

无刺枸骨原生质体制备与瞬时转化体系建立

葛剑斌¹, 吴兴鑫¹, 张军², 金小军², 周宇生¹,
朱雨涵¹, 卢心可¹, 金松恒³, 董彬^{1*}

¹浙江农林大学风景园林与建筑学院, 杭州 311300; ²同创工程设计有限公司, 绍兴 312000;

³浙江农林大学暨阳学院, 诸暨 311800

摘要 无刺枸骨(*Ilex cornuta* 'Fortunei')在园林绿化中应用非常普遍,也是常见的造型树种。高效简便的原生质体制备分离体系对于木本植物育种和基因研究具有重要价值。该研究以无刺枸骨幼嫩叶片为材料,采用L₉(3⁴)正交试验、浓度梯度实验探究影响原生质体分离的影响因素,并采用聚乙二醇(PEG-4000)介导法进行原生质体瞬时转化。结果表明,2.5% (W/V)纤维素酶、1.0% (W/V)离析酶、0.5% (W/V)果胶酶和0.4% (W/V)蜗牛酶为最适酶浓度组合;酶解3.5小时后,原生质体产量最高,达1.18×10⁷·g⁻¹ FW,活力为68.30%。通过40% (W/V) PEG-4000介导转化pORE_R4-IcFPS₂质粒后,在激光共聚焦显微镜下可观察到细胞核内的绿色荧光信号和DAPI蓝色荧光信号。研究成功构建了无刺枸骨原生质体高效分离体系,为后续无刺枸骨的原生质融合育种及基因功能研究奠定了基础。

关键词 无刺枸骨,原生质体,酶解法,瞬时转化

葛剑斌, 吴兴鑫, 张军, 金小军, 周宇生, 朱雨涵, 卢心可, 金松恒, 董彬 (2026). 无刺枸骨原生质体制备与瞬时转化体系建立. 植物学报 61, 1-1.

近年来,木本观赏植物在国内外花卉市场上呈现稳步增长的趋势,其在家庭园艺和园林绿化中备受青睐。为了满足消费者多样化的需求,木本观赏植物育种正朝着性状多样、植株小型化等方向发展。然而,传统杂交育种技术在木本观赏植物性状改良中面临诸多挑战,受到育种周期长以及生殖隔离等限制,使其难以快速响应市场需求和实现理想的育种目标。在此背景下,以原生质体技术为代表的生物技术手段正逐渐成为推动木本观赏植物性状改良的关键突破口(Wu et al., 2017)。

原生质体作为去除细胞壁的活细胞,不仅能通过细胞融合技术克服远缘杂交中不亲和障碍,实现遗传物质的重新组合,还可直接应用于基因功能验证和调控网络分析(Naing et al., 2021; Li et al., 2023)。在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)以及重要作物棉花(*Gossypium hirsutum*)和水稻(*Oryza sativa*)中,因具有一年生、细胞壁结构相对简单(如拟南芥叶片细胞薄壁化,水稻愈伤组织细胞分裂旺盛)等特性,其原生质体更易通过酶解获得,且转化效率高,因此该技术在这些物种中得到广泛应用(Jeong et al., 2021; Sretenovic et al., 2021; Wang et al., 2022)。然而,木本植物因其多年生茎干木质化以及叶片革质化等特性,在原生质体分离和转化等方面面临诸多限制和挑战(彭邵锋等, 2013),这在一定程度上制约了木本观赏植物的育种进程以及遗传机制解析。目前,获取原生质体的常见方法主要是酶解法,即利用纤维素酶、离析酶和果胶酶等不同配比的酶制剂组合,在温和的条件下催化细胞壁分解,从而释放出具有活力的原生质体(Avila-Peltroche et al., 2021; Hyden et al., 2022)。不同物种在细胞壁组成、组织结构等方面存在显著差异,这意味着需要对特定物种的原生质体分离和转化体系进行优化。因此,针对特定物种建立原生质体分离和转化体系具有重要的研究意义和实际应用价值。

无刺枸骨(*Ilex cornuta* 'Fortunei')作为一种常见的园林绿化观赏植物,因其独特的造型和优良的性状而广泛应用于城市绿化和庭院美化。目前,尚未见无刺枸骨原生质体分离和转化体系的相关报道。本研究以无刺枸骨新生叶片为实验材料,通过系统优化酶解体系,建立了适用于无刺枸骨新生叶片的高效原生质体制备体系,进一步采用聚乙二醇(PEG)介导的瞬时转化法,实现外源基因在无刺枸骨原生质体中的高效表达和亚细胞定位。研究结果为后续深入开展无刺枸骨的基因功能研究以及利用原生质体融合技术培育具有理想性状的新品种提供了关键的技术支撑和方法基础。

收稿日期: 2025-05-30; 接受日期: 2025-09-02

* 通讯作者。E-mail: dongbin@zafu.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 材料

实验材料来源于浙江农林大学校内种植的五年生无刺枸骨(*Ilex cornuta* Lindl. et Paxt. 'Fortunei')。选取长势良好且无病虫害植株的当年新生叶片制备原生质体。

纤维素酶(Cellulase R-10)和离析酶(Macerozyme R-10)、蜗牛酶、果胶酶、吗啉乙磺酸(MES)、甘露醇和聚乙二醇 4000 (PEG-4000)均购自上海源叶生物公司。RNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、无内毒素质粒大提试剂盒(增强型)和快速反转录试剂盒均购自北京天根生物公司。重组克隆试剂盒与高保真酶购自南京诺唯赞公司。其余试剂均为国内常规试剂。

1.2 正交试验设计

为了获得最佳的原生质体酶液组合,针对不同酶的组合及其质量浓度采用正交试验设计 $L_9(3^4)$, 其它试验均控制单一变量(表 1)。

表 1 不同酶液处理组合

Table 1 Different enzyme solution treatment combination

Level	Cellulase (%)	Macerozyme (%)	Pectinase (%)	Snailase (%)
1	1.50	1.00	0.40	0.25
2	1.50	1.50	0.60	0.40
3	1.50	2.00	0.50	0.55
4	2.00	1.00	0.60	0.55
5	2.00	1.50	0.50	0.25
6	2.00	2.00	0.40	0.40
7	2.50	1.00	0.50	0.40
8	2.50	1.50	0.40	0.55
9	2.50	2.00	0.60	0.25

1.3 原生质体分离与制备

从生长在自然光下长势良好的无刺枸骨上摘取新生嫩叶,称取 1.0 g,使用 75%乙醇浸泡 5 分钟,用去离子水冲洗 3 次,洗净残留在叶片上的乙醇。灭菌后的材料置于无菌培养皿中,在超净工作台上用刀片切除叶脉,将剩下的叶片部分切成 0.1–0.3 mm 的细丝,放入装有 5 mL 的酶解液(含 1 110 mg·L⁻¹ CaCl₂, 745 mg·L⁻¹ KCl, 3 900 mg·L⁻¹ MES (pH5.7), 8 700 mg·L⁻¹ PVP, 1 000 mg·L⁻¹ BSA),去离子水定容后于 55 °C 水浴 10 分钟(使植物细胞自身内源蛋白酶和酯酶降解),冷却至室温后用 0.45 μm 纤维素微孔滤膜过滤,置于恒温 25 °C 摇床,黑暗下 50 r·min⁻¹ 进行酶解。酶解后加入等体积的 W5 溶液(含 2 mmol·L⁻¹ MES (pH5.7), 154 mmol·L⁻¹ NaCl, 125 mmol·L⁻¹ CaCl₂, 5 mmol·L⁻¹ KCl)终止酶解反应,用 75 μm 尼龙滤网过滤酶解液至 50 mL 离心管,滤液以 100 ×g 离心 3 分钟,管内绿色沉淀用 1–3 mL W5 溶液洗涤并重悬,重复 2–3 次,尽可能吸去上清,置于冰中备用。

