

植物体细胞耐盐突变体的研究进展

马进^{1,2}, 鲍沁星³, 汤庚国¹, 郑钢²

(1. 南京林业大学 风景园林学院, 江苏 南京 210037; 2. 浙江林学院 园林学院, 浙江 临安 311300;
3. 北京林业大学 园林学院, 北京 100083)

摘要: 植物体细胞耐盐突变体研究已经成为抗盐植物育科学研究的热点问题。综述了植物耐盐体细胞突变体筛选的试材确定、突变体筛选方法和突变体鉴定的研究现状, 并指出植物耐盐突变体筛选还存在着变异类型复杂, 变异方向难以控制, 耐盐细胞系难以再生植株等缺陷。应加强高效稳定的植株再生体系建立; 加强细胞悬浮培养技术研究, 提高耐盐突变体筛选效率; 提高耐盐目标性状的变异频率, 减少非目的性状变异产生; 从不同层面上加强耐盐突变体基础研究, 提高突变体检测效果等方面研究, 以提高植物体细胞耐盐突变体育种效果, 更好地为实践和生产应用。参36

关键词: 植物育种学; 体细胞; 耐盐突变体; 筛选

中图分类号: S754 文献标志码: A 文章编号: 1000-5692(2009)02-0273-06

Selecting salt-tolerant mutants from somatic plant cells

MA Jin^{1,2}, BAO Qin-xing³, TANG Geng-guo¹, ZHENG Gang²

(1. College of Landscape Architecture, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China; 2. School of Landscape Architecture, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 3. College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: Selection of salt-tolerant mutants from somatic cells of plants has been an important issue for breeding salt-tolerant plants. This paper introduces current development levels of materials, methods, and identification for the selection of salt-tolerant mutants from somatic cells of plants and points out defects which exist with complex variation types, such as difficulty in controlling the direction of variation and regeneration difficulties with a salt tolerant line of plant cells. Further study should focus on: 1) establishing a stable and highly efficient plant regeneration system, 2) reinforcing cell suspension culture in order to improve selection efficiency of salt-tolerant mutants from somatic cells of plants, 3) increasing the frequency of variation for salt-tolerant target characteristics to reduce the production of non-target characteristics, and 4) determining a new direction in basic research for detecting salt-tolerant mutants. This would improve salt-tolerant breeding from somatic cells of plants and be useful for application in today's world. [Ch, 36 ref.]

Key words: plant breeding; somatic; salt-tolerant mutant; selection

伴随着全球气候变化, 淡水资源将成为未来世界的最大制约因子。目前, 全世界 20%可耕地受到盐渍化的影响^[1], 传统农业灌溉所导致水资源短缺将不可避免; 从另一个角度来讲, 不合理灌溉及水质劣化所带来的土壤盐渍化正以前所未有的速度发展。土壤的盐渍化是全球性的问题^[2]。由于盐渍化是世界范围内植物的主要非生物胁迫形式, 这使得人们致力于研究植物耐盐性及改进植物耐盐性研究。对于多基因控制植物耐盐数量性状, 由于不知道多少基因参与抗盐性状调控、转多基因技术局限

收稿日期: 2008-05-05; 修回日期: 2008-10-27

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(Y304072)

作者简介: 马进, 副教授, 博士研究生, 从事园林植物利用等研究。E-mail: majinzjl@yahoo.cn

性、基因沉默问题和基因产物能否满足供应等问题存在,使它们其通过基因工程方法培育耐盐植物品种难以取得惊人突破。随组织培养技术的发展,植物组织及细胞培养过程中会出现广泛的变异即体细胞无性系变异^[3],经过组织培养产生的变异要比常规繁殖方法产生的植株表现出更多的变异。体细胞无性系变异的变异率可以高达30%~40%,有时甚至高达100%,某一具体性状的变异率为0.2%~3.0%,显示出用细胞培养技术从高等植物细胞中分离出耐盐突变体的可能性,为植物耐盐性改良提供了新的思路,植物体细胞耐盐突变体筛选研究已经成为抗盐植物育种学术研究的热点问题。笔者对植物体细胞耐盐突变体的筛选、鉴定及在今后研究重点作一简要综述。

