

## 围食膜: 害虫生物防治的潜在靶标

吉洪湖, 袁哲明\*

(湖南农业大学生物安全科技学院, 长沙 410128)

**摘要:** 围食膜是昆虫中肠细胞分泌的一层特有的非细胞结构, 由蛋白质、粘多糖和几丁质组成, 是昆虫中肠细胞抵御随食物摄入的病原微生物入侵的第一道天然屏障。昆虫病毒增效蛋白、几丁质酶、荧光增白剂和外源凝集素等生物防治促进因子通过与围食膜上特异位点的结合, 可破坏围食膜结构, 改变其通透性, 促进病原微生物对害虫的感染。该文综述了与昆虫围食膜密切相关的生防促进因子的增效活性及其作用机理, 阐明了以围食膜为害虫生物防治靶标的应用前景。

**关键词:** 围食膜; 靶标; 生防促进因子; 害虫生物防治

中图分类号: Q969 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2005)06-0968-07

**Peritrophic membrane: a potential target for biocontrol of pest insects**

Ji Hong-Hu, YUAN Zhe-Ming\* (College of Bio-Safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**Abstract:** Peritrophic membrane (PM), composed of proteins, glycosaminoglycans and chitins, is an acellular structure secreted by midgut cells and lines along digestive tract in most insects. It is the first barrier and plays an important role in protecting the gut epithelium from infection of pathogens. Biocontrol-promoting factors, such as baculovirus enhancin, chitinase, calcofluor and agglutinin, can destroy PM's structure, vary its permeability and facilitate infection of pathogens to pest insects by binding with PM components specifically. In the current paper, enhancing activity and mechanism of each biocontrol-promoting factor were summarized and opportunities for the development of new midgut targeting strategies for control of pest insects were prospected.

**Key words:** Peritrophic membrane; target site; biocontrol-promoting factor; biocontrol of pest insects

昆虫病原微生物杀虫剂因其与环境的相容性而极具发展潜力, 然而与化学杀虫剂相比, 微生物杀虫剂杀虫速度慢、杀虫谱窄, 限制了其在大田的广泛应用。微生物农药增效因子因而成为我国虫害基础研究的关键科学问题之一(李典谟等, 1999)。围食膜(peritrophic membrane, PM)是昆虫中肠与外环境直接接触的区域, 是中肠细胞抵御病原微生物入侵的第一道天然屏障(Tellam, 1996; Tellam and Eisemann, 2000; Bolognesi and Ribeiro, 2001; 谢超等, 2002)。多种生物防治促进因子如昆虫病毒增效蛋白、几丁质酶、荧光增白剂和外源凝集素等通过与围食膜上特异位点的结合, 可破坏围食膜结构, 促进病原微生物对害虫的感染(郭慧芳等, 2003; 朱蓉等, 2003)。本文综述与昆虫围食膜密切相关的生防促进因子的增效活性及其作用机理, 阐明了以围食膜为害虫生物防治靶标的应用前景。

**1 围食膜的结构与组成**

围食膜是由昆虫中肠细胞分泌的一层厚薄均匀的长管状非细胞膜状结构, 主要由蛋白质、粘多糖和几丁质组成, 从中肠前端一直延伸到后肠(相静波等, 2004)。根据其成因分为 I 型围食膜和 II 型围食膜, 前者为多层管状膜, 由中肠细胞分泌形成; 后者呈连续的套筒管状, 是中肠前端器官贲门中高度特化的细胞连续分泌产生; II 型围食膜较 I 型更具结构性(Tellam, 1996; Tellam *et al.*, 1999)。

围食膜中蛋白质的含量为 20% ~ 55%, 根据其提取的难易程度分为可溶于生理盐水蛋白、可溶于较弱表面活性剂蛋白、可溶于强变性剂蛋白和强变性剂亦不可抽提蛋白 4 类, 其中可溶于强变性剂蛋白特称为围食膜因子(peritrophin X Tellam *et al.*,

基金项目: 国家自然科学基金项目(30100122, 30570351)

作者简介: 吉洪湖, 男, 1981 年 5 月生, 湖南长沙人, 硕士, 研究方向为昆虫生理生化, E-mail: xiaoji0517@hunau.net

\* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: zhmyuan@sina.com

收稿日期 Received: 2005-01-12; 接受日期 Accepted: 2005-05-12

1999)。SDS-PAGE 分析表明,围食膜中所含蛋白质种类较多,I型围食膜中约20~40种,II型围食膜中约40种(Lehane *et al.*, 1996; Tellam *et al.*, 1999)。氨基酸序列分析表明,围食膜因子由信号序列和数量不等的相似结构域组成。绿蝇 *Lucilia cuprina* 的 peritrophin-44 和 peritrophin-48 含有2个潜在的N-糖基化位点,一个信号序列和5个连续的 peritrophin-A 区域,每个结构域长约60~70个氨基酸,且含有6个保守的 Cys,6个 Cys 形成3个二硫键,在 Cys1-Cys2、Cys2-Cys3 和 Cys4-Cys5 之间还有3个保守的疏水芳香族氨基酸;peritrophin-95 除含5个 peritrophin-A 区域外,还有1个富含 Pro/Thr 的类粘蛋白结构域,并具5个N-糖基化位点和多个O-糖基化位点;peritrophin-30 的信号序列后连接2个 peritrophin-B 区域(每个区域含8个 Cys),并含1个潜在的N-糖基化位点;peritrophin-55 有1个 peritrophin-B 区域和1个富含 Pro/Thr 类粘蛋白结构域,具1个N-糖基化位点和O-糖基化位点(Elvin and Vuocolo, 1996; Tellam, 1996; Casu *et al.*, 1997; Tellam *et al.*, 1999)。冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 的围食膜蛋白 Ag-Aper1 由信号序列和2个富含 Pro 的 peritrophin-A 区域组成(Shen and Marcelo, 1998)。蛆症金蝇 *Chrysomya bezziana* 幼虫的 peritrophin-15 由信号序列和1个 peritrophin-C 区域组成,无潜在的糖基化位点,C区含6个 Cys;peritrophin-42 在信号序列和C区间还包括一段含4个 Cys 的序列,具1个潜在的N-糖基化位点(Eisemann *et al.*, 2001; Wijffels and Eisemann, 2001)。