1.4 原生质体计数与活力检测

根据 Ren 等(2021)的方法,利用血球计数板对原生质体进行计数。将收集到的无刺枸骨肉原生质体稀释 2–5 倍,吸取 10 μL 纯化后的原生质体悬浮于血球计数板上,在光学显微镜下观察计数。重复 3 次,取平均值。原生质体产量计算公式如下:

原生质体数(个·mL⁻¹)= 5 个中格内原生质体数总数×5×10 000×稀释倍数;

原生质体产量(个·g⁻¹ FW)=(原生质体数(个·mL⁻¹)×稀释后体积(mL))/分离材料总质量(g)。

原生质体活力使用荧光双醋酸酯(FDA)方法进行检测。将 FDA 溶于 5 mg·mL⁻¹ 丙酮中,取纯化后的原生质体 0.5 mL,加入 10 μL FDA 丙酮溶液,使其终浓度为 0.01%。避光静置 5 分钟,在荧光显微镜下观察。此时有活力的原生质体呈现黄绿色荧光,无活力的原生质体呈现红色。选取 3 个代表性的视野进行统计,取平均值。原生质体活力计算公式如下:

原生质体活力=(发荧光的原生质体数/原生质体总数)×100%。

1.5 亚细胞定位载体构建

使用植物总 RNA 提取试剂盒(天根,北京)提取无刺枸骨叶片 RNA,通过普通琼脂糖凝胶电泳挑选出未降解的 RNA 进行反转录,对 RNA 进行浓度和纯度的测定,将所有 RNA 稀释到 500 ng·μL⁻¹ 后使用反转录酶将 RNA 反转录成 cDNA。将提取的 cDNA 保存在–20 °C,用于后续实验。

以 Qin 等(2018)中 *FPS2* 基因序列为参考, 利用 Prime 6.0 设计扩增引物, 即 *lcFPS2-F* (5'-ATGCTGGACTATAATGTACCTGGAGGG-3')和 *lcFPS2-R* (5'-CTTCTGCCTCTTGTAT-ATCTTACCCAAAAGGA-3')。利用 2x Phanta Max Master Mix (Dye Plus) (诺唯赞, 南京) 高保真酶对 *lcFPS2* 基因片段进行扩增, 具体操作参考说明书。扩增片段通过普通琼脂糖凝胶电泳检验条带长度, 用 DNA 凝胶回收试剂盒(金沙生物, 北京)对长度与目的片段相近的 PCR 产物进行纯化, 具体操作参考说明书。使用同源重组酶(全式金, 北京)将纯化后的 PCR 产物与用 *NheI* 和 *XhoI* 双酶切的 pORE_R4 载体进行连接, 具体操作步骤参考说明书。取 10 μL 重组后的 pORE_R4 载体热激转化 *DH5 α* 大肠感受态, 选取测序验证正确的重组克隆, 命名为 pORE_R4-*lcFPS2*。用无内毒素质粒大提试剂盒(天根, 北京)提取足量(质量浓度 $>10 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) pORE_R4-*lcFPS2* 质粒, 用于后续原生质体瞬时转化。

1.6 原生质体瞬时转化

采用 PEG 介导法将 pORE_R4-*lcFPS2* 质粒进行瞬时转化。在 5 mL 离心管中加入 200 μL 原生质体悬浮液(密度 $\approx 2\times 10^6$ 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$, 活力 $>80\%$), 离心弃上清, 加入 200 μL MMG (4 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ MES, 0.4 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇, 15 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl₂, ddH₂O 定容)溶液并轻轻混匀, 再依次加入 3–4 μL 的质粒(10 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)以及同原生质体等体积的 PEG-CaCl₂ 溶液(40%(W/V)PEG-4000, 2 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ D-mannitol, 1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl₂), 轻轻吹打混匀; 然后将其置于室温, 暗培养孵育 15 分钟, 加入 2 倍体积的 W5 溶液终止反应, 将转化后的原生质体于 100 $\times\text{g}$ 离心 2–3 分钟, 弃上清; 然后用 1 mL W5 溶液重悬 3–4 次, 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养 24 小时。向暗培养后的原生质体悬浮液中加入 5–10 μL 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DAPI 荧光染料, 轻轻吸打混匀。利用激光共聚焦显微镜(LSM880, 蔡司)观察原生质体 GFP 和 DAPI 荧光信号。

1.7 qRT-PCR 分析

分别准备 0.1 g 未转化的原生质体和已将 *lcFPS2* 瞬时转化的原生质体, 使用植物总 RNA 快速提取试剂盒(天根, 北京)按照说明书提取 RNA, 通过 NanoDrop One ThermoScientific, 美国)和无 Rnase 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 浓度质量和完整性。使用 4 \times All-in-One Ultra qRT SuperMix (诺唯赞, 南京)将 1 μg 质量合格的 RNA 反转录为 cDNA, PCR 反应体系与反应条件见说明书。反转录产物可立即用于 qPCR 反应, 也可于 -20°C 短期保存, 或分装后于 -80°C 长期保存, 避免反复冻融。使用 qPCR SYBR Master Mix 试剂盒(11185ES03, 羿圣)进行实时荧光定量 PCR 分析, 设 3 个生物学重复和技术重复。qRT-PCR 反应体系与反应程序见说明书。以无刺枸骨 *lcGAPDH* 作为内参基因(涂逸等, 2022), 目的基因的相对表达量分析利用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法(Livak et al., 2001)。qRT-PCR 引物设计借助在线工具 NCBI Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)。引物信息见表 2。引物由浙江有康生物科技有限公司(杭州)合成。

表 2 引物序列信息

Table 2 Primer sequence information

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Purpose
<i>lcFPS2-F</i>	ATGCTGGACTATAATGTACCTGGAGGG	Gene cloning
<i>lcFPS2-R</i>	CTTCTGCCTCTTGTATATCTTACCCAAAAGGA	
<i>qR-lcFPS2-F</i>	ACCTTGGGCACTTTGAACCA	Real-time quantitative PCR
<i>qR-lcFPS2-R</i>	TGTACCTGGAGGGAAGCTGA	
<i>lcGAPDH-F</i>	TATCAACGGCTTCGGTCGCA	Housekeeping gene
<i>lcGAPDH-R</i>	GGACGGAGTCGTAATTGAGCAT	

