

## 4 种维生素对黑木耳锁状联合菌丝形成的影响

董锡文<sup>1,2</sup>, 朱德旋<sup>1</sup>, 杜春梅<sup>1,2\*</sup>, 姜忠元<sup>3</sup>, 韩笑<sup>1</sup>, 张宇<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; 3. 佳木斯大学教育科学学院, 黑龙江佳木斯 154007)

**摘要** [目的] 研究维生素对黑木耳锁状联合菌丝形成的影响。[方法] 采用平板插片培养法, 选取 4 种维生素  $V_{B_1}$ 、 $V_{B_2}$ 、 $V_{B_{12}}$  和  $V_C$  分别加入黑木耳基础培养基中, 使维生素终浓度分别为 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 和 0.30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 以不加维生素溶液的基础培养基为对照, 进行单因素试验和正交试验。[结果] 提高黑木耳品种黑 29 锁状联合菌丝比率, 单一加入维生素最佳浓度分别为  $V_{B_1}$  0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $V_{B_2}$  0.20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $V_{B_{12}}$  和  $V_C$  均为 0.15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 多种维生素加入的最适  $V_{B_1}$  0.28  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $V_{B_2}$  0.20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $V_{B_{12}}$  0.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $V_C$  0.18  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。[结论] 培养基中单一加入适当浓度的  $V_{B_1}$ 、 $V_{B_2}$ 、 $V_{B_{12}}$  和  $V_C$  会促进黑木耳菌丝锁状联合的形成, 多种维生素加入培养基更适宜黑木耳菌丝锁状联合的形成, 其中  $V_C$  的作用效果最显著。

**关键词** 维生素; 黑木耳; 锁状联合; 正交试验

中图分类号 S646.6 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)05-0056-02

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.05.015



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

### The Effects of Four Kinds of Vitamin on the Forming of Hyphal Clamp Connection of *Aurieuzaria auricular*

DONG Xi-wen<sup>1,2</sup>, ZHU De-xuan<sup>1</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 explore the effects of vitamin on the forming of hyphal clamp connection in *Aurieuzaria auricular*. [Method] Using plat inserting cover method, four kinds of vitamin were chosen to add in the basal medium of *Aurieuzaria auricular* as the test factors. The concentrations of adding vitamins were 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 and 0.30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectively. The media with no adding of vitamin was served as control. Single-vitamin experiment and orthogonal experiment were done in the process. [Result] The optimum concentration of single-vitamin was  $V_{B_1}$  0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $V_{B_2}$  0.20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $V_{B_{12}}$  and  $V_C$  0.15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectively for enhancing rate of clamp connection. Meanwhile, the optimum concentrations of multivitamin were  $V_{B_1}$  0.28  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $V_{B_2}$  0.20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $V_{B_{12}}$  0.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and  $V_C$  0.18  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . [Conclusion] The suitable concentration of  $V_{B_1}$ ,  $V_{B_2}$ ,  $V_{B_{12}}$  and  $V_C$  that added in the medium can promote the forming of clamp connection. The effects of multivitamin, especially  $V_C$  that added in the medium on the forming of clamp connection were obvious significantly.

**Key words** Vitamin; *Aurieuzaria auricular*; Clamp connection; Orthogonal experiment

黑木耳[*Aurieuzaria auricular* (L. ex Hook.) Uzderw.] 是世界上最早实现人工栽培的食用菌, 其食用和药用价值极高, 深受消费者的普遍欢迎<sup>[1]</sup>。关于黑木耳生长研究已有很多<sup>[2-6]</sup>。有关黑木耳锁状联合形成的研究也逐渐受到重视<sup>[7-8]</sup>, 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, 且形成锁状联合的菌丝形成耳基的时间比不形成锁状联合的菌丝形成耳基的时间提前 30 d 左右。这说明形成锁状联合的菌丝在形成黑木耳产量和降低生产成本方面具有重要影响, 研究维生素对黑木耳锁状联合菌丝形成的影响将会对实际生产, 尤其是生产效益具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 菌株。黑木耳黑 29 购于黑龙江省微生物研究所。

1.1.2 试剂。维生素  $B_1$  片(山东仁和堂药业有限公司); 维生素  $B_2$  片(东北制药集团沈阳第一制药有限公司); 维生素  $B_{12}$  片(上海信谊九福药业有限公司); 维生素 C 片(山西国润制药有限公司); 葡萄糖(分析纯, 天津市北方天医化学试剂厂); 琼脂粉(生物试剂, 北京奥博星生物技术有限责任公司)。

