

转 Bt 基因植物中外源基因时空动态表达的研究现状*

王军辉¹ 王念¹ 张建国¹ 张守攻¹

(¹中国林业科学研究院林业科学研究所,北京 100091)

摘要: 在转 Bt 基因植株中,外源基因的时空动态表达对于害虫的防治和转基因安全评价管理具有重要意义。利用生物测定法和酶联免疫吸附测定法(ELISA),对植物不同组织在同一发育阶段、同一组织在不同的发育阶段以及不同转基因植株的外源基因的时空动态表达进行研究。本文综述了转基因植物中外源基因时空动态表达的研究进展和现状。

关键词: 转 Bt 基因植物 Bt 杀虫蛋白基因 时空表达 抗性

Current Status in Spatio-temporal Expression of the Insecticidal Protein Gene Bt in the Transgenic Plants

Wang Junhui¹ Wang Nian¹ Zhang Jianguo¹ Zhang Shougong¹

(¹ Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091)

Abstract: It is very important for controlling pest and safety assessment to temporal and spatial expression of transgenic plants. This article describes current research development of spatio-temporal expression of the insecticidal protein gene Bt in the transgenic plants, including different tissue of the same plant in the same growing season, the same tissue in the different growing season and different transgenic plants by ELISA, laboratory bioassay.

Key words: Bt transgenic plants Bt insecticidal protein Spatio-temporal expression Resistance

随着植物基因工程技术在作物品种改良上的应用,它作为一种现代化的育种手段已经越来越显示出巨大的潜力。转基因作物的广泛种植,因产量的增加和除草剂及农药施用量的减少,带来了巨大的经济和环境效益。转基因作物特别是 Bt 基因抗虫作物的广泛种植,使作物自身能够合成杀虫物质,防治目标害虫,是作物对害虫防治技术上的重大突破,而且还会进一步对作物生产和害虫防治产生一系列重要影响。深入研究 Bt 基因的表达规律及抗虫性的关系,对于以利用转基因抗虫植物为主的更为有效地控制目标害虫,减少危害,延长抗虫作物的利用年限,都具有十分重要的意义和作用。对于转基因植物的抗虫特点,时空动态变化等的研究,旨在揭示 Bt 转基因植物抗虫性时空表达含量的基本规律,阐明目标昆虫对转 Bt 基因植物产生耐药性的定量变

化过程、提出解决耐药性的管理对策,制定一套以科学研究为基础可操作的转基因植物安全性检测和评价技术指标体系,为转 Bt 基因作物害虫的配套防治技术以及抗性预测和安全评价管理提供科学的依据。

1 Bt 杀虫蛋白表达水平的检测方法

最早间接测定 Bt 毒蛋白表达水平的方法是生物测定法。但生物测定法需统一虫源、统一取样、统一试验条件。试验占用空间大、对操作者要求高、耗时长、结果变异系数大。但生物测定法是一切其它测定方法的标准鉴定方法。杨雪梅等(1997)^[1]建立 Bt 棉抗棉铃虫鉴定技术。确定转基因棉株嫩叶为标准试材,孵化后饲养 1~2 天的一龄幼虫做标准试虫。束春娥(1998)^[2]用生物测定法研究了转基因 Bt 棉毒蛋白的时空表达动态。

* 国家重点基础研究发展规划项目“林木育种的分子基础”第五课题“分子改良性状表达与鉴定”(G1999016005)

作者简介:王军辉, Tel:010-62888539, Fax:010-62872015, E-mail:wangjh@rif.forestry.ac.cn

现在从事落叶松、云杉遗传改良、落叶松种的指纹图谱数据库构建和杂种优势的分子预测、北美落叶松优质材料引进项目、落叶松优良杂种及其配套技术和推广项目、转基因林木安全评估等研究

