

线虫共生细菌光杆菌在台湾之开发

高穗生*, 谢奉家

(行政院农委会农业药物毒物试验所, 台湾台中县雾峰乡 41358)

摘要: 光杆菌属于肠内杆菌科, 革兰氏阴性, 可发出冷光, 为异小杆线虫之肠道共生细菌, 已证实对台湾蔬菜害虫、植物病原线虫、真菌和细菌等具有杀虫和抑菌作用。由于全球迄今尚未上市兼具杀虫与抑菌效果的微生物制剂, 光杆菌具有杀虫与抑菌双效作用, 在植物病虫害之生物防治上, 深具开发潜力。本研究从台湾土壤样品, 利用大蜡蛾诱饵法, 采集虫生病原线虫。线虫种类经电子显微镜观察与核酸序列分析, 证实筛获台湾首例的短尾异小杆线虫 TG01。再自线虫分离光杆菌并以细菌形态、生化测试, 16S rRNA 序列及 Biolog 菌种分析系统进行鉴定, 显示本土筛获的光杆菌分类应属于 *Photobacterium luminescens* subsp. *akhurstii*。为了解本土光杆菌菌株的防治应用范围, 已进行对小菜蛾、拟尺蠖、斜纹夜蛾、甜菜夜蛾与玉米穗虫 5 种蔬菜害虫之生物活性检定, 显示对小菜蛾的杀虫效果良好。已进行对檬果炭疽病菌、水稻立枯丝核菌与柑橘青霉病等 18 种植物病害之对峙试验, 显示对檬果炭疽病菌有极佳的生物活性。已进行对于瓜类细菌性斑点病与细菌性软腐病等 12 种植物细菌病害之对峙试验, 显示对细菌性软腐病有极佳的生物活性。已针对檬果炭疽病, 进行檬果储藏期的室内生物检定。已初步建立光杆菌杀虫毒蛋白的纯化分析方法, 且完成杀虫毒蛋白与抗生物质等分析。未来的研究, 期望找出量产时的指标性成分, 作为制程与质量管理的重要依据。并持续对于光杆菌的有效成分与有用基因进行功能与结构分析。

关键词: 光杆菌; 杀虫毒蛋白; 抑菌活性; 短尾异小杆线虫

Development of *Photobacterium luminescens*, a Symbiont of Entomopathogenic Nematode, as Microbial Pesticides in Taiwan

Suey-sheng Kao*, Feng-Chia Hsieh

(Biopesticides Division, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, 11, Kuang-ming Rd., Taiwan Wu-feng, Taichung Hsien 41358)

Abstract: *Photobacterium luminescens*, a Gram-negative bioluminescent insect-pathogenic bacterium, belonging to the family Enterobacteriaceae, lives in a symbiotic relationship with Heterorhabditid nematodes. We proved that the metabolites and toxins from *P. luminescens* exhibited a wide spectrum of antimicrobial and insecticidal activity against native pests and plant pathogens. This report also showed that the secondary metabolites from culture filtrate of *P. luminescens* had nematocidal properties. Therefore, efforts will be focused on developing this microorganism as a microbial pesticide with potent bioactivity against insect pests, plant nematodes and pathogens of agricultural importance in Taiwan. An entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis brevicaudis* TG01, was isolated from sampled soils for the first time in Taiwan using the *Galleria*-bait method. Identification of the nematode was mainly based on observations under scanning electron microscopy (SEM) and nucleotide sequence of the internal transcribed spacer

* 通讯作者, E-mail: sskao@tactri.gov.tw.

1 (ITS1) . *P. luminescens* subsp. *akhurstii* was isolated from nematodes and identified by phenotypic, biochemical tests, 16S rRNA and Biolog identification system. In this study, supernatant fluid of the bacterial culture was centrifuged, filtered, and bioassayed against 5 key pests of vegetables. Antagonistic effects of bacterial culture and protein preparations on 18 species of fungi and 12 species of bacteria were examined by means of dual or concomitant culture methods. High antimicrobial activities against *Plutella xylostella*, *Glomerella cingulata* and *Erwinia* spp. were observed. Studies were also carried out to test the preventability of mango anthracnose during storage with local *P. luminescens*. We set up the purification methods of insecticidal toxin proteins from *P. luminescens* and also assayed the antibiotic substances. We will identify and define the indicator components of *P. luminescens* in the production process for the development of multiple-use microbial pesticides in the near future. Focus will also be concentrated to carry out structure/activity relationship (SAR) analysis of the promising gene-encoded proteins.

