

利用胺磺灵诱变西瓜四倍体研究

张娜, 施先锋, 任俭, 曾红霞, 程维舜, 孙玉宏

(武汉市农业科学研究所, 湖北 武汉 430345)

摘要:为了给无籽西瓜的选育提供优质亲本材料, 以小果型西瓜二倍体自交系 A8 为试材, 采用胺磺灵对幼苗生长点进行剥滴处理, 设计不同浓度和处理天数, 进行四倍体诱导, 并进行形态学鉴定、流式细胞仪分析鉴定、保卫细胞叶绿体计数法鉴定, 经 3 代种植观察和筛选, 获得了稳定的四倍体材料。结果表明: 不同处理均可诱变产生该材料的四倍体, 其中最有效的处理是在播种后第 8 天剥除心叶, 再用 100 mg/L 胺磺灵连续处理裸露的生长点 6 d, 幼苗成活率达 100%, 最终诱变率达 30.59%。

关键词:小果型西瓜; 黄瓢; 四倍体; 诱变; 胺磺灵

中图分类号:S 651 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2013)19-0052-04

西瓜是世界五大水果之一, 但是普通二倍体西瓜种子相对较多, 不仅给食用带来不便, 而且影响其商品价值; 而多倍体西瓜具有少籽、丰产、耐贮、抗性强等特点, 深受广大消费者欢迎。近年来, 我国无籽西瓜种植面积不断增加^[1], 种子需求量以每年 25% 的速度增长, 需要大量优质的四倍体材料, 然而自然界产生四倍体的过程相当漫长且频率极低。而传统的四倍体人工诱变剂秋水仙素毒性较大, 据王惠林等^[2]报道, 胺磺灵(Oryzalin)对苹果、马铃薯的四倍体诱变率较秋水仙素高 3~4 倍且毒性较低, 被认为是一种可替代秋水仙素的新型诱变剂。该试验利用胺磺灵对黄瓢二倍体西瓜 A8 进行诱变, 以期获得遗传稳定的同源四倍体, 为无籽西瓜新品种的选育提供亲本材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的优质二倍体自交系 A8 花皮黄瓢西瓜由武汉市农业科学研究所西甜瓜资源与育种研究室提供; 所用药剂胺磺灵为美国进口原剂。

1.2 试验方法

1.2.1 诱变处理 供试西瓜种子用 55℃ 温水浸泡 30 min, 再以 0.1% KnMO_4 溶液浸泡 10 min, 用清水洗净后置于 32℃ 催芽 3 d, 而后播于 50 孔穴盘, 以正常出苗数作为处理株数。7 d 后, 待绝大部分幼苗子叶展开

且心叶生长 2 d 时, 将心叶摘除, 然后用浓度为 40、60、100 mg/L 的胺磺灵溶液分 2、4、6 d 处理其裸露生长点, 每株 1 滴(约 0.05 mL), 每处理设 3 次重复, 每天 7:00~8:00 和 16:00~18:00 各 1 次。温室昼/夜温度为 25℃/19℃, 湿度 80% 左右。

1.2.2 变异株的鉴定 形态学鉴定: 诱变植株 2 叶 1 心后移栽至塑料大棚, 进行常规田间管理。营养生长期观察植株茎秆粗度、节间长度、叶片厚度、叶色深浅、叶缘缺刻深浅, 盛花期观察雌雄花花冠大小, 采收期观测果形指数和重量、种子外观和多少等外观形态变异特征进行形态学初步鉴定^[3], 花期单株套袋自交。气孔保卫细胞叶绿体计数: 经形态学观察鉴定为变异株的植株进行观察。上午采集植株的叶片, 先在载玻片上加 1 滴蒸馏水, 然后小心撕取叶片的下表皮(使叶肉尽量少, 不要褶皱), 平放于载玻片上, 盖上盖玻片后及时用 Olympus 显微镜观察叶绿体数目。每株观察 5 个气孔保卫细胞, 对叶绿体数进行统计分析。流式细胞仪分析鉴定: 胺磺灵诱变四倍体机理与传统诱变剂秋水仙素相似, 可在细胞分裂后期抑制纺锤丝的形成和细胞分裂中期的有丝分裂, 在细胞分裂后期, 染色体沿着纺锤体分离, 尽管 DNA 被复制, 但不形成新的细胞壁, 于是在核中产生双 DNA, 细胞周期停滞于 G2/M 期^[4-5]。故可用荧光物质标记细胞 DNA, 流式检测的荧光强度即代表细胞内 DNA 的多少, 根据荧光的强弱判断检测的细胞在周期中不同时期的分布, 从而对材料倍性做出鉴定。根据以上 2 种方法的鉴定结果, 取二倍体植株和变异植株的中上部嫩叶, 用流式细胞仪进行 DNA 相对含量测定, 判断变异植株的倍性, 统计诱变率。果实成熟后, 采收单瓜进行外观品质鉴定并单瓜收种。

