

金针菇菌种中短期保藏因素的正交分析

张丹 颜梦秋 刘建雨 宋春艳 于海龙 尚晓冬 谭琦*

(上海市农业科学院食用菌研究所 国家食用菌工程技术研究中心 农业部南方食用菌资源利用
重点实验室 上海市农业遗传育种重点开放实验室 上海 201403)

摘要:【背景】金针菇(*Flammulina velutipes*)是我国一种重要的栽培食用菌,年产量超过250万t,规模已跃居世界首位。菌种保藏技术是金针菇栽培和新品种研发的基础,但相关研究十分薄弱,已成为制约我国金针菇产业进一步发展的瓶颈问题。【目的】探索不同保藏因素对金针菇优良菌种中短期保藏的影响,为建立高效、低成本、易操作的保藏方法奠定基础。【方法】以温度、甘油、海藻糖、甘露醇以及保护剂体积5个因素进行正交试验。经12个月保藏,考察金针菇菌种在木屑培养基中的菌丝生长速度,通过极差分析和回归分析解析保藏因素的效应。【结果】温度、海藻糖、甘油和甘露醇对金针菇菌种的中短期保藏有极显著的影响,保护剂体积的影响不显著。温度是最重要的影响因子,与其它4个因素的互作效应均达到极显著水平。20℃是较好的短期保藏温度,−80℃为理想的中期保藏温度。渗透型与非渗透型保护剂间的互作效应对金针菇菌种的中短期保藏有极显著影响,海藻糖和甘露醇间的互作效应不显著。高浓度的海藻糖、甘油及甘露醇均不利于金针菇菌种的中短期保藏。保藏效果较佳的保护剂为10%甘油和0.3 mol/L甘露醇混合液。【结论】建立的菌种中短期保藏方法填补了金针菇产业发展的空白,研究结果可为其它大型真菌的中短期保藏提供重要参考。

关键词: 食用菌, 菌种保藏, 正交试验设计, 菌丝生长速度

Influence factors on short- and medium-term spawn preservation of *Flammulina velutipes* using orthogonal experimental design

ZHANG Dan YAN Meng-Qiu LIU Jian-Yu SONG Chun-Yan YU Hai-Long
SHANG Xiao-Dong TAN Qi*

(Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, National Research Center of Edible Fungi
Biotechnology and Engineering, Key Laboratory of Applied Mycological Resources and Utilization, Ministry of Agriculture,
Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai 201403, China)

Abstract: [Background] *Flammulina velutipes* is an important edible mushroom cultivated in China

Foundation items: Shanghai Agriculture Applied Technology Development Program (G2015-5-1); Youth Talent Development Plan of Shanghai Municipal Agricultural System (2017-1-11); Earmarked Fund for Shanghai Modern Edible Fungi-industry Technology Research System (2017-9)

*Corresponding author: Tel: 86-21-62209760; E-mail: syj0@saas.sh.cn

Received: August 01, 2017; **Accepted:** November 14, 2017; **Published online** (www.cnki.net): December 04, 2017

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目[沪农科攻字(2015)第5-1号]; 上海市市级农口系统青年人才成长计划项目(沪农青字[2017]第1-11号); 上海市食用菌产业技术体系建设专项(沪农科产字[2017]第9号)

*通信作者: Tel: 86-21-62209760; E-mail: syj0@saas.sh.cn

收稿日期: 2017-08-01; **接受日期:** 2017-11-14; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2017-12-04

with an annual output of more than 2 500 000 tons and the cultivation scale became first place in the world. Spawn preservation is the foundation of cultivation and breeding of new varieties. However, weak research about spawn preservation has become a bottleneck that restricts the further development of *F. velutipes* industry in China. **[Objective]** To establish an efficient, low-cost and easy method for short- and medium-term preservation of *F. velutipes* spawn by evaluated the preservation factors. **[Methods]** The orthogonal experiments were carried out with temperature, glycerol, trehalose, mannitol and the volume of protectant as the experimental factors. After 12 months of preservation, the growth rate of mycelia on sawdust medium was investigated. Range analysis and regression analysis were used to detect the effect of preservation factors. **[Results]** The results showed that temperature, trehalose, glycerol and mannitol had very significant influences on the short- and medium-term preservation of *F. velutipes* spawn, while the effect of protectant volume was not significant. Temperature was the most important factor, and the interaction effects of temperature and other 4 factors were all very significant. The proper short-term preservation temperature was 20 °C, and the proper medium-term preservation temperature was -80 °C. The interaction between osmotic and nonosmotic protectant had a significant effect on spawn preservation. The interaction effect between osmotic protectants (trehalose and mannitol) was not significant. High concentrations of trehalose, glycerol and mannitol were not conducive to the short- and medium-term spawn preservation of *F. velutipes*. The best protectant was a mixture of 10% glycerol and 0.3 mol/L mannitol. **[Conclusion]** The spawn preservation method established by this study filled the blank of *F. velutipes* industry, and the results can also provide important reference value for short- and medium-term spawn preservation of other macro fungi.

