

文章编号:1001-7380(2016)02-0039-05

苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白研究及应用概述

薛 欢

(江苏省林业局,江苏 南京 210036)

摘要:作为应用最广最有效的细菌杀虫剂,苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)在形成芽孢时可产生具有杀虫活性的杀虫晶体蛋白(ICPs)。迄今为止,ICP已有近800种,对鳞翅目、双翅目、同翅目、膜翅目、鞘翅目、蜚蠊目等害虫都具有特异性的毒杀作用。该文概述了ICP的结构、功能及基因分类,以及其基因工程研究及应用,为Bt杀虫蛋白的推广应用及其定向改造提供参考。

关键词:苏云金芽孢杆菌;杀虫晶体蛋白;结构;功能;转Bt植物

中图分类号:S767.3 **文献标志码:**A **doi:**10.3969/j.issn.1001-7380.2016.02.012

Research progress on *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins

XUE Huan

(Forestry Bureau of Jiangsu Province, Nanjing 210036, China)

Abstract: *Bacillus thuringiensis* (Bt) is a species of microbe which can form effective and widely-used insecticidal crystal proteins (ICPs). ICP possess highly specialized insecticidal activity against a large number of insect species. In this article, the structure, function and gene classification of Bt insecticidal crystal proteins were introduced, and the relative research and application of gene engineering were reviewed.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; Insecticidal crystal protein; Structure; Function; Transgenic Bt plant

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*,简称Bt)是目前世界上应用最广、最有效的细菌杀虫剂^[1],在形成芽孢的过程中,能形成具有杀虫活性的伴孢晶体(Parasporal Crystal)。伴孢晶体由具有高度特异的杀虫活性的一种或几种被称为杀虫晶体蛋白(insecticidal crystal proteins,ICPs)或 δ -内毒素(δ -endotoxins)^[2-7]的晶体蛋白组成。ICPs是Bt杀虫活性的主要来源,Hannay于1953第1次描绘了此类有效杀虫成分^[8]。1977年以前,只发现13个Bt亚种,且仅对鳞翅目昆虫有效。之后,分别于1983和1991年发现了对鞘翅目^[9]、线虫^[10]有效的菌株。现在证明Bt对鳞翅目、双翅目、鞘翅目、同翅目、膜翅目、蜚蠊目、线形动物门、扁形动物门和原生动物中的有害生物等都有作用。

ICPs的专一性很强,通常1种毒素只能杀死某

一目标昆虫,对害虫天敌及脊椎动物无毒,是一种安全有效的杀虫蛋白。目前,已确定数十种Bt菌系及它们编码的130多种ICPs,20世纪90年代,克隆的Bt基因就被转入植物,并在植物体内高效表达^[11]。本文对Bt杀虫晶体蛋白的分类、蛋白结构、杀虫机制及应用等方面进行了综述,使读者对ICP的类型、作用机制等有更多的认识,为对ICP进行改造并将其应用于转基因奠定基础,以便更好地将其应用于农林害虫的防治中。

1 杀虫晶体蛋白的分类

1981年Schnepf等从菌株HD-1中克隆了第1个ICP基因Cry1Aa1^[12]。随后,大量杀鳞翅目幼虫ICP基因被克隆。由于分子生物学及核酸测序技术的飞速发展,ICP基因的克隆得到了飞速发展^[12]。

收稿日期:2015-06-12;修回日期:2016-03-15

基金项目:江苏省林业三新工程项目“天敌生物防控重大森林病虫害技术集成与示范”(LYSX[2014]17)

