

• 综 述 •

药用植物原生质体的研究进展

谢小瑜^{1,2}, 李翠², 雷明², 张占江^{1,2*}

1. 广西医科大学药学院, 广西 南宁 530021

2. 广西壮族自治区药用植物园/国家中医药传承创新中心/广西药用资源保护与遗传改良重点实验室/广西壮族自治区中药资源智慧创制工程研究中心, 广西 南宁 530023

摘要: 近年来, 原生质体技术在植物遗传转化、育种及植株再生领域应用广泛, 模式植物(如烟草、拟南芥)的相关研究已较为深入, 牧草、水稻、番茄等作物的应用亦趋成熟。随着经济的发展与人们对健康需求的不断提升, 药用植物市场需求持续增长, 但其育种与遗传转化研究尚显不足, 而原生质体技术恰可为此提供新路径。通过聚焦药用植物原生质体的分离制备技术与应用场景, 综述其研究现状与挑战, 为药用植物原生质体在遗传转化、品种改良及植株再生等方向的深入研究提供参考。

关键词: 药用植物; 原生质体; 分离; 瞬时转化; 再生植株; 基因编辑

中图分类号: R282 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)02-0675-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.02.026

Research progress on protoplasts in medicinal plants

XIE Xiaoyu^{1,2}, LI Cui², LEI Ming², ZHANG Zhanjiang^{1,2}

1. School of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

2. Guangxi Zhuang Autonomous Region Medicinal Plant Garden/National Traditional Chinese Medicine Inheritance and Innovation Center/Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resource Conservation and Genetic Improvement/Guangxi Smart Innovation Engineering Research Center for TCM Resources, Nanning 530023, China

Abstract: In recent years, protoplast technology has widely applied in the fields of plant genetic transformation, breeding, and plant regeneration. Related research on model plants (such as tobacco and *Arabidopsis thaliana*) has been in-depth, and its application in crops like forage grass, rice, and tomatoes has also become more and more mature. With the development of the economy and the increase in health demands, the market demand for medicinal plants has been continuously growing. However, the research on their breeding and genetic transformation is still insufficient, and protoplast technology can just provide a new path for this. This paper focuses on the preparation and isolation techniques of protoplasts of medicinal plants and their application scenarios, reviews their research status and challenges, and provides a reference for in-depth research on protoplasts of medicinal plants in fields such as genetic transformation, variety improvement, and plant regeneration.

Key words: medicinal plants; protoplasts; isolation; transient transformation; regenerated plant; gene editing

药用植物是指含有生物活性成分, 能够预防、治疗疾病并对人体具有保健养护作用的植物^[1]。药

用植物已有几千年的历史, 在人类发展及与疾病斗争的历史进程中扮演着重要角色。药用植物是不断

收稿日期: 2025-10-11

基金项目: 广西中央引导地方科技发展专项资金(桂科 ZY24212031); 广西自然科学基金面上项目(2025GXNSFAA069814, 2025GXNSFBA069023, 2023GXNSFAA026509); 国家自然科学基金资助项目(32460105); 国家自然科学基金资助项目(32560103); 广西重点研发计划(桂科 AB23026092); 广西岐黄学者培养项目(GXQH202402); 广西药用资源保护与遗传改良重点实验室自主课题(KL2025ZZ02); 广西壮族自治区中医药管理局自筹经费科研课题(GXZYA20250004)

作者简介: 谢小瑜, 硕士研究生, 研究方向为分子生药学。E-mail: 18378765729@163.com

*通信作者: 张占江, 研究员, 从事药用资源保护与开发利用。E-mail: zzj1811@163.com

积累并保存下来的宝贵财富，也是未来药物研发的重要源泉^[2]。近年来，随着经济的增长、人口的增加及生活水平的快速提高，药用植物的需求量也在不断增加。然而，过度采挖、生境破坏、非法贸易等问题使药用植物资源正面临着严重的威胁和挑战^[3]。同时，药用植物具有种类繁多、地域性强、药用部位多、成分变化大等特点，且存在优良品种标准不明确、分子机制研究较深入但育种研究较少、育种途径较多但育成品种推广较少、种质资源研究不足等问题，大大增加了药用植物育种工作的难度^[4]。

原生质体是指通过各种方法将植物细胞的细胞壁去除后所形成的裸露细胞。由于没有细胞壁的阻碍，原生质体能够直接摄入外源的细胞器、DNA、病毒、质粒等，是进行遗传转化研究的理想受体，对其进行细胞融合可获得杂种细胞^[5]。原生质体能够帮助解决药用植物发展的一系列难题和痛点，如通过原生质体技术将调控药用植物有效成分的基因在原生质体中进行瞬时表达来验证基因的功能，从而促进药用植物的基因研究，如利用丹参原生质体转染 CRISPR/Cas9 核糖核蛋白复合物，通过敲除植物髓母细胞瘤相关转录因子（v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog, MYB）家族中的 MYB28 等基因，成功验证这些基因对丹参酚酸、丹参酮等活性成分合成的调控作用^[6]；将 2 个不同物种的原生质体进行融合，经植株再生培养后可获得优良的品种，能够克服药用植物远缘杂交不亲和的问题，从而解决药用植物育种及成分变化大等难题，如将东方百合与麝香百合进行原生质体杂交，获得可育的体细胞杂种植株，最后得到的表型性状与亲本有显著差异^[7]。近年来，单细胞转录组测序（single-cell RNA sequencing, scRNA-seq）的研究成为一大热点，将其与原生质体技术结合成为当前的前沿技术，能够服务于药用植物的基因研究。由此可见，原生质体能作为高效基因载体加速功能研究，通过原生质体杂交可以打破药用植物生殖隔离，创造新种质，并结合培养技术实现优良种质的快速扩繁与保存，以解决药用植物种质资源创新、利用和扩繁的不足。

早在 140 多年前，Hanstein 就提出了原生质体的概念；1892 年，Klercker^[8]通过机械法成功从水剑叶叶片中获得了完整的原生质体，这是首次成功从植物中分离得到原生质体的报道。1960 年，Cocking^[9]首次使用酶解法分离得到大量有活力的

原生质体，为原生质体的应用奠定了基础。1969 年，Power 等^[10]采用一步法直接使用混合酶液，成功从植物组织中分离得到原生质体。商品酶的出现使得原生质体制备技术获得了飞速的发展。此外，因具有全能性、敏感性和多功能性，原生质体通过融合和再生还能够创造再生植株，甚至新的植物物种。1970 年，Nagata 等^[11]利用烟草叶肉组织的原生质体进行了再生研究，最终得到了完整植株。自此，多种植物通过原生质体培养获得了再生植株。1972 年，Carlson 等^[12]选取粉蓝烟草和朗氏烟草的原生质体进行细胞融合培养，首次获得了体细胞杂种。1974 年，Kao 等^[13]首次利用聚乙二醇（polyethylene glycol, PEG）进行原生质体融合，并成功得到了完整再生植株。之后又出现电击法、高钙法等融合方法。此后，原生质体的应用领域不断拓展^[14]。当前原生质体已用于植物分子育种、再生植株、遗传转化等领域，极大地促进了现代植物学的发展^[15]。国内外对原生质体的研究也日趋成熟，在拟南芥^[16]、烟草^[17]等的研究中，原生质体的研究已较为完善；而药用植物原生质体的研究还相对滞后^[18]。目前，药用植物原生质体的研究已经扩展到夹竹桃科、五加科、紫草科等数 10 科^[5]，但相对于约 400 种已开展原生质体研究的植物而言^[19]，还稍显不足，现有报道多聚焦于原生质体基础理论或模式植物应用，缺乏对药用植物专属技术进展的系统梳理，尤其对近年新兴的 CRISPR/Cas9 基因编辑、scRNA-seq 等技术的整合分析不足，未能清晰界定药用植物原生质体研究的独特价值与突破方向。基于此，本文就药用植物原生质体的分离制备和应用场景进行总结，结合目前药用原生质体的最新技术，如原生质体的瞬时转化、亚细胞定位与蛋白质互作、基因编辑、scRNA-seq 技术等，为药用植物原生质体的高效分离获取及其在药用植物基因功能的研究、遗传转化体系的建立等方面提供新的思路与方法。

1 原生质体的分离

原生质体的分离方法可分为机械法和酶解法。机械法是指先将细胞进行质壁分离，再使用物理方法破除细胞壁，最终获得原生质体的方法，其局限性很大，液泡化程度低的细胞不能采用，且获得的原生质体数量较少，目前已基本不再使用^[20]。酶解法是指将植物细胞放置在含有纤维素酶、果胶酶等的酶溶液中，通过一段时间酶解后使细胞壁消化破坏从而使原生质体释放出来，最终收获原生质体的

