

## 拟南芥叶片细胞数直接高效检测体系的建立

李依驰<sup>1,2</sup>, 崔看<sup>1,2#</sup>, 程鹏<sup>1</sup>, 陈锦<sup>1,2</sup>, 莫旭东<sup>1,2</sup>, 张小波<sup>1,2</sup>, 肖浪涛<sup>1,2</sup>, 夏石头<sup>1,2\*</sup>

(1.湖南省植物激素与生长发育重点实验室, 湖南 长沙 410128; 2.湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

**摘要:**以拟南芥野生型(Col)植株和突变体 *rfc3-1* 植株为材料, 经叶片酶解、细胞裂解和细胞核收集与染色后, 采用流式细胞仪检测分析了 *RFC3* 基因突变对叶片细胞数的影响, 以建立植物细胞数直接高效检测体系。结果表明, 野生型植株第 1、2 片真叶与第 3、4 片真叶的平均细胞数分别是 *rfc3-1* 植株相应叶片平均细胞数的 1.6 倍和 2.6 倍, 说明 *RFC3* 基因突变严重影响了植物细胞的分裂增殖; 建立了拟南芥叶片细胞数直接高效检测体系, 其检测结果的变异值(CV)均小于 5%。

**关键词:** 拟南芥; 突变体 *rfc3-1*; 细胞数; 检测体系

中图分类号: Q949.748.3 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2015)05-0480-06

## Establish the direct and high performance detection system for cell counts in leaves of *Arabidopsis thaliana*

Li Yichi<sup>1,2</sup>, Cui Kan<sup>1,2#</sup>, Cheng Peng<sup>1</sup>, Chen Jin<sup>1,2</sup>, Mo Xudong<sup>1,2</sup>, Zhang Xiaobao<sup>1,2</sup>, Xiao Langtao<sup>1,2</sup>, Xia Shitou<sup>1,2\*</sup>

(1.Hunan Provincial Key Laboratory of Phytohormones and Growth Development, Changsha 410128, China; 2.College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**Abstract:** In order to establish a direct and high performance detection system for cell counts in leaves of *Arabidopsis thaliana*, wild type (Col) and replication factor C subunit 3 mutant (*rfc3-1*) plants were selected as materials to study the effects of gene mutation on cell counts by the approach of flow cytometry after enzyme digestion, cell lysis, nuclear collection and dyeing. The results showed that cell counts in the first and the second or the 3<sup>rd</sup> and the 4<sup>th</sup> of true leaf in wild type plants were 1.6 or 2.6 times that of *rfc3-1* mutant plants respectively. It was indicated that proliferation of leaves was severely affected by gene mutation of *RFC3*. The established detection system for cell counts of leaves in *Arabidopsis* was direct and efficient with coefficient of variation (*cv*) less than 5%.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*; *rfc3-1* mutant; cell number; detection system

复制因子 C(RFC)是一个最初从人类 Hela 细胞提取物中纯化出来、在真核生物中普遍存在的保守基因家族, 包括 1 个大亚基(RFC1)和 4 个小亚基(RFC2-5)<sup>[1-4]</sup>。RFC 复合物在 DNA 复制和修复、细胞周期检测点控制和多细胞生物发育中起重要作用<sup>[5-8]</sup>。Xia 等<sup>[9-10]</sup>在用 EMS 筛选更多生物和非生物胁迫的抗性突变体时, 发现并鉴定出 *rfc3-1* 突变

体中存在一个由 G 到 A 的点突变。该点突变导致 RFC3 中一个非极性脂肪族氨基酸(Gly-85)变成了带负电的氨基酸(Asp), 从而影响了 RFC3 与其他亚基的结合, 并导致 *rfc3-1* 植株对病原菌的抗性增强, 植株生长发育受到明显影响, 株型矮小, 花瓣变小、变窄, 叶片小而狭长。为进一步研究 *RFC3* 基因突变对叶细胞分裂增殖的影响, 建立植物叶片细胞直

接高效检测体系,以量化分析 *rfc3-1* 的突变性状,笔者以拟南芥野生型(Col)植株和突变体 *rfc3-1* 植株为材料,采用流式细胞仪对叶片细胞数进行计数,现将结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

