

植物凝集素及其在抗病虫害分子育种中的应用

侯学文* 黄剑威

华南农业大学生命科学学院, 广州 510642

Phytoagglutinin and Its Application in Pest Resistance Molecular Breeding

HOU Xue-Wen*, HUANG Jian-Wei

College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

提要 文章简要介绍植物凝集素的抗虫特点, 并与其他类型的抗虫基因进行了比较; 对目前研究较多、应用前景较好的植物凝集素的性质、抗虫性、转基因植物的抗虫性等研究进展作了阐述; 并对植物凝集素在抗虫转基因工程中的应用现状和前景进行了讨论。

关键词 植物凝集素; 甘露糖结合凝集素; 基因克隆; RACE-PCR; 抗虫基因工程

植物凝集素是含有至少一个非催化结构域并能可逆结合特异单糖或寡糖的一类(糖)蛋白质(Peumans 和 Van Damme 1995)。它们的明显特点是能选择性地使不同来源的血红细胞发生凝集, 因而又命名为植物血凝素(phytohemagglutinin)。从1888年Herman Stillmark在蓖麻籽中发现第1个凝集素到现在, 已发现1 000多种植物凝集素。由于分离的凝集素越来越多, 人们为了便于研究, 对它们进行了归类(高莹等 2000)。根据植物凝集素亚基的结构特征, 植物凝集素被分成4种类型: 部分凝集素、全凝集素、嵌合凝集素、超凝集素; 根据氨基酸序列的同源性及其在进化上的关系, 植物凝集素可以分为7个家族: 豆科凝集素、几丁质结合凝集素、单子叶甘露糖结合凝集素、II型核糖体失活凝集素、木菠萝素家族、葫芦科韧皮部凝集素、苋科凝集素; 根据凝集素专一识别的糖类的不同, 可以分为6个组别: 岩藻糖组、半乳糖/N-乙酰半乳糖胺组、N-乙酰葡萄糖胺组、甘露糖组、唾液酸组、复合糖组。

植物凝集素在植物界的分布极其广泛, 且具有许多独特的生理功能, 如植物防御(抗虫、真菌、细菌及病毒)、与固氮菌共生识别(王逸群和荆玉祥 2000)等。在农业生产中, 我们对其抗虫性曾做过一定的研究。虽然目前在农业研究中有Bt、凝集素、蛋白酶抑制剂、淀粉酶抑制剂、病毒外壳蛋白基因等供选用, 但它们的抗病虫害的范围各不相同。在上述几类基因中, 仅有凝集

素不仅对蚜虫、叶蝉和稻飞虱等同翅目的害虫高效, 同时对鳞翅目、鞘翅目的害虫也有一定的效果, 并对一些真菌病害有效。众所周知, 同翅目的害虫不仅寄主范围广, 除因取食使植物营养不良导致减产外, 更严重的是, 其取食过程可导致植物感染100多种病害, 使作物大幅减产。由于凝集素的这一独特抗虫特性, 因此凝集素基因在抗虫转基因分子育种中具有独特的优势和广阔的应用前景(潘科等 2002; 赵强等 2005)。

1 重要的植物抗虫凝集素

对植物凝集素基因的克隆, 早期是将纯化后的凝集素分析其氨基酸序列, 根据编码规则反推出核苷酸序列, 通过PCR或RT-PCR的方式获得该凝集素基因; 目前, 随着克隆的同源基因增多, 可以通过已知序列的多重比较, 找到保守区域后设计引物, 采用PCR或RT-PCR的方式获得凝集素的DNA或cDNA序列。目前许多公司已将这一克隆方式程序化, 并设计出各种各样的RACE-PCR试剂盒, 可以非常方便地克隆到与已知基因同源的未知基因的序列(Schaefer 1995)。下面我们对在农业生产中具有应用价值的凝集素基因的情况进行介绍。

1.1 雪花莲凝集素(GNA) 分离自雪花莲(*Galanthus*

收稿 2006-10-23 修定 2006-12-01

资助 广东省自然科学基金(000643)和华南农业大学创新基金(L06063)。

*E-mail: hxw1969@scau.edu.cn, Tel: 020-85280194

nivalis), 是一个含4个相同亚基(12 kDa)的四聚体蛋白, 能特异识别 α -1, 3或1, 6连接的D-甘露糖残基, 因此它属于单子叶甘露糖结合凝集素家族(monocot mannose-binding lectin, MBL)。采用人工饲料夹毒法得到的结果表明, GNA对一些重要的农业害虫表现出一定的毒杀作用, 如同翅目的蚜虫、叶蝉和稻飞虱; 对咀嚼式口器的害虫表现出中等的毒杀作用。虽然GNA对昆虫有较高的毒性, 但对哺乳动物基本上无毒(Sharma和Ortiz 2000)。因此GNA基因已转入多种植物中, 并对转基因植物的抗虫性进行了测试。

