

陈 鹏,郭成金. 金针菇原生质体制备和再生探究[J]. 江苏农业科学,2014,42(9):200-204.

金针菇原生质体制备和再生探究

陈 鹏, 郭成金

(天津师范大学草菌研究所/天津市植物动物抗性实验室,天津 300387)

摘要:采用正交试验方法对影响金针菇[*Flammulina velutipes*(Curt.:Fr.)Sing.]原生质体制备、再生的主要因素进行探究,结果表明,金针菇原生质体最佳再生体系为:培养7 d的菌丝体,在1%溶壁酶、1%蜗牛酶组成的混合酶中,以0.6 mol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 作为渗透剂,在30℃下酶解4 h,经过3次验证试验,金针菇原生质体再生率高达0.851 7。最佳制备体系为:培养9 d的菌丝体,在2%溶壁酶中,以0.6 mol/L蔗糖作为渗透剂,在26℃下酶解4 h,此条件下金针菇原生质体的制备率高达 2.025×10^7 个/mL。

关键词:金针菇;正交试验;原生质体;再生;融合;诱变

中图分类号: S646.1⁺50.36 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)09-0200-05

金针菇[*Flammulina velutipes*(Curt.:Fr.)Sing.]别称冬菇、朴菇、构菌、青杠菌、毛柄金钱菌等,隶属担子菌亚门(Basidiomycotina)层菌纲(Hymenomycetes)伞菌目(Agaricales)口蘑科(Tricholomataceae)金钱菌属(*Flammulina*)^[1]。金针菇菌盖滑嫩、菌柄细长脆质、形美、味鲜,富含多种维生素、矿物质,不含胆固醇,富含赖氨酸、精氨酸,能促进幼儿大脑发育^[2]。金针菇药用价值很高,金针菇具有抗肿瘤、护肝作用,是世界上著名的观赏菌、食药兼用菌,是目前工厂化生产技术最成熟的菇类之一^[3-4]。原生质体指将细胞壁破除后由质膜

包裹的裸露的细胞结构^[5]。1973年,有学者将原生质体融合技术运用到草菌研究领域。目前原生质体融合技术已成为研究草菌生理、生化、遗传等基础理论、改良菌种的重要方法。有学者采用单因素试验对金针菇原生质体制备、再生进行了研究,但再生率均不高^[6-7]。笔者在前人的基础上首次采用正交试验方法对影响金针菇原生质体制备、再生条件进行优化,旨在为开展金针菇原生质体融合、诱变研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种 金针菇保藏种由天津师范大学草菌研究所提供。

1.1.2 试剂 葡萄糖、蔗糖、甘露醇、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、维生素 B_1 、KCl、NaCl、琼脂(天津福晨化学试剂厂)、溶壁酶(广东省微生物研究所)、蜗牛酶、纤维素酶(北

收稿日期:2013-12-03

基金项目:国家星火计划(编号:2012GA610002)

作者简介:陈 鹏(1989—),女,天津人,硕士研究生,主要从事草菌生物学研究。Tel:(022)23765561;E-mail:630261583@qq.com。

通信作者:郭成金,教授,主要从事植物细胞营养及草菌生物学研究。

Tel:(022)23765561;E-mail:chengjin@vip.sina.com。

通过构建高效复合农业生产系统,陆基生态渔场实现了高效率的有机农产品生态生产,有利于环境保护;同时,通过降耗、增产,实现了增收,保证了生产循环与发展。本研究还发现,本系统的产量较高,随着农业面源污染的减少,农药和化肥的减量或禁用将减少人力和用药成本,从而产生显著的社会综合价值,是生态效率极高的一种生态农业形式,具有极高的生态系统服务价值,同时有较高的经济价值和社会价值,是人类发展的必然选择。

参考文献:

- [1] Boyce D G, Lewis M R, Worm B. Global phytoplankton decline over the past century[J]. Nature, 2010, 466(736): 591-596.
- [2] 王松良. 用生态学思维重构传统农学学科:生产生态学的角色[J]. 应用生态学报, 2012, 23(8): 2031-2035.
- [3] 董双林. 高效低碳——中国水产养殖业发展的必由之路[J]. 水产学报, 2011, 35(10): 1595-1600.
- [4] Xie J, Hu L L, Tang J J, et al. Ecological mechanisms underlying the sustainability of the agricultural heritage rice-fish coculture system[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United

States of America, 2011, 108(50): E1381-E1387.

