

玉米和拟南芥的原生质体制备及瞬时表达体系的研究

赵苏州^{1,2}, 卢运明³, 张占路³, 赵杨敏³, 王磊^{1,2*}

(1. 西南科技大学生命科学与工程学院, 四川绵阳 621010; 2. 中国农业科学

院生物技术研究所, 北京 100081; 3. 深圳农科集团, 广东深圳 518040)

摘要 [目的]优化玉米和拟南芥原生质体的制备条件及瞬时表达体系。[方法]以不同时期玉米叶片和拟南芥为材料分离原生质体, 通过对不同酶浓度、解离时间和渗透压的研究, 优化最佳分离原生质体体系; 原生质体再经 PEG 介导的转化, 通过 GFP 基因表达百分比鉴定原生质体活性和转化效率。[结果]玉米和拟南芥原生质体分离的最佳条件为: 纤维素酶 1.5%, 离析酶 0.5%; 拟南芥酶解 4 h, 甘露醇浓度 0.4 mol/L; 玉米酶解 6 h, 甘露醇浓度 0.45~0.50 mol/L。最佳生长期为: 拟南芥 6~8 片叶; 玉米二片叶。用去内毒素质粒经 PEG (玉米 30% PEG, 拟南芥 40% PEG) 诱导转化置于黑暗下培养, 原生质体活性和转化效率较高, 原生质体中可以观察到明显的 GFP 荧光。[结论]玉米和拟南芥原生质体的制备受酶浓度、解离时间和渗透压的影响, 在原生质体转化过程中, 质粒 DNA 纯度, PEG 浓度等是影响转化效率的关键因素, 与拟南芥原生质体相比玉米原生质体要稳定性差一些。

关键词 玉米; 原生质体; 拟南芥

中图分类号 S513; Q819 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2014)12-03479-04

Protoplast Preparation and Transient Expression System in Maize and Arabidopsis

ZHAO Su-zhou, WANG Lei et al (School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang, Sichuan 621010; Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract [Objective] To optimize the preparation conditions of maize and Arabidopsis protoplasts and transient expression system. [Method] Maize and Arabidopsis leaves at different development periods were used to dissociate protoplasts, the enzyme concentrations, dissociation time and osmotic pressure were investigated and optimized using GFP expression system to identify protoplast activity and transformation efficiency. [Result] The best conditions for protoplasts isolation were that 1.5% cellulase enzyme, 0.5% macerozyme and 0.4 mol/L mannitol, digested for 4 hours for Arabidopsis; 0.45-0.50 mol/L mannitol, digested for 6 hours for maize. The best development periods were 6-8 leaves Arabidopsis and two-leaf corn. Endotoxin-free plasmid were used for transformation with PEG (maize 30% PEG, Arabidopsis, 40% PEG) and cultured dark. GFP fluorescence was obviously observed in protoplasts. [Conclusion] Preparation of maize and Arabidopsis protoplasts was affected by the enzyme concentration, the dissociation time, the leaves and osmolality. For protoplast transformation, purity of plasmid DNA, PEG concentration was important factor for transformation efficiency. Compared with Arabidopsis, the stability of maize protoplasts was poor.

Key words Maize; Protoplast; Arabidopsis

植物原生质体是指植物细胞通过机械或酶解等特殊方法脱去细胞壁后, 留下的裸露、具有生活力、被细胞膜所包围的原生质团。原生质体由于没有细胞壁, 可相对容易摄取外源 DNA、质粒、病毒颗粒等外源遗传物质, 是进行遗传转化的理想受体; 同时, 原生质体也是获得细胞无性系和选育突变体的优良起始材料; 还可通过诱导形成杂种细胞, 为创造新杂种开辟了途径。酶解法作为现在最常用的方法, 通过纤维素酶和离析酶将植物细胞裂解为均一的单细胞体系, 能获得完整和高活性的原生质体^[1-2]。纯化后植物原生质体可按既定方向进行培养, 使原生质体适合于遗传转化、细胞融合、生理研究、体胚发生、器官发生等操作^[3]。因此, 原生质体的制备是其中最关键的一部, 如何获得完整且活性较高的原生质体是各项工作的起始。在植物快速繁殖、植物远缘遗传重组、转基因以及品种改良和创造新类型等方面具有广阔的应用前景。

