

## 4 种抗生素对黑木耳黑 29 菌丝生长的影响

甄文爽<sup>1</sup>, 董锡文<sup>1,2</sup>, 杜春梅<sup>1,2\*</sup>, 柏广波<sup>1</sup>, 王也<sup>1</sup>, 韩月新<sup>1</sup>

(1. 佳木斯大学生命科学学院, 黑龙江佳木斯 154007; 2. 佳木斯大学应用微生物研究所, 黑龙江佳木斯 154007)

**摘要** [目的] 研究氨苄青霉素、硫酸链霉素、制霉菌素和卡那霉素对黑木耳外观特征及显微结构的影响, 寻找适合的遗传筛选标记, 同时又不降低黑木耳的产量与品质。[方法] 以黑木耳黑 29 为试验材料, 采用平板插片培养法、显微镜观察法测定菌丝生长速率、菌落形态特征和锁状联合菌丝数量。[结果] 适宜浓度的青霉素和硫酸链霉素对黑 29 菌丝生长都有显著的促进作用, 而制霉菌素和卡那霉素对菌丝生长有明显的抑制作用; 制霉菌素和卡那霉素对菌丝色泽、密度影响较大, 菌落隆起现象明显, 偶尔出现褐变现象; 随着 4 种抗生素浓度的升高, 锁状联合菌丝比率先升高后降低, 抗生素在 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时该比率升高显著。[结论] 一定浓度的制霉菌素或卡那霉素较适合做遗传筛选标记, 又不影响锁状联合菌丝的比率。该研究对黑木耳的遗传育种具有指导意义。

**关键词** 黑 29; 抗生素; 菌丝; 锁状联合

中图分类号 S646.6 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)33-0057-03

**Effects of Four Kinds of Antibiotics on Mycelial Growth of *Auricularia auricular* H29**ZHEN Wen-shuang<sup>1</sup>, DONG Xi-wen<sup>1,2</sup>, DU Chun-mei<sup>1,2\*</sup> et al (1. College of Life Science, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007; 2. Institute of Applied Microbiology, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007)

**Abstract** [Objective] To study the effect of ampicillin, streptomycin sulphate, nystatin and kanamycin on appearance characteristic and microstructure in *Auricularia auricular* H29, to find a good genetic screening marker, without reducing the output and quality of the strain. [Method] Mycelial growth rate, colonial morphological features and clamp connection hyphal amount were determined by plate culture and microscopic method with *Auricularia auricular* H29 as the material. [Result] A proper concentration of ampicillin and streptomycin sulfate significantly promoted the mycelial growth, while nystatin and kanamycin significantly inhibited it. The nystatin and kanamycin had great effects on the color, lustre and density of mycelia. The colony uplift was obvious, and the browning phenomenon occasionally appeared. With the increasing of four antibiotics concentration, the ratio of hyphal clamp connection increased firstly and then decreased. It increased significantly at 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  antibiotics concentration. [Conclusion] A certain concentration of nystatin or kanamycin is suitable for genetic screening markers while does not affect the ratio of hyphal clamp connection. This study is of guiding significance for the genetic breeding of black fungus.

**Key words** *Auricularia auricular* H29; Antibiotics; Mycelia; Clamp connection

黑木耳是世界上最重要的 4 大栽培食用菌之一, 主要生长在中国和东南亚<sup>[1-2]</sup>。黑龙江省为黑木耳的主产区, 占全国份额的 60% 以上<sup>[3]</sup>。黑木耳质地滑嫩、味道鲜美、营养丰富, 是我国珍贵的食药两用真菌, 也是国内外公认的保健品<sup>[4-5]</sup>。随着人们生产和消费水平的提高, 黑木耳产业正在由数量型向质量型转变, 逐步向“高产、高质、高端、高效”方向发展<sup>[6]</sup>。选育优良的栽培品种是推动黑木耳产业科技进步的首要问题。原生质体融合和转化育种有可能从子代中筛选出具有优良性状的新种<sup>[7]</sup>, 但是利用哪种筛选标记筛选重组子成为育种工作者面临的一道难题。抗药性遗传稳定、容易保持, 是微生物各菌种自身特征之一。抗药性标记是根据不同菌种对某一药物的抗性存在差异而进行的。黑木耳黑 29 是黑龙江省科学院微生物研究所选育出来的菌种, 产量高, 且性状优良, 是黑龙江省主栽品种之一, 也是用于融合育种的重要备选菌种。寻找到适合黑木耳黑 29 的遗传筛选标记, 对黑木耳新品种的选育具有重要的意义。鉴于此, 笔者以黑木耳黑 29 为试验材料, 采用平板插片培养法、显微镜观察法测定菌丝生长速率、菌落形态特征和锁状联合菌丝数量。

