

HMC 毒素诱导玉米专效寄主 原生质体细胞凋亡的检测

马春红¹ 李秀丽^{1,2} 张红心³ 董文琦⁴ 戴志刚⁵ 王立安² 贾银锁¹

1. 河北省农林科学院遗传生理研究所/河北省植物转基因中心, 石家庄 050051;

2. 河北师范大学生命科学学院, 石家庄 050016; 3. 唐山师范学院生命科学系, 唐山 063000;

4. 河北省农林科学院科技处, 石家庄 050051; 5. 湖北省土壤肥料工作站, 武汉 430064

摘要 以 2 对同核异质玉米 B37 和 Mo17 叶片的原生质体为试材, 并将原生质体随机分为 4 组, HMC 毒素质量浓度分别为 0、50、100、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 处理时间分别为 1、3、6 h。采用吖啶橙(AO)与溴化乙啶(EB)荧光复染的方法进行检测, 观察处理后原生质体的凋亡特征及细胞凋亡率的变化趋势。结果表明: HMC 毒素处理玉米原生质体后发生细胞凋亡, 并出现凋亡小体、染色质边集或环状染色质等凋亡特征; 经不同浓度 HMC 毒素处理 B37 和 Mo17 玉米原生质体, CB37 的最大凋亡率为 10.80%, NB37 为 4.90%, CMo17 为 21.00%, NMo17 为 8.83%; HMC 毒素对 2 种基因型的 C、N 细胞质所测结果一致, 均为 C 细胞质对毒素敏感, 先出现细胞凋亡, N 细胞质出现细胞凋亡的时间相对较晚; C、N 之间的细胞凋亡率差异显著, 且前者高于后者。当毒素浓度不变时, 细胞凋亡率随毒素处理时间的延长而递增; 当处理时间不变时, 细胞凋亡率随毒素浓度的增加而上升。

关键词 玉米小斑病菌 C 小种; 毒素; 原生质体; 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(2012)02-0199-05

植物细胞凋亡中研究最多的是过敏反应, 即真菌或细菌感染植物后, 寄主植物发生主动或快速死亡, 同时触发体内受感染处和远处组织的防御反应, 限制病原体生长扩散的现象^[1]。玉米小斑病菌 C 小种毒素 (*Helminthosporium maydis* race C toxin, HMC-toxin) 是一种寄主专化性毒素, 能从寄主特异性的作用位点诱导其感病。植物细胞凋亡检测的相关研究已有报道。在实验室通过细胞发生凋亡时对玉米叶片内过氧化物酶(POD)和苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性、线粒体通透性改变、有害物质丙二醛(MDA)含量等的检测与对叶片抗病性的鉴定, 发现用纯化的低浓度 HMC 毒素处理 C 细胞质叶片, 可显著提高叶片的抗病性^[2-4]。经吖啶橙(AO)与溴化乙啶(EB)复染、Hoechst33258 荧光染色发现 C 细胞质和 N 细胞质玉米的根冠细胞均存在凋亡现象^[5-7], 根冠细胞的原生质体微丝结构也出现异常^[8]。Deng 等^[9]用小麦白粉病菌侵染小麦叶片, 发

现小麦的不定根存在细胞凋亡, 细胞凋亡的细胞学和分子生物学特征为 TUNEL 阳性、基因组 DNA 呈现梯状条带、核染色质固缩; Wang 等^[10]采用透射电镜、间接免疫荧光标记等方法, 观察到小麦颖果后生韧皮部筛分子 (metaphloem sieve element, MSEs) 分化是细胞程序性半死亡 (programmed cell semi-death) 过程, 并存在细胞核变形、染色质凝集和线粒体内嵴模糊等现象。

笔者在前期利用玉米小斑病菌毒素作为激发子诱导玉米抗小斑病等研究工作基础上, 又以不同同核异质的玉米原生质体为材料, 采用荧光染色法观察经 HMC 毒素诱导后, 不同细胞质玉米细胞凋亡的形态特征及凋亡率变化规律, 旨在通过荧光显微观察专效性毒素对相同基因型不同细胞质玉米的敏感性及其产生凋亡时的形态特征, 为进一步探讨寄主抗病性与细胞凋亡率之间的关系提供科学依据。

