

# The Dynamic Changes and Origin Analysis of Reactive Oxygen Species during Isolation and Culture of *Citrus reticulata* Blanco Protoplasts

Xiaoyong Xu, Yihui Zhang, Yuping Ling

School of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou Jiangsu  
Email: xyxu@yzu.edu.cn

Received: May. 3<sup>rd</sup>, 2016; accepted: May. 20<sup>th</sup>, 2016; published: May. 30<sup>th</sup>, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

---

## Abstract

In order to uncover the mechanisms underlying different regeneration capacity of protoplasts, we analyzed the dynamic changes and origin of reactive oxygen species (ROS) during isolation and culture of *Citrus reticulata* Blanco protoplasts. The dynamic changes of ROS were analyzed by fluorescent markers, and ROS origin was investigated by ROS indicators. The results showed that ROS signals were visible in the cytoplasm and cell membrane of protoplasts; compared with mesophyll protoplasts, callus protoplasts contained significantly lower level of ROS during isolation, but significantly higher level of ROS during culture; a significant decrease in the level of ROS during isolation and culture of callus protoplasts was observed after DPI or  $\text{NaN}_3$  treatment. Our findings indicate ROS plays a crucial mediating role in protoplast regeneration of *Citrus reticulata*.

## Keywords

Protoplast, Reactive Oxygen Species, DPI,  $\text{NaN}_3$

---

# 椴柑原生质体分离与培养过程中活性氧动态变化及来源分析

徐小勇, 张一卉, 凌裕平

扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏 扬州  
Email: xyxu@yzu.edu.cn

收稿日期: 2016年5月3日; 录用日期: 2016年5月20日; 发布日期: 2016年5月30日

## 摘要

分析原生质体分离与培养过程中活性氧(ROS)的动态变化与来源, 对揭示原生质体再生能力差异的机制具有重要意义。本研究采用荧光标记法分析了ROS在椪柑原生质体分离与培养中的动态变化, 同时通过ROS抑制剂处理探究了其ROS的来源。结果表明, ROS分布在原生质体的细胞质和细胞膜上; 分离阶段愈伤组织原生质体的ROS水平显著低于叶肉原生质体, 但在培养阶段显著高于叶肉原生质体; DPI与NaN<sub>3</sub>处理均显著降低了原生质体分离与培养过程中的ROS水平。因此, ROS在椪柑原生质体再生中具有重要调控作用。

## 关键词

原生质体, 活性氧, DPI, NaN<sub>3</sub>

## 1. 引言

原生质体是采用机械法或酶解法去掉细胞壁的裸露细胞。目前已知植物原生质体及其衍生系统便于进行各种细胞及遗传操作, 已成功用于体细胞杂交、遗传转化、基因瞬时表达、蛋白质互作等方面[1]-[3]。但是由于不同植物之间、不同基因型之间、不同外植体之间原生质体再生能力存在很大差异, 不少植物(一些禾谷类作物、部分豆科作物、银杏等)、某些基因型(葡萄与梨主要栽培种等)、常用外植体(大多数禾谷类作物叶片、柑橘叶片等)的原生质体目前尚不能再生或再生难。因此, 植物原生质体的再生能力问题已成为限制了这项技术广泛应用的关键瓶颈。

柑橘原生质体主要由愈伤组织和叶片分离而来, 但只有愈伤组织来源的原生质体能持续分裂并再生植株, 叶肉原生质体目前不能分裂再生, 还不可单独用于柑橘遗传改良[4] [5]。迄今, 这两种类型原生质体再生能力差异的机制尚不清楚。已有研究表明, ROS引起的氧化胁迫可能是造成不可再生型原生质体再生难的原因, 然而另一方面ROS作为信号分子, 对原生质体再生具有重要的调控作用, 抑制其产生会导致原生质体不可分裂再生[6]-[9]。本文采用荧光标记法分析了ROS在椪柑原生质体分离与培养中的动态变化, 同时通过ROS抑制剂处理探究了其ROS的来源, 以期了解ROS在柑橘原生质体中的作用, 为调控原生质体再生奠定理论基础。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 植物材料

