

质子辐射诱变玉米 M₂ 代形态变异与 RAPD 分析

边晓萌, 田安然, 耿金鹏, 丁兰, 龚佳梦, 胡金山, 曹天光* (河北工业大学理学院生物物理研究所, 天津 300401)

摘要 [目的]研究不同剂量质子辐射(PR)的白马牙玉米 M₂ 代的生长发育、形态和基因组 DNA 水平上的变异情况。[方法]对白马牙玉米干种子进行 5 种不同剂量的辐射处理, 研究 M₂ 代玉米生长状况, 采用 RAPD 分子标记技术研究 M₂ 代损伤和变异。[结果]发芽率随着剂量的增加先升高后降低, 20、30 Gy 处理的发芽率均高于对照, 20 Gy 处理最高; 空秆率随着剂量的增加呈先升高后降低再升高再降低的马鞍型曲线, 其中 20 Gy 和 50 Gy 处理最低, 40 Gy 处理空秆率最高, 达 29.4%; 光合速率 PR 组显著低于对照, 随着剂量的增加呈马鞍形曲线; 籽粒千粒重随着剂量的增加呈马鞍形曲线, 10、20 和 40 Gy 处理显著高于对照, 50 Gy 处理低于对照。综合考虑发芽率、空秆率、千粒重, 对白马牙玉米 M₂ 代产量的有益变异多的辐射剂量依次为 20、10 和 30 Gy。RAPD 试验分析中 16 条随机引物扩增出 142 条条带, 其中多态性条带 71 条, 多态性比例达 57.3%, 各 PR 组变异率为 20.2% ~ 32.3%; 各组在遗传相似度 0.73 附近处聚为 2 类, 10 Gy 组与 50 Gy 组聚为 1 类, 表明其变异程度较大, 其他组与对照聚为 1 类。[结论]该研究可为今后辐射诱变玉米产生有益变异和培育新品种提供辐射剂量的指导和参考, 也为拓展玉米种质奠定一定的基础。

关键词 质子辐射诱变; 玉米; 马鞍形曲线; RAPD 分析

中图分类号 S513 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)33-0149-04

The M₂ Morphological Variation and RAPD Analysis of Maize Irradiated by Proton

BIAN Xiao-meng, TIAN An-ran, GENG Jin-peng, CAO Tian-guang* et al (Institution of Biophysics, School of Science, Hebei University of Technology, Tianjin 300401)

Abstract [Objective] The growth and development, morphology and variation of genomic DNA level in the M₂ of maize were studied in different doses of proton radiation (PR). [Method] Maize seeds were irradiated by different doses of proton (10, 20, 30, 40, 50 Gy). We studied the growth status of M₂ of maize, and studied the M₂ damage and variation with RAPD molecular marker technology. [Result] The germination rate increased firstly and then decreased with the increase of the dose. The germination rate of 20 Gy and 30 Gy groups were higher than the control, and the 20 Gy group's was the highest. The empty bar rate was a saddle shaped curve, the minimum was at 20 Gy and 50 Gy, the highest was at 40 Gy and up to 29.4%. The photosynthetic rate of the maize of irradiation groups was significantly lower than the control, it showed saddle shaped curve with the dose increasing. The thousand-grain weight also showed saddle shaped curve with the dose increasing, its values of the groups of 10 Gy, 20 Gy and 40 Gy were significantly higher than the control and the minimum was at 50 Gy. Comprehensive considering the germination rate, the empty bar rate and the thousand-grain weight, the radiation dose of producing useful variation of maize M₂ generation was in the order 20, 10 and 30 Gy. 16 random primers were used on Random Amplified Polymorphic DNA, called RAPD experiment. All primers amplified 142 bands, 71 polymorphism bands. The polymorphism bands ratio reached 57.3%, and the variation rate of irradiation group was between 20.2% and 32.3%. The result of genetic similarity clustering analysis showed that those groups were clustered into two categories. One included the 10 Gy group and the 50 Gy group, and the variation was high. The other included the 20, 30 and 40 Gy groups and the control. [Conclusion] These works can provide a guidance and reference of radiation dose for the radiation induced maize to produce beneficial mutations and cultivate new varieties, and may lay a certain foundation for expanding the maize germplasm.

