

Identification and Diversity Analysis of Contaminant Bacteria in Tissue Culture of *Magnolia sieboldii*

Xiaoping Zheng, Wei Tang, Jingkun Yin, Yining Ma, Lu Chen, Ying Yang, Ruijian Wang, Huan Wang*

Forestry College of Beihua University, Jilin
Email: *magnolia2009@126.com

Received: Apr. 24th, 2019; accepted: May 8th, 2019; published: May 15th, 2019

Abstract

Contaminant bacteria were isolated from the tissue culture medium of *Magnolia sieboldii* using streak plate method. Strains were identified using 16S rDNA sequencing analysis. Then cluster analysis was performed by NJ tree method in MEGA7.0 software. Results: 95 strains were isolated from the tissue culture medium of *Magnolia sieboldii*. Shannon index (H_e) of flora is 1.91. Most strains were gram-negative bacteria. Those strains were close in evolution relationship. Conclusion: The diversity of contamination bacteria of *Magnolia sieboldii* was lower, most belongs to gram-negative bacteria. So the control strategy of gram-negative bacteria could be used in contaminant of *Magnolia sieboldii* tissue culture.

Keywords

Magnolia sieboldii K. Koch, Tissue Culture, Contaminant Bacteria, Identification, Diversity

天女木兰组培污染菌的鉴定及多样性分析

郑小平, 唐薇, 尹靖琨, 马一宁, 陈露, 杨影, 王瑞俭, 王欢*

北华大学林学院, 吉林
Email: *magnolia2009@126.com

收稿日期: 2019年4月24日; 录用日期: 2019年5月8日; 发布日期: 2019年5月15日

*通讯作者。

文章引用: 郑小平, 唐薇, 尹靖琨, 马一宁, 陈露, 杨影, 王瑞俭, 王欢. 天女木兰组培污染菌的鉴定及多样性分析[J]. 自然科学, 2019, 7(3): 153-158. DOI: 10.12677/ojns.2019.73022

摘要

采用划线分离法从天女木兰外植体培养基中分离污染菌株,用16S rDNA序列对污染菌株进行核酸分类学鉴定,运用MEGA7.0软件中NJ树法对天女木兰组培污染菌进行聚类分析。结果:从天女木兰组培培养基中分离出95株污染菌,天女木兰污染菌Shannon指数(H_e)值为1.91,存在明显优势菌群,绝大多数为革兰氏阴性菌。污染菌大多数在进化上较为接近。结论:天女木兰组培污染菌多样性较低,以革兰氏阴性菌为主,在污染菌控制上可重点参考革兰氏阴性菌的抑菌方法。

关键词

天女木兰, 组织培养, 污染菌, 鉴定, 多样性

Copyright © 2019 by author(s) 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

在植物组织培养过程中,菌类污染是经常遇到并难以解决的问题之一。污染率过高,会导致生产成本增加,浪费人力、物力和财力。因此如何控制污染,把污染率降低到可以接受的范围是组培工厂化生产亟待解决的问题。

目前,关于植物组织培养污染的研究主要集中在污染的原因及防控措施方面。采用一种或几种抗生素混合溶液对外植体进行预处理可以有效减少一些植物组培污染,但有些种类抗生素不利于试管苗的生长分化[1] [2] [3] [4]。J. Fisse 等用头孢菌素 II 和链霉素消除植物外植体中内生菌效果好。在培养基中加入氨中塞肟头孢菌素和头孢菌素可以消除苹果组织培养中革兰氏阳性菌[5]。刘静等采用正交设计实验比较了不同植物杀菌剂与抗生素的混合物对植物组培污染的防治研究[6]。植物源抑菌剂具有低毒、低残留、对组培苗伤害小等特点,李白等采用不同提取方法获取生姜、洋葱、大蒜和苦瓜提取物,探讨植物提取物对组培生产中污染细菌的抑制作用[7]。李晓燕对常用的化学农药、医用抗生素、植物源杀菌剂、消毒剂、防腐剂及植物生长延缓剂缩节胺等 39 种抑菌剂对植物组织培养过程中的常见菌类进行了体外抑菌能力比较研究,并初步研究了抑菌剂对组培苗生长分化的影响[8]。

