

文章编号:1000-8551(2013)04-0430-07

体细胞无性系变异在草坪草改良上的研究进展

顾敏霞 张丽 邵丽达 柴明良

(浙江大学园林研究所,浙江 杭州 310058)

摘要:体细胞变异是来源于细胞和组织培养过程中的变异。本文综合国内外体细胞无性系变异的相关研究,概述了体细胞无性系变异的来源、遗传学基础及筛选与鉴定途径,详细介绍了体细胞无性系变异在选育抗逆境胁迫、抗病虫害、抗除草剂草坪草等方面的研究进展,叙述了应用体细胞无性系变异育种存在变异类型复杂、变异方向难以预期、劣变多、突变细胞系分化能力下降、变异遗传不稳定等问题以及讨论了利用离体筛选的方法获得相应变异体来丰富草坪草育种材料的前景。

关键词:体细胞无性系变异;草坪草;育种

Progress in Somaclonal Variation and Its Application in Germplasm Improvement of Turfgrasses

GU Min-xia ZHANG Li SHAO Li-da CHAI Ming-liang

(Institute of Landscape Architecture, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058)

Abstract: Somaclonal variation is defined as variation originating in cell and tissue culture. The paper combined domestic with foreign research of somaclonal variation, summarized the sources, the mechanism, the selection and identification of somaclonal variation. In addition, a detailed introduction of its application in breeding turfgrass species with stress-resistance, diseases-resistance and herbicide-resistance was included. The paper pointed out the shortages of somaclonal variation such as the complexity, unexpectation, inferiority, reduction of differentiation ability and genetic instability in variation. Besides, prospects of its application in enriching breeding resources for turfgrasses through in vitro selection were also discussed.

Key words: Turfgrass; Somaclonal variation; Breeding

草坪草是指构成草坪植被的草本植物,包括禾本科和少数几种莎草科植物及一些符合草坪草特性的其它植物。草坪草具有保持水土、改造自然、美化环境等多种功能,在改善城市人居环境和营造休闲场所等方面起着重要作用^[1-2]。

体细胞无性系变异(Somaclonal variation)被定义为来源于细胞和组织培养过程中的变异^[3],包括细胞培养、再生植株及其后代中产生的变异。自从1959年Braun^[4]首次观察和报道体细胞无性系变异以来,日益增多的研究表明体细胞无性系变异是植物组织培养中

出现的普遍现象。虽然体细胞变异影响离体培养植物性状的一致性,但其产生的新变异对作物改良的作用较大^[5-6]。近年来,科学家们已经利用体细胞无性系变异在小麦(*Triticum aestivum* L.)、水稻(*Oryza sativa* L.)、玉米(*Zea mays* L.)、高粱[*Sorghum bicolor* (L.) Moench]、番茄(*Lycopersicon esculentum* L.)、马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)、甜椒(*Capsicum annuum* L.)、草莓(*Fragaria* L.)等多种农作物上培育出新品种^[7-13]。诱导的体细胞变异可用于作物多基因性状

收稿日期:2012-09-24 接受日期:2013-01-16

作者简介:顾敏霞(1988-),女,江苏江阴人,硕士研究生,研究方向:草坪草生物技术。Tel:15067131702;E-mail:21016153@zju.edu.cn

通讯作者:柴明良(1964-),男,浙江安吉人,副教授,研究方向:园艺植物生物技术。Tel:13757109402;E-mail:mlchai@zju.edu.cn

的遗传操作^[14,15],同时也能用其变异体的后代来育种,这些变异表现出抗病性或质量、产量更好的特性^[16,17]。

体细胞变异有如下优点:一是变异频率高,一般为1%~3%^[18],远高于自然变异频率;二是能在保持原品种优良性状不变的情况下有效改善个别不良性状;三是育种周期短,成本低,操作难度小,应用范围广;四是提供了变异的快捷途径,特别是对常规育种比较困难的植物,因组织培养阶段既可改变遗传重组的频率,也可改变其分布,同时也存在细胞质突变,有异于常规育种和诱变育种,因此有可能选择到细胞质雄性不育系等新的变异^[19];五是可通过人为施加生物与非生物胁迫选择压来定向筛选突变体。因此,利用体细胞培养技术从植物细胞中筛选出耐热、抗寒、耐盐、抗病虫害等突变体是可行的,其为植物品种改良和新品种的选育提供了新的途径。

1 体细胞无性系变异

1.1 体细胞变异的主要来源

体细胞无性系变异既可能是外植体细胞预先存在的变异的表达,也可能是在组织培养过程中诱导产生的^[20]。

1.1.1 预先存在并于再生植株中表现出的变异 嵌合体是这类变异的一个重要来源^[21]。Krikorian 等^[22]发现车前草(*Plantago asiatica* L.)自发产生的嵌合体‘Maricongo’再生出一种新的稳定的变异体‘Superplantano’;无刺黑莓(*Rubus canadensis* L.)‘Thornless Evergreen’嵌合体组织培养后再生梢近一半是矮化且纯粹的‘Thornless Evergreen’^[23]。不定芽发生是导致嵌合体分离的最通常原因^[24],这是因为不定芽通常认为是从单细胞或特定组织的少数细胞起源的^[25-26]。

