

# 重組表生菌在蟲害防治之利用

林志輝<sup>1</sup>、曾經洲<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> 行政院國家科學委員會科學教育發展處 台北市和平東路二段 106 號

<sup>2</sup> 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所生物藥劑組 台中縣霧峰鄉舊正村光明路 11 號

## 摘 要

在運用生物性農藥防除害蟲的策略中，結合抗蟲基因與植物表生菌去防治作物害蟲，是值得嘗試的生物防治方法。利用作物葉面自然附生的細菌，例如：*Pantoea agglomerans* (*Erwinia herbicola*)、*Pseudomonas* 等，作為抗蟲基因的轉殖目標，已證實是一個有效的蟲害防治策略。本篇回顧數個利用表生菌，配合轉殖蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 殺蟲晶體蛋白 (Bt ICP) 基因的實作範例，藉以說明利用重組表生菌表現殺蟲蛋白，有利於防治害蟲的近況與趨勢。

**關鍵詞：**表生菌、生物防治、害蟲、蘇力菌、殺蟲晶體蛋白。

## 前 言

運用微生物防治作物害蟲的策略，可以利用其對害蟲之專一性，擔任生物防治天敵的角色，例如：蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt)、蟲生真菌、昆蟲病毒等；或也可以利用其改造作物的抗蟲能力，例如：轉殖抗蟲基因在作物體內表現，害蟲食用後因急毒性致死，進而減低作物被危害的損失。另外，植物體表面多帶有不同種類的微生物，這些自然附生的微生物，與植物大多具有共生或附生的關係，對昆蟲或人類多半無害，若將抗蟲性狀轉入表生微生物，例如表生細菌，則可利用微生物附

生的活性，使抗蟲性狀維持在葉面或植物體表面上，在抗蟲基因的持續表現下，達到防治蟲害的目的。

蘇力菌製劑是目前全世界銷售量最大的生物農藥，占生物農藥總銷售量的 90% 以上，金額可達 3.5 億美元。蘇力菌的特色是來源廣泛，篩選取得容易，屬於腸毒素類型 (Gill *et al.*, 1992)，殺蟲結晶蛋白基因產物 (Insecticidal Crystal Protein, ICP) 即是殺蟲活性的主要有效成份，對脊椎動物無害，不同的 ICP 具有專一性的殺蟲對象。目前已知的 ICP 基因種類，其防治對象已涵蓋鱗翅目、雙翅目或鞘翅目等田間常見害蟲，甚至有對線

\*論文聯繫人

e-mail: cctzeng@tactri.gov.tw

蟲、螞蟻等亦有效者 (Schnepf *et al.*, 1998)。蘇力菌施用在田間，雖可部分取代化學合成殺蟲劑，然而藥效效期較短，卻是蘇力菌的主要缺點，因 ICP 毒素易受到陽光波長介於 280 ~ 330 nm 的紫外線破壞，使其在田間之殘效期不及化學性農藥 (Myasnik *et al.*, 2001)。近來研究亦發現，蘇力菌雖常見於土壤，但在植物體表面上也可發現，然而其在植物葉面表生的能力並不好，施用後，蘇力菌在作物葉面上的單位表生族群量，僅為其他常見葉表生菌，例如 *Pseudomonas fluorescens* 族群量的十分之一 (Maduell *et al.*, 2008)。若能取之自然而用之，利用基因轉殖技術，將 ICP 毒素基因轉入常見的葉表生菌，使其借重這些細菌在葉面棲息的特性，因不斷表現毒素，而延長殺蟲效力，將可能改進蟲害防治之成效。

### 可培養的植物正常表生細菌種類

健康植物的地上部，有許多細菌與真菌定殖 (colonization)，有的發生在組織內，大部分則在表面上。而葉是植物地上部的重要器官，其上主要是細菌，每平方公分的菌數大約是  $10^6 \sim 10^7$ ，最多可達  $10^8$  個。群落大小不一，主要係受到物理性因素的影響，例如光、溫度，以及位置、營養條件的影響 (Lindow and Brandl, 2003; Beattie and Lindow, 1999)。其上的種類，隨著四季氣候的變化以及葉齡，而有所消長，例如最溫暖乾燥的季節或者老葉上，菌的種類較少，冷濕的季節或者新葉上則呈現多樣性 (Ercolani, 1991)。以培養的方法調查發現，非病原性 *Pseudomonas* 和 *Erwinia (Pantoea) spp.* 是葉表生菌中最常見的兩類細菌族群 (Lindow and Brandl, 2003)，其他還有 *Acinetobacter*、*Bacillus*、*Enterobacter*、*Sphingomonas* 等細菌 (Yang