方法。由于酶解法得到的原生质体数量和活性都优于机械法, 所以目前大部分的原生质体制备实验都采用酶解法。鉴于此, 本文在原生质体分离部分主要是基于酶解法进行论述(图1)。此外, 因原生质体的分离受到包括选择分离的植物部位、酶的种类、酶解时间、酶解温度、离心速度、离心时间等的影响^[21], 且分离得到的原生质体还需进行活力检测, 以确保后续实验的顺利开展, 故下文将对这些方面进行总结论述。

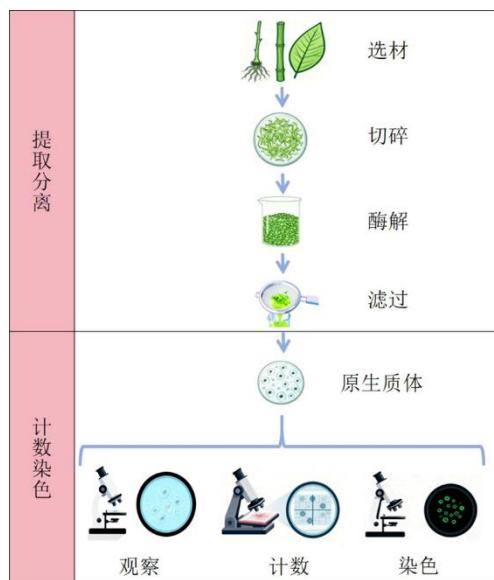


图1 原生质体的分离制备

Fig. 1 Isolation and preparation of protoplasts

1.1 分离的材料及预处理

使用酶解法进行原生质体的分离时, 分离材料的选择会直接影响原生质体的产量和活性。不同的植物部位及植物不同的生长状况对原生质体的产量和活性有着显著的影响。一般生长旺盛、幼嫩的组织, 如幼嫩的叶子、愈伤组织、根分生组织等作为分离材料产生的原生质体产量更高, 活力更旺盛^[22]。

1.1.1 以叶片为起始材料的原生质体的分离 由于叶片取材简单方便, 容易获取并含有较多的组织细胞, 通常分离原生质体时首选植物的叶片作为起始材料^[23]。叶如梅等^[24]以闽楠幼嫩的叶片为材料, 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, 明确闽楠幼嫩叶片原生质体的高效分离条件, 成功实现了闽楠幼嫩叶片原生质体的高效分离。李梦迪等^[25]在制备滇黄精的原生质体实验中, 使用的是种子萌发形成的幼嫩叶片。在黄芪原生质体制备实验中亦使用了幼嫩

叶片^[26]。兰州百合^[27]、葡萄^[28]则以无菌苗叶片为材料, 在一定条件下能分离得到均一的叶肉原生质体, 平均产量可超过 4×10^6 个/g, 且细胞活力超过90%, 为细胞融合、基因工程及品种改良等研究奠定基础。Tian等^[29]以半夏的叶片为材料, 成功分离得到原生质体, 为建立高效快速的原生质体瞬时表达系统奠定了基础。在石斛兰^[30]、甘薯^[31]、穿心莲^[32]的原生质体分离制备中, 均以成熟新鲜的叶片为材料进行酶解, 可获得产量高、品质好的原生质体。综上, 植物叶片是原生质体分离的主流起始材料, 这一选择在多种药用植物研究中均得到验证并能实现高效分离, 体现了叶片取材的普适性规律。同时, 不同药用植物在叶片选择上存在差异, 采用幼嫩叶片, 或使用无菌苗叶片, 或选取成熟新鲜叶片, 需结合植物种类特性进行选择。

1.1.2 以植物的根为起始材料的原生质体的分离 植物的根也常作为植物原生质体的制备材料。翟妞等^[17]以模式植物本氏烟草和栽培烟草K326为材料, 采用酶解法成功制备了烟草根细胞原生质体, 根是烟草吸收营养元素的关键部位, 也是生物碱的合成场所, 建立有效的烟草根原生质体的制备方法, 对在细胞水平上研究烟草营养和生物碱代谢具有重要意义。相较于其他材料, 幼根具有易获得、分化程度低、易于诱导分化、细胞壁薄等特点, 因此成为制备原生质体的理想材料, 武延生等^[33]利用生长6~9 d的酸枣种子幼根为试验材料, 得到了产量较高、细胞碎片量较少的原生质体。珠眉海棠^[34]等药用植物也将根作为供体进行原生质体分离条件的研究, 建立了高效的根原生质体分离体系, 为后续的一系列实验提供了原生质体材料。根细胞作为原生质体制备的关键材料, 在多类植物研究中成效显著, 从烟草到珠眉海棠, 再到酸枣与紫花苜蓿等药用植物都成功分离出活性良好、质量可靠的原生质体, 为植物细胞工程探索与植株再生培育开辟了有效路径。

1.1.3 以植物的其他组织或部位为起始材料的原生质体的分离 愈伤组织包括植物的其他部位也可以作为分离提取原生质体的材料。宁晓春等^[35]利用黑果枸杞的愈伤组织进行原生质体的制备, 在含0.5 mg/mL甘露醇的酶液中继代1次的愈伤组织中原生质体产量为 7.77×10^6 个/g, 活力为92%。其他药用植物, 如罗布麻^[36]、青海蕨麻4号^[37]等, 也通过各种途径获得了不同部位的愈伤组织, 并在此基

础上成功得到了原生质体，为后续的原生质体培养、再生细胞壁等研究提供了合适的实验材料。曹春艳等^[38]在槟榔原生质体的研究中，以花苞和胚状体为材料进行原生质体分离，最终分离得到不同数量和质量的原生质体；其实验结果表明从花苞分离出的原生质体数量最多，达到 8.9×10^7 个/mL，活力达 86%；胚状体中分离到的原生质体数量为 4.5×10^6 个/mL。Ren 等^[39]利用红花进行原生质体制备实验，以红花的花冠作为实验材料，建立了红花花冠的原生质体体系。陈曼等^[40]以龙牙百合种球经组织培养的试管再生苗的小鳞茎为试材，获得了大量的原生质体，酶解时间由 9 h 缩短至 3 h，大大提高了百合原生质体的分离效率。白桦是一种具有清热利湿、祛痰止咳作用的药用植物，在制备分离白桦原生质体时，以木质部为材料可获得数量和活力均较高的原生质体，后续利用此部位的原生质体成功进行了原生质体细胞壁的研究^[41]。总之，在开展药用植物原生质体分离制备时，应按需选择合适的试验材料；总体而言，以成熟的叶片作为材料可较为便利地获取大量活性高的原生质体；后续需要进行原生质体融合或植株再生实验时，可选择细胞分裂旺盛的部位，如幼嫩叶片、幼根、愈伤组织等；研究其有效成分时，可考虑以药用部位作为材料等。

1.1.4 分离材料的预处理 在开展原生质体的分离实验时，分离材料的预处理也会影响原生质体的产量和活性。预处理的方法有很多，常用的主要有真空处理、预质壁分离、暗处理等。陈思慧等^[42]在云南松原生质体的制备实验中发现，真空处理可提高酶解效率，云南松幼苗未进行真空处理的原生质体产量仅为真空处理的 1/3，且酶解时间相差约 5 倍。对花生 60 d 龄植株尚未展开的复叶、黄化叶、盛开的花瓣、幼嫩果针及幼苗下胚轴进行真空处理均可获得活性较好的原生质体^[43]。张芬等^[44]研究发现，芸薹属植物在分离原生质体前对供试材料进行预质壁分离，可促进原生质体的分裂再生，提高其产量。张晓丽^[45]在进行青天葵原生质体的制备实验中发现，在酶解反应前使用原生质体清洗液的高渗溶液处理叶片，可使叶肉细胞发生质壁分离，有利于原生质体的分离。罗丽华等^[46]在对石斛兰叶片的原生质体制备实验中，探究了不同预处理条件对原生质体分离的影响，在最佳分离条件下探究了多种预处理方式，包括分别对石斛兰叶片进行黑暗或光照条件下不同时间的萎蔫预处理、不同浓度的质膜

稳定剂 CaCl_2 下的预处理，及不同浓度渗透压稳定剂甘露醇预处理；观察在不同预处理条件下原生质体的产量，并通过单因素分析，确定最佳的石斛兰原生质体预处理条件。张娜^[47]在分离苎麻叶片原生质体时，在酶解前分别将子叶接种于生长激素培养基上进行不同时间的预处理及进行不同时间的暗处理，结果显示 2 种预处理的方法均能够提高原生质体的产量和活力。材料预处理是影响原生质体产量与活性的重要因素。对于与酶解液难以充分接触的材料，可经过真空处理从而加大接触面，提高酶解的效率；预质壁分离可减轻游离过程对原生质体的损伤，也能够促进原生质体的分裂再生，提高其产量；对叶片进行一定的萎蔫处理在一定程度内可促进原生质体分离，萎蔫使叶片失水，细胞质壁分离，加入酶解液后更易接触细胞壁和原生质体间的果胶，从而使原生质体更易达到分离；暗处理使叶片等材料无法进行光合作用，加快了营养物质的消耗，加速萎蔫等。预处理方法需结合酶解材料的特性综合考虑。