供试材料为拟南芥哥伦比亚生态型野生型植株(Col)和 *rfc3-1* 突变体。

### 1.2 主要药品与试剂

碘化丙啶(PI)、四盐酸精胺购自 Sigma 公司;MES(Methyl Methanesulfonate, 甲磺酸甲酯)、纤维素酶(cellulose R10)、离析酶(macerozyme R10)、水合氯醛、甘油和  $\beta$ -巯基乙醇购自鹏程生物有限公司;其他常规化学试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

叶片酶解液的配制:参照 Yoo 等<sup>[12]</sup>的方法,按比例分别称取纤维素酶、离析酶、KCl 和甘露醇,加去离子水溶解,然后向其中加入预先于 70 °C 预热 5 min 的 MES,于 55 °C 水浴加热 10 min 以钝化脱氧核糖核酸酶(DNAse)和蛋白酶(proteases),增加纤维素酶与离析酶的溶解度。将所配制溶液冷却至室温,加入 CaCl<sub>2</sub>、 $\beta$ -巯基乙醇和 BSA,混匀得植物叶片酶解液。所配制酶解液中各组分的浓度分别为纤维素酶 1.5%、离析酶 0.4%、KCl 20 mmol/L、MES 20 mmol/L、甘露醇 0.4 mol/L、CaCl<sub>2</sub> 10 mmol/L、 $\beta$ -巯基乙醇 5 mmol/L 和 BSA 0.1%,酶解液 pH 为 5.7。

细胞裂解缓冲液(pH 7.5)的配制:按比例分别称取 Tris base、Na<sub>2</sub>EDTA、四盐酸精胺、KCl 和 NaCl,以去离子水配制细胞裂解缓冲液,并加入 TritonX-100 和  $\beta$ -巯基乙醇,使 Tris、Na<sub>2</sub>EDTA、四盐酸精胺、KCl、NaCl 和  $\beta$ -巯基乙醇的浓度分别为 15、2、0.5、80、20、15 mmol/L, TritonX-100 为 0.5%,调节 pH 至 7.5,于 -20 °C 条件下保存。

磷酸缓冲液(pH 7.4)的配制:取 7.65 g NaCl、0.725 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 0.212 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,加入 800 mL 去离子水溶解后调节 pH 至 7.4,然后定容至 1 L。

洗涤溶液 I 的配制:按比例分别称取 NaCl、CaCl<sub>2</sub>、KCl 和葡萄糖,以去离子水配制洗涤溶液 I,使 NaCl、CaCl<sub>2</sub>、KCl 和葡萄糖的浓度分别为 154、125、5、5 mmol/L,加入 0.03% MES。

碘化丙啶(PI)染液的配制:用已配制的磷酸缓冲液溶解 PI,使其质量浓度为 100  $\mu$ g/mL,加入 100  $\mu$ g/mL 的 RNase 和 0.1% 的 TritonX-100,配制成碘化丙啶(PI)染液。

### 1.3 植物的种植与管理

按照 Xia 等<sup>[11]</sup>的方法,将 *rfc3-1* 突变体种子和野生型种子进行消毒后,置于 4 °C 环境中春化 3 d,春化后播种在灭菌过的培养土上。待种子发芽,幼苗生长 3 d 后揭开培养盘盖,约 10 d 后将幼苗移栽到新配制的培养土中,然后再在 16 h 光照(23 °C)/8 h 黑暗(21 °C) 培养室条件下继续培养 4~5 周后取材。

### 1.4 叶细胞数直接高效检测体系的建立

为了探寻 *rfc3-1* 叶片面积的变化是由叶细胞面积(体积)变化引起的还是由细胞数变化引起的,需要获取每片叶的全部离散细胞,以便对叶片细胞数进行精确计数,建立植物叶片细胞直接高效检测体系。

