

## 真菌保藏技术研究进展

顾金刚\* 李世贵 姜瑞波

(中国农业科学院农业资源与农业区划研究所 中国农业微生物菌种保藏管理中心 北京 100081)

中图分类号: Q939.5 文献标识码: A 文章编号: 1672-6472 (2007) 02-0316-0320

### Recent advance of fungal preservation technology

GU Jin-Gang\* LI Shi-Gui JIANG Rui-Bo

(Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Science Agricultural Culture Collection of China, Beijing 100081)

真菌研究及其生物工业的发展必然和安全、长效的保藏技术方法联系,对于有重要经济价值的菌株来说,其保藏技术处理和保藏过程中生理、基因性状的损害、变异,将会带来巨大损失。真菌种类的多样性异常丰富,据估计全世界存在 150 万种真菌 (Hawksworth, 1991),但还不到 5%的真菌被描述,只有很少的种类有合适保藏的工艺技术 (Ryan, 2000),且保藏效果存在菌株水平上的差异性。本文针对近几年真菌保藏领域采取的新技术、原理及适用的保藏研究对象进行了概述。

#### 1 真菌保藏的基本原理及保藏工艺的要点

微生物保藏的最终目的是保持菌株的纯度、活性、基因信息的完整性、避免菌株变异和降低退化。多种保藏技术方法适用于真菌的保藏,大体可以分为三类 (Smith *et al.*, 2001):

一是让真菌连续生长的保藏技术。这一类的保藏技术的特点是不断地将菌株移植在新鲜的培养基上,并在合适的条件下生长,随后至于一个低温的环境中,一般是 4℃~10℃,这类保藏技术主要包括斜面移植、油管保藏和蒸馏水保藏等方法。

二是利用干燥环境保藏菌株的休眠体,如分生孢子、厚垣孢子等,干燥选用的基质可以是空气、硅胶、土壤、沙子等。

三是利用抑制菌株代谢活性的办法达到长期保藏,一般是通过脱水降低细胞内水分或低温冷冻,此过程关键环节是避免和降低冰晶细胞造成的伤害,这类保藏工艺包括冷冻干燥法、低温冻结和液氮保藏法等。

真菌的长期保藏要保证菌株的生理性状和遗传信息的完整性 (Ryan & Smith, 2003),而保藏过程中仅以活性指标判断真菌是否保藏完好有些片面。Kuhls & Borner (1995) 研究来自不同菌种保藏中心的同一个 *Trichoderma* sp. 菌株时,在 PCR-指纹检测结果中出现了偏差 (Kuhls & Borner, 1995)。Kelly 等 (1994) 将保藏了 12 年的 *Fusarium oxysporium* f.sp.*ciceris* 和这一种的其他菌株比较,发现该菌株没有显现出典型的分子指纹特征,证实该菌株已发生退化。Horgen 等 (1996) 证实了 *Agaricus bisporus* 的不同传代菌株出现染色体异常和 RFLP 指纹的多型性。一些没有经过最优化保藏程序的 *Metarhizium anisopliae* 菌株处理,其 PCR 分子指纹证据显示出了多型性的特征,报道 *M. anisopliae* 菌株经过连续传代培养后,出现“角变”并伴随着一些生理性状的变化 (Ryan *et al.*, 2002)。Santors 等 (2002) 报道 *Penicillium expansum* 长期保

\*通讯作者 Corresponding author. E-mail: jggg@caas.ac.cn; Tel:010-68918651

收原稿日期: 2006-04-03, 收修改稿日期: 2007-02-03

藏后的菌株产棒曲霉素 (patulin) 和橘霉素 (citrinin) 的功能受到影响。各种保藏方法优劣比较见表 1。

表 1 各保藏技术方法的优、缺点及保藏周期 (引自 Ryan & Smith, 2004)

Table 1 Advantages, disadvantages and storage lengths of various fungal preservation regimes