Key words Proton radiation mutation; Maize; Saddle shaped curve; RAPD analysis

玉米为一年生禾本科草本植物, 是目前全世界总产量最高的粮食作物, 也是我国第一大农作物。除食用外, 玉米深加工产业处于快速增长阶段, 现阶段的玉米生产不能满足日益增长的需求, 然而提高玉米种植面积已经非常困难, 这就需要培育新的单产高的玉米品种。玉米种质资源是玉米育种的物质基础, 而玉米种质资源的遗传脆弱性, 已成为制约玉米育种发展的“瓶颈”因素。玉米种质扩增、改良和创新已成为其育种研究的重要发展方向^[1]。近年来, 随着辐射诱变技术迅速发展, 越来越多的研究将这项技术应用到植物育种方面。对玉米的辐射诱变手段主要是采用重离子^[2-3]、 γ 射线^[4]以及航天搭载^[5]等。质子辐射生物效应的研究一直以哺乳动物及其细胞材料为主, 在医学领域应用较多^[6]。20 世纪 90 年代研究人员才开始用质子辐照植物种子, 唐掌雄

等^[7]利用质子辐射麦类种子发现, M₁ 代苗高和根长的变化与辐照剂量和射线能量有关; 王彩莲等^[8]用质子辐照水稻, 获得了矮秆和千粒重增加等有益突变的新材料; 孙逊等^[9]利用质子束处理甜瓜种子发现, 质子束处理对细胞染色体有一定的致畸效应, 致畸类型以微核比例较高, 并经 6 代选育获得了甜瓜早熟品种; 施巾帼等^[10]研究质子对小麦的诱变效应发现, 不同能量的质子对小麦 M₁ 代生物损伤效果不同, 能量越高损伤越严重, 至 6 MeV 时损伤达到最大后随能量的提高又有所降低。目前质子辐射植物的生物效应主要集中在形态学、细胞学、生理损伤等方面, 而采用随机引物扩增多态性 DNA 分子标记技术(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)对质子辐射诱变玉米的相关研究较少^[11-12]。

该研究利用中国原子能科学研究所的串列加速器产生的质子对白马牙玉米干种子进行了 5 种不同剂量的辐射处理, 研究了 M₂ 代玉米生长状况, 采用 RAPD 分子标记技术研究了 M₂ 代损伤和变异, 为进一步辐射诱变玉米产生有益变异提供辐射剂量的试验数据和参考, 为拓展种质资源和培育玉米新品种提供参考, 也为探索质子辐射诱变玉米的理论机制提供试验依据。

基金项目 河北省高等学校科学技术研究项目(ZD2017023)。

作者简介 边晓萌(1992—), 女, 河北石家庄人, 硕士研究生, 研究方向: 辐照生物学。* 通讯作者, 副研究员, 从事辐射育种等研究。

鸣谢 感谢中国原子能科学研究所北京串列加速器核物理国家实验室和隋丽副研究员、孔福全副研究员在质子辐射试验上提供的帮助。

收稿日期 2017-09-06

1 材料与与方法

1.1 材料 供试材料是由河北省迁安市隆兴农业科技示范场提供的白马牙玉米干种子,经质子辐射(PR)后播种,采集二代(M₂)的玉米叶片,以未经质子辐射(0 Gy)的玉米种子播种采集的二代叶片作为对照(CK)。

1.2 诱变处理 采用中国原子能科学研究院串行加速器国家实验室的串行加速器(HI-13)对玉米种子进行质子辐射,辐射剂量分别为10、20、30、40、50 Gy。

1.3 光合速率测定 在37℃下于生长发育期选取生长一致、无病虫害的成熟叶片,测得净光合速率,在同一时间每个处理组测8株,取其平均值作为此处理组的光合速率。试验使用的是北京益康农科技有限公司的ECA-PB0402光合测定仪。