#### 1.4.1 植物叶片的酶解

从苗龄约 4~5 周生长良好的拟南芥野生型(Col)植株和 *rfc3-1* 突变体植株中随机选取同等数量的、状态良好的植株。分别剪取植株的第 1、2 片和第 3、4 片真叶,并将第 1 片与第 2 片真叶、第 3 片与第 4 片真叶混在一起取样。用刀片将叶片均匀横切成宽约 0.1 mm 的窄条,将窄条放入圆底离心管中,加入新配制的酶解液,每 2 mL 叶片酶解液中加入 10 片叶片窄条,立即用锡纸包裹遮光,于 22 °C 30~40 r/min 摇床上黑暗酶解 12 h,直到所有叶片窄条酶解完全为止。

#### 1.4.2 植物细胞裂解与细胞核的收集

将酶解完全的叶片酶解液用孔径 38.5  $\mu$ m 的钢筛过滤后,于 1 500 g 离心 10 min,去上清。加入洗涤溶液 I 溶解洗涤沉淀,并用装有 500  $\mu$ L 枪头的移液枪(剪去顶端 1~2 cm)吹吸沉淀多次,直至沉淀

完全溶解,再于 1 500 g 离心 10 min,去上清,留在管底的绿色沉淀即为叶片原生质体。加入含 0.5% Triton-100 的预冷细胞裂解缓冲液,再用装有 200  $\mu$ L 枪头的移液枪(剪去顶端 1~2 cm)吹吸沉淀多次,直至溶解完全,再冰浴 5~10 min,使叶片原生质体破裂细胞核释放出来。于 4  $^{\circ}$ C 条件下 1 500 g 离心 10 min,去上清,沉淀再次用预冷细胞裂解溶解。重复上述步骤 1~3 次,直至沉淀为灰黑色。

#### 1.4.3 细胞核的染色与流式细胞仪计数

在上述所得灰黑色沉淀中加入含 0.5% Triton-100 的磷酸缓冲液(pH 7.4)500  $\mu$ L,用装有 200  $\mu$ L 枪头的移液枪(剪去顶端 1~2 cm)吹吸沉淀多次,直至沉淀完全溶解后,加入等体积的 PI 染液,混匀,冰浴 30 min 后用双层孔径为 38.5  $\mu$ m 的尼龙膜过滤,用流式细胞仪检测分析滤液细胞核数,根据每次检测时流式细胞仪吸取样本的体积和叶片滤液的总体积,统计出叶片细胞数。

#### 1.5 原生质体计数板计数与叶表皮细胞计数

为了对比和验证本试验中建立的细胞数直接高效检测体系,对野生型(Col)植株和 *rfc3-1* 突变体植株的叶片样本进行原生质体细胞计数板统计计数和叶表皮细胞统计计数。

每叶细胞数的统计:参照 Yoo 等<sup>[12]</sup>的方法,在植物叶片样本酶解完全后,直接取样置于细胞计数板上,显微观察并进行原生质体计数,再根据酶解液的体积粗略统计出每叶的细胞数。

叶表皮细胞计数方法:参照 Xia 等方法<sup>[11]</sup>,用水合氯醛、甘油、蒸馏水<sup>[13]</sup>将叶细胞内含物清除,用 Zeiss Axiovert 200M 显微镜观察叶片上、下表皮细胞,用 AxioCam HRm 数码相机显微照相,然后用

软件计算叶片表面积和表皮细胞的平均面积,并由此计算出上、下表皮的细胞数。

用数码相机获取叶片图片后用软件计算叶片面积。

## 2 结果与分析

### 2.1 野生型(Col)植株和 *rfc3-1* 突变体植株叶片的形态特征

在相同培养条件下,*rfc3-1* 突变体植株在生长早期就显现出与野生型(Col)植株明显的差异特征:株型矮小,叶小而狭长(图1)。

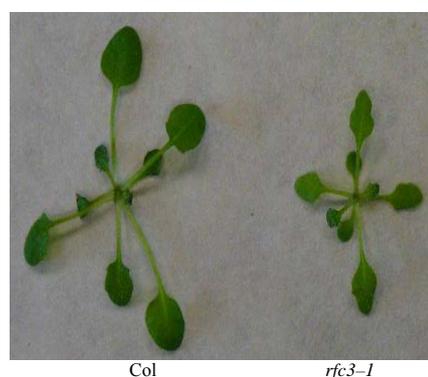


图 1 野生型(Col)和 *rfc3-1* 突变体的叶片形态  
Fig.1 Leaf morphology of wild type (Col) and *rfc3-1* mutant plants