**1 材料与方法****1.1 材料**

**1.1.1 供试菌株。**黑木耳品种黑 29(H29) 购于黑龙江省微生物研究所。

**1.1.2 培养基。**PDA 固体培养基<sup>[8]</sup>和抗生素—PDA 固体培养基(即在 PDA 固体培养基中加入不同浓度的氨苄青霉素、硫酸链霉素、制霉菌素和卡那霉素), pH 5.6。

**1.1.3 试剂。**氨苄青霉素(50 万单位, 国药准字 H13020653, 华北制药股份有限公司); 硫酸链霉素(10 万单位, 国药准字 H37022586, 瑞阳制药有限公司); 制霉菌素片(50 万单位, 国药准字 H330211393, 浙江震元制药有限公司); 卡那霉素(20 万单位, 国药准字 H37020562, 齐鲁制药有限公司)。

**1.2 方法**

**1.2.1 抗生素母液的配制。**分别取 5 g 抗生素药品, 注入 100 mL 无菌水中, 摇匀, 制备成 50 mg/mL 抗生素母液, 过滤除菌后于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中储存备用。

**1.2.2 培养基的制备。**按照常规方法制备 PDA 固体培养基。抗生素—PDA 固体培养基制备采用 PDA 固体培养基加药法, 使其终浓度分别为 50、100、150、200、300 和 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

**1.2.3 菌种的活化及接种。**用接种铲将斜面供试菌株转接到 PDA 固体培养基上, 26  $^{\circ}\text{C}$  活化培养 6 d。取菌落边缘直径 0.85 cm 健壮的菌丝块接种到制备好的抗生素—PDA 培养基上。同时, 用镊子夹取灭菌的盖玻片, 以倾斜 45 $^{\circ}$  插入接好菌的平板中, 盖玻片距离菌丝块 2~3 cm, 每板插入 3 个盖玻片。置于 26  $^{\circ}\text{C}$  恒温避光培养。每个处理设 6 个重复, 其中 3

**基金项目** 黑龙江省大学生创新创业训练计划项目(201610222117); 佳木斯大学基础研究类(自然类)面上项目(JMSUJCMS2016-065)。**作者简介** 甄文爽(1995—), 男, 黑龙江佳木斯人, 本科生, 专业: 食用菌遗传育种。\* 通讯作者, 讲师, 硕士, 从事微生物的教学与科研工作。**收稿日期** 2017-09-21

个重复观察菌丝体生长状况,3个重复插片用于显微观察,以上均以不加抗生素的培养基为空白对照。

### 1.3 项目测定

**1.3.1 菌丝体外观特征。**每隔24 h观察1次,用游标卡尺测量培养8 d的黑29菌丝体直径,计算其平均日长速。菌丝平均日长速(cm/d) = (菌丝直径 - 接种块直径)/(2 × 天数)。同时观察菌丝组织外观特征,包括萌发时间,菌丝色泽、密度、长势,菌落边缘,褐变程度,隆起状况等。

**1.3.2 显微观察。**待盖玻片上长满黑29菌丝,将盖玻片取出,置于10 × 40倍显微镜下观察记录菌丝锁状联合情况,计算锁状联合菌丝比率。菌丝锁状联合比率 = 锁状联合个数/菌丝数<sup>[9]</sup>。

**1.4 数据分析** 试验数据采用SPSS 17.0和Origin 8.0软件进行统计分析并作图。

## 2 结果与分析

**2.1 不同抗生素培养基对黑29菌丝平均日长速的影响** 由图1可知,在300 μg/mL浓度以内,青霉素和硫酸链霉素对黑29菌丝生长都有显著的促进作用( $P < 0.05$ )。当青霉素浓度在200 μg/mL时,促进作用最强,生长速率提高了26.5%。硫酸链霉素浓度在150 ~ 300 μg/mL时促进作用最强且无差异显著性( $P > 0.05$ ),生长速率提高了约16.3%;制霉菌素和卡那霉素对该菌具有抑制作用,随着抗生素浓度的增加,抑制作用显著增强( $P < 0.05$ ),生长抑制率分别为3.1% ~ 57.0%和7.6% ~ 34.4%。在200 μg/mL浓度以内,2种抗生素对菌丝生长的抑制作用无差异显著性

