

桑黄菌种质量鉴定技术规程

Regulations for identification of species quality of sanghuangporus

地方标准信息服务平台

2023 - 08 - 22 发布

2023 - 11 - 22 实施

目 次

前言III

1 范围1

2 规范性引用文件1

3 术语和定义1

4 鉴定要求1

5 质量指标1

6 鉴定方法2

7 判定规则4

8 档案管理4

附录 A（资料性） 桑黄基因组 DNA 提取方法5

附录 B（资料性） PCR 扩增体系和扩增程序6

附录 C（资料性） 桑黄菌种质量鉴定档案7

地方标准信息服务平台

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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由湖南省农业农村厅提出。

本文件由湖南农业标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：湖南省微生物研究院、长沙县综合检测中心、湖南湘蕈生物科技有限公司、湖南省产商品质量监督检验研究院。

本文件主要起草人：唐少军、邱华丽、钟文涛、许隼、喻桃生、杨祎、邵晨霞、任锐、朱华琚、靳磊、吴胜莲、贺月林。

地方标准信息服务平台

桑黄菌种质量鉴定技术规程

1 范围

本文件规定了桑黄菌种质量鉴定的质量指标、鉴定方法、判定规则及档案管理。
本文件适用于桑黄菌种的质量鉴定。

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/T 191 包装储运图示标志
- GB/T 12728 食用菌术语
- GB/T 30989 高通量基因测序技术规程
- NY/T 1284 食用菌菌种中杂菌及害虫的检验
- NY/T 1742 食用菌菌种通用技术要求
- NY/T 1846 食用菌菌种检验规程

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

桑黄 *Sanghuangporus*

桑黄在分类上属于担子菌门（Basidiomycota）、伞菌纲（Agaricomycetes）、锈革孔菌目（Hymenochaetales）、锈革孔菌科（Hymenochaetaceae），桑黄菌属（*Sanghuangporus*）。

4 送样要求

菌种送样时同一待鉴定菌种应不少于 10 瓶（管/袋），菌种应长满瓶（管/袋）。将样品分为 A、B 两份，每份 5 瓶（管/袋）以上，其中 1 份送检，另 1 份留样备查。留样菌种应于 4℃~6℃ 下贮存。

5 质量指标

5.1 感官指标

应符合表 1 要求。

表 1 感官指标

项目	要求
菌丝体特征	浅黄色至黄色，生长旺盛，菌丝浓密
培养物表面菌丝体	生长均匀，无角变，无高温抑制线
培养基	紧贴瓶（管/袋）壁，无干缩
培养物表面分泌物	允许有少量黄色至黄褐色水珠
菌丝生长量	长满瓶（管/袋）
气味	有桑黄菌种特有的清香味，无酸、臭、霉等异味
子实体原基	无
拮抗现象	无
污染	无

5.2 微生物学和虫害指标

应符合表 2 要求。

表 2 微生物学和虫害指标

项目	要求
杂菌	无
害虫	无
萌发时间（h）	≤48 h
菌丝生长速度	在温度 27℃ 条件下培养，平均生长速率应大于 6 mm/d。
定植率（%）	≥90
真实性	真实

6 鉴定方法

6.1 感官鉴定

应符合 NY/T 1846 的规定。

6.2 杂菌及害虫检验

应符合 NY/T 1284 的规定。

6.3 菌丝活力检验

6.3.1 菌丝继代培养

在含 PDA 固体培养基的培养皿中央接种初始菌种，27℃ 避光培养，当菌丝生长至距离培养皿边缘

约 1 cm 处时，用打孔器取菌丝前端直径 0.5 cm 的圆形菌块，转接至新的 PDA 培养皿中继代培养。

6.3.2 菌丝萌发时间

应继代培养 48 h 内萌发。

6.3.3 菌丝生长速度测定

在继代培养时，每天测量菌落直径，计算菌丝生长速率，菌丝平均生长速率应 2 mm/d~4 mm/d。

6.3.4 菌丝微观形态

应符合 NY/T 1846 的规定。

6.3.5 定植率测定

每个测试菌种准备 50 瓶（袋）培养基，接种后 10 d 内定植的计入定植数量 n ，定植率 X 由式（1）进行计算：

$$X = \frac{n}{m} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X ——定植率，%；

n ——定植数量；

m ——接种总数量。

6.4 菌种真实性鉴定

6.4.1 菌丝体培养

将活化的菌块接种于 PDA 固体培养基，30 ℃ 条件下静置培养 10 d~12 d，然后收集菌丝体。

6.4.2 基因组 DNA 提取

基因组 DNA 的提取方法参见附录 A，得到的 DNA 浓度不宜低于 50 ng/μl， $1.7 < A_{260}/A_{280} < 2.0$ 。

6.4.3 PCR 扩增

选择 ITS 通用引物 ITS1/ITS4：TCCGTAGGTGAACCTGCGG/TCCTCCGCTTATTGATATGC。PCR 扩增体系和扩增程序参见附录 B。