1.4 RAPD分子标记

1.4.1 DNA提取及有关检测。采用TIANGEN公司的DNA提取试剂盒,提取玉米PR组及对照的DNA,经凝胶电泳成像系统(1%琼脂糖凝胶)检测,观察DNA的完整性。随后采用紫外分光光度计对所提取的样品逐一进行吸光度检测,DNA样品的OD₂₆₀/OD₂₈₀的值均为1.8~2.0,DNA纯度较好。

1.4.2 体系优化及引物筛选。采用25 μL体系优化,优化结果:10.8 μL超纯水、2.5 μL Buffer、2.5 μL Dye、2 μL dNTP、4 μL引物、1.2 μL Taq酶、2 μL DNA模板。进一步以对照的DNA为模板,选用140种随机引物在一定条件下逐一扩增,后采用凝胶电泳成像系统(1.5%琼脂糖凝胶)检测,观察扩增结果,选出条带稳定性好、清晰度高、带型丰富的16条随机引物备用(表1)。

表1 选用随机引物序列

Table 1 The sequence of selected primers

引物编号 Primer No.	序列(5'—3') Primer sequence (5'—3')	引物编号 Primer No.	序列(5'—3') Primer sequence (5'—3')
A1	CAGGCCCTC	F14	TGCTGCAGGT
A2	TGCCGAGCTG	F15	CCAGTACTCC
A10	GTGATCGCAG	G10	AGGGCCGTCT
B1	GTTTCGCTCC	H18	GAATCGGCCA
B6	TGCTCTGCCC	J18	TGGTGCAGA
B7	GGTGACGCAG	J20	AAGCGGCCTC
F4	GGTGATCAGG	N16	AAGCGACCTG
F5	CCGAATTCCC	N18	GGTGCAGTCA

1.4.3 PCR扩增。采用美国Bio公司的实时定量基因扩增仪进行DNA扩增。使用上一步骤中优化后的体系;扩增程序:95℃ 5 min;94℃ 1 min;36℃ 1 min;72℃ 90 s;35个循环,72℃ 10 min,4℃保存;扩增产物在含有EB的1.5%琼脂糖凝胶中进行电泳分离,电泳缓冲液为1×TAE,最后用凝胶成像系统拍照记录结果。

1.5 统计分析 采用SPSS软件的单因素方差分析和LSD多重比较对光合速率测定结果进行数据分析。

根据RAPD随机引物扩增产物电泳图结果,扩增阳性记为1,扩增阴性记为0,建立数据库。采用NTsys软件对各处理组玉米进行聚类分析。各统计量定义如下:多态性条带比例=多态性条带数/对照扩增条带数×100%;种子发芽率=

发芽种子粒数/供试种子粒数×100%;空秆率=空秆株数/成活总株数×100%。

2 结果与分析

2.1 玉米M₂代种子发芽率和空秆率 发芽率能够更直观地显示种子的出苗状况,玉米的空秆率可直接影响其产量高低,这2项数据对准确估算玉米产量影响较大。PR组以及对照各播种20粒种子,统计其发芽率和空秆率,结果如图1所示。随剂量增加发芽率先增高后降低,PR 10 Gy处理与对照相同,为90%,20、30 Gy处理高于对照,20 Gy处理发芽率最高,40、50 Gy处理低于对照。随剂量增加空秆率呈现先升高(10 Gy)后降低(20 Gy)再增高(40 Gy)又降低(50 Gy)的马鞍型曲线,其中40 Gy处理空秆率高达29.4%,20、50 Gy处理空秆率为0。