原生质体作为常用的植物瞬时表达系统, 植物中瞬时表达系统具有检测速度快、转化简单等特点, 结合报告基因 RFP、YFP、GUS^[4]、GFP^[5]、EGFP^[6] 等的使用, 该技术被广泛地用于基因功能分析的研究, 如基因表达、蛋白亚细胞定位、

染色质免疫沉淀、蛋白活性检测以及蛋白间互作等^[7]。原生质体瞬时表达系统相继建立, 为研究蛋白的亚细胞定位和基因的表达调控提供了方便而有效的试验系统。玉米和拟南芥原生质体转化体系可以对研究基因的功能和调控途径的研究具有重要意义。笔者用玉米和拟南芥相互对照分离和纯化, 以期获得高产接高活力的原生质体, 再通过 PEG 介导转化的方法, 成功建立玉米和拟南芥叶肉原生质体较高效的瞬时表达系统。

1 材料与方法**1.1 材料**

1.1.1 研究对象。选取玉米 (*Zea mays* L.) 自交系宗 31 饱满的种子, 用 10% 过氧化氢消毒, 用灭菌水冲洗 3 次置于发芽机, 生长 5 d, 待胚芽长至约 2 cm, 移置营养土中, 置于温室培养 1 周左右, 长至 2 叶期和 3 叶期, 选取第 2 片伸展的叶子作为提取玉米原生质体的材料。

1.1.2 主要试剂。氯化钠、氯化镁、氯化钙、甘露醇、葡萄糖、MES、PEG 4000, 购自 Sigma 公司; Cellulase R10 和 Macerozyme R10, 均购自 Japan Yakult Honsha, Tokyo; 金牌超量无内毒素质粒大提试剂盒 (Lot: 00071309), 购自北京康为世纪生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 原生质体的制备。拟南芥先用无水乙醇洗 5 min, 然后再用 75% 的乙醇加 0.1% Triton-100 洗 3 min, 分别用 95%

基金项目 国家转基因生物新品种培育重大专项 (2011ZX08003-002)。**作者简介** 赵苏州 (1988-), 男, 山东临沂人, 硕士研究生, 研究方向: 植物转录因子。* 通讯作者, 研究员, 博士, 从事植物基因沉默研究。**收稿日期** 2014-04-14

乙醇再洗1遍,晾干后播种与1/2MS中,在温度22℃/18℃光照14/10h周期下7d左右,移栽至营养土中,分别取到8~10片叶和12~14片叶期的拟南芥,取拟南芥叶片作为原生质体。

1.2.2 质粒提取。pCAMBIA1303表达框由花椰菜花叶病毒(CaMV)35S启动子、GFP报告基因、胭脂碱合成酶终止子(NOS)构成。按照说明书用康为世纪无内毒素质粒大提试剂盒抽提质粒,-20℃保存备用。

1.2.3 酶液配置。取0.5%~2.0%纤维素酶R-10,0.5%~1.5%离析酶R-10,0.3~0.6mmol/L D-甘露醇,20mmol/L KCl,20mmol/L MES(pH 5.7)混合液置于55℃水浴10min,冷却至室温后,加入10mmol/L CaCl₂,0.1% BSA,并用0.45μm滤膜过滤到培养皿中。

