

冬虫夏草无性型菌丝体的原生质体制备条件研究

潘丹丹, 肖岩岩, 陈超, 张磊, 李春如*

(安徽农业大学微生物防治省重点实验室, 合肥 230036)

摘要: 以冬虫夏草无性型中国被毛孢为原材料, 通过液体培养获得菌丝体, 经酶解处理后在不同条件下获得原生质体, 以研究酶的种类及浓度、渗透压稳定剂及浓度、酶液 pH 值以及酶解时间等不同因素对中国被毛孢原生质体制备的影响。结果显示, 中国被毛孢菌株原生质体的最佳制备条件为: 使用浓度配比如分别为 4 和 3 mg·mL⁻¹ 的 Yatalase 和 Glucanex 酶, 在 1.0 mol·L⁻¹ KCl 作为渗透压稳定剂, 酶液 pH 值为 6, 酶解 3 h, 所得原生质体量最多。

关键词: 冬虫夏草; 中国被毛孢; 原生质体; 制备条件

中图分类号: S476.12; Q933

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2012)05-0793-05

Conditions for protoplast preparation of *Ophiocordyceps sinensis*

PAN Dan-dan, XIAO Yan-yan, CHEN Chao, ZHANG Lei, LI Chun-ru

(Anhui Provincial Key Laboratory of Microbial Control, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: The mycelia of *Hirsutella sinensis*, the anamorph of *O. sinensis*, were cultured in liquid flasks and the different parameters for protoplast preparation of *H. sinensis* were investigated including the enzyme type and its concentration, stabilizer of osmotic pressure and its concentration, pH value of the enzyme and the enzymolysis time. The results showed that protoplasts were obtained with the highest yield of protoplast under the conditions as follows: digested by Yatalase enzyme of 4 mg/ml and Glucanex enzyme of 3 mg·mL⁻¹, 1.0 mol·mL⁻¹ KCl as osmotic stabilizer, pH value of enzyme of 6.0 and enzymatic hydrolysis for 3 h.s

Key words: *Ophiocordyceps sinensis*; *Hirsutella sinensis*; protoplast; preparation condition

冬虫夏草 (*Ophiocordyceps sinensis* (Berk.) Sung et al.) 别名虫草、冬虫草、夏草冬虫, 其无性型为中国被毛孢 (*Hirsutella sinensis* Liu, Guo, Yu & Zeng)^[1]。研究者大多集中在对冬虫夏草发酵工艺^[2-3]、发酵液和发酵菌丝中的药用成分, 以及冬虫夏草生药有效成分的研究^[4]。随着人们研究的深入, 对冬虫夏草的研究扩展到多个领域, 其中包括体细胞融合杂交育种^[5]、交配型基因及菌株遗传变异性^[6]等。

近几年, 许多学者对虫生真菌的原生质体制备进行了不同程度的研究, 使得原生质体技术在虫生真菌的研究领域有了较快的发展^[7]。原生质体制备的关键是去除细胞壁, 以形成大量的原生质体, 一般选择酶解的方法去除细胞壁。在原生质体制备的过程中, 影响原生质体产量及质量的因素有很多,

如: 菌龄的选择; 制备酶解液时, 酶体系的选择、渗透压稳定剂的选择、pH 值、酶解液的浓度等; 酶解时, 酶解菌丝与酶解液的比例、菌丝与酶解液接触的程度、酶解时间、酶解时的温度等^[8]。

研究原生质体制备条件具有重要意义。原生质体技术可能是揭示真菌杂交奥秘的有用工具^[9], 且已被应用到真菌遗传学研究和菌种选育工作中, 并取得了一定成果^[10]。近年来, 原生质体融合和原生质体诱变技术在虫草属真菌育种方面引起了大家极大兴趣^[11-14], 而冬虫夏草遗传育种方面的研究论文并不多见, 且部分论文所用菌株来源值得商榷^[15-16]。

