

멸균 증류수를 사용한 담자균류 버섯 균주의 보존

이동훈 · 김창진¹ · 신광수*

대전대학교 이과대학 미생물학과, ¹한국과학기술연구원 생명공학연구소

Preservation of Mushroom Cultures in Sterile Distilled Water

Dong-Hoon Lee, Chang-Jin Kim¹ and Kwang-Soo Shin*

Department of Microbiology, College of Sciences, Taejon University, Taejon 300-716

¹Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejon 305-600, Korea

ABSTRACT: Optimal conditions for the preservation of mushroom cultures in sterile distilled water were investigated. Mycelial disks from 12 mushroom cultures were preserved at room temperature, 5°C, -20°C, and -75°C using sterile water and 6 cryoprotectants for 12 months. The maximal viability of mycelial disks was observed at room temperature and 5°C with the value of 91.7%. At -75°C, the viability was highest in polyethylene glycol (PEG) and lowest in 10% dimethyl sulfoxide (DMSO). The average mycelial growth was highest for disks preserved at -75°C in PEG. PEG was the most suitable for the preservation at -75°C, although this chemical has rarely been used as a cryoprotectant in fungal culture preservation. The laccase isozyme patterns of the preserved isolate of *H. ferrugineum* were not changed during preservation at 5°C in sterile distilled water as compared to that of slant culture.

KEYWORDS: Preservation of mushroom cultures, Sterile water, Cryoprotectants

실험실이나 균주보관센터, 종균센터 등에서 미생물을 장기간 동안 안정적인 상태로 유지, 보존하는 방법은 매우 중요한 작업이다. 전 세계적으로 생물종 다양성 보전에 심혈을 기울이고 있는 현실을 감안할 때, 경제적으로 유용한 미생물이나, 각종 생리활성을 지닌 미생물의 경우 그 중요성은 더욱 가중된다. 그러나, 이와 관련한 대부분의 연구가 세균이나 효모 등 단세포 생물들을 대상으로 진행되었으며, 고등 균류인 버섯류의 보존에 대한 연구는 그리 많지 않은 실정이다. 특히, 대부분의 고등 균류는 포자 형성이 잘되지 않아 균사 상태로 보존을 한다. 그러나, 균사는 계대배양시 균주의 성질이 변하는 등 안정도가 낮고, 생존율이 매우 저조한 것으로 알려져 있다. 이와 같은 단점을 보완하기 위하여 액체 질소를 이용한 보존법(Hwang, 1968; Jong, 1978), 멸균 증류수를 이용한 보존법(McGinnis 등, 1974; Boesewinkel, 1976; Ellis, 1979), silica gel에 보존하는 방법(Smith and Onions, 1983),

2단계 원심분리 후 동결건조 하는 법(Smith, 1983) 등 다양한 방법이 개발, 보고되어 있다.

이 중에서도 멸균 증류수를 이용한 보존 방법은 경제적이고, 간단하며, 장기간 보존 후에도 생존율과 생리활성 유지가 높다는 점에서 각광을 받고 있다. 그러나, 최적 보존에 요구되는 여러 요인들, 예컨대 보존온도, cryoprotectant의 종류 및 농도 등에 대한 연구 결과는 아직까지 미흡한 실정이다. 따라서, 본 실험은 멸균 증류수를 이용한 버섯류 균사의 보존 방법을 최적화하고자 시행하였다. 국내에서 분리하여 보관하고 있는 야생 버섯류를 대상으로 여러 요인을 조합하여 12개월간 보존하고, 생존율 및 균사의 생장속도 등을 측정하여 최적 보존 조건을 알아보았다.

재료 및 방법

균 주

본 실험에 사용된 균주는 대전대학교 이과대학 미생물학과 진균센터(Fungal Culture Collection of

*Corresponding author

Taejon University, FCCTU)에서 보관 중인 균주들로서, 국내 각지에서 자생하고 있는 버섯의 자실체로부터 분리한 균사를 대상으로 하였다. 분류학상으로는 담자균류 균심강에 속하는 10종과 복균강에 속하는 1종 및 격실담자균아문에 속하는 1종으로 총 12종이며, 그 목록은 Table 1에 나타나 있다.

