

DOI:10.14188/j.ajsh.2019.06.008

“红颜”草莓原生质体制备及瞬时转化体系的建立

杜小云[†], 王震[†], 王翠华, 曾弓箭, 沈祥陵*

(三峡大学 三峡区域植物遗传与种质创新重点实验室, 湖北 宜昌 443000)

摘要: 为探索“红颜”草莓悬浮细胞系原生质体提取的最优条件,并建立“红颜”草莓原生质体瞬时转化体系,以“红颜”草莓悬浮细胞为材料,对酶液组成、酶解温度、酶解方式进行研究。用PEG介导的瞬时转化法将标记基因 *GFP* 转化到“红颜”草莓原生质体中。结果显示:以“红颜”草莓悬浮细胞系作为分离材料,酶液组合为CPW中含有0.5%PVP+0.1%MES+1%纤维素酶+0.5%离析酶+0.01%半纤维素酶+0.9 mol/L甘露醇,在低速(50 r/min)恒温(31℃)震荡下进行酶解反应,酶解10 h时,达到“红颜”草莓原生质体最佳分离效果,每克鲜重产量可得原生质体 6×10^8 个,活力值可达93.0%。PEG介导法成功将含有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的植物表达载体转化“红颜”草莓悬浮细胞原生质体,转化效率达44%。通过实验筛选得到“红颜”草莓悬浮细胞原生质体的最佳制备条件,建立“红颜”草莓悬浮细胞原生质体的瞬时转化体系,为进一步开展“红颜”草莓功能基因及合成生物学研究奠定基础。

关键词: “红颜”草莓;悬浮细胞系;原生质体制备;瞬时转化体系

中图分类号: Q7

文献标识码: A

文章编号: 2096-3491(2019)06-0532-07

Preparation of protoplasts and establishment of transient transformation system of Hongyan strawberry

DU Xiaoyun[†], WANG Zhen[†], WANG Cuihua, ZENG Gongjian, SHEN Xiangling*

(Key Laboratory of Three Gorges Regional Plant Genetics & Germplasm Enhancement, China Three Gorges University, Yichang 443000, Hubei, China)

Abstract: In order to explore the optimal conditions for protoplast extraction of Hongyan strawberry suspension cell line, the transient transformation system was established, and the suspension cell of Hongyan strawberry was used as material to study the composition of enzyme solution, enzymatic hydrolysis temperature and enzymatic hydrolysis method. The marker gene *GFP* was transformed into the protoplast of Hongyan strawberry by PEG-mediated transient transformation. When the Hongyan strawberry suspension cells were used as the separation material, and the composition of enzyme solution was 0.5% PVP+0.1% MES+1% cellulase+0.5% isolation enzyme+0.01% hemicellulase+0.9 mol/L mannitol in CPW, enzymatic hydrolysis was carried out under low speed (50 r/min), constant temperature (31℃) shaking for 10 h, the best separation effect of protoplasts of Hongyan strawberry can be achieved. The protoplast yield was up to 6×10^8 and the vitality value was up to 93.0%. By PEG-mediated method, the plant expression vector containing *GFP* was transformed into the protoplast of the Hongyan strawberry suspension cell with a transformation efficiency of 44%. The optimal preparation conditions of protoplasts of Hongyan strawberry suspension cells were obtained, and transient transformation system of protoplasts of Hongyan strawberry suspension cells was established.

收稿日期: 2019-07-03 修回日期: 2019-10-21 接受日期: 2019-11-14

作者简介: 杜小云(1994-),女,硕士生,研究方向为分子植物育种。E-mail: amber_yun@163.com。王震(1992-),男,硕士生,研究方向为分子植物育种。E-mail: wangzhen921231@163.com。杜小云、王震对本研究有同等贡献,为本文共同第一作者

* 通讯联系人: 沈祥陵(1982-),男,博士,教授,现主要从事植物育种与分子生物学研究。E-mail: shenxl1982@hotmail.com

基金项目: 三峡大学高层次人才科研启动基金(2016GCRC02)

引用格式: Du X Y, Wang Z, Wang C H, *et al.* Preparation of protoplasts and establishment of transient transformation system of Hongyan strawberry [J]. Biotic Resources, 2019, 41(6): 532-538.

杜小云,王震,王翠华,等. “红颜”草莓原生质体制备及瞬时转化体系的建立[J]. 生物资源, 2019, 41(6): 532-538.

These studies lay a foundation for further research on functional genes and synthetic biology of Hongyan strawberry.

