

线虫共生致病杆菌 PacYellow 的吲哚抗生素

方启¹ 孙丹丹¹ 俞银贤² 邓子新¹ 林双君^{1*}

(1. 上海交通大学 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240)

(2. 上海交通大学 医学院 上海 200080)

摘要:【目的】研究特殊生境的微生物——嗜线虫致病杆菌(*Xenorhabdus bovienii* PacYellow)的次级代谢产物,为微生物药物或农用抗生素开发提供结构多样的化合物。【方法】通过 16S rRNA 基因比对鉴定菌株;利用薄层层析、硅胶柱层析、凝胶层析、液相制备等技术进行分离纯化;利用质谱、红外光谱与核磁共振等光谱技术鉴定化合物结构。【结果】PacYellow 菌株被鉴定属于致病杆菌属 *bovienii* 种。从该菌株中分离纯化了 4 个单体化合物,它们的结构被鉴定为吲哚类衍生物,可能源于色氨酸与缬氨酸或异亮氨酸的缩合产物。【结论】从嗜线虫致病杆菌——PacYellow 菌株中分离鉴定了 4 个吲哚生物碱类抗生素,它们具有中等到高的抗菌活性。

关键词: 致病杆菌, 天然产物, 吲哚生物碱, 抗生素

Indole antibiotics from entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus bovienii* PacYellow

FANG Qi¹ SUN Dan-Dan¹ YU Yin-Xian² DENG Zi-Xin¹ LIN Shuang-Jun^{1*}

(1. State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

(2. School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China)

Abstract: [Objective] To study secondary metabolites of special eco-environmental microorganism—*Xenorhabdus bovienii* PacYellow, and to provide structurally diverse compounds for microbial drug/pesticide development. [Methods] The strain PacYellow was identified by comparison of 16S rRNA gene. The secondary metabolites were purified by thin-layer chromatography, silica gel column chromatography, gel chromatography, and semi-preparative high-performance liquid chromatography. The structures were elucidated by using spectroscopic technologies including nuclear magnetic resonance (NMR), infrared spectroscopy (IR) and mass spectroscopy (MS). [Results] The strain PacYellow was identified as a strain of *Xenorhabdus bovienii*. Four compounds were purified and their chemical structures were elucidated as indole derivatives that are probably biosynthesized from tryptophan and valine or isoleucine. [Conclusion] Four indole derivatives were identified from entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus bovienii* PacYellow.

Keywords: *Xenorhabdus* spp., Natural products, Indole alkaloids, Antibiotics

基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2010CB833805); 教育部项目

*通讯作者: Fax: 86-21-34206722; ✉: linsj@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2014-04-28; 接受日期: 2014-05-23; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-08-29

近年来,属革兰氏阴性菌的嗜线虫致病杆菌,由于其在与线虫的共生生活以及昆虫寄生中产生丰富的次级代谢产物和发挥独特的作用,吸引了越来越多的关注^[1-3]。致病杆菌具有独特的生活史,其首先寄生在土壤中,处于感染态的线虫通过其自然开口侵染到被寄生的昆虫体腔内,并将线虫体内共生的致病杆菌释放到昆虫的体腔中,致病杆菌在24-28 h 内进行繁殖,并产生一系列的代谢物。这些毒素和蛋白酶类对昆虫具有很强的杀伤作用,导致昆虫产生败血症而死亡。继而,致病杆菌会继续产生体外酶,将昆虫的生物大分子物质降解为氨基酸和核酸等生物小分子物质,以提供线虫自身繁殖所需;同时致病杆菌还可以产生一些次级代谢产物来抑制其他细菌或真菌的生长,防止营养物质流失。线虫利用被转化的小分子物质开始自身繁殖,一般可持续繁殖一到三代。当营养物质匮乏时,通过特定信号的诱导,线虫与共生杆菌进行重新组装,生成新的感染态共生体系被释放到土壤中,继续寻找新的宿主进行下一个生命周期^[4-6]。尽管嗜线虫致病杆菌的次级代谢产物在与线虫的共生生活史中具有极其重要的作用^[7],但是到目前为止,仅仅少数几类化合物被分离鉴定出来^[8-10]。已经被报道的化合物具有各种各样的生物活性,如抗昆虫、抗线虫、抗菌以及抗癌活性等^[11-16]。不仅如此,因其独特的生活史,致病杆菌所产生的代谢产物正在被当作新型的生物农药而被广泛研究^[17]。本文从筛选新型农业抗生素角度出发,选取一株嗜线虫致病杆菌,以 HPLC-MS 技术指导代谢产物的分离,从中分离鉴定了4个吡啶生物碱类抗生素,并对其抗菌活性进行了测试,为寻找新型微生物药物或农业抗生素提供了有益信息。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养基

菌株 PacYellow 为馈赠的未鉴定菌株。NBTA 培养基(g/L): NB 培养基(Difco) 8.000, 溴百里酚蓝 0.025, 氯化三苯基四氮唑 0.040, 蒸馏水 1 000 mL。TSBY 液体培养基(g/L): Oxoid tryptone soya broth

