

文心兰 NaN_3 离体化学诱变及 RAPD 检测

崔广荣, 张子学, 张从宇, 胡能兵, 隋益虎, 李杰勤

(安徽科技学院 植物科学学院, 安徽 凤阳 233100)

摘要: 采用3种浓度的 NaN_3 分别对离体培养的文心兰类原球茎薄切片进行不同时间诱变处理, 考察了不同浓度、不同时间诱变处理对类原球茎薄切片生长、类原球茎再生及再生苗生长的影响, 并对再生苗 DNA 进行了 RAPD 检测。结果表明: 诱变剂对类原球茎薄切片生长产生严重影响, 部分薄切片褐化死亡, 再生类原球茎生长受到抑制, 再生苗数量减少, 表现出明显的伤害作用, 这种伤害作用随诱变剂浓度的加大和处理时间的延长而加重; NaN_3 抑制再生苗生长, 试管苗普遍矮小。10 条 RAPD 引物 PCR 检测表明, 再生苗 DNA 发生了一定的变异, 表现在 RAPD 图谱带型的多态性, 随着诱变剂浓度的加大和处理时间延长, 多态性比例增高。 NaN_3 适宜诱变浓度为 6 mmol/L, 适宜处理时间为 2~4 d。

关键词: 文心兰; 叠氮化钠; 离体培养; 化学诱变; RAPD

中图分类号: S682.31; Q813.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)06-0836-08

Study on NaN_3 chemical induction for *Oncidium* in *in vitro* culture and RAPD screening

CUI Guang-Rong, ZHANG Zi-Xue, ZHANG Cong-Yu,
HU Neng-Bing, SUI Yi-Hu, LI Jie-Qin

(Plant Science school of Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China)

Abstract: Three kinds of concentrations of NaN_3 were used as mutagens for chemical induction with thin cell layers (TCLs) of *Oncidium* protocorm-like bodies (PLBs) in different time. The effects of different concentration and time treatments on the growth of TCLs, PLBs and plantlets which regenerated from the TCLs were investigated. Meanwhile, the DNA of the plantlets were tested by RAPD reaction. The results showed that mutagen NaN_3 had great effects on TCLs growth. Some TCLs got browning and died, the PLBs grew slowly and the number of regenerated plantlets were reduced. There were obvious injured effects on the explants, PLBs and plantlets regenerated from the TCLs. The injured effects got more and more serious with higher concentration of mutagen and longer time treatment. The mutagen NaN_3 inhibited plantlets growing. RAPD reaction indicated that the molecule maps had some polymorphisms which mean the sequence of DNA had changed. The ratio of polymorphisms got higher with higher concentration of mutagen and longer time treatment. The concentrations of 6 mmol/L NaN_3 treatment for 2-4 days are suitable dosage for *Oncidium* chemical induction *in vitro*.

Key words: *Oncidium*; NaN_3 ; *in vitro* culture; chemical induction; RAPD

传统的杂交育种由于受种质资源和地域的限制, 致使很多研究工作者难以在兰花育种上获得更大的突破, 诱变育种技术的发展给人们带来了希望

(Ahloowalia 等, 2001, 2004)。化学诱变主要通过化学诱变剂造成生物 DNA 的损伤和错误修复而产生突变体, 这些突变往往以点突变为主, 并且因诱变

收稿日期: 2011-02-17 修回日期: 2011-09-21

基金项目: 安徽省自然科学基金(070411010)[Supported by the Natural Science Foundation of Anhui Province](070411010)

作者简介: 崔广荣(1964-), 男, 安徽长丰人, 博士, 教授, 主要从事植物生物技术的研究和教学工作, (E-mail) cuigr64@sina.com.

剂不同具有较高突变频率和较为稳定的突变谱(夏英武,1997;Stefano,2001)。将植物组织培养技术与化学诱变技术结合起来,具有不受环境条件限制、节省人工和时间、扩大变异谱和提高变异率等优点(刘进平等,2004)。叠氮化钠(NaN_3)是植物化学诱变育种中常用的诱变剂,其在细胞内以碱基替换方式影响 DNA 的正常合成,从而导致点突变的产生(夏英武,1997)。 NaN_3 作为诱变剂在植物诱变育种上已经获得了广泛应用(安学丽等,2003;彭波等,2007;徐小万等,2009)。RAPD(random amplified polymorphic DNA)分析技术是一种检测核苷酸序列多态性的方法,该方法以 PCR(polymerase chain reaction)为基础,无需预先了解 DNA 序列的信息(Williams 等,1990),是突变体检测和筛选的常用方法(李莉等,2004;冯霞等,2006;温亮等,2009)。

