

## 覆土对双孢蘑菇菌丝产量的影响

蔡为明<sup>1,2\*</sup>, 金群力<sup>2</sup>, 冯伟林<sup>2</sup>, 李南羿<sup>2</sup>, 范丽军<sup>2</sup>, 郑 重<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 浙江大学农业与生物技术学院, 杭州 310029; <sup>2</sup> 浙江省农业科学院园艺研究所, 杭州 310021)

**摘 要:** 在双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*) 栽培中, 以传统蘑菇窖糠田泥覆土为对照, 研究了不同泥炭比例覆土配方的理化性状、细菌生长量、双孢蘑菇菌丝生物量及其产量。理化性状分析结果表明, 不同泥炭比例覆土的空隙度、持水率, 以及在  $-2.16 \sim -17.28$  kPa 水柱牵力下的水分释出量, 都随着覆土中泥炭含量的增大而增大。磷脂脂肪酸 (PLFA) 分析结果表明, 100%、50% 和 30% 泥炭覆土中的菌丝生物量均显著高于传统窖糠田泥覆土 ( $P < 0.05$ ), 并随着泥炭比例的增大而增高; 覆土中的菌丝生物量均于第 2 潮菇原基形成期达最大值。覆土中的细菌数量随着双孢蘑菇菌丝的生长而增多, 不同覆土的细菌数量与其中的蘑菇菌丝生物量正相关, 覆土中的细菌与蘑菇菌丝存在营养共生关系。栽培试验结果表明, 蘑菇子实体形成量与覆土中的菌丝生物量密切正相关, 与覆土持水率 (含水量) 正相关; 覆土层蘑菇菌丝生物量和持水率是蘑菇覆土基质优化的重要技术指标。

**关键词:** 双孢蘑菇; 覆土; 理化性状; 磷脂脂肪酸; 菌丝生物量; 细菌数量; 产量

**中图分类号:** S 646 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 08-1167-08

## Effects of Different Casing Soil on Mycelium Biomass and Yield of *Agaricus bisporus*

CAI Wei-ming<sup>1,2\*</sup>, JIN Qun-li<sup>2</sup>, FENG Wei-lin<sup>2</sup>, LI Nan-yi<sup>2</sup>, FAN Li-jun<sup>2</sup>, and ZHENG Zhong<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> College of Agricultural and Biological Technology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; <sup>2</sup> Institute of Horticulture, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

**Abstract:** Physical and chemical properties, culturable bacterial population and phospholipid fatty acid (PLFA) profile of different casing soils at different mushroom (*Agaricus bisporus*) cropping stages were investigated. The air-filled porosity (AFP), water retention and water released under  $-2.16$  kPa to  $-17.28$  kPa of the casing soils increase with the increasing in the ratio of peat to soil. The results of phospholipid fatty acid (PLFA) analysis indicated that mycelium biomass of *Agaricus bisporus* in 100%, 50% and 30% peat casing were significantly higher than that of traditional casing soil with rice husk ( $P < 0.05$ ), and the increase in the ratio of peat to soil was accompanied by an increase in mycelium biomass. Comparatively higher mycelium biomass of *Agaricus bisporus* were found in all casing soils at the primordia stage of second flush. The increase of mycelium biomass of *Agaricus bisporus* in casing was accompanied by an increase in the bacterial population. The result may indicate the syntrophism between bacteria and mycelia during growth of mushroom. There is a strong positive correlation between the number of mushroom primordia and mycelium biomass in casing, and the yield of mushroom positively correlated with number of mushroom primordia and moisture content of casing soil. The important aspects of casing soil improvement are to increase mycelium biomass and water retention in casing.

**Key words:** *Agaricus bisporus*; casing soil; physical and chemical properties; phospholipid fatty acid; mycelium biomass; bacterial population; yield

收稿日期: 2008-03-13; 修回日期: 2008-06-10

基金项目: 浙江省科技计划项目 (2003C32042)

\* E-mail: caiwm527@126.com

在双孢蘑菇 [*Agaricus bisporus* (Large) Sing.] 栽培中, 菌丝长满培养料后, 必须覆土才能诱导形成子实体, 获得商业性产量。覆土是影响蘑菇产量、质量和出菇整齐度的重要因素 (Noble & Gaze, 1995)。尽管蘑菇覆土的确切作用目前还不十分清楚, 但理想的覆土必须具备特殊的理化特性和微生物特性 (Colauro & Eira, 1998)。已研究明确覆土的某些理化性状, 如空隙度、持水率、盐浓度、渗透势和 pH 值等可以影响蘑菇生长 (Noble et al., 1999b)。覆土是蘑菇生长发育所需水分的重要来源。据 Kalberer (1983, 1985) 研究, 蘑菇子实体生长发育所吸收的水分 54% ~ 83% 来自于培养料, 17% ~ 46% 来自于覆土。覆土材料是否具备适于蘑菇生长发育的理化特性, 尤其是持水率的高低与蘑菇产量关系密切 (Bels Koning, 1950; Edwards & Flegg, 1953; Schroeder & Schisler, 1981; Kalberer, 1991)。

