

doi: 103969/j.issn.0490-6756.2016.11.033

山药愈伤组织 EMS 诱变及其再生苗变异研究

陈芝华, 华树妹, 李丽红, 雷伏贵, 贺佩珍, 曹奕鸯, 莫智龙

(福建省三明市农业科学研究院, 三明 365051)

摘要: 为了加速创造山药新种质, 以“明淮 2 号”山药愈伤组织为材料, 研究了不同浓度 EMS [0(ck), 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3%]、不同时间 [0(ck), 6h, 12h, 24h, 48h] 处理对山药愈伤组织致死率的影响, 以确定半致死浓度和时间; 比较了在半致死处理后愈伤组织不同继代次数的影响情况; 并对再生植株进行形态学比较和分子鉴定. 结果表明, EMS 诱变浓度和时间都对山药愈伤组织的致死率有显著影响, 且 EMS 诱变浓度影响更显著, 适宜的诱变方法为 0.1% EMS 浓度处理 48h. 诱变后愈伤组织增殖系数和分化率随继代次数增加而增加, 但诱变率随继代次数增加而显著降低, 诱变后愈伤组织经过一次继代后转入分化有利诱变体的筛选. 再生植株主要发生叶色、叶型变异, 通过 RAPD 标记鉴定结果显示有 8 份表型突变体植株条带确实出现了差异.

关键词: 山药; EMS 诱变; 突变类型; 分子鉴定

中图分类号: S53 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2016)06-1379-07

EMS mutagenesis in callus of *Rhizoma Dioscorea* and its regeneration plantlets variation

CHEN Zhi-Hua, HUA Shu-Mei, LI Li-Hong, LEI Fu-Gui, HE Pe-Zhen, CAO Yi-Yang, MO Zhi-Long
(Sanming Academy of Agricultural Sciences, Sanming 365051, China)

Abstract: To accelerate the breeding of *Rhizoma Dioscorea*, the effects of EMS concentrations (0(ck), 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3%) at different time (0(ck), 6h, 12h, 24h, 48h) on mortality of “Ming huai 2” callus were performed to determine the semi-lethal activity of EMS. And the effects of different subcultures on callus after semi lethal treatment were compared. The morphological analysis and molecular characterization in the EMS-mutated plants were examined. The result showed that the death rate of callus is corrected to the concentration and temporal effect of EMS, especially for the dosage-dependent of EMS. Based on the result, the callus was treated with 0.1% EMS for 48 hours as the suitable condition for EMS mutation assay. The proliferation coefficient and regeneration rate of callus were increased with the subculture frequency; however the mutation rate were significantly decreased with the subculture. Thus, the callus after primary subculture was regenerated to screen the mutant effectively. The morphological analysis revealed that the mutation of leaf shape and color were observed in EMS-induced mutants. By RAPD maker analysis, the result showed that the DNA bands of 8 regeneration plantlets did appear to differ.

Keywords: Yam; EMS mutagenesis; Mutation types; Molecular identification

收稿日期: 2015-10-20

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2014J01381); 国家星火项目(2015S0067)

作者简介: 陈芝华(1980-), 男, 浙江温州人, 助理研究员, 研究方向为作物遗传育种. E-mail: czh_5555@163.com.

通讯作者: 华树妹. E-mail: hsm20082006@126.com

1 引言

山药(*Rhizoma Dioscorea*)属薯蓣科(Dioscoreaceae)薯蓣属(*Dioscorea* L.),为具双子叶植物特征的单子叶缠绕蔓性藤本植物^[1],是重要的药、食兼用经济作物^[2,3].近年来山药育种研究逐渐受到重视^[4,5],但目前山药品种的选育多采用系统选育而来,通过地方品种的提纯复壮选育出新品种,缺乏山药种质的创新.而人工化学诱变可显著提高自然突变率,从而使人们定向地创造和筛选变异成为可能.通过组培技术结合化学诱变方法,创新种质并筛选有益性状的突变体已在许多植物中得到成功应用^[6-9].

EMS(甲基磺酸乙酯, ethyl methane sulfonate)是目前在植物诱变育种中应用最广泛,最有效的化学诱变剂之一.其诱变不仅可以产生丰富类型的突变体,而且可以不经遗传转化,即可获得一些不同性状的优良种质.由于其作用主要是诱发点突变,不易造成染色体畸变,且稳定性好,因而被广泛用于构建突变类型^[10-12].

