

doi: 103969/j.issn.0490-6756.2016.11.040

双孢蘑菇担孢子⁶⁰Co-γ射线诱变效应初步研究

田 鸿¹, 张小平¹, 余桂荣², 李前红¹

(1. 四川农业大学资源学院, 成都 611134; 2. 四川省农业科学院生物技术核技术研究所, 成都 610066)

摘要: 本文研究了放射性同位素⁶⁰Co-γ不同辐照剂量对双孢蘑菇担孢子的诱变效应, 结果表明, 试验设定的6个辐照剂量下, 孢子致死率在50.6%~90.63%, 辐照处理后萌发孢子菌丝生长速度与对照有差异, 且菌落出现一种新类型. 辐照处理后分离出的66个异核单孢菌株, 酯酶同工酶、过氧化物同工酶和多酚氧化酶同工酶都出现新条带. 同工酶聚类结果, 70个单孢试验菌株在0.87的相似水平上聚成18个群, 在0.95相似水平下聚类成25个群, 3个对照菌株在一个群. 研究结果显示, 经放射性同位素⁶⁰Co-γ辐照处理的双孢蘑菇担孢子, 萌发后出现较大变异, 有可能创制出双孢蘑菇新的育种材料乃至选育出双孢蘑菇新品种.

关键词: ⁶⁰Co-γ射线; 双孢蘑菇; 担孢子; 诱变效应

中图分类号: S124.1

文献标识码: A

文章编号: 0490-6756(2016)06-1423-06

The preliminary study on the mutagenic effects by ⁶⁰Co-γ rays to the basidiospores of *Agaricus bisporus*

TIAN Hong¹, ZHANG Xiao-Ping¹, YU Gui-Rong², LI Qian-Hong¹

(1. College of Resources of Sichuan Agricultural University, Chengdu 611134, China;

2. Institute of Nuclear and Biotechnology of Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China)

Abstract: Radioisotope mutagenesis has been applied in the breeding but not reported in *Agaricus bisporus* before. This paper reports the mutagenic effects on the basidiospores of *Agaricus bisporus* with different irradiation dosage of ⁶⁰Co-γ ray. The results showed that the lethal rate of basidiospores was 50.6% ~ 90.63% under six irradiation dosages, and mutant isolates were different from control, and a new type of colony appeared. The 70 single spore isolates appeared new isoenzyme bands of esterase, peroxidase and polyphenol oxidase. Based on the analysis of isoenzyme, all the 70 isolates were clustered into 18 groups at 0.87 and 25 groups at 0.95 similarity level, respectively, while the three control isolates were clustered into one class. All these results showed that ⁶⁰Co-γ radiation treatment may create new breeding material or new cultivar.

Keywords: ⁶⁰Co-γ Rays; *Agaricus bisporus*; Basidiospores; Mutagenic effects

1 引言

双孢蘑菇是全球广泛栽培的食用菌, 目前主要栽培的白色双孢蘑菇品种都来自法国自然突变的

白色菌株, 遗传背景十分狭窄, 自然变异小, 育种工作难度大. 从20世纪70年代末开始, 国内不同研究单位以引进品种为材料, 采用单孢分离、紫外诱变、同核杂交等选育出一些新品种^[1], 特别是国内

收稿日期: 2016-05-01

基金项目: “四川省农作物“十二五”育种公关项目(2011NZ0098-7); 国家现代食用菌产业技术体系四川省食用菌创新团队项目.