2 结果与分析

2.1 不同酶浓度组合对原生质体分离的影响

本实验选择无刺枸骨当年生叶片进行原生质体提取和制备(图 1)。为了获得原生质体分离的最佳酶组合, 我们采用 L₉(3⁴)正交试验对不同浓度的酶液组合进行筛选, 其中渗透压调节剂甘露醇的浓度为 0.30 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 。结果表明, 9 个酶液组合中, 组合 7 的原生质体产量最高, 达 $(11.75\pm 1.75)\times 10^6\cdot\text{g}^{-1}$ FW, 活力达 $(68.3\pm 2.29)\%$; 原生质体产量及活力最低的为组合 3, 平均产量仅为 $(1.5\pm 0.33)\times 10^6\cdot\text{g}^{-1}$ FW, 活力为 $(56.70\pm 1.55)\%$ (表 3; 图 2)。

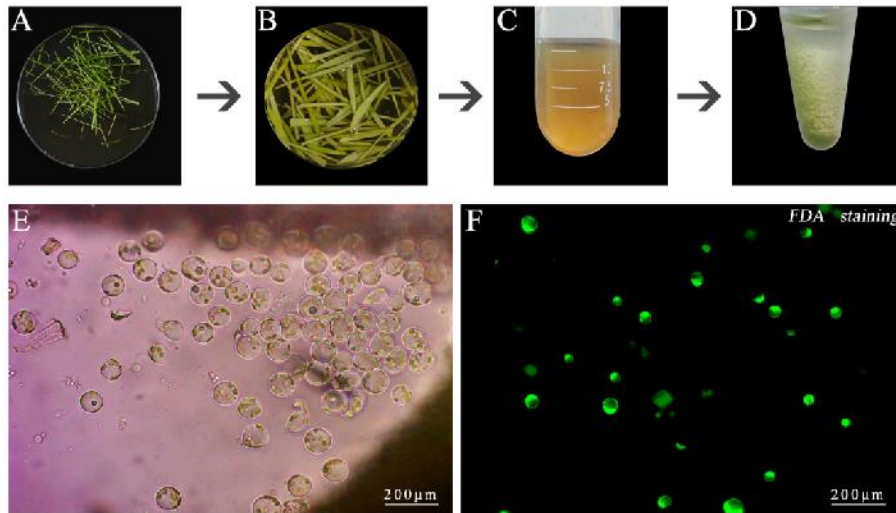


图 1 原生质体制备流程

(A) 叶片切成 0.1 mm 的细丝; (B) 叶丝置于酶解液中酶解; (C) 用 75 µm 尼龙滤网过滤后的酶解液; (D) 纯化后的原生质体悬浮液; (E) 在显微镜下观测原生质体的形态和产量; (F) 使用 FDA 荧光染色测定原生质体活力

Figure 1 Flowchart of protoplast preparation

(A) Cut the leaves into thin filaments with a thickness of 0.1 mm; (B) Place the leaf filaments in the enzymatic hydrolysis solution for enzymatic hydrolysis; (C) The enzymatic hydrolysis solution filtered through a 75 µm nylon filter; (D) The purified protoplast suspension; (E) Examine the morphology and yield of the protoplasts under the microscope; (F) Determine the viability of protoplasts by fluorescence staining with FDA

表 3 无刺枸骨叶片原生质体最佳分离条件筛选

Table 3 Screening for optimal isolation conditions of protoplasts from *Ilex cornuta* 'Fortunei' leaves

Screening object	Cellulase (%)	Macerozyme (%)	Pectinase (%)	Snailase (%)	D-mannitol (mol·L ⁻¹) ¹⁾	Enzymatic hydrolysis time (h)	Protoplast yield (×10 ⁶ ·g ⁻¹ FW)	Protoplast viability (%)
Enzyme	1.50	1.00	0.40	0.25	0.30	3.5	2.75 de	64.50 d
Concentration	1.50	1.50	0.60	0.40	0.30	3.5	2.00 ef	83.00 a
Combination	1.50	2.00	0.50	0.55	0.30	3.5	1.50 f	56.70 f
	2.00	1.00	0.60	0.55	0.30	3.5	6.75 b	57.00 f
	2.00	1.50	0.50	0.25	0.30	3.5	5.00 c	71.40 c
	2.00	2.00	0.40	0.40	0.30	3.5	1.25 f	64.80 d
	2.50	1.00	0.50	0.40	0.30	3.5	11.75 a	68.30 c
	2.50	1.50	0.40	0.55	0.30	3.5	5.75 c	84.00 a
	2.50	2.00	0.60	0.15	0.30	3.5	3.75 d	77.00 b
	D-mannitol concentration	2.50	1.00	0.50	0.40	0.20	3.5	14.59 a
(mol·L ⁻¹)	2.50	1.00	0.50	0.40	0.25	3.5	8.17 c	53.69 c
	2.50	1.00	0.50	0.40	0.30	3.5	12.42 b	73.06 b
	2.50	1.00	0.50	0.40	0.35	3.5	6.25 d	80.05 a
	2.50	1.00	0.50	0.40	0.40	3.5	12.08 b	72.03 b
Enzymatic hydrolysis time (h)	2.50	1.00	0.50	0.40	0.30	2.5	3.59 d	61.98 c
	2.50	1.00	0.50	0.40	0.30	3.0	6.25 c	70.30 b
	2.50	1.00	0.50	0.40	0.30	3.5	14.50 a	78.74 a
	2.50	1.00	0.50	0.40	0.30	4.0	10.33 b	64.58 c

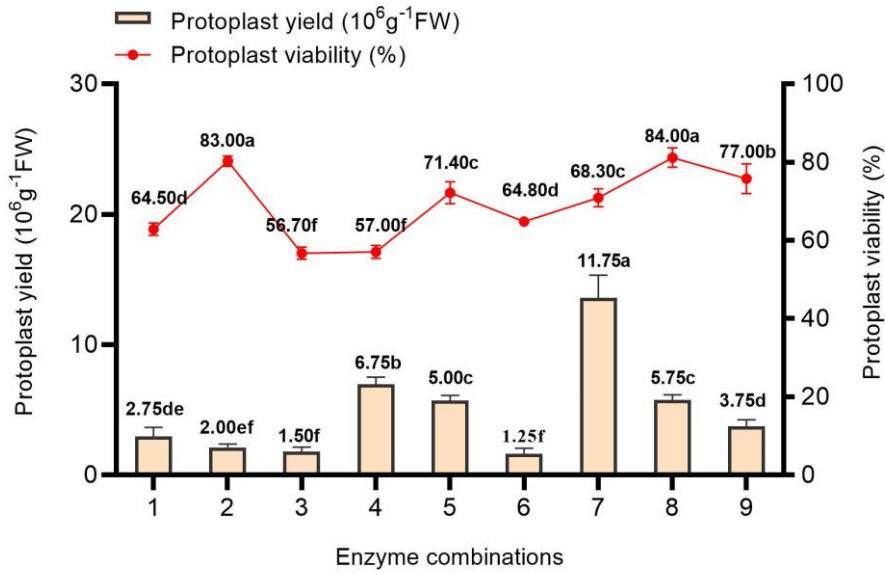


图 2 不同酶液组合对原生质体产量和活力的影响

不同小写字母表示各处理间差异显著 ($P < 0.05$)

Figure 2 The impact of different enzyme combinations on protoplast yield and viability

