



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 118879514 B

(45) 授权公告日 2025. 02. 25

(21) 申请号 202411297200.8

(22) 申请日 2024.09.18

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 118879514 A

(43) 申请公布日 2024.11.01

(83) 生物保藏信息
GDMCC NO.64380 2024.02.28

(73) 专利权人 云南省农业科学院生物技术与种
质资源研究所
地址 650205 云南省昆明市盘龙区北京路
2238号#省农科院生物所

(72) 发明人 李树红 敖成策 李娥贤 罗红梅
吴晓蕖

(74) 专利代理机构 昆明正原专利商标代理有限
公司 53100
专利代理师 于洪 金耀生

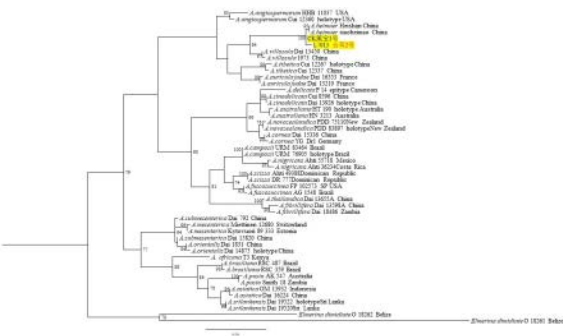
(51) Int.Cl.
C12N 1/14 (2006.01)
A01G 18/00 (2018.01)
A01G 18/40 (2018.01)
A01G 18/20 (2018.01)
C12R 1/645 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 104094770 A, 2014.10.15
CN 105624046 A, 2016.06.01
审查员 冯娟

权利要求书2页 说明书24页
序列表(电子公布) 附图10页

(54) 发明名称
一种黑木耳菌株L7013及其栽培方法

(57) 摘要
本发明涉及一种黑木耳菌株L7013及其栽培方法,属于微生物技术领域。该黑木耳菌株L7013,已于2024年02月28日保藏于中国广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号GDMCC No: 64380。本发明黑木耳菌株L7013具有出菇状况良好,出菇整齐度好,栽培性状稳定,子实体深褐色,耳片形状为耳状、簇生,耳片生长较密,产量高,转化率高,蛋白质和粗多糖含量高,营养物质丰富等特点。该菌株温度适应范围广,适宜在低纬高原的云南地区大面积推广种植,具有较好的市场前景。



1. 一种黑木耳菌株L7013, 其特征在于, 所述的黑木耳 (*Auricularia heimuer*) 菌株L7013已于2024年02月28日保藏于中国广东省微生物菌种保藏中心, 保藏编号GDMCC No: 64380。

2. 权利要求1所述的黑木耳菌株L7013的栽培方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

步骤(1), 母种扩繁: 无菌条件下, 取黑木耳菌株L7013接种到母种PDA培养基上, 置于24℃培养箱恒温培养7-10d;

所述的母种PDA培养基包括按照重量份数计的如下原料: 马铃薯200份、葡萄糖19-21份、琼脂粉19-21份、水990-1010份;

步骤(2), 原种制备: 取步骤(1)培养好的母种接种至原种培养瓶中, 置于24℃培养室恒温培养25-30d, 得到原种;

所述的原种培养瓶中的原种培养基包括按照重量份数计的如下原料: 杂木屑72-74份、麸皮23-25份、白糖0.9-1.1份、石膏粉0.9-1.1份、石灰粉0.8-1.2份; pH值6-8, 含水量55-65%;

步骤(3), 栽培种制备: 将步骤(2)培养好的原种接种到栽培料袋中, 置于24℃培养室恒温培养30-35d, 得到栽培种;

所述的栽培料袋中的栽培基质包括按照重量份数计的如下原料: 杂木屑77-79份、麦麸16-18份、豆饼粉1.9-2.1份、石膏粉0.9-1.1份、石灰粉0.8-1.2份; pH值6-8, 含水量55-65%;

步骤(4), 后熟开口: 待步骤(3)中菌丝长满栽培料袋后, 将培养室温度调至17.5-18.5℃后熟培养6.5-7.5d, 后熟完成后对菌棒刺孔, 刺孔后放置干净整洁的场地养菌3-5天以恢复菌丝;

步骤(5), 菌棒栽培及出耳管理: 将刺孔养菌好的菌棒下地, 分畦摆放, 畦宽1.4-1.6米, 每排摆放6-7个菌棒; 下地三天后开始浇水, 采用干湿交替管理, 浇水温度为14-25℃。

3. 根据权利要求2所述的黑木耳菌株L7013的栽培方法, 其特征在于, 步骤(4)中, 每棒刺孔160-200个。

4. 根据权利要求2所述的黑木耳菌株L7013的栽培方法, 其特征在于, 步骤(4)中, 养菌时避免太阳直射, 且避免温度超过28℃高温, 并保持通风。

5. 根据权利要求2所述的黑木耳菌株L7013的栽培方法, 其特征在于, 步骤(5)中, 在干湿交替管理中, 需要浇水时, 每天浇水四次, 每次20-30min。

6. 根据权利要求2所述的黑木耳菌株L7013的栽培方法, 其特征在于, 步骤(5)中, 出耳后长到耳片不再增大时采摘; 采摘时, 采大留小, 每次采摘后停止浇水3d。

7. 权利要求1所述的黑木耳菌株L7013的栽培方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

步骤A, 母种扩繁: 无菌条件下, 取黑木耳菌株L7013接种到母种PDA培养基上, 置于24℃恒温培养7-10d, 得到菌丝块;

所述的母种PDA培养基包括按照重量份数计的如下原料: 马铃薯200份、葡萄糖19-21份、琼脂粉19-21份、水990-1010份;

步骤B, 液体摇瓶培养: 将步骤A培养好的菌丝块接种于灭菌后的摇瓶种培养基中, 于27.5-28.5℃下摇床培养7-10d, 即得到种子液;

其中, 摇瓶种培养基包括按照重量份数计的如下原料: 马铃薯200份、乳糖19-21份、蛋白胨1.9-2.1份、氯化钙0.19-0.21份、水990-1010份, pH为8.8-9.2;

步骤C,液体发酵罐发酵培养:将步骤B得到的种子液接种至发酵液培养基中,于23.5-24.5℃下培养8-11d,得到液体菌种;

其中,发酵液培养基包括按照重量份数计的如下原料:可溶性淀粉600份、葡萄糖2350-2450份、蛋白胨190-210份、磷酸二氢钾115-125份、氯化钙59-61份、水99000-101000份,pH为8.8-9.2;

步骤D,栽培种制备:将步骤C培养好的液体菌种接种至栽培袋中,置于24℃培养室恒温培养30-35d;

所述的栽培袋中的栽培基质包括按照重量份数计的如下原料:杂木屑77-79份、麦麸17-19份、豆饼粉1.9-2.1份、石膏粉0.9-1.1份、石灰粉0.5-0.8份;pH值6-8,含水量55-65%;

步骤E,后熟开口:菌丝长满栽培袋后,将培养室温度调至17.5-18.5℃后熟培养6.5-7.5d,后熟完成后对菌棒刺孔,刺孔后放置干净整洁的场地养菌3-5天以恢复菌丝;

步骤F,菌棒栽培及出耳管理:将刺孔养菌好的菌棒下地,分畦摆放,畦宽1.4-1.6米,每排摆放6-7个菌棒;下地三天后开始浇水,采用干湿交替管理,浇水温度为14-25℃。

8.根据权利要求7所述的黑木耳菌株L7013的栽培方法,其特征在于,步骤B中,摇床的速度为170-190r·min⁻¹。

9.根据权利要求7所述的黑木耳菌株L7013的栽培方法,其特征在于,步骤E中,每棒刺孔160-200个;养菌时避免太阳直射,且避免温度超过28℃高温,并保持通风。

10.根据权利要求7所述的黑木耳菌株L7013的栽培方法,其特征在于,步骤F中,在干湿交替管理中,需要浇水时,每天浇水四次,每次20-30min;

出耳后长到耳片不再增大时采摘;采摘时,采大留小,每次采摘后停止浇水3d。

一种黑木耳菌株L7013及其栽培方法

技术领域

[0001] 本发明属于微生物技术领域,具体涉及一种黑木耳菌株L7013及其栽培方法。

背景技术

[0002] 木耳属全世界约有30余个种,而我国就有20个种,包括:黑木耳、角质木耳、皱木耳、象牙白木耳、褐黄木耳、海南木耳、大毛木耳、毡木耳、黑皱木耳、华丽木耳、遁形木耳、毛木耳、薄肉木耳、西沙木耳等。其中黑木耳和毛木耳作为我国两大主栽品种研究与应用较多。

[0003] 黑木耳[*Auricularia auricula* (L.exhook.) Underw]又名黑菜、木耳、云耳,为真菌门担子菌亚门异担子菌纲木耳目木耳科木耳属。黑木耳生长于栎、榆、杨、榕、洋槐等阔叶树上或朽木及针叶树冷杉上,密集成丛生长,可引起木材腐朽。生长在不同树木上的木耳称谓不同,其功效也有差异。黑木耳是一类具有重要营养和药用价值的食用菌,是世界著名四大食用菌(双孢菇、平菇、香菇、木耳)之一,被誉为“素中之荤”、“素中之王”和“菌中瑰宝”。

[0004] 据现代科学分析,木耳具有多种营养成分,包括蛋白质、维生素、矿质元素等。有研究发现干木耳中碳水化合物最多(占65%)、水分11%、蛋白质10.6%(含量是牛奶的6倍)、粗纤维7%、灰分5.8%、钙0.357%、磷0.201%、脂肪0.2%、铁0.185%(含量是肉类的100倍),此外还含有尼克酸、核黄素、硫胺素和胡萝卜素等多种微量元素。此外,木耳作为重要的食药兼用菌,含有多糖、腺苷、氨基酸等多种生物活性成分,具有补益、抗肿瘤、抗炎、通便、降血脂、降血糖、抗动脉粥样硬化、抗血小板凝聚、抗辐射、增强免疫力等多种作用。木耳营养价值高、功效作用多,在食品、药品、化妆品等领域均有着巨大的应用潜力。

[0005] 目前,云南省木耳在实际生产过程中,菌种品质参差不齐,导致栽培后不能正常出菇的现象时常发生,子实体产量不够稳定。近年来云南木耳产业不断扩大,栽培技术也逐渐成熟,但引进省外成熟木耳品种及技术在多元立体气候的云南省栽培适宜性,产量和生物转化率等都不稳定,阻碍了木耳的大规模推广。目前,非常缺乏云南省本地木耳认(审)定或鉴定的品种,特别是适宜利用云南不同温型、立体气候栽培的品种。

[0006] 因此如何克服现有技术的不足是目前微生物技术领域亟需解决的问题。

发明内容

[0007] 本发明的目的是为了解决现有技术的不足,提供一种黑木耳菌株L7013及其栽培方法。

[0008] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案如下:

[0009] 本发明第一方面提供一种黑木耳菌株L7013,所述的黑木耳菌株L7013(*Auricularia heimuer*)已于2024年02月28日保藏于中国广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号GDMCC No:64380。

[0010] 本发明第二方面提供一种黑木耳菌株L7013的栽培方法,包括如下步骤:

[0011] 步骤(1),母种扩繁:无菌条件下,取黑木耳菌株L7013接种到母种PDA培养基上,置

于24℃培养箱恒温培养7-10d;

[0012] 所述的母种PDA培养基包括按照重量份数计的如下原料:马铃薯200份、葡萄糖19-21份、琼脂粉19-21份、水990-1010份;

[0013] 步骤(2),原种制备:取步骤(1)培养好的母种接种至原种培养瓶中,置于24℃培养室恒温培养25-30d,得到原种;

[0014] 所述的原种培养瓶中的原种培养基包括按照重量份数计的如下原料:杂木屑72-74份、麸皮23-25份、白糖0.9-1.1份、石膏粉0.9-1.1份、石灰粉0.8-1.2份;pH值6-8,含水量55-65%;

[0015] 步骤(3),栽培种制备:将步骤(2)培养好的原种接种到栽培料袋中,置于24℃培养室恒温培养30-35d,得到栽培种;

[0016] 所述的栽培袋中的栽培基质包括按照重量份数计的如下原料:杂木屑77-79份、麦麸16-18份、豆饼粉1.9-2.1份、石膏粉0.9-1.1份、石灰粉0.8-1.2份;pH值6-8,含水量55-65%;

[0017] 步骤(4),后熟开口:待步骤(3)中菌丝长满栽培料袋后,将培养室温度调至17.5-18.5℃后熟培养6.5-7.5d,后熟完成后对菌棒刺孔,刺孔后放置干净整洁的场地养菌3-5天以恢复菌丝;

[0018] 步骤(5),菌棒栽培及出耳管理:将刺孔养菌好的菌棒下地,分畦摆放,畦宽1.4-1.6米,每排摆放6-7个菌棒;下地三天后开始浇水,采用干湿交替管理,浇水温度为14-25℃。

[0019] 进一步,步骤(4)中,每棒刺孔160-200个。

[0020] 进一步,步骤(4)中,养菌时避免太阳直射,且避免温度超过28℃高温,并保持通风。

[0021] 进一步,步骤(5)中,在干湿交替管理中,需要浇水时,每天浇水四次,每次20-30min。

[0022] 进一步,步骤(5)中,出耳后长到耳片不再增大时采摘;采摘时,采大留小,每次采摘后停止浇水3d。

[0023] 本发明第三方面提供另一种黑木耳菌株L7013的栽培方法,包括如下步骤:

[0024] 步骤A,母种扩繁:无菌条件下,取黑木耳菌株L7013接种到母种PDA培养基上,置于24℃恒温培养7-10d,得到菌丝块;

[0025] 所述的母种PDA培养基包括按照重量份数计的如下原料:马铃薯200份、葡萄糖19-21份、琼脂粉19-21份、水990-1010份;

[0026] 步骤B,液体摇瓶培养:将步骤A培养好的菌丝块接种于灭菌后的摇瓶种培养基中,于27.5-28.5℃下摇床培养7-10d,即得到种子液;

[0027] 其中,摇瓶种培养基包括按照重量份数计的如下原料:马铃薯200份、乳糖19-21份、蛋白胨1.9-2.1份、氯化钙0.19-0.21份、水990-1010份,pH为8.8-9.2;

[0028] 步骤C,液体发酵罐发酵培养:将步骤B得到的种子液接种至发酵液培养基中,于23.5-24.5℃下培养8-11d,得到液体菌种;