椪柑(*Citrus reticulata* Blanco)胚性愈伤组织在液体培养基(MT + 0.5 mg/l ME + 1.5 mg/l 谷胺酰氨 + 50 g/l 蔗糖)悬浮培养4代后用于原生质体分离; 从椪柑果实中挑出饱满种子接种于MT培养基上, 取充分展开的叶片用于原生质体分离。

### 2.2. 椪柑原生质体分离与培养

原生质体的分离与纯化参照 Xu 等[9]的方法, 稍作修改。

愈伤组织原生质体的分离:取适量愈伤组织于培养皿中,分别加入 2 mL 的 0.7 mol/L EME 培养基(MT + 0.7 mol/L 蔗糖 + 0.5 g/L ME)和酶液(2%纤维素酶 R-10 + 2%离析酶 R-10 + 12.8%甘露醇 + 0.011%  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 0.12% MES + 0.36%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )。封口膜封口, 28℃暗条件下酶解 18~20 h。

叶肉原生质体的分离:用手术刀片将试管苗叶片切成 1~2 mm 宽的条状,之后放入预先加入 2 mL 0.6 mol/L EME (MT + 0.6 mol/L 蔗糖 + 0.5 g/L ME)培养基中,最后加入 2 mL 酶液(2%纤维素酶 R-10 + 2%离析酶 R-10 + 10.9%甘露醇 + 0.011%  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 0.12% MES + 0.36%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )。封口膜封口, 28℃暗条件下酶解 20~24 h。

酶解完成后的原生质体(酶解混合物)通过孔径为 45  $\mu\text{m}$  的不锈钢筛网过滤,并用 CPW13 洗涤、离心。然后采用 CPW13/CPW26 界面梯度离心,用吸管将两液面间的原生质体带吸出。最后将原生质体悬浮于液体培养基 MA (MT + 0.15 M 蔗糖 + 0.45 M 甘露醇 + 40 mg/L 腺嘌呤)中,封口转入 28℃恒温培养箱培养。

### 2.3. 原生质体分离与培养中 ROS 的动态分析体分离与培养

使用荧光探针 2, 7-二氯二氢荧光素乙酰乙酸( $\text{H}_2\text{DCF DA}$ )分析细胞中 ROS 分布与水平。先取 1 mL 原生质体悬浮液,加入 5  $\mu\text{L}$  的 0.2 mM  $\text{H}_2\text{DCF DA}$  溶液,混匀避光孵育 15~20 min。然后用缓冲液洗去原生质体表层的多余探针,重复两次。取一滴原生质体溶液于干净载玻片上,加盖玻片后,迅速用激光共聚焦显微镜(激发波长  $\lambda = 460\sim 490$  nm, 发射波长  $\lambda = 510\sim 520$  nm)观察,拍照。实验重复 3 次,选择其中有代表性样本进行分析。荧光亮度采用 Image J 软件进行分析,数据采用 SPSS 软件进行差异显著性分析。

### 2.4. ROS 抑制剂处理观察原生质体的活性氧变化

取 1.5 ml 原生质体悬浮液,加入 1  $\mu\text{L}$  的 25 mM NADPH 氧化酶特异性抑制剂二苯基氯化碘盐(Diphenylene iodonium, DPI)或 1  $\mu\text{L}$  的 5 M 过氧化物酶抑制剂叠氮化钠( $\text{NaN}_3$ ),混匀培养 10 min 或 30 min 后,1000 rpm 离心 10 min,弃上清,留原生质体沉淀,再用 MA 培养液离心洗涤 1 次。对处理后的原生质体悬浮液,加入 5  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{DCF DA}$  溶液,混匀避光孵育 15~20 min。同上步骤进行活性氧的观察与分析。

