



研究报告

灰树花菌株的复壮及常压室温等离子体诱变

马娜娜* 车树刚 张心青 吴文雷 傅英旬 李超孟 杨丹丹 刘海玉

黄河三角洲京博化工研究院有限公司 山东 滨州 256500

摘要:【背景】实验室所用灰树花菌株系长期继代培养,易出现菌株退化。【目的】通过菌株复壮的方法实现菌株的生物学活性及性状的恢复,并借助高效诱变仪对菌株实施诱变,以期得到活性更高、遗传稳定的诱变株。【方法】分别以 PDA 加富培养基和 PDA-板栗壳培养基为培养基质,采用尖端菌丝分离法进行菌株复壮,得到回复菌株原有的生物学活性及性状的复壮株 P-2,为了进一步提高菌株的高产性能,利用常压室温等离子体(atmospheric room temperature plasma, ARTP)诱变技术作用于复壮株 P-2 菌丝体,最终筛选到一株性能优良、遗传稳定性高的诱变株 b-35。【结果】复壮后的菌株 P-2 菌丝干重和多糖含量分别达到 1.18% 和 19.01%,较出发株分别提高 35.17% 和 35.11%,通过发酵罐验证菌株的发酵周期由 48 h 缩短至 32 h,菌株发酵活性及效率明显提高。诱变株 b-35 菌丝干重和多糖含量分别达到 1.56% 和 25.07%,较复壮株 P-2 分别提高了 40.15% 和 39.33%。【结论】ARTP 诱变方法易操作、无污染且诱变效率高,是获得灰树花高产菌株的重要方式。

关键词: 灰树花, 复壮, 常压室温等离子体诱变, 菌丝干重, 多糖

Rejuvenation and atmospheric room temperature plasma mutagenesis in breeding of *Grifola frondosa*

MA Na-Na* CHE Shu-Gang ZHANG Xin-Qing WU Wen-Lei FU Ying-Xun
LI Chao-Meng YANG Dan-Dan LIU Hai-Yu

Chambroad Chemical Industry Research Institute Company Limited, Binzhou, Shandong 256500, China

Abstract: [Background] *Grifola frondosa* showed degenerated characteristics due to long-term subculture. [Objective] To restore the biological activity and characteristics of *G. frondosa* through rejuvenation method, and to acquire strains possessing improved vitality and genetic stability through mutagenesis by high efficient apparatus. [Methods] Hyphae tip isolation method was utilized for rejuvenation of the strains cultivated in PDA enriched medium and PDA-chestnut shell medium respectively. Rejuvenated strain P-2 regained its biological activity and properties. To further improve its production performance, P-2 was subjected to ARTP mutagenesis, and a mutant b-35 with promoted performance and high genetic stability was obtained finally. [Results] The dry weight of mycelium and polysaccharide content of the strain P-2 were 1.18% and 19.01%, and the growth rates were 35.17% and 35.11% respectively compared with that of the original strain. Cultivation of P-2 in fermentation tank

Foundation item: Key Research and Development Plan of Shandong Province (2018YYSP018)

*Corresponding author: E-mail: wma667@163.com

Received: 21-11-2019; **Accepted:** 01-04-2020; **Published online:** 17-04-2020

基金项目: 山东省重点研发计划(2018YYSP018)

*通信作者: E-mail: wma667@163.com

收稿日期: 2019-11-21; 接受日期: 2020-04-01; 网络首发日期: 2020-04-17

indicated that the fermentation cycle was shortened to 32 h from 48 h, showing significant improvement of fermentation activity and efficiency. Mycelium dry weight and polysaccharide content of the mutant b-35 reached 1.56% and 25.07%, 40.15% and 39.33% higher than that of P-2. **[Conclusion]** ARTP mutagenesis method was proved to be an important way in breeding of high yield *Grifola frondosa* because it is easily operated, pollution-free and efficient.

Keywords: *Grifola frondosa*, Rejuvenation, ARTP mutagenesis, Dry weight of mycelium, Polysaccharide

灰树花^[1-2](*Grifola frondosa*)是一种药食兼用的大型真菌,有关灰树花中药理活性物质的研究较为广泛,同时也是近年来国内外研究的热点,大量研究^[3-6]表明灰树花具有降血糖、增强机体免疫力、清除体内自由基、延缓衰老等多种保健功能。对灰树花活性物质研究的初期都是从其子实体着手,实验周期长且产量不稳定^[7]。随着真菌液体深层发酵技术的不断成熟,许多研究者开始借助液体深层发酵技术开展灰树花产品的定向开发^[8-10]。液体发酵相较于子实体培养具有原料易得、产量高、发酵周期短、可定向发酵且可大规模化生产等优点,因此利用液体深层发酵技术进行灰树花产品的开发具有广阔的应用前景^[11]。

优良菌株的获得是液体深层发酵技术的重中之重^[11],生产上多用尖端菌丝分离法、组织分离及原生质体再生技术进行食用菌的提纯复壮,但后两种方法工艺复杂且所需时间长。我们实验室现有的灰树花菌株 Gf932 由于长期的继代培养出现了部分优良性能退化现象,因此本文采用尖端菌丝分离法^[12-13]对其进行菌株复壮,并借助常压室温等离子体(atmospheric room temperature plasma, ARTP)诱变仪对复壮株进行诱变,以同时提高菌丝体干重和多糖含量为考察指标,获得高产菌株,为灰树花菌株 Gf932 的工业化生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 出发菌株

