

广西壮族自治区地方标准

DB45/T 2866—2024

灵芝菌种制备技术规程

Technical code of practice for preparation of Ganoderma strain

地方标准信息服务平台

2024 - 06 - 28 发布

2024 - 08 - 01 实施

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 菌种生产 1

 4.1 品种及菌种的选择 1

 4.2 菌种制备环境 1

 4.3 设施设备 1

5 母种制作 2

 5.1 培养基 2

 5.2 容器要求 2

 5.3 培养基分装及灭菌 2

 5.4 菌种扩繁 2

 5.5 母种要求及入库 2

6 原种和栽培种生产 3

 6.1 容器要求 3

 6.2 培养基制作 3

 6.3 灭菌 3

 6.4 接种 3

 6.5 培养 3

 6.6 原种、栽培种要求及入库 3

7 菌种检验 4

 7.1 杂菌检验 4

 7.2 害虫检验 5

8 生产档案 5

附录 A （资料性） 常用培养基及配方 6

 A.1 母种培养基 6

 A.2 原种、栽培种培养基 6

 A.3 检验培养基 6

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。

本文件由广西壮族自治区农业农村厅提出、归口并宣贯。

本文件起草单位：广西壮族自治区农业科学院。

本文件主要起草人：王灿琴、韦娇君、胡秀月、韦仕岩、王晓国、蓝桃菊、罗阳兰、吴圣进、陈雪凤。

地方标准信息服务平台

灵芝菌种制备技术规程

1 范围

本文件确立了灵芝菌种制备的程序，规定了菌种生产、母种制作、原种和栽培种生产、菌种检验等阶段的操作指示，描述了制备过程信息的追溯方法。

本文件适用于广西行政区域内紫芝、赤芝等菌种的制备。

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 4806.7 食品安全国家标准 食品接触用塑料材料及制品
- GB 5749 生活饮用水卫生标准
- GB/T 12728 食用菌术语
- NY/T 528 食用菌菌种生产技术规程
- NY/T 1731 食用菌菌种良好作业规范
- NY/T 1742 食用菌菌种通用技术要求

3 术语和定义

GB/T 12728界定的术语和定义适用于本文件。

4 菌种生产

4.1 品种及菌种的选择

应选择出芝整齐、抗逆性强、产量高且稳定的品种，菌种应从具有资质的供种单位购买，其质量应符合NY/T 1742的规定。

4.2 菌种制备环境

应符合NY/T 528的规定。

4.3 设施设备

主要设施包括搅拌室、配料室、灭菌室、冷却室、接种室、培养室（通风、可控温）。主要设备包括电子秤、搅拌机、装袋机、高压灭菌锅、超净工作台或接种箱、空调机、除湿机、培养架、恒温培养箱、冰箱、显微镜等。

5 母种制作

5.1 培养基

参见附录A。

5.2 容器要求

母种选用试管作为容器，规格为18 mm×180 mm或者20 mm×200 mm；组织分离或纯化选用培养皿，规格直径为90 mm或60 mm。

5.3 培养基分装及灭菌

5.3.1 培养基试管分装及灭菌

分装培养基至试管的1/5~1/4，用硅胶塞封口，顶端胶塞长40 mm~50 mm。每5支试管扎成一捆，用消毒过的牛皮纸包住胶塞一头，用橡皮筋扎紧，胶塞一头朝上放入灭菌锅，在121.5℃~123℃(0.11 MPa~0.12 MPa)下灭菌25 min。灭菌后温度降至60℃左右摆斜面，斜面长度不超过试管长度的2/3，待培养基凝固并冷却后装进无菌聚丙烯袋备用。

5.3.2 培养基灭菌及培养皿分装

培养基装入300 mL~500 mL三角瓶刻度的1/2处，用硅胶塞封口，在121.5℃~123℃(0.11 MPa~0.12 MPa)下灭菌25 min，待温度降至60℃左右，在超净工作台上将三角瓶里的培养基倒入无菌的玻璃或塑料培养皿内，倒入培养基的量占培养皿高度的1/3。

5.4 菌种扩繁

组织块培养4 d~5 d，长出20 mm左右的白色菌丝，挑取健壮、洁白、均匀、整齐的前端约3 mm~4 mm的菌落，移接到PDA综合培养基试管斜面，于28℃恒温培养7 d~8 d，选菌丝健壮、洁白、均匀、整齐的试管斜面做为母种保存。

5.5 母种要求及入库

5.5.1 母种要求

母种在25℃~30℃下培养，6 d~8 d长满斜面，其它要求见表1。

表1 母种要求

项目	要求
容器	完整、无破损、无裂纹、洁净
棉塞或硅胶塞	干燥、整洁、松紧适度、能满足透气和过滤要求
接种量（菌种块大小）	(3 mm~5 mm) × (3 mm~5 mm)
菌丝生长量	长满培养基表面
菌丝体特征	洁白、色泽一致、均匀健壮、舒展、浓密，无角变，无抑制拮抗线
菌丝分泌物	无
菌落边缘	整齐
杂菌菌落	无
气味	具有菌种特有的清香味，无酸、臭、霉等异味

表 1 母种要求（续）

项目	要求
斜面背面外观	培养基不干缩、颜色均匀、无暗斑、个别菌株有少量色素

5.5.2 母种入库

符合NY/T 1742、NY/T 1731的规定。母种检验完成后应及时入库贮藏，库房温度为4℃～6℃，避光，适当通风，入库贮藏时间不超过1年。超过1年的母种应进行出芝检验后再进行后继生产。

