

低温保藏对壳囊孢属菌种活力的影响

焦淑萍, 岳朝阳, 张新平*, 张静文

(新疆林业科学院 森林生态研究所, 新疆 乌鲁木齐 830006)

摘要:为研究森林病原菌真菌的几种壳囊孢属(*Cytospora*)菌种,在低温保藏方法后的活力指数,对试管冰箱保藏和石蜡油冰箱保藏时间进行研究。结果表明:0~4℃冰箱试管保藏的时间为9 a左右、石蜡油封闭保藏的时间可达23 a左右,在第9年、第23年,石蜡油冰箱菌种活力指数分别为67.2、30.0。

关键词:壳囊孢属;保藏;活力指数

中图分类号:S763.15 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2014)06-0132-04

Effects of Low-temperature Preservation on Strains Activity of *Cytospora*

JIAO Shu-ping, YUE Zhao-yang, ZHANG Xin-ping*, ZHANG Jing-wen

(Xinjiang Academy of Forestry Science, Urumqi, Xinjiang 830006, China)

Abstract: Two methods were used to study the activity index after low-temperature preservation of several forest pathogenic fungus of *Cytospora*. The results showed that the duration of preservation by tube-refrigerator method (0—4℃) was about 9 years and paroline-refrigerator method (0—4℃) was about 23 years. For paroline-refrigerator method, the activity index of the cultures was 67.2 in the 9th year, and 30.0 in the 23rd year.

Key words: *Cytospora*; preservation; activity index

菌种的保藏方法很多,一般常用的保藏方法有:室温保存、低温保存、矿物油下保存、液氮超低温保藏法等^[1-2]。菌种保藏是以保持它的生活力和原有的形状稳定及不被杂菌污染的一项重要的基础工作。但菌种低温保藏时间因保藏方法的不同而产生较大的差异^[3]。1986年以来,对新疆各地区采集的木本植物壳囊孢属(*Cytospora*)进行分离培养^[3-4],在低温状态下,将分离的菌种采用不同方法保藏试验,以筛选适宜保藏方法,为壳囊孢属森林病原菌真菌特性研究及其病害防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

三角瓶、培养皿、试管、医用石蜡油(衡水圣康化工有限公司)、PDA培养基(琼脂、蔗糖、马铃薯)^[1]、

高压灭菌锅、超净工作台、冰箱(海尔 BCD-221TMCY,青岛海尔股份有限公司)、恒温箱(联申 FN202,西安高创电力设备有限公司)。

1.2 供试标本

对历年来采集的标本分别进行分离培养,从26个寄主植物上分离得到14种菌种,寄主植物及菌种鉴定参考不同文献^[3-9]确定(表1)。菌种保存时间1986年5月24日。

1.3 方法

1.3.1 斜面试管培养冰箱保藏 将洗涤干净的玻璃试管(18 mm×180 mm)加入5 mL PDA培养基,在103.4 kPa压力下灭菌30 min,后将试管培养基呈斜面冷却。在无菌操作下,将分离出来的纯菌种接入斜面培养基上,置恒温箱内培养,待菌丝长满后,置冰箱(0~4℃)内保藏。

收稿日期:2014-03-24 修回日期:2014-04-15

基金项目:新疆维吾尔自治区科技支撑重大专项(201130102-3)。

作者简介:焦淑萍,女,高级实验师,研究方向:有害生物与保护。E-mail:jsp6188@163.com

* 通信作者:张新平,男,研究员,研究方向:有害生物与保护。E-mail:zxp74@163.com

1.3.2 石蜡油封闭冰箱保藏 用高压灭菌锅将医用石蜡油在 121℃ 条件下灭菌 60 min,在无菌操作下,将石蜡油加入接种有生长优良的菌块(40 mm×40 mm)的含 PDA 培养基试管中,液面超过菌块 1 cm 为宜,放置在冰箱(0~4℃)内保藏^[1,3]。