[0029] 其中,发酵液培养基包括按照重量份数计的如下原料:可溶性淀粉600份、葡萄糖2350-2450份、蛋白胨190-210份、磷酸二氢钾115-125份、氯化钙59-61份、水99000-101000

份,pH为8.8-9.2;

[0030] 步骤D,栽培种制备:将步骤C培养好的液体菌种接种至栽培袋中,置于24℃培养室恒温培养30-35d;

[0031] 所述的栽培袋中的栽培基质包括按照重量份数计的如下原料:杂木屑77-79份、麦麸17-19份、豆饼粉1.9-2.1份、石膏粉0.9-1.1份、石灰粉0.5-0.8份;pH值6-8,含水量55-65%;

[0032] 步骤E,后熟开口:菌丝长满栽培袋后,将培养室温度调至17.5-18.5℃后熟培养6.5-7.5d,后熟完成后对菌棒刺孔,刺孔后放置干净整洁的场地养菌3-5天以恢复菌丝;

[0033] 步骤F,菌棒栽培及出耳管理:将刺孔养菌好的菌棒下地,分畦摆放,畦宽1.4-1.6米,每排摆放6-7个菌棒;下地三天后开始浇水,采用干湿交替管理,浇水温度为14-25℃。

[0034] 进一步,步骤B中,摇床的速度为170-190r·min⁻¹。

[0035] 进一步,步骤E中,每棒刺孔160-200个;养菌时避免太阳直射,且避免温度超过28℃高温,并保持通风。

[0036] 进一步,步骤F中,在干湿交替管理中,需要浇水时,每天浇水四次,每次20-30min;

[0037] 出耳后长到耳片不再增大时采摘;采摘时,采大留小,每次采摘后停止浇水3d。

[0038] 本发明采用露天地摆式栽培法进行菌棒栽培。

[0039] 本发明中,干湿交替管理的具体方法采用现有技术即可,本发明对此不做限制。本发明浇水时,采用常规的喷灌喷洒,喷灌流量可以为1.33m³/h,本发明对此不做限制。

[0040] 本发明畦长不做限定,可按照场地自行设置。

[0041] 本发明与现有技术相比,其有益效果为:

[0042] (1)黑木耳菌株L7013为云南省内采集的野生黑木耳资源选育而成,该菌株菌丝粗壮浓密,生长速率快,抗杂菌能力强。在云南省内大田地摆栽培效果优异,适应温度较广,在15℃~28℃环境下均能正常出耳,耳片为耳状簇生,干重产量达759.7g/袋,生物学转化率达138.1%,为生产上可大规模推广的优质高产菌株;

[0043] (2)黑木耳菌株L7013经本发明技术制种及驯化栽培,经云南低维高原的气候滋养,具有较高的营养价值,功能成分粗多糖的富集量为对照的4倍多,蛋白质含量接近为对照的2倍;

[0044] (3)黑木耳菌株L7013经本发明技术试验优化后,可采取灵活制种技术,固体菌种和液体菌种制种效果均较优,且该菌株经优化试验后发现大田地摆栽培效果最优,该栽培技术不需要建设种植大棚,不需要遮阴及环境参数调控,节约大量成本。

附图说明

[0045] 图1为1TIS碱基差异对比图;其中,1HA0为对照CK黑保1号,L7013为试验菌株;

[0046] 图2为nLSU碱基差异对比图;其中,1HA0为对照CK黑保1号,L7013为试验菌株;

[0047] 图3为黑木耳菌株L7013基于ITS+nLSU序列多基因系统发育树;

[0048] 图4为黑木耳菌株L7013和对照CK黑保1号菌株拮抗图;其中,左侧标有13菌丝块为L7013菌株,右侧菌丝块为对照CK黑保1号;

[0049] 图5为黑木耳菌株L7013 SSR分子标记胶图;其中,YE2H为L7013菌株,CK为对照菌株黑保1号,Marker为模板;a为采用引物YE2H-01的SSR分子标记胶图;b为采用引物YE2H-02

的SSR分子标记胶图;c为采用引物YE2H-03的SSR分子标记胶图;d为采用引物YE2H-04的SSR分子标记胶图;e为采用引物YE2H-05的SSR分子标记胶图;f为采用引物YE2H-06的SSR分子标记胶图;

[0050] 图6为黑木耳菌株L7013形态图;a为子实体野生形态;b为子实体横切面;c为不孕面柔毛;d-f为子实层中担子和拟担子图;g-1为担孢子图;标尺b=6 μ m,c=10 μ m,d-f=30 μ m,g-l=5 μ m;

[0051] 图7为黑木耳菌株L7013示范栽培效果图;其中,a为云南省昆明市嵩明县栽培出菇在实体形态,b为云南省文山州富宁县里达镇栽培出菇在实体形态,c为云南省文山州富宁县木央镇栽培出菇整体形态图,d为云南省文山州富宁县木央镇栽培出菇在实体形态,e为耳片正面,f为耳片背面,g为单朵鲜重;

[0052] 图8为碳源单因子筛选试验菌丝生长速度柱形图;

[0053] 图9为碳源单因子筛选试验菌丝生长形态图;

[0054] 图10为氮源单因子筛选试验菌丝生长速度柱形图;

[0055] 图11为氮源单因子筛选试验菌丝生长形态图;

[0056] 图12为无机盐单因子筛选试验菌丝生长速度柱形图;

[0057] 图13为无机盐单因子筛选试验菌丝生长形态图;

[0058] 图14为温度单因子筛选试验菌丝生长速度柱形图;

[0059] 图15为温度单因子筛选试验菌丝生长形态图;

[0060] 图16为pH单因子筛选试验菌丝生长速度柱形图;

[0061] 图17为pH单因子筛选试验菌丝生长形态图。

具体实施方式

[0062] 下面结合实施例对本发明作进一步的详细描述。

[0063] 本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用材料或设备未注明生产厂商者,均为可以通过购买获得的常规产品。

[0064] 文中除非另有说明,否则百分号均为体积百分数。

[0065] 实施例1

[0066] 一种黑木耳菌株L7013,所述的黑木耳菌株L7013(*Auricularia heimuer*)已于2024年02月28日保藏于中国广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号GDMCC No:64380。

[0067] 上述黑木耳菌株L7013的栽培方法,包括如下步骤:

[0068] 步骤(1),母种扩繁:无菌条件下,取黑木耳菌株L7013接种到母种PDA培养基上,置于24 $^{\circ}$ C培养箱恒温培养8d;

[0069] 所述的母种PDA培养基包括按照重量份数计的如下原料:马铃薯200份、葡萄糖20份、琼脂粉20份、水1000份;

[0070] 步骤(2),原种制备:取步骤(1)培养好的母种接种至原种培养瓶中,置于24 $^{\circ}$ C培养室恒温培养28d,得到原种;

[0071] 所述的原种培养瓶中的原种培养基包括按照重量份数计的如下原料:杂木屑73

份、麸皮24份、白糖1份、石膏粉1份、石灰粉1份;pH值7,含水量55-65%;

[0072] 步骤(3),栽培种制备:将步骤(2)培养好的原种接种到栽培料袋中,置于24℃培养室恒温培养33d,得到栽培种;

[0073] 所述的栽培袋中的栽培基质包括按照重量份数计的如下原料:杂木屑78份、麦麸17份、豆饼粉1份、石膏粉1份、石灰粉1份;pH值7,含水量55-65%;

[0074] 步骤(4),后熟开口:待步骤(3)中菌丝长满栽培料袋后,将培养室温度调至18℃后熟培养7d,后熟完成后对菌棒刺孔,刺孔后放置干净整洁的场地养菌4天以恢复菌丝;

[0075] 步骤(5),菌棒栽培及出耳管理:将刺孔养菌好的菌棒下地,分畦摆放,畦宽1.5米,每排摆放6个菌棒;下地三天后开始浇水,采用干湿交替管理,浇水温度为18-22℃。

[0076] 实施例2

[0077] 一种黑木耳菌株L7013,所述的黑木耳菌株L7013(*Auricularia heimuer*)已于2024年02月28日保藏于中国广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号GDMCC No:64380。

[0078] 上述黑木耳菌株L7013的栽培方法,包括如下步骤:

[0079] 步骤(1),母种扩繁:无菌条件下,取黑木耳菌株L7013接种到母种PDA培养基上,置于24℃培养箱恒温培养7d;

[0080] 所述的母种PDA培养基包括按照重量份数计的如下原料:马铃薯200份、葡萄糖19份、琼脂粉19份、水990份;

[0081] 步骤(2),原种制备:取步骤(1)培养好的母种接种至原种培养瓶中,置于24℃培养室恒温培养25d,得到原种;

[0082] 所述的原种培养瓶中的原种培养基包括按照重量份数计的如下原料:杂木屑72份、麸皮23份、白糖0.9份、石膏粉0.9份、石灰粉0.8份;pH值6,含水量55-65%;

[0083] 步骤(3),栽培种制备:将步骤(2)培养好的原种接种到栽培料袋中,置于24℃培养室恒温培养30d,得到栽培种;

[0084] 所述的栽培袋中的栽培基质包括按照重量份数计的如下原料:杂木屑77份、麦麸16份、豆饼粉1.9份、石膏粉0.9份、石灰粉0.8份;pH值6,含水量55-65%;

[0085] 步骤(4),后熟开口:待步骤(3)中菌丝长满栽培料袋后,将培养室温度调至17.5℃后熟培养6.5d,后熟完成后对菌棒刺孔,刺孔后放置干净整洁的场地养菌3天以恢复菌丝;

[0086] 步骤(5),菌棒栽培及出耳管理:将刺孔养菌好的菌棒下地,分畦摆放,畦宽1.4米,每排摆放6个菌棒;下地三天后开始浇水,采用干湿交替管理,浇水温度为14-18℃。

[0087] 步骤(4)中,每棒刺孔160个。

[0088] 步骤(4)中,养菌时避免太阳直射,且避免温度超过28℃高温,并保持通风。

[0089] 步骤(5)中,在干湿交替管理中,需要浇水时,每天浇水四次,每次2min。

[0090] 步骤(5)中,出耳后长到耳片不再增大时采摘;采摘时,采大留小,每次采摘后停止浇水3d。

[0091] 实施例3

[0092] 一种黑木耳菌株L7013,所述的黑木耳菌株L7013(*Auricularia heimuer*)已于2024年02月28日保藏于中国广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号GDMCC No:64380。

[0093] 上述黑木耳菌株L7013的栽培方法,包括如下步骤:

[0094] 步骤(1),母种扩繁:无菌条件下,取黑木耳菌株L7013接种到母种PDA培养基上,置

于24℃培养箱恒温培养10d;

[0095] 所述的母种PDA培养基包括按照重量份数计的如下原料:马铃薯200份、葡萄糖21份、琼脂粉21份、水1010份;

[0096] 步骤(2),原种制备:取步骤(1)培养好的母种接种至原种培养瓶中,置于24℃培养室恒温培养30d,得到原种;

[0097] 所述的原种培养瓶中的原种培养基包括按照重量份数计的如下原料:杂木屑74份、麸皮25份、白糖1.1份、石膏粉1.1份、石灰粉1.2份;pH值8,含水量55-65%;

[0098] 步骤(3),栽培种制备:将步骤(2)培养好的原种接种到栽培料袋中,置于24℃培养室恒温培养35d,得到栽培种;

[0099] 所述的栽培袋中的栽培基质包括按照重量份数计的如下原料:杂木屑79份、麦麸18份、豆饼粉2.1份、石膏粉1.1份、石灰粉1.2份;pH值8,含水量55-65%;

[0100] 步骤(4),后熟开口:待步骤(3)中菌丝长满栽培料袋后,将培养室温度调至18.5℃后熟培养7.5d,后熟完成后对菌棒刺孔,刺孔后放置干净整洁的场地养菌5天以恢复菌丝;

[0101] 步骤(5),菌棒栽培及出耳管理:将刺孔养菌好的菌棒下地,分畦摆放,畦宽1.6米,每排摆放7个菌棒;下地三天后开始浇水,采用干湿交替管理,浇水温度为20-25℃。

[0102] 步骤(4)中,每棒刺孔200个。

[0103] 步骤(4)中,养菌时避免太阳直射,且避免温度超过28℃高温,并保持通风。

[0104] 步骤(5)中,在干湿交替管理中,需要浇水时,每天浇水四次,每次30min。

[0105] 步骤(5)中,出耳后长到耳片不再增大时采摘;采摘时,采大留小,每次采摘后停止浇水3d。

[0106] 实施例4

[0107] 一种黑木耳菌株L7013,所述的黑木耳菌株L7013(*Auricularia heimuer*)已于2024年02月28日保藏于中国广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号GDMCC No:64380。

[0108] 上述黑木耳菌株L7013的栽培方法,包括如下步骤:

[0109] 步骤(1),母种扩繁:无菌条件下,取黑木耳菌株L7013接种到母种PDA培养基上,置于24℃培养箱恒温培养9d;

[0110] 所述的母种PDA培养基包括按照重量份数计的如下原料:马铃薯200份、葡萄糖20份、琼脂粉20份、水1000份;

[0111] 步骤(2),原种制备:取步骤(1)培养好的母种接种至原种培养瓶中,置于24℃培养室恒温培养27d,得到原种;

[0112] 所述的原种培养瓶中的原种培养基包括按照重量份数计的如下原料:杂木屑73份、麸皮24份、白糖1份、石膏粉1份、石灰粉1份;pH值7,含水量55-65%;

[0113] 步骤(3),栽培种制备:将步骤(2)培养好的原种接种到栽培料袋中,置于24℃培养室恒温培养33d,得到栽培种;

[0114] 所述的栽培袋中的栽培基质包括按照重量份数计的如下原料:杂木屑78份、麦麸17份、豆饼粉2份、石膏粉1份、石灰粉1份;pH值7,含水量55-65%;

[0115] 步骤(4),后熟开口:待步骤(3)中菌丝长满栽培料袋后,将培养室温度调至18℃后熟培养7d,后熟完成后对菌棒刺孔,刺孔后放置干净整洁的场地养菌4天以恢复菌丝;

