

榆紫叶甲病原菌分离及生防菌的筛选与鉴定

胡基华¹, 陈静宇^{1*}, 曹旭^{1,2}, 姜威^{1,2}, 刘宇帅^{1,2}, 孟利强^{1,2}, 李晶^{1,2}, 张淑梅^{1,2}

(1. 黑龙江省科学院微生物研究所, 黑龙江哈尔滨 150010; 2. 黑龙江省科学院高技术研究院, 黑龙江哈尔滨 150015)

摘要 [目的] 探寻防治榆紫叶甲病的生防菌株。[方法] 从榆紫叶甲虫体上分离菌株后进行培养, 并对室内饲养的榆紫叶甲各龄幼虫进行致病性试验。[结果] 从感病榆紫叶甲成虫虫体上分离到 18 个菌株, 其中 12 个菌株具有几丁质和蛋白质降解活性。5 个菌株对 1~2 龄幼虫表现出不同程度的致病力, 在接种后 1~3 d 幼虫开始死亡, 处理后 7 d 幼虫的累积死亡率为 21.2%~46.8%, 其中 YJA-03 和 YJA-10 菌株的累积死亡率 >30.0%。YJA-03 菌株为革兰氏阳性菌, 经过形态学、生理生化特性和 PCR 扩增鉴定确定它属于短杆菌属(*Exiguobacterium*)。YJA-10 菌株为革兰氏阴性菌, 经鉴定其属于 *Glutamicibacter* 属。[结论] YJA-03 和 YJA-10 菌株可用作防治榆紫叶甲病的生防菌。

关键词 榆紫叶甲; 生物防治; 菌株分离; 生理生化特性

中图分类号 S763.38 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)11-0003-04

Isolation, Screening and Identification of Bacterial Agents for Biological Control of *Ambrostoma quadriimpressum*

HU Ji-hua¹, CHEN Jing-yu^{1*}, CAO Xu^{1,2} et al (1. Institute of Microbiology, Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin, Heilongjiang 150010; 2. Institute of Advanced Technology, Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin, Heilongjiang 150015)

Abstract [Objective] To explore the pathogen for the biological control of *Ambrostoma quadriimpressum*. [Method] Some bacteria strains were isolated from *A. quadriimpressum* to determine the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* to each instar of larvae fed in the laboratory. [Result] 18 bacterial isolates were obtained from diseased adults of *A. quadriimpressum*, among them 12 isolates showed protein-degrading and chitin-degrading activities. 5 isolates showed different pathogenicity to 1st-instar and 2nd-instar larvae of *A. quadriimpressum*. The larvae began to die during 3-7 d after inoculation, and the accumulative mortality rate of larvae of *A. quadriimpressum* was 21.2% - 46.8%. The accumulative mortality rate of *A. quadriimpressum* larvae to YJA-03 strain and YJA-10 strain were more than 30%. YJA-03 was identified as Gram-positive bacterium, a bacteria of genus *Exiguobacterium* identified by morphological, physiological and biochemical characteristics and PCR amplification. YJA-10 was identified as Gram-negative bacterium, belonging to genus *Glutamicibacter*. [Conclusion] YJA-03 strain and YJA-10 strain can be used for the biological control of *A. quadriimpressum*.

Key words *Ambrostoma quadriimpressum* Motschulsky; Biological control; Strain isolation; Physiological and biochemical characteristics

