ICS 03.100.01
CCS X 00

DB5115

四 川 省 （ 宜 宾 市 ） 地 方 标 准

DB5115/T 72—2021

长裙竹荪菌种培育技术规范

Specification for spawn production of *Dictyophora indusiata* (Vent.Pers.) Fisch.

2021-11-18 发布 2021-12-01 实施

宜宾市市场监督管理局 发 布

目　　次

目　　次.....I

前　　言.....II

1 范围.....1
2 规范性引用文件.....1
3 术语与定义.....1
4 生产条件.....2
4.1 技术人员.....2
4.2 场地环境.....2
4.3 厂房设置与布局.....2
4.4 设施设备.....2
5 生产工艺.....3
5.1 母种.....3
5.2 原种.....4
5.3 栽培种.....6
5.4 记录.....6
5.5 入库贮存.....6
6 质量要求及检验方法.....6
6.1 菌种质量要求.....6
6.2 抽样、留样.....8
6.3 检验规则.....8
6.4 检验方法.....8
7 标签、包装、运输、贮存.....9
7.1 标签.....9
7.2 包装.....9
7.3 运输.....9
附录A （资料性） 母种常用培养基配方及制作方法.....10
附录B （资料性） 原种和栽培种常用培养基及其配方.....11
附录C （资料性） 常用栽培性状检验用培养基.....12

前　　言

本文件按 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。

本文件由宜宾学院提出。

本文件由宜宾市农业农村局及宜宾市林业与竹业局归口。

本文件起草单位：宜宾学院、长宁县林业和竹业局、长宁县产品质量检验检测中心、长宁县农业局、长宁县竹海山宝食用菌开发专业合作社、蜀南竹海竹生物与竹文化研究所、宜宾方向生物科技有限公司。

本文件主要起草人：游玲、王涛、邓骛远、侯茂、黄文培、唐森强、李青、朱大毛、何莉、杨敬、杨毅、黄晓、韦仕林、徐开良、邓斌、刘开明。

本文件为首次发布。

长裙竹荪菌种培育技术规范

1 范围

本文件规定了长裙竹荪菌种的生产条件、生产工艺、质量要求、检验方法、标签、包装、运输、贮存等技术要求。

本文件适用于长裙竹荪菌种生产。

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 4789.28 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求

GB/T 5749 （水质要求）并在文中体现

GB 38850 消毒剂原料清单及禁限用物质

NY/T 528 食用菌菌种生产技术规程

NY 5099 无公害食品 食用菌栽培基质安全技术要求

食用菌菌种管理办法 中华人民共和国农业部（2006）第62号令

3 术语与定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

母种 stock culture

经选育出具有结实性的菌丝体纯培养物及其继代培养物，也称一级种。

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，也称二级种。

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，也称三级种。

3.4

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等异常的现象。

3.5

颉颃 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性边缘的现象。

3.6

高温圈 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、发暗或菌丝变稀弱等现象。

3.7

锁状联合 clamp connection

食用菌不同性别的一级菌丝发生接合后，通过质配形成了由双核构成二级菌丝，再形成喙状突起而连和两个细胞的方式后，不断使双核细胞分裂，从而使菌丝尖端不断向前延伸的过程。

3.8

种性 characters of variety

食用菌对温度、湿度、酸碱度、光线、氧气等栽培条件的要求，以及抗逆性、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。亦是品种特性的简称。

4 生产条件

4.1 技术人员

按照中华人民共和国农业部（2006）第 62 号令《食用菌菌种管理办法》的规定配备生产技术人员和检验人员。

4.2 场地环境

应符合NY/T 528的要求。

4.3 厂房设置与布局

4.3.1 应设设置能有效隔离的原材料库、堆料场、配料分装场、灭菌间、冷却室、接种室、培养室、菌种检验室、菌种贮存室和出菇试验场、废物堆集场等设施。

4.3.2 厂房建造从结构和功能上应能满足食用菌菌种生产的基本需要，应按照菌种制种工艺流程合理布局，各操作环节顺序形成流水线。灭菌前的操作区域与灭菌后的操作区域应完全隔离，出菇场与菌种生产、培养车间应完全隔离。