1.1.2 组织培养中产生的变异 在体外培养期间,外植体基因型、类型、生长调节剂浓度及持续继代培养次数等均是导致变异的重要因素。

染色体数目和结构的变异通常易发生在多倍体材料中,基因突变则在二倍体和单倍体中更易表达;而外植体类型可以影响体细胞变异的频率和性质^[27],离器官分化生长越远,时间越久,就越有机会产生变异;从顶芽、腋芽、侧芽和茎尖分生组织获得的无性系变异频率低,而无分生组织功能的叶、根、细胞和原生质体培养产生的无性系变异频率高^[28]。

植物生长关键阶段如细胞周期干扰引发的形态发

生可导致变异,这些阶段可由外源的植物生长调节剂(PGR)所控制^[29]。这在香蕉(*Musa sapientum* L.)品种‘Williams’^[30]、四季橘(*Citrus madurensis* Lour.)^[31]和大豆[*Glycine max* (L.) Merr.]^[32]等体细胞无性系的发生中得到了证实。此外,Rodrigues 等^[33]发现体细胞无性系变异率在第5次继代时为1.3%,经11次继代变异率增至3.8%;Bairu 等^[34]也发现香蕉在连续继代培养中变异体的发生率较高。

1.2 体细胞无性系变异的遗传学基础

可遗传的细胞变异可来自于突变,表观遗传改变,或者两者机制的结合^[21]。虽然尚未有分子生物学证据说明它是如何发生的,但是无性系变异在染色体结构和数目上的异常以及细胞核细胞质基因的突变已被试验所证实。体细胞无性系变异的遗传学基础如下。

1.2.1 染色体变异 在离体培养产生的体细胞无性系变异中已观察到染色体结构和数目的改变^[35-37]。

1.2.2 点突变 1983年Evans 等^[20]在230株番茄再生植株中发现13株发生了不同的单基因突变,突变率高达5.7%。目前,点突变已被认为是引起水稻体细胞无性系变异的重要来源^[38]。

1.2.3 染色体交换和姐妹染色单体的互换 染色体交换引起的变异在烟草(*Nicotiana tabacum* L.)、大豆等植物中均有报道^[39]。

1.2.4 基因的扩增和丢失 基因扩增和丢失被认为是体细胞无性系变异的原因之一^[3]。研究显示,在高度重复的基因组中,小麦、黑麦(*Secale cereale* L.)、玉米和烟草等植物中均发现一类编码核糖体RNA(rDNA)其间隔序列及一些重复序列可以随条件不同而增加或减少^[40]。

1.2.5 转座因子的激活 转座因子激活也是导致植物体细胞无性系高频率变异的主要原因。在玉米的组织培养中Ac和Spm转座因子的发现^[41-42]显示了体细胞变异和可移动因子之间可能的关系。而转座子产生的变异在木豆[*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]^[43]、风铃草(*Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. f.)^[44]、小果野蕉(*Musa acuminata* L.)^[45]、小麦^[46]等植物上得到证实。最近Gao 等^[47]也在某品种水稻再生植株中观察到新转座子的插入引发的体细胞无性系变异。

1.2.6 DNA 甲基化 在离体培养过程中植物基因组可产生广泛的甲基化变异^[48]。1991年Brown 等^[49]在玉米的再生植株中发现了DNA甲基化。Devaux 等^[50]在大麦(*Hordeum vulgare* L.)体细胞无性系再生植株中,用限制性片段长度多态性(RFLP)技术验证了DNA甲基化状态的变化。关于DNA甲基化等表观遗传

传引起的体细胞变异是近年研究的热点,已有大量的报道,详细可参见相关的综述^[51-52]。

1.3 体细胞无性系变异的筛选与鉴定

由于体细胞无性系变异的发生往往没有方向性,变异类型繁多,而用于植物育种目标的变异则必须是优良性状,因此对变异进行有效的筛选与鉴定就至关重要。

1.3.1 田间表型选择法 是在田间栽培的大量再生植株中筛选优良变异的单株。此法工作量大,但较简单直观,是筛选株高、叶型、叶色、绿期、盖度等的最有效和最主要的方法。

1.3.2 外加选择压定向筛选 通过向培养基加入氯化钠、真菌毒素、除草剂和抗生素等选择压力,或采用干燥、冷热和冰冻等环境处理,获得抗性愈伤组织或抗性细胞系,然后再生获得抗性突变株^[53],该法主要用于抗逆性选育。

1.3.3 生理生化检测 筛选得到的突变体一般要进行生理生化的鉴定,为进一步育种应用奠定基础。主要包括色素、同工酶酶谱及可溶性蛋白分析等。所能检测的范围很有限,仅能解释很小一部分变异。

