

真菌菌种保藏方法及资源现状

主讲人：孙炳达

2024-02-28



报告内容

- **CGMCC真菌资源状况**
- **CGMCC主要真菌菌种保藏方法**
- **改善服务面临的挑战**



CGMCC真菌资源 — 早期菌种

来源单位	数量 (株)	保藏日期	菌株种类
黄海化学工业研究社	420	1952-1-1至1953-11-12	青霉、曲霉、毛霉、红曲、酿酒酵母等
东北科学研究所大连分所	500	1952-1-1至1953-11-12	酵母类, 毛霉类, 红曲, 青霉, 曲霉
兰州工业试验所	60	1952-1-1	曲霉、毛霉、酿酒酵母等
苏联援建石家庄药厂	16	1957-9-12	链霉菌 (14) 、产黄青霉 (2)
茅台酒厂	13	1959-1-1	酿酒酵母、伊萨酵母、毕赤酵母等

早期社会主义国家苏联、捷克、波兰、东德交流菌种

微生物学先辈从美国、日本、台湾带回的菌种

日本侵略时期修建工厂 (济南酒精厂) 枯草、根霉、酿酒酵母菌种

.....



CGMCC真菌资源 — 类别

霉菌类



丝状真菌



担子菌、专利菌种



酵母类



- ◆ 服务单位：>250家；
- ◆ 服务课题组：>400个；
- ◆ 模式菌株：400株/年

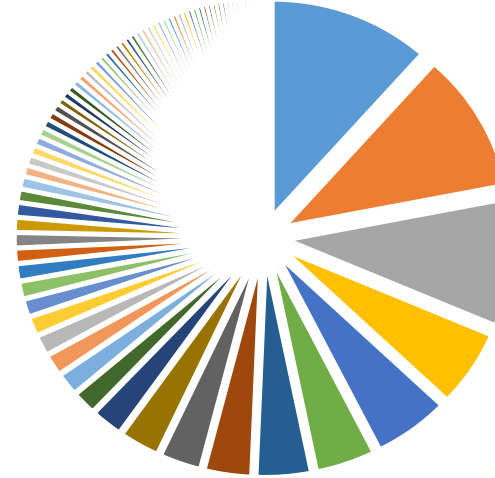
种类	属	物种	菌株
霉菌、丝状真菌	910	3832	26175
酵母类	249	1090	7113
担子菌	200	466	2014



CGMCC真菌资源 — 现状

Aspergillus	2215
Penicillium	2001
Saccharomyces	1825
Fusarium	1093
Rhizopus	1044
Candida	815
Trichoderma	745
Pestalotiopsis	640
Mucor	563
Chaetomium	546
Alternaria	429
Monascus	326
Cunninghamella	309
Talaromyces	292
Pleurotus	277
Trametes	259
Sporobolomyces	238
Pichia	233
Colletotrichum	229
Rhodotorula	201
Lentinula	200
Cryptococcus	196
Ganoderma	192
Lasioidiplodia	175
Pseudocercospora	168
Diaporthe	143
Neofusicoccum	141
Cladosporium	132
Geotrichum	130
Paecilomyces	124
Curvularia	119
Absidia	115
Yarrowia	114
Aschersonia	100
Mortierella	100
Wickerhamomyces	99

图表标题



- | | | | | |
|-------------------|------------------|---------------------|------------------|-----------------------|
| ■ Aspergillus | ■ Penicillium | ■ Saccharomyces | ■ Fusarium | ■ Rhizopus |
| ■ Candida | ■ Trichoderma | ■ Pestalotiopsis | ■ Mucor | ■ Chaetomium |
| ■ Alternaria | ■ Monascus | ■ Cunninghamella | ■ Talaromyces | ■ Pleurotus |
| ■ Trametes | ■ Sporobolomyces | ■ Pichia | ■ Colletotrichum | ■ Rhodotorula |
| ■ Lentinula | ■ Cryptococcus | ■ Ganoderma | ■ Lasiodiplodia | ■ Pseudocercospora |
| ■ Diaporthe | ■ Neofusicoccum | ■ Cladosporium | ■ Geotrichum | ■ Paecilomyces |
| ■ Curvularia | ■ Absidia | ■ Yarrowia | ■ Aschersonia | ■ Mortierella |
| ■ Wickerhamomyces | ■ Nigrospora | ■ Acremonium | ■ Hirsutella | ■ Dioszegia |
| ■ Isaria | ■ Cyathus | ■ Zygosaccharomyces | ■ Phomopsis | ■ Vishniacozyma |
| ■ Debaryomyces | ■ Humicola | ■ Umbelopsis | ■ Pezicula | ■ Agaricus |
| ■ Xylaria | ■ Filobasidium | ■ Metarhizium | ■ Metschnikowia | ■ Pythium |
| ■ Hypoxylon | ■ Actinomyces | ■ Phyllosticta | ■ Polyporales | ■ Schizosaccharomyces |
| ■ Neurospora | ■ Beauveria | ■ Moelleriella | ■ Flammulina | ■ Bipolaris |
| ■ Botryosphaeria | ■ Stachybotrys | ■ Bullera | ■ Derxomyces | ■ Botrytis |
| ■ Meyerozyma | ■ x | ■ Phoma | ■ Issatchenkia | ■ Sporormiella |