배양 및 보존 방법

보관중인 각 균주는 PDA(Potato Dextrose Agar) 배지에 접종한 후, 28°C 항온기에서 배양하였다. 균사가 충분히 자란 후 직경 4 mm의 cork borer를 이용하여 4~5 조각의 균사를 취한 후 멸균 증류수나 cryoprotectant가 함유된 cryovial에 넣고 플라스틱 용기에 넣은 후 각각 5°C, -20°C, -75°C 및 상온(25°C)에서 12개월 동안 보존하였다. 사용된 cryoprotectant는 polyethylene glycol(PEG), dimethyl sulfoxide(DMSO) 및 glycerol이었고, 그 농도는 각각 5%와 10%였다.

생장속도 및 생존율 측정

12개월 후 각 온도에서 보관 중인 vial을 꺼내 25°C 항온수조에서 완전히 녹이고 에탄올을 사용하여 표면 살균시킨 후 무균적으로 균사 조각을 꺼냈다. 균사 조각을 준비된 PDA배지에 접종하고 28°C 항온기에서 배양하였다. 배양 후 2일째 되는 날부터 하루 간격으로 균사의 생장 직경을 측정하

였으며, 동일한 vial에 있는 모든 균주의 평균 생장 직경을 생장속도(mm/day)로 정하였다. 생존율은 PDA 배지에 접종한 균사 조각 중 생장한 균사 조각의 비율로써 나타내었다.

Laccase의 활성염색

액체배양한 균사를 수확하여 Blender를 사용하여 분쇄하고, 세포분쇄액을 4°C, 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상층액을 Mini-Protean II system(Bio-Rad, USA)을 사용하여 전기영동(7.5% acrylamide, 2.6% bis-acrylamide)을 실시한 후, 활성염색을 시도하였다. Gel을 1 mM o-toluidine이 함유된 초산완충용액(pH 5.0)에 담근 후, 30°C에서 청록색 활성띠가 나타날 때까지 반응시켰다.

결과 및 고찰

생존율 및 생장속도에 대한 온도의 영향

균사를 멸균 증류수에 넣어 12개월 동안 상온, 5°C, -20°C 및 -75°C에서 보관한 후 생존율을 측정한 결과, 상온과 5°C에서는 두엄먹물버섯(*C. atramentarius*)을 제외한 대부분의 균주에서 접종한 4개의 균사조각이 모두 생장하였다. 그러나, -20°C에서는 생존율이 저조하여 털젖버섯아재비(*L. subvellereus*), 치마버섯(*S. commune*), 말뚝버

Table 1. List of mushrooms used in this study

Classification	Scientific name	FCCTU number
Basidiomycotina		
Holobasidiomycetidae		
Hymenomycetes		
Agaricales	<i>Coprinus atramentarius</i>	A-03
	<i>Lactarius subvellereus</i>	A-05
	<i>Lepista sordida</i>	A-06
	<i>Marasmius maximus</i>	A-07
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	A-02
	<i>Schizophyllum commune</i>	A-22
Aphyllophorales	<i>Fomes formentarius</i>	P-01
	<i>Hydellum ferrugineum</i>	P-03
	<i>Coriolus hirsutus</i>	P-04
	<i>Daedaleopsis tricolor</i>	P-02
Gasteromycetes	<i>Phallus impudicus</i>	G-01
Phragmobasidiomycetidae	<i>Auricularia polytricha</i>	S-02

섯(*P. impudicus*) 및 털목이(*A. polytricha*)만이 성장하였으며, -75°C에서는 두엄먹물버섯, 자주망이버섯아재비(*L. sordida*)와 큰낙엽버섯(*M. maximus*)을 제외한 모든 균주에서 생장을 하였다. 같은 온도에서 삼색도장버섯(*D. tricolor*)은 비교적 낮은 생존율을 보였다(Table 2). 이와 같은 결과는 저온에서 보존할 경우 요구되는 cryoprotectant가 첨가되지 않아 균주 활성이 상실되었으리라 추정된다. Ellis(1979)에 의하면 멸균 증류수를 이용한 균주의 보존시 균심강에 속하는 대부분의 버섯류가 상온에서 5개월 내지 20개월까지 생존하는 것으로 보고되었다. 그러나, 저온인 -85°C에서도 단기간(1개월)동안 보관하면 생존율이 100%에 가깝게 나타나는 것으로 보고된 바가 있어(Ohmasa 등, 1992), 단기간 보관 시에는 온도의 영향이 크지 않을 것으로 판단된다.

