



百合原生质体分离培养和瞬时转化

何珊珊^{1†}, 李宏宇^{1,2†}, 马月¹, 孙红梅^{1*}

(1. 沈阳农业大学园艺学院, 设施园艺教育部重点实验室/北方园艺设施设计与应用技术国家地方联合工程研究中心, 辽宁 沈阳 110866;
2. 沈阳大学生命科学与工程学院, 辽宁 沈阳 110044)

摘要 原生质体是遗传转化和基因功能验证的重要受体。百合(*Lilium*)是世界上重要的观赏、食用和药用植物, 其原生质体分离培养体系仍不完善。本文以细叶百合(*Lilium pumilum*)和新铁炮百合(*Lilium formosanum*×*Lilium longiflorum* var. *scabrum*)为材料, 对百合原生质体分离培养和瞬时转化进行了深入探索。结果表明: 百合叶片和胚性愈伤组织均是分离原生质体的优良材料。试管苗叶片原生质体的最佳分离液为细胞原生质体清洗液(cell protoplast wash medium, CPW)+1.0%~2.0% 纤维素酶 RS+0.5% 离析酶 R-10+0.10% 果胶酶 Y-23+12~14 g/L D-甘露醇。胚性愈伤组织原生质体分离的最佳分离液为 CPW+2.0% 纤维素酶 RS+0.60% 果胶酶 Y-23+12~14 g/L D-甘露醇。叶片原生质体是瞬时转化的优良受体, 瞬时转效率为 34.0%~36.7%。新铁炮百合胚性愈伤组织原生质体具有很强的分裂能力, 在 MS(Murashige-Skoog, 含 206.25 mg/L NH₄NO₃) + 60 g/L 葡萄糖的固-液双层培养基中及培养密度为 2×10⁵ 个/mL 条件下, 培养 70 d 可形成愈伤组织。本研究为百合细胞工程和分子育种奠定了基础。

关键词 细叶百合; 新铁炮百合; 原生质体培养; 瞬时转化

中图分类号 S682.29 **文献标志码** A

引用格式 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. DOI: 10.3785/j.issn.1008-9209.2024.11.091

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.

Isolation, cultivation, and transient transformation of lily protoplasts

HE Shanshan^{1†}, LI Hongyu^{1,2†}, MA Yue¹, SUN Hongmei^{1*} (1. Key Laboratory of Protected Horticulture of Ministry of Education/National and Local Joint Engineering Research Center of Northern Horticultural Facilities Design and Application Technology, College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, Liaoning, China; 2. College of Life Science and Bioengineering, Shenyang University, Shenyang 110044, Liaoning, China)

Abstract Protoplasts are important receptors for genetic transformation and gene function verification. Lily is an important ornamental, edible, and medicinal plant worldwide. The isolation and cultivation system for lily protoplasts is still incomplete. In this study, taking *Lilium pumilum* and *Lilium formosanum*×*Lilium longiflorum* var. *scabrum* as materials, the isolation, cultivation, and transient transformation of lily protoplasts were studied. The results revealed that lily leaves and embryogenic callus tissues were both excellent materials for isolating protoplasts. The optimal solution for isolating protoplasts from sterile plantlet leaves was cell protoplast wash

基金项目: 辽宁省种质创新藏粮于技专项计划项目(2023JH1/10200010); 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-23)。

***通信作者**(Corresponding author): 孙红梅(https://orcid.org/0000-0003-0800-9539), E-mail: hmbh@sina.com

第一作者(First author): 何珊珊(https://orcid.org/0009-0006-0701-4917), E-mail: 3984693337@qq.com; 李宏宇(https://orcid.org/0009-0005-8801-0274), E-mail: lihongyu_sy@163.com. †共同第一作者

收稿日期(Received): 2024-11-09; **接受日期**(Accepted): 2025-01-09

medium (CPW) + 1.0%–2.0% cellulase RS + 0.5% macerozyme R-10 + 0.10% pectinase Y-23 + 12–14 g/L D-mannitol. The optimal solution for isolating protoplasts from embryogenic callus tissues was CPW + 2.0% cellulase RS + 0.60% pectinase Y-23 + 12–14 g/L D-mannitol. Protoplasts isolated from leaves were excellent receptors for transient transformation, with a transformation efficiency of 34.0%–36.7%. Protoplasts isolated from embryogenic callus tissues of *Lilium formosanum* × *Lilium longiflorum* var. *scabrum* had strong division ability. In a solid-liquid double-layer culture medium with MS (Murashige–Skoog, containing 206.25 mg/L NH_4NO_3) + 60 g/L glucose and a cultivation density of 2×10^5 cells/mL, callus tissues were formed after 70 days of cultivation. This study lays the foundation for lily cell engineering and molecular breeding.

Keywords *Lilium pumilum*; *Lilium formosanum* × *Lilium longiflorum* var. *scabrum*; protoplast culture; transient transformation

百合(*Lilium*)花色艳丽,姿态多样,是世界上重要的观赏、食用和药用植物。农杆菌介导法是百合分子育种中应用广泛且效率较高的方法。愈伤组织、鳞片和叶片是百合遗传转化中常用的受体^[1]。然而,以多细胞组织为受体,在转化后易形成嵌合体,使转基因苗的筛选和鉴定变得困难。原生质体作为一种独特无壁的单细胞,在短时间内能得到遗传上同质的大量群体,且在适宜的培养条件下,具有分裂、分化、再生成完整植株的能力。原生质体再生植株由单细胞组成,后期性状稳定,易纯化,是分子育种和遗传转化的优良受体。目前,在百合中尚未建立高效稳定的原生质体制备方法和以原生质体为受体的转化体系,这直接阻碍了百合分子育种及功能基因组学等的研究。

百合原生质体分离研究起步较早。1979年, SIMMOMDS等^[2]首次以百合鳞片为材料,成功分离出原生质体,并在后续培养中观察到细胞分裂。TANAKA等^[3]以百合花粉为材料,成功分离出原生质体,并在后期培养中观察到原生质体细胞壁再生。UEDA等^[4]以麝香百合(*Lilium longiflorum*)花粉为材料获得了原生质体,并首次开展了花粉来源的原生质体融合研究。HORITA等^[5]从东方百合(*Lilium* ‘Oriental hybrids’)和以麝香百合为亲本所得的杂交种的悬浮细胞中成功分离出高活力的原生质体,并再生出完整植株,移栽后,再生植株成功生长并开花,这是百合形成杂种细胞后得到再生植株的首例报道。鉴于原生质体再生系统的广泛应用前景,研究人员分别以叶片、愈伤组织、花瓣、花粉为材料获得了百合原生质体^[6–10],在部分研究中还成功启动了细胞分裂,但尚未形成愈伤组织^[11–13]。

迄今,细胞壁重建、细胞分裂和再分化仍是百合原生质体培养的瓶颈。虽然以悬浮细胞为材料

已成功分离出原生质体并再生出完整植株,但是悬浮细胞培养体系稳定性差,而成熟的百合原生质体再生技术体系仍然没有建立。为此,本研究对百合原生质体的分离、培养进行了深入探索,并以原生质体为受体开展了瞬时转化研究,旨在为百合细胞工程和分子育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

植物材料为细叶百合(*Lilium pumilum*)和新铁炮百合(*Lilium formosanum* × *Lilium longiflorum* var. *scabrum*)。将细叶百合和新铁炮百合试管苗培养于MS (Murashige–Skoog)培养基中,培养温度(25 ± 1) °C,光周期为16 h光照/8 h黑暗。叶片外植体以苗龄60 d的试管苗内层3~4 cm长的幼嫩叶片为材料。以中层鳞片为外植体诱导愈伤组织。以转接培养15~20 d的疏松、嫩黄色胚性愈伤组织为材料分离原生质体。植物表达载体为pRI101-ON-GFP。农杆菌菌株为GV3101。

1.2 原生质体分离和纯化

使用锋利的刀片将百合试管苗叶片切成3~4 cm长、1~2 mm宽的小块,将疏松的胚性愈伤组织切成0.5 g的小块,分别置于附加D-甘露醇的细胞原生质体清洗液(cell protoplast wash medium, CPW)中,预处理20 min后,置于pH=5.8的酶解液(表1)中,抽真空20 min,利用直径0.22 μm 的滤膜对酶解液过滤灭菌,4 °C保存,备用。酶解后,使用70 μm 的细胞筛过滤。取10 mL过滤后的混合液,以800 r/min离心3 min,弃上清液。加入2 mL W5溶液[154 mmol/L NaCl, 125 mmol/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 mmol/L KCl, 4 mmol/L MES (pH=5.7)]洗涤2次

