

甜瓜突变体库的构建及 M₂ 群体表型变异的研究

宋燕妮^{1,2}, 杜黎黎^{1,2}, 王学征^{1,2}, 栾非时^{1,2}

(¹东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030; ²农业部东北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 哈尔滨 150030)

摘要: 利用 8 种不同浓度的甲基磺酸乙酯(EMS), 4 种不同的浸种时间, 处理甜瓜品系“3-2-2”种子, 根据 M₁ 植株发芽率, 筛选出适宜的诱变剂量为浓度 1.2%, 诱变时间 24 h。采用这种方法构建了含有 67 个 M₁ 家系及相应自交 M₂ 种子的甜瓜突变体库。对 M₁ 群体 541 个单株的表型变异进行了全生育期初步调查, 总的表型变异频率达 71.53%。对 M₂ 群体 603 个单株的节间长度、主蔓粗度、叶片长度、叶片宽度、叶柄长度、叶柄粗度共 6 个表型性状进行形态学调查表明: 除节间长度外, 其他 5 个性状和野生型相比均差异显著; 不同性状的变异系数不同, 叶柄长度的变异系数最大, 达 15.37%, 节间长度的变异系数最小, 为 7.10%; 在 M₂ 中, 编号为 25 的家系叶片出现了黄色和绿色的性状分离。

关键词: 甜瓜; EMS; 突变体库; 诱变

Construction of Mutant Library and Research on Phenotypic Variation of M₂ Population in Melon

SONG Yan-ni^{1,2}, DU Li-li^{1,2}, WANG Xue-zheng^{1,2}, LUAN Fei-shi^{1,2}

(¹College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030; ²Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (Northeast Region), Ministry of Agriculture, Harbin 150030)

Abstract: Seeds of the melon strain '3-2-2' were treated by ethyl methane sulfonate (EMS) with 8 different concentrations and 4 different time in this study, and the suitable EMS mutation dosage for seed mutagenesis was determined as a concentration of 1.2% and 24 h by studying the germination rate of M₁ plants. By this way, the melon mutant library containing 67 M₁ families and their selfing seeds of M₂ was constructed. For M₁ individuals in the mutant library, phenotypic traits of 541 seedlings at whole growing period were investigated, resulting in total mutant frequency of 71.53%. For M₂ individuals in the mutant library, length of internode, diameter of main stem, length of leaf, width of leaf, length of petiole and diameter of petiole of 603 seedlings were investigated. Except length of internode, differences of the other 5 traits were significant compared to the wild type. Variation coefficient of different phenotypic traits were different, the maximum was 15.37% in length of petiole, and the minimum was 7.10% in length of internode. In M₂ generation, leaf color of No. 25 line appeared segregation of yellow and green.

Key words: melon; EMS; mutant library; mutagenesis

甜瓜 (*Cucumis melo* L.) 是葫芦科、甜瓜属一年生蔓性双子叶草本植物 ($2n = 2x = 24$), 基因组大约有 450 Mb, 性状丰富, 在现代遗传学研究中起着重要作用, 并逐步成为研究重要生物性状的模式植物^[1]。随着甜瓜全基因组测序的顺利完成, 甜瓜遗

传育种的相关研究已经逐步进入到后基因组时代^[1-2]。利用反向遗传学方法分析鉴定基因功能越来越受到重视^[3-7]。突变是遗传变异的基础, 而突变体是所有生物必不可少的遗传资源。通过构建饱和的基因突变体库, 借助突变体分析鉴定基因功能

收稿日期: 2014-12-30 修回日期: 2015-03-12 网络出版日期: 2015-10-14

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20151014.1125.002.html>

基金项目: 农业部“948”项目(2014-S15); 黑龙江省攻关项目(2013G0197)

第一作者研究方向为甜瓜分子遗传育种。E-mail: yannisong@126.com

通信作者: 栾非时, 研究方向为西甜瓜分子遗传育种。E-mail: luanfeishi@sina.com

是目前最有效的方法。

化学诱变以其操作简单、突变频率高、突变专一性与多效性等优点长期用于育种工作中^[8], 甲基磺酸乙酯(EMS, ethyl methane sulfonate)作为目前应用最广泛、最有效的化学诱变剂之一^[9-12], 已经成功构建了多种作物的突变体库, 如拟南芥^[13]、水稻^[14]、大豆^[15]、大麦^[16]、小麦^[17]、花生^[18]、玉米^[19]、画眉草^[20]、番茄^[21]、油菜型甘蓝^[22]、梨^[23]等突变体库, 对这些作物功能基因组学的研究发挥了巨大作用。

