

doi: 10.16104/j.issn.1673-1891.2024.03.003

皇竹草原生质体分离及瞬时表达系统的建立

陈梓涵^{a,b}, 彭睿^{a,b}, 相雨欣^{a,b}, 颜朗^a, 赖先军^{a*}

(西昌学院 a. 厅州共建攀西特色作物研究与利用四川省重点实验室; b. 农业科学学院, 四川 西昌 615013)

摘要: [目的] 建立皇竹草高效原生质体分离体系和瞬时表达系统。[方法] 通过 CRISPR-Cpf1 系统构建了针对皇竹草 *P_sC3H53* 基因的 pCAMBIA1304-LbCas12a-P_sC3H53cr 表达载体, 对纤维素酶 R-10 的酶解液质量分数设置了 4 组处理 (1.5%、2.0%、2.5%、3.0%) 和 7 组处理的酶解时间 (3、4、5、6、7、8、9 h), 并采用聚乙二醇 (PEG) 介导原生质体转化。[结果] 酶解 7 h, 2.5% 纤维素酶、0.5% 果胶酶与 0.4% 离析酶组合的酶解条件最佳, 原生质体的产量可达 1.712×10^6 cell/(g·FW), PEG 法可成功介导质粒转化皇竹草原生质体并在荧光显微镜下观察到绿色荧光蛋白。[结论] 在皇竹草中成功建立瞬时表达系统和遗传转化体系, 经优化最佳酶解组合和时间后即能通过 PEG 介导实现皇竹草原生质体的瞬时转化, 为后续皇竹草的再生及品种培育奠定了基础。

关键词: 皇竹草; 载体构建; 原生质体; PEG 瞬时转化

中图分类号: Q943.2; S543.9 文献标志码: A 文章编号: 1673-1891(2024)03-0017-08

Development of a System for Protoplast Isolation from *Pennisetum sinense* Roxb and for Transient Expression

CHEN Zihan^{a,b}, PENG Rui^{a,b}, XIANG Yuxin^{a,b}, YAN Lang^a, LAI Xianjun^{a*}

(a. Panxi Crops Research and Utilization Key Laboratory of Sichuan Province; b. School of Agricultural Science, Xichang University, Xichang 615013, Sichuan, China)

Abstract: [Objective] It is important to develop an efficient protoplast isolation and transient expression system in high-quality forage grass, *Pennisetum sinense* Roxb. [Method] In this study, the pCAMBIA1304-LbCas12a-P_sC3H53cr vector was constructed through the CRISPR-Cpf1 system. The plasmid was mixed with protoplast solution and transformation solution. The protoplasts were cultured under weak light conditions. Four treatments (1.5%, 2.0%, 2.5%, 3.0%) and seven sets of enzyme digest times (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 h) were set for the enzymatic hydrolysis solution of cellulase R-10. The enzymatic hydrolysis conditions suitable for *P. sinense* were optimized to improve its yield and activity. Finally, polyethylene glycol (PEG) was used to mediate protoplast transformation. [Result] The enzyme digestion for 7 h was optimal with the combination of 2.5% cellulase, 0.5% pectinase and 0.4% dissociative enzyme, and the yield of protoplasts was up to 1.712×10^6 cells/(g·FW). PEG method can successfully mediate plasmid transformation into protoplasts of *P. sinense* and green fluorescence protein could be observed under fluorescence microscope. [Conclusion] A transient expression system and genetic transformation system were successfully established in *P. sinense*. After optimizing the best enzymatic hydroly-

收稿日期: 2024-07-18

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (32160329); 四川省科技厅重点研发项目 (2021YFN0132)。

作者简介: 陈梓涵 (2001—), 男, 四川资阳人, 本科生, 研究方向: 生物信息学, e-mail: 2441797012@qq.com。

*通信作者: 赖先军 (1986—), 男, 四川成都人, 副教授, 博士, 研究方向: 生物信息学、作物群体遗传学、作物分子遗传育种, e-mail: laixianj@hotmail.com。

sis combination and time, the transient transformation of *P. sinense* bioplastids could be achieved through PEG mediation, laying the foundation for the subsequent regeneration and variety breeding of *P. sinense*.

