

前 言

本标准的附录 A、附录 B 均为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出并归口。

本标准起草单位：福建省轻工业研究所、福建省蘑菇菌种研究推广站。

本标准主要起草人：王泽生、廖剑华、曾辉、陈军、陈美元。

引 言

栽培双孢蘑菇使用的菌种是人工培育的纯菌丝体及其培养基的混合体。我国采用三级扩大繁育程序(即母种、原种、栽培种)培育双孢蘑菇菌种。

为了规范我国双孢蘑菇菌种生产、经销和使用,确保我国双孢蘑菇生产持续健康发展,特制定本标准。

双孢蘑菇菌种

1 范围

本标准规定了双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)菌种的质量要求、试验方法、检验规则及标签、标志、包装、贮运等。

本标准适用于双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)菌种的生产、经销和使用。

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—2000,eqv ISO 780:1997)

GB/T 4789.28 食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂

GB/T 12728—1991 食用菌术语

GB 19172—2003 平菇菌种

NY/T 528—2002 食用菌菌种生产技术规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

母种 stock culture

经各种方法选育得到的具有结实性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和使用单位,也称一级种、试管种。

[NY/T 528—2002,定义 3.3]

3.2

原种 pre-culture spawn

由母种移植、扩大培养而成的菌丝体纯培养物。常以玻璃菌种瓶或塑料菌种瓶或 15 cm×28 cm 聚丙烯塑料袋为容器。

[NY/T 528—2002,定义 3.4]

3.3

栽培种 spawn

由原种移植、扩大培养而成的菌丝体纯培养物。常以玻璃瓶或塑料袋为容器。栽培种只能用于栽培,不可再次扩大繁殖菌种。

[NY/T 528—2002,定义 3.5]

3.4

颞颞现象 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行边缘的现象。

[GB 19172—2003,定义 3.4]

3.5

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。
[GB 19172—2003,定义 3.5]

3.6

高温抑制线 high temperature 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。

[GB 19172—2003,定义 3.6]

3.7

同工酶 isoenzyme

催化相同生化反应,而结构及理化性质不同的酶分子。通过凝胶电泳使同工酶分离成迁移率不同的区带,经生物化学染色后显示出的同工酶谱,可对生物品种进行酶分子水平的鉴别或鉴定。

3.8

生物学效率 biological efficiency

单位数量培养料的干物质与所培养产生出的子实体或菌丝体干重之间的比率。

[GB/T 12728—1991,定义 2.1.20]

3.9

种性 characters of variety

食用菌的品种特性是鉴别食用菌菌种或品种优劣的重要标准之一。一般包括对温度、湿度、酸碱度、光线和氧气的要求,抗逆性、丰产性、出菇迟早、出菇潮数、栽培周期、商品质量及栽培习性等农艺性状。

[NY/T 528—2002,定义 3.8]

4 质量要求

4.1 母种

4.1.1 容器规格应符合 NY/T 528—2002 中 4.7.1.1 规定。

4.1.2 感官要求应符合表 1 规定。

表 1 母种感官要求

项 目	要 求	
容器	完整,无损	
棉塞或无棉塑料盖	干燥、洁净,松紧适度,能满足透气和滤菌要求	
培养基灌入量	为试管总容积的四分之一至五分之一	
培养基斜面长度	顶端距棉塞 40 mm~50 mm	
接种量(接种块大小)	(3~5) mm×(3~5) mm	
菌种外观	菌丝生长量	长满斜面
	菌丝体特征	洁白或米白、浓密、羽毛状或叶脉状
	菌丝体表面	均匀、平整、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	有双孢蘑菇菌种特有的香味,无酸、臭、霉等异味	

4.1.3 微生物学要求应符合表 2 规定。

表 2 母种微生物学要求

项目	要求
菌丝	粗壮
杂菌	无

4.1.4 菌丝生长速度:在 PDA 培养基上,在适温($24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$)下,15 天~20 天长满斜面。

4.1.5 母种遗传和栽培性状:供种单位需对所供母种进行酯酶(Est)同工酶类型鉴定,确认其遗传类型与对照相同后,再经出菇试验确证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。

4.1.5.1 菌丝体 Est 同工酶的板状聚丙烯酰胺凝胶电泳类型:包括 G 型(呈现 e1、e3 特征带)、H 型(呈现 e2、e4 和 e30~e33 特征带)、HG1~HG2 型(呈现 e1、e3、e30~e33 特征带)和 HG4 型(呈现 e1、e2、e3、e4 和 e30~e33 特征带)等。以 Est 区带向正极泳动距离与溴酚蓝指示剂向正极泳动距离的比值作为电泳相对迁移率(R_m)。e1、e2、e3、e4、e30、e31、e32 和 e33 的 R_m 值分别为 0.820、0.810、0.760、0.750、0.128、0.100、0.070 和 0.010。

