

蛋白质激发子 Hrip1 对小麦黄矮病的诱抗作用

李琳^{1,2}, 王双超¹, 杨秀芬¹, Frederic Francis², 邱德文^{1*}

(1. 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 100081; 2. 比利时列日大学让布鲁农学院/昆虫功能与进化系, 让布鲁 B-5030)

摘要: 小麦黄矮病是由大麦黄矮病毒 (Barley Yellow Dwarf Virus, BYDV) 引起的一种小麦病毒病, 其传播介体是小麦蚜虫, 在小麦生产中造成巨大的经济损失。近年来, 植物诱导抗性作为一种新兴的植物病虫害防治措施引起了广泛的关注。蛋白质激发子 Hrip1 可以激活多种植物的免疫防御反应诱导植物产生广谱抗性。本研究评价了 Hrip1 对小麦黄矮病的诱抗效果。用 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Hrip1 溶液进行小麦浸种和幼苗喷雾, 随后接种 BYDV, 接种后第 7-14 d, Hrip1 对小麦黄矮病控制效果在 50% 以上, 接种后第 14-21 d 控制效果仍在 30% 以上。实时荧光定量 PCR 检测结果显示, 在 Hrip1 处理的小麦幼苗体内, BYDV 的外壳蛋白 mRNA 的数量及其增加指数显著低于对照组; EPG 结果显示, 在 Hrip1 处理的小麦幼苗上, 麦二叉蚜寻找叶片刺吸位点和韧皮部取食位点的时间增加。降低了传毒媒介麦二叉蚜在细胞取食过程中唾液分泌的时间, 即 pd II-1 的时间减少。以上结果表明: Hrip1 能够有效地抑制 BYDV 在小麦体内的增殖; 影响传毒媒介麦二叉蚜的取食行为, 抑制其传毒能力。此外, Hrip1 处理小麦能有效缓解 BYDV 引起的小麦叶片黄化和植株矮化的症状。以上结果表明: Hrip1 能够有效的抑制 BYDV 在小麦体内的增殖, 降低传毒媒介麦二叉蚜的传毒效率, 并减少 BYDV 造成的小麦生物量损失, 因此, Hrip1 可以作为生物诱导剂综合控制小麦黄矮病。

关键词: 小麦黄矮病; Hrip1; EPG; 传毒效率能力; 病毒增殖

中图分类号: **文献标识码:** A **文章编码:**

Protein elicitor Hrip1 functions in controlling barley yellow dwarf virus in wheat

LI Lin^{1,2}, WANG Shuangchao¹, YANG Xiufen¹, Frederic FRANCIS², QIU Dewen^{1*}

(1 State Key Laboratory of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, P.-R. China; 2 Functional and Evolutionary Entomology, Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liège, Gembloux B-5030, Belgium)

Abstract: Wheat yellow dwarf disease is caused by barley yellow dwarf virus (BYDV), which is transmitted by wheat aphid and causes causing huge loss in agriculture. Nowadays, induced resistance has aroused great discussion as a new measure to control plant pathogens and herbivores. Protein elicitor Hrip1 could induced defense response in various plants, leading to broad spectrum resistance. In this study, we evaluated the control efficiency of Hrip1 against BYDV. Wheat seeds and seedlings were soaked and sprayed with 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hrip1, respectively, and then inoculated with BYDV. The control efficiency of Hrip1 against against BYDV was over 50% at 14th day 7 days after BYDV inoculation and over 30% at 21th day 14 days after BYDV inoculation. Q-RT-PCR test showed that quantity and increase rate of mRNA for BYDV coat protein was less in Hrip1 treated wheat seedlings than that of control. EPG test showed that *Schizaphis graminum* performed longer time to find probe site on leaf surface and feeding site in phloem on Hrip1 treated wheat seedlings, declined the saliva secretion time of the virus transmission vector

收稿日期:

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFD0200900, 2018YFD0201500), 科技部中比合作专项 (2014DFG32270)。

作者简介: 李琳, 女, 博士研究生, Email: cherryli@live.cn; *通讯作者: 邱德文, 博士, 研究员, Email: qiudewen@caas.cn。

Schizaphis graminum during cell puncture (pd II-1), resulting in lower efficiency of virus transmission. These results suggested that Hrip1 is efficient in inhibiting BYDV proliferation, and affecting feeding behavior of *S. graminum*, further more reducing virus transmission ability of *S. graminum*. Additionally, Hrip1 weakened the symptom of dwarf and yellow in wheat seedlings caused by BYDV. In conclusion, Hrip1 could be a biological agent to integrately control BYDV. These results suggested that Hrip1 is efficient in controlling BYDV as a biological agent, with significant inhibition of BYDV proliferation, reduction of virus transmission efficiency and decline of the biomass loss due to BYDV in wheat.

Key words: Barley yellow dwarf virus; Hrip1; EPG; virus transimission efficiencyability; virus proliferation

大麦黄矮病毒（Barley Yellow Dwarf Virus，BYDV）是一类正单链 RNA 病毒，属黄矮病毒科 Luteoviridae 黄矮病毒属（Luteoviridae luteovirus），以禾本科植物为主要寄主，主要在植物韧皮部内繁殖，由蚜虫以持久性非增殖方式传播^[1]。在农业生产中，大麦黄矮病毒在麦类作物上引起黄矮病，表现为由叶尖或叶缘起的黄化或发红，植株矮化，生长缓慢，分蘖减少，根系发育不良，不抽穗或穗发育不良^[2]。黄矮病是危害小麦生产最主要的病毒病，引起小麦减产，在农业生产中造成巨大的经济损失。目前，小麦黄矮病的控制主要以培育抗性品种和化学药物防治传播介体蚜虫为主，生物防治为辅。近年来，诱导抗性作为一个新兴的生物防治手段，在农业生产中引起广泛关注。诱导抗性是植物针对外界刺激的一种应激性反应，当植物不能以固有防御机制抵抗外界生物或非生物胁迫时，会启动自身的免疫系统，增强自身防御，并在下一次面对外界胁迫时，产生更强的防御反应^[3]。例如，使用根际细菌蜡样芽胞杆菌 *Bacillus cereus* 对番茄种子进行浸种处理，能够增强番茄植株对丁香假单胞菌 *Pseudomonas syringae* pv. tomato 的抗性，并提高挽回番茄的产量损失^[4]。植物激素茉莉酸和水杨酸诱导的也可以植物防御反应，能够增强植物对病原物和害虫的抗性^[5,6]。上述研究可以表明诱导抗性可以有效的防治农业有害生物，减少有害生物对植物的危害，降低农业经济损失。

