



植物原生质体分离与瞬时表达体系研究进展

李悦^{1,2,3}, 宋慧云^{1,2,3}, 王志^{1,2,3}, 王悦阳^{1,2,3}, 毛文迈^{1,2,3}, 吴劲松^{1,2,3}, 周瑜^{1,2,3}, 李培^{1,2,3,*}

¹华南农业大学林学与风景园林学院, 广州510642

²广东省森林植物种质资源创新开发利用重点实验室, 广州510642

³亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广州510642

*通信作者(lipei-meinv@163.com)

摘要: 原生质体由于易吸收外源物质而被广泛应用于遗传转化、生理生化等领域, 建立高效的原生质体分离体系和瞬时转化体系是进行分子生物学及相关研究的基础。近年来, 植物原生质体分离和转化技术取得了迅速的发展和应用。目前, 植物原生质体瞬时转化常用的方法包括根癌农杆菌渗透、聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 介导、电穿孔、植物病毒载体及基因枪法。本文总结了原生质体分离的步骤、影响原生质体分离纯化的因素、植物瞬时转化的方法和瞬时表达体系的应用领域, 以期为更多植物原生质体分离体系和瞬时转化体系的建立提供参考。

关键词: 原生质体; 原生质体分离; 瞬时表达

Research progress of plant protoplast isolation and transient expression system

LI Yue^{1,2,3}, SONG Huiyun^{1,2,3}, WANG Zhi^{1,2,3}, WANG Yueyang^{1,2,3}, MAO Wenmai^{1,2,3},
WU Jinsong^{1,2,3}, ZHOU Yu^{1,2,3}, LI Pei^{1,2,3,*}

¹College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

²Guangdong Key Laboratory of Innovative Development and Utilization of Forest Plant Germplasm Resources, Guangzhou 510642, China

³State Key Laboratory of Subtropical Agricultural Biological Resource Conservation and Utilization, Guangzhou 510642, China

*Corresponding author (lipei-meinv@163.com)

Abstract: Protoplasts are widely used in genetic transformation, physiological and biochemical fields, for it is easy to absorb exogenous substances. Also, an efficient protoplast isolation system and transient transformation system are the basis for molecular biology and related research. In recent years, plant protoplast isolation and transformation technology has achieved rapid development and application. Currently, the commonly used methods for plant protoplasts transient transformation include *Agrobacterium* infiltration, polyethylene glycol (PEG) mediation, electroporation, plant virus vectors and biolistic methods. This paper summarizes protoplast isolation steps, the factors affecting protoplasts isolation and purification, plant transient transformation methods and transient expression systems application fields, in order to

收稿 2022-06-30 修定 2022-09-21

资助 国家重点研发计划(2021YFD2200305)、广东省基础与应用基础研究基金(2021A1515010534)和广州市科技计划项目(2021-02080217)。

provide reference for the establishment of more plant protoplast isolation systems and transient transformation systems.

Key words: protoplast; protoplast isolation; transient expression

1 原生质体研究概述

原生质体(protoplast)的概念最早由J. Hanstein于1880年提出,指植物细胞去除细胞壁得到的具有活力的细胞质,由于没有细胞壁的阻碍,原生质体之间可相互融合从而培养出杂种植株。同时由于原生质体也可以直接吸收外源物质如DNA、细菌、细胞器等,所以原生质体被广泛应用于遗传转化、细胞融合及细胞无性系和突变体选育。模式植物如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和烟草(*Nicotiana benthamiana*)的原生质体分离与瞬时转化体系已非常完善,在相关研究中得到了广泛应用;非模式植物如柑橘(*Citrus reticulata*; Xu等2017)、矮牵牛(*Petunia hybrid*; Kang等2020)、甘蓝(*Brassica oleracea*; Sun等2019)等植物的原生质体提取也有相关报道;在木本植物如国槐(*Sophora japonica*; 张天2019)、花椒(*Piperis Dahongpao*; 李南等2018)等植物中也有广泛应用。

2 原生质体的分离与纯化研究

2.1 原生质体的分离方法

目前原生质体的分离方法主要有酶解法和机械法,又分别被称为化学法和物理法。1892年, Klercker最早通过机械法从水剑叶(*Cyperus helferi*)叶片中获得原生质体。机械法是先将植物细胞进行质壁分离,当原生质体收缩成球形后,再将细胞壁切破从而得到原生质体。但由于游离的原生质体产量较少,且只适用于高度液泡化的组织与细胞,所以目前较少使用(张天2019)。1960年, E. Cocking首次利用酶解法从番茄(*Lycopersicon esculentum*)根尖获得产量大且活力强的原生质体。酶解法的原理是采用纤维素酶、果胶酶、离析酶、半纤维素酶等酶解细胞壁从而得到原生质体。该方法相较于机械法应用更加广泛高效,是目前最常使用的原生质体制备的方法(Kang等2020)。所以本文主要针对酶解法进行总结和阐述。

2.2 原生质体分离材料的选择

分离材料的选择对原生质体产量与活力有着重要影响。叶片、花瓣、子叶组织、愈伤组织、悬浮细胞是原生质体常用的分离材料。一般生长旺盛、幼嫩的组织作为分离材料产生的原生质体产量更高,活力更旺盛(Kang等2020)。不同植物的最佳分离材料不同,可通过相关实验确定。如在茉莉花(*Jasminum sambac*)原生质体提取时,使用花瓣提取的原生质体优于嫩叶(张娅等2019);相同的酶解条件下,从山杏(*Armeniaca sibirica*)悬浮培养物分离的原生质体产量和活力最高,其次是无菌苗叶片,但从愈伤组织分离的原生质体产量和活力最低(马锋旺和李嘉瑞1998)。

分离材料的生长阶段也会影响原生质体的提取。如在提取矮牵牛原生质体时,相同酶解条件下继代培养15 d的愈伤组织产生的原生质体产量最高且质量最好(Kang等2020)。同种原生质体分离材料的不同生长环境也会影响原生质体的分离效果。室外生长的叶片作为原生质体分离材料时,为了去除附着在叶片上的菌体,首先要先用体积分数为75%的无水乙醇溶液和 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氯化汞溶液进行消毒和洗涤(Yao等2020a),然后再完成分离过程;无菌种子苗叶片可直接进行原生质体分离,其生长环境和生理状态也容易控制。所以相比之下无菌种子苗更适合作为原生质体的分离及后续培养材料(谢鑫等2019)。

2.3 原生质体分离材料预处理方式

采用酶解法分离植物的原生质体时,酶解液在消化细胞壁的同时也会与细胞膜接触,从而对细胞膜的生理状态产生一定程度的影响,进而降低原生质体的质量。所以在酶解前需要对分离材料进行预处理,在一定程度上增强细胞膜的生理强度,减少原生质体破裂,提高原生质体产量和活性(赖青2020)。预处理的方式主要有黑暗处理、低温处理、预质壁分离处理、叶片萎蔫处理、去叶片下表皮等方式。黑暗处理是将进行原生质体分离

