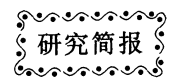


DOI: 10.3724/SP.J.1006.2012.01538



## 用基因枪法获得转异天南星基因 *aha* 抗蚜虫小麦

张彦<sup>1</sup> 喻修道<sup>1</sup> 唐克轩<sup>2</sup> 夏兰琴<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> 中国农业科学院作物科学研究所 / 农作物基因资源与遗传改良国家重大科学工程, 北京 100081; <sup>2</sup> 上海交通大学农业与生物学院植物生物技术研究中心, 上海 200240

**摘要:** 凝集素是一类具有特异糖结合活性的蛋白, 对蚜虫等害虫有很强的抗杀作用。利用异天南星凝集素基因 *aha* (*Arisaema heterophyllum* agglutinin) 以及水稻 Rubisco 小亚基启动子, 构建了 *aha* 基因植物绿色组织特异性表达载体, 并采用基因枪转化方法, 与携带 *bar* 基因的 pAHC20 载体共转化到小麦品种科农 199 中。经过愈伤诱导、再生和筛选以及 PCR 鉴定, 获得 *aha* 转基因植株 42 株, 平均转化效率为 2.41%。对转 *aha* 基因植株后代 PCR 鉴定表明, T<sub>1</sub> 代转基因植株的分离比例基本符合孟德尔遗传规律。利用室内多目标综合判别法评定抗蚜虫特性, 8 个 T<sub>1</sub> 代转基因株系中有高抗材料 1 份, 低抗材料 3 份, 占参试比例 44.4%。本研究为获得抗蚜虫转基因小麦新材料奠定了基础。

**关键词:** 小麦; 植物凝集素; Rubisco 小亚基启动子; 基因枪转化; 共转化; 抗虫性

## Generation of Aphid Resistant Transgenic Wheat with *aha* from *Arisaema heterophyllum* by Particle Bombardment

ZHANG Yan<sup>1</sup>, YU Xiu-Dao<sup>1</sup>, TANG Ke-Xuan<sup>2</sup>, and XIA Lan-Qin<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement / Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; <sup>2</sup> Plant Biotechnology Research Center, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

**Abstract:** Agglutinin is a class of mannose-binding protein, which has detrimental effect on aphids and other pests. In this study, the vector harboring *aha* cloned from *Arisaema heterophyllum* directed by rice Rubisco small subunit promoter (*rbcS*) was constructed. By co-transformed with pAHC20 that harbors *bar* selection gene, the *aha* gene was transferred into wheat variety Kenong 199 via bombardment. After induction, regeneration, two rounds of selection and with the conformation by PCR analysis, 42 transgenic plants with foreign *aha* gene were obtained, average co-transformation efficiency of 2.41%. According to PCR analysis, the segregation of the T<sub>1</sub> plants was basically consistent with Mendel's separation. Aphid resistance bioassay was carried out using eight randomly selected transgenic lines by multiple discrimination method. One high-resistant and three low-resistant transgenic lines were identified, accounting for 44.4% of the tested materials. This study has laid a basis for application of *aha* gene in development of aphid resistant transgenic wheat.

**Keywords:** Wheat; Agglutinin; *rbcS* promoter; Particle bombardment; Co-transformation; Insect resistance

蚜虫是危害小麦生产的主要害虫之一, 据统计, 我国每年小麦蚜虫危害面积可达 1 667 万公顷, 造成减产 15%~30%, 严重时高达 50%。近年来, 由于全球气候变暖、耕作制度变化等因素使麦蚜的繁殖能力和适应性显著增强, 其危害日趋严重<sup>[1]</sup>。目前, 防治麦蚜以喷洒农药为主, 但大量使用农药, 不仅对人畜有害, 而且造成严重环境污染。培育抗虫小麦品种是防止蚜虫危害的最有效途径, 但由于现有小麦种质资源中缺乏有效的抗蚜基因, 抗性

