

## 液氮保藏菌种对平菇菌丝体和子实体的影响

韩芹芹<sup>1</sup>, 王金宁<sup>1</sup>, 李国庆<sup>2</sup>, 聂凡<sup>2</sup>, 陈静娴<sup>2</sup>, 蔡永萍<sup>1\*</sup>

(1. 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036; 2. 安徽省农业科学院园艺所, 合肥 230031)

**摘要:**以皖平菇1号为试验材料,对菌种液氮保藏过程中的降温方式、保护剂、解冻3个关键环节设计三因素三水平正交试验。结果表明,正交试验9个不同的处理中对菌种萌发率影响最小的条件处理组合为不加保护剂直接放入液氮,38~40℃水浴解冻;对菌丝生长速度影响最小的处理组合为-70℃-液氮逐步降温,10%的二甲基亚砜作保护剂,38~40℃水浴解冻;对子实体平均产量影响最小的处理组合为4℃--20℃--70℃分别放置2h的逐步降温法,10%的蔗糖水溶液作保护剂,38~40℃水浴解冻。保护剂和解冻方式的选择对菌种影响较大,结合成本等其他因素综合考虑,不加保护剂直接将菌种放入液氮,38~40℃水浴快速解冻的处理方式为最佳选择。

**关键词:**平菇;液氮保藏;保护剂;降温;解冻

中图分类号: S646.14

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2012)06-1003-05

### Effects of liquid nitrogen preservation on mycelial and fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*

HAN Qin-qin<sup>1</sup>, WANG Jin-ning<sup>1</sup>, LI Guo-qing<sup>2</sup>, NIE Fan<sup>2</sup>, CHEN Jing-xian<sup>2</sup>, CAI Yong-ping<sup>1</sup>

(1. School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Horticulture Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031)

**Abstract:** In this paper, ultra-low temperature preservation of *Pleurotus ostreatus* "Wanping No.1" spawn was studied by designing an orthogonal experiment with three factors(cryoprotectant, pretreatment and thawing) at three levels. The results showed that in the 9 treatments, A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>, with non-pretreatment, without a cryoprotectant into liquid nitrogen and thawing in a 38-40℃ water bath after taken out from liquid nitrogen is the best combination which bring the minimal influence on the germination phase and viability rate of mycelial; A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>3</sub>, with -70℃-liquid nitrogen cooling of spawn, 10%dimethylsulfoxide as cryoprotectant and thawing in a 38-40℃ water bath after taken out from liquid nitrogen is the best combination which bring the minimal influence on the mycelial growth rate and growth condition; A<sub>1</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>, with 4℃--20℃--70℃-liquid nitrogen cooling of spawn, 10% sugar solution as cryoprotectant and thawing in a 38-40℃ water bath after taken out from liquid nitrogen is the best combination which bring the minimal influence on the yield of fruiting bodies. Cryoprotectant and thawing play important roles in the process of liquid nitrogen preservation of *Pleurotus ostreatus*. The best method for preservation of spawn in liquid nitrogen is the combination of non-pretreatment, without a cryoprotectant into liquid nitrogen and thawing in a 38-40℃ water bath after taken out from liquid nitrogen, taken cost into consideration.

**Key words:** *Pleurotus ostreatus*; liquid nitrogen; preservation; cryoprotectant; cooling; thawing

近年来,食用菌产业得到了快速的发展,有效促进了农业结构调整、农业增效增收和循环农业等的发展<sup>[1]</sup>。随着食用菌产业的发展,食用菌种质资源的收集和保藏显得愈加重要。在菌种保藏过程中,不仅要保证菌种的成活,更重要的是保证菌种的遗传性状不发生或尽可能少的发生变异<sup>[2]</sup>。菌种保藏方法很多,自1968年Hwang首先使用液氮保藏食用菌菌种以来,人们对该方法的认识逐步加深,采取的技术也日益完善<sup>[3]</sup>。目前液氮保藏被认为可长期保存菌种,是最有效、最安全的菌种保藏方法之