本试验在本实验室研究的基础上对冬虫夏草原生质体制备条件进行了探索, 并筛选出了冬虫夏草无性型中国被毛孢的原生质体最佳制备条件。这为

收稿日期: 2012-03-28

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目 (863 计划) (2007AA021506) 和教育部留学回国人员科研启动基金 (2009 年) 共同资助。。

作者简介: 潘丹丹, 女, 硕士研究生。

* 通讯作者: 李春如, 男, 博士, 教授。E-mail: chunruli@hotmail.com

高产菌株的筛选、子实体的人工培育、虫草资源的保护等研究提供了重要的技术参数并奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及其来源

供试的40个菌株,于2009年5月采自青海省青沙山,其中有10株为子囊单孢子分离法获得的子囊单孢子菌株,22株系组织分离(13株分离自冬虫夏草子座,9株分离自冬虫夏草菌核),7株系子囊孢子弹射后分离所得,1号菌株来自上海。以上分离所得菌株经纯化、鉴定后,保存于安徽农业大学微生物防治省重点实验室。

1.2 主要培养基

1.2.1 水琼脂分离培养基配方 琼脂粉15g,最后加蒸馏水定容为1000mL,灭菌冷却至40~50℃加入0.04%的青霉素和0.1%的盐酸链霉素。

1.2.2 PDA分离培养基配方 去皮马铃薯200g,切成小块,加水煮沸20min,两层纱布过滤,加葡萄糖20g,琼脂粉15g,最后加蒸馏水定容为1000mL。灭菌后加入0.04%的青霉素和0.1%的盐酸链霉素。

1.2.3 液体培养基 去皮马铃薯200g,切成小块,加水煮沸20min,两层纱布过滤,加葡萄糖10g,麦芽糖40g,蛋白胨10g,酵母浸出粉10g, KH_2PO_4 3g, MgSO_4 1.5g,柠檬酸三胺0.4g,复合维生素B片4片,最后加蒸馏水定容为1000mL。

1.2.4 固体培养基 其它成分同液体培养基,另外加琼脂粉15g,最后加蒸馏水定容为1000mL。

1.2.5 所需溶液 (1)磷酸钠缓冲液(pH7.0):10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2HPO_4 387mL,10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaH_2PO_4 613mL。

(2)等渗溶液:加入渗透压稳定剂的磷酸钠缓冲液。

(3)酶液的配制:取细胞降解酶 Yatalase(Ozeki, Japan)和 Glucanex (Novozyme),加入渗透压稳定剂和10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸钠缓冲液(pH 7.0)。并用0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,放入冰箱备用。

1.3 酶解所需菌丝体的制备

固体培养基中的中国被毛孢菌株大量产生分生孢子后,用解剖刀切取平板表面菌落(由于菌丝生长过于紧密且质地较硬,往往会刮取菌落表面菌丝),加入6mL含0.05% Tween-80的无菌水,在涡旋混合器上充分振荡,再用玻璃丝棉过滤除菌丝,用血球计数板测定滤液中的分生孢子浓度,保证孢子浓度达到 1×10^7 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 。取分生孢子悬浮液接种于液体摇瓶培养液中,放置于恒温振荡培养箱(18

℃,150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)振荡培养,培养至产生大量的白色小菌球。将培养物经纱布过滤所得的菌丝,用无菌水洗涤,3000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10min,弃除上清液,用渗透压稳定剂洗涤3次,吸干多余水分,备用。

1.4 原生质体的制备

将预处理所得的菌丝按菌丝湿重/g:酶液/mL为1:3的比例,加入配置好的酶液在恒温振荡培养箱中(120 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)进行酶解,然后吸取一定量的酶解液用血球计数板在显微镜计数。

1.4.1 酶解体系的筛选 Yatalase (Ozeki, Japan)和 Glucanex (Novozyme) 2种酶和两者组成的混合酶以及蜗牛酶、纤维素酶和溶壁酶的混合酶进行比较试验,本实验设计的4种酶体系分别为:溶壁酶2.33 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ +蜗牛酶2.33 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ +纤维素酶2.33 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; Yatalase 3.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ +Glucanex 3.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; Glucanex 7 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; Yatalase 7 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。在其它条件相同的情况下,酶解相同的时间后,用血球计数板计数并统计产生的原生质体数。

