

引用格式: 叶如梅, 汪长天, 韩潇, 等. 闽楠叶片原生质体分离及瞬时转化体系的建立[J]. 浙江农林大学学报, 2025, 42(3): 592–600. YE Rumei, WANG Changtian, HAN Xiao, *et al.* Establishment of protoplast isolation and transient expression system in *Phoebe bournei* leaves[J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2025, 42(3): 592–600.

闽楠叶片原生质体分离及瞬时转化体系的建立

叶如梅, 汪长天, 韩 潇, 张俊红, 杨 琪

(浙江农林大学 林业与生物技术学院/全省林木育种重点实验室, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】以中国珍稀树种闽楠 *Phoebe bournei* 为材料, 建立高效且稳定的叶肉细胞原生质体分离与瞬时转化技术。【方法】以闽楠幼嫩叶片为材料, 对不同酶液质量浓度组合、不同展叶期的叶片和渗透压等 3 个条件进行单因素实验, 明确闽楠叶片原生质体的高效分离条件。进一步采用聚乙二醇 (PEG) 介导转化法, 对 PEG 4000 质量分数、质粒质量浓度和转化温度 3 个条件进行比较, 筛选闽楠叶片原生质体的高效瞬时转化条件。【结果】选用展叶期 7 d 的闽楠幼叶, 并提前浸泡于 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇中 20 min, 随后使用第 2 组酶解液 ($15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 纤维素酶 R-10+ $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 纤维素酶 RS+ $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 离析酶 R-10+ $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 果胶酶 Y-23+ $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 半纤维素酶, 均为质量浓度), 室温避光酶解 3 h, 能够达到闽楠叶片原生质体分离最佳效果, 其产量达 7.7×10^6 个 $\cdot \text{g}^{-1}$, 同时活力可达 72%。原生质体瞬时转化采用 PEG 介导法, 以 $2 \text{ } \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 质粒浓度与分离出的新鲜闽楠叶片原生质体混合, 等体积加入质量分数为 50% 的 PEG 4000 溶液并在 $42 \text{ } ^\circ\text{C}$ 下孵育 15 min, 可成功将携带绿色荧光蛋白的质粒 pAN580-GFP 和 PbTPSa25-GFP 分别转入闽楠原生质体中, 转化效率达 61%。进一步通过激光共聚焦显微镜观察, 明确了 PbTPSa25 蛋白定位于细胞质中。【结论】选用适宜用于闽楠原生质体分离的幼嫩叶片, 通过调整酶液配方以及渗透压进行优化, 成功实现了闽楠叶片原生质体的高效分离。在此基础上, 通过 PEG 介导法将外源质粒载体高效地转入闽楠原生质体中, 进一步建立了闽楠叶片原生质体瞬时转化体系, 为深入开展闽楠基因功能研究与遗传改良提供技术支撑。图 6 表 2 参 35

关键词: 闽楠; 原生质体; 叶片; 瞬时转化; 亚细胞定位

中图分类号: S503 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2025)03-0592-09

Establishment of protoplast isolation and transient expression system in *Phoebe bournei* leaves

YE Rumei, WANG Changtian, HAN Xiao, ZHANG Junhong, YANG Qi

(College of Forestry and Biotechnology/Zhejiang Key Laboratory of Forest Genetics and Breeding, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] This study aims to establish an efficient and stable technology for the isolation and transient transformation of mesophyll cell protoplasts from *Phoebe bournei*, which is a rare species in China. [Method] The young leaves of *P. bournei* were used as test materials, and 3 conditions were examined individually to clarify the effectient isolation conditions for protoplasts from *P. bournei*: different enzyme solution combinations, leaf expansion stages and osmotic pressure. Furthermore, the PEG-mediated transformation method was used to compare the 3 conditions - PEG concentration, plasmid concentration, and transformation temperature to screen the efficient transient transformation conditions of protoplasts from *P. bournei* leaves. [Result] The young leaves of *P. bournei* were selected at 7 days of leaf development and

收稿日期: 2024-10-22; 修回日期: 2025-02-20

基金项目: 浙江省农业新品种选育重大科技专项 (2021C02070-10); 国家自然科学基金资助项目 (32201581)

作者简介: 叶如梅 (ORCID: 0009-0001-1738-8983), 从事林木遗传育种等研究。E-mail: 1224613017@qq.com。通信

作者: 杨琪 (ORCID: 0000-0002-7492-9619), 教授, 博士, 从事林木遗传育种等研究。E-mail: qiyang@zafu.edu.cn

immersed in $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ mannitol for 20 minutes, followed by treatment with the enzymatic solution from group 2, which comprised $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cellulase R-10, $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cellulase RS, $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ lyase R-10, $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ pectinase Y-23 and $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ hemicellulase. The enzymatic digestion was conducted for 3 hours at room temperature under low light conditions to achieve the best effect of protoplast isolation from *P. bournei* leaves, yielding $7.7 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$ with a viability of up to 72%. The transient transformation of protoplasts was mediated using the PEG method, where in a plasmid concentration of $2 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ was combined with freshly isolated *P. bournei* leaf protoplasts. An equal volume of a 50% PEG 4000 solution was then added to this mixture, which was incubated at 42°C for 15 minutes. Plasmids containing green fluorescent proteins, specifically pAN580-GFP and PbTPSa25-GFP, were successfully transformed into *P. bournei* protoplasts, resulting in a transformation efficiency of 61%. Additionally, confocal microscopy revealed that the PbTPSa25 protein was localized in the cytoplasm. [Conclusion] This study successfully isolated protoplasts from young leaves of *P. bournei* by optimizing various conditions, including enzyme formulation and osmotic pressure. and effectively transferred an exogenous plasmid vector into *P. bournei* protoplasts using a PEG-mediated method, thereby establishing a system for the instantaneous transformation of protoplasts. This protocol provides a robust experimental platform and technological support for in-depth research on gene function and genetic improvement in *P. bournei*. [Ch, 6 fig. 2 tab. 35 ref.]

