

冰核活性细菌的分子生物学及防霜技术的研究进展*

崔汝强, 姬广海, 张世琬**

(云南农业大学, 云南省植物病理重点实验室, 云南 昆明 650201)

摘要: 从冰核活性细菌的分子生物学基础上, 研究冰核细菌的基因遗传背景。并提出了冰核细菌的研究方法, 防霜新技术的开发应用及冰核细菌在不同领域的应用等方面阐述冰核活性细菌的研究进展。

关键词: 冰核活性细菌; 分子生物学; 作物霜冻; 防霜

中图分类号: S 425; S 432.42 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X(2003)04-0426-04

Progress on Molecular Biology of Ice Nucleation Active Bacteria and Technology for Plant Research Frost Control

Cui Ru-qiang, Ji Guang-hai, Zhang Shi-guang

(Key Lab of Plant Pathology of Yunnan Province, Y A U, Kunming 650201, China)

Abstract: In this paper would make a brief summary on the relationship between Ice nucleation active bacteria and crop frost. Practical methods proposed for study of INA bacteria molecular biology. A new method for chemical and biological control of frost injury has been studied.

Key words: Ice nucleation active bacteria; crop frost; anti-frost

冰核细菌 (Ice nucleation active bacteria, 简称 INA 细菌) 是广泛腐生于植物表面, 在 -5°C 条件下具有冰核作用的细菌^[1]。霜冻是一种严重的静态自然灾害, 它能在几小时内毁掉大片农作物, 使农业生产造成重大损失, 冰核细菌的这种降低水过冷却作用, 促进过冷却水结冰的独特特性 (即冰核活性) 不仅开辟了防霜的新思路现已成为一种重要的生物资源应用于人工降雪、制冰、食品冷冻浓缩、促冻杀虫等领域^[2]。冰核基因及分子生物学的研究已成为国内外的研究热点, 涉及多个领域: 构建冰核细菌的表面展示系统、用作报告基因、促冻杀虫和病原微生物高敏检测等, 显示了良好的应用前景^[3~5]。

1 冰核细菌的分子生物学

1.1 冰核基因

随着分子生物学的迅猛发展, 80 年代中期, 分子生物学技术已运用到研究冰核细菌。据报道, 细

菌的成冰核活性是由单个结构基因决定的。该基因的缺失导致成冰核活性的完全丧失。各种细菌的成冰基因已被克隆并在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中大量表达, 克隆的基因赋予宿主和原菌株相同的成冰核活性。亚克隆、缺失及插入突变的研究结果表明, 在大肠杆菌中表达冰核活性的基因区域是 4.0~5.0 kb。

目前已对丁香假单胞菌的成冰基因 *inaZ*, *iceC*, 荧光假单胞菌的成冰核基因 *inaW*, 成团泛菌的冰核基因 *iceE*, 菠萝泛菌的冰核基因 *inaA* 和油菜黄单胞菌的冰核基因 *inaX* 等 6 个编码冰蛋白的基因作了测序分析, 发现 *inaZ* 基本上与 *inaW* 相似, SOUTHERN 杂交证明 *inaZ* 基因与 *inaE* 具有同源性, *inaX* 的分子序列与 *inaZ*, *inaW*, *inaE* 基因分别具有 65.8%, 67.8%, 68.8% 的同源性^[6,7]。GREEN 等对 *inaZ* 的测序分析表明, 其含有单个长链通读框^[8]。该通读框架中存在明显的 24 碱基重复序

* 收稿日期: 2002-11-28

** 通讯作者

基金项目: 云南省应用基础研究基金资助课题(95G-009)

作者简介: 崔汝强 (1978-), 男, 汉族, 山东威海市人, 在读研究生, 主要从事冰核细菌的研究。

列,重复序列为 GCCGGTTATGGCAGCAGCTGACC. 但并非完全保守,其翻译产物含 1200 个氨基酸,分子量大约为 120 kD,蛋白质中含有 122 个 Ala - Gly - Tyr - Gly - Ser - Thr - Leu - Thr 八肽重复,这种重复具有偶然性结构的区域并非功能所必需的,可去掉 68 个八连体而不丧失活性。