本试验通过比较不同 EMS 诱变处理对愈伤组织致死率的影响,以及诱变后不同继代次数对愈伤组织增殖、分化、诱变率等的影响以及再生植株形态学和分子水平差异,确定 EMS 处理山药愈伤组织的适宜条件和有效提高诱变体筛选的方法,为丰富新种质、创造新品种奠定理论基础,有关山药愈伤组织 EMS 诱变的研究还少见报道.

2 材料与方法

2.1 试验材料

山药品种为福建省三明市农科院药用所选育的山药新品种“明淮 2 号”.

所用化学诱变剂 EMS 购于 SIGMA 公司, RAPD 随机引物、2×TaqMasterMix、Mark 等购自上海生物工程有限公司.其他化学试剂主要由中国化学药品公司生产,均为分析纯.

2.2 试验方法

2.2.1 愈伤诱导 试验用“明淮 2 号”愈伤组织材料通过带芽茎段诱导获得,愈伤组织诱导培养基为:MS+4.0mg/L KT+2.0mg/L NAA+30g/L 蔗糖 4g/Lg 琼脂粉, pH5.8.

2.2.2 EMS 溶液的配制 配制 0.1mol/L、pH7 磷酸缓冲液:取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.852g 定容 100mL, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.561g 定容 100mL, 从 100mL $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 中取 61.0mL, 100mL

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 中取 39.0mL, 配制成 100mL 磷酸缓冲液,调节 pH 7.0,高压灭菌.然后将缓冲液作为溶剂,配制 0.05%、0.1%、0.2%、0.3%、4 个浓度 EMS 溶液,过滤灭菌备用.

2.2.3 愈伤组织 EMS 诱变 愈伤组织经过 3~4 次继代后,选取处于旺盛增殖阶段的愈伤组织,利用不同时间(6, 12, 24, 48h)与不同浓度梯度(0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3%)EMS-磷酸缓冲液处理,设置缓冲液为对照 CK,进行愈伤组织 EMS 处理试验,统计 EMS 对愈伤组织致死率的影响.

2.2.4 愈伤组织诱变后的不同继代次数处理 愈伤组织 EMS 诱变后经过一次、二次和三次继代增殖培养,而后分别转入分化培养,以未经 EMS 诱变处理的愈伤组织为对照,每个处理 30 瓶,10 个/瓶,共 300 个外植体.统计愈伤组织的增殖系数、分化率和诱变率.

2.2.5 突变体的 RAPD 检测 参考改良的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法分别提取突变体和对照的组培苗幼嫩叶片总 DNA,在琼脂糖凝胶上进行电泳检测 DNA 质量,使用分光光度仪调整浓度至 50ng/ μL ,DNA 样品保存于 -20°C 备用.用 RAPD 随机引物采用 25 μL 体系:2×TaqMaster-Mix 12 μL , DNA 模板 2 μL , 引物 2 μL , ddH₂O 9 μL ,在 PTC-100PCR 扩增仪上扩增.PCR 反应程序为:94 $^\circ\text{C}$ 4min,94 $^\circ\text{C}$ 30s,37 $^\circ\text{C}$ 1min,72 $^\circ\text{C}$ 30s,40 个循环,72 $^\circ\text{C}$ 6min,4 $^\circ\text{C}$ 保存.产物跑 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色并在 UV 凝胶成像仪上观察结果并照相.

2.2.6 统计方法 试验用 Excel 2003 对数据进行处理,并采用 DPS 软件对数据进行分析.其中,致死率/%=死亡愈伤组织数/愈伤组织总数×100;分化率/%=分化愈伤组织数/愈伤组织总数×100;突变率/%=表型变异株数/EMS 处理后成活的总株数×100;变异系数/%=标准差/均值×100.

