

网络出版时间:2017-11-06 13:53

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2017.12.008

网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20171106.1353.016.html

海南岛吊罗山杀棉铃虫 *Bt* 菌株的筛选

张文飞,刘肖静,刘 倩,彭丝伦,龚建如,
何建桥,戴文玉,余思蓝,王锐萍

(海南师范大学 生命科学学院,热带动植物生态学省部共建教育部重点实验室,海南 海口 571158)

【摘 要】【目的】从海南岛吊罗山原始热带雨林区筛选分离杀棉铃虫 *Bt* 菌株,为研发新的防治棉铃虫的生物农药和抗虫转基因棉花奠定基础。【方法】在吊罗山原始热带雨林区不同海拔高度采集 253 份土壤样品,采用醋酸钠高温处理方法从中分离各类芽孢杆菌,通过显微镜观察鉴定出产伴胞晶体蛋白的苏云金芽孢杆菌(*Bt*),对伴胞晶体蛋白进行 SDS-PAGE 电泳和质谱分析,了解其基本特性。并以棉铃虫二龄幼虫为靶标,测定获得的 *Bt* 菌株对棉铃虫的杀虫活性。【结果】从 253 份土壤样品中分离出芽孢杆菌 786 株,其中产伴胞晶体蛋白的 *Bt* 菌株 33 株,*Bt* 菌株分离率为 4.2%。SDS-PAGE 电泳和质谱分析表明,分离 *Bt* 菌株含有的伴胞晶体蛋白与已发现的毒素蛋白不同,可能为新型晶体蛋白;利用棉铃虫二龄幼虫进行 *Bt* 分离株生物活性测定,结果表明有 8 株 *Bt* 菌株对棉铃虫幼虫的致死率为 25%~85%。【结论】从海南岛吊罗山原始热带雨林区筛选分离获得 8 株杀棉铃虫的 *Bt* 菌株,这些菌种可能含有新的杀虫晶体蛋白基因。

【关键词】 海南岛吊罗山;苏云金芽孢杆菌;棉铃虫

【中图分类号】 S476.11

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2017)12-0054-07

Screening *Bacillus thuringiensis* strains against cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Diaoluoshan primitive tropic rainforest in Hainan

ZHANG Wenfei, LIU Xiaojing, LIU Qian, PENG Silun, GONG Jianru,
HE Jianqiao, DAI Wenyu, YU Silan, WANG Ruiping

(Ministry of Education Key Laboratory for Tropical Animal and Plant Ecology, College of Life Sciences,
Hainan Normal University, Haikou, Hainan 571158, China)

Abstract: 【Objective】 This research aimed to select *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) with insecticidal activity against cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) from tropical rain forest reserves of Diaoluoshan to provide new insecticidal protein genes for microbial biopesticide and transgenic crops. 【Method】 Soil samples were collected from Diaoluoshan at different heights above sea level. The *Bacillus* isolates were harvested following the approach of selection culture medium with sodium acetate at high temperature. *Bt* strains producing parasporal crystal were recognized by microscope. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and mass spectrometry were used to identify *Bt* isolates. Then, bioassay was carried out to detect the insecticidal activity of *Bt* crystalline inclusion. 【Result】 A total of 786 *Bacillus*

【收稿日期】 2016-09-17

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31560527);海南省自然科学基金项目(314077);海南省应用技术研发与示范推广专项(ZDXM2015018)

【作者简介】 张文飞(1979—),男,湖南华容人,副教授,博士,主要从事资源微生物学和功能基因组学研究。
E-mail:wenfei2007@163.com

【通信作者】 王锐萍(1963—),女,陕西西安人,教授,硕士生导师,主要从事资源微生物学研究。E-mail:wrp@hainnu.edu.cn

were obtained from 253 soil samples, and 33 *Bacillus* isolates were further identified as *Bt* isolates with isolation rate of 4.2%. The bioassay against the second instar larva of *Helicoverpa armigera* indicated that 8 *Bt* isolates out of 33 strains showed insecticidal activity of 25%—85% against lavas of cotton bollworm.

【Conclusion】Eight *Bt* isolates were identified with insecticidal activity against lavas of the cotton bollworm. They may have new insecticidal genes and provide application possibility for cultivating transgenic cotton.