Keywords: Edible mushroom, Spawn preservation, Orthogonal experiment design, Mycelia growth rate

金针菇[*Flammulina velutipes* (Fr.) Sing.]是我国一种主要的栽培食用菌,其口感脆嫩,富含多种氨基酸,长期以来深受广大消费者喜爱。我国的金针菇产业经过近 20 年的高速发展,规模已跃居世界首位。据中国食用菌协会统计,2016 年我国金针菇的年产量约为 260 万 t,工厂化企业 170 余家。然而,与快速增长的体量相比,我国金针菇产业的核心竞争力较弱,主要表现为工厂化栽培使用的品种单一,优良菌种多购自国外,种源受制于人。在菌种保藏和新菌种研发等方面与日韩等发达国家仍存在较大差距。

菌种保藏是生产栽培和菌种研发的基础,常用的保藏方法有继代培养、矿物油、蒸馏水、低温、液氮保藏等,这些方法在成本、效率以及人力投入等方面各有不同^[1]。就保藏质量而言,液氮保藏是公认的最佳保藏方法^[2-5],大型的菌种保藏机构常采用液氮保藏,此法也是金针菇菌种长期保藏的有效方法之一。除了长期保藏之外,生产实践中对金针菇菌种的中短期保藏也有较大的需求,例如杂交育种时常需要对大量育种中间材料进行 1-6 个月的短

期保藏,液氮保藏由于成本过高而不能满足这一需求。目前广泛采用的继代培养法虽然操作简单、成活率高,但费时、费力、易污染、材料的遗传和生理性状易改变,也无法满足大规模材料的短期保藏需求^[1]。低温保藏法被认为是较好的中短期保藏方法,日本的金针菇菌种企业常采用-80 °C 超低温冰箱进行菌种保藏(私人交流)。目前公开报道的低温保藏研究多集中于温度、保护剂、保藏基质等内容^[1,6-8]。温度方面,由于菌种本身具有耐低温和不耐低温的差别,筛选出合适的保藏温度对菌种种性的维持具有重要意义。保护剂方面,低温保藏常用的保护剂有渗透型和非渗透型两类,渗透型保护剂有甘油、二甲基亚砷,非渗透型保护剂有蔗糖、海藻糖、甘露醇等。渗透型保护剂在细胞内外发生水合作用,弱化水的结晶过程,达到保护作用;非渗透型保护剂能使溶液呈过冷状态,在特定温度下降低溶质浓度,从而起到保护作用^[9]。目前菌种保藏使用较为广泛的保护剂是渗透型的甘油和二甲基亚砷。海藻糖、甘露醇等非渗透型保护剂在肝素

黄杆菌、乳酸杆菌、白斑狗鱼精子、猪精液和草菇等的保藏上有应用^[10-14]。渗透型和非渗透型混合保护剂在人类细胞的低温保藏中有研究报道^[15-17]。

有关金针菇菌种的保藏方法研究较少,杨慧等^[18]比较了蒸馏水和液氮保藏的金针菇菌种特性,认为2种保藏方法在菌丝生长速度、生长势、纤维素酶活力等方面差异不显著,而蒸馏水保藏的菌丝满瓶时间和产量极显著高于液氮保藏。保护剂方面,金针菇菌种保藏常使用甘油或二甲基亚砷,有关非渗透型以及渗透型和非渗透型混合保护剂对菌种保藏的影响未见报道。

为满足金针菇产业发展的需求,探索不同保藏因素对金针菇菌种中短期保藏效果的影响,本试验以温度、甘油、海藻糖、甘露醇以及保护剂体积5个因素进行正交试验,将保藏12个月的菌种接种于木屑培养基,考察菌丝的生长速度,拟通过统计分析探索温度、保护剂种类以及保护剂体积对金针菇菌种中短期保藏的影响,同时筛选出高效、低成本、易操作的保藏方法。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

金针菇栽培菌种 HJ-25 由上海市农业科学院食用菌研究所菌种保藏中心提供。该菌种菌丝的最适生长温度为 22–25 °C,经过多次工厂化栽培试验,农艺性状与现有主流栽培菌种相当。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

金针菇母种的培养采用 PDA 培养基(g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 20.0, pH 6.5。木屑培养基(质量体积比): 木屑 38%, 玉米芯 38%, 麸皮 21%, 玉米粉 2.3%, 石膏 0.7%, 含水量 65%。实验所用的葡萄糖、琼脂、甘油、海藻糖、甘露醇等试剂均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;生化培养箱,上海博讯实业有限公司;超低温冰箱,美国 Thermo 公司。

