

植物原生质体培养技术在药用植物中的应用

吴登宇^a, 韦 体^a, 高丹丹^b, 臧荣鑫^b, 徐红伟^b, 郭鹏辉^{a*}

(西北民族大学 a. 生命科学与工程学院; b. 生物工程与技术国家民委重点实验室, 中国甘肃 兰州 730030)

摘要:我国是世界上使用和出口药用植物资源最多的国家, 到目前为止, 大多数中草药仍然依靠传统的大田栽培及野生资源的采挖等手段获取, 这些获取方法不仅生产周期长, 而且会导致部分特色植物资源因过度采挖而濒临灭绝, 造成药用植物的产量与其活性成分无法满足人们日益增长的需求。原生质体培养技术是利用植物细胞快速增殖的一种种质资源保护方法, 可以有效解决药用植物资源紧缺问题, 对于保护濒危野生植物资源、提高其利用效率具有重要的经济价值和参考价值。本综述从原生质体培养技术的原理、方法、在药用植物资源中的应用及其存在的问题等方面进行了阐述和分析, 旨在为药用植物资源可持续发展与高效开发利用提供理论参考。

关键词:药用植物; 原生质体培养; 原生质体分离; 开发利用

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2021)02-0176-07

Application of Plant Protoplast Culture in Medicinal Plants

WU Deng-yu^a, WEI Ti^a, GAO Dan-dan^b, ZANG Rong-xin^b, XU Hong-wei^b,
GUO Peng-hui^{a*}

(a. *Life Science and Engineering College*; b. *The Key Bio-engineering and Technology Laboratory of Nationality Commission, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, Gansu, China*)

Abstract: Medicinal plant resources are widely used in China and are exported abroad. So far, most Chinese herbal medicines are still obtained by traditional field cultivation and wild resource exploitation. These methods not only require a long production cycle, but also lead to extinction of some characteristic plants due to over-excavation, resulting in short supply of these raw materials and their active ingredients. Plant protoplast technology is a method of plant resource protection, using rapid proliferation of plant cells. It can effectively solve the shortage of medicinal plant resources and improve their utilization efficiency, therefore it has important economic and reference values for endangered wild plants. Herein, principles and methods of protoplast culture and its application in medicinal plant resources are reviewed. The problems and other aspects of this technology are also described and analyzed for sustainable and efficient development and utilization of these useful resources.

Key words: medicinal plants; protoplast culture; protoplast isolation; development and utilization

(*Life Science Research*, 2021, 25(2): 176~182)

据统计, 我国中药种植面积达 $3\ 335 \times 10^7$ m², 2015 年我国中药工业产值已达 7 867 亿元, 且以每年超过 20% 的速度在快速增长^[1]。药用植物产

生的次生代谢产物具有良好的药用及保健价值, 深受人们的喜爱, 如黄花蒿中的青蒿素、红豆杉中的紫杉醇及人参中的人参皂苷等, 这些代谢产

收稿日期: 2020-04-16; 修回日期: 2020-06-23

基金项目: 西北民族大学中央高校基本科研业务费-创新团队培育项目(31920190019); 西北民族大学 2019 年度中央高校基本科研业务费项目-武陵山片区科技扶贫与技术开发专项(31920190202-03); 西北民族大学本科生创新科研项目(XBMU-BYL19126); 西北民族大学 2020 年度实验室开放项目(SYSKF-2020101)

作者简介: 吴登宇(1998—), 女, 黑龙江鹤岗人, 学生; 吴登宇和韦体对本文的贡献相同, 为本文共同第一作者; * 通信作者: 郭鹏辉(1981—), 男, 甘肃宁县人, 博士, 副教授, 主要从事特色植物资源开发与利用研究, E-mail: xbmusky@163.com。

物在疾病治疗与保健等方面发挥着至关重要的作用^[2]。然而,自然条件下药用植物产生的天然次生代谢产物产量极低,无法满足人们日益增长的需求,导致许多药用植物被过度采伐,甚至濒临灭绝。因此,如何采取科学有效的措施使药用植物资源得到保护的同时实现合理的、可持续的综合开发利用便显得尤为重要。

植物原生质体是指去除细胞壁后被质膜所包围的、具有生命力和全能性的裸露细胞,其结构包括细胞膜、细胞质(包括各种细胞器、细胞骨架系统及胞基质)和细胞核等部分^[3]。目前,植物原生质体再生培养及悬浮培养等技术手段已应用到蔷薇科、紫草科、玄参科等数十个科种中,其应用潜力巨大、技术成熟。相较于其他模式植物与作物而言,药用植物在细胞瞬时转化、细胞融合、信号转导、亚细胞定位及中药品质形成分子机制解析等方面的研究还不够深入,技术体系还不够完善。因此,进一步对药用植物原生质体开展再生培养、相关功能基因解析及代谢产物合成机制研究等具有重要意义。同时,随着基因工程技术的发展,药用植物原生质体在 CRISPR/Cas9 技术中也将得到进一步的应用和发展。

