

网络出版时间:2013-01-25 17:19

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130125.1719.006.html>

化学诱变及其在蔬菜育种中的应用

崔霞, 梁燕, 李翠, 秦蕾, 李云洲

(西北农林科技大学园艺学院, 陕西杨凌 712100)

[摘要] 化学诱变因其点突变比例和突变频率高、特异性强等特点,被广泛应用于诱发育种。近年来,用此方法获得的突变材料,成为基因组学等研究的重要基础,进而成为研究热点。文章介绍了化学诱变的特点与发展历史,总结分析了诱变材料、诱变剂种类以及诱变方法如浓度、时间、温度等对诱变效率的影响,综述了化学诱变技术在国内外蔬菜育种研究中的进展及成果。

[关键词] 化学诱变;蔬菜育种;诱变效应

[中图分类号] S603.6

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2013)03-0205-08

Chemical mutagenesis and its application in vegetable breeding

CUI Xia, LIANG Yan, LI Cui, QIN Lei, LI Yun-zhou

(College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Chemical mutagenesis is widely used in induced breeding because of its high point mutation probability, high mutation frequency, and strong specificity. In recent years, the materials based on chemical mutagenesis become popular in the field of genomics and other researches. This study introduced the characteristics and development history of chemical mutagenesis, summarized the influence of the mutation materials, mutagen types and mutation methods, such as concentration, time, and temperature on the mutation efficiencies. The progress of chemical mutagenesis technology in vegetable breeding worldwide and its achievements were presented as well.

Key words: chemical mutagenesis; vegetable breeding; mutagenic effect

遗传性变异是生物进化的基础,突变作为变异的一种方式,分为自然突变和诱发突变。自然条件(如温度、光照、干湿湿度等)变化引发的突变称为自然突变,其突变率很低,约为 $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-5}$ ^[1]。人们利用物理(如射线、中子、激光、电子束、离子束、紫外线、空间诱变等)、化学(如烷化剂、叠氮化物、碱基类似物等)、生物学(如转座子、T-DNA 插入基因等)方法^[2-3]对生物有机体进行诱变,进而产生的遗传性变异称为诱发突变,其突变率是自然突变的100~1 000倍。在这3类诱变途径中,化学诱变产生的突变率高于辐射诱变,突变谱宽于插入突

变^[4-5]。化学诱变是指用化学诱变剂处理植物材料,以诱发可以遗传的突变,然后根据育种目标,对这些变异进行鉴定、选择和固定,育成需要的遗传稳定的品系或品种^[6]。

1 化学诱变的特点及发展历史

1.1 化学诱变的特点

1.1.1 点突变比例高 与物理诱变相比,化学诱变更多的是引起分子水平上的变化,对生物分子的影响通常是个别、局部的,不易引起染色体畸变或损伤。因此,产生点突变的比例高,突变谱的稳定性

[收稿日期] 2012-06-24

[基金项目] 陕西省科技统筹创新工程计划项目(2011KTCL02-03)

[作者简介] 崔霞(1987—),女,甘肃永靖人,在读硕士,主要从事番茄化学诱变育种研究。E-mail:lcuixia@163.com

[通信作者] 梁燕(1963—),女,陕西渭南人,教授,主要从事番茄遗传育种与蔬菜种质资源研究。E-mail:liangyan@nwsuaf.edu.cn

好^[3-4]。

1.1.2 突变频率高 化学诱变剂可同时作用于多个位点,同时引发一个基因组中多个基因发生突变,诱变范围广、突变频率高。生物学方法要保证 95% 以上的拟南芥基因有一个插入片段,至少需要 10 万株植物,而化学诱变在一个基因组中能够造成几十个突变,5 000~10 000 株用 EMS(甲基磺酸乙酯)处理的植物中,一般就包括了所有可能的基因突变^[7]。

1.1.3 主要影响基因功能的强弱 化学诱变对基因功能的影响多数是量上的,也就是功能程度不同。这对研究一些植物生长所必需的基因非常重要,因为用基因敲除方法得不到他们的突变株^[7]。

1.1.4 特异性强 诱变剂有特异性,遗传变异定位的准确程度比辐射强,诱发的突变性状有明确的专一性^[8]。

1.1.5 成本低、易操作 化学诱变对基因组的损伤小、诱变剂量易控制,不存在转基因产品的安全性问题。

另外,化学诱变还具有以下特点:受组织结构的限制,穿透性不如辐射射线强;存在残留药物的迟效作用,在 M_1 代引起的生物损伤大;对后代选择需要足够大的群体。

1.2 化学诱变的发展历史

化学诱变育种始于 20 世纪初,Robson 等于 1941 年首次发现芥子气可以诱发基因突变,揭开了化学诱变育种的序幕;1943 年,Ochlikers 用脲脞处理月苋草,使化学药剂的诱变作用得到肯定^[4]。1948 年,Gustafsson 等用芥子气处理大麦获得突变体,开创了化学诱变在农作物育种上应用的先河;1967 年,Nilan 用硫酸二乙酯(DES)处理大麦种子,育成了茎秆矮、产量高、抗倒伏的品种 Luther^[9]。在此后的 40 多年时间里,化学诱变育种发展迅速并逐渐成熟。