带格式的：字体：非倾斜

在诱导抗性的研究过程中，人们在一些病原物中分离得到一些小分子化合物，包括蛋白、肽和其他化合物。这些化合物一般是病原相关分子模式（pathogen-associated molecular patterns, PAMPs）或者病原物效应子(Effector)，也统称为激发子（Elicitor）^[7]。激发子被植物识别后，启动植物的多重免疫防御反应，包括过敏性反应（Hypersensitive Response, HR），细胞壁次生加厚，植物激素积累，次生代谢产物合成^[8,9]。植物经激发子诱导后表现出对病原物或害虫的直接毒性或趋避性，限制病原物在植物体内的移动，从而达到防治病虫害的目的。激发子作为化学农药的代替物新兴的生物防控剂，具有环境友好，对有害生物的选择压力小，不易产生抗药性等特点，在生物防治的应用中具有十分显著的优势。Hrip1 是本实验室从极细链格孢菌 *Alternaria tenuissima* 中分离到的一种小分子蛋白质激发子。前期研究表明，Hrip1 能诱导多种植物对病原真菌、病毒、盐胁迫、干旱胁迫产生抗性，促进植物生长^[10-12]。另外，本实验室发现 Hrip1 处理的小麦幼苗显著抑制麦长管蚜 *Sitobion avenae* 的繁殖，对无翅成蚜有趋避作用（结果未发表）。本研究评价了 Hrip1 处理的小麦对 BYDV 的抗性以及对传毒媒介麦二叉蚜取食行为的影响，期望为综合控制小麦黄矮病提供科学依据。

1. 材料与amp;方法

批注 [W用1]: 文中相关单位的表示方法与本刊不符，请参照本刊已发表文章或投稿模板进行修改

1.1 供试材料

本研究中所用病毒为大麦黄矮病毒 GAV 品系，病毒及外壳蛋白基因序列的质粒 pDHB1 由中国农业科学院植物保护研究所刘艳研究员提供。麦二叉蚜 *Schizaphis graminum*，由中国农业科学院

植物保护研究所张勇博士提供。小麦 *Triticum aestivum* L. 为中麦 175，由中国农业科学院作物科学研究所李法计博士提供。小麦-BYDV-麦二叉蚜体系置于培养箱中， $(23 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ ，16 ~~小时~~ h 光照培养。

1.2 供试蛋白表达与纯化

蛋白质激酶子 Hrip1 使用 本实验室构建并保存的 毕赤酵母 *Pichia pastoris*-pPICZαA-Hrip1-His 表达体系 *Pichia pastoris*-pPICZαA-Hrip1-His 表达^[12]，诱导表达及纯化过程参考 李书鹏^[12] 和 Zhang 等^[13]。对获得的重组蛋白 Hrip1-His tag (下文中以 Hrip1 表示) 进行 SDS-PAGE 检测，使用考马斯亮蓝 G250 染色，并利用 Bradford 方法对 Hrip1 进行浓度测定^[14]。用 1 mL 的无针注射器将 100 μL 的 30 μg/mL 的 Hrip1 注射入三生烟 *Nicotiana tabacum* cv. Samsun 叶片背面，以 50 mmol/L 的 Tris-HCl 溶液 (Hrip1 保存液) 为对照。48 h 后观察叶片是否出现过敏性坏死反应。每处理重复三次。并用三生烟 *Nicotiana tabacum* Samsun 检测蛋白活性。

1.2.1.3 生物测定

使用 30 μg/mL 的 Hrip1 水 溶液对小麦种子进行黑暗浸种 24 ~~小时~~ h，清水冲洗干净后挑选萌发状态相近 的 种子播种，每盆 6 粒，置于培养箱中， $(23 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ ，16 h ~~小时~~ 光照培养。7 d ~~天~~ 后，用 30 μg/mL 的 Hrip1 水 溶液喷雾处理小麦幼苗 (每 6 盆，共 36 棵小麦幼苗使用 20 mL 的 Hrip1 水溶液喷雾，随后每 7 d 天进行一次喷雾处理，共喷雾处理 4 次)。以水处理为对照，以水处理且不接种 BYDV 为健康对照。每处理 6 盆，重复 3 次。首次喷雾 一天 1 d 后，接种 15 日龄的带毒麦二叉蚜无翅成蚜，两天 2 d 后，用 1000 倍敌敌畏溶液杀灭麦二叉蚜 (记为 BYDV 接种后第 0 天)。随后，在 BYDV 接种后第 14 d 天和第 21 d 天，以小麦第 2, 3 片叶片为对象观察并记录 全部 小麦发病情况，根据叶片发病程度对病叶分级 (图 1 及表 1)，0-10 依次代表发病程度由轻到重，并计算病情指数和诱抗效果。病情指数 = $100 \times \Sigma (\text{病情级别} \times \text{各级叶片数量}) / (\text{总调查叶片数} \times 10)$ ，10 为叶片病情的最高级；诱抗效果 (%) = $(1 - \text{处理组病情指数} / \text{对照组病情指数}) \times 100\%$ 。随机取 20 株小麦测量株高，取 5 片第三片真叶进行叶绿素含量检测。使用 100% 甲醇浸没叶片 24 小时，随后取上清液在 652 nm 和 665 nm 测其吸光值，计算叶绿素 a&b 的总量^[15,16]。叶绿素 a&b 含量 (μg/g * 叶片鲜重) = $(24.93 \times A_{665} + 1.44 \times A_{652}) / \text{叶片鲜重}$ 。

批注 [W用2]: 每株小麦喷雾量???

批注 [W用3]: 一共喷了几次?

批注 [W用4]: 应设有健康对照?

