

文章编号:1000-8551(2019)06-1072-07

# 作物根际解磷真菌 YTY 的离子束诱变及其解磷机理探讨

杨天佑<sup>1,2,\*</sup> 田静<sup>1</sup> 张明霞<sup>1</sup> 张蕾<sup>1</sup>( <sup>1</sup>河南科技学院生命科技学院,河南 新乡 453003; <sup>2</sup>现代生物育种河南省协同创新中心,河南 新乡 453003)

**摘要:**为筛选并构建高效的作物根际解磷真菌,探讨解磷真菌的解磷机理,本研究从小麦和棉花根际土壤中分离筛选了一株高效解磷能力的真菌 YTY,对其离子束诱变的最佳条件进行探讨,进一步构建 YTY 的高效解磷突变菌,并从有机酸角度研究 YTY 的解磷机理。结果表明,从作物根际土壤分离的解磷真菌 YTY 具有较高的解磷能力,形态学和 ITS 鉴定表明该菌为草酸青霉;YTY 的最佳诱变条件为 30 keV 和  $1 \times 10^{15}$  ions·cm<sup>-2</sup>,利用该诱变条件获得了 3 株高效解磷突变株,即 p-1-1、p-1-2、p-1-3,解磷能力分别较出发菌株 YTY 提高了 56.88%、42.26%和 32.15%;YTY 培养液(5 d)的 pH 值为 2.5,离子色谱法测得其中含有 3 种有机酸,即乳酸、乙酸和草酸,同时测得 3 株突变菌培养液的 pH 值为 2.0,显著低于出发菌株 YTY,且乳酸、乙酸、草酸和总酸含量均显著高于 YTY,表明有机酸是 YTY 解磷的重要物质,且乳酸、乙酸、草酸是 YTY 解磷的主要有机酸。本研究结果为解磷真菌的离子束诱变选育提供了参考,并为真菌 YTY 解磷机理的探明及开发应用提供了理论依据和生物材料。

**关键词:**解磷真菌;离子束;增强的抗辐射效应;解磷机理;有机酸

DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2019.06.1072

磷是作物生长发育所必需的重要营养元素之一,但土壤中的磷大部分具有难溶性,能被作物直接吸收利用的有效无机磷较低。针对土壤潜在磷源丰富而有效磷缺乏的现状,开发能充分利用土壤潜在磷源的解磷微生物,对于缓解磷资源短缺,发展高效农业具有重要意义<sup>[1]</sup>。目前已有关于高效解磷微生物的筛选及解磷机理探索的报道<sup>[2]</sup>,已经发现的解磷微生物有细菌<sup>[3]</sup>、放线菌和真菌<sup>[4]</sup>。研究表明,解磷真菌在数量和种类上虽少于解磷细菌,但其解磷能力及稳定性一般要强于细菌<sup>[5]</sup>。微生物解磷机理的研究,在细菌中研究较为全面深入,而在真菌方面的研究较为滞后,无论细菌还是真菌,有机酸被研究者认为是解磷微生物解磷的关键物质<sup>[6]</sup>。

低能离子束诱变自上世纪 80 年代被应用于生物诱变遗传育种以来,由于其具有独特的辐射效应,目前已被广泛应用于微生物育种,并取得了丰硕的成

果<sup>[7-9]</sup>。近年来,前人对低能离子束诱变解磷微生物进行了大量的研究,如游银伟等<sup>[10]</sup>通过氮离子束注入对枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* P-1 进行诱变,筛选得到一株解磷突变菌株,解磷能力提高了 48%。胡秀芳等<sup>[11]</sup>利用离子束注入技术选育胶质芽孢杆菌 *Bacillus mucilaginosus* Krassilnikov KNP414 的解磷突变菌株,也明显提高了其解磷能力。低能离子束是一种新型的诱变源,其诱变生物体存在能量交换、能量沉积、质量沉积及电荷交换 4 种效应<sup>[12]</sup>,具有损伤低、突变谱宽、突变率高等特点<sup>[13]</sup>。目前国内外离子束诱变解磷菌的研究诱变材料多为细菌,真菌离子束诱变的研究报道尚鲜见,利用离子束诱变解磷真菌,有望获得离子束作用解磷真菌的诱变条件并可构建高效的解磷真菌突变体。

本研究从作物根际土壤筛选解磷真菌,利用离子束构建高效解磷突变体,并以有机酸作为关键物质探

收稿日期:2017-12-01 接受日期:2018-03-06

基金项目:国家自然科学基金资助项目(11305047),河南省高等学校青年骨干教师资助计划项目(2014GGJS-100),河南省教育厅科学技术研究重点项目(12A180011)

作者简介:杨天佑,男,副教授,主要从事微生物的离子束诱变及植物根际促生菌相关领域研究。E-mail:yangtianyou2004@163.com

\* 通讯作者:同第一作者。

讨真菌的解磷机制,以期为阐明解磷真菌机理提供一定的理论依据,为高效解磷真菌的开发提供生物材料。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:马铃薯 200 g、蔗糖 20 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 mL、pH 值 7.0。