作者简介: 田鸿(1966-), 男, 四川雅安人, 理学博士, 讲师. 研究领域为大型真菌资源与育种. E-mail: tianhongmicrobiol@163.com

通讯作者: 张小平. E-mail: zhangxiaopingphd@126.com

第一个具有自有知识产权的半气生型高产优质广适性双孢菇杂交品种 AS2796 及系列品种的选育和推广,极大地推动了国内双孢蘑菇产业的发展.采用物理诱变技术既可以直接从目前品种中筛选出更优良菌株,同时也可以加大杂交亲本的变异程度,增加选育更优良新品种的可能性.双孢菇诱变育种中,寿城学等利用紫外诱变从引进品种的孢子诱变后代中选育出浙农 1 号曾经在双孢菇主产区得到大面积推广^[2],而目前其他诱变研究尚未有报道.本试验采用同位素⁶⁰Co- γ 处理双孢蘑菇孢子,研究同位素⁶⁰Co- γ 对双孢蘑菇孢子的诱变效应,为开展双孢蘑菇放射性同位素诱变创制育种材料提供参考.

2 材料与方法

2.1 材料

供试菌株为 As2796,制作栽培菌种的试管菌种购于福建省农科院食用菌研究所,采用小麦粒和发酵牛粪制作而成.子实体采集于四川邛崃市上安镇大田双孢蘑菇种植基地,8 成熟,菌膜未开,采下去根,留下 2cm 左右菌柄,带回实验室

2.2 方法

2.2.1 材料准备 250mL 烧杯和 90mm 培养皿底子对接,事先在培养皿中填充厚纸板,中间立插短竹签,再将圆形滤纸从中央穿过按压在厚纸板上,对接体报纸圆筒包好,121℃ 高温灭菌 40 min,烘干.采回的子实体用医用棉签取 75% 酒精对菌盖和菌柄擦洗消毒两次,再用无菌水擦洗,将子实体菌柄插在竹签上,用不干胶将烧杯和培养皿的对接体粘好,用小刀在烧杯出料口处将不干胶划开一小口以排湿和通气,对接体置于 20℃ 培养箱中 24h,见滤纸上出现褐色孢子印,取下滤纸.

2.2.2 孢子稀释和辐照处理 用无菌剪刀剪切下褐色部分滤纸,无菌生理盐水洗涤稀释,血球计数板调节稀释孢子悬液浓度到数量级 10^6 个/mL,分装到无菌小玻璃瓶中,10mL/瓶,进行辐照处理,辐照剂量设为 100Gy、300 Gy、500 Gy、600 Gy、800 Gy、1000 Gy,每个剂量三个重复.

2.2.3 孢子萌发和单孢分离 采用稀释平板分离法,取不同剂量辐照处理后的孢子悬液,按 10 倍稀释,最大稀释度 10^{-4} ,每个稀释梯度均加入 10mg/kg 硫酸素,每稀释度取 0.1mL 孢子液注入 PDA 培养基平板,均匀涂布,用卡拉胶膜封好培养皿,

25℃ 避光培养,待孢子萌发形成微小星芒状单菌落,挑出接种 PDA 斜面并编号.连续 7 天挑取萌发单孢,记录每个剂量下孢子萌发个数,计算孢子萌发率和致死率(致死率=1-孢子萌发个数/(孢子浓度 \times 45.0% \times 稀释倍数).

2.2.4 诱变菌株的菌落生长观察 将挑取的异核单孢菌株,接种 PDA 平板,25℃ 培养,培养 20d,用无菌打孔器取 0.5cm 菌丝块接种 PDA 平板中央,每个菌株 3 个平板,25℃ 培养,5d 后测定菌落直径,2d 测定一次,培养 20d,计算菌丝生长速度并记录每个菌株菌落形态.菌丝生长速度=(第二次菌落直径 cm-第一菌落直径)按公式计算.

2.2.5 同工酶分析 试验菌株酯酶、过氧化氢酶和多酚氧化酶同工酶分析参考 NY/T1097-2006.

供试菌株接种 PDA 平板,25℃ 培养 15d,刮取菌丝,按菌丝:样品提取液:石英沙 1:3:0.5 比例混合,冰浴中研磨成浆,1.5mLEP 管中 10000r/min 4℃ 离心 10min,取上清,并按上清液:蔗糖溶液(400g/L):溴酚蓝 5:1:1(体积比)的比例混匀即为电泳样品.