*et al.*, 2001)。

### *Pseudomonas* 和 *Pantoea* 中蘇力菌毒素重組基因的表現

Obukawicz 等人 (1986b) 將蘇力菌的 ICP 毒素基因，以 Tn5 跳躍子 (transposon)，插入定殖於玉米根部的 *Pseudomonas* 菌株染色體中進行表現，該轉殖菌株防治地下害蟲的效期，可達三個月之久 (Obukawicz *et al.*, 1986a, 1986b)。此後陸續有運用非蘇力菌的宿主，來表現 ICP 基因，根據生態適應力及毒素活性，而表現對蟲害防治的能力，例如大腸桿菌 *Escherichia coli* (Ge *et al.*, 1990; Oeda *et al.*, 1987; Whiteley and Schnepf, 1986)、*Clavibacter xyli* (Tuner *et al.*, 1991)、*Burkholderia cepacia* (Stock *et al.*, 1990) (原分類為 *Pseudomonas cepacia*)、*Bacillus megaterium* (Bora *et al.*, 1994)、*Bacillus cereus* (Moar *et al.*, 1994)、*Bacillus pumilus* (Selinger *et al.*, 1998)、*Azospirillum lipoferum* 與 *Azospirillum brasilense* (Udayasuriyan *et al.*, 1995)、*Gluconacetobacter diazotrophicus* (Falcão Salles *et al.*, 2000)、*Herbaspirillum seropedicae* (Downing *et al.*, 2000; Falcão Salles *et al.*, 2000)、*Methylobacillus flagellatum* (Marchenko *et al.*, 2000)、*Bacillus subtilis* 與 *Bacillus licheniformis* (Theoduloz *et al.*, 2003)。這些非蘇力菌的宿主，表現出來的 ICP 蛋白量，差距很大 (0.24% ~ 48%)，雖然在實驗室的生物活性檢定中，皆具一定程度的效果，然而在實際田間應用的防治過程與效果中，包括蘇力菌基因在活菌中的穩定性、檢定使用的劑型、有效成分的比例及半致死劑量、活菌定殖的後續生態追蹤等等，

不是差異很大，就是難以比較或有待評估，因此能連結實際應用的需求，以及能縝密完成定量的試驗設計實屬必要。

Alberghini 等人 (2005) 從松樹針葉尖端，分離出可以快速生長，且經評估定殖效率良好的 *Pseudomonas* 野生菌種 Clb01，供作為宿主，再植入可以防治針葉害蟲大蠟蛾 (*Galleria mellonella*) 的 *cry9Aa* 基因，一方面利用 *lac* 操縱子 (operator)，誘導蛋白表現的機制，做為評估轉殖質體複製的穩定性，另一方面控制定量的菌數，評估出殺蟲蛋白的相對與絕對劑量，在設計縝密的定量生物活性檢定試驗中，求出蟲體服毒量、服菌量與致死率 (Mortality) 的關係 (Alberghini *et al.*, 2005)。本例中以 *Pseudomonas* 為宿主的 *cry9Aa*，表現殺蟲效力，可長達三個月，而且殺蟲範圍應用，能擴大到對松樹帶蛾 (*Thaumetopoea pityocampa*) 的生物防治 (Alberghini *et al.*, 2006, 2008)，其成效比施用純化的 *Cry9Aa* 蛋白更佳，顯示殺蟲蛋白包裹在宿主中，可減少被分解的損失。利用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 及電腦輔助族群分析方法檢視 16S rDNA，進行該轉殖菌株，在溫室施放後的動態追蹤，長達 102 天之結果顯示，其能長駐在葉表，而對其他原生的葉表生菌族群亦無顯著影響 (Alberghini *et al.*, 2008)。

除了 *Pseudomonas* spp.，另一種最常見的葉表生菌族群是 *Erwinia* (又稱 *Pantoea*) spp. (Lindow and Brandl, 2003)。Viñas 等人 (1999) 利用非病原性的 *Pantoea agglomerans* CPA-2 分離株，去拮抗 *Penicillium digitatum* 和 *P. italicum* 真菌，以減低真菌對採收後的柑橘或梨等水果的危害，並將該分離菌株進行大量商品化的培養，包括測試工業來源的廉價碳、氮源、水活性 (water activity)、溫度、

