

引文格式: 邵瑛瑛, 唐其, 彭晓英, 等. 响应面法优化罂粟科植物叶片原生质体的制备条件[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2024, 39(2): 119–129. DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).202210022](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).202210022)

响应面法优化罂粟科植物叶片 原生质体的制备条件*

邵瑛瑛¹, 唐其^{1,2**}, 彭晓英³, 黄子豪^{1,2}, 郑亚杰^{1,2**}

(1. 湖南农业大学园艺学院, 湖南长沙 410128; 2. 国家植物功能成分利用工程技术研究中心, 湖南长沙 410128;
3. 湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南长沙 410128)

摘要:【目的】系统优化罂粟科(Papaveraceae)植物叶片原生质体提取的影响因素, 建立其高效的原生质体提取体系。【方法】以花菱草(*Eschscholtzia californica* Cham.)幼苗为罂粟科模式植物, 通过单因素试验对影响原生质体产量和活力的预制液浓度、酶解液组成、酶解时间进行考察, 借助响应面 Box-Behnken 设计预测最佳提取方案, 并将最佳方案在罂粟亚科(Papaveroideae)、角茴香亚科(Hypecooideae)和荷包牡丹亚科(Fumarioideae)的代表性植物中进行验证。【结果】当预制液浓度为 0.8 mol/L、酶解时间 6 h、酶解液组成为 1.5% 纤维素酶+0.4% 离析酶+0.3% 果胶酶时, 花菱草原生质体的产量和活力最为理想, 与响应面法的预测结果一致, 能够成功获取罂粟科植物叶片原生质体。【结论】本研究可实现罂粟科植物叶片原生质体的高效提取, 为后续瞬时表达体系、亚细胞定位、单细胞测序等研究提供技术支撑。

关键词: 罂粟科; 原生质体; 酶解法; 单因素试验; Box-Behnken 响应面法

中图分类号: Q949.748.1

文献标志码: A

文章编号: 1004–390X (2024) 02–0119–11

Optimization of the Preparation Conditions of Leaf Protoplasts of Papaveraceae by Response Surface Methodology

SHAO Yingying¹, TANG Qi^{1,2}, PENG Xiaoying³, HUANG Zihao^{1,2}, ZHENG Yajie^{1,2}

(1. College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. National Research Center of Engineering and Technology for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Changsha 410128, China;
3. College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: [Purpose] To optimize the influencing factors of protoplast extraction from Papaveraceae leaves and establish an efficient protoplast extraction system. [Methods] Taking the seedlings of *Eschscholtzia californica* Cham. as the model plant of Papaveraceae, the concentration of preparation solution, the composition of enzymolysis solution, and the time of enzymolysis were examined by single factor experiments, which affected the yield and vitality of protoplasts; the optimal extraction protocol was predicted by response surface Box-Behnken design. The optimum protocol was validated in representative plants of Papaveroideae, Hypecooideae and Fumarioideae. [Results] Wh-

收稿日期: 2022-10-10

修回日期: 2024-03-14

网络首发日期: 2024-04-22

*基金项目: 国家自然科学基金项目(31600238); 湖南省教育厅项目(16C0769)。

作者简介: 邵瑛瑛(1993—), 女, 甘肃平凉人, 在读硕士研究生, 主要从事中药资源与开发利用研究。

E-mail: 2250519718@qq.com

**通信作者 Corresponding authors: 唐其(1981—), 男, 湖南株洲人, 博士, 副教授, 主要从事中药材品质基因资源发掘和遗传改良研究。E-mail: tangqi423@sina.com; 郑亚杰(1978—), 女, 河北保定人, 博士, 高级工程师, 主要从事中药资源与开发研究。E-mail: zhengyj4@126.com

网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/53.1044.S.20240419.1711.003>



en the concentration of preparation solution was 0.8 mol/L, the time of enzymolysis was six hours, and the composition of enzymolysis solution was 1.5% cellulase+0.4% macerozyme+0.3% pectinase, the yield and vitality of protoplasts in *E. californica* were ideal, which was consistent with the predicted values from response surface methodology, and it was able to obtain the leaves protoplasts from the family of Papaveraceae. [Conclusion] This research method can realize the efficient at extraction of protoplasts from leaves of Papaveraceae plants, providing effective technical support for subsequent studies such as transient expression system, subcellular location and single-cell sequencing.

Keywords: Papaveraceae; protoplasts; enzymatic digestion; single factor test; Box-Behnken response surface

罂粟科 (Papaveraceae) 包括罂粟亚科 (Papaveroideae)、角茴香亚科 (Hypecooideae) 和荷包牡丹亚科 (Fumarioideae), 在全球分布广泛^[1]。该科植物荷包牡丹 [*Lamprocapnos spectabilis* (L.) Fukuhara]、虞美人 (*Papaver rhoeas* L.)、花菱草 (*Eschscholzia californica* Cham.) 等因花朵艳丽通常被用作园艺观赏植物^[2]; 多数植物因特异性富集苜蓿基异喹啉类生物碱而具有广泛的医疗作用, 如吗啡具有很强的镇痛作用但具成瘾性而受到严格管控, 延胡索乙素是生物碱中镇痛作用强但不具成瘾性的非麻醉性类镇痛药物^[3], 小檗碱、血根碱等有较好的抗菌、消炎作用^[4]。传统的罂粟科植物栽培育种生长周期长且成本高, 无法满足市场对所需性状品种的需求。原生质体是去除细胞壁后均一稳定的感受态细胞, 作为基础植物分子生物学研究和开发基因组编辑作物的重要材料, 有助于实现从细胞水平上开展定向基因编辑或构建稳定的遗传转化体系, 对于促进罂粟科植物的品种选育或改良具有重要意义。

目前, 原生质体普遍应用于瞬时原生质体转染技术^[5]、单细胞测序技术^[6]、借助 CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑技术等研究领域^[7-8]。在药用植物功能成分形成的分子机制研究方面, 上述技术已应用于青天葵叶片、雷公藤悬浮细胞、秦艽叶、红花等研究中^[9-12], 但技术体系有待进一步完善。在酶解法制备原生质体过程中, 酶溶液组成和浓度以及酶解所需的 pH 值、温度、时间等是影响原生质体分离和活性的最关键因素, 预制液性质、稳渗剂种类和浓度、富集处理方法、剪切方法等也会影响原生质体的产量和活力^[13-14]。由于表面蜡质较厚、不易浸于酶解液, 罂粟科植物白

屈菜 (*Chelidonium majus* L.) 和博落回 [*Macleaya cordata* (Willd.) R. Br.] 叶片原生质体酶解效果不理想^[15-17], 且该科其他植物原生质体提取及应用的研究报道也较少。响应面法结合单因素试验是一种有效开发、改进和优化试验的方法, Box-Behnken 设计可用于以最少的试验次数研究输入变量的个体效应和交互效应^[18], 该方法已成功用于真菌、霉菌、藻类、桔梗等原生质体的制备条件优化^[19-22], 但在罂粟科植物原生质体制备中尚未见报道。