Different lowercase letters indicate significant differences among different treatments ($P < 0.05$)

2.2 不同酶解时间对原生质体分离的影响

以酶液组合 7 为基础, 通过设置不同的时间梯度进一步筛选分离无刺枸骨原生质体所需要的最佳酶解时间。结果表明, 随着酶解时间的增加, 原生质体产量和活力逐步增高。酶解 3.5 小时的原生质体产量为 $(14.50 \pm 1.00) \times 10^6 \cdot g^{-1} FW$, 且活力最高, 为 $(8.74 \pm 2.46)\%$, 显著高于酶解 2.5 和 3.0 小时; 但当酶解时间超过 3.5 小时之后, 原生质体的活力和产量不断下降。因此, 我们确定酶解法制备无刺枸骨原生质体的最佳酶解时间为 3.5 小时(图 3A, B)。

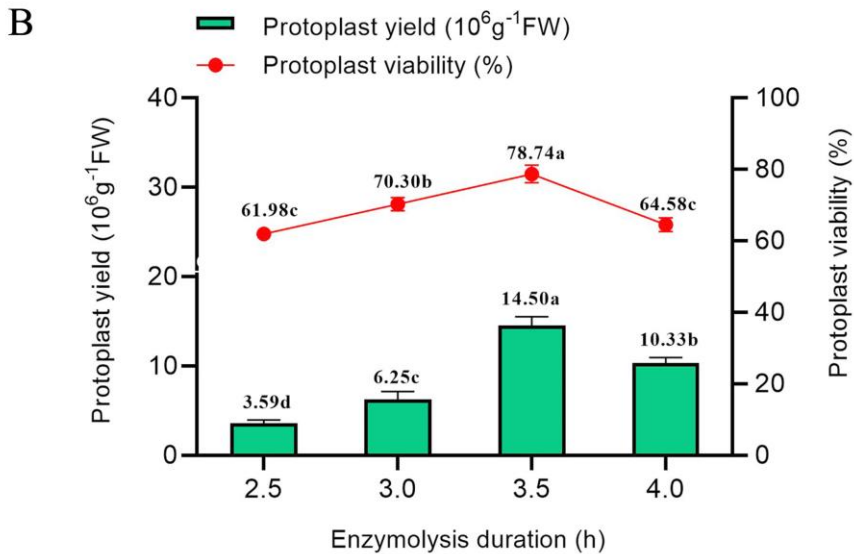
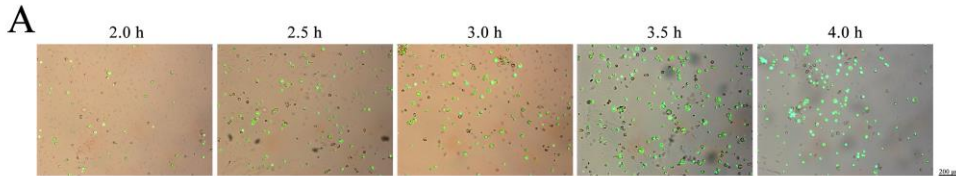


图 3 不同酶解时间下的原生质体及其产量与活力统计

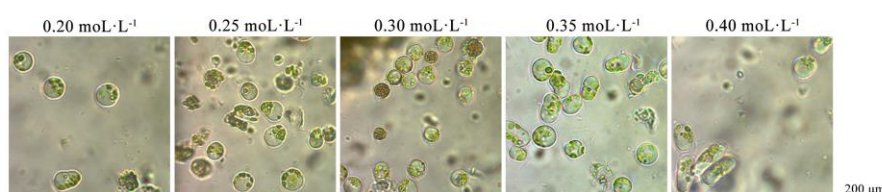
(A) 不同酶解时间后的原生质体; (B) 不同酶解时间下的原生质体产量和活力统计(2 小时 h 酶解时间下的产量太少未统计)。不同小写字母表示各处理间差异显著($P<0.05$)

Figure 3 Statistics on protoplasts and their yield and vitality under different enzymatic hydrolysis times (A) Protoplasts after different enzymatic hydrolysis times; (B) Statistics on protoplast yield and vitality at different enzymatic hydrolysis times (yield at 2 h was too low to be included in the statistics). Different lowercase letters indicate significant differences among different treatments ($P<0.05$)

2.3 不同甘露醇浓度对原生质体分离的影响

为了明确渗透压对原生质体提取的影响,我们以酶液组合 7 为基础,依次加入梯度浓度(0.20–0.40 mol·L⁻¹)甘露醇,对原生质体的分离情况进行探究(图 4A)。从原生质体产量看,甘露醇浓度为 0.20、0.30 以及 0.40 mol·L⁻¹ 时,分离纯化得到的原生质体较多;而从原生质体活力看,甘露醇浓度为 0.30、0.35 以及 0.40 mol·L⁻¹ 时,原生质体活力较高(图 4B)。综合来看,0.30 mol·L⁻¹ 甘露醇分离纯化出的原生质体状态良好,产量达 $(12.42\pm 0.52)\times 10^6\cdot g^{-1}$ FW,活力为 $(73.06\pm 2.66)\%$ 。

A



B

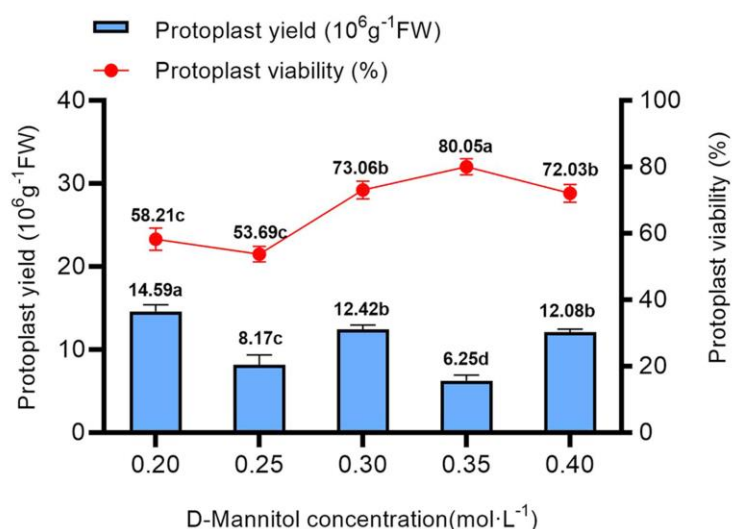


图 4 不同甘露醇浓度下的原生质体及其产量与活力统计

(A) 不同甘露醇浓度下的原生质体; (B) 甘露醇浓度梯度实验。不同小写字母表示各处理间差异显著($P<0.05$)

Figure 4 Statistics on protoplasts and their yield and vitality at different D-mannitol concentrations

(A) Protoplasts under different D-mannitol concentrations; (B) D-mannitol concentration gradient experiment. Different lowercase letters indicate significant differences among different treatments ($P<0.05$)