- [5] 丁伟华, 李娜娜, 任伟征, 等. 传统稻鱼系统生产力提升对稻田水体环境的影响[J]. 中国生态农业学报, 2013, 21(3): 308-314.
- [6] 陶 玲, 李 谷, 李晓丽, 等. 复合池塘循环水养殖系统生态足迹分析[J]. 渔业现代化, 2010, 37(4): 10-15.
- [7] 徐田伟. 发展有机农业与农业面源污染控制[J]. 环境保护与循环经济, 2009, 29(4): 45-47.
- [8] 李廷友, 林振山, 尹静秋. 基于有机水产养殖减轻农业面源污染的研究[J]. 水生态学杂志, 2009, 2(6): 67-70.
- [9] 蒋高明. 中国未来农业向哪里去——“生态农业:试验与前景”专栏主持人语[J]. 工程研究:跨学科视野中的工程, 2012, 4(1): 7-9.
- [10] 杨挺秀. 发展绿色革命 建设生态农业[J]. 水土保持通报, 1983(4): 43-48.
- [11] 曹家龙. 健康生态养殖:标本兼治的绿色革命[J]. 内陆水产, 2002(10): 3.
- [12] 董双林. 中国综合水产养殖的发展历史、原理和分类[J]. 中国水产科学, 2011, 18(5): 1202-1209.
- [13] 耿晨光, 段婧婧, 王 灿, 等. 长三角平原水网区域城郊循环农业圈层模式研究[J]. 中国生态农业学报, 2012, 20(7): 956-962.

京鼎国昌盛生物技术有限责任公司)、马铃薯、棉籽皮、玉米粉。

1.1.3 仪器与设备 YXQG02 手提式压力蒸汽消毒器(山东新华医疗器械厂)、SW-CJ-2FD 双人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司)、WDP 型微生物多用培养箱(广东省医疗器械厂)、TGL-16G 高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器有限公司)、BS224S 电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)、HH-S 恒温水浴锅(江苏省医疗仪器厂)、血球计数板(上海求精生化试剂仪器有限公司)、Galen 光学显微镜(Gambridge 公司)、针头式滤器、0.22 μm 微孔滤膜(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司)。

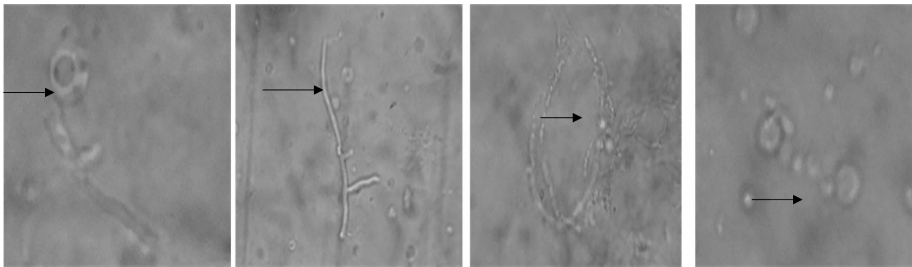
1.1.4 培养基 PDA 综合培养基:马铃薯 20.00%(浸提液)、棉籽皮 20.00%(浸提液)、葡萄糖 2.00%、KH₂PO₄ 0.30%、MgSO₄·7H₂O 0.15%、维生素 B₁ 0.0004%、琼脂 2.00%,pH 值自然^[8]。液体培养基:玉米粉 3.00%(浸提液)、马铃薯 15.00%(浸提液)、葡萄糖 0.50%、KH₂PO₄ 0.02%、KH₂PO₄ 0.08%、MgSO₄·7H₂O 0.05%、pH 值 6.0~6.5。再生培养基:液体培养基+0.8%琼脂,以 0.6 mol/L 甘露醇配得,pH 值自然。再生对照培养基:液体培养基+0.8%琼脂,以蒸馏水配得,pH 值自然。渗稳剂:甘露醇、蔗糖、KCl、NaCl 均为 0.6 mol/L。

1.2 方法

1.2.1 菌丝体的培养 取斜面培养基上经提纯复壮后生长旺盛的菌丝体尖端接种于液体培养基表面,25℃静置培养 5~11 d,每隔 24 h 手摇 1 次。

1.2.2 酶液的配制 按表 1 称取各种酶置于 4 mL 离心管中,用相应渗稳剂溶解,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后备用。