蔬菜诱变育种始于 20 世纪 50 年代^[10],80 年代后在番茄、辣椒、黄瓜、洋葱、豆类蔬菜、甘蓝等多种蔬菜作物上被广泛应用,并获得了一批新品种^[11]。90 年代后,随着组织培养及原生质体、小孢子、花药、胚珠、胚等离体培养技术的发展,诱变结合体外培养被认为是作物改良的“一个理想体系”;2000 年,TILLING(Targeting induced local lesions in genomes,定向诱导基因组局部突变)技术的建立进一步推动了化学诱变的应用^[12]。近几年,体外诱变技术在品质改良、抗性提高的应用上受到重视。目

前,构建饱和的基因突变体库成为分析鉴定基因功能最直接、最有效的方法,而在诱变过程中施加生物(如真菌、昆虫、线虫、病毒、细菌、寄生杂草等)和非生物(如高盐、干旱、高温、低温、除草剂、重金属等)选择压,可获得抗逆突变体。

2 化学诱变效应的影响因素

2.1 诱变材料

基因差异可影响突变谱和突变频率。以创造新种质为目的的诱变,选用杂合材料可增加重组率,提高诱变效果,但稳定慢。以培育新品种或优系为目的的诱变,应选用优良的品系或自交系,处理后稳定快,能很快用于生产。在新基因发掘、功能基因组、生物的生理机制和代谢途径的研究中,应选用单倍体材料,有利于稳定性基因的表达,不存在显隐性的遮盖问题,而且不会在器官发生过程中出现嵌合体,单倍体是研究基因突变的良好材料。因此,结合不同的育种目标,在考虑相应遗传背景的基础上,还应选择综合性状和适应性好、改良某个缺点的品种或品系。

蔬菜植物的各个部分都可用化学诱变剂处理,但是诱变部位不同,所产生的突变率、突变频率、筛选难度也不同。根据不同的繁殖方式,诱变材料可分为:1)种子繁殖。干种子、萌动种子、植株、花药、花粉、花粉母细胞和极少量的子房细胞等配子体。2)无性繁殖。营养器官,如块茎、鳞茎、球茎、块根、腋芽、不定芽等。3)离体繁殖。茎尖、叶柄、叶片、嫩叶、胚珠、愈伤组织、悬浮培养体细胞、原生质体、顶端分生组织、小孢子、合子等。

蔬菜上化学诱变单倍体细胞已被广泛应用,如 Beversdorf 和 Kott 用 EMS、Swanson 等用 ENU(乙基亚硝基脲)、Polsoni 等用 NaN_3 (叠氮化钠)、Jedrzejaszek 和 Cegielska-Taras 等用 MNU(甲基亚硝基脲)诱变甘蓝型油菜的游离小孢子,Barro 等用 EMS 诱变埃塞俄比亚芥的游离小孢子^[13],石淑稳等^[14]用 EMS 处理甘蓝型油菜小孢子再生的胚性培养物,均获得了突变体。

原生质体和悬浮细胞多是单细胞起源,选择压力均一,而且还可避免或限制嵌合体的形成,是获得同质突变体的理想材料,已在甘薯、菊花、水稻、绞股蓝、葡萄、香蕉等植物上被应用。Colijn 等^[15]利用 6 种化学诱变剂诱变了矮牵牛悬浮细胞,并获得了 HgCl_2 和 6-氟色氨酸有抗性的愈伤组织。悬浮细胞的再生及将筛选出的性状稳定传送到再生植株的能

力,是诱变成败的关键。目前,诱变悬浮细胞在蔬菜作物上的研究很少。

2.2 诱变剂种类

化学诱变剂有上千种,不同诱变剂所诱发的突变类型和突变频率各不相同。主要分为:1)烷化剂,如甲基磺酸乙酯(EMS)、硫酸二乙酯(DES)、乙烯亚胺(EI)、乙基磺酸乙酯(EES)、甲基磺酸甲酯(MMS)、亚硝基胍(NTG);2)碱基类似物及有关化合物,如5-溴尿嘧啶(BU)、水合肼(HZ)、5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)、2-氨基嘌呤;3)叠氮化物,如叠氮化钠(SA)、叠氮化钾(KN_3)等;4)其他种类的化学诱变剂,如抗生素、羟胺、吖啶、秋水仙素等。

在蔬菜作物上使用最广泛的是烷化剂和秋水仙素,EMS被证明是最为有效且负面影响小、使用最广的诱变剂。Wani等^[16]用EMS、HZ、SA对鹰嘴豆的种子进行诱变,结果表明,EMS诱变的叶绿素突变体比HZ和SA的诱变频率高、突变谱广。Khan等^[17]用体积分数为0.3%的HZ、MMS和质量浓度为0.3 g/L的SA诱变鹰嘴豆种子6 h,对形态突变体的诱变频率为 $\text{HZ} > \text{MMS} > \text{SA}$ 。

2.3 诱变方法

选择适宜的剂量是得到理想突变体、获得最佳突变率、提高突变频率的关键。剂量=处理液剂量×处理时间,诱变剂剂量和处理时间是影响诱变效果的主要因素,此外还受温度、pH等因素的影响。