Key words: Hongyan strawberry; suspension cell line; protoplast preparation; transient transformation system

0 引言

草莓(*Fragaria ananassa* Duch.)属蔷薇科(Rosaceae)草莓属(*Fragaria*)多年生草本植物,草莓喜温凉气候,喜光但又有较强的耐阴性,宜生长在肥沃、疏松的中性或酸性土壤中,原产于南美洲,种植面积广泛,现在中国各地和欧洲等地均有种植^[1]。草莓果实含有丰富的营养价值,素有“水果皇后”之称,包括多种维生素及矿物质,其中含量丰富的胡萝卜素与维生素A可起到缓解夜盲症的功效,丰富的膳食纤维能够促进肠道蠕动,改善便秘^[2]。同时,草莓色泽鲜红,口感酸甜,具有生长周期短、上市早、效益高等特点,广受消费者喜爱,是一种营养价值和经济价值较高的水果种植品种^[3]。

草莓的优良栽培品种很多,全世界约有2 000余种,但实现大面积栽培的优良种只有几十个,包括“红颜”、“明晶”、“明旭”、“朔丰”等品种^[4,5]。其中“红颜”草莓具有味道甘甜,色泽艳丽,果形大,硬度适中,耐储运等优点,是最受欢迎的草莓品种之一^[6]。“红颜”草莓又称红颊,是日本静冈县用章姬与幸香草莓品种杂交培育成的早熟栽培品种^[7]。“红颜”草莓长势旺,产量高,根系生长能力和吸收能力强,连续结果性能好,采摘期可从当年12月持续至次年5月份,是具有良好发展前景的优良草莓品种^[8]。

原生质体是指脱去了细胞壁的细胞,含有该物种的全部遗传信息,在合适的培养条件下,具备再生为与亲本相似个体的全能性^[9]。细胞壁的存在会阻碍外源DNA进入细胞,因此原生质体被广泛应用于DNA、质粒等分子的转化,是遗传转化的理想受体^[10]。原生质体用于遗传转化有多种途径,包括农杆菌转化法、显微注射法和PEG介导转化法等^[11,12]。除进行DNA和蛋白质的转染外,原生质体可用于进行原生质体融合,这能够克服远缘杂交障碍,实现体细胞杂交,或用于整个植物的再生^[13]。还可用于对生物膜的研究,包括高分子和病毒的摄取等。这些原因使得原生质体成为生物学相关研究的重要媒介^[14]。

草莓是一个高度杂合、多种倍性及具有丰富野生资源的植物品种,草莓原生质体的有效分离对于草莓的相关研究具有重要意义。史永忠等^[15]利用经5次继代培养的草莓花药愈伤组织进行草莓原

生质体的制备,最终产量达每克鲜重产 1.47×10^6 个,活力为67.35%。有学者以草莓花药为实验材料进行原生质体分离,最终产量可达到每克鲜重产 16.35×10^6 个,活力达84.6%^[16]。张学英等^[17]对草莓原生质体的分离条件进行了探讨,结果显示继代5 d的悬浮细胞系是草莓原生质体分离的最佳材料,并对酶液组成进行了相关研究,经富集后的原生质体产量达到每克鲜重产 17.02×10^6 个,活力达94.3%。有研究对“丰香”和“红颜”草莓的原生质体提取和细胞融合进行了条件优化,使草莓也能成为实验材料,提取的“红颜”草莓原生质体数量达 7.5×10^6 个/mL^[18]。目前对于草莓原生质体的研究工作还在继续,但对于“红颜”草莓品种的研究和报道较少,本研究对“红颜”草莓原生质体的制备条件进行了初步探索,包括酶液组成、酶解温度、酶解方式等因素对“红颜”草莓原生质体制备的影响,得到了“红颜”草莓原生质体制备的有效方案,并将构建好的35S::GFP瞬时表达载体成功转入“红颜”草莓原生质体,转化效率达44%,为后续“红颜”草莓原生质体的遗传转化等生物学研究提供了参考。

1 材料和方法

1.1 供试材料及仪器

本实验以“红颜”草莓为研究材料,该材料由湖北勤劳农夫生态农业股份有限公司提供。

MES: 2-(N-吗啉)乙磺酸(2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid)

PVP: 聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl pyrrolidone)

PEG溶液: 40%PEG4000、0.2 mol/L甘露醇、0.1 mol/L CaCl₂(现配现用,4℃最多保存5 d)

W5溶液: 0.125 mol/L CaCl₂、0.154 mol/L NaCl、5 mmol/L KCl、2 mmol/L MES,用KOH调节pH至5.6,高温高压灭菌,室温保存