3 结果与分析

3.1 EMS 不同处理对山药愈伤组织致死率的影响

经 EMS 处理后的山药愈伤组织培养 1w 后,部分开始褐化,随着培养时间的延长,褐化逐渐加深,部分材料最后死亡.存活的材料则为浅黄色或浅黄褐色.培养 4w 后统计其死亡率情况(见表 1).从表中可以看出:经 EMS 处理后的山药愈伤组织的致死率均高于对照,说明 EMS 对山药愈伤组织具有毒害作用;随着 EMS 浓度增加与时间的延长愈伤组织褐化死亡也越来越严重,说明 EMS 的浓

度和处理时间都对山药愈伤组织存活情况存在影响. EMS 浓度在 0.05%—0.3% 内山药愈伤组织都能维持一定的存活率, 但各处理之间存在不同程度的差异, 并且 EMS 浓度 0.3% 处理 48h 时致死率最高, 0.1% 处理 48h 和 0.2% 处理 12h 获得的致死率最接近于半数, 为半致死处理.

极差 R 的大小反映了该因素的影响程度, 极差大的因素对试验结果影响也大. 进一步对表 1 进行极差分析(见表 2), 由 R 值大小可以看出, EMS 浓度和时间的极差 R 值都比较大, 可知 EMS 浓度和时间都对山药愈伤组织致死产生重要影响; 通过 EMS 浓度和时间的 R 值大小的比较, 可知 EMS 浓度对山药愈伤组织的致死率影响最大; 由 K 值大小可以看出, 愈伤组织致死率随着 EMS 浓度增加与时间的延长也越来越高.

表 1 不同 EMS 浓度与时间处理对山药愈伤组织的影响
Tab. 1 Effects of different medium on long-term proliferation of gerbera

处理	EMS 浓度 (%)	时间 (h)	接种数 (个)	死亡数 (个)	死亡率 (%)
CK	0	0	120	0	0.0
1	0.05	6	120	19	15.8 i
2	0.05	12	120	29	24.2 h
3	0.05	24	120	38	31.7 fg
4	0.05	48	120	47	40.8 e
5	0.1	6	120	28	23.3 h
6	0.1	12	120	35	29.2 g
7	0.1	24	120	43	35.8 f
8	0.1	48	120	57	47.5 d
9	0.2	6	120	39	32.5 fg
10	0.2	12	120	56	46.7 d
11	0.2	24	120	70	58.3 c
12	0.2	48	120	76	63.3 c
13	0.3	6	120	53	44.2 de
14	0.3	12	120	71	59.2 c
15	0.3	24	120	94	78.3 b
16	0.3	48	120	110	91.7 a

注: 数据采用 Duncan 多极复差法进行检验, 表中不同小写字母表示在 0.05 水平上存在显著差异 ($P < 0.05$).

Note: The data were tested by Duncan method, and the difference between the 0.05 levels of the different letters indicated significant difference ($P < 0.05$).

表 2 EMS 处理试验致死率极差分析

Tab. 2 The analysis of range of death ratio

	EMS 浓度	时间
K1	28.125	28.950
K2	33.950	39.825
K3	50.200	51.025
K4	68.350	60.825
R	40.225	31.875

从表 3 的方差分析结果表明, 因素 EMS 浓度和时

间对山药愈伤组织致死率的影响均达到极显著水平.

表 3 EMS 处理试验致死率方差分析

Tab. 3 Analysis of variance of death ratio

变异来源	SS(平方和)	DF(自由度)	MS(均方)	F 值
EMS 浓度	3916.1319	3	1305.3773	46.3230 * *
时间	2284.0667	3	761.3556	27.0180 * *
误差	253.6206	9	28.1801	
总变异	6453.8192	15		

从极差 R 值和方差分析 F 值可知, EMS 浓度对山药愈伤组织致死率的影响均大于时间对山药愈伤组织致死率的影响. 在 EMS 浓度为 0.2%、处理时间 12h 时, 虽然愈伤组织死亡率接近“半致死量”. 但在愈伤组织分化过程中, 依然有部分愈伤组织会陆续褐化死亡, 表现出较为明显的残留与后害作用. 而在 EMS 浓度为 0.1%、处理时间 48h 时, 在愈伤组织分化过程中的残留与后害作用则相对较轻, 因此, 山药愈伤组织 EMS 诱变较适宜的半致死处理为: EMS 处理浓度为 0.1%、处理时间为 48h.