Key words: *Phoebe bournei*; protoplast; leaf; transient transformation; subcellular localization

闽楠 *Phoebe bournei* 是樟科 Lauraceae 楠属 *Phoebe* 常绿大乔木, 广泛分布于中国长江以南地区^[1]。闽楠木材纹理美观, 气味清雅, 是珍贵用材树种, 具有很高的经济价值与生态价值, 现已成为中国亚热带地区人工栽培面积最大的树种之一^[2]。目前关于闽楠的研究多集中在育苗、栽培和生理特性方面^[3]。闽楠染色体级别高质量全基因组测序已完成, 这为开展基因功能研究提供了重要基础^[4]。近期 XU 等^[5]以未成熟胚胎为原始材料, 成功建立了闽楠体细胞胚胎发生技术体系并进行遗传转化研究, 最高转化率为 11.24%。利用该体细胞胚转基因体系, 张苗等^[6]深入探究了 *PbWOX* 基因在闽楠体胚发育过程中的分子调控机制。此外, 利用发根农杆菌 *Agrobacterium rhizogenes* 介导的闽楠毛状根转基因体系也已成功构建, 为闽楠重要基因的功能验证以及分子辅助育种提供了技术支撑^[7]。然而, 闽楠现有转化体系效率低、育种周期长, 优良性状难以稳定遗传等问题, 严重阻碍了闽楠基因功能的快速解析及分子育种进程。

原生质体是除去细胞壁后由质膜包裹的裸露的植物细胞^[8-9], 作为细胞的基本单位, 携全套遗传信息, 具有全能性^[10]。由于原生质体没有细胞壁, 使得外源遗传物质容易通过理化方式进入原生质体。原生质体瞬时表达体系快速、高效, 已被广泛应用于亚细胞定位、蛋白质互作、基因沉默等功能研究^[11-13]。近年来许多非模式植物的原生质体瞬时表达体系已经成功建立, 如杨树 *Populus × xiaohei*^[14]、茶树 *Camellia sinensis*^[15]、茉莉 *Jasminum sambac*^[16] 及柑橘 *Citrus grandis*^[17] 等, 原生质体已成为开展基因功能研究的有力工具。

为了使目标基因的表达产物正确折叠, 修饰并精准定位于相应的亚细胞结构, 选择同源植物细胞瞬时表达分析可增加研究的准确性。本研究以闽楠实生苗幼叶为原材料, 分离得到原生质体, 并采用聚乙二醇 (PEG) 介导的遗传转化方法, 成功建立了原生质体瞬时表达体系, 并通过目标蛋白的亚细胞定位分析进行了验证, 可为将来闽楠基因的同源表达、功能分析及单细胞转录组测序等研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 6~8 周的闽楠实生苗栽培于透气透水性高的河沙中, 人工气候室培养条件为温度 $26^\circ\text{C}/22^\circ\text{C}$ (昼/夜), 光照 16 h/黑暗 8 h, 光照强度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

1.1.2 质粒载体亚细胞定位载体构建 所用质粒载体为 pAN580-GFP, 带有 35S 启动子及绿色荧光蛋白

(green fluorescent protein, GFP) 标记基因。质粒载体转化至大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5 α (上海唯地生物技术有限公司) 菌株中。pAN580-PbTPSa25-GFP 载体: 参考闽楠基因组设计 *PbTPSa25* 克隆引物, 以闽楠叶片 cDNA 为模板克隆并测序验证, 利用同源重组试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 将 *PbTPSa25* 基因质粒构建在 pAN580-GFP 载体上并转入大肠埃希菌 DH5 α 菌株。同源重组选择 BamHI (NEB) 进行酶切, 上下游引物分别为: PbTPSa25F(AGGACCGGTCCCCGGGGGATCCATGGCTCTTGTTC TGGTTCTG), PbTPSa25R(GCCCTTGCTCACCATGGATCCAATTGGGATAGGATTAACAAGC)。pAN580-PbTPSa25-GFP 质粒提取纯化后 DNA 质量浓度为 2 g $\cdot$ L $^{-1}$, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 闽楠叶片原生质体的分离 选用展叶期为 1~7 d 的叶片进行混合采样, 开展闽楠叶片原生质体分离实验。针对影响原生质体分离的主要因素进行单因素筛选实验。①酶组合。根据新疆杨 *Populus alba* var. *pyramidalis*^[18] 和茶树^[19] 等木本植物叶片原生质体分离的最适酶质量浓度, 设计了 6 种酶组合 (表 1)。②不同展叶期的叶片材料。将尚未展叶的叶片定义为展叶期 1 d, 本研究选择展叶期 2、4、7 d 的叶片为材料, 利用 E 组酶解液进行原生质体分离实验。③渗透压。选择展叶期 7 d 的叶片, 使用甘露醇溶液预处理浸泡叶片 20 min, 分别设置不同浓度甘露醇 (0.3、0.4、0.5、0.6 mol $\cdot$ L $^{-1}$), 调节酶解液的渗透压, 溶解 E 组酶组合后酶解 3 h, 进行优化实验。由于后续瞬时转化实验对大量且完整原生质体的需求, 参考前人研究^[20-21], 在原有酶液配比体系的基础上进一步增加半纤维素酶、蜗牛酶和崩溃酶等 4 组酶组合 (表 2), 使用展叶期 7 d 的叶片, 探究更适合闽楠叶片的酶组合 (表 2)。先将不同的酶溶解于酶解缓冲液 [0.3~0.6 mol $\cdot$ L $^{-1}$ 甘露醇、20 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ KCl、20 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ 2-吗啉乙磺酸 (MES, pH 5.7)], 55 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 冷却至室温后再加入 10 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ CaCl $_2$ 和质量分数为 0.1% 的牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)。在前期预实验分别对甘露醇预处理时间 (0、20 和 40 min) 和酶解时间 (3、4 和 5 h) 筛选出合适处理, 将 0.5 g 闽楠叶片切成宽度小于 1 mm 的细丝, 在 0.4 mol $\cdot$ L $^{-1}$ 甘露醇溶液中黑暗下预处理 20 min, 随后转移至 10 mL 酶液中, 60 r $\cdot$ min $^{-1}$ 摇床, 25 $^{\circ}$ C 避光酶解 3 h。

