

· 研究论文 ·

嗜线虫致病杆菌对棉铃虫的生物活性研究

史翠红, 宋萍, 王勤英*, 杨君, 崔龙, 孔繁芳

(河北农业大学植物保护学院, 河北省农业病虫害生物防治工程技术研究中心, 河北保定 071001)

摘要:嗜线虫致病杆菌 HB310(*Xenorhabdus nematophila* HB310)菌液中主要的杀虫活性物质是一种高分子量的复合蛋白—毒素。以该菌液和毒素分别饲喂棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 幼虫, 检测其对棉铃虫生长发育的影响, 同时通过生化分析研究了该毒素对幼虫中肠内几种蛋白酶活性的影响。结果表明: 菌液和毒素对棉铃虫幼虫的取食量和生长发育均有显著的影响, 取食拌有菌液和毒素的人工饲料的棉铃虫食量明显减少, 发育速度延缓, 发育历期比对照明显推迟; 尽管一直取食混合原菌液 (6.5×10^8 cells/mL) 人工饲料的棉铃虫 2 龄幼虫前期死亡率很低, 但是其生长发育几乎完全被抑制, 该处理组所有幼虫均不能化蛹; 原菌液对 4 龄幼虫的食量、发育历期、蛹重及化蛹率均有显著影响。菌液对棉铃虫幼虫的影响与菌液的浓度和幼虫的龄期成反比, 稀释 50 倍的菌液对 2 龄和 4 龄幼虫的生长发育仍有一定影响; 毒素 ($51.9 \mu\text{g/mL}$) 对 4 龄棉铃虫的生长发育也有明显的抑制作用。短时间 (2 d) 饲喂原菌液后更换正常饲料, 仅延缓了棉铃虫幼虫的发育历期, 而对其化蛹率、蛹重及羽化率均无明显影响。饲喂毒素的棉铃虫幼虫中肠主要蛋白酶的活性受到明显的抑制。

关键词:嗜线虫致病杆菌; 棉铃虫; 蛋白酶; 中肠; 生物活性

中图分类号: S476.15; S482.39

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2007)03-0269-06

Study on Bioactivities of *Xenorhabdus nematophila* against *Helicoverpa armigera*

SHI Cui-hong SONG Ping WANG Qin-yin*, YANG Jun CUI Long KONG Fan-fang

(College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Biocontrol Center of Plant Diseases and Plant Pests of Hebei Province, Baoding 071001, Hebei Province, China)

Abstract The main insecticidal toxin from *Xenorhabdus nematophila* HB310 was a kind of high molecular weight protein complex— toxin. The effects of the culture broth and the toxin on the growth and several midgut enzymatic activities of the *H. armigera* larvae were investigated. The results indicated that the culture broth and the toxin not only affected the feeding food quantity but also disrupted the development of the *H. armigera* larvae (including larvae period, pupation percentage, pupa weight and emergence percentage). The growth of the 2nd instar larvae exposed to 6.5×10^8 cells/mL culture broth was almost entirely inhibited, and all the larvae did not pupate. The growth of the 2nd instar larvae exposed to 1.3×10^7 cells/mL culture broth was still markedly inhibited. The growth of the 4th instar larvae exposed to $51.9 \mu\text{g/mL}$ toxin was also inhibited remarkably. Short

收稿日期: 2007-01-12 修回日期: 2007-7-25

作者简介: 史翠红 (1981-), 女, 山东济宁人, 硕士研究生; * 通讯作者 (Author for correspondence): 王勤英 (1962-), 女, 河北高城人, 博士, 教授, 主要从事昆虫病原微生物研究。联系电话: 0312-7528150; E-mail: wqinyin@hebau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30400296); 河北省自然科学基金项目 (C2006000443)

time exposure to the culture broth prolonged the development period of the 2nd and 4th instar larvae but did not impact on the pupation percentage, pupa weight and emergence percentage of *H. armigera*. Toxin also significantly inhibited the primary enzymatic activities of the midgut of *H. armigera* larvae.