1.3.4 分子水平检测 直接对变异体的 DNA 进行分析,常用的分子标记有: AFLP、RFLP、RAPD、SSRs、STRs、STMs 和 SSLP 等。

2 体细胞无性系变异在草坪草上的研究进展

体细胞无性系变异筛选已在水稻、小麦、高粱等农作物上获得了不少可应用的成果^[54-57],但在草坪草上仍然以研究和探索为主,主要集中在形态变异和逆境变异包括耐盐、抗寒、抗热、抗旱、抗重金属离子等逆境胁迫,抗病虫害及抗除草剂的突变体筛选等。

2.1 形态变异

Jackson 等^[58]进行了多花黑麦草 (*Lolium multiflorum* L.) 离体培养再生植株的细胞学、形态学及同工酶的分析,发现同一基因型的 65 株再生植株在高度、叶耳长度、开花时间和叶绿素含量上均发生了变异; Hanna 用 40 ~ 80 Gy 的⁶⁰Co γ 射线处理狗牙根 (*Cynodon dactylon* L.) ‘Tifway’ 和 ‘TifwayII’, 诱导出精细质地的突变体^[59]; Taliaferro 等^[60]在狗牙根栽培品种 ‘Zebra’ 中发现了矮化的体细胞无性系变异; Byron 等^[61]在 400 多株毛花雀稗 (*Paspalum dilatatum* Poir.) 的再生植株中发现有 20 株除了柱头和花粉囊的颜色、对麦角症的抗性、染色体数目没有发生变化

外,其余形态均发生了变化的变异体,尤为重要的是其中一株的结实率显著提高,这对育种生产具有重大意义; Chayaporn^[62]发现了 10 个无芒雀麦 (*Bromus inermis* Leyss.) 的变异系,其与亲本在形态和干重上均有所不同; Roylance 等^[63]发现一个高羊茅 (*Festuca arundinacea* Schreb.) 再生突变体的生物量和产量与对照株明显不同; 以不同生态型的海滨雀稗 (*Paspalum vaginatum* Swartz.) 为材料的研究表明, 1848 株愈伤组织再生的植株中有 136 株的节间变短, 而移栽到田间的 2800 株中有 100 多株出现了节间变短、耐寒性增强、生长速度变化等变异^[64]; Denise 等^[65]对海滨盐草 [*Distichlis spicata* (L.) Greene] 的研究发现很多具有变高、花茎比重增大、根茎比增加等特征的变异体; 卢少云等通过杂交狗牙根 [*Cynodon dactylon* (L.) Pers. \times *C. Transvaalensis* Burtdary] 愈伤组织诱导和植株再生, 获得了 1 株 ‘TifEagle’ 矮化变异株 TV4, 其匍匐茎节间长度比亲本短 47%, 叶长短 32%, 叶宽增大 30%, 根系较亲本更发达^[66]; Goldman 和 Hanna^[67] 通过从杂交狗牙根品种 ‘TifEagle’ 的茎节和 ‘TifSport’ 的未成熟花序中诱导出愈伤组织, 再生后移栽到田间, 测定田间苗的株高、叶长、叶宽和茎节数, 发现 22% 的植株在其中 3 个指标上和 ‘TifEagle’ 存在显著性差异, 一株苗在株高上和 ‘TifSport’ 存在显著性差异; 彭丽梅等^[68]将多年生黑麦草 (*Lolium perenne* L.) 愈伤组织利用神舟 7 号飞船搭载进行空间诱变处理, 获得了叶片变窄, 单位叶面积干重等性状发生变异的株系 31 个; 最近, 向佐湘等^[69]以假俭草 [*Eremochloa ophiuroides* (Munro) Hack.] 种子为外植体, 发现继代时间超过 12 个月的胚性愈伤上分化的植株出现包括矮化, 花叶、花期改变的多种变异。

2.2 非生物逆境胁迫变异

非生物胁迫抗性变异体包括耐盐、抗寒、抗热、抗旱、抗重金属离子等。Ackerman^[70]通过体细胞培养, 从俯仰马唐 (*Digitaria decumbens* Stent.) 再生植株中筛选出对低温抗性显著不同的个体; Cardona 和 Duncan^[64]在海滨雀稗的再生苗中发现了一些显著耐寒的突变体; Krans 等^[71]利用热处理匍匐剪股颖 (*Agrostis stolonifera* L.) 悬浮细胞, 从再生植株中筛选出一些抗热品系; 柴明良等^[72]将结缕草 (*Zaysia japonica* Steud.) 栽培品种 ‘Zenith’ 种子诱导的愈伤组织, 利用盐溶液进行多代定向选择, 在试管中筛选出了比该栽培品种群体耐盐性增强的体细胞无性系变异植株; 卢少云等^[73]利用盐胁迫处理杂交狗牙根愈伤组织, 从再生植株中筛选出抗旱耐盐突变体, 接着筛选出矮化、