1.2.4 原生质体制备和产量的测定。将玉米叶片和拟南芥叶片去两端切成约0.5~1.0mm细丝,把切好的叶片放入含有酶液,室温黑暗中振荡(转速为40r/min)酶解(2~7h)。显微镜下检查溶液中的原生质体,玉米叶肉原生质体大小大约30~40μm,拟南芥叶肉原生质体大小大约30~50μm。在过滤除去未溶解的叶片前用等量的W5[2mmol/L MES(pH 5.7),154mmol/L NaCl,125mmol/L CaCl₂,5mmol/L KCl]溶液稀释含有原生质体的酶液。先用W5溶液润湿35~75μm的尼龙膜或60~100目筛子,然后用其过滤含有原生质体的酶液。将过滤后的绿色混合物置于40ml圆底离心管中,400r/min,2min。洗涤沉淀1次,离心后弃上清液,再次加入W5,重悬沉淀,置于冰上30min。再次400r/min离心2min,弃上清液,加入适量的MMg溶液(4mmol/L MES,0.4mmol/L D-甘露醇,15mmol/L MgCl₂),备用。参考侯岁稳的原生质体简易计数方法^[8]。

1.2.5 PEG介导原生质体转化和激光共聚焦显微镜检测。吸取10μg质粒于2ml圆底离心管中,加入制备好的100μl原生质体溶液混匀,原生质体加入等体积30%~50%PEG-Ca²⁺溶液[PEG4000(m/v),200mmol/L甘露醇,100mmol/L CaCl₂],将混合物用2倍体积的W5溶液清洗2次,最后加入500μl W5溶液置于室温、弱光下培养15h。转化GFP融合载体的原生质体培养过夜后用Leica激光共聚焦显微镜SP5观测荧光分布^[9-10]。

2 结果与分析

2.1 酶液浓度对原生质体分离的影响 在含不同浓度组合的酶液中黑暗裂解(拟南芥4h,玉米6h),其原生质体的分离情况见表1。由表1可知,随着酶浓度的不断增加,玉米和拟南芥叶肉原生质体的产量逐渐提高。当2种酶的浓度达到1.5%和0.5%以上后,原生质体的产量增加不明显。拟南芥中当两种酶的浓度均达到1.5%以上后,原生质体的产量逐渐减少,碎片也较多。玉米中情况稍微有点差别,在2种酶浓度均达到1.5%或2.0%,1.0%以上后,原生质体产量逐渐减少,碎片也较多。因此,从原生质体的产量、细胞碎片的多少及酶的使用量等多方面综合考虑,拟南芥叶肉原生质体分离的最佳的酶类组合为纤维素酶1.5%,离析酶0.5%,

玉米原生质体则有2个选择,1个和拟南芥相同,产量较多,碎片少,另外纤维素酶2%,离析酶0.5%,产量最多,碎片稍微增多。

表1 酶浓度对原生质体分离的影响

组合	纤维素酶 %	离析酶 %	拟南芥		玉米	
			原生质体产量 ×10 ⁵ /ml	细胞碎片	原生质体产量 ×10 ⁵ /ml	细胞碎片
1	0.5	0.5	1.2±0.5	+	0.6±0.3	+
2	1.0	0.5	3.5±0.9	+	2.0±0.9	+
3	1.0	1.0	4.0±1.2	+	2.8±1.1	+
4	1.5	0.5	7.8±2.5	+	6.8±2.3	+
5	1.5	1.0	8.0±3.1	++	7.0±1.8	++
6	1.5	1.5	6.1±1.7	+++	5.1±1.9	+++
7	2.0	0.5	5.5±1.3	+++	7.6±1.3	+++
8	2.0	1.0	4.2±1.2	++++	5.5±1.7	++++

注: +指很少; ++指较多; +++指很多; ++++指极多。

2.2 酶解时间对原生质体分离的影响 试验比较了酶解2、3、4、5和6h对拟南芥和玉米叶肉原生质体分离效果的影响,结果见表2。结果表明,随着酶解时间的增加,原生质体产量不断提高,酶解4h时,拟南芥原生质体产量最高,达(7.0±1.2)×10⁵/ml,玉米则继续增加,在6h使玉米产量最高,达(6.0±2.1)×10⁵/ml。当达到最大产量后,叶肉细胞已趋于完全解离,酶液中叶片成透明状。酶解时间继续增加,原生质体产量反而下降。究其原因可能是由于长时间的酶解使一部分已解离的原生质受到损伤进而解体的缘故。