Key words *Xenorhabdus nematophila*; *Helicoverpa armigera*; protease; midgut bioactivity

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 是农业上的重要害虫, 随着苏云金芽孢杆菌 (Bt) 生物制剂的大量使用, 特别是表达 Bt 毒素的转基因植物的大面积种植, 加速了棉铃虫对 Bt 抗性的发展^[1], 因此亟待筛选和开发新的杀虫毒素和杀虫基因。

嗜线虫致病杆菌 *Xenorhabdus nematophila* 是与线虫 *Steinernema carpocapsae* 互惠共生的细菌, 二者联合可以侵染和杀死多种昆虫, 此类线虫共生菌复合体作为生防制剂早已应用于生产中^[2,3]。近年来, 又从多种昆虫病原线虫共生菌中发现了具有口服胃毒活性的蛋白毒素, 并且其杀虫谱较 Bt 菌广^[4-6]。昆虫病原线虫共生菌具有胃毒活性的杀虫蛋白及其基因的研究, 为共生菌在害虫生物防治中的应用开辟了一条新的途径, 昆虫病原线虫共生菌有可能直接作为生防制剂用于防治叶面害虫, 其杀虫基因也可能像 Bt cry 基因一样用于培育转基因抗虫植物。

嗜线虫致病杆菌 HB310 菌株是从小卷蛾斯氏线虫 *S. carpocapsae* HB310 体内分离获得的共生菌, 其发酵液经盐析获得胞内蛋白提取物, 然后通过制备型非变性凝胶电泳从中分离得到对棉铃虫幼虫具有胃毒活性的蛋白复合物——毒素^[7], 该毒素能够破坏棉铃虫中肠组织, 并导致其生长发育缓慢^[8]。作者以嗜线虫致病杆菌 HB310 菌液以及毒素 分别饲喂棉铃虫幼虫, 观察其对棉铃虫幼虫生长发育的影响, 并通过测定饲毒幼虫中肠蛋白酶的活性, 来揭示该菌及其毒素对棉铃虫幼虫的影响, 以期更深入地了解嗜线虫致病杆菌的作用机理。

1 材料与方 法

1.1 供试昆虫与菌株

棉铃虫 *H. armigera* 和嗜线虫致病杆菌 HB310 菌株 *X. nematophila* HB310 均由河北农业大学害虫生物防治实验室提供。

1.2 供试药剂及仪器

考马斯亮蓝 G-250、甘氨酸、氨苯磺胺偶氮酪蛋白、 α -N-苯甲酰-DL-精氨酸-p-硝基苯胺

(BA-PNA)、p-甲苯磺酰-L-精氨酸甲酯 (TAME)、N-苯甲酰-L-酪氨酸乙酯 (BTEE)、5,5'-二巯基-双(2-硝基苯甲酸) (DTNB) 及二甲基亚砜均为 Sigma 公司产品; N,N,N',N'-四甲基乙二胺 (TEMED) 为 Fluka 公司产品; 其他试剂均为国产分析纯。

