

# 湖南省农业技术规程

HNZ230—2021

---

## 食用菌菌种保藏方法

Preservation methods for culture collection of edible mushroom

湖南省农业农村厅制定

发布日期：2021年5月25日

## 目 次

发布日期：2021年5月25日.....	1
目 次.....	2
1 范围.....	3
2 术语和定义.....	3
3 基本原则.....	3
4 技术要求.....	3
5 方法.....	4
5.1 定期移植保藏法.....	4
5.2 -86℃低温保藏法.....	4
5.3 液氮超低温保藏法.....	4
6 引用和参考资料.....	4
附录 A.....	5
附录 B.....	6
附录 C.....	7
附录 D.....	8
附录 E.....	10

# 食用菌菌种保藏方法

## 1 范围

本文件规定了食用菌菌种保藏的基本原则和技术要求。  
本文件适用于湖南省食用菌菌种保藏。

## 2 术语和定义

GB/T 12728 界定的术语和定义适用于本文件。

## 3 基本原则

菌种的保存应遵循以下原则：

- a 应针对菌种的生物学性状选择适宜方法进行保藏。
- b 应使保藏的菌种不染杂菌，并保持其固有的活性和活力，使退化和死亡降低到最低限度。
- c 食用菌菌种保藏不能对人类、动物和周边环境等造成污染和潜在危害。
- d 同一菌种应同时用 2 种以上保藏方法进行保藏。

## 4 技术要求

菌种的保存有以下技术要求：

- a 食用菌菌种保藏所使用的器皿应干净、透明、无破损、无裂痕、无污染。
- b 根据菌种特性选择适宜保藏培养基。
- c 保藏过程中应无菌操作。
- d 移植过程应对菌株编号及培养基分别进行核对。
- e 培养至状态最好时或稳定期进行保藏。
- f 移植培养后，应与原保藏菌株的培养特性和菌株登记信息对照检查，无误后再存放。
- g 保藏期间，应定期检查菌种存放的设施设备的温度和湿度，菌株有无污染，盖子有无霉变，变形，如发现异常应重新移植培养并进行替换。
- h 保藏应建立和保存其所有菌种的收集、储藏、保存和确认试验的记录（见附录 A）。  
管理记录中还应包括（但不限于）以下内容：从原始菌种传代到工作菌种的代数，菌种生长的培养基及活化条件，菌种生存条件。

## 5 方法

### 5.1 定期移植保藏法

见附录 B。

### 5.2 -86℃低温保藏法

见附录 C。

### 5.3 液氮超低温保藏法

见附录 D。

## 6 引用和参考资料

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改）适用于本文件。

GB/T 4789.28 食品卫生微生物学检验

GB/T 12728 食用菌术语

GB/T 19489 实验室 生物安全通用要求

SN/T 1538.1 培养基制备指南

SN/T 2632 微生物菌种常规保藏技术规程

SN/T 2660 食品微生物实验室菌种保藏方法

WS 233 微生物和生物医学实验室生物安全通用准则

编写单位：湖南省食用菌研究所

编写人员：黄晓辉 王小艳 冯立国 姜性坚 徐宁 吴芳 王春晖 彭运祥

## 附录 A

表 A 食用菌菌种资源共性描述表  
(规范性附录)

平台资源号		菌株保藏编号	
中文名称		属名	
拉丁名		其他保藏中心编号	
标记信息			
主要用途	1 分类；2 研究；3 教学；4 分析检测；5 生产；6 其他		
特征特性			
基本信息			
资源归类编码		模式菌株	1 模式菌株；2 非模式菌株
分离人		分离时间	
鉴定人所在单位		收藏时间	
原产国或地区		采集地区	
采集地生境		培养基	
培养条件		培养时间	
来源历史		分类地位	
机构名称	机构名称缩写		
资源保藏类型	1 培养物；2 二元培养物；3 基因；4 其他		
保存方法	1 液氮超低温冻结法；2 -86 °C 冰箱冻结法；3 定期移植保藏法		
共享方式	1 公益性共享；2 公益性借用共享；3 合作研究共享；4 知识产权性交易共享； 5 资源纯交易性共享；6 资源租赁性共享；7 资源纯交换性共享；8 收藏地共享； 9 行政许可性共享		
提供形式	1 斜面培养物；2 冻干物；3 冻结物；4 其他		
获取途径	1 邮件；2 现场获取；3 网上订购；4 其他		
联系方式			

