

DB3702

青 岛 市 地 方 标 准 规 范

DBNY3702/T 0034—2021

长根菇固体菌种质量检验规程

2021-03-05 发布

2021-04-01 实施

青 岛 市 农 业 农 村 局 发 布
青 岛 市 市 场 监 督 管 理 局

目 次

前言	1
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 抽样与保藏	2
5 培养基和试剂	2
6 检验内容与方法	2
7 质量要求	3
8 判定规则	5
附录 A（资料性）长根菇原种和栽培种培养基配方	6
附录 B（资料性）ITS 序列分析	7

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由青岛市农业农村局提出。

本文件由青岛市农业农村局归口。

本文件起草单位：青岛市农产品质量安全中心、青岛农业大学、青岛蘑菇兄弟生物科技有限公司。

本文件主要起草人：刘苗苗、徐丽丽、张阳、于浩、张嵘、宋智斌、张朋朋、臧玉佳、王海波、王庆东、鹿明广、徐小强、张作鹏。

本文件首次发布于2021年3月1日。

长根菇固体菌种质量检验规程

1 范围

本文件规定了长根菇固体菌种质量检验的术语和定义、抽样与保藏、培养基和试剂、检验内容与方法、质量要求、判定规则。

本文件适用于青岛市长根菇固体菌种质量的检验。

2 规范性引用文件

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，仅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（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 4789.28 食品安全国家标准食品微生物学检验培养基和试剂的质量要求

GB/T 12728 食用菌术语

GB/T 35880 银耳菌种质量检验规程

NY/T 528 食用菌菌种生产技术规程

NY/T 1284 食用菌菌种中杂菌及害虫的检验

NY/T 1846 食用菌菌种检验规程

3 术语和定义

GB/T 12728、NY/T 1846界定的以及下列术语和定义适用于本文件。为了便于使用，以下重复列出一些术语和定义。

3.1

菌种 culture

生长在适宜基质上具结实性的菌丝培养物，包括母种、原种和栽培种。

3.2

固体菌种 solid spawn

生长在固体培养料上的菌种。

3.3

送检样品 submitted sample

送到菌种检验机构待检验的、达到规定数量的样品。

3.4

试验样品 working sample

从送检样品中分出的部分样品，供测定某一检验项目的样品。

3.5

生长速度 growth rate

在一定条件下，单位时间内菌丝体生长的长度。常以长满容器所需的天数表示。

4 抽样与保藏

4.1 抽样方法

采取随机抽样，从批次中抽取具有代表性的送检样品。

4.2 抽样数量

长根菇母种、原种、栽培种的抽样量分别为该批次菌种的10%、5%、1%。但每批次抽样量不得少于10支(瓶、袋)；超过100支(瓶、袋)的，可进行两级抽样。

4.3 样品运输与保藏条件

不得与有毒物品混装、混运。样品运输和保藏时，容器温度应控制在4℃~6℃，湿度自然，保藏时间不超过20d。待检样品容器温度应控制在18℃~23℃，湿度自然，24h内检测。

5 培养基和试剂

按照GB 4789.28中相关规定执行。

6 检验内容与方法

6.1 感官检验

菌种感官检验内容和方法如表1所示。

表1 菌种感官检验内容和方法

菌种级别	容器外观	菌丝外观	气味	杂菌及其他
母种	观察容器有无破损，标签是否完备，棉塞（硅胶塞）松紧度，洁净度	观察菌丝生长量、菌丝体特征、有无其他色泽及异常，同时观察培养基颜色等。必要时用10倍放大镜观察	无菌条件下将容器口置于距鼻5cm~10cm处，屏住呼吸，用清洗过或酒精棉球擦拭过的手在容器口上方轻轻扇动，嗅气味	按照 NY/T 1284 方法执行，肉眼观察有无异常，必要时用10倍放大镜观察
原种				
栽培种				

6.2 微生物学检验

6.2.1 菌丝微观特征检验

取干净载玻片，滴一滴无菌水，无菌条件下挑取少量菌丝于水滴中，挑散菌丝，盖上盖玻片，先用10倍物镜观察菌丝是否粗壮、丰满、均匀，再转到40倍物镜下观察菌丝的细微结构。同时观察有无锁状联合、形态结构和特征。每一试验样品应检查不少于30个视野。

6.2.2 霉菌检验

在无菌条件下将试验样品接种于PDA培养基上，置于25℃~28℃避光培养，3d~5d后取出，在光线充足的条件下对比观察。每个样品设3个重复。检查菌落是否外观均匀、边沿整齐，是否具有长根菇菌种的固有色泽；有无绿、黑、黄、红、灰等颜色的粉状分生孢子或异常。

6.2.3 细菌检验

在无菌条件下将试验样品接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基中，置于摇床上36℃~37℃振荡避光培养1d~2d后取下，在光线充足的条件下对比观察。每个样品设3个重复。检查培养基是否仍呈半透明状，是否出现浑浊或具有异味。

6.3 菌丝生长速度测定

6.3.1 母种

取3mm×3mm~5mm×5mm试验样品一块，无菌条件下接种于直径90mm的PDA培养皿中央，置于25℃避光培养。每个样品设5个重复。每2d观察菌丝生长情况和有无杂菌污染，记录至菌丝长满平板。