1.3 试验设计

以温度、甘油、海藻糖、甘露醇以及保护剂

体积5个因素作为试验因子进行 $L_{16}(4)^5$ 正交试验(表1),每处理重复3次。保藏容器使用5 mL 冷冻管,添加保护剂后采用 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。将 PDA 培养基上生长健壮一致的 HJ-25 菌种用 5 mm 打孔器打孔,挑取接种块置于冷冻管,每管3个接种块,保护剂上覆盖1 mL 灭过菌的石蜡油进行密封。在涉及低温的试验处理中均直接冷冻和室温自然解冻,未采用程序降温 and 快速解冻处理。

1.4 木屑培养基菌丝生长速度测验

金针菇菌种保藏12个月后,挑取各处理菌块,经 PDA 培养基转接活化2次后,接入装有木屑培养基的 200 mm×30 mm 玻璃大试管中(每管培养基干重 35 g),每个处理3个重复。25 °C 暗培养,待菌丝长到料面 2 cm 以下时沿菌丝前端划线,培养14 d 后再次在菌丝前端划线。测量2次划线之间的长度,计算14 d 菌丝的平均生长速度。

1.5 数据处理

利用数据分析软件 DPS V6.05 对试验各处理进行单因素方差分析。利用 Excel 软件进行极差分析并绘制正交试验因素的效应趋势图。利用 R3.2.2 软件对正交试验进行基于二次回归方程模型的逐步回归分析,回归模型为:

$$Y = \sum_i A_i X_i + \sum_i A_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^4 \sum_{j=i+1}^5 A_{ij} X_i X_j。$$

2 结果与分析

2.1 正交试验各处理菌丝生长速度的差异性分析

金针菇 HJ-25 菌种在木屑培养基的菌丝生长情况见表1。单因素方差分析表明,16个处理的木屑菌丝生长速度具有极显著差异($F=5.585$, $P=0.0001$)。所有保藏处理的菌丝生长速度变化范围为 2.93–3.89 mm/d,生长速度最快的是第2处理,达到 3.89 mm/d;生长速度最慢的是第12处理,为 2.93 mm/d。值得注意的是,20 °C、10%海藻糖、10%甘油、0.3 mol/L 甘露醇、2 mL 体积的处理菌丝生长速度最快(即第2处理),比第1处理的20 °C 蒸馏水保藏的菌丝生长速度快 0.35 mm/d。

表 1 正交试验 $L_{16}(4)^5$ 设计表及各处理的木屑培养基菌丝生长速度
Table 1 Design of orthogonal table $L_{16}(4)^5$ run in triplicate to assess effects of mycelia growth rate on sawdust of *Flammulina velutipes* strain HJ-25

处理 Treatment	因素 Factors					菌丝生长速度 Sawdust mycelia growth rate (mm/d)
	温度 Temperature (°C)	海藻糖 Trehalose (% W/V)	甘油 Glycerol (% V/V)	甘露醇 Mannitol (mol/L)	保护剂体积 Protectant volume (mL)	
1	20	0	0	0.0	1	3.54±0.09
2	20	10	10	0.3	2	3.89±0.07
3	20	20	20	0.6	3	3.43±0.00
4	20	30	30	0.9	4	3.11±0.04
5	4	0	10	0.6	4	3.36±0.04
6	4	10	0	0.9	3	3.18±0.14
7	4	20	30	0.0	2	2.96±0.12
8	4	30	20	0.3	1	3.29±0.06
9	-20	0	20	0.9	2	3.32±0.07
10	-20	10	30	0.6	1	3.14±0.06
11	-20	20	0	0.3	4	3.29±0.10
12	-20	30	10	0.0	3	2.93±0.15
13	-80	0	30	0.3	3	3.50±0.07
14	-80	10	20	0.0	4	3.36±0.18
15	-80	20	10	0.9	1	3.57±0.24
16	-80	30	0	0.6	2	3.54±0.04

2.2 正交试验菌丝生长速度的极差分析

通过极差分析可以阐明试验因素的不同水平对木屑菌丝生长速度的影响,同时也可以挖掘出重要的试验因素。表 2 显示了金针菇木屑培养基菌丝生长速度的极差分析结果,其中 K 值表示的是表 1 中试验因素各水平对应的菌丝平均生长速度。极差 R 是各水平平均值中最大值与最小值的差值。极差大说明此因素不同水平间的菌丝生长速度差异大,重要性也越高。根据 K 值还可以得出正交试验各因

素的菌丝生长速度趋势图(图 1)。平方差 S (Square of deviation)是各水平的平均值对总体平均值的离差平方和,反映的是试验因素不同水平间的离散程度。