WI溶液: 0.5 mol/L甘露醇、4 mmol/L MES、20 mmol/L KCl,用KOH调pH至5.6,高温高压灭菌,室温保存

以上药品或试剂均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

CPW溶液: (KH₂PO₄: 27.2 mg/L、KNO₃: 101 mg/L、CaCl₂·2H₂O: 1480 mg/L、MgSO₄·7H₂O: 246 mg/L、CuSO₄·5H₂O: 0.025 mg/L、KI: 0.16 mg/L,该溶液配制所需试剂购于国药集团化学试剂有限

公司)。

MS(Murashig-Skoog)粉末购于上海伊卡生物技术有限公司;6-苄氨基嘌呤(6-benzyl aminopurine, 6-BA)、萘乙酸(1-naphthylacetic acid, NAA)、甘露醇购于上海生物制药有限公司;蔗糖购于天津科密欧化学试剂有限公司;琼脂粉、纤维素酶、离析酶、半纤维素酶购于北京索莱宝科技有限公司。

EVOS M5000 荧光显微镜(赛默飞科技中国有限公司)

1.2 继代培养

为得到理想的“红颜”草莓新生嫩叶作为原生质体制备的材料,该研究选取长势良好的“红颜”草莓植株于无菌环境下消毒处理并进行继代培养(培养基配方:MS 粉末 4.4 g/L,蔗糖 30 g/L,琼脂 10 g/L,6-BA 0.5 mg/L, NAA 0.1 mg/L,最终调至 pH 为 5.8)。

1.3 原生质体分离

取继代培养后的“红颜”草莓幼嫩叶片 0.02 g, 70% 酒精消毒 40 s, 无菌水冲洗 3 遍,再用 0.5% 次氯酸钠溶液浸泡 7 min, 无菌水冲洗 5 遍,最后用无菌纱布吸收掉叶片上的多余水分。将叶片剪切成 3 mm×5 mm 大小后放入 9 mol/L 甘露醇溶液中预处理 2 h。本试验采用酶解法在设定条件下对“红颜”草莓嫩叶进行原生质体的分离制备,酶液组成如表 1 所示。酶液使用 0.1% 的 MES 和 0.5% 的 PVP 溶解于 CPW 溶液配制而成,最终调节 pH 值为 5.6。使用 0.2 μm 滤膜过滤除菌后放入至 50 ℃ 水浴锅中预热 10 min,按照酶液与材料 10:1~20:1 的比例加入到已剪切好的叶片中。黑暗环境,在不同温度(28、29、30、31 和 32 ℃)条件下,分别以 30、40、50、60 和 70 r/min 不同震摇转速及静置方式下进行酶解反应。

1.4 原生质体的富集和计数

酶解 4 h 时开始测量,每隔一小时观察并记录一次“红颜”草莓原生质体的活力,酶解物经 200 目不锈钢筛网过滤,使用缓冲溶液(CPW 溶液中加入 0.1% MES, 0.5% PVP, 0.9 mol/L 甘露醇)进行洗涤,离心机 600 r/min 离心 5 min 后去除上清液,缓冲液重悬后使用血球计数板进行计数。

1.5 原生质体活力的测定

取洗涤过的原生质体悬浮液 0.5 mL,加入荧光素双醋酸酯(fluorescein diacetate, FDA)溶液使其终浓度为 0.01%,室温(25 ℃)静置 5 min 后于荧光显微镜下观察,视野中发绿色荧光的为有活力的原生质体,没有产生荧光的原生质体无活力。

表 1 不同分组的酶液组成

Table 1 Composition of different groups of enzymes

处理分组	酶液组成(m/V)		
	纤维素酶	离析酶	半纤维素酶
1	0.5	0.3	0
2	0.5	0.5	0.01
3	0.5	0.7	0.03
4	1	0.3	0
5	1	0.5	0.01
6	1	0.7	0.03
7	1.5	0.3	0
8	1.5	0.5	0.01
9	1.5	0.7	0.03
10	2	0.3	0
11	2	0.5	0.01
12	2	0.7	0.03

