

Predominant Contamination Agents in Rubber Tree Tissue Culture and Its Elimination

Yunxia Qin¹, Huizhen Zhou², Jing Chen¹, Jianghua Yang¹, Yanshi Hu¹, Chaorong Tang^{1*}

¹Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture, Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou Hainan

²Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Danzhou Hainan

Email: qinyunxia2004@163.com, *chaorongtang@126.com

Received: May 6th, 2017; accepted: May 24th, 2017; published: May 27th, 2017

Abstract

Tissue culture is a practical technique of modern biotechnology. Self-rooting juvenile clones of rubber tree is a new type material for field planting, which has characters of higher yielding and faster growth, compared with previous budded rubber trees, and its quicker propagations are based on tissue culture. However, contamination during tissue culture progress has been one key reason for higher cost. In this study, the main causal agents were identified by molecular method to be *Aspergillus niger* and *Aspergillus versicolor*. Chemicals such as potassium sorbate or sodium benzoate and biological agents as *Trichoderma harzianum* strain 13-3-2 were suggested to reduce the rate of contamination. 3% sodium benzoate or potassium sorbate were found effective in killing or inhibiting contaminated bacteria and some of the contaminated fungi, including the predominant *A. niger*. During the later periods when seedlings acclimated, *Tri. harzianum* 13-3-2 was found so useful of killing miscellaneous agents that the live rate of contaminated seedlings could be enhanced by 43%. These results will be used for reducing cost in mass tissue culture production and fastening the propagation or utilization of elite rubber tree clones or materials.

Keywords

Tissue Culture of Rubber Tree, Contamination, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niger*, Sodium Benzoate, Potassium Sorbate, *Trichoderma harzianum*

橡胶树组培苗常见污染源的鉴定及防除方法

秦云霞¹, 周慧珍², 成 镜¹, 阳江华¹, 胡彦师¹, 唐朝荣^{1*}

¹中国热带农业科学院橡胶研究所, 农业部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室, 海南 儋州

²海南大学热带农林学院, 海南 儋州

*通讯作者。

文章引用: 秦云霞, 周慧珍, 成镜, 阳江华, 胡彦师, 唐朝荣. 橡胶树组培苗常见污染源的鉴定及防除方法[J]. 植物学研究, 2017, 6(3): 167-174. <https://doi.org/10.12677/br.2017.63022>

摘要

植物组织培养技术是一门实用性非常强的现代生物技术。自根幼态无性系是橡胶树新一代种植材料, 与传统芽接苗相比具有高产速生的特点, 其推广应用正是建立在规模化组培繁殖体系上的。然而, 组培生产过程中杂菌污染是造成生产成本高的主要原因之一。本研究通过分子鉴定的方法确认橡胶树组织培养中最主要的污染源是黑曲霉、杂色曲霉等。我们发现苯甲酸钠和山梨酸钾以及益生菌哈茨木霉菌株 13-3-2 可以用于降低污染率。添加3%的苯甲酸钠或山梨酸钾的培养基可有效防止细菌及部分真菌(包括黑曲霉)污染; 在后期驯化练苗过程中, 接种的哈茨木霉菌13-3-2可有效杀死多种污染真菌, 使污染苗的成活率提高43%以上。该研究结果将用于降低生产橡胶树组培苗的生产成本, 加快橡胶树优良品种或材料在橡胶树生产中的应用。

关键词

橡胶树组织培养, 污染, 杂色曲霉, 黑曲霉, 苯甲酸钠, 山梨酸钾, 哈茨木霉

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

植物组织培养技术是一门实用性非常强的现代生物技术, 被广泛地应用于各个领域, 在科研与生产上都具有广泛的应用价值[1] [2]。中国热带农业科学院橡胶研究所科技人员以此技术为基础, 通过近 30 年的努力, 成功建立起高效的工厂化繁育橡胶树自根幼态无性系培育体系, 从而使橡胶树体培苗成为继实生苗和芽接苗后的新一代种植材料[3]。橡胶树体胚苗比实生苗的培育所需时间短, 从 2 年缩短到 8 个月。从体培苗成长来的橡胶树抗风能力强, 产量提高 10%~30%, 生长速度快 10%~20%, 定植后 5~6 年即可割胶, 而芽接苗需要种植 7~8 年才能割胶[4]。然而由于海南高温高湿的气候环境, 真菌污染成为橡胶自根无性系体胚苗的生产成本偏高的因素之一[5]。通常在生产中污染材料处理所采用的方法有 a) 污染的材料被挑拣出来, 集中用各种农药处理后, 再进行移栽等处理, 但成活率降低了很多; b) 污染的材料被挑拣出来, 高温灭菌后处理掉。如果能够了解污染源种类, 做到有针对性地在培养基中添加抑菌剂或生防菌, 不但能够降低污染率、提高成活率, 而且简化操作流程, 降低生产成本。

