

一株对苹果树鳞翅目害虫高毒力的 苏云金芽胞杆菌 YX-1^{*}

苏俊平 葛东华 郭丽伟 宋 萍 曹克强 王勤英^{**}

(河北农业大学植物保护学院 河北省农业病虫害生物防治
工程技术研究中心 保定 071000)

摘 要 苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis* (Bt) YX-1 是从土壤中分离的对多种鳞翅目害虫具有杀虫活性的新菌株。为了探索该菌株在果树上应用的可行性,本研究测定了 Bt YX-1 菌株对苹果树上 6 种鳞翅目害虫的杀虫毒力,同时对该菌株的晶体形态特征、蛋白型、生长特性、基因型等进行了分析。结果表明,Bt YX-1 菌株产生菱形伴胞晶体,SDS-PAGE 分析表明该菌株表达的主要蛋白条带分子量约为 130 ku 和 60 ku;基因型鉴定表明,Bt YX-1 菌株含有 *cry1Ac*、*cry2Ac*、*cry1I*、*vip3Aa* 和 *cry34-35* 基因;生物活性测定表明,Bt YX-1 菌株的孢晶混合物对美国白蛾 *Hlyphantia cunea*、棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、斜纹夜蛾 *Prodenia litura*、梨小食心虫 *Grapholitha molesta*、苹小卷叶蛾 *Adoxophyes orana* 以及苹掌舟蛾 *Phalera flavescens* 的 LC_{50} 分别为 14.48 、 2.72×10^3 、 6.24×10^4 、 1.01×10^2 、 3.52×10^4 、 4.73×10^3 mg/L,均低于标准菌株 Bt HD-1 的 LC_{50} 。发酵上清液的杀虫活性很低,2 龄棉铃虫幼虫的死亡率仅为 8.33%,但是该上清液能显著提高孢晶混合物的毒力,说明上清液中含有增效物质。研究结果表明该菌株具有进一步开发为商品制剂的潜力。

关键词 苏云金芽胞杆菌,基因型鉴定,活性测定,苹果树害虫,鳞翅目

Characteristics of *Bacillus thuringiensis* strain YX-1 with high toxicity to Lepidopteran apple pests

SU Jun-Ping GE Dong-Hua GUO Li-Wei SONG Ping CAO Ke-Qiang WANG Qin-Ying^{**}

(College of Plant Protection, Biocontrol Center of Plant Diseases and Plant Pests of Hebei Province,
Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China)

Abstract A strain of *Bacillus thuringiensis* (Bt) strain, YX-1, with high toxicity to apple tree pests was isolated from soil in Hebei. In order to explore the feasibility of using this to control apple pests the toxicity of Bt YX-1 to some apple tree pests was assayed. The crystal shape, protein type, genotype and growth characteristics of Bt YX-1 were also observed and analyzed. A light microscope indicated that Bt XY-1 has crystals with a bipyramidal shape. SDS-PAGE analysis indicates that this strain produced 130 ku and 60 ku protein bands. PCR-RFLP analysis revealed the presence of *cry1Ac*, *cry2Ac*, *cry1I*, *vip3Aa* and *cry34-35* genes. The bioassay results show that Bt YX-1 was highly toxic to larvae of *Hlyphantia cunea*, *Helicoverpa armigera*, *Prodenia litura*, *Grapholitha molesta*, *Adoxophyes orana* and *Phalera flavescens* with respective LC_{50} of 14.48 mg/L, 2.72×10^3 mg/L, 6.24×10^4 mg/L, 1.01×10^2 mg/L, 3.52×10^4 mg/L and 4.73×10^3 mg/L. The toxicity of Bt YX-1 was higher than that of Bt HD-1. Although supernatant from a culture broth of Bt YX-1 showed very low insecticidal activity (8.33% mortality) against 2nd instar larvae of *H. armigera* it markedly improved the toxicity of a mixture of spores and crystals. Our results show that the Bt YX-1 may prove valuable as a microbial control agent for lepidopteran pests or apple crops.