抗旱和抗盐的株系,同时发现抗旱变异体的耐旱性与其在干旱胁迫下抗氧化保护能力增强有关,而耐盐变异体的耐盐性与其脯氨酸含量提高,在盐胁迫下具有更高的 K/Na 和抗氧化酶活性有关^[74];王婷婷等^[75]通过对愈伤组织进行高温胁迫处理,获得了草地早熟禾 (*Poa pratensis* L.) 耐热变异体;利用低温处理诱导百喜草 (*Paspalum notatum* Flugge) 和海滨雀稗的耐寒突变体也有了报道^[76-77];陈曙等^[78]对培养 6 年的愈伤组织进行⁶⁰Co γ 射线处理,再经 NaCl 筛选,获得沟叶结缕草 [*Zoysia matrella* (L.) Merr.] 耐盐变异体;王小华等^[79]在 2010 年利用硫酸二乙酯 (DES) 处理柱花草 [*Stybsanthes guianensis* (Aubl) Sw.] 愈伤组织获得耐寒突变体;刘明稀等^[80]对假俭草胚性愈伤组织进行反复间歇低温处理并结合长期继代,诱导体细胞无性系变异发生,通过人工气候箱低温筛选,在再生群体中获得 5 个耐寒性提高的变异株,并且得出耐寒突变体的耐寒性与其 SOD 和 CAT 对低温的响应更敏感有关;同年,其实验室将继代 2 年的假俭草胚性愈伤组织再生,从再生植株中获得了 5 株抗旱性提高的变异株^[81];而袁学军等^[82]以国产假俭草 E-126 种子为外植体,将获得的黄色颗粒状愈伤组织在 0℃ 低温条件下处理,筛选出 2 块耐寒愈伤组织,此愈伤组织经分化、生根、再生出的变异株系其外部形态相同且与对照没有显著性差异,但抗寒性与对照植株相比显著增强。

关于筛选抗金属离子的突变体,草坪草中尚未有成果,但在水稻、小麦中用高浓度铝盐筛选抗铝突变体已有成功的报道^[5,83],这表明定向筛选同为禾本科的草坪草的抗金属离子突变体也是有可能性的。

2.3 抗病虫害

抗病虫变异的价值取决于有效的筛选途径、发生抗病变异的频率以及抗性的遗传^[84],至今已有不少学者在草坪草抗病虫害方面做了研究。Skipp 等^[85]将 3 个不同亲本细胞系的多年生黑麦草的营养器官进行组织培养和再生,利用冠锈病 (*Puccinia coronata*) 侵染,结果大多数植株表现出显著的抗性,且发现细胞系对冠锈病的反应不同,有的表现出极高的抗性;Croughan 等^[86,87]在狗牙根栽培品种 ‘Brazos’ 和 ‘OSU LCB W2’ 愈伤诱导的再生植株中,筛选出对秋季黏虫表现出显著抗性的两个细胞系 (Brazos-R3 和 OSU LCB W26-R2),获得了 Brazos-R3 的新的栽培品种,其对秋季黏虫的抗性显著高于原品种;Krans 等^[71]用立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 接种匍匐翦股颖的愈伤组织,从再生植物中筛选出了抗病变异体;Chai 等^[88]将结缕草的愈伤组织放入添加不同浓度褐斑病菌株 (*Rhizoctonia*

solani AG2-2(IV)) 的培养基中,筛选出在田间水平上依然具有显著抗性的株系。

2.4 抗除草剂

杂草控制是草坪草管理者的重要难题,因此培育出抗除草剂的草坪草不仅能让草坪更加美观,还能减少草坪管理的维护费。但关于利用体细胞无性系来培育抗除草剂的草坪草的报道并不多。Lee 等^[89]结合⁶⁰Co γ 射线和离体培养,筛选出了抗草甘膦 (Glyphosate) 的结缕草变异株;Douglas 等^[90]通过对海滨雀稗愈伤组织进行定向筛选,获得了具有稀禾定 (Sethoxydim) 抗性的再生植株。近年,本实验室通过在培养基中添加草甘膦筛选出了抗草甘膦的沟叶结缕草变异株^[91],同时,抗除草剂稀禾定的变异株筛选也获得了初步的结果。

3 体细胞无性系变异存在的问题及展望

3.1 存在的问题

体细胞无性系变异育种避免了转基因植物的生物安全问题,近年来越来越受重视,已逐渐成为植物育种的有效补充手段。但普遍存在变异类型复杂、变异方向难以预期、劣变多、突变细胞系分化能力下降、变异遗传不稳定等缺点。特别在草坪草上,由于诱导高再生能力的胚性愈伤组织相当难度,且要长期维持愈伤组织的胚性能力愈加困难,更增加了该技术的操作难度^[92]。此外,体细胞无性系变异的多数研究仅限于实验室和温室阶段,由于所选材料实用价值的有限性、非期望遗传变异的产生以及获得变异性状的不显著性^[85],导致其在生产上应用的局限性。同时,研究的系统性不够,大多的研究报道局限于筛选过程及初代变异株,对变异的机理以及变异株在繁殖后代稳定性的研究还缺乏深入的探索。