本文以原生质体分离、培养、纯化等理论为基础,系统阐述了该技术在药用植物中的应用和发展前景,以期为特色药用植物资源的保护和综合利用提供新的研究思路与理论支持。

1 药用植物原生质体分离及培养方法

1.1 原生质体分离方法

原生质体的分离是原生质体培养及后续研究的关键步骤,其原材料一般以组织细胞较多、活力强及取材容易的幼嫩植物叶片为主,其分离方法主要有机械法和酶解法两种。1892年 Klercher 首次通过机械法获得了原生质体,但此法所获得的原生质体存在产量低且获取困难的缺陷;直到1960年 Cocking 通过酶解法从西红柿的根尖部位分离出大量的原生质体,原生质体的研究才进入了一个新的阶段^[4]。采用酶解法进行原生质体分离时,目前广泛应用的酶有纤维素酶(cellulase)、半纤维素酶(hemicellulase)、果胶酶(pectinase)、离析酶(maceroyzyme)、蜗牛酶(snailase)及崩溃酶(driselase)等^[5]。从近几年的研究来看,其中较为常用的酶是纤维素酶 R-10、果胶酶 Y-23 及离析酶 R-10 等。2019年,王梦茹等^[6]采用 2% 纤维素酶 R-10+

0.5% 果胶酶 Y-23+0.3% 离析酶 R-10 组合对矮牵牛愈伤组织进行了原生质体的分离;2020年,姜倩倩等^[7]利用 1% 纤维素酶 R-10+0.3% 离析酶 R-10 对多年生黑麦草进行了原生质体制备,并成功构建了瞬时转化体系。这些酶在进行原生质体制备时发挥着不同的作用,其中纤维素酶与果胶酶起主要作用,纤维素酶水解细胞壁中的纤维素,果胶酶则促进细胞间隙中果胶质的分解,而其他酶类主要对这两种酶起到辅助作用^[8]。有研究表明,纤维素酶 RS 的分离效果比纤维素酶 R-10 好,但纤维素酶 RS 的价格远高于纤维素酶 R-10,因此多数研究仍主要采用纤维素酶 R-10 进行原生质体的分离^[8]。

采用酶解法对原生质体进行分离时,除了酶的种类对分离结果产生影响外,酶解浓度、酶解时间及渗透压稳定剂等分离条件的选择均对分离结果有较大的影响。酶解液的浓度过高容易导致原生质体被酶降解,浓度过低则导致原生质体分离不彻底,这两个因素都会导致原生质体产量低下^[9]。酶解时间对原生质体的产量及活力也存在重大影响,时间不足导致酶解不充分,影响原生质体的产量,酶解时间过长则直接影响原生质体活力,甚至破坏原生质体的完整性^[10]。同时,失去细胞壁保护的原生质体对渗透压稳定剂也特别敏感,原生质体与外界渗透压不能维持等渗状态,易发生皱缩或者破裂,常用的等渗溶剂有 KCl、NaCl、蔗糖及甘露醇等^[10]。

1.2 原生质体纯化

在获取原生质体的酶解过程中,酶解作用会产生很多组织残渣(如细胞碎片、破碎的原生质体)及残留酶液等,这些残留物的存在会给原生质体的生理状态造成不良影响,因此酶解时间结束后需要进行原生质体纯化。原生质体纯化的方法主要有漂浮法和沉淀法。漂浮法是利用高渗蔗糖溶液比重大于原生质体比重的原理,使原生质体在离心的过程中漂浮在液面上层,而组织残渣等沉淀于离心管底部,这种方法获得的原生质体的完整度与纯度比较高,但是数量较少^[11]。沉淀法是通过特定的细胞过滤筛将组织残渣等过滤去除,再利用比重原理,在一定的渗透压溶液中将原生质体沉淀至离心管底部,这种方法在离心振荡过程中会对原生质体造成一定的伤害,但获得的原生质体数量较多。