1.2.3 原生质体的分离 在无菌操作下取培养好的菌丝体湿质量约 500 mg 置于 4 mL 离心管中,6 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,用相应的渗稳剂洗涤 3 次,用无菌滤纸吸去多余水分。4 mL 离心管中,每 100 mg 湿菌丝体加 1 mL 酶液,每管放入 2 粒直径为 2.5 mm 的无菌玻璃珠,在恒温水浴锅中进行酶解。吸取 1~10 μL 酶解液,用血球计数板计算原生质体的初步得率。



从左至右依次是:顶端释放、侧位释放、端位释放、原位释放

图1 金针菇原生质释放方式(400×)

2.2 影响原生质体制备的因素

由表 2 可知,各因素对原生质体制备率的影响由大到小依次为:酶组成及浓度>酶解时间>渗稳剂>菌龄>酶解温度。最佳原生质体制备条件组合为 A₂B₄C₁D₄E₃。即培养 9 d 的菌丝体,在 2%溶壁酶中,以 0.6 mol/L 蔗糖作为渗稳剂,在

1.2.4 原生质体的纯化 酶解一定时间后,用孔径为 18 μm 的无菌滤网过滤原生质体悬液,除去残余的菌丝体片段。滤液 4 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,用渗透压稳定剂洗涤 3 次,得到纯化的原生质体。吸取少许悬液,置于显微镜下观察,用血球计数板计算原生质体最终得率。

1.2.5 原生质体再生 将纯化的原生质体悬液稀释至浓度为 10⁵ 个/mL,吸取 0.2 mL 涂布在再生培养基上,另取 0.2 mL 用无菌水稀释的原生质体悬液涂布在对照培养基上,作为对照。培养 8~15 d 后记录再生菌落数,每处理重复 3 次,再生率计算公式如下:

原生质体再生率=(再生菌落数-对照组再生菌落数)/涂布的原生质体总数×100%。

表 1 金针菇原生质体制备条件正交试验因素及水平

水平	因素				
	A:酶组成及浓度	B:渗稳剂(0.6mol/L)	C:酶解温度(℃)	D:酶解时间(h)	E:菌龄(d)
1	1% L	MgSO ₄ ·7H ₂ O	26	1	5
2	2% L	KCl	28	2	7
3	1% L+1% S	甘露醇	30	3	9
4	1% L+1% S+1% C	蔗糖	32	4	11

注:C 代表纤维素酶,L 代表溶壁酶,S 代表蜗牛酶。下表同。

2 结果与分析

2.1 原生质体的释放方式

金针菇原生质体有 4 种释放方式。酶解反应初期无原生质体释放,但菌丝出现断裂,菌丝变粗、变短且膨大,在菌丝顶端部位细胞的细胞壁被溶解,原生质体从细胞壁缺口溢出,原生质体呈球形,通常金针菇菌丝以这种方式从缺口释放 1~2 个原生质体。0.5 h 后,菌丝慢慢变得疏松,菌丝侧面出现孔洞,原生质体从侧面被释放出来。随着酶解时间的延长,一些菌丝细胞壁横隔被溶解,大部分菌丝裂解成菌丝段,原生质体从菌丝段的一端或两端释放出来。当酶解比较彻底时,质壁分离,在内外环境的压力下,原生质体从孔洞溢出,呈串珠排列在原位(图 1)。