保藏方法	优点	缺点	保藏周期
斜面移植法	方法直接, 花费较少	转接周期短, 污染风险, 菌株易变异	14d~1 年
油管保藏法	方法直接, 花费较少	菌株退化, 污染风险, 菌株易变异	~10 年
蒸馏水保法	方法直接, 花费较少	菌株退化, 污染风险, 菌株易变异	~10 年
沙土管保法	方法直接, 花费较少	湿度大时易恶化, 保藏内容物太多	~10 年
硅胶保藏法	方法直接, 花费较少	硅胶有毒性影响, 只能保存产孢子的真菌	~25 年
冷冻干燥法	长时间保藏, 容易储藏及发放	方法复杂, 耗时较长, 设备较贵, 不适用于不产孢的真菌	~50 年
低温冻结法 (超低温冰箱保藏)	方法直接, 降低菌株变异	设备较贵, 必须有电力不间断供应, 一些低温保护剂可能对真菌有毒性	~40 年
液氮保藏法	适用于大多数真菌, 针对不同的属可以最大优化处理, 降低菌株变异	设备昂贵, 控制降温速率, 必须保证液氮的充足供应, 降低菌株变异	无限期

注: 保藏周期指多数情况, 特例除外。

## 2 真菌保藏技术方法

真菌的保藏技术方法很多, 但没有一种保藏工艺能够适合所有真菌种类的保藏。Ryan 等 (2002) 从科学、供应以及财政等角度制定了一些原则来指导保藏者选择合适的保藏技术。一些基本的保藏方法, 如斜面移植法、油管保藏法、蒸馏水保藏法、沙土管保藏法、硅胶保藏法等文献已经为一些真菌的保藏提供选择, 不再进行赘述 (Smith & Onions, 1994; Fenell, 1960; Smith *et al.*, 2001; Boesewinkel, 1976; Burdsall, 1994; Perkins, 1962)。以下仅对真菌的冷冻干燥、超低温冻结、液氮保藏、固定化和玻璃化保藏技术及进展进行概述。

### 2.1 冷冻干燥保藏技术 (Freeze drying)

真菌的冷冻干燥保藏技术包括 3 个主要步骤, 一是要培养物冷冻阶段; 二是冷冻状态下的减压干燥, 干燥过程必须避免液体状态, 温度应保证在  $-15^{\circ}\text{C}$  以下, 避免温度反复起伏, 控制培养物的水分到 5% 左右为宜; 最后进行真空密封, 在低温、避光的环境下保藏 (Smith, 1983)。冷冻干燥过程中的重要环节是避免低温伤害, 低温伤害在冷冻和干燥时段都有发生, 其原理可能是细胞膜上液体的结晶体向胶体阶段转变的时候, 引起细胞膜流动镶嵌结构的损害 (Tan, 1997)。一些保护剂的应用, 如血清、脱脂乳、肌糖、海藻糖以及蛋白胨的应用可以降低这种伤害。采用该技术保藏的微生物菌株有分发时不用事先开启、便于包装、降低运输过程的泄漏危险等优点。冷冻干燥保藏技术适用于一些产孢子的真菌, 特别是一些能够产生子囊孢子和分生孢子的真菌, 保藏周期可达到 20~40 年。Tan 等采用该技术对真菌的菌丝进行保藏复活研究, 大多数情况下, 得不出满意的结果 (Tan, 1991), 目前仅有 Pertot 等 (1977) 报道 *Claviceps* spp. 菌丝可经过冷冻干燥保藏后复活。

### 2.2 超低温保藏技术 (Cryopreservation)

**2.2.1 超低温保藏技术:** 超低温保藏一般分为两种方式, 一是超低温冰箱保藏, 保藏温度一般为  $-70^{\circ}\text{C}$  ~  $-80^{\circ}\text{C}$ ; 另一种方式为液氮超低温保藏, 根据液氮罐的构造类型, 可分为隔氮式和浸氮式, 隔氮式是将保

藏物保藏于气相中,保藏温度一般在 $-135^{\circ}\text{C}$ 左右,浸氮式是将保藏物保藏在液氮的液面之下,保藏温度为 $-196^{\circ}\text{C}$ 。Herry 于 1663 年发现,将一些线虫经过冷冻并通过溶化过程使之复活 (Morris, 1981),Polge 等 (1949) 首先将此技术成功应用保藏鸟类精子,Hwang (1960) 首次将此技术应用于真菌的保藏。液氮超低温保藏技术有 3 个关键环节影响真菌的保藏效果,一是降温速率控制,理论上保藏前的降温速率控制越慢越好, $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  降温速率已完全能够适合大多数真菌的保藏。二是复活过程中保藏物快速升温到最适温度,目前处理的方法将保藏的冻存管快速置于  $37\sim 45^{\circ}\text{C}$  水浴中,放置  $1\sim 2\text{min}$ 。三是保护剂的种类和浓度选择,常用的保护剂有甘油、海藻糖、DMSO 等。