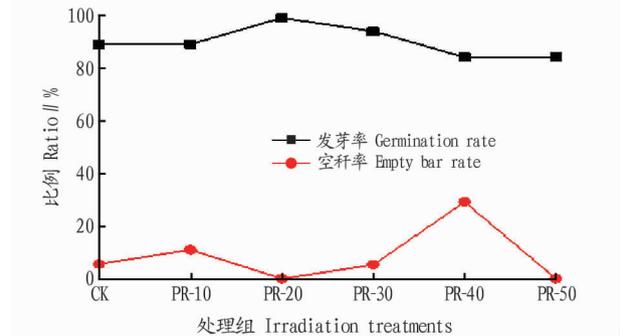


图1 质子不同剂量辐射玉米的发芽率和空秆率

Fig. 1 Germination rate and empty bar rate of different irradiation treatments

2.2 玉米M₂代主要性状及产量变异 穗高比(穗部高与株高之比)能在一定程度反映植株的抗倒伏能力,千粒重是体现种子大小与饱满程度的一项指标,也是田间预测产量时的重要依据。测量玉米的株高、穗位、千粒重,计算穗高比,并采用统计软件进行显著性分析,结果见表2。由表2可知,随剂量增加,株高先降低后增高,其中20 Gy处理株高显著降低;穗位无显著变化;穗高比先增高后降低再增高,20 Gy处理穗高比显著增加;千粒重先增高后降低再增高再降低,除50 Gy处理偏低外其他组都有所增加,其中10、20、40 Gy处理较其他处理显著增加。

2.3 玉米光合速率情况 光合作用提供植物生长发育所需的物质和能量,是作物产量形成的基础。该试验白马牙玉米光合速率的测量结果如图2所示。结果表明,随剂量的增加,光合速率先降低后增加再降低又增加,PR组的光合速率均显著低于对照组。

2.4 基因组DNA多态性 在该试验反应条件下,16条随机引物(表1)对PR不同剂量组和处理进行RAPD-PCR扩增,共扩增出142条条带,扩增产物为200~3 000 bp,其中多态性条带71条,多态性比例为57.3%。RAPD结果显示,16个引物扩增均出现不同程度多态性,主要表现为扩增条带的缺失、增加和深浅的变化。部分电泳结果见图3,其中箭头所指为条带的缺失或增加,引物A2在800~1 200 bp时,10、20 Gy处理各增加1条,50 Gy处理增加2条;引物A10在800~

1 200 bp 时,50 Gy 处理缺失 1 条,500 ~ 800 bp 时,10、50 Gy 处理各增加 1 条,20、30、40 Gy 处理各增加 1 条。

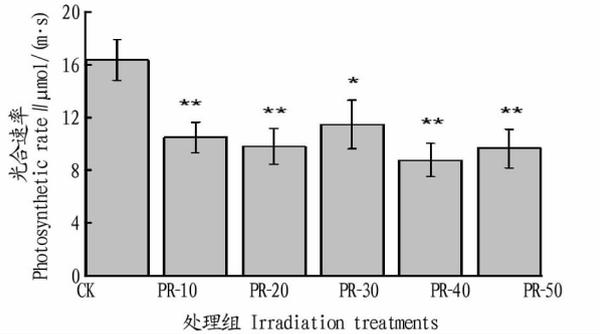
表 2 玉米 M₂ 代形态性状及产量统计

Table 2 The M₂ morphological characters and grain yield of maize

处理组 Irradiation treatments	样本容量 Sample size	株高 Plant height//cm	穗位 Ear height//cm	穗高比 Ear height ratio	千粒重 1 000-grain weight//g
CK	20	257 ± 2.84	111 ± 2.01	0.431 ± 0.004 26	567 ± 1.93
PR - 10	20	256 ± 3.73	110 ± 2.01	0.431 ± 0.005 23	654 ± 6.80*
PR - 20	20	244 ± 4.88*	110 ± 2.28	0.451 ± 0.004 46*	643 ± 3.82*
PR - 30	20	249 ± 4.21	108 ± 2.07	0.432 ± 0.005 02	582 ± 7.64
PR - 40	20	253 ± 3.48	109 ± 2.08	0.432 ± 0.003 63	619 ± 7.05*
PR - 50	20	256 ± 2.96	113 ± 1.93	0.441 ± 0.003 54	557 ± 1.38

注: * 表示差异显著(P < 0.05)

Note: * indicated significant differences(P < 0.05)



注: * 表示差异显著(P < 0.05), ** 表示差异极显著(P < 0.01)

Note: * indicated significant differences(P < 0.05), ** indicated extremely significant differences(P < 0.01)