## 附录 B

### 4℃保藏法 (规范性附录)

#### B.1 设备与材料

B.1.1 高压灭菌器。

B.1.2 15mm\*124mm 具帽带胶垫玻璃试管。

B.1.3 培养箱：18℃~28℃。

B.1.4 冷藏冰箱：4℃~6℃。

#### B.2 培养基制备

按 GB/T4789.28 和 SN/T1538.1 执行。

#### B.3 菌种的准备

在玻璃试管中分装 4ml 培养基，121℃下高压灭菌 25 min~30 min，冷却到 60℃取出摆斜面，以无菌操作将菌种纯培养物挖块接种到培养基斜面上，将接种好的培养基放入培养箱中于最适培养条件下培养至成熟期，并进行纯度检查。

#### B.4 保藏

将培养好的菌种贴好标签，同一品种扎成一捆，置于 4℃~6℃，相对湿度为 50%~70%恒温冰箱中避光保存，草菇等易低温自溶物种在 18℃保存。

#### B.5 保藏周期

常规 3-4 月移植一次，参照本方法执行可每 12 个月移植一次，草菇每 6 个月移植一次。

#### B.6 注意事项

- a) 菌株反复传代会发生变异，应在定期（转接 20-30 次后）进行出菇特性试验检查；
- b) 斜面菌种应保藏相继三代的培养物以便对照，防止因意外和污染的损失。

## 附录 C

-86℃低温保藏法  
(规范性附录)

## C.1 设备与材料

## C.1.1 高压灭菌器。

## C.1.2 超低温冰箱：-86℃。

## C.1.3 10ml 冻存管，冻存盒、程序降温盒。

## C.2 准备工作

## C.2.1 冻存管的准备

塑料冻存管用蒸馏水浸泡，冲洗干净，烘干。

## C.2.2 标签的准备

塑料冻存管的标记一般为管外标记，即用专用非水溶性记号笔标记菌种编号、保藏日期。

## C.2.3 保护剂的准备

一般常用甘油或二甲基亚砷作保护剂。将甘油配成 10% 的溶液，121℃ 灭菌 30min 备用；或将二甲基亚砷配成 5% 或 10% 的溶液，过滤灭菌，备用。

## C.3 培养基制备

按 GB/T4789.28 和 SN/T1538.1 执行。

## C.4 菌种的准备

在冻存管中分装 3ml 培养基，121℃ 下高压灭菌 25 min~30 min，冷却到 60℃ 取出摆斜面，按无菌操作要求将菌种纯培养物挖块接种到培养基斜面上，将接种好的培养基放入培养箱中在最适培养条件下培养至成熟期。

## C.5 加入保护剂

在无菌条件下加 1.5ml 保护剂，封口。

## C.6 预冻

加入保护剂后，将冻存管放入程序降温盒进行预冻，冷冻速度一般控制在每分钟下降 1℃，冻结到 -35℃~-40℃ 即可。

## C.6 保藏

将预冻好的冻存管放入冻存盒内，做好标记，置于 -86℃ 冰箱内保藏。

## C.7 保藏周期

一般 3 年~5 年。

## C.8 复苏方法

从 -86℃ 冰箱中取出冻存管，立即放置在 38℃~40℃ 温水中快速复苏并适当摇动，直到内部结冰全部溶解为止，一般需 50s~100s。在无菌条件下开启塑料冻存管，将管内保藏物接种至合适的培养基上进行培养。

## 附录 D

### 液氮超低温保藏法 (规范性附录)

#### D.1 设备与材料

D.1.1 高压灭菌器。

D.1.2 液氮罐。

D.1.3 10ml 冻存管、冻存盒、程序降温盒。

#### D.2 准备工作

##### D.2.1 冻存管的准备

塑料冻存管用蒸馏水浸泡，冲洗干净，烘干。

##### D.2.2 标签的准备

塑料冻存管的标记一般为管外标记，即用专用非水溶性记号笔标记菌种编号、保藏日期。

##### D.2.3 保护剂的准备

一般常用甘油或二甲基亚砷作保护剂。将甘油配成 10% 的溶液，121℃ 灭菌 30min 备用；或将二甲基亚砷配成 5% 或 10% 的溶液，过滤灭菌，备用。

##### D.2.4 培养基制备

按 GB/T4789.28 和 SN/T1538.1 执行。

##### D.2.5 菌种的准备

在冻存管中分装 3ml 培养基，121℃ 下 高压灭菌 25 min~30 min，冷却到 60℃ 取出摆斜面，以无菌操作将菌种纯培养物挖块接种到培养基斜面上，将接种好的培养基放入培养箱中在最适培养条件下培养至成熟期。

