

植物突变体库的构建及突变体检测研究进展

郭建秋, 雷全奎, 杨小兰, 马 雯, 张向召
(洛阳市农业科学研究院, 河南 洛阳 471022)

摘要: 突变体是研究基因功能的重要材料, 为此, 介绍了创造突变体的方法, 特别是理化诱变方法以及突变体的检测方法等方面的研究进展。

关键词: 植物突变体; 构建; 检测方法

中图分类号: Q319 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004—3268(2010)06—0150—06

随着大量基因序列和 EST 资料的积累, 后基因组时代诞生了。功能基因组学是后基因组时代的重要内容, 主要研究生物有机体内各种基因的生物学功能, 进而了解所有基因如何协调发挥作用, 完成一系列的生长发育过程。要精确了解每个基因的功能及基因间的相互作用, 必须分析单个基因和多个基因的突变表型以及它们的时空表达剖面。随着新技术新方法的不断创新开发, 分析鉴定基因功能的方法越来越多, 并逐渐形成功能基因组学的分支学科。目前已经发展了多种分析鉴定基因功能的方法, 其中最直接最有效的方法是构建饱和的基因突变体库, 通过突变体分析鉴定基因功能。因此, 突变体库的构建是功能基因组学的基础。为此, 综述了创造突变体的方法以及突变体的检测筛选方法等方面的研究进展。

1 创造突变体的方法

突变体库有不同的分类方法^[1]。按照产生突变体的方法大致可分为自发突变体库、体细胞无性系变异突变体库、理化诱变突变体库和插入突变体库4类。

1.1 自发突变

自发突变是指自然条件下发生的突变, 是生物变异的重要来源, 是自然进化的基础。自发突变为人类提供了极有价值的研究材料。李玮等^[2]在芥菜型油菜品系 L638—g 中发现了几株无致死效应的天然叶片黄化突变体, 并研究揭示了该突变体的黄化机理及生物学特性。在水稻中, 矮秆突变株的发

现揭开了矮化育种的序幕; 细胞质雄性不育株的发现使水稻三系法杂种优势的利用成为现实; 而光(温)敏核不育株的发现则为采用两系法利用水稻亚种间的杂种优势铺平了道路。但是自发突变的频率很低, 在高等生物中, 大约 10 万个到 1 亿个生殖细胞中才会有 1 个生殖细胞发生突变, 且许多突变通过表型无法鉴定而丢失, 很难进行系统收集。即使获得了感兴趣的突变株, 要分离突变基因并进一步鉴定其功能也是相当困难的, 因为自发突变体的遗传背景非常复杂。

1.2 体细胞无性系变异

体细胞无性系变异是组织培养中的普遍现象, 泛指在细胞、组织和器官培养过程中, 培养细胞和再生植株中产生的遗传变异, 又可细分为自发无性系变异和诱发无性系变异。体细胞无性系变异的产生没有种属特异性, 出现的频率一般比较高^[3,4]。其变异频率随培养时间的延长而提高, 且结合化学诱变和利用选择压力进行细胞突变体筛选可实现一定程度的定向诱变^[5-7]。植物通过体细胞无性系变异, 可产生一系列有益的新性状, 对植物品种改良和选育新品种具有重要意义。但近年来的遗传转化实践表明, 经历组织培养和再生阶段后, 常表现出一些非目的性状的变异, 其原因属体细胞无性系变异还是外源基因的插入诱变, 往往很难确定^[8]。体细胞无性系变异已在农作物的育种中广泛应用, 并已获得了抗逆、可遗传的新品系^[9]。赵成章等^[9,10]从水稻幼胚愈伤组织中, 筛选出一些早熟、矮秆、千粒重高的新品系。孙立华等^[11]获得了抗水稻白叶枯病的

收稿日期: 2009—12—11

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2009CB118400)