近年来,食用菌产业得到了快速的发展,有效促进了农业结构调整、农业增效增收和循环农业等的发展<sup>[1]</sup>。随着食用菌产业的发展,食用菌种质资源的收集和保藏显得愈加重要。在菌种保藏过程中,不仅要保证菌种的成活,更重要的是保证菌种的遗传性状不发生或尽可能少的发生变异<sup>[2]</sup>。菌种保藏方法很多,自1968年Hwang首先使用液氮保藏食用菌菌种以来,人们对该方法的认识逐步加深,采取的技术也日益完善<sup>[3]</sup>。目前液氮保藏被认为可长期保存菌种,是最有效、最安全的菌种保藏方法之

收稿日期: 2012-03-21

作者简介: 韩芹芹,女,硕士研究生。E-mail: qqhan2010@163.com

\* 通讯作者: 蔡永萍,女,博士,教授。E-mail: swkx12@ahau.edu.cn

一<sup>[4]</sup>。顾金刚等<sup>[5]</sup>认为降温速率控制、复活物快速升到最适温度和保护剂种类与浓度是液氮保藏技术的3个关键环节。目前对食用菌菌种的液氮保藏技术已经有了一些研究,主要集中于香菇、木耳等,但对液氮保存平菇菌种的研究较少。

平菇 [*Pleurotus ostreatus* (Fr) Kummer] 又名糙皮侧耳,其适应性强,产量高,经济效益显著,营养丰富,味道鲜美,而且还具有良好的食疗价值,是世界上生产量最大的食用菌,也是当前我国广泛栽培的食用菌品种之一<sup>[6]</sup>。因此,针对液氮保藏技术中的关键环节,系统地研究平菇菌种的液氮超低温保藏技术尤为必要。

本试验选择经麦粒培养的皖平菇1号原种<sup>[7]</sup>做实验材料,对菌种液氮保藏的不同处理方式进行了研究,选择降温方式、保护剂种类和解冻方式3个因素设计三因素三水平的正交试验,对平菇菌种液氮保藏的重要环节进行了研究,并对保藏后的菌种进行了菌丝体生长指标以及子实体产量的测定,以期找到适合平菇菌种液氮保藏的一种较好的处理方式,为液氮保藏其它菌种提供一些有价值的参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试菌株

皖平菇1号由安徽省农科院园艺所选育。

### 1.2 试验方法

选择麦粒培养基培养菌种,待菌丝满瓶后进行试验。对菌种液氮保藏过程中的降温方式、保护剂、解冻3个关键环节设计三因素三水平的正交试验进行研究。

**1.2.1 因子水平设计** 正交试验各因素的不同水平组合设计见表1。

**1.2.2 菌丝体生长指标的测定** 保藏后的菌种经解冻后,将其接种到装有PDA培养基的培养皿上(每个平板接种3个长满菌丝体的小麦粒,每个处理5个平板共15个长满菌丝体的小麦粒),接种后用胶带封口,置于25℃培养箱内培养,并观察菌种萌发的时间,菌丝萌发2d后测量菌丝圈直径并计算菌丝的生长速度,培养2周后计算菌种的总萌发率。

菌丝生长速度 ( $\text{mm}\cdot\text{d}^{-1}$ ) = 2 d 后菌丝圈直径 (mm)/2/2

菌种总萌发率 (%) = 2周后长出菌丝的小麦粒总数/接种的小麦粒总数 × 100%

**1.2.3 子实体生长指标的测定** 将PDA培养基上生长的菌丝体接种到配料中,放置在培养室中,温度控制在25℃左右,待大部分菌丝体长满瓶后加大昼夜温差,用加湿器控制培养室内的相对湿度大约保持在85%~90%,以刺激原基的生成和子实体的分化。

表1 各因素不同水平组合设计

Table 1 The combination of three factors at three levels

试验号 No.	因素 Factor		
	降温方式 (A) Way of cooling (A)	保护剂 (B) Cryoprotectant(B)	解冻方式 (C) Way of thawing (C)
1	4℃-20℃-70℃-液氮	10%二甲基亚砷	-20℃-4℃-常温接种
2	4℃-20℃-70℃-液氮	10%蔗糖水溶液	4℃-常温接种
3	4℃-20℃-70℃-液氮	不加	38~40℃水浴-常温接种
4	-70℃-液氮	10%二甲基亚砷	38~40℃水浴-常温接种
5	-70℃-液氮	10%蔗糖水溶液	-20℃-4℃-常温接种
6	-70℃-液氮	不加	4℃-常温接种
7	直接放入液氮	10%二甲基亚砷	4℃-常温接种
8	直接放入液氮	10%蔗糖水溶液	38~40℃水浴-常温接种
9	直接放入液氮	不加	-20℃-4℃-常温接种

