

植物化学诱变技术在育种中的运用及其进展

iv. 化学诱变技术及诱变效率

董颖苹¹ 连勇² 何庆才¹ 徐涵³

(1 贵州省农业科学院 贵阳 550006 2 中国农业科学院蔬菜花卉所 北京 100084

3 法国图卢兹生物技术研究所 法国图卢兹)

摘要: 综述了对植物化学诱变技术、突变体筛选技术、分子检测技术及其理论基础近年来的进展, 并进行了较系统的阐述。化学诱变获得成功的关键是高效的诱变技术结合高效的突变体筛选技术, 同时, 帮助早期隐性突变发现的分子检测技术, 作为辅助手段也是有利的。本文着重介绍了当代化学诱变技术、发生突变的机理、突变谱和诱变效率, 并选择性地介绍了几种公认有效的突变剂的作用机理。

关键词 化学诱变 诱变效率 突变体筛选 分子检测

1 概述

变异是生物进化的基础推动力 (Stebbins 1950), 也是保证物种多样性的前提, 是其他任何方式不能代替的重要演变方式。人为地利用这种方式, 用尽可能小地影响基础生命代谢的方式最大限度地追求对物种变异的加速, 正是诱导变异的研究目的。诱变育种对于栽培品种的改良有着很大的贡献, 而在生物的生理机制研究中, 诱变技术也功不可没, 许多代谢途径的发现都是建立在若干突变体的基础上的。随着分子水平的深入研究, 与诱变相关的基因 *umuD*、*C* 和 *dinB* 的克隆, 以及其他突变机理的进一步明晰, 诱变育种的工作变得更为有序和可操纵。

诱变育种技术发展至今形成了 3 种技术: 辐射诱变、定点诱变和化学诱变。辐射方式在早期是主要的方式, 使用各种射线以造成染色体水平的畸变, 如倒位、缺失等等形成突变。特点是对染色体伤害较大, 因此致死突变较多。尽管如此, 由于早期是诱变技术的主流, 从事诱变及其后代品种筛选工作的人员众多, 也获取了大量的用于生产的稳定突变体后代; 定点诱变是在分子水平进行操作, 通过人为设计单个碱基的顺序, 产生变异的新性状, 以造成突变。定点突变效率高

低关键在于转基因效率和基因的表达效率的高低; 化学诱变则通过化学试剂造成生物 DNA 的损伤和错误修复, 产生突变体。这些突变以点突变为主, 并且因试剂不同具有某些相对高频而且较为稳定的突变谱。由于这一技术还具有易操作、剂量易控制、对基因组损伤小、突变率高等特点, 因而近年来成为运用最为广泛的诱变技术。狭意的化学诱变的技术包括诱变材料的选择、诱变剂的选用, 而广意上说, 突变体筛选技术和随后的突变体分子检测技术的发展也是重要的组成部分, 决定着化学诱变技术在当代科技的背景下, 在育种上的广泛而有效的应用。

2 化学诱变技术、突变机理及诱变效率

2.1 诱变材料

诱变材料不同, 将使诱变效率和筛选难度不同。有效的诱变, 一方面必须保证诱变剂能有效渗入, 另一方面诱变后的植物必须能进一步生长、发育, 最终产生新的个体。因此, 诱变者常采用生长点或能快速繁殖的器官, 以获得较高频率, 并从中筛选可遗传的突变。此外, 由于嵌合体这种特殊形式的存在常常会给发现和筛选突变体增加难度。一些研究者采用单细胞培养或原生质培养的方式以获得纯的突变体, 减少嵌合体的出现。而从染色体的倍性方面考虑诱变材料, 从文献上看, 目前的观点与早期不同。下文将从繁殖方式和染色体倍数两方面对诱变材料进行综述:

2.1.1 按繁殖方式区分

将植物区分为种子繁殖植物、无性繁殖植物和试管繁殖植物, 对不同繁殖类型的植物采用不同的诱变部位。根据这种区分, 植物可供进行诱变的部位包括: 种子繁殖植物的诱变材料主要是种子, 也有花药、花粉、花粉母细胞和极少量的子房细胞等配子体; 无性繁殖植物材料非常广泛, 包括块茎、休眠芽、根状茎、嫁接枝条、茎; 试管繁殖植物可为: 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。

值得一提的是, 无性繁殖植物在诱变历史上就已

收稿日期: 2005-04-12

基金项目: 贵州省科学技术基金黔基合字 (2002) 3045 号资助项目。

作者简介: 董颖苹 (1975~), 女, 助理研究员; 主要从事马铃薯生物技术诱变育种研究工作。

表现出独特的诱变优势。

2.1.2 按染色体数区分

(1) 单倍体: 单倍体的诱变报道较少, 由于没有染色体间的相互作用, 基因的隐性突变可以直接表现。但单倍体的生命力和生产力都很缺乏优势, 即便是加倍的单倍体也因为基因过于纯合而不具备生产中需要的杂种优势。所以育种者常常会较少选用单倍体作为诱变材料。

(2) 二倍体、四倍体及多倍体: 大多数栽培种是二倍体, 部分是四倍体, 还有极少数的三倍体、六倍体和八倍体。从这些方面考虑, 加上人们对多条染色体基因组间存在的覆盖效应 (Masking) 理应大于单一染色体的推测, 栽培种诱变选用二倍体材料能得到更大的突变概率。而 1976 年, Borertjes^[1] 对观赏植物 *Achimenes* SP 的二倍体和同源四倍体材料诱导后得到相反的观察结果。作者用射线和快速中子处理 570 个二倍体和 961 个四倍体, 观察其子代生长习性、叶片和花突变, 发现四倍体获得的突变频率是二倍体的 2 倍。此后, 在许多作物上都报道了四倍体诱导突变的例子。如: 1982 G eorgiev-S 报道了 EMS 处理得到了球形针晶状硬质小麦的四倍体突变种。1988 年, Lazany+J B mnerH, H emelin-T 报道 SUDAN 草花粉中四倍体的畸变数显著高于二倍体。2000 年 H assan -L Ahmad, -S D 在植物研究中认为诱变剂在二倍体和四倍体中都有诱变效应, 如小麦^[2,3]、燕麦^[4]、油菜^[5]、葱类^[6]等。20 世纪 70 年代以来, 报道同源四倍体诱变效率比相应二倍体高的文献达到了一定数量。人们发现四倍体有与二倍体同样甚至更高的突变效率。

同源四倍体突变率比二倍体更高的可能的解释是: 四倍体有着更大的核染色体区, 单位细胞接受了比二倍体更大的诱变剂量, 而又没有特殊的修复突变的优势对应使分裂中不稳定因素增多, 有丝分裂中的不规则分裂多于相应低倍体, 因此更易产生突变。Basak-S Chandreshw ar-Prasad^[8] 在 EMS 对芜菁甘蓝二倍体和四倍体结构异染色体作用的细胞学观察中发现: 在所有浓度下, 四倍体的染色中心区分布都大于二倍体, 因而四倍体与诱变剂溶液接触面积大于二倍体。后代观察中还发现, M 2 代大量的核基因控制性状发生了恢复, 只是未能恢复到突变前的水平。在一篇研究酵母染色体数量进化演变的论文^[9]中, 精确设计的实验用以验证高倍性的染色体是否具有比低倍染色体更强的对突变的修饰作用, 如果这种修饰作用存在, 染色体数多的材料将较难获得突变体。通过细胞体积的测量和 FACSscan 分析证实, 四倍体只是获得了比二倍

体和单倍体更早的“立即”的而不是更强的修饰作用。实验也证明实际上染色体的倍性本身就是一个突变性状, 在诱导突变的过程中, 多数四倍体倍性下降, 一些单倍体倍性上升。H assan -L 等在比较葱类二、四倍体诱变染色体行为后认为四倍体主要是有丝分裂更不规则。