泥炭是一种优质蘑菇覆土材料, 具有均匀合适的空隙度, 结构稳定, 反复喷水能保持良好的结构等特性, 十分有利于菌丝与子实体的生长发育, 并且持水率高达 80% 以上, 能充分供应蘑菇生长发育所需的水分。欧美国家蘑菇工厂化生产中普遍采用泥炭覆土, 是获得高产的重要因素。我国许多蘑菇产区缺乏泥炭资源, 多采用田土或厩糠田泥混合土作为覆土材料, 持水率仅 33% ~ 42%; 并且喷水后容易板结, 不利于菌丝生长发育, 是导致我国蘑菇低产的主要因素 (蔡为明 等, 2002)。

本研究中以传统厩糠田泥覆土为对照, 对不同泥炭比例覆土配方的空隙度、持水率和水分释放特征等进行了分析, 应用磷脂脂肪酸 (PLFA) 法对不同覆土的蘑菇菌丝生物量进行比较分析, 采用平板稀释涂布培养法分析了不同蘑菇生育阶段、不同覆土中的细菌消长动态, 并对蘑菇菇蕾形成量和产量的影响进行探讨, 以期对蘑菇覆土材料的优化提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

蘑菇菌株 As2796 引自福建省蘑菇菌种推广站; 干泥炭购自吉林敦化泥炭开发公司; 田土为浙江省农业科学院水稻试验田表面 20 cm 以下的田泥, 晒至半干, 粉碎、过筛, 泥粒直径小于 10 mm。按体积比配制 4 种覆土配方, 用石灰调节酸碱度。A (对照): 田土 85%, 厩糠 15%, pH 7.4; B: 田土 70%, 泥炭 30%, pH 7.3; C: 田土 50%, 泥炭 50%, pH 7.3; D: 泥炭 100%, pH 7.4。采用 NA 培养基分离培养覆土中的细菌。

### 1.2 持水率测定

采用 Noble 等 (1999a) 和蔡为明等 (2002) 的方法, 将各覆土样品装入容积为 192.5 mL 的两端开口其中一端包扎网纱的圆柱形浸样筒, 浸在水中过夜, 沥水 1 h 后, 称样品湿样质量, 置干燥箱内, 在 65 °C 下干燥 4 d 至恒定质量, 称样品干样质量。重复 3 次, 计算平均持水率。

### 1.3 水分释放特性测定

取上述浸过的样品连同浸样筒置于水分释放测定装置上, 按 Noble 等 (1999a) 和蔡为明等 (2002) 的方法, 沥水 1 h 后测定不同高度水柱牵力下的水分释出量。每处理重复 3 次。计算不同高度水柱牵力下的水分平均释出量, 绘制水分释放曲线。

### 1.4 空隙度 (AFP) 测定

采用 Anon (1990) 以及 Waller 和 Harrison (1991) 的方法, 将样品装入测试筒, 在水中充分浸泡后取出沥水, 测量样品中沥出水的体积。按下列公式计算空隙度 (AFP) 值 (沥水体积法):  $AFP(1), \% = 100V/1000$ 。其中 V 为沥出水的体积。

第 2 种计算方法为 Waller 和 Harrison (1991) 提出的根据上述沥水后样品的湿样质量 (M) 和干样质量 (D) 计算的公式 (干湿质量法):  $AFP(2), \% = 96.72 - (100M - 61.9D)/1000$ 。

### 1.5 电导率 (EC) 和 pH 测定

按干样品和蒸馏水质量比 1:6 配制样品悬浮液, 放置 1 h 后, 测定 EC 值和 pH 值。

### 1.6 栽培试验

试验于 2006 年 9 月至 2007 年 5 月在浙江省农业科学院园艺研究所蘑菇试验基地进行。试验小区随机设置在菇房不同层次床架上, 每小区  $1 \text{ m}^2$ , 每处理设 3 个重复。覆土经常规消毒后, 覆盖在长满菌丝的料床上, 覆土厚 3 cm。覆土后第 2 天调水至覆土材料充分吸水而不渗流入培养料层。按常规栽培法管理。观测蘑菇菌丝在不同覆土中的生长情况、菇蕾形成数量与蘑菇产量。

