

# 利用二硝基苯胺类除草剂离体诱导西瓜四倍体

阎志红, 刘文革\*, 赵胜杰, 何楠

(中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009)

**摘要:** 以二倍体西瓜单系 Z-A 和 Z-R 为试验材料, 采用不同浓度的二硝基苯胺类除草剂——胺磺灵、二甲戊乐灵和氟乐灵处理其离体子叶, 以秋水仙素和不含任何诱导剂的液体培养基为对照, 研究诱导西瓜四倍体的效果。结果表明, 3种除草剂诱导西瓜四倍体的效果都比秋水仙素好, 二甲戊乐灵、胺磺灵、氟乐灵和秋水仙素的四倍体诱导率分别为 40.0%、33.3%、26.7%和 13.3%。采用子叶直接处理比间接处理的四倍体诱导率高。通过 FDA 荧光法对西瓜试管苗叶片表皮保卫细胞叶绿体计数, 进行四倍体变异早期鉴定, 准确率为 90%以上。

**关键词:** 西瓜; 四倍体; 二硝基苯胺类除草剂; 离体诱导; 倍性

**中图分类号:** S 651 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 11-1621-06

## In Vitro Induction of Tetraploid Watermelon Using Dinitroaniline Herbicide

YAN Zhi-hong, LIU Wen-ge\*, ZHAO Sheng-jie, and HE Nan

(Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, China)

**Abstract:** Tetraploid watermelons were successfully induced *in vitro* by treating cotyledons of diploid watermelon lines Z-A and Z-R in liquid MS medium with three dinitroanilines herbicide oryzalin, pendimethalin and trifluralin in different concentrations, colchicine or no inductor used as control. The results indicated that the effects of tetraploid induction were better by using three dinitroanilines than those of colchicine. The induced tetraploid rate of oryzalin, pendimethalin, trifluralin and colchicine was 40.0%, 33.3%, 26.7% and 13.3% respectively. The induction rate of direct treatment in which the cut cotyledons were directly planted into inductive medium was higher than that of indirect treatment in which the cotyledons were pre-cultured on differentiation medium (MS + BA 2.0 mg · L<sup>-1</sup>) for 7 d before planted into inductive medium. The tetraploid of watermelon plantlets was determined in the early stage with FDA fluorescence method in which the chloroplasts of epidermal guard cells were counted under a microscope and UV light. The detective rate was above 90%. The confirmed tetraploid plantlets were transplanted into a greenhouse and self-pollinated and the seeds of tetraploids were obtained.

**Key words:** watermelon; tetraploid; dinitroaniline herbicide; *in vitro* induction; ploidy

培育三倍体无籽西瓜品种的关键是先获得优良的四倍体。目前西瓜四倍体的诱导方法是用秋水仙素处理幼苗生长点 (Tan et al, 1995; 刘文革和阎志红, 2005)。但此法容易造成幼苗死亡, 且诱导频率较低 (刘文革和王鸣, 2002)。一般西瓜组织培养中有 5%左右的四倍体变异 (Compton & Gray, 1993)。用秋水仙素进行离体诱导, 可使四倍体诱导频率明显提高 (张兴平, 1996; 马国斌和王鸣, 2002)。但在培养初期使用秋水仙素会显著抑制不定芽的再生 (张兴平, 1996), 给离体加倍带来困

收稿日期: 2008 - 09 - 03; 修回日期: 2008 - 10 - 10

基金项目: 国家 '863' 计划子课题项目 (2004AA241170); 国家科技支撑计划项目 (2006BAD01A7-6-03); 河南省重大科技攻关项目 (072101110500); 河南省自然科学基金项目 (0511030800)

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: lwgwm@163.com; Tel: 0371-65330936)

难 (Compton et al, 1996)。

近年来发现二硝基苯胺类 (DNH) 除草剂也具有使染色体加倍的功效, 并且比秋水仙素的毒性小, 诱导四倍体效果好 (Morejohn et al, 1987; Dunn & Lindstrom, 2007)。国内已在黄瓜、甜瓜等作物上有成功的报道 (韩毅科等, 2006; 魏育国和蒋菊芳, 2006), 而西瓜这方面的报道较少 (Li et al, 1999)。

本试验中以 3 种二硝基苯胺类除草剂: 胺黄灵 (oryzalin)、二甲戊乐灵 (pendimethalin) 和氟乐灵 (trifluralin) 作为诱导剂, 在离体条件下进行西瓜四倍体的诱导, 以期在西瓜四倍体诱导寻找一条快速有效的新途径。