3.2 展望

体细胞无性系变异选育目前仅为常规育种的一种有效补充,并不能代替传统的育种技术。但当原材料不具备所需的性状时,就可以用离体筛选的方法获得具有相应性状的变异体来丰富育种材料。为了更好地利用该项技术,应该强化以下方面的研究:(1)从分子水平上进一步深入探讨体细胞无性系变异的遗传机制,提高目标性状和其他有益农艺性状的变异频率,减少非目的性状变异的产生^[93]。(2)建立高效的稳定的植株离体再生体系,系统探索保持愈伤组织高再生率的长期维持条件,以创造更多的变异类型及得到新的种质资源并防止细胞全能性的丧失。(3)应该对变异

体的生物化学和分子生物学基础进行深入研究,然后从中抓住这些特征或某一生化环节,作为选择指标来利用,以便更好地分离筛选突变体^[94]。(4)与诱变育种紧密结合,提高变异细胞的频率。如合理使用物理诱变,筛选愈伤组织合适的辐射剂量;采用甲基磺酸乙酯(EMS)等化学诱变剂来显著提高突变频率。(5)将目标更多集中于无性繁殖的种类和品种,既可克服无法杂交形成新种质的难题,又可有效利用杂合态的变异,避免有性生殖过程中基因的重组和分离带来的复杂性及不稳定性。

参考文献:

- [1] 艾定增. 草坪文化与环境色彩[J]. 中国园林, 1993, 9(1): 32 - 33
- [2] Henderson S, Perkins P B, Nathan H P, Maurice N. Residential lawn alternatives: a study of their distribution, form and structure [J]. Landscape and Urban Planning, 1998, 42:135 - 145
- [3] Larkin P, Scowcroft W. Somaclonal variation-a novel source of variability from cell cultures for plant improvement [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1981, 60:197 - 214
- [4] Braun A C. A demonstration of the recovery of the crown-gall tumor cell with the use of complex tumors of single-cell origin [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1959, 45:932 - 938
- [5] Bouharmont J. Application of somaclonal variation and in vitro selection to plant improvement [J]. Acta Horticulturae, 1994, 355: 213 - 218
- [6] Predieri S. Mutation induction and tissue culture in improving fruits [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2001, 64:185 - 210
- [7] Mehta Y R, Angra D C. Somaclonal variation for disease resistance in wheat and production of dihaploids through wheat × maize hybrids [J]. Genetics and Molecular Biology, 2000, 23:617 - 622
- [8] Sultana R, Tahira F, Tayyab H, Khurram B, Shiekh R. RAPD characterization of somaclonal variation in indica basmati rice [J]. Pakistan Journal of Botany, 2005, 37:249 - 262
- [9] Matheka J M, Magiri E, Rasha A O, Machuka J. In vitro selection and characterization of drought tolerant somaclones of tropical maize (*Zea mays* L.) [J]. Biotechnology, 2008, 7:641 - 650
- [10] Van den Bulk R W, Loffler H J M, Lindhout W H, Koornneef M. Somaclonal variation in tomato: effect of explant source and a comparison with chemical mutagenesis [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1990, 80:817 - 825
- [11] Ehsanpour A A, Madani S, Hoseini M. Detection of somaclonal variation in potato callus induced by UV-C radiation using RAPD-PCR [J]. General and Applied Plant Physiology, 2007, 33:3 - 11
- [12] Hossain A M, Konisho K, Minami M, Nemoto K. Somaclonal variation of regenerated plants in chili pepper (*Capsicum annum* L.) [J]. Euphytica, 2003, 130:233 - 239
- [13] 罗 静, 周厚成, 王永清, 赵 霞. EMS 离体诱变及抗草莓灰霉病愈伤组织的筛选 [J]. 核农学报, 2009, 23(1): 90 - 94
