小菜蛾高效 Bt 菌株的分离、生化特性及基因型鉴定*

朱 勋[1,2] 吴青君[2] 张友军[2] 刘春光[1] 刘岩林[1]
余亚军[1] 景 伟[1] 薛 原[1] 杨峰山[1**]

(1. 黑龙江大学生命科学学院 微生物黑龙江省高校重点实验室 哈尔滨 150080;2. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所 北京 100081)

摘 要 从哈尔滨田间采集死亡小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.)幼虫,从中分离出 10 株苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis*。对小菜蛾幼虫室内生物测定结果表明,各菌株对小菜蛾幼虫的死亡率均在 85% 以上,其中 DBW902 毒力最强,48 h 的 LC_{50} 为 13.99 mg/L。菌株 *cry/cyt* 基因检测表明,所有菌株均含有 *cry1A* 或 *cry2A* 基因,这与其高毒力的特性基本吻合。生化检测与分析表明,菌株 DBW904、DBW93、DBW962 与已报道的苏云金芽孢杆菌山东亚种 *B. thuringiensis* subsp. *shandongiensis* 的生化特性一致,但是其它菌株的生理生化特性与已报道菌株有区别。

关键词 苏云金芽孢杆菌,鉴定,杀虫活性,*cry/cyt* 基因

Isolation, biochemical and *cry*-type gene characterization of *Bacillus thuringiensis* strains with high toxic to *Plutella xylostella*

ZHU Xun[1,2] WU Qing-Jun[2] ZHANG You-Jun[2] LIU Chun-Guang[1]
LIU Yan-Lin[1] YU Ya-Jun[1] JING Wei[1] XUE Yuan[1] YANG Feng-Shan[1**]

(1. Key Laboratory of Microbiology of Heilongjiang Province, College of Life Science, Heilongjiang University, Harbin 150080, China;
2. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract The insecticidal activities of ten strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from diseased *Plutella xylostella* (L.) larvae were characterized. All strains caused >80% larval mortality and the strain DBW902 had the highest insecticidal activity with an LC_{50} of 13.99 mg/L at 48 h. The biochemical characteristics and *cry/cyt* genes of each strain were determined. High insecticidal activity coincided with the detection of at least one *cry1A* or *cry2A* family gene. The biochemical characteristics of the strains, DBW904, DBW93 and DBW962 were homologous to *B. thuringiensis* subsp. and *Shandongiensis*, but not the other strains. The identification of these 10 *B. thuringiensis* isolates with moderate to high insecticidal activity against *P. xylostella* is promising for the control of this pest in northeastern China.

Key words *Bacillus thurigiensis*, identification, insecticidal activity, *cry/cyt* genes

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*,简称 Bt)是一种从土壤或死亡昆虫体内分离出来的革兰氏阳性细菌,此类菌在芽孢形成时期产生一种或多种杀虫晶体蛋白(insecticidal crystal proteins, ICPs)而对田间害虫有很高的毒性,因其对人畜无害而作为生物农药被广泛应用(Schnepf *et al.*, 1998)。该菌菌剂是目前世界上用途最广、产量最大的微生物杀虫剂,占微生物杀虫剂总量的 90% ~95%(刘石泉等,2008)。我国最早用于防治小菜蛾的 Bt 菌是库斯塔克亚种(*B. thuringiensis* var. *kurstaki*),其主效成分是 *cry1Ac* 基因(Gong *et al.*, 2010)。目前已发现对小菜蛾 *Plutella xylostella*

* 资助项目:公益性行业(农业)科研专项(200803001)、国家自然科学基金(30700539)、黑龙江省自然科学基金(C2007-03)、哈尔滨市科技创新人才研究专项(2007RFXXN048)和黑龙江省教育厅面上项目(11511273)。

