

马铃薯‘春薯4号’原生质体的分离纯化

李楠¹, 朱旭¹, 张玲¹, 李闯¹, 韩忠才², 张胜利², 李传龙¹, 杨春明^{1*}, 贺红霞^{1*}

(1. 吉林省农业科学院农业生物技术研究所/吉林省农业生物技术重点实验室, 长春 130033; 2. 吉林省蔬菜花卉科学研究院, 长春 130033)

摘要:植物原生质体是去掉细胞壁的由细胞膜包被的有活力的裸细胞,它具有活细胞的一切特征,是基础生命科学研究及作物育种改良的理想材料。本研究以马铃薯‘春薯4号’组培苗叶片为外植体,对‘春薯4号’原生质体的分离和纯化条件进行了探索和优化。结果表明,含3 mg/L硝酸银的MS培养基培养21 d可显著增大叶面积,为原生质体制备提供充足的材料;0.4%纤维素酶+0.5%果胶酶+0.1%离析酶,在转速为35 r/min、25 °C、黑暗条件下酶解叶片14 h,原生质体产量较高,质量最好;界面法纯化原生质体,得到的原生质体大小一致,破碎细胞较少;用上述方法制备的原生质体活力达90%以上,可用于原生质体培养。

关键词:马铃薯;原生质体;硝酸银;分离纯化

中图分类号:S532;Q813.1^{†1}

文献标识码:A

文章编号:2096-5877(2023)05-0056-05

Isolation and Purification of Protoplasts from Potato Chunshu 4

LI Nan¹, ZHU Xu¹, ZHANG Ling¹, LI Chuang¹, HAN Zhongcai², ZHANG Shengli², LI Chuanlong¹, YANG Chunming^{1*}, HE Hongxia^{1*}

(1. Institute of Agricultural Biotechnology, Jilin Academy of Agricultural Sciences/Jilin Province Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Changchun 130033; 2. Jilin Academy of Vegetables and Flowers Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: Plant protoplasts are viable naked cells without cell wall and coated by cell membranes. They have all the characteristics of living cells and are ideal materials for basic life science research and crop breeding improvement. In this study, the leaves of potato Chunshu 4 tissue culture seedlings were used as explants, the isolation and purification conditions of Chunshu 4 protoplasts were explored and optimized. The results showed that MS medium containing 3 mg/L silver nitrate for 21 days could significantly increase leaf area and provide sufficient materials for protoplast preparation. When 0.4% cellulase + 0.5% pectinase + 0.1% isolating enzyme were used to hydrolyze leaves for 14 h under the condition of rotating speed of 35 rpm, 25 °C and darkness, the yield of protoplast was higher and the quality was the best. The protoplast was purified by interface method, and the protoplast size was the same, and there were few broken cells. The activity of protoplast prepared by the above method is over 90%, which can be used for protoplast culture.

Key words: Potato; Protoplast; Silver nitrate; Isolation and purification

收稿日期:2022-12-05

基金项目:吉林省农业科技创新工程项目(CXGC2018ZY034);吉林省自然科学基金项目(20210101484JC);国家现代农业产业技术体系项目(CARS-09-ES07)

作者简介:李楠(1985-),女,助理研究员,硕士,主要从事作物基因资源发掘与利用研究。

通讯作者:杨春明,男,硕士,副研究员,E-mail: dou0101_2006@126.com

贺红霞,女,博士,副研究员,E-mail: hehx35@cjaas.com

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)是仅次于玉米、水稻、小麦的世界第四大粮食作物,因其粮、菜、饲、加工兼用的特性,具有重要的经济价值。由于马铃薯栽培种存在自交不亲和、花器退化、雄性不育或育性低等问题,使得传统杂交育种进展缓慢^[1]。原生质体细胞融合和遗传转化技术可克服杂交育种障碍缩短植物育种周期^[2-4]。用原生质体作为细胞融合和遗传转化受体的前提是制备出高质量的原生质体^[5-6]。

马铃薯原生质体的研究开始于1973年, Lorenzini等^[7]使用马铃薯栽培种的块茎作为外植体,游离出原生质体。1977年,Shepard等^[8]建立了较为完善的原生质体制备体系,并且获得再生植株。国内直到20世纪80年代末才有马铃薯原生质体制备与培养成功的报道^[9-10]。马铃薯原生质体的产量受基因型影响较大^[11],不同马铃薯品种使用相同酶解条件产量也存在较大差异^[12-13],导致很难有一套马铃薯原生质体制备体系适用于所有马铃薯品种,所以,有必要针对不同品种的马铃薯开展原生质体培养技术的研究。