收稿日期: 2011-09-08

基金项目: 农业部“948”项目(2011-G1-07, 2008-Z20)、科技部国际科技合作项目(2006DFB02480)、河北省自然科学基金项目(C2011301010)、河北省人才培养经费项目(冀人社字[2010]353号)和河北省科学技术研究与发展计划项目(10393912D)

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

通讯作者: 王立安, 博士, 研究员. 研究方向: 真菌生物化学与分子生物学. E-mail: wlian1965@126.com;

贾银锁, 博士, 研究员. 研究方向: 植物抗逆生理与分子育种. E-mail: jiays2005@163.com

1 材料与方法

1.1 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，基因型为 Mo17 的 C 型不育细胞质 CMo17 及其同核保持系 NMo17；菌种：玉米小斑病菌 C 小种。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。

1.2 HMC 毒素的制备

HMC 毒素的制备详见马春红等^[7]的方法。

1.3 原生质体的制备

将玉米不同细胞质的 5~7 d 黄化苗叶片，切成长短相等的片段，去中脉，称取 0.5 g，剪碎。清水洗净，75%乙醇浸泡 5 min，无菌水冲洗 3 次。25%蔗糖溶液浸泡 15~20 min，使细胞发生质壁分离，便于原生质体的提取。用细菌滤器加入 5 mL 的酶解液进行第一次酶解，于 30 °C 下静置 1 h。弃第一次酶解液，加入漂洗液，于 30 °C 下静置 10 min。用细菌滤器加入 5 mL 酶解液进行第二次酶解，于 30 °C 下静置 2.5~3 h。弃第二次酶解液，加入漂洗液，抖动叶片使原生质体释放出来。将漂洗液放入 2 mL 的 EP 管中，4 °C 下 10 000 r/min 离心 5 min，弃上清。用 25% 的蔗糖溶液重悬沉淀，4 °C 下 10 000 r/min 离心 5 min，弃沉淀，得到上清液用去离子水稀释 3 倍，4 °C 下 10 000 r/min 离心 5 min，弃上清后得到的沉淀即为原生质体^[11]。

1.4 纯化 HMC 毒素的处理

将原生质体随机分为 4 组。以纯化好的毒素用漂洗液作为等渗液分别稀释至 0、50、100、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，对照用漂洗液，再分别取 1 mL 于 1.5 mL 的 EP 管中（内有原生质体）。每种浓度设 3 个重复。缓缓重悬原生质体，分别于 25 °C 下静置 1、3、6 h。取 300 μL 的处理液于 1.5 mL 的 EP 管中，4 °C 下 10 000 r/min 离心 5 min，用漂洗液洗 2 遍，最后一次离心后吸去大部分液体保留约 50 μL 液体，再缓缓悬起细胞。

1.5 玉米原生质体的染色

采用吖啶橙(AO)和溴化乙啶(EB)染色法^[12]：取玉米原生质体液 10 μL 于 0.5 mL 的 EP 管中，加 10 μL AO(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和 10 μL EB(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，立即用 NIKON 倒置显微成像系统进行观察，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。处理后观察细胞形态并计数^[13]。每组试验设 3 次重复，每次重复计数 200 个细胞。

1.6 细胞凋亡率的计算

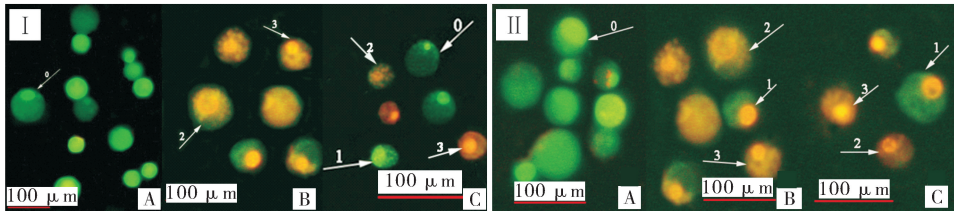
$$\text{凋亡率} = \frac{\text{凋亡细胞}}{\text{凋亡细胞} + \text{坏死细胞} + \text{活细胞}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 B37 玉米叶片原生质体的凋亡