采用垂直不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳,4℃ 电泳.胶板大小:12cm \times 20cm,分离胶浓度 7~9%,浓缩胶浓度 3%.30 μ L 样品液点样,以溴酚蓝作为前沿指示剂,指示剂在浓缩胶中电泳电压为 180V,进入分离胶,电压为 210V.指示剂迁移至胶板下缘 2cm 时停止电泳,取出凝胶,于相应同工酶染色液中室温下显色 30min,超纯水冲洗,乙酸液中固定,取出于洁净玻璃板上记录酶带数并计算酶带迁移率(Rf).

根据同工酶图谱,计算条带迁移率(Rf 值),并将电泳图谱在同一位置有条带的标记为“1”.没有的标记“0”,将电泳图谱转化成二维编码表,以 NTSYS2.1 计算菌株间的相似性,采用平均连锁聚类法(UPGMA)构建聚类图.

3 结果与分析

3.1 不同照射剂量对孢子萌发的影响

不同照射剂量对孢子萌发的影响见表 1.设定辐照剂量范围内,孢子萌发数随辐照剂量增加呈逐渐减少的趋势,孢子的致死率在 50.6%~90.63% 之间,在 0.05 水平上,不同辐照剂量下担孢子致死率都达到了显著水平;在 0.01 水平上,也都达到极显著水平.

表 1 不同辐照剂量对孢子萌发的影响

Tab.1 The effect on the lethal rate of basidiospores under different irradiation dose

辐照剂量(Gy) Irradiation dose(Gy)	孢子致死率(%) The lethal rate of basidiospores (%)
100	50.60
300	57.57
500	63.50
600	70.93
800	81.13
1000	90.63

3.2 不同辐照剂量对菌株菌丝生长速度的影响

考虑到辐照对菌丝生长可能的影响,本试验每

个辐照剂量随机选取 10 个异核单孢菌株连同 10 个未辐照处理的单孢菌株,测定 20d 培养时间内的菌丝生长速度,并检验其差异显著性,结果见表 2. 表 2 中未处理菌株平均生长速度是 2.17mm/d, 100Gy 辐照剂量下菌株的平均生长速度是 2.22mm/d,是 7 个试验处理中生长最快的,经差异显著性检验,6 个辐照处理菌株与对照未经处理菌株菌丝平均生长速度差异都未达到显著水平,但菌丝生长速度极差不同,未经处理菌株的平均生长速度极差最小,600 Gy 处理的极差最大,未经处理的菌丝生长较为整齐,经处理菌株菌丝生长较为杂乱,反应出辐照处理对菌丝生长有影响.

表 2 不同辐照剂量处理对菌株菌丝生长速度的影响

Tab.2 The difference growth speed of the strains under different irradiation dose treatment

辐照剂量(/Gy) Irradiation Dose/Gy	试验菌株生长速度(mm/d) The growth speed of different test strains(mm/d)										平均生长速度(mm/d) The average growth speed(mm/d)	菌丝生长速度极差 The range of growth speed
	2.3	2.4	2.1	2.5	2.3	2.5	2.2	2.3	1.0	2.6		
100	2.3	2.4	2.1	2.5	2.3	2.5	2.2	2.3	1.0	2.6	2.22	1.5
300	2.1	2.2	2.7	2.0	2.0	1.6	2.1	2.0	2.2	2.1	2.10	1.1
500	2.5	2.6	2.0	2.2	2.0	2.3	2.4	2.1	2.2	1.6	2.19	1.0
600	2.1	1.8	2.6	2.1	1.4	0.9	2.1	1.5	2.5	2.5	1.95	1.7
800	2.5	2.4	2.2	2.4	1.5	2.6	2.2	2.0	1.8	1.2	2.08	1.4
1000	2.4	1.1	2.4	1.8	1.9	2.3	2.3	2.6	1.9	2.0	2.07	1.5
0(CK)	2.2	2.3	2.1	1.9	2.5	2.4	1.8	2.2	2.1	2.2	2.17	0.7

3.3 不同辐照剂量处理孢子萌发的菌落特征

经不同剂量处理,菌落类型与亲本菌株差异

大,而且出现从未报道过的轮纹菌株.将每个剂量下不同特征菌落整理如表 3.