酸鹼度、乾燥包裝及儲藏等製程相關條件，對開發其做為活性生物農藥商品的影響 (Viñas *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2001, 2002a, 2002b, 2002c; Nunes *et al.*, 2002; Teixidó *et al.*, 2006)。半商品化的 *Pantoea agglomerans* CPA-2 菌株，能抑制低溫儲藏蘋果表面的藍黴 (blue mould) 生長，效果達到 80% 以上 (Nunes *et al.*, 2002)。

筆者等人 (Lin *et al.*, 2002, 2003) 利用 *Erwinia herbicola* (= *Pantoea agglomerans*) ATCC 14589 及自行篩選的野生株做為宿主，轉殖 *cry1Aa1* 基因，觀察質體穩定性及活菌在植物葉面定殖的效果，所表現的 *Cry1Aa1* 蛋白產物，噴灑在甘藍葉面，進行防治效期與致死率關係之測試。結果顯示，15 日內轉殖質體在無抗生素篩選壓力下，仍能使重組的 *Erwinia* 表生菌，在總菌量中維持一定數量範圍的比例 (0.0001~0.1%)；在利用培養方式的測試上，呈現葉面上的重組表生菌族群量，是隨著時間而逐漸下降；葉面經噴灑一定濃度的該重組表生菌活菌體後，在第 17 天進行生物檢定，仍能造成三分之一的小菜蛾三齡幼蟲在 48 小時內死亡。比較筆者等人 (Lin *et al.*, 2003) 與 Alberghini 等人 (2005) 分別利用葉面上最常見的兩大類表生菌做為宿主，進行蘇力菌殺蟲基因的轉殖表現，皆顯示利用無病原性葉表生菌，結合殺蟲基因，做為生物農藥，是一個相當可行的生物防治策略，尤其是 *Pantoea agglomerans* 更具有拮抗植物病原細菌或真菌的能力 (Nunes *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2003)。

## 水稻表生菌 *Bacillus pumilus* 的抗蟲應用潛力

在革蘭氏陽性的表生菌中，*Bacillus*

*pumilus* 的抗蟲應用潛力，是值得注意的。Selinger 等人 (1998) 將蘇力菌殺蟲基因，轉入定殖在植物根部的 *Bacillus pumilus*，並證明其具有生物防治效果 (Selinger *et al.*, 1998)，而 *Bacillus pumilus* 本身也具有抑制真菌及促進植物生長的活性 (Leifert *et al.*, 1995; Mari *et al.*, 1996; Walker *et al.*, 1998; Sari *et al.*, 2007)。Cao 等人 (2000, 2001) 在水稻的葉表面分離出 *Bacillus pumilus*，並獲得一個常效的啟動子 pCP01，藉著電穿孔 (electroporation) 轉殖方式，高效表現外來基因 (Cao *et al.*, 2000, 2001; Sun *et al.*, 2006)。若能仿效 Alberghini 等人 (2005) 開發 *Pseudomonas* 菌種 Clb01 的模式，將針對毒殺水稻害蟲的蘇力菌殺蟲基因，轉入水稻葉面表生菌 *B. pumilus*，使殺蟲蛋白大量表現，將可減少化學藥劑的施用，而兼顧水田水質、作物藥害及蟲害的管理。

## 其 他

除了做為殺蟲基因的宿主，葉表生菌 *Erwinia* spp. 多具有冰核基因 (ice nucleation gene, IN)，IN 蛋白能催化冰水形成冰晶。具有 IN 活性的菌株，能降低昆蟲幼蟲的耐寒能力，使採收的蔬果經過低溫儲存，殺死其上的害蟲，但是這些菌株，未必能有效定殖在蟲體或昆蟲的腸道中，因此，將 IN 基因轉入定殖能力強的菌株，亦能達到減少蟲害的目的，例如從家蠶排泄物分離出來的細菌 *Enterobacter cloacae* 對昆蟲腸道的定殖能力強，對植物的定殖能力弱，轉入 IN 基因後，轉殖菌株活體被噴灑在蔬果表面，昆蟲幼蟲食入後，轉殖菌株會快速定殖在蟲的腸道中，當蔬果進入低溫儲藏及運送時，蟲體會因腸內形成冰晶而死亡，可降低回溫後的蟲害發生

