

玉米小斑病菌毒素诱导自交系 Mo17 凋亡的检测

马春红¹ 李秀丽^{1,2} 董文琦³ 及增发³ 戴志刚⁴ 王立安²

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. 河北省农林科学院科技处, 石家庄 050051;

4. 湖北省土壤肥料工作站, 武汉 430064

摘要 利用提取的玉米小斑病菌 C 小种 (*Helminthosporium maydis* race C, HMC) 毒素处理同核异质体 Mo17-C 和 Mo17-N 叶片及叶片中的原生质体并进行凋亡检测。叶片凋亡检测采用 DNA 凝胶电泳分析, 结果表明: Mo17-C 和 Mo17-N 均出现 DNA-ladder, 其中 HMC 毒素质量浓度为 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 诱导 12 h 后 Mo17-C 出现的 DNA-ladder 最明显, 而 Mo17-N 在 HMC 毒素质量浓度升至 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 诱导 12 h 后 DNA-ladder 才最明显。原生质体的凋亡检测采用 Hoechst 33258 荧光染色法并统计其凋亡率, 结果表明: Mo17-C 和 Mo17-N 均出现细胞凋亡的特征, 包括产生凋亡小体、环状染色质和染色质边集的现象, 且凋亡率均随毒素浓度的增加和诱导时间的延长而呈上升趋势。但对于相同处理, C 细胞质的凋亡率显著高于 N 细胞质, Mo17-C 对 HMC 毒素的敏感性大于 Mo17-N。

关键词 玉米小斑病菌 C 小种; 毒素; 玉米; 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(2013)04-0033-05

玉米小斑病是世界各玉米产区普遍发生的一种重要病害。由于感病杂交种的推广, 小斑病已成为许多国家玉米生产的主要障碍之一。玉米小斑病的致病菌为玉蜀黍双极蠕孢菌 [*Bipolaris maydis* (Nisik.) Shoemaker, 异名: *Helminthosporium maydis* Nisik. et Miyake], 病菌主要以无性形态存在, 属半知菌亚门双极蠕孢属真菌^[1]。其有性态为异旋孢腔菌 (*Cochliobolus heterostrophus* Drechsler)。玉米小斑病菌 C 小种 (*Helminthosporium maydis* race C, HMC) 毒素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, C 小种对 C 细胞质产生专效性毒害, 严重时叶片甚至全株萎蔫致死^[2]。

细胞凋亡也称为程序性死亡 (programmed cell death, PCD)^[3], 是指当细胞不再行使功能时, 将在细胞的程序性调控下发生死亡的过程, 在植物生长和发育过程中起到了重要的作用, 包括叶片的脱落及对病原真菌和环境胁迫的响应等^[4]。植物细胞凋亡中研究最多的是过敏反应 (hypersensitive re-

sponse, HR), 即真菌或细菌感染植物后, 寄主植物发生主动、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^[5-6]。

在植物系统获得性抗性反应 (systemic acquired resistance, SAR) 过程中, 未受侵染的细胞也会发生类似 PCD 的现象。拟南芥接种低毒力丁香假单胞菌番茄致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, Pst DC3000) 后, 在接种位点附近出现细胞过敏反应, 同时在非接种叶片上也出现了轻微细胞死亡症状^[7]。周树敏等^[8]发现番茄局部侵染烟草花叶病毒 (TMV) 就可诱导非接种部位细胞凋亡, 凋亡细胞表现为染色质浓缩形成团块, 分布于细胞核边缘, 核 DNA 出现断裂且呈梯状条带, TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 检测也呈阳性, 线粒体和叶绿体结构破坏, 液泡膜和质膜发生收缩和降解等, 说明 TMV 局部性侵染番茄叶片后, 能诱导根尖、茎尖和非接种叶片的系统性 PCD 反应。目前, 有关病原菌对不同基因型不同细胞质寄主的研究较少, 笔者选用基因型为 Mo17 的同核异

收稿日期: 2012-12-06

基金项目: 农业部“948”项目[2011-G1(3)-07]、科技部国际合作项目(2006DFB02480)、河北省自然科学基金项目(C2011301010)、河北省科技计划项目(13396401D)和河北省高层次人才项目(A2010003028)

