第 18 卷 第 4 期　　昆 虫 学 报　　Vol. 18, No. 4
1975 年 11 月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　November, 1975

苏云金杆菌 β-外毒素的研究*

冯喜昌　王 瑛　冯维熊　傅贻玲
(中国科学院北京动物研究所)

摘要　本文报道苏云金杆菌 β-外毒素研究的结果。

从苏云金杆菌 40 个菌株（分属于 9 个血清型）中筛选出 5 个产 β-外毒素的菌株：E-013 (H_9)、Frc (H_1)、E-009(H_1)、E-096(H_7) 和 E-012 (H_8)。

用家蝇 (*Musca vicina*)三龄幼虫作生物测定，发现发酵液和菌粉水抽提液的致死中浓度 (LC_{50}) 分别为原液稀释 520 倍和 2,300 倍，证明在我们的培养条件下，很易获得高浓度的 β-外毒素，这对实际应用具有重要意义。此外，还研究了培养基种类和培养时间对β-外毒素产生的影响。

葡萄糖氧化酶对 E-013 菌株所产 β-外毒素的活性有显著的抑制作用。

经过乙醇分级分离、钡盐沉淀和离子交换层析得到初步纯化的 β-外毒素。紫外吸收光谱具有典型的腺嘌呤核苷酸类的特性：最大吸收波长 (λ_{max}) 为 258 毫微米，最小吸收波长(λ_{min})为 233 毫微米。

苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis* Berliner) 包括 17 个变种，分属 12 个血清型，具有多种能毒杀害虫的毒素，已发展为最有希望的微生物农药之一。除已熟知的伴孢晶体内毒素外，在杆菌生长过程分泌到体外的代谢产物中，β-外毒素由于其杀虫作用的广谱性和昆虫中毒后所表现的特有症状，在近年来引起了国内外的重视。

1959 年 McConnell 和 Richards 首次将离心的苏云金杆菌上清液注射入大蜡螟幼虫体内发现其毒性。Burgerjon 和 deBarjac (1960) 扩大了试虫范围，证明了β-外毒素对膜翅目、鞘翅目、鳞翅目的昆虫都具有一定毒效。

此后，许多实验室曾致力于 β-外毒素化学性质的研究。deBarjac 和 Dedonder (1965)、Benz (1966)、Šebesta 等(1967)、Bond 等(1969)、Kim 和 Huang (1970) 等人用不同方法提纯了这种毒素，并一致确定了其腺核苷酸的化学性质。

在应用方面，对蝗虫 (Burgerjon 等，1964)、螨类 (Hall 等，1972)、马铃薯甲虫 (Кандыбин, 1973)、斜纹夜蛾 (Hitchings, 1967) 等均有报道。田间对家蝇 (Briggs,1960; Dunn, 1960)；松叶蜂 (Burgerjon 和 Biache, 1964) 也有较好的效果。

国内对 β-外毒素的工作尚属开始。本文就菌种筛选、β-外毒素产生的适宜条件、生物测定、提取方法及土法生产等方面进行了初步的工作，现报道如下：

一、筛选具有 β-外毒素的菌株

苏云金杆菌类各血清型和变种间，甚至同一血清型的不同品系间，产生 β-外毒素的情况各异。为获得产生 β-外毒素的菌株，我们对 9 个血清型的 40 个品系进行了筛选(表 1)，以期选出毒力最强的菌株，为进一步应用和研究提供材料。由于尚未找到一种直接的、特异的 β-外毒素的化学测定方法 (Bond, 1971)，同时为了更直接地说明毒性问题，

---

* 照片由于延芬、王林瑶同志拍摄。

我们所做毒素的测定均采用了比较普遍使用的生物测定法。方法如下：将 0.3 克奶粉与被试液 3 毫升加到灭菌指形管中，用玻棒搅拌均匀，然后加入适量灭菌脱脂棉，将上述液体全部吸附在棉花上，接入家蝇三龄幼虫 20 条，饲养于 25℃。观察至对照组的成虫羽化