### 1.7 磷脂脂肪酸 (PLFA) 分析

通过分析 PLFA 组成和含量, 定量比较不同覆土中的双孢蘑菇菌丝生物量。分别于首潮、第 2 潮和第 3 潮菇原基形成期取样。设 3 个重复, 每个重复均在同一菇房中分别随机选择 6 个取样点, 挖取直径 5 cm、深 3 cm 的土样。样品充分混合取 50 g, 立即冻干备用。

称取 0.5 g 冻干样品, 采用修正的 Bligh 和 Dyer (1959) 方法进行脂类提取和磷脂脂肪酸分析 (Frostegård et al., 1993a, 1993b)。

### 1.8 覆土细菌消长动态分析

分别于覆土时、蘑菇菌丝生长至覆土层一半高度、原基形成期、采收期和菇潮间隔期 (采收后 2 d) 5 个时期取样, 采用平板稀释涂布培养计数法检测覆土中的细菌数量变化情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同覆土理化性状

从表 1 可以看出, 4 种覆土配方的电导率随着配方中泥炭含量的增加而增大, 原因是泥炭呈酸性, 随着覆土中泥炭比例的增加, 用于调节 pH 的石灰用量随之增加, 从而使覆土电导率增大; 100% 泥炭配方的空隙度 (AFP), 通过干湿质量法计算的 AFP (2) 值高于沥水体积法计算的 AFP (1) 值, 而其它 3 个含不同比例田土的覆土配方的 AFP 值相反, AFP (1) 值高于 AFP (2) 值。3 个不同泥炭含量的配方中, 2 种不同测试计算方法所得的 AFP 值均随着泥炭含量的增加而增大; 持水率以 100% 泥炭配方最高, 达 75.1%, 苍糠田土配方最低, 仅 33.2%, 覆土配方的持水率随着泥炭比例的增加而增高。

表 1 不同覆土的理化特性

Table 1 Physical and chemical properties of different casing soil

代号 Code	覆土体积配方/% Casing soil in volume			pH	电导率/ ( $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) EC	空隙度/% Air-filled porosity		持水率/% Water retention
	苍糠 Rice husk	田土 Soil	泥炭 Peat			AFP(1)	AFP(2)	
A	15	85	0	$7.4 \pm 0.11$	$437 \pm 52$	$18.8 \pm 1.33$	$17.4 \pm 1.06$	$33.2 \pm 2.16$
B	0	70	30	$7.3 \pm 0.09$	$928 \pm 41$	$5.6 \pm 0.37$	$4.1 \pm 0.23$	$47.0 \pm 1.74$
C	0	50	50	$7.3 \pm 0.12$	$1112 \pm 37$	$6.1 \pm 0.45$	$4.3 \pm 0.35$	$51.1 \pm 2.02$
D	0	0	100	$7.4 \pm 0.07$	$1532 \pm 59$	$8.8 \pm 0.32$	$9.9 \pm 0.43$	$75.1 \pm 1.86$

注: 表中数值为 3 次重复平均值  $\pm$  SE。

Note: Each value is the mean  $\pm$  SE of three replicates.

### 2.2 不同覆土配方的水分释放特征

图 1 所示, 覆土的水分释出量随着泥炭比例的增加而增加, 水分释放曲线的上扬幅度也随之增大。15% 苍糠田土覆土的水分释放曲线最为低平, 当牵力增大到  $-2.16 \text{ kPa}$  以上时水分释出增量少, 水分释放曲线上升平缓, 当牵力增大到  $-8.64 \text{ kPa}$  以上时水分释放曲线几乎呈一平直的直线, 在  $-17.28 \text{ kPa}$  牵力下, 总水分释出量仅为 54 mL。100% 泥炭覆土的水分释放曲线最为高扬,

当牵力增大到  $-2.16$  kPa 以上时仍保持较大的水分释出增量, 水分释放曲线上扬, 在  $-17.28$  kPa 牵力下, 总水分释出量达  $92.8$  mL。30% 和 50% 泥炭覆土的水分释放介于上述二者之间, 曲线上扬幅度和水分释出量随着泥炭含量的增加而增大, 在  $-17.28$  kPa 牵力下, 总水分释出量分别为  $61.1$  和  $69.2$  mL。