2.3.1 诱变剂剂量 随着诱变剂剂量的提高,诱变率增加,对诱变材料产生生理损伤的比例也提高。因此,选择剂量时应遵循既能达到较多变异,又不致过大损伤诱变材料的原则。诱变剂剂量与诱变材料有关,花药、游离小孢子、悬浮细胞和原生质体对诱变剂的敏感性,比种子、块茎、鳞茎等多细胞的组织和器官强,因此剂量应减小。卢银^[18]诱变大白菜“津育80”和“99-2”的种子,初步获得适宜的EMS诱变体积分数及时间为4%~6%和4 h;对“85-1”和“A12”的花粉进行诱变,初步得到较适宜的EMS诱变体积分数为4%~6%;对“85-1”、“A01”和“A06”的小孢子进行诱变培养,初步获得适于大白菜小孢子诱变的EMS体积分数应小于0.5%;对“85-1”花蕾结合小孢子进行诱变培养,EMS体积分数宜为1%~5%,处理时间为15~30 min。杨乾等^[19]用EMS诱变“甘农薯2号”和“青薯2号”,并进行耐盐性研究,得到适宜的体积分数和时间组合为9%~10%,4 h。杨国志等^[20]用不同浓度的 NaN_3 (0.000 5,0.001,0.001 5,0.002 mol/L)处理

西瓜种子,用0.001 5 mol/L NaN_3 诱变处理1.5 h,可使外植体再生频率降到40.0%,不定芽数/外植体降低到4.3,符合抗冷突变体半致死剂量的要求。Nadarajan等对木豆的诱变研究认为,叶绿素的突变频率呈剂量依赖性,中间或低剂量诱变能得到较高频率的叶绿素突变^[16]。Wani等^[16]研究发现,中间剂量的3种诱变剂EMS、HZ和SA,对叶绿素突变的诱变有效性和诱变率普遍较高。Basu等^[21]用EMS诱变葫芦巴种子,随着EMS浓度(0.01~0.3 mol/L)的升高, M_1 植株的成活率从84.7%下降到7.8%, M_2 的成活率由86.3%下降到49.5%。

2.3.2 诱变时间 处理时间越长,诱变剂在材料中的渗透程度越强,造成的生理损伤程度越大,适宜的处理时间为使受处理组织完全水合和被诱变剂浸透。在诱变种子时,可预先浸泡种子,使代谢和合成活跃起来,以缩短处理时间。Basu等^[21]用EMS诱变葫芦巴种子,随诱变时间(2~24 h)延长,植株的成活率下降,研究表明,长时间(24 h)、高剂量(0.3 mol/L)可产生高水平的致死突变。Luan等^[22]以0.2 mol/L NaCl为选择压,用体积分数5% EMS诱变甜薯愈伤组织0,1,1.5,2,2.5和3 h,发现0~1.5 h的处理因时间太短而没能产生耐盐突变体,3 h的处理对愈伤组织的增殖产生了不利影响,2和2.5 h的处理则分别得到了30%和32%的耐盐愈伤组织。

2.3.3 诱变温度 温度对诱变剂的水解速度有很大影响,低温能使诱变剂在较长时间内保持其稳定性,高温可以提高反应速度和增加效应。如对于种子诱变,可以先于低温(0~10℃)下将种子在诱变剂中浸泡足够时间,使诱变剂进入胚细胞,然后再将种子移入40℃的新鲜诱变剂溶液中,以提高诱变剂在体内的反应速度。

3 化学诱变在蔬菜育种中的应用

3.1 在蔬菜研究中的应用领域

3.1.1 抗病突变 选择剂主要有毒素提取物和病菌活体2类,目前国外对蔬菜抗病突变体的研究主要有:番茄抗茎枯病^[23]、番茄抗青枯病^[24]、番茄抗溃疡病^[25]、毕豆抗白粉病^[26]、茄子抗链霉素^[27]、豌豆抗枯萎病^[28]和油菜抗菌核病^[29]等;国内研究有芦笋抗茎枯病,大白菜抗黑斑病,番茄抗早疫病、晚疫病^[30],茄子抗黄萎病^[31],番茄抗叶霉病^[32]等。张喜春等^[30]在培养基中添加临界致死浓度(仅存活2%微型愈伤组织时的浓度)的制霉菌素,对番茄子叶、

下胚轴为外植体诱导的愈伤组织进行抗晚疫病筛选,经鉴定其突变体抗病性明显高于对照。Pereira 等^[26]利用诱变剂 ENU(乙基亚硝基脲)诱变毕豆幼苗,得到了 2 个抗白粉病的品种。