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, 教授. 研究方向: 真菌生物化学与分子生物学. E-mail: wlian1965@126.com

质玉米原生质体为试材,采用细胞凋亡检测技术(Hoechst 33258 荧光染色和 DNA ladder)观察寄主反应,旨在为探讨因病原菌入侵而引起植物抗性的机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

菌株:玉米小斑病菌 C 小种(HMC);玉米:不育细胞质 Mo17-C 及其同核保持系 Mo17-N,均由河北省农林科学院遗传生理研究所提供。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

参照马春红等^[9]的方法进行。

1.3 原生质体的制备

参照马春红等^[10]和马力耕等^[11]的方法进行。

1.4 Hoechst 33258 荧光染色

将纯化好的 HMC 毒素分别稀释至质量浓度 50、100、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$,处理方法参照马春红等^[12]的方法进行。用 HMC 毒素分别处理 Mo17-C 和 Mo17-N 玉米原生质体,1、3、6 h 后观察经 Hoechst 33258 荧光染色不同细胞质玉米发生的凋亡情况,并计算细胞凋亡率^[9]。

1.5 琼脂糖凝胶电泳

将纯化的毒素分别稀释至质量浓度 200、250、

300 $\mu\text{g}/\text{mL}$,对照为 pH 6.5 的 PBS。每组试验重复 3 次^[12]。电泳条件:电压为 100 V,电流为 300 mA,电泳时间以指示剂为准。电泳过程中保证恒压,且电流不超过 120 mA。

2 结果与分析

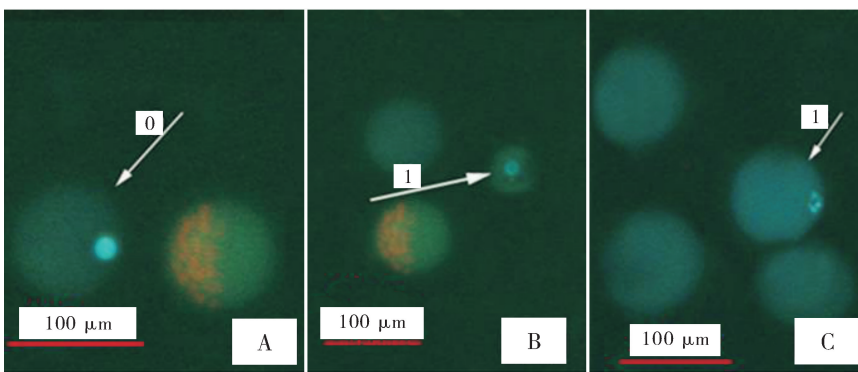
2.1 Mo17 玉米原生质体的凋亡与检测

HMC 毒素处理的 Mo17-C 和 Mo17-N 玉米原生质体,经 Hoechst 33258 荧光染色玉米均发生了不同程度的凋亡。

在荧光显微镜下能清晰地观察到经 Hoechst 33258 荧光染色后的正常细胞和凋亡细胞。正常细胞的细胞核为蓝色荧光,染色均匀,形状为圆形或椭圆形(图 1-A 中带 0 的箭头所示)。凋亡细胞的细胞核被染成蓝色荧光,染色致密浓染,出现环形,凋亡小体和染色质边集等凋亡现象(图 1-B,C 中带 1 的箭头所示)。

在进行 Mo17 玉米原生质体的凋亡细胞检测时,各处理组中出现的凋亡细胞形态相似,故只取其中的 1 组照片列入图 1 中。

随着处理时间和 HMC 毒素质量浓度的提高,Mo17 玉米原生质体会产生皱缩或出泡现象,也可见细胞碎片增多。检测结果表明,HMC 毒素处理后的 Mo17 玉米原生质体均出现了凋亡小体、染色质边集或环状染色质等凋亡现象。