**通讯作者,E-mail:yangfshan@126.com

收稿日期:2011-01-28,接受日期:2011-02-18

(L.)有毒力的基因有:*cry1Aa*、*cry1Ab*、*cry1Ac*、*cry1B*、*cry1C*、*cry1F*、*cry2A* (Tabashnik *et al.*, 1994)、*cry1I* (Song *et al.*, 2003)、*cry7Ba1* (Huang *et al.*, 2007)和 *cry9A*、*cry9B* (Prakai *et al.*, 2008),其中 *cry1Aa*、*cry1Ab*、*cry1Ac* 已在我国应用(Gao *et al.*, 2008)。但 Bt 制剂和转 Bt 基因作物广泛应用,也使得部分害虫对 Bt 产生了一定抗性,其中田间小菜蛾的抗性尤为突出(Heckel *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2008)。为遏制害虫抗性产生,寻找新的高活性菌株是解决这个问题的有效途径之一(Yang *et al.*, 1993)。目前,基于 *cry* 基因序列建立的菌株分离方法(陈中义等,2003;苏旭东等,2006)是普遍采用的分离手段,此方法在含 *cry* 基因的菌株分离中体现了其优越性。但是含有 *cry* 基因,并不代表基因一定表达,更不能反映菌株能产生杀虫晶体蛋白的能力(Song *et al.*, 2003)。目前分离的十几万种 Bt 菌株中,近一半没有任何杀虫活性。因此,针对靶标害虫进行直接毒力测定,才是筛选高活性菌株直接有效的方法(Huang *et al.*, 2007)。本试验从黑龙江省田间致死小菜蛾中分离高毒力 Bt 菌株,并对其生物学特性及杀虫活性进行研究,以期为进一步筛选并克隆编码对鳞翅目害虫具有高活性的杀虫基因提供材料,进而探索 Bt 杀虫晶体蛋白的作用机理,并为 Bt 微生物制剂的研发和应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试小菜蛾

哈尔滨相对敏感种群:2008 年采自哈尔滨郊区,在室内用干净无虫的萝卜苗和甘蓝苗饲养,期间从未施用过任何杀虫剂。

1.2 样品采集

本试验样品是从哈尔滨地区未施药试验田中采集的非正常死亡的小菜蛾幼虫,共 60 只。对虫体进行表面处理,方法如下:用镊子夹住幼虫头部,蘸取 95% 乙醇灼烧后,放入 75% 乙醇中 2 s,再放入 3% 次氯酸钠溶液中浸泡 3 min,取出幼虫用无菌水清洗 3 次。将处理好的虫体放入装有 0.5 mL 无菌水的 1.5 mL 离心管中打碎,制成虫体悬液,于 4℃ 保存,备用。

1.3 菌株的分离

将处理的虫体样品(杨自文等,2000),取 0.1 mL 虫体悬液涂布在 LB 平板上,30℃ 恒温培养 12 h,待长出菌落后进行分离纯化。

1.4 菌株毒力测定

1.4.1 菌株毒力初测 挑单菌落接种于 LB 液体培养基中,在 30℃ 恒温摇床上 200 rpm 培养 48 h。离心收集孢晶混合物,洗涤后真空抽干,得到干粉混合物。称取孢晶混合物,加入定量双蒸水配成 1 000 mg/L的溶液或悬浮液,置 4℃ 备用。

取 5 mL 孢晶混合液与 50 μL 5% 的 Triton100 混合均匀(Triton100 终浓度为 0.05%),选老嫩适中的甘蓝叶片洗净晾干,剪成直径 2 cm 大小,放入孢晶悬液(含 Triton100 终浓度为 0.05%)中,浸泡 10 s 晾干,放入铺有湿润滤纸的平皿中。以双蒸水混合 Triton100(Triton100 终浓度为 0.05%)浸泡叶片作为对照。选取 2 ~ 3 龄小菜蛾幼虫,每个处理 10 头,设 3 个重复,25℃ 下饲养 2 d。记录幼虫死亡情况,计算死亡率和校正死亡率;保留死亡率 85% 以上的菌株,进行下一步试验。