**基金项目** 黑龙江省教育厅基本科研业务费基础研究资助项目(2016-KYYWF-0581)。

**作者简介** 董锡文(1965—), 男, 黑龙江佳木斯人, 教授, 博士, 硕士生导师, 从事微生物的教学与科研等工作。\* 通信作者, 讲师, 在读博士, 从事微生物的教学与科研等工作。

**收稿日期** 2018-11-01

1.1.3 培养基。基础培养基(PDA 培养基): 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 18 g, 水 1 000 mL, pH 6.0。维生素培养基: 在基础培养基中加入不同浓度维生素, 包括  $V_{B_1}$  培养基、 $V_{B_2}$  培养基、 $V_{B_{12}}$  培养基和  $V_C$  培养基, pH 6.0。

1.1.4 主要仪器与设备。MP1002 电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司); 恒温培养箱(上海福玛实验设备有限公司); 光学显微镜(北京泰克仪器有限公司); LDZX-75KBS 立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂); 移液枪(Thermo Scientific 公司)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 维生素母液的配制。将 4 种维生素制备成适当浓度的母液, 用 45  $\mu\text{m}$  细菌滤膜进行过滤除菌, 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱储存备用。

1.2.2 培养基的制备。基础培养基按照常规方法进行。维生素培养基采用基本培养基加维生素法, 用移液枪吸取不同体积的 4 种维生素母液加入到基本培养基中, 混匀倒平板, 每种维生素终浓度分别为 0、0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 和 0.30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.2.3 菌种活化与扩大培养。在 25  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中对黑 29 进行活化培养 4 h 后, 在无菌条件下用接种铲将斜面菌种转接至基础培养基上进行扩大培养, 待长势良好后进行后续试验。

1.2.4 单因素试验。在扩大培养的黑 29 菌落周边选取直径 0.86 cm 健壮菌丝块, 接种至维生素培养基平板中央, 在距接种块 2 cm 处以 45 $^{\circ}$ 角进行插片处理, 每个平板插 3 个盖

玻片。每个变量设 3 个重复,以无维生素的基本培养基为空白对照。

**1.2.5 正交试验。**根据单因素试验结果,选取最佳的 3 个维生素浓度,采用  $L_9(3^4)$  正交试验因素水平表对黑 29 锁状联合菌丝形成所需维生素含量进行优化试验,每个组合设 3 个平行。

**1.3 测定项目与方法** 待黑 29 菌丝长满盖玻片,置于  $10\times 40$  倍显微镜下观察记录菌丝数、锁状联合菌丝数并计算锁状联合菌丝比率。锁状联合菌丝比率=锁状联合菌丝数/菌丝数 $\times 100\%$ 。

**1.4 数据分析** 试验数据采用 SPSS 17.0 和 Excel 进行统计分析分析与做图。

## 2 结果与分析

**2.1 单因素试验结果** 从图 1 可以看出,在试验浓度范围内,随着 4 种维生素浓度的升高,黑 29 锁状联合菌丝平均比率先升高后降低。当  $V_{B_1}$  和  $V_{B_{12}}$  浓度分别为 0.25 和 0.15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,锁状联合菌丝平均比率最高分别为 76.33% 和 80.97%,比对照菌株分别提高了 37.04% 和 45.37%。 $V_C$  培养基对锁状联合菌丝平均比率影响最大,当  $V_C$  浓度为 0.15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,该比率高达 90.60%,比对照菌株提高了 62.66%; $V_{B_2}$  培养基对该比率影响最小,当  $V_{B_2}$  浓度为 0.20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,该比率为 67.83%,比对照菌株提高了近 21.78%。因此,单因素试验中可以确定不同维生素的最佳浓度。即  $V_{B_1}$  浓度为 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $V_{B_2}$  浓度为 0.20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $V_{B_{12}}$  和  $V_C$  浓度为 0.15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

