

# 植物原生质体的细胞壁再生

何其邹洪<sup>1,2</sup> 鄂一岚<sup>1,2</sup> 王广超<sup>1,2</sup> 张贵芳<sup>1</sup> 林金星<sup>1,2</sup> 李瑞丽<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>北京林业大学林木分子设计育种高精尖创新中心, 北京 100083;

<sup>2</sup>北京林业大学生物科学与技术学院, 林木育种国家工程实验室, 北京 100083)

**摘要** 细胞壁作为植物细胞重要的组成部分, 在决定细胞形状、维持机械支撑、吸收养分等方面发挥重要功能。因此, 揭示植物细胞壁合成的调控机制具有重大的生物学意义。基于植物组织水平研究细胞壁的生物合成具有难以控制时间尺度、观察空间狭小等局限性。原生质体作为去除细胞壁的单个细胞是研究细胞壁再生的理想系统。在过去的几十年里报道了大量关于植物原生质体再生细胞壁的研究, 但是关于细胞壁再生的机制尚不清楚。该综述介绍了目前应用于植物原生质体再生细胞壁研究的主要技术和取得的研究进展, 并且对该领域的后续发展进行了展望, 为进一步阐明植物细胞壁生物合成的机制提供理论参考。

**关键词** 植物; 细胞壁再生; 原生质体; 细胞壁成像; 原生质体培养

## Cell Wall Regeneration of Plant Protoplast

HE Qizouhong<sup>1,2</sup>, E Yilan<sup>1,2</sup>, WANG Guangchao<sup>1,2</sup>, ZHANG Guifang<sup>1</sup>, LIN Jinxing<sup>1,2</sup>, LI Ruili<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Beijing Advanced Innovation Center for Tree Breeding by Molecular Design, Beijing 100083, China; <sup>2</sup>National Engineering Laboratory for Tree Breeding, College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

**Abstract** Cell wall, as a significant component of plant cell, is essential for determining cell shape, maintaining mechanical support, and absorbing nutrients of plants. Thus, it is of great biological significance to reveal the regulatory mechanism of plant cell wall biosynthesis. Studying cell wall biosynthesis based on organizational levels has great limitations in terms of controlling the time scale and narrow observation space. Protoplast is an ideal model system for studying cell wall regeneration with cell wall removed. Over the past few decades, a large number of studies on cell wall regeneration from plant protoplast have been reported. However the mechanism underlying this process is yet unclear. This review introduces the primary techniques and research progresses applied to the study of plant cell wall regeneration in protoplast and unveils a prospective advances of this field, providing theoretical reference for further clarifying the mechanism of cell wall biosynthesis.

**Keywords** plant; cell wall regeneration; protoplast; cell wall imaging; protoplast culture

植物的细胞壁是其区别于动物细胞所具有的特征结构之一, 其组成和动态结构在决定细胞形状、维持植物生长过程中的机械支撑、吸收养分

以及响应生物和非生物胁迫等方面发挥重要的生物学功能<sup>[1]</sup>。在《科学》杂志创刊125周年纪念刊中, 植物如何形成细胞壁被列为未来25年要解决的重大

收稿日期: 2020-07-29 接受日期: 2020-10-09

国家自然科学基金(批准号: 31970182、31670182、31530084、31761133009)、中央高校基本科研业务费专项(批准号: 2019ZY29)和国家重点研发计划(批准号: 2016YFD0600102)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13426330885, E-mail: liruli@bjfu.edu.cn

Received: July 29, 2020 Accepted: October 9, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31970182, 31670182, 31530084, 31761133009), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Grant No.2019ZY29) and the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2016YFD0600102)

\*Corresponding author. Tel: +86-13426330885, E-mail: liruli@bjfu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5436>

科学问题之一。因此, 阐明植物细胞壁的形成机理是一项亟待解决的科学问题。传统的基于植物组织水平的研究方法在表征细胞壁的发生、再生过程的动态变化等方面具有局限性。COCKING<sup>[2]</sup>于1960年首次报道了采用酶解法去除细胞壁得到大量原生质体的方法, 为研究细胞壁再生创造了条件。从植物组织或者悬浮细胞中酶解得到的原生质体具备再生细胞壁的能力, 是研究细胞壁再生的理想材料。早在上世纪50—60年代, BACHMANN等<sup>[3]</sup>就利用真菌原生质体进行再生细胞壁的研究, POJNAR等<sup>[4]</sup>实现了番茄薄壁组织原生质体细胞壁再生的实验。此后, 涌现出一大批以原生质体为材料进行细胞壁再生的研究。本文总结了近几十年来报道的关于植物原生质体细胞壁再生的研究, 从原生质体分离与培养、细胞壁再生过程成像技术、细胞壁组分检测技术、细胞壁再生分子机制研究几个方面作简要综述。

## 1 植物细胞原生质体分离与培养

### 1.1 原生质体分离

制备高质量的原生质体是研究植物原生质体细胞壁再生关键的一步。原生质体分离可以通过机械的方法和酶解的方法实现。早在1892年, KLERCKER<sup>[5]</sup>就采用机械的方法在细胞质壁分离后通过切割细胞壁分离出藻类的原生质体, 机械的分离方法对操作手法的要求高且分离的通量低。1960年, 英国的COCKING<sup>[2]</sup>首次采用酶解法分离得到了大量具备高活性的植物原生质体; 在1972年, RONA等<sup>[6]</sup>用木本植物欧亚槭(*Acer pseudoplatanus*)悬浮培养细胞作为酶解材料, 建立了第一个木本植物原生质体分离体系。此后, 大量研究者对酶解体系、酶解条件等进行探索, 使酶解法得以快速发展。时至今日, 酶解法仍然是一种最常用的分离植物细胞原生质体的方法。

### 1.2 原生质体培养方法

分离得到原生质体后, 需要将原生质体置于合适的培养体系中, 原生质体只有在适宜的环境中才能正常生长, 从而完成细胞壁从头再生。目前比较常用的植物原生质体培养方法分为: 液体培养和固定培养。而液体培养和固定培养具体又可以分为液体浅层静置培养、固定培养、固-液结合培养、琼脂糖念珠培养以及看护培养等方法。液体浅层静置培养是相对简单的原生质体培养方法, 仅需要用合

