

我国苏云金杆菌研究 60 年

关雄^{1*} 蔡峻²

(1. 福建农林大学 生物农药与化学生物学教育部重点实验室 福建 福州 350002)

(2. 南开大学 生命科学学院 天津 300071)

摘要: 综述了我国近 60 年来的苏云金杆菌研究进展, 包括资源收集及分类鉴定、Bt 新基因的发掘及组学研究、病理学与作用机制、毒力测定、产品标准化、产业化, 并就 Bt 生物农药存在的问题及改善途径进行了探讨。

关键词: 苏云金杆菌, 研究, 产业化

Bacillus thuringiensis: sixty years of research, development and commercial applications in China

GUAN Xiong^{1*} CAI Jun²

(1. Key Laboratory of Biopesticides and Chemical Biology, Ministry of Education, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

(2. College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: This paper reviewed the isolation, identification, classification, mode mechanism of action, molecular biology, mass production, bioassay and quality control, application and international expansion of *Bacillus thuringiensis* in China. The existing problems and improving ways of Bt biological pesticides were also discussed.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, Research, Development and commercial applications

作为与化学农药相互补充的生物农药, 在植物病虫害防治中发挥重要作用, 而苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 占据了微生物农药 95% 以上的市场, 一直吸引着中国新老科技工作者的关注, 他们默默无闻地在这个领域耕耘奉献, 留下了光辉的足迹。

我国的 Bt 研究, 大概可以分为两个明显的阶段: 第一阶段: 20 世纪 90 年代前的收集资源、菌株鉴定、生产发酵等研究的常规阶段; 第二阶

段: 20 世纪 90 年代后以分子生物学、蛋白质组学、转录组学、代谢组学、转基因植物等现代技术手段全面介入的新阶段, 新基因的发现、转基因新成果的不断涌现, 大大提升了我国微生物农药在国际上的地位。

早在 1941 年, 蒲蛰龙就在我国南方进行了细菌防治菜粉蝶的试验。1955 年, 曹骥应用从法国引进的 Bt 菌粉防治玉米螟, 这也是我国首次有关 Bt 研究的正式报道, 迄今已近 60 年。1959 年刘

*通讯作者: ✉ guanxfafu@126.com

收稿日期: 2013-11-01; 接受日期: 2014-01-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-08

崇乐从捷克引进菌株防治多种害虫,同年张履鸿也从前苏联引进菌株开展试验,1961年彭中允从前苏联带回菌株进行应用。1962年,刘崇乐等撰写了《苏云金杆菌研究的五十年》一书,系统介绍了这一领域的现状并总结了当时国内的研究情况,对我国 Bt 研究进展起到了推动作用,标志着我国 Bt 研究全面展开^[1-3]。

20 世纪 60–80 年代,国内许多单位开展了有关 Bt 的大量工作。自 1968 年开始,中国科学院武汉病毒研究所和华中农业大学一直坚持从资源基础生物学到产品开发的全方位研究,在国内外形成了鲜明特色。华中师范大学在 70 年代开始杀螟杆菌的土法生产和应用,后来在病理学和产品标准化等领域做出了有特色的工作。中山大学和广东省微生物研究所等机构也进行了 Bt 血清学鉴定和简易生产,还提出用家蚕初孵幼虫作为 Bt 毒力测定的方法^[4]。福建农林大学自 1980 年开始分离菌株,从不同生境分离到有特色的菌株,开展了分子生物学的基因鉴定,对提高生产企业产品效价发挥了重要作用,促进了我国 Bt 产品的出口和国内的广泛应用。1990 年以来,国内工作主要集中在 Bt 分子生物学、细胞工程菌的培育、基因工程菌的构建和转基因植物等高新领域。

1 资源收集及分类鉴定

Bt 广泛分布于世界各地,从热带雨林到极地,从高山到平地。自 20 世纪 60 年代起,国内就开始有 Bt 资源分离鉴定的报道^[5]。近 50 年来,Bt 分离、鉴定方法不断改进,迄今已经分离到 8 000 株以上,鉴定了 13 个新亚种。80 年代以前,基本上是从昆虫上分离得到的菌株;80 年代后,从土壤为主的其他生境也分离到大量的 Bt 菌株^[6]。

