

冰核细菌生物学特性及其诱发植物霜冻机理与防霜应用

孙福在, 赵廷昌

(中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100094)

摘要:就国内外有关冰核细菌生物学特性及其诱发植物霜冻机理与防霜应用的研究进展作以概述。阐述了冰核细菌种类、分布、影响冰核活性的成冰因素, 冰核活性等级划分、冰核细菌保存方法以及冰核细菌诱发植物霜冻机理; 简介了冰核细菌分子生物学研究进展; 药剂和生防菌能够防除植物上冰核细菌减轻或控制霜冻危害, 并已取得成效, 是防御植物霜冻的一条新途径。

关键词:冰核活性细菌; 冰核基因; 冰蛋白; 霜冻机理; 防霜药剂; 防霜生防菌

Biological characteristics and frost-inciting mechanisms of ice nucleation active (INA) bacteria and the research in frost control

SUN Fu-Zai ZHAO Ting-Chang (State Key Lab for the Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094). *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23 (2): 336~345.

Abstract: Since 1987, the biological characteristics of INA bacteria and their relationship with frost have been thoroughly studied in the institutes of Plant Protection and Agricultural Meteorology of CAAS under the consecutive support of the National Natural Sciences Foundation of China. In this paper, the research progress both in China and abroad was reviewed. From 68 species of plants in 17 provinces or cities of China, 250 strains of INA bacteria were isolated and classified into 17 species or pathovars of 3 bacterial genera (*Pseudomonas*, *Erwinia* and *Xanthomonas*) by bacteriological determination. Of the isolated INA bacteria, 133 strains belong to *E. ananas*, 59 as *P. syringae* pvs, so these two genera cover most of the isolated strains, which indicates *E. ananas* and *P. syringae* pvs are the predominant species of INA bacteria in China. The species, growth and decline of INA bacteria significantly change with the latitude, climate, weather conditions and plant species. Intensity of ice nucleation activity of INA bacteria is governed by a variety of factors including bacterial genotype, cell concentration, culture temperature, pH value, medium composition and so on. Based on the formula of ice nucleation frequency presented by Lindow, we first differentiated ice nucleation activity into 4 grades; especially strong (10^2 cells per ice nucleus), medium strong ($10^5 \sim 10^6$ cells per ice nucleus) and weak ($< 10^7$ cells per ice nucleus), where cells per ice nucleus

基金项目:国家自然科学基金资助项目(3860229 和 38970521); 国家“九五”攻关专题资助项目(No. 96-01-08)

收稿日期:2001-05-28; **修订日期:**2001-10-20

作者简介:孙福在(1939~), 男, 辽宁黑山人, 研究员。主要从事植物细菌病害和生物冰核学方面研究。sunfuzai@163.com

Foundation item: This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (No. 3860229 and 38970521) and by a grant from the National Key Technologies R & D Program of China during the 9th Five-Year Plan Period (No. 96-01-08)

Received date: 2001-05-28; **Accepted date:** 2001-10-20

Biography: SUN Fu-Zai, Professor. Focus on bacterial diseases and ice nucleation active bacteria. Email, sunfuzai@163.com



means the bacterial cells required to produce one ice nucleus active at temperatures over -3C . This criterion has been proved to be useful in forecasting INA-bacteria-incited frost injury to plants. Experiments demonstrate that vacuum lyophilization or freezing in sterile distilled water are appropriate storage methods for INA bacteria. Under these conditions, INA bacteria could be stored in -20C for a long term without significant decrease in the viability and activity. The field of biological ice nucleation has developed rapidly in recent years, broadening from INA bacteria to INA fungi. Up to now, 3 species of lichen and 8 species of *Fusarium* fungi have been found to be ice nucleation active, and the differences between fungal ice nuclei and bacterial ones have also been thoroughly studied. Research in the molecular biology of INA bacteria has also seen a rapid progress. Eight genes encoding bacterial ice nucleating proteins (INPs) have been cloned and sequenced. Nucleotide sequence homology between different INA genes ranges from 65.8% to 68.6%, 82.5% to 98.4% in amino acid sequence between different INPs. Data confirm a single INA gene determines the ice nucleation activity of INA bacteria. Kim identified 3 kinds of INPs (155kDa, 75kDa and 50kDa) from INA bacteria of *P. syringae* and *P. fluorescens*, 2 kinds (75kDa and 50kDa) from *E. herbicola*. Wolber purified one INP of 153kDa from *Escherichia coli* heterologously overexpressing the INA gene of *inaZ*. Lindow also isolated heterologously expressed INPs of *inaW* (180kDa) and *iceC* (150kDa). All these purified proteins showed ice nucleation activity to a certain extent, although not so active as intact bacterial ice nuclei. All these studies verified INPs were indispensable but not enough for ice nucleation activity of INA bacteria, high ice nucleation activity requiring the anticipation of lipid, sugar and polyamine.

Experiments studying frost have verified that INA bacteria are the key factors to incite and intensify plant frost. When leaf temperatures reached $-2.5\sim-3\text{C}$, serious frost occurred in seedlings of corn, soybean, tomato and some other plants on which INA bacteria had been sprayed, while checks of sterile seedlings would not show any frost-injury symptoms until the temperatures dropped to $-6\sim-7\text{C}$. The rules of temperature distribution and the formation and growth of ice crystals in plants are determined when frost incited by INA bacteria occurs. It has been found the existence of large quantities of INA bacteria on plants can fasten injury to cell membranes, resulting in great increase in electronic conductivity. A vast of research has indicated that with existence of ample INA bacteria, Richards logic can well describe the relationship between frost, low temperature and INA bacteria, and a frost-forecasting model has been established based on these studies. The relationship between the frost incited by INA bacteria and plant species and air moisture was also reviewed in this paper.

pesticides and bio-control bacteria (genetically-modified bacteria and antagonistic ones), which could reduce or eradicate INA bacteria, have been proved effective in relieving frost injury to plants. In this paper, a brief introduction about the progress in this area was also made.