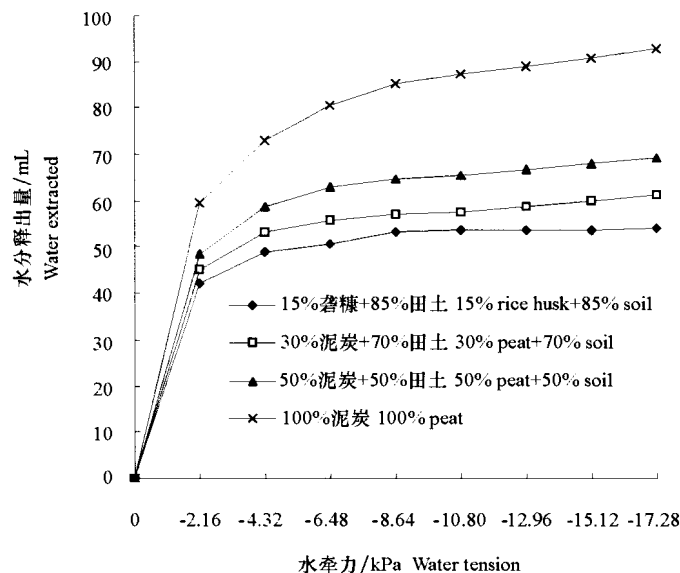


图 1 不同覆土水分释放曲线

Fig. 1 Water release curves for different casing soil

### 2.3 不同覆土处理磷脂脂肪酸 (PLFA) 分析

从图 2 所示的 4 种覆土处理间菌丝 PLFA 量比较来看, 覆土中的蘑菇菌丝生物量随着泥炭含量增大而增大。以 100% 泥炭覆土中的菌丝生物量最大, 首潮菇原基形成期、第 2 潮菇基形成期和第 3 潮菇原基形成期 3 个时期覆土的菌丝 PLFA 量分别为  $531.9$ 、 $1157.2$  和  $1149.2$   $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ , 均显著高于 15% 砻糠田土覆土和 30% 泥炭覆土 ( $P < 0.05$ ), 但与 50% 泥炭覆土间无显著差异; 15% 砻糠田土覆土中的菌丝生物量最小, 3 个时期覆土的菌丝 PLFA 量分别为  $270.3$ 、 $807$  和  $713.1$   $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ , 均显著低于其它覆土配方 ( $P < 0.05$ )。

从图 2 所示的 3 个不同时期间菌丝 PLFA 量比较看, 4 种覆土中的菌丝生物量均于第 2 潮菇原基形成期达最大, 均显著大于首潮菇原基形成期 ( $P < 0.05$ ), 15% 砻糠田土覆土第 3 潮菇原基形成期的蘑菇菌丝 PLFA 量 ( $713.1$   $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 显著低于第 2 潮菇原基形成期的菌丝 PLFA 量 ( $807$   $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $P < 0.05$ ), 而其它 3 种覆土第 2 潮和第 3 潮菇原基形成期的蘑菇菌丝土量无显著差异。

### 2.4 不同覆土可培养细菌生长量

如图 3 所示, 覆土至首潮菇形成期, 4 种覆土中的可培养细菌数量都随着蘑菇菌丝在覆土层中生长而增加, 以 100% 泥炭覆土增幅最大, 覆土时的初始细菌数量为  $1.5 \times 10^7$   $\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ , 随着蘑菇菌丝在覆土中生长至首潮菇原基形成期, 覆土中的细菌数量达  $2.2 \times 10^9$   $\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ ; 首潮菇采收期, 4 种覆土中的细菌量均显著下降 ( $P < 0.05$ ), 菇潮间隔期细菌量又显著回升 ( $P < 0.05$ )。

15% 砻糠田土和 30%、50%、100% 泥炭 4 种不同覆土间的初始细菌量无显著差异, 分别为  $1.1 \times 10^7$ 、 $1.2 \times 10^7$ 、 $1.1 \times 10^7$  和  $1.5 \times 10^7$   $\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ ; 各个蘑菇生育阶段覆土中的细菌量都随着泥炭含量增大而增大。100% 泥炭覆土中细菌量最大, 在首潮菇原基形成期、首潮菇采收期和菇潮间隔期

3 个时期的细菌量分别为  $2.2 \times 10^9$ 、 $1.1 \times 10^9$  和  $2.3 \times 10^9$  cfu  $\cdot$  g $^{-1}$ , 均显著高于其它覆土配方 ( $P < 0.05$ ); 15% 砻糠田土覆土在蘑菇各个生育时期的细菌量均低于其它覆土配方, 其中, 首潮菇原基形成期和菇潮间隔期覆土中的细菌量分别为  $8.1 \times 10^8$  和  $6.2 \times 10^8$  cfu  $\cdot$  g $^{-1}$ , 均显著低于其它覆土配方 ( $P < 0.05$ )。