表2 酶解时间对玉米和拟南芥叶肉原生质体分离效果的影响

酶解时间 h	拟南芥		玉米	
	原生质体产量 ×10 ⁵ /ml	细胞碎片	原生质体产量 ×10 ⁵ /ml	细胞碎片
2	0.1±0.06	+	0	+
3	3.5±0.90	+	0.1±0.04	+
4	7.0±1.20	++	1.1±0.20	+
5	5.5±2.50	+++	3.8±1.50	+
6	3.1±1.10	++++	6.0±2.10	++
7	1.7±0.40	++++	4.1±2.70	+++

注:酶液组成为1.5% Cellulase R-10,0.5% Mecerzyme R-10;渗透压为拟南芥0.40mol/L甘露醇,玉米0.45mol/L甘露醇。

2.3 渗透压对原生质体分离效果的影响 以甘露醇为渗透压调节剂,比较了浓度范围由0.3mol/L到0.6mol/L 6种不同渗透压的酶液对拟南芥和玉米叶肉原生质体的解离效果。由表3可知,在甘露醇浓度为0.3~0.6mol/L的范围内,随着酶液渗透压的增大,原生质体的产量呈逐渐上升的趋势,这是由于当溶液渗透压低于原生质体内部渗透压时,部分原生质体因过分吸胀而破裂,随着溶液渗透压的提高,原生质体内外渗透压逐渐趋于平衡,因吸胀而破裂的原生质体比例逐渐减小,产量则稳步提高。从原生质体的形态来看,拟南芥在甘露醇浓度为0.3mol/L时,玉米在0.3~0.4mol/L时,获得的原生质体的体积过分膨胀,叶绿体分布不均匀,在以相应渗透压的洗涤液洗涤的过程中,可以观察到不断有原生质体吸胀破裂,以相应渗透压的液体培养基进行培养时,1d后多数原生质体破裂解体,显然此时的渗透压远低于

于细胞内部的渗透压,不适于用来解离烟草叶肉原生质体。拟南芥甘露醇浓度为 0.40 和 0.45 mol/L 时,玉米甘露醇浓度为 0.45 和 0.50 mol/L 时,解离出的原生质体形态完整,饱满,叶绿体分布均匀,清晰可见,在离心洗涤过程中原生质体稳定完好,破损率低,继续进行培养 24 h 后原生质体的体积略有膨胀。当甘露醇浓度高于上面浓度时,所得原生质体产量稍微提高,离心洗涤过程中不易破裂,但原生质体的体积有所收缩,继续培养时原生质体逐渐褐化死亡。可见拟南芥甘露醇浓度为 0.40 和 0.45 mol/L 时,玉米甘露醇浓度为 0.45 和 0.50 mol/L 时原生质体与酶液的渗透压趋于一致,在这种渗透压条件下获得的原生质体质量最好。过高或过低的渗透压对原生质体均有损伤,不利于以后的培养。

表 3 不同渗透压对玉米和拟南芥叶肉原生质体分离效果的影响

甘露醇浓度 mol/L	拟南芥		玉米	
	原生质体产量 $\times 10^5/\text{ml}$	原生质体状态	原生质体产量 $\times 10^5/\text{ml}$	原生质体状态
0.30	5.1 ± 2.96	胀大	4.1 ± 2.2	胀大
0.40	7.8 ± 2.90	膨胀	5.5 ± 1.3	胀大
0.45	7.9 ± 2.20	膨胀	6.1 ± 1.8	膨胀
0.50	8.2 ± 2.50	收缩	6.5 ± 2.0	膨胀
0.55	8.3 ± 3.10	收缩	6.7 ± 2.3	收缩
0.60	8.5 ± 3.40	收缩	6.8 ± 2.4	收缩