批注 [W用5]: 调查时间表达不清楚，是喷雾后还是蚜，请再组织语言

批注 [W用6]: 补充分级标准

批注 [W用7]: 补充测定方法或参考文献

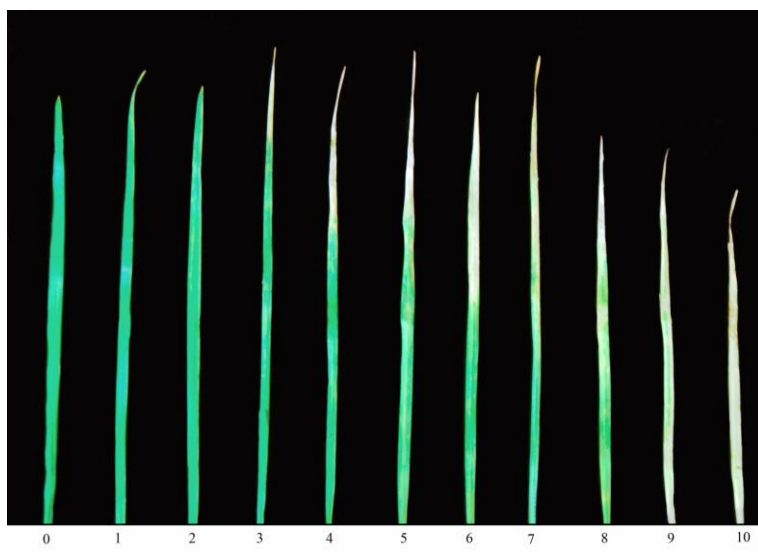


图 1 感染 BYDV 的小麦病叶分级

Fig. 1 Grade of wheat leaf that infected with BYDV

表 1 感染 BYDV 的小麦病叶分级标准

Table 1 Grade standard of wheat leaf that infected with BYDV

分级	分级标准
Grade	Standard of grade
0	叶片健康, 未见变色
1	叶片顶点发黄
2	叶片尖端 1-2 cm 侧缘发黄
3	叶片尖端 1-2 cm 完全变黄
4	叶片 1/4 变黄, 其余部位部分褪绿
5	叶片 1/3 变黄, 其余部位部分褪绿
6	叶尖干枯, 叶片 1/2 变黄, 其余部位部分褪绿
7	叶尖干枯, 叶片超过 1/2 变黄, 其余部位褪绿
8	叶片从叶尖起超过 1/3 变黄, 叶片整体褪绿, 不均匀发黄
9	叶片从叶尖起超过 1/3 变黄, 叶片整体褪绿或发黄
10	叶片完全变黄, 甚至干枯

1.3.1.4 病毒外壳蛋白 mRNA 含量检测

小麦种子、幼苗处理, 病毒接种同上。在 BYDV 接种 (即杀灭蚜虫) 后第 3, 6, 9, 12, 15 天分别取样, 并提取植物总 RNA, 并使用 Nano-Photometer NP80 测定 RNA 的浓度。取 1-3 μL 的 RNA, 加入 1 μL 随机引物, 10 μL 2 \times TS Reaction Mix, 1 μL RT/RI enzyme Mix, 以去 RNase 水补足体系至 20 μL (TransGen)。25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 s。随后反转录产物用于对 BYDV 外壳蛋白的基因进行绝对定量检测 (TransGen)。外壳蛋白基因的引物为正向引物: 5'-ATGAATTCAGTAGGCCGTAGA-3'和反向引物: 5'-CTATTTGGGAGTCATGTTGGC-3'^[4715]。取 1 μL 反转录产物, 加入 0.4 μL 正向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$), 0.4 μL 反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$), 10 μL 的 2 \times Top/Tip Green qPCR SuperMix, 0.4 μL Passive Reference Dye, 7.8 μL ddH₂O。反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 s; 94 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 s 和 64 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 34 s, 40 个循环 (ABI Prism7500)。每处理重复 3 次, 实验重复 3 次。以不同浓度的质粒 pDHB1 进行 BYDV 外壳蛋白基因的标准曲线制作^[4816]。病毒外壳蛋白 mRNA 增加指数 = (本次调查含量 - 前次调查含量) / 前次调查含量 \times 100%^{???}。

带格式的: 突出显示

带格式的: 突出显示

带格式的: 突出显示

带格式的: 突出显示

带格式的: 突出显示

批注 [W用8]: 补充具体条件和方法

带格式的: 突出显示

1.5 小麦叶绿素含量和株高调查

小麦种子、幼苗处理, 病毒接种同上。随机取 20 株小麦测量株高, 取 5 片第三片真叶进行叶绿素含量检测。使用 100% 甲醇浸没叶片 24 小时, 随后取上清液在 652 nm 和 665 nm 测其吸光值, 计算叶绿素 a&b 的含量^[17, 18]。叶绿素 a&b 含量 ($\mu\text{g/g}\cdot\text{FW}$) = (24.93 \times A₆₆₅+1.44 \times A₆₅₂) / FW, FW 表示小麦叶片鲜重 (fresh weight)。

批注 [W用9]: 补充测定方法或参考文献

1.4.1.6 带毒蚜虫取食行为监测

小麦种子、幼苗处理同上。喷雾处理 1 天后, 进行利用刺吸电位技术 (EPG; Electrical Penetration Graph, GIGA-8d) 对蚜虫取食行为进行监测实验, 对以带毒无翅麦二叉蚜成蚜取食行为进行监测和健康的植株为调查对象。选取 13-15 日龄的带毒麦二叉蚜无翅成蚜, 在实验前饥饿 1 小时。取 2-3 cm 的 18 μm 的金丝, 一端用水溶性导电银胶粘在蚜虫腹部背面, 另一端连接在 EPG 监测仪上,

批注 [W用10]: ???