围食膜中糖的含量因虫种和虫龄差异较大,大部分的糖与蛋白质结合形成糖蛋白或蛋白多糖(Eisemann *et al.*, 1994)。粘蛋白的多聚糖侧链形成高度伸展缠绕结构,亲水带电荷的糖基及硫酸根通过吸引渗透性好的  $Ca^{2+}$  可吸收大量水分;水溶性粘蛋白具有较强的抗挤压能力,能增强围食膜的牢固性。粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* I型围食膜上的肠粘蛋白(insect intestinal mucin, IIM)IIM14 和 IIM22 高度糖基化,其氨基酸序列与人类肠粘蛋白 MUC2 高度同源(Wang and Granados, 1998)。从该虫围食膜上分离的2种非粘蛋白 CBP1 和 CBP2 各具12和10个串联的几丁质结合域(Wang and Granados, 2004)。糖蛋白和蛋白多糖增加了围食膜屏障的致密性、坚韧性和半渗透性,可能与决定围食膜孔径大小有关(Wang and Granados, 1998)。

昆虫围食膜中几丁质含量较低,约占围食膜总量的4%~20%,是N-乙酰-D-葡萄糖胺(GlcNAc)以 $\beta$

(1A)糖苷键聚合形成的大型线性同聚体,由 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 3种结晶状态以蜂巢式、随机交错或正交方式组织排列形成几丁质纤维(Tellam, 1996; Tellam and Eisemann, 2000)。几丁质是II型围食膜的关键组分,其弹力保证了围食膜的机械强度。

在昆虫围食膜中,蛋白质以共价或非共价键形式结合到几丁质微纤丝上,构成围食膜的骨架结构,决定了围食膜的功能:通过Cys富集区,peritrophin-44与几丁质中的3-N-乙酰基壳三糖和脱乙酰壳多糖特异性结合,peritrophin-15在细胞微绒毛顶端与新生围食膜的几丁质微纤丝末端特异性结合,而peritrophin-30则以非共价方式与围食膜紧密结合,共同维持围食膜结构稳定并决定其孔径大小;Ag-Aper1可能是连接几丁质原纤维到三维网络结构的分子连接物(Elvin and Vuocolo, 1996; Shen and Marcelo, 1998; Eisemann *et al.*, 2001; Wijffels and Eisemann, 2001)。II型围食膜中,peritrophin-55和peritrophin-95具有与粘蛋白类似的高分子量和强二硫键,趋于形成聚合体,其二硫键和几丁质网状基质紧密相连;IIM通过二硫键与几丁质网状基质紧密相连(Tellam *et al.*, 1999; Wang and Granados, 2001)。这些特异性结合,使蛋白质和几丁质最小程度地暴露在消化酶中,不仅使围食膜蛋白具抗水解能力,同时也保护了几丁质免受消化道内几丁质酶的降解(Tellam and Eisemann, 2000; Li *et al.*, 2001)。

## 2 昆虫病毒增效蛋白对围食膜的作用

昆虫病毒增效蛋白(enhancin)主要存在于颗粒体病毒(granulovirus, GV)中。迄今为止,已在美洲粘虫 *Pseudaletia unipuncta* GV(PuGV)、粉纹夜蛾 GV(TnGV)、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* GV(HaGV)、八字地老虎 *Xestia c-nigrum* GV(XcGV)、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* GV(SeGV)、粘虫 *Pseudaletia separata* GV(PsGV)、菜青虫 *Pieris rapae* GV(PrGV)、旋幽夜蛾 *Scotogramma trifolii* GV(StGV)等8种颗粒体病毒和舞毒蛾核型多角体病毒(*Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus, LdNPV)以及粘虫痘病毒(*P. separata* entomopoxvirus, PsEPV)等4种痘病毒共计13种昆虫病毒中发现了增效蛋白的存在,其中PuGV、TnGV、HaGV、XcGV、LdNPV和PsEPV等6个增效基因的序列已测定(Hashimoto *et al.*, 1991; Xu and Hukuhara, 1992; Roelvink *et al.*, 1995; Bischoff and Slavicek, 1997)。纯化的天然增效蛋白具广谱高效增效作用,可极显著促进核型多角体病毒对幼虫和离

体昆虫细胞的感染,增强苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)对幼虫的毒力,其增效倍数一般可达100倍,LT<sub>50</sub>缩短9.5~24 h (Hashimoto *et al.*, 1991; Wang and Granados, 1998)。LdNPV 增效基因 E1、E2 单独失活或两者同时失活,则重组病毒对宿主的感染力明显下降 (Popham *et al.*, 2001)。