Eppendorf Centrifuge 5180 离心机; UNICO UV-2602 紫外可见分光光度计。

1.3 HB310 菌液的培养及毒素 的分离纯化

按李秀花等^[6]方法制备菌液, 菌液的细胞浓度一般在 6.5×10^8 cell/mL 左右。

采用盐析法提取共生菌胞内总蛋白; 采用制备型非变性凝胶电泳法^[7]分离纯化毒素, 纯化后的毒素 置于 -70°C 保存备用。

1.4 HB310 菌液对棉铃虫生长发育的影响

分别挑选生长发育一致的棉铃虫 2 龄和 4 龄幼虫, 预先饥饿 6 h 分别以 HB310 原菌液 (5×10^8 cells/mL) 和用灭菌水稀释 50 倍的菌液 (1×10^7 cells/mL) 供试, 以无菌牛肉汤为对照。每处理设 3 次重复, 每重复 40 头幼虫。每处理按样品: 饲料 = 1:10 (体积质量比, mL/g) 的比例混合后分装于 10 孔生测板内, 每孔接 1 头试虫, 加盖 1 层保鲜膜和两层纸巾, 置于 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、14 h 光照培养箱内至试虫羽化, 记录棉铃虫的死亡、化蛹和羽化情况并计算其死亡率, 同时称量处理第 5 d 的幼虫质量和蛹重。处理 1 和处理 2 为一直饲喂带菌饲料, 处理 3 为饲喂带菌饲料 2 d 后取出剩余饲料, 换成正常的人工饲料继续饲养。

1.5 HB310 菌液对棉铃虫非选择性拒食作用的影响

参照 1.4 节中的幼虫饲毒处理, 设 HB310 原菌液和稀释 50 倍菌液两个处理, 同时设两组对照, 一组接试虫, 另一组不接试虫作为空白对照。饲喂前称量饲料质量, 48 h 再称量剩余饲料的质量, 计算饲料失水量及棉铃虫幼虫取食量。

1.6 毒素 对棉铃虫生长发育的影响

挑选生长发育一致的棉铃虫 4 龄幼虫, 预先饥饿 6 h 以毒素 为供试药剂 (蛋白浓度为

51.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 以无菌水为对照。每处理按药剂:饲料 = 100:1(体积质量比, $\mu\text{L}/\text{g}$)的比例混合后饲喂棉铃虫。实验于(27 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 、14 h光照培养箱内进行,一直延续到试虫化蛹。每处理100头幼虫,记录棉铃虫的死亡和化蛹情况并统计其死亡率,称量化蛹后第2 d的蛹重。

1.7 毒素对棉铃虫幼虫中肠蛋白酶活性的影响

幼虫饲毒处理同1.6节,饲毒后定期取样,每个样品取10头幼虫,设3个重复。在48 h内,按6 h次的时间间隔取上述处理过的棉铃虫幼虫,在0~4 $^{\circ}\text{C}$ 下迅速解剖,用预冷的0.15 mol/L的氯化钠溶液冲去体液,截取中肠及其内含物,于-70 $^{\circ}\text{C}$ 下冰冻贮存。测试前取出,稍融后加0.15 mol/L的氯化钠缓冲溶液,冰浴下匀浆。匀浆液在12 000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心15 min,取上清液作为测试用酶液。

根据王琛柱等报道^[8],于30 $^{\circ}\text{C}$ 、最适pH值下,用紫外-可见分光光度计测定蛋白酶活性。总蛋白酶活力测定时采用pH 10.5的甘氨酸缓冲液,以氨基磺胺偶氮酪蛋白为底物。反应混合物于12 000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心15 min,取上清液,测定其在366 nm下的光吸收值(A_{366}),将反应混合物1个吸收单位的变化定义为1个偶氮酪蛋白单位。类胰蛋白酶活力以BAPNA和TAME两种专性底物,分别用pH 10.5的甘氨酸缓冲液和pH 8.5的Tris缓冲液,测定其在406和248 nm下反应混合物的光吸收变化值 A_{406} (A_{248})。类胰凝乳蛋白酶活力用pH 8.5的Tris缓冲液,以BTEE为专性反应底物,测定256 nm下光吸收的变化值(A_{256})。酶活力是以棉铃虫幼虫中肠的匀浆组织中每微克蛋白在单位时间内水解相应底物的微摩尔数计算。