植物电极插入土壤中^[19]。当蚜虫口针刺入植物细胞时，形成回路，蚜虫的取食行为将转化为电信号呈现。所有 EPG 检测在每日上午 10 点至下午 4 点进行。使用 Stylet⁺ a&b 对蚜虫取食行为波形进行记录鉴定^[20]。应用 Excel 工作表对 EPG 数据进行分析^[21]。

4.5.1.7 数据统计与分析

试验数据采用统计软件 SPSS 18.0 进行独立样本 T 检验进行方差分析，差异显著性以最小显著性差异法 (LSD) 进行检验。

2. 结果与分析

2.1 Hrip1 表达与纯化

将纯化后的重组蛋白进行经 SDS-PAGE 检测，和考马斯亮蓝 G250 染色后，在显示一条分子量在 20 kDa 左右的显示出单一条带。用 100 μ L 浓度为 30 μ g/mL 的 Hrip1 重组蛋白溶液注射三生烟叶片，以 50 mmol/L 的 Tris HCl 缓冲液为对照。烟草叶片在注射蛋白溶液 48 小时后，可以看到烟草叶片明显的过敏性坏死反应 (图 1)，说明重组 Hrip1 蛋白具有激发子活性，可以用于后续实验。

批注 [w/用11]: 请在材料与方法中相关试验细节

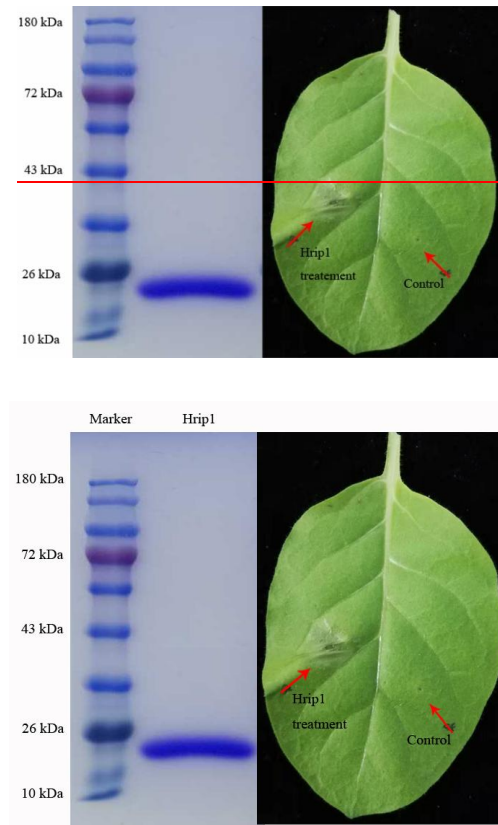


图 12 蛋白质激发子 Hrip1 的 SDS-PAGE 及生物活性检测

Fig.12 SDS-PAGE analysis and biological activity of protein elicitor Hrip1

2.2 BYDV 病情分级

本研究以小麦叶片为调查对象，根据叶片的发病严重程度对病情分级。具体分级标准见图 2。

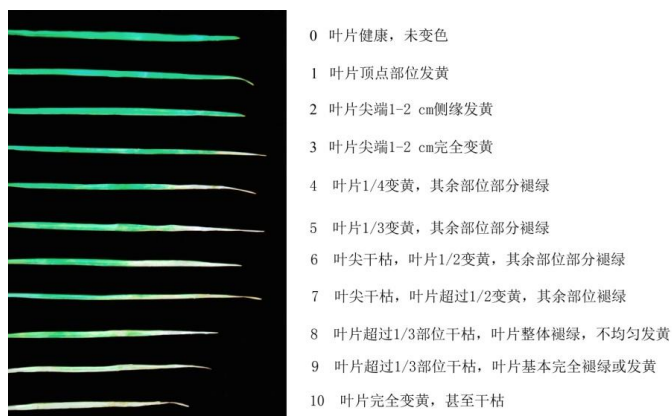


图 2 BYDV 室内小麦病叶发病情况分级

Fig.2 Grading of disease leaf of wheat infected with BYDV indoor

2.3.2.2 Hrip1 对小麦黄矮病的诱抗效果

本研究以小麦植株第二片及第三片真叶为调查对象，根据叶片发病情况分级标准，分别记录对照组和处理组的叶片发病级别，计算病情指数，根据病情指数计算 Hrip1 对 BYDV 的诱抗效果。从表 2 中可以看出，Hrip1 对 BYDV 有较理想的诱抗效果，显著降低小麦感染 BYDV 后的病情指数。病毒接种后第 7 天-14 d 的诱抗效果高达 50% 以上，接种后第 14 天-21 d 的诱抗效果仍在 30% 以上。

表 2 Hrip1 对 BYDV 的室内诱抗效果

Table 2 Control efficiency of Hrip1 on BYDV indoor

BYDV 接种后时间 (天)	病情指数		诱抗效果 (%)
	Disease index		
	对照组	处理组	
Time after BYDV inoculation (Day)	Control	Treatment	Control efficiency (%)
7-14	27.47 ± 2.22	13.12 ± 2.25 **	52.01 ± 8.75
14-21	38.93 ± 0.70	26.46 ± 2.53 **	32.35 ± 5.01

注：星号表示在同一调查时间，对照组和 Hrip1 处理组的病情指数有极显著差异， $P < 0.01$ ，下同。

Note: Asterisks shows significant difference in disease index between control and Hrip1 treatment, $P < 0.01$, the same below.

2.4.2.3 Hrip1 对 BYDV 外壳蛋白 mRNA 含量的影响

病毒粒子外壳蛋白 mRNA 的数量可以反映病毒粒子的数量。由含外壳蛋白基因序列的质粒 pDHB1 制备的标准曲线为 $y = -3.3313x + 37.962$ ， $r^2 = 0.9996$ (图 3)。实时荧光定量 PCR 检测小麦体内 BYDV 外壳蛋白 mRNA 含量发现，Hrip1 处理的小麦体内病毒外壳蛋白 mRNA 的含量显著少于低于处理对照组小麦病毒外壳蛋白 mRNA 的含量 (图 4)。Hrip1 处理组外壳蛋白 mRNA 的含量依次为：12.65, 15.48, 22.41, 31.56, 30.57 / μg mRNA；对照组外壳蛋白 mRNA 的含量依次为 33.13, 29.23, 38.89, 62.28, 122.37 / μg mRNA。且病毒粒子外壳蛋白 mRNA 的增加指数明显低于对照组 (图 4)，说明 Hrip1 可以在一定程度上抑制 BYDV 在小麦体内的增殖。