从表 2 可以发现,极差分析得出的保藏因素重要性排序为:温度>甘露醇>甘油>海藻糖>保护剂体积。温度因素中, A_1 水平(20 °C)和 A_4 水平(-80 °C)的菌丝生长速度快,均达到 3.49 mm/d, A_2 水平(4 °C)和 A_3 水平(-20 °C)的菌丝生长速度低,说明 20 °C 或-80 °C 对金针菇菌种的保藏效果较好。海藻糖因

表 2 金针菇 HJ-25 木屑菌丝生长速度正交试验的极差分析
Table 2 Range analysis for mycelia growth rate on sawdust medium of *Flammulina velutipes* strain HJ-25

因子 Factors	温度 Temperature (A)	海藻糖 Trehalose (B)	甘油 Glycerol (C)	甘露醇 Mannitol (D)	保护剂体积 Protectant volume (E)
K_1	3.49	3.43	3.39	3.20	3.39
K_2	3.20	3.39	3.44	3.49	3.43
K_3	3.17	3.31	3.35	3.37	3.26
K_4	3.49	3.22	3.18	3.30	3.28
R	0.32	0.21	0.26	0.30	0.17
S	0.10	0.03	0.04	0.05	0.02

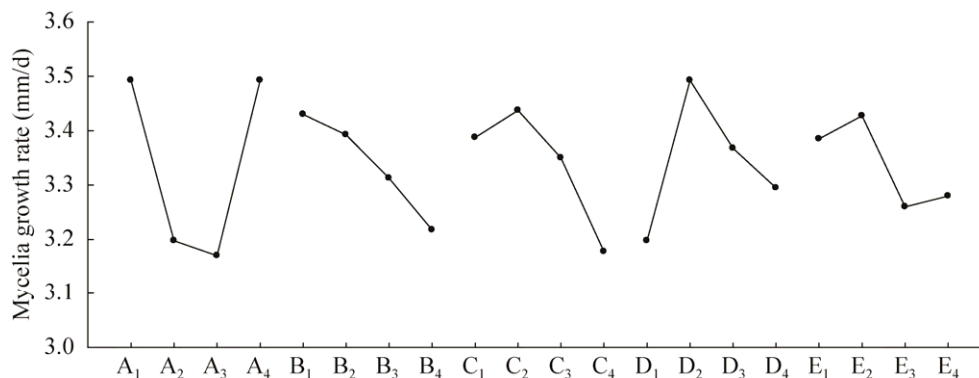


图1 木屑培养基菌丝生长速度的试验因子趋势

Figure 1 The influencing tendency of factors on mycelia growth rate on sawdust medium

注: A: 温度; B: 海藻糖; C: 甘油; D: 甘露醇; E: 保护剂体积。

Note: A: Temperature; B: Trehalose; C: Glycerol; D: Mannitol; E: Protectant volume.

素中, 菌丝生长速度最快的是 B₁ 水平(海藻糖含量为 0), 为 3.43 mm/d, 随着海藻糖浓度增加, 菌丝生长速度呈下降趋势(图 1, B₁–B₄), 说明高浓度的海藻糖不利于金针菇菌种的保藏; 甘油因素中, C₂ 水平(10% 甘油)对应的菌丝平均生长速度最高, 达到 3.44 mm/d, 随着甘油浓度的升高, 菌丝生长速度也呈下降趋势(图 1, C₁–C₄); 甘露醇因素中, D₂ 水平(0.3 mol/L 甘露醇)对应的菌丝平均生长速度最高, 为 3.49 mm/d, 随着甘露醇浓度的升高, 菌丝平均生长速度呈下降趋势(图 1, D₁–D₄), 但不添加甘露醇的水平(D₁)的菌丝平均生长速度最低; 保护剂体积因素中, E₂ 水平(2 mL)的菌丝生长速度最高, 为 3.43 mm/d。

由正交试验的极差分析可知, 金针菇 HJ-25 菌种中短期保藏的最佳条件为: 以 20 °C 或 -80 °C 为保藏温度, 以 10% 甘油和 0.3 mol/L 甘露醇为保护剂, 在 5 mL 聚丙烯冷冻管中以 2 mL 的保护剂体积进行密封保藏。

2.3 正交试验菌丝生长速度的回归分析

为进一步解析正交试验各因素对金针菇菌种 HJ-25 保藏的影响, 采用基于二次多元回归方程的逐步回归方法对试验结果进行了分析, 拟合得到的回归方程的决定系数高达 0.996 7 (表 3)。表 3 中方程回归系数的显著性测验表明, 温度、海藻糖、甘

油、甘露醇的主效应对金针菇菌种在木屑培养基上的菌丝生长有极显著的影响, 温度和保护剂体积的平方项效应也达到极显著水平。交互效应中, 温度与海藻糖、甘油、甘露醇、保护剂体积的交互效应对菌丝生长有极显著影响, 海藻糖与甘油的交互效应也达到极显著水平, 其余因素间的交互效应不显著。