表 1 细叶百合和新铁炮百合的不同酶解液组合

Table 1 Different enzymatic hydrolysate combinations for *Lilium pumilum* and *Lilium formosanum*×*Lilium longiflorum* var. *scabrum*

序号 No.	叶片酶解液组合 Enzymatic hydrolysate combination for leaf	序号 No.	愈伤组织酶解液组合 Enzymatic hydrolysate combination for callus
T1	0.5% 离析酶+0.10% 果胶酶	L1	0.60% 果胶酶
T2	1.0%(1.0%)纤维素酶+0.5% 离析酶+0.10% 果胶酶	L2	1.0% 纤维素酶+0.60% 果胶酶
T3	1.5%(1.5%)纤维素酶+0.5% 离析酶+0.10% 果胶酶	L3	2.0% 纤维素酶+0.60% 果胶酶
T4	2.0%(2.0%)纤维素酶+0.5% 离析酶+0.10% 果胶酶	L4	3.0% 纤维素酶+0.60% 果胶酶
T5	2.0%(1.0%)纤维素酶+0.10% 果胶酶	L5	2.0% 纤维素酶
T6	2.0%(1.0%)纤维素酶+0.1% 离析酶+0.10% 果胶酶	L6	2.0% 纤维素酶+0.40% 果胶酶
T7	2.0%(1.0%)纤维素酶+1.0% 离析酶+0.10% 果胶酶	L7	2.0% 纤维素酶+0.80% 果胶酶
T8	2.0%(1.0%)纤维素酶+0.5% 离析酶		
T9	2.0%(1.0%)纤维素酶+0.5% 离析酶+0.050% 果胶酶		
T10	2.0%(1.0%)纤维素酶+0.5% 离析酶+0.15% 果胶酶		

3 种酶试剂分别为纤维素酶 RS、离析酶 R-10、果胶酶 Y-23。括号里的数据为新铁炮百合叶片酶解液中纤维素酶的用量。

Three enzyme reagents used are cellulase RS, macerozyme R-10, and pectinase Y-23. The data in parentheses represent the amount of cellulase used in the enzymatic hydrolysate combinations of the leaves of *Lilium formosanum*×*Lilium longiflorum* var. *scabrum*.

后,静置于冰上 40 min,再次离心纯化破碎细胞及残留酶液。利用 MS 液体培养基(含 206.25 mg/L NH₄NO₃,即 1/8 NH₄NO₃)调整原生质体初始培养密度。用巴氏吸管吸取少量纯化后的原生质体,利用 YA0810 血球计数板计数,计算原生质体的密度。采用二乙酸荧光素(fluorescein diacetate, FDA)法进行染色鉴定。

1.3 原生质体培养

分别采用液体培养法和固-液双层培养法探究培养方式对百合原生质体的影响。液体培养法:将纯化后的百合原生质体与 MS(含 1/8 NH₄NO₃)液体培养基混合,调整培养密度为 2×10⁵ 个/mL,培养厚度为 2~3 mm,每隔 5 h 轻轻摇晃 1 次。固-液双层培养法:使用 MS(含 1/8 NH₄NO₃)液体培养基调整原生质体初始培养密度至 2×10⁵ 个/mL,然后将 10~15 滴原生质体培养液滴入 MS(含 1/8 NH₄NO₃)固体培养基中。培养条件:于 26~28 ℃ 黑暗条件下培养 10 d 后,移入弱光下培养。每 10 d 更换新鲜培养基。随着继代次数的增加,逐渐降低葡萄糖质量浓度,每次下调 10 g/L。随着原生质体分裂次数的增多,直至形成肉眼可见的小愈伤组织后,将葡萄糖完全去除。将小愈伤组织转移至含 MS+1 mg/L 毒莠定(picloram, PIC)的培养基中继续培养,20 d 后,将达到 1 cm 长的愈伤组织块转移至附加 MS 的培养基中培养。每天镜检并记录原生质体状态,培养 2 周后调查细胞分裂频率,培养 4 周后统计细胞

团形成频率。

1.4 原生质体瞬时转化

在百合原生质体中加入 MMG 溶液[0.4 mol/L D-甘露醇,0.015 mol/L MgCl₂,0.004 mol/L 2-吗啉乙磺酸(2-morpholinoethanesulphonic acid, MES; pH=5.7)],调整原生质体密度至 1×10⁵~1×10⁶ 个/mL,探究添加不同浓度 D-甘露醇对百合原生质体瞬时转化的影响。分别取 100 μL 原生质体培养液,加入 10 μg 植物表达载体 pRI101-ON-GFP、110 μL 聚乙二醇-钙离子(polyethylene glycol-calcium ion, PEG-Ca²⁺)溶液[400 g/L PEG-4000,不同浓度 D-甘露醇(0.2、0.4、0.6 mol/L),0.1 mol/L CaCl₂],轻敲混匀。在黑暗、室温条件下静置处理 5 min 后,向混合液中加入 440 μL W5 溶液,以 100×g 离心 2 min,除去上清液;加入 1 mL WI 溶液(0.5 mol/L D-甘露醇、0.004 mol/L MES、0.02 mol/L KCl,用 KOH 调节 pH 值至 5.6),重悬原生质体后,转入用 5% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)润洗过的 6 孔培养皿,于黑暗、室温条件下静置培养。孵育完成后,以 100×g 离心 2 min,浓缩原生质体,并在荧光显微镜下观察其绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的表达情况。

1.5 原生质体活力检测

采用 FDA 法对细叶百合和新铁炮百合原生质体活力进行染色鉴定。FDA 用丙酮溶解,配制成 5 mg/mL 溶液。取 1 mL 含有百合原生质体的溶液

于25 μL FDA溶液中进行染色。在1.5 mL灭菌离心管中加入0.5 mL刚分离的原生质体悬浮液,吸取1滴于载玻片上,静置5 min后在荧光显微镜下观察,检测其活性。在紫外光激发下,发绿色或黄绿色光的为有活力的原生质体,随机选取3个视野统计原生质体数量。

2 结果与分析

2.1 百合原生质体分离

2.1.1 酶解液对百合叶片原生质体分离的影响

植物细胞壁主要由纤维素、半纤维素和果胶质组成,因而常用纤维素酶、半纤维素酶、离析酶和果胶酶降解细胞壁,进而获得原生质体。CHAMANI等^[14]研究表明,用4%纤维素酶和1%果胶酶处理24 h为百合叶片原生质体的最佳分离条件。然而,本研究表明,仅使用2种酶进行酶解时,获得的叶片原生质体产量极低且无活力,只有同时添加纤维素酶、离析酶和果胶酶3种酶才能大幅提高分离效率。这可能是由基因型和外植体生理状态的差异所致。纤维素酶、离析酶和果胶酶对百合叶片原生质体分离的影响如图1所示。

在含有0.5%离析酶和0.10%果胶酶的酶解液中加入不同质量分数的纤维素酶,细叶百合叶片原生质体产量和活力随纤维素酶质量分数的提高而增加。当纤维素酶质量分数为2.0%时,其原生质体产量和活力达到峰值,分别为 9.2×10^5 个/mL和70.0%(图1A)。新铁炮百合与细叶百合的试管苗叶片对纤维素酶的反应不同。当纤维素酶质量分数低于2.0%时,新铁炮百合原生质体产量和活力随纤维素酶质量分数的提高先增加后降低。当纤维素酶质量分数为1.0%时,其原生质体产量和活力达到峰值,分别为 9.3×10^5 个/mL和71.1%(图1D)。

在含有2.0%纤维素酶和0.5%离析酶的酶解液中添加0.10%果胶酶,原生质体产量和活力最高,其中,细叶百合和新铁炮百合的原生质体产量分别为 1.05×10^6 个/mL和 1.08×10^6 个/mL,活力分别为70.0%和71.0%(图1B,E)。

在含有2.0%纤维素酶和0.10%果胶酶的酶解液中添加0~1.0%的离析酶,百合原生质体产量和活力随离析酶质量分数的提高先升高后降低。当离析酶质量分数为0.5%时,原生质体产量和活力最

高,其中,细叶百合和新铁炮百合的原生质体产量分别达到 9.5×10^5 个/mL和 1.05×10^6 个/mL,活力分别为72.6%和71.1%(图1C,F)。

综上所述,细叶百合和新铁炮百合叶片原生质体分离的适宜酶解液分别为2.0%纤维素酶+0.5%离析酶+0.10%果胶酶和1.0%纤维素酶+0.5%离析酶+0.10%果胶酶。

