

PROTEIN TOKSININSEKTISIDAL DARIBAKTERIPATOGEN SERANGGA

Photorhabdus luminescens HJ

[Insecticidal Toxin Protein Produced by Entomopathogenic Bacterium

Photorhabdus luminescens HJ]

Alina Akhdiya^B, Ety Pratiwi dan I Made Samudra

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi
dan Sumberdaya Genetik Pertanian

Jl. Tentara Pelajar 3 A, Cimanggu, Bogor 16111

Telp./Fax.: (0251)337975,339793,08881490763/(0251)338820

ABSTRACT

Photorhabdus luminescens HJ is an entomopathogenic bacterium that has a high toxicity against *Tenebrio molitor* larvae. Toxicity assay of crude extra cellular protein precipitated using ammonium sulphate showed that the highest toxin activity was found in 70 % saturation. Purification of the toxin using Hi Prep 16/60 Sephacryl S-200 HR column exhibited one fraction of toxic protein and three fractions of non-toxic protein. Mortality of *T. molitor* larvae treated with 19.2 nanogram of toxic fraction was up to 80%. Denatured protein analysis using sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis revealed that the toxic fraction was composed of three proteins, which were 19.5, 42, and 66 kDa respectively. Based on toxin activity bioassay, this toxin type was an injectable toxin and presumably classified as Mcf toxin.

Kata kunci: Entomopatogen, bakteri patogen, *Photorhabdus luminescens*, toksisitas protein, larva serangga *Tenebrio molitor*, bioesei.

PENDAHULUAN

Kekhawatiran akan timbulnya resistensi serangga terhadap tanaman transgenik yang mengekspresikan α -endotoksin pada masa kini maupun masa yang akan datang telah membangkitkan pengembangan pengelolaan resistensi di antaranya melalui penggunaan toksin alternatif secara pergantian baik spasial dan temporal, atau dengan teknik *pyramiding* yaitu melalui ekspresi beberapa toksin (koekspresi) pada satu tanaman transgenik (Blackburn *et al.*, 1998).

Hal ini mendorong maraknya pencarian sumber-sumber gen resistensi/ toksin alternatif dari berbagai organisme. Salah satu bakteri yang dewasa ini banyak dikaji sebagai sumber gen resistensi adalah *Photorhabdus luminescens* (Bowen dan Ensign, 1998; Brown *et al.*, 2006; Duchaud *et al.*, 2003). *Photorhabdus* merupakan bakteri Gram negatif yang secara alami bersimbiosis dengan nematoda patogen serangga *Heterorhabditis*. Simbiosis antara bakteri dan nematoda ini telah lama digunakan sebagai agen pengendalian hayati untuk serangga hama yang hidup di tanah termasuk kumbang penggerek dan lepidoptera (Hazire/a/.,2003).

P. luminescens sangat patogenik terhadap

serangga baik dalam keadaan bebas maupun bersimbiosis dengan nematoda (Guo *et al.*, 1999). Patogenesisitas tersebut disebabkan oleh beberapa produk ekstraselular yang dikeluarkan oleh bakteri saat memasuki fase stasioner. Produk ekstraselular itu di antaranya adalah fosfolipase, lipase, protease dan beberapa antibiotik, kompleks protein toksin (*toxin complex*) berberat molekul tinggi, lipopolisakarida (LPS), serta berbagai macam antibodi (Forst dan Nealson, 1996).

Penelitian-penelitian lebih lanjut membuktikan bahwa ternyata kompleks protein toksin berberat molekul tinggi saja (tanpa aktivitas lipase dan protease) juga menyebabkan tingkat mortalitas yang tinggi jika disuntikkan ke dalam tubuh serangga atau dicampurkan pada makanan larva serangga (Bowen dan Ensign, 1998). Hal ini mendorong penggunaan gen toksin insektisidal dari bakteri ini sebagai bahan perakitan tanaman transgenik. Integrasi gen toksin insektisidal ini di antaranya telah berhasil dilakukan pada tanaman *Arabidopsis thaliana*. Ekspresi gen ini dapat melindungi tanaman transgenik tersebut dari larva *Manduca sexta* yang digunakan sebagai larva uji (Liu, *et al.*, 2003).

Tujuan penelitian ini adalah untuk memurnikan

dan menentukan berat molekul protein toksin insektisidal dari bakteri indigenus *P. luminescens* HJ yang diisolasi dari daerah Pelabuhan Raru Sukabumi. Penelitian ini merupakan bagian dari eksplorasi isolat-isolat lokal sebagai agen pengendali dan sumber gen resistensi terhadap serangga hama.

