

# 氟乐灵诱导甜瓜四倍体研究初探

魏育国<sup>1,2</sup>, 蒋菊芳<sup>2</sup>

(1. 中国气象局兰州干旱气象研究所, 甘肃 兰州 730020; 2 甘肃省武威市农业气象试验站, 甘肃 武威 733000)

**摘要:** 氟乐灵是一种新型的具有染色体加倍功效的除草剂。该试验通过氟乐灵溶液处理刚刚发芽的甜瓜种子诱导四倍体, 在室温条件下对甜瓜品种黄河蜜三号, 以 200, 400, 600 倍浓度的氟乐灵溶液处理甜瓜种子 4, 6, 8 h 进行四倍体诱导试验, 发现氟乐灵处理的根尖有明显的加粗现象。通过镜检, 染色体计数法测定诱导率<sup>[1]</sup>, 结果表明, 浓度为 400 倍的氟乐灵溶液处理露白的甜瓜种子 8 h 所获得的加倍效果最好, 诱导率达到 32.2%。试验结果表明, 氟乐灵处理甜瓜种子可以成为获得四倍体甜瓜的有效途径之一, 同时对其他作物的多倍体育种研究提供了参考依据。

**关键词:** 氟乐灵; 甜瓜; 四倍体; 诱导

中图分类号: S652.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2006)增刊-0073-04

## The Preliminary Explore on Induction of Tetraploidin Muskmelon with Trifluralin

WEI Yit-guo<sup>1,2</sup>, JIANG Jit-fang<sup>2</sup>

(1. Lanzhou Institute of Arid Meteorology, CMA, Lanzhou 730020, China;

2. Agricultural and Experimental Station, Wuwei Meteorological Office, Wuwei 733000, China)

**Abstract:** Trifluralin is a Patten herbicide. It is reported that Trifluralin have function of making double chromosomes. In the experiment muskmelon seeds of 3# yellow river honeydew in immersing with Thifluralin at 200 times, 400 times, and 600 times for 4 h, 6 h, 8 h respectively were treated under room temperature. The roots tip that treated with Trifluralin were increased obviously in diameter by observed directly. The cell root tip were inspected by microscope. The result showed that the best treatment for inducing tetraploid were obtained by immersing seeds showing valuables unintentionally with trifluralin solution at 400 times, when the muskmelons seeds were immersed for 8 h, the induction frequency being 32.2%. The method that seeds were immersed with trifluralin solution was a new and efficient way to obtain tetraploid muskmelons. Meanwhile, the achievements of experiment provide a new guiding basis for ployploid breeding research work of other crops.

**Key words:** Muskmelon; Trifluralin; Tetraploid; Induction

甜瓜属于葫芦科(*Cucurbitaceae*)甜瓜属(*Cucumis*)蔓性草本植物。它营养丰富, 外观美丽, 香气浓郁, 性寒止渴, 具有除热利尿的医疗保健功效, 是深得世界各地广大消费者钟爱的盛夏消暑解渴水果。甜瓜在栽培上分为厚皮甜瓜(*ssp. melon*)和薄皮甜瓜(*ssp. coromon*)两大类型, 都属于二倍体物种, 其染色体数目为  $2n=24$ 。它在南北各地均有栽培, 其中新疆、甘肃等西北地区是哈密瓜、白兰瓜等厚皮甜

瓜的老产区, 而东北地区是薄皮甜瓜的传统产区。厚皮甜瓜在昼夜温差较小, 空气湿度较大的地区栽培往往生长不良, 容易染病而且含糖量低, 品质不佳。尤其是晚熟品种(哈密瓜一类的大型晚熟品种)几乎不能在多雨的地区和江南栽培, 即使在西北干旱地区, 也常因病害严重而影响生产。由于多倍体效应能使植株的抗性提高, 并由于在生理生化方面所产生的一系列变化, 也扩大了适应性。所以, 可望