关于植物组织培养过程中的菌类污染种类的鉴定研究较少。周俊辉等以组培实验室中污染的组培苗为材料,进行污染菌的分离纯化,经纯菌培养镜检得出引起组培苗污染的菌类主要是棒杆菌属、曲霉属、肠杆菌属、地霉属、葡萄球菌属、毛霉属和根霉属。并通过实验得出庆大霉素对细菌的抑制能力较青霉素、四环素强[9]。方丽等将浙江省杭州和宁波的植物组培生产车间的污染物进行分离纯化和培养,得出主要的污染细菌为芽孢杆菌属和假单胞菌属,芽枝霉、黑曲霉、青霉和酵母为主要污染真菌。污染物的数量,真菌污染与细菌污染的比例呈现季节性变化,夏季和秋季是污染的高发期[10]。

天女木兰(*Magnolia sieboldii* K. Koch)是集观叶、赏花、赏果于一体的珍稀濒危植物[11]。全株含有芳香油,其提取物中含有活性成分,具有一定的药用价值[12] [13] [14]。目前,由于生境被破坏及天然更新难,天女木兰种群数量日益减少。通过植物组织培养技术可以获得再生植株,但存在污染严重、褐化现象及生根率低等问题[15] [16],控制污染是根本,因此,本文以天女木兰组培中出现的污染菌为研究对象,

采用划线法分离纯化微生物, 选用特异引物扩增 16S rDNA 序列, 测序与数据库中已知细菌比对确定天女木兰组培污染菌的种类, 根据菌类的特性采取合理的措施以减少天女木兰在组培过程中的污染, 同时也为其它植物组培污染问题提供参考。

2. 材料与方法

2.1. 试验材料与处理

试验材料采自吉林农业科技学院种植园。于 5 月、6 月晴天的午后, 采集当年萌发的幼嫩或半木质化天女木兰枝条。采集的枝条处理: 流水冲洗 1 h, 洗洁精溶液浸泡 20 min, 0.1% HgCl₂ 消毒 7 min, 无菌水冲洗 6 次。

2.2. 试验方法

2.2.1. 培养基与试剂

1) B₅ 培养基母液的配制

按照 B₅ 培养基的配方, 分别配制 B₅ 大量元素母液(10 倍), B₅ 微量元素母液(200 倍), B₅ 铁盐母液(200 倍)与 B₅ 有机物质母液(100 倍)。各种化学试剂充分溶解, 然后用容量瓶准确定容, 最后移入试剂瓶中, 贴好标签, 放在 4℃ 冰箱中保存待用。

2) 生长调节物质母液的配制

先用少量 1 mol/L NaOH 溶解生长素 IBA, 再用温热的蒸馏水定容配成 0.5 mg/mL IBA 母液; 用少量 1 mol/L HCL 溶解细胞分裂素 6-BA, 再用温热的蒸馏水定容配成 0.5 mg/mL 6-BA 母液备用。

3) B₅ 固体培养基的配制

琼脂粉 6 g、蔗糖 30 g, 加水约 800 ml, 加热溶解。按照大量元素母液、微量元素母液、铁盐母液、有机物质母液和植物生长调节物质母液的顺序分别加入 100 mL、5 mL、5 mL、10 mL, 再加入 6-BA 母液 2 mL, IBA 母液 0.6 mL, 定容至 1000 ml, 用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH = 5.8。高压蒸汽灭菌后备用。

2.2.2. 接种与培养

将枝条剪成 1 cm 左右的带芽茎段接种在 B₅ + 1.0 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA 培养基, 放在培养室内培养 15 d。培养条件为: 培养温度(23 ± 2)℃, 光照强度 1500 lx, 光照时间 10~12 h/d。