目前国内尚无关于甜瓜突变体库的相关报道, 本研究中以甜瓜品系“3-2-2”为材料, 通过 EMS 诱变的方法构建甜瓜突变体库, 分析其突变群体的表型变异特点, 旨在拓宽甜瓜遗传背景, 为甜瓜功能基因组研究和新品种选育提供基础材料。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

供试材料为甜瓜品系“3-2-2”, 薄皮甜瓜, 早熟材料, 雌雄异花同株, 瓜皮白色, 有条纹, 果实长圆形, 果肉白色, 由东北农业大学园艺学院西甜瓜分子育种研究室提供。

EMS 诱变剂购于美国 Sigma 公司, 为无色溶液。使用时用 0.1 mol/L, pH = 7 的磷酸缓冲液稀释成不同浓度即可。

1.2 EMS 诱变剂量筛选试验设计

选取大小均匀、形状饱满的甜瓜种子 1600 粒, 为 M_0 , 平均分成 32 份, 每份 50 粒, 将 32 份种子平均分为 8 组, 分别用浓度为 0.4%、0.6%、0.8%、1.0%、1.2%、1.4%、1.6% 的 EMS 诱变剂浸泡处理, 以磷酸缓冲液浸种作为对照, 每组中 4 份种子浸种时间分别为 12 h、24 h、36 h、48 h, 3 次重复。将试验用的锥形瓶封口后置于 25 °C, 90 rpm 的摇床内避光进行诱变处理, 防止 EMS 诱变剂见光分解。处理完毕后弃去 EMS 诱变剂, $Na_2S_2O_3$ 溶液解毒处理, 自然晾干, 为 M_1 种子。浸种催芽, 第 4 天统计发芽势, 第 7 天统计发芽率。

1.3 M_2 种子库的构建

1.3.1 EMS 种子诱变 2013 年 3 月, 以浓度 1.2% 的 EMS 诱变剂, 浸种处理“3-2-2”种子 1500 粒, 其中 779 粒发芽, 只有 541 株成苗, 成苗的 M_1 植株定植于东北农业大学香坊实验实习基地日光温室中, 构成 M_1 群体, 单株自交授粉, 共收获 M_2 种子 67 份, 构成甜瓜 M_2 种子库。

1.3.2 M_2 群体开花结果期表型性状形态学调查

2014 年 3 月, 对 2013 年收获的 M_2 种子, 每份种子为一个株系, 共 67 个株系。每个株系选取种子 50 粒, 浸种催芽, 4 月播种, 5 月中旬定植, 最终成活 1529 株, 构成突变体库 M_2 群体, 种植野生型对照 200 株。采取标准化和规范化的田间管理, 避免病虫害的侵蚀。

参考《甜瓜种质资源描述规范和数据标准》, 以野生型“3-2-2”为对照, 对开花结果阶段叶片、节间长、茎粗等性状进行调查。性状测量标准如下, 节间长度: 主蔓第 10~15 节的节间长的平均值; 主蔓粗度: 主蔓第 10~15 节的节间最粗处直径; 叶片长度: 主蔓第 10~15 节最大叶片自叶片基部量至叶顶端之长; 叶片宽度: 主蔓第 10~15 节最大叶片最宽处; 叶柄长度: 主蔓第 10~15 节最大叶叶柄长; 叶柄粗度: 主蔓第 10~15 节最大叶叶柄粗。每个家系随机选取 3 株, 3 次重复, 共 9 株。长度测量用钢卷尺和游标卡尺。