表 3 不同辐照剂量处理孢子萌发菌落特征

Tab.3 The different morphological characteristics of colony after different irradiation dose treatment

菌落特征 Morphological characteristics of colony	菌落数(个) Number of different type colony	不同特征菌落数占辐照孢子萌发总菌落比例(%) The percent of different type colony(%)	不同辐照剂量的菌落数(个) Number of different type colony under different irradiation dose					
			100	300	500	600	800	1000
气生型	19	28.8	5	3	4	1	3	3
半气生型	26	39.4	4	5	2	5	4	6
贴生型	21	31.8	1	2	3	5	6	4
菌丝白色	38	57.6	6	5	3	8	7	9
菌丝发黄	28	42.4	4	5	6	3	6	4
菌丝浓密	50	75.6	9	7	8	6	10	10
菌丝稀疏	16	24.2	1	3	1	5	3	3
菌落边沿整齐	45	68.2	7	6	7	7	9	9
菌落边沿不整齐	19	28.8	3	4	2	3	3	4
轮纹菌落	6	0.91	0	2	0	1	2	1

亲本菌株 AS2796 的菌落特征为菌丝半气生、白色、浓密、边沿整齐,其担孢子经不同辐照剂量处

理后,萌发后代的菌丝培养性状发生变化.表 3 中,66 个辐照菌落中,保持亲本原有某一性状的比例

较大,分别是半气生 39.4%;白色 57.6%,浓密 75.6%,边沿整齐 68.2%,其原因尚待研究.保持亲本菌落特征的只有 5 个菌落,比例为 0.76%,显示辐照处理对孢子萌发后菌丝培养性状影响很大,总体看,辐照后代出现四个变化,一是出现原杂交亲本两种菌落;二是出现菌丝稀疏和边沿不整齐菌落;第三,部分菌落菌丝变黄,而且比例还比较大(42.4%);第四,出现新型轮纹菌落,这是从未报道

过的双孢菇新型菌落.

3.4 不同辐照剂量处理单孢菌株的同工酶分析

3.4.1 不同辐照处理单孢菌株的同工酶变化 试验对经辐照处理的 66 个单孢菌株和 3 个未经辐照处理和 1 个组织分离菌株酯酶、过氧化物酶及多酚氧化酶同工酶进行分析(图 1),结果显示经辐照处理后这三个同工酶都出现一些差异,反应出辐照处理对菌株的基因型产生影响.