Key words: Diaoluoshan in Hainan island; *Bacillus thuringiensis*; *Helicoverpa armigera*

棉铃虫 (*Helicoverpa armigera* Hubner) 属鳞翅目夜蛾科, 是棉花蕾铃期重要钻蛀性害虫, 主要蛀食蕾、花、铃, 也取食嫩叶。棉铃虫寄主植物有 20 多科 200 余种, 近年棉铃虫为害十分猖獗, 广泛分布在中国及世界各地, 尤以黄河流域棉区、长江流域棉区受害较重^[1]。

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 *Bt*) 的研究和开发已有百余年的历史, 近年来, *Bt* 菌株的各种蛋白和生物活性物质的杀虫活性谱被不断挖掘, 不仅发现其毒蛋白对线虫和动物原虫有杀虫活性, 而且发现其对某些癌细胞和肿瘤细胞也有活性^[2-4]。因此利用 *Bt* 菌株可以开发出生物农药, 用于农林牧业的害虫防治, 或者用于蚊虫等病原媒介昆虫的生物防治。尤其 21 世纪以来, *Bt* 杀虫蛋白基因被分离克隆, 并被用于培育转基因作物, 兼顾了生产效益和环境保护效果^[5]。

当前, 商业化的抗虫转基因作物绝大多数利用 *cry1A* 和 *cry2A* 基因, 但是长期应用 *Cry1A* 和 *Cry2A* 蛋白控制棉铃虫, 容易导致棉铃虫产生相应的抗性。农业害虫对 *Cry* 杀虫蛋白的抗性风险已经严重威胁转基因作物的安全和推广应用, 亟需开发与现有 *Cry* 蛋白基因有着不同杀虫机制的新型杀虫基因^[6-8], 以解决昆虫短时间产生抗性的问题。围绕这一课题, 笔者一直致力于从海南热带原始雨林区收集和挖掘新型的杀虫微生物和杀虫基因资源^[9], 这是因为海南吊罗山热带原始雨林区原始植被保存完好, 地表土壤腐质层厚, 昆虫种类多, 有丰富的菌种资源。本研究从海南岛吊罗山国家自然保护区采集土样样品 253 份, 从中筛选分离获得 *Bt* 菌株 33 株, 并以棉铃虫二龄幼虫为靶标进行杀虫活性测定, 以期为后续进行杀虫基因鉴定和克隆奠定基础, 进而为棉铃虫的综合防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 土壤样品采集

从海南吊罗山热带原始雨林区采集土壤样品,

采样点一般选择植被保护完整、生态环境没有人为破坏、土壤腐殖质丰富的地方, 选择山体的向阳面按照一定海拔从高到低进行样品收集。选择一个采样点, 去除地表覆土, 虚拟 1 个边长 2 m 的正三角形, 从三角形 3 个角的地表下 5~15 cm 处共取 50 g 土壤, 装入样品袋中, 算作 1 个样品, 共采集 253 份样品, 记录采样地经纬度和海拔等信息, 贴好标签备用^[10]。

1.2 *Bt* 菌株筛选

土壤样品收集完成后, 立即于 40 °C 下进行风干操作, 之后将风干的样品混匀研磨破碎进行 *Bt* 菌株分离。采用醋酸钠培养基 (5 g/L 牛肉膏, 10 g/L 蛋白胨, 34 g/L 醋酸钠, pH 7.0) 进行富集培养, 然后 70 °C 高温水浴 20 min 后进行平板培养, 培养 3~5 d 至芽孢充分形成, 挑取菌苔用石碳酸复红液染色后进行显微镜油镜 (×1 500) 观察, 若观察到伴随着无色芽孢有红色蛋白点的即为疑似 *Bt* 菌株, 将其进行甘油低温保存^[10]。统计分离的 *Bt* 菌株和芽孢菌株总数, 计算 *Bt* 菌株的分离率 (分离率 = *Bt* 菌株总数 / 芽孢杆菌总数 × 100%)。

1.3 *Bt* 分离株的扫描电镜观察

挑取 *Bt* 分离株单菌落至 5 mL LB 培养基中, 28 °C、200 r/min 过夜活化培养, 转接至液体 G-Tris 培养基^[14] 28 °C 培养 3 d, 至 90% 菌体产生芽孢。收集菌体, 用预冷的 1 mol/L NaCl 洗涤菌体 2~3 次, 取 10 μL 芽孢和晶体蛋白的混合物小心平铺在洁净的盖玻片上, 然后 4 °C 低温真空干燥。将有样品的盖玻片浸没在体积分数 2.5% 戊二醛固定液中, 4 °C 避光固定 24 h, 先后用体积分数 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 乙醇分别洗脱 15 min, 再用无水乙醇脱水 15 min。在通风橱中, 将样品浸入六甲基二硅胺烷 (HMDS) 中 15 min, 重复 2 次, 将玻片贴在铜板上, 喷金, 利用扫描电镜 (德国蔡司 EVO MA 10/LS 10) 进行伴胞晶体蛋白观察^[11-12]。