1.6 原生质体分离纯化方法优化及提取效率检测

将上述研究得到的最佳酶液组成、最适酶解温度以及酶解方式进行组合,使用最优条件对草莓原生质体进行再次提取,对原生质体的数量和活力进行检测。

1.7 原生质体的转化与信号检测

将原生质体浓度调至每 mL 为 5×10^5 个,取 200 μL 与 20 μg 已构建好的 35S::GFP 瞬时表达载体混合,再加入 220 μL 的 PEG 溶液,轻敲混匀,在黑暗条件下诱导转化混合物 20 分钟。室温下用 880 μL 的 W5 溶液稀释转化混合液,然后轻柔颠倒摇动离心管,使之混合完全以终止转化反应。100 ×g 离心 2 min,去上清,再用 W5 溶液清洗一次,去上清,用 1 mL 的 WI 溶液轻轻重悬原生质体于多孔组织培养皿中,室温黑暗静置培养。24 h 后取出,100 ×g 离心 2 min,去部分上清,对原生质体溶液进行浓缩,取适量制片,在荧光显微镜下观察 GFP 表达情况。观察多个视野下的原生质体转化情况,按照如下公式计算转化率:

原生质体转化效率(%)=(激发光下发出绿色荧光的原生质体数目/明场下所有原生质体数)×100%

2 结果与分析

2.1 酶液组成

在“红颜”草莓原生质体的分离过程中,酶液组成和浓度对原生质体的产量和活力有较大影响。如表 2 所示,我们选取了 3 种酶进行组合,对原生质体

分离的酶液组合进行探索,结果发现,纤维素酶、离析酶和半纤维素酶的组合效果要优于纤维素酶和离析酶的组合。在同一纤维素酶浓度下,随着离析酶浓度的提高,原生质体产量先增加后降低,这可能与离析酶浓度升高损伤原生质体结构有关。在同一纤维素浓度和离析酶浓度下,随着半纤维素酶浓度的增加,原生质体产量呈先增加后降低变化,根据此实验结果,我们得到了“红颜”草莓原生质体分离的酶液组合,即:1% 纤维素酶+0.5% 离析酶+0.01% 半纤维素酶+0.9 mol/L 甘露醇,该组合分离效果最好,分离结果如表2所示。

表2 原生质体活力和数量的测定

Table 2 Determination of protoplast viability and quantity

处理分组	活力/%	原生质体数量/个·g ⁻¹
1	78.5	3.7×10 ⁸
2	80.5	4.3×10 ⁸
3	83.6	5.0×10 ⁸
4	87.2	5.2×10 ⁸
5	93.0	6.0×10 ⁸
6	86.3	5.6×10 ⁸
7	82.9	4.2×10 ⁸
8	84.6	5.0×10 ⁸
9	85.3	5.2×10 ⁸
10	80.6	4.0×10 ⁸
11	82.5	4.7×10 ⁸
12	83.6	5.1×10 ⁸

2.2 酶解温度

温度能够影响酶的活性,从而影响“红颜”草莓原生质体的分离。温度过高或过低都会对酶的活性产生影响,如图1所示,随着温度的升高,“红颜”草莓原生质体的活力呈现先上升后下降的变化,当温度达到31℃时,原生质体活力最高,达到93%。因此我们将该温度作为“红颜”草莓原质体分离的最适酶解温度。

2.3 酶解方式

该研究中,我们采用不同转速震摇和在静置方式进行酶解反应,发现经过相同处理时间,震摇方式比静置方式得到的“红颜”草莓原生质体数量更多,活力更好,能更快地达到较充分的酶解状态。其中震摇速率能够影响原生质体的数量和活力,结果如图2和图3所示,当震摇速率达到50 r/min时,得到的原生质体数量多,活力高,因为震摇能够促进原生质体的分散,增加酶液与细胞壁的接触,加快酶解进程,但过快的速率也可能损伤原生质体,