生化测定和氨基酸序列分析表明,增效蛋白富含酸性氨基酸,是一种金属蛋白酶,含糖量很少但具有丰富的潜在糖基化位点。已测序的8种杆状病毒增效蛋白中均含一个典型的金属蛋白酶锌结合氨基酸序列 HEXXH,且其位置极其保守;在这一类酶中,Zn<sup>2+</sup>先与结合域中的两个H残基络合,再与下游20~120个氨基酸处的第3个残基(通常是H、C、D、E残基)络合,在结合域中的E残基作为催化基团,使一个水分子极性化亲核攻击肽链上的肽键并使之断裂,从而发挥金属蛋白酶活性 (Bischoff and Slavicek, 1997)。PsEPV 增效蛋白中也含有一个锌结合域类似序列 HENRRHH。杆状病毒增效蛋白的潜在糖基化位点多集中于中部,约10~12个,位置也较为保守,在已检测的TnGV和PuGV增效蛋白中未检出糖的存在,暗示增效基因在翻译后并未进行糖基化修饰,IM高度糖基化,增效蛋白丰富的潜在糖基化位点可能与其对宿主中肠围食膜上IM的结合、降解有关 (Yamamoto and Tanada, 1980; 刘强等, 1998; 袁哲明等, 2001; 郭慧芳等, 2003)。PsEPV 增效蛋白仅含1个可能的糖基化位点。

增效蛋白的作用机理有(1)发挥金属蛋白酶活性,降解宿主中肠围食膜上的IM,破坏围食膜,使病毒粒子等更易进入中肠细胞,有效避免病毒随排泄物排出体外或被肠道消化液灭活(2)促进病毒核衣壳与细胞质膜的吸附、融合,加速感染 (Wang and Granados, 1997)。TnGV 增效蛋白饲喂5龄粉纹夜蛾幼虫后,在粪便中检测到IM的存在,随增效蛋白剂量增加,IM体外降解程度加剧。美洲粘虫饲喂增效蛋白后,电镜观察围食膜的孔径显著增大,染料检测表明处理组较对照组围食膜能通过更多较大的蓝色葡聚糖颗粒;苜蓿丫纹夜蛾 *Autographa californica* NPV (AcNPV) 中添加TnGV 增效蛋白感染美洲粘虫后发现在幼虫的刷状缘膜上有增效蛋白的特异性结合位点 (Derksen and Granados, 1988; Peng *et al.*, 1999)。增效蛋白还可破坏围食膜上蛋白质的二硫键和糖基化位点,使几丁质-蛋白复合体解离,围食膜崩溃 (Wang and Granados, 2001)。

由于颗粒体病毒宿主域极窄且有些不含增效蛋白,含增效蛋白的颗粒体病毒与核型多角体病毒混

用时可能发生拮抗作用等诸多限制 (Goto, 1990),因此前人主要考虑将增效基因插入广谱型病毒 AcNPV p10 基因启动子下游构建重组病毒,但目前已构建的数个重组病毒毒力均未明显改善。其主要原因是病毒多角体在昆虫中肠经碱解释放的病毒粒子如短期内不能攻入中肠上皮细胞,在碱液的纯化下将失去感染活性,病毒粒子一旦攻入中肠上皮细胞,后续感染则主要通过血腔扩散;p10启动子为极晚期基因启动子,增效蛋白表达较迟,对第一代病毒粒子侵入中肠细胞并无促进作用;在以血腔扩散为主的后续感染中,增效蛋白虽已表达却失去了其作用靶标围食膜,因此其毒力与野生型病毒比较并未见提高。将增效基因插入广谱型病毒早期基因启动子下游构建重组病毒是未来值得进一步研究的课题。

在TnGV和PuGV增效蛋白中未检出糖的存在,暗示增效基因在翻译后并未进行糖基化修饰;大肠杆菌表达的增效蛋白虽形成包涵体晶体,但存在由昆虫中肠碱性消化液溶解而释放出有增效作用活性片段的可能(就像Bt伴胞晶体在中肠的碱解释放一样),从而勿需变性重折叠。基于上述考虑,袁哲明等(2001)构建了重组表达载体 pQE/enhancin,并在大肠杆菌中表达获得了有显著增效活性的含TnGV 增效蛋白C端818个氨基酸的融合蛋白P96。P96作用广谱,可促进多种作用于消化道的微生物杀虫剂对多种鳞翅目害虫的感染,活性高效,1 mL 大肠杆菌培养液表达的P96可有效促进HaNPV对10000头3龄棉铃虫的感染;对害虫生长发育有明显的弱化作用 (袁哲明等, 2002, 2004; 陈浩涛等, 2003)。HaGV 增效基因的全长与截断片段在大肠杆菌中也都获得了有生物活性的表达 (刘相国等, 2000; 欧洋等, 2000; 胡蓉等, 2001)。大肠杆菌表达系统具有生产简单、低成本、安全和表达产物形成包涵体晶体稳定等特点,因此在大肠杆菌中大量表达增效蛋白用作昆虫病毒、Bt、阿维菌素等的高效广谱生物增效剂已具有较为切实的应用前景。含增效基因的转基因水稻、马铃薯和烟草已构建成功并表现出较强的杀虫性 (Hayakawa *et al.*, 1996)。将增效基因与Bt杀虫基因耦连构建双价广谱重组病毒或高效Bt工程菌是颇为有趣的课题。