A:玉米(Mo17-C、Mo17-N)原生质体经 PBS 处理后,用 Hoechst 33258 荧光染色后细胞核呈均匀蓝色荧光($\times 200$)。After protoplasts from corn Mo17-C or Mo17-N treated by PBS and dyed by Hoechst 33258, the nuclei exhibited uniform blue fluorescence($\times 200$); B:HMC 毒素处理 C 细胞质(Mo17-C)玉米原生质体,用 Hoechst 33258 荧光染色后出现凋亡小体($\times 200$)。After protoplasts from corn Mo17-C treated by HMC-toxin and dyed by Hoechst 33258, appeared the late apoptotic body($\times 200$); C:HMC 毒素处理 N 细胞质(Mo17-N)玉米原生质体,用 Hoechst 33258 荧光染色后出现凋亡小体和坏死细胞($\times 200$)。After protoplasts from corn Mo17-N treated by HMC-toxin and dyed by Hoechst 33258, appeared the late apoptotic body and died cell($\times 200$)。

图 1 Hoechst 33258 荧光染色检测 Mo17 玉米原生质体的凋亡

Fig. 1 The apoptosis of protoplasts from Mo17 genotype maize and stained by Hoechst 33258

2.2 Mo17 玉米原生质体的凋亡率

经过 Hoechst 33258 荧光染色后,检测结果表明:当 HMC 毒素质量浓度分别为 50、100、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,处理 6 h 后 Mo17-C 玉米原生质体最大凋亡率分别为 2.83%、3.83%、6.83%;当毒素质量浓度为 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,处理 1、3、6 h 后玉米原生质体最大凋亡率分别为 4.00%、4.83%、6.83%(图 2, Mo17-C)。

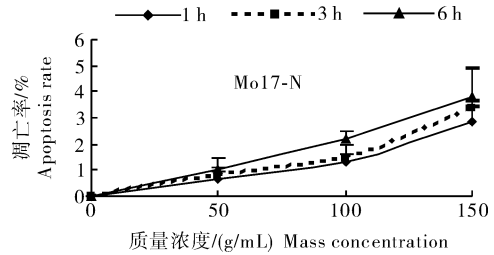
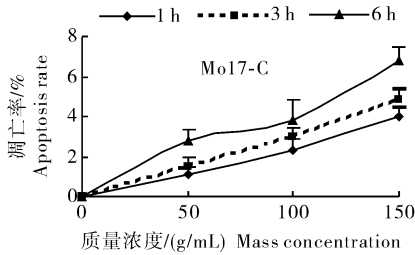


图 2 Hoechst 33258 染色检测 Mo17 玉米原生质体的凋亡率

Fig. 2 The apoptosis rate of protoplasts from Mo17 maize treated by HMC-toxin and stained by Hoechst 33258

2.3 Mo17 玉米的 DNA ladder 检测

HMC 毒素质量浓度为 200、250、300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理 Mo17-C 及 Mo17-N 玉米叶片,用 pH 6.5 的 PBS 缓冲液处理的叶片作为对照,在处理 3、6、9、12、15 h 后,除对照外其他处理均可出现不同程度的 DNA 梯状条带(图 3)。统计 DNA 条带,无明显条带的记作“弥散”,然后再结合条带的亮度,得出诱导寄主凋亡最佳诱导浓度和时间。

用 3 种浓度的毒素处理 Mo17-C 玉米叶片,在 5 个处理时间后呈现不同程度的 DNA 梯状条带。在处理 3、6、9、12、15 h 后,质量浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,条带数分别为弥散、弥散、3、5、3。质量浓度为 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,条带数分别为弥散、弥散、2、6、1。质量浓度为 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,条带数分别为弥散、弥散、3、5、2。由此可见,毒素处理 Mo17-C 玉米叶片产生条带最清晰的处理质量浓度为 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$,处理时间为 12 h。DNA 梯状条带随处理浓度和时间的增加出现先增加后减少的趋势(图 3)^[10]。