Key words: ice nucleation active bacteria; gene; protein; frost mechanism; bio-control bacteria

文章编号: 1000-0933(2003)02-0336-10 中图分类号: Q938.1, Q939.1, S425 文献标识码: A

霜冻是一种严重的自然灾害,能够在短短几小时内毁坏大片农作物,给农业生产造成重大损失。长期以来人们普遍认为植物霜冻是由低温和植物的霜敏感性所决定,但难以圆满解释霜冻的多方面原因。自从发现冰核细菌以来,就引起人们的关注,世界上有美、日、中等 20 几个国家,涉及 10 多个学科,对冰核细菌进行了全面系统的研究,已召开 6 次国际生物冰核作用学术研讨会。近 10a 来,国内外大量研究证明^[1~6],在自然界广泛存在着冰核活性细菌(Ice nucleation active bacteria 简称 INA 细菌),它可在 $-2\sim-3\text{C}$ 诱发植物细胞水结冰而发生霜冻;无 INA 细菌存在的植物,一般能耐 $-6\sim-7\text{C}$ 的低温不发生或发生轻微霜冻。因此,这一发现为研究和防御植物霜冻开辟了一条新途径。下面就有关冰核细菌生物学特征、诱发植物

霜冻机理和防霜应用等方面研究进展作以概述。

1 冰核和冰核生物

摄氏零度是水的液相与固相的平衡点,称为冰点。水在摄氏零度以下仍能保持液体状态,这种现象,叫作过冷却作用(Supercooling),小体积纯水可过冷却到 -40C 而不结冰。水从液态向固态转变需要一种称为冰核的物质来催化。由水分子自身形成的冰核称同质冰核,它在 -40C ^[7]时催化水结冰;非水分子形成的冰核称为异质冰核,多数异质冰核催化水结冰温度都在 -10C 以上如碘化银 -8C ,高岭土 -9C ,尘埃颗粒 -10C 。自1974年Maki^[8]首次从赤杨树叶中分离到一类细菌能使植物体内的水在 $-2\sim-5\text{C}$ 结冰而发生霜冻,后被称为冰核细菌,目前已知有3个属19个种冰核细菌(见表1),其中有13个种为植物病原细菌;另外,在1988年Kieft^[21]首次发现一种在 -1.9C 具有冰核活性地衣真菌(见表1),除3种为地衣真菌外,其余8个种均属镰刀菌属(*Fusarium*);这些冰核细菌和冰核真菌产生的冰核称为生物冰核,在 $-2\sim-5\text{C}$ 条件下具有冰核活性,是自然界冰核活性最强的异质冰核。目前INA细菌的研究已应用于植物霜冻防御,人工造雪制冰,食品保鲜及冷冻浓缩,促冻杀虫,高敏检测以及基因表达的报告基因方面^[1,9,10]。

表1 冰核细菌和冰核真菌种类

Table 1 Species of INA bacteria and INA Fungi

学名 Scientific name	中文名 Chinese name	参考文献 References
<i>Pseudomonas syringae</i>		
<i>pv. syringae</i>	丁香假单胞菌丁香致病变种	Maki <i>et al.</i> (1974) Vali <i>et al.</i> (1976)
<i>pv. seami</i>	丁香假单胞菌芝麻致病变种	Lindow S. E. <i>et al.</i> (1978)
<i>pv. lachrymas</i>	丁香假单胞菌黄瓜致病变种	Hriano S. S. <i>et al.</i> (1978)
<i>pv. pisi</i>	丁香假单胞菌豌豆致病变种	Paulin J. P. 和 Luisetti J. (1978)
<i>pv. mori</i>	丁香假单胞菌桑缩叶致病变种	高桥幸吉(1985)
<i>pv. coronafaciens</i>	丁香假单胞菌燕麦晕斑病菌	Hirano <i>et al.</i> (1978)
<i>pvs</i>	丁香假单胞菌群未定变种	孙福在(1988)
<i>P. marginalis</i>	镶边假单胞菌	孙福在(1988)
<i>P. fluorescens</i>	荧光假单胞菌	Maki(1978)
<i>P. viridiflava</i>	菜豆荚斑病菌	Paulin(1978)
<i>P. sp.</i>	非荧光假单胞菌	孙福在(1988)
<i>Erwinia herbicola pvs</i>	草生欧文氏菌未定变种	孙福在(1988)
<i>Erwinia herbicola</i>	草生欧文氏菌	Lindow(1978)
<i>E. stewartii</i>	玉米欧文氏菌	Weaver(1978)
<i>E. ananas</i>	凤梨欧文氏菌	牧野(1981)
<i>E. amylovora pvs</i>	梨火疫病病菌未定变种	孙福在(1988)
<i>Xanthomonas campestris</i>		
<i>pv. cerealis</i>	黑腐黄单胞菌禾谷致病变种	孙福在(1988)
<i>pv. hordei</i>	黑腐黄单胞菌大麦致病变种	Kim(1988)
<i>pv. undulosa</i>	黑腐黄单胞菌小麦致病变种	Kim(1988)
<i>Rhizoplaca chrysoleuca</i>	红脐鳞地衣	Kieft(1989)
<i>Lecanora dispersa</i>	鸡皮地衣	Kieft(1989)
<i>Pertusaria flavican</i>	茶渍型地衣	Kieft(1989)
<i>Fusarium acuminatum</i>	锐顶镰刀菌	Pouleur(1992)
<i>Fusarium avenaceum</i>	燕麦镰刀菌	Pouleur(1992)
<i>Fusarium moniliforme</i>	稻恶苗病菌	Tsumuki(1990)
<i>Fusarium tricinctum</i>	三线镰刀菌	Tsumuki(1990)
<i>Fusarium oxysporum</i>	尖孢镰刀菌	Richard(1992)
<i>Fusarium graminearum</i>	禾谷镰刀菌	孙福在(1998)
<i>Fusarium sportrichioides</i>	拟枝孢镰刀菌	孙福在(1998)
<i>F. moniliforme var. subglutinans</i>	串珠镰刀菌 <i>Subglutinans</i> 变种	Tsumuki(1990)

