

野生鸡枞菌种长期保存方法比较

马涛 冯颖* 丁伟峰 张欣 马艳

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所 云南 昆明 650224)

摘要: 野生鸡枞菌种质资源的有效保存是对野生鸡枞加以保护和利用的前提。以自行分离的 5 个野生鸡枞菌株作为研究对象, 采用蒸馏水保藏法和 -80°C 冻结保藏法对野生鸡枞菌种长期保存的方法进行了实验研究, 蒸馏水法分别保存于室温和 4°C , -80°C 冻结保藏同时采用程控降温法和泡沫盒降温法, 保存 20 个月后将 4 种不同方法保存的 5 个菌株的保存效果进行比较。实验结果表明: 蒸馏水室温保存法菌种存活率为 100%, 萌发期较短, 为 4-10 d, 是一种简便、实用、有效而成本低廉的长期保存方法; -80°C 冻结保藏法的存活率为 56%-76%, 萌发期 7-16 d, 泡沫盒降温法可以很好地控制降温速度, 是一种简便有效的控温方法。

关键词: 鸡枞, 菌种, 蒸馏水保藏法, -80°C 冻结保藏

Comparison of Different Preservation Methods for Strains of *Termitomyces*

MA Tao FENG Ying* DING Wei-Feng ZHANG Xin MA Yan

(Research Institute of Resource Insects, Chinese Academy of Forestry, Kunming, Yunnan 650224, China)

Abstract: Efficient storage of the wild germplasm is prerequisite for conservation and utilization of *Termitomyces*. In our study, using 5 isolated *Termitomyces* strains as materials, the preservation effects of distilled water preservation method and -80°C freezing storage method were compared. These five wild strains of *Termitomyces* were stored in distilled water at room temperature and 4°C refrigerator, as well as preserved at -80°C freezer for about 20 months after programmable cooler and styrofoam box controlled cooling. The survival rates of strains in distilled water were 100% after 20 months storage at room temperature, and that for frozen at -80°C were 56%-76%. The strains preserved in distilled water at room temperature germinated in 4 to 10 d after inoculation, which is quicker than in -80°C preservation (7-16 d). Styrofoam box method is an easy and effective method to control cooling speed compared to the programming method. In summary, preserving strains in distilled water at room temperature is a simple, practical and cheap method for long-term storage of *Termitomyces* germplasm.

Keywords: *Termitomyces*, Strain, Distilled water method, -80°C freezing preservation

鸡枞又名蚁巢伞, 蚁巢伞 (*Termitomyces* R. Heim 1942) 属种类隶属于担子菌门 Basidiomycota、伞菌纲 Agaricomycetes、蘑菇目 Agaricales、离褶伞科 Lyophyllaceae, 全世界约有 30 个种, 主要分布于

非洲、东亚、南亚及南太平洋岛屿等热带、亚热带地区, 中国已确认的 13 种, 主要分布于长江以南的广大地区和台湾、香港、海南诸岛及西藏等 19 个省区, 尤其以云贵川三省为中心, 其中云南达 9 种^[1-4]。蚁巢伞属真菌是一类与白蚁共生的珍贵食用菌, 其味道鲜美, 营养丰富, 深受人们喜爱, 该属真菌还含有多种活性物质, 有很高的食药价值, 极具开发利用前景^[5]。受季节和产地限制, 常供不应求, 市场价值较高, 是一种重要的贸易真菌^[6]。受利益驱使, 每年生长季鸡枞都被人们无节制掠夺式的采集, 致使野生鸡枞生态环境被破坏, 生物量日趋减少, 甚至处于濒危状态, 急需加强对其中种质资源的保护^[6-7]。因其复杂的共生机制, 到目前仍无法进行人工栽培, 为此, 其分离培养、驯化栽培及其相关的基础和应用研究一直是人们研究的热点^[5,8-12]。鸡枞菌种是进行上述研究和应用的基础, 也是鸡枞菌种质资源保护的一种重要形式^[13], 不论是要对鸡枞进行开发利用, 还是加以保护, 都要求对其菌种进行长期有效的保藏。目前, 对于鸡枞菌种的长期保存方法尚未见具体报道。

