

EMS 诱发大豆“南农 94-16”突变体库的扩建及部分突变体的 SSR 分析

陈远东,喻德跃

(南京农业大学大豆研究所 国家大豆改良中心 作物遗传与种质创新国家重点实验室,江苏 南京 210095)

摘要:甲基磺酸乙酯(EMS)是一种稳定、高效的诱发点突变的诱变剂。采用 EMS 处理大豆“南农 94-16”的种子,在初步构建大豆突变体库的基础上进一步扩建了大豆突变体库,获得 95 份茎、叶、花、种子等性状变异的突变材料。采用 200 对 SSR 标记分别对其中高蛋白、叶黄化等 9 个不同性状的突变体进行了鉴定。结果表明:与对照相比突变体发生了多位点的变异。构建的突变体库不但可以作为新的种质资源,而且可促进大豆功能基因组研究的开展。

关键词:EMS;大豆;突变体;SSR

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2009)04-0574-04

Construction of Mutant Pools for Soybean “Nannong 94-16” Induced by EMS and Analysis of SSR Marker on Several Mutants

CHEN Yuan-dong, YU De-yue

(Soybean Research Institute, Nanjing Agricultural University, National Center for Soybean Improvement, State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, Jiangsu, China)

Abstract: EMS is a stable and effective mutagen. In this study, soybean mutant pools were constructed by treating the seeds of soybean “Nannong 94-16” with EMS. These pools include 95 mutants of stem, leaf, cotyledon, flower and seed. In addition, 200 SSR primer pairs were used to characterize several mutants such as high-protein content mutant, revealing polymorphism between mutants and base materials. These mutant pools created for “Nannong 94-16” will be valuable for the research in breeding and functional genomics soybean.

Key words: EMS; Mutants; SSR; Soybean

诱变育种是运用物理因素和化学诱变剂诱导遗传变异,在较短时间内能获得有利用价值的突变体,创造新的种质资源并育成新的品种。诱变育种分为物理诱变和化学诱变。化学诱变就是通过化学诱变剂处理植物(通常是种子)来诱发突变。目前,使用较多的化学诱变剂是甲基磺酸乙酯(EMS)。EMS 是一种稳定的、高效的诱发点突变的诱变剂,而且是通过直接修

饰碱基的化学结构而改变 DNA 性质的^[1]。应用 EMS 诱变可以对作物品种进行快速改良^[2]。早在 20 世纪 60 年代,人们就已开始采用 EMS 水溶液处理植物种子,Neuffer 等^[3]将 EMS 溶于石蜡油中处理玉米花粉并获得成功。王永胜等利用 EMS 处理水稻,筛选出了一种水稻分蘖突变体^[4]。叶俊等

利用 EMS 溶液处理籼稻“9311”种子,新创建了籼稻“9311”突变体库^[5]。从 20 世纪 70 年代以来,大豆诱变育种也取得很大进展,创造出一批具有矮秆、早熟、高蛋白、抗病和耐盐碱等特点的优良突变系^[6-13]。采用 0.4% EMS 水溶液处理大豆“南农 94-16”种子,进一步鉴定这些突变体,并扩建了“南农 94-16”突变体库,可为大豆功能基因组学的研究提供较好的基础材料。

1 材料与方法

1.1 供试材料

大豆品种“南农 94-16”由南京农业大学国家大豆改良中心种质资源研究室提供。

收稿日期:2009-03-16

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(2004CB117206);国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(2006AA10Z1C1)。

作者简介:陈远东(1983-),男,硕士研究生,研究方向为植物基因工程。E-mail:chenyd0926@163.com。

通讯作者:喻德跃,教授,博士生导师。E-mail:dyyu@njau.edu.cn。

1.2 诱变处理方式

2005 年 6 月在南京农业大学国家大豆改良中心江浦试验场用 0.4 % EMS 处理种子 2 500 粒。纯水浸种约 4 h 后用 0.4 % 的 EMS 浸种 8 h,再用流水冲洗 1 h,风干后播种^[12]。