有关文心兰的 NaN_3 的离体化学诱变研究尚未见报道。本研究以文心兰类原球茎薄片离体培养高效再生植株技术体系为基础(崔广荣等,2009),探讨 NaN_3 诱变剂对文心兰的诱变效应,并对诱变处理再生苗 DNA 进行初步的 RAPD 分子检测,为文心兰离体化学诱变育种奠定技术基础。

1 材料与方法

1.1 外植体与培养基

外植体:由茎尖诱导的文心兰成熟类原球茎。
培养基:薄片再生类原球茎培养基为 $1/2\text{MS}+6\text{-BA}4.0\text{ mg/L}+\text{Ad}2.0\text{ mg/L}+\text{NAA}1.0\text{ mg/L}+\text{椰汁}100\text{ mL/L}+\text{蔗糖}20\text{ g/L}+\text{琼脂粉}4.5\text{ g/L}$;试管苗分化培养基为 $\text{MS}+6\text{-BA}2.0\text{ mg/L}+\text{NAA}0.5\text{ mg/L}+\text{蔗糖}20\text{ g/L}+\text{琼脂粉}4.5\text{ g/L}$;试管苗生根培养基为 $1/2\text{MS}+\text{IBA}0.5\text{ mg/L}+\text{蔗糖}20\text{ g/L}+\text{琼脂粉}4.5\text{ g/L}$ 。各培养基灭菌前用 1.0 mol/L 的 KOH 溶液调节为 pH5.5。

1.2 试剂

诱变剂:叠氮化钠(NaN_3)由中国化学药品公司生产,化学纯。RAPD 引物:10 bp 随机引物由南京农业大学侯喜林教授研究室提供,由上海英俊生物工程公司合成。PCR 反应试剂:Taq 酶($5\ \mu\text{L}$)、 MgCl_2 、dNTP(10 mM)、 $10\times\text{buffer}$ 等购于 TaKaRa 公司。其它化学试剂:主要由中国化学药品公司生产,均为分析纯。

1.3 方法

1.3.1 外植体处理和接种培养 选取直径约 3~4 mm 的文心兰类原球茎,在超净工作台上切成厚约 1 mm 的薄片,每瓶接种 7 块薄片,置于培养架上光照培养。培养室温度为 $25\pm 2\text{ }^\circ\text{C}$,光照强度约为 $1\ 500\text{ lx}$ 。

1.3.2 诱变剂配制 叠氮化钠用蒸馏水配制成 3 种浓度 3.0、6.0、12.0 mmol/L, $121\text{ }^\circ\text{C}$ (灭菌压力 0.12 MPa)湿热灭菌 20 min 冷却备用。

1.3.3 诱变处理 当类原球茎薄片表面出现点状突起,新类原球茎开始形成时(接种后 8 d)在净化工作台上对每块组织滴加诱变剂,并确保诱变剂浸润组织块。3 种浓度的叠氮化钠各自设置 3 个处理时间,即 1、2、4 d,并设 1 无菌水处理为对照,共 10 个处理,每处理 10 瓶,每瓶接种 7 个类原球茎薄片。处理完毕后,用无菌水漂洗 3 次后,于无菌吸水纸上吸干水分后,接种于新的诱导培养基上继续培养,30 d 后,将新形成的类原球茎接种到分化苗培养基上成苗,而后进行生根培养。观察统计诱变剂对新类原球茎的形成、苗再生的影响。各处理随机取 10 棵再生苗测量株高,取平均值。

1.3.4 DNA 提取与电泳检测 当试管苗根长至 2 cm 左右时,采用改良 SDS 法,剪下叶片,提取总 DNA。随机选取 30 棵苗(处理 N-9 除外,仅获得 26 棵苗),称取叶片 0.2 g,在冰浴条件下进行研磨提取。具体步骤为:(1)叶片 0.2 g+研磨缓冲液 0.8 mL,研磨成匀浆;(2)加入等体积的氯仿-异戊醇,充分摇匀;(3)6 000 rpm 离心 5 min;(4)取上清液于另一离心管 $72\text{ }^\circ\text{C}$ 保温 3~4 min,取出于冰浴迅速冷却;(5)加入 $1/4$ 体积 5 mol/L 高氯酸钠溶液,摇匀后加入等体积氯仿-异戊醇,充分摇匀后 6 000 rpm 离心 5 min;(6)取上清液,加入 2 倍体积预冷 95%乙醇,轻摇后静置 10 min, DNA 絮状析出;(7)用牙签挑出 DNA 于另一离心管,加入 $100\ \mu\text{L}\ 1\times\text{TE}$ 溶液,让 DNA 充分溶解。重复(5)、(6)、(7)步骤, DNA 最后溶解于 $100\ \mu\text{L}\ 1\times\text{TE}$ 备用。取上述提取的 DNA 溶液 $2\ \mu\text{L}$ 于 0.8%琼脂糖凝胶上 100V 恒压电泳,并用标准浓度分子量标记,检测 DNA 的纯度及浓度,根据检测结果将样品 DNA 浓度调节约为 $25\text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