1.3 原生质体培养

药用植物原生质体的培养常采用 MS、B5、

KM8p 等改良培养基^[12-13]。其中, MS 培养基因含有较高浓度的 NH_4^+ 而对原生质体具有一定的毒害作用, 会直接影响原生质体的生长^[14]; B5 培养基是专门为大豆组织培养设计的, 其主要特点是含有高钾盐、高硝酸盐以及低铵盐等成分^[15]。马锋旺等^[16]在对山桃原生质体培养的过程中发现, 高浓度的 NH_4^+ 会抑制原生质体的分化, 影响原生质体的生长分裂。而 KM8p 培养基中含有丰富的有机营养物质, 如有机酸、氨基酸、维生素和椰乳等, 对原生质体的分裂及细胞壁的形成具有一定促进作用^[17], 蒋友燊等^[18]以 KM8p+0.20 mg/L 2,4-D+0.50 mg/L 6-BA+100.00 mg/L 水解酪蛋白+1.00%蔗糖+0.40 mol/L 甘露醇为培养基, 对百脉根原生质体进行了再生壁研究, 成功测定了原生质体再生壁纤维素的含量, 因此 KM8p 可作为百脉根原生质体分离与培养的培养基进行改良和利用。在原生质体培养过程中, 植物激素作为不可或缺的一部分, 主要通过调节植物细胞的生理反应影响细胞的生长与分化。目前研究较为深入的植物激素主要包括生长素(auxin)、细胞分裂素(cytokinin)、赤霉素(gibberellin, GA)、脱落酸(abscisic acid, ABA)、乙烯(ethylene)等^[19], 其中生长素和细胞分裂素在植物组织培养过程中被广泛使用, 其主要的天然成分分别是吲哚乙酸(indole acetic acid, IAA)和玉米素(zeatin, ZT)。由于这两种天然成分稳定性差, 为提高其稳定性, 人们通过人工合成法相继合成了 6-苄基腺嘌呤(6-benzylaminopurine, 6-BA)及 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)等植物生长调节剂。表 1 对组织培养过程中常用植物生长调节剂的来源及稳定性进行了整理。

关于药用植物原生质体的培养方法, 目前有很多种, 但具体方法的选择应因材料而异。常用的培养方法主要有液体浅层培养(culture in shallow liquid medium)、固-液双层培养(liquid-solid culture)、琼脂糖包埋(agarose bead culture)及看护培

养(nurse culture)等。范小峰等^[20]采用液体浅层培养、固-液双层培养、琼脂糖包埋等方法对南蛇藤的原生质体进行了培养和比较, 发现液体浅层培养法对南蛇藤原生质体的培养效果较为理想。在此之前, 李乐工^[21]也采用液体浅层培养法对人参的原生质体进行了培养, 并成功获得人参愈伤组织。另有研究报道, 芸薹属植物的原生质体培养大多采用液体浅层培养法和固-液双层培养法, 很少采用看护培养法^[11]。

2 原生质体培养技术在药用植物中的应用

2.1 在药用植物快速繁殖中的应用

目前, 我国将原生质体培养技术运用于药用植物培养并获得成功的主要有前胡(*Peucedanum praeruptorum* Dunn)、防风(*Saposhnikovia divaricata* (Trucz.) Schischk.)、党参(*Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf.)、石刁柏(*Asparagus officinalis* L.)、枸杞(*Lycium barbarum* L.)及红景天(*Rhodiola rosea* L.)等。原生质体主要通过 3 种途径进行植株再生: 一是由原生质体分化形成愈伤组织, 再继续分化成植株; 二是由原生质体分化成胚状体, 再发育成植株; 三是由原生质体分化形成愈伤组织, 愈伤组织再分化成胚状体, 最终发育成植株。王济玫等^[22]利用前胡幼苗切段诱导导出愈伤组织, 经细胞悬浮培养后获得大量具有胚性的细胞团, 再经酶解分离得到大量原生质体, 原生质体经液体浅层培养后移接至 MS 固体培养基上进行培养, 最终获得完整植株。李继胜等^[23]从党参下胚轴愈伤组织中分离出原生质体, 经液体浅层培养获得胚状体并发育成完整植株。刘剑锋等^[24]通过组织培养获得了红景天组培苗叶, 将组培苗叶进行酶解处理得到了红景天原生质体, 原生质体经浅层培养后获得了愈伤组织, 愈伤组织分化形成不定芽, 继而发育形成完整植株。表 2 对其他一些经原生质体培养获得再生植株的物种^[25-30]进行了概括。

表 1 药用植物再生体系建立常用植物生长调节剂

Table 1 Commonly used plant growth regulators for establishment of medicinal plant regeneration system

Name	Action	Source	Stability
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D	Callus induction	Artificial synthesis	Yes
1-Naphthylacetic acid, NAA	Embryogenic callus induction	Artificial synthesis	Yes
1H-indole-3-butanoic acid, IBA	Root induction	Natural hormones	Yes
Indole-3-acetic acid, IAA	Callus and root induction	Natural hormones and artificial synthesis	No
6-Benzylaminopurine, 6-BA	Promote cell division and callus induction	Artificial synthesis	Yes
Kinetin, KT	Promote cell division	Natural hormones	Yes
Zeatin, ZT	Promote callus germination	Natural hormones	No

表 2 药用植物原生质体培养概况
Table 2 An overview of protoplast culture of medicinal plants

Plant	Protoplast source	Culture result	Reference
<i>Panax quinquefolius</i> L.	Anther culture	Plant regeneration	[25]
<i>Pinellia cordata</i> N. E. Brown	Leaf culture	Plant regeneration	[26]
<i>Datura innoxia</i> Mill.	Leaf culture and callus culture	Plant regeneration	[27]
<i>Solanum dulcamara</i> L.	Suspension cells	Plant regeneration	[28]
<i>Solanum khasianum</i> C. B. Clarke	Hypocotyl and leaf	Plant regeneration	[29]
<i>Solanum nigrum</i> L.	Leaf	Plant regeneration	[30]