1.3 播种与收获

2005 年 6 月在南京农业大学国家大豆改良中心江浦试验场播种,出苗 705 株,10 月按单株收获;2006 年 6 月播种 M₁ 种子,M₂ 出苗 3000 株,10 月份按株行收获 M₂ 代种子 392 份和 49 份突变种子;2007 年 6 月将 392 份 M₂ 代种子和 49 份突变种子播种并进行验证,10 月收获 340 份 M₃ 代种子及去年观察到的 172 份突变种子;2008 年 6 月将 340 份 M₃ 代种子及去年观察到的 172 份突变种子播种并进行验证,10 月收获 337 份 M₄ 代种子及 95 份突变种子。

1.4 品质性状测定

对 M₃、M₄ 代种子利用近红外分析仪 (INFRA-TEC 1255 Food &Feed Analyzer) 进行蛋白质和油份含量测定。

1.5 突变体 SSR 鉴定

PCR 反应在 BioRad DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler 型 PCR 扩增仪上进行。设定 PCR 反应体系为 10 μ L,包含:模板 DNA 2.0 μ L (20 ng \cdot μ L⁻¹), 10 \times buffer 1.5 μ L, Mg²⁺ 0.8 μ L (25 mmol \cdot L⁻¹), dNTP 0.24 μ L (10 mmol \cdot L⁻¹), Taq 酶 0.16 μ L (5 U \cdot μ L⁻¹), 引物 2.0 μ L (5 μ mol \cdot μ L⁻¹), 用 ddH₂O 补齐至 10 μ L。PCR 反应程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,34 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min,12 $^{\circ}$ C 保温。大豆 SSR (Simple Sequence Repeat) 标记引物序列来源于 <http://soybase.ncgr.org/cgi-bin/ace/generic/home/soybase> 扩增产物在变性 8% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳,恒定功率 2 000 W,电泳 1 h。结束后用银染法显色条带,用 Bio2Rad Versa DOC 3000 凝胶成像系统扫描并记录电泳结果。

1.6 蛋白质和油份含量等的 t 分布测验

参照盖钧镒的方法进行^[14],数据按 t 分布测验两个样本成组数据的平均数比较分析。 t 分布测验用 SAS 软件计算完成。

1.7 表型性状调查

2006 年对 M₂ 代植株全生育期每 4 ~ 5 d 田间调查一次,2007 年对 M₃ 代植株全生育期每 4 ~ 5 d 田

间调查一次,2008 年对 M₄ 代植株全生育期每 4 ~ 5 d 田间调查一次,观察记载株形、株高、叶色、叶形、花色等性状。

2 结果与分析

2.1 诱变效应分析

“南农 94-16”种子经 0.4 % EMS 诱变,M₁ 代出苗率为 28.2 %,产生大量致死突变^[12]。M₁ 代植株表现为生长受到抑制,出现大量不育株,贪青晚熟,结荚少。虽然在后代可逐渐恢复,但是 M₂、M₃ 代出苗率并无大幅提高。直到 M₄ 代出苗率才稳定在 94.2% 的水平。有些突变性状则可能受环境影响较大,在 M₂、M₃ 代大量出现但在 M₃、M₄ 代基本没有表现出来,这说明诱变效应在后代并不是都能稳定表现。

2.2 表型性状分析

韩锁义等^[12]对 M₂ 代大豆突变体进行了初步分类,表 1 是在其基础上对扩建大豆突变体库获得的突变体表型性状的进一步分类。

M₂ 代突变材料份数为 101 份,M₃ 代突变材料份数为 290 份,M₄ 代突变材料份数为 95 份。可以看出 M₃ 代,M₄ 代突变类型种类丰富,尤其是 M₃ 代还出现了黑荚、大粒种子等突变性状。同时从表 1 可以看出,在突变类型中,叶突变种类最多,从叶形、叶色、叶片数到叶片感病都产生了变异,而花突变类型最少。种子性状突变有大粒、黑脐种子、种皮皱缩、绿色种皮等类型,而且这些种子突变性状遗传稳定,在 M₄ 代能够重复出现。此外,诱变群体中还产生了早熟、晚熟、不育、子叶,真叶底部长小叶等突变类型。

