

王一菲,刘新星,张青,等. 油棕叶肉原生质体分离及瞬时转化体系的建立[J]. 华中农业大学学报, 2021, 40(1): 154-159.  
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.01.019

# 油棕叶肉原生质体分离及瞬时转化体系的建立

王一菲,刘新星,张青,郑育声,李东栋

海南大学热带作物学院,海口 570228

**摘要** 以油棕试管苗幼嫩叶片(发芽后 25 d)为材料,建立油棕叶肉原生质体分离及瞬时转化体系。取幼嫩油棕叶片在 30 g/L 纤维素酶和 8 g/L 离析酶的作用下,酶解 3.5 h 后,2 000 r/min、4 ℃离心 5 min 得到油棕叶肉原生质体。借助绿色荧光蛋白和红色荧光蛋白双质粒瞬时共转化,对油棕叶肉原生质体瞬时体系的相关参数进行优化,结果显示:当瞬时转化过程中质粒含量比为 8 : 1,PEG/Mg<sup>2+</sup> 溶液中 PEG4000 的质量浓度为 200 g/L、Mg<sup>2+</sup> 溶液质量浓度为 100 g/L,热激 20 min,再经过 20 min 室温孵育,最后加入的洗液体积为 2 mL 时,原生质体的转化效率最高。

**关键词** 油棕; 试管苗; 同源表达; 原生质体; 瞬时转化; 功能验证; 植株再生; 亚细胞定位; 蛋白质互作

**中图分类号** S 565.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)01-0154-06

油棕(*Elaeis guineensis* Jacq.)是棕榈科单子叶热带植物,它主要生产 2 种棕榈油和棕榈仁油,占世界油量的 36%<sup>[1]</sup>。其中,棕榈油含有棕榈酸、油酸、维生素 E 和类胡萝卜素,具有极高的营养价值<sup>[2]</sup>。应用基因工程手段鉴定油棕中与油脂代谢相关基因的功能,进而对其脂肪酸种类和含量进行遗传修饰,对提高棕榈油的产量及改善其品质具有重要的价值。

然而,作为多年生木本植物,油棕植株再生体系周期很长,转基因植株也不易获得。因此,研究者通常将油棕基因异源表达于模式植物如拟南芥中,以研究其功能。但由于遗传背景差别太大而无法取得满意的效果。原生质体瞬时转化系统快速、高效,被广泛用于亚细胞定位、蛋白与蛋白之间的互作、蛋白与启动子之间的特异性结合等研究<sup>[3]</sup>。利用油棕原生质体进行基因的同源表达,将有效避免异源表达可能造成的差异结果。

目前,油棕原生质体的分离<sup>[4-6]</sup>及瞬时转化<sup>[7]</sup>虽然有过报道,但其原材料都是油棕胚性悬浮细胞。然而由胚性愈伤到胚性悬浮细胞要 3 个月<sup>[4]</sup>,耗时长。因此,本研究以油棕试管苗叶片为原材料,分离

得到原生质体,并借助绿色荧光蛋白和红色荧光蛋白,对油棕叶肉原生质体的双质粒瞬时共转化体系进行优化,旨在为油棕基因的同源表达、功能鉴定及蛋白质与 DNA、蛋白质与蛋白质之间的互作研究提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

油棕(*Elaeis guineensis* Jacq.)试管苗幼嫩叶片(发芽后 25 d),以海南大学热带棕榈植物实验室诱导获得的油棕愈伤组织为基础,通过芽诱导获得幼嫩植株。绿色荧光蛋白载体 pGreen II 62-SK-EGFP 和红色荧光蛋白载体 pGreen II 0800-DsRed2 载体皆购买于优宝生物公司。纤维素酶、离析酶、MES 酸和 BSA 购自 Solarbio 公司,甘露醇、PEG4000、氯化镁等购自西陇科学公司。

### 1.2 油棕叶肉原生质体的分离

油棕叶肉原生质体分离参照拟南芥叶片原生质体的分离方法<sup>[8]</sup>,稍有改动。将幼嫩油棕试管苗叶片切成 0.5 mm 宽的细丝,浸没于 15 mL 过滤除菌

收稿日期: 2020-06-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(31660222); 海南省自然科学基金创新团队项目(2019CXTD397)