用于真菌长期保藏的方法很多, 常用的有蒸馏水法、 -80°C 冻结保藏法和液氮保藏法。液氮保藏法被认为是效果最好、使用最广泛的保藏方法^[14], 但由于其设备昂贵, 要求液氮持续地充足供给, 成本较高, 使用常受条件限制。 -80°C 冻结保藏法需要 -80°C 超低温冰箱, 在保证供电的情况下可满足多数真菌的长期保存, 虽然所需设备较贵, 但相对于液氮保藏法其保藏成本大大降低, 且操作简易。蒸馏水法自 Castellani 于 1939 年^[15]首次应用于病原真菌保存以来, 陆续被用于丝状真菌、酵母菌和担子菌等真菌的长期保存, 此法不需特殊设备, 不受实验室条件限制, 在对许多真菌的保存中被证实是一种简便、易行、有效且成本低廉的保存方法^[16-19]。本研究以自行分离得到的 5 株野生鸡枞菌种作为研究对象, 采用蒸馏水法和 -80°C 冻结保藏法对其进行保存, 蒸馏水法分别保存于室温和 4°C , -80°C 冻结保藏法同时采用程控降温法和泡沫盒降温法, 保存 20 个月后, 以菌株的存活率、萌发期和生长速度评价不同保存方法的效果, 旨在寻找一种适合于鸡枞菌种长期保存且简便实用的方法。

1 材料与方法

1.1 菌株

供试菌株为本所自行分离的 5 个野生鸡枞菌株, 样品分别采自云南双柏、大姚、富民和易门, 菌株信息见表 1。

菌株 Strains	种类 Species
SB089	<i>Termitomyces eurhizus</i> (Berk.) R. Heim
SB092	<i>Termitomyces eurhizus</i> (Berk.) R. Heim
DY010	<i>Termitomyces</i> sp.
FM001	<i>Termitomyces globulus</i> R. Heim & Gooss.-Font.
YM003	<i>Termitomyces clypeatus</i> R. Heim

1.2 培养基

分离及保藏前后均使用 PDA 培养基(广东环凯微生物有限公司), 使用前每升加入 3 g 琼脂粉(Japan, 云科生物工程公司)使其浓度至 1.8%, pH 自然。

1.3 菌种保存

1.3.1 菌种准备: 将各供试菌种接种于直径为 55 mm 的 PDA 平板中央, 置于 24°C 恒温箱培养至直径大于 25 mm。

1.3.2 菌种保存: 沿菌落边缘切取大小约 8 mm 的菌块, 置于冻存管中, 每管 5 块, 每个菌块保留有尽可能多的菌丝体。(1) 蒸馏水保存法: 在装有菌块的冻存管中加入灭菌蒸馏水没过菌块, 为防止水份蒸发, 可尽量多地加入蒸馏水, 将冻存管置于相应的塑料冻存盒分别于室温(实验室地处云南昆明, 全年室内温度在 10°C – 26°C 之间)和 4°C 保存。(2) 10% 甘油保护剂 -80°C 低温保存法: 在装有菌块的冻存管中加入 10% 甘油保护剂没过菌块, 室温放置 2 h, 于 -80°C 保存。降温方法: ①泡沫盒法: 将冻存管置于 2 mL 冻存盒, 把冻存盒放入大小合适的聚苯乙烯泡沫盒(壁厚 2.0 cm)中, 并用海绵填充两者之间的缝隙, 于 -80°C 超低温冰箱过夜后取出泡沫盒, 留冻存盒继续保存; ②程控降温法: 将冻存管置于程控降温仪(FREEZE CONTROL CL-8000 系统, 澳大利亚 Cryologic 公司), 选择 $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 程序降至 -40°C , 然后取出冻存管置于相应的冻存盒再放入 -80°C 超低温冰箱。

1.4 菌种复苏

保存时间约 20 个月时进行菌种复苏, 将蒸馏水

保存于室温和 4°C 的菌株在无菌条件下取出菌块, 直接接于 PDA 平板中央, 取出时注意避免菌块带有较多的水, 每个平板接一个菌块, 置于 24°C 恒温箱培养。-80°C 保存的菌株取出冻存管后迅速放于 37°C 水浴使冻结状态的菌块快速融化, 至冰晶完全消除, 其余步骤同前。

1.5 存活情况观察

复苏培养的各菌株每处理接 5 个重复, 观察各平板上菌块的存活情况, 以各处理存活菌块数占接种菌块总数的百分比计算存活率。对于同一菌株, 各处理存活 3 个重复以下视为不存活。