第一作者简介:张娜(1980-), 女, 硕士研究生, 农艺师, 研究方向为西瓜栽培与育种。E-mail: zn800329@163.com.

责任作者:孙玉宏(1968-), 女, 正高级农艺师, 硕士生导师, 现主要从事西甜瓜栽培与育种等研究工作。E-mail: sunyuh68@163.com.

基金项目:武汉市农业科学技术研究院科研资助项目(YL201101005)。

收稿日期:2013-05-16

1.2.3 优良四倍体材料的筛选 根据考种结果,选出优良四倍体自交单瓜,播种并套袋自交授粉,获得 Y₁ 代,再从 Y₁ 代中选择果皮较薄、折光糖含量高、单瓜结籽数多的自交单瓜进行种植,套袋自交获得 Y₂ 代,自 Y₂ 代单瓜中任选 10 个种植,观察其稳定性^[6]。

2 结果与分析

2.1 四倍体诱变率

由表 1 可以看出,胺磺灵在 40~100 mg/L 的浓度

表 1 胺磺灵诱导西瓜四倍体效果

Table 1 Effect of inducing tetraploid watermelon using Oryzalin

处理时间 Treatment time/d	处理浓度 Treatment concentration/mg · L ⁻¹								
	40			60			100		
	处理苗数 No. of treated plants/株	4 倍体苗数 No. of tetraploid plants/株	诱变率 Induction frequency/%	处理苗数 No. of treated plants/株	4 倍体苗数 No. of tetraploid plants/株	诱变率 Induction frequency/%	处理苗数 No. of treated plants/株	4 倍体苗数 No. of tetraploid plants/株	诱变率 Induction frequency/%
2	84	2	2.38	83	3	3.61	78	6	6.41
4	77	7	9.09	81	10	12.34	82	11	13.41
6	79	10	12.66	87	17	19.54	85	26	30.59

2.2 变异植株观察鉴定

2.2.1 形态学观察鉴定 该诱变试验获得的变异植株符合四倍体的变异特征,如叶片增厚变宽,裂片重叠,花器增大,果皮条纹变宽,脐部变大,果形指数下降(图 1),且植株生长势增强,节间变短,茎增粗等,可能是染色体加倍使植株体细胞增大、花粉体积增大等原因所致。另

范围内 A8 材料四倍体的诱变均有效,但浓度和处理时间不同四倍体诱变率也不同,随胺磺灵浓度的升高和处理时间的延长,诱变率呈递增趋势。由于胺磺灵对幼苗的伤害较低,诱变处理过后幼苗基本均能成活,保证了最终诱变率。A8 在 100 mg/L 胺磺灵处理 6 d 的情况下,诱变率最高,达到 30.59%,将该处理作为其四倍体诱变的理想方法。

外,诱变获得的四倍体 YA8 自交坐果率和单瓜结籽数较二倍体均明显降低(表 2),其可能原因一是四倍体花粉母细胞减数分裂过程中,后期 I、后期 II 出现落后的染色体,这些染色体多是一些染色体片段,导致形成的配子不具有完整的染色体,丢失了关键基因,使配子丧失活力而影响育性,降低了坐果率^[7];二是四倍体西瓜雌

