

丁林云, 万 可, 杨 丹, 等. 转基因在菊花叶肉原生质体瞬时表达及亚细胞定位分析[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(2): 518-524.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.02.025

转基因在菊花叶肉原生质体瞬时表达及亚细胞定位分析

丁林云^{1,2}, 万 可³, 杨 丹^{1,2}, 王 同^{1,2}, 王春梅^{1,2}, 郭书巧^{1,2}, 杨 霞^{1,2}

(1.江苏省农业科学院中心实验室/江苏省农业科学院种质资源与生物技术研究所, 江苏 南京 210014; 2.江苏省农业科学院经济作物研究所, 江苏 南京 210014; 3.南京农业大学农学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 为探究用于亚细胞定位研究的菊花叶肉原生质体分离的最适条件, 本研究以菊花无菌苗叶片为受体材料, 分析不同叶龄叶片和酶解时间对菊花原生质体细胞产量的影响, 并利用外源质粒的导入验证了聚乙二醇(PEG)介导的菊花原生质体瞬时转化体系。结果表明, 以组织培养 14 d 的菊花无菌苗叶片为外植体材料, 在含 1.5% 纤维素酶、0.4% 离析酶和 0.8 mol/L 甘露醇的酶解液中振荡酶解 6 h, 能获得高产的原生质体细胞。采用 PEG 介导的瞬时转化含绿色荧光蛋白(GFP)的表达载体, 在菊花原生质体细胞中观察到强烈的绿色荧光信号。结果显示, 稗草乙烯转录因子基因(*EcERF*)在菊花原生质体中与本氏烟草叶片中的瞬时表达一致, *EcERF* 基因定位于细胞核中。

关键词: 菊花; 原生质体; 瞬时表达; 亚细胞定位

中图分类号: S682.1⁺1

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2023)02-0518-07

Analysis of transient expression of chrysanthemum mesophyll protoplasts and subcellular localization

DING Lin-yun^{1,2}, WAN Ke³, YANG Dan^{1,2}, WANG Tong^{1,2}, WANG Chun-mei^{1,2}, GUO Shu-qiao^{1,2}, YANG Xia^{1,2}

(1. Central Laboratory of Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Institute of Crop Germplasm and Biotechnology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 3. College of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: To explore the optimal condition for the separation of mesophyll protoplasts of chrysanthemum for subcellular localization study, leaves of aseptic chrysanthemum seedlings were used as acceptor material in this study to analyze the effects of leaves with different culture times and different enzymatic hydrolysis time on the yield of chrysanthemum protoplast cells, and polyethylene glycol (PEG)-mediated transient transformation system of chrysanthemum protoplasts was verified by leading in exogenous plasmids. The results showed that, protoplasmic cells with high yield could be obtained by shaking enzymatic hydrolysis for six hours in enzymatic hydrolysis solution containing 1.5% cellulase, 0.4% macerozyme and 0.8 mol/L mannitol, using leaves of aseptic chrysanthemum seedlings cultured for 14 days as explants material. A strong green fluorescent signal was observed in chrysanthemum protoplast cells by using PEG mediated expression vector for transient transformation containing green fluorescent protein (GFP). The results indicated that ethylene transcription factor gene in *Echinochloa crusgalli* (*EcERF*) were transiently

expressed in chrysanthemum protoplasts and tobacco (*Nicotiana benthamiana*) leaves, which were both located in the nucleus.

Key words: *chrysanthemum*; protoplast; transient expression; subcellular localization

收稿日期: 2022-05-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(31772183); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX17(3050)]

作者简介: 丁林云(1980-), 女, 江苏连云港人, 硕士, 助理研究员, 从事植物转基因功能研究。(E-mail) 20210991@jaas.ac.cn。
万可为共同第一作者。

通讯作者: 杨 霞, (E-mail) xiayang_njau@hotmail.com

菊花(*Dendranthema morifolium* Ramat.)是菊科

菊属多年生宿根草本植物,其种质资源丰富,起源于中国并广泛栽培于世界各地,具有较高的观赏、食用、茶饮和药用价值,在生产和园林应用中具有重要作用^[1-2]。随着社会发展及人们生活水平的提高,菊花产业发展迅速,不断增长的菊花需求促使科学家们选育出新型性状、耐胁迫、品质高的菊花品种,然而,菊花的高度杂合性和多倍性给菊花功能基因的鉴定工作增加了难度,给菊花育种工作带来了很大的挑战^[3-4]。据研究,原生质体细胞作为优质转化外植体运用于瞬时表达分析,可为关键基因的功能研究、转基因研究提供重要的材料基础,可为菊花育种研究提供重要的技术手段。