Tang等(2001)采用基因枪法将pWRG1515(含报告基因GUSA和潮霉素抗性筛选基因HPT)和pRSSGNA1(含GNA基因, 受到韧皮部特异表达的启动子RSs-1的驱动)共转化水稻Eyi105的胚性愈伤组织, 经过几轮在含潮霉素的筛选培养基上筛选, 获得纯合的含潮霉素抗性基因HPT和GNA基因的转基因株系。选用GNA表达量占可溶性蛋白0.3%以上的3个纯合株系, 研究稻褐飞虱的成活率、育性、发育以及取食行为的结果显示, 这些指标比未转基因的均大幅度降低, 说明GNA在水稻中的表达是可以有效控制稻褐飞虱的。

Ripoll等(2003)将基因GNA2置于带有2个增强子序列的35S启动子的下游, 采用农杆菌介导的花序浸入法转化野生型拟南芥Ws, 经筛选获得仅有一个T-DNA插入位点的转GNA2基因的株系。Western blot分析表明, GNA的表达量占可溶性蛋白的0.1%~1.3%, 多数转基因植物在接种根结线虫(*Meloidogyne incognita*)后, 形成的根瘤大幅减少(20%~50%), 说明GNA的表达对线虫的防治有一定的效果。在马铃薯、油菜等作物中表达GNA后的结果也表明其对根腐线虫(*Pratylenchus neglectus*)、马铃薯白线虫(*Globodera pallida*)和胞囊线虫(*Heterodera schachtii*)等几种线虫有一定的防治效果。

Wang等(2005b)采用双元载体pWRG815构建了GNA基因在韧皮部专一表达的水稻蔗糖合成酶1(RSs-1)启动子驱动, 潮霉素抗性基因HPT在35S启动子控制下的转化载体, 采用农杆菌介导法侵染玉米胚性愈伤组织, 从众多的转化再生植

株中, 采用PCR和Southern blot等验证了GNA基因的插入。Western blot分析表明, 转基因株系GNA的表达量占可溶性蛋白的0.13%~0.28%。选取表达量为0.22%的株系于温室条件下进行抗虫性测试的结果表明, 转基因株系对玉米叶蚜的抗性有明显提高, 蛹的形成率降低了近一半; 田间测试的结果也与此类似。Wang等(2005a)还选择了3条GNA表达量占可溶性蛋白0.24%的株系进行抗亚洲玉米螟(*Ostrinia furnacalis*)试验, 结果表明幼虫的成活率降低近10%, 幼虫期延长5~6 d, 第5期幼虫的体长减少将近30%, 蛹重减少一半。这些结果表明, 转GNA基因的玉米, 不仅表现出对同翅目蚜虫有较好的防治效果, 而且对鳞翅目的亚洲玉米螟也表现出良好的防效。

梁辉等(2004)用基因枪法将GNA基因转入2个品种小麦, 对麦长管蚜和禾谷缢管蚜均产生明显的拒食作用, 麦长管蚜的虫体发育减缓, 幼虫成活率也降低; 禾谷缢管蚜在接种当代即表现出明显的毒杀作用。吴昌银等(2000)用农杆菌LBA4404介导法, 将GNA基因转入番茄后, 转基因番茄对蚜虫的虫口密度抑制率达30%~70%, 而且还有生活力差的畸形蚜产生。周岩等(1998)将GNA基因转入烟草后, GNA表达量占可溶性蛋白的0.08%~0.15%, 桃蚜(*Myzus persicae*)有45%~60%的蚜口密度受抑制, 有的甚至高达90%以上。王关林等(2004)用农杆菌LBA4404介导法将GNA基因导入菊花(*Dendranthema morifolium*)基因组中, 其中GNA表达最强的转基因植株的蚜虫种群受抑制率最高达84%。GNA基因还转入马铃薯和甘蔗等作物中, 也均表现出明显的抗虫效果。