表 1 供试菌种一览表

Table 1 Test strains		
菌种	寄主	采集地
冷杉壳囊孢(<i>Cytospora abietis</i>)	侧柏(<i>Platycladus orientalis</i>)、天山云杉(<i>Picea schrenkiana</i>)、西伯利亚落叶松(<i>Larix sibirica</i>)	阜康
金黄壳囊孢(<i>C. chrysosperma</i>)	白柳(<i>Salix alba</i>)、龙爪柳(<i>Salix matsudana</i>)、银灰杨(<i>Populus canescens</i>)、银白杨(<i>Populus alba</i>)、胡杨(<i>Populus euphratica</i>)、新疆杨(<i>Populus bolleana</i>)	乌鲁木齐
迂回壳囊孢(<i>C. mbiens</i>)	欧洲榆(<i>Ulmus laevis</i>)、白榆(<i>Ulmus pumila</i>)	乌鲁木齐
美小壳囊孢(<i>C. ulchella</i>)	榆(<i>Ulmus rubra</i>)	察布察尔
苹果壳囊孢(<i>C. mali</i>)	苹果(<i>Malus pumila</i>)	巩留
夏橡壳囊孢(<i>C. intermedia</i>)	夏橡(<i>Quercus robur</i>)	察布察尔
槐壳囊孢(<i>C. ophorae</i>)	国槐(<i>Sophora japonica</i>)	乌鲁木齐
角壳蕉囊孢(<i>C. orrida</i>)	天山桦(<i>Betula tianschanica</i>)	哈密
桦壳囊孢(<i>C. raxini</i>)	大叶白蜡(<i>Fraxinus americana</i>)、小叶白蜡(<i>F. sogdiana</i>)	昌吉
桑壳囊孢(<i>C. atra</i>)	白桑(<i>Morus alba</i>)	沙湾
胡桃壳囊孢(<i>C. juglandis</i>)	核桃(<i>Juglans regia</i>)	巩留
胡颓子壳囊孢(<i>C. elaeagni</i>)	沙枣(<i>Elaeagnus angustifolia</i>)	精河
<i>C. marchica</i>	火炬树(<i>Rhus typhina</i>)	乌鲁木齐
壳囊孢属(<i>Cytospora</i> sp.)	枫杨(<i>Pterocarya stenoptera</i>)、榆叶梅(<i>Prunus triloba</i>)、李(<i>Prunus salicina</i>)、梨(<i>Pyrus</i> spp.)	阿克苏

1.3.3 活力指数 对 2 种方法保藏的菌种分别在保存初期第 0 年(1986 年)、第 9 年(1995 年 4 月 12 日)、第 23 年(2009 年 4 月 20 日)进行活力检查。制作 PDA 培养基,高压灭菌后,在无菌操作下倒入灭菌后的培养皿(Φ70 mm)中,每皿约 20 mL,等凝固后,用接种针挑一小块保藏菌种接入培养基平板中央,每个处理重复 3 次,置于 22℃ 下无光照培养,48 h 后开始观测(表 2)。

表 2 菌种活力分级标准

Table 2 The grading standard of strain activity		
菌种成活程度	级别	代表值
死亡、不长	I	0
生长缓慢、菌丝稀疏	II	1
生长较缓慢、菌丝稀疏、质地薄	III	2
生长快、菌丝旺盛、质地厚(有孢子角产生)	IV	3

采用活力指数作为菌种活力强弱的判断指标,活力指数愈大,菌种活力愈强,反之则菌种活力愈弱。
菌种活力指数/% = $\sum(\text{级别菌种数} \times \text{级别代表值}) \times 100 / (\text{菌种总数} \times \text{最高级别代表值})$ (1)

2 结果与分析

2.1 2 种保藏方法保藏效果比较

试管培养菌种在冰箱保藏 9 a 后,活力与初期相比有明显下降,活力指数仅 15.6,说明试管培养菌种冰箱保藏时间可为 9 a 左右,随时间延长,被藏

菌种的培养基已基本干缩,无法再做活力测定。石蜡油封闭冰箱保藏的供试菌种在第 9 年的活力指数为 67.2,菌种的活力下降较为缓慢、均匀。2009 年 4 月 20 日对石蜡油封闭冰箱保藏的菌种做活力测定,供试菌种平均活力指数为 30.0,有些菌种如冷杉壳囊孢、金黄壳囊孢、苹果壳囊孢、夏橡壳囊孢、桑壳囊孢、核桃壳囊孢、胡颓子壳囊孢、*C. marchica*、*Cytospora* sp. 的存活时间已达 23 a,而且仍具有较强活力(表 3)。

2.2 石蜡油封闭菌种冰箱保藏时间比较

石蜡油封闭菌种冰箱保藏第 9 年仍有较高的活力,平均活力指数为 67.2。第 23 年,平均活力指数仍为 30.0。3 次重复活力检测差异显著(表 4)。

3 结论与讨论

1995 年和 2009 年 2 次菌种保藏试验检测结果表明,壳囊孢属菌种保藏时间越长,2 种方法之间菌种活力的差异越大。试管培养冰箱保藏菌种可保存时间为 9 a 左右,活力指数为 15.6。石蜡油封闭冰箱保藏的菌种时间在第 9 年时,活力指数为 67.2。在第 23 年,石蜡油封闭供试菌种平均活力指数为 30.0,且仍具有较强活力,有些菌种的存活时间可达 23 a 以上,是一种较为简单有效的菌种保藏方法。