3.1.2 抗逆突变 在非生物因素(如高盐、干旱、高温、低温、除草剂等)的胁迫下,对蔬菜抗性突变体的研究也有了一定的进展,如国内外针对甘蓝型油菜、大白菜、辣椒抗除草剂,马铃薯、甘薯耐盐突变体,蚕豆耐重金属铅、铬突变体等的研究^[12]。杨国志^[33]用 NaN_3 处理西瓜种子,子叶再生苗经低温胁迫,得到了抗冷性增强的再生植株。吴沿友等^[34]用 EMS 处理甘蓝型油菜幼胚,以 HYP(羟脯氨酸)为选择剂选择出抗羟脯氨酸的突变体,发现抗性系比原始系耐聚乙二醇(PEG)、NaCl 及低温的能力加强。Atanassova 等^[35]研究表明,以含有 4 个影响花色素苷合成突变基因的番茄(*ah*、*aw*、*bls*)、辣椒(*al1*)的等基因系和近等基因系为材料,逆境条件(13 和 33 ℃, 0.12 mol/L NaCl、质量浓度 150 g/L PEG-6000 水溶液)下发芽率为 50%时所用时间比对照植株少。

3.1.3 多倍突变 染色体加倍在蔬菜诱变育种研究中较多,诱变剂多为秋水仙素,目前已在辣椒^[36]、番茄^[37]、甘薯^[38]、豌豆^[39]、大蒜^[40]等蔬菜的诱变育种中被研究应用。如周力等^[36]用 2 g/L 秋水仙素溶液处理“华椒 17”的种子及幼芽,育成了能稳定遗传、产量极显著高于“华椒 17”和“湘研 1 号”(杂交种),果色和果肉比“华椒 17”增深、增厚且果实商品

性进一步提高的 M-Ⅲ 株系。乔永刚等^[37]用 2 g/L 秋水仙素溶液对 3 个普通番茄品种进行多倍体诱变,结果均获得了四倍体材料。

3.1.4 突变库 以构建突变库为目的或诱变过程中不施加选择压,一般会得到较多不定向的突变,主要表现在产量,株高,叶型,叶色,果实和种子的形状、大小、颜色及品质,花器官发育等田间性状上。国内外已在番茄^[41-42]、大豆^[43]、甘蓝^[44]、生菜^[45]等蔬菜作物上构建了突变库。如韩锁义等^[46-47]用 $\text{Co}^{60}\gamma$ 射线和 EMS 分别对“南农 8624”大豆种子进行诱变,并构建大豆突变体库,结果在 M_3 代分别获得 40 份和 145 份叶、茎、花、种子、子叶等性状发生变异的材料。

3.2 在蔬菜育种中的应用成果

据 IAEA/FAO 突变品种数据库最新统计,截止 2012 年 2 月,联合编入目录的数据库中有来自 234 个国家的 240 种植物的 3 218 个突变品种,其中通过化学诱变得到的品种占 11.7%。蔬菜共有 49 种,诱变共得到 423 个突变品种,其中化学诱变占 20%。通过化学诱变育成的品种及其数量有:普通菜豆(22)、大豆(17)、蚕豆(6),莴苣、豌豆各 5 个,豇豆 4 个,茄子、兵豆各 3 个,芸豆、大粒豌豆、芽菜仔、洋葱各 2 个,黑绿豆、鹰嘴豆、黄瓜、青椒、羽衣甘蓝、东方芥菜、菠菜、甜椒、芋艿、番茄、芜菁各 1 个,其中,以 EMS 为诱变剂诱变所得品种占化学诱变所得品种的 51%^[11],详见表 1。

表 1 化学诱变得到的部分蔬菜新品种

Table 1 Some new vegetable varieties induced by chemical mutagenesis

蔬菜作物 Vegetables	品种 Varieties	诱变剂 Mutagen	特性 Characteristics	国家/年份 Country/Year
黑绿豆 Blank gram	Co 4	0.2 mL/L EMS	早熟、直立、光敏、有限生长	印度/1978
			Early maturity, erect, photosensitive, determinate type	India/1978
鹰嘴豆 Chickpea	CM-2008	2 mL/L EMS	抗枯萎病、高产	巴基斯坦/2008
			Resistance to wilt, high yield	Pakistan/2008
普通菜豆 Common bean	Plovdiv 11 M	0.006 2 mol/L EMS	早熟	保加利亚/1998
	NEP-2	0.04 mol/L EMS	早熟	Bulgaria/1998
			白色种子、白花、抗病	哥斯达黎加/1975
	Montalbano	EMS	White seed color, white flower color, resistance to diseases	Costa Rica/1975
豇豆 Cowpea	V240	DMS	杂色种子突变为白色种子	意大利/1985
			Uniform white seed color instead of variegated	Italy/1985
	V38	DMS	高产,抗病	印度/1984
			High yield, resistance diseases	India/1984
蚕豆 Faba bean	V16	DMS	高产,早熟,花期同步,抗病	印度/1981
			High yield, early maturity, synchronous flowering, resistance to diseases	India/1981
	Severinovskie 1	0.1 g/L NMU	高产,抗细菌、真菌性病害	印度/1981
			High yield, resistance to fungal and bacterial diseases	India/1981
			高产,高蛋白	俄罗斯/1992
			High yield and high protein content	Russian /1992