上述分析的结果表明, 温度是金针菇菌种 HJ-25 中短期保藏的最大影响因素, 其主效应以及与其它因素的交互效应均极显著地影响了菌丝在木屑培养基上的生长速度。同时, 海藻糖、甘油、甘露醇对菌丝生长速度均有极显著影响, 表明渗透型和非渗透型保护剂对金针菇菌种的中短期保藏有积极作用。此外, 海藻糖和甘油的交互效应对菌丝生长具有极显著的影响 ($P < 0.001$), 表明渗透型与非渗透型混合保护剂有利于金针菇菌种的中短期保藏。

通过表 3 中建立的回归方程, 对方程的预测值和木屑培养基上菌丝生长速度的实际测量值进行了相关性分析(图 2)。如图 2 所示, 虽然有少量的点超出了 99% 的预测区间, 总体而言, 回归方程的预测值与试验的观测值具有较高的一致性。

基于构建的回归方程及其预测值, 进一步分析了试验各因素间的交互效应。图 3 显示了温度与其

表 3 正交试验木屑菌丝生长速度的逐步回归分析表
Table 3 Stepwise regression analysis of mycelia growth rate on sawdust medium by orthogonal experiment design

项目 Items	逐步回归分析 Stepwise regression analysis	
	t 值	P 值
	t value	P value
X ₁	21.004	<0.001
X ₂	8.612	<0.001
X ₃	8.053	<0.001
X ₄	11.835	<0.001
X ₁ ²	7.009	<0.001
X ₅ ²	3.229	0.002 7
X ₁ X ₂	-12.361	<0.001
X ₁ X ₃	-11.855	<0.001
X ₁ X ₄	-15.246	<0.001
X ₁ X ₅	-14.886	<0.001
X ₂ X ₃	-4.717	<0.001
R ²	0.996 7	
回归方程 Equation	$Y=0.204\ 2X_1+0.079\ 0X_2+0.096\ 8X_3+1.763\ 4X_4+0.000\ 2X_1^2+0.121\ 8X_5^2-0.002\ 3X_1X_2-0.002\ 2X_1X_3-0.093\ 1X_1X_4-0.029\ 2X_1X_5-0.002\ 4X_2X_3$	

注：X₁、X₂、X₃、X₄、X₅ 分别代表温度、海藻糖、甘油、甘露醇、保护剂体积。
Note: X₁, X₂, X₃, X₄, X₅ represent temperature, trehalose, glycerol, mannitol and protectant volume, respectively.

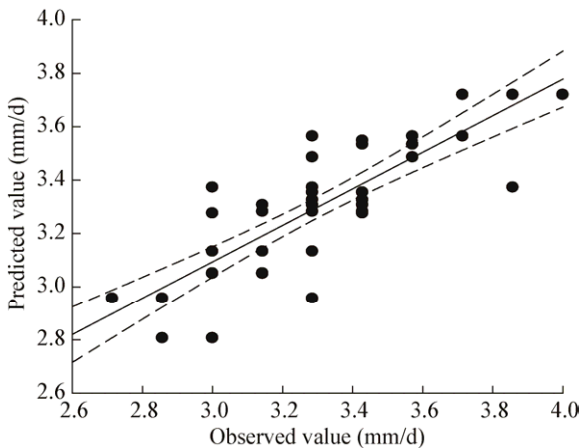


图 2 金针菇木屑培养基菌丝生长速度测量值与回归方程预测值的相关性散点图
Figure 2 Scatter plot of correlation between the observed values and predicted values for mycelia growth rate in *Flamulina velutipes* incubated in sawdust medium

注：虚线表示的是 99% 置信区间。
Note: The dashed lines indicate the 99% confidence limits.

它 4 个因素的交互效应以及甘油与海藻糖、甘油与甘露醇的交互效应。在温度与海藻糖的交互效应中(图 3A), 20 °C 与 10%海藻糖最有利于金针菇菌丝在木屑培养基上的生长; 温度与甘油的交互中(图 3B), 20 °C 与 5%–15%的甘油最有利于菌丝生长; 温度与甘露醇的交互中(图 3C), 20 °C 与 0.2–0.4 mol/L 甘露醇最有利于菌丝生长; 温度与保护剂体积的交互中(图 3D), 20 °C 与 2.0–2.5 mL 的保护剂体积最有利于菌丝生长; 甘油和海藻糖的交互效应图显示 10%甘油和 10%海藻糖最有利于菌丝在木屑培养基上生长(图 3E); 甘油与甘露醇的交互显示, 10%甘油和 0.3 mol/L 的甘露醇最有利于金针菇菌丝生长(图 3F)。