1.3.5 RAPD 反应体系及引物筛选 RAPD 反应体系设置为:以对照苗 DNA 对 100 条引物进行筛选,选择适合文心兰基因组 RAPD 扩增的引物,琼脂糖

凝胶浓度为 1.2%，100V 恒压电泳(表 1)。

表 1 RAPD 反应体系
Table 1 The reaction system of RAPD

94 °C 3 min	} 38 循环	反应体系 (20 μL)	Taq 酶(5 U/μL)	0.2 μL
94 °C 1 min			10×buffer	2.0 μL
36 °C 1.5 min			MgCl ₂ (25 mM)	2.4 μL
72 °C 1.5 min			dNTP(10 mM)	1.0 μL
72 °C 5 min			DNA 模板	1.0 μL
4 °C 保存			引物	1.0 μL
		双蒸水	12.4 μL	

表 2 选用引物名称及序列
Table 2 Selected primers and their sequence

引物名称 Primer name	引物序列 Sequence of primer	引物名称 Primer name	引物序列 Sequence of primer
AP12	GTCTTACCCC	AQ11	AGCCGTTTCAG
AU19	AGCCTGGGGGA	AE18	CTGGTGCTGA
AQ20	GTGAACGCTC	AK16	CTGCGTGCTC
AK12	AGTGTAGCCC	AI19	GGCAAAGCTG
AM20	ACCAACCAGG	AQ15	TGCGATGCGA

1.2.6 诱变植株基因组 RAPD 筛选及分析 选择条带清晰、干扰带少的 10 条引物对诱变处理苗 DNA 进行多态性检测,每处理检测 30 株(处理 N-9 再生

苗仅 26 棵,以 26 棵为准),琼脂糖凝胶浓度为 1.2%,100V 恒压电泳。统计每处理中各单株扩增总条带数、多态性带数,并进行植株变异性分析。10 条引物序列见表 2。

2 结果与分析

2.1 NaN₃ 对类原球茎薄切片(TCLs)生长、PLBs 形成和再生苗生长的影响

表 3 显示,NaN₃ 处理对文心兰类原球茎薄切片(TCLs)伤害较为严重,导致部分 TCLs 褐化死亡(图 1:B),随着 NaN₃ 浓度的增加和处理时间的延长,这种伤害的程度逐渐加重,与对照处理 TCLs(图 1:A)生长状态差异巨大。其中处理 N-9 中文心兰 TCLs 的死亡率可达 85.7%,处理 N-3 和 N-5 的死亡率分别为 55.7%和 58.6%,除去自然死亡率后,这 2 个处理基本达到“半致死量”效应(Stefano, 2001;董颖萍等,2005),也即在 NaN₃ 浓度为 12 mmol/L、处理 1 d 或 6 mmol/L、处理 2 d 时,均可致外植体类原球茎 TCLs 半数死亡。

表 3 NaN₃ 对类原球茎薄切片生长及再生苗的影响
Table 3 Effects of NaN₃ on the growth of TCLs and shoot formation

处理编号 No. of treatment	诱变时间 Time of induction (d)	叠氮化钠浓度 Concentrations of NaN ₃ (mmol/L)	接种切片块数 Number of innoculated TCLs	类原球茎切片死亡率 The death rate of TCLs (%)	再生苗株高 Height of shoots (cm)	再生苗总数 Number of regeneration shoots
N-1	1	3	70	15.7 g	2.6±0.6	79
N-2	1	6	70	34.3 f	2.7±0.7	54
N-3	1	12	70	55.7 de	2.5±0.7	53
N-4	2	3	70	31.4 f	2.5±0.6	61
N-5	2	6	70	58.6 d	2.4±0.8	39
N-6	2	12	70	81.4 b	2.3±0.5	34
N-7	4	3	70	52.9 e	2.3±0.5	51
N-8	4	6	70	70.0 c	2.2±0.6	36
N-9	4	12	70	85.7 a	2.3±0.7	26
CK	0	0	70	7.1 h	3.7±0.9	141

注:苗高小于 1.0cm 不计入再生苗总数; a, b, c, d, e, f, g, h 表示在 5% 水平上差异显著。

Note: The height of shoot less than 1.0 cm didn't calculate in number of regenerated shoots; a, b, c, d, e, f, g, h represent significant difference at 5% level.