Key words: *Photorhabdus luminescens*; insecticidal toxin proteins; antimicrobial activities; *Heterorhabditis brevicaudis*

1 前言

光杆菌 (*Photorhabdus luminescens*) 属于肠内杆菌科 (Enterobacteriaceae), 为革兰氏阴性, 可发出生物光 (bioluminescent)。光杆菌与其分类地位相近之异杆菌 (*Xenorhabdus* spp.) 同为病原线虫之肠道共生 (symbiotic) 细菌; 光杆菌与异小杆线虫 (*Heterorhabditis* spp.) 共生; 异杆菌与斯氏线虫 (*Steinernema* spp.) 共生。异小杆科 (Heterorhabditidae) 与斯氏线虫科 (Steinernematidae) 的线虫均为昆虫病原线虫, 共生细菌可以从寄主分离出来培养, 1993 年光杆菌属才正式从异杆菌属中分出^[20]。异小杆线虫的生活史分为寄生期及自由生活期, 寄生时期光杆菌随着线虫的侵染过程进入昆虫宿主的血腔 (haemocoel), 并在血腔中大量繁殖后, 分泌多种二次代谢产物和水解酵素, 包含: 脂肪酶 (lipases)、蛋白酶 (proteases)、抗生物质 (antibiotics)、脂多糖 (lipopolysaccharides) 和一些高分子量的毒素复合物 (high-molecular-weight toxin complexes; Tc), 且在 24~48h 之内杀害昆虫宿主。当光杆菌感染昆虫时, 昆虫的尸体在黑暗中可看见淡绿色生物光, 在白天尸体则呈现砖红色。笔者实验室在 2004 年开始参与农业生物技术国家型计划, 进行台湾本土异小杆线虫搜集, 2005 年首度筛获本土异小杆线虫—短尾异小杆线虫^[17], 并已累计筛获 6 只台湾本土异小杆线虫—短尾异小杆线虫 (*Heterorhabditis brevicaudis*)。由于短尾异小杆线虫与光杆菌共生, 所以接着自线虫体内采集、分离与筛选光杆菌菌株, 有 13 株共生细菌已经依细菌的形态、生化试验与 16 S rRNA 等方法, 确认为本土光杆菌菌株 (*P. luminescens* subsp. *akhurstii*)^[40,41]。

2 短尾异小杆线虫之搜集

异小杆线虫科与斯氏线虫科在分类上属于小杆目 (Rhabditida), 这两科线虫均可寄生昆虫, 侵染期幼虫肠道携带有共生细菌。异小杆线虫与斯氏线虫的生活史分为寄生期及自由生活期。寄生时期共生菌随着线虫的侵染过程而进入寄主昆虫的血腔, 并在血腔中大量繁殖后, 分泌多种代谢产物, 于 24~48h 之内即能杀死寄主, 当营养耗尽时线虫再离开寄主, 进入自由生活期, 此时的线虫龄期为第 3 龄期称为侵染期幼虫 (infective juveniles, IJ), 具高致病力, 不取食, 兼具寄生性、捕食性及病原微生物三大类天敌的特性。它们的寄主范围广, 对哺乳动物、植物及其他非标的生物无毒性, 产品在美国注册时并不需做

毒理测试。又可和许多的化学药剂混合,可以说拥有其他生物防治因子所缺乏的特点^[14,15]。

台湾对于斯氏线虫的研究始于20世纪70年代,台湾大学朱耀沂教授曾针对斯氏线虫DD-136的饲养条件及田间应用情形作探讨^[4];20世纪80-90年代,中央研究院吴辉荣博士进行白蚁及白粉蝶的致病性探讨^[6],中兴大学侯丰男教授针对剂型(膏剂、液剂及胶囊)、大量饲养的条件、饲料的改进(植物性或动物性)、生理(酸碱度、温湿度的效应)及应用性(如斜纹夜蛾、甜菜夜蛾、小菜蛾、玉米螟蛾等致病性)进行研究^[5,6,8,11,13];嘉义大学萧文凤教授曾进行田间试验,评估防治十字花科害虫的可能性(未发表);生技中心朱亮光博士曾致力筛选合适的本地品系(未发表);台糖公司王次男研究员尝试以甘蔗加工后的副产品来大量繁殖线虫^[1]。2000年,中兴大学侯丰男教授与唐立正博士采集台湾斯氏线虫与其共生菌并评估线虫对斜纹夜蛾与亚洲玉米螟的杀虫效力^[3,9]。以上都是针对斯氏线虫进行的研究,截至2004年,在台湾尚未有文献报告发现本土异小杆线虫,但在澳洲、德国、荷兰、芬兰、瑞士、爱尔兰、印度、西班牙、葡萄牙、阿根廷、意大利、以色列、美国、加拿大、土耳其与中国大陆等地已陆续发现当地的异小杆线虫^[23,57]。