表 1　苏云金杆菌不同菌株 β-外毒素的产生情况*

血清型	品系或培养号	产外毒素情况	寄主	菌株来源
H_1	Frc	++**	—	本所病理组从法国商品制剂中分离
	058	—	—	本所病理组从捷克斯洛伐克菌粉中分离
	E-009	++	地中海粉螟	英国引进
	007	—	玉米螟	本所病理组分离
H_2	E-021	—	天幕毛虫	英国引进
H_3	E-H_3	—	家蚕	英国引进
$H_{4a,4b}$	008	—	西伯利亚松毛虫	东北农学院
	L-008	—	—	—
	E-016	—	家蚕	英国引进
	V-008	—	西伯利亚松毛虫	捷克斯洛伐克引进
$H_{4a,4c}$	7304	—	鞘翅目	本所病理组
	E-023	—	粉斑螟	英国引进
	36	—	菜青虫	东北农学院
	7235	—	大谷盗	本所病理组分离
H_5	E-087	—	大蜡螟	英国引进
	39	—	—	—
	48	—	螟虫	上海植物生理研究所
	7303	—	鳞翅目幼虫	广东省昆虫研究所
	013	—	刺蛾	本所病理组
	7302	—	褶翅尺蠖	本所病理组
	7217	—	米蛾	本所病理组
	126	—	—	—
	H-B_1	—	棉铃虫	辽阳农学院朝阳分院、朝阳地区农科所
	P-A_9	—	粘虫	同　上
	H-B_2	—	棉铃虫	同　上
	安-18	—	—	—
	18	—	—	—
	010	—	蜜蜂幼虫	本所病理组分离
	140	—	棉花小造桥虫	湖北省微生物研究所
	012	—	刺蛾	本所病理组
	P-A_2	—	粘虫	辽阳农学院朝阳分院、朝阳地区农科所
	7219	—	蓖麻蚕	本所病理组
	111	—	—	湖北省微生物研究所
	174	—	黄地老虎	上海复旦大学
	P-A_5	—	粘虫	辽阳农学院朝阳分院、朝阳地区农科所
H_6	E-010	—	一点谷螟	英国引进
H_7	E-096	++	地中海粉螟	英国引进
H_8	E-012	+	地中海粉螟	英国引进
	006	—	玉米螟	本所病理组
H_9	E-013	++	谷螟	英国引进

* 普通肉汤培养基 30℃ 振荡培养24小时，经高压灭菌（1.1 公斤/厘米² 15 分钟）后作生物测定。

** ++：表示 β-外毒素产量较高；+：β-外毒素产量低；—：不产生 β-外毒素。

(10—12 天)。

从表 1 可以看到：在所用 40 个菌株中，只有 5 个菌株明显地产生 β-外毒素，即血清型 1 的 Frc、E-009，血清型 7 的 E-096，血清型 8 的 E-012 和血清型 9 的 E-013。

二、β-外毒素产生的适宜条件

国外对 β-外毒素的很多报道互相矛盾，而且毒效不稳定。同时考虑到 β-外毒素的产生受到多方面因素的影响而有较大幅度的变动，为了发挥一个产 β-外毒素菌种的最大效能，我们从培养基成分、培养时间等不同角度摸索外毒素产生的最适条件。所用菌种为 E-013 (H_9)。

(一) 不同培养基的影响

实验分为液体培养和固体培养两种。液体培养：将 E-013 的斜面种子转接到液体培养基中，30℃ 振荡培养 24 小时后收集。固体培养：从斜面转接到普通肉汤培养基中 30℃ 振荡培养 8 小时，然后转到固体培养基中，30℃ 静止培养 5 天收集。实验选用了 5 种培养基(表 2)；所得样品生物测定前用 1.1 公斤/厘米^{2}高压灭菌 15 分钟。

表 2 不同培养基对 E-013 菌株 β-外毒素产生的影响

培养基	稀释倍数	试虫数(头)	毒性表现						
			死幼虫	半化蛹	畸蛹	未羽化	羽化畸形	正常羽化	死亡率(%)***
普通肉汤	原液	60	2	—	58	—	—	—	100
	50	60	—	—	—	13	1	46	21.7
普通肉汤＋d-葡萄糖	原液	60	—	—	—	3	1	56	5.0
	50	60	1	—	—	4	—	55	8.3
普通肉汤＋酵母膏	原液	40	8	—	32	—	—	—	100
	50	40	—	—	—	22	5	13	55.0
培养基 A*	原液	60	57	2	1	—	—	—	100
	50	60	—	—	59	—	1	—	98.3
固体培养基**	50	40	40	—	—	—	—	—	100
	800	40	—	—	36	—	2	2	90.0
对照(无菌水)		60	—	—	—	2	—	58	3.4

* 培养基 A 成分：麦胚芽粉 4.0%、豆饼粉 2.4%、玉米浆 2.0%，灭菌前调至 pH 8.0 后加 0.1% $CaCO_3$。

** 固体培养基成分：麦麸 50 克、米糠 50 克、贝蛎粉 3 克、KH_2PO_4 0.3 克、$MgSO_4$ 0.15 克、麸质水(与料比例为 2:1)，灭菌前调至 pH 9.0。

*** 由于 β-外毒素的毒效主要表现在变态畸形致死而不是骤然地死亡，我们采取了如下的死亡率计算：将死幼虫、半化蛹、畸形蛹、未羽化及半羽化者列为死虫，而羽化畸形和正常羽化者列为活虫。对照组死亡率极低，实验组具特异的死亡症状，因此死亡率不需用 Abbott 公式校正。

由表 2 可以看出 E-013 菌株在不同培养基中产生 β-外毒素的量有明显差异，以固体培养基产外毒素量最多，四种液体培养基在同样培养条件下，以培养基 A 的外毒素产量最高。

(二) β-外毒素的产量与培养时间的关系

试验表明用培养基 A 作液体培养时，在 30℃条件下，E-013 菌株一般在 14 小时 β-外毒素产量还很少，在 24 小时则达最高值(图 1)。多次试验重复观察到：延长培养时间至