榆紫叶甲 (*Ambrostoma quadriimpressum* Motschulsky) 隶属鞘翅目叶甲科, 其食性专一, 仅取食榆树芽苞、叶片, 常将叶片吃光, 使树势衰弱并引起其他病虫害危害, 在黑龙江、吉林、辽宁和内蒙古等地危害严重^[1-2]。近年来, 榆树已经逐渐成为城市园林绿化的重要树种, 榆紫叶甲的危害程度日益加大, 严重影响城市园林绿化景观, 同时造成了极大的经济损失。目前, 主要依靠广谱性的化学农药进行防治, 虽然在短时间内可快速控制种群数量, 但是害虫一旦产生抗药性, 就会有再度猖獗的现象。同时, 也给环境带来了污染, 随着人们对环境问题的关注越来越多以及对环境保护意识的增强, 人们不断探索以生物农药为主的无公害防治方法。苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 因其能够产生杀虫蛋白而被用于防治鳞翅目、鞘翅目和双翅目等害虫^[3-4]。国内有关榆紫叶甲的生物防治报道很少, 而直接从虫体上分离筛选出防治榆紫叶甲病原菌的研究鲜见报道。笔者从感病的榆紫叶甲虫体上筛选出对榆紫叶甲幼虫具有生防作用的 2 株菌株 JYA-03 和 JYA-10, 并对室内饲养的榆紫叶甲各龄幼虫进行致病性试验, 以期从榆紫叶甲虫体上获得可用于对榆紫叶甲控制的生防细菌。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 虫生菌株的分离。感病榆紫叶甲成虫采集于东北林

业大学校园内, 从虫体上分离到菌株后进行培养, 将菌株编号并保存于试管斜面培养基上, 于 4℃ 冰箱中保存备用。

1.1.2 供试昆虫。致病性试验采用榆紫叶甲 2 龄幼虫, 林间采集老熟卵块, 经过室内饲养分别获得 1~4 龄幼虫, 用于室内致病性试验。

1.1.3 培养基。分离培养和保存虫生细菌的培养基为 LB 培养基、几丁质琼脂 (CA) 培养基、牛奶琼脂 (MA) 培养基, 分别用于几丁质酶和蛋白酶活性测定。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离与纯化。用 75% 乙醇清洗感病榆紫叶甲成虫 5 s, 体表消毒后用 0.1% 升汞水溶液对虫体表面消毒 2~3 min, 无菌水清洗 2 次, 将虫体压碎后, 用 0.85% 生理盐水制成菌悬液, 水悬液 (65℃ 15 min), 取 0.1 mL 菌悬液涂布于 LB 平板培养基上, 28℃ 下培养 48 h。

1.2.2 菌株降解酶活性的测定。将分离到的菌株分别接种在 CA 或 MA 平板中, 培养 3 d 后进行观察, 发现菌落周围出现透明圆环的即为具有降解活性的菌株, 初步推测为致病性菌株。

1.2.3 致病性试验。将具有降解酶活性的菌株活化稀释成 2.0×10^9 个/mL 的细菌悬浮液。在培养皿 (直径 9.0 cm 或 15.0 cm) 中铺上滤纸, 每个皿中放入新鲜榆树叶片, 将试虫置于叶片上 (每皿 15 头), 室温下进行饲养。用喷雾器将菌液均匀喷在榆树叶片和试虫虫体上, 进行室内观察。另外, 以灭菌水喷雾叶片和试虫作为对照 (CK), 每个处理重复 3 次。处理后 1~7 d, 每天定时观察并记录虫体发病和死亡情况。

基金项目 哈尔滨市应用技术与开发项目 (2014RFQYJ043)。

作者简介 胡基华 (1970—), 女, 吉林长春人, 副研究员, 博士, 从事昆虫生物防治研究。* 通讯作者, 实验师, 从事农业微生物研究。

收稿日期 2017-02-10

1.2.4 测定项目与方法。致病菌确定为可降解几丁质或蛋白质的菌株;致病性试验通过累积死亡率(LR_{7d})和致死中时(50%虫体死亡所需的时间, LT_{50}),比较不同菌株之间 LR_{7d} 值的差异,同时通过回归分析建立毒力回归模型。

1.2.5 致病菌株的分子学鉴定。致病菌株活化培养 36 h 后进行革兰氏染色;观察菌落特征、细胞形态和大小;菌株的生理生化特性参照东秀珠等^[5]的方法进行测定。

