

研究报告

利用原生质体紫外诱变技术选育耐高温香菇菌株

王丽宁^{1,2} 赵妍^{1*} 张宝粉¹ 陈明杰^{1,2*}

- (1. 上海市农业科学院食用菌研究所 上海市农业遗传育种重点开放实验室 农业部南方食用菌资源利用重点实验室 国家食用菌工程技术研究中心 上海 201403)
(2. 上海海洋大学 食品学院 上海 201306)

摘要:【目的】运用原生质体紫外诱变技术选育香菇耐高温新菌株。【方法】以香菇菌株 18 为出发菌株, 紫外诱变处理其原生质体, 通过 47 °C 热激 3 h 后菌丝恢复生长的情况来筛选获得耐高温诱变株, 测定 18 及其所有诱变株在木屑培养基中的恒温长速、高温长速以及恢复长速, 并进行高温出菇试验。【结果】筛选得到 57 株耐高温诱变株, 其中诱变株 N6、N44 和 N24 的综合性状较好。恒温长速、高温长速以及恢复长速与出菇性状具有相关性, 恢复长速与出菇产量、单菇性状、耐高温能力呈正相关, 可初步作为预测耐高温菌株综合性状的指标。【结论】利用原生质体紫外诱变技术, 可初步选育出耐高温香菇新菌株。

关键词: 香菇, 紫外诱变, 原生质体, 耐高温

Breeding thermo-tolerant strains of *Lentinula edodes* by UV induced protoplast mutagenesis

WANG Li-Ning^{1,2} ZHAO Yan^{1*} ZHANG Bao-Fen¹ CHEN Ming-Jie^{1,2*}

- (1. Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Key Laboratory of Edible Fungi Resources and Utilization (South), Ministry of Agriculture, P. R. China, National Engineering Research Center of Edible Fungi, Shanghai 201403, China)
(2. College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: [Objective] In order to obtain some thermo-tolerant strains of *Lentinula edodes*, the original strain 18 was mutated by UV induced protoplast mutagenesis. [Methods] The protoplasts of 18 were exposed to ultra-violet ray and the mutants were screened through the recover ability of mycelia after being treated at 47 °C for three hours. The growth rate of mycelia in sawdust medium during constant temperature process (25 °C), high temperature process (30 °C) and recover process (25 °C) were determined. And the fruiting bodies of the mutants were collected at 25 °C. [Results] Fifty-seven thermo-tolerant mutant strains of 18 were obtained, and N6, N44 and N24 got good comprehensive properties. The growth rate during constant temperature process, high temperature process and recover process had correlation with fruiting characteristics. The growth rate during the recover

基金项目: 国家食用菌产业技术体系资助项目(No. CARS-24)

*通讯作者: 赵妍: Tel: 86-21-37196813; ✉: jiandan289@126.com

陈明杰: Tel: 86-21-62200747; ✉: mjchen@saas.sh.cn

收稿日期: 2014-03-19; 接受日期: 2014-05-08; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-05-09

process had positive correlation with fruiting production, single mushroom traits and high temperature tolerance capability, and it was selected as the predictor of integrated traits of thermo-tolerant mutant strains. [Conclusion] Basing on UV induced protoplast mutagenesis, some new thermo-tolerant mutant strains of *Lentinula edodes* were obtained.

Keywords: *Lentinula edodes*, UV mutagenesis, Protoplast, Thermo-tolerant strains