‘春薯4号’是东北地区的主栽品种,具有高产稳产、抗病性强、加工品质好等优点^[14]。近年来,

随着加工业对马铃薯需求量的不断增加,对具有特定品质的马铃薯需求量迅速增大。因此,迫切需要对地方品种进行改良以适应市场经济的需求。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

马铃薯‘春薯4号’脱毒苗由吉林省蔬菜花卉科学研究院张胜利研究员提供,由吉林省农业科学院农业生物技术研究 所保存。

1.2 培养基

试验中用到的培养基参照蔡兴奎^[15]的配方(表1),配制完成后调pH值至5.8,用0.45 μm滤膜过滤灭菌后,4℃保存。

表1 原生质体操作培养基的组成

成分	FM	CM	MR	MP	MPS	CM I	CM II	PF
NH ₄ NO ₃	80	-	-	-	-	-	-	-
CaCl ₂ ·2H ₂ O	147	-	-	-	-	-	-	-
MES	500	500	-	-	-	-	-	-
MS培养基	-	443	4 430	4 430	4 430	4 430	4 430	4 430
水解酪蛋白	-	500	500	500	500	500	500	500
肌醇	-	100	-	-	4 500	4 550	100	-
蔗糖	-	-	-	230 000	8 500	8 560	25 680	154 050
甘露醇	-	-	63 760	-	45 500	36 430	36 430	-
葡萄糖	-	-	-	-	4 500	4 500	4 500	-
山梨醇	-	-	-	-	4 550	4 550	-	-
木糖醇	-	-	-	-	-	3 800	-	-
生物素	-	-	-	-	-	0.005	0.005	-
叶酸	-	-	-	-	-	0.05	0.05	-

1.3 试验方法

1.3.1 ‘春薯4号’组培苗的硝酸银处理

取在MS培养基中培养21 d的组培苗,剪取生长状态一致的含腋芽茎段(长约0.5 cm),接种于分别含有硝酸银浓度为0、1、2、3、4 mg/L的MS培养基中。光照强度2 000 lx,光周期16 h/8 h(光/暗),(23±1)℃培养21 d后,测量组培苗的株高、叶面积和叶绿素含量等。其中,叶面积测定采用方格法,叶绿素含量测定采用紫外分光光度计法。

1.3.2 ‘春薯4号’叶片原生质体分离

取培养21 d的组培苗顶端完全展开的幼嫩叶片,于25℃、FM培养基中浅层暗培养48 h,转至4℃、CM培养基中浅层暗培养24 h,将叶片切成宽0.5~1 mm的细丝,置于15 mL酶解液中酶解。酶解后使用Nikon 80i显微镜观察原生质体状态,使用血球计数板计数,每个处理统计10个视野取平均值。

酶解液组成:纤维素酶+果胶酶+离析酶+0.4

mol/L甘露醇+0.3% PVP+20 mmol/L MES+20 mmol/L KCl+0.1% BSA+10 mmol/L CaCl₂,0.45 μm滤膜过滤灭菌,现用现配。纤维素酶、果胶酶和离析酶分别选用3个浓度水平设计L₉(3⁴)正交试验(表2),25℃、35 r/min黑暗条件下酶解14 h,以确定最适酶解液组合。

表2 解离酶正交试验

组别	纤维素酶(%)	果胶酶(%)	离析酶(%)	误差列
1	1(0.2)	1(0.3)	1(0)	1
2	1(0.2)	2(0.5)	2(0.2)	2
3	1(0.2)	3(0.7)	3(0.1)	3
4	2(0.4)	1(0.3)	2(0.2)	3
5	2(0.4)	2(0.5)	3(0.1)	1
6	2(0.4)	3(0.7)	1(0)	2
7	3(0.6)	1(0.3)	3(0.1)	2
8	3(0.6)	2(0.5)	1(0)	3
9	3(0.6)	3(0.7)	2(0.2)	1