原生质体是植物细胞经酶解或机械去除细胞壁后分离纯化的裸露细胞,具有细胞全能性,能够高效表达外源 DNA^[5]。植物原生质体作为功能基因研究的转化受体材料,能够让植物细胞快速增殖和植物再生,广泛应用于植物分子育种、亚细胞定位、基因启动子活性、信号转导以及蛋白质互作等方面^[6-9]。据报道,利用原生质体的高效瞬时基因表达系统在许多植物(包括烟草^[10]、拟南芥和玉米^[11]、水稻^[12]、棉花^[13]、多年生黑麦草^[14]、短梗草^[15]、茶树^[16]等)中已成功建立原生质体瞬时转化体系,在植物的非生物胁迫和生物胁迫等研究中得到了应用^[17-18]。菊花中原生质体分离和再生体系近几年才有报道^[19],将外源基因转化的菊花原生质体细胞进行瞬时表达,并进行目标基因功能分析的报道较少^[20],且不同菊花品种之间可能存在差异。参考拟南芥等模式作物原生质体瞬时表达系统,本研究以金丝皇菊花品种为转化受体,研究其用于瞬时转化研究的原生质体叶肉分离的最适条件,将带有绿色荧光蛋白(GFP)报告基因的质粒转化菊花原生质体细胞,以期进行外源基因的亚细胞定位应用研究。

1 材料与方法

1.1 植物材料

菊花品种为金丝皇菊,幼苗来源于江苏省淮安茹园生态农业种植基地。将生长至叶片数为(15±1)张的菊花苗移栽到温室(25℃,16 h光照/8 h黑暗)进行盆栽培养,选取完全展开、绿色无病害的菊花植株,取其顶芽培养的无菌苗作为外植体。

烟草品种为本氏烟(*Nicotiana benthamiana*),种子由本研究室保存。将烟草种子撒播于无菌营养土

中,盆栽(26℃,16 h光照/8 h黑暗)培养30 d左右,待用。

1.2 试验方法

1.2.1 菊花无菌苗的培养 选取完全展开的健康菊花叶片顶芽,流水下冲洗2 h;无菌环境下,用体积分数70%乙醇表面灭菌30 s,用无菌水冲洗;然后用0.1% HgCl₂浸泡6 min,再用无菌水冲洗5~6次。切割2~3 cm左右的叶片顶芽并去除叶片,接种于含1.2 mg/L 6-苄氨基嘌呤(6-BA)+0.3 mg/L萘乙酸(NAA)的MS培养基中,进行无菌苗成苗培养。待培养15~30 d后,顶芽伸长并叶片舒展,株高1~2 cm,将伸长芽接种至含0.5 mg/L吲哚丁酸(IBA)的1/2 MS培养基中生根培养,诱导大量不定根生成,获得菊花无菌苗。

1.2.2 菊花外植体的制备 获得菊花生根无菌苗后,温室继代培养14 d。挑选健康、发育完全的菊花无菌苗植株,选取长势良好、大小一致、饱满圆润的倒3叶和倒4叶叶片。基于高产原生质体细胞的获得,进行外植体最适生长周期的筛选,试验设置菊花无菌苗不同继代培养时间:6 d、10 d、14 d和18 d,每个处理重复3次。

1.2.3 菊花原生质体细胞的分离 将1.0~1.5 g无菌苗叶片置于覆盖滤纸的玻璃培养皿上,用刀片将叶鞘切成1~2 mm的细丝状,并迅速浸入配制好的20 ml酶解液[含1.5%纤维素酶R-10、0.4%离析酶R-10、0.8 mol/L甘露醇、0.2 mol/L吗啉乙磺酸钠(MES)(pH 5.7)、2.0 mol/L NaCl、1.0 mol/L CaCl₂、2.0 mol/L KCl、2.0 mol/L MgCl₂]中,使其充分散开,26℃避光,置于摇床轻摇(40 r/min)酶解,至酶解混合液呈现淡绿色,肉眼观察到沉淀细胞。考虑在不同酶解时间条件下,获得的原生质体细胞质量有差异,试验设置了不同梯度的酶解时间:2 h、4 h、6 h和8 h。每个处理重复3次。