[0116] 步骤(5),菌棒栽培及出耳管理:将刺孔养菌好的菌棒下地,分畦摆放,畦宽1.5米,

每排摆放7个菌棒；下地三天后开始浇水，采用干湿交替管理，浇水温度为18-23℃。

[0117] 步骤(4)中，每棒刺孔180个。

[0118] 步骤(4)中，养菌时避免太阳直射，且避免温度超过28℃高温，并保持通风。

[0119] 步骤(5)中，在干湿交替管理中，需要浇水时，每天浇水四次，每次25min。

[0120] 步骤(5)中，出耳后长到耳片不再增大时采摘；采摘时，采大留小，每次采摘后停止浇水3d。

[0121] 实施例5

[0122] 一种黑木耳菌株L7013，所述的黑木耳菌株L7013(*Auricularia heimuer*)已于2024年02月28日保藏于中国广东省微生物菌种保藏中心，保藏编号GDMCC No:64380。

[0123] 上述黑木耳菌株L7013的栽培方法，包括如下步骤：

[0124] 步骤A，母种扩繁：无菌条件下，取黑木耳菌株L7013接种到母种PDA培养基上，置于24℃恒温培养8d，得到菌丝块；

[0125] 所述的母种PDA培养基包括按照重量份数计的如下原料：马铃薯200份、葡萄糖20份、琼脂粉20份、水1000份；

[0126] 步骤B，液体摇瓶培养：将步骤A培养好的菌丝块接种于灭菌后的摇瓶种培养基中，于28℃下摇床培养8d，即得到种子液；

[0127] 其中，摇瓶种培养基包括按照重量份数计的如下原料：马铃薯200份、乳糖20份、蛋白胨2份、氯化钙0.2份、水1000份，pH为9；

[0128] 步骤C，液体发酵罐发酵培养：将步骤B得到的种子液接种至发酵液培养基中，于24℃下培养9d，得到液体菌种；

[0129] 其中，发酵液培养基包括按照重量份数计的如下原料：可溶性淀粉600份、葡萄糖2400份、蛋白胨200份、磷酸二氢钾120份、氯化钙60份、水00000份，pH为9；

[0130] 步骤D，栽培种制备：将步骤C培养好的液体菌种接种至栽培袋中，置于24℃培养室恒温培养34d；

[0131] 所述的栽培袋中的栽培基质包括按照重量份数计的如下原料：杂木屑78份、麦麸18份、豆饼粉2份、石膏粉1份、石灰粉0.7份；pH值7，含水量55-65%；

[0132] 步骤E，后熟开口：菌丝长满栽培袋后，将培养室温度调至18℃后熟培养7d，后熟完成后对菌棒刺孔，刺孔后放置干净整洁的场地养菌4天以恢复菌丝；

[0133] 步骤F，菌棒栽培及出耳管理：将刺孔养菌好的菌棒下地，分畦摆放，畦宽1.5米，每排摆放6个菌棒；下地三天后开始浇水，采用干湿交替管理，浇水温度为17-23℃。

[0134] 实施例6

[0135] 一种黑木耳菌株L7013，所述的黑木耳菌株L7013(*Auricularia heimuer*)已于2024年02月28日保藏于中国广东省微生物菌种保藏中心，保藏编号GDMCC No:64380。

[0136] 上述黑木耳菌株L7013的栽培方法，包括如下步骤：

[0137] 步骤A，母种扩繁：无菌条件下，取黑木耳菌株L7013接种到母种PDA培养基上，置于24℃恒温培养7d，得到菌丝块；

[0138] 所述的母种PDA培养基包括按照重量份数计的如下原料：马铃薯200份、葡萄糖19份、琼脂粉19份、水990份；

[0139] 步骤B，液体摇瓶培养：将步骤A培养好的菌丝块接种于灭菌后的摇瓶种培养基中，

于27.5℃下摇床培养7d,即得到种子液;

[0140] 其中,摇瓶种培养基包括按照重量份数计的如下原料:马铃薯200份、乳糖19份、蛋白胨1.9份、氯化钙0.19份、水990份,pH为8.8;

[0141] 步骤C,液体发酵罐发酵培养:将步骤B得到的种子液接种至发酵液培养基中,于23.5℃下培养8d,得到液体菌种;

[0142] 其中,发酵液培养基包括按照重量份数计的如下原料:可溶性淀粉600份、葡萄糖2350份、蛋白胨190份、磷酸二氢钾115份、氯化钙59份、水99000份,pH为8.8;

[0143] 步骤D,栽培种制备:将步骤C培养好的液体菌种接种至栽培袋中,置于24℃培养室恒温培养30d;

[0144] 所述的栽培袋中的栽培基质包括按照重量份数计的如下原料:杂木屑77份、麦麸17份、豆饼粉1.9份、石膏粉0.9份、石灰粉0.5份;pH值6,含水量55-65%;

[0145] 步骤E,后熟开口:菌丝长满栽培袋后,将培养室温度调至17.5℃后熟培养6.5d,后熟完成后对菌棒刺孔,刺孔后放置干净整洁的场地养菌3天以恢复菌丝;

[0146] 步骤F,菌棒栽培及出耳管理:将刺孔养菌好的菌棒下地,分畦摆放,畦宽1.4米,每排摆放6个菌棒;下地三天后开始浇水,采用干湿交替管理,浇水温度为14-18℃。

[0147] 步骤B中,摇床的速度为 $170\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

[0148] 步骤E中,每棒刺孔160个;养菌时避免太阳直射,且避免温度超过28℃高温,并保持通风。

[0149] 步骤F中,在干湿交替管理中,需要浇水时,每天浇水四次,每次20min;

[0150] 出耳后长到耳片不再增大时采摘;采摘时,采大留小,每次采摘后停止浇水3d。

[0151] 实施例7

[0152] 一种黑木耳菌株L7013,所述的黑木耳菌株L7013(*Auricularia heimuer*)已于2024年02月28日保藏于中国广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号GDMCC No:64380。

[0153] 上述黑木耳菌株L7013的栽培方法,包括如下步骤:

[0154] 步骤A,母种扩繁:无菌条件下,取黑木耳菌株L7013接种到母种PDA培养基上,置于24℃恒温培养10d,得到菌丝块;

[0155] 所述的母种PDA培养基包括按照重量份数计的如下原料:马铃薯200份、葡萄糖21份、琼脂粉21份、水1010份;

[0156] 步骤B,液体摇瓶培养:将步骤A培养好的菌丝块接种于灭菌后的摇瓶种培养基中,于28.5℃下摇床培养10d,即得到种子液;

[0157] 其中,摇瓶种培养基包括按照重量份数计的如下原料:马铃薯200份、乳糖21份、蛋白胨2.1份、氯化钙0.21份、水1010份,pH为9.2;

[0158] 步骤C,液体发酵罐发酵培养:将步骤B得到的种子液接种至发酵液培养基中,于24.5℃下培养11d,得到液体菌种;

[0159] 其中,发酵液培养基包括按照重量份数计的如下原料:可溶性淀粉600份、葡萄糖2450份、蛋白胨210份、磷酸二氢钾125份、氯化钙61份、水101000份,pH为9.2;

[0160] 步骤D,栽培种制备:将步骤C培养好的液体菌种接种至栽培袋中,置于24℃培养室恒温培养35d;

[0161] 所述的栽培袋中的栽培基质包括按照重量份数计的如下原料:杂木屑79份、麦麸

19份、豆饼粉2.1份、石膏粉1.1份、石灰粉0.8份;pH值8,含水量55-65%;

[0162] 步骤E,后熟开口:菌丝长满栽培袋后,将培养室温度调至18.5℃后熟培养7.5d,后熟完成后对菌棒刺孔,刺孔后放置干净整洁的场地养菌5天以恢复菌丝;

[0163] 步骤F,菌棒栽培及出耳管理:将刺孔养菌好的菌棒下地,分畦摆放,畦宽1.6米,每排摆放7个菌棒;下地三天后开始浇水,采用干湿交替管理,浇水温度为20-25℃。

[0164] 步骤B中,摇床的速度为190r·min⁻¹。

[0165] 步骤E中,每棒刺孔200个;养菌时避免太阳直射,且避免温度超过28℃高温,并保持通风。

[0166] 步骤F中,在干湿交替管理中,需要浇水时,每天浇水四次,每次30min;

[0167] 出耳后长到耳片不再增大时采摘;采摘时,采大留小,每次采摘后停止浇水3d。

[0168] 实施例8

[0169] 一种黑木耳菌株L7013,所述的黑木耳菌株L7013(*Auricularia heimuer*)已于2024年02月28日保藏于中国广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号GDMCC No:64380。

[0170] 上述黑木耳菌株L7013的栽培方法,包括如下步骤:

[0171] 步骤A,母种扩繁:无菌条件下,取黑木耳菌株L7013接种到母种PDA培养基上,置于24℃恒温培养8d,得到菌丝块;

[0172] 所述的母种PDA培养基包括按照重量份数计的如下原料:马铃薯200份、葡萄糖20份、琼脂粉20份、水1000份;

[0173] 步骤B,液体摇瓶培养:将步骤A培养好的菌丝块接种于灭菌后的摇瓶种培养基中,于28℃下摇床培养8d,即得到种子液;

[0174] 其中,摇瓶种培养基包括按照重量份数计的如下原料:马铃薯200份、乳糖20份、蛋白胨2份、氯化钙0.2份、水1000份,pH为9;

[0175] 步骤C,液体发酵罐发酵培养:将步骤B得到的种子液接种至发酵液培养基中,于24℃下培养10d,得到液体菌种;

[0176] 其中,发酵液培养基包括按照重量份数计的如下原料:可溶性淀粉600份、葡萄糖2400份、蛋白胨200份、磷酸二氢钾120份、氯化钙60份、水100000份,pH为9;

[0177] 步骤D,栽培种制备:将步骤C培养好的液体菌种接种至栽培袋中,置于24℃培养室恒温培养32d;

[0178] 所述的栽培袋中的栽培基质包括按照重量份数计的如下原料:杂木屑78份、麦麸18份、豆饼粉2份、石膏粉1份、石灰粉0.6份;pH值7,含水量55-65%;

[0179] 步骤E,后熟开口:菌丝长满栽培袋后,将培养室温度调至18℃后熟培养7d,后熟完成后对菌棒刺孔,刺孔后放置干净整洁的场地养菌4天以恢复菌丝;

[0180] 步骤F,菌棒栽培及出耳管理:将刺孔养菌好的菌棒下地,分畦摆放,畦宽1.5米,每排摆放7个菌棒;下地三天后开始浇水,采用干湿交替管理,浇水温度为17-23℃。

[0181] 步骤B中,摇床的速度为180r·min⁻¹。

[0182] 步骤E中,每棒刺孔180个;养菌时避免太阳直射,且避免温度超过28℃高温,并保持通风。

[0183] 步骤F中,在干湿交替管理中,需要浇水时,每天浇水四次,每次25min;

[0184] 出耳后长到耳片不再增大时采摘;采摘时,采大留小,每次采摘后停止浇水3d。

[0185] 应用实例

[0186] 1. 黑木耳菌株L7013的分离纯化及鉴定

[0187] 本发明发明人于2022年5月6日,选育组于云南省迪庆藏族自治州香格里拉市金江镇栎树树干倒木上采集野生黑木耳,并经组织分离纯化获得纯菌株——黑木耳菌株L7013。

[0188] 1.1 分离纯化(组织分离)

[0189] 在酒精灯附近切取野生黑木耳内部组织小块于PDA培养基上面,萌发,经过纯化,获得纯菌株,在同一培养条件下比较生长速度、粗壮程度、浓密度等菌丝长势,淘汰菌丝弱的菌株,筛选出菌丝长势最好,能够生长出子实体的有效菌株,得到黑木耳菌株L7013,定名为“云耳2号”。

[0190] 1.2 分子鉴定

[0191] 刮取适量纯培养菌丝,液氮(或研磨仪)研磨,采用植物基因组DNA提取试剂盒(上海生工生物技术有限公司)步骤进行总DNA提取。采用RNA聚合酶链反应(PCR)技术选择四个基因片段:ITS、LSU进行扩增,具体引物的碱基组成如表1,PCR扩增体系都选用30 μ L反应体系,其中包括15 μ L MIX扩增缓冲液,正、反向引物(浓度均为0.03mmol/ μ L)各0.5 μ L,DNA模板1-2 μ L(量的多少因DNA浓度而异),用ddH₂O定容至30 μ L。然后进行PCR扩增。

[0192] 表1 PCR扩增采用的引物及碱基组成

基因	引物编号	序列(5'-3')
ITS	ITS5	ggaagtaaaagtcgtaacaagg (SEQ ID NO.1)
	ITS4	tcctccgcttattgatatgc (SEQ ID NO.2)
nLSU	LR0R	acccgctgaacttaagc (SEQ ID NO.3)
	LR5	tcctgagggaaacttcg (SEQ ID NO.4)

[0194] ITS反应程序的热循环参数如下:95 $^{\circ}$ C预变性3min,进入连续34个循环(94 $^{\circ}$ C变性40s,54 $^{\circ}$ C退火45s,72 $^{\circ}$ C延伸1min)循环结束后,于72 $^{\circ}$ C延伸10min,放置于4 $^{\circ}$ C保存;

[0195] nLSU反应程序的热循环参数:94 $^{\circ}$ C预变性1min,进入连续34个循环(94 $^{\circ}$ C变性30s,50 $^{\circ}$ C退火1min,72 $^{\circ}$ C延伸1.5min)循环结束后,于72 $^{\circ}$ C延伸10min,放置于4 $^{\circ}$ C保存;

[0196] 使用电子天平精密称取2g琼脂糖溶于100mL TBE缓冲液(Tris-硼酸盐-EDTA)中,放入微波炉中使用中火加热2.0min使其达到澄清透明状态,当温度达到65 $^{\circ}$ C时加入2 μ L核酸染料充分摇匀,倒入硅胶板中,使其冷却备用,放入电泳池中用移液枪进行点样,点样量为5 μ L,电泳时电压为160V、电流90A、时间15min。于1.0 $\times$ TBE缓冲液中电泳后再在紫外线凝胶成像仪观察、拍照并记录结果,检测所提取的DNA浓度,阳性产物送上海生工测序。使用引物(ITS4/ITS5/LR0R/LR5)将成功的PCR产物送给生工生物工程有限公司测序。当序列有杂合子INDEL或不明确位点时,对样本进行双向测序,使扩增区域拼接或验证不明确位点。ITS、LSU片段在NCBI数据库中进行比对,并下载相似度较高序列进行比对,确定“云耳2号”为黑木耳(*Auricularia heimuer*)。