2 冰核细菌生物学特征

2.1 我国INA细菌种类及其分布^[1,11,12]

中国农业科学院植物保护研究所(简称“农科院植保所”),自 1986~1993 年间,北起黑龙江南至广西,西起新疆东至山东,从 17 个省、市、区的 68 种植物上,分离到 250 株 INA 细菌,对其进行了细菌形态、革兰氏染色、培养性状和生理生化特性鉴定和致病性测定,确定我国有 3 个属(*Pseudomonas*、*Erwinia*、*Xanthomonas*)17 个种或致病变种 INA 细菌。在 250 株 INA 细菌中 *E. ananas* 有 133 株,占 53.2%,*Ps. syringae. pvs.* 有 59 株占 23.6%,两者共占 76.8%,为我国优势 INA 细菌种类,而 *Xanthomonas* 的 INA 细菌出现频率少,仅限在北方寒冷地区的禾本科植物上。但冰核活性以丁香假单胞种群为高。

作者经调查和研究证明,INA 细菌种类和数量分布受地理纬度、气候条件、植物种类和不同季节的影响而有明显差异。如在我国云南、广西的亚热带地区,主要分布是 *E. ananas* INA 细菌,占 80%以上;在东北、西北和华北的温带地区,主要有 *Ps. syringae. pvs.*,占 52%,其次是 *E. ananas*,占 40%;同一种植物上可同时存在几种 INA 细菌,但因植物种类不同 INA 细菌种类间出现频率差异较大,如在水稻、小麦、玉米、香蕉等植物上主要分布着 *E. ananas*;在白菜、番茄和黄瓜上主要分布着 *Ps. syringae. pvs.*,占有绝对优势,而在松树和柏树上尚未分离到 INA 细菌。INA 细菌在植物体上的数量消长变化,受温度高低、雨露多少、湿度大小影响较大,当气温平均在 10~25℃、雨露多、湿度大、又逢春、秋霜冻易发季节时,其 INA 细菌出现频率高、数量大;相反,当平均气温高于 30℃,处于炎热盛夏季节时,INA 细菌分布数量就很少,甚至难以分离到。

2.2 影响 INA 细菌成冰活性因素^[13,14]

INA 细菌的成冰活性受菌株基因型、细菌浓度、温度、pH 值、培养基组分等诸多因素综合作用的结果。

(1)菌液浓度 当菌液浓度在 $5 \times 10^2 \sim 5 \times 10^8$ cell/ml、温度在 $-2 \sim -7$ ℃ 范围内,当温度一定时,菌液浓度越浓冰核活性越强;当菌液浓度一定时,温度越低冰核活性越强。

(2)温度 培养 INA 细菌的最佳温度为 20℃,超过 25℃ 时成冰活性明显下降,温度越高下降幅度越大。若把在 20℃ 培养好的 INA 细菌的菌苔或菌悬液,置放于 0~4℃ 的低温条件下处理数小时或过夜后,将会显著地提高其成冰活性,置放 20d 后其冰核活性仍然稳定;相反,在 37℃ 保存 24h 后就会完全丧失冰核活性。

(3)pH 值 冰核细菌生长的 pH 值范围为 5.0~9.0,最适为 7.0。但 pH2~4 的酸性溶液或 pH10 的碱性溶液都会破坏 INA 细菌的冰核活性。

(4)培养基组分 冰核细菌可利用多种碳源和氮源,但培养基种类和组分不同也影响冰核活性,如蔗糖、甘油及柠檬酸能促进 INA 细菌提高冰核活性,而 LB 培养基对成冰核作用不利,酚衍生物作为碳源则 INA 细菌无冰核活性,而吐温-20 能增强冰核活性。一般分离或培养 INA 细菌常用 KB 培养基,其效果较好。

(5)其它因素 INA 细菌和冰核活性物质是一种冰蛋白,它对重金属离子、硫制剂、脲素、巯基试剂、SDS、蛋白酶、植物外源凝集素等试剂敏感,对紫外线、钴的照射也敏感。有些抗菌素能杀灭 INA 细菌,但不一定破坏冰蛋白的成冰活性。研究发现,室内分离到的同一种 INA 细菌,经过频繁传代、保存、加之营养和温度等诸多因素影响会导致冰核活性下降,往往会低于它在自然植物上的冰核活性。

2.3 INA 细菌冰核活性等级划分及保存^[4,15,16]

作者对采自我国 9 个省、市、自治区的 42 种植物上的 100 株 INA 细菌,采用 Vali 滴冻结法,在菌液浓度和温度固定的条件下,对其冰核活性做了定量定性测定,结果表明,不同种类的 INA 细菌的菌株之间冰核活性存在显著差异。根据 Lindow 等人提出的冰核率公式,首次以 -3 ℃ 下不同的 INA 细菌的菌株冰核率倒数,即产生一个冰核所需细菌数作为分级标准,将 100 株 INA 细菌的冰核活性划分 4 个等级:特强 (10^2 个细菌/冰核),占 7%;强 ($10^3 \sim 10^4$ 个细菌/冰核),占 17%;中 ($10^5 \sim 10^6$ 个细菌/冰核),占 64%;弱 (10^7 以上个细菌/冰核),占 12%。由此看出,我国 INA 细菌的总体冰核活性为中等偏强。应用这一标准分析植物上 INA 细菌的冰核活性强弱程度,对预测霜冻发生程度和指导防霜有一定应用价值。

对来自 3 个属 4 个种的 4 株 INA 细菌,做了 5 种保存方法和 3 种温度处理,测定结果表明,不同保存方法对 INA 细菌的冰核活性和存活力有不同程度的影响;保存温度越高,对冰核活性影响越大。以真空冷