表 1 酶质量浓度配比

酶液组合	质量浓度/(mg $\cdot$ L $^{-1}$)		
	纤维素酶R-1	离析酶R-1	果胶酶Y-23
A	15	4	4
B	15	4	6
C	20	4	4
D	20	4	6
E	25	4	4
F	25	4	6

表 2 新增酶质量浓度配比

酶液组合	质量浓度/(mg $\cdot$ L $^{-1}$)						
	纤维素酶R-10	纤维素酶RS	离析酶R-10	果胶酶Y-23	半纤维素酶	蜗牛酶	崩溃酶
1	15	10	10	4	0	0	0
2	15	10	10	4	10	0	0
3	15	10	10	4	0	5	0
4	15	10	10	4	0	0	5

1.2.2 闽楠叶片原生质体的纯化 将酶解后混合液用 40 μ m 细胞筛过滤, 100 g 离心 10 min, 弃上清液。加入预冷的等体积 W5 溶液 [154 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ NaCl、125 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ CaCl $_2$ 、5 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ MES (pH 5.7)、2 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ KCl、5 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ 无水葡萄糖] 轻弹底部重悬, 100 g 离心 10 min, 弃上清液。加入 200~500 μ L 预冷 MMG 溶液 [0.4 mol $\cdot$ L $^{-1}$ 甘露醇、4 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ MES (pH 5.7)、15 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ MgCl $_2$] 重悬。将离心管置于冰上 30 min, 并避光保存。

1.2.3 闽楠叶片原生质体产量与活力测定 使用 0.1 mm 血球计数板统计原生质体数量, 用质量浓度为 0.01% 二乙酸荧光素 (FDA) 测定原生质体活力。详细计数方法及计算公式参考前人研究^[22]。

1.2.4 闽楠叶片原生质体的瞬时转化 针对影响原生质体瞬时转化的主要因素, 对 PEG 4000 质量分数 (40%、50%)、质粒质量浓度 (1、2 μ g $\cdot$ μ L $^{-1}$) 和转化温度 (25、42 $^{\circ}$ C) 等进行了比较。原生质体转化时, 取 100 μ L 高活性的原生质体悬液与 10 μ L 质粒以及 110 μ L PEG 4000 溶液 [质量分数分别为 40% 和 50% 的 PEG 4000、0.2 mol $\cdot$ L $^{-1}$ 甘露醇、100 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ MgCl $_2$] 充分混匀后置于黑暗下孵育 15 min, 加入 440 μ L W5 溶液终止反应, 100 g 离心 3 min 弃上清。加入 1 mL W5 溶液, 轻弹混匀, 在室温黑暗下孵育 16 h。

原生质体转化率=发绿色荧光原生质体数目/同视野下原生质体总数 $\times 100\%$ 。每个重复的原生质体转化率均统计 10 个及以上视野的数据。利用建立的闽楠原生质体瞬时转化体系对编码萜类合酶蛋白的 *PbTPSa25* 基因的亚细胞定位, 检测瞬时表达体系中外源基因是否转化成功。

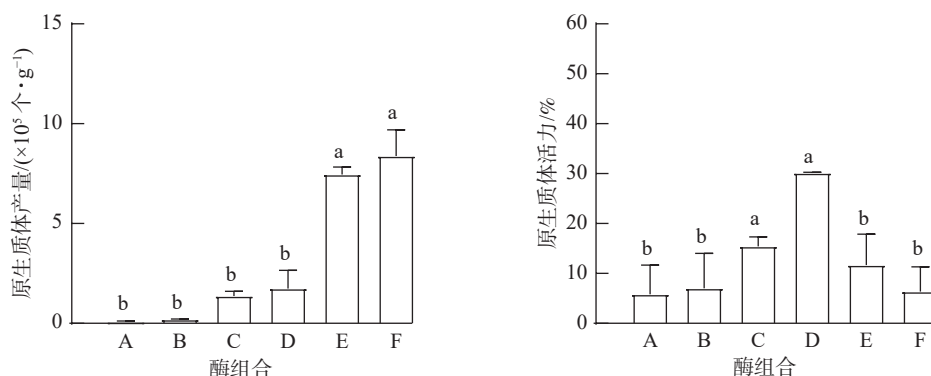
1.2.5 共聚焦显微镜观察细胞定位 从管底吸取 10 μL 原生质体溶液置于载玻片上, 激光共聚焦显微镜 (LSM880, Zeiss) 观察目标蛋白表达情况。用于观察 GFP 信号的荧光激发光波长为 488 nm, 发射波长为 505~535 nm; 观察叶绿体自发荧光的激发光波长为 633 nm, 发射波长为 647~685 nm。

1.2.6 数据分析 用 Office 2016 对数据进行统计, 用 SPSS 27.0 进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 用 Tukey 法进行多重比较, 并用 Graphpad Prism 9.0 进行独立样本 *t* 检验和作图以及 Adobe Illustrator 2018 进行图表绘制。不同小写字母代表在 $P < 0.05$ 水平上差异显著, 相同字母表示差异不显著。 $P > 0.05$ 标为 ns, $P < 0.05$ 标为*。