随着植物组培技术的发展,植物原生质体的研究工作越来越受到重视,其相关研究在国内外不断开展并取得了巨大成就,主要体现在越来越多的植物种类通过原生质体实现了植株再生,突破了常规育种的限制。因此,深入研究如何利用该技术加快育种进程、解决药用植物组培快繁难等问题,对药用植物品种改良和种质资源保护具有重要意义。

2.2 在有效成分分离提取方面的应用

目前,全世界约有千余种植物可通过细胞悬浮培养产生次生代谢产物。药用植物细胞悬浮培养产生的天然产物可应用于药品、香料、色素、食品、化妆品等产品的开发。原生质体培养技术在药用植物有效成分提取方面具有很高的应用价值,很多药用植物的原生质体已完成了实验室阶段的研究,走向了大规模生产阶段,如人参(*Panax ginseng* C. A. Meyer)、红豆杉(*Taxus wallichiana* var. *chinensis* (Pilg.) Florin)、紫草(*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.)、黄芪(*Astragalus propinquus* Schischkin)等。

紫杉醇作为目前较为有效的抗癌药物,被广泛应用于各类癌症治疗,如卵巢癌、乳腺癌、肺癌等,其生产方式主要有化学合成法、半合成法、人工种植栽培法及细胞培养法,在这些方法中细胞培养法是最具有潜力的方法。该法首先以红豆杉为原材料进行其愈伤组织的诱导和驯化,并筛选出适合于植物细胞培养的细胞株,然后进行细胞悬浮培养生产紫杉醇,目前其生产已完全实现工业化,质量浓度在 100 mg/L 以上^[31]。紫草素为萘醌类化合物,具有抗炎、降胆固醇及抗肿瘤等作用,1983 年日本率先成功地进行了紫草宁衍生物的工业化生产^[32]。人参皂苷是从人参细胞中分离出的三萜类化合物,具有抗疲劳、提高记忆力、增强免疫等功效。研究表明,通过人参愈伤组织诱导并采用 13 万 L 发酵罐进行细胞发酵培养,已能够基本满足人们对于人参药用有效成分的需求^[33]。

2.3 在膜侵染方面的应用

由于酶解液的作用,原生质体失去细胞壁的保护,更利于接受外源基因,也更易于进行细胞融合等操作。原生质体不仅可以用于研究植株再生、悬浮培养生产次生代谢产物,同时还是开展病毒侵染机理、膜转运及融合等基础研究的理想材料。陈雅寒等^[34]以抗烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)活性为指标,对马蓝、玉簪、鸦胆子等 13 种常见中草药进行了抗病毒活性筛选,结果显示被 TMV 侵染的烟草原生质体在加入 0.5 μg/mL 马蓝醇提取物后仍可以维持细胞完整性。

2.4 在原生质体融合方面的应用

自 1972 年 Carlson 将原生质体融合技术应用于烟草体细胞并获得第 1 株杂种植株后,该技术便开始被广泛应用于药用植物的原生质体融合^[35],例如:霍丽云等^[36]将紫外线照射后的柴胡原生质体与石防风原生质体进行融合,得到了 34 个杂种细胞系;江莉^[37]利用原生质体融合技术成功实现了獐牙菜与柴胡的体细胞远缘杂交,且研究表明,獐牙菜与柴胡的遗传物质在杂交植株中均有表达。原生质体融合技术不仅克服了种间不亲和的缺点,还能高效地将外源遗传物质成功导入受体细胞,为物种改良、遗传育种提供了重要理论基础^[38-39]。虽然原生质体间可以自发融合,但频率很低,聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)诱导法是目前在植物中诱导原生质体融合最广泛的方法,具有诱导融合频率高、无种属特异性要求、不需要特殊的仪器、操作简单等特点。彭章等^[40]以酶解法分离出茶树原生质体,通过 40% PEG-6000 诱导融合,其融合率达 10%。目前,介导原生质体融合的方法不仅有 PEG 法,还有硝酸钠法、高浓度 Ca²⁺高 pH 值法、电融合法及聚集微束激光法等。

2.5 在分子细胞生物学研究中的应用

植物原生质体瞬时转化体系是研究基因功能与亚细胞定位的快速途径,转化方法包含 PEG 转化法、电击转化法及显微注射法等^[41]。通过遗传转

化法分析药用植物有效成分相关合成基因的功能, 不仅可为药用植物的遗传改良提供有效的基因资源, 也可为药用植物的产业发展提供有利途径。胡添源等^[42]对药用植物雷公藤进行了原生质体分离, 并通过 PEG 转化法成功构建了其遗传转化体系, 为雷公藤基因编辑及合成生物学研究奠定了基础。Patra 等^[43]利用电击转化法对长春花叶肉原生质体中参与茉莉酸代谢和长春碱代谢相关的转录因子进行了瞬时转化, 并通过 qRT-PCR 对各个转录子的表达情况进行了检测。