한편, 균주 보존시 고려되는 가장 중요한 요인은 생존율과 생리활성의 유지라 할 수 있는데, 생리활성의 측정 방법으로는 각종 효소활성도의 측정, 성장속도의 측정, 자실체 형성의 유무 등 여러 가지 방법이 알려져 있다. 본 실험에서는 가장 기본적인 방법인 성장속도의 측정과 세포내 laccase isozyme pattern 분석을 통해 간접적으로 생리활성을

측정하였다. 각 온도별로 생존한 균사의 성장속도를 측정한 결과, 털젖버섯아재비, 치마버섯 및 삼색도장버섯을 제외하고는 사면배지에서 계대배양한 대조구의 성장속도가 빨랐다. 그러나, 실험구 중에서는 비교적 생존율이 저조한 것으로 나타난 온도인 -75°C에서 보관한 균주들의 균사 성장속도가 가장 빠르게 나타났다(Table 2). 따라서, 저온에서의 보존이 생리활성 유지에는 좋은 것으로 판단된다. 한편, 최적 보존온도인 5°C에서 보존한 균사와 사면배지에서 보존한 균사를 배양하여 세포내 laccase의 활성을 조사한 결과 차이가 없었다(Fig. 1). 이러한 결과로 멸균증류수에서 보존한 균주의 생리활성이 유지되고 있음을 알 수 있었다. Ohmasa 등(1992)은 -85°C에서 15개월 동안 보존한 버섯류를 대상으로 하여 esterase isozyme의 활성염색을 통해 생리활성 정도를 분석한 결과, 효소의 band pattern에 변화가 없음을 보고한 바 있다.

Cryoprotectant의 영향

상온과 5°C 및 비교적 저조한 생존율을 보인 온도인 -20°C와 -75°C에서 glycerol, DMSO 및 PEG를 각각 5%와 10% 되게 첨가하여 생존율과 성장속도를 조사하였다. 각 온도별, cryoprotect-

Table 2. Viability and average mycelial growth of mushroom isolates after storage for 12 months at various temperatures in sterile distilled water

Mushrooms	Viability ^a (average mycelial growth, mm/day)				
	RT	5°C	-20°C	-75°C	control ^b
<i>C. atramentarius</i>	0/4(0)	0/4(0)	0/4(0)	0/4(0)	3.3
<i>L. subvellereus</i>	4/4(6.8)	4/4(7.4)	4/4(8.3)	4/4(10.0)	8.5
<i>L. sordida</i>	4/4(1.0)	4/4(1.4)	0/4(0)	0/4(0)	5.7
<i>M. maximus</i>	4/4(2.5)	4/4(1.7)	0/4(0)	0/4(0)	5.2
<i>P. ostreatus</i>	4/4(6.5)	4/4(7.1)	0/4(0)	4/4(9.0)	13.3
<i>S. commune</i>	4/4(6.3)	4/4(6.9)	0/4(0)	4/4(10.0)	8.8
<i>F. formentarius</i>	4/4(3.3)	4/4(4.1)	0/4(0)	4/4(3.2)	9.1
<i>H. ferrugineum</i>	4/4(6.3)	4/4(7.1)	0/4(0)	4/4(9.6)	10.2
<i>C. hirsutus</i>	4/4(6.0)	4/4(7.1)	0/4(0)	4/4(9.0)	12.9
<i>D. tricolor</i>	4/4(6.5)	4/4(7.1)	0/4(0)	1/4(5.0)	6.4
<i>P. impudicus</i>	4/4(3.8)	4/4(4.4)	4/4(2.5)	4/4(4.6)	12.8
<i>A. polytricha</i>	4/4(1.0)	4/4(2.6)	4/4(1.7)	4/4(2.0)	7.5

^aViability was indicated as the number of recovered mycelial disks per total number of tested mycelial disks.