花菱草为罂粟科多年生草本植物, 具有生长周期短、株高适宜、易栽培等特点, 已成功构建稳定的遗传转化体系^[23], 被用作苜蓿基异喹啉生物碱生物合成及转运机制研究的模式植物^[24]。本研究利用酶解法提取花菱草幼苗原生质体, 通过单因素试验和响应面法优化预制液浓度、酶解液组成和酶解时间, 考察各变量间的相互作用对原生质体产量和活力的影响, 从而获得原生质体提取数量和活力的最佳条件; 再利用优化条件对部分罂粟亚科、角茴香亚科和荷包牡丹亚科植物进行原生质体提取验证, 旨在为罂粟科植物后续原生质体融合、遗传转化体系构建、原生质体再生、单细胞测序技术等研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

供试罂粟科植物包括 3 亚科 7 属 9 种样本, 分别为罂粟亚科罂粟属的虞美人, 花菱草属的花菱草, 白屈菜属的白屈菜, 博落回属的博落回和小果博落回 [*M. microcarpa* (Maxim.) Fedde]; 角茴香亚科角茴香属的角茴香 (*Hypecoum erectum*

Linn.); 荷包牡丹亚科荷包牡丹属的荷包牡丹, 紫堇属的紫堇 (*Corydalis edulis* Maxim.) 和延胡索 (*C. yanhusuo* W.T. Wang)。博落回幼苗采集自湖南农业大学智能温室苗圃; 花菱草、小果博落回和虞美人幼苗在组培室内用种子萌发获得; 白屈菜、角茴香、紫堇、荷包牡丹和延胡索购自河南省禹州药材市场。

供试纤维素酶 Celluase Onozuka R-10 和离析酶 Macerozyme Onozuka R-10 购自日本 Yakult Han-

sha 公司; 2-CPW 溶液购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 果胶酶 Pectinase Y-23 等其他试剂均购自北京酷来搏科技有限公司。

1.2 试验设计

1.2.1 单因素试验

利用单因素分析方法对影响花菱草原生质体产量制备及活力的因素进行考察, 包括酶解液组成、预制液浓度和酶解时间, 相关因素和水平见表 1。

表 1 单因素试验因素及水平
Tab. 1 Factors and levels of single-factor experiment

水平 level	因素 factor		
	酶解液组成 composition of enzymolysis solution	预制液浓度/(mol·L ⁻¹) concentration of preparation solution	酶解时间/h time of enzymolysis
1	1.0%A+0.2%B	0.5	4
2	1.0%A+0.2%B+0.1%C	0.6	5
3	1.5%A+0.4%B	0.7	6
4	1.5%A+0.4%B+0.3%C	0.8	7
5	2.0%A+0.6%B	0.9	8
6	2.0%A+0.6%B+0.5%C	1.0	—

注: A. 纤维素酶; B. 离析酶; C. 果胶酶; 下同。
Note: A. cellulase; B. macerozyme; C. pectinase; the same as below.

1.2.2 响应面试验设计

在单因素试验基础上, 依据 Box-Behnken 设计响应面试验以考察各因素对原生质体制备产量和活力的影响及其交互作用, 具体因素及水平见表 2。利用 Design-Expert 8.0.6 对响应面试验中对

应因素及水平的数据进行直观表征; 利用 Graph-Pad Prism 9 进行数据相关性及其显著性差异分析。

1.3 酶解液和预制液的配制

按照单因素试验和响应面试验的设计要求, 分别称取各试验所需的不同质量纤维素酶、离析

表 2 Box-Behnken 响应面试验设计及结果
Tab. 2 Design and results of Box-Behnken response surface

序号 No.	预制液浓度/(mol·L ⁻¹) X ₁ concentration of preparation solution	酶解液组成 X ₂ composition of enzymolysis solution	酶解时间/h X ₃ time of enzymolysis	原生质体产量×10 ⁶ /(个·mL ⁻¹) protoplast yield	原生质体活力/% protoplast vitality
1	0.8	1.0%A+0.2%B+0.1%C	7	3.25	60.0
2	0.7	1.5%A+0.4%B+0.3%C	5	2.25	46.6
3	0.9	1.5%A+0.4%B+0.3%C	7	5.30	69.8
4	0.9	1.5%A+0.4%B+0.3%C	5	6.75	71.1
5	0.8	1.0%A+0.2%B+0.1%C	5	2.40	50.0
6	0.8	2.0%A+0.6%B+0.5%C	7	3.40	50.0
7	0.8	2.0%A+0.6%B+0.5%C	6	8.50	62.2
8	0.8	1.5%A+0.4%B+0.3%C	6	15.50	88.1
9	0.8	1.5%A+0.4%B+0.3%C	6	14.81	88.8
10	0.7	1.5%A+0.4%B+0.3%C	7	4.00	23.8
11	0.8	1.5%A+0.4%B+0.3%C	6	14.65	91.1
12	0.8	1.5%A+0.4%B+0.3%C	6	14.28	93.9
13	0.9	2.0%A+0.6%B+0.5%C	6	5.63	72.5
14	0.7	1.0%A+0.2%B+0.1%C	6	2.70	42.5
15	0.8	1.5%A+0.4%B+0.3%C	6	15.50	94.5
16	0.7	2.0%A+0.6%B+0.5%C	6	5.25	74.0
17	0.9	1.0%A+0.2%B+0.1%C	6	2.35	91.5

酶和果胶酶,再称取甘露醇 1.0 g 一同加入到 10 mL 离心管中,加入 DEPC 处理水 5 mL 溶解,涡旋振荡 2 min 后加入 2-CPW 溶液 500 μ L 和 5 mmol/L 2-吗啉乙磺酸 (MES) 溶液 1 mL,在 55 $^{\circ}$ C 水浴锅中水浴 10 min 后取出冷却至常温,继续加入 5 mol/L CaCl_2 500 μ L 和 0.1% BSA 1 mL,定容至 10 mL,调节 pH 值为 5.8,即得到酶解液 1~6 (即表 1 中酶解液组成水平 1~6)。称取甘露醇,用 DEPC 处理水溶解,配制浓度分别为 0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 和 1.0 mol/L 的预制液。酶解液和预制液经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤后备用。

1.4 原生质体制备

取供试植物叶片切成 1~3 mm 细丝,并称取 0.2~0.5 g 放入装有 5 mL 预制液的离心管中浸泡 20 min,倒掉预制液后加入酶解液 10 mL,用锡箔纸包裹后置于 25 $^{\circ}$ C 恒温摇床中避光振荡进行酶解。于超净工作台内向酶解后的混合液中加入等量 W5 缓冲液 (提前配制并于 4 $^{\circ}$ C 冰箱预冷),混匀后用乳胶管轻轻吹打 3~5 次,用 300 目无菌过滤网过滤至 2 mL 灭菌离心管中,常温、200 r/min 离心 1 min,弃上清液后再加入等体积 W5 缓冲液,常温、200 r/min 离心 1 min,绿色沉淀即为原生质体。吸去上清液后将原生质体置于冰上孵化 30 min,备用。所有试验重复 3 次。