( $P > 0.05$ )。在200 μg/mL以上,制霉菌素的抑制作用显著高于卡那霉素( $P < 0.05$ )。

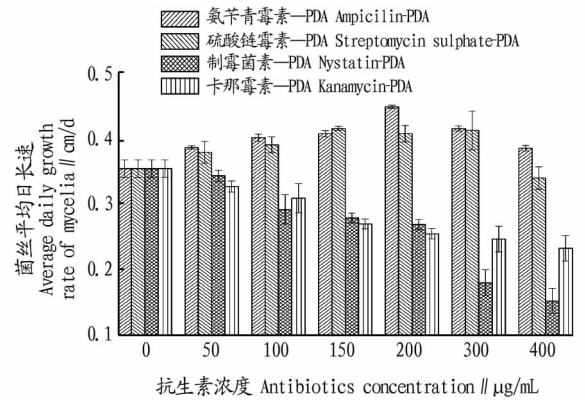


图1 不同抗生素培养基黑29菌丝平均日长速

Fig. 1 Average daily growth rate of mycelia of H29 on PDA containing different antibiotics concentrations

**2.2 不同抗生素培养基对黑29菌落形态特征的影响** 在试验浓度范围内,含氨苄青霉素和硫酸链霉素的PDA培养基培养的黑29菌丝的萌发时间为<48 h。菌丝洁白、浓密,长势较好,菌落边缘整齐舒展,无褐变和隆起现象,与对照菌丝相比无显著变化。

含制霉菌素和卡那霉素的PDA培养基(图2)培养的黑29菌丝的萌发时间为48 ~ 72 h。随着2种抗生素浓度的升高,菌丝逐渐变得浓白、致密,菌落边缘整齐有力,菌落背面逐渐出现褐变,隆起生长现象明显。

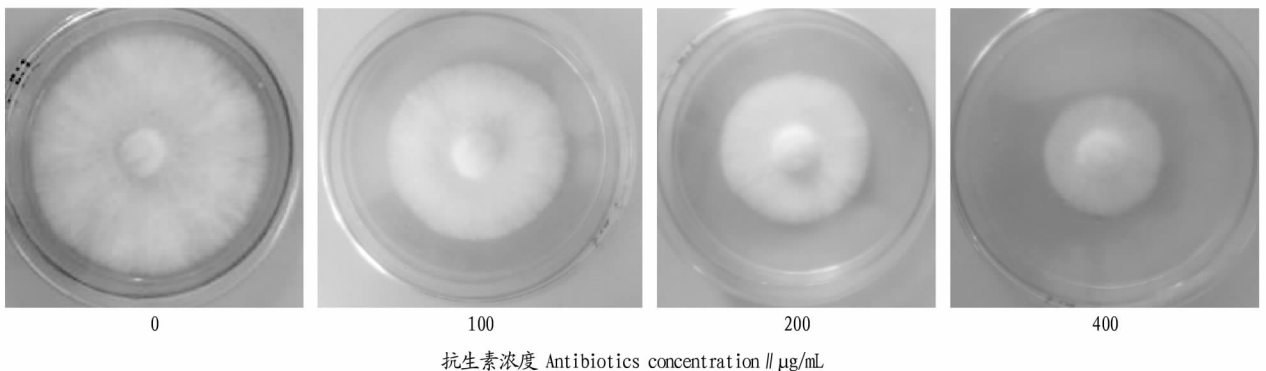


图2 卡那霉素—PDA平板上培养8 d的黑29菌落形态

Fig. 2 Colonial morphology of H29 on PDA including different kanamycin concentrations for 8 d

**2.3 不同抗生素培养基对黑29锁状联合菌丝比率的影响** 从表1可以看出,随着4种抗生素浓度的升高,黑29锁状联合菌丝比率先升高后降低,抗生素浓度在50 μg/mL时,该比率显著高于不加抗生素培养的对照菌株( $P < 0.05$ ),分别提高了34.6%、42.5%、18.9%和33.0%。浓度在50 ~ 300 μg/mL时,该比率有一定程度的提高,但与对照菌株相比无差异显著性( $P > 0.05$ )。抗生素在高浓度下均显著降低锁状联合菌丝的比率( $P < 0.05$ )。

