculation, respectively.

## 3 结论与讨论

前期研究表明,高浓度盐胁迫对木霉菌生长速率、菌丝生长量和产孢量具有一定程度的抑制作用<sup>[15-16]</sup>,因而,为了获得具有更强耐盐性的木霉突变菌株,寻求改良和提高木霉菌耐盐性的技术和手

## 2.6 NaCl 胁迫下紫外诱变对深绿木霉 T-YM 菌株耐盐遗传稳定性的影响

表 6 为 10 mg · mL<sup>-1</sup> NaCl 胁迫下,紫外诱变 0.5 min 获得的突变菌株经传代接种培养后的菌落生长状况。NaCl 胁迫下突变菌株传代接种培养 4 d 后,不同代培养菌株间菌落直径无显著差异;培养 5 d 后,不同代培养菌株间菌丝干重无显著差异;培养 7 d 后,不同代培养菌株间产孢量无显著差异。

段已成为目前研究的一种新趋势。据报道,改良微生物菌株的手段和方法主要有诱变、遗传改良和原生质体融合等技术<sup>[17-19]</sup>,其中诱变技术是目前应用较为广泛的一种技术,已被应用于多功能木霉菌突变菌株的研究<sup>[20]</sup>。在现有的诱变技术中,紫外诱变作为简便、实用和诱变效果明显的物理诱变因子,已被广泛应用于菌种改良<sup>[21]</sup>。本试验以盐碱土分离获得的 1 株深绿木霉 T-YM 菌株为原始菌株进行紫外诱变处理,结果表明当诱变时间为 3 min 时能够显著提高深绿木霉 T-YM 菌株的生长速率和产孢量,当诱变时间为 5 min 能够显著提高菌丝生长量。薛应钰等<sup>[22]</sup>研究表明在紫外照射强度 20 W,照射时间 40 min 和照射距离 30 cm 时获得的诱变菌株生长速率和产孢量显著高于野生型菌株,其研究结果与本试验基本一致,但是其诱变条件与本试验存在差异,其原因可能由于不同微生物对紫外光的敏感性有所差异,进而导致其最佳的诱变条件不一致。

另外,在 NaCl 溶液模拟盐胁迫条件下,当诱变时间为 0.5~5 min 时,与对照相比诱变菌落直径、产孢量和菌丝干重整体高于野生型菌株,且当诱变处理时间为 3 min 时,诱变菌株的生长速率和产孢量显著提高,即显著提高其耐盐性。Mohamed 等<sup>[23]</sup>研究发现,通过利用 $\gamma$ -辐射诱导获得 2 株具有稳定耐盐性的哈茨木霉突变体 Th50M6 和 Th50M11,且在

盐胁迫下突变菌株生长速率和产孢量,以及其对尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)生物防治效果显著高于野生菌株。同时,2个耐盐性菌株在盐浓度为0~69 mM的培养基上其菌丝能够正常生长和产孢。另外,已有相关的研究报道了利用紫外诱变提高木霉菌的解磷能力和抗药性。薛应钰等<sup>[22]</sup>通过紫外诱变获得一株具备高效解磷能力的木霉突变株 T2-8,其解磷能力显著高于野生型菌株。尹婷等<sup>[24]</sup>通过紫外光照射获得了4株对速克灵抗药性较强的深绿木霉菌株,但是有关利用紫外诱变提高木霉菌耐盐性方面尚未报道,在今后还有待进一步深入研究。

因此,紫外诱变可作为选育高效耐盐木霉突变菌株的有效方法。同时,利用植物与盐渍土中有益微生物的共生关系缓解盐渍土对植物生长造成的不利影响,可为提高植物的耐盐性及盐渍土的生物改良提供一条新思路,但是目前有关木霉菌耐盐机理还有待深入研究。