1.2.4 菊花原生质体细胞的纯化与产量检测 预先用W5溶液(含2.0 mol/L NaCl、1.0 mol/L CaCl₂、2.0 mol/L KCl、0.2 mol/L MES)浸润无菌细胞过滤器(40 μm),过滤酶解混合液至培养皿中,并沿着管壁轻轻加入到50 ml离心管,再吸取20 ml W5溶液润洗酶解液的烧杯、细胞筛及培养皿,收集其中残余的原生质体细胞,与滤液加入到同一个50 ml离心管轻旋混匀。使用吊篮低速离心机(湖南赫西仪器装备有限公司产品),1档升/降速,4℃、60 g

离心 4 min, 弃去上清液, 加入 20 ml W5 溶液重悬细胞, 1 档升/降速, 4 ℃、60 g 离心 4 min, 弃去上清液。沉淀加入适量的 W5 重悬细胞。

取 1 ml 纯净的原生质体悬浮液进行镜检, 取 8 μ l 滴于载玻片上, 用 18 mm \times 18 mm 的盖玻片加盖, 利用荧光显微镜进行图片采集, 在 10 倍物镜视野 (640 mm \times 480 mm) 下观察总原生质体数, 生物学 3 次重复, 试验设置 3 次重复, 取平均值。按植物原生质体简易计数法^[21]统计原生质体总密度, 原生质体总密度 (个, 1 ml) = $[(1\ 000 \div 8) \times (18 \times 18 \div 3.14)] \times$ 平均值。

1.2.5 载体制备 将目的基因稗草乙烯转录因子 (*EcERF*) 插入到植物表达载体 pBinGFP4 中^[22], 构建 *EcERF*::GFP 融合表达载体, 以 pBinGFP4 空载体为对照, 进行菊花原生质体瞬时转化; 并将稗草乙烯转录因子基因插入到含黄色荧光蛋白 (Yellow fluorescent protein, YFP) 的植物表达载体 pCAMBIA1300-YFP 中, 构建 *EcERF*::YFP 融合表达载体, 进行烟草的瞬时转化。

1.2.6 目标基因在菊花原生质体中的瞬时转化 加入适量的 MMG (0.8 mol/L 甘露醇, 2.0 mol/L $MgCl_2$, 0.2 mol/L MES) 溶液于原生质体细胞沉淀中, 混匀后利用吊篮低速离心机, 1 档升/降速, 4 ℃、60 g 转速离心 4 min, 弃去上清液。分别将重组质粒 *EcERF*::GFP 和空载体 pBinGFP4 质粒各 10 μ g (1 μ g/ μ l, 10 μ l) 与原生质体细胞按照体积比 1:30 混匀, 加入与质粒 DNA 及原生质体细胞混合液等体积的 40% 聚乙二醇 (PEG, 4000) 溶液。然后, 立即轻柔混匀, 室温静置 15 min。再加入 2 倍体积的 W5 溶液, 轻弹混匀, 再次离心。加入 2 ml W5 溶液, 轻弹或颠倒混匀, 26 ℃ 避光, 静置过夜培养 8~12 h。

取出过夜培养的原生质体转化体培养液, 1 档升/降速, 60 g 转速离心 4 min, 收集沉淀。去除上清液, 加入适量的 W5 溶液重悬原生质体。利用激光共聚焦显微镜 (珀金埃尔默仪器有限公司产品) 进行观察, 显示绿色荧光信号的原生质体为已成功转化的原生质体, 观察 GFP 在菊花原生质体细胞中是否正常表达, 计算其转化率。原生质体转化率 = 绿色荧光视野中原生质体个数/明场中原生质体个数 \times 100%。

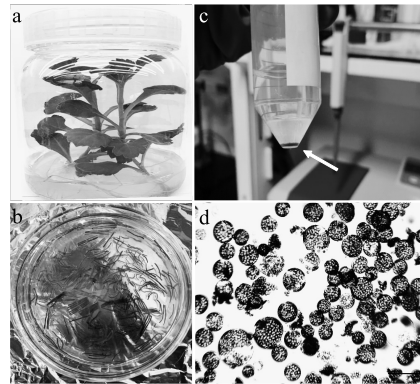
1.2.7 目标基因在烟草中的亚细胞定位 将 *EcERF*::YFP 载体导入菌株 GV3101 中, 挑取单克隆

