

DB13

河北省地方标准

DB 13/T 2276—2015

食用菌母种质量评价及复壮方法

2015-12-25 发布

2016-2-1 实施

河北省质量技术监督局 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由河北师范大学提出。

本标准起草单位：河北师范大学。

本标准主要起草人：王立安、张金秀、姚清国、刘红霞、孙艳颖。

食用菌母种质量评价及复壮方法

1 范围

本标准规定了食用菌母种的质量评价、复壮及检测方法。
本标准适用于常规人工栽培食用菌母种。

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。

- GB/T 12728-2006 食用菌术语
- NY/T 528-2010 食用菌菌种生产技术规程
- NY/T 1845-2010 食用菌菌种区别性鉴定 拮抗反应
- NY/T 1097-2006 食用菌菌种真实性鉴定 酯酶同工酶电泳法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

母种老化

母种因菌龄过长或培养、保藏条件不适宜等因素而出现的生理衰退现象。具体表现为：培养过程中菌丝生长速度减慢、色泽变暗，容易产生韧质菌皮或分泌色素；栽培时“吃料”速度慢，出菇(耳)提早，菇体(耳片)变薄等。

3.2

母种退化

母种在栽培使用过程中因遗传变异而导致的优良性状下降的现象。具体表现为：培养过程中菌落形状不规则，菌丝稀疏或出现扇变菌落，菌落过早产生色素；栽培时出菇潮次不明显，畸形菇比例上升，产量下降，对不良环境或杂菌的抗性降低等。

3.3

病毒侵染

母种菌丝体因病毒感染而导致代谢生长出现显著的不正常，甚至菌丝体停止生长或死亡的现象。

3.4

杂菌污染

母种受到细菌、放线菌或其他真菌污染的现象。

3.5

母种复壮

对菌丝均一性差、生活力已下降的母种恢复其活力及优良性状的过程。

4 母种质量评价

4.1 培养基选择

根据母种特性，按NY/T 528-2010相关要求及附录A进行选择，配制相应的母种培养基。

4.2 接种及培养

取直径约0.5cm待评价母种菌丝块，接种到平板培养基中央部位；每个菌株3次以上重复。于恒温培养箱中适温培养7d~10d。

4.3 评价

观察接种块长出的菌落及菌丝体长势，并按下列方法作出母种质量评价：

- a) 优质母种：菌落呈规则圆形、菌丝粗壮、长势良好，符合本品种母种应有的特征，可用于生产；
- b) 老化、退化母种：部分菌落菌丝生长不规则或出现明显扇变角或分泌色素较多，可用于提纯复壮；
- c) 淘汰母种：具备下列特征之一的均应淘汰：
 - 接种块菌丝体停止生长或死亡；
 - 部分菌落出现黑褐色、青灰色、黄褐色或红色等颜色的孢子堆，或与母种菌丝体之间存在拮抗反应；
 - 菌丝生长缓慢、散发出难闻的酸臭气味。

5 母种复壮方法

5.1 提纯复壮

5.1.1 母种来源

被确认为存在老化、退化现象的母种。

5.1.2 接种培养

从斜面培养基母种中挑取远离接种点下端的菌丝，尽量为圆块，接种到与斜面培养基成分不同的平板培养基中，每一平板可接3~4块。按菌种最适温度要求置恒温培养箱中培养7d~10d后，观察菌落形态。

5.1.3 复壮操作

从形态圆形、规整，菌丝生长旺盛的菌落边缘，用无菌小刀切取菌落边缘的菌丝尖端进行分离移植；也可在显微镜下应用显微操作器把菌丝尖端切下；也可用无菌毛细管截取菌丝尖端。分离物转接到与平板培养基成分不同的平板上。按菌种最适温度要求置恒温培养箱中继续培养。

采用相同操作，对菌种进一步提纯复壮，直至菌落完全呈规则圆形且菌丝生长明显加快。

5.1.4 菌种保藏

挑取菌落边缘菌丝，接种到与平板培养基成分不同的试管斜面中。按菌种最适温度要求于恒温培养箱中培养至长满后使用，或当菌丝体生长到占整个培养基表面的70%~80%后，按菌种温型特点于冷藏箱保存。

5.2 原生质体脱毒复壮

5.2.1 母种来源

被确认为受到病毒侵染，且具锁状联合结构的食用菌母种。

5.2.2 菌丝体制备

从斜面培养基母种中挑取远离接种点下端的菌丝3~5块，接种到适合该菌种生长的最适液体培养基上。静置培养3d~5d后，于150rpm及最适温度下摇床培养5d~7d。用四层纱布过滤收集菌丝体，用0.6 M甘露醇洗涤2次，用滤纸吸掉菌丝中多余的液体，将菌丝块至于10mL的容器中。

5.2.3 原生质体制备

按每100mg菌丝加入1mL 2%溶壁酶（0.6M的甘露醇配制，0.22μm微孔滤膜过滤除菌，现用现配）。30℃~34℃水浴，每30min摇晃一次。3h之后，加入等体积0.6M甘露醇，用400目细胞筛过滤，将滤液收集到离心管中，室温、3000rpm离心10min，沉淀即为原生质体。

5.2.4 原生质体再生

用0.6 M甘露醇将原生质体悬浮，调整原生质体悬液浓度到 1×10^7 个/mL。稀释后吸取100 μL均匀涂布于适合该菌种生长的最适平板培养基上，于恒温培养箱中最适温度下培养15d~20d。