的植株或组织在黑暗环境下处理若干小时。研究表明, 将山丹丹(*Lilium pumilum*)愈伤组织在常温下进行套袋黑暗处理3 h后再进行原生质体分离能够显著提高原生质体产量和活性(王珺华2020)。低温处理是将进行原生质体分离的植株或组织放入低温环境处理若干小时, 通常在4°C冰箱进行, 操作时与黑暗处理相结合。如在对银杏幼叶的原生质体分离时, 酶解前将幼叶放在4°C冰箱中处理12 h后得到的原生质体比对照组产量更高、活性更强(赖青2020)。预质壁分离因其操作简便是目前原生质体分离选择最多的预处理方式。预质壁分离是将要酶解的外植体放入细胞原生质体清洗液(cell protoplast wash medium, CPW)、一定浓度的甘露醇溶液或两者的混合液中静置或一定转速处理若干小时。该处理方式可使细胞壁内外层充分与酶解液接触, 从而提高细胞壁降解速度, 同时减少原生质体内电解质渗漏, 提高原生质体的稳定性和存活率。此预处理方式在矮牵牛(Kang等2020)、高粱(*Sorghum bicolor*; 谢鑫等2019)、国槐(张天2019)、宁夏枸杞(*Lycium barbarum*; 高思丹2020)等植物的原生质体分离中得到了充分利用, 明显提高了原生质体的产量与活力。叶片萎蔫预处理是一种在植物的生长发育过程中, 通过改变其生长环境如加强光照强度、减少供水让叶片萎缩卷曲, 加速叶肉细胞的质壁分离, 从而加速原生质体在酶解中释放的处理方式。萎蔫处理的时间是影响原生质体的产量和活性的重要因素。在分离人心果(*Manilkara zapota*)叶片原生质体时, 萎蔫处理6 h, 原生质体产量减少; 萎蔫处理8 h, 产量比对照提高了22.93%(罗丽华等2009)。目前, 还有一种分离材料预处理方法, 该方法是通过去除叶片下表皮的方式扩大分离材料与酶液的接触面积, 从而使酶解过程更充分, 提高酶解效率。去除叶片下表皮的手段有用镊子撕掉下表皮、待叶片萎蔫后撕掉下表皮或胶带法粘掉下表皮, 其中利用胶带去除表皮的过程可被称为胶带法。胶带法最早是由Wu等(2009)提出的一种名叫胶带-拟南芥三明治(Tape-*Arabidopsis* Sandwich)的去除叶片下表皮的预处理方式, 此种方法能够有效提高拟南芥原生质体提取过程中的酶解效率。但要用特定的胶带Time Tape和Magic Tape(两

种美国的胶带品牌)才能处理叶片下表皮的特点限制了胶带法的推广。直到史勇(2019)等发现普通的胶带处理叶片下表皮也可用于提高拟南芥原生质体的产量和质量, 大大提高了该方法的普遍性。后续胶带法在烟草(赖叶林等2020)等植物的原生质体提取中取得了较好的效果。胶带法只能用于叶片下表皮易剥离的植物。对于叶片下表皮不易剥离的植物可以选用镊子撕掉下表皮或萎蔫法去除下表皮(赖青2020)。离体材料预处理方法多样且各具优缺点, 所以实验中需要根据分离材料的种类和生理状态选择合适的预处理方式。

2.4 酶解法制备原生质体的影响因素

在酶解过程中, 酶的种类和浓度、酶解液的渗透压和酸碱度、酶解时间等都是影响原生质体的产量和活力的重要因素。

2.4.1 酶的种类和浓度

酶解植物细胞壁一般选用纤维素酶、果胶酶和半纤维素酶等酶制剂。原生质体制备过程中要根据分离材料的品种和生理状态选择合适的酶种类和浓度。目前, 植物原生质体分离常用到的酶为日本Yakult公司的纤维素酶R-10、离析酶R-10和果胶酶Y-23。此外Sigma公司的果胶酶和Worthington公司的纤维素酶在酶解中也有较好的分离效果。酶解的方式有混合法(同时加入纤维素酶、离析酶、果胶酶等)和顺序酶解法(先用果胶酶处理叶片, 使细胞变松, 随后用纤维素酶消化)。顺序酶解法适用于较成熟的细胞, 如保卫细胞等(安杰等2017), 因此目前使用最多的为混合法。

制备原生质体的酶解过程中纤维素酶是必不可少的, 离析酶或果胶酶可根据植物特性选择。如黑麦草(*Lolium perenne*)叶片原生质体制备的最佳酶解液组成为15 g·L⁻¹纤维素酶和7.5 g·L⁻¹离析酶(Sun等2019); 银杏(*Ginkgo biloba*)幼叶是20 g·L⁻¹纤维素酶R-10、2 g·L⁻¹果胶酶Y-23和15 g·L⁻¹离析酶R-10(赖青2020)。不同的植物在酶解时最适酶的种类及其浓度并不相同, 同种植物的组织不同、器官不同在酶解时也有不同的最适酶液种类与浓度。以葡萄(*Vitis vinifera*)叶片为分离材料时最适的酶解组合为30 g·L⁻¹纤维素酶和7.5 g·L⁻¹离析酶的酶组合; 葡萄愈伤组织原生质体的分离则以20 g·L⁻¹

纤维素酶和 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 离析酶的酶组合为最佳(舒小娟等2015)。当选择纤维素酶、离析酶和果胶酶的组合不能取得好的酶解效果时,可以选择加入半纤维素酶、蜗牛酶等酶制剂辅助酶解。如酸枣(*Chorospondias axillaris*)四分体花粉酶解的最佳酶液组合是 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蜗牛酶和 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 纤维素酶(牛瑜菲和彭建营2019)。百脉根(*Lotus corniculatus*; 蒋友燊等2017)成熟叶片酶液最佳组合是 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 纤维素酶、 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 果胶酶和 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 半纤维素酶。

酶浓度过低会导致酶解不充分、原生质体不能完全释放出来,酶浓度过高会使原生质体受到伤害,所以选择合适的酶制剂浓度对建立良好的原生质体制备体系很重要。已有研究表明以幼叶为分离材料时,所需的酶浓度一般较低,通常纤维素酶浓度为 $5\sim 10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,果胶酶浓度为 $2\sim 5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;而当以悬浮细胞和愈伤组织为分离材料进行酶解时,纤维素酶、果胶酶等酶的浓度则需要提高到10或 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。酶解液的体积一般根据分离材料的鲜重而定,通常混合酶解液的体积可选分离材料鲜重的5或10倍(赖叶林等2020)。