30, 葡萄糖 103, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。

1.2 主要试剂和仪器

甲醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇,上海凌峰试剂公司;氘代试剂,美国CIL公司;色谱级分析试剂,美国TEDIA试剂公司;柱层析硅胶,青岛海洋化工厂;C₁₈反相层析硅胶(50-75 μm), YMC公司;Sephadex TM LH-20, GE 医疗;500M 核磁共振仪,德国布鲁克;傅立叶红外光谱仪,美国赛默飞;紫外测试仪,美国赛默飞;安捷伦 1260 系 HPLC、LC-MS、Q-TOF, 安捷伦科技有限公司。

1.3 细菌 16S rRNA 基因序列扩增及分析方法

用于细菌 16S rRNA 基因序列扩增的上游引物 27F: 5'-AGAGTTTGATC MTGGCTCAG-3', 下游引物 1492R: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'。挑取新鲜培养的单克隆菌落,充分悬浮于 50 μL 无菌水中,沸水浴 5 min, 8 000 r/min 离心 5 min, 取上清液作为 PCR 反应模板。50 μL PCR 反应液中含有: 10×Buffer 5 μL, 0.025 mol/L MgCl₂ 5 μL, 0.002 mol/L dNTPs 5 μL, Taq DNA 聚合酶 2.5 U, 10 μmol/L 引物各 2 μL, 模板 DNA 40 ng, 50% DMSO 5 μL, 补双蒸水至 50 μL。反应条件为: 95 °C 5 min; 94 °C 90 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s; 循环 30 次; 72 °C 10 min。反应产物用 1%琼脂糖胶进行电泳观察,用凝胶回收试剂盒(OMEGA)回收和纯化目的片段,上海杰李生物技术有限公司进行测序。得到的序列结果与 GenBank 数据库进行比对和相似性分析,并用 Neighbor-Joining 法建立系统进化树。

1.4 菌株的培养及发酵

将菌种划线接种于 NBTA 平板, 28 °C 培养 48 h, 然后挑取 I 型单克隆菌落^[18]接种于装有 25 mL TSBY 培养基的 100 mL 三角瓶中, 28 °C、220 r/min 振荡培养 24 h, 取 5 mL 种子液接种于装有 500 mL 相同培养基的 2 L 三角瓶中, 相同条件下发酵 3 d。

1.5 次级代谢产物的提取

对嗜线虫致病杆菌 PacYellow 进行大批量发

醇, 共 50 L。将收集到的发酵液先经过 8 000 r/min 离心 8 min, 得上清液和菌体沉淀, 分别合并上清液和沉淀。随后上清液用乙酸乙酯反复萃取 3 次, 将萃取后的有机相于 30 °C 减压蒸馏, 除去有机溶剂; 利用丙酮重悬菌体沉淀, 将丙酮破碎的菌体离心, 收集上清液, 于 30 °C 减压蒸馏, 除去溶剂, 合并两部分待进一步分离纯化。

1.6 次级代谢产物分离及纯化

通过石油醚、乙酸乙酯和甲醇体系来进行 TLC 分析, 确定正相硅胶柱分离条件为石油醚: 石油醚: 乙酸乙酯=2:1 (体积比)、乙酸乙酯: 乙酸乙酯: 甲醇=5:1 (体积比)、乙酸乙酯: 甲醇=2:1 (体积比)、甲醇。收集正相硅胶柱分离的样品, 使用 HPLC 利用分析柱(5.0 mm×150 mm, 3.6 μm, C₁₈)检测后合并目标化合物组分, HPLC 分离条件为 0–30 min, 乙腈浓度从 30% 梯度洗脱到 100%。随后, 将目标化合物经 Sephadex LH-20 (2.0 cm×110 cm; MeOH; 2.5 mL/min) 纯化。接下来将所得的目标组分经半制备型 HPLC (9.4 mm×250 mm, 5 μm, C₁₈) 纯化。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

