



中华人民共和国国家标准

GB/T 23599—2009

草 菇 菌 种

Pure culture of straw mushroom

2009-04-23 发布

2009-09-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准的附录 A、附录 B、附录 C 和附录 D 均为规范性附录。

本标准由中华全国供销合作总社提出并归口。

本标准起草单位：广东省食用菌行业协会、广东省微生物研究所、广东粤微食用菌技术有限公司、农业部微生物肥料和食用菌菌种质量监督检验测试中心。

本标准主要起草人：杨小兵、胡惠萍、吴清平、朱少琼、李森柱、黄龙花、黄晨阳、廖世煌、张一帆、张金霞。

草 菇 菌 种

1 范围

本标准规定了草菇(*Volvariella volvacea*)菌种的相关术语和定义、质量要求、试验方法、检验规则及标签、标志、包装、运输、贮存的要求。

本标准适用于草菇菌种的生产、流通和使用。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 191 包装储运图示标志(GB/T 191—2008,ISO 780:1997,MOD)

GB/T 4789.28—2003 食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂

GB/T 12728—2006 食用菌术语

NY/T 528—2002 食用菌菌种生产技术规程

3 术语和定义

GB/T 12728—2006 确立的以及下列术语和定义适用于本标准。

3.1

拮抗现象 antagonism

具有不同遗传基因的菌落间产生不生长区带或形成不同形式线状边缘的现象。

3.2

角变 sector

因菌丝体局部变异或感染病毒而导致菌丝变细、生长缓慢、菌丝体表面特征成角状异常的现象。

3.3

高温抑制线 high-temperated line

食用菌菌种在生产过程中受高温的不良影响,培养物出现的圈状发黄、发暗或菌丝变稀弱的现象。

4 质量要求

4.1 母种

4.1.1 容器规格

按 NY/T 528—2002 中 4.7.1.1 的规定执行。

4.1.2 感官要求

应符合表 1 的规定。

表 1 母种感官要求

项 目		要 求
容器		完整,无损
棉塞或硅胶塞		干燥、洁净、松紧适度,能满足透气和滤菌要求
培养基灌入量		试管总容积的四分之一至五分之一
斜面长度		顶端距棉塞或硅胶塞 40 mm~50 mm
接种块大小(接种量)		(3 mm~5 mm)×(3 mm~5 mm)
菌种外观	菌丝生长量	长满斜面
	菌丝体特征	淡白至黄白色、半透明、旺健、丰满、爬壁力强、气生菌丝旺盛、菌种表面允许有少量红褐色的厚垣孢子
	菌丝体表面	舒展、无角变
	菌丝分泌物	无
	菌落边缘	整齐
	杂菌菌落	无
斜面背面外观		培养基不干缩,颜色均匀、无暗斑、无色素
气味		有草菇菌种特有的清香味,无酸、臭、霉等异味

4.1.3 微生物学要求

应符合表 2 的规定。

表 2 母种微生物学要求

项 目	要 求
菌丝生长状态	粗壮、丰满,显微镜下观察,有直径 $\geq 8 \mu\text{m}$ 的粗壮菌丝,菌丝线形,分枝均匀,呈直角或近于直角
细菌和霉菌	无

4.1.4 菌丝生长速度

在 PDA(马铃薯葡萄糖琼脂)培养基上,在黑暗、适温($32 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$)条件下,菌丝长满斜面的时间为 3 d~5 d。

4.1.5 母种栽培性状

供种单位所供母种需经出菇试验确认农艺性状和商品性状等种性合格后,方可用于扩大繁殖或出售。产量性状在正常条件下,以采用附录 B 中提供的栽培培养基为例,生物学效率应不低于 20%。