26℃下酶解 4 h,此条件下金针菇原生质体的制备率高达 2.025×10⁷ 个/mL,原生质体大小均匀、质膜完整、平滑明亮(图 2)。

2.3 影响原生质体再生的因素

原生质体再生包括细胞壁再生、细胞结构和功能修复、细

表 2 原生质体制备正交试验结果与极差分析

水平	因素					制备率 (× 10 ⁶ 个/mL)
	A:酶组成及浓度	B:渗稳剂	C:酶解温度 (℃)	D:酶解时间 (h)	E:菌龄 (d)	
1	1% L	MgSO ₄ · 7H ₂ O	26	1	5	6.175
2	1% L	KCl	28	2	7	1.625
3	1% L	甘露醇	30	3	9	3.850
4	1% L	蔗糖	32	4	11	11.375
5	2% L	MgSO ₄ · 7H ₂ O	28	3	11	19.950
6	2% L	KCl	26	4	9	27.150
7	2% L	甘露醇	32	1	7	8.225
8	2% L	蔗糖	30	2	5	24.200
9	1% L + 1% S	MgSO ₄ · 7H ₂ O	30	4	7	1.000
10	1% L + 1% S	KCl	32	3	5	0.350
11	1% L + 1% S	甘露醇	26	2	11	1.400
12	1% L + 1% S	蔗糖	28	1	9	0.700
13	1% L + 1% S + 1% C	MgSO ₄ · 7H ₂ O	32	2	9	2.325
14	1% L + 1% S + 1% C	KCl	30	1	11	0.250
15	1% L + 1% S + 1% C	甘露醇	28	4	5	1.050
16	1% L + 1% S + 1% C	蔗糖	26	3	7	0.975
<i>k</i> ₁	5.756	7.362	8.925	3.837	7.944	
<i>k</i> ₂	19.881	7.344	5.831	7.387	2.956	
<i>k</i> ₃	0.863	3.631	7.325	6.281	8.506	
<i>k</i> ₄	1.150	9.313	5.569	10.144	8.244	
<i>R</i>	19.018	5.682	3.356	6.307	5.550	

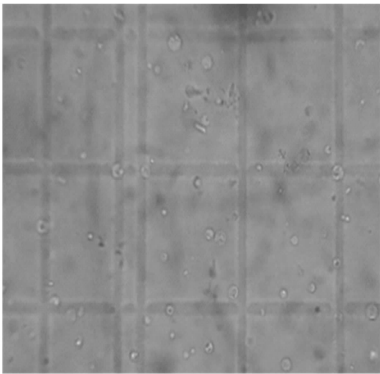


图2 最佳条件下制备的原生质体 (400 ×)

胞分裂和萌发 3 个相互联系又具有一定独立性的生理过程，是细胞自我修复的过程。它有利于克服菌种退化，保持菌种自身的优良性状。原生质体制备条件直接影响原生质体的再生能力，因此采用正交试验对影响原生质体制备的 5 个因素进行研究。由表 3 可知，各因素对原生质体再生影响程度由大到小依次是酶解时间 > 酶组成及浓度 > 渗稳剂 > 酶解温度 > 菌龄。最佳原生质体制备条件组合为 A₃B₁C₃D₄E₂。即培养 7 d 的菌丝体，在 1% 溶壁酶、1% 蜗牛酶组成的混合酶中，以 0.6 mol/L MgSO₄ · 7H₂O 作为渗稳剂，在 30℃ 下酶解 4 h。经过 3 次验证试验，金针菇原生质体再生率高达 85.17%，与前人研究得到的金针菇再生率相比提高了 60%^[6]。

2.4 渗稳剂种类与原生质体再生的关系

参照表 3 的金针菇原生质体最佳再生条件：培养 7 d 的菌丝体，在 1% 溶壁酶、1% 蜗牛酶组成的混合酶中，以 0.6 mol/L MgSO₄ · 7H₂O 作为渗稳剂，在 30℃ 下酶解 4 h，比较不同渗稳剂对金针菇原生质体再生率的影响。

由表 4 可知，以甘露醇、蔗糖作为渗稳剂，金针菇再生率高于无机盐类，尤其以甘露醇作为渗稳剂时金针菇再生率最高，再生菌落长出的时间也最短；以 NaCl 作为渗稳剂时，金针菇再生率最低，且再生菌落长出的时间也最长。4 种不同的再生培养基中，原生质体的再生率相差较大，这可能是由于渗稳剂的种类不同导致原生质体对其利用、转化的速度也不同。不同渗稳剂培养基上的菌落长势如图 3 所示。

2.5 原生质体再生情况

在最佳渗稳剂的再生培养基上暗培养 4 d 可以看到一个半透明的白色印记，边缘不规则，呈辐射状。5 ~ 7 d 时，菌落的痕迹变得清晰，呈白色不规则的圆形，以再生点为中心辐射状生长。8 d 以后，菌落向四周扩大，金针菇的气生菌丝比较旺盛，随着时间的推移，辐射状愈加明显，边缘不规则，且开始分泌色素，中心泛黄，边缘菌丝白色，最终再生菌落布满整个再生培养基（图 4）。