2.2 DNA 损伤、修复系统与适应性突变

自然条件下, DNA 损伤和发生复制差错的频率都是很高的。Ames^[13] (1989) 对鼠肝脏因氧化作用引起的 DNA 损伤作了统计, 核基因组每 130 000 bp 有 1 个损伤, 线粒体 DNA 中每 8 000 bp 有一个碱基损伤。DNA 复制的错误包括转座、倒位、移码和丢失。Haynes&Kunz (1988) 报道, DNA 复制错误频率大约是 10^{-2} , 即: “每一个复制的基因中会出现一个错误” 尽管这些错误大部分被各种 DNA 修复系统, 包括复制中的和复制后的修复作用修复到人们公推的每个体 $10^{-8} \sim 10^{-9}$ 次突变。修复系统的高效率是物种维持遗传稳定的决定因素。

M icke (1991) 曾对高等植物除紫外修复以外的 DNA 修复提出了疑问, 原因是当时关于修复系统的研究都集中在关于微生物^[17-20]、酵母和拟南芥^[17]上, 大多数 DNA 修复系统的研究都基于低等生物和少数模式植物。由近年来的研究来看, 修复系统的作用是明显的, 只不过它的功能并不是精确无误的。Hall 在选择压力下为获得适应性作的基因水平的突变似乎是被允许的, 有选择性压力比中性环境能获得更多的基因突变。突变形成只出现在包含允许错误修复的 DNA 聚合酶 IV 的编码基因 *dinB+* 的克隆里, 筛选条件既可以刺激 lac 突变体的反转突变, 也可以促使野生型基因发生适应性突变^[14]。G rzesiuk -E ; Jan in -C^[15] (1994) 用 MMS 诱变大肠杆菌报道了 umuDC 依赖型的突变。在 UmuDC 蛋白过量表达的细胞中富含 AT 的 *argE(ochre)-Arg(+)* 和另一基因 *Rif(R)-Rif(R)* 突变率增高。他们的研究也表明: MMS 诱导产生的突变位点在细胞饥饿时被 RecA 催化的重组修复方式修复。正常情况下, RecA 催化的重组修复方式是避免复制错误发生的途径, 但在代谢活跃的细胞里, 由于有 UmuD 2 C-Reca 翻译合成的 DNA 聚合酶 3 全酶复合体的出现, 也会以易产生差错的修复途径进行修复。以上研究不同程度地表明生物体为在逆境中求生是可以产生适应性突变的。

Bunny, -K im^[16] (2002) 等人对阻遏蛋白 LexA 编码基因进行诱变, 发现沙门氏菌中 *lexA* 失效突变体是致死突变, 也就是说 *lexA* 失效突变体不是突变效应的

增效基因。这一结果和大肠杆菌中一样。进一步研究表明: RecA 和 LexA 是特殊修复方式的作用因子。能造成 DNA 损伤或复制受抑制的逆境会引发一系列称为应急反应 (SOS response) 的复杂的诱导修复效应。在不利环境中, 突变有利于生物的生存的情况下, 细胞为避免死亡而启动这项特殊的求生功能, 包括 DNA 损伤修复、诱变效应、细胞分裂的抑制以及溶原性细菌释放噬菌体等。有 DNA 修复和导致变异两条支路, 具有双重功效。SOS 反应由 RecA 蛋白和 LexA 阻遏蛋白相互作用引起。RecA 蛋白是 SOS 反应系统的发动因子, 单链 DNA 和 ATP 存在时, RecA 蛋白被激活, 促进 LexA 阻遏蛋白水解, 使 SOS 反应的一系列基因得到表达, 其中包括紫外线损伤的修复基因 *uvrA*, *uvrB*, *uvrC* (分别编码切除酶的亚基) 以及 *recA* 和 *lexA* 基因本身, 与诱变作用有关的基因 *umuDC* 和 *dinB*, 与细胞分裂有关的基因 *suIA*, *ruv* 和 *bn* 等等。