作者简介:薛欢(1984-),女,江苏启东人,工程师,大学本科毕业,主要从事林业综合管理、林业技术培训等工作。E-mail:179507869@qq.com。

截止 2015 年 5 月,全世界已克隆了近 800 种 ICP 基因^[13]。

1995 年 Crickmore 等^[14]在无脊椎动物病理学(SIP)年会上提出的 ICP 的分类方法沿用至今,其分类原则是:用计算机比较收集到的 ICP 氨基酸序列的同源性,绘出它们序列相似性的百分比值图,以 45%,78%和 95%为界,将基因划分为 4 个分类等级。命名方法:①不具有溶血细胞作用的 ICPs 编为 Cry,具有溶血细胞作用的 ICPs 编为 Cyt。②第 1 分类等级用阿拉伯数字书写,ICPs 间同源性不超过 45%的命名为不同的第 1 分类等级,例如 Cry1 和 Cry2。③第 2 分类等级用大写英文字母表示。这一等级之间的同源性在 45%–78%之间,如 Cry1A 和 Cry1B。④第 3 分类等级用小写英文字母表示,这一等级的同源性在 78%–95%之间,如 Cry1Aa 和 Cry1Ab。⑤第 4 分类等级是最终等级,用阿拉伯数字表示,彼此间同源性大于 95%。该等级在一般情况下是不用的,其编号主要是为了说明其来源。如 Cry1Ac3 和 Cry1Ac5 完全相同。截止 2015 年 5 月,已经发现近 800 种 ICP 基因,分属 308 种模式基因,其中 296 类为 Cry 蛋白,12 类为 Cyt 蛋白^[13]。

2 杀虫晶体蛋白的结构

大多数的 ICP 基因编码都含 1 个 60 kD 左右的胰蛋白酶抗性中心,分子量 130–140 kD 的蛋白^[15,16]。全长的 ICP 对毒性的发挥并不都是必需的,切除 C 端 600–1 150 个氨基酸残基以及 N 端 28–29 个氨基酸残基后形成的约 60 kD 毒素核心片段,对毒力的发挥才是必需的和充分的^[17–19]。N-末端的胰蛋白酶抗性中心是 ICP 的杀虫活性部分,C-末端对于维持 ICP 晶状结构具有非常重要的作用。ICPs 由 3 个不同结构域组成,位于肽链的 N 端的结构域 I(由 7 个 α 螺旋组成,其中 6 个两性的 α 螺旋围绕着 1 个疏水的 α 螺旋形成的 α 螺束)参与了细胞膜的穿孔^[20],位于肽链中间的结构域 II(由 7 个 β 折叠组成)顶端的突环参与了毒蛋白与受体蛋白的结合^[21],位于 C 端的结构域 III(由 2 组反平行的 β 折叠片层组成的三明治结构)与受体的识别相关^[22]。

目前研究最多的 ICPs 是 Cry1,它们由 1 100–1 200 个氨基酸组成,分子量 130–140 kD。其 C 端高度保守,同源性大于 90%,而 N 端却差异较大,同源性只有 40%–90%。这 2 部分具有明显不同的结

构与功能特征,前者为亲水性的部分,表现为 β -折叠的二级结构,主要用于维持伴胞晶体的形成;后者主要为疏水性的部分,形成 α -螺旋结构,具有发挥毒力所必需的功能区域^[21]。Cry1Aa, Cry3A 和 Cyt2A 的空间结构已通过 X 衍射方法测定(见图 1)。部分降解的 Cry1Aa(65 kD)和 Cry3A(67 kD)氨基酸序列同源性为 36%,它们的空间结构也非常相似^[23],都可分为 3 个结构域(Domain): Domain I 是一簇由 7 或 8 个疏水的 α -螺旋形成的结构,这一结构是毒素插入细胞膜并发挥毒性作用的部位;Domain II 是 3 个反向平行的 β -折叠结构,该结构域可能参与了与膜受体蛋白的识别与结合;Domain III 是紧裹在一起的 β 三夹心结构,其中 C 末端包裹在该结构中,因此可以保护激活毒素的 C 末端不至于在昆虫中肠内进一步降解^[22]。Cry2A 与 Cry3A, Cry1A 的同源性都不到 20%,因此它们的空间结构存在较大的差异(见图 1)。

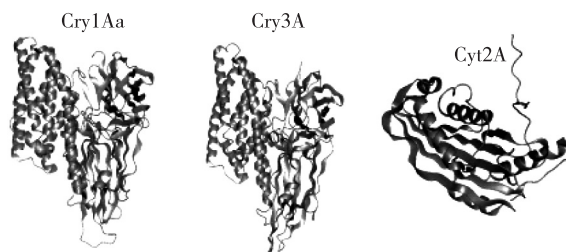


图 1 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白的空间结构
(引自 Schnepf 等^[16])