3 结论与讨论

3.1 原生质体制备的相关因素

3.1.1 酶液组成对原生质体制备率的影响 蕈菌的细胞壁较复杂，使用酶法破壁制备原生质体时，酶很关键。复合酶的酶解效果较单一酶效果好。溶壁酶是一种活力很强的复合酶^[9]。本研究表明，单独使用溶壁酶比使用其他混合酶的效果要好，这与前人研究结果^[10-12]一致。由于高浓度的酶液对原生质体有一定的损伤作用，酶解过于彻底会影响原生质体再生，为提高原生质体的活力，采用较低浓度的酶液配比，结果表明，2% 溶壁酶效果最好。

3.1.2 渗稳剂对原生质体制备率的影响 原生质体制备中，渗透压稳定剂不仅能保护原生质体免于因渗透压差值过大而破裂，而且有助于酶与底物结合^[13]。细胞破壁后，原生质体

表 3 原生质体再生正交试验结果与极差分析

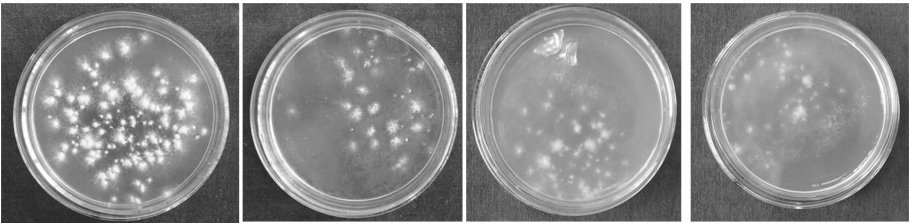
水平	因素					制备率 (%)
	A:酶组成及浓度	B:渗稳剂	C:酶解温度(℃)	D:酶解时间(h)	E:菌龄(d)	
1	1% L	MgSO ₄ · 7H ₂ O	26	1	5	0.170 6
2	1% L	KCl	28	2	7	0.016 4
3	1% L	甘露醇	30	3	9	0.121 2
4	1% L	蔗糖	32	4	11	0.175 8
5	2% L	MgSO ₄ · 7H ₂ O	28	3	11	0.021 7
6	2% L	KCl	26	4	9	0.030 6
7	2% L	甘露醇	32	1	7	0.182 4
8	2% L	蔗糖	30	2	5	0.190 0
9	1% L + 1% S	MgSO ₄ · 7H ₂ O	30	4	7	1.066 7
10	1% L + 1% S	KCl	32	3	5	0.030 0
11	1% L + 1% S	甘露醇	26	2	11	0.352 4
12	1% L + 1% S	蔗糖	28	1	9	0.255 2
13	1% L + 1% S + 1% C	MgSO ₄ · 7H ₂ O	32	2	9	0.243 7
14	1% L + 1% S + 1% C	KCl	30	1	11	0.293 1
15	1% L + 1% S + 1% C	甘露醇	28	4	5	0.441 2
16	1% L + 1% S + 1% C	蔗糖	26	3	7	0.194 4
<i>k</i> ₁	0.121	0.376	0.187	0.225	0.208	
<i>k</i> ₂	0.106	0.093	0.184	0.201	0.365	
<i>k</i> ₃	0.426	0.274	0.418	0.092	0.163	
<i>k</i> ₄	0.293	0.204	0.158	0.429	0.211	
<i>R</i>	0.320	0.283	0.260	0.337	0.202	

表 4 不同渗稳剂下金针菇原生质体再生情况

渗稳剂	菌落再生时间 (d)	再生率 (%)
甘露醇	4	85.17
蔗糖	4	19.33
KCl	5	10.17
NaCl	8	5.92

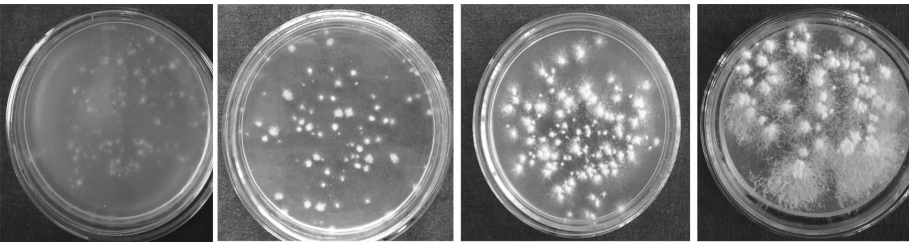
呈球状被释放出来。由于原生质体对渗透压高度敏感,加入渗稳剂可以维持胞内外平衡。通常 0.2、0.4 mol/L 渗稳剂的