1.4 数据分析

数据处理采用 Microsoft Excel 2010, 方差分析采用 DPS 7.05, 对平均数作 Duncan's 新复极差法多重比较。

2 结果与分析

2.1 EMS 诱变剂量的筛选

由图 1 可知, EMS 抑制甜瓜种子的萌发, 且随着 EMS 浓度及浸种时间的增加, 甜瓜种子的发芽势、发芽率以及相对发芽指数减小, 致死率增加。

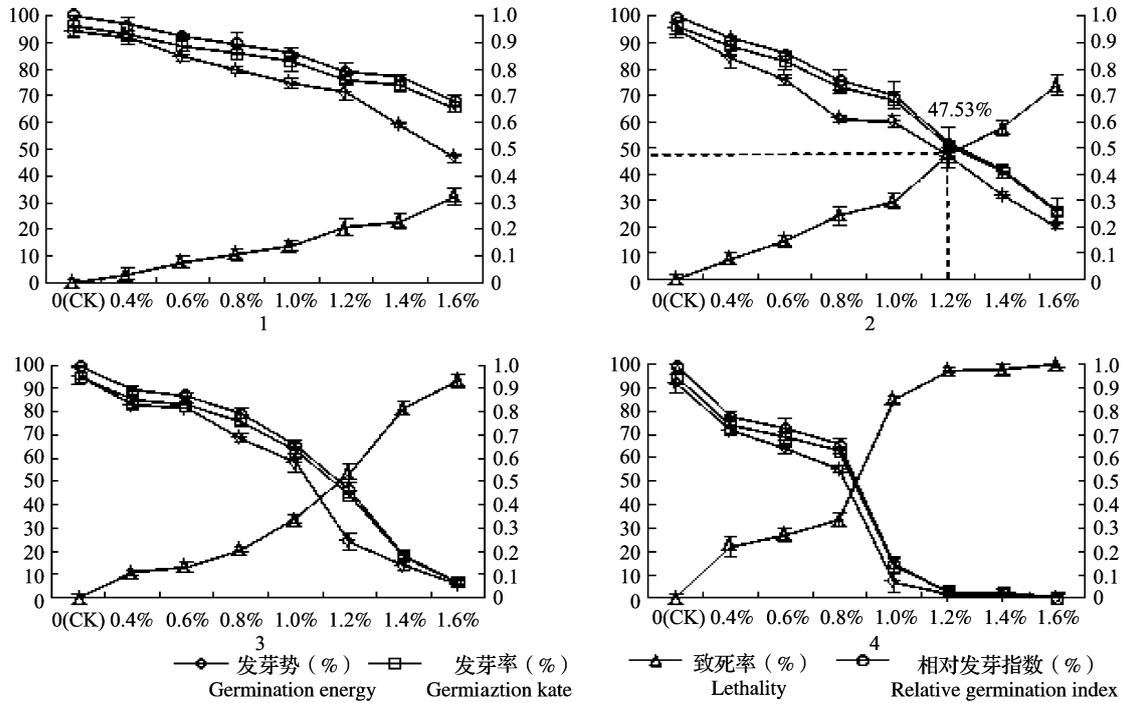
当浸种时间为 12 h、24 h 时(图 1-1, 1-2), 发芽势、发芽率、致死率以及相对发芽指数随 EMS 浓度增加均匀变化; 而当浸种时间为 36 h、48 h 时(图 1-3, 1-4), 这 4 个萌发指标随 EMS 浓度增加并非均匀变化, 而是存在某一阈值: 低浓度(0.4%~0.8%)时, 发芽势、发芽率、致死率以及相对发芽指数变化缓慢, 当浓度达到某一范围(0.8%~1.2%)时, 再增加浓度, 发芽势、发芽率、致死率以及相对发芽指数显著变化, 降幅(增幅)最大。当浓度为 1.6%, 浸种时间为 48 h 时, 种子的致死率达 100%, 可见高浓度的 EMS、长时间浸种, 完全抑制甜瓜种子的萌发。

本试验为二因素完全随机试验设计, 其中 A 因素是 8 种不同浓度的 EMS 处理(含对照), B 因素是 4 个不同的浸种时间。由表 1 可知, 对于这 4 个萌发指标来说, A 因素、B 因素、A 因素 × B 因素的 F 值均达极显著水平($P < 0.01$), 说明不同浓度与浸

种时间存在交互作用。可见诱变剂浓度及浸种时间是否合理对诱变效果影响很大。

确定合适的诱变剂量是诱变成败的关键环节,不同作物都有一定的适宜剂量,在适宜剂量范围内,能更多的产生新的变异,并保持原有的优良性状。一般认为经过 EMS 诱变处理后植株存活 50% 的剂