收稿日期: 2006-07-06

作者简介: 魏育国(1978-), 男, 甘肃民勤人, 助理工程师, 学士, 主要从事荒漠生态与农业气象研究工作。

通过染色体加倍获得抗病、品质和含糖量得到改善的品系,扩大厚皮甜瓜的栽培范围和区域。薄皮甜瓜的许多优良品种,则因皮薄且十分酥脆娇嫩而不耐贮运。多倍体效应可以增加果皮、果肉的厚度,也可望它们的贮运性和果肉厚度获得改善。而且从已获得四倍体甜瓜来看,它的果实比二倍体果实大,食用品质也改进了<sup>[2]</sup>。鉴于多倍体的效应,国内许多科研单位纷纷通过甜瓜染色体加倍,使之在生理生化方面产生一系列变化,从而得到多倍体植株,使其抗病性和品质有所改善,并扩大栽培区域,在我国的河南、上海等地已有成功的事例<sup>[3]</sup>。四倍体甜瓜可溶性固型物含量明显增加,风味变优,抗性增加<sup>[4]</sup>,果肉增厚,成熟期略变晚<sup>[5]</sup>。但至今,无论是野生还是栽培甜瓜中尚未发现天然四倍体的报道。因而甜瓜四倍体获得的途径仍然依赖于人工诱变产生。目前,人工诱导二倍体甜瓜,使之染色体加倍,最有效并比较普遍采用的化学药剂是秋水仙素<sup>[6,7]</sup>。但秋水仙素诱导多倍体存在无法克服的缺点:处理需要大量试材,占地多,用工多<sup>[8]</sup>;秋水仙素有剧毒,对中枢神经有麻痹作用,同时对环境造成污染;秋水仙素造价高,用于试验成本高。由于秋水仙素以上无法克服的缺点,科学工作者开始探索更好的诱导多倍体途径。现发现几种除草剂(Trifluralin, oryzalin 等)也具有染色体加倍的功效<sup>[6]</sup>,育种工作者已在用过氟乐灵的大田甜瓜中发现了加倍的四倍体植株。Li Ying 等<sup>[9]</sup>用两种二硝基苯胺(Oryzalin, Ethlfurlin)和秋水仙素在离体培养过程中处理西瓜的芽,Oryzalin, Ethlfurlin 在诱导培养 9 d,有 50% 四倍体变异发生,而秋水仙素在诱导 30 d 才达到此效果。氟乐灵比秋水仙素毒性小,与纺锤丝蛋白结合专一,诱导效率高且价格低廉<sup>[6]</sup>。同时,氟乐灵对人畜毒性极低,对皮肤无刺激,慢性毒力也低,是染色体加倍的理想诱导剂。但用氟乐灵处理瓜类种子诱导四倍体的试验研究还未见报道。为此,本试验尝试用氟乐灵诱导处理甜瓜种子的新方法,以期摸索一条更有效、更简便、更经济的四倍体诱导途径。同时,以氟乐灵诱导甜瓜四倍体为基础和指导,进一步探索其它植物的多倍体诱导,期望能为育种工作者提供参考的依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

试验于 2003 年在甘肃农业大学园艺系瓜类研

究所进行,以甘肃农业大学园艺系育成的甜瓜品种黄河蜜三号种子为主要材料。

### 1.2 方法

1.2.1 预备试验 氟乐灵具有诱导多倍体的效果,仅在施用过氟乐灵的大田甜瓜中发现,至于具体种子诱导方式还未见报道,适宜的浓度和处理时间没有前人的资料可借鉴。因此,本试验开始并没有可供参考的浓度、时间范围。为此,首先对氟乐灵诱导甜瓜四倍体试验进行了有关浓度、时间、预处理时间、解离时间等大量的预备试验。