菌株 PacYellow 的总 DNA 作为模板进行 PCR 扩增, 获得长 1.5 kb 的 16S rRNA 基因序列(图 1)。与 GenBank 的序列比对结果显示, 共有 37 株已经报道菌株的 16S rRNA 基因序列与 PacYellow 的 16S rRNA 基因序列有 99% 的一致性, 其中菌株 *Xenorhabdus bovienii* SS-2004 (444303959)、*Xenorhabdus bovienii* (343202497) 等致病杆菌显示了最高的同源性。表明菌株 PacYellow 在分类上应属于肠杆菌科致病杆菌属。进一步应用 NCBI 对该菌株的 16S rRNA 基因序列在 16S ribosomal RNA (Bacteria and Archaea) 进行 BLASTn 搜索, 参照 Saitou 等^[19]采用 MEGA 5 中的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树(图 2)。通过比较系统发育树, 可明显发现菌株 PacYellow 处于致病杆菌 *Xenorhabdus bovienii* 的分支。因此, 这株线虫共生菌被鉴定为致病杆菌 *Xenorhabdus bovienii*。

```

1 ACTACCATGC AAGTCGAGCG GCAGCGGGGG GAAGCTTGCT TCCCCGCCGG
  CGAGCGGGCGG ACGGGTGAGT AATGTCTGGG GATCTGCCCG ATGGAGGGGG
101 ATAACCACTG GAAACGGTGG CTAATACCGC ATAACCTCTG TGGAGTAAAG
  TGGGGGACCT TCGGGCCTCA CGCCATCGGA TGAACCCAGA TGGGATTAGC
201 TAGTAGGTGG GGTAATGGCT CACCTAGGCG ACGATCCCTA GCTGGTCTGA
  GAGGATGACC AGCCACACTG GGAAGTGGAC ACGGCCCGA CTCCTACGGG
301 AGGCAGCAGT GGGGAATATT GCACAATGGG CGCAAGCCTG ATGCAGCCAT
  GCCGCGTGTA TGAAGAAGGC CTTCGGGTTG TAAAGTACTT TCAGCGGGGA
401 GGAAGGCAAC AGCGTAAATA GCGCTGTTGA TTGACGTTAC CCGCAGAAGA
  AGCACC GGCT AACTCCGTGC CAGCAGCCCG GGTAATACGG AGGGTGCAAG
501 CGTTAATCGG AATTACTGGG CGTAAAGCGC ACGCAGGCGG TCAATTAAGT
  TAGATGTGAA ATCCCCGGGC TCAACCTGGG AACGGCATCT AAAACTGGTT
601 GACTAGAGTC TCGTAGAGGG GGGTAGAATT CCACGTGTAG CGGTGAAATG
  CGTAGAGATG TGGAGGAATA CCGGTGGCGA AGGCGGCCCG CTGGACGAAG
701 ACTGACGCTC AGGTGCGAAA GCGTGGGGAG CAAACAGGAT TAGATACCCT
  GGTAGTCCAC GCTGTAAACG ATGTCGATTT GGAGGTTGTG CCCTTGAGGC
801 GTGGCTTCCG GAGCTAACGC GTTAAATCGA CGCCTGGGGA GTACGGCCGC
  AAGGTTAAAA CTCAAATGAA TGACGGGGGC CCGCACAAGC GGTGGAGCAT
901 GTGGTTTAAT TCGATGCAAC GCGAAGAACC TTACCTACTC TTGACATCCT
  CAGAAATTCG TGGAGACAGC GAAGTGCCTT CGGGAAGTGA GAGACAGGTG
1 001 CTGCATGGCT GTCGTAGCTC CGTGTTGTGA AATGTTGGGT TAAGTCCCGC
  AACGAGCGCA ACCCTTATCC TTTGTTGCCA GCACGTGATG GTGGGAAGTC
1 101 AAGGGAGACT CCGGTGATA AACCGGAGGA AGGTGGGGAC AAAGAGAAGC
  GACCTCGCGA GAGCAAGCGG AACTCATAAA GTCTGTCGTA GTCCGGATTG
1 201 GAGTCTGCAA CTCGACTCCA TGAAGTCGGA ATCGCTAGTA ATCGTAGATC
  AGAATGCTAC GGTGAATACG TTCCCGGGCC TTGTACACAC CGCCCGTCAC
1 301 ACCATGGGAG TGGGTTGCAA AAGAAGTAGG TAGCTTAACC TTCGGGGGGG
  CGCTACCACT G