量(半致死剂量 LD₅₀)为可遗传变异应该吸收的能量阈值,即最佳诱变剂量^[24]。由图 1-2 可知,EMS 浓度为 1.2%,浸种时间为 24 h 时,致死率为 47.53%,接近于 50%,基于以上 2 点考虑,确定甜瓜品系“3-2-2”的适宜诱变剂量为 1.2%,24 h,并作为后续大批处理种子的条件。



1, 2, 3, 4 分别代表浸种时间为 12 h, 24 h, 36 h, 48 h

1, 2, 3 and 4 represent soaking time is 12 h, 24 h, 36 h and 48 h

图 1 EMS 不同浓度、不同浸种时间对甜瓜种子萌发的影响

Fig. 1 Effect of EMS treated with different concentrations and different time of seeds soaking for the germination of melon seeds

表 1 两个因素对甜瓜不同生理指标影响的方差分析

Table 1 Variance analysis of the effects of two factors on different physiological indexes in melon

生理指标 Physiological index	变异来源 Source of Variation	自由度 Degree of freedom	F 值 F value	生理指标 Physiological index	变异来源 Source of Variation	自由度 Degree of freedom	F 值 F value
发芽势 Germination energy	EMS 浓度	7	593.573 **	相对发芽指数 Relative germination index	EMS 浓度	7	220.345 **
	浸种时间	3	389.833 **		浸种时间	3	195.045 **
	EMS 浓度 × 浸种时间	21	28.873 **		EMS 浓度 × 浸种时间	21	16.232 **
发芽率 Germination percentage	EMS 浓度	7	289.220 **	致死率 Lethality	EMS 浓度	7	221.142 **
	浸种时间	3	261.952 **		浸种时间	3	195.104 **
	EMS 浓度 × 浸种时间	21	20.981 **		EMS 浓度 × 浸种时间	21	16.245 **