(Watanabe *et al.*, 2000)。寒帶作物在種植期，亦可採行此生物防治策略，惟不能兼顧益蟲，不具專一性是其缺點，但此類的廣效性殺蟲範圍，在蟲害多元發生時，也足堪是防治上的優點。

## 結 語

具有優勢的殺蟲、抗菌防治方法，必須是趨向類似化學藥劑快速產生毒效的優點，但也應趨向減少衝擊生物圈等的環保優勢。一般而言，細菌的繁殖速度，比真菌和病毒的繁殖速度快；若具有病原性，在病程發展的速度上，細菌性病原的急毒性，一般也強於病原性真菌及病毒，因此其具有類似化學藥劑快速產生毒效的特長。對照轉殖基因改造植物的策略，開發葉表生菌，使其成為具有殺蟲、抗菌的生物農藥，是一個兼具研發成本低、產製流程工業化、多元劑型適應蟲害變化速度、趨近環境保護原則等的優勢策略。若能結合蘇力菌殺蟲蛋白的快速藥效，和葉表生菌長久自然存在，而無害於動植物的特性，加上微生物族群間的拮抗作用等多方特點，開發成生物農藥，則可期望其將能在蔬果食品安全、對環境友善、對耕作成本的控制、商品劑型與效能多元化等議題上，發揮重大的貢獻。

## 誌 謝

本文係承農業生物技術國家型計畫 (94 農科-5.2.1-藥-P1(2)) 補助研究之成果，特此申謝。

## 引用文獻

Alberghini, S., A. Battisti, and A. Squartini.

2008. Monitoring a genetically modified *Pseudomonas* sp. released on pine leaves reveals concerted successional patterns of the bacterial phyllospheric community. *Antonie van Leeuwenhoek* 94: 415-422.
- Alberghini, S., R. Filippini, A. B. Shevelev, A. Squartini, and A. Battisti.** 2006. Extended plant protection by an epiphytic *Pseudomonas* sp. derivative carrying the *cry9Aa* gene from *Bacillus thuringiensis galleriae* against the pine processionary moth *Thaumetopoea pityocampa*. *Biocontrol Sci. Technol.* 16: 709-715.
- Alberghini, S., R. Filippini, E. Marchetti, M. L. Dindo, A. B. Shevelev, A. Battisti, and A. Squartini.** 2005. Construction of a *Pseudomonas* sp. derivative carrying the *cry9Aa* gene from *Bacillus thuringiensis* and a proposal for new standard criteria to assess entomocidal properties of bacteria. *Res. Microbiol.* 156: 690-699.
- Beattie, G. A., and S. E. Lindow.** 1999. Bacterial colonization of leaves: A spectrum of strategies. *Phytopathol.* 89: 353-359.
- Bora, R. S., M. G. Murty, R. Shenbagarathai, and V. Sekar.** 1994. Introduction of a lepidopteran-specific insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* by conjugal transfer into a *Bacillus megaterium* strain that persists in the cotton phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 214-222.
- Cao, Q. Y., Z. X. Liu, and Z. C. Qu.** 2000. The identification of rice symbiont DX01 and establishment of transformation system by electroporation. *J. Fudan Univ.* 39: 282-286. (in Chinese)
- Cao, Q. Y., Z. C. Qu, Y. Z. Wan, H. W. Zhang, and D. L. Shen.** 2001. Cloning, molecular characterization, and application of rice epiphytic *B. pumilus* promoter fragments. *Curr. Microbiol.* 43: 244-248.
- Costa, E., N. Teixidó, J. Usall, E. Atarés, and I. Viñas.** 2001. Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 using commercial products and by-products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 367-371.
- Costa, E., J. Usall, N. Teixidó, J. Delgado, and I. Viñas.** 2002a. Water activity, temperature, and pH effects on growth of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. *Can. J. Microbiol.* 48: 1082-1088.
- Costa, E., J. Usall, N. Teixidó, R. Torres, and I. Viñas.** 2002b. Effect of package and storage conditions on viability and efficacy of the freeze-dried biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2. *J. Appl. Microbiol.* 92: 873-878.
- Costa, E., N. Teixidó, J. Usall, E. Atarés, and I. Viñas.** 2002c. The effect of nitrogen and carbon sources on growth of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2. *Lett. Appl. Microbiol.* 35: 117-120.