至今已从昆虫尸体^[7-9]、土壤^[10-11]、贮藏物及粉尘^[12]、植物材料^[13]、食物^[14]、水环境(鲜水、污水、海洋)^[15-17]、动物体^[18-20]、排泄物^[21]、酒糟和酒曲^[22-23]等各种材料中广泛分离到 Bt。

Bt 的分类方法很多,最早采用形态学、生理生化 and 血清学,被普遍接受的是 1962 年由 de

Barjac 和 Bonnefoi 提出的血清型鉴定法,迄今已将 Bt 至少分类为 71 个血清型 85 个亚种^[24-25]。在国内,任改新等(1975)率先应用血清学的方法对 13 株国外引进的已知菌和国内 51 株未知菌进行了分型鉴定,至今我国已鉴定出 41 个血清型,命名 12 个新亚种和 12 个新血清型(含 2 个无鞭毛型,武汉亚种)^[6,26]。

华中农业大学喻子牛、戴经元等分离、筛选了 1 800 多个菌株,鉴定和命名了 Bt 的云南亚种 *B. thuringiensis* subsp. *yunnanensis* (H20a20b)、华中亚种 *B. thuringiensis* subsp. *huazhongensis* (H40)、中华亚种 *B. thuringiensis* subsp. *chinensis* (无鞭毛型),并探索了新的鉴定方法^[26-28]。

任改新等从土壤、贮藏产品、死亡昆虫和叶片等分离到 1 400 多个菌株^[29-30]。其中,在虫尸中鉴定发现 Bt 的 1 个新亚种——玉米螟亚种(H8a-8c),并报道了 4 个 Bt 亚种:肯尼亚亚种 *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* (H4a-4c)、达姆斯达特亚种 *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* (H10)、巴基斯坦亚种(H13) *B. thuringiensis* subsp. *pakistani* 和科默尔亚种 *B. thuringiensis* subsp. *colmeri* (H21)^[31-33]。

中国林业科学院王学聘、戴莲韵等^[34-35]从虫尸和土壤中分离、筛选到高毒力的 Bt 菌株。他们在 1990–1993、1997–1998 年从我国 11 个森林地带所属 24 个自然保护区的 644 个土壤中鉴定出 121 株 Bt,研究了 Bt 在森林土壤中生态分布的规律,从中筛选出不少的高效杀虫菌株^[36-37],这对于开展 Bt 在我国森林生态资源的保护、开发和利用具有重大意义。

中国科学院武汉病毒研究所李荣森、戴顺英、高梅影等分离和收集了 1 980 株 Bt 菌,鉴定了 7 个新血清型并命名了 7 个新亚种:景洪亚种 *B. thuringiensis* subsp. *jinghongensis* (H42)、贵阳亚种 *B. thuringiensis* subsp. *guiyangensis* (H43)、荣森亚种 *B. thuringiensis* subsp. *rongseni* (H56)、平罗亚种 *B. thuringiensis* subsp. *pingluonsis* (60)、肇东亚种 *B. thuringiensis* subsp. *zhaodongensis* (H62)、中

国亚种 *B. thuringiensis* subsp. *sinensis* (H70) 和武汉亚种 *B. thuringiensis* subsp. *wuhanensis* (无鞭毛血清型)^[6,38-41]。筛选出一批对鳞翅目、鞘翅目和直翅目等害虫高效的特异菌株, 还有少数对血吸虫中间宿主钉螺有效, 特别是首次从土壤中分离到杀鞘翅目的高效 Bt 菌株^[42]。他们的研究揭示了 Bt 菌在形态学、生物化学及分子生物学方面的多样性特点。

福建农林大学高日霞、关雄、张灵玲等从虫尸、土壤、植物材料、食物、污水、鲜水、动物粪便、化妆品、酒糟等多种材料上均分离到 Bt 菌株, 大大拓宽了 Bt 的分离来源, 筛选到了对鳞翅目、双翅目高效的 Bt 菌株^[8,13-14,16,21,23,43-45]。他们首次报道从非维管植物(苔藓、地衣)、酒糟、化妆品分离到 Bt, 对研究 Bt 的生态学有特别意义。