Keywords: *Pennisetum sinense* Roxb; vector construction; protoplast; PEG-mediated transient transformation

0 引言

皇竹草(*Pennisetum sinense* Roxb)是一种起源于哥伦比亚的热带C4植物,属于禾本科狼尾草属,是由象草(*Pennisetum purpureum*)和美洲狼尾草(*Pennisetum americanum*)杂交而来,染色体倍型为三倍体,含21条染色体^[1]。中国热带农科院于1982年引进多年生高大型皇竹草,经全国牧草品种审定委员会审定登记为“热研4号王草”,适生于热带、亚热带及暖温带,海拔200~2000 m的地区。皇竹草因其根系发达,光合速率比同类牧草高,在合理的水肥条件下,一年产青草量可达150~450 t/hm²,再配以苜蓿、白三叶等高蛋白的豆科牧草,既能平衡营养,又能有效提高生产力,是我国南方地区牛羊养殖的当家草种^[2]。尽管皇竹草被誉为“牧草之王”,但它在国内的栽培和推广应用一直很有限,其主要原因是皇竹草引自热带,抗寒能力差,在10℃以下生长被抑制,低于5℃就会停止生长,0℃以下就会出现冻害^[3]。在中高纬度和中高海拔地区,抗寒能力不仅制约了其引种与推广,还对其持续产量产生了重要影响。因此,通过分子育种手段提高皇竹草的耐寒能力对其适应高海拔或高纬度地区的气候具有重要的意义。

在植物遗传转化体系中,转化受体通常有体外培养材料和活体材料2类^[4],其中原生质体具有全能性,且无细胞壁的阻挡,可以更好地被DNA、病毒颗粒、细胞器、染色体等所吸收,是一种很好的转化受体^[5]。由于其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應用。目前,植物原生质体

瞬时转化常用的方法包括根瘤农杆菌渗透、聚乙二醇(PEG)介导、电穿孔、植物病毒载体及基因枪法。另外,在基因功能研究中,通过原生质体系统可以实现高效的基因转化、瞬时表达和基因编辑,这在验证新型基因编辑工具、研究基因功能和筛选基因编辑效率等方面具有重要应用价值。Cocking等^[6]使用纤维素酶酶解法得到的番茄原生质体不仅活性高,产量高,而且结构完整,流程简单,应用范围十分广泛。近年来,利用原生质体系统进行基因编辑的研究取得了显著进展。李晓^[7]利用CRISPR/Cas9系统在马铃薯原生质体中实现了基因编辑。Andersson等^[8]利用靶向*GBSS*基因的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。随着技术的进步,原生质体系统在植物科学研究中的应用将更加广泛,为作物改良和基础研究提供强有力的工具。模式植物中原生质体瞬时表达系统已广泛应用于基因编辑器筛选、生物合成调控和基因功能分析等研究,然而在非模式植物中还缺乏系统性的探索研究。由于影响原生质体活性的因素很多,尤其是酶解液的浓度、反应时间、环境渗透值等,因此对于不同植物细胞需进一步优化原生质体培养条件。皇竹草原生质体转化及瞬时表达系统目前尚未见报道。因此,构建与优化该系统的对皇竹草基因功能研究具有重要价值。本文以皇竹草冷响应基因*PsC3H53*的敲除载体,在皇竹草中建立高效的原生质体分离体系和瞬时表达系统,优化原生质体的最佳分离条件,并采用PEG技术实现皇竹草原生质体的瞬时表达,以期通过本研究为皇竹草遗传转化体系及基因功能研究奠定基础。

1 研究材料与方法

1.1 研究材料

1.1.1 植物材料

皇竹草材料均取自西昌学院农业实践教学基地(颜朗教授实验室提供),为热研4号品种。

1.1.2 载体及菌株

载体为pUC57和pCAMBIA1304,大肠杆菌感受态菌株JM109、DH5 α 均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.1.3 酶与试剂