2 结果与分析

2.1 闽楠叶片原生质体分离的影响因素

2.1.1 不同酶组合对闽楠叶片原生质体分离的影响 图 1 显示: 原生质体产量随着纤维素酶浓度提高而上升, E 组和 F 组的原生质体产量与其他组相比显著增加 ($P < 0.05$), 但两组之间的产量无显著差异。然而, D 组的原生质体活力最高, 达到 30%, 但该组的产量明显低于 E、F 组。因此综合考虑原生质体产量与活力两方面因素, 选择 E 组 (2.5% 纤维素酶+0.4% 离析酶+0.4% 果胶酶) 作为后续实验的酶解液配比。

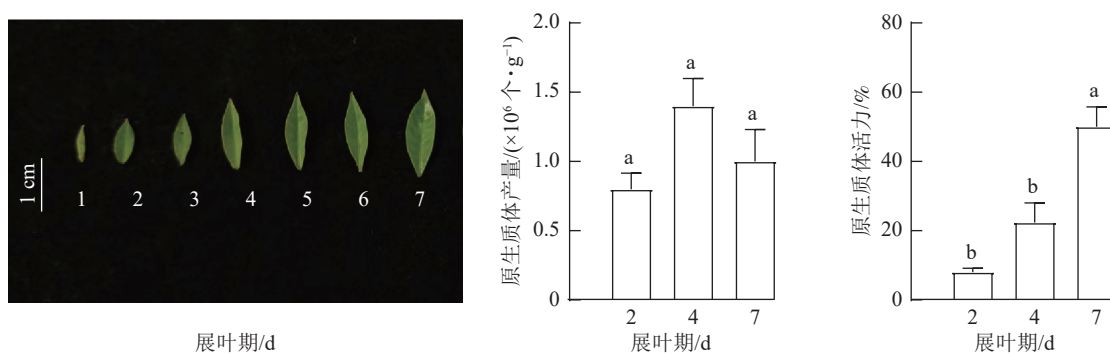


A~F组酶质量浓度配比见表1。不同小写字母表示不同酶组合间差异显著 ($P < 0.05$)。

图 1 不同酶组合对闽楠叶片原生质体分离的影响

Figure 1 Effect of different enzyme combinations on protoplast isolation in *Phoebe bournei* leaves

2.1.2 不同展叶期叶片对闽楠叶片原生质体分离的影响 由图 2 可见: 不同展叶期叶片分离的原生质体产量无显著差异, 但是其活力存在显著差异 ($P < 0.05$)。当叶片处于展叶期 4 d 时, 原生质体产量最高, 达 1.4×10^6 个 $\cdot\text{g}^{-1}$ 。随着叶片叶龄增加, 原生质体活力随之增加, 叶片展叶期为 2 d 时, 原生质体活力仅为 8%, 但叶片展叶期为 7 d 时, 原生质体活力最高, 达 50%。因此, 选择展叶期为 7 d 的闽楠叶片最佳,



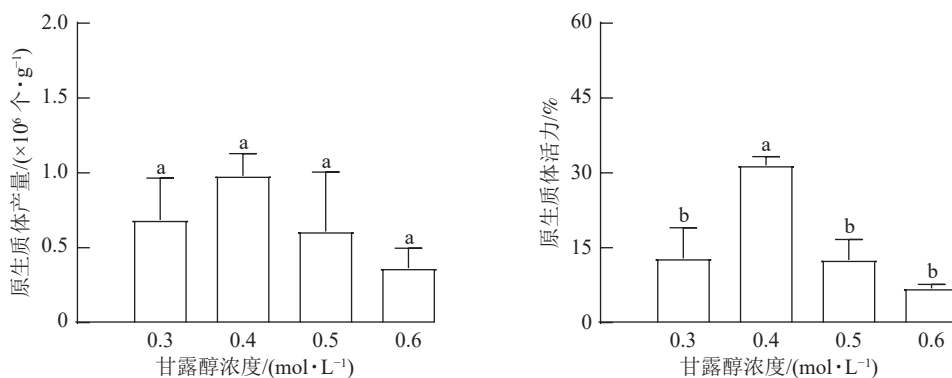
不同小写字母表示不同展叶期间差异显著 ($P < 0.05$)。

图 2 不同展叶期叶片对闽楠叶片原生质体分离的影响

Figure 2 Effects of different leaf development stages on protoplast isolation in *P. bournei* leaves

能够分离出较高活力的原生质体。

2.1.3 不同甘露醇浓度对闽楠叶片原生质体分离的影响 原生质体产量与活力随着甘露醇浓度的增加呈先上升后下降趋势(图3)。不同甘露醇浓度下原生质体产量差异不显著,其中甘露醇浓度为 $0.4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时原生质体产量最高。此外, $0.4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇浓度下原生质体活力最高,达32%,显著高于其他组($P<0.05$)。因此,在闽楠叶片原生质体分离时,选择 $0.4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甘露醇浓度配置酶解液最为适宜。

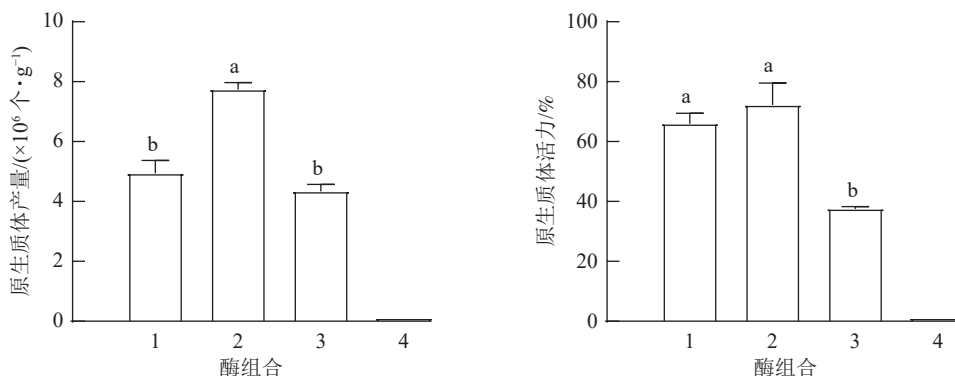


不同小写字母表示不同甘露醇浓度处理间差异显著($P<0.05$)。

图3 不同甘露醇浓度对闽楠叶片原生质体分离的影响

Figure 3 Effect of different mannitol concentrations on protoplast isolation in *P. bournei* leaves

