

大麦黄矮病毒的冰核活性与作物霜冻的关系

周希明 朱 红 孙福在

(中国农业科学院植物保护研究所 北京 100094)

摘 要 对大麦黄矮病毒 (Barley Yellow Dwarf Virus, BYDV) 的冰核活性, 以及它的侵染与作物霜冻的关系进行了研究。利用人工模拟霜箱, 测试了接种 BYDV 的小麦等作物植株的霜冻温度, 并用 ELISA 法检测了供试植株的病毒含量。结果表明, 接种样品与对照相比, 感病品种的霜冻温度升高 1—2℃ 以上, 抗病品种的霜冻温度变化不大。离体叶片测定结果表明, “中 7902” 的叶片中, 病毒含量与霜冻温度成正相关, 说明 BYDV 可以起到异源冰核 (heterogeneous ice nuclei) 的作用, 它的侵染能影响作物的抗霜冻能力。用 “Vali 小液滴冻结法” 检测提纯的 BYDV, 证明 BYDV 具冰核活性, 从而首次发现病毒也能起到生物冰核的作用。

关键词 冰核活性, 病毒, 大麦黄矮病毒, 小麦黄矮病, ELISA

霜冻是一种严重的自然灾害, 对农业生产造成极大危害。多年来国内外许多学者对植物霜冻原理和自然界冰核来源的研究作了大量的工作。研究表明, 纯净的植物在 -10℃ 以上具有过冷却作用 (supercooling), 即在 -10℃ 以上植物不具备自身冰核 (homogeneous ice nuclei)。造成植物在较高温度下发生霜冻的原因, 是在自然界广泛存在着异源冰核^[1]。自从 1974 年 Maki 等人从赤杨树叶中分离出具有很高冰核活性的冰核活性细菌 (ice nucleation active bacteria)^[2] 以来, 对生物冰核的研究已在世界上广泛开展。研究结果表明, 在 3 属 17 种 (变种) 细菌^[3]、2 种真菌^[4] 和几种地衣^[5] 中具有冰核活性。但具冰核活性的病毒, 至今在国内外还没见报道。

小麦黄矮病是由大麦黄矮病毒引起的世界性重要作物病毒病害之一, 每年都给农业生产带来很大损失。作者就 BYDV 侵染作物后对其霜冻温度的影响作了研究和分析, 同时检测了提纯 BYDV 的冰核活性。

1 材料和方法

1.1 植物霜冻温度及病毒含量检测

1.1.1 供试材料: 感病材料: 775433 (冬小麦, $2n=42$), 中 7902 (春小麦, $2n=42$)。抗病材料: 中 5 (春性, 普通小麦与天蓝偃麦草 (*Agropyron intermedium*) 杂交后代, $2n=56$)。

1.1.2 毒源: BYDV-PAV 株系。本实验室分离、保存。

1.1.3 抗血清及传毒介体: MIX 抗血清由澳大利亚 (CSIRO) Dr. Peter Waterhouse 提

供。以禾谷缢管蚜 (*Rhopalosiphum padi*) 为传毒介体。

1.1.4 供试材料的栽种与接种: 将上述供试材料各 50 粒在室温下 (15—20℃) 催芽 5 天后栽种, 二叶时期 (约栽种 10 天后), 用饲毒 BYDV-PAV 株系 24 小时后的禾谷缢管蚜接种, 每株接 5—10 头有毒蚜, 三天后喷杀虫剂去虫, 然后放入 20℃、光照为 18 小时/天、25000 lx 的环境箱中培养, 15 天后测试。育苗期需确保植株生长环境的洁净, 尽量减少其它病菌和虫害的影响。

1.1.5 植株霜冻温度的检测: 供试植株分为二批, 第一批单叶检测, 剪取叶片部位为“新叶下一叶”, 每株 0.2g^[6]。第二批用于整株检测。测霜冻冰点时将热敏电阻测温探头紧贴叶片固定 (整株检测时, 探头固定于“新叶下一叶”上), 然后置于人工霜冻模拟箱中^[7], 以 0.05℃/min 的速度使箱内温度下降, 温度的变化导致探头电阻值的改变而得到一个变化的电压降, 经数据采集器 (AML1000 型) 采集输入计算机 (图 1), 计算机则自动记录、分析叶片表面温度的变化, 并绘制出温度变化曲线图。由于植物在冻结的瞬间要释放出凝结热, 使叶表温度骤然升高, 此时在计算机显示屏温度变化曲线图上会出现一个明显的峰, 这个峰的始端, 正是叶片冻结的冰点, 即霜冻温度 (图 2)。该设备每次可测 32 个样品。