适的液体培养基将原生质体稀释成细胞悬液后静置培养即可。液体浅层静置培养的方法适用范围较广, PARK等<sup>[7]</sup>对比了多种原生质体培养方法对杂种白杨(*Populus nigra* × *P. maximowiczii*)原生质体培养的效果后, 发现液体浅层静置培养的方法最适宜杂种白杨原生质体的生长。液体浅层静置培养具有操作简便、易于随时添加新鲜培养基等优点, 但是同时存在培养基水分散失、细胞间发生黏连等缺陷。相较于液体浅层静置培养, 固定培养的操作相对繁琐。固定培养最早由NAGATA等<sup>[8]</sup>应用在烟草叶肉原生质体培养中, 将原生质体悬液与溶胶状态的琼脂混合后平铺在培养皿上, 待琼脂凝固后原生质体镶嵌在固体培养基中, 实现原生质体的固定培养。固定培养的一个显著优点是培养基的更新比较方便<sup>[9]</sup>。固-液结合培养与液体静置培养相似, 在液体培养基的下层添加一层含有琼脂的固体培养基, 底层的固体培养基具有吸收细胞代谢物、向液体培养基释放营养物质等作用<sup>[10]</sup>。琼脂糖念珠培养可以分类到固-液结合培养中, 具体方法是将原生质体悬液与液体状态的琼脂以合适的比例混合后以液滴的形式加入到液体培养基中, 包裹着原生质体的琼脂糖以念珠的形式存在于液体培养基中, THOMPSON等<sup>[11]</sup>利用该方法实现了水稻悬浮细胞原生质体的培养。看护培养是通过在培养基的底部添加一层灭活的原生质体作为滋养层, 采用纤维素膜将滋养层与培养的细胞分隔开的方式, WANG等<sup>[12]</sup>通过看护培养方法研究青桐(*Musa acuminata* cv)原生质体再生植株的过程。各种原生质体的培养方法总结如表1所示。

### 1.3 原生质体培养的影响因素

原生质体再生细胞壁涉及到复杂的代谢调控过程, 对于原生质体培养的条件要求比较高, 细胞壁再生受到原生质体的密度、培养液渗透压、培养基的类型、外源添加物(例如植物激素、小分子化合物)、培养条件等多种因素的影响。

1.3.1 初植密度 原生质体培养的初植密度对其正常生长尤为重要, 密度过高或者过低均不适宜原生质体的生长: 密度过大则细胞间对营养物质、氧气的竞争大; 密度过小则不利于原生质体的生长。目前, 大多数关于原生质体培养的研究表明, 比较理想的原生质体培养密度为 $10^4 \sim 10^6$ 个/mL。KOBAYASHI等<sup>[23]</sup>关于甜橙(*Citrus sinensis* Osb.)原生质体培养的研究显示, 初始培养密度为 $4 \times 10^4$ 个/mL时,

表1 几种常用原生质体培养方法比较

Table 1 Comparison of several commonly used protoplast culture methods

培养方法 Culture methods	优点 Advantages	缺点 Disadvantages	适用植物 Applicable plants
Liquid culture	Simple operation, convenient to add fresh medium	The water in the culture medium is easily lost and adhesion occurs between cells	hybrid poplar( <i>Populus nigra</i> × <i>P. maximowiczii</i> ) <sup>[7]</sup> , <i>Gossypium hirsutum</i> L. <sup>[13]</sup> , <i>Robinia pseudoacacia</i> L. <sup>[14]</sup> , <i>Ipomoea cairica</i> L. <sup>[15]</sup>
Liquid over solid culture	The bottom solid medium can absorb cell metabolites and release nutrients to the liquid medium	Complex operation	<i>Gossypium davidsonii</i> <sup>[16]</sup>
Agarose droplets culture	Avoiding cell adhesion, convenient supply of nutrients	The experiment process is complicated	<i>Oryza sativa</i> L. <sup>[11]</sup> , <i>Ulmus minor</i> Mill. <sup>[17]</sup> , <i>Spathiphyllum</i> and <i>Anthurium</i> <sup>[18]</sup> , <i>C. sinensis</i> <sup>[19]</sup>
Solid culture	Convenient medium replacement; easy to track the growth status of specific cells	It is difficult to remove cell metabolites	<i>Brassica oleraceavar botrytis</i> <sup>[20]</sup> , <i>Echinacea purpurea</i> <sup>[21]</sup>
Liquid, feeder layer culture	Feeder layer may provide growth factors for cultured cells	The operation is difficult and the experimental steps are complicated	<i>Musa nana</i> Lour. <sup>[22]</sup>

最适合原生质体生长, 密度过高或过低均影响原生质体的正常生长。

**1.3.2 渗透压** 培养液的渗透压也是影响原生质体再生壁的一个重要指标, 渗透压过高原生质体会皱缩停止生长, 渗透压过低原生质体则直接吸水胀破。渗透压的调整不能只考虑渗透压的大小, 不同的物种对于渗透剂也有不同的要求。例如, 在小构树(*Broussonetia kazinoki* Sieb)叶肉原生质体再生植株的研究中, OKA等<sup>[24]</sup>发现, 当使用蔗糖或果糖作为渗透剂时, 细胞发生多次分裂, 但子细胞细胞质贫乏且没有淀粉积累, 最终停止分裂; 相比之下, 葡萄糖作为渗透剂可以诱导细胞持续分裂。

**1.3.3 培养基类型** 培养基为原生质体再生细胞壁提供必需的营养物, 目前市场上常见的用于组织培养的基本培养基大部分可以用来培养原生质体, 大量关于原生质体再生的研究表明, MS培养基<sup>[25]</sup>、B5基本培养基<sup>[26]</sup>、WPM培养基、KM8P培养基<sup>[27]</sup>等均可应用于植物原生质体培养, 其中, KM8P培养基富含有机物且营养丰富, 广泛应用于植物原生质体培养。但是不同的物种对于基本培养基也有一定的偏好性, 例如木本植物原生质体培养比较偏向于使用MS培养基和WPM培养基。总之, 培养基的选择需要根据所选择的培养材料的特性进行摸索。

**1.3.4 外源补充物** 研究表明, 在原生质体培养体系中加入一些外源补充物有助于原生质体的生长与分裂。植物激素是原生质体从头再生细胞壁首要考

虑的因素之一, 大部分植物原生质体培养都需要添加外源激素。生长素和细胞分裂素是两种在植物细胞培养中被使用最多的激素, 大量研究表明生长素和细胞分裂素在启动细胞壁的再生过程中发挥重要作用<sup>[28-32]</sup>。在胡萝卜<sup>[28]</sup>和大豆<sup>[29]</sup>的原生质体培养中, 外源生长素的加入是保证原生质体正常生长的必要条件。TAKEUCHI等<sup>[30]</sup>发现, 在培养长春花(*Vinca rosea*)原生质体时, 如果缺少生长素2,4-D, 原生质体再生细胞壁的效率显著下降。然而UCHIMIYA等<sup>[31]</sup>培养烟草原生质体的实验结果与前者相反, UCHIMIYA的结果表明, 生长素在烟草原生质体培养中并不能发挥促进作用。关于细胞分裂素在原生质体培养中的作用, TAO等<sup>[32]</sup>发现, 在烟草原生质体培养体系中加入细胞分裂素BA, 原生质体会发生出芽的现象; UCHIMIYA等<sup>[31]</sup>的研究也表明, 在含有激动素的培养基中, 烟草原生质体再生细胞壁的效率高达85%; 有关细胞分裂素促进原生质体再生细胞壁的机制目前尚不清楚。此外, 脱落酸对原生质体的生长也有影响, COCKING等<sup>[33]</sup>和BALSEVICH等<sup>[34]</sup>的研究均表明, 脱落酸对原生质体的生长具有一定程度的抑制作用, 但是, ROBERTS<sup>[35]</sup>在培养烟草保卫细胞原生质体的实验中发现, 低浓度的脱落酸(0.1~1.0 μmol/L)可以提高原生质体的存活率。