2.1.4 不同酶解液组合对闽楠叶片原生质体分离的影响 与其他3组酶组合相比,第2组酶解液的分离效果最佳,获得的原生质体产量和活力最高,分别达到 $7.7\times 10^6\text{ 个}\cdot\text{g}^{-1}$ 和72%(图4)。相较于之前E组酶解液,使用第2组酶解液分离的原生质体产量实现了一定程度的提升,同时原生质体活力提升2.4倍(图1)。而添加了崩溃酶的组4酶解效果较差,且抑制原生质体细胞壁解离的作用。综上,第2组酶解液($15\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 纤维素酶R-10+ $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 纤维素酶RS+ $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 离析酶R-10+ $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 果胶酶Y-23+ $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 半纤维素酶)适合于闽楠叶片原生质体分离。



1~4组酶质量浓度配比见表2。不同小写字母表示不同酶组合间差异显著($P<0.05$)。

图4 不同酶解液组合对闽楠叶片原生质体分离的影响

Figure 4 Effect of different enzymatic hydrolysates on protoplast isolation in *P. bournei* leaves

2.2 闽楠叶片原生质体瞬时转化的影响因素

图5表明:质量分数为50%PEG 4000的转化效率略高于40%PEG 4000,但差异不显著。同时,使用质粒质量浓度为 $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的瞬时转化效率明显高于 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的质粒质量浓度,可达46%。此外,还比较了使用室温($25\text{ }^{\circ}\text{C}$)和热激法($42\text{ }^{\circ}\text{C}$)下孵育15 min对闽楠叶片原生质体瞬时转化效果的影响,发现 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 转化效率可达60%,显著高于 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 室温孵育($P<0.05$)。综上,闽楠叶片原生质体瞬时转化使用 $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的质粒和质量分数为50%的PEG 4000在 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下热激15 min转化效率最佳。

2.3 原生质体瞬转GFP荧光鉴定及亚细胞定位分析

将重组载体PbTPSa25-GFP和空对照载体pAN580-GFP分别转化到闽楠原生质体中,16 h后,转染的闽楠原生质体细胞内可见绿色荧光(图6)。结果表明:pAN580-GFP的绿色荧光分布在整個原生质体

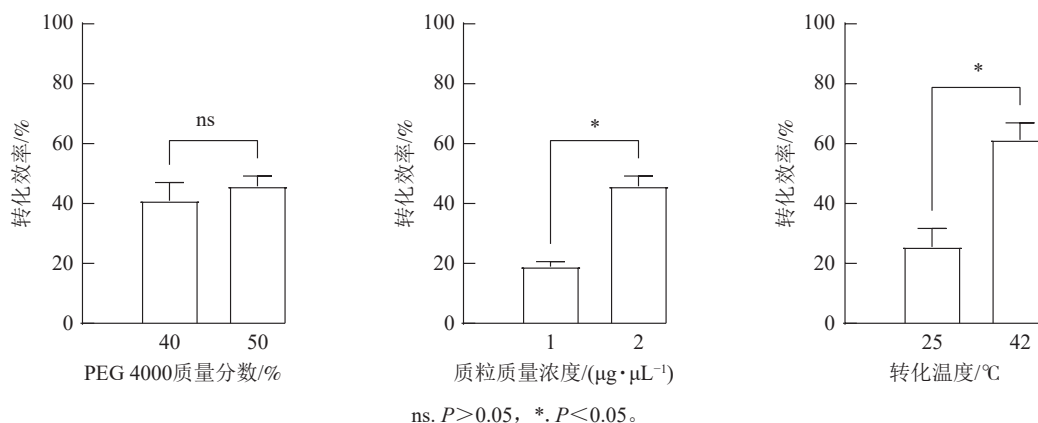


图 5 PEG 4000 质量分数、质粒质量浓度及转化温度对闽楠原生质体瞬时转化效率的影响

Figure 5 Effect of PEG 4000 concentration, plasmid concentration and transformation temperature on transformation efficiency in *P. bournei*