1.1.6 叶片中病毒含量的检测: 将整株检测的植株叶片在测完霜冻温度后, 也像单叶检测的一样, 每株取 0.2g 剪下, 两批苗的叶片每片分别加 5 倍重量的抽提缓冲液压成汁液, ELISA 法检测各叶片的病毒含量。

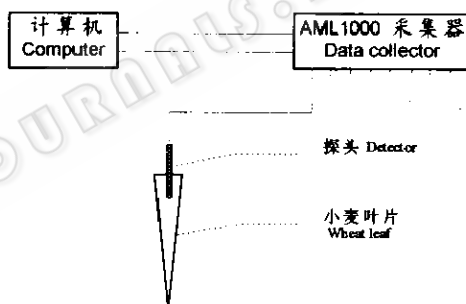


图 1 冰点检测示意图

Fig. 1 A sketch diagram for freezing point test on plants

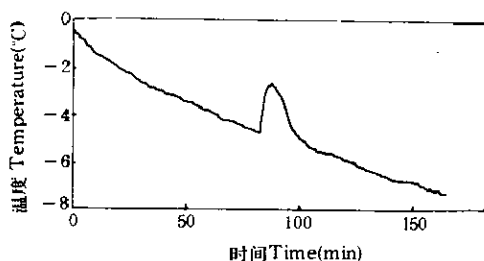


图 2 温度变化曲线图

Fig. 2 A diagram of temperature curve on the tested plants

1.2 提纯病毒的冰核活性的检测

1.2.1 病毒提纯：参考澳大利亚联邦科工组织 (CSIRO) Dr. Peter Waterhouse 实验室所用程序 (私人通讯)。

1.2.2 冰核活性的测定：提取纯病毒液 50 μ l，加 50 μ l 三蒸水配成原液，原液再按 10 倍梯度稀释成 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ 倍稀释液，共 5 个浓度。用“Vali 小液滴冻结法”^[8]测定冰核活性，即：先将含有 1% 石蜡油的二甲苯溶液喷于铝箔纸上，并于 50 C 下烘干，然后将各浓度的病毒液滴在上面，每个浓度滴 10 滴一排，每滴 10 μ l。再将该铝箔纸漂浮于低温水浴中的酒精表面，测定各液滴的冻结温度，以三蒸水和 0.01mol/L KPB 作对照。

2 结果和讨论

2.1 植株霜冻温度

整株检测的接种和对照植株在人工霜冻模拟箱中的霜冻温度及各植株的 ELISA 值见表 1。

表 1 各品种整株霜冻温度与病毒含量 (ELISA 读数)

Table 1 Freezing point and ELISA reading of tested plants

品种名 Cultivars	霜冻温度 Frddzing point (C)	ELISA 读数 ELISA reading	品种名 Cultivars	霜冻温度 Frddzing point (C)	ELISA 读数 ELISA reading
中 5	-4.2	0.026	中 5	-4.6	0.041
Zhong 5	-4.5	0.012	Zhong 5	-4.4	0.077
(CK)	-5.5	0.019	(接种株)	-5.5	0.043
	-6.4	0.016	(Infected)	-4.9	0.069
均值 Mean	-5.15	0.018	均值 Mean	-4.90	0.058
775433	-4.8	0.009	775433	-3.5	0.124
	-6.3	0.021	(接种株)	-3.9	0.134
(CK)	-5.5	0.029	(Infected)	-3.0	0.157
	-5.4	0.020		-3.4	0.150
均值 Mean	-5.5	0.020	均值 Mean	-3.45	0.141
中 7902	-5.1	0.048	中 7902	-3.8	0.184
Zhong 7902	-5.5	0.046	(接种株)	-4.5	0.147
(CK)	-6.8	0.036	(Infected)	-3.8	0.154
	-6.5	0.020		-3.3	0.186
均值 Mean	-5.97	0.038	均值 Mean	-3.85	0.168