从突变的后果看, 并非所有的碱基改变都能影响基因的功能和表型。可能性有 3 个, 即基因功能的丢失、新功能的获得和对基因表达完全没有影响, 分别由编码区的突变和非编码区的突变引发。基因编码区的突变可能会引起单个碱基的替换、缺失等, 从而造成合成的蛋白质类型改变, 造成基因功能的丢失或新功能的获得; 或者因移码引起阅读框改变合成了另一种蛋白质或提前终止转录转译而不合成有功能蛋白, 也能造成基因功能改变或尚失。而非编码区的突变是否影响基因功能就有很强的选择性。以 *E. Coli* 乳糖操纵子为例, 阅读框上游 -10~-35 非保守区发生碱基突变并不影响下游基因的启动转录, 但 -70~-50 和 -50~-40 区, -10 区的突变影响就很大, 可以引起基因功能的变化甚至表型变化。起始位点上, 甚至单独一个碱基的突变都造成基因表达失活, 产生表型变异。

2.3 诱变效率

尽管植株个体自然突变率只有 $10^{-8} \sim 10^{-9}$, 辐射诱变率也只不过比自然突变率增加 10 倍, 但人们在过去的几十年已获得了许多的突变体并形成品种用于生产或研究。Micke (1991) 给出不完全统计数据: 过去 25 年全世界已有约 1300 个诱发突变的植物品种, 其中利用化学诱变育成新品种有 106 个, 约占诱变育成品种 (系) 的 7%^[10]。近年来, 一方面随着高效低诱变剂 EMS 等的使用, 诱变的效率得到了提高, 方法也更为多样化; 另一方面, 由于化学诱变的操作可控性强、与新的分子生物学技术结合较容易, 效率也有了较大的上升, 由此化学诱变的使用频率迅速上升, 很快成为诱变的主流方法。

诱变的效率首先受基因型限制, 其次因化学诱变剂的种类、浓度、处理时间不同而不同。

无性繁殖作物由于无须经历减数分裂过程繁殖后代, 因而与种子繁殖植物相比, 更容易发生可传递的突变。在 Micke (1991) 给出的 1300 个诱发突变的植物品种中仅观赏植物一项就有 406 个用于商品化生产, 以花卉秋海棠、康乃馨、温室玫瑰、菊花为主, 水果和马铃薯类也有较多有名的品种来自天然芽变和诱发突变^[11]。

赵永亮^[21]的实验数据支持如下观点: (1) 诱变效率因基因型不同存在极显著差异。赵等采用 EMS 和 NG 的石蜡油处理玉米花粉, 在 M₂ 代进行突变基因等位性测验, 发现白胚乳基因 *yl* 突变率最高, 达到 29.29%; 甜玉米基因 *su1* 突变率也达到 2.64%; 糯玉米基因 *wx* 突变率 1.46%; 超甜玉米基因 BTL 和直链淀粉扩充基因 *ae* 相应突变率为 0.59% 和 0.29%。*su1* 和 *wx* 突变频率大约是自然突变的 100~1000 倍。(2) 诱变效率与因浓度不同而存在差异, 过高和过低的试剂浓度都不利于获取较高的突变频率。在对玉米自交系黄早 4 号 (音译) 的 M₂ 代胚乳白化突变体的检验中发现: 0.167% EMS 对该自交系处理后, 在 500 余个 M₂ 后代结穗中找到 80 个突变体, 诱导频率达到 15.04%, 0.11% 的浓度获得 5.26% 的诱变率, 0.100% 对应 1.20%, 0.083% 和 0.091% 对应 0.47% 和 0.45% 的诱变率。

