

· 研究论文 ·

苏云金芽胞杆菌 GS8菌株的生物学特性及其 cry基因型鉴定

刘廷辉^a, 郭巍^{* a, b}, 申建茹^a

河北农业大学 a 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, b 生命科学学院, 河北 保定 071001)

摘要:采用桑叶浸渍法和饲料表面覆盖法测定发现,从土壤中分离的一株苏云金芽胞杆菌菌株 GS8对家蚕 *Bombyx mori*、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 初孵幼虫均表现出较高的杀虫活性,经形态学和生理生化反应鉴定该菌株为东北亚种 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *tohokuensis*)。聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析结果表明, GS8 菌株的杀虫蛋白晶体主要由分子质量为 130、81 和 60 kDa 的蛋白组成。聚合酶链反应限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 鉴定结果显示, GS8 菌株含有 *cryIAa*、*cryIAb*、*cryIb*、*cry2Ab* 和 *cry9Ba* 等基因。

关键词:苏云金芽胞杆菌; 杀虫活性; 生理生化反应; PCR-RFLP

中图分类号: Q78; S482.39

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2009)01-0092-06

Biological Characteristics of *Bacillus thuringiensis* Isolate GS8 and Identification of its cry-type Genes

LIU Ting-hui^a, GUO Wei^{* a, b}, SHEN Jian-ru^a

(a. College of Plant Protection / Biological Control Center of Plant Diseases and Plant Pests of Hebei Province,

b. College of Life Sciences, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, Hebei Province, China)

Abstract: A modified diet overlay assay method and immersed mulberry leaf assay method were employed to test the susceptibility of neonates to a novel strain of *Bacillus thuringiensis* GS8, isolated from soil samples in China. The isolate GS8 showed high toxicity against neonates of *Bombyx mori*, *Spodoptera exigua* and *Helicoverpa armigera*. Morphological characteristics and physiological and biochemical test indicated that isolate GS8 was *Bacillus thuringiensis* subsp. *tohokuensis*. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis revealed that 130, 81 and 60 kDa proteins were the major components of crystal from GS8. PCR-RFLP revealed that *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIb*, *cry2Ab* and *cry9Ba* genes were presented in the isolate GS8.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; insecticidal activity; physiological and biochemical reaction; PCR-RFLP

苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 B.t) 是一种能形成芽胞的, 具有杀虫活性的革兰氏

阳性细菌, 在芽胞形成过程中能够产生伴胞晶体蛋白^[1]。B.t 的杀虫活性主要来自伴胞晶体, 又称

收稿日期: 2008-09-09; 修回日期: 2008-12-11.

作者简介: 刘廷辉 (1978-), 男, 河北保定人, 博士, 主要从事农业害虫生物防治研究, E-mail: liutinghui@126.com; * 通讯作者 (Author for correspondence): 郭巍 (1971-), 女, 黑龙江绥化人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事生物技术与生防微生物的研究. 联系电话: 0312-7528178; E-mail: guowei@hebau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (30771447); 国家重点基础研究发展规划 (“973计划”) (2009CB118902); 河北农业大学引进人才基金项目.

杀虫晶体蛋白 (Insecticidal Crystal Proteins, ICPs), 由 cry基因和 cyt基因编码。Bt具有重要的经济意义,在农业、林业、卫生害虫综合防治中占有极其重要的地位,这使得人们对寻找新的高毒力菌株和高杀虫活性的基因产生了很大兴趣。迄今为止,全世界收集保存的苏云金芽胞杆菌已超过 40 000株^[2],已报道的血清型共有 82种^[3]。

虽然血清型仍然作为 Bt分类的有效依据,但目前所采用的分类方法已越来越多。聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)可以快速分析出其蛋白组成,聚合酶链式反应 (PCR)是一种检测目标 DNA 序列最为有效和快速的方法^[4],已经被许多学者用于鉴定 Bt的伴孢晶体蛋白组成和预测其杀虫活性^[5]。尽管这些方法能够对大量的样品进行分析及预测,但生物活性测定仍是确定伴孢晶体蛋白杀虫活性和杀虫谱的有效方法。