** 表示 1% 极显著水平

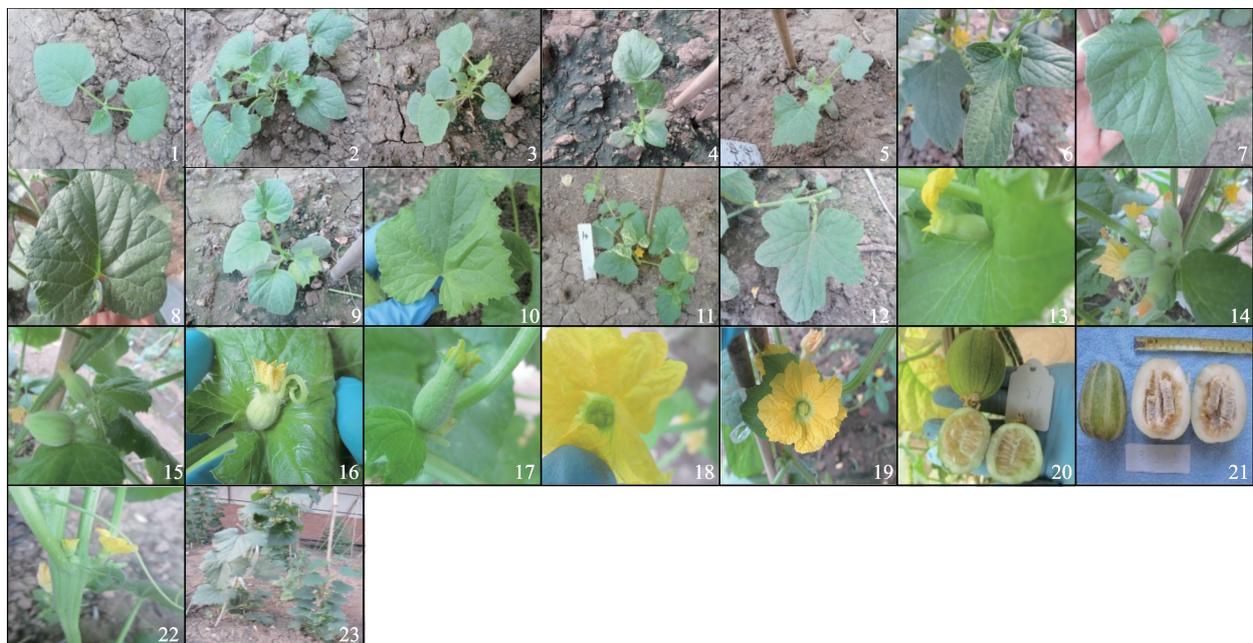
** indicates significant level of 1%

2.2 甜瓜突变体库 M₁群体的表型变异

通过对突变体库中 M₁群体进行全生育期初步调查发现:经 EMS 诱变剂处理后,植株 M₁群体出苗时间比较一致,但苗期生长不整齐,幼苗大小不一。和野生型材料(图 2-1)相比, M₁群体中 37.34% (表 2) 的植株表现为叶片簇生(图 2-2~3), 23.11% (表 2) 的植株表现为叶片畸形(图 2-4~7),且生长势明显减弱,发育缓慢,和野生型材料相比,开始抽生真叶的时间相差 5~20 d,授粉结实率低,难以坐果。

叶片性状变异主要表现在叶色突变和叶形突

变。其中,叶色突变主要表现在叶片出现黄色斑点(图 2-8)、部分黄化(图 2-9~11)、部分白化(图 2-11);叶形突变主要表现在出现畸形叶(图 2-4~7)。花性状变异主要表现在:雌花簇生(图 2-14~15)、雌花上着生卷须(图 2-16)、雌花子房茸毛增多(图 2-17)、雌花柱头分离(图 2-18)等,另外还出现了和野生型“雌雄异花同株”不一样的株型“两性花株”,该植株花子房变小,呈圆形,所结果实呈小圆形(图 2-20)。另外,还出现了变态茎(图 2-22)、节间变短(图 2-23)等变异类型。总的表型变异率达 71.53% (表 2)。



1:野生型;2~3:叶片簇生;4~7:叶片畸形;8:叶片黄色斑点;9~10:叶片部分黄化;11:叶片部分白化,部分黄化;12~13:野生型;14~15:雌花簇生;16:雌花上着生卷须;17:雌花子房茸毛增多;18:雌花柱头分离;19:野生型;20:果实小圆型;21:野生型;22:变态茎;23:植株矮化

1: Wild type, 2-3: Leaves fasciculation, 4-7: Malformed leaves, 8: Yellowish spot in leaf, 9-10: Partially yellowish leaf, 11: Partially albino and yellowish leaf, 12-13: Wild type, 14-15: Female flowers fasciation, 16: Tendril adnation on the female flowers, 17: Pubescence increased of female flowers ovary, 18: Female flowers stigma segregation, 19: Wild type, 20: Small round type fruit, 21: Wild type, 22: Abnormal stem, 23: Dwarf plant

图 2 甜瓜突变体库 M₁群体突变类型

Fig. 2 Mutant types of M₁ generation in melon mutation library

表 2 甜瓜突变体库 M₁群体突变类型统计

Table 2 Statistic of mutant type of M₁ generation in melon mutation library

性状 Traits	描述 Description	株数 No. of plants	调查总株数 Total number	频率(%) Frequency
叶片颜色 Leaf color	出现黄色斑点 Showed yellowish spot	5	541	0.92
	部分白化 Partially albino	3	541	0.55
	部分黄化 Partially yellowish	10	541	1.85
叶片形状 Leaf shape	畸形叶 Malformed leaves	125	541	23.11
茎 Stem	变态茎 Abnormal stem	3	541	0.55

表 2(续)

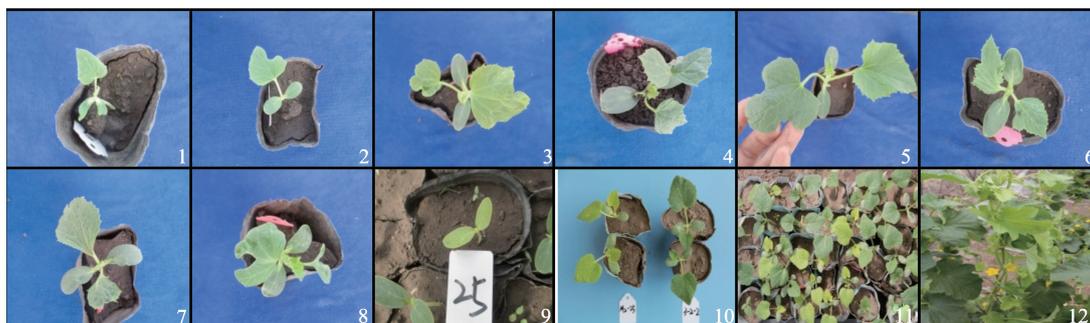
性状	描述	株数	调查总株数	频率(%)
Traits	Description	No. of plants	Total number	Frequency
雌花 Female flower	雌花簇生 Female flowers fasciculation	12	541	2.22
	雌花柱头分离 Female flowers stigma segregation	16	541	2.96
性别分化 Sex differentiation	两性花株 Hermaphrodite	2	541	0.37
	植株矮化 Dwarf plant	4	541	0.74
其他 Others	叶片簇生 Leaves fasciculation	202	541	37.34
	果实小圆形 Small round type fruit	5	541	0.92
总数 Total number	M ₁ 群体突变 Mutation of M ₁ generation	387	541	71.53