2.4 暗处理对原生质体的影响

为了提高原生质体的产量和活力,我们以酶液组合 7、酶解 3.5 小时和甘露醇浓度为 0.30 mol·L⁻¹ 酶解体系对无刺枸骨叶片进行不同时间的暗处理。取带枝条的新生嫩叶,将其置于 25°C 暗处理,以 0 小时为对照,处理 12、18 和 24 小时,最后进行酶解并统计原生质体产量及活力。结果表明,随着叶片暗处理时间的增加,原生质体产量逐渐增高,但原生质体活力降低(图 5)。综合来看,叶片暗处理 12 小时,无刺枸骨原生质体活力达到最大,为 $(73.25\pm 2.93)\%$,产量为 $(3.95\pm 0.17)\times 10^6\cdot g^{-1}$ FW。

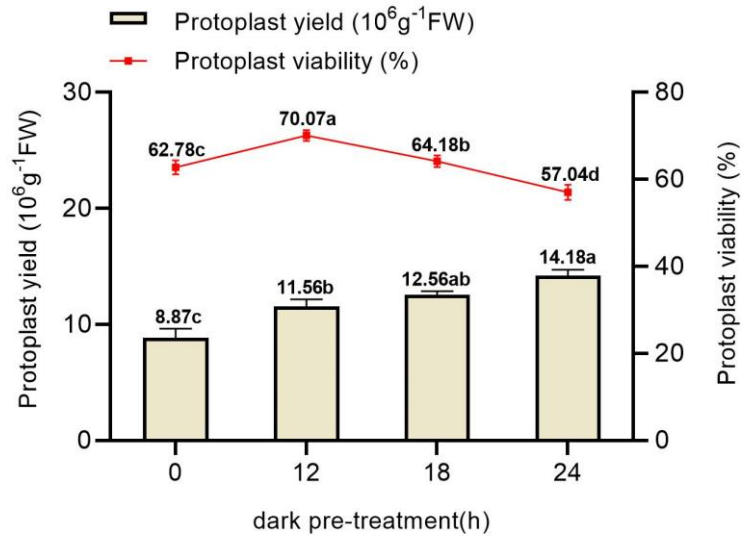


图 5 黑暗预处理对无刺枸骨叶片原生质体分离的影响
不同小写字母表示各处理间差异显著 ($P < 0.05$)

Figure 5 The influence of dark pre-treatment on the isolation of protoplasts from the leaves of *Ilex cornuta* 'Fortunei'
Different lowercase letters indicate significant differences among different treatments ($P < 0.05$)

2.5 原生质体瞬时转化

法尼基焦磷酸合酶(farnesyl diphosphate synthase, FPS)是萜类代谢途径中的关键酶,能够催化倍半萜化合物的前体法尼基焦磷酸(farnesyl diphosphate, FPP)的合成,在调控植物生长发育中发挥重要作用(Qin et al., 2018)。为了建立无刺枸骨叶片原生质体的瞬时转化体系并检测其转化效果,本研究以 *IcFPS2* 与 GFP 融合蛋白的表达情况作为依据。首先,我们对无刺枸骨的 *IcFPS2* 基因进行了克隆和序列分析。*IcFPS2* 基因编码的氨基酸含有 5 个典型的 FPS 保守结构域(图 6A)。基序 I (GKLNLR)中的赖氨酸残基可促进法尼基焦磷酸合酶(FPS)与异戊烯基焦磷酸(IPP)的结合;基序 II (EXXXXXLXXDDXXDXXXXRRG)的氨基酸残基参与 IPP 和烯丙基底物之间碳碳键(C-C 键)的形成,并决定产物链的长度;基序 III (GQMID)中第 1 位的甘氨酸(G)、第 2 位的谷氨酰胺(Q)和第 5 位的天冬氨酸(D)在所有植物 FPS 序列中均保守;基序 IV (KT)在所有植物 FPS 序列中均为保守氨基酸;基序 V (DDXXD)是 FPS 序列中的天冬氨酸富集区域。*IcFPS2* 与冬青科巴拉圭冬青(*Ilex paraguariensis*) *IpFPS* 同源性较高(图 6B)。我们使用已构建并经测序正确的 pORE_R4-*IcFPS2*-GFP 载体,利用 PEG- CaCl_2 介导法将其转化到原生质体中。本研究中,为明确 *IcFPS2*-GFP 融合蛋白的亚细胞定位,我们对转化后的原生质体进行了 DAPI 染色处理。在激光共聚焦显微镜下可观测到 *IcFPS2*-GFP 荧光信号与 DAPI 蓝色荧光重合(图 6C),FPS2-GFP 融合蛋白在细胞核内表达。此外,通过 qRT-PCR 分析发现,瞬时转化 *IcFPS2* 外源基因的原生质体的相对表达量显著高于未转化组,证实 *IcFPS2* 基因在原生质体中实现了有效转录激活,与荧光显微镜下观察到的蛋白表达趋势一致。这说明原生质体瞬时转化成功。