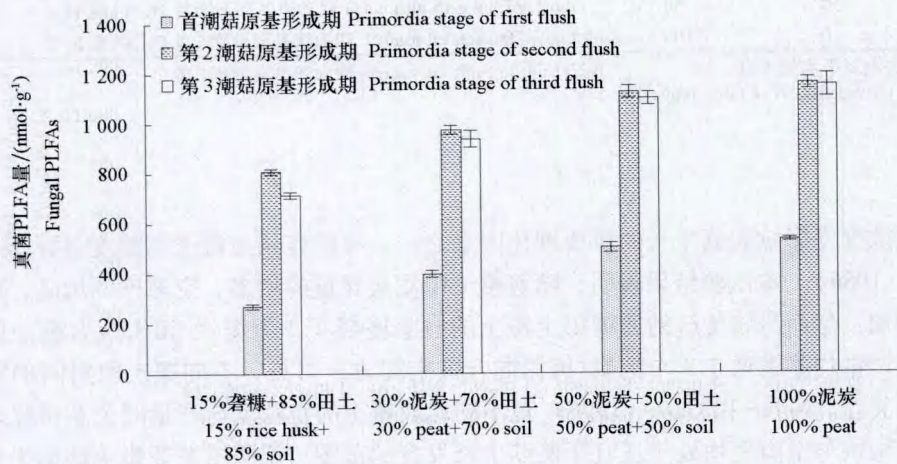


图2 不同覆土中生长的菌丝生物量

Fig. 2 Mushroom mycelium biomass in different casing soil

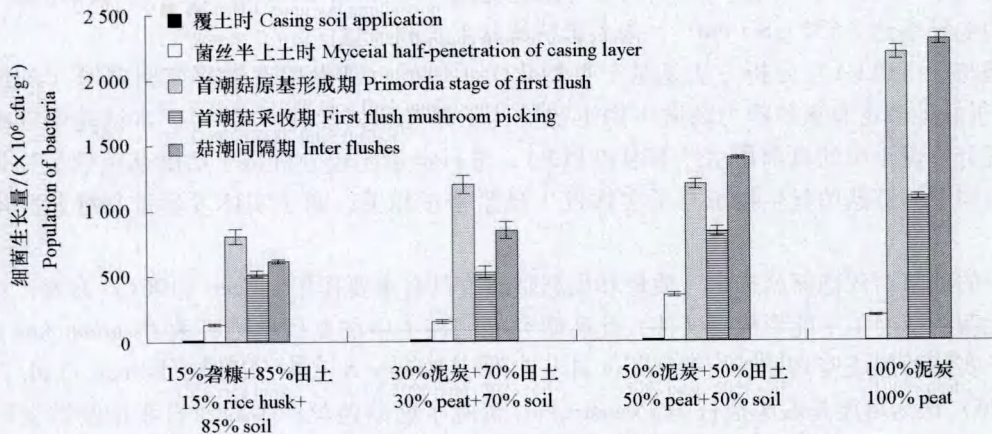


图3 不同蘑菇生育阶段不同覆土中细菌生长量

Fig. 3 Numbers of culturable bacteria in different casing soil at different cropping stages

## 2.5 不同覆土蘑菇出菇量与产量

首潮菇蕾形成量随着覆土中泥炭含量增大而增多 (表2)。100%、50% 和 30% 泥炭覆土的首潮菇蕾形成量均显著高于 15% 砻糠田土覆土, 以 100% 泥炭覆土最高, 平均菇蕾数达 286.1 个  $\cdot$  m $^{-2}$ , 菇蕾形成量比砻糠田土覆土多 48.8%; 100% 和 50% 泥炭覆土的菇蕾形成量均显著高于 30% 泥炭覆土 ( $P < 0.05$ ), 而 100% 和 50% 泥炭覆土之间无显著性差异。

蘑菇产量也随着覆土中泥炭含量增大而增高 (表2)。100%、50% 和 30% 泥炭覆土的产量均显著高于砻糠田土覆土, 以 100% 泥炭覆土最高, 平均产量达 11.3 kg  $\cdot$  m $^{-2}$ , 比砻糠田土覆土增产 43.0%, 其次是 50% 泥炭覆土, 比砻糠田土覆土增产 38.0%; 100% 和 50% 泥炭覆土的产量均显著高于 30% 泥炭覆土 ( $P < 0.05$ ), 而 100% 和 50% 泥炭覆土之间无显著差异。

表 2 不同覆土蘑菇出菇量与产量

Table 2 Mushroom number and yield of different casing soil

代号 Code	覆土体积配方/% Casing soil in volume			首潮菇蕾形成量/(个·m <sup>-2</sup> ) Primordia number of first flush	蘑菇产量/(kg·m <sup>-2</sup> ) Mushroom yield
	苍糠 Rice husk	田土 Soil	泥炭 Peat		
A	15	85	0	192.3 ± 26.7 c	7.9 ± 0.57 c
B	0	70	30	237.5 ± 19.5 b	9.4 ± 0.61 b
C	0	50	50	272.7 ± 15.9 a	10.9 ± 0.42 a
D	0	0	100	286.1 ± 13.6 a	11.3 ± 0.51 a

注: 表中数值为 3 次重复平均值 ± SE。

Note: Each value is the mean ± SE of three replicates.