笔者实验室2004年开始进行台湾本土异小杆线虫搜集,利用大蜡蛾诱饵法(*Galleria-bait*)^[55]采集台湾本土虫生病原线虫。在2005年发表的短尾异小杆线虫,为分离台湾本土异小杆线虫的首例报告^[17]。台湾分离的短尾异小杆线虫虽与中国大陆的短尾异小杆线虫^[12]属同种线虫,但来源系台南县关子岭之土壤样品中分离所得。短尾异小杆线虫是台湾第1种发表之本土异小杆线虫,台湾也是该线虫在全世界中第2个发现地。

3 光杆菌之分离、鉴定

光杆菌有两种型态,第一种型态是从侵染期的线虫中分离出来,被称为I型菌(primary-phase)或初生型菌。在共生菌离开培养的稳定期或在用人工饲料培养线虫的期间,会自然地产生第二种类型,被称为II型菌(secondary-phase)或次生型菌^[18]。两者在许多方面存在着相当的差异,并且几个型态特性在光杆菌和致病杆菌两类共生菌中总是同时发生改变^[36,38]。像是温度的改变, H_2O_2 改变,不同的渗透压,酸碱值的不同,减低氧气的供给,都会改变细菌的型态^[46]。光杆菌I、II型特性的不同,包括第二型为非黏液样的菌落形成、不会产生生物光、吸收染料能力丧失、及产生色素、抗生素、蛋白质分解酵素与晶体包含体的数量明显减少^[35,39,52,58]。

由于异小杆线虫与光杆菌共生,所以笔者实验室接着自线虫体内采集、分离与筛选光杆菌菌株,目前共有13株共生细菌已经依细菌的形态、生化试验与16S rRNA等方法,确认为本土光杆菌菌株。

4 杀虫毒蛋白

综合国内外文献,光杆菌至今已分离到3个具有不同程度杀虫活性的光杆菌亚种^[17,32,34,36]。美国Wisconsin大学的科学家从寄生在嗜菌异小杆线虫消化道内的一种光杆菌中找到一个蛋白复合物,它由A、B、C、D种成分组成^[21],这种蛋白复合物除了对鳞翅目具有杀虫活性外,对鞘翅目和双翅目也都有很强的毒杀活性,是一种广谱杀虫基因,

这些发现可能产生出新的防治虫害方法。例如可经量产纯化直接喷洒这种细菌的毒素，以防治害虫，或者是将它们的基因选殖到植物中去，这种新基因对于农作物持久性抗虫育种具有很大的应用潜力。在1998年公开的一项专利^[31]和随后发表的几篇论文中^[19,21,22]，光杆菌菌株 W-14 中的毒蛋白复合基因已利用基因剔除 (genetic knock-out) 方式，初步发现含4个编码毒蛋白复合体 (toxin complex, tc) 的基因簇 *tca* (13kb), *tcb* (7.5kb), *tcc* (11.5kb) 和 *tcd* (12kb)，其中 *tca* 和 *tcd* 编码的高分子量蛋白复合体 a (complex a) 和蛋白复合体 d (complex d) 对于烟草天蛾 (*Manduca sexta*) 等害虫有较强的口服毒性 (oral toxicity)。光杆菌毒蛋白复合体为外分泌型，分子量大于 100kDa，其活性作用部位位于害虫中肠。Ragni^[54]等在1998年公开的另一项专利中则报道光杆菌 XPO1 的杀虫活性成分为非外分泌型物质，将上述杀虫蛋白基因转入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 后，可用抗体检出表现蛋白，但未显示出口服毒性，据分析可能是表现蛋白未加工修饰成活性蛋白和未分泌至胞外所致。光杆菌杀虫毒蛋白的基因簇 (genomic islands) 较大，遗传操作较难^[32,60]。研究人员也陆续发现其他与杀虫有关的毒素，例如 *Mcf* 毒素 (makes caterpillars floppy toxin)^[28,49]。*Mcf* 基因可能是共生细菌中最基本的毒素，存在于所有光杆菌菌株中，*Mcf* 蛋白破坏昆虫中肠上皮细胞^[28]，但详细的胞内作用路径仍然未知^[30]。*Mcf* 缺失的突变株毒性明显降低，说明 *Mcf* 是一种毒性主导因子。虽然目前文献发表了许多杀虫毒蛋白的核酸和氨基酸序列，但对于杀虫毒蛋白的种类、修饰方式、分泌类型、杀虫机制、结构组成等方面，仍有待进一步研究^[25,27,29]。

