

木霉菌 REMI 转化子解磷筛选及其解磷效果分析

菅丽萍^{1,2}, 刘力行², 陈云鹏², 薛春生¹, 陈捷^{2*}

(1. 沈阳农业大学植物保护学院, 辽宁沈阳 110161; 2. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 201101)

摘要 [目的]为了获得具有防病和解磷双重功能的木霉菌 REMI 转化子。[方法]从康氏木霉菌 *Trichoderma koningii* T30 及其 60 株 REMI (限制性内切酶介导的基因整合技术) 转化子中筛选出 3 株解磷作用较好的转化子, 并研究不同碳、氮源对转化子 TK-46 解磷作用的影响。[结果]结果表明, 碳源对转化子解磷能力影响较小, 而氮源的作用较大, 其中转化子在解磷过程中最适氮源是氨态氮。[结论]该研究为研制多功能木霉菌剂奠定了基础, 但完全揭示木霉菌解磷机理仍需进一步研究。

关键词 木霉菌 REMI 转化子; 解磷; 碳源; 氮源

中图分类号 Q949 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)20-06179-02

Phosphate-dissolving Screening and Effective Analysis of *Trichoderma* REMI Transformant

JIAN Li-ping et al (College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract [Objective] The aim of this study was to obtain *Trichoderma* REMI transformant with double functions of disease prevention and phosphate-dissolving. [Method] Three preferable phosphate-dissolving transformants were screened out from *Trichoderma koningii* T30 and its 60 REMI (restriction enzyme mediated DNA integration) transformants. Furthermore, the effect of different carbon and nitrogen sources on phosphate solubilization of TK-46 was investigated. [Result] Result showed that there was minor influence of carbon sources on the phosphate solubilization. But significant influence of nitrogen sources was found on the phosphate solubilization of *Trichoderma*. Comparatively $\text{NH}_4^+\text{-N}$ was subjected to be utilized more easily by *Trichoderma* transformant than $\text{NO}_3\text{-N}$ during the solubilization of phosphate. [Conclusion] This research provided basis for the study of *Trichoderma* with multiple functions. But there still needed further study to reveal the phosphate-dissolving mechanism of *Trichoderma*.

Key words *Trichoderma* REMI transformant; Phosphate solubilization; Carbon sources; Nitrogen sources

木霉菌是一种传统的植物病害生物防治因子^[1], Harman 研究还发现木霉菌具有提高作物营养利用的能力^[2]。Yedidia 等对木霉菌吸收利用微量元素并促进黄瓜生长进行了研究^[3]。Rudresh 等发现木霉菌可以在液体培养条件下溶解难溶性磷酸盐^[4]。Altomare 等发现, *T.harzianum* 菌株 T22 具有溶解可溶性或微溶性矿物质的能力, 通过螯合或降解作用来溶解金属氧化物, 促进植物对矿物质的吸收, 提高植物的生长量^[5]。对木霉菌解磷作用的研究可以说明木霉菌刺激作物生长的可能机制, 同时为其作为稳定的解磷菌进行推广应用奠定基础。笔者研究在液体纯培养条件下, 经 REMI 转化构建的已证明具有植物病害生物防治功能的木霉菌转化子对磷酸盐的溶解能力, 并研究影响解磷效应的主要碳、氮源种类, 以期获得具有防病和解磷双重功能的木霉菌 REMI 转化子, 为今后创制多功能木霉菌剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株 康氏木霉菌 T30 及其 REMI 转化子, 由上海交通大学农业与生物学院植科系微生物代谢实验室构建和保存。

1.2 培养基

1.2.1 无机磷基础培养基。 NaCl 0.1 g, NH_4Cl 1 g, KCl 0.2 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2 g, 葡萄糖 10 g, 酵母浸汁 0.5 g, 蒸馏水 1 000 ml, pH 7.0, 将其分装于 250 ml 三角瓶, 每瓶 100 ml, 每瓶添加磷源 0.2 g, 120 °C 灭菌 30 min。供试的不同磷源为磷酸氢钙、磷酸铝、磷酸铁。

1.2.2 碳源培养基。 将无机磷基础培养基中的葡萄糖分别替换成果糖、蔗糖、麦芽糖、木糖、可溶性淀粉, 共设 6 种碳源处理, 加入量仍为 1%。

1.2.3 氮源培养基。 将无机磷基础培养基中的氮源氯化铵

分别替换成硫酸铵、钼酸铵、尿素、硝酸铵、硝酸钠, 共设 6 种氮源处理, 每处理折合纯氮 0.264 g/L。

1.3 方法

1.3.1 液体条件下解磷 REMI 转化子的筛选。 分别将不同木霉菌 T30 及其 60 株转化子在 PDA 培养基上培养 4 d 后产孢, 将孢子用无菌接种钩刮下, 用无菌水稀释到 10^7 cfu/ml, 吸取 1 ml 稀释好的孢子悬浮液加入到装有 100 ml 磷酸氢钙培养基的三角瓶中, 设置不接菌的空白对照, 每个处理 3 次重复。28 °C 下 180 r/min 摇床培养 9 d。