机制不明确, 常规小麦抗虫育种难以奏效。因此, 利用转基因技术培育抗蚜小麦新种质, 对于保障我国粮食安全和环境安全具有重要意义。

凝集素是一类具有特异糖结合活性的蛋白, 可与昆虫消化道上皮细胞的糖蛋白结合, 降低膜透性, 影响对营养物质的吸收。此外, 还可在昆虫消化道内诱发病变, 促进消化道内的细菌繁殖, 影响害虫生长发育, 进而达到抗虫效果。研究发现, 自石蒜科植物雪花莲中分离得到的雪

本研究由国家转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08002-001)资助。

\* 通讯作者(Corresponding author): 夏兰琴, E-mail: xialq@mail.caas.net.cn, Tel: 010-82105804

第一作者联系方式: E-mail: qauzhangyan@yahoo.com.cn

Received(收稿日期): 2011-12-21; Accepted(接受日期): 2012-04-15; Published online(网络出版日期): 2012-05-11.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20120511.1817.031.html>

花莲凝集素(*Galanthus nivalis* agglutinin, GNA)对同翅目类害虫(如水稻褐飞虱、叶蝉)以及蚜虫(如桃蚜、麦蚜)具有明显的毒杀作用。目前, *gna* 基因已被成功导入烟草<sup>[2]</sup>、马铃薯<sup>[3]</sup>、水稻<sup>[4]</sup>和小麦<sup>[5]</sup>等作物, 转基因植株对蚜虫和飞虱表现出明显抗性。Stoger 等<sup>[6]</sup>将韧皮部特异启动子调控下的 *gna* 导入小麦, 发现转基因株系对麦长管蚜有明显抗性。徐琼芳等<sup>[7]</sup>利用人工合成 *sgna* 基因获得的转基因小麦, 对蚜虫繁殖具有显著的抑制作用。天南星科半夏凝集素(*Pinellia ternate* agglutinin, PTA)粗提取液对刺吸式同翅目害虫棉蚜有显著致死作用, 饲喂棉蚜 48 h 后致死率为 40%, 84 h 后为 70%, 且产蚜率也明显降低<sup>[8]</sup>。生测实验表明, 转 *pta* 基因小麦株系可以降低蚜虫和粘虫的存活率、变态发育率和整体的繁殖力<sup>[9]</sup>。蛋白水平序列比对表明, 天南星科异天南星凝集素(AHA)与石蒜科雪花莲凝集素(GNA)的相似性为 37%, 与天南星科半夏凝集素(PTA)的相似性为 83%。虽然在蛋白结构上 AHA 与 GNA 不同, 但功能域分析显示, AHA 存在的 3 个甘露糖结合位点中前 2 个位点与 GNA 有很高的同源性, 第 3 个糖结合位点与 GNA 相比存在差异。可能是由于物种的差异, GNA 属同源四聚体, 而 AHA 与 PTA 属异源四聚体。但 AHA 作用机制与 GNA、PTA 等其他凝集素相似<sup>[10]</sup>, 研究表明转 *aha* 基因烟草可以显著降低桃蚜的生长速度, 进而提高烟草的抗蚜特性<sup>[11]</sup>。AHA 在小麦中的作用特征尚无研究和报道。因此, 鉴于 AHA 对蚜虫的毒杀作用, 通过在小麦绿色组织中特异高效表达 *aha*, 有望获得相对安全的抗蚜虫转基因小麦新材料。

如何在植物绿色组织中特异、高效表达外源基因是近年来植物抗病虫基因工程研究的热点之一。Rubisco 由叶绿体基因组编码的大亚基 *rbcL* 和核基因编码的小亚基 *rbcS* 组成, 是植物叶片中含量最丰富的蛋白, 约占可溶性总蛋白的 50%。刘巧泉等<sup>[12]</sup>和黄海群<sup>[13]</sup>等分别对水稻 *rbcS* 启动子的组织特异性分析表明, *rbcS* 启动子可驱动 *gus* 基因在转基因植株的叶片、叶鞘及颖壳等绿色组织中高效表达, 在种子、茎、根等器官中不表达或表达很弱, 表现出明显的组织特异性。刘巧泉等<sup>[12]</sup>通过光诱导 *rbcS-GUS* 融合基因在转基因水稻中表达, 发现光诱导处理可明显提高 *rbcS* 启动子指导外源基因在转基因水稻植株中的表达量。将水稻 *rbcS* 启动子与其他一些可在转基因水稻中组成型表达的启动子, 如玉米泛素基因 *Ubi* 启动子和