苯甲酸钠和山梨酸钾具有低廉的价格和广谱的抑菌效果而成为食品、药品、化妆品的首选防腐剂[6]。据报道它们对霉菌、细菌等都有抑菌作用[7]。相比而言, 山梨酸(钾)更能有效地抑制霉菌, 其防腐效果是苯甲酸钠的 5~10 倍, 而且苯甲酸钠的毒副作用较大, 但是山梨酸钾的价格是苯甲酸钠的 2~3 倍, 考虑到生产成本, 胡春红等试用筛选这两种防腐剂的抑菌配比及抑菌浓度[8]。王丹和刘霞将山梨酸钾作为开放式组织培养红豆杉的抑菌剂, 确定其最佳抑菌浓度为 0.02 g/L [7]。为了更有的放矢地解决橡胶组培苗生长过程中的污染问题, 本文作者收集污染平板和污染的试管苗, 根据表型及外观分类, 将最常见污染源进行分离培养和 ITS 序列鉴定, 并通过试验分析了苯甲酸钠和山梨酸钾对这些菌的抑菌效果。

木霉菌(*Trichoderma* spp.)是一类重要的多功能益生真菌[9] [10]。它们不仅能通过多种机制来控制病原菌的侵染和病害的发生,而且还具有促进作物生长、提高作物抗生物和非生物胁迫的能力[11] [12] [13] [14],是一种公认的环境友好型真菌。根据我们前期对哈茨木霉菌株 13-3-2 的研究,发现木霉菌可有效抑制杂菌,可显著降低污染苗的死亡率,因此在本文研究中我们重点考察了哈茨木霉菌株 13-3-2 对黑曲霉的抑制作用。该研究结果将用于有效防除橡胶树组培生产中的杂菌污染,提升组织培养效率。

2. 试验材料和方法

2.1. 试验材料

苯甲酸钠和山梨酸钾(国药集团化学试剂有限公司),化学纯。黑曲霉是我们从污染的平板上分离并进行形态和测序鉴定。哈茨木霉 13-3-2 (保藏号为 CGMCC No. 13163)和哈茨木霉 5P-3 (保藏号为 CGMCC No. 13164),本实验室鉴定并保藏于中国菌种保藏中心。污染平板及污染的热研 7-33-97 自根无性系的组培试管苗来自于中国热带农业科学院试验场九队,国家天然橡胶种植圃内组培苗大量生产工作室。

2.2. 试验方法

2.2.1. 真菌基因组 DNA 提取方法及 ITS 序列扩增

用孟加拉红培养基分离培养各个污染菌。用 CTAB 方法提取污染真菌的基因组 DNA。用通用引物 ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行 PCR 扩增污染真菌的 18S rDNA-ITS 序列,PCR 反应体系是 25 μ L: Taq 酶 0.20 μ L、10 xbuffer 2.5 μ L、dNTP 0.2 μ L、10 μ L 的 primer 各 0.3 μ L, ddH₂O 21.5 μ L, DNA 模板 25 ng。扩增片段克隆后送由上海生物技术有限公司进行测序。

2.2.2. 菌液制备

取经 28 $^{\circ}$ C 培养 4 天的黑曲霉,加 5 ml 无菌水洗下霉菌孢子,依次 10 倍稀释为 10^{-3} ,使孢子数约为 10^3 个/ml。

2.2.3. 苯甲酸钠和山梨酸钾抑菌培养基的制备

在配置 1/2 PDA + 5 g 酵母粉固体培养基时,分别加入苯甲酸钠或山梨酸钾,使其质量浓度分别为 (3%、2%、1.0%、0.5% 和 0),高压蒸汽灭菌(121 $^{\circ}$ C, 20 分钟)备用。