1.4 *Bt* 分离株蛋白质的 SDS-PAGE 分析

将 *Bt* 菌种转接到 5 mL G-Tris 液体培养基中, 28 °C、200 r/min 振荡培养 3 d, 收集菌体。用 1

mol/L NaCl 洗涤 3 次,然后加入 1 mL 无菌水,超声波(VCX-750,美国 Sonics 公司)破碎处理 15 min。12 000 r/min 离心 10 min,收集菌体沉淀(为细胞碎片、芽孢和伴胞晶体蛋白混合物),参照文献[13]进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.5 Bt 分离株蛋白质的质谱分析

取 1.4 节 *Bt* 菌株芽孢期蛋白,用考马斯亮蓝 R250 进行染色脱色处理。用洁净的刀片割取 SDS-PAGE 胶上最亮的蛋白带,然后切割成小块作为质谱分析的样品。小胶块洗涤脱色真空干燥后,进行胰蛋白酶酶解过夜^[14]。蛋白被酶解后进行真空干燥,然后进行质谱分析(Applied Biosystems,USA),获得 MS 和 MS/MS 数据。使用 MASCOT 软件(<http://www.matrixscience.com>)对本地 NCBI nr 数据库进行检索^[2],如果蛋白质质谱分析得分(Protein/Ion score)大于 65,且可信度(C. I.)大于 95%,则说明为同源蛋白。

1.6 Bt 分离株的生物活性测定

将 *Bt* 菌株在 200 mL G-Tris 培养基中 28 ℃ 培养 3 d 至芽孢完全形成,4 ℃、12 000 g 离心 10 min 收集菌体,然后用 1 mol/L 冰冷的 NaCl 洗涤 3 次,最后将菌体悬浮于 30 mL 冰冷蒸馏水中。超声波破碎处理 10 min,12 000 g 离心 10 min,收集芽孢和伴胞蛋白混合物,再用 15 mL 无菌水重新悬浮,取 2 mL 菌株蛋白与人工饲料^[15]混匀加入到 6 孔板中晾