无机难溶性磷培养基:葡萄糖 10 g、NaCl 0.3 g、KCl 0.3 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3 g、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.03 g、MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.03 g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 g、Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 5 g、蒸馏水 1 000 mL、pH 值 7.0~7.5,其中Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>经充分研磨灭菌后加入。

真菌总 DNA 提取按照真菌 DNA 提取试剂盒(生物工程上海股份有限公司)说明书进行,真菌 ITS 序列扩增的通用引物由大连宝生物工程有限公司合成。

### 1.2 方法

1.2.1 解磷真菌 YTY 的筛选 取河南科技学院试验田小麦和棉花的根际土壤每株 5 g 于 50 mL 无菌水中,振荡器充分混匀,静置取上清液制备 10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>和 10<sup>-6</sup> 3 个梯度的稀释液处理,分别取每个稀释处理菌悬液 0.2 mL 涂布于无机难溶性磷固体培养基,每处理设 5 次重复,28℃ 培养 5 d,观察有明显解磷圈的真菌菌落,测量菌落的直径大小(D<sub>菌落</sub>)和周围透明圈的直径大小(D<sub>透明圈</sub>),D<sub>透明圈</sub>/D<sub>菌落</sub> 作为初筛依据,挑取 D<sub>透明圈</sub>/D<sub>菌落</sub> 较大的真菌菌落转至 PDA 斜面培养基,4℃ 保存。

取 2 环解磷真菌的斜面孢子于 100 mL 无机难溶性磷液体培养基中,28℃、70 r·min<sup>-1</sup> 条件下往复摇床培养 5 d,每株菌设 3 次重复,钼锑抗比色法<sup>[3]</sup>测定菌株的解磷能力,挑选解磷能力最强的解磷真菌,编号 YTY,4℃ 保存备用。

1.2.2 解磷真菌 YTY 的鉴定 将 YTY 菌株接种于 PDA 培养基,28℃ 培养 2 d,观察菌落形态。用牙签挑取 YTY 孢子,点接种于 PDA 平板,接种点附近插 1 cm<sup>2</sup> 的金属片,28℃ 进行爬片培养,待菌丝体爬上金属片后,用 Quantu200 环境扫描电镜(美国 FEI 公司)进行观察。

利用 PDA 培养基培养真菌 YTY,刮取平皿表面的菌丝体放入研钵中用液氮研磨,经研磨后的菌丝体,采用真菌总 DNA 提取试剂盒(生物工程上海股份有限公司)提取其基因组 DNA。利用真菌 ITS 序列的 PCR 通用引物,上游引物为 ITS1:5'-TCCGTAGGTGAACCTG

CGG-3';下游引物为 ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'进行 PCR 扩增,扩增体系 50 μL,包括 50 μmol·L<sup>-1</sup> dNTPs 5 μL、10 μmol·L<sup>-1</sup> 上游引物 1 μL、10 μmol·L<sup>-1</sup> 下游引物 1 μL、3 U Taq plus DNA 聚合酶 1 μL、10× PCR 反应缓冲液 5 μL、ddH<sub>2</sub>O 37 μL。PCR 扩增程序:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min,57℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 45 s,35 个循环;72℃ 延伸 10 min。PCR 产物送至宝生物工程(大连)有限公司测序,获得其 DNA 序列,提交 GenBank 登录,通过 BLAST 比对比分析序列,利用 MEGA5.0 软件对 YTY 进行系统发育树的构建。

1.2.3 解磷真菌 YTY 的离子束诱变 取 0.2 mL 充分混匀的 YTY 孢子悬浮液(10<sup>8</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>)于洁净无菌的培养皿内,涂布均匀后置于超净工作台,无菌风吹干制备 YTY 孢子菌膜,然后将培养皿置于 Titan 离子注入机微生物靶室内,利用 20、25、30 keV 3 个能量低能氮离子进行辐射诱变,辐射剂量分别为 5×10<sup>14</sup>、1×10<sup>15</sup>、5×10<sup>15</sup>、1×10<sup>16</sup> ions·cm<sup>-2</sup>,辐射处理设真空对照。注入后,用 1 mL 无菌水冲洗菌膜于试管中,充分打散混匀,稀释 10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>和 10<sup>-5</sup>后涂布于无机难溶性磷平板。按照公式计算 YTY 存活率:

$$\text{YTY 存活率} = \frac{\text{辐照样品的菌落数}}{\text{真空对照的菌落数}} \times 100\% \quad (1)$$

YTY 的初筛根据 D<sub>透明圈</sub>/D<sub>菌落</sub> 的大小进行,复筛采用摇床培养 5 d,钼锑抗比色法<sup>[3]</sup>测定菌株的解磷能力。

1.2.4 解磷真菌 YTY 培养液 pH 值的测定 取解磷真菌 YTY 28℃ 培养 5 d 的无机难溶性磷培养液 3 mL,利用 PHS-3E 型 pH 计(上海雷磁有限公司)测定 pH 值,每株菌设 3 次重复。