1.4.2 同种酶解体系中酶的不同浓度配比的筛选 在筛选出最佳酶解体系的基础上筛选出酶的最佳浓度配比,4种浓度配比分别为 Yatalase 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ +Glucanex 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; Yatalase 3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ +Glucanex 4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; Yatalase 4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ +Glucanex 3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; Yatalase 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ +Glucanex 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。酶解相同的时间后取样用血球计数板计数,并统计产生的原生质体数,计算出最佳的浓度配比。

1.4.3 酶解时间的筛选 在最佳酶解体系、最佳酶解浓度配比下,筛选最佳酶解时间。菌丝和酶液预热后混匀进行酶解,酶解1.0h后每半小时取样,即酶解时间分别为1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5和4.0h时取样计数,测定最佳酶解时间。

1.4.4 酶液pH的筛选 原生质体的产量受酶液pH值的影响,分别配制pH值为5、6、7和8的酶液,控制其他条件不变,在最适酶解时间时,进行取样观察原生质体产生的数量。

1.4.5 渗透压稳定剂的筛选 在其它条件相同的基础上,酶液制备中加入6种不同的渗透压稳定剂:KCl、NaCl、 MgSO_4 、甘露醇、山梨醇、蔗糖,取样后用血球计数板计数并统计产生的原生质体数,确定最佳的渗透压稳定剂种类。

1.4.6 渗透压稳定剂浓度的筛选 在确定了最适渗透压稳定剂种类后,分别取0.6、0.8、1.0和1.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 4种不同浓度的渗透压稳定剂,配置等量的酶液,分别酶解等量的菌丝,在最佳酶解时间时取样,用血球计数板计数并统计产生的原生质体数。

2 结果与分析

2.1 菌种分离结果鉴定

分离得到的菌株培养一段时间产生分生孢子后, 观察发现菌落表面呈绒毛状, 淡黄色, 质地较紧密, 菌落周围及背面有色素产生, 呈黄褐色(图 1)。在显微镜下观察其产孢结构及孢子的结构与形态特征(图 2), 符合有关文献所描述的中国被毛孢菌种的鉴定特征, 从而证明分离获得的菌株是中国被毛孢。

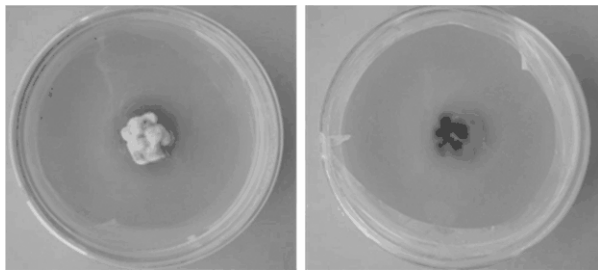


图 1 中国被毛孢 PDA 平板菌落

Figure 1 Colonies of *Hirsutella sinensis* on the PDA plate

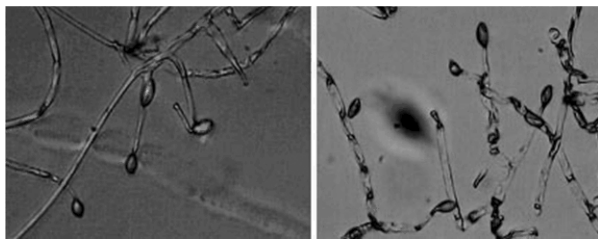


图 2 中国被毛孢的产孢结构和分生孢子

Figure 2 Conidiogenous structure and conidia of *Hirsutella sinensis*

2.2 酶解体系的筛选

选取 4 种常用酶体系作为此次筛选实验所用的体系, 在其它酶解条件都基本相同的条件下探讨不同酶解体系对酶解效果的影响。从表 1 可以看出, Yatalase 和 Glucanex 酶解液效果最好, 原生质体的产量最高。总体上 Yatalase 和 Glucanex 的单一酶和混合酶的酶解液均比溶壁酶+蜗牛酶+纤维素酶的酶解效果好。Yatalase 和 Glucanex 单一作用时, Yatalase 的作用效果大于 Glucanex。