3 讨论

优良菌种的保藏一直是食用菌产业发展的瓶颈问题, 目前菌种的保藏方法虽多, 但针对特定品种保藏方法的研究尚不能满足生产实践的需求。如何建立简单、高效、低成本的保藏方法, 已经成为迫在眉睫需要解决的问题。

金针菇菌种具有菌丝生长速度快、细胞壁薄、种性易受环境影响等特点, 生产中极易发生退化。为了探索适合金针菇菌种的中短期保藏方法, 本试验筛选了温度、海藻糖、甘油、甘露醇以及保护剂体积 5 个因素对金针菇优良菌种 HJ-25 进行正交保藏试验。其中, 温度对金针菇菌种的中短期保藏具有十分重要的影响, 正交试验的极差分析表明 20 °C 和-80 °C 均为较好的保藏温度。这与 Karaduman 等^[19]对裂褶菌菌种保藏的研究结果较为一致, 该研究认为 20 °C 是裂褶菌较好的短期保藏温度。然而, 在试验中我们还发现 20 °C 处理的菌种块周围及保护剂中出现了较多的絮状菌丝团, 这表明 PDA 接种块上的金针菇菌丝在 20 °C 密封状态下仍能缓慢生长, 随着保藏时间的延长, 菌种有发生退化的风险。而-80 °C 处理的菌丝始终处于生长停滞状态, 种性发生退化的风险较低。考虑到-80 °C 保藏需购置超低温冰箱, 相关运行和维护费用较高,