除了植物激素, 近些年的研究表明, 肽类生长调节物质和糖类也对原生质体培养具有促进作用。在甜菜(*Beta vulgaris* L.)叶肉原生质体培养的

研究中, GRZEBELUS等<sup>[36]</sup>发现, 向培养体系中添加10 nmol/L植物磺胺素可以大大增加原生质体的植板率。半乳糖葡甘露寡糖是一种植物细胞伸长和分化的信号分子, 其对原生质体的活力和再生有促进作用<sup>[37]</sup>。在高等植物中, 多胺参与多种生长发育过程, 细胞内多胺水平和代谢可能与植物原生质体的全能性表达有关<sup>[9]</sup>。RAKOSY等<sup>[38]</sup>提出, 亚精胺促进原生质体生长并刺激有丝分裂。

因为植物细胞本身就能合成内源激素和生长调节因子, 所以外源添加物在原生质体培养中的应用没有统一的标准, 对于外源激素的需求需要同其内源激素的合成情况相结合, 不同的植物材料对外源植物激素的种类及浓度的需求差别很大。利用液相色谱-高分辨质谱联用(liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, LC-HRMS)、液相色谱-串联质谱(liquid chromatography with tandem mass spectrometry, LCMS/MS)等技术测定原生质体不同再生阶段释放多种体内激素或调节因子的水平, 可以为原生质体培养研究中外源添加物的选择提供参考<sup>[9]</sup>。

**1.3.5 培养条件** 适宜的培养条件对原生质体生长和细胞壁的再生具有辅助作用。温度和光照是两个最基本的指标。原生质体培养的温度控制在24~28 °C的范围内比较合适。培养过程是否提供光照需要根据培养材料而定, 一般木本植物的原生质体培养不需要进行光照, 而是采用黑暗培养, 因为光照可能会对细胞膜造成损伤。但是也有一些研究表明, 在培养过程中, 对含有叶绿体的原生质体给予光照刺激可以提高细胞壁再生效率<sup>[6]</sup>。

## 2 细胞壁再生过程研究进展

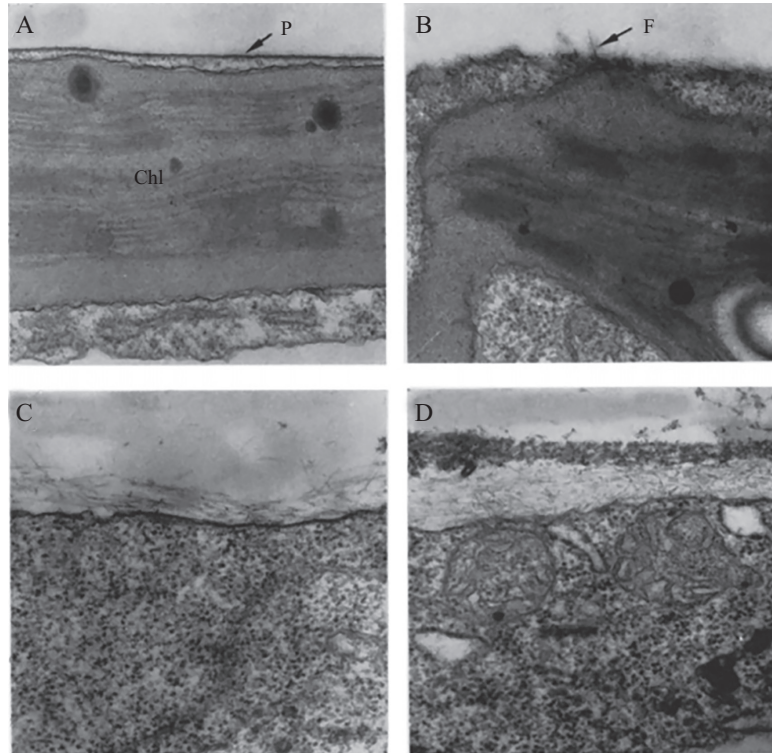
### 2.1 细胞壁再生过程成像研究

近几十年来, 细胞壁组分标记技术及各类显微镜的发展为细胞壁成像研究奠定了基础, 高分辨率的细胞壁成像技术为揭示细胞壁的发生提供最直观的证据。电子显微镜和荧光显微镜在细胞壁再生的成像研究中应用较广。

**2.1.1 电子显微镜成像** 原生质体新形成的细胞壁在普通的光学显微镜下无法被观察到, 而电子显微镜可以直接表征出新生细胞壁的形态特征, 在结合免疫化学技术的基础上还能鉴定新生壁的物质成分(例如六氨银染色多糖), 是一种理想的表征再

生细胞壁的工具。通过使用透射电子显微镜, POJNAR等<sup>[4]</sup>发现, 番茄原生质体培养3天后细胞膜表面就会产生致密物, 5天左右产生再生壁。同样利用透射电子显微镜, 吴斯俊等<sup>[39]</sup>观察到, 小立碗藓(*Physcomitrella patens*)原生质体在培养2天时细胞膜上就会有微纤丝的发生, 当培养到第4天的时候微纤丝相互交织形成细胞壁。FOWKE等<sup>[40]</sup>利用电子显微镜观察阿米芹(*Ammi visnaga*)原生质体在不同培养时期细胞壁再生情况, 并用六氨银染色证实原生质体新生壁的成分为多糖, 结果显示, 原生质体培养2天后细胞表面产生分布不均匀的细小纤维, 第4天时细胞壁成分已经很容易被检测到, 并且部分细胞开始分裂。黄祥辉等<sup>[41]</sup>通过对烟草叶肉原生质体的电镜研究发现, 原生质体培养1天后细胞内线粒体的数量明显增加, 高尔基囊泡向质膜外分泌内含物, 到达第6天时质膜表面出现松散的再生壁, 其结果表明, 内质网、高尔基体的活动在细胞壁再生过程中发挥重要作用。NAGATA等<sup>[42]</sup>用烟草叶肉原生质体为材料也得到了与黄祥辉相似的结果, 其研究表明: 在细胞壁再生的早期(培养35小时后), 细胞膜表面新生的原纤维是随机排列的, 就像穿透质膜出来的一样; 然后新生壁会逐渐增厚并有一定的方向性; 在培养7天后, 细胞膜表面形成密集交织的纤维, 整个过程如图1所示。利用电子显微镜成像, WILLISON等<sup>[43]</sup>将番茄原生质体再生细胞壁的过程归纳为两个阶段: 第一个阶段再生壁由一个多片层系统组成, 在细胞膜与新生壁之间具有空隙; 在第二个阶段原生质体通常会在多片层系统下产生一种无定形的物质用于填充原生质体和质膜之间的空间, 直至形成完整的细胞壁。