但是,能直接显示毒蛋白表达水平的方法主要有 ELISA 法(包含免疫层析法和试纸条法)和 Western-blot 法。Western-blot 法是最早用于 Bt 植物毒蛋白含量分析的方法。但检测灵敏度不高,低于 10ng/mg 可溶性蛋白,就检测不出来。相比而言,从 Bt 制剂杀虫晶体蛋白的免疫检测基础上发展起来的酶联免疫法(ELISA)却较为成熟和适宜。Vaeck(1987)^[13]用 ELISA 法测定展开后的 6~8 天的叶片,毒蛋白检测的线性范围为 1~42ng/mg 可溶性蛋白。Sims(1996)^[14]用 ELISA 法检测了抗虫棉种子及加工后种子中 cryIA(b) 及 cryIA(c) 蛋白的含量。Benedict^[15]检测了田间不同时期抗虫棉顶部叶片中 cryIA(b) 及 cryIA(c) 蛋白的含量。cryIA(b) 蛋白占可溶性蛋白的 0.019%~0.346%。cryIA(c) 蛋白占可溶性的 0.031%~0.056%。上述 ELISA 测定法,都有生物测定数据的验证。陈松(1997)^[16]利用抗体-抗原-酶标抗体反应建立了间接 ELISA,初步测定结果为占可溶性蛋白的 0.126%,检测极限为 20ng/ml。美国 Envirologix 公司已生产 CryIAb/CrYIAC 平板试剂盒,是定量检测 Bt 杀虫蛋白的专用试剂盒,已在转基因 Bt 玉米、水稻上得到了应用。其定量检测 CryIAb 的最低浓度为 0.5ng/g 以下,测定时间显著缩短,除准备样品的时间外,测试过程所需时间为 2.5h。谢小波(2001)^[7]的研究表明,试剂盒是定量检测转基因水稻 Bt 毒蛋白表达的一种理想产品。

2 外源基因在转基因植物中的时空表达研究

2.1 生物测定法外源基因抗虫性研究

对于转基因植物中 Bt 基因的时空表达的研究,主要集中在农作物上,以转 Bt 基因棉花研究为最多,对转基因株系的不同植株、组织、器官的时空动态表达有不同的结论。Greenplate(1998)^[18]通过研究 BollgardR 棉花发现,棉铃虫之所以产生抗性是因为 Bt 杀虫蛋白在转基因抗虫棉发育后期表达减弱。另一方面,Bt 杀虫蛋白的表达具有组织和空间差异,特别是在花药中含量较低,因而使有些幼虫得以生存。赵奎军等(1999)^[19]用 GK-12 品系,利用生测法测试了抗虫棉对棉铃虫杀虫活性的时间和空间动态变化。结果表明,Bt 抗虫棉相同部位叶片的杀虫

活性随着棉花的生育期呈下降趋势,并在盛花期之后显著降低。Bt 抗虫棉不同器官杀虫活性的顺序为:叶>蕾>铃>花。束春娥等(1998)^[21]通过对转基因棉不同发育阶段的不同空间组织和不同发育阶段的相同组织进行生物测定。试验结果表明,同一组织的抗虫性,随生育期而呈下降趋势:营养生长阶段>营养、生殖并存阶段>生殖旺盛阶段>成熟衰老阶段。同一棉株不同组织的抗虫性不同,子叶、真叶、展开叶、果枝边叶、外围中小蕾>内侧大蕾>主叶>嫩铃>硬青铃。董双林等(1998)^[10]对花铃期棉株的室内生物测定结果表明,植株营养组织的抗性较繁殖组织强。Bt 抗虫棉的抗虫性有随着棉株生育期进展而降低的趋势,供试 Bt 棉株在 6、7、8 和 9 月初对棉铃虫初孵幼虫的抗性分别为 100%、76.63%、22.69%和 58.75%。8 种组织对棉铃虫初孵幼虫的抗性顺序为:成熟叶>幼铃蕾、嫩尖、嫩叶、苞口十>花瓣>花蕊。王武刚(1996)^[11]等在鉴定转基因抗虫棉对棉铃虫的抗性时发现,所有参试品系苗期(三叶期和七叶期)抗虫能力最强,现蕾期和花铃期依次下降,结铃后期又开始回升。崔金杰、夏敬源等(1998)^[12]利用室内喂虫的方法对转基因棉花进行棉铃虫抗性的时空动态变化的研究表明:转基因棉株不同组织随着时间的变化,表现出的抗性不同。7 月以前,蕾>苞叶>花瓣>棉叶>花蕊;8 月份不同器官的抗性为苞叶>蕾>花瓣>花蕊>叶;9 月份以后不同器官的抗性表现为蕾、苞叶>棉桃>棉叶>花瓣>花蕊。美国 Jenkins 等(1995)^[13]对美国转 cryIA(c) 的 Mon-249 和转 cryIA(b) 的 Mon-62、Mon-81 等进行田间小区实验,并随后进行抗虫性实验时,发现不同品系抗虫棉的不同组织器官抗虫性不同。