4.3.3 堆料场、配料分装场、废物堆集场等带有杂菌的区域应设置在下风口，尽可能远离生产场地。

4.4 设施设备

4.4.1 基本设施

4.4.1.1 原材料库应防潮防雨、通风、远离火源。

4.4.1.2 堆料场可由若干水泥池并排构成，各池顶面应有开口、一侧面有门，各排水泥池之间应便于机械化作业。

4.4.1.3 配料分装场水电等应齐备，且空间充裕、通风良好，地面应便于冲洗。

4.4.1.4 灭菌间水电等应齐备，且空间充裕，能通风散热，墙壁和地面应便于冲洗消毒。

4.4.1.5 接种室应配备降温、除尘设备，四周墙面及屋顶、地面应光洁，能满足清洗消毒要求。

4.4.1.6 培养室应具有与生产量相适应的面积和防蚊虫、鼠害设施；应通风良好并无直射阳光，能密闭熏蒸消毒杀虫；应有通风换气和能实现 18 ℃～28 ℃控温要求的设备。

4.4.1.7 贮存室应具备 0 ℃～15 ℃低温贮存条件。

4.4.1.8 检验室水电等设备应齐备，能满足安装相应的检验设备和仪器等要求。

4.4.2 基本设备

应具备称量用具、蒸煮设备、母种培养基分装设备、拌料机、装袋机、高压灭菌和常压灭菌设备、接种工具、接种箱或超净工作台、恒温培养箱、振荡培养箱（转速170 r/min以上，可控温）、培养架、烘箱、除湿机、电冰箱、质量检测仪器设备及其它工器具等设备。

4.4.3 消耗材料

4.4.3.1 培养料

应符合NY 5099的要求。

4.4.3.2 培养容器

应具备以下器材及装置：

a) 试管：玻璃试管，配套棉塞（梳棉制作）或硅胶塞等；
b) 三角瓶：500 mL～2000 mL 规格，并配套大小适宜的棉塞、硅胶塞或透气封口膜等可满足滤菌和透气要求的无棉塑料盖封口。
c) 培养皿：90 mm 规格玻璃培养皿或一次性灭菌培养皿。
d) 玻璃瓶、塑料瓶、组培瓶：500 mL～1000 mL 容积等规格，并附有能透气的瓶塞。
e) 食用菌袋：根据灭菌方式对应选用聚乙烯（不透明，韧性较好，只能常压灭菌）或聚丙烯食用菌（透明，韧性较差，可高压灭菌）等材质。

4.4.3.3 消毒材料及药品

应配备紫外灯、75%酒精、石炭酸（苯酚）、来苏儿、漂白粉、波尔多液、石灰等消毒材料，并配备符合GB 38850要求的二氧异氰尿酸钠等主要成分的消毒剂。

5 生产工艺

5.1 母种

5.1.1 母种来源

应是经两年以上栽培的、种性合格的长裙竹荪（*Dictyophora indusiata* (Vent.Pers.) Fisch.）斜面菌种，正常条件下生物学效率应不低于10%。

5.1.2 工艺流程

工艺流程应按图1要求。

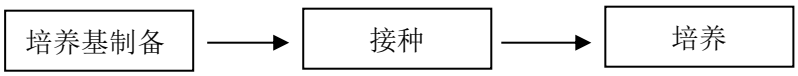

图1 母种生产工艺流程图

5.1.3 培养基制备

5.1.3.1 培养基制作

所用原材料应符合 NY 5099 的要求，推荐按附录 A 要求。

5.1.3.2 灭菌

培养基配制完成后应在1 h内灭菌，在0.11 MPa～0.12 MPa条件下灭菌30 min；灭菌完毕自然降压至零，不应强制降压。

5.1.3.3　摆斜面

灭菌结束后应及时开盖，自然降温20 min～30 min，并利用余热烘干棉塞；再将试管的一端斜放在厚度约1 cm、顶端距试管口40 mm～50 mm的斜面木条上。