2.3 品质性状分析

2.3.1 百粒重 对照“南农 94-16”百粒重为 27.699 g,诱变群体 M₄ 代 305 份种子的百粒重为 19.548 ~ 38.061 g,最轻百粒重材料比对照小 8.151 g,即比对照减少 29.4%;最高百粒重材料比对照重 10.591 g,即比对照大 37.4%。

通过对最重百粒重突变材料与对照的百粒重 t 分布测验分析,当 $v = 4$, $t_{0.01} = 4.604$,现实得 $|t| = 75.171 > t_{0.01}$,故 $P < 0.01$ 。可以推断出最重百粒重突变材料与对照材料的百粒重的差异达到极显著水平,说明该突变体具有很强的可选择性。

表1 0.4% EMS 诱变获得突变体表型性状分类

Table 1 Category for phenotype characters of mutants treated with EMS(0.4%)

项目	变异性状	突变份数	突变份数
Item	Variation of characters	No. of mutant plants	No. of mutant plants
		(M ₃)	(M ₄)
茎 Stem	2 茎 Two- stem,3 茎 Three- stem	19	1
	绿茎 Green- stem	43	14
	矮茎 Dwarf	3	3
	白茎 White- stem	2	2
叶 Leaf	皱叶 Wrinkly	3	2
	窄叶 Narrow	10	6
	卷曲 Curly	2	1
	锈化 Rust	0	1
	黄化 Yellow	13	9
	单真叶 One- rough leaf	1	0
	叶片宽大 Wide	10	3
	叶椭圆形 Ellipse	2	0
	叶色深 Deep green,	13	3
	叶色浅 Light green		
	叶绿素缺失 Green deletion	0	4
子叶 Cotyledon	1 片子叶 One- cotyledon	2	2
	3 片子叶 Three- cotyledon	2	0
	子叶折叠 Curled- cotyledon	15	2
	子叶肥大 Wide- cotyledon	2	0
	子叶萎缩 Atrophic cotyledon	1	0
花 Flower	白花 White color	11	7
种子 Seed	大粒 Big seed	1	1
	黑脐 Black hilum	8	8
	种子皱缩 Wrinkled seed	3	3
	绿皮豆 Green seed coat	5	6
荚 Pod	黑色豆荚 Black pod	2	0
其他 Others	早熟 Early- maturity	1	0
	晚熟 Late maturity	2	1
	不育 Sterile	16	0
	早开花 Early- flower	1	0
	黄化苗 Etiolated seedlings	19	15
	白化苗 Albino plantlets	2	0
	子叶,真叶底部长小叶 Tiny leaves	76	1
	growing on cotyledon or rough leaves		

2.3.2 蛋白质和油含量 对照“南农 94-16”的蛋白质含量 47.63%,蛋白质油份总含量为 64.83%。诱变群体 M₃代 283 份种子的蛋白质含量为 42.1% ~53.0%,油含量为 14.8% ~24%,蛋白质油份总含量为 61.0% ~71.9%;诱变群体 M₄代 333 份种子的蛋白质含量 43.4% ~53.6%,油含量为 14.8% ~20.49%,蛋白质油总含量为 62.34 % ~69.15%。在这些材料中筛选出一份在 M₃代种子蛋白质含量 53.08%,蛋白质油份总含量为 69.28%,同时在 M₄代种子蛋白质含量 53.75%,蛋白质油份总含量为

69.15% 的高蛋白质含量突变材料,而且其 M₄代种子蛋白质含量和蛋脂总含量在 333 份种子中含量是最高的。这可以初步判断该突变材料为高蛋白突变材料。

通过该高蛋白突变体与对照的蛋白质含量 t 分布测验分析,当 $v = 4, t_{0.01} = 4.604$, 现实得 $|t| = 29.790 > t_{0.01}$,故 $P < 0.01$ 。可以推断出该高蛋白突变体与对照的蛋白质含量的差异达到极显著水平,说明该高蛋白突变体有进一步研究的价值。