双 *CaMV35S* 启动子, 在转基因水稻叶片中的表达水平进行比较, 结果水稻 *rbcS* 启动子启动的外源基因的表达量高于后两者。Outchkourov 等<sup>[14]</sup>研究发现, 菊花 *rbcS* 启动子在转基因番茄中能把外源基因的表达量提高到可溶蛋白的 10%, 可在植物绿色组织中特异性高量表达外源基因。此外, 一些重要的表达调控元件也在转基因植物中外源基因的表达上起重要作用, 如烟草花叶病毒(TMV)Ω 序列作为翻译增强子在双子叶植物原生体中可提高 *gus* 基因的表达量 3~17 倍<sup>[15]</sup>; Kozak 序列是 ATG 附近的特定保守序列, 能促进翻译起始效率<sup>[16]</sup>; 植物细胞中 mRNA 稳定性与多聚腺苷酸化序列 poly(A) 的加入和长度有关, 将外源基因加入 poly(A) 尾巴, 会避免被核酸外切酶降解, 进而增加其稳定性<sup>[17]</sup>。

本研究采用水稻 *rbcS* 小亚基启动子, 利用本实验室现存的含有 Ω、Kozak、Poly(A) 等调控元件的质粒 pG4AB 为基础载体, 构建意在小麦绿色组织中高量、特异表达 *aha* 的小麦表达载体。以华北地区推广品种 KN199 为受体材料, 通过基因枪共转化方法转化小麦, 获得抗蚜虫转基因小麦植株, 并对其后代进行了初步的抗虫性分析。

1 材料与方法

1.1 材料

水稻品种日本晴(*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*)、普通小麦(*Triticum aestivum* L.)品种科农 199 由本实验室保存。含有 *bar* 基因的共转化载体 pAHC20 由中国农业科学院作物科学研究所徐惠君研究员提供; 含有 Ω、Kozak、Poly(A) 等调控元件的 pG4AB 载体由中国农业科学院生物技术研究所郭三堆研究员惠赠并由本实验室保存; 含有目的基因 *aha* 的载体 PHB-*aha* 由上海交通大学唐克轩教授实验室保存。本试验所用引物(表 1)均由北京华大基因公司合成。

1.2 植物表达载体的构建

将 pG4AB 的 35S 启动子置换为可驱动目的基因在绿色组织中特异性表达的水稻 Rubisco 小亚基启动子后, 获得 R-pG4AB 空载体(图 1)。具体方法如下: 用 CTAB 法提取水稻基因组 DNA, 以水稻基因组 DNA 为模板, 利用引物对 *rbcSP1* F/*rbcSP1* R (表 1) 扩增水稻 Rubisco 小亚基启动子。测序正确后, 再利用引物 *rbcSP2* F/*rbcSP2* R (表 1), 扩增带酶切位点 *Hind* III 的片段。将回收纯化的 PCR 产

表 1 本研究所用引物  
Table 1 Primer sets used in this study

引物 Primer set	序列 Sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	扩增产物 Product size (bp)
<i>rbcSP</i> 1	F: TCGGGTCGAGGTGAACCTTA R: AGATGCACTGCTCTGCACAC	63	1828
<i>rbcSP</i> 2	F: GGGaagcttTCGGGTCGAGGTGAACCTTA ( <i>Hind</i> III) R: AGATGCACTGCTCTGCACAC	61	1837
A	F: CCCCatgcatATGGCCTCCAAGCTCCTCCTCTT ( <i>Nsi</i> I) R: GCGCgtcgacCTACGCGACAATGGGGCGCT ( <i>Sal</i> I)	66	798
ajc	F: ATCCATCGTCTTTAGGAGCGGC R: GTAGTCACCCTGCTTGGAACCG	60	451