2.2.3. 污染菌分离纯化

组培瓶中出现污染现象时, 对染菌瓶进行编号、拍照并记录各菌落特征, 在无菌环境下取污染菌在 LB 固体培养基上划线分离, 在 28℃ 倒置培养 1~2 d。取单菌落用 YMA 固体培养基划线纯化 3 次, 得到纯化菌株。

2.2.4. 污染菌的分离与鉴定

1) 细菌 DNA 提取

取各菌株单菌落于 5 mL LB 液体培养基中培养过夜, 取菌液 200 μL, 12,000 r 离心 2 min, 弃上清, 沉淀加 100 μL 0.2% SDS, 涡旋混匀, 100℃ 处理 10 min, 12,000 r 离心 5 min, 上清中含菌株的基因组 DNA。

2) PCR 扩增与检测

以提取的细菌基因组 DNA 为模板, 用 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增。上游引物均为 BSF8 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 下游引物 1: BSRI541 (5'-AAGCAGGTCATCCAGCCGCA-3') [17], 下游引物 2: MIb 16 (5'-GGCTGCTGGCAGTAGTTAG-3') [18]。反应体系: 30 μL (H₂O: 12.5 μL, 2 × Taq 酶: 15 μL, 引物 1.5 μL, 模板: 1 μL)。PCR 反应程序: 95℃ 5 min; 95℃ 20 s, 59℃ 20 s, 72℃ 1.5 min,

30 次循环; 72℃ 2 min。用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

3) 16S rDNA 片段的序列测定

将扩增效果良好的 PCR 产物委托上海美吉生物技术公司进行 DNA 序列测定, 测序引物为 PCR 扩增用引物。

4) DNA 序列整理及分析

测序结果经 MEGA7.0 软件去除无用序列后, 递交在线 NCBI 核酸数据库分析, 对各菌株进行核酸分类学鉴定。根据与数据库中已知菌株 16S rDNA 序列同源性确定菌株的种属。用 Excel (BiodixcelforExcel2007.xlsx [19])分析丰富程度、均匀程度、Shannon 指数等多样性参数。用 MEGA7.0 软件进行 DNA 序列比对, 选择 NJ 树法采用 Bootstrap 检测(1000 次)对天女木兰组培污染菌进行聚类分析。

3. 结果与讨论

3.1. 结果

3.1.1. 天女木兰组培污染菌的分离与鉴定

采用划线分离法, 从 30 瓶天女木兰组培污染样本中分离、纯化出 105 株菌, 采用细菌 16S rDNA 序列核酸分类法从中鉴定了 95 株菌, 其中引物 BSF8-BSR1541 鉴定出 34 株菌, 引物 BSF8-Mlb16 鉴定出 61 株菌。从污染菌种类上看, 天女木兰污染以银耳假单胞菌(29 株)、丁香假单胞菌(21 株)、柠檬酸菌(15 株)为主, 其中假单胞菌类约占 60%, 绝大多数为革兰氏阴性菌(表 1)。