蛋白质含量以牛血清蛋白为标准蛋白,用考马斯亮兰G-250方法测定。

1.8 数据分析

采用DPS数据处理系统进行方差分析和Duncan's新复极差多重比较^[9]。

2 结果与分析

2.1 毒素的分离纯化

从图1可以看出,盐析法得到的胞内蛋白,通

过6% native-PAGE分离纯化的毒素只有1个条带,其大小与原胞内蛋白条带一致(见图1)。

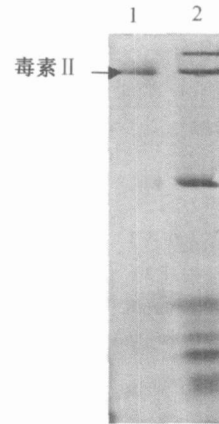


图1 胞内蛋白和毒素的native-PAGE图谱

Fig 1 Native-PAGE of intracellular proteins and Toxin

注:1 毒素;2 胞内蛋白提取物

Note: 1. Toxin; 2. Intracellular proteins extract

2.2 HB310菌液对棉铃虫幼虫生长发育的影响

由表1可以看出,HB310原菌液对棉铃虫2龄幼虫取食量和生长发育影响较大。取食原菌液(处理1)的2龄幼虫表现出明显的拒食现象,生长缓慢,饲菌2 d的取食量和5 d时幼虫体重分别为2.3和0.3 $\mu\text{g}/\text{头}$,显著低于对照(17.1和10.1 $\mu\text{g}/\text{头}$)。尽管取食原菌液的幼虫前期死亡率较低,但随着饲毒时间的延长,试虫虫体萎缩,在对照幼虫化蛹时,该处理大部分试虫已经死亡,所有试虫均不能化蛹。原菌液稀释50倍后(处理2)对棉铃虫幼虫的影响有所减小,但2 d的取食量仍明显低于对照,2龄幼虫-化蛹历期也比对照组推迟了3.0 d。尽管化蛹率与对照组比较无显著差别,但是蛹重和羽化率明显低于对照组,其蛹多为畸形,难以正常羽化或成虫致畸展翅不良。饲喂2 d原菌液后再饲喂正常饲料的处理(处理3),2龄幼虫-化蛹历期比对照组延长了3.9 d,而对蛹重、化蛹率和羽化率均没有显著影响。

HB310菌液对棉铃虫4龄幼虫生长发育的影响程度低于对2龄幼虫的影响。从表1可以看出,原菌液及其50倍稀释液(处理1和2)对棉铃虫4龄幼虫有明显的拒食作用,2 d的取食量明显低于对照。一直取食原菌液和稀释50倍菌液的棉铃虫幼虫发育速度延缓,4龄幼虫-化蛹历期分

表 1 HB310菌液对棉铃虫幼虫生长发育的影响

Table 1 Effects of HB310 culture broth on the development of *H. armigera* larvae

龄期 Instar	供试样品 Samples	2 d取食量 Amount of food consumption in 2 d/(mg/头)	5 d幼虫体重 5 d Larvae weight /(μ g/头)	幼虫-蛹历期 Larvae period(from larvae to pupae) /d	蛹平均体重 Average weight of pupae /(mg/头)	化蛹率 Pupation percentage (%)	羽化率 Eclosion percentage (%)
2nd	无菌培养基(对照) Broth(CK)	17.1 \pm 1.7 a	10.1 \pm 1.8 a	13.7 \pm 0.3 b	250.3 \pm 11.6 a	76.6 \pm 3.3 a	91.7 \pm 4.2 a
	原菌液* (处理 1) Culture broth(Treatment 1)	2.3 \pm 0.1 b	0.3 \pm 0.0 b	—	—	0.0 \pm 0.0 b	—
	稀释 50倍菌液(处理 2) Diluted 50 \times culture broth (Treatment 2)	7.0 \pm 0.6 b	1.2 \pm 0.1 b	16.7 \pm 0.9 a	163.7 \pm 15.2 b	56.7 \pm 12.0 a	44.0 \pm 6.5 b
	饲喂 2 d原菌液(处理 3) Feeding culture broth in 2 days(Treatment 3)	—	6.8 \pm 0.7 b	17.6 \pm 0.3 a	225.3 \pm 5.8 a	70.3 \pm 8.3 a	81.0 \pm 10.7 a
4th	无菌培养基(对照) Broth(CK)	65.2 \pm 5.2 a	—	7.0 \pm 0.6 b	256.2 \pm 3.3 a	90.0 \pm 5.8 a	89.2 \pm 5.8 a
	原菌液* (处理 1) Culture broth(Treatment 1)	24.9 \pm 1.5 b	—	12.7 \pm 0.7 a	196.7 \pm 0.9 b	61.8 \pm 5.8 b	83.3 \pm 16.7 a
	稀释 50倍菌液(处理 2) Diluted 50 \times culture broth (Treatment 2)	40.8 \pm 4.3 b	—	10.0 \pm 0.6 a	216.0 \pm 4.4 b	93.3 \pm 3.3 a	96.3 \pm 3.7 a
	饲喂 2 d原菌液(处理 3) Feeding culture broth in 2 days(Treatment 3)	—	—	9.3 \pm 0.3 a	235.7 \pm 3.3 a	86.7 \pm 3.3 a	84.7 \pm 3.5 a