Key words *Bacillus thuringiensis*, genotype analysis, bioassay, apple tree pests, Lepidoptera

* 资助项目:公益性行业(农业)科研专项(200903042)和国家苹果产业技术体系(nyeytx-08-04-01)。

**通讯作者,E-mail:wqinying@hebau.edu.cn

收稿日期:2011-12-10,接受日期:2011-12-30

苹果树是我国重要的经济树种,虫害严重影响着其产量和品质,目前采取的主要防治措施是化学防治,不仅容易使害虫产生抗药性,还会严重破坏环境,影响人体健康,因而适时的采用生物防治具有重要意义。

苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 自 1901 年由日本学者 S. Ishiwata 在日本的蚕场首次发现后,由于其在生物防治实践中的突出作用,受到世界各国的极大关注 (Babu *et al.*, 2003)。Bt 的杀虫活性主要来源于杀虫晶体蛋白 (insecticidal crystal proteins, ICPs) 组成的伴孢晶体,ICPs 经昆虫肠液酶消化或酶解成毒素后引起昆虫死亡 (Schnep *et al.*, 1998)。尽管杀虫晶体蛋白种类繁多,但是不同菌株其组成以及各组分的含量的差异,导致了其杀虫谱和杀虫活性的差异,也决定了 Bt 对不同的昆虫的作用有较高的特异性,许多重要农业害虫对 Bt 毒素不敏感。现有商品 Bt 菌株杀虫谱过窄,工程菌株遗传性状不稳定以及某些害虫对生产上已经广泛应用的 Bt 毒素的抗性产生等原因,都将成为影响 Bt 进一步成功推广使用的制约因素。因此,对广谱高效的 Bt 自然菌株的分离筛选,已成为世界性研究热点 (王津红等, 2001)。为了得到对苹果树害虫广谱高效的野生菌株,作者通过对杀虫基因和杀虫蛋白的分析,同时结合生物测定,以棉铃虫 *Helicoverpa armigera* Hübner、美国白蛾 *Hlyphantria cunea* (Drury)、梨小食心虫 *Grapholitha molesta* (Busck)、苹小卷叶蛾 *Adoxophyes orana* Fischer von Roslerstamm 等苹果树害虫作为靶标害虫,对河北农业大学害虫生物防治实验室分离保存的 100 余株 Bt 野生株进行了评价,从中筛选出具有广谱高效杀虫活性的 Bt YX-1 菌株。本实验从晶体形态特征、蛋白型、生长特性、基因型、杀虫毒力等方面对 Bt YX-1 进行了深入研究,进一步探索该菌株开发为杀虫剂的应用潜力。

1 材料与方法

1.1 菌株和试虫

苏云金芽孢杆菌 (Bt YX-1 菌株、库斯塔克亚种 HD-1 菌株均由河北农业大学害虫生防实验室提供。美国白蛾、斜纹夜蛾 *Prodenia litura* (Fabricius)、苹小卷叶蛾、苹掌舟蛾 *Phalera flavescent* (Bremeret Grey) 的卵采自河北农业大学

标本园内,室内孵化后分别用杜仲、蓖麻和苹果叶片饲养至适宜龄期备用。棉铃虫由河北农业大学害虫生防实验室提供,用人工饲料饲养。梨小食心虫由西北农林科技大学应用昆虫学重点实验室提供,饲养方法参见杜娟等 (2010)。苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* (L.) 采自新疆伊犁苹果园内,在苹果蠹蛾为害期采集被害果,剖果选取大小一致的约 3 龄幼虫直接用于生测。

1.2 Bt YX-1 菌株形态特征观察

在 LB 固体平板培养基上培养该菌株,28℃ 培养 72 h 后,刮取少量菌落进行涂片,用孔雀绿和碱性复红染色,在 10 × 100 油镜下观察晶体形状大小以及芽孢和晶体的分离率。

1.3 Bt YX-1 菌株晶体蛋白的 SDS-PAGE 分析

将保存在 LB 斜面培养基上的 Bt 菌株转接到 LB 固体培养基平板上,28℃ 培养至孢晶分离期,刮取少量菌苔充分溶于 100 μL 灭菌水中,在 4℃、15 294 g 条件下离心 5 min,弃上清,将沉淀重悬于 20 μL 灭菌水中,加入相同体积的 2 × 上样缓冲液,混匀后,100℃ 煮沸 5 min,再离心 (4℃、15 294 g、1 min),取上清用于晶体蛋白的 SDS-PAGE 检测。采用 5% 的浓缩胶,8% 的分离胶,采用恒电流泳,电泳结束后用考马斯亮蓝染色。以标准菌株 Bt HD-1 做阳性对照。