渗透压较低,易使原生质体破裂;0.8 mol/L 渗稳剂的渗透压较高,不利于原生质体释放,形成的原生质体较小^[14]。本研究表明,以蔗糖为渗稳剂时制备率最高,其次是 MgSO₄ · 7H₂O,再次是 KCl,最后是甘露醇。有学者认为,无机渗稳剂有利于原生质体的制备,有机渗稳剂适合原生质体的再生。笔者认为,渗稳剂在原生质体分离体系中的作用是促进细胞壁的解离、保证原生质体的完整性,且不同酶系统只有与其适合的渗稳剂共同作用时,酶解效果最佳。



从左到右依次是以甘露醇、蔗糖、KCl、NaCl为再生培养基渗稳剂

图3 不同再生培养基对金针菇原生质体再生的影响



4 d 5 d 7 d 8 d

图4 金针菇原生质体的再生情况

3.1.3 酶解温度对原生质体制备率的影响 随着温度的增加,酶易失活,原生质体也易破损,产量不再增加。25 ~ 37 ℃ 温度范围内,酶解反应都能进行,但对于不同的酶体系来说,最适的酶解温度不同^[15]。本研究表明,26 ℃ 时金针菇原生质体产量最高,这与前人研究结果^[6]一致。

3.1.4 酶解时间对原生质体制备率的影响 本研究表明,随着酶解时间的延长,菌丝逐渐变得疏松,开始断裂,原生质体制备率逐渐增加,随着酶解时间的延长,原生质体制备率有增加的趋势,酶解 4 h,制备率最高达 2.025×10^7 个/mL。

3.1.5 菌龄对原生质体制备率的影响 菌龄是影响原生质体释放的重要因素,菌丝体的不同生理状态直接影响细胞壁的结构、菌丝体代谢水平。菌龄过短,酶解时原生质体易破裂,稳定性差^[16]。以菌龄为 9 d 的金针菇菌丝体制备原生质体时原生质体产量最高,但随着培养时间的延长,原生质体产量下降,可能是由于老龄化菌丝细胞壁较厚,菌丝细胞壁上容易沉积色素等次生物质,酶的作用减弱,原生质体产量减少,故最佳菌龄为 9 d。

3.2 再生相关因素的原生质体

3.2.1 酶液组成对原生质体再生率的影响 本研究表明,用混合酶制备出的原生质体再生率高于用单一酶制备出的原生质体再生率。用 1% 溶壁酶、1% 蜗牛酶组成的混合酶制备出的原生质体再生率最高,达 0.851 7,这与之之前的最佳制备酶条件不同,因为适合原生质体制备的条件不一定适合其再生。有文献报道,破壁后的适量细胞壁组分可促进细胞壁的再生^[17]。本研究表明,经酶解后一定量的细胞残壁可以作为合成细胞壁的“引物”,有助于细胞壁再生。

3.2.2 渗透剂对原生质体再生率的影响 渗透压稳定剂的主要作用是维持原生质体内外渗透压的平衡^[18]。无机盐类不利于再生可能是因为盐对细胞壁降解有促进作用。笔者认为,原生质体再生体系的作用是促进细胞壁的形成以及胞内各细胞器、超分子复合物功能修复及均衡养分。原生质体制备体系及再生体系的共性在于细胞渗透压的稳定。

3.2.3 酶解温度对原生质体再生率的影响 酶解温度也影响原生质体再生。本研究表明,金针菇原生质体再生率随着温度的升高有上升的趋势,当温度超过 30 ℃ 时,再生率开始下降,高温会损伤原生质体活性,进而影响其再生,所以金针菇原生质体再生的最适温度为 30 ℃。

3.2.4 酶解时间对原生质体再生率的影响 本研究表明,酶解 1 ~ 2 h,原生质体释放不彻底,再生率较低;酶解 4 h 时,原生质体释放较完全,原生质体结构功能也较完整,再生率最高。