续表 1 Continued table 1				
蔬菜作物 Vegetables	品种 Varieties	诱变剂 Mutagen	特性 Characteristics	国家/年份 Country/Year
蚕豆 Faba bean	Tisesta	EMS	株型改善 Improved plant architecture	德国/1991 Germany/1991
	Chabanskii	NEU	早熟、高产 Early maturity,high yield	俄罗斯/1985 Russian /1985
芸豆 Kidney bean	Svetlaya	0.06 g/L NMU	高产、高蛋白 High yield,high protein content	俄罗斯/1992 Russian /1992
	Mukhranula	0.15 mL/L EI	早熟 Early maturity	俄罗斯/1982 Russian /1982
兵豆 Lentil	Binamasur-3	0.5 mL/L EMS	高产,早熟,耐锈病、枯萎病 High yield,early maturity,rust and blight tolerance	孟加拉国/2005 Bangladesh/2005
	Zornitsa	1 mL/L EMS	高产,高蛋白,烹饪和感官品质好,抗炭疽、病毒、叶枯病 High yield,high protein content,good culinary and organoleptic quality, resistance to anthracnose, viruses and ascochyta blight	保加利亚/2000 Bulgaria /2000
豌豆 Pea	Hans	EI	早熟,高产,种子品质好 Early maturity,high yield,better seed quality	印度/1979 India /1979
	Kexin 8		高抗大豆花叶病毒病,中熟 High resistance to soybean Mosaic virus disease,medium	中国/2004 China/2004
黄瓜 Cucumber	Altaj	0.5 mL/L DMS	早熟,耐盐,适于露地栽培 Early maturity, toleranceto salinity, cultivation on open fields	俄罗斯/1981 Russian /1981
	Co. 3	1 mL/L EMS	植株紧凑,适应性强,果实圆、光滑、Vc 含量高 Compact growth,adaptability,fruit shape round and smooth,high vitamin C	印度/1997 India /1997
茄子 Eggplant	Floralba	8 mL/L EMS	节间短,早熟,高产,适宜加工(白果),田间抗黄萎病 Shorter internodes,early maturity,higher yield,suitable for processing (white fruits),field tolerance to Verticillium dahliae	意大利/1985 Italy/1985
	Macla	8 mL/L EMS	早熟,株高变小,果实小 Shorter plant height,early maturity,smaller fruit size	意大利/1983 Italy/1983
青椒 Green pepper	Friari KS80	6 mL/L EMS	节间短,株高小,抗黄萎病 Shorter internodes and plant height,tolerance to Verticillium dahliae Kleb	意大利/1985 Italy/1985
	Veha		抗霜霉病,抗细菌性病,抗虫 Resistance to peronosporosis,bacteriosis and insects	俄罗斯/1990 Russian/1990
莴苣 Lettuce	Mini-Green	0.3 mL/L EMS	植株矮小 Dwarfness	美国/1992 America /1992
	Novogodnii	0.2 mL/L EI	弱光下光合能力强、Vc 含量高 High productivity under limited light (photosynthesis), high vitamic C content	俄罗斯/1991 Russian/1991
芽菜仔 Mungbean	Binamoog-7	7.5 mL/L EMS	种子产量高,抗油菜花叶病毒,抗叶斑病,荚果成熟期一致 Higher seed yield,tolerance to leaf YMV and Cercospora leaf spot,synchronous pod maturity	孟加拉国/2005 Bangladesh/2005
	MUM-2	2 mL/L EMS	高产、抗病 High yield,resistence to diseases	印度/1992 India /1992
东方芥菜 Oriental mustard	Tabys-(KIK-13)	0.5 g/L NEU	高产 High yield	俄罗斯/1993 Russian/1993
	Shambal (BAU-M/248)	6.4 mL/L EMS	茎短、种子大 Short stem,larger seed size	孟加拉国/1984 Bangladesh/1984
菠菜 Spinach	Lavewa	EMS	低硝酸盐含量、高干物质含量,耐抽薹,营养生长、收割期长 Low nitrate content,high dry matter,late bolting,long vegetative growth,long harvest time	德国/1987 Germany/1987
	Nush-51	0.5 mL/L EI	高产,品质优良 High yield,good quality	俄罗斯/1991 Russian/1991
芋艿 Taro	Fukugashira	MNU	圆球茎,适宜烹饪、加工 Round corm,higher cooking and processing	日本/1992 Japan/1992

4 展 望

化学诱变育种技术较物理辐射诱变技术起步晚、发展慢,尤其在蔬菜作物上应用较少。最初,其主要目的是得到新的种质资源,近年来,诱变结合生物技术,如物理图谱技术、荧光染色法、分子细胞遗传学工具(如 FISH、GISH、TUNEL、COMET assay)、分子标记技术(如 RFLP、AFLP、SSR、SCAR、ISSR、IRAP、EST、SNP)、染色体标记检测等,获得了目的基因及基因复合体,促进了育种工程中对有益基因的筛选,尤其是 TILLING 技术的开发,因可以快速有效地从化学诱变剂(如 EMS)诱变产生的突变群体中鉴定出点突变,从而使得化学诱变成为研究基因功能、生物的生理生化机制及代谢途径的有力工具。在化学诱变育种中,结合育种目标,选择适宜的诱变材料、诱变剂,结合最佳诱变剂量和有效的突变体筛选鉴定体系,才可得到理想的突变体。同时,化学诱变技术应与杂交育种、组织培养、双单倍体体系、分子生物学等技术相结合,以扩展化学诱变体系,扩大种质资源。

[参考文献]