1996 年姬广海采用 G + C 丰富的简并引物,对 3 种冰核细菌 *Pseudomonas syringae*, *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananas* 的基因组 DNA 进行了 PCR 扩增^[9],其结果表明,云南省的 *P. syringae* 中等偏强型菌株与 *E. heribocola* 同源性较高,且明显高于 *P. ananas*. 1997 年,胡爱民等用 Operon 公司的 8 个随机引物对菠萝欧文氏菌、流黑欧文氏菌、丁香假单胞菌和菜豆荚斑假单胞 4 种 INA 细菌的 9 个菌株进行 PCR 扩增,构建了 INA 细菌系统树,对其遗传关系进行了初步探讨,并用其多态性 DNA 图谱进行 INA 细菌的分类鉴定。

1.2 成冰核蛋白

细菌的成冰核蛋白结构十分保守。其氨基末端和羧基末端各具有一独特的序列区(分别占总序列的 15% 及 4%)、蛋白的其余部分有一中央串联重复结构组成,该重复结构具有 8, 16 及 48 氨基酸周期。此有规律的重复可能是将水分子排列成冰状网格而发生成冰核作用的原因^[10,11]。成冰核蛋白 N - 末端结构域较为疏水,可能为膜结合位点,而 C - 末端结构域相对亲水。缺失诱变试验表明, N - 末端特有的结构域的缺失导致了丁香假单胞菌成冰核活性降低,其临界温度降至 - 5 °C 以上; C - 末端特有结构域的缺失导致成冰活性的完全丧失;中央重复结构域连续缺失也导致成冰核能力相应降低。成冰核蛋白的二级结构被认为是 β - 折叠片,重复单位为亲水的,特别富含 Ser 和 Thr,进而提出了成冰核蛋白的结构模型^[12]。

1.3 与成冰核作用有关的其它组份

Kozloffetal 等的研究表明,一种脂(磷脂酰肌醇)可能是成冰核位点的组分之一。GOVINDARAJAN(1988)用 phospholipase Az, Sodium cholate 和 SDS 处理冰核细菌 *P. syringae*, 去除磷脂的数量与外膜的冰核活性的丧失成显著的线性相关^[13]。若加上最初除去的磷脂,失去的冰核活性又得到恢复,说明冰核细菌表达冰核活性需要磷脂的参与。另外,成冰核蛋白本身的修饰作用也不能排除。

1.4 成冰核活性的细胞学定位

Sprang 和 Lindow 证明,冰核存在于细胞膜,并发现 80% 的冰核与外套膜部分联系^[1]。Phelps 等表明,生长中的成冰核成团泛菌培养细胞将冰核排放到基质中。有证据指出,冰核排放与膜泡(membrane vesicles)的排放相关联。

Govindarajan 等利用 γ - 射线辐射失活分析法测定了丁香假单胞菌及成团泛菌等植株的成冰核位点原位大小(in situ size)。他们发现,在低于 - 10 °C 时,具有功能冰核活性的位点最小为 150 kD,随着温度的升高,所需要的冰核的大小成对数性增加,在 - 3 °C 时,活性核约为 8700 kD. 因此,成冰核位点可能是一个可发生自我联系的寡聚结构。最大的冰核位点的功能单位可达到 19000 kD,冰核位点的有效大小也随结冰温度上升而呈指数上升,由 - 9 °C 的 620 kD 到 - 2 °C 的 19000 kD^[14]。

2 防霜技术的研究开发、利用

我国平均每年霜冻面积约为 34 万 km²,最重年份达 77 万 km²,造成农作物严重的损失。植物霜冻害的程度由植物上冰核细菌数量的多少、低温强度及植物的抗寒性决定^[15~21]。基于这一原理,利用药物及微生物防治等方法,防除植物上的冰核细菌,可以达到控制和减轻植物霜冻害的目的。防御霜冻是农业生产上的亟待解决的问题。防除 INA 细菌可减轻农作物霜冻害,是防霜研究新方向,现已初步取得成效。