2.1.2 酶解液对百合愈伤组织原生质体分离的影响

与试管苗叶片相比,仅用纤维素酶和果胶酶即可高效分离原生质体(图2)。在含有0.60%果胶酶的酶解液中添加0~3.0%的纤维素酶,原生质体产量和活力随纤维素酶质量分数的提高先升高后降低。当纤维素酶质量分数为2.0%时,细叶百合和新铁炮百合原生质体产量和活力达到峰值;随后,随着纤维素酶质量分数继续升高,原生质体产量和活力都开始下降,细胞破碎程度严重(图2A,C)。在含有2.0%纤维素酶的酶解液中添加0~0.80%的果胶酶,原生质体产量和活力均先升高后降低(图2B,D)。综上所述,百合愈伤组织原生质体的最佳分离液为2.0%纤维素酶+0.60%果胶酶。在此条件下,细叶百合和新铁炮百合的原生质体产量分别为 8.8×10^5 个/mL和 1.12×10^6 个/mL,活力分别为57.4%和73.9%。

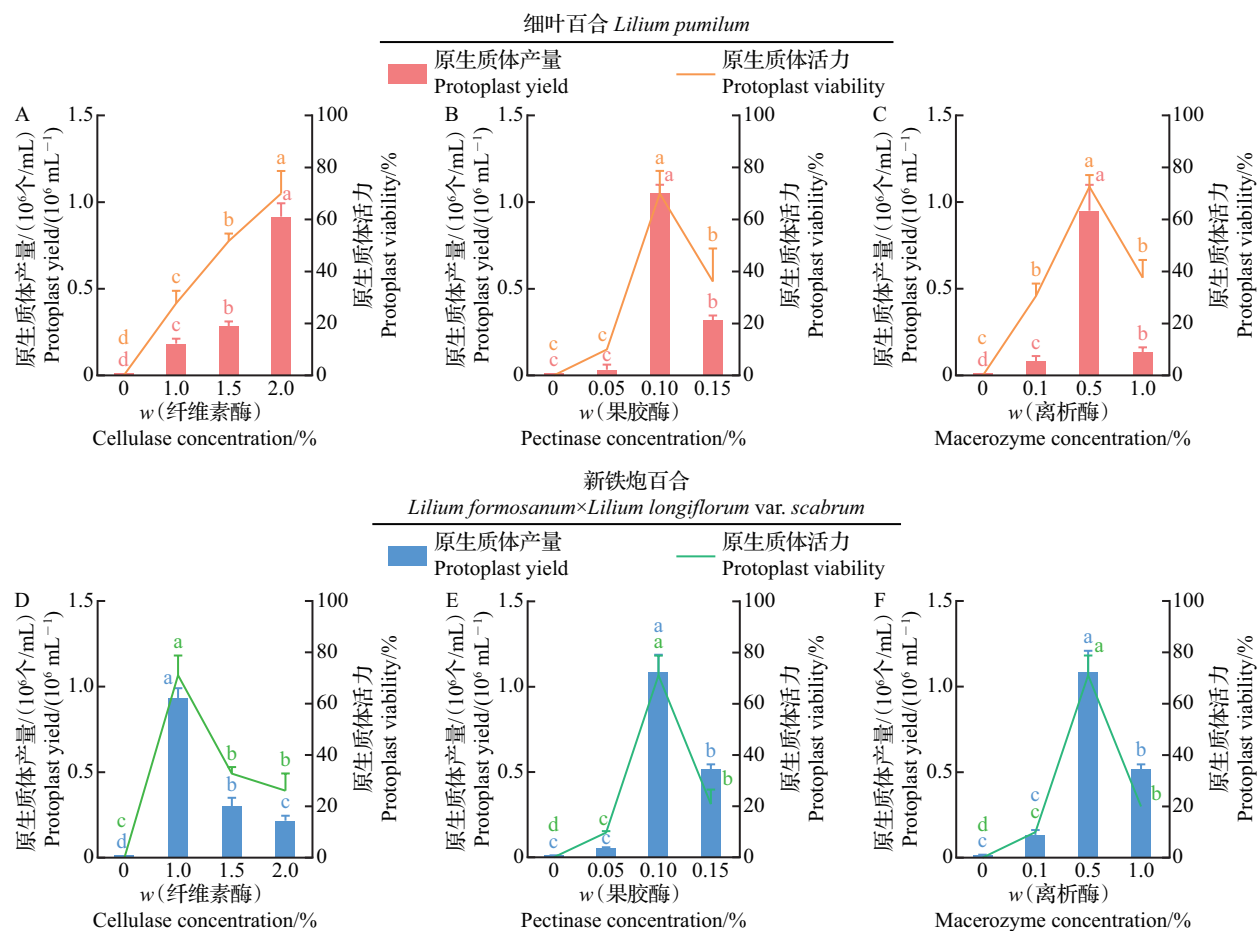
2.1.3 酶解时间对百合原生质体分离的影响

酶解处理时间直接影响原生质体的产量和活力。在酶解处理0~8 h内,随着处理时间的延长,百合原生质体产量和活力呈现先升高后下降的趋势(图3)。

百合叶片的最佳酶解处理时间为6 h,细叶百合和新铁炮百合的原生质体产量分别为 1.08×10^6 个/mL和 1.01×10^6 个/mL,活力分别为72.6%和71.1%(图3A,C)。然而,2种百合愈伤组织的最佳酶解处理时间不同。细叶百合愈伤组织的最佳酶解处理时间为4 h,其原生质体的产量和活力分别为 1.15×10^6 个/mL和53.2%;新铁炮百合愈伤组织的最佳酶解处理时间为6 h,其原生质体的产量和活力分别为 1.18×10^6 个/mL和73.9%(图3B,D)。

2.1.4 渗透压对百合原生质体分离的影响

适宜的渗透压有利于维持原生质膜的稳定性。适当提高渗透压,可防止水分渗入细胞内部,并提高原生质体产量。在原生质体分离培养过程中,常用



A. 添加 0.5% 离析酶+0.10% 果胶酶; B. 添加 2.0% 纤维素酶+0.5% 离析酶; C. 添加 2.0% 纤维素酶+0.10% 果胶酶; D. 添加 0.5% 离析酶+0.10% 果胶酶; E. 添加 1.0% 纤维素酶+0.5% 离析酶; F. 添加 1.0% 纤维素酶+0.10% 果胶酶。短栅上不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异有统计学意义,下同。

A. Adding 0.5% macrozyme+0.10% pectinase; B. Adding 2.0% cellulase+0.5% macrozyme; C. Adding 2.0% cellulase+0.10% pectinase; D. Adding 0.5% macrozyme+0.10% pectinase; E. Adding 1.0% cellulase+0.5% macrozyme; F. Adding 1.0% cellulase+0.10% pectinase. Different lowercase letters above bars indicate significant differences at the 0.05 probability level, and the same as below.