## 1 材料与方 法

### 1.1 四倍体的离体诱导

以中国农业科学院郑州果树研究所多倍体育种课题组选育的优良二倍体西瓜材料 Z-A 和 Z-R 为试验材料。Z-A 为大果型品种, Z-R 为小果型品种。试验于 2003—2007 年在本所组织培养室进行, 田间鉴定在郑州果树研究所中牟试验基地进行。

直接处理: 将西瓜种子在无菌条件下发芽培养, 切取 4 d 苗龄的整片子叶, 近轴端向上直接接种到含 15、30 和 45  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  胺磺灵的液体培养基 (MS+BA 2.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 下同) 和含 5、10、50 和 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  二甲戊乐灵或氟乐灵的液体培养基中, 在 26 $^{\circ}\text{C}$  弱散射光下转速为 110  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  的摇床上振荡培养 2、4、6 d。分别以含秋水仙素 500、1 000 和 1 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的液体培养基和不含诱导剂的液体培养基为对照。每处理 15 片子叶。

间接处理: 切取 4 d 苗龄的整片子叶先接种在固体培养基 (MS+BA 2.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 上预培养 7 d, 然后再接种到含 15、30 和 45  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  胺磺灵的液体培养基 (MS+BA 2.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 中, 培养条件同上, 每处理 15 片子叶。上述处理后的材料用无菌水冲洗 4~5 遍, 灭菌滤纸吸干, 再接种到不含诱导剂的固体培养基 (MS+BA 2.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 上继续培养 30 d, 继代培养 2 次, 周期 24 d。之后转接到伸长培养基 (MS+KT 0.2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 中, 待茎生长至 2.0 cm 左右, 将无根苗切下转至生根培养基 (MS+BA 0.2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 中诱导生根。

### 1.2 倍性鉴定方法

保卫细胞叶绿体数观察: 采用 FDA 荧光鉴定法 (Compton et al, 1999; 刘文革等, 2005)。具体步骤如下: 将 0.5 g 二乙酸盐荧光黄溶于 100 mL 丙酮中, 溶解后置于 0 $^{\circ}\text{C}$  备用。鉴定时取 FDA 溶液用蒸馏水配成 0.01% 的溶液, 取成熟平展的叶片放在载玻片上, 将 0.01% FDA 溶液滴于叶片背面, 盖上盖玻片, 在荧光显微镜 UV 光下镜检。由同一子叶分化的植株随机抽取 1 株进行 FDA 鉴定, 每株观察 10 个气孔保卫细胞, 记录叶绿体的数量, 重复 3 次。SPSS 软件进行统计分析。

根尖细胞染色体数鉴定: 采用去壁低渗法。上午 8 时切取再生植株的幼嫩根尖, 置于 0.002  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 8-羟基喹啉中预处理 3 h, 然后用 0.075  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 KCl 浸泡 20 min 作为前低渗, 用蒸馏水洗净。用 2.5% 纤维素酶和 2.5% 果胶酶混合液在 25 $^{\circ}\text{C}$  下经过 4 h 酶解去壁, 之后浸泡在蒸馏水内 20 min 作为后低渗。Giemsa 染色, 显微镜下观察染色体数。

对四倍体植株进行试管苗移栽, 在温室条件下锻炼 20 d, 然后移栽到大田。田间自交并获得种子, 第 2 年田间种植再次鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 二硝基苯胺类除草剂离体诱导四倍体的效果