笔者实验室近年尝试探讨单一毒蛋白的杀虫效果，从光杆菌分别选殖出 *tcaA* 和 *tcaC* 单一基因，并成功地将其表现于大肠杆菌中。光杆菌的 *tcaA* 基因含有 3 243 核苷酸和 1 081 个氨基酸，*tcaC* 基因含有 4 458 核苷酸和 1 486 个氨基酸。利用 His-Binding column 分别纯化 TcaA 和 TcaC 毒蛋白，其分子量分别约为 120kDa 和 160kDa。将 TcaA 和 TcaC 蛋白质分别注射至七龄初大蜡蛾 (*Galleria mellonella*)，发现注射 TcaA 蛋白质的杀虫活性和生长抑制率都比 TcaC 蛋白质高^[7]。

5 抗生物质

产生抗生物质是共生菌的特征，多种抗生物质可以阻止来自肠道和土壤环境中的微生物对虫尸的二次感染，还可抑制其他昆虫对被侵染昆虫尸体的取食以及共生菌之间的竞争。不同种或同种不同菌株产生的抗生物质各不相同，大蜡蛾体内光杆菌菌株 C9 产生抗生复合物 (3,5-二羟基-4-异丙基-二苯乙烯) 抑制幼虫肠道细菌^[44]。光杆菌菌株 K122 产生 13 种小分子有机化合物，对细菌、真菌及其他种的线虫有抑制作用。这些抗生物质可能由多聚亚胺合成酶基因控制合成，该基因在许多光杆菌基因组样品中都有发现^[33]。光杆菌对病原细菌和真菌具有较广谱拮抗性，尤其对植物病原真菌有较强的抑制效果，但目前相关抑菌成分仍只有极少数被研究或确认^[26,47,48,50-53]。

陆等 (2003)^[10]测定光杆菌属 (*Photobacterium* sp.) HBgy13 发酵液对于甘薯菌核菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*)、尖镰孢菌 (*Fusarium oxysporum*)、立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)、玫瑰灰霉菌 (*Botrytis cinerea*) 4 种病原真菌的抑制作用，且该菌株对于立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)、玫瑰灰霉菌 (*Botrytis cinerea*) 有较佳的抑制作用。加拿大学者 Chen 等 (1994)^[26]测定光杆菌 *Photobacterium luminescens* C9 对于真菌的抑制作用，发现该菌株对

于玫瑰灰霉菌 (*Botrytis cinerea*)、榆树长喙壳菌 (*Ceratocystis ulmi*)、胶树长喙壳菌 (*C. dryocoetidis*)、梨形毛霉菌 (*Mucor piriformis*)、色孢腐霉菌 (*Pythium coloratum*)、终极腐霉菌 (*Pythium ultimum*)、假康宁木霉菌 (*Trichoderma pseudokingii*) 都有很好的效果。

目前光杆菌的抗生物质已知约有 5 类, 在 *in vitro* 培养的情况下, 经由 ethyl acetate 萃取下被分离出来并鉴定, 例如芪衍生物 (stilbene derivatives)、蒽醌衍生物 (anthraquinone derivatives)、染料木素 (genistein)、呋喃衍生物 furan derivatives、酚衍生物 (phenol derivatives)^[42,47,48,53,59]。其中, 芪衍生物 (stilbene derivatives) 已有两种抗生素经由 *in vitro* 和 *in vivo* 的光杆菌中被鉴定分离出来, 3, 5-dihydroxy-4-isopropylstilbene (ST) 和 3, 5-dihydroxy-ethylstilbene。ST 也可藉由 *Galleria mellinella*-nematode-bacterium (*in vivo*) 这 3 种的互助关系下产生^[42]。而纯化的 ST 可以有效的抑制一些细菌、真菌植物线虫^[26,47,48,53], 并且可以有效使用在农业上来防治真菌和病原菌^[47,48,53,56]。在其他研究中, 也有新的抗生物质被发现, 例如 1-hydroxy-2, 6, 8-trimethoxy-9, 10-anthraquinone 和 1, 4-dihydroxy-2, 5-dimethoxy-9, 10-anthraquinone 称为 AT^[43]。

笔者实验室近年自 13 株供试之本土光杆菌株中, 筛选与黄色微球菌 (*Micrococcus luteus* BCRC 10449) 之对峙试验较好者进行抑菌研究^[2], 发现编号 0813-124 之菌株对黄色微球菌有最好的抑制效果。已利用低渗透压的培养基来改变培养条件, 使光杆菌 0813-124 自第一型菌株变成第二型菌株。在第一型菌株中, 生物光、几丁质酶、胞内结晶体含量及蛋白质酶的表现都比第一型菌株好; 在第二型菌株中, 生长速度、抗生物质的分泌及脂肪酶的表现都比第一型好。将光杆菌 0813-124 第一型注射到大蜡蛾体中, 并且培养 5 天, 其抗生物质利用丙酮进行萃取, 然后使用薄膜层析法 (TLC) 及高效能液相层析仪 (HPLC) 两种方法进行分离纯化。接着做 LC Q-TOF MS, 得到此抗生物质之分子量为 255 Da 左右, 与 3, 5-dihydroxy-4-isopropylstilbene (ST) 抗生物质相似。