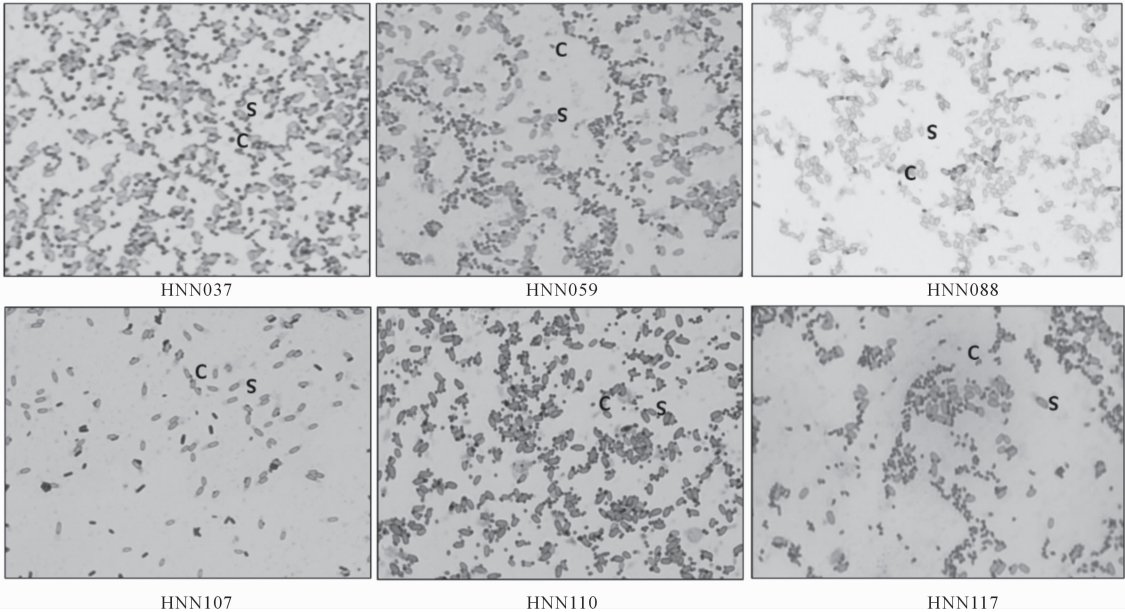
干,用于生物活性测定。

挑取孵化 5 d 左右的棉铃虫幼虫(棉铃虫幼虫由海口海森元生物科技有限公司提供)至装有 *Bt* 晶体蛋白人工饲料的 6 孔板中,每孔 1 头虫,每个蛋白样品用 20 头棉铃虫幼虫。放置在相对湿度为 65%左右、温度为 26 ℃、光照周期为光照/黑暗=14 h/10 h 的条件下,观察测试昆虫形态变化以及饲料是否变质,培养 3~5 d 记录棉铃虫死亡情况,计算棉铃虫的死亡率。

2 结果与分析

2.1 Bt 菌株的分离与鉴定

采集的土壤样品经过醋酸钠结合高温处理以进一步富集 *Bt* 菌株,因为醋酸钠能够抑制非 *Bt* 芽孢杆菌的芽孢形成,使其在突然高温处理时被杀死,从而保证最大限度地富集 *Bt* 菌株。分离株培养至芽孢充分形成,石碳酸复红液染色后在油镜下观察,如果观察到同时有芽孢杆菌和伴胞晶体的产生,即可初步判定分离株为 *Bt* 菌株^[16]。本研究共从吊罗山热带雨林区采集的 253 份土壤样品中筛选分离到芽孢杆菌 786 株,其中 *Bt* 菌株 33 株,分别命名为 HNN037、HNN059、HNN088、HNN107 等(图 1),*Bt* 菌株分离率为 4.2%。进一步用扫描电镜观察发现,*Bt* 菌株的伴胞晶体形状有方形、圆形、椭圆形等(图 2)。



C. 伴胞晶体蛋白;S. 芽孢;图 2 同
C. Crystalline inclusion;S. Spore;The same for Fig. 2
图 1 *Bt* 菌株芽孢和伴胞晶体蛋白的光学显微镜观察(×1 500)
Fig. 1 Observation of *Bt* isolates and crystalline inclusion by optical microscope(×1 500)