```

图 1 PacYellow 的 16S rRNA 基因序列

Figure 1 16S rRNA gene sequence of the strain PacYellow

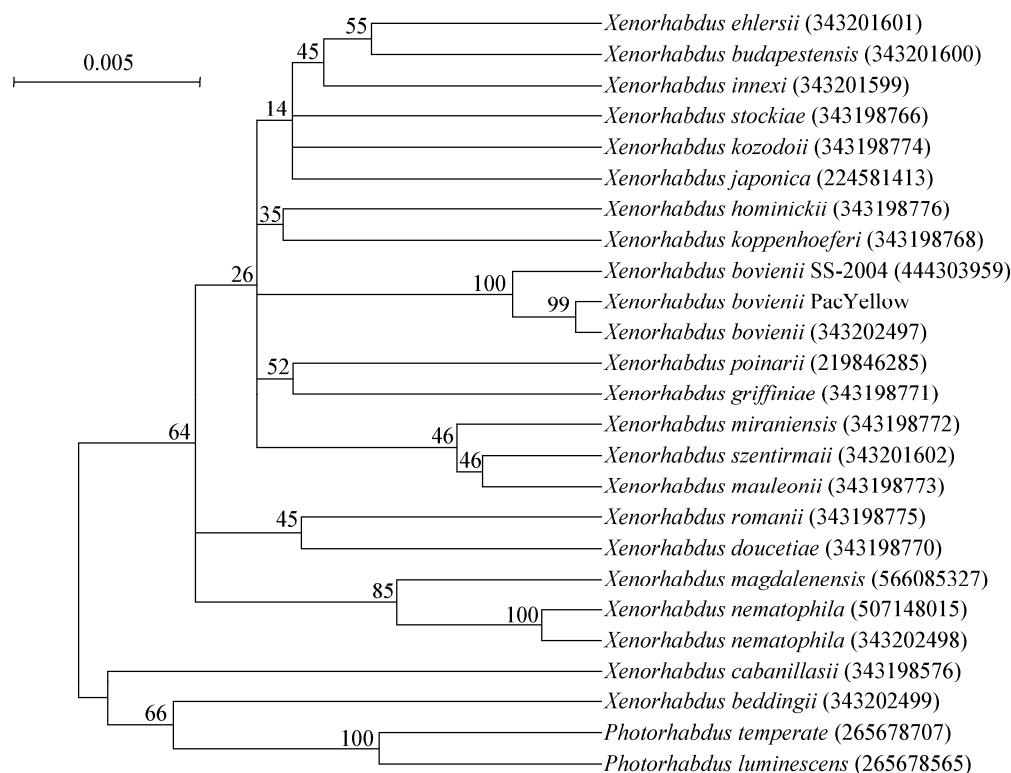


图2 基于16S rRNA基因序列分析构建的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree constructed based on 16S rRNA gene sequence

Note: Bar: 0.5% sequence divergence. The numbers at the nodes indicate the bootstrap values based on N-J analysis of 1 000 resampled data sets.

2.2 代谢产物1-4的化学结构

化合物1(图3)为无色油脂状。紫外吸收(MeOH): $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$: 222 nm (2.27)、282 nm (1.59)。红外光谱(KBr): ν_{\max} 3 410、2 972、1 707、1 457、1 098、1 026、743。高分辨质谱给出加钠分子离子峰 $[M+Na]^+$ 为 m/z 288.154 5, 而其理论分子加钠峰为 288.152 1, 因此确定其分子式为 $C_{17}H_{21}NO_3$ 。核磁共振氢谱中(图4), 在 δ 7.35(1H, d, $J=8.0$ Hz)、7.65(1H, d, $J=7.8$ Hz)、7.15(1H, t, $J=7.5$ Hz)、7.21(1H, t, $J=7.5$ Hz)、7.04(1H, d, $J=2.0$ Hz)和核磁共振的碳谱信号如 δ 127.5、110.7、118.9、123.0、119.8、122.3、110.3 和 136.2, 表明该化合物中存在一个吲哚环结构。结合氢谱中的信号 δ 2.07(3H, s) 信号和碳谱中的信号 δ 170.5(s) 和 20.9(q) 信号, 表明该化合物中含有一个乙酰基结构单元。结合氢谱(图4)中其他位置的信号 δ 3.31(dd, $J=15.1$, 4.6 Hz)、

3.19(dd, $J=15.1$, 8.2 Hz)、5.49(dd, $J=8.2$, 4.6 Hz)、2.64(m)、1.74(m)、1.40(m)、0.88(t, $J=7.5$ Hz)、1.00(d, $J=6.8$ Hz)和碳谱中的信号 δ 210.8、44.3、26.7、15.2、26.3(表1), 化合物1被鉴定为一个已知的吲哚类生物碱^[20-21]。