2.3 同种酶解体系中酶的不同浓度配比的筛选

在最适的 Yatalase 和 Glucanex 酶解体系下进行筛选, 菌丝在 4 种不同浓度配比的条件下酶解 3 h, Yatalase 和 Glucanex 的浓度配比分别如下: Yatalase 2 mg·mL⁻¹+ Glucanex 5 mg·mL⁻¹; Yatalase 3 mg·mL⁻¹+ Glucanex 4 mg·mL⁻¹; Yatalase 4 mg·mL⁻¹+ Glucanex 3 mg·mL⁻¹; Yatalase 5 mg·mL⁻¹+ Glucanex 2

mg·mL⁻¹。4 种浓度组合下酶解效果如表 2 所示。菌株在 Yatalase 4 mg·mL⁻¹+ Glucanex 3 mg·mL⁻¹ 的浓度配比下酶解效果最好。同时随着 Yatalase 浓度配比的增加, 产生原生质体的量也逐渐增多, 但当 Yatalase 和 Glucanex 浓度配比达到 Yatalase 5 mg·mL⁻¹+ Glucanex 2 mg·mL⁻¹ 时, 产生的原生质体的量开始减少, 这说明在酶解体系中酶之间浓度配比也很重要。

表 1 酶解体系的筛选

Table 1 The screening of enzyme system

酶液浓度 Enzyme concentration	原生质体产量/个·mL ⁻¹ The yield of protoplast
溶壁酶 2.33 mg·mL ⁻¹ +蜗牛酶 2.33 mg·mL ⁻¹ +纤维素酶 2.33 mg·mL ⁻¹	1.95×10 ⁶
Yatalase 3.5 mg·mL ⁻¹ + Glucanex 3.5 mg·mL ⁻¹	1.87×10 ⁷
Yatalase 7 mg·mL ⁻¹	1.6×10 ⁷
Glucanex 7 mg·mL ⁻¹	4.75×10 ⁶

表 2 同种酶解体系中酶的不同浓度配比筛选

Table 2 The screening of enzymes with different concentrations in different proportions

酶的不同浓度配比 Enzymes with different concentrations in different proportions	原生质体产量/个·mL ⁻¹ The yield of protoplast
Yatalase 2 mg·mL ⁻¹ + Glucanex 5 mg·mL ⁻¹	1.20×10 ⁶
Yatalase 3 mg·mL ⁻¹ + Glucanex 4 mg·mL ⁻¹	2.20×10 ⁶
Yatalase 4 mg·mL ⁻¹ + Glucanex 3 mg·mL ⁻¹	2.55×10 ⁶
Yatalase 5 mg·mL ⁻¹ + Glucanex 2 mg·mL ⁻¹	1.85×10 ⁶

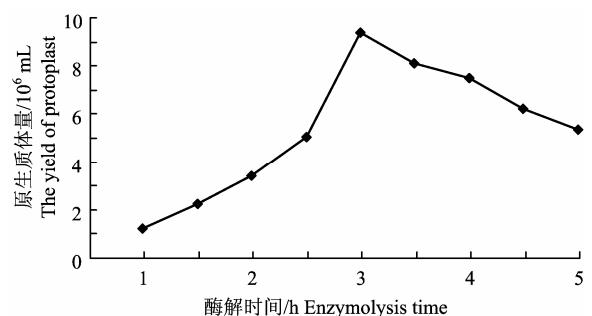


图 3 酶解时间对原生质体形成的影响

Figure 3 The effect of enzymolysis time on the formation of protoplast

2.4 酶解最佳时间的筛选

在最佳酶解体系和最佳酶解浓度配比的基础上, 进行不同处理时间的酶解, 结果如图 3 所示。在酶的作用下, 菌丝酶解 0.5 h 即有一定数量的原生质体产生, 随后随着时间的推移, 原生质体的量逐渐增加, 1 h 到 2 h 内原生质体量缓慢增加, 2.5 h