细胞中。PbTPSa25-GFP 融合蛋白的荧光信号仅部分与叶绿体自发荧光重叠，预示 PbTPSa25 蛋白主要定位于闽楠细胞质内。

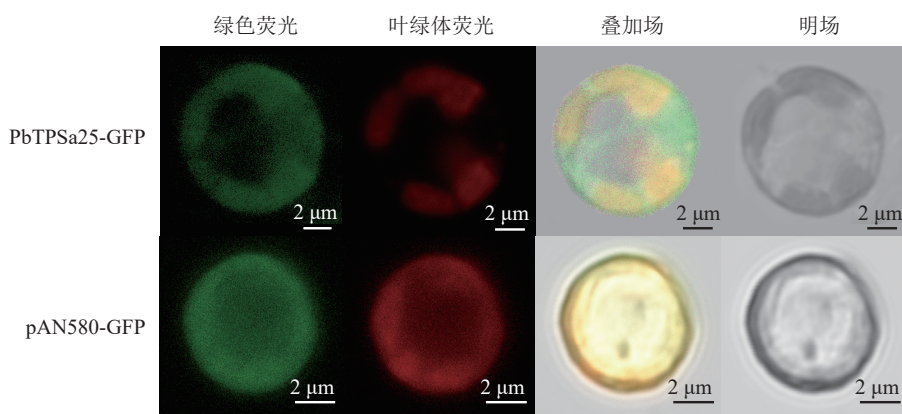


图 6 闽楠原生质体细胞的亚细胞定位

Figure 6 Subcellular localization of *P. bournei* protoplast cells

3 讨论

原生质体转化技术广泛应用于亚细胞定位^[23]、蛋白质互作^[24]、基因功能和基因表达调控分析^[25]等领域。此外，原生质体分离及培养技术在组培快繁、作物性状改良和作物育种中发挥重要作用^[26]。如樟树 *Cinnamomum camphora* 已成功实现胚性愈伤组织的原生质体分离与再生植株^[27]。然而同属于樟科的闽楠作为经济价值极高的国家二级珍稀渐危树种，其遗传转化研究长期以来因转基因技术的限制而进展缓慢。本研究建立并优化了闽楠叶片原生质体分离及瞬时表达体系，能够在短时间内实现目的基因在同源体系中的高效表达，避免使用异源瞬时转化体系可能引起的表达或定位紊乱，为闽楠基因工程研究提供了高效稳定的技术体系。然而，由于原生质体细胞壁再生植株的过程艰难，难以直接观察到其表型特征，因此，后续研究将继续深入探索。

叶片因易获取性及包含有叶绿体等多种细胞器而成为原生质体分离及瞬时转化的优选材料。杨树^[14]及油棕 *Elaeis guineensis*^[28] 等木本植物仅需幼嫩叶片就能分离出高质量原生质体。但闽楠叶片为革质，表面覆盖较厚角质层和蜡质层，原生质体释放难度大。本研究结果表明：展叶期 7 d 的闽楠叶片能够有效提升原生质体分离质量。在酶液中加入适量的甘露醇，可确保原生质体的活性，其添加的浓度范围为 $0.3 \sim 1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[19]。国槐 *Sophora japonica* 叶肉细胞的原生质体在甘露醇浓度为 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时表现最佳^[29]，新疆杨叶肉细胞的原生质体则在 $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甘露醇浓度下达到最优状态^[21]。相比之下，闽楠叶肉细胞的原生质体所需的甘露醇浓度较低，本研究结果表明， $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甘露醇浓度最为适宜。

在分离植物原生质体时，酶的选择至关重要。常见方案采用纤维素酶和果胶酶，前者分解初生细胞

壁中的纤维素和半纤维素,后者则针对胞间层的果胶。在分离新疆杨叶肉细胞原生质体过程中,除了纤维素酶和离析酶外,还添加了果胶酶及半纤维素酶^[21]。闽楠和新疆杨叶肉细胞原生质体在分离时所需的最佳酶质量浓度相近。本研究结果显示:闽楠叶肉细胞原生质体分离的最佳酶组合质量浓度为:15 mg·L⁻¹ 纤维素酶 R-10+10 mg·L⁻¹ 纤维素酶 RS+10 mg·L⁻¹ 离析酶 R-10+4 mg·L⁻¹ 果胶酶 Y-23+10 mg·L⁻¹ 半纤维素酶。适量增加酶解液质量浓度能够提高原生质体的产量,但是过高的酶质量浓度会降低原生质体活性。在闽楠原生质体分离过程中,半纤维素酶及果胶酶 Y-23 靶向协同作用于细胞壁中的半纤维素组分及胞间层的果胶物质,从而促进了这些高分子结构的有效分解,对实现原生质体的高效、高产量及高生物活性分离具有重要作用。

原生质体的转化效率受到质粒质量浓度、PEG 质量分数及转化温度等多重因素的影响^[30-31]。通常使用 1 μg·μL⁻¹ 的质粒进行瞬时转化,如拟南芥 *Arabidopsis thaliana*、烟草 *Nicotiana benthamiana*、大豆 *Glycine max*^[32]。然而,闽楠则表现出对更高质粒质量浓度的需求,研究表明:使用 2 μg·μL⁻¹ 的质粒转化效率提升显著。此外,PEG 质量分数也是影响原生质体转化的关键因素。在高粱 *Sorghum bicolor* 中使用 30% 的 PEG 4000 可获得最高原生质体融合率^[33];而棉花 *Gossypium hirsutum* 则需要 40% 的 PEG 4000^[34]。闽楠最适 PEG 4000 质量分数更高,需达 50%。温度也是影响原生质体转化效率的重要因素。菊花 *Chrysanthemum morifolium* 花瓣原生质体经 28 ℃ 热激处理 60 s 后有效促进了转化效率^[35];柑橘叶片原生质体在 47 ℃ 下热激 7 min 时转化效率最高^[17]。本研究结果显示:闽楠在 42 ℃ 条件下进行 15 min 热激处理,可高效地将外源质粒导入原生质体内。值得注意的是,尽管闽楠和柑橘的材料均为叶片,且转化温度相近,但闽楠的热激处理时间却高于柑橘和菊花。

4 结论

针对闽楠叶片原生质体难释放的问题,本研究建立了高效分离高活力闽楠原生质体的体系,即先以 0.4 mol·L⁻¹ 甘露醇预处理展叶期 7 d 的闽楠叶片 20 min,随后在 15 mg·L⁻¹ 纤维素酶 R-10+10 mg·L⁻¹ 纤维素酶 RS+10 mg·L⁻¹ 离析酶 R-10+4 mg·L⁻¹ 果胶酶 Y-23+10 mg·L⁻¹ 半纤维素酶的混合酶液中酶解 3 h。在此基础上,通过 PEG 介导法,采用 2 μg·μL⁻¹ 质粒与质量分数为 50% 的 PEG 4000,在 42 ℃ 条件下进行 15 min 热激处理,可高效地将外源质粒导入原生质体内。本研究验证了 PbTPSa25-GFP 融合蛋白定位于细胞质中,建立了闽楠叶片原生质体瞬时转化体系,为深入探索闽楠的基因功能与种质创新提供技术支撑。