2.3 甜瓜突变体库 M₂ 群体的表型变异

为了尽可能避免环境因素产生的影响,本试验中将 1529 个 M₂ 单株分别完全随机地种植于塑料大棚中,进行标准化管理,并种植 200 株野生型植株作为对照。

M₂ 群体苗期叶片表现出大量不同类型的畸形

(图 3-1~8),据统计,M₂ 苗中约 38% 左右的苗为畸形叶片。叶形有长心形(图 3-1),表现为边缘缺刻消失;残缺不全叶(图 3-2~4)、马褂形叶(图 3-5)、不对称叶(图 3-6)、芭蕉扇形(图 3-7)等。在 M₂ 群体中发现编号为 25 的家系出现叶色的性状分离(图 3-9~12)。



1~8: M₂ 群体苗期畸形叶; 9~12: 25 家系不同时期黄化苗

1-8: Malformed leaves at seedlings stage in M₂ generation, 9-12: Line 25 'yellowish plant' at different stages

图 3 甜瓜突变体库 M₂ 群体苗期畸形叶及 25 家系黄化苗

Fig. 3 Malformed leaves at seedlings stage and line 25 yellowish plant of M₂ generation in melon mutation library

由表 3 可知,EMS 诱变后,M₂ 群体和野生型群体相比,在以上 6 个性状中均表现出一定差异,除节间长

度外,其他 5 个性状差异均达到显著水平($P < 0.05$),其中叶宽、叶柄长、叶柄粗差异极显著($P < 0.01$)。

表 3 野生型群体和甜瓜突变体库 M₂ 群体性状调查表

Table 3 Phenotypic traits survey of wild and M₂ generation

	节间长度	主蔓粗度	叶片长度	叶片宽度	叶柄长度	叶柄粗度
	Internode	Diameter of main stem	Length of leaf	Width of leaf	Length of petiole	Diameter of petiole
野生型群体 Wild generation	9.62aA	5.13bA	12.93bA	15.27bB	17.50aA	5.55aA
M ₂ 群体 M ₂ generation	9.43aA	6.62aA	16.34aA	19.24aA	11.30bB	4.20bB

大小写字母分别表示差异达 1% 和 5% 显著水平

Capital and lowercase letters represent the significant level of 1% and 5%, respectively

对 M₂ 群体植株的主蔓节间长度等 6 个植物学性状的调查发现(表 4):不同性状的变异系数不同,

变异系数最大的是叶柄长度,达 15.37%,最小的是节间长度,仅 7.10%,叶柄长度的变异系数和其他 4

个性状的变异差异达显著水平 ($P < 0.05$)。说明该群体中叶柄长度这一性状有丰富的筛选潜力。经田间观察,叶柄长度与植物的株型高度相关,而合理的

株型能使植物充分接受阳光的照射,是影响植物光合速率的重要因素,因此在该群体中筛选叶柄长度这一性状十分重要。

表 4 甜瓜突变体库 M₂ 群体性状的变异幅度

Table 4 Variation magnitude of phenotypic characters of M₂ generation in melon mutation library

性状 Character	平均值 Average	标准差 SD	变异系数 (%) CV	最小值 Min.	最大值 Max.
节间长度 Internode	9.43	0.67	7.10b	7.96	11.34
主蔓粗度 Diameter of main stem	6.63	0.58	8.81b	4.92	7.81
叶片长度 Length of leaf	16.34	1.54	9.45b	11.37	18.94
叶片宽度 Width of leaf	19.24	1.80	9.35b	13.35	21.64
叶柄长度 Length of petiole	17.50	2.71	15.37a	11.08	24.92
叶柄粗度 Diameter of petiole	5.55	0.54	9.62b	4.05	6.56