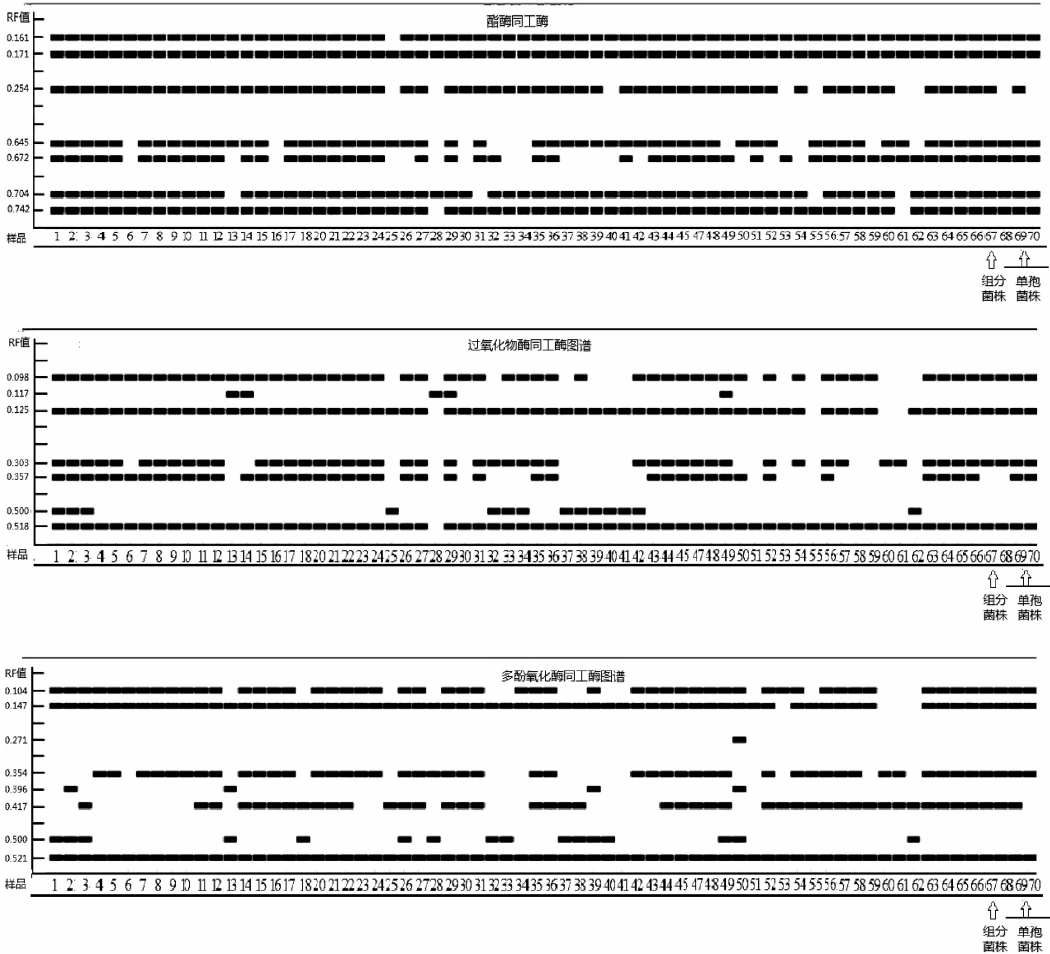


图 1 供试菌株酯酶同工酶(EST),过氧化物酶同工酶(POD)和多酚氧化酶同工酶(POP)同工酶图谱
Fig. 1 EST,POD,POP isozyme electrophoresis of the tested strains

酯酶染出 7 条清晰条带,迁移率 Rf 在 0.161~0.742 之间,这 7 条酶带包含三个区域,第一个区域 Rf 值 0.161~0.177,第二个区域 Rf 值 0.661~0.677,第三个区域 Rf 值 0.709~0.742,这 66 个菌株酯酶同工酶与 4 个来源于亲本菌株,迁移率在 0.161~0.177 间除了 I-As25 少一条外,其余的与来源于亲本的菌株相同,而迁移率在 0.661~0.742 之间的条带与来源于亲本的菌株条带差异较大,反应出辐照处理可能产生新的酯酶同工酶.

过氧化物酶染出 7 条清晰的条带,迁移率在 0.098~0.518 之间,这 7 条酶带包含三个区域,第一个区域的 Rf 值是 0.098~0.125,第二个区域的 Rf 值是 0.303~0.357,第三个区域的 Rf 值是 0.50~0.518.这 70 个试验菌株酯酶条带特点为:亲本菌株有 6 条带,I-As13、I-As14、I-As28、I-As29、I-As49 这 5 个菌株在迁移率 0.098~0.125 之间出现一条新条带;迁移率为 0.5178 时除了 I-As61 缺失外,其余菌株都有该条带.

多酚氧化酶同工酶染出 8 条清晰条带, 迁移率在 0.104~0.521 之间, 这 8 条酶带包含三个区域, 第一个区域 Rf 值是 0.104~0.271, 第二个区域 Rf 值是 0.354~0.416, 第三个区域 Rf 值是 0.50~0.521. 这 70 个试验菌株多酚氧化酶条带为: 来源于亲本的菌株有 7 条带, I-As50 菌株在迁移率 0.271 处出现了一条新带; 迁移率为 0.518 处的条带是 70 个菌株的共同条带.