1 植物体细胞耐盐突变体的选育

1.1 耐盐筛选的试材确定

在植物体细胞耐盐突变体筛选时,植物细胞材料的选择是非常重要的。首先,应该用优良的仅少许性状需要改进的基因型;其次,应该避免采用不能再生或难以再生的材料;第三,选用染色体数稳定的细胞系。此外,在离体条件下,比单倍体倍性高的细胞培养物具有更大的遗传稳定性,因此,实际上用这样的细胞系更为方便。利用植物细胞进行耐盐突变体筛选的材料使用最多是愈合组织^[4-5]和悬浮细胞系^[6]。还有一些研究者采用原生质体培养。采用愈合组织分离突变体方法简单,较易获得突变植株,但存在着培养生长慢,选择压力不均一,个别抗性细胞可能由于周围组织的障碍,失去分裂新细胞的能力等缺点。悬浮细胞和原生质体多是单细胞起源的,选择压力均一,生长周期短,容易获得耐盐能力较强的突变细胞系,而且还可避免或限制嵌合体的形成,是直接获得同质突变体的理想材料。由于悬浮培养技术难度较大,目前还处于初步研究阶段。

1.2 耐盐突变体的筛选方法

无论是人工诱导还是培养条件自发的体细胞无性系变异,变异类型繁多,方向不易控制,因此,对变异有效的筛选就至关重要。

1.2.1 田间表型筛选法 田间表型筛选法是在田间栽培的大量再生植株中筛选优良的耐盐变异单株。该方法工作量虽然大,但较为简单,得到的结果能直观反映耐盐变异产生的性状变化,可以对改良的耐盐性状作出直接判断。如米海莉等^[7]采用此法获得耐盐春小麦 *Triticum aestivum* 突变体。

1.2.2 室内压力选择法 室内压力选择法即在实验室内通过向固体培养的愈合组织或液体悬浮培养的细胞系应用盐或海水等选择剂进行胁迫培养,获得抗盐愈合组织或抗盐细胞系,然后经过植株再生获得抗盐突变体植株。此外,还有将外植体直接接种到含盐培养基上诱导耐盐愈合组织^[8]。由于悬浮细胞培养技术难度大,目前更多是通过盐或海水等选择剂进行胁迫培养,获得抗盐愈合组织。其途径有2种:一是采用正筛选法^[9-11],一是多步正筛选法^[12-13],采用这2种途径,人们已经分别从草地早熟禾 *Poa pratensis*, 紫花苜蓿 *Medicago sativa*, 向日葵 *Helianthus annuus*, 羊草 *Leymus chinensis*, 大豆 *Glycine max* 等植物获得耐盐愈合组织。

1.2.3 间接筛选法 借助与耐盐突变表现型有关的性状作为选择指标的称之为间接筛选法。当缺乏直接表型指标或直接选择条件对细胞生长不利时,可以考虑采用间接筛选法。如 Chaleff^[14]认为可以利用聚乙二醇(PEG-6000)、羟脯氨酸(HYP)等作为选择剂,通过渗透调节能力的选择作为耐盐性的指标。用这种方法,人们分别从水稻 *Oryza sativa*, 甘薯 *Ipomoea batatas*, 沙打旺 *Astragalus adsurgens*, 玉米 *Zea mays* 和小麦等植物的培养细胞中获得耐盐变异系。

此外,在筛选方法上为了提高耐盐突变体的突变频率,扩大突变范围,加速育种过程,常采用人工诱变和组培相结合的耐盐突变体筛选方法^[15]。人工诱导包括物理诱变和化学诱变,已经在小麦,药菊 *Chrysanthemum morifolium*, 枸杞 *Lycium chinense*, 杜鹃 *Rhododendron simsii*, 常夏石竹 *Dianthus plumarius* 等植物耐盐突变体上筛选成功。但这种方法,也存在着过程烦琐、突变不确定性及变异不能在植株水平上反映等缺陷^[16]。