注:酶液组成为 1.5% Cellulase R-10,0.5% MecerozymeR-10;酶解时间为 4 和 6 h。

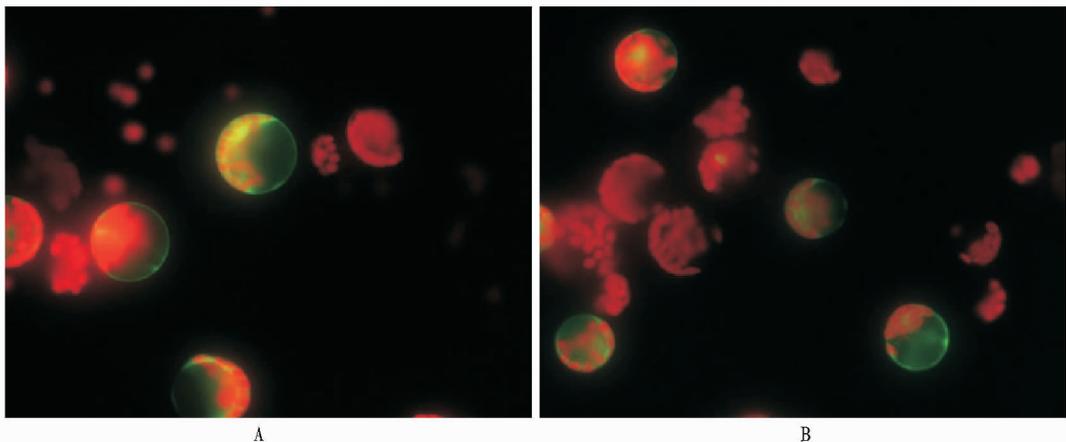
2.4 PEG 浓度对原生质体转化的影响 PEG4000(聚乙二醇 4000)分子能改变各类细胞的生物膜结构,使 2 细胞接触点处质膜的脂类分子发生疏散和重组,原生质体体表面的负电荷在钙离子的连接下,形成静电键,降低细胞表面的极性,促使之间粘着和结合,在高 pH、高钙离子的作用下,钙离子

和结合在质膜上的 PEG 被洗脱,导致电荷平衡失调并重新分配,使 2 种原生质体形成具有共同质膜的融合体。由表 4 可知,试验选用 PEG4000 对拟南芥叶肉原生质体进行转化,结果发现在 PEG4000 浓度发生变化时,转化效率也随之发生变化。PEG 浓度为 20% 时,拟南芥转化效率仅有 9%,随着 PEG 浓度的升高转化效率也随之升高;当 PEG 浓度为 40% 时,转化效率达到 67%(图 1A)。玉米中在 PEG 浓度 20% 时转化效率有 17%,在 30% 和 35% 时转化效率达到了 45% 左右(图 1B),且细胞碎片较少,PEG 浓度在增加虽增加了转化效率,但是细胞碎片开始增多。PEG 的浓度越高,其对细胞的影响也越来越大,因为 PEG 对细胞有一定的毒害作用,高浓度下常致使细胞发生破碎。另外,PEG 的物理化学性质决定了其在较高浓度下(大于或等于 50%)很难溶解,所以在较高浓度下不便于试验操作。所以在转化拟南芥和玉米原生质体时,试验选择了 40% 和 30% 的溶液,以达到最好的效果。在培养 16 h 后用激光共聚焦显微镜观察,发现拟南芥转化效率(67%)比玉米转化效率(45%)高,细胞碎片比玉米少。

表 4 PEG 浓度对玉米和拟南芥叶肉原生质体转化效率的影响

PEG 浓度 %	拟南芥		玉米	
	原生质体产量 $\times 10^5/\text{ml}$	细胞碎片	原生质体产量 $\times 10^5/\text{ml}$	细胞碎片
20	9	+	17	+
30	23	+	45	+
35	50	+	48	+
40	60	+	49	++
45	63	++	52	+++
50	67	+++	56	++++

注:酶液组成为 1.5% Cellulase R-10,0.5% Mecerozyme R-10;渗透压为拟南芥 0.40 mol/L 甘露醇,玉米 0.45 mol/L 甘露醇。