1.2.1.1 适宜诱变浓度、时间的筛选 设置氟乐灵浓度 50, 100, 200, 400, 600, 800 倍 6 个处理,每一浓度进行 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 6 个处理共 36 个组合对甜瓜种子进行浸泡处理,再在恒温箱中催芽,结果未发现根尖加粗现象。为此,初步认为氟乐灵溶液更易作用于根尖。后改为用氟乐灵溶液处理露白的甜瓜种子,试验设计氟乐灵 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 倍 8 个浓度,时间 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 h 8 个处理共 64 个组合浸泡刚露白的种子,再在恒温箱中继续催芽,发现高浓度,长时间处理药害比较严重,表现症状如根尖变黄,根尖基部细化等。而浓度在 200 ~ 600 倍范围内,处理时间在 4~ 9 h 范围内根尖有较好的加粗现象,尤其,氟乐灵浓度为 400, 8 h 处理的根尖有明显加粗现象,未发生药害症状。根据观察对比确定了浓度在 200~ 600 倍范围内,时间在 4~ 9 h 范围内处理为氟乐灵诱导甜瓜四倍体的参考浓度和时间。

1.2.1.2 适宜取材、预处理、解离时间、预处理药剂的确定 试验中发现取材时间、预处理时间、解离时间、预处理药剂对于未经药剂处理的甜瓜种子与氟乐灵处理过甜瓜种子间存在明显的差异。为此,本试验采用不同的取材时间,设置不同的预处理时间、解离时间、预处理药剂进行试验。经镜检后确定早晨 8:00~ 9:00 取材,采用饱和的对二氯苯溶液(1%~ 2%)预处理 2 h,解离 5 min 染色较好,染色体分散好,有较好的分裂相。

1.2.2 正式试验 在预备试验的基础上,开始进行正式试验。

1.2.2.1 供试材料准备 供试材料选用甘肃主栽的甜瓜品种黄河蜜三号种子。在室温下,浸泡 12 h 后,在恒温箱中 28~ 30 °C 温度下催芽,种子露白后,设置氟乐灵 200, 400, 600 倍 3 个浓度,处理时间分别为 4, 6, 8 h 共 9 个处理浸泡,后用自来水冲洗 2

~ 3 次,洗净种子表面的残留药液,再在恒温箱内继续催芽,芽长约 1.5 mm 时<sup>[11, 12]</sup>,在早晨 8:00~ 9:00 时随机地取生长旺盛的新生根尖于小滴瓶内备用。

1.2.2.2 预处理 将甜瓜根尖放入饱和的对二氯苯溶液(1%~ 2%)中处理 2 h<sup>[12]</sup>,使细胞停留在中期,增加中期分裂相比比例,并使染色体缩短和使染色体更加分散。

1.2.2.3 固定 预处理的根尖用蒸馏水冲洗 3~ 4 次后,换至乙醇丙醋酸(3:1)固定液中固定 12 h 以上<sup>[12]</sup>,尽快杀死细胞,使细胞的结构尽可能接近生活状态。

1.2.2.4 解离 先用酒精将固定后的根尖冲洗 2~ 3 次,再用蒸馏水冲洗 2~ 3 次,充分洗去根尖上的醋酸味,换至 1 mol/L 的盐酸 60 ℃水浴中解离 5 min,以解离细胞壁的纤维素和果胶质,使细胞容易分开。

1.2.2.5 染色 解离完的根尖用蒸馏水冲洗干净后浸泡入新配的改良苯酚品红溶液中染色 12 h 以上。

1.2.2.6 制片 切取 0.5 mm 的处理的根尖用常规制片法制片。

1.2.2.7 诱导率测定 用染色体计数法进行测定。每个处理观察有较好分裂相的片子 30 个作为 1 次重复,每一处理做 3 次重复,用显微镜进行镜检,统计诱变数。

2 结果与分析

2.1 处理方法分析

通过在预备试验中直观观察,用氟乐灵溶液处理露白的甜瓜种子,较种子直接浸泡处理根尖明显加粗。可见用氟乐灵溶液处理露白的甜瓜种子是诱导多倍体的可行方法。

2.2 诱导结果分析

通过不同浓度氟乐灵,不同处理时间诱导甜瓜四倍体的诱导结果见表 1

从表 1 可以看出,在试验中选用的氟乐灵浓度范围内(200~ 600 倍),使用不同处理时间(4~ 8 h),均能诱导甜瓜种子根尖细胞使染色体加倍,使用不同浓度的氟乐灵和不同的处理时间处理甜瓜种子,四倍体诱导率不同。在一定处理浓度范围内(400~ 600 倍),随着处理时间延长,诱导率相应增高。在氟乐灵浓度为 400 倍时,诱导率由 23.3% 增至