2.4 高蛋白,绿色种皮,矮秆,黄化,大粒种子和绿茎突变体的基因组 SSR 标记

用 200 对 SSR 引物对高蛋白、绿色种皮、矮秆(2 份)、黄化(3 份)、大粒种子和绿茎突变体进行鉴定,结果表明 9 个突变体与对照存在不同程度的多态性,见表 2,而且引物多态性频率介于 1.5% ~4% 之间。有差异的 SSR 引物编号为 Satt077, BE347343, Sct064, Sat_190, Sat_196, Satt187, Sat_337, Sat_348, Satt699, BE806308, Satt578, BE820148, AW310961, Satt523, Satt513, Sat_244, Satt595, Satt431, Sat_009, Sat_245, Sat_003, Sat_421, BE823543, Sat_266, Sat_092, BF008905, Satt513, Sctt011, Satt197, Sat_150, Satt328, Satt699, Sat_292, Satt681, Sat_336, Satt270, Satt568。

表2 突变体 SSR 标记鉴定
Table 2 SSR screening for mutants

突变体	有多态的引物个数	有差异的 SSR 引物
Mutant	Polymorphic primers	SSR Primers
高蛋白	3	Sat_336, Satt270, Satt568
High- protein		
绿色种皮	6	Satt077, BE347343, Sct064, Sat_190, Sat_196, Satt187
Green seed coat		
矮秆 1 Dwarf 1	5	Sat_337, Sat_348, Satt699BE806308, Satt578
矮秆 2 Dwarf 2	4	BE820148, Satt523, Satt513Sat_244
叶黄化 1	8	Satt595, Satt431, Sat_009, Sat_245Sat_003, Sat_421, BE823543, Sat_266
Yellow leaf 1		
叶黄化 2	4	Sat_092, BF008905, Sat_421Satt578
Yellow leaf 2		
叶黄化 3	5	BE347343, Satt513, Satt328Sctt011, Satt197
Yellow leaf 3		
大粒种子	5	BE347343, Sat_150, Satt328Satt699, Sat_292
Big seed		
绿茎	6	BE347343, Satt681, Sat_244AW310961, Sat_266
Green stem		

其中引物 BE347343 在 4 个不同突变体中与对

照有多态性;Sat_421 在 2 个黄化突变体中与对照有多态性;Satt578 在 2 个黄化突变体中与对照有多态性;Sat_244 在 2 个茎突变植株中与对照有多态性;同时 Satt328、Sat_266 分别在 2 个不同性状突变体中与对照有多态性。

3 讨论

大豆种质资源研究是大豆遗传育种及其相关学科发展的基础^[16]。功能基因组学称为 post - genomics,即利用结构基因组学所提供的信息及产物,系统地研究基因的功能及调控机理的一门科学。分析基因功能最有效的方法就是构建饱和的基因突变群体,通过突变体分析鉴定基因功能^[17-18]。利用 EMS 等化学诱变剂可以在短时间内构建大量点突变群体,通过比较突变体与其对照在特定环境条件下基因表达的差异可以获取基因功能的重要信息。构建大豆的突变体库,集中各种特异性状,选育和创造近等基因系可以为基因功能的分析提供材料。本研究就是利用 EMS 诱变大豆“南农 94-16”种子,在韩锁义等^[12]的基础上扩建大豆突变体库并获得了 95 份突变材料,创造了新的大豆种质资源,也为大豆功能基因组的研究打下良好的基础。

从 2006~2008 年表型性状调查结果可以看到表型性状突变在 M₂、M₃、M₄ 代都大量出现,并且如种皮皱缩、绿皮豆等表型突变性状在 M₄ 代基本可以稳定遗传。但是 2 茎,3 茎,和子叶,真叶底部长小叶等突变材料大量出现而又在隔代大量消失的情况,说明这些突变材料可能是在人工诱变条件下,只是生理条件等受到伤害,并没有使基因发生变异,性状因此并不能稳定遗传。

SSR 标记以其众多优点被广泛应用于大豆研究中,SSR 标记的高多态性使得其对大豆遗传多样性研究具有相当优势,因此,采用 SSR 标记对高蛋白绿色种皮,矮秆,黄化,大粒种子和绿茎突变体进行了鉴定。结果表明这 9 个突变体与对照都有多态性出现。而 EST-SSR 引物 BE347343 同时在 4 个不同突变体中与对照有多态性,这说明引物 BE347343 很值得进一步深入研究,同时这也表明有多个基因位点与这些突变性状的表现有关,原因还需进一步研究。