- [1] Jiont FAO/IAEA programe of nuclear techniques in food and agriculture. Application of nuclear techniques in food and agriculture [ED/OL]. (2011-04-10) [2012-03-15]. <http://www.doc88.com/p-51466173975.html>
- [2] Shu G Y. Induced plant mutations in the Gonomics Era [R]. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nation, 2009.
- [3] 徐冠仁. 植物诱变育种学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 1.
Xu G R. Plant mutation breeding [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1996: 1. (in Chinese)
- [4] 柳学余. 农作物化学诱变育种 [M]. 南京: 东南大学出版社, 1992: 2.
Liu X Y. Induced mutations in plant breeding by chemical mutagen [M]. Nanjing: Southeast University Press, 1992: 2. (in Chinese)
- [5] 赵永亮, 宋同明. 玉米化学诱变研究进展 [J]. 华北农学报, 1996, 11(4): 24-28.
Zhao Y L, Song T M. Advances in induced mutations in maize by chemical mutagens [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 1996, 11(4): 24-28. (in Chinese)
- [6] 郭建秋, 雷全奎, 杨小兰, 等. 植物突变体库的构建及突变体检测研究进展 [J]. 河南农业科学, 2010(6): 150-155.
Guo J Q, Lei Q K, Yang X L, et al. The development of constructing mutant plants population and mutant detection [J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2010(6): 150-155. (in Chinese)
- [7] 葛 莘. 高级植物分子生物学 [M]. 北京: 科学出版社, 2004: 222.
Ge S. Senior plant molecular biology [M]. Beijing: Science Press, 2004: 222. (in Chinese)
- [8] 罗 静, 周厚成, 王永清. 园艺植物化学诱变与抗性突变体筛选研究进展 [J]. 中国农学通报, 2005, 21(8): 302-305.
Luo J, Zhou H C, Wang Y Q. Development of the chemical induction and selection of mution research in horticulture plant [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 21(8): 302-305. (in Chinese)
- [9] 安学丽, 蔡一林, 王久光, 等. 化学诱变及其在农作物育种上的应用 [J]. 核农学报, 2003, 17(3): 239-242.
An X L, Cai Y L, Wang J G, et al. Chemical mutagen and its application in plant breeding [J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2003, 17(3): 239-242. (in Chinese)
- [10] 赵会芳, 巩振辉, 李大伟. 我国蔬菜作物诱变育种研究进展 [C]//赵尊练. 园艺学进展: 第六辑. 西安: 陕西科学技术出版社, 2004: 578-583.
Zhao H F, Gong Z H, Li D W. The advanced on research in vegetable mutation breeding [C]//Zhao Z L. Horticulture progress: The sixth album. Xi'an: Shaanxi Science and Technology Publisher, 2004: 578-583. (in Chinese)
- [11] FAO/IAEA. Mutant varieties database [ED/OL]. (2011-04-10) [2012-02-04]. <http://www-mvd.iaea.org/MVD/Default.html>.
- [12] Xu L, Najeeb U, Naeem M S, et al. *In vitro* mutagenesis and genetic improvement [J]. Technological Innovations in Major-world Oil Crops, 2012, 2: 151-173.
- [13] Szarejko I, Forster B P. Doubled haploidy and induced mutation [J]. Euphytica, 2007, 158: 359-370.
- [14] 石淑稳, 吴江生, 刘后利. 离体诱发甘蓝型油菜长角果和矮秆突变体 [J]. 核农学报, 1995, 9(4): 252-253.
Shi S W, Wu J S, Liu H L. Dwarf stem and long pod mutants induced from micrispore embryo cultures of *Brassica napus* with EMS [J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 1995, 9(4): 252-253. (in Chinese)
- [15] Colijn C M, Keel A J, Nijkamp H J J. An effective chemical mutagenesis procedure for petunia hybrida cell suspension cultures [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1979, 55: 101-106.
- [16] Wani M R, Khan S, Kozgar M I. Induced Chloropyll mutations; I. Mutagenic effectiveness and efficiency of EMS, HZ and SA in mungbean [J]. Frontiers of Agriculture in China, 2011, 5(4): 514-518.
- [17] Khan S, Parveen K, Goyal S. Induced mutations in chickpea-morphological mutants [J]. Frontiers of Agriculture in China, 2011, 5(1): 35-39.
- [18] 卢 银. EMS 诱发大白菜变异的研究 [D]. 保定: 河北农业大学, 2011.
Lu Y. Induced variation of Chinese cabbage by EMS treatment [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2011. (in Chinese)