图 1 酶解液对百合叶片原生质体分离的影响

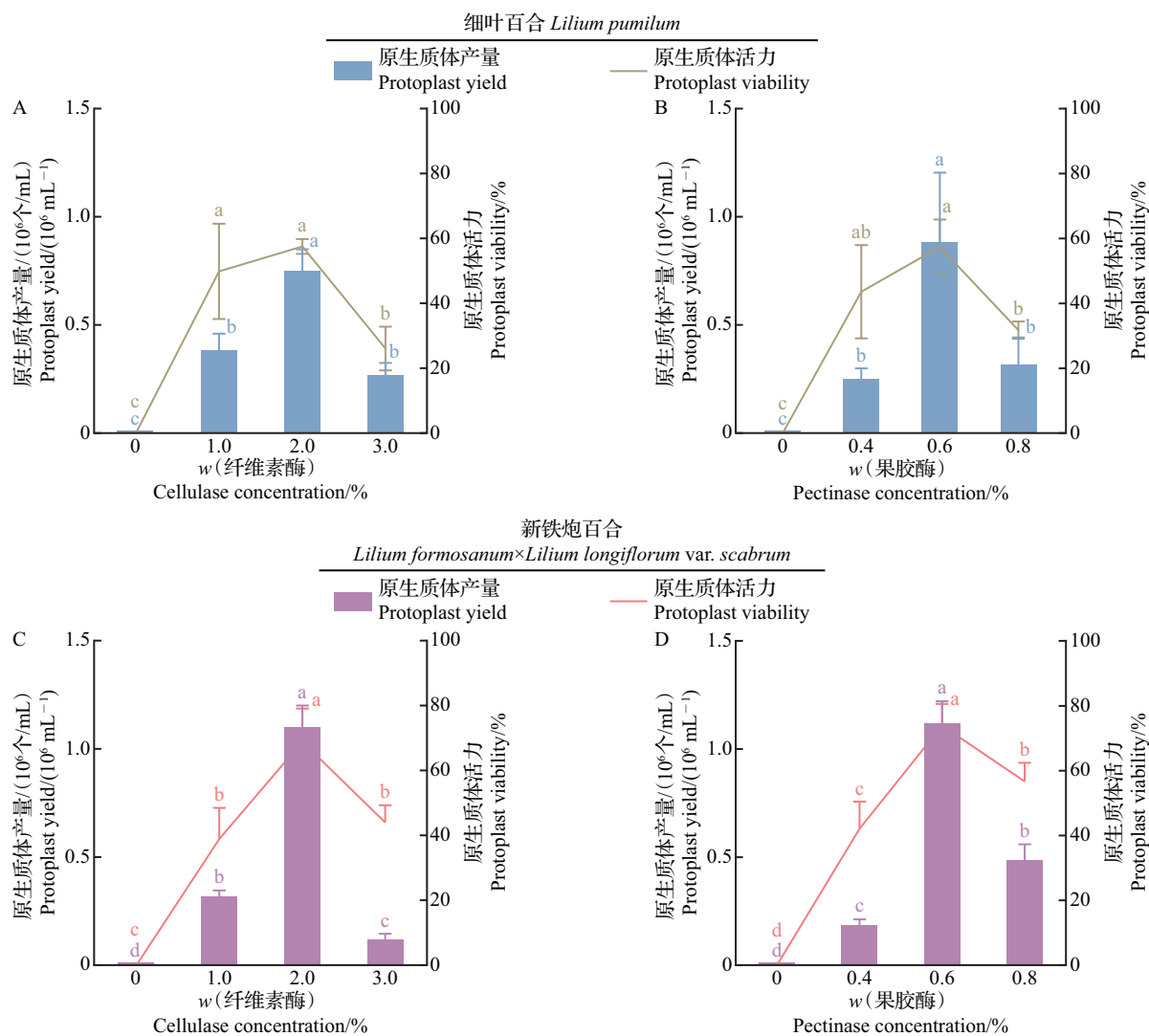
Fig. 1 Effects of enzymatic hydrolysate on the isolation of protoplasts from lily leaves

的渗透压调节剂有蔗糖、葡萄糖、D-甘露醇、山梨醇、无机盐等。在预试验的基础上,选择D-甘露醇为渗透压调节剂。在0~16 g/L D-甘露醇处理下,百合原生质体产量和活力呈先升高后降低趋势(图4)。当D-甘露醇质量浓度分别为12 g/L和14 g/L时,细叶百合和新铁炮百合叶片原生质体形态完整,叶绿体分布均匀,产量和活力均最高(图4A,C)。当D-甘露醇质量浓度为14 g/L时,细叶百合胚性愈伤组织原生质体的产量和活力最高,原生质体基本为圆形;当D-甘露醇质量浓度为12 g/L时,新铁炮百合胚性愈伤组织原生质体的产量和活力均最高;当D-甘露醇质量浓度为16 g/L时,2种百合胚性愈伤组织原生质体出现皱缩(图4B,D)。

2.2 百合原生质体培养

2.2.1 百合原生质体分裂和培养过程

分离自新铁炮百合胚性愈伤组织的原生质体经过培养能够形成愈伤组织(图5)。在荧光显微镜下观察发现,纯化后的百合原生质体为球形。培养4 d后细胞开始膨大,由球形变为卵圆形,启动第一次分裂;培养12 d后,启动第二次细胞分裂;培养30 d后,出现由多个单细胞组成的多细胞团。继续培养,细叶百合愈伤组织原生质体皱缩并停止分裂,没有观察到肉眼可见的愈伤组织。然而,新铁炮百合在培养50 d后形成肉眼可见的小愈伤组织;70 d后形成愈伤组织;继续培养,愈伤组织出现褐化现象,未能形成不定芽。



A, C. 添加 0.60% 果胶酶; B, D. 添加 2.0% 纤维素酶。

A, C. Adding 0.60% pectinase; B, D. Adding 2.0% cellulase.

图 2 酶解液对百合愈伤组织原生质体分离的影响

Fig. 2 Effects of enzymatic hydrolysate on the isolation of protoplasts from lily callus tissue

由于叶绿体的存在,分离自叶片的原生质体在荧光显微镜下呈现浅绿色;培养 3 d 后,细胞开始膨大,由球形变为卵圆形,同时开始启动不规则细胞分裂,有的细胞从中间一分为二,有的细胞从细胞边缘开始不对称分裂;培养 30 d 后,能观察到细胞团;继续培养,细胞团开始皱缩,未能继续分裂,无法形成肉眼可见的小愈伤组织(图 6)。

2.2.2 培养密度对百合原生质体的影响

在原生质体培养的初始阶段,培养密度过低,很难启动分裂;培养密度过高,会直接导致原生质体粘连和有害物质累积。表 2 显示了培养密度对百合愈伤组织原生质体启动细胞分裂的影响。当初始培养密度为 5×10^4 个/mL 时,细叶百合原生质体无

法启动分裂,新铁炮百合原生质体也无法形成小细胞团;当初始培养密度提升至 2×10^5 个/mL 时,细叶百合和新铁炮百合原生质体分裂频率分别为 20.01% 和 25.04%,细胞团形成频率分别为 7.60% 和 14.21%;当初始培养密度增加至 4×10^5 个/mL 时,2 种百合的原生质体分裂频率和细胞团形成频率均开始下降。

2.2.3 培养方式对百合原生质体的影响

液体培养(浅层)法、平板培养法、固-液双层培养法是原生质体常见的培养方式。在预试验的基础上,本研究探索了液体培养与固-液双层培养对百合愈伤组织原生质体分裂和再生的影响。由表 3 可知:细叶百合和新铁炮百合原生质体在固-液双