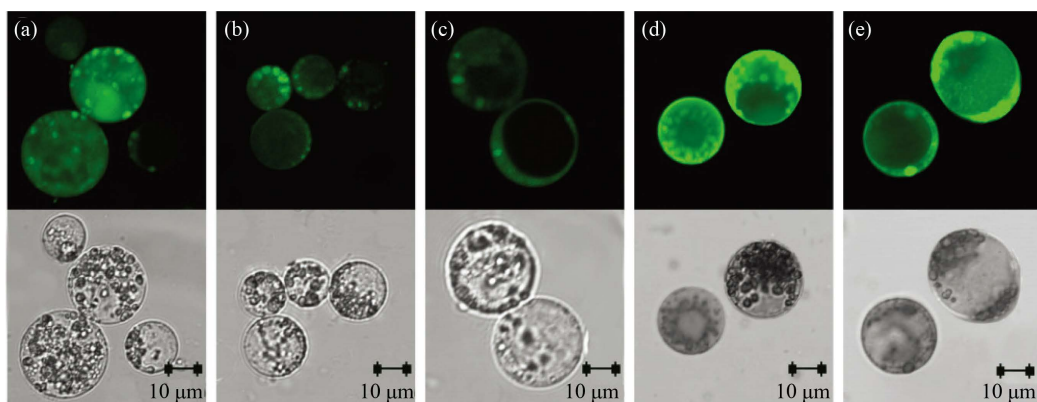
## 3. 结果与分析

在不少植物原生质体分离与培养过程,研究人员发现 ROS 积累现象[9]-[12]。因此,本研究以椴柑原生质体分离与培养过程中的五个重要时间点进行了 ROS 相关分析,包括酶解 2 小时、酶解 4 小时、酶解 6 小时、培养 4 天和培养 8 天。

### 3.1. 原生质体分离与培养中 ROS 的亚细胞定位与时空变化研究

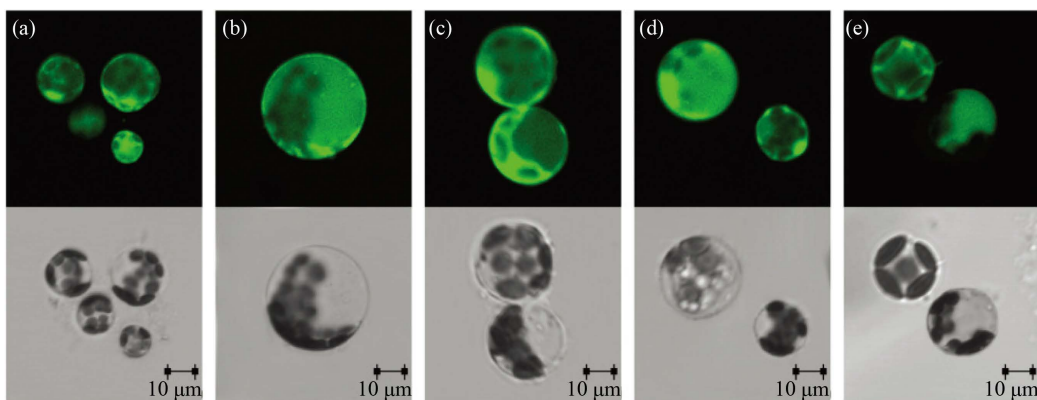
在植物细胞中,叶绿体、线粒体和过氧化物体是产生 ROS 的主要部位,其他一些具有高度氧化活性或强烈电子传递作用的细胞器或部位也都可以产生 ROS。在椴柑愈伤组织原生质体分离过程中(图 1(a)~(c)),原生质体的细胞质和细胞膜上检测到较弱的 ROS 荧光信号;而培养的 4~8 天内,ROS 荧光信号在细胞膜和细胞器中较强(图 1(d), 图 1(e))。叶肉原生质体在分离与培养过程中,ROS 荧光信号未有明显变化,且多数出现在细胞质和细胞膜上,叶绿体上较少(如图 2)。