冻干燥和灭菌水冷冻法,于-20℃保存对INA细菌的存活力和冰核活性的影响较小,适用于一般冰核细菌的长期保存。

2.4 冰核细菌与冰核真菌的差异比较^[17-21]

对生物冰核的研究,已由冰核细菌发展到冰核真菌,自从1992年Bouler等人报道冰核真菌以来,目前已知冰核真菌有4属11个种(见表1),除3种为地衣真菌外,其余8个种均属镰菌属(*Fusarium*),我国鉴定出4个种:燕麦镰刀菌、串珠镰刀菌、禾谷镰刀菌和拟枝孢镰刀菌,可能还会发现新的冰核真菌种类。研究证明真菌比细菌冰核抗热,在40~50℃处理10min后仍有较强冰核活性,而细菌冰核超过25℃就逐渐丧失活性,而在37℃处理2min就完全丧失活性;真菌冰核耐酸碱,在pH2~11范围内冰核活性稳定,而细菌冰核在pH4~9范围内稳定;真菌冰核比细菌冰核抗紫外线,对大部分金属离子不敏感;真菌冰核和细菌冰核对蛋白酶类敏感,表明两者冰核活性物质均是蛋白质;真菌冰核活性表达不需要脂类、糖类和SH-基,而细菌冰核需要。冰核真菌的这些重要的生理生化特性,引起人们的关注,认为冰核真菌比冰核细菌冰核活性稳定,更具开发应用前景。

冰核真菌与植物冰害关系研究尚无报道,目前已知有6种冰核真菌都是镰刀菌,对植物有一定致病性或兼性寄生菌,特别是我国三北地区越冬农作物、牧草、果树和林木冻害发生严重,这可能与大量冰核真菌存在有关,从而诱发和加重了冻害发生。这一问题值得深入研究,给予揭示证实,对冻害防御有重要意义。

2.5 冰核细菌分子生物学研究^[1,22-26]

(1)冰核细菌的冰核基因 1983年Orser从*E. herbicola*克隆出了第一个冰核基因*iccE*之后,目前分子生物学家已经从冰核细菌中克隆了7个冰蛋白基因并完成了测序(见表2)。对6个冰蛋白基因的序列分析表明冰蛋白基因间具有同源性的65.8%~68.6%,冰蛋白的氨基酸相似性达82.5%~98.4%,已经明确了冰核活性物质是单个结构基因决定的,该基因缺乏能使INA细菌冰核活性丧失。冰核基因的显著特点是中间部分碱基周期性重复,每个重复区含保守的24个碱基对序列,但并非完全保守;GCCGGTTATGGCAGCACTGACC,即在所有的这些基因中发现了重复的八肽AGYGSTLT相对应的不完整的重复DNA序列。

表2 已测序的冰核基因

Table 2 *ina* genes that have been sequenced

基因 Gene	菌株 Strain	大小 Size(Kb)	分离 Isolation	测序 Sequencing
<i>iceE</i>	<i>Erwinia herbicola</i> M1	4.9	Orser <i>et al.</i> (1983)	Warren and Corotto(1989)
<i>inaA</i>	<i>E. ananas</i> IN-10	4.3	Arai <i>et al.</i> (1989)	Abe <i>et al.</i> (1989)
<i>inaU</i>	<i>E. uredovora</i> KUIN-3	3.4	Michigami <i>et al.</i> (1994)	Michigami <i>et al.</i> (1994)
<i>inaZ</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> S203	4.4	Orser <i>et al.</i> (1985)	Green and Warren (1985)
<i>inaV</i>				D. Pridmore, <i>pers. comm.</i>
<i>inaW</i>	<i>P. fluorescens</i> MS1650	7.5	Corotto <i>et al.</i> (1986)	Warren <i>et al.</i> (1986)
<i>inaX</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>translucens</i> X56S	5.3	Zhao and Orser(1990)	Zhao and Orser(1990)
<i>iceA</i>	<i>E. ananas</i> 110	4.0	Tang <i>et al.</i> (2001)	Tang <i>et al.</i> (2001)

不同冰核细菌的冰蛋白结构十分保守,*inaY*、*inaW*、*iccE*、*inaX*的冰蛋白都包含中央重复区域(占总体序列的81%),N-末端和C-末端区域分别占15%和4%。中央重复结构具有8、16和48个氨基酸周期,这一有规律的重复可能是将水分子排列成冰状网格而发生冰核作用的原因。冰蛋白N-末端结构域较为疏水,可能为膜的结合位点,而C-末端结构相对亲水,对*inaI*进行缺失分析表明:N-端结构域缺失会导致I型冰核(冰核活性为-2~-5℃)失活,但细胞仍可产生活性较低的I、II型冰核(冰核活为-5~-7℃、-7~-9℃),中部重复性结构单位缺失可大大降低冰核活性,但只要保持48氨基酸单位的重复的周期性,缺失对冰核活性影响较小,甚至可以去掉68个8氨基酸重复单位仍不完全丧失冰核活性,证明冰核基因重复区的肽段对冰核的形成作用是独立的;逐步缺失C-端序列会造成各种类型冰核的完全丧失。这些结果说明,虽然中部重复序列结构组成冰晶模板(ice template),但C、N两端结构区域在活性冰核位占的组装和

稳定中仍起着重要作用。中国农业科学院植物保护研究所最近克隆了 *Erwinia. ananas* 110 冰核细菌冰核基因,命名为新基因 iceA,在 GenBank 上的登录号为 AF387802^[27]。