44 小时 β-外毒素的产量不再增加，甚或略有降低。有关此菌生长代谢的规律尚待进一步研究。由于 β-外毒素大量产生的时间在 24 小时左右，此时显微镜下观察菌体内芽孢、晶体均尚未形成。说明这种外毒素出现于生长时期的营养体而积累于培养液中，也进一步证明其为不同于晶体内毒素的另一种毒性物质。

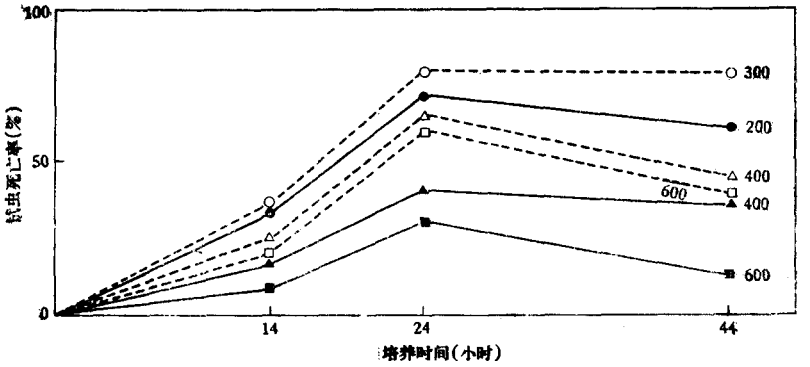


图 1　β-外毒素产量与培养时间的关系

（虚线和实线表示两次实验的结果，各以三种稀释倍数作生物测定，总计 24 组样品，每组试虫数为 60 头。培养温度 30℃）

三、β-外毒素对家蝇的毒性

（一）家蝇幼虫的罹病症状

家蝇三龄幼虫对 β-外毒素非常敏感，接毒 3 天后引起幼虫死亡或造成 β-外毒素独特的罹病症状——畸形变态。幼虫的发育明显地受到抑制，出现半化蛹（上部是幼虫，下部是蛹）、畸形蛹（尖蛹等）、不羽化（蛹外观正常不羽化）、半羽化（仅头部是成虫状下半部为蛹）或羽化畸形（残翅、窄而尖的腹部等）等症状（见图版 I、II）。所有变态畸形的虫体均不能继续发育而致死亡。羽化畸形的成虫无飞翅能力，不能繁殖后代，生活力很弱，羽化后 10 天全部死亡。

（二）毒性与剂量的关系

实验用 E-013 菌株进行液体和固体发酵。含外毒素的培养液与菌粉水抽提液经高压灭菌伴孢晶体内毒素失活，然后将此液体用无菌水进行一系列（10 至 8,000 倍）稀释，作生物测定。为了验证 β-外毒素的作用，特选用国外已证实不产外毒素的品系——血清型 1 捷克 058 菌株作对照（Burgerjon 等 1964，Barjac 等 1973）。实验结果（见图 2）证明 β-外毒素对家蝇三龄幼虫毒力非常显著，培养基 A 的培养液 LC_{50} 为原液稀释 520 倍，菌粉水抽提液 LC_{50} 为 2,300 倍。

058 菌株进行液体和固体培养，以同样的培养条件和同样的抽提方法作生物测定，发现即使不稀释的原液对家蝇也不产生任何中毒现象，与水对照组相同。

从实验结果可清楚地看出：家蝇三龄幼虫的中毒程度与 β-外毒素的剂量（以稀释倍数表示）有着明显的关系：在一定的剂量范围内，虽然获得 100% 的死亡效果，但随着此范围内剂量的变化，表现中毒的程度有所不同，高剂量的外毒素引起幼虫的全部死亡，剂量逐渐降低，幼虫死亡减少，但畸形蛹数量增加。当剂量再降低时，幼虫发育正常能化蛹

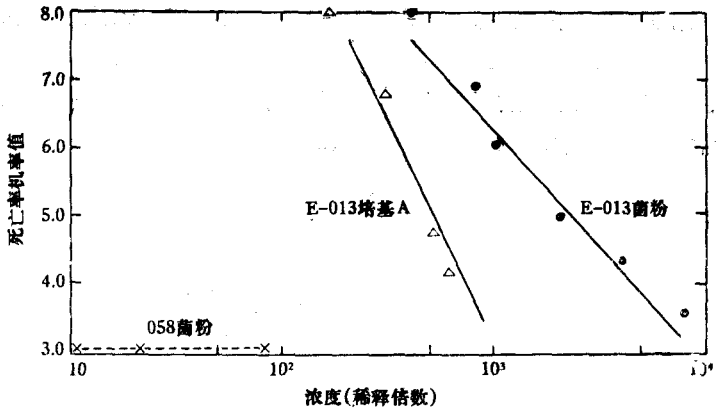


图 2 死亡率机率值与 β-外毒素浓度的关系

(此蛹外观正常)，但不羽化。当降至最低有效剂量的范围，有少量外观正常蛹不能羽化，并出现相当比例的羽化畸形的成虫。

(三) 内外毒素混用与单用外毒素的比较

取一定量 E-013 菌粉加水浸泡充分搅拌，然后用消毒纱布过滤备用。此为内外毒素混用组；另称取同量 E-013 菌粉加水充分搅拌后高压灭菌(同前)为外毒素单用组。实验结果载于表 3。