1.3.2 REMI 转化子对难溶性磷酸盐解磷能力的测定。 REMI 转化子 TK-20、TK-36、TK-46 及出发菌 T30 在 PDA 平板上培养产孢后, 稀释孢子浓度为 10^7 cfu/ml, 然后将 1 ml 分生孢子悬浮液加入 100 ml 含有磷酸氢钙、磷酸铝和磷酸铁的无机磷基础培养基中, 每个处理重复 3 次, 以未接菌的培养基为空白对照, 28 °C 下 180 r/min 摇床培养 9 d。

1.3.3 碳源种类对转化子解磷效果的影响。 转化子 TK-46 在 PDA 平板上培养产孢子后, 配制成 10^7 cfu/ml 的孢子悬液, 将 1 ml 孢子悬浮液加入到含有不同碳源的 100 ml 磷酸氢钙和磷酸铝的无机基础培养基中, 每个处理重复 3 次, 以未接菌的培养基为空白对照, 28 °C 下 180 r/min 摇床培养 9 d。

1.3.4 氮源种类对转化子解磷效果的影响。 方法同 1.3.3”。

1.4 测定方法

培养滤液含磷量用钼锑抗比色法测定^[6], pH 值用雷磁 PHS-3C 精密 pH 计测定。

2 结果与分析

2.1 液体条件下解磷木霉菌筛选结果 图 1 表明, 从 REMI 转化子中可以筛选出比出发菌解磷作用更理想的菌株, 其中 TK-46 解磷作用为 363.79 $\mu\text{g/ml}$, TK-2 为 337.73 $\mu\text{g/ml}$, TK-47 为 336.32 $\mu\text{g/ml}$, 说明木霉菌 REMI 技术改良后可以提高其解磷的效果。

转化子培养后滤液 pH 值下降, 从 pH 7.0 下降到 pH 3.0 左右。pH 下降有利于转化子与铁、铝、钙、镁等离子结合, 从

基金项目 农业部 948 项目 (2006-G54(A)); 上海市科委中法合作项目 (063407060); 上海市科委崇明重大专项 (05DZ19104)。

作者简介 菅丽萍(1979-), 女, 内蒙古五原人, 硕士研究生, 研究方向: 分子植物病理学研究。* 通讯作者。

收稿日期 2007-05-03

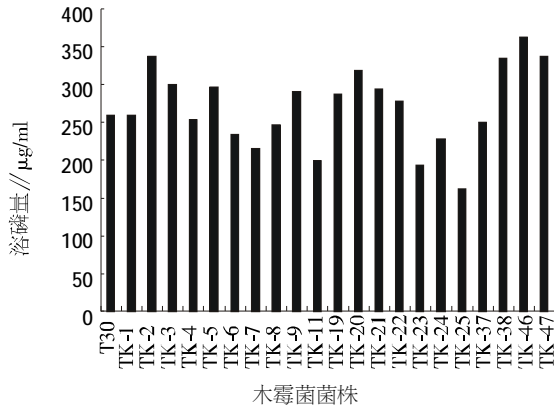


图1 不同木霉菌转化子对磷酸氢钙的溶解能力

而使难溶性磷酸盐溶解。但 pH 下降与解磷的关系还有待于深入研究。

2.2 REMI 转化子对难溶性磷酸盐解磷能力的测定 图2表明,转化子对磷酸铝的溶解能力比对磷酸氢钙弱一些,但溶解能力仍保持在 300 μg/ml 以上。转化子均不能溶解磷酸铁。无论是溶解磷酸氢钙还是磷酸铝,所筛选出的转化子的解磷能力均比出发菌 T30 高。

同样,转化子溶解磷酸铝和磷酸铁过程中 pH 值均下降。由于转化子不能溶解磷酸铁,说明 pH 值下降并不是解磷的必要条件。

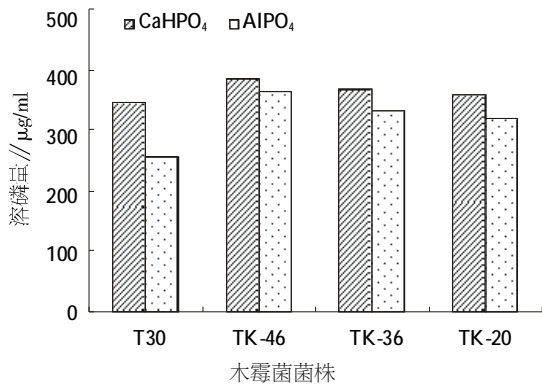


图2 不同木霉菌转化子对不同磷酸盐的溶解能力

2.3 碳源种类对转化子解磷效果的影响 图3表明,不同碳源对转化子 TK-46 溶解磷酸氢钙和磷酸铝的效率不同。溶解磷酸氢钙的最适碳源为麦芽糖,解磷量可以达到 373.78 ug/ml,溶解磷酸铝的最适碳源为蔗糖,解磷量为 302.52 ug/ml。麦芽糖是 TK-46 解磷过程中最易利用的碳源。可溶性淀粉不利于 TK-46 解磷作用的发挥,在该碳源