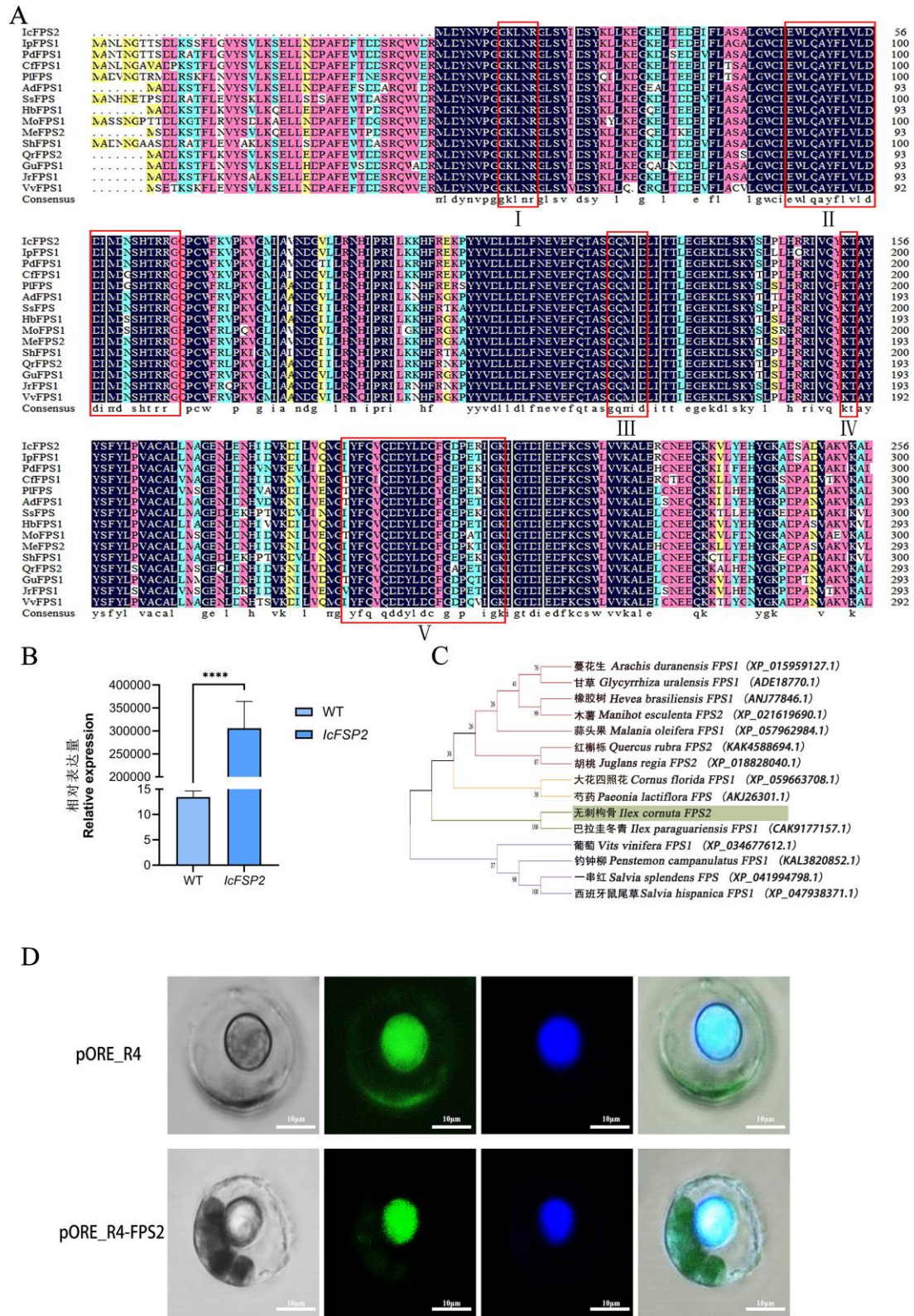


图 6 *IcFPS2* 基因序列与亚细胞定位
(A) *IcFPS2* 蛋白与其它物种 FPS 蛋白的序列比对; **(B)** *IcFPS2* 的表达水平分析; **(C)** 不同物种 FPS 基因的系统进化树; **(D)** *IcFPS2* 的亚细胞定位
Figure 6 Analysis of *IcFPS2* gene sequence and subcellular localization
(A) Sequence alignment of the *IcFPS2* protein with FPS proteins from other species; **(B)** The expression level analysis of *IcFPS2*; **(C)** The phylogenetic tree of FPS genes from different species; **(D)** Subcellular Localization of *IcFPS2*

3 讨论

合适的植物材料是决定原生质体活力与产量的前提条件(Liu et al., 2024)。叶片、根系、茎秆、愈伤组织、花等不同组织均可用于制备分离原生质体,但不同组织材料在制备时存在一定的局限性(Sivanandhan et al., 2021; Hu et al., 2024)。例如,愈伤组织分离得到的原生质体为透明状,而且比重比叶肉细胞小,分离和纯化过程中的离心步骤不易于操作(Wang et al., 2022; Gao et al., 2024);矮牵牛(*Petunia x atkinsiana*) (Yu et al., 2020)等多种观赏植物中,利用花瓣制备获得原生质体,但花瓣提取原生质体受花期短的限制(Lin et al., 2018)。与愈伤组织和花瓣相比,植物叶片是分离获得植物原生质体的优良材料,不仅容易获取,而且采样时对细胞的损伤较小(高成昱等, 2023)。因此,在无刺枸骨原生质体的提取中,优先选择当年新生叶。

酶解法是常见的分离原生质体的方法之一,不同酶浓度组合、酶解时间和渗透压是影响原生质体产量与活力的重要因素(Jamet and Dunand, 2020; Wang et al., 2021)。在非洲菊(*Gerbera hybrida*)中,用 1.6% (W/V)纤维素酶 R-10、0.5% (W/V)果胶酶与 0.2% (W/V)离析酶组合从叶片中分离获得了原生质体(张玉琴等, 2017)。在茉莉(*Jasminum sambac*)中,以 1.5% (W/V)纤维素酶、0.4% (W/V)离析酶和 0.8% (W/V)果胶酶组合分离获得了高产量($2.38 \times 10^7 \cdot g^{-1}$ FW)的原生质体(Ahmed et al., 2021)。本研究通过对酶的种类及浓度进行四因素三水平正交试验,对无刺枸骨的最佳酶组合进行筛选,获得最佳酶组合为 2.5% (W/V)纤维素酶、1.0% (W/V)离析酶、0.5% (W/V)果胶酶和 0.4% (W/V)蜗牛酶,原生质体产量较高,达 $1.18 \times 10^7 \cdot g^{-1}$ FW (图 2)。由于不同物种和组织的细胞结构差异较大,酶解时间对于原生质体的产量和活力影响很大(Zhang et al., 2024)。酶解时间过短会使原生质体不完全释放,导致获得的原生质体产量降低;而酶解时间过长会损伤质膜,导致原生质体活力降低(Naing et al., 2021)。银杏(*Ginkgo biloba*)叶片分离原生质体最佳酶解时间为 5 小时(Lai et al., 2020)。菠萝(*Ananas comosus*)叶片分离原生质体最佳酶解时间为 3 小时(Priyadarshani et al., 2018)。本研究表明无刺枸骨叶片原生质体分离的最适酶解时间为 3.5 小时(图 3)。甘露醇对维持原生质体的活力十分重要,较高的渗透压导致细胞失水过多而死亡(Tricoli et al., 2024)。在铁观音(*Pinus massoniana*)原生质体提取过程中, $0.40 \text{ mol} \cdot L^{-1}$ 甘露醇用于原生质体的分离效果最好(宋爱华等, 2017)。本研究发现,在 $0.30 \text{ mol} \cdot L^{-1}$ 甘露醇处理下,获得的无刺枸骨原生质体状态最好(图 4)。此外,材料预处理可改变细胞核、细胞壁的生理状态、增加细胞膜的强度、提高细胞壁酶解的效率并减少原生质体损伤(Naing et al., 2021; Kolasinliiler et al., 2025)。在实验中我们也发现预先对无刺枸骨叶片进行暗处理一段时间,得到的原生质体产量优于未处理组(图 5),其原因可能是暗处理导致植物细胞壁变得相对疏松,更容易被纤维素酶和果胶酶分解。而暗处理时间过长,得到的原生质体活力降低,推测可能由于长期避光,原生质体的抗氧化系统受到抑制,导致活性氧(ROS)积累增多,进而损伤原生质体的膜结构和代谢功能,致使原生质体的活力降低(Naing et al., 2021)。

目前,PEG 介导法已广泛用于多种植物的基因瞬时转化(Yoo et al., 2007)。例如,山茶(*Camellia japonica*)和兰花(*Cymbidium goeringii*)原生质体转化中,采用 PEG 介导法转化效率可达 80%以上(Ren et al., 2021; Lin et al., 2023)。本研究将含有目的基因 *IcFPS2* 的 pORE_R4 质粒瞬时转化到无刺枸骨叶肉原生质体中,亚细胞定位观察发现 *IcFPS2*-GFP 荧光信号与 DAPI 蓝色荧光重合(图 8C),说明已成功构建了无刺枸骨原生质体瞬时转化体系。