关于冰蛋白是如何结合到细胞膜相应位点上,如何聚合成冰蛋白复合物及如何表现出冰核活性等问题,科学家们正在深入研究和探索中。

(2)冰核细菌的冰蛋白^[28~30] 用一些与蛋白反应的试剂处理冰核细菌能引起冰核活性丧失,据此推测冰核活性物质可能是一种蛋白质。Kim 首次从冰核细菌的外膜中分离、纯化到高冰核活性冰蛋白(-5.5~-7.5℃),其中从 *P. syringae* 和 *P. fluorescens* 中鉴定出 3 种冰蛋白(155kDa、75kDa 和 50kDa),从 *E. herbicola* 鉴定出两种冰蛋白(75kDa 和 50kDa); Wolber P. R 从过量表达冰核基因(*inaZ*)的大肠杆菌中分离纯化到冰蛋白(153kDa);Lindow 也从异源表达的 *E. coli* 中分离纯化到 *inaW* 冰蛋白(180kDa)和 *iceC* 冰蛋白(150kDa)。这些研究证明冰蛋白是冰核细菌冰核活性物质的核心。同时,Turner 发现与脂类物质反应的试剂(氟仿、磷脂酶 A₂ 等),与碳水化合物反应的试剂(硼酸盐、亚硝酸盐等)都能使冰核细菌丧失冰核活性,据此推测冰核细菌冰核活性物质蛋白外,脂类、糖类也可能参与活性冰核物质的形成。Kawahara 通过超滤、蔗糖密度离心和凝胶过滤纯化得到冰核细菌 *Erwinia uedovora*KUIN-3 均一的脱外冰核活性物质,测定其组份为:蛋白 47%、糖类 35%、脂类 10%、多胺 12%。该结果表明,冰蛋白是冰核活性物质主要组成部分,但高冰核活性物质的形成还需要脂类、糖类和一些胺类物质参与。

3 冰核细菌诱发植物霜冻机理

中国农科院植保所和气象所合作,开展了冰核细菌与植物霜冻关系研究,证明冰核细菌能够诱发和加重植物霜冻,其作用机理概述如下:

3.1 INA 细菌是诱发植物霜冻的重要因素^[2~4]

农作物发生霜冰害是细胞间水发生结冰引起的,而结冰的必要条件是温度降到冰点以下和存在冰核。采用人工模拟霜箱和自然诱发霜冰方法,以玉米、大豆、番茄、黄瓜和菜豆等植物做试验。结果表明,喷施 INA 细菌的,叶温达-2.5~-3℃就发生严重霜冻,而对照无菌苗则在-6~-7℃时才发生霜冻,两者相差 3~4℃,这是冰核细菌产生的冰核诱发植物体内过冷却态水在较高的温度下结冰所致,充分证明了 INA 细菌是诱发和加重农作物霜冻的重要因素。

3.2 INA 细菌诱发冻结温度分布规律^[30,31]

同一作物、同一品种、以及同一生育期的不同植株,发生冰结的温度不是同一值,而是一个范围。在这个范围内,不同温度点发生冻结的概率是不同的,其概率随温度的分布与 INA 细菌的密度有关系,INA 细菌密度越大,开始冻结温度越高,发生冻结的温度范围越窄,概率的温度分布曲线越偏离正态分布而呈对数正态分布,众位数的温度要比中位数的温度偏高得越多。

3.3 INA 细菌与冰晶在作物体内的发生规律^[1,31,32]

应用计算机快速测定冰晶在作物体内的生长。结果表明,在植株上 INA 细菌分布密度比较大的部位首先发生结冰,随后冰晶会在体内向处于过冷却状态的各方向延展,其速度(*V*)随温度(*T*)的降低而增大,两者呈指数关系。

3.4 INA 细菌与生物膜伤害的关系^[1,4,33]

有 INA 细菌的植株,在温度降到-2~-3℃时发生冻结,生物膜加速损伤,其电导率急剧增大,在短短的 10min 内就超过半致死值。结冰持续时间越长,伤害越严重,直至完全冻死。而无 INA 细菌的植株则保持过冷却状态,其电导率虽然随温度降低而逐渐增大,但是温度降低到-6℃时也远未达到半致死值,日出升温后植株仍能恢复生长。从而表明有大量 INA 细菌的植株在霜冻中受害较重是因为它们开始发生冻结的温度较高,时间较早,至日出解冻前的冻结持续时间较长,致使细菌膜遭受严重伤害的缘故。

3.5 霜冻、低温和冰核菌间的数量关系^[1,33]

经对大量的试验数据分析后得出:当植物体上无 INA 细菌存在时,用逻辑斯蒂克(Logistic)方程描述霜冻程度与低温的关系,拟合度较高;而有 INA 细菌时拟合度降低;INA 细菌密度越高,拟合度越低。理查兹(Richards)方程能很好地描述在不同 INA 细菌密度下霜冻、低温和 INA 细菌这三者间的数量关系。而在

此研究基础上,建立了霜冻预报模式和霜冻发生后的植株受害率评估模式。

3.6 INA 细菌诱发霜冻与其它因素关系^[33]

(1)与作物的关系 不同类型农作物的形态特征不同,植株小气候不一样。在同一个霜夜,叶片宽、薄又呈水平伸展型的叶温比叶片窄、厚而直竖型的要低 1 C 多,在有 INA 细菌存在的条件下,前者易发生结冰。不同作物对胞间结冰的反应是不一样的。据此可分为不耐霜冻作物:这类作物组织内一旦发生结冰,不论冻结温度高低,解冻速率如何缓慢,都不能恢复生长,如甘薯、黄瓜、西瓜和棉花等;中等耐霜冻作物:这类作物在 -2.4~3.5 C 范围内,组织内发生结冰、生物膜体系对其有一定忍耐能力,经缓慢解冻可恢复生长,如玉米、番茄、烟草等;耐霜冻植物:这类作物对组织内发生结冰有相当强的忍耐能力,只要不低于 -6 C,解冻后可恢复生长,如甘蓝、白菜和芹菜等作物。依此应将防除 INA 细菌,减轻作物霜冻的重点放在不耐和中等耐霜作物上,阻止组织内结冰。

(2)与湿度的关系 试验结果表明,当叶片上 INA 细菌密度大时,在较大的湿度或有露水的条件下,会加重霜冻危害。

4 药剂和生防菌防霜应用^[1,14,34~38]