用 3 种浓度梯度的 HMC 毒素处理玉米雄性不育细胞质 CB37 和其同核保持系 NB37 的原生质体。经 AO 和 EB 染色后，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 透过破损的核膜，嵌入细胞核 DNA，使之发出橙红色荧光。在荧光显微镜下进行观察，能清晰地分辨出 4 种细胞：活细胞、坏死细胞、早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞。活细胞的细胞核呈均匀绿色荧光，形状为圆形或椭圆形，细胞质也呈绿色荧光，且较为均匀（图 1-I 中 A 带 0 的箭头所示）；坏死细胞的细胞核呈均匀橙色荧光，细胞质呈均匀的绿色荧光或橙色荧光，形状为圆形或椭圆形（图 1-中 B 和 C 带 3 的箭头所示）；早期凋亡细胞的细胞核呈浓染的绿色荧光，形状为新月形或碎片或环形，细胞质呈绿色荧光，染色均匀或呈颗粒状（图 1-I 中 C 带 1 的箭头所示）；晚期凋亡细胞的核染色质呈浓染的橙色荧光，形状为新月形或碎片或环形，细胞质为橙色荧光，染色均匀或呈颗粒状（图 1-I 中 B 和 C 带 2 的箭头所示）。对比 CB37 与 NB37，其试验组和对照在形态特征上表现较为相似，故只列出 1 组图片，其他的处理与此相同。

由图 2 可知，B37 的 C、N 2 种细胞质用 3 种浓度的毒素诱导处理并经 AO 与 EB 复染后，原生质体细胞凋亡在 3 个时间段内(1、3、6 h)的动态变化。当毒素质量浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，处理 1、3、6 h 后，3 个时间段细胞凋亡率的平均值 CB37 为 5.40%，NB37 为 1.40%；当毒素质量浓度升至 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，CB37 为 7.90%，NB37 为 2.40%；当毒素质量浓度再升至 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，则 CB37 为 10.80%，NB37 为 4.90%。综上所述，3 种浓度毒素在 3 个时间段内对原生质体细胞凋亡率的影响，均表现出 CB37 细胞质的凋亡率远高于 NB37 细胞质，且与对照相比差异极显著($P < 0.01$)。



I : A. 玉米(CB37,NB37)原生质体经等渗液处理后,用 AO 和 EB 荧光染色后,细胞核呈均匀的绿色荧光,细胞质呈均匀绿色荧光($\times 200$)。Detached corn(CB37,NB37) protoplasts treated by isotonic solution and dyed by AO and EB, Nuclei are fluorescent green uniform, cytoplasm are fluorescent green uniform; B. HMC 毒素处理 C 细胞质玉米(CB37)原生质体,用 AO 和 EB 荧光染色后,出现晚期凋亡细胞和坏死细胞($\times 200$)。Detached corn protoplasts of C cytoplasm(CB37) treated by HMC toxin and dyed by AO and EB, appear the late apoptotic cell and died cell; C. HMC 毒素处理 N 细胞质玉米(NB37)原生质体,用 AO 和 EB 荧光染色后,出现早期凋亡细胞、晚期凋亡细胞和坏死细胞($\times 200$)。Detached corn protoplasts of N cytoplasm (NB37)treated by HMC toxin and dyed by AO and EB, appear apoptotic body and died cell.

II : A. 玉米(CMo17, NMo17)离体原生质体经等渗液处理后,用 AO 和 EB 荧光染色后,细胞核呈均匀的绿色荧光,细胞质呈均匀绿色荧光($\times 200$)。After the protoplasts from corn (CMo17,NMo17) treated by isotonic solution and dyed by AO and EB, the nuclei and cytoplasm exhibited uniform green fluorescence; B. HMC 毒素处理 C 细胞质玉米(CMo17)原生质体,用 AO 和 EB 荧光染色后出现早期凋亡细胞和坏死细胞($\times 200$)。After the protoplasts from corn CMo17 treated by HMC-toxin and dyed by AO and EB, appeared the early apoptotic cell and died cell($\times 200$); C. HMC 毒素处理 N 细胞质玉米(NMo17)原生质体,用 AO 和 EB 荧光染色后,出现晚期凋亡细胞和坏死细胞($\times 200$)。After protoplasts from corn NMo17 treated by HMC-toxin and dyed by AO and EB, appeared the late apoptotic cell and died cell.