王一菲, E-mail: 1184660256@qq.com

通信作者: 李东栋, E-mail: lidd@hainanu.edu.cn

后的酶解液中。酶解液的配方为:30 g/L的纤维素酶、8 g/L的离析酶、0.4 mol/L的甘露醇、20 mmol/L的氯化钾、20 mmol/L的MES、10 mmol/L的氯化钙和1 g/L的BSA。然后在室温、避光、转速为60 r/min的条件下孵育3.5 h。再将其用80  $\mu\text{m}$ 的细胞过滤筛过滤到离心管中,加入20 mL的洗液(30 g/L KCl、5 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和36 g/L甘露醇,pH 5.6),2 000 r/min、4  $^\circ\text{C}$ 离心5 min,弃上清。最后加入适量的悬浮液(30 g/L KCl和36 g/L甘露醇,pH 5.6)重悬原生质体,使原生质体的量为 $4 \times 10^5/\text{mL}$ 。

### 1.3 油棕叶肉原生质体的瞬时转化

油棕叶肉原生质体的转化方法参照文献[7]进行并有稍许改动。取200  $\mu\text{L}$ 的油棕原生质体( $4 \times 10^5/\text{mL}$ )于2 mL的离心管,加入10  $\mu\text{g}$ 的pGreen II 62-SK-EGFP质粒和10  $\mu\text{g}$ 的pGreen II 0800-DsRed2质粒,混匀,冰上静置30 min后,45  $^\circ\text{C}$ 热激5 min,再于冰上静置2 min。然后室温黑暗孵育30 min,转移混合液于6孔板中。加入等量的PEG/ $\text{Mg}^{2+}$ 溶液(100 g/L的PEG 4000和50 g/L的氯化镁),于黑暗中静置孵育10 min。然后再加入4 mL的洗液(30 g/L KCl、5 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和36 g/L甘露醇,pH 5.6),室温弱光诱导16 h,4  $^\circ\text{C}$ 、2 000 r/min离心5 min,弃上清,加200  $\mu\text{L}$ 的洗液重悬原生质体,在荧光倒置显微镜下观察并计算转化效率。

为了获得更高的转化效率,对转化条件进行梯度设置:pGreen II 0800-DsRed2质粒质量设置为1.25、2.50、5.00和10.00  $\mu\text{g}$ ,45  $^\circ\text{C}$ 热激时间设置为5、10、15、20和25 min,PEG/ $\text{Mg}^{2+}$ 溶液中PEG 4000的质量浓度设为100、200、400和600 g/L,氯化镁的质量浓度设为50、100、200和300 g/L,加入PEG/ $\text{Mg}^{2+}$ 溶液后孵育时间设为10、20和30 min,最后加入的洗液体积为2和4 mL。

### 1.4 转化效率的计算

转化效率参照Masani等<sup>[7]</sup>的方法计算。油棕叶肉原生质体的转化完成后,取原生质体于荧光倒置显微镜下观察。转化效率=(发出荧光的原生质体数目/总原生质体个数) $\times 100\%$ 。

### 1.5 统计学分析

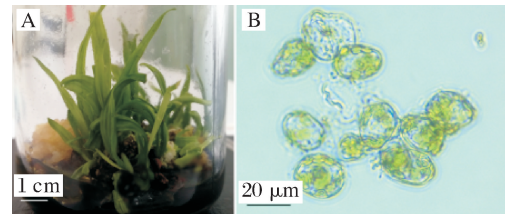
每个样本3个平行。所有数据利用SPSS软件进行显著性分析。2组数据间的差异性检验方法为

“独立样本 $t$ 检验”,多组数据间的差异性检验方法为“Duncan's multiple range test”。

## 2 结果与分析

### 2.1 油棕叶肉原生质体的分离

以再生1个月内的油棕幼芽叶片(图1A)为原材料,按本文“1.2”的方法进行操作,得到油棕叶肉原生质体(图1B)。



A. 油棕试管苗幼叶 Young leaves of oil palm plantlet; B. 油棕叶肉原生质体 Oil palm mesophyll protoplasts.

图1 油棕叶肉原生质体的分离

Fig.1 Isolation of oil palm mesophyll protoplasts

### 2.2 油棕叶肉原生质体瞬时转化体系的优化

1)质粒含量对油棕叶肉原生质体转化效率的影响。将10  $\mu\text{g}$ 的绿色荧光蛋白质粒pGreen II 62-SK-EGFP分别和1.25、2.50、5.00、10.00  $\mu\text{g}$ 的红色荧光蛋白质粒pGreen II 0800-DsRed2,按照本文“1.3”的方法,共转入相同含量的原生质体中,计算转化效率,结果(图2A)显示,转化效率随质粒pGreen II 0800-DsRed2含量的降低而升高,当pGreen II 62-SK-EGFP质粒为10  $\mu\text{g}$ 、pGreen II 0800-DsRed2质粒为1.25  $\mu\text{g}$ 时,转化效率最高,为0.068%。