1.2 麦胚凝集素(WGA) WGA是从小麦胚芽(wheat germ)中分离到的一种凝集素, 完整的WGA分子量大约为35 kDa, 由2个完全相同的亚基组成, 每个亚基含2个N-乙酰葡萄糖胺结合位点(Nagata和Burger 1974)。WGA添加到昆虫饲料中饲养昆虫的结果表明, WGA对四纹豆象(*Callosobruchus maculatus*)、玉米螟(*Ostrinia nubilalis*)、长角叶甲(*Diabrotica species*)、灰褐飞虱(*Empoanata lugens*)及黑尾叶蝉(*Nephotettix cinciteps*)、卷心菜

蚜等均有明显的发育延迟和致死的作用。Kanrar等(2002)报道, *WGA-B* 基因置于 35S 启动子控制之下(pBin AR/*WGA B*), 采用农杆菌 GV2260 介导法将其转入印度油菜(*Brassica juncea* cv. RLM-198)后, 筛选获得 *WGA-B* 为单拷贝的转基因植株; Western blot 分析表明, *WGA* 的表达量占叶子总蛋白的 0.07%, 采用这一株系进行抗印度油菜蚜(*Lipaphis erysimi*)生测的结果表明, 蚜虫的虫口密度、蜜露分泌量、后代个体大小均比对照明显降低。这一结果表明, *WGA* 在其他植物中表达后同样有抗虫效果。

1.3 伴刀豆凝集素(ConA) 分离自刀豆(*Canavalia ensiformis*), 是由 4 个分子量大约为 26.5 kDa 的非糖基化亚基构成, 它可识别 D-甘露糖和 D-葡萄糖。Sauvion 等(2004)用含 ConA 的人工饲料饲养豌豆蚜(*Acyrtosiphon pisum*)的结果表明, ConA 对其有明显的拒食作用, 半致死剂量 LC_{50} 为 $312 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (20°C 下饲养 7 d)。Gatehouse 等(1999)用含 ConA 的人工饲料饲养番茄夜蛾(*Lacanobia oleracea*), 在含 2% ConA 时, 其死亡率达到 90%, 而且试虫的发育迟缓; 用含 ConA 的人工饲料饲养的桃蚜(*Myzus persicae*)体积减少达 30%, 成熟时间延长, 生育率下降在 35% 以上。Gatehouse 等(1999)还将 *ConA* 基因置于 35S 启动子的控制下, 放入双元转化载体 pLG239G 中, 用叶盘法通过农杆菌 LBA4404 介导转入马铃薯, 经筛选获得含有 *ConA* 基因的马铃薯转基因苗; Western blot 分析表明, 多数转化子 ConA 的表达量占可溶性蛋白的 0.001%~0.01% 之间。而后他们选用 ConA 表达量在 0.005% 以上的株系进行抗虫性测试。结果在转基因植株上饲养的番茄夜蛾生长速率减慢约 25%, 叶消耗量也明显减少, 虫重降低 45% 以上; 桃蚜的测试表明, 转 *ConA* 的马铃薯上的桃蚜生育率降低 45% 以上。

1.4 菊芋凝集素(HTA) 分离自菊芋(*Helianthus tuberosus*), 它是由分子量为 15.5 kDa 的 4 个完全相同的亚基构成, 能专一识别甘露二糖。Chang 等(2003)从菊芋块茎中克隆了 4 个高度同源的 *HTA* cDNA, 它们分别编码 147 个氨基酸的蛋白, 说明菊芋中含有同工凝集素; 用在原核表达 *HTA*

cDNA 的方法, 证明 *HTA* 同时还有胰蛋白酶抑制剂活性。分别将这 4 个 *HTA* 的 cDNA 置于 35S 启动子控制下, 采用农杆菌介导法转化烟草叶盘后获得的再生转基因植株, 经 PCR、Southern blot 以及 Western blot 分析表明, *HTA* cDNA 已经插入烟草基因组并且有效地表达。在 4 种 T_0 转基因烟草中, 桃蚜的种群抑制率分别为 78.1% (*HTA-a*)、75.8% (*HTA-b*)、46.9% (*HTA-c*) 和 77% (*HTA-d*)。在 T_1 转基因烟草的桃蚜的生殖受抑率为 53.0% (*HTA-b*)、64.6% (*HTA-c*); 同时, 桃蚜的生长发育进程明显延迟。

