



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113711842 A

(43) 申请公布日 2021. 11. 30

(21) 申请号 202111108446.2

(22) 申请日 2021.09.22

(71) 申请人 辽宁省农业科学院

地址 110161 辽宁省沈阳市沈河区东陵路
84号

(72) 发明人 王红 刘岩岩 刘俊杰 李红
曹君 李宏亮 崔容 刘跃进
孙利平

(74) 专利代理机构 北京慕达星云知识产权代理
事务所(特殊普通合伙)
11465

代理人 崔自京

(51) Int. Cl.

A01G 18/00 (2018.01)

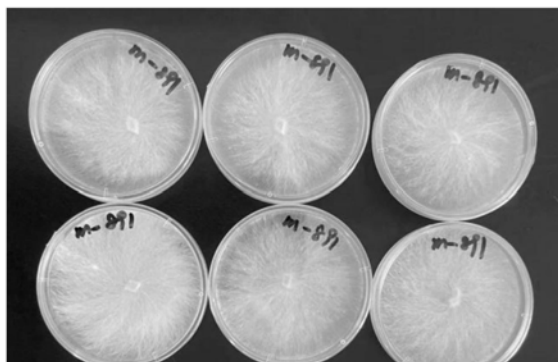
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54) 发明名称

一种简易黑木耳菌种复壮的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种简易黑木耳菌种复壮的方法,属于食用菌菌种复壮技术领域;在复壮培养基上铺设玻璃纸,将待复壮菌种接种于玻璃纸上,操作简单,可实现黑木耳衰退菌种的快速复壮,复壮效果显著。



1. 一种简易黑木耳菌种复壮的方法,其特征在于,
在复壮培养基上铺设玻璃纸,将待复壮菌种接种于玻璃纸上。
2. 根据权利要求1所述的一种简易黑木耳菌种复壮的方法,其特征在于,
所述玻璃纸在铺设之前经过无菌水浸泡和灭菌处理。
3. 根据权利要求1或2所述的一种简易黑木耳菌种复壮的方法,其特征在于,包括如下步骤:
 - (1) 一代复壮培养:
将待复壮菌种接种于PDA培养基上,获得一代菌株;
 - (2) 二代复壮培养:
选取无角变的一代菌株,分别接种于铺设有玻璃纸的PDA培养基上,获得二代菌株;
 - (3) 三代复壮培养:
选取长势一致、菌落边缘整齐的二代菌株,分别接种于PDA加富培养基上,培养出的菌丝再接种到铺设有玻璃纸的PDA培养基上,获得三代菌株;
所述PDA加富培养基为在PDA培养基的基础上,添加木屑汁18-22v/v%、硫酸镁0.5-1.0g/L、磷酸二氢钾0.5-1.0g/L、蛋白胨0.5-1.0g/L;所述木屑汁为木屑煮后滤液;
 - (4) 四代复壮培养:
选取长势好的三代菌株,分别接种于铺设有玻璃纸的PDA培养基上,获得四代菌株;
 - (5) 母种保存:
选取长势一致、菌落边缘整齐的四代菌株作为母种保存。
4. 根据权利要求3所述的一种简易黑木耳菌种复壮的方法,其特征在于,
步骤(1) (2) (4),均使用打孔器取菌丝块进行接种;
步骤(3)中,二代菌株接种到PDA加富培养基上时,使用打孔器取菌丝块进行接种;当PDA加富培养基上的菌丝接种到铺设有玻璃纸的PDA培养基上时,使用接种刀切取菌丝块进行接种。
5. 根据权利要求3所述的一种简易黑木耳菌种复壮的方法,其特征在于,
步骤(1) (2) (4),选择距离菌落边缘0.3-1.2cm范围内的菌丝接种;
步骤(3)中,二代菌株接种到PDA加富培养基上时,选择距离菌落边缘0.3-1.2cm范围内菌丝接种;当PDA加富培养基上的菌落半径达到2.5-3cm时,选择距离接种点1.5-2.5cm处的菌丝接种到铺设有玻璃纸的PDA培养基上。
6. 根据权利要求3所述的一种简易黑木耳菌种复壮的方法,其特征在于,
步骤(1) - (4)中培养温度为 $25 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$,
在PDA培养基上的培养时间为7-10天。