- Chinese)
- [19] 杨乾,张峰,王蒂,等. EMS诱变筛选马铃薯茎段离体耐盐变异体[J]. 核农学报, 2011, 25(4): 673-678.
Yang Q, Zhang F, Wang D, et al. Selection of salt-tolerant variants from potato *in vitro* micro-cuttings induced by EMS[J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2011, 25(4): 673-678. (in Chinese)
- [20] 杨国志, 张明方, 顾掌根, 等. NaN_3 处理条件下西瓜直接再生试验体系研究[J]. 长江蔬菜, 2009(6): 11-14.
Yang G Z, Zhang M F, Gu Z G, et al. Study on the direct regeneration system of watermelon under the treatment of NaN_3 [J]. Journal of Changjiang Vegetables, 2009(6): 11-14. (in Chinese)
- [21] Basu S K, Acharya S N, Thomas J E. Genetic improvement of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) through EMS induced mutation breeding for higher seed yield under western Canada prairie conditions [J]. Euphytica, 2008, 160: 249-258.
- [22] Luan Y S, Zhang J, Gao X R, et al. An mutation induced by ethylmethanesulphonate (EMS), *in vitro* screening for salt tolerance and plant regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2007, 88: 77-81.
- [23] Vander Biezen E A, Nijkamp H J J, Hille J. Mutations at the Asc locus of tomato confer resistance to the fungal pathogen *Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersici* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1996, 92: 898-904.
- [24] Toyodat H, Shimizu K, Chatani K, et al. Selection of bacterial wilt-resistant tomato through tissue culture [J]. Plant Cell Reports, 1989, 8: 317-320.
- [25] Özer Ç, Yusuf B, Demet Ç. Characterization of resistant tomato mutants to bacterial canker disease [J]. African Journal of Biotechnology, 2012, 11(32): 8070-8075.
- [26] Pereira G, Leita J. Two powdery mildew resistance mutations induced by ENU in *Pisum sativum* L affect the locus *er1* [J]. Euphytica, 2010, 171: 345-354.
- [27] Rao A V, Farooqui A, Jaya Sree T, et al. EMS-induced streptomycin resistance in *Solanum melongena* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1993, 87: 527-530.
- [28] Sharma A, Rathour R, Plaha P, et al. Induction of fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*) resistance in garden pea using induced mutagenesis and *in vitro* selection techniques [J]. Euphytica, 2010, 173: 345-356.
- [29] Mullins E, Quinlan C, Jones P. Isolation of mutants exhibiting altered resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* from small M_2 populations of an oilseed rape (*Brassica napus*) variety [J]. European Journal of Plant Pathology, 1999, 105: 465-475.
- [30] 张喜春, Lutova L A. 利用细胞筛选方法获得番茄抗晚疫病突变异体的研究[J]. 园艺学报, 2000, 27(5): 377-379.
Zhang X C, Lutova L A. Study of the selection of tomato resistant mutant line to *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary by cellular breeding [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2000, 27(5): 377-379. (in Chinese)
- [31] 孙桂英. 茄子抗黄萎病突变体再生植株诱导及抗病性鉴定[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2004.
Sun G Y. Studies on inducing plantlet regeneration of resistant mutants and determination resistance to *Verticillium dahliae* in eggplant [D]. Huhehaote: Inner Mongolia Agricultural University, 2004. (in Chinese)
- [32] 任涛涛. 番茄叶霉病拮抗菌株的选育、复合诱变及田间试验研究[D]. 西安: 西北大学, 2011.
Ren T T. Breeding, composite mutation of the antagonistic strain against tomato leaf mould and their biocontrol effect in fields [D]. Xi'an: Northwest University, 2011. (in Chinese)
- [33] 杨国志. 西瓜耐冷种质的离体化学诱变研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
Yang G Z. Induction of cold tolerant germplasm in watermelon by chemical mutagenesis *in vitro* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2006. (in Chinese)
- [34] 吴沿友, 罗鹏. 甘蓝型油菜抗 HYP 突变体的筛选及鉴定[J]. 中国油料作物学报, 1998, 20(2): 10-15.
Wu Y Y, Luo P. Selection and determination of *Brassica napus* variant resistant to hydroxyprolin [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 1998, 20(2): 10-15. (in Chinese)
- [35] Atanassova B, Daskalov S, Shtereva L, et al. Anthocyanin mutations improving tomato and pepper tolerance to adverse climatic conditions [J]. Euphytica, 2011, 120: 357-365.
- [36] 周力, 高和平, 杨成万, 等. 秋水仙素在辣椒诱变育种中的应用初探[J]. 中国蔬菜, 1995(5): 22-24.
Zhou L, Gao H P, Yang C W, et al. Application of colchicine in mutation breeding of pepper [J]. China Vegetables, 1995(5): 22-24. (in Chinese)
- [37] 乔永刚, 宋秀英. 秋水仙素诱导普通番茄多倍体的研究[J]. 西南农业大学学报: 自然科学版, 2008, 28(2): 139-143.
Qiao Y G, Song X Y. Polyploid induction of *Lycopersicum Esculentum* Mill var *Vulgare* with colchicine [J]. Journal of Southwest Agricultural University: Natural Science, 2008, 28(2): 139-143. (in Chinese)
- [38] 王凤宝, 付金锋, 董立峰, 等. 秋水仙素和二甲基亚砷诱变选育短蔓型甘薯新品种短蔓3号[J]. 核农学报, 2008, 22(2): 169-174.
Wang F B, Fu J F, Dong L F, et al. Breeding of new sweet potato cultivar duanwan 3 with short vine by colchicine and dimethyl sulphoxide induced mutation [J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2008, 22(2): 169-174. (in Chinese)
- [39] 王凤宝, 付金锋, 董立峰. 秋水仙素与 DMSO 诱导豌豆同源四倍体[J]. 核农学报, 2009, 23(2): 203-208.
Wang F B, Fu J F, Dong L F. Inducing autotetraploid pea with colchicine and DMSO [J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2009, 23(2): 203-208. (in Chinese)
- [40] 张素芝, 李纪蓉. 秋水仙素诱导大蒜四倍体的研究[J]. 核农学报, 2006, 20(4): 303-308.
Zhang S Z, Li J R. Study on colchicine-induced tetraploid in garlic (*Allium sativum* L.) [J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2006, 20(4): 303-308. (in Chinese)

[41] Watanabe S,Mizoguchi T,Aoki K,et al. Ethylmethanesulfonate (EMS) mutagenesis of *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom for large-scale mutant screens [J]. Plant Biotechnology, 2007,24:33-38 .