1.5 豌豆凝集素(p-Lec) 分离自豌豆(*Pisum sativum*)种子, 它编码一个 275 个氨基酸的前凝集素原, 在内质网中除去信号肽后转运至蛋白体中, 进一步加工形成 178 个氨基酸的 β 链和 58 个氨基酸残基的 α 链, 它可专一识别甘露糖或葡萄糖残基。油菜花粉甲虫的饲料中添加 1% p-Lec 后, 试虫成活率降低 84%, 成活幼虫的体重降低 79%; 当 p-Lec 浓度提高到 10% 时, 试虫于 4 d 后全部死亡。Melander 等(2003)将 *p-Lec* 基因置于花粉特异表达的基因 *Sta44-4* 的启动子控制下, 用农杆菌介导的叶柄转化法获得转基因油菜, 在测试的 20 株 T_0 代转基因植物中, 有 11 株的花粉甲虫幼虫虫重显著降低 46%。Western blot 分析表明, p-Lec 在转基因油菜花粉中表达量最高可达总可溶性蛋白的 1.5%, 转基因植株的抗虫效果与 p-Lec 的表达量有密切关系, 有抗虫效果的转基因株系的 p-Lec 表达量为 0.64%, 而没有抗虫效果的株系其表达量仅为 0.15%。

1.6 大蒜凝集素(ASA) 据 Powell 等(1995)报道, 分离自大蒜(*Allium sativum*)球茎中的凝集素 ASA 对水稻褐飞虱有很强的抗代谢作用。后来又从蒜叶中分离到与 ASA 高度相似的蒜叶凝集素 ASAL, 它是由 2 个分子量为 12.5 kDa 亚基构成的同二聚体, 专一识别甘露糖。Smeets 等(1997)证明 ASAL 对兔红细胞的凝血活性是 ASA 的 500 倍, Bandyopadhyay 等(2001)的工作表明, ASAL 的凝血活性与其抗虫活性之间呈正相关, 说明 ASAL 的抗虫活性远高于 ASA。Dutta 等(2005b)将 *ASAL* 基因置于 CaMV 35S 启动子控制下, 通过农杆菌 LBA4404

介导的叶盘转化法转化烟草, 获得的转基因植株经 Western blot 分析表明, ASAL 的表达量占可溶性蛋白的 0.68%~2%。整体植物上进行抗桃蚜的试验表明, 接种后 6 d, 转基因烟草上的桃蚜成活率为 16%~20%, 显著低于非转基因烟草的 75%。无论蒜叶还是转基因烟草中的 ASAL 都能紧密结合昆虫刷状缘上的 3 个蛋白, 与这些蛋白的相互作用可能是其抗虫的分子基础。Dutta 等 (2005a) 还将 ASAL 基因分别置于 35S 和 RSs-1 启动子控制下, 采用农杆菌介导法转化印度油菜 (*Brassica juncea*) 愈伤组织, 获得了 ASAL 组成型或在韧皮部表达的转基因油菜, 油菜蚜在两类转基因植株上的成活率和生育率均显著降低。Saha 等 (2006) 通过双元载体 pCambia 1301 将 35S 启动子控制下的 ASAL 基因转入水稻品种 'IR64', ASAL 在 T₁ 代转基因株系中的表达量为总可溶性蛋白的 0.477%~0.676%, 此种植株上的褐飞虱和二点黑尾叶蝉的成活率分别为 36% 和 32%, 生育率分别为 40.5% 和 29.5%, 均显著低于非转基因植株。由此可见, ASAL 对多种同翅目害虫有相当好的防治效果。

1.7 苋科凝集素 尾穗苋 (*Amaranthus caudatus*) 凝集素 (ACA) 专一识别 2-乙酰氨基-2-脱氧-D 半乳糖, Rahbé 等 (1995) 的工作表明, ACA 在体外的抗虫活性与 GNA 和 ConA 类似, 其对蚜虫的 LC₅₀ 为 68 μg·mL⁻¹, 这表明 ACA 是一种有效的抗蚜基因。Guo 等 (2004) 将 ACA 基因置于韧皮部特异表达的启动子 CoYMV 驱动下, 用农杆菌 LBA4404 转化烟草获得的转基因植株经 Western 分析表明, ACA 的表达量为叶总可溶性蛋白的 0.093%。转 ACA 基因烟草离体叶接种桃蚜后的结果显示, 78% 的烟草对桃蚜虫口密度增长的抑制率在 75% 以上, 并在抗性植株上观察到有桃蚜若虫死亡的现象。