图 1 AO 和 EB 染色法检测 B37 和 Mo17 玉米原生质体的凋亡

Fig. 1 B37 and Mo17 apoptosis in detached maize protoplasts stained by AO and EB

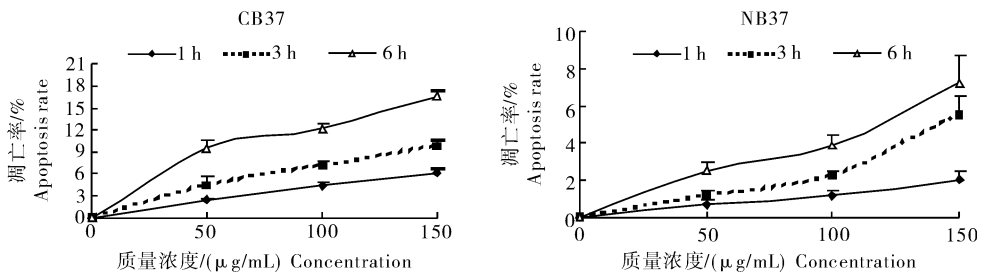


图 2 B37 经 AO 和 EB 染色后原生质体的凋亡率

Fig. 2 The rate of apoptosis in detached maize(B37) protoplast stained by AO and EB

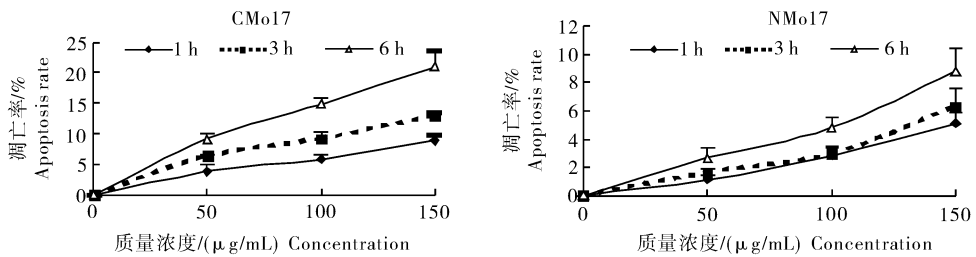


图 3 Mo17 经 AO 和 EB 染色后原生质体的凋亡率

Fig. 3 The rate of apoptosis in detached maize(Mo17) protoplast stained by AO and EB

2.2 Mo17 玉米叶片原生质体的凋亡

HMC 毒素处理玉米雄性不育细胞质 CMo17 及其同核保持系 NMo17 的叶片原生质体时,2 种细胞质均发生了不同程度的凋亡,通过 AO 和 EB 荧光染色能清晰分辨出活细胞、坏死细胞、早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞。特征:活细胞的细胞核发均匀

的绿色荧光,呈圆形或椭圆形,细胞质也呈均匀的绿色荧光(图 1-II A 中带 0 的箭头所示);坏死细胞的核染色质呈橙色荧光,圆形或椭圆形(图 1-II 中 C 带 3 的箭头所示);凋亡细胞的形状为新月形或碎片或环形,有些细胞存在出泡现象,其中早期凋亡细胞的细胞核呈现浓染的绿色荧光(图 1-II C 中带 1

的箭头所示),晚期凋亡的细胞核呈现浓染的橙色荧光(图 1-II B 和 C 中带 2 的箭头所示)。

由图 3 可知,当处理浓度相同时,原生质体凋亡率随时间的增加而显著增加。毒素质量浓度为 50、100、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$,处理 6 h 时,Mo17 均达到最大凋亡率,其中 CMo17 分别为 9.17%、14.83%、21.00%;NMo17 分别为 2.67%、4.83%、8.83%。处理时间相同时,其凋亡率随处理浓度的增加而增加。将处理时间设为 1、3、6 h,HMC 毒素质量浓度为 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,Mo17 均达到最大凋亡率,其中 CMo17 分别为 8.83%、13.00%、21.00%,NMo17 分别为 5.17%、6.33%、8.83%。用相同浓度的 HMC 毒素处理相同的时间后,CMo17 的玉米原生质体的凋亡率均显著性高于 NMo17,且与对照相比差异极显著($P < 0.01$)。