降温速率的控制和保护剂的配合使用是为了降低低温损害风险 (Smith & Thomas 1998)。Smith (1983) 认为真菌的低温伤害是由于细胞组织被冰晶破坏和细胞内浓度增高等几方面互相作用的结果。Merryman 等 (1977) 认为细胞缓冲液快速波动引发 pH 变化,细胞内大分子失水的过程中可导致细胞内部结晶化,引起细胞皱褶等原因导致细胞死亡。细胞膜的破坏是细胞死亡的真正原因,Roquebet & Bury (1993) 在研究 *Lentinula edodes* 菌株降温过程时认为,冰晶对细胞膜的物理破坏作用可能是导致细胞死亡的直接原因。

Ryan & Smith (2003) 在对 *Phytophthora* 的保藏研究中,比较了 10% 的 DMSO 及降温速率  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  和 10% 甘油保护剂及降温速率  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  两种保藏工艺,在 10% 的 DMSO 及降温速率  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  的试验中,67 个分离物中 65 个分离物具有活性,存活率达 92.5%;而在 10% 的甘油及降温速率  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  的试验中,保藏后检测到了卵孢子和厚垣孢子的形成,没有卵孢子形成的分离物依然有菌丝的生长。Ryan & Smith 将 10% 甘油保护剂及降温速率  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  的保藏工艺用于 *Diploccarpon rosae* 和 *Moniliophthora roreri* 时,保藏的成活率低于 50%。为了提高 *Moniliophthora roreri* 菌株的孢子产量,所有的菌株在进行超低温保藏前事先放在冰箱中低温处理 21d,在此后的活性检测中,成活率达到了 91%,比先前的成活率提高了 41%。用不同的保护剂,如海藻糖、甘油、DMSO、肌糖、蛋白胨等,对 *Serpula lacrymans* 进行了保藏处理,各保护剂处理保藏效果的差异不明显,DMSO 的保藏效果最好,成活率达到了 89%。液氮的超低温保藏目前认为是最有效的保藏方法,但对于一些真菌来说,虽然在保护剂和降温速率控制方面进行了较多的研究,但保藏效果依然不好,例如一些担子菌类以及 *Straminipila*、*Phytophthora*、*Saprolegnia* 属等。

**2.2.2 玻璃化技术 (Vitrification):** 超低温保藏技术过程必然要经过“玻璃化”过程。“玻璃化”技术实质就是让水分子处于一种类似于固体状态而不发生结晶,可以通过空气干燥、化学物质干燥蒸发水分,渗透浓脱水、海藻盐包装脱水、化学保护剂等手段实现“玻璃化”。一是部分的“玻璃化”过程和全部的“玻璃化”过程。部分的玻璃化过程,主要控制细胞膜外的水分结晶,减少细胞破坏,全部“玻璃化”过程要完全阻止细胞内、外冰晶的形成。玻璃化保藏技术在多细胞组织保藏中应用较广,是用高浓度的保护剂溶液保护保藏物,使之在降温过程中以“玻璃体”形式存在,从而避免冰晶对细胞组织的破坏。此外,在恢复培养的过程中注意避免晶状体破碎和及时洗掉对真菌有毒的玻璃化溶液。Ryan & Smith (2002) 报道了应用此法成功保藏一些真菌,如 *Flammulina*、*Boletus*、*Mycena* 等属的一些菌种,而对 *Phytophthora* 和 *Saprolegnia* 保藏的检测结果是全部死亡,与常规应用的一些方法相比,高浓度玻璃化溶液对大多数真菌是有毒的,不利于真菌菌株的长期保藏。

**2.2.3 固定化技术 (Immobilisation):** 固定化的保藏技术是将真菌菌株事先包裹在藻酸钙中并进行超低温保藏的一种保藏技术。固定化的技术方法已用于真菌酶制剂、生防菌株、生物降解等多个方面的研究 (Kwak & Rhee, 1992; Pereira & Roberts, 1991; Lestan *et al.*, 1998; Walker & Connick, 1983),用藻酸钙诱捕固定真菌也有多方面的报道 (Walker & Connick, 1983; Mauperin, *et al.*, 1987; Pereira & Roberts, 1991; Kwak & Rhee, 1992; Daigle & Cotty, 1997)。Abdullah 等 (1995) 发现固定化的技术并不对真菌的菌丝造成伤害,可以扩展用固定化的技术应用于真菌的长期保藏。Smith 等 (1992) 建议可应用于一些担子菌、卵菌以及一些不产孢真菌的保藏。