### 3 讨论

蘑菇覆土的空隙度是影响蘑菇生长的重要理化因素之一, 有研究认为覆土空隙度与蘑菇产量正相关 (Rainey et al., 1986)。本试验结果表明, 随着覆土中泥炭含量的增多、空隙度的增高, 蘑菇菌丝量和蘑菇产量均增加; 然而尽管传统的苍糠田土覆土的空隙度高于 3 个泥炭/田土混合覆土配方, 但蘑菇菌丝量和蘑菇产量均显著低于 3 个泥炭/田泥混合覆土配方, 可见, 不同覆土原料间的空隙度与蘑菇产量不存在相关性。Noble 和 Gaze (1995) 对不同泥炭覆土的空隙度与产量间关系研究表明, 由于不同泥炭的团粒结构与空隙度均处于适宜于蘑菇生长发育的范围, 空隙度并非影响蘑菇生长发育的决定性因素, 二者也不存在相关性。

Hayes (1981) 的试验表明覆土的电导率在 350 ~ 900  $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$  之间不影响蘑菇产量; 当添加可溶性盐使电导率增大到 1 500  $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$  时会导致蘑菇减产 (Awad & Nair, 1989)。而本试验中 100% 泥炭覆土的电导率达 1 532  $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ , 未见影响蘑菇生长和产量。

磷脂脂肪酸 (PLFA) 分析方法是基于生物化学手段的一种微生物学研究新技术 (陈振翔 等, 2005), 能很好地测定有繁殖能力的微生物生物量 (王曙光和侯彦林, 2004)。本试验中首次应用该技术, 通过分析覆土中的真菌指示性饱和和 PLFA, 进行定量比较分析覆土层蘑菇菌丝生物量。结果表明, 覆土层中的蘑菇菌丝生物量与子实体发生量紧密正相关, 而子实体发生量与蘑菇产量密切相关。

覆土中的细菌对双孢蘑菇产量、质量和出菇整齐度具有重要作用, Eger (1961) 发现, 双孢蘑菇在覆土层无菌的情况下不能形成子实体, 此后研究表明覆土中的臭假单胞杆菌 *Pseudomonas putida* 与双孢蘑菇子实体的形成密切相关 (Hayes et al., 1969; Rainey & Cole, 1987; Fermor et al., 2000)。Wood (1976) 认为可能是假单胞杆菌 *Pseudomonas* 消除了蘑菇菌丝产生的“自我抑制结实”物质而引发蘑菇子实体形成。本试验中对覆土中的可培养细菌量分析和 PLFA 分析表明, 可培养细菌量随着蘑菇菌丝在覆土层中生长而显著增加; 出菇后, 蘑菇菌丝转入生殖生长, 至蘑菇采收期, 覆土中的细菌量显著下降; 采收后的菇潮间隔期, 随着蘑菇菌丝恢复生长, 细菌量随之显著增加; 不同覆土间的细菌量与蘑菇菌丝生物量正相关。这些现象表明覆土中的细菌与蘑菇菌丝存在营养共生关系。

提高覆土的持水率、增加覆土的含水量是提高蘑菇产量的有效措施 (Kalberer, 1991)。我国当前应用的覆土材料持水率低、供水不足, 是影响蘑菇产量的一个关键因素, 水分释放特征是优质覆土的重要指标 (蔡为明 等, 2002)。本试验表明, 蘑菇产量与覆土持水率正相关, 随着覆土持水率的提高, 产量也随之增加, 因此, 提高我国蘑菇覆土材料的持水率是提高当前蘑菇产量有效可行的技术措施。100% 泥炭覆土与 50% 泥炭/田土混合覆土的产量无显著性差异, 综合考虑覆土成本因素, 生产应用以 50% 泥炭覆土为佳。