3 杀虫晶体蛋白的杀虫机制研究

ICPs 首先以原毒素的形式被昆虫吞食后,在昆虫中肠中被酶解消化,形成活性片段。活化的 ICPs 与中肠上高丰度的碱性磷酸酶(ALP)和氨肽酶 N(APN)以相对较低的亲合力结合,从而使活化的毒素在中肠细胞的微绒毛膜上富集。毒素以较高的亲合力与受体钙粘蛋白(CAD)结合^[24–26],引发毒素 Domain I 中的 α -1 螺旋的剪切,使 Domain I 的疏水区域暴露,而且螺旋 α -1 的剪切是毒素插入细胞膜前形成前孔低聚物的必要条件^[25,26]。与 CAD 的结合是一个复杂的互作过程,涉及 3 个抗原决定基,即 CAD 胞外区域 CR7, CR11 和 CR12,其中 CR12 是钙黏蛋白距离细胞膜最近的结构域。切除 α -1 螺旋的毒素形成寡聚体后,再次与 ALP 和 APN 受体结合,且亲和力增强了近 200 倍。ALP 和 APN 蛋白与前孔物质结合

后的作用是促进前孔物质插入细胞膜,形成孔洞并最终导致细胞裂解^[26]。

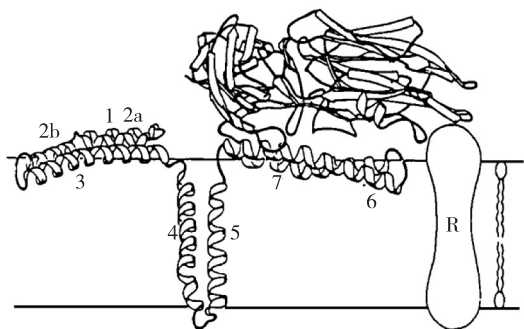


图2 ICPs插入质膜的“伞”模型(引自Li等^[22])

利用2.5埃的分辨率对Cry3A的晶体结构进行了分析,Li等提出了ICPs的三维空间结构,使机制研究取得新突破^[22]。根据空间结构,可将Cry3A分为3个结构域,整个活性片段的5个保守区都包含在这3个结构域中。N端的1-290个氨基酸残基形成的7个 α -螺旋组成结构域I,其中6个 α -螺旋以相对倾斜20°角包围 α -5螺旋形成一个螺旋束,这种螺旋束结构很可能在细胞膜穿孔过程中发挥重要作用。为此,根据ICPs可能所共有的三维空间结构,Li等提出了“伞模型”(见图2)。根据这个模型, α -4和 α -5螺旋或者 α -6和 α -7螺旋形成一个处在结构域I边沿的发夹结构,最接近于质膜;当其他螺旋在膜表面象伞架一样打开时将促使这一对螺旋比较容易地插入脂双层膜。这种机制与大肠杆菌毒素A类似,但是可能需要在的一个或多个螺旋内的凸环处断开才能适应大的构象变化;即整个膜穿孔的形成需要多个毒素分子内部不同结构域或螺旋的参与^[27-29]。

4 杀虫晶体蛋白的基因工程研究及其应用

为克服*Bt*杀虫谱窄的缺点,一方面,可以从自然界筛选新的*Bt*菌株以克隆获得具有新杀虫特性的ICP基因,另一方面,可以利用基因重组、基因转移等基因工程技术构建新的或具有多重杀虫功效的*Bt*工程菌^[30-32]。1982年首次获得了对地中海粉斑螟(*Ephestia kuehniella*)和斑须按蚊(*Anopheles stephensi*)都有杀伤活性的接合子。瑞士Sandoz公司在同一受体菌中表达Cry I和Cry III 2类基因,获得对鳞翅目和鞘翅目均具活性的产品SAN418。此外,

ICP基因的高量表达或超量表达可以通过增加ICP基因拷贝数,受体菌为无芽孢或无质粒突变株,改造启动子,利用辅助蛋白(如p19, p20, ORF1h和ORF2)等方式获得^[33]。