到 3 h 原生质体质量急剧增加, 到 3 h 时达到最大值, 3 h 后原生质体质量开始线性降低。可知, 原生质体质量并不是随着酶解时间增加而增加, 随着酶解时间增加到一定程度, 原生质体质量便开始减少。

酶解时间是制备原生质体又一个重要因素。酶作用时间不够, 原生质体不能得到充分释放。但酶作用时间过长, 原生质体膜稳定性降低, 导致原生质体破碎。

2.5 酶液 pH 值的筛选

酶对 pH 值很敏感, 所以在原生质体制备过程中, pH 值也是一个很大的影响因素。在所有筛选过的最佳条件下进行最适酶液 pH 值的筛选, 不同酶液的 pH 值对原生质体制备的影响如下表 3。由表 3

表 3 酶的 pH 对原生质体形成的影响

Table 3 The effect of pH of enzyme on the formation of protoplast

项目 Item	酶液 pH 值 pH value of enzyme			
	5.0	6.0	7.0	8.0
所得的原生质体量/mL The yield of protoplast	5.00×10^6	6.65×10^6	3.00×10^4	2.00×10^4

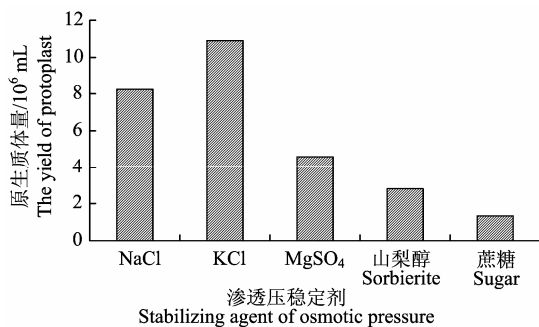


图 4 渗透压稳定剂对原生质体的影响

Figure 4 The effect of stabilizing agent of osmotic pressure on the formation of protoplast

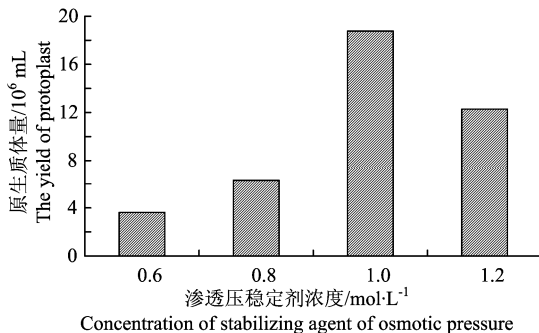


图 5 渗透压稳定剂浓度对原生质体量的影响

Figure 5 The effect of concentration of stabilizing agent of osmotic pressure on the formation of protoplast

2.7 渗透压稳定剂浓度对原生质体制备的影响

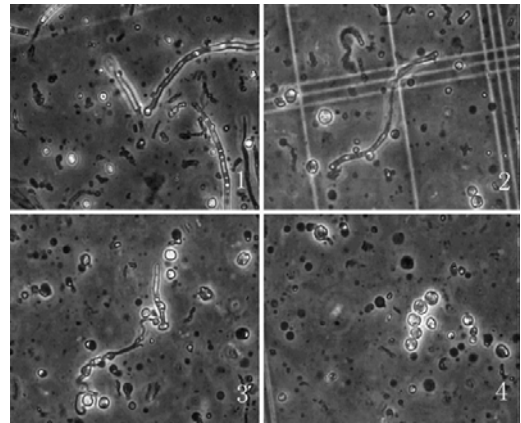
选取最适的渗透压稳定剂 KCl 来配制酶液, 在所有筛选的最佳条件下, 进行最佳渗透压稳定剂 KCl 浓度筛选, 3 h 后观察, 血球计数板计数并统计产生的原生质体数, 得到结果如图 5。可以看出 1.0