3 讨论

本试验用 HMC 毒素不同浓度处理 B37 和 Mo17 的 C、N 细胞质玉米叶片原生质体时,均出现不同程度的细胞凋亡。通过荧光显微镜检测到核小体、染色质边集和环状染色质等凋亡特征,不同细胞质的玉米均存在相似的形态特征。C 与 N 间凋亡率的相同之处在于不同基因型玉米原生质体发生凋亡的趋势,即随 HMC 毒素浓度和处理时间的增加而增加;同一种基因型不同细胞质玉米叶片原生质体的凋亡程度存在显著性差异,即 C 细胞质的凋亡率显著高于 N 细胞质,两者差异极显著。HMC 毒素对 C 细胞质的专效性在原生质体系统内获得证实。这与早期用 HMC 毒素分别处理 20 种基因型成对 C、N 细胞质玉米的离体根冠细胞时,两者细胞死亡百分率(C 为 19.5,N 为 7.3)差异极显著的结果吻合^[7]。HMC 毒素对同核的 C 细胞质的线粒体等结构和功能损伤程度比 N 细胞质严重^[4]。许多研究显示,线粒体的通透性改变,导致各种凋亡因子从线粒体释放到细胞质中,它们或破坏核染色质,或激活 Caspase,使细胞表现出核染色质断裂、染色质边集等凋亡现象,最后细胞膜内陷形成凋亡小体^[14]。笔者在前期的试验观察到细胞凋亡时细胞质的固缩程度 CB37 大于 NB37^[7],这进一步证实 HMC 毒素诱导处理 C、N 细胞质的原生质体时,C 细胞质玉米对 HMC 毒素的敏感性显著高于 N 细胞质^[8]。本试验改用玉米叶片的原生质体,使之更接近于田间常在叶片上感病的实际情况。路艳艳

等^[12]用 AO 和 EB 复染法检测人肝细胞的凋亡现象时指出,其细胞凋亡率与流式细胞仪测出的结果一致,说明本试验采用该染色法精确度较高。

病原菌与寄主之间的相互关系,如萎蔫型病斑与细胞坏死、细胞凋亡三者病理反应的机制是否相同? HMC 毒素对 C 细胞质的杀伤属于亲和反应,脂膜过氧化基本不发生。笔者前期的研究结果表明,由于 C 毒素显著抑制 C 细胞质线粒体 SOD 活性,并使膜透性增强,膜内离子严重泄漏,叶片产生萎蔫型病斑,被动地结束生命^[4]。Greenburg^[15]也认为这种萎蔫而死亡的细胞膜很快破裂。林久生等^[13]指出细胞内大量离子外泄是细胞萎蔫死亡的一个重要标志。但当 C 小种接种于 N 细胞质叶片,则将启动膜脂过氧化,细胞产生 Necrosis 现象,也称为过敏性坏死反应(HR),细胞内出现 DNA-ladder,该染色质及胞质浓缩^[16]。Wang 等^[17]证实抗病植株的 HR 反应具有细胞凋亡的典型特征。过氧化物自由基是诱导萎蔫型细胞死亡的关键信号, H_2O_2 则可能是植物细胞程序性死亡的触发因子。换言之,寄主通过识别并限制病原物在侵染处诱发局部的细胞过敏性坏死反应以及植物的细胞凋亡,均是为了更好地适应生存环境而采取的程序死亡,完全不同于细胞萎蔫型被动结束生命的坏死反应。

参 考 文 献

- [1] WEINRAUCH Y,ZYCHLINSKY A. The induction of apoptosis by bacterial pathogens [J]. Annual Review of Microbiology,1999,53:155-187.
- [2] 商闯,贾银锁,马春红,等. HMC 毒素培养滤液对专化寄主玉米叶片诱导抗病性及相关酶的影响[J]. 中国农业科学,2008,41(12):4307-4313.
- [3] 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.
- [4] 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院,2002:24-29.
- [5] 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(简报)[J]. 分子细胞生物学报,2008,41(4):329-334.
- [6] 马春红,李秀丽,董文琦,等. 玉米小斑病菌 C 小种毒素诱导玉米离体根冠细胞凋亡的检测[J]. 华中农业大学学报,2010,29(2):138-142.
- [7] 马春红,李秀丽,董文琦,等. HMC 毒素诱导玉米同核 C、N 细胞质细胞凋亡的荧光显微观察[J]. 中国农业科学,2011,44(9):1823-1829.