1.2.5 解磷真菌 YTY 培养液有机酸的测定 取 1.2.3 中的 YTY 培养液 3 mL 至离心管中,8 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,上清液经 0.22 μm 水系滤膜过滤,用 1 mL 的注射器注入 ICS-2000 型离子色谱仪(美国戴安公司)进行测定,所用色谱柱为 DIONEX IonPac® AS11-HC 阴离子交换柱(水系),样品流速为 1.20 mL·min<sup>-1</sup>,柱温为 30℃,进样体积为 0.5 mL,根据 Chromeleon 色谱工作站的操作指南分析色谱数据。

## 2 结果与分析

### 2.1 解磷真菌 YTY 的筛选

由表 1 可知,通过初筛和复筛分离到 13 株解磷真菌(phosphate solubilizing fungi, PSF)。13 株 PSF 都可

在以磷酸三钙为唯一磷源的无机难溶性磷平板上生长,并能产生明显的透明圈,根据  $D_{\text{透明圈}}/D_{\text{菌落}}$  比值大小依次编号为 PSF 1~PSF 13。13 株菌中  $D_{\text{透明圈}}/D_{\text{菌落}}$  比值最小的为 1.020,最大的为 1.420。13 株 PSF 除了 PSF 2 没有测得解磷活性外,其他 12 株 PSF 均具有一定的解磷能力,其中 PSF 13 的解磷能力最强,为  $186.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,命名为解磷真菌 YTY。

表 1 不同作物根际解磷真菌的筛选

Table 1 Screening of PSP in rhizosphere of different crops

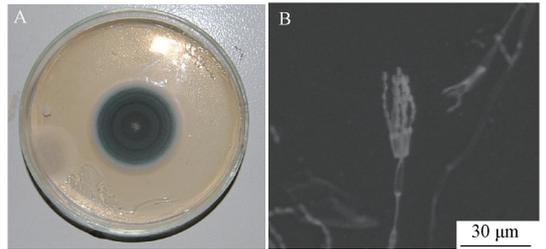
菌株 Strains	$D_{\text{透明圈}}/D_{\text{菌落}}$ $D_{\text{solvent zones}}/$ $D_{\text{colonies}}$	解磷能力 P solubilizing abilities/( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	菌株来源 Sources of strains
PSF 1	1.020	$23.8\pm 1.2$	棉花根际土壤
PSF 2	1.082	-	小麦根际土壤
PSF 3	1.130	$43.2\pm 1.7$	小麦根际土壤
PSF 4	1.176	$68.2\pm 2.2$	棉花根际土壤
PSF 5	1.180	$60.4\pm 2.8$	棉花根际土壤
PSF 6	1.211	$90.7\pm 3.0$	小麦根际土壤
PSF 7	1.230	$105.8\pm 1.5$	小麦根际土壤
PSF 8	1.260	$99.8\pm 2.1$	小麦根际土壤
PSF 9	1.262	$103.8\pm 1.7$	棉花根际土壤
PSF 10	1.265	$117.8\pm 2.0$	小麦根际土壤
PSF 11	1.280	$120.8\pm 3.4$	棉花根际土壤
PSF 12	1.312	$143.8\pm 1.2$	小麦根际土壤
PSF 13	1.420	$186.4\pm 2.2$	棉花根际土壤

注:“-”表示未测得解磷效果。

Note: ‘-’ means unmeasured P solubilizing abilities.

### 2.2 解磷真菌 YTY 的生物学鉴定

由图 1-A 可知,在 PDA 平板上解磷真菌 YTY 菌落由白色逐渐变为深绿色,最后为灰绿色,边缘为白色,菌落较平坦,质地绒状,分生孢子易脱落。YTY 的分生孢子梗发生于基质,帚状枝由分生孢子梗上轮生的小梗组成,帚状枝呈现单轮生(图 1-B)。进一步对比分析发现,解磷真菌 YTY 符合青霉属(*Penicillium*)的生长特性,可初步鉴定为解磷青霉 YTY。



注:A:解磷真菌 YTY 菌落;B:解磷真菌 YTY 的电镜照(bar=30 μm)。

Note: A: Colony of YTY. B: Electron microscope photo of YTY (Bar=30 μm).

图 1 解磷真菌 YTY 的菌落及电镜照

Fig.1 Colony and electron microscope photo of phosphate solubilizing fungus YTY

系统进化树显示解磷真菌 YTY 与草酸青霉 *Penicillium oxalicum* SD123 KP639194.1 的进化距离最近(图 2)。结合形态学特征和分生孢子结构特征,鉴定解磷真菌 YTY 为草酸青霉 *Penicillium oxalicum*。