2.2.4. 苯甲酸钠和山梨酸钾不同配比培养基的配置方法

分别精确称取苯甲酸钠和山梨酸钾各 2.5 g 混合即复合配伍为 1:1,称取苯甲酸钠 2.0 g、山梨酸钾 3.0 g 混合,即复合配伍为 2:3;称取苯甲酸钠 3.0 g、山梨酸钾 2.0 g 混合,即复合配伍为 3:2。将 3 种配比的混合物加入培养基中,制备质量浓度为 3.0、2.0、1.0、0.5、0 g/L 的培养基用于分析它们对黑曲霉、炭疽菌等的抑制或杀菌效果。

2.2.5. 苯甲酸钠的抑菌作用

苯甲酸钠和山梨酸钾对真菌抑菌效果的评价方法有两种:一是测量真菌菌丝生长速度受抑制率来判断;一是取 0.1 ml 稀释好的浓度为 10^3 个/ml 分生孢子稀释液加入抑菌培养基平皿中,涂板,于 28 $^{\circ}$ C 培养,第 2~3 天观察和统计孢子萌发生长情况。

2.2.6. 哈茨木霉 13-3-2 孢子液的准备

哈茨木霉 13-3-2 在 1/2 玉米粉(CMA, corn meal agar) + PDA 培养基上生长 7 天,将分生孢子用灭菌 ddH₂O 洗下来,并用 PDB + 1/2MS 无机盐溶液稀释为浓度 10^7 个/ml 备用。

2.2.7. 污染的组培橡胶苗接种方法

为了考察哈茨木霉 13-3-2 是否能够挽救被污染的橡胶组培苗, 分别于 2016 年 12 月和 2017 年 2 月接种两次。我们选用生长势相对一致的被污染的热研 7-33-97 橡胶组培苗 600 株进行了接种试验。处理组每一个试管内接种哈茨木霉 13-3-2 分生孢子数量为 10^7 个/ml 的营养液 1 ml (用 PDB + 1/2MS 无机盐溶液配制), 对照组的每一个试管内加入等量不添加哈茨木霉 13-3-2 分生孢子的 PDB + 1/2MS 无机盐溶液。

3. 结果与分析

3.1. 分离及鉴定橡胶树组培的污染源

根据污染源出现的频率和污染源在培养基上的表型, 挑取了 6 个进行分离接种, 命名为 R1-R6, 又根据它们在孟加拉红培养基上的表型合并为四个, 分别为 R1, R3, R5 和 R6。它们的 ITS 扩增片段大小约分别为 590 bp、607 bp、624 bp 和 644 bp, 利用 NCBI blast 序列比较, 发现它们与同源基因的 rDNA-ITS 区序列相似性为 98%~100%。下载同源基因的 fasta 序列, 利用软件 ClustaX (1.81 版本) 进行序列比对分析, 采用 Neighbor-Joining 方法进行聚类分析, 进行 1000 次 bootstrap 统计学检验(图 1), 得到结果。R5 与 KY354579.1 *Aspergillus niger* 黑曲霉归为一类, R3 与 KX961206.1 *Penicillium* 青霉菌归为一类; R6 与 KT336515 聚一起, 属于哈茨木霉菌; R1 与 FJ878627.1、KJ082097.1、KJ527011.1 聚为一组, 属于 *Aspergillus versicolor* 杂色曲霉(又名采色曲霉和变色曲霉)。

KY354579.1 *Aspergillus niger* 黑曲霉; KX961206.1 *Penicillium* 青霉菌; FJ878627.1 *Aspergillus versicolor* 采色曲霉, 杂色曲霉, 变色曲霉; KT336515 *Trichoderma harzianum* isolate