2,4-D (0.1 mg L<sup>-1</sup>)+PPT (2.5 mg L<sup>-1</sup>); 第 2 轮再生筛选于 22℃ 16 h 光照(50 μmol s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>)条件下培养 3 周, 培养基为 1/2 MS+玉米素(5 mg L<sup>-1</sup>)+2,4-D (0.1 mg L<sup>-1</sup>)+PPT (4.0 mg L<sup>-1</sup>); 第 3 轮再生筛选于 22℃ 16 h 光照(50 μmol s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>)条件下培养 3 周, 培养基为 1/2 MS+玉米素(5 mg L<sup>-1</sup>)+2,4-D (0.1 mg L<sup>-1</sup>)+PPT (4.0 mg L<sup>-1</sup>)。然后利用再生培养基 1/2 MS 壮苗培养 1~3 周后, 移栽入土。

1.4 PCR 检测

提取转化再生植株及非转化对照植株的基因组 DNA, 根据 *aha* 序列设计检测引物 ajc F 和 ajc R (表 1), 进行 PCR 鉴定。PCR 扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离, 以凝胶成像系统照相和分析。

1.5 转基因后代的初步遗传分析

选取 2 个 *aha* 基因 T<sub>0</sub> 代转基因株系, 提取 T<sub>1</sub> 种子 DNA, 进行 PCR 检测和初步遗传分析。不同处理的株系的显著性差异由 SAS 软件的 PROC GLM 程序进行适合性方差分析。所有的均值都按此模型修正。

1.6 转基因植株蚜虫抗性鉴定

选取 7 份转基因材料及 1 份对照材料, 每份材料包含 5 株, 共 40 株。由中国农业科学院植物保护研究所植保信息技术研究组采用室内多目标综合法鉴定蚜虫抗性。麦长管蚜 [*Sitobion avenae* (Fabricius)] 在 18~20℃、16 h 光照/8 h 黑暗、相对湿度(60±10)%条件下由同一实验室饲养。

选取长势一致的小麦叶片, 用正立方体生态盒(2.5 cm × 2.5 cm × 2.5 cm)将其夹住, 接种 24 h 内的初产若蚜, 每株材料重复 2~10 次, 每天观察 2 次记载其生长发育情况, 随时移去蚜蛻、仔蚜和死蚜, 直到成蚜死亡为止。根据调查结果计算麦蚜若虫的发育历期、产仔量和世代历期。由 SAS 软件 PROC TTEXT 程序的 *t* 检验分析不同株系的差异显著性。根据调查结果, 将发育历期(*X*<sub>1</sub>)、世代历期(*X*<sub>2</sub>)和产仔量(*X*<sub>3</sub>)极差标准化, 其平均值为抗蚜指标 (*R*), 作为抗性定级的依据。

$$R = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{X_i - X_{i, \min}}{X_{i, \max} - X_{i, \min}}}{n}$$

2 结果与分析

2.1 植物表达载体的构建与鉴定

以日本晴基因组 DNA 为模板, 以 *rbcSP1 F* 和 *rbcSP2 R* 为引物(表 1), 扩增出水稻 Rubisco 小亚基 *rbcS* 启动子的片段(1 828 bp), 测序结果与网上提交序列一致(GenBank 登录号为 109644667)。利用 *Hind* III 和 *Pst* I 对重组质粒

*R*-pG4AB 进行酶切检测鉴定, 酶切片段大小为 4.9 kb 和 1.8 kb, 确定载体构建正确。随后将 *aha* 基因与 *R*-pG4AB 载体连接, 构建转基因表达载体 *R*-pG4AB-*aha*; 利用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 对重组质粒 *R*-pG4AB-*aha* 进行酶切检测鉴定, 酶切片段为 2.5 kb 和 3.1 kb, 确定载体构建正确。