待子实体七八成熟后采摘,测量子实体总产量并计算单个子实体平均重量。

单个子实体平均重量 (g) = 子实体总产量/子实体个数

### 1.3 培养基配方

麦粒培养基:煮熟的小麦粒沥干水,装瓶备用。

PDA培养基:1000 mL培养基包含马铃薯200g,蔗糖20g,琼脂20g。

栽培料:棉籽壳75%,稻壳20%,石灰3%,麦麸2%。

## 2 结果与分析

### 2.1 液氮保藏对皖平菇1号菌丝体萌发时间、萌发率的影响

液氮保藏后不同处理的菌种菌丝萌发时间及萌发率的测量结果如表2所示。

由表 2 可知, 不作任何处理的菌种菌丝体萌发时间最短, 接种后一天菌种全部萌发, 萌发率最高, 达到了 100%。不同处理的液氮保藏后, 对菌种的萌发时间和萌发率影响不同。保藏后菌种的萌发时间有不同程度的延长, 萌发率也有不同程度的降低。9 个不同的处理中, 处理 3、7 和 8 菌种的萌发时间较短, 萌发率最高, 都达到了 100%。处理 4、处理

6 萌发率也都达到了 90% 以上。处理 2 和处理 5 的萌发时间最长, 萌发率最低。

正交试验极差分析可得, 对菌种萌发时间及萌发率影响最小的条件组合为  $A_3B_3C_3$ , 即不加保护剂直接放入液氮,  $38\sim 40^\circ\text{C}$  水浴解冻的处理组合。3 个因素对菌种萌发时间萌发率的影响大小顺序为保护剂>解冻方式>降温方式。

表 2 不同处理对菌丝体萌发时间及萌发率的影响

Table 2 The effects of different treatments on the mycelial germination phase and viability rates

试验号 No.	萌发时间/d Germination time														成活率/% Viability rate
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
0	15														100
1					3	3	6	10	11	11	11	11	11	11	73.33
2								1	2	2	2	2	4	4	26.67
3		3	11	13	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	100
4							9	12	14	14	14	14	14	14	93.33
5								1	2	6	6	7	7	7	46.67
6			1	1	8	11	13	14	14	14	14	14	14	14	93.33
7			5	7	1	5	12	15	15	15	15	15	15	15	100
8				4	10	12	14	15	15	15	15	15	15	15	100
9					4	7	11	12	13	13	13	13	13	13	86.67

表 3 不同处理对菌丝体平均长速和长势的影响

Table 3 The effects of different treatments on the mycelial growth rate and growth condition

试验号 No.	菌丝长速/ $\text{mm}\cdot\text{d}^{-1}$ Mycelial growth rate	菌丝长势 Mycelial growth condition
0	$14.25\pm 0.65^{aA}$	++++
1	$6.76\pm 1.48^{bcBC}$	+++
2	$4.00\pm 0.63^{dD}$	++
3	$5.64\pm 1.00^{bcBC}$	+++
4	$5.74\pm 1.05^{bcBC}$	+++
5	$6.14\pm 1.13^{cdCD}$	+++
6	$5.71\pm 1.01^{bcBC}$	+++
7	$5.64\pm 1.05^{bcBC}$	+++
8	$6.40\pm 1.05^{bB}$	+++
9	$4.56\pm 0.76^{bcBC}$	++

注: 表中小写字母表示在 5% 的水平上差异显著, 大写字母表示在 1% 的水平上差异极显著, 下同。菌丝长势好坏用+多少表示, +多的长势好, +少的长势差。

Note: The lowercase letters show significant difference at the level of 5%, and the capital letters show significant difference at the level of 1%. The same below. The number of “+” shows the mycelial growth condition, the more “+”, the better growth condition, on the contrary, the less “+”, the worse growth condition.