- Downing, K. J., L. Graeme, and J. A. Thomson. 2000. Biocontrol of the sugarcane *Eldana saccharina* by expression of the *Bacillus thuringiensis cryIAc7* and *Serratia marcescens chiA* genes in sugarcane-associated bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2804-2810.
- Ercolani, G. L. 1991. Distribution of epiphytic bacteria on olive leaves and the influence of leaf age and sampling time. *Micro. Ecol.* 21: 35-48.
- Falcão Salles, J., P. De Medeiros Gíthy, L. Skøt, and J. I. Baldani. 2000. Use of endophytic diazotrophic bacteria as a vector to express the *cry3a* gene from *Bacillus thuringiensis*. *Braz. J. Microbiol.* 31: 155-161.
- Ge, A. Z., R. M. Pfister, and D. H. Dean. 1990. Hyperexpression of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin-ncoding gene in *Escherichia coli*: Properties of the product. *Gene* 93: 49-54.
- Gill, S. S., E. A. Cowles, and P. V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 615-636.
- Leifert, C., H. Li, and S. Chidburse. 1995. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* CL45. *J. Appl. Microbiol.* 78: 97-108.
- Lin, C. H., W. C. Huang, C. C. Tzeng, and L. J. Chen. 2002. Insecticidal activity and plasmid retention of the epiphytic *Erwinia herbicola* strains transformed with the *Bacillus thuringiensis cryIAa1* gene. *Plant Prot. Bull.* 44: 21-36. (in Chinese)
- Lin, C. H., C. C. Tzeng, S. S. Kao, and L. J. Chen. 2003. Insecticidal efficacy and phytopathogenic antagonism of the epiphytic *Erwinia herbicola* strains transformed with the *Bacillus thuringiensis cryIAa1* gene. *J. Agri. Assoc. China* 4: 17-29. (in Chinese)
- Lindow, S., and M. T. Brandl. 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1875-1883.
- Maduell, P., G. Armengol, M. Liagostera, S. Orduz, and S. Lindow. 2008. *B. thuringiensis* is a poor colonist of leaf surfaces. *Microb. Ecol.* 55: 212-219.
- Marchenko, N. D., G. N. Marchenko, L. O. Ganushkina, and R. R. Azizbekyan. 2000. Cloning and expression of mosquitocidal endotoxin gene *cryIVB* from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in the obligate methylotroph *Methylobacillus flagellatum*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 24: 14-18.
- Mari, M., M. Guizzardi, and G. C. Pratella. 1996. Biological control of gray mold in pars by antagonistic bacteria. *Biol. Control* 7: 30-37.
- Moar, W. J., J. Trumble, R. Hice, and P. Backmann. 1994. Insecticidal activity of the CryIIA protein from the NRD-12 isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* expressed in *Escherichia coli* and *Bacillus thuringiensis* and in a leaf-colonizing strain of *Bacillus*

- cereus*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 896-902.
- Myasnik, M., R. Manasherob, E. Ben-Dov, A. Zaritsky, Y. Margalith, and Z. Barak.** 2001. Comparative sensitivity to UV-B radiation of two *Bacillus thuringiensis* subspecies and other *Bacillus* sp. Curr. Microbiol. 43: 140-143.
- Nunes, C., J. Usall, N. Teixidó, E. Fons, and I. Viñas.** 2002. Post-harvest biological control by *Pantoea agglomerans* (CPA-2) on Golden Delicious apples. J. Appl. Microbiol. 92: 247-255.
- Obukowicz, M. G., F. J. Perlak, K. Kusano-Kretzmer, E. J. Mayer, S. L. Bolten, and L. S. Watrud.** 1986a. Tn5-mediated integration of the  $\delta$ -endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of root-colonizing *Pseudomonads*. J. Bacteriol. 168: 982-989.
- Obukowicz, M. G., F. J. Perlak, K. Kusano-Kretzmer, E. J. Mayer, and L. S. Watrud.** 1986b. Integration of the  $\delta$ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of root-colonizing strains of *Pseudomonads* using Tn5. Gene 45: 327-331.
- Oeda, K., K. Oshie, M. Shimuzu, K. Nakamura, H. Yamamoto, I. Nakayama, and H. Ohkawa.** 1987. Nucleotide sequence of the insecticidal protein gene of *Bacillus thuringiensis* strain aizawai IPL7 and its high-level expression in *Escherichia coli*. Gene 53: 113-119.
- Sari, E., H. R. Etebarian, and H. Aminian.** 2007. The effects of *Bacillus pumilus*, isolated from wheat rhizosphere, on resistance in wheat seedling roots against the take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. J. Phytopathol. 155: 720-727.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feltelson, D. R. Zeigler, and D. H. Dean.** 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 775-806.
- Selinger, L. B., G. G. Khachtourians, J. R. Byers, and M. F. Hynes.** 1998. Expression of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin gene by *Bacillus pumilus*. Can. J. Microbiol. 44: 259-269.
- Stock, C. A., T. J. McLoughlin, J. A. Klein, and M. J. Adang.** 1990. Expression of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Pseudomonas cepacia* 526. Can. J. Microbiol. 36: 879-884.
- Sun, X. B., Y. P. Chen, C. R. Wu, G. X. Yang, B. Guo, and D. L. Shen.** 2006. Functional evaluation of a novel constitutive promoter F1 of *Bacillus pumilus*, as a rice epiphytic strain, and construction of an efficient expression and secretion system under the control of F1. Biotechnol. Lett. 28: 979-985.
- Teixidó, N., T. P. Cañamás, M. Abadías, J. Usall, C. Solsona, C. Casals, and I. Viñas.** 2006. Improving low water activity and desiccation tolerance of