1.4.2 LC_{50} 测定 对初筛的菌株配置孢晶混合液,通过预试验测定小菜蛾在 90% 和 10% 死亡率的孢晶混合物的浓度,在其范围内设计 5 ~ 7 个浓度梯度,每个浓度 4 个重复,每重复 10 头 2 ~ 3 龄幼虫,25℃ 饲养 48 h,记录幼虫死亡情况,利用 POLO 软件计算菌株的 LC_{50} 值 95% 置信度、LC_{90} 值 95% 置信度和 b 值。

1.5 菌株的鉴定

1.5.1 形态特征 对筛选的菌株,参照文献(沈萍和陈向东,2007),进行简单染色、革兰氏染色、芽孢及晶体染色。将菌株接种于 LB 琼脂培养基上,30℃ 培养 2 ~ 4 d 后,观察菌落大小、形态、颜色(色素是水溶性还是脂溶性)、光泽度、透明度、质地、隆起形状、边缘特征及迁移性等并照相。

1.5.2 生理生化特征 参照文献(James *et al.*, 2005)方法对菌株进行生理生化鉴定。

1.6 *cry*/*cyt* 基因型检测

参见 Ben-Dov 等(1999)和 Berón 等(2005)方法,分别使用通用引物 Un1、Un2、Un3、Un4、Un7、8、gral-cry8、gral-cry11、gral-nem、gral-cyt 和特异引物 spe-Cry13 等鉴定 *cry1*、*cry2*、*cry3*、*cry4*、*cry7*、*cry8*、*cry11*、*cry5*、*cry12*、*cry13*、*cry21* 和 *cyt* 基因。引物由上海生物工程有限公司合成(表 1)。PCR 产物回收后,连接到 TaKaRa pMD18-T 载体上并转化

表 1　PCR 引物及退火温度

Table 1　PCR primers and corresponding annealing temperatures

引物 Primer	序列(5′—→3′) Sequence(5′—→3′)	扩增片段长度(bp) Amplified fragment length (bp)	Tm 值(℃) Tm value(℃)	靶标昆虫 Target
Un1	CATGATTCATGCGGCAGATAAA(d) TTGTGACACTTCTGCTTCCCATT(r)	277 ~ 274	58	Lepidoptera
Un2	GTTATTCTTAATGCAGATGAATGGG(d) CGGATAAAATAATCTGGGAAATAGT(r)	689 ~ 701	55	Lepidoptera/Diptera
Un3	CGTTATCGCAGAGAGATGACATTAAC(d) CATCTGTTGTTTCTGGAGGCAAT(r)	589 ~ 604	58	Coleoptera
Un4	GCATATGATGTAGCGAAACAAGCC(d) GCATATGATGTAGCGAAACAAGCC(r)	439	60	Diptera
Un7,8	AAGCAGTGAATGCCTTGTTTAC(d) CTTCTAAACCTTGACTACTT(r)	420 ~ 423	54	Coleoptera
gal - Cry8	ATGAGTCCAAATAATCTAAATG(d) TTTGATTAATGAGTTCTTCCACTCG(r)	373 ~ 376	49	Coleoptera
gal-Cry11	TTAGAAGATACGCCAGATCAAGC(d) CATTTGTACTTGAAGTTGTAATCCC(r)	305	51	Diptera
gal-nem	TTACGTAAATTGGTCAATCAAGCAAA(d) AAGACCAAATTCAATACCAGGGTT(r)	474 ~ 489	50	Nematode
Spe-Cry13	CTTTGATTATTTAGGTTTAGTTCAA(d) TTGTAGTACAGGCTTGTGATTC(r)	313	50	Nematode
gal-cyt	TTACGTAAATTGGTCAATCAAGCAAA(d) AAGACCAAATTCAATACCAGGGTT(r)	522 ~ 525	51	Diptera

大肠杆菌 DH5α。利用表 1 中对应引物进行 PCR 验证,筛选到的阳性克隆送 Invitrogen 公司进行测序,利用 Blast (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)将测序结果与 GenBank 中已知的 *cry* 基因进行比对。

2　结果与分析

2.1　菌株的分离与初筛

采用稀释平板和划线分离法从 60 份小菜蛾幼虫悬液中分离纯化 Bt 菌株。对小菜蛾生测,其中 DBW1001、DBW1002、DBW75、DBW901、DBW902、DBW903、DBW904、DBW93、DBW961 和 DBW962 对小菜蛾校正死亡率均大于 85%。