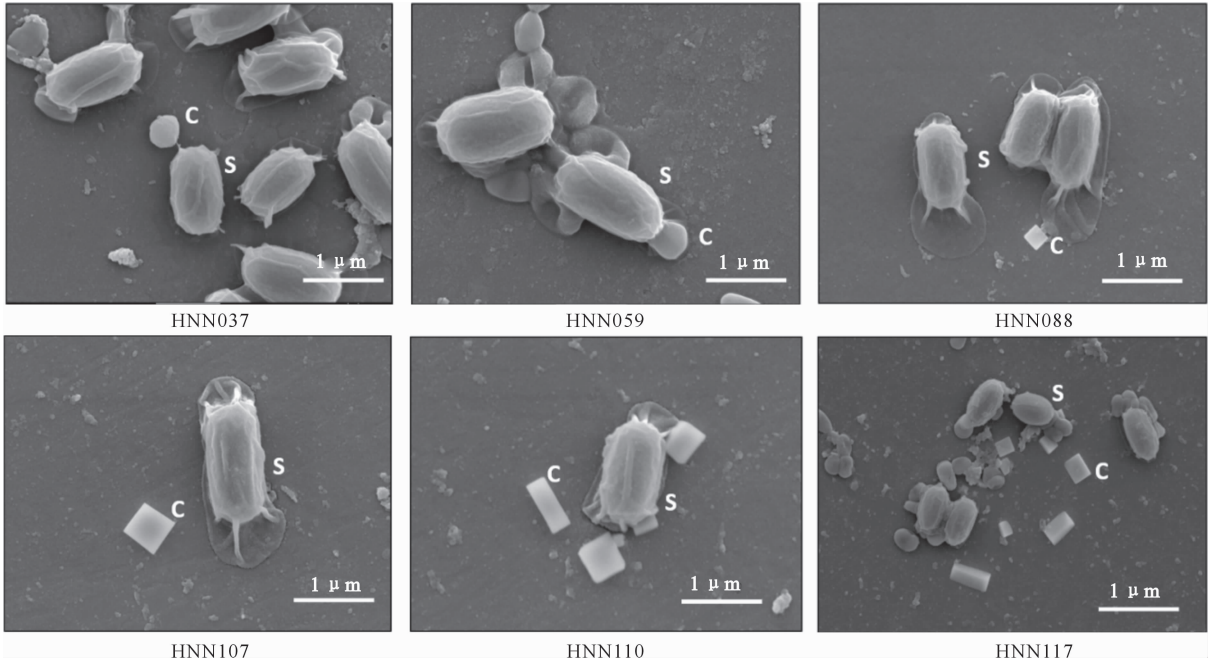


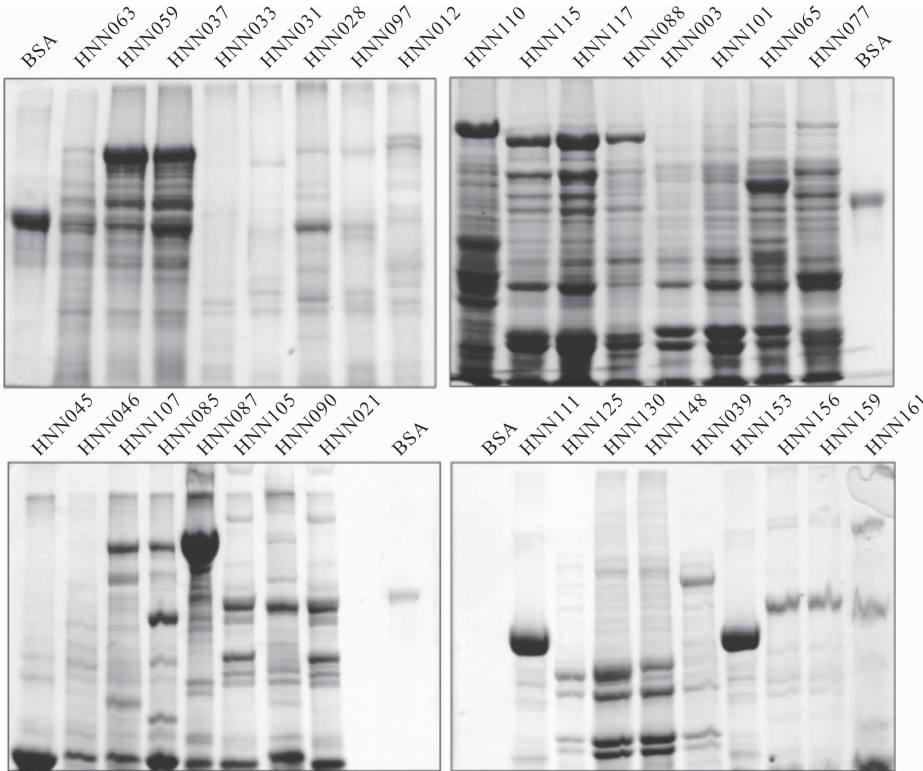
图 2 *Bt* 菌株伴胞晶体蛋白的扫描电镜观察

Fig. 2 Observation of *Bt* crystalline inclusion under scanning electron microscope

2.2 *Bt* 菌株的伴胞晶体蛋白分析

SDS-PAGE 电泳可用于分析 *Bt* 菌株芽孢期的蛋白组成及其分子质量大小,伴胞晶体蛋白的 SDS-PAGE 电泳带型作为 *Bt* 菌独有的一个重要特征,可以作为判断 *Bt* 新菌株的重要标准。*Bt* 菌株培养进

入芽孢期时,90% 的基因表达关闭,伴胞晶体蛋白能够占到细胞干质量的 1/3 以上,因此芽孢期 SDS-PAGE 电泳出现的蛋白带主要为伴胞晶体蛋白。本研究中,芽孢期 *Bt* 菌株的主要蛋白带大小为 130, 70 和 30 ku 左右(图 3)。



BSA. 牛血清白蛋白,分子质量为 66 ku BSA. Bovine albumin, molecular weight 66 ku

图 3 *Bt* 菌株伴胞晶体蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 3 Analysis of parasporal inclusion protein profiles by SDS-PAGE

用洁净刀片从 SDS-PAGE 胶上割取最亮的蛋白带进行质谱分析,结果见表 1。表 1 表明,*Bt* 分离株的伴胞晶体蛋白在 nr 数据库中无对应的同源蛋白。据此初步判断从吊罗山国家自然保护区分离的