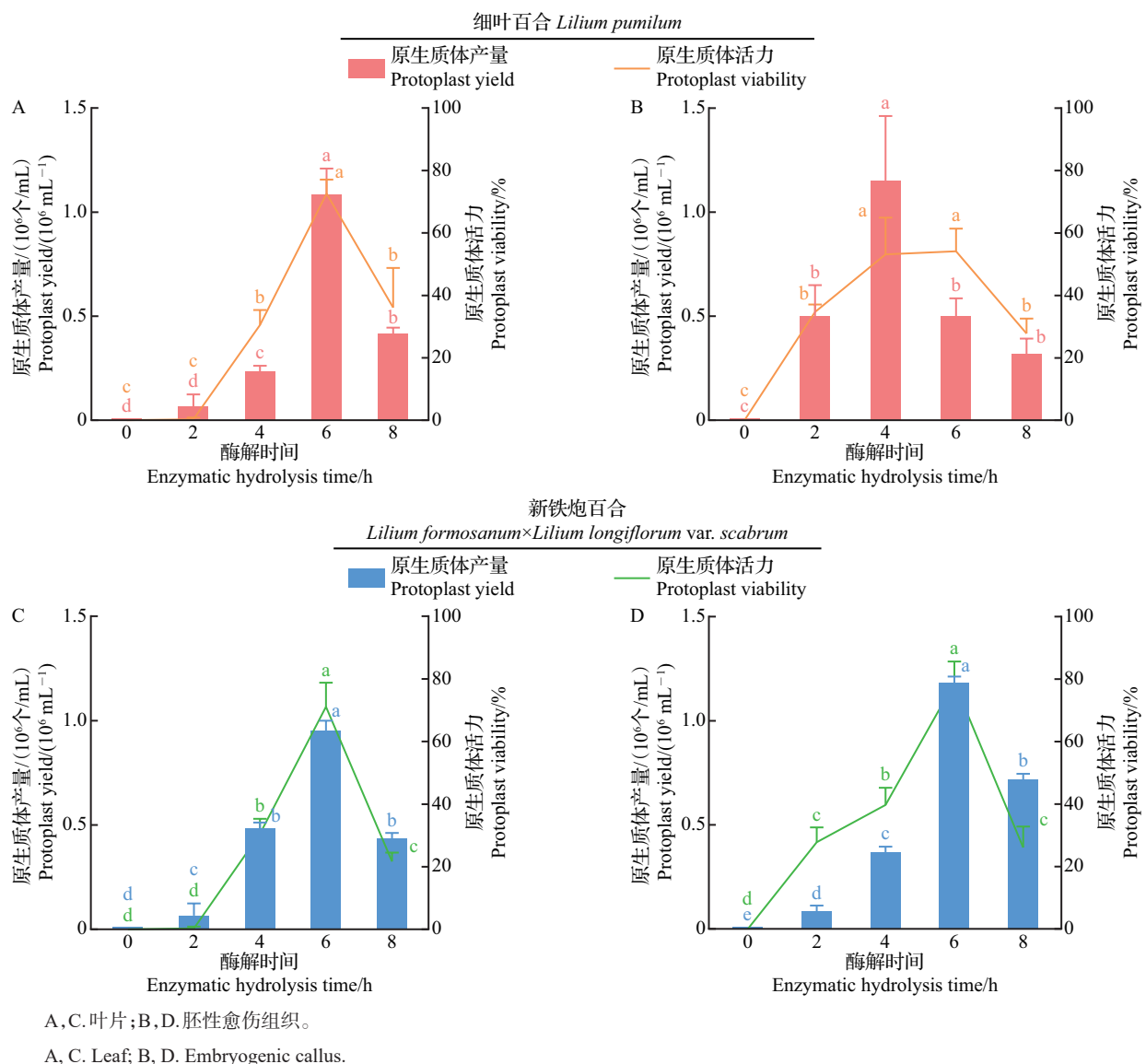


图3 酶解时间对百合原生质体分离的影响

Fig. 3 Effects of enzymatic hydrolysis time on the isolation of lily protoplasts

层培养下的分裂频率分别为20.04%和23.77%,细胞团形成频率分别为8.33%和10.00%;而在液体培养中,两者的原生质体分裂频率仅为13.61%和12.50%,细胞团形成频率分别为5.50%和5.94%。可见,对于百合原生质体的早期细胞分裂,固-液双层培养的效果良好。

2.2.4 葡萄糖质量浓度对百合原生质体培养的影响

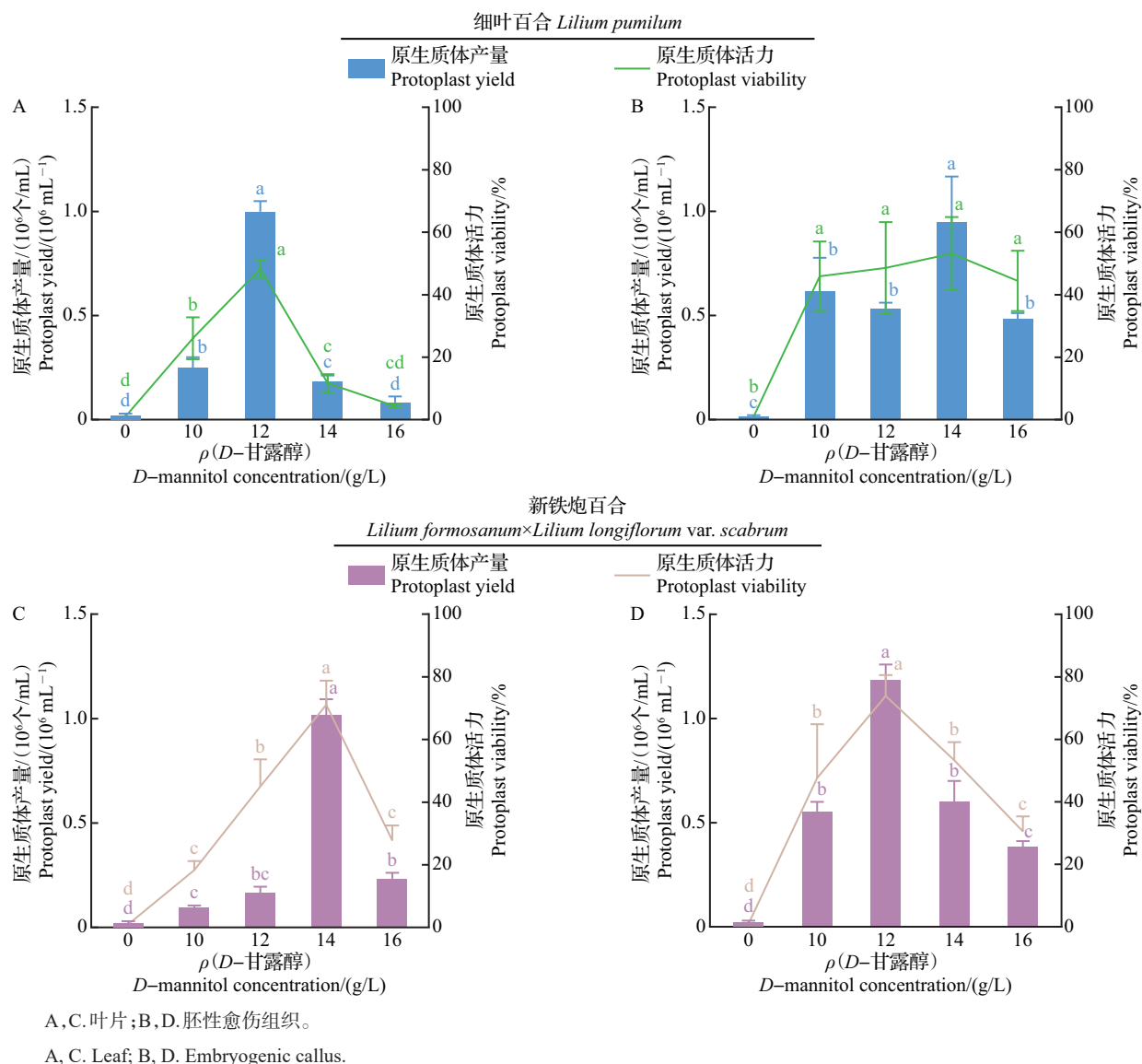
在原生质体培养初期,由于缺少细胞壁的保护,需要在培养基中添加渗透压力稳定剂以维持培养液的高渗条件,减少细胞破损。但在培养后期,高渗条件对细胞分裂不利。随着细胞壁的重建和细胞分裂,需要逐渐降低渗透压调节剂的浓度并

调整渗透压调节剂的种类。本研究探索了葡萄糖作为渗透压调节剂,在百合原生质体培养初期对细胞分裂的影响。由表4可知:在培养基中添加30~90 g/L葡萄糖时,原生质体分裂能力随着葡萄糖质量浓度的增加而提升。当葡萄糖质量浓度为90 g/L时,细叶百合和新铁炮百合原生质体分裂频率分别为20.34%和26.74%,细胞团形成频率分别为8.31%和10.08%。

2.3 百合原生质体瞬时转化

2.3.1 培养密度对百合原生质体瞬时转化的影响

分离自百合叶片和胚性愈伤组织原生质体的瞬时转化的最佳培养密度不同(图7)。培养密度为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个/mL时,分离自试管苗叶片的原

图4 *D*-甘露醇质量浓度对百合原生质体分离的影响Fig. 4 Effects of *D*-mannitol concentration on the isolation of lily protoplasts

生质体的瞬时转化效率逐渐增加。当培养密度为 1×10^6 个/mL 时,转化效率最高,细叶百合和新铁炮百合的瞬时转化效率分别达到 34.0% 和 36.7%。分离自胚性愈伤组织原生质体的最佳培养密度为 5×10^5 个/mL,细叶百合和新铁炮百合的瞬时转化效率分别为 11.5% 和 14.0%,低于叶片。

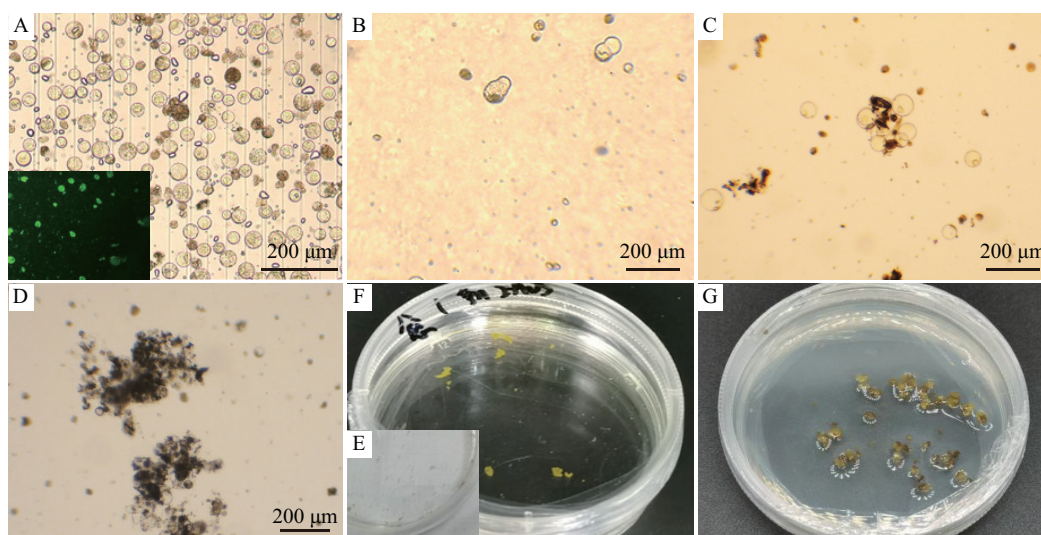
2.3.2 *D*-甘露醇浓度对百合原生质体瞬时转化的影响

原生质体的膜渗透性直接影响瞬时转化效率。由图 8 可见:在百合叶片原生质体培养基中添加 $0.2 \sim 0.6$ mol/L *D*-甘露醇,瞬时转化效率逐渐增加;当 *D*-甘露醇浓度达到 0.6 mol/L 时,转化效率最高,细叶百合和新铁炮百合的瞬时转化效率分别为