5.1.3.4　灭菌效果检查

将制好的母种斜面培养基随机抽取3%～5%的试管量，直接置于28 ℃恒温培养；待48 h后检查，无微生物长出的为灭菌合格。

5.1.4　接种

5.1.4.1　接种室（箱）或超净工作台的消毒

5.1.4.1.1　应采用符合GB 38850要求的气雾消毒剂（包括但不限于以二氧异氰尿酸钠为主要成分的各种商品消毒剂）熏蒸。

5.1.4.1.2　操作台面应先用75%酒精或其它消毒剂擦拭消毒，并用紫外灯照射30 min后接种。

5.1.4.1.3　接种室应熏蒸2 h～3 h后，再进接种箱熏蒸40 min。

5.1.4.2　接种操作

5.1.4.2.1　应检查、核对菌种。

5.1.4.2.2　应用75%酒精棉球擦拭消毒，接种针和母种试管口应用酒精灯火焰消毒。

5.1.4.2.3　待接种针经火焰消毒并冷却后，切取（3 mm～5 mm）×（3 mm～5 mm）的任一母种快速转接进待接试管斜面中央；同时，应塞好试管塞、贴好标签。

5.1.5　培养

接种后应置于22 ℃～28 ℃的恒温培养箱内培养直至长满斜面，期间应密切观察并及时拣出污染菌种。

5.2　原种

5.2.1　固体原种

5.2.1.1　工艺流程

应按本文件5.1.2执行。

5.2.1.2　培养基制备

5.2.1.2.1　培养基配方

宜采用附录B中所列培养基配方，所用原材料应符合NY 5099的要求。竹屑或木屑等颗粒较大，吸水较慢的原材料应要进行预湿处理；其间应加水浸泡24 h，并中途换水1次～2次。

5.2.1.2.2　制作方法

按照配方量取相应原材料放入搅拌机内混合，加入糖和石灰等应溶入水中，控制含水量在60%～65%（紧捏可成团，松开可分散）时，充分搅拌，混合均匀；调节pH值至6～7后装瓶，培养料装至距瓶口5 mm ～10 mm处，稍作压实，上紧下松，松紧适度。将瓶口和外瓶壁洗擦干净，封瓶口。

5.2.1.2.3　灭菌

菌种装瓶后应置于灭菌锅灭菌。当灭菌锅压力升到0.05 Mpa时，应及时打开放汽阀排放冷气，直至锅内冷空气排净。待压力升至0.14 MPa开始计时，再灭菌2.5 h～3.0 h。灭菌完毕后自然降压，开锅取出菌种瓶，移入预先清洁和消毒的冷却室或接种室内，冷却至25 ℃～28 ℃准备接种。

5.2.1.3　接种

5.2.1.3.1　接种环境消毒

按本文件5.1.4.1执行。

5.2.1.3.2　接种操作

应核对菌种无误后用于接种。接种人员的手应用75%酒精棉球擦拭消毒；母种试管口应在位于火焰上方无菌区域、不直接灼烧瓶口的位置用酒精灯火焰消毒。接种器具经火焰消毒并冷却后，应切取12 mm ×12 mm大小的任一母种快速接入原种瓶内并封好瓶口；每支母种接原种3瓶～5瓶。接种后应及时贴好标签标识，做好接种场所的清洁卫生并消毒。