灰树花菌株 Gf932^[14]为本实验室保存。

1.1.2 培养基

PDA 加富培养基(g/L): 马铃薯 200.00, 葡萄糖 20.00, 蛋白胨 5.00, 磷酸二氢钾 1.50, 硫酸镁

0.75, 维生素 B₁ 0.001, 琼脂粉 18.00, pH 自然。

PDA-板栗壳培养基(g/L): 马铃薯 200.00, 葡萄糖 20.00, 板栗壳(粉碎后煮 2 h) 45.00, 琼脂粉 18.00, pH 自然。

灰树花发酵培养基(g/L): 马铃薯 30.00, 麸皮 30.00, 葡萄糖 30.00, 玉米粉 7.50, 蛋白胨 4.50, 酵母粉 2.30, 磷酸二氢钾 0.75, 硫酸镁 0.75, 硫酸铵 1.00, pH 自然。

1.1.3 主要试剂和仪器

葡萄糖,西王集团有限公司;蛋白胨,生工生物工程(上海)股份有限公司;磷酸二氢钾、无水乙醇,天津市科密欧化学试剂有限公司。恒温振荡器,常州中捷实验仪器制造有限公司;发酵罐,江苏科海生物工程设备有限公司;ARTP 诱变仪,北京思清源生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 尖端菌丝分离复壮法^[15]

第 1 次分离:灰树花菌株 Gf932 的菌丝长到 PDA-板栗壳平板的 1/2 时打孔取菌落外缘 3 mm 尖端菌丝转接到培养基中央,每个菌落转接 3 个平板,28 °C 恒温培养;第 2 次分离同第 1 次;第 3 次分离:待分离菌丝生长到平板的 2/3 处时打孔取菌落外缘 3 mm 处尖端菌丝转接到斜面试管中央,28 °C 恒温培养,培养完成的菌株进行后期筛选。

1.2.2 ARTP 诱变^[16-17]

取 4 块 1.0×1.0 cm 的出发菌株 P-2 菌块接入 100 mL PDA 加富培养基中,28 °C、180 r/min 振荡培养 4 d,菌丝干重达 0.5%,培养好的菌液稀释至 10⁵后,取适量涂布于钢片上,ARTP 诱变仪上设置好相应参数,菌液诱变时间分别设置 10、20、30、40、50、60 s,将诱变完成的菌液接入 1 mL

EP管中充分振荡悬浮后涂布PDA加富平板, 28℃暗培养2 d, 待菌落长出后进行计数, 计算每个诱变梯度下的致死率。对致死率在80%及以上条件下的菌株进行挑取筛选。

1.2.3 菌株初筛

(1) 菌丝生长速度测定法^[18-19]

采用平板菌丝生长速度测定法分别进行复壮菌株和诱变菌株的初筛, 具体做法: 先将复壮菌株或诱变菌株进行活化, 待菌丝长满平板后, 用打孔器在菌丝边缘打孔(3 mm), 转接至PDA加富培养基平板中央, 采用十字交叉法划线测定菌株的菌丝生长速度, 并分别与原始菌株Gf932或出发菌株P-2的生长速度进行比较分析。

(2) 诱变株拮抗筛选法^[20]

挑取1块0.4×0.4 cm的出发菌株P-2菌块接种至固体PDA加富培养基上, 在其四周各接种4株诱变菌株, 28℃暗培养3 d左右, 观察诱变菌株与出发菌株P-2之间是否存在拮抗线, 由此可判断菌株是否发生变异。

1.2.4 菌株复筛

(1) 菌丝干重测定^[21]

按照10%接种率接入灰树花发酵培养基中, 28℃、180 r/min振荡培养48 h后结束发酵, 将液体培养所得的菌丝体经5 500 r/min离心10 min分离后, 再用蒸馏水洗涤一次, 以除去菌丝体表面所附着的培养液, 放入鼓风干燥箱中, 在105℃条件下干燥至恒重, 经电子天平称量即得菌丝干重。

(2) 菌丝胞内多糖的测定^[21-22]

向烘干的菌丝中加入10倍体积蒸馏水, 经研磨后, 在80℃水浴中浸提3 h, 浸提2次, 5 500 r/min离心10 min后取上清液, 再用3倍体积的95%乙醇溶液醇沉提取胞内多糖。在4℃的冰箱中醇沉24 h以上, 经5 500 r/min离心10 min后冷冻干燥, 采用苯酚-硫酸法(SN/T4260-2015)进行多糖的测定。

1.2.5 发酵罐验证

制备1 L待验证菌株的发酵菌种接入容积为20 L的发酵罐中, 物料体积为10 L, 控制温度

28℃、转速200 r/min, 每隔8 h取样检测一次, 发酵液pH降为3.0–4.0即为发酵结束。

2 结果与分析

2.1 菌株复壮

2.1.1 菌株复壮初筛

分别以PDA加富培养基和PDA-板栗壳培养基为复壮培养基, 筛得灰树花菌株Gf932的复壮菌株20株。采用平板菌丝生长速度测定法对其进行初筛, 初筛结果见表1。表1数据表明PDA加富培养基复壮得到的菌株菌丝生长速度均在0.835 mm/h以上, 最高达0.980 mm/h; PDA-板栗壳培养基复壮得到的菌株菌丝生长速度均在0.858 mm/h以上, 最高达0.981 mm/h。然而原始菌株的菌丝生长速度为0.810 mm/h, 复壮株菌丝长速提高了20%左右, 其中有8株复壮株与原始菌株相比差异极显著。