可知, 酶液 pH 值对原生质体的形成有很大的影响。在 pH 值为 6 时酶解产生的原生质体质量最多。中国被毛孢原生体制备的适宜环境偏酸性, 酶液 pH 值在 5~6 对原生质体制备率的影响不大。

2.6 渗透压稳定剂的筛选

酶液制备中加入 6 种不同的 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 渗透压稳定剂: KCl、NaCl、MgSO₄、甘露醇、山梨醇、蔗糖, 放入 25℃ 摇床内酶解 3 h, 用血球计数板计数观察。从图 4 可以看出, 使用 KCl 作为渗透压稳定剂配制酶液得到的原生质体质量最高, 且总体看来, 无机盐作为渗透压稳定剂所得的原生质体数量明显高于有机化合物。

$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KCl 为中国被毛孢原生体制备的最适浓度。渗透压稳定剂起着维持原生质体膜内外渗透压平衡作用, 浓度过高过低都不利于原生质体的稳定。



1. 顶端释放; 2. 侧位释放; 3. 端位释放; 4. 原位释放
1. Releasing at the top; 2. Releasing at the lateral position; 3. Releasing at the both ends; 4. Releasing at the normal position

图 6 中国被毛孢原生质体的形成

Figure 6 The formation of protoplast of *Hirsutella sinensis*

2.8 最佳制备条件的验证

根据上述单因素实验得到的最佳制备条件设计试验, 原生质体的产量是最初制备条件的 2.49 倍。说明此实验筛选出的中国被毛孢原生质体最佳制备条件为较优条件, 可以进行大规模制备。

2.9 原生质体产生方式观察

从图 6 中可以看出, 在菌丝酶解过程中原生质体主要有 3 种释放方式。图 6-1 中, 菌丝顶端膨大

后细胞壁破裂, 出现孔洞, 从孔洞里释放出原生质体, 原生质体释放后呈球形, 这种释放方式称为原生质体的顶端释放; 从图 6-2 可以观察到原生质体从菌丝的侧壁溢出, 称为原生质体的侧位释放; 菌丝酶解一段时间后, 菌丝裂解成许多菌丝段, 在菌丝段的一端或两端释放原生质体, 如图 6-3, 为菌丝段的端位释放, 也可称为另一个时期的顶端释放; 同时在图 6-4 还能发现原生质体的另一种释放方式, 即原位释放。主要是菌丝酶解后期菌丝的细胞壁整个被酶解, 原生质体在其原位形成自然的球形, 原生质体原位释放后呈串珠状排列。

3 讨论

本试验通过酶的种类, 酶的各种成分配比, 酶解时间, 酶液 pH 值, 渗透压稳定剂种类和浓度等主要因素探讨了中国被毛孢原生质体制备的条件。然而原生质体的形成受多种因素的影响, 如提纯原生质体时, 由于不断的离心过滤也有可能破坏原生质体的完整性。而且在酶的使用上有很多值得注意的地方, 活性高, 且使用方便的细胞壁溶解酶是原生质体制备的关键。

各种不同生物的细胞壁组成存在一定的差异, 所以破壁需要的酶的种类和浓度配比也不尽相同。本试验中 Yatalase 和 Glucanex 混合酶较一般常用的溶壁酶+蜗牛酶+纤维素酶的酶解效果好, 所得的原生质体量更多。在相同种类的酶解混合液下, 不同酶的浓度配比不同, 酶解效果也不相同, 可能是由于混合酶液中的各种酶在酶解过程中有差别的起作用。在本试验中 Yatalase 较 Glucanex 在中国被毛孢的原生质体制备过程中起了更重要的作用, 所以在一定范围内随着 Yatalase 浓度配比的增加, 酶解的原生质体量也有所增加。