6 结语

笔者实验室已于 2004 年证实^[16]单独使用光杆菌代谢产物分子量大于 100kDa 的毒蛋白复合体对鳞翅目具有很强的杀虫活性, 是一种广谱杀虫蛋白; 对于测试之病原真菌亦具有广谱拮抗性。接着利用光杆菌代谢产物分子量大于 100kDa 的毒蛋白复合体, 针对于台湾本土重要害虫, 例如小菜蛾、大蜡蛾、玉米穗虫、斜纹夜蛾、拟尺蠖与甜菜夜蛾等鳞翅目昆虫进行室内杀虫谱试验。由试验结果得知分子量大于 100kDa 的毒蛋白复合体对于小菜蛾和大蜡螟的半致死浓度分别为 56mg/kg 与 200mg/kg, 显示其具有显著杀虫效果, 甚至不亚于市售苏力菌商品。

为了解光杆菌菌液对植物病原真菌的抑制效果, 笔者实验室进行玫瑰灰霉病菌、檬果炭疽病菌、苹果褐斑病菌、甜椒疫病菌、香蕉炭疽病菌、百合灰霉病菌、豌豆镰孢菌、番茄镰孢菌、水稻立枯丝核菌与百合白绢病菌的对峙试验。试验结果显示除了对百合白绢病菌没有明显抑制效果外, 对于其他 9 种植物病原真菌都有明显抑制效果, 尤其对于玫瑰灰霉病菌、檬果炭疽病菌、苹果褐斑病菌、甜椒疫病菌具有相当显著的抑菌效果。其中, 我们也针对檬果炭疽病菌进行檬果生物检定 (bioassay), 证实光杆菌菌液有良好的防治效果。另外, 进行光杆菌“菌体及其代谢产物混合液”对细菌的抑制试验, 结果发现对于仙人掌菌、沙门氏菌、大肠杆菌、黑腐病原细菌、胡萝卜软腐杆菌与菊花软腐杆菌 6 种细

菌全部都有明显的抑菌效果^[17,40,41]。

另有国外研究报告显示光杆菌 (*P. luminescens* subsp. *laumondii*) 之 GPS12 及 GPS11 品系, 对洋菇害螨 (*Luciphours* sp., 矮蒲螨科) 雌螨能造成很高的致死率^[24]。光杆菌 (*P. temperata*) 对西方蓟马和葱蓟马均有良好的杀虫活性^[37]。尤其, 也有研究发现光杆菌的抗生物质可以杀死松材线虫^[45]。

为纯化有效成分与了解防治作用机制, 笔者实验室近年已进行抑菌成分的二次代谢物质分析, 初步发现有效成分的蛋白质分子量约为 7kDa, 正尝试不同纯化方法同时也进行不同培养基对于抑菌物质产生的影响。另外, 已初步建立光杆菌杀虫毒蛋白的纯化分析方法, 且完成杀虫毒蛋白、脂质分解酵素等基因的选殖、定序与表现, 显示有蛋白质活性, 已进行生化特性分析。未来的研究, 期望找出量产时的指标性成分, 作为制程与质量管理的重要依据。并持续对于光杆菌的有效成分与有用基因进行功能与结构分析。

笔者实验室近年积极针对台湾本土光杆菌菌株进行有效成分的分离。由于全球迄今尚未上市兼具杀虫与抑菌效果的微生物制剂, 光杆菌具有杀虫与抑菌双效作用, 在植物病虫害之生物防治与抗生物质之利用上, 未来与异小杆线虫皆值得国人进行深入探讨并研发上市。例如可以开发线虫共生细菌光杆菌作为生物性杀虫剂、生物杀菌剂、生物杀线虫剂等, 若配合混合剂型更可开发出双效、三效之生物药剂, 可说具有相当开发潜能之微生物植物保护制剂。笔者实验室同时尝试进行有用基因的转殖工作, 了解光杆菌之分泌物并选殖有用基因, 进一步申请基因专利, 或将选殖出之有用基因导入其他微生物, 以拓展转殖微生物之杀虫或杀菌效果, 最后期望能进一步申请转殖微生物相关专利, 将研究成果落实于产业发展, 并申请办理技术转移厂商, 协助产业创造商机。