Reddy, V-R-K^[22]对二倍体黑麦国王 II 四倍体小麦 Jaira; 六倍体小麦 WH 147 和六倍体黑小麦 Caman 的实验证实: (1) 与辐射方式相比, 化学试剂具有明显的优势, 但植物的基因型仍是诱变效率的决定因素。在他们的实验中, 个别种类的叶绿素突变对 (射线比对 EMS 敏感, 其余种类在 EMS 处理下得到更多叶绿素突变体; (2) 处理时间对效率有影响, 3 种处理时间的 0.5% EMS (8, 10, 12 h), 处理时间较长的 EMS 获得更多的突变体; (3) 染色体倍数也是重要影响因子。二倍体黑麦的叶绿素突变体率高于四倍和六倍体小麦, 六倍体黑小麦 Caman 无论在突变率还是突变种类上都多于其余 3 种。

化学诱变效率得以提高的关键在于两方面: 一是获取足够大的诱变群体; 二是科学家的研究证实获得高于自然变异的突变率是可能的。突变来源于染色体畸变、DNA 损伤、DNA 复制错误和修复系统对错误的忽略。突破生物体的保护, 造成 DNA 损伤并在复制中保存下来, 使错误复制通过修复系统的作用稳定遗传给子代, 这些环节的加深认识和技术突破使得诱变率

得以提高成为可能。

2.4 诱变谱

人们观察到的突变现象中, 雄性不育的突变成为观察到较多的性状, 原因是两种不同类型的不育都在诱变谱的范围里。质不育是报道最早的突变类型之一。而在 2003 年 Badigannavar et al.^[7] 在四倍体棉花诱发突变后代中分离出分离比接近 1:1 的核基因不育型个体, 证实核不育也在诱变谱中。

生产中需要的矮化类型, 也在诱变谱内, 而且已证明是单基因控制的性状; 此外, 观赏植物需要的突变类型集中在花型和叶型上也是诱变最敏感, 易观察到的性状。叶片的蜡质、有毛或无毛性状有非常多的报道。根据笔者的试验, 有关叶绿素的突变如黄化和白化也是高频发生的诱变性状。其他报道较多的突变性状还有抗病性及一些产量、品质相关的性状如穗粒数、糖含量等。

当使用不同的诱变剂时, 诱变谱常不相同。谷爱秋等 (1994) 采用 3 种烷化试剂 EMS、DES (硫酸二乙脂) 和 EI (乙烯亚胺) 对黑龙江地区的大豆推广品种进行诱变, 得到形态变异频率大致相同, 而早熟突变突变频率差异很大, 丰产性状突变率以 DES 为最佳, 并从中选育出高抗、优质、高产的大豆新品种, 以 0.3% 的 EMS 诱变处理后也获得了优良的新品种。

3 诱变剂作用机理

化学诱变剂大致包括碱基类似物、碱基修饰剂和嵌入染料 3 大类。碱基类似物是与 DNA 正常碱基结构类似的化合物, 能在 DNA 复制时取代正常碱基掺入并与互补碱基配对。如 5-溴尿嘧啶 (BU) 和 2-氨基嘌呤 (AP), 都能引起 AT 碱基对转换为 GC 碱基对; 碱基修饰剂通过对 DNA 碱基进行修饰作用而改变其配对性质。有专一作用于胞嘧啶的羟胺和种类繁多、目前运用最多、效率公认为最好的烷化剂系列, 包括氮芥、甲基磺酸乙酯 (EMS)、乙基磺酸乙酯 (EES)、甲基磺酸甲酯 (MMS)、亚硝基胍 (NTG) 等等; 吖啶橙 (acridine)、溴化乙锭 (EB) 等可插入到 DNA 碱基对之间的染料, 被称作嵌入染料, 也是较强的诱变剂, 能造成两条链错位或移码突变。此外, 叠氮类化合物和一些抗生素也被人们认为是良好的诱变剂。本文选择介绍 EMS、叠氮钠和我国报道的高效诱变剂抗生素平阳素的诱变机理。

3.1 甲基磺酸乙酯 (EMS)