- [14] Brar D S, Jain S M. Somaclonal variation: Mechanism and Applications in crop improvement [A] // Jain S M, Brar D S, Ahloowalia B S. Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Netherland: Kluwer Academic Publishers, 1998, 15 - 38
- [15] Jain S M. Tissue culture-derived variation in crop improvement [J]. Euphytica, 2001, 118:153 - 166
- [16] Karp A. Somaclonal variation as a tool for crop improvement [J]. Euphytica, 1995, 85:295 - 302
- [17] Unai E, Iselen T, de Garcia E. Comparison of characteristics of bananas (*Musa* sp.) from the somaclone CIEN BTA - 03 and its parental clone Williams [J]. Fruits, 2004, 59:257 - 263
- [18] Skirvin R M, McPheeters K D, Norton M. Sources and frequency of somaclonal variation [J]. HortScience, 1994, 29:1232 - 1237
- [19] 肖辉海, 陈良碧. 植物体细胞变异育种 [J]. 湖南文理学院学报: 自然科学版, 2003, 15: 40 - 46
- [20] Evans D A, Sharo W R, Medina-Filho H P. Somaclonal and gametoclonal variation [J]. American Journal of Botany, 1984, 71: 750 - 774
- [21] George E F. Plant propagation by tissue culture, part 1: the technology [M]. London: Exegetics Ltd, 1993
- [22] Krikorian A D, Irizarry H, Cronauer-Mitra S S, Rivera E. Clonal fidelity and variation in plantain (*Musa* AAB) regenerated from vegetative stem and floral axis tips in vitro [J]. Annals Botany, 1993, 71:519 - 535
- [23] McPheeters K, Skirvin R M. Histogenic layer manipulation in chimeral 'Thornless Evergreen' trailing blackberry [J]. Euphytica, 1983, 32:351 - 360
- [24] Marcotrigiano M. Genetic mosaic and chimeras: Implication in biotechnology [A] // YPS. Bajaj (ed). Biotechnology in agriculture and forestry. 1990, 11:85 - 111
- [25] Broertjes C. Mutation of bmeding of streptocarpus [J]. Euphytica, 1969, 18:333 - 339
- [26] Broertjes C, Keen A. Adventitious shoots: Do they develop from one cell [J]. Euphytica, 1980(29):73 - 87
- [27] Chuang S J, Chen C L, Chen J J, Chou W Y, Sung J M. Detection of somaclonal variation in micro-propagated *Echinacea purpurea* using AFLP marker [J]. Scientia Horticulturae, 2009, 120:121 - 126
- [28] 刘进平, 郑成木, 胡新文. 体细胞无性系变异研究进展 [J]. 华南热带农业大学, 2001, 7(2): 22 - 29
- [29] Peschke V M, Phillips R L. Genetic implications of somaclonal variation in plants [J]. Advances in Genetics, 1992, 30:41 - 75
- [30] Gimenez C, de Garcia E, de Enrech N X, Blanca I. Somaclonal variation in banana: cytogenetic and molecular characterization of the somaclonal variant CIEN BTA - 03 [J]. In Vitro Cellular and Developmental Biology-plant, 2001, 37:217 - 222
- [31] Siragusa M, Carra A, Salvia L, Puglia A, De Pasquale F, Carimi F. Genetic instability in calamondin (*Citrus madurensis* Lour.) plants derived from somatic embryogenesis induced by diphenylurea derivatives [J]. Plant Cell Reports, 2007, 26:1289 - 1296
- [32] Radhakrishnan R, Ranjitha Kumari B. Morphological and agronomic