3.4.2 不同辐照处理单孢菌株的同工酶聚类分析

根据同工酶图谱, 采用平均连锁聚类法 (UPGMA) 构建聚类图 (图 2), 图 2 中, 在相似系数为 0.48 时, 所有菌株聚为一大群, 表明辐照菌株遗传变异明显. 在

相似系数为 0.61 时, 所有菌株聚为四群, 在 0.87 时, 聚为 18 个群, 在 0.95 时, 所有菌株共分为 25 个群, 其中 3 个未经处理来源于亲本的单孢菌株聚成一类, 而组织分离菌株与 100Gy 处理的单孢菌株在高相似系数 (0.96) 时聚成一类, 反应出和直接单孢分离菌株相比出现遗传差异, 但差异很小, 这也说明了白色双孢蘑菇种内变异小. 同时, 100Gy 辐照剂量虽然对孢子的致死率可达 50.6%, 但对基因型影响并不大. 从不同相似系数的聚类分析看, ⁶⁰Co- γ 辐照处理对双孢菇孢子萌发的菌株遗传影响极大, 通过辐照处理能拉大育种材料的遗传距离, 可作为一种创制双孢菇育种新材料或选育新品种的新方法.

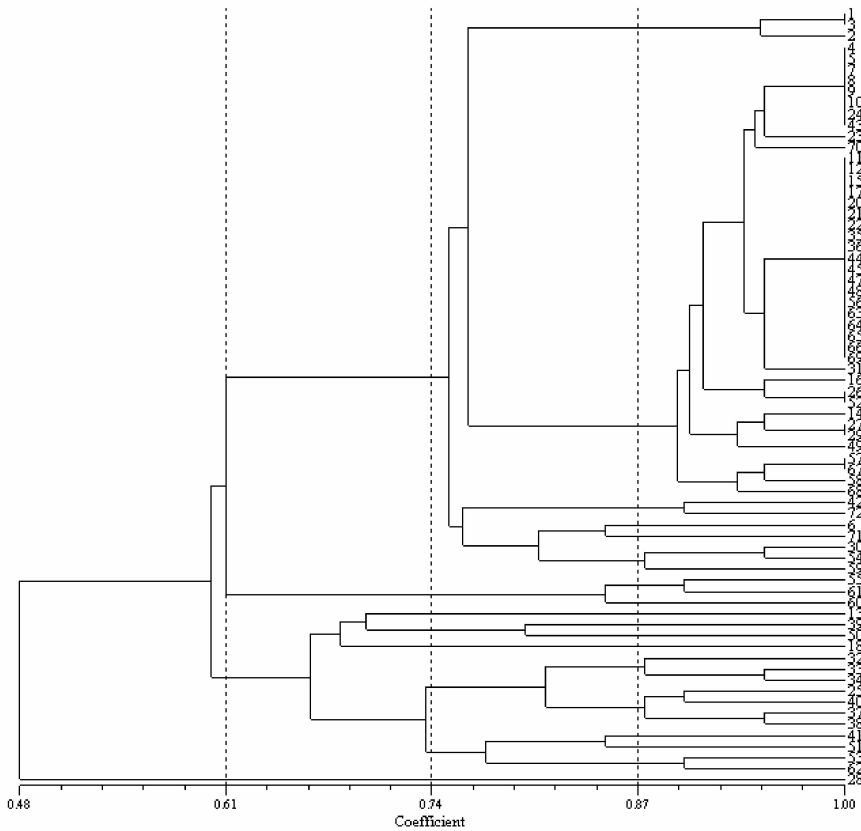


图 2 基于供试菌株三种同工酶分析的聚类图

Fig. 2 The dendrogram of tested strains based on the analysis of the three isozymes