4.1.5.2 菌丝萌发、定植与生长能力:接种到适合的培养基后,在正常条件下 24 h 内萌发,定植迅速、菌丝健壮。

4.1.5.3 结菇转潮能力:覆土后 12 天~16 天结菇,分布均匀;18 天~22 天采菇,每潮菇间隔 7 天~10 天。

4.1.5.4 生物学效率:在正常条件下生物学效率不低于 3%。

4.2 原种

4.2.1 容器规格应符合 NY/T 528—2002 中 4.7.1.2 规定。

4.2.2 感官要求应符合表 3 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	
培养基上表面距瓶口的距离	50 mm \pm 5 mm	
接种量(每支母种接原种数,接种物大小)	(4~6)瓶(袋), ≥ 12 mm \times 15 mm	
菌种外观	菌丝生长量	长满容器
	菌丝体特征	洁白浓密、生长旺健
	表面菌丝体	生长均匀,无角变,无高温抑制线
	培养基及菌丝体	紧贴瓶(袋)壁,无干缩
	表面分泌物	无
	杂菌菌落	无
	颤颤现象	无
气 味	有双孢蘑菇菌种特有的香味,无酸、臭、霉等异味	

4.2.3 微生物学指标应符合表 2 规定。

4.2.4 菌丝生长速度:在适宜培养基上,在适温($24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$)下菌丝长满容器不超过 45 天。

4.3 栽培种

4.3.1 容器规格应符合 NY/T 528—2002 中 4.7.1.3 规定。

4.3.2 感官要求应符合表4规定。

表4 栽培种感官要求

项 目		要 求
容器		完整,无损
棉塞或无棉塑料盖		干燥、洁净,松紧适度,能满足透气和滤菌要求
培养基面距瓶(袋)口的距离		50 mm±5 mm
接种量[每瓶(袋)原种接栽培种数]		(30~50)瓶(袋)
菌种外观	菌丝生长量	长满容器
	菌丝体特征	洁白浓密、生长旺健
	不同部位菌丝体	生长均匀,无角变,无高温抑制线
	培养基及菌丝体	紧贴瓶(袋)壁,无干缩
	表面分泌物	无
	杂菌菌落	无
	颌颌现象	无
气 味		有双孢蘑菇菌种特有的香味,无酸、臭、霉等异味

4.3.3 微生物学指标应符合表2规定。

4.3.4 菌丝生长速度:在适宜培养基上,在适温(24℃±1℃)下菌丝长满瓶(袋)不超过45天。

5 抽样

5.1 质检部门的抽样应具有代表性。

5.2 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。

5.3 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 试验方法

6.1 感官检验

按表5逐项进行。

表5 感官检验方法

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
			栽培种	检查生产记录
棉塞、无棉塑料盖	肉眼观察	菌丝生长量	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	肉眼观察	杂菌菌落	肉眼观察,必要时用 5×放大镜观察	
母种斜面正面外观各项	肉眼观察			
培养基上表面距瓶 (袋)口的距离	肉眼观察			
		气味	鼻嗅	

6.2 微生物学检验

6.2.1 表 2 中菌丝和杂菌用放大倍数不低于 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。

6.2.2 细菌检验:取少量疑有细菌污染的培养物,按无菌操作接种于 GB/T 4789.28 中 4.8 规定的营养肉汤培养液中, $25^{\circ}\text{C}\sim 28^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 1 天~2 天,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。

6.2.3 霉菌检验:取少量疑有霉菌污染的培养物,按无菌操作接种于 PDA 培养基(见附录 A)中, $25^{\circ}\text{C}\sim 28^{\circ}\text{C}$ 培养 3 天~4 天,出现双孢蘑菇菌落以外的菌落,或有异味者为霉菌污染物,必要时进行水封片镜检。

6.3 菌丝生长速度

6.3.1 母种:PDA 培养基,在 $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 下培养,计算长满需天数。

6.3.2 原种和栽培种:采用第 B.1 章或第 B.2 章规定的配方之一,在 $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 下培养,计算长满需天数。

6.4 母种遗传和栽培性状

6.4.1 菌丝体 Est 同工酶的板状聚丙烯酰胺凝胶电泳:取菌龄为 15 天~20 天的试管母种,刮取菌丝,按 1:3:0.5 的比例混合菌丝(g)、0.1 mol/L 磷酸缓冲液(mL)和石英砂(g),研磨成匀浆,台式离心机 10 000 r/min 离心 5 min,取上清液,按 5:1:1 的比例混合上清液、40%蔗糖和 0.01%溴酚蓝溶液作为电泳样品, 4°C 下冷藏备用。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳。用 pH8.9 Tris-HCl 缓冲液配制 9%分离胶,用 pH8.3 Tris-甘氨酸作电极缓冲液。点样 75 μL , 3°C 下 120 V 电泳 20 min 后稳压 200 V, 4 h。用固蓝 RR 盐 60 mg, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH6.0) 80 mL, α -萘乙酯 38 mg 和 β -萘乙酯 38 mg 溶于 3 mL 丙酮配制的染色液,染色,显现酶谱,再根据特征带分型。