## 3 结论与讨论

自然抗性标记主要根据真菌有较强的对抗细菌类抗菌素的能力,在真菌中得到广泛应用。1992年开始应用于平

菇、香菇等的抗性转化。张国广等<sup>[10-13]</sup>对灵芝、秀珍菇、真姬菇等食用菌进行了抗生素的敏感性研究,得到抗生素在不同程度上对食用菌生长的影响参数。胡乐琴<sup>[14]</sup>进行了香菇对潮霉素的抗性实验,结果表明香菇对潮霉素极为敏感,在固定的条件下抗性稳定。张学炜等<sup>[15]</sup>利用配制不同浓度的潮霉素试液,得出潮霉素对深黄袍孢霉原生质体转化的重要影响。王淑珍等<sup>[16]</sup>用食用菌对潮霉素的自然抗性筛选香菇和松茸的融合子。但抗生素对黑木耳菌丝生长的影响尚鲜见报道。该研究结果显示,适宜浓度的氨苄青霉素对菌丝生长有明显的促进作用,菌落外观特征与对照菌株相比没有发生明显的变化,这与张国广等的研究结果类似,硫酸链

表 1 不同抗生素培养基黑 29 锁状联合菌丝比率

Table 1 The ratio of mycelial clamp connection of H29 including different antibiotics concentrations

抗生素浓度 Antibiotics concentration// $\mu\text{g}/\text{mL}$	氨苄青霉素—PDA Ampicilin-PDA	硫酸链霉素—PDA Streptomycin sulphate-PDA	制霉菌素—PDA Nystatin-PDA	卡那霉素—PDA Kanamycin-PDA
0	0.557 $\pm$ 0.051 ab	0.557 $\pm$ 0.051 bc	0.557 $\pm$ 0.051 ab	0.557 $\pm$ 0.051 bc
50	0.750 $\pm$ 0.250 a	0.794 $\pm$ 0.042 a	0.662 $\pm$ 0.079 a	0.741 $\pm$ 0.102 a
100	0.583 $\pm$ 0.144 ab	0.689 $\pm$ 0.102 ab	0.628 $\pm$ 0.076 ab	0.620 $\pm$ 0.078 ab
150	0.542 $\pm$ 0.037 ab	0.639 $\pm$ 0.127 b	0.605 $\pm$ 0.107 ab	0.608 $\pm$ 0.056 b
200	0.533 $\pm$ 0.080 ab	0.589 $\pm$ 0.084 bc	0.510 $\pm$ 0.086 b	0.567 $\pm$ 0.058 b
300	0.486 $\pm$ 0.099 b	0.476 $\pm$ 0.041 c	0.328 $\pm$ 0.075 c	0.505 $\pm$ 0.092 bc
400	0.411 $\pm$ 0.084 b	0.467 $\pm$ 0.058 c	0.233 $\pm$ 0.088 c	0.435 $\pm$ 0.063 c

注:同列数据后不同小写字母表示在  $P < 0.05$  水平上差异显著

Note: Different lowercases after data in the same column showed significant differences ( $P < 0.05$ )

霉素也具有同样的作用效应。试验浓度范围内的卡那霉素对菌丝生长有明显的抑制作用,与张国广等人的研究结果相反,这可能与菌株自身的遗传特性有关。制霉菌素具有共轭多烯大环内酯结构,能抑制真菌的活性,研究结果显示适宜浓度的制霉菌素既能抑制黑 29 菌丝的生长,又完全抑制杂菌的生长。在制霉菌素和卡那霉素培养基上,黑 29 菌落表现明显的隆起生长现象,与笔者研究的斜卧青霉 A10 在潮霉素平板上的生长状态一致,可能是微生物菌体逃避不良环境的一种自然属性。

锁状联合是黑木耳菌丝生长发育过程中明显的指示特征,形成锁状联合的菌丝再形成耳基的比例为 100%,而不形成锁状联合的菌丝形成耳基的比例仅为 20% 左右<sup>[17]</sup>。研究结果显示,较低浓度的抗生素能显著提高锁状联合菌丝的比例,即使在敏感的抗生素浓度下,该比率也未受到明显的影响。

研究表明,卡那霉素或制霉菌素在一定范围内能抑制黑 29 菌丝的生长速率,对锁状联合菌丝比率无明显影响,该药品具有廉价、无毒的特性,可考虑作为育种的抗性筛选标记。

#### 参考文献

[1] YAN P S, LUO X C, ZHOU Q. RAPD molecular differentiation of the cultivated strains of the jelly mushrooms, *Auricularia auricula* and *A. polytricha* [J]. World journal of microbiology and biotechnology, 2004, 20 (8): 795 - 799.