4 讨论

我国是全球菌类产业规模最大的国家, 栽培种类、年总产量和贸易量均为全球第一, 菌类新品种选育极大地推动了产业发展. 菌类新品种的选育方法包括野生资源驯化与系统选育、杂交育种、诱变育种和原生质融合等. 物理诱变是目前菌类新品种诱变育种的主要方法, 主要包括激光诱变^[3]、氮离子注入^[4]、太空育种^[5]、离子束注入^[6-9]、紫外诱

变^[10]、放射性同位素诱变^[11-14]等方法. 诱变材料为孢子、菌丝和原生质体. 诱变目的包括提高子实体产量、提高多糖含量及提高子实体的营养成分等.

⁶⁰Co- γ 在菌类产业中的应用研究, 主要是鲜菇采后辐照处理的化学成分变化和新品种的辐射育种. Filomena Nazzaro 等采用电泳技术和色谱技术研究了不同辐照剂量处理后的黑块菌在 4℃ 条件下存储过程中的多酚类物质、过氧化物类物质结构、蛋白质及多肽变化和微生物组成变化, 发现

1. 5kGy处理后的保存效果最佳^[15]. Isolde Sommer等研究了不同辐照剂量双孢菇鲜菇的酪氨酸、苯丙氨酸以及单磷酸腺苷(AMP)、单磷酸鸟苷酸(GMP)、二磷酸鸟苷(GDP)等呈味物质的变化,结果显示经 5kGy 剂量处理后,二磷酸鸟苷降低了 22%,单磷酸腺苷降低了 46%,酪氨酸、苯丙氨酸的含量没有变化^[16]. 郑向华等运用主成分分析方法研究了⁶⁰Co- γ 射线不同剂量诱变大杯香菇的营养价值的比较效应,蛋白质和氨基酸等营养价值的差异达到显著或极显著^[13]. 在菌类⁶⁰Co- γ 辐射育种中,刘朋虎等比较了⁶⁰Co- γ 诱变新菌株姬松茸 J5 和出发菌株 J1 的子实体氨基酸比值系数,结论是 J5 的氨基酸比值系数比出发菌株 J1 的要高 5.6~7.13%,蛋白质含量更丰富,氨基酸成分更均衡^[17]. 用⁶⁰Co- γ 辐照处理,诱变双孢菇担孢子研究尚未见报道.

本研究采用⁶⁰Co- γ 辐照处理双孢菇担孢子,对辐照处理后担孢子的致死率、菌落形态特征、菌丝生长速度以及同工酶分析等进行了研究. 设定辐照剂量范围内,孢子萌发数随辐照剂量增加逐渐减少,在 0.05 水平和 0.01 水平上,不同剂量下孢子致死都达到了显著和极显著水平,但孢子萌发菌落形态并无规律性变化,菌丝生长速度差异也不显著,但极差不同,未经处理的菌株,极差最小,菌落生长较为整齐,600 Gy 处理的极差最大. 经处理菌株菌丝生长较为杂乱,没有规律性变化,反应出辐照处理变异的随机性很大,而且出现一种从未报道过的双孢菇新型轮纹菌落,这些都表明辐照处理对菌株的表型或者基因型产生影响. 总体而言,辐照处理对孢子萌发菌株有较大影响,出现四个变化,一是出现原杂交亲本的气生和贴生型菌落,反应出杂交菌株的双核中的某个单核所控制性状经过辐照处理后出现丢失或某个核在菌丝生长中逐渐占据优势;二是菌落菌丝浓密程度以及边沿整齐程度出现变化,菌丝稀疏也许是退化现象;第三,部分菌落菌丝变黄,可能也是退化现象;第四,出现新型轮纹菌落,是辐照处理后的变异表现.