## 2.2 液氮保藏对皖平菇 1 号菌丝生长速度及长势的影响

液氮保藏后不同处理的菌种菌丝生长速度及长

势的测量结果如表 3 所示。

由表 3 可知, 不做任何处理的菌种在装有 PDA 培养基培养皿上生长速度是最快, 为  $14.25 \text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ 。液氮保藏后菌丝长速都有不同程度的减慢, 9 个处理均和对照组差异显著, 其中处理 1、处理 8 和处理 5 菌丝长速均在  $6 \text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$  以上, 受影响较小。而处理 2 和处理 9 菌丝长速均在  $5 \text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$  以下, 受影响较大。

另外, 由正交试验极差分析可得, 3 个因素对菌丝生长速率的影响作用大小不同, 主次顺序为解冻方式>保护剂>降温方式。还可以得出对菌丝体长速影响最小的条件组合为  $A_2B_1C_3$ , 即  $-70^\circ\text{C}$ -液氮的降温方式, 10% 的二甲基亚砷作保护剂,  $38\sim 40^\circ\text{C}$  水浴解冻的处理组合。

## 2.3 液氮保藏对皖平菇 1 号子实体产量的影响

液氮保藏后不同处理的菌种子实体产量及正交分析结果如表 4 所示。

不经液氮处理的菌种单个子实体平均产量为  $7.04 \text{ g}$ 。由表 4 可知, 液氮不同处理对子实体产量的影响大小不同, 处理 6 和处理 9 子实体不发育, 受影响最大。在子实体发育的 7 个不同的处理组合中, 处理 8 单个子实体平均重量, 为  $9.27 \text{ g}$ , 超过了不经液氮处理的子实体产量。处理 1、2、3 和 7 单个子实体平均重量和不经液氮处理的对照组相当, 处理 4 和处理 5 单个子实体平均重量较小, 受影响最大。

表 4 正交试验中各处理对子实体平均产量的影响  
Table 4 The effects of different treatments on the yield of fruiting bodies

试验号 No.	A	B	C	单个子实体平均产量/g Average yield of single fruiting body
1	1	1	1	7.31±1.84 <sup>AA</sup>
2	1	2	2	7.22±1.42 <sup>AA</sup>
3	1	3	3	7.47±1.45 <sup>AA</sup>
4	2	1	3	5.53±0.90 <sup>AA</sup>
5	2	2	1	5.17±0.94 <sup>AA</sup>
6	2	3	2	0 <sup>bB</sup>
7	3	1	2	7.49±1.34 <sup>AA</sup>
8	3	2	3	9.27±1.57 <sup>AA</sup>
9	3	3	1	0 <sup>bB</sup>
$K_1$	5.79	6.01	5.50	
$K_2$	3.24	6.09	4.33	
$K_3$	4.51	1.55	3.42	
$R$	2.56	4.55	2.24	
排序 Order	2	1	3	

经极差分析可得, 3 个因素影响子实体产量的主次顺序为保护剂 > 解冻方式 > 降温方式。对子实体产量影响最小的最佳条件处理组合为  $A_1B_2C_3$ , 即降温方式为  $4^{\circ}\text{C}-20^{\circ}\text{C}-70^{\circ}\text{C}$  分别放置 2 h 的逐步降温法, 10% 的蔗糖水溶液作保护剂,  $38\sim 40^{\circ}\text{C}$  水浴解冻的处理组合。

### 3 讨论

液氮保藏技术具有保藏时间长、菌株不易变异、适合大多数真菌等优点, 被许多菌种保藏机构所采用<sup>[8]</sup>。但是由于该方法的特殊性, 保藏过程中的许多环节都可能影响到菌种的保藏效果, 其中以降温方式、保护剂以及解冻方式的影响最为明显。本文选择液氮保藏过程中的降温方式、保护剂以及解冻方法设计三因素三水平的正交试验, 发现各因子不同的水平组合对菌丝体生长指标以及子实体产量的影响是不同的。