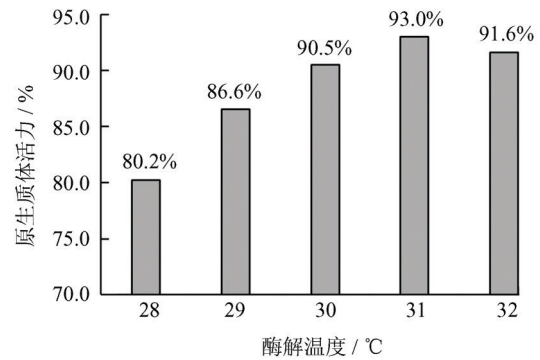


图1 温度对原生质体制备的影响

Fig. 1 Effect of temperature on protoplast preparation

导致“红颜”草莓原生质体活力下降。

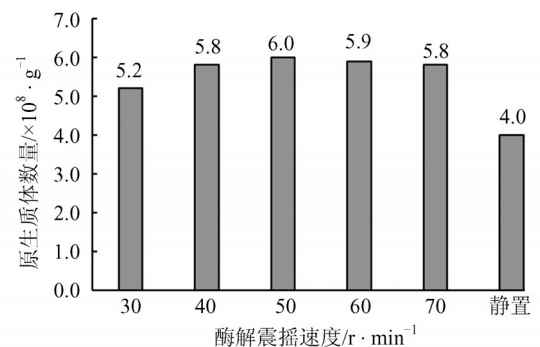


图2 酶解方式对原生质体数量的影响

Fig. 2 Effect of enzymatic hydrolysis on the number of protoplasts

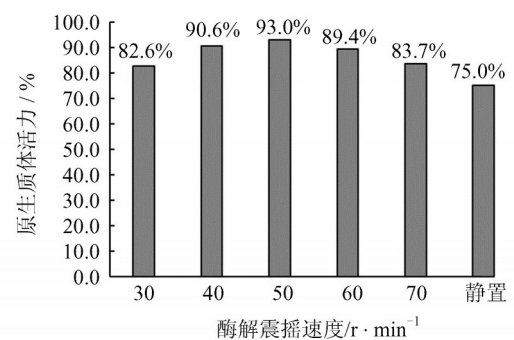


图3 酶解方式对原生质体活力的影响

Fig. 3 Effect of enzymatic hydrolysis on protoplast viability

2.4 原生质体分离过程

本研究探索了“红颜”草莓原生质体的制备方法,通过已探索得到的酶液组成和浓度、温度、酶解方式等,我们从酶解5 h开始对原生质体的分离情况进行显微观察,观察结果如图4所示,当酶解时间为5 h时,叶片边缘细胞与叶片发生脱离;6 h时,叶片边缘细胞与叶片脱离程度加大;当酶解7 h时已出现整体脱落的细胞团,且细胞开始分散;酶解至8

h时,已能够观察到分散的细胞团;酶解至9 h出现少量形态完整的原生质体,酶解10 h时,原生质体数量最多,分散程度最好,但有少部分原生质体开始出现破碎现象。将处理10 h的原生质体进行富集、洗涤之后使用血球计数板计数,得到 6×10^8 个/g,活力值达到93.0%。

2.5 PEG介导“红颜”草莓悬浮细胞原生质体的瞬时转化

利用PEG介导转化“红颜”草莓悬浮细胞原生质体的瞬时转化进行了研究,将构建好的35S::GFP瞬时表达载体利用PEG介导法导入草莓原生质体细胞,室温孵育24 h于荧光显微镜下观察GFP蛋白的荧光信号,结果如图5所示,显示了在特定波长激发光下观察到的GFP绿色荧光,经计算转化效率达44%。

同时,利用RT-PCR验证方法,证明在转化后的草莓原生质体中,含有GFP表达原件的质粒能够高效瞬时表达,如图6所示。这为草莓功能基因组研究和相关重要功能基因研究提供了重要的实验材料和遗传转化方法。

3 讨 论

该研究通过对酶液组成、酶解温度、酶解方式等因素的研究,得到了制备“红颜”草莓原生质体的有效方法,并通过该方法获得了数量多、活力高的“红颜”草莓原生质体,但影响原生质体制备的因素还有很多,细心注意实验过程中的每一步骤,才可能获得优

质的原生质体,为后续研究提供高质量的材料保证。

实验的前期准备对于实验的顺利进行至关重要,该实验需要不断调整实验条件,探索各条件合适的范围,因此合理的预实验对于该探索实验是十分必要的。在预实验的基础上,一些需要注意的细节对实验的顺利完成有重要意义。首先需确保有足够的初始材料,并使用相同的试剂进行多次尝试,这对于利用酶解法制备原生质体非常重要^[19]。其次为了得到活的原生质体,材料的选择应以幼嫩的植物组织为佳,过于年轻的组织通常细胞较小,宜受到伤害,会降低原生质体在处理中存活的几率,另一方面,老的组织活力低,不易再生,细胞壁不易酶解,这两者都不是合适的制备原生质体的材料。另外,原生质体对渗透压非常敏感,为了防止原生质体的破裂,维持等渗条件至关重要,该研究选择一定浓度的甘露醇保证细胞渗透压稳定。在大多数研究中,并不需要得到完全移除细胞壁的原生质体,将细胞壁部分移除就已足够满足后续实验要求,过度追求完全移除细胞壁的原生质体会导致部分原生质体未完全形成,而部分原生质体已发生破碎,因此,在本研究在注重原生质体产量的同时,还重点关注了原生质体的活性变化。