用 3 种浓度的毒素处理 Mo17-N 玉米叶片,在 5 个处理时间后呈现不同程度的 DNA 梯状条带。在处理 3、6、9、12、15 h 后,质量浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,条带数分别为弥散、弥散、2、5、弥散。质量浓度为 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,条带数分别为弥散、2、2、3、1。质量浓度为 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,条带数分别为弥散、3、3、6、2。由此可见,毒素处理 Mo17-N 玉米叶片产生条带最清晰的处理质量浓度为 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$,处理时间为 9 h。DNA 梯状条带随处理浓度和时间的增加出

用 HMC 毒素处理 Mo17-N 玉米原生质体,毒素质量浓度为 50、100、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,在 6 h 后凋亡率为 1.00%、2.17%、3.83%。处理 1、3、6 h 后,在 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,原生质体凋亡率分别为 2.83%、3.33%、3.83%(图 2, Mo17-N)。检测结果表明,原生质体的凋亡率随毒素浓度的增加和处理时间的延长而不断增加,Mo17-C 细胞质玉米原生质体的凋亡率显著高于 N 细胞质原生质体。

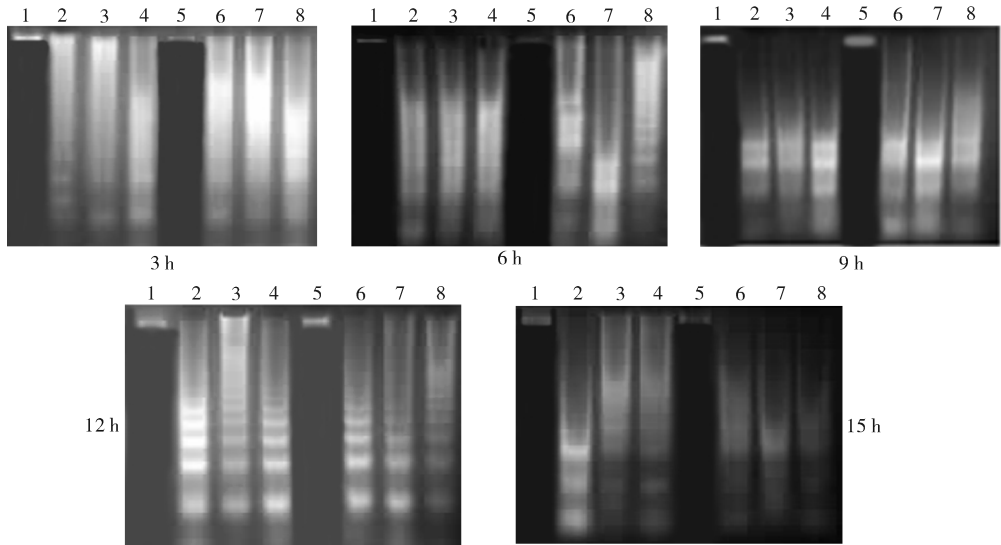
现先增加后减少的趋势,且 Mo17-N 叶片出现清晰条带的处理浓度大于 Mo17-C 叶片,处理时间相同(图 3)。

检测结果表明,除对照外其他处理均出现 DNA ladder 的现象,且 C 细胞质比 N 细胞质较早出现,同时还存在最佳的处理浓度和时间。HMC 毒素能诱导 C、N 细胞质玉米发生凋亡,但是 N 细胞质玉米叶片产生最清楚 DNA 梯状条带时的处理浓度大于 C 细胞质玉米或处理时间长于 C 细胞质玉米,说明 N 细胞质玉米对 C 毒素的敏感性低于 C 细胞质玉米,这是由于 N 细胞质玉米的质量高于 C 细胞质的缘故。

3 讨论

目前检测细胞凋亡的方法有多种,且还在继续完善^[13-14]。细胞凋亡是一种不同于坏死的死亡形式,过敏反应是植物细胞凋亡中研究最多的,是一种积极的死亡反应。它是由病原体感染引起的,即真菌或细菌感染植物后,寄主植物发生主动、快速的死亡,同时触发体内受感染处和远处组织的防御反应,从而限制了病原体的生长和扩散的现象^[12]。