### 2.3 解磷青霉 YTY 的剂量存活效应

由图 3 可知,能量为 20 keV 时, $5\times 10^{14}$ 、 $1\times 10^{15}$ 、 $5\times$

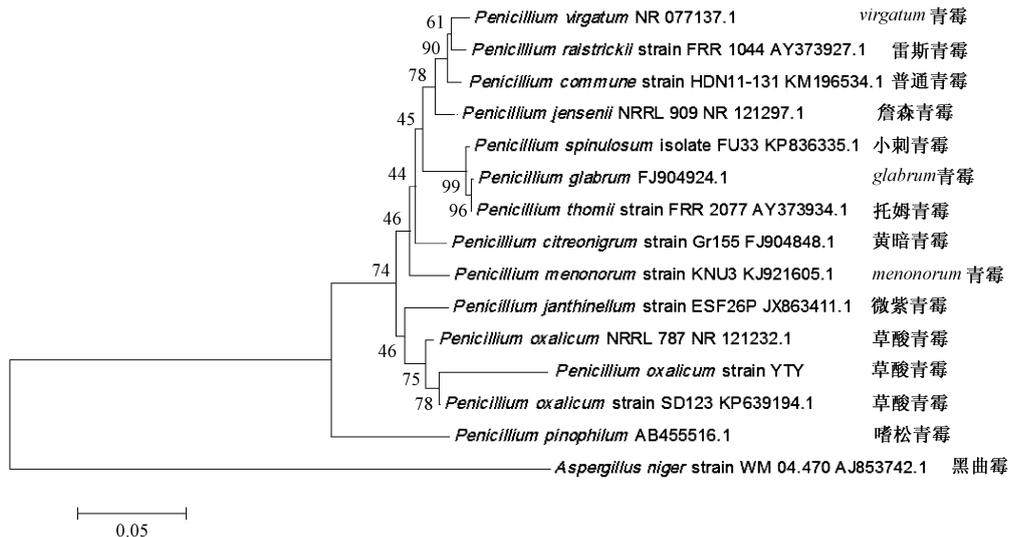
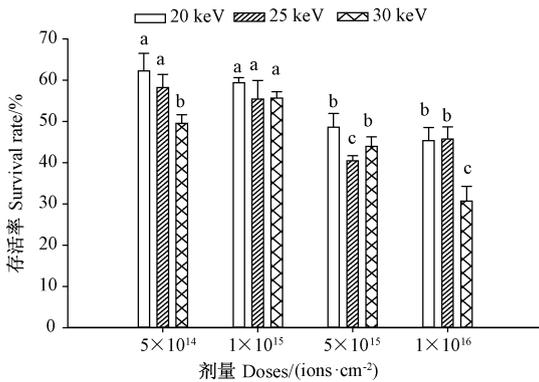


图 2 解磷真菌 YTY 的系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of phosphate solubilizing fungus YTY

$10^{15}$ 、 $1 \times 10^{16}$  ions·cm<sup>-2</sup> 4 个辐射处理下解磷青霉 YTY 存活率分别为 62.3%、59.4%、48.6%、45.3%，即随着离子束辐照剂量的增加，存活率呈逐渐降低的趋势，未呈现 HRS/IRR (hyper-radiosensitivity and induced radioresistance) 效应；能量为 25 keV 时， $1 \times 10^{16}$  ions·cm<sup>-2</sup> 辐射处理的解磷青霉 YTY 的存活率显著高于  $5 \times 10^{15}$  ions·cm<sup>-2</sup> 下的存活率 ( $P < 0.05$ )，其 HRS/IRR 效应呈现不完全；能量为 30 keV 时，解磷青霉 YTY 在  $1 \times 10^{15}$  ions·cm<sup>-2</sup> 辐射处理存活率显著高于  $5 \times 10^{14}$  ions·cm<sup>-2</sup> 和  $5 \times 10^{15}$  ions·cm<sup>-2</sup> 辐射处理，HRS/IRR 效应明显。表明 30 keV 能量下，对解磷青霉 YTY 可诱发 HRS/IRR 效应，解磷真菌 YTY 的 HRS/IRR 效应的研究结果为其离子束诱变最佳条件的确定提供了参考。



注：不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。下同。

Note: Different small letters mean significant difference at 0.05 level. The same as following.

图 3 解磷真菌 YTY 低能离子注入的剂量存活效应

Fig.3 Dose survival effect of phosphate solubilizing fungus YTY irradiated by low energy nitrogen ion beam

## 2.4 解磷青霉 YTY 诱变条件的探索及高效菌的筛选

由表 2 可知，诱变初筛共获得解磷真菌 YTY 的正突变菌 48 株。20、25、30 keV 能量下获得正突变株分别为 13、12、23 株； $5 \times 10^{14}$ 、 $1 \times 10^{15}$ 、 $5 \times 10^{15}$ 、 $1 \times 10^{16}$  ions·cm<sup>-2</sup> 4 个辐射处理下的正突变株分别为 13、18、7、10 株。其中，能量为 30 keV、辐射剂量为  $1 \times 10^{15}$  ions·cm<sup>-2</sup> 处理下，初筛获得突变菌株数量最多。

对初筛获得 48 株正突变株进一步进行摇床复筛，最后获得解磷能力最高的突变体为 p-1，其解磷能力为 235.7 mg·L<sup>-1</sup>，较出发菌解磷真菌 YTY 提高了 26.4%，获得该菌株的诱变条件为 30 keV， $1 \times 10^{15}$  ions·cm<sup>-2</sup> 氮离子，表明 30 keV 和  $1 \times 10^{15}$  ions·cm<sup>-2</sup> 辐射