随着 Bt制剂应用的不断扩大, cry基因编码产生的晶体蛋白均在不同程度上引发了昆虫抗性的发生,寻找新的高毒力菌株是避免抗性昆虫所造成损失的有效途径。GS8菌株是笔者等采用温度筛选法自行从土壤中分离的 Bt菌株,发现其对多种农业害虫尤其是棉铃虫 *Helicoverpa armigera*和甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*具有高毒力。本研究主要对 GS8菌株的生物学特性、晶体蛋白组成、杀虫活性和杀虫蛋白基因类型等进行测定及鉴定,以期为进一步筛选并克隆编码对鳞翅目害虫具有高活性的杀虫基因提供材料,进而探索 Bt杀虫晶体蛋白的作用机理。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 菌株 本实验室分离保存的 GS8菌株; Bt标准菌株由中国农业科学院植物保护研究所惠赠。

1.1.2 昆虫 家蚕 *Bombyx mori*棉铃虫 *Helicoverpa armigera*和甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*的初孵幼虫。家蚕品种为菁松 ×皓月,购于山东广通蚕种集团有限公司,其他试虫均为本研究室饲养。

1.1.3 试剂 PCR所用试剂和限制性内切酶购自 TaKaRa公司;其他化学试剂均为市售分析纯。

1.2 方法

1.2.1 杀虫活性测定

1.2.1.1 GS8发酵液制备 采用 1/2LB 液体培

养基 (胰蛋白胨 0.5%、酵母抽提物 0.25%、氯化钠 0.5%),于 pH 7.0、30、220 r/min 摇床上培养 38 h,至 70%~90%晶体脱落。镜检计数,计算单位体积晶体数。

1.2.1.2 生物测定 于 GS8发酵液中加入 1%吐温-20(体积分数)作为乳化剂,以同样加入 1%吐温-20的无菌水为对照。将生长期和大小一致的新鲜桑叶浸入发酵液中,不断摇晃使叶片充分粘着胞晶混合液,取出自然晾干后饲喂家蚕初孵幼虫,置于 26.5 培养箱中,48 h后调查死亡虫数。

对棉铃虫和甜菜夜蛾的杀虫活性采用饲料表面覆盖法^[6,7]测定:将饲料平铺于 20 cm²小盒底部,然后将 100 μL GS8发酵液均匀涂布于饲料表面,风干,每盒中接 10头试虫,重复 5次。置于 26.5 培养箱中,每 24 h检查一次活虫的数量(以不能顺利进入 2龄期视为死亡)。用 Abbott公式计算死亡率^[8]。

1.2.2 形态观察 在 1/2LB 固体培养基上、于 30 条件下培养,定期涂片,染色,镜检,观察晶体形态。

1.2.3 培养特征 分别在 LB琼脂、营养琼脂、牛肉浸汁琼脂、葡萄糖斜面琼脂和卵黄琼脂上于 30 培养 2~4 d后观察菌落形状及菌体颜色等。

1.2.4 生理生化反应 参照戴莲韵等^[9]和喻子牛^[10]的方法,测定了 GS8与 6个 Bt标准菌株(苏云金亚种、加拿大亚种、东北亚种、蜡螟亚种、鮎泽亚种、库斯塔克亚种)的 V.P. (乙酰甲基甲醇)反应,卵磷脂酶的产生,对淀粉、明胶蛋白、七叶灵的作用,在加入蔗糖、甘露糖、纤维二糖、水杨苷的培养基中是否产酸以及菌膜的形成等 10项生理生化反应指标。

