

DB45

广西壮族自治区地方标准

DB 45/T 1760—2018

草菇菌种保藏技术规范

Technical specification for preserving *Volvariella volvacea* culture

地方标准信息服务平台

2018 - 05 - 10 发布

2018 - 06 - 10 实施

广西壮族自治区质量技术监督局

发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由广西壮族自治区农业科学院提出。

本标准起草单位：广西壮族自治区农业科学院微生物研究所。

本标准主要起草人：吴圣进、韦仕岩、王灿琴、陈雪凤、吴小建、陈丽新、陈振妮、黄卓忠。

地方标准信息服务平台

草菇菌种保藏技术规范

1 范围

本标准规定了草菇（*Volvariella volvacea*）菌种保藏的术语和定义、原则、要求和保藏方法。
本标准适用于草菇菌种中母种的保存。

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。

- GB/T 12728 食用菌术语
- GB/T 23599 草菇菌种

3 术语和定义

GB/T 12728界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

菌种 culture
可培养的具有保藏价值的菌丝纯培养物。

3.2

母种 stock culture
生长于试管斜面培养基上的具有结实性的菌丝体纯培养物及其继代培养物。

3.3

菌种保藏 culture preservation
将菌种用适宜方法妥善保藏，避免死亡、污染、退化，保持其原有性状稳定。

3.4

厚垣孢子 chlamydospore
草菇菌丝在生长过程中，菌丝细胞原生质浓缩、细胞壁增厚并断裂而形成的一种红褐色或棕褐色无性孢子。

4 原则

- 4.1 应根据菌种的使用频率选择适宜方法进行保藏。
- 4.2 应使保藏的菌种不染杂菌。

5 要求

- 5.1 菌种保藏所使用的器皿应清洁、透明、无破损、无裂痕。
- 5.2 接种时应对应菌株编号及培养基分别进行核对，采用适宜的培养基和无菌操作。
- 5.3 菌种培养至有厚垣孢子产生后进行保藏。
- 5.4 菌种移植培养后，应与原保藏菌株的培养特性及其登记卡（包含菌株名称、编号、所用培养基、菌种代数等信息）逐个对照，检查无误后再存放。
- 5.5 保藏期间应定期检查菌种存放设施的温度、湿度，菌株有无污染、棉塞有无霉变、培养基是否干枯，如发现异常应重新移植、培养、更换。
- 5.6 传代过程中，将保藏菌种在营养贫乏和丰富的新鲜培养基中作交替培养。
- 5.7 菌种的传代移植次数不宜超过 4 次。

6 保藏方法

6.1 定期移植保藏法

按附录A的规定。

6.2 液体石蜡保藏法

按附录B的规定。

6.3 液氮超低温保藏法

按附录C的规定。

地方标准信息服务平台

附 录 A
(规范性附录)
定期移植保藏法

A.1 原理

亦称传代培养保藏法,是将菌种接种于适宜的斜面培养基中,最适条件下培养后,置于15℃~20℃进行保存并间隔一定时间进行移植培养的方法。

A.2 要求

A.2.1 宜在接种培养后用硅胶塞封存。

A.2.2 使用前检查确认菌株是否变异,移植传代次数不宜超过4次。

A.3 方法

A.3.1 培养基制备

A.3.1.1 配方

A.3.1.1.1 PDA培养基

去皮马铃薯200 g,葡萄糖20 g,琼脂20 g,蒸馏水1 000 mL。

A.3.1.1.2 加富PDA培养基

去皮马铃薯200 g,葡萄糖20 g,酵母膏2 g,磷酸二氢钾1.0 g,硫酸镁0.5 g,琼脂20 g,蒸馏水1 000 mL。

A.3.1.2 配制

将马铃薯切成边长0.5 cm~1.0 cm的方形小粒,加入蒸馏水1 000 mL,置小铝锅或不锈钢锅煮沸20 min~30 min,用4层纱布过滤,取马铃薯滤液,加入琼脂继续加热,边加热边搅拌,直到琼脂完全液化,加入葡萄糖等其他成分,调节pH为8.0,补水至1 000 mL,搅拌均匀。

A.3.1.3 分装

将配制好的培养基分装至直径18 mm、长180 mm的玻璃试管中,装量为每管8 mL~15 mL。试管口应保持干净,随后塞入棉塞或硅胶塞,并用牛皮纸包扎。

A.3.1.4 灭菌

将配制分装和包扎好的试管直立放在高压蒸汽灭菌锅内加热灭菌。加热到0.05 MPa时,打开排气阀排气,待压力指针回到零点后,关闭排气阀。重复操作两次后继续加热,当压力升到0.11 MPa(温度121℃)时,持续加热30 min后停止加热,待指针回到零点,立即取出试管,并倾斜摆放在桌面上,试管口比试管底部高1.0 cm~1.5 cm,做成培养基斜面,培养基长度不超过试管长度的1/2。

A.3.1.5 灭菌效果检查

将灭菌后的试管斜面培养基置于 $(30 \pm 2)^\circ\text{C}$ 条件下1 d~2 d 后检查是否有细菌或霉菌的菌斑。

A.3.2 接种

用接种铲挖取长有草菇菌丝体的长0.5 cm、宽0.5 cm的琼脂培养基，转移到新鲜斜面上，接种位置为培养基斜面中间，且菌丝面朝上。接种后立即塞上棉塞或硅胶塞，用牛皮纸包扎试管口，贴上标签。