批注 [W用12]: 应为材料与方法部分，请文字部分应为可编辑状态

批注 [W用13]: 应放到材料与方法部分

带格式的：突出显示

带格式的：突出显示

带格式的：突出显示

带格式的：突出显示

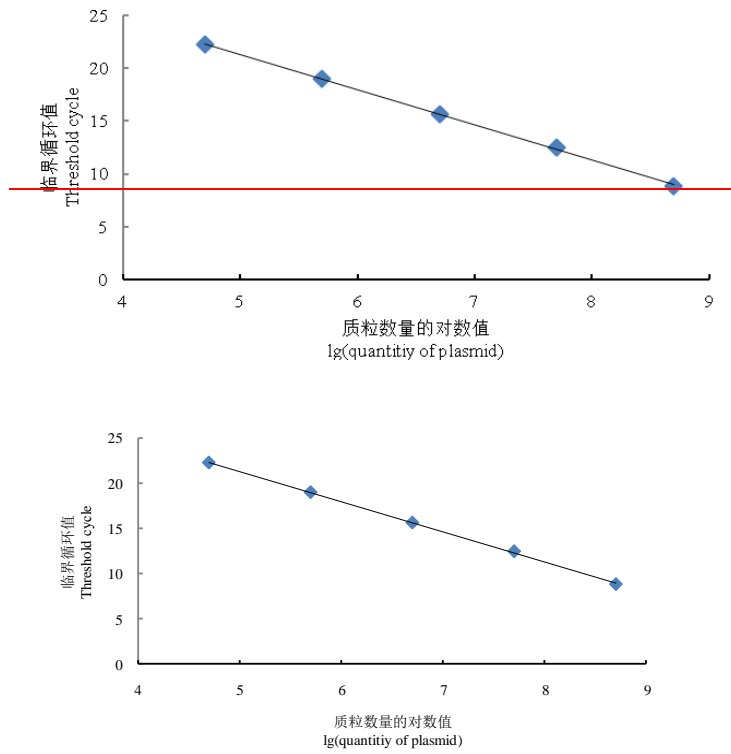
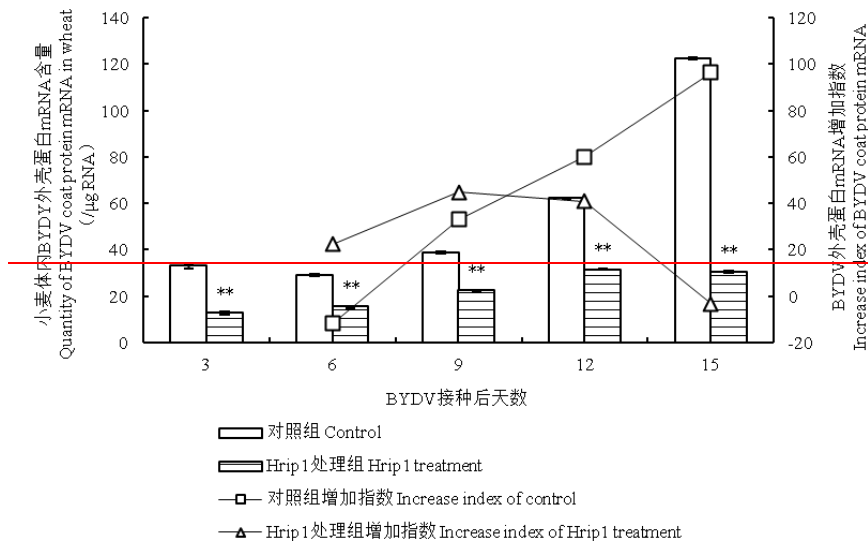
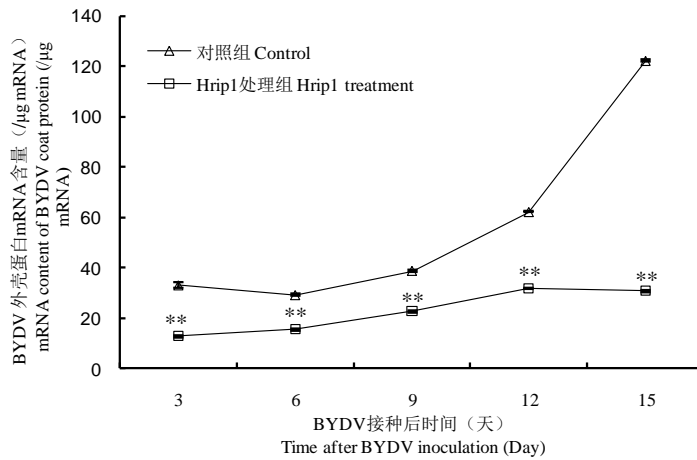


图 3 BYDV 外壳蛋白基因的 Q-RT-PCR 标准曲线
 Fig. 3 Standard curve of BYDV coat protein gene by Q-RT-PCR





注: *为差异显著性???

图 4 Hrip1 对小麦体内 BYDV 外壳蛋白 mRNA 含量的影响

Fig. 4 Effect of Hrip1 on quantity of BYDV coat protein mRNA in wheat

注: 星号表示在同一调查时间, 对照组和 Hrip1 处理组的 BYDV 外壳蛋白 mRNA 含量有极显著差异, $P < 0.01$ 。

Note: Asterisks shows significant difference in mRNA content of BYDV coat protein between control and Hrip1 treatment, $P < 0.01$.

2.52.4 Hrip1 对传毒媒介麦二叉蚜取食行为的影响

EPG 记录仪可以将蚜虫的取食行为转化为电信号, 量化分析蚜虫的取食行为, 可以作为分析蚜虫传播植物病毒机制的重要依据。病毒粒子一般随着蚜虫唾液分泌的过程进入植物细胞, 所以本研究选择与蚜虫叶肉细胞取食和韧皮部取食唾液分泌相关的 EPG 参数作为依据评价 Hrip1 对蚜虫传毒效率的影响。从表 3 可知, Hrip1 处理的小麦显著降低了麦二叉蚜叶肉细胞取食过程中的唾液分泌时间 (pd-H-1), 而对韧皮部筛管取食过程中的唾液分泌时间 (E1) 没有显著影响。说明 Hrip1 处理小麦对蚜虫的传毒时间没有影响。减少了麦二叉蚜在细胞取食过程中的传毒时间。然而, 从 EPG 开始至第一次刺吸行为的时间显著增加, 说明在 Hrip1 处理的小麦植株上, 麦二叉蚜需要更长的时间在叶片表面寻找口针的刺吸位点。从 EPG 开始至一次 E1 波间的非取食时间增加, 以及在同一次刺吸行为内, E1 波前的刺吸时间增加, 说明 Hrip1 处理小麦植株增加了麦二叉蚜在叶片上寻找韧皮部取食位点的时间。以上数据说明 Hrip1 处理小麦影响麦二叉蚜的取食行为, 进而影响其传毒能力。