植物纤维素酶R-10、果胶酶、离析酶、ExTaq DNA聚合酶、DNA回收试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司;KOD高保真DNA聚合酶购自东洋纺(上海)生物科技有限公司;KOD-FX酶、限制性内切酶购自Fermentas公司;TakaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit购自宝日医生物技术(北京)有限公司;植物原生质体制备及转化试剂盒购自中科瑞泰(北京)生物科技有限公司;大量元素(KNO₃、MgSO₄·7H₂O、KH₂PO₄、CaCl₂·2H₂O)、微量元素I(KI、H₃BO₃、MnSO₄·4H₂O、ZnSO₄·7H₂O)、微量元素II(Na₂MoO₄·2H₂O、CuSO₄·5H₂O、CoCl₂·6H₂O)、铁盐(Na₂·EDTA、FeSO₄·7H₂O)、烟酸(VB₃)、盐酸硫胺素(VB₁)、盐酸吡哆醇(VB₆)、甘氨酸、肌醇、脂肪酸甲酯磺酸钠(MES)、生物素、D-纤维二糖、萘乙酸(NAA)、6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)等基本试剂均购自北京索莱宝科技有限公司。

1.1.4 培养基与培养液配方

培养基与培养液的组成如表1所示。

1.1.5 主要仪器

舜宇(SOFTOP)倒置荧光显微镜XD, T100 PCR仪(BIO-RAD), Centrifuge 5427 R离心机(Eppendorf)。

1.2 研究方法

1.2.1 皇竹草PsC3H53基因瞬时表达系统的建立

基于前期研究中在皇竹草冷胁迫实验中挖掘出的112个与耐寒、抗冻功能相关的基因^[9],本研究选择在冷诱导条件下响应程度较高的PsC3H53基因为编辑目标。利用网站CRISPR-DT(miamioh.edu)对PsC3H53基因的CDS序列进行分析,筛选并设计了2个靶位点序列。同时,通过CRISPR-Cpf1 target efficiency calculator进行位点得分评估,选择得分最高的靶序列。使用引物PsC3H53F(5'-GAT TGGATTGGACTAGGACTG-3')和PsC3H53R(5'-GGACAAATAACTATTCTTCGGTA-3')克隆PsC3H53基因的全长序列,扩增产物经1%凝胶电泳回收后进行单克隆测序。crRNA的设计基于选定的靶序列,最终确定的crRNA序列为5'-GGUAAUUU CUACUAAGUGUAGA UCCCATGATGAGGATGAGCT CGGUAUUUCUACUAAGUGUAGAUTGCCACCCC CTCTGTCGCCA-3'。

载体构建选择pCAMBIA1304作为骨架,人工合成的片段主要由2个表达框组成:一个是由AtU6启动子驱动的crRNA序列,为优化Cpf1系统,提高基因编辑的效率和精确性,还插入了HH和HDV核酶;另一个是由ZmUbi启动子驱动的经验密码子优化的Cpf1蛋白序列,其两端带有核定位序列。这些人工合成序列首先连接到pUC57克隆载体上,转化至JM109细胞,并利用pUC57的氨苄抗性在LB培养基上筛选阳性克隆,提取质粒。随后通过EcoRI和HindIII双酶切,将目标片段纯化并连接到pCAMBIA1304上,最终获得pCAMBIA1304-LbCas12a-PsC3H53cr载体。

1.2.2 皇竹草原生质体遗传转化体系的建立

皇竹草(热研4号)原生质体的分离与纯化参照李风云等^[10]报道的马铃薯组培苗叶片预处理方法,主要包括皇竹草组培苗培养、FM工作液预处理、CM工作液预处理、叶片酶解、原生质体分离与纯化等

表 1 培养基与培养液的组成

成分	CM-I 培养基	CM 培养液	FM 培养液
$\text{NH}_4\text{NO}_3/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$			80
$\text{KNO}_3/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	1 900	190	
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	900	44	147
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	900	37	
$\text{KH}_2\text{PO}_4/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	170	17	
$\text{H}_3\text{BO}_3/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	3.1	0.62	
$\text{KI}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	0.42	0.083	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	0.13	0.025	
$\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	0.013	0.002 5	
$\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	11.16	2.23	
$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	4.3	0.86	
$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	0.013	0.002 5	
$\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	13.94	2.79	
$\text{Na}_2\text{EDTA}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	18.64	3.73	
烟酸/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	0.5	0.05	
盐酸硫胺素/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	0.01	0.01	
盐酸吡哆醇/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	0.5	0.05	
甘氨酸/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	2	0.2	
NAA/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	1	2	2
6-BA/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	0.4	0.5	1
MES/ $(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$		3	3
肌醇/ $(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	0.025	10	
木糖醇/ $(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	0.025		
D-山梨醇/ $(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	0.025		
D-纤维二糖/ $(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	0.025		
甘露醇/ $(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	0.2		
蔗糖/ $(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	0.025		
葡萄糖/ $(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	0.025		