1.3 耐盐愈合组织细胞系的分化和植株再生

耐盐突变体筛选的一个关键问题是使具有耐盐性的细胞分化产生再生植株。耐盐变异系的愈合组

织经过长期选择培养后, 就会减弱或丧失植株再生能力, 便不易再生植株。由于组织培养技术的改进, 已经在水稻, 玉米, 小麦, 番茄 *Lycopersicon esculentum*, 大豆, 红豆草 *Onobrychis viciaefolia*, 烟草 *Nicotiana tabacum*, 燕麦 *Avena sativa*, 獐毛 *Aeluropus littoralis*, 高粱 *Sorghum bicolor*, 枸杞, 马铃薯 *Solanum tuberosm*, 草莓 *Fragaria chiloensis*, 紫花苜蓿, 鲁梅克斯 *Rumex acetosa*, 结缕草 *Zoysia japonica*, 狗牙根 *Cynodon dactylon*, 高羊茅 *Testuca arundinacea*, 甘薯, 杜鹃, 常夏石竹上获得耐盐细胞系的再生植株。

2 耐盐突变体鉴定

组织和细胞培养耐盐突变体是否为真正的遗传突变, 还需进一步鉴定。如何以简单有效的手段筛选鉴定出优良的耐盐突变体, 是提高耐盐突变体育种效率的关键。

2.1 形态检测

形态检测是通常采用的耐盐突变体的检测方法, 也是实际育种工作中最直接、最简便的方法。如米海莉等^[7]采用此法获得耐盐春小麦突变体。

2.2 生理生化检测

植物耐盐机制是错综复杂的, 耐盐性状是受多基因控制的, 涉及多种生理和代谢途径。利用耐盐突变体生理生化功能上差别, 进行有意识筛选和研究, 可为判断耐盐变异体提供一些依据。目前采用生理生化检测研究主要集中在无机离子积累、游离脯氨酸的变化和蛋白质(酶)的变化等研究方面。

植物的正常生长发育需要维持细胞内离子的相对平衡, 盐胁迫离子平衡关系的破坏将对其生理作用的发挥产生明显的影响^[17-18], 而细胞质保持相对恒定是决定 K^+/Na^+ 的能力是植物适应性的重要决定因素之一^[19], 高浓度 Na^+ 对植物具有毒害作用。在基本相同的遗传背景下产生的变异体在耐盐方面可能有很大的差异, 利用不同变异体进行离子吸收差异的研究, 将提供很有价值的研究资料。研究人员对突变体在盐胁迫时的 Na^+ 和 K^+ 等离子的吸收与耐盐性的关系进行研究, 发现细胞中 Na^+ 的浓度与耐盐性呈正相关, 而 K^+ 浓度与 Na^+ 浓度呈负相关^[20]。

盐渍条件下, 植物都要受到渗透胁迫的伤害, 而它们只有通过渗透调节物质减轻或避免伤害。脯氨酸是植物体内最为有效的渗透调节物质之一^[21]。研究人员在大麦、玉米、水稻、沙打旺、杨树、烟草、常夏石竹、獐毛、羊草、大蒜 *Allium sativum* 等植物的在盐胁迫下, 耐盐细胞系游离脯氨酸积累高于对照系。

自从 Singh 等^[22]首次报道盐适应的烟草悬浮培养细胞产生盐胁迫蛋白以来, 至今已在水稻, 玉米, 大麦 *Hordeum vulgare*, 小麦, 沙打旺, 苜蓿等植物的培养组织或再生植株中都发现了这种盐胁迫蛋白。另外, 还有通过对同工酶变化来进行耐盐突变体进行鉴定^[23], 但并不是所有氨基酸的代换都能引起蛋白质分子电荷的变化, 还不是所有氨基酸的改变都能通过电泳来检出, 因此, 利用同工酶方法对突变体进行鉴定和检测还有一定的局限性。

2.3 细胞学检测

细胞学检测目前主要是通过染色体形态的配对分析对变异植株的染色体数目和结构变异进行鉴定。陈可咏等^[24]用甲基磺酸乙酯(EMS)处理芦苇 *Phragmites australis* 胚性愈合组织。从处理后的愈合组织诱导获得芦苇耐盐变异植株。变异植株能在含有 $10.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氯化钠的 MS 培养基上生长。细胞学检查变异植株是混倍体, 染色体数目变异范围为 $100 \sim 33$ 。在耐盐细胞变异系再生植株中, 染色体结构和数目变异与不同的植物种、品种, 甚至不同的培养细胞有密切关系, 也与采用的外植体以及不同的培养条件, 特别是同激素成分有密切关系。当染色体结构和数目变异越多, 其受的代谢损伤就越严重, 生长势越弱, 导致应用价值越低^[25]。此外, 众多研究表明, 表型发生变异但染色体结构和数目并未发生变化, 说明细胞学的变异只能解释少数耐盐无性系的变异, 而更多的耐盐无性系变异可能是在 DNA 水平上的变异^[26]。