2.4.2 酶解液的渗透压

去除细胞壁后的原生质体非常脆弱,须维持在一定的渗透压下才能保持正常的生理状态。所以酶解液中必须加入渗透压稳定剂来代替细胞壁保护原生质体。渗透压的大小由稳压剂种类和浓度共同决定。稳压剂主要分为两类,一类是糖醇系统,包括蔗糖、葡萄糖、山梨醇、甘露醇等。原生质体易将蔗糖、葡萄糖等吸收,从而降低酶液渗透压,因而并不被经常使用;山梨醇、甘露醇因能稳定地维持渗透浓度而被广泛使用,浓度一般为 $0.4\sim 0.8\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。不同种类的植物、同种植物不同生理状态的分离材料所需的稳压剂浓度一般不同,如葡萄无菌苗叶片需要的最佳甘露醇浓度是 $0.6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (舒小娟等2015),而柑橘愈伤组织的是 $0.93\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Xu等2017)。油桐(*Vernicia fordii*)成熟叶片和组培苗幼叶酶解液中甘露醇最佳浓度分别是 0.6 和 $0.7\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (谷战英等2018)。一般而言,木质化程度越高的分离材料所需的渗透势就越高,最高的是子叶或下胚轴,其次是愈伤组织,胚性悬浮细胞要求的渗透势最低;另一类稳压剂为无机盐溶液,包

括氯化钙、氯化钾、硫酸镁等,具有维持细胞膜稳定的作用,但会对原生质体产生较大的损害,此时可以通过选择糖醇系统与无机盐配合作为稳压剂降低对原生质的伤害。另外可以在酶解液中加入适量浓度的牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)用以降低酶解过程中生物酶对细胞器造成的损害(Qiu等2020)。

2.4.3 酶解液的酸碱度

合适的酶解液pH能提高原生质体的产量与活力。原生质体分离常用的pH值介于 $5.5\sim 6.0$ 之间,既能保持较高的酶活性,又能保持原生质体正常生理状态。另外在酶解液中加入适量浓度的2-N-吗啡啉乙磺酸[2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid, MES]可以维持溶液的pH。影响酶解液pH的因素很多,如植物材料、酶液组成、稳压剂等。矮牵牛继代培养4周的叶片酶解时最适pH为5.8(Kang等2020),博落回(*Macleaya cordata*)叶片、银杏幼叶和国槐叶片原生质体分离的最佳pH均为5.7(汪鹏等2020; 赖青2020; 张天2019)。

2.4.4 酶解时间

酶解时间是影响酶解效果的关键因素。酶解时间过短会导致原生质体释放不充分,产量低;时间过长会导致原生质体破裂,活力降低。酶解时间的长短一般由酶液组成、细胞壁成分、分离材料决定,基本在 $0.5\sim 24\text{ h}$ 之间。一般情况下,木本类比草本类植物所需的酶解时间更长,柑橘(Xue等2017)愈伤组织的最佳酶解时间为 $16\sim 20\text{ h}$,而拟南芥、烟草的幼叶去除下表皮后酶解的最佳时间为 40 min (赖叶林等2020),非洲菊(*Gerbera jamesonii*)叶片的最佳酶解时间为 1 h (宋爱华等2017)。同一植物不同取材部位的酶解时间也有很大差异,一般而言愈伤组织需要的时间最长,其次为叶片,时间最短的为悬浮细胞系。如苹果叶片愈伤组织的最适酶解时间为 20 h ,而悬浮细胞系仅需要 5 h (Qiu等2020)。

2.4.5 其他因素

温度、光照、酶解时摇床的转速等也会影响原生质体的制备。原生质体分离的温度范围一般介于 $25\sim 30^{\circ}\text{C}$ 。在操作过程中一般会选择低光照或黑暗环境下进行酶解,效果会优于光照条件下的操作。研究表明,在低转速摇床下酶解的原生质

体产量和活力明显优于静置条件, 因为低转速条件可以增加分离材料与酶解液的接触面积, 从而提高酶解效果。酶解时的转速一般选择 $30\sim 60\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 转速过高会致原生质体破裂。另外, 对于一些具有多酚物质的植物材料, 可在酶解液中加入适量的聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl pyrrolidone, PVP), 因为该物质可以吸附酚类物质, 有效防止酶解过程中原生质体的褐变老化, 大大提高原生质体的产量并保持它们的活力(Kang等2020)。

2.5 原生质体纯化研究

通过酶解得到的原生质体(酶解液混合物)会含有大量细胞碎片、未分解的植物组织等, 需要纯化才能用于后续实验。目前的纯化方法是先使用网筛或尼龙网进行初步分离, 孔径一般选择 $140\sim 400$ 目(Ren等2021)。之后再通过离心沉淀法、漂浮法或接口法对原生质体进一步纯化。离心沉淀法操作简便, 是最常用的纯化方法。离心时的转速一般选择 $100\times g$, 离心后小心去除上清液, 用CPW溶液或W5溶液重新悬浮后离心洗涤2、3次后得到纯净的原生质体溶液。拟南芥、高粱、非洲菊等植物的原生质体纯化采用了离心沉淀法(赖叶林等2020; 谢鑫等2019; 宋爱华等2017)。漂浮法的原理是使用渗透剂含量较高的洗涤液从而使原生质体漂浮在液体表面, 洗涤液一般选择 $110\sim 230\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的蔗糖溶液(Kang等2020)。接口法又称界面法, 是选择两种不同渗透浓度的溶液, 使原生质体密度介于两种溶液之间从而完成对原生质体纯化的方法。一般选择 $130\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇或 $250\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的蔗糖溶液。接口法在柑橘、油桐、花椒等植物的原生质体分离中得到了较好的应用(谷战英等2020; 李南等2018; Xu等2017)。

2.6 原生质体产量与活力检测

分离纯化后的原生质体需通过检测其产量与活力来评价分离效果, 目前原生质体产量检测主要用血球计数板。检测时吸取适量原生质体溶液于血球计数板计数室上, 盖上盖玻片后于普通光学显微镜下观察。通过对计数室原生质体数量的统计, 结合稀释倍数、分离材料质量等估算出原生质体的产量。

在分离过程中酶液伤害、操作等因素会导致

原生质体破碎, 影响后续实验, 所以原生质体活力检测是必要的。目前原生质体活力检测一般用到荧光素双醋酸酯(fluorescein diacetate, FDA), FDA本身不发光, 但可以进入细胞, 被降解后产生黄绿色荧光物质。无活力的原生质体没有降解能力, 所以不会发出荧光。通过荧光显微镜观察发荧光的原生质体占原生质体总数的比例便可得出原生质体活力(Xu等2017)。部分植物原生质体分离时的最佳条件如表1所示。

3 植物瞬时表达体系研究

瞬时表达技术不需要将外源性目的基因插入到植物基因组中, 只需将目的基因的载体导入受体细胞中, 让其短时间植物细胞中获得高产量的表达或沉默。因此植物瞬时表达相对稳定、方便、快捷, 并可同时对大量基因进行检测, 与稳定转化相比, 具有高通量的特质, 但不能稳定遗传给下一代。鉴于以上特点, 目前多种植物都已经建立起稳定的瞬时表达体系。除模式植物烟草(Yao等2020a)、拟南芥(Alqahtani等2021)及作物水稻(Page等2019)、大豆(*Glycine max*; Xiong等2019)外, 木本植物杜梨(*Pyrus betulifolia*; 郝紫微等2021)、杨树(*Populus*; 单慧敏2020)等也具有相对稳定的表达体系, 为其他木本植物的研究奠定了基础。