步骤。其中,参考华南象草^[11]、玉米胚乳细胞^[12]以及甘蔗^[13]原生质体分离的酶解条件,设计以下组合:纤维素酶 R-10 质量分数选择 4 个水平(1.5%、2.0%、2.5%、3.0%),果胶酶质量分数采用 0.5%,离析酶质量分数选择 0.4%。酶解液为 1/10 RA 溶液+(1.5%~3.0%)纤维素酶 R-10 + 0.5% 果胶酶+ 0.4% 离析酶+ 2% PVP + 0.2% BSA + 3 mmol/L MES + 0.4

mol/L 甘露醇。通过体式显微镜观察叶片的解离状态,酶解时间设为 3、4、5、6、7、8、9 h。每个时间点取样后,使用血球计数板进行原生质体产量进行统计。酶解后的原生质体进行 10 倍稀释后,取 10 μL 滴加在 0.1 mm 的血球计数板上,静置 10 s,盖上盖玻片,让液体自然充满整个计数室,于显微镜下观察和统计原生质体产量。在 10 倍镜弱光下找到计

数室的9个方格(每个方格 0.1 mm^3 , 即 $0.1 \mu\text{L}$), 统计中间方格和4个角上方格内的原生质体数(共5格), 然后根据式(1)计算原生质体产量:

$$Y = \frac{1000 \times A \times B}{C}$$

式中: Y 为原生质体产量, $\text{cell}/(\text{g} \cdot \text{FW})$; A 为5个方格内观察到的原生质体数量, cell ; B 为稀释倍数; C 为样品鲜质量, g 。

采用荧光素二乙酸(FDA)染色鉴定原生质体的活力。FDA染色后, 在脂肪酶作用下, 通过紫外光激发可在原生质体内发出绿色的荧光。在舜宇(SOFTOP)荧光显微镜下观察样本, 通过紫外光照射下的荧光视野和普通光照下的明场视野分别计数发出绿色荧光的原生质体数量和总的原生质体数量。每个样本至少选择3个不同视野进行计数, 以确保结果的准确性, 公式如式(2)所示:

$$V = \left(\frac{G}{P} \right) \times 100\%$$

式中: V 为原生质体活力, %; G 为视野下发出绿色荧光的原生质体数量, cell ; P 为明场视野下观察到的原生质体数量, cell 。

1.2.3 PEG介导原生质体转化

参照植物原生质体制备及转化试剂盒方法, 取 $10 \mu\text{L}$ 质粒DNA于 1.5 mL 离心管中, 加入 $100 \mu\text{L}$ 原生质体溶液, 轻柔混匀, 再加入 $110 \mu\text{L}$ 的转化溶液, 混匀, 常温 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 放置 $5 \sim 15 \text{ min}$; 加入 $440 \mu\text{L}$ 溶液II, 轻柔彻底混匀, 终止转化过程; 收集原生质体: 常温 100 g 离心 $1 \sim 2 \text{ min}$, 尽量去除上清液; 加入 $500 \mu\text{L}$ 溶液II轻轻重悬原生质体, 常温 100 g 离心 1 min , 尽量去除残留的上清液; 沉淀中加入 1 mL 溶液V, 轻柔重悬; 将离心管水平放置, $23 \sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$ 弱光培养 24 h 。使用舜宇(SOFTOP)倒置荧光显微镜XD 40倍放大倍数下, 观察明场与暗场下的原生质体, 并在 488 nm 的波长条件下观察绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)。