1.5 原生质体产量和活力的测定及优化条件验证

按照文献 [12] 进行原生质体计数及活力测定。

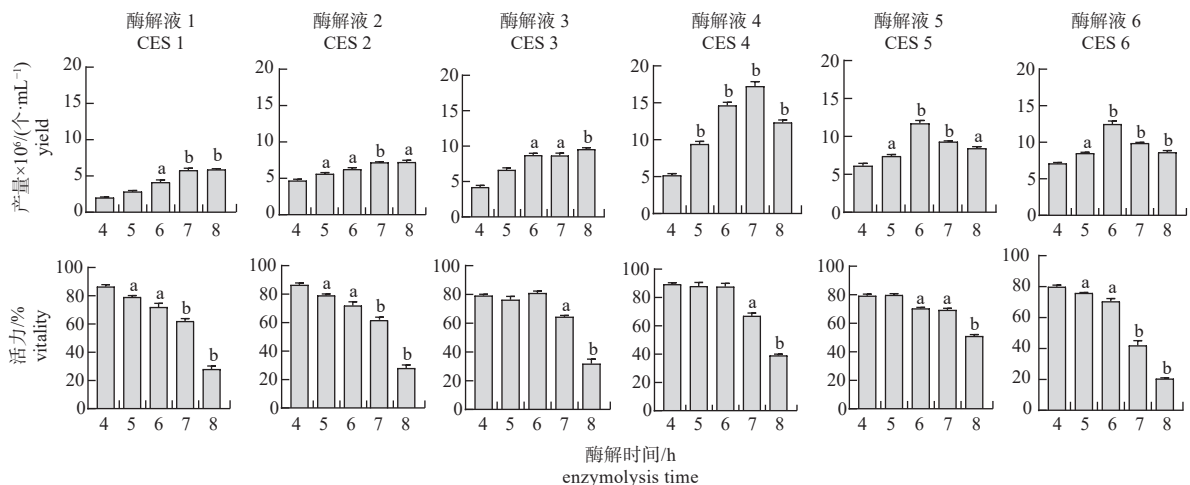
用 DMSO 溶解 FDA 配成 0.01% 染液,向原生质体溶液中加入 FDA 染液 2 μ L,黑暗处理 5 min,用移液枪吸取 1 滴原生质体悬浮液滴于血球计数板中心,制成玻片置于荧光显微镜 (Zeiss Apo-tome 2) 下观察,分别统计视野中明场下完整原生质体的细胞数量和暗场下绿色荧光的细胞数量。按照公式计算原生质体产量和活力:原生质体产量=5 个单元格内完整原生质体数/ 3.2×10^8 ;原生质体活力=单个视野中绿色荧光的细胞数量/单个视野中原生质体总数 $\times 100\%$ 。每个样本选取 3 个视野进行统计并计算平均值。利用经过优化的原生质体提取条件对虞美人、花菱草、白屈菜、博落回、小果博落回、角茴香、荷包牡丹、紫堇和延胡索的叶片原生质体进行制备和测定,以验证优化的提取体系。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 酶解液组成和酶解时间对花菱草原生质体产量及活力的影响

由图 1 可知:酶解液 1 和 2、酶解液 3 和 4、酶解液 5 和 6 相比,加入果胶酶后原生质体的数量呈上升趋势,表明添加果胶酶的酶解效果更佳;酶解液 2、4 和 6 相比,原生质体的数量随着酶解液质量分数的增加呈先增加后减少的趋势,表明酶解液质量分数会影响原生质体数量。



注:酶解液 1~6 的组成见表 1。与 4 h 相比,原生质体产量或原生质体活力显著 (a, $P < 0.05$) 或极显著 (b, $P < 0.01$) 升高或降低。

Note: The compositions of enzymolysis solution (CES) are list in Tab.1. Compared with four hours, the yield or vitality of protoplasts significantly (a, $P < 0.05$) or extremely significantly (b, $P < 0.01$) increased or decreased.

图 1 不同酶解液与酶解时间条件下原生质体的产量 (上) 及活力 (下)

Fig. 1 Protoplast yield (above) and vitality (below) under different composition of enzymolysis solution and enzymolysis time

当酶解液质量分数较低时(酶解液1、2和3),随着酶解时间的延长,产生原生质体的数量呈持续增多的趋势;当酶解液质量分数较高时(酶解液4、5和6),随着酶解时间的延长,产生原生质体的数量表现为先增加后降低的趋势,特别是酶解6或7 h时原生质体的数量达到峰值,表明酶解时间对原生质体产量的影响与酶解液质量分数有关。由图1还可知:原生质体活力受酶解液组成的影响较小,酶解时间是影响原生质体活力的主要因素。随着酶解时间的延长,各酶解液处理的原生质体活力均呈下降趋势,酶解时间超过6 h时原生质体活力急剧下降。综上所述,酶解液组成、酶解液质量分数和酶解时间都会对原生质体的产量和活力产生影响,特别是酶解时间对原生质体活力影响较大;酶解液4在原生质体产量表现出较明显优势;酶解时间不超过6 h时有较好的活力水平。因此,仍需要进一步优化影响因素,以在保证原生质体活力的前提下满足后续研究对原生质体产量的需求。

2.1.2 预制液浓度对花菱草原生质体产量及活力的影响

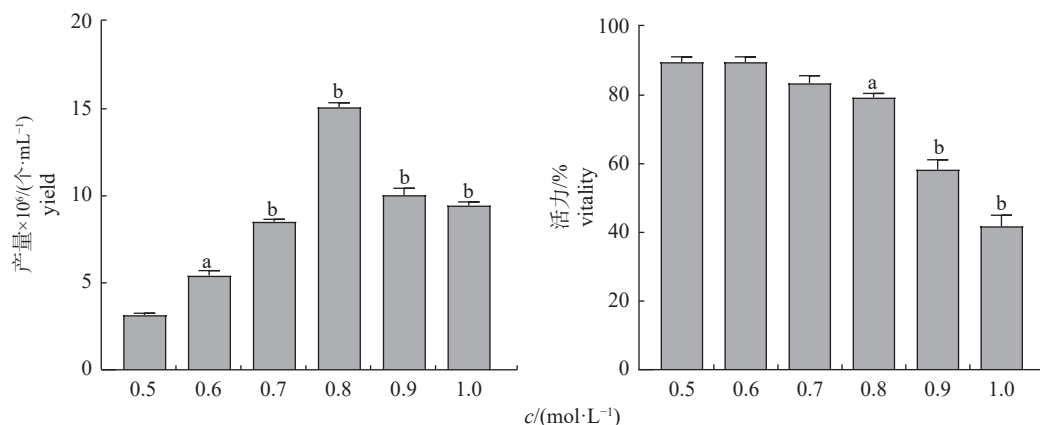
基于2.1.1节的结果,选择酶解液4作为酶解体系,继续考察预制液浓度对花菱草原生质体产量及活力的影响。由图2可知:随着预制液中甘露醇浓度的增加,原生质体的产量呈先升高后降低的变化趋势,当甘露醇浓度为0.8 mol/L时原生质体产量最高;随着甘露醇浓度的增加,原生质体活力由90%下降至40%,当甘露醇浓度