**2.1.2 荧光显微镜成像** 电子显微镜成像需要繁琐的制样步骤并且需要将细胞固定杀死, 不能实现活细胞成像。荧光显微镜尤其是激光共聚焦显微镜的出现为活细胞成像提供条件并被广泛应用到细胞壁再生成像的研究中。利用荧光成像检测细胞壁的再生需要将再生壁染色, 荧光增白剂(calcofluor white, CW)是一类应用较多的细胞壁染料, 其可以和细胞壁纤维素的 $\beta$ -1,4糖苷键特异性结合。早在1970年, NAGATA等<sup>[44]</sup>就发现, CW是植物细胞壁的优秀着色剂, 并且他们用CW染色烟草原生质体新生细胞壁来演示细胞壁再生的过程。HAHNE等<sup>[45]</sup>的研究也表明, 在原生质体培养体系中加入CW不会影响原



A: 培养16小时后原生质体中质膜(P)表面没有纤维素产生, Chl: 叶绿体; B: 细胞壁再生的早期阶段(培养35小时后), 质膜表面可见微原纤维(F); C: 细胞壁再生后期(培养5天后), 微纤丝与质膜平行; D: 细胞壁再生成熟期(培养7天后), 细胞膜表面形成密集交织的纤维。

A: no cellulose was produced on the surface of the plasma membrane (P) in the protoplasts after 16 h of cultivation, Chl: chloroplast; B: in the early stage of cell wall regeneration (after 35 h of culture), microfibrils (F) were visible on the plasma membrane surface; C: in the late stage of cell wall regeneration (after 5 days of culture), the microfibrils were parallel to the plasma membrane; D: at the mature stage of cell wall regeneration (after 7 days of culture), dense interwoven fibers were formed on the surface of cell membrane.

图1 烟草原生质体再生壁电镜图(根据参考文献[42]修改)

Fig.1 Electron microscopy of cell wall regenerated from tobacco protoplasts (modified from reference [42])

生质体再生细胞壁, CW是一种理想的细胞壁荧光染料, 下图2为CW染色拟南芥原生质体再生壁的荧光成像图<sup>[46]</sup>。

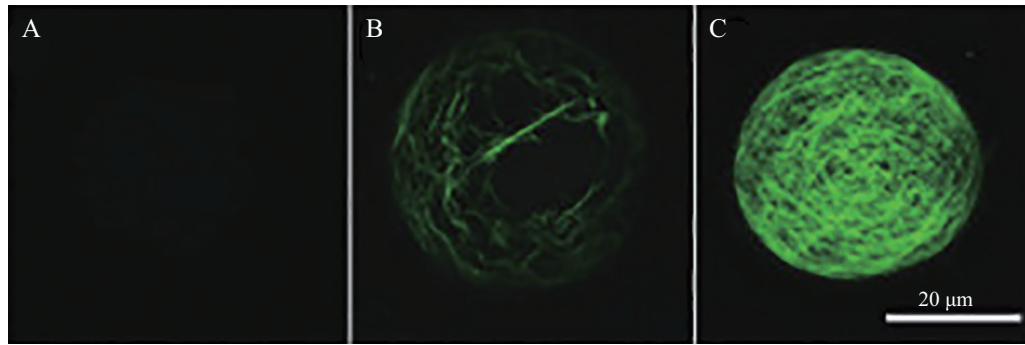
为了更详细地研究原生质体再生细胞壁过程中纤维素微纤丝在再生原生质体中的沉积顺序, RYUSUKE等<sup>[47]</sup>用荧光增白剂染色再生细胞壁, 然后利用激光共聚焦显微镜检测微纤丝的再生情况, 发现原生质体在早期表现为纤维素微纤丝的随机排列, 随后微纤丝的排列具有一定的方向性。这暗示, 着有序的纤维素沉积可能决定了原生质体早期极化和细胞形状。AMSTEL等<sup>[48]</sup>对烟草原生质体再生细胞壁进行荧光成像表明, 烟草原生质体再生在30分钟内开始在原生质体表面不同的部位形成微纤丝, 随后, 具有方向性的纤维素微纤丝开始在细胞表面沉积, 暗示细胞早期极化的开始。

荧光成像除了可以将细胞壁再生过程可视化, 还能定量分析沉积在原生质体表面的纤维素微纤

丝。KUKI等<sup>[26]</sup>开发了一种定量共聚焦成像方法, 用于研究拟南芥叶肉细胞原生质体的细胞壁再生的动态过程, 一共对3个关键指标(纤维素微纤丝的偏斜度、纤维素微纤丝总长度和平均角度)进行量化, 其中纤维素微纤丝偏斜度可以反映多条微纤丝成束情况, 微纤丝总长度是衡量纤维素微纤丝沉积扩散的一个很好的指标, 平均角度可以作为细胞伸长的重要指标。

## 2.2 细胞壁再生过程细胞壁组分检测

细胞壁的组分十分复杂, 在体外培养原生质体再生出来的细胞壁是初生壁, 初生壁的主要成分为纤维素、半纤维素和果胶。纤维素形成的微纤丝嵌入胶质状的果胶基质、半纤维素和少量蛋白质中。这些细胞壁组分在细胞壁再生的过程中发挥重要的生物学功能。揭示细胞壁再生过程中新生细胞壁各化学组分的时空信息有助于更好地阐明细胞壁再生的机制。



A: 原生质体培养0小时, 细胞膜表面没有微纤丝产生; B: 原生质体培养6小时, 微纤丝开始在细胞膜表面部分沉积; C: 原生质体培养24小时, 微纤丝在细胞膜表面大量积累, 细胞表面形成致密的微纤丝网络。

A: no microfibrils were produced on the surface of cell membrane in freshly isolated protoplasts; B: microfibrils began to deposit on the surface of cell membrane in the first 6 h after cultivation; C: microfibrils accumulated on the cell membrane surface, and a dense microfibril network formed on the cell surface after 24 h of cultivation.