2.4 分子水平检测

仅通过测定耐盐变异系的生理生化指标不足以证明它们的基因组发生遗传变异, 因此, 随着植物

分子生物学的快速发展, 现有的分子标记已经相当丰富, 应用广泛的有随机扩增多态性 DNA (RAPD)、限制性片段长度多态性(RFLP)、简单重复系列(SSR)等分子水平检测方法^[27]。RAPD 分析技术是建立在聚合酶链式反应(PCR)的基础上, 具有快速、方便、经济等优点^[28], 是目前应用于耐盐突变体鉴定中的常用方法。已经在水稻, 小麦, 小黑麦 *Triticale wittmack*, 大豆, 紫花苜蓿和苹果 *Malus domestica* 砧木等体细胞耐盐突变体上鉴定中应用^[29-31]。由于高等植物的基因组较大, 利用少数引物检测的 DNA 序列非常有限, 不可能覆盖整个基因组, 而引起表型差异的突变则可能位于整个基因组一个很小的位点上, 容易造成漏检, 所以, 应用 RAPD 技术检测 DNA 片段存在着一定的局限性^[32]。RFLP在由于碱基插入或缺失而引起限制性内切酶识别位点发生变化时发挥作用, 可以对耐盐突变体进行鉴定, 特别适合那些能特异性地识别甲基化碱基的限制性内切酶, RFLP 对检测因 DNA 甲基化状态改变引起的体细胞克隆变异尤其有用^[33], 但 RFLP 对 DNA 的需求量较大, 需要的仪器设备较多, 操作复杂, 成本高, 而且多使用同位素。SSR 因其广泛均匀分布于整个基因组中并具有高度多态性, 共显性遗传, 易于检测和重复性好等优点而倍受青睐^[34-35], 它也是耐盐突变体鉴定常用的一种方法, 它对 DNA 质量要求不高, 需要的 DNA 量也很少, 可以检测到一个单一的多等位基因位点。随着植物分子生物学快速发展, 植物耐盐突变体鉴定已深入到盐胁迫基因工程方面, 主要是耐盐相关基因的克隆、基因的结构分析以及基因表达特性等领域, 有很多植物的耐盐基因已经被克隆, 这些已克隆的耐盐相关基因涉及盐胁迫信号传导、基因表达的调控因子、渗透调节物质、胚胎发育晚期丰富蛋白(LEA)等。由于植物体细胞耐盐突变体本身存在着杂合性和不稳定性, 在利用这种方法进行育种过程中必须先进行杂合突变、纯合突变等遗传稳定性分析, 长期检测其子代的稳定性^[36]。

3 展望

植物通过组织培养产生的耐盐体细胞无性系变异具有操作简单, 周期短, 可以和化学、物理诱导方法相结合提高突变频率, 并结合多种方法筛选出耐盐突变体, 但也存在着变异类型复杂, 并非所有的耐盐突变体变异都能稳定遗传, 变异方向难以控制、耐盐细胞系难以再生完整植株等缺点, 因此, 通过体细胞进行耐盐突变体筛选在技术上仍然存在着不少问题, 应用上还存在一定局限性。

3.1 建立高效稳定的植株再生体系

由于辐射处理和盐胁迫时, 细胞受到不同程度的伤害, 同时通过长期耐盐筛选, 这些因子均可使一些有潜力的突变体细胞丧失分化能力, 不能再生植株, 因此, 在利用细胞或组织培养筛选耐盐突变体, 要建立高效稳定的再生体系, 改进胁迫培养程序, 获得具有较高分化能力的耐盐细胞系。

3.2 加强细胞悬浮培养技术研究, 提高耐盐突变体筛选效率

悬浮细胞由于其选择压力均一, 生长周期短, 容易获得耐盐能力较强的突变细胞系, 而且还可避免或限制嵌合体的形成, 今后要加强细胞悬浮培养技术研究, 提高耐盐突变体筛选效率。