1.2 分离条件

制备原生质体实验的最主要影响因素是实验的分离条件。不同条件下制备原生质体，其获得的数量及活性也不同。分离的条件主要包括酶的种类及组合、酶解时间、酶解温度、渗透压、pH 值、离心的速度与时间等；不同的植物及材料最适的分离条件亦不相同。

1.2.1 酶的种类及组合、酶解时间、渗透压的影响 在药用植物原生质体分离研究中，酶系组成、酶解时长和渗透压调控是关键因素。植物细胞壁主要由纤维素和果胶构成，故进行原生质体分离时以纤维素酶和果胶酶为基础，但不同植物或组织的细胞壁成分比例存在差异，故通常需要搭配离析酶、半纤维素酶等辅助酶类，并调整好配比^[48]。原生质体的酶解时间通常控制在 2~18 h；酶解时间过短会影响分离的效果，过长则会损伤细胞，降低原生质体存活率，所以需要根据材料的特性进行精准把控^[49]。失去细胞壁保护的原生质体对渗透压极为敏感，低渗会致其破裂，因此需在酶解液中添加甘露醇等渗透压稳定剂维持活性^[50]。由表 1 可知，因物种和药用植物部位的不同，原生质体分离时酶的组合、酶解时间及甘露醇（渗透压）的用量亦有所差异。

1.2.2 其他因素的影响 除上述影响因素外，酶解时的温度、pH 速度也会对原生质体的分离制备产

表1 酶组合、酶解时间、渗透压对原生质体产量和活性的影响

Table 1 Effects of enzyme combination, enzymatic hydrolysis time and osmotic pressure on protoplast yield and activity

物种	酶解部位	酶组合	酶解时间/h	甘露醇浓度/(mol·L ⁻¹)	产量/(个·g ⁻¹)	活性/%
西洋参 ^[51]	愈伤组织	2%纤维素酶+0.5%果胶酶	9	0.70	12.66×10^5	89.13
白及 ^[52]	幼嫩叶片	1.5%纤维素酶+0.4果胶酶+0.5离析酶	4	0.75	4.72×10^6	90.40
广藿香 ^[53]	悬浮细胞	1.5%纤维素酶+0.5%半纤维素酶+0.8%果胶酶	12	0.40	13.2×10^5	81.80
狭叶柴胡 ^[54]	愈伤组织	2%纤维素酶+1%离析酶	4	0.60	1.26×10^6	—
秦艽 ^[55]	愈伤组织	2%纤维素酶+1%半纤维素酶+0.5%果胶酶	16	0.40	4.5×10^6	80.00
山丹丹 ^[56]	愈伤组织	0.015 g·mL ⁻¹ 纤维素酶+0.005 g·mL ⁻¹ 果胶酶	6	0.66	3.46×10^5	39.17
三七 ^[57]	愈伤组织	15 mg·mL ⁻¹ 纤维素酶+7 mg·mL ⁻¹ 果胶酶	7	0.70	6.44×10^5	59.60
穿心莲 ^[32]	叶片	1.5%纤维素酶 R-10+0.75%离析酶 R-10	8	0.60	8.81×10^5	—
铁冬青 ^[58]	新鲜幼叶	3%纤维素酶 R-10+0.4%离析酶 R-10	6	0.70	2.67×10^5	—
金花茶 ^[59]	叶片	1%纤维素酶 R-10+2.0%离析酶 R-10	9	0.60	4.46×10^5	—
丹参 ^[60]	组培苗叶片	1.5%纤维素酶 R-10+0.5%离析酶 R-10	5	0.80	3.37×10^6	—
积雪草 ^[61]	叶柄	1.5%纤维素酶 R-10+1.0%离析酶 R-10+0.5%崩溃酶	16	0.70	7.9×10^5	79.30
银杏 ^[62]	幼苗叶片	2%纤维素酶+0.25%果胶酶	3	0.40	3×10^6	>90.00
石斛兰 ^[63]	培苗叶片	1%纤维素酶纤维素酶 R-10+0.2%离析酶	4	0.30	3.97×10^5	95.60
杜仲 ^[64]	幼嫩的茎	2.5%纤维素酶 R-10+0.6%离析酶 R-10+2.5%果胶酶+0.5%半纤维化酶	10	0.60	1.13×10^6	94.84
甘蓝 ^[65]	下胚轴	1%纤维素酶+0.5%离析酶	6	0.60	3.0×10^6	90.90
枇杷 ^[66]	幼嫩果肉	4.6%纤维素酶 RS+2.6%离析酶 R-10	11	0.60	1.66×10^6	62.29
	幼嫩种子	4.4%纤维素酶 RS+2.6%离析酶 R-10	10	0.60	7.583×10^5	90.83
连翘 ^[67]	幼嫩叶片	20 g·L ⁻¹ 纤维素酶+5 g·L ⁻¹ 离析酶	9	0.20	5.57×10^6	86.79

生影响。酶解温度指的是实验材料放入酶解液时环境的温度。较高的温度虽然会激发酶的活性,但同样会对试验材料造成损伤,所以选择合适的酶解温度十分必要。在分离制备狭叶柴胡金花茶、茉莉花、原生质体时,酶解温度分别为 27、25、25 °C^[54,59,68]。可见,酶解温度设置在 25 °C 左右可能较为合适。酶解液的 pH 值是原生质体生存环境的酸碱度,过酸或过碱都会对原生质体产生影响。在进行山丹丹原生质体的分离制备实验时,酶解液的 pH 控制在 5.7^[56];在研究百合原生质体时,分离原生质体的酶解液的 pH 为 5.8^[69]。离心速度亦可以影响原生质体的分离制备,进而显著影响原生质体的产量。离心速度过低或过高都不利于制备原生质体;过低会导致原生质体未完全被沉淀到离心管底部,过高则会导致原生质体受到较大离心力挤压而破裂。在三七原生质体制备实验中,酶解过程的离心速率为 800 r/min^[57]。顾元钦等^[59]在金花茶原生质体的制备中,探究了酶解时的离心速率对原生质体产量的影响,随着离心速度的增大,原生质体的产量也随之提高,当离心速度增大至 700 r/min 时,原生质体的产量最高,而增大至 800、900 r/min 时,原生质体的产量开始下降甚

至没有观察到游离的原生质体,得到最适的离心速率为 700 r/min。此外,原生质体分离的影响因素还有物种、植物生长状况、外植体状态等。

总之,分离的条件并无统一的标准,应考虑药用植物的特性来决定。在影响原生质体的分离因素中,植物细胞壁的影响尤为重要。不同药用植物的细胞壁成分及比例多有不同,如人参根含大量木质素、枸杞果富含果胶等。细胞壁的成分直接决定了酶的种类,所以在分离制备原生质体前应先了解细胞壁的主要成分,以便选择合适的酶;细胞壁较厚的组织可延长酶解时间。此外,药用植物本身的成分或次生代谢物对其原生质体的分离制备也有一定的影响;酚类、生物碱、皂苷等本身会干扰分离,如丹参的酚类会氧化破膜,黄连的生物碱会改变酶解液 pH,这些因素决定了是否需要添加如聚乙烯吡咯烷酮、2-吗啉乙磺酸等抗干扰试剂,也决定了制备过程中的温度、时间等参数。不仅如此,在确定离心速度时,要根据原生质体密度大小来进行调整,密度较大时应适当降低转速,以免原生质体过多地挤压摩擦导致破裂,密度较低时可适当提高转速,使原生质体聚集,减少浪费。总之,实验时需

进行综合分析,以获得最优方案。

1.3 原生质体的纯化

酶解后得到的混合液中除原生质体外,还存在细胞器、未解离的细胞、破碎的细胞等杂质,这些杂质会对原生质体的活性及后续的实验造成影响,因此需要对混合液进行纯化,以获得高纯度和高活性的原生质体。纯化原生质体法的方法主要有沉降法、漂浮法和界面法,其中沉降法应用最广泛,操作也较为简便^[70]。高思丹^[71]在研究枸杞原生质体的分离时使用蔗糖梯度离心沉降法进行纯化,发现17%~18%的蔗糖溶液对枸杞的优化效果相对较好,但同时也会造成一定的损失。胡添源等^[72]通过沉降法,探究了转速对雷公藤原生质体数量及活力的影响,获得原生质体得率高又对其无机械损伤的最佳转速。在栀子的原生质体分离中,亦采用了沉降法^[73]。