表 3 内外毒素混用与单用比较

组别	稀释倍数	试虫数(头)	毒性表现					
			死幼虫	半化蛹	尖蛹	未羽化	羽化畸形	正常羽化
内外毒素混用	800	60	1	1	58	—	—	—
外毒素	800	60	1	1	58	—	—	—
对照	水	60	1	—	—	1	—	58

实验结果表明，内外毒素混用与单纯施用外毒素毒性效果完全一致。没有出现内毒素引起的幼虫死亡或加强外毒素的毒杀作用。说明对家蝇仅外毒素有杀虫作用，内毒素的存在对外毒素无增效作用。

(四) β-外毒素对家蝇成虫的毒性观察

用 β-外毒素进行大面积的野外灭蝇试验与应用，如何合理施用外毒素，要求我们必须弄清家蝇生活周期中的不同阶段对外毒素的敏感性。因此我们除对幼虫进行实验外，还观察了外毒素对成蝇的毒性。

用菌粉加奶粉和红糖(1:1:1)饲喂成蝇 15 天，成虫正常存活，并能产卵。其卵与对照组卵同时孵化，其幼虫均能正常发育。证明 β-外毒素对成蝇并无毒性。

用低剂量 β-外毒素(菌粉用水稀释 3,000 倍)处理过的家蝇三龄幼虫，选择其中能正常羽化的成蝇按常规饲养，发现它们也能产生正常的第二代。

四、β-外毒素的提纯与酶促分解

国外对 β-外毒素的提纯进行了不少工作，方法各异，结果也不尽同。但一致证实 β-外毒素是一种腺嘌呤核苷酸类似物，对其腺嘌呤及磷酸成分比较肯定，但含有何种糖残基

则意见很不一致。本实验综合了 Benz (1966)、Bond 等 (1969) 和 deBarjac 及 Dedonder (1968)等纯化 β-外毒素的方法，设计了以下适合本实验室条件的提纯程序，对 β-外毒素进行了初步提取，目的在于验证 β-外毒素的化学本质。

(一) β-外毒素的提纯

1. 抽提：将 E-013 菌粉 10 克加 200 毫升重蒸水，搅拌浸泡过夜，然后用纱布过滤，滤液离心(22,000g 20 分钟)上清液含 β-外毒素。

2. 乙醇分级分离：上清液在 50—60℃ 减压蒸馏浓缩至 20 毫升，加入等量体积冷无水乙醇，在 4℃ 静置 24 小时，离心去沉淀。上清液再加无水乙醇至乙醇浓度为 60% (V/V)，离心去沉淀。上清液继续加无水乙醇至乙醇浓度为 90% (V/V)，放 4℃ 下 24 小时后离心，收集沉淀，并溶于 60 毫升重蒸水中。

3. 钡盐沉淀：90% 乙醇沉淀物的水溶液用氮气流搅动后加入 1.5 毫升 2.45*M* 醋酸钡，4℃ 下静置过夜。离心弃去上清液。沉淀物溶于 3 毫升冷的 1*N* HCl 中，搅拌 5 分钟离心，重复提取一次。两次上清液（呈棕黄色）合并，立即用大量的蒸馏水（160 毫升）稀释。稀释液用 1*N* NaOH 调 pH 2.5。

4. 离子交换层析：将 12 克 Dowex 1 × 2 (Cl^- 型) 树脂加到上述稀释液中，搅拌 3 小时后装柱。先用 0.1*M* NaCl 洗柱，再用 0.1*M* HCl (含 0.1*M* NaCl) 进行洗脱，洗脱液用紫外分光光度计在 260 毫微米波长测量(图 3)，合并显示洗脱峰的各管洗脱液，进行紫外光

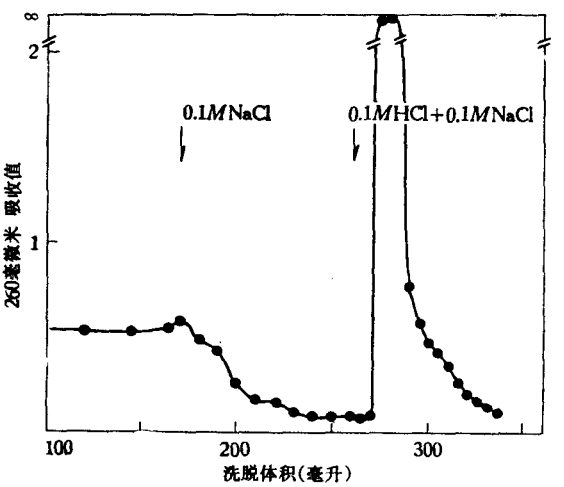


图 3　β-外毒素在 Dowex 1×2 离子交换层析柱上的洗脱谱

吸收光谱扫描(图 4)和生物测定，发现具有典型的 β-外毒素吸收光谱和显著的 β-外毒素特有的毒性。

提纯过程所用的几种方法都是核酸研究中常用的分离单核苷酸的技术。这些分离方法本身就足以反映我们所要纯化的物质具有核苷酸类似物的化学特性：如被高浓度乙醇沉淀，可形成不溶性的钡盐，被 Dowex 树脂吸附并为强酸所洗脱等等。初步提纯品的紫外吸收光谱也表现出腺嘌呤核苷酸吸收光谱的特征：最大吸收波长 (λ_{max}) 为 258 毫微米，最小吸收波长 (λ_{min}) 为 233 毫微米(图 4)。