5.2.1.4　培养

培养室内应控制室温在20 ℃～2 5℃、空气相对湿度在60%～70%，保持空气清新，避光培养。应定期检查菌种萌发情况，及时拣出污染和不合格菌种。

5.2.2　液体原种

5.2.2.1　工艺流程

按本文件5.1.2执行。

5.2.2.2　培养基制备

5.2.2.2.1　培养基配方

宜采用附录B中B.5所列培养基配方，所用原材料应符合NY 5099的要求，其中麦粒提取液的制作方式为：将麦粒称量后用自来水常温浸泡24 h，经过滤后，再用干净自来水淘洗3次；加麦粒质量4倍比的水后煮至麦粒无白心，冷却过滤后备用。

5.2.2.2.2　配制方法

取麦粒提取液按配方加入其他配料后，按比例配制400 mL培养基，装入1000 mL容量的三角瓶中。

5.2.2.2.3　灭菌

宜在121 ℃温度时灭菌40 min（或等同灭菌条件）。待灭菌锅压力归零后，开锅取出菌种瓶，移入预先清洁和消毒的冷却室或接种室内冷却。待冷却至25 ℃～28 ℃准备接种。

5.2.2.3　接种

5.2.2.3.1 接种环境消毒

按本文件5.1.4.1执行。

5.2.2.3.2 接种操作

挑取母种斜面菌丝少许到液体培养基中。一支装有斜面母种的400 mL液体培养基可接种3瓶～5瓶1000 mL的三角瓶。

5.2.2.4 培养

振荡培养箱应用安全型气雾消毒剂（包括但不限于以二氧异氰尿酸钠为主要成分的各种商品消毒剂）熏蒸1 h ～2 h，再将已接种母种的三角瓶放置到温度25 ℃、转速170 r/min振荡箱中培养6 d。

5.3 栽培种

栽培种生产工艺宜参照以下路径：

——栽培种容器：可选用规格为15 cm×30 cm的折角聚丙烯菌种袋，或其它规格的菌种袋；

——菌种袋装料：袋面应平整无皱褶，袋内料面无空隙，松紧适度，用手轻压袋面有弹性；

——灭菌条件：聚丙烯菌袋可采用0.14 Mpa，灭菌2 h ～3 h，聚乙烯菌袋可采用0.11 Mpa，灭菌3 h～4 h，栽培种也可采用常压100 ℃，灭菌12 h～16 h，各灭菌方式均应自然降压；

——接种：原种瓶的瓶口内外和外瓶壁应用消毒液清洗消毒，固体原种瓶内的表层菌种和已形成原基的部分去掉不用，接种量为栽培种培养料体积的2%～3%，液体原种使用无菌吸管或针筒接种，接种量为栽培种培养料体积的0.25%～0.5%。

5.4 记录

生产各环节应详细记录。母种按品种记录培养条件、接种时间、分批编号；原种、栽培种按菌种来源记录制种方法、接种时间、分批编号。

注：同一批次菌种为同一来源、同一品种、同一培养基配方、同一天接种、同一培养条件和质量基本一致的符合规定数量的菌种。

5.5 入库贮存

5.5.1 完成培养的菌种应及时登记入库并在适龄期内使用。

5.5.2 母种应在4 ℃ ± 2 ℃冰箱中贮存，贮存期不超过90 d。

5.5.3 原种应及时使用。在温度不宜超过20℃，清洁、通风、干燥（相对湿度50%～70%），避光的室内，液体原种的存放时间不应超过15 d，固体原种不应超过30 d。

5.5.4 栽培种应及时使用。通常情况下，在温度不超过20℃，清洁、通风、干燥（相对湿度50%～70%），避光的室内可贮存12个月；在20 ℃～25 ℃，清洁、通风、干燥（相对湿度50%～70%），避光的室内可贮存45 d。