#### D.3 加入保护剂

在无菌条件下加 1.5ml 保护剂，封口。

#### D.4 预冻

加入保护剂后，将冻存管放入程序降温盒进行预冻，冷冻速度一般控制在每分钟下降 1℃，冻结到 -35℃~-40℃ 即可。

#### D.5 保藏

将预冻好的塑料冻存管置于冻存盒内，做好标记，放入液氮罐中保藏。一般气相温度为 -150℃，液相温度为 -196℃。

#### D.6 保藏周期

一般 10 年以上。

#### D.7 复苏方法

从液氮中取出冻存管，立即放置在 38℃~40℃ 温水中快速复苏并适当摇动，直到内部结冰全部溶解为止，一般需 50 s~100 s。在无菌条件下开启塑料冻存管，将管内保藏物接种至合适培养基上进行培养。

#### D.8 液氮保藏应注意事项

注意事项包括：

- a) 操作时应注意安全，戴面罩及皮手套，以防冻伤；
- b) 塑料冻存管保藏要拧紧螺帽；
- c) 运送液氮时要用专用特制的容器，绝不可用一般密闭容器存放或运输液氮，切勿使用保温瓶存放液氮；
- d) 存放液氮容器的场所要注意通风，防止过量氮气使人窒息；
- e) 注意观察液氮容器中液氮的残存量，定期填充液氮。

## 附录 E

### 常用培养基配方及制作 (规范性附录)

#### E.1 PDA 培养基

E.1.1 配方: 马铃薯(去皮切片) 200g, 葡萄糖 20g, 琼脂 18g, 蒸馏水 1000mL, PH 自然。

E.1.2 制法: 将马铃薯去皮切片, 加 1000 mL 蒸馏水煮沸 30min。过滤, 滤液补加蒸馏水至 1 000 mL。加入葡萄糖和琼脂, 充分搅拌至完全溶化后分装, 121℃高压灭菌 30min。

#### E.2 桑枝粉培养基

E.2.1 配方: 桑枝粉细粉 75%, 麦麸 24%, 蔗糖 1%, 水适量。

E.2.2 制法: 将桑枝粉、麦麸充分混匀后, 加适量水再次混匀, 测含水量、以手捏时指间有水珠为宜, 不足补水再次混匀, 分装后, 121℃高压灭菌 120min。

#### E.3 综合马铃薯培养基

E.3.1 配方: 马铃薯(去皮切片) 200g, 葡萄糖 20g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5g, Vitainib B<sub>1</sub> 微量, 琼脂 18g, 蒸馏水 1000ml, PH6。

E.3.2 制法: 将马铃薯去皮切片, 加 1 000 mL 蒸馏水煮沸 15min。用 4 层纱布过滤, 补加蒸馏水至 1 000 mL。加入葡萄糖、牛肉膏、酵母粉和琼脂, 加热溶化, 分装后, 121℃高压灭菌 30min。

#### E.4 孢子形成培养基

E.4.1 配方: 酵母膏 1.0g, 牛肉膏 1.0g, 胰蛋白胨 2.0g, 葡萄糖 10.0g,  $\text{FeSO}_4$  微量, 琼脂 18.0g 蒸馏水 1000mL, pH 7.2。

E.4.2 制法: 将配方中除琼脂外全部溶解, 加蒸馏水至 1000mL, 过滤, 将琼脂粉溶在滤液中, 小火煮至琼脂溶化, 并再次定容至 1000mL, 分装后, 121℃高压灭菌 30min。

#### E.5

注意事项:

E.5.1 试管及冻存管中培养基的分装量按照容器体积的 2/5~1/2 分装。

E.5.2 灭菌完成后, 待降温至 60℃左右取出摆斜面, 斜面长度不得超过试管管长的一半。

E.5.3 制备好的斜面放入 30℃培养箱中培养 3 天做无菌筛查。