2.1 药剂防治

利用冰核活性细菌对药物的敏感性,选用适当的生物制剂及结冰抑制剂控制植物上的冰核细菌能达到减轻霜冻危害的目的。目前使用的生物制剂已在玉米、蚕豆、果树、蔬菜上取得了可喜的成绩^[15,18,22,23]。在美国以羧酸酯化丙烯聚合物(商品名:CRYOTEO, Agru - k 社产品)防除果树、蔬菜霜冻已实用化了。云南农业大学、云南省植物病理重点实验室冰核细菌研究课题组于 1990 ~ 1997 年间进行了防除 INA 细菌室内药效测验和田间防霜试验,自行研制开发了一系列防霜药剂^[24]。室内对 *P. syringae*, *E. heribocola*, *P. ananas* 均有明显的抑菌效果。经多年田间小区试验,农大抗霜剂 5 号在蚕豆上使用效果较好,并且蚕豆各项经济指标均有上升,可使蚕豆增产高达 20% ~ 30%。现药剂防霜技术已在云南大面积推广应用。农大防霜剂 1 号用于蔬菜防霜,喷施西葫芦可使其提前 1 个月

上市,平均每棚(133 m²)增产 200 元,玫瑰防霜试验减轻冻害率 9.38%,可挽回 1 876 枝花,每 hm² 增产 2 805 元。

中国农科院植保所从 102 种各类药物中,筛选到既能灭杀 INA 细菌又具有不同程度破坏冰核活性的药剂 228 种。经人工模拟霜箱防霜效果测定,从中又筛选到防霜剂 1 号、防霜素 1 号和抗霜保这 3 种药剂。经多点小区试验,当叶片为 -5 ~ -3℃ 时,用抗霜剂 1 号防止玉米苗期霜冻的效果 49% ~ 80%;用抗霜保防止蚕豆花期霜冻,有明显的保花保荚作用,提高产量 20% 左右。

2.2 微生物防霜技术

由于化学药剂容易污染环境,化学药剂持效期短、容易产生药害等不利因素。利用冰核细菌的拮抗菌或无活性冰核细菌突变体,进行霜冻的生物防治以成为防止霜冻的新方法。生物防治的优点是成本低、持效期长,无药害,不污染环境等。国内外已有许多报道。

美国高级遗传科学公司 1984 年将草莓植株上分离获得的冰核活性细菌菌株 (*P. syringae* 和 *P. fluorescens*) 中编码产生冰核蛋白的基因缺失后将重组 DNA 通过同源交换导入原菌株,构建成为无冰核活性的工程菌,进行田间防治草莓霜冻害试验,取得了较好的防霜效果,现工程菌已申请注册,进入产业化阶段。德国 Phytobacter 公司已开展利用无冰核活性的工程菌株(园艺菌)进行农作物的霜冻害控制研究。

1994 年中国中科院植保所采用转座子诱变技术获得 INA (*P. fluorescens*) 突变菌株 4 株^[25],对 INA 细菌有抑制作用,用于防治黄瓜角斑病 (*P. Syringae* pv. *lachrymans*, INA 细菌) 取得 38.2% ~ 60.4% 的防效,起到防霜防病的综合效果。并筛选到 83 株对 INA 细菌有拮抗作用的菌株,经人工模拟霜箱防霜效果测定,从中获得 6 个菌株,用于防止番茄、烟草和黄瓜霜冻有一定效果,可使发生霜冻温度降低 1.5 ~ 2.0℃。现正进行田间防霜示范试验。

赵廷昌等采用转座子诱变技术对 INA IS-11 (*P. fluorescens*) 菌株进行诱变,获得 5 株冰核活性丧失的 IS-11 突变体。经过 Southern Blot 杂交试验证明 4 株 INA⁻ 缺失突变体的染色体 DNA 中均有 Tn5 的插入位点,经传代和保存后冰核活性仍不恢复,十分稳定。抑菌实验结果表明 4 株 INA⁻ 突变株对于 *P. syringae* pv. *lachrymans* 及 *E. herbicola*

等冰核细菌均有明显的抑菌效果,而且对野生型菌株 IS-11 也有明显的抑菌作用;对黄瓜角斑病防效达到 32.8% ~ 60.4%。而黄瓜角斑病病菌 *P. syringae* pv. *lachrymans* 就是冰核细菌,因此也为突变菌株能放出 INA 细菌而减轻霜冻害发生提供了证据,具有防霜防病功能,特别是 IS-11 的突变株 PFT-8 菌株用于防治玉米苗期霜冻和辣椒疮痂病取得了显著效果,有应用前景。