2.2 免疫法测定外源基因抗虫性研究

刑朝柱等(2000)^[14]采用 ELISA(酶联免疫吸附测定法)、室内初孵棉铃虫生测法和田间棉铃虫危害调查方法,研究和分析了我国构建的 Bt 基因抗虫棉品系 GK3 和美国构建 Bt 基因棉品系新棉 33B 的不同生育期以及花铃期不同器官的杀虫蛋白含量。结果表明,转 Bt 基因棉 Bt 杀虫蛋白含量在棉花生育过程中,呈时空动态变化。在时间分布上,各生育期顶尖平展叶表现为:初花期>蕾期、花铃期>苗期>吐絮期;在花铃期,各器官表现为:功能叶、茎尖>小

蕾、幼铃 > 花蕊、花瓣、苞叶、老叶。室内生测幼虫校正死亡率与棉株 Bt 杀虫蛋白含量高度一致;田间表现与 Bt 杀虫蛋白含量有一定的差异。张永军等(2001)^[15]采用 ELISA 法和生测法研究分析了 3 个 Bt 基因棉花株系新棉 33B、GK12、GK2 不同生育期、不同组织器官的杀虫蛋白表达含量、校正死亡率及它们之间的关系。结果表明,杀虫蛋白表达量在棉花生育过程中有明显的时空动态变化。总的趋势是苗期和蕾期杀虫蛋白表达量较高,花期呈下降趋势,花铃期下降最为明显,到铃期和吐絮期含量略有回升。不同组织器官的杀虫蛋白表达量也有显著的差异,其顺序为叶 > 铃、花心、花萼、蕾 > 花瓣 > 苞叶。室内生测棉铃虫幼虫校正死亡率与其杀虫蛋白表达量高度一致。王保民、李召虎等^[16]以转基因抗虫棉(*Gossypium hirsutum* L.) 中棉所 30 为实验材料,用 ELISA 测定植株 Bt 毒蛋白含量,研究在大田栽培条件下,中棉所 30 不同器官 Bt 毒蛋白含量及时空变化。结果表明:叶片中 Bt 毒蛋白含量远远高于蕾、花、铃中的含量差异;主茎叶片和果枝叶中(07-19 标记) Bt 毒蛋白含量在叶片展开后 0 ~ 28d 随叶龄增大而升高,28 ~ 48d 含量比较稳定。种子和铃壳在花后 20d, Bt 毒蛋白含量最低,前期和后期差别较小。在不同生育阶段,相同发育期的叶、蕾、花、铃毒蛋白的表达并未出现明显的前期高、后期低或则峰谷现象。张小四(1999)^[17]和李卓(2000)^[18]对转 Bt 基因抗虫棉的整个生长期不同器官的 ELISA 测定结果均显示了随着棉花的生长,在棉花不同的器官中,杀虫蛋白的含量有一个从高到低,再逐渐降低的趋势。李汝忠等(2002)^[19]以转 Bt 抗虫棉 33B 为材料,利用 ELISA 检测方法,通过对棉株不同发育时期和同一时期的不同组织或器官 Bt 晶体蛋白含量的测定,研究了转 Bt 基因抗虫棉 Bt 基因表达的时空变化,结果表明,随着棉株生育进程的推进和株体的老化,Bt 晶体蛋白含量随着植株体内可溶性总蛋白含量的逐渐降低而降低,而 Bt 基因的表达强度从苗期到蕾期随着棉株营养生长的加快而呈上升趋势,至蕾期达到高峰,以后逐渐减弱。不同组织或器官 Bt 晶体蛋白的含量也有较大差异,表现在幼嫩组织或器官的含量较高,成熟组织或器官次之,衰老组织最低。陈松等^[6](2000)采用 ELISA 技术对转 Bt