6.3.2 原种和栽培种

按照NY/T 528的规定制作原种、栽培种培养基，配方按附录A任选其一。按每支母种接种4瓶(袋)~6瓶(袋)原种、每瓶(袋)原种接种30瓶(袋)~50瓶(袋)栽培种的接种量，取试验样品接入培养基中，置于23℃~25℃避光培养。每个样品设5个重复。每3d观察菌丝生长情况和有无杂菌污染，记录至菌丝长满瓶(袋)。

6.4 分子生物学检验

6.4.1 DNA提取

按照GB/T 35880方法执行。

6.4.2 ITS序列分析

ITS序列分析按照附录B中的方法进行。

7 质量要求

7.1 感官要求

7.1.1 母种感官要求

母种感官要求应符合表2的规定。

表2 母种感官要求

项目	要求	
容器	完整、无损、洁净	
棉塞或硅胶塞	干燥、洁净、松紧适度，能透气和滤菌	
菌种外观	菌丝生长量	长满斜面
	菌丝体特征	整齐浓密、丝状或绒毛状，白色
	菌丝体表面	均匀、平整、无角变
	菌落边缘	整齐
	菌丝分泌物	无
	杂菌菌落	无
斜面背面外观	培养基贴壁、不干缩，颜色均匀、无暗斑、无明显色素	
气味	有长根菇菌种特有的清香味，无酸、臭、霉等异味	
纯度	纯培养物，无虫（螨）体等生物，无杂菌	

7.1.2 原种感官要求

原种感官要求应符合表3的规定。

表3 原种感官要求

项目	要求	
容器	完整、无损、洁净	
封口物	干燥、洁净、松紧适度，能透气和滤菌	
菌种外观	菌丝生长量	长满容器
	菌丝体特征	洁白浓密、生长旺健
	培养物	紧贴瓶（袋）壁，无干缩，无菌皮
	培养物表面菌丝体	均匀一致、无角变、无高温抑制线
	培养物表面分泌物	无，允许有少量无色或浅黄色透明水珠
	杂菌菌落	无
	拮抗现象	无
气味	有长根菇菌种特有的清香味，无酸、臭、霉等异味	
纯度	纯培养物，无虫（螨）体等生物，无杂菌	

7.1.3 栽培种感官要求

栽培种感官要求应符合表4的规定。

表4 栽培种感官要求

项目		要求
容器		完整、无损、洁净
封口物		干燥、洁净、松紧适度，能透气和滤菌
菌种外观	菌丝生长量	长满容器
	菌丝体特征	洁白浓密、生长旺健、饱满
	培养物	紧贴瓶（袋）壁，无干缩，无菌皮
	不同部位菌丝体	生长均匀，色泽一致，无角变，无高温抑制线
	培养物表面分泌物	无，允许有少量无色水珠或浅黄色透明水珠
	杂菌菌落	无
	拮抗现象	无
气味		有长根菇菌种特有的清香味，无酸、臭、霉等异味
纯度		纯培养物，无虫（螨）体等生物，无杂菌

7.2 微生物学检验要求

菌丝显微形态粗壮、丰满、均匀，有锁状联合。无细菌、霉菌等杂菌污染。

7.3 菌丝生长速度测定要求

菌种长满容器所需天数如下：

母种：可在7d~10d菌丝长满斜面；

原种：可在28d~33d菌丝长满瓶（袋）；

栽培种：可在30d~35d菌丝长满瓶（袋）。

7.4 分子生物学检验要求

按照ITS分析方法，鉴定结果与长根菇ITS序列相似性达98%以上。

8 判定规则

8.1 合格菌种

菌种感官检验、微生物学检验、菌丝生长速度测定及分子生物学检验等项均符合标准要求的，为合格菌种。

8.2 不合格菌种

菌种感官检验、微生物学检验、菌丝生长速度测定及分子生物学检验等任何一项不符合标准要求的，为不合格菌种。

附录 A

(资料性)

长根菇原种和栽培种培养基配方

- A.1 杂木屑 75%，麦麸 22%，蔗糖 1.5%，石膏粉 1.5%；料水比 1: 1.3。
- A.2 棉籽壳 78%，麦麸 20%，蔗糖 1%，过磷酸钙 1%；料水比 1: 1.3。
- A.3 玉米芯 62%，豆秸粉 30%，麦麸 7%，石膏粉 1%；料水比 1: (1.3~1.4)。

附录 B
(资料性)
ITS 序列分析

A.4 ITS 引物

采用真菌核糖体基因间隔区通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 进行扩增。

A.5 ITS 反应体系和条件

A.5.1 PCR反应体系 (30 μ L)

PCR反应的总体积为30 μ L, 含有2 \times Taq PCR MasterMix 15 μ L, 通用引物ITS1和ITS4分别1 μ L, 模板DNA 1 μ L, ddH₂O 12 μ L。轻轻摇晃使其混合均匀, 置于PCR仪中进行rDNA ITS区段的PCR扩增。

A.5.2 PCR反应条件

PCR扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C预变性5min; 94 $^{\circ}$ C变性1min, 55 $^{\circ}$ C退火1min, 72 $^{\circ}$ C延伸90s, 共35个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸10min, 4 $^{\circ}$ C保存。

A.6 测序分析

PCR产物经1%~1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。目标DNA片段大约600bp, 回收片段大小约为550bp的扩增产物进行测序。将测序得到的序列, 通过NCBI在线Blast, 与GenBank中已被测序成功的长根菇序列进行同源性比对。