图2 拟南芥原生质体再生细胞壁荧光显微镜成像图(根据参考文献[46]修改)

Fig.2 Fluorescence microscopy of cell wall regenerated from *Arabidopsis thaliana* protoplasts (modified from reference [46])

纤维素的检测主要是应用荧光染色和电子显微镜成像等技术进行的, 前文细胞壁成像部分已经介绍, 本节主要介绍除纤维素以外的其他细胞壁组分的检测。有研究显示, 原生质体培养再生出的细胞壁和植物组织自然形成的细胞壁存在差异。例如, 1978年KOMAMINE等<sup>[49]</sup>通过气液色谱法比较了长春花(*Vinca rosea*)原生质体再生的细胞壁和悬浮细胞系形成的细胞壁的成分, 结果显示, 相较于悬浮细胞的细胞壁, 原生质体再生的细胞壁由具有 $\beta$ -1,3和 $\beta$ -1,4糖苷键的非纤维素葡聚糖组成, 果胶和半纤维素成分含量极低, 这表明原生质体缺乏将一些细胞壁成分沉积到再生细胞壁的能力。HANKE和NORTHCOTE<sup>[50]</sup>在1974年也曾报道, 大豆原生质体再生细胞壁中不含果胶成分, 并且他们推测, 之前研究所观察到的原生质体的出芽是由于果胶的丢失而发生的。但是GODEL等<sup>[51]</sup>在胡萝卜原生质体再生壁中发现了被LM20抗同型半乳糖醛酸聚糖(leeds monoclonal 20-anti-homogalacturonan)抗体识别的果胶成分。由此可见, 原生质体新生细胞壁的组成成分在物种间存在差异。阿拉伯聚半乳糖蛋白(arabinoglactan-proteins, AGPs)也是细胞壁再生研究中关注的重要组成部分之一。前人研究表明, AGPs可能对细胞壁的延展性以及细胞壁的结构产生影响<sup>[52-53]</sup>, RUMYANTSEVA等<sup>[54]</sup>发现, AGPs在细胞壁的组装过程中发挥功能。BUTOWT等<sup>[55]</sup>用JIM8和JIM13抗体标记甜菜悬浮细胞原生质体细胞壁再生过程中AGPs的生成情况, 其结果显示, 在原生质体培养的

2天以内不能检测到AGPs的产生, 培养至第4天再生壁更厚时可以检测到AGPs的产生<sup>[55]</sup>。但是GODEL等<sup>[51]</sup>在胡萝卜原生质体再生壁的研究中发现, 细胞表面最先形成的化学成分就包含有JIM8和JIM13识别的AGPs。这些研究结果展示了AGPs在不同物种的细胞壁再生过程中可能具有不同的功能。

总之, 原生质体再生细胞壁的组分检测是阐明细胞壁再生机制必不可少的一项工作。虽然目前细胞壁各组分在原生质体细胞壁再生过程中的形成过程还没有被清晰地表征出来, 但随着细胞壁标记技术的进步, 此项工作在今后会有较好的进展。例如近年来发展起来的傅里叶变换红外显微光谱(fourier transform infrared microspectroscopy, FTIR)<sup>[56]</sup>、共焦拉曼光谱(confocal Raman microspectroscopy, CRM)<sup>[57]</sup>、相干反斯托克斯拉曼散射(coherent anti-stokes Raman scattering, CARS)显微术<sup>[58]</sup>和受激拉曼散射(stimulated Raman scattering, SRS)显微术<sup>[59]</sup>等技术都在植物组织的细胞壁组分检测中被广泛应用<sup>[60]</sup>, 上述技术在分析原生质体再生细胞壁的组分方面也具有广泛的应用。

### 2.3 细胞壁再生的分子调控机制研究

早期细胞壁再生的研究主要集中在再生壁的形态研究和细胞壁成分鉴定中, 再生壁的组装及分子调控网络非常复杂, 有关揭示其机理的研究为数不多。ALBERSHEIM<sup>[61]</sup>和他的同事们提出了第一个初生细胞壁网络结构的分子模型, 木葡聚糖(xyloglucan xylosyltransferase, XXT)通过氢键和纤

纤维素微纤丝紧密连接在一起, 其他的细胞壁基质聚合物(例如果胶)等通过共价键与木葡聚糖连接。CAVALIER等<sup>[62]</sup>发现, 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) XXT双突变体 $xxt1\ xxt2$ 缺乏木葡聚糖, 但是具备正常的细胞壁结构, CAVALIER的研究对上述网络模型提出了严峻的挑战。2020年, KUKI等<sup>[46]</sup>的最新研究也表明, 在拟南芥叶肉细胞原生质体再生细胞壁的过程中, 木葡聚糖对初生壁纤维素网络的初始组装并不是必需的, 在没有木葡聚糖的情况下形成的纤维素网络为原生质体再生的初生细胞壁提供了足够的强度。因此, 有关细胞壁再生的分子调控机制尚存在争议, 阐明细胞壁再生的分子机制可以更好地理解细胞壁再生过程。近年来, 转录组学和蛋白组学在细胞壁再生研究中的应用为揭示细胞壁再生的分子机制创造了条件。SHARMA等<sup>[63]</sup>分析了水稻(*Oryza sativa* L.)悬浮细胞去除细胞壁和新细胞壁再生这一过程的转录组动态变化, 并且揭示了调控水稻细胞壁发育的一批基因, 其中涉及到细胞壁再生的有4个糖基水解酶基因( $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -淀粉酶、几丁质酶和GH36家族基因)、4个乙烯响应因子(ethylene response factor, ERF)转录因子家族基因、3个激酶基因、3个锌指基因、1个苯丙氨酸解氨酶和1个磷酸二酯酶编码基因。通过抑制性减法杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH), YANG等<sup>[64]</sup>对棉花原生质体培养过程中细胞壁再生相关基

因表达谱进行分析, 发现富脯氨酸蛋白(proline-rich protein, PRPL)、富甘氨酸蛋白(glycine-rich protein, GRP)、延伸蛋白1(extension proline-rich 1, EPR1)、束状阿拉伯半乳糖蛋白2(fasciclin-like arabinogalactan protein 2, FLA2)以及伸展蛋白A(expensing-like protein A, EXLA)、EXLB在原生质体细胞壁再生过程中表达上调。基于各类差异表达基因在细胞壁再生的不同阶段具有不同的表达模式, 该研究还提出了棉花原生质体细胞壁再生可能的基因表达模型, 此模型详细展示了细胞壁再生各个时期各类基因的表达情况(图3), 说明上述蛋白可能参与初生细胞壁或次生细胞壁的构建和修饰。

除了对细胞壁再生过程进行转录组分析, 蛋白质组的分析在细胞壁再生的研究中也具有重要作用。KWON等<sup>[65]</sup>开发了一种非破坏性提取细胞壁蛋白的方法, 该方法可以提取细胞壁中蛋白并且避免细胞质中的蛋白泄漏到细胞外, 通过该方法并且结合二维聚丙烯酰胺凝胶电泳和基质辅助激光解吸电离-光/质谱分析技术, KWON从原生细胞壁中分离出71个蛋白, 从培养1小时后原生质体的再生壁中分离出175个蛋白, 从培养3小时后原生质体的再生壁中分离出212个蛋白。这些蛋白包括扩张蛋白酶、多糖水解酶、几丁质酶、木葡聚糖内转糖基化酶/水解酶以及一些目前功能尚未鉴定的蛋白。这些蛋白质在翻译后修饰, 例如磷酸化和糖基化等方面表