上述这些变化,体现在同工酶上条带变化上,孢子辐照处理萌发后,菌丝的三种试验同工酶都出现新条带,反映出辐照处理对菌株的基因型产生影响,且同工酶聚类分析表明,辐照处理对菌株基因型影响很大,在相似系数 0.87 处,所有菌株可分为 18 个类群,而四个对照菌株,在相似系数 0.96 处都还聚成一类,表明辐照处理对菌株基因型的变异影响很大,而且是从低剂量到高剂量逐渐变大. 综合上述,⁶⁰Co- γ 辐照

处理能拉大辐照后代的遗传距离,可以作为创制双孢菇育种新材料乃至选育新品种的一种方法. 至于辐照处理菌株的遗传稳定性,可在后续的工作中从分子遗传分析和田间栽培试验加以筛选.

参考文献:

- [1] 王泽生,廖剑华,陈美元. 我国双孢蘑菇育种研究与产业发展[C]. 第九届全国食用菌学术研讨会论文集, 2010.
- [2] 寿诚学 陆亚蓉. 蘑菇罐藏新品种——浙农 1 号[A]// 中国农业年鉴,北京,中国农业出版社, 1987.
- [3] 薛正莲,潘文浩,杨超英. 采用 He-Ni 激光诱变选育速生高产茯苓菌[J]. 食品与发酵工业, 2005, 2: 51.
- [4] 严涛,李冠,曾宪贤. N⁺离子注入技术选育猴头菌优良菌株[J]. 食品工业科技, 2007, 3:109.
- [5] 张诚,陈庆隆,陈柳萌,等. 金针菇航天诱变育种研究. 第九届全国食用菌学术研讨会[C], 2010.
- [6] 严涛,李冠,曾宪贤. N⁺离子注入技术选育猴头菌优良菌株[J]. 食品工业科技, 2007, 3:109.
- [7] 吕杰,金湘,毛培宏. 离子束注入诱变技术应用于食用菌的研究[J]. 中国食用菌, 2011, 5:3.
- [8] 丁兴红,温成平,丁志山,等. 低能离子射线诱变桑黄菌株 SH009 的初步研究[J]. 食用菌学报, 2010, 2: 15.
- [9] 陈恒雷,武宝山,石伟娜,等. 阿魏菇多糖高产菌的离子束和激光复合诱变育种[J]. 生物技术, 2010, 1: 30.
- [10] 刘海英,张运峰,范永山,等. 紫外线对杏鲍菇原生质体的诱变作用[J]. 核农学报, 2011, 4:719.
- [11] 翁伯琦,江枝和,宾文,等.⁶⁰Co 辐射诱变对巴氏蘑菇(姬松茸)子实体多糖组分与结构变化的影响[J]. 菌物学报,2007,1:106.
- [12] 蔡为明,冯伟林,金群力,等.⁶⁰Co- γ 辐照对食用菌菌丝的影响及 ISSR 分[J]析. 核农学报,2009,2:214.
- [13] 郑向华,江枝和,翁伯琦,等.⁶⁰Co- γ 射线辐射诱变大杯香菇的营养价值效应的主成分分析[J]. 激光生物学报,2010, 2:179.
- [14] 江枝和,翁伯琦,雷锦桂,等.⁶⁰Co 辐射诱变新菌株姬松茸 J5 产质量的评价[J]. 热带作物学报, 2011,7:1287.
- [15] Nazzaro F, Fratianni F, Picariello G, et al. Evaluation of gamma rays influence on some biochemical and microbiological aspects in black truffles [J]. Food Chemistry,2007, 103: 344.
- [16] Sommer I, Schwartz H, Solar S, et al. Effect of gamma-irradiation on flavour 5'-nucleotides, tyrosine, and phenylalanine in mushrooms (*Agaricus bisporus*) [J]. Food Chemistry, 2010,123: 171.
- [17] 刘朋虎,江枝和,翁伯琦,等. 姬松茸⁶⁰Co 辐射诱变菌株 J5 与原菌株 J1 蛋白质营养价值比较[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2011, 5: 686.