作者简介: 郭建秋(1972—), 男, 河南新安人, 助理研究员, 主要从事大豆品质改良利用研究。

E-mail: guojianqiu.2008@yahoo.com.cn

水稻新品系。凌定厚等^[12]得到了抗胡麻叶斑病的水稻品系。林定波等^[13]曾以脯氨酸作为选择压,筛选到了抗寒的柑橘植株,其抗寒性比对照显著增加,并发现抗寒植株叶片中脯氨酸、亮氨酸和精氨酸的含量均比对照增加2倍以上。在草坪草育种上也有应用,如Smith和Quesenberry^[14]利用体细胞无性系变异的方法获得了红三叶的新种质资源,其再生能力显著提高;Croughan等^[15]获得了狗牙根的新种质Brazos—R3,对秋季黏虫*Spodoptera frugiperda*具有显著抗性。体细胞无性系变异的显著特点,一是变异频率高,一般为1%~3%,最高可达25%~100%;二是致死和不利的变异频率低;三是嵌合体的发生率相对较低,变异稳定快;四是性状变异广泛^[3]。体细胞无性系变异的遗传基础主要包括染色体畸变^[16,17]、基因突变、基因扩增和丢失、DNA甲基化^[18]和转座子激活^[18,19]等方面。

此外,重组自交系(RILs)、双单倍体群体(DH)和近等基因系(NILs)等群体中也可找到可供利用的突变体,在基因功能鉴定上也具有重要的应用价值。

1.3 理化诱变

1.3.1 化学诱变 化学诱变是用化学诱变剂处理植物材料,以诱发遗传物质的突变,从而引起形态变异,然后根据育种目标,对这些变异进行鉴定、培育和选择,最终得到目标变异株。目前最常用的化学诱变剂是甲基磺酸乙脂(EMS)。陈忠明等^[20]利用EMS处理水稻93—11,构建了包含271个家系的突变体库。Lee等^[7]已在水稻上获得14000个EMS突变群体。魏玉昌等^[21]用不同浓度的化学诱变剂EMS处理大豆合子, M_2 出现的突变类型较多,比较明显的有晚熟、黄化、矮化、半不孕等类型。王瑾等^[22]用EMS处理抗旱性差的小麦品种豫麦49号和周麦17的花药愈伤组织和幼胚愈伤组织,得到13株抗旱突变体。

1.3.2 物理诱变 在辐射诱变育种的半个多世纪发展过程中,采用的辐射技术和方法越来越多。辐射源由X射线、 γ 射线、热中子、激光发展到离子束、空间诱变等。

电离辐射主要包括 γ 射线、X射线、中子等,其中应用最多的是 γ 射线和X射线。这些射线由于能量高、穿透力强,可以使原子的内层电子激活释放,致使原子呈离子化而可与其他原子或分子结合,造成共价键断裂,形成染色体结构变异。研究表明,染色体结构断裂的数量与离子化射线的剂量呈正相

关,常见的结构变异主要是易位、倒位和缺失。 γ 射线诱变效果稳定,诱变当代效果直观,现在许多试验中已经把 γ 射线诱变作为与其他诱变方法比较的标准。但是由于实际操作中,辐射的剂量往往难以控制,导致试验效果的重现性较差。曹雪芸等^[23]分别用X射线和 γ 射线处理原冬6号、京冬8号和北京411等3个冬小麦种子,在后代中得到了矮丛、育性、穗型、芒性、穗长、株高、蜡质、生育期等多种突变类型。夏璐等^[24]分析由 γ 射线诱导形成的质粒突变体的*lazZ*基因序列,发现碱基变异类型主要是颠换,且变异位点的分布不是随机的。

研究表明^[25],热中子处理对大豆休眠种子的后代诱发突变较 β 射线和 γ 射线的处理要丰富些,且突变率高,对早熟综合产量性状籽粒化学品质等均有独特的效果。张圣君^[26]用快中子、热中子、电子束分别处理8个水稻品种的种子,确定了3种诱变因素对水稻的半致死剂量和致死剂量,并从中选育出有价值的一些新品种(系)。郭玉红等^[27]用热中子照射杂交后代育成5个大豆新品种,其中黑农31及黑农32脂肪含量为23.1%和22.9%,为黑龙江省少有的大豆高油品种。