3.1 植物瞬时表达体系建立的方法

目前可用于瞬时表达的方法主要有基因枪法、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)渗透法、PEG法、植物病毒载体法、电击法等。

3.1.1 基因枪法

基因枪法又称为微观粒子轰击法, 其原理是用金属粉末如金粉、钨粉等包裹外源DNA, 利用高压快速将外源DNA分子导入植物细胞中, 从而实现外源基因的瞬时表达。该方法应用广泛, 不受宿主细胞的限制, 使用方法简单快捷、可控性强, 但受体植物的种类和状态、金属粒子的种类和大小、轰击时的距离、轰击的次数等都会影响基因枪法瞬时转化的效率。不过在拟南芥(Ueki等2009)、烟草(Mattozzi等2014)、小麦(Miroshnichenko等2020)等植物中已经通过使用该方法成功建立了瞬时表达体系。

表1 部分植物原生质体分离条件
Table 1 Isolation conditions of some plant protoplasts

植物种类	(最佳)分离材料	(最佳)预处理方式	最佳酶液组合	稳压材料	最佳分离时间	纯化方式	离心转速	参考文献
矮牵牛	继代培养4周叶片	预质壁分离	20 g·L ⁻¹ 纤维素酶	0.6 mol·L ⁻¹ 甘露醇	6 h	漂浮法	1 000 r·min ⁻¹	Kang等2020
大花蕙兰	花瓣	无	12 g·L ⁻¹ 纤维素酶、 6 g·L ⁻¹ 果胶酶	0.5 mol·L ⁻¹ 甘露醇	6 h	沉淀法	100×g	Ren等2021
多年生黑麦草	叶片	无	15 g·L ⁻¹ 纤维素酶、 7.5 g·L ⁻¹ 离析酶	0.6 mol·L ⁻¹ 甘露醇	4 h	沉淀法	100×g	Sun等2019
拟南芥	叶片	去下表皮	10 g·L ⁻¹ 纤维素酶、 2.5 g·L ⁻¹ 果胶酶	0.4 mol·L ⁻¹ 甘露醇	20~30 min	沉淀法	100×g	赖叶林等2020
黄梁木	叶片	无	15 g·L ⁻¹ 纤维素酶、 3 g·L ⁻¹ 离析酶	0.4 mol·L ⁻¹ 甘露醇	4 h	沉淀法	100×g	赖叶林等2020
山杏	悬浮细胞继代7次	无	15 g·L ⁻¹ 纤维素酶、 5 g·L ⁻¹ 离析酶、 5 g·L ⁻¹ 半纤维素酶	0.6 mol·L ⁻¹ 甘露醇	10 h	沉淀法		马锋旺和李嘉瑞1998
甘蓝	下胚轴	无	10 g·L ⁻¹ 纤维素酶、 5 g·L ⁻¹ 离析酶	0.6 mol·L ⁻¹ 甘露醇	6 h	沉淀法	2 115 r·min ⁻¹	Sun等2019
高粱	幼叶	预质壁分离	10 g·L ⁻¹ 纤维素酶、 2.5 g·L ⁻¹ 离析酶	0.6 mol·L ⁻¹ 甘露醇	5 h	沉淀法	100×g	谢鑫等2019
山丹丹	鳞茎	暗处理	15 g·L ⁻¹ 纤维素酶、 5 g·L ⁻¹ 果胶酶	120 g·L ⁻¹ 甘露醇	6 h	接口法	800~1 000 r·min ⁻¹	王珺华2020
银杏	幼叶	低温冰箱12 h 去下表皮	20 g·L ⁻¹ 纤维素酶、 2 g·L ⁻¹ 果胶酶、 15 g·L ⁻¹ 离析酶	0.7 mol·L ⁻¹ 甘露醇	5 h	沉淀法	50×g	赖青2020
宁夏枸杞	叶片、愈伤	预质壁分离	20 g·L ⁻¹ 纤维素酶	0.5 mol·L ⁻¹ 甘露醇	叶片6 h, 愈伤12 h	漂浮法	100×g	高思丹2020
黑果枸杞	叶片愈伤	预质壁分离	12 g·L ⁻¹ 纤维素酶	0.5 mol·L ⁻¹ 甘露醇	叶片5 h, 愈伤8 h	漂浮法	100×g	高思丹2020
博落回	叶片	无	5 g·L ⁻¹ 纤维素酶、 2 g·L ⁻¹ 果胶酶	0.6 mol·L ⁻¹ 甘露醇	6 h	沉淀法	15×g	汪鹏等2020
酸枣	四分体花粉	无	10 g·L ⁻¹ 蜗牛酶、 15 g·L ⁻¹ 纤维素酶	0.3 mol·L ⁻¹ 甘露醇	4 h	沉淀法	500 r·min ⁻¹	牛瑜菲和彭建营2019

表1 (续)

植物种类	(最佳)分离材料	(最佳)预处理方式	最佳酶液组合	稳压材料	最佳分离时间	纯化方式	离心转速	参考文献
国槐	叶龄15~20 d	预质壁分离	纤维素酶、果胶酶、离析酶	0.4 mol·L ⁻¹ 甘露醇	与季节气温有关	沉淀法	50×g	张天2019
花椒	试管苗叶片、愈伤组织、悬浮细胞	无	10 g·L ⁻¹ 纤维素酶、15 g·L ⁻¹ 果胶酶	0.6~0.7 mol·L ⁻¹ 甘露醇	叶片: 10 h; 愈伤: 12~14 h	接口法	500 r·min ⁻¹	李南等2018
柑橘	愈伤	预质壁分离	24 g·L ⁻¹ 纤维素酶、12 g·L ⁻¹ 离析酶	0.93 mol·L ⁻¹ 甘露醇	16~20 h	接口法	100×g	Xu等2017
紫花苜蓿	成熟叶片保卫细胞	研磨、匀浆机处理	两步酶解法	0.55 mol·L ⁻¹ 山梨醇	3 h	沉淀法	200 r·min ⁻¹	安杰等2017
非洲菊	幼叶	无	20 g·L ⁻¹ 纤维素酶、3 g·L ⁻¹ 离析酶	0.4 mol·L ⁻¹ 甘露醇	4 h	沉淀法	60×g	未爱华等2017
百脉根	成熟叶片	无	10 g·L ⁻¹ 纤维素酶、10 g·L ⁻¹ 离析酶、5 g·L ⁻¹ 半纤维素酶	0.6 mol·L ⁻¹ 甘露醇	14 h	沉淀法	600~800 r·min ⁻¹	蒋友荣等2017
葡萄	叶片	无	30 g·L ⁻¹ 纤维素酶、7.5 g·L ⁻¹ 离析酶	0.6 mol·L ⁻¹ 甘露醇	14 h	沉淀法	600~800 r·min ⁻¹	舒小娟等2015
油桐	成熟叶片	无	15 g·L ⁻¹ 纤维素酶、10 g·L ⁻¹ 离析酶	0.6 mol·L ⁻¹ 甘露醇	12 h	接口法	100×g	谷战英等2018
茉莉花	花瓣	切丝法最优	15 g·L ⁻¹ 纤维素酶、8 g·L ⁻¹ 果胶酶	0.4 mol·L ⁻¹ 甘露醇	5 h	沉淀法	200×g	张娅等2019
人心果	嫩叶	暗处理	30 g·L ⁻¹ 纤维素酶、4 g·L ⁻¹ 果胶酶	—	2 h	沉淀法	—	罗丽华等2009