1.4 生长特性观察

将在液体 LB 培养基活化过夜的 Bt YX-1 菌按 1% 的接种量接种于 200 mL 的 LB 液体培养基中,28℃、230 r/min 条件下振荡培养,每隔 2 h 取样测定 OD₆₀₀,共测 24 h。同时测定菌液的 pH,并观察其发酵过程中菌株的生长发育状况。

1.5 Bt YX-1 菌株的 PCR-RFLP 基因型分析

Bt YX-1 菌株总 DNA 的提取参考 Narva 等 (1991) 的方法。以总 DNA 为模板,参考 Kuo 和 Chak (1996)、宋福平等 (1998) 的方法,分别用 K5un2/K3un2 和 K5un3/K3un3、S5un2/S3un2 和 S5un3/S3un3 等 31 对通用引物对新分离的 Bt 菌株进行基因型鉴定。以标准菌株 Bt HD-1 做阳性对照。

1.6 Bt 菌株生物活性测定

1.6.1 菌悬液制备 分别将 Bt YX-1 和 Bt HD-1 接种于 LB 固体平板培养基上 28℃ 培养 72 h 后镜

检,在产生大量晶体时,加入适量灭菌水,将菌体从平板上刮下,放入离心管中,15 294 g 离心 5 min 弃上清,取沉淀为胞晶混合物,称重后加入一定量的无菌水充分混匀后制备成均匀的 500 mg/mL 的胞晶混合母液备用。

1.6.2 杀虫毒力的测定 分别将 Bt YX-1 和 Bt HD-1 的胞晶混合母液稀释成系列浓度梯度,按以下 2 种方法饲喂供试昆虫,并将各处理试虫置于 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、60% ~ 70% 的相对湿度、14 h 光照的条件下培养,72 h 后观察试虫的生长状况,记录死虫数,采用 DPS 数据处理系统计算 LC_{50} 值。对棉铃虫的 2 龄幼虫及梨小食心虫的 3 龄幼虫的生物活性测定用人工饲料混合饲喂法。按每 10 g 饲料加入 1 mL 胞晶混合菌悬液,充分混合均匀,平均分装于 24 孔板内,每孔接入 1 头试虫。每个处理重复 3 次,每个重复 24 头供试昆虫,以无菌水处理饲料作为对照。对美国白蛾、斜纹夜蛾和苹掌舟蛾的 2 龄幼虫及苹小卷叶蛾的 3 龄幼虫的生物活性测定用浸叶法。将制备好的 Bt 胞晶混合菌悬液(内含 0.3% 土温 80),均匀涂抹在新鲜的杜仲叶片、蓖麻叶片和苹果叶片上,自然晾干后放入 4 cm × 9 cm 生测盒内,每盒接入幼虫 15 头。每个处理重复 3 次,每个重复 15 头试虫,用无菌水(内含 0.3% 土温 80)涂叶片做空白对照。采用饲料混合饲喂法测定 Bt YX-1 对苹果蠹蛾 3 龄幼虫的杀虫活性。利用梨小食心虫的人工饲料,按 10 g 饲料加入 1 mL 胞晶混合物(20 mg/mL),混匀后分装入 24 孔生测板内,每孔接入 1 头试虫。每个处理重复 3 次,每个重复 24 头供试昆虫,以无菌水处理饲料作为对照。72 h 后观察试虫的生长状况,记录死虫数。