### 3 几丁质酶及几丁质合成抑制剂对围食膜的作用

几丁质酶是一类具生物催化活性的水解酶,能特异性水解成形的几丁质。序列分析表明其结构一

般包括 N-端催化域、中部富含 Ser/Thr 区和 C-端富含 Cys 的几丁质结合域(CBD)(Kramer and Muthukrishnan, 1997)。几丁质酶能显著提高细菌、病毒、真菌等微生物杀虫剂的毒力: Bt 中添加微生物几丁质酶防治云杉卷叶蛾 *Choristoneura fumiferana* 幼虫,在低温下可加速幼虫死亡; LdNPV 中添加微量几丁质酶防治舞毒蛾,增效显著;烟草天蛾 *Manduca sexta* 几丁质酶基因插入 AcNPV 中构建重组病毒,对草地夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 的  $LT_{50}$  从 88 h 缩短到 65 h;昆虫杆状病毒表达的几丁质酶对病毒破坏昆虫中肠的几丁质组分和虫体液化作用关键,云杉卷叶蛾 NPV(CfNPV)几丁质酶基因对 CfNPV 感染和穿透云杉卷叶蛾幼虫中肠上皮细胞是必需的(Smirnoff, 1974; Shapiro, 1987; 彭辉银等, 1998; Sampson and Gooday, 1998)。含几丁质酶基因的转基因作物在生产上已显示了广泛的抗病抗虫应用前景(贾放和余泽华, 2003)。

几丁质酶的增效活性与其对围食膜中几丁质组分的降解有关,微量的几丁质酶能有效阻止围食膜形成或造成围食膜穿孔,使杀虫活性物质快速侵入中肠上皮细胞,加速幼虫罹病进程,提高幼虫死亡率。经几丁质酶体外处理的围食膜出现孔和缝,且随处理时间延长,破坏程度越大,对围食膜蛋白质和糖的含量也有一定影响;鸡疟原虫可分泌一种几丁质酶前体,当蚊消化酶扩散进入围食膜后激活,生成成熟的几丁质酶,降解几丁质,促进疟原虫动合子对围食膜的穿透;马来布鲁线虫 *Brugia malayi* 产生的几丁质酶能降解蚊子的围食膜,使线虫快速进入寄主体内;灰色链霉菌 *Streptomyces griseus* 的几丁质酶能使黄杉毒蛾 *Orgyia pseudotsugata* 幼虫离体围食膜表面变得粗糙,出现小洞和被侵蚀的坑(Miller and Lehane, 1993; 谢超等, 1999; Tellam *et al.*, 2000; Zieler and Garon, 2000; 张严峻等, 2000a, 2000b; Li and Marcelo, 2001; Merzendorfer and Zimoch, 2003)。

酰基脲类、噻嗪酮类几丁质合成抑制剂不但强烈抑制昆虫新表皮形成过程中几丁质的合成,还削弱 O-糖苷键对 IIM 的保护,干扰蛋白质和几丁质的结合,阻止围食膜形成(Wang and Granados, 2001)。除虫脲可在 15 min 内抑制猿叶虫 *Phaedon brassicae* 幼虫围食膜中几丁质的合成,对红头丽蝇 *Calliphora erythrocephala* 和甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* 也有类似作用;克菌丹能抑制花蝇围食膜的形成;几丁质亲和剂 Calhour 处理后 5 种鳞翅目幼虫不能形成围食膜(Cohen, 1987; Tellam *et al.*, 2000; Wang and Granados, 2000; Zhu *et al.*, 2002)。

## 4 荧光增白剂对围食膜的作用

荧光增白剂主要用作涂料、纺织、洗涤等化工产品的助剂,包括萘酰亚胺类、吡唑啉类、香豆素类、杂环类和二苯乙烯类等,它通过吸收紫外光并将其转化为蓝色的可见光可使产品显白。在生物防治中,光增白剂最早用作昆虫病毒、线虫、真菌等微生物杀虫剂的紫外保护剂,后来发现其还可提高微生物杀虫剂毒力、加快害虫死亡进程。添加 1% 浓度的二苯乙烯光增白剂 M2R,对甜菜夜蛾 NPV(SeNPV)感染甜菜夜蛾的增效倍数为 130 倍, $LT_{50}$  缩短 34%;对芹菜夜蛾 *Anagrapha falcifera* NPV 感染棉铃虫的增效倍数为 300 倍;对 LdNPV 感染舞毒蛾的增效倍数为 214 倍;对 AcNPV 感染粉纹夜蛾的增效倍数为 41 倍(Dougherty *et al.*, 1996; Shapiro, 2000; Shapiro and Argauer, 2001)。M2R 能促进 HaNPV 和大蜡螟 *Galleria mellonella* NPV 对各自宿主的感染, $LT_{50}$  缩短 30%~40%(郭君慧等, 2002)。另外 4 种类似的二苯乙烯荧光增白剂对 NPV 感染能力也各具不同的增效作用,最高的达 400 倍以上,相互混用可进一步增效。

正常的围食膜表面光滑致密、无孔洞和缝,光增白剂可竞争性结合到几丁质上导致围食膜蛋白和几丁质解离,从而促进细菌毒素作用和病毒感染,加速幼虫死亡(Li and Marcelo, 2001)。用 1% M2R 处理粉纹夜蛾幼虫 2 h 后扫描电镜观察发现其 I 型围食膜表面粗糙,出现凹沟和小孔,随处理时间延长围食膜损坏程度加重,4 h 后围食膜完全消失;SDS-PAGE 表明 1% M2R 在离体条件下可使围食膜蛋白和几丁质解离,液滴法喂食幼虫蓝色葡聚糖 2000 进一步证实了光增白剂能破坏围食膜的完整性,光增白剂处理后,光学显微镜下观察到大量蓝色葡聚糖溢出至中肠肠腔(Wang and Granados, 2000; 朱蓉等, 2003)。荧光增白剂通过干扰纤维素和原纤维性几丁质的代谢,可阻止昆虫中肠围食膜的形成或改变其结构,使病毒粒子迅速进入中肠细胞;中肠杯状细胞和柱细胞中的钾离子泵影响  $K^+$  在两种细胞中的流通,在维持和调节中肠 pH 中起关键作用,光增白剂可破坏两种细胞之间的电耦合作用,造成害虫营养不良,生长发育受阻(Sheppard and Shapiro, 1994)。荧光增白剂对人畜安全,可自然降解,是微生物杀虫剂(特别是昆虫病毒杀虫剂)的理想助剂,兼具紫外保护和增效功能。