在植物原生质体培养过程中, 受到外界环境及培养条件的影响, 细胞在生长过程中有时会出现突变体。由于自发变异程度低, 人们可通过物理、化学及生物等处理手段定向诱导细胞发生变异, 得到变异基因型细胞, 从而为植物新品种的选育提供更多的选择。相关研究报道, 莴苣原生质体在诱导形成再生植株的过程中发生了变异, 再生植株呈现不同的性状表型, 如有的长势好; 有的成熟期不同; 有的育性降低等^[44]。

2.6 在中药品质形成分子机制中的应用

目前, 药用植物原生质体的研究主要集中于原生质体的分离获取、瞬时转化等方面, 在中药品质形成分子机制方面的研究还有很大的空间, 而中药品质形成分子机制解析是中药资源研究中的重点和难点^[45]。上述细胞融合、细胞瞬时转化及原生质体再生等研究的不断深入, 可为中药品质形成分子机制的探究提供理论依据。

张改娜等^[46]以秦艽愈伤组织为材料制备原生质体, 构建了高效、稳定的培养体系, 为秦艽细胞规模化培养及秦艽的品质改良工作奠定了基础。此外, Ren 等^[47]对中药红花进行了原生质体分离研究, 构建了原生质体的转化体系, 并解析了红花中有效成分类黄酮在合成过程中的一些功能基因启动子的活性, 为其后续品质形成分子机制研究奠定了理论基础。

3 存在的问题

自原生质体培养技术应用于植物研究以来, 其在植物细胞融合、天然产物提取、蛋白质互作等方面取得了很重要的进展^[48], 同时也存在很多问题。将原生质体培养技术应用于诸多药用植物当中, 只有少数药用植物成功构建了再生体系, 如人参、红景天等, 大部分药用植物的原生质体分离及培养存在较大困难, 导致该方面研究很难有重

大突破, 尤其是近年来, 人们对在植物中构建稳定的原生质体分离及培养体系不够重视, 致使该技术无法在中药中进行规模化应用。另外, 虽然利用原生质体培养获取药用植物次生代谢产物在药用植物资源利用上具有良好的优势, 但是目前只有少量药用植物达到大规模生产的程度, 主要原因在于其培养成本高于大田培养, 且产物不稳定、不能进行商品化, 其次是植物原生质体分裂繁殖能力远低于微生物, 且由于其特殊性, 不能完全适应生物反应器培养。因此, 应从实际出发, 将原生质体培养技术与其他前沿生物技术(如基因编辑)结合应用于难以进行人工培育且野生资源短缺的药用植物, 在保护其种质资源的同时, 对其次生代谢产物进行充分利用, 满足人们的需求。

4 展望

药用植物是天然药物的重要来源, 也是我国中医药事业发展的基础, 目前其研究工作主要集中在有效成分分析和药理作用探讨等方面, 但在药材品质控制、特色濒危植物保护、人工组培快繁体系构建以及次生代谢产物规模化生产等方面的研究起步较晚, 尤其是通过植物组培技术对药用植物进行人工驯化、选育以及次生代谢产物的规模化生产方面仍然存在着许多亟待解决的科学问题。首先, 在药用植物优质高产品种的人工驯化和选育方面, 其木质化程度往往较为严重, 导致组培苗在培养过程中发生褐化或者玻璃化而难以成活; 其次, 受到生长环境和技术条件的限制, 许多药用植物的天然有效活性成分的合成途径与调控机制仍不清楚, 极大地制约了药用植物资源的进一步开发利用与可持续发展。原生质体培养技术具有生长速度快、培养条件易于控制的典型特征, 不仅克服了传统药用植物在种植栽培过程中对环境条件的过度依赖, 而且在基因功能研究和天然活性成分生产方面也有着巨大的应用潜力, 但针对药用植物原生质体培养过程中的次生代谢产物不稳定、成本高且技术操作难度高等问题, 还需进一步研究和探讨。

参考文献(References):

- [1] 谢蕾, 张羽师, 李卫东. 药用植物非药用部位开发利用现状与展望[J]. 中药材(XIE Lei, ZHANG Yu-shi, LI Wei-dong. Current situation and prospect of development and utilization of non-medicinal parts of medicinal plants[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials), 2019, 42(2): 470-473.