基因组 DNA 的提取:①取 500 μ L 样品置于 2 mL 无菌离心管中,11 000 r/min 离心 10 min。②加入 0.8 mL 抽提缓冲液[1% CTAB、100 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)、20 mmol/L EDTA(pH 8.0)、700 mmol/L NaCl(pH 8.0)]和 20 μ L 蛋白酶 K,充分混匀。37 $^{\circ}$ C 下水浴 30 min,每隔 10 min 混匀 1 次。③加入 160 μ L 10% SDS,充分混匀后,65 $^{\circ}$ C 水浴 1 h,每隔 15 min 混匀 1 次。④加入等体积的氯仿,充分混匀,4 $^{\circ}$ C 11 000 r/min 离心 10 min。⑤取 700 μ L 上清液置于 2 mL 离心管中,重复步骤③和④。⑥加入 0.6 倍体积的异丙醇混匀使其沉淀,离心。⑦加入 75% 乙醇 700 μ L,混匀后 11 000 r/min 离心 10 min,弃上清。⑧重复步骤⑥,将沉淀风干。⑨用 30 μ L TE 缓冲液溶解 DNA 沉淀,使用切胶试剂盒纯化 DNA,进行琼脂糖电泳检测。

PCR 扩增体系:处理后的样品(70 ng/ μ L)模板 2.0 μ L; dNTP Mixture(2.5 mmol/L)2.5 μ L;27F(20 μ mol/L)1.5 μ L; 1492R(20 μ mol/L)1.5 μ L;10 \times Ex Taq Buffer(Mg^{2+} plus)5.0 μ L;Ex Taq 酶(5 U/ μ L)0.2 μ L;补足 ddH₂O 至 50.0 μ L。Ex Taq DNA Polymerase 等扩增所用试剂均购自 TaKaRa 公司,PCR Purification Kit 购自 Promega,引物由上海生工合成。PCR 仪使用 Biometra 公司生产的 Tgradient,凝胶成像分析仪为 Bio-Rad 公司的 Gel-Doc2000。

参考 Goto 等的方法^[6-8],以菌株的形态特征以及生理生化特性为基础,根据《伯杰细菌鉴定手册》^[8]初步确定各菌

株的分类学属名;根据 16S rDNA 基因序列的 BLASTn 比对结果,最终确定菌株的分类地位。

2 结果与分析

2.1 榆紫叶甲虫病原菌菌株的分离与纯化 采集到的感病榆紫叶甲虫通过对其虫体进行分离与纯化,共得到 18 个菌株,编号为 YJA-01~YJA-18。通过几丁质和蛋白质水解试验测定,其中具有几丁质降解活性的有 9 株,具有蛋白质降解活性的有 8 株,能同时降解 2 种物质的有 5 株(表 1),初步推测这 12 株菌株是榆紫叶甲的病原菌。

表 1 具有降解几丁质和蛋白质能力的菌株
Table 1 Some bacteria with protein-degrading and chitin-degrading activities

菌株 Strain	几丁质降解 Chitin-degrading	蛋白质降解 Protein-degrading	菌株 Strain	几丁质降解 Chitin-degrading	蛋白质降解 Protein-degrading
YJA-02	+	-	YJA-12	-	+
YJA-03	+	+	YJA-13	+	+
YJA-06	+	-	YJA-14	+	-
YJA-09	+	+	YJA-15	+	+
YJA-10	+	+	YJA-16	+	-
YJA-11	-	+	YJA-18	-	+

2.2 具有酶活性的菌株对榆紫叶甲幼虫的致病性 灭菌水(CK)处理后榆紫叶甲幼虫的生长发育正常,全部能按期蜕皮直至预蛹。用虫体分离具有降解酶活性的 12 个菌株接种榆紫叶甲 2 龄幼虫,有 7 个菌株未引起发病,其取食和生长发育未受到影响;5 个菌株具有致病性,但其致病性存在差异(表 2)。其中,2 个菌株 YJA-03 和 YJA-10 的致病性较强,接种后 2 d 始见虫体死亡, LT_{50} 分别为 6.30 和 8.30 d;其余 3 个菌株对榆紫叶甲 2 龄幼虫的致病性较弱,接种 5~6 d 始见虫体死亡, LR_{7d} 均在 25.00% 以下, LT_{50} 均超过 5.00 d,其中 YJA-13 菌株的致病性最低,接种后第 6 天虫体开始死亡, LR_{7d} 为 22.98%, LT_{50} 为 30.10 d。