激光是一种相干性很强的单色射线,通过显微聚焦,激光微束可以聚焦成微米级光点,能准确地照射到事先选择好的细胞某一特定部位或某一细胞器,使细胞器或细胞组织产生选择性损伤或进行显微手术而不损伤临近部位的细胞器或组织,从而达到某一特定的研究目的。激光诱变育种在国外从20世纪60年代开始,美国、苏联、澳大利亚、加拿大等国家研究较早,苏联育出早熟、含糖量、Vc含量、胡萝卜素均高的番茄新类型,还育出高产玉米,成果显著。我国激光诱变育种始于1972年。四川大学生物系首先进行激光处理油菜诱变育种研究,之后国内相继育成了油菜、番茄、黄瓜、菜豆、蚕豆等激光新品种^[28]。刘友杰^[29]用He—Ne激光照射水稻种子,发现激光照射可诱发核基因突变,如株型、株高、粒重、品质等性状变异,并可真实遗传。伍育源等^[30]采用功率密度为394 mW/cm²的CO₂激光照射蚕豆萌动种子, L_2 代植株高度、分枝数及结荚数等农艺性状均产生不同程度的变异。

离子束在生物技术上的应用是我国科技工作者开创的新兴研究领域,已成为我国自主知识产权的定向遗传育种的新方法、新途径。离子束是指一束具有能量的带电粒子放射线,具有高传能线密度(LET)、尖锐的电离峰(Bragg峰)及低氧增比,可精

确控制其入射深度和部位。离子束物质能量的传递特征是:离子通过物质时,在物质中的局部引起高密度的电离和激发。已有研究表明:离子注入与生物体相互作用存在峰值,在峰值范围内,注入离子与生物体相互作用是局部的、双重的和不易修复的。因此,离子注入用于植物诱变有可能在损伤轻的情况下获得较高的突变率和较宽的突变谱^[31]。离子辐射与 X、 γ 、e (低 LET) 辐射相比在辐射生物学方面有着独特的优势:(1)离子辐射的电离密度大,是属于高传能线密度辐射(高 LET),其产生的相对生物效应(RBE)也高。(2)离子辐射的能量损失在小的区域内,故剂量集中度高,因而对生物体产生的总体生理损伤较小。(3)离子辐射在物质中的射程末端产生布喇格(Bragg)峰效应(高电离密度率);此时的 LET 更大(其相对剂量也更大)。同时也在物体中产生质量的沉积和电荷交换作用。(4)低 LET 辐射(X、 γ 、e)与生物体作用产生较多易修复的 DNA 单链断裂;而高 LET 辐射易产生较多的难以修复的 DNA 双链断裂,故其诱导的染色体畸变的有效性较低 LET 辐射高数倍^[32]。离子注入产生的生物效应的因素与辐射不同,荷能离子注入除了具有能量沉积引起机体损伤的特征外,还具有动量传递产生的级联损伤,表现为遗传物质的原子移位、重排或基因缺失,还有沉积离子、移位原子和本底元素复合反应造成的化学损伤以及电荷交换引起的生物分子电子转移造成的损伤。因此,注入的荷电离子的电信号和所形成的微电场影响着生物体生命过程中的基因表达和调控、细胞内外的能量交换、物质运输、信息传递,并刺激损伤 DNA 的修复、生物体的生长和发育。

低能离子用于遗传育种和遗传修饰的能量一般在 30~50 keV,注入剂量一般为 $10^{14} \sim 10^{17}$ ions/cm²。安徽省农科院利用离子束技术已育成早粳 S9042、晚粳 D9055、中粳 63、晚粳 M 3122、早粳 14、晚粳 48 和晚粳 M 1148 共 7 个水稻新品种^[33-36]。甄卫军等^[37]将离子束生物技术应用用于谷氨酸高产菌株的选育,获得了产酸率比出发菌株提高 2% 以上的优良菌株 2 株。虞龙等^[38]和袁成凌等^[39]分别用低能离子注入选育的 Vc 高产菌株和花生四烯酸(AA)产生菌,其发酵水平创国内外新高。被业内专家喻为“自维生素 C 二步法发酵发明以来的重大突破”。离子束生物工程菌生产花生四烯酸,发酵水平是当前国内报道的 10 倍,比国外高 50%。