6 质量要求与检验方法

6.1 菌种质量要求

6.1.1 母种

6.1.1.1 生长速度

在PDA培养基上、22 ℃～28 ℃时，菌丝体可在15 d ～25 d时间内长满斜面。

6.1.1.2 感官质量

应符合以下要求：

——试管完好无损，试管塞干燥、洁净、松紧适度，满足透气和滤菌要求。

——斜面长度为试管总长的1/3～1/2，顶端距试管塞40 mm～50 mm，菌落边缘整齐，洁白、浓密、旺健、棉毛状，均匀、舒展、平整、无角变，无分泌物，有具有长裙竹荪菌种特有的清香味，无酸、臭、霉等异味。

——斜面培养基背面不干缩，颜色均匀、无暗斑、无色素。

6.1.1.3 显微特征

在400倍显微镜下可见菌丝粗壮、丰满、均匀，有锁状联合，无杂菌。

6.1.2 原种

6.1.2.1 固体原种

6.1.2.1.1 生长速度

在采用适宜培养基，20 ℃～25 ℃培养条件下，80 d～100 d时间可长满90%以上。

6.1.2.1.2 感官质量

应符合以下要求：

——容器完好无损，瓶塞干燥、洁净、松紧适度，满足透气和滤菌要求。

——容器内培养基紧贴瓶（袋）壁，无干缩，菌丝体洁白浓密、生长旺健，生长均匀，上表面距瓶口10 mm～30 mm，无角变，无高温圈及颉颃现象，菌丝培养物无肉眼可见的子实体原基。

——表面无分泌物，允许有少量无色或浅黄色水珠，有长裙竹荪菌种特有的清香味，无酸、臭、霉等异味。

6.1.2.1.3 显微特征

在400倍显微镜下可见菌丝粗壮、丰满、均匀，有锁状联合，无杂菌。

6.1.2.2 液体原种

6.1.2.2.1 生长速度

母种应接种至装有适宜液体培养基的500 mL或1000 mL三角瓶内，在25 ℃±2 ℃条件下，5 d～7 d应形成乳白色混浊的菌悬液。

6.1.2.2.2 感官质量

菌丝球应均匀分散，有竹荪菌种特有的清香味，无酸、臭、霉等异味。

6.1.2.2.3 理化指标

菌丝球直径应在0.1 mm～0.5 mm之间，培养基中菌丝干重应大于1.5 g/100 mL。

6.1.3 栽培种

菌丝出现脱壁但未见萎缩可正常使用。若出现菌丝发黄、萎缩甚至自溶产生渗滤液等现象则不能继续使用。其余要求同本文件6.1.2.2。

6.2 抽样、留样

6.2.1 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）抽样量的，可进行两级抽样，第一次按0.1%抽样。

6.2.2 复检时，应按6.2.1抽取1%样品复检。应98%以上合格。

6.2.3 各级菌种都应留样备查，留样的数量应每个批号3支（瓶、袋）～5支（瓶、袋）在0 ℃～15 ℃下贮存。留样时间为母种5个月、原种4个月、栽培种2个月，或该批菌种正常生产条件下出菇后方可处置。

6.3 检验规则

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。复检按6.2.2判定。

6.4 检验方法

6.4.1 感官检验方法

主要采用肉眼观察，必要时借助放大镜或显微镜观察。

6.4.2 理化检验方法

菌丝干重：100 ℃烘干至恒重时称重，精确到0.001 g。

6.4.3 农艺性状和商品性状

应将被检母种制成原种，检验其农艺性状和商品性状。宜采用附录C规定的培养基配方，制作菌袋45个。接种后分3组（每组15袋）进行常规管理，根据表1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1 母种栽培中农艺性状和商品发送检验记录

检验项目	检验结果
母种长满所需时间/天	
原种长满所需时间/天	
长满菌袋所需时间/天	
出第一潮菇所需时间/天	
第一潮菇产量/kg	
第一潮菇生物学效率（100%）	
总产/kg	
平均单产/kg	
生物学效率/（%）	
色泽、质地	