2 结果与分析

2.1 皇竹草瞬时表达系统的建立

皇竹草 *PsC3H53* 基因序列编码区长度为 $239 \sim 2278 \text{ bp}$, 含有3个保守结构域。通过网站CRISPR-DT搜索, 共获得48条可用靶位点。根据尽可能影响所有转录本的原则, 最终选择 *PsC3H53* 基因编码区的第 1239 、 1380 bp 这2个位点处作为靶位点。Cas12a载体图谱如图1(a)所示, 以pCAMBIA1304为载体骨架, 将人工合成序列连接到pUC57克隆载体上。连接后的片段大小为 7884 bp , 符合试验预期(图1(b))。然后将纯化后的片段与pCAMBIA1304载体骨架连接得到pCAMBIA1304-Lb-Cas12a-PsC3H53cr终载体, 整合过程及载体图谱分别如图1(c)和图1(d)所示。

使用绿色荧光蛋白作为报告基因, 可通过荧光显微镜观察到的绿色荧光信号, 可以确认GFP基因的成功表达, 进而表明载体的成功转化。最后, 通过碱裂解法提取质粒并进行电泳检测, 质粒大小为 17535 bp , 与预期一致(图2)。

2.2 皇竹草遗传转化体系的建立

2.2.1 最佳酶组合条件优化

试验首先比较了质量分数 $1.5\% \sim 3.0\%$ 的纤维素酶对原生质体数量的影响。通过显微镜观察发现, 在同样的酶解时间下, 质量分数 1.5% 、 3.0% 的纤维素酶对皇竹草的原生质体解离效率较低, 且单个的原生质体数量较少。当纤维素的质量分数为 2.0% 和 2.5% 时, 原生质体得到了较好的酶解; 其中, 纤维素酶质量分数为 2.5% 时, 原生质体的酶解效率最高(图3)。酶解结束后, 对原生质体的产量和活力统计结果表明, 纤维素酶的浓度对其产率和活力影响较大(表2)。在纤维素质量分数为 $1.5\% \sim 2.5\%$ 的情况下, 原生质体的产率和活力均得到了提高, 但在纤维素质量分数增加到 3.0% 时, 其产量和活力显著降低。因此, 本试验中 2.5% 的纤维素酶为