1.4 活力检测

原生质体活力的高低是代表原生质体质量的重要指标,也是进行后续实验的关键^[74]。检测原生质体活力常用的染色方法有荧光素二乙酸染色法(fluorescein diacetate staining method, FDA)、酚藏红花染色法、台盼蓝染色法、荧光增白剂染色法和溴化乙锭染色法等,其中常用的为FDA染色法^[75]。FDA是一种非荧光的化合物,具有独特的细胞膜渗透能力。在活性状态的原生质体内,FDA会被特定的酶催化降解,最终产生一种黄绿色荧光物质。相反,若原生质体处于非活性状态,由于缺乏降解FDA所需的酶活性,则无法产生荧光信号,从而能有效鉴别原生质体是否具有活性^[76]。李玉株等^[77]经反复实验比较了5种荧光染料对紫花苜蓿原生质体进行染色的效果,其中FDA染色效果最好,区分度高,最适于原生质体活力检测。黑果枸杞^[35]、三七、西洋参^[78]均采用了FDA染色法测定原生质体的活性。除FDA染色法外,常用的还有酚藏红花染色法^[79]。该方法以质量分数为0.01%的酚藏红花溶液对原生质体进行染色,无活力的原生质体呈现红色,有活力原生质体不显色。除上述染色法外,伊文斯蓝染色法^[80]也可用于原生质体的活性检测。伊文斯蓝不能自由通过原生质体膜,但当原生质体膜受损时,细胞就能被染色;以质量分数为0.025%的伊文斯蓝溶液对原生质体染色,无活力的原生质体5 min后被染成蓝色,有活力原生质体不被染色。此外还有其他检测原生质体活力的方法,如可通过观察胞质环流法检测代谢以测定原生质体的活力;通过

观察原生质体体积随渗透压的改变而变化从而测定活力;用氧电极测定放氧量检测呼吸代谢以测定原生质体活力;通过光合作用的研究来测定原生质体的活力等^[81]。

2 原生质体的应用

近年来关于药用植物原生质体的研究逐渐增加,其在药用植物培养、生物育种、遗传转化等方面的应用日益广泛(图2),已取得一系列显著成果^[82]。

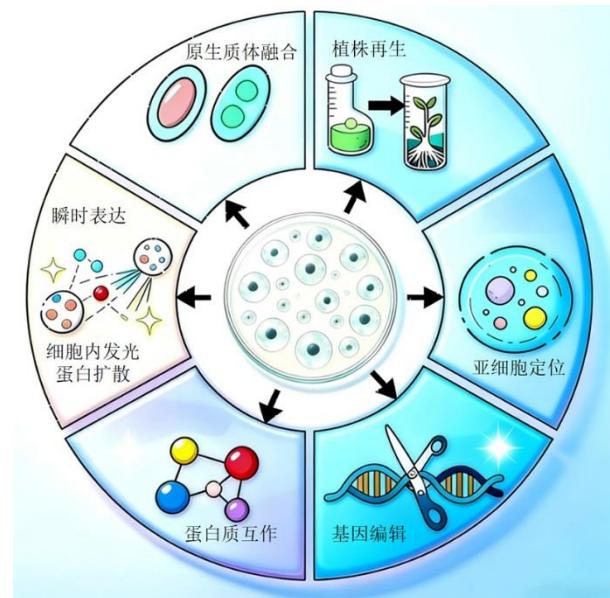


图2 原生质体的应用

Fig. 2 Application of protoplasts

2.1 生物育种方面的应用

在生物育种方面,原生质体的作用十分广泛,在体细胞杂交、原生质体融合、植株再生、筛选突变体等均有涉及,其应用潜力巨大^[83]。其中原生质体融合是实现远缘杂种再生的核心手段,而再生植株则是融合技术的最终目标与价值体现,二者紧密关联。

2.1.1 原生质体融合介导的再生植株培养 原生质体融合是指利用物理或化学方法使2个细胞的原生质体融合,经培养后获得具有双亲全部或部分遗传物质后代的技术。原生质体融合技术可以克服远缘杂交不亲和的障碍,打破物种之间的生殖隔离,扩大杂交亲本范围,实现基因在物种间的转移和遗传重组,进行植株再生后甚至能够培育新品种和创造新物种,是植物育种的核心技术之一^[84]。早在1972年,Carlson等^[12]通过无性杂交方法首次获得了种间植物杂种。通过分离粉蓝烟草和朗氏烟草的原生质体,诱导融合并再生为植株。Sencio等^[85]使

用电刺激诱导植物原生质体融合,成功诱导大麦叶肉细胞原生质体的自身融合及大麦与蛇根木原生质体间的融合,首次证实了电刺激诱导植物原生质体融合的可行性,为原生质体的融合提供了新的方法。目前主流的原生质体融合方法有自发融合、PEG融合、高钙高pH-PEG融合、电融合等,李春秀莉^[78]研究了西洋参和三七的原生质体融合,成功培养出西洋参和三七原生质体融合后的融合体愈伤组织;使用PEG融合、高钙高pH-PEG融合、电融合3种方法得到的原生质体融合率分别为1.7%、5.03%、1.07%,该研究为西洋参、三七杂交育种提供了方法与理论指导。刘剑锋等^[86]以高山红景天愈伤组织原生质体为材料,进行了40%PEG6000介导的原生质体融合,获得了同源四倍体材料,为高山红景天多倍体育种提供了科学依据。徐德林等^[87]采用高钙高pH值结合PEG4000诱导法对金钗石斛开展原生质体融合实验,发现当PEG4000浓度为38.41%、CaCl₂浓度为0.44 mol/L、pH为9.26、融合时间为28.87 min的组合条件下,异核体融合率达到最高,为0.924%。周国海等^[88]以虎杖的根状茎芽为外植体诱导虎杖愈伤组织,选取生长状况良好的愈伤组织作为原生质体分离材料,使用电融合的方法进行原生质体的融合,融合率为20.2%。植物原生质体融合技术在细胞生物学、遗传学等基础研究领域的应用日益广泛。通过融合不同特性的原生质体,可以更深入地探究基因表达调控、细胞发育分化等机制,进一步为植株再生效率的提升提供理论指导。

2.1.2 其他路径的原生质体再生植株研究 除融合介导的植株再生路径外,直接从单一物种原生质体分离、培养并再生植株,也是药用植物育种的重要补充,可为遗传改良、种质保护提供纯合材料或技术平台。当前药用植物再生植株的研究正不断深入,但能够成功分离原生质体并成功培养得到完整再生植株的药用植物还较少^[89]。Johnson等^[90]以苜蓿品种的2个克隆(RS-K1和RS-K2)为材料,探索其原生质体再生植株的能力。通过诱导愈伤组织得到胚状体,胚状体在半强度Hoagland培养基上可生根长叶;RS-K1和RS-K2分别获得39、54株再生苗,移栽后再生苗生长正常。该方法为苜蓿及其他植物原生质体技术应用提供参考。紫锥菊^[91]的再生植株则是使用海藻酸钠固液双层培养的方法,将制备好的原生质体嵌入改良MS液体培养基中,促进细胞分裂和克隆的形成,先形成致密绿色愈伤,

愈伤组织在6-苄氨基嘌呤5.0 μmol/L+吲哚乙酸2.0 μmol/L培养基中诱导芽分化,最终在无激素培养基中发育为完整植株。该方法建立了一套高效的紫锥菊原生质体再生体系,通过优化分离、培养及分化条件,实现了从单细胞到完整植株的全流程可控再生,为紫锥菊的原生质体及育种的研究提供了可靠的技术平台。Klimek-Chodacka等^[92]利用黑种草的愈伤组织进行了原生质体的分离制备,并将原生质体进行培养,得到微愈伤组织后利用KN和BN培养基继续培养,最终在无激素培养基上成功形成了体细胞胚胎和实现了植株再生。安利佳等^[93]利用细叶黄芪的外植体愈伤组织分化的再生苗叶片进行原生质体的分离制备,在改良的高-米氏培养基中培养得到愈伤组织,再转移至分化培养基中培养分化出苗;幼苗在生根培养基中成功长出不定根,最终再生成为完整的植株。Tomiczak等^[94]对龙胆属的5种植物进行原生质体的分离及后续对原生质体进行培养,成功得到愈伤组织,之后进行植株再生,其中库鲁龙胆、西藏龙胆成功实现了植株再生。宁晓春等^[35]以黑果枸杞无菌苗叶片为材料,进行原生质体的分离制备,成功得到大量有活性的原生质体;培养后得到的愈伤组织在分化培养基上形成不定芽,最终得到再生植株;再生植株平均遗传系数为0.875,说明其能较好地保持亲本的遗传性状。该实验成功建立了愈伤组织来源的原生质体再生体系。综上,由药用植物原生质体获得再生植株为药用植物的遗传改良、品种创新和活性成分调控提供了重要技术支撑,有助于加快药用植物优良品种的选育进程,提升药用植物的品质和产量,同时也为珍稀濒危药用植物的种质资源保护与可持续利用开辟了新路径。