国内其他 Bt 菌种资源收集单位, 如湖北农业科学院谢天健、杨自文、吴继星、陈在俱等^[46], 中国农业科学院黄大昉、张杰、宋福平等, 中国科学院动物研究所王瑛等, 河北农业科学院冯书亮等, 江苏连云港教育学院姚江等, 中山大学庞义、海南省热带农业资源开发利用研究所方宣钧等课题组, 都为丰富 Bt 菌种资源做出了很有特色的工作。

2 Bt 新基因的发掘及组学研究

自国际上 1981 年 Schnepf 和 Whiteley 克隆了 Bt 第一个杀虫晶体蛋白(ICPs)基因以来, 大量新 ICPs 基因被发现和克隆^[47]。截止 2013 年 10 月, 国际上把 ICPs 基因按照其氨基酸序列的同源性分为 *cry1-cry72*, *cyt1-cyt3* 共 75 类 751 种, 其中我国发现新基因 39 类 272 个(包括中国台湾学者发现的 6 个)(http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/)。近年来, 我国 Bt 分子生物学研究发展迅速。2008 年以来新发现 183 个 Bt ICPs 基因, 占这期间世界发现新基因数的 55.8% (183/337), 占我国全部 ICPs 基因总数的 67.3% (183/272)。

华中农业大学孙明等首次从 Bt 库斯塔克亚种菌株 YBT-1520 克隆到新 ICPs 基因, 1997 年被国

际 Bt 内毒素命名委员会命名为 *cry1Ac10*。目前该单位已新发现 ICPs 基因 26 个, 其中 20 个是 2008 年以来新发现的, 仅 2010 年就新发现了 13 个, 占该单位总基因数的 50%。

中国农业科学院植物保护研究所黄大昉、张杰、宋福平等自 1998 年克隆到新蛋白基因 *cry1Fb3* 以来, 已发现新 ICPs 基因 91 个, 占我国全部 ICPs 基因总数的 34.6%。1998-2004 年新发现 28 个, 占该时期国内总数的 57.7% (30/52)。近年来, 他们采用高分辨溶解分析、高通量测序等杀虫基因鉴定新技术, 大量发掘新 ICPs 基因, 仅 2010 年以来就新发现 54 个, 占该单位新基因总数的 59.3% (54/91), 占该时期国内新基因总数的 57.7% (54/149)。

福建农林大学关雄、黄志鹏、黄天培等新克隆 20 个 Bt 毒素基因, 其中 *cry2Ah2* 为世界首个, *cry2Ad2*、*cry4Aa4*、*cry10Aa4*、*cry11Aa4* 为国内首个且目前唯一, *cyt1Aa6*、*cyt1Aa7* 基因也是国内仅有的 *cyt1Aa* 类基因。

国内其他多家单位也在积极发掘 Bt 新 ICPs 基因。四川农业大学新克隆 42 个 Bt 毒素基因, 均为 2005 年以来发现, 仅 2011 年就新发现 14 个, 占该单位总数的 1/3。此外, 中国科学院武汉病毒研究所、东北农业大学、海南热带农业资源研究所、中山大学、南开大学等都在新基因的发掘中作出各自的贡献。

截止 2013 年 10 月, Bt 内毒素命名委员会命名了 VIPs 基因 105 个, 其中我国发现 39 个(中国台湾学者发现 1 个), 中国农业科学院植物保护研究所、华中农业大学、中山大学、南开大学、四川农业大学、福建农林大学等均有贡献(http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/)。

在发掘 ICPs 和 VIPs 新基因的同时, 也重视发掘 Bt 的其他编码活性成分的基因。全世界在 NCBI 注册 Bt 几丁质酶基因 102 条, 其中由中国登记的为 30 条, 注册量仅次于美国; 注册 *aiiA* 基因及蛋白序列 75 条, 其中由中国登记的 33 条,

