应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2016, 53(4): 745−751. DOI: 10.7679/j.issn.2095−1353.2016.093

黑龙江省苏云金杆菌的分离及对夜蛾科昆虫高毒力菌株的筛选*

徐馨竹** 周长梅** 韩岚岚 程 媛 赵奎军***

（东北农业大学农学院，哈尔滨 150030）

摘 要 **【目的】** 为了发掘新的苏云金杆菌（*Bacillus thuringiensis*）的资源，在黑龙江省不同地区采集不同类型的土壤样品分离出对夜蛾科具有高毒力的菌株。**【方法】** 采用醋酸钠选择性筛选法筛选 Bt 菌株，利用 10 对通用引物对分离株进行基因型分析，SDS-PAGE 进行杀虫晶体蛋白分析，同时测定苏云金杆菌分离株对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (HÜbner)、甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae*(Linnaeus)、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (Fabricius)的杀虫活性。**【结果】** 从黑龙江省不同地区采集的 352 份不同类型的土壤样品中，共分离出 46 株苏云金芽孢杆菌野生菌株，出菌率为 13.06%。油镜下可观察到伴孢晶体的形态有菱形、球形、镶嵌形及不规则形。结果表明产菱形晶体的菌株多含有 *cry1* 类基因，而同时产生菱形、球形及不规则形晶体的菌株则含有多种基因型。SDS-PAGE 蛋白分析发现这些菌株主要表达 130、90、60 ku 蛋白。对其中的部分菌株进行毒力测定，结果表明有 4 株菌株对 3 种夜蛾科昆虫具有高毒力。**【结论】** 黑龙江省苏云金芽孢杆菌分布广泛，类型多样，已获得对夜蛾科昆虫有高毒力的菌株，这对夜蛾科害虫的绿色防控及延缓其抗性具有重要意义。

关键词 苏云金芽孢杆菌，伴孢晶体，基因型，毒力测定，夜蛾科

Screening and identification highly virulent strain of *Bacillus thuringiensis* from the soil of Heilongjiang Province to control Noctuidae insects

XU Xin-Zhu** ZHOU Chang-Mei** HAN Lan-Lan
CHENG Yuan ZHAO Kui-Jun***

(College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract **[Objectives]** To find new, highly insecticidal, *Bacillus thuringiensis* stains with which to control Noctuid insects. **[Methods]** *B. thuringiensis* strains were isolated from soil in Heilongjiang province using Sodium acetate selective screening. The genotypes of *B. thuringiensis* isolates were identified with 10 general primers. SDS-PAGE was used to analyze insecticidal crystal proteins. The insecticidal activity of these isolates against *Helicoverpa armigera*（HÜbner）, *Mamestra brassicae* (Linnaeus) and *Spodoptera litura* (Fabricius) was assayed. **[Results]** A total of 46 strains of *B. thuringiensis* were isolated from different soils from various regions in Heilongjiang province. The percentage of *B. thuringiensis* strains isolated was 13.06%. Observed under an oil lens, the shapes of parasporal crystals were bipyramidal, spherical, mosaic and irregular. Strains with bipyramidal crystals contained *cry1* genes whereas those with spherical and irregular shapes contained other genes. The result of SDS-PAGE showed that these strains expressed 130, 90 and 60 ku proteins. In toxicity tests, four *B. thuringiensis* strains were high toxic to Noctuid insects. **[Conclusion]** Different strains of *B. thuringiensis* are widely distributed in

*资助项目 Supported projects：现代农业产业技术体系建设专项资金（CARS-04）；公益性行业（农业）专项基金（201103002）

**第一作者 First author，E-mail：xinzhu0109@163.com，zhou_cm@126.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：kjzhao@163.com

收稿日期 Received：2016-04-18，接受日期 Accepted：2016-06-29

Heilongjiang province including those that are highly toxic to Noctuid insects. It is important to develop environmentally-friendly methods of control for Noctuid insects and to delay the development of resistance in these pests.