2.2 基因枪转化及转基因植株的获得

质粒 *R*-pG4AB-*aha* 与含有 *bar* 基因的 pAHC20 金粉包被后, 共转化小麦幼胚、诱导愈伤组织, 愈伤诱导率为 99.33%~100.00%; 第 1 轮再生筛选效率为 93.38%~99.33%; 再生组织经第 2 轮再生筛选 21 d, 植株生长状况良好, 第 2 轮再生筛选效率为 42.88%~59.67%; 抗性再生幼苗经第 3 轮再生筛选培养基筛选 21 d, 其筛选效率为 5.25%~12.83%。将抗性植株转到再生培养基上壮根, 7 d 后转入花盆。炼苗 1 周后, 获得生长良好的植株 323 株。利用特异性引物 PCR 检测获得 *aha* 阳性植株 42 株(图 2), 平均转化效率(2.41±2.00)%。

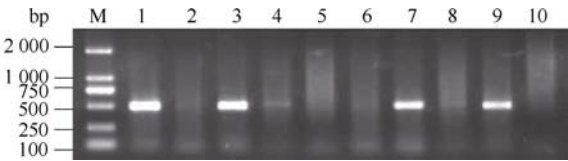


图 2 T<sub>0</sub> 代部分转 *aha* 基因小麦株系的 PCR 检测  
Fig. 2 PCR analysis of partial *aha* transgenic wheat lines in T<sub>0</sub> generation  
M: DL 2000; 1: *R*-pG4AB-*aha* 质粒; 2: 未转基因对照;  
3, 7, 9: 阳性植株; 4, 5, 6, 8, 10: 非转基因植株。  
M: DL 2000; 1: *R*-pG4AB-*aha* plasmid; 2: wild type (control); 3, 7, 9: transgenic lines; 4, 5, 6, 8, and 10: non-transgenic lines.

2.3 转基因小麦后代遗传分析

对 2 个 *aha* T<sub>1</sub> 代转基因株系的 PCR 检测表明, 阳性与阴性植株分离比均符合孟德尔遗传比例(表 2), 推测外源基因插入位点分别为 2 个和 3 个。

2.4 转基因小麦后代抗性鉴定结果

与对照相比, 8 份转基因小麦材料对麦长管蚜表现出不同程度的抗性(表 3), 其中转 *aha* 基因小麦株系 BC003-37-(41)的抗蚜虫指标为 0.04, 达到高抗水平; 转基因株系 BC003-4-(31)、BC003-4-(65)和 BC003-37-(55)的抗虫指标在 0.36~0.42 之间, 为低抗水平。抗性材料占参试材料的 44.4%, 没有发现免疫材料。此外, 麦长管蚜的生长参数存在明显差异, 与对照相比, 转基因小麦显著影响蚜虫的繁殖力(*P*<0.01), 但对若蚜历期和世代历期影响不大(图 3), 表明转基因小麦中 AHA 的表达导致蚜虫的繁殖力降低, 从而降低了蚜虫群体的数量, 进而表现为抗蚜特性。

表 2 T<sub>1</sub> 转基因植株 *aha* 基因的分离  
Table 2 Segregation analyses of T<sub>1</sub> progenies of *aha* transgenic wheat lines

T <sub>0</sub> 代植株 T <sub>0</sub> plant	T <sub>1</sub> 代株数 No. of T <sub>1</sub> plants	PCR 阳性 PCR positive plants	PCR 阴性 PCR negative plants	预计分离比 Expected ratio	χ <sup>2</sup> (df=1)	<i>P</i>
BC003-37	101	92	9	15:1	1.2205	0.2693
BC003-43	72	69	3	63:1	3.1746	0.0748

表 3 部分 T<sub>1</sub> 转基因小麦材料抗蚜特性鉴定  
Table 3 Aphid bioassay of eight T<sub>1</sub> transgenic wheat lines

T <sub>1</sub> 代植株 T <sub>1</sub> plant	若蚜历期 Instar developmental duration	世代历期 Generation duration	产仔量 Fecundity	抗蚜指标(R) Indicator of aphid resistance (R)	指标范围 Range of indicator	抗性 Resistance
BC003-37(41)	4.00	11.50	2.00	0.04	0.01–0.15	HR
BC003-4(31)	5.50	16.00	1.25	0.36	0.31–0.45	LR
BS003-4(65)	4.50	16.50	4.50	0.41	0.31–0.45	LR
BC003-37(55)	6.50	14.80	1.16	0.42	0.31–0.45	LR
BC003-37(51)	6.00	15.00	4.00	0.49	0.46–0.60	LS
BC003-37(46)	7.00	15.00	2.00	0.52	0.46–0.60	LS
BS003-4(60)	6.50	19.00	1.00	0.58	0.46–0.60	LS
BC003-4(36)	5.00	19.90	4.50	0.60	0.46–0.60	LS
科农 199						
Kenong 199 (CK)	5.73	17.27	8.67	0.75	0.61–0.75	MS