空间搭载是利用空间条件下具有高能离子辐

射、空间微重力、交变磁场、超真空、超净及没有昼夜变化等物理因素,诱发植物产生变异,并选育成有利用价值的新品种。航天育种是近几年发展起来的一项植物高科技育种新技术。目前我国空间诱变的搭载方式主要有 3 种,即高空气球、返地式卫星和飞船搭载。高空气球的条件一般为 30~40 km,卫星搭载的条件一般是近地点 200 km,远地点 470 km 左右^[40-43]。而飞船的搭载条件一般为近地点 200 km,远地点 300 km 左右。这种条件下的大气结构、气温、空气密度、压力、磁场、辐射流均与地面有很大差异,可能引起生物发生变异。自 20 世纪 80 年代开始,我国通过返回式卫星和神州号飞船搭载植物种子的航天育种研究有近 20 次,先后共搭载 500 多个植物品种,如水稻、油菜、大豆、棉花、黄瓜、青椒、番茄等,研究了空间条件对植物种子诱变机理,并选育出一些新的突变类型和具有优良农艺性状的新品种。Tripathy 等^[44]研究了太空小麦的生长和光合反应,发现与地面对照植株相比,幼芽的干质量降低了 25%,重力条件下植株叶的光补偿点提高了约 33%,这可能是由于叶的暗呼吸速率提高造成的。Horneck^[45]的研究指出,微重力是通过增加植物对其他诱变因素的敏感性和干扰 DNA 损伤修复系统的正常运作,从而加剧生物变异,提高变异率。许多试验证明^[46],空间诱变与地面辐射处理发生的变异情况有许多类似之处,辐射敏化剂预处理能增加生物损伤。Horneck G^[47]研究认为,空间辐射主要导致作物遗传物质的损伤,诸如突变、肿瘤形成、染色体畸变、细胞失活、发育异常等。Hagen^[48]对植物的研究证明,空间条件尤其是高能离子具有强烈的致变作用,导致细胞死亡、突变、恶性转化,而且在微重力条件下辐射的诱变作用将会加强。

1.4 生物技术创新突变体库

插入突变技术通过将特定的外源基因引入受体细胞,并使其定向稳定地转化,从而超越物种的限制,实现了基因的交流,产生具有特定性状的转基因植物,是对传统植物育种方法的补充,也是进一步实现作物产量提高、抗性增强和品质改善的重要途径。插入突变是 T-DNA 或转座标签插入到基因组中后,相应位点基因的功能就可能受到抑制而产生基因敲除(knock out)突变体,插入元件同时又可用作标签从基因组中分离出相应的基因并鉴定其功能。T-DNA、逆转座子标签(retrotransposon tagging)和转座子标签(transposon tagging)是构建插入突变体库的 3 种主要方法。常用的遗传转化方

法主要有基因枪法、农杆菌转化法和花粉管通道法等。基因枪转化法是一种 DNA 的直接转化法,在小麦的遗传转化中应用非常广泛。基因枪法的主要优点是受体取材广泛,不受寄主特异性限制,转化的方法相对也比较成熟,但是由于受到基因型的限制、取材的季节性、组织培养的手段的制约以及转化效率不高等诸多问题,寻找合适的受体材料及组培方法成为提高基因枪法转化效率的关键。农杆菌侵染法广泛用于植物的转化当中,主要优点是外源基因拷贝数低,大多数单一位点整合、遗传稳定性好,但受到宿主范围的限制。自 1983 年至今已在烟草、马铃薯、番茄、拟南芥等多种双子叶植物上转化成功。