千穗谷苋菜 (*A. hypochondriacus*) 和尾穗苋菜是同一属中不同的种, 2 种凝集素的氨基酸序列同源性高达 97.7%。周永刚等 (2001) 采用 PCR 技术从苋属植物千穗谷的总 DNA 中扩增出苋菜凝集素 (AHA) 的核基因片段, 转入 pBAHA_g 和 pBAHA_c 的烟草对蚜虫的抑制率分别为 57.2% 和 48.8%, 个别株系高达 90% 以上。表达 AHA 蛋白的转基因烟

草主要表现出对蚜虫繁殖有抑制, 影响其群体的形成, 但对蚜虫的死亡率没有大的影响。这与转 GNA 和 ConA 基因的植物对蚜虫的影响一致。

1.8 天南星科凝集素 侯学文等 (1998) 从天南星科植物海芋 (*Alocasia macrorrhiza*) 中分离纯化得到一种凝集素, 在所有测试的 17 种单糖和寡糖中, D-甘露糖的凝血抑制作用最强, 说明它可能是一种特异识别 D-甘露糖的凝集素, 凝胶过滤法测定其分子量为 31.5 kDa; 离体培养试验表明, 海芋凝集素对肺腺癌细胞株 P18 具有较强的毒杀作用。潘科等 (2004) 将海芋凝集素添加到人工营养液中饲养豆蚜 (*Aphis craccivora*) 的结果表明, 豆蚜的忌避作用随饲养时间和凝集素添加量的增加而增强, 添加 0.125% 海芋凝集素饲养 4 d 的蚜虫, 其蜜露分泌抑制率达 84.21%; 每个雌虫生产的若蚜率降低近 70%, 生产若蚜的高峰期推迟 1 d。海芋凝集素对豆蚜的直接毒杀作用也较强, 用 1% 海芋凝集素处理豆蚜 3 d 后的死亡率高达 89%。Zhu 等 (2006) 采用 SMART RACE-PCR 从海芋块茎总 RNA 中克隆了海芋凝集素 cDNA, 经分析表明, 它编码一个 270 个氨基酸的蛋白, 具有 3 个甘露糖结合位点。目前, 已成功构建了多种双元表达载体, 并以此将海芋凝集素 cDNA 转入烟草和水稻等作物中进行抗蚜虫、叶蝉和稻飞虱等同翅目害虫的测试。

李润植等 (2000) 从朝鲜天南星 (*Alocasia consanguineum*) 幼叶组织的可溶性蛋白中分离纯化到一种凝集素, 它对棉蚜 (*Aphis gossypii*) 等蚜虫具有明显致死和降低生殖的效应。

半夏和掌叶半夏是天南星科半夏属的药用植物, 黄大昉等 (1997) 从这 2 种植物中分离到对几种蚜虫具有致死活性的蛋白, 属于组成相近的同工凝集素。他们用棉蚜成蚜进行生物测定的结果表明, 人工饲料中含有 0.12% (W/V) 的此类活性蛋白时, 产若蚜率即明显下降, 且处理开始后第 5 天, 成蚜校正死亡率可达 80%~90%, 所产若蚜的死亡率也极显著高于未做处理的。以 24~48 h 虫龄的桃蚜若蚜为试虫的生物测定表明, 含有 0.15% 掌叶半夏活性蛋白的人工饲料, 处理后第 2 天的若蚜死亡率明显上升, 校正死亡率可达 50% 左右。

以2种麦蚜成蚜为试虫的结果表明, 人工饲料中含有此种活性蛋白时, 其成活率也明显下降。

2 凝集素与其他类型抗虫基因的联合应用

在生产实践中, 人们常感到单一使用一种抗虫基因的效果并不十分理想, 为了克服这一不足, 人们采用2种或多种不同来源的抗虫基因(如Bt、蛋白酶抑制因子、淀粉酶抑制因子等)共同转入植物中构成双价或多价转基因植物的方法, 试图通过不同基因间的互补作用扩展抗虫谱和提高抗虫能力, 同时还可延缓害虫对单一基因产生耐药性而延长转基因植物的使用寿命。