2.2　菌株的鉴定结果

2.2.1　形态特征　10 株菌株形态观察发现:菌落均呈白色圆形、扁平,表面干燥无光泽,边缘缺刻;在普通 LB 平板上能生长,为好氧菌;细胞杆状,有鞭毛,革兰氏染色为阳性,且一个营养细胞只有一个芽孢,芽孢为中生、次端生或端生,孢子囊不膨大,有晶体存在。

2.2.2　生理生化特征　对 10 株菌株进行生理生化试验。结果显示,菌膜试验、卵磷脂酶、淀粉水解、蛋白水解、甲基红反应、伏普(V - P)试验、尿酶试验、几丁质酶试验、触酶反应和明胶液化试验对全部菌株均为阳性。其他反应呈现多样性。而糖醇的发酵特性各不相同,其中果糖能被所有的菌株发酵,而蔗糖则所有菌株均不能发酵。大多数菌株能发酵纤维二糖和麦芽糖,而对甘露糖、乳糖、山梨醇、阿拉伯糖、木糖和葡萄糖的发酵能力不强(表 2)。

2.2.3　菌种鉴定结果　根据以上菌株形态和生理生化特征观察结果,参照伯杰细菌鉴定手册进行鉴定:10 株菌株均为苏云金芽孢杆菌。菌株 DBW902、DBW903、DBW93、DBW961、DBW962、DBW1001 的甘露醇、阿拉伯糖和木糖发酵试验为阴性,与已报道的苏云金芽孢杆菌糖醇发酵特性基本一致。菌株 DBW904、DBW93、DBW962 与已发表的山东亚种 *Bt.* subsp. *shandongiensis* 生理生

化特性一致，但是菌株之间在脂酶(Tween80)试验及对木糖和葡萄糖的发酵特性上还存在差异(表2)。其他菌株则与已发表的 Bt 亚种及 Bt 标准菌株的生理生化特性不一致。

表 2 菌株的生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical properties of the isolated strains

菌名 Strains	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X
DBW75	+	−	+	+	−	+	+	−	+	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	−	−	+	+	−
DBW901	+	−	+	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	−	+	−	+
DBW902	+	+	+	+	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	−	−	+	−	+
DBW903	+	−	+	−	−	+	−	−	+	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	−	−	+	−	+
DBW904	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	+	+	+	+	−
DBW93	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	−	+	+	−	+
DBW961	+	−	+	+	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	−	+	+	−	+
DBW962	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	+	+	+	+	−	+	+	−	+	−	−	+	−	+
DBW1001	+	+	+	−	−	+	−	−	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	−	+	+	+
DBW1002	+	−	+	−	−	+	+	−	+	+	+	+	+	+	−	−	+	−	−	+	+	+	−	+

注："+"表示阳性，"−"表示阴性。A:菌膜试验；B:伏普试验；C:卵磷脂酶；D:水杨苷；E:蔗糖；F:纤维二糖；G:甘露糖；H:七叶灵；I:淀粉水解；J:蛋白质水解；K:甲基红；L:脲酶试验；M:接触酶试验；N:明胶液化；O:乳糖；P:山梨醇；Q:果糖；R:阿拉伯糖；S:麦芽糖；T:木糖；U:葡萄糖；V:几丁质酶；W:酯酶(Tween80)；X 精氨酸脱羧酶。

"+"positive reaction, "−"negative reaction. A :Bacteria film test; B: Voges-Prokauer test; C: Lecithinas; D: Salicin; E : Sucrose; F: Cellobiose; G :Carbinose; H: Esculin; I :Hydrolysis of Starch; J: Protein hydrolysis; K: Methyl Red test; L: Urease test; M :Catalase test; N: Gelatin Liquefaction; O: Lactose; P:Sorbitol; Q: Fructose; R: Arabinose; S :Maltose; T: Xylose; U: Glucose; V: Chitinase; W: Esterase(Tween80); X :Arginine decarboxylase.