3.2 EMS 半致死处理后愈伤组织不同继代次数的影响

将 EMS 半致死处理后的愈伤组织经过不同继代次数的培养, 比较其对增殖、分化、诱变率的影响(见表 4), 经 EMS 处理后愈伤组织第一次继代早期长势十分缓慢, 先出现褐化现象, 后逐渐导致部分愈伤组织死亡, 经过 1 个月的增殖培养部分愈伤组织重新长出. 转入分化培养后再生苗诱变率可达 9.43%. 将重新长出的愈伤组织经过第二、三次继代后, 愈伤组织增殖系数和分化率都有所提高, 但诱变率却显著降低. EMS 处理后愈伤组织第一、二、三次继代增殖、分化情况见图 1.

表 4 EMS 处理后愈伤组织不同继代次数的影响

Tab. 4 Effects of different subculture times on Callus from EMS treatment

处理	接种数(个)	增殖系数	分化率(%)	诱变率(%)
对照(ck)	300	5.4	87.3	0.03
第一次继代	300	0.6	26.1	9.43
第二次继代	300	2.9	59.8	2.16
第三次继代	300	5.1	81.6	0.77

3.3 EMS 处理后山药植株表型的变化

观察诱变后的再生植株, 发现与对照相比表型变化较丰富, 包括叶片颜色变化和叶片形态变化.

3.3.1 叶片颜色变化 山药无菌苗正常叶色多为绿色或淡绿色, 诱变后叶色变异类型较丰富, 且颜

色差异较大.从叶色类型来分,多数是绿色与红色的混合色,约占 60%.其次是粉红色至红褐色之间

的过渡色,约占 30%.最后是黄色、黄绿色、白化以及不同色系的斑状复色,约占 10%.



图 1 愈伤组织在 EMS 处理后生长分化情况

a: 愈伤组织在 EMS 处理后第一次继代分化情况;b: 愈伤组织在 EMS 处理后第二次继代分化情况;c: 愈伤组织在 EMS 处理后第三次继代分化情况.

Fig.1 The growth and regeneration of callus after EMS treatment

a: The first subculture of callus after EMS treatment;b: The second subculture of callus after EMS treatment;c: The third subculture of callus after EMS treatment

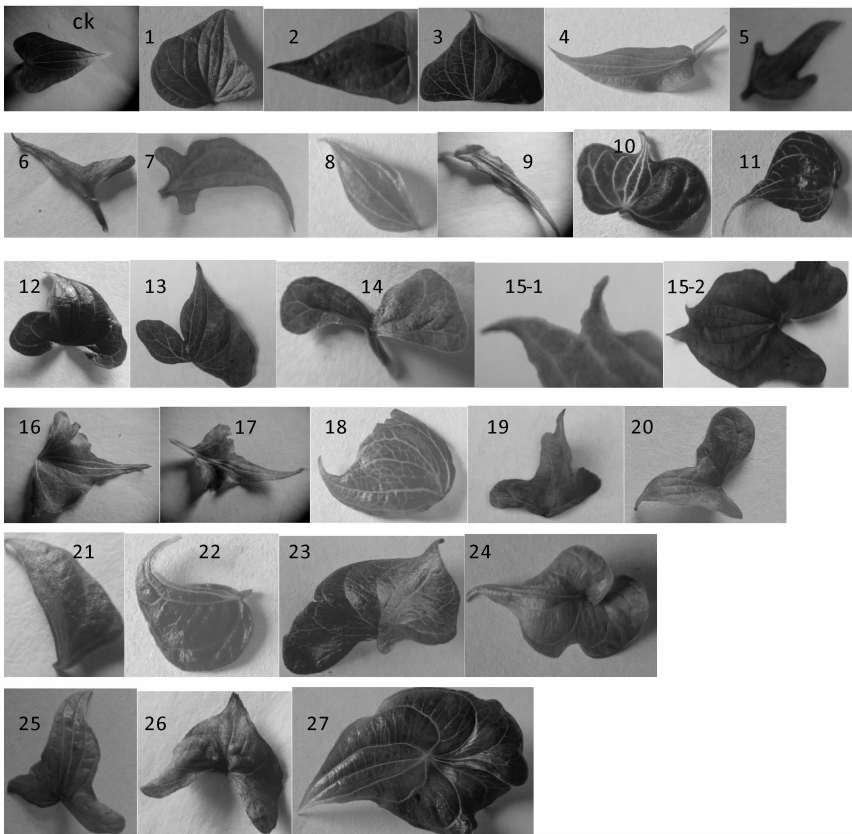


图 2 EMS 诱变后叶形变异情况

CK: 对照;1~11: 左右对称叶;12~15: 分裂叶;16~20: 褶皱叶;21~24: 左右非对称叶;25~27: 叶基变异.