一种简易黑木耳菌种复壮的方法

技术领域

[0001] 本发明属于食用菌菌种复壮技术领域,具体涉及一种简易黑木耳菌种复壮的方法。

背景技术

[0002] 菌种在培养或保藏过程中,由于自发突变的存在,出现某些原有优良性状的劣化、遗传标记的丢失等现象,称为菌种衰退。菌种衰退不是突然发生的,而是从量变到质变的逐步演变过程。开始时,在群体细胞中仅有个别细胞发生自发突变(一般均为负变),不会使群体菌株性能发生改变。经过连续传代,群体中的负变个体达到一定数量,发展为优势群体,从而使整个群体表现为严重的衰退。

[0003] 黑木耳菌种通常会出现气生菌丝弱或不生长气生菌丝,角变等衰退现象,因此需要进行菌种复壮。

[0004] 黑木耳菌种的复壮方法主要有纯种分离法、淘汰法、遗传育种法等。其中,纯种分离法是从衰退菌种细胞群体中,将一部分仍保持原有典型性状的单细胞分离出来,经扩大培养,就可复原菌株的典型性状。纯种分离法又分为“菌落纯”和单细胞法;“菌落纯”法主要是在生长点选取菌丝,进行传代培养,通过大量的传代,才有可能筛选到原菌株的典型性状,但是传代本身就是一个自发负突变的过程,如果传达不慎,将使菌种无法继续使用。而单细胞法、淘汰法、遗传育种法操作繁琐,只适合科研人员,操作周期一般为6-10个月,对于黑木耳常规品种,耗费的人力财力远不如用于创制新品种。

[0005] 因此,如何提供一种简易黑木耳菌种复壮的方法是本领域亟待解决的问题。

发明内容

[0006] 本发明公开了一种简易黑木耳菌种复壮的方法,可实现黑木耳菌种的快速复壮。

[0007] 为了实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0008] 一种简易黑木耳菌种复壮的方法,在复壮培养基上铺设玻璃纸,将待复壮菌种接种于玻璃纸上。

[0009] 玻璃纸是一种半透性纤维素膜,将其铺设于复壮培养基上,在菌丝和培养基之间起到缓冲作用。由于复壮培养基营养丰富、水分充足,但对于待复壮的菌种而言,直接接受丰富的营养和充足的水分,反而会导致菌丝在萌发时呼吸效率减弱,造成缺氧;而玻璃纸作为生物屏障,既可以提供湿润的生长环境,又可将营养缓慢地传递给菌丝体,使菌丝体通过自身能力进行自我修复。玻璃纸的加入可减少传代次数,使菌丝快速复壮。

[0010] 优选地,玻璃纸在铺设之前经过无菌水浸泡和灭菌处理。

[0011] 经无菌水浸泡和灭菌处理的玻璃纸可更加贴合于培养基表面。

[0012] 进一步优选地,玻璃纸直径小于培养皿内径,以方便菌丝生长到无玻璃纸的培养皿边缘位置时打孔取菌丝进行传代。

[0013] 一种简易黑木耳菌种复壮的方法,包括如下步骤:

- [0014] (1) 一代复壮培养：
- [0015] 将待复壮菌种接种于PDA培养基上，获得一代菌株；
- [0016] (2) 二代复壮培养：
- [0017] 选取无角变的一代菌株，分别接种于铺设有玻璃纸的PDA培养基上，获得二代菌株；
- [0018] (3) 三代复壮培养：
- [0019] 选取长势一致、菌落边缘整齐的二代菌株，分别接种于PDA加富培养基上，培养出的菌丝再接种到铺设有玻璃纸的PDA培养基上，获得三代菌株；
- [0020] PDA加富培养基为在PDA培养基的基础上，添加木屑汁18-22v/v%、硫酸镁0.5-1.0g/L、磷酸二氢钾0.5-1.0g/L、蛋白胨0.5-1.0g/L；木屑汁为木屑煮后滤液；
- [0021] (4) 四代复壮培养：
- [0022] 选取长势好的三代菌株，分别接种于铺设有玻璃纸的PDA培养基上，获得四代菌株；
- [0023] (5) 母种保存：
- [0024] 选取长势一致、菌落边缘整齐的四代菌株作为母种保存。
- [0025] 一代复壮培养未铺设玻璃纸，主要用于筛除95%以上的衰退菌株，提高后续复壮效率；二代复壮培养接种于铺设有玻璃纸的PDA培养基上，可增加气生菌丝浓密度，提高菌丝活力；三代复壮培养过程中先在PDA加富培养基上培养，增加营养，方便挑取顶端优势菌丝，后接种到铺设有玻璃纸的PDA培养基上，进一步提高气生菌丝旺盛度并避免菌丝老化；四代复壮培养过程中使用铺设有玻璃纸的PDA培养基，稳固菌丝浓密度性状，相较于PDA加富培养基降低营养成分，便于保存和下次传代使用。
- [0026] 优选地，步骤(1)(2)(4)，均使用打孔器取菌丝块进行接种；
- [0027] 步骤(3)中，二代菌株接种到PDA加富培养基上时，使用打孔器取菌丝块进行接种；当PDA加富培养基上的菌丝接种到铺设有玻璃纸的PDA培养基上时，使用接种刀切取菌丝块进行接种。
- [0028] 优选地，步骤(1)(2)(4)，选择距离菌落边缘0.3-1.2cm范围内的菌丝接种；
- [0029] 步骤(3)中，二代菌株接种到PDA加富培养基上时，选择距离菌落边缘0.3-1.2cm范围内菌丝接种；当PDA加富培养基上的菌落半径达到2.5-3cm时，选择距离接种点1.5-2.5cm处的菌丝接种到铺设有玻璃纸的PDA培养基上。
- [0030] 本发明所选择的用于接种的菌丝活力相对旺盛，有助于恢复气生菌丝浓密度，减少角变的发生。
- [0031] 进一步优选地，步骤(1)(2)(4)及步骤(3)第一次接种时，在距离菌落边缘0.3-1.2cm范围内周向多点取菌丝。
- [0032] 优选地，步骤(1)-(4)中培养温度为 $25 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ ，
- [0033] 在PDA培养基上的培养时间为7-10天。
- [0034] 优选地，木屑汁的制备方法如下：选取硬杂木屑(柞树或阔叶树)，加入4-6倍重量的水，煮沸15-25min后，用3层纱布过滤后备用。
- [0035] 综上所述，本发明黑木耳菌种复壮方法所用材料简单易得，无需使用大型精密仪器，操作方便，技术难度低，复壮周期短，效果显著。

附图说明

- [0036] 图1所示为接种打孔示意图；
- [0037] 其中,由外至内依次为培养皿内边缘、菌落边缘、打孔位置；
- [0038] 图2所示为各代菌株菌丝浓密度对比图；
- [0039] 图3所示为各代菌株角变情况对比图；
- [0040] 图4所示为菌种复壮后生长状态图；
- [0041] 图5所示为采用常规“菌落纯”方法复壮后菌株生长状态图；
- [0042] 由左至右依次为为原始菌株、复壮1次菌株、复壮2次菌株、复壮3次菌株；
- [0043] 图6所示为不同培养基培养的菌株对比图；
- [0044] 其中,左图为PDA培养基组;中图为PDA加富培养基2组;右图为CK组；
- [0045] 图7所示为不同处理玻璃纸对比图；
- [0046] 左图为经浸泡处理组,中、右图为未经浸泡处理组。

具体实施方式

[0047] 下面对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0048] 实施例1

[0049] 以国审品种黑29为原始材料,经分离获得的衰退菌种为实验材料,进行复壮:

[0050] (1) 一代复壮培养

[0051] 以“菌落纯”的方法为基础,将衰退的菌种采用直径为0.5cm的打孔器,在距离菌落边缘0.5cm-1.0cm处打孔,如图1所示,选取10个9cm培养皿,每个培养皿打20个孔。