1.7 Bt YX-1 发酵液不同组分的杀虫活性的测定

发酵液各组分的制备方法为:将保存在 LB 斜面培养基上的 Bt 菌株转接到 5 mL LB 液体培养基中,28℃、200 r/min 培养过夜,按 1% 的接种量转接到含 200 mL LB 液体培养基的摇瓶中,28℃、200 r/min 振荡培养至孢晶分离期。取 10 mL 发酵液,经 3 824 g 离心 30 min,上清液放于 10 ku 的超滤离心管中,3 824 g 离心 30 min,取出下层超滤液作为无菌上清液备用。沉淀用灭菌水离心清洗 2 次,再用无菌水悬浮至 10 mL 备用。以棉铃虫为试虫,采用 1.6.2 所述的人工饲料混合饲喂法,分别

以原菌液、无菌上清液和细胞悬浮液对 2 龄棉铃虫进行生物测定,72 h 计算死亡率。采用 DPS 数据处理系统对数据进行 Duncan 新复极差法多重比较分析(唐启义和冯明光,2002)。

2 结果与分析

2.1 YX-1 菌株晶体形态及杀虫蛋白

Bt YX-1 菌株在 LB 固体平板培养基上培养 72 h 后,在油镜下观察可见芽胞、菱形伴胞晶体(图 1)。SDS-PAGE 分析表明,YX41 菌株表达的晶体蛋白分子量约 130 ku 和 60 ku(图 2),和标准菌株 HD-1 的晶体蛋白分子量之间没有明显的差别。

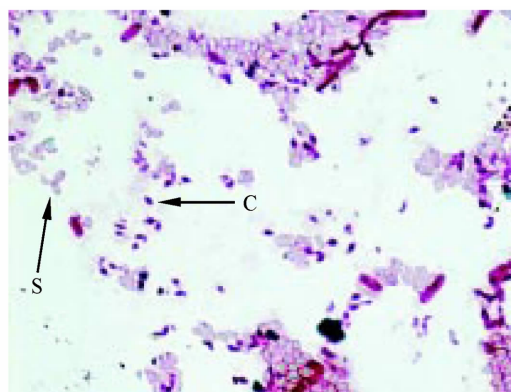


图 1 Bt YX-1 菌株的芽胞、菱形晶体的光镜图片

Fig.1 The crystal and spores of Bt YX-1 under optic microscope

S:芽胞 spore;C:晶体 crystal.

2.2 YX-1 菌株生长特性

苏云金芽胞杆菌菌株 YX-1 在 LB 液体培养基中生长良好,在生长周期 24 h 内,可正常产生芽胞和伴胞晶体。每隔 2 h 取样测定培养液的 OD_{600} 值和 pH 值,绘制生长曲线与 pH 变化(图 3),并观察其发酵过程中菌株的发育状况。其中 0 ~ 4 h 为潜伏期,pH 值变化不大;4 ~ 14 h 为对数生长期,14 h 营养体开始出现内生芽胞,芽胞位于杆菌的中央,pH 值呈先迅速下降,后缓慢回升的现象,在 10 h 时达到最低点 pH5.89;14 ~ 24 h 为稳定期,有大约 80% 的营养体出现芽胞,芽胞位于杆菌的中央,晶体蛋白位于杆菌的两端,但是没有发生胞晶分离,此阶段 pH 值呈缓慢上升,到 24 h 时 pH 达 7.53。

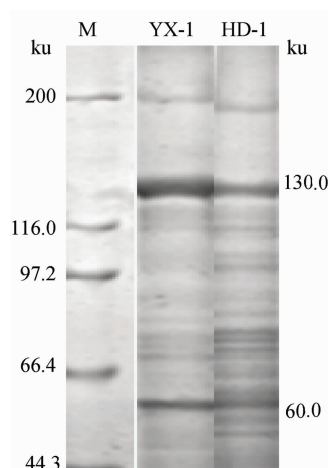


图2 Bt YX-1 菌株蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Fig.2 SDS-PAGE analysis of proteins from Bt YX-1

M: 标准蛋白 protein marker.