图 2 质子不同剂量辐射处理的光合速率

Fig. 2 The photosynthetic rate of different irradiation treatments

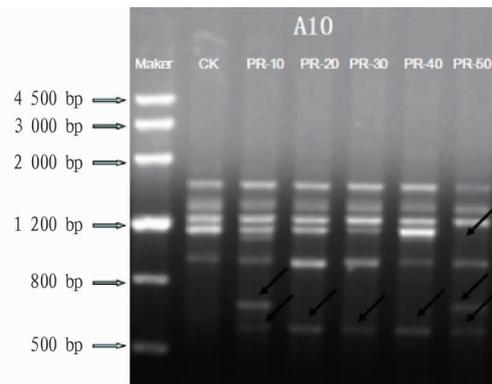
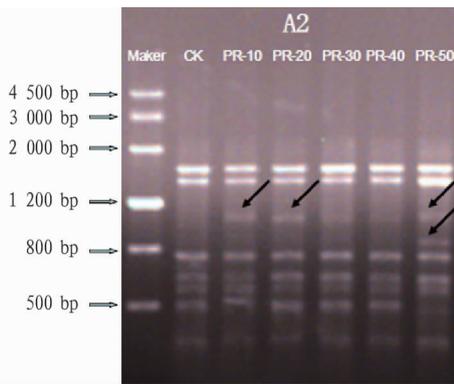


图 3 随机引物 A2、A10 号扩增结果

Fig. 3 The amplification results of the random primers A2 and A10

表 3 不同辐射处理玉米的 DNA 多态性

Table 3 DNA polymorphism of maize of different irradiation treatments

处理组 Irradiation treatments	对照扩增条带数 Contrast amplification bands	多态性条带数 Polymorphism bands number	多态性条带比例 Polymorphism bands ratio//%
CK	124	—	—
PR - 10	—	40	32.3
PR - 20	—	25	20.2
PR - 30	—	30	24.2
PR - 40	—	29	23.4
PR - 50	—	39	31.5

为研究不同处理组对玉米遗传物质的影响,统计了各处理组的多态性比例。由表 3 可知,PR 组的多态性比例为 20.2% ~ 32.3%,呈现出随剂量的增加先增高后降低再增高的趋势。10、50 Gy 处理明显高于其他剂量组,表明其变异程度较大。20 Gy 处理多态性最低。结果表明,质子辐射的二代白马牙玉米在基因水平上变异明显,在基因多态性上表现出马鞍型曲线关系。

基于遗传相似度,利用 NTsys 软件做聚类分析,结果见图 4。由图 4 可知,遗传相似度 0.73 附近处聚为 2 类,其中质子 20、30、40 Gy 处理组与对照聚为 1 类,质子 10 Gy 与质子 50 Gy 处理聚为 1 类。