2)PEG/ $\text{Mg}^{2+}$ 溶液的诱导时间对油棕叶肉原生质体转化效率的影响。为了研究加入PEG/ $\text{Mg}^{2+}$ 溶液的孵育时间对转化效率的影响,将10  $\mu\text{g}$ 的pGreen II 62-SK-EGFP质粒和1.25  $\mu\text{g}$ 的pGreen II 0800-DsRed2质粒共转入油棕叶肉原生质体,对PEG/ $\text{Mg}^{2+}$ 溶液的诱导时间梯度设置为:10、20和30 min。结果显示,当诱导时间为20 min时,转化效率最高,为0.418%(图2B)。

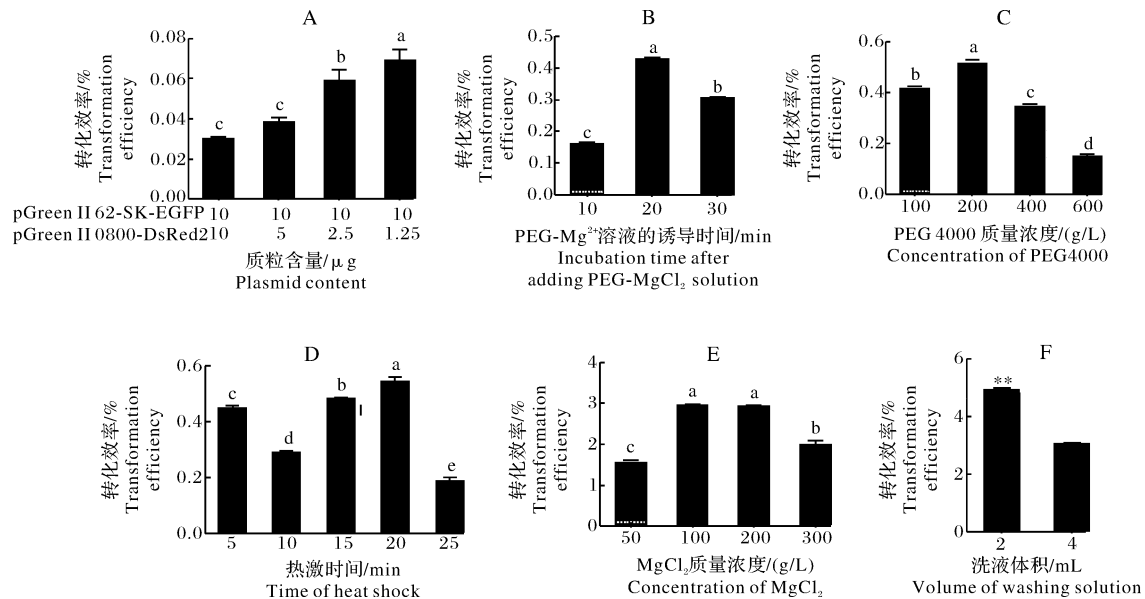
3)PEG 4000质量浓度对油棕叶肉原生质体转化效率的影响。在PEG诱导的原生质体的转化体系中,PEG质量浓度是影响转化效率的重要因素之一,在质粒含量和PEG/ $\text{Mg}^{2+}$ 溶液的诱导时间都是最优的条件下,检测了PEG/ $\text{Mg}^{2+}$ 溶液中的

PEG4000 的质量浓度 (100、200、400 和 600 g/L) 对转化效率的影响。结果显示,当 PEG 4000 的质量浓度为 200 g/L 时,转化效率最高,为 0.500%,过低或过高浓度的 PEG 4000 都会使转化效率降低(图 2C)。

4) 热激时间对油棕叶肉原生质体转化效率的影响。结果(图 2D)显示,在其他转化条件皆相同,热激时间分别为 5、10、15、20 和 25 min 时,转化效率先是随着热激时间的增加而降低,当热激时间为 10 min 时,转化效率比热激时间为 5 min 的低;然而当热激时间再延长,转化效率随之升高,且热激时间为 20 min 时,转化效率达到最高,为 0.528%;最后,当热激时间为 25 min 时,转化效率最低。