基因抗虫棉植株中 Bt 毒蛋白含量进行了测定。在苗期全展功能叶中 Bt 毒蛋白含量最高,根、茎和叶柄中 Bt 毒蛋白含量较低,在铃期当日开花的子房中 Bt 毒蛋白含量较高,雌雄蕊中 Bt 毒蛋白较低,花瓣及苞叶 Bt 毒蛋白含量较低,表明 Bt 基因在不同器官中的表达强度存在差异。不同生育期的功能叶片中最高,蕾期次之,花铃期最低。随着棉花生长发育进程的推进,Bt 基因在叶片中的表达强度逐渐减弱。另外,林良斌等(2001)^[20]在转 Bt 基因油菜中采用 ELISA 方法检测 Bt 杀虫蛋白基因在转基因油菜中表达。实验结果表明:在第 3 至第 9 叶期 Bt 杀虫蛋白基因在转基因油菜植株中稳定、局效地表达,Bt 杀虫蛋白的表达量为 170ng/25mg ~ 260ng/25mg 鲜叶,占植物可溶性蛋白的 0.067% ~ 0.105%,其抗虫效果高达 42.5% ~ 80.0%。但从第 11 叶期后杀虫蛋白表达量显著降低,只有 7ng/25mg ~ 50mg/25ng 鲜叶,占可溶性蛋白的 0.003% ~ 0.02%。

2.3 不同转基因植株外源基因的时空表达

赵荣敏等(1995)^[21]获得的转 Bt + CpTI 双基因烟草比转单基因烟草具有更强的杀虫活性。张天真等^[22](2000)对 Bt 棉不同生育期抗虫性的研究表明:转 Bt 基因单价棉的抗虫性有随棉株生长发育而降低的趋势;澳大利亚对 Bt 棉的研究表明抗虫性有两种趋势:现蕾前至成熟均出现季节性下降趋势,季节早期偶然出现突然下降趋势。芮昌辉等^[23](2002)利用 2 个对 Bt 抗性水平不同的棉铃虫品系,测定了转 Bt 和 CpTi 基因双价抗虫棉(SG321)和 Bt 棉(GK12,33B)杀虫活性的时间和空间动态变化。结果表明,2 类 3 种抗虫棉杀虫活性共同表现为:(1)时间动态上均呈现前高后低的下降趋势;(2)空间动态上表现为,在生长前期以叶的活性最高,中、后期以铃和蕾的活性较高;(3)对敏感品系的活性高于对抗性品系。不同点表现为:(1)双价棉在生长中、后期(8~9 月份)活性明显高于 Bt 棉;(2)双价棉对抗性品系的活性表现更稳定。Fuchs 等(1998)^[24]的研究证明了 Bt 与 CpTI 协同作用可增强 Bt 的杀虫能力。但是也有试验结果不同的,袁小玲、孙敬等(2000)^[25]通过对双抗 1 主茎叶的抗虫性测定和分期播种试验,发现双抗 1 与 Bt 棉的抗虫性没有差异。

刘海涛^[26](2000)对抗虫杂交棉 F₁ 代与抗虫亲

本的 Bt 蛋白时空表达差异性的研究结果表明:抗虫亲本的 Bt 蛋白表达含量明显地高于杂种 F_1 代,盛花期抗虫亲本倒 2 叶,倒 4 叶和花瓣的 Bt 蛋白表达量分别为高值 F_1 代的 1.2 倍、2.97 倍和 19.33 倍,花铃期抗虫亲本倒 3 叶和花瓣 Bt 蛋白表达量分别为高值 F_1 代的 2.16 倍和 1.58 倍。抗虫亲本功能叶的 Bt 蛋白含量则明显低于上部非功能叶,说明 Bt 蛋白在杂种 F_1 代中分解较快,其稳定性和持久性较差。花铃期 Bt 蛋白表达量明显地高于盛花期,在抗虫亲本中表现最为明显,与叶片相比在花瓣中检测到 Bt 蛋白含量较低。张小四^[17]对转基因棉株的大量检测中发现,抗虫棉有明显的株系分离现象,有相当比例的 F_2 代失去或大大降低了表达杀虫蛋白的能力。

3 时空表达规律以及影响转基因抗虫性的因素

采用不同的测定方法对转基因植株不同组织器官中外源基因的表达研究,可以得到如下结论:外源基因在转基因植株中都能稳定表达,但其含量的变化基本是随着生育期的下降而呈现下降趋势,即在生长期前期,植株生理活动旺盛,蛋白表达量高,杀虫蛋白的含量也随之增加,到了中、后期,杀虫蛋白的含量急剧下降。不同组织随着生育阶段的变化外源基因的表达量而表现出时空动态变化。双价、或多价转基因植株的抗虫性高于单价基因植株。