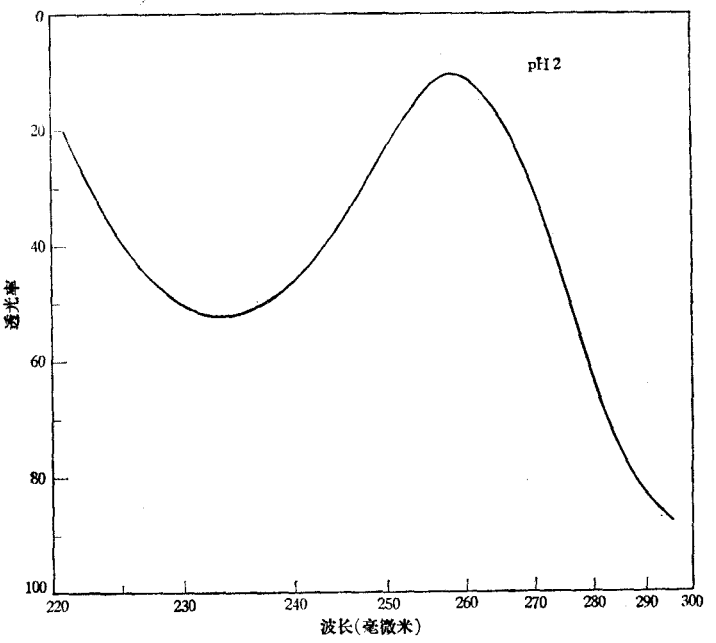


图 4 β-外毒素的紫外吸收光谱

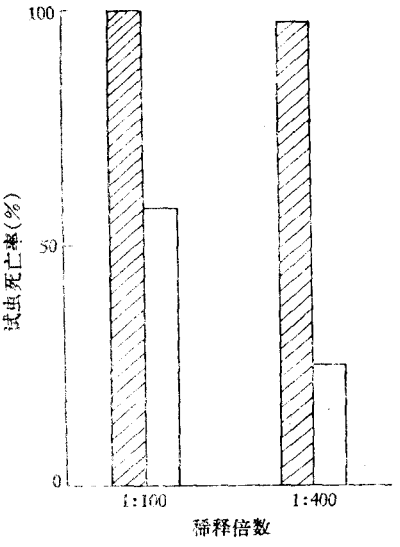


图 5 葡萄糖氧化酶对 E-013 菌株所产 β-外毒素活性的抑制作用

▨ E-013 菌粉水抽提液;
□ E-013 菌粉水抽提液加葡萄糖氧化酶

(二) 酶促分解

关于 β-外毒素分子是否含有葡萄糖残基,看法很不一致。为了检验 E-013 菌株产生的 β-外毒素分子中是否具有葡萄糖残基,我们作了如下实验:将 E-013 菌粉水抽提液分成两组,各加入葡萄糖氧化酶 220 单位[1],然后用无菌水分别稀释成 100 倍、400 倍。另用上述同样稀释倍数菌粉水抽提液作对照。同时置 30℃ 保温 24 小时,然后取出作生物测定。发现 β-外毒素用酶处理后显著失活(见图 5)。较浓的菌液(如稀释倍数为 100) β-外毒素活性丧失的比例不如较稀的菌液(如稀释 400 倍),显然在浓的菌液中存在过量的未被分解的 β-外毒素。

五、讨 论

本项工作所用样品中具毒性的主要成分由于下列特征可以肯定即为 β-外毒素:

1. 筛选出的 5 株毒性高的菌种肉汤培养液,以及 E-013 菌株的菌粉抽提液和提纯物质,在家蝇幼虫上表现出苏云金杆菌 β-外毒素独特的罹病症状;

1) 葡萄糖氧化酶中含适量过氧化氢酶,以分解葡萄糖在氧化时所产生的对机体有害的过氧化氢。酶来源于中国科学院微生物研究所。

2. 培养液、菌粉抽提液经 121℃ 高压灭菌 15 分钟，活性仍保持稳定；

3. 毒性物质是从细胞的代谢产物中分离出来的；

4. 提纯制品的紫外光谱显示为一种腺嘌呤核苷酸的物质，与国外许多实验室 (deBarjac 和 Dedonder, 1968; Benz, 1966; Bond 等，1969; Kim 和 Huang, 1970) 所测的光谱一致。