我国平均每年霜冻面积约 34 万 km²,最重年达 77 万 km²,造成粮食、蔬菜和水果损失约 7 亿美元,防御霜冻是农业生产上急待解决的问题。大量的研究证明,植物遭遇霜冻危害的轻重程度是由低温强度大小、植物抗霜能力强弱和植物体上 INA 细菌数量多少这 3 个因素决定的,冰核细菌是诱发和加重植物霜冻的重要因素,因此研究用化学、物理和生防方法防除 INA 细菌减轻农作物霜冻危害,是防御霜冻研究的重要组成部分,正在加速研究,现已取得成效。

4.1 药剂防霜

研制或筛选防除 INA 细菌的药剂,要求具有杀灭 INA 细菌和破坏冰蛋白成冰活性的功能,方能取得防霜效果。Lindow 等人用链霉素(500×10⁻⁶)和铜水合剂(1.25g/L)防除玉米苗期上的 INA 细菌,当 -4.5~-5 C 发生霜冻时,结果处理比对照苗减轻霜冻危害 1.5~3 倍。日本研制出的辛基苯偶酰二甲基铵(OBDA),能有效地使 INA 细菌的冰核活性失活,已用于茶树防霜。美国用一羧酸脂化丙烯酸聚合物(CRYOTED)喷洒叶面,形成薄膜,阻止 INA 细菌繁殖来防御果树和蔬菜霜冻。作者从 102 种各类药剂中,筛选到既能杀灭 INA 细菌又能破坏冰核活性的药剂 28 种,经人工霜箱防霜效果测定,从中获得抗霜剂 1 号和抗霜素 1 号两种防霜药剂,用于防御玉米苗期霜冻,当霜冻温度为 -3.5~-3.7 C 时,抗霜剂 1 号和抗霜素 1 号防霜效果分别是 80%和 61%,当霜冻温度为 -5 C 时,两种药剂的防效均达 49%。这两种药剂用于防御蔬菜和果树霜冻也有显著效果。用药剂防霜是一条重要途径,关键需要研制出一种具有内吸性、既能杀灭冰核细菌又能破坏冰蛋白活性、残效期长、无毒无害的新农药,就会大大提高药剂防霜的效果和快速推广应用。

4.2 生防方法防霜

从自然界植物体上的多种微生物中,筛选对 INA 细菌有拮抗作用、营养竞争能力强、抑杀或寄生性强的微生物菌株,对其进行了人工生产繁殖,再喷洒在植物体上,以期控制或杀灭 INA 细菌,达到防御霜冻的目的。

4.2.1 拮抗菌防霜 Lindow 等人从玉米上分离到一种 M232A 拮抗菌(*Erwinia herbicola*),用 8×10⁹CFU/ml 的菌悬液,喷雾接种事先用 INA 细菌处理的三叶期玉米苗,再用人工霜箱在 -4.5~-5 C 低温条件下测定,结果处理霜冻指数比对照降低 30.75。又用 M232A 处理 1.5m 株高的田间玉米,当发生气温为 -1.5~-2.5 C 的霜冻时,结果处理霜冻指数为 0.83,而对照高达 2.09,防效十分显著。Lindow 等人还筛选到 A510 和 A506 拮抗菌,用于防御梨花霜冻,当气温为 -3 C 发生辐射霜冻时,霜冻率分别降低 83%和 64%。中国农科院植保所,筛选到 83 株对 INA 细菌有拮抗作用的菌株,经过人工霜箱测定防霜效果,从中获得 6 个菌株,用于防御番茄、烟草和黄瓜霜冻有一定效果,可使霜冻温度降低 1.5~2.0 C;从中筛选出了 RNA506 和生防 31 两种生防菌株,都具有抑菌、促生、定殖能力和抗逆性强等特性,经过室内和田间试验,用于防御玉米苗期霜冻,当在 -3~-6 C 发生霜冻时,防效达 36%~50%;防御玉米成株期霜

冻,当在 -5C 发生霜冻时,防效达 $13\%\sim 31\%$ 。特别是RNA506和生防31菌株,对其作了抗药选择压力处理后,能与抗霜素1号混用,可使药剂和生防菌两者优势互补,从而提高了防霜效果,更具应用前景。同时,B. H. Cho等人报道用*Candida sp*的酵母菌用于防御霜冻,能破坏植物体上INA细菌的冰核活性。

4.2.2 基因工程菌防霜 所谓基因工程菌防霜,就是选择有拮抗作用,营养竞争、定殖能力和抗逆性强,又对植物无致病性的INA细菌,采用生物技术手段,将INA细菌的冰核活性基因切除或缺失,从而获得无冰核活性的变异基因工程菌,该菌除无冰核活性特性外,仍保持原INA细菌的优异生物学特性,用于防除INA细菌来防御植物霜冻。这种方法,比从自然界筛选拮抗生防菌成功率高,效果好。

1985年,美国AGS公司,采用遗传工程方法,用标记交换(marker exchange)技术,对采自草莓上INA细菌(P. S和P. F)做了DNA重组改造,获得了冰核活性丧失变异基因工程菌,当温度为 -3C 时,可将草莓霜冻率降低 60% 。1987年Lindow等人,将INA细菌(P. S)的冰核基因序列切掉 $30\%\sim 50\%$,再把其余基因连接起来,创造出了体外重组基因工程菌(INA, p. s.)。1984年做田间试验结果表明,处理苗上INA细菌数量比对照降低了8倍,经过3次 $-2.5\sim -5\text{C}$ 的自然辐射霜冻后,处理苗比对照霜冻率降低 80% ;1988年试验,处理苗比对照苗上INA细菌数量降低10倍,霜冻减轻 $2\sim 4$ 倍。中国农科院植保所,采用转座子诱变技术,对INA细菌IS11(*P. fluorescens*)菌株进行了诱变,获得8株冰核活性丧失突变株,从中筛选出PFT-8菌株,具有良好的抑菌、促生和定殖能力,经过室内和田间试验结果表明,当在 $-3\sim -6\text{C}$ 发生辐射霜冻时,对玉米苗防霜效果达 $38\%\sim 41\%$ 。这些研究结果说明,采用生物技术获得高效防霜基因工程菌用于防御霜冻,是一条重要途径,值得深入研究和探索。