刘召华等(2005)分别将ACA基因的cDNA置于35S启动子、GNA基因置于韧皮部特异的CoYMV启动子控制下, 以相同转录方向的方式插入形成含以上2种凝集素基因的表达载体pBACG, 以Southern和Western blot分析表明, 这2个基因已插入烟草基因组中并能有效地表达。已知GNA专一识别甘露糖, 而ACA则专一结合一种N-乙酰半乳糖胺, 据此推测, 两者的作用靶标可能有所不同, 从而起到协同抗虫的作用。用桃蚜进行生测的结果表明, T₀代阳性植株对桃蚜的虫口密度抑制率达83.9%, 其中, 58%植株抑制率更高, 可达90%以上; 阳性子代的桃蚜的虫口密度抑制率为85.3%。说明这2种凝集素基因能稳定遗传表达, 抗虫性能也比较稳定。而且, 它们对桃蚜的虫口密度抑制率比转单个基因的植物均高出10%~20%。

Tang等(1999)将位于不同载体上的Xa21基因(对稻瘟病高效)、GNA基因(对刺吸式口器害虫高效)通过基因枪法共转化入水稻中, 其共转化效率高达70%。据此认为, 以此法有可能获得既能抗稻瘟病, 又能抗同翅目害虫的转基因植物。

Ramesh等(2004)将含苏芸金杆菌(*Bacillus thuringiensis*) δ 内毒素合成基因 $cry1Ab$ 、 $cry1Ac$ 置于玉米Ubi启动子控制下, GNA基因置于韧皮部特异表达的水稻蔗糖合成酶基因启动子控制下, 通过农杆菌LBA4404转化水稻胚性愈伤组织, 筛选获得转基因植株, 阳性转基因株系对三化螟幼虫的致死率高达96%~100%, 对褐飞虱致死率为50%~55%, 对二点黑尾叶蝉致死率为46%~49%,

对白背飞虱致死率为85%~91%。

王伟等(1999)构建的双元表达载体pBin-LK含有豌豆凝集素基因和大豆Kunitz型胰蛋白酶抑制剂(soybean Kunitz trypsin inhibitor, SKTI)基因, 均在35S启动子的驱动下, 用农杆菌LBA4404介导, 将其转入棉花后获得的转基因植株, 分子水平检测的结果表明, 这2个基因已经转入棉花基因组中并表达。用棉铃虫测试表明, 转基因植株比非转化植株有较为明显的杀虫效果。从叶片受害程度来看, 转基因棉株受到的危害明显轻于非转化的棉株, 转基因棉株叶片上的棉铃虫幼虫生长发育明显受到抑制, 表现为个体小, 死亡率高, 蜕皮指数、活虫生物总量和体重均明显降低。

3 结语

植物分子育种是在基因水平上按人们设计要求定向改变植物的遗传物质, 它可以使有用基因实现跨物种的流动, 打破物种间的生殖隔离障碍, 突破传统育种技术的限制。植物抗病虫害育种是植物分子育种的重要组成部分, 前已述及, 凝集素抗虫的一个独特特点是对刺吸式口器的害虫高效, 而这一类害虫直接或间接造成的作物产量损失是十分巨大的。因此采用植物基因工程技术, 培育含植物凝集素的抗同翅目害虫的转基因植物是有光明的应用前景的。但在应用中应注意以下问题:

(1)凝集素对高等动物(包括人)以及害虫天敌是否也存在毒性。由于凝集素广泛分布于植物中, 而且在我们的食物中也有分布(如大豆、水稻、多种蔬菜), 再加上人们的饮食习惯(高温烹调), 笔者认为, 外源凝集素基本上对人不会产生危害。外源凝集素在转基因植物中的表达量并不很高, 为数不多的研究表明, 转GNA基因植物对哺乳动物和害虫天敌的影响较小(Down等2000)。但为了安全起见, 可按分步走的办法, 即先在非食用的经济作物(如棉花、烟草)中进行转基因试验, 经证实这些基因确实是安全的以后, 再逐步应用到其他粮食作物中。

(2)如何解决凝集素表达浓度不高、抗虫性不强、抗虫谱不广的问题。一方面, 可以通过构建强的高效表达载体, 采用合适的强启动子(Tang

等2001);同时针对害虫取食部位是韧皮部可采用特异性表达启动子,局部提高凝集素的浓度以提高抗虫效果(Wang等2005a)。另一方面,还可与其他来源的基因联合使用以扩大抗虫范围(Ramesh等2004;王伟等1999)。实践证明,采用上述方法基本上可以得到较好的抗虫效果。