固定化保藏真菌技术基本过程包括, 第一步制备真菌的孢子或菌丝的藻酸盐的悬浮液; 第二步是滴入藻酸钙的溶液中, 此时真菌孢子或菌丝体会包裹在形成的藻酸钙的小球中, 并放置一段时间; 第三步将菌丝或孢子小球转移到高渗溶液中进行脱水; 第四步可以按照真菌保藏的一些常规方法保藏, 如液氮超低温保藏、油管保藏、蒸馏水保藏等。

Gilson 等 (1990) 注意到将固定化的小球放置在藻酸钙的溶液中放置一段时间, 可以防止小球破裂。Abdullah 等 (1995) 用固定化的技术对 8 株担孢子的菌丝进行了保藏, 一年后检测仍有活性。Mauperian 等 (1987) 报道用固定化的方法对外生菌根菌的菌丝进行保藏, 4℃冰箱中用蒸馏水保藏法, 活性至少保持了 5 个月。Ryan (2001) 用固定化的方法处理 *Serpula lacrymans* 菌丝, 分别做了在 -20℃ 冰箱和 20℃ 蒸馏水保藏两种处理, 经过一个月的保藏, 经过固定化处理的菌丝活性显著高于对照处理。Wood 等 (2000) 报道用固定化技术和超低温保藏相结合的方法对 *Dactylorhiza fuchsia* 和 *Anacamptis morio* 的种子以及种子上附带的担孢菌 *Ceratobasidium cornigerum* 菌丝进行保藏处理, 保藏效果良好。

### 3 展望

真菌保藏技术研究方向是提高菌株的存活率和稳定性, 开拓保藏范围, 特别是对不能培养的专性寄生菌, 如锈菌、*Halophythora*、*Saprolegnia*、*Aphanomyces* 属的菌种, 以及 *Basidiomycota* 和 *Glomeromycota* 中一些种开展保藏技术研究。Ryan & Ellison (2002) 用原位结合超低温保藏的技术方法对 *Puccinia spegazzinii* 菌株进行了保藏处理, 经过保藏后的菌株依然有产生担孢子的能力, 虽然对寄生侵染能力下降, 在叶柄的侵染没有成功, 但显示了固定化和超低温保藏结合对保藏一些不易保藏真菌有应用的潜力, 如内生真菌、地衣、菌根菌、不能培养的真菌等。多数的研究者专注于真菌分类学、酶学、分子生物学等学科进展, 专注于发现新的功能基因、生物大分子以及基因、生物大分子的代谢调控功能等, 而忽视研究菌株的稳定性、基因完整性的安全长期保藏, 一旦由于管理或保藏技术的原因, 致使菌株丢失、变异、退化, 其先前的研究成果也就不复存在, 将重要菌株通过一定的手续存放于专业的菌种保藏机构是可行的一种选择。

**致谢:** 此工作是作者在 CABI Bioscience UK Center (Egham) 工作学习期间完成, Dr. Smith 和 Dr. Ryan 给予了极大的指导与帮助, 在此表示衷心的感谢。

### [REFERENCES]

- Abdullah N, Iqbal M, Zafar SI, 1995. Potential of immobilised fungi as viable inoculum. *Mycologist*, **9**: 168~171
- Boesewinkle HJ, 1976. Storage of fungal culture in water. *Transactions of the British Mycological Society*, **66**: 183~185
- Burdall HH, Dorwor EB, 1994. Preserving cultures of wood decaying Basidiomycotina using sterile water in cryovials. *Mycologia*, **86**: 275~280
- Daigle DJ, Cotty PJ, 1997. The effect of sterilization on the preoatation of alginate pellets. *Biocontrol Science and Technology*, **7**: 3~10
- Fennell DI, 1960. Conservation of fungus cultures. *Botanical Reviews*, **26**: 79~141
- Gilson CD, Thomas A, Kwakes FR, 1990. Gelling mechanism of alginate beads with and without immobilized yeast. *Process Biochemistry International*, **6**: 104~108
- Horgen P, Carvalho D, Sonnenberg A, van Griensven LJLD, 1996. Chromosomal abnormalities associated with strain degeneration in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Fungal Genetics and Biology*, **20**: 229~141
- Hwang SW, 1960. Long term preservation of fungus cultures with liquid nitrogen refrigeration. *Applied Microbiology*, **14**: 784~788
- Hawksworth DL, 1991. The fungi dimension of biodiversity: magnitudes significance and conservation. *Mycological Research*,