表 3 麦二叉蚜 *Schizaphis graminum* 在 6 小时内取食的 EPGpd 波形的时间参数

Table 3 EPG Parameters of pd-wave of *Schizaphis graminum* in 6 hours feeding time

EPG 参数 Parameters of EPG	对照组 Control (n=22)	Hrip1 处理组 Hrip1 treatment (n=22)	P 值 P value
pd 波形次数	49.71±4.41	41.59±4.39	0.15
pd 波形平均持续时间 (s)	6.47±0.07	6.54±0.10	0.62
pd-H-1 平均持续时间 (s)	1.99±0.02	1.90±0.03**	0.01
pd-H-2 平均持续时间 (s)	2.15±0.04	1.93±0.05**	0.00
pd-H-3 平均持续时间 (s)	2.16±0.05	2.35±0.05*	0.02
从 EPG 开始至第一次刺吸行为的时间 (min)	4.20±0.64	8.45±1.84*	0.04
E1 平均持续时间 (min)	2.16±0.32	2.68±0.34	0.28

批注 [W用14]: 横坐标补充英文翻译, 图注应放在图上, 下图同样问题

批注 [W用15]: 不是结果, 不能放到结果部分

从 EPG 开始至第一次 E1 波间的非取食时间(h)	0.31±0.06	1.04±0.05*	0.05
在同一次刺吸行为内, E1 波前的刺吸时间(h)	0.99±0.07	1.31±0.13*	0.04

注: n 为 EPG 实验中, 每个处理的有效记录数。一或二个星号表示同一参数在对照组和 Hrip1 处理组间有显著或极显著差异, $P < 0.05$ 或 0.01 。

Note: n was the valid record number of each treatment. One or two asterisks showed that the parameter is different or significant different between control and Hrip1 treatment, $P < 0.05$ or 0.01 .

2.6.2.5 Hrip1 促进小麦生长

BYDV 影响小麦的生长, 主要表现为叶片发黄和植株矮化。本研究发现 Hrip1 处理组小麦株高和叶绿素含量显著高于对照组小麦。说明 Hrip1 可以减轻 BYDV 对小麦生长的影响。由表 4 可知, 在 BYDV 接种后第 14 d, 健康对照组和 Hrip1 处理组的叶绿素含量没有差异, 且都显著高于对照组叶绿素含量; 在 BYDV 接种后第 21 d, 健康对照组的小麦叶绿素含量最高, Hrip1 处理组次之, 对照组最低。两次调查结果都显示, 健康对照组的小麦株高最高, Hrip1 处理组次之, 对照组最低。以上结果说明 Hrip1 可以显著缓解由 BYDV 引起的小麦叶片黄化和植株矮化的症状。

批注 [W用16]: 应给出具体数据

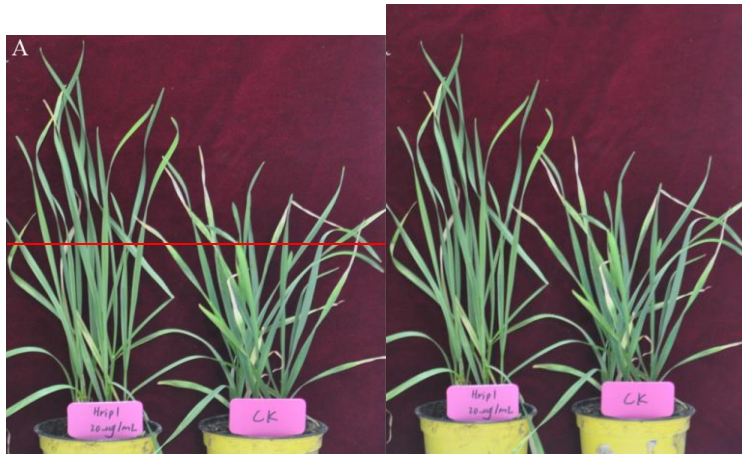


图 5 Hrip1 减弱 BYDV 引起的小麦黄矮症状

Fig. 5 Hrip1 weakened symptom of yellow and dwarf in wheat caused by BYDV

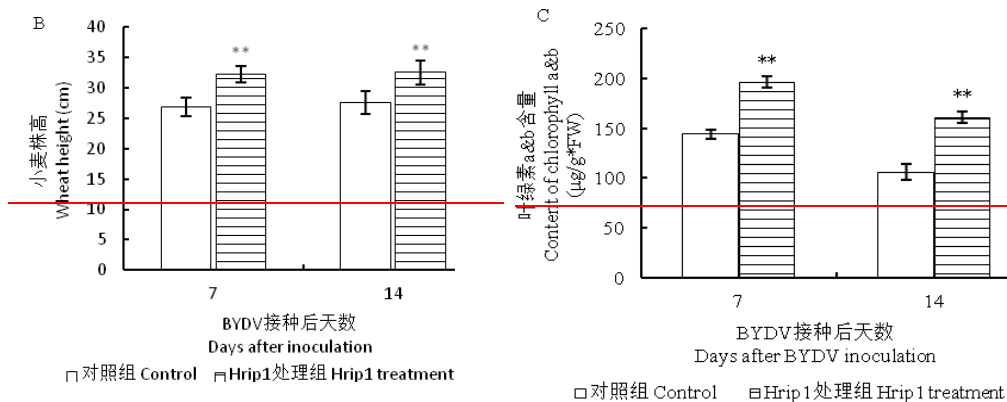


图 5 Hrip1 对小麦接种 BYDV 植株株高及叶绿素含量的影响

Fig: 5 Effect of Hrip1 on height and chlorophyll content wheat infected with BYDV

批注 [W用17]: 图 A 每盆播种 6 粒种子?