3.1.2 根癌农杆菌渗透法

根癌农杆菌渗透法是目前使用较多的一种方法,该方法首先需将目的基因插入载体,再将载体导入根癌农杆菌中,采用叶面注射、真空渗透、牙签接种、高压喷枪法等方式将带有目的基因的载体导入受体细胞中,从而在受体细胞中获得表达(Liu等2019a)。农杆菌菌株的类型和浓度、农杆菌导入受体细胞的方式、受体植物的类型和生理状态、农杆菌与受体植物共培养的时间等作为主要因素影响该方法的转化效率,另外培养温度、光照等物理状态对瞬时转化的效率也有一定影响。

3.1.3 PEG法

PEG法所用受体通常选择原生质体,该方法是利用聚乙二醇辅助外源DNA进入受体细胞。当PEG与细胞膜上的阳离子结合,便可使更多的外源DNA在细胞膜上聚集,促进转化的发生。这种方法不需要特定的仪器,因此具有方便快捷、可控性强的特点,且可同时进行多个基因的功能验证,具有高通量的特性(Page等2019)。多种因素会影响PEG介导原生质体转化的效率,其中PEG的浓度比较关键,浓度过高会使原生质体受到损伤甚至死亡,浓度过低会降低转化效率;转化时间、质粒的浓度、原生质体的浓度也对转化效率有着不同程度的影响(张娅等2019)。

3.1.4 植物病毒载体法

植物病毒载体法是把所需的目标基因克隆到植物病毒载体上的启动子下游,再进行体外转录后直接侵染,也可通过农杆菌或基因枪等方法导入到目的细胞中。如今有烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)和烟草脆裂病毒(*Tobacco rattle virus*, TRV)等病毒载体应用较为成功(Tan等2020)。由于病毒可在细胞内快速繁殖扩增,短时间内可得到大量表达。同时,病毒外壳蛋白和目的基因融合,能够使外源基因的产物在病毒颗粒的表面表现出来,从而有助于后续的提取以及分析。在利用苹果褪绿叶斑病毒(*Apple chlorotic leafspot virus*, ACLSV)为载体构建的瞬时表达体系中验证了CpLRR-RLK1基因可增强拟南芥对细菌病害的抵抗力(Guo等2020)。Tan等(2020)在金鱼草(*Antirrhinum majus*)中以烟草脆裂病毒(TRV)为载体建立了瞬时表达

体系,使得在这些难以遗传转化的物种中快速测试基因功能成为可能。

3.1.5 电击法

1989年G. Andreason等人最早使用电击法在哺乳动物细胞转化中获得了成功表达,后续开始应用于植物细胞中,原生质体、花粉、组织、器官等都可以成为受体,其中原生质体较常见(Sharma等2020)。电击法是将细胞置于高电场、低电容的环境中,给予细胞瞬间电击,使细胞表面出现无数小孔,外源的DNA就可以通过小孔进入受体细胞中进行表达。电击所产生的小孔一般可逆,可以通过细胞膜的自我修复而恢复原样,但不可避免地,有些细胞会因为恢复困难造成内容物外渗而死亡。影响电击法转化效率的因素有电穿孔参数、缓冲液的成分和浓度、受体细胞的生理状态与数目、外源基因的浓度和类型、温度等外界因素等。

3.2 植物瞬时转化技术的应用

3.2.1 单克隆抗体及疫苗的合成

目前,瞬时表达技术可应用于单克隆抗体及疫苗生产等。若以植物材料为受体,较为安全无害,也有较高的产量。而且,植物表达系统可以对翻译后的蛋白质进行修饰,更有利于蛋白质正常功能的行使和保持其结构的稳定。农杆菌渗透法是目前生产疫苗的主要方法。利用农杆菌渗透法注射本氏烟草下表面,可获得抗肿瘤药物依那西普、抗癌药物,生产抗癌药物槲寄生凝集素(viscumin)、芹菜核酸内切酶CELI (Fard等2019; Gengenbach等2019; Yao等2020b)等。利用瞬时表达生产疫苗和生物制剂的产量通常与载体的构建有着密切联系,同时启动子的活性、密码子的使用等都对蛋白的产量有重要影响。

3.2.2 基因功能分析

瞬时表达技术周期短的特性使其在验证基因功能方面得到了广泛应用。通过目的基因的过表达或沉默从而间接验证基因功能也成为了现在研究的热点。农杆菌注射法是目前用于验证基因功能最常用的方式。以农杆菌注射的方法建立烟草瞬时表达体系验证了Pm4CL2基因可提高烟草的抗性(Liang等2020)。采用农杆菌渗透法对锦鸡儿(*Caragana sinica*)叶片进行的瞬时表达验证了Ci-

*DREB1C*基因增强了锦鸡儿对干旱、盐和ABA胁迫的耐受性,表明该基因是测定非生物胁迫反应中相关基因功能的合适工具(Liu等2019b)。在甜瓜(*Cucumis melo*)叶片建立的瞬时表达体系验证了*NLP1*和*NIS1*两种基因对植物具有明显的细胞死亡诱导活性(Chen等2021)。

3.2.3 蛋白质亚细胞定位与互作分析

亚细胞是细胞范围内构成细胞各部分微小结构的总称,包括细胞核、叶绿体、线粒体等结构,亚细胞水平包括细胞代谢的各种酶与蛋白质。以原生质体为受体建立瞬时表达体系是研究蛋白质亚细胞定位与互作的主要方式。在中山杉(*Taxodium hybrid 'Zhongshanshan'*)建立的原生质体瞬时表达体系中确定了ThSHR3蛋白定位在细胞核中,而且ThSHR3蛋白与ThSCR蛋白存在着明显互作关系(宣磊等2021)。Liu等(2020)对本氏烟草瞬时表达体系的亚细胞定位研究中*RIN13*在细胞核中表达,且*RIN13*在本氏烟草叶片中的瞬时表达可加速叶片衰老和细胞死亡。