其中黑曲霉 R5 污染所占比例在 50% 以上是本研究的重点对象。

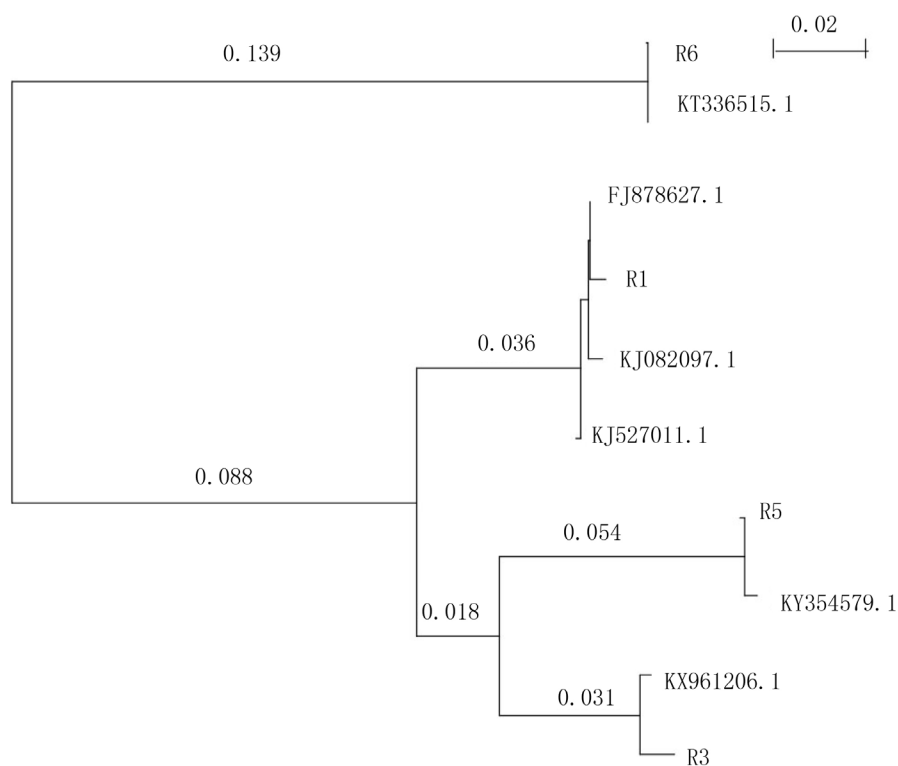


Figure 1. Phylogenetic analysis of ITS sequences in several contaminated fungi and some homologous species

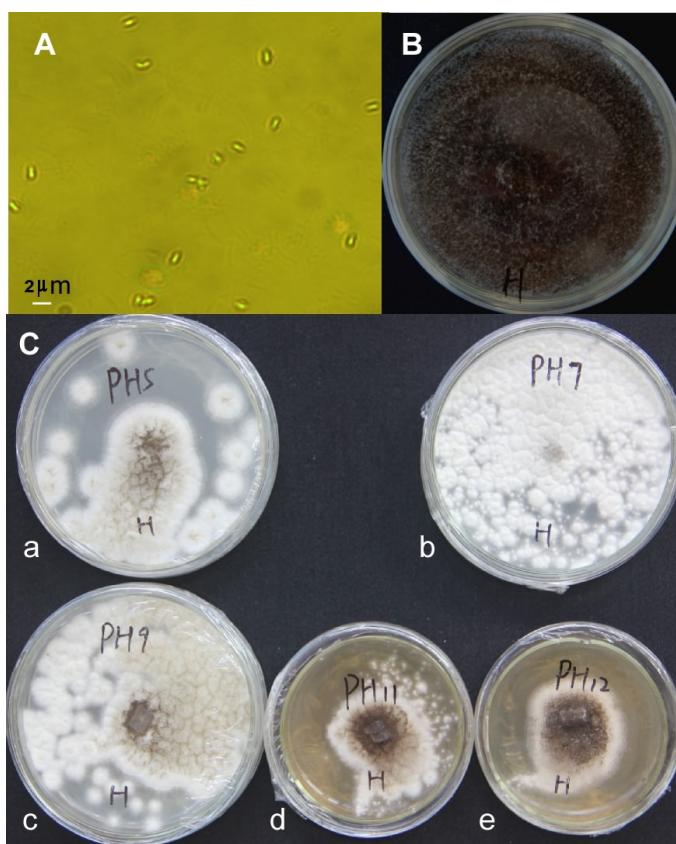
图 1. 污染真菌 ITS 序列的进化分析

3.2. 黑曲霉分生孢子大小及 pH 适应特性

利用 PDA 固体培养基, 用稀盐酸或氢氧化钾调节培养基的 pH 分别为 3、5、7、9、11 和 12, 接种黑曲霉菌块(菌块带有分生孢子), 第三天观察观察黑曲霉的生长情况。结果表明在 pH = 7~9 的培养基上, 黑曲霉生长最好, 在 pH < 5 的培养基上, 黑曲霉孢子的萌发率低于 50%, 在 pH = 11~12 培养基上, 黑曲霉孢子也能生长(图 2), 可见黑曲霉对 pH 的适应性广, 适应能力强。黑曲霉分生孢子大小在放大 1000 倍下, (Leica DMLB, 油镜下拍摄)平均长度为在 1~1.35 微米。