在原生质体制备过程中存在一些关键性问题,这些问题会影响到实验结果的准确性。首先是对原生质体进行过滤时,需要选择大小合适的滤网,因为很可能有其他物质随原生质体一起被滤出,影响到最终的计数;其次,酶液处理的时间对于酶解结果的

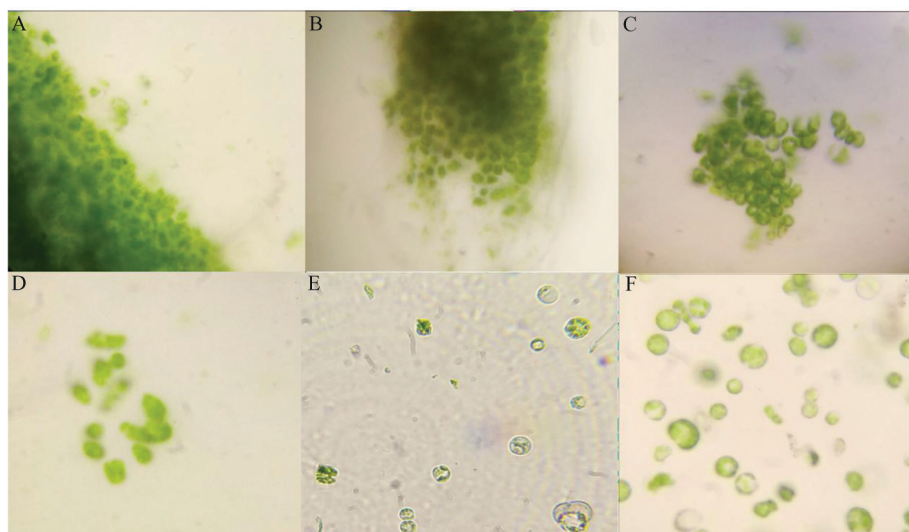


图4 草莓原生质体的分离过程

Fig. 4 Separation process of strawberry protoplasts

注:A,B,C,D,E,F分别代表酶解5、6、7、8、9和10 h,显微镜放大倍数 5×10

Note: A, B, C, D, E, F represent enzymatic hydrolysis for 5, 6, 7, 8, 9 and 10 h, respectively, with a microscope magnification of 5×10

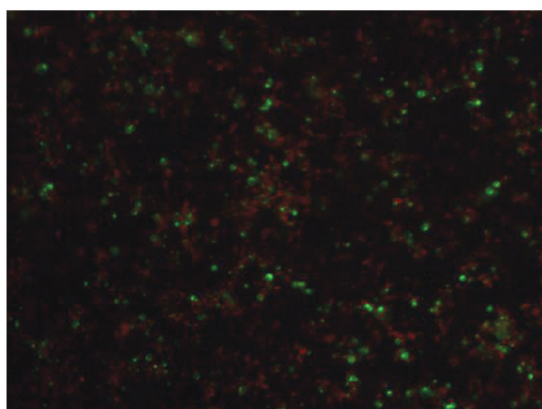


图5 GFP蛋白在“红颜”草莓原生质体中的表达

Fig. 5 Expression of GFP protein in protoplasts of Hongyan strawberry

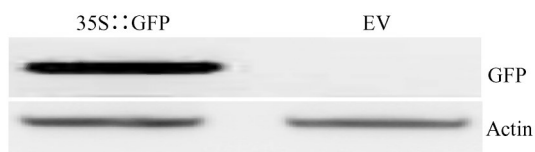


图6 RT-PCR验证35S::GFP载体转入“红颜”草莓原生质体

Fig. 6 RT-PCR verification of 35S::GFP vector transferred to Hongyan strawberry protoplasts

影响非常大,在关键的时间点需要持续地对原生质体进行观察,而不是单一地只观察确定的时刻。最后,在对原生质体进行计数的过程中,盖玻片的使用会将原生质体压碎,因此计数过程中可不使用盖玻片,但需要尽量将酶液铺成薄薄一层,便于观察,这能够提高计数的准确性。