[0197] ITS为:ttctaaggcttcggtcttaatttcggctgtgcgctcaggctgcacgccgataacctctcaccctgtgcaccttttcggttgcggttttcggccgcttccgcttttacatgcaaccacgaaaagtctagaatgtgacgaactataaagtaacaactttcaacaacggatctcttggctctcgcacgatgaagaacgcagcgaaatgcgataa

gtaatgtgaattgcagaattcagtgatcatcgaatctttgaacgcaccttgcgctccttggtattccatggagca
tgccctgtttgagtgctcacgtaaaccctcaccctgcgatgtaacagtcgcctgcggtggacttggaccgtgccggt
aatcggtcgtcttgaaatgcattagctggtgcttttagagtgtggcggaacgggtgtgataattatctgcgccga
ctgccctgggcctcttcagcggcgctgcttacagccgtcccttgtggacaactattttaaagctttggcctc (SEQ
ID NO.5)

[0198] nLSU为:tttgaaatctggcggcctcaggccgtccgagttgtaatctagagaggtgtttccgtgccg
gaccgtgtacaagtcccttggaacagggcgctcatagagggtgagaatcccgtccatgacacggactaccggcgctc
tgtgatacaccttcaaagagtcgagttgtttgggaatgcagctcaaaacgggtggtaaattccatctaaagctaaa
tacaggcgagagaccgatagcgaacaagtaccgtgagggaagatgaaaagaactttggaaagagagttaaacagt
acgtgaaattgttgaaagggaaacgcttgaagtcagtcgcgtccgtagggactcagccttgcttttgcttggtgca
cttctctgcggacgggccagcatcatttttggtcgccggaaaagggcgagggaatgtggcagcttttagctgtgt
tatagcctttcgctcgtaacaggtggctgggatcgaggactgcagcacgccttttggtcgggttcgcccacgccacg
tgcttaggatgtctggcgtaatggctttaacgaccgctcttgaaacacggaccaaggagtctaacatgcctgcgag
tggttggtgcaaaaccaggcgctaatgaaagtgaaggttgggactctttagtgaggcaccgacgcccgaacc
tgaagtcttctgacggttttgaggcagagcatgtatgttgggacccgaaagatggtgaactatgcctgaatagggt
gaagccagaggaaactctggtggaggctcgtagcattctgacgtgcaaatcgatcgtcaaatttggttatagggg
cgaaagactaatcgaaccatctagtagctggttccctgccgaagtttccctcaggatagcagaaactcacatcagtt
ttatgtggttaaagcgaatgattagaggccttggggttgaaacaaccttaacctattctcaaactttaaatatgtaa
gatcgaccgtcacttgattggaccgtctggcgaatgagagtttctagtgggccatttttggttaagcagaactggc
gatgcgggatgaaccgatcgcggttaaggtgccggaatacacgctcatcagacaccacaaaaggtgttagttca
tctagacagcaggacggtggccatggaagtcggaatccgctaaggagtggtgaacaactcacctgccgaatgaact
agccctgaaaatggatggcgctcaagcgtgttaccataccccgccgtcagcgttgaaagtacgcgctgacgagta
ggcagg (SEQ ID NO.6)

[0199] 1.3多基因序列比对

[0200] 将黑木耳菌株L7013菌丝体2个基因序列进行正反向拼接处理,并在NCBI数据库中进行比对,结果表明,黑木耳菌株L7013ITS序列与木耳*Auricularia heimuer* (GXMRI YE1)序列相似率达100%;nLSU序列与木耳*Auricularia heimuer* (Dai14760)序列相似度达100%。对照CK黑保1号与木耳*Auricularia heimuer* (Cui 7101)序列相似率为100%,黑木耳菌株L7013与对照CK黑保1号 ITS序列存在1个碱基差异,nLSU序列存在5个碱基差异。序列比对结果发现,黑木耳菌株L7013和对照CK黑保1号均与黑木耳*Auricularia heimuer*有较高相似率,根据大型真菌基因相似率大于97%,一般认为是同一物种,因此初步确定黑木耳菌株L7013和对照CK黑保1号均为黑木耳*Auricularia heimuer*,但分子序列和进化枝存在一定差异,因此他们是同一物种的不同菌株。

[0201] 1.4碱基差异

[0202] (1) ITS碱基差异

[0203] 将黑木耳菌株L7013与对照CK黑保1号ITS序列放置BioEdit软件种进行比较,结果表明,黑木耳菌株L7013与对照CK黑保1号ITS序列存在一个碱基差异,如图1所示。

[0204] (2) nLSU碱基差异

[0205] 将黑木耳菌株L7013与对照CK黑保1号nLSU序列放置BioEdit软件种进行比较,结

果表明,黑木耳菌株L7013与对照CK黑保1号nLSU序列存在5个碱基差异,如图2所示。

[0206] 1.5系统发育分析

[0207] 从GenBank下载相关参考序列,从中挑选了木耳属25个物种基因序列,并以*Elmerina dimidiata*和*Exidia candida*作为外类群,基于ITS+nLSU序列进行多基因系统发育分析。最大似然(ML)系统发育分析,RAxML的组合数据集分析生成了一个最佳评分树,最大似然(ML)大于70%的引导值在节点显示。

[0208] 如图3所示,系统发育分析表明,黑木耳菌株L7013和对照CK黑保1号在木耳属系统发育树中与已报道的黑木耳*A. heimuer*形成一个单独分支,并获得100%支持率。结合形态确定“云耳2号”为黑木耳*A. heimuer*,和对照菌株为同一物种,但在遗传距离上有一定差异。

[0209] 1.6拮抗试验

[0210] 通过分离得到的黑木耳菌株L7013和对照CK黑保1号(北方大规模栽培品种)进行拮抗试验,结果显示黑木耳菌株L7013和对照黑保1号有较强的拮抗反应,不具有亲和性,形成“凹线型”拮抗线,如图4所示。

[0211] 1.7 SSR分子标记

[0212] (1) DNA提取

[0213] 将供试的菌种转接到PDA(马铃薯200g,葡萄糖20g,琼脂粉18g,水1000mL)培养基上,25℃培养15d后收集菌丝;金莎生物DE711-50试剂盒提取菌丝的基因组DNA,用琼脂糖凝胶电泳法和生物分光光度计法检测DNA的纯度和浓度。

[0214] (2) 基因组测序

[0215] 样品经过DNA抽提、纯化、建库之后,采用测序技术,基于测序平台进行测序。黑木耳菌株L7013基因组的序列中搜寻SSR位点。

[0216] (3) 基于基因组测序结果开发SSR引物

[0217] 基于木耳基因组数据进行开发和筛选,使用6对SSR引物YE2H-01、YE2H-02、YE2H-03、YE2H-04、YE2H-05、YE2H-06能将黑木耳菌株L7013与对照CK黑保1号两者明显区分开,引物详细信息如表2。

[0218] 表2 SSR标记引物信息

[0219]

引物名称	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')	退火温度(°C)
YE2H-01	tgtatatggctgcagctcgg (SEQ ID NO.7)	tggtatctcacagcctggga (SEQ ID NO.8)	60
YE2H-02	gctcggcagcaaaaacttct (SEQ ID NO.9)	cgagtacgacgtcgaggac (SEQ ID NO.10)	60
YE2H-03	ctttctcccaccggtcttcc (SEQ ID NO.11)	tcaggttctgaagcgtcgt (SEQ ID NO.12)	60
YE2H-04	acagtggtaggattcagcgc (SEQ ID NO.13)	ccagacgaggcgaatatgct (SEQ ID NO.14)	60
YE2H-05	gaagggggatcggtcgtgag (SEQ ID NO.15)	gccaaaccccttccgcaa (SEQ ID NO.16)	60
YE2H-06	ctcaagccgtcgcacgac (SEQ ID NO.17)	gtcatggtgccagagcgt (SEQ ID NO.18)	60

[0220] (4) PCR扩增

[0221] 采用SSR分子标记对提取的DNA进行SSR标记的PCR扩增:

[0222] PCR扩增体系为:总体积25 μ L,包括:生工2 $\times$ San Taq PCR Mix(with B μ Le Dye) 17 μ L;SSR标记正向引物和反向引物(浓度均为0.025mmol/ μ L)各1 μ L,模板DNA 2 μ L。PCR反应条件:95 $^{\circ}$ C 3min;94 $^{\circ}$ C 40s,60 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 30s,34个循环;72 $^{\circ}$ C 10min。为保证鉴定的准确性,进行三次重复实验。将对照CK黑保1号使用上述条件,重复三次。

[0223] (5)电泳:

[0224] 使用聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,电泳后银染显色,呈现条带:

[0225] 将下述试剂混合:1 $\times$ TBE溶液 48mL;Acr-Bis (19:1) 12mL;10% APS溶液1mL;10% TEMED 100 μ L;

[0226] 混合配置后立即倒胶,排出气泡。待胶凝固后,进行电泳;加样量为2 μ L每孔,电泳条件为270V恒压1h。电泳完成后,蒸馏水洗胶2次;加入10%硝酸银溶液400mL,摇床震荡8min;银染完成后,水洗两次;加入氢氧化钠、甲醛显色(NaOH 6g,蒸馏水400mL,甲醛溶液2mL)。

[0227] 表3 引物在黑木耳菌株L7013及对照CK黑保1号的扩增片段大小比较

[0228]

引物名称	黑木耳菌株 L7013 中扩增片段的大小 (bp)	对照 CK 黑宝 1 号中扩增片段的大小 (bp)
YE2H-01	145	159
YE2H-02	165	175
YE2H-03	168	165
YE2H-04	149	163
YE2H-05	144	150
YE2H-06	149	159

[0229] 由图5和表3的结果可见,使SSR引物YE2H-01、YE2H-01、YE2H-01、YE2H-01、YE2H-01、YE2H-01可将黑木耳菌株L7013与对照CK黑保1号区分开,黑木耳菌株L7013扩增特异性片段大小分别为145、156、168、149、144、149bp,对照CK黑保1号片段大小分别159、175、165、163、150、159bp。说明二者具遗传差异。

[0230] 2、子实体形态特征

[0231] 2.1形态学观察结果

[0232] 形态学观察如图6所示,子实体一年生,新鲜时胶质,淡褐色或红棕色,单生或丛生,无柄或似具柄;耳状或花瓣状,边缘全缘,耳片最宽直径可达12cm,0.8mm-1.5mm厚,0.04mm-0.24mm厚,干燥时灰褐色到葡萄褐色;上表面具有柔毛,有时具褶皱;下表面光滑,有时有浅褶皱;干后深褐色或黑色。内部特征:横切面中央可见髓质;无晶体;柔毛基部略肿大,透明,厚壁,具有狭窄管腔,顶部渐尖或钝圆,单根或丛生,50-150×4-6.5μm;菌丝具锁状联合,在KOH中直径0.5μm-3μm;担子棒状,具有3横隔,小管状,40-67×3-6.5μm;囊状体缺失。担孢子在Melzer试剂中不变色(IKI-),在棉蓝试剂中不出现嗜蓝反应(CB-),担孢子:11~13(-13.1)×4~5(-5.1)μm,孢子平均长(L)为12μm,平均宽(W)为4.71μm,平均长和平均宽的比值(Q)为2.43-2.74(n=120/4)。

[0233] 生境:子实体通常发生在夏秋季,寄主为栎属植物,主要生长在湿润的倒木、腐木上,广泛分布于亚洲地区。

[0234] 在形态上黑木耳*A. heimuer*与*A. villosula* Malysheva相似,后者担孢子较大(13-15.5×5-6.1μm),野生子实体担子瘤不常见。以前,亚洲的黑木耳*A. heimuer*被认为与欧洲的*A. auricula-judae*是同一个种,因为种植后形态很相似;后来经戴玉成团队研究发现,两个种在系统发育树上是两个不同的分支,每个分支都有很高的支持率,因此把黑木耳*A. heimuer*确立为一个独立物种。

[0235] 3、黑木耳菌株L7013多年多点试验总结

[0236] 3.1供试菌株

[0237] 供试菌株1个,由云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所提供。以北方黑保1号菌株为对照CK。

[0238] 3.2培养基配方

[0239] (1)母种培养基配方为PDA培养基。配方为:马铃薯200g,葡萄糖20g,琼脂20g,水1000mL。

[0240] 母种培养基配制方法:

[0241] A.煮制:马铃薯去皮,洗净、切片,称取200g,加水1000mL,加热煮沸至马铃薯片酥而不烂,用六层纱布过滤;

[0242] B.配比:滤液加入葡萄糖20g、琼脂20g,加水1000mL,搅拌溶解;

[0243] C.分装灭菌:溶解后趁热分装入试管内,一般装量为试管长度的1/5-1/4。分装完毕后,塞上棉塞,5支一把,用牛皮纸将试管口一端包好扎紧。试管包好后放入高压灭菌锅,121℃灭菌30min;

[0244] D.斜面摆放:灭好菌后,趁热将试管取出,放在工作台上摆成斜面,通常斜面长是试管1/2,待凝固后放置于清洁干燥处备用。

[0245] (2)原种培养基质

[0246] 原种培养基质包括按照重量份数计的如下原料:杂木屑72-74份、麸皮23-25份、白糖0.9-1.1份、石膏粉0.9-1.1份、石灰粉0.8-1.2份;

[0247] 原种培养基配制方法:

[0248] ①配料及预处理:按照配方称取配料,其中杂木屑、麸皮需提前用水预湿再与其它辅料拌匀;

[0249] ②拌料装瓶(装袋):将处理好的主料与其它配料拌匀,原种使用透气盖组培瓶,栽培种使用菌袋,装好瓶(袋)压实,中央可打孔方便接种;

[0250] ③灭菌:灭菌之前需要彻底排除冷空气,以保证灭菌包中的杂菌彻底杀除。原种瓶放入高压灭菌器中121℃、0.103MPa灭菌2h;

[0251] (3)栽培袋基质

[0252] 栽培袋中的栽培基质包括按照重量份数计的如下原料:杂木屑77-79份、麦麸16-18份、豆饼粉1.9-2.1份、石膏粉0.9-1.1份、石灰粉0.8-1.2份;

[0253] 制作方法:

[0254] ①配料及预处理:按照配方称取配料,其中杂木屑、需提前2h用水预湿,所需的石膏粉、石灰粉溶于水中,依次将麸皮和豆饼粉加入在木屑上,边加水边搅拌,搅拌至均匀。

[0255] ②装袋:选用17cm×35cm×0.05cm的聚乙烯袋装袋,装料时保证装袋的高度要基本一致,松紧要适宜,边加边将培养料压实,装料要紧,装袋后袋高度为20-21cm,套上套环和盖子。每袋培养料干重0.5kg,湿重1.0-1.2kg。