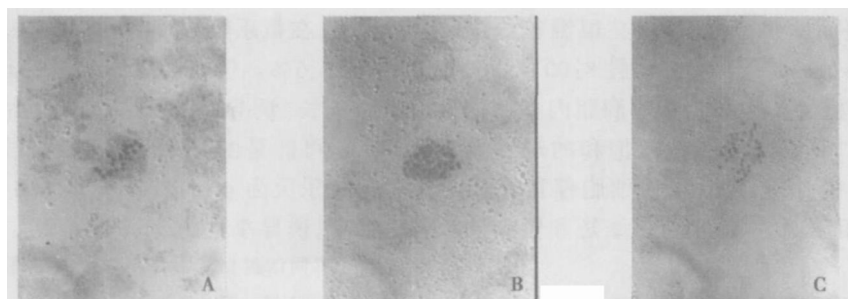
32.2%,在氟乐灵浓度为 600 倍时,诱导率由 18.9% 升至 25.6%。但在 200 倍浓度处理种子时,随着时间的延长,诱导率呈下降趋势,由 15.6% 降至 14.4%,这可能是由于发生药害的缘故。在上述 9 个处理中氟乐灵为 400 倍时,处理 8 h 对甜瓜种子诱导率最高,诱导率达到 32.2%。

表 1 不同浓度氟乐灵用不同时间处理甜瓜根尖的诱导率

Tab.1 The induction frequency of the roots tip treating with the different					
浓 度 ( 倍液) Density	处理时间 (h) Treatment time	制片数 ( 个) Number of piece	加倍数 ( 个) Number doubling chromosomes	诱导率 ( % ) The induction frequency	平均诱导率 ( % ) The average induction frequency
200	4	30	4	13.3	15.6
		30	1	3.3	
		30	9	30.0	
	6	30	3	10.0	17.8
		30	5	16.7	
		30	8	26.7	
	8	30	4	13.3	14.4
		30	7	23.3	
		30	2	6.7	
	4	30	4	13.3	23.3
		30	9	30.0	
		30	8	26.7	
400	6	30	7	23.3	26.7
		30	7	23.3	
		30	10	33.3	
	8	30	7	23.3	32.2
		30	11	36.7	
		30	11	36.7	
	4	30	6	20.0	18.9
		30	8	26.7	
		30	3	10.0	
	6	30	7	23.3	21.1
		30	8	26.7	
		30	4	13.3	
600	8	30	5	16.7	25.6
		30	9	30.0	
		30	9	30.0	

2.3 四倍体的细胞学初步鉴定

镜检后,初步判定根尖细胞染色体发生了倍性改变,本试验中观察到经氟乐灵诱变的四倍体与普通的黄河蜜三号种子根尖和现有的四倍体甜瓜根尖进行比较。普通甜瓜黄河蜜三号根尖细胞染色体 2n= 24(图 1\_A),育成的四倍体甜瓜种子根尖细胞染色体 2n= 4x= 48(图 1\_B),而用氟乐灵处理过的黄河蜜三号种子根尖细胞染色体数为 2n= 4x= 48(图 1\_C)。通过染色体数目的鉴定,进一步证明了经氟乐灵处理露白的甜瓜种子,确实获得了四倍体。



a. 普通甜瓜根尖细胞染色体; b. 四倍体甜瓜种子根尖细胞染色体; c. 氟乐灵处理过的甜瓜种子根尖细胞染色体  
a. The chromosome of ordinary melon's root tip; b. The chromosome of tetraploid melon's root tip;  
c. The chromosome of melon root tip treating with Trifluralin