#### 参 考 文 献:

- [1] Ma L J, Li Y Y, Yu C M, et al. Alleviation of exogenous oligochitosan on wheat seedlings growth under salt stress [J]. *Protoplasma*, 2012, 249 (2): 393-399.
- [2] Rivero R M, Mestre T C, Mittler R, et al. The combined effect of salinity and heat reveals a specific physiological, bio-chemical and molecular response in tomato plants [J]. *Plant Cell and Environment*, 2014, 37(5): 1059-1073.
- [3] Munns R, Tester M. Mechanisms of salinity tolerance [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59(1): 651-681.
- [4] Bui E N. Soil salinity: a neglected factor in plant ecology and biogeography [J]. *Journal of Arid Environment*, 2013, 92: 14-25.
- [5] Garg N, Manchanda G. ROS gene ration in plants: boon or bane? [J]. *Plant Biosystems*, 2009, 143(1): 81-96.
- [6] Phang T H, Shao G H, Lam H M. Salt tolerance in soybean [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2008, 50(1): 1196-1212.
- [7] Zou P, Li K C, Liu S, et al. Effect of chito oligo saccharides with different degrees of acetylation on wheat seedlings under salt stress [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 126(5-6): 62-69.
- [8] Glick B R. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase [J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2007, 26: 227-242.
- [9] Tian X Y, He M R, Wang Z L, et al. Application of nitric oxide and calcium nitrate enhances tolerance of wheat seedlings to salt stress [J]. *Plant Growth Regulation*, 2015, 77(3): 343-356.
- [10] Qiu Z B, Guo J L, Zhu A J, et al. Exogenous jasmonic acid can enhance tolerance of wheat seedlings to salt stress [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2014, 104: 202-208.
- [11] Egamberdieva D, Lugtenberg B. Use of plant growth-promoting rhizobacteria to alleviate salinity stress in plants [M]. New York: Springer, 2014: 73-96.
- [12] Harman G E, Howell C R, Viterbo A, et al. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2(1): 43-56.
- [13] 张瑾, 张树武, 徐秉良, 等. 长枝木霉菌抑菌谱测定及其抑菌作用机理初步研究 [J]. *中国生态农业学报*, 2014, 22(6): 661-667.
- [14] Mastouri F, Björkman T, Harman G E. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings [J]. *Phytopathology*, 2010, 100(11): 1213-1221.
- [15] Henk G A, Cuppers M L. A model for the combined effects of temperature and salt concentration on growth rate of food spoilage molds [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(10): 3764-3769.
- [16] 张树武, 徐秉良, 刘佳, 等. 长枝木霉 T6 菌株对小麦耐盐性的影响 [J]. *干旱地区农业研究*, 2016, 34(4): 101-105.
- [17] Baker R. Diversity in biological control [J]. *Crop Protection*, 1991, 10(2): 85-94.
- [18] Lewis J A, Papavizas G C. Biocontrol of plant disease: the approach for tomorrow [J]. *Crop Protection*, 1991, 10(2): 95-105.
- [19] Chet I, Hayes C G, Harman G E. The genetic nature and biocontrol ability of progeny from protoplast fusion in *Trichoderma* [J]. *Biotechnology in plant Disease Control*, 1993, 13: 237-255.
- [20] 杨合同, 唐文华, 李纪顺, 等. 绿色木霉 LTR-2 菌株的紫外线改良 [J]. *中国生物防治*, 2004, 20(3): 182-186.
- [21] 闫冬, 别小妹, 陆兆新, 等. 多粘类芽孢杆菌 Jsa-9 高产 LI-F 类抗菌脂肽突变株的选育 [J]. *核农学报*, 2014, 28(10): 1739-1743.
- [22] 薛应钰, 叶巍, 张树武, 等. 紫外诱变选育木霉高效解磷菌株 [J]. *核农学报*, 2015, 29(8): 1509-1516.
- [23] Mohamed H A A, Haggag W M. Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum* [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2006, 37(2): 181-191.
- [24] 尹婷, 徐秉良, 梁巧兰, 等. 耐药性木霉 T2 菌株的筛选、紫外诱变与药剂驯化 [J]. *草业学报*, 2013, 22(2): 117-122.