1.2.5 生长情况观察 将野生型 Bt菌株 GS8和标准菌株 HD-73接种于 1/2LB 液体培养基中,230 r/min、30 培养,每 2 h取样,在紫外分光光度计下测定 OD₆₀₀值,观察细胞生长变化。

1.2.6 晶体蛋白 SDS-PAGE分析 参照 Sambrook等^[11]的方法。取 1 mL Bt过夜培养物,12 000 r/min 下离心 10 min,弃上清液,将沉淀悬于 40 μL 无菌水中,加入 40 μL 2 ×SDS 样品缓冲液(每 10 mL 中含 10% SDS 4 mL,甘油 2 mL, 巯基乙醇 1 mL, pH 6.8 的 Tris 缓冲液 1.25 mL, 溴酚兰

2 mg, 双蒸水 1.75 mL), 混匀, 100 处理 10 min, 12 000 r/min 离心 2 min, 吸取上清液进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.7 cry 基因型鉴定 采用 Kuo 等^[12]及宋福平等^[13]的方法鉴定菌株 GS8 的 cry 基因类型。

2 结果与分析

2.1 菌株 GS8 的生物活性

GS8 菌株对家蚕、棉铃虫和甜菜夜蛾初孵幼

虫均表现出较高的杀虫活性(表 1)。

2.2 菌株培养性状及形态观察

显微镜(1 000 ×)观察结果显示, GS8 营养体细胞为杆状, 较为粗壮; 培养 16 h 后偶见有更为粗壮的芽胞囊形成, 染色后可见一端着深红色, 另一端不着色; 培养 38 h 后, 绝大多数芽胞囊破裂, 释放出卵圆形的芽胞和菱形、球形以及不规则形状的晶体(见图 1)。

表 1 菌株 GS8 的生物活性测定结果

Table 1 Bioassay results of isolate GS8

供试昆虫 Tested insects	供试虫数 Number of neonate tested	处理浓度 / (孢子 / mL) Concentration of GS8 /(spores /mL)	校正死亡率 Corrected mortality (%)
家蚕 <i>Bombyx mori</i>	50	4.7×10^7	100
棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i>	50	5.9×10^7	100
甜菜夜蛾 <i>Spodoptera exigua</i>	50	5.9×10^7	100

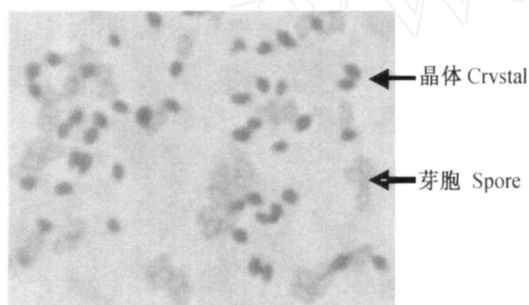


图 1 菌株 GS8 的芽胞和晶体

Fig 1 The spore and crystal of isolate GS8

2.3 培养特征和生理生化反应

GS8 菌株的培养特征见表 2, 生理生化反应指标测定结果见表 3。结合培养特征和生理生化特征定种的原则, 该菌株的菌落呈乳脂色、乳白色、淡黄色且有粗糙、褶皱, 但无可溶性色素产生; 不能形成菌膜, V. P. 反应为阴性, 可水解七叶灵, 脲酶反应、分解水杨苷、蛋白水解、淀粉水解等反应为阳性, 不利用甘露糖、纤维二糖等特征均与东北亚种 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *tohokuensis*) 的 10 项生理生化反应结果完全一致。因此, 初步推断 GS8 菌株属于东北亚种。

2.4 GS8 菌株的生长特性

GS8 菌株和标准菌株 HD-73 的生长曲线见图 2, 比较发现 GS8 和 HD-73 的生长情况基本一致: 0~2 h 处于延滞期, 其对数生长期为 2~16 h, 16 h 后处于稳定期。