注:表中数据为平均值 \pm SE;同一列数据后的不同字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著。*原菌液的浓度为 6.5×10^8 cells/mL,稀释50倍菌液浓度为 1.3×10^7 cells/mL。下同。

Note: The data in the table indicate mean \pm SE. The means in the same column followed by different letters are significantly different at $P < 0.05$. * Concentration of the culture broth was 6.5×10^8 cells/mL. Concentration of the diluted 50 \times culture broth was 1.3×10^7 cells/mL. The same as in the following tables.

别为 12.7 d 和 10.0 d 较对照组分别推迟 5 d 和 2 d, 且其蛹重也明显低于对照。处理 1 的化蛹率为 61.8%, 与对照差异显著, 而处理 2 的化蛹率与对照组无显著差别。取食原菌液 2 d 后换喂正常饲料, 试虫仅仅发育速度受到影响, 4 龄幼虫到化蛹的历期比对照组推迟 2.3 d 而蛹重、化蛹率和羽化率与对照组比较差异均不显著。

2.3 毒素 对幼虫生长发育的影响

从表 2 中的数据可以看出, 取食正常人工饲料的对照组棉铃虫幼虫发育速度较快, 而饲喂拌有毒素人工饲料的幼虫发育缓慢, 4 龄幼虫化蛹历期比对照组推迟 2 d。毒素对棉铃虫幼虫化蛹也具有显著的影响, 饲毒幼虫化蛹率为 62.0%, 显著低于对照组幼虫化蛹率(98.0%); 并且处理组蛹的平均体重也明显低于对照, 两者差异显著。

表 2 毒素 对棉铃虫 4 龄幼虫生长发育的影响

Table 2 Effects of toxin on the growth of 4th instar larvae of *H. armigera*

供试样品 Samples	4 龄幼虫化蛹历期 The larvae period(from 4th instar to pupae) /(d)	蛹平均体重 Average weight of pupae /(mg/头)	化蛹率 Pupation rate (%)
对照 CK	4.7 \pm 0.02 b	348.2 \pm 4.9 a	98.0 \pm 1.3 a
毒素 Toxin (51.9 μ g/mL)	6.7 \pm 0.01 a	241.8 \pm 7.9 b	62.0 \pm 2.0 b

2.4 毒素 对幼虫中肠蛋白酶活性的影响

由图 1~4 可以看出, 饲毒后棉铃虫幼虫中肠几种蛋白酶活性的变化趋势基本一致, 前期 (~12 h) 处理与对照各种蛋白酶活力差别不大, 12 h 后饲毒幼虫各种蛋白酶的活性受到抑制, 在饲喂毒素