该研究采用的是悬浮细胞系对“红颜”草莓进行原生质体的制备,除悬浮细胞系外,草莓幼嫩叶片、愈伤组织等都可用于制备原生质体^[17]。有研究报道称采用悬浮细胞系进行植物原生质体的制备效果最好^[20],但不同材料需进行具体的实验验证。温度能够影响酶的活性,从而影响酶解效率,温度过高或过低均会通过降低酶的活性而减缓酶解效率,通过设置不同的温度范围可探索原生质体制备的最适温度^[21]。时间同样是影响酶解效率的重要因素,这可能是因为随着时间延长,酶的活性会发生相关变化^[22]。酶解时间太短,无法分离出脱壁的原生质体,而酶解时间过长,原生质体会发生破碎,如在本实验中,当酶解时间超过10 h后,原生质体发生大量破碎,活力大幅下降,因此通过实验探索酶解的合适时长是保证原生质体活性的关键因素^[23]。除采用静置或不同速率震摇作为酶解方式外,还可选取其他方式来探索提高酶解效率的途径,但要注意所选取的

方式不能破坏酶的活性。高质量的原生质体为“红颜”草莓的后续遗传转化等研究提供了良好的细胞材料。

外源基因转化原生质体的方法有多种,常见的有PEG介导转化法、农杆菌转化法、显微注射法等。其中PEG介导转化法成本低、操作简单、重复性好,是生物学研究中常用的方法之一。利用PEG介导的瞬时转化体系已在多种植物中成功建立,包括拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)和烟草(*Nicotiana tabacum*)等,并且转化率较高,为基因功能的研究及基因编辑技术的开发提供了帮助。PEG介导的瞬时转化效率与质粒DNA浓度、PEG浓度和原生质体数目等因素相关。本研究采用40%的PEG-4000将20 μL质粒瞬时转化到“红颜”草莓悬浮细胞原生质体中,转化效率达到44%。但观察到在PEG处理过程中,仍有小部分细胞发生破裂,该转化体系仍有可优化的空间。

本研究通过对影响原生质体制备的因素进行探索,得到了制备“红颜”草莓悬浮细胞原生质体的优化条件,并在此基础上,建立了一套简单、高效的原生质体瞬时表达体系,为深入开展“红颜”草莓的功能基因组学和基因编辑研究奠定了基础。

参考文献

- [1] Kolle S R, Shankarappa T H, Rahimi B A, *et al.* Review of trends in strawberry research from 1960 to 2016 [J]. *J Agric Food Inf*, 2019, 20(1): 25-38.
- [2] Chen S P, Liu X G, Chen Z. Comparison of fruit qualities of strawberry [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2016, 44(2): 54, 78.
陈胜萍, 刘晓光, 陈志. 草莓鲜果品质的比较[J]. *安徽农业科学*, 2016, 44(2): 54, 78.
- [3] Zou P H. Research progress of strawberry germplasm resources [J]. *Chin Hortic Abstr*, 2016, 32(5): 29-31.
邹盼红. 草莓种质资源研究进展[J]. *中国园艺文摘*, 2016, 32(5): 29-31.
- [4] Wang G X, Zhang Y T, Dong J, *et al.* Retrospection and prospect of strawberry breeding in China [J]. *J Plant Genet Resour*, 2008, 9(2): 272-276.
王桂霞, 张运涛, 董静, 等. 中国草莓育种的回顾和展望[J]. *植物遗传资源学报*, 2008, 9(2): 272-276.
- [5] Qi X. Introduction of strawberry varieties [J]. *Sci Technol of Tianjin Agric For*, 2013(5): 37-45.
祁欣. 草莓品种介绍[J]. *天津农林科技*, 2013(5): 37-45.
- [6] Zhao G F, Wang J A, Xie T H. Changes of nutritional quality and aroma during fruit development of *Fragaria*