3.2.4 植物品种的改良和选育

利用瞬时表达技术与传统遗传育种结合,可定向改变植物的特性,如增加抗旱、抗寒、抗虫的基因,促进植物品种的改良与选育等。Li等(2020)利用白桦(*Betula platyphylla*)瞬时表达体系中验证了*BpARF1*的沉默可以提高白桦的耐旱性;Lei等(2021)以花椰菜花叶病毒(*Cauliflower mosaic virus*, CaMV)为载体建立了柽柳(*Tamarix chinensis*)的瞬时表达体系,确定了ThCOL2蛋白定位在细胞核上,且该蛋白编码基因可提高柽柳对盐胁迫的抗性。通过瞬时表达确定基因与植物抗性的关系后,结合传统育种方式,可培育出具有抗性的植物新品种。

3.2.5 基因组编辑

基因组编辑工具的发展为基因工程提供了重大机遇,进行植物基因组编辑的工具主要有3种:CRISPR/Cas系统、锌指核酸酶系统,以及类转录激活因子效应物核酸酶系统,其中CRISPR/Cas系统由于靶位点选择广泛、载体设计简便等优点成为目前最受欢迎的基因组编辑工具(曾秀英和侯学文2015)。植物瞬时表达法作为常用的检测方法,被广泛应用于验证基因组编辑事件的成败和基因组

编辑效率。目前最常用的瞬时表达法为PEG介导原生质体法。如原生质体瞬时转化体系结合CRISPR/Cas系统验证启动子活性:王佳恒(2021)基于黄瓜原生质体瞬时转化体系,比较了2种*U6*启动子的基因组编辑活性以及4种*Cas9*核酸酶元件,发现使用黄瓜内源*CsU6*启动子基因组编辑效率低于*AtU6*启动子,之后对黄瓜和水稻的原生质体进行瞬时表达鉴定,最终确定了具有转录活性的黄瓜内源启动子元件共3个(*CsCRE02*、*CsCRE10*、*CsCRE11*);刘炳麟(2020)也通过落叶松原生质体转化体系的建立,确认了6个具备转录活性的落叶松内源启动子元件,随后构建对应编辑载体,进而进行落叶松原生质体瞬时转化,实现了对内源基因的定向敲除编辑,完成了对落叶松基因组内源位点的基因组编辑;Mariette等(2016)利用靶向*aGBSSgene*的CRISPR/Cas9系统的原生质体瞬时表达开发了四倍体马铃薯的全基因敲除,获得了4个等位基因的突变,经杂交后建立起后续研究所需的马铃薯基因型。

4 总结与展望

选择合适的分离材料是建立原生质体分离体系的基础,酶液的成分与浓度、甘露醇的浓度、酶解时间、pH是影响酶解效率的主要因素。目前原生质体分离体系的建立主要集中于草本植物,木本植物生理状态更复杂,增加了建立原生质体分离体系的复杂性。综合目前所做的研究,建议在设计原生质体分离体系系列实验之前,可参考与所选分离材料生态习性、理化状态相近的植物的原生质体分离体系。如耐干旱、耐盐碱的植物在分离中所需的甘露醇浓度更高;喜酸性土壤的植物分离时所需的pH较低;革质叶片较肉质叶片所需分离时间更长等,这些均可作为原生质体分离实验设计的依据。此外,目前处理原生质体分离材料的方法较为局限且费力,除了部分植物叶片可通过去除下表皮的方式快速完成,大部分植物仍然需要将叶片切成1~2 mm的细丝再进行后续处理,对于叶片较小且薄的植物来说,处理较为费力费时。未来对于分离材料的处理研究可继续探索。

瞬时表达的方法同稳定遗传的方式相近,可采用农杆菌渗透法、PEG介导、基因枪法、植物

病毒载体、电穿孔法等方式进行建立。由于瞬时表达体系具有快速、便捷、可操作性高的优点可被广泛应用于基因功能鉴定、蛋白质亚细胞定位、疫苗和单克隆抗体的生产、品种改良、基因组编辑等方面。目前以原生质体作为受体的瞬时转化体系,转化效率在不同的植物种类中相差较大,大多数木本植物的原生质体瞬时转化效率很难达到50%以上,而草本植物瞬时转化效率要远远高于木本植物。在之后深入研究中,对于如何提高木本植物原生质体的瞬时转化效率还需要进一步探索。同时,植物瞬时表达体系作为强有力的验证工具被广泛应用于基因工程技术中,虽然通过瞬时表达技术可短时间得到大量转化成功的细胞,但后续如何将转化成功的细胞更高效地再生还需要继续探索。

参考文献(References)

- Alqahtani M, Lightfoot DJ, Lemtiri-Chlieh F, et al (2021). The role of *PQL* genes in response to salinity tolerance in *Arabidopsis* and barley. *Plant Direct*, 5 (2): e00301
- An J, You Z, Cao YM, et al (2017). Preparation of guard cell protoplasts from *Medicago sativa*. *Pratac Sci*, 34 (10): 2063–2069 (in Chinese with English abstract) [安杰, 尤章, 曹玉曼等(2017). 紫花苜蓿保卫细胞原生质体的制备. *草业科学*, 34 (10): 2063–2069]
- Chen J, Inoue Y, Kumakura N, et al (2021). Comparative transient expression analyses on two conserved effectors of *Colletotrichum orbiculare* reveal their distinct cell death-inducing activities between *Nicotiana benthamiana* and melon. *Mol Plant Pathol*, 22 (8): 1006–1013
- Endo S, Pesquet E, Tashiro G, et al (2008). Transient transformation and RNA silencing in *Zinnia tracheary* element differentiating cell cultures. *Plant J*, 53 (5): 864–875
- Fard AB, Nayeri FD, Anbuhi MH (2019). Transient expression of etanercept therapeutic protein in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Int J Biol Macromol*, 130: 483–490
- Gao SD (2020). Studies on isolation and culture of protoplast of *Lycium* (dissertation). Xining: Qinghai University (in Chinese with English abstract) [高思丹(2020). 枸杞原生质体分离与培养研究(学位论文). 西宁: 青海大学]
- Gengenbach BB, Keil LL, Opdensteinen P, et al (2019). Comparison of microbial and transient expression (tobacco plants and plant-cell packs) for the production and purification of the anticancer mistletoe lectin viscumin. *Bio-technol Bioeng*, 116 (9): 2236–2249
- Gu ZY, Yang RN, Chen H (2018). The establishment of isolation and transient transformation methods of protoplasts of *Vernicia fordii* mesophyll cells. *Sci Silvae Sin*, 54 (1): 46–53 (in Chinese with English abstract) [谷战英, 杨若楠, 陈昊(2018). 油桐叶肉细胞原生质体分离及瞬时转化体系的建立. *林业科学*, 54 (1): 46–53]
- Guo W, Chen W, Zhang Z, et al (2020). The hawthorn *CpLRR-RLK1* gene targeted by ACLSV-derived vsiRNA positively regulate resistance to bacteria disease. *Plant Sci*, 300: 110641
- Hao ZW, Dai YQ, Zhang SL, et al (2021). Genetic transformation method of hairy roots mediated by *Agrobacterium rhizogenes* for *Pyrus betulaefolia*. *Hubei Agric Sci*, 60 (1): 151–154, 159 (in Chinese with English abstract) [郝紫微, 戴雨沁, 张绍铃等(2021). 发根农杆菌介导的杜梨毛状根遗传转化方法. *湖北农业科学*, 60 (1): 151–154, 159]
- Hassanein A, Hamama L, Loidon K, et al (2009). Direct gene transfer study and transgenic plant regeneration after electroporation into mesophyll protoplasts of *Pelargonium × hortorum*, ‘Panaché Sud’. *Plant Cell Rep*, 28 (10): 1521–1530
- Hoshikawa K, Fujita S, Renhu N, et al (2019). Efficient transient protein expression in tomato cultivars and wild species using agroinfiltration-mediated high expression system. *Plant Cell Rep*, 38 (1): 75–84
- Jiang YS, Song L, Zhao DG (2017). Enzyme optimization for protoplast isolation and cellulose analysis of regenerated cell-wall in *Lotus corniculatus*. *Mol Plant Breed*, 15 (6): 2274–2277 (in Chinese with English abstract) [蒋友燊, 宋莉, 赵德刚(2017). 百脉根原生质体制备酶解液优化及再生壁纤维素含量分析. *分子植物育种*, 15 (6): 2274–2277]
- Kang HH, Naing AH, Kim CK (2020). Protoplast isolation and shoot regeneration from protoplast-derived callus of *Petunia hybrida* cv. Mirage Rose. *Biology (Basel)*, 9 (8): 228
- Lai Q (2020). Composition of mesophyll cell wall of ginkgo leaf and its protoplast isolation technology (dissertation). Yangling: Northwest A&F University (in Chinese with English abstract) [赖青(2020). 银杏叶肉细胞壁成分及原生质体分离技术研究(学位论文). 杨凌: 西北农林科技大学]
- Lai YL, He Y, Li XX, et al (2021). An approach to isolation and transient transformation of protoplasts in plants. *Plant Physiol J*, 56 (4): 895–903 (in Chinese with English abstract) [赖叶林, 贺莹, 李欣欣等(2020). 一种植物原生质体分离与瞬时转化的方法. *植物生理学报*, 56 (4): 895–903]
- Lei XJ, Tan B, Liu ZY, Wu J, et al (2021). *ThCOL2* improves the salt stress tolerance of *Tamarix hispida*. *Front Recent Dev. Plant Sci*, 12: 653791