利用 ROS 荧光探针,使用共聚焦显微镜检测,既可以定位 ROS,通过细胞内的荧光强度分析也能反映细胞的总体 ROS 水平。本研究采用 Image J 软件分析了原生质体 ROS 荧光强度。结果表明,在愈伤组织原生质体分离过程中,原生质体内 ROS 水平降低,在培养过程中呈先上升后下降,培养阶段的原生质体与分离阶段的原生质体其 ROS 水平之间存在显著差异;叶肉原生质体在分离阶段 ROS 水平显著高于



**Figure 1.** The detection of ROS signal during isolation and culture of callus protoplasts from *Citrus reticulata* Blanco (a: enzymolysis time of 2 hours; b: enzymolysis time of 4 hours; c: enzymolysis time of 6 hours; d: 4 days after protoplast culture; e: 8 days after protoplast culture)

**图 1.** 柑桔愈伤组织原生质体分离与培养过程中的 ROS 的检测(a: 酶解 2 小时; b: 酶解 4 小时; c: 酶解 6 小时; d: 培养 4 天; e: 培养 8 天)



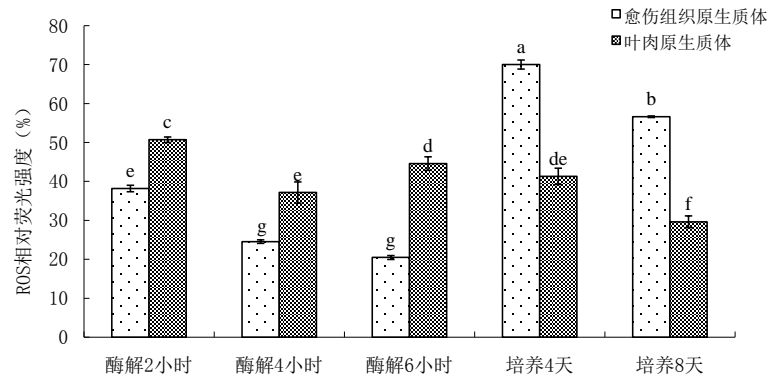
**Figure 2.** The detection of ROS signal during isolation and culture of mesophyll protoplasts from *Citrus reticulata* Blanco (a: enzymolysis time of 2 hours; b: enzymolysis time of 4 hours; c: enzymolysis time of 6 hours; d: 4 days after protoplast culture; e: 8 days after protoplast culture)

**图 2.** 柑桔叶肉原生质体分离与培养过程中的 ROS 的检测(a: 酶解 2 小时; b: 酶解 4 小时; c: 酶解 6 小时; d: 培养 4 天; e: 培养 8 天)

愈伤组织原生质体，而在培养阶段 ROS 水平显著低于愈伤组织原生质体。其中，愈伤组织原生质体的 ROS 荧光亮度值在酶解 6 小时最低，为 20.47%，在培养 4 天时最高，达 69.99%；而叶肉原生质体的 ROS 荧光亮度值在培养 8 天时最低，为 29.62%，在酶解 2 小时最高，达 50.7% (图 3)。

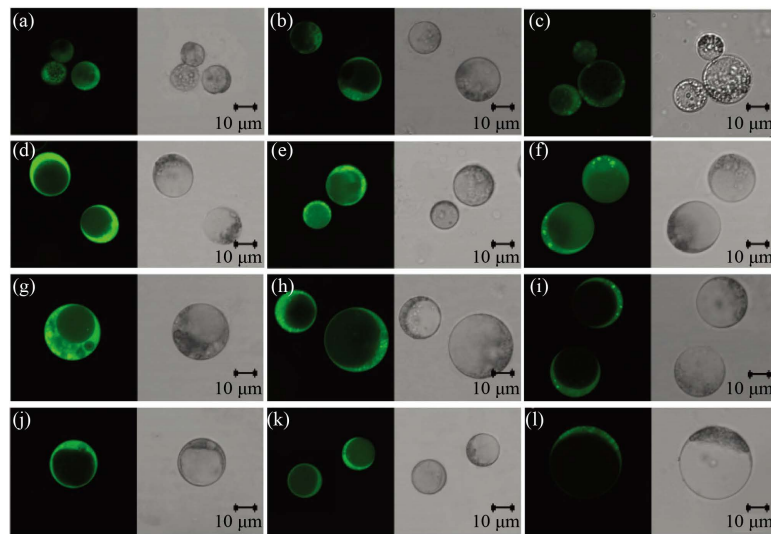
### 3.2. DPI 与 $\text{NaN}_3$ 处理后原生质体分离与培养中 ROS 动态变化研究