亲本的外源基因含量高于杂种后代。

转基因抗虫棉的抗虫性具有时空特异性,这表明转基因抗虫棉中 Bt 杀虫基因的表达受发育调控。其原因有以下几个方面:转基因抗虫棉抗虫性下降是由于发育后期,组织老化、钝化,从而使 Bt 蛋白表达量降低。Bt 毒蛋白表达量没有降低,但棉株内单宁含量增高,单宁和内毒素结合而使其失去活性,从而使内毒素的有效含量降低。与后期高温有关,高温影响了毒蛋白的表达。mRNA 的转录或翻译水平的调控影响 Bt 杀虫蛋白的表达。

Sachs 等^[27]研究发现,同样的材料在同一生育期,不同地点,由于管理条件不同,Bt 基因表达量呈现较大差异。转基因抗虫棉叶片后期抗虫性下降可能是由于 CaMV35S 启动子或棉株本身的生长发育

特性等引起的。例如:组织老化 Bt 基因表达量降低;后期植株生长量的加大,使单位重量组织中的蛋白表达量降低;棉株由营养生长发育到生殖生长后,生长中心由营养器官转到生殖器官,叶片中的 Bt 蛋白含量降低;棉株中的次生化合物丹宁、花青素和类萜烯等也可能是 Bt 蛋白下降的背景因素,如丹宁可使 Bt 的杀虫性下降而花青苷和类萜烯可使 Bt 的杀虫性提高;此外,环境因子如温度、光照、水分等也可能影响植株的抗虫性,随季节变化环境因子也发生变化。Sachs 等^[27]研究发现外源基因的表达量高低受土壤水分和肥力的影响。前人测定抗虫棉不同生育期的抗虫性时,不是在同一时间测定,因而不能排除环境因子对抗虫性的影响。林良斌等^[20]认为转基因油菜植株中 Bt 杀虫蛋白基因的表达变化可能与栽培的外界环境条件变化有关,也可能与外源基因整合的位点有关,当外源基因整合到与生长发育有关的基因附近,外源基因的表达就会受生长发育基因的调控序列的调控,随着生长时期的不同,而发生变化。

4 问题和展望

对于转 Bt 基因抗虫棉毒蛋白的检测,目前主要有两种方法,免疫检测法和生物测定法。免疫检测法测定快速、准确,高灵敏性,能比较不同器官毒蛋白含量,进行半定量检测。但需特异性的抗体和一定的仪器设备,而且操作步骤繁杂;生物测定法简便、直观,但比较不同器官和不同时期毒蛋白含量的变化较为困难。生物测定法受多种因素影响,结果变异系数大。测定结果的差异,原因可能是品种不同,毒蛋白的表达规律也不同。另一原因可能是由于生物测定的误差和局限性导致结论的差异。由于受研究手段的限制,在已有的文献中,用免疫法测定抗虫棉各器官的毒蛋白的研究大都只有少量数据且容易出现假阳性,对于需大量检测毒蛋白含量以弄清表达规律的研究大多用生物测定法进行,所得出的结论大都相互矛盾。目前,对于外源基因在转基因植株中的动态表达的研究还处于初级阶段,许多机理和结论都是推测得到的。

鉴于目前毒蛋白表达随着植株发育成熟逐渐下降这一事实,在今后的遗传育种中,进一步提高毒性

(下转第 18 页)

