ICS 65.020.01
CCS B 38

T/MSC 004-2024

中 国 菌 物 学 会 团 体 标 准

猪苓栽培用蜜环菌菌种生产技术规程

Code of practice for good agricultural practice of *Armillaria* strains for *Polyporus Umbellatus* cultivation

2024-05-23 发布

2024-05-23 实施

中 国 菌 物 学 会 发 布

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　生产要求 2
5　生产流程 2
6　培养基配制 2
7　接种 3
8　培养 4
9　检验 4
10　标志、包装、运输与贮存 5
11　生产档案 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。

本文件由中国菌物学会归口。

本文件起草单位：中国医学科学院药用植物研究所，留坝县猪苓科技专家工作站。

本文件主要起草人：郭顺星、李兵、刘柳。

猪苓栽培用蜜环菌菌种生产技术规程

1 范围

本文件规定了猪苓栽培用蜜环菌菌种生产要求、生产流程、培养基配置、接种、培养和检验等各环节的关键控制点及技术参数。

本文件适用于猪苓栽培用蜜环菌菌种生产。

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 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

GB 4789.28—2013 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

NY/T 528 食用菌菌种生产技术规程

NY/T 1742 食用菌菌种通用技术要求

GB/T 12728 食用菌术语

GB/T 191 包装储运图示标志

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。GB/T 12728 食用菌术语中的其他术语也适用于本文件。

3.1

猪苓 *Polyporus umbellatus* （Pers.）Fr.

为多孔菌属的药用猪苓菌核，一般以 3～4 年生黑苓为宜，可以为猪屎苓、鸡屎苓等。

3.2

蜜环菌 *Armillaria* sp.

为蜜环菌属的真菌。

3.3

猪苓栽培用蜜环菌 *Armillaria* for *Polyporus umbellatus* cultivation

蜜环菌[*Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm.）]、高卢蜜环菌（*A. gallica*）和奥氏蜜环菌（*A. ostoyae*）等能够与猪苓共生的蜜环菌类群。若使用农家品种或选育品种应经过鉴定，其品质应符合 9.2 的要求。

3.4

菌株 strain

蜜环菌种内或变种内在若干遗传特性上有区别的微生物群体。

[来源：GB/T 12728，2.5.2，有修改]

3.5

蜜环菌母种 stock culture of *Armillaria*

具有结实性的菌丝体/菌索的纯培养物及其继代培养物，以玻璃试管或培养皿为培养容

器和使用单位，也称一级种、试管种。

[来源：GB/T 12728，2.5.7，有修改]

3.6

蜜环菌原种 mother spawn of *Armillaria*

由蜜环菌母种移植、扩大培养而成的菌丝体/菌索纯培养物，也称二级种。

[来源：GB/T 12728，2.5.8，有修改]

3.7

蜜环菌栽培种 spawn of *Armillaria*

由蜜环菌原种移植、扩大培养而成的菌丝体/菌索纯培养物，也称三级种。注：栽培种只能用于栽培，不可再次扩大繁殖菌种。

[来源：GB/T 12728，2.5.9，有修改]

3.8

菌龄 period of spawn running

菌丝在培养基物中的生长时间，即菌种自接种至使用之间的间隔时间。

[来源：GB/T 12728，2.3.22，有修改]

4 生产要求

4.1 技术人员

人员应为经专业培训、掌握蜜环菌基础知识及菌种生产技术规程的技术人员。

4.2 场地选择

生产场地选择及其周边环境卫生应符合 NY/T 528 的规定。

4.3 厂房设置和布局

有各自隔离的摊晒场、原材料库、配料分装室（场）、灭菌室、冷却室、接种室、培养室、贮存室、菌种检验室等。厂房建造从结构和功能上满足蜜环菌菌种生产需要，不同功能区要求和布局应符合 NY/T 528 的规定。

[来源：NY/T 528-2010，4.3.1，有修改]

4.4 设备设施

厂房设备宜包括磅秤、天平、搅拌机、装瓶装袋机、高压灭菌锅、常压灭菌锅、净化工作台、调温设备、培养架、冰箱等设备。

培养机配制、分装、灭菌、冷却、接种、培养、检验等各环节均应配套基本设施，应符合 NY/T 528 的规定。

[来源：NY/T 528-2010，4.4，有修改]

5 生产流程

生产工艺流程宜包括培养基配制→分装→灭菌→冷却→接种→培养（检查）→成品。

6 培养基配制

6.1 培养基

6.1.1 原料

应包括下列内容：

a）化学类试剂：葡萄糖、硫酸镁、磷酸二氢钾等使用化学纯试剂。

b）生物制剂和天然材料：天然材料锯末、麦麸、树枝等新鲜、无虫害、无霉变，洁净干燥

6.1.2 培养基配方

应符合下列规定：

a）母种培养基：PDA 培养基（马铃薯葡萄糖琼脂培养基）配方：马铃薯（去皮）200 g，葡萄糖 20 g，琼脂 15 g，水 1 000 ml。

b）原种培养基：锯末麦麸培养基 配方：壳斗科木屑 75%，麦麸 25%，含水量 100%，pH 值自然。

c）栽培种培养基：壳斗科枝条培养基，宜采用青冈树枝条。配方：各种壳斗科的树枝，要求直径 2 cm 左右，断成长约 5 cm 的小段，用水浸泡 24 h 后，装入 700 mL 塑料瓶中，装入八分瓶高度，加水没过枝条。