超过0.8 mol/L时原生质体活力快速下降。预制液浓度对原生质体产量和活力的影响呈非线性,选择0.7~0.9 mol/L为适宜浓度进行系统优化。

2.2 花菱草原生质体制备条件的优化结果

2.2.1 Box-Behnken Design 试验结果

基于响应面试验结果(表2)对试验数据进行拟合分析,分别以原生质体产量和原生质体活力为评价指标得到多元二次回归方程,即方程1: $Y_{\text{产量}}=14.95+0.29X_1+1.51X_2-0.93X_3+0.18X_1X_2+0.077X_1X_3-1.49X_2X_3-4.95X_1^2-6.02X_2^2-4.55X_3^2$; 方程2: $Y_{\text{活力}}=91.48+14.75X_1+1.84X_2-3.29X_3-12.63X_1X_2+5.38X_1X_3-5.55X_2X_3-12.04X_1^2-9.31X_2^2-26.61X_3^2$ 。由表3可知:方程1回归模型的 F 值=165.50,在 $\alpha=0.05$ 水平上的回归具有极显著性;相关系数 $R^2=99.53$,校正系数 $R_{\text{Adj}}^2=0.9591$,失拟项 $P=0.5106$,失拟不具有显著性,表明该模型的实测值与预测值之间拟合度良好,可用于预测原生质体产量的实际情况; X_2 、 X_2X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 对结果的影响极显著($P<0.01$),3个因素对原生质体产量的影响大小为酶解液组成>酶解时间>预制液浓度。由表4可知:方程2回归模型的 F 值=36.31, $P<0.05$,相关系数 $R^2=97.90$,校正系数 $R_{\text{Adj}}^2=0.9448$,失拟项 $P=0.0671>0.05$,表明该模型的实测值与预测值之间拟合度良好,可用于预测原生质体活力的实际情况; X_1 和 X_3^2 对结果的影响极显著($P<0.01$),3个因素对原生质体活力的影响大小为预制液浓度>酶解时间>酶解液组成。综上所述,3个因素对原生质体产量和活力的影响不同,预制液浓度



注:与0.5 mol/L相比,原生质体产量或原生质体活力显著(a, $P<0.05$)或极显著(b, $P<0.01$)升高或降低。

Note: Compared with 0.5 mol/L, the yield or vitality of protoplasts significantly (a, $P<0.05$) or extremely significantly (b, $P<0.01$) increased or decreased.

图2 不同预制液浓度下原生质体的产量和活力

Fig. 2 Protoplast yield and vitality under different concentrations of preparation solution

表 3 原生质体产量回归模型方差分析

Tab. 3 Variance analysis of protoplast yield regression model

来源 source	平方和 sum of sequence	自由度 degree of freedom	均方 mean square	F值 F-value	P值 P-value
模型 model	416.88	9	46.32	165.50	<0.000 1**
X_1	0.67	1	0.67	2.40	0.165 0
X_2	18.24	1	18.24	65.17	<0.000 1**
X_3	6.96	1	6.96	24.85	0.001 6*
X_1X_2	0.13	1	0.13	0.48	0.512 5
X_1X_3	0.02	1	0.02	0.09	0.778 0
X_2X_3	8.85	1	8.85	31.62	0.000 8**
X_1^2	103.18	1	103.18	368.65	<0.000 1**
X_2^2	152.35	1	152.35	544.34	<0.000 1**
X_3^2	86.99	1	86.99	310.80	—
残差 residual	1.96	7	0.28	—	—
失拟项 lack of fit	0.80	3	0.27	0.91	0.510 6
纯误差 pure error	1.16	4	0.29	—	—
校正总和 calibration sum	418.83	16	—	—	—

注：“**”表示影响极显著 ($P<0.01$)，“*”表示影响显著 ($P<0.05$)；下同。
Note:“**” indicates an extremely significant impact ($P<0.01$), “*” indicates a significant impact ($P<0.05$); the same as below.

表 4 原生质体活力回归模型方差分析

Tab. 4 Variance analysis of protoplast vitality regression model

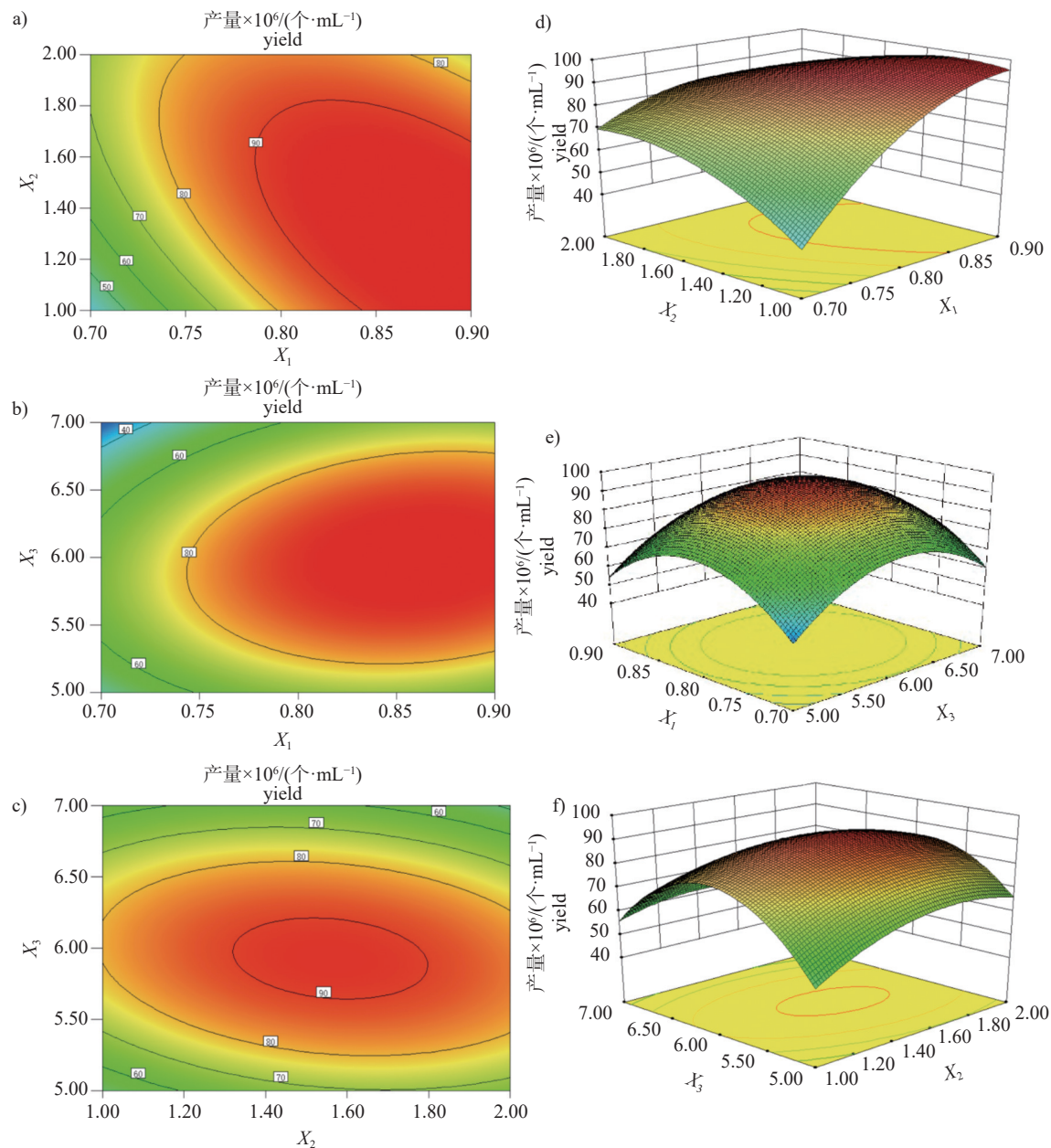
来源 source	平方和 sum of sequence	自由度 degree of freedom	均方 mean square	F值 F-value	P值 P-value
模型 model	7032.10	9	781.34	36.31	<0.000 1**
X_1	1 740.50	1	1 740.50	70.30	<0.000 1**
X_2	27.01	1	27.01	1.09	0.331 0
X_3	86.46	1	86.46	3.49	0.103 9
X_1X_2	637.56	1	637.56	25.75	0.001 4*
X_1X_3	115.56	1	115.56	4.67	0.067 6
X_2X_3	123.21	1	123.21	4.98	0.060 9
X_1^2	610.36	1	610.36	24.65	0.001 6*
X_2^2	365.34	1	365.34	14.76	0.006 4*
X_3^2	2 982.56	1	2 982.56	120.47	<0.000 1**
残差 residual	173.31	7	24.76	—	—
失拟项 lack of fit	139.34	3	46.65	5.47	0.067 1
纯误差 pure error	33.97	4	8.49	—	—
校正总和 calibration sum	7 205.41	16	—	—	—