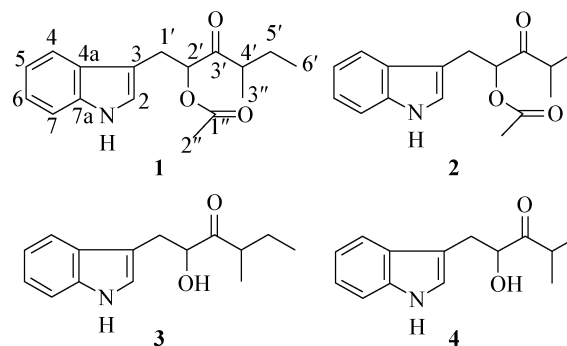


图3 代谢产物1-4的化学结构

Figure 3 The chemical structures of compounds 1-4

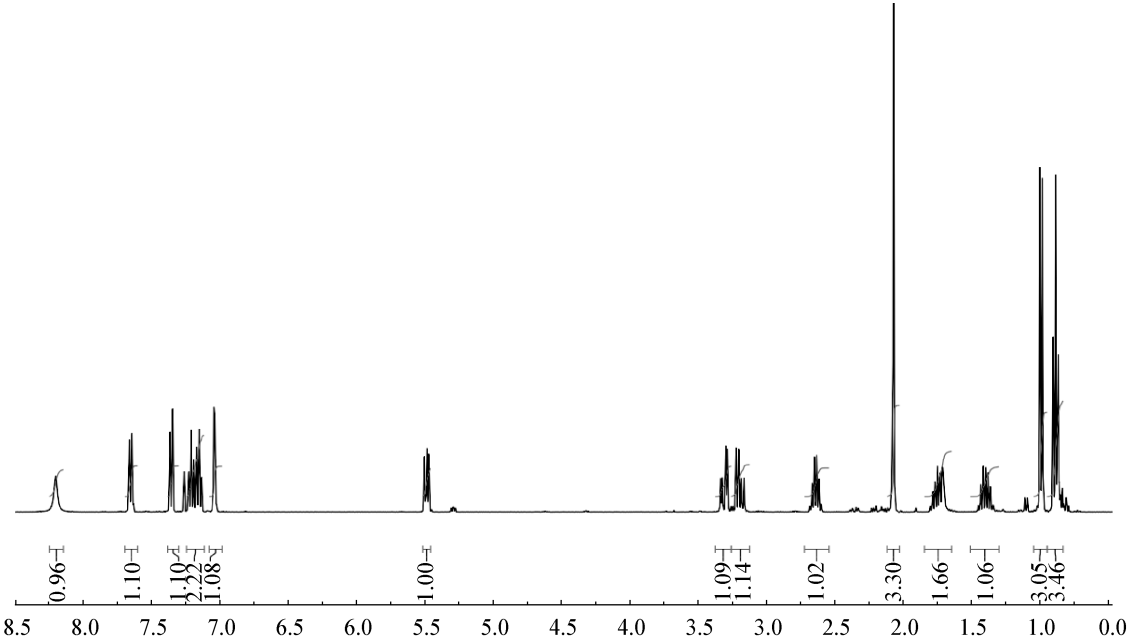


图 4 代谢物 1 的核磁共振氢谱
Figure 4 The ¹H NMR of compound 1

表 1 化合物的核磁数据(500 MHz, CDCl3)						
Table 1 NMR data (500 MHz, CDCl3) of the compounds						
Site	1		2		3	4
	δ_{H} (multi, Hz)	δ_{C}	δ_{H} (multi, Hz)	δ_{H} (multi, Hz)	δ_{H} (multi, Hz)	
2	7.04 (d,2.0)	127.5	7.04 (d, 2.0)	7.04 (s)	7.02 (d, 1.5)	
3		110.7				
4	7.65 (d,7.8)	118.9	7.64 (d,7.8)	7.62 (d,8.0)	7.61 (d,7.5)	
4a		123.0				
5	7.15 (t, 7.5)	119.8	7.14 (t, 7.8)	7.11 (t, 8.0)	7.12 (t, 7.5)	
6	7.21 (t, 7.5)	122.3	7.21 (t, 7.8)	7.17 (t, 8.0)	7.18 (t, 7.5)	
7	7.35 (d,8.0)	110.3	7.36 (d,8.0),	7.31 (d,8.0)	7.31 (d,8.0)	
7a		136.2				
1'	3.31 (dd, 15.1, 4.6) 3.19 (dd, 15.1, 8.2)	26.7	3.27 (dd, 15.0, 5.0) 3.20 (dd, 15.0, 7.8)	3.30 (dd, 15.0, 4.5) 3.02 (dd, 15.0, 7.5)	3.29 (dd, 15.0, 4.5) 3.04 (dd, 15.0, 7.0)	
2'	5.49 (dd, 8.2, 4.6)	78.0	5.47 (dd, 7.8, 5.0)	4.60 (m)	4.66 (m)	
3'		210.8				
4'	2.64 (m)	44.3	2.72 (m)	2.76 (m)	2.87 (m)	
5'	1.74 (m) 1.40 (m)	26.3	0.99 (d, 6.8)	1.67 (m) 1.43 (m)	1.02 (d, 6.5)	
6'	0.88 (t, 7.5)	11.6		0.99 (t, 6.5)		
1''		170.5				
2''	2.07 (s)	20.9	2.07 (s)			
3''	1.00 (d, 6.8)	15.2	1.10 (d, 6.8)	1.09 (d, 7.0)	1.12 (d, 6.5)	

化合物 **2** 也是无色油脂状。它的紫外吸收光谱和红外光谱与化合物 **1** 基本相同。高分辨质谱的分子加钠离子峰 $[M+Na]^+$ 为 m/z 273.274 1, 比化合物 **1** 小 14, 因此确定其分子式为 $C_{16}H_{19}NO_3$ 。它的核磁共振氢谱(图 5)与化合物 **1** 非常相似(表 1), 不同之处只在于化合物 **1** 氢谱中的一个三重峰甲基在化合物 **2** 的氢谱中变成了二重峰, 并且减少了亚甲基信号。因此, 化合物 **2** 被鉴定是化合物 **1** 的结构类似物^[20-21], 结构见图 3。

化合物 **3** 的紫外吸收光谱和红外光谱与以上两个化合物的基本相同, 说明是同系物。高分辨质谱的分子加钠离子峰 $[M+Na]^+$ 为 m/z 246.158 5, 比化合物 **1** 要小 42, 其分子式被确定为 $C_{15}H_{19}NO_2$ 。化合物 **3** 的核磁共振氢谱(图 6)非常类似于化合物 **1** 的核磁共振氢谱, 不同之处是化合物 **3** 缺失了乙酰基的甲基信号(表 1)。因此, 化合物 **3** 被鉴定为 **1** 的去乙酰基衍生物^[20-21](图 3)。化合物 **4** 的紫外吸收光谱和红外光谱基本与上述化合物相同, 表明该化

合物与上述化合物为类似物。高分辨质谱的分子加钠离子峰 $[M+Na]^+$ 为 m/z 232.125 4, 分子式被确定为 $C_{14}H_{17}NO_2$ 。化合物 **4** 的核磁共振氢谱(图 7)非常类似于化合物 **2** 的氢谱, 同样缺失了乙酰基的甲基信号(表 1), 因此化合物 **4** 被鉴定为化合物 **2** 的去乙酰基衍生物^[20-21](图 3)。