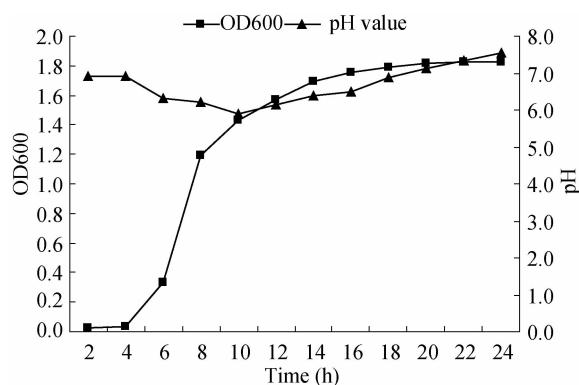


图3 Bt YX-1 菌株生长曲线及 pH 变化

Fig.3 The growth curve and pH variation of Bt YX-1

2.3 YX-1 菌株杀虫基因

利用 Bt *cry* 基因鉴定体系,以 Bt YX-1 的总 DNA 为模板,用 31 对通用引物进行 PCR 扩增,结果表明 YX-1 菌株含有 *cryI*、*cry2*、*cryII*、*vip3A*、*cry34-35* 基因(图 4)。用 K5un2/K3un2、K5un3/K3un3、S5un2/S3un2、*vip3A*-1/*vip3A*-2 4 对引物进行扩增,扩增产物进行酶切分析(图 5),根据此结果进行判定,菌株 YX-1 含有 *cryIAc*、*cry2Ac*、*cryII*、*vip3Aa*、*cry34-35* 基因。

2.4 YX-1 菌株的杀虫活性

采用浸叶法和人工饲料混合饲喂法测定 Bt

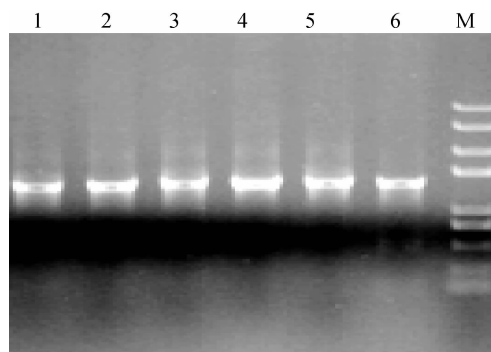


图4 Bt YX-1 杀虫基因 PCR 扩增图谱

Fig.4 Gene identification of Bt YX-1 by PCR

1-6: *cryI*、*cry2*、*cryII*、*cry34-35* 和 *vip3A* 的 PCR 扩增产物。

1-6: PCR-amplified product of *cryI*、*cry2*、*cryII*、*cry34-35* and *vip3A* gene.

M: DNA 分子量标准, DNA marker (8 000, 5 000, 3 000, 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp).

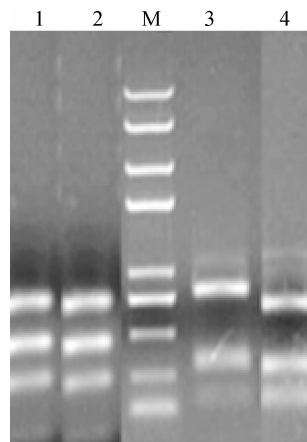


图5 Bt YX-1 PCR-RFLP 图谱

Fig.5 PCR-RFLP of Bt YX-1

1: *cryI*-KUN2 酶切; 2: *cryI*-KUN3 酶切; 3: *cry2* 酶切; 4: *Vip3A* 酶切。

1: PCR product/PstI & XbaI; 2: PCR product/PstI & EcoRI; 3: PCR product/Hinc II & MspI; 4: PCR product/Hind III & EcoRI.

M: DNA 分子量标准, DNA marker (8 000, 5 000, 3 000, 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp).

YX-1 菌悬液对鳞翅目害虫的生物活性。结果表明(表 1), Bt YX-1 菌株对以下 6 种试虫, 均具有较高的杀虫活性, 该菌的 LC_{50} 值均低于标准菌株 HD-1。Bt YX-1 菌株对美国白蛾和梨小食心虫最

为敏感,LC₅₀值分别为 14.48 mg/L、1.01 × 10² mg/L,对斜纹夜蛾的敏感性最差,LC₅₀值为 6.24 × 10⁴ mg/L。Bt YX-1 菌株对苹果蠹蛾幼虫也具有杀虫