^bAverage mycelial growth of isolates cultured on agar slants.

RT; room temperature.



Fig. 1. The laccase isozyme patterns of *Hydenelum ferrugineum* after staining with enzyme substrate. Preserved at 5°C in sterile water (a) and slant culture at 10°C (b).

ant별 생존율을 비교한 결과(Table 3), 상온에서는 cryoprotectants의 효과가 거의 없거나 오히려 균사생존에 역효과를 나타내었다. 특히, DMSO를 처리하였을 경우, 털적버섯아재비와 향기갈색갈매기버섯을 제외한 모든 실험균주가 자라지 못했다. -20°C에서는 10% PEG가 가장 효과적으로 나타났다. 이 중에서 목재부후균에 속하는 향기갈색갈매기버섯(*H. ferrugineum*)과 흰구름버섯(*C. hirsutus*)은 멸균 증류수만을 첨가하여 동일 온도에서 보존하였을 경우 전혀 자라지 않았으나, 10% PEG가 첨가된 실험구에서는 접종한 균주 모두가 생장을 하여 cryoprotectant의 첨가가 효과를 보였다. 이와 유사한 결과는 -75°C에서도 나타났는데, 삼색도장버섯의 경우에 5%와 10% PEG 첨가시 접종한 4개의 균사조각 중 2개가 생장을 하였다. 균사의 성장속도 또한 cryoprotectant 첨가에 의해 다소 증가하는 것으로 나타났다(Table 4).

본 실험의 결과, 액체 질소에서의 보존시 일반적으로 cryoprotectant로 glycerol이나 DMSO가 많이 사용되고 있는데(Chen, 1987; Maekawa 등, 1990), 이들 보다는 PEG가 더 높은 생존율을 보여 저온에서의 균사 보존에는 cryoprotectant로 PEG를 사용하는 것이 효율적이라 생각된다. 한편, DMSO는 농도가 증가할수록 생존율 및 성장속도를 저해하는 것으로 나타나 버섯류의 보존에는 적합하지 않은 것으로 판단된다. 이와 유사한 결과로 Hwang(1968)은 액체질소 보존시 cryoprotectant로 DMSO를 첨가하면, 두엄먹물버섯, 말뚝버섯, 말장버섯(*Calvatia* sp.), 자주주발버섯(*Peziza badia*) 등의 균사생장 속도가 현저히 감소하는 것으로 보고하고 있다.

균사 보존의 최적 조건

균사 보존을 위한 온도별, cryoprotectant별 생존율을 비교한 결과는 Table 5에 나타나 있다. 온도별 생존율을 비교해 보면, 상온에서는 평균 70.8%의 생존율을 나타냈으며, 5°C에서 보존하였을 경우, 생존율이 79.5%로 최적으로 나타났다. 실온에서 보존하였을 경우, 10% DMSO를 처리하였을 때 16.7%로 최저치를 나타냈고, 멸균 증류수와 10% glycerol을 첨가한 조건에서 91.7%로 최대치를 보였다. 온도를 5°C로 하여 보존하였을 경우에는 멸균 증류수와 PEG를 첨가한 실험구에서 91.7%의 생존율을 보였으며, 최저 생존율은 43.8%로 10% DMSO를 첨가하였을 때 나타났다. -20°C에서는 전체 31.0%의 생존율을 나타내 실험대상 온도 중에서 제일 낮은 값을 보였으며, 10% PEG를 첨가하였을 때 최대 값인 47.9%의 생존율을 나타냈다. 낮은 온도인 -75°C에서는 PEG의 효과가 두드러지게 나타나 PEG를 첨가하였을 때 가장 높은 생존율인 70.8%를 나타냈다. Ohmasa 등에 의하면 2종의 느타리를 대상으로 한 생리활성 실험에서 -85°C와 -196°C에서 보존한 균주의 자실체 형성 능력은 10°C에서 사면배지에서 계대배양한 균주와 큰 차이가 없었다. 따라서, 저온에서의 장기간 보존이 계대배양의 번거로움을 대체할 수 있는 좋은 방법이라 생각된다.