和酶解液组成在 2 个评价指标体系中影响力排序差异较大，提示在原生质体制备过程中需要对各因素的不同水平组合进一步优化，以保证优化的制备方法能够兼顾原生质体的产量和活力。

2.2.2 影响因素交互作用分析

基于上述多元二次回归方程得到响应面图形，以预制液浓度 (X_1)、酶解液质量分数 (X_2) 和酶解时间 (X_3) 构成的三维空间曲面图，可在固定

其中 1 个因素不变时考察另外 2 个因素对试验评价指标 (即原生质体产量或活力) 的两两交互作用。由图 3 可知：随着 X_1 、 X_2 和 X_3 的增加，原生质体的产量呈先升高后降低的曲线型变化， X_2 方向上的曲面坡度最陡；各等高线图中，仅 X_2 — X_3 的等高线呈椭圆形，表明这 2 个因素的交互作用对原生质体产量的影响较强，且 X_2 的等高线密集程度较 X_3 大，颜色变化也更大，表明原生



注: X_1 . 预制液浓度, mol/L; X_2 . 酶解液质量分数, %; X_3 . 酶解时间, h; 下同。
Note: X_1 . concentration of preparation solution; X_2 . mass fraction of enzymolysis solution; X_3 . time of enzymolysis; the same as below.

图 3 各因素对原生质体产量影响的等高线图 (a~c) 和交互作用曲面图 (d~f)

Fig. 3 Contour plots (a-c) and profiles of surface response (d-f) in the optimization of two variables for protoplast yield

质体产量对 X_2 的变化更敏感。由图 4 可知: X_1 的曲面图坡度最大, 提示 X_1 对原生质体活力的影响较大; X_2 — X_3 的等高线呈椭圆形, 其余均接近圆形, 表明 X_1 与 X_2 的交互作用对原生质体活力的影响较显著, 且 X_1 的等高线密集程度较 X_2 大, 颜色变化也更大, 表明原生质体活力对 X_1 的变化更敏感。

响应面分析得到的两两因素交互作用结果与

方差分析结果一致, 因此, 可以用于预测花菱草原生质体制备的最优条件, 即预制液浓度 0.82 mol/L, 酶解时间 5.93 h, 酶解液组成为 1.5% 纤维素酶+0.4% 离析酶+0.3% 果胶酶, 在此条件下预测的花菱草原生质体产量为 13.57×10^6 个/mL, 活力为 91.92%。