[0052] 将0.5cm的圆形菌丝块菌丝面相上转接到PDA培养基培养皿上,放入培养箱中25℃,倒置培养7~10d,当菌丝长至距离培养皿边缘0.5cm处,根据气生菌丝生长状态、菌落边缘整齐度以及角变现象进行统计:

[0053] 菌丝生长旺盛、菌落边缘整齐、未发生角变记录为正常菌株,有气生菌丝生长弱、菌落边缘不整齐、角变现象之一的记录为衰退菌株,统计其衰退率。

[0054] 进行平行试验,经统计,一代菌株的衰退率为95-100%。

[0055] (2) 二代复壮培养

[0056] 从一代菌种中选取10个长势最好的培养皿(以没有角变为主,气生菌丝弱可以忽略不计)作为二代复壮培养的材料。

[0057] 准备铺有玻璃纸的PDA培养基:剪取直径为6cm的圆形玻璃纸,将其浸泡在无菌水中,完全泡软后,放入高压灭菌锅中,121℃灭菌30min,取出在超净工作台上晾凉备用;配制PDA培养基,将其倒入9cm培养皿后,过夜凝固备用;将处理好的玻璃纸平铺于装有PDA的培养基上,尽量放置中间位置。

[0058] 按照步骤(1)的方法,将选取的培养皿打孔,转接到铺有玻璃纸的PDA培养基上,转接量按1:20传代(第二代的数量在200皿),培养条件与统计方法同步骤(1)。

[0059] 经平行试验验证,获得的二代菌株衰退率40-50%。

[0060] (3) 三代复壮培养

[0061] 从二代菌株中选取长势一致、菌落边缘整齐的培养皿10个,按照步骤(1)的方法打孔,以1:20传代比例接种到PDA加富培养基(在PDA培养基的基础上,添加木屑汁20v/v%、硫酸镁0.5g/L、磷酸二氢钾0.5g/L、蛋白胨0.5g/L)上,当菌落半径达到2.5-3.0cm时,挑取距接种点2cm左右长势较好的菌丝,使用接种刀切取 $0.3\pm 0.1\text{cm}\times 0.3\pm 0.1\text{cm}$ 的正方形小块,菌丝面向上,接种到铺有玻璃纸的PDA培养基上,25℃倒置培养7~10d,当菌丝长距离培养皿边缘0.5cm处,按照步骤(1)的方法统计衰退率。

[0062] 经平行试验验证,三代菌株的衰退率为35-40%。

[0063] (4) 四代复壮培养

[0064] 从三代菌株中选取长势最佳的10个培养皿,按照步骤(1)的接种方法,将选取的培养皿打孔,再次转接到铺有玻璃纸的PDA培养基上,培养条件与统计方法同步骤(1),经平行试验验证,获得的四代菌株衰退率小于10%。

[0065] (5) 母种保存

[0066] 从四代菌株中选取长势一致、菌落边缘整齐的培养皿,挑取菌丝保存于PDA斜面培养基上作为母种,或整体将玻璃纸取出,风干玻璃纸上的菌丝后保存。

[0067] 对一代菌株、二代菌株、三代菌株的菌丝浓密度进行比较,如图2所示,随着复壮传代,菌丝浓密度有显著提高。进一步地,对各代菌株角变情况进行比较,如图3所示,随着复壮传代,角变现象恢复。复壮后的母种传代培养10d后如图4所示,无角变、气生菌丝生长旺盛,菌落边缘整齐,性状稳定。

[0068] 实施例2

[0069] 按照实施例1步骤(1)进行“菌落纯”复壮培养,并且将培养获得正常菌株按照步骤(1)方法传代3次,并未见气生菌丝浓密度有所改善(图5)。

[0070] 实施例3

[0071] 按照实施例1步骤(1)(2)对待复壮菌种进行菌种复壮,获得的二代菌株按照步骤(1)接种方法分别接种到PDA培养基、PDA加富培养基(在PDA培养基的基础上,添加木屑汁20v/v%、硫酸镁0.5g/L、磷酸二氢钾0.5g/L、蛋白胨0.5g/L)上;并以PDA培养基上培养的正常菌种作为对照(CK);培养15d后,结果如图6所示,PDA加富培养基有利于筛选出生长更为旺盛的菌株,但培养时间较长时也更容易老化。