在去除诱变剂 NaN₃ 后,这种伤害作用依然存在,具体表现在对新生类原球茎继代增殖培养的生长状态上,新生类原球茎生长速度相对缓慢,部分类原球茎依然会死亡(图 1:D),有可能是漂洗后还有少量诱变剂残留或诱变效应延续的缘故。经过 NaN₃ 处理后,各处理中再生苗数量和生长状态也受到了较大影响,苗再生数少且再生苗普遍表现为矮小,与对照苗高差异明显,但各 NaN₃ 诱变处理间

的苗高度差异却不明显(图 1:E),其具体原因尚不清楚。除了 NaN₃ 诱变处理导致再生植株矮小外,未发现其它形态变异植株。

2.2 NaN₃ 不同处理样品 DNA RAPD 检测及分析

2.2.1 NaN₃ 不同处理样品 DNA RAPD 检测及分析

(1) 3 mmol/L NaN₃ 不同时间处理植株 RAPD 检测结果(表 4)。表 4 归纳了 10 条 RAPD 随机引物对 3 mmol/L NaN₃ 诱变后再生植株扩增的结果,表明

表 4 3 mmol/L NaN₃ 不同时间处理再生植株随机引物扩增多态性
Table 4 Random primers amplified polymorphism for plantlets regenerated from treatments with 3 mmol/L NaN₃ in different time

引物名称 Primer name	处理 1 d Treated for 1 day		处理 2 d Treated for 2 days		处理 4 d Treated for 4 days	
	多态性植株数 Number of polymorphic plants	多态性比例(%) Ratio of polymorphic	多态性植株数 Number of polymorphic plants	多态性比例(%) Ratio of polymorphic	多态性植株数 Number of polymorphic plants	多态性比例(%) Ratio of polymorphic
AP12	4	13.3	6	20.0	7	23.3
AU19	6	20.0	6	20.0	9	30.0
AQ20	10	33.3	11	36.7	9	30.0
AK12	10	33.3	14	46.7	16	53.3
AM20	9	30.0	13	43.3	12	40.0
AQ11	8	26.7	9	30.0	16	53.3
AE18	5	16.7	9	30.0	7	23.3
AK16	9	30.0	8	26.7	19	63.3
AI19	6	20.0	7	23.3	11	36.7
AQ15	9	30.0	18	60.0	14	46.7

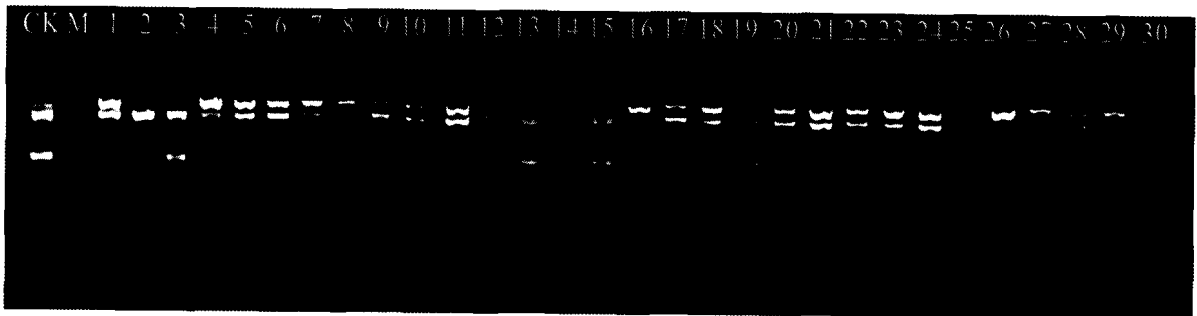


图 2 引物 AQ20 对处理 1 d 再生植株扩增 RAPD 图谱

Fig. 2 Primer AQ20 amplification profile for plantlets treated with 3 mmol/L NaN₃ for 1 day

表 5 6 mmol/L NaN₃ 不同时间处理再生植株随机引物扩增多态性
Table 5 Random primers amplified polymorphism for plantlets regenerated from treatments with 6 mmol/L NaN₃ in different time

引物名称 Primer name	处理 1 d Treated for 1 day		处理 2 d Treated for 2 days		处理 4 d Treated for 4 days	
	多态性植株数 Number of polymorphic plants	多态性比例(%) Ratio of polymorphic	多态性植株数 Number of polymorphic plants	多态性比例(%) Ratio of polymorphic	多态性植株数 Number of polymorphic plants	多态性比例(%) Ratio of polymorphic
AP12	6	20.0	5	16.7	7	23.3
AU19	7	23.3	9	30.0	12	40.0
AQ20	11	36.7	14	46.7	16	53.3
AK12	18	60.0	17	56.7	18	60.0
AM20	7	23.3	15	50.0	20	66.7
AQ11	7	23.3	14	46.7	24	80.0
AE18	16	53.3	15	50.0	19	63.3
AK16	14	46.7	17	56.7	17	33.3
AI19	10	33.3	22	73.3	19	63.3
AQ15	10	33.3	17	56.7	17	3.3