5 参考文献

- [1] 肖建华,丁鑫,蔡超男,等. 闽楠 (*Phoebe bournei*, Lauraceae) 地理分布及随气候变化的分布格局模拟[J]. 生态学报, 2021, 41(14): 5703-5712.
XIAO Jianhua, DING Xin, CAI Chaonan, et al. Simulation of the potential distribution of *Phoebe bournei* with climate changes using the maximum-entropy (MaxEnt) model[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2021, 41(14): 5703-5712.
- [2] 尹耀南. 闽楠生长特性及其苗木培育技术[J]. 林业与生态, 2023(9): 42-43.
YIN Yaonan. Growth characteristics of *Phoebe bournei* and its seedling cultivation technology[J]. *Forestry and Ecology*, 2023(9): 42-43.
- [3] 曹苜,刘刚. 闽楠研究进展[J]. 长江大学学报(自然科学版), 2016, 13(27): 1-3, 27.
CAO Mu, LIU Gang. Research progress of *Phoebe bournei*[J]. *Journal of Yangtze University (Natural Science Edition)*, 2016, 13(27): 1-3, 27.
- [4] HAN Xiao, ZHANG Junhong, HAN Shuang, et al. The chromosome-scale genome of *Phoebe bournei* reveals contrasting fates of terpene synthase (TPS)-a and TPS-b subfamilies[J/OL]. *Plant Communications*, 2022, 3(6): 100410[2024-09-30]. DOI: 10.1016/j.xplc.2022.100410.
- [5] XU Wenting, ZHANG Miao, WANG Chen, et al. Somatic embryo induction and *Agrobacterium*-mediated transformation of embryonic callus tissue in *Phoebe bournei*, an endangered woody species in Lauraceae[J]. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 2020, 48(2): 572-587.
- [6] ZHANG Miao, CHEN Xinyi, LOU Xiongzen, et al. Identification of *WUSCHEL*-related homeobox (*WOX*) gene family

- members and determination of their expression profiles during somatic embryogenesis in *Phoebe bournei*[J/OL]. *Forestry Research*, 2023, **3**: 5[2024-09-30]. DOI: [10.48130/FR-2023-0005](https://doi.org/10.48130/FR-2023-0005).
- [7] 吴梦洁, 洪家都, 李芳燕, 等. 发根农杆菌介导的闽楠遗传转化体系构建与优化[J]. *核农学报*, 2023, **37**(8): 1516–1522.
WU Mengjie, HONG Jiadu, LI Fangyan, *et al.* Construction and optimization of genetic transformation system mediated by *Agrobacterium rhizogenes* in *Phoebe bournei*[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2023, **37**(8): 1516–1522.
- [8] XU Ying, LI Ruilian, LUO Hongbing, *et al.* Protoplasts: small cells with big roles in plant biology[J]. *Trends in Plant Science*, 2022, **27**(8): 828–829.
- [9] REYNA-LLORENS I, FERRO-COSTA M, BURGESS S J. Plant protoplasts in the age of synthetic biology[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2023, **74**(13): 3821–3832.
- [10] DAVEY M R, ANTHONY P, POWER J B, *et al.* Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives[J]. *Biotechnology Advances*, 2005, **23**(2): 131–171.
- [11] MA Wenjun, YI Fei, XIAO Yao, *et al.* Isolation of leaf mesophyll protoplasts optimized by orthogonal design for transient gene expression in *Catalpa bungei*[J/OL]. *Scientia Horticulturae*, 2020, **274**: 109684[2024-09-30]. DOI: [10.1016/j.scienta.2020.109684](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109684).
- [12] 史勇, 金维环, 刘姣姣, 等. 一种改良的拟南芥原生质体的制备和转化方法[J]. *生物技术*, 2019, **29**(2): 147–152, 170.
SHI Yong, JIN Weihuan, LIU Jiaojiao, *et al.* An improved method for *Arabidopsis* mesophyll protoplast isolation and transformation[J]. *Biotechnology*, 2019, **29**(2): 147–152, 170.
- [13] 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.
XIAO Zheng, XU Yanqin, LUO Nian, *et al.* Application of plant protoplasts in molecular and cell biology research[J]. *Guihaia*, 2020, **40**(4): 576–582.
- [14] YANG Chengjun, YU Ruiqiang, LI Jinbo, *et al.* Preparation of leaf protoplasts from *Populus* (*Populus* × *xiaohei* T. S. Hwang et Liang) and establishment of transient expression system[J/OL]. *Journal of Plant Physiology*, 2023, **291**: 154122[2024-09-30]. DOI: [10.1016/j.jplph.2023.154122](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2023.154122).
- [15] 叶晶晶, 赵东, 梁月荣, 等. 茶树原生质体制备体系的研究进展[J]. *茶叶*, 2021, **47**(2): 75–79.
YE Jingjing, ZHAO Dong, LIANG Yuerong, *et al.* Research progress on protoplast preparation of tea plants[J]. *Journal of Tea*, 2021, **47**(2): 75–79.
- [16] 张娅, 刘晓烽, 张婧, 等. 茉莉花原生质体瞬时表达体系的建立及应用[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2019, **48**(6): 727–735.
ZHANG Ya, LIU Xiaofeng, ZHANG Jing, *et al.* Development of a protoplast-based transient expression system and application in *Jasminum sambac*[J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2019, **48**(6): 727–735.
- [17] 何珊珊, 李宏宇, 马月, 等. 百合原生质体分离培养和瞬时转化[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2025, **51**(1): 67–79.
HE Shanshan, LI Hongyu, MA Yue, *et al.* Isolation, cultivation, and transient transformation of lily protoplasts[J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences)*, 2025, **51**(1): 67–79.
- [18] 景艳春, 康向阳, 王君, 等. 新疆杨叶肉原生质体分离和纯化的研究[J]. *西北植物学报*, 2007, **27**(3): 509–514.
JING Yanchun, KANG Xiangyang, WANG Jun, *et al.* Isolation and purification of mesophyll protoplasts of *Populus alba* L. var. *pyramidalis*[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2007, **27**(3): 509–514.
- [19] 彭章, 童华荣, 梁国鲁, 等. 茶树叶片和胚根原生质体的分离及 PEG 诱导融合[J]. *作物学报*, 2018, **44**(3): 463–470.
PENG Zhang, TONG Huarong, LIANG Guolu, *et al.* Protoplast isolation and fusion induced by PEG with leaves and roots of tea plant (*Camellia sinensis* L. O. kuntze)[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2018, **44**(3): 463–470.
- [20] AOYAGI H. Development of a quantitative method for determination of the optimal conditions for protoplast isolation from cultured plant cells[J]. *Biotechnology Letters*, 2006, **28**(20): 1687–1694.
- [21] 李婧瑶, 刘龙飏, 丁兵, 等. 植物原生质体分离及培养研究进展[J]. *分子植物育种*, 2023, **21**(2): 620–632.
LI Jingyao, LIU Longbiao, DING Bing, *et al.* Research progress on isolation and culture of plant protoplasts[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2023, **21**(2): 620–632.
- [22] 唐佳妮, 林二培, 黄华宏, 等. 杉木叶片原生质体分离及 RNA 提取体系的建立[J]. *林业科学*, 2018, **54**(4): 38–48.