1.6 萌发期及生长速度测定

复苏培养 3 d 后每天观察各菌块的萌发情况, 记录菌块开始萌发日期, 自接种日算起至开始萌发之日的期间为萌发期。以菌落的直径来表示生长速度, 复苏菌株培养 30 d 后, 测量菌落直径。

1.7 继代培养观察

复苏存活的菌株培养 30 d 后, 转接至新的 PDA 平板, 观察其萌发期及生长速度。

2 结果与分析

2.1 存活情况

不同条件保存的 5 株鸡枞菌种 20 个月后复苏培养, 结果显示(表 2), 蒸馏水室温条件下保存的 5 个菌株所有菌块全部存活, 存活率为 100%, 而 4°C 保存的菌株则全部失去活力。-80°C 保存的菌株泡沫盒降温法存活率为 76%, 程控降温法存活率为 56%。说明菌体在冻结保存后受到不同程度的损害, 部分菌块和菌株失去活力, 其中, 菌株 SB092 除蒸馏水室温保存下存活外, 其他 3 种保存方法均全部失活(表 2)。显然, 蒸馏水室温保存鸡枞菌种存活率最高, 适于鸡枞菌种的长期保存, 而蒸馏水 4°C 不适宜鸡

枞菌种的保存。

2.2 萌发期

萌发期是指复苏菌株由接种到培养基至能观察到菌丝有明显生长(菌块上可见毛状物)的一段时期, 亦称生长迟缓期。生长迟缓期是菌种适应外界环境变化的一段时期, 对于长期保存后复苏的菌种, 生长迟缓期的长短可反映菌种的受损程度及对环境变化的适应性强弱。表 3 显示了不同方法保存的鸡枞菌种的萌发期, 蒸馏水室温保存的菌株萌发期为 4-10 d, 各菌株不同菌块的萌发期基本一致; -80°C 保存采用 2 种方法降温的菌株萌发期差异不大, 约 7-16 d, 各菌株不同菌块萌发期较不一致。继代培养后, 不同方法保存的菌株萌发期基本一致, 均缩短至 3-4 d。结果说明蒸馏水室温保存的鸡枞菌株不易受到损害, 因此复苏时能较快适应外界环境的变化, 萌发期较短。-80°C 保存的菌株则易受到不同程度的损害, 萌发期较长。

表 2 不同保存条件下鸡枞菌种的存活率

Table 2 Survival rate of wild strains of *Termitomyces* preserved in different condition

菌株 Strains	蒸馏水 Distilled water		-80°C	
	室温 Room temperature	4°C	泡沫盒 Styrofoam box	程控 Programmed control
	SB089	5/5	0/5	5/5
SB092	5/5	0/5	0/5	0/5
DY010	5/5	0/5	5/5	5/5
FM001	5/5	0/5	5/5	3/5
YM003	5/5	0/5	4/5	1/5
存活率 Survival rate (%)	100	0	76	56

注: A/B: 存活菌块数/接种菌块数。

Note: A/B: Number of successfully surviving aliquots/total aliquots inoculated.

表 3 不同保存条件下鸡枞菌种的萌发期

Table 3 Germination stage of wild strains of *Termitomyces* preserved in different condition (d)

菌株 Strains	保存 20 个月后 Stored for 20 months				继代培养后 After subculture			
	蒸馏水 Distilled water		-80°C		蒸馏水 Distilled water		-80°C	
	室温 Room temperature	4°C	泡沫盒 Styrofoam box	程控 Program controlled	室温 Room temperature	4°C	泡沫盒 Styrofoam box	程控 Program controlled
SB089	4.4 ± 0.5	-	7.0 ± 0.0	7.0 ± 0.7	3.8 ± 0.5	-	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0
SB092	10.2 ± 0.4	-	-	-	3.3 ± 0.5	-	-	-
DY010	7.2 ± 0.8	-	8.6 ± 5.7	10.2 ± 2.0	4.0 ± 1.2	-	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0
FM001	8.4 ± 0.9	-	12.0 ± 4.2	12.3 ± 5.5	3.0 ± 0.0	-	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0
YM003	9.4 ± 0.9	-	15.5 ± 4.9	-	3.3 ± 0.5	-	4.2 ± 1.6	-

2.3 生长速度

表 4 显示 5 个鸡枞菌株保存 20 个月后复苏培养的生长速度。除 DY010 菌株外, 蒸馏水室温保存的菌株生长速度均快于 -80°C 保存的菌株, 继代培养后, 这种差异在有的菌株逐渐消失。两种降温方法 -80°C 保存对 DY010 及 FM001 的生长速度无明显影响, 而 SB089 泡沫盒降温的生长速度明显低