Table 1. Identification of bacteria in tissue culture of *Magnolia sieboldii*

表 1. 天女木兰组培污染菌的鉴定

引物	菌株	数量	基因 ID	拉丁名	中文名	相似度(%)	革兰氏染色
	B2B25	4	KU738958.1	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	肠杆菌	97.95	G-
	B2H25	2	KR010982.1	<i>Pantoea agglomerans</i>	成团泛菌	98.29	G-
	B5X25	20	MH884040.1	<i>Pseudomonas</i> sp.	丁香假单胞菌	100.00	G-
BSF8-BSR1541	B8-45	1	LT962480.1	<i>Pseudomonas syringae</i> pv.	丁香假单胞菌	98.30	G-
	B12-35	1	MF077144.1	<i>Pseudomonas cichorii</i>	菊苣假单胞菌	100.00	G-
	B111	5	MH686062.1	<i>Methylobacterium</i> sp.	甲基杆菌	99.42	G-
	B114	1	MH379725.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	嗜麦芽窄食单胞菌	99.88	G-
	M10-17	29	MK517637.1	<i>Pseudomonas tremae</i>	山黄麻假单胞菌	100.00	G-
	M12-17	5	MF943243.1	<i>Pseudomonas cichorii</i>	菊苣假单胞菌	100.00	G-
	M2B17	15	CP011132.1	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	柠檬酸菌	99.28	G-
BSF8-Mlb16	M2H17	5	MH101508.1	<i>Pantoea agglomerans</i>	成团泛菌	100.00	G-
	M111	1	MH686062.1	<i>Methylobacterium</i> sp.	甲基杆菌	99.48	G-
	M114	5	CP031741.1	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	短食单胞菌	100.00	G-
	M123	1	AP018587.1	<i>Staphylococcus caprae</i>	山羊葡萄球菌	100.00	G+

3.1.2. 天女木兰组培污染菌的多样性

天女木兰污染菌的多样性分析结果表明, 污染菌优势度较高(Berger-Parker 指数(d)), 说明污染菌中有明显优势菌群, 本文中鉴定的菌株中超过半数为假单胞菌属。污染菌总体丰富度并不太高, Margalef

指数(d_{Ma})为 1.98, 说明天女木兰污染菌来源并不是很多。Simpson 指数(λ)值较低为 0.18, 说明污染菌群中优势菌群数量较多。污染菌整体群落多样性较低, Shannon 指数(H_e)值为 1.91, 说明污染菌的来源并不复杂, 在控制上相对较为容易。群落的均匀程度 Pielou 指数(J_e)值为 0.83, 说明各菌群分布不均匀, 存在某些优势或数量极少的种群(表 2)。

Table 2. Diversity analysis of bacteria in tissue culture of *Magnolia sieboldii*
表 2. 天女木兰组培污染菌的多样性分析

Berger-Parker 指数(d)	Margalef 指数(d_{Ma})	Simpson 指数(λ)	Shannon 指数(H_e)	Pielou 指数(J_e)
3.28	1.98	0.18	1.91	0.83

应用 MEGA7.0 软件对天女木兰组培污染菌进行聚类分析, 结果见图 1。分析显示, 天女木兰的 95 株污染菌, 基本上按扩增引物不同分成两枝。比较特殊的是 BSF8-BSR1541 组的菌株 B8-45 (丁香假单胞菌), 其序列在进化上与 BSF8-M1b16 组更接近(图 1)。