置于含有卡那霉素 (50 mg/L) 和利福平 (25 mg/L) 的液体 LB 培养基中, 28 ℃ 振荡培养 24 h, 4 000 r/min, 离心 20 min, 弃去上清液。用缓冲液 [10 mmol/L $MgCl_2$, 10 mmol/L MES (pH 5.7), 200 μ mol/L 乙酰丁香酮 (AS)] 重悬浮 2 次, 将 OD_{600} 调至 0.5 左右。黑暗室温放置 3~4 h, 用 1 ml 的针头注射器将菌液注入烟草叶片的反面, 注射后 48~72 h 用激光共聚焦显微镜观察, 使用细胞核染料 4, 6-二氨基-2-苯基吡啶 (DAPI) 作为细胞核定位的标记。

2 结果与分析

2.1 菊花原生质体细胞体系的制备

选取菊花组培苗幼嫩叶片作为外植体 (图 1a) 并切成均匀的细丝, 再迅速置于酶解混合液中 (图 1b)。充分酶解受体组织, 破除细胞壁并释放原生质体细胞, 收集菊花的原生质体沉淀后进行纯化 (图 1c), 镜检获得大量的菊花叶片原生质体细胞, 并且产生少量碎片 (图 1d)。



a: 菊花无菌苗 ($\times 10$); b: 酶解后的混合液 ($\times 10$); c: 原生质体富集 ($\times 10$); d: 纯净的叶片原生质体 ($\times 10$)。

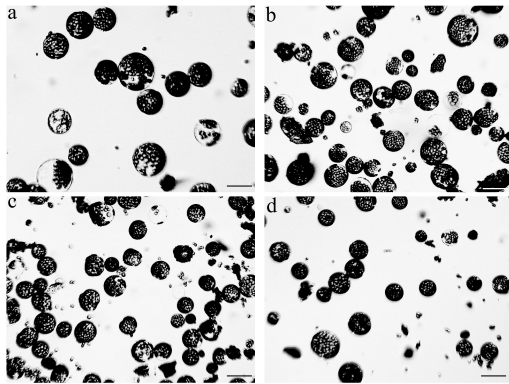
图 1 菊花原生质体的游离与纯化

Fig.1 Isolation and purification of protoplasts from chrysanthemum

2.2 不同培养时间对菊花原生质体细胞分离的影响

研究结果表明, 在相同的酶解时间下, 不同培养时间的菊花组培苗获得的原生质体细胞得率存在显著差异。参考宋爱华等^[20]的方法选择酶解时间 4 h、组培时间 6 d 的菊花无菌苗的叶片, 产生了极少量的原生质体 (图 2a); 选用培养 10 d 的组培苗的叶片制备原生质体细胞, 获得的原生质体大小均一, 且产量显著增加, 细胞碎片减少 (图 2b);

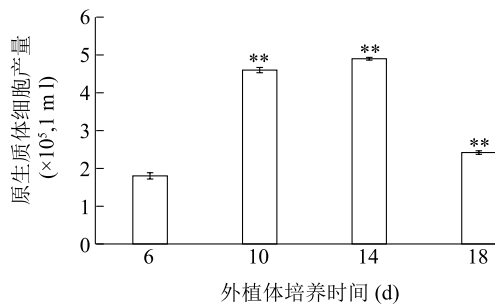
当培养时间达到 14 d 时,获得原生质体的数量达到最高值(图 2c)。但是,随着培养时间延长,培养 18 d 的菊花无菌苗获得的原生质体产量却开始下降(图 2d)。因此,选取培养 14 d 的菊花组培苗嫩叶为最佳外植体材料,能获得纯净原生质体细胞,且数量可达 1 ml 4.9×10^5 个(图 3)。