2.3 代谢物的生物活性

通过检索发现分离鉴定的化合物均从其他两株致病杆菌 *Xenorhabdus bovienii* 得到分离鉴定^[20-21], 这从侧面证实了该菌株属于 *Xenorhabdus bovienii*。并且发现化合物 **1** 和 **2** 对条件致病真菌新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)分别在 25 mg/L 和 50 mg/L 的浓度时有很好的抑制作用, 该类真菌为人类的条件致病菌, 通常会导致严重的新型隐球菌脑膜炎, 目前关于真菌感染的疾病一直是临床治疗的难点和热点问题^[22]。化合物 **3** 和 **4** 则在浓度为 12 mg/L 对植物病原真菌灰霉菌(*Botrytis cinerea*)有很好的抑制作用。该类真菌又称灰葡萄孢菌, 一种

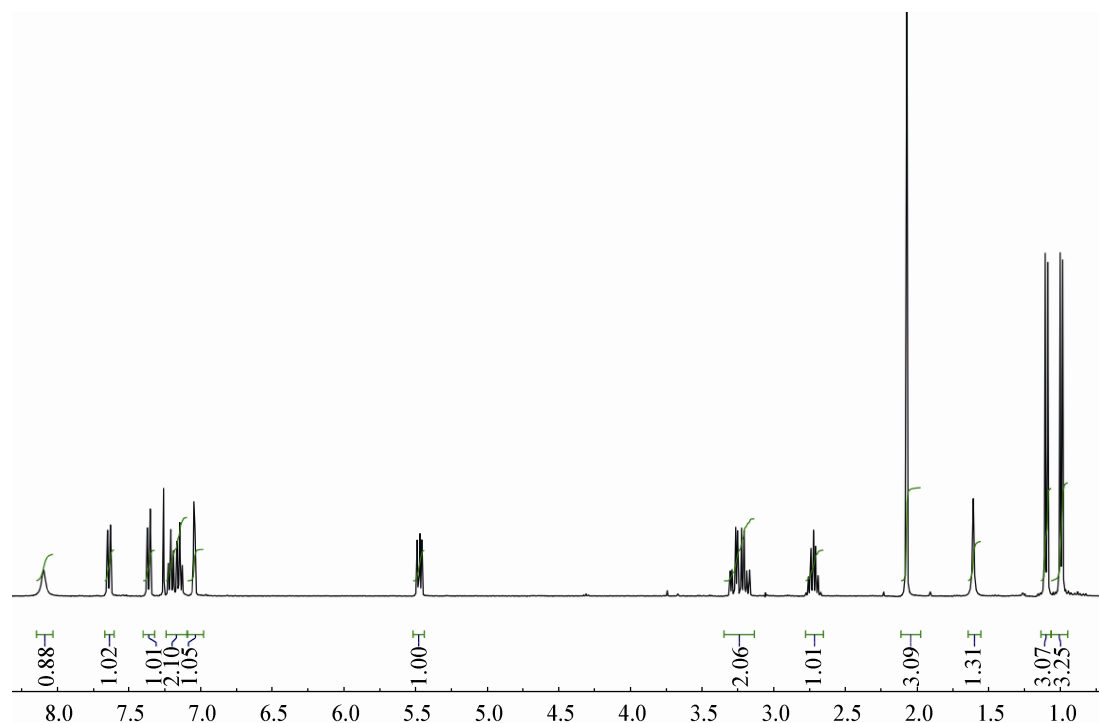


图 5 代谢物 **2** 的核磁共振氢谱
Figure 5 The 1H NMR of compound **2**

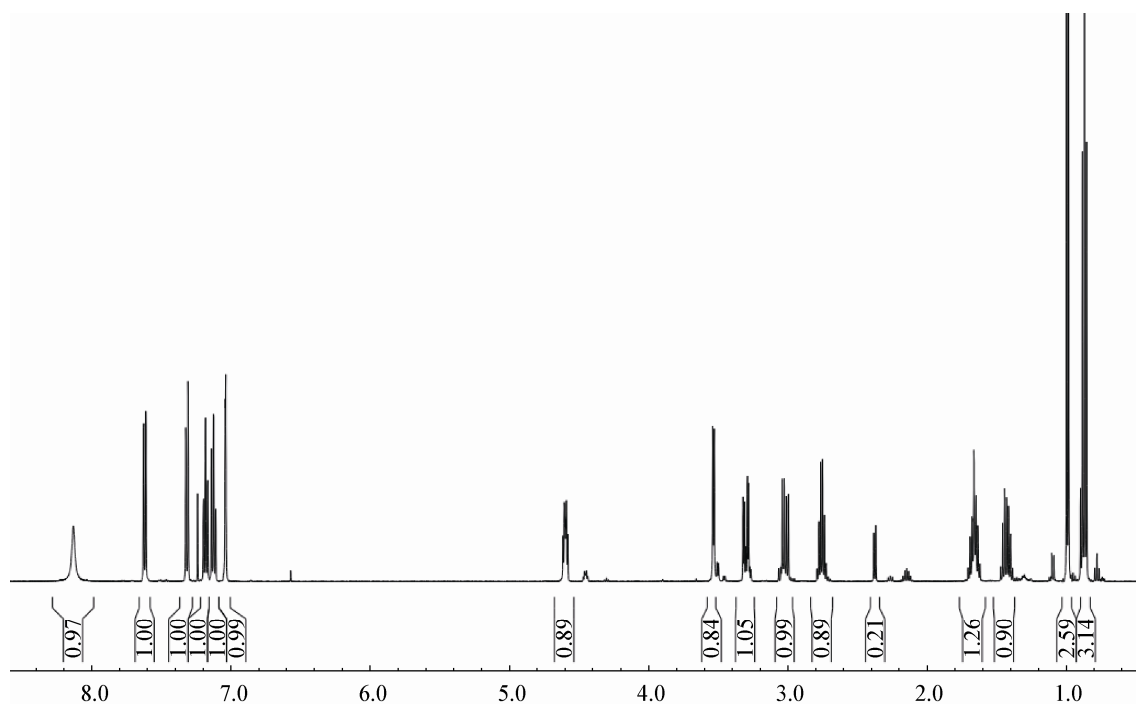


图 6 代谢物 3 的核磁共振氢谱
Figure 6 The ^1H NMR of compound 3