- evaluation of tissue culture derived Indian soybean plants[J]. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 2008, 91:391-396
- [33] Rodrigues P H V, Tulmann Neto A, Cassieri Neto P, Mendes B M J. Influence of the number of subcultures on somoclonal variation in micropropagated Nanico (*Musa* spp., AAA group) [J]. *Acta Horticulturae*, 1998, 490:469-473
- [34] Bairu M W, Fennell C W, van Staden J. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv. 'Zelig') [J]. *Scientia Horticulturae*, 2006, 108:347-351
- [35] Al-Zahim M A, Ford-Lloyd B V, Newbury H J. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis[J]. *Plant Cell Reports*, 1999, 18:473-477
- [36] Hao Y J, Deng X X. Occurrence of chromosomal variations and plant regeneration from long-term-cultured citrus callus [J]. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-plant*, 2002, 38:472-476
- [37] Mujib A, Banerjee S, Dev Ghosh P. Callus induction, somatic embryogenesis and chromosomal instability in tissue culture-raised hippeastrum (*Hippeastrum hybridum* cv. United Nations) [J]. *Propagation of Ornamental Plants*, 2007, 7:169-174
- [38] 高东迎,郭士伟,李霞,孙立华,刘嵩民. 水稻体细胞无性系变异[J]. *植物学通报*, 2002, 19: 749-755
- [39] Evans D A, Paddock E F. Comparison of somatic crossing over frequency in *Nicotiana tabacum* and three other crop species [J]. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 1976, 18:57-65
- [40] 陈纯贤,孙敬三. 植物体细胞无性系变异研究进展[J]. *生物学杂志*, 1994(3): 4-6
- [41] Peschke V M, Phillips R L, Gengenbach B G. Discovery of transposable element activity among progeny of tissue culture-derived maize plants[J]. *Science*, 1987, 238:804-807
- [42] Peschke V M, Phillips R L. Genetic implications of somaclonal variation in plants[J]. *Advances in Genetics*, 1992, 30:41-75
- [43] Chintapalli P, Moss J, Sharma K, Bhalla J. In vitro culture provides additional variation for pigeonpea [J]. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-plant*, 1997, 33:30-37
- [44] Guo W, Wu R, Zhang Y, Liu X, Wang H, Gong L, Zhang Z, Liu B. Tissue culture-induced locus-specific alteration in DNA methylation and its correlation with genetic variation in *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. f [J]. *Plant Cell Reports*, 2007, 26: 1297-1307
- [45] Asif M J, Othman R Y. Characterization of fusarium wilt-resistant and fusarium wilt-susceptible somaclones of banana cultivar rastali (*Musa* AAB) by random amplified polymorphic DNA and retrotransposon markers [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2005, 23:241-249
- [46] Larkin P J, Ryan S A, Brettell R I S, Scowcroft W R. Heritable somaclonal variation in wheat [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1984, 67:443-455
- [47] Gao D Y, Vallejo V, He B, Gai Y C, Sun L H. Detection of DNA changes in somaclonal mutants of rice using SSR markers and transposon display[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2009, 98:187-196
- [48] Phillips R L, Kaeppler S M, Olhoff P. Genetic instability of plant tissue cultures, breakdown of normal controls [J]. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 1994, 91:5222-5226
- [49] Brown P T H, Gobel E, Lorz H. RFLP analysis of *Zea mays* callus cultures and their regenerated plant [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1991, 81:227-232
- [50] Devaux, Hou L M, Ullrich S E, Huang Z X, Kleinhofs A. Factors affecting anther culturability of recalcitrant barley genotypes [J]. *Plant Cell Reports*, 1993, 13:32-36
- [51] Neelakandan A K, Wang K. Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications[J]. *Plant Cell Reports*, 2012, 31:597-620
- [52] Wang Q M, Wang L. An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection [J]. *Plant Cell Reports*, 2012, 31: 1535-1547
- [53] 孙振元,韩蕾,李银凤. 植物体细胞无性系变异的研究与应用[J]. *核农学报*, 2005, 19(6): 479-484
- [54] 石永顺,王艳秋,葛立平. 王立新利用植物体细胞无性系变异技术选育高粱优良品种[J]. *杂粮作物*, 2004, 24(3): 151-152
- [55] 张硕,张明方,杨景华. 体细胞无性系变异技术在园艺植物育种中的应用[J]. *北方园艺*, 2006, 5: 48-50
- [56] 林凤,王学英. 利用植物体细胞无性系变异技术选育高粱恢复系“011”的研究[J]. *中国生态农业学报*, 2006, 14(2): 37-39
- [57] 何盛莲,崔党群,陈军营. 体细胞无性系变异及其在小麦新种质创造中的应用[J]. *河南农业科学*, 2006, 2: 20-25
- [58] Jackson J A, Dale P J. Somaclonal variation in *Lolium multiflorum* L. and *L. temulentum* L. [J]. *Plant Cell Reports*, 1989, 8:161-164
- [59] Hanna W W. Induced mutations in Midiron and Tifway bermudagrass [C]. *Agronomy Abstracts*, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1990,175
- [60] Taliaferro C M. Somaclonal variation in regenerated bermudagrass plants [C]. *Agronomy Abstracts*, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1992,116
- [61] Byron L B, Charles R T. Regeneration and somaclonal variation in apomictic *Paspalum dilatatum* Poir [J]. *Euphytica*, 1993, 67:71-78
- [62] Chayaporn W, Peter D W. Effect of growth regulator on callus cell growth, plant regeneration and somaclonal variation of smooth bromegrass (*Bromus inermis* L.) [J]. *Euphytica*, 1993, 69:77-82
- [63] Roylance J T, Hill N S, Parrott W A. Detection of somaclonal variation in tissue culture regenerants of tall fescue [J]. *Crop Science*, 1994, 34:1369-1372
- [64] Cardona C A, Duncan R R. In vitro culture, somaclonal variation, and transformation strategies with paspalum turf ecotype [A]// Sticklen M B, Kenna M P. Turfgrass biotechnology-cell and molecular genetic approaches to turfgrass improvement. Michigan: Ann Arbor Press, MI, 1997. 229-236
- [65] Denise M Seliskar, John L Gallagher. Exploiting wild population diversity and somaclonal variation in the salt marsh grass *Distichlis spicata* (Poaceae) for marsh creation and restoration[J]. *American Journal of Botany*, 2000, 87(1):141-146
- [66] 卢少云,郭振飞,陈永传. 狗牙根的组织培养及其矮化变异体研