2.2 遗传转化体系的应用

2.2.1 原生质体瞬时表达 在现代分子生物学技术中,原生质体瞬时转化及表达系统已被广泛使用,并取得了一系列成果,在蛋白质定位和相互作用、基因的表达及功能验证、启动子的活性检测、基因编辑等方面的应用也日趋成熟^[76]。原生质体转化的方法有PEG转化法、显微注射法、农杆菌介导法和电击法等。其中显微注射法则能精准导入外源基因,转化频率高,实验时间短且无需载体即可直接获得纯系,但该方法的设备精密而昂贵,操作技术需要长时间练习,同时每次只能注射有限的细胞,难以规模化应用。农杆菌介导法的优势在于,

其质粒转化系统操作简单、所需仪器设备门槛低，易于推广，同时作为天然的遗传转化系统，它的成功率高、效果稳定，且 T-DNA 区可插入高达 50 kb 大小的外源 DNA 片段，但该方法的短板也较为突出，多数情况下需经过组织培养阶段，操作复杂、周期长，再生难度大。电击法适用范围广，几乎对任何类型的细胞都有效，是细菌和某些动物细胞系遗传转化的首选，但它对药用植物原生质体的活性要求较高，电击过程中会有相当一部分原生质体死亡，边缘或活性不强的原生质体更易因电击致死。PEG 转化法虽有一定的局限，如整个流程涉及多步骤与关键试剂，每个环节都需要针对性优化，且试剂质量需严格检验，同时 PEG 的有效浓度范围较窄，还对细胞具有一定毒性，但仍以操作简单、转化高效、成本低廉等特点成为了药用植物研究中应用最广且最常用的方法^[95]。Tian 等^[29]建立了一个高效快速的半夏原生质体瞬时表达系统，以半夏的叶片为材料，成功分离得到原生质体，且发现 40% 的 PEG4000 转化效率最高，并使用亚细胞定位技术来进一步验证了瞬时表达系统。为钩藤原生质体瞬时表达实验中，利用 PEG 转化法进行转染，转染率最高可达 71%^[96]。Gao 等^[97]通过建立核桃原生质体瞬时转化系统，解决了核桃蛋白质亚细胞定位和功能分析的技术瓶颈，并实现了其在蛋白质定位、相互作用及脂质合成调控中的应用价值。在瞬时转化实验中，认为 30% 的 PEG4000 孵育 30 min 可使核桃胚性愈伤组织原生质体获得最高的转化效率，可达 53.5%。马尾松原生质体 PEG 转化平均转化效率可达 40%，最高为 47.83%^[98]，为马尾松功能基因的研究及针叶树遗传育种提供了新的思路。在枇杷叶肉组织原生质体瞬时转化的实验中，PEG4000 的浓度为 20%，质粒 DNA 的浓度为 5 μL/100 mL，甘露醇的浓度为 0.4 mol/L，金属浴中共转化的时间为 5 min，温度为 25 °C，时间为 48 h 的条件下，原生质体转化的效率最高，约为 35%^[99]。大麻幼苗子叶和下胚轴的原生质体 PEG 转化实验中，最佳转化条件为 40% 的 PEG4000、转化孵育 7 min 和加入 30 μg 转染的质粒 DNA，在此条件下，大麻原生质体的转化率达到 75.4%^[100]。Han 等^[62]利用银杏原生质体建立了一种简单、高效且可靠的系统，用于从银杏叶片中分离原生质体并进行瞬时表达。该系统包括幼苗的原生质体分离、PEG 介导的瞬时 DNA 转化及下游实验分析，优化后的转化效率为 40%。该系统可

使银杏的原生质体分离和瞬时转化在 5 h 内完成，实验结果可以在 3 d 内获得，可用于常见的下游定性和定量实验，如蛋白质亚细胞定位、瞬时基因表达和蛋白质相互作用分析，可为银杏基因的瞬时转化和分析提供稳定可靠的平台。总之，原生质体瞬时转化及表达系统在药用植物中的应用，可助力快速解析基因功能与活性成分合成机制，为定向育种和基因编辑提供技术支撑。

2.2.2 亚细胞定位与蛋白质互作 亚细胞定位是指确定蛋白质或其他的生物分子在细胞内的具体位置。亚细胞定位可作为了解细胞整体功能的途径。利用原生质体建立瞬时表达系统结合荧光蛋白融合技术或免疫荧光技术可快速检测蛋白质在细胞中的分布，验证蛋白质的相互作用，揭示配体与受体的识别机制等^[101]。Han 等^[62]建立了高效的银杏原生质体分离与瞬时转化系统。在亚细胞定位方面，通过融合绿色荧光蛋白标记的基因，成功验证核定位信号；在蛋白质互作方面，通过双分子荧光互补（bimolecular fluorescence complementation，BiFC）实验验证了银杏转录因子间的互作关系。该系统的建立为基因功能验证提供了技术平台。刘晓娜^[60]对丹参原生质体进行瞬时转化实验，利用前期研究的 2 个相互作用蛋白，成功开展了亚细胞定位及 BiFC 实验，为基于原生质体的蛋白质互作、转录调控、基因编辑等研究提供了技术支持。楠迪娜等^[102]以沙冬青的子叶进行原生质体的制备，将获得的原生质体作为受体，利用 PEG 转化法成功实现瞬时转化，并以此开展了亚细胞定位实验，证实目标蛋白位于细胞核中。原生质体亚细胞定位及蛋白质互作研究为深入解析药用植物基因功能、阐明活性成分的合成调控机制提供了关键技术路径。

2.2.3 基因编辑系统 对基因组特定区域进行定点修改的基因工程技术被称为基因编辑技术。利用基因编辑技术可以实现对植物体或植物细胞中遗传物质的高效编辑。编辑方式主要包括碱基删除、引入突变、切除小片段 DNA 及同时在多个位点上引入突变等^[103]。传统的基因编辑技术主要有锌指核酸酶技术、转录激活样效应因子核酸酶技术等，而 CRISPR/Cas9 作为第 3 代基因编辑工具，相比传统技术具有设计简单、成本低和高效的特点，因此使用较为广泛^[104]。目前 CRISPR/Cas9 技术已在许多植物中实现基因编辑，显示其可靠性，如拟南芥、水稻、牧草等植物，但在药用植物原生质体中的应

用还较少。丹参^[105]原生质体在不同元件的组合下, 编辑效率为 13.97%~33.64%, 为其他传统药用植物的基因编辑研究提供了重要参考。冯亮^[106]在柴胡原生质体的研究中, 通过 PEG 介导 CRISPR/Cas9 表达载体 pHEC401-DT1T2 转化柴胡原生质体瞬时表达验证了靶向能力, 编辑效率为 19.4%。Nie 等^[107]首次在槟榔中实现了靶向基因编辑, 在 CRISPR/Cas9 基因编辑验证靶向设计上, 针对八氢番茄红素脱氢酶基因 AcPDS 设计双 sgRNA 载体 pAtU6-2gR-ZmCas9, 利用高通量转座子插入位点定位测序技术检测到 2.82% 的编辑效率, 该研究通过白色叶片原生质体高效分离、PEG-Ca²⁺浓度梯度优化和双 sgRNA 载体设计, 成功构建槟榔基因编辑技术体系, 标志着热带棕榈科作物槟榔精准育种的重要突破, 为后续基因功能解析及抗病抗逆品种选育奠定关键技术基础。目前, 基于原生质体的药用植物基因编辑还存在着一些瓶颈, 如缺乏现成的基因编辑工具, 需要重新构建, 导致成本较高且实验重复性低, 规模化难; 药用植物编辑效率较低, 如上述药用植物中的基因编辑效率最高不到 40%, 而在拟南芥中, 基因编辑的效率可达 90% 以上^[108]; 药用植物再生植株困难, 编辑后难以分化成完整植株而稳定遗传等。对于以上瓶颈, 可聚焦升级编辑工具, 开发多基因编辑系统并利用组织特异性启动子精准作用于药用部位; 此外, 挖掘内源元件替代外源元件、建立技术库实现参数复用, 以降低成本并推动实用化等, 使其可以被更好地用于药用植物基因功能研究、分子育种和创制新的种质资源等^[109]。

2.2.4 scRNA-seq 技术 scRNA-seq 是一种在单细胞分辨率下解析基因表达、揭示细胞异质性的高通量技术^[110]。scRNA-seq 技术发展迅速且日益成熟, 在解析细胞对发育和环境信号的响应方面极具优势^[111]。在植物的应用中, scRNA-seq 技术依赖植物组织的原生质体分离从而获取单细胞样本。在单细胞水平明确细胞功能, 则需捕获单个细胞基因表达。液滴单细胞 RNA 测序出现前, 主要依赖激光捕获显微切割 (laser capture microdissection, LCM) 和荧光激活细胞分选 (fluorescence-activated cell sorting, FACS) 技术, 但 LCM 通量低、细胞识别难, FACS 依赖荧光标记、限制谱系研究, 且二者均不分析单个细胞。液滴 scRNA-seq 可大量分离单细胞、捕获转录本, 能以单细胞分辨率获取转录本信息, 克服了上述技术缺陷。因此, 液滴 scRNA-seq