包括福建农林大学的 21 条；已注册的 *InhA* 基因及蛋白仅有 5 条，其中由中国注册的为 3 条，福建农林大学率先在国际上登录 *Bt* 的 *InhA* 基因序列。此外，还克隆了 *Bt* 辅助蛋白基因，如 p19、p20 等^[48-51]，也申请了许多 *Bt* 基因专利，足见我国近 20 年以来在 *Bt* 基因发掘领域的成就卓著。

截止 2013 年 10 月，已有 11 个 *Bt* 菌株完成了全基因组测序，其中，5 株 *Bt* 菌株由我国学者完成。华中农业大学率先完成了 BMB171 菌株的全基因组测序^[52]，随后又完成了 CT-43 和 YBT-020 的全基因组测序^[53-54]；四川农业大学和中国农业科学院植物保护研究所分别完成 MC28 和 HD-73 的全基因组测序^[55-56]。华中农业大学还在基因组的基础上，深入进行了 *Bt* 蛋白组、代谢调控和代谢网络的研究^[57-60]。湖南师范大学进行了 *Bt* 杀虫晶体蛋白质组学研究，建立了对 *Bt* 原毒素表达谱进行鉴定的方法，可快速、准确地筛选具有新的杀虫特性的 *Bt* 菌株或杀虫晶体蛋白；对 *Bt* 不同亚种的杀虫晶体蛋白还进行了比较蛋白质组学研究。

福建农林大学利用新一代测序技术分析受了 LLP29 侵染的埃及伊蚊 IV 龄幼虫的转录组数据。通过该转录组数据及对照组的信息学分析，获得多种差异表达基因。这些研究表明我国 *Bt* 组学研究已经达到国际水平。

3 病理学与作用机制

早在 1962 年，中国科学院动物研究所、华中农学院等就报道过取食 *Bt* 后，昆虫血细胞、中肠细胞、脂肪体、气管壁等细胞、组织的病理变化，进行了 *Bt* 病理学的初步研究^[2,61]。

20 世纪 80 年代，华中师范大学利用娴熟的组织切片技术对感染 *Bt* 毒素及 *Bt* 产品的害虫进行了病理学观察，证实中肠上皮细胞是敏感组织，其病理表现为绒毛膨大、细胞膜突出、最后细胞破裂解体。他们还用电子显微镜观察感病后细胞亚微结构的变化，如线粒体内脊膨大、粗面内质

网断裂等，尽管都是跟踪国外报道，但在国内是最早的工作。他们发表的文章“菜青虫感染苏云金杆菌晶体毒素后中肠上皮细胞的免疫电镜观察”^[61]，证明了毒素结合的位点在细胞膜上，有力否定了当时盛极一时 *Bt* 毒素作用机理的“氧化磷酸化解偶联学说”，当时蒲蛰龙院士曾给与较高的评价，认为解决了当时 *Bt* 晶体毒素作用机制研究中一个悬而未决的问题。

此后，中国科学院武汉病毒研究所^[63-64]、中国农业科学院^[65]等研究了昆虫中肠酶对 *Bt* 毒力的影响、芽胞孢衣中类晶体蛋白质的发现及其作用。南开大学^[66]、福建农林大学^[67]、南京农业大学^[68]等应用配体印迹、光散射分析、免疫组织化学、间接免疫荧光等技术方法，研究了 *Bt* 毒素与受体的结合。

4 产品标准化

20 世纪 50–60 年代，中国科学院动物研究所和微生物研究所、中国林业科学院、湖北农科院、湖南微生物研究所等进行了 *Bt* 发酵生产的研究。

我国正式开始生产 *Bt* 是 1964 年在武汉兴建的第一个中试车间。1965 年底，武汉生产的“三五牌”和长沙生产的“424”苏云金杆菌商品在我国上市，这是我国第一批 *Bt* 商品制剂。20 世纪 70–80 年代，全国各地小型 *Bt* 厂进行半固体发酵遍地开花，但由于生产技术不过关、产品质量以及防效不稳定等问题，这种群众运动式的生产未能继续。在“七五”和“八五”期间，*Bt* 杀虫剂正式列入国家科技攻关计划，全国科研大协作，解决了菌种、发酵技术、后处理工艺等一系列难题，使得我国 *Bt* 产品踏上了一个新的台阶。