Key words *Bacillus thuringiensis*, parasporal crystal, genotypes, toxicity tests, Noctuidae

苏云金杆菌（*Bacillus thuringiensis*，简称 Bt）是一种全球广泛存在的革兰氏阳性细菌（Gobatto *et al.*，2010），其形成的蛋白晶体毒素（Insecticidal crystal poteins，ICPs）对鳞翅目（Lepidopera）、鞘翅目（Coleoptera）、膜翅目（Hymenoptera）、双翅目（Diptera）、食毛目（Mallophaga）、直翅目（Orthoptera）等 9 个目 500 多种害虫具有杀虫活性，也对线虫（Nematodes）、螨虫（Mites）、原生动物等害虫具有毒力（Chattopadhyay *et al.*，2004）。因其杀虫效率高、对人畜无害、不污染环境等特点已成为当前世界上应用最为广泛的一种杀虫微生物，也是遗传改良作物中最重要的基因资源。因此对 Bt 的研究越来越受到世界各国的重视，对 Bt 资源的调查也在逐渐扩大。但随着研究的广泛深入，Bt 杀虫基因在杀虫工程菌和转基因抗虫植物广泛应用的过程中已发现多种昆虫在实验室条件下对 Bt 毒素产生抗性，与此同时在田间也发现了具有抗性的个体（Liu and Tabashnik，1997），因此，筛选出高毒力的、杀虫谱广的菌株是解决现阶段问题的重要途径之一（李海涛等，2005）。

苏云金杆菌的分布极其广泛，在土壤、昆虫尸体、贮藏物、植被以及污水、尘埃等基质上均有广泛的分布，而在土壤中分布最为丰富（Maeda *et al.*，2000）。因此，从不同土壤中采集样品，有利于筛选到不同类型的 Bt 菌株。我国地域辽阔，生态环境复杂多样，深入发掘我国丰富的苏云金杆菌资源，对筛选高毒力菌株、分离克隆新的高效广谱杀虫基因，丰富我国 Bt 菌株资源，具有重要的意义。

苏云金杆菌的萌发受 pH 影响，因此加入适量醋酸盐的培养基可选择性地抑制其萌发，经热处理而不被杀死，同时达到消除干扰菌的目的（Cawford *et al.*，1987）。采用 PCR-RELP 方法鉴定 Bt 的杀虫基因，可鉴定出已知的基因的同时检测出未知的新基因（Su *et al.*，2007）。

夜蛾科害虫历年来给农业生产造成巨大经济损失，由于化学杀虫剂的滥用，导致了害虫抗性增加、环境污染严重，因此需加强 Bt 等生物农药的研究和利用。尽管目前有些 Bt 菌株（如 G03 等）对夜蛾科昆虫具有较好的防治效果（王杨等，2016），但随着菌株大面积的应用，害虫抗性不断产生，因此，仍需不断地寻找新的菌株。黑龙江省位于中国的最北部，土地面积大，土壤类型多样，主要有棕色针叶林土、暗棕壤、白浆土、黑土、黑钙土、草甸土和沼泽土等，是世界上著名的三大黑土带之一。本文对黑龙江省土壤中的 Bt 资源进行了详细的调查，通过基因型鉴定、伴孢晶体的形态观察及 SDS-PAGE 分析，以棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（Hübner）、甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae*（Linnaeus）、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (Fabricius)为靶标昆虫，筛选出高毒力的 Bt 菌株，这对促进苏云金杆菌在农业生产中的可持续利用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 菌株和试虫

苏云金杆菌菌株从黑龙江省棕色针叶林土、黑土、暗棕壤、草甸土、黄沙土、白浆土、盐碱土中分离得到；甘蓝夜蛾成虫采集自东北农业大学园艺站，成虫于室内养虫笼中成虫以 5%蜂蜜水饲养，室内羽化，幼虫以白菜喂养至 3 龄；棉铃虫卵、斜纹夜蛾卵购于哈尔滨美延生物科技有限公司，室内孵化，幼虫分别以人工饲料、白菜喂养至 3 龄。