Navarre 等^[5]报道 Victorin 处理后的燕麦组织细胞出现凋亡现象。Curtis 等^[15]证明 Victorin 可改变燕麦线粒体的通透性,从而使线粒体丧失功能并诱导细胞进入细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD)过程。Tada 等^[16]报道 Victorin 诱导的 PCD 过程与禾冠柄锈菌(*Puccinia coronata*)产生的



1:CK,pH 6.5 PBS 处理 Mo17-C 黄化苗。DNA from Mo17-C yellow leaves treated by pH 6.5 PBS buffer; 2:200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 HMC 毒素处理的 Mo17-C 黄化苗。DNA from Mo17-C yellow leaves treated by HMC-toxin with a concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 3:250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 HMC 毒素处理的 Mo17-C 黄化苗。DNA from Mo17-C yellow leaves treated by HMC-toxin with a concentration of 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 4:300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 HMC 毒素处理的 Mo17-C 黄化苗。DNA from Mo17-C yellow leaves treated by HMC-toxin with a concentration of 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 5~8:材料为 Mo17-N,其他处理与 1~4 号依次对应。DNA from Mo17-N, the same treatment as Mo17-C homologously.

图 3 HMC 毒素处理不同时间后 Mo17 玉米叶片的 DNA ladder 检测

Fig. 3 DNA ladder of Mo17 maize leaves treated by HMC-toxin for different times

激发子引起燕麦 HR 反应中的坏死过程有相似之处。Wang 等^[17]报道 AAL 毒素可诱导毒素敏感的番茄进入 PCD 过程,经 AAL 毒素处理的番茄组织细胞出现凋亡过程特有的 TUNEL 染色阳性、DNA ladder 和凋亡小体,与 HR 抗性反应过程中的现象相似。研究发现 HMC 毒素在对专化寄主的“伤害”过程中有细胞凋亡现象^[18-19]。同核异质玉米的根冠细胞对 HMC 毒素反应与细胞质抗病性相关。

本试验供试材料为玉米黄化苗的原生质体,采用荧光染色观察原生质体的凋亡现象。正常细胞可摄取少量 Hoechst 荧光染料,坏死细胞则不能摄取。与根冠细胞为材料相比,在形态上根冠细胞更容易区分出凋亡细胞与坏死细胞以及正常细胞,可能是由于细胞核随原生质体的移动而移动,以至有些细胞不能够观察到细胞核,对细胞凋亡率的统计带来了一定的误差。

由试验结果可知:HMC 毒素“伤害”寄主细胞的过程中,寄主细胞发生不同程度的 DNA 梯状条带,有的 DNA 呈弥散状,说明 DNA 已经发生断裂,但没有完全形成 200 bp 整数倍的核酸片段,有研究证明该现象也属于凋亡分子学的特征^[20]。有些处理呈现明显的 DNA 梯状条带,该现象表明 DNA 呈

整数倍的断裂,是凋亡现象的典型特征,条带越多,亮度越强说明核酸酶的作用越强^[21]。

DNA 梯状条带的变化并没有像根冠细胞及原生质体的凋亡率随处理浓度和时间的增加而增加,而是先增强后减弱。说明低浓度毒素能诱导寄主产生抗性,高浓度使寄主致死。本试验结果表明,毒素诱导寄主细胞发生凋亡需要一定的浓度和一定的处理时间,过低的浓度不能使寄主细胞产生较好的抗性,而浓度太大又会因“伤害”较大使细胞致死,也不能起到抗病的效果。这可能是一定的毒素浓度和一定的处理时间能够激活与细胞凋亡有关的基因,从而加速细胞的凋亡。这可为研究毒素与寄主间的互作机制提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] SMITH D R, HOOKER A L, LIM S M. Physiologic races of *Helminthosporium maydis* [J]. Plant Disease Report, 1970, 54: 819-822.
- [2] WEI J K, LIU K M, CHEN J P, et al. Pathological and physiological identification of race C of *Bipolaris maydis* in China [J]. Phytopathology, 1988, 78(5): 550-554.
- [3] PALAVAN-UNSAI N, BUYUKTUNCER E D, TUFEKCI M A. Programmed cell death in plants [J]. Journal of Cell and Molecular Biology, 2005(4): 9-23.