在质量检定方面，最早是中山大学采用初孵家蚕测定毒力，湖北省微生物所(原中国科学院武汉微生物研究所)以菜青虫微量点滴法测定伴孢晶体的毒力，并以家蚕和棉铃虫测定了提纯晶体的毒力。有些单位还用家蝇等测定 β -外毒素。华中师范大学还探讨使用了火箭免疫电泳、酶联免

疫吸附测定和苏云金杆菌制剂离体生物测定等方法, 尤其是离体生物测定是该研究小组首创, 具有快速简便可靠, 结果客观误差较小的优点。鉴于许多生产单位宁愿选择养虫不愿养细胞, 该工作未得到有效推广。在这期间, 根据中国农业实际情况, 全国制定了棉铃虫、小菜蛾为标准试虫, 建立起一套完整的 Bt 生测体系, 使我国成为继法国、美国之后的第三个采用毒力效价为标准的质量标准化国家。

在 Bt 产业化进程中, 湖北科诺、康欣以及福建绿安等生物农药公司一直统领全国 Bt 原药研发, 为我国 Bt 产品出口、国内推广應用和增强我国在国际上生物农药话语权作出了杰出的贡献。我国目前已成为世界上最大的井冈霉素、阿维菌素、赤霉素生产国, 苏云金杆菌(Bt)、枯草芽孢杆菌、农用链霉素、农抗 120、苦参碱、多抗霉素和中生霉素等产业化品种成为生物产业的中坚。2012 年, 在我国 126 家企业的 196 登记证生物农药出口中, Bt 产值已达 1 160 万美元, 与阿维菌素(4 792 万美元)和赤霉酸(2 825 万美元)一起共为 8 777 万美元, 占有所有生物农药出口的 51%。

我国 Bt 生产企业存在的问题是, 绝大多数农药企业研发投入占销售收入的比例不到 1%; 绿色环保产品少; 废弃物缺乏有效处置。产业结构不合理。而且这些产品针对常发性、难治害虫、地下害虫、线虫、外来入侵害虫没有效果。目前发展的趋势是, 推动剂型向水基化、无尘化、控制释放等高效安全方向发展, 鼓励开发节约型、环保型包装材料。加大重要农药中间体和专用助剂的开发, 严格控制含甲苯、二甲苯等有毒有害溶剂和助剂的使用等。

我们坚信, 随着我国绿色农业的倡导以及生态文明观念在我国社会文化事业中的层层落实, 生物农药 Bt 将在未来的害虫防治中扮演越来越重要的角色。

致谢: 本文承中国科学院微生物研究所程光胜先生审阅, 特此致谢!