95: 641~645

- Kelly A, Alcalá, Jimenez AR, Bainbridge BW, Heale JB, Perez-Artes E, Jimenez Diaz RM, 1994. Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporium* f.sp.ciceris infecting chickpea. *Phytopathology*, **84**: 1293~1298
- Kuhls K, Liekfeld E, Borner T, 1995. PCR fingerprinting used for comparison of ex type strains of *Trichoderma* species deposited in different culture collections. *Microbiological Research*, **150**: 363~371
- Kwak MY, Rhee JS, 1992. Controlled mycelial growth for kojic acid production using Ca-alginate immobilized fungal cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **36**: 578~583
- Lestan D, Lestan M, Lamar RT, 1998. Growth and viability of mycelial fragments of white-rot fungi on hydrogels. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **20**: 244~250
- Merrymam HT, Williams RJ, Douglas MSJ, 1977. Freezing injury from solution effects and its prevention by natural or artificial cryoprotection. *Cryobiology*, **14**: 287~302
- Morris GJ, Clarke A (eds.), 1981. Effect of low temperatures on biological membranes. London: Academic Press. 241~262
- Perkins DD, 1962. Preservation of *Neurospora* stock cultures in anhydrous silica gel. *Canadian Journal of Microbiology*, **8**: 591~594
- Pereira RM, Robert DW, 1991. Alginate and cornstarch mycelial formulations of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Economic Entomology*, **86**: 1657~1661
- Pertot E, Puc A, Kresmer M, 1977. Lyophilization of nonsporulating strains of the fungus *Claviceps*. *European Journal of Applied Microbiology*, **4**: 289~294
- Ploge C, Smith AU, Parkes S, 1949. Revival of spermatozoa after dehydration at low temperatures. *Nature*, **164**: 666
- Roquebert MF, Bury E, 1993. Effects of freezing and thawing on cell membrane of *Lentinus edodes*, the Shiitake mushroom. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **9**: 641~647
- Ryan MJ, 2001. The use of immobilization for the preservation of *Serpula lacrymans*. *Mycologist*, **15** (2): 65~67
- Ryan MJ, Bridge PD, Smith D, Jeffries P, 2002. Phenotypic degeneration occurs during sector formation in *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Applied Microbiology*, **93**: 163~168
- Ryan MJ, Ellison CA, 2002. Development of cryopreservation protocol for the microcyclic rust-fungus *Puccinia spegazzinii*. *Cryoletters*, **24**: 43~48
- Ryan MJ, Smith D, 2004. Fungal genetic resource centers and the genomic challenge. *Mycological Research*, **108**(12): 1351~1362
- Ryan MJ, Smith D, Jeffries P, 2000. A decision-based key to determine the most appropriate protocol for the preservation of fungi. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **16**: 183~186
- Santos IM, Abrunhosa L, Venancio A, Lima N, 2002. The effect of culture preservation techniques on patulin and citrinin production by *Penicillium expansum* Link. *Letters in Applied Microbiology*, **35**: 272~275
- Smith D, 1983. Cryoprotectant and the cryopreservation of fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, **80**: 360~363
- Smith D, Onions AHS (2<sup>nd</sup> eds.), 1994. The preservation and Maintenance of living fungal. Wallingford, CAB International.
- Smith D, Thomas VE, 1998. Cryogenic light microscopy and the filamentous fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **14**: 49~57
- Tan CS, Stalpers JA, van Ingen CW, 1991. Freeze-drying of fungal hyphae. *Mycologia*, **83**: 654~657
- Wood CB, Pritchard HW, Miller AP, 2000. Simultaneous preservation of orchid seed and its fungal symbiont using encapsulation-dehydration is dependent on moisture content and storage temperature. *Cryoletters*, **21**: 125~136