综上所述, 覆土的蘑菇菌丝生物量、持水率和含水量, 是蘑菇覆土基质优化的重要技术指标。

## References

- Anon. 1990. Recommendations for peat for horticultural and landscape use, BS4156. Landon: British Standards Institution. 13.
- Awad A S, Nair N G. 1989. Salt tolerance of *Agricus bisporus* in relation to water stress and toxicity of sodium ions. *Ann Appl Biol*, 115: 215 – 220.
- Bels Koning H C. 1950. Experiments with casing soils, water supply and climate. *Mushroom Science*, 1: 78 – 84.
- Bligh E G, Dyer W J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 37: 911 – 917.
- Cai Wei-ming, Ralph Noble, Jin Qun-li, Fang Ju-lian, Feng Wei-lin, Fan Li-jun. 2002. Physical and chemical properties of three kinds of industrial or agricultural wastes and their influence on growth of the mushroom (*Agaricus bisporus*) as casing soil. *Acta Agriculturae Zhejian-gensis*, 14 (6): 315 – 319. (in Chinese)
- 蔡为明, Ralph Noble, 金群力, 方菊莲, 冯伟林, 范丽军. 2002. 三种工农业废料的理化性状及作为覆土材料对蘑菇生长的影响. *浙江农业学报*, 14 (6): 315 – 319.
- Chen Zhen-xiang, Yu Xin, Xia Ming-fang, Dai Zhao-xia, Sun Cheng. 2005. Application of phospholipid fatty acid (PLFA) analysis in microbial ecology. *Chinese Journal of Ecology*, 24 (7): 828 – 832. (in Chinese)
- 陈振翔, 于鑫, 夏明芳, 戴朝霞, 孙成. 2005. 磷脂脂肪酸分析方法在微生物生态学中的应用. *生态学杂志*, 24 (7): 828 – 832.
- Colauro N B, Eira A F. 1998. Quantitative evaluation of the bacterium community in the casing layer on *Agaricus bisporus*. *Energiana Agricultura*, 132: 15 – 26.
- Edwards R L, Flegg P B. 1953. Experiments with artificial mixtures for casing mushroom beds. *Mushroom Science*, 2: 143 – 149.
- Eger G. 1961. Untersuchungen über die function der deckschicht bei der fruchtkörperbildung des kulturchampignons, *Psalliota bispora* Lange. *Archiv für Mikrobiologie*, 39: 313 – 334.
- Fermor T, Lincoln S, Noble R, Dobrovin-Pennington A. 2000. Microbiological properties of casing//van Griensven. *Science and cultivation of edible fungi*. Rotterdam: Balkema; 447 – 454.
- Frostegård A, Bååth E, Tunlid A. 1993a. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biol Biochem*, 25: 723 – 730.
- Frostegård A, Tunlid A, Bååth E. 1993b. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Appl Environ Microbiol*, 59: 3605 – 3617.
- Hayes W A. 1981. Interrelated studies of physical, chemical and biological factors in casing soils and relationships with productivity in commercial culture of *A. bisporus* (Pilait). *Mushroom Science*, 11: 103 – 129.
- Hayes W A, Randle P E, Last F T. 1969. The nature of the microbial stimulus affecting sporophore formation in *Agaricus bisporus* (Lange). *Sing, Ann Appl Biol*, 64: 177 – 178.
- Kalberer P P. 1983. Influence of the depth of the casing layer and the harvesting time on changes of the water content of the casing layer and the substrate caused by the first flush of mushroom. *Scientia Horti*, 21: 9 – 18.
- Kalberer P P. 1985. Influence of the depth of the casing layer on the water extraction from casing soil and substrate by the sporophores, on the yield and on the dry matter content of the fruit bodies of the first three flushes of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Scientia Horti*, 27: 33 – 43.
- Kalberer P P. 1991. Water relations of the mushroom culture (*Agaricus bisporus*): Influence on the crop yield and on the dry matter content of the fruit bodies. *Mushroom Science*, 13: 269 – 274.
- Noble R, Gaze R H. 1995. Properties of casing peat types and additives and the influence on mushroom yield and quality. *Mushroom Science*, 14: 305 – 312.
- Noble R, Dobrovin-Pennington A, Evered C E, Mead A. 1999a. Properties of peat-based casing soils and their influence on the water relations and growth of the mushroom (*Agaricus bisporus*). *Plant and Soil*, 207: 1 – 13.
- Noble R, Gaze R, Dobrovin-Pennington A. 1999b. Casing-effects on yield and quality. *HDC News*, 54: 10 – 11.
- Rainey P B, Cole A L, Sanderson F R. 1986. Air filled pores—an important component of the mushroom casing layer//The Pennsylvania State Univ. *Scientific and technical aspects of cultivating edible fungi*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier; 501 – 514.
- Rainey P B, Cole A L J. 1987. Evidence for the involvement of plasmids in sporophore initiation and development in *Agaricus bisporus*//Wuest P J, Royes D J, Beelman R B. *Developments in crop science*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier; 235 – 248.

- Schroeder G M, Schisler L. 1981. Influence of compost and casing moisture on size, yield, and dry weight of mushrooms. *Mushroom Science*, 11: 495–509.
- Waller P L, Harrison A M. 1991. Estimation of pore space and the calculation of air volume in horticultural substrates. *Acta Horticulturae*, 294: 29–39.
- Wang Shu-guang, Hou Yan-lin. 2004. Application of phospholipid fatty acid method in soil microbial analysis. *Microbiology*, 31 (1): 114–117. (in Chinese)
- 王曙光, 侯彦林. 2004. 磷脂脂肪酸方法在土壤微生物分析中的应用. *微生物学通报*, 31 (1): 114–117.
- Wood D A. 1976. Primordium formation in axenic cultures of *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. *Journal of General Microbiology*, 95: 313–323.