β-外毒素的分子结构至今尚未完全确定。虽然使用了近代的物理学和化学方法（如核磁共振、薄层层析等），但对于分子中包括那些糖类，许多实验室 (deBarjac 和 Dedonder, 1968; Sebesta 等, 1969; Bond 等, 1969; Kim 和 Huang, 1970)所得结果仍有出入，这可能与菌株不同有关。我们利用葡萄糖氧化酶处理 E-013 菌粉抽提液，引起 β-外毒素活性显著丧失，证明至少在某些菌株所产生的 β-外毒素分子中葡萄糖残基是存在的，且对生物活性非常重要。

与此同时我们进行了产 β-外毒素菌株的筛选。从 40 个菌株(分属 9 个血清型) 中筛选出 5 个产 β-外毒素菌株：Frc (H_1)、E-009 (H_1)、E-096 (H_7)、E-012 (H_8)、E-013 (H_9)。这与国外许多报道基本一致 (deBarjac 和 Bonnefoi, 1968; Heimpel, 1967)。其他菌株在我们的培养条件下，不产 β-外毒素或产量极微。但必须指出的是测定 β-外毒素产生的结果系随培养条件、试虫种类及测定方法而有变化，所以历年来国外各实验室报道有一致的地方，也有完全矛盾之处。如 Burgerjon 和 deBarjac (1967) 报道 H_5 不产 β-外毒素，但 Heimpel (1967) 认为 H_5 是产 β-外毒素的。在我们实验过程中也发现培养基成分的改变将明显地影响外毒素的产生。E-013 在普通肉汤培养基中产生较多的 β-外毒素，而在此培养基中加入 1% 葡萄糖则培养液中外毒素极少。由此看来外毒素的“有、无”确实受到很多条件的影响。但捷克 058 品系用多种培养基培养均不产生 β-外毒素，这与国外几个实验室结果一致 (Cantwell 和 Heimpel, 1964; deBarjac 和 Burgerjon, 1973)。

我们所用生物测定方法的设备、操作均很简单，易于掌握，所得毒效结果也非常稳定，在目前还未找到直接的化学测定方法的情况下，此法是切实可行的。

本实验的固体培养法能产生较大量的 β-外毒素，菌粉水抽提液稀释 1,000 倍对家蝇幼虫仍有显著毒性，具体培养方法与国内已大力开展的青虫菌、杀螟杆菌固体培养法完全相同，原料来源丰富、成本低、设备与操作简单，这为今后大面积推广应用提供了更大的可能。

β-外毒素为细菌分泌到培养液中的代谢产物。但目前国内主要微生物农药工业生产在后处理时细菌培养液经板框压滤后均废弃，对于产 β-外毒素的菌株则此毒素几乎全部流失，降低了杀虫效果，因此应在苏云金杆菌工业生产中，考虑 β-外毒素的回收问题。

苏云金杆菌 β-外毒素的研究还是较新开拓的领域，至今对它的化学结构、作用原理、应用范围还不十分清楚，特别在实际应用和毒性方面还有更多的课题有待进一步探索和解决。

参　考　资　料

任改新等　1975　昆虫病原细菌调查研究(一)苏云金芽孢杆菌的鉴定。微生物学报 **15**(4)。

deBarjac, H. and R. Dedonder　1965　Isolement d'un nucleotide identifiable a la toxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* var. Berliner. *Compt. Rend. Acad. Sci.* **260**:7050.

deBarjac, H. and A. Bonnefoi 1968 A classification of strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner with a key to their differentiation. *J. Invert. Pathol.* **11**:335.

deBarjac, H. and R. Dedonder 1968 Purification de la toxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* et analysis complementaires. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **50**:941.

deBarjac, H. and A. Burgerjon 1973 Studies on the presence of the thermostable toxin in serotypes 10, 11 and 12 of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invert. Pathol.* **21**:325.

Benz, G. 1966 On the chemical nature of the heat-stable exotoxin of *Bacillus thuringiesis*. *Experientia* **22**:81.

Bond, R. P. M. *et al.*. 1969 A purification and some properties of an insecticidal exotoxin from *Bacillus thuringiensis* Berliner. *J. Biochem.* **114**:477.

Bond, R. P. M. *et al.* 1971 The thermostable exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol control of insects and mites. Chap. **12**:275.

Briggs, J. D. 1960 Reduction of adult house fly emergence by the effects of *Bacillus* spp. on the development of immature forms. *J. Insect. Pathol.* **2**:418.

Burgerjon, A. and H. deBarjac 1960 Nouvelles donuceés sur la rôle de la toxine soluble thermostable produite par *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Compt. Rend.* **251**:911.

Burgerjon, A. and G. Biache 1964 The activity of the heat-stable toxin of *Bacillus thuringiensis* Berliner used in nature against the larvae of *Diprion pini* (Linnaeus). *J. Insect. Pathol.* **6**:538.

Burgerjon, A. *et al.* 1964 Activity of the heat-stable toxin of *Bacillus thuringiensis* Berliner in *Locusta migratoria* (Linnaeus) (Locustidae, Orthoptera). *J. Insect. Pathol.* **6**:381.