4.1.6 菌丝可溶性蛋白电泳图谱特征

电泳图谱在 $R_f=0.75$ (R_f 为电泳条带的相对迁移率)处具染色很深的蛋白带。

4.1.7 ITS(内部转录间隔区)序列特征

供试菌株的 ITS 序列与草菇 V23 的 ITS 序列进行比对,相似性应达 98%以上。

4.2 原种

4.2.1 容器规格

使用 650 mL~750 mL 且耐 $126 \text{ }^\circ\text{C}$ 高温的无色或近无色的玻璃菌种瓶,或 850 mL 耐 $126 \text{ }^\circ\text{C}$ 高温白色半透明的塑料菌种瓶,或 $(13 \text{ cm} \sim 15 \text{ cm}) \times (26 \text{ cm} \sim 28 \text{ cm})$ 耐 $126 \text{ }^\circ\text{C}$ 高温的聚丙烯塑料袋,各类容器都应使用棉塞或能满足滤菌和透气要求的无棉塑料盖。

4.2.2 感官要求

应符合表 3 的规定。

表 3 原种感官要求

项 目		要 求
容器		完整,无损
棉塞或无棉塞塑料盖		干燥、洁净、松紧适度,能满足透气和滤菌要求
培养基上表面距瓶(袋)口距离		50 mm±5 mm
接种量(每支母种接原种数,接种物大小)		4 瓶(袋)~6 瓶(袋),≥(12 mm×15 mm)
菌种外观	菌丝生长量	长满容器
	菌丝体特征	菌丝显淡白或灰白色,生长旺健、饱满,菌种表面允许有少量红褐色的厚垣孢子
	培养物表面菌丝体	无角变、无高温抑制线
	培养基及菌丝体	紧贴瓶壁、无干缩
	培养物表面分泌物	无
	杂菌菌落	无
	拮抗现象	无
子实体原基		无
气味		有草菇菌种特有的清香味,无酸、臭、霉等异味

4.2.3 微生物学要求

应符合表 2 的规定。

4.2.4 菌丝生长速度

在适宜培养基上,在适温(32℃±1℃)条件下,菌丝长满容器的时间为 7 d~12 d。

4.3 栽培种

4.3.1 容器规格

按照 4.2.1 的规定执行。

4.3.2 感官要求

应符合表 4 的规定。

表 4 栽培种感官要求

项 目		要 求
容器		完整,无损
棉塞或无棉塞塑料盖		干燥、洁净、松紧适度,满足透气和滤菌要求
培养基上表面距瓶(袋)口的距离		50 mm±5 mm
接种量[每瓶(袋)原种接栽培种数]		30 瓶(袋)~50 瓶(袋)
菌种外观	菌丝生长量	长满容器
	菌丝体特征	菌丝显淡白或灰白色,生长旺健、饱满,菌种表面允许有少量红褐色的厚垣孢子
	不同部位菌丝体	生长齐整,色泽一致,无角变,无高温抑制线
	培养基及菌丝体	紧贴瓶(袋)壁、无干缩
	培养物表面分泌物	无
	杂菌菌落	无
	拮抗现象	无
子实体原基		无
气味		有草菇菌种特有的清香味,无酸、臭、霉等异味

4.3.3 微生物学要求

应符合表 2 的规定。

4.3.4 菌丝生长速度

在适宜培养基上,在黑暗、适温(32 °C±1 °C)条件下,菌丝长满容器的时间为 7 d~12 d。

5 试验方法

5.1 感官检验

按表 5 逐项进行。

表 5 感官要求检验方法

检验项目	检验方法	检验项目	检验方法
容器	肉眼观察	接种量	母种、原种 肉眼观察、测量
			栽培种 检查生产记录
硅胶塞、无棉塑料盖	测量	培养基上表面距瓶(袋)口的距离	肉眼观察
母种培养基灌入量	肉眼观察	菌种外观各项(杂菌菌落除外)	肉眼观察
母种斜面长度	测量	杂菌菌落	肉眼观察,必要时用 5 倍放大镜观察
母种斜面背面外观	肉眼观察	气味	鼻嗅

5.2 微生物学检验

5.2.1 表 2 中菌丝生长状态用放大倍数不低于 10×40 的光学显微镜对培养物的水封片进行观察,每一检样应观察不少于 50 个视野。

5.2.2 细菌检验:取少量疑有细菌污染的培养物或菌块,按无菌操作接种于 GB/T 4789.28—2003 中 4.8 规定的营养肉汤培养液中,36 °C~38 °C 振荡培养 1 d,观察培养液是否混浊。培养液混浊,为有细菌污染;培养液澄清,为无细菌污染。