이상의 결과를 종합해 보면 멸균 증류수를 이용

Table 3. Effect of cryoprotectants on the survival of mushroom isolates after 12 months at various temperatures

Mushroom	Viability ^a																							
	Room temperature						5°C						-20°C						-75°C					
	GL	DMSO	PEG	GL	DMSO	PEG	GL	DMSO	PEG	GL	DMSO	PEG	GL	DMSO	PEG	GL	DMSO	PEG						
<i>C. atramentarius</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. subvellerius</i>	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
<i>L. sordida</i>	1/4	4/4	0	0	0	3/4	3/4	0	0	4/4	4/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. maximus</i>	4/4	4/4	0	4/4	4/4	4/4	4/4	0	4/4	4/4	4/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. ostreatus</i>	4/4	4/4	0	4/4	4/4	4/4	4/4	0	4/4	4/4	4/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. commune</i>	4/4	4/4	0	4/4	4/4	4/4	4/4	0	4/4	4/4	4/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>F. formentarius</i>	4/4	4/4	0	4/4	4/4	4/4	4/4	0	4/4	4/4	4/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>H. ferrugineum</i>	4/4	4/4	0	4/4	4/4	4/4	4/4	0	4/4	4/4	4/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. hirsutus</i>	4/4	4/4	0	4/4	4/4	4/4	4/4	0	4/4	4/4	4/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>D. tricolor</i>	4/4	4/4	0	4/4	4/4	4/4	4/4	0	4/4	4/4	4/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. impudicus</i>	4/4	4/4	1/4	4/4	4/4	4/4	4/4	0	4/4	4/4	4/4	0	0	0	0	1/4	3/4	2/4	1/4	0	0	0	0	0
<i>A. polytricha</i>	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	0	0	0	0	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4

^aViability was indicated as the number of recovered mycelial disks per total number of tested mycelial disks. GL; glycerol, DMSO; dimethyl sulfoxide, PEG; polyethylene glycol

Table 4. Effects of cryoprotectants on the average mycelial growth of mushroom isolates after 12 months at various temperatures

Mushroom	Average mycelial growth (mm/day)																							
	Room temperature						5°C						-20°C						-75°C					
	GL	DMSO	PEG	GL	DMSO	PEG	GL	DMSO	PEG	GL	DMSO	PEG	GL	DMSO	PEG	GL	DMSO	PEG						
<i>C. atramentarius</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. subvellerius</i>	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	8.3	8.3	8.3	8.3	8.3	8.3	10	10	10	10	10	10
<i>L. sordida</i>	1.6	1.5	0	0	0	1.4	1.4	0	0	1.1	1.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. maximus</i>	2.3	2.5	2.4	0	1.9	2.3	2.1	2.0	0	2.1	2.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. ostreatus</i>	6.5	6.5	0	0	6.5	6.5	7.1	7.1	0	7.1	7.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. commune</i>	5.9	6.0	6.0	0	6.3	6.3	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	5.0	4.8	5.0	4.7	7.0	7.0	7.0	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6
<i>F. formentarius</i>	3.8	4.3	0	0	2.9	3.0	4.3	4.4	3.9	0	4.3	4.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.6	3.6
<i>H. ferrugineum</i>	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.9	7.1	7.1	7.1	7.1	8.0	8.0	8.0	5.3	5.3	8.0	8.0	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6
<i>C. hirsutus</i>	6.0	6.3	6.3	0	6.1	6.3	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	6.9	0	0	7.0	0	8.3	8.3	9.0	9.0	7.6	5.0	9.2	9.0
<i>D. tricolor</i>	6.5	6.5	0	0	6.5	6.3	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.0	6.0
<i>P. impudicus</i>	4.3	4.0	3.8	0	4.1	3.9	4.7	4.6	4.3	0	4.7	4.3	3.0	0	0	0	3.0	3.3	5.0	2.4	0	0	5.0	5.0
<i>A. polytricha</i>	1.5	1.3	2.1	0	1.1	1.3	1.4	2.6	2.3	2.7	2.6	2.6	1.7	0	0	1.7	1.7	1.7	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

^aAverage mycelial growth of isolates cultured on agar slants.