1.2 土样的采集与菌株的分离

从黑龙江省不同地区距表层 5~10 cm 之间的土层采集不同类型的土壤样品，采用醋酸钠选择筛选法（Cawford *et al.*，1987）分离 Bt 菌株，镜检观察后划线培养、分离保存。

1.3　苏云金芽孢杆菌晶体类型观察

显微镜样品制备：将胞晶混合液滴于载玻片上，涂抹均匀，烘干固定，石炭酸复红染液染色，清水冲洗，100×油镜进行镜检，石炭酸复红染液配制方法参见文献（Breed *et al.*，1994）。

1.4　苏云金芽孢杆菌基因型的鉴定

采用 PCR-RELP 的方法对 *cry* 基因型进行鉴定。其中 *cry1* 基因鉴定方法参照文献（Kuo and Chak，1996）；*cry2*、*cry3*、*cry4/10* 基因鉴定方法参见文献；*cry5-9* 基因鉴定方法参见文献（Yu *et al.*，2006）。

1.5　苏云金芽胞杆菌晶体蛋白的分析

SDS-PAGE 分析方法参见文献（萨姆布鲁克等，1992）。

1.6　室内杀虫活性测定

待测 Bt 菌株于 5 mL 液体 LB 培养基中，30℃，220 r/min 振荡条件下培养过夜后，涂布在 LB 固体培养基上，30℃倒置培养 3 d 获得胞晶混合物，用灭菌蒸馏水稀释至芽孢浓度为 5×10^7 孢子/mL 待用。

棉铃虫为人工饲料饲养，称取人工饲料置于灭菌培养皿中，加入待测样品稀释液，充分混匀，分装于经消毒福尔马林浸泡的 24 孔的孔细胞培养板中或养虫管中。用毛笔轻轻接入试虫初孵幼虫，每孔管一头，每处理重复 3 次，放置 25℃光照培养箱中，培养 96 h 后调查死虫数、活虫数，计算死亡率、校正死亡率。

甘蓝夜蛾、斜纹夜蛾的杀虫活性测定方法采用浸叶法，将植物叶片用清水洗净晾干，选取鲜嫩一致的植物叶片切成大小相近的块状，在稀释好的待测样品中浸湿，晾干，放入生测瓶中，每瓶接幼虫 25 头，每个处理重复 3 次，培养箱中培养，培养 96 h 后调查死、活虫数，计算死亡率、校正死亡率。

2　结果与分析

2.1　菌株分离与晶体形态

采用醋酸钠选择筛选法，从 352 份土样中筛选出 46 株 Bt 菌株，出菌率为 13.06%。黑龙江省不同类型土壤 Bt 的分布见表 1。这些菌株含有的晶体类型包括长菱形、钝菱形、镶嵌形、球形、不规则形等。不同类型土壤分离出来的菌株(H1~H9)光学显微镜（100×油镜）镜检结果见图 1，列于表 2，其中菌株 H1 分离自棕色针叶林土样；菌株 H2~H4 分离自黑土；H5~H6 分离自暗棕壤；H7 分离自草甸土；H8 分离自黄沙土；H9 分离自白浆土。

2.2　Bt 菌株 *cry* 基因型的初步鉴定

通过 PCR-RFLP 鉴定系统对其中分离的 9 株菌株进行 *cry* 基因型的初步鉴定，结果见图 2、图 3，列于表 2。结果表明：9 株 Bt 菌株均鉴定出了已知基因类型，鉴定出的基因型有：*cry1*、*cry2*、*cry3*、*cry8*、*cry9*。没有检测出 *cry3-cry7*、*cry10* 等基因。

表 1　不同类型土壤中 Bt 菌株的分布
Table 1　The distribution of Bt strain in different soil

土壤类型 Kind of soil	土壤样本数量（份） Amount of soil sample	Bt 菌株数（株） Amount of Bt isolates	出菌率（%） Percent of Bt isolates
棕色针叶林土 Brown coniferous forest soil	38	3	7.89
黑土 Black earth	101	19	18.81
暗棕壤 Dark brown	93	17	18.83
草甸土 Meadow soil	34	4	11.76
黄沙土 Yellow sand	21	2	9.52
白浆土 Lessive	42	1	2.38
盐碱土 Saline-alkali soil	23	0	0
合计 Total	352	46	13.06