## 番茄雌核发育诱导及胚珠植株再生研究初报

王孝宣\*, 杜永臣, 朱德蔚, 高建昌, 国艳梅, 李 菲, 戴善书

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

### *In vitro* Gynogenesis Induction and Ovule Plant Regeneration in Tomato

WANG Xiao-xuan\*, DU Yong-chen, ZHU De-wei, GAO Jian-chang, GUO Yan-mei, LI Fei, and DAI Shan-shu

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

关键词: 番茄; 雌核发育; 子房; 胚珠; 大孢子; 单倍体

中图分类号: S 641.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2008) 08-1174-01

番茄单倍体培养技术的建立对于番茄育种、分子标记、遗传图谱构建、基因定位、基因克隆等均有极其重要的意义。目前诱导番茄雄核发育——花药和小孢子培养是获得单倍体的主流技术, 但未获得理想的结果。作者探索另一条获得番茄单倍体的途径——诱导雌核发育, 目前已从离体胚珠获得大量愈伤组织, 并获得一再生植株, 其来源有待鉴定, 现将方法报道如下。

试材为中国农业科学院蔬菜花卉研究所育成的两个番茄杂交品种‘中杂 101’和‘中杂 105’, 常规种植和管理。定植后选取单核期的花蕾, 剥离出子房, 用 10% 次氯酸钠灭菌 16~20 min, 再用去离子无菌水冲洗 3~4 次。无菌条件下在诱导培养基上接种 4 种外植体: (1) 完整子房; (2) 半子房 (将子房外部果皮切除使胚珠外露); (3) 胚珠块 (将半子房切成与宽均 1~3 mm 的胚珠块); (4) 离体胚珠。在每个离心管中接种 2~3 个子房、半子房或胚珠块, 接种 100~200 个胚珠, 每种外植体接种 10 个离心管。诱导培养基以 B5 和 MS 为基本培养基, 附加不同浓度 ( $1 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的生长素 (IAA、NAA、2, 4-D、IBA) 和细胞分裂素 (KT、6-BA、TDZ、ZT), 共组成 20 种培养基, 蔗糖 2%, 琼脂糖 0.8%, pH 5.8~6.0。在 28℃、70% 相对湿度下进行暗培养。分化培养基以 B5、MS、DBM II、Nitsch 和 N6 为基本培养基, 附加不同浓度 ( $0.1 \sim 1\,000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的生长素 (IAA、NAA、2, 4-D) 和细胞分裂素 (KT、6-BA、TDZ、ZT), 蔗糖 2%, 琼脂糖 0.8%, pH 5.8~6.0。

两个品种的子房、半子房和胚珠块均未获得愈伤组织, 离体胚珠在培养 7~12 h 后开始膨大, 颜色逐渐变白, 呈不透明状。1 周后体积增加 1 倍, 60% 以上的胚珠成长为不透明的白球状。10~15 d 开始形成愈伤组织, 20 d 后愈伤组织可达 2~3 mm, 每个离心管中均可生长出 50~100 个愈伤组织。两个品种均获得了上千个愈伤组织。

当愈伤组织达到 2 mm 大小时转移至分化培养基上, 16 h 光照 ( $90 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), 8 h 黑暗, 温度 28℃, 70% 相对湿度, 每 20~40 d 更换 1 次培养基, 1 周后开始膨大, 随后表面稍变褐, 3 周左右开始变绿, 2~3 个月后完全变绿, 随后继续生长。‘中杂 101’番茄未能诱导出芽。‘中杂 105’番茄在 B5 + IAA  $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + ZT  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  培养基中培养, 更换 10~12 次培养基, 生长 15 个月, 一个愈伤组织开始出现绿色的芽点, 再过 2~3 周后形成 2 cm 高的植株。当芽生长至 2~3 片叶时, 将其转移至 MS +  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA + 2% 蔗糖 + 0.8% 琼脂, pH 5.8 的生根培养基中培养, 1 周后根即长成。根尖染色体鉴定结果其染色体数为 24 条。该植株是来源于体细胞还是来自胚囊中的单倍体细胞, 正在鉴定中。

收稿日期: 2008-05-30; 修回日期: 2008-07-17

基金项目: 国家‘863’计划资助项目 (2007AA10Z178); 农业部蔬菜遗传与生理重点开放实验室资助项目

\* E-mail: wxlxhy@yahoo.com.cn