表 2 感病榆紫叶甲虫上分离菌株及其对榆紫叶甲 2 龄幼虫的致病性

Table 2 The pathogenicity of obtained strains from *A. quadriimpressum* to 2nd-instar larvae of *A. quadriimpressum*

菌株 Strain	始见死亡时间 Initial dead time//d	接种后 7 d 累积校正死亡率 Accumulative corrected mortality rate(LR_{7d})//%	致死中时 Median lethal time(LT_{50})//d	症状特点 Characteristics of symptoms
YJA-03	2	46.67 \pm 0.24	6.30	虫体发软,颜色变深
YJA-09	5	21.93 \pm 0.29	22.78	虫体发软,颜色变深
YJA-10	2	45.56 \pm 1.13	8.30	虫体变小,颜色变深
YJA-13	6	22.98 \pm 0.48	30.10	虫体发软,颜色变深
YJA-15	5	21.20 \pm 0.49	18.20	虫体发软,颜色变深
CK	—	0	—	无症状

对 3 个杀虫效果较好的菌株进行毒力回归分析(表 3),经 t 检验可知,这些回归模型都达到显著水平($P < 0.05$)。通过这些模型可以估计 3 个菌株对榆紫叶甲 2 龄幼虫的致病能力。在一定的接种浓度(2.0×10^9 CFU/mL)下,计算出使 50% 的 2 龄榆紫叶甲幼虫死亡所需要的时间(LT_{50}), LT_{50} 时间越短,其致病性就越强,即对榆紫叶甲幼虫的杀虫效果越好。由表 3 可知,菌株 YJA-03 的致病性最强, LT_{50} 仅为 6.30 d,其杀虫效果最好。菌株 YJA-10 的致病性较强, LT_{50} 为 8.30 d。

表 3 致病菌株对榆紫叶甲 2 龄幼虫的毒力回归分析
Table 3 The toxicity regression analysis of pathogens to 2nd-instar larvae of *A. quadriimpressum*

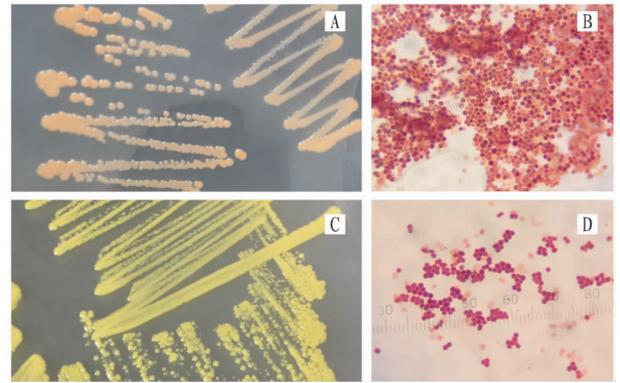
菌株 Strains	回归方程 Regression equation	LT_{50} d	相关系数 Correlation coefficient
YJA-03	$y = 0.842x + 3.669$	6.30	0.912
YJA-06	$y = 0.702x + 4.023$	10.60	0.974
YJA-10	$y = 0.694x + 3.518$	8.30	0.968