菇形	
菌裙直径、菌柄长短/mm	

6.4.4 微生物学检验方法

不定期抽检或母种、原种、栽培种质量异常情况下，需按下述方法进行微生物学检验：

——菌丝生长状态和锁状联合：用放大倍数不低于 400 倍的光学显微镜观察培养物的水封片，每一检样应观察不少于 20 个视野。

——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 中规定的营养肉汤培养液中，25 ℃～28 ℃振荡培养 1 d～2 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。

——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 ℃～28 ℃培养 3 d～4 d，出现白色以外色泽的菌落或非竹荪菌丝形态菌落的，或有异味者为霉菌污染物，必要时进行水封片镜检。

7 标签、包装、运输、贮存

7.1 标签

出售的菌种应贴标签，注明竹荪品种、级别、接种日期、生产单位、地址、电话、执行标准。

7.2 包装

7.2.1 母种的外包装宜用木盒或有足够强度的纸盒，原种和栽培种的外包装可按购买方要求提供。

7.2.2 如需长途运输，原种和栽培种还需根据 GB/T 191 的相关要求提供不同规格的外包装，如木箱、塑料箱或有足够强度的纸箱，箱内除菌种外的空隙用轻质材料填满塞牢。

7.2.3 每箱菌种根据 GB/T 191 的要求，除贴有本文件 7.1 中所述标签外，还应标明包装数量、出厂日期、保质期及贮存条件等相关信息。

7.3 运输

运输时不应与有毒有害物品混装。气温达30 ℃以上时，需用2 ℃～20 ℃的冷藏车运输。运输中应有防震、防晒、防尘、防雨淋、防冻、防杂菌污染的措施。

附录 A
（资料性）
母种常用培养基配方及制作方法

A.1 PDA 培养基

马铃薯 200 g，葡萄糖 20 g，琼脂 20 g，水 1000 mL。

制作方法：以配制1000 mL的 PDA培养基为例，选无青皮、未发芽的新鲜马铃薯洗净、去皮、去芽眼，称取200 g切成5 mm厚的薄片，加水1200 mL煮20 min ～ 30 min，煮至熟而不烂，纱布过滤收集滤液，加入2%的琼脂，煮沸至全部溶化，再加入20 g葡萄糖搅拌溶化，加水定容至1000 mL，立即分装，装量为试管长度的1/5～1/4，管口不能粘染培养基。

A.2 CPDA 培养基

马铃薯 200 g，葡萄糖 20 g，磷酸二氢钾 2 g，硫酸镁 0.5 g，琼脂 20 g，水 1000 mL。

制作方法：除在加入葡萄糖的同时加入磷酸二氢钾 2 g、硫酸镁 0.5 g外，其余同A.1。

附录 B
（资料性）
原种和栽培种常用培养基及其配方

B.1 培养基 1

杂竹屑 89%，麦麸 10%，石膏 1%，含水量 60%±2%。

B.2 培养基 2

竹屑 80.0%，杂木屑 （主要来源于阔叶树木的混合木屑，不含松、杉、柏、樟等树种）18.8%，尿素 0.7%，轻质碳酸钙 0.5%，含水量 60%±2%。

B.3 培养基 3

竹屑 98.8%，尿素 0.7%，轻质碳酸钙 0.5%，含水量 60%±2%。

B.4 培养基 4

竹屑 60.0%，杂木屑（主要来源于阔叶树木的混合木屑，不含松、杉、柏、樟等树种） 28.8%，秸秆或花生壳或蔗渣等 10.0%，尿素 0.7%，轻质碳酸钙0.5%，含水量 60%±2%。

B.5 培养基 5

1.5% 淀粉，麦粒提取液20%，磷酸二氢钾 0.5%，硫酸镁 0.1%，碳酸钙 0.2%，维生素B_1 0.001%。

附录 C
（资料性）
常用栽培性状检验用培养基

C.1 竹屑培养基

杂竹屑89%，麦麸10%，石膏1%，含水量60%±2%。