Fig. 2 Leaf shape variation after EMS mutation

CK: Normal leaf;1~11: Symmetrical leaf;12~15: Split leaf;16~20: Fold leaf;21~24 : Asymmetric leaf;25~27: Leaf base variation

3.3.2 叶片形态变化

(1) 叶的整体形态变化:对照叶形为长心形(图 2-CK),而突变体叶中发现了圆心形(图 2-1),长三角形(图 2-2),正三角形(图 2-3),细叶柳条形(图 2-4、8、9),长矛形(图 2-5、6),弯刀形(图 2-7),

皇冠形(图 2-10),叶尖细长形(图 2-11);(2) 叶缘变化:对照叶缘光滑,突变体中出现了褶皱状(图 2-16、17),牙齿状(图 2-18);(3) 叶裂变化:对照叶是无裂叶,突变体中出现了对称的裂沟叶(图 2-5、7),叶片呈浅裂沟(图 2-12),只有一个深裂沟(图

2-13), 甚至形成复叶(图 2-14);(4)叶尖变化: 对照叶片的叶尖为锐尖形, 在突变体中发现了钝尖形(图 2-14), 细长尖形(图 2-11), 双尖形(图 2-15-1、15-2)的叶尖;(5)非对称叶: 非对称叶片包括叶片一部分缺失(图 2-21、22)和叶基左右不对称(图 2-23、24);(6)叶基变化: 对照叶片的叶基为心形, 而突变体中的叶基则呈楔形(图 2-5、8)、直线形(图 2-2、3)、耳垂形(图 2-25、26)和圆形(图 2-27)等。

3.3.3 EMS 诱变对再生苗叶片形态的影响 进一步对诱变后再生苗叶形态进行分析后由表 5 可

知, 对照组正常情况叶型的变异系数为 26.2%, 诱变后其叶型的变异系数可提高到 63.4%。叶形指数、叶面积、叶宽、叶长等的变化幅度也都高于对照, 说明 EMS 诱变确实显著提高了再生苗叶片形态的变异。

3.4 EMS 处理后的山药突变体的分子鉴定

3.4.1 山药突变植株 EMS 处理后有些突变植株茎秆绿色、叶片细长, 有些植株茎秆红色、叶片呈正三角形、叶缘皱缩, 有些植株叶片薄、细长, 有些植株叶片巨大、增厚(见下图 3)。

表 5 EMS 诱变对再生苗叶片形态的影响

Tab. 5 Effect of EMS mutation on leaf morphology of regenerated plantlets

处理	数值	叶长(cm)	叶宽(cm)	叶面积(cm ²)	叶形指数	变异系数(%)
诱变再生苗	变化幅度	1.1-3.4	0.3-2.2	0.59-3.77	0.65-6.30	63.4
	均值	2.42	1.29	1.46	2.21	
对照(CK)	变化幅度	1.0-2.8	0.9-2.2	0.84-3.12	0.63-1.79	26.2
	均值	1.83	1.57	1.52	1.19	



图 3 变异植株

A: 叶小、细长植株; B、C: 茎秆红色、叶缘褶皱植株; D: 叶粉色、叶片薄、细长植株; E: 叶片厚植株; F: 叶型巨大植株。

Fig. 3 Mutant plant

A: Leaves small, slender plant; B, C: Red Stalk and leaf margin fold plant; D: Leaves pink, thin, slender plant; E: Thick leaf plant; F: Huge leaf plant.