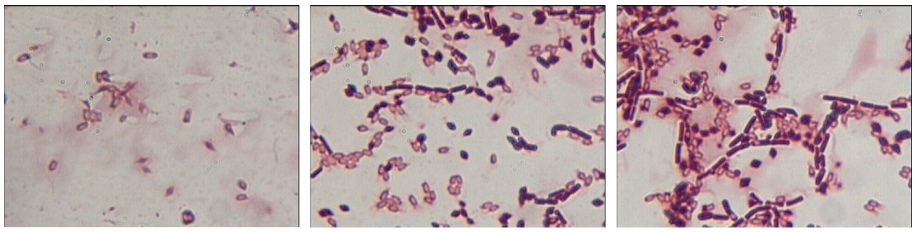


图 1　在光学显微镜下（100×油镜）观察到的 Bt 菌株

Fig. 1　Observation of Bt isolates under optical microscope(100×oil lens)

A：H2；B: H4；C：H9。H 代表不同的分离菌株。下图同。

H indicates different Bt isolate. The same below.

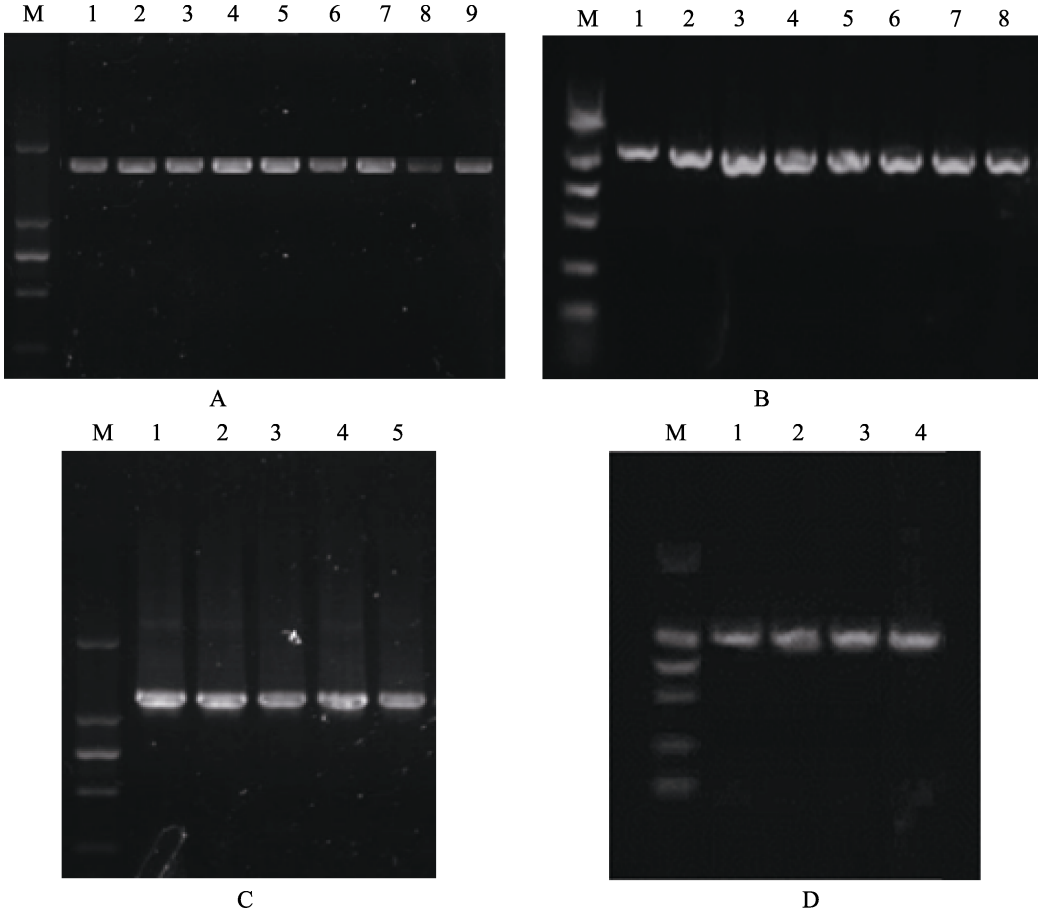


图 2　部分 Bt 分离株的 PCR 扩增结果

Fig. 2　PCR amplification from part of Bt isolates

A：引物 K5un3/K3un3 PCR 图谱；1：H1，2：H2，3：H3，4：H4，5：H5，6：H6，7：H7，8：H8，9：H9，M：DL2000 marker；B：引物 S5un3/S3un3 PCR 图谱；1：H1，2：H2，3：H3，4：H4，5：H6，6：H7，7：H8；8，H9；M：DL2000 marker；C: 引物 S5un2/S3un2 PCR 图谱；1：H1，2：H3，3：H4，4：H5，5：H9，M：DL2000 marker；D：引物 S5un8/S3un8 PCR 图谱；1：H1，2：H3，3：H6，4：H9，9：H1，M：DL2000 marker（2 000，1 000，750，500，250，100 bp）。

A: PCR patterns with primers K5un3/K3un3 PCR；1: H1, 2: H2, 3: H3, 4: H4, 5: H5, 6: H6, 7: H7, 8: H8, 9: H9, M: DL2000 marker; B: PCR patterns with primers S5un3/S3un3 PCR; 1: H1. 2: H2. 3: H3. 