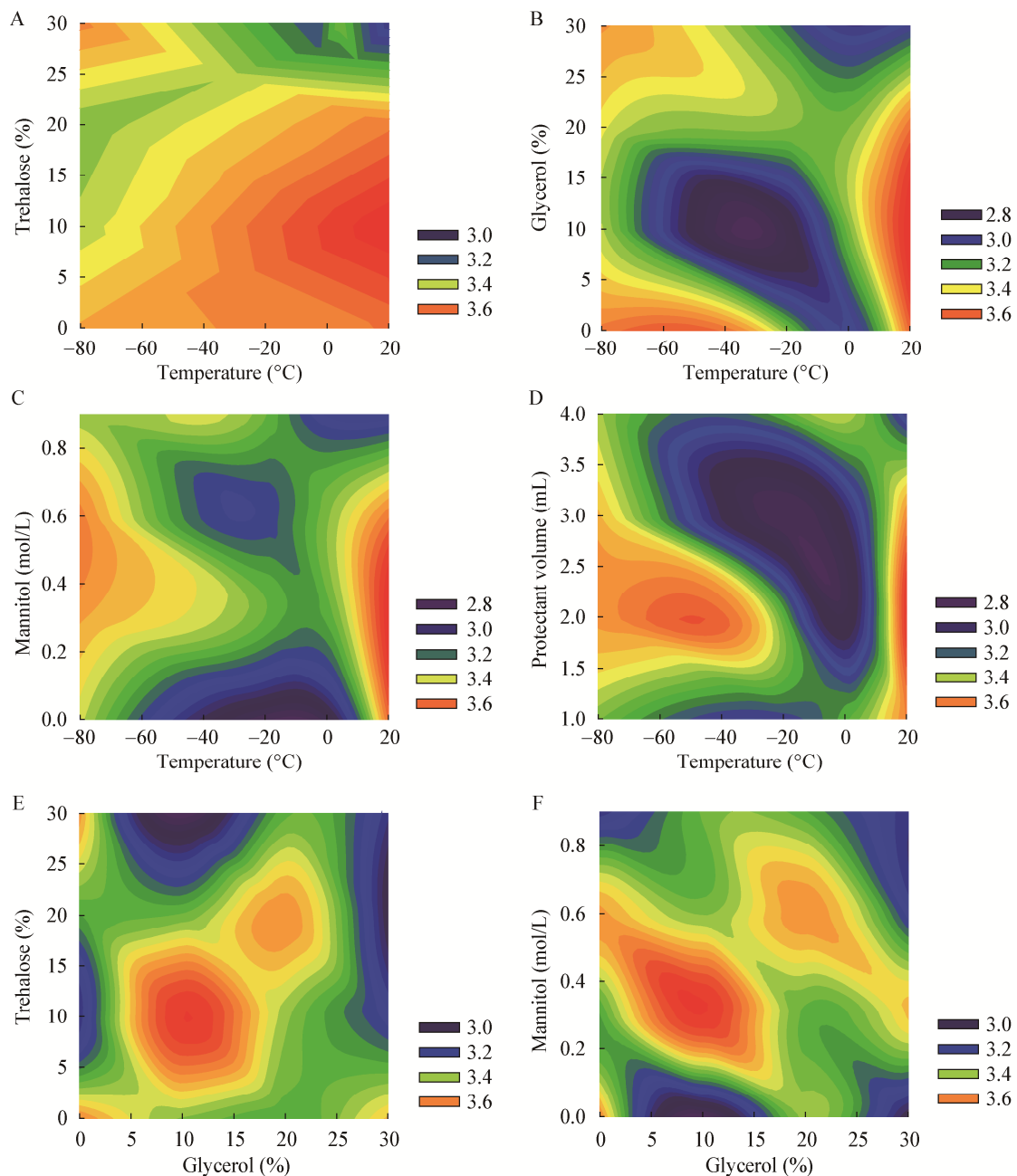


图3 正交试验相关保藏因素的互作效应图

Figure 3 Contour map of interactive effects of orthogonal experiment factors

我们认为当金针菇大量育种材料有低于6个月的保藏需求时(金针菇完整的育种周期约为4个月),可利用20℃培养箱进行短期保藏,当涉及超过6个月的菌种保藏需求时,可采用-80℃超低温冰箱进行保藏。保护剂方面,本试验的分析结果表明渗透

型的甘油和非渗透型的海藻糖、甘露醇在浓度较低时对金针菇菌种的中短期保藏均有积极作用,这与Nakagiri等^[20]对多种食用菌菌种保藏的研究结果较为一致。

金针菇菌种在木屑培养基中的菌丝生长速度

与生育期有直接的联系,同时也是考察菌种是否退化的重要指标之一。本试验以木屑培养基的菌丝生长速度为检测指标,通过正交试验对金针菇菌种的中短期保藏方法进行了探索,结果表明,在5 mL聚丙烯冷冻管中,以2~3 mL的10%甘油和0.3 mol/L甘露醇混合液作为保护剂,同时覆盖1 mL灭菌的石蜡油进行密封,利用20 °C培养箱可满足金针菇菌种1~6个月的短期保藏需求。当金针菇菌种具有超过6个月的保藏需求时,可将同样处理的聚丙烯冷冻管置于-80 °C超低温冰箱进行中期保藏。

4 结论

金针菇菌种 HJ-25 的正交保藏试验表明,温度、海藻糖、甘油和甘露醇对金针菇菌种的中短期保藏有极显著的影响。其中,温度是最重要的影响因素,20 °C 和-80 °C 均为较好的保藏温度;渗透型和非渗透型保护剂均有利于金针菇菌种的中短期保藏,但高浓度保护剂不利于菌种保藏。2 种类型保护剂的互作效应对金针菇菌种的中短期保藏有极显著影响,低浓度的混合保护剂(如10%甘油和0.3 mol/L甘露醇)有利于金针菇菌种的保藏。非渗透型保护剂(海藻糖、甘露醇)的互作效应对金针菇菌种中短期保藏的影响不显著。

由于保藏时间所限,本试验尚未能对-80 °C 的长期保藏效果进行评价,在后续的研究中,我们将完善这方面的数据,并将其与液氮保藏法进行对比。本研究采用的培养基配方与工厂化生产企业的常用配方相同,试验结果与前人保藏试验的结果较为一致,可为其它食用菌菌种的中短期保藏研究提供参考。