为量化这种差异特征,本研究中检测并统计了生长约 30 d 的野生型(Col) 幼株和 *rfc3-1* 突变体幼株第 3、4 叶的叶柄长、叶片长、叶宽度和叶面积(表 1),发现 *rfc3-1* 叶柄长度比野生型的短 24.90%,叶片长、宽度分别少 21.79% 和 33.24%,而叶片面积只有野生型相应叶片面积的 54.66% ( $P < 0.01$ ),说明 *RFC3* 基因突变导致叶片面积减少了 45.34% ( $P < 0.01$ )。

表 1 生长约 30 d 幼株第 3、4 片叶的形态指标

材料	叶柄长/mm	叶片长/mm	宽度/mm	叶面积/mm <sup>2</sup>
Col	(6.73±0.12)A	(5.65±0.08)A	(5.50±0.09)A	(25.35±0.52)A
<i>rfc3-1</i>	(5.06±0.09)B	(4.44±0.07)B	(3.67±0.05)B	(14.14±0.38)B

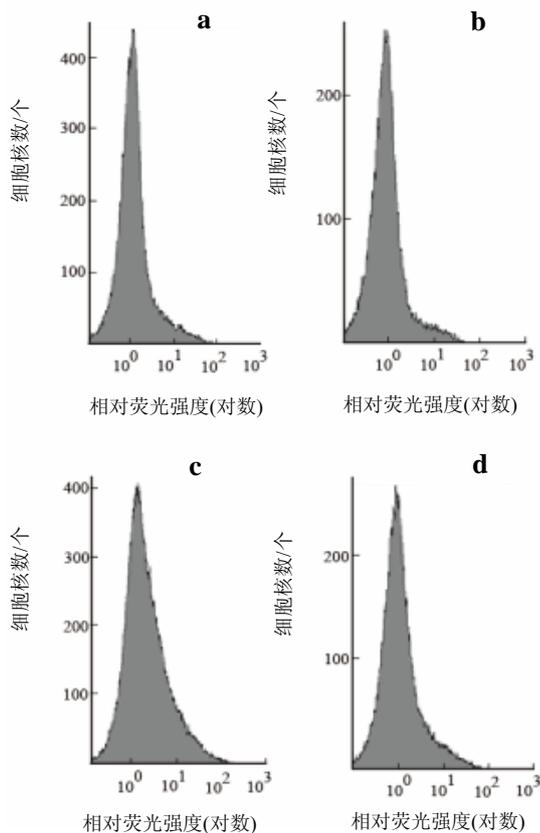
### 2.2 植物细胞数的直接高效检测结果

在不同试验条件下对植物叶片进行酶解的结果表明,在温度为 22  $^{\circ}$ C、转速 30~40 r/min 摇床上

锡纸包裹遮光条件下,黑暗酶解 12 h,所有叶片窄条可被完全酶解。

叶片酶解后,去除叶绿体和线粒体等悬浮颗粒杂质(含质粒 DNA),获得灰黑色的细胞核沉淀。通

过优化细胞核染色与分析检测参数,得到最佳试验条件。用流式细胞仪检测计数时将仪器参数设置如下:FS 为 Volts 77-gain 1;SS 为 Volts 66-gain 1;PI 为 Volts 851-gain 1;AUX 为 Volts 514-gain 5。每次计数时间 30 s。野生型(Col)植株和突变体 *rfc3-1* 植株第 1、2 片与第 3、4 片真叶的细胞核数计数结果的变异值都小于 5%,表明有效数据在正常的变异范围内。多次重复的试验结果一致,完全符合检测要求。



a,c 为野生型(Col) 植株第 1、2 和 3、4 真叶叶片细胞核计数; b,d 为 *rfc3-1* 突变体植株第 1、2 和 3、4 真叶叶片细胞核计数。