参考文献

- 高莹,瞿礼嘉,陈章良(2000).植物凝集素的分子生物学研究.生物技术通报,(5):18~22
- 侯学文,吴伯良,曾仲奎,郭勇(1998).海芋凝集素的鉴定及性质研究.暨南大学学报,19(3):89~93
- 黄大昉,潘映红,张淑香,曹景萍,杨雪梅,张杰,尹蔚庄(1997).从掌叶半夏和半夏中发现对几种蚜虫有致死活性的蛋白.中国农业科学,30(2):94~96
- 李润植,高武军,季道藩,李彩霞(2000).朝鲜天南星凝集素的分离及抗棉蚜效应分析.棉花学报,12(1):54~56
- 梁辉,朱银峰,朱祯,孙东发,贾旭(2004).雪花莲凝集素基因转化小麦及转基因小麦抗蚜性的研究.遗传学报,31(2):189~194
- 刘召华,张振山,郭洪年,贾燕涛,郑光宇,田颖川(2005).两种凝集素基因在转基因烟草中表达的研究.遗传学报,32(7):758~763
- 潘科,侯学文,黄炳球(2004).海芋凝集素对豆蚜的抗生作用研究.华南农业大学学报,25(3):51~54
- 潘科,黄炳球,侯学文(2002).植物凝集素在病虫害防治中的研究进展.植物保护,28(4):42~46
- 王关林,刘彦泓,郭绍华,王宇,纪彦,方宏筠(2004).雪花莲凝集素基因转化菊花及转基因植株的抗蚜性研究.遗传学报,31(12):1434~1438
- 王伟,朱祯,高越峰,石春林,陈宛新,郭仲琛,李向辉(1999).双价抗虫基因陆地棉转化植株的获得.植物学报,41(4):384~388
- 王逸群,荆玉祥(2000).豆科植物凝集素及其对根瘤菌的识别作用.植物学通报,17(2):127~132
- 吴昌银,叶志斌,李汉霞,唐克轩(2000).雪花莲外源凝集素基因转化番茄.植物学报,42(7):719~723
- 赵强,张廷婷,崔德才(2005).植物来源抗虫基因的应用.生物技术通讯,16(4):456~459
- 周岩,田颖川,吴标,莽克强(1998).转雪花莲外源凝集素基因烟草对桃蚜的抑制作用.生物工程学报,14(1):13~19
- 周永刚,田颖川,莽克强(2001).苜蓿凝集素基因的克隆及在转基因烟草中抗蚜性研究.生物工程学报,17(1):34~39
- Bandyopadhyay S, Roy A, Das S (2001). Binding of garlic (*Allium sativum*) leaf lectin to the gut receptors of homopteran pests is correlated to its insecticidal activity. Plant Sci, 161 (5): 1025~1033
- Chang TJ, Chen L, Chen SB, Cai HY, Liu X, Xiao GF, Zhu Z (2003). Transformation of tobacco with genes encoding *Helianthus tuberosus* agglutinin (HTA) confers resistance to peach-potato aphid (*Myzus persicae*). Trans Res, 12 (5): 607~614
- Down RE, Ford L, Woodhouse SD, Raemaekers RJM, Leitch B, Gatehouse JA, Gatehouse AMR (2000). Snowdrop lectin (GNA) has no acute toxic effects on a beneficial insect predator, the 2-spot ladybird (*Adalia bipunctata* L.). J Insect Physiol, 46 (4): 379~391
- Dutta I, Majumder P, Saha P, Ray K, Das S (2005a). Constitutive and phloem specific expression of *Allium sativum* leaf agglutinin (ASAL) to engineer aphid (*Lipaphis erysimi*) resistance in transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*). Plant Sci, 169 (6): 996~1007
- Dutta I, Saha P, Majumder P, Sarkar A, Chakraborti D, Banerjee S, Das S (2005b). The efficacy of a novel insecticidal protein, *Allium sativum* leaf lectin (ASAL), against homopteran insect monitored in transgenic tobacco. Plant Biotechnol J, 3 (6): 601~611
- Gatehouse AMR, Davison GM, Stewart JN, Gatehouse LN, Kumar A, Geoghegan IE, Birch ANE, Gatehouse JA (1999). Concanavalin A inhibits development of tomato moth (*Lacanobia oleracea*) and peach-potato aphid (*Myzus persicae*) when expressed in transgenic potato plants. Mol Breeding, 5 (2): 153~165
- Guo HN, Jia YT, Zhou YG, Zhang ZS, Ou YQ, Jiang Y, Tian YC (2004). Effects of transgenic tobacco plants expressing *ACA* gene from *Amaranthus caudatus* on the population development of *Myzus persicae*. Acta Bot Sin, 46 (9): 1100~1105
- Kanrar S, Venkateswari J, Kirti PB, Chopra VL (2002). Transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*) with resistance to the mustard aphid (*Lipaphis erysimi* Kalt.). Plant Cell Rep, 20 (10): 976~981
- Melander M, Åhman I, Kammert I, Strömdahl AC (2003). Pea lectin expressed transgenically in oilseed rape reduces growth rate of pollen beetle larvae. Trans Res, 12 (5): 555~567
- Nagata Y, Burger MM (1974). Wheat germ agglutinin: molecular characteristics and specificity for sugar binding. J Biol Chem, 249 (10): 3116~3122
- Peumans WJ, Van Damme EJM (1995). Lectins as plant defense proteins. Plant Physiol, 109 (2): 347~352
- Powell KS, Gatehouse AMR, Hilder VA, Gatehouse AJ (1995). Antifeedant effects of plant lectins and an enzyme on the adult stage of the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. Entomol Exp Appl, 75 (1): 51~59
- Rahbé Y, Sauvion N, Febvay G, Peumans WJ, Gatehouse AMR (1995). Toxicity of lectins and processing of ingested proteins in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. Entomol Exp Appl, 76 (2): 143~155
- Ramesh S, Nagadhara D, Reddy VD, Rao KV (2004). Production of transgenic indica rice resistant to yellow stem borer and