活性,72 h 校正死亡率达到 86.5% ± 6.8%。因为虫量太少,没有测定其 LC₅₀,也没能与 Bt HD-1 进行比对。

表 1 Bt YX-1 对 6 种苹果害虫的 LC₅₀
Table 1 LC₅₀ of Bt YX-1 strain against 6 species of apple pests

Bt 菌株 Bt strain	LC ₅₀ mg/L (斜率,95% 置信区间) LC ₅₀ mg/L (slope,95% Fiducial limits)					
	美国白蛾 <i>H. cunea</i> (2 instar)	棉铃虫 <i>H. armigera</i> (2 instar)	斜纹夜蛾 <i>P. litura</i> (2 instar)	梨小食心虫 <i>G. molesta</i> (3 instar)	苹小卷叶蛾 <i>A. orana</i> (3 instar)	苹掌舟蛾 <i>P. flavescen</i> (2 instar)
YX-1	14.48 (1.59,0— 94.29)	2.72 × 10 ³ (1.00,1.83 × 10 ³ —5.26 × 10 ³)	6.24 × 10 ⁴ (5.01,5.14 × 10 ⁴ —8.85 × 10 ⁴)	1.01 × 10 ² (1.02,35.07— 1.92 × 10 ²)	3.52 × 10 ⁴ (0.57,1.61 × 10 ⁴ —9.64 × 10 ⁴)	4.73 × 10 ³ (0.69,1.86 × 10 ³ —8.72 × 10 ³)
HD-1	1.87 × 10 ² (2.03,70.22 —319.41)	3.16 × 10 ⁴ (1.34,1.80 × 10 ⁴ —7.16 × 10 ⁴)	1.03 × 10 ⁵ (3.07,8.11 × 10 ⁴ —1.60 × 10 ⁵)	3.01 × 10 ² (0.96,1.63 × 10 ² —4.82 × 10 ²)	7.13 × 10 ⁴ (0.75,3.71 × 10 ⁴ —1.88 × 10 ⁵)	7.85 × 10 ³ (0.56,2.93 × 10 ³ —1.58 × 10 ⁴)

2.5 Bt YX-1 菌株上清液的增效作用

从图 6 的生测结果可以看出,上清液的致死作用不明显,校正死亡率为 8.33%,沉淀的校正死亡率为 56.25%,均明显低于发酵液的校正死亡率(91.67%),并且上清和细胞沉淀杀虫活性之和也明显低于发酵液,说明上清具有明显的增效作用。试验中还发现上清液有明显的抑制生长作用,体重抑制率为 98.33%。

3 讨论

库斯塔克亚种 HD-1 是目前生产上应用较广的标准菌株,本研究以此为对照菌株,发现 Bt YX-1 菌株与 Bt HD-1 相比,尽管两者的杀虫谱相似,但是 Bt YX-1 菌株对供试的 6 种苹果害虫的毒力更强。从晶体形状和晶体蛋白分子量来看,这 2 个菌株都产生菱形晶体,SDS-PAGE 检测两者均有 130 ku 和 60 ku 的主带。利用已报道的 31 对引物对该菌株进行 PCR-RFLP 基因型鉴定,发现 Bt YX-1 含有的杀虫基因为 *cryIAc*、*cry2Ac*、*cryII*、*vip3Aa*、*cry34-35*,而 Bt HD-1 菌株中含有 *cryIAa*、*cryIAb*、*cryIAc*、*cryIIa*、*cry2Aa*、*cry2Ab*、*vip3Aa* 等基因(Milne *et al.*, 2008),2 个菌株所含杀虫基因不完全相同,有些基因可能是沉默基因,因此这 2 个菌株之间杀虫活性的差异,可能是由于组成晶体毒蛋白的种类不同或表达量的差异引起的。

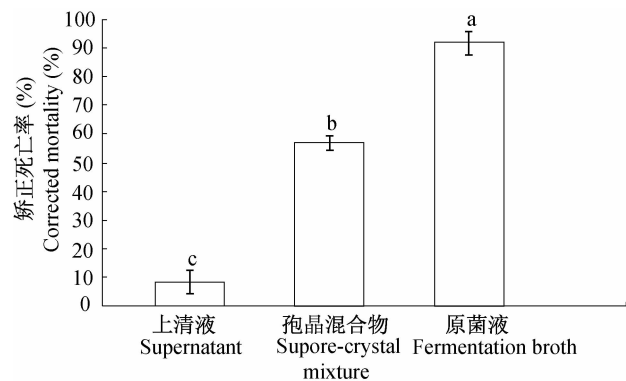


图 6 Bt YX-1 发酵液中不同组分的杀虫活性
Fig.6 The insecticida activities of different ingredients from Bt YX-1 culture broth