注:A 为 40% PEG 诱导拟南芥原生质体;B 为 30% PEG 诱导玉米原生质体。

图 1 PEG 诱导原生质体转化

2.5 其他条件对原生质体转化的影响 由表 5 可知,其他影响因素对拟南芥转化效率的影响。①从转化的拟南芥和玉米细胞含 GFP 荧光的数量百分比可以看出,玉米和拟南芥的生长状态对转化效率影响很大。拟南芥 8~10 叶期的转化效率是 12~14 期的拟南芥的 2 倍多,幼嫩的细胞容易转化。玉米 2 叶期原生质体的转化效率是 3 叶期玉米的 3 倍

左右,而且细胞不易解离且细胞容易破碎。所以拟南芥和玉米原生质体需要幼嫩组织作为转化材料,此时细胞壁比较薄,细胞壁没有大液泡,细胞膜流动性比较好,容易出去细胞壁,获得高活性的原生质体,转化效率很高。②质粒的纯度和浓度对转化效率也有很大影响,通过普通破裂法提取的质粒和通过大提试剂盒提取的质粒转化效率相比较,浓度都

在 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, 以 $10 \mu\text{g}$ 转化, 拟南芥原生质体中大提质粒大约是粗体质粒效率的 7 倍, 玉米原生质体大提质粒是粗体质粒的 11 倍, 而且粗体质粒中有大量的细胞碎片, 细胞很容易受到内毒素的伤害而破裂死亡。③在光照和避光处理下分别从原生质体裂解开始, 在黑暗下进行裂解和培养的拟南芥原生质体的转化效率大约是光照下处理的原生质体转化效率的 5 倍, 玉米大约是 3.7 倍。在光照条件下, 拟南芥和玉米叶肉细胞原生质体细胞膜受到损伤, 细胞进行光合作用合成糖类都会造成原生质体活力下降, 导致原生质体破碎。

表 5 其他条件对玉米和拟南芥叶肉原生质体转化效率的影响

拟南芥	转化效率//%	玉米	转化效率//%
8~10 叶	70	2 叶期	55
12~14 片	33	3 叶期	20
粗提质粒	10	粗提质粒	5
大提质粒	70	大提质粒	55
避光	55	避光	55
光照	18	光照	15

注: 酶液组成为 1.5% Cellulase R-10, 0.5% Mecerozyme R-10; 渗透压为拟南芥 0.40 mol/L 甘露醇, 玉米 0.45 mol/L 甘露醇。

3 结论与讨论

酶解去壁对植物细胞是一个严重的机械损伤和生理损伤过程^[11]。原生质体适宜的分离条件要求既能将细胞壁完全去除, 又要尽量减少对原生质体的损伤。采用酶解法来分离烟草叶肉原生质体时, 试验发现酶液的浓度、酶液的处理时间及其渗透压等对原生质体的产量及转化活力等都有很大的影响。日本生产的纤维素酶 (Cellulase R-10) 和离析酶 (M acerzyme R-10) 效果最佳, 酶浓度经过组合分析, 发现拟南芥在 1.5% Cellulase R-10, 0.5% Mecerozyme R-10 时裂解比较完全并且细胞碎片比较少, 玉米在 1.5% Cellulase R-10, 0.5% Mecerozyme R-10 时裂解也比较完全。在据以往的报道, 渗透压稳定剂一般是用甘露醇、山梨醇、蔗糖或葡萄糖等, 试验过程中用甘露醇渗透压稳定剂, 结果是在拟南芥当甘露醇浓度为 0.40 mol/L 时原生质体游离效果最为理想, 玉米以浓度为 0.45~0.50 mol/L 的甘露醇做酶液的渗透压稳定剂时效果最理想。酶解处理一般静置在黑暗中进行, 拟南芥和玉米在未去表皮情况下酶解时间分别以 4 和 6 h 最佳, 如果超过时间, 原生质体的转化活力就会明显降低, 细胞碎片增多。