2 突变体的筛选鉴定方法

2.1 表型鉴定

表型鉴定是以诱变育种和基因功能研究为目的的突变体筛选最常用的方法。要求必须有能遗传的、相对于野生型有显著差异的外观性状,一般也包括逆境筛选和化验分析筛选。曹健等^[49]利用空间诱变处理菜心种子,其 SP₂ 代群体性状变异频率达 6.7%,通过调查植株的株高、株幅、叶长、叶宽、叶形指数,发现这些性状在株系间、单株间均有较大的差异;菜心在 SP₃ 代群体中出现性状变异频率相对下降,为 1.7%,群体性状表现趋于稳定。郭玉虹等^[50]用 EMS、NaN₃ 处理 LF837 稳定系的种子后,采用品质分析的方法从后代中筛选出 2 个早熟突变系,蛋白质含量分别为 45.38% 和 45.24%,较对照提高 0.92 个百分点和 0.78 个百分点。表型鉴定的方法虽然简单易行,不需要特殊的硬件设备,但是在突变体鉴别方面的作用是有限的。

2.2 细胞学鉴定

这个层次的鉴定一般以研究诱变的机理及诱变因素的靶标为目的,主要通过观察细胞及细胞器形态的变化、染色体异常的变化,研究诱变的作用机理和效果。张月学等^[51]对卫星搭载的 2 种苦苣菜种子 SP₁ 代根尖细胞染色体变异进行了研究,表明,太空环境诱变处理后提高了苦苣菜种子的根尖细胞有丝分裂指数,出现了包括微核、染色体桥、染色体断片等在内的多种类型的染色体变异。

2.3 生物化学鉴定

对于数量性状的变异,往往很难区分这种变异是由遗传物质的改变造成的还是由环境造成的。可以从生理生化的角度对突变体作进一步的分析。有

学者用 SDS-PAGE 技术从一批大豆品质突变体中筛选出 3 个种子贮藏蛋白发生变异的稳定突变体,并发现其中一个突变体比其野生型亲本的蛋白质谱带多一个小带,从而把该突变体和其野生型亲本区分开来。李水凤等^[52]对卫星搭载后的辣椒 SP₁-SP₄ 进行蛋白质的 SDS-PAGE 电泳和 RAPD 检测分析,发现 SP₂ 代蛋白条带比对照增加了 2 条。陈慧选等^[53]比较了突变体与其亲本的叶、茎、根过氧化物同工酶电泳图谱在谱带数量、位置、宽度和颜色深浅方面的差异,从而把突变体与其亲本区别开来。

2.4 分子生物学鉴定

主要鉴定基因组中酶切位点、引物结合位点或 PCR 扩增产物片段大小的变化,从分子层次挖掘突变体,确定突变频率。这种方法直接从 DNA 水平上进行分析,因此又叫 DNA 分子标记。分子标记技术用于突变体鉴定的主要优点在于:突变位点直接以 DNA 的形式表现,在植物体的各个组织、各发育时期均可检测到,不受季节环境限制。缺点是找到的突变位点可能没有相应的表型功能缺失,或者找到多个突变位点后,不能确定到底哪个位点和缺失的功能相关,只能说明诱变材料从 DNA 水平上发生了变化以及突变发生的频率。

分子标记检测技术大致可分为四大类:第一大类是基于 DNA-DNA 杂交的 DNA 标记技术,其代表性技术有 RFLP;第二大类是基于 PCR 技术的 DNA 标记技术,其代表性技术有 RAPD 和 SSR 等;第三大类是基于限制性酶切和 PCR 的 DNA 分子标记技术,其代表性技术为 AFLP 和 CAPS 等;第四大类是基于单个核苷酸多态性的 DNA 标记。

化学诱变剂 EMS(ethyl methane sulfonic acid)可以诱发产生点突变。利用点突变可以精确鉴定基因的功能,在基因功能鉴定上具有独特的优势,但由于点突变不易鉴定,在功能基因组学上的应用受到限制。近年来,单核苷酸多态性(single-nucleotide polymorphism)筛选技术的成熟为鉴定点突变奠定了基础^[54,56]。在此基础上,McCallum 等建立了一个用于大规模筛选点突变的方法 TILLING(targeting induced local lesions in oenomes)^[56,57]。TILLING 利用 DHPLC(denatured high-performance liquid chromatography)检测异源双链核酸分子之间的错配来检测点突变,其主要步骤:①利用 EMS 诱发点突变;②突变后代个体 DNA 的提取和 DNA 池的构建;③根据目标基因序列设计引物扩增出感兴趣的片段;④PCR 片段的变性、退火,形成异