对菌丝体和子实体各指标综合分析可得, 不加保护剂直接放入液氮,  $38\sim 40^{\circ}\text{C}$  水浴快速解冻的处理组合对菌种萌发时间萌发率影响最小, 这与 Mata 等<sup>[9]</sup>的不加保护剂经液氮保藏后的菌种可以得到较好的成活率的结论一致。处理 7 菌种萌发时间短, 萌发率高, 子实体平均产量也较高, 但是菌丝长速较慢; 处理 2 菌丝萌发时间长, 萌发率小, 菌丝长速慢, 但是子实体产量处于中等水平。而这 2 个处理都是选择  $4^{\circ}\text{C}$ -常温接种的解冻方式, 我们推测可能是由于在逐步升温的过程中菌丝体受到了损伤的原因, 但是在菌丝体发育到子实体的过程中菌种自身可以修复这一损伤。这与蔡令仪等<sup>[10]</sup>的液氮保藏

可能会损伤菌丝或抑制菌丝生长, 但经活化可修复菌丝或恢复其活性, 使其保持原有的农艺性状的结论相一致。处理 6 和处理 9 经液氮保藏后菌种在从菌丝体到子实体发育的过程中, 菌种逐步退化, 子实体不发育。这可能是因为这 2 种处理组合对菌种造成了不可修复的损伤。

另外, 正交试验分析表明, 对菌种萌发时间、萌发率、菌丝长速长势以及子实体的平均产量影响最小的条件处理组合不同, 各因素对菌种复活后的不同生长时期(菌丝体时期和子实体时期)的影响大小也不同。在菌丝体萌发成活阶段和子实体生长阶段, 各因素影响大小的先后顺序为保护剂 > 解冻方式 > 降温方式, 而在菌丝体生长阶段, 各因素影响大小的先后顺序为解冻方式 > 保护剂 > 降温方式。由此可见, 保护剂和解冻方式 2 个因素在菌种液氮保藏过程中起着比较重要的作用, 所以在菌种液氮保藏过程中要尤其注意这 2 个条件的选择。

综上所述, 同一菌种液氮超低温保藏过程中, 不同的处理方式对复活后的菌丝体和子实体生长状况的影响不同, 同一因素在菌种生长的不同时期对菌种的影响大小也不同。在平菇菌种的液氮保藏过程中, 尤其要注意保护剂和降温方式的选择, 结合成本和操作等因素综合考虑, 不加保护剂直接将菌种放入液氮,  $38\sim 40^{\circ}\text{C}$  水浴快速解冻的处理方式为最佳选择。在实际操作的过程中, 也不能只根据某一或某几个保藏条件对菌种保藏效果的影响判断该方法的优劣, 而应该根据生产和科研的需要进行综合分析, 选择恰当的处理方式对菌种进行液氮保藏。

## 参考文献:

- [1] 张金霞. 中国食用菌产业现状与发展趋势[J]. 食用菌学报, 2010(增刊): 15-18.
- [2] 边银丙. 食用菌菌种质量问题与菌种管理对策的商榷[J]. 中国食用菌, 1999, 18(4): 12-14.
- [3] 曾辉, 王泽生. 食用菌菌种保藏研究进展[J]. 中国食用菌, 1994(5): 5-6.
- [4] Morten C, Sanjeeb B, Shiva D, et al. Collection and use of wild edible fungi[M]. Nepal: Economic Botany by Springer New York, 2008: 12-23.
- [5] 顾金刚, 李世贵, 姜瑞波. 真菌保藏技术研究进展[J]. 菌物学报, 2007, 26(2): 316-320.
- [6] 杜敏华. 食用菌栽培学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [7] Mata G, Perez -merlo R. Spawn viability in edible mushrooms after freezing in liquid nitrogen without a cryoprotectant[J]. Cryobiology, 2003, 47: 14-20.
- [8] 黄河, 徐大雅. 液氮保存疫霉属菌种存活期检测[J]. 真菌学报, 1993, 12(1): 48-53.
- [9] Mata G, Rodríguez Estrada A E. Viability in spawn stocks of the white button mushroom, *Agaricus bisporus*, after freezing in liquid nitrogen without a cryoprotectant [J]. Journal of Agricultural Technology, 2005, 1(1): 153-162.
- [10] 蔡令仪, 谭琦, 曹晖, 等. 不同菌种保藏方法对香菇产量的影响[J]. 食用菌学报, 2003, 10(4): 52-54.