2.3 致病菌株的形态特征 对榆紫叶甲幼虫具有杀虫活性

的 2 株病原菌在 LB 培养基上进行室内培养,单胞菌落 YJA-03 呈浅橙色,色素不扩散,菌株表面湿润,菌落平坦,表面略微隆起,光滑,有蜡层(图 1A);菌体幼龄培养物为杆菌,老培养物为球状,菌体大小为(1.1~1.2) μm × (1.4~3.2) μm (图 1B),革兰氏染色呈阳性,初步鉴定为杆菌^[5,9]。YJA-10 菌株为淡黄色,表面湿润,略微隆起,光滑,有蜡层(图 1C)。革兰氏染色均呈阴性,菌体短杆形,菌体大小(1.16~1.77) μm × (1.35~2.81) μm (图 1D)。

2.4 榆紫叶甲致病菌株的生理生化特性 具有杀虫活性的 2 株致病菌的各生理生化特性见表 4。从碳源和氮源来看,2 个菌株都能利用 D-葡萄糖、D-果糖、D-蔗糖、甘露醇、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 和 KNO_3 ;2 个菌株接触酶反应、柠檬酸盐利用和硝酸盐还原反应结果均呈阳性;2 个菌株淀粉水解试验、脲酶试验、吲哚试验、V-P 试验都呈阴性;甲基红检测 YJA-03 菌株呈阳性,YJA-10 菌株呈阴性,都能在 2% NaCl 和 30~37 $^{\circ}\text{C}$ 正常生长,而在 5%~7% NaCl、4 和 41~45 $^{\circ}\text{C}$

条件下均不能生长。



注:A,B. 菌株 YJA-03;C,D. 菌株 YJA-10

Note:A,B. YJA-03 strain;C,D. YJA-10 strain

图 1 2 株具有杀虫活性致病菌的菌落和细胞形态

Fig. 1 The colony and cell morphology of two strains with insecticidal activities

表 4 2 株榆紫叶甲病原菌的生理生化特性

Table 4 Physiological and biochemical characteristics of 2 strains of *A. quadriimpressum*

菌株 Strain	菌落颜色 Colony color	菌落形态 Colony morphology	革兰氏染色 Gram staining	碳源利用 Carbon source utilization				氮源利用 Nitrogen source utilization		接触酶反应 Catalase reaction	淀粉水解 Starch hydrolysis
				D-葡萄糖 D-glucose	D-果糖 D-fructose	D-蔗糖 D-sucrose	甘露醇 Mannitol	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	KNO_3		
YJA-03	浅橙色	短杆状	+	+	+	+	+	+	+	+	-
YJA-10	淡黄色	短杆状	-	+	+	+	+	+	+	+	-

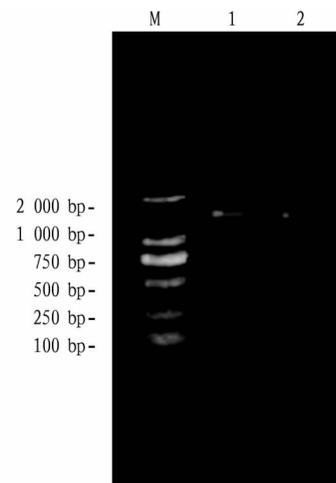
菌株 Strain	脲酶试验 Urease test	柠檬酸盐 利用 Citrate utilization	甲基红检测 Methyl red detection	吲哚试验 Indole test	明胶液化 Gelatin liquefaction	V-P 试验 V-P test	硝酸盐 还原 Nitrate reduction	糖醇发酵 Sugar alcohol fermentation			
								D-葡萄糖 D-glucose	D-木糖 D-xylose	D-蔗糖 D-sucrose	甘露醇 Mannitol
YJA-03	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
YJA-10	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+

菌株 Strain	2% NaCl 生长 Growth in 2% NaCl	5% NaCl 生长 Growth in 5% NaCl	7% NaCl 生长 Growth in 7% NaCl	4 $^{\circ}\text{C}$ 生长 Growth at 4 $^{\circ}\text{C}$	30 $^{\circ}\text{C}$ 生长 Growth at 30 $^{\circ}\text{C}$	37 $^{\circ}\text{C}$ 生长 Growth at 37 $^{\circ}\text{C}$	41 $^{\circ}\text{C}$ 生长 Growth at 41 $^{\circ}\text{C}$	45 $^{\circ}\text{C}$ 生长 Growth at 45 $^{\circ}\text{C}$
YJA-03	+	-	-	-	+	+	+	-
YJA-10	+	-	-	-	+	+	+	-