Burgerjon, A. and H. deBarjac 1967 Another serotype (4:4a, 4c) of *Bacillus thuringiensis* which produces thermostable toxin. *J. Invert. Pathol.* **6**:381.

Cantwell, G. E. and A. M. Heimpel 1964 The production of an exotoxin by various crystal-forming bacteria related to *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner. *J. Insect. Pathol.* **6**:466.

Dunn, P. H. 1960 Control of house flies in Bovine feces by a feed additive containing *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner. *J. Insect. Pathol.* **2**:13.

Hall, I. M. *et al.* 1972 The effect of the β-exotoxin fraction of *Bacillus thuringiensis* on the citrus red mite. *J. Invert. Pathol.* **18**:359.

Heimpel, A. M. 1967 A taxonomic key proposed for the species of the "crystalliferous bacteria". *J. Invert. Pathol.* **9**:364.

Hitchings, D. L. 1967 *Bacillus thuringiensis*: A reproduction inhibitor for southern armyworm. *J. Econ. Entomol.* **60**:596.

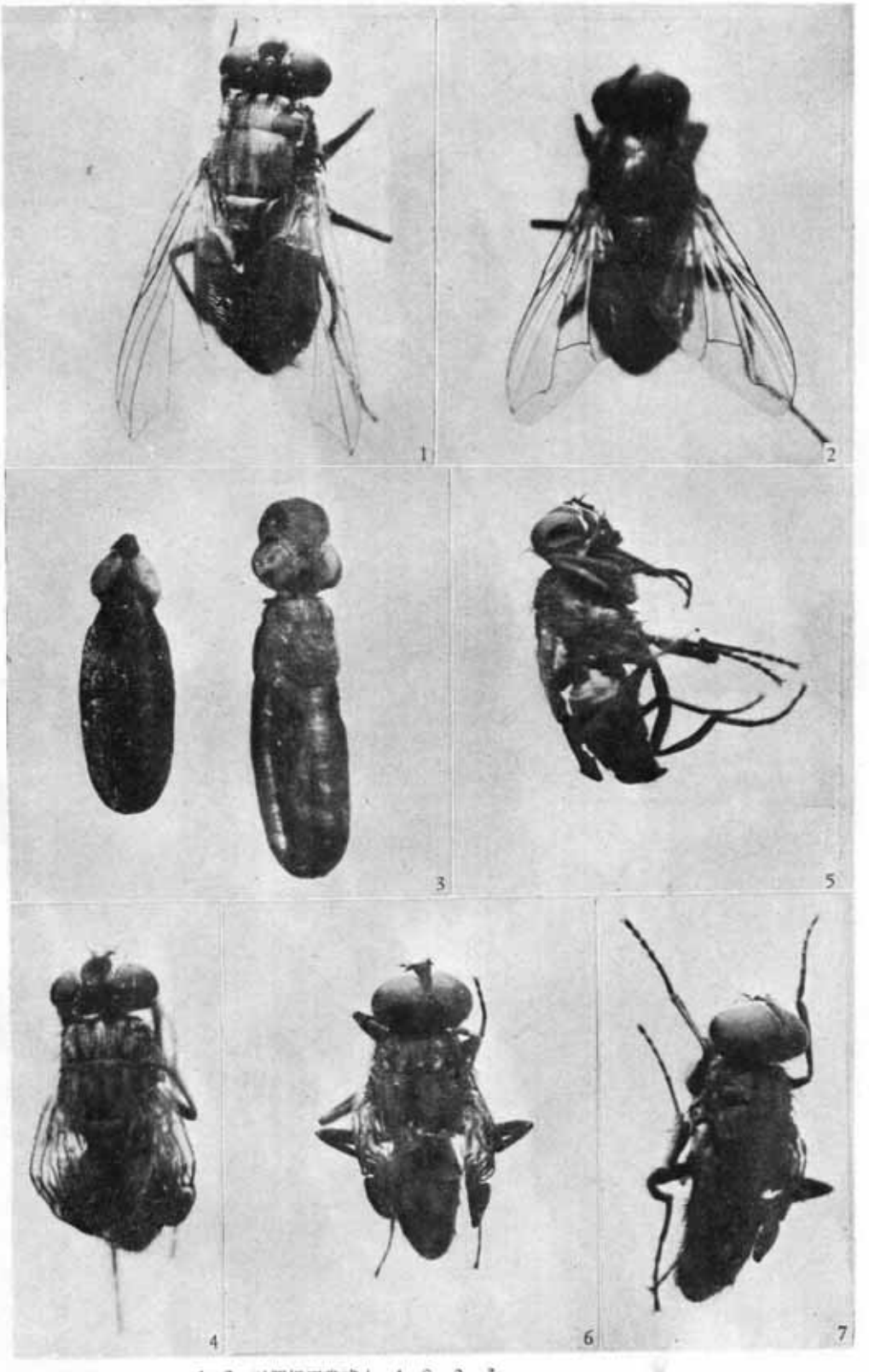
Kim, Y. T. and H. T. Huang 1970 The β-exotoxin of *Bacillus thuringiensis* I. Isolation and characterization. *J. Invert. Pathol.* **15**:100.