1996 年, Lindow 基于结冰温度阈值来估测冰核细菌 *E. amylovora* 的菌量,从梨花上筛选到 257 个拮抗菌株^[26],其中 45 个菌株(4 株酵母菌,41 株细菌)接种后具有 70% 或高于 70% 的防效,其降低 *E. amylovora* 菌量,而且还发现了防治梨火疫病强于已使用的生防菌 *P. fluorescens* A506 菌株。这为防治其它植物冻害和病害,拮抗菌的筛选提供了一种快速、简便的方法。

在防除霜冻害的研究中,除了拮抗菌的研究之外,国外已开始注意噬菌体的利用^[27]。KOZLOFF 等曾经分离获得了 *E. fluorescens* 的特异性噬菌体。将这种噬菌体培养物喷到植物上后,低温处理 24 h 以上,与不喷洒的对照比,冻害减少了 20% ~ 25%,通过大田试验,霜害减轻了 40% ~ 45%。

2.2.1 冰核细菌促冻杀虫

用冰核细菌喷接和喂食棉铃虫和光肩星天牛 3~4 龄期幼虫,再用计算机控制的人工模拟霜箱测定虫体上结冰温度,结果虫体平均结冰温度提高了约 7℃,证明冰核细菌能在这两种虫体上起到异源冰核作用,提高幼虫过冷却点而结冰,延长结冰时间,破坏细胞组织,造成虫体死亡,为提高害虫越冬死亡率减轻翌年危害提供了科学依据,为生防指出了一条新途径^[22]。

2.2.2 人工制雪

人工制雪或制冰越来越普遍。但制雪过程非常耗能,细菌的成冰核作用已用于人工制雪过程而降低所需的超低温冷却温度,从而节约能源供。对此已有专利申请。专利产品的商业名称为 Snomax 雪诱导剂,是冰冻干燥的丁香假单胞菌。使用前每 300 g Snomax 溶于 400 L 水,然后将其注入制雪水源^[12]。

2.2.3 食品工业

INA 细菌在食品工业中成功地用于食品及水质的沙门氏菌检测,成功率高,操作快速。WATANABE 等研究了成功冰核菠萝泛菌在高效食品冰冻干燥中的作用。这些成冰核菌可以提高超

冷温度,从而可使冰箱耗能降低、冰冻时间缩短。此外,INA细菌还可改善食品的冰冻质地^[12]。

2.2.4 其他

冰核细菌在免疫检测中的应用已有专利申请。INA细菌对提高空调及冰箱系统效率存在影响,这类系统在较高温度的成冰核作用可增加系统的效率而降低耗能。此外,广泛用于处理有害废物、浆缩果汁、冰冻食品及纯化有机化学物质的各类冰冻浓缩物^[12]。

[参 考 文 献]