5.2.3 霉菌检验:取少量疑有霉菌污染的培养物或菌块,按无菌操作接种于 PDA 培养基(见 A.1.1)中,25 °C~28 °C 培养 3 d~4 d,出现白色以外色泽的菌落或非草菇菌丝形态菌落的,或有异味者为霉菌污染物,必要时进行水封片镜检。

5.3 菌丝生长速度

5.3.1 母种:按 A.1.1 或 A.1.2 的配方,32 °C±1 °C 培养,计算长满试管所需天数。

5.3.2 原种和栽培种:按 A.2.1、A.2.2 的配方任选其一,在 32 °C±1 °C 培养,计算长满所需天数。

5.4 菌丝可溶性蛋白电泳方法

供试菌株先经 3 次继代培养,按附录 C 规定的 PDY(马铃薯加富)液体培养基,32 °C 黑暗浅层培养 10 d。取上层菌丝体于冰浴中匀浆,再于 13 000 r/min,离心 10 min,上清液作为样品,采用聚丙烯酰胺凝胶电泳,Tris-甘氨酸缓冲系统,pH8.9,凝胶浓度 8%。使用 Mini-PROTEAN II 板式电泳槽,点样量 20 μL,于冰浴中以 10 mA/块电泳 2 h。用考马斯亮蓝 R250 染色(0.1%考马斯亮蓝的 7%乙酸溶液),用含 7%乙酸的 20%甲醇溶液固定脱色。

5.5 ITS 序列分析方法

按照附录 D 进行操作。

5.6 母种农艺性状和商品性状

将被检母种制成原种、栽培种。按附录 B 规定的培养基配方,采用床架式栽培方法,制作 15 m² 培养料,料厚度为 8 cm~10 cm。接种后分三组(每组 5 m²)进行常规管理,根据表 6 所列项目,做好栽培

记录,统计检验结果。同时将该母种的出发菌株设为对照,做同样处理。对比二者的检验结果,以时间计的检验项目中,被检母种的任何一项时间较对照菌株推迟3 d以上(含3 d)者,为不合格;产量显著低于对照菌株者,为不合格;菇体外观形态与对照明显不同或畸形者,为不合格。

表6 母种栽培中农艺性状和商品形状检验记录

检验项目	检验结果	检验项目	检验结果
母种长满所需时间/d		原种长满所需时间/d	
菌丝长满培养基料面所需时间/d		总生物学效率/%	
出第一潮菇所需时间/d		色泽、质地	
第一潮菇生物学效率/%		菇形	
平均单产/(kg/m ²)		菇体尺寸/mm	

5.7 留样

各级菌种都要留样备查,留样的数量应每个批号菌种3支(瓶、袋),于15℃~20℃下贮存,贮存期母种为90 d,原种为15 d,栽培种为15 d。

6 检验规则

6.1 抽样

质检部门的抽样应具有代表性。母种按品种、培养条件、接种时间分批编号,原种、栽培种按菌种来源、制种方法和接种时间分批编号。按批随机抽取被检样品。母种、原种、栽培种的抽样量分别为该批菌种量的10%、5%、1%。但每批抽样数量不得少于10支(瓶、袋);超过100支(瓶、袋)的,可进行两级抽样。

6.2 判定规则

按质量要求进行。检验项目全部符合质量要求时,为合格菌种,其中任何一项不符合要求,均为不合格菌种。

技术指标全部或部分不符合要求,允许业者整改后申请复检一次,如仍不符合要求,则判此批产品不合格。

7 标签、标志、包装、运输、贮存

7.1 标签、标志

7.1.1 产品标签

每支(瓶、袋)菌种应贴有(印有)清晰注明以下内容的标签:

- 产品名称(如:草菇母种);
- 品种名称(如:粤草02);
- 生产单位(××菌种厂);
- 接种日期(如:20××.××.××);
- 执行标准。

7.1.2 包装标签

每箱(或其他包装单位)菌种应贴有清晰注明以下要素的包装标签:

- 产品名称、品种名称;
- 厂名、厂址、联系电话;
- 出厂日期;
- 保质期、贮存日期、贮存条件;
- 数量;

f) 执行标准。

7.1.3 包装贮运图示

按 GB/T 191 的规定,应注明以下图示标志:

- a) 小心轻放标志;
- b) 防水、防潮、防冻标志;
- c) 防晒、防高温标志;
- d) 防止倒置标志;
- e) 防止重压标志。

7.2 包装

7.2.1 母种外包装采用木盒或有足够强度的纸盒,内填棉花、碎纸、泡沫塑料等缓冲物。

7.2.2 原种、栽培种外包装可采用洁净、干燥的塑料箱、编织袋或有足够强度的纸箱。

7.3 运输

7.3.1 不得与有毒物品混装、混运。

7.3.2 气温在 10℃~15℃和 35℃以上时,运输时间不得超过 2 d;气温在 15℃~35℃时,运输时间不得超过 1 周;气温在 10℃以下时,应保温 15℃~35℃运输。

7.3.3 运输中应有防震、防晒、防尘、防雨淋、防冻、防杂菌污染的措施。

7.4 贮存

7.4.1 母种在使用或销售前,在 15℃~20℃保藏不超过 90 d。使用前,在 20℃~35℃存放不超过 48 h。

7.4.2 原种和栽培种菌丝长满种袋(瓶)后,应置于清洁、干燥通风(空气相对湿度 30%~70%)、避光的室内。在 28℃~32℃贮存不超过 5 d,而在 15℃~20℃贮存不超过 15 d。

附录 A
(规范性附录)

草菇母种、原种及栽培种常用培养基及其可选配方

A.1 草菇母种常用培养基及其可选配方

A.1.1 PDA 培养基(1 000 mL)

马铃薯(去皮)200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,水 1 000 mL, pH7.5~8。

A.1.2 综合 PDA(CPDA)培养基(1 000 mL)

马铃薯(去皮)200 g,葡萄糖 20 g,磷酸二氢钾 2 g,硫酸镁 0.5 g,琼脂 20 g,维生素 B₁ 20 μg,水 1 000 mL, pH7.5~8。

A.2 草菇原种和栽培种常用培养基及其可选配方

A.2.1 颗粒培养基

小麦、谷子、玉米或高粱等粮食颗粒 99.5%,生石灰 1%,含水量 50%±2%,pH8~9。

A.2.2 棉籽壳培养基

棉籽壳 80%,麦麸 15%,生石灰 5%,含水量 60%±2%,pH8~9。

附 录 B
(规范性附录)
草菇栽培常用培养基

粕籽棉培养基

粕籽棉 95%，用 5%生石灰水浸泡，沥去余水后使用。

附 录 C

(规范性附录)

菌丝可溶性蛋白电泳方法中 PDY 培养基配方

PDY 培养基

Difco 马铃薯-葡萄糖粉 21 g, 酵母粉 2 g, 蒸馏水 1 000 mL。

附 录 D
(规范性附录)
草菇菌种 ITS 序列分析法

D.1 检测流程

待测样品→液体培养基增菌或待测菌株→菌丝 DNA 提取→PCR 扩增→序列测定→比对分析→结果判定。

D.2 材料与方法

D.2.1 菌体培养

待测菌种增菌液体培养基 CYM: 蛋白胨 2 g, 酵母膏 2 g, 葡萄糖 20.2 g, 硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.5 g, 磷酸氢二钾 (K_2HPO_4) 1 g, 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 1 g, 纯水 1 000 mL, pH7.5~8.0。

培养基分装至三角瓶后灭菌, 冷却, 接种, 置于 30 °C 130 r/min 摇床培养 3 d, 菌丝真空抽滤, 无菌水洗涤, 低温干燥, -20 °C 保存备用。

D.2.2 DNA 提取和纯化

CTAB(cetyl trimethyl ammonium bromide)法:

- a) 2 倍 CTAB 提取液在 65 °C 水浴锅中预热。
- b) 取适量(0.1 g~1 g)菌丝体置于研钵中, 用已灭菌的石英沙或液氮中研磨, 同时加入少量聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)(防氧化), 将菌丝体充分研磨成粉末状。
- c) 样品转入 1.5 mL 离心管中, 管内先加入 600 μL 2 倍 CTAB 提取液在 65 °C 水浴锅中预热(用少量提取液洗下研钵上残留的粉末样品, 轻轻混匀, 65 °C 水浴 30 min~60 min, 其间每隔 10 min 轻轻摇动)。
- d) 冷却 2 min 后, 加入等体积(约 600 μL)的酚-三氯甲烷-异戊醇(25:24:1), 充分摇动混匀。
- e) 10 000 r/min, 离心 10 min, 取上清液移入另一新管, 重复步骤 d) 用三氯甲烷-异戊醇(24:1)再抽提离心一次。同时将 2/3 体积的异丙醇(或 2 倍体积的无水乙醇)预冷。
- f) 两次抽提后的上清液转入新离心管, 加入 2/3 体积的预冷异丙醇(或 2 倍体积的预冷无水乙醇), 再加入约 1/10 体积的乙酸钠(约 30 μL ~50 μL), 缓慢翻转混匀, 沉淀 DNA。
- g) 13 000 r/min, 离心 15 min, 去上清液。70%酒精(400 μL)漂洗沉淀 2 次(快速翻转振荡几分钟), 8 000 r/min, 离心 5 min, 去上清液, 沉淀用纸巾吸取剩余乙醇, 自然晾干或低温烘干(电风筒吹干)。
- h) 加 1 倍 TE 缓冲液(Tris 10 mmol/L+EDTA 1mmol/L)溶解(约 50 μL)。-20 °C 保存备用。

D.2.3 PCR 扩增

采用真菌核糖体基因间隔区通用引物对 ITS1/ITS4(ITS1: TCC GTA GGT GAA CCT GCG G; ITS4: TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC)进行 PCR 扩增。

反应体系: PCRmix 25 μL , DNA 模板 5 μL , 双蒸水 12 μL , 通用引物(10 uM)各 4 μL , 总体积 50 μL 。

反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 1 min→55 °C 1 min→72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min 完成延伸。

D.2.4 序列测定

PCR 扩增产物用 1.0%琼脂糖电泳检测, 在 UVP 凝胶成像系统下成像观察条带情况, 并保存图像。PCR 扩增产物回收纯化后, 以 PCR 引物为测序引物, 分别从正反链双向测序, 该操作由生物公司完成。

D.2.5 序列分析

双向序列拼接后在 GenBank 上进行比对(Blast),若发现序列与 GenBank 上已知序列方向相反,则应对序列进行反向互补处理后再比对,对获得的同源序列进行分析,待测菌种与 GenBank 上某菌种序列同源性达 98%以上时,则待测菌与 GenBank 上该已知菌是同一个种。

取草菇 V23 为草菇的对照标准种,其 ITS 序列登录号为 FJ379273,其碱基序列如下:GGCTTTCTGGTAGGGTAACCTGCGCAAGGATCATTACAGAATCGAACGCGGGTCGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCCCGACGCCTTCCATTCTCCACGTCCCCACCTGTGCACCTTCTGTAGGCCGTGAAGCCGCCTCGTTCGGCTCCCTCGGCTCTACGAGATCTTTTGTACACCCTTGAGAAAAACGTGTTGCAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGACCCCTCGTCGGCCCCATA GACATACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGACCTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATCGAATCCTCAAGCCAGCCCCGGCTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAGTTGGGAGCTGTGCGGGTCGCTAGCCTTCGCGATCCGCTCTCTCAAAGGCATCAGCAGGGCCAGTCGCAGTCGGCCTCGTGGCGTTGATAGTCCATCTACGCCCCCGCGGCCGCACTCAGCGTGGCTCGGCTTCGAACCGTCCGGCCCCTCGAGCCGGACAGGCCGACACACCCCGGCCTCACCCCTTGACACCCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAGGCGGGAGGAA,当待测菌的 ITS 序列与草菇 V23 的 ITS 序列相似性 $\geq 98\%$ 时,该待测菌种就是草菇(*Volvariella volvacea*)菌种。