a: 组培 6 d; b: 组培 10 d; c: 组培 14 d; d: 组培 18 d。比例尺 = 100 μm 。

图 2 不同培养时间菊花原生质体细胞

Fig.2 Chrysanthemum protoplasts under different tissue culture times



** 表示培养 10 d、14 d、18 d 的菊花组培苗原生质体细胞产量极显著高于培养 6 d 的菊花组培苗原生质体细胞产量 ($P < 0.01$)。

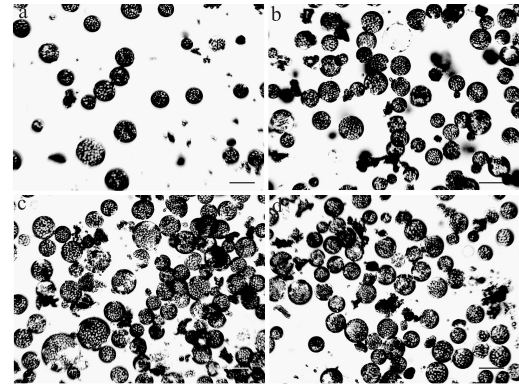
图 3 不同培养时间对菊花原生质体细胞产量的影响

Fig.3 Effects of chrysanthemum protoplast yield under different tissue culture times

2.3 不同酶解时间对原生质体细胞分离的影响

不同的酶解时间对获得的原生质体的产量有较大影响。在渗透压、叶龄一致的条件下,不同的酶解时间,原生质体的产量有明显差异。在酶解 2 h 后,菊花叶片开始变软,并有少量的原生质体细胞产生(图 4a);酶解 4 h 后,游离出的原生质体细胞数量逐

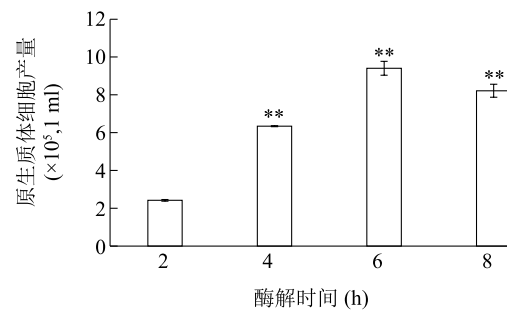
渐增多(图 4b);酶解 6 h 后,酶解液的酶解效率最高(图 4c),原生质体产量达到 1 ml 9.4×10^5 个。但是,酶解 8 h 后,因已分离出的原生质体会破开,细胞碎片增加,原生质体的得率减少(图 4d)。结果显示,菊花叶片最适酶解时间为 6 h(图 5)。



a: 酶解 2 h; b: 酶解 4 h; c: 酶解 6 h; d: 酶解 8 h。比例尺 = 100 μm 。

图 4 不同酶解时间的菊花原生质体细胞

Fig.4 Chrysanthemum protoplast under different enzymolysis times



** 表示酶解时间 4 h、6 h、8 h 的菊花组培苗原生质体细胞产量极显著高于酶解时间 2 h 的菊花组培苗原生质体细胞产量 ($P < 0.01$)。

图 5 不同酶解时间对菊花原生质体细胞产量的影响

Fig.5 Effects of chrysanthemum protoplast yield under different tissue enzymolysis times

2.4 菊花原生质体的遗传转化

激光共聚焦显微镜的观察结果显示,在菊花的原生质体细胞的细胞核、质膜等部位均可检测到绿色荧光(图 6),与同一视野其明场原生质体细胞相比,计算得出成功转化绿色荧光原生质体细胞的阳性转化率达 91.3%。结果表明,本研究已将带有 GFP 荧光蛋白的空载体质粒 DNA 成功转入菊花原生质体中,并进行了有效的瞬时表达。