表 2 解磷真菌 YTY 初筛突变菌株在不同辐射处理下的突变菌分布

Table 2 Distribution of mutants of phosphate solubilizing fungus YTY under different irradiation conditions

辐射剂量 Radiation doses /(ions·cm <sup>-2</sup> )	能量 Energy/keV		
	20	25	30
$5 \times 10^{14}$	5	2	6
$1 \times 10^{15}$	1	2	15
$5 \times 10^{15}$	3	2	2
$1 \times 10^{16}$	4	6	0

条件下获得的突变体不仅数量多且解磷效率也高，其可作为解磷真菌 YTY 诱变选育的最佳辐射条件。利用 30 keV、 $1 \times 10^{15}$  ions·cm<sup>-2</sup> 对 p-1 菌株进行诱变，最终获得 3 株高效解磷突变株，编号分别为 p-1-1、p-1-2、p-1-3。3 株菌的解磷能力分别为 291.8、264.6、245.8 mg·L<sup>-1</sup>，较出发菌株解磷真菌 YTY 分别提高了 56.88%、42.26% 和 32.15% (表 3)。

表 3 解磷真菌 YTY 高效突变菌解磷能力

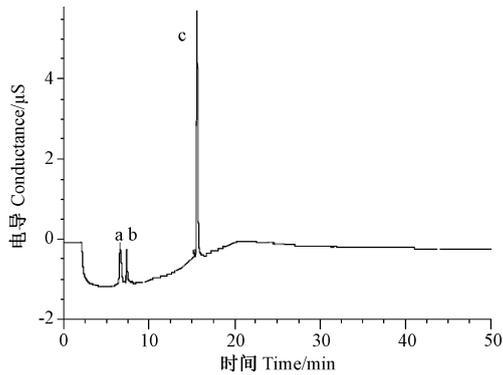
Table 3 Phosphate solubilizing ability of efficient mutants of YTY

菌株名称 Strains name	解磷能力 P solubilizing abilities /(mg·L <sup>-1</sup> )	解磷能力变化率 Change of P solubilizing abilities/%
YTY	186.4±2.2	0
p-1	235.7±3.6	26.40±1.93
p-1-1	291.8±5.5	56.88±2.96
p-1-2	264.6±10.2	42.26±5.48
p-1-3	245.8±8.7	32.15±4.67

## 2.5 解磷青霉 YTY 产酸的分析

利用离子色谱法测定解磷真菌 YTY 无机难溶性磷的培养液(培养 5 d)，由图 4 可知，共测得 3 个明显的吸收峰，3 个峰保留时间分别为 6.6、7.3、15.6 min。进一步分析发现这 3 个峰保留时间与乳酸、乙酸和草酸 3 种有机酸的单一和混合标准样品的保留时间相同，可判断 3 种有机酸分别为乳酸、乙酸和草酸，培养液中这 3 种有机酸含量分别为 0.040 1、0.038 4、0.064 3 mmol·L<sup>-1</sup>，此时培养液的 pH 值为 2.5。表明解磷真菌 YTY 溶解磷酸三钙过程中主要产生了 3 种有机酸。

由图 5 可知，突变株 p-1-1、p-1-2、p-1-3 培养液的 pH 值分别为 2.1、1.9 和 2.0，三者之间无显著差异，但是 3 株突变菌培养液的 pH 值均显著低于 CK ( $P$



注: a、b、c 分别表示乳酸、乙酸、草酸。

Note: a, b and c mean the absorption peaks of lactic, acetic, oxalic, respectively.

图4 解磷真菌 YTY 有机酸产生的情况

Fig.4 Production of organic acids in phosphate solubilizing fungus YTY

<0.05), 表明 3 株突变菌酸化环境的能力均高于 CK。p-1-1 菌株所产乳酸、乙酸、草酸和总酸含量分别较 CK 提高了 113.3%、60.3%、131.2% 和 45.1%, p-1-2 菌株分别较 CK 提高了 131.2%、62.2%、43.1% 和 52.9%, p-1-3 菌株分别较 CK 提高了 30.4%、14.1%、43.8% 和 11.9%。离子束诱变使得解磷青霉 YTY 产乳酸、乙酸、草酸和总酸的能力得到不同程度的提高。综上,解磷青霉 YTY 产有机酸能力与其解磷能力呈正相关,表明解磷青霉 YTY 的解磷能力与其产有机酸的能力密切相关。