3 结论与讨论

该研究对白马牙玉米种子经质子辐射后的 M₂ 代种子萌发情况和植株生长中出现空秆情况做了统计,发芽率在 0 ~

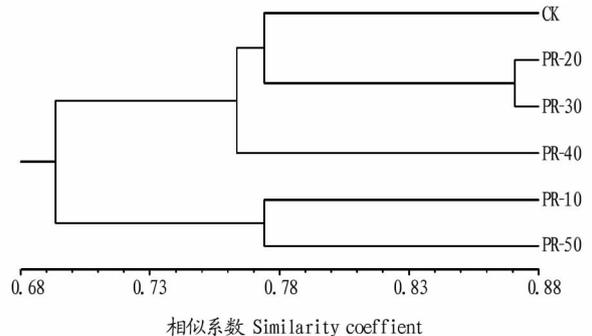


图 4 不同处理组之间聚类结果

Fig. 4 Clustering result of different irradiated groups

50 Gy 剂量时随着剂量的增加先升高后降低,10 Gy 处理与对照相同,为 90%,20、30 Gy 处理均高于对照,20 Gy 处理发芽率最高为 100%,40、50 Gy 处理低于对照。空秆率随着剂量增加,在 0~50 Gy 时呈现先升高(10 Gy)后降低(20 Gy)再增高(30、40 Gy)又降低(50 Gy)的马鞍型曲线,其中 40 Gy 处理空秆率显著增加,达 29.4%,20、50 Gy 处理无空秆出现。籽粒千粒重随着剂量的增加,在 0~50 Gy 时呈马鞍形曲线,10、20 和 40 Gy 处理显著高于对照(分别较对照增高 15.3%、13.4% 和 9.2%),50 Gy 处理低于对照。综合考虑发芽率、空秆率、千粒重,白马牙玉米 M₂ 代的产量由高到低依次为处理 20、10、30、0(CK)、50 和 40 Gy。对白马牙玉米产量提高的有益变异多的辐射剂量可能为 20、10、30 Gy,这可以作为质子辐射诱变玉米和下一步研究的参考剂量。

对质子辐射后玉米光合速率测定的结果显示,辐射组的光合速率在 0~50 Gy 时随剂量的增加先降低后增加再降低又增加,且辐射组显著低于对照组。唐掌雄等^[7]利用质子辐射麦类种子发现 M₁ 幼苗出现条状叶绿素缺失的现象。赵洪兵等^[13]研究空间环境诱变小麦叶绿素缺失突变体的光合特性,发现小麦叶绿素缺失突变体的光合作用受到显著影响。是否为质子辐射白马牙玉米产生叶绿素缺失进而影响光合速率,需要进一步试验研究。

辐射处理植物干种子可对其产生非遗传生理损伤和基因突变。该研究 RAPD 试验结果中质子辐射 10 Gy 的多态性条带比例最高,为 32.3%,其次是质子 50 Gy,为 31.5%,其他组比例均在 20% 以上,可见质子辐射在白马牙玉米二代植株分子水平上发生明显变异。根据遗传相似性聚类分析结果显示,各组在遗传相似度 0.73 附近处聚为 2 类,质子 10 Gy 与 50 Gy 聚为 1 类,其他组为 1 类。该试验中质子 10、50 Gy 与对照的遗传距离较远,变异程度较大,结合聚类分析及多态性条带比例考虑,质子 10 Gy 与 50 Gy 影响变异效果相近,

且变异率较高。

综上所述,质子辐射白马牙玉米的 M₂ 代,空秆率、籽粒千粒重和光合速率随剂量增加在 0~50 Gy 时呈现马鞍型曲线。对白马牙玉米产量提高的有益变异多的质子辐射剂量依次为 20、10、30 Gy。RAPD 及聚类分析结果显示质子 10 Gy 与 50 Gy 聚为 1 类,变异率较高。这可以为质子辐射诱变玉米提高产量、最优剂量培育玉米新品种、拓展玉米种质提供参考,为进一步研究辐射引起植物变异的机理和马鞍型曲线产生的机理提供一定的基础试验数据。