- [2] 朱智慧, 晁二昆, 钱广涛, 等. 药用植物毛状根研究体系及应用方向[J]. 中国现代中药(ZHU Zhi-hui, CHAO Er-kun, QIAN Guang-tao, et al. Hairy root system and its application in medicinal plants[J]. Modern Chinese Medicine), 2019, 21(11): 1475-1481, 1496.
- [3] 王欢, 何彦峰, 刁洋, 等. 刺槐愈伤组织原生质体的分离和PEG融合[J]. 东北林业大学学报(WANG Huan, HE Yan-feng, XI Yang, et al. Protoplast isolation and fusion induced by PEG with callus of *Robinia pseudoacacia* L.[J]. Journal of Northeast Forestry University), 2014(10): 28-33, 37.
- [4] 许智宏, 张宪省, 苏英华, 等. 植物细胞全能性和再生[J]. 中国科学: 生命科学(XU Zhi-hong, ZHANG Xian-sheng, SU Ying-hua, et al. Plant cell totipotency and regeneration[J]. Scientia Sinica (Vitae), 2019, 49(10): 1282-1300.
- [5] 张良波, 李培旺, 黄振, 等. 木本植物原生质体制备体系的研究进展[J]. 中南林业科技大学学报(ZHANG Liang-bo, LI Pei-wang, HUANG Zhen, et al. Advances in preparation system of woody plants protoplast[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology), 2011, 31(8): 102-107.
- [6] 王梦茹, 曾丽, 张邀月, 等. 矮牵牛愈伤组织诱导及原生质体的分离与纯化[J]. 上海交通大学学报(农业科学版) (WANG Meng-ru, ZENG Li, ZHANG Yao-yue, et al. Study on callus induction and protoplast isolation of *Petunia hybrida*[J]. Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science)), 2019, 37(6): 195-200.
- [7] 姜倩倩, 陈磊, 李正男, 等. 多年生黑麦草原生质体制备及瞬时表达体系的建立[J/OL]. 分子植物育种(JIANG Qian-qian, CHEN Lei, LI Zheng-nan, et al. Protoplast isolation and establishment of gene transient expression system in *Lolium perenne* L.[J/OL]. Molecular Plant Breeding), 2020. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20200417.1503.006.html>.
- [8] ZHANG Y, SU J B, DUAN S, et al. A highly efficient rice green tissue protoplast system for transient gene expression and studying light/chloroplast-related processes[J]. Plant Methods, 2011, 7: 30.
- [9] 刘欣, 张金铭, 李军乔, 等. 蕨麻愈伤组织原生质体制备条件的优化[J]. 西北植物学报(LIU Xin, ZHANG Jin-ming, LI Jun-qiao, et al. Preparation and optimization of callus protoplast of *Potentilla anserina*[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica), 2017, 37(8): 1664-1671.
- [10] 张钟仁, 陈鹏. 苦荞叶肉细胞原生质体的分离纯化及瞬时转化[J]. 西北植物学报(ZHANG Zhong-ren, CHEN Peng. Isolation, purification and transient expression of mesophyll protoplast in tartary buckwheat[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica), 2016, 36(1): 183-189.
- [11] 张芬, 郑爱红, 肖楠, 等. 芸薹属植物原生质体培养研究进展[J]. 分子植物育种(ZHANG Fen, ZHENG Ai-hong, XIAO Nan, et al. Progress of protoplast culture research on *Brassica* species[J]. Molecular Plant Breeding), 2018, 16(2): 546-551.
- [12] 姜淑慧, 管荣展, 董海滨, 等. 播娘蒿愈伤组织原生质体培养体系的研究[J]. 草业学报(JIANG Shu-hui, GUAN Rong-zhan, DONG Hai-bin, et al. Studies on protoplast culture of *Descurainia sophia* calli[J]. Acta Prataculturae Sinica), 2006, 15(4): 94-98.