后 36 h 棉铃虫幼虫中肠弱碱性类胰蛋白酶、强碱性类胰蛋白酶、类胰凝乳蛋白酶和总蛋白酶活性均显著低于对照。对照幼虫中肠各种蛋白酶活性在 6~48 h 内均呈现低-高-低的变化趋势, 波动较大, 不同时间的酶活性差异显著, 在 36 h 时, 对照幼虫这几种蛋白酶活性开始降低, 到 48 h 即降低到饲毒幼虫的蛋白酶活性水平。

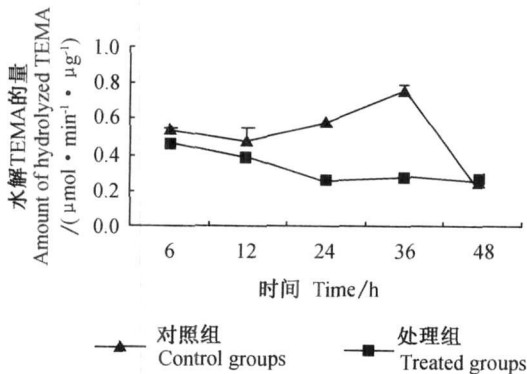


图 1 处理后不同时段棉铃虫幼虫中肠内弱碱性类胰蛋白酶活力变化 (底物为 TAM E)

Fig 1 Change of weak alkaline trypsin-like enzyme activity of midgut from *H. armigera* larvae after treatment at different times (using TAM E as substrate)

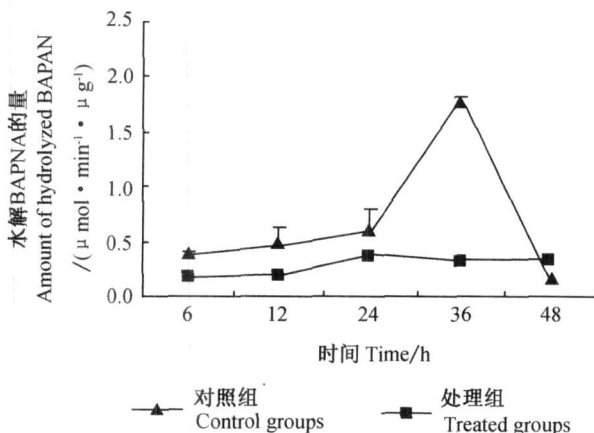


图 2 处理后不同时段棉铃虫幼虫中肠内强碱性类胰蛋白酶活力变化 (底物为 BAPNA)

Fig 2 Change of strong alkaline trypsin-like enzyme activity of midgut from *H. armigera* larvae after treatment at different times (using BAPNA as substrate)

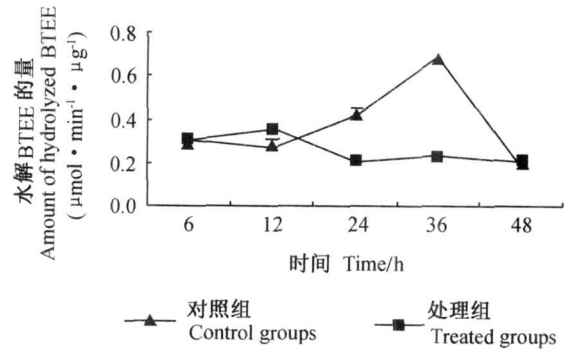


图 3 处理后不同时段棉铃虫幼虫中肠内类胰凝乳蛋白酶活力变化 (底物为 BTEE)

Fig 3 Change of chymotrypsin-like enzyme activity of midgut from *H. armigera* larvae after treatment at different times (using BTEE as substrate)