Bt 菌株含有的伴胞晶体可能为新型杀虫晶体蛋白,可对其进行生物活性、基因组和蛋白质测序分析,以进一步确定。

表 1 *Bt* 菌株伴胞晶体蛋白的质谱分析

Table 1 Mass spectrometry analysis of crystalline inclusions of *Bt* isolates

<i>Bt</i> 菌株 <i>Bt</i> isolates	蛋白分子质量/ku Protein band size	nr 库对应蛋白 Corresponding accession No.	质谱肽段 Pep. count	质谱得分 Protein score	可信度/% C. I.
HNN012	130	gi 227976386	3	6	0
HNN021	60	gi 41688283	2	15	0
HNN028	70	gi 4033727	6	13	0
HNN037	130	gi 15721993	12	21	0
HNN039	90	gi 201129	2	6	0
HNN059	130	gi 3360519	6	9	0
HNN063	65	gi 227976386	8	18	0
HNN065	75	gi 17977981	9	12	0
HNN085	130	gi 17385650	8	8	0
HNN087	130	gi 218235686	8	9	0
HNN088	130	gi 23751165	6	8	0
HNN090	60	gi 201118	5	12	0
HNN105	60	gi 201122	6	16	0
HNN107	130	gi 234203282	6	9	0
HNN110	140	gi 16588691	4	13	0
HNN111	30	gi 201102	5	10	0
HNN115	130	gi 474892	7	8	0
HNN117	130	gi 15143039	6	8	0
HNN149	75	gi 206939340	3	8	0
HNN153	45	gi 8567977	1	6	0
HNN156	45	gi 16554960	1	5	0
HNN161	45	gi 201103	5	13	0

2.3 *Bt* 菌株蛋白的杀虫活性

对 33 株 *Bt* 分离株进行杀棉铃虫活性测定,饲养 5 d 后统计存活和死亡的数量(表 2)。

表 2 *Bt* 菌株对棉铃虫幼虫的杀虫活性

Table 2 Toxicity test against larvae of cotton bollworm

<i>Bt</i> 菌株 <i>Bt</i> isolate	死亡率/% Corrected mortality	伴胞晶体形态 Shape of acrystalline
HNN021	55.0	双锥体 Bipyramidy
HNN028	50.0	不规则 Irregular
HNN037	85.0	球形 Sphere
HNN039	75.0	球形 Sphere
HNN059	85.0	椭圆形 Oval
HNN088	25.0	正方体 Cube
HNN107	25.0	正方体 Cube
HNN110	80.0	正方体 Cube

从表 2 可见,*Bt* 菌株 HNN037、HNN039、HNN059 和 HNN110 蛋白对棉铃虫的杀虫致死率超过 75%,HNN021 和 HNN028 对棉铃虫的致死率为 50%左右,HNN088 和 HNN107 蛋白对棉铃虫的致死率为 25%。其余 25 个 *Bt* 菌株的蛋白对棉铃虫幼虫没有杀虫活性或杀虫活性极低。

3 讨 论

20 世纪 90 年代我国开始种植转 *Bt* 杀虫基因棉花,获得了良好的经济、环境和社会效益。转 *Bt* 杀虫基因抗虫棉曾经力挽狂澜,挽救了棉花种植业^[17-19]。但正如多年使用同一种农药控制害虫会致害虫产生抗药性,长期大面积种植同一种抗虫基因的转基因作物也可能导致害虫产生相应的抗性,至少已有 4 种农业害虫被报道在田间对 *Bt* 毒素产生了相应的抗性^[20-21]。目前抗虫转基因作物的抗虫基因主要是 *cry1Ab*、*cry1Ac*、*cry2A* 基因及其同源基因,大量研究表明,*Cry1Ac*、*Cry1Fa* 和 *Cry1Ja* 等蛋白能结合相同或相似的受体蛋白,因此容易产生交互抗性^[22]。*Cry1A* 和 *Cry2A* 蛋白虽然不竞争同一受体蛋白,但也可能因为抗性机制复杂而产生交互抗性^[23-24]。

我国开展了大量转基因抗虫棉的研究与开发工作,成为继美国之后世界上独立自主成功研制抗虫棉的第 2 个国家。为了缓解棉铃虫对 *Bt* 杀虫蛋白产生抗性,中国农业科学院生物技术所于 1996 年开

始将不同杀虫机理的 *Bt* 毒蛋白转入棉花共表达,构建双价抗虫棉。但中国严重缺乏具有完全自主知识产权的 *Bt* 杀虫基因,为此,华中农业大学、中国农业科学院、四川农业大学、中国科学院武汉病毒所和海南师范大学等单位开展了大规模 *Bt* 资源挖掘,鉴定克隆 *Bt* 杀虫蛋白基因 400 多个,克隆的杀虫蛋白基因数量已经超越美国。但其中对棉铃虫有杀虫活性的基因仅有 *cry1*、*cry2* 等,能应用到抗虫转基因棉花的基因资源依然非常有限^[25]。