图 2 野生型(Col) 及 *rfc3-1* 突变体叶片细胞核数的流式细胞仪检测分析结果

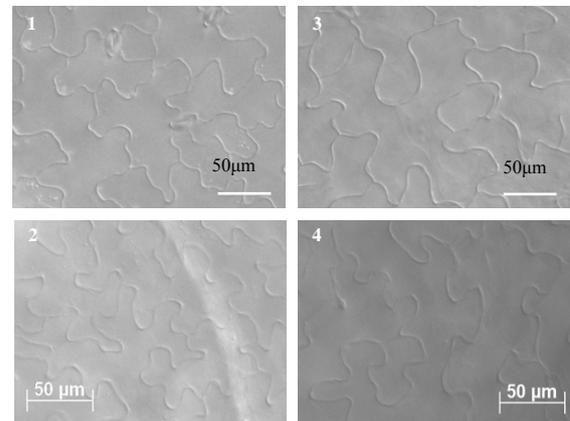
Fig.2 Numbers of cell nuclei from leaf in wild type (Col) and *rfc3-1* mutant plants gotten by flow cytometry

根据检测结果计算出每片真叶细胞数的结果表明,野生型(Col)植株第 1 片与第 2 片真叶细胞数的平均值每片叶为  $4.62 \times 10^4$  个,是 *rfc3-1* 突变体植株第 1 片与第 2 片真叶细胞数(平均每片叶为  $2.84 \times 10^4$  个)的 1.6 倍;野生型(Col) 植株第 3 片与第 4 片真叶细胞数的平均值(每片叶  $1.14 \times 10^5$  个)是 *rfc3-1* 突变体植株第 3 片与第 4 片真叶细胞数平均值(每片叶  $4.45 \times 10^4$  个)的 2.6 倍,表明 *rfc3-1* 突

变叶细胞数大幅度降低,说明 *RFC3* 基因突变削弱了植株细胞分裂的增生能力。

### 2.3 所建立的检测体系与原生质体计数板计数和叶表皮细胞计数法的比较

原生质体细胞计数板统计结果显示,野生型(Col) 植株第 1 片与第 2 片真叶细胞数平均每片叶约为  $5.28 \times 10^4$  个,是 *rfc3-1* 突变体植株的第 1 片与第 2 片真叶细胞数(平均每片叶约为  $2.77 \times 10^4$  个)的 1.9 倍;野生型(Col) 植株第 3 片与第 4 片真叶细胞数的平均值(每片叶约为  $1.18 \times 10^5$  个)是 *rfc3-1* 突变体植株第 3 片与第 4 片真叶细胞数(平均每片叶约为  $4.43 \times 10^4$  个)的 2.6 倍。该结果与本试验所建立的检测体系检测结果基本一致。



1 Col 下表皮细胞; 2 Col 上表皮细胞。3 *rfc3-1* 下表皮细胞; 4 *rfc3-1* 上表皮细胞。

图 3 野生型(Col)植株和 *rfc3-1* 突变体植株真叶的表皮细胞形态

Fig.3 Morphology of epidermal cell from leaf in wild type (Col) and *rfc3-1* mutant plants

用显微镜系统自带软件统计图 3 中叶表皮细胞的面积,结果表明 *rfc3-1* 突变体植株真叶的上、下表皮细胞表面积稍大于野生型(Col) 植株相应叶片的上、下表皮细胞表面积。野生型(Col) 植株第 3 片真叶上表皮细胞数平均每片叶约 6 423 个,是 *rfc3-1* 突变体植株第 3 片真叶上表皮细胞数平均值(每片叶约 2 086 个)的 3.08 倍。野生型(Col) 植株第 3 片真叶下表皮细胞平均数(每片叶约为 4 259 个)是 *rfc3-1* 突变体植株第 3 片真叶下表皮细胞数平均值(每片叶约为 1 427 个)的 2.99 倍。结果表明表皮细胞数真实反映出了 *rfc3-1* 突变体叶细胞数的突变特性。