是目前植物单细胞测序的技术主流^[112]。目前 scRNA-seq 技术已广泛用于拟南芥、水稻等模式植物, 及大豆、草莓、茶树、花生、棉花等农作物, 还拓展至苜蓿、长春花、三七、荆芥等药用植物^[113], 可实现细胞类型鉴定、发育轨迹解析、标记基因挖掘、转录调控网络构建等研究目标。如在花生中明确高油酸突变体抑制叶片生长的分子机制^[114]; 在长春花中揭示单萜吲哚生物碱合成途径的空间分布特异性^[115]; 在三七中解析茎尖发育特征及关键候选基因^[116]。此外, 部分研究还将其与转座酶可及性染色质测序技术结合, 绘制基因组尺度染色质的可及性图谱, 进一步丰富了分子机制解析维度^[112]。在技术关键环节方面, 高质量原生质体的获取是 scRNA-seq 成功的前提。现有方案多通过纤维素酶、果胶酶等酶解液处理植物组织 (如叶片、花器官、幼果等), 分离后需检测细胞活力并调整浓度适配测序平台^[117]。部分研究已开发出高效通用的原生质体分离方案, 可适用于不同系统发育谱系的植物, 甚至仅需少量组织即可获得足量原生质体, 为非模式植物研究提供了方法支撑^[118]。目前, scRNA-seq 还存在一定的局限性, 主要包括样品制备的物种或组织存在特异性, 细胞壁组成和厚度差异导致部分植物原生质体分离困难, 且原生质体脆性高、易破裂, 可能引入实验偏差; 数据解读困难, 非模式植物缺乏成熟标记基因, 多倍体基因组复杂性增加了跨物种或器官的比较难度, 且原位杂交等验证方法通量低; 技术适配性不足, 难以捕获细菌、病毒及小 RNA 转录组, 空间信息丢失, 需结合空间转录组学等技术补充; 数据管理缺乏统一标准, 且技术门槛高等, 限制了其广泛应用^[119]。scRNA-seq 技术为植物发育机制解析、环境响应研究及作物改良提供了强大工具, 为药用植物的分子研究提供了新范式, 但仍需进一步优化原生质体分离体系、完善数据标准化流程, 以降低技术局限性, 拓展其应用范围。

2.2.5 其他方面的应用 利用原生质体技术可以提高药用植物有效成分的产量。Dinkeloo 等^[120]研究发现, 原生质体品系间的融合能够增强人参中人参皂苷的积累。原生质体的培养技术还可帮助解决药用植物的育种难题; Nirmal 等^[121]发明了基于生姜的原生质体的离体培养技术, 为解决生姜育种和种植的瓶颈问题奠定了重要技术基础。原生质体技术还可以应用到基因功能验证的研究中, Gao 等^[97]构建了核桃原生质体的瞬时转化系统, 通过瞬时过表

达调控脂质合成的 *JrWRII* 基因可以显著激活脂质合成通路基因表达, 如脂肪酸去饱和酶 3、 β -酮脂酰-ACP 合酶基因, 揭示其在核桃脂质积累中的核心调控作用。Zhu 等^[122]开发了一种基于原生质体瞬时表达的 RNA 测序技术, 该技术可无需依赖突变体或转基因植物, 仅通过在原生质体中瞬时表达带标记的转录因子并结合 RNA 测序, 就可实现快速、高通量筛选其靶基因, 经玉米和拟南芥验证, 效率高、准确性强且适用于多种植物。若将该项技术用于药用植物领域, 可有望通过药用植物原生质体, 快速筛选调控生物碱、皂苷等活性成分合成的“开关”基因, 还能通过快速锁定候选基因缩短药用植物分子育种周期, 助力提升有效成分含量。由此可见, 原生质体技术在提升药用植物有效成分产量、突破育种瓶颈、助力基因功能验证等方面可起到关键作用。

3 结语与展望

自 19 世纪末以来, 随着酶解法和培养技术的突破, 原生质体逐渐成为植物生物技术的核心工具, 在拟南芥、水稻、牧草等模式植物和经济作物中的研究已较为成熟, 在克服物种间生殖障碍、基因功能研究和新型种质创制等领域发挥了关键作用^[19]。近年来药用植物原生质体的研究也取得了一定的进展, 如在少数药用植物中可通过原生质体细胞融合获得中间杂合细胞, 在丹参等少数植物中实现了原生质体到植株的再生, 在一些药用植物中也尝试了 CRISPR/Cas9 基因编辑, 然而, 相对于模式植物和作物而言, 药用植物基于原生质体技术的育种难度仍然很大, 目前的育种水平还比较有限, 这主要可能受限于以下几个因素。首先, 在种质上, 药用植物多缺乏清晰的遗传背景, 基因型差异大导致实验材料难以标准化。其次, 再生植株的研究中, 多数药用植物原生质体分化能力弱, 如铁皮石斛原生质体脱分化成愈伤组织率不足 10%, 再分化成植株更是难上加难。再次, 药用植物的活性成分合成路径往往涉及多个基因, 调控机制至今未完全明确, 直接制约了原生质体育种导向。目前, 仅有极少数药用植物如丹参、甘草等能完成“酶解分离-液体培养-愈伤分化-完整植株再生-基因编辑应用”的全流程, 而对于基因功能验证、代谢途径解析等深度研究成果较稀缺。

随着 scRNA-seq、基因编辑工具的不断完善, 原生质体研究将向更精准高效的方向发展, 有望辅助解决更多药用植物遗传转化难题^[103], 可通过

scRNA-seq 锁定药用植物原生质体中再生能力强的细胞亚群, 再使用 CRISPR/Cas9 基因编辑定向敲除再生抑制基因, 或可解决植株再生效率低的核心难题; 同时, 人工智能与合成生物学的深度介入, 将助力设计更高效的原生质体培养与调控策略, 精准调控药用植物活性成分合成路径。借助人工智能算法, 利用大数据将已知药用植物的酶解条件进行整合, 建立数据库, 为尚未进行原生质体制备的植物或部位提供合理的制备方法。人工智能技术亦可利用光照、激素浓度等数据, 构建“原生质体培养条件-再生效率”的预测模型, 如模拟人参皂苷等的代谢网络, 精准找到关键酶基因的调控节点。生物育种方面, 可将原生质体技术与植物组织培养结合, 通过不同物种间的原生质体进行融合, 再进行再生植株, 从而获得优良的品种, 或与微生物工程耦合, 例如通过原生质体融合将黄芪的皂苷合成基因导入大肠杆菌, 实现活性成分异源量产, 最终形成覆盖种质创新、成分合成、濒危保护的平台, 推动药用植物产业升级。原生质体技术与其他生物技术的交叉融合, 将构建起多元化的药用植物开发平台, 为新药研发、濒危药用植物保护和可持续利用开辟新路径, 推动药用植物产业的创新升级。药用植物原生质体研究的不断深入, 必将助力药用植物在经济、医疗、农业等领域发挥更重要的作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张云罗, 吴迎梅, 刘义飞, 等. 药用植物遗传转化和基因编辑技术研究进展 [J]. 植物科学学报, 2024, 42(2): 242-253.
- [2] 李杰, 蔡嘉慧, 王慧中, 等. 药用植物基因组测序及功能基因组学研究进展 [J]. 杭州师范大学学报: 自然科学版, 2021, 20(4): 364-373.
- [3] 刘元. 药用植物遗传资源保护问题浅析 [J]. 分子植物育种, 2023, 21(10): 3450-3454.
- [4] 许玲, 何秋伶, 梁宗锁. 药用植物育种现状、存在的问题及对策 [J]. 科技通报, 2021, 37(8): 1-7.
- [5] 尹红新, 雷秀娟, 宋娟, 等. 我国药用植物原生质体培养的研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2015, 43(3): 243-245.
- [6] Hsu C T, Chiu C C, Hsiao P Y, et al. Transgene-free CRISPR/Cas9-mediated gene editing through protoplast-to-plant regeneration enhances active compounds in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Plant Biotechnol J, 2024, 22(6): 1549-1551.
- [7] Horita M, Morohashi H, Komai F. Production of fertile

somatic hybrid plants between oriental hybrid lily and *Liliumxformolongi* [J]. *Planta*, 2003, 217(4): 597-601.

[8] Klercker J A F. Eine methode zur isolierung lebender protoplasten [J]. *Ofvers Vetensk Akad Forh*, 1892, 9: 463-75.