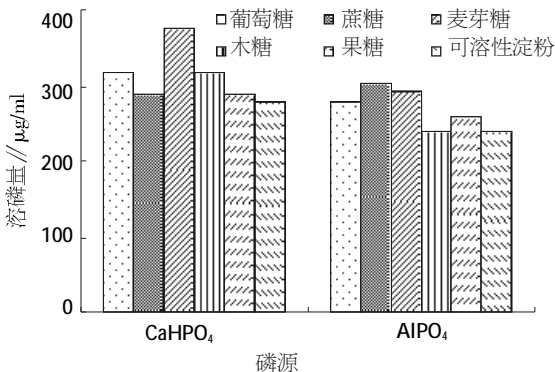


图3 不同碳源对木霉菌转化子 TK-46 解磷能力的影响

条件下,TK-46 对磷酸氢钙和磷酸铝的解磷量分别为 277.85 μg/ml 和 239.85 μg/ml。总的来说,碳源对转化子解磷能力影响较小。

表1、表2表明,在不同碳源条件下,转化子 TK-46 溶解磷酸氢钙和磷酸铝后培养滤液 pH 值都下降,同时发现解磷效率与培养滤液 pH 值之间不存在必然相关性,例如在以蔗糖为碳源时 TK-46 对磷酸铝的解磷量比其他碳源的解磷量高,但是 pH 值下降却是最小的(表1、图3)。

表1 不同碳源条件下 TK-46 溶解磷酸氢钙过程中 pH 值的变化

碳源	pH 值
葡萄糖	2.72
蔗糖	2.63
麦芽糖	2.71
木糖	2.75
果糖	2.77
可溶性淀粉	2.70

表2 不同碳源条件下 TK-46 溶解磷酸铝过程中 pH 值的变化

碳源	pH 值
葡萄糖	2.83
蔗糖	5.62
麦芽糖	5.07
木糖	5.24
果糖	3.34
可溶性淀粉	3.33

2.4 氮源种类对转化子解磷效果的影响 图4表明,不同形态的氮素,显著地影响转化子 TK-46 溶解磷酸氢钙和磷酸铝的能力。TK-46 溶解磷酸氢钙最适氮源为氯化铵,解磷量为 345.99 μg/ml;TK-46 溶解磷酸铝最适的氮源为硫酸铵,解磷量为 288.68 μg/ml;TK-46 对其他几种氮源的利用率较小,以尿素为氮源时对磷酸氢钙和磷酸铝的解磷量仅为 67.63 μg/ml 和 9.29 μg/ml,以硝酸铵为氮源时对磷酸氢钙和磷酸铝的解磷量仅为 96.21 μg/ml 和 6.95 μg/ml,说明氯化铵和硫酸铵是 TK-46 解磷时较易利用的氮源。总之,木霉菌比较易于利用铵态氮而不易于利用硝态氮。

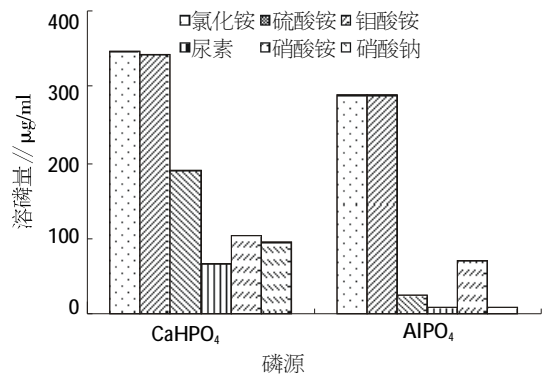


图4 不同氮源对木霉菌转化子 TK-46 解磷能力的影响

表3、4表明,不同的氮源对于培养滤液 pH 值的影响不同。转化子 TK-46 在以氯化铵和硫酸铵为氮源时,磷酸氢钙的培养滤液 pH 值分别由 7.0 下降到 5.12 和 5.74,磷酸铝的培养滤液的 pH 值分别由 7.0 下降到 2.74 和 2.86,培养滤液的 pH 值下降较明显。而以尿素和硝酸钠为氮源时溶解磷酸氢钙 pH 值由 7.0 升高到 7.69 和 8.61。TK-46 在以硫酸铵和氯化铵为氮源时,降低了磷酸氢钙和磷酸铝的培养滤液的 pH 值,其解磷量也较其他氮源时高(结果见表3、图4),表明在以 NH4⁺-N 为氮源时有利于降低木霉菌培养介质