3.4.2 山药突变体材料的分子检测 通过对 14 份山药表型发生突变的植株及对照植株进行基因组总 DNA 提取后, 用随机 RAPD 引物进行 PCR 扩增。结果表明, 引物 P762、P772 和 P801 的扩增

效果较好(引物名称及序列见表 6), 显示共有 8 份发生表型突变植株的扩增条带与对照植株的扩增条带不同, 主要表现出明显的条带缺失、增多和条带浓度的不同, 说明诱变体可能发生了变异(见图 4)。

表 6 选用引物名称及序列

Tab. 6 Selected primer and their sequence

引物名称	引物序列(5' to 3')
P762	gTg TggTggg
P772	CCCACCACCC
P801	gTTgCgATCC

4 讨论

影响 EMS 化学诱变效果的主要因素有外植体的选择、EMS 的浓度、处理时间及处理方法等^[13]。确定 EMS 的浓度和处理时间时,通常以半致死剂量

条件作为最适条件^[14,15]。本试验外植体采用带腋芽茎段诱导的胚性愈伤组织,由于其本身已经开始形成点状突起且生长处于旺盛时期,这样的外植体对化学诱变剂具有一定的敏感性。EMS 诱变剂不仅在诱变处理过程中会导致愈伤组织毒害和死亡,而且在诱变后愈伤组织分化过程中还会表现明显的残留和后害作用。Stefano^[16]认为在离体诱变过程中,需要用低剂量、长时间的温和处理,这样更有利于获得突变的材料。这与本研究的结果相一致。

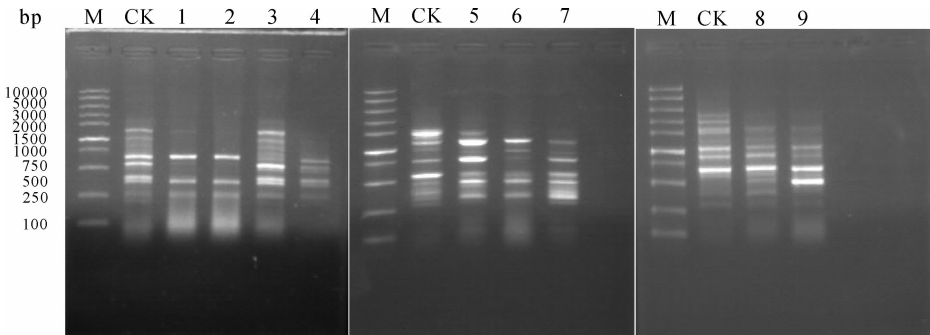


图 4 EMS 诱变植株的 PCR 扩增图

a:引物 762 的扩增产物;b:引物 772 的扩增产物;c:引物 801 的扩增产物

Fig. 4 PCR amplification of EMS-mutated plants

a:Primer 762 amplification products;b:Primer 772 amplification products;c:Primer 801 amplification products

经 EMS 半致死处理后愈伤组织第一次继代表现出明显的褐化现象及愈伤组织的死亡,部分褐化较轻的愈伤组织呈浅黄色生长缓慢,出现明显的生长恢复期,其增殖和分化能力降低。但存活愈伤组织转入分化培养后再生苗的诱变率较高,可达 9.43%。而愈伤组织经过第二、三次继代后,虽然愈伤组织增殖系数和分化率都有明显的提高,但诱变率却显著降低。对于这一现象初步分析认为,一方面原因可能是突变细胞在继代过程中得到部分恢复,转变为正常细胞;另一方面正常细胞较突变细胞更具有竞争力,繁殖快。

叶色表达受遗传因素和环境因子共同影响^[17],遗传因素主要集中于基因镶嵌、基因位置变化、基因重组等。叶片呈色主要是由叶绿素(绿色)、类胡萝卜素(黄色)以及花色素苷(彩色)共同决定的。山药的叶色突变主要出现叶片白化、叶色嵌合体、红色、黄色等,推测是叶片中的色素种类和比例发生了变化,叶色白化、局部变白可能是叶片中存在不正常质体及叶绿素合成受阻引起叶色素缺乏。而当叶片类胡萝卜素、花色素苷合成增多,叶绿素合成受抑制是导致叶色呈现黄色、红色的主要原