[0072] 实施例4

[0073] 按实施例1方法进行玻璃纸浸泡、灭菌处理,并设置不经浸泡直接121℃灭菌30min的对照组,将灭菌获得的各组玻璃纸铺设于培养基上,如图7所示,未经浸泡处理的玻璃纸发生变形。

[0074] 本说明书中各个实施例采用递进的方式描述,每个实施例重点说明的都是与其他实施例的不同之处,各个实施例之间相同相似部分互相参见即可。

[0075] 对所公开的实施例的上述说明,使本领域专业技术人员能够实现或使用本发明。对上述实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的,本文中定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下,在其它实施例中实现。因此,本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例,而是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

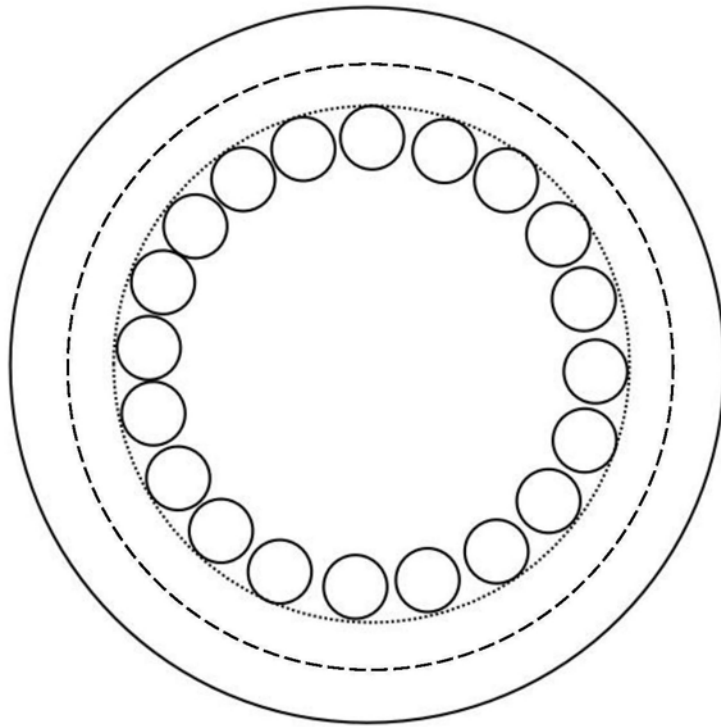


图1