5) 氯化镁质量浓度对油棕叶肉原生质体转化效率的影响。在质粒含量、PEG/Mg<sup>2+</sup> 溶液的诱导时间、PEG4000 质量浓度和热激时间都为最优的条件下,检测了氯化镁的质量浓度分别为 50、100、200 和 300 g/L 时原生质体的转化效率。从图 2E 可见,当氯化镁的质量浓度为 100 和 200 g/L 时,转化效率最高,为 2.85%,为了节约成本,选择 100 g/L 进行后续实验。

6) 过夜培养时液体体积对油棕叶肉原生质体转化效率的影响。在其他条件都为最优的情况下,进行了油棕叶肉原生质体的转化,然后分别加入 2 和 4 mL 的洗液进行过夜培养。结果发现当加入 2 mL 洗液时,转化效率最高,为 4.82%(图 2F)。



不同小写字母表示经 Duncan's multiple range test 检验差异显著。2 组数据间的差异性检验方法为“独立样本 *t* 检验”;“\*”表示显著性差异 ( $P < 0.05$ ); “\*\*”表示极显著性差异 ( $P < 0.01$ )。Different lowercase letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) using Duncan's multiple range test. “\*” and “\*\*” indicated significant differences ( $P < 0.05$ ) or ( $P < 0.01$ ) using independent-samples *t* test.

图 2 质粒含量(A)、PEG/Mg<sup>2+</sup> 溶液的诱导时间(B)、PEG 4000 质量浓度(C)、热激时间(D)、氯化镁质量浓度(E)和洗液体积(F)对油棕叶肉原生质体瞬时转化效率的影响  
Fig.2 Effects of plasmids content(A), incubation time after adding PEG/Mg<sup>2+</sup> solution(B), concentration of PEG 4000(C), time of heat shock(D), concentration of MgCl<sub>2</sub> (E) and volume of washing solution(F) on transient transformation efficiency of oil palm mesophyll protoplasts

### 2.3 最优条件下油棕叶肉原生质体瞬时转化

在最优条件下即 pGreen II 62-SK-EGFP 质粒为 10 μg、pGreen II 0800-DsRed2 质粒为 1.25 μg、45 °C 的热激时间为 20 min、PEG/Mg<sup>2+</sup> 溶液中的 PEG 4000 质量浓度为 200 g/L、氯化镁的质量浓度

为 100 g/L、加入 PEG/Mg<sup>2+</sup> 溶液后的孵育时间为 20 min,最后加入的洗液的体积为 2 mL 进行了油棕叶肉原生质体转化,荧光倒置显微镜观察结果(图 3)显示,GFP 和 RFP 都正常表达在整个原生质体中,证明此油棕叶肉原生质体的双质粒共转化体系可行。