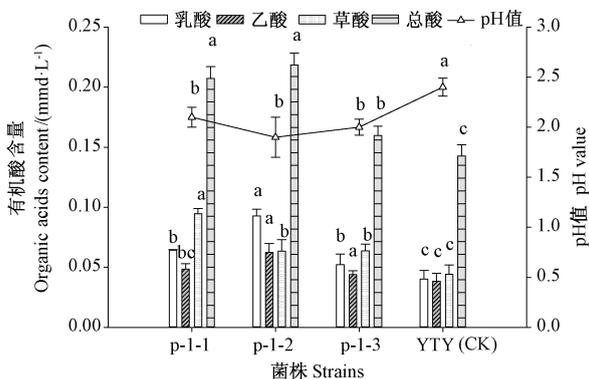


图5 解磷真菌 YTY 突变菌株的 pH 值及产酸的分析

Fig.5 Analysis of pH and organic acids of YTY mutants

### 3 讨论

目前发现的解磷真菌有 60 多种,主要属于链格孢属 (*Alternaria*)、曲霉属 (*Aspergillus*)、镰刀菌属

(*Fusarium*)、青霉属 (*Penicillium*)、踝节菌属 (*Talaromyces*)、木霉属 (*Trichoderma*) 等,其中报道较多的为曲霉属和青霉属,且均具有较高的解磷能力<sup>[14]</sup>。林启美等<sup>[15]</sup>对一些细菌和真菌的解磷能力进行对比研究,发现细菌溶解磷矿粉的能力为 26.92~43.34 mg·L<sup>-1</sup>,而大多数真菌溶解磷矿粉的能力为 59.64~145.36 mg·L<sup>-1</sup>,真菌比细菌溶解磷矿粉的能力更强。Nath 等<sup>[16]</sup>发现 2 株青霉属真菌,具有较强的溶磷能力,其解磷能力最高达到 84.25 和 86.1 mg·L<sup>-1</sup>。本研究从作物根际土壤筛选获得的解磷草酸青霉 YTY,具有高解磷活性,其解磷能力为 186.4 mg·L<sup>-1</sup>,高于前人报道的细菌和同类真菌<sup>[16-17]</sup>。本研究解磷真菌 YTY 的获得为解磷真菌解磷机理的研究及其开发利用提供了重要的材料,同时菌株 YTY 来源于作物根际土壤,可为根际真菌解磷促生效应的研究提供材料。

离子束诱变技术的注入离子种类、能量、剂量等条件可选择范围较大,导致其最佳辐照参数的确定较为困难,若能快速有效获得低能离子诱变真菌 YTY 的最佳诱变条件,可极大提高 YTY 离子束诱变选育工作的效率<sup>[13]</sup>。本研究发现 30 keV 的低能氮离子辐射 YTY 菌株可诱发 HRS/IRR 效应,分析 48 株初筛正突变菌株来源时,发现 30 keV、 $1 \times 10^{15}$  ions·cm<sup>-2</sup> 辐照处理下的突变菌较多且解磷效果最好,且该辐射条件与 YTY 的 IRR 效应诱发条件一致,利用 IRR 效应剂量诱变可能获得理想突变体。目前,国内外也有类似报道<sup>[18]</sup>,且在类芽孢杆菌 (*Paenibacillus* sp.)<sup>[19]</sup>、酒精酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)<sup>[20]</sup>、不动杆菌 (*Acinetobacter* sp.)<sup>[18]</sup> 等微生物中都发现了类似规律。辐射中剂量存活 HRS/IRR 效应可能与 DNA 损伤修复密切相关<sup>[21-22]</sup>,已有研究发现 DNA 损伤,特别是 DNA 双链断裂 (double strand break, DSB) 的损伤修复状态在 HRS/IRR 效应诱发中作用显著<sup>[23]</sup>。前期研究也发现低能氮离子注入大肠杆菌 MG1655 可诱发 HRS/IRR 效应,其诱发与参与 DNA 易错修复的 *recA* 基因<sup>[24]</sup>、参与自由基修复的 SOD 和 CAT 密切相关,推测 IRR 效应诱发时,离子束对 YTY 细胞内 DNA 有较大的损伤作用,启动了 DNA 的修复机制,DNA 损伤修复系统的启动不仅使得大量损伤细胞得以存活,导致其存活率增加,且此时 YTY 细胞内 DNA 应急修复也极大提高了微生物的突变率<sup>[25]</sup>。表明利用 IRR 辐射敏感剂量可加速青霉 YTY 的诱变选育,本研究也为利用离子束 IRR 效应构建高效解磷突变体提供了参考和依据。

微生物参与无机磷解磷的机理大致可分为 4 种,包括有机酸、氢质子、蛋白质、螯合作用<sup>[26]</sup>,其中有机

酸是解磷微生物解磷的关键物质<sup>[27-28]</sup>。Chai 等<sup>[29]</sup>从明矾矿中分离到 1 株青霉 PSM11-5, 发现其解磷作用与葡萄糖酸、柠檬酸关系密切。目前国内外已有青霉解磷机制的研究报道, 如 Ahuja 等<sup>[30]</sup>认为马氏拟青霉 (*Paecilomyces marquandii*) AA1 产生的柠檬酸和草酸是导致解磷的重要条件; Mendes 等<sup>[31]</sup>发现变灰青霉菌 (*Penicillium canescens*) 产生的柠檬酸、葡萄糖酸、草酸是其溶解磷酸钙的主要产物。本研究发现解磷青霉 YTY 降解磷酸三钙过程中, 产生了 3 种有机酸, 即乳酸、乙酸、草酸, 也表明 YTY 解磷过程与有机酸关系密切。下一步的研究可以重点探讨解磷真菌 YTY 的基因在离子束诱变中发生了哪些突变。