EMS 分子式 $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{OC}_2\text{H}_5$ 中文名为甲基磺酸乙酯, 无色液体, 分子量 124 水中溶解度为 8%。pH 7 条

件下在水中半衰期 20℃ 时是 93 h, 30℃ 时 26 h, EMS 是烷化剂的一种。烷化剂通常带有 1 个或多个活性烷基, 此基团能够转移到其它电子密度高的分子上去, 使碱基许多位置上增加了烷基, 从而在多方面改变氢键的能力。EMS 被证明是最为有效而且负面影响小的诱变剂。与其他烷化诱变剂类似, 是通过与核苷酸中的磷酸、嘌呤和嘧啶等分子直接反应来诱发突变。EMS 诱发的突变主要通过两个步骤来完成, 首先鸟嘌呤的 O6 位置被烷基化, 成为一个带正电荷的季铵基团, 从而发生两种遗传效应: 一是烷化的鸟嘌呤与胸腺嘧啶配对, 代替胞嘧啶, 发生转换型的突变; 二是由于鸟嘌呤的 N27 烷基活化, 糖苷键断裂造成脱嘌呤而在 DNA 复制过程中, 烷基化鸟嘌呤与胸腺嘧啶配对, 导致碱基替换, 即 G:C 变为 A:T。当然, 化学诱变存在着染色体结构和数量方面的诱导变异, 但这种单一碱基对改变而形成的点突变仍是化学诱变的主要形式。这样的点突变将是品种改良和退化特性恢复的希望所在。诱变剂也可与核苷结构的磷酸反应, 形成酯类而将核苷酸从磷酸与糖分子之间切断, 产生染色体的缺失。这些 DNA 结构上的变化都可能促使不表达的基因或区段被激活, 而表现出被掩盖的性状。EMS 化学诱变产生点突变的频率较高, 而染色体畸变相对较少, 可以对作物的某一种特殊性状进行改良。与其它诱变剂相比, EMS 诱变后产生的突变频率高, 且多为显性突变体, 易于突变体的筛选。EMS 是目前运用最广泛也是公认最为有效的诱变剂。

3.2 叠氮化钠 (NaN_3)

NaN_3 等电点是 $\text{pH} = 4.18$ 在 $\text{pH} = 3$ 时 NaN_3 溶液中主要产生呈中性的分子 HN_3 , 易透过膜进入细胞内, 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。由于 NaN_3 只作用于复制中的 DNA, 所以处理种子时把种子预浸到种胚中, 有利于提高处理效果。 NaN_3 具有高效、无毒、便宜及使用安全等优点。在酸性溶液中对大麦叶绿素缺失和形态突变诱发非常有效。

3.3 平阳霉素 (PYM)

PYM 是一种抗生素, 属于博莱霉素的一类, 是博莱霉素的 A5 组分。目前主要作为抗肿瘤药应用于临床, 对多种癌症具有较好的疗效。抗生素具有高度选择性, 能抑制细胞的生长, 其中的大多数对维持生命有重要意义。作为一种新的诱变剂, PYM 在许多实验中均被证明具有安全、高效、诱变频率高、范围大等特点。与 EMS 的诱变特点相近, 在某些方面优于 EMS 很具有开发和应用前景。