酶解时间对原生质体的制备率有影响, 试验结果表明体系最适酶解时间是 3 h, 刚开始分离的原生质体数量随着时间的延长而增加, 但随着反应时间的延长, 分离的原生质体数量的增加不再明显, 而是缓慢增加, 在达到一定时间后其数量开始下降。主要是酶解时间过短导致菌丝与酶液接触时间不充分, 而时间过长又导致了原生质体的破裂。

渗透压稳定剂对原生质体的制备非常重要, 渗透压稳定剂可以使原生质体内部的渗透压与环境渗透压保持平衡, 防止原生质体破裂, 是试验中保证分离的原生质体数量和质量的一个非常重要因素。本试验的渗透压稳定剂中无机盐明显较有机化合物

所得原生质体量多, 这也正符合有关文献所描述的, 无机盐做渗透压稳定剂更有利于丝状真菌菌丝原生质体的产生^[17]。渗透压稳定剂的浓度直接影响释放后的原生质体的稳定性, 浓度过低会使原生质体涨破, 数量减少; 浓度过高, 也不利于原生质体稳定。

本试验在研究菌丝酶解过程中发现原生质体主要有 3 种释放方式, 即顶端释放, 侧位释放, 原位释放, 但是不同产生方式是否与酶液组合、酶解时间和菌丝菌龄等有关有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Sung G H, Hywel-Jones N L, Sung J M, et al. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi [J]. *Studies in Mycol*, 2007, 57: 5-59.
- [2] Li C R, Li Z Z, Fan M Z. The composition of *Hirsutella sinensis*, anamorph of *Cordyceps sinensis*[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2006, 19(8): 800-805.
- [3] 葛飞, 李春如. 不同培养条件对中国被毛孢胞内核普类组分的影响[J]. *菌物学报*, 2007, 26(2): 234-242.
- [4] 刘彦威, 刘娜, 刘利强. 冬虫夏草有效成分的研究进展[J]. *动物医学进展*, 2004, 25(3): 51-53.
- [5] Holliday J C, Cleaver P, Loomis-Powers M, et al. Analysis of quality and techniques for hybridization of medicinal fungus *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. (Ascomycetes)[J]. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2004, 6: 151-164.
- [6] Zhang Y J, Xu L L, Zhang S, et al. Genetic diversity of *Ophiocordyceps sinensis*, a medicinal fungus endemic to the Tibetan Plateau: implications for its evolution and conservation[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2009, 9: 290.
- [7] 徐莉. 六株细脚拟青霉原生质体制备和染色体核型研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2009.
- [8] 汪晓燕. 几株蛹草拟青霉原生质体制备及染色体核型研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2010.
- [9] 蒲蛰龙, 李增智. 昆虫真菌学[M]. 合肥: 安徽科技出版社, 1996.
- [10] 鹿桂花, 陈恒雷, 吕杰, 等. 食用菌原生质体技术的研究进展[J]. *生物技术*, 2008, 18(1): 87-89.
- [11] 陈晓琳. 两种虫草无性型原生质体融合及蜂头虫草发酵条件的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2001.
- [12] Yokoyama E, Yamagishi K, Hara A. Heterothallism in *Cordyceps takaomontana*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 250: 145-150.
- [13] 周洪英, 边银丙. 蛹虫草虫草素高产原生质体融合子鉴定与筛选[J]. *食用菌学报*, 2007, 14(2): 65-70.
- [14] 陈宏伟, 陈安徽. 原生质体诱变选育高富硒冬虫夏草菌株的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2009, 35(3): 15-18.
- [15] 张华, 钱秀萍, 袁萍. 冬虫夏草原生质体形成和再生的初步研究[J]. *生物技术*, 2004, 14(2): 49-50.
- [16] 贾乐. 冬虫夏草原生质体育种及液体富 Zn、Se、Ge 研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2006.
- [17] 张志光, 李东屏, 邹寿长, 等. 丝状真菌原生质体技术的研究(VIII)[J]. *湖南师范大学: 自然科学版*, 1998, 21(1): 67-71.