32.0% 和 34.0%。在百合胚性愈伤组织原生质体培养基中添加 $0.2 \sim 0.6$ mol/L *D*-甘露醇,瞬时转化效率均呈现先升高后下降的趋势;当添加 0.4 mol/L *D*-甘露醇时,瞬时转化效率最高,细叶百合和新铁炮百合的瞬时转化效率分别为 12.3% 和 16.7%。

2.3.3 转化时间对百合原生质体瞬时转化的影响

转化时间是影响原生质体瞬时转化效率的重要因素。由图 9 可知:在 $12 \sim 48$ h 内,百合原生质体瞬时转化效率呈先升高后下降的趋势。细叶百合和新铁炮百合叶片原生质体的最佳转化时间均为 24 h,其瞬时转化效率分别达到 38.0% 和 36.7%;随着共培养时间的延长,其瞬时转化效率开始下降。细叶百合和新铁炮百合胚性愈伤组织原生质体的

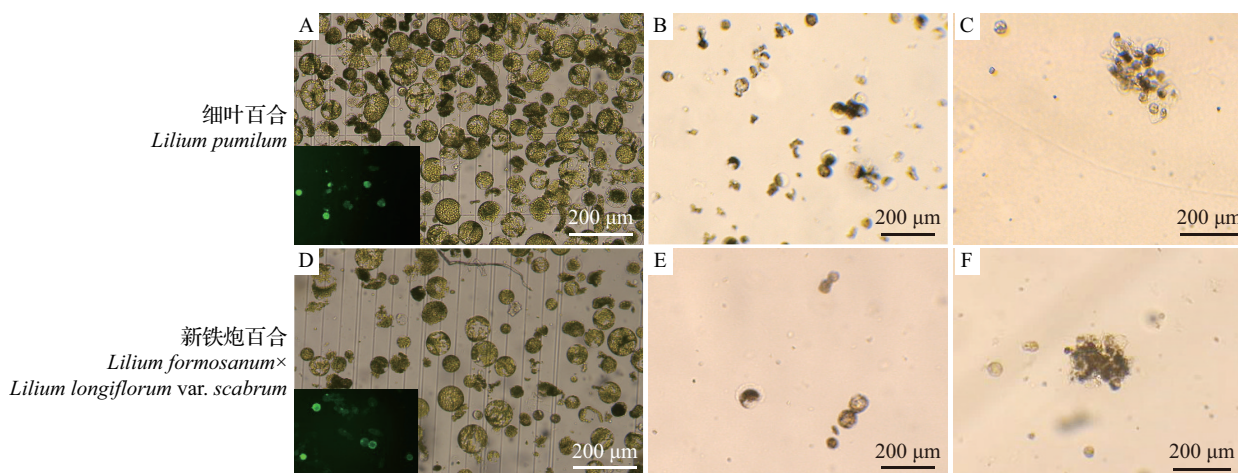


A. 分离的原生质体; B. 第一次细胞分裂; C. 第二次细胞分裂; D. 细胞团形成; E. 小愈伤组织形成; F. 转移到培养基中的再生愈伤组织; G. 愈伤组织褐化。

A. Isolated protoplasts; B. First cell division; C. Second cell division; D. Cell mass formation; E. Microcallus formation; F. Regenerative callus transferred to medium; G. Browning callus.

图5 新铁炮百合胚性愈伤组织原生质体分离和培养

Fig. 5 Isolation and cultivation of protoplasts from callus tissue of *Lilium formosanum* × *Lilium longiflorum* var. *scabrum*



A, D. 分离的原生质体; B, E. 原生质体细胞分裂; C, F. 细胞团形成。

A, D. Isolated protoplasts; B, E. Protoplast cell division; C, F. Cell mass formation.

图6 百合叶片原生质体分离和培养

Fig. 6 Isolation and cultivation of protoplasts from lily leaves

最佳转化时间均为 36 h, 其瞬时转化效率分别为 12.3% 和 13.3%。与叶片原生质体相比, 胚性愈伤组织的转化时间长, 转化效率低。

3 讨论

3.1 外植体类型对原生质体分离培养至关重要 分离高活性原生质体是细胞分裂和再生出完

整植株的根本保障。基因型、外植体的类型和生理状态是影响原生质体分离效果的重要因素。原生质体的分化受到环境条件影响, 不同物种或同一物种不同品种间的适宜培养条件均有较大差异^[15]。在分离百合胚性愈伤组织原生质体时也发现, ‘Sorbonne’ 和 ‘山丹丹’ 百合的产量及活力具有较大的差异^[8,12]。本研究进一步证明, 细叶百合和新铁炮百合在分离叶片和愈伤组织原生质体时, 也存在较大差异。细

表 2 培养密度对百合愈伤组织原生质体的影响

Table 2 Effects of cultivation density on protoplasts isolated from lily calli					%
培养密度/ (个/mL) Cultivation density/ (cells/mL)	原生质体分裂频率 Protoplast division frequency		细胞团形成频率 Cell colony-forming frequency		
	细叶百合 <i>Lilium pumilum</i>	新铁炮百合 <i>Lilium formosanum</i> × <i>Lilium longiflorum</i> var. <i>scabrum</i>	细叶百合 <i>Lilium pumilum</i>	新铁炮百合 <i>Lilium formosanum</i> × <i>Lilium longiflorum</i> var. <i>scabrum</i>	
5×10 ⁴	0.00±0.00c	5.00±1.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00c	
2×10 ⁵	20.01±2.14a	25.04±4.63a	7.60±0.02a	14.21±2.37a	
4×10 ⁵	13.57±2.40b	14.23±1.32b	2.50±0.00b	6.01±1.04b	

培养方式为固-液双层培养,葡萄糖质量浓度为 90 g/L。同列数据后不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平差异有统计学意义,下同。
The cultivation mode is solid-liquid double-layer cultivation, with a glucose concentration of 90 g/L. Data within the same column followed by different lowercase letters indicate significant differences at the 0.05 probability level, and the same as below.

表 3 培养方式对百合愈伤组织原生质体的影响

Table 3 Effects of cultivation modes on protoplasts isolated from lily calli					%
培养方式 Cultivation mode	原生质体分裂频率 Protoplast division frequency		细胞团形成频率 Cell colony-forming frequency		
	细叶百合 <i>Lilium pumilum</i>	新铁炮百合 <i>Lilium formosanum</i> × <i>Lilium longiflorum</i> var. <i>scabrum</i>	细叶百合 <i>Lilium pumilum</i>	新铁炮百合 <i>Lilium formosanum</i> × <i>Lilium longiflorum</i> var. <i>scabrum</i>	
液体培养 Liquid cultivation	13.61±1.36a	12.50±0.95b	5.50±0.24b	5.94±0.77b	
固-液双层培养 Solid-liquid double-layer cultivation	20.04±2.22a	23.77±1.73a	8.33±0.10a	10.00±1.24a	

培养密度为 2×10⁵ 个/mL,葡萄糖质量浓度为 90 g/L。
The cultivation density is 2×10⁵ cells/mL, with a glucose concentration of 90 g/L.