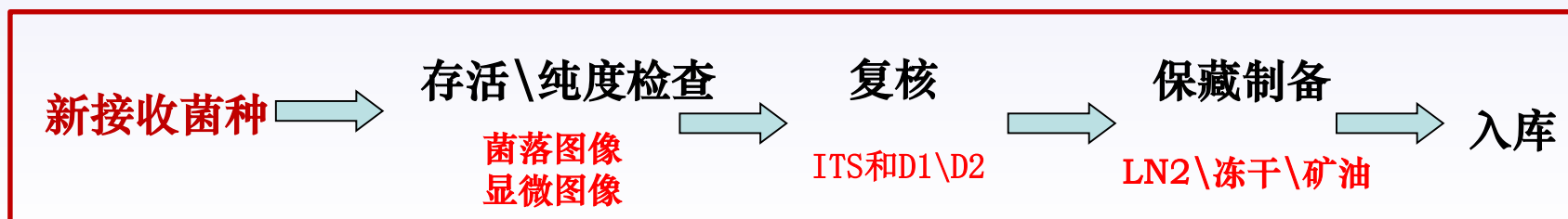


CGMCC主要真菌菌种保藏方法

- 液体石蜡保藏法
- 真空冷冻干燥法
- 超低温冻结保藏法



菌种复核保藏流程



产生数据	菌种数据	复核数据	制备数据	存放数据
电子文档数据库	菌种数据库	序列数据库	图像数据库	实验管理数据库
纸质档案	菌种保藏表	复核制备表		序列

- 公开寄存：原则上不接收缺少分离源数据、序列数据的菌种
- 寄存人的座机、手机、电子邮件等联系方式至少提供一项



液体石蜡保藏法

液体石蜡保藏法是一种变相的传代培养方法，能够适当延长保藏时间，它是在斜面培养物和穿刺培养物上面覆盖灭菌的液体石蜡，一方面可保持水分，另一方面可阻止氧气进入，以减弱代谢作用。

- ◆ 长期保存存活率低；
- ◆ 占用空间大；
- ◆ 易污染；
- ◆ 液体石蜡易燃；



液体石蜡保藏法

- (1) 将液体石蜡分装于试管内，塞上棉塞，并用牛皮纸包扎，121°C & 30分钟灭菌，隔夜重复灭菌1次，然后在40°C温箱中蒸发水汽备用。
- (2) 将需要保藏的菌种，在适宜的斜面培养基培养，得到健壮的菌体。
- (3) 用灭菌吸管吸取灭菌的液体石蜡，注入已长好菌的斜面上，液面高出斜面顶端1cm,使菌种与空气隔绝。
- (4) 将试管直立，置低温或室温下保存（4 - 15°C）。