### 3 结论与讨论

*RFC3* 基因突变对植物细胞分裂增殖的影响。

拟南芥 *AtRFC1* (*RFC* 复合物大亚基)在植株花器官发育中有重要作用<sup>[11]</sup>。*AtRFC1* 可能在拟南芥基因组稳定性和基因转录沉默(transcriptional gene silencing, TGS)中起重要作用<sup>[14]</sup>,还可能在减数分裂过程染色体交叉交换中起重要作用而影响配子体发育<sup>[15-16]</sup>。Xia 等<sup>[9-10]</sup>通过 EMS 诱变和图位克隆突变体基因,发现在低浓度 SA 诱导下,*rfc3-1* 植株体内抗病蛋白 PR1 和 PR2 的表达量大幅度上调,对病原菌的抗性显著增强。遮光培养 2.5 d 时 *rfc3-1* 黄化苗下胚轴变得更长,这可能是由 *RFC* 基因突变,造成 *rfc3-1* 突变体纯合子植株的黄化幼苗下胚轴表皮细胞长度大于野生型植株的下胚轴表皮细胞长度所致<sup>[17-18]</sup>。本研究中发现,在相同培养条件下,*rfc3-1* 突变体植株第 3、4 片真叶的面积只有野生型的 54.66%,较小的叶片面积可能是由更小体积或更少数目的细胞引起。

植物细胞数的检测。为研究 *RFC3* 基因突变对植物细胞分裂增殖的影响,笔者通过叶片酶解、细胞裂解和细胞核收集与染色后,采用流式细胞仪检测分析了 *RFC3* 基因突变对突变体 *rfc3-1* 植株叶片细胞数的影响,建立了植物叶片细胞直接高效检测体系,并获得了 CV 值(变异值)皆小于 5%的细胞核计数图。近年来,虽然流式细胞仪逐渐被用于对植物染色体倍性进行检测<sup>[19]</sup>,但尚未有关于植物细胞数检测的报道。本试验中发现,拟南芥野生型(Col)植株第 1、2 片和第 3、4 片真叶细胞数平均值分别是 *rfc3-1* 突变体植株相应叶片细胞数平均值的 1.6 倍和 2.6 倍,进一步证明了 *RFC3* 基因突变削弱了植株的细胞分裂增生能力。

以同样样本进行原生质体细胞计数板统计计数得到的结果,与本试验建立的检测体系测定结果基本一致,但数据的标准差稍大。其主要原因是:在取样计数时,若酶解时间过短,将导致细胞分离不完全,粘连体多;若酶解时间过长,原生质体容易破裂,获得完整细胞的比例不高,导致统计误差大。叶表皮细胞统计计数结果也反映出 *RFC3* 基因突变对植株第 3 片真叶细胞分裂增殖的显著影响,

但只得到表皮细胞的数目或每一横(竖)切面上细胞的数目,而难以对整个叶片细胞进行计数,且需要长时间的显微镜和专业软件操作。与之相比,本试验中建立的检测体系可更直接、客观、精确地检测拟南芥叶片细胞数,且操作时间较短,操作方便,重复性好。

综合分析结果表明,拟南芥野生型植株第 1、2 片真叶的细胞数平均值是 *rfc3-1* 相应叶片细胞数平均值的 1.6 倍,第 3、4 片真叶的细胞数平均值是 *rfc3-1* 的 2.6 倍,表明 *RFC3* 基因突变严重影响了植物细胞分裂增殖,导致 *rfc3-1* 叶片细胞数大幅减少。本试验体系获得的细胞(核)计数的变异值(CV 值)皆小于 5%,与原生质体细胞板计数或叶表皮细胞计数相比,具有高效、精确和重现性好的优势。