A.3.3 培养

将接种后的试管置于 30°C ~ 32°C 温度下培养7 d~10 d，当菌丝长满斜面并有少量红褐色厚垣孢子产生时结束培养。

A.3.4 性状指标

菌丝应呈灰白至黄白色，浓密粗壮，萌发生长快，分布均匀，气生菌丝旺盛，爬壁力强，菌丝分枝角度大，能产生大量红褐色厚垣孢子。

A.3.5 保藏

培养好的菌种于温度 16°C ~ 18°C 、相对湿度50%~70%环境下保藏。也可以将培养好的菌种齐试管口将棉塞或胶塞剪下，用干净的固体石蜡加热熔化后封口再保藏。

A.3.6 定期移植

草菇菌种保藏时间不宜超过90 d，参照GB/T 23599的要求，每隔3个月将保藏的菌种转接到新鲜培养基中，适宜条件下培养后再保藏。用固体石蜡封口的草菇菌种可保藏1年。

地方标准信息服务平台

附 录 B
(规范性附录)
液体石蜡保藏法

B.1 原理

菌种在适宜的斜面培养基上培养好后，注入灭菌的液体石蜡，在液体石蜡完全覆盖下进行保存的方法。

B.2 要求

- B.2.1 应选用化学纯液体石蜡。
- B.2.2 操作时应防止液体石蜡燃烧。
- B.2.3 应使用电子式火焰灭菌器对移种过培养物的接种铲灭菌。
- B.2.4 保藏场所应保持干燥，防止胶塞污染。
- B.2.5 保藏期间应定期检查，如培养基露出液面，应及时补充无菌液体石蜡。

B.3 方法

B.3.1 液体石蜡准备

将液体石蜡分装，塞上胶塞，用牛皮纸包好，在121℃下灭菌30 min后置于40℃恒温箱中，待水分完全蒸发，经无菌检查后备用。

B.3.2 培养物制备

符合附录A.3.1的规定。

B.3.3 石蜡灌注

无菌条件下将经灭菌的液体石蜡注入培养物上，液面高出培养物斜面1 cm~2 cm，加胶塞并用固体石蜡封口。

B.3.4 保藏

将草菇菌种直立存放于15℃~20℃的干燥处。保藏时间1年。保藏期间应定期检查菌种活力及杂菌情况，液体石蜡减少，露出培养基斜面时应及时补充经灭菌的液体石蜡。

B.3.5 恢复培养

挑取小块菌种块转接在适宜的新鲜培养基上，置于30℃下培养。生长繁殖后，再重新转接一次。

附 录 C
(规范性附录)
液氮超低温保藏法

C.1 原理

将菌种先置于含有冷冻保护剂的容器内，再保存于-150℃气相液氮或-196℃的液相液氮中的保藏方法。

C.2 要求

- C.2.1 操作时应戴上面具和皮手套，冻存管应拧紧螺帽。
- C.2.2 运送液氮应使用专用特制液氮罐，存放液氮罐的房间应保持良好通风。
- C.2.3 应防止安瓿管爆裂。
- C.2.4 注意液氮罐中液氮的残存量，定期填充液氮。

C.3 方法

C.3.1 准备

C.3.1.1 安瓿管或冻存管

选用耐温度骤变，耐压，管壁厚度均一且为中性玻璃的安瓿管，或螺旋口的塑料冻存管。注意玻璃管不得有裂纹。清洗安瓿管时，先用2%盐酸浸泡8 h~12 h，然后用自来水冲洗3次以上，宜用蒸馏水冲洗，浸泡至pH中性，然后干燥。塑料冻存管用蒸馏水浸泡8 h~12 h，冲洗干净，干燥即可。在121℃下高压灭菌15 min~20 min，安瓿管也可在160℃烘箱中干热灭菌2 h，备用。

C.3.1.2 标签

使用专用的非水溶性记号笔作标记，记录菌种编号和保藏日期。

C.3.1.3 保护剂

宜采用无菌的10%~20%甘油作为保护剂。加甘油于蒸馏水，配制浓度为10%（体积分数）或20%（质量分数）的甘油，然后121℃高压灭菌15 min~20 min。

C.3.1.4 培养物

将草菇培养物接种于装有PDA培养基的平皿中，于30℃培养7 d~10 d，形成菌落并产生少量红褐色厚垣孢子时结束培养。

C.3.2 分装

用无菌打孔器从草菇菌落边缘1 cm处切取直径5 mm~10 mm的菌种块，放入冻存管内与保护剂混匀，保护剂用量以不超过冻存管高度的2/3为宜。菌种块和保护剂应置于冻存管底部，避免溅污上部管壁。

分装完后立即封口。若用安瓿管保存时，在距离管口5 cm用酒精喷灯将其熔封；如使用塑料冻存管保存，应立即拧紧螺帽。

C.3.3 预冻

预冻时，温度宜控制在每分钟下降1℃，至-35℃~-40℃。常用降温方法有：

- 程序控温降温法：应用程序控制降温仪，稳定连续降温，控制好降温速率；
- 冷冻干燥机自行冷冻：在不开启真空泵的情况下，利用冷冻干燥机的制冷作用，将菌种冷冻至-35℃~-40℃；
- 将菌种放置于-80℃冰箱预冻。温度控制在每分钟下降1℃，至-35℃~-40℃。

C.3.4 冷冻保藏

将预冻好的安瓿管或冻存管置于液氮罐中保藏。气相温度为-150℃，液相温度为-196℃。保藏周期5年~10年。

C.3.5 复苏

从液氮罐中取出菌种冻存管，立即置于37℃~40℃水浴中轻轻摇动，直到融化为止。无菌条件下开启冻存管，将菌种块移接到加富PDA培养基，于30℃下培养。生长繁殖后，再重新转接一次。

地方标准信息服务平台

中华人民共和国广西地方标准

草菇菌种保藏技术规范

DB45/T 1760—2018

广西壮族自治区质量技术监督局统一印刷

版权专有 侵权必究