图中柱顶所标不同字母表示其处理间存在显著差异 (P < 0.05)。

Histogram with different letters indicate significant difference at 0.05 level by Duncan's multiple range test.

近来的研究表明,苏云金杆菌某些菌株除能产生 δ 内毒素及多种水溶性外毒素外,还可产生提高 Bt 杀虫活性的增效物质(Manker *et al.*, 1994;李青等,1997;吴继星等,1997)。这种增效物质本身对昆虫的毒力极弱,但可以显著提高 Bt 伴孢晶体蛋白对一些重要害虫的毒力,增效可达到几百倍(Manker *et al.*, 1994)。尽管 Bt YX-1 菌

株的上清液的致死作用不明显,但是其增效作用明显,其中的增效物质能显著提高孢晶混合物的杀虫活性,应该对上清液中的增效活性物质进行深入研究,特别关注如何在 Bt 制剂的生产中如何保留并充分利用上清液中的增效活性物质。此外,该菌株上清液对棉铃虫具有明显的生长抑制作用,体重抑制率为 98.33%,可能原因是上清中含有 *vip3Aa* 基因表达的蛋白。Bt YX-1 菌株的毒力是晶体、芽孢与增效物质共同作用的结果,在生产中如能快速检测增效物质的含量,配合晶体毒素的定量测定,则可作为一种快速检验毒力的手段。

致谢:梨小食心虫幼虫由西北农林科技大学植物保护学院仵均祥教授提供,在此表示感谢。

参考文献 (References)

- Babu RM, Sajeena A, Seet haramn K, Reddy MS, 2003. Advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management overview. *J. Crop Prot.*, 22(9):1071—1086.
- Kuo WS, Chak KF, 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.
- Manker DC, Lidster WD, MacIntosh SC, Starness RL, 1994. Potentiator of *Bacillus* pesticidal activity. Patent Coop. Treaty, W094/09630.
- Milne R, Liu Y, Gauthier D, van Frankenhuyzen K, 2008. Purification of Vip3Aa from *Bacillus thuringiensis* HD-1 and its contribution to toxicity of HD-1 to spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) and gypsy moth (*Lymantria dispar*) (Lepidoptera). *J. Invert. Pathol.*, 99(2):166—172.
- Narva, Kenneth E, Payne JM, Schwab GE, Hickie LA, Galasan T, Sick AJ, 1991. Novel *Bacillus thuringiensis* microbes active against nematodes, and genes encoding novel nematodes-active tooxin from *Bacillus thuringiensis* isolates. European Patent Office, EP0462721.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH, 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal protein. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(3):775—806.
- 杜娟,王艳蓉,仵均祥,2010. 不同饲料配方对梨小食心虫生长发育及繁殖的影响. 山西农业大学学报(自然科学版), 30(3):228—231.
- 李青,吴继星,谢天健,王开梅,1997. 苏云金杆菌 GC-91 发酵上清液增效作用研究. 中国生物防治, 13(4):166—168.
- 宋福平,张杰,黄大昉,谢天健,杨自文,戴莲韵,李国勋,1998. 苏云金芽孢杆菌 *cry* 基因 PCR-RFLP 鉴定体系的建立. 中国农业科学, 31(3):13—18.
- 唐启义,冯明光. 2002. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统. 北京:科学出版社. 99—132.
- 王津红,吴卫辉,陈月华,任改新,2001. 中国苏云金芽孢杆菌的分布与 *cry* 基因的多样性. 微生物学通报, 28(3):50—55.
- 吴继星,陈在仵,李青,1997. 苏云金杆菌 79007 发酵上清液对棉铃虫的毒力作用. 微生物学通报, 24(1):35—36.