参 考 文 献

- [1] 曹骥, 贾佩华, 林佩华. 用苏芸金杆菌孢子粉防治玉米螟[J]. 昆虫学报, 1955, 5(3): 349-350.
- [2] 刘崇乐, 任改新, 傅贻玲. 苏芸金杆菌防除粘虫的研究增效途径及血细胞的病态变化[C]. 中国昆虫学会1962年学术讨论会会刊, 1962: 273-274.
- [3] 李荣森, 罗绍彬, 张用梅, 等. 我国微生物防治害虫研究的成就[J]. 微生物学通报, 1979, 6(5): 1-7.
- [4] 古德祥, 张古忍, 张润杰, 等. 中国南方害虫生物防治50周年回顾[J]. 昆虫学报, 2000, 43(3): 327-335.
- [5] 姜书勤, 徐婉学. 苏芸金芽孢杆菌变种的鉴定[J]. 微生物学报, 1965, 11(2): 298-300.
- [6] 李荣森. 我国微生物防治研究与微生物农药产业化的进展(1980-1999)[J]. 中国病毒学, 2000, 15(S): 1-15.
- [7] 王婉瑜, 王启方, 张雪萍, 等. 苏芸金杆菌的一个新变种——云南变种[J]. 微生物学报, 1979, 19(2): 117-121.
- [8] 高日霞, 林国宪, 关雄, 等. 苏云金杆菌新菌株“8010”菌的研究[J]. 福建农学院学报, 1986, 15(1): 1-10.
- [9] 朱勋, 吴青君, 张友军, 等. 小菜蛾高效 Bt 菌株的分离、生化特性及基因型鉴定[J]. 应用昆虫学报, 2011, 48(2): 285-290.
- [10] 靳庆生, 林英, 徐广庆, 等. 从土壤分离苏芸金芽孢杆菌[J]. 河北省科学院学报, 1986(02): 58-61.
- [11] 吴仲琦, 罗爽, 张捷, 等. 海南五指山热带雨林区 Bt 菌株的分离及其新型 *cry* 基因鉴定[J]. 基因组学与应用生物学, 2013, 32(1): 46-52.
- [12] 齐绪峰, 宋纪真, 谢剑平, 等. 贮烟仓库中苏云金芽孢杆菌对烟草甲的杀灭活性[J]. 烟草科技, 2006(5): 57-59.
- [13] 张群林, 林群新, 吴小凤, 等. 源于地衣的苏云金芽孢杆菌分离及 PCR-RFLP 分析[J]. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2009, 25(4): 84-89.
- [14] 苏芙蓉, 关怡, 柳婧, 等. 牛奶中苏云金芽孢杆菌的分离与鉴定[J]. 莆田学院学报, 2010, 17(2): 31-34.
- [15] 颜聪毅. 南海海域苏云金芽孢杆菌的分离筛选和产几丁质酶条件初探及一株几丁质降解菌的鉴定[J]. 厦门: 厦门大学硕士学位论文, 2008.
- [16] 吴丽云, 何金清, 周勇, 等. 污水、污泥中苏云金杆菌的分离及其基因型鉴定[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2010, 39(1): 19-24.
- [17] 林毅, 方光伟. 红树林沉积物 Bt 菌株的分离与 *cry* 基因型的鉴定[J]. 生态毒理学报, 2010, 5(6): 889-893.
- [18] 王赟, 靳亚平, 利光辉, 等. 隐性乳腺炎乳牛乳样中苏云金芽孢杆菌的分离与鉴定[J]. 中国兽医科技, 2004, 34(9): 78-79.
- [19] 祖国掌, 李模年, 余为一, 等. 河蟹细菌病病原分离与