体间具有较多的相同或相似的多态性,表明 NaN₃ 作用于 DNA 序列具有一定的专一性。

(3) 12 mmol/L NaN₃ 不同时间处理植株 RAPD 检测结果(表 6)。表 6 统计结果显示,12

mmol/L 的 NaN₃ 对文心兰基因组 DNA 的诱变作用更加明显,各引物扩增的 RAPD 带谱的多态性比例、类型均不同程度增加。如图 4 所示,浓度为 12 mmol/L NaN₃ 处理再生苗 DNA 的多态性比例更

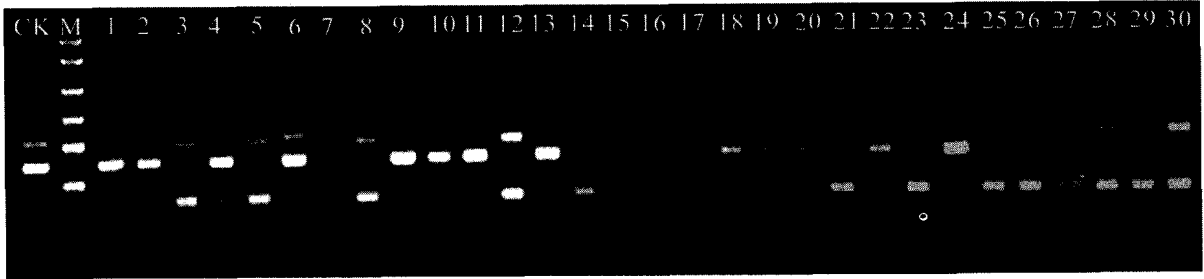


图 3 引物 AQ11 对处理 4 d 再生植株 PCR 扩增 RAPD 图谱

Fig. 3 Primer AQ11 amplification profile for plantlets treated with 6mmol/L NaN_3 for 4 day表 6 12 mmol/L NaN_3 不同时间处理再生植株随机引物扩增多态性Table 6 Random primers amplified polymorphism for plantlets regenerated from treatments with 12 mmol/L NaN_3 in different time

引物名称 Primer name	处理 1 d Treated for 1 day		处理 2 d Treated for 2 days		处理 4 d Treated for 4 days	
	多态性植株数 Number of polymorphic plants	多态性比例(%) Ratio of polymorphic	多态性植株数 Number of polymorphic plants	多态性比例(%) Ratio of polymorphic	多态性植株数 Number of polymorphic plants	多态性比例(%) Ratio of polymorphic
AP12	9	34.6	11	42.3	9	34.6
AU19	9	34.6	8	30.8	11	42.3
AQ20	17	65.4	15	57.7	18	69.2
AK12	16	61.5	13	50.0	16	61.5
AM20	11	42.3	16	61.5	14	53.8
AQ11	12	46.2	13	50.0	17	65.4
AE18	15	57.7	13	50.0	22	84.6
AK16	13	50.0	16	61.5	19	73.1
AI19	11	42.3	12	46.2	18	69.2
AQ15	12	46.2	14	53.8	15	57.7

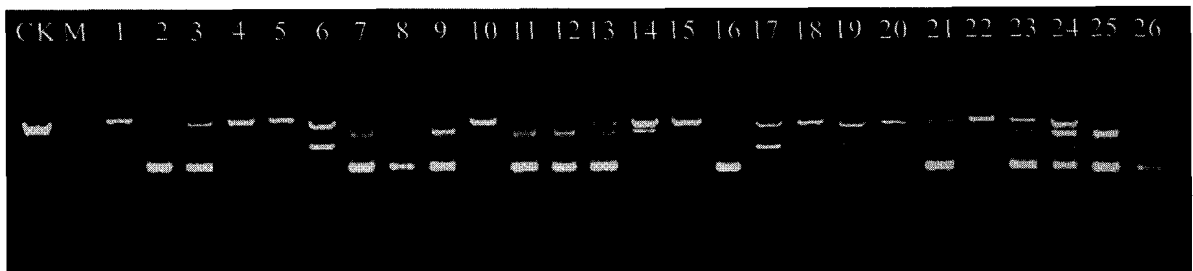


图 4 引物 AQ20 对处理 1 d 再生苗 PCR 扩增 RAPD 图谱

Fig. 4 Primer AQ20 amplification profile for plantlets treated with 12 mmol/L NaN_3 for 1 day

高,类型也更加丰富,但不同引物的表现也不尽相同。

3 结论与讨论

利用不同浓度的 NaN_3 诱变剂对文心兰类原球茎薄片进行诱变处理,均能产生较为理想的诱变效应,6 mmol/L NaN_3 处理 2 d 和 12 mmol/L NaN_3 处理 1 d 能使外植体达到“半致死率”。 NaN_3 对外植体及其再生类原球茎、试管苗的生长影响较