2.3 *cry/cyt* 基因型检测

对 10 株 Bt 菌株以 *cry/cyt* 的通用引物进行了 PCR 鉴定，研究结果表明：DBW75 含有 *cry1* 和 *cry4*；DBW901、DBW902、DBW903、DBW904、DBW961、DBW1001 含有 *cry1*、*cry2* 和 *cry4*；DBW962、DBW1002 和 DBW93 含有 *cry1* 和 *cry2*(图 1,2)。对片段进行克隆并测序，在 Genbank 上比对发现：*cry1* 基因片段与 *cry1A* 类基因序同源性较高，达到了 99%，*cry2* 基因片段主要与 *cry2A* 类基因同源性较高，达到了 98%。

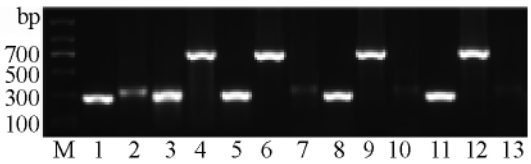

图 1 *cry/cyt* 基因扩增结果

Fig. 1 Amplification results of *cry/cyt* gene by PCR

M: DNA Marker Ⅱ; 1: DBW75 *cry1*; 2: DBW75 *cry4*; 3: DBW93 *cry1*; 4: DBW93 *cry2*; 5: DBW901 *cry1*; 6: DBW901 *cry2*; 7: DBW901 *cry4*; 8: DBW902 *cry1*; 9: DBW902 *cry2*; 10: DBW902 *cry4*; 11: DBW903 *cry1*; 12: DBW903 *cry2*; 13: DBW903 *cry4*.

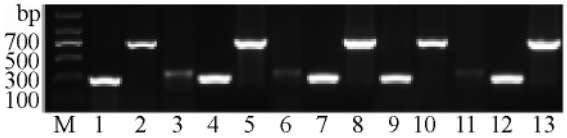

图 2 *cry/cyt* 基因扩增结果

Fig. 2 Amplification results of *cry/cyt* gene by PCR

M: DNA Marker Ⅱ; 1: DBW904 *cry1*; 2: DBW904 *cry2*; 3: DBW904 *cry4*; 4: DBW961 *cry1*; 5: DBW961 *cry2*; 6: DBW961 *cry4*; 7: DBW962 *cry1*; 8: DBW962 *cry2*; 9: DBW1001 *cry1*; 10: DBW1001 *cry2*; 11: DBW1001 *cry4*; 12: DBW1002 *cry1*; 13: DBW1002 *cry2*.

2.4 LC_{50} 测定结果

毒力测定结果表明，各个菌株对小菜蛾的毒力均较高，其中，DBW902 对小菜蛾幼虫的毒力最高，其 LC_{50} 为 13.99 mg/L；DBW75，DBW903，

DBW904,DBW1001,DBW93,BW962,DBW961 次之,LC_{50} 为 18.53 ~ 74.38 mg/L;DBW1002 最差,LC_{50} 为 152.59 mg/L。与标准菌株 HD-73 相比,菌株 DBW901 和 DBW1002 毒力略低,其他菌株毒力均高于 HD-73。各菌种对小菜蛾的毒力大小依次为:DBW902 > DBW75 > DBW903 > DBW904 > DBW1001 > DBW93 > BW962 > DBW961 > HD-73 > DBW901 > DBW1002 (表 3)。