源双链核酸分子;⑤DHPLC 检测异源双链核酸分子,获得突变池;⑥利用相同的方法从突变池中筛选出突变个体;⑦突变个体 PCR 片段的测序验证。McCallum 等^[57]利用这种方法筛选出 CM T1(chromomethylase,一种 DNA 甲基转移酶)和 CMT2 的相应突变体,充分说明了这个方法的可行性。McCallum 等^[57]和 Colbert 等^[58]已经构建了拥有 10000 个突变体的大规模 TILLING 筛选体系,达到 1 周可筛选 1 个基因的速度。

EcoTILLING 是 Comai 等^[59]在 TILLING 的基础上发展起来的、检测自然群体中的等位基因多态性的方法。EcoTILLING 技术不同于 TILLING 技术之处在于: EcoTILLING 技术在构建 DNA 池时,向被检测的 DNA 中加入了等量的标准 DNA (对照),所以 EcoTILLING 技术可以检测自然群体中的等位基因的多态性,而 TILLING 技术检测的是化学诱变剂诱发的等位基因多态性^[58,59]。EcoTILLING 技术还可以高效地检测单核苷酸多态性(SNPs)、小片段插入和缺失、微卫星重复数变异等^[59]。EcoTILLING 技术已经广泛地应用于水稻、玉米、莲属植物、杨树、芸苔属植物等^[60]的研究中。

对于转基因得到的突变体(包括 Ac/Ds 转座子标签法得到的突变体),由于在转基因的过程中带有各种筛选标记,如 GUS、GFP、潮霉素、氨苄、除草剂等,可以利用这些标记进行转基因突变体的筛选,而且导入基因的序列已知,可以利用已知 DNA 序列进行 PCR 扩增、Southern 杂交等,或者对转入基因后的目标表型变化进行筛选。

参考文献:

- [1] 栾维江,孙宗修. Ac/Ds 标签系统与水稻功能基因组学[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2005, 31(5): 441-450.
- [2] 李玮,于澄宇,胡胜武. 芥菜型油菜叶片黄化突变体的初步研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(9): 79-82.
- [3] 宋再华,彭守华,苟爱兰. 体细胞无性系变异及变异频率[J]. 莱阳农学院学报, 1997, 14(2): 126-129.
- [4] Smith M K, Dnew R A. Current applications of tissue culture in plant propagation and improvement[J]. Austml J Physiol, 1990, 17: 267-289.
- [5] Brar D S, Jain S M. Somaclonal variation: mechanism and application in crop improvement[M] //Jain SM, Brar D S. Ahloowalia. Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1998: 15-37.
- [6] Jain S M. Tissue culture derived variation in crop improvement[J]. Euphytica, 2001, 118: 153-166.
- [7] Lee J H, Lee S Y. Selection of stable mutants from cultured rice anthers treated with ethylmethane sulfonic acid[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2002, 71: 165-171.
- [8] Veilleux R E, Johnson A A T. Somaclonal variation, molecular analysis, transformation interaction, and utilization[J]. Plant Breeding Review, 1998(16): 229-269.
- [9] 赵成章,郑康乐,戚秀芳,等. 水稻再生植株及后代的性状表现[J]. 遗传学报, 1982, 9(4): 320-324.
- [10] 赵成章,孙宗修,郑康乐,等. 水稻体细胞组织培养在品种改良上的应用[J]. 中国农业科学, 1984, 17(5): 35-40.
- [11] 孙立华,余建明,吕学锋. 用组织培养法筛选水稻抗白叶枯病突变体 I. 水稻愈伤组织抗白叶枯病病原菌的选择及其再生植物的抗病性鉴定[J]. 遗传学报, 1986, 13(3): 188-193.
- [12] 凌定厚, P Vidhyaseharan, E S Borromeo, 等. 运用植物毒素离体筛选水稻抗胡麻叶斑病种质的研究[J]. 遗传学报, 1984, 13(4): 194-200.
- [13] 林定波,颜秋生,沈得绪. 柑橘抗寒细胞变异体的获得及其抗性遗传稳定性的研究[J]. 植物学报, 1999, 41(6): 136-141.
- [14] Smith R R, Quesenberry K H. Registration of NEWRC red clover germplasm[J]. Crop Science, 1995, 35: 295.
- [15] Croughan S S, Quisenberry S S, Eichhorn M M, et al. Registration of Brazos-R3 bermudagrass germplasm[J]. Crop Science, 1994, 34: 542.
- [16] Peschke V M, Phillips R L. Genetic implications of somaclonal variation in plants[J]. Adv Genet, 1992, 30: 41-75.
- [17] Phillips R L, Kaeppler S M, Olhoft P. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 5222-5226.
- [18] Kaeppler S M, Phillips R L, Olhoft P. Molecular basis of heritable tissue culture-induced variation in plants[M] //Jain S M, Brar D S, Ahloowalia. Somaclonal variation and Induced Mutations in Crop Improvement. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1998: 467-486.
- [19] Ahloowalia B S. Transmission of somaclonal variation in wheat[J]. Euphytica, 1985, 34: 525-537.
- [20] 陈忠明,王秀娥,赵彦,等. 水稻 93-11 EMS 诱导突变体的分离与鉴定[J]. 分子植物育种, 2004, 2(3): 331-335.
- [21] 魏玉昌,杜连恩. EMS 诱发大豆合子突变效果的研究[J]. 中国油料作物, 1999, 21(3): 34-37.
- [22] 王瑾,刘桂茹,杨学举. EMS 诱变小麦愈伤组织选择抗旱突变体的研究[J]. 中国农学通报, 2005, 21(12): 190-193.
- [23] 曹雪芸,施巾帼,唐掌雄,等. 同步辐射(软 X 射线)对冬小麦的诱变效应及机理研究 I. 同步辐射的辐射生物学