2.5 杀虫晶体蛋白的 SDS-PAGE 分析

苏云金芽胞杆菌的不同亚种或菌株, 其伴孢晶体可由单一的或多个不同大小级别的毒蛋白组成。SDS-PAGE 分析结果表明, 菌株 GS8 的晶体主要由分子质量为 130、81 和 60 kDa 等的蛋白组成(图 3)。

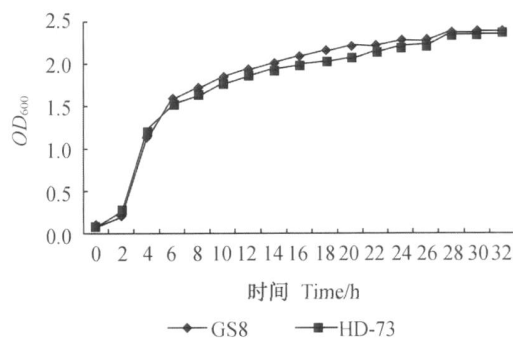


图 2 GS8 和标准菌株 HD-73 的生长曲线

Fig 2 The growth curve of isolate GS8 and standard strain HD-73

2.6 cry 基因型鉴定

利用聚合酶链反应限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 方法对 GS8 的 cry 基因型进行鉴定, 分别得到了 *cry1*、*cry11*、*cry2* 和 *cry9* 基因的扩增产物 (约 1.5 kb 的片段), 而没有 *cry3*、*cry4/10*、*cry5*、*cry7*、*cry8*、*cry11*、*cry13/14*、*cry18*、*cry22* 等基因的扩增产物产生。表明 GS8 菌株中仅含有 *cry1*、*cry11*、*cry2* 和 *cry9* 4 类基因, 而不含以上其他几类

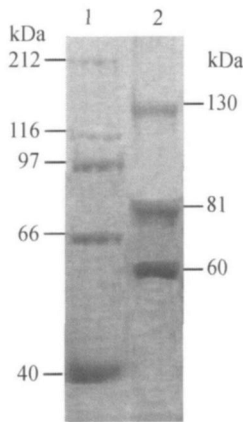


图3 菌株GS8蛋白的SDS-PAGE分析

Fig 3 SDS-PAGE analysis of isolate GS8

1. 高分子质量标准蛋白 (212, 116, 97, 66, 40 kDa); 2. 菌株GS8

1. Represents high molecular weight protein marker

(212, 116, 97, 66, 44 kDa); 2. Represents GS8 isolate

基因。PCR-RFLP分析结果见图4和表4,表明GS8中含有 *cryIAa*、*cryIAb*、*cryIB*、*cry2Ab*和 *cry9Ba* 5种基因型。*cryIAa*、*cryIAb*和 *cry9Ba* 两类基因均表达130 kDa左右的蛋白, *cryI*类基因表达81 kDa左右的蛋白, *cry2*类基因表达60 kDa左右的蛋白,这与上述SDS-PAGE分析中晶体蛋白的结果相一致。

3 讨论

虫害是造成农业生产损失的一个非常重要的因素,利用苏云金芽胞杆菌对虫害进行生物防治具有广阔的应用前景,因此寻找高效菌株更有着十分重要的意义。苏云金芽胞杆菌伴孢晶体的形状各不相同,有菱形、长菱形、方形、圆形或椭圆