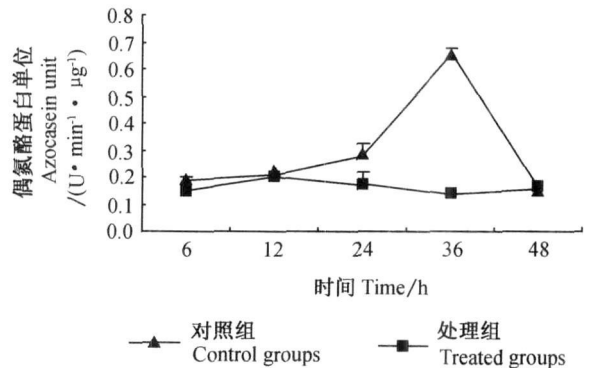


图 4 处理后不同时段棉铃虫幼虫中肠内总蛋白酶活力变化 (底物为偶氮酪蛋白)

Fig 4 Change of total protease activity of midgut from *H. armigera* larvae after treatment at different times (using azocasein as substrate)

3 结论与讨论

已有研究发现, 嗜线虫致病杆菌 HB310 菌液和毒素 对棉铃虫幼虫具有明显的生长抑制作用, 但是致死作用较低^[7, 10]。本实验结果表明, 无论是取食菌液还是毒素, 棉铃虫幼虫取食量均减少, 表现出明显的拒食作用, 幼虫生长发育减慢, 发育历期比对照明显推迟, 并且还会影响到化蛹和羽化, 其平均蛹重也明显低于对照。此外该菌对棉铃虫的影响随着菌液浓度的降低而减小, 并且随棉铃虫龄期的增大其影响力减小。尽管嗜线虫致病杆菌菌液和毒素对棉铃虫幼虫的致死作用较低, 但是对其后期的生长发育影响较大, 因而

对种群数量的影响较大,蛹重的降低还有可能影响到成虫的寿命和繁殖力,进而会影响棉铃虫下一代的种群数量。因此在评价该菌对害虫的防治效果时,不能只考虑幼虫的死亡率,应该从死亡率、害虫的取食量、化蛹率、羽化率、成虫寿命和雌虫的产卵量等多方面因素来进行综合评价。

中肠是昆虫消化和吸收食物的重要场所,毒素对 中肠蛋白酶有明显的抑制作用,与常规胃毒剂抑制消化酶系活力的特性类似,但与同为蛋白毒素的 Bt δ -内毒素对棉铃虫中肠蛋白酶活性的影响有所差异。棉铃虫幼虫在取食 Bt毒蛋白后,其类胰凝乳蛋白酶活力显著升高,这是因为类胰蛋白酶在 Bt前毒素活化为 Bt毒素的过程中起着主要作用^[11]。而本研究发现,在棉铃虫幼虫取食毒素 后 36 h时,类胰凝乳蛋白酶活性受到显著抑制,说明毒素 不需要中肠酶的酶解活化就能直接发挥作用,受昆虫中肠内的环境影响较小,这可能也是导致嗜线虫致病杆菌的杀虫谱比 Bt广的原因。昆虫中肠蛋白酶是中肠上皮细胞分泌的消化蛋白质和碳水化合物的重要酶^[8]。南宮自艳等研究证明,毒素 对棉铃虫幼虫中肠组织有明显的破坏作用,其特征类似于 Bt δ -内毒素引起的症状^[10],因此,毒素 对棉铃虫中肠蛋白酶活性所表现的抑制作用可能与中肠被破坏有关。HB310菌液和毒素 对棉铃虫的拒食作用也可能与此有关。