2.5 致病菌株的 16S rDNA 与分子学鉴定 以 2 个致病菌株的基因组 DNA 为模板,用细菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增;对扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析(图 2),可见提取 DNA 大小约为 1 600 bp;测序后去除首尾非相关序列后,得到各菌株大小 1 012~1 268 bp 的序列,序列登录到 GenBank 数据库中并得到它们的登录号。将这些菌株的 16S rDNA 序列进行 Blast 分析,结果表明 YJA-03 与 GenBank 中的短杆菌属(*Exiguobacterium*) 菌株高度相近;YJA-10 则与 *Glutamicibacter* 属菌株高度相近(表 5)。根据包括 2 个菌株在内的 10 个菌株的 16S rDNA 序列,构建系统进化树(图 3)。从 16S rDNA 系统发育树可以看出,同一种菌不总是聚为一簇,但相隔较近;不同种的菌株在系统进化树上相隔较远;菌株 YJA-03 和 YJA-10 分别处于不同的小分支内,进化上距离较近。

3 讨论与结论

利用昆虫病原菌能有效控制害虫的发生危害,在防治害虫的同时,还可以保护自然环境安全^[10]。该研究从感病的



注:M. DL 2000 Marker;1. YJA-03 菌株;2. YJA-10 菌株

Note:M. DL 2000 Marker;1. YJA-03 strain;2. YJA-10 strain

图 2 致病菌提取 DNA 的 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification results of DNA extracted from pathogen

表5 序列比对结果

Fig. 5 Sequence alignment results

菌株 Strains	最相似菌株 Most similar strains	登录号 Accession No.	相似度 Similarity//%
YJA-03	<i>Exiguobacterium sibiricum</i>	NR_075006.1	99
YJA-10	<i>Glutamicibacter soli</i>	NR_044338.1	99

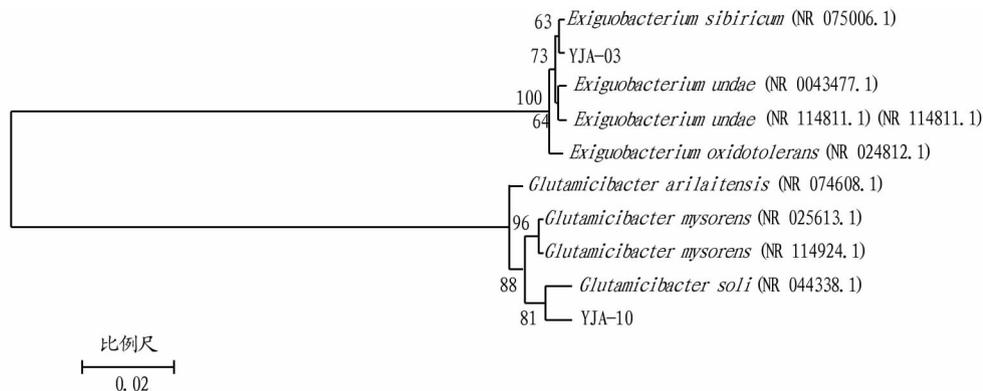


图3 基于16S rDNA序列的系统发育树分析

Fig. 3 The phylogenesis analysis based on 16S rDNA sequences

凡是对害虫有毒性的细菌(如苏云金杆菌、假单孢菌及色细菌等)都具有几丁质酶和蛋白酶活性^[12-14]。该研究先从榆紫叶甲上分离并获得病原菌,由于昆虫表皮的成分主要为几丁质和蛋白质^[15],因此首先研究分离病原菌的几丁质酶和蛋白酶活性,因为幼龄幼虫集中危害嫩叶,室内试验中用细胞悬浮液喷洒于榆树叶片和虫体上,大大增加了病原菌侵入虫体的机会。今后林间野外试验应对昆虫林间发育进度进行调查,选择适当的施药时期和合适的气候条件,以保证药剂的杀虫效果。