[9] Cocking E C. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles [J]. *Nature*, 1960, 187: 962-963.

[10] Power J B, Cocking E C. A simple method for the isolation of very large numbers of leaf protoplasts by using mixtures of cellulase and pectinase [J]. *Biochem J*, 1969, 111(5): 33P.

[11] Nagata T, Takebe I. Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts [J]. *Planta*, 1970, 92(4): 301-308.

[12] Carlson P S, Smith H H, Dearing R D. Parasexual interspecific plant hybridization [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, 69(8): 2292-2294.

[13] Kao K N, Michayluk M R. A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts [J]. *Planta*, 1974, 115(4): 355-367.

[14] Ren R, Gao J, Yin D M, et al. Highly efficient leaf base protoplast isolation and transient expression systems for orchids and other important monocot crops [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 626015.

[15] Duarte P, Ribeiro D, Carqueijeiro I, et al. Protoplast transformation as a plant-transferable transient expression system [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1405: 137-148.

[16] 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.

[17] 翟姐, 徐国云, 张慧, 等. 烟草根细胞原生质体的制备 [J]. 烟草科技, 2022, 55(10): 39-43.

[18] 张航宁, 吴琴生, 刘大钧. 药用植物原生质体培养及其应用 [J]. 南京农业大学学报, 1995, 18(4): 25-32.

[19] Davey M R, Anthony P, Power J B, et al. Plant protoplast technology: Current status [J]. *Acta Physiol Plant*, 2005, 27(1): 117-130.

[20] 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.

[21] 张颖, 张微微, 王芳. 植物原生质体研究概况 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(8): 3941-3943.

[22] 李悦, 宋慧云, 王志, 等. 植物原生质体分离与瞬时表达体系研究进展 [J]. 植物生理学报, 2023, 59(1): 21-32.

[23] 李婧瑶, 刘龙飚, 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.

[24] 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.

[25] 李梦迪, 丛琨, 胡明举, 等. 不同酶解条件对滇黄精叶片原生质体分离的影响初探 [J]. 上海农业科技, 2024(6): 38-40.

[26] 刘强, 张宗申, 丛丽娜, 等. 黄芪原生质体分离技术 [J]. 广西植物, 2008, 28(3): 411-413.

[27] 韩忻, 吴若楠, 李心, 等. 兰州百合原生质体的分离纯化和应用 [J]. 植物研究, 2024, 44(6): 936-944.

[28] 刘琰, 杨欢, 任福仙, 等. ‘巨玫瑰’葡萄叶片原生质体的分离 [J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2024(6): 19-24.

[29] Tian Y H, Liu M, Tang L, et al. Establishment of protoplasts transient expression system in *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit [J]. *Biotechnol Lett*, 2023, 45(10): 1381-1391.

[30] 罗丽华, 严虹羽, 王业华, 等. 石斛兰叶片原生质体分离条件研究 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(12): 6144-6146.

[31] 赵昊, 周晓晴, 马遇乐, 等. 甘薯叶片原生质体快速制备方法的优化 [J]. 青岛农业大学学报: 自然科学版, 2023, 40(4): 283-287.

[32] 黄瑞华, 刘潇晗, 曹天丽, 等. 穿心莲叶片原生质体制备方法的建立与优化 [J]. 分子植物育种, 2021, 19(17): 5878-5885.

[33] 武延生, 邢翠娟, 李敏, 等. 酸枣幼根原生质体的制备 [J]. 耕作与栽培, 2021, 41(1): 25-27.

[34] 于立杰, 王忆, 许雪峰, 等. 珠眉海棠根原生质体分离条件研究 [J]. 干旱地区农业研究, 2010, 28(2): 118-121.

[35] 宁晓春, 高思丹, 杨莉娜, 等. 黑果枸杞原生质体培养及植株再生 [J]. 西北植物学报, 2021, 41(11): 1825-1833.

[36] 徐琴, 王晓军, 郝秀英, 等. 罗布麻愈伤组织原生质体分离培养 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(3): 1139-1140.

[37] 刘欣, 张金铭, 张昭, 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, 2017, 37(8): 1664-1671.

[38] 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.

[39] Ren C X, Xi Z Q, Xian B, et al. Identification and characterization of CtUGT3 as the key player of astragalbin biosynthesis in *Carthamus tinctorius* L. [J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(43): 16221-16232.

[40] 陈曼, 涂艺声, 叶丽娟. 食用百合试管苗原生质体制备条件的优化 [J]. 中国蔬菜, 2015(3): 54-57.

[41] 郑杰, 于颖, 贺卓熙, 等. 白桦木质部原生质体初生细胞壁再生过程转录组分析 [J]. 北京林业大学学报, 2022, 44(8): 12-22.

[42] 陈思慧, 孙大宽, 沙合热扎提·吾素云, 等. 云南松原

生质体制备及优化 [J]. 云南农业大学学报: 自然科学, 2024, 39(6): 133-141.

[43] 伍顺达, 梁绮雯, 孙敏, 等. 花生原生质体分离方法探究 [J]. 亚热带植物科学, 2023, 52(3): 220-227.

[44] 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, 2018, 16(2): 546-551.

[45] 张晓丽. 青天葵组织培养与原生质体分离的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2012.

[46] 罗丽华, 严虹羽, 林尤河, 等. 预处理条件对石斛兰叶片原生质体分离的影响 [J]. 南方园艺, 2010, 21(3): 10-12.

[47] 张娜. 芝麻原生质体培养技术研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2007.

[48] 马超越, 彭世清, 郭冬, 等. 植物原生质体分离及其瞬时转化的应用 [J]. 热带生物学报, 2024, 15(2): 241-250.

[49] 王凡. 锥栗叶肉原生质体分离与融合技术研究 [D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2023.

[50] 刘善贺. 棉花原生质体瞬时转化体系的建立与优化 [D]. 保定: 河北农业大学, 2023.

[51] 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, 2015.

[52] 徐德林, 张林, 储士润, 等. 白及原生质体的分离与纯化 [J]. 植物研究, 2016, 36(5): 795-800.

[53] 李磊. 广藿香原生质体融合与茉莉酸甲酯参与调控的百秋李醇生物合成机制初步研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2017.

[54] 程玉鹏, 李天聪, 林进华, 等. 狹叶柴胡愈伤组织原生质体的制备及纯化 [J]. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2017, 37(4): 254-257.

[55] 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, 2018, 46(17): 32-34.

[56] 王珺华. 山丹丹原生质体分离初探 [D]. 延安: 延安大学, 2020.

[57] 王琪, 雷秀娟, 张浩, 等. 三七原生质体的制备 [J]. 江苏农业科学, 2020, 48(19): 45-48.

[58] 徐丹, 黄瑞华, 刘希, 等. 铁冬青叶片原生质体制备方法的建立与优化 [J/OL]. 分子植物育种, (2023-02-08) [2025-07-08]. <https://link.cnki.net/urlid/46.1068.s.20230207.1101.001>.

[59] 顾元钦, 郑健云, 钟婉欣, 等. 金花茶叶片原生质体制备条件的优化 [J/OL]. 分子植物育种, (2023-03-10) [2025-07-08]. <https://link.cnki.net/urlid/46.1068.s.20230309.1500.006>.

[60] 刘晓娜. 丹参原生质体制备与转化的体系构建及应用 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2024.

[61] Pan Z G, Liu C Z, Murch S J, et al. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of the Egyptian medicinal plants *Artemisia judaica* L. and *Echinops spinosissimus* Turra [J]. *Plant Sci*, 2003, 165(4): 681-687.

[62] Han X, Rong H, Feng Y N, et al. Protoplast isolation and transient transformation system for *Ginkgo biloba* L [J]. *Front Plant Sci*, 2023, 14: 1145754.

[63] Khentry Y, Paradornuvat A, Tantiwiwat S, et al. Protoplast isolation and culture of *Dendrobium Sonia* "Bom 17" [J]. *Int J Agric Nat Resour*, 2006, 40(2): 361-369.

[64] Hu B, Dong M Y, Liu R N, et al. Establishment of an efficient protoplast isolation and transfection method for *Eucommia ulmoides* oliver [J]. *Front Biosci*, 2024, 29(5): 187.

[65] 王飞, 钟雄辉, 陈登辉, 等. 甘蓝原生质体制备体系优化及瞬时转化体系的建立 [J]. 华北农学报, 2020, 35(3): 69-78.

[66] 王淑明, 黄汉文, 王莉云, 等. 枇杷幼嫩果肉及种子原生质体制备体系优化 [J]. 西南大学学报 (自然科学版), 2025, 47(7): 93-103.

[67] 赵峥烟, 张晓璐, 程堂仁, 等. 连翘叶片原生质体分离及瞬时转化 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2023, 51(4): 130-136.

[68] 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.