本实验还发现,对照棉铃虫幼虫体内酶活性并不是固定不变的,特别是中肠蛋白酶在不同时间段差异非常显著。李伟等测定了棉铃虫幼虫在4龄期内取食及消化变化及与中肠蛋白酶的关系,结果显示,4龄期内取食及消化呈现有规律的变化,中肠主要蛋白酶活性和取食量均随幼虫发育的前-中-后期呈现低-高-低的变化趋势^[12]。本实验所用试虫是蜕皮后饥饿 6 h的 4龄幼虫,取样时间正好涵盖了同一龄期内的前-中-后 3个时期,因而对照幼虫中肠几种蛋白酶活性的变化规律与李伟等人的结果是类似的,而饲毒幼虫中肠蛋白酶活性因受到抑制而一直比较低。此外在本实验结果中,出现了处理后 48 h时对照与处理幼虫中肠蛋白酶活性差异缩小的现象,这与对照试虫龄期中肠酶活性的变化有很大关系,此外与饲毒幼虫的发育速度慢可能也有一定的关系。

参 考 文 献:

- [1] SHEN Ji-liang(沈晋良), ZHOU Wei-jun(周威君), WU Yidong(吴益东), et al. 棉铃虫对生物农药早期抗性及其与转基因棉抗虫性的关系 [J]. *Acta Entomologica Sinica* (昆虫学报), 1998, 41(1): 8-14
- [2] EHLERS R U. Current and Future Use of Nematodes in Biocontrol Practice and Commercial Aspects with Regards to Regulatory Policy Issue [J]. *Biocontrol Science and Technology*, 1996, 6: 303-316.
- [3] LIU Qizhi(刘奇志), ZHAO Ying-xia(赵映霞), YAN Yuhua(严毓骅), et al. 我国昆虫病原线虫生物防治应用研究进展 [J]. *J China Agric Univ* (中国农业大学学报), 2002, 7(5): 65-69.
- [4] BOWEN D, ROCHELEAU THOMAS A, BLACKBURN M, et al. Insecticidal Toxins from the Bacterium *Photorhabdus luminescens* [J]. *Science*, 1998, 280: 2129-2132.
- [5] BOWEN D, JENSGEN J C. Purification and Characterization of a High Molecular Weight Insecticidal Protein Complex Produced by the Entomopathogenic Bacterium *photorhabdus luminescens* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64: 3029-3035
- [6] LI Xue-hua(李秀花), WANG Qinying(王勤英), LU Xuejun(陆秀君), et al. 不同昆虫寄主对昆虫病原线虫共生菌的敏感性比较 [J]. *Entomological Knowledge* (昆虫知识), 2004, 41(1): 39-42
- [7] WANG Qinying(王勤英), NAN GONG Zi-yan(南宮自艳), LU Xuejun(陆秀君), et al. 嗜线虫致病杆菌 HB310菌株杀虫蛋白的纯化及活性鉴定 [J]. *Acta Entomologica Sinica* (昆虫学报), 2005, 48(3): 353-358
- [8] WANG Chen-zhu(王琛柱), QIN Jun-de(钦俊德). 棉铃虫幼虫中肠主要蛋白酶活性的鉴定 [J]. *Acta Entomologica Sinica* (昆虫学报), 1996, 39(1): 7-13
- [9] TANG Qiyi(唐启义), FENG Ming-guang(冯明光). *DPS Data Processing System for Practical Statistics* (实用统计分析及其 DPS 数据处理系统) [M]. Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 2002: 1-664
- [10] NAN GONG Zi-yan(南宮自艳), WANG Qinying(王勤英), SONG Ping(宋萍), et al. 嗜线虫致病杆菌杀虫毒素对棉铃虫的中肠组织病理学研究 [J]. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 2005, 38(11): 2240-2245
- [11] MOHAN M, GUJAR G T. Characterization and Comparison of Midgut Proteases of *Bacillus thuringiensis* Susceptible and Resistant Diamondback moth (*Plutellidae* Lepidoptera) [J]. *J Inverteb Pathol*, 2003, 82: 1-11.
- [12] LI Wei(李伟), WANG Chen-zhu(王琛柱). 棉铃虫 4龄幼虫的摄食行为和中肠蛋白酶活性的变化 [J]. *Acta Entomologica Sinica* (昆虫学报), 1999, 42(4): 358-363

(Ed JN SH)