参考文献

- [1] 杨培珠,钟国祥,谢虹,等. 玉米种质资源的背景与利用现状[J]. 中国农学通报,2011,27(5):25-28.
- [2] 陈学君,李文建,陈婧,等. 不同剂量重离子辐照玉米自交系的生物学效应比较[J]. 原子核物理评论,2008,25(2):176-181.
- [3] PICKERT M, GARTENBACH K E, KRANZ A R. Heavy-ion induced mutations in genetic effective cells of a higher-plant[J]. Adv Space Res, 1992, 12(2/3):69-72.
- [4] 石海春,李奇,柯永培,等.⁶⁰Co- γ 射线对自交系 R08 和 48-2 的诱变效应[J]. 西南农业学报,2011,24(5):1636-1641.
- [5] 乔晓,石海春,柯永培,等. 玉米航天诱变 SP₃ 株系的遗传变异分析[J]. 玉米科学,2012,20(3):15-21.
- [6] TARASENKO N O. Comparative mutagenic effectiveness of physical factors on plants[J]. Zhurnal, 1985, 3:55-65.
- [7] 唐掌雄,施巾幅,巩玲华,等. 质子辐照麦类种子对苗期生长的影响[J]. 核农学通报,1997,18(6):260-262.
- [8] 王彩莲,陈秋方,慎政. 空间环境和质子对水稻的诱变效应[J]. 中国核科技报告,1998(00):1-11.
- [9] 孙逊,任瑞星,施巾幅,等. 质子束(H⁺)处理甜瓜种子的辐射生物学效应和利用研究[J]. 核农学报,2006,20(4):318-320.
- [10] 施巾幅,孙国庆,李桂英,等. 质子对小麦的诱变效应及作用机理研究 I. 质子对小麦的诱变效应[J]. 核农学报,2002,16(2):65-69.
- [11] JIANG K M, FAN J H, LIU Q, et al. Phylogenetic analysis among maize *Exserohilum turcicum* isolates from Yunnan Province by RAPD[J]. Agricultural biotechnology, 2013, 2(1/2):20-23.
- [12] 罗红兵,孔福全,嵇楠,等. 重离子辐照玉米种子引起的基因组 DNA 变异分析[J]. 激光生物学报,2009,18(5):755-759.
- [13] 赵洪兵,郭会君,赵林妹,等. 空间环境诱变小麦叶绿素缺失突变体的主要农艺性状和光合特性[J]. 作物学报,2011,37(1):119-126.
- [14] 倪志华,张玉明,周艳芬. 一株中性嗜盐菌 *Halobacillus dabanensis* N522 的分离鉴定及其抗菌活性研究[J]. 生物技术通报,2016,32(5):158-164.
- [15] 贾立平,顾云杰,姚和雨. 大庆地区盐碱土改良利用初探[J]. 北方园艺,2000(2):47-48.
- [16] 王钱福. 嗜盐菌的分离及其多相分类学研究[D]. 兰州:兰州大学,2007.
- [17] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京:中国农业出版社,1999.
- [18] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [19] 阎松,张翼,王珊珊. 抗生活性中度嗜盐菌的筛选及菌种鉴定[J]. 大连交通大学学报,2015,36(S1):115-118.
- [20] 陈书华,李梅,蒋细良,等. 防治人参锈腐病木霉菌的筛选及防治效果[J]. 中国生物防治学报,2016,32(2):265-269.
- [21] KIM S L, SHIM J O, SHIN H S, et al. Suppressive mechanism of soil-borne disease development and its practical application. Isolation and identification of species of *Trichoderma* antagonistic to soil diseases and its activities in the rhizosphere[J]. Korean J Mycology, 1992, 20(4):334.
- [22] 孙卓,杨利民. 人参锈腐病生防细菌的筛选及鉴定[J]. 中国生物防治学报,2015,31(4):536-542.
- [23] MATAR S M, EL-KAZAZ S A, WAGIH E E, et al. Antagonistic and inhibitory effect of *Bacillus subtilis* against certain plant pathogenic fungi[J]. Biotechnology, 2009, 8(1):53-61.

(上接第 145 页)

人参药用价值较高,根部是其药用部位,生物防治意义重大。可将获得的 3 株菌应用到人参锈腐病的后续试验中,为大庆地区盐碱土中嗜盐碱菌在植物病害生物防治和人参锈腐病生物防治方面的进一步应用提供菌株来源。

参考文献

- [1] LEI Z C, QIU P, YE R Y, et al. *Bacillus shacheensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a saline-alkalisoil[J]. The journal of general and applied microbiology, 2014, 60(3):101-105.
- [2] ZHAO B S, WANG H, MAO X W, et al. *Halomonas xianhensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a saline soil contaminated with crude oil[J]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2012, 62(1):173-178.
- [3] 王蓓,牛世全,达文燕,等. 河西走廊盐碱土壤中抗立枯丝核菌的放线菌筛选[J]. 生物技术通报,2014(1):156-160.
- [4] 马玥,来航线,韦小敏,等. 新疆荒漠盐碱环境中抗动物病原菌的放线菌筛选与鉴定[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2013,41(3):133-140.
- [5] 陈雷,王光玉,卜同,等. 一株中度嗜盐细菌 whb45 的鉴定及其抗菌与抗肿瘤活性筛选[J]. 微生物学通报,2010,37(1):85-90.