- sap-sucking insects, using super-binary vectors of *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Sci, 166 (4): 1077~1085
- Ripoll C, Favery B, Lecomte P, Van Damme E, Peumans W, Abad P, Jouanin L (2003). Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Glanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes. Plant Sci, 164 (4): 517~523
- Saha P, Majumder P, Dutta I, Ray T, Roy SC, Das S (2006). Transgenic rice expressing *Allium sativum* leaf lectin with enhanced resistance against sap-sucking insect pests. Planta, 223 (6): 1329~1343
- Sauvion N, Charles H, Febvay G, Rahbé Y (2004). Effects of jackbean lectin (ConA) on the feeding behaviour and kinetics of intoxication of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. Entomol Exp Appl, 110 (1): 31~44
- Schaefer BC (1995). Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. Anal Biochem, 227 (2): 255~273
- Sharma HC, Ortiz R (2000). Transgenics, pest management, and the environment. Curr Sci, 79 (4): 421~437
- Smeets K, Van Damme EJM, Verhaert P, Barre A, Rouge P, Leuven FV, Peumans WJ (1997). Isolation, characterization and molecular cloning of the mannose-binding lectins from leaves and roots of garlic (*Allium sativum* L.). Plant Mol Biol, 33 (2): 223~234
- Tang KX, Tinjuangjun P, Xu YN, Sun XF, Gatehouse JA, Ronald PC, Qi HX, Lu XG, Christou P, Kohi A (1999). Particle-bombardment-mediated co-transformation of elite Chinese rice cultivars with genes conferring resistance to bacterial blight and sap-sucking insect pests. Planta, 208 (4): 552~563
- Tang KX, Zhao E, Sun X, Wan B, Qi H, Lu X (2001). Production of transgenic rice homozygous lines with enhanced resistance to the rice brown planthopper. Acta Biotechnol, 21 (2): 117~128
- Wang ZY, Sun XF, Wang F, Tang KX, Zhang JR (2005a). Enhanced resistance of snowdrop lectin (*Galanthus nivalis* L. agglutinin)-expressing maize to Asian corn borer (*Ostrinia furnacalis* Guenée). J Integrative Plant Biol, 47 (7): 873~880
- Wang ZY, Zhang KW, Sun XF, Tang KX, Zhang JR (2005b). Enhancement of resistance to aphids by introducing the snowdrop lectin gene *gna* into maize plants. J Biosci, 30 (5): 627~638
- Zhu YR, Wang J, Huang BQ, Hou XW (2006). Molecular cloning of a lectin cDNA from *Alocasia macrorrhiza* and prediction of its characteristics. J Plant Physiol Mol Biol, 32 (6): 634~642