表2 GS8菌株的培养特征

Table 2 Cultural characters of isolate GS8

培养基 Mediums	菌落颜色 Color of colony	菌落形态及特征 Characterization and morphology of colony	可溶性色素 Dissolubility coloring matter
LB培养基 LB medium	淡黄色、不透明 Pale yellow, opacity	菌落圆形、表面粗糙有褶皱、湿润 Rough appearance, plicate, wet, rotundity colony	无 None
营养琼脂 Nutrient agar	淡黄色、不透明 Pale yellow, opacity	菌落圆形、表面光滑、干燥型 Dry, smooth appearance, rotundity colony	无 None
牛肉浸汁琼脂 Beef extract agar	乳白色、不透明 Milk white, opacity	菌落圆形、表面光滑、半干燥 Subarid, smooth appearance, rotundity colony	无 None
葡萄糖斜面琼脂 Dextrose agar	象牙黄色、不透明 Ivory, opacity	菌落圆形、表面有褶皱、半干燥 Plicate, subarid, rotundity colony	无 None
卵黄琼脂 Egg yolk agar	乳脂白色、不透明 Milk white, opacity	菌落圆形、表面粗糙、干燥型 Rough appearance, dry, rotundity colony	无 None

表3 GS8菌株的生理生化特征

Table 3 Physiological and biochemical characters of the isolate GS8

菌株 Isolates	菌膜 Mycodema	V. P.	卵磷脂酶 Lecithinase	水杨苷 Salicin	蔗糖 Sucrose	纤维二糖 Cellobiose	七叶灵 Aesculin	甘露糖 Mannose	淀粉水解 Starch hydrolysis	蛋白水解 Protein hydrolysis	脲酶 Urease
GS8	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+
苏云金亚种 <i>thuringiensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
加拿大亚种 <i>canadensis</i>	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
东北亚种 <i>tohokuensis</i>	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+
蜡螟亚种 <i>galleriae</i>	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+
鲑泽亚种 <i>aizawai</i>	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
库斯塔克亚种 <i>kurstaki</i>	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+

注: “+”为反应呈阳性,“-”为反应呈阴性。Note: “+”positive,“-”negative

形、镶嵌形、无定形、三角形等^[14, 15]。本研究中未见到三角形的伴孢晶体,其他形状的伴孢晶体均可见。有报道^[14]指出,苏云金芽胞杆菌不同形状伴孢晶体对昆虫的毒性表现出一定的差异,因此研究该类细菌晶体的形成及其形状、结构有着十分重要的意义。不同形状伴孢晶体与其对昆虫所表现的毒力的相关性及其作用机理尚有待进一步深入研究。

本研究室从土壤中分离的 B 野生型菌株 GS8 经初步鉴定为苏云金芽胞杆菌东北亚种,进一步丰富了我国的 B t 资源,同时为研制新型高效微生物杀虫剂提供了新的菌种资源。本研究应用 PCR 技术测得 GS8 菌株同时含有 *cryIAa*、*cryIAb*、*cryI Ib*、*cry2Ab* 和 *cry9Ba* 基因,此外是否还含有其他种类的 *cry* 基因还有待进一步研究。

表 4 菌株 GS8 的 *cry* 基因型鉴定结果

Table 4 *cry*-type gene contents of the isolate GS8

基因 Gene	引物 Primer	产物大小 Product size/bp	限制性内切酶 Restriction enzyme	RFLP 结果 RFLP results/bp
<i>cryIAa</i>	K5un2 /K3un2	1 635	Pst I & Xba I	1 117, 518
	K5un3 /K3un3	1 463	EcoR I & Pst I	726, 493, 244
<i>cryIAb</i>	K5un2 /K3un2	1 557	Pst I & Xba I	1 039, 518
	K5un3 /K3un3	1 463	EcoR I & Pst I	726, 493, 244
<i>cryI Ib</i>	S5uni /S3uni	1 584	Bsp119 & Ban	1 156, 47, 381
<i>cry2Ab</i>	S5un2 /S3un2	1 231	Hinc & Msp	791, 297, 143
<i>cry9Ba</i>	S5un9 /S3un9	1 556	Msp & Cla	910, 646