从表 1 中可见，①各品种接种株的平均霜冻温度和 ELISA 值均比对照高。②各品种的平均 ELISA 值与霜冻温度成正相关。③抗病品种“中 5”的接种株霜冻平均温度与对照的差异不大，约 0.25 C。而感病品种“775433”和“中 7902”的接种和对照植株，平均霜冻温度相差均在 2 C 以上。由此可见，植株体内的病毒含量和发病程度直接影响着植

株的霜冻温度。“中 7902”离体叶片的霜冻冰点与病毒含量测定结果见表 2。从表 2 可见，离体叶片的霜冻温度高于整株检测的霜冻温度 5~7℃，但病毒含量与霜冻温度间仍存在着相关性，接种植株叶片平均霜冻温度高于对照植株叶片 1℃以上。从以表 2 所作病毒含量与植株霜冻温度关系图（图 3）中可见，植株叶片的病毒含量与霜冻温度间呈现正相关关系，即病毒含量越高，霜冻温度也越高。这表明 BYDV 的侵染能提高植株的霜冻温度，从而使作物植株的冻害更易发生。

表 2 中 7902 叶片霜冻温度与病毒含量 (ELISA 读数)

Table 2 ELISA reading and freezing point of the leaves of Zhong 7902

品种名 Cultivars	霜冻温度 Freezing point (℃)	ELISA 读数 ELISA reading	品种名 Cultivars	霜冻温度 Freezing point (℃)	ELISA 读数 ELISA reading
中 7902	-14.9	0.048	中 7902	-10.8	0.201
Zhong 7902	-13.4	0.040	Zhong 7902	-11.2	0.28
(CK)	-13.2	0.023	(接种株)	-11.2	0.159
	-14.6	0.020	(Infected)	-11.5	0.169
	-14.7	0.031		-11.8	0.158
	-12.8	0.044		-12.1	0.154
	-13.6	0.029		-12.2	0.148
	-13.2	0.025		-12.5	0.143
	-14.1	0.038		-12.7	0.148
	-13.9	0.046		-13.2	0.142
	-14.9	0.036		-13.6	0.140
	-15.4	0.020		-13.6	0.137
	-13.3	0.027		-13.7	0.112
	-12.8	0.022		-14.1	0.131
	-14.6	0.038		-14.2	0.135
均值 Mean	-13.96	0.032	均值 Mean	-12.56	0.152

2.2 提纯病毒的冰核活性

提纯病毒各浓度稀释液及对照液滴在不同温度下的结冰率见表 3。从表 3 可见，稀释 10^{-3} 倍及以上的各浓度病毒稀释液的结冰率均高于对照，而病毒原液于 -5℃ 就能达到较高的结冰率，且各浓度在同一温度下的结冰率随病毒浓度的降低而降低，这清楚地表明，BYDV 具有冰核活性，能提高过冷却水的冻结温度。

多年来国内外研究证明，冰核细菌之所以具冰核作用，是由于冰核细菌能产生一种冰核蛋白 (ice nucleation protein)，该蛋白分子量为 180kD，具有重复性较高的氨基酸序列和整齐的排列结构，从而具有作为冰核所需的束水特性^[9]。BYDV 的外形为球状正 20 面体^[10]（图 4），是由约 200 个氨基酸的单一肽链组成，具较规则的蛋白质外壳，推测是其外壳蛋白的三维构象提供了与冰核细菌冰核蛋白相似的束水特性从而具有冰核活性。

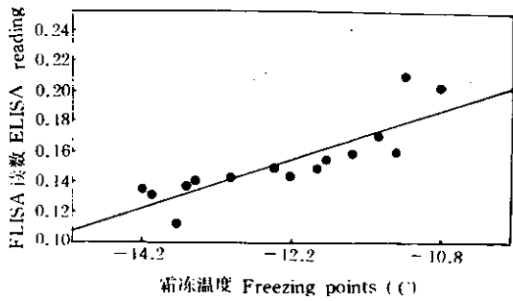


图 3 中 7902 叶片含病毒量与霜冻温度

Fig. 3 ELISA reading and freezing point of the leaves of Zhong 7902

表 3 提纯病毒各浓度稀释液的结冰率

Table 3 The freezing rates in purified BYDV of varying contents

样品浓度 BYDV contents		-5℃	结冰率 (%) Freezing rates -6.5℃
原液	×1	70	100
稀释 10 倍	×10 ⁻¹	0	100
稀释 100 倍	×10 ⁻²	0	90
稀释 1000 倍	×10 ⁻³	0	30
稀释 10000 倍	×10 ⁻⁴	0	0
三蒸水	dl water	0	0
0.01 mol/L KPB		0	0

* 原液：提纯病毒液 50μl+三蒸水 50μl。
50μl purified BYDV+50μl dl water.