为了探明愈伤组织原生质体中 ROS 的来源，本研究使用了不同 ROS 抑制剂处理观察了 ROS 动态变化(图 4, 图 5)。结果表明，在所检测的四个时间点(酶解 2 小时、培养 4 天、培养 8 天和培养 12 天) DPI 处理与  $\text{NaN}_3$  处理都显著降低了 ROS 水平。其中，DPI 处理与对照相比，分别降低了 8.1%、8.6%、7.7%、7.5%； $\text{NaN}_3$  处理则分别降低了 8.6%、18.2%、13.9%、10.9%。值得注意的是，除了酶解 2 小时的检测点，其他检测点 DPI 处理后的 ROS 水平显著低于  $\text{NaN}_3$  处理。据此推测，在愈伤原生质体分离与培养过程中其 ROS 产生源有 NADPH 氧化酶和过氧化物酶。此外，定位分析表明，与对照相比 DPI 处理的原生质体中细胞质 ROS 荧光信号减弱明显， $\text{NaN}_3$  处理的原生质体中细胞质和细胞膜 ROS 荧光信号减弱明显。



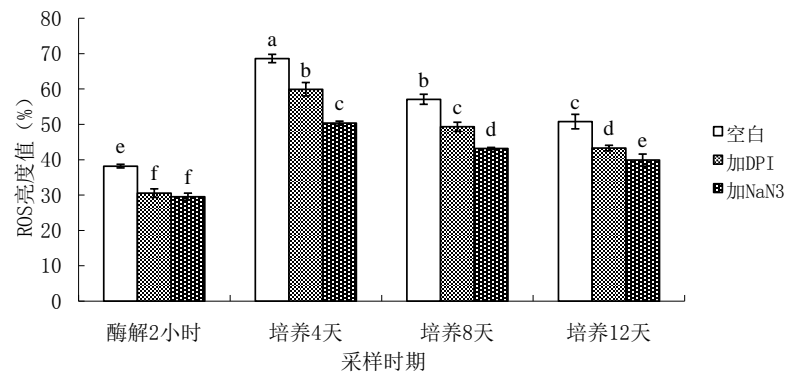
**Figure 3.** The detection of ROS level during isolation and culture of two kinds of protoplasts from *Citrus reticulata* Blanco

**图 3.** 椪柑两种原生质体分离与培养过程中的 ROS 水平变化



**Figure 4.** The detection of ROS signal of protoplasts after DPI or  $\text{NaN}_3$  treatment (a, d, g, j: comparison for enzymolysis time of 2 hours, 4 days, 8 days, 12 days after protoplast culture; b, e, h, k: DPI addition; c, f, i, l:  $\text{NaN}_3$  addition)

**图 4.** DPI 与  $\text{NaN}_3$  处理后原生质体中 ROS 的检测(a, d, g, j: 分别为酶解 2 小时, 培养 4 天, 培养 8 天, 培养 12 天的对照; b, e, h, k: 分别为对应于对照的 DPI 处理; c, f, i, l: 分别为对应于对照的  $\text{NaN}_3$  处理)