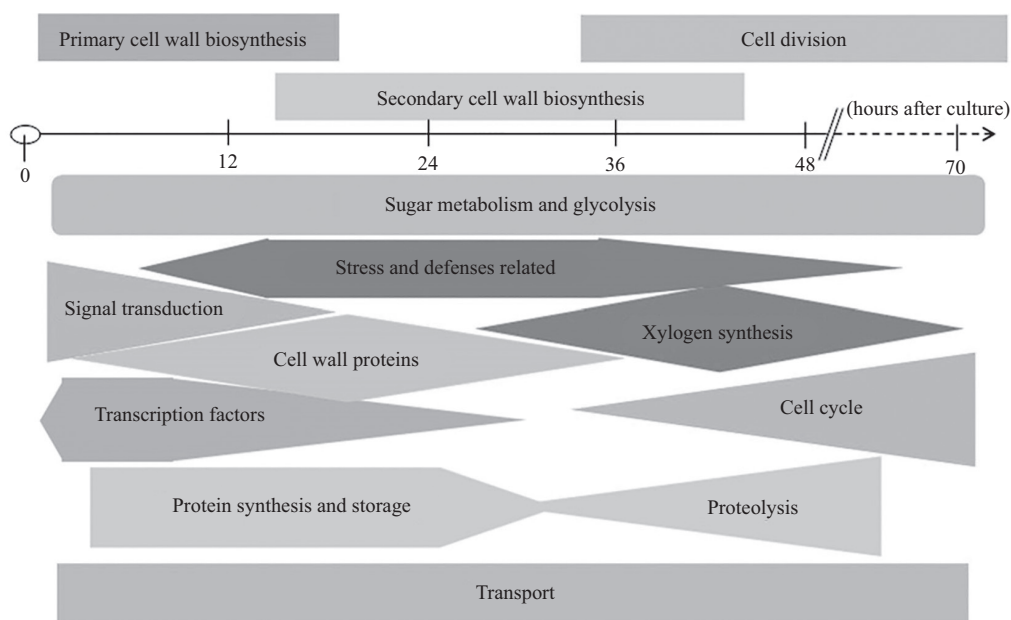


图3 基于基因表达模式的棉花原生质体细胞壁再生模型(根据参考文献[64]修改)

Fig.3 Cell wall regeneration model of cotton protoplast based on gene expression pattern (modified from reference [64])

现出不同的状态, 表明在细胞壁再生过程中这些蛋白的状态是动态变化的。

## 2.4 小结

目前对于细胞壁再生过程的研究在不同的物种中存在一定的差异性, 尚未揭示统一的规律, 但是通过比较不同的物种原生质体细胞壁再生过程可以发现一些共性。原生质体再生细胞壁大致归纳为以下几个阶段。(1) 停滞期。在这一时期原生质体表面不会有细胞壁物质的沉积。各个物种的原生质体停滞期的长短不同, 停滞期的长短可能与细胞所处的生理状态和代谢强度相关<sup>[41]</sup>。BURGESS等<sup>[66]</sup>认为, 之所以存在停滞期是因为原生质体启动细胞壁的再生需要一定的活化时间。(2) 细胞壁再生早期。原生质体在经历停滞期的活化后即进入细胞壁再生早期, 电镜研究表明该时期细胞膜表面开始有少量纤维素不均匀地沉积在细胞膜表面<sup>[4,39-40]</sup>, 纤维素微纤丝荧光成像也表明, 原生质体在早期表现为纤维素微纤丝的随机排列, 此时的微纤丝不具有方向性<sup>[47]</sup>。值得一提的是, 在此时期, 细胞内线粒体的数量明显增加, 高尔基体囊泡向质膜外分泌内含物<sup>[41]</sup>, 这可能是为后续细胞壁的大量再生作准备。(3) 细胞壁再生中期。纤维素微纤丝不断在细胞表面积累并且呈现出一定的方向性<sup>[47]</sup>, 此时的细胞壁在细胞表面形成一个多片层系统组成, 在细胞膜与新生壁之间具有一定距离的间隙<sup>[43]</sup>, AMSTEL等<sup>[48]</sup>推测, 这一时期是细胞早期极化的开始。(4) 成熟期。成熟期会有少量的果胶质<sup>[51]</sup>、糖蛋白<sup>[55]</sup>等分泌到细胞外产生无定形的物质用于填充在原生质体和微纤丝构成的多片层系统之间, 直至形成完整的细胞壁, 细胞进入分裂期。总之, 原生质体再生细胞壁是一个非常复杂的生物过程, 研究表明, 此过程涉及细胞的去分化和再分化, 不同于细胞壁自然条件下正常发育的过程, 原生质体再生细胞壁可能存在另外一套调控系统<sup>[67]</sup>。

## 3 展望

虽然原生质体再生细胞壁的研究早在上世纪50—60年代就已开展, 在细胞壁成像和细胞壁各个组分的鉴定等方面也取得了一些研究进展, 但是由于技术水平的限制使得细胞壁的再生过程及机理至今尚未被清楚地阐明。近年来, 新发展的各类成像技术对于推动这一领域研究具有重要意义, 例如

连续超薄切片扫描电镜成像(automatic collector of ultrathin sections scanning electron microscopy, Auto CUTs-SEM)<sup>[68]</sup>或结构光照明荧光显微镜可以对细胞壁再生过程中各个时期的细胞进行三维重构, 得到高分辨率的再生细胞壁三维图像。免疫电镜技术可以应用于观察细胞壁再生过程各细胞壁组分的变化及相关蛋白的定位。在分子机理方面, 近年来兴起的单细胞测序技术可以获取单个细胞的组学信息, 克服了早期细胞壁再生组学研究基于大量样本而丢失个体特定信息的缺陷; 利用单细胞测序技术可以精确地检测处于特定阶段的特定细胞的组学信息, 在探寻细胞壁再生相关基因及其表达模式、比较细胞壁再生各个阶段的细胞基因表达差异以及挖掘调控细胞壁再生的新基因等方面具有广阔的前景。随着新技术的发展, 原生质体再生细胞壁的研究作为一个高效的系统可以为阐明细胞壁的形成机理提供重要的理论参考。

## 参考文献 (References)

- [1] RAO X, SHEN H, PATTATHIL S, et al. Dynamic changes in transcriptome and cell wall composition underlying brassinosteroid-mediated lignification of switchgrass suspension cells [J]. *Biotechnol Biofuels*, 2017, 10(1): 266.
- [2] COCKING E C. Enzymatic degradation of cell wall for protoplast formation [J]. *Nature*, 1960, 187: 927-9.
- [3] BACHMANN B J, BONNER D M. Protoplasts from *Neurospora crassa* [J]. *J Bacteriol*, 1959, 78(4): 550.
- [4] POJNAR E, WILLISON J H M, COCKING E C. Cell-wall regeneration by isolated tomato-fruit protoplasts [J]. *Protoplasma*, 1967, 64(4): 460-80.
- [5] KLERCKER J A F. Eine methode zur isolierung lebender protoplasten [J]. *Ofvers Vetensk Akad Forh*, 1892, 9: 463-75.
- [6] 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 S F, LU J, CHEN Y Z, et al. Research progress of protoplast culture in woody plants [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*), 2013, 29(1): 1-6.
- [7] PARK Y G, SON S H. *In vitro* shoot regeneration from leaf mesophyll protoplasts of hybrid poplar (*Populus nigra* × *P. maximowiczii*) [J]. *Plant Cell Rep*, 1992, 11(1): 2-6.
- [8] NAGATA T, TAKEBE I. Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium [J]. *Planta*, 1971, 99(1): 12-20.
- [9] EECKHAUT T, LAKSHMANAN P S, DERYCKERE D, et al. Progress in plant protoplast research [J]. *Planta*, 2013, 238(6): 991-1003.
- [10] OCHATT S J, CHEVREAU E, GALLET M. Organogenesis from 'passe crassane' and 'old home' pear (*Pyrus communis* L.) protoplasts and isoenzymatic trueness-to-type of the regenerated plants [J]. *Theor Appl Genet*, 1992, 83(8): 1013-8.
- [11] THOMPSON J A, ABDULLAH R, COCKING E C. Protoplast culture of rice (*Oryza sativa* L.) using media solidified with