本研究建立的无刺枸骨叶片原生质体分离及 PEG 介导的瞬时转化体系,在后续研究中可结合 CRISPR/Cas9 基因编辑技术,通过原生质体作为基因编辑的受体,将靶向编辑载体(如含 sgRNA 和 Cas9 的表达载体)通过 PEG 介导,利用原生质体的全能性进行植株再生,从而实现对目标基因(调控株型、抗逆性的关键基因)的精准修饰(Naing et al., 2021)。相比传统的稳定转化,原生质体介导的基因编辑可提高编辑效率(通过瞬时表达验证 sgRNA 活性),缩短筛选周期,尤其适用于无刺枸骨等再生难度较高的木本植物。在葡萄(*Vitis vinifera*)和白杨(*Populus alba*)中,原生质体已成功用于 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑,实现了目标基因的定向突变(Najafi et al., 2023; Liu et al., 2025),这为未来无刺枸骨分子育种提供了可借鉴的范式。

4 结论

本研究以无刺枸骨叶肉原生质体为材料成功构建了原生质体分离纯化体系以及瞬时转化体

系。原生质体制备体系如下：首先对当年生叶片进行 12 小时暗处理，然后采用 2.5% (W/V) 纤维素酶、1.0% (W/V) 离析酶、0.5% (W/V) 果胶酶、0.4% (W/V) 蜗牛酶，结合 $0.30 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇调节渗透压，酶解 3.5 小时，可获得高质量的原生质体(表 3)。进一步，利用 40% (W/V) PEG-4000 成功将 pORE_R4-*lcFPS2-GFP* 质粒转化至原生质体中，在激光共聚焦显微镜下观测到细胞核内的 GFP 荧光。本研究结果将为后续利用无刺枸骨原生质体融合育种以及基因功能研究提供技术支持。

作者贡献声明

董彬：整体规划研究内容，指导实验实施与论文撰写，统筹修改及定稿，提供资金支持；葛剑斌，吴兴鑫：负责无刺枸骨原生质体制备与瞬时转化体系实验操作，参与实验方案设计及其结果分析；张军，金小军：协助原生质体制备条件优化，承担部分实验验证工作；周宇生，朱雨涵，卢心可：负责实验数据记录、整理及数据分析，参与文献查阅；金松恒：提供原生质体实验技术支持，参与实验思路研讨。

参考文献

- Ahmed MA, Miao M, Pratsinakis ED, Zhang H, Wang W, Yuan Y, Lyu M, Iftikhar J, Yousef AF, Madesis P, Wu B (2021). Protoplast isolation, fusion, culture and transformation in the woody plant *Jasminum* spp. *Agric Basel* **11**, 699.
- Avila-Peltroche J, Won BY, Cho TO (2021). Protoplast isolation from *Dictyopteris pacifica* and *Scytosiphon lomentaria*, using a simple commercial enzyme preparation. *J Genet Eng Biotechn* **19**, 1–7.
- Gao CY, Wang YH, Le JZ, Li T, Li JD, Zhou MY, Zhang HX, Ma H, Zhang YX, Qi BX, Xu JF (2023). Establishment of a protoplast preparation method from pear leaves and its transient gene transformation assay. *Acta Horti Sin* **50**, 1141–1150. (in Chinese)
- 高成昱, 王艺衡, 靳江周, 李涛, 李金斗, 周梦瑶, 张海霞, 马辉, 张玉星, 元宝秀, 许建锋 (2023). 梨叶片原生质体制备方法的建立及其基因瞬时转化试验. *园艺学报* **50**, 1141–1150.
- Gao YL, Tang TY, Cao WH, Ali M, Zhou QR, Zhu DM, Ma XH, Cai Y, Zhang QX, Wang ZJ, Pei D, Huang JQ, Shen JB (2024). Protoplast facilitates transformation localization and functional analysis of walnut proteins transient subcellular. *Plant Physiol* **197**, kiae627.
- Hu B, Dong MY, Liu RN, Shan W, Wang Y, Ding Y, Peng JY, Meng LY, Wang CY, Zhou Q (2024). Establishment of an efficient protoplast isolation and transfection method for *Eucommia ulmoides* Oliver. *Front Biosci-Land Mrk* **29**(95), 187.
- Hyden B, Yuan GL, Liu Y, Smart LB, Tuskan GA, Yang XH (2022). Protoplast-based transient expression and gene editing in shrub willow (*Salix purpurea* L.). *Plants* **11**, 3490.
- Jamet E, Dunand C (2020). Plant cell wall proteins and development. *Int J Mol Med* **21**(8), 2731.
- Jeong YY, Lee HY, Kim SW, Noh YS, Seo PJ (2021). Optimization of protoplast regeneration in the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Plant Methods* **17**, 1–16.
- Kolasinliler G, Akkale C, Kaya HB (2025). Establishing a reliable protoplast system for grapevine: isolation, transformation, and callus induction. *Protoplasma* **262**(3), 1–17.
- Li YL, Huang CJ, Liu Y, Zeng JM, Yu HQ, Tong ZJ, Yuan XJ, Sui XY, Fang DH, Xiao BG, Zhao SC, Yuan C (2023). CRISPR/Cas9-mediated seamless gene replacement in protoplasts expands the resistance spectrum to TMV-U1 strain in regenerated *Nicotiana tabacum*. *Plant Biotechnol J* **21**, 2641–2653.
- Lin HY, Chen JC, Fang SC (2018). A protoplast transient expression system to enable molecular, cellular, and functional studies in *Phalaenopsis orchids*. *Front Plant Sci* **9**, 843.
- Lin Z, Huang LJ, Yu PY, Chen JL, Du SX, Qin GN, Zhang L, Li N, Yuan DY (2023). Development of a protoplast isolation system for functional gene expression and characterization using petals of *Camellia oleifera*. *Plant Physiol Biochem* **201**, 107885.
- Liu H, Sun PP, Tong YQ, Gao XL, Tang ZH, Fan GZ (2024). Establishment of transient and stable gene transformation systems in medicinal woody plant *Acanthopanax senticosus*. *Chem Biol Technol Agric* **11**, 142.
- Liu YJ, Jiang PF, Han XM, Li XY, Wang HM, Wang YJ, Wang XX, Zeng QY (2025).