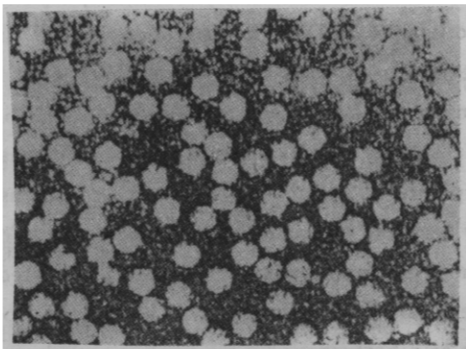


图 4 BYDV 病毒粒子电镜照片 (106664×)

Fig. 4 Particles of BYDV of electron scanning micrograph with 106, 664 times

病毒冰核活性的发现，使我们认识到自然界生物冰核的多样性，它不仅包括细菌、真菌，还有病毒等更多有待发现的其它生物体。病毒的冰核活性对病毒与植物的相互关系、

霜冻与病毒病害的相互作用,以及作物抗逆性研究和抗病品种选育等方面,均具有重要意义,急待我们做更深一步的工作。

致谢 承周广和研究员、成卓敏副研究员及吴茂森同志的指导和帮助,特此致谢

参 考 文 献

- [1] Lindow S E. *Ann Rev Phytopathol*, 1983, **21**:363—384.
- [2] Maki L R, Galyon E L, Chang-Chien M. *Appl Microbiol*, **28**:456—460, 1974.
- [3] 孙福在,朱 红,何礼远,等. 自然科学进展, 1994, **4**(3):134—142.
- [4] Pouleur S, Richard C, Martin J G *et al*. Proceedings of the 5th International Conference on Biological Ice Nucleation. Wisconsin USA, 1991. 6.
- [5] Kieft T L, Ruscetti T *et al*. Proceedings of The 5th International Conference on Biological Ice Nucleation. Wisconsin USA, 1991. 9.
- [6] 周希明,周广和,钱幼亭,等. 植物病理学报, 1993, **23**(2): 175—178.
- [7] 冯玉香,何维勋,夏满强,等. 中国农业气象, 1991, **12**(4):6—9.
- [8] Lindow S E, Arny D C, Upper C P *et al*. *Phytopathology*, 1978, **68**(3): 523—527.
- [9] Green R L, Warren G J *et al*. *Nature*, 1985, **317**:645—648.
- [10] 田 波,裴美云. 植物病毒研究方法(上册). 北京:科学出版社, 1987, 401.

ICE NUCLEATION ACTIVITY OF BYDV AND ITS INFLUENCE TO CROP FROST INJURY

Zhou Ximing Zhu Hong Sun Fuzai

(Institute of Plant Protection CAAS, Beijing 100094)

Abstract Ice nucleation activity of BYDV (Barley Yellow Dwarf Virus) and the relationships between BYDV and frost injury to wheat and some other crop seedlings were tested in artificial frost chamber. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the content of the virus in leaves. The results showed that BYDV was sufficient to incite frost injury of the susceptible plants at about -3 to -4°C , whereas the plants themselves, without BYDV, frost only occurred at much lower temperature. To resistant plants, BYOV was insufficient to raise the frost temperature. The result of tested leaves of “Zhong 7902” showed the more the content of BYDV in leaves, the higher the frost temperature was, that means BYDV was efficient as a heterogeneous ice nuclei, and the resistant ability to frost of the plants could be influenced by it. Vali's droplet-freezing method was used to test ice nucleation activity of BYDV, it was quite clear that BYDV had ice nucleation activity, and it was the first discovery of ice nucleation activity in virus.

Key words Ice nucleation activity, Virus, Barly yellow dwarf virus, Wheat yellow dwarf disease, ELISA