百粒重、蛋白质和油含量是大豆重要的农艺性状。在百粒重方面,筛选出一个比对照重 37.4% 的突变体,但其在蛋白质,油含量上并不突出。在蛋白质,油含量方面筛选出一个蛋白质含量比对照高

6.12%,蛋白油总含量高 4.32% 的突变体。通过 t 分布测验分析,可以看出最重百粒重突变体与对照百粒重的差异达到极显著水平,同样高蛋白突变体与对照的蛋白质含量的差异也达到极显著水平。该高蛋白突变体经 SSR 标记研究,发现其与对照存在多态性,且有差异的引物分别处在 C2,I 和 H 连锁群上,这说明高蛋白突变体很可能不是单一基因位点发生突变,而是多个基因位点发生突变造成种子蛋白含量增大的,其相关研究还需进一步展开。

参考文献

- [1] 徐晋麟,徐沁,陈淳. 现代遗传学原理[M]. 北京:科学出版社,2001,647. (Xu J L, Xu L, Chen C. Principle of modern genetics [M]. Beijing: Science Press, 2001, 647.)
- [2] 王丕武,刘宗昭,杜丽梅,等. 大豆 EMS 诱变群体 M₂ 代主要性状遗传变异及相关研究[J]. 吉林农业大学学报,1991,2,1-5. (Wang P W, Liu Z Z, Du L M, et al. Studies on genetic variations and correlation of soybean characters in M₂ population by EMS [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 1991, 2, 1-5.)
- [3] Neuffer M G, Coe E H. Paraffin oil technique corn pollen with chemical mutagens[M]. Maydica, 1978.
- [4] 王永胜,王景,蔡业统,等. 一种水稻分蘖突变体的初步分析[J]. 热带亚热带植物学报,2001,9(4):341-344. (Wang Y S, Wang J, Cai Y T, et al. Preliminary analysis of a rice tiller mutant [J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2001, 9(4): 341-344.)
- [5] 叶俊,吴建国,杜婧,等. 水稻“9311”突变体筛选和突变体库构建[J]. 作物学报,2006,10:1525-1529. (Ye J, Wu J G, Du J, et al. The screening of mutants and construction of mutant population for cultivar “9311” in rice [J]. Acta Agronomica Sinica, 2006, 10: 1525-1529.)
- [6] 王培英,许德春,郭玉虹,等. 人工诱变改良大豆品质的研究[J]. 核农学报,2000,14(1):21-23. (Wang P Y, Xu D C, Guo Y H, et al. Induced mutation for soybean quality [J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2000, 14(1): 21-23.)
- [7] 郝再彬,吴东岚. 矮秆大豆突变体的获得[J]. 核农学报,2004,18(3):204-206. (Hao Z B, Wu D L. Obtaining of soybean dwarf mutant [J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2004, 18(3): 204-206.)
- [8] 于秀普,杜连恩,魏玉昌. EMS 诱发大豆突变可筛选高蛋白或高脂肪含量的种质资源[J]. 作物品种资源,1995(1):24-26. (Yu X P, Du L E, Wei Y C. EMS induces the soybean mutant screening high protein or the high oil content germplasm [J]. Crop Genetic Resources, 1995(1): 24-26.)
- [9] 余章清,张富厚,范占标,等. ⁶⁰Co γ 射线对大豆辐射后代性状变异的研究及应用[J]. 河南农业科学,1997(1):6-8. (Yu Z Q, Zhang F H, Fan Z B, et al. Studies on the radiation effect of ⁶⁰Co γ rays on the progeny soybean plant [J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 1997(1): 6-8.)

1995,23(4):304-306.)

[3] Gai J Y,Cui Z L, Ji D F. A Report on the nuclear cytoplasmic male sterility from a cross between two soybean cultivars[J]. Soybean Genetics Newsletter,1995,22:55-58.

[4] 孙寰,赵丽梅,黄梅. 大豆质-核互作不育系研究[J]. 科学通报,1993,38(16):1535-1536. (Sun H,Zhao L M,Huang M. Studies on cytoplasmic male sterile soybean line in soybean[J]. Science Bulletin,1993,38(16):1535-1536.)