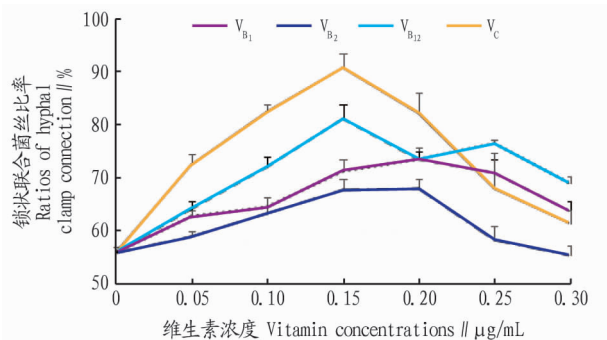


图 1 不同种类浓度维生素对黑 29 锁状联合菌丝比率的影响

Fig.1 The effect of different kinds and concentrations vitamin on ratios of hyphal clamp connection in H29

**2.2 正交试验结果** 将单因素试验最佳结果应用于正交试验,维生素浓度正交试验因素水平见表 1,正交试验结果见表 2。从表 2 可以看出,影响黑 29 锁状联合菌丝比率的主次因素依次是 D、A、B、C,即  $V_C$  是主要影响因子, $V_{B_1}$ 、 $V_{B_2}$  和  $V_{B_{12}}$  次之。方差分析结果表明,仅有 D 因素即  $V_C$  在  $\alpha=0.05$  水平上对锁状联合菌丝比率的影响存在显著差异,因此,在黑木耳菌丝生长培养基中首先考虑的是添加  $V_C$ 。经验证试验后等综合方面考虑,维生素的添加最佳方案为  $D_3A_3B_2C_1$ ,即  $V_C$  0.18  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $V_{B_1}$  0.28  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $V_{B_2}$  0.20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $V_{B_{12}}$  0.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 1 正交试验因素水平

Table 1 Factor and levels of orthogonal test

水平 Levels	因素 Factors/ $\mu\text{g}/\text{mL}$			
	$V_{B_1}$	$V_{B_2}$	$V_{B_{12}}$	$V_C$
1	0.22	0.17	0.12	0.12
2	0.25	0.20	0.15	0.15
3	0.28	0.23	0.18	0.18

表 2 正交试验结果

Table 2 Orthogonal experimental results

序号 No.	因素 Factors/ $\mu\text{g}/\text{mL}$				锁状联合菌丝平均比率 Average ratio of hyphal clamp connection/%
	A	B	C	D	
1	0.22	0.17	0.12	0.12	80.70 $\pm$ 2.18 e
2	0.22	0.20	0.15	0.15	83.50 $\pm$ 0.85 d
3	0.22	0.23	0.18	0.18	87.53 $\pm$ 1.80 c
4	0.25	0.17	0.15	0.18	91.50 $\pm$ 1.48 b
5	0.25	0.20	0.18	0.12	83.70 $\pm$ 1.22 d
6	0.25	0.23	0.12	0.15	85.50 $\pm$ 1.65 cd
7	0.28	0.17	0.18	0.15	80.67 $\pm$ 1.16 e
8	0.28	0.20	0.12	0.18	94.43 $\pm$ 0.76 a
9	0.28	0.23	0.15	0.12	83.50 $\pm$ 1.48 d
$K_1$	251.73	252.87	260.63	247.90	
$K_2$	260.70	261.63	258.50	249.67	
$K_3$	258.60	256.53	251.90	273.46	
R	8.97	8.76	8.73	25.56	

注:同列不同小写字母表示不同组合间差异显著 ( $P<0.05$ )

Note: Different lowercases in the same column stand for significant differences between different combinations at 0.05 level

## 3 结论与讨论

黑木耳菌丝的生长需要大量的碳源和氮源,不同碳源和氮源对菌丝生长有一定的影响<sup>[9-10]</sup>。赵萍<sup>[5]</sup>研究表明,适宜浓度的氨基酸(除酪氨酸)对黑木耳菌丝生长有促进作用,高浓度有抑制作用。而作为生长因子的维生素对黑木耳菌丝形成锁状联合的研究很少。该研究发现,适宜浓度的  $V_{B_1}$ 、 $V_{B_2}$ 、 $V_{B_{12}}$  和  $V_C$  对黑木耳菌丝形成锁状联合均有促进作用,这也是生长因子促进菌丝生长的一个重要表现,与其他研究者关于维生素对食用菌菌丝生长影响的研究结果一致<sup>[11-13]</sup>。