- [13] 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(QIN Xiao-jie, DUAN Hua-jin, ZHU Yong-ping, et al. Preliminary study on protoplast culture of *Lilium oriental* hybrids ‘Sorbonne’[J]. Molecular Plant Breeding), 2013, 11(5): 600-604.
- [14] 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(PENG Shao-feng, LU Jia, CHEN Yong-zhong, et al. Research progress of protoplast culture in woody plants[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin), 2013, 29(1): 1-6.
- [15] 刘德承. 辣木组培三种培养基及抑菌剂的初步研究[D]. 南宁: 广西大学(LIU De-cheng. Preliminary Study on Three Kinds of Culture Medium and Bacteriostatic Agent in Tissue Culture of *Moringa oleifera*[D]. Nanning: Guangxi University), 2018.
- [16] 马锋旺, 李嘉瑞. 山桃原生质体培养再生愈伤组织[J]. 西北农业学报(MA Feng-wang, LI Jia-rui. Callus formation from cultured protoplasts of *Prunus davidiana*[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica), 1999, 8(3): 73-76.
- [17] 何业华, 胡芳名, 谢碧霞, 等. 枣树原生质体培养及其植株再生[J]. 中南林学院学报(HE Ye-hua, HU Fang-ming, XIE Bi-xia, et al. Protoplast culture of *Zizyphus jujube* and plant individual regeneration[J]. Journal of Central South Forestry College), 1999(3): 29-31, 47.
- [18] 蒋友燊, 宋莉, 赵德刚. 百脉根原生质体制备酶解液优化及再生壁纤维素含量分析[J]. 分子植物育种(JIANG You-shen, SONG Li, ZHAO De-gang. Enzyme optimization for protoplast isolation and cellulose analysis of regenerated cell-wall in *Lotus corniculatus*[J]. Molecular Plant Breeding), 2017, 15(6): 2274-2277.
- [19] 黎家, 李传友. 新中国成立70年来植物激素研究进展[J]. 中国科学: 生命科学(LI Jia, LI Chuan-you. Seventy-year major research progress in plant hormones by Chinese scholars[J]. Scientia Sinica (Vitae), 2019, 49(10): 1227-1281.
- [20] 范小峰, 李东波, 刘灵霞, 等. 南蛇藤原生质体培养及植株再生[J]. 植物研究(FAN Xiao-feng, LI Dong-bo, LIU Ling-xia, et al. Protoplast culture and plant regeneration of *Celastrus orbiculatus* Thunb.[J]. Bulletin of Botanical Research), 2011, 31(3): 300-305.
- [21] 李乐工. 人参原生质体培养再生愈伤组织[J]. 植物学报(英文版) (LI Le-gong. Callus regeneration from protoplasts of *Panax ginseng*[J]. Journal of Integrative Plant Biology), 1989, 31(10): 815-816.
- [22] 王济玫, 陈惠民. 前胡原生质体再生植株[J]. 植物学报(英文版) (WANG Ji-mei, CHEN Hui-min. Plant regeneration from protoplast of *Peucedanum praeruptorum* Dunn[J]. Journal of Integrative Plant Biology), 1991, 33(4): 261-266.
- [23] 李继胜, 贾敬芬. 党参原生质体再生植株[J]. 植物学报(英文版) (LI Ji-sheng, JIA Jing-fen. Plant regeneration from callus protoplasts of *Codonopsis pilosula*[J]. Journal of Integrative Plant Biology), 1993, 35(11): 864-867.
- [24] 刘剑锋, 程云清, 陈智文. 高山红景天叶肉原生质体分离培养与植株再生[J]. 中草药(LIU Jian-feng, CHENG Yun-qing, CHEN Zhi-wen. Protoplast isolation and plant regeneration from leaves of *Rhodiola sachalinensis*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs), 2009, 40(7): 1127-1131.