大,外植体褐化死亡率高,试管苗普遍矮小。RAPD 筛选结果表明,再生试管苗基因组 DNA 不同程度发生了变异,呈现出不同比例的带谱多态性,多态率随处理时间的延长和诱变剂浓度的增大而提高,RAPD 带谱多态性主要表现为增加或减少某些带。 NaN_3 的适合剂量是 6 mmol/L 浓度处理 2~4 d。

诱变材料的选择是园艺植物诱变育种成败的关键之一(徐小万等,2009),在离体化学诱变中,茎尖、叶片、愈伤组织等均可作为诱变材料使用,但必须保

证诱变剂的有效渗入和诱变后的材料能进一步生长、发育,最终产生新的个体(夏英武,1997;Stefano,2001;刘进平等,2004;徐小万等,2009)。文心兰和其他兰花一样,生长速度(包括离体培养的外植体生长速度)相对缓慢,因此在化学诱变时选择合适的外植体尤为重要。类原球茎薄切片再生类原球茎不仅速度快,而且操作简单、方便,是进行文心兰离体化学诱变的理想材料(崔广荣等,2009),既有利于诱变剂的渗入,又有利于诱变后再生植株,本试验的结果更进一步证明了这点。其他一些研究者在进行兰花诱变时常选择类原球茎作为外植体,虽然也取得了较好的诱变效果(陈超等,2006),但类原球茎本身已经是较为成熟的个体,不仅不利于诱变剂的渗入,而且获得的突变体中嵌合体的比例较高。利用类原球茎薄切片快速再生新类原球茎过程进行诱变处理,有可能减少嵌合体产生的比例。

提高诱变频率和减少外植体的损伤是化学诱变处理中的一个矛盾,如何确定诱变剂浓度和处理时间因材料不同而异。刘艳萌等(2008)用 EMS 诱发草莓耐盐性变异时认为,(0.1%+1.5 h)和(0.2%+1.0 h)处理浓度及时间适合于愈伤组织,而(0.2%~0.4%+1.0~2.0 h)的处理浓度和处理时间则适合于叶片。安学丽等(2003)在考察 EMS 对玉米自交系的诱变效应时认为 0.4%EMS 处理玉米种子 12 h 可达“半致死量”。陈超等(2006)进行蝴蝶兰类原球茎诱变时认为 0.4%的 EMS 处理 6~8 h 即可达半致死量。杨志国等(2009)在进行西瓜离体振荡培养诱变时认为 1.5 mmol/L NaN_3 处理 1.5h 较为合适。本研究中,6 mmol/L NaN_3 处理 2 d 和 12 mmol/L NaN_3 处理 1 d 能使外植体达到“半致死率”,其原因是正处于生长旺盛阶段的类原球茎薄切片可能具有更强的抗损伤力,具体原因尚待进一步研究。 NaN_3 诱变处理,植株普遍表现矮化现象,并伴有畸变植株的形成(安学丽等,2003;姜振峰等,2006;)。本试验中 NaN_3 诱变文心兰试管苗矮化效应明显。植株矮化效应与其诱变后生理效应存在一定的关系(张景萍等,2004;付凤玲等,2005)。

RAPD 技术是建立在 PCR 基础之上的一种可对整个未知序列的基因组进行多态性分析的分子技术,扩增产物的多态性反映了基因组多态性,因此该技术已广泛用于突变体的鉴定分析(李莉等,2004;王健等,2006;章宁等,2009;温亮等,2009;)、遗传多样性研究等(明凤等,2003;谢伟等,2005,2006),已

经成为一种十分成熟的分子标记技术(梁肖仍,2010)。必须注意的是,RAPD 多态性反映了基因组 DNA 发生了序列上的变异,并不能直接说明植株性状就一定发生了变异。本研究中部分引物扩增的 RAPD 多态性比例较高,但最终真正鉴定出突变体尚有许多工作要做,特别是苗在田间的各种性状表现,尤其是能否获得花色、花型等变异性状还需进一步研究。

参考文献:

- 夏英武. 1997. 作物诱变育种[M]. 北京:中国农业出版社;24-30
- Ahloowalia BS, Maluszynski M. 2001. Induction mutation—a new paradigm in plant breeding[J]. *Euphytica*, **118**:167-173
- Ahloowalia BS, Maluszynski M, Nichterlein K. 2004. Global impact of mutation-derived varieties[J]. *Euphytica*, **135**:187-204
- An XL(安学丽), Cai YL(蔡一林), Wang JG(王久光), et al. 2003. Mutagenic effects of EMS on maize inbred line(甲基磺酸乙酯(EMS)对玉米自交系诱变效应的研究)[J]. *J Maize Sci (玉米科学)*, **11**(3):74-75,84
- An XL(安学丽), Cai YL(蔡一林), Wang JG(王久光). 2003. Mutagenic effects of some mutagens on maize inbreds(几种化学诱变剂对玉米自交系的诱变效应)[J]. *J Southwest Agric Univ; Nat Sci(西南农业大学学报·自然科学版)*, **25**(6):498-501
- An XL(安学丽), Cai YL(蔡一林), Wang JG(王久光), et al. 2003. Chemical mutagen and its application in plant breeding(化学诱变及其在农作物育种上应用)[J]. *J Nucl Agric Sci(核农学报)*, **17**(3):239-242
- Chen C(陈超), Wang GL(王桂兰), Qiao YX(乔永旭), et al. 2006. The PLB chemical induced mutagenesis and regeneration of Phalaenopsis(蝴蝶兰类原球茎的化学诱变试验)[J]. *J Nucl Agric Sci(核农学报)*, **20**(2):99-102
- Cui GR(崔广荣), Zhang ZX(张子学), Zhang CY(张从宇), et al. 2009. High efficiency regeneration of PLBs from thin cell layers of PLBs of oncidium and phalaenopsis *in vitro*(文心兰、蝴蝶兰类原球茎薄切片高频诱导 PLBs)[J]. *J Anhui Sci Tech Univ(安徽科技学院学报)*, **23**(1):64-70
- Dong YP(董颖苹), Lian Y(连勇), et al. 2005. Application and progress of plant chemical induction in breeding(植物化学诱变技术在育种中的运用及其进展)[J]. *Seed(种子)*, **24**(7):54-58
- Feng X(冯霞), Sun ZY(孙振元), Han L(韩蕾), et al. 2006. Somaclonal variation of regenerated plants of perennial ryegrass(多年生黑麦草体细胞无性系变异分析)[J]. *J Nucl Agric Sci(核农学报)*, **20**(1):49-50
- Fu FL(付凤玲), Li WC(李晚忱), Rong TZ(荣廷昭), et al. 2005. Drought tolerant and male sterility screening from maize callus mutated by γ -ray and sodium azide(用 γ 射线和叠氮化钠诱变的玉米愈伤组织筛选耐旱和雄性不育材料)[J]. *J Nucl Agric Sci(核农学报)*, **19**(5):356-359
- Goh MWK, Kumar PP, Lim SH, et al. 2005. Random amplified polymorphic DNA analysis of the moth orchids, *Phalaenopsis* (Epidendroideae:Orchidaceae)[J]. *Euphytica*, **141**:11-22