## 5 外源凝集素对围食膜的作用

植物组织中广泛存在能破坏昆虫围食膜的几丁质结合蛋白——凝集素。凝集素主要存在于植物细胞的蛋白粒中,是一类非免疫性来源的蛋白质或糖蛋白,不具几丁质酶活力,能非共价、可逆性地与糖结合(朱玉等,1999)。雪花莲凝集素(GNA)含3个Cys并富含Leu、Asn和Gly,由4个分子量为12.5 kD的亚基组成,四聚体之间是一个溶剂通道,每个亚基mRNA编码157个氨基酸的蛋白前体,翻译后加工去除N-端23个氨基酸的信号肽和C-端29个氨基酸残基,变成105个氨基酸的成熟蛋白亚基,具12个甘露糖结合位点(路子显等,2002)。

凝集素能识别和结合暴露于昆虫及哺乳动物消化道中的糖复合物,在植物生长的各阶段协同其他的保护性蛋白(如几丁质酶)建立起一个高效的防御系统,抵御害虫的侵害,并可促进害虫消化道内细菌的增殖,诱发病灶,使害虫死亡(朱玉等,1997; Pechan *et al.*, 2002)。麦胚凝集素(WGA)能强烈抑制欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis* 的生长,饲喂0.05%的WGA 72 h后,3龄幼虫体重无增长,电镜观察表明围食膜层组织结构紊乱,中间几乎无食物颗粒;小扁豆凝集素(LCA)和伴刀豆球蛋白A(ConA)能引起丽蝇幼虫取食减少;GNA对飞虱、叶蝉、蚜虫等刺吸式害虫的生长发育也有明显抑制作用(Harper *et al.*, 1998; Hopkins and Harper, 2001)。

凝集素分子以围食膜蛋白、几丁质或中肠上皮细胞表面的糖基化位点为主要靶标,发生可逆结合但不改变糖苷键的共价结构(Lehane *et al.*, 1996)。WGA通过扰乱中肠前部细胞微绒毛的形成而产生大量不完全的围食膜,影响营养物质的吸收,使害虫生长发育受到抑制甚至死亡。多种外源凝集素对人和哺乳动物有较强的毒性,在生产上应用较少。豌豆凝集素(PSA)和雪花莲凝集素对人的毒性极低,对害虫却有极强的抑制作用,常作为外源基因转入作物。目前,已有油菜、西红柿、水稻、甘蔗等至少10种植物获得了转雪花莲凝集素基因抗虫植株。转外源凝集素基因植物作用广谱,对鳞翅目、同翅目、双翅目害虫均有较强抗性,凝集素基因有取代Bt杀虫晶体蛋白基因成为未来转基因抗虫作物首选外源基因的趋势(Czapla and Lang, 1990; 朱玉等, 1997)。

## 6 结语

以围食膜为作用靶标,进一步的研究重点可在以下几个方面展开:一是构建高效转几丁质酶基因和凝集素基因植物;二是构建早期启动子控制的、含增效基因和其他杀虫基因的多价广谱重组病毒或Bt工程菌;三是在病原微生物杀虫剂中直接添加荧光增白剂或大肠杆菌表达的重组增效蛋白、几丁质酶和凝集素等;四是对重要医学昆虫,将其围食膜蛋白重组表达,免疫寄主动物产生抗体,阻滞害虫生长发育或使其致死。

### 参考文献 (References)

- Bischoff DS, Slavicek JM, 1997. Molecular analysis of an enhancing gene in the *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.*, 71(11): 8 133 - 8 140.
- Bolognesi R, Ribeiro AF, 2001. The peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda*: secretion of peritrophins and role in immobilization and recycling digestive enzymes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 47(2): 4 762 - 4 775.
- Casu R, Eisemann C, Pearson R, 1997. Antibody-mediated inhibition of the growth of larvae from an insect causing cutaneous myiasis in a mammalian host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 8 939 - 8 944.
- Chen HT, Pan XY, Yuan ZM, 2003. The debilitation of recombinant enhancin on cotton bollworm. *Journal of Hunan Agricultural University*, 29(4): 308 - 310. [陈浩涛, 潘雪义, 袁哲明, 2003. 重组增效蛋白对棉铃虫的弱化作用. 湖南农业大学学报, 29(4): 308 - 310.]
- Cohen E, 1987. Chitin biochemistry: synthesis and inhibition. *Annu. Rev. Entomol.*, 32(3): 71 - 93.
- Czapla TH, Lang BA, 1990. Effect of plant lectins on the larval development of European corn borer (Lepidoptera, Pyralidae) and southern corn rootworm (Coleoptera, Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.*, 83: 2 480 - 2 485.
- Derksen ACG, Granados RR, 1988. Alteration of lepidopteran peritrophic membrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity. *Virology*, 167(1): 242 - 250.
- Dougherty EM, Guthrie KP, Shapiro M, 1996. Optical brighteners provide baculovirus activity enhancement and UV radiation protection. *Biol. Control*, 7(1): 71 - 74.
- Eisemann CH, Wijffels G, Tellam RL, 2001. Secretion of the type 2 peritrophic matrix protein, peritrophin-15, from the cardia. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 47: 76 - 85.
- Eisemann CH, Donaldson RA, Pearson RD, Cadogan LC, Vuocolo T, Tellam RL, 1994. Larvicidal activity of lectins on *Lucilia cuprina*: mechanism of action. *Entomol. Exp. Appl.*, 72: 1 - 10.
- Elvin CM, Vuocolo T, 1996. Characterization of a major peritrophic membrane protein, peritrophin-44, from the larvae of *Lucilia cuprina*. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(15): 8 925 - 8 935.
- Goto C, 1990. Enhancement of a nuclear polyhedrosis virus infection by a granulosis virus isolated from the spotted cutworm, *Xestia c-nigrum* L.