[69] 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.

[70] 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.

[71] 高思丹. 枸杞原生质体分离与培养研究 [D]. 西宁: 青海大学, 2020.

[72] 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, 2017, 52(6): 774-782.

[73] 张庆红. 桑子组织培养及原生质体分离的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.

[74] 黄静, 赵琦, 李楠, 等. 烟草原生质体活力检测和细胞核染色方法的研究 [J]. 首都师范大学学报: 自然科学版, 2007, 28(4): 42-45.

[75] 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, 2011, 31(8): 102-107.

[76] 王兴丽, 董学明, 周强, 等. 草类植物原生质体分离及应用研究进展 [J/OL]. 草业科学, (2025-05-13) [2025-07-13]. <https://link.cnki.net/urlid/62.1069.s.20250512.1428.002>.

[77] 李玉珠, 师尚礼, 贺延玉. 不同荧光染料对苜蓿原生质体染色效果的研究 [J]. 草地学报, 2012, 20(2): 348-351.

[78] 李春秀莉. 西洋参和三七原生质体融合研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2022.

[79] 郭英华. 生姜原生质体培养与体细胞变异 [D]. 北京: 中国农业大学, 2005.

[80] 周正君. 花椒细胞悬浮培养及原生质体分离 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.

[81] 王莉, 姚占军. 植物原生质体的制备与活力检测研究进展 [J]. 生物技术通报, 2009, 25(S1): 46-50.

[82] 王慧中, 黄绍兴. 生物工程在药用植物中的应用 [J]. 杭州师范学院学报, 1994, 16(6): 115-121.

[83] 吴登宇, 韦体, 高丹丹, 等. 植物原生质体培养技术在药用植物中的应用 [J]. 生命科学研究, 2021, 25(2): 176-182.

[84] 李琦. 植物原生质体融合方法的研究进展 [J]. 种子科技, 2018, 36(6): 38.

[85] Sencio M, Takeda J, Abe S, et al. Induction of cell fusion of plant protoplasts by electrical stimulation [J]. *Plant Cell Physiol*, 1979, 20(7): 1441-1443.

[86] 刘剑锋, 刘建华, 程云清, 等. PEG 介导高山红景天原生质体融合获同源四倍体研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(14): 1783-1788.

[87] 徐德林, 储士润, 潘胤池, 等. 金钗石斛原生质体的制备与融合 [J]. 中国细胞生物学学报, 2016, 38(8): 935-944.

[88] 周国海, 陈雪香, 雷勇, 等. 虎杖原生质体分离纯化及电融合初步研究 [J]. 西北植物学报, 2008, 28(6): 1145-1149.

[89] 林阅兵. 人参与胡萝卜原生质体培养再生植株的研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2012.

[90] Johnson L B, Stuterville D L, Higgins R K, et al. Regeneration of alfalfa plants from protoplasts of selected Regen S clones [J]. *Plant Sci Lett*, 1981, 20(4): 297-304.

[91] Pan Z G, Liu C Z, Murch S I, et al. Isolation, culture, and plant regeneration from *Echinacea purpurea* protoplasts [J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 318: 211-217.

[92] 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 Organ Cult PCTOC*, 2020, 143(3): 693-707.

[93] 安利佳, 罗希明, 李喜文, 等. 细叶黄芪叶肉原生质体植株再生 [J]. 植物学报, 1991, 33(1): 38-42.

[94] Tomiczak K, Sliwinska E, Rybczyński J J. Comparison of the morphogenic potential of five *Gentiana* species in leaf mesophyll protoplast culture and ploidy stability of regenerated calli and plants [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC*, 2016, 126(2): 319-331.

[95] 周蝶, 王慧, 蔺孟卓, 等. 牧草原生质体的分离培养及应用 [J]. 草学, 2023(4): 53-59.

[96] Shao Y Y, Mu D T, Pan L M, et al. Optimization of isolation and transformation of protoplasts from *Uncaria rhynchophylla* and its application to transient gene expression analysis [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 3633.

[97] Gao Y L, Tang T Y, Cao W H, et al. Protoplast transient transformation facilitates subcellular localization and functional analysis of walnut proteins [J]. *Plant Physiol*, 2025, 197(2): kiae627.

[98] 李岩硕, 王民炎, 刘殿宽, 等. 马尾松原生质体制备及瞬时转化体系的建立 [J]. 植物研究, 2025, 45(2): 202-210.

[99] 王莉云. 枇杷原生质体分离及瞬时表达体系的建立 [D]. 重庆: 西南大学, 2022.

[100] Zhu P P, Zhao Y Q, You X E, et al. A versatile protoplast system and its application in *Cannabis sativa* L [J]. *Botany*, 2023, 101(7): 291-300.

[101] 周丹丹, 俞嘉宁. 植物细胞中瞬时表达系统的建立及研究进展 [J]. 中国农学通报, 2013, 29(24): 151-156.

[102] 楠迪娜, 薛敏, 唐宽刚, 等. 沙冬青子叶原生质体瞬时表达体系的建立及其 AmDREB1 蛋白的亚细胞定位 [J]. 植物科学学报, 2018, 36(4): 562-568.

[103] Meng Y Y, Hou Y L, Wang H, et al. Targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 system in the model legume *Medicago truncatula* [J]. *Plant Cell Rep*, 2017, 36(2): 371-374.

[104] 龙雨青, 曾娟, 王玲, 等. CRISPR/Cas9 基因组编辑技术在药用植物中的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(9): 2940-2952.

[105] Shao J, Peng B W, Zhang Y J, et al. A high-efficient protoplast transient system for screening gene editing elements in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Plant Cell Rep*, 2024, 43(2): 45.

[106] 冯亮. 柴胡 BcIAA13 基因 CRISPR/Cas9 编辑体系及遗传转化体系的构建与优化 [D]. 绵阳: 西南科技大学, 2022.

[107] Nie H, Batool S, Htwe Y M, et al. Development of protoplast-based gene editing system for *Areca* palm [J]. *Plants*, 2025, 14(6): 832.

[108] 杜伟. 高效且特异的 CRISPR-Cas9 基因组编辑工具在拟南芥中的研究 [D]. 石家庄: 河北科技大学, 2024.

[109] 余潇潇. 芸薹属中高效原生质体瞬时转化体系的建立及应用 [D]. 保定: 河北农业大学, 2023.

[110] 高琳, 吴智春. 单细胞转录组测序在中医药领域的应用研究进展 [J]. 山东中医药大学学报, 2025, 49(1): 135-139.

[111] Zhang K, Liu S H, Fu Y Z, et al. Establishment of an efficient cotton root protoplast isolation protocol suitable for single-cell RNA sequencing and transient gene expression analysis [J]. *Plant Methods*, 2023, 19(1): 5.

[112] Ren S L, Wang Y. Protoplast isolation for plant single-cell RNA-seq [J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2686: 301-305.

[113] 安妍妍, 张明惠, 谭何新. 单细胞测序在植物研究中的应用 [J]. 科学通报, 2024, 69(12): 1586-1597.

[114] Du P X, Deng Q Q, Wang W Y, et al. scRNA-seq reveals the mechanism of fatty acid desaturase 2 mutation to repress leaf growth in peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. *Cells*, 2023, 12(18): 2305.

[115] 李益. 单细胞转录组测序揭示长春花叶中单萜吲哚生物碱合成途径的空间分布特异性 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2021.

[116] 刘梅. 利用单细胞转录组测序技术解析三七茎尖的发育特征和关键候选基因 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2024.

[117] Seyfferth C, Renema J, Wendrich J R, et al. Advances and opportunities in single-cell transcriptomics for plant research [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2021, 72: 847-866.

[118] Wang J J, Wang Y, Lü T F, et al. An efficient and universal protoplast isolation protocol suitable for transient gene expression analysis and single-cell RNA sequencing [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(7): 3419.

[119] Cervantes-Pérez S A, Thibivilliers S, Tennant S, et al. Review: Challenges and perspectives in applying single nuclei RNA-seq technology in plant biology [J]. *Plant Sci*, 2022, 325: 111486.

[120] Dinkeloo K, Cantero A M, Paik I, et al. Genetic transformation technologies for the common dandelion, *Taraxacum officinale* [J]. *Plant Methods*, 2021, 17(1): 59.

[121] Nirmal Babu K, Samsudeen K, Divakaran M, et al. Protocols for *in vitro* propagation, conservation, synthetic seed production, embryo rescue, microrhizome production, molecular profiling, and genetic transformation in ginger (*Zingiber officinale* roscoe.) [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1391: 403-426.

[122] Zhu J M, Li S Z, Jiang H Y, et al. Protoplast transient expression-based RNA-sequencing: A simple method to screen transcriptional regulation in plants open access [J]. *Plant Physiol*, 2023, 194(1): 408-411.

[责任编辑 赵慧亮]