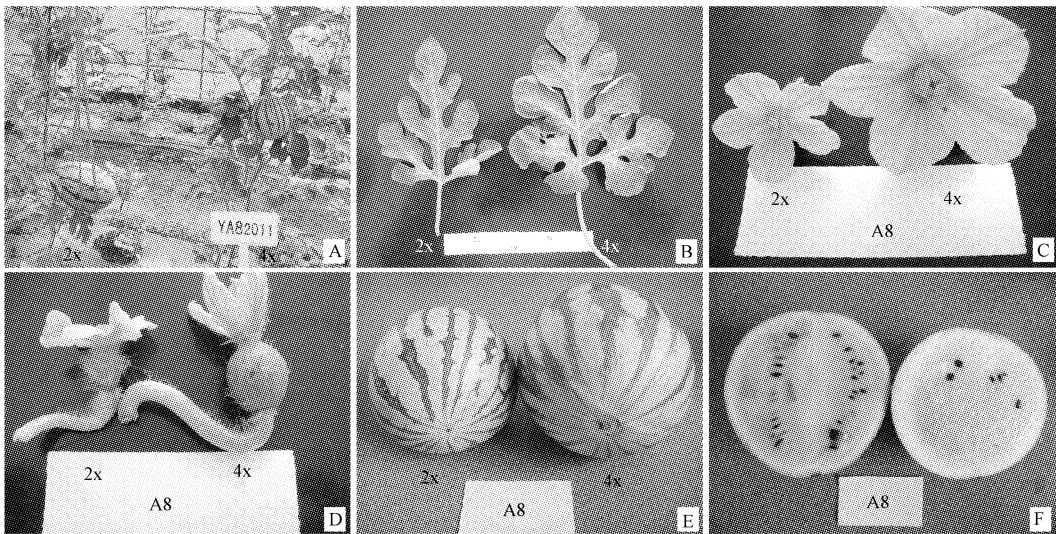


图 1 二倍体西瓜 A8 和其同源四倍体西瓜的形态学比较

注:A. 植株;B. 叶片;C. 雄花;D. 子房;E. 果实;F. 果实剖面。

表 2 二倍体西瓜及其同源四倍体西瓜主要性状比较

Table 2 Comparison of main characters on diploid and its autotetraploid of watermelon

材料 Genotype	单瓜重 Fruit weight /kg	果实成熟期 Maturity date /d	果形指数 Fruit-based index	皮厚 Pericarp thickness /cm	中心折光糖含量 Center refractive sugar content /%	自交坐果率 Inbred fruit rate /%	单瓜结籽数 No. of single melon seeds /粒	生长势 Growth vigour
2×	1.8	28	1.03	0.57	9.20	100	106.5	中强
4×	2.0	35	0.97	1.08	10.63	66.67	64.80	强

注:表中数据为供试材料 A8 的 30 个二倍体单瓜和 30 个同源四倍体单瓜所测平均值。

蕊生长素/细胞分裂素比值较二倍体西瓜的比值小很多,二倍体所含大量的生长素全部用以促进花粉萌发和花粉管生长,而四倍体西瓜雌蕊中生长素的含量本来就不多,用于克服细胞分裂素对生长的抑制作用后,剩余的生长素促进花粉萌发和花粉管生长的作用就极小了。

2.2.2 气孔保卫细胞中叶绿体数目测定 研究表明,西瓜二倍体叶片气孔叶绿体数在 15 个以下,四倍体叶片叶绿体数大于等于 15 个;气孔叶绿体数随染色体倍性的增加而增加,用气孔保卫细胞叶绿体数预测植株倍性的准确率可达 90.2%^[8]。该试验诱变所得变异植株叶片气孔保卫细胞叶绿体计数观察(图 3)也得到相同结论。A8 变异植株叶片气孔叶绿体数均在 15 个及以上,证明为四倍体。

2.2.3 流式细胞仪分析鉴定 经形态学观察符合变异特征和经叶绿体计数法鉴定为四倍体的植株,用流式细

胞仪进一步鉴定,倍性分析结果(图 3)显示,二倍体 DNA 相对含量峰值在 50 附近,而诱变植株 DNA 相对含量峰值在 100 附近,二者比值约为 2,表明变异植株是四倍体。