在最适酶解液组合的基础上,采用静置和摇动(35 r/min)两种酶解方式,25 °C分别酶解10、12、14、16、18 h,以确定最适酶解方式和最适酶解时间。

1.3.3 ‘春薯4号’原生质体的纯化

叶片酶解完成后,过400目筛,分别用界面法^[15]和漂浮法^[16]进行纯化,对两种纯化方法进行比较,纯化过程中使用水平离心机进行离心。

1.3.4 ‘春薯4号’原生质体的活力测定

原生质体纯化后,使用0.01%酚藏花红染色液与细胞溶液等体积混合,在显微镜下观察染色情况,细胞内被染上红色的为无活力细胞或死细胞,未染上红色的为具有活力的细胞^[17-18]。

1.3.5 ‘春薯4号’原生质体的初培养

用CMI液体培养基将原生质体稀释至 1×10^5 个/mL,置于25 °C黑暗条件下静置培养,15 d后将原生质体转移至CMII培养基中,培养过程中每天使用显微镜观察原生质体生长状态。

1.4 数据处理

正交试验中各因素对试验结果的影响分析采用直观分析法^[19-20]。

2 结果与分析

2.1 硝酸银处理对‘春薯4号’组培苗的影响

‘春薯4号’组培苗茎秆细弱、叶片小,无法为

原生质体的制备提供充足的叶片。硝酸银是乙烯抑制剂,具有增加植株长势的作用^[21-22]。由表3可知,与对照相比,经硝酸银处理后的组培苗株高显著降低,叶面积显著增大,当硝酸银浓度为3 mg/L时,组培苗叶面积最大,叶绿素含量最高,可为原生质体制备提供充足的叶片材料。

表3 硝酸银处理后‘春薯4号’组培苗生长指标

硝酸银浓度 (mg/L)	株高(cm)	叶面积(cm ²)	叶绿素含量 (mg/g·FW)
0	17.91+0.85a	19.43+1.03e	2.65+0.06b
1	11.13+1.14c	39.93+0.98d	2.64+0.07b
2	11.16+1.15c	54.27+1.47c	2.59+0.03b
3	13.18+0.58b	77.23+1.14a	3.18+0.06a
4	7.19+0.46d	69.03+1.04b	2.59+0.05b

注:同列小写字母不同表示在0.05水平上差异显著

2.2 酶解液浓度组合对原生质体解离的影响

对9组酶解液组合中原生质体的产量和状态进行统计,筛选适宜‘春薯4号’叶片原生质体解离的酶解液浓度组合(表4)。其中第5组即0.4%纤维素酶+0.5%果胶酶+0.1%离析酶是较适宜‘春薯4号’叶片原生质体解离的酶解液浓度组合。采用直观分析法计算极差分析可知,3种酶对‘春薯4号’叶片原生质体解离影响的顺序为:纤维素

表4 试验方案与结果分析

因素 处理	A 纤维素酶(%)	B 果胶酶(%)	C 离析酶(%)	误差列	原生质体产量 ($\times 10^6$ 个/g·FW)
1	1(0.2)	1(0.3)	1(0)	1	0.60
2	1(0.2)	2(0.5)	2(0.2)	2	1.28
3	1(0.2)	3(0.7)	3(0.1)	3	1.34
4	2(0.4)	1(0.3)	2(0.2)	3	1.86
5	2(0.4)	2(0.5)	3(0.1)	1	2.04
6	2(0.4)	3(0.7)	1(0)	2	1.75
7	3(0.6)	1(0.3)	3(0.1)	2	1.54
8	3(0.6)	2(0.5)	1(0)	3	1.16
9	3(0.6)	3(0.7)	2(0.2)	1	1.95
K_1	3.22	4.00	3.51	4.59	
K_2	5.65	4.48	5.09	4.57	
K_3	4.65	5.04	4.92	4.36	
K_1^2	10.37	16.00	12.32	21.07	T=13.52
K_2^2	31.92	20.07	25.91	20.88	$\frac{1}{9}T^2=20.31$
K_3^2	21.62	25.40	24.21	19.01	
极差R	2.43	1.04	1.58	0.23	
偏差平方和S	0.99	0.18	0.50	0.01	
因素主→次			ACB		
优方案			A ₂ B ₃ C ₃		

酶>离析酶>果胶酶。分析趋势可知,随着纤维素酶浓度的增加,原生质体产量呈先增加后减少的趋势;随着果胶酶浓度的增加,原生质体产量呈逐渐增加的趋势;添加离析酶与不添加离析酶的处理相比,原生质体产量有明显增加,但随着离析酶浓度的增加,原生质体产量差异不大。推测