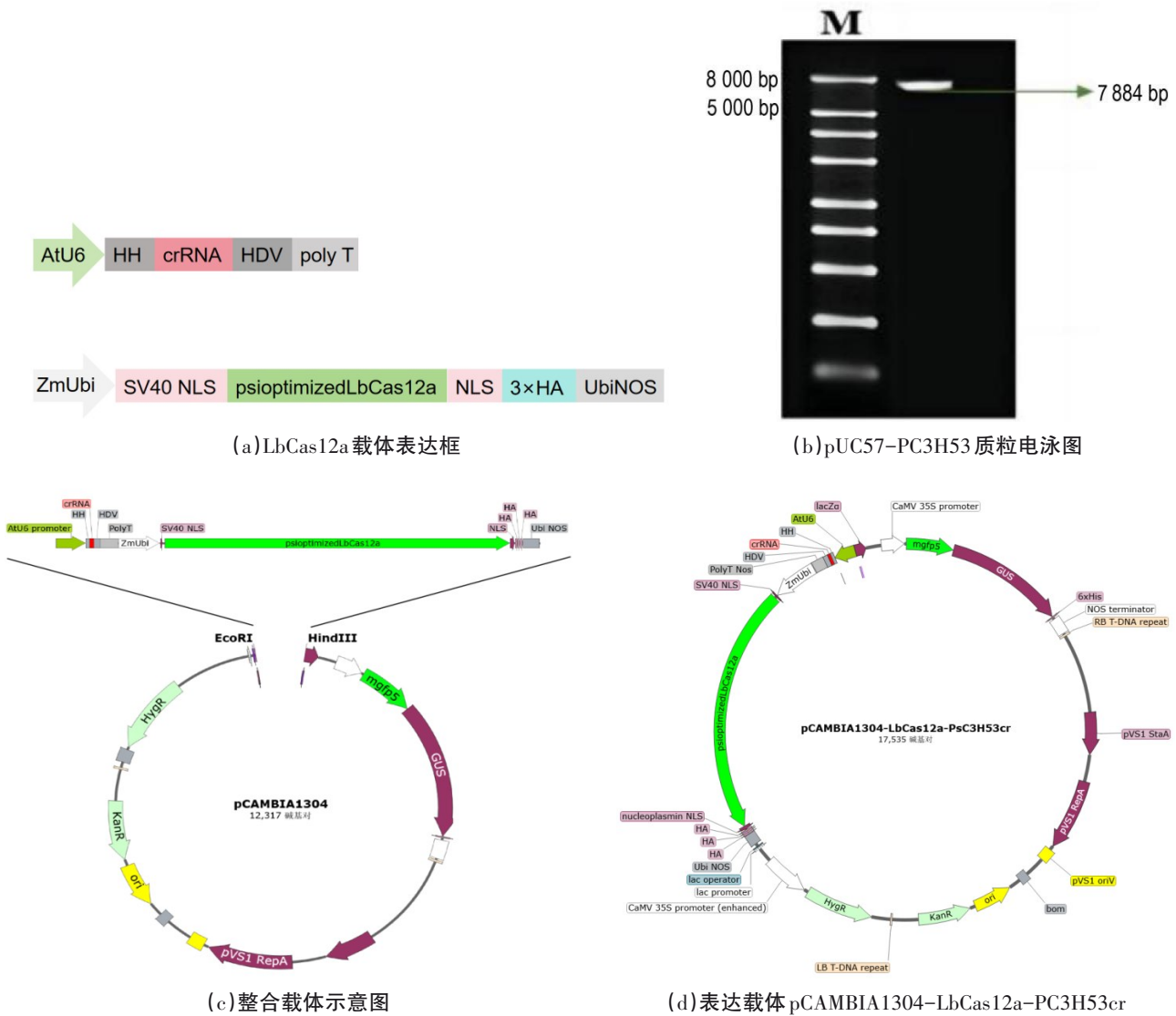
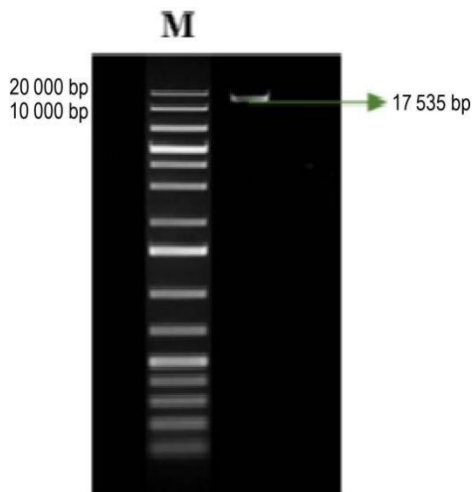


图1 皇竹草瞬时表达载体构建与表达综合示意图

注:图1(b)中M为DL 8000 DNA Maker。



注:M为DL 20000 DNA Maker。

图2 载体转化大肠杆菌后的质粒电泳图

最佳的酶解液质量分数。

2.2.2 酶解时间对原生质体分离的影响

试验进一步比较了3~8 h酶解对原生质体分离的效果。通过显微镜观察发现,酶解3~4 h时,原生质体数量较少,5 h以后原生质体数量显著增加,6~7 h是原生质体的高产时期,8 h以后原生质体数量呈下降趋势(图4)。

本试验表明,在纤维素酶质量分数为2.5%的最佳酶解条件下,原生质体产量在酶解6~7 h达到最大。以沉降法分离纯化原生质体,后经荧光素二乙酸染色,其活力可高达94.38%,原生质体产量为