参考文献

- [1] 王次男. 昆虫寄生性线虫之植物性固体培养基. 植保会刊, 1995, 37: 448-449.
- [2] 王昭翔. 光杆菌 0813-124 抗细菌物质之分离与特性分析. 私立朝阳科技大学生物技术研究所硕士论文, 2008, 71.
- [3] 白志方. 虫生线虫 (*Steinernema abbasi*) 感染寄主之特性, 在土壤中之持效力及其田间应用之研究. 国立中兴大学昆虫学系博士论文, 2004, 163.
- [4] 朱耀沂, 金小安. 寄生性线虫 DD-136 的生活史与大量繁殖. 植保会刊, 1975, 17: 121-132.
- [5] 吴永泉, 侯丰男. 虫生线虫感染斜纹夜盗之研究. 国立中兴大学昆虫学系硕士论文, 1996, 71.
- [6] 吕佳容, 侯丰男. 虫生线虫 (*Steinernema capocapsae*) 之人工繁殖及其对斜纹夜盗与小菜蛾之致病力. 国立中兴大学昆虫学系硕士论文, 1994, 54.
- [7] 林宜颖, 谢奉家, 吴俐静, 高穗生. 光杆菌毒蛋白 TcaA 和 TcaC 之基因选殖、表现及杀虫活性测试. 台湾昆虫学会第 29 届年会论文宣读, 2008.
- [8] 侯丰男, 萧文凤. 虫生线虫在农业上之应用. 昆虫生态及生物防治研讨会专刊, 第十号. 李后晶编. 中华昆虫学会印, 1997.
- [9] 陈舆贤, 唐立正, 侯丰男. 两种虫生线虫共生菌 *Xenorhabdus* sp. 及 *X. nematophilus* (真细菌目: 肠内菌科) 对斜纹夜蛾之致病力比较. 台湾昆虫: 31 (第 25 届年会论文宣读), 2004.
- [10] 陆秀君, 王勤英, 赵光耀. 发光杆菌 *Photorhabdus* spp. HBgy13 菌株对四种蔬菜病原菌的抑菌活性. 和北医病大学学报, 2003, 4 (26): 18-20.
- [11] 曾美容, 侯丰男. 虫生线虫对甜菜夜蛾之致病力及持久性. 国立中兴大学昆虫学系硕士论文, 1995, 59.

- [12] 刘杰. 中国异小杆线虫属一新种. 动物分类学报, 1994, 19: 268 - 272.
- [13] 郑旗志, 侯丰男. 虫生线虫防治亚洲玉米螟之潜用性. 国立中兴大学昆虫学系硕士论文, 1992, 80.
- [14] 萧文凤, 侯丰男. 虫生线虫杀虫剂在虫害管理上之应用. 生物农药研究与发展研讨会专刊, 第十一章. 李国钦, 高穗生, 费雯绮编. 台湾省农业药物毒物试验所印, 1994.
- [15] 萧文凤. 虫生线虫在农林业害虫管理上之应用. 跨世纪台湾昆虫学研究之进展研讨会论文集, p 95 - 114. 谢丰国, 林政行, 顾世红编. 国立自然科学博物馆印, 2001.
- [16] 谢奉家, 林宗俊, 曾瑞堂, 高穗生. 兼具杀虫与抗菌作用之线虫共生细菌——光杆菌. 植物保护学会会刊, 2004, 46: 163 - 172.
- [17] 谢奉家, 曾巧燕, 高穗生. 台湾首次分离的异小杆线虫——短尾异小杆线虫. 植物保护学会会刊, 2005, 47: 263 - 271.
- [18] Akhurst, R. J. Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families *Heterorhabditidae* and *Steinernematidae*. J. Gen. Microbiol., 1982, 128: 3061 - 3065.
- [19] Blackburn, M., E. Golubeva, D. Bowen, and R. H. French-Constant. A novel insecticidal toxin from *Photorhabdus luminescens*, toxin complex a (Tca), and its histopathological effects on the midgut of *Manduca sexta*. Appl. Environ. Microbiol., 1998, 64: 3036 - 3041.
- [20] Boemare, N. E., R. J. Akhurst, and R. G. Mourant. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 1993, 43: 249 - 255.
- [21] Bowen, D., J. and J. C. Ensign. Purification and characterization of a high-molecular-weight insecticidal protein complex produced by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. Appl. Environ. Microbiol., 1998, 64: 3029 - 3035.
- [22] Bowen, D., T. A. Rocheleau, M. Blackburn, O. Andreev, E. Golubeva, R. Bhartia, and R. H. French-Constant. Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. Science, 1998, 280: 2129 - 2132.
- [23] Brunel, B., Givaudan, A., Lanois, A., Akhurst, R. J., and Boemare, N. Fast and accurate identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species by restriction analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. Appl. Environ. Microbiol., 1997, 63: 574 - 580.
- [24] Bussaman, P., R. W. Sermiswan, and P. S. Grewal. Toxicity of the entomopathogenic bacteria *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* to the mushroom mite (*Luciaphorus* sp.; Acari: Pygmephoridae). Biocontrol Science and Technology, 2006, 16: 245 - 256.
- [25] Carlos, P. S., R. W. Nicholas, J. D. Phillip, D. Paul, C. Timothy, P. Y. A. Candy, S. Sadhana, P. Ursula, E. R. Stuart, and R. H. French-Constant. Bacterial infection of a model insect; *Photorhabdus luminescens* and *Manduca sexta*. Cellular Microbiol., 2002, 4: 329 - 339.
- [26] Chen, G., G. B. Dunphy, and J. M. Webster. Antimycotic activity of two *Xenorhabdus* species and *Photorhabdus luminescens*, bacteria associated with the nematodes *Steinernema* species and *Heterorhabditis megidis*. Biol. Control., 1994, 4: 157 - 162.
- [27] Clarke, D. J., and B. C. A. Dowds. Virulence mechanisms of *Photorhabdus* sp. strain K122 toward wax moth larvae. J. Invert. Pathol., 1995, 66: 149 - 155.
- [28] Daborn, P. J., N. Waterfield, C. P. Silva, C. P. Y. Au, S. Sharma, and R. H. French-Constant. A single *Photorhabdus* gene, makes caterpillars floppy (mcf), allows *Escherichia coli* to persist within and kill insects. Proc Natl. Acad. Sci. USA, 2002, 99: 10742 - 10747.