#### 参考文献:

- [1] Tsurimoto T, Stillman B. Purification of a cellular replication factor, RF-C, that is required for coordinated synthesis of leading and lagging strands during simian virus 40 DNA replication *in vitro*[J]. Molecular and Cellular Biology, 1989, 9(2): 609-619.
- [2] Chen M, Pan ZQ, Hurwitz J. Studies of the Cloned 37-kDa Subunit of Activator 1 (Replication Factor C) of HeLa Cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1992, 89(12): 5211-5215.
- [3] Cai J, Gibbs E, Uhlmann F, et al. A complex consisting of human replication factor C p40, p37, and p36 subunits is a DNA-dependent ATPase and an intermediate in the assembly of the holoenzyme[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(30): 18974-18981.
- [4] Furukawa T, Ishibashi T, Kimura S, et al. Characterization of all the subunits of replication factor C from a higher plant, rice (*Oryza sativa* L.), and their relation to development[J]. Plant Molecular Biology, 2003, 53(1/2): 15-25.
- [5] Culligan K M, Hays J B. DNA mismatch repair in plants, an *Arabidopsis thaliana* gene that predicts a protein belonging to the MSH2 subfamily of eukaryotic MutS homologs[J]. Plant Physiology, 1997, 2(2): 833-839.
- [6] Pascucci B, Stucki M, Jónsson Zo, et al. Long patch base excision repair with purified human proteins, DNA ligase I as patch size mediator for DNA polymerases delta and epsilon[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1999, 47: 33696-33702.

- [7] Shimada M , Okuzaki D , Tanaka S , et al . Replication factor C3 of *Schizosaccharomyces pombe* a small subunit of replication factor C complex , plays a role in both replication and damage checkpoints[J] . *Molecular Biology of the Cell* , 1999 , 10(12) : 3991–4003 .
- [8] Kim Hs , Brill S j . Rfc4 interacts with Rpa1 and is required for both DNA replication and DNA damage checkpoints in *Saccharomyces cerevisiae*[J] . *Molecular and Cellular Biology* , 2001 , 21(11) : 3725–3737 .
- [9] Xia S , Zhu Z , Hao L , et al . Negative regulation of systemic acquired resistance by replication factor c subunit3 in *Arabidopsis*[J] . *Plant Physiology* , 2009 , 150(4) : 2009–2017 .
- [10] Xia S , Xiao L , Gannon P , et al . *RFC3* regulates cell proliferation and pathogen resistance in *Arabidopsis*[J]. *Plant Signaling & Behavior* , 2010 , 5(2) : 168–170 .
- [11] Xia St , Xiao Lt , Bi Dl , et al . *Arabidopsis* replication factor C subunit 1 plays an important role in embryogenesis[J] . *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* , 2007 , 33(3) : 179–187.
- [12] Yoo S d , Cho Y h , Sheen J . *Arabidopsis* mesophyll protoplasts : A versatile cell system for transient gene expression analysis[J] . *Nature Protocols* , 2007 , 2(7) : 1565–1572 .
- [13] Ohad N , Margossian L , Hsu Yc , et al . A mutation that allows endosperm development without fertilization[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* , 1996 , 93(11) : 5319–5324 .
- [14] Liu Q . DNA replication factor C1 mediates genomic stability and transcriptional gene silencing in *Arabidopsis* [J] . *The Plant Cell* , 2010 , 22(7) : 2336–2352 .
- [15] Yang Liu , Yingtian Deng , Gang Li , et al . Replication factor C1(RFC1) is required for double-strand break repair during meiotic homologous recombination in *Arabidopsis*[J] .*The Plant Journal* ,2013 ,73(1) :154–165 .
- [16] Wang Yingxiang ,Cheng Zhihao ,Huang Jiyue ,et al .The DNA replication factor RFC1 is required for interference-sensitive meiotic crossovers in *Arabidopsis thaliana*[J]. *PLoS Genetics* , 2012 , 8(11) : 52–53 .
- [17] 夏石头 , 匡勇 , 萧浪涛 . 拟南芥复制因子 C 亚基 3 在黄化苗下胚轴伸长生长中的作用[J] .*植物生理学通讯* , 2009 , 45(10) : 991–994 .
- [18] 陈良城 , 陈锦 , 崔看 等 . 复制因子 C 亚基 3 基因(*RFC3*) 突变降低了拟南芥植株复制损伤的修复能力[J] .*植物生理学报* , 2013 , 49(5) : 485–492 .
- [19] Jan Suda . Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry[J] . *Nature Protocols* , 2007 , 2(9) : 2233–2244 .

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 王 库