香菇(*Lentinula edodes*)是产于北半球温带与亚热带地区的一种腐生真菌,不仅营养丰富,而且具有较高的保健价值,自古以来深受人们的喜爱^[1]。香菇属中低温型变温结实性菇类,自然条件下其菌丝的生长温度为 5–32 °C,最适温度为 24–27 °C;子实体发生温度为 5–24 °C,最适温度为 15–20 °C^[2]。因此长期以来我国香菇生产都面临一个问题:香菇主产区(福建、浙江等)夏季温度较高,能够高温出菇的香菇品种少,导致夏季鲜香菇供应不足。多年来致力于香菇研究的科研工作者和菇农尝试通过不同途径实现香菇的高温栽培,实际生产中应用较广泛的措施主要有两种:一是利用海拔越高温度越低的原理,采取在海拔 500 m 以上的高山上栽培^[3];二是改进栽培措施实现降温出菇,主要包括林下或山沟出菇、覆土栽培出菇等^[4],其中以覆土栽培出菇应用最为广泛。高海拔地区通常交通不便,运输周期长、成本高,相对而言较适合干香菇的生产而不适合鲜香菇生产与销售;覆土栽培的越夏管理要求十分严格,操作起来具有一定的难度,同时覆土材料存在诸多不确定因素易造成食品安全隐患,使得覆土栽培的应用存在诸多局限性。因此,要想从根本上解决香菇高温栽培的问题,最有效的方法是通过育种手段选育出高产优质的高温型香菇新品种,从而提高香菇越夏的成活率,及实现大范围高温下的香菇栽培。

近年来,高温香菇菌种的选育取得了一定的进展。张忠伟等^[5]以长白山野生香菇菌株野香 3 号和生产用品种 L66 为亲本进行单孢杂交,经 4 年出菇试验、产比试验和生产试验选育得到的杂交菌株抚香 2 号具有出菇期耐高温,且农艺性状优良的特点。浙江省武义县真菌研究所选育出武香 1 号,其菌丝可以在 35 °C 下生长,子实体的出菇温度比一

般的菌株高出 5–6 °C,且具有原基发生快的特点^[6]。丽水市大山菇业研究开发有限公司,通过自选分离得到了菇形和菇质优良的高温型香菇菌株 L9319,目前已成为国内各高温香菇的主栽品种^[7]。但是高温香菇的品种相对单一,生产实践中需要更多优质的高温香菇品种。

原生质体诱变技术是一种行之有效的育种方法,目前广泛应用于微生物育种^[8–11]。食用菌原生质体制备与再生技术已相对成熟,为本试验顺利开展奠定了良好的基础^[12–15]。本文对香菇 18 的原生质体进行紫外诱变处理,经 47 °C 热激初筛后共获得 57 株耐高温诱变株,测定各菌株在木屑培养基中的恒温长速、高温长速以及恢复长速,并通过栽培试验对诱变株在高温下的出菇性状进行了考察,初步获得了部分表现优良的香菇诱变新菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:香菇菌株 18 (河北平泉主栽品种)。

1.1.2 主要仪器及试剂:智能食用菌培养箱(型号:ZJX-300A),杭州钱江仪器设备有限公司;紫外交联仪(型号:CA 94547),Bio-Rad 公司;洁净工作台(型号:VS-1300L-U),苏净集团苏州安泰空气技术有限公司。溶壁酶,广东省微生物研究所;甘露醇,生工生物工程上海股份有限公司。

1.1.3 培养基:PDA 培养基、液体培养基^[13];再生培养基(g/L):在 PDA 培养基中添加蔗糖 205.38,麦芽糖 2.00;木屑培养基^[16]。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株的活化及扩大培养:将冷藏的 PDA 斜面菌种转接到平板中,放置于 25 °C 培养箱中培养 4–5 d,然后转接至新的平板中,如此重复 2–3 次以活化菌株。活化后的菌株培养 7–10 d 直至长满

平板,然后连同培养基一起转移至匀浆器中,并加入一定量的液体培养基打碎,分装至预先装有液体培养基的三角瓶中,25℃静置培养5d备用。

1.2.2 原生质体制备与再生:过滤并收集液体培养的菌丝,用无菌水冲洗后再用无菌吸水纸将菌丝吸干,将菌丝转移到酶液(0.12 g 溶壁酶溶于6 mL 0.6 mol/L 的甘露醇溶液中,经0.2 μm 细菌过滤器过滤)中,轻微振荡使其均匀分散开,置于32℃、60 r/min 摇床中酶解3 h。用G-2 砂芯漏斗过滤除去酶解液中残留的菌丝,将收集的滤液在4℃、3 000 r/min 条件下离心10 min,弃上清,沉淀用0.6 mol/L 的甘露醇洗涤2~3次即得到纯化的原生质体。将原生质体稀释至适当浓度用血球计数板计数,吸取100 μL 稀释好的原生质体悬液于再生培养基上,用涂布棒涂布均匀,25℃倒置遮光培养7~10 d可见再生菌落。