图 2 西瓜气孔保卫细胞叶绿体显微观察
注:A. 二倍体气孔保卫细胞;B. 四倍体气孔保卫细胞。

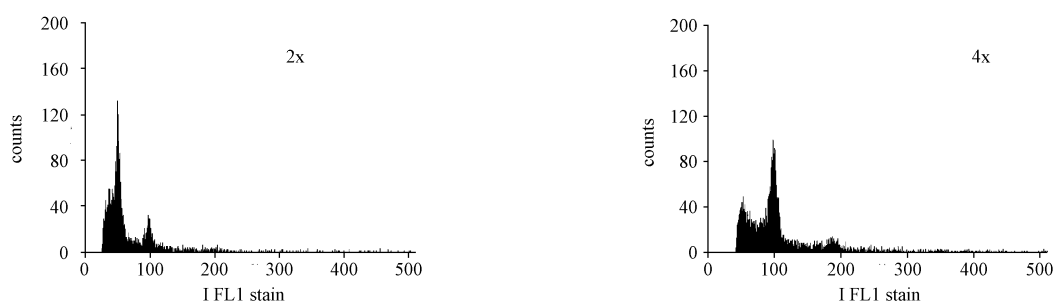


图 3 西瓜叶片流式细胞仪倍性分析

Fig. 3 Analyses of flow cytometry of watermelon leaves

2.3 优良四倍体材料的筛选

通过 3 种方法鉴定证明,该试验诱变所得变异植株为诱变材料的同源四倍体植株。经 2011 年秋季至 2012 年秋季连续 3 季种植及筛选,所得自交第 3 代遗传稳定,田间性状整齐一致,室内考种果实性状未见分离,获得了稳定的小果型四倍体材料。

3 结论与讨论

该试验结果表明,胺磺灵为西瓜四倍体诱变剂,其诱变率较高,毒性小,可作为秋水仙素的替代药剂。四倍体西瓜普遍存在坐果难的问题,一般自第 2 朵雌花开始授粉,但第 3 朵雌花授粉后坐果几率相对提高。授粉过程中还发现,蔓粗花大、长势过旺的植株绝大部分主蔓不能坐果,可尝试及时剪除主蔓,利用侧蔓授粉坐果。该试验获得的四倍体西瓜材料已经稳定,皮色美观,肉质细腻,含糖量高且中糖和边糖差距小,可作优质的食用西瓜,也可作无籽西瓜选育的亲本材料。在该试验所用诱变剂浓度在 40~100 mg/L 范围内,诱变率是持续

升高的,考虑到幼苗成活率的因素,而未设计更高浓度的处理。因而,对于 100 mg/L 以上浓度是否会产生更高的诱变率还有待进一步探讨。

参考文献

- [1] 刘文革. 我国无籽西瓜产业发展状况与对策[J]. 长江蔬菜, 2010(8): 121-127.
- [2] 王惠林, 张慧林, 周志成. ORYZALIN 不同处理方法对西瓜四倍体诱变效果的影响[J]. 新疆农业大学学报, 2008, 31(6): 21-25.
- [3] 中国农业科学院果树研究所郑州分所. 培育四倍体西瓜初报[J]. 植物学通讯, 1974(2): 26-31.
- [4] 袁建民. 小果型西瓜离体培养关键技术及四倍体诱导研究[D]. 海口: 海南大学, 2010: 5-7.
- [5] 王秀莉, 赵世萍. 秋水仙素诱导细胞周期停滞[J]. 生物学通报, 2010, 45(8): 51-52.
- [6] 谭素英, 刘济伟, 黄秀强, 等. 西瓜新品种‘蜜枚四倍体’的选育研究[J]. 果树科学, 1993, 10(2): 87-91.
- [7] 祁碧菽, 罗耀武, 任清. 四倍体葡萄花粉母细胞减数分裂与坐果率关系的研究[J]. 河北农业大学学报, 2000, 23(4): 49-52.
- [8] 施先锋, 彭金光, 汪李平. 用西瓜叶片气孔保卫细胞叶绿体数鉴定西瓜染色体倍性[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2009, 35(6): 640-643.