3.3. 苯甲酸钠和山梨酸钾对黑曲霉、杂色曲霉、青霉等生长的抑制作用

培养基中添加不同含量的苯甲酸钠和山梨酸钾的试验结果表明 1.0%的苯甲酸钠可以完全抑制黑曲霉菌丝的生长(图 3(B)); 1.0%的苯甲酸钠可明显抑制黑曲霉分生孢子的萌发, 2.0%~3.0%可以完全抑制其萌发(图 3(C), 表 1)。同样质量浓度, 且配比为 1:1 的苯甲酸钠和山梨酸钾对黑曲霉生长的抑制效果不如单一的苯甲酸钠(图 3(D), 其它配比 2:3, 3:2 的效果更差, 略)。3.0%苯甲酸钠才能完全抑制青霉的菌丝生长和孢子的生长(图 3(E))。哈茨木霉 5P-3 和 13-3-2 可以显著抑制黑曲霉的快速生长(图 3(F)), 在对峙生长中, 黑曲霉及其分生孢子的生长被明显抑制, 哈茨木霉 5P-3 的抑制率达 75.0%, 哈茨木霉 13-3-2 的抑制率为 85.7% (图 3(F))。



A、黑曲霉的分生孢子大小, 放大 1000 倍, bar 为 2 微米; B、黑曲霉产生大量的分生孢子; C、黑曲霉在不同 pH 平板上的生长情况(a-e, pH = 5、7、9、11 和 12)。

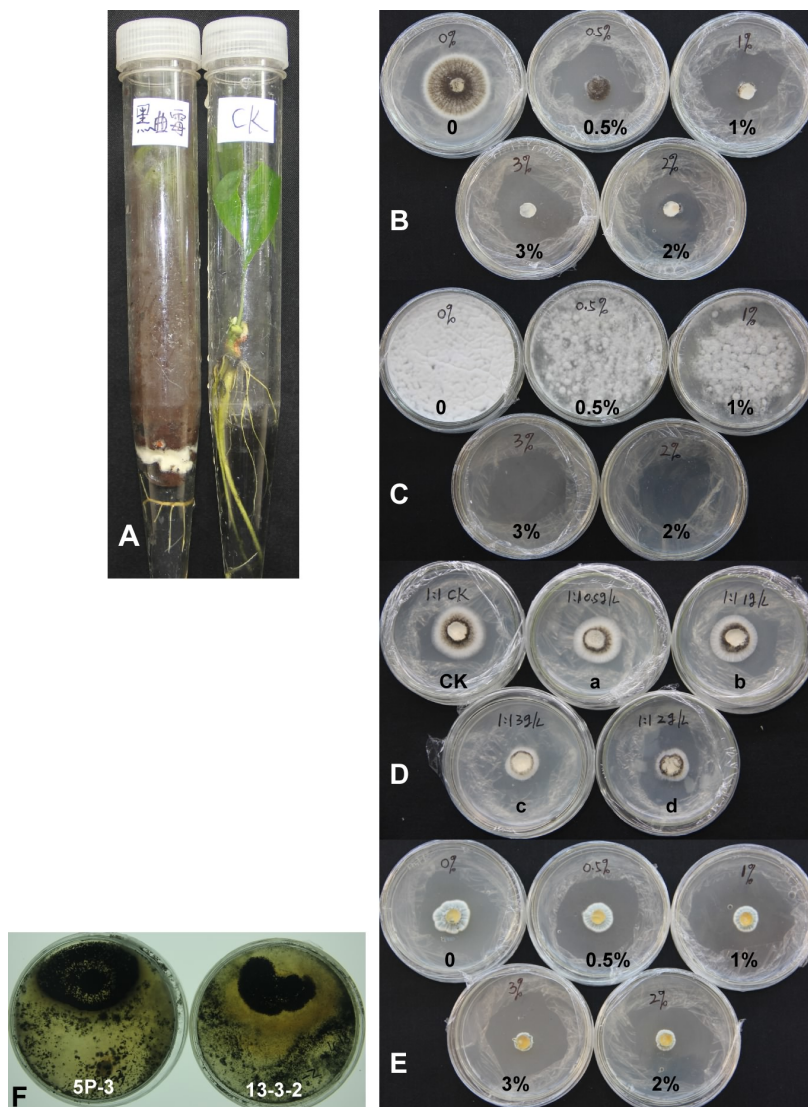
Figure 2. Spores of *Aspergillus niger* and its growth profiles on different pH media