2.3 罂粟科植物原生质体提取体系的验证

根据预测花菱草原生质体制备的最优条件对

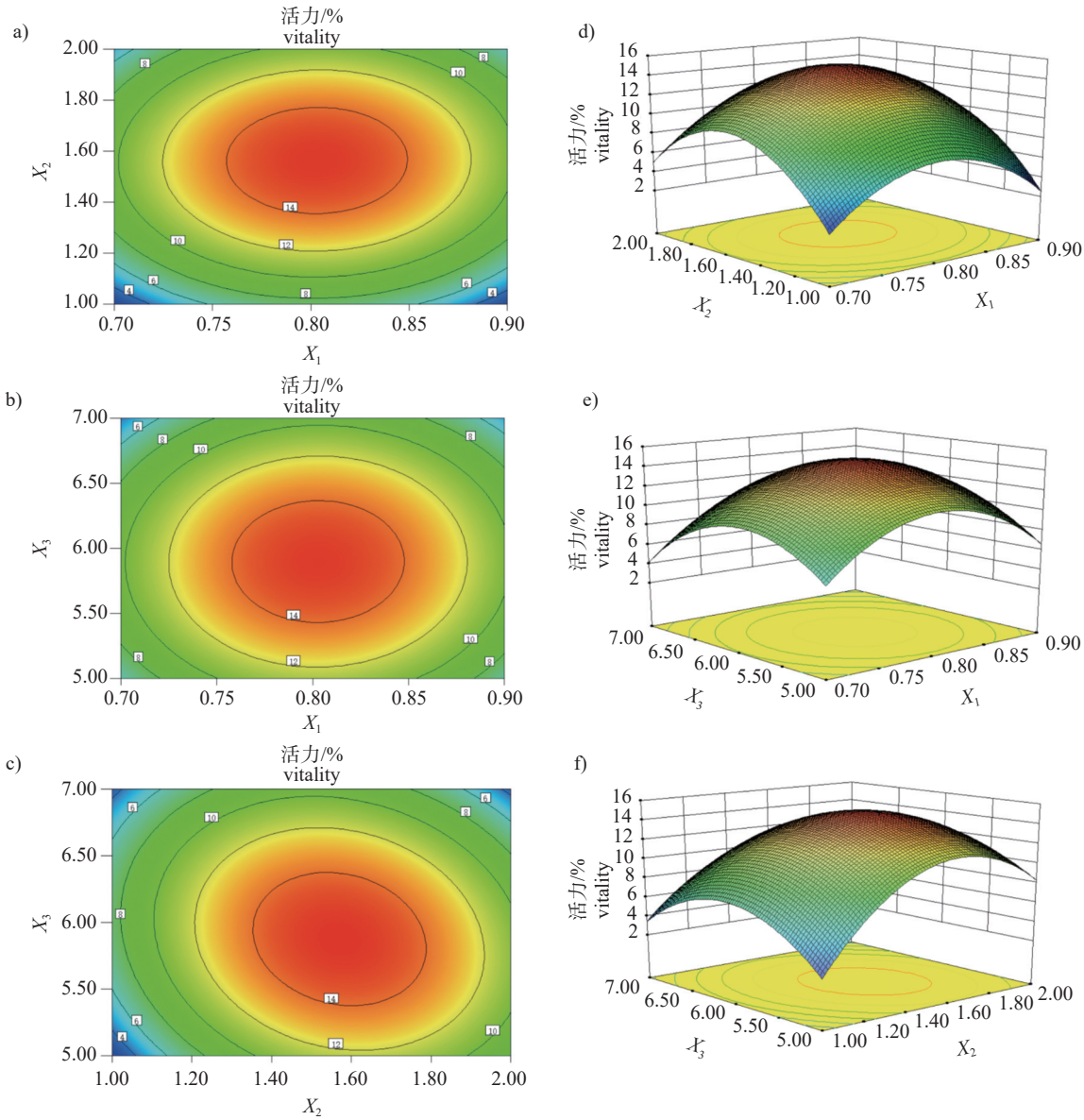


图 4 各因素对原生质体活力影响的等高线图 (a~c) 和交互作用曲面图 (d~f)

Fig. 4 Contour plots (a-c) and profiles of surface response (d-f) in the optimization of two variables for protoplast vitality

提取条件进行验证, 结果为花菱草叶片原生质体产量为 $(15.18 \pm 1.68) \times 10^6$ 个/mL, 原生质体活力为 $(92.17 \pm 1.76)\%$ 。由图 5 和表 5 可知: 罂粟科 3 个亚科的植物叶片中均成功获取原生质体, 且原生质体活力均大于 80%。

3 讨论

3.1 预制液浓度对原生质体制备的影响

原生质体是经机械法或酶解法脱离细胞壁的均一稳定的植物细胞, 可以帮助扩大基因工程技术的应用范围^[25]。原生质体分离过程中受预制液溶质类型和浓度的影响, 渗透有助于维持原生质

体的膨压^[26], 因此, 将花菱草叶片在甘露醇预制液中浸泡 20 min, 其原生质体的产量和活力有明显变化。本研究表明: 当甘露醇浓度从 0.5 mol/L 增加到 0.8 mol/L 时, 原生质体的产量极显著增加; 当甘露醇浓度超过 0.8 mol/L 时, 原生质体活力极显著下降, 且原生质体的产量也下降, 这与钩藤原生质体提取的最佳预制液浓度^[27]一致。然而, 不同物种的不同部位对预制液的敏感程度不一致, 如山茶花瓣的最佳预制液浓度为 0.5 mol/L^[28], 棉花的根及银杏叶片的最适预制液浓度为 0.4 mol/L^[29-30]。预制液浓度对原生质体细胞形状和活力均有显著影响, 低浓度预制液不利

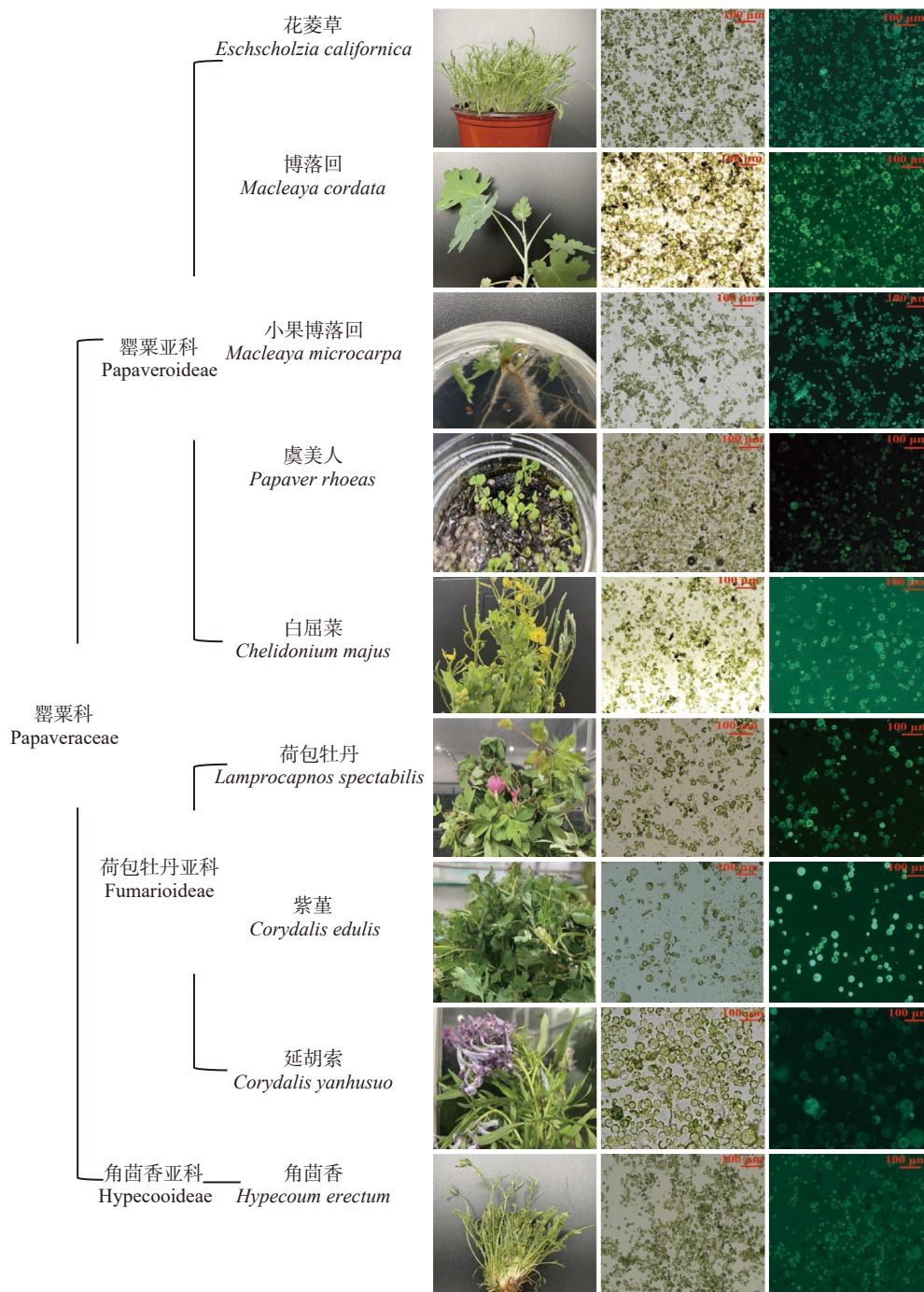


图 5 罂粟科不同亚科植物叶片的原生质体 (10×)

Fig. 5 Protoplasts in different subfamilies of Papaveraceae on bright field and dark field