- [4] KERR J F R, WYLLIE A H, CURRIE A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics [J]. *Br J Cancer*, 1972, 26: 239-257.
- [5] NAVARRE D A, WOLPERT T J. Victorin induction of an apoptotic/senescence-like response in oats [J]. *Plant Cell*, 1999, 11(2): 237-249.
- [6] 王立安, 赵俊霞, 马春红, 等. 玉米根冠脱落细胞中微丝分布的荧光显微观察[J]. *实验生物学报*, 2003, 36(2): 149-151.
- [7] 杨柳, 董浚键, 陈文利. 病原菌 Pst DC3000 侵染拟南芥导致自噬和光合作用的抑制[J]. *生物物理学报*, 2011, 27(6): 517-527.
- [8] 周树敏, 刘文娜, 孔令安, 等. TMV-番茄互作中的系统性 PCD 反应[J]. *中国科学*, 2008, 38(9): 825-835.
- [9] 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.
- [10] 马春红, 李秀丽, 张红心, 等. HMC 毒素诱导玉米专效寄主原生质体细胞凋亡的检测[J]. *华中农业大学学报*, 2012, 31(2): 199-203.
- [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(1): 71-74.
- [12] 马春红, 李秀丽, 董文琦, 等. HMC 毒素诱导玉米同核异质 B37 原生质体细胞凋亡的检测[J]. *华北农学报*, 2011, 26(6): 136-140.
- [13] 陈默. 细胞程序性死亡研究进展[J]. *化学工程与装备*, 2010(6): 154-155.
- [14] 任平, 高明辉, 李慧妹. 细胞凋亡及其检测方法[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2004(12): 31-32.
- [15] CURTIS M J, WOLPERT T J. The oat mitochondria permeability transition and its implication in victorin binding and induced cell death [J]. *Plant J*, 2002, 29(3): 295-312.
- [16] TADA Y, HATA S, TAKATA Y, et al. Induction and signaling of an apoptotic response typified by DNA laddering in the defense response of oats to infection and elicitors [J]. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2001, 14: 477-486.
- [17] WANG H, LI J, BOSTOCK R M, et al. Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development [J]. *Plant Cell*, 1996, 8: 375-391.
- [18] 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.
- [19] 马春红, 郑秋玲, 董文琦, 等. HMC 毒素引起玉米根冠活细胞凋亡的荧光显微观察[J]. *华北农学报*, 2009, 24(增刊): 135-139.
- [20] 孙英丽, 周军, 戴尧仁, 等. VK3 诱导的植物细胞凋亡及其机理[J]. *科学通报*, 1999, 44(19): 2075-2080.
- [21] 李秀丽. HMC 毒素对专化寄主细胞凋亡的诱导作用[D]. 石家庄: 河北师范大学图书馆, 2009.

Detection of apoptosis in Mo17 induced by *Helminthosporium maydis* race C (HMC) toxin

MA Chun-hong¹ LI Xiu-li^{1,2} DONG Wen-qi³ JI Zeng-fa³ DAI Zhi-gang⁴ WANG Li-an²

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 Science and Technology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China;

4. Soil and Fertilizer Station of Hubei Province, Wuhan 430064, China

Abstract Apoptosis in leaves and protoplasts from homokaryon maize Mo17-C and Mo17-N treated by *Helminthosporium maydis* race C (HMC) toxin were detected by DNA ladder and hoechst 33258 respectively. The DNA ladder result indicates that DNA ladder appeared in both Mo17-C and Mo17-N, and the obvious DNA ladder in Mo17-C appeared after 12 h induction when the concentration of HMC reached 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, but appeared in Mo17-N when the concentration reached 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Protoplasts of both Mo17-C and Mo17-N revealed apoptotic features such as apoptotic bodies, ring chromatin or chromatin margination. The apoptosis rate of Mo17-C maize protoplasts were significantly higher than that of Mo17-N in the same treatment, and it increased with the increase of treatment time and concentration. So, it is concluded that Mo17-C was more sensitive than Mo17-N.

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

(责任编辑:陈红叶)