4.2.3 噬菌体防霜 噬菌体是寄生细菌体内的一种病毒,它利用细菌体内营养物质进行自身繁殖,最后导致细菌解体而死亡。国外已经注意到利用噬菌体来防除植物体表面上的INA细菌的研究,Kozlott等人从*E. herbicola*(INA细菌)上分离到特异性噬菌体,把它喷洒在植物体上,再做低温处理24h,尔后调查霜冻危害,结果处理霜冻率比对照减轻 $20\%\sim 25\%$;通过田间试验,霜害减轻了 $40\%\sim 50\%$ 。故认为利用专化特异性噬菌体杀灭INA细菌来减轻或控制植物霜冻,也是一条值得研究和探索的防霜途径。

References

- [1] Sun F Z. Progress on the Studies of Biological Ice Nucleation in China. *Scientia Agricultura Sinica*, 1996, **29**(5): 62~68.
- [2] Feng Y X. Studies on Relationship Between Frost Injury to Cucumber Plants and Ice Nucleation-Active Bacteria. *Horticulturae Sinica*, 1990, **17**(3): 211~216.
- [3] Liu J H, Tao Y F, He W X, et al. Studies on the role of ice nucleation active bacteria in frost injury to maize and soybean. *The Chinese Journal of Agricultural Meteorology*, 1990, **11**(1): 1~6.
- [4] Sun F Z, Zhao T C, Yang J M, et al. Species of Ice Nucleation Active Bacteria on the Apricot and the Relationship Between Their Activity and Flower Frost. *Scientia Agricultura Sinica*, 2000, **33**(6): 50~58.
- [5] Lindow SE. *Erwinia herbicola*; a bacteria ice nucleus active in increasing frost injury to corn. *Phytopathology*, 1978, **68**: 523~527.
- [6] Lindow SE, et al. Relationship between ice nucleation frequency of bacteria and frost injury. *Plant Physiology*, 1982, **70**: 1090~1093.
- [7] Bigg E K The supercooling of water. *Proc. Soc.*, 1953, **66**: 686~694.
- [8] Maki L R, et al. Ice nucleating induced by *Pseudomonas syringae*. *Appl. Microbiol.*, 1974, **28**: 456~460.
- [9] Zhao T C, Tang C R, Sun F Z. Progress on the Studies of Ice Nucleation Protein and Its Coding Gene of INA Bacteria. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2000, **8**(Supplement)(3): 59~63.
- [10] Zhu H, Sun F Z, Zhang Y X, et al. The Effects of INA Bacteria on the Freezing Temperature of Cotton Bollworm. *Scientia Agricultura Sinica*, 1994, **27**(6): 23~28.
- [11] Sun F Z, Zhu H, He L Y, et al. Identification of Ice Nucleation Active Bacteria on Plants of China. *Progress in Natural Science*, 1994, (4): 449~456.

- [12] Sun F Z, Wei J F. Investigation on the Dominant Species of Ice Nucleation Active Bacteria in China. *Acta Ecologica Sinica*, 1996, **16**(6):618~623.
- [13] Sun F Z, Zhu H, He L Y. Factors Affecting Ice Nucleation Activity of INA Bacteria. *Scientia Agricultura Sinica*, 1991, **24**(3):57~64.
- [14] Kokichi Takahashi. Actuality on Researches on Ice Nucleation-active Bacteria and Applications. *Freeze*, 1987, **62**(718):73~80.
- [15] Vali G. Quantitative evaluation of experimental results on the heterogeneous freezing nucleation of supercooled liquids. *J. Atmos. Sci.*, 1971, **28**:402~409.
- [16] Sun F Z, Zhu H, Zhang Y X. The effect of Preservation on Ice Nucleation Activity of INA Bacteria. *Microbiology*, 1993, **20**(3): 137~139.
- [17] Sun F Z, Zhu T C, Zhang M, *et al.* Identification and Ice Nucleation Activity of Ice Nucleation Active Fungi. *Mycosytema*, 1999, **18**(2):149~153.
- [18] Zhang M, Sun F Z, Zhu T C. Studies on Biological Characters of Ice-formation by Ice Nucleation Active Fungi. *Scientia Agricultura Sinica*, 1998, **31**(6):50~55.
- [19] Tsumuki H, Konno H, 1994. Ice nuclei produced by *Fusarium* sp. Isolated from the gut of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker(Lepidoptera: Pyralidae). *Biosci Biotech Biochem.*, **58**:578~579.
- [20] Pouleur S, Richard C, Martin J-G, Antoun H, 1992. Ice nucleation activity in *Fusarium acuninatum* and *Fusarium avenaceum*. *Appl. Environm. Microbiol.*, **58**:2960~2964.
- [21] Tang C R, Sun F Z, Zhu T C. Progress on the Studies of INA Fungi. *Microbiology*, 2000, **27**(5):374~377.
- [22] Orser C, *et al.* Cloning of genes involved in bacterial ice nucleation and fluorescent pigment/siderophore production. Pages 353~361 in *Molecular Gemetics of the Bacteria~Plant Interaction*. 1983. A. Puhler, ed. Springer-Verlag, Berlin.
- [23] Orser C, *et al.* Clonig and expression of bacterial ice nucleation genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1985, **164**:359~366.
- [24] Michigami Y, *et al.* Cloning and sequencing of an ice nucleation active gene of *Erwinia uredovora*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1994, **58**:762~764.
- [25] Warren G, Identification and Analysis of ina genes and proteins. In: *Biological ice nucleation and its applications*. Richard, E. L Jr., Warren, G. J., Gusta L. V. eds. APS Press, Minnesota, 1995. 85~99.
- [26] Watanabe S, Abe K, Hirata A, *et al.* Large-scale production and purification of an *Erwinia ananas* ice nucleation protein and evaluation of its ice nucleation activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1993, **57**:603~606.
- [27] Tang C R. Cloning of a new ice nucleation active gene and construction of ice nucleation active *Enterobacter cloacae* for insect pest control. *Acta phytopathologica sinica*, 2002, **32**(4):373~374.
- [28] Kim K C, Lee U, Song D U, *et al.* Purification and characterization of ice nucleating proteins from ice nucleation-active bacteria. *Korean J. Plant Pathol.*, 1996, **12**(1): 99~108.
- [29] Kawahara H, Mano Y, Obata H. Purification and characterization of extracellular ice-nucleating matter from *Erwinia uredovora* KUIN-3. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1993, **57**:1429~1432.
- [30] Wolber P K, Deininger C A, Southworth M W, *et al.* Identification and purification of a bacterial ice-nucleation protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 1986, **83**:7256~7260.
- [31] He W X, Feng Y X. An Experimental Study on the Ice Growth in the Body of Crops During frost-Period. *Agricultural Meteorology*, 1991, **12**(4):6~9.
- [32] He W X, Feng Y X. The Influence of Thawing Velocity to Frost Injury of Plants. *Journal of Applied Meteorology*, 1995 **6**(1): 90~94.
- [33] Feng Y X, He W X. *The Researches of Frost*, Meteorology Press, 1996. 93~157.
- [34] Sun F Z, Zhao T C, Zhang W W, *et al.* Control Effects of Several Bio-control Bacteria on Bacterial Disease and Plant Frost. *Journal of Microecology*, 1998, **10**(Supplement):17~22.
- [35] Lindow SE. Competitive exclusion of epiphytic bacteria by ice *Pseudomonas syringae* mutants. *Applied and*