真空冷冻干燥保藏法

原理：菌体冷冻后在减压下利用升华现象除去水分，使细胞的生理活动停止；去除氧气后密封，达到长期维持生命状态的目的。

该方法为菌种保藏方法中最有效的方法之一，适用于大多数产孢子真菌。

该方法适用于菌种长期保存，一般可保存数年至十余年，但设备和操作都比较复杂。

常用的保护剂有：10%脱脂乳、12%蔗糖等。



冷冻干燥保藏法（步骤）

准备安瓿管：安瓿管宜采用中性玻璃制造，事先在2% HCl中浸泡过夜，自来水冲洗3次后，蒸馏水刷净，干燥，插标签，塞棉塞，121.3℃灭菌30分钟备用。

准备10%脱脂牛奶溶液：115℃灭菌15分钟，在37℃温箱中培养过夜，观察灭菌效果。

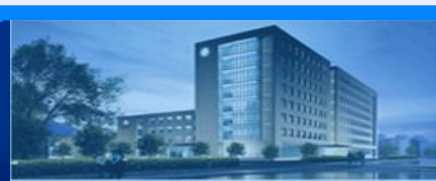
准备菌种：确保菌种纯度、健壮；孢子大量形成。

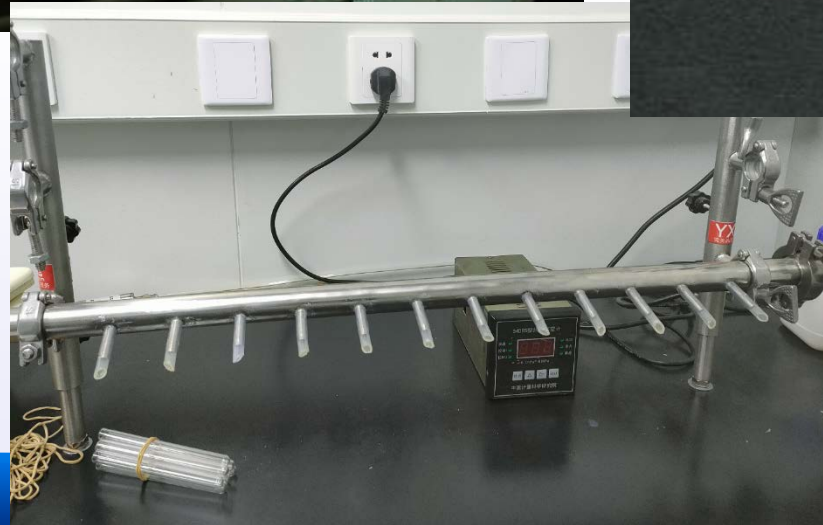
制备菌悬液与分装：将4ml左右脱脂牛乳溶液加入斜面试管中，用挑针在菌落上反复刮擦，使菌丝体片断和孢子脱落，制成菌悬液，每支安瓿管分装0.2 ml。

冻结：将分装好的安瓿管放低温冰箱的冷冻格中冻结。

干燥：安瓿管放入冷冻槽中的干燥瓶内。抽气一般若在30分钟内能达到93.3Pa（0.7mmHg）真空度时，则干燥物不致熔化，以后再继续抽气，几小时内，肉眼可观察到被干燥物已趋干燥，一般抽到真空度26.7Pa（0.2mmHg），保持压力6-8小时即可。

封口：干燥完成后，先用火焰烧软安瓿管中部，拉伸成细颈状；然后接在封口用的L形连通管抽气，可达到90%真空状态时，以火焰在安瓿管细颈中央进行熔封。封口以后，保存于冰箱或室温暗处。





液氮超低温冻结保藏法

将菌种悬液在控制速度冻结后，贮藏在液氮超低温储藏罐中。该保藏方法操作简单，要求具备液氮存储设备，并持续供应液氮。

该保藏方法适宜于大多数真菌种类（产孢和不产孢），而且可以保证性状不变异。



液氮超低温冻结保藏法

保护剂：易溶、对细胞代谢过程无影响、对微生物和生物酶无毒害作用

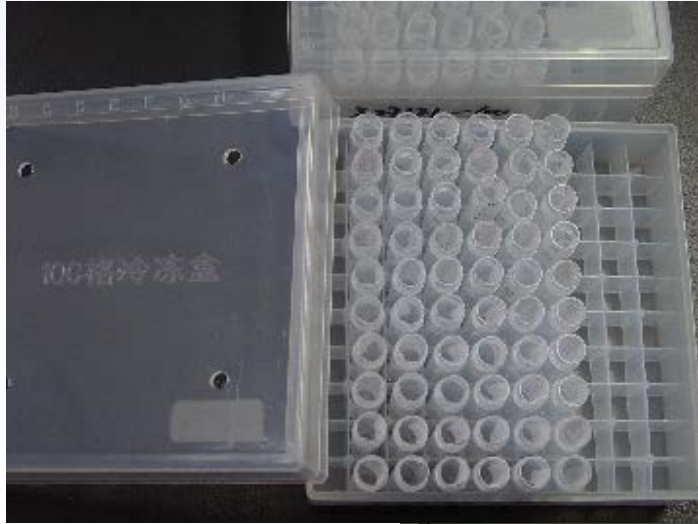
10%甘油溶液、10%二甲亚砜溶液：自由渗透细胞膜，在冻结过程中平衡胞内外渗透压，维持细胞构型。

也可使用葡萄糖、蔗糖、乳糖、甘露醇、山梨醇、PVP等。

恢复培养：将冻存管取出，**立即放入38-40℃的水浴中**进行快速解冻，直到全部融化。菌体移入适宜的培养基上培养。



液氮超低温冻结保藏法



常用菌种保藏方法比较

定期移植法

3-6个月

简单经济，
随时取用，
不需特殊设备

易变异、易
退化，繁琐、
费时

液体石蜡保藏法

2-10年

简便易行，
对难于冷冻
干燥的真菌
更有效

不适用于部
分种类的微
生物，需防
火、防污染

冷冻干燥法

5-10年

长期保藏，
不易污染，
存活率高，
便于运输

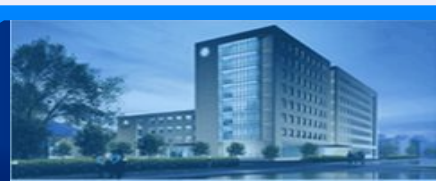
不适用于部
分种类微生
物，操作复
杂

液氮超低温冻结法

长期

适用范围最
广，方法简
便，菌种不
易退化

设备和管理
费用高，取
用不便



改善服务面临的挑战

□ 低等真菌存活率低；

腐霉菌Pythium、疫霉Phytophthora、裂殖壶菌Schizochytrium等

□ 栽培担子菌保存后退化问题；

□ 库存菌种的名称复核；

□ 菌种的宽进与严出；

□ 拓展“非公开”保存服务；

□



谢谢!

请大家批评指正!