此外, 由图1可知复壮株与原始株共培养一段时间后, 复壮株菌丝生长茂盛且浓密, 菌株生长圈明显大于原始株菌圈。

表1 灰树花复壮株初筛

Table 1 The initial screening of *Grifola frondosa* restored strain

菌株	菌丝生长速度
Strain	Mycelial growth rate (mm/h)
Original strain	0.810±0.016
P-1	0.956±0.006***
P-2	0.980±0.011***
P-3	0.909±0.038
P-4	0.900±0.052
P-5	0.865±0.018*
P-6	0.835±0.049*
P-7	0.920±0.036*
P-8	0.933±0.016**
P-9	0.938±0.043**
P-10	0.937±0.031**
L-1	0.858±0.016*
L-2	0.956±0.009***
L-3	0.981±0.008***
L-4	0.892±0.019
L-5	0.906±0.037
L-6	0.954±0.004***
L-7	0.919±0.007*
L-8	0.961±0.011***
L-9	0.926±0.022**
L-10	0.924±0.030**

Note: *: $0.05 \leq P < 0.1$; **: $0.01 \leq P \leq 0.05$; ***: $P \leq 0.01$. P-: PDA enriched medium; L-: PDA-chestnut shell medium.

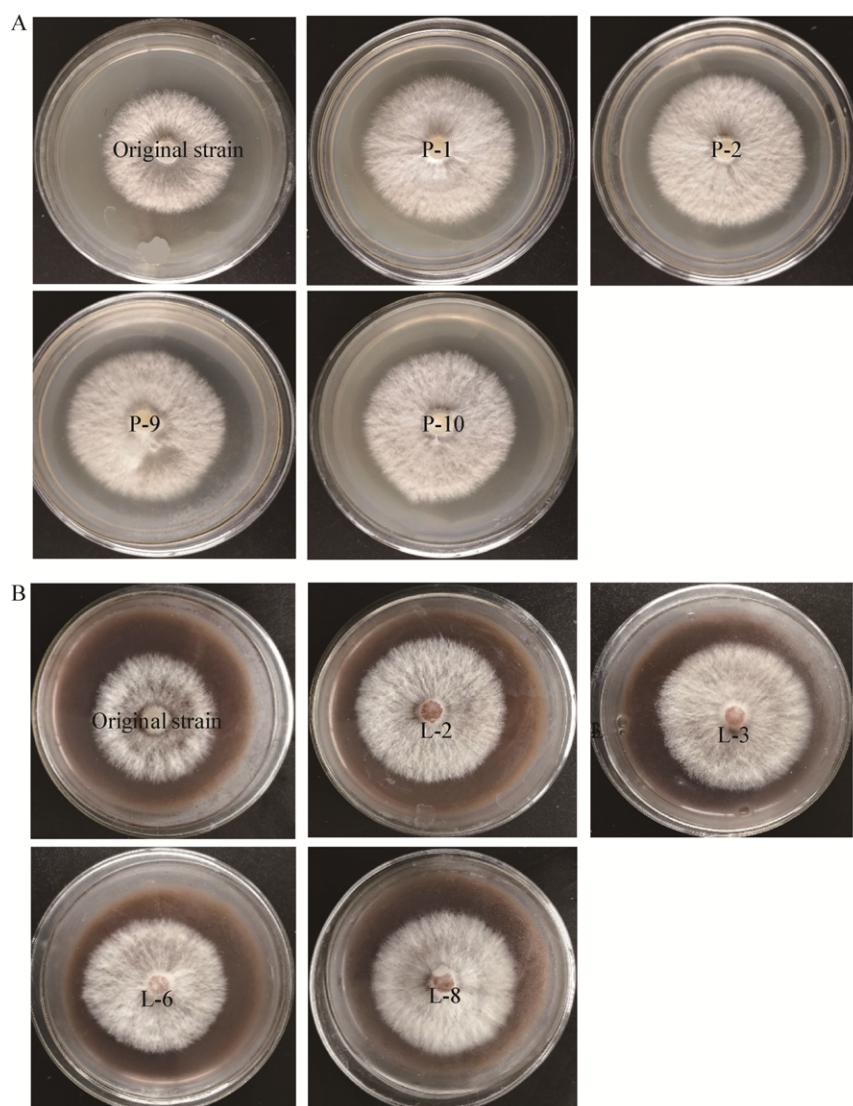


图1 灰树花原始株与复壮株共培养 64 h 后的对比结果

Figure 1 Comparison of the results of *Grifola frondosa* original strain and rejuvenation strains after co-cultivation for 64 hours

注: A: PDA 加富培养基; B: PDA-板栗壳培养基.

Note: A: PDA enriched medium; B: PDA-chestnut shell medium.

2.1.2 复壮株复筛

采用菌丝干重法对初筛中 8 株差异性极显著的复壮株进行复筛, 实验结果见图 2, 菌丝干重与多糖含量呈正相关性, 结果表明复壮株 P-2、P-10、L-2、L-6、L-8 的菌丝干重均能达到 1.1%, 其中复壮株 P-2 复筛效果最佳, 菌丝干重和多糖含量分别达到 1.18% 和 19.01%, 较原始菌株分别提高 35.17% 和 35.11%。

此外, 由图 3 可见, 在复筛过程中发现复壮株的发酵液菌球较小、密度大、较粘稠, 而原始株发酵液菌球较大、发酵液澄清。

2.1.3 发酵罐验证

选取复筛效果最佳的复壮株 P-2 进行发酵罐验证, 同时以原始菌株为对照, 发酵初始 pH 调为 6.0, 溶氧 90%, 发酵数据如图 4 所示。在工艺参数控制方面两罐均未进行 pH 调控, 保持自然生长