[5] 孙寰,赵丽梅,黄梅. 大豆细胞质雄性不育系 ZA 的选育和初步研究[J]. 大豆科学,1998,17(3):268-270. (Sun H,Zhao L M,Huang M. The development and preliminary studies on cytoplasmic male sterile soybean line ZA[J]. Soybean Science,1998,17(3):268-270.)

[6] 张磊,戴欧和,黄志平,等. 杂交大豆杂优豆 1 号选育[J]. 大豆通报,2007(2):14-16. (Zhang L,Dai O H,Huang Z P,et al. Breeding of hybrid soybean Zayoudou No. 1[J]. Soybean Bulletin,2007,2:14-16.)

[7] 张磊,戴欧和. 大豆质核互作不育系 W931A 的选育研究[J]. 中国农业科学,1997,30(6):90-91. (Zhang L,Dai O H. Selection and breeding of nucleo- cytoplasmic male sterile line W931A in soybean[J]. Scientia Agricultura Sinica,1997,30(6):90-91.)

[8] 赵丽梅,孙寰,王曙明,等. 大豆杂交种“杂交豆 1 号”选育报告[J]. 中国油料作物学报,2004,26(3):15-17. (Zhao L M,Sun H,Wang S M,et al. Breeding of hybrid soybean Hybsoy 1[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences,2004,26(3):15-17.)

(上接第 577 页)

[10] 翁秀英,王彬如,吴和礼,等. 大豆辐射育种的研究[J]. 遗传学报,1974,1(2):152-160. (Weng X Y,Wang B R,Wu H L,et al. Research on soybean mutation breeding[J]. Acta Genetica Sinica,1974,1(2):152-160.)

[11] 李雪华. 大豆突变体库的初步构建及突变类型的鉴定[D]. 南京:南京农业大学,2003. (Li X H. Construction of soybean mutant pools and characterization of different mutant-types[D]. Nanjing:Nanjing Agricultural University,2003.)

[12] 韩锁义,杨玛丽,陈远东,等. 大豆“南农 94-16”突变体库的构建及部分性状分析[J]. 核农学报,2008,22(2):131-135. (Han S Y,Yang M L,Chen Y D,et al. Construction of mutant library for soybean “Nannong 94-16” and analysis of some characters[J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica,2008,22(2):131-135.)

[13] 韩锁义,张恒友,杨玛丽,等. 大豆“南农 86-4”突变体筛选及突变体库的构建[J]. 作物学报,2007,33(12):2059-2062. (Han S Y,Zhang H Y,Yang M L,et al. Screening of mutants and construction of mutant population in soybean“Nannong 86-4”[J]. Acta Agronomica Sinica,2007,33(12):2059-2062.)

[14] 盖钧镒,翟虎渠,胡蕴珠,等. 试验统计方法[M]. 北京:中国农业出版社,2000,81-84. (Gai J Y,Zhai H Q,Hu W Z,et al. Experimental statistics method[M]. Beijing:China Agriculture Press,2000,81-84.)

[15] Song Q J,Marek L F, Shoemaker R C. A new integrated genetic linkage map of the soybean[J]. Theoretical and Applied Genetics,2004,109:122-128.

[16] 冯峰,杨新泉. “大豆优异基因资源发掘及其基因组研究”立项背景和意义[J]. 中国科学基金,2003,6:335-338. (Feng F,Yang X Q. Exploration of excellent gene resources in soybean and their genomic studies[J]. Bulletin of National Science Foundation of China,2003,6,335-338.)

[17] 朱兴全,林瑞庆,宋慧群. 功能基因组学研究概述[J]. 中国兽医科技,2003,33(7):29-34. (Zhu X Q,Lin R Q,Song H Q. Progress on the functional genomics[J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology,2003,33(7):29-34.)

[18] 江树业. 水稻突变群体的构建及功能基因组学[J]. 分子植物育种,2003,1(2):137-150. (Jiang S Y. Rice mutant population and its applications on functional genomics[J]. Molecular Plant Breeding,2003,1(2):137-150.)