

# 玉米小斑病菌 小种毒素诱导玉米 离体根冠细胞凋亡的检测

马春红<sup>1</sup> 李秀丽<sup>1,2</sup> 董文琦<sup>3</sup> 李运朝<sup>1</sup> 崔四平<sup>1</sup> 贾银锁<sup>1\*\*</sup> 王立安<sup>2\*\*</sup>

1. 河北省农林科学院遗传生理研究所, 石家庄 050051;

2. 河北师范大学生命科学学院, 石家庄 050016; 3. 河北省农林科学院科技处, 石家庄 050051

**摘要** 将玉米同核异质体不育细胞质 CB37 及其正常保持系 NB37 的离体根冠细胞分为 4 组, 其中 3 组分别用质量浓度 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的玉米小斑病菌 C 小种 (HMC) 毒素诱导, 1 组用 pH 6.5 PBS 诱导作为对照, 诱导时间分别为 1 h、4 h 和 7 h。然后采用中性红与伊文思蓝染色、吖啶橙 (AO) 与溴化乙啶 (EB) 复染和 Hoechst 33258 染色 3 种方法检测玉米根冠细胞的凋亡状况。结果表明: HMC 毒素诱导玉米根冠细胞发生凋亡, 并出现凋亡小体与染色体边集形态特征。中性红与伊文思蓝染色, 只能检测出活细胞和死细胞, 且在 3 种毒素浓度、3 种处理时间下, CB37 的根冠细胞死亡率均高于 NB37; 采用 AO 与 EB 复染方法, 用 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  HMC 毒素处理 7 h 时, CB37 细胞凋亡率达到最高值 70.2%, 而 NB37 仅为 36.7%; 经 Hoechst 33258 染色后, CB37 用 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  HMC 毒素处理 7 h 时达到最大凋亡率为 74.5%, 而 NB37 为 30.7%。专效性 HMC 毒素对 C 细胞质敏感, 在毒素伤害细胞致死过程中, C 细胞质的细胞死亡率远高于 N 细胞质; 在诱导细胞凋亡程序中, C 细胞质的细胞凋亡率也远高于 N 细胞质, 且其凋亡率随诱导质量浓度和诱导时间的增加而增加; AO、EB 复染与 Hoechst 33258 染色两者相比, 细胞凋亡率接近, 准确度均高, 图像清晰, 且费用相当, 但前者可以区分早期和晚期凋亡细胞, 而后者不能区分。

**关键词** 玉米小斑病菌 C 小种; 毒素; 细胞凋亡; 检测

**中图分类号** S 435.131.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)02-0138-05

玉米小斑病是全世界普遍发生的真菌病害之一。玉米小斑病菌 *Helminthosporium maydis* C 小种 (HMC) 是对 C 细胞质玉米专化浸染的生理小种, 其毒素可专化侵染 C 细胞质雄性不育玉米<sup>[1-3]</sup>。低浓度毒素在一定的处理时间内能诱导寄主细胞发生凋亡, 使其产生抗病反应<sup>[4]</sup>。细胞发生凋亡时会伴随线粒体通透性的改变, 根冠细胞原生质体的微丝结构出现异常等现象, 细胞形态也随之会发生变化<sup>[5-9]</sup>。笔者选用同核异质的玉米材料 B37 的根冠细胞作为试验材料, 用 3 个浓度梯度的玉米小斑病菌 C 小种毒素 (HMC-toxin) 分 3 个时间段进行处理, 用 3 种染色方法进行检测, 观察了经 C 毒素处理后 C 细胞质和 N 细胞质玉米细胞凋亡的形态特征、凋亡率及其变化规律, 分析了相同基因型不同细胞质玉米的根冠细胞对专化性毒素的敏感性以及细胞产生凋亡现象的影响, 旨在探索毒素处理时间与

浓度的关系, 为研究毒素与寄主间的互作机制提供理论依据。

## 材料与方 法

### 供试材料

供试玉米品种和菌种均由河北省农林科学院遗传生理研究所提供。玉米: 基因型为 B37 的 C 型不育细胞质 CB37 及其同核保持系 NB37; 菌种: 玉米小斑病菌 C 小种。

### 根冠细胞的制备

选用饱满玉米种子, 用 0.1%  $\text{HgCl}_2$  消毒 5 min, 蒸馏水反复冲洗后, 在 25  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中浸泡 48 h, 待初生根长到 1~2 cm 时, 取其根冠备用。