GL; glycerol, DMSO; dimethyl sulfoxide, PEG; polyethylene glycol

Table 5. Effect of preservation temperatures and cryoprotectants on the survival of mushroom cultures after 12 months

Temperature	Viability ^a							Total
	DW	Glycerol (5%)	Glycerol (10%)	DMSO (5%)	DMSO (10%)	PEG (5%)	PEG (10%)	
RT	91.7	85.4	91.7	52.1	16.7	83.3	75.0	70.8
5°C	91.7	89.6	89.6	58.3	43.8	91.7	91.7	79.5
-20°C	41.7	35.4	20.8	16.7	14.6	39.6	47.9	31.0
-75°C	68.8	60.4	47.9	37.5	35.4	70.8	70.8	56.0
Total	73.5	67.7	62.5	41.2	27.6	71.4	71.4	

^a(No. of recovered mycelial disks/total no. of tested mycelial disks) × 100.

RT; room temperature, DW; distilled water, DMSO; dimethyl sulfoxide, PEG; polyethylene glycol.

한 담자균류 버섯 균주의 보존은 5°C가 최적 온도이며, -75°C에서 보존할 경우에는 cryoprotectant로 PEG가 적합한 것임을 알 수 있었다.

적 요

국내에서 채집, 분리한 12종 버섯류의 균사를 대상으로 하여 멸균 증류수를 이용한 최적 보존 방법을 탐색하였다. 온도, cryoprotectant의 종류 및 농도 등의 조건을 달리하여 12개월간 보존 후 생존율 및 성장속도를 측정된 결과, 보존 온도는 상온과 5°C가 최적으로 대상 균주 거의 모두가 생존하여 91.7%의 생존율을 보였다. 균사의 성장속도는 저온인 -75°C에 보존하였을 때 가장 높았으며, 이 온도에서 보존시 polyethylene glycol를 cryoprotectant로 첨가하였을 때 최대의 생존율이 관찰되었다. 향기갈색갈대기버섯(*H. ferrugineum*)을 대상으로 하여 계대배양으로 보존한 균주와 5°C에서 보존한 균주의 세포내 laccase의 활성을 조사한 결과, 효소의 활성양상이 동일하게 나타났다.

감사의 글

본 연구는 한국과학기술연구원 생명공학연구소 "신기능 생물소재 공통기반·지원 기술"의 위탁연구("한국산 고등균류의 분리 배양 및 분양 지원")로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

Boesewinkel, H. J. 1976. Storage of fungal cultures in water. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 66: 183-185.

Chen, Y. Y. 1987. The preservation of basidiomycetes cultures by ultra-low temperature freezing. *Acta Mycol. Sin.* 6: 110-117.

Ellis, J. J. 1979. Preserving fungus strains in sterile waters. *Mycologia* 7: 1072-1075.

Hwang, S. W. 1968. Investigation of ultra-low temperature for fungal cultures. I. An evaluation of liquid-nitrogen storage for preservation of selected fungal cultures. *Mycologia* 60: 613-621.

Jong, S. C. 1978. Conservation of the cultures. Pp 119-135. In: Chang, S. T. and Hayes, W. A. Eds. The biology and cultivation of edible mushrooms. Academic Press. New York.

Maekawa, N., Fukuda, M. and Arita, T. 1990. Effects of liquid-nitrogen cryopreservation on stock cultures of three cultivated basidiomycetous fungi. *Rept. Tottori Mycol. Inst.* 28: 227-232.

McGinnis, M. R., Padhye, A. A. and Ajello, L. 1974. Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeasts, and some aerobic Actinomycetes in sterile distilled water. *Appl. Microbiol.* 28: 218-222.

Ohmasa, M., Abe, Y., Babasaki, K., Hiraide, M. and Okabe, K. 1992. Preservation of cultures of mushrooms by freezing. *Trans. Mycol. Soc. Japan.* 33: 467-479.

Smith, D. 1983. A two-stage centrifugal freeze-drying method for the preservation of fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 80: 333-337.

Smith, D. and Onions, A. H. S. 1983. A comparison of some preserving techniques for fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 81: 535-540.