- TANG Jiani, LIN Erpei, HUANG Huahong, *et al.* Isolation and total RNA extraction of leaf protoplasts in Chinese fir[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2018, **54**(4): 38–48.
- [23] HUO Ailing, CHEN Zhenyu, WANG Pengkai, *et al.* Establishment of transient gene expression systems in protoplasts from *Liriodendron* hybrid mesophyll cells[J/OL]. *PLoS One*, 2017, **12**(3): e0172475 [2024-09-30]. DOI: [10.1371/journal.pone.0172475](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172475).
- [24] REN Rui, GAO Jie, LU Chuqiao, *et al.* Highly efficient protoplast isolation and transient expression system for functional characterization of flowering related genes in *Cymbidium* orchids[J/OL]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, **21**(7): 2264 [2024-09-30]. DOI: [10.3390/ijms21072264](https://doi.org/10.3390/ijms21072264).
- [25] 曹春艳, 王威, 杨新奇, 等. 槟榔原生质体分离及瞬时转化体系的建立[J]. 分子植物育种, 2023, **21**(17): 5730–5737.
- CAO Chunyan, WANG Wei, YANG Xinqi, *et al.* Isolation of protoplast and establishment of transient expression system in *Areca catechu*[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2023, **21**(17): 5730–5737.
- [26] KLIMEK-CHODACKA M, KADLUCZKA D, LUKASIEWICZ A, *et al.* Effective callus induction and plant regeneration in callus and protoplast cultures of *Nigella damascena* L.[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2020, **143**(3): 693–707.
- [27] DU Li, BAO Manzhu. Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic suspension cultured cells of *Cinnamomum camphora* L. [J]. *Plant Cell Reports*, 2005, **24**(8): 462–467.
- [28] 王一菲, 刘新星, 张青, 等. 油棕叶肉原生质体分离及瞬时转化体系的建立[J]. 华中农业大学学报, 2021, **40**(1): 154–159.
- WANG Yifei, LIU Xinxing, ZHANG Qing, *et al.* Isolation of oil palm mesophyll protoplasts and establishment of transient transformation system[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2021, **40**(1): 154–159.
- [29] 张天. 国槐叶肉细胞原生质体分离研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- ZHANG Tian. *Study on Isolation of Protoplasts from Mesophyll Cells of Sophora japonica*[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2019.
- [30] BAI Liang, CHENG Yan, SHE Jikai, *et al.* Development of an efficient protoplast isolation and transfection system for *Castor bean (Ricinus communis L.)*[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2020, **143**(2): 457–464.
- [31] HUANG Hongyu, WANG Zhenyu, CHENG Jintao, *et al.* An efficient cucumber (*Cucumis sativus L.*) protoplast isolation and transient expression system[J]. *Scientia Horticulturae*, 2013, **150**: 206–212.
- [32] 赖叶林, 贺莹, 李欣欣, 等. 一种植物原生质体分离与瞬时转化的方法[J]. 植物生理学报, 2020, **56**(4): 895–903.
- LAI Yelin, HE Ying, LI Xinxin, *et al.* An approach to isolation and transient transformation of protoplasts in plants[J]. *Plant Physiology Journal*, 2020, **56**(4): 895–903.
- [33] 谢鑫, 蒋君梅, 王勇, 等. 高粱原生质体的制备及转化方法研究[J]. 种子, 2019, **38**(8): 43–46.
- XIE Xin, JIANG Junmei, WANG Yong, *et al.* Study on the method of protoplast isolation and transformation of *Sorghum bicolor*[J]. *Seed*, 2019, **38**(8): 43–46.
- [34] 李青, 鱼海鹏, 张子豪, 等. 棉花真叶原生质体分离及瞬时表达体系的优化[J]. 中国农业科学, 2021, **54**(21): 4514–4524.
- LI Qing, YU Haipeng, ZHANG Zihao, *et al.* Optimization of cotton mesophyll protoplast transient expression system[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2021, **54**(21): 4514–4524.
- [35] 李志美, 张碧佩, 伍青, 等. 菊花花瓣原生质体分离与瞬时转化体系的建立[J]. 植物生理学报, 2023, **59**(10): 1951–1963.
- LI Zhimei, ZHANG Bipei, WU Qing, *et al.* Establishment of isolation and transient expression system for protoplasts from chrysanthemum petals[J]. *Plant Physiology Journal*, 2023, **59**(10): 1951–1963.