小写字母差异达 5% 显著水平

Lowercase letters represent a significant level of 5%

3 讨论

3.1 EMS 诱变剂量的筛选

甜瓜种子萌发试验结果表明:EMS 诱变剂抑制甜瓜种子的萌发,且浸种时间不同,抑制作用不同,表现为长时间浸种使 EMS 诱变剂浓度对甜瓜种子萌发的影响存在某一阈值,和原小燕等^[11]的研究结果一致。这可能是由于长时间浸种导致甜瓜种子种皮透性增强,使 EMS 诱变剂与甜瓜种子种皮内部结构充分接触,抑制作用增强。另一方面,浸种时间过长,种子的无氧呼吸现象严重,影响种子的发芽率^[25]。

构建突变体库,既要保证有一定规模的突变体数,还要尽可能使用高浓度来达到一定的诱变频率,以便产生更多的可遗传变异。确定适宜 EMS 处理浓度和时间是化学诱变育种的关键工作,通常采用半致死剂量作为标准。本试验中,使诱变组种子发芽率达到对照种子发芽率一半的诱变处理为:EMS 浓度 1.2%,浸种时间 24 h。根据苗期观察,经过 24 h、浓度 1.2% EMS 处理的甜瓜植株突变频率高,达 71.53% (表 2),突变体易于选择,诱变筛选效果好。徐美红等^[2]建立的甜瓜“Piel de Sapo”突变体库即以 1.0% 的 EMS 浓度得到了包含 2368 株的 M₂ 群体,本试验中所选 1.2% 的浓度与其基本一致。

3.2 甜瓜突变体库 M₂ 群体表型变异的调查

植物学性状的变异幅度是物种固有的遗传特性,是性状遗传多样性的具体体现,是反映某一物种资源丰度的重要指标。性状变异幅度的大小用变异系数来数值化,变异系数越大,说明性状在个体间的

差异越大,更便于资源的鉴别评价,在育种中进行资源筛选的潜力就越大。本试验中,甜瓜突变体库 M₂ 群体所调查性状中,不同性状的变异系数不同,叶柄长度的变异系数最大,说明该性状在个体间的差异最大^[26]。叶柄的长短是反映植株外观形态的一个指标,叶柄长则植株散放,叶柄短则植株紧凑,这对植株的光合效率影响很大。

在性状调查中,多数植株在苗期出现了畸形叶,但后期生长中表型又恢复正常,说明幼苗期变异与生长后期变异相关性不大。在 M₂ 中仅有编号为 25 的株系,苗期叶片颜色表现出黄色和绿色的性状分离,在 M₃ 中该株系苗期叶色依然出现性状分离,若多代自交得到纯合稳定的黄化突变体,可作为瓜类作物品种鉴定、品质性状改良及研究植物生理相关代谢的重要种质材料,其黄色性状遗传机理有待进一步研究。

4 结论

本试验确定甜瓜突变体库构建的适宜 EMS 处理剂量为 1.2%,诱变时间为 24 h,通过该浓度构建了一个表型变异丰富的突变体库。该突变体库中, M₁ 群体表现出多种类型的变异,总的表型变异达 71.53%; M₂ 群体的节间长度等 6 个表型性状和野生型材料相比差异显著 ($P < 0.05$); M₂ 群体中编号为 25 的家系变异极具价值,为黄化突变体,但需进行多代自交让其性状纯合稳定。