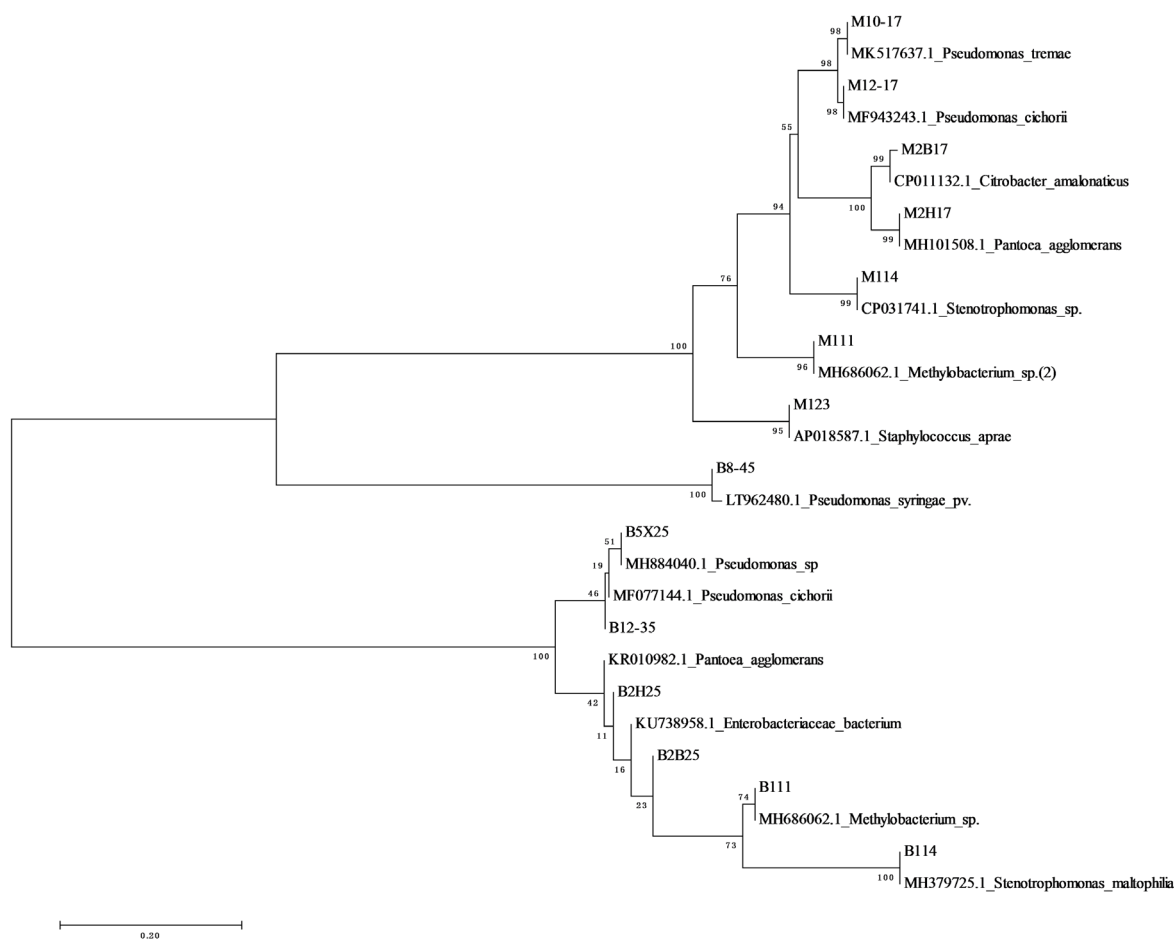


Figure 1. Cluster analysis of bacteria in tissue culture of *Magnolia sieboldii*

图 1. 天女木兰组培污染菌的聚类分析图

3.2. 讨论

从天女木兰茎段外植体组织培养过程中分离纯化了 95 株污染菌株。多样性分析结果表明, 天女木兰

组培污染菌多样性较低, 且存在明显优势菌群, 在种群分布上不平衡, 均一性较差, 提示天女木兰污染菌种类较少, 且主要为少数几类菌, 因此, 其组培污染菌在控制上难度相对较低。只要采取针对主要污染菌的抑制措施就能大幅度降低其污染机率。

天女木兰组培污染菌绝大多数为革兰氏阴性菌, 该类细菌细胞壁中含较多脂类, 因此在外植体样本处理时, 用乙醇配合消毒剂使用, 可能提高消毒剂作用效果, 从而降低组培过程中的污染机率。另外, 在培养基中可以考虑加入氨基糖苷类、利福霉素类和多黏菌素等对革兰氏阴性菌效果较好的抗生素, 可进一步降低染菌机率。

天女木兰组培污染菌中除 B8-45 外, 大多数在进化上较为接近, 提示其污染的控制方法也大致相同。在实际中可参考革兰氏阴性菌的抑菌方法, 可有效降低天女木兰组培染菌机率。