通过正交试验可以看出,多生长因子的加入对黑木耳锁状联合形成有促进作用,锁状联合菌丝比率达 94.43%,高于单因子的作用,但作用效果不同。方差分析结果表明,在多因子作用中,只有  $V_C$  作用效果显著, $V_{B_1}$ 、 $V_{B_2}$ 、 $V_{B_{12}}$  的效果未达到显著水平,多种维生素加入的组合是  $V_{B_1}$  0.28  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $V_{B_2}$  0.20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $V_{B_{12}}$  0.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $V_C$  0.18  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。因此,在黑木耳菌种制备过程中有必要考虑加入适量的维生素,以利于提高黑木耳子实体的产量。

## 参考文献

- [1] 邹莉,姜童童,王玥,等. LED 光源不同光质对黑木耳菌丝体生长的影响[J]. 安徽农业科学,2014,42(10):2855-2856.
- [2] 张鹏,姚方杰,王立军,等. 黑木耳形态发育研究的概述[J]. 北方园艺,2011(4):185-187.
- [3] 张鹏. 木耳形态发育及木耳属次生菌丝和子实体的解剖学研究[D]. 长春:吉林农业大学,2011.
- [4] 顾龙云. 浅谈锁状联合[J]. 食用菌,1982(2):43.
- [5] 赵萍. 氨基酸对黑木耳菌丝生长发育的影响[J]. 甘肃农业大学学报,1997,32(2):159-162.
- [6] 刘佳宁,张介驰,马庆芳,等. 不同温度和光照条件下黑木耳次生菌丝形态的研究[J]. 黑龙江科学,2014,5(6):13-15,20.
- [7] 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.

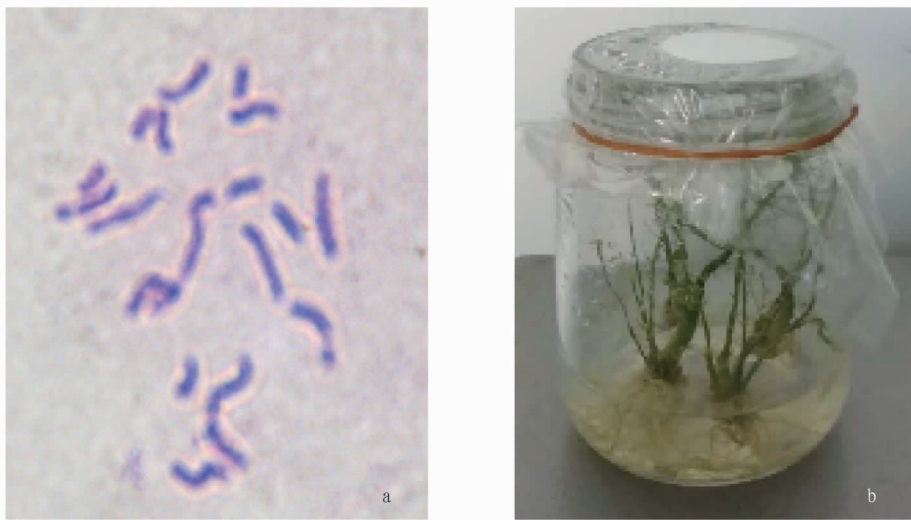


图 4 二倍体根尖染色体数目及生根苗

Fig. 4 Chromosome number of diploid root tip and rooting seedlings

### 3 结论与讨论

该研究结果表明,在离体培养条件下,用秋水仙碱和 Oryzalin 溶液处理单倍体芦笋的茎尖,均可以诱导单倍体芦笋的染色体加倍。不管是用浸泡法还是培养基添加法,均是秋水仙碱的加倍效率优于 Oryzalin(其中培养基添加法的诱导效果优于浸泡法)。秋水仙碱仍是芦笋单倍体加倍最有效的诱变剂。

秋水仙碱一直以来是植物多倍体育种的优良诱变剂,但其自身存在剧毒性,对被处理的植物材料、试验操作人员和生态环境会造成危害,而且在诱导植物染色体加倍时需要使用较高的浓度。国外研究者认为 Oryzalin、Suflan、Trifulan 是秋水仙素的有效代用品。这类染色体加倍剂能有效地抑制植物的有丝分裂,达到染色体加倍的效果,且具有毒性低、用量小、加倍率高等特点。Hansen 等<sup>[7]</sup>研究了 Trifulan 在芸苔属植物染色体加倍上的应用;Takanmura 等利用 surflan 对百合进行诱导,获得了百合多倍体植株;其他研究者将 Oryzalin 应用于甜菜、梨、杜鹃花。