- Appl. Entomol. Zool.*, 25(1): 135 – 137.
- Guo HF, Fang JC, Han ZJ, 2003. Advances in insect virus synergists. *Acta Entomol. Sin.*, 46(6): 766 – 772. [郭慧芳, 方继朝, 韩召军, 2003. 昆虫病毒增效剂研究进展. 昆虫学报, 46(6): 766 – 772]
- Guo JH, Yang H, Peng JX, Hong HZ, 2002. Enhancement in activity of *Syngrapha falcifera* baculovirus by an optical brightener. *Chinese Journal of Biological Control*, 18(3): 144 – 145. [郭君慧, 杨红, 彭建新, 洪华珠, 2002. 荧光增白剂对芹菜夜蛾核型多角体病毒的增效作用. 中国生物防治, 18(3): 144 – 145]
- Harper MS, Hopkins TL, Czapl TH, 1998. Effect of wheat germ agglutinin on formation and structure of the peritrophic membrane in European corn bore(*Ostrinia nubilalis*) larva. *Tissue Cell*, 30: 166 – 176.
- Hashimoto Y, Corsaro BG, Granaos RR, 1991. Location and nucleotide sequence of the gene encoding the viral enhancing factor of the *Trichoplusia ni* granulosis virus. *J. Gen. Virol.*, 72(11): 2 645 – 2 651.
- Hayakawa T, Xu JH, Hukuhara T, 1996. Cloning and sequencing of the gene for an enhancing factor from *Pseudaletia separate* entomopoxvirus. *Gene*, 177: 269 – 270.
- Hopkins TL, Harper ML, 2001. Lepidopteran peritrophic membranes and effects of dietary wheat germ agglutinin on their formation and structure. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 47: 100 – 109.
- Hu R, Meng XL, Xu JP, 2001. Expression of 2.6 kb enhancin gene fragment from *Helicoverpa armigera* granulovirus. *Virologica Sinica*, 16(4): 364 – 368. [胡蓉, 孟小林, 徐进平, 2001. 棉铃虫颗粒体病毒增效蛋白基因 2.6 kb 片段的表达. 中国病毒学, 16(4): 364 – 368]
- Jia F, Yu ZH, 2003. Research advances on structures and functions of baculovirus chitinase genes. *Microbiology*, 30(2): 74 – 77. [贾放, 余泽华, 2003. 杆状病毒几丁质酶基因结构与功能的研究进展. 微生物学通报, 30(2): 74 – 77]
- Kramer KJ, Muthukrishnan S, 1997. Insect chitinase: molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27(11): 887 – 900.
- Lehane MJ, Allingham PG, Weglicki P, 1996. Composition of the peritrophic matrix of the tsetse fly, *Glossina morsitans morsitans*. *Cell Tissue Res.*, 283: 375 – 384.
- Li DM, Ge F, Wang CZ, Ge SK, Zhang ZN, 1999. Some research issues on outbreak mechanisms and management of key agricultural insect pests in China. *Entomological Knowledge*, 36(6): 373 – 376. [李典谟, 戈峰, 王琛柱, 葛绍奎, 张钟宁, 1999. 我国农业重要害虫成灾机理和控制研究的若干科学问题. 昆虫知识, 36(6): 373 – 376]
- Li S, Martin D, Marcelo JL, 2001. The peritrophic matrix of hematophagous insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 47: 119 – 125.
- Liu Q, Ding C, Cai XY, 1998. Purification and biochemical characterization of synergetic factor in the capsule of a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *Chinese Journal of Virology*, 14(4): 352 – 358. [刘强, 丁翠, 蔡秀玉, 1998. 粘虫颗粒体病毒增效因子的分离纯化及其生化性质. 病毒学报, 14(4): 352 – 358]
- Liu XG, Yang G, Qiu BS, 2000. Molecular cloning of enhancin gene from *Helicoverpa armigera* granulovirus and its expression in *E. coli*. *Acta Microbiologica Sinica*, 40(4): 379 – 383. [刘相国, 杨恭, 邱并生, 2000. 棉铃虫颗粒体病毒增效蛋白基因克隆及在大肠杆菌中表达. 微生物学报, 40(4): 379 – 383]