**Figure 5.** The detection of ROS level of protoplasts after DPI or  $\text{NaN}_3$  treatment

**图 5.** DPI 与  $\text{NaN}_3$  处理后原生质体中 ROS 水平的变化

## 4. 讨论

活性氧在原生质体再生中具有双重作用,一方面植物原生质体分离与培养过程中产生活性氧,活性氧的大量累积会导致 ROS 清除酶系统失衡,由此产生过氧化胁迫致使原生质体活力下降和大量解体死亡 [7] [13] [14]; 另一方面适宜的 ROS 水平是细胞壁重建和细胞分裂的基础 [10] [15]。例如, Papadakis 和 Roubelakid-Angelakis [16] 比较了烟草原生质体和葡萄原生质体的活性氧含量变化,发现分裂能力强的烟草原生质体的  $H_2O_2$  含量比分裂能力弱的葡萄原生质体高,认为适量的  $H_2O_2$  有助细胞分裂。Petřivalský 等 [17] 发现当黄瓜原生质体培养基中加入外源性  $H_2O_2$ , 会导致原生质体内源性 ROS 水平急剧下降、细胞活力显著降低及细胞分裂抑制,间接地证实了 ROS 在原生质体再生中的关键作用。本研究中,椪柑可分裂的愈伤组织原生质体在培养 4~8 天内,其 ROS 水平是不可分裂的叶肉原生质体的 2 倍,而这个时期正是愈伤组织原生质体细胞壁再生与分裂启动的重要节点 [18]。另外,原生质体的细胞膜和细胞质中有明显的 ROS 荧光信号 (图 1)。因此,我们推测 ROS 参与原生质体的细胞壁重建和细胞分裂,在椪柑原生质体再生中具有重要调控作用。

在正常生长条件下,植物细胞内 ROS 处于一个较低的水平,但胁迫会导致 ROS 水平的升高。非生物胁迫所诱导的 ROS 主要来自于叶绿体、线粒体和过氧化物酶体;生物胁迫所诱导的 ROS 主要来自于细胞膜 NADPH 氧化酶和细胞壁过氧化物酶 [18]。而原生质体分离与培养过程是一种特殊的逆境过程,因为原生质体的酶解过程在某种程度上类似于病原物释放的胞外酶对侵染细胞的壁降解,另外培养中的裸露原生质体易遭受到类似于一些非生物胁迫表现出的渗透压逆境。目前已初步清楚,在原生质体分离和培养过程中,ROS 产生源有 NADPH 氧化酶和/或过氧化物酶 [12] [15]。在本研究中,两种抑制剂处理均降低了原生质体分离与培养过程中的 ROS 水平,表明椪柑愈伤组织原生质体其活性氧产生源有 NADPH 氧化酶和过氧化物酶。但是这两种 ROS 产生源是否参与了原生质体的再生调控还有待进一步研究。

## 5. 结论

ROS 主要分布在椪柑原生质体的细胞质和细胞膜上;在原生质体分离阶段,愈伤组织原生质体的 ROS 水平显著低于叶肉原生质体,但在培养阶段显著高于叶肉原生质体;DPI 与  $NaN_3$  处理均显著降低了原生质体分离与培养过程中的 ROS 水平。

## 基金项目

国家自然科学基金(31372025);江苏省自然科学基金(BK20131228);扬州大学研究生科研创新计划(CXLX\_1425)。

## 参考文献 (References)

- [1] Eeckhaut, T., Lakshmanan, P.S., Deryckere, D., Bockstaele, E. and Huylenbroeck, J. (2013) Progress in Plant Protoplast Research. *Planta*, **238**, 991-1003. <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-013-1936-7>
- [2] Yu, C.C., Wang, L.L., Chen, C., He, C.L., Hu, J., Zhu, Y.G. and Huang, W.C. (2014) Protoplast: A More Efficient System to Study Nucleo-Cytoplasmic Interactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **450**, 1575-1580. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.043>
- [3] Duarte, P., Ribeiro, D., Carqueijeiro, I., Bettencourt, S. and Sottomayor, M. (2016) Protoplast Transformation as a Plant-Transferable Transient Expression System. *Methods in Molecular Biology*, **1405**, 137-148. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-3393-8\\_13](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-3393-8_13)
- [4] Tusa, N., Ferrauto, G. and Calderaro, E. (1992) Investigations on Protoplast Regeneration from Leaves of Monoembryonic and Polyembryonic Citrus Species. *Proceedings of International Citrus Congress*, Acireale, 8-13 March 1992, 180-182.
- [5] 徐小勇, 刘继红. 紫外线灭活的原生质体作为饲养层培养柑橘原生质体的研究[J]. 江苏农业科学, 2009(6): 74-75.