4: H4; 5: H6, 6: H7, 7: H8, 8: H9, M: DL2000 marker; C: PCR patterns with primers S5un2/S3un2 PCR; 1: H1, 2: H3, 3: H4, 4: H5, 5: H9, M: DL2000 marker; D: PCR patterns with primers S5un8/S3un8 PCR; 1: H1; 2: H3; 3: H6; 4: H9; M: DL2000 marker (2 000，1 000，750，500，250，100 bp).

2.3　杀虫晶体蛋白的 SDS-PAGE 分析

通过 SDS-PAGE 分析了 9 株 Bt 所表达的 Cry 蛋白分子量，结果见图 3，列于表 2。其中 H4 表达约 70 ku 的蛋白，H1、H3、H5、H9 表达约 60 ku 蛋白，H1、H4、H6、H7 表达约 90 ku 的蛋白，所有菌株都表达约 130 ku 蛋白。

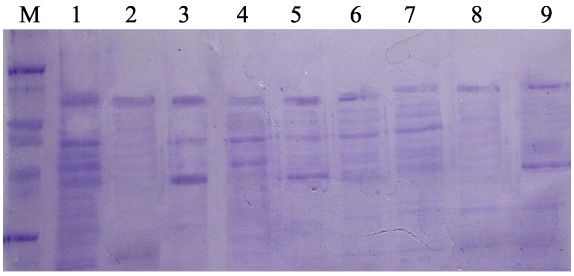


图 3　分离菌株杀虫晶体蛋白 SDS-PAGE 电泳分析
Fig. 3　SDS-PAGE analysis of ICPs from Bt isolates

1：H1；2：H2；3：H3；4：H4；5：H5；6：H6；7：H7；8：H8；9：H9；M: Marker (200，116，97，66，44 ku).

2.4　生物测定

棉铃虫、甘蓝夜蛾和斜纹夜蛾的测定结果见表 2。其中，H3、H5、H8、H9 对棉铃虫、甘蓝夜蛾、斜纹夜都有较好的活性，属于高毒力菌株。H3 菌株在 96 h 时对 3 种夜蛾科昆虫的校正死亡率达到了 100%。

3　讨论

近些年来，我国许多学者从不同地域的不同类型的土壤中分离出高毒力的 Bt 菌株，如孙钰航等（2014）在辽宁千山地区土壤样品中分离到含 *cry8* 类基因的 Bt 菌株；顾爱星等（2011）等在新疆天山北坡土壤中分离到含 *cry3* 类基因的，对鞘翅目昆虫具有很高的活性 Bt 菌株；张巧铃等（2015）从新疆某铀矿厂土样中同样也分离出苏云金杆菌。