海南岛地处热带,是中国热带生物资源和物种基因库的重要分布中心,因此在海南开展热带生物资源研究具有得天独厚的地理条件。西北农林科技大学、南开大学、海南大学、海南师范大学和中国农业科学院等多家科研机构在海南岛开展了 *Bt* 菌种资源收集调查^[9-10,26-27]。其中,中国热带农业科学院椰子研究所对杀椰心叶甲幼虫的 *Bt* 菌株进行筛选,发现 6 株 *Bt* 菌株对椰心叶甲幼虫的校正致死率高于 60%^[28]。三亚南繁研究院对三亚地区的 *Bt* 菌种资源进行发掘,筛选出 21 株 *Bt* 菌株,其中 1 株 *Bt* 菌株对小菜蛾幼虫有活性^[29]。但尚未见对海南岛杀棉铃虫 *Bt* 资源进行筛选和分离的研究报道。本研究对海南岛吊罗山热带原始雨林 *Bt* 资源进行系统收集,着力筛选分离对棉铃虫有杀虫活性的 *Bt* 菌,并成功筛选出 8 株杀棉铃虫活性较强的 *Bt* 菌株。下一步将对这些 *Bt* 菌株进行第二、三代测序技术基因组测序^[30],以全面鉴定这些菌株所含的杀虫蛋白基因,探讨这些杀虫基因用于抗虫转基因棉花的可能性。

[参考文献]

- [1] 戴小枫,郭予元. 1992 年棉铃虫暴发危害的特点及成因分析 [J]. 中国农学通报,1993,9(5):38-43.
- [2] Dai X F, Guo Y Y. Causality exploration for cotton bollworm plague occurred in China and its solution strategy [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 1993, 9(5):38-43.
- [3] Zhang W, Crickmore N, George Z, et al. Characterization of a new highly mosquitocidal isolate of *Bacillus thuringiensis*-an alternative to *Bti*? [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2012, 109(2):217-222.
- [4] Wolfenbarger L L, Naranjo S E, Lundgren J G, et al. *Bt* crop effects on functional guilds of non-target arthropods: a meta-analysis [J]. PLoS One, 2008, 3(5):e2118.
- [5] Wei J Z, Hale K, Carta L, et al. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 100(5):2760-2765.
- [6] Ohba M, Mizuki E, Uemori A. Parasporina, new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis* [J]. Medical Care, 2009, 29(1):427-433.
- [7] Pray C E, Huang J, Hu R, et al. Five years of *Bt* cotton in China-the benefits continue [J]. Plant, 2002, 31(4):423-430.
- [8] Liu Y B, Tabashnik B E, Dennehy T J, et al. Development time and resistance to *Bt* crops [J]. Nature, 1999, 400:519.
- [9] Gassmann A J, Carrière Y, Tabashnik B E. Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* [J]. Annu Rev Entomol Bio, 2009, 54:147-163.
- [10] 张文飞, 全嘉新, 谢柳, 等. 海南岛热带雨林区芽孢杆菌收集及 *Bt* 菌鉴定 [J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(2):265-274.
- [11] Zhang W F, Quan J X, Xie L, et al. Collection of *Bacillus* and identification of *Bacillus thuringiensis* isolates from tropical rain forest reserves of Hainan island [J]. Genomics and Applied Biology, 2009, 28(2):265-274.
- [12] 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.
- [13] Wu Z Q, Luo S, Zhang J, et al. Screening *Bacillus thuringiensis* isolates from soil samples of Wuzhishan primitive tropic rainforest in Hainan and identifying novel *cry*-type genes [J]. Genomics and Applied Biology, 2013, 32(1):46-52.
- [14] 谢家仪, 董光军, 刘振英. 扫描电镜的微生物样品制备方法 [J]. 电子显微学报, 2005, 24(4):440.
- [15] Xie J Y, Dong G J, Liu Z Y. Microbial sample preparation method of scanning electron microscopy [J]. Journal of Chinese Electron Microscopy Society, 2005, 24(4):440.
- [16] 伍思宇, 周志如, 尤青, 等. 海南东寨港红树林聚磷菌的筛选及其特性 [J]. 应用与环境生物学报, 2016, 22(3):397-401.
- [17] Wu S Y, Zhou Z R, You Q, et al. Screening and characterization of soil phosphate accumulating bacteria from Dongzhaigang mangrove wetlands in Hainan [J]. Chinese Journal Applied Environmental Biology, 2016, 22(3):397-401.
- [18] 张文飞, 姚淑霞, 谢柳, 等. 苏云金芽孢杆菌 S1478-1 分离株的特性鉴定及 *Cry1Ac* 同源基因克隆 [J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(3):471-476.
- [19] Zhang W F, Yao S X, Xie L, et al. Identification of *Bacillus thuringiensis* isolate S1478-1 and cloning of *Cry1Ac* homolog [J]. Genomics and Applied Biology, 2009, 28(3):471-476.
- [20] Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 6:2856-2860.
- [21] Liao C, Heckel D G, Akhurst R. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins for *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae), major pests of cotton [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2002, 80(1):55-63.
- [22] Santana M A, Moccia V C C, Gillis A E. *Bacillus thuringiensis* improved isolation methodology from soil samples [J]. Journal of Microbiological Methods, 2008, 75(2):357-358.
- [23] Yue Z, Liu X, Zhou Z, et al. Development of a novel-type trans-