### 纯化的制备

在无菌条件下, 把复壮后的玉米小斑病菌 C 小种接种到 PDA 培养基上, 恒温 25  $^{\circ}\text{C}$  培养 7 d。然后

收稿日期: 2009-04-24; 修回日期: 2009-06-29

\* 科技部国际科技合作项目 (2006DFB02480)、河北省自然科学基金项目 (C2006000744)、河北省科技支撑计划项目 (07297162D) 和农业部 948 项目 (2008-Z20) 资助

\*\* 通讯作者。E-mail: jjiays2005@163.com; E-mail: wlian1965@126.com

马春红, 女, 1968 年生, 研究员。研究方向: 植物抗逆生理与生物防治。E-mail: mchdonger@sohu.com

转接到 Fries 液体培养基,于 25 ℃ 静置 1 d,再置于 25 ℃、160 r/min 条件下培养 15 d。将培养 15 d 后的菌液用 4 层纱布过滤后得毒素培养滤液,再将滤液用 50 ℃ 真空旋转蒸发进行浓缩,加入等量的氯仿充分摇匀,静置分层,最后用分液漏斗获取氯仿相。将氯仿相在 40 ℃ 条件下用真空旋转蒸发器蒸干,所得褐色粘稠油状物即为毒素粗品。将毒素粗品过硅胶柱层析,用氯仿-甲醇梯度洗脱 ( $V_{\text{氯仿}}:V_{\text{甲醇}} = 9:1, 4.5:1, 3:1, 1:1$ ),分别收集得毒素。把活性最高的收集液集中在一起重新蒸干,并用少许甲醇溶解,贮存于冰箱(-20 ℃)中保存备用<sup>[10]</sup>。

### 材料处理

将纯化好的毒素分别稀释为质量浓度 50 μg/mL, 100 μg/mL 和 150 μg/mL 后(对照用 pH 6.5 的 PBS),各取 1 mL 放于 1.5 mL 的 EP 管中。每管放入 5 根玉米根冠部分,充分振荡,然后于 25 ℃ 下分别静置 1 h、4 h、7 h。分别取 300 μL 的处理液于 1.5 mL 的 EP 管中,在 25 ℃、12 000 r/min 条件下离心 5 min。用 pH 6.5 的 PBS 洗 2 次。然后加入 50 μL PBS 液,缓缓重悬细胞。

### 染色方法

1) 中性红(neutral red)和伊文思蓝(Evans blue)染色法。取根冠细胞液 10 μL 于 0.5 mL 的 EP 管中,加 10 μL pH 6.5 的 0.01% 中性红染色 5 min,再加 10 μL 0.2% 的 Evans blue 染色 5 min,光学显微镜下观察并记录活细胞(红色)和死细胞(蓝色)的数量<sup>[11]</sup>。

2) Hoechst 33258 染色法。取根冠细胞液 10 μL 于 0.5 mL 的 EP 管中,加 10 μL Hoechst 33258(10 μg/mL),避光处理 10 min 后,立即用 NIKON 倒置荧光显微镜(由河北师范大学生命科学学院细胞实验室提供)进行观察。观察条件:激发波段为紫外 UV;波光块型号为 UV-2A;波长参数为 EX 330-380,DM 505,BA 420。观察活细胞与凋亡细胞的形态特征并计数。

3) 吖啶橙(AO)和溴化乙啶(EB)染色法。取根冠细胞液 10 μL 于 0.5 mL 的 EP 管中,加 10 μL AO(100 μg/mL)和 10 μL EB(100 μg/mL),立即用 NIKON 倒置显微成像系统进行观察。观察条件:激发波段为蓝 B;波光块型号为 B-2A;波长参数为 EX 450-490,DM 505,BA 520。观察活细胞与凋亡细胞的形态特征并计数<sup>[12]</sup>。每组试验设 3 次重复,每次重复计数 200 个细胞。

### 凋亡率的计算

$$\text{凋亡率}(\%) = \frac{\text{凋亡细胞}}{\text{凋亡细胞} + \text{坏死细胞} + \text{活细胞}} \times 100$$