3.2.5 菌龄对原生质体再生率的影响 本研究表明,菌龄为 7 d 时,金针菇原生质体再生率最高,小于或超过 7 d 菌龄,菌丝细胞或过于幼嫩或已老化均不易被酶解,原生质体活力弱,再生率呈下降趋势。菌龄过短的菌丝细胞经酶解破壁形成的原生质体,有的细胞器不完全,功能尚未完善,再生能力较低。由于处在生长对数期的细胞内含物多、功能完善,所以原生质体再生率高、再生时间短。菌龄过长同样不适合再生,由于细胞壁较老,酶解困难,整个原生质体可能从酶解所生成的小孔中流出。

4 结论

本研究通过正交试验对金针菇原生质体制备、再生条件进行优化,得到金针菇原生质体最佳再生体系为:培养 7 d 的菌丝体,在 1% 溶壁酶、1% 蜗牛酶组成的混合酶中,以 0.6 mol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 作为渗稳剂,在 30 ℃ 下酶解 4 h,经过 3 次验证试验,金针菇原生质体再生率高达 0.851 7。最佳制备体系为:培养 9 d 的菌丝体,在 2% 溶壁酶中,以 0.6 mol/L 蔗糖作为渗稳剂,在 26 ℃ 下酶解 4 h,此条件下金针菇原生质体的制备率高达 2.025×10^7 个/mL,原生质体大小均匀、质膜完整、平滑明亮。

参考文献:

- [1] 于荣利,秦旭升,宋凤菊. 金针菇研究概况[J]. 食用菌学报, 2004, 11(4): 63 - 68.
- [2] 黄年来,林志彬,陈国良,等. 中国食药食用菌学[M]. 上海:上海科学技术文献出版社,2010:937 - 978.
- [3] 何轩辉,廖森泰,刘吉平. 金针菇的食用和药用价值研究开发进展[J]. 广东农业科学,2008(3): 70 - 72, 94.
- [4] 侯波,郑淑珍,邵丽梅,等. 金针菇营养保健功能及食品加工研究现状[J]. 食品研究与开发,2013, 34(12): 122 - 126.
- [5] Gregory D W, Cocking E C. Studies on isolated protoplasts and vacuoles: I. general properties[J]. Journal of Experimental Botany, 1966, 17(1): 57 - 67.
- [6] 陈力力,马美湖,周传云,等. 不同因素对金针菇原生质体制备和再生的影响[J]. 生物技术,2005, 15(5): 47 - 51.
- [7] 龚淑刚,邓放明,陈力力. 金针菇原生质体制备的研究[J]. 现代食品科技,2007, 23(4): 54 - 57.
- [8] 郭成金. 蕈菌生物学[M]. 天津:天津科学技术出版社,2005: 144 - 146.
- [9] 张丽霞,郭成金. 猪苓原生质体制备与再生条件的研究[J]. 中国食用菌,2008, 27(5): 35 - 37, 55.
- [10] 张炳炘. 金针菇原生质体制备和再生条件实验[J]. 山东师大学报:自然科学版,1990, 5(3): 74 - 77.
- [11] Hongg S W. Formation and regeneration of protoplasm in *Lentinus edodes* [J]. Mushroom Newsletter for the Tropics, 1988, 5(4): 1 - 3.
- [12] Cheng Y, Bélanger R R. Protoplast preparation and regeneration from spores of the biocontrol fungus *Pseudozyma flocculosa* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, 190(2): 287 - 291.
- [13] 刘文芳,郭成金. 白灵菇原生质体制备与再生研究[J]. 天津师范大学学报:自然科学版,2012, 32(1): 88 - 92.
- [14] 郭成金,杨子美. 槐耳原生质体制备与再生研究[J]. 天津师范大学学报:自然科学版,2010, 30(4): 63 - 67.
- [15] 张志光. 真菌原生质体技术[M]. 长沙:湖南科学技术出版社, 2003: 79 - 86.
- [16] 金卫根,孙丽萍. 茶薪菇原生质体制备条件的分析[J]. 江西农业学报,2009, 21(11): 147 - 148, 150.
- [17] Fodor K, Alföldi L. Fusion of protoplasts of *Bacillus megaterium* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1976, 73(6): 2147 - 2150.
- [18] 江力,刘国庆,窦伟. 茶树菇原生质体制备及融合研究[J]. 食品科学,2008, 29(9): 348 - 351.