- [6] Pasternak, T.P., Ötvös, K., Domoki, M. and Fehér, A. (2007) Linked Activation of Cell Division and Oxidative Stress Defense in Alfalfa Leaf Protoplast-Derived Cells Is Dependent on Exogenous Auxin. *Plant Growth Regulation*, **51**, 109-117. <http://dx.doi.org/10.1007/s10725-006-9152-0>
- [7] Papadakis, A.K. and Roubelakis-Angelakis, K.A. (2002) Oxidative Stress Could Be Responsible for the Recalcitrance of Plant Protoplasts. *Plant Physiology and Biochemistry*, **40**, 549-559. <http://dx.doi.org/10.1007/s10725-006-9152-0>
- [8] de Marco, A. and Roubelakis-Angelakis, K.A. (1996) Hydrogen Peroxide Plays a Bivalent Role in the Regeneration of Protoplasts. *Journal of Plant Physiology*, **149**, 109-114. [http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617\(96\)80181-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617(96)80181-7)
- [9] Xu, X.Y., Xie, G.S., He, L., Zhang, J.J., Xu, X.L., Qian, R., Liang, G.H. and Liu, J.H. (2013) Differences in Oxidative Stress, Antioxidant Systems, and Microscopic Analysis between Regenerating Callus-Derived Protoplasts and Recalcitrant Leaf Mesophyll-Derived Protoplasts of *Citrus reticulata* Blanco. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **114**, 161-169. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-013-0312-4>
- [10] Papadakis, A.K., Siminis, C.I. and Roubelakis-Angelakis, K.A. (2001) Reduced Activity of Antioxidant Machinery Is Correlated with Suppression of Totipotency in Plant Protoplasts. *Plant Physiology*, **126**, 434-444. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.126.1.434>
- [11] Yasuda, K., Watanabe, Y. and Watanabe, M. (2007) Generation of Intracellular Reactive Oxygen Species during the Isolation of *Brassica napus* Leaf Protoplasts. *Plant Biotechnology*, **24**, 361-366. <http://dx.doi.org/10.5511/plantbiotechnology.24.361>
- [12] Tewari, R.K., Watanabe, D. and Watanabe, M. (2012) Chloroplastic NADPH Oxidase-Like Activity-Mediated Perpetual Hydrogen Peroxide Generation in the Chloroplast Induces Apoptotic-Like Death of *Brassica napus* Leaf Protoplasts. *Planta*, **235**, 99-110. <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-011-1495-8>
- [13] 王丽莉, 贾敬芬. 小麦原生质体分离过程中生理状态的变化[J]. 植物生理学报, 1994(20): 393-398.
- [14] Cutler, A.J., Saleem, M. and Wang, H. (1991) Cereal Protoplast Recalcitrance. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, **27**, 104-111. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02632192>
- [15] De Marco, A. and Roubelakis-Angelakis, K.A. (1996) The Complexity of Enzymic Control of Hydrogen Peroxide Concentration May Affect the Regeneration Potential of Plant Protoplasts. *Plant Physiology*, **110**, 137-145.
- [16] Papadakis, A.K. and Roubelakis-Angelakis, K.A. (1999) The Generation of Active Oxygen Species Differs in Tobacco and Grapevine Mesophyll Protoplasts. *Plant Physiology*, **121**, 197-205. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.121.1.197>
- [17] Petřivalský, M., Vaníčková, P., Ryzí, M., Navrátilová, B., Píterková, J., Sedlářová, M. and Luhová, L. (2012) The Effects of Reactive Nitrogen and Oxygen Species on the Regeneration and Growth of Cucumber Cells from Isolated Protoplasts. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **108**, 237-249. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-011-0035-3>
- [18] Apel, K. and Hirt, H. (2004) Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, **55**, 373-399. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>