参考文献

- 1 Broertjes C. Mutation breeding of autotetraploid Achimenes cultivars. In: Improvement of Vegetatively Propagated Plants and Tree Crops through Induced Mutations. Vienna: IAEA, 1976.
- 2 El-Shawaf-I I S, Abdel-Shafiq-A. M.; Mahmoud, -S. K. Annals of Agricultural Science. Moshtohor (Egypt), 1986, 24 (1), 163-173.
- 2 Kalia -G-S, Kharkwal -M-G, Singh -M-P, Vari -A lice-K. Indian Journal of Genetics and Plant Breeding 2001, 61 (3): 203-208.
- 4 Simons -M. D.; Browning -J. A.; Frey -K. J. Vienna: IAEA, 1983, 139-150. Martens -J W., et al. Vienna: IAEA, 1983, 105-110.
- 5 Auil -D. L.; Heikkinen -M. K.; Erickson, -D. A.; Semyk -J L.; Romero -J. E. Crop-science. USA, 1992, 32(3): 657-662.
- 6 Hassan -L.; Ahmad -S. D. Pakistan Journal of Biological Sciences 2000, 3(7): 1187-1189.
- 7 Badigannavar-AM; Katageri-ES; Khadi-BM. Induced pleiotropy for curved stigma and genetic male sterility in tetraploid cotton. Indian Journal of Genetics and Plant Breeding 2003, 63 (3): 271-272.
- 8 Malak -R. K.; Otto -S. P. Making and purging mutations following EMS treatment in haploid, diploid and tetraploid yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Genetics. Cambridge: Cambridge University Press 2001, 77 (1): 9-26.
- 9 McDonald -J. P.; Levine -A. S.; Woodgate -R. The *Saccharomyces cerevisiae* RAD30 gene, a homologue of *Escherichia coli* *dinB* and *umuC*, is DNA damage inducible and functions in a novel error-free postreplication repair mechanism. Genetics Society of America 1997, 147 (4): 1557-1568.
- 11 Mickle A. Plant mutation breeding: its future role, the methodology needed, training and the research priorities. In: Plant Mutation Breeding for crop improvement. Vienna: IAEA, 1983, (2): 473-475.
- 12 Harter, A. M. Van. Mutation Breeding. Cambridge University Press 1998.
- 13 Ames B. n. Endogenous DNA damage as related to cancer and aging. Mutation Research 1989, 214: 41-46.
- 14 Slechta -E.; Susar, Bunny -K in-L; Kugeberg -Elisabeth. Adaptive mutation. General mutagenesis is not a programmed response to stress but results from rare coamplification of *dnB* with *lac*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(22): 12847-52.
- 15 Grzesiuk -E.; Janion -C. The frequency of MMS-induced, *umuDc*-dependent mutations declines during starvation in *Escherichia coli*. Molecular and General Genetics (Germany), 1994, 245(4): 486-492.
- 16 Bunny -K in; Liu -Jing; Roth -John. Phenotypes of *lexA* Mutations in *Salmonella enterica*: Evidence for a Lethal *lexA* Null Phenotype Due to the Fels-2 Prophage. Journal of Bacteriology 2002, 184 (22): 6235-6249.
- 17 Georgiev -S. New botanical *Sphaerococcus* varieties in *Triticum durum* obtained as a result of EMS ethylmethanesulfonate treatment Tetraploid mutants, phenotypical expression. Cereal Res Commun 1982, 10 (1/2): 115-118.
- 18 McKenzie -G regory-J; Magner -Daniel B.; Lee -Peter L. The *dnB* Operon and Spontaneous Mutation in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 2003, 185(13): 3972-3977.
- 19 Jara -Monica; Nunez -Cinthia; Canpoy -Susana. *Geobacter sulfurreducens* Has Two Autoregulated *lexA* Genes Whose Products Do Not Bind the *recA* Promoter. Differing Responses of *lexA* and *recA* to DNA Damage. Journal of Bacteriology 2003, 185(8): 2493-2502.
- 20 Sung -Huang M q; Yeaman -Gabriel; Ross -Christian. A Roles of *YqJH* and *YqJW*, Homologs of the *Escherichia coli* *UmuC/D* *dnB* or *Y* Superfamily of DNA Polymerases in Stationary-Phase Mutagenesis and UV-Induced Mutagenesis of *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 2003, 185 (7): 2153-2160.
- 21 赵永亮, 宋天明. 利用花粉化学诱变快速创造特有玉米新种质. 作物学报, 1999, 25(2): 157-161.
- 22 Sue Forrest. Effect of different ploidy levels on chlorophyll mutation frequency in some cereals: In "Mutation detection". New York, Oxford University Press 2002.