于原生质体分离, 而高浓度预制液会破坏细胞膜的完整性, 影响原生质体的活力。此外, 预制液浓度还会显著影响原生质体的产量^[31]。

3.2 酶解液组成和酶解时间对原生质体制备的影响

适宜质量分数的酶解液是获取理想原生质体产量的关键因素, 质量分数过低和酶种类减少都不利于细胞壁酶解, 使原生质体产量不佳; 而质

量分数过高可能会对细胞质膜的完整性^[31]、原生质体的生理和代谢活动产生不利影响。本研究花菱草原生质体提取的最佳条件为: 预制液浓度 0.82 mol/L, 酶解时间 5.93 h, 酶解液组成为 1.5% 纤维素酶+0.4% 离析酶+0.3% 果胶酶, 该条件下花菱草原生质体产量为 15.18×10^6 个/mL, 原生质体活力为 92.17%。

表 5 罂粟科不同亚科植物叶片原生质体的产量及活力

Tab. 5 Protoplast yield and vitality in different subfamilies of Papaveraceae

物种 species	产量 $\times 10^6/(\text{个}\cdot\text{mL}^{-1})$ yield	活力/% vitality
花菱草 <i>Eschscholzia californica</i>	15.18 $\pm$ 1.68	92.17 $\pm$ 1.76
博落回 <i>Macleaya cordata</i>	8.75 $\pm$ 0.97	85.03 $\pm$ 3.00
小果博落回 <i>Macleaya microcarpa</i>	13.38 $\pm$ 0.18	91.05 $\pm$ 2.19
虞美人 <i>Papaver rhoeas</i>	14.88 $\pm$ 1.03	88.53 $\pm$ 0.66
白屈菜 <i>Chelidonium majus</i>	6.90 $\pm$ 0.49	84.25 $\pm$ 2.47
荷包牡丹 <i>Lamprocapnos spectabilis</i>	6.73 $\pm$ 0.11	90.00 $\pm$ 2.83
紫堇 <i>Corydalis edulis</i>	5.83 $\pm$ 0.46	87.25 $\pm$ 2.47
延胡索 <i>Corydalis yanhusuo</i>	13.10 $\pm$ 0.42	80.63 $\pm$ 1.94
角茴香 <i>Hypecoum erectum</i>	9.08 $\pm$ 0.53	86.50 $\pm$ 2.12

植物叶片的细胞壁组成存在一定的差异,选择混合酶体系更有利于酶解。在不同酶解液组合下原生质体释放的最佳时间不一致,酶解时间在高质量分数酶解液体系中对原生质体产量和活力的影响尤为明显。用相同的酶解液(2.00%纤维素酶+0.25%果胶酶)分离银杏叶肉、茎和根的原生质体,可在3~6 h内得到一定产量的原生质体^[30]。棉花根在1.50%纤维素酶+0.75%离析酶的酶解液中酶解3 h效果最佳,且不同生长期棉花根的最佳酶解液浓度也不同^[29]。不同品质、不同部位的牵牛花在2.0%纤维素酶+0.6%离析酶的酶解液中均可获得理想的原生质体^[32]。在斑叶草原生质体制备过程中加入一定量的果胶酶,可有效分离酶解不完全的叶片组织,原生质体分离效果显著提高^[14]。

3.3 其他因素对原生质体制备的影响

中国分布有罂粟科植物3亚科18属^[1],因栽培相对广泛且易获取,本研究选取了罂粟属、花菱草属、白屈菜属、博落回属、角茴香属、荷包牡丹属和紫堇属植物进行最佳原生质体制备方案的验证,这些罂粟科不同亚科植物或相同亚科不同属植物的叶片特性存在较大差异,导致其原生质体个体大小和数量均有不同,因此,在相同倍镜的视野下,相同取样量时原生质体数量不同。植物叶片生长时间、结构特点和生长状态都会对原生质体提取效果产生影响。如:秋冬季节的原

生质体产量和质量较低^[33];植物叶片越幼嫩,提取效果越好,如花菱草、博落回、小果博落回和虞美人所取叶片为嫩叶,原生质体的产量和活力均比较理想;而紫堇和白屈菜的叶片因生长周期较长,在酶解过程中原生质体产量相对较低。随着叶片生长周期的延长,相同植物的叶片原生质体形态、大小也会发生变化。因此,试验过程中应根据试验需求选择适宜生长周期的植物叶片,以获取理想产量及活力的原生质体。

原生质体具有发育成完整植株的能力^[34],但类似研究在罂粟科植物中还处于起步阶段。本研究建立的罂粟科植物原生质体制备体系具有高效、可靠的特点,所获得的原生质体可用于原生质体瞬时转化和表达,也可用于植物体细胞再生、转录因子亚细胞定位、蛋白质相互作用和转录因子活性的检测^[13],有助于解析罂粟科植物苜蓿基异喹啉生物碱的合成通路;但该合成过程主要在博落回和花菱草的根部进行,因此,后续需要进一步建立罂粟科植物根的原生质体制备体系,为原生质体瞬时转染体系、原生质体细胞壁的再生以及形成完整植株的体系提供技术支持,也为药用植物遗传和育种研究奠定基础。

4 结论

花菱草原生质体制备的最优提取条件为预制液浓度0.8 mol/L,酶解时间6 h,酶解液组成为1.5%纤维素酶+0.4%离析酶+0.3%果胶酶。对罂粟科不同亚科多种药用植物进行了原生质体提取和应用验证,进一步证明该条件可以对罂粟科植物原生质体进行高效提取,可为后续单细胞测序、遗传转化体系构建、原生质体融合育种及转录组多样性分析等提供技术支撑。

[参考文献]

- [1] 庄璇. 罂粟科植物的分类、进化与分布[J]. 云南植物研究, 1993, 15(2): 137.
- [2] 宁岁侠. 罂粟科Papaveraceae花发育研究及其系统学意义[D]. 西安: 陕西师范大学, 2009.
- [3] 薛楚, 刘思雪, 黄芳. 罂粟科植物罂粟、延胡索和岩黄连镇痛作用的研究进展[J]. 药学研究, 2019, 38(5): 290. DOI: 10.13506/j.cnki.jpr.2019.05.011.
- [4] 于荣敏, 王春盛, 宋丽艳. 罂粟科植物的化学成分及药理作用研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2004, 38(7): 59. DOI: 10.16305/j.1007-1334.2004.07.027.
- [5] LIN H Y, CHEN J C, FANG S C. A protoplast transient expression system to enable molecular, cellular, and functional studies in *Phalaenopsis* orchids[J]. Frontiers