1.2.3 原生质体紫外诱变:按1.2.2 制备原生质体,用0.6 mol/L 的甘露醇溶液稀释至 10^4 个/mL,分别取2 mL于21个无菌培养皿中,每3个为一组,在预热15 min的紫外灯(紫外灯功率为10 W,距离照射位置垂直距离15 cm)下分别照射0、5、10、15、20、25、30 s(以上操作均在黑暗条件下进行),然后于每个培养皿中取100 μL涂布于再生培养基上,黑暗培养7~15 d观察并记录再生情况,每组以3个培养皿菌落数的平均值作为该组的菌落数,计算不同照射时间梯度下的致死率,多次重复试验,求平均值后绘制致死曲线。

致死率=(未经诱变处理菌落数-诱变处理后菌落数)/未经诱变处理菌落数×100%。

1.2.4 初步筛选标准的确立以及耐高温诱变株的筛选:对出发菌株18进行高温耐受性试验,发现47℃是菌丝能否恢复生长的临界温度。将18接种到PDA平板上,培养5 d后用记号笔划出菌丝生长范围,然后置于47℃培养箱中分别处理1.5、2.0、2.5、3.0 h。热激后的平板转移至25℃培养箱中继续培养,观察并记录不同时间梯度处理组的菌丝恢复生长情况,以确定18于47℃的耐受时

间限度,并以此作为耐高温诱变株的初筛标准。将18经紫外线诱变获得的诱变株按照上述方法于47℃培养箱中热激一定时间,然后重新置于25℃恢复培养,比18恢复生长快且与18对峙培养出现拮抗的视为耐高温诱变株。

1.2.5 诱变株菌丝生长速度试验:将18及其各诱变株转接到木屑试管中,每个菌株接10支试管于25℃培养,待菌丝延伸到木屑中划线作为起始标志。在每个菌株中抽取5个试管继续置于25℃培养,每7 d划线一次,测定其在25℃的生长速度,即恒温长速;另外5个试管置于30℃,每7 d划线一次,测其在30℃的生长速度,即高温长速;然后将经历30℃高温的菌株重新置于25℃培养,并对恢复10 d后生长范围进行划线标记,测量两横截面的垂直距离,记录各菌株的恢复生长速度,即恢复长速。

1.2.6 诱变株栽培出菇试验:(1)原种的制作:将PDA斜面菌种转接木屑培养基中,25℃培养待用。(2)菌袋的制作:每袋装入木屑培养基900 g, 1×10^5 Pa 灭菌2 h冷却后待用。(3)接种:将原种转接到菌袋中,每个编号接10袋。待菌丝延伸到一半时转移至培养架上,以便进行通风管理。发菌期温度设定为20℃,出菇期温度设定为25℃。常规管理整个生产流程,整个栽培试验的持续时间约为5个月。

1.2.7 遗传稳定性试验:将出菇试验中综合性状优良的18诱变株连续传代10次,然后再进行47℃热激试验,恢复能力稳定的其遗传性能稳定。

2 结果与分析

2.1 紫外诱变条件的选择

将18的原生质体悬液用紫外线进行不同时间照射处理,根据再生情况绘制紫外诱变效应曲线(图1)。从该曲线可以看出,原生质体在0~15 s内的致死率升高较快,随后曲线斜率有所降低,到照射25 s时致死率达到100%。为了获得较高的正诱变率,本试验选择致死率为70%~80%(约13~15 s)的照射剂量作为诱变条件。