6.4.2 栽培性状:使用附录 B 中 B.2.1 培养基按表 6 各项观察记录。

6.4.2.1 菌丝萌发、定植与生长能力:接种到附录 B 中 B.2.1 培养基(含水量提高到 68%)上,在适温($24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$)下培养,肉眼观察菌丝萌发、定植与生长情况。

6.4.2.2 结菇转潮能力:栽培试验,肉眼观察,计算覆土到出第一潮菇的时间。

6.4.2.3 生物学效率:栽培试验,记录、统计产量,按 GB/T 12728—1991 中 2.1.20 规定计算。

6.4.2.4 栽培试验:将被检母种制成原种。采用附录 B 中 B.2.1 的培养基配方(含水量提高到 68%),配制 360 kg 培养基,接种后分三组(每组 2 m^2)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,亦做同样处理。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 5 天以上(含 5 天)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性状检验记录

检验项目	检验结果	检验项目	检验结果
母种长满所需时间/天		转潮间隔时间/天	
原种长满所需时间/天		总产/kg	
栽培种长满所需时间/天		平均单产/kg	
菌种萌发所需时间/天		平均单菇质量/g	
菌丝长满培养基所需时间/天		生物学效率/(%)	
覆土至扭结所需时间/天		菇形、质地、色泽	
覆土至采菇所需时间/天		菇盖直径、厚度、柄长、柄粗(直径)/mm	

6.5 留样

各级菌种都要留样备查,留样的数量应每个批号菌种(3~5)支(瓶、袋),于4℃~6℃下贮存,母种5个月,原种4个月,栽培种2个月。

7 检验规则

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。

8 标签、标志、包装、运输、贮存

8.1 标签、标志

8.1.1 产品标签

每支(瓶、袋)菌种必须贴有清晰注明以下要素的标签:

- a) 产品名称(如:双孢蘑菇母种);
- b) 品种名称(如:As2796);
- c) 生产单位(×××菌种厂);
- d) 接种日期(如:2000.××.××);
- e) 执行标准。

8.1.2 包装标签

每箱菌种必须贴有清晰注明以下要素的包装标签:

- a) 产品名称、品种名称;
- b) 厂名、厂址、联系电话;
- c) 出厂日期;
- d) 保质期、贮存条件;
- e) 数量;
- f) 执行标准。

8.1.3 包装储运图示

按GB/T 191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。

8.2 包装

8.2.1 母种外包装采用木盒或有足够强度的纸材制做的纸箱,内部用棉花、碎纸、报纸等具有缓冲作用的轻质材料填满。

8.2.2 原种、栽培种外包装采用有足够强度的纸材制做的纸箱,菌种间用碎纸、报纸等具有缓冲作用的轻质材料填满。纸箱上部和底部用8 cm宽的胶带封口,并用打包带捆扎两道,箱内附产品合格证书和使用说明(包括菌种种性、培养基配方及适用范围)。

8.3 运输

8.3.1 不得与有毒物品混装。

8.3.2 气温达30℃以上时,需用2℃~20℃的冷藏车运输。

8.3.3 运输中必须有防震、防晒、防尘、防雨淋、防冻、防杂菌污染的措施。

8.4 贮存

8.4.1 母种在 $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 下贮存,贮存期不超过 90 天。

8.4.2 原种应尽快使用,10 天内可在温度 $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、清洁、通风、干燥(相对湿度 50%~75%)、避光的室内存放。一般在 $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 下贮存,贮存期不超过 40 天。

8.4.3 栽培种应尽快使用,在温度 $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、清洁、通风、干燥(相对湿度 50%~75%)、避光的室内存放谷粒种不超过 10 天,其余培养基的栽培种不超过 20 天。在 $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 下可贮存 90 天。

附 录 A
(规范性附录)
PDA 培养基配方

马铃薯 200 g(取用浸出液),葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,水 1 000 mL,pH 值自然。

附 录 B
(规范性附录)
常用原种和栽培种培养基及其配方

B.1 谷粒种培养基

谷粒 98%,石膏粉 2%,含水量 50%±1%,pH7.5~8.0。

B.2 腐熟料种培养基

B.2.1 腐熟粪草种培养基

腐熟麦秆或稻秆(干)77%,腐熟牛粪粉(干)20%,石膏粉 1%,碳酸钙 2%,含水量 62%±1%,pH7.5。

B.2.2 腐熟棉籽壳种培养基

腐熟棉籽壳(干)97%,石膏粉 1%,碳酸钙 2%,含水量 55%±1%,pH7.5。