- [29] Daborn, P. J., N. Waterfield, M. A. Blight, and R. H. French-Constant. Measuring virulence factor expression by the pathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* in culture and during insect infection. *J. Bacteriol.*, 2001, 183: 5834 - 5839.
- [30] Dowling, A. J., P. J. Daborn, N. R. Waterfield, P. Wang, C. H. Streuli, and R. H. French-Constant. The insecticidal toxins *Mcf* promote apoptosis in cells mammalian. *Cell. Microbiol.*, 2004, 6: 345 - 353.
- [31] Ensign, J. C. Insecticidal protein toxins from *Photorhabdus*. World Intellectual Property, 1998, Patent WO1998/08932 A1.
- [32] French-Constant, R. H., N. Waterfield, P. J. Daborn, S. Joyce, H. Bennett, C. P. Y. Au, A. Dowling, S. Boundy, S. Reynolds, and D. Clarke. *Photorhabdus*: towards a functional genomic analysis of a symbiont and pathogen. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2003, 26: 433 - 456.
- [33] French-Constant, R. H., N. Waterfield, V. Burland, N. T. Perna, P. J. Daborn, D. Bowen, and F. R. Blattner. A genomic sample sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* W14: potential implications for virulence. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66: 3310 - 3329.
- [34] Fischer-Le Saux, M., V. Viillard, B. Brunel, P. Normand, and N. E. Boemare. Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1999, 49: 1645 - 1656.
- [35] Forst, S., and K. Neilson. Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. *Microbiol. Rev.*, 1996, 60: 21 - 43.
- [36] Forst, S., B. Dowds, N. Boemare, and E. Stackebrandt. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Annu. Rev. Microbiol.* 1997, 51: 47 - 72.
- [37] Gerritsen, L. J. M., J. Georgieva, and G. L. Wieggers. Oral toxicity of *Photorhabdus* toxins against thrips species. *J. Invertebr. Pathol.*, 2005, 88: 207 - 211.
- [38] Gerritsen, M., G. Deraay, and P. H. Smiths. Characterization of from variants of *Xenorhabdus luminescens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, 58: 1975 - 1979.
- [39] Givaudan, A., S. Baghdiguan, and A. Lanois. Swarming and swimming changes concomitant with phase variation in *Xenorhabdus nematophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, 61: 1408 - 1413.
- [40] Hsieh, F. C., C. Y. Tzeng, and S. S. Kao. An entomopathogenic-nematophilic bacterium, *Photorhabdus luminescens*, with insecticidal and antimicrobial activities. P. 30. in Program and Abstracts of Taiwan-Japan-Czech Republic Tri-countries Cooperation Symposium on Entomology, April 18-22, 2005. National Taiwan University, Taipei, Taiwan, 2006.
- [41] Hsieh, F. C., C. Y. Tzeng, and S. S. Kao. Bioactivities of *Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*, a symbiont of entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis brevicaudis*. p. 101 In Annual Meeting of the Invertebrate Pathology and the 1st International Forum on Entomopathogenic Nematodes and Symbiotic Bacteria August 12-16. Universite Laval in Quebec City, Canada, 2007.
- [42] Hu, K. J., J. X. Li, and J. M. Webster. Quantitative analysis of a bacteria-derived antibiotic in nematode-infected insects using HPLC - UV and TLC - UV methods. *J. Chromatogr. B.*, 1997, 703: 177 - 183.
- [43] Hu, K. J., J. X. Li, W. J. Wang, H. M. Wu, H. Lin, and J. M. Webster. Comparison of metabolites produced in vitro and in vivo by *Photorhabdus luminescens*, a bacterial symbiont of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis*. *Can. J. Microbiol.*, 1998, 44: 1072 - 1077.
- [44] Hu, K., and J. M. Webster. Antibiotic production in relation to bacterial growth and nematode development