- 鉴定[J]. 水产养殖, 2007, 28(2): 1-4.
- [20] 王炳晓, 柴同杰, 苏鹏程, 等. 奶牛瘤胃兼性厌氧纤维素分解菌的分离鉴定[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2009, 37(3): 35-42.
- [21] 吴昌标, 吴莉莉, 郑文金, 等. 动物园动物粪便中苏云金芽孢杆菌调查[J]. 经济动物学报, 2008, 12(4): 241-244, 248.
- [22] 袁先铃, 黄丹, 卫春会. 浓香型大曲中蛋白酶产生细菌的分离鉴定[J]. 酿酒科技, 2012(9): 51-53.
- [23] 郑琦, 邓波, 关雄. 酒糟和窖泥中苏云金芽孢杆菌的分离及鉴定[OL]. 中国科技论文在线, <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201212-943>. 2012-12-27.
- [24] Reyes-Ramirez A, Ibarra JE. Fingerprinting of *Bacillus thuringiensis* type strains and isolates by using *Bacillus cereus* group-specific repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR analysis[J]. Applied Environmental Microbiology, 2005, 71: 1346-1355.
- [25] Roh JY, Liu Q, Lee DW, et al. *Bacillus thuringiensis* serovar *mogi* (flagellar serotype 3a3b3d), a novel serogroup with a mosquitocidal activity[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2009, 102(3): 266-268.
- [26] 孙明, 喻子牛. 苏云金芽孢杆菌中华亚种 CT-43菌株伴胞晶体蛋白的特性[J]. 微生物学报, 1996, 36(4): 303-306.
- [27] 喻子牛, 戴经元, 周宏斌, 等. 苏芸金杆菌的一个新血清型[J]. 微生物学报, 1984, 24(2): 117-121.
- [28] Dai J, Yu L, Wang B, et al. *Bacillus thuringiensis* subspecies *huazhongensis*, serotype H40, isolated from soils in the People's Republic of China[J]. Letters in Applied Microbiology, 1996, 22(1): 42-45.
- [29] 张文成, 刘光宇, 刘春勇, 等. 我国粮食粉尘中苏云金芽孢杆菌的多样性及其杀虫特性的研究[C]. 第七届全国杀虫微生物学术讨论会, 武汉大学学报(杀虫微生物专刊), 1998, 44(S): 1-3.
- [30] 王津红, 吴卫辉, 陈月华, 等. 中国苏云金芽孢杆菌的分布与 *cry* 基因的多样性[J]. 中国病毒学(杀虫微生物专刊), 2000(S): 241.
- [31] 任改新, 李克田, 杨明华, 等. 昆虫病原菌苏云金芽孢杆菌群(*Bacillus thuringiensis* Group)的分类[J]. 微生物学报, 1975, 15(4): 292-301.
- [32] 朱呈智, 赵形言, 任改新. 三株苏芸金杆菌的鉴定[J]. 微生物学通报, 1986, 13(1): 10-12.
- [33] 任改新, 刘霞, 熊海山, 等. 中国 Bt ken-Ag 的特性及其杀虫毒肽的研究[J]. 微生物学报, 1995, 35(4): 303-308.
- [34] 戴莲韵, 王学聘. 苏芸金芽孢杆菌的一个新亚种[J]. 微生物学报, 1988(4): 301-306.
- [35] 戴莲韵, 王学聘. 高毒力苏云金杆菌株的筛选[J]. 林业实用技术, 1989(11): 3-6.
- [36] 戴莲韵, 王学聘, 杨光滢, 等. 我国森林土壤中苏云金芽孢杆菌生态分布的研究[J]. 微生物学报, 1994, 34(6): 449-456.
- [37] 王学聘, 戴莲韵, 杨光滢, 等. 我国西北干旱地区森林土壤中苏云金芽孢杆菌生态分布[J]. 林业科学研究, 1999, 12(5): 467-473.
- [38] 70级工农兵学员杀虫菌鉴定小组, 武汉染料厂青虫菌车间. 几种细菌杀虫剂的菌种鉴定[J]. 微生物学报, 1975, 15(1): 5-14.
- [39] 湖北省微生物研究所虫生菌组. 苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)无鞭毛变种“140”菌的研究[J]. 微生物学报, 1976, 16(1): 12-16.
- [40] 李荣森, 高梅影, 戴顺英, 等. 土壤来源的五个苏云金芽孢杆菌新亚种的鉴定[J]. 微生物学报, 1999, 39(2): 154-159.
- [41] 李荣森, 戴顺英, 高梅影. 苏云金芽孢杆菌的一个新亚种(*Bt* subsp. *sinensis*)[J]. 中国病毒学, 2000, 15(S): 224-225.
- [42] 高梅影, 李荣森, 戴顺英, 等. 杀鞘翅目苏云金芽孢杆菌新菌株及其杀虫剂的研究[J]. 微生物学报, 1999, 39(6): 515-520.
- [43] 黄勤清, 黄志鹏, 关春鸿, 等. 苏云金芽孢杆菌 WB9菌株的分离、生化特性及培养基优化[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2006, 35(4): 346-351.
- [44] Zhang L, Huang E, Lin J, et al. A novel mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* strain LLP29 isolated from the phylloplane of *Magnolia denudata*[J]. Microbiological Research, 2010, 165(2): 133-141.
- [45] 张灵玲, 陈伟生, 沈建闽, 等. 鲜水中 *Bt* 菌株的分离及其生物学特性分析[J]. 热带作物学报, 2011, 32(10): 1898-1892.
- [46] 湖北省天门县微生物研究所, 中国科学院动物研究所, 中国科学院武汉病毒研究所. 苏芸金杆菌天门变种——“7216”菌的研究[J]. 微生物学报, 1980, 20(1): 1-5.
- [47] Schnepf HE, Whiteley HR. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*[J]. Preceding of the National Academy of Sciences USA, 1981, 78: 2893-2897.
- [48] 郑嵘. 辅助蛋白 P19和 P20对苏云金芽孢杆菌 *cryI* 基因表达的增效作用[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 1998.
- [49] 余健秀, 曾少灵, 谢瑞瑜, 等. 苏云金芽孢杆菌分子伴侣串联基因 p19-p29的克隆和表达载体的构建[J]. 微生物学报, 2002, 42(5): 567-572.
- [50] 汤慕瑾, 袁美姘, 陈建武, 等. 苏云金杆菌辅助蛋白 P20对杀虫晶体蛋白 *CryIAb* 表达的影响[J]. 生物工程学报, 2003, 19(5): 566-571.
- [51] He J, Shao X, Zheng H, et al. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* mutant strain BMB171[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(15): 4074-4075.