## 结果与分析

### 中性红和伊文思蓝染色的观察

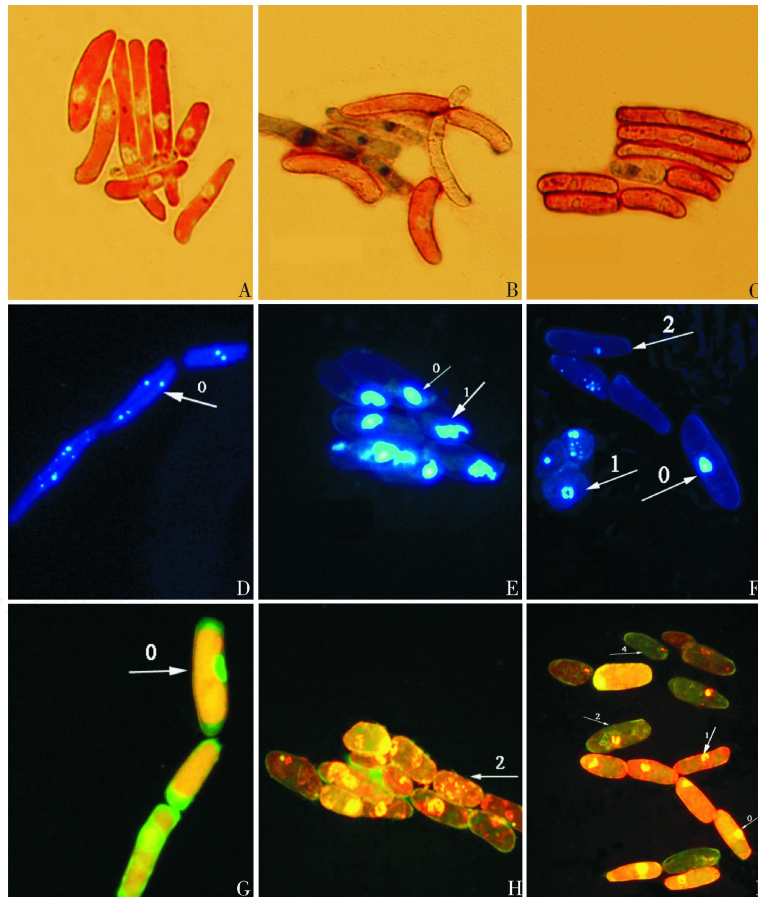
从图 1-A~C 可以看出,经中性红和伊文思蓝复染后,有活性的玉米根冠细胞呈现红色,无活性的根冠细胞被染成蓝色,在光学显微镜下清晰可见。因为毒素处理过的 CB37、NB37 中,染色结果形态表现几乎相同,所以只选用 1 种对照即可,其它染色类似。从形态上可以看出,C 细胞质经毒素处理后出现了明显的原生质体固缩现象,N 细胞质经毒素处理后原生质体出现轻微的固缩。

观察结果表明,随着 HMC 毒素质量浓度从 50 μg/mL 到 150 μg/mL 的增加,CB37、NB37 的死亡细胞也不断增加,其中 CB37 的死亡率从 30.0% 增加到 99.2%,NB37 的死亡率从 24.0% 增加到 95.5%;3 个浓度梯度下,都保持着 CB37 的细胞死亡率高于 NB37。这说明 HMC 毒素有诱导玉米根冠细胞死亡的作用,而且 B37 的 C 型细胞质的质量不如其同核保持系。

### 染色的观察

从图 1-D~F 可以看出,荧光显微镜下检测到正常细胞的核染色质呈均匀的蓝色荧光,细胞呈圆形或椭圆形(图 1-D 中带有 0 的箭头所示)。凋亡细胞的染色体也呈蓝色荧光,且核染色体聚集成碎片或新月状(图 1-E、F 中带有 1 的箭头所示),呈致密浓染。坏死细胞核染色质呈絮状或颗粒状蓝色,颜色淡且结构疏松(图 1-F 中带有 2 的箭头所示)。部分细胞膨大呈鲜红色,为晚期凋亡细胞。随着处理时间的延长可见许多细胞碎片。B37 的 C 和 N 细胞质的玉米根冠细胞经毒素处理后均出现上述染色特征。C 细胞质表现出荧光染色较深,多为新月状的致密浓染。N 细胞质荧光染色较浅,坏死细胞较多。

观察结果表明,HMC 毒素能诱导玉米根冠细胞发生凋亡,诱导玉米根冠细胞发生凋亡的 3 个不同浓度下,当诱导时间相同时,诱导质量浓度大的细胞凋亡率高。当诱导时间为 1 h、4 h 和 7 h 时,CB37 的根冠细胞最大凋亡率依次为 9.0%、62.3% 和 74.5%;NB37 的根冠细胞最大凋亡率依次为 5.7%、19.3% 和 30.7%。当诱导浓度相同时,玉米