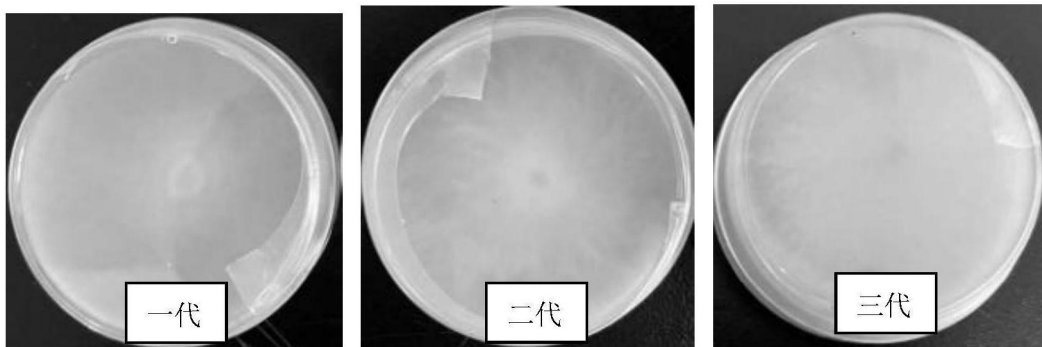


图2

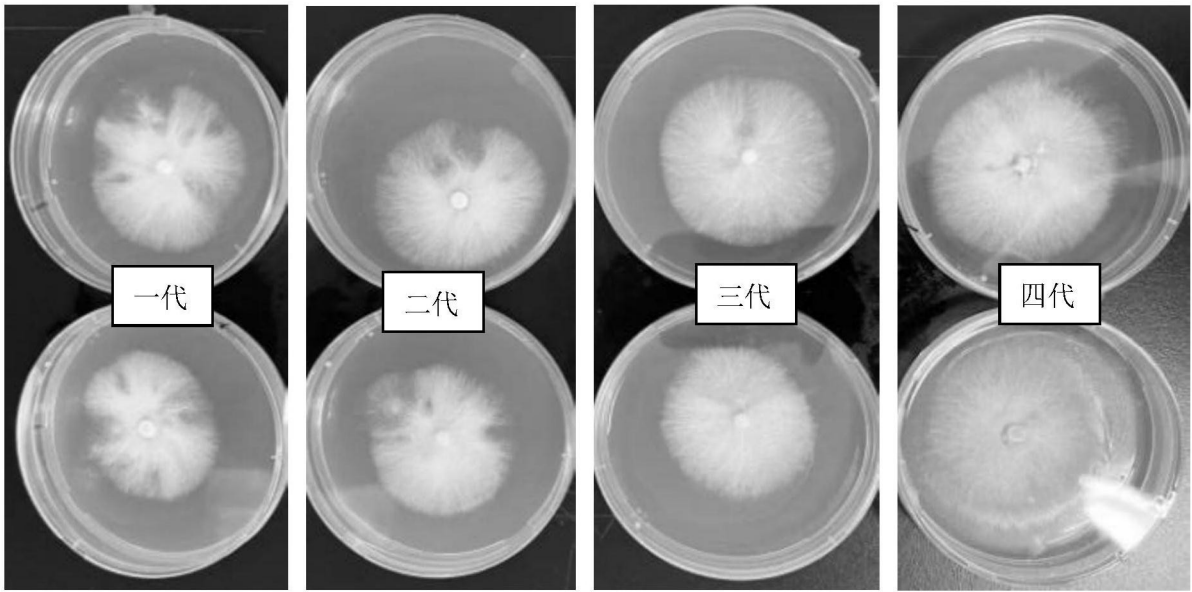


图3

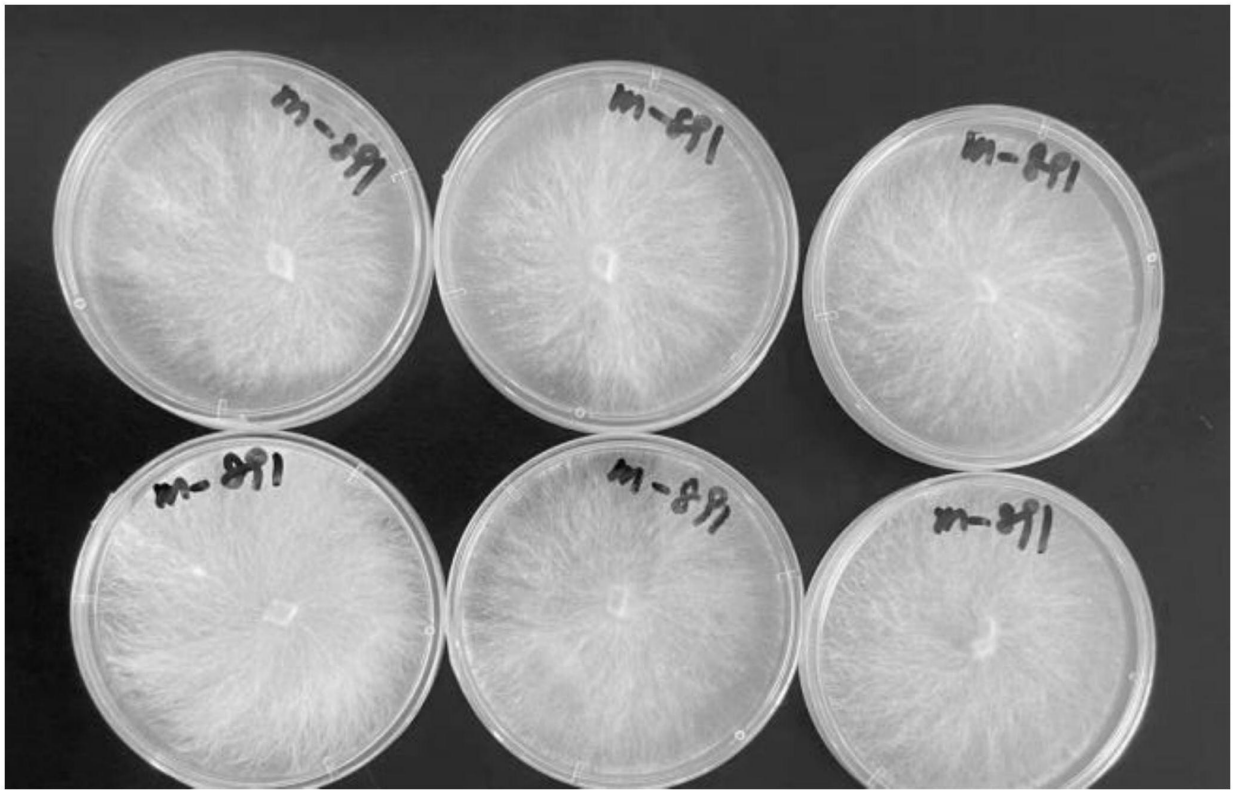


图4

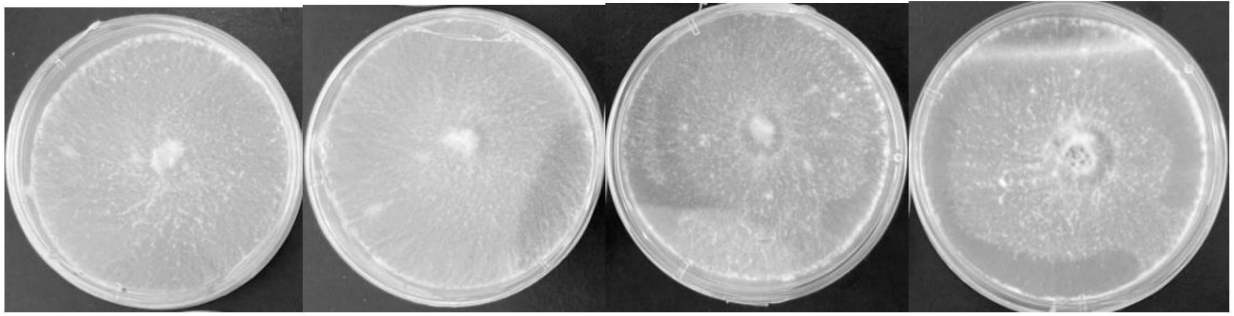


图5

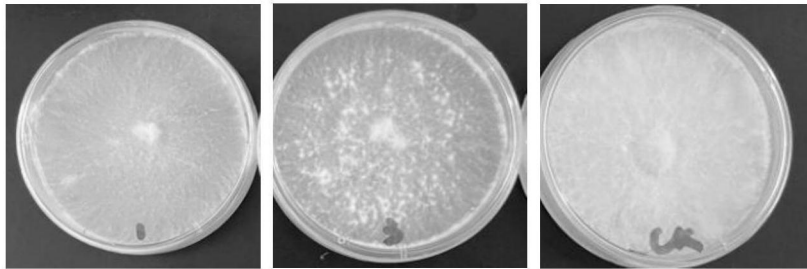


图6

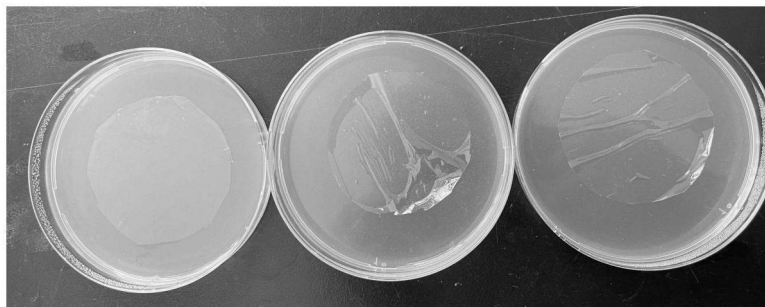


图7