图 1 甜瓜染色体镜检照片

Fig. 1 The chromosome photograph of melon over microscopic examination

### 3 讨论

在进行氟乐灵诱导甜瓜四倍体试验中,诱导的关键是既要获得较高的诱导率,又要保持较高的成活率。为此,选择合理的药剂浓度、处理时间是关键。处理时间和浓度是影响加倍的主要因素,处理时间短,药剂浓度低,加倍效果差,处理时间过长,药剂浓度过高易发生药害,出现根尖基部细化,根尖顶端发生萎蔫现象,因此,选用适宜的浓度和时间是诱导多倍体的关键。同时,合理的材料处理方法是十分重要的,如处理时间,未经处理的黄河蜜 3 号种子和氟乐灵药液处理过的种子间是存在差异的。且取材时间,解离时间影响分裂相的好坏、多少,从而影响了染色体的观察,而诱导温度的不恒定也影响染色体的加倍效果。当然,制片技术的高低也对试验结果造成一定的误差。用氟乐灵诱导甜瓜四倍体并不是浓度、时间两个因素造成的结果,而是一个多因素综合的过程,可望在今后的试验中,对其他因素作进一步的探索。

### 4 问题与展望

通过本诱导试验表明,用氟乐灵溶液诱导露白的甜瓜种子使之加倍为四倍体,或许是又一诱导多倍体的有效途径。本试验仅仅是对氟乐灵诱导甜瓜四倍体的初步探索。氟乐灵与秋水仙素相比有价格低廉、毒性小等优点。但仍然需要在影响诱导率的因素如温度、浓度、时间等方面进一步研究,用药浓度须与其他条件相匹配,以期达到更高的诱导率。氟乐灵对四倍体甜瓜诱导试验的成功,可以成为秋水仙素之外的又一获得四倍体的途径。同时,为其他植物多倍体诱导提供了依据。植物多倍体化不仅

使植株基因活性及酶的差异性增强,而且还增强了植株的生态适应性,对环境的抗耐性及降低了蒸腾作用,提高了光合效率等。四倍体则恢复育性,提高稳定性<sup>[13]</sup>。若将此用于干浆果类,可延长贮存期,用于无性繁殖的花卉上,则可使花器官增大,色彩更好或花期延长。这大大提高了花卉的观赏价值和商品价值<sup>[13]</sup>。因此。氟乐灵诱导多倍体有着无比广阔的应用前景。

### 参考文献:

- [1] 中国农业科学研究院等主编. 中国西瓜甜瓜[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 275- 280.
- [2] 王 鸣, 杨鼎新. 染色体和瓜类育种[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 1981: 181- 192.
- [3] 蒋 舰, 姚自鸣, 吕 凯. 甜瓜倍性育种研究[J]. 安徽农业科学, 1996, 27( 2): 164- 165.
- [4] 柴兴蓉, 张 莉, 王 欣. 甜瓜四倍体育种及其生产利用研究[J]. 中国西瓜甜瓜, 1998( 2): 16- 19.
- [5] 马国斌, 王 鸣, 郑学勤. 甜瓜组织培养在植株中的四倍体变异[J]. 园艺学报, 1999, 26( 2): 128- 130.
- [6] 刘文革, 王 鸣. 西瓜甜瓜育种中的染色体倍性操作及倍性鉴定[J]. 果树学报, 2002, 19( 2): 132- 135.
- [7] Kaltsikes P J. Zpflanzenzuchtg. 1974, 71( 3): 264- 286.
- [8] 谭素英, 黄秀强, 刘济伟. 提高西瓜四倍体的研究[J]. 华北农学报, 1993, 8( 4): 2- 15.
- [9] Li Ying, whitesides J F, Rhosdes B. preparation of nuclei from in vitro watermelon shoot tissue for cell flow cytometry [J]. Cucurbit Genetics coop RPT, 1999, 22: 43- 46.
- [10] 陈 俊, 李登科, 李太保. 诱导葡萄多倍体研究[J]. 果树科学, 1995, 12( 3): 151- 155.
- [11] 王敏琴, 鲍学珍, 王晓红. 葡萄多倍体诱导的初步研究[J]. 山东农业科学, 2002, ( 1): 19- 20.
- [12] 李国珍. 染色体及其研究方法[M]. 北京: 科学出版社, 1985: 103- 109.
- [13] 郭启高, 宋 明, 梁国鲁. 植物多倍体诱导育种研究进展[J]. 生物学通报, 2000, 35( 2): 8- 10.