A. 细胞经 PBS 处理,用中性红和伊文思蓝染色后,有活性细胞被染成红色(×400)。Cells treated by PBS and dyed by neutral red and Evans blue,the living cells were dying red; B. HMC 毒素处理 C 细胞质玉米根冠离体细胞,用中性红和伊文思蓝染色后,出现死亡细胞,原生质体固缩(×400)。Detached corn root cap cells of C cytoplasm treated by HMC-toxin and dyed by neutral red and Evans blue,apper died cell ,protoplast dyeing homogeneous; C. HMC 毒素处理 N 细胞质玉米根冠离体细胞,用中性红和伊文思蓝染色后,出现死亡细胞(×400)。Detached corn root cap cells of N cytoplasm treated by HMC-toxin and dyed by neutral red and Evans blue ,apper died cells; D. 细胞经 PBS 处理后,用 Hoechst 33258 荧光染色后,细胞核呈均匀蓝色荧光(×200)。Cells treated by PBS and dyed by Hoechst 33258 ,Nuclei are fluorescent blue uniform; E. HMC 毒素处理 C 细胞质玉米根冠离体细胞,用 Hoechst 33258 荧光染色后,出现凋亡小体(×200)。Detached corn root cap cells of C cytoplasm treated by HMC-toxin and dyed by Hoechst 33258 ,appear apoptotic body; F. HMC 毒素处理 N 细胞质玉米根冠离体细胞,用 Hoechst 33258 荧光染色后,出现凋亡小体和坏死细胞(×200)。Detached corn root cap cells of N cytoplasm treated by HMC-toxin and dyed by Hoechst 33258 ,appear apoptotic body and died cell; G. 细胞经 PBS 处理后,用 AO 和 EB 荧光染色后,细胞核呈均匀的绿色荧光,细胞质呈均匀橙红色荧光(×200)。Cells treated by PBS and dyed by AO and EB ,Nuclei are fluorescent green uniform ,cytoplasm are fluorescent orange-red uniform; H. HMC 毒素处理 C 细胞质玉米根冠离体细胞,用 AO 和 EB 荧光染色后,出现晚期凋亡细胞(×200)。Detached corn root cap cells of C cytoplasm treated by HMC-toxin and dyed by AO and EB ,appear the late apoptotic cell; I. HMC 毒素处理 N 细胞质玉米根冠离体细胞,用 AO 和 EB 荧光染色后,出现凋亡细胞和坏死细胞(×200)。Detached corn root cap cells of N cytoplasm treated by HMC-toxin and dyed by AO and EB ,appear apoptotic body and died cell.

图 1 玉米离体根冠细胞染色后的形态特征

Fig. 1 Morphological character of detached corn root cap cells by dyeing

根冠细胞的凋亡率随着诱导时间的增加而增加。当诱导质量浓度为 50 μg/mL、100 μg/mL 和 150 μg/mL 时, CB37 的根冠细胞最大凋亡率依次为 32.5 %、58.7 % 和 74.5 %;而 NB37 的凋亡率分别为 7.5 %、22.3 % 和 30.7 %。即随着处理时间与毒素浓度的增加,细胞凋亡率也不断增加,且 CB37 的凋亡率远远高于 NB37。CB37 和 NB37 最大凋亡率分别为 74.5 % 和 30.7 %, 其最大凋亡率差值为

43.8%。两者之间的差距在 4 h 时增加迅速,在 7 h 时增加幅度下降。HMC 毒素对 CB37 有专化致死作用,凋亡细胞发生细胞核降解,染色质固缩,核内 DNA 断裂,形成凋亡小体。从中性红与伊文思蓝复染和 Hoechst 33258 染色这 2 种结果看出,同一浓度相同处理时间,细胞的死亡率远远高于凋亡率。这说明在外界环境不适时可使细胞致死,但是 HMC-toxin 则可使细胞发生凋亡。

### 和 染色的观察

从图 1-G~I 可以看出,有活性的细胞其细胞核染色质被染成绿色,发均匀的绿色荧光(图 1-G 中带有 0 的箭头所示)。早期凋亡细胞其细胞核为浓染的绿色荧光,染色体固缩成新月形和颗粒状,细胞质呈黄绿色或绿色(图 1-I 中带有 1 的箭头所示)。晚期凋亡细胞其细胞核被染成橙色荧光,染色体固缩成新月形和颗粒状,有的核染色质偏向细胞一侧(图 1-H,I 中带有 2 的箭头所示)。坏死细胞的细胞核呈淡染松散的颗粒状或新月状绿色或橙色荧光,有的呈橙色均匀的荧光(图 1-I 中带有 3 的箭头所示)。随着处理时间的延长可见许多的细胞碎片。