- in Plant Science, 2018, 9: 843. DOI: [10.3389/fpls.2018.00843](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00843). eCollection2018.
- [6] NAING A H, ADEDEJI O S, KIM C K. Protoplast technology in ornamental plants: current progress and potential applications on genetic improvement[J]. Scientia Horticulturae, 2021, 283: 110043. DOI: [10.1016/j.scienta.2021.110043](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110043).
- [7] NEUBAUER A, RUAUD S, WALLER M, et al. Step-by-step protocol for the isolation and transient transformation of hornwort protoplasts[J]. Applications in Plant Sciences, 2022, 10(2): e11456. DOI: [10.1002/aps3.11456](https://doi.org/10.1002/aps3.11456).
- [8] 赖叶林, 贺莹, 李欣欣, 等. 一种植物原生质体分离与瞬时转化的方法[J]. 植物生理学报, 2020, 56(4): 895. DOI: [10.13592/j.cnki.ppj.2019.0151](https://doi.org/10.13592/j.cnki.ppj.2019.0151).
- [9] 张晓丽, 何瑞, 童家赞, 等. 青天葵叶片原生质体分离条件的优化[J]. 广东农业科学, 2011, 38(19): 107. DOI: [10.16768/j.issn.1004-874x.2011.19.052](https://doi.org/10.16768/j.issn.1004-874x.2011.19.052).
- [10] 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. DOI: [10.11983/CBB16171](https://doi.org/10.11983/CBB16171).
- [11] 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. DOI: [10.15889/j.issn.1002-1302.2018.17.007](https://doi.org/10.15889/j.issn.1002-1302.2018.17.007).
- [12] 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. DOI: [10.1186/s12870-020-02554-6](https://doi.org/10.1186/s12870-020-02554-6).
- [13] 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, 2020, 45(19): 4555. DOI: [10.19540/j.cnki.cjcm.20200623.101](https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcm.20200623.101).
- [14] WANG J H, WANG Y, LU T F, et al. An efficient and universal protoplast isolation protocol suitable for transient gene expression analysis and single-cell RNA sequencing[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(7): 3419. DOI: [10.3390/ijms23073419](https://doi.org/10.3390/ijms23073419).
- [15] LANG H, KOHLENBACH H W. Differentiation of alkaloid cells in cultures of *Macleaya* mesophyll protoplasts[J]. Planta Medica, 1982, 46(10): 80. DOI: [10.1055/s-2007-970025](https://doi.org/10.1055/s-2007-970025).
- [16] HAUSER M T, WINK M. Uptake of alkaloids by latex vesicles and isolated mesophyll vacuoles of *Chelidonium ntajus* (Papaveraceae)[J]. Zeitschrift Für Naturforschung C, 1990, 45(9): 949. DOI: [10.1515/znc-1990-9-1005](https://doi.org/10.1515/znc-1990-9-1005).
- [17] 汪鹏, 黄鹏, 刘薇, 等. 博落回叶肉组织原生质体的分离条件筛选[J]. 分子植物育种, 2020, 18(10): 3341. DOI: [10.13271/j.mpb.018.003341](https://doi.org/10.13271/j.mpb.018.003341).
- [18] MYERS R H, MONTGOMERY D C, ANDERSON-COOK C M. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiment[M]. 4th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2016.
- [19] 孙佳星, 杨红, 孙晓东, 等. 基于响应面法对香菇原生质体制备条件的优化[J]. 菌物学报, 2022, 41(5): 837. DOI: [10.13346/j.mycosystema.210295](https://doi.org/10.13346/j.mycosystema.210295).
- [20] MURALIDHAR R, GUMMADI S N, DASU V V, et al. Statistical analysis on some critical parameters affecting the formation of protoplasts from the mycelium of *Penicillium griseofulvum*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2003, 16(3): 229. DOI: [10.1016/S1369-703X\(03\)00024-X](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00024-X).
- [21] AVILA-PELTROCHE J, WON B Y, CHO T O. Optimization of protoplast isolation from the gametophytes of brown alga *Undaria pinnatifida* using response surface methodology[J]. Journal of Applied Phycology, 2020, 32(4): 2233. DOI: [10.1007/s10811-020-02095-3](https://doi.org/10.1007/s10811-020-02095-3).
- [22] WANG M, ZHANG J, WANG L Y, et al. Optimization of production conditions for protoplasts and polyethylene glycol-mediated transformation of *Gaeumannomyces tritici*[J]. Molecules, 2018, 23(6): 1253. DOI: [10.3390/molecules23061253](https://doi.org/10.3390/molecules23061253).
- [23] LOTZ D, IMANI J, EHLERS K, et al. Towards a genetic model organism: an efficient method for stable genetic transformation of *Eschscholzia californica* (Ranunculales)[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2022, 149: 823. DOI: [10.1007/s11240-021-02223-y](https://doi.org/10.1007/s11240-021-02223-y).
- [24] PARK S U, FACCHINI P J. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of opium poppy, *Papaver somniferum* L., and California poppy, *Eschscholzia californica* Cham., root cultures[J]. Journal of Experimental Botany, 2000, 51(347): 1005. DOI: [10.1093/jexbot/51.347.1005](https://doi.org/10.1093/jexbot/51.347.1005).
- [25] XU M X, DU Q W, TIAN C H, et al. Stochastic gene expression drives mesophyll protoplast regeneration[J]. Science Advances, 2021, 7(33): eabg8466. DOI: [10.1126/sciadv.abg8466](https://doi.org/10.1126/sciadv.abg8466).
- [26] HUO A L, CHEN Z Y, WANG P K, et al. Establishment of transient gene expression systems in protoplasts from Liriodendron hybrid mesophyll cells[J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0172475. DOI: [10.1371/journal.pone.0172475](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172475).
- [27] 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]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(4): 3633. DOI: [10.3390/ijms24043633](https://doi.org/10.3390/ijms24043633).
- [28] LIN Z, HUANG L J, YU P Y, et al. Development of a protoplast isolation system for functional gene expression and characterization using petals of *Camellia oleifera*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2023, 201: 107885. DOI: [10.1016/j.plaphy.2023.107885](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107885).
- [29] 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. DOI: [10.1186/s13007-023-00983-6](https://doi.org/10.1186/s13007-023-00983-6).
- [30] HAN X, RONG H, FENG Y N, et al. Protoplast isolation and transient transformation system for *Ginkgo biloba* L.[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1145754. DOI: [10.3389/fpls.2023.1145754](https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1145754).
- [31] WU J Z, LIU Q, GENG X S, et al. Highly efficient mesophyll protoplast isolation and PEG-mediated transient gene expression for rapid and large-scale gene characterization in cassava (*Manihot esculenta* Crantz)[J]. BMC Biotechnology, 2017, 17(1): 29. DOI: [10.1186/s12896-017-0349-2](https://doi.org/10.1186/s12896-017-0349-2).
- [32] KANG H H, NAING A H, PARK S K, et al. Protoplast isolation and transient gene expression in different petunia cultivars[J]. Protoplasma, 2023, 260: 271. DOI: [10.1007/s00709-022-01776-9](https://doi.org/10.1007/s00709-022-01776-9).
- [33] DUARTE P, RIBEIRO D, CARQUELJEIRO I, et al. Protoplast transformation as a plant-transferable transient expression system[M]//FETT-NETO A G. Biotechnology of plant secondary metabolism: methods and protocols. New York: Springer, 2016.
- [34] XUE Y X, HITI-BANDARALAGE J C A, HU Z P, et al. First Report on mesophyll protoplast isolation and regeneration system for the *Duboisia* species[J]. Plants, 2024, 13(1): 40. DOI: [10.3390/plants13010040](https://doi.org/10.3390/plants13010040).

责任编辑: 何承刚