- Li HY, Zhang X, Tong BT, et al (2020). Expression analysis of the *BpARF* genes in *Betula platyphylla* under drought stress. *Plant Physiol Bioch*, 148: 273–281
- Li N, Yang XP, Zhou ZJ, et al (2018). Protoplast isolation and culture of *Zanthoxylum bungeanum*. *J Northwest For Univ*, 33: 100–105 (in Chinese with English abstract) [李南, 杨秀平, 周正君等(2018). 花椒原生质体分离与培养研究. *西北林学院学报*, 33: 100–105]
- Liang CL, Wan T, Wu RD, et al (2020). Resistance analysis of cherry rootstock ‘CDR-1’ (*Prunus mahaleb*) to crown gall disease. *BMC Plant Biol*, 20 (1): 516
- Liu K, Yang Q, Yang TR, et al (2019). Development of *Agrobacterium*-mediated transient expression system in *Caragana intermedia* and characterization of *CiDREB1C* in stress response. *BMC Plant Biol*, 19 (1): 237
- Liu RL (2020). Promoter element mining and genome editing in larch (dissertation). Chengdu: University of Electronic Science and Technology of China (in Chinese with English abstract) [刘炳麟(2020). 落叶松启动子元件挖掘及基因组编辑实现(学位论文). 成都: 电子科技大学]
- Liu XX, Liu H, Liu WC, et al (2020). The nuclear localized *RIN13* induces cell death through interacting with *ARF1*. *Biochem Bioph Res Co*, 527 (1): 124–130
- Luo LH, Yang DH, Yan HY (2009). Effect of different pre-treatments on the protoplast yield of *Manilkara zapodilla* leaf. *J Fujian For Sci Technol*, 36 (3): 98–101 (in Chinese with English abstract) [罗丽华, 杨定海, 严虹羽(2009). 不同预处理对人心果叶片原生质体产量的影响. *福建林业科技*, 36 (3): 98–101]
- Ma FW, Li JR (1998). Plant regeneration from cultured protoplasts of *Armeniaca vulgaris* var. *ansu*. *Hortic Plant J*, (3): 17–22 (in Chinese with English abstract) [马锋旺, 李嘉瑞(1998). 山杏原生质体培养再生植株. *园艺学报*, (3): 17–22]
- Mariette A, Helle T, Alessandro N, et al (2016). Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Rep*, 36 (1): 117–128
- Mattozzi MD, Voges MJ, Silver PA, et al (2014). Transient gene expression in tobacco using Gibson assembly and the Gene Gun. *J Vis Exp*, (86): 51234
- Miroshnichenko D, Klementyeva A, Pushin A, et al (2020). A competence of embryo-derived tissues of tetraploid cultivated wheat species *Triticum dicoccum* and *Triticum timopheevii* for efficient and stable transgenesis mediated by particle inflow gun. *BMC Plant Biol*, 20 (suppl 1): 442
- Niu YF, Peng JY (2019). Isolation conditions of pollen protoplasts in wild jujube. *Chin Agric Sci Bull*, 35 (32): 53–56 (in Chinese with English abstract) [牛瑜菲, 彭建营(2019). 酸枣花粉原生质体的分离条件研究. *中国农学通报*, 35 (32): 53–56]
- Page MT, Parry MAJ, Carmo-Silva E (2019). A high-throughput transient expression system for rice. *Plant Cell Environ*, 42 (7): 2057–2064
- Poborilova Z, Plchova H, Cerovska N, et al (2020). Transient protein expression in tobacco BY-2 plant cell packs using single and multi-cassette replicating vectors. *Plant cell Rep*, 39 (9): 1115–1127
- Qiu L, Wang YZ, Qu HY (2020). Loading calcium fluorescent probes into protoplasts to detect calcium in the flesh tissue cells of *Malus domestica*. *Hortic Res*, 7 (1): 91
- Ratanasut K, Monmai C, Piluk P (2015). Transient hairpin RNAi-induced silencing in floral tissues of *Dendrobium sonia* ‘Earsakul’ by agroinfiltration for rapid assay of flower colour modification. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 120 (2): 643–654
- Ren R, Gao J, Lu CQ, et al (2020). Highly efficient protoplast isolation and transient expression system for functional characterization of flowering related genes in *Cymbidium* orchids. *Int J Mol Sci*, 21 (7): 2264
- Ren R, Gao J, Yin DM, et al (2021). Highly efficient leaf base protoplast isolation and transient expression systems for orchids and other important monocot crops. *Front Plant Sci*, 12: 626015
- Sabbadini S, Capriotti L, Molesini B, et al (2019). Comparison of regeneration capacity and *Agrobacterium*-mediated cell transformation efficiency of different cultivars and rootstocks of *Vitis* spp. via organogenesis. *Sci Rep*, 9 (1): 582
- Shan HM (2020). Study of host-induced gene silencing system (HIGS) for *Cytospora chrysosperma* (dissertation). Beijing: Beijing Forestry University (in Chinese with English abstract) [单慧敏(2020). 基于杨树腐烂病菌寄主诱导的基因沉默体系(HIGS)的探究(学位论文). 北京: 北京林业大学]
- Sharma S, Holme IB, Dionisio G, et al (2020). Cyanidin based anthocyanin biosynthesis in orange carrot is restored by expression of *AmRosea1* and *AmDelila*, MYB and bHLH transcription factors. *Plant Mol Biol*, 103 (4–5): 443–456
- Shi Y, Jin WH, Liu JJ, et al (2019). An improved method for *Arabidopsis* mesophyll protoplast isolation and transformation. *Biotechnology*, 29 (2): 147–152, 170 (in Chinese with English abstract) [史勇, 金维环, 刘姣姣等(2019). 一种改良的拟南芥原生质体的制备和转化方法. *生物技术*, 29 (2): 147–152, 170]
- Shu XJ, Wen TJ, Xing JY, et al (2015). Isolation of protoplast and establishment of transient expression system in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 35 (6): 1262–1268 (in Chinese with English abstract)