6 原种和栽培种生产

6.1 容器要求

原种培养容器采用500 mL～750 mL，瓶口直径≤4 cm的聚丙烯塑料瓶或玻璃瓶；栽培种采用(13 cm～15 cm) × (26 cm～28 cm) × (0.04 cm～0.06 cm)的聚丙烯塑料袋，聚丙烯塑料袋应符合GB 4806.7的要求。

6.2 培养基制作

培养基配方参见附录A。阔叶木屑、棉籽壳、桑枝屑应于前一天预湿，麦麸、轻质碳酸钙、石灰等装袋前加入并搅拌均匀。原料含水量为55%～60%，pH为7～8。分装时，装至瓶子或袋子的1/2～2/3处，培养基上表面距瓶（袋）口4.5 cm～5.5 cm。瓶（袋）的棉塞、塑料盖应干燥、洁净、松紧适度，符合透气和滤菌要求。

6.3 灭菌

培养基配制好后，在4 h内进行装袋并高压灭菌，在0.14 MPa～0.15 MPa（温度为126℃～127℃）下灭菌2.5 h。

6.4 接种

灭菌后的培养基移入接种室，待瓶（袋）料冷却至30℃即可接种。接种量为1支母种接5～6瓶原种，每瓶原种接40～50袋栽培种，菌种块要紧贴培养料。

6.5 培养

接种后，原种、栽培种放置培养室进行培养。培养室环境要求黑暗、通风，温度为25℃～27℃，空气相对湿度为60%～70%。每隔2 d～3 d检查并清除污染的菌种。

6.6 原种、栽培种要求及入库

6.6.1 原种、栽培种要求

原种、栽培种在25℃～30℃下培养，25 d～32 d长满瓶（袋）。原种要求见表2，栽培种要求见表3。

表2 原种要求

项目	要求
容器	完整、无破损、无裂纹、洁净
棉塞或无棉盖体	干燥、整洁、松紧适度、能满足透气和过滤要求
接种量（菌种块大小）	45 mm～55 mm
气味	具有菌种特有的清香味，无酸、臭、霉等异味
菌丝生长量	长满培养基表面
菌丝体特征	洁白浓密、生长旺盛
培养基表面特征	生长均匀、无抑制拮抗线、紧贴瓶壁、无干缩，有少量革状黄色或褐色菌皮
杂菌菌落	无
子实体原基	无

表3 栽培种要求

项目	要求
容器	完整、无破损、洁净
棉塞或无棉盖体	干燥、整洁、松紧适度、能满足透气和过滤要求
接种量（菌种块大小）	45 mm～55 mm
气味	具有菌种特有的清香味，无酸、臭、霉等异味
菌丝生长量	长满培养基表面
菌丝体特征	菌丝体洁白、色泽一致、均匀健壮、舒展、浓密、菌落边缘整齐，无角变，无抑制拮抗线
培养基表面特征	培养基不干缩，无积水、颜色均匀、无暗斑、无色素、无高温抑制线、紧贴瓶壁、表面分泌物允许有少量革状褐色菌
杂菌菌落	无
子实体原基	无

6.6.2 原种、栽培种入库

符合NY/T 1742、NY/T 1731的规定。原种、栽培种检验完成后应及时入库贮藏，库房温度为10℃～15℃，避光，适当通风。入库贮藏时间不超过50 d，超过50 d应进行出菇检验后再进行后继生产。

7 菌种检验

7.1 杂菌检验

7.1.1 感官检验

按照表1、表2、表3的要求进行检验。

7.1.2 培养检测

7.1.2.1 细菌培养检测：取菌种上、中、下三个部位黄豆粒大小的菌块，接入15 mL～20 mL三角瓶肉汤培养基中，在28℃～30℃条件下振荡培养1 d～2 d，观察培养液是否混浊，若混浊则判定有细菌污染。

7.1.2.2 霉菌培养检测：取菌种上、中、下三个部位黄豆粒大小的菌块接到PDA培养皿上，在28℃～30℃条件下培养3 d～5 d，观察菌丝颜色、长势、菌落特征、有无杂菌孢子产生等。

7.2 害虫检验

从待检菌种的不同部位取少量培养物，置于白色搪瓷盘上，均匀铺开，用放大镜或解剖镜观察是否有害虫的卵、幼虫、蛹或成虫。

8 生产档案

生产者保留菌种生产过程中各个环节的有效记录，生产档案应至少保留两年。档案内容包括：原料来源、原料数量与配比、培养基制作过程、菌种来源、菌株名称、培养条件、检验及入库情况、污染及虫害发生情况等。

地方标准信息服务平台

附 录 A
(资料性)
常用培养基及配方

A.1 母种培养基

A.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1000 mL, pH自然。

A.1.2 PDA综合培养基

去皮马铃薯200 g, 葡萄糖20 g, 琼脂20 g, 磷酸二氢钾1.0 g, 硫酸镁0.5 g, 蒸馏水1000 mL, pH自然。

A.1.3 淀粉加富培养基

去皮马铃薯200 g, 可溶性淀粉20 g, 蛋白胨2 g, 磷酸二氢钾1.0 g, 硫酸镁0.5 g, 琼脂20 g, 蒸馏水1000 mL, pH自然。

A.2 原种、栽培种培养基

用水应符合GB 5749的规定。桑枝、棉籽壳20%~30%, 阔叶木屑60%~70%, 麦麸15%~20%, 石灰1%~2%, 石膏1%~2%, 过磷酸钙0.5%~1%, 含水量58%~62%, pH自然。

A.3 检验培养基

A.3.1 肉汤培养基

牛肉膏3 g, 蛋白胨10 g, 氯化钠5 g, 蒸馏水1000 mL, pH为7.0~7.5。

A.3.2 PDA培养基

去皮马铃薯200g, 葡萄糖 20 g, 琼脂20 g, 蒸馏水1000 mL, pH自然。