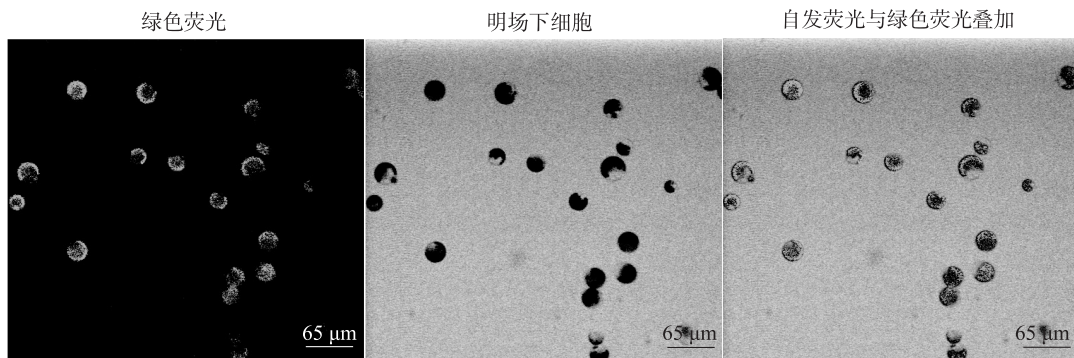
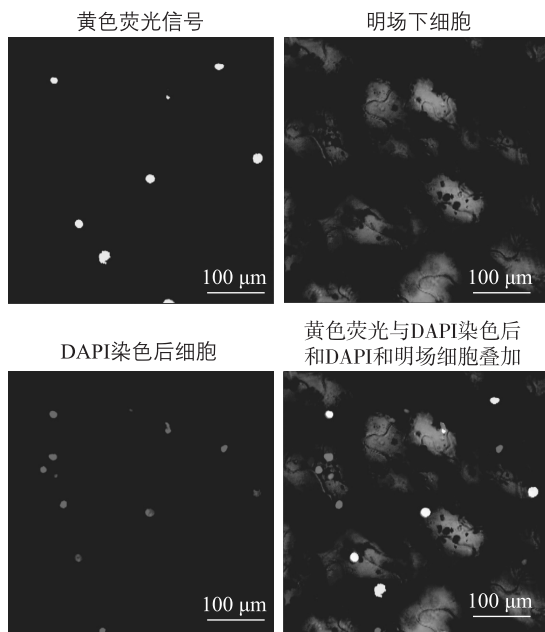
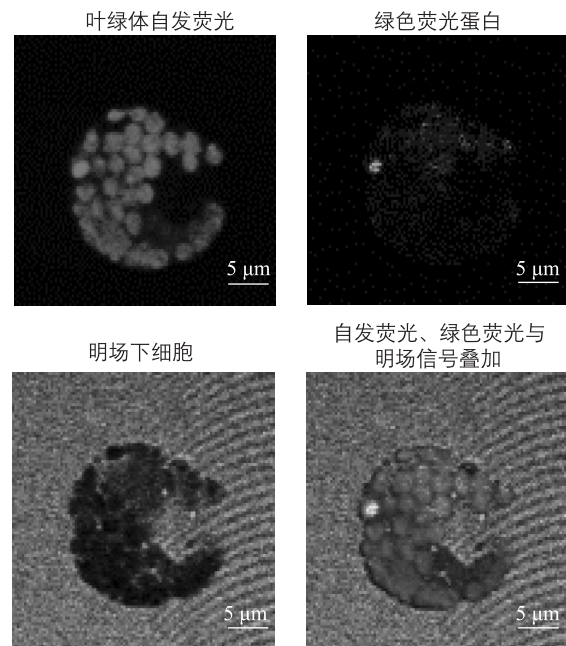


图 6 pBinGFP4 转化菊花原生质体细胞

Fig.6 Chrysanthemum protoplasts transformed by pBinGFP4

2.5 菊花原生质体瞬时转化体系的验证

将 *EcERF::YFP* 载体转化烟草,采用 DAPI 染料作为细胞核定位标记,发现与 *EcERF* 融合的 YFP 的荧光信号与 DAPI 共定位,表明 *EcERF* 基因定位于细胞核中(图 7)。将 *EcERF* 基因融合 GFP 蛋白,在菊花原生质体细胞中进行瞬时转化,结果表明, *EcERF* 基因亦定位于细胞核中(图 8),与该基因在烟草中的定位结果一致。

图 7 稗草乙烯转录因子基因(*EcERF*)在烟草叶片中的瞬时表达Fig.7 Transient expression of ethylene transcription factor gene in *Echinochloa crusgalli* (*EcERF*) in tobacco leaves图 8 稗草乙烯转录因子基因(*EcERF*)在菊花原生质体细胞中的瞬时转化Fig.8 Transient transformation of ethylene transcription factor gene in *Echinochloa crusgalli* (*EcERF*) in chrysanthemum protoplasts

3 讨论

3.1 高质量菊花原生质体的制备

在进行植物原生质体的制备过程中,选择合适的外植体材料、不同的酶解时间、合适的渗透压、不同酶液质量浓度或几个关键因素组合,对于高质量原生质体细胞的获得至关重要。本研究利用酶解法分离纯化出菊花叶肉的原生质体细胞,对影响制备