- Lu ZX, Chang TJ, Zhu Z, 2002. Plant lectins and their application on plant gene engineering. *Advances of Bioengineering*, 22(2): 3 – 9. [路子显, 常团结, 朱祯, 2002. 植物外源凝集素及其在植物基因工程中的应用. 生物工程研究进展, 22(2): 3 – 9]
- Merzendorfer H, Zimoch L, 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *The Journal of Experimental Biology*, 206: 4 393 – 4 412.
- Miller N, Lehane MJ, 1993. Relationship of peritrophic membrane, cell suffice molecular and parasites tropism in insect vectors' body. *Foreign Medical Sciences: Parasitoses*, 20(5): 210 – 211. [Miller N, Lehane MJ, 1993. 虫媒体内围食膜. 细胞表面分子与寄生虫向性的关系. 国外医学: 寄生虫病分册, 20(5): 210 – 211]
- Ou Y, Meng XL, Xu JP, 2000. Expression of 2.1 kb enhancin gene fragment from *Helicoverpa armigera* granulovirus in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 16(5): 595 – 598. [欧洋, 孟小林, 徐进平, 2000. 棉铃虫颗粒体病毒增效蛋白基因 2.1 kb 片段在大肠杆菌中的表达. 生物工程学报, 16(5): 595 – 598]
- Pechan T, Cohen A, Williams WP, 2002. Insect feeding mobilizes a unique plant defense protease that disrupts the peritrophic matrix of caterpillars. *PNAS*, 99(20): 13 319 – 13 323.
- Peng HY, Li X, Zhang SM, Bhsil MA, Chen XW, Hu ZH, 1998. Localization and cloning of the chitinase gene of *Heliothis armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *Virologica Sinica*, 13(2): 139 – 143. [彭辉银, 李星, 张双民, Bhsil MA, 陈新文, 胡志红, 1998. 中国棉铃虫核型多角体病毒几丁质酶基因的定位与克隆. 中国病毒学, 13(2): 139 – 143]
- Peng J, Zhong J, Granados RR, 1999. A baculovirus enhancin alters the permeability of a mucosal midgut peritrophic matrix from lepidopteran larvae. *J. Insect Physiol.*, 45: 159 – 166.
- Popham HJR, Bischoff DS, Slavicek JM, 2001. Both *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus enhancin genes contribute to viral potency. *Journal of Virology*, 75(18): 8 639 – 8 648.
- Roelvink PW, Corsaro BG, Granados RR, 1995. Characterization of the *Helicoverpa armigera* and *Pseudaletia unipuncta* granulovirus enhancin genes. *J. Gen. Virol.*, 76(11): 2 693 – 2 705.
- Sampson MN, Gooday GW, 1998. Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. *Microbiology*, 144: 2 189 – 2 194.
- Shapiro M, 1987. Enhancement of baculovirus activity on gypsy moth (Lepidoptera: *Lymantria dispar*) by chitinase. *J. Econ. Entomol.*, 80(6): 1 113 – 1 116.
- Shapiro M, 2000. Enhancement in activity of homologous and heterologous baculoviruses infectious to beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) by an optical brightener. *J. Econ. Entomol.*, 93(3): 572 – 576.
- Shapiro M, Argauer R, 2001. Relative effectiveness of selected stilbene optical brighteners as enhancers of the beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus. *J. Econ. Entomol.*, 94(2): 339 – 343.
- Shen ZC, Marcelo JL, 1998. A type 1 peritrophic matrix protein from the malaria vector *Anopheles gambiae* binds to chitin. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(28): 17 665 – 17 670.
- Sheppard CA, Shapiro M, 1994. Physiological and nutritional effects of a fluorescent brightener nuclear polyhedrosis virus infected *Lymantria dispar* (L.) larvae (Lepidoptera: Lymantriidae). *Biological Control*,