试验结果表明: 采用直接处理方式, 3 种除草剂均可诱导产生四倍体 (图 1, A~D), 在低浓度

下对西瓜四倍体的诱导率都比秋水仙素高，未经除草剂和秋水仙素处理的对照经过 FDA 鉴定和根尖染色体鉴定没有四倍体植株（表 1）。

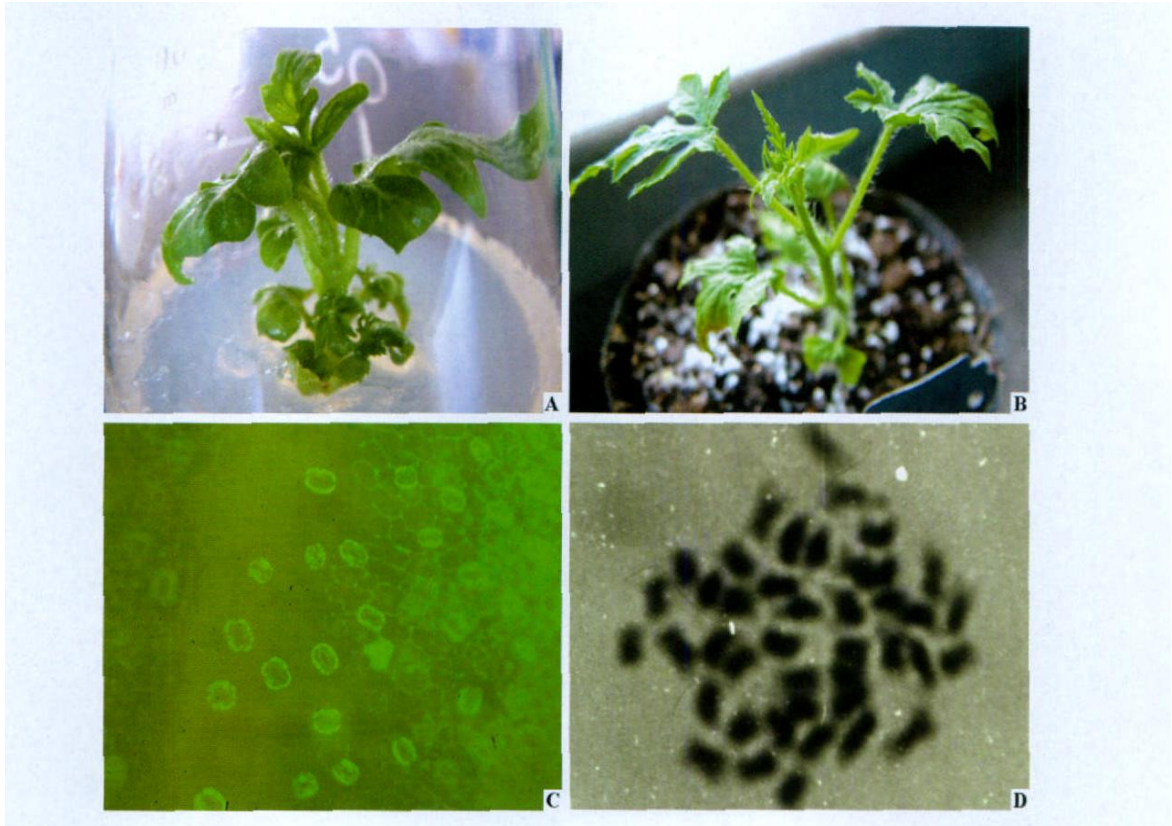


图 1 诱变的西瓜四倍体

A. 试管苗；B. 移栽成活；C. FDA 鉴定为  $4x$ 西瓜叶片保卫细胞的叶绿体数；D. 根尖染色体数， $2n = 4x = 44$ 。

Fig. 1 Induced tetraploid watermelon plants

A. Test-tube plantlet; B. Transplanted plantlet; C. Chloroplasts in guard cell pairs from different tetraploid watermelon leaves by FDA under UV light; D. The chromosome number of root tips of induced tetraploid watermelon,  $2n = 4x = 44$ .

处理浓度和诱导时间对西瓜子叶不定芽的分化有一定影响，从而间接影响四倍体的诱导率。随着处理浓度和诱导时间的增加，发生不定芽的子叶数递减（表 1）。

结果还表明：在相同处理下，Z-A 四倍体的诱导率总体上都比 Z-R 高。Z-R 分化不定芽较少，说明对除草剂更加敏感，容易受到抑制。诱导剂胺磺灵在  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  处理 4 d 时，Z-R 子叶边缘开始变褐，子叶背部上端表面有增厚疏松的褐变组织，Z-A 仅有少量子叶边缘变褐；处理 6 d 后，Z-R 所有叶片都反卷，分化不定芽的子叶数为零，Z-A 仅部分叶片反卷。未添加诱导剂的不定芽分化正常。

选用诱导效果较好的胺磺灵对 Z-R 子叶进行直接诱导和间接诱导比较（表 1），结果表明：四倍体诱导率直接处理（20.0% ~ 26.7%）比间接处理（13.3% ~ 20.0%）高，而且直接处理褐化较轻，死亡率低。