[2] VEERALAKSHMI S, AHILA DEVI P, PRAKASAM V, et al. Molecular characterization and standardization of cultivation for wood ear mushroom [*Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc.] [J]. International journal of biotechnology research, 2014, 2(5): 60 - 64.

[3] 于文志. 黑龙江省森工企业黑木耳产业发展方向[J]. 中国林副特产, 2007, 41(6): 93 - 95.

[4] 戴肖东, 马银鹏, 张介驰, 等. 黑龙江省木耳主栽品种遗传多样性分析[J]. 生物技术, 2014, 24(5): 86 - 89.

[5] 何容, 罗孝坤, 尚陆娥, 等. 24 个黑木耳栽培品种比较试验[J]. 中国食用菌, 2014, 33(4): 28 - 31, 34.

[6] 万鲁长, 辛淑荣. 山东省食用菌产业现状、发展趋势与产业技术创新方向[J]. 山东农业科学, 2013, 45(12): 103 - 106.

[7] 杨国良, 杨秀琴, 杨晓仙, 等. 毛木耳与黑木耳的原生质体融合育种[J]. 中国食用菌, 1990, 9(4): 14 - 16.

[8] 李秀霞. 生物学综合实验: 下册[M]. 沈阳: 东北大学出版社, 2013.

[9] 王妍, 杜春梅, 姜忠元, 等. 不同培养基对黑木耳锁状联合菌丝比率的影响[J]. 安徽农业科学, 2010, 44(35): 49 - 50.

[10] 张国广, 黄家福, 陈丽萍, 等. 灵芝菌丝体对 4 种抗生素的敏感性研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(14): 7701 - 7702, 7719.

[11] 邹金美, 王翔, 黄世玉, 等. 真姬菇菌丝体对四种抗生素的敏感性研究[J]. 北方园艺, 2010(18): 201 - 203.

[12] 张国广, 邹金美, 吴海仙, 等. 秀珍菇对 4 种抗菌素的敏感性研究[J]. 江西农业科学, 2010(5): 350 - 352.

[13] 张国广, 王丽霞, 黄淑惠, 等. 四种抗菌素对侧耳科三种食用菌菌丝生长的影响[J]. 北方园艺, 2010(2): 215 - 217.

[14] 胡乐琴, 潘迎捷. 香菇对潮霉素的抗性实验[J]. 微生物杂志, 2007, 23(4): 14 - 16.

[15] 张学伟, 王笑梅, 李明春, 等. 以潮霉素 B 抗性为选择标记的深黄被孢霉原生质体转化[J]. 生物工程学报, 2007, 23(3): 264 - 268.

[16] 王淑珍, 白晨, 高雁, 等. 松茸与香菇原生质体融合的研究[J]. 食用菌, 2003, 25(2): 9 - 10.

[17] 王妍, 姜忠元, 董锡文. 不同黑木耳品种锁状联合形成的差异性研究[J]. 湖北农业科学, 2017, 56(4): 682 - 685.

## 科技论文写作规范——标点符号

标点符号按照 GB/T 15834—2011 执行, 每个标点占 1 格(破折号占 2 格)。外文中的标点符号按照外文的规范和习惯。外文字母、阿拉伯数字、百分号等并列时, 其间用“,”不用顿号“、”。注意破折号“——”、一字线“—”(浪纹线“~”)和短横线“-”的不同用法。破折号又称两字线或双连划, 占 2 个字身位置; 一字线占 1 个字身位置, 短横线又称半字线或对开划, 占半个字身位置。破折号可作文中的补充性说明(如注释、插入语等), 或用于公式或图表的说明文字中。一字线“—”(浪纹线“~”)用于表示标示相关项目(如时间、地域等)的起止。例如 1949—1986 年, 北京—上海特别旅客快车。参考文献范围号用“-”。短横线用于连接词组, 或用于连接化合物名称与其前面的符号或位序, 或用于公式、表格、插图、插图、型号、样本等的编号。外文中的破折号(Dash)的字身与 m 宽, 俗称 m Dash, 其用法与中文中的破折号相当。外文的连接符俗称哈芬(hyphen)。其中, 对开哈芬的字身为 m 字身的一半, 相当于中文中范围号的用法; 三开哈芬的字身为 m 字母的 1/3, 相当于中文中的短横线的用法。