3.3 提高耐盐目标性状的变异频率, 减少非目的性状变异产生

由于耐盐突变体变异缺乏人为的调控能力, 在耐盐突变体筛选过程中, 可能造成植物其他抗性、育性、产量和品质等方面的下降现象, 因此, 今后应加强提高耐盐目标性状的变异频率, 减少非目的基因性状变异产生方面研究。

3.4 从不同层面上加强耐盐突变体基础研究, 提高突变体检测效果

目前采用形态学、生理生化、细胞学和分子检测耐盐突变体都具有一定的局限性, 耐盐突变体变异可能在不同水平(植株、细胞、分子水平)上发生, 因此, 只有从不同层面研究对耐盐细胞系变异发生原因、性质及遗传规律的进行深入研究, 进而针对耐盐突变体性状确定有效检测指标, 可以大大提高耐盐突变体育种效果, 更好为实践和生产应用。

参考文献:

- [1] 王树凤, 陈益泰, 潘红伟, 等. 土壤盐胁迫下柃木 8 个无性系生理特性的变化[J]. 浙江林学院学报, 2006, 23 (1): 19 - 23.

- WANG Shufeng, CHEN Yitai, PAN Hongwei, *et al.* Changes of physiological characteristics of eight *Alnus cremastogyne* clones under salt stress[J]. *J Zhejiang For Coll*, 2006, **23** (1): 19 – 23.
- [2] 王慰, 黄胜利, 丁国剑, 等. 盐胁迫下舟山新木姜子 1 年生苗形态变化及生理反应[J]. 浙江林学院学报, 2007, **24** (2): 168 – 172.
- WANG Wei, HUANG Shengli, DING Guojian, *et al.* Morphological and physiological changes accompanying the induction of salt tolerance in *Neolitsea sericea* seedlings[J]. *J Zhejiang For Coll*, 2007, **24** (2): 168 – 172.
- [3] 张立钦, 郑勇平, 金佩英. 用组织培养技术筛选杨树耐盐种质[J]. 浙江林学院学报, 1996, **13** (4): 397 – 404.
- ZHANG Liqin, ZHENG Yongping, JIN Peiying. Selection of salt tolerance poplar regenerated plant lets in tissues culture [J]. *J Zhejiang For Coll*, 1996, **13** (4): 397 – 404.
- [4] SEPASKHAH A R, MAFTOUN M. Relative salt tolerance of pistachio cultivars[J]. *J Hort Sci*, 1988, **63** (1): 157 – 162
- [5] LERNER H R. Adaptation to salinity at the plant cell level[J]. *Plant and Soil*, 1985, **89**: 3 – 14.
- [6] 张绮纹, 张望东. 群众杨 39 无性系耐盐悬浮细胞系的建立和体细胞变异体完整植株的诱导[J]. 林业科学研究, 1995, **8** (4): 395 – 401.
- ZHANG Qiwen, ZHANG Wangdong. Establishment of saline-tolerant cell lines of *Populus × xiaozhuanica* ‘Popularis’ - 39 and the induction of somaclonal variant plant[J]. *For Res*, 1995, **8** (4): 395 – 401.
- [7] 米海莉, 许兴, 李树华, 等. 春小麦耐盐突变体的筛选及耐盐性研究[J]. 宁夏农林科技, 2001 (3): 1 – 4.
- MI Haili, XU Xing, LI Shuhua, *et al.* Study on selection of salt tolerant mutant of spring wheat and its salt tolerance [J]. *Ningxia J Agric For Sci Technol*, 2001 (3): 1 – 4.
- [8] PIQURAS A, HERNANDEZ J A, OLMOS E, *et al.* Changes in antioxidant enzymes and organic solutes associated with adaptation of citrus cells to salt stress[J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 1996, **45**: 53 – 60.
- [9] BASU S, GANGOPADHYAY G, GUPTA S, *et al.* Screening for cross tolerance against related osmotic stress in adapted calli of salt sensitive and tolerant varieties of rice[J]. *Phytomorphology*, 1996, **46**: 357 – 364.