- [1] SCHNELL R C, VALI G. World-wide source of leaf-der freezing nuclei[J]. *Nature*, 1973, 246: 212 - 213.
- [2] 孙福在,何礼远. 冰核细菌与植物霜冻研究概况[J]. *植物保护*, 1989, 15(4): 41 - 43.
- [3] 张世珩. PCR在快速检测冰核细菌及其冰核活性强度中的应用[A]. 海峡两岸植物病理学术研讨会会刊[C]. 中华植物病理学会, 1997, 4.
- [4] PHELP S, GIDDINGS T H. Release of cell-free ice nuclei by *Eriwina herbicola*[J]. *Bacterial*, 1986, 167: 496 - 502.
- [5] MASANORI, KOIKE. Random Amplified Polymorpnmz DNA Analysis of Japanese Isolates of *Verticillium dahliae* and *V. albo-atrum*[J]. *Plant Disease*, 1996, 80: 1 224 - 1 227.
- [6] ORSER C, STASKAWICZ B J, Panopoulous N J, et al. . Cloning and expression of bacterial ice nucleation genes in *Escherichia coli*[J]. *Bacterol*, 1985, 164(1): 359 - 366.
- [7] CROTTO L V, WOLBER P K, WARREN G J. Ice nucleation activity of *Pseudomonas fluorescens*: nutagenesism, Complemetation analysis and identification of agene product [J]. *EmBO*, 1986, 5: 231 - 236.
- [8] 孙福在,朱红. 影响冰核细菌成冰核活性的因素研究[J]. *中国农业科学*, 1991, 24(3): 57 - 64.
- [9] 姬广海,张世珩. 冰核活性细菌冰核基因多态性研究[J]. *云南农业大学学报*, 1997, 12(3): 153 - 157.
- [10] WARREN G J, COROTTO L, WOLBER P K. Conserved repeats in diverged ice nucleation structural genes from two species of *Pseudomonas* Nucl[J]. *Acids Res*, 1986, 20: 8 047 - 8 060.
- [11] WOLBER P, WARREN G J. Bacterial ice nucleation proteins[J]. *TIBS*, 1989, 14: 179.
- [12] 任修海. 成冰核细菌的生物学及生物技术开发[J]. *生物技术通报*, 1993, (6): 12 - 15.
- [13] GOVINDARAJAN A G, LINDOW S E. Phospholipid requirements for expression of ice nuclei in bacteria membranes and in vitro[J]. *Plant Physiology*, 1984, 75: 43 - 46.
- [14] TURNER, ARELLANO F, KOZLOFF M. Components of ice nucleation structures of bacteria [J]. *J. Bacterial*, 1991, 173: 6 515 - 6 527.
- [15] 冯玉香. 黄瓜霜冻与冰核细菌活性细菌的关系[J]. *园艺学报*, 1990, 17(3): 211 - 216.
- [16] 何维勋,冯玉香,孙福在,等. 防御霜灾新途径的研究[J]. *灾害学*, 1990, (1): 14 - 19.
- [17] 冯玉香,何维勋,夏满强. 作物霜冻与低温强度及冰核细菌密度的关系[J]. *应用气象学报*, 1995, 6(1): 90 - 94.
- [18] 刘建华. 冰核菌与玉米和大豆霜冻关系的研究[J]. *中国农业气象*, 1990, 11(1): 1 - 6.
- [19] 韦建福. 我国生物冰核研究进展[A]. 植物病虫害生物学研究进展—植物病虫害生物学国家重点实验室研究论文选[C]. 北京: 中国农业科技出版社, 1995.
- [20] ARNY D C, LINDOW S E, UUPPER C D. Frost sensitivity of *Zea mays* increased by application of *Pseudomonas syringae*[J]. *Nature*, 1976, 266: 282 - 284.
- [21] LINDOW S E. *Erwinia herbicola*: a bacteria ice nucleus active in increasing frost injury to corn[J]. *Phytopathology*, 1978, 68: 523 - 527.
- [22] 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[J]. *中国农业科学*, 1994, 27(6): 23 - 27.
- [23] YUXING FENG. JUOR HANGU, Michiakiokano, Influences on inc nucleating active Bacteria on the Frost injury of crops[J]. *Agr. Met*, 1989, 45(1): 7 - 12.
- [24] 张世珩. 云南冰核细菌的鉴定及防霜新技术研究[J]. *云南农业大学学报*, 1995, 10(2): 192 - 197.
- [25] 杨丽. 冰核细菌活性的冰核基因克隆及其在大肠杆菌中表达[J]. *中国农业科学*, 1993, 26(5): 88 - 89.
- [26] MAES M, GARBEVA P, KAMOEN O. Recognition and detection in seed of the *Xanthomonas* Pathogens That Cause Cereal leaf Streak Using DNA Space Sequences and Dolymerase China Reaction[J]. *Phytopathology*, 1996, 86 (1): 63 - 69.
- [27] GRARETH J, WARREN. Bactera Ice Nucleation: molecular Biology and Application[J]. *Biotechnology and Genetic Engineering Review*, 1987, 5(7).
- [28] 朱红. 冰核细菌活性研究[A]. 首届全国中青年植物保护工作学术讨论会论文集[C]. 北京: 中国科学技术出版社, 1991.
- [29] SPRING M L, LINDOW S E. Subcellular localization and partial characterizal of ice nucleation antivity of *Pseudomonas syringae* and *Eriwina herbicola*[J]. *Phytopathology*, 1981, 7(71): 256.