表 2　分离菌株 *cry* 基因型鉴定及杀虫活性测定
Table 2　Isolates cry genotyping and insecticidal activity assay

菌株编号 Strain number	晶体性状 Crystal shape	基因型 Genotype	蛋白分子量 (ku) Protein molecular weight	校正死亡率 Corrected mortality (%)		
				棉铃虫 *Helicoverpa armigera*	甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae*	斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*
H1	球晶，大菱晶 Spherical, bipyramid	*cry1，cry2，cry3，cry8，cry9*	130，90，60	36.4	100.0	43.5
H2	菱晶 Bipyramid	*cry1，cry3，cry9*	130	36.4	60.8	100.0
H3	菱晶，镶嵌形 Bipyramid, mosaic	*cry1，cry2，cry3，cry8，cry9*	130，60	100.0	100.0	100.0
H4	大小不一菱晶，球晶 Different sizes of bipyramid, spherical	*cry1，cry2，cry3*	130，90，70	86.4	60.8	95.7
H5	菱晶，不规则晶体 Bipyramid, irregular	*cry1，cry2，cry9*	130，60	95.5	100.0	100.0
H6	菱晶 Bipyramid	*cry1，cry3，cry8*	130，90	81.9	73.9	100.0
H7	菱晶 Bipyramid	*cry1，cry3*	130，90	86.4	82.6	17.4
H8	大小不一菱晶 Different sizes of bipyramid	*cry1，cry3，cry9*	130	84.4	87.0	100.0
H9	菱晶 Bipyramid	*cry1，cry2，cry3，cry8，cry9*	130，60	95.5	100.0	100.0

土壤是微生物的大本营，一般苏云金芽孢杆菌的资源分布表现出一定的地域特色，且分布数量与土壤类型、pH 值、土壤腐殖质含量、植被类型等有关，Bt 菌生存的土壤最适 pH 值一般为 7.5~8.2，pH 值小于 5.0 或大于 8.5 的土壤中鲜有分布（戴顺英等，1996；张永安等，2003）。黑龙江省位于中国的最北部，土地面积大，土壤类型多样，是世界上著名的黑土带之一，Bt 含量丰富。本研究在采集的 23 份盐碱土的土样中未分离出 Bt 菌株。通常理论上讲在沙壤土中因所含营养物质较少，Bt 分布比较有限，本研究在采自不同地区的 21 份黄沙土的土样中，有 2 份土样分离出 Bt 菌株，出菌率为 9.52%，初步说明土壤中营养物质的含量不是影响 Bt 分布的主要因素。

通过 PCR-RFLP 鉴定系统和 SDS-PAGE 蛋白分析体系对分离得到的 Bt 菌株进行了基因型鉴定及蛋白分析。PCR 结果显示，含有 *cry1*、*cry2*、*cry3*、*cry8*、*cry9* 类基因。同时还发现，在基因组合方面，组合类型也是多种多样，包括 *cry1+cry2* 型、*cry1+cry3* 型、*cry3+cry8* 型等，充分体现了 Bt 菌株基因型的多样性。不同类型的 *cry* 基因编码的蛋白具有不同的杀虫活性。通常 *cry1*、*cry2*、*cry9* 基因编码的晶体蛋白对鳞翅目害虫具有毒杀活性（Wang *et al.*，2003）；*cry3*、*cry8* 类基因对鞘翅目害虫具有特异毒性（顾爱星等，2011；孙钰航等；2014），因此鉴定菌株的基因型对预测其杀虫活性具有指导意义。蛋白分析也表现出多样性，其中含有 *cry1+cry2* 基因组合的菌株大多表达 130 ku 和 60 ku 大小的蛋白，包含 *cry8* 类基因的菌株多数表达 130 ku 大小的蛋白，同时含有 *cry3+cry8* 类基因组合的菌会表达 130 ku 大小的蛋白。在镜检观察中也发现了多种多样的晶体类型，同时发现产菱形晶体的菌株多含有 *cry1* 类基因，而同时产生菱形、球形及不规则形晶体的菌株则含有多种基因型。以上结果均表明黑龙江省不同土壤苏云金芽孢杆菌资源极为丰富，为该地区苏云金芽孢杆菌资源的开发和利用打下了良好的基础。