- 效应[J]. 核农学报, 2000, 14(4): 193-199.
- [24] 夏璐, 丘冠英, 杜海彪. γ 射线诱导质粒 pGEM-3ZF(-) DNA *lacZ* 基因突变的序列分析[J]. 生物物理学报, 1997, 13(3): 482-488.
- [25] 王培英, 翁秀英, 王彬如, 等. 大豆诱变育种研究四十年[J]. 激光生物学报, 1998, 7(3): 212-215.
- [26] 张圣君. 中子和电子束辐照对水稻等农作物育种的影响[J]. 上海大学学报: 自然科学版, 1999, 15(5): 388-392.
- [27] 郭玉虹. 热中子照射杂交后代育成的几个大豆品种[J]. 核农学通报, 1995, 16(2): 65-67.
- [28] 郝丽珍, 侯喜林. 激光在农业领域应用研究进展[J]. 激光生物学报, 2002, 11(2): 149-154.
- [29] 刘友杰. 水稻激光诱变的遗传育种研究[J]. 应用激光, 1991, 11(2): 88-92.
- [30] 伍育源, 邹伟民. 激光对蚕豆诱变效应试验研究[J]. 激光生物学报, 1999, 8(1): 48-51.
- [31] 刘录祥, 程俊源. 植物诱变育种新技术研究进展[J]. 核农学通报, 1997(4): 187-190.
- [32] 唐掌雄, 刘志芳, 邵俊明, 等. 离子辐射育种研究进展[J]. 核农学报, 2005, 19(4): 312-316.
- [33] 吴敬德, 吴跃进. 离子注入生物效应[J]. 安徽农业大学学报, 1994, 26(3): 42-46.
- [34] 吴敬德, 吴跃进. 早粳 14 生物学特性和栽培技术[J]. 安徽农业科学, 2000, 28(3): 306-307.
- [35] 吴敬德, 吴跃进. 晚粳新品种 M1148 的特征特性及栽培技术研究[J]. 安徽农业科学, 2001, 29(6): 724.
- [36] 程剑. 安徽省农业重点课题论文集[C]. 北京: 中国农业科技出版社, 1997.
- [37] 甄卫军. 低能 N^+ 离子注入谷氨酸产生菌诱变选育初步研究[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(3): 20-24.
- [38] 虞龙, 许安. 低能 N^+ 离子注入在 *Vc* 高产菌株选育中的应用[J]. 激光生物学报, 1998, 8(3): 218-220.
- [39] 袁成凌, 姚建铭, 王纪, 等. 低能离子注入在花生四烯酸(AA)高产菌株选育中的研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2003, 21(4): 18-22.
- [40] 程西水, 许海霞, 董中东, 等. 小麦航天诱变育种效果研究[J]. 中国农学通报, 2007, 23(7): 598-601.
- [41] 王广金, 阎文义, 孙岩, 等. 空间诱变选育小麦新品系的研究[J]. 黑龙江农业科学, 2004(4): 1-4.
- [42] 王俊敏, 徐建龙, 魏力军, 等. 空间环境和地面 γ 射线辐射对水稻诱变的差异[J]. 作物学报, 2006, 32(7): 1006-1010.
- [43] 王瑞珍, 程春明, 胡水秀, 等. 春大豆空间诱变性状变异研究初报[J]. 江西农业学报, 2001, 13(4): 62-64.
- [44] Tripathy B C, Brown C S, Levine H G, *et al.* Growth and photosynthetic responses of wheat plants growth in space[J]. Plant Physiology, 1996, 110(3): 801-806.
- [45] Horneck G. Impact of space flight environment on radiation respon[M] // P D Mc Cormack, C E Swenberg, H Buckner. Terrestrial Space Radiation and Its Biological Effects. New York: Plenum Press, 1987: 707-714.