该研究通过观察2个榆紫叶甲杀虫活性菌株的菌落和菌体形态特征和生理生化特性,结合16S rDNA序列对比分析鉴定,确定它们分属于短杆菌属(*Exiguobacterium*)和*Glutamicibacter*属。前者曾从马铃薯加工废水中提取到,也用于废水处理研究中。目前,还未见到2个菌株侵染昆虫的报道,因此还需要对其杀虫机理、发酵扩繁和制剂配制、应用技术等方面进行深入研究。此外,该研究虽然筛选到对榆紫叶甲具有生防效果的细菌,但不同环境中的榆紫叶甲虫体上还存在其他潜在的生防细菌,今后还需要进行进一步分离筛选和鉴定研究。

参考文献

- [1] 安瑞军,李秀辉,张冬梅.榆紫叶甲生物学特性的研究[J].林业科技,2005,30(5):18-20.
- [2] 张执中.森林昆虫学[M].2版.北京:中国林业出版社,1993:286.
- [3] VAN FRANKENHUYZEN K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins[J]. Journal of invertebrate pathology,2009,101(1):1-16.

榆紫叶甲成虫上分离并筛选出2株对其具有致病性的细菌菌株YJA-03和YJA-10,具有一定的开发利用价值。筛选出的生防菌对1龄、2龄榆紫叶甲幼虫有很好的杀虫效果,但对高龄幼虫和成虫没有明显的致病性,说明榆紫叶甲等鞘翅目昆虫的高龄幼虫和成虫对细菌的抗性明显高于低龄幼虫,与其他研究报道^[11-12]相一致。

- [4] BURGESS H D. Control of insects by bacteria[J]. Parasitology,1982,84(4):79-117.
- [5] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001:364-386.
- [6] GOTO K,OMURA T,HARA Y,et al. Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*[J]. Journal of general and applied microbiology,2000,46(1):1-8.
- [7] KESHAVARZI M. Isolation, identification and differentiation of local *B. thuringiensis* strains[J]. Journal of agricultural science and technology,2008,10(2):493-499.
- [8] HALFMANN H, DENIS B, BIBINOV N, et al. Identification of the most efficient VUV/UV radiation for plasma based inactivation of *Bacillus atrophaeus* spores[J]. Journal of physics D: Applied physics,2007,40(19):5907-5911.
- [9] 布坎南 R E,吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M].中国科学院微生物研究所翻译组,译.8版.北京:科学出版社,1984:729-739.
- [10] AVIS T J, GRAVEL V, ANTOUN H, et al. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity[J]. Soil biology and biochemistry,2008,40(7):1733-1740.
- [11] CANTWELL G E, CANTELO W W. Control of the Colorado potato beetle with *Bacillus thuringiensis* variety *Thuringiensis*[J]. American potato journal,1984,61(8):451-459.
- [12] SHARMA P, NAIN V, LAKHANPAUL S, et al. Synergistic activity between *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab and Cry1Ac toxins against maize stem borer (*Chilo partellus* Swinhoe)[J]. Letters in applied microbiology,2010,51(1):42-47.
- [13] 罗华东,严加林,余洋,等.马铃薯甲虫病原细菌分离及生防菌的筛选与鉴定[J].中国农业科学,2012,45(18):3744-3754.
- [14] MARTIN P A W, BLACKBURN M B, SHROPSHIRE A D S. Two new bacterial pathogens of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae)[J]. Journal of economic entomology,2004,97(3):774-780.
- [15] 李瑶,范晓军.昆虫几丁质酶及其在害虫防治中的应用[J].应用昆虫学报,2011,48(5):1489-1494.