该试验选用 Oryzalin 与秋水仙碱进行对比研究,发现利用 2 种方法,Oryzalin 也均能诱导芦笋单倍体染色体加倍。其中利用培养基添加法,0.02% Oryzalin 培养 5 d,染色体加倍效率也能达 25%,植株成活率达 73.3%。虽然加倍率低于秋水仙碱,但成活率明显高,这与其低毒性有关。

用培养基添加法,在 0.01% Oryzalin 下,随着处理时间的延长,染色体加倍效率提高。在 0.02%、0.05% Oryzalin 时,随着处理时间的延长,染色体加倍效率反而降低。其中当浓度为 0.02%,处理时间为 5 d 时,加倍效率最高,达 25%。整

体上看,浓度为 0.01% 与 0.05% 的加倍效率差异不大。可能 Oryzalin 适宜的处理浓度为 0.01%~0.02%,适宜的处理时间为 5~7 d。

虽然该试验结果显示秋水仙碱仍是芦笋单倍体加倍的最有效诱变剂。但还应对用 Oryzalin 对芦笋单倍体染色体加倍做进一步研究,如优化处理浓度和处理时间,优化后期的培养方法等,Oryzalin 有望替代秋水仙碱作为诱变剂。

### 参考文献

- [1] 李书华. 芦笋标准化栽培技术[M]. 北京:中国农业出版社,2004:8-14, 67-69.
- [2] 叶劲松. 芦笋的食疗与食谱[M]. 北京:台海出版社,2005:15-41.
- [3] 张元国,于继庆,陈桂英,等. 芦笋全雄株品种的培育途径及其关键技术[J]. 农业科技通讯,1997(6):16-17.
- [4] 王小佳. 蔬菜育种学(各论)[M]. 北京:中国农业出版社,2000:241-251.
- [5] CHOO T M, REINBERGS E, KASHA K J. Use of haploids in barley breeding[J]. Plant breeding reviews, 1985, 3:219-252.
- [6] 周维燕. 植物细胞工程原理与技术[M]. 北京:中国农业大学出版社,2001:127.
- [7] HANSEN N J P, ANDERSEN S B. Efficient production of doubled haploid wheat plants by *in vitro* treatment of microspores with trifluralin or APM[J]. Plants breeding, 1998, 117(5):401-405.
- [8] 李静,李春明,卓泳杉,等. 秋水仙碱诱导山杨异源多倍体[J]. 安徽农业科学,2014,42(4):1098-1100.
- [9] VAN TUYL J M, MEIJER B, VAN DIEN M P. The use of Oryzalin as an alternative for Colchicine in *in-vitro* chromosome doubling of *Lilium* and *Nerine*[J]. Acta horticulturae, 1992, 325:625-629.
- [10] 朱惠琴. 二甲基亚砜(DMSO)对烟草单倍体植株的染色体加倍效应[J]. 青海师范大学学报(自然科学版),2004(2):54-56.
- [11] 张天翔,林宗铨,蔡坤秀,等. 芦笋单倍体染色体加倍技术研究[J]. 中国农学通报,2011,27(13):212-215.
- [12] TAKAMURA T, LIM K B, van TUYL J M. Effect of a new compounds on the mitotic polyploidization of *Lilium longiflorum* and oriental hybrid lilies[J]. Acta horticulture, 2002, 572:37-42.
- [13] 辽宁林业科技,2009(5):46-47.
- [14] 杜春梅,欧滢蔓,董锡文,等. 三种维生素对滑菇固体培养的影响[J]. 北方园艺,2014(21):149-151.
- [15] 冯杉,江林炎,李赛楠,等. 无机盐和维生素对固体培养槐耳菌丝生长影响的研究[J]. 中草药,2015,13(6):591-593.
- [16] 贾洛,张红,王广耀. 不同生长调节物质对白灵菇菌丝生长的影响[J]. 北方园艺,2009(11):226-227.

(上接第 57 页)

- [8] 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,2016,44(35):49-50.
- [9] 林衍铨,马路,应正河,等. 碳源和氮源对绣球菌菌丝生长的影响[J]. 食用菌学报,2011,18(3):22-26.
- [10] 张玉龙,石文平,王承禄,等. 不同培养基对黑木耳菌丝生长的影响