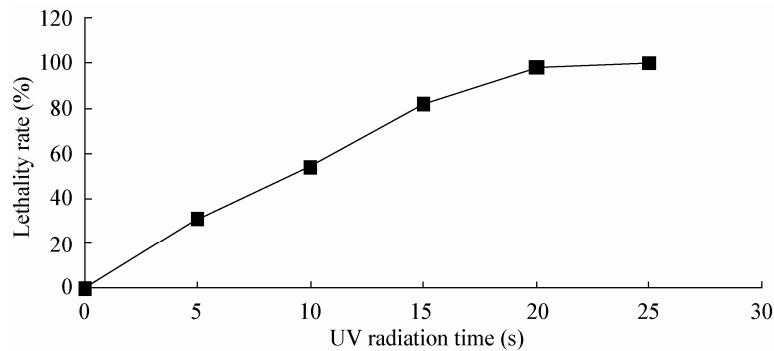


图 1 紫外诱变效应曲线

Figure 1 Mortality curve of *Lentinula edodes* protoplasts under UV radiation

2.2 初步筛选标准的确立及耐高温菌株的获得

以出发菌株 18 为试验材料进行耐热性试验,结果显示经过 47 °C 高温刺激后,18 的菌丝有变黄萎缩的现象并呈现浅色高温圈,恢复后的菌丝生长稀疏、细弱。18 在 47 °C 热激 2 h 恢复生长时间为 7–10 d,热激 2.5 h 恢复生长时间需要 15–20 d,热激 3 h 后则无法恢复生长(图 2)。因此,以 47 °C 热激 3 h 是否能恢复生长来筛选 18 的耐高温诱变株,最终获得耐高温诱变株 57 株(均与 18 产生拮抗)。

2.3 诱变株菌丝生长速度

统计 18 及其各诱变株在 25、30 °C 以及经历 30 °C 高温胁迫后重新置于 25 °C 的生长速度,分别记为恒温长速、高温长速以及恢复长速,为了解出发菌株及诱变株不同长速的分布情况,对各长速作正态分布图(图 3)。从正态分布图可以看出:高

温和恢复长速的离散程度明显比恒温时大,说明随着高温刺激诱变株和出发菌株的差异增加,即相对于恒温生长诱变株在高温耐受性和恢复能力方面与出发菌株的差异性更大,高温和恢复长速整体上明显慢于恒温,说明高温对菌丝长速有抑制作用;在恢复生长过程中,57 株诱变株中共有 24 株的长速超过出发菌株,说明诱变株在经历高温后优势明显表现出来。

2.4 诱变株栽培出菇试验

香菇菌丝经过 47 °C 处理 3 h 后,转移至 25 °C 是否恢复生长作为初筛的标准。由于这个初步筛选标准只考察了菌丝的耐高温能力,无法保证目的性状之外的其它性状是否会发生负突变而影响出菇性状,因此利用出菇试验对诱变株的综合性状进行验证(子实体照片如图 4 所示)。高温对香菇出菇最

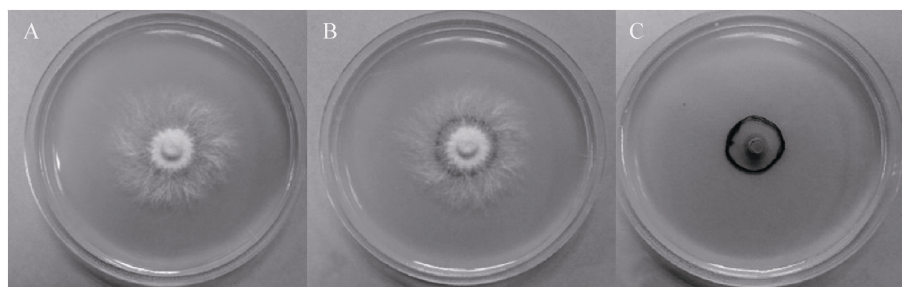


图 2 出发菌株 18 的耐高温实验

Figure 2 Heat treatment on the mycelia of 18

注: A–C: 18 菌丝 47 °C 热激 2.0、2.5 和 3.0 h 后的恢复情况。

Note: A–C: 18 mycelia recover ability after being treated at 47 °C for 2.0, 2.5 and 3.0 h respectively.