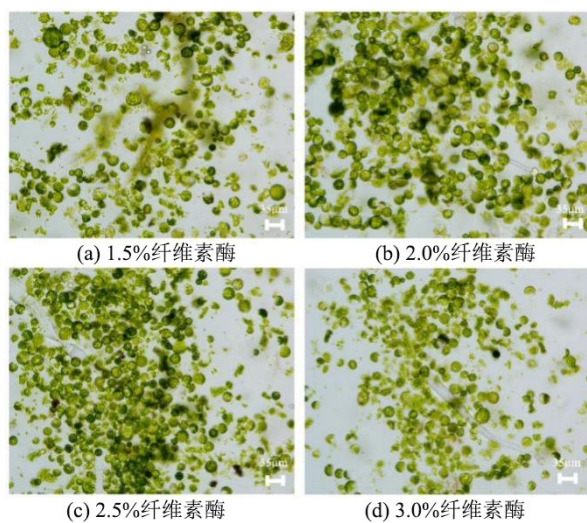


图 3 酶解液质量分数对原生质体分离的影响

表 2 酶解液质量分数对原生质体产量和活力的影响

处理	纤维素酶质量分数/%	产量/($\times 10^5$ cell· g^{-1} ·FW $^{-1}$)	活力/%
1	1.5	1.5 \pm 0.193d	78.37 \pm 1.292b
2	2.0	16.05 \pm 0.044b	93.125 \pm 0.498a
3	2.5	17.12 \pm 0.087a	94.375 \pm 1.032a
4	3.0	11.82 \pm 0.176c	92.975 \pm 1.058a

注: 数字后不同小写字母表示同列数据间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

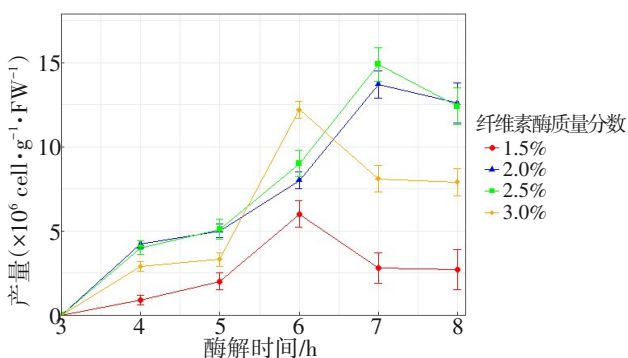


图 4 酶解时间对原生质体产量的影响

1.712 $\times 10^6$ cell/($g \cdot FW$) (图 5)。

2.3 PEG 介导的原生质体转化

由于 pCAMBIA1304-LbCas12a-PsC3H53cr 带有绿色荧光蛋白, 转化成功后可在皇竹草的原生质体中检测到绿色荧光信号 (图 6)。结果表明, 在 10 μ L 质粒体积下, 原生质体的活力较好, 形态基本完整, 经 PEG 介导后实现了表达载体在皇竹草原生质

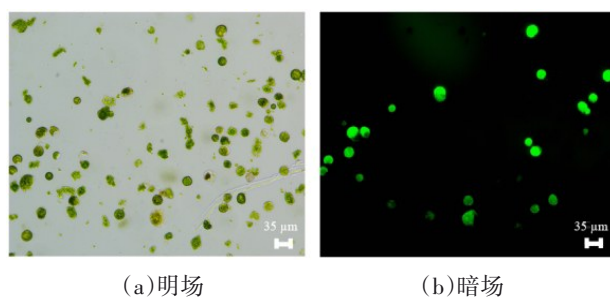


图 5 FDA 活力染色

体中的瞬时表达。

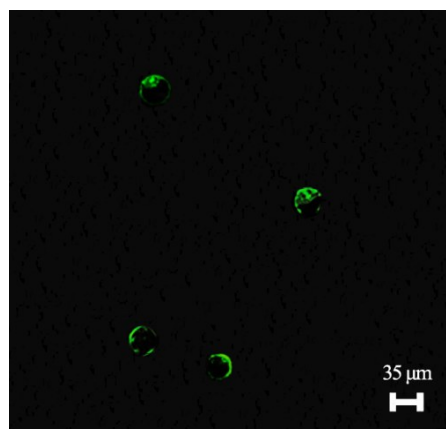


图 6 pCambia1304-LbCas12a-PsC3H53cr 质粒在皇竹草原生质体中的瞬时表达

3 讨论

目前, 国内关于牧草耐寒性的研究多集中在从现有品种中筛选出耐寒性较强的植株, 并通过无性繁殖在高海拔地区进行种植。然而, 利用分子育种手段进行牧草耐寒性研究的文献较少, 尤其是使用 CRISPR/Cas 系统研究多年生高大型牧草的相关报道更少。本试验建立了以皇竹草为基础的 CRISPR/Cas12a 基因编辑系统, 通过将设计的目标序列并构建了 pCAMBIA1304-LbCas12a-PsC3H53cr 载体。本文对 CRISPR/Cas12a 的应用为今后皇竹草的研究与开发奠定了基础。