微生物菌剂对设施番茄幼苗生长的影响

朱 英¹, 孙 权¹, 司海丽¹, 施 明¹, 王 明², 王 锐¹

(1. 宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏五丰农业科技有限公司, 宁夏 银川 750021)

摘 要:以设施番茄幼苗为试材,研究了“五丰-B6”、“五丰-001”、“五丰-002”3种自主研发的微生物菌剂对番茄幼苗株高、茎粗、冠幅、叶片数、叶绿素含量等指标的影响,以不添加任何成分为对照1(CK1)、生长调节剂S-诱抗素为对照2(CK2)。结果表明:3种微生物菌剂以及生长调节剂S-诱抗素对番茄幼苗的生长均具有一定促进作用,处理后的番茄幼苗各项生长指标与对照1存在显著差异;“五丰-B6”菌剂处理的番茄幼苗株高、茎粗、叶绿素含量均显著高于对照1(CK1)以及生长调节剂S-诱抗素(CK2),分别比对照株高、茎粗、叶绿素含量分别增加22.36%、34.03%、11.23%;“五丰-001”菌剂在增加植株冠幅方面表现显著,分别比生长调节剂S-诱抗素(CK2)增加8.30%,比CK1增加14.62%;综合各菌剂以及S-诱抗素对番茄幼苗生长影响的程度,依次为“五丰-B6”>“五丰-001”>“五丰-002”>“生长调节剂S-诱抗素”>CK1。

关键词:微生物菌剂;设施番茄;幼苗;长势

中图分类号:S 641.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)19-0055-04

生物菌剂经过特殊工艺加工后,可直接作用于植物,由于其含有大量有益活菌,可有效提高作物的抗病能力、增加土壤肥力等^[1]。大量研究表明,植物根际促生菌(Plant Growth Promoting Rhizobacteria)可显著提高作物的品质及产量^[2-4],能与病原微生物产生拮抗作用,

可有效抑制病原微生物生长,减少植物被感染的机会,降低植物的生物或非生物压力^[5],作为一种新型肥料深受人们关注^[6-7],具有良好的发展前景,在今后的推广中可得到广泛应用^[8-9]。李勤奋等^[10]研究指出,施用复合菌剂能明显的促进番茄的生长,同时表明复合菌剂对番茄细菌性青枯病有一定的抑制效果;于恩晶等^[11]研究发现,使用微生物菌剂后,在小白菜的整个生长过程中微生物可产生各类植物生长激素,能有效抑制多种真菌、细菌、病毒等对植物的伤害,可很大限度减轻土传病害的发生;李维炯等^[12]研究表明,微生物菌剂稀释后,用稀释液浸种或者做基肥施入土壤,对小麦、玉米、豌豆、萝卜、油菜等作物种子发芽以及苗期生长均存在明显的促

第一作者简介:朱英(1988-),女,硕士研究生,现主要从事农业资源利用等研究工作。E-mail:zy467800@126.com.

责任作者:王锐(1981-),男,博士,讲师,现主要从事农业资源高效利用等研究工作。E-mail:amwangrui@126.com.

基金项目:宁夏大学校企合作资助项目(20121101);2012宁夏回族自治区科技攻关资助项目(20120502)。

收稿日期:2013-05-20

Study on Mutagenesis of Tetraploid Watermelon by Using Oryzalin

ZHANG Na, SHI Xian-feng, REN Jian, ZENG Hong-xia, CHENG Wei-shun, SUN Yu-hong
(Wuhan Institute of Agricultural Sciences, Wuhan, Hubei 430345)

Abstract: In order to provide breeding high-quality parent material for seedless watermelon, taking small-type diploid watermelon line A8 as material, tetraploid plants of watermelon were induced by treating the growing points of seedlings with different concentration Oryzalin and lasting different treating time. Autotetraploid plants were selected and identified basing on morphology, flow cytometry, hybridization and characterization. Then observed a stable tetraploid material after three quarters' continuous cultivation, observation and filtering. The results showed that different treatments could obtain tetraploid watermelons by processing with Oryzalin. The most effective way was extirpating interiorleaf at the 8th day after sowing, then treating the growing points of seedlings with 100 mg/L Oryzalin for 6 d. The treatmented seedlings could all survival and the induction frequency of tetraploid watermelon was 30.59%.

Key words: small-type watermelon; yellow-flesh; tetraploid; mutagenesis; Oryzalin