0.4%纤维素酶+0.7%果胶酶+0.1%离析酶组合解离效果可能更好,且果胶酶浓度或可再提高,需进一步试验加以验证。根据方差分析可知(表5),对‘春薯4号’叶片原生质体酶解的影响,纤维素酶是高度显著因素($P<0.01$),离析酶是显著因素($P<0.05$),果胶酶是有一定影响的因素($P<0.1$)。

表5 方差分析

方差来源	偏差平方和 S	自由度 f	平均偏差平方和 V	F值	临界值	显著性
A	0.99	2	0.495	99	$F_{0.01}(2,2)=99$	**
B	0.18	2	0.090	18	$F_{0.10}(2,2)=9$	(*)
C	0.50	2	0.250	50	$F_{0.05}(2,2)=19$	*
误差e	0.01	2	0.005			
总和T	1.68	8				

2.3 酶解时间和酶解方式对原生质体产量的影响

叶片在0.4%纤维素酶+0.5%果胶酶+0.1%离析酶酶解液组合基础上,进行静置酶解与摇动酶解(35 r/min),酶解温度均为25℃。分别在酶解10、12、14、16、18 h后使用血球计数板对原生质体进行计数,结果见图1。静置酶解方式下的各处理原生质体产量都低于摇动酶解方式下的原生质体产量;两种酶解方式的原生质体产量随着时间的延长均呈先增加后减少的趋势;当酶解时间超过14h,原生质体破碎增多,产量逐渐下降;虽然摇动酶解16 h比14 h原生质体产量高,但镜检发现16 h时,破碎原生质体多,导致后续试验纯化效率低。综合上述结果,摇动酶解14 h更适合‘春薯4号’原生质体解离。

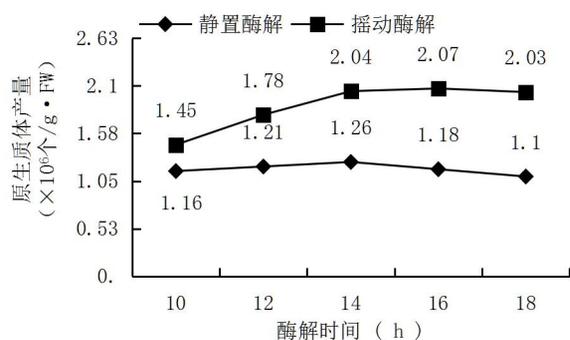


图1 酶解时间与酶解方式对原生质体产量的影响

2.4 两种原生质体纯化方式的比较

酶解后的原生质体需进行纯化去除未解离的组织 and 破碎的细胞,以便进行原生质体培养试验。将酶解后的组织液过400目筛,使用界面法和漂浮法两种方式纯化。比较纯化效果:漂浮法操作简单,但由于缺乏较低浓度的上层溶液,酶解液中不同质量的原生质体和细胞碎片混在一起

不易分离,纯化后获得的原生质体大小不一,含有大量细胞碎片;界面法操作略复杂,但由于含有浓度较低的上层溶液和浓度较高的下层溶液,通过离心能将不同大小的原生质体及细胞碎片依据质量而区分开来,高质量的原生质体聚集在两层液面中间,纯化后的原生质体大小一致,细胞碎片少,质量较高。因此,选取界面法为‘春薯4号’原生质体的纯化方法。

2.5 ‘春薯4号’原生质体的活力测定

原生质体纯化后,使用0.01%酚藏花红进行染色,在光学显微镜下观察染色情况,细胞内被染成红色的为无活力的死细胞,细胞内未被染成红色的为具有活力的细胞。结果显示,有活力的原生质体达90%以上,可用于原生质体培养试验。

2.6 ‘春薯4号’原生质体的初培养

纯化后的原生质体稀释至 1×10^5 个/mL,置于25℃黑暗条件下进行液体浅层培养,每天用显微镜观察细胞生长状态。原生质体培养1~2 d时,叶绿素减少,原生质体呈现半透明状态;培养4 d左右,大部分原生质体完成第一次分裂;培养15~20 d时,原生质体持续分裂出现大量肉眼可见的细胞团。