本研究中含有 *cry1+cry2* 类的 Bt 菌株对鳞翅目夜蛾科昆虫表现出高毒力，这与朱勋等（2011）研究相一致。同时，本研究还发现具有相同基因型的菌株对夜蛾科昆虫杀虫活性也表现出明显差异。伴孢晶体是苏云金杆菌杀虫活性的主要来源，当被昆虫幼虫取食后，在幼虫中肠碱性环境下被降解成毒素分子，毒素分子进一步与受体结合而产生毒杀作用（喻子牛，1990）。因此 Bt 菌株的杀虫活性除受不同基因型编码的蛋白结构影响，还与昆虫中肠液的理化特性及蛋白酶的种类有关（邵宗泽和喻子牛，2002）。

夜蛾科害虫在黑龙江省乃至全国、全世界范围内危害严重，而世界各国都将 Bt 资源的收集、鉴定、开发、利用作为一项重点项目。本研究通过对黑龙江省不同土壤分离出的菌株进行基因鉴定、SDS-PAGE 蛋白分析以及生物活性检测，筛选出对棉铃虫、甘蓝夜蛾及斜纹夜蛾具有高毒力的 Bt 菌株，不仅为农业生产中害虫的绿色防控提供了可应用的菌株及基因资源，同时对延缓害虫抗性的产生也具有重要意义。

参考文献 (References)

Breed EG, Murray D, Smith NR, 1994. Berger’s Manual of Determinative Bacteriology, 9th. Baltimore (USA). 288–291.

Cawford IT, Greis KD, Kong EM, 1987. Facile autoplast generation and transformation in *Bacillus thuringiensis* subsp. Kurstaki. *Bacteriol*, 16(12): 5423–5428.

Chattopadhyay A, Bhatnagar NB, Bhatnagar R, 2004. Bacterial insecticidal toxins. *Crit. Rev. Microbiol.*, 30(1): 33–54.

Dai SY, Gao MY, Li XG, 1996. Distribution and insecticidal properties of *Bacillus thuringiensis* of the soil in the north and south spores. *Microbes*, 36 (4): 295–302. [戴顺英, 高梅影, 李小刚, 1996. 我国南北方土壤中苏云金芽胞杆菌的分布及杀虫特性. 微生物学报, 36(4): 295–302.]

Gobatto V, Giani SG, Camassola M, 2010. *Bacillus thuringiensis* isolates entomopathogenic for Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) and *Anticarsia gemmatalis*(Lepidopter: Noctuidae). *Braz. J. Biol.*, 70(4): 1039–1046.

Gu AX, Zhang H, Zhang CF, Zhang L,Yan J, Asandyan A, 2011. Cloning and sequence analysis *cry3 gene* of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from Xinjiang. *Journal of Xinjiang Agricultural University*, 34(2): 156–160. [顾爱星, 张桦, 张翠芳, 张璐, 高微, 颜君, 艾山江·艾则孜, 2011. 苏云金芽孢杆菌新疆分离株

cry3 基因的克隆和序列分析. 新疆农业大学学报, 34(2): 156–160.]

Kuo W, Chak K, 1996. Identification of novel *cry*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(4): 1369−1377.

Li HT, Yao J, Guo W, 2005. *Bacillus thuringiensis cry2Aa* gene cloning, expression and activity. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 13(6): 787−791. [李海涛, 姚江, 郭巍, 2005. 苏云金芽胞杆菌 *cry2Aa* 基因的克隆、表达与活性. 农业生物技术学报, 13(6): 787–791.]

Liu YB, Tabashnik BE, 1997. Experimental evidence that refuges delay insect adaptation to *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 264(1381): 605–610.