- the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2 by osmotic treatments. *J. Appl. Microbiol.* 101: 927-937.
- Theoduloz, C., A. Vega, M. Salazar, E. Gonzalez, and L. Meza-Basso.** 2003. Expression of a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin *cry1Ab* gene in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* strains that naturally colonize the phyllosphere of tomato plants (*Lycopersicon esculentum*, Mills). *J. Appl. Microbiol.* 94: 375-381.
- Tuner, J. T., J. S. Lampel, R. S. Stearman, G. W. Sundin, P. Gunyuzlu, and J. J. Anderson.** 1991. Stability of the  $\delta$ -endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a recombinant strain of *Clavibacter xily* subsp. *cynodontis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3522-3528.
- Udayasuriyan, V., A. Nakamura, H. Masaki, and T. Uozumi.** 1995. Transfer of an insecticidal protein gene of *Bacillus thuringiensis* into plant-colonizing *Azospirillum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11: 163-167.
- Viñas, I., J. Usall, C. Nunes, and N. Teixidó.** 1999. Nueva cepa bacteriana *Pantoea agglomerans*, Beijerinck (1888) Gavini, Mergaert, Beji, Mielcareck, Izard, Kerstersy, De Ley (1989) y su utilización como agente de control biológico de las enfermedades fúngicas de fruta. Spanish Patent P9900612.
- Walker, R., A. A. Powell, and B. Seddon.** 1998. *Bacillus* isolates from spermatophyte of peas and dwarf French beans with antifungal activity against *Botrytis cinerea* and *Pythium* species. *J. Appl. Microbiol.* 84: 791-801.
- Watanabe, K., K. Abe, and M. Sato.** 2000. Biological control of an insect pest by gut-colonizing *Enterobacter cloacae* transformed with ice nucleation gene. *J. Appl. Microbiol.* 88: 90-97.
- Whiteley, H. R., and F. S. Schnepf.** 1986. The molecular biology of parasporal crystal body formation in the *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Microbiol.* 40: 549-576.
- Yang, C. H., D. E. Crowley, J. Borneman, and N. T. Keen.** 2001. Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 3889-3894.

# The Use of Recombinant Epiphytic Bacteria in Pest Control

Chi-Hui Lin<sup>1</sup>, and Ching-Chou Tzeng<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Science Education, National Science Council, No. 106, HoPing E. Road, Sec. 2, Taipei 10622, Taiwan, R.O.C.

<sup>2</sup> Biopesticide Division, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic substances Research Institute, Council of Agriculture, No. 11, Guangming Rd., Wufong Township, Taichung County 41358, Taiwan, R.O.C.

## ABSTRACT

In biocontrol strategies using biopesticides, it is worthy to develop the combination of employment of insecticidal genes together with plant epiphytes. The naturally-colonizing bacteria on leaf surface, *Pantoea agglomerans* (*Erwinia herbicola*) or *Pseudomonas* spp. for example, play roles in such a biocontrol strategy to serve as the transformation target of insecticidal genes. In this mini review, we discuss several practical cases for the transformed insecticidal crystal protein (ICP) from *Bacillus thuringiensis* (Bt) into dominant epiphytes in an attempt to illustrate the use and trends of recombinant epiphytes to express ICP for pest control.

**Key words:** epiphytes, biocontrol, pest, *Bacillus thuringiensis* (Bt), insecticidal crystal protein (ICP)