因。如果叶色变异具有遗传稳定性则很可能发生了遗传因子的改变。

EMS 诱变导致植株叶形发生变异的报道比较多^[18,19],主要可以引起叶片褶皱、叶片变得狭长,甚至产生畸形叶等。这在本试验结果中也基本得到了印证。

在诱变育种中,RAPD 技术可以快速找到不同 DNA 样本间的多态性差异,为诱变体的筛选提供了快速而简便的检测手段^[20,21]。通过对表型变异植株的 RAPD-PCR 分析表明,部分植株电泳条带表现出了多态性,初步证明这些变异可能是由于基因组 DNA 的变异而引起的。利用该方法成功获得表型变异植株,说明采用 EMS 诱变创造山药突变体新种质是可行的。但是对于表型变化单株在以后的种植过程中对其薯形与品质等方面是否有意义还有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 中国农业科学院蔬菜花卉研究所. 中国蔬菜品种志下卷[M]. 北京:中国农业科技出版社,2001,1054.
- [2] Robert A, Alieu S. Crops that feed the world 1. Yams[J]. Food Security,2010,2: 305.

- [3] 齐建红. 山药的化学成分及其生物活性[J]. 西安文理学院学报: 自然科学版, 2010, 13(4): 12.
- [4] 华树妹, 贺佩珍, 陈芝华, 等. 应用 SRAP 标记构建山药种质资源 DNA 指纹图谱[J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(3): 527.
- [5] 王蓉蓉, 王定国, 田子明. 山药新品种瑞山药的选育与栽培技术探析[J]. 杂粮作物, 2015, (2): 12.
- [6] Joong Ho Lee, Seung Yeob Lee. Selection of stable mutation from cultured rice anthers ethyl methane sulfonic acid[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2002, 71(2): 165.
- [7] Muthusamy A, Vasanth K, Sivasankari D, et al. Effects of mutagens on somatic embryogenesis and plant regeneration in groundnut[J]. Biologia Plantarum, 2007, 51(3): 430.
- [8] Mohan Jain S. Tissue culture derived variation in crop improvement [J]. Euphytica, 2001, 118(2): 153.
- [9] Junaid A, Mujib A, Sharma M P. Effect of growth regulator and ethylmethane sulphonate on growth, and chlorophyll, sugar and praline contents in *Draecena sanderiana* cultured in vitro[J]. Biologia Plantarum, 2008, 52(3): 569.
- [10] Beatriz M, Mercedes R, Jose M M, et al. A high-density collection of EMS- induced mutations for TILLING in Landsberg erecta genetic background of *Arabidopsis*[J]. BMC Plant Biology, 2009, 9: 147.
- [11] Latado R R, Adames A H, Neto A T. In vitro mutation of chrysanthemum with EMS in immature floral pedicels[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2004, 77(4): 103.
- [12] 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 condition[J]. Euphytica, 2008, 160: 249.
- [13] Van Harten A M. Mutation breeding[M]. Cambridge University Press, 1998.
- [14] 骆海波, 邹颀, 贺从安, 等. 甲基磺酸乙酯(EMS)对萝卜早期发育性状的诱变效应[J]. 基因组学与应用生物学, 2013, 32(5): 608-611.
- [15] 夏曾润, 杜凤凤, 李偲, 等. 紫花苜蓿 EMS 突变体库的构建和形态学性状鉴定[J]. 草业学报, 2014, 23(2): 215-222.
- [16] Stefano P. Mutation Induction and Tissue Culture in Improving Fruits[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2001, 64: 185.
- [17] 曹松龄, 张修宝, 罗洪发, 等. 水稻色素基因遗传分析[J]. 广东农业科学, 2014, 41(11): 6-9, 19.
- [18] 黄奇娜, 杨杨, 施勇烽, 等. 水稻斑点叶变异研究进展[J]. 中国水稻科学, 2010, 24(2): 108.
- [19] 蔡海燕, 温立柱, 郑成淑, 等. EMS 诱发菊花突变类型及重要性状的分子鉴定[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2013, 44(2): 171-175.
- [20] Mignouna H D, Abang M M, Fagbemi S A. A comparative assessment of molecular marker assays (AFLP, RAPD and SSR) for white yam (*Dioscorea rotundata*) germplasm characterization[J]. Ann. appl. Biol, 2003, 142: 269.
- [21] Junqueira K P, Faleiro F G, Bellon G, et al. Pitaya accesses genetic variability with different production levels through RAPD markers[J]. Revista Brasileira de Fruticultura, 2010, 32(3): 840.