图 2. 黑曲霉的分生孢子及其在不同 pH 培养基上生长情况

Table 1. Inhibition effect of sodium benzoate or potassium sorbate on growth of *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor* and *Penicillium* spp.**表 1.** 苯甲酸钠和山梨酸钾对黑曲霉、杂色曲霉和青霉生长的影响

苯甲酸钠浓度 g/L	0 (CK)	0.5%	1%	2%	3%
黑曲霉孢子萌发率%	100	70 ± 5	40 ± 2	0	0
青霉孢子萌发率%	100	60 ± 3	30 ± 2	5 ± 2	0
黑曲霉菌丝生长抑制率%	2.9 ± 0.3 cm	0.75 ± 0.10 cm	0	0	0
杂色曲霉菌丝生长抑制率%	1.70 ± 0.10 cm	0.95 ± 0.10 cm	0	0	0

注：表中数据为 3 次独立试验，数值结果为培养 3 天的平均值



A、黑曲霉对橡胶苗的致死效果；B、不同浓度苯甲酸钠对黑曲霉菌丝及分生孢子生长的影响；C、不同浓度苯甲酸钠对黑曲霉分生孢子萌发的影响；D、不同质量百分比下配比为 1:1 的苯甲酸钠和山梨酸钾对黑曲霉菌丝及分生孢子生长，其中 ck 为 0，a~d 为质量百分比为 0.05%~0.30%，配比为 1:1 苯甲酸钠和山梨酸钾培养基；E、不同浓度苯甲酸钠对杂色曲霉菌丝及分生孢子生长的影响；F、木霉菌 13-3-2 和 5P-3 对黑曲霉生长的影响(8 天对峙生长效果)。

Figure 3. Growth of *Aspergillus niger* inhibited by sodium benzoate, potassium sorbate and *Trichoderma harzianum*

图 3. 苯甲酸钠、山梨酸钾、哈茨木霉等对黑曲霉生长的影响

Table 2. Contaminated Reyan7-33-97 tissue cultured seedlings were dramatically saved by treatment with *Trichoderma harzianum* 13-3-2**表 2.** 污染的热研 7-33-97 组培苗用哈茨木霉 13-3-2 处理后成活率显著提高

品种	污染株数/株	处理时间/d	练苗成活株数/株	死亡率/%	成活率/%
热研 7-33-97	300	10	288 ± 5	4.1	95.9
对照	300	10	142 ± 8	47	53

注：表中数据为 2 次独立试验结果

3.4. 哈茨木霉 13-3-2 对热研 7-33-97 污染苗成活率的影响

选用污染的热研 7-33-97 组培试管苗于同一时间按照方法 2.2.7 所述，接种营养液或哈茨木霉菌孢子液，10 天后移栽温室沙床，移栽 10 天后统计结果如表 2 所示。没有处理的污染苗死亡率达到 47.0%，而处理后的达到 95.9%，污染苗的成活率提高约 43.0% (表 2)。