表 3　各菌株对小菜蛾的毒力测定

Table 3　Toxicities of the isolated strains against *Plutella xylostella*

菌种 Strains	致死中浓度 LC_{50} (mg/L) (mg/L)	95% 置信度(mg/L) 95% confidence interval(mg/L)	LC_{90} (mg/L)	95% 置信度(mg/L) 95% confidence interval(mg/L)	斜率 b(*SE*) Slope of regression
HD-73	123.54	86.12 ~ 177.22	528.63	323.18 ~ 1282.56	2.03 ± 0.261
DBW75	18.53	11.79 ~ 29.14	271.94	90.47 ~ 2312.07	1.10 ± 0.145
DBW90.1	134.11	90.19 ~ 199.42	506.29	285.34 ~ 1246.60	2.22 ± 0.31
DBW90.2	13.99	9.11 ~ 21.48	181.25	58.768 ~ 1620.18	1.15 ± 0.17
DBW90.3	30.24	17.09 ~ 53.50	659.99	192.05 ~ 7215.45	0.96 ± 0.15
DBW90.4	30.99	15.19 ~ 63.21	316.56	117.61 ~ 1500.30	1.27 ± 0.188
DBW93	50.94	32.81 ~ 79.10	182.40	104.82 ~ 435.60	2.32 ± 0.35
DBW96.1	74.38	48.52 ~ 114.01	344.39	178.78 ~ 964.82	1.93 ± 0.27
DBW96.2	54.91	36.04 ~ 83.67	212.43	118.77 ~ 529.67	2.18 ± 0.32
DBW100.1	50.62	35.55 ~ 72.09	230.72	130.92 ~ 640.19	1.98 ± 0.24

3　讨论

本试验分离到 10 株 Bt 菌株,对小菜蛾均表现出较高活性,与标准菌株 HD-73 相比,其中 8 株菌株的毒力高于 HD-73,2 株菌株的毒力略低于 HD-73。本试验直接选择田间非正常死亡的小菜蛾幼虫作为试验材料,增强了目的性。作者还发现所有菌株均具有几丁质酶活性,这可能是其对小菜蛾幼虫毒力较高的原因之一。对菌株几丁质酶活性的分析工作正在进行。

对于菌株理化特性分析中,有 11 项完全一致,这可能与菌株均来源于小菜蛾幼虫体内有关。DBW904、DBW93、DBW962 与已发表的山东亚种 *Bt.* subsp. *shandongiensis* 生理生化特性一致(喻子牛,1990;Berón *et al.*,2005;李长友等,2007),但是菌株之间部分理化特性有差异,需要进行血清型鉴定才能确定。山东亚种由我国科学家喻子牛、李荣森等率先发现并命名(刘石泉等,2008)。王学聘等(1999)对我国西北干旱地区森林土壤的 Bt 菌分布的研究中发现,山东亚种是我国西北干旱地区的优势亚种。本试验中得到的 3 株与山东亚种相似的菌株,为山东亚种在中国的分布研究提供参考。

值得指出的是对于菌株的杀虫基因分析,菌株除都含有 *cry1A* 类基因外,部分还含有 *cry2A* 类基因。这与已报道的中国对鳞翅目害虫高毒力的 Bt 菌株多含有 *cry1* 和 *cry2* 基因的特点一致(张杰等,2000;张永安等,2003;韩岚岚等,2008)。Liang 和 Dean(1994)发现通过 BBMV 结合试验表明 cry2A 类蛋白与 cry1A 蛋白具有不同的结合位点,害虫对这两种蛋白不容易产生交互抗性,因此,这些菌株为构建多价基因提供了重要的菌株来源。李海涛等(2005)等证明部分 *cry2Aa* 基因对小菜蛾有较高的活性,本试验中高毒菌株中的 *cry2A* 类基因对小菜蛾是否也具有高活性,要通过进一步克隆这些 *cry2A* 基因全长才能得出确切结论,该试验目前正在进行中。

参考文献(References)

Ben-Dov E, Wang QF, Zaritsky A, Manasherob R, Barak Z, Schneider B, Khamraev A, Baizhanov M, Glupov V, Margalith Y, 1999. Multiplex PCR screening to detect *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(8): 3714—3716.

Berón CM, Curatti L, Salerno GL, 2005. New strategy for

identification of novel *cry*-type genes from *Bacillus thuringiensis strains*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71 (2): 761—765.

陈中义，吴限，张杰，宋福平，管宇，黄大昉，2003. PCR-RFLP 筛选 DNA 文库克隆 Bt*cry* 基因的研究. 中国农业科学，36(4): 398—402.

Gao MY, Li RS, Dai SY, Wu Y, Yi D, 2008. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from soil in China and their pesticidal activities. *Biol. Control*, 44(3): 380—388.