供试 2 种保存方法操作简单、简便易行,不同点包括试管培养冰箱保藏菌种受容器的限制,且有一

定的代谢能力,故保藏时间短。石蜡油封闭试管培养菌种冰箱保藏由于培养基还未见干缩,故保存时间长。可见影响菌种活力的主要因素是保藏条件,菌种活力随着保存时间的延长而逐渐减弱。就目前

而言,国内尚未见有石蜡油封闭试管培养菌种冰箱保藏壳囊孢属菌种 23 a 以上的报道,因此,石蜡油封闭试管培养菌种冰箱保藏不失为该菌种长期保藏的良好方法。

表 3 2009 年石蜡油冰箱保藏菌种活力测定

Table 3 Strains activity test by paroline-refrigerator method in 2009

序号	菌种	寄主	重复					
			级别	代表值	级别	代表值	级别	代表值
1	冷杉壳囊孢(<i>Cytospora abietis</i>)	云杉	I	0	Ⅲ	2	Ⅲ	2
2	冷杉壳囊孢(<i>C. abietis</i>)	侧柏	Ⅲ	2	Ⅲ	2	Ⅲ	2
3	金黄壳囊孢(<i>C. chrysosperma</i>)	白柳	I	0	I	0	I	0
4	金黄壳囊孢(<i>C. chrysosperma</i>)	龙爪柳	I	0	I	0	I	0
5	金黄壳囊孢(<i>C. chrysosperma</i>)	银白杨	I	0	I	0	I	0
6	金黄壳囊孢(<i>C. chrysosperma</i>)	胡杨	Ⅳ	3	Ⅳ	3	Ⅳ	3
7	金黄壳囊孢(<i>C. chrysosperma</i>)	新疆杨	I	0	Ⅱ	1	Ⅱ	1
8	迂回壳囊孢(<i>C. ambiens</i>)	大叶榆	I	0	I	0	I	0
9	迂回壳囊孢(<i>C. ambiens</i>)	白榆	I	0	I	0	I	0
10	美小壳囊孢(<i>C. pulchella</i>)	钻天榆	I	0	I	0	I	0
11	苹果壳囊孢(<i>C. mali</i>)	苹果	Ⅱ	1	Ⅱ	1	Ⅱ	1
12	夏橡壳囊孢(<i>C. intermedia</i>)	夏橡	Ⅲ	2	Ⅲ	2	Ⅲ	2
13	槐壳囊孢(<i>C. sophorae</i>)	国槐	I	0	I	0	I	0
14	角壳蕉孢属(<i>C. horrida</i>)	天山桦	I	0	I	0	I	0
15	枞壳囊孢(<i>C. faxini</i>)	大叶白蜡	I	0	I	0	I	0
16	桑壳囊孢(<i>C. atra</i>)	白桑	Ⅲ	2	Ⅲ	2	Ⅲ	2
17	胡桃壳囊孢(<i>C. juglandis</i>)	核桃	Ⅲ	2	Ⅲ	2	Ⅲ	2
18	胡颓子壳囊孢(<i>C. elaeagni</i>)	沙枣	Ⅲ	2	Ⅲ	2	Ⅲ	2
19	<i>C. marchica</i>	火炬树	I	0	I	0	I	0
20	<i>C. sp.</i>	榆叶梅	Ⅲ	2	Ⅲ	2	Ⅲ	2
活力指数			26.67		31.67		31.67	
平均活力指数			30					

表 4 石蜡油封闭冰箱保藏菌种活力指数

Table 4 The activity index of the strains

年份/年	重复 I	重复 II	重复 III	平均	LSD($\alpha=0.05$)
1986(ck)	100.00	100.00	100.00	100.00	a
1995	75.80	66.70	59.10	67.20	b
2009	26.67	31.67	31.67	30.00	c

虽然菌种保藏的方法很多,但无论采用何种保藏方法,应尽可能保持其菌种的原有性状和活力的稳定,确保菌种不死亡、不变异、不被污染,以达到便于研究、交换和使用等诸方面的需要。常用的室温保存菌种方法,容易干燥是丧失生活力的最主要的原因之一^[1]。用液氮超低温保藏菌种已被公认为保持菌种特性不变和存活力持久最为理想的方法,被许多菌种保藏中心所采用^[10-11]。疫霉属菌种在液氮中保存 5~6 a 后检测证明有 68.9% 的菌种存活下来^[12-16],说明在液氮中保存也有存菌种活力下降的现象^[17]。

参考文献:

[1] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,2004.
[2] 霍红. 蜜环菌种保藏技术要点[J]. 食用菌,2003,25(6):42.