[0256] ③灭菌:使用常压蒸汽灭菌,升温过程中提前排出冷空气,当温度达到121℃后,开始计时,保持该温度2h,之后停止加温,自然降温,当灭菌器内部温度降到80℃以下时,可将菌袋转移到冷却室自然冷却。

[0257] ④原种接种和培养灭好菌原种瓶放入接种室,接种前用紫外消毒灯灭菌半小时。操作时,应严格按无菌操作规程。将母种切割成小块,接种培养料中央洞内,子实体小块接在表面。接种完毕,将原种瓶全部移入培养室内,控制温度在22℃-25℃。当培养瓶中的菌丝长满1/3袋时,将培养室的温度降至20℃-23℃,每周至少1次检查原种瓶是否受到杂菌污染,若有应及时将污染的培养瓶移出培养室,记录木耳品种菌丝生长情况。

[0258] 3.3试验方法

[0259] 3.3.1示范试验设计

[0260] 黑木耳菌株L7013为袋料地摆式栽培,按GB/T 21125-2007食用菌品种选育技术规范要求,示范栽培试验设计每组栽培袋数为4000袋。每袋干料550g,采用液体接种,每袋接

种量18mL,则每组接种量为72L,每组袋栽干料2200kg。以市场种植菌株黑保1号为对照。每个点采用同一批菌种和栽培袋,保证相同的菌种量和一致的示范栽培管理技术。

[0261] 3.3.2示范地点选择

[0262] 云南省昆明市嵩明县(海拔1800m),云南省文山州富宁县里达镇(海拔1200m),云南省文山州富宁县木央镇(海拔1500m)。

[0263] 3.3.3栽培方法

[0264] (1)栽培工艺流程

[0265] 备料→拌料→装袋→灭菌→冷却接种→发菌及培养→搭荫棚、筑畦→移放场地及后熟→刺孔养菌→摆袋→出耳管理→采收子实体→数据记录

[0266] (2)栽培管理技术

[0267] 季节选择:根据自然条件和黑木耳生长特性情况,南方冬耳为7月中旬至10月上旬开始生产制种(袋),每年10月中旬至次年1月中旬为黑木耳的栽培季节;春耳为11月中旬至2月上旬开始生产制种(袋)2月上旬至4月中旬为出耳季节,可用自然(环境)温度即可栽培黑木耳。

[0268] 场地选择:栽培场所多为日光温室大棚、选择向阳、背风、干燥、卫生、离水源较近的场地。黑木耳栽培种植场地应选择交通方便,没有污染,坡度平缓,容易湿度较大的。

[0269] 出耳管理:

[0270] (1)催芽:温度不高于24℃,空气相对湿度60%-90%;通风7d-10d可形成黑色原基。避免高温高湿。

[0271] (2)湿度管理:耳芽形成至开片时,不定时向摆棒空间雾化喷水,使空间相对湿度保持在70%-90%,子实体开片基本开足,防止袋内湿度高于外界环境湿度造成憋芽,耳片生长阶段,空气相对湿度可保持60%以上,对菌棒间接性浇水,使耳片干干湿湿生长。

[0272] (3)温度管理:原基分化和子实体发育的最适温度为18℃-24℃,菌丝生长阶段,温度控制在23℃,可促使菌蕾形成,子实体生长趋于成熟时,适宜温度为15℃-24℃。

[0273] 采收:为了确保黑木耳的质量,应掌握适当的采收标准,确定适宜的采收时间和方法。采收过早,耳片小,重量轻,不能达到销售标准。采收过晚,黑木耳品质变差,色泽变浅。一般耳片长至3cm~5cm,边缘内卷,有弹性,耳色由黑色变为深褐色,耳片舒展变软,肉质肥厚,耳根收缩变细,即可采收。采收前1d~2d停止喷水。采收时要避免碰掉小耳芽,以防影响产量和延长采收期。

[0274] 3.3.4观测、测定项目

[0275] 不同地点各个示范点分别进行调查和数据统计。主要观察供试菌株的主要性状情况,统计产量。采收后分别统计产量。同时委托有资质的检测公司对主要营养成分含量、重金属、农残等进行测定。

[0276] 3.4结果与分析

[0277] 黑木耳菌株L7013菌株制作菌种,菌丝粗壮,发菌快,污染少,抗杂能力强;子实体深褐色、耳片胶质有弹性,且性状稳定;耳形耳状,蛋白质和粗多糖含量高,营养物质丰富,较对照有更高的产量和活性成分,具有较高的应用价值,市场前景较好。

[0278] 表4 黑木耳菌株L7013示范点养菌周期及出芽率

[0279]

年 份	试 点	养 菌 周 期	出 芽 率
2022 年 10 月	昆明市嵩明县	30	98
2023 年 10 月	昆明市嵩明县	30	99
2022 年 10 月	富宁县里达镇	30	100
2023 年 10 月	富宁县里达镇	30	100
2022 年 10 月	富宁县木央镇	30	100
2023 年 10 月	富宁县木央镇	30	100
均值		30	99.5

[0280] 表5 黑木耳菌株L7013示范栽培主要农艺性状及产量表现

[0281]

年 份	试 点	耳片厚度 (cm)	耳片直径(cm)	鲜重(g/袋)	干重(g/袋)	生物学效率 (%)
2022 年 10 月	昆明市嵩明县	0.19±0.03	7.3±0.3	631.5±20.2	57.9±1.21	114.8
2023 年 10 月	昆明市嵩明县	0.18±0.02	6.5±0.2	633.1±21.6	58.2±2.2	115.1
2022 年 10 月	富宁县里达镇	0.20±0.04	6.8±0.2	840.0±34.20	72.2±2.39	152.7
2023 年 10 月	富宁县里达镇	0.19±0.02	7.1±0.2	823.4±24.20	68.7±2.39	149.6
2022 年 10 月	富宁县木央镇	0.18±0.02	6.6±0.1	796.0±50.33	76.5±3.50	144.7
2023 年 10 月	富宁县木央镇	0.19±0.03	6.9±0.2	834.1±50.43	70.4±2.50	151.6
平均值		0.188±0.03	6.88±0.4	759.7±34.95	67.32±2.03	138.1

[0282] 注：“M±SD”代表平均值±标准差。每组随机抽取20袋、产量测定单袋子实体平均重量，子实体性状随机抽取50朵子实体计算平均值。

[0283] 表6 对照CK黑保1号示范点养菌周期及出芽率

[0284]

年份	试点	养菌周期 (天)	出芽率(%)
2022年10月	昆明市嵩明县	30	100
2023年10月	昆明市嵩明县	30	100
2022年10月	富宁县里达镇	30	100
2023年10月	富宁县里达镇	30	100
2022年10月	富宁县木央镇	30	100
2023年10月	富宁县木央镇	30	100
均值		30	100

[0285] 表7 对照CK黑保1号示范栽培主要农艺性状及产量表现

[0286]

年份	试点	耳片厚度 (cm)	耳片直径 (cm)	鲜重(g/袋)	干重(g/袋)	生物学效率 (%)
2022年10月	昆明市嵩明县	0.16±0.03	6.7±0.3	654±23.22	54.5±1.11	118.91
2023年10月	昆明市嵩明县	0.15±0.02	7.52±0.2	671±22.17	63.7±2.14	122.00
2022年10月	富宁县里达镇	0.18±0.02	7.41±0.2	635±30.22	56.6±3.37	115.45
2023年10月	富宁县里达镇	0.16±0.03	7.83±0.1	686±22.26	66.7±2.41	124.71
2022年10月	富宁县木央镇	0.17±0.02	7.54±0.1	622±40.31	54.5±3.28	113.10
2023年10月	富宁县木央镇	0.17±0.03	6.68±0.2	656±36.42	60.4±2.70	119.27
平均值		0.165±0.02	7.28±0.4	654±24.75	59.4±2.37	118.91

[0287] 注：“M±SD”代表平均值±标准差。每组随机抽取20袋、产量测定单袋子实体平均重量，子实体性状随机抽取50朵子实体计算平均值。

[0288] 示范栽培效果图如图7所示。2022年至2023年两年三地的示范结果表明：黑木耳菌株L7013出菇状况良好，出菇整齐度好，栽培性状稳定，子实体深褐色，耳片形状为耳状、簇生，耳片生长较密，有耳脉，背面有褐色纤毛，耳片透光度弱、耳片无柄。较对照CK黑保1号，具有子实体更厚实，生物学转化率及产量更高等特点，生产及栽培周期短，平均养菌周期30天。黑木耳菌株L7013耳片平均直径6.88cm、耳片平均厚度0.188cm；平均单菇鲜重759.7g/袋，单袋子实体平均干重67.32g，生物学转化率为138.1%。对照CK黑保1号袋栽子实体耳片平均直径7.28cm、耳片平均厚度0.165cm；平均单菇鲜重654g/袋，单袋子实体平均干重59.4g，生物学转化率为118.91%。因此，相较对照CK黑保1号、黑木耳菌株L7013子实体整体出菇效果更好，耳片更密，周期较短，产量和生物学转化率更高，可作为黑木耳新品种，适宜西南高原地区栽培，可实现黑木耳高品质地摆及设施化栽培，具有较高的应用价值，市场前

景较好。

[0289] 特异性:黑木耳菌株L7013出菇状况良好,出芽率高,出菇整齐度高,栽培性状稳定,子实体深褐色,耳片形状为耳状、簇生,耳片生长较密,胶质,有耳脉,背面有褐色纤毛,耳片透光度弱、耳片无柄。平均养菌周期30d。黑木耳菌株L7013耳片平均直径6.88cm、耳片平均厚度0.188cm;平均单菇鲜重759.7g/袋,单袋子实体平均干重67.32g,生物学转化率为138.1%。对照CK黑保1号子实体深褐色,耳片形状为耳状,耳片生长较密,有耳脉,背面有灰白色纤毛,耳片透光度弱、耳片无柄。袋栽子实体耳片平均直径7.28cm、耳片平均厚度0.165cm;平均单菇鲜重654g/袋,单袋子实体平均干重59.4g,生物学转化率为118.91%。

[0290] 一致性:通过两年三地栽培示范的观察,黑木耳菌株L7013具备一致性。

[0291] 稳定性:黑木耳菌株L7013具备一致性,原则上具备稳定性。

[0292] 4、区别性鉴定

[0293] 4.1、固体培养特性

[0294] PDA培养基配置混匀后,于121℃、0.103MPa条件下灭菌30min,倒入90mm培养皿中制成平板。将保藏的L7013菌株活化后转接至培养皿中,待菌丝长满培养皿后备用。

[0295] 基础培养基:包括按照重量份数计的如下原料:马铃薯200份、葡萄糖0份、蛋白胨2份、磷酸二氢钾0.2份、水1000份;用于碳源、氮源、无机盐、pH和温度的筛选优化,配料完成后,放入高压蒸汽锅在120℃-125℃条件下高温灭菌30分钟后,拿出冷却备用。

[0296] 4.1.1碳源单因子筛选试验

[0297] 以基础培养基为对照,分别设置如下碳源:麦芽糖、乳糖、蔗糖、可溶性淀粉、果糖替换葡萄糖作为处理组,以不加入碳源为对照CK。

[0298] 采用直径为6mm的打孔器进行打孔,将菌块接种至固体培养基中央,并置于24℃恒温培养箱中避光培养,每组试验设置6个重复。采用十字划线法每隔24h测量1次菌落直径;观察并记录菌丝形态及长势,数据结果采用SPSS 26.0软件的Duncan法比较差异显著性($P < 0.05$),使用Excel 2019制作菌丝生长速度柱形图。菌丝生长速率(V)公式为:

[0299] $V = (L - 6) / D$ (1)

[0300] 式中:L表示菌落直径;D表示培养天数;6表示接种菌块直径为6mm。

[0301] 4.1.2氮源单因子筛选试验

[0302] 以基础培养基为对照,分别设置如下氮源:酵母粉、尿素、磷酸氢二氨、豆饼粉、硝酸钾替换蛋白胨作为处理组,以不加入氮源为对照CK。

[0303] 接种、培养、设置重复及数据处理等方法同4.1.1。

[0304] 4.1.3无机盐单因子筛选试验

[0305] 以基础培养基为对照,分别设置如下无机盐:磷酸氢二钾、硫酸亚铁、硫酸镁、氯化钙、碳酸钙替换磷酸二氢钾作为处理组,以不加入无机盐为对照CK。

[0306] 接种、培养、设置重复及数据处理等方法同4.1.1。

[0307] 4.1.4温度单因子筛选试验

[0308] 将菌块接种至基础培养基中,分别置于20℃、22℃、24℃、26℃、28℃、30℃、32℃恒温培养箱内避光培养。

[0309] 接种、培养、设置重复及数据处理等方法同4.1.1。

[0310] 4.1.5 pH单因子筛选试验

[0311] 使用HCl ($1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和NaOH ($1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 将基础培养基的pH分别调为5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0作为供试培养基;

[0312] 接种、培养、设置重复及数据处理等方法同4.1.1。

[0313] 4.2、结果分析

[0314] 4.2.1碳源对菌丝生长速度的影响

[0315] 不同碳源对菌丝生长速度及形态的影响结果见图8和图9。

[0316] 由图8和图9可知,乳糖作为碳源时菌丝最为洁白和浓密,生长速度最快为 $(3.01 \pm 0.434) \text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$ 。果糖作为碳源时菌丝生长速度最慢,为 $(2.20 \pm 0.164) \text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$ 。菌丝生长较其他碳源条件不洁白、不浓密。

[0317] 4.2.2氮源对菌丝生长速度的影响

[0318] 不同氮源对菌丝生长速度及形态的影响结果见图10和图11。

[0319] 由图10和图11可知,蛋白胨作为氮源时菌丝最为洁白和浓密,生长速度最快为 $(2.208 \pm 0.102) \text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$ 。尿素作为氮源时菌丝生长速度最慢,为 $(0.222 \pm 0.142) \text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$ 与磷酸氢二氨作为氮源没有显著性差异。

[0320] 4.2.3无机盐对菌丝生长速度的影响

[0321] 不同无机盐对菌丝生长速度及形态的影响结果见图12和图13。

[0322] 由图12和图13可知,氯化钙作为无机盐时菌丝生长较快,但浓密程度高于其余条件,生长速度为 $(3.069 \pm 0.335) \text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$,与其余无机盐存在显著性差异。硫酸亚铁为无机盐时菌丝生长速度最慢,为 $(0.000 \pm 0.000) \text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$,与其他无机盐存在显著性差异,硫酸镁作为无机盐时,菌丝最为浓密,但生长速度较慢。