观察结果表明,HMC 毒素能诱导 CB37 根冠细胞发生凋亡。当 HMC 毒素诱导质量浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,CB37 的根冠细胞凋亡率随处理时间(1 h、4 h、7 h)的不断增加,凋亡细胞也在不断增加,最大凋亡率达到 24.8%;当诱导质量浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,细胞凋亡率随着时间的延长任在不断增加,最大凋亡率为 58.2%;当质量浓度为 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、诱导时间为 7 h 时,得到 CB37 玉米根冠细胞最大凋亡率为 70.2%。

经 HMC 毒素诱导的 NB37 的玉米根冠细胞,其凋亡率的变化趋势与 CB37 相同,在 3 个诱导质量浓度下,诱导 7 h 时分别达到最大凋亡率,依次为 11.0%、25.7%、36.7%。在检测玉米根冠细胞发生凋亡的 3 个诱导质量浓度下以及每个浓度下的 3 个诱导时间内,NB37 的凋亡率远远小于 CB37,凋亡率最大差值可达 40.5%。

与上述 2 种染色相比,AO 和 EB 染色的凋亡率与 Hoechst 33258 染色的凋亡率较为接近,说明这 2 种凋亡的检测方法比较可靠。染色结果表明,随着时间的增加,毒素不断积累,C 细胞质的凋亡率不断增加且远远高于其同核保持系。这是由于 HMC-toxin 为 C 细胞质寄主专化选择性决定的。

## 讨 论

本试验结果表明,中性红和伊文思蓝染色能清晰区分活细胞与死细胞,检测方法简便,在光学显微镜下就可进行,但是这种染色方法不能区分凋亡细胞和坏死细胞。Hoechst 33258 染色、AO 和 EB 复染均属于荧光染色,在荧光显微镜下可以清楚区分活细胞、坏死细胞和凋亡细胞,并且这 3 种细胞在细胞质和细胞核等方面的形态特征均较明显,图片清晰美观。AO 和 EB 染色还可区分早期和晚期的凋亡细胞。其中 Hoechst 33258 荧光染色观察到的形态结果,与商闯等用 Hoechst 33342 的荧光染色结果一致<sup>[13]</sup>。随 HMC 毒素浓度的增加和处理时间的延长,B37-C 和 B37-N 细胞的凋亡率在逐渐增加,且 C 细胞质的凋亡率远远高于 N 细胞质。另外,通过 HMC 毒素对根冠细胞微丝结构及细胞膜影响的观察,发现 N 型玉米细胞原生质体只是轻度收缩,仍可见微丝网络分布<sup>[4]</sup>;经 HMC 毒素处理后,C 细胞质的苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性要高于 N 细胞质<sup>[6]</sup>;经低浓度 HMC 毒素培养滤液预处理的玉米叶片,C 细胞质的丙二醛(MDA)含量的下降比 N 细胞质的下降幅度明显<sup>[7]</sup>。

检测细胞凋亡可从形态特征、生化及分子生物学等方面进行。Hoechst 33258 是一种与核 DNA 特异性结合的荧光染料,属于特异性检测凋亡细胞。AO 能透过完整的细胞膜,与 DNA 特异性结合,呈现绿色荧光,与 RNA 结合呈橙红色荧光。EB 不能透过完整的细胞膜,可以透过破损的核膜,嵌入细胞核 DNA,使之发出橙红色荧光。这 2 种染色方法在动物细胞的凋亡检测中较常用,且统计的凋亡率与流式细胞仪的结果一致<sup>[12]</sup>。为探讨凋亡率与寄主抗性间的关系,笔者将继续观察 HMC 毒素对玉米叶片原生质体凋亡诱导的作用,并从分子生物学方面进行深入研究。

## 参 考 文 献

- [1] 郭兰凯,刘俊芳,马春红,等. HMC 毒素对雄花不育及正常细胞质玉米根冠活细胞的影响[J]. 作物学报,1991,17(1):54-57.
- [2] 崔洋,马春红,刘克明,等. 纯化的玉米小斑病菌 C 小种毒素生物活性的研究[J]. 植物病理学报,1992,22(2):175-178.
- [3] 陈颖,杨虹,霍晨敏,等. HMC 毒素对同核异质玉米叶肉细胞原生质体的影响[J]. 河北师范大学学报,2007,31(5):662-665.
- [4] 王立安,马春红,赵俊霞,等. HMC 毒素对 C 型不育玉米根冠

