

DB35

福建省地方标准

DB35/T 1203—2011

银耳栽培种质量检验规程

Regulations of quality inspection for Tremella spawn

2011 – 10 – 28 发布

2012 – 02 – 15 实施

福建省质量技术监督局

发布

前 言

本标准依据GB/T 1.1-2009的起草规则起草。

本标准由福建省质量技术监督局提出并归口。

本标准起草单位：福建农林大学菌物研究中心、全国银耳标准化工作组。

本标准主要起草人：温志强、刘新锐、董秀云、郑昭、谢宝贵、吴小平。

银耳栽培种质量检验规程

1 范围

本标准规定了银耳栽培种质量检验的术语和定义、真实性检验、纯度检验和活力检验和检验判定规则。

本标准适用于银耳栽培种质量的检验。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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。

NY/T 1097-2006	食用菌菌种真实性鉴定 酯酶同工酶电泳法
NY/T 1284-2007	食用菌菌种中杂菌及害虫的检验
DB35/T 137.5	古田银耳菌种制作规程
DB35/T 1021-2010	食用菌品种鉴别技术规范-DNA指纹法
DB35/T 1022-2010	食用菌菌种纯度检测方法
DB35/T 1026-2010	野生食用菌菌种分离与鉴定技术规范

3 术语和定义

NY/T 1284-2007、NY/T 1097-2006、DB35/T 1026-2010 中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。

3.1

银耳栽培种

经人工培养可供栽培使用的银耳菌丝与香灰菌的混合培养物。

3.2

银耳栽培种的真实性

指同时含有银耳Tremella fuciformis菌丝和香灰菌Hypoxylon stygium菌丝的菌种。

3.3

银耳栽培种纯度

银耳栽培种的纯度是指银耳栽培种受其它生物污染的程度。

3.4

银耳栽培种的活力

指银耳栽培种的健壮程度。

3.5

害虫

各种为害食用菌的昆虫和螨类。

[NY/T 1284-2007, 3.2]

3.6

核糖体转录间隔区

在真菌中，18S、5.8S、28S核糖体RNA的基因串联在一起，同时被转录，这三个基因之间被一段DNA序列隔开（ITS），18S和5.8S、5.8S和28S的基因之间的间隔区分别称为ITS1和ITS2，ITS序列具有较高的保守性，种内不同菌株之间的ITS序列同源性很高，但种间的差异较大，它可用于种的鉴别。

[DB35/T 1026-2010, 3.9]

3.7

霉菌

具管状菌丝营养体并产生大量孢子的小型真菌。

[NY/T 1097-2006, 2.1.10]

3.8

放线菌

分枝丝状的单细胞原核生物。

[NY/T 1097-2006, 2.1.11]

3.9

酵母菌

营出芽系列的单细胞真菌。

[NY/T 1097-2006, 2.1.12]

3.10

细菌

以裂殖方式繁殖的单细胞原核生物。

[NY/T 1097-2006, 2.1.13]

3.11

菌龄

接种后菌丝在培养基物中生长发育的时间。

[NY/T 1097-2006, 2.3.22]

4 银耳栽培种的真实性检验

4.1 取样

用接种钩均匀取银耳栽培种表面白毛团及基部培养物，称取2g，放到预冷的研钵中。

4.2 DNA 的提取

银耳栽培种DNA的提取方法按照DB35/T 1021-2010中7.2DNA的提取方法执行。

4.3 ITS 扩增

ITS扩增按照DB35/T 1026-2010中7.2.2.2 ITS-PCR的方法执行。但所使用的ITS引物为ITS5和ITS4。ITS5: 5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'; ITS4: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'。

4.4 ITS 扩增产物的检测

ITS扩增产物的检测按照DB35/T 1026-2010中7.2.2.3 ITS-PCR的方法执行。

4.5 ITS 片段的回收

把扩增的ITS片段进行单一片段分别回收。

4.6 ITS 片段的克隆与测序

ITS片段的克隆与测序按照DB35/T 1026-2010中7.2.2.4 ITS片段的克隆与测序的方法执行。

4.7 ITS 序列相似性计算方法

待检样ITS序列与标准菌株ITS序列匹配的碱基数比上标准菌株ITS序列碱基数(100%)

5 银耳栽培种纯度检验

银耳栽培种中的细菌污染、霉菌污染、酵母菌污染、螨虫为害检测检验按照NY/T 1284-2007、DB35/T 1022-2010方法执行。

6 银耳栽培种活力检验

6.1 银耳栽培种外观检验

用肉眼观察银耳栽培种的颜色、分泌液等。

6.2 银耳栽培种粗酶液制备

在银耳栽培种中间均匀取白毛团鲜重5g，加入25ml蒸馏水并搅匀，浸提2h后进行抽滤，抽滤后的溶液即为银耳栽培种粗酶液。设置3-5个重复。

6.3 银耳栽培种多酚氧化酶检测

在15mm×150 mm试管中分别加入 0.1 mol/L邻苯二酚2ml、0.05mol/L pH6.0的磷酸缓冲液2ml、银耳栽培种粗酶液0.5ml，28℃水浴保温30min，用紫外分光光度计，选择400 nm波长测量反应液的OD值。