- 4 : 404 - 411.
- Smirnov WA, 1974. Three years of aerial field experiments with *Bacillus thuringiensis* plus chitinase formulation against the spruce budworm. *J. Invertebr. Pathol.*, 24 : 344 - 348.
- Tellam RL, 1996. The peritrophic matrix. In: Lehane MJ, Billingsley PF eds. *Biology of the Insect Midgut*. London: Chapman & Hall. 86 - 113.
- Tellam RL, Eisemann C, 2000. Chitin is only a minor component of the peritrophic matrix from larvae of *Lucilia cuprina*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30 : 189 - 201.
- Tellam RL, Vuocolo T, Johnson SE, 2000. Insect chitin synthase: DNA sequences, gene organization and expression. *Eur. J. Biochem.*, 267 : 6 025 - 6 042.
- Tellam RL, Wijffels G, Willadsen P, 1999. Peritrophic matrix proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29 : 87 - 101.
- Wang P, Granados RR, 1997. An intestinal mucin is the target for a baculovirus enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(14) : 6 977 - 6 982.
- Wang P, Granados RR, 1998. Observations on the presence of the peritrophic membrane in larval *Trichoplusia ni* and its role in limiting baculovirus infection. *J. Invertebr. Pathol.*, 72 : 57 - 62.
- Wang P, Granados RR, 2000. Calcofluor disrupts the mid-gut defense system in insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30 : 135 - 143.
- Wang P, Granados RR, 2001. Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): identification of potential PM target sites for insect control. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 47 : 110 - 118.
- Wang P, Li GX, Granados RR, 2004. Identification of two new peritrophic membrane proteins from larval *Trichoplusia ni*: structural characteristics and their functions in the protease rich insect gut. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34 : 215 - 227.
- Wijffels G, Eisemann C, 2001. A novel family of chitin-binding proteins from insect type 2 peritrophic matrix. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(18) : 15 527-15 536.
- Xiang JB, Liu HX, Wu WJ, 2004. Progress in research on peritrophic membrane of insect. *Entomological Knowledge*, 41(2) : 116 - 122. [相静波, 刘惠霞, 吴文君, 2004. 昆虫围食膜的研究进展. 昆虫知识, 41(2) : 116 - 122]
- Xie C, Yang FQ, Zhao TY, Lu BL, 1999. Peritrophic membrane of adult mosquitoes, its effects on arbo viruses infection. *Acta Parasitol. Med. Entomol. Sin.*, 2(2) : 178 - 184. [谢超, 杨发青, 赵彤言, 陆宝麟, 1999. 成蚊围食膜及对虫媒病毒感染的研究. 寄生虫与医学昆虫学报, 2(2) : 178 - 184]
- Xie C, Zhao TY, Lu BL, 2002. Peritrophic membrane: the formation and effect on mesenteron infection barrier to dengue-2 virus in adult *Aedes albopictus* and *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Acta Parasitol. Med. Entomol. Sin.*, 5(2) : 92 - 96. [谢超, 赵彤言, 陆宝麟, 2002. 围食膜在蚊虫对登革热 II 型病毒中肠感染屏障中的作用. 寄生虫与医学昆虫学报, 5(2) : 92 - 96]
- Xu JH, Hukuhara T, 1992. Enhanced infection of a nuclear polyhedrosis virus in larvae of the armyworm, *Pseudaletia separata*, by a factor in the spheroids of an entomopoxvirus. *J. Invertebr. Pathol.*, 60 : 259 - 264.
- Yamamoto T, Tanada Y, 1980. Physicochemical properties and location of capsule components, in particular the synergistic factor, in the occlusion body of a granulosis virus of the armyworm. *Pseudaletia unipuncta. Virology*, 107(2) : 434 - 440.
- Yuan ZM, Meng XL, Liu SS, 2002. Synergy of recombinant enhancing of *Trichoplusia ni* granulovirus. *Virological Sinica*, 15(Special issue) : 55 - 60. [袁哲明, 孟小林, 刘树生, 2002. 粉纹夜蛾颗粒体病毒重组增效蛋白的增效作用. 中国病毒学, 15(杀虫微生物专刊) : 55 - 60]
- Yuan ZM, Liu SS, Meng XL, 2004. Wide-spectrum synergy of recombinant enhancing from insect baculovirus expressed in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biological Control*, 20(1) : 31 - 33. [袁哲明, 刘树生, 孟小林, 2004. 昆虫病毒重组增效蛋白的广谱增效活性. 中国生物防治, 20(1) : 31 - 33]
- Yuan ZM, Meng XL, Liu SS, 2001. Cloning and expression of 2.5 kb enhancer gene from *Trichoplusia ni* granulosis virus in *Escherichia coli*. *Acta Entomol. Sin.*, 44(2) : 155 - 160. [袁哲明, 孟小林, 刘树生, 2001. 粉纹夜蛾颗粒体病毒增效基因 3'端 2.5 kb 片段在大肠杆菌中的表达. 昆虫学报, 44(2) : 155 - 160]
- Zhang YJ, Tan J, Lin YQ, 2000a. The structure and constitution of peritrophic membrane of *Helicoverpa armigera*. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 12(3) : 140 - 143. [张严峻, 谭军, 林玉清, 2000a. 棉铃虫围食膜的结构和组成. 浙江农业学报, 12(3) : 140 - 143]
- Zhang YJ, Tan J, Lin YQ, 2000b. The effects on peritrophic membrane of *Helicoverpa armigera* treated by low temperature and chitinase. *Chinese Journal of Biological Control*, 16(4) : 152 - 155. [张严峻, 谭军, 林玉清, 2000b. 低温和几丁质酶处理对棉铃虫围食膜的影响. 中国生物防治, 16(4) : 152 - 155]
- Zhu R, Peng JX, Hong HZ, 2003. Effects of fluorescent brightener on the peritrophic membrane structure of *Spodoptera exigua*. *Acta Entomol. Sin.*, 46(4) : 424 - 428. [朱蓉, 彭建新, 洪华珠, 2003. 光增白剂对甜菜夜蛾围食膜结构的作用与影响. 昆虫学报, 46(4) : 424 - 428]
- Zhu Y, Wu X, Gao YF, Xu HL, Liu CM, Zhou ZL, Zhu Z, Li XH, 1997. Cloning and sequencing of snowdrop lectin cDNA and construction of plant expression vector. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 5(4) : 331 - 338. [朱玉, 吴茜, 高越峰, 徐鸿林, 刘春明, 周兆澜, 朱祯, 李向辉, 1997. 雪花莲外源凝集素基因的克隆、序列分析和植物表达载体的构建. 农业生物技术学报, 5(4) : 331 - 338]
- Zhu Y, Zhu Z, Xu HL, 1999. Cloning and sequencing of snowdrop lectin cDNA and polymorphism analysis. *High Technology Communication*, 9 : 36 - 41. [朱玉, 朱祯, 徐鸿林, 1999. 雪花莲外源凝集素基因的克隆及其多态性分析. 高技术通讯, 9 : 36 - 41]
- Zhu YC, Specht CA, Dittmer NT, 2002. Sequence of a cDNA and expression of the gene encoding a putative epidermal chitin synthase of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32 : 1 497 - 1 506.
- Zieler H, Garon CF, 2000. A tubular network associated with the brush-border surface of the *Aedes aegypti* midgut: implications for pathogen transmission by mosquitoes. *The Journal of Experimental Biology*, 203 : 1 599 - 1 611.