McConnell, E. and A. G. Richards 1959 The production by *Bacillus thuringiensis* Berliner of a heat-stable surstance toxic for insects. *Can. J. Microbiol.* **5**:161.

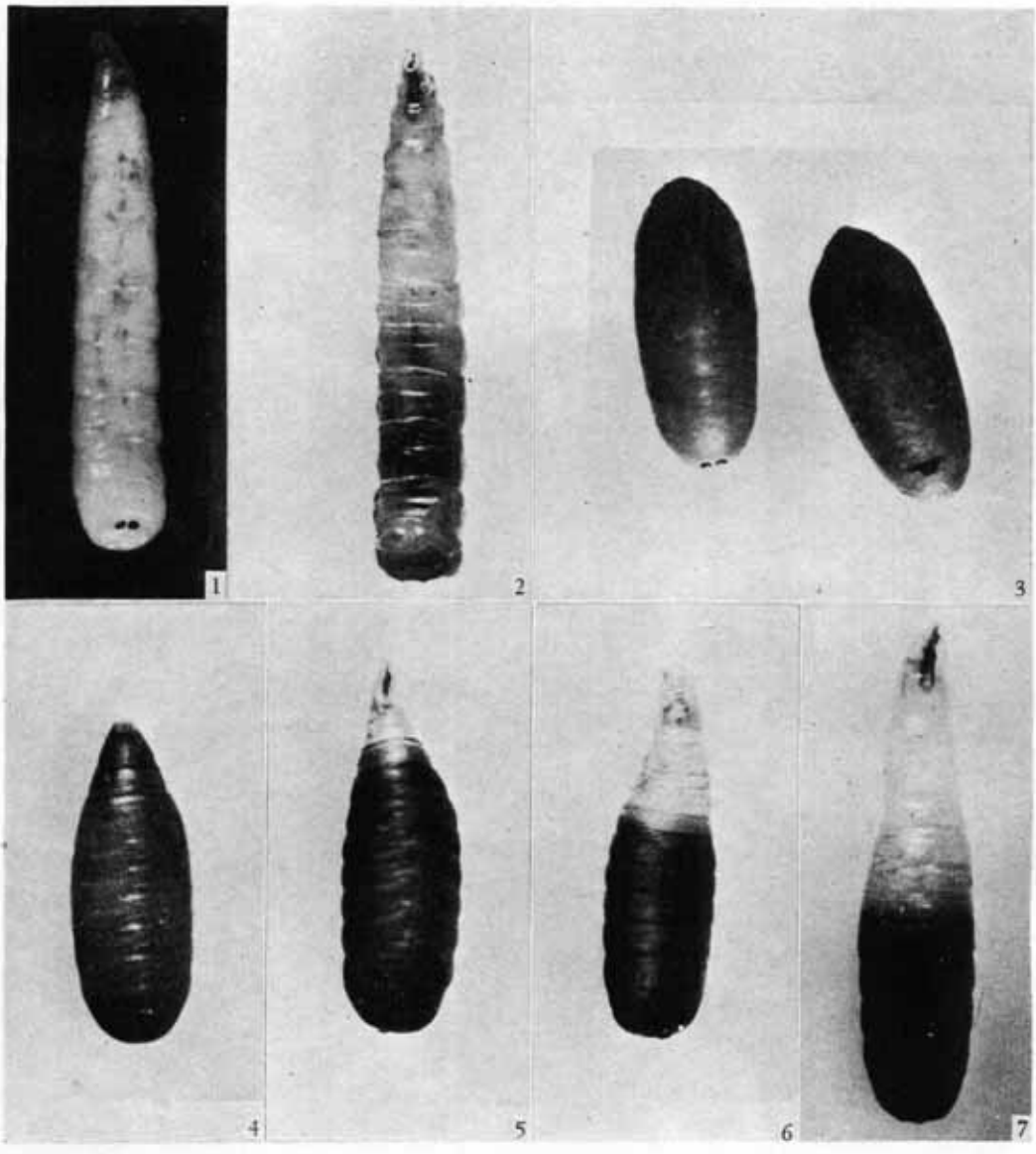
Šebesta, K. *et al.* 1967 Isolation, purification and toxicity of a thermostable exotoxin from the strain of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechiae* Auct. In "Insect Pathology and Microbiol Control" (P. A. Van der Laan, ed.), pp. 238. North-Holland Publ. Co., Amsterdam.

Šebesta, K. *et al.* 1969 Isolation and properties of the insecticidal exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechiae* Auct. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **34**:891.

Кандыбин, Н. В. 1973 Битоксибациллин. Защита растений, 2.



1—2. 对照组正常成虫：1. ♀，2. ♂；
3—7. 用 β-外毒素处理后所形成的畸形虫态：
3. 半羽化死蛹； 4—5. ♀畸形成虫； 6—7. ♂畸形成虫



1．正常幼虫；　2．用 β-外毒素处理后形成的死幼虫；
3．正常蛹；　4—7．用 β-外毒素处理后形成的畸形死蛹-半化蛹