- [舒小娟, 温腾建, 邢佳毅等(2015). 葡萄原生质体分离及瞬时转化体系的建立. 西北植物学报, 35 (6): 1262–1268]
- Song AH, Zhang WB, Sun SL, et al (2015). Isolation of protoplast and establishment of transient expression system in *Gerbera jamesonii*. Chin Bull Bot, 52 (4): 511–519 [宋爱华, 张文斌, 孙姝兰等(2017). 非洲菊原生质体制备及瞬时转化体系的建立. 植物学报, 52 (4): 511–519]
- Spitzer B, Zvi MM, Ovadis M, et al (2007). Reverse genetics of floral scent: application of tobacco rattle virus-based gene silencing in petunia. J. Plant Physiol, 145 (4): 1241–1250
- Sun B, Yuan Q, Zheng H, et al (2019). An efficient and economical protocol for isolating, purifying and PEG-Mediated transient gene expression of Chinese kale hypocotyl protoplasts. Plants (Basel), 8 (10): 385
- Tan Y, Bukys A, Molnár A, et al (2020). Rapid, high efficiency virus-mediated mutant complementation and gene silencing in *Antirrhinum*. Plant Methods, 16: 145
- Ueki S, Lacroix B, Krichevsky A, et al (2009). Functional transient genetic transformation of *Arabidopsis* leaves by biolistic bombardment. Nat Protoc, 4 (1): 71–77
- Wang JH (2020). Study on protoplast isolation of *Lilium pumilum* DC. (dissertation). Yan'an, Shaanxi: Yan'an University (in Chinese with English abstract) [王珺华(2020). 山丹丹原生质体分离初探(学位论文). 陕西延安: 延安大学]
- Wang JH (2021). Construction and verification of cucumber STU-Cas9 genome editing system (dissertation). Chengdu: University of Electronic Science and Technology of China (in Chinese with English abstract) [王佳恒(2021). 黄瓜STU-Cas9基因组编辑系统构建及验证(学位论文). 成都: 电子科技大学]
- Wang P, Huang P, Liu W, et al (2020). Isolation and purification of protoplasts from mesophyll tissues of *Macleaya cordata*. Mol Plant Breed, 18 (10): 3341–3347 (in Chinese with English abstract) [汪鹏, 黄鹏, 刘薇等(2020). 博落回叶肉组织原生质体的分离条件筛选. 分子植物育种, 18 (10): 3341–3347]
- Wu FH, Shen SC, Lee LY, et al (2009). Tape-*Arabidopsis* Sandwich – a simpler *Arabidopsis* protoplast isolation method. Plant Methods, 5: 16
- Wu YY, Chen TC, Qiu T, et al (2021). Establishment of tissue culture, protoplast isolation and transient expression system in ‘Summer Black’ grape. Plant Physiol J, 57 (11): 2128–2144 (in Chinese with English abstract) [吴月燕, 陈天池, 邱甜等(2021). ‘夏黑’葡萄组织培养、原生质体分离和瞬时表达体系的建立. 植物生理学报, 57 (11): 2128–2144]
- Xie X, Jiang JM, Wang Y, et al (2019). Study on the method of protoplast isolation and transformation of *Sorghum bicolor*. Seed, 38 (8): 43–46 (in Chinese with English abstract) [谢鑫, 蒋君梅, 王勇等(2019). 高粱原生质体的制备及转化方法研究. 种子, 38 (8): 43–46]
- Xiong L, Li C, Li HY, et al (2019). A transient expression system in soybean mesophyll protoplasts reveals the formation of cytoplasmic GmCRY1 photobody-like structures. Sci China Life Sci, 62 (8): 1070–1077
- Xu XY, Xu XL, Zhou YP, et al (2017). Identification of protoplast-isolation responsive micro RNAs in *Citrus reticulata* Blanco by high-through put sequencing. PLOS One, 12 (8): e0183524
- Xuan L, Wang ZQ, Yin YL, et al (2021). Cloning, expression and protein interaction of *ThSHR3* genes in *Taxodium* hybrid ‘Zhongshanshan406’. For Res, 34 (4): 32–39 (in Chinese with English abstract) [宣磊, 王芝权, 殷云龙等(2021). 中山杉406 *ThSHR3*基因的克隆、表达及蛋白互作研究. 林业科学研究, 34 (4): 32–39]
- Yao XF, Wu SY, Guo L, et al (2020). Efficient CELI endonuclease production in *Nicotiana benthamiana* through transient expression and applications in detections of mutation and gene editing events. Plant Sci, 296: 110469
- Zeng XW, Hou XW (2015). Application of CRISPR/Cas9 genome editing technology in functional genomics and improvement of plants. Plant Physiol J, 51 (9): 1351–1358 (in Chinese with English abstract) [曾秀英, 侯学文(2015). CRISPR/Cas9基因组编辑技术在植物基因功能研究及植物改良中的应用. 植物生理学报, 51 (9): 1351–1358]
- Zhang T (2019). Isolation of protoplasts from mesophyll cells of *Sophora japonica* (dissertation). Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University (in Chinese with English abstract) [张天(2019). 国槐叶肉细胞原生质体分离研究(学位论文). 陕西杨凌: 西北农林科技大学]
- Zhang Y, Liu XF, Zhang J, et al (2019). Development of a protoplast-based transient expression system and application in *Jasminum sambac*. J Fujian Agric For Univ, 48 (6): 727–735 (in Chinese with English abstract) [张娅, 刘晓烽, 张婧等(2019). 茉莉花原生质体瞬时表达体系的建立及应用. 福建农林大学学报(自然科学版), 48 (6): 727–735]