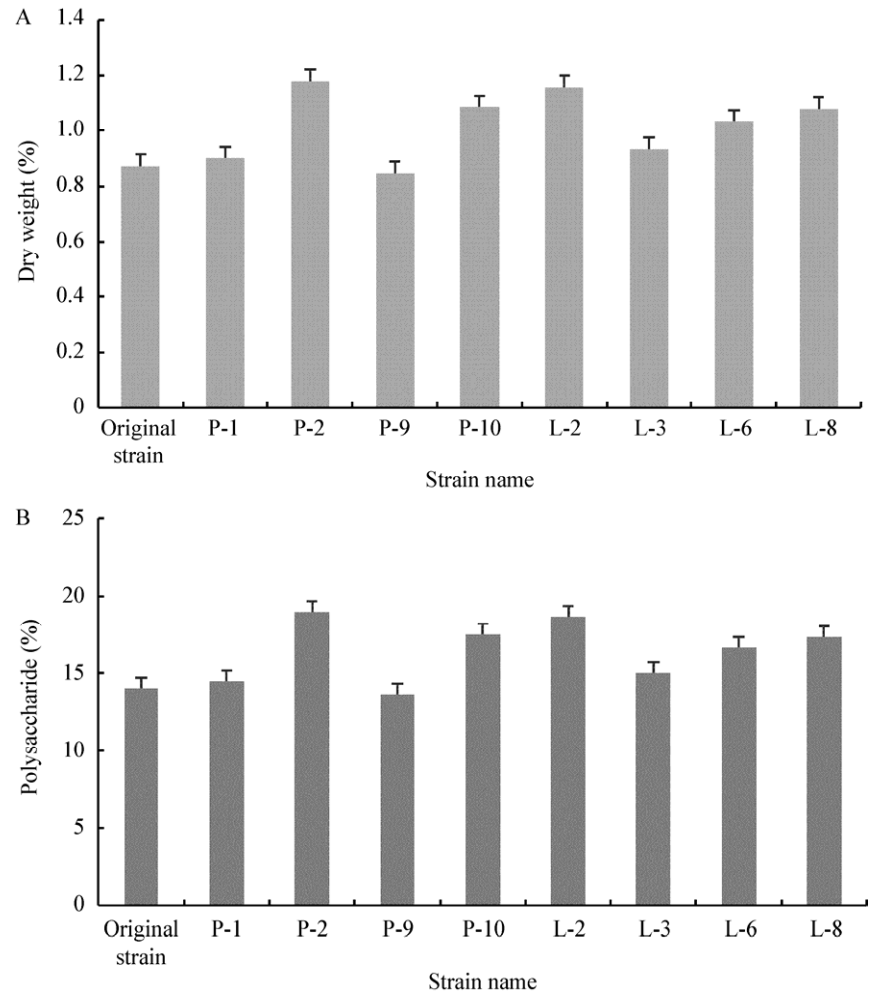


图 2 灰树花原始株和复壮菌株菌丝干重(A)和多糖含量(B)检测结果
Figure 2 Detection results of hyphae dry weight (A) and polysaccharide content (B) of the *Grifola frondosa* original strain and rejuvenation strains

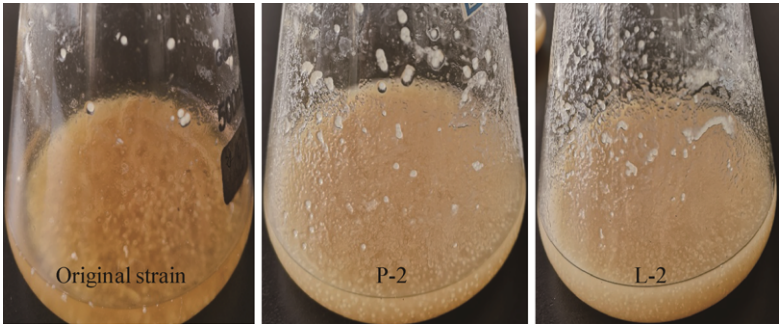


图 3 灰树花原始菌株和复壮株发酵液对比图
Figure 3 Comparison of fermentation broth of the *Grifola frondosa* original strain and rejuvenation strains

状态, 复壮株溶氧和 pH 较原始株下滑快, 而菌丝干重和多糖含量增长速度快, 发酵 32 h 时菌丝干重和多糖含量分别达到 1.363% 和 21.97%, 38 h 取样检测菌丝干重和多糖含量分别为 1.38% 和 22.24%, 菌株发酵 32 h 已基本停止生长, 而出发株发酵 48 h 菌丝干重和多糖含量分别为 0.977 1% 和 15.75%。

与原始菌株相比, 复壮株在发酵罐的发酵周期由 48 h 缩短至 32 h, 菌株发酵活性明显优于原始

菌株, 由此得出通过尖端菌丝分离法进行灰树花菌株的复壮是有效可行的。

2.2 复壮株 P-2 的 ARTP 诱变

2.2.1 菌丝体诱变致死率条件确定

取菌丝干重达 0.5% 的原始菌株 P-2 菌液稀释 10^5 后进行诱变实验, 由图 5 可见菌丝体致死率随着 ARTP 诱变时间的延长而增长, 诱变时间在 90 s 内时致死率呈急剧增长趋势, 90 s 时致死率为 90.81%, 因此确定菌丝体最佳诱变时长为 80–90 s。