参考文献

- [1] Garcia-Mas J, Benjak A, Sanseverino W, et al. The genome of

- melon (*Cucumis melo* L.) [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(29): 11872-11877
- [2] 徐美红, 闫景景, 陆文玉, 等. 甜瓜“Piel de Sapo” TILLING 平台的测序 [J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2012, 30(5): 34-39
- [3] Martín B, Ramiro M, Martínez-Zapater J M, et al. A high-density collection of EMS-induced mutations for TILLING in Landsberg erecta genetic background of *Arabidopsis* [J]. BMC Plant Biol, 2009, 9: 147
- [4] Uchida N, Sakamoto T, Kurata T, et al. Identification of EMS-induced causal mutations in a non-reference *Arabidopsis thaliana* accession by whole genome sequencing [J]. Plant Cell Physiol, 2011, 52(4): 716-722
- [5] González M, Xu M, Esteras C, et al. Towards a TILLING platform for functional genomics in Piel de Sapo melons [J]. BMC Res Notes, 2011, 4: 289
- [6] Jones M O, Piron-Prunier F, Marcelb F, et al. Characterisation of alleles of tomato light signalling genes generated by TILLING [J]. Phytochemistry, 2012, 79: 78-86
- [7] Kumar A P, Boualel A, Bhattacharya A, et al. Sunflower mutant population and reverse genetic tool for crop improvement [J]. BMC Plant Biol, 2013, 13(1): 38
- [8] Serrat X, Esteban Roger, Guibourt N, et al. EMS mutagenesis in mature seed-derived rice calli as a new method for rapidly obtaining TILLING mutant populations [J]. Plant Methods, 2014, 10: 5(3): 467-475
- [9] Shiwa Y, Tanaka S F, Kasahara K, et al. Whole-genome profiling of a novel mutagenesis technique using proofreading-deficient DNA polymerase δ [J]. Int J Evol Biol, 2012; doi: 10.1155/2012/860797
- [10] Sabetta W, Alba V, Blanco A, et al. sunTILL: a TILLING resource for gene function analysis in sunflower [J]. Plant Methods, 2011, 7: 20
- [11] 原小燕, 李加纳, 刘列钊. EMS 对油菜种子萌发的影响 [J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2010, 35(3): 217-221
- [12] 卢银, 刘梦洋, 赵建军, 等. 大白菜突变体库的构建及 M_2 叶片表型变异的研究 [J]. 园艺学报, 2014, 41(8): 1609-1619
- [13] Chiu W H, Chandler J, Cnops G, et al. Mutations in the *TORNADO2* gene affect cellular decisions in the peripheral zone of the shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Mol Biol, 2007, 63(6): 731-744
- [14] Wang L, Zheng J, Luo Y Z, et al. Construction of a genome-wide RNAi mutant library in rice [J]. Plant Biotechnol J, 2013, 11(8): 997-1005
- [15] Cooper J L, Till B J, Laport R G, et al. TILLING to detect induced mutations in soybean [J]. BMC Plant Biol, 2008, 8: 9
- [16] Caldwell D G, McCallum N, Shaw P, et al. A structured mutant population for forward and reverse genetics in barley [J]. Plant J, 2004, 40(1): 143-150
- [17] Slade A J, Fuerstenberg S I, Loeffler D, et al. A reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING [J]. Nat Biotechnol, 2005, 23(1): 75-81
- [18] Knoll J E, Ramos M L, Zeng Y, et al. TILLING for allergen reduction and improvement of quality traits in peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. BMC Plant Biol, 2011, 11: 81
- [19] Till B J, Reynolds S H, Weil C, et al. Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING [J]. BMC Plant Biol, 2004, 4: 12
- [20] Zhu Q, Smith S M, Ayele M, et al. High-throughput discovery of mutations in *tef* semi-dwarfing genes by next-generation sequencing analysis [J]. Genetics, 2012, 192(3): 819-829
- [21] Minoia S, Petrozza A, Onofrio O D, et al. A new mutant genetic resource for tomato crop improvement by TILLING technology [J]. BMC Res Notes, 2010, 3: 69
- [22] Wang N, Wang Y J, Tian F, et al. A functional genomics resource for *Brassica napus*: Development of an EMS mutagenized population and discovery of FAE1 point mutations by TILLING [J]. New Phytologist, 2008, 180(4): 751-765
- [23] Liu Y J, Du Y M, Xu L F, et al. A suppression subtractive hybridization library construction for red skin mutant of 'Zaosu' pear and *MYBR* gene analysis [J]. New Zeal J Crop Hort, 2012, 40(2): 87-101
- [24] 张兵. EMS 诱导黄瓜突变体的研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2012
- [25] 钱春荣, 王俊河, 冯延江, 等. 不同浸种时间对水稻种子发芽势和发芽率的影响 [J]. 中国农学通报, 2008, 24(9): 183-185
- [26] 周俊国, 李新峥, 朱月林, 等. 蔓生型南瓜资源部分植物学数量性状的评价探讨 [J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8(1): 30-34