于程控降温, 结合其萌发期来看, 2 种降温方法的萌发期基本一致, 但泡沫盒降温的各菌块生长速度差异较大, 继代培养后这种差异消失, 这种差异可能是由于菌丝在各菌块分布不均所致。继代培养后, 不同保藏方法保存的菌株生长速度均明显加快, 表明菌株复苏培养后经一次传代活力得以恢复。

表 4 不同保存条件下鸡枞菌种的生长速度
Table 4 Growth rate of wild strains of *Termitomyces* preserved in different condition (cm)

菌株 Strains	复苏后 30 d 30 days of revival				继代培养后 30 d 30 days of Subculture			
	蒸馏水 Distilled water		-80°C		蒸馏水 Distilled water		-80°C	
	室温 Room temperature	4°C	泡沫盒 Styrofoam box	程控 Program control	室温 Room temperature	4°C	泡沫盒 Styrofoam box	程控 Program control
	SB089	3.2 ± 0.3	—	1.8 ± 0.8	2.9 ± 0.2	4.0 ± 0.3	—	3.4 ± 0.2
SB092	1.9 ± 0.4	—	—	—	3.1 ± 0.3	—	—	—
DY010	2.5 ± 0.2	—	2.8 ± 0.5	2.8 ± 0.1	3.5 ± 0.3	—	3.9 ± 0.1	4.1 ± 0.2
FM001	3.3 ± 0.3	—	2.5 ± 0.2	2.5 ± 1.0	3.9 ± 0.1	—	3.8 ± 0.2	4.1 ± 0.1
YM003	2.0 ± 0.3	—	1.7 ± 0.1	—	2.9 ± 0.2	—	3.0 ± 0.1	—

3 讨论

实验结果表明, 蒸馏水室温保存 20 个月后 5 株鸡枞菌供试菌种的存活率均为 100%, 保存的菌株不易受到损害, 活化时菌种能较快的适应外界环境, 萌发期(4–10 d)明显短于 -80°C (7–16 d)保存的菌种, 其操作简便, 保存成本低, 是一种很好的鸡枞菌种保存方法。

蒸馏水 4°C 保存的所有菌株 20 个月后完全失去活力, 说明鸡枞菌种对低温较为敏感, 4°C 不适合于鸡枞菌种的长期保存。分析其原因可能与鸡枞菌的生长温度有关, 鸡枞菌的孢子萌发、菌丝生长、原基分化的温度范围为 12°C – 24°C , 以 16°C – 20°C 最适, 低于 8°C 和高于 30°C 几乎停止生长甚至死亡^[12], 菌种在 4°C 保存条件下仍缓慢生长, 只是处于低新陈代谢状态, 长期保存对鸡枞菌种造成伤害。

对一些担子菌的研究表明, 蒸馏水法是一种简便有效的长期保存方法, 如 Burdsall 等用于木腐担子菌的保存, 许多菌种保存至 7 年仍保持活率^[18], Richter 用此法保存一些腐生担子菌和菌根担子菌, 在 5°C 保存 20 年后存活率仍可达 88.2% 和 77.1%^[19]。但在实际操作中, 蒸馏水保存菌种普遍存在易污染和水分蒸发 2 个问题, 常对其保存效果造成影响。

我们在实验中发现, 如果所选择的保存管密封性不好, 则很难避免上述问题。本研究采用德国 Greiner 冻存管作保存管, 保存 20 个月后, 所复苏的菌株无一污染, 且冻存管中的水分无明显减少, 说明该冻存管密封性能良好, 在保存过程中既可有效地防止杂菌污染, 且能较好地阻止水分蒸发。此外, 在蒸馏水法保存中使用 2 mL 冻存管, 可将其置于能容纳 100 个 2 mL 冻存管的冻存盒, 不但大大地节省了空间, 而且存取容易, 方便管理。