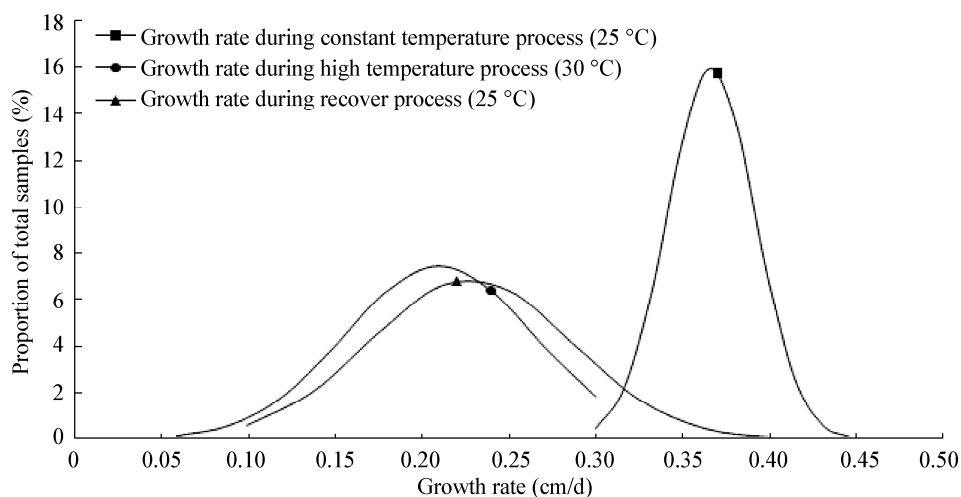


图 3 18 诱变株变温生长速度的正态分布图

Figure 3 The growth rate distribution of mutant strains from 18 under different temperature

注：靠近正态分布顶端标记的是出发菌株。

Note: In the distribution plot, the origin strain is marked near the top of the curve.

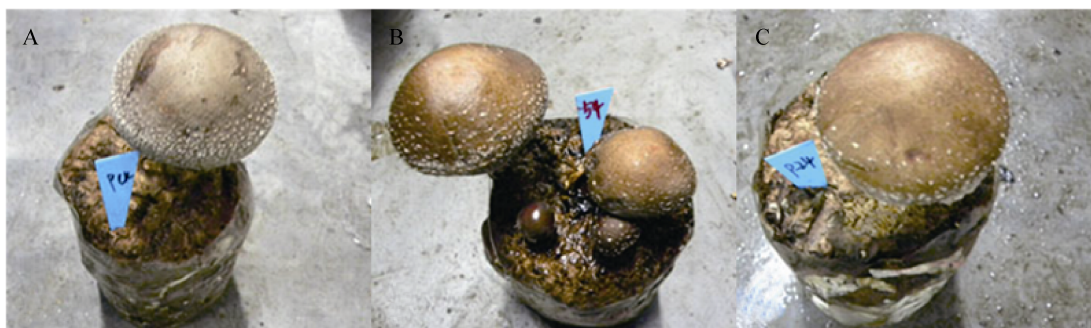


图 4 部分菌株子实体照片

Figure 4 Fruiting bodies of several strains

注：A-C：18、18N54 和 18N24 子实体。

Note: A-C: Fruiting bodies of 18, 18N54 and 18N24.

大的影响是使其子实体性状变差^[17]，为了考察诱变株在高温下的子实体发生发育及产量情况，每个试验菌株随机选取 50 个子实体进行测量，取平均值后按照单菇重量、菌盖直径、单袋产量的顺序对所有菌株的出菇性状进行排序，并统计性状优于出发菌株的诱变株(表 1)。从出菇性状统计结果可以看出，以单菇性状为考察对象时，有部分诱变株性状优于出发菌株 18，这表明利用紫外诱变技术定向筛选耐高温菌株的方法行之有效。

2.5 菌丝生长速度与出菇性状的关联分析

为了了解菌丝的生理性状与农艺性状的相关性，从而建立耐高温育种后代的筛选指标，运用 SPSS 软件对菌丝在木屑中的生长速度与相关农艺性状进行了关联分析，结果如表 2 所示。从表 2 中可以看出每袋子实体的个数和产量呈显著正相关，说明个数越多产量越高；每袋子实体个数与单菇重量、菌盖大小、菌盖厚度、菌柄长度等表征单菇质量的性状呈负相关，说明每袋菇数越多单菇质