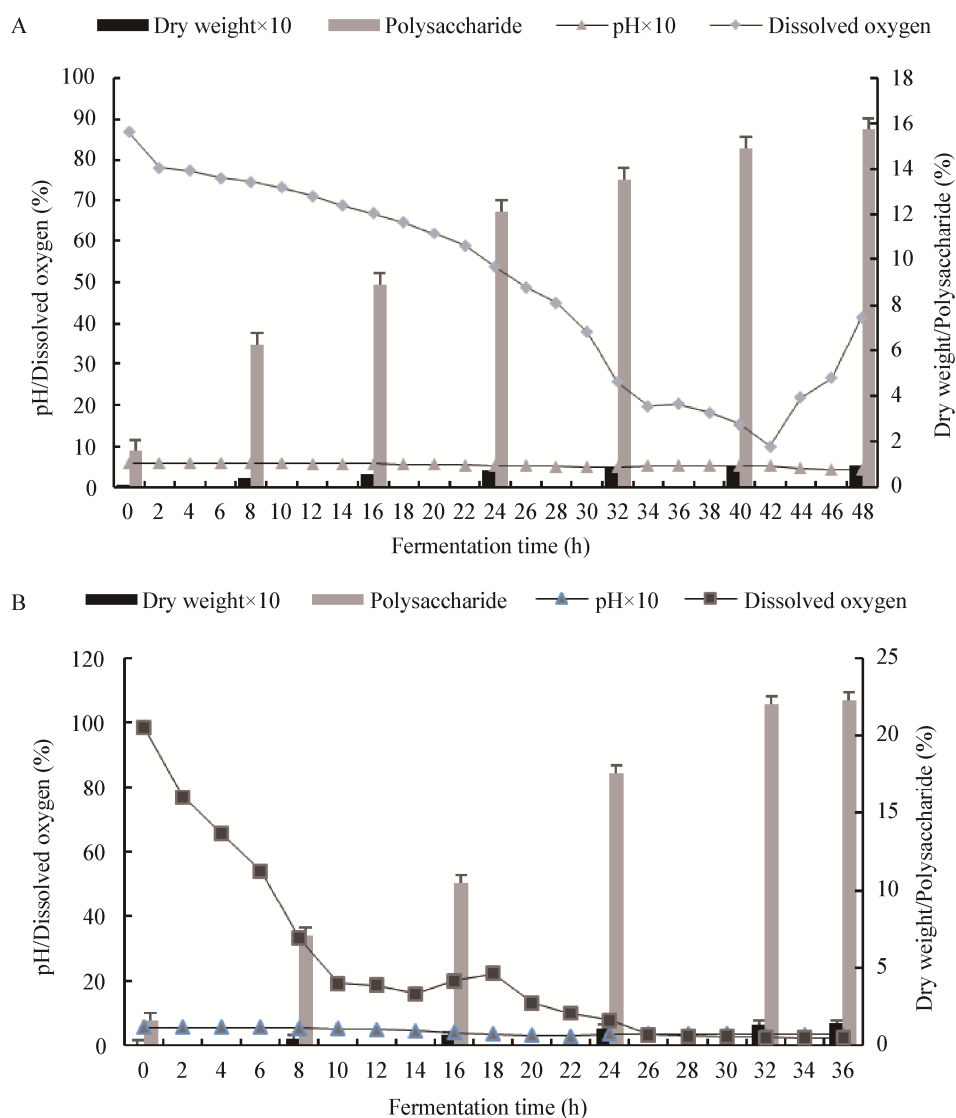


图 4 灰树花原始株(A)和复壮株 P-2 (B)发酵数据

Figure 4 The fermentation data of the *Grifola frondosa* original strain (A) and rejuvenation strain P-2 (B)

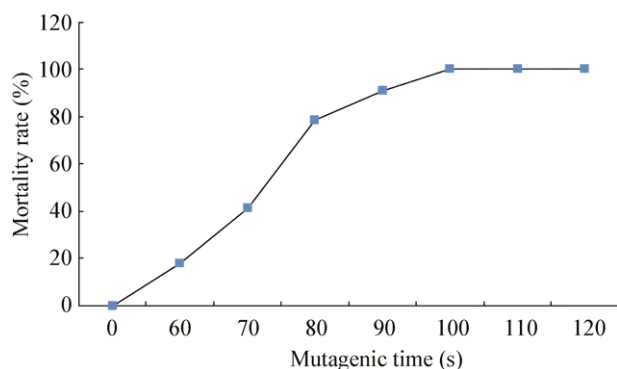


图5 灰树花诱变致死率曲线

Figure 5 Mutant lethality curve of *Grifola frondosa*

2.2.2 ARTP 诱变初筛

以复壮株 P-2 为出发菌株进行诱变筛选, 共分离单菌 330 株, 以出发株为对照进行拮抗实验, 筛选如图 6 所示能够与出发株产生明显拮抗线的变异株, 共筛选到 87 株变异株。表 2 显示初筛得到 35 株具有差异显著性的正突变株, 其中 J-25、b-35 及 J-40 三株变异株的菌丝生长速度均超过 1.1 mm/h。