- ananassa* Duch. cv benihoppe [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2018, 30(12): 2044-2048.
- 赵国富, 王金敖, 谢庭辉. 红颜草莓不同发育时期营养品质及香气变化[J]. *浙江农业学报*, 2018, 30(12): 2044-2048.
- [7] Xiao S L, Luo C, Jiang X X, *et al.* Different season fruit quality and cultivation technique points of Hongyan strawberry [J]. *Seed*, 2009, 28(4): 109-112.
- 肖树林, 罗充, 蒋晓霞, 等. “红颜”草莓不同季节成熟果实品质及栽培技术要点[J]. *种子*, 2009, 28(4): 109-112.
- [8] Xu M L, Wang X P. Preliminary study on introduction and screening of strawberry varieties [J]. *Shanghai Agric Sci Technol*, 2018(4): 75-77.
- 许梅玲, 王小萍. 草莓品种引种与筛选初探[J]. *上海农业科技*, 2018(4): 75-77.
- [9] Lin H, Chen J, Fang S. A protoplast transient expression system to enable molecular, cellular, and functional studies in *Phalaenopsis orchids* [J]. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 843.
- [10] Jia N, Zhu Y L, Xie F. An efficient protocol for model legume root protoplast isolation and transformation [J]. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 670.
- [11] Duarte P, Ribeiro D, Carqueijeiro I, *et al.* Protoplast transformation as a plant-transferable transient expression system [M]. *Methods in Molecular Biology*, New York, NY: Springer New York, 2016: 137-148.
- [12] Woo J W, Kim J, Kwon S I, *et al.* DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(11): 1162-1164.
- [13] Li J L, Liao X Z, Zhou S S, *et al.* Efficient protoplast isolation and transient gene expression system for *Phalaenopsis* hybrid cultivar ‘Ruili Beauty’ [J]. *In Vitro CellDevBiology-Plant*, 2018, 54(1): 87-93.
- [14] Gu Z Y, Yang R N, Chen W. The establishment of isolation and transient transformation methods of protoplasts of *Vernicia fordii* mesophyll cell [J]. *Sci Silva Sin*, 2018, 54(1): 46-53.
- 谷战英, 杨若楠, 陈昊. 油桐叶肉细胞原生质体分离及瞬时转化体系的建立[J]. *林业科学*, 2018, 54(1): 46-53.
- [15] Shi Y Z, Wan Y Y, Xue G R. Formation of multicellular colonies from protoplasts of anther-derived calli in strawberry [J]. *J Huazhong Agric Univ*, 1995, 14(2): 187-190.
- 史永忠, 万蜀渊, 薛光荣. 草莓花药愈伤组织原生质体培养再生多细胞团[J]. *华中农业大学学报*, 1995, 14(2): 187-190.
- [16] Zhou C J, Li W D, Ge H B. Regeneration of callus from protoplast of suspension cells in strawberry [J]. *J Fruit Sci*, 2003, 20(4): 319-321.
- 周春江, 李卫东, 葛会波. 草莓悬浮细胞原生质体培养再生愈伤组织[J]. *果树学报*, 2003, 20(4): 319-321.
- [17] Zhang X Y, Ge H B, Liu Y M, *et al.* Study on the separation conditions for protoplast isolation of strawberry [J]. *Mol Plant Breed*, 2006, 4(S2): 147-152.
- 张学英, 葛会波, 刘艳萌, 等. 草莓原生质体分离条件的研究[J]. *分子植物育种*, 2006, 4(S2): 147-152.
- [18] Kang J. Conditions optimization of protoplast extraction and cell fusion in strawberry Fengxiang and Hongyan [J]. *Guizhou Agric Sci*, 2015, 43(3): 58-61.
- 康洁. 丰香和红颜草莓原生质体提取与细胞融合的条件优化[J]. *贵州农业科学*, 2015, 43(3): 58-61.
- [19] Yang R N, Zhao F K, Yu Y X, *et al.* Two-step enzyme digestion of *Arabidopsis* guard cell protoplasts [J]. *J Beijing Univ Agric*, 2008, 23(4): 67-69.
- 杨瑞楠, 赵福宽, 于涌鲲, 等. 两步酶解法制备拟南芥保卫细胞原生质体[J]. *北京农学院学报*, 2008, 23(4): 67-69.
- [20] Lü C P, Zheng Y S, Shi X H, *et al.* Protoplast culture and plant regeneration of strawberry [J]. *Acta Agric Univ Jiangxiensis*, 2003, 25(2): 254-257.
- 吕长平, 郑玉生, 石雪晖, 等. 草莓原生质体的培养和植株再生[J]. *江西农业大学学报*, 2003, 25(2): 254-257.
- [21] Yang S, Zhang H N, Li Q Z, *et al.* Optimization of protoplast preparation and regeneration conditions of *Hericium erinaceus* fusion breeding [J]. *North Hortic*, 2018(9): 159-165.
- 杨珊, 张赫男, 李巧珍, 等. 猴头菌融合育种原生质体制备与再生条件优化[J]. *北方园艺*, 2018(9): 159-165.
- [22] Shabanian N, Shafih Rahmani M, Zarrinjoei F. The effect of enzyme concentrations and digestion time on protoplast isolation from *in vitro* grown leaves of oak (*Quercus brantii*) [J]. *Journal Biotechnol*, 2010, 150: 565.
- [23] Mu H M, Zhu C L, Shen Z P, *et al.* Research of efficiency preparation of laver protoplasts by complex enzymatic method [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2018, 39(19): 142-146.
- 穆惠敏, 朱常亮, 沈照鹏, 等. 复合酶法高效制备紫菜原生质体的研究[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(19): 142-146.

□