在原生质体的分离培养方面, 该过程涉及多种因素的优化, 影响原生质体质量的关键因素包括材料选择、酶解条件、渗透压稳定剂以及酶解时间等。李晓^[7]的研究表明, 在马铃薯原生质体的研究中, 浓度质量分数为 0.7% 的酶解液、渗透压为 0.4 mol/L 甘露

醇、酶解时间为 8~9 h 时,原生质体的产量和活力分别达到了 1.67×10^6 cell/(g·FW) 和 88.46%。类似地,唐然等^[14]的实验表明,在酶解液中含有 1.5% 纤维素酶 R-10、0.75% 离析酶 R-10、0.5 mol/L 甘露醇, pH 为 5.8, 并酶解 4 h 的条件下,华南象草原生质体的产量和活力分别达到 5.11×10^6 cell/g·FW 和 91.08%。

在本试验中,皇竹草原生质体在 2.5% 纤维素酶下,酶解 7 h 后,其产量达到了 1.712×10^6 cell/g·FW, 活力为 94.38%。这一结果表明,本研究优化的条件达到了预期的试验目的。目前,皇竹草原生质体的最佳分离条件尚无文献报道,本试验的结果可为今后皇竹草的进一步研究提供参考依据。

参考文献:

- [1] 何琳,祝其丽,王彦伟,等. 多年生禾草皇竹草的综合利用研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26(3): 705-712.
- [2] 吴征敏,王志敬,吴浩浩,等. 象草与皇竹草组合效应的研究[J]. 草业学报, 2018, 27(2): 135-145.
- [3] 李海利,齐大胜,张满月,等. 栽培技术对皇竹草产量和品质的影响[J]. 饲料博览, 2014(6): 26-29.
- [4] 刘进平. 植物遗传转化中基因受体的选择[J]. 农业与技术, 2003, 23(4): 97-100.
- [5] 彭邵锋,陆佳,陈永忠,等. 木本植物原生质体培养体系研究进展[J]. 中国农学通报, 2013, 29(1): 1-6.
- [6] COCKING E. A Method for the Isolation of Plant Protoplasts and Vacuoles[J]. Nature, 1960, 187: 962-963.
- [7] 李晓. 马铃薯原生质体培养再生及利用 CRISPR/Cas9 瞬时转化的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2019.
- [8] ANDERSSON M, TURESSON H, NICOLIA A, et al. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts[J]. Plant Cell Reports, 2017, 36(1): 117-128.
- [9] 颜朗,吴燕,陈鼎,等. 皇竹草转录组分析揭示其抗冻特性[J]. 应用与环境生物学报, 2017, 23(3): 459-466.
- [10] 李风云,蔡兴奎,盛万民,等. 二倍体马铃薯试管苗的培养及对叶肉原生质体融合的影响[J]. 中国马铃薯, 2014, 28(5): 257-263.
- [11] NAVRÁTILOVÁ B. Protoplast cultures and protoplast fusion focused on Brassicaceae: a review[J]. Horticultural Science, 2004, 31(4): 140-157.
- [12] 郭艳萍,任成杰,李志伟,等. 玉米胚乳细胞原生质体的分离与流式纯化[J]. 作物学报, 2014, 40(3): 424-430.
- [13] 史晓朋. 甘蔗原生质体分离与培养体系的建立和优化[D]. 南宁: 广西大学, 2018.
- [14] 唐然,彭小群,解新明. 华南象草原生质体分离及基因瞬时表达研究[J]. 草地学报, 2015, 23(3): 571-579.
- [15] RIGOULOT S B, PARK J, FABISH J, et al. Enabling high-throughput transgene expression studies using automated liquid handling for etiolated maize leaf protoplasts[J]. Jove-Journal of Visualized Experiments, 2024(204): e65989.
- [16] AHMED M A A, MIAO M, PRATSINAKIS E D, et al. Protoplast isolation, fusion, culture and transformation in the woody plant *Jasminum* spp.[J]. Agriculture, 2021, 11(8): 699.
- [17] REED KM, BARGMANN BOR. Protoplast regeneration and its use in new plant breeding technologies[J]. Frontiers in Genome Editing, 2021, 3: 734951.