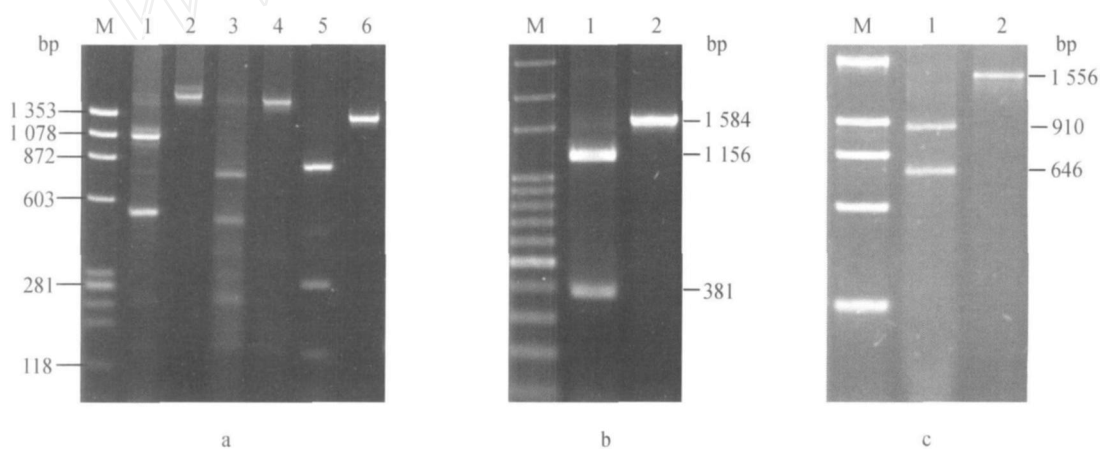


图 4 菌株 GS8 *cry* 基因的 PCR-RFLP 图谱

Fig. 4 A garose gel electrophoresis of PCR-RFLP of isolate GS8

- a. *cryI* 和 *cry2*; M. X174-Hae digest DNA Marker; 1. GS8-K2 PCR/Pst & Xba; 2. GS8-K2 PCR; 3. GS8-K3 PCR/EcoR & Pst; 4. GS8-K3 PCR; 5. GS8-S2 PCR/Hinc & Msp; 6. GS8-S2 PCR
- b. *cryI I*; M. 100 bp DNA Marker; 1. GS8-S1iPCR/Bsp119 & Ban; 2. GS8-S1i PCR
- c. GS8 *cry9*; M. DNA Marker DL2 000; 1. GS8-S9PCR/Msp & Cla; 2. GS8-S9 PCR

有报道指出^[16-19],杀虫晶体蛋白 *CryIAa* 对粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 等具有一定的毒性, *CryIAb* 对棉铃虫和粉纹夜蛾等具有较高毒性,而对甜菜夜蛾低毒, *Cry2Ab* 对粉纹夜蛾和棉铃虫等具有较高毒性。而 *CryI Ib* 和 *Cry9B* 类杀虫晶体蛋白的生物活性尚未见报道。本研究中生物活性测定结果表明,GS8 菌株对甜菜夜蛾和棉铃虫具有

高杀虫活性,这可能与其含有多种 *cry* 基因有关。进一步对其中的杀虫晶体蛋白基因进行克隆,可为基因工程提供有益的基因资源,为工程菌株的构建奠定基础,并为生物制剂的开发提供材料。

参考文献:

- [1] GLL S S, ELIZABETH A C, PARTICIA V P. The Mode of

- Action of *Bacillus thuringiensis* Endotoxins [J]. *Annu Rev Entomol*, 1992, 37: 615-36.
- [2] ZHANG Guang-mei(张光美). 苏云金芽胞杆菌及其伴孢晶体蛋白[M]//CHENG Jia-an(程家安), TANG Zheng-hua(唐振华). *Insect Molecular Science(昆虫分子科学)*. Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 2001: 293-326.
- [3] LECADET M M, FRACHON E, DUMANOR V C, et al Updating the H-antigen Classification of *Bacillus thuringiensis* [J]. *J Appl Microbiol*, 1999, 86: 660-672.
- [4] SAKI R K, GELFAND D H, STOFFEL S, et al Primer Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase[J]. *Science*, 1988, 239: 487-491.
- [5] CERON J, COVARRUBIAS L, QUINTERO R, et al PCR Analysis of the CryI Insecticidal Crystal Family Genes from *Bacillus thuringiensis* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60(1): 353-356.
- [6] GUO Wei(郭巍). Studies on the Inheritance of Resistance to *Bacillus thuringiensis* CryI_{Ac} and Defense System of Cabbage Looper, *Trichoplusia ni*(粉纹夜蛾对苏云金芽胞杆菌 CryI_{Ac}的抗性及其防御体系的研究) [D]. Guangzhou(广州): Zhongshan (Sun Yen-sen) University(中山大学), 2005.
- [7] ZHAO J Z, CAO J, LI Y X, et al Transgenic Plants Expressing Two *Bacillus thuringiensis* Toxins Delay Insect Resistance Evolution [J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(12): 1493-1497.
- [8] ABBOTT W S. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide [J]. *J Econ Entomol*, 1925, 18: 265-267.
- [9] DAILI an-yun(戴莲韵), WANG Xue-pin(王学聘). Progress of Study on *Bacillus thuringiensis*(苏云金芽胞杆菌研究进展) [M]. Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 1997: 15-23.
- [10] YU Zi-niu(喻子牛). *Bacillus thuringiensis*(苏云金杆菌) [M]. Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 1990: 25-47.
- [11] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual(2nd ed)*(分子克隆实验指南, 第2版) [M]. JIN Dong-yan(金冬雁), LIM eng-feng(黎孟枫). Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 1992.
- [12] KUO W S, CHAK K F. Identification of Novel Cry-type Genes from *Bacillus thuringiensis* Strains on the Basis of Restriction Fragment Length Polymorphism of the PCR Amplified DNA [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(4): 1369-1377.
- [13] SONG Fu-ping(宋福平), ZHANG Jie(张杰), HUANG Da-fang(黄大防), et al 苏云金芽胞杆菌 cry基因 PCR-RFLP鉴定体系的建立 [J]. *Scientia Agricultura Sinica(中国农业科学)*, 1998, 31(3): 13-18.
- [14] LI Rong-sen(李荣森), CHEN Tao(陈涛), DENG Hai-fan(邓海凡). 几种苏云金杆菌的超微结构 [J]. *Acta Microbiologica Sinica(微生物学报)*, 1983, 23(4): 343-346.
- [15] LI Rong-sen(李荣森), CHEN Tao(陈涛), LUO Cheng(罗成), et al 几种苏云金杆菌的毒力和形态结构 [J]. *Acta Microbiologica Sinica(微生物学报)*, 1989, 29(6): 397-404.
- [16] RACHETA M M, PEREYRA-ALFÉREZ B, GALÁN-WONG L, et al Screening for *Bacillus Thuringiensis* Crystal Proteins Active against the Cabbage Looper, *Trichoplusia ni* [J]. *J Invertebr Pathol*, 2000, 76(1): 70-75.
- [17] DeMaagd R A, Kwam S, Van der Klei H, et al Domain III Substitution in *Bacillus thuringiensis* Delta-endotoxin CryI_A(b) Results in Superior Toxicity for *Spodoptera exigua* and Altered Membrane Protein Recognition [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(5): 1537-1543.
- [18] LIAO C, HECKEL D G, AKHURST R, et al Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Proteins for *Helicoverpa amigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae), Major Pests of Cotton [J]. *J Invertebr Pathol*, 2002, 80(1): 55-63.
- [19] DAN KOCSIK C, DONOVAN W P, JAN Y C S. Activation of a Cryptic Crystal Protein Gene of *Bacillus thuringiensis* Subspecies *Kurstaki* by Gene Fusion and Determination of the Crystal Protein Insecticidal Specificity [J]. *Mol Microbiol*, 1990, 4(12): 2087-2094.

(Ed. TANG J)