- agarose [J]. *Plant Sci*, 1986, 47(2): 123-33.
- [12] XIAO W, HUANG X L, HUANG X, et al. Plant regeneration from protoplasts of *Musa acuminata* cv. Mas (AA) via somatic embryogenesis [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2007, 90(2): 191-200.
- [13] WANG J, SUN Y, YAN S, et al. High frequency plant regeneration from protoplasts in cotton via somatic embryogenesis [J]. *Biol Plant*, 2008, 52(4): 616-20.
- [14] KANWAR K, DEEPIKA A B. Efficient regeneration of plantlets from callus and mesophyll derived protoplasts of *Robinia pseudoacacia* L. [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2009, 96: 95-103.
- [15] GUO J M, LIU Q C, ZHAI H, et al. Regeneration of plants from *Ipomoea cairica* L. protoplasts and production of somatic hybrids between *I. cairica* L. and sweetpotato *I. batatas* L. Lam [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2006, 87(3): 321-7.
- [16] YANG X, GUO X, ZHANG X, et al. Plant regeneration from *Gossypium davidsonii* protoplasts via somatic embryogenesis [J]. *Biol Plant*, 2007, 51(3): 533-7.
- [17] CONDE P, SANTOS C O. An efficient protocol for *Ulmus minor* Mill protoplast isolation and culture in agarose droplets [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2006, 86(3): 359-66.
- [18] DUQUENNE B, EECKHAUT T, WERBROUCK S, et al. Effect of enzyme concentrations on protoplast isolation and protoplast culture of *Spathiphyllum* and *Anthurium* [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2007, 91(2): 165-73.
- [19] NIEDZ R P. Regeneration of somatic embryos from sweet orange (*C. sinensis*) protoplasts using semi-permeable membranes [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2006, 84(3): 353-7.
- [20] SHENG X, ZHAO Z, YU H, et al. Protoplast isolation and plant regeneration of different doubled haploid lines of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2011, 107(3): 513-20.
- [21] PAN Z G, LIU C Z, ZOBAYED S M A, et al. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Echinacea purpurea* [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2004, 77(3): 251-5.
- [22] 肖望, 黄霞, 魏岳荣, 等. ‘过山香’香蕉原生质体培养及植株再生[J]. *园艺学报*(XIAO W, HUANG X, WEI Y R, et al. Plant regeneration from protoplast culture of musa AAB silk ‘Guoshanxiang’ [J]. *Acta Horticulturae Sinica*), 2008, 6: 873-8.
- [23] KOBAYASHI S, IKEDA I, UCHIMIYA H. Conditions for high frequency embryogenesis from orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 1985, 4(3): 249-59.
- [24] OKA S, OHYAMA K. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of *Broussonetia kazinoki* Sieb. (Paper Mulberry) [J]. *J Plant Physiol*, 1985, 119(5): 455-60.
- [25] ROBENEK H, PEVELING E. Ultrastructure of the cell wall regeneration of isolated protoplasts of *Skimmia japonica thunb* [J]. *Planta*, 1977, 136(2): 135-45.
- [26] KUKI H, HIGAKI T, YOKOYAMA R, et al. Quantitative confocal imaging method for analyzing cellulose dynamics during cell wall regeneration in *Arabidopsis* mesophyll protoplasts [J]. *Plant Direct*, 2017, 1(6): 1-10.
- [27] RODR GUEZ R R, DALLOS M P. Aislamiento y cultivo de protoplastos en maracuyá isolation and cultivate of protoplast in passion fruit [J]. *Acta Biol Colomb*, 2004, 9(2): 35-46.
- [28] GRAMBOW H J, KAO K N, MILLER R A, et al. Cell division and plant development from protoplasts of carrot cell suspension cultures [J]. *Planta*, 1972, 103(4): 348-55.
- [29] KAO K N, KELLER W A, MILLER R A. Cell division in newly formed cells from protoplasts of soybean [J]. *Exp Cell Res*, 1970, 62(2): 338-40.
- [30] TAKEUCHI Y. Changes in the composition of cell wall polysaccharides of suspension-cultured *Vinca rosea* cells during culture [J]. *Physiol Plant*, 1978, 42(1): 21-8.
- [31] UCHIMIYA H. Influence of the nutrient medium on the recovery of dividing cells from tobacco protoplasts [J]. *Plant Physiol*, 1976, 57(3): 424-9.
- [32] TAO W, VERBELEN J P. Switching on and off cell division and cell expansion in cultured mesophyll protoplasts of tobacco [J]. *Plant Sci*, 1996, 116(1): 107-15.
- [33] COCKING E C, POWER J B, EVANS P K, et al. Naturally occurring differential drug sensitivities of cultured plant protoplasts [J]. *Plant Sci Lett*, 1974, 3(5): 341-50.
- [34] BALSEVICH J J, CUTLER A J, LAMB N, et al. Response of cultured naize cells to (+)-Abscisic Acid, (-)-Abscisic Acid, and their metabolites [J]. *Plant Physiol*, 1994, 106(1): 135-42.
- [35] ROBERTS C. Temperature and abscisic acid can be used to regulate survival, growth, and differentiation of cultured guard cell protoplasts of tree tobacco [J]. *Plant Physiol*, 1995, 109(4): 1411.
- [36] GRZEBELUS E, SZKLARCZYK M, GREŃ J, et al. Phytosulfokine stimulates cell divisions in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) mesophyll protoplast cultures [J]. *Plant Growth Regul*, 2012, 67(1): 93-100.
- [37] KONIOV D, HLINKOV E, LIKOV D, et al. Oligosaccharides induce changes in protein patterns of regenerating spruce protoplasts [J]. *Cent Eur J Biol*, 2010, 5(3): 353-63.
- [38] KOSY-TICAN E, AURORI A, VESA S, et al. *In vitro* morphogenesis of sunflower (*Helianthus annuus*) hypocotyl protoplasts: the effects of protoplast density, haemoglobin and spermidine [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2007, 90(1): 55-62.
- [39] 吴斯俊, 丁昱晗, 王晓琴. 小立碗藓原生质体细胞壁再生过程观察[J]. *北京农学院学报*(WU S J, DING Y H, WANF X Q. Protoplast cell-wall regeneration in *Physcomitrella patens* [J]. *Journal of Beijing University of Agriculture*), 2016, 31(2): 1-4.
- [40] FOWKE L C, BECH-HANSEN C W, GAMBORG O L. Electron microscopic observations of cell regeneration from cultured protoplasts of *Ammi visnaga* [J]. *Protoplasma*, 1974, 79(1): 235-48.
- [41] 黄祥辉, 颜季琼. 烟草叶肉原生质体再生壁形成的电镜研究[J]. *华东师范大学学报(自然科学版)*(HUANG X H, YAN J Q. Electron microscopy study on the formation of regeneration wall of tobacco mesophyll protoplasts [J]. *Journal of East China Normal University, Natural Science*), 1989(3): 105-9.
- [42] NAGATA T, YAMAKI T. Electron microscopy of isolated tobacco mesophyll protoplasts cultured *in vitro* [J]. *Pflanzenphysiol*, 1973, 70(5): 452-9.
- [43] WILLISON J H M, COCKING E C. The production of microfibrils at the surface of isolated tomato-fruit protoplasts [J]. *Protoplasma*, 1972, 75(4): 397-403.
- [44] NAGATA T, TAKEBE I. Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts [J]. *Planta*, 1970, 92(4): 301-8.
- [45] HAHNE G, HERTH W, HOFFMANN F. Wall formation and