Maeda M, Mizuki E, Nakamura Y, 2000. Recovery of *Bacillus thuringiensis* from marine sediments of Japan. *Curr. Microbial.*, 40(6): 418–422.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1992. Guide to Molecular Cloning , 2nd edition// Jin DY translated. Beijing: Science Press. 22–28. [萨姆布鲁克, 弗里奇, 曼尼阿蒂斯, 1992. 分子克隆指南. 第 2 版// 金东雁译. 北京: 科学出版社. 22–28.]

Shao ZZ, Yu ZN, 2002. The effect of Insect midgut fluid to *Bacillus thuringiensis* parasporal crystal virulence. *Journal of Insects*, 45 (3): 384–390. [邵宗泽, 喻子, 2002. 昆虫中肠液性质对苏云金芽胞杆菌伴孢晶体毒力的影响. 昆虫学报, 45(3): 384–390.]

Su X, Zhu C, Zhang J, 2007. Identification and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates from primeval forests in Yunnan and Hainan Provinces and northeast region of China. *Agricultural Sciences in China*, 6(11): 1343–1351.

Sun YH, Liu YJ, Li HT, Gao JG, 2014. Isolation, cloning and expression of *cry8* gene of *Bacillus thuringiensis* in Liaoning Qianshan area. *Agricultural Sciences*, 42(10): 28–32. [孙钰航, 刘艳杰, 李海涛, 高继国, 2014. 辽宁千山地区含 *cry8* 类基因的苏云金芽胞杆菌的分离、克隆与表达. 江苏农业科学, 42(10): 28–32.]

Wang J, Boets A, Van R J, 2003. Characterization of *cry1*,*cry2* and *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. *Invertebrate Pathol.*, 82(l): 63–71.

Wang Y, Zhou ZS, Liu YL, Han R, Zhang LJ, Zhang J, 2016. Study of Bt strain *cry1Ca* having the insecticidal acticity of beet armyworm. *Plant Protection*, 42(2): 19–25. [王杨, 周子珊, 刘永磊, 韩榕, 张林静, 张杰, 2016. 对甜菜夜蛾具有杀虫活性的 Bt 菌株 *cry1Ca* 基因研究. 植物保护, 42(2): 19–25.]

Yu H, Zhang J, Zhang D, 2006. Characterization of *Bacillus thuringiensis* strain Bt185 toxic to the Asian cockchafer: *Holotrichia parallela*. *Curr. Microbiol.*, 53 (1): 13–17.

Yu ZN, 1990. *Bacillus thuringiensis*. Beijing: Science Press. 15–20. [喻子牛, 1990. 苏云金芽胞杆菌. 北京: 科学出版社. 15–20]

Zhang QL, Qiu SH, Zhang YR, Huang TP, 2015. Identification of a *Bacillus thuringiensis* strain isolated from uranium soil. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University*, 44(2): 131–134. [张巧铃, 邱淑惠, 张永嵘, 黄天培, 2015. 一株分离自铀矿土壤的苏云金芽胞杆菌的鉴定. 福建农林大学学报, 44(2): 131–134.]

Zhang YA, Song FP, Dai LY, 2003. Researching *Bacillus thuringiensis cry* gene resources on the different forest zones in soil. *Forest Research*, 16 (1): 19–25. [张永安, 宋福平, 戴莲韵, 2003. 我国不同森林地带土壤中苏云金芽胞杆菌 *cry* 基因资源研究. 林业科学研究, 16(1): 19–25.]

Zhu X, Wu QJ, Zhang YJ, Liu CG, Liu YL, Yu YJ, Jing W, Xue Y, Yang FS, 2011. Isolation, biochemical characterization and gene identification of a highly efficient Bt strain isolated from the cabbage moth. *Joural of Applied Entomology*, 48(2): 285–290. [朱勋, 吴青君, 张友军, 刘春光, 刘岩林, 余亚军, 景伟, 薛原, 杨峰山, 2011. 小菜蛾高效 Bt 菌株的分离、生化特性及基因型鉴定. 应用昆虫学报, 48(2): 285–290.]