- Genome and CRISPR/Cas9 system of a widespread forest tree (*Populus alba*) in the world. *Plant Biotechnol J* **23**, 857–859.
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ methods. *Methods* **25**, 402–408.
- Naing AH, Adedeji SO, Kim CK** (2021). Protoplast technology in ornamental plants: current progress and potential applications on genetic improvement. *Sci Hortic* **283**, 110043.
- Najafi S, Bertini E, D'Inca E, Fasoli M, Zenoni S** (2023). DNA-free genome editing in grapevine using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes followed by protoplast regeneration. *Hortic Res* **10**, uhac240.
- Peng SF, Lu J, Chen YZ, Wang R, Chen LS, Ma L, Wang XN** (2013). Research Progress on protoplast culture systems of woody plants. *Chin Agric Sci Bull* **29**, 1–6. (in Chinese)
- 彭邵锋, 陆佳, 陈永忠, 王瑞, 陈隆升, 马力, 王湘南 (2013). 木本植物原生质体培养体系研究进展. *中国农学通报* **29**, 1–6.
- Priyadarshani S, Hu B, Li W, Ali H, Jia H, Zhao L, Ojolo SP, Azam SM, Xiong J, Yan M, Rahman Z, Wu Q, Qin Y** (2018). Simple protoplast isolation system for gene expression and protein interaction studies in pineapple (*Ananas comosus* L.). *Plant Methods* **14**, 1–12.
- Qin X, Li W, Liu Y, Tan M, Ganai M, Chetelat RT** (2018). A farnesyl pyrophosphate synthase gene expressed in pollen functions in S-RNase-independent unilateral incompatibility. *Plant J* **93**, 417–430.
- Ren R, Gao J, Yin D, Li Kai, Lu C, Ahmad S, Wei Y, Jin J, Zhu G, Yang F** (2021). Highly efficient leaf base protoplast isolation and transient expression systems for orchids and other important monocot crops. *Front Plant Sci* **12**, 626015.
- Sivanandhan G, Bae S, Sung C, Choi S, Lee G J, Lim YP** (2021). Optimization of Protoplast isolation from leaf mesophylls of Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) and subsequent transfection with a binary vector. *Plants* **10**, 10122636.
- Song AH, Zhang WB, Sun SL, Li LF, Wang XJ** (2017). Establishment of protoplast preparation and transient transformation system in *Gerbera jamesonii*. *Chin Bull Bot* **52**, 511–519. (in Chinese)
- 宋爱华, 张文斌, 孙姝兰, 李凌飞, 王小菁 (2017). 非洲菊原生质体制备及瞬时转化系统的建立. *植物学报* **52**, 511–519.
- Sretenovic S, Pan C, Tang X, Zhang Y, Qi Y** (2021). Rapid vector construction and assessment of BE3 and target-AID C to T base editing systems in rice protoplasts. *Rice Genome Eng Gene Edit* 95–113.
- Tricoli MD, Debernardi MJ** (2024). An efficient protoplast-based genome editing protocol for *Vitis* species. *Hortic Res* **11**(1), uhad266.
- Tu Y, Zeng H, Zhang WW, Xu F, Liao YL, Ye JB** (2022). Cloning and prokaryotic expression analysis of farnesyl pyrophosphate synthase *IcFPS2* gene from *Ilex cornuta*. *Chin Herb Med*, **53**, 4813–4821. (in Chinese)
- 涂逸, 曾慧, 张威威, 许锋, 廖咏玲, 叶家保 (2022). 枸骨法尼基焦磷酸合酶 *IcFPS2* 基因克隆与原核表达分析. *中草药* **53**, 4813–4821.
- Wang P, Pu Y, Abid MA, Kang L, Ye Y, Zhang M, Liang C, Wei Y, Zhang R, Meng Z** (2022). A rapid and efficient method for isolation and transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) callus protoplast. *Int J Mol Sci* **23**, 8368.
- Wang QL, Yu GR, Chen ZY, Han JL, Hu YF, Wang K**(2021). Optimization of protoplast isolation, transformation and its application in sugarcane (*Saccharum spontaneum* L.). *CROP J* **9**(1), 133–142.
- Wu JZ, Liu Q, Geng XS, Li KM, Luo LJ, Liu JP** (2017). Highly efficient mesophyll protoplast isolation and PEG-mediated transient gene expression for rapid and large-scale gene characterization in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *BMC Biotechnol* **17**(1), 1–8.
- Yoo SD, Cho YH, Sheen J** (2007). *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc* **2**, 1565–1572.
- Yu J, Tu L, Subburaj S, Bae S, Lee G** (2021). Simultaneous targeting of duplicated genes in *Petunia* protoplasts for flower color modification via CRISPR-Cas9

ribonucleoproteins. *Plant Cell Rep* **40**, 1037–1045.

Zhang XL, Peng R, Tian XB, Guo YQ, Li XY, Liu XL, Xie Y, Li MZ, Xia H, Liang D (2024). Establishment of protoplasts isolation and transient transformation system for kiwifruit. *Sci Hort* **329**, 113034.

Zhang YQ, Wu JC, He M, Liu RY, Zhu XY (2022). Establishment of an efficient transient transformation method for protoplasts of *Camellia sinensis* var. *sinensis* cv. 'Tieguanyin'. *Chin Bull Bot* **57**, 340–349.(in Chinese)

张玉琴, 吴嘉诚, 何萌, 刘仁义, 朱晓玥 (2022). 铁观音原生质体高效瞬时转化方法的建立. *植物学报* **57**, 340–349.

Preparation of Protoplasts from *Ilex cornuta* 'Fortunei' Leaves and Establishment of a Transient Transformation System

Jianbin Ge¹, Xingxin Wu¹, Jun Zhang², Xiaojun Jin², Yusheng Zhou¹,
Yuhan Zhu¹, Xinke Lu¹, Songheng Jin³, Bin Dong^{1*}

¹College of Landscape Architecture, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Hangzhou 311300, China; ²Tongchuang Engineering Design Co. Ltd, Shaoxing 312000, China; ³Jiyang college, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Zhuji 311800, China

INTRODUCTION: *Ilex cornuta* 'Fortunei' is widely used in landscape gardening and is a common sculptured tree species. An efficient and simple protoplast preparation and separation system is of great value for breeding and gene research of woody plants. However, there are no relevant reports on the protoplast isolation and transformation system of *I. cornuta* 'Fortunei' so far, making it necessary to carry out this study.

RATIONALE: Woody plants face challenges in protoplast isolation and transformation due to characteristics such as perennial stem lignification and leaf leatheriness. Differences in cell wall composition and tissue structure among species require optimization of protoplast systems for specific species. To establish an efficient protoplast preparation and transient transformation system for *I. cornuta* 'Fortunei', orthogonal experiments and gradient experiments were used to explore factors affecting protoplast separation, and PEG-mediated method was applied for transient transformation.

RESULTS: Compared with other enzyme combinations, the orthogonal test showed that the optimal enzyme concentration combination was 2.5% (W/V) cellulase, 1.0% (W/V) macerozyme, 0.5% (W/V) pectinase, and 0.4% (W/V) snailase. After 3.5 h of enzymolysis, the protoplast yield was the highest ($1.18 \times 10^7 \cdot g^{-1}$ FW) with a viability of 68.30%. The suitable mannitol concentration for osmotic regulation was $0.30 \text{ mol} \cdot L^{-1}$, and dark pretreatment of leaves for 12 h improved the effect. For transient transformation, 40% (W/V) PEG-4000 mediated the transformation of pORE_R4-*lcFPS2-GFP* plasmid into protoplasts, and green fluorescent signals in the nucleus overlapping with DAPI blue fluorescent signals were observed under a laser confocal microscope, indicating successful transformation.

CONCLUSION: In conclusion, this study successfully established an efficient protoplast isolation system for *I. cornuta* 'Fortunei' with optimal conditions including specific enzyme combination, enzymolysis time, osmotic regulator, and dark pretreatment. The PEG-mediated transient transformation system was also successfully constructed. These results provide a foundation for future protoplast fusion breeding and gene function research of *I. cornuta*.

Key words *Ilex cornuta* 'Fortunei', protoplast, enzymatic hydrolysis, transient transformation

Ge JB, Wu XX, Zhang J, Jin XJ, Zhou YS, Zhu YH, Lu XK, Jin SH, Dong B (2026). Morphology and genetic diversity of *Phragmites australis* in Beijing. *Chin Bull Bot* **61**, 1–1.

* Author for correspondence. E-mail: dongbin@zafu.edu.cn

(责任编辑: 白羽红)