- [10] 杨爱芬, 姜素云, 胡孝瑞, 等. 鲁梅克斯离体培养及耐盐植株的再生[J]. 草业学报, 2005, **14** (2): 43 – 47.
- YANG Aifeng, JIANG Suyun, HU Xiaorui, *et al.* High efficient in vitro propagation and salt-tolerant plantlet regeneration in Rumex[J]. *Acta Pratacult Sci*, 2005, **14** (2): 43 – 47.
- [11] BARAK M N, ABSEL-LATIF T H. In vitro selection of wheat callus tolerance to high levels of salt and plant regeneration[J]. *Euphytica*, 1996, **91**: 127 – 140.
- [12] HASSON E, POLJAKOFF-MAYBER A. Callus culture from hypocotyls of *Kosteletzkya virginica* seedlings[J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 1995, **43**: 279 – 285.
- [13] 魏健, 李秀岩, 孙振雷. 羊草愈伤组织耐盐性研究[J]. 安徽农业科学, 2007, **35** (1): 24 – 25.
- WEI Jian, LI Xiuyan, SUN Zhenlei. Research on characters of salt-tolerant callus in *Leymus chinensis* [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2007, **35** (1): 24 – 25.
- [14] CHALEFF R S. Isolation of agronomic useful mutants from plant cell culture[J]. *Science*, 1983, **219**: 676 – 682.
- [15] BHAGWAT B, DUNCAN E J. Mutation breeding of banana cv. Highgate (*Musa* spp., AAA Group) for tolerance to *Fusarium oxysporum* f sp. *cubense* using chemical mutagens[J]. *Sci Hortic*, 1998, **73**: 11 – 22.
- [16] SCOWCROFT W R, LARKIN P J. Selection of paraquat-resistant variants of tobacco from cell culture[J]. *Ipn Vitro*, 1988, **16**: 1085 – 1091.
- [17] 夏阳, 林彬, 张福锁, 等. 叶片淋洗对盐胁迫下玉米生长和矿物质影响的基因型差异研究[J]. 生态学报, 2001, **21** (4): 593 – 597.
- XIA Yang, LIN Bin, ZHANG Fusuo, *et al.* Effect of foliar leaching on growth and mineral nutrient contents of maize under NaCl stress[J]. *Acta Ecol Sin*, 2001, **21** (4): 593 – 597.
- [18] GREEWAY H, MUNNS R. Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes[J]. *Ann Rev Plant Physiol*, 1980, **31**: 149 – 154.
- [19] 白文波, 李品芳. 盐胁迫对马蔺生长及 K⁺、Na⁺吸收与运输的影响[J]. 土壤, 2005, **37** (4): 415 – 420.
- BAI Wenbo, LI Pinfang. Effect of salt stress on growth and absorption and transportation of K⁺ and Na⁺ in *Iris lactea* var. *chinensi*[J]. *Soils*, 2005, **37** (4): 415 – 420.
- [20] 徐云远, 王鸣刚, 贾敬芬. 红豆草耐盐愈伤组织的筛选及植株再生[J]. 西北植物学报, 2000, **20** (1): 15 – 21.
- XU Yunyuan, WANG Minggang, JIA Jingfeng. Selection for salt tolerance in tissue culture of sainfoin and recovery of plants from NaCl tolerant callus[J]. *Acta Bot Boreali-Occidentalia Sin*, 2000, **20** (1): 15 – 21.
- [21] SANTA-CRUZA A Z, ACOSTAM R A. Short-term salt tolerance mechanisms in differentially salt tolerance tomato