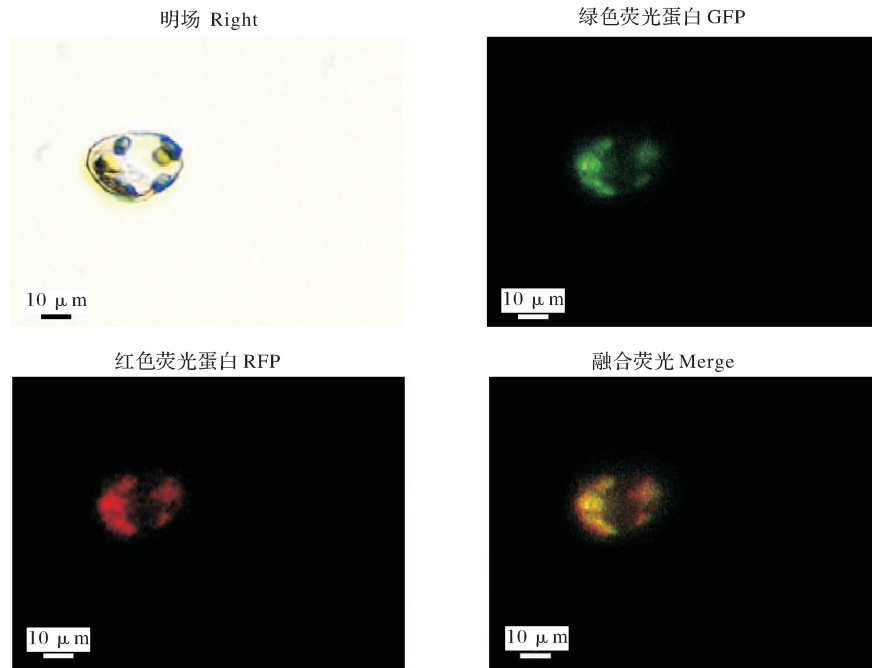


图 3 双质粒共转化油棕叶肉原生质体

Fig.3 Two plasmids co-transformed into oil palm mesophyll protoplasts

### 3 讨 论

原生质体由于没有细胞壁,更易于接受外源 DNA,且瞬时表达周期短,能更快地获得实验数据,常被用于亚细胞定位、实时监测胞内生化反应、qRT-PCR 检测基因的表达模式、验证蛋白质与蛋白质或蛋白质与 DNA 的互作等,对鉴定植物基因的功能有着重要意义<sup>[9]</sup>。Bai 等<sup>[10]</sup>利用大麦原生质体进行了亚细胞定位,发现 OsSPCH 定位于细胞核,OsLrgB 定位于叶绿体;同时利用 qRT-PCR 检测了共转 miR393a 和其靶基因后的大麦原生质体中靶基因的表达水平,从而证明了两者的靶向关系。Lin 等<sup>[11]</sup>利用植物原生质体检测了 CRISPR/Cas9 的诱变效率;同时以烟草原生质体为材料,利用 CRISPR/Cas9 对 NtPDS 进行靶向突变,最终获得突变后的再生植株。Liu 等<sup>[12]</sup>通过拟南芥原生质体瞬时转化体系,鉴定出 BnWRKY15 和 BnWRKY33 都定位于细胞核;同时借助双萤光素酶报告系统,发现 BnWRKY15 在拟南芥原生质体中,能抑制 BnWRKY33 的反式激活能力。Menzel 等<sup>[13]</sup>在拟南芥叶肉原生质体中通过免疫印迹法检测了 flg22 处理对 PIP5K6 磷酸化的影响。

以往报道的油棕原生质体的分离大都是油棕细胞培养物,且多用于植株再生。Bass 等<sup>[5]</sup>从油棕细

胞培养物中分离出原生质体,经培养后再生出细胞壁。Sambanthamurthi 等<sup>[6]</sup>从多胚培养物中分离出原生质体,并培养得到微小愈伤组织。Masani 等<sup>[4]</sup>由细胞悬浮培养物分离得到原生质体,并再生成植株。Masani 等<sup>[7]</sup>还报道了来源于细胞悬浮培养物的原生质体的单个质粒瞬时转化体系,转化效率为 4.76%。但是,获得油棕胚性愈伤需要 5~10 个月,由胚性愈伤到胚性悬浮细胞则又要花费 3 个月<sup>[4]</sup>。以细胞悬浮培养物为原材料分离原生质体将会拖慢实验进程。而油棕叶片是最为容易获得的材料,因此,本研究以油棕试管苗叶片为原材料,分离原生质体,整个过程仅需 5 h。与拟南芥叶肉原生质体的分离相比<sup>[8]</sup>,油棕叶片所用酶解液中的纤维素酶和离析酶为拟南芥的 2 倍,可能与木本植物结构更为复杂、组织间内含物更丰富有关<sup>[14]</sup>。

分离得到油棕叶肉原生质体后,考虑到大多数实验需要同时转入 2 个基因,以验证两者间的关系,本研究按照 Masani 等<sup>[7]</sup>报道的最优体系将 2 个质粒(各 10 μg)共转入原生质体中,然而转化效率极低,仅有 0.028%(图 2A),这可能是由于原生质体来源于叶片而非悬浮细胞,且转入质粒为 2 个。Peng 等<sup>[15]</sup>发现热激处理有利于提高籼稻原生质体瞬时转化的效率。本研究中,当热激时间为 20 min 时,油棕叶肉原生质体转化效率达到最高,缩减或延长