4. 结论和讨论

通过单菌分离及分子鉴定结果表明：黑曲霉和杂色曲霉是热带地区橡胶树组织培养过程中最常见和最主要的污染源，青霉和哈茨木霉次之(图 1)。研究发现黑曲霉最适温度是 33°C~37°C (在 45°C 下处理 6 小时的培养基上还能生长)，最低相对湿度为 88%，适应在高温、高湿环境下生长，而且生成黑曲霉的分生孢子小 1.0~1.35 μm (图 2)，易扩散，生命力强，这些特性可能是该菌成为橡胶树组培中最主要的污染源的原因。由于降低成本和简化操作是植物组织培养科研工作者和大量商业繁育苗木时所追求的共同目标[15] [16]，为减少组培过程中的微生物污染，很多人已经做了不少的探索，比如在培养基中添加抗生素[17]、苯甲酸钠和山梨酸钾以及利用植物益生菌[13]等。崔刚等探索并建立一种植物开放式组织培养模式，通过应用抑生素将污染率控制在 10% 以下的可接受范围内，从而使植物组织培养可以在自然、开放的有菌环境中进行操作，从根本上简化组培环节，降低组培成本[18]。在本文研究中，我们发现接种哈茨木霉菌株 13-3-2 对黑曲霉、杂色曲霉、青霉菌的孢子萌发和菌丝生长都有一定的抑制作用(图 3)。此外，发现 2%~3% 的苯甲酸钠可以有效抑制黑曲霉。这些结果，有助于我们在明确污染源的情况下，通过有针对性地在培养基中添加适宜的抑菌剂和利用拮抗木霉，达到降低橡胶组培污染率，提高成活率，缩短培育时间，从而降低生产成本的目的。至于在组织培养不同阶段的培养基中添加山梨酸钾和苯甲酸钠是否会影响橡胶胚状体的生长速度及苗子质量，还需要进一步研究。

基金项目

该研究得到海南省自然科学基金项目(20153213)的支持，国家橡胶树种质资源圃提供材料。

参考文献 (References)

- [1] “试管橡胶苗”攻克世界难题，橡胶组培苗有望产业化生产[J]. 中国西部科技, 2011(33): 69.
- [2] 杨国泰, 李亮, 张冬敏, 等. 克服植物组织培养中内生菌污染的研究[J]. 中国园艺文摘, 2011(12): 180-182.
- [3] 范南虹, 林红生, 田婉莹. 橡胶组培苗成功研发的背后[N]. 海南日报, 2011(2).
- [4] “试管橡胶苗”攻克世界难题. 橡胶组培苗有望产业化生产[J]. 中国西部科技, 2011(33): 69.
- [5] 周权男, 姜泽海, 李哲, 等. 植物组织培养中污染控制技术的研究现状[J]. 热带农业科学, 2012(09): 53-56.
- [6] 王好. 不同浓度的苯甲酸钠对微生物限度检查的影响[J]. 中国热带医学, 2007(09): 1664-1697.
- [7] 王丹, 刘霞. 山梨酸钾在红豆杉开放式组织培养中的应用[J]. 安徽农业科学, 2010(02): 634-635.
- [8] 胡春红, 陈龙, 李季平, 等. 苯甲酸钠和山梨酸钾的复配抑菌效果研究[J]. 中国调味品, 2012(03): 46-49.

- [9] Schuster, A. and Schmoll, M. (2010) Biology and Biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **87**, 787-799. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2632-1>
- [10] 陈捷, 朱洁伟, 张婷, 等. 木霉菌生物防治作用机理与应用研究进展[J]. 中国生物防治学报, 2011(02): 145-151.
- [11] Harman, G.E. (2006) Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, **96**, 190-194. <https://doi.org/10.1094/PHTO-96-0190>
- [12] Shores, M., Harman, G.E. and Mastouri, F. (2010) Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Bio-control Agents. *Annual Review of Phytopathology*, **48**, 21-43.
- [13] Harman, G.E. (2011) Multifunctional Fungal Plant Symbionts: New Tools to Enhance Plant Growth and Productivity. *New Phytologist*, **189**, 647-649. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03614.x>
- [14] Tripathi, P., Singh, P.C., Mishra, A., et al. (2013) *Trichoderma*: A Potential Bioremediator for Environmental Clean Up. *Clean Technologies and Environmental Policy*, **15**, 541-550. <https://doi.org/10.1007/s10098-012-0553-7>
- [15] 刘静宇. 植物组织培养中常见病原菌种类及污染控制措施[J]. 中国林业产业, 2017(02): 217.
- [16] 崔刚, 单文修, 秦旭, 等. 植物开放式组织培养研究初探[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2004(04): 529-533.
- [17] 王梅, 汤浩茹, 刘淑芳, 等. 抗生素对草莓内生菌的抑制[J]. 安徽农业科学, 2005(04): 606-607.
- [18] 陈玉生, 梁秋月, 洪向平. 植物组织培养污染防治措施[J]. 广东农业科学, 2008(01): 28-29.

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: br@hanspub.org