HR: 高抗(0.01<R≤0.15); LR: 抵抗(0.31<R≤0.45); LS: 低感(0.46<R≤0.60); MS: 中感(0.61<R≤0.75)。未发现免疫(I, R=0)、中抗(MR, 0.16<R≤0.30)和高感(HS, 0.76<R≤1.00)材料。  
HR: high resistant (0.01<R≤0.15); LR: low resistant (0.31<R≤0.45); LS: low susceptible (0.46<R≤0.60); MS: moderate susceptible (0.61<R≤0.75). No immune (I, R=0), moderate resistant (MR, 0.16<R≤0.30) and high susceptible (HS, 0.76<R≤1.00) materials.

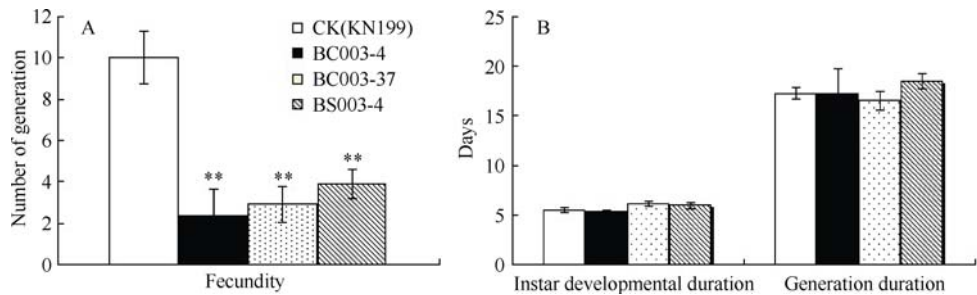


图 3 T<sub>1</sub> 代转 *aha* 基因小麦的抗蚜虫鉴定

Fig. 3 Aphid bioassay of T<sub>1</sub> transgenic wheat lines

A: 不同转基因株系对蚜虫繁殖力的影响; B: 不同转基因株系对蚜虫若蚜历期和世代历期的影响。误差线代表标准误。

\*\*表示经 *t* 测验转基因株系与对照差异极显著( $P<0.01$ )。

A: Effects of different transgenic lines on fecundity of aphids. B: Effects of different transgenic lines on instar developmental duration and generation duration of aphids. Error bar represents SE. \*\* indicates significant difference between transgenic lines and the control at  $P<0.01$  according to *t*-test.

3 讨论

在植物转基因研究中, 选用特异性表达启动子是实现目标基因定点、定时表达, 培育安全转基因作物的重要途径。通过调控目标基因在特定时间或目标组织中表达, 不仅可减少外源基因在非目标组织中表达所造成的能量浪费, 而且可减少因在籽粒等食用组织中表达外源基因而引起的公众对转基因食品安全性的担忧<sup>[11]</sup>。本研究构建了含有植物绿色组织特异表达的水稻 *rbcS* 小亚基启动子以及促进外源基因高效表达的 Ω、Kozak、Poly(A)等调控元件的转基因小麦载体, 通过基因枪共转化将植物凝集素基因 *aha* 转入小麦, 目前已获得 T<sub>2</sub> 转基因小麦种子, 通过对后代性状的深入考察, 可为获得相对安全、高抗蚜虫转基因小麦新材料奠定基础。本研究所采用的载体构建和共转化策略, 不仅可应用于在小麦绿色组织中高量、特异表达 *aha* 基因, 亦可应用于其他抗病虫小麦基因工程改