热激时间都会使转化效率降低。在 PEG 介导的原生质体转化中,质粒的质量比、PEG 浓度、PEG 诱导时间对转化效率具有重要影响。当 pGreen II 62-SK-EGFP 质粒为 10  $\mu\text{g}$ 、pGreen II 0800-DsRed2 质粒为 1.25  $\mu\text{g}$  时,油棕叶肉原生质体的转化效率最高。高分子质量的 PEG 溶液对原生质体有毒害作用<sup>[16]</sup>,而 PEG 浓度过低,会导致转化效率过低,因此,PEG 浓度是优化原生质体转化的关键因素。本研究中油棕叶肉原生质体转化的最适 PEG4000 质量浓度为 200 g/L、诱导时间为 20 min。Lazzeri 等<sup>[17]</sup>发现,与  $\text{Ca}^{2+}$  相比, $\text{Mg}^{2+}$  对 PEG 介导的转化有更好的促进作用。本研究对氯化镁的质量浓度进行了优化,发现其最适质量浓度为 100 g/L。此外,由于过夜孵育前,加入的洗液体积会直接影响到 PEG、 $\text{Mg}^{2+}$  的最终浓度,且此浓度下的 PEG 和  $\text{Mg}^{2+}$  将与原生质体一同孵育 16 h,分别检测了加入 2 mL 和 4 mL 时,油棕叶肉原生质体的转化效率,发现加入 2 mL 时,效率更高。然而,世界范围内,鲜少报道油棕原生质体的瞬时转化,与模式植物拟南芥相比,油棕原生质体的瞬时转化体系尚不成熟。本研究在最优组合条件下,转化效率为 4.82%,远低于大麦(83%)<sup>[10]</sup>、拟南芥(90%)<sup>[18]</sup>、水稻<sup>[19]</sup>(53%~75%)等体系。

本研究以油棕试管苗叶片为原材料,在酶解液中的纤维素酶为 30 g/L、离析酶为 8 g/L 时,分离得到了油棕叶肉原生质体,并对双质粒瞬时共转化体系进行了优化。最优转化条件如下:pGreen II 62-SK-EGFP 质粒为 10  $\mu\text{g}$ 、pGreen II 0800-DsRed2 质粒为 1.25  $\mu\text{g}$ ,45  $^{\circ}\text{C}$  的热激时间为 20 min,PEG/ $\text{Mg}^{2+}$  溶液中的 PEG 4000 的质量浓度为 200 g/L、氯化镁的质量浓度为 100 g/L,加入 PEG/ $\text{Mg}^{2+}$  溶液后的孵育时间为 20 min,最后加入的洗液体积为 2 mL。此瞬时转化体系为油棕基因的同源表达提供了可能,可以用于亚细胞定位、蛋白质与 DNA 或蛋白质互作、基因表达模式等研究,有效地缩短了试验周期,为油棕基因的功能验证提供了一种新的手段。

## 参考文献 References

[1] BOURGIS F, KILARU A, CAO X, et al. Comparative transcriptome and metabolite analysis of oil palm and date palm mesocarp that differ dramatically in carbon partitioning[J].

PNAS, 2011, 108(30):12527-12532.

[2] 夏秋瑜,李瑞,唐敏敏,等.海南文昌油棕油脂的脂肪酸组成及抗氧化活性研究[J].热带作物学报,2011,32(5):906-910. XIA Q Y, LI R, TANG M M, et al. Fatty acid composition and antioxidant property of the oils from oil palm produced in Wenchang City, Hainan[J]. Chinese journal of tropical crops, 2011, 32(5):906-910(in Chinese with English abstract).

[3] 谢鑫,蒋君梅,王勇,等.高粱原生质体的制备及转化方法研究[J].种子,2019,38(8):43-46. XIE X, JIANG J M, WANG Y, et al. Study on the method of protoplast isolation and transformation of *Sorghum bicolor*[J]. Seeds, 2019, 38(8):43-46(in Chinese with English abstract).

[4] MASANI M Y A, NOLL G, PARVEEZ G K A, et al. Regeneration of viable oil palm plants from protoplasts by optimizing media components, growth regulators and cultivation procedures[J]. Plant science, 2013, 210:118-127.

[5] BASS A, HUGHES W. Conditions for isolation and regeneration of viable protoplasts of oil palm (*Elaeis guineensis*) [J]. Plant cell reports, 1984, 3:169-171.

[6] SAMBANTHAMURTHI R, PARMAN S H, NOOR M R M. Oil palm (*Elaeis guineensis*) protoplasts: isolation, culture and microcallus formation[J]. Plant cell, tissue and organ culture, 1996, 46:35-41.