- 究初报[J]. 园艺学报, 2003, 30(4):482-484
- [67] Goldman J J, Hanna W W. Plant regeneration and an analysis of somaclonal variation from 'TifEagle' and 'TifSport' bermudagrass cultivars[J]. HortScience, 2004, 39(6):1381-1384
- [68] 彭丽梅, 孙振元, 赵梁军, 韩蕾, 钱永强. 多年生黑麦草愈伤组织航天搭载后再生株系生长性状的变异研究[J]. 核农学报, 2011, 25(4):645-651
- [69] 向佐湘, 刘明稀. 假俭草胚性愈伤组织分化及再生植株的变异研究[J]. 中国草地学报, 2012, 43(1):65-71
- [70] Ackerman E B. Enzymatic and physiological studies of low-temperature response in vegetative and somaclonal Pangola [R]. University of Florida, PHD, Dai-B 51/10, 1991:4645
- [71] Krans J V, Park S L, Tomaso-Peterson M, Luthe D S. In Vitro selection in *Agrostis stolonifera* var. palustris: heat tolerance and *Rhizoctonia solani* resistance [A]. In: Stieklen M B, Kenna M P, eds. Turfgrass biotechnology: cell and molecular genetic approaches to turfgrass improvement. Michigan: Ann Arbor Press, 1997:221-222
- [72] 柴明良, 王贺飞. 试管筛选耐盐的结缕草再生植株[J]. 科技通报, 2005(21), 5: 557-560
- [73] Lu S Y, Peng X X, Guo Z F, Zhang G Y, Wang Z C, Wang C Y, Pang C S, Fan Z, Wang J H. In vitro selection of salinity tolerant variants from triploid bermudagrass (*Cynodon transvaalensis* × *C. dactylon*) and their physiological responses to salt and drought stress [J]. Plant Cell Reports, 2007, 26:1413-1420
- [74] Lu S Y, Chen C H, Wang Z C, Guo Z F, Li H H. Physiological responses of somaclonal variants of triploid bermudagrass (*Cynodon transvaalensi* × *C. dactylon*) to drought stress [J]. Plant Cell Reports, 2009, 28:517-526
- [75] 王婷婷, 徐国荣, 张举仁, 杨爱芳. 细胞工程技术选育的草地早熟禾新种质的耐热性分析[J]. 草业学报, 2009, 18(2):60-65
- [76] 叶晓青, 张旭, 余建明, 张松凤, 黄益红, 童红玉. 百喜草体细胞低温筛选变异体 SRAP 分子标记[J]. 江苏农业学报, 2009, 25(5):552-557
- [77] 叶晓青, 余建明, 梁流芳, 张旭, 王松凤, 董民强, 吴瑛瑛. 海雀稗体细胞低温筛选获得耐寒突变体[J]. 草地学报, 2010, 18(1):97-102
- [78] 贾玉芳, 陈曙, 柴明良. γ 射线对沟叶结缕草愈伤组织再生和耐盐性的影响[J]. 草业学报, 2010, 19(5):25-30
- [79] 王小华, 庄南生, 王英, 高和琼, 韩平原. DES 诱变与离体培养结合筛选柱花草抗寒突变体的研究[J]. 草业学报, 2010, 19(5):25-30
- [80] 刘明稀, 卢少云, 郭振飞. 假俭草耐寒变异体的筛选及其生理鉴定[J]. 草地学报, 2011, 19(4):652-656
- [81] 刘明稀, 卢少云, 郭振飞. 假俭草抗旱变异体的筛选及其生理鉴定[J]. 草业学报, 2012, 21(1):126-132
- [82] 袁学军, 王志勇, 郑轶琦, 刘建秀, 余建明. 假俭草体细胞抗寒突变体的获得及其 SRAP 分子鉴定[J]. 草业学报, 2011, 20(6):237-244
- [83] Bouharmont J, Dekeyser A S, Jan V V, Dogbe Y S. Application of somaclonal variation and in vitro selection to rice improvement [M]. I RRI, Manila, Philippines, 1991:271-277
- [84] Bulk R W. Application of cell and tissue culture and in vitro selection for disease resistance Breeding-a review [J]. Euphytica, 1991, 56:269-285
- [85] Skipp R A, White D W R. Somaclonal variation in resistance of perennial ryegrass to crown rust [J]. Proceeding of New Zealand Grassland Association, 1988, 49:93-96
- [86] Croughan S S, Quisenberry S S. Enhancement of fall armyworm (Lepidoptera: noctuidae) resistance in bermudagrass through cell culture [J]. Journal of Economic Entomology, 1989, 82:236-238
- [87] Croughan S S, Quisenberry S S, Eichhorn M M, Croughan S S, Quisenberry S S, Eichhorn M M, Colyorr P D, Broun T F. Registration of Brazos-R3 bermudagrass germplasm [J]. Crop Science, 1994, 34:542
- [88] Chai M L, Lee J M, Park M H, Kim D H. In vitro selection for large patch resistance in zoysiagrass [J]. Journal of the Korean Society for Horticultural Science, 2001, 42(3):249-253
- [89] Lee H J, Lee G J, Kim D S, Kim B J, Ku J H, Kang S Y. Selection and Physiological Characterization of Glyphosate-tolerant Zoysiagrass Mutants Derived from a Gamma Ray Irradiation [J]. Korean Journal Horticultural Science and Technology, 2008, 26(4):454-463
- [90] Douglas L H, Wayne A P, Paul L R. Obtaining sethoxydim resistance in seashore paspalum [J]. Crop Science, 2010, 50:2632-2640
- [91] Chen S, Chai M L, Jia Y F, Gao Z S, Zhang L, Gu M X, Lin W D, Wang L P. In vitro selection of glyphosate-tolerant variants from long-term callus cultures of *Zoysia matrella* [L.] Merr [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2012, 111:199-207
- [92] 梁雪莲, 陈平, 黄冀, 余伟标, 姚冬梅, 张庚. 草坪草体细胞组织培养研究进展[J]. 北方园艺, 2006, (6):53-56
- [93] 丰先红, 李健, 罗孝贵. 植物组织培养中体细胞无性系变异研究[J]. 中国农学通报, 2010, 26(14):70-73
- [94] 李爱仙, 许亚东, 罗建平, 刘惠. 植物体细胞无性系变异的研究[J]. 北京农业, 2007, (11):11-15