3 结论与讨论

植物原生质体是去掉细胞壁由细胞膜包被的有活力的裸细胞,它具有活细胞的一切特征,是基础生命科学研究及作物育种改良的理想材料。原生质体可应用于细胞融合、瞬时转化、亚细胞定位、基因表达模式实时监测、大分子复合物互作、生物反应器、基因编辑等方面,成为科学家们的研究热点^[23]。

培养物的形态发生或器官形成能力弱是植物离体培养中常遇到的主要问题之一。硝酸银是一种乙烯抑制剂,可竞争性地与乙烯受体结合,在培养基中添加适量浓度的硝酸银可促进培养物繁育及体外生长,为科学研究提供丰富而稳定的材料^[21-22]。本研究中马铃薯‘春薯4号’在添加硝酸银的MS培养基中培养21 d,株高显著降低,叶面积显著增大,这与前人研究结果一致^[24-25],为原生质体解离提供了充足的叶片材料。但需要注意硝酸银处理浓度过高或时间过长,会对植物细胞的生长代谢产生胁迫或毒害作用^[26],本研究中发现长时间培养后,植株叶片背部及茎部出现白色凸起的斑点,张志军等^[25]发现在培养基中添加4 mg/L硝酸银会导致马铃薯叶片背面出现红色斑点,与本研究结果相似。

原生质体的解离常采用纤维素酶、果胶酶和离析酶,有时会采用少量的半纤维素酶。马铃薯一般以幼嫩叶片为材料进行原生质体解离,由于叶片幼嫩去细胞壁相对容易,为获得高质量的原生质体,应选用低浓度的酶进行解离^[9,16]。本研究根据直观分析法推测,果胶酶浓度在0.7%或更高时,酶解效果可能更好,还需进一步试验,并结合所获原生质体的产量和质量来验证这个推测。最佳酶解时间要根据酶种类和浓度的组合来确定,尽量缩短酶解时间以减小酶解液对原生质体的毒害作用。解离过程中,摇动酶解较静置酶解效果好,可能是由于低速摇动增加了酶解液与叶片组织之间的接触,从而促进了原生质体的释放^[27]。

原生质体的纯化方式是影响原生质体质量的重要因素,马铃薯原生质体的纯化方式主要有漂浮法、界面法和沉降法等^[24]。漂浮法是底层放置高浓度溶液,离心后原生质体漂浮于其上,比重大的杂质沉淀于其底部。界面法是利用两种浓度的溶液,离心后原生质体悬浮于两溶液之间,比重小的杂质停留在上层溶液,比重大的杂质停留在下层溶液。沉降法是使用一种比重略低于原生质体的溶液,通过离心使原生质体沉降于溶液底部的方法,由于该方法纯化效果较差已很少有人使用^[28]。周宇波等^[16]在研究中使用漂浮法纯化原生质体,蔡兴奎^[15]在研究中则使用界面法纯化原生质体。本研究对漂浮法和界面法的纯化效果进行了比较,虽然界面法操作较为复杂,但与漂浮法相比,界面法纯化后的原生质体杂质和破碎细胞更少,获得的原生质体纯度更高。

参考文献:

- [1] Muthoni J, Kabira J, Shimelis H, et al. Tetrasomic inheritance in cultivated potato and implications in conventional breeding[J]. *Australian Journal of Crop Science*, 2015(3): 185-190.
- [2] Barrell P J, Meiyalaghan S, Jacobs J M E, et al. Applications of biotechnology and genomics in potato improvement[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2013, 11(8): 907-920.
- [3] Lei R, Qiao W, Hu F, et al. A simple and effective method to encapsulate tobacco mesophyll protoplasts to maintain cell viability[J]. *MethodsX*, 2015, 6(7): 78-107.
- [4] Wu F, Hanzawa Y. A simple method for isolation of soybean protoplasts and application to transient gene expression analyses[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2018, 18(6): 75-97.
- [5] Prüfer D, Schmitz J, Tacke E, et al. In vivo expression of a full-length cDNA copy of potato leafroll virus (PLRV) in protoplasts and transgenic plants[J]. *Molecular & General Genetics*, 1997, 18(7): 89-115.
- [6] Craig W, Gargano D, Scotti N, et al. Direct gene transfer in potato: a comparison of particle bombardment of leaf explants and PEG-mediated transformation of protoplasts[J]. *Plant Cell Reports*, 2005, 8(9): 10-47.
- [7] Lorenzini M. Obtention de protoplasts de tubercule de pomme de terre[J]. *Compte Rendu Hebdomadaire des Séances de l'Académie des Science Paris*, 1973, 276: 1839-1842.
- [8] Shepard J F, Totten R E. Mesophyll cell protoplasts of potato: isolation, proliferation, and plant regeneration[J]. *Plant Physiology*, 1977, 60(2): 313-316.
- [9] 李耿光, 张兰英. 马铃薯叶肉原生质体再生植株的研究[J]. *植物学报(英文版)*, 1988(1): 21-24.
- [10] 戴朝曦. 马铃薯实生苗子叶和下胚轴原生质体培养的研究[J]. *植物学通报*, 1992(S1): 81.
- [11] Prakash J, Foxe M J. Optimisation of conditions for infection of isolated potato protoplasts with potato virus X[J]. *Archives of Virology*, 1985, 61(6): 189-192.
- [12] 李风云, 蔡兴奎, 盛万民, 等. 二倍体马铃薯试管苗的培养及对叶肉原生质体融合的影响[J]. *中国马铃薯*, 2014, 28(5): 257-263.
- [13] 蔡兴奎, 柳俊, 谢从华. 马铃薯栽培种与野生种叶肉细胞融合及体细胞杂种鉴定[J]. *园艺学报*, 2004, 31(5): 623-626.
- [14] 姜润田, 刘佩兰, 李威, 等. 三个兼用型马铃薯新品种的选育与利用[J]. *吉林农业科学*, 1997, 22(1): 19-24.
- [15] 蔡兴奎. 原生质体融合创造抗青枯病的马铃薯新种质及其遗传分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2004.
- [16] 周宇波, 柳俊, 谢从华, 等. 马铃薯原生质体培养体系改良[J]. *华中农业大学学报*, 2001, 20(5): 469-473.
- [17] 王红霞, 范雪晖. 芦荟原生质体的分离[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(19): 90-96.
- [18] 李世君, 李向辉, 孙勇如. 马铃薯无菌苗叶肉原生质体再生植株[J]. *生物工程学报*, 1989, 5(1): 57-63.
- [19] 杨明贺, 朱旭, 李楠, 等. 马铃薯茎段高频再生体系的建立[J]. *东北农业科学*, 2019, 44(1): 57-62. (下转第111页)

势,GPT活性呈先下降后上升的趋势,GS活性呈先下降后上升的趋势。在年周期内,北陆越橘树体氮素含量表现为叶片>果实>新梢>韧皮部>木质部。建议在越橘栽培管理过程中要掌握正确的施肥时间合理施肥,早春萌芽及新梢等器官建造期必需保证有效而充分的氮素供应水平;果实生长期氮素主要用于维持各部位正常功能及果实发育,为营养稳定期,此期应少量供应氮素;果实采收后为氮素营养储备期,应注意保护叶片、延长叶的光合能力,及时进行根际、根外追肥来提高树体的贮藏养分水平。

参考文献:

- [1] 唐雪东,赵珊珊,李亚东,等.氮肥施用量对越橘根域微生物数量及根际效应的影响[J].东北农业大学学报,2012,43(10):35-40.
- [2] Aimé J Messiga,Dennis Haak,Martine Dorais. Blueberry yield and soil properties response to long-term fertigation and broadcast nitrogen[J]. Scientia Horticulturae, 2018, 230: 92-101.
- [3] Douglas S A,John W D,Anish M. Nitrogen-source preference in blueberry (*Vaccinium* sp.): Enhanced shoot nitrogen assimilation in response to direct supply of nitrate[J]. Journal of Plant Physiology, 2017, 216: 79-87.
- [4] 庞薇,侯智霞,李国雷,等.氮肥对蓝莓树体生长及果实品质的影响[J].中国农学通报,2012,28(13):225-229.
- [5] 李亚东,赵爽,张志东,等.不同氮素形态配比对越橘生长、产量及叶片元素含量的影响[J].吉林农业大学学报,2008,30(4):477-480.
- [6] Bailey J S, Gersten B, Valach E, et al. Response of Rubel blueberry bushes to ammonium sulfate and sulfate of potash-magnesia[J]. Proceedings of the American Society for Horticultural Science, 1966, 89: 237-242.
- [7] 张磊,杨建,侯云鹏,等.控释氮肥与速效氮肥配施对玉米氮素吸收及利用的影响[J].东北农业科学,2017,42(1):24-27.
- [8] Goulart B L, Demchak K, Yang W Q. Organic matter and nitrogen level effects on mycorrhizal infection in 'Bluecrop' highbush blueberry plants[J]. Journal of Small Fruit & Viticulture, 1995, 3: 151-164.
- [9] 曾碧涛,朱涛,王天霞.蕨类植物一支箭中总氮含量的测定[J].技术与市场,2015,22(12):71,73.
- [10] 上海植物生理学会.现代植物生理学实验指南[M].北京:科学技术出版社,1999:130-157.
- [11] Cren M, Hirel B. Glutamine synthetase in higher plant: regulation of gene and protein expression from the organ to the cell[J]. Plant Cell Physiology, 1999, 40: 1187-1193.
- [12] 范宗民.不同砧木对'赤霞珠'葡萄枝条抗寒性、果实品质及酒质的影响[D].石河子:石河子大学,2020.
- [13] 田歌.年周期苹果氮素最大效率期及氮素变化动态研究[D].泰安:山东农业大学,2018.
- [14] 刘春梅,王孟雪,孙海燕,等.施氮水平对芸豆叶片氮代谢酶活性和氮吸收及营养品质的影响[J].东北农业科学,2020,45(3):16-21.
- [15] 李亚飞,常栋,孙军伟,等.酶调节剂对烟草氮代谢及其化学成分的影响[J].中国烟草科学,2017,38(1):29-34.
- [16] 曾骧,郝中宁.枣树(*Zizyphus jujuba* Mill.)叶片内氮素贮藏和循环利用的研究[J].核农学报,1991,5(1):37-43.
- [17] 马文娟,同延安,高义民.葡萄氮素吸收利用与累积年周期变化规律[J].植物营养与肥料学报,2010,16(2):504-509.
- [18] 顾曼如,张若抒,束怀瑞,等.苹果氮素营养研究初报—植株中氮素营养的年周期变化特性[J].园艺学报,1981,8(4):21-28.
- [19] 曾骧.果树生理学[M].北京:北京农业大学出版社,1992:389-393.
- [20] Komamura K, Suzuki A, Fukumoto M, et al. Effects of long-term nitrogen application on tree growth, yield, and fruit qualities in a 'Jonathan' apple orchard [J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 2000, 69(5): 617-623.
- [21] Maria A Pescie, Marcela P Borda, Daniela P, et al. Absorption, distribution and accumulation of nitrogen applied at different phenological stages in southern highbush blueberry[J]. Scientia Horticulturae, 2018, 230: 11-17.
- (责任编辑:王显)
- ~~~~~
- (上接第60页)
- [20] 邱轶兵.试验设计与数据处理[M].合肥:中国科学技术大学出版社,2008:101-165.
- [21] 刘尊英,吕艳春,姜微波.1-甲基环丙烯及乙烯对绿芦笋采后品质的影响[J].中国农业大学学报,2003,8(6):26-28.
- [22] 苏新国,郑永华,张兰,等.菜用大豆采后用不同浓度1-MCP处理对贮藏期间衰老及腐烂的影响[J].中国农业科学,2003,36(3):318-323.
- [23] 肖政,徐艳琴,罗念,等.植物原生质体在分子细胞生物学研究中的应用[J].广西植物,2020,40(4):576-582.
- [24] 陈鹏.马铃薯叶片和悬浮细胞原生质体的分离与培养[D].兰州:甘肃农业大学,2014.
- [25] 张志军,李会珍,何云,等.硝酸银处理对马铃薯离体苗生长与结薯的影响(英文)[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2006,32(1):36-40.
- [26] 刘娟,汤浩茹,王小蓉,等.硝酸银在植物离体培养中的应用之研究进展[J].中国农学通报,2007,23(10):400-406.
- [27] 孙雪梅.马铃薯原生质体培养研究进展[J].黑龙江农业科学,2011(1):134-136.
- [28] Haberlach G T, Cohen B A, Reichert N A, et al. Isolation, culture and regeneration of protoplasts from potato and several related solanum species[J]. Plant Science, 1985, 39(1): 67-74.
- (责任编辑:范杰英)