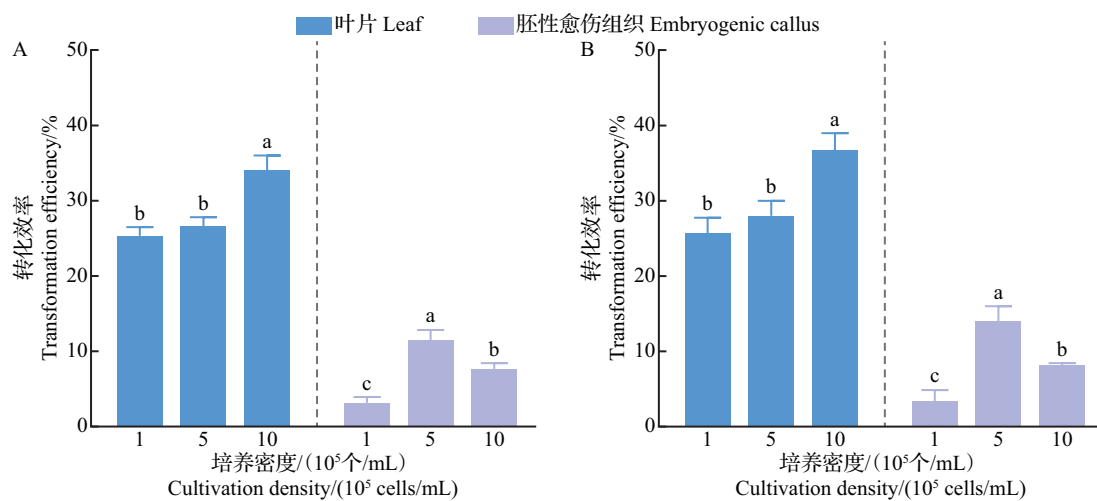
表 4 葡萄糖质量浓度对百合愈伤组织原生质体培养的影响

Table 4 Effects of glucose concentration on the cultivation of protoplasts isolated from lily calli					%
葡萄糖质量浓度 Glucose concentration/ (g/L)	原生质体分裂频率 Protoplast division frequency		细胞团形成频率 Cell colony-forming frequency		
	细叶百合 <i>Lilium pumilum</i>	新铁炮百合 <i>Lilium formosanum</i> × <i>Lilium longiflorum</i> var. <i>scabrum</i>	细叶百合 <i>Lilium pumilum</i>	新铁炮百合 <i>Lilium formosanum</i> × <i>Lilium longiflorum</i> var. <i>scabrum</i>	
30	6.70±0.14c	12.53±0.19c	2.40±0.10c	2.51±0.11c	
60	11.23±0.88b	18.75±0.60b	5.91±0.75b	6.30±0.32b	
90	20.34±1.90a	26.74±0.97a	8.31±0.71a	10.08±0.87a	

培养密度为 2×10⁵ 个/mL,培养方式为固-液双层培养。
The cultivation density is 2×10⁵ cells/mL, and the cultivation mode is solid-liquid double-layer cultivation.

叶百合的胚性愈伤组织疏松,而新铁炮百合的胚性愈伤组织相对致密,这可能是影响两者原生质体分离效率的重要因素。此外,细叶百合愈伤组织原生质体无法形成肉眼可见的愈伤组织,而新铁炮百合愈伤组织原生质体具备旺盛的分裂能力。
不同外植体类型对原生质体的分离效果不同。如:分离自木薯(*Manihot esculenta*)愈伤组织的原生质体产量仅为 3.0×10⁶ 个/g(按鲜质量计,下同),分离自叶肉组织的原生质体产量可达 1.0×10⁷ 个/g^[16]。分离自兰花(*Cymbidium* ssp.)叶基的原生质体产量最

高,达到 6.67×10⁶ 个/g;花梗和幼叶次之,分别为 3.67×10⁶ 个/g 和 1.07×10⁶ 个/g;根尖最低,仅为 2.97×10⁵ 个/g^[17]。在本研究中,百合试管苗叶片和胚性愈伤组织均可高效分离原生质体,原生质体产量均达到 10⁶ 数量级。其中,用叶片分离的原生质体的活力为 70% 左右,用胚性愈伤组织分离的原生质体的活力为 60% 左右,稍低于叶片。
虽然用叶片分离的原生质体具有较高的活力,但是在培养阶段却无法形成愈伤组织。用新铁炮百合胚性愈伤组织分离获得的原生质体具有持续

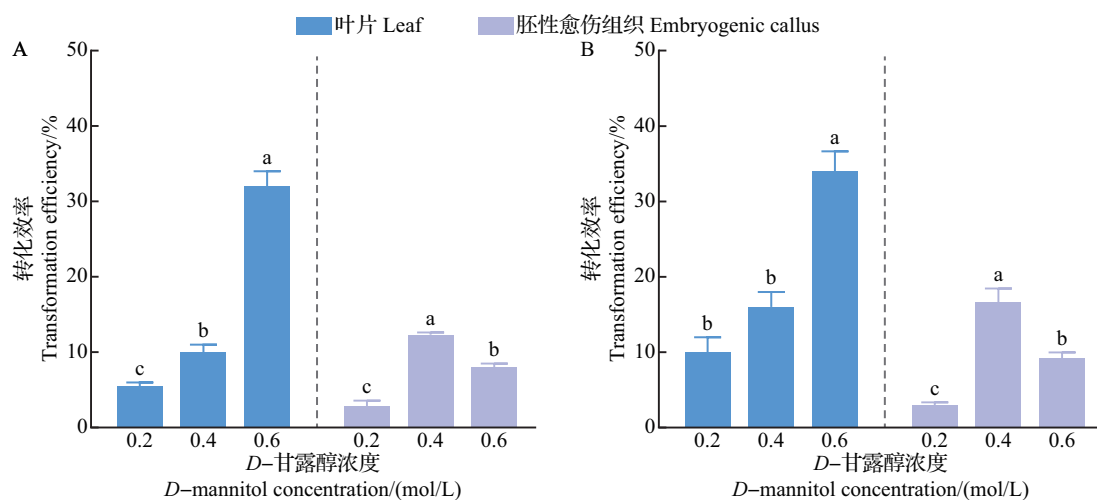


A. 细叶百合; B. 新铁炮百合。

A. *Lilium pumilum*; B. *Lilium formosanum* × *Lilium longiflorum* var. *scabrum*.

图 7 培养密度对百合原生质体瞬时转化效率的影响

Fig. 7 Effects of cultivation density on the transient transformation efficiency of lily protoplasts



A. 细叶百合; B. 新铁炮百合。

A. *Lilium pumilum*; B. *Lilium formosanum* × *Lilium longiflorum* var. *scabrum*.

图 8 D-甘露醇浓度对百合原生质体瞬时转化效率的影响

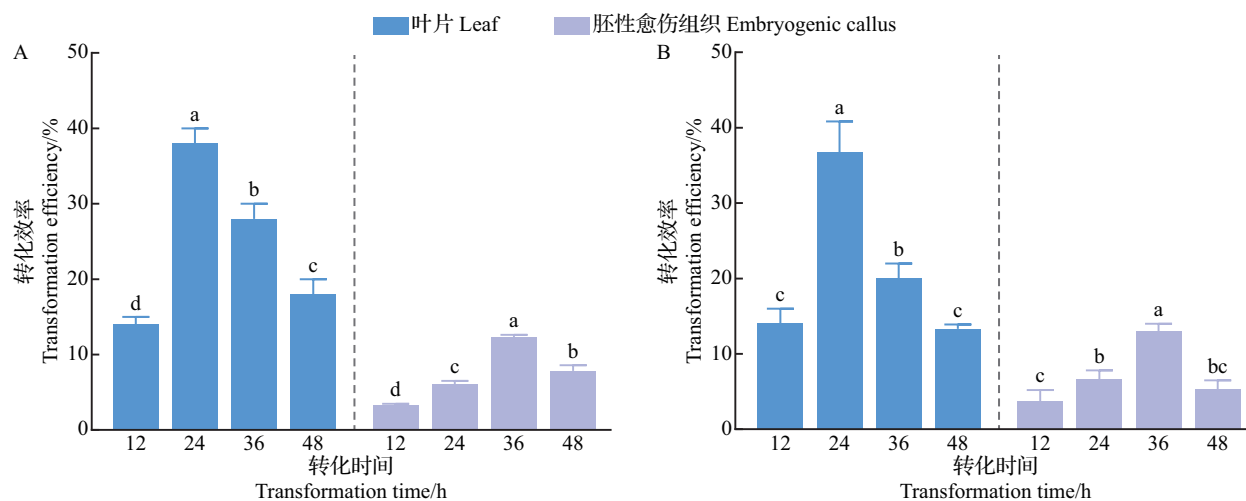
Fig. 8 Effects of D-mannitol concentration on the transient transformation efficiency of lily protoplasts

分裂的能力,并最终形成肉眼可见的愈伤组织。因此,可认为百合愈伤组织是原生质体培养的潜在优良外植体。遗憾的是,原生质体分裂所获得的愈伤组织在继代培养后开始褐化死亡,未观察到细胞的分化。这可能与细胞分化和分裂所需条件(如激素、温度等)差异巨大有关,仍需进一步探索。