- genic cotton plant for control of cotton bollworm [J]. *Plant Biotechnol*, 2016, 14(8): 1747-1755.
- [18] Kumar S, Chandra A, Pandey K C. *Bacillus thuringiensis* (Bt) transgenic crop: an environment friendly insect-pest management strategy [J]. *Journal of Environmental Biology*, 2008, 29: 641-653.
- [19] Milne A E, Bell J R, Hutchison W D, et al. The effect of farmers' decisions on pest control with Bt crops: a billion dollar game of strategy [J]. *PLoS Comput Biol*, 2015, 11(12): e1004483.
- [20] Aaron J G, Jennifer L P M, Ryan S K, et al. Field-evolved resistance to Bt maize by western corn rootworm [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22629.
- [21] Rod J M, Sharon J D, Bill J. *Vip3A* resistance alleles exist at high levels in Australian targets before release of cotton expressing this toxin [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39192.
- [22] Hernández C S, Ferré J. Common receptor for *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ac, Cry1Fa, and Cry1Ja in *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, and *Spodoptera exigua* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(9): 5627-5629.
- [23] Qiu L, Hou L, Zhang B, et al. Cadherin is involved in the action of *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ac and Cry2Aa in the beet armyworm, *Spodoptera exigua* [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2015, 127: 47-53.
- [24] Hernandez C S, Ferre J. Common receptor for *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ac, Cry1Fa, and Cry1Ja in *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, and *Spodoptera exigua* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(9): 5627-5629.
- [25] Érica S M, Lilian B P, Vinícius F D, et al. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) [J]. *Biological Control*, 2007, 40(1): 65-68.
- [26] 罗 兰, 谢丙炎, 袁忠林, 等. 我国土壤中苏云金芽孢杆菌的分离与基因型的鉴定 [J]. *应用与环境生物学报*, 2005, 11(6): 756-759.
- Luo L, Xie B Y, Yuan Z L, et al. Identification of cry-type gene and isolation of *Bacillus thuringiensis* from soil in China [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2005, 11(6): 756-759.
- [27] 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]. *微生物学通报*, 2001, 28(3): 50-55.
- Wang J H, Wu W H, Chen Y H, et al. The distribution of *Bacillus thuringiensis cry* gene diversity in China [J]. *Microbiology China*, 2001, 28(3): 50-55.
- [28] 孙晓东, 李朝绪, 吕朝军, 等. 海南滨海椰林 Bt 菌株的筛选与鉴定 [J]. *热带作物学报*, 2011, 32(11): 2129-2132.
- Sun X D, Li C X, Lü C J, et al. Isolation and identification of *Bacillus thuringiensis* strains from coconut grove of seaside, Hainan province [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2011, 32(11): 2129-2132.
- [29] 任 红, 孔祥义, 安可岫, 等. 三亚地区苏云金芽孢杆菌的筛选与生物活性测定 [J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(28): 13660-13661.
- Ren H, Kong X Y, An K S, et al. Screening and bioactivity determination of *Bacillus thuringiensis* in Sanya region [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2009, 37(28): 13660-13661.
- [30] Ye W, Zhu L, Liu Y, et al. Mining new crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* on the basis of mixed plasmid-enriched genome sequencing and a computational pipeline [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(14): 4795-4801.