- [8] 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.
- [9] DENG X Y, LI J W, ZHOU Z Q, et al. Cell death in wheat roots induced by the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* [J]. Plant and Soil, 2010, 328: 45-55.
- [10] WANG L K, ZHOU Z Q, SONG X F, et al. Evidence of ceased programmed cell death in metaphloem sieve elements in the developing caryopsis of *Triticum aestivum* L. [J]. Protoplasma, 2008, 234: 87-96.
- [11] 马力耕, 唐志军, 王秀娟, 等. 玉米叶片原生质体的制备[J]. 河北师范大学学报: 自然科学版, 1994, 49(1): 71-73.
- [12] 路艳艳, 杨锦蓉, 王菁. AO/EB 染色法及流式细胞术检测 DMF 诱导人肝细胞凋亡[J]. 浙江预防医学, 2007, 19(6): 11-14.
- [13] 林久生, 王根轩. 渗透胁迫诱导的小麦叶片细胞程序性死亡[J]. 植物生理学报, 2001, 27(3): 221-225.
- [14] HENGATNER M O. The biochemistry of apoptosis [J]. Nature, 2000, 407(6805): 770-776.
- [15] GRENNERG J T. Programmed cell death; a way of life for plants [J]. Proceedings of the National Academy of Science of United States of America, 1996, 93(22): 12094-12097.
- [16] LEVINE A, PENNELL R I, ALVAREZ M E, et al. Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response [J]. Current Biology, 1996, 6(4): 427-437.
- [17] WANG H, LI J, BOSTOICK R M. Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development[J]. Plant Cell, 1996, 8(3): 375-391.

Detection of apoptosis in host protoplasts induced by HMC-toxin

MA Chun-hong¹ LI Xiu-li^{1,2} ZHANG Hong-xin³ DONG Wen-qi⁴
DAI Zhi-gang⁵ WANG Li-an² JIA Yin-suo¹

1. Institute of Genetics and Physiology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences / Plant Genetic Engineering Center of Hebei Province, Shijiazhuang 050051, China;
2. College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China;
3. Department of Life Science, Tangshan Teachers College, Tangshan 063000, China;
4. Department of Science and Technology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China;
5. Soil and Fertilizer Station of Hubei Province, Wuhan 430064, China

Abstract Apoptosis in protoplasts from homokaryon maize B37(CB37, NB37) and Mo17 (CMo17, NMo17) inbred lines treated by HMC-toxin were studied. Homokaryon maize B37 and Mo17 inbred lines were tested and the protoplasts may be stained by AO and EB. The protoplasts were divided into 4 groups. 3 groups were treated by 0, 50, 100, 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of HMC-toxin as the experimental groups, and the induced time were 1, 3, 6 h to study the feature of apoptotic and the rate of apoptosis. The apoptotic features such as apoptotic bodies, chromatin margination or ring chromatin were found after the treatment. When treated by HMC-toxin with different concentrations, the apoptosis rates of CB37, NB37, CMo17 and NMo17 maize protoplasts were 10.80%, 4.90%, 21.00%, and 8.83%. According to the above study, a conclusion can be reached as follows: apoptosis in protoplasts from homokaryon maize B37 were the same as that of Mo17; CB37 and CMo17 were more sensitive to HMC-toxin than NB37 and NMo17, respectively; when treated by the same concentration of HMC-toxin, the apoptosis rates of CB37 and CMo17 maize protoplasts were significantly higher than NB37 and NMo17 respectively; the rates of apoptosis were significantly different between C and N, and the former was significantly higher than the latter. In addition, the apoptosis rate increased when the treatment time and the concentration increased.

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