自1981年首次成功地克隆了ICP基因以来,全世界总共已获得了70多种转*Bt*基因植物。目前转ICP基因工程中主要运用农杆菌介导法、基因枪法、电击法、花粉介导法、子房注射法等对植物进行遗传转化。通过提高ICP编码基因中G/C含量、使用植物偏爱密码子、利用强启动子(如CaMV-35S启动子)等方法来提高ICP在植物中的表达量。而将优良品种与转*Bt*基因植物杂交可获得既带有ICP基因又带有优良品种优良特性的品种。我国在转*Bt*抗虫棉、抗虫水稻、抗虫杨树等方面都取得了成功。在20世纪90年代,郭三堆等将人工合成的*Bt*杀虫基因导入棉花,成功选育了GK1, GK2, GK19, GKZ1和晋棉26国产单价转基因抗虫棉品种,并大面积应用,使中国成为继美国之后世界上第2个研制成功转基因抗虫棉的国家。在此基础上,创制了双价转基因抗虫棉新品种,进一步丰富了抗虫棉种质资源,加速了抗虫棉新品种的培育和推广应用^[34,35]。截止到2013年,中国共通过了134个国审转基因抗虫棉品种^[36]。1989年杨虹等^[37]利用原生质体电融合技术将ICP基因导入水稻。1991年,谢道昕等^[38]通过花粉管通道法把ICP基因转入水稻。1993年Fujimoto等^[39]用电激法将*cry1Ab*转入梗稻。1995年舒庆尧等^[40]在国际上首次采用农杆菌介导法培育出*cry1Ab*基因的水稻。Wunn等^[41]用基因枪法将*cry1Ab*导入水稻中。2000年,姚方印等^[42]用农杆菌和基因枪法将有*cry1Ab*基因和抗除草剂Bar基因的融合基因导入水稻,获得效果良好的抗螟虫植株。2003年,沈圣泉等^[43]采用一步成苗法,对转*Bt*基因水稻“克螟稻”与梗稻品种秀水63的杂种F1进行花药培养,选育3个抗虫高产品系。2007年,杨清华^[44]以TP309为转化材料,通过农杆菌和基因枪介导法2种方法将*cry1Ac*导入水稻均获得成功。2009年农业部为转*Bt*水稻“华恢1号”和“汕优63”颁发了生产应用安全证书,迈出了转基因水稻发展的重要一步。我国在世界上最早开展了*Bt*基因转杨树的研究,1991年国内伍宁丰等^[45]首次成功地将ICP基因转入欧洲黑杨,1993年田颖川等^[46]通过农杆菌介导法将携带ICP基因的双元载体转化欧洲黑杨的叶片外植体,并获得了

对杨尺蠖和舞毒蛾幼虫有杀虫效果的再生植株 54 株;继 1994 年进入田间试验表现出明显的抗虫效果后于 2002 年实现商品化,成为世界上首个商品化栽培的转基因林木树种。从 20 世纪 90 年代至今,国内外专家将不同类型的 ICP 基因转入欧洲黑杨、美洲黑杨等众多杨树无性系中,获得了对舞毒蛾、天幕毛虫、杨尺蠖、杨小舟蛾、杨叶甲、桑天牛等杨树主要害虫有杀虫活性的杨树转基因植株。目前,世界范围内已经获得了棉花、水稻、杨树、玉米、番茄、马铃薯、烟草、甘蓝等 70 余种能够高效表达 ICP 的转基因植株。

5 展 望

随着生活水平的提高,人类对健康和生态环境的要求越来越高,农产品安全问题将备受关注。微生物农药可为农产品优质安全生产和降低有毒物质残留提供技术和物质保证。Bt 等生防菌的应用是防控植物病虫害的重要手段,是减少化学农药使用、促进农业供给侧结构性调整、保护生态环境、实现农业可持续发展的有力保证^[47-49],这预示着 Bt 发展前景将是乐观的。目前,ICPs 的分子结构、功能及其在转基因作物中的表达调控得到深入的研究,抗性的分子机理也逐渐明晰;同时在发展多样化 Bt 制剂及转 ICP 基因作物;建立抗性的早期监测技术、抗性治理措施,实现无公害 Bt 农药及转 ICP 基因作物的持续利用等方面均将取得长足进展。

参考文献:

- [1] 关 雄,蔡 峻.我国苏云金杆菌研究 60 年[J].微生物学通报,2014,41(3):459-465.
- [2] 李 林,喻子牛.细菌杀虫剂研究和开发的现状与展望[J].微生物学杂志,1998,18(4):33-38.
- [3] 龙紫新,庞 义.昆虫细菌病:第七章[M]//蒲蛰龙.昆虫病理学.广州:广东科技出版社,1994:217-338.
- [4] 潘映红,张 杰,黄大昉.几种微生物杀虫蛋白基因研究进展[J].生物技术通报,1999,15(2):1-4.
- [5] 晓 岚.农用生物农药展望[J].农药译丛,1994,16(20):7-17.
- [6] CONVENTS D, HOUSSIER C, LASTERS I, et al. The *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins: Evidence for a two domain structure of the minimal toxic fragment [J]. Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(3):1369-1375.
- [7] CRICKMORE N, WHEELER V C, ELLAR D J. Use of an operon fusion to induce expression and crystallization of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins encoded by a cryptic gene [J]. Molecular and General Genetics, 1994, 242(3):365-368.
- [8] HANNAY C L. Crystalline inclusions in aerobic sporeforming bacteria [J]. Nature, 1953, 172(4387):1004.
- [9] KRIEG V A, HUGER A M, LANGENBRUCH G A, et al. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*, a new pathotype effective against larvae of Coleoptera [J]. Zeitschrift für Angewandte Entomologie, 1983, 96:500-508.
- [10] ZUCKERMAN B M, DICKLOW M B, ACOSTA N. A strain of *Bacillus thuringiensis* for the control of plant parasitic nematodes [J]. Biocontrol Science and Technology, 1993, 3(1):41-46.
- [11] 李 林,刘子铎,孙 明,等.苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因表达的调控[J].农业生物技术学报,1998,6(1):90-95.
- [12] CHAETOPOD A, BHATNAGAR N B, BHATNAGAR R. Bacterial insecticidal toxins [J]. Critical Reviews in Microbiology, 2004, 30(1):33-54.
- [13] CRICKMORE N, ZEIGLER D R, BRAVO A, et al. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. 2014, http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/index.html.
- [14] CRICKMORE N, ZEIGLER D R, FEITELSON J, et al. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins [J]. Microbiology & Molecular Biology Reviews, 1998, 62(3):807-813.
- [15] 喻子牛.苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白及其基因的研究与应用.见:生命科学和土壤学中几个领域研究的进展[M].北京:农业出版社,1993:170-179.
- [16] SCHNEPF E, CRICKMORE N, VAN RIE J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins [J]. Microbiology & Molecular Biology Reviews, 1998, 62(3):775-806.
- [17] NAGAMATSU Y, ITAI Y, HATANAKA C, et al. A toxic fragment from the entomocidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis* [J]. Agricultural & Biological Chemistry, 1984, 48:611-619.
- [18] WHITELEY H R, SCHNEPF H E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis* [J]. Annual Review of Microbiology, 1986, 40:549-576.
- [19] 邵宗泽,喻子牛.苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白超量表达的机制[J].生命科学,2000,12(4):173-176.
- [20] BRAVO A, GOMEZ I, PORTA H, et al. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity [J]. Microbial Biotechnology, 2013, 6(1):17-26.
- [21] CHOMA C T, SUREWICZ W K, CAREY P R, et al. Unusual proteolysis of the protoxin and toxin from *Bacillus thuringiensis* Structural implications [J]. European Journal of Biochemistry, 1990, 189:523-527.
- [22] LI J D, CARROLL J, ELLAR D J. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution [J]. Nature, 1991, 353(6347):815-821.
- [23] GROCHULSKI P, MASSON L, BORISOVA S, et al. *Bacillus thuringiensis* CryIA (a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation [J]. Journal of Molecular Biology, 1995, 254(3):447-464.
- [24] GOMEZ I, ARENAS I, BENITEZ I, et al. Specific epitopes of domains II and III of *Bacillus thuringiensis* CryIAb toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N