3.2 试管苗叶片是百合原生质体瞬时转化的优良受体

高效稳定的原生质体瞬时转化系统可用于亚细胞定位、蛋白质互作和代谢调控网络研究,还能

为植物的稳定转化提供可靠的辅助证据。在一些植物中,用不同外植体分离的原生质体的瞬时转化效率有所差异。如对柑橘(*Citrus reticulata*)叶片原生质体进行瞬时转化,其转化效率仅为3.63%,而对柑橘胚性愈伤组织原生质体进行瞬时转化,其转化效率提高至13.18%^[18]。本研究发现,分离自细叶百合和新铁炮百合试管苗叶片的原生质体的瞬时转化效率高于分离自愈伤组织的原生质体。这可能是由于百合胚性愈伤组织细胞中含有大量淀粉体^[19],对外源基因的瞬时表达产生了一定的影响。原生质体



A. 细叶百合; B. 新铁炮百合。

A. *Lilium pumilum*; B. *Lilium formosanum* × *Lilium longiflorum* var. *scabrum*.

图9 转化时间对百合原生质体瞬时转化效率的影响

Fig. 9 Effects of transformation time on the transient transformation efficiency of lily protoplasts

积累较多的淀粉颗粒会降低原生质体的产量和完整性,进而可能对瞬时转化效率产生影响^[20-21]。

4 结论

本研究以细叶百合和新铁炮百合为材料,探索百合叶片和胚性愈伤组织的原生质体分离纯化和培养条件。得到的结论如下:

以细叶百合和新铁炮百合的叶片和愈伤组织为材料,均可分离获得高质量和高活力的原生质体。叶片原生质体取材方便,产量和活力高,且原生质体的体积更大,是瞬时转化和基因功能研究的优良材料。分离自胚性愈伤组织的原生质体,在细胞壁重建和细胞分裂过程中再生能力更强,是离体再生、稳定的遗传转化和分子育种的良好受体。通过固-液双层法培养百合原生质体,可以缩短培养周期,并成功获得愈伤组织。本研究建立的细叶百合和新铁炮百合原生质体瞬时转化体系为百合基因功能和亚细胞定位研究提供了新方法。

参考文献(References):

- [1] YAN R, WANG Z P, REN Y M, et al. Establishment of efficient genetic transformation systems and application of CRISPR/Cas9 genome editing technology in *Lilium pumilum* DC. Fisch. and *Lilium longiflorum* White Heaven[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(12): 2920. DOI: 10.3390/ijms20122920
- [2] SIMMONDS J A, SIMMONDS D H, CUMMING B G.

Isolation and cultivation of protoplasts from morphogenetic callus cultures of *Lilium*[J]. *Canadian Journal of Botany*, 1979, 57(5): 512-516. DOI: 10.1139/b79-066

- [3] TANAKA I, KITAZUME C, ITO M. The isolation and culture of lily pollen protoplasts[J]. *Plant Science*, 1987, 50(3): 205-211. DOI: 10.1016/0168-9452(87)90075-6
- [4] UEDA K, MIYAMOTO Y, TANAKA I. Fusion studies of pollen protoplasts and generative cell protoplasts in *Lilium longiflorum*[J]. *Plant Science*, 1990, 72(2): 259-266. DOI: 10.1016/0168-9452(90)90090-B
- [5] HORITA M, MOROHASHI H, KOMAI F. Production of fertile somatic hybrid plants between Oriental hybrid lily and *Lilium × formolongi*[J]. *Planta*, 2003, 217(4): 597-601. DOI: 10.1007/s00425-003-1020-9
- [6] 李炫岱,张琪,王英姿,等.‘白天堂’百合原生质体的分离纯化与培养[J]. *北京农学院学报*, 2023, 38(1): 76-81. DOI: 10.13473/j.cnki.issn.1002-3186.2023.0113
- LI W D, ZHANG Q, WANG Y Z, et al. Isolation, purification and culture of protoplast of *Lilium* ‘White Heaven’[J]. *Journal of Beijing University of Agriculture*, 2023, 38(1): 76-81. (in Chinese with English abstract)
- [7] 柳玉晶. 百合原生质体分离及培养的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2006.
- LIU Y J. Studies on protoplast isolation and culture of *Lilium* [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2006. (in Chinese with English abstract)
- [8] 秦晓杰,段华金,朱永平,等. 东方百合‘Sorbonne’原生质体培养初步研究[J]. *分子植物育种*, 2013, 11(5): 600-604. DOI: 10.3969/mpb.011.000600
- QIN X J, DUAN H J, ZHU Y P, et al. Preliminary study on protoplast culture of *Lilium* Oriental hybrids ‘Sorbonne’ [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2013, 11(5): 600-604. (in Chinese with English abstract)

- [9] 石雪珺,陈俊通,钟剑,等. 东方百合‘索邦’原生质体分离与纯化[M]//张启翔. 中国观赏园艺研究进展2018. 北京:中国林业出版社,2018:543–548.
SHI X J, CHEN J T, ZHONG J, et al. Isolation and purification of protoplasts of *Lilium* Oriental hybrids ‘Sorbonne’ [M]//ZHANG Q X. *Advances in Ornamental Horticulture of China (2018)*. Beijing: China Forestry Publishing House, 2018: 543–548. (in Chinese)
- [10] 徐是雄. 百合花粉原生质体中肌动蛋白微丝的荧光共聚焦观察[J]. 植物学报,1992,34(12):907–911.
XU S X. Confocal microscopic observations on actin filament distribution in lily pollen protoplasts[J]. *Acta Botanica Sinica*, 1992, 34(12): 907–911. (in Chinese with English abstract)
- [11] 孙晓梅,王晶,罗凤霞,等. ‘索蚌’百合原生质体分离及培养的研究[J]. 北方园艺,2007(10):170–172. DOI:10.3969/j.issn.1001-0009.2007.10.081
SUN X M, WANG J, LUO F X, et al. Isolation and culture of lily ‘Sorbonne’ protoplasts[J]. *Northern Horticulture*, 2007 (10): 170–172. (in Chinese with English abstract)
- [12] 王珺华. 山丹丹原生质体分离初探[D]. 延安:延安大学, 2020.
WANG J H. Study on protoplast isolation of *Lilium pumilum* DC. [D]. Yan'an: Yan'an University, 2020. (in Chinese with English abstract)
- [13] 张宁. 岷江百合原生质体的分离与培养[D]. 武汉:华中农业大学,2011.
ZHANG N. The protoplast isolation and culture of *Lilium regale* Wilson[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011. (in Chinese with English abstract)
- [14] CHAMANI E, TAHAMI S K, ZARE N, et al. Effect of different cellulase and pectinase enzyme treatments on protoplast isolation and viability in *Lilium ledebourii* Bioss[J]. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 2012, 40 (2): 123–128. DOI: 10.15835/nbha4028055
- [15] 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. DOI:10.13271/j.mpb.021.000620
- LI J Y, LIU L B, DING B, et al. Research progress on isolation and culture of plant protoplasts[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2023, 21(2): 620–632. (in Chinese with English abstract)
- [16] WEN F, SU W P, ZHENG H, et al. Plant regeneration via protoplast electrofusion in cassava[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2020, 19(3): 632–642. DOI: 10.1016/S2095–3119 (19)62711–5
- [17] REN R, GAO J, LU C Q, et al. Highly efficient protoplast isolation and transient expression system for functional characterization of flowering related genes in *Cymbidium* orchids [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21 (7): 2264. DOI: 10.3390/ijms21072264
- [18] 徐旋. 柑橘原生质体瞬时转化体系优化及利用 CRISPR/Cas9 技术定点突变山金柑基因[D]. 武汉:华中农业大学, 2018.
XU X. Optimization of citrus protoplast transient transformation system and using CRISPR/Cas9 genome editing system to modify gene in *Fortuella hindsii*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018. (in Chinese with English abstract)
- [19] ZHANG J, GAI M Z, LI X Y, et al. Somatic embryogenesis and direct as well as indirect organogenesis in *Lilium pumilum* DC. Fisch., an endangered ornamental and medicinal plant [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2016, 80(10): 1898–1906. DOI: 10.1080/09168451.2016.1194178
- [20] CHANG M M, LOESCHER W H. Effects of preconditioning and isolation conditions on potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Russet Burbank) protoplast yield for shoot regeneration and electroporation[J]. *Plant Science*, 1991, 73(1): 103–109. DOI: 10.1016/0168–9452(91)90131–Q
- [21] CROWDER A J, LANDGREN C R, ROCKWOOD L L. Cultivar differences in starch content and protoplast yields from root cortical explants of *Pisum sativum*[J]. *Physiologia Plantarum*, 1979, 46(2): 85–88. DOI: 10.1111/j.1399–3054.1979.tb06536.x