表 4 Hrip1 对感染 BYDV 小麦叶绿素及株高的影响

Table 4 effect of Hrip1 on chlorophyll content and plant height of BYDV infected wheat

BYDV 接种后时间 (天)	叶绿素含量 (µg/g*FW)			小麦株高 (cm)		
	Content of Chlorophyll (µg/g*FW)			Wheat height (cm)		
	对照组	健康对照	Hrip1 处理组	对照组	健康对照	Hrip1 处理组
Time after BYDV inoculation (Day)	Control	Control	Hrip1 treatment	Control	Control	Hrip1 treatment
14	144.29±4.58b	178.70±14.43a	196.00±5.71a	26.88±1.3c	35.78±1.51a	32.23±1.32b
21	106.06±7.56c	182.34±13.27a	160.97±5.29b	27.59±1.82c	39.57±3.48a	32.58±1.98b

注: A 展示 Hrip1 对接种 BYDV 小麦生长的影响, B 为 Hrip1 对接种 BYDV 小麦株高的影响, C 为 Hrip1 对接种 BYDV 小麦叶绿素含量的影响。小写字母 a, b, c 表示同一调查时间, 叶绿素含量或小麦株高在对照组, 健康对照组和 Hrip1 处理组之间有显著差异, $P < 0.05$ 。FW 表示小麦叶片鲜重。*为差异显著性???

Note: A shows effect of Hrip1 on growth of BYDV-infected wheat, B shows the effect of Hrip1 on plant height of BYDV-infected wheat, C shows the effect of Hrip1 on chlorophyll content of BYDV-infected wheat. Lowercases, a, b and c, show significant difference in same parameter between control, healthy control and Hrip1 treatment in same investigation time, $P < 0.05$. FW stands for fresh weight of wheat leaf.

3. 讨论

小麦黄矮病是蚜传病害, 其田间控制一般以防治蚜虫为主, 对病毒的控制除了培育抗病植株外缺少有效的药剂。近年来, 随着人们对食品安全需求的增加, 诱导抗性作为一个新兴的生态友好型植物病虫害防治手段, 引起了广泛关注。蛋白质激酶具有易降解, 无残留, 不易引起病虫害抗药性的特点, 在农业生产中具有广阔的发展前景。本研究表明蛋白质激酶 Hrip1 能够有效的控制小麦黄矮病, BYDV 接种后第 14 d7 天的控制水平在 50% 以上, 第 21 d14 天的控制水平也在 30% 以上。

实时定量结果表明, 在 Hrip1 处理的小麦体内, BYDV 病毒粒子外壳蛋白 mRNA 的增加速度显著低于对照组, 说明 Hrip1 能够处理组小麦能够显著抑制 BYDV 的增殖。植物的诱导抗性可以增加其对病毒的抵抗能力, 减少病毒对植物的危害^[22, 23]。前期研究发现 Hrip1 在双子叶植物烟草、拟南芥和单子叶植物水稻中激活水杨酸依赖的诱导抗性, 提高了一些防御酶的活性, 例如过氧化物酶 (POD)、过氧化氢酶 (CAT)、苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 等^[10-12]。这些酶与植物积累防御性次生代谢产物直接相关, 在植物防御方面起重要作用^[24, 25]。可以推测: Hrip1 激活了小麦的防御反应, 增加了其抵抗病毒危害的能力, 表现为 Hrip1 对小麦黄矮病有显著的诱抗效果。

蚜虫取食行为分析表明, 在 Hrip1 处理组, 麦二叉蚜口针穿刺细胞的取食过程中, pd II 波形时间显著低于对照组。EPG 所记录的各个波形直接反应蚜虫取食行为, pd 波形反应蚜虫口针进入细胞后分泌唾液并吸食细胞液的过程, 该过程伴随着病毒粒子由蚜虫体内进入植物细胞或由植物细胞进入蚜虫体内的过程, 其中, pd II 反应蚜虫口针穿刺植物细胞过程中分泌唾液及病毒粒子进入植物细胞的过程。BYDV 主要分布在植物韧皮部, 包括筛管、伴胞和薄壁细胞, 被蚜虫以持久性循环非增殖的方式传播^[26]。一般认为蚜虫传播 BYDV 主要发生在韧皮部筛管取食的唾液分泌阶段 (E1 阶段), 病毒粒子随着唾液分泌进入植物筛管, E1 的持续时间与蚜虫的传毒能力正相关^[27]。从本实验结果可以看出, E1 的持续时间在对照组和 Hrip1 处理组间没有差异。但是, 在一定程度上, Hrip1 处理的小麦对麦二叉蚜的取食行为有抑制作用。麦二叉蚜需要更长的时间在 Hrip1 处理的小麦植株

上寻找口针的刺吸位点和韧皮部取食位点。有研究表明,在抗性小麦植株上,蚜虫的取食行为受到抑制,其传播 BYDV 的能力也有所下降,主要表现在蚜虫需要更长的时间寻找韧皮部的取食位点^[28]。Hrip1 处理的小麦表现出对蚜虫取食行为的抑制作用,影响麦二叉蚜的传播 BYDV 的能力,为防治小麦黄矮病提供了一个新的综合防治思路。有研究表明黄症病毒科的豌豆耳突病毒 (Pea Enation Mosaic Virus, PEMV) 可以在蚜虫 *Acyrtosiphon pisum* 在细胞取食分泌唾液的过程进入植物细胞,即 pd II-1 阶段^[29]。BYDV 与 PEMV 同属黄症病毒科,具有相似的生物学特性^[26]。可以推测 BYDV 的传播也可能发生在蚜虫细胞取食分泌唾液的阶段 (pd II-1)。pd II-1 时间减少,可以从一定程度上说明病毒粒子进入植物细胞的效率减弱,即 Hrip1 降低了麦二叉蚜的传毒效率。

BYDV 能够破坏细胞内的叶绿体结构,减少细胞内叶绿素的含量^[30]。我们发现 Hrip1 能够显著提高感染 BYDV 的小麦叶绿素含量,这说明, Hrip1 减弱了 BYDV 对叶绿体的破坏作用。另外, Hrip1 处理的小麦株高显著高于对照组小麦,说明 Hrip1 降低了 BYDV 对小麦的矮化作用。已证实 Hrip1 可以促进拟南芥的生长,增加植株株高、果角长度和植株干重^[11]。Hrip1 处理小麦后,小麦株高和叶绿素含量增加,在一定程度上可以降低 BYDV 对小麦造成的生物量的损失危害,提高小麦产量,减少农业经济损失。