## 2.2 西瓜试管苗早期倍性鉴定

选取西瓜伸长培养阶段平展、正常的叶片，FDA 荧光法进行叶片保卫细胞叶绿体数观察发现，胺磺灵、二甲戊乐灵、氟乐灵以及秋水仙素处理后的部分组培苗叶绿体数为 15 左右（表 2）。这些组培苗大部分形态上表现叶片相对肥大厚实、叶形指数相对较小、叶色相对深绿、茎相对粗壮，而未经诱导剂处理的空白对照则相反，其叶绿体数为 8 左右，据此推断前者为四倍体，后者为二倍体。

表 1 不同二硝基苯胺类除草剂离体诱导西瓜四倍体

Table 1 In vitro induction of tetraploid watermelon by three dinitroanilines and colchicine

处理方式 Treatment	诱导剂 Inducer	处理时间 /d Treatment time	诱导剂浓度 /( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) Concentration	不定芽子叶数		四倍体植株数		诱导率 /%		
				Shoots number		Confirmed tetraploids		Tetraploid explant percentage		
				Z-A	Z-R	Z-A	Z-R	Z-A	Z-R	
直接处理	对照	2	0	15	15	0	0	0	0	
Direct treatment	No induced	4	0	13	12	0	0	0	0	
		6	0	12	10	0	0	0	0	
	秋水仙素 Colchicine	2	500	13	12	0	0	0	0	
			1 000	10	8	0	0	0	0	
			1 500	9	7	0	0	0	0	
		4	500	7	5	0	0	0	0	
			1 000	6	2	1	0	6.7	0	
			1 500	4	1	2	1	13.3	6.7	
		6	500	4	0	-	-	-	-	
			1 000	2	0	1	0	6.7	0	
			1 500	0	0	0	0	0	0	
		二甲戊乐灵 Pendimethalin	2	5	14	13	0	0	0	0
				10	13	10	2	2	13.3	13.3
				50	11	8	4	4	26.7	26.7
	4		100	10	5	5	1	33.3	6.7	
			5	13	12	0	0	0	0	
			10	11	10	6	2	40.0	13.3	
	6		50	9	7	3	1	20.0	6.7	
			100	5	1	1	0	6.7	0	
			5	9	6	0	0	0	0	
	氟乐灵 Trifluralin		2	10	6	3	2	0	13.3	-
				50	4	0	0	-	0	-
				100	2	0	-	-	-	-
		4	5	14	12	0	0	0	0	
			10	12	10	1	0	6.7	0	
			50	10	7	2	2	13.3	13.3	
6		100	9	4	4	3	26.7	20.0		
		5	12	11	0	0	0	0		
		10	11	9	2	2	13.3	13.3		
胺黄灵 Oryzalin		4	50	7	6	3	1	20.0	6.7	
			100	4	0	1	-	6.7	0	
			5	8	4	0	0	0	0	
	6	10	4	3	-	-	-	-		
		50	2	0	-	-	-	-		
		100	0	0	-	-	-	-		
	间接处理 Indirect treatment	2	15	14	11	4	3	26.7	20.0	
			30	13	11	5	4	33.3	26.7	
			45	13	9	2	1	13.3	6.7	
		4	15	13	11	3	1	20.0	6.7	
			30	11	9	1	2	6.7	13.3	
			45	10	6	0	-	0	-	
6		15	8	2	1	0	6.7	0		
		30	9	2	-	0	-	0		
		45	8	1	-	-	-	-		

注: 接种数均为 15; - 表示玻璃化或褐化引起全部死亡; 四倍体诱导率 = 四倍体植株数 / 处理数  $\times 100\%$ 。

Note: The treated buds is 15; - means died plants because of vitrification or browning; Tetraploid explant percentage = Number of confirmed tetraploids / Number of treated buds  $\times 100\%$ .