Environmental Microbiology, 1987, **53**(10):2520~2527.

- [36] Wolber P K Bacterial ice nucleation. *Physiology*, 1993, **34**:203~237.
- [37] Sun F Z, He L Y. An Overview of Studies on Ice Nucleation Active Bacteria and frost injury of Plants. *Plant Protection*, 1989, **15**(4):41~43.
- [38] Sun F Z, Zhu H, He L Y. *et al.* Studies of the Use of Pesticide to Control Frost Injury of Maize. *Heilongjiang Scientia Agricultura Sinica*, 1991, (3):24~29.

参考文献

- [1] 孙福在. 我国生物冰核研究进展. *中国农业科学*, 1996, **29**(5):62~68.
- [2] 冯玉香. 黄瓜霜冻与冰核活性细菌的关系. *园艺学报*, 1990, **17**(3):211~216.
- [3] 刘建华 陶毓汾 何维勋, 等. 冰核活性细菌与玉米和大豆霜冻关系的研究. *中国农业气象*, 1990, **11**(1):1~5.
- [4] 孙福在, 赵廷昌, 杨建民, 等. 杏树上冰核细菌种类及其冰核活性与杏花霜冻关系研究. *中国农业科学*, 2000, **33**(6):50~58.
- [9] 赵廷昌, 唐朝荣, 孙福在. 细菌冰核蛋白及其编码基因的研究进展. *农业生物技术学报*, 2000, **8**(3):59~63.
- [10] 朱红, 孙福在, 张永祥. 冰核细菌对棉铃虫结冰温度影响的研究. *中国农业科学*, 1994, **27**(6):23~28.
- [11] 孙福在, 朱红, 何礼远, 张永祥. 我国植物上冰核细菌种类鉴定. *自然科学进展*, 1994, **4**(4):449~456.
- [12] 孙福在, 韦建福. 我国冰核活性细菌的优势种类调查与研究. *生态学报*, 1996, **16**(6):618~623.
- [13] 孙福在, 朱红, 何礼远. 影响冰核菌成冰核活性的因素研究. *中国农业科学*, 1991, **24**(3):57~64.
- [14] 高桥幸吉. 冰核活性细菌の研究现状と实用化. *冷凍(日)*, 1987, **62**:883~890.
- [16] 朱红, 孙福在, 张永祥. 菌种保存方法对冰核细菌冰核活性的影响. *微生物学通报*, 1993, **20**(3):137~139.
- [17] 孙福在, 赵廷昌等. 冰核真菌的冰核活性及其种类鉴定. *菌物系统*. 1999, **18**(2):149~153.
- [18] 张敏, 孙福在, 赵廷昌. 冰核真菌成冰生物学特性研究. *中国农业科学*. 1998, **31**(6):50~55.
- [21] 唐朝荣, 孙福在, 赵廷昌. 冰核真菌研究进展. *微生物学通报*, 2000, **27**(5):374~377.
- [27] 唐朝荣. 冰核细菌 *Erwinia ananas* 110 冰核基因克隆、序列分析和促冻杀虫基因工程菌构建. *植物病理学报*, 2002, **32**(4):373~374.
- [31] 冯玉香, 何维勋, 等. 霜冻时冰晶在作物体内生长的试验研究. *中国农业气象*, 1991, **12**(4):6~9.
- [32] 何维勋, 冯玉香, 等. 解冻速率对植物霜冻害的影响. *应用气象学报*, 1995, **6**(1):90~94.
- [33] 冯玉香, 何维勋著. 霜冻的研究, 北京:气象出版社, 1996. 93~157.
- [34] 孙福在, 赵廷昌, 等. 几种生防菌防治植物细菌性病害和霜冻的效果测定. *中国微生态学杂志*, 1998, **10**(增刊):17~21.
- [37] 孙福在, 何礼远. 冰核细菌与植物霜冻研究概况. *植物保护*, 1989, **15**(4):41~43.
- [38] 孙福在, 朱红, 何礼远等. 药剂防治玉米霜冻的初步研究. *黑龙江农业科学*, 1991, (3):24~29.