6.4 银耳栽培种漆酶检验

在15mm×150 mm试管中分别加入0.1mol/L pH 4.6的乙酸缓冲液3.4ml、3.36mmol/L的邻联甲苯胺0.5ml、银耳菌种粗酶液0.5ml，28℃水浴保温30min，用紫外分光光度计，选择600 nm波长测量反应液的OD值。

7 判定规则

7.1 银耳栽培种真实性

ITS扩增产物经检测、ITS片段的克隆与测序后，图谱上同时出现535bp和910bp两条片段，且满足其中535bp的片段序列和银耳*Tremella fuciformis*的ITS序列相似性达98%以上的为银耳种性，否则是其它菌；其中910bp的片段序列和香灰菌*Hypoxylon stygium*的ITS序列相似性达98%以上的为香灰菌种性，否则是其它菌。

标准的银耳*Tremella fuciformis*和香灰菌*Hypoxylon stygium*的ITS序列见附录A。

检测菌种同时含有银耳ITS标记和香灰菌ITS的为完整菌种，否则为不完整菌种。

7.2 银耳栽培种纯度

按照NY/T 1284-2007、DB35/T 1022-2010的检测方法，检测结果未检出除银耳、香灰菌以外其他生物的菌种，判定为菌种纯；检测结果若出现细菌、霉菌、酵母菌、螨虫或其它生物的其中一种或一种以上，为污染菌种，判定为菌种不纯。

7.3 银耳栽培种活力

7.3.1 菌龄规定：培养基按 DB35/T 137.5 执行。

7.3.2 感观要求：白毛团色洁白，形状圆整、丰满，分泌液清亮，无浊液；香灰菌丝生长有力，分布均匀，分泌黑色素，瓶壁上出现黑色花纹。

7.3.3 生化指标：此外银耳栽培种的多酚氧化酶活性的OD值在0.2以上，同时满足银耳栽培种的漆酶活性的OD值在0.05以上，则表明银耳栽培种的活力强；否则活力弱。

7.4 银耳栽培种质量评价

同时满足银耳栽培种的真实性、纯度和种活力要求的银耳栽培种为合格，否则为不合格。

附 录 A
(规范性附录)

银耳 *Tremella fuciformis* 和香灰菌 *Hypoxylon stygium* 的 ITS 序列

A.1 银耳 *Tremella fuciformis* 的 ITS 序列

TCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAGCCCTACCTGATTTGAGGCCAGAGTGCAAAAGTAAAGGGGGTTGTGAGC
GGCCACAGTCGACGCGTAACCTACGACGTCTGCGTGAAACCACTAACGCATTTAAGGCCAGCCAGAGAGGCAGGGCCCAATCCAACA
CCGCCGGGTCAGAAACCCAGGGGGTTGAGTCTACATGACACTCAAACAGGCATGCCTTTCGGAATACCAAAAGGCGCAAGGTGCGTTCA
AAGATTCGATGATTCAGTGAATTCGCAATTCACATTACTTTTCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGT
TGTGAAAGTTGTTTCATGTTATGATGCATTACGTTCTTGACATATGTTTGTGTGAAGGCGGCCCGGGGGGCGCGGTCCGATGTG
CACAGGTGTTTGAAGGGCCTCGTGCCCGGTGTAATCTCAAATGATCCTTCCGAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACGACTTTTA
CTTCC。

A.2 香灰菌 *Hypoxylon stygium* 的 ITS 序列

TCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCTACCTAATCCGAGGTCAACCACTATAAGTTATAGGGGGTTTTACG
GCAAGCAGCTACAGCCTCCCTGAAAGCGAGTTAACTACTACGCTTAGAGTGTGCTATAACCCCGCCACTAAATTTAAGGAACTACCCC
TCAGTGAGGGGTAGATTCCCAACGCTAAGCTACAAGGCTTAAGGGTTGTAATGACGCTCGAATAGGCATGCCCACTAGAATACTAATGG
GCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCAGTGAATTCGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGTCA
GAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTAAACGTATTTGGTTTTTAAACCTTGTTTGATCACCCCTAAGAACCGTAGTTTATAGGT
GGCTTTTGCCAATTTTATGAATTCATTAGACCCCTCAGAGCTTTGAACAATTTTCGAGCAGATATTGTAGCTTGAAAACAAACGACTG
CAGGGTAAAGAAATTATTATTCGAGCAATAATTCCAACCAGGAAAGACGTTTTAGCGTAAAGAAAAAAGCAAAAGCAGATTTTCGAT
AGTTGTTCAACGCGGGGTTGGATGCACTAGGTGCTTAAGTTTGGAGCGGTCTACTCGGCGCCGCCGAGGCCTTGGTCAGCACCTTCAC
TGCACTAACCGTACCCGAAGGATGGGTAGCACTCAGGCACCTCCCGAGCAGAACCCCTTAGGGGAGCCCTGTGGGTAGGCTAAAG
CGGTACGCCGAGGAAACATAGGTAGGTTCAAAAGGGTTGGAGTTTTTGATAACTCAGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGA
GACCTTGTTACGACTTTTACTTCC。