## 4 结论

本研究通过形态学及分子学方法鉴定表明 YTY 为草酸青霉 (*P. oxalicum*)。30 keV 氮离子辐照为解磷真菌 YTY 的最佳诱变条件, 可诱发 HRS/IRR 效应, 共获得了 3 株高效解磷突变株; 乳酸、乙酸、草酸为 YTY 解磷的主要有机酸, YTY 产酸能力与其解磷能力关系密切, 但乳酸、乙酸、草酸 3 种有机酸对 YTY 解磷贡献的大小, 尚有待进一步研究。本研究结果为解磷青霉的离子束诱变选育提供了参考, 为探明青霉解磷的机理及开发应用提供了理论依据和生物材料。

## 参考文献:

- [1] 滕泽栋, 李敏, 朱静, 宋明阳. 解磷微生物对土壤磷资源利用影响的研究进展[J]. 土壤通报, 2017, 48(1): 229-235
- [2] Busato J G, Zandonadi D B, Mól A R, Souza R S, Aguiar K P, Júnior F B, Olivares F L. Compost biofortification with diazotrophic and P-solubilizing bacteria improves maturation process and P availability[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2017, 97(3): 949-955
- [3] Tomer S, Suyal D C, Shukla A, Rajwar J, Yadav A, Shouche Y, Goel R. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from Western Indian Himalayan soils[J]. Biotechnology, 2017, 7(2): 95-103
- [4] Elias F, Woyessa D, Muleta D. Phosphate Solubilization potential of rhizosphere fungi isolated from plants in jimma zone, Southwest Ethiopia[J]. International Journal of Microbiology, 2016, 2016(3): 1-11
- [5] Kucey R. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils[J]. Canadian Journal of Soil Science, 1983, 63(4): 671-678
- [6] Wei Y, Zhao Y, Shi M, Cao Z, Lu Q, Yang T, Fan Y, Wei Z. Effect of organic acids production and bacterial community on the possible mechanism of phosphorus solubilization during composting with enriched phosphate-solubilizing bacteria inoculation [J]. Bioresource Technology, 2017, 247(9): 190-199
- [7] 刘胜男, 王亚洲, 石林霞, 李市场, 古绍彬.  $\gamma$ -亚麻酸产生菌的低能离子束诱变选育[J]. 河南科技大学学报(自然科学版), 2015, 36(3): 76-80
- [8] 刘国生, 李金鑫, 刘磊, 谷艳昌, 许航. N 离子束注入与 DES 复合诱变选育腺苷高产菌株[J]. 河南农业科学, 2017, 46(4): 143-146
- [9] 李阔阔, 王钰, 万田, 庄晓晓. 高产洛伐他汀红曲霉氮离子束诱变育种[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(4): 98-102
- [10] 游银伟, 王梅, 江丽华, 刘兆辉. 高效解磷菌 *Bacillus subtilis* P-1 的 N 离子束诱变育[J]. 西南农业学报, 2009, 22(4): 1020-1023
- [11] 胡秀芳, 高园园, 方琼楼, 吴金光, 陈集双. 离子束注入技术选育胶质芽孢杆菌 KNP414 的解磷突变菌株[J]. 核农学报, 2008, 22(4): 420-425
- [12] Yu Z L. Study on the interaction of low-energy ions with organisms [J]. Surface and Coatings Technology, 2007, 201: 8006-8013
- [13] Yu L D, Vilaithong T, Brown I. Introduction to Ion Beam Biotechnology[M]. New York: Springer, 2006
- [14] Mohammad S K, Almas Z, Javed M. Phosphate Solubilizing Microorganisms-principles and Application of Microphos Technology [M]. Switzerland: Springer International Publishing, 2014
- [15] 林启美, 王华. 一些细菌和真菌的解磷能力及其机理初探[J]. 微生物学通报, 2001, 28(2): 26-30
- [16] Nath R, Sharma G D, Barooah M. Efficiency of tricalcium phosphate solubilization by two different endophytic *Penicillium* sp. isolated from tea (*Camellia sinensis* L.) [J]. European Journal of Experimental Biology, 2012, 2(4): 1354-1358
- [17] Patil P M, Kuligod V B, Hebsur N S, Patil C R, Kulkarni G N. Effect of phosphate solubilizing fungi and phosphorus levels on growth, yield and nutrient content in maize (*Zea mays*) [J]. Karnataka Journal of Agricultural Science, 2012, 25(1): 58-62
- [18] 马睿, 蔡长龙, 梁海锋, 严一心. 离子注入选育高效石油烃降解菌研究[J]. 西安工业大学学报, 2017, 37(2): 129-133
- [19] 梅建凤, 唐中秀, 王琦, 易喻, 王鸿, 应国清. 低能 N<sup>+</sup> 离子注入诱变选育琼胶酶高产菌株[J]. 浙江工业大学学报, 2013, 41(1): 53-64
- [20] 王鹏银, 郝欣, 郭学武, 肖冬光. 离子注入诱变选育低产高级醇酿酒酵母菌株[J]. 酿酒科技, 2008, 164(2): 17-26
- [21] Enns L, Rasouli-Nia A, Hendzel M, Marples B, Weinfeld M. Association of ATM activation and DNA repair, with induced radioresistance after low-dose irradiation [J]. Radiation Protection Dosimetry Radiat, 2015, 166(1/2/3/4): 131-136
- [22] Xue L, Furusawa Y, Yu D. ATR signaling cooperates with ATM in the mechanism of low dose hypersensitivity induced by carbon ion beam[J]. DNA Repair, 2015, 34(1): 1-8
- [23] Thopan P, Yu L, Brown I G, Tippawan U. Low-energy ion-species-dependent induction of DNA double-strand breaks: ion energy and fluence thresholds [J]. Radiation Research, 2017, 188(4): 426-432
- [24] 杨天佑, 王铁固, 田静. 低能 N<sup>+</sup> 注入 *E. coli* 诱发的 HRS/IRR 与