表 2 西瓜二倍体和四倍体试管苗叶片保卫细胞中的叶绿体数

Table 2 Comparison of number of chloroplast per guard cell pair of diploid and tetraploid leaves from in vitro cotyledons of watermelon

品种 Breeding lines	倍性 Ploidy	叶绿体数 Number of chloroplast	T测验 T-test	P值 P-value
Z-A	2x	8.02 ±0.15	- 29.0 <sup>**</sup>	0.007
	4x	15.45 ±0.21		
Z-R	2x	8.13 ±0.14	- 31.5 <sup>*</sup>	0.018
	4x	15.43 ±0.18		

依据 FDA 鉴定结果分别取 20 株四倍体和 20 株二倍体进行根尖染色体鉴定。其中有 18 株为四倍体 ( $2n=4x=44$ ), 有 19 株为二倍体 ( $2n=2x=22$ ), FDA 荧光鉴定准确率为 90% 和 95%。

### 3 讨论

#### 3.1 诱导剂的选择

二硝基苯胺类除草剂作为染色体加倍的诱导剂, 是通过干扰纺锤体而抑制细胞分裂中期的有丝分裂, 在离体染色体加倍情况下对微管蛋白的作用比秋水仙素更有效 (Morejohn et al., 1987)。低浓度胺磺灵使植株多倍体化是由于其和微管蛋白的高亲和性而形成胺磺灵—微管蛋白复合物, 更主要是胺磺灵通过影响  $Ca^{2+}$  在微管丝组装中的作用而干扰细胞器的  $Ca^{2+}$  运输系统, 这两种因素共同作用导致更多微管解聚合, 最终导致产生四倍体的频率比秋水仙素高 (Ganga & Chezhyan, 2002)。

在本试验中, 采用  $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  胺磺灵处理两个西瓜材料的子叶仅 2 d, 获得 33.3% 和 26.7% 的四倍体诱变率, 都比秋水仙素的诱导率高, 使用的浓度都比秋水仙素低。二硝基苯胺类除草剂与秋水仙素相比, 诱导的死亡率低, 对人体毒性小且价格低廉, 因此可作为秋水仙素的替代品。

从诱导率、不定芽的发生率以及死亡率等综合指标分析, 3 种除草剂诱导西瓜四倍体的效果依次为二甲戊乐灵 > 胺磺灵 > 氟乐灵。

#### 3.2 诱导浓度、时间和方式对西瓜四倍体诱导效果的影响

诱导剂对西瓜不定芽的分化有一定的抑制作用, 且浓度越高抑制作用越明显。本研究表明, 随着除草剂处理浓度的提高及时间的延长, 外植体再生能力下降, 死亡率增加。胺磺灵除草剂以  $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度处理 2 d, 二甲戊乐灵除草剂以  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  处理 4 d 的四倍体诱导率 (33%) 最高。

离体诱导四倍体的培养基大多采用液体培养基, 这是由于液体培养基比固体培养基更有助于诱导剂对试材的深入渗透, 有利于发挥诱导剂对试材的诱导作用。但试材在液体培养基中处理的时间不宜过长, 否则易引起玻璃化。本试验中, 试材在液体培养基中处理 6 d, 转入固体培养基后有部分子叶或茎尖玻璃化严重。培养容器中湿度大是引起玻璃化的主要原因之一。

直接处理西瓜子叶, 四倍体诱导率高于间接处理, 可能是直接处理方式有利于发挥诱导剂对外植体的诱导作用。

#### 3.3 倍性的早期鉴定

染色体计数法是鉴定倍性最可靠的方法之一, 但难度较大, 不易得到典型制片。碘—碘化钾叶绿体计数法虽然简单方便, 但对于西瓜来说必须撕取叶片的表皮, 而组培苗太幼嫩难以撕取, 故无法应用。有学者用扫描细胞光度仪早期检测倍性 (Zhang et al., 1994), 但成本昂贵, 不易普及。Sari 等 (1999) 认为根据保卫细胞的大小、单位面积上的气孔数及保卫细胞中叶绿体数, 可以有效区分倍性。刘文革等 (2005) 用二乙酸盐荧光黄 (FDA) 涂抹田间西瓜成熟叶片的下表皮, 在荧光显微镜

UV光下观察保卫细胞叶绿体数,二倍体和四倍体每对保卫细胞的叶绿体数平均为9.7和17.8。作者将FDA法用于四倍体离体诱导的早期倍性鉴定,在组培苗早期即可鉴定出倍性,其方法简单,容易观察,成本低廉,结果可靠,是西瓜倍性鉴定的一种快速有效的方法。

