

DB5117

四川省（达州市）地方标准

DB5117/TXX~2024

蜜环菌菌种生产技术规程

Technical regulation for spawn culture by *Armillaria mellea*

2024-XX-XX 发布

2024-XX-XX 实施

达州市市场监督管理局 发布

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这些专利的责任。

本文件由达州市农业科学研究院提出，达州市农业农村局归口。

本文件起草单位：达州市农业科学研究院。

本文件主要起草人：何雪梅、赵辉、李彪、冯慧、孙传齐、马洁、邓力、徐德、付亮、黄娟、王涛

蜜环菌菌种生产技术规范

1 范围

本文件规定了蜜环菌菌种生产技术的术语和定义、生产环境与设施、菌种的制备、菌种保藏、菌种质量、入库、留样、标志、包装、运输以及生产档案等技术要求。

本文件适用于四川省达州市蜜环菌菌种生产。

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 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/T12728 食用菌术语

NY/T 528 食用菌菌种生产技术规范

NY/T 2375 食用菌生产技术规范

GB 9687 食品包装用聚乙烯成型品卫生标准

GB 9688 食品包装用聚丙烯成型品卫生标准

NY 5099 无公害食品 食用菌栽培基质安全技术要求

3 术语和定义

GB/T 12728 界定的下列术语和定义适用于本文件。

3.1 蜜环菌 *Armillaria mellea*

蜜环菌（*Armillaria mellea*）是担子菌门（Basidiomycota）、伞菌目（Agaricales）、泡头菌科（Physalacriaceae）蜜环菌属（*Armillaria*）的兼性腐生和寄生真菌，是天麻（*Gastrodia elata*）的共生菌，天麻生长的营养来源全靠与其共生的蜜环菌供给。

3.2 母种 stock culture

从菌索、子实体、菌材、着生菌丝体的天麻块茎，经各种方法分离得到的菌丝体纯培养物及其继代培养物，以玻璃试管为培养容器，也称一级菌种、试管种。

3.3 原种 mother spawn

由母种移植、扩大培养而成的菌丝体纯培养物。常以 500 mL 或 750 mL 容积的菌种瓶为容器，也称二级种。

3.4 栽培种 cultispawn

由原种移植、扩大培养而成的菌丝体纯培养物。常以聚丙烯塑料瓶或塑料袋为容器。栽培种只能用于栽培，不可再次扩大繁殖菌种，也称三级种。

3.5 菌索 rhizomorph

真菌菌丝体集合而成的绳索状结构。蜜环菌菌索形似植物的根或绳索，由菌丝紧密排列组成，并角质化形成鞘包裹着内部白嫩的菌丝，菌索幼嫩时常呈白色，后变为黄褐色、红褐色、褐色直至老化变黑。

4 菌种生产环境要求

菌种生产应选择地势平坦，通风良好，靠近水源，排水畅通，交通便利的场地。场地环境符合 NY/T 528 规定。使用水源符合 GB 5749 的要求。

5 设备设施

根据生产需要配备高压或常压灭菌锅、装瓶机、超净工作台或接种箱、恒温培养箱、调温设备、培养架、冰箱等常规菌种生产设备。各级菌种生产有各自隔离的原材料库、配料分装室、灭菌室、冷却室、接种室、培养室、储存室、菌种检验室等设施。菌种生产设施设备应符合 NY/T 1731（食用菌菌种良好作业规范）的规定。

菌种和基质质量标准应符合 NY 5099 的规定和要求。

6 蜜环菌菌种的选择、制备

6.1 母种的制备

6.1.1 培养基配方

去皮马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、水 1000 mL、pH 自然。

6.1.2 容器

试管规格 18 mm×180 mm 或者 20 mm×200 mm。

6.1.3 配制

将马铃薯切片，加水煮沸 30 min，用八层纱布过滤，取滤液 1000 mL 并放入琼脂加热，使之全部融化，最后加入葡萄糖溶解于培养基中。

6.1.4 分装及灭菌

将培养基趁热分装于试管内，分装培养基至试管长度的 $\frac{2}{3}$ 处，用硅胶塞封口，每 7 支试管为 1 把，牛皮纸包扎，在 121-123 °C（0.1-0.12 MPa）灭菌 30 min。灭菌结束后，试管直立放置于洁净环境中。

6.2 菌种选择

使用正规菌种厂生产的优良品种，筛选菌索萌发时间短、主枝粗壮、分枝茂密、布满培养基时间短、生物量大、与天麻亲和性强、能显著提高天麻产量的的优良蜜环菌菌株。

6.3 菌种分离及一级菌种（母种）制备

蜜环菌菌种主要有蜜环菌菌索、带菌索的天麻块茎、蜜环菌子实体和孢子等。

6.3.1 菌索制备法

将蜜环菌索、天麻块茎、天麻原球茎或兰科植物的根分别用水洗净表面泥土，然后切取需要的蜜环菌菌索组织，用无菌水冲洗 3 次，放入 0.1%氯化汞溶液浸泡 1 min，再用无菌水冲洗 3 次，洗去残存的药液，在青霉素液（20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）中浸泡片刻，用灭菌滤纸吸去表面附着水液，然后接种于 PDA 培养基上，重复接种三个平板，置 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养，观察菌丝生长状态，确保无污染，3-7d 左右，开始长出绒状白色菌丝，继续培养可产生菌索分枝，用接种铲切取幼嫩的菌索部分，接入 PDA 培养基中，25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养，菌索长满培养基后即为纯化的母种，存放于 4-8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