[42] Minoia S,Petrozza A,D’Onofrio O,et al. A new mutant genetic resource for tomato crop improvement by TILLING technology [J]. BMC Research Notes.2010(3):69.

[43] 魏玉昌,杜连恩,于秀普,等. 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.
Wei Y C,Du L E,Yu X P,et al. Research on mutative effect of EMS on soybean zygote [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences,1999,21(3):34-37. (in Chinese)

[44] 汪 念. 甘蓝型油菜 EMS 突变体库的构建及 TILLING、Eco-TILLING 技术的应用研究 [D]. 武汉:华中农业大学,2009.
Wang N. Construting an EMS mutant population and applying TILLING,EcoTILLING technology in *Brassica napus* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009. (in Chinese)

[45] Mou B. Mutations in lettuce improvement [J]. International Journal of Plant Genomics,2011,1-7. Article ID:723518. doi: 10.1155/2011/723518.

[46] 韩锁义,张恒友,杨玛丽,等. 大豆“南农 86-4”突变体筛选及突变体库的构建 [J]. 作物学报,2007,33(2):2059-2062.
Han S Y,Zhang H Y,Yang M L,et al. Screening of mutants and construction of mutant population in soybean “Nannong 86-4” [J] . Acta Agronomica Sinica,2007,33(2):2059-2062. (in Chinese)

[47] 韩锁义,杨玛丽,陈远东,等. 大豆“南农 94216”突变体库的构建及部分性状分析 [J]. 核农学报,2008,22(2):131-135.
Han S Y,Yang M L,Chen Y D,et al. Construction of mutant library for soybean “Nannong 94216” and analysis of some characters [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2008,22(2):131-135. (in Chinese)

(上接第 198 页)

[12] 李慧敏,胡雪英,秦新民,等. 一种适用于 PCR 的土壤微生物 DNA 的提取方法 [J]. 安徽农业科学,2010,38(2):600-601,619.
Li H M,Hu X Y,Qin X M,et al. An extraction method of soil microbial DNA for PCR analysis [J]. Journal of Anhui Agri. 2010,38(2):600-601,619. (in Chinese)

[13] 黄婷婷,曹 慧,王兴祥,等. 一种土壤微生物总 DNA 的高效提取方法 [J]. 土壤,2004,36(6):662-666.
Huang T T,Cao H,Wang X X,et al. An efficient method for DNA extraction from soil microorganism [J]. Soils,2004,36(6):662-666. (in Chinese)

[14] Thompson J,Mareelino L A,Polz M F. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: Formation, COR sequence and elimination by ‘reconditioning PCR’ [J]. Nucleic Acids Res,2002,30(9):2083-2088.

[15] Wintzingerode F V,Gobel U B,Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: Pitfalls of PCR-based rRNA analysis FEMS [J]. Microbiology Reviews,1997,21:213-229.

[16] Myers R M,Fischer S G,Lerman L S,et al. Nearly all single base substitution in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Nucleic Acids Res,1985,13(9):3131-3145.

(上接第 204 页)

[14] 李懋学,张赞平. 作物染色体及其研究技术 [M]. 北京:中国农业出版社,1996:1-37.
Li M X,Zhang Z P. Chromosomes and its studying techniques in the crops [M]. Beijing:China Agricultural Press,1996:1-37. (in Chinese)

[15] 李懋学,陈瑞阳. 关于植物核型分析的标准化问题 [J]. 武汉植物研究,1985,3(4):297-302.
Li M X,Chen R Y. A suggestion on the standardization of karyotype analysis in plants [J]. Journal of Wuhan Botanical Research,1985,3(4):297-302. (in Chinese)

[16] Stebbins G L. Chromosomal evolution in higher plans [M]. London:Edward Arnoold Ltd,1971:72-123.

[17] Kuo S R,Wang T T,Huang T C. Karyotype analysis of some Formosan gymnosperms [J]. Taiwanania,1972,17(1):66-80.

[18] Arano H. The karotypes and the speciations in subfamily Carduoideae of Japan [J]. Jap Journ Bot,1965,19(3):31-67.

[19] 洪德元. 植物细胞分类学 [M]. 北京:科学出版社,1990:88-115.
Hong D Y. Plant cellular taxonomy [M]. Beijing: Science Press,1990:88-115. (in Chinese)

[20] Tzanoudakis D. Karyotypes of the taxa of *Allium* section *Scorodon* from Greece [J]. Caryologia,1983,36(3):259-284.