表 1 18 超亲菌株子实体性状统计							
Table 1 The biological characteristics of fruiting bodies of 18 mutants with heterobeltiosis							
菌株编号	每袋菇数	每袋重量	单菇重量	菌盖直径	菌盖厚度	菌柄直径	菌柄长度
Strain No.	Quantity of each bag	Mushroom weight of each bag (g)	Single mushroom weight (g)	Cap diameter (cm)	Cap thickness (cm)	Stipe diameter (cm)	Stipe length (cm)
N6	4.00	98.43	30.00	63.72	15.33	14.59	58.07
N49	7.86	87.79	27.04	62.24	15.50	10.92	53.89
N11	7.71	84.93	23.70	59.48	14.86	12.97	47.69
N3	6.00	73.41	23.23	66.12	15.42	12.97	60.06
N44	9.67	164.99	23.16	66.85	12.28	11.85	61.10
N24	7.83	111.45	23.13	59.58	13.03	10.91	50.79
CK	6.38	99.75	22.70	60.85	15.37	12.03	47.20

表 2 18 子实体性状间的相关性										
Table 2 Correlation analysis of fruiting traits of 18 strains										
	每袋菇数	每袋重量	单菇重量	菌盖直径	菌盖厚度	菌柄直径	菌柄长度	恒温长速	高温长速	恢复长速
	Quantity of each bag	Mushroom weight of each bag (g)	Single mushroom weight (g)	Cap diameter (cm)	Cap thickness (cm)	Stipe diameter (cm)	Stipe length (cm)	Growth rate at 25 °C	Growth rate at 30 °C	Growth rate at 25 °C
每袋菇数	1.000	0.787**	-0.246	-0.111	-0.296*	-0.307*	-0.115	0.050	-0.122	0.073
Quantity of each bag										
每袋重量	0.787**	1.000	0.135	0.295*	-0.123	-0.089	0.244	0.096	-0.209	0.189
Mushroom weight of each bag (g)										
单菇重量	-0.246	0.135	1.000	0.719**	0.598**	0.597**	0.497**	0.005	-0.035	0.129
Single mushroom weight (g)										
菌盖直径	-0.111	0.295*	0.719**	1.000	0.326*	0.365**	0.699**	0.000	-0.117	0.176
Cap diameter (cm)										
菌盖厚度	-0.296*	-0.123	0.598**	0.326*	1.000	0.162	0.236	0.109	0.184	0.062
Cap thickness (cm)										
菌柄直径	-0.307*	-0.089	0.597**	0.365**	0.162	1.000	0.094	0.037	-0.070	0.031
Stipe diameter (cm)										
菌柄长度	-0.115	0.244	0.497**	0.699**	0.236	0.094	1.000	-0.025	-0.018	0.122
Stipe length (cm)										
恒温长速	0.050	0.096	0.005	0.000	0.109	0.037	-0.025	1.000	0.215	0.152
Growth rate at 25 °C										
高温长速	-0.122	-0.209	-0.035	-0.117	0.184	-0.070	-0.018	0.215	1.000	0.454**
Growth rate at 30 °C										
恢复长速	0.073	0.189	0.129	0.176	0.062	0.031	0.122	0.152	0.454**	1.000
Growth rate at 25 °C										

注：**：相关性显著水平为 0.01；*：相关性显著水平为 0.05。
Note: **: Correlation is significant at the 0.01 level; *: Correlation is significant at the 0.05 level.

量越差;单菇重量与菌盖直径、菌盖厚度、菌柄直径、菌柄长度都呈显著正相关,但是相关系数却有差异,单菇重量与菌盖大小的相关程度明显大于菌柄;恒温长速与每袋产量、子实体个数呈正相关,高温长速与每袋产量、子实体个数呈负相关,恢复长速与每袋产量、子实体个数呈正相关,说明恒温长速、恢复长速快的每袋产量相对较高,高温长速快的每袋产量相对较低;高温长速与菌盖直径呈负相关,与菌盖厚度呈正相关,与单菇重量呈负相关,说明高温长速快的菌盖小而厚;恢复长速与单菇重量、菌盖直径、菌盖厚度都呈正相关,说明恢复长速快的菌盖大且厚,单菇性状较好。