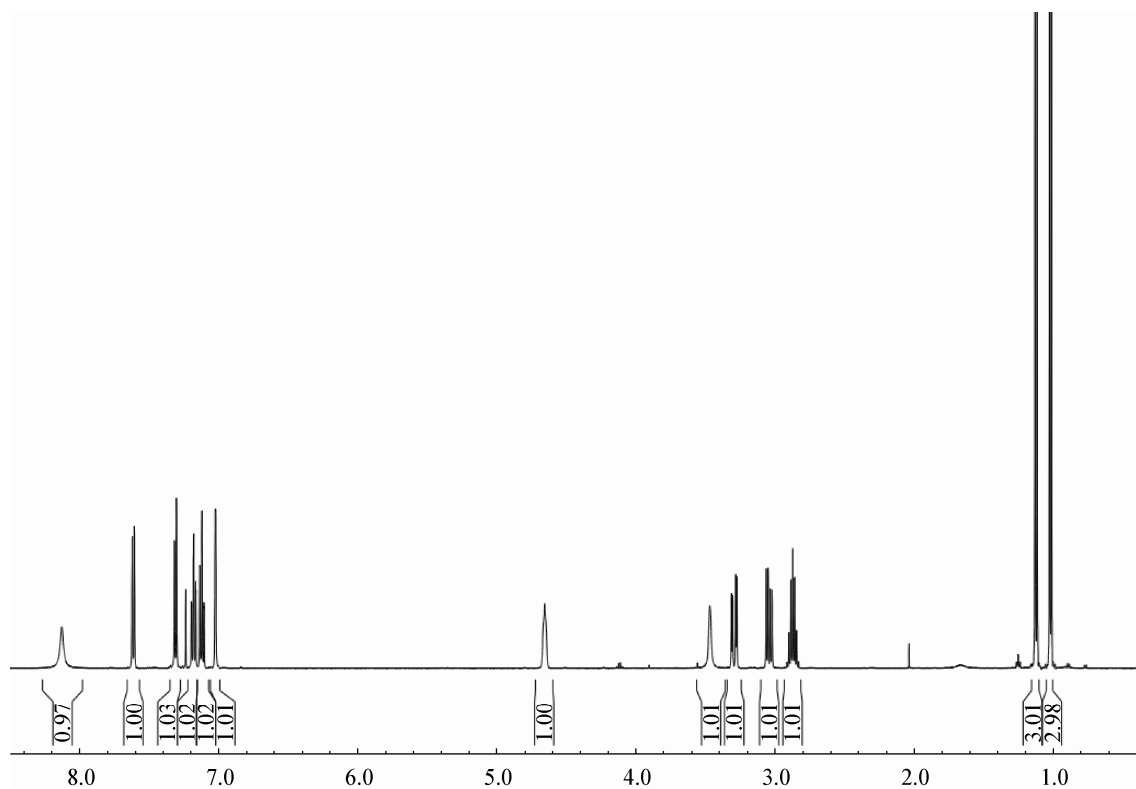


图 7 代谢物 4 的核磁共振氢谱
Figure 7 The ^1H NMR of compound 4

广寄主性的、能够引起 200 多种已知植物灰霉病的坏死营养型病原真菌^[23]。因此,该组化合物有潜力作为微生物农用抗生素进行更为深入的研究和开发。另外,基于对微生物药物研究的兴趣,我们对化合物 1-4 的其他抗菌活性,尤其是产生临床疾病的模式菌株进行了活性测试,结果表明该组化合物对临床上引起肺炎等疾病的金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、覃状芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*) 以及引起结核病的结核分枝杆菌的实验室模式菌株耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis* mc²155) 均表现出非常微弱的活性。然而,鉴于这组化合物作为该类菌株中的主要代谢产物,在嗜线虫致病杆菌的生活史中可能具备特殊的作用,如抗植物病原真菌等。因此,根据我们的实验结果分析,有必要对该类化合物进一步进行深入的研究,确定它们在其生活史中的真实作用,以期能够开发新的微生物抗生素,尤其是抗植物病原真菌和临床用的抗真菌类抗生素。