真菌菌种在超低温保存时, 细胞极易在冻结和解冻的过程中受胞内冰晶的形成和胞内水分外渗引起的溶液效应等因素而损伤^[20]。保存时通过控制降温和解冻速度并配合冻存保护剂的使用来减少这种损伤, 通常采用慢冻快融的方法, $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的降温速率可满足大多数真菌的保藏^[21–22]。以聚苯乙烯树脂为基础的泡沫盒, 其热导率较低, 保温性能较好, 在冻结保存中常被用作一种简易的控温方法来替代程控降温仪^[23]。为了不受降温设备的限制, 使降温过程更为简便, 本文采用了泡沫盒法控制降温速率, 并与程控降温法相比较。实验结果表明, 泡沫盒法可以很好地控制降温速度, 达到慢速降温的效果, 是一种较简便而有效的控温方法。真菌保存中常用的冻存保护剂有甘油和二甲亚砜(DMSO)^[24]。本文采

用甘油作为冻存保护剂保存的鸡枞菌种存活率为56%–76%，复苏时萌发期较长，且同一菌株不同菌块萌发期差异较大，这可能与甘油渗透速度较慢及其对菌体的毒性有关^[24]。有研究表明在对担子菌的保存中对于一些较敏感的菌种，适于采用二甲亚砜作保护剂^[25]。鸡枞菌种对低温较为敏感，采用二甲亚砜作保护剂能否提高鸡枞菌的保存效果尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, *et al.* Dictionary of the Fungi. 10th Edition. Wallingford: CAB International, 2008: 682.
- [2] 魏征铁. 中国蚁巢伞属系统学研究. 中国科学院微生物研究所博士学位论文, 2004.
- [3] 贺新生. 中国鸡枞菌的种类与分布. 食用菌, 1995(6): 3–4.
- [4] 胡忠策, 郑晓冬. 鸡枞菌的研究进展, 中国食用菌, 2000, 19(4): 20–22.
- [5] 唐保宏, 苗文莉. 蚁巢伞的活性物质与营养成分. 生物技术, 2009, 19(3): 93–95.
- [6] 于富强, 王向华, 刘培贵. 云南食用菌资源应用开发前景与展望. 中国野生植物资源, 2002, 21(4): 21–25.
- [7] 刘培贵, 王向华, 于富强, 等. 中国大型高等真菌生物多样性的关键类群. 云南植物研究, 2003, 25(3): 285–296.
- [8] 胡尚勤, 刘天贵, 李贤柏. 鸡枞菌的培养条件研究. 食品与生物技术学报, 2008, 27(1): 67–70.
- [9] 罗晓妙, 史碧波. 鸡枞菌菌丝体研究概况. 中国食物与营养, 2007(3): 17–19.
- [10] 朱必凤, 马海燕, 赵发清, 等. 鸡枞菌液体培养及多糖物质研究. 真菌学报, 1996, 15(1): 42–47.
- [11] 胡清秀. 五种鸡枞菌的分离培养试验. 食用菌学报, 2000, 7(3): 43–47.
- [12] 赖井平. 鸡枞菌的驯化与高产栽培. 中国食用菌, 1993, 12(3): 24–26.
- [13] 季维智, 宿兵. 遗传多样性研究的原理与方法. 浙江科学技术出版社, 1999: 18.
- [14] Smith D. The use of cryopreservation in the *ex-situ* conservation of fungi. *CryoLetters*, 1998(19): 79–90.
- [15] Castellani A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *J Trop Med Hyg*, 1939(42): 225–226.
- [16] McGinnis MR, Padhye AA, Ajello L. Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeasts, and some aerobic actinomycetes in sterile distilled water. *Applied Microbiology*, 1974, 28(2): 218–222.
- [17] Capriles CH, Mata S, Middelveen M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia*, 1989(106): 73–79.
- [18] Burdsall HH, Dorworth EB. Preserving cultures of wood decaying Basidiomycotina using sterile distilled water in cryovials. *Mycologia*, 1994, 86(2): 275–280.
- [19] Richter DL. Revival of saprotrophic and mycorrhizal basidiomycete cultures after 20 years in cold storage in sterile water. *Can J Microbiol*, 2008, 54(8): 595–599.
- [20] Smith D. Cryoprotectants and the cryopreservation of fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 1983(80): 360–363.
- [21] Smith D, Thomas VE. Cryogenic light microscopy and the development of cooling protocols for the cryopreservation of filamentous fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1998, 14(1): 49–57.
- [22] 顾金刚, 李世贵, 姜瑞波. 真菌保藏技术研究进展. 菌物学报, 2007, 26(2): 316–320.
- [23] Hoffmann P. Cryopreservation of fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1991, 7(1): 92–94.
- [24] Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 2003(46): 205–229.
- [25] 陈燕妍. 超低温冻结保藏担子菌. 真菌学报, 1987, 6(2): 110–117.