[0323] 4.2.4温度对菌丝生长速度的影响

[0324] 不同温度对菌丝生长速度及形态的影响结果见图14和图15。

[0325] 由图14和图15可知,温度为28℃时菌丝最为洁白且浓密,生长速度较快为 $(2.29 \pm 0.057) \text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$,与温度为30℃时生长速度最快,菌丝出现高温抑制圈。温度为20℃时菌丝生长速度最慢,为 $(1.52 \pm 0.057) \text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

[0326] 4.2.5 pH对菌丝生长速度的影响

[0327] 不同pH条件对菌丝生长速度及形态的影响结果见图16和图17。

[0328] 由图16和图17可知,pH为9.0时菌丝生长速度最快,为 $(4.958 \pm 0.482) \text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$,与其他pH的生长速度存在显著性差异。pH为8.0时菌丝生长速度最慢,为 $(1.861 \pm 0.165) \text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$,与pH为7.0时生长速度不存在显著性差异。

[0329] 5、品种抗性鉴定

[0330] 菌丝高温、低温生长速度测定:将生长在PDA(马铃薯200g,葡萄糖20g,琼脂粉20g,水1000mL)平皿上的黑木耳菌株L7013与对照CK黑保1号用0.5cm的打孔器打孔,置于新的PDA(马铃薯200g,葡萄糖20g,琼脂粉20g,水1000mL)平皿上进行温度梯度生长实验。

[0331] 设置11个培养温度,分别为5℃、10℃、15℃、20℃、22℃、24℃、26℃、28℃、30℃、32℃、35℃,每个温度3个重复,培养一定时间测量生长速度。木霉抗性检测方法:首先将生长在PDA平皿上的黑木耳菌株L7013、对照CK黑保1号、青霉、木霉用直径为0.5cm的打孔器打孔。后置于新的PDA(马铃薯200g,葡萄糖20g,琼脂粉20g,水1000mL)平皿上,新的PDA(马铃薯200g,葡萄糖20g,琼脂粉20g,水1000mL)平皿一侧为木耳菌株,另一接种侧木霉。每个抗

性实验3个重复,培养定时间观察生长情况。

[0332] 表8 黑木耳菌株L7013、对照CK黑保1号菌丝生长速度(单位:mm/d)

温度 编号	5℃	10℃	15℃	20℃	22℃	24℃
	5℃	10℃	15℃	20℃	22℃	24℃
黑木耳菌株 L7013	不萌发	不萌发	2.64	3.32	3.93	4.31
对照 CK 黑宝 1 号	不萌发	不萌发	0.64	1.64	3.52	4.53

[0334] 耐低温试验结果:从表8中可以看出,在5℃、10℃、15℃、20℃、22℃和24℃的温度条件下培养7d,L7013的菌丝生长速度整体较比对照CK黑保1号稍慢,菌丝整体粗壮浓密;5℃、10℃的低温条件下培养7天,可以看出在5℃时,对照CK黑保1号与黑木耳菌株L7013菌丝均不萌发。结果表明L7013和CK在低温条件下生长规律具有一致性,生长速度生长差异较大,L7013在低温下不容易萌发。

[0335] 表9 黑木耳菌株L7013、对照CK黑保1号菌丝生长速度(单位:mm/d)

温度 编号	26℃	28℃	30℃	32℃	35℃
	26℃	28℃	30℃	32℃	35℃
黑木耳菌株 L7013	4.96	5.42	6.45	6.14	4.21
对照 CK 黑宝 1 号	5.21	6.32	10.07	9.53	9.14

[0337] 抗高温试验结果:从表9中可以看出,在26℃、28℃、30℃、32℃和35℃的温度条件下培养7d,L7013的菌丝生长速度整体较对照CK黑保1号略慢,随着温度升高菌丝有明显高温抑制圈和稀疏情况;随着温度升高,两者生长速度明显变缓,且生长变化趋势具有一致性,30℃条件下,L7013菌丝接种点周围开始变得稀疏,有高温抑制圈出现,生长缓慢。当温度达到35℃温度条件时,L7013菌丝有明显衰退情况。

[0338] 结合抗低温试验结果,可以发现L7013菌株菌丝培养最适温度为28℃,对照CK黑保1号菌株菌丝培养最适温度为30℃,耐高温实验结果具有一致性,因此L7013是中低温型真菌,适合高原山区推广种植。

[0339] 表10黑木耳菌株L7013、对照CK黑保1号对木霉抑菌率

温度 编号	R1	Rck	Rck-R1	抑菌率(%)
	R1	Rck	Rck-R1	抑菌率(%)
黑木耳菌株 L7013	4.2	4.8	0.6	14.28
对照 CK 黑宝 1 号	2.2	2.7	0.5	18.52

[0341] 结果显示:从表10中可以看出,在黑木耳对木霉抑菌试验中,黑木耳菌株L7013抑菌率比对照CK黑保1号高,说明黑木耳菌株L7013抗杂能力更强。在制种生产种污染率低,吃料速度快不易感染杂菌,抗杂能力强;且在选育多批次栽培试验中杂菌感染和病虫害发生少。因此,通过记录得到黑木耳菌株L7013对抗病害能力较强。

[0342] 黑木耳菌株L7013菌丝长势强,萌发速度快,生长速率快,对木霉的抑菌率高于对

照CK黑保1号,抗逆性强。菌丝在15℃-30℃之间可以正常生长。在15℃-26℃的温度条件下培养7d,黑木耳菌株L7013的菌丝生长速度比对照CK黑保1号快,菌丝较为浓密;出菇温度15℃-24℃;最适出菇温度20℃-24℃。

[0343] 6、现有木耳栽培农艺性状对比

[0344] 目前我国主要的木耳品种选育品种主要来自我国吉林、黑龙江等地区,本实验以常见的栽培木耳菌株对照CK黑保1号(主要来源于吉林农业大学)为对照。和已有的品种相比菌丝形态、子实体形态、生物转化率、功能成分含量等都与目前已有的木耳品种有明显差异,具体比较详见表11。

[0345] 表11 L7013木耳与审定品种栽培农艺性状对比

[0346]

参数	L7013	对照 CK 黑宝 1 号
菌落形态	菌落绒毛状略蓬松, 颜色白, 菌丝直径 1.5 μ m-4.0 μ m 有锁状联合, 多分枝。菌丝生长温度 15℃-30℃, 适宜温度 22℃-26℃。菌丝生长 pH 值 6-8	菌落绒毛状略蓬松, 颜色白, 菌丝直径 10 μ m-39 μ m, 有锁状联合。菌丝生长温度 15℃-30℃, 适宜温度 26℃-30℃。菌丝生长 pH 值 7-9
菌丝生长速率	栽培袋菌丝生长速率 1.5mm/d-2mm/d; 发菌期 30d 左右; 出菇期 70d-85d	菌丝长速 2mm/d-3mm/d, 发菌期 30d 左右, 出菇期 86d-90d
子实体形态	子实体发育温度 12℃-24℃, 最适温度 20℃-22℃。耳片深褐色至黑色, 胶质。有柄侧或无柄, 呈耳状, 上表面有柔毛为褐色, 干是灰白色; 有筋状皱褶。	子实体发育温度 15℃-24℃, 适温 18℃-22℃。耳片胶质, 薄, 呈耳状, 表面颜色为棕褐色, 表面有筋脉状网格, 耳片边缘整齐, 子实体不透光。
生物学转化率	138.1%	118.91%
功效成分	总氨基酸含量为 16.90%, 蛋白质含量为 20.50%; 脂肪含量为 0.40%; 多糖含量为 45.60%	总氨基酸含量为 9.46%, 蛋白质含量为 11.70%; 脂肪含量为 0.3%; 多糖含量为 10.1%
栽培技术要点	适宜西南高原地区海拔 1200m-1800m 推广种植, 出耳温度为 13℃-24℃; 空气相对湿度 80%-90%; 子实体生长阶段;	海拔 1200m-1500m; 发菌温度为 22℃-26℃, 出耳温度为 12℃-24℃; 空气相对湿度 80%-90%; 子实体生长阶段。

[0347] 7、黑木耳菌株L7013品质分析

[0348] 黑木耳菌株L7013和对照CK黑保1号营养成分及功能成分统计分析,结果见表12。

[0349] 表12 黑木耳菌株L7013和对照CK黑保1号成分统计表

[0350]

成分	黑木耳菌株 L7013 含量	对照 CK 黑宝 1 号含量	单位
天冬氨酸 (Asp)	1.82	1.04	g/100g
苏氨酸 (Thr)	1.13	0.63	g/100g
丝氨酸 (Ser)	1.00	0.61	g/100g
谷氨酸 (Glu)	2.22	1.23	g/100g
脯氨酸 (Pro)	0.66	0.42	g/100g
甘氨酸 (Gly)	0.83	0.49	g/100g
丙氨酸 (Ala)	1.41	0.80	g/100g
缬氨酸* (Val)	1.03	0.57	g/100g
蛋氨酸* (Met)	0.57	0.25	g/100g
异亮氨酸* (Ile)	0.63	0.38	g/100g
亮氨酸* (Leu)	1.34	0.78	g/100g
酪氨酸 (Tyr)	0.63	0.32	g/100g
苯丙氨酸 (Phe)	0.86	0.47	g/100g
组氨酸* (His)	0.57	0.29	g/100g
赖氨酸* (Lys)	1.02	0.56	g/100g
精氨酸 (Arg)	1.20	0.62	g/100g
16 种氨基酸总量	16.90	9.46	g/100g
蛋白质	20.50	11.70	g/100g
脂肪	0.40	0.30	g/100g
粗多糖	45.6	10.10	g/100g
总黄酮	<0.05	<0.05	g/100g
铁	1.96×10^2	2.58×10^2	mg/kg
灰分	5.8	5.3	g/100g

[0351] 注:*必须氨基酸

[0352] 2023年栽培生长成熟期的黑木耳菌株L7013和对照CK黑保1号子实体在棚内晾晒干后,送至广东省微生物分析检测中心测定。黑木耳菌株L701316种氨基酸每一种的含量都

高于对照含量,16种氨基酸总量为16.90g/100g,对照CK黑保1号16种氨基酸总量为9.46g/100g;黑木耳菌株L7013蛋白质为20.50g/100g,对照CK黑保1号蛋白质为11.70g/100g;黑木耳菌株L7013脂肪为0.40g/100g,对照CK黑保1号脂肪也为0.30g/100g;黑木耳菌株L7013粗多糖为45.6g/100g,对照CK黑保1号粗多糖为10.1g/100g;黑木耳菌株L7013铁为 1.96×10^2 mg/kg,对照CK黑保1号铁为 2.58×10^2 mg/kg;黑木耳菌株L7013灰分为5.8g/100g,对照CK黑保1号为5.3g/100g。黑木耳菌株L7013所有检测的营养成分都高于对照CK黑保1号,铁含量低于对照CK黑保1号,功能成分粗多糖也高于对照CK黑保1号。黑木耳菌株L7013比对照CK黑保1号营养价值更高。

[0353] 以上显示和描述了本发明的基本原理、主要特征和本发明的优点。本行业的技术人员应该了解,本发明不受上述实施例的限制,上述实施例和说明书中描述的只是说明本发明的原理,在不脱离本发明精神和范围的前提下,本发明还会有各种变化和改进,这些变化和改进都落入要求保护的本发明范围内。本发明要求保护范围由所附的权利要求书及其等效物界定。