在质粒转化过程, PEG 浓度对转化效率和转化后的原生质体状态有很大的影响, 拟南芥在 40% 或者 45% 浓度下可以获得较高的转化效率, 玉米在 30% 可以获得较高的转化效率和保持稳定的原生质体。玉米原生质体比拟南芥原生质体容易皱缩破裂, 玉米一般在 16 h 后就开始破裂, 而拟南芥在 4 ℃ 却可以保持 48 h 以上还可以看到 GFP。还有材料状态、质粒纯度和培养过程, 都会对转化效率有很大影响。尤其是在双质粒转化过程, 需要较高的转化效率, 最后是用氯化铯超速离心法提取超纯质粒。酶解后的原生质体失去了细胞壁的保护, 极易受渗透压变化的影响而导致破裂, 因此在制备原生质体的过程中, 要保证酶解液等所用溶液的渗透压尽量接近在玉米叶肉细胞自身的渗透势, 避免细胞吸水胀破或者失水皱缩; 所有的操作过程都要轻柔, 尤其是用移液枪吸取和离心速度要控制好, 以防止因剧烈震荡而导致原生质体破裂; 在原生质体转化过程中, PEG-Ca²⁺ 浓度 (玉米 30% 和拟南芥 40%)、质粒 DNA 纯度, PEG 诱导转化时间等是影响转化效率的关键因素。

参考文献

- [1] FROOZABADY E. Rapid plant regeneration from *Nicotiana mesophyll* protoplasts[J]. *Plant Sci*, 1986, 46:127-131.
- [2] SAXENA P K, GILL R. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of the tree legume *Pithecellobium dulce* benth[J]. *Plant Sci*, 1987, 53:257-262.
- [3] CHU C C. Contributions of Chinese Botanists to Plant Tissue Culture in the 20 Century[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2002, 44(9):1075-1084.
- [4] JEFFERSON R A, BURGESS S M, HIRSH D. beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1986, 83(22):8447-8451.
- [5] CHALFIE M, TU Y, EUSKIRCHEN G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. *Science*, 1994, 263(5148):802-805.
- [6] CHIU W, NIWA Y, ZENG W, et al. Engineered GFP as a vital reporter in plants[J]. *Current Biology*, 1996, 6(3):325-330.
- [7] SUTTER V, VANDERHAEGHEN R, TILLEMANN S, et al. Exploration of jasmonate signalling via automated and standardized transient expression assays in tobacco cells[J]. *The Plant Journal*, 2005, 44(6):1065-1076.
- [8] 侯岁稳, 贾敬芬. 一种简易的植物原生质体计数方法[J]. *植物生理学通讯*, 2002, 38(1):57.
- [9] LUAN M, XU M, WANG L. Family-Wide Survey of miR169s and NF-YAs and Their Expression Profiles Response to Abiotic Stress in Maize Roots[J]. *PLoS One*, 2014, 9:91369.
- [10] XU T, ZHANG L, WANG L. Expressional and regulatory characterization of *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerase 1[J]. *Planta*, 2013, 237:1561-1569.
- [11] CHEN L P, ZHANG M F, HIRATA Y, et al. Efficient Plant Regeneration from Cotyledon-derived Protoplasts of Cytoplasmic Male-sterile Tuber Mustard[J]. *Acta Phytophysiological Sinica*, 2001, 27(5):437-440.

(上接第 3478 页)

- [4] 索风梅, 宋经元, 陈士林, 等. AFLP 分析唐古特大黄、掌叶大黄和药用大黄的亲缘关系研究[J]. *中草药*, 2010, 41(2):292-296.
- [5] 廖红, 严小龙. 高级植物营养学[M]. 北京: 科学出版社, 2003:26.

- [6] 李天才, 陈桂琛, 周国英, 等. 青海西宁种植大黄中矿物质元素研究[J]. *现代中药研究与实践*, 2004, 18(5):35-38.
- [7] 魏全嘉, 刘占厚, 张华, 等. 青海不同生境大黄质量研究[J]. *中药材*, 2007, 30(12):1495-1497.