良研究。

鉴于植物凝集素对具有刺吸式口器的同翅目害虫, 如蚜虫等有明显的抗性, 被广泛应用于抗虫转基因工程研究。转 *gna* 的小麦植株中目的基因蛋白表达量如果高于总可溶蛋白 0.04%, 可以显著降低麦长管蚜的繁殖力, 但未降低存活率<sup>[6]</sup>。转入人工合成 *sgna* 基因的小麦不仅显著降低蚜虫的繁殖力而且减轻由其传播的大麦黄矮病对小麦造成的影响<sup>[5]</sup>。而 Yu 等<sup>[9]</sup>获得的 2 个转 *pta* 小麦株系也显示不仅降低蚜虫的繁殖力, 分别为对照的 28%和 43%, 而且抑制蚜虫的发育和存活。本研究获得的转凝集素基因 T<sub>1</sub> 代小麦株系的抗蚜虫鉴定结果表明, 其抗虫性与受体材料科农 199 相比, 有不同程度的增强。从图 3-A 和表 3 可以看出, 相对于科农 199, 转基因株系上的麦长管蚜的繁殖率比对照明显降低, 平均降低 74.1%, 最高可降低 88.5%。而对若蚜历期(降低 1.8%)和世代历期(降低 7.6%)的影响不明显(图 3-B)。部分转基因植株的抗虫能力非常



强, 对蚜虫有明显的抑制效果, 最显著的是转 *aha* 基因的 BC003-37 小麦株系, 有一个后代株系的抗蚜性明显增强, 而且对蚜虫的若蚜历期也有一定影响。此外, 我们还发现, 同为 BC003-37 转基因后代, BC003-37(41)表现为高抗、BC003-37(55)表现为低抗, 但 BC003-37(51)和 BC003-37(46)却表现为低感(表 3)。徐琼芳等<sup>[7]</sup>对转 *sgna* 基因小麦后代的遗传分析表明, *sgna* 基因的遗传在单株和单穗间都存在很大差异, 原因是株系不稳定, 后代有分离, 抗蚜虫植株间变异系数也较大。在本研究中也存在类似情况, 不同株系间抗性差异较大, 同一株系的不同后代株系之间的抗性也存在一定差异(表 3), 推测是由于小麦是六倍体, 被鉴定植株是  $T_1$  代, 且后代遗传分析表明, *aha* 基因插入位点初步判定为 3 个和 2 个, 因而造成了各后代株系的纯合度不同, 基因表达量存在差异, 最终导致抗性存在差异。因此, 对转基因小麦材料的抗蚜虫特性的进一步甄别, 还应在转基因材料纯合后, 结合田间抗蚜效果鉴定。

本研究成功获得了转基因抗蚜虫小麦材料。研究结果将为探索异南星凝集素基因 *aha* 在重要农作物抗蚜虫转基因工程中的应用提供参考, 同时为创制抗蚜小麦新种质奠定基础。