理将得到进一步阐明,叶片再生中存在的问题将会彻底解决。苹果转基因技术的发展也将促使叶片再生技术具有更加广阔的发展前景。

参考文献

- 何道一,李雅志,王其会.核农学报,1997,11(2):84~88.
- Ishisara A. Abstr Japan Soc Hort Sci Autumn Meet, 1981, 42~43.
- 潘增光,邓秀新.果树科学,1998(3):261~266.
- 达克东,李雅致,束怀瑞.核农学报,1995,9(3):139~143.
- Liu JR, Sink KC, Dennis FG. HortSci,1983,18(6):871~873.
- 达克东,张松,李雅致,等.园艺学报,1996,23(3):241~245.
- 达克东.1999年山东农业大学园艺系博士学位论文.
- 时保华,付润民,赵政阳,税守岐.西北植物学报,1995,15(1):67~72.
- David J. Plant Cell Reports,1989,7:658~661.
- 赵政阳,付润民,程守岐,等.陕西农业科学,1992(6):18~19.
- Fasolo F, Zimmerman R H, Fordham I. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,1989,16:75~87.
- Pawliki N, Welander M. J Hort Sci. 1994, 69(4): 687~696.
- 马锋旺,王飞.西北农业大学学报,1996(4):102~104.
- 裴东.苹果基因转化及叶片离体再生的研究^[D].河北农业大学硕士论文,1992.
- Korban SS, Oconnor PA, Elobeidy A, et al. J Hort Sci,1992, 67(3): 341~349.
- Dufour M. Acta Hort, 1990, 280: 51~58.
- 陈喜文,范晖,裘立群,等.核农学报,1997,11(1):39~44.
- Chritel TH, Robert TH. Acta Hort, 1990, 280: 195~199.
- Famiani F, Ferradini N, Staffolani P, et al. J Hort Sci, 1994, 69(4): 679~685.
- 赵政阳,曹晓玲,黄英,等.陕西农业科学,1997(1):20~21.
- Caboni E, Tonelli MG. Plant Cell Rep, 1999, 18: 985~988.
- 达克东.1994年山东农业大学园艺系硕士学位论文.
- 达克东,张松,米瑞芙,等.核农学报,2001,15(5):290~293.
- Korban SS, Oconnor PA, Elobeidy A. Hort Science, 1992, 67(3): 341~349.
- Predieri S, Malavasi F. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1989,17:133~142.

(上接第4页)

含量和毒性表达方式仍然是主要目标。随着研究的深入,各种测定方法的改进以及对影响外源基因表达因素的研究,外源基因在转基因植株中的时空表达会逐渐清晰,并针对现有的结论对转基因植株后期以及子代加强监测和管理,避免造成经济损失并给转基因植物的安全评价提供有力的证据

参考文献

- 杨雪梅,王武刚,郭予元,等.植物保护,1997,23(4):3~5.
- 束春娥,孙洪武,等.棉花学报,1998,10(3):131~135.
- Vaeck M, Reynaerts A, Hofte H, et al. Nature, 1987, 328: 33~37.
- 孙芹.中国农业科学院博士论文,1998.
- Benedict J. Econ Entomol, 1996, 89: 230~238.
- 陈松,吴敬音,等.棉花学报,2000,12(4):189~193.
- 谢小波,舒庆尧.中国农业科学,2001,34(5):465~468.
- Greenplate J T. Proceedings Beltwide Cotton Conferences, San Diego, California, USA, 1998, 2: 1030~1033.
- 赵奎军,赵建周,范贤琳,等.农业生物技术学报,2000,8(1):49~52.
- 董双林.棉花学报,1998,10(2):57~63.
- 王武刚,姜永幸,杨雪梅,等.中国农业科学,1997,30(1):7~12.
- 崔金杰,夏敬源.棉花学报,1999,113:141~146.
- Jenkin S J N, Parrott W I, McCarty J C, et al. J Econ Entomol, 1995.
- 刑朝柱,靖深蓉,崔学芬,等.棉花学报,2001,13(1):11~15.
- 张永军,吴孔明,郭予元.植物保护学报,2001,28(1):1~6.
- 王保民,李召虎,等.农业生物技术学报,2002,10(3):215~219.
- 张小四,李松岗,许崇任.北京大学学报,2000,36(4):476~484.
- 李卓.北京大学硕士论文,1999.
- 李汝忠,沈法富,等.山东农业科学,2002(2):7~9.
- 林良斌,官春云,等.西南农业大学学报,2001,23(2).
- 赵荣敏,等.生物工程学报,1995,11(1):1.
- 张天真,唐灿明.科学通报,2000,45(2):119~127.
- 芮昌辉,范贤林,等.昆虫学报,2002,45(5):567~570.
- Fuchs RL, Macintosh SC, Dean DA, et al. ACS symposium series. NO. 432. Analytical chemistry of Bacillus thuringiensis. Elsevier Science Publisher BV, 1990. 105~113.
- 袁小铃,孙敬,唐灿明,张天真.高技术通讯,2000,10:9~12.
- 刘海涛.中国农业科学院硕士论文,2000.
- Sachs ES, Benedict J H, Stelly DM, et al. Environmental Entomology, 1996, 25(6): 1257~1266.