- [52] He J, Wang J, Yin W, et al. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *chinensis* strain CT-43[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(13): 3407-3408.
- [53] Zhu Y, Shang H, Zhu Q, et al. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* serovar *finitimus* strain YBT-020[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(9): 2379-2380.
- [54] Guan P, Ai P, Dai X, et al. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* serovar *sichuansis* strain MC28[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(24): 6975.
- [55] Liu G, Song L, Shu C, et al. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD73[J]. Genome Announcements, 2013, 1(2): e00080-13.
- [56] Wu D, He J, Gong Y, et al. Proteomic analysis reveals the strategies of *Bacillus thuringiensis* YBT-1520 for survival under long-term heat stress[J]. Proteomics, 2011, 11(13): 2580-2591.
- [57] Chen D, Xu D, Li M, et al. Proteomic analysis of *Bacillus thuringiensis* Δ phaC mutant BMB171/PHB(-1) reveals that the PHB synthetic pathway warrants normal carbon metabolism[J]. Journal of Proteomics, 2012, 75(17): 5176-5188.
- [58] Gong Y, Li M, Xu D, et al. Comparative proteomic analysis revealed metabolic changes and the translational regulation of Cry protein synthesis in *Bacillus thuringiensis*[J]. Journal of Proteomics, 2012, 75(4): 1235-1246.
- [59] Wang J, Mei H, Zheng C, et al. The metabolic regulation of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis* revealed by transcriptomics and proteomics[J]. Molecular Cellular Proteomics, 2013, 12(5): 1363-1376.
- [60] 陈守坚, 张维球, 吴荣宗. 苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner) 研究初报 II. 致病实验及致病机制研究[C]. 中国昆虫学会1962年学术讨论会会刊, 1962: 274-275.
- [61] 洪华珠, 李星, 毓华珊. 菜青虫(*Pieris rapae*)感染苏云金杆菌晶体毒素后中肠上皮细胞的免疫酶标电镜观察[J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 1989, 23(1): 87-89.
- [62] 李荣森, 盛竹莓. 昆虫肠道蛋白酶作用下 δ -内毒素的毒性肽及毒力特异性的变化[J]. 昆虫学报, 1993, 36: 263-271.
- [63] 邵宗泽, 崔云龙. 两种鳞翅目幼虫对 Bt 敏感性的差异及其机理的探讨[J]. 中国生物防治, 1995, 11(2): 75-79.
- [64] Gao MY, Li RS, Dai SY, et al. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from soil in China and their pesticidal activities[J]. Biological Control, 2008, 44: 380-388.
- [65] 苏建亚, 余杰, 韦宏伟, 等. 棉铃虫和甜菜夜蛾中肠丝氨酸蛋白酶活性测定以及活化、降解 CryI_{Ac} 毒素分析[J]. 昆虫知识, 2009, 46(2): 260-266.
- [66] Cai J, Liu RB, Ren GX. The toxicity of *Bacillus thuringiensis* 9816C to *Spodoptera exigua* related to the binding sites on BBMV[J]. Insect Science, 2005, 12: 429-433.
- [67] 张灵玲, 关怡, 张易, 等. 苏云金芽孢杆菌杀蚊新菌株 LLP29对白纹伊蚊作用机理的研究[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2007, 14(1): 16-19.
- [68] 徐永桂, 杨亦桦, 吴益东. CryI_A 毒素与二化螟中肠刷状缘膜囊泡受体蛋白配基结合分析[J]. 昆虫学报, 2009, 52(2): 153-158.