## References

- Compton M E, Gray D J. 1993. Shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of diploid, triploid and tetraploid watermelon. *Amer Soc Hort Sci*, 118: 151 - 157.
- Compton M E, Gray D J, Elmstrom G W. 1996. Identification of tetraploid regenerants from cotyledons of diploid watermelon cultured *in vitro*. *Euphytica*, 87 (3): 165 - 172.
- Compton M E, Bamett N, Gray D J. 1999. Use of fluorescein diacetate (FDA) to determine ploidy of *in vitro* watermelon shoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58 (3): 199 - 203.
- Dunn B L, Lindstrom J T. 2007. Oryzalin-induced chromosome doubling in *Buddleja* to facilitate interspecific hybridization. *HortScience*, 42 (6): 1326 - 1328.
- Ganga M E, Chezhyan N. 2002. Influence of the antimitotic agents colchicine and oryzalin on *in vitro* regeneration and chromosome doubling of diploid bananas (*Musa* spp.). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 77 (5): 572 - 575.
- Han Yi-ke, Du Sheng-li, Zhang Gui-hua, Wei Ai-min. 2006. Antimitotic herbicides oryzalin for induction of tetraploid cucumber. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 21 (4): 27 - 30. (in Chinese)
- 韩毅科, 杜胜利, 张桂华, 魏爱民. 2006. 利用抗微管除草剂胺磺灵诱导黄瓜四倍体. *华北农学报*, 21 (4): 27 - 30.
- Li Y, Whitesides J F, Rhodes B. 1999. *In vitro* generation of tetraploid watermelon with two dinitroanilines and colchicine. *Cucurbit Genetics Cooperative Report*, 22: 38 - 40.
- Liu Wen-ge, Wang Ming. 2002. Manipulation and identification of chromosomal ploidy in watermelon and melon breeding. *Journal of Fruit Science*, 19 (2): 132 - 135. (in Chinese)
- 刘文革, 王 鸣. 2002. 西瓜甜瓜育种中的染色体倍性操作及倍性鉴定. *果树学报*, 19 (2): 132 - 135.
- Liu Wen-ge, Yan Zhi-hong. 2005. *In vitro* induction of auto tetraploids in plants. *Chinese Bulletin of Botany*, 22 (Supplement): 29 - 36. (in Chinese)
- 刘文革, 阎志红. 2005. 植物离体组织染色体加倍诱导同源四倍体. *植物学通报*, 22 (增刊): 29 - 36.
- Liu Wen-ge, Yan Zhi-hong, Rao Xiao-li. 2005. Comparison of the leaf epidermal ultra-structure morphology of different ploidy watermelon. *Journal of Fruit Science*, 22 (1): 31 - 34. (in Chinese)
- 刘文革, 阎志红, 饶小利. 2005. 不同倍性西瓜的叶表皮微形态特征比较. *果树学报*, 22 (1): 31 - 34.
- Morejohn L C, Bureau T E, Mole-Bajer T, Bajer A S, Fosket D E. 1987. Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization *in vitro*. *Planta*, 172 (2): 252 - 264.
- Ma Guo-bin, Wang Ming. 2002. Tetraploid induced from shoot tips of watermelon and melon *in vitro* culture. *China Watermelon and Muskmelon*, 1: 4 - 5. (in Chinese)
- 马国斌, 王 鸣. 2002. 西瓜和甜瓜茎尖离体诱导四倍体. *中国西瓜甜瓜*, 1: 4 - 5.
- Sari N, Abak K, Pitrat M. 1999. Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.). *Scientia Horticulturae*, 82: 265 - 277.
- Tan Su-ying, Huang Xiu-qiang, Liu Ji-wei, Liu Wen-ge. 1995. Raising the frequency of inducing tetraploid watermelon by treating of colchicine. *Acta Horticulturae*, 402: 18 - 22.
- Wei Yu-guo, Jiang J ūfang. 2006. The preliminary explore on induction of tetraploid in muskmelon with trifluralin. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 21 (Supplement): 73 - 76. (in Chinese)
- 魏育国, 蒋菊芳. 2006. 氟乐灵诱导甜瓜四倍体研究初探. *华北农学报*, 21 (增刊): 73 - 76.
- Zhang Xing-ping. 1996. Utilization of biotechnology in watermelon and melon genetic improvement. *Annual Review of Horticultural Science*, 2: 107 - 129. (in Chinese)
- 张兴平. 1996. 生物技术在西瓜甜瓜遗传改良中的作用. *园艺学年评*, 2: 107 - 129.
- Zhang X P, Rhodes B B, Whitesides J F. 1994. Determination of watermelon ploidy level using flow cytometry. *Cucurbit Genet Coop Rep*, 17: 102 - 105.