菊花原生质体的上述部分关键因素进行探索分析。不同生理状态和生长周期的植物外植体,对获得高产原生质体有着极其重要的影响。本试验选用组织培养 14 d 的菊花无菌苗,并挑选生长状态良好的菊花无菌苗倒3~4 叶叶片提取原生质体,获得了 1 ml 4.9×10^5 个以上的原生质体。而酶解时间的长短是获得高产原生质体的另一个重要条件,植物原生质体细胞的产量会随着酶解时间的延长而逐渐下降。在选择最适培养周期(14 d)的菊花无菌苗的条件下,进行最佳酶解时间的摸索,发现酶解 6 h 时,获得的原生质体的数量与质量均最佳,产量达 1 ml 9.4×10^5 个;当酶解时间达到 8 h 时,原生质体的数量呈下降趋势。在其他试验条件一致的前提下,酶解时间越长,细胞质和细胞膜越易受到伤害,产生破碎的细胞也越多,对细胞产生的毒害作用亦越大。因此,酶解时间是否合适是能否获得优质的原生质体的重要限制因素之一。

3.2 目标基因在菊花原生质体细胞中的有效表达

目前,关于菊花的转基因功能研究已有很多报道,如转录因子基因 *DgWRKY5*^[23]、*CmERF053*^[24]、*CICBF1*^[25] 等,在菊花育种上具有很高的产业应用前景。本研究运用已建立的菊花原生质体制备及瞬时转化体系,对 ERF 转录因子家族基因 *EcERF* 进行亚细胞定位,*EcERF* 蛋白清晰定位在细胞核上,表明该体系可用于基因的功能研究。

在进行原生质体细胞转化过程中,原生质体细胞质量的高低直接影响到转化效率。首先,内毒素对细胞具有毒性,在极大程度上影响细胞的转化效率。为确保目的基因成功转化原生质体细胞,本试验利用无内毒素质粒提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]大量提取重组质粒和空载体质粒,成功转化原生质体;其次,如果载体质粒 DNA 浓度过高或过低,均会影响蛋白质的有效瞬时表达。本研究通过紫外-可见光全光谱分光光度计测定的质粒 DNA 质量浓度在 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 以上, OD_{260}/OD_{280} 为 1.8~2.0 时,能够有效地将目的基因转入原生质体细胞。

鉴于菊花的生理特性,结合菊花外植体的材料选择,对菊花原生质体制备的其他因素进行了优化。为提高菊花叶肉细胞的酶解效率,对酶解液进行预处理(55 ℃ 水浴 10~15 min),能够提高酶的活性,提高破碎植物细胞壁的效率,大大缩短酶解时间,降低

细胞毒害,从而减少因细胞破碎产生的细胞碎片,降低亚细胞的数量,有助于获得产量高且大小一致的原生质体细胞。在酶解过程中选择避光和轻柔振荡,能够有效提高酶解效率,大大缩短酶解时间,为进一步高质量的基因转化提供基础。此外,由于原生质体是裸露的无细胞壁的细胞,极易破裂,离心力大小可能会影响原生质体的得率。因此,本研究选择 60 g、1 档升/降速,适宜的离心速度可以减少原生质体受外力破坏的程度,有利于获得高质量的原生质体细胞。

4 结 论

综上所述,以组织培养 14 d 的菊花无菌苗叶片为外植体,酶解液组合为 1.5% 纤维素酶、0.4% 离析酶和 0.8 mol/L 甘露醇,26 ℃ 避光振荡酶解 6 h,获得高质量的菊花原生质体细胞,并成功进行了 *EcERF* 基因的瞬时表达,对 *EcERF* 基因在烟草中的亚细胞定位的结果进行了佐证,证明 *EcERF* 蛋白清晰定位于细胞核中。

参考文献:

- [1] 邓 波,王亚磊,林思思,等. 中国菊花精品展传统菊品种资源调查与整理分析[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(5): 1292-1298.
- [2] 杨 霞,付佑胜,李建伟,等. 不同覆盖处理对金丝皇菊种植地的控草效果[J]. 杂草学报, 2021, 9(3): 61-66.
- [3] SU J S, JIANG J F, ZHANG F, et al. Current achievements and future prospects in the genetic breeding of chrysanthemum: a review [J]. Horticulture Research, 2019, 6: 109.
- [4] NAKANO M, HIRAKAWA H, FUKAI E, et al. A chromosome-level genome sequence of chrysanthemum seticuspe, a model species for hexaploidy cultivated chrysanthemum [J]. Communications Biology, 2021, 4(1): 1167.
- [5] 孙勇如,安锡培. 植物原生质体培养[M]. 北京:科学出版社, 1991.
- [6] FARACO M, DI SANSEBASTIANO G P, SPELT K, et al. One protoplast is not the other [J]. Plant Physiology, 2011, 156(2): 474-478.
- [7] YOO S D, CHO Y H, SHEEN J. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis [J]. Nature Protocols, 2007, 2(7): 1565-1572.
- [8] SHEEN J. Signal transduction in maize and *Arabidopsis* mesophyll protoplasts [J]. Plant Physiology, 2001, 127(4): 1466-1475.
- [9] WALTER M, CHABAN C, SCHUTZE K, et al. Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation [J]. Plant Journal, 2010, 40(3): 428-

- 438.
- [10] FISCHER R, HAIN R. Tobacco protoplast transformation and use for functional analysis of newly isolated genes and gene constructs [J]. *Methods in Cell Biology*, 1995, 50: 401-410.
- [11] 赵苏州, 卢运明, 张占路, 等. 玉米和拟南芥的原生质体制备及瞬时表达体系的研究 [J]. *安徽农业科学*, 2014, 42(12): 3479-3482.
- [12] 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.
- [13] 李妮娜, 丁林云, 张志远, 等. 棉花叶肉原生质体分离及目标基因瞬时表达体系的建立 [J]. *作物学报*, 2014, 40(2): 231-239.
- [14] YU G H, CHENG Q, XIE Z, et al. An efficient protocol for perennial ryegrass mesophyll protoplast isolation and transformation, and its application on interaction study between LpNOL and LpNYC1 [J]. *Plant Methods*, 2017, 13: 46.
- [15] HONG S Y, SEO P J, CHO S H, et al. Preparation of leaf mesophyll protoplasts for transient gene expression in *Brachypodium distachyon* [J]. *Journal of Plant Biology*, 2012, 55(5): 390-397.
- [16] XU X F, ZHU H Y, REN Y F, et al. Efficient isolation and purification of tissue-specific protoplasts from tea plants [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] [J]. *Plant Methods*, 2021, 17(1): 84.
- [17] CONFRAIA A, BAENA-GONZÁLEZ E. Using *Arabidopsis* protoplasts to study cellular responses to environmental stress [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2016, 1398: 247-269.
- [18] SON S, KWON M, IM J H, et al. A new approach for wounding research: *MYC2* gene expression and protein stability in wounded *Arabidopsis* protoplasts [J]. *Plants*, 2021, 10(8): 1518.
- [19] ADEDEJI O S, NAING A H, KIM C K. Protoplast isolation and shoot regeneration from protoplast-derived calli of *Chrysanthemum* cv. White ND [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2020, 141(3): 571-581.
- [20] 宋爱华, 张文斌, 孙姝兰, 等. 非洲菊原生质体制备及瞬时转化系统的建立 [J]. *植物学报*, 2017, 52(4): 511-519.
- [21] 侯岁稳, 贾敬芬. 一种简易的植物原生质体计数方法 [J]. *植物生理学通讯*, 2003, 38(1): 57.
- [22] LIU T, CHEN T Z, KAN J L, et al. The *GhMYB36* transcription factor confers resistance to biotic and abiotic stress by enhancing *PR1* gene expression in plants [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 20(4): 722-735.
- [23] LIANG Q Y, WU Y H, WANG K, et al. *Chrysanthemum* WRKY gene *DgWRKY5* enhances tolerance to salt stress in transgenic chrysanthemum [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 4799.
- [24] NIE J, WEN C, XI L, et al. The AP2/ERF transcription factor CmERF053 of chrysanthemum positively regulates shoot branching, lateral root, and drought tolerance [J]. *Plant Cell Reports*, 2018, 37(7): 1049-1060.
- [25] GAO W J, HE M, LIU J, et al. Overexpression of *Chrysanthemum lavandulifolium* *ClCBF1* in *Chrysanthemum morifolium* 'White Snow' improves the level of salinity and drought tolerance [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 124: 50-58.

(责任编辑: 陈海霞)