5.2.5 复壮母种筛选

在载玻片上滴一滴蒸馏水，从菌丝生长旺盛的再生菌落中挑取部分菌丝，充分展开后制临时装片，置显微镜下观察。具锁状联合结构的菌丝即为脱毒复壮试验母种。

6 复壮母种的检测方法

按下列方法对复壮菌种进行检测，具备以下特征的母种为复壮菌种。

6.1 肉眼观察

用肉眼观察，复壮后母种菌丝具有本品种固有色泽和形态特征，如：洁白、粗壮；无任何杂菌等。

6.2 显微镜检查

显微镜下观察复壮母种菌丝体应粗壮，菌丝节较长，呈分枝状；与未复壮前菌丝节很短，菌丝纤细形成对比。

6.3 菌丝生长速度测定

将复壮菌种，转接至PDA或适宜其生长的平板培养基中央，待菌丝形成放射状菌落后，用直径0.5cm的无菌打孔器沿菌落边缘同心圆处取菌丝块，接种到PDA平板培养基上。在平板培养基中部放上1个菌种块，共接种3个平板培养基，即为3个重复。按菌种最适温度要求置恒温培养箱中培养至直径为1cm~1.5cm

后，每隔24h测量菌落直径，连测3d~5d，计算并统计菌丝平均生长速度。复壮后菌丝平均生长速度应高于未复壮前。

6.4 吃料能力测定

将复壮母种接种到盛有适合该菌种生长的、无菌栽培料的大试管或栽培袋中，按菌种最适温度要求置恒温培养箱中培养，7d~10d后观察菌丝生长状况。复壮后母种与未复壮的母种相比，菌块萌发快并迅速向培养料中生长伸展，吃料能力应明显增强。

6.5 第一潮菇产量测定

复壮前后母种采用相同出菇培养基制备栽培袋，发满菌后按食用菌出菇环境要求进行管理，测定第一潮菇产量。复壮后母种第一潮菇产量应高于复壮前。

6.6 酯酶同工酶图谱

参照NY/T 1097-2006方法及标准制备复壮前后菌丝体或子实体酯酶同工酶图谱。复壮前后菌丝体或子实体同工酶图谱应具相同谱带；复壮后各酯酶条带应比复壮前着色深。

附 录 A
(规范性附录)
食用菌母种质量评价及复壮常用培养基

A.1 常用母种培养基

A.1.1 PDA 培养基

配方：马铃薯200g，葡萄糖20g，琼脂20g，饮用水1000 mL，pH自然。

制法：马铃薯洗净、去芽、切片后，称取200g，加水1000mL，煮至沸腾。15min~20min后双层纱布过滤得马铃薯煮汁。向煮汁中加入葡萄糖、琼脂后，继续加热、搅拌，直至琼脂完全融化。过滤。用90℃~100℃水补足至1000mL。趁热分装试管，封口、包装后，121℃灭菌25min~30min。

A.1.2 CPDA培养基

配方：马铃薯 200g，葡萄糖20g，磷酸二氢钾1g，磷酸氢二钾1g 硫酸镁0.5g，琼脂20g，饮用水1000mL，pH自然。

制法：马铃薯去芽、洗净、切片后，称取200g，加水1000mL，煮至沸腾。15min~20min后双层纱布过滤得马铃薯煮汁。向煮汁中加入葡萄糖、磷酸二氢钾、硫酸镁、琼脂后，继续加热、搅拌，直至琼脂完全融化。过滤。用90℃~100℃水补足至1000mL。趁热分装试管或三角瓶，封口、包装后，121℃灭菌25min~30min。

PDA、CPDA+木屑煮汁：在PDA、CPDA基础上加200 g阔叶树木屑煮汁。

A.1.3 麦粒、麦麸浸汁培养基

配方：麦粒100g或麦麸（或米糠）50g，葡萄糖20g，蛋白胨2g，磷酸二氢钾0.3g，磷酸氢二钾0.3g，硫酸镁0.2g，酵母膏2g，琼脂20g，饮用水1000mL，pH自然。

制法：新鲜麦粒100g或麦麸（米糠）50g，加水1000mL，煮至沸腾约10min，4~6层纱布过滤得麦麸或米糠煮汁。向煮汁中加入葡萄糖、蛋白胨、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、硫酸镁、酵母膏、琼脂后，继续加热、搅拌，直至琼脂完全融化，过滤。90℃~100℃水补足至1000mL。趁热分装试管或三角瓶，封口、包装后，121℃灭菌25min~30min。

A.2 常用原种和栽培种培养基

A.2.1 谷粒培养基

配方：谷粒（小麦、谷子、玉米或高粱）98%，石膏2%，含水量52%~55%。

制法：谷粒（小麦、谷子、玉米或高粱）加水浸泡6h~12h，吸足水后煮沸至熟而不烂。加入石膏，拌匀后分装。121℃~124℃灭菌2h~2.5h。

A.2.2 棉籽壳培养基

配方：棉籽壳84%，麦麸（或米糠）15%，石膏1%，含水量60%±2%。

制法：按配方比例称取原料，干拌均匀后逐渐加水。检测含水量，合格后分装。121℃~124℃灭菌2h~2.5h，或100℃常压灭菌8h~14h。

A. 2. 3 木屑培养基

配方：阔叶树木屑78%，麦麸（或米糠）20%，蔗糖1%，石膏1%，含水量60%±2%。

制法：按配方比例称取原料，先把糖溶于水，再把麦麸（或米糠）、石膏、木屑混合在一起拌匀，逐渐加入糖水。拌匀后检测含水量，合格后分装。121℃～124℃灭菌2h～2.5h，或100℃常压灭菌8h～14h。

A. 3 出菇试验常用培养基

配方参照A. 2. 2和A. 2. 3。