- 抗氧化酶关系的初探[J]. 原子核物理评论, 2010, 27(2): 197-201
- [25] 杨天佑, 李培睿, 田静, 李宗伟, 秦广雍. 低能离子注入 *E. coli* K12 的 HRS/IRR 效应及 *recA* 基因在其诱发中的作用[J]. 原子核物理评论, 2008, 25(4):397-340
- [26] Gong M, Tang C, Zhu C. Cloning and expression of delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  improves phosphate solubilization [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2014, 60(11):761-765
- [27] Vyas P, Gulati A. Organic acid production *in vitro* and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*[J]. *BMC Microbiology*, 2009, 9(1): 174-189
- [28] 龚明波. 溶磷微生物分离、应用及其相关基因的克隆与功能鉴定 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2011
- [29] Chai B, Wu Y, Liu P, Liu B, Gao M. Isolation and phosphate-solubilizing ability of a fungus, *Penicillium* sp. from soil of an alum mine[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2011, 51(1):5-14
- [30] Ahuja A, Ghosh S B, Souza S F. Isolation of a starch utilizing, phosphate solubilizing fungus on buffered medium and its characterization[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98(17):3408-3411
- [31] Mendes G O, Dias C S, Silva I R, Junior J I R, Pereira O L, Costa M D. Fungal rock phosphate solubilization using sugarcane bagasse [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 29(1):43-50

## Ion Beam Mutagenesis and Phosphate Solubilizing Mechanism on PSF YTY Isolated From Rhizospheric Soil

YANG Tianyou<sup>1,2,\*</sup> TIAN Jing<sup>1</sup> ZHANG Mingxia<sup>1</sup> ZHANG Lei<sup>1</sup>

<sup>1</sup> School of Life Science and Technology, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003;

<sup>2</sup> Henan Collaborative Innovation Center of Modern Biological Breeding, Xinxiang, Henan 453003)

**Abstract:** To screen efficient Phosphate Solubilizing (PS) fungi and mutants as well as exploring their PS mechanism, in this article, the fungus YTY with PS ability was isolated from rhizosphere of wheat and cotton. Followed by low energy ion irradiation basing on optimum irradiational condition, the mutants of YTY with highly efficient PS ability were acquired. In addition, the PS mechanism of YTY was explored based on organic acids as products. Our results showed that YTY strain isolated from rhizosphere had a PS capacity of 186.4 mg·L<sup>-1</sup>, and was identified as *Penicillium oxalicum* according to its morphology and ITS amplicon sequencing. Three efficient PS mutants p-1-1, p-1-2 and p-1-3 were obtained at the best mutagenic dose of 30 keV and 1×10<sup>15</sup> ions·cm<sup>-2</sup>. The PS ability of three mutants were 291.8, 264.6 and 245.8 mg·L<sup>-1</sup> for p-1-1, p-1-2 and p-1-3, respectively, which were 56.88%, 42.26% and 32.15% higher than that of YTY strain. The concentration of lactic, acetic, and oxalic determined by ion chromatography were 0.0401, 0.0384, and 0.0643 mmol·L<sup>-1</sup>, respectively in YTY medium cultured for five days (pH 2.5). For three mutants of p-1-1, p-1-2 and p-1-3, the lactic, acetic, oxalic, and total acid contents were 0.0643, 0.0484, 0.0945, 0.2072; 0.0927, 0.0623, 0.0634, 0.2184 and 0.0523, 0.0438, 0.0637, 0.1598 mmol·L<sup>-1</sup>, respectively, which were significantly higher than that of YTY (*P*<0.05). The media pH of mutants (pH 2) were also significantly lower than that of YTY (*P*<0.05). It is suggested that YTY solubilized phosphate mainly by producing organic acids, such as lactic, acetic and oxalic. This study could guide us the breeding of efficient PS mutants by ion beam, build up a theoretical basis on the detection of the PS mechanism, and provide biological materials for development and application for PS fungi.

**Keywords:** Phosphate Solubilizing (PS) fungi, ion beam, increased radioresistance (IRR), PS mechanism, organic acids