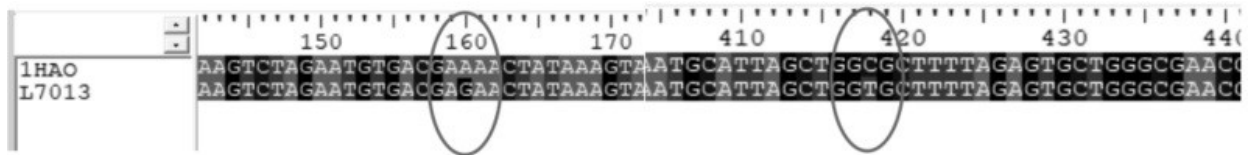


图 1

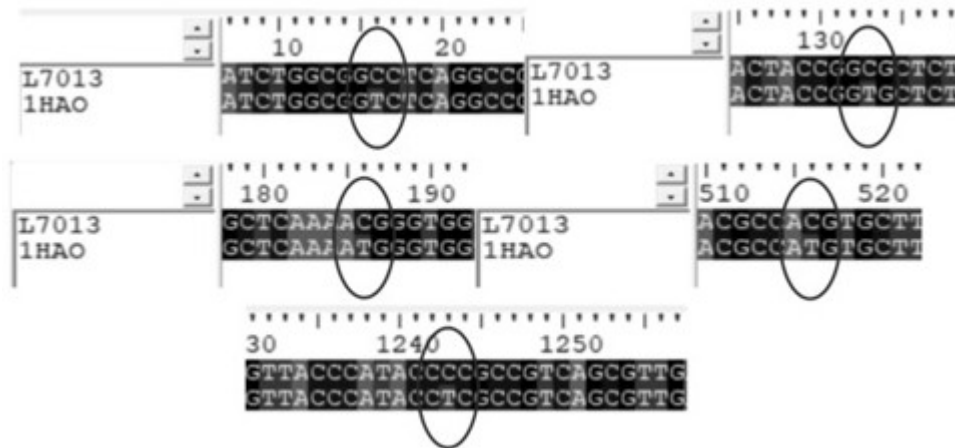


图 2

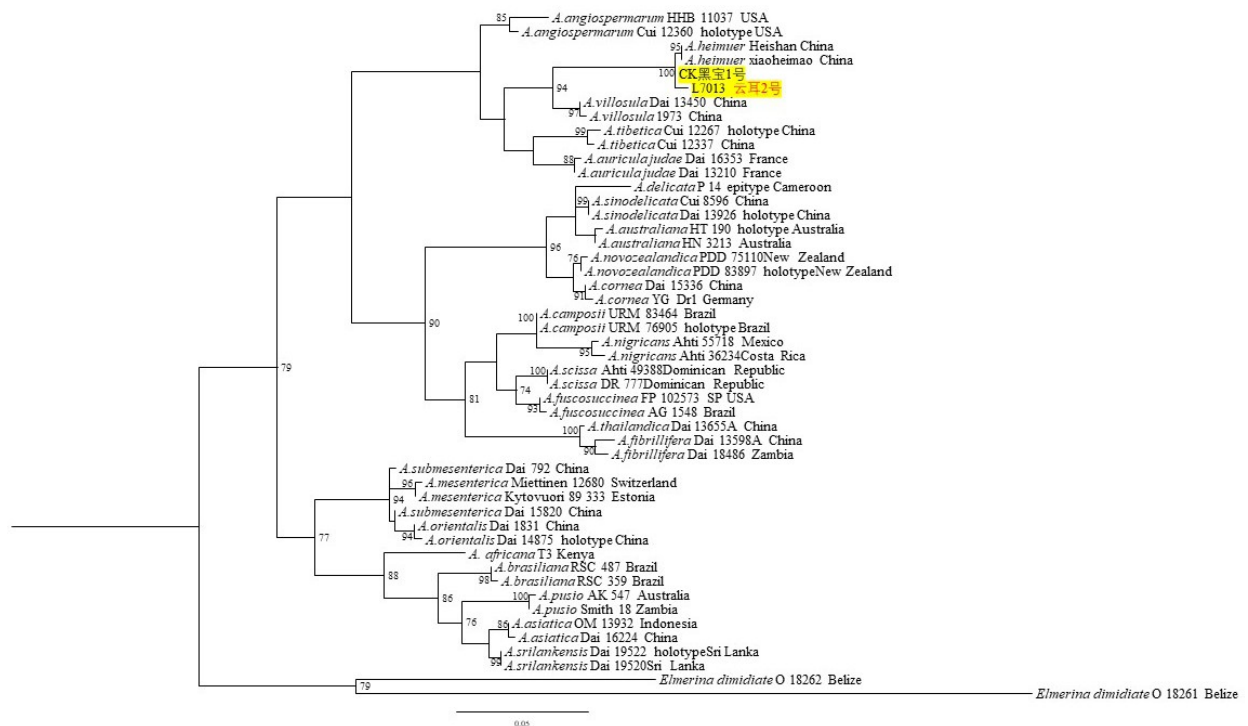


图 3

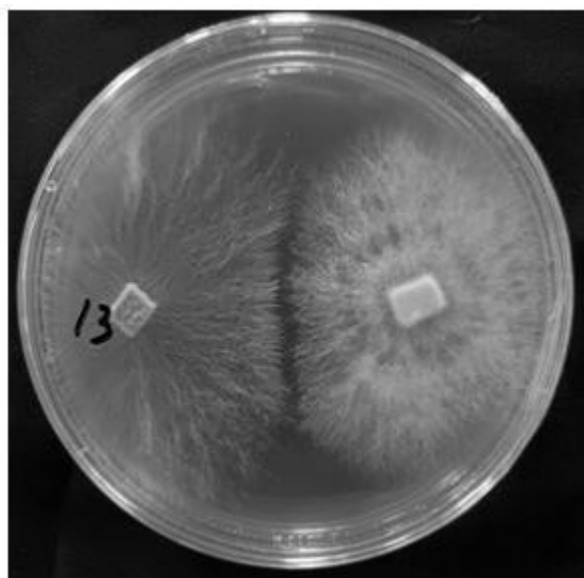


图 4

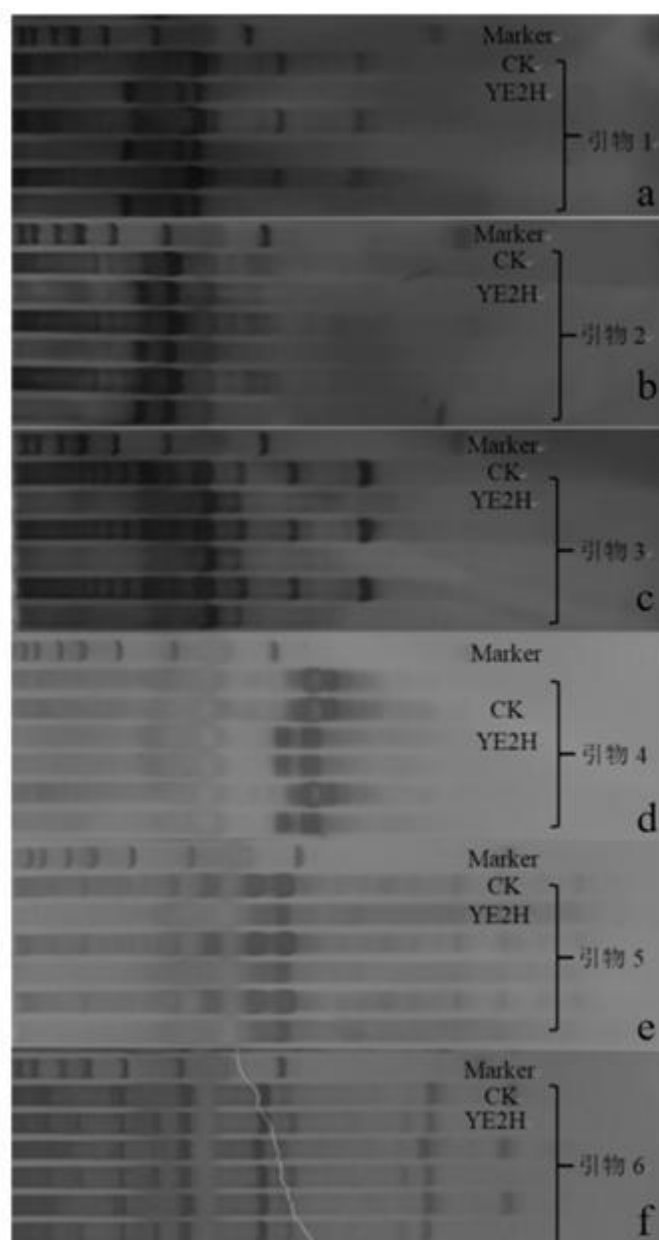


图 5

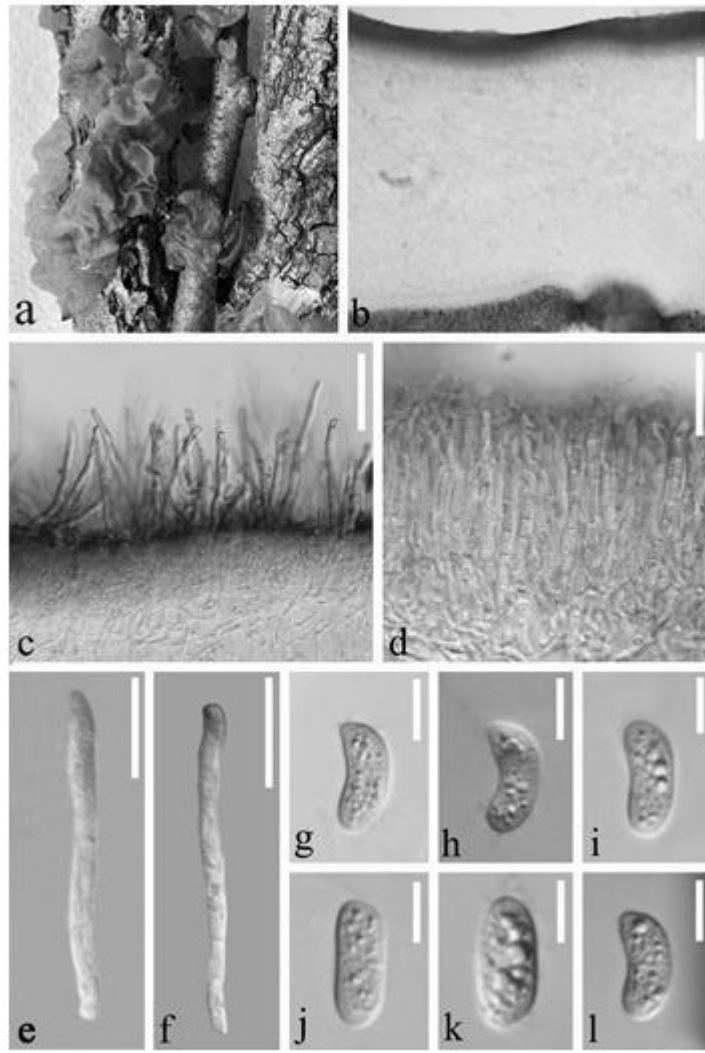


图 6

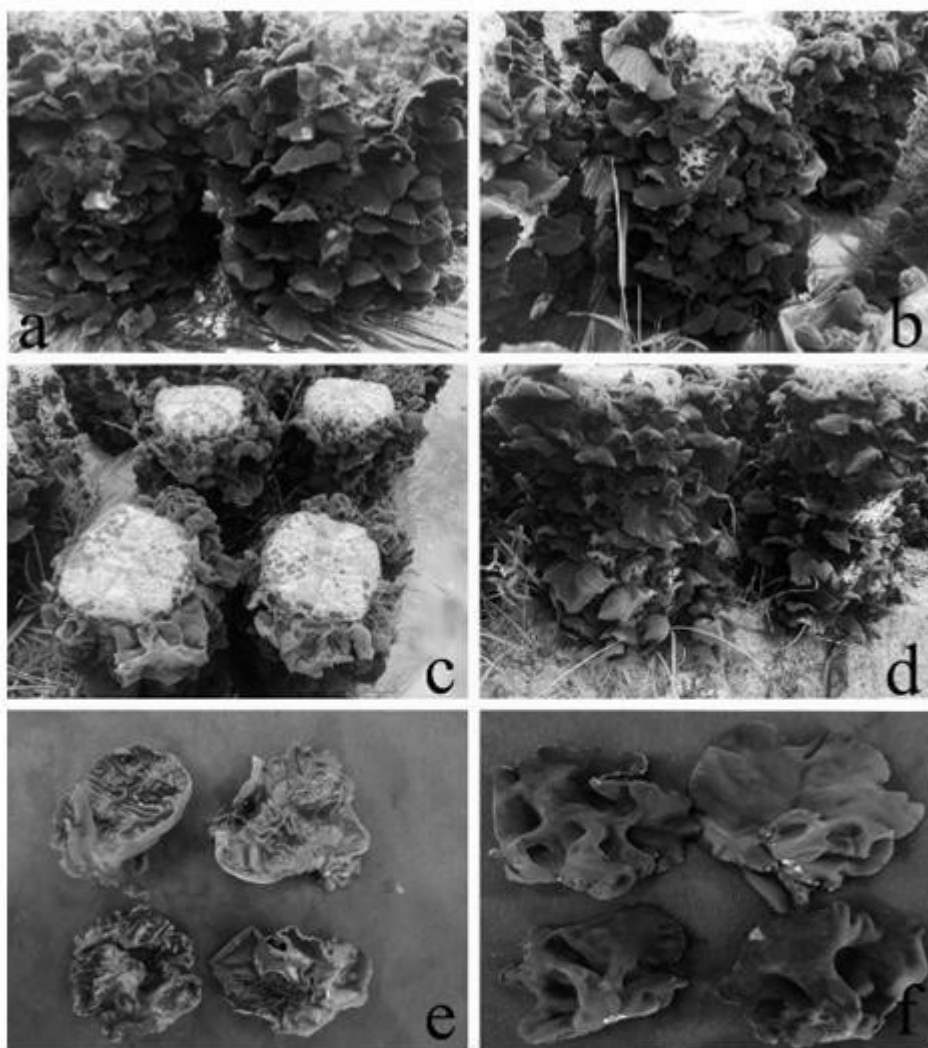


图 7

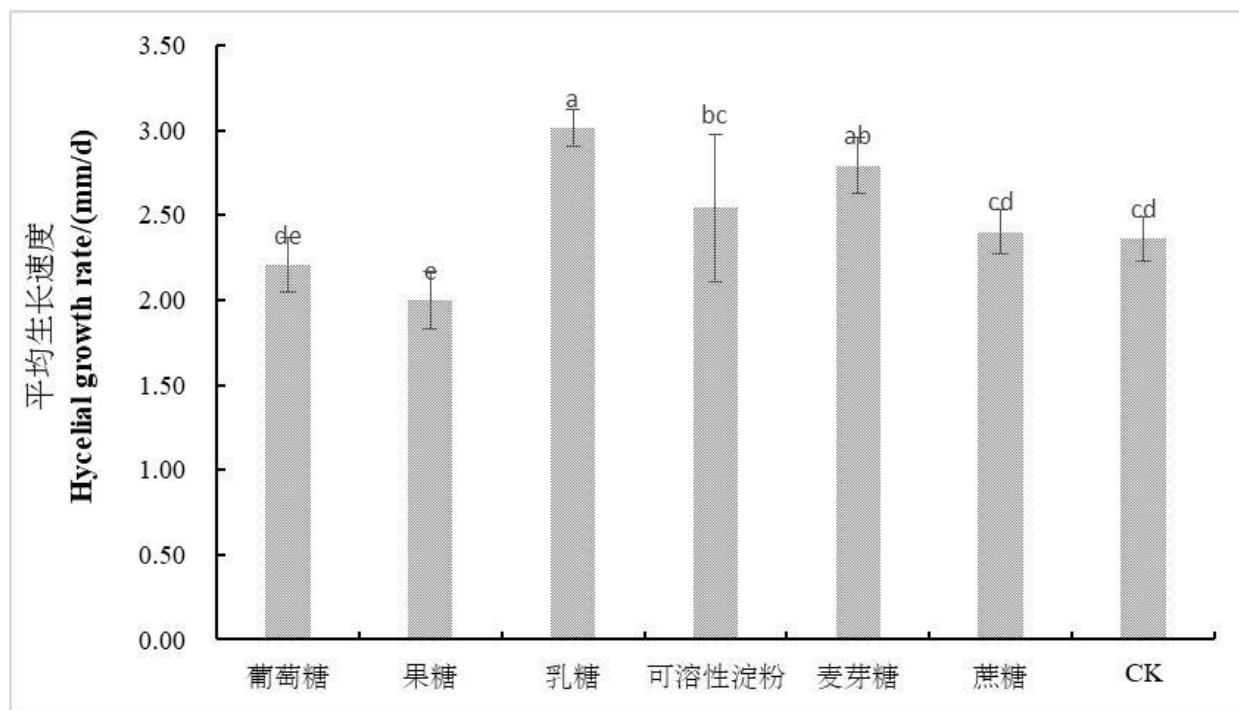


图 8

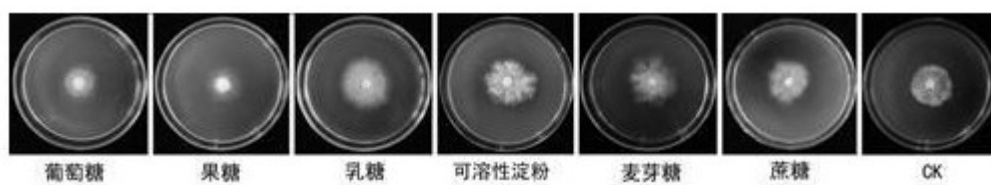


