ICS 65.020.01

CCS B 39

|  |
| --- |
|  |

DB43

湖南省地方标准

DB 43/ XXXXX—2022

|  |
| --- |
|  |

桑黄菌种质量鉴定技术规程

Regulations for identification of species quality of sanghuangporus

|  |
| --- |
|  |
|  |

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

湖南省市场监督管理局   发布

目  次

[前言 II](#_Toc91860110)

[1　范围 1](#_Toc91860111)

[2　规范性引用文件 1](#_Toc91860112)

[3　术语和定义 1](#_Toc91860113)

[4　鉴定要求 1](#_Toc91860114)

[5　质量指标 2](#_Toc91860115)

[6　鉴定方法 3](#_Toc91860116)

[7　判定规则 4](#_Toc91860120)

[8　档案管理 4](#_Toc91860121)

[附录A　（资料性）　桑黄基因组DNA提取方法 5](#_Toc91860122)

[附录B　（资料性）　PCR扩增体系和扩增程序 6](#_Toc91860123)

[附录C　（资料性）　桑黄菌种质量鉴定档案 7](#_Toc91860124)

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。

本文件由湖南省农业农村厅提出。

本文件由湖南农业标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：湖南省微生物研究院、长沙县综合检测中心、湖南省产商品质量监督检验研究院、湖南湘蕈生物科技有限公司。

本文件主要起草人：唐少军、邱华丽、钟文涛、许隽、喻桃生、杨祎、邵晨霞、任锐、朱华珺、靳磊、吴胜莲、贺月林。

桑黄菌种质量鉴定技术规程

1. 范围

本文件规定了桑黄菌种质量鉴定的术语和定义、质量指标、鉴定方法、鉴定规则及档案管理。

本文件适用于湖南省内桑黄原种和栽培种（以下简称“菌种”）的质量检验。

1. 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 12728 食用菌术语

GB/T 30989 高通量基因测序技术规程

NY/T 1284 食用菌菌种中杂菌及害虫的检验

NY/T 1742 食用菌菌种通用技术要求

NY/T 1846 食用菌菌种检验规程

《食用菌菌种管理办法》（2006年3月27日农业部令第62号）

1. 术语和定义

GB/T 12728界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

桑黄 sanghuangporus.

桑黄在分类上属于担子菌门 (Basidiomycota) 、伞菌纲（ Agaricomycetes ）、 锈 革 孔 菌 目（Hymenochaetales）、锈革孔菌科（Hymenochaetaceae），桑黄菌属（*Sanghuangporus*），是一类珍贵的具有重要药用价值的大型真菌。

1. 鉴定要求
   1. 人员要求

应符合农业部 2006 年《食用菌菌种管理办法》的要求。

* 1. 资质要求

应符合农业部 2006 年《食用菌菌种管理办法》的要求。

* 1. 送样要求

菌种送样时同一待鉴定菌种应不少于 10 瓶（袋)。将样品分为 A、B 两份，每份 5 瓶（袋)以上，其中 1 份送检，另 1 份留样备查。留样菌种应于 4℃~6℃下贮存。

1. 质量指标
   1. 感官指标

应符合表1要求。

表1 感官指标

|  |  |
| --- | --- |
| 项目 | 要求 |
| 菌丝体特征 | 浅黄色至黄色，生长旺盛，菌丝浓密 |
| 培养物表面菌丝体 | 生长均匀，无角变，无高温抑制线 |
| 培养基 | 紧贴瓶（袋）壁，无干缩 |
| 培养物表面分泌物 | 允许有少量黄色至黄褐色水珠 |
| 菌丝生长量 | 长满瓶（袋） |
| 气味 | 有桑黄菌种特有的清香味，无酸、臭、霉等异味 |
| 子实体原基 | 无 |
| 拮抗现象 | 无 |
| 污染 | 无 |

* 1. 微生物学和理化指标

应符合表2要求。

表2 微生物学和理化指标

|  |  |
| --- | --- |
| 项目 | 要求 |
| 杂菌 | 无 |
| 害虫 | 无 |
| 萌发时间（h） | ≤48 h |
| 菌丝生长速度 | 在温度27℃±2℃条件下培养，菌丝35d～45d长满瓶（袋）。 |
| 定植率（%） | ≥ 90 |
| 真实性 | 真实 |

1. 鉴定方法
   1. 感官鉴定

应符合NY/T 1846的规定。

* 1. 杂菌及害虫检验

样品的杂菌及害虫检验应符合NY/T 1284的规定。

* 1. 菌丝生长速度测定

应符合NY/T 1846的规定。

* 1. 定植率测定

每个测试菌种准备50瓶（袋）培养基，接种后10 d内定植的计入定植数量n，定植率X由式（1）进行计算：

x 100 ......................(1)