- cell division in fluorescence-labelled plant protoplasts [J]. *Protoplasma*, 1983, 115(2): 217-21.
- [46] KUKI H, YOKOYAMA R, KUROHA T, et al. Xyloglucan is not essential for the formation and integrity of the cellulose network in the primary cell wall regenerated from *Arabidopsis* protoplasts [J]. *Plants*, 2020, 9(5): 629.
- [47] YOKOYAMA R, KUKI H, KUROHA H, et al. *Arabidopsis* regenerating protoplast: a powerful model system for combining the proteomics of cell wall proteins and the visualization of cell wall dynamics [J]. *Proteomes*, 2016, 4(4): 34.
- [48] VAN AMSTEL T N M, KENGEN H M P. Callose deposition in the primary wall of suspension cells and regenerating protoplasts, and its relationship to patterned cellulose synthesis [J]. *Can J Bot*, 1996, 74(7): 1040-9.
- [49] KOMAMINE T A. Composition of the cell wall formed by protoplasts isolated from cell suspension cultures of *Vinca rosea* [J]. *Planta*, 1978, 140(3): 227-32.
- [50] HANKE D E, NORTHCOTE D H. Cell wall formation by soybean callus protoplasts [J]. *J Cell Sci*, 1974, 14(1): 29-50.
- [51] GODEL-JĘDRYCHOWSKA K, MAĆKOWSKA K, KURCZYŃSKA E, et al. Composition of the reconstituted cell wall in protoplast-derived cells of *daucus* is affected by phyto-sulfokine (PSK) [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(21): 5490.
- [52] KREUGER M, VAN H. Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. [J]. *Planta*, 1993, 189(2): 243-8.
- [53] SERPE M D, NOTHNAGEL E A. Effects of yariv phenylglycosides on *rosa* cell suspensions: evidence for the involvement of arabinogalactan-proteins in cell proliferation [J]. *Planta*, 1994, 193(4): 542-50.
- [54] RUMYANTSEVA N I. Arabinogalactan proteins: involvement in plant growth and morphogenesis [J]. *Biochem Bio*, 2005, 70(10): 1073-85.
- [55] BUTOWT R, NIKLAS A, RODRIGUEZ-GARCIA M I, et al. Involvement of JIM13- and JIM8-responsive carbohydrate epitopes in early stages of cell wall formation [J]. *J Plant Res*, 1999, 112(1): 107-16.
- [56] OLSSON A M, BJURHAGER I, GERBER L, et al. Ultra-structural organisation of cell wall polymers in normal and tension wood of aspen revealed by polarisation FTIR microspectroscopy [J]. *Planta*, 2011, 233(6): 1277-86.
- [57] AGARWAL U P. Raman imaging to investigate ultrastructure and composition of plant cell walls: distribution of lignin and cellulose in black spruce wood (*Picea mariana*) [J]. *Planta*, 2006, 224(5): 1141-53.
- [58] ZENG Y, SAAR B G, FRIEDRICH M G, et al. Imaging lignin-downregulated alfalfa using coherent anti-stokes raman scattering microscopy [J]. *BioEnergy Res*, 2010, 3(3): 272-7.
- [59] MAN Y, ZHAO Y Y, YE Y, et al. *In vivo* cytological and chemical analysis of casparian strips using stimulated raman scattering microscopy [J]. *J Plant Physiol*, 2018, 220: 136-44.
- [60] ZHAO Y, MAN Y, WEN J, et al. Advances in imaging plant cell walls [J]. *Trends Plant Sci*, 2019, 24(9): 867-88.
- [61] KEEGSTRA K, TALMADGE K W, BAUER W D, et al. The structure of plant cell walls: iii. a model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components [J]. *Plant Physiol*, 1973, 51(1): 188-97.
- [62] CAVALIER D M, LEROUXEL O, NEUMETZLER L, et al. Disrupting two *Arabidopsis thaliana* xylosyltransferase genes results in plants deficient in xyloglucan, a major primary cell wall component [J]. *Plant Cell*, 2008, 20(6): 1519-73.
- [63] SHARMA R, TAN F, JUNG K H, et al. Transcriptional dynamics during cell wall removal and regeneration reveals key genes involved in cell wall development in rice [J]. *Plant Mol Biol*, 2011, 77(4/5): 391-406.
- [64] YANG X Y, TU L L, ZHU L F, et al. Expression profile analysis of genes involved in cell wall regeneration during protoplast culture in cotton by suppression subtractive hybridization and macroarray [J]. *J Exp Bot*, 2008, 59(13): 3661-74.
- [65] HYE-KYOUNG K, RYUSUKE Y, KAZUHIKO N. A proteomic approach to apoplastic proteins involved in cell wall regeneration in protoplasts of *Arabidopsis* suspension-cultured cells [J]. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46(6): 843-57.
- [66] BURGESS J, LINSTED P J. Scanning electron microscopy of cell wall formation around isolated plant protoplasts [J]. *Planta*, 1976, 131(2): 173-8.
- [67] TAN F, ZHANG K, MUJAHID H, et al. Differential histone modification and protein expression associated with cell wall removal and regeneration in rice (*Oryza sativa*) [J]. *Proteome Res*, 2011, 10(2): 551-63.
- [68] LI X X, JI G, CHEN X, et al. Large scale three-dimensional reconstruction of an entire *Caenorhabditis elegans* larva using AutoCUTS-SEM [J]. *J Struct Biol*, 2017, 200(2): 87-96.