- in *Photorhabdus-Heterorhabditis* infected *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Microbiol. Lett.* , 2000, 189: 219 - 223.
- [45] Hu, K. , J. Li, and J. M. Webster. Nematicidal metabolites produced by *Photorhabdus luminescens* (enterobacteriaceae) , bacterial symbiont of entomopathogenic nematodes. *Nematology.* , 1999, 1: 457 - 469.
- [46] Karina, C. Influence of osmolarity on phase shift in *Photorhabdus luminescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* , 1995, 61: 3748 - 3749.
- [47] Li, J. , G. Chen, H. Wu, and J. M. Webster. Identification of two pigments and a hydroxystilbene antibiotic from *Photorhabdus luminescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* , 1995a, 61: 4329 - 4333.
- [48] Li, J. , G. Chen, J. M. Webster, and E. Czyceskwa. Antimicrobial metabolites from a bacterial symbiont. *J. Nat. Prod.* , 1995b, 58: 1081 - 1085.
- [49] Marokhazi, J. , N. Waterfield, G. LeGoff, E. Feil, R. Stabler, J. Hinds, A. Fodor, and R. H. French-Constant. Using a DNA microarray to investigate the distribution of insect virulence factors in strains of *Photorhabdus* bacteria. *J. Bacteriol.* , 2003, 185: 4648 - 4656.
- [50] McInerney, B. V. , R. P. Gregson, M. J. Lacey, R. J. Akhurst, G. R. Lyons, S. H. Rhodes, D. R. Smith, L. M. Engelhardt, and A. H. White. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp. , Part 1. Dithiopyrrolone derivatives with antibiotic activity. *J. Nat. Prod.* , 1991a, 54: 774 - 784.
- [51] McInerney, B. V. , W. C. Taylor, M. J. Lacey, R. J. Akhurst, and R. P. Gregson. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp. , Part 2. Benzopyran-1-one derivatives with gastroprotective activity. *J. Nat. Prod.* , 1991b, 54: 785 - 795.
- [52] Neelson, K. H. , T. M. Schmidt, and B. Bleakley. Physiology and biochemistry of *Xenorhabdus*. In *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*, pp. 271-284. Edited by R. Gaugler & H. Kaya. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990.
- [53] Paul, V. J. , S. Frautschy, W. Fenical, and K. H. Neelson. Antibiotics in microbial ecology. Isolation and structure assignment of several new antibacterial compounds from the insect-symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp. *J. Chem. Ecol.* , 1981, 7: 589 - 597.
- [54] Ragni, A. , F. Valentini, and B. Fridlender. Insecticidal bacteria. World Intellectual Property, 1998, Patent WO/1998/005212.
- [55] Rajagopal, R. , and R. H. Bhatnagar. Insecticidal toxic proteins produced by *Photorhabdus luminescens akhurstii*, a symbiont of *Heterorhabditis indica*. *J. Nematol.* , 2002, 34: 23 - 27.
- [56] Richardson, W. H. , T. M. Schmidt, and K. H. Neelson. Identification of an anthraquinone pigment a hydroxystilbene antibiotic from *Xenorhabdus luminescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* , 1988, 54: 1602 - 1605.
- [57] Rosa, J. S. , Bonifassi, E. , Amaral, J. , Lacey, L. A. , Simoes, N. , and Laumond, C. Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernema, Heterorhabditis) in the Azores. *J. Nematol.* , 2000, 32: 215 - 222.
- [58] Schmidt, T. M. , B. Bleakley, and K. H. Neelson. Characterization of an extracellular protease from the insect pathogen *Xenorhabdus luminescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* , 1988, 54: 2793 - 2797.
- [59] Sztaricskai, F. , Z. Dinya, Gy. Batta, E. Szallas, A. Szentirmai, and A. Fodor. Anthraquinones produced by enterobacters and nematodes. *Acta Chem Hungar Models Chem.* , 1992, 129: 697 - 770.
- [60] Waterfield, N. , P. J. Daborn, and R. H. French-Constant. Genomic islands in *Photorhabdus*. *Trends Microbiol.* , 2002, 10: 541 - 545.
- [61] Wu, H. J. , Z. N. Wang, C. F. Ou, R. S. Tsai, and Y. S. Chow. Susceptibility of two Formosan termites to the entomogenous nematode, *Steinernema feltiae* Filipjev. *Bull. Inst. Zool. Academia Sinica*, 1991, 30: 31 - 39.