- [25] 尹红新. 西洋参花药及原生质体培养研究[D]. 北京: 中国农业科学院(YIN Hong-xin. Research on Anther and Protoplast Culture of *Panax quinquefolius* L.[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences), 2015.
- [26] 杨仙, 马丹丹, 蒋福升, 等. 滴水珠原生质体的分离纯化与植株再生[J]. 中国中药杂志(YANG Xian, MA Dan-dan, JIANG Fu-sheng, et al. Protoplasts isolation, purification and plant regeneration of *Pinellia cordata*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica), 2014, 39(21): 4211-4215.
- [27] SCHIEDER O. Regeneration von haploiden und diploiden *Datura innoxia* Mill. mesophyll-protoplasten zu pflanzen[J]. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 1975, 76(5): 462-466.
- [28] CHAND P K, DAVEY M R, POWER J B. Efficient plant regeneration from cell suspension protoplasts of the woody medicinal plant *Solanum dulcamara* L. (bittersweet, woody nightshade)[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1990, 22: 119-125.
- [29] KOWALCZYK T P, MACKENZIE I A, COCKING E C. Plant regeneration from organ explants and protoplasts of the medicinal plant *Solanum khasianum* C. B. Clarke var. *chatterjeeanum* Sengupta (syn. *Solanum viarum* Dunal)[J]. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 1983, 111(1): 55-68.
- [30] 王光远, 夏镇澳. 从龙葵叶肉细胞原生质体再生植株[J]. 植物学报(英文版)(WANG Guang-yuan, XIA Zhen-ao. Regeneration of plantlets from *Solanum nigrum* L. mesophyll protoplasts[J]. Journal of Integrative Plant Biology), 1983, 25(2): 111-114, 202.
- [31] 李永成. 东北红豆杉悬浮细胞与内生真菌在紫杉醇合成中相互关系的研究[D]. 无锡: 江南大学(LI Yong-cheng. Studies on the Interactions of *Taxus cuspidata* Suspension Cells and Endophytic Fungi during Paclitaxel Synthesis[D]. Wuxi: Jiangnan University), 2009.
- [32] 宁文, 曹日强. 硬紫草细胞悬浮培养和紫草宁及其衍生物的形成[J]. 生物工程学报(NING Wen, CAO Ri-qiang. Lithospermum erythrorhizon cell suspension culture and shikonin derivatives formation[J]. Chinese Journal of Biotechnology), 1994, 10(1): 76-80.
- [33] 丁家宜, 耿惠兴, 张恩汉. 人参茎愈伤组织的细胞悬浮培养[J]. 南京药学院学报(DING Jia-yi, GENG Hui-xing, ZHANG En-han. Suspension culture of stem callus cells of *Panax ginseng*[J]. Journal of Nanjing College of Pharmacy), 1981(2): 61-67.
- [34] 陈雅寒, 汝冰璐, 翟颖妍, 等. 抑制烟草花叶病毒(TMV)植物提取物的筛选[J]. 植物保护学报(CHEN Ya-han, RU Bing-lu, ZHAI Ying-yan, et al. Screening and inhibitory effects of plant extracts against tobacco mosaic virus (TMV)[J]. Acta Phytologica Sinica), 2018, 45(3): 463-469.
- [35] 刘继红, 邓秀新. 植物原生质体非对称融合及其在育种上的应用[J]. 生命科学(LIU Ji-hong, DENG Xiu-xin. Asymmetric plant protoplast fusion and its application in breeding[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences), 1999, 11(Suppl. 1): 88-91.
- [36] 霍丽云, 向风宁, 夏光敏. 药用植物石防风与柴胡不对称体细胞杂交的初步研究[J]. 山东大学学报(自然科学版)(HUO Li-yun, XIANG Feng-ning, XIA Guang-min. Asymmetric somatic hybridization between *Peucedanum terebinthaceum* Fisch and *Bupleurum scorzoniferifolium* Willd[J]. Journal of Shandong University (Natural Science Edition)), 2000, 35(4): 464-468.
- [37] 江莉. 高寒藏药材——四数獐牙菜体细胞杂交及其药效成分转移的研究[D]. 济南: 山东大学(JIANG Li. Study on the Somatic Hybridization of *Swertia tetraptera* and Transfer of Its Efficacious Composition[D]. Jinan: Shandong University), 2006.
- [38] 徐文锦, 刘湘, 宁勇. 植物原生质体融合技术的研究进展[J]. 湖北中医学院学报(XU Wen-jin, LIU Xiang, NING Yong. Research progress of protoplast fusion in plants[J]. Journal of Hubei College of Traditional Chinese Medicine), 2008, 10(1): 46-48.
- [39] RASMUSSEN J O, RASMUSSEN O S. PEG mediated DNA uptake and transient GUS expression in carrot, rapeseed and soybean protoplasts[J]. Plant Science, 1993, 89(2): 199-207.
- [40] 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(PENG Zhang, TONG Hua-rong, LIANG Guo-lu, 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.
- [41] 刘鑫, 魏学宁, 张学文, 等. 小麦原生质体高效转化体系的建立[J]. 植物遗传资源学报(LIU Xin, WEI Xue-ning, ZHANG Xue-wen, et al. Establishment of a highly-efficient transformation system of wheat protoplasts[J]. Journal of Plant Genetic Resources), 2017, 18(1): 117-124.
- [42] 胡添源, 王睿, 陈上, 等. 雷公藤悬浮细胞原生质体的制备及瞬时转化体系的建立[J]. 植物学报(HU Tian-yuan, WANG Rui, CHEN Shang, et al. Protoplast isolation and establishment of transient expression system of *Tripterygium wilfordii* suspension culture cells[J]. Chinese Bulletin of Botany), 2017, 52(6): 774-782.
- [43] PATRA B, PATTANAIK S, SCHLUTTENHOFER C, et al. A network of jasmonate-responsive bHLH factors modulate monoterpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*[J]. New Phytologist, 2018, 217(4): 1566-1581.
- [44] 刘继红, 徐小勇, 邓秀新. 原生质体再生植株变异及其在植物育种上的应用[J]. 华中农业大学学报(LIU Ji-hong, XU Xiao-yong, DENG Xiu-xin. Variation of protoplast-derived plants and its application to plant breeding[J]. Journal of Huazhong Agricultural University), 2003, 22(3): 301-306.
- [45] 陈江, 王洁, 吴清华, 等. 原生质体及其在中药品质形成分子机制中的应用[J]. 中国中药杂志(CHEN Jiang, WANG Jie, WU Jing-hua, et al. Protoplast and its application in molecular mechanism of quality formation of traditional Chinese medicine[J]. China Journal of Chinese Materia Medica), 2020, 45(19): 4555-4560.
- [46] 张改娜, 史国安, 侯典云. 秦艽的原生质体培养[J]. 江苏农业科学(ZHANG Gai-na, SHI Guo-an, HOU Dian-yun. Protoplast culture of *Gentiana macrophylla* Pall.[J]. Jiangsu Agricultural Sciences), 2018, 46(17): 32-34.
- [47] REN C X, TANG X H, CHEN J, et al. Cloning and analysis of promoter regions of flavonoid biosynthesis genes in safflower[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2018, 36(2): 239-246.
- [48] 常胜合, 孙威, 许桂莺, 等. 植物原生质体分离方法及其应用研究进展[J]. 分子植物育种(CHANG Sheng-he, SUN Wei, XU Gui-ying, et al. Isolating method of plant protoplast and its research advances of application[J]. Molecular Plant Breeding), 2018, 16(4): 1271-1277.