[7] MASANI M Y, NOLL G A, PARVEEZ G K, et al. Efficient transformation of oil palm protoplasts by PEG-mediated transfection and DNA microinjection [J/OL]. PLoS One, 2014, 9(5):e96831[2020-06-09]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096831>.

[8] 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.

[9] 肖政,徐艳琴,罗念,等.植物原生质体在分子细胞生物学研究中的应用[J].广西植物,2020,40(4):576-582. XIAO Z, XU Y Q, LUO N, et al. Application of plant protoplasts in the molecular and cell biology research[J]. Guihaia, 2020, 40(4):576-582(in Chinese with English abstract).

[10] BAI Y, HAN N, WU J, et al. A transient gene expression system using barley protoplasts to evaluate microRNAs for post-transcriptional regulation of their target genes[J]. Plant cell, tissue and organ culture, 2014, 119(1):211-219.

[11] LIN C S, HSU C T, YANG L H, et al. Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis: from single-cell mutation detection to mutant plant regeneration[J]. Plant biotechnology journal, 2018, 16(7):1295-1310.

[12] LIU F, LI X, WANG M, et al. Interactions of WRKY15 and WRKY33 transcription factors and their roles in the resistance of oilseed rape to *Sclerotinia* infection[J]. Plant Biotechnol J, 2018, 16(4):911-925.

[13] MENZEL W, STENZEL I, HELBIG L M, et al. A PAMP-triggered MAPK cascade inhibits phosphatidylinositol 4, 5-bi-

- sphosphate production by PIP5K6 in *Arabidopsis thaliana* [J]. *New Phytol.* 2019, 224(2): 833-847.
- [14] 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. ZHANG L B, LI P W, HUANG Z, et al. Advances in preparation system of woody plants protoplast[J]. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 2011, 31(8): 102-107 (in Chinese with English abstract).
- [15] PENG J, LYZNIK L A, LEE L, et al. Co-transformation of indica rice protoplasts with gus A and neo genes[J]. *Plant cell reports*, 1990, 9: 168-172.
- [16] PIGNA G, DHILLON T, DLUGOSZ E M, et al. Methods for suspension culture, protoplast extraction, and transformation of high-biomass yielding perennial grass *Arundo donax* [J]. *Biotechnol J*, 2016, 11(12): 1657-1666.
- [17] LAZZERI P A, BRETTSCHEIDER R, LÜHRS R, et al. Stable transformation of barley via PEG-induced direct DNA uptake into protoplasts[J]. *Theoretical and applied genetics*, 1991, 81: 437-444.
- [18] 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, 170. SHI Y, JIN W H, LIU J J, et al. An improved method for *Arabidopsis* mesophyll protoplast isolation and transformation [J]. *Biotechnology*, 2019, 29(2): 147-152, 170 (in Chinese with English abstract).
- [19] ZHANG Y, SU J, DUAN S, et al. A highly efficient rice green tissue protoplast system for transient gene expression and studying light/chloroplast-related processes [J/OL]. *Plant methods*, 2011, 7(1): 30 [2020-06-09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21961694/>. DOI: 10.1186/1746-4811-7-30.

## Isolation of oil palm mesophyll protoplasts and establishment of transient transformation system

WANG Yifei, LIU Xinxing, ZHANG Qing, ZHENG Yusheng, LI Dongdong

*College of Tropical Crops, Hainan University, Haikou 570228, China*

**Abstract** The method of isolating and transiently transforming oil palm leaf protoplasts was established. Protoplasts were isolated from leaves of oil palm with 30 g/L cellulase and 8 g/L macerozyme for 3.5 h, and collected by centrifugating at 2 000 r/min for 5 min at 4 °C. The dual plasmid transient co-expression system was optimized with green fluorescent protein (GFP) and red fluorescent protein (RFP). The best transformation efficiency was the obtained when the plasmids were mixed with oil palm protoplasts with the mass ratio of 8 : 1, heat shocked at 45 °C for 20 min after placed on ice for 30 min, and incubated at room temperature under the dark condition for 30 min with equal amount of PEG/Mg<sup>2+</sup> (200 g/L PEG 4000 and 100 g/L MgCl<sub>2</sub>). It will provide a novel method for further identifying the function of the genes from oil palm.

**Keywords** oil palm; plantlet; homologous expression; protoplasts; transient transformation; function identification; plantlet regeneration; subcellular localization; protein-protein interaction

(责任编辑: 张志钰)