[3] 焦淑萍,岳朝阳,张新平. 森林病原真菌菌种长期保藏方法的研究[J]. 西北林学院学报,1997,12(1):90-92.
JIAO S P, YUE Z Y, ZHANG X P, *et al.* A study on the ways of culture preservation of forest pathogenic fungi[J]. Journal of Northwest Forestry University,1997,12(1):90-92. (in Chinese)
[4] 刘振坤. 林木病害防治[M]. 乌鲁木齐:新疆人民出版社,1988.
[5] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979.
[6] 国家林业局. GB/T15161-1994:林业资源分类与代码 林木病害[S]. 北京:中国标准出版社,1994.
[7] 邓叔群. 中国的真菌[M]. 北京,科学出版社,1964.
[8] 戴芳澜. 中国真菌总汇[M]. 北京,科学出版社,1979.
[9] 岳朝阳,张新平,马沛沛,等. 新疆杨树不同种、品种(无性系)造林初期对腐烂病的抗性研究[J]. 西北林学院学报,2011,26(1):113-118.

YUE Z Y, ZHANG X P, MA P P, *et al.* Resistance of different poplars in the initial afforestation stages on *Cytospora chrysosperma* in Xinjiang[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2011, 26(1):113-118. (in Chinese)

[10] DAHMEN H, STAUB T, SCHWINN F J. Technique for longterm preservation of phytopathogenic fungi in liquid nitrogen[J]. Phytopathology, 1983, 73:241-246.

[11] HWANG S W. Long-term preservation of fungus cultures with liquid nitrogen refrigeration[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1966, 14(5):784-789.

[12] 任俊琦, 贺稚非, 赵季, 等. 接种发酵泡菜及其低温保藏微生物变化规律[J]. 食品与发酵科技, 2009, 45(5):38-41.

REN J Q, HE Z F, ZHAO J, *et al.* Inoculated fermentation of kimchi and its low-temperature variation of microorganisms[J]. Food and Fermentation Technology, 2009, 45(5):38-41. (in Chinese)

[13] 高永强. 黄酒酵母菌种和米曲霉菌种的保藏[J]. 山东食品发酵, 2011(4):43-44.

[14] 李育岳, 汪麟. 草菇厚垣孢子低温保藏试验[J]. 微生物学研究与应用, 1989(1):9-11.

[15] 杨淑玺. 食用菌菌种的简易保藏[J]. 农村百事通, 2008(14):15.

[16] 范立宝. 食用菌菌种的简易保藏法[J]. 吉林农业, 2004(9):31.

[17] 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.

HUANG H, XU D Y. Determination of the viability of *Phytophthora* cultures stored in liquid nitrogen[J]. Aeta Mycologlca Slnica, 1993, 12(1):48-53. (in Chinese)

(上接第 131 页)

[15] 王杰, 张名位, 刘兴华. 苦瓜提取物抑菌作用及其稳定性研究[J]. 食品科技, 2004(4):71-74.

WANG J, ZHANG M W, LIU X H. Study on antimicrobial actions and stability of *Momordica charantia* extracts[J]. Food Science and Technology, 2004(4):71-74. (in Chinese)

[16] 王博, 徐龙光, 余仲东, 等. 刀孢轮枝菌产红色素条件及稳定性研究[J]. 西北林学院学报, 2013, 28(6):112-116.

WANG B, XU L G, YU Z D, *et al.* Study of producing condition and the stability of a red pigment from *Lecanicillium psalliotae* Zare & W. Gams[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2013, 28(6):112-116. (in Chinese)

[17] 向志楠, 宁正祥. 植物性天然防腐剂及其在食品中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2004, 6(3):79-83.

XIANG Z N, NING Z X. Application of natural preservation[J]. China Food Addictives, 2004, 6(3):79-83. (in Chinese)

[18] 李丙菊. 食品和化妆品用柿子提取物或收敛物质反复[J]. 林产化工通讯, 2000, 34(1):46-47.

LI B J. Extractive from persimmon or material of convergence in food and cosmetics[J]. Forest Chemical Communication, 2000, 34(1):46-47. (in Chinese)

[19] 邢宇, 郭丽娜, 孙伟. 微生物源天然防腐剂在食品上的应用研究[J]. 生物技术, 2012, 22(6):93-96.

XING Y, GUO L N, SUN W. Research of natural microor-ganism sources preservation application on food[J]. Biotechnology, 2012, 22(6):93-96. (in Chinese)