Gong YJ, Wang CL, Yang YH, Wu SW, Wu YD, 2010. Characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin *cry1Ac* in *Plutella xylostella* from China. *J. Inverteber. Pathol.*, 104: 90—96.

韩岚岚，宋福平，张杰，赵奎军，2008. 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白对棉铃虫活性分析. 东北农业大学学报，39(8): 21—24.

Heckel DG, Gahan LJ, Liu YB, Tabashnik BE, 1999. Genetic mapping of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in diamondback moth using biphasic linkage analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96(15): 8373—8377.

Huang DF, Zhang J, Song FP, Lang ZH, 2007. Microbial control and biotechnology research on *Bacillus thuringiensis* in China. *J. Inverteber. Pathol.*, 95: 175—180.

James TS, David RB, Don JBP, 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Germany: Springer-Verlag. 601.

Kim YS, Roh JY, Kang JN, Wang Y, Shim HJ, Li MS, Choi JY, Je YH, 2008. Mutagenesis of *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene and its insecticidal activity against *Plutella xylostella* and *Ostrinia furnacalis*. *Biol. Control*, 47: 222—227.

李海涛，姚江，郭巍，宋福平，高继国，黄大昉，张杰，2005. 苏云金芽孢杆菌 *cry2Aa* 基因的克隆、表达与活性. 农业生物技术学报，13(6): 787—791.

李长友，李国勋，张杰，宋福平，黄大昉，2007. 苏云金芽孢杆菌菌株 B-Hm-16 的生物学特及 *cry* 基因型鉴定. 青岛农业大学学报，24 (1): 1—4.

Liang Y, Dean DH. 1994. Location of a lepidopteran specificity region in insecticidal crystal protein *cry* Ⅱ *A* from *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.*, 13(4): 569—75.

刘石泉，单世平，夏立秋，2008. 苏云金芽孢杆菌高效价杀虫剂的研究进展. 微生物学通报，35(7): 1091—1095.

Prakai T, Suttipun K, Jariya C, 2008. Isolation, toxicity and detection of *cry* gene in *Bacillus thuringiensis* isolates in Krabi province, Thailand. Songklanakarin. *J. Sci. Technol.*, 30 (5): 597—601.

Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean D H, 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(3): 775—806.

沈萍，陈向东，2007. 微生物学实验. 北京：高等教出版社. 181—187.

Song FP, Zhang J, Gu AX, Wu Y, Han LL, He KL, Chen ZY, Yao J, Hu YQ, Li GX, Huang DF, 2003. Identification of *cry1I*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel *cry1I*-type gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(9): 5207—5211.

苏旭东，张杰，谭建新，宋福平，2006. 苏云金芽孢杆菌及其 δ-内毒素基因的分类与鉴定. 植物保护，32(2): 15—18.

Tabashnik BE, Finson N, Johnson MW, Heckel DG, 1994. Cross-resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin *cry1F* in the Diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 4627—4629.

王学聘，戴莲韵，杨光滢，张万儒，1999. 我国西北干旱地区森林土壤中苏云金芽孢杆菌生态分布. 林业科学研究，12(5): 467—473.

Yang JC, Chu YI, Taleker NS. 1993. Biological studies of *Diadegma semiclausum* (Hym Ichneumonidae), a parasite of diamondback moth. *Entomophaga*, 38 (4): 579—581.

杨自文，吴宏文，王开梅，谢天健，钟连胜，岳书奎，2000. 从土壤中高效分离苏云金杆菌的方法. 中国生物防治，16(1): 26—30.

喻子牛. 1990. 苏云金杆菌. 北京：科学出版社. 41—46.

张杰，宋福平，左雅慧，戴莲韵，黄大昉，2000. 31 株苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因型鉴定及表达产物研究. 微生物学报，40(4): 372—378.

张永安，宋福平，戴莲韵，张杰，李长友，2003. 我国不同森林立地带土壤中苏云金芽孢杆菌 *cry* 基因资源研究. 林业科学研究，16(1): 19—25.