REFERENCES

- [1] Homolka L. Preservation of live cultures of basidiomycetes—recent methods[J]. Fungal Biology, 2014, 118(2): 107-125
- [2] Homolka L, Lisá L, Nerud F. Viability of basidiomycete strains after cryopreservation: comparison of two different freezing protocols[J]. Folia Microbiologica, 2003, 48(2): 219-226
- [3] Homolka L, Lisá L, Nerud F. Basidiomycete cryopreservation on perlite: evaluation of a new method[J]. Cryobiology, 2006, 52(3): 446-453
- [4] Smith D. The use of cryopreservation in the ex-situ conservation of fungi[J]. Cryo Letters, 1998, 19: 79-90
- [5] Mata G, Pérez-Merlo R. Spawn viability in edible mushrooms after freezing in liquid nitrogen without a cryoprotectant[J]. Cryobiology, 2003, 47(1): 14-20
- [6] Homolka L, Lisá L, Nerud F. Basidiomycete cultures on perlite survive successfully repeated freezing and thawing in cryovials without subculturing[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 69(3): 529-532
- [7] Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms[J]. Cryobiology, 2003, 46(3): 205-229
- [8] Mata G, Salmones D, Ortega PM. Viability and mushroom production of *Lentinula edodes* and *L. boryana* strains (Fungi: Basidiomycetes) after cryogenic storage of spawn stocks[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2000, 16(3): 283-287
- [9] Zhang RY, Hu DD, Zuo XM, et al. Advances in the preservation of edible mushroom cultures[J]. Acta Edulis Fungi, 2010, 17(4): 84-88 (in Chinese)
张瑞颖, 胡丹丹, 左雪梅, 等. 食用菌菌种保藏技术研究进展[J]. 食用菌学报, 2010, 17(4): 84-88
- [10] Li SZ, Zhang J, Cheng P, et al. Effects of mannitol and glycerol on sperm motility of northern pike[J]. Journal of Aquaculture, 2013, 34(1): 18-20 (in Chinese)
李胜忠, 张健, 成沛, 等. 甘露醇和甘油对白斑狗鱼精子活力的影响[J]. 水产养殖, 2013, 34(1): 18-20
- [11] Ma XL, Yao JF, Yuan QS. Study on preservation method for *Flavobacterium heparinum*[J]. Food and Drug, 2006, 8(4A): 39-42 (in Chinese)
马小来, 姚君斐, 袁勤生. 肝素黄杆菌菌种保存方法的研究[J]. 食品与药品, 2006, 8(4A): 39-42
- [12] Wang YH, Guo J, Chen MB, et al. Effect of trehalose in protecting straw mushroom (*Volvariella volvacea*) at low temperature[J]. Microbiology China, 2008, 35(1): 137-141 (in Chinese)
王永红, 郭俊, 陈美标, 等. 海藻糖对草菇菌种的低温保护效应研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(1): 137-141
- [13] Zhang SS, Li QW, Li G, et al. Effect of trehalose, sucrose and lactose on cryopreservation of boar sperm[J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry (Natural Science Edition), 2006, 34(6): 41-45, 51 (in Chinese)
张树山, 李青旺, 李刚, 等. 海藻糖、蔗糖和乳糖对猪精液冷冻保护效果的影响[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(6): 41-45, 51
- [14] Zhang YH, Huo GC, Guo L. Study on the cryoprotective mechanism of trehalose for lactic acid bacteria during freeze drying[J]. Food and Fermentation Industries, 2007, 33(7): 148-151 (in Chinese)
张英华, 霍贵成, 郭鸽. 海藻糖对乳酸菌冷冻干燥保护机理的研究[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(7): 148-151
- [15] Beattie GM, Crowe JH, Lopez AD, et al. Trehalose: a cryoprotectant that enhances recovery and preserves function of human pancreatic islets after long-term storage[J]. Diabetes, 1997, 46(3): 519-523
- [16] Jia XM, Cai H. Trehalose's protective effects of cryopreserved

- skin to resist the damage of oxygen free radical[J]. Academic Journal of PLA Postgraduate Medical School, 2005, 26(6): 435-436 (in Chinese)
- 贾晓明, 蔡宏. 皮肤低温损伤机制中海藻糖的抗氧化作用[J]. 军医进修学院学报, 2005, 26(6): 435-436
- [17] Sheng CJ, Xu P, Chang Q, et al. Effect of trehalose on the structure of allogeneic aortic valves preserved in liquid nitrogen[J]. Acta Academiae Medicinae Qingdao Universitatis, 2010, 46(2): 109-112 (in Chinese)
- 盛存见, 徐平, 常青, 等. 海藻糖对液氮保存同种带瓣大动脉组织结构的影响[J]. 青岛大学医学院学报, 2010, 46(2): 109-112
- [18] Yang H, Shang XD, Wang RX, et al. Comparison of selected vegetative and fruiting characteristics of a *Flammulina velutipes* strain following long-term preservation in liquid nitrogen or distilled water[J]. Acta Edulis Fungi, 2010, 17(4): 23-25 (in Chinese)
- 杨慧, 尚晓冬, 王瑞霞, 等. 蒸馏水与液氮保藏金针菇菌种特性的比较[J]. 食用菌学报, 2010, 17(4): 23-25
- [19] Karaduman AB, Atli B, Yamaç M. An example for comparison of storage methods of macrofungus cultures: *Schizophyllum commune*[J]. Turkish Journal of Botany, 2012, 36(2): 205-212
- [20] Nakagiri A. Improvement of freeze preservation methods for various fungal cultures[J]. Microbiology and Culture Collections, 2014, 30(2): 51-63

(上接 p.1302)

征 稿 简 则

3.5 参考文献: 参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- [1] Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroxyl radicals as monitored by immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 1991, 12(5): 376-377
- [2] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. Microbiology China, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)
- 王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(1): 6-17
- [3] Shen T, Wang JY. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)
- 沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)
- 刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

4 特别说明

4.1 关于测序类论文: 凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲) 或 GenBank (美国) 或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.) 后再投来。

4.2 关于版权: (1) 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。(2) 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的) 版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。(3) 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。(4) 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

4.3 审稿程序及提前发表: (1) 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登录我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登录我刊系统上传修改稿, 编辑部复审通过后将发出稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。(2) 本刊对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtb.cn>