参 考 文 献

- [1] Forst S, Dowds B, Boemare N, et al. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs[J]. In Annual Review of Microbiology, 1997: 47-72
- [2] Forst S, Nealson K. Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp.[J]. Microbiological Reviews 1996, 60(1): 21-43
- [3] Goodrich BH, Clarke DJ. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination[J]. Molecular Microbiology, 2007, 64(2): 260-268
- [4] Boemare N, Akhurst R. The genera *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*[A]//Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, et al. The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community[M]. Third ed. New York: Springer, 2006: 451-494
- [5] Vallet GI, Lemaitre B, Boccard F. Bacterial strategies to overcome insect defences[J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(4): 302-313
- [6] Herbert EE, Goodrich BH. Friend and foe: the two faces of *Xenorhabdus nematophila*[J]. Nature Reviews Microbiology, 2007, 5(8): 634-646
- [7] Bode HB. Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2009, 13(2): 224-230
- [8] McInerney BV, Gregson RP, Lacey MJ, et al. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., Part 1. Dithiopyrrolone derivatives with antibiotic activity[J]. Journal of Natural Products, 1991, 54(3): 774-784
- [9] McInerney BV, Taylor WC, Lacey MJ, et al. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., Part 2. Benzopyran-1-one derivatives with gastroprotective activity[J]. Journal of Natural Products, 1991, 54(3): 785-795
- [10] Thaler JO, Boyer GMH, Boemare NE. New antimicrobial barriers produced by *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. to secure the monoxenic development of entomopathogenic nematodes[J]. Symbiosis, 1997, 22 (1/2): 205-215
- [11] Ciche TA, Blackburn M, Carney JR, et al. Photobactin: a catechol siderophore produced by *Photorhabdus luminescens*, an entomopathogen mutually associated with *Heterorhabditis bacteriophora* NC1 nematodes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(8): 4706-4713
- [12] Li J, Chen G, Webster JM. Nematophin, a novel antimicrobial substance produced by *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae)[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1997, 43(8): 770-773
- [13] Li J, Chen G, Wu H, et al. Identification of two pigments and a hydroxystilbene antibiotic from *Photorhabdus luminescens*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(12): 4329-4333
- [14] Tan RX, Zou WX. Endophytes: a rich source of functional metabolites[J]. Natural Product Reports, 2001, 18(4): 448-459
- [15] Yang X, Qiu D, Zhang Y, et al. A toxin protein from *Xenorhabdus nematophila* var. *pekingensis* and insecticidal activity against larvae of *Helicoverpa armigera*[J]. Biocontrol Science and Technology, 2009, 19 (9): 943-955
- [16] Wang LX, Yang XF, Jian H, et al. Metabolites from the symbiotic entomopathogenic bacteria[J] Acta Microbiologica Sinica, 2001, 41(6): 753-756 (in Chinese)
王立霞, 杨秀芬, 简恒, 等. 昆虫病原线虫共生细菌的代谢产物[J]. 微生物学报, 2001, 41(6): 753-756
- [17] Tian B, Yang J, Zhang KQ. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, 61(2): 197-213
- [18] Yang XF, Yang HW, Jian H, et al. Medium and conditions for antibiotics production of *Xenorhabdus nematophilus*[J]. Microbiology China, 2001, 28(1): 12-16 (in Chinese)
杨秀芬, 杨怀文, 简恒, 等. 嗜线虫致病杆菌产生抗生素的培养基及条件[J]. 微生物学通报, 2001, 28(1): 12-16
- [19] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425
- [20] Li J, Chen G, Webster JM, et al. Antimicrobial metabolites from a bacterial symbiont[J]. Journal of Natural Products, 1995, 58(7): 1081-1086
- [21] Paul VJ, Frautschy S, Fenical W, et al. Antibiotics in microbial ecology: isolation and structure assignment of several new antibacterial compounds from the insect-symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp.[J]. Journal of Chemical Ecology, 1981, 7(3): 589-597
- [22] Liang X, Luo GH. Advances in the treatment of cryptococcal meningitis [J]. Epidemiology Lemology Foreign Medical Sc., 2005(4): 249-251 (in Chinese)
梁欣, 罗光汉. 新型隐球菌性脑膜炎的治疗进展[J]. 国外医学: 流行病学传染病学分册, 2005(4): 249-251
- [23] Meng XD, Fu JF, Yan XR, et al. Advances in the studies on the biocontrol of *Botrytis cinerea*[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2003(6): 472-475 (in Chinese)
孟祥东, 傅俊范, 严雪瑞, 等. 灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)生物防治研究进展[J]. 沈阳农业大学学报, 2003(6): 472-475