d）Luria-Bertani（LB）：酵母提取物 5 g，蛋白胨 10 g，氯化钠 5 g，琼脂 15 g，水 1 000 ml。

e）培养基和试剂质量应符合 GB 4789.28 的规定。

6.2 分装

6.2.1 母种培养基应分装到试管中，灌入量为试管总容积的 3/4～4/5。

6.2.2 原种和栽培种培养基灌入 700 mL 耐高温塑料瓶肩为宜。

6.2.3 容器、棉塞或者无棉塑料盖标准符合 NY/T 528 要求。

6.3 灭菌

6.3.1 母种培养基宜在 121 ℃～126 ℃(0.103 MPa～0.137 MPa) 的高压灭菌锅内灭菌 15 min～30 min。

6.3.2 原种和栽培种培养基宜在压力 0.12 MPa 下灭菌 3 h。灭菌完毕后自然降压。

6.3.3 灭菌效果应符合 NY/T 528 的规定。

6.4 冷却

6.4.1 冷却时，应将母种培养基置于洁净工作台面上，自然冷却到室温。

6.4.2 冷却时，应将原种和栽培种培养基置于已消毒的接种室摆放整齐，冷却至室温备用。

6.5 灭菌效果检查

母种培养基置于 28 ℃恒温培养；原种和栽培种培养基应在无菌条件下，挑取碎片接种至 PDA 培养基中，于 28 ℃ 恒温培养；48 h 后检查，无微生物生长的应为灭菌合格。

疑有细菌污染，母种、原种和栽培种培养基应在无菌条件下，挑取碎片接种至 LB 培养基中，于 37 ℃ 恒温培养；48 h 后检查，无细菌生长的应为灭菌合格。

[来源：NYT 1742-2009，5.2.1，有修改]

7 接种

7.1 接种室消毒

接种室消毒宜紫外灯照射 30 min。

7.2 超净工作台消毒

超净工作台消毒宜采用 75%酒精棉擦拭工作台表面，紫外灯照射 20 min～30 min。

7.3 接种

7.3.1 母种接种时，接种菌块直径 3 mm～5 mm 于平面培养基的中部，棉塞封口。

7.3.2 原种接种时，每瓶原种培养基中接种母种宜为 1～2 块，直径宜为 2～3 cm。

7.3.3 栽培种接种时，从容器开口处，每瓶栽培种培养基中接种原种不应少于 15 g。

8 培养

8.1 培养条件

培养室控温宜为 20 ℃～25 ℃，空气相对湿度宜低于 60 %，通风、避光培养。

8.2 培养时间

培养时间宜为母种培养 7 d～14 d 至长满培养基；原种培养 25 d～30 d、栽培种培养 40 d～50 d 至长满培养基。

8.3 培养管理

菌种生长情况宜定期检查，宜在接种后的第 4、7、11 d 检查，及时挑出容器破损、未成活、污染、生长不良等的试管和菌袋。

9 检验

9.1 检验数量

母种每支均应进行检验。原种、栽培种抽样量应分别为该批菌种量的 5 %、1 %，且每批抽样量不应少于 10 瓶。

9.2 质量要求

9.2.1 母种 容器应无破损，菌株应无杂菌感染；菌丝体早期为白色，后逐渐表面褐化，呈梅花状，可见少量黄色分泌物。菌索健壮，分枝多而密。

图 1. 蜜环母种平皿培养形态示例

9.2.2 原种和栽培种的菌丝、菌索应长满瓶体，长势旺盛；菌索紧贴瓶壁不收缩，无老化变色；菌索应健壮，分枝多而密；栽培种的菌枝、菌索间呈蜜黄色胶体状。

图 2. 蜜环菌原种形态示例

图 3. 蜜环菌栽培种形态示例

9.3 微生物检验

杂菌检验应按 NY/T 1742 进行。

9.4 留样

菌种应留样备查，留样的数量宜为每个批号菌种不少于 10 支（瓶、袋），置于 4 ℃冷藏，贮存至使用者在正常条件下培育出蜜环菌。

10 标志、包装、运输与贮存

10.1 标志

10.1.1 产品标签

产品标签应符合表 1 的规定。

表 1 猪苓栽培用蜜环菌菌种质量要求

菌种名称		菌株名称	
菌种类别		传代次数	
生产单位（盖章）		采购单位（盖章）	
菌种数量		接种日期	
检验结果	合格菌种：支/瓶		
检验意见			
证书签发期		证书有效期	
检验单位			
注：本证一式三份，生产单位、采购单位、检验单位各一份			

审核人（签字）：　　校核人（签字）：　　检测人（签字）：

10.1.2 包装储运图示标志

包装储运图示标志应符合 GB/T191 的规定。

10.2 包装

包装应符合 NY/T 1742 的规定。

10.3 运输

栽培菌种宜在栽培季节运输，运输过程中应避光、避雨水和高温。气温 30℃以上时，需用 2 ℃～20 ℃的冷藏车运输。防止破损、污染，不应与有毒有害物品混装。

10.4 贮存

10.4.1 菌种贮存室不应有毒、有害、有异味、易挥发、易腐蚀物品，还应防鼠。
10.4.2 母种宜贮存于 4 ℃～6 ℃冰箱中，菌龄不应超过 6 个月。
10.4.3 原种宜贮存在 10 ℃～20 ℃的阴凉处，菌龄不应超过 3 个月。
10.4.4 栽培种贮存温度应低于 25 ℃，清洁、通风、干燥、避光的阴凉处存放，菌龄不应超过 12 个月。

11　生产档案

应建立菌种生产档案，生产档案应保存至菌种销售后 3 年。