综上所述,蛋白质激酶 Hrip1 对小麦黄矮病有显著的控制效果,其控制作用主要体现在两方面:1、Hrip1 显著抑制 BYDV 在小麦体内的复制;2、Hrip1 显著降低麦二叉蚜的传毒效率影响 BYDV 传播介体——麦二叉蚜的取食行为,进而抑制其传毒能力。此外, Hrip1 能够缓解 BYDV 引起的小麦叶片黄化和植株矮化的症状。因此,以 Hrip1 为主要成分的阿泰灵可以作为生物药剂应用于小麦生产。

参考文献

- 1 王锡锋,刘艳,韩成贵,等 *et al.* 我国小麦病毒病害发生现状与趋势分析[J]. 植物保护, 2010, 36(3): 13-19.
- 2 高凯. 小麦黄矮病品种抗病性鉴定[D]. 西北农林科技大学. 2017.
- 3 Mauch-Mani B, Baccelli I, Luna E, *et al.* Defense priming: An adaptive part of induced resistance[J]. Annual Review of Plant Biology, 2017, 68: 485-512.
- 4 Silva H S A, Romeiro R S, Carrer Filho R, *et al.* Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under field conditions[J]. Journal of Phytopathology, 2004, 152(6): 371-375.
- 5 Kouzai Y, Kimura M, Watanabe M, *et al.* Salicylic acid-dependent immunity contributes to resistance against *Rhizoctonia solani*, a necrotrophic fungal agent of sheath blight, in rice and *Brachypodium distachyon*[J]. New Phytologist, 2018, 217(2): 771-783.
- 6 Sanches P A, Santos F, Penafior M, *et al.* Direct and indirect resistance of sugarcane to *Diatraea saccharalis* induced by jasmonic acid[J]. Bulletin of Entomological Research, 2017, 107(6): 828-838.
- 7 Jones J D G, Dangl J L. The plant immune system[J]. Nature, 2006, 444(7117): 323-329.
- 8 Hael C V, Perato S M, Arias M E, *et al.* The elicitor protein AsES induces a SAR response accompanied by systemic microbursts and micro-HRs in *Fragaria ananassa*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2017, 31(1): 46-60.
- 9 Zhang W, Yang X, Qiu D, *et al.* PeaT1-induced systemic acquired resistance in tobacco follows salicylic acid-dependent pathway[J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38(4): 2549-2556.
- 10 Kulye M, Liu H, Zhang Y, *et al.* Hrip1, a novel protein elicitor from necrotrophic fungus, *Alternaria tenuissima*, elicits cell death, expression of defence-related genes and systemic acquired resistance in tobacco[J]. Plant Cell & Environment, 2012, 35(12): 2104-2120.

- 11 Peng X C, Qiu D W, Zeng H M, *et al.* Inducible and constitutive expression of an elicitor gene Hrip1 from *Alternaria tenuissima* enhances stress tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Transgenic Research*, 2015, 24(1): 135-145.
- 12 李书鹏. 真菌蛋白激发子 Hrip1 诱导水稻抗病性及互作蛋白的鉴定[D]. 中国农业科学院. 2017.
- 13 Zhang Y, Gao Y, Liang Y, *et al.* The *Verticillium dahliae* SnodProt1-like protein VdCP1 contributes to virulence and triggers the plant immune system[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8(8): 1880.
- 14 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(~~s-1-2~~): 248-254.
- 15 王亚楠, 周锐, 王锡锋, *等 et al.* 大麦黄矮病毒-GAV 在燕麦植株体内运动规律的初步研究[J]. *植物病理学报*, 2009, 39(3): 249-253.
- 16 李丽, 赵成萍, 李宏, *等 et al.* 质粒制备绝对定量 PCR 标准曲线方法的建立[J]. *农业生物技术学报*, 2011, 19(6): 1157-1162.
- 17 Chen H, Zhou W, Chen W, *et al.* Simplified, rapid, and inexpensive estimation of water primary productivity based on chlorophyll fluorescence parameter Fo[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2017, 211: 128-135.
- 18 Lichtenthaler H K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes[J]. *Methods in Enzymology*, 1987, 148(1): 350-382.
- 19 Zhang Y, Fan J, Francis F, *et al.* Watery saliva secreted by the grain aphid *Sitobion avenae* stimulates aphid resistance in wheat[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(40): 8798-8805.
- 20 Tjallingii W F, Esch T H. Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals[J]. *Physiological Entomology*, 1993, 18(3): 317-328.
- 21 Sarria E, Cid M, Garzo E, *et al.* Excel workbook for automatic parameter calculation of EPG data[J]. *Computer and Electronics in Agriculture*, 2009, 67(~~3~~): 35-42.
- 22 马志卿, 李威, 王海鹏, *等 et al.* 植物源病毒抑制剂 VFB 对烟草抗烟草花叶病毒的诱导作用研究[J]. *植物病理学报*, 2010, 40(4): 419-425.
- 23 王炳南, 王双超, 檀贝贝, *等 et al.* 大丽轮枝菌蛋白激发子 PevD1 诱导的烟草对烟草花叶病毒 (TMV) 系统获得性抗性及其分子机制[J]. *农业生物技术学报*, 2012, 20(2): 188-195.
- 24 Rani P U, Jyothsna Y. Biochemical and enzymatic changes in rice plants as a mechanism of defense[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2010, 32(4): 695-701.
- 25 Zhao L Y, Chen J L, Cheng D F, *et al.* Biochemical and molecular characterizations of *Sitobion avenae*-induced wheat defense responses[J]. *Crop Protection*, 2009, 28(5): 435-442.
- 26 Gray S, Gildow F E. Luteovirus-aphid interactions[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2003, 41(~~1~~): 539-566.
- 27 Prado E, Tjallingii W F. Aphid activities during sieve element punctures[J]. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 1994, 72(2): 157-165.
- 28 Givovich A, Niemeyer H M. Hydroxamic acids affecting barley yellow dwarf virus transmission by the aphid *Rhopalosiphum padi*[J]. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 1991, 59(1): 79-85.
- 29 Powell G. Intracellular salivation is the aphid activity associated with inoculation of non-persistently transmitted viruses[J]. *Journal of General Virology*, 2005, 86(~~Pt-2~~): 469-472.
- 30 Rong W, Wang X, Wang X, *et al.* Molecular and Ultrastructural Mechanisms Underlying Yellow Dwarf Symptom Formation in Wheat after Infection of Barley Yellow Dwarf Virus[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(4): 1187.