- [46] Chen Y X. Diurnal changes and effects fixation on the structure content of inclusion bodies in chloroplasts of *Tillandsia usneoides*[J]. Midwest Microse, 1992, 22: 9-11.
- [47] Horneck G. Radiobiological experiments in space. international journal of radiation applications and instrumentation [J]. Part D Nuclear Tracks and Measurements, 1992, 20 (1): 185-205.
- [48] Hagen V. Radiation biology in space[J]. A Critical Review Adv Space Research, 1989, 9(10): 3-8.
- [49] 曹健, 李振源, 罗少波, 等. 博罗福田菜心空间诱变效应研究初报[J]. 广东农业科学, 2006(1): 46-44.
- [50] 郭玉虹, 王培英, 许德春, 等. 诱变改良大豆蛋白质含量的研究[J]. 大豆通报, 2005(6): 12-13.
- [51] 张月学, 李成权, 申忠宝, 等. 太空环境诱变苦苣菜的细胞学研究[J]. 草业科学, 2007, 24(9): 38-41.
- [52] 李水凤, 汪炳良, 钟莉, 等. 卫星搭载处理后辣椒突变系的分子生物学分析[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(22): 6730-6732.
- [53] 陈慧选, 陈承现, 陈慧平, 等. 大豆突变体与亲本过氧化物同工酶酶谱的比较研究[J]. 中国油料作物学报, 2003, 25(2): 21-24.
- [54] Gross E, Arnold N, Goette J, *et al.* A comparison of BRCA1 mutant analysis by direct sequencing, SSCP and DHPLC[J]. Human Genetic, 1999, 105: 72-78.
- [55] Li-Sucholeiki, Khrapko K, Andre P C, *et al.* Applications of constant denaturant capillary electrophoresis/ high fidelity polymerase chain reaction to human genetic analysis [J]. Electrophoresis, 1999, 20: 1224-1232.
- [56] McCallum C M, Comai L, Greene E A. Targeted screening for induced mutations[J]. Nature Biotechnology, 2000, 18: 455-457.
- [57] McCallum C M, Comai L, Greene E A. Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics[J]. Plant Physiology, 2000, 123: 439-442.
- [58] Colbert T, Till B J, Tompa R, *et al.* S. High-throughput screening for induced point mutations[J]. Plant Physiology, 2001, 126: 480-484.
- [59] Comai L, Young K, Till B J, *et al.* Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by EcoTilling [J]. The Plant Journal, 2004, 37: 778-786.
- [60] Henikoff S, Comai L. Single-nucleotide mutations for plant functional genomics[J]. Annual Review Plant Biology, 2003, 54: 375-401.