6.3.2 子实体制备法

将野外采集到的蜜环菌子实体在超净工作台上用 75%的酒精棉球擦拭菌盖表面，用镊子撕去菌盖表皮，用无菌解剖刀在菌柄与菌盖交接处切取小块菌肉，接种于 PDA 培养基上，在 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱避光培养 5-7d，在接种处产生菌索分枝时，同菌索制备法进行培养获得纯化后的母种。

6.3.3 孢子制备法

将开伞的蜜环菌子实体截去菌柄的下半部，用 75%的酒精在菌盖表面及菌柄部分进行擦拭消毒，然后菌褶向下插在孢子收集装置的支架上。将支架放于无菌培养皿中，用钟罩或大烧杯罩住以收集孢子。孢子落于皿内后，加入无菌水制成孢子悬浮液，取悬浮液接种于 PDA 培养基，25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d-4 d，在接种点处萌发出绒状白色菌丝后，同菌索制备法进行培养获得纯化后的母种。

6.4 鉴定

采取天麻常规种植的伴栽试验对蜜环菌进行鉴定。

7 二级菌种（原种）培养

7.1 培养基配方

木屑150 g、麸皮20 g、黄豆粉10 g、葡萄糖20 g、琼脂粉10 g、pH自然。

7.2 容器

500mL、750 mL 无色玻璃菌种瓶。

7.3 配置

取木屑 150 g 加水浸泡过夜，将浸泡后的木屑连同浸泡液小火煮沸 30 min 后，取滤液加入麦麸、黄豆粉继续小火煮沸 30 min，定容至 1000 mL，加入琼脂搅拌均匀煮至溶化后加入葡萄糖溶化即可。

7.4 分装、灭菌及接种

分装时，先将煮过的木屑装入菌种瓶内，每瓶装至瓶高的 $\frac{1}{5}$ 处，再将配制好的培养基搅拌均匀后分装至菌种瓶，装至瓶高 $\frac{2}{3}$ 处，封口膜封口后在121℃-123℃下灭菌3小时，自然降温。冷却后，接入母种，置于25℃恒温培养，30d~45d蜜环菌菌丝和菌索可长满全瓶，所得菌种即为原种。

8 三级菌种（栽培种）培养

8.1 培养基配方

配方 1：锯末 60%，麸皮 17%，玉米面 15%，黄豆粉 10%，KH₂PO₄ 2%，葡萄糖 2%，石膏 1%。

配方 2：棉籽壳 20%，锯末 50%，麸皮 28%，蔗糖 1%，石膏粉 0.5%，KH₂PO₄ 0.3%，MgSO₄ 0.2%。

配方 3：玉米粒 50%，棉籽壳 50%，石膏 1%。

配方 4：枝条 50%，杂木屑 44.8%，麦麸 5%，白糖 0.1%，石膏 0.1%。

8.2 容器

择容积750 mL（口径4.5 cm×高度18 cm×底径8.5 cm）的带盖聚丙烯塑料瓶，瓶盖带有透气棉；聚丙烯塑料袋规格为17 cm×33 cm×0.005 cm，塑料瓶、塑料袋的材质应符合GB 4806.7的规定。

8.3 配制、分装及灭菌

锯末、棉籽壳需在配置培养基前24 h预湿；玉米粒先清洗除去杂物和破碎粒，放入锅中加水煮至熟而不烂、涨而不破，内部无白心，煮好后摊薄、翻动晾干表面水分，直至内湿外干、相互无粘结；枝条选取直径0.5cm-1.5 cm的树枝截成1.5cm--2.5 cm的小段，枝条、杂木屑需在水中浸泡48 h。

配方 1-3 按照各原材料比例加水搅拌均匀至含水量 60%左右，用手紧握栽培料有水溢出无滴落为宜，用装袋机装入 17 cm×33 cm×0.005 cm 栽培袋中，每袋装料高度不超过料袋总高度的 $\frac{2}{3}$ ，以防止高压灭菌过程中培养基沸腾污染无绵盖；枝条液体培养基需使用菌种瓶培养，先将原材料按比例加水搅拌均匀，再用装瓶机进行装瓶，装料量不超过总瓶高度的 $\frac{2}{3}$ ，再加水至瓶口后封盖。培养基配置完成后，在 121℃-123℃下灭菌 3 小时。

8.4 接种及培养

培养基经高压灭菌冷却后，每瓶接入蜜环菌原种。在 25℃恒温培养 30 d~45 d 后，蜜环菌丝和菌索可长满全瓶，即为栽培种，可用于培养菌枝和菌材。

9 菌种保藏

母种于1℃-4℃下冰箱或冰柜中保藏；原种和栽培种不能与有刺激气味的东西混放，要求在4℃-6℃的清洁干燥暗光的贮藏库中存放。

10 菌种质量

10.1 母种质量

母种菌索应长满直立培养基，粗壮均匀，有索状联合，无杂菌和异味。

10.2 原种、栽培种质量

无杂菌，无害虫，上下一体，袋（瓶）壁有少量水珠、无积水，菌块完整、不萎缩、有弹性、无异味，菌丝呈白色至棕红色。

11 入库、留样

制备好的菌种，检验合格后及时入库。各级菌种都应留样备查，母种留样数量为每批次3-5支，原种和栽培种每批次5瓶（袋）-7瓶（袋），贮藏至正常条件下该批菌种生产出天麻为止。

12 标志、包装、运输

各级菌种都应表明产品名称、生产单位、生产许可证号、保藏条件；包装材料应符合GB 4806.7的规定；在0℃-15℃条件下运输，不得与有毒有害物质混合运输。

13 建立生产档案

生产中各环节都应详细记录，建立生产档案，保存不少于2年。