式中：

*X* ——定植率，%；

*n* ——定植数量；

*m* ——接种总数量。

* 1. 菌种真实性鉴定
     1. 菌丝体培养

将活化的桑黄菌块接种于PDA固体培养基，30℃静置培养10 d~12 d，然后收集菌丝体。

* + 1. 基因组DNA提取

基因组DNA的提取方法参见附录A，得到的DNA浓度不宜低于50 ng/μl，1.7<A260/A280<2.0。

* + 1. PCR扩增

选择ITS通用引物ITS1/ITS4：TCCGTAGGTGAACCTGCGG/TCCTCCGCTTATTGATATGC。PCR扩增体系和扩增程序参见附录B。

* + 1. 电泳检测

采用琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物，用凝胶成像系统拍照并记录电泳条带，条带应为750~850 bp，条带大小正确且无其他杂带的样品应进行双向测序，测序方法应符合GB/T 30989的规定。

* + 1. 数据库比对

获得的测序结果应在NCBI数据库进行Blastn比对（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/），或者在RDP数据库进行Classifier比对（http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp），初步分析测序菌种的分类地位。

* + 1. 系统发育树的构建

下载准确的桑黄ITS序列，利用软件CLUSTAL进行多序列比对，用软件MEGA通过最大简约法( maximum parsimony, MP)和邻位相连法(neighbour joining, NJ)分别构建分子系统发育树，初步确定测序菌种的分类地位。

* 1. 菌种标签、包装、标志检验

应符合GB/T 191和NY/T1742的规定

1. 判定规则
   1. 菌种真实性

经ITS序列比对和系统发育分析为桑黄菌种的判定为真实菌种。

* 1. 合格菌种

各指标均符合本文件要求的，为合格菌种。

* 1. 不合格菌种

任何一项指标不符合本文件要求的，为不合格菌种。

1. 鉴定档案

应建立桑黄菌种质量鉴定档案，档案应包括但不限于感官鉴定、杂菌及害虫鉴定、真实性鉴定、菌丝生长活力等内容，电子档应保存3年以上。



（资料性）

桑黄基因组DNA提取方法

桑黄菌种基因组DNA 提取按照以下步骤进行：

1. 将菌丝体加入液氮研磨成粉末，取约0.1 g粉末转移至无菌的2 ml离心管中；
2. 加入700 μl裂解液（CTAB 2%，pH=8.0）65℃裂解1.5~2.0 h，每隔10 min颠倒混匀；
3. 12000 r/min离心10 min，取上清液转移至新的离心管；
4. 加入等体积的PCA（苯酚:氯仿:异戊醇=25:24:1），缓慢混匀；
5. 12000 r/min离心10 min，取上清液加入等体积CA（氯仿:异戊醇=24:1），缓慢混匀；
6. 12000 r/min离心10 min，取上清液加入2倍体积的无水乙醇，缓慢混匀，置－20℃静置1 h以上；
7. 12000 r/min离心10 min弃上清留下DNA沉淀；
8. 用1 mL 75%乙醇清洗DNA沉淀，离心弃上清；
9. 用含1% RNase A的TE缓冲液（Tris-HCl 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L）或灭菌双蒸水溶解沉淀；
10. 采用超微量分光光度计或琼脂糖凝胶电泳检测DNA浓度和质量。

（资料性）

PCR扩增体系和扩增程序

* 1. PCR扩增体系

PCR扩增的总体积为50 μl，其中10×PCR Buffer 5 μl，dNTPs 5μl，引物ITS1/ITS4各1 μl，*Taq*聚合酶0.5 μl，模板DNA 2 μl，双蒸水35.5 μl。

* 1. PCR扩增程序

首先94℃预变性4 min；然后94℃变性30 sec，55℃退火45 sec，72℃延伸60 sec，30个循环；最后72℃延伸7 min。



（资料性）

桑黄菌种质量鉴定档案

1. 桑黄菌种质量鉴定档案表

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 菌种名称 |  | 菌种来源 |  | | 菌种级别 | |  |
| 接种日期 |  | 保藏条件 |  | | 联系人 | |  |
| 菌种质量鉴定步骤 | | | | | | | |
| 感官检验 | 气味 |  | | 菌丝体 | |  | |
| 培养基颜色 |  | | 培养物表面 | |  | |
| 记录人 |  | | | | | |
| 杂菌及害虫  检验 | 斑点 |  | | 液体培养检验 | |  | |
| 液体培养检验 |  | | 镜检 | |  | |
| 记录人 |  | | | | | |
| 菌种鉴定 | DNA浓度 |  | | 电泳结果 | |  | |
| 测序结果 |  | | 进化树分析 | |  | |
| 记录人 |  | | | | | |
| 理化指标 | 萌发时间 |  | | 菌丝生长速率 | |  | |
| 菌丝长势 |  | | 定植率 | |  | |
| 菌落颜色 |  | | 原基 | |  | |
| 记录人 |  | | | | | |
| 判定结果 | 是否合格 |  | | | | | |
| 记录人 |  | | | | | |

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_