虽然恒温长速和恢复长速都与每袋产量呈正相关,但是恢复长速与产量的相关性更大;恢复长速与高温长速呈显著正相关,说明恢复长速在较大程度上代表耐高温能力;由于恢复长速快的菌株单菇性状较好,因此恢复长速比高温长速更能说明菌株的耐高温能力和出菇能力,故可以初步作为优质菌株筛选的重要指标。

2.6 遗传稳定性试验结果

将出菇试验中综合性状表现优良的诱变株连续传代10次,然后再进行47℃热激3h的试验处理,结果表明大部分诱变株的恢复能力较强,并未发生大的偏差,具有较稳定的遗传特性。

3 讨论

食用菌的育种方法主要有人工选择育种、杂交育种、原生质体融合育种、诱变育种、基因工程育种等^[18],它们都曾在食用菌的菌种改良方面发挥了巨大的作用。由于原生质体缺少细胞壁的保护,使得外界的理化因子能够直接进入细胞,易于诱变;同时在生理生化、分化程度方面原生质体相较于菌丝相异性大,为育种提供了各种各样的材料,增加了诱变的可能性。紫外线诱变因其不需要昂贵的设备且操作方便,成为育种工作中应用最为广泛的物理诱变方法。本研究选用紫外诱变原生质体的方法对香菇菌种18进行改良,首先通过紫外诱变

原生质体获得诱变菌株,然后经过47℃热激处理3h试验初筛获得耐高温诱变株,最后经过栽培试验考察诱变株子实体的综合性状,从而筛选出耐高温且农艺性状优良的优质香菇新菌株。

利用紫外线诱变原生质体的关键在于紫外线剂量的选择以及目标性状诱变株的筛选。不同菇类对于紫外线的敏感程度差异较大,近年来为了得到有利于生产上应用的正突变型菌株,往往采用致死70%–80%的诱变剂量^[2]。本试验采用13–15s的处理时间使出发菌株的原生质体致死率达到70%–80%,获得了较好的诱变效果。根据育种目的不同诱变株的筛选方法也不尽相同。如筛选高产物的目的菌株,主要依靠产物的物理和化学性质,如在琼脂培养基上的抑菌圈、透明圈及水解圈等;筛选对环境高耐受性的目的菌株,可以利用相应的选择培养基。本试验选用47℃热激处理3h的方法对诱变株进行初筛,最终初步筛选到18的耐高温诱变株57株。高温对香菇子实体发育的影响主要表现为,子实体偏小、不易开伞等子实体性状变差的现象^[17,19],因此通过栽培试验进一步考察57株诱变株在高温下的子实体发育情况。出菇结果表明无论考察单菇性状还是总产量,18的诱变群体中都有超亲菌株出现。综合分析发现18诱变株中的N6、N44、N24综合性状较好,可以在香菇主产区进行小范围试种,进一步验证这些诱变株的产量和耐高温特性。

为了考察菌丝的生理性状与农艺性状的相关性,对相关生理性状与农艺性状进行了相关性分析。通过分析发现菇数和产量成极显著的正相关,即菇数越多产量也越高,这与林范学等^[20]的研究结果一致,但是菇数和单菇鲜重之间存在此消彼长的关系,因此要想获得产量高性状好的香菇,应该尽可能使两者处于较佳的平衡点。菌丝生长慢在一定程度上影响发菌速度,但是根据汪昭月等^[21]的研究结果来看,菌丝在25℃时长速的差异并不能作为判断是否高产的标准,本研究也发现恒温长速和产量相关性相对较小,这与林范学等^[20]研究发