- 细胞原生质体及微丝分布的影响[J]. 植物病理学报, 2003, 33(3): 225-228.
- [5] 马春红, 翟彩霞, 郑秋玲, 等. 玉米小斑病菌 T 小种毒素诱导对玉米叶片苯丙氨酸解氨酶活性的影响[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(1): 21-25.
- [6] 商闯, 马春红, 李运朝, 等. 玉米小斑病菌 C 毒素培养滤液对玉米叶片苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的诱导效应[J]. 玉米科学, 2008, 16(2): 131-134.
- [7] 商闯, 马春红, 翟彩霞, 等. 丙二醛(MDA)含量在玉米诱导抗病过程中的变化[J]. 华北农学报, 2007, 22(增刊): 29-32.
- [8] NAVARRE D A, WOLPRET T J. Victorin induction of an apoptotic/senescence-like response in oats[J]. Plant Cell, 1999, 11(2): 237-249.
- [9] SCHEFFER R P. Role of toxins in evolution and ecology of plant pathogenic fungi[J]. Cellular and Molecular Life Science, 1991, 47(8): 804-811.
- [10] 崔洋, 刘克明, 魏建昆, 等. 玉米小斑病菌小种毒素的分离、纯化及其植物病理反应[J]. 植物病理学报, 1991, 21(3): 187-191.
- [11] 郝丽梅. HMC 毒素对玉米 CMS 与 N 细胞质线粒体结构和功能的影响[D]. 石家庄: 河北师范大学生命科学学院, 2002.
- [12] 杨连君, 司晓辉, 王文亮, 等. 六种染色后光镜观察法检测肝癌细胞凋亡[J]. 实用医技杂志, 2006, 13(1): 8-10.
- [13] 商闯, 贾银锁, 侯立白, 等. 玉米离体根冠细胞凋亡的荧光显微观察[J]. 分子细胞生物学报, 2008, 41(4): 329-334.

## Detection of Apoptosis in Detached Maize Root Cap Cells Induced by HMC-Toxin

MA Chun-hong<sup>1</sup> LI Xiu-li<sup>1,2</sup> DONG Wen-qi<sup>3</sup>  
LI Yun-chao<sup>1</sup> CUI Si-ping<sup>1</sup> JIA Yin-suo<sup>1</sup> WANG Li-an<sup>2</sup>

1. Institute of Genetics and Physiology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China;

2. College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China;

3. Department of Science and Technology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China

**Abstract** The root cap cells of CB37 and NB37 were divided into 4 groups, in which 3 groups were induced by 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of *Helminthosporium maydis* C toxin (HMC-toxin) as the experimental group, and one group induced by pH 6.5 PBS as the control group. The inducing time was 1 h, 4 h and 7 h. The apoptosis of root cap cell was examined with 3 methods: neutral red and Evans blue staining, AO and EB staining and Hoechst 33258 staining. In the process of induction with HMC toxin, apoptotic bodies appeared in root cap cells and the chromosome morphology became marginate. Living and death cells could be clearly detected after Neutral red and Evans blue staining and the ratio of death in CB37 cells treated with 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  HMC-toxin was higher than that of NB37 with the maximum death rates of 99.2% and 95.5%. Living, necrosis and apoptosis cells could be distinguished clearly by AO and EB complex staining and Hoechst 33258 staining. The ratio of apoptosis in cells of CB37 was much higher than that of NB37, the max ratio of apoptosis cells of CB37 and NB37 were 70.2% and 36.7%. In contrast, the max ratio of apoptosis cells of CB37 and NB37 were 74.5% and 30.7% stained by Hoechst 33258 respectively. The max ratio of apoptosis in CB37 and NB37 occurred in 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  HMC-toxin treated for 7 h. Therefore, a conclusion can be made as follows: during the process of the "harm" by HMC-toxin, apoptosis appeared in the root cap cells, the ratio of apoptosis in C cytoplasm was higher than that in N cytoplasm. Along with the increase of the toxin concentration and treating time, the ratio of apoptosis became higher. In spite of the different staining methods by AO and EB or by Hoechst 33258, the ratio of the cell apoptosis was similar. But the early and late apoptotic cells can be distinguished only by AO and EB complex staining.

**Key words** *Helminthosporium maydis* C (HMC); toxin; apoptosis; detection

(责任编辑: 陈红叶)