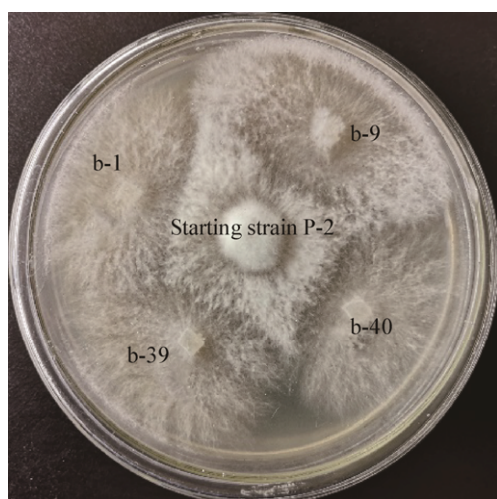


图6 灰树花诱变菌株拮抗实验

Figure 6 The antagonistic experiment of *Grifola frondosa* mutagenic strains

2.2.3 ARTP 诱变复筛

对初筛得到的 35 株突变株进行复筛, 结果见图 7。菌丝干重与多糖含量结果一致, 共筛选到 10 株与出发株有显著差异的正突变株, 其中突变株 b-35 的正突变效果最佳, 菌丝干重和多糖含量分别达到 1.56% 和 25.07%, 较出发株分别提高了 40.15% 和 39.33%。

2.2.4 诱变株 b-35 的传代稳定性

对菌株 b-35 进行了连续的 5 代传代实验以验证其遗传稳定性, 表 3 为 5 代菌株的菌丝干重及多糖含量, 结果表明连续传代 5 代后菌株的菌丝干重及多糖含量无明显差异, 能够将高产性能稳定遗传给后代。

3 讨论与结论

灰树花深层发酵培养液及菌丝体已逐渐成为相关药品和保健食品开发的主要来源, 而灰树花菌种品质的好坏直接决定了发酵效率的高低。菌种由于长期的继代培养或保藏不当会发生整体活力或某些优良性能等减弱甚至丧失^[13], 本文主要通过复壮和诱变两种手段来提高灰树花菌株 Gf932 的性能。灰树花以顶端延长的方式进行生长, 各种有利于生长的营养物质都向顶端聚集, 因此菌丝尖端内的细胞也是最具生命活力的^[23], 菌丝尖端分离法就是以获得具有旺盛生命力的群体为目标, 通过分离培养恢复菌株的生机。此外, 灰树花喜好附着于板栗树生长, 为了实现灰树花菌株复壮的高效性, 在菌株复壮过程中加入板栗壳以丰富灰树花培养基质, 本文通过菌丝尖端分离法对实验室灰树花菌株进行复壮, 复壮后的菌株 P-2 菌丝干重和多糖含量分别达到 1.18% 和 19.01%, 较出发株分别提高 35.17% 和 35.11%, 通过发酵罐发酵验证菌株的发酵周期由 48 h 缩短至 32 h, 菌株发酵活性及效率明显提高。

表 2 灰树花变异株初筛实验结果

Table 2 The initial screening results of *Grifola frondosa* mutagenic strains

编号 No.	菌丝生长速度 Mycelial growth rate (mm/h)	编号 No.	菌丝生长速度 Mycelial growth rate (mm/h)
Starting strain	0.906±0.101	b-30	0.511±0.252
J-27	1.052±0.104***	J-15	0.656±0.147
J-24	1.011±0.069**	J-40	1.065±0.069**
J-16	1.099±0.024***	J-17	1.064±0.181**
J-2	1.058±0.044***	J-11	0.653±0.139
J-14	1.085±0.066***	J-10	0.579±0.199
J-5	1.063±0.039***	b-38	0.705±0.178
J-6	0.573±0.087	b-19	0.699±0.164
J-13	0.681±0.107	b-22	0.653±0.137
J-8	0.581±0.293	b-16	0.611±0.109
J-21	0.706±0.057	S"	1.095±0.123***
J-23	1.024±0.067**	b-29	0.527±0.163
J-29	1.088±0.084***	b-1	1.098±0.111***
J-3	1.055±0.105***	b-14	0.618±0.150
J-22	1.035±0.089**	b-9	0.668±0.183
J-7	0.673±0.122	b-7	0.719±0.110**
J-25	1.316±0.105***	b-2	0.619±0.194
J-19	0.689±0.128	b-10	0.648±0.201
J-4	0.631±0.285	b-41	0.514±0.113**
b-39	0.695±0.109	b-34	0.446±0.054***
b-40	0.657±0.171	J-30	0.532±0.183**
b-4	1.036±0.097**	J-39	1.050±0.121**
b-43	0.663±0.159	J-38	1.045±0.149**
b-32	1.056±0.140**	J-45	1.029±0.154**
b-33	0.652±0.139	J-31	1.052±0.138**
b-25	0.536±0.081	b-21	0.477±0.099
b-8	0.667±0.136	J-41	0.658±0.143
b-36	0.534±0.107	J-36	0.696±0.176*
J-43	0.606±0.122	J-39"	1.050±0.121**
b-33"	0.639±0.137	J-40	1.109±0.099***
b-28	0.493±0.159	J-37	0.621±0.139
S-26	0.698±0.212	S"-5	0.737±0.179
S-33	1.026±0.137*	S-35	0.681±0.148
S-34	0.677±0.162	S-8	1.090±0.144**
S"-2	1.035±0.131*	S-7	0.525±0.136
S-23	0.661±0.163	S"-7	1.056±0.103**
S-24	0.484±0.164	S-19	0.515±0.185
S-12	0.704±0.149	S-20	0.556±0.159
S-14	0.666±0.151	S-1	0.612±0.166
S-17	1.036±0.131*	S-2	0.626±0.184
S-6	1.025±0.170*	S-18	1.014±0.143*
S-4	1.090±0.129**	S-36	1.053±0.132**
S-31	0.641±0.150	S-32	0.688±0.123
b-35	1.143±0.091***	S-13	1.026±0.107*

Note: *: $0.05 \leq P < 0.1$; **: $0.01 \leq P \leq 0.05$; ***: $P \leq 0.01$.