现菌丝长速和鲜菇总重呈极显著正相关的结论并不相符。菌丝生长速度和产量之间的关系目前还难以下定论,有待于进一步的研究。高温长速和产量、菌盖直径、菌柄直径呈负相关,说明高温下长得快的菌株出菇性状并不好;恢复长速和产量、菌盖直径、菌柄直径呈正相关,说明恢复长速快的出菇性状好,且在高温出菇方面表现出一定的优势。因此,高温下长速不是特别快但恢复长速快的菌株出菇性状相对较好,这些菌株是生产中真正有价值的耐高温菌株。综上所述,恢复长速的快慢既能反映耐高温的能力,又能在一定程度上反映单菇性状和出菇产量,因此可以初步作为预测耐高温菌株综合性状的指标。值得指出的是,虽然生理性状与农艺性状之间存在一定的关联性,但是有很多并未达到显著性水平,一方面有可能是本出菇试验条件所限导致农艺性状偏差、样本数量较少,另一方面也有可能是本身的相关性就不大,这需要进一步的验证。

参 考 文 献

- [1] 刘春如. 香菇的分布概况及生物学特性[J]. 中国林副特产, 2001(4): 32-33.
- [2] 黄年来. 中国食药食用菌学[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2010: 246, 1250.
- [3] 于斌武, 柳文录, 张文学, 等. 高山地区优质香菇高棚层架栽培技术及推广[J]. 中国食用菌, 2009, 28(4): 71.
- [4] 王文治, 张志军, 刘连强, 等. 林地香菇覆土栽培技术[J]. 天津农林科技, 2007(3): 15-17.
- [5] 张忠伟, 姜涛, 魏立敏, 等. 香菇杂交新品种抚香2号选育报告[J]. 食用菌, 2013(1): 17-19.
- [6] 李明炎, 朱惠照, 郭美英. 武香1号香菇菌株的品种特性[J]. 食用菌, 1998(5): 13-14.
- [7] 应国华, 吕明亮, 徐波, 等. L9319 香菇品种的主要特性及栽培技术[J]. 中国食用菌, 2011, 30(3): 63-64.
- [8] Lee JS, Iijima Y, Kobayashi H, et al. Release, regeneration and mutant induction of *Pleurotus comucopiae* protoplasts[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1988, 52(7): 1877-1878.
- [9] 田丰伟, 程传荣, 袁维涵, 等. 原生质体诱变选育 ϵ -聚赖氨酸高产菌株[J]. 微生物学通报, 2010, 37(10): 1457-1461.
- [10] 董玉玮, 张雁秋, 涂宝军, 等. 亚硝化细菌原生质体化学诱变育种研究[J]. 生物技术通报, 2013(12): 178-183.
- [11] 王远山, 牛鑫淼, 郑裕国. 游动放线菌原生质体诱变选育阿卡波糖高产菌株[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(5): 37-43.
- [12] 周继阳, 王勇, 祝长青. 阿魏菇原生质体制备及再生条件的建立[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(3): 152-155.
- [13] 江力, 黄健威, 慈凌坤, 等. 茶树菇与鸡腿菇原生质体融合及再生[J]. 食品科学, 2011, 32(1): 141-144.
- [14] Li Y, Yuan QP, Du XL. Protoplast from β -carotene-producing fungus *Blakeslea trispora*: Preparation, regeneration and validation[J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2008, 25(6): 1416-1421.
- [15] Djajanegara I, Masduki A. Protoplast fusion between white and brown oyster mushrooms[J]. Indonesian Journal of Agricultural Science, 2010, 11(1): 16-23.
- [16] 宋春艳, 陈明杰, 谭琦. 图说香菇栽培关键技术[M]. 北京: 中国农业出版社出版, 2011: 32.
- [17] 孙华瑜. 温度对香菇子实体生长的影响[J]. 食用菌, 1980(3): 11-12.
- [18] 付立忠, 吴学谦, 魏海龙, 等. 我国食用菌育种技术应用研究现状与展望[J]. 食用菌学报, 2005, 12(3): 63-68.
- [19] 王波, 唐利民, 熊鹰, 等. 香菇菌株菌丝和子实体生长耐高温试验研究[J]. 吉林农业大学学报, 2004, 26(2): 145-147.
- [20] 林范学, 程水明, 李安政, 等. 香菇数量性状的相关性分析和主成分分析[J]. 菌物学报, 2006, 25(4): 579-586.
- [21] 汪昭月, 王曰英. 香菇菌丝体生长发育的初步研究[J]. 食用菌, 1982, 3(1): 35.