图 9

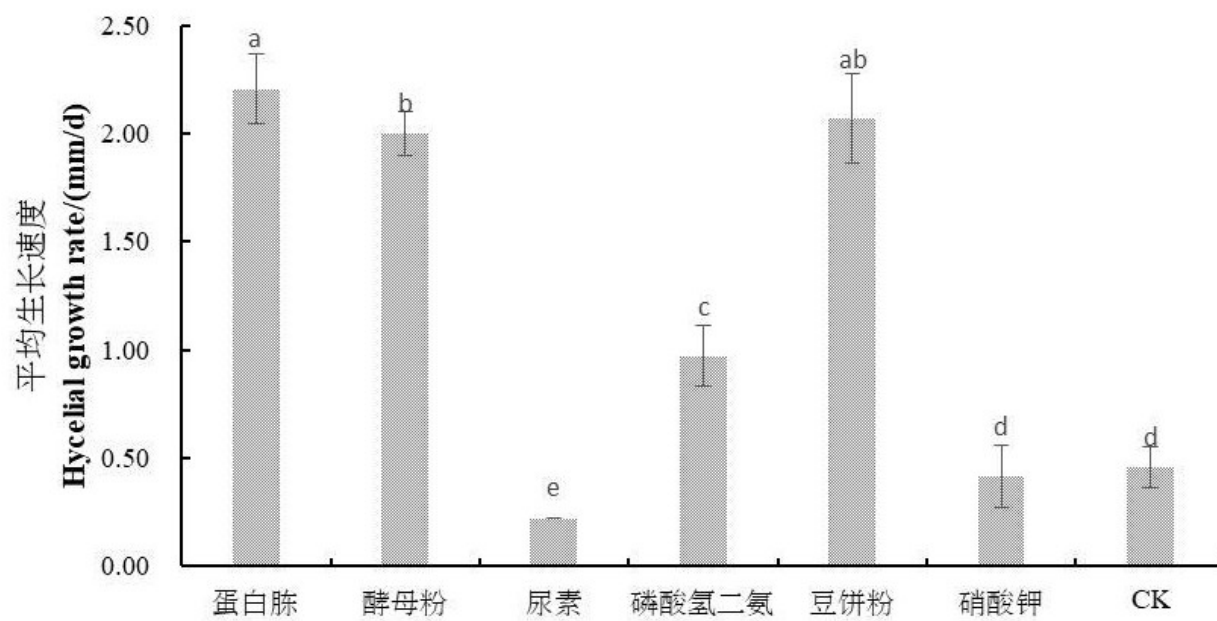


图 10

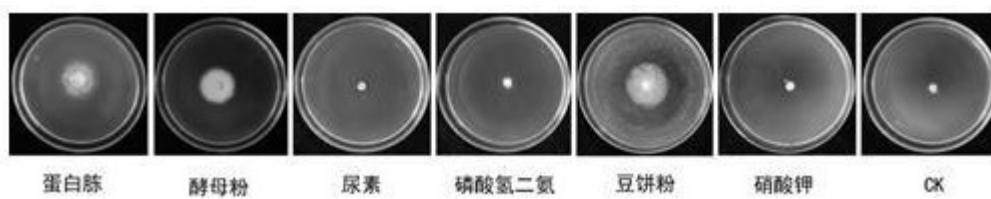


图 11

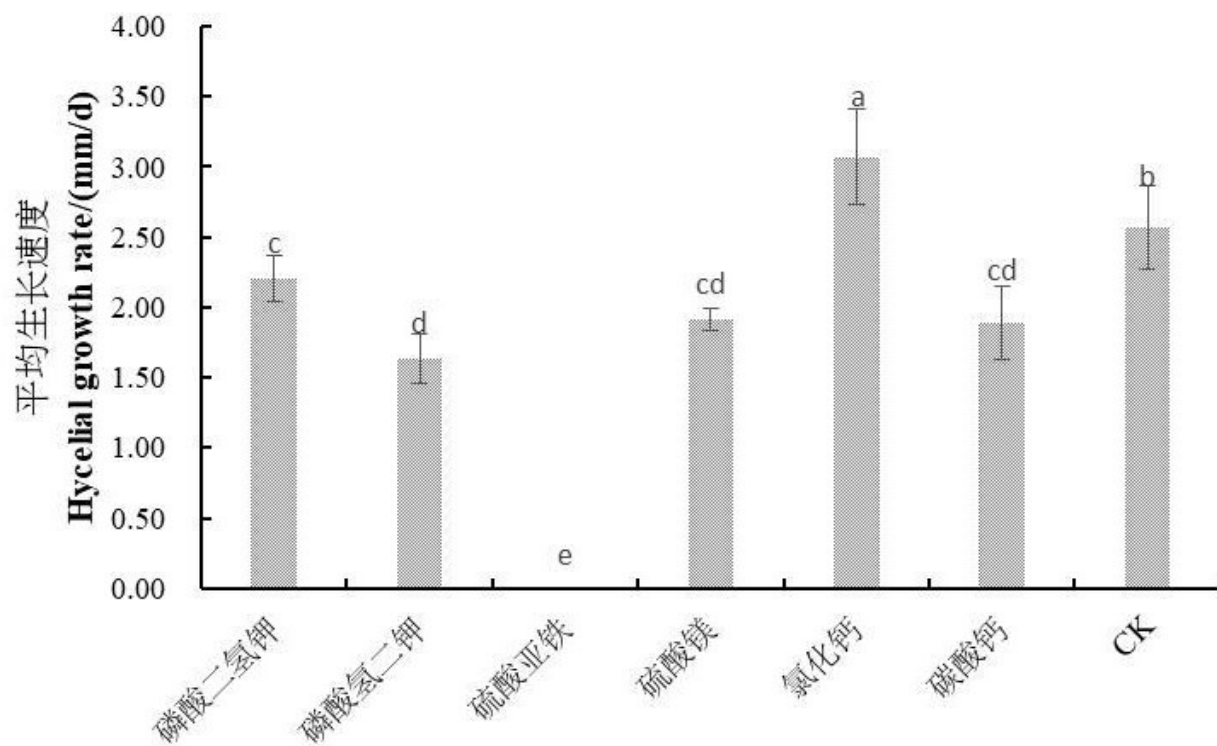


图 12

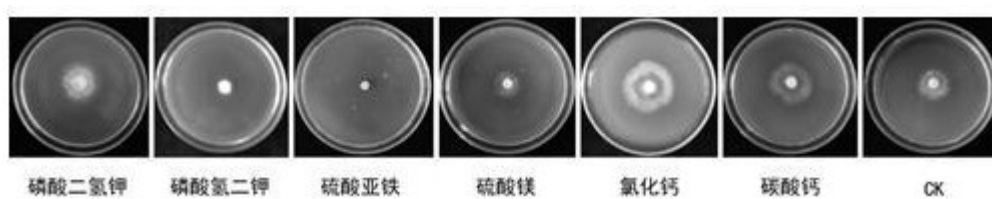


图 13

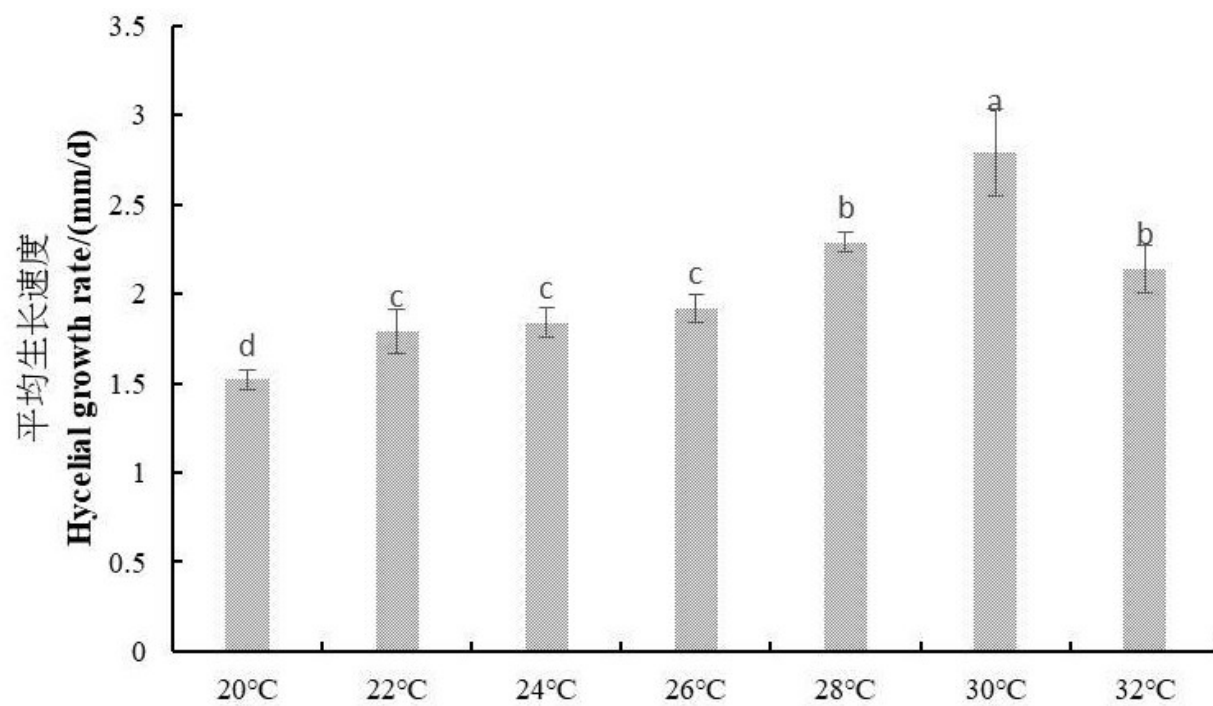


图 14

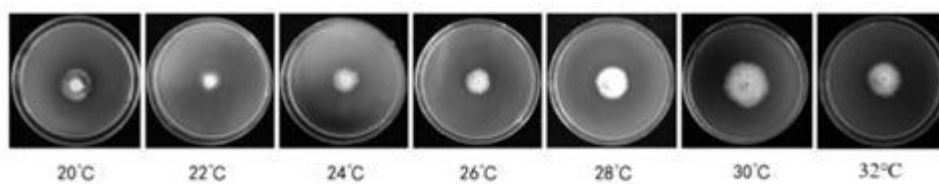


图 15

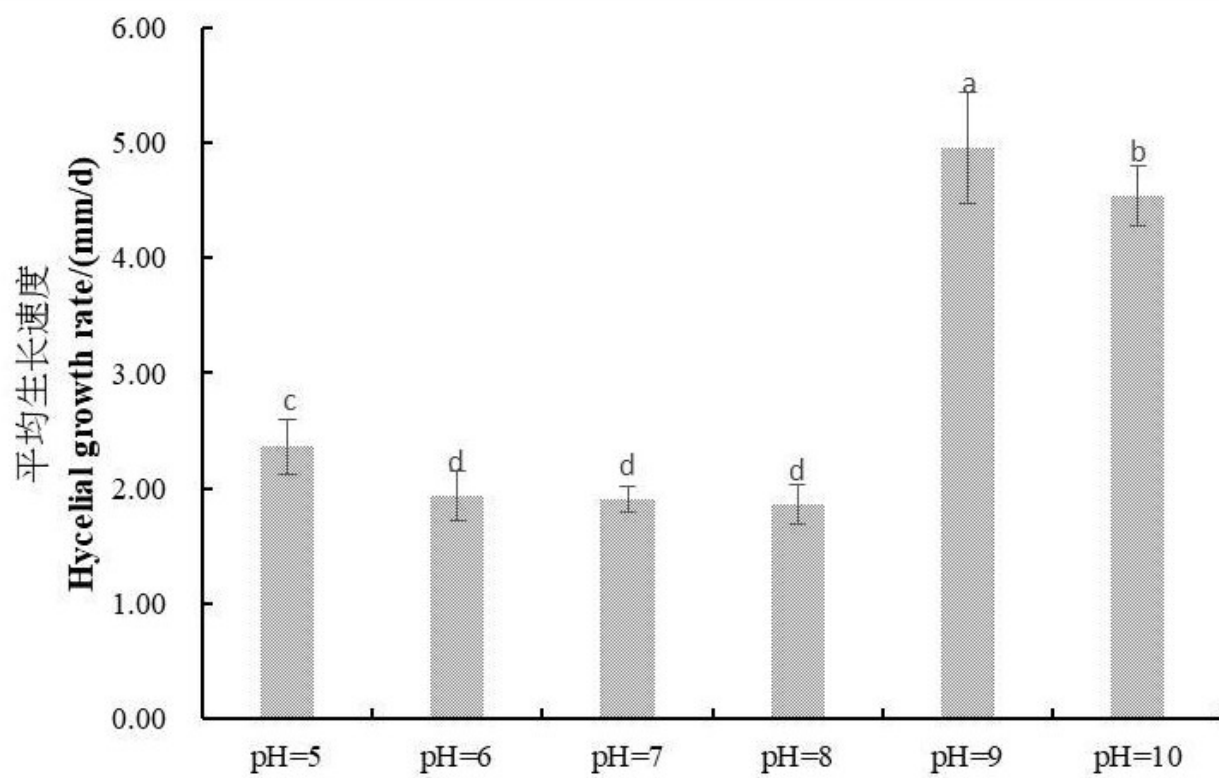


图 16

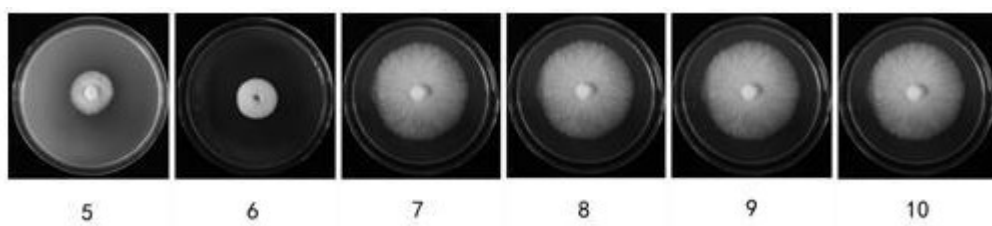


图 17