6.4.4 电泳检测

采用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，用凝胶成像系统拍照并记录电泳条带，条带应为 750~850 bp，条带大小正确且无其他杂带的样品应进行双向测序，测序方法应符合 GB/T 30989 的规定。

6.4.5 数据库比对

获得的核酸序列应在 NCBI 数据库进行 Blastn 比对 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)，或者在 RDP 数据库进行 Classifier 比对 (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>)，初步分析测序菌种的分类地位。

6.4.6 系统发育树的构建

下载准确的桑黄 ITS 序列，利用软件 CLUSTAL 进行多序列比对，用软件 MEGA 通过最大简约法（maximum parsimony, MP）和邻位相连法（neighbour joining, NJ）分别构建分子系统发育树，初步确定测序菌种的分类地位。

6.5 菌种标签、包装、标志检验

应符合 GB/T 191 和 NY/T1742 的规定。

7 判定规则

7.1 菌种真实性

经 ITS 序列比对和系统发育分析为桑黄（属名）菌种的判定为真实菌种。

7.2 合格菌种

各指标均符合本文件要求的，为合格菌种。

7.3 不合格菌种

任何一项指标不符合本文件要求的，为不合格菌种。

8 鉴定档案

应建立桑黄菌种质量鉴定档案，档案应包括但不限于感官鉴定、杂菌及害虫鉴定、真实性鉴定、菌丝生长活力等内容，电子档应保存 3 年以上。

地方标准信息服务平台

附录 A

(资料性)

桑黄基因组 DNA 提取方法

桑黄菌种基因组 DNA 提取按照以下步骤进行：

- a) 将菌丝体加入液氮研磨成粉末，取约 0.1 g 粉末转移至无菌的 2 ml 离心管中；
- b) 加入 700 μ l 裂解液 (CTAB 2%，pH=8.0) 65 $^{\circ}$ C 裂解 1.5~2.0 h，每隔 10 min 颠倒混匀；
- c) 12000 r/min 离心 10 min，取上清液转移至新的离心管；
- d) 加入等体积的 PCA (苯酚:氯仿:异戊醇=25:24:1)，缓慢混匀；
- e) 12000 r/min 离心 10 min，取上清液加入等体积 CA (氯仿:异戊醇=24:1)，缓慢混匀；
- f) 12000 r/min 离心 10 min，取上清液加入 2 倍体积的无水乙醇，缓慢混匀，置 -20 $^{\circ}$ C 静置 1 h 以上；
- g) 12000 r/min 离心 10 min 弃上清留下 DNA 沉淀；
- h) 用 1 mL 75% 乙醇清洗 DNA 沉淀，离心弃上清；
- i) 用含 1% RNase A 的 TE 缓冲液 (Tris-HCl 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L) 或灭菌双蒸水溶解沉淀；
- j) 采用超微量分光光度计或琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 浓度和质量。

地方标准信息服务平台

附 录 B

(资料性)

PCR 扩增体系和扩增程序

B.1 PCR 扩增体系

PCR 扩增的总体积为 50 μl ，其中 10 $\times$ PCR Buffer 5 μl ，dNTPs 5 μl ，引物 ITS1/ITS4 各 1 μl ，Taq 聚合酶 0.5 μl ，模板 DNA 2 μl ，双蒸水 35.5 μl 。

B.2 PCR 扩增程序

首先 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min；然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 sec，55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 sec，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 sec，30 个循环；最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。

地方标准信息服务平台

附 录 C
(资料性)
桑黄菌种质量鉴定档案

表 1 桑黄菌种质量鉴定档案表

菌种名称		菌种来源		菌种级别	
接种日期		保藏条件		联系人	
菌种质量鉴定步骤					
感官检验	气味		菌丝体		
	培养基颜色		培养物表面		
	记录人				
杂菌及害虫 检验	斑点		固体培养检验		
	液体培养检验		镜检		
	记录人				
菌种鉴定	DNA 浓度		电泳结果		
	测序结果		进化树分析		
	记录人				
理化指标	萌发时间		菌丝生长速率		
	菌丝长势		定植率		
	菌落颜色		原基		
	记录人				
判定结果	是否合格				
	记录人				