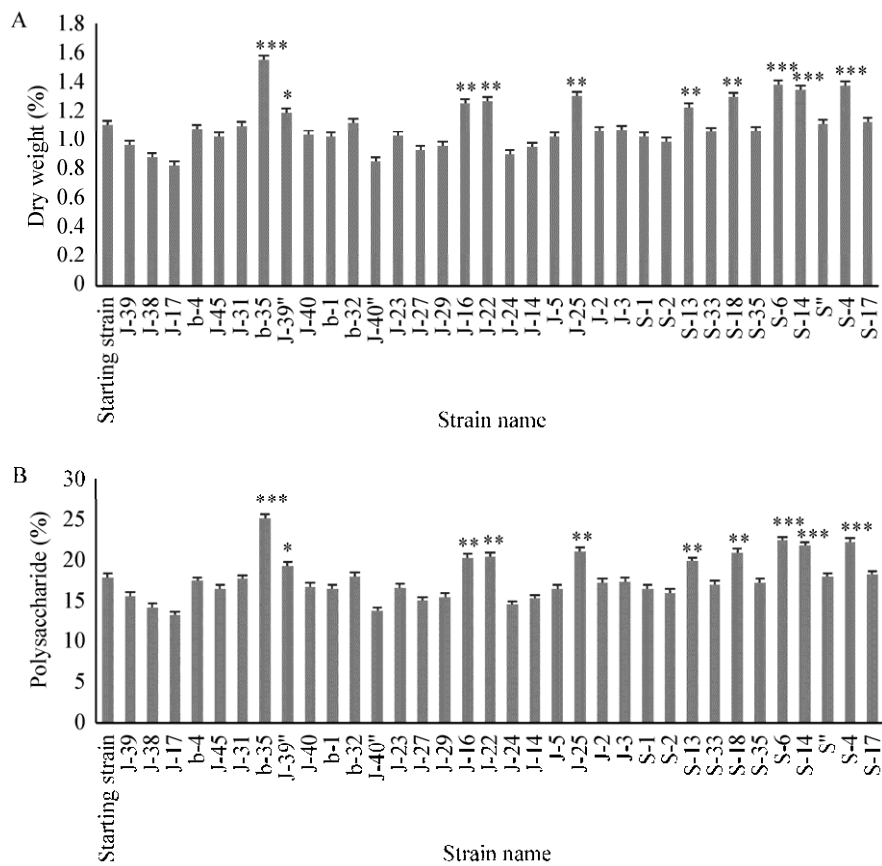


图 7 灰树花突变株复筛结果
Figure 7 The rescreening results of *Grifola frondosa* mutagenic strains
注：A：菌丝干重结果；B：多糖含量结果。

Note: A: Hyphae dry weight results; B: Polysaccharide content results.

表 3 灰树花诱变株 b-35 传代稳定性实验结果
Table 3 The passage stability test results of *Grifola frondosa* mutagenic strain b-35

代数	菌丝干重	多糖含量
Passage	Dry weight (%)	Polysaccharide (%)
T1	1.535±0.031	24.74±0.044
T2	1.506±0.020	24.27±0.029
T3	1.486±0.003	23.95±0.010
T4	1.557±0.021	25.09±0.093
T5	1.516±0.047	24.43±0.007

ARTP 在室温常压下产生的高活性粒子通过改变细胞壁和细胞膜的结构，从而进入细胞引发丰富的遗传物质损伤，并借助体内高容错率的 SOS 修复体系构建突变体库，从中筛选具有遗传稳定性的高效突变株^[16]。本文利用 ARTP 诱变技术作用于复壮株 P-2 菌丝体，最终筛选到一株性能优良、遗传稳定性高的诱变株 b-35，菌丝干重和多糖含量分别达

到 1.56% 和 25.07%，较复壮株 P-2 分别提高了 40.15% 和 39.33%。由此可见，ARTP 技术诱变效率高，是获得灰树花高产菌株的重要方式。

REFERENCES

[1] Kong L, Zhang L, Hu WH, et al. The Chinese edible fungi industry-current status and future predictions[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2016, 23(2): 104-109 (in Chinese)
孔雷, 张良, 胡文洪, 等. 中国食用菌产业现状及预测[J]. *食用菌学报*, 2016, 23(2): 104-109

[2] Guo JR, Wang WG, Li L, et al. An outline for the research of *Grifola frondosa*[J]. *Edible Fungi*, 2010, 32(4): 1-2,13 (in Chinese)
郭家瑞, 王卫国, 李磊, 等. 灰树花研究概述[J]. *食用菌*, 2010, 32(4): 1-2,13

[3] Bian S, Ye BP, Xi T, et al. Progress on the studies of grifolan from *Grifola frondosa*[J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2004, 11(1): 60-63 (in Chinese)
边杉, 叶波平, 奚涛, 等. 灰树花多糖的研究进展[J]. *药物生物技术*, 2004, 11(1): 60-63