- species[J]. *Plant Physiol Biochem*, 1999, **37** (1): 65 – 67.
- [22] LOPEZ F V. Accumulation of a 22 kDa protein and its RNA in the leaves of *Raphanus sativus* in response to salt stress or water deficit[J]. *Plant Physiol*, 1994, **91**: 605 – 614.
- [23] 王翠亭, 黄占景, 何聪芬, 等. 小麦耐盐突变体生化标记的研究[J]. 麦类作物学报, 2002, **22** (1): 10 – 13.
WANG Cuiting, HUANG Zhanjing, HE Congfeng, *et al.* Study on biochemical markers of the wheat salt-tolerant mutants[J]. *J Triticeae Crops*, 2002, **22** (1): 10 – 13.
- [24] 陈可咏, 叶和春, 陈建林, 等. 芦苇耐盐变异植株及其细胞学鉴定[J]. 植物学报, 1994, **36** (12): 930 – 933.
CHEN Keyong, YE Hechun, CHEN Jianlin, *et al.* A salt tolerant variant of phragmites communits and its cytological [J]. *Acta Bot Sin*, 1994, **36** (12): 930 – 933.
- [25] 刁现民, 孙敬三. 植物体细胞无性系变异的细胞学和分子生物学研究进展[J]. 植物学通报, 1999, **16** (4): 372 – 377.
TIAO Xianmin, SUN Jingsan. Cytological and molecular biological research progress in plant somaclonal variation[J]. *Chin Bull Bot*, 1999, **16** (4): 372 – 377.
- [26] LARKIN P J. Somaclonal variation: history, method and plant genetic resource management[J]. *Lowa Sate J Res*, 1987, **61**: 393 – 434.
- [27] 吴家胜, 汪旭升. 数量性状位点(QTLs)内候选基因的生物信息学分析方法[J]. 浙江林学院学报, 2008, **25** (1): 104 – 108.
WU Jiasheng, WANG Xusheng. Methods of bioinformatic analysis for candidate genes underlying quantitative trait loci (QTLs)[J]. *J Zhejiang For Coll*, 2008, **25** (1): 104 – 108.
- [28] 唐娟娟, 范义荣, 朱睦元. 黄山松群体遗传多样性分析[J]. 浙江林学院学报, 2003, **20** (1): 23 – 26.
TANG Juanjuan, FAN Yirong, ZHU Muyuan. Analysis of the genetic diversity of *Pinus taiwanensis* populations[J]. *J Zhejiang For Coll*, 2003, **20** (1): 23 – 26.
- [29] 陈受宜, 朱立煌, 洪建, 等. 水稻抗盐突变体的 RFLP 分析[J]. 植物学报, 1991, **33** (8): 569 – 573.
CHEN Shouyi, ZHU Lihuang, HONG Jian, *et al.* RFLP analysis of salt tolerant rice mutants[J]. *Acta Bot Sin*, 1991, **33** (8): 569 – 573.
- [30] 孙宁, 孙建设, 李增裕. 苹果砧木耐盐突变体的筛选鉴定及 RAPD 分析[J]. 河北农业大学学报, 2004, **27** (5): 37 – 40.
SUN Ning, SUN Jianshe, LI Zengyu. Salt tolerant mutant screening and RAPD analysis studies on apple rootstock[J]. *J Agric Univ Hebei*, 2004, **27** (5): 37 – 40.
- [31] 秘彩莉, 沈银柱, 黄占景, 等. 小麦耐盐突变体的分子生物学鉴定[J]. 遗传, 1999, **21** (6): 32 – 36.
BI Caili, SHEN Yinzhu, HUANG Zhanjing, *et al.* Molecular biological identification of wheat salt tolerant lines [J]. *Hereditas*, 1999, **21** (6): 32 – 36.
- [32] VEILLEUX R E, JOHNSON A T. Somaclonal variation: molecular analysis, transformation interation and utilization [J]. *Plant Breeding Rev*, 1998, **16**: 229 – 268.
- [33] LIU Z L, HAN F P, TAN M, *et al.* Activation of a rice endogenous retrotransposon *Tos17* in tissue culture is accompanied by cytosine demethylation and causes heritable alteration in methylation pattern of flanking genomic regions[J]. *Theor Appl Genet*, 2004, **109**: 200 – 209.
- [34] 张雷凡, 高燕会, 朱玉球, 等. 石蒜属植物种质资源 ISSR-PCR 反应体系的建立[J]. 浙江林学院学报, 2007, **24** (2): 156 – 161.
ZHANG Leifan, GAO Yanhui, ZHU Yuqiu, *et al.* An inter simple sequence repeats (ISSR) reaction system for *Lycoris* (Amaryllidaceae)[J]. *J Zhejiang For Coll*, 2007, **24** (2): 156 – 161.
- [35] 张文标, 金则新, 李钧敏, 等. 甜槠 ISSR-PCR 反应体系的正交优化[J]. 浙江林学院学报, 2006, **23** (5): 516 – 520.
ZHANG Wenbiao, JIN Zexin, LI Junmin, *et al.* Optimization of ISSR-PCR reaction system of *Castanopsis eyrei* by orthogonal design[J]. *J Zhejiang For Coll*, 2006, **23** (5): 516 – 520.
- [36] SKIRVIN R M, MCPHEETERS K D, NORTON M. Sources and frequency of somaclonal variation[J]. *Hortscience*, 1994, **29**: 1232 – 1237.