基金项目

北华大学大学生创新创业训练计划项目(201711923241), 吉林省科技发展计划项目(20180201006NY)。

参考文献

- [1] 李春燕, 李颖. 组织培养中青霉素对细菌污染的控制作用[J]. 东北林业大学学报, 2000, 28(5): 97-98.
- [2] 简兴, 王米力, 石大兴. 红掌组培苗继代过程中细菌污染的防治试验[J]. 亚热带植物科学, 2003, 32(2): 52-54.
- [3] 王春. 医用抗生素在马铃薯组织培养中的抑菌效应研究[J]. 甘肃农业科技, 2004(10): 15-16.
- [4] 张桂芳, 贺红. 广佛手组织培养中的污染及防治研究[J]. 中医药学刊, 2005, 23(2): 296.
- [5] Fisse, J., Batalle, A. and Pera, J. (1987) Endogenous Bacteria Elimination in Ornamental Plants. *Acta Horticulturae*, **212**, 87-90. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1987.212.11>
- [6] 刘静, 孙海伟, 段祖安, 等. 混合杀菌剂对植物组培污染防治试验[J]. 山东林业科技, 2004(5): 10-12.
- [7] 李白, 高广春, 方琪, 等. 四种蔬菜食用器官提取物对植物组培污染细菌的抑制作用[J]. 浙江农业学报, 2017, 9(11): 1854-1861.
- [8] 李晓燕. 抑菌剂抑菌能力比较及其对组培苗生长发育的影响[D]: [硕士学位论文]. 大连: 辽宁师范大学, 2007.
- [9] 周俊辉, 李宏彬, 杨耀强, 等. 植物组织中污染的鉴定与防止初步研究[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(2): 53-55.
- [10] 方丽, 王连平, 茹水江, 等. 植物组培过程中污染微生物种类及其季节性的变化[J]. 浙江农业学报, 2013, 25(2): 284-287.
- [11] 傅立国. 中国植物红皮书——稀有濒危植物(第 1 册) [M]. 北京: 科学出版社, 1992: 736.
- [12] Lim, S.S., Shin, K.H., Ban, H.S., *et al.* (2002) Effect of the Essential Oil from the Flowers of *Magnolia sieboldii* on the Lipopolysaccharide-Induced Production of Nitric Oxide and Prostaglandin in E-2 by Rat Peritoneal Macrophages. *Planta Medica*, **68**, 459-462. <https://doi.org/10.1055/s-2002-32085>
- [13] Park, J.B., Choi, S.U., Lee, C.O., *et al.* (2001) Costunolide, a Sesquiterpene from the Stem Bark of *Magnolia sieboldii*, Inhibits the RAS-Farnesyl-Proteintransferase. *Planta Medica*, **67**, 358-359. <https://doi.org/10.1055/s-2001-14315>
- [14] Park, H.J., Kwon, S.H., Han, Y.N., *et al.* (2001) Apoptosis-Inducing Costunolide and a Novel a Cyclic Monoterpene from the Stem Bark of *Magnolia sieboldii*. *Archives of Pharmacal Research*, **24**, 342-348. <https://doi.org/10.1007/BF02975104>
- [15] 王欢, 杜凤国, 张志翔, 等. 天女木兰组织培养的抗褐化研究[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(14): 3107-3109.
- [16] 徐石, 刘翔, 张明宏, 等. 天女木兰组织培养技术研究进展[J]. 林业实用技术, 2011(6): 3-4.
- [17] 刘树根, 朱南文, 楼紫阳, 等. 污泥高温好氧消化过程的生物多样性分析[J]. 环境科学学报, 2010, 30(5): 990-995.
- [18] 赵玉娟, 牛春华, 张雪, 等. 16S rRNA 序列分析及其在乳酸菌分类、鉴定中的应用[J]. 食品科学, 2009(7): 299-303.
- [19] 孔凡洲, 于仁成, 徐子钧, 等. 应用 Excel 软件计算生物多样性指数[J]. 海洋科学, 2012, 36(4): 57-62.

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2330-1724，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

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

期刊邮箱：ojs@hanspub.org