(下转第 6191 页)

表 3 不同氮源条件下 TK-46 溶解磷酸氢钙过程中 pH 值的变化

氮源	pH 值
氯化铵	5.12
硫酸铵	5.74
钼酸铵	5.76
尿素	7.69
硝酸铵	6.33
硝酸钠	8.61

表 4 不同氮源条件下 TK-46 溶解磷酸铝过程中 pH 值的变化

氮源	pH 值
氯化铵	2.74
硫酸铵	2.86
钼酸铵	5.43
尿素	7.68
硝酸铵	3.48
硝酸钠	6.12

的 pH 值,该菌株的解磷机制可能与质子的分泌有关。

3 讨论

木霉菌在利用碳源过程中 pH 变化与解磷作用的相关性没有利用氮源的规律性明显,说明解磷过程中酸度变化与解磷相关性的规律比较复杂,pH 变化是解磷的原因还是结果,是否还涉及到其他因素,尚需进一步研究。已有研究表明:解磷量与培养介质的 pH 之间缺乏相关性^[7-9]。微生物之所以能够溶解难溶性磷酸盐,机制之一是由于其在代谢过程中分泌质子,或通过呼吸过程放出的 CO₂降低周围的 pH 值,从而引起磷酸盐的溶解使培养介质的酸度升高,导致磷酸盐溶解。质子来源于呼吸作用和呼吸利用 NH₄⁺,呼吸作用中的质子主要用来生成 NADH₂、NADHP₂ 和 FADH₂,进入培养介质的质子比较少,所以,培养介质中的质子主要来源于 NH₄⁺。Roos 和 Luckner 发现 *Penicillium cyclopium* 每吸收利用 1 mol NH₄⁺,就释放出等量的 H⁺,使培养介质的 pH 升高^[9]。相反,Hynes 报道当微生物吸收利用 1 mol NO₃⁻时,释放出等量的 OH⁻或消耗掉等量的 H⁺,使培养介质的 pH 升高^[11]。该研究表明:木霉菌在以 NH₄⁺为氮源时 pH 值都下降,

而以 NO₃⁻为氮源时 pH 值升高,与上述报道结果一致,说明木霉菌的解磷机制可能与代谢过程中分泌的质子有关。

该研究结果是在液体培养基体条件下得出的,与自然农田土壤条件相差很大,因此要完全揭示木霉菌解磷机理尚需做大量工作,对进一步揭示木霉菌-作物共生体的营养生理具有重要意义。

参考文献

- [1] GARY HARMAN. New advances in the science and use of *Trichoderma* spp. [J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2004, 30 (4): 388.
- [2] HARMAN G E, HOWELL C R, VITERBOA, et al. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2004, 2: 43-56.
- [3] YEDIDIA IRIS, SRIVASTVA ALOK K, KAPULNIK YORAM. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants [J]. *Plant and Soil*, 2001, 235: 235-242.
- [4] RUDRESH D L, SHIVAPRAKASH M K, PRASAD R D. Tricalcium phosphate solubilizing abilities of *Trichoderma* spp. in relation to uptake and growth and yield parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.) [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2005, 51 (3): 217-222.
- [5] ALTOMARE C, NORVELL W A, BJOKMAN T, et al. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant growth promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai [J]. *Environ Microbiol*, 1999, 65: 2926-2933.
- [6] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000: 166-185.
- [7] 赵小蓉, 林启美, 李保国. 解磷菌对 4 种难溶性磷酸盐溶解能力的初步研究[J]. *微生物学报*, 2002, 42 (2): 236-241.
- [8] 王光华, 周克琴, 金剑, 等. 不同氮源对 3 种解磷真菌溶解磷矿粉能力的影响[J]. *农业系统科学与综合研究*, 2003, 19 (4): 260-263.
- [9] KUCEY RMN. Effect of *Penicillium bilaji* on the solubility and uptake of P and micronutrients from soil by wheat [J]. *Can J Soil Sci*, 1988, 68: 261-270.
- [10] ROOS, LUCKNER. Relationship between proton extrusion and fluxes of ammonium ions and organic acids in *Penicillium cyclopium* [J]. *Gen Microb*, 1984, 130: 1007-1014.
- [11] HYNES R J. Active ion uptake and maintenance of cation/anion balance: a critical examination of their role in regulating rhizosphere pH [J]. *Plant & Soil*, 1990, 126: 247-264.