- receptors in *Manduca sexta* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(45):34032-34039.
- [25] PACHECO S, GOMEZ I, ARENAS I, et al. Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a “ping pong” binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidase-N and cadherin receptors[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(47):32750-32757.
- [26] ARENAS I, BRAVO A, SOBERON M, et al. Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin [J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(17):12497-12503.
- [27] 邵宗泽, 刘子铎, 喻子牛. 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白的结构与功能研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(5):476-480.
- [28] 刘子铎, 孙 明, 罗曦霞, 等. 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白的作用机制[M]//喻子牛. 苏云金芽孢杆菌生产和应用. 北京: 农业出版社, 1994:144-166.
- [29] GILL SS, COWLES E A, PIETRANTONIO P V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins[J]. Annual Review of Entomology, 1992, 37:615-636.
- [30] 崔洪志, 郭三堆. Bt 毒蛋白抗虫植物基因工程研究[J]. 农业生物技术学报, 1998, 6(2):166-172.
- [31] 宋福平, 张 杰, 黄大昉, 等. 苏云金芽孢杆菌 cry 基因 PCR-RFLP 鉴定体系的建立[J]. 中国农业科学, 1998, 31(1):13-18.
- [32] SCHNEPF H E, WIHTELEY H R. Delineation of a toxin-encoding segment of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene[J]. Journal of Biological Chemistry, 1985, 260(10):6273-6280.
- [33] 程 萍, 王清锋, 喻子牛. 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因的启动子及其转录调控[J]. 微生物学通报, 1999, 26(2):130-134.
- [34] 郭三堆, 倪万潮, 徐琼芳. 编码杀虫蛋白融合基因和表达载体及其应用; 中国, ZL95119563.8[P].
- [35] 郭三堆, 崔洪志, 倪万潮. 两种编码杀虫蛋白质基因和双价融合表达载体及其应用; 中国, ZL98102885.3[P].
- [36] 郭三堆, 王 远, 孙国清, 等. 中国转基因棉花研发应用二十年[J]. 中国农业科学, 2015, 48(17):3372-3387.
- [37] 杨 虹, 李家新, 郭三堆, 等. 苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素基因导入水稻原生质体后获得转基因植株[J]. 中国农业科学, 1989, 22(6):1-5.
- [38] 谢道昕, 范云六, 倪丕冲. 苏云金芽孢杆菌杀虫基因导入中国栽培水稻品种中花 11 号获得转基因水稻植株[J]. 中国科学(B 辑), 1991(8):830-834.
- [39] FUJIMOTO H, ITOH K, YAMAMOTO M, et al. Insect resistant rice generated by introduction of a modified delta endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* [J]. Biotechnology (N Y), 1993, 11(10):1151-1155.
- [40] 舒庆尧, 叶恭银, 崔海瑞, 等. 转基因水稻“克螟稻”选育[J]. 浙江农业大学学报, 1998, 24(6):579-580.
- [41] WUNN J, KIOTI A, BURKHARDT P K, et al. Transgenic indica rice breeding line IR58 expressing a synthetic *Cry1A(b)* gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective insect pest control[J]. Biotechnology Journal, 1996, 14(2):171-176.
- [42] 姚方印, 李广贤, 朱常香, 等. 转 Bt 基因水稻的抗虫性鉴定[J]. 山东农业科学, 2000(6):31-32.
- [43] 沈圣泉, 吴殿星, 夏英武, 等. 花药培养获得转 Bt 基因抗虫水稻纯系[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(6):561-565.
- [44] 杨清华. 转 Bt 基因水稻选育研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007.
- [45] 伍宁丰, 范云六. 含苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白基因的杨树工程植株的建立[J]. 科学通报, 1991(9):705-708.
- [46] 田颖川, 李太元, 莽克强, 等. 抗虫转基因欧洲黑杨的培育[J]. 生物工程学报, 1993, 9(4):291-297.
- [47] 黄大昉. 农业微生物基因工程研究与展望[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(2):111-114.
- [48] 王利平, 代林远, 李 鹏. 苏云金芽孢杆菌研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(9):224-227.
- [49] GOBATTO V, GIANI S G, CAMASSOLA M, et al. *Bacillus thuringiensis* isolates entomopathogenic for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) and *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. Brazilian Journal of Biology, 2010, 70(4):1039-1046.