## References

- [1] Awmack C S, Harrington R. Elevated CO<sub>2</sub> affects the interactions between aphid pests and host plant flowering. *Agric For Entomol*, 2000, 2: 57–61
- [2] Hilder V A, Powell K S, Gatehouse A M R, Gatehouse J A, Gatehouse L N, Shi Y, Hamilton W D O, Merryweather A, Newell C A, Timans J C, Peumans W J, Damme E V, Boulter D. Expression of snowdrop lectin in transgenic tobacco plants results in added protection against aphids. *Transgenic Res*, 1995, 4: 18–25
- [3] Gatehouse A M R, Down R E, Powell K S, Sauvion N, Rahbe Y, Newell C A, Merryweather A, Hamilton W D O, Gatehouse J A. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the peach-potato aphid *Myzus persicae*. *Entomol Exp Appl*, 1996, 79: 295–307
- [4] Tang K X, Tinjuangjun P, Xu Y N, Sun X F, Gatehouse J A, Ronald P C, Qi H X, Lu X G, Christou P, Kohli A. Particle bombardment mediated co-transformation of elite Chinese rice cultivars with genes conferring resistance to bacterial blight and sap-sucking insect pests. *Planta*, 1999, 208: 552–563
- [5] Xu Q-F(徐琼芳), Li L-C(李连城), Chen X(陈孝), Ma Y-Z(马有志), Ye X-G(叶兴国), Zhang Z-Y(张增艳), Xu H-J(徐惠君), Xin Z-Y(辛志勇). Study on the obtaining of transgenic wheats with GNA alien gene by biolistic particle. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2001, 34(1): 5–8 (in Chinese with English abstract)
- [6] Stoger E, Williams S, Christou P, Down R E, Gatehouse J A. Expression of the insecticidal lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin: GNA) in transgenic wheat plants: effects on predation by the grain aphid *Sitobion avenae*. *Mol Breed*, 1999, 5: 65–73
- [7] Xu Q-F(徐琼芳), Tian F(田芳), Chen X(陈孝), Hou W-S(侯文胜), Li L-C(李连城), Du L-P(杜丽璞), Xu H-J(徐惠君), Xin Z-Y(辛志勇). Inheritance of *sgna* gene and insect-resistant activity in transgenic wheat. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2004, 30(5): 475–480 (in Chinese with English abstract)
- [8] Yao J H, Pang Y Z, Qi H X, Wan B L, Zhao X Y, Kong W W, Sun X F, Tang K X. Transgenic tobacco expressing *Pinellia ternate* agglutinin confers enhanced resistance to aphids. *Transgenic Res*, 2003, 12: 715–722
- [9] Yu Y, Wei Z M. Increased oriental armyworm and aphid resistance in transgenic wheat stably expressing *Bacillus thuringiensis* (Bt) endotoxin and *Pinellia ternate* agglutinin (PTA). *Plant Cell Tissue Organ Cul*, 2008, 94: 33–44
- [10] Zhao X Y, Yao J H, Liao Z H, Zhang H Y, Chen F, Wang L, Lu Y Q, Sun X F, Yu S Q, Tang K X. Molecular cloning of a novel mannose-binding lectin gene from *Arisaema heterophyllum*. *Plant Sci*, 2003, 165: 55–60
- [11] Yao J H, Zhao X Y, Qi H X, Wan B L, Chen F, Sun X F, Yu S Q, Tang K X. Transgenic tobacco expressing an *Arisaema heterophyllum* agglutinin gene displays enhanced resistance to aphids. *Can J Plant Sci*, 2004, 84: 785–790
- [12] Liu Q-Q(刘巧泉), Yu H-X(于恒秀), Zhang W-J(张文娟), Wang H-M(王红梅), Gu M-H(顾铭洪). Specific expression of the foreign gene regulated by the rice *rbcS* promoter in transgenic rice. *J Plant Physiol Mol Biol* (植物生理与分子生物学学报), 2005, 31(3): 247–253 (in Chinese with English abstract)
- [13] Huang H-Q(黄海群), Lin Y-J(林拥军). Cloning and functional analysis of the rice *rbcS* gene promoter. *J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报), 2007, 15(3): 451–458 (in Chinese with English abstract)
- [14] Outchkourov N S, Peters J, Rademakers W, Jongsma M A. The promoter–terminator of chrysanthemum *rbcS1* directs very high expression levels in plants. *Planta*, 2003, 216: 1003–1012
- [15] Qin H-M(秦红敏), Guo H-N(郭洪年), Jia Y-T(贾燕涛), Li L-H(李利红), Tian Y-C(田颖川). The effect of TMV-RNA untranslation region on the expression lever of foreign gene in entire plant. *Chin Sci Bull* (科学通报), 2000, 45(6): 617–622 (in Chinese)
- [16] Kozak M. Compilation and analysis of sequences upstream from translational site in eukaryotic mRNAs. *Nucl Acid Res*, 1984, 12: 857–872
- [17] Mao L-Q(毛立群), Guo S-D(郭三堆). Relationship between  $\Omega$  as well as the length of 3' poly(dA) and efficiency of gene expression. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1998, 40(12): 1–3 (in Chinese with English abstract)
- [18] Rasco-Gaunt S, Barcelo P. Immature inflorescence culture of cereals: a highly responsive system for regeneration and transformation. In: Hall R D ed. *Plant Cell Culture Protocols*. Totowa NJ: Humana Press, 1999. pp 71–81