- Jiang ZF(姜振峰), Liu ZH(刘志华), Li WB(李文滨), et al. 2006. M1 mutagenic effect on soybean induced by NaN_3 (叠氮化钠对大豆 M1 的生物学诱变效应)[J]. *J Nucl Agric Sci* (核农学报), **20**(3):208-210
- Li L(李莉), Guan CY(官春云), Liu ZS(刘忠松). 2004. Plant somaclonal variation RAPD analysis for mutants(植物体细胞无性系变异及其突变体的 RAPD 鉴定分析)[J]. *Crop Res* (作物研究), **5**:376-379
- Liang XR(梁肖仍), Jin K(金科), Long ZD(龙章德), et al. 2010. RAPD mapping of a brown planthopper(*Nilaparvatalugens*) resistance gene from *Oryza* of ficinalis(药用野生稻抗褐飞虱基因的 RAPD 标记研究)[J]. *Guihaia* (广西植物), **30**(6):865-868
- Liu JP(刘进平), Zheng CM(郑成木). 2004. Induced mutation in connection with in vitro culture for crop breeding(诱变结合植物组织培养在植物育种中的应用)[J]. *Acta Agric Shanghai* (上海农业学报), **20**(1):19-22
- Liu YM(刘艳萌), Zhang XY(张学英), Ge HB(葛会波). 2008. The variation of salt tolerance induced by EMS from different strawberry tissues(EMS 诱发草莓不同组培材料的耐盐性变异)[J]. *J Nucl Agric Sci* (核农学报), **22**(6):798-802
- Manisha M, Sharama DR. 2002. In vitro mutagenesis and cell selection for the induction of black rot resistance in cauliflower[J]. *J Hort Sci Biotech*, **77**:268-272
- Ming F(明凤), Dong YG(董玉光), Lou YX(娄玉霞), et al. 2003. RAPD analysis on genetic diversities with different flower colors(蝴蝶兰不同花色品种遗传多样性的 RAPD 分析)[J]. *Acta Agric Shanghai* (上海农业学报), **19**(2):44-47
- Peng B(彭波), Xu QG(徐庆国), Li HL(李海林), et al. 2007. Research progress on crop chemical induction in breeding(农作物化学诱变育种研究进展)[J]. *Crop Res* (作物研究), **21**(5):517-519
- Stefano P. 2001. Mutation induction and tissue culture in improving fruits[J]. *Plant Cell, Tiss Org Cult*, **64**:185-210
- Wang J(王健), Yue CY(乐超银), Xie W(谢伟), et al. 2006. RAPD markers of genes related with fragrance in orchids(兰花香味相关基因的 RAPD 分子标记)[J]. *Hebei Agric Sci* (江苏农业科学), **5**:78-79
- Wen L(温亮), Wang ZH(王中华), Huo XM(霍雪梅), et al. 2009. RAPD markers linked to the red leaf traits of *Prunus*(李属植物叶片红色性状 RAPD 分子标记研究)[J]. *J Agric Univ Hebei* (河北农业大学学报), **32**(4):43-45
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, et al. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers [J]. *Nucleic Acids Res*, **18**:6 531-6 535
- Xie W(谢伟), Yue CY(乐超银), Guo ZH(郭政宏), et al. 2006. Analysis on the genetic difference among *Cymbidium* by RAPD (兰花基因组 DNA 多态性 RAPD 分析)[J]. *Hubei Agric Sci* (湖北农业科学), **45**(1):24-26
- Xie W(谢伟), Yue CY(乐超银), Zhou Y(周艳), et al. 2005. Optimization of RAPD conditions for five *Cymbidium* Sw. Species(5 种中国兰花 RAPD 反应条件的优化)[J]. *Chin J Trop Agric* (热带农业科学), **25**(4):19-23
- Xu XW(徐小万), Luo SB(罗少波), Shi XH(石雪晖), et al. 2009. Chemical inducement and its application in breeding of horticultural plants(化学诱变及其在园艺植物育种中的应用)[J]. *Acta Agric Jiangxi* (江西农业学报), **21**(6):70-74
- Yang GZ(杨国志), Zhang MF(张明方), Gu ZG(顾掌根), et al. 2009. Study on the direct regeneration system of watermelon under the treatment of NaN_3 (NaN_3 处理条件下西瓜直接再生试验体系研究)[J]. *J Changjiang Veget* (长江蔬菜), **6**:11-14
- Zhang JP(张景萍), Wu ZL(吴珍龄). 2004. Research on seedling physiology and biology and biology characters of maize mutations induced by EMS(EMS 诱变玉米突变体苗期生理生化特性研究)[J]. *Acta Laser Biol Sin* (激光生物学报), **13**(1):41-43

(上接第 734 页 Continue from page 734)

- B(Tokyo), **22**:135-144
- Cai XZ, Liu KM and Tian SZ. 2008. *Impatiens rupestris* (Balsaminaceae), a new species from Hunan, China[J]. *Novon*, **18**(1):9-11
- Chen, YL, Akiyama S, Ohba, H. 2008. Balsaminaceae[M]//Wu Z-Y, Raven PH(eds). Flora of China. Beijing: Science Press; St Louis, Missouri Botanical Garden Press, **12**:43-113
- Cong YY(丛义艳), Liu KM(刘克明), Chen W(陈薇), et al. 2007. A study on micromorphological characters of leaf epidermis of six species in *Impatiens*(6 种凤仙花属植物叶表皮特征的微形态学研究)[J]. *J Nat Sci Hunan Norm Univ* (湖南师范大学自然科学学报), **30**:68-71
- Dilcher, DL. 1974. Approaches to the identification of angiosperm leaf remains[J]. *Bot Rev*, **40**:1-157
- Fischer E. 2004. Balsaminaceae[D]. Kubitzki K(ed). The Families and Genera of Vascular Plants, Springer, Berlin, **6**:20-25
- Grey-Wilson C. 1980. *Impatiens* of Africa[D]. Rotterdam: A. A. Balkema: 1-59
- Qin WH(秦卫华), Wang HY(汪恒英), Zhou SB(周守标). 2003. The modifications of the preparing techniques on permanent slices of the plant epidermis(植物叶表皮永久制片技术的改进)[J]. *J Biol* (生物学杂志), **20**:38-38, 41
- Stace, CA. 1984. The Taxonomic Importance of the Leaf Surface [M]//Heywood VH, Moore DM(eds). Current Concepts in Plant Taxonomy. Academic Press, London and Orlando: 67-90
- Yu ShX, Hou YT, Chen YL, et al. 2009. *Impatiens lobulifera* (Balsaminaceae), a new species from limestone areas in Guangxi, China[J]. *Bot Stud*, **50**:365-370