- [4] Xu ZP, Liu HP, Sheng SG. Immunomodulation and antitumor activity of *Grifola frondosa* polysaccharide[J]. Microbiology China, 1999, 26(2): 156 (in Chinese)
徐泽平, 刘海鹏, 生寿国. 灰树花多糖的免疫调节和抗肿瘤活性[J]. 微生物学通报, 1999, 26(2): 156
- [5] Preuss HG, Echard B, Bagchi D, et al. Enhanced insulin-hypoglycemic activity in rats consuming a specific glycoprotein extracted from maitake mushroom[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2007, 306(1/2): 105-113
- [6] Preuss HG, Echard B, Bagchi D, et al. Maitake mushroom extracts ameliorate progressive hypertension and other chronic metabolic perturbations in aging female rats[J]. International Journal of Medical Sciences, 2010, 7(4): 169-180
- [7] Cui FJ. Study on fermentation optimization and anti-tumor polysaccharide-peptide of *Grifola frondosa* GF9801[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2006 (in Chinese)
崔凤杰. 灰树花深层发酵条件优化及其菌丝体抗肿瘤糖肽的研究[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2006
- [8] Kodama N, Murata Y, Asakawa A, et al. Maitake D-fraction enhances antitumor effects and reduces immunosuppression by mitomycin-C in tumor-bearing mice[J]. Nutrition, 2005, 21(5): 624-629
- [9] Gu SM, Sun Y, Wang LJ, et al. Fermentative production for *Grifola frondosa* mycelia[J]. Industrial Microbiology, 2003, 33(4): 1-4 (in Chinese)
顾顺明, 孙晔, 王潞江, 等. 发酵法生产灰树花菌丝体的研究[J]. 工业微生物, 2003, 33(4): 1-4
- [10] Chen XX. Study on fermentation conditions affecting the mycelial growth and polysaccharide biosynthesis of *Grifola frondosa*[D]. Zhenjiang: Master's Thesis of Jiangsu University, 2016 (in Chinese)
陈潇筱. 发酵环境影响灰树花菌丝体生长和多糖合成的研究[D]. 镇江: 江苏大学硕士学位论文, 2016
- [11] Konno S. Potential growth inhibitory effect of maitake D-fraction on canine cancer cells[J]. Veterinary Therapeutics: Research in Applied Veterinary Medicine, 2004, 5(4): 263-271
- [12] Wang FJ, Zhou XY, Pan K. Detoxification rehabilitation and cultivation experiment of white *Flammulina* mushroom strains[J]. Edible Fungi, 2015(4): 20-21 (in Chinese)
王锋尖, 周向宇, 潘坤. 白色金针菇菌株脱毒复壮与栽培试验[J]. 食用菌, 2015(4): 20-21
- [13] Liu HY, Dong YX, Zhou YB, et al. Degradation and rejuvenation of edible fungi[J]. Edible Fungi, 2003, 25(6): 16-17 (in Chinese)
刘海英, 董月香, 周廷斌, 等. 食用菌菌种的退化及复壮[J]. 食用菌, 2003, 25(6): 16-17
- [14] Wang BQ, Xu ZP, Yang CL. Effects of different aeration methods on liquid submerged fermentation of *Grifola frondosa*[J]. Food and Fermentation Industries, 2010, 36(4): 136-137 (in Chinese)
王宝琴, 徐泽平, 杨传伦. 不同通气方式对灰树花液态深层发酵的影响[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(4): 136-137
- [15] Qu Z. Isolation purification screening and application of high quality and high yield *Wolfiporia cocos* in Guizhou[D]. Guiyang: Master's Thesis of Guizhou University, 2007 (in Chinese)
屈直. 贵州优质高产茯苓菌株分离纯化筛选及应用研究[D]. 贵阳: 贵州大学硕士学位论文, 2007
- [16] Zhang X, Zhang XF, Wang LY, et al. Recent progress on atmospheric and room temperature plasma mutation breeding technology and its applications[J]. CIESC Journal, 2014, 65(7): 2676-2684 (in Chinese)
张雪, 张晓菲, 王立言, 等. 常压室温等离子体生物诱变育种及其应用研究进展[J]. 化工学报, 2014, 65(7): 2676-2684
- [17] Zhang X, Zhang C, Zhou QQ, et al. Quantitative evaluation of DNA damage and mutation rate by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) and conventional mutagenesis[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(13): 5639-5646
- [18] Ren X, Jia L, Yang FL, et al. Research progress on the protoplast fusion technique in edible mushroom breeding[J]. Biotechnology Bulletin, 2008(2): 42-44, 53 (in Chinese)
任轩, 贾乐, 杨凤苓, 等. 食用菌原生质体融合育种研究进展[J]. 生物技术通报, 2008(2): 42-44, 53
- [19] Peng WH, Zheng LY, Gan BC, et al. Studies on protoplast fusion technique in the breeding of *Ganoderma lucidum* strains of HH series[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2006, 19(3): 498-501 (in Chinese)
彭卫红, 郑林用, 甘炳成, 等. 灵芝原生质体融合HH系列菌株的选育研究[J]. 西南农业学报, 2006, 19(3): 498-501
- [20] Xu ZX, Li G, Li BJ. UV induced mutagenesis of *Grifola frondosa*[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2004, 43(2): 84-87 (in Chinese)
徐志祥, 李刚, 李宝健. 灰树花紫外诱变育种研究[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2004, 43(2): 84-87
- [21] Yang SB. A comparative study of composition and polysaccharide in fruiting bodies and submergedly cultured mycelia of *Grifola frondosa*[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2012 (in Chinese)
杨生兵. 灰树花子实体和发酵菌丝体成分及多糖比较研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2012
- [22] Li YN. Study on *Grifola Frondosa*'s mutagenesis, liquid fermentation and product's properties[D]. Zhenjiang: Master's Thesis of Jiangsu University, 2013 (in Chinese)
李亚楠. 灰树花菌种诱变及发酵和产物性能研究[D]. 镇江: 江苏大学硕士学位论文, 2013
- [23] Huang LS. Modern Edible Fungus Production Technology[M]. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press, 2011: 1-76 (in Chinese)
黄良水. 现代食用菌生产新技术[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2011: 1-76