BAHAPANMETODE

Isolat dan pengkulturannya

P. luminescens HJ merupakan bakteri koleksi Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian-Bogor, yang diisolasi dari tanah asal Pelabuhan Ratu Sukabumi. Bakteri diremajakan pada media Nutrient Bromthymol Blue Tetrazolium Choride Agar (NBTA dengan komposisi NB 8 g/1, Bromothymol Blue 0,025 g/1, Triphenyltetrazolium Chloride 0,04 g/1). Produksi protein insektisidal dilakukan dengan menginokulasikan 1 ml kultur cair dalam 500 ml media kaldu Luria Bertani (LB dengan komposisi NaCl 10 g/1, tripton 10 g/1, yeast extract 5 g/1). Inkubasi dilakukan pada suhu ruang selama 48 jam sambil dikocok menggunakan *rotary orbital shaker* pada kecepatan 125 rpm.

Pemurnian protein toksin insektisidal

Setelah diinkubasi selama 48 jam, kultur disentrifugasi pada 15.000 rpm pada suhu 4 °C selama 30 menit. Pelet dibuang kemudian supernatan ditambah amonium sulfat sedikit demi sedikit hingga tercapai tingkat saturasi yang diinginkan (60,70, dan 80 persen) sambil diaduk dengan batang pengaduk magnet. Setelah disimpan semalam di dalam refrigerator, campuran tersebut disentrifugasi pada suhu 4°C dan kecepatan 17.000 rpm selama 30 menit. Pelet yang diperoleh dilarutkan dalam larutan PBS pH 7,3 (NaCl 8 g/1, KCl 0,2 g/1, Na₂HPO₄ 1,15 g/1, KH₂PO₄ 0,2 g/1) kemudian dialisis selama semalam dalam bufer yang sama. Pemurnian protein toksin dilakukan dengan perangkat kromatografi AKTA Purifier (Pharmacia) menggunakan kolom Hi Prep 16/60 Sephacryl S-200 *High Resolution* (HR). Elusi protein toksin dilakukan dengan larutan PBS pH 7,3 pada kecepatan alir 0,3 ml/menit. Proses elusi diikuti dengan detektor pada panjang gelombang 280 nm dan fraksi yang keluar ditampung secara otomatis *dengan fraction collector*.

Penentuan konsentrasi protein

Penentuan konsentrasi protein dalam supernatan dilakukan berdasarkan metode Bradford (1976) dengan menggunakan pereaksi *Protein ass* (Biorad.USA).

Analisis elektroforesis dengan SDS PAGE

Elektroforesis protein dilakukan pada *homogenous* gel 12,5%. Sampel dan standar protein dipanaskan masing-masing selama 10 menit dan 5 menit Kemudian sebanyak 20 μ l campuran tersebut dimasukkan ke dalam sumur pada gel penahan Elektroforesis dijalankan pada tegangan 100 volt selama 2 jam. Visualisasi hasil elektroforesis dilakukan dengan teknik pewarnaan Coomassie Brilliant Blue. Ge direndam dalam larutan TCA 20% selama 15 menit, lalu diwarnai dengan Coomassie Brilliant Blue R-250 selama 15 menit. Perendaman dan pewarnaan dilakukan sambil digoyang konstan. Kelebihan warna dihilangkan dengan merendam gel dalam larutan metanohasair. asetat:akuades (1:1:8) sampai diperoleh pita-pita protein berwarna biru dengan latar belakang jernih. Kurva standar protein berat molekul rendah dibuat dengan memplotkan nilai log BM (Berat Molekul) dan Rf. Nilai Rf ditentukan dengan rumus berikut:

$$Rf = \frac{\text{jarak pergerakan pita dari gel pemisah}}{\text{jarak pergerakan biru bromofenol dari gel pemisah}}$$

Berat molekul protein ditentukan dengan menghitung nilai Rf dan dimasukkan ke dalam persamaan kurva standar.

Bioesei

Bioesei toksin kasar (cairan kultur) dan toksin murni dilakukan secara oral maupun injeksi langsung ke hemokol larva *Tenebrio molitor* (instar 3-4). Bioesei secara injeksi dilakukan dengan menyuntikkan 1 μ l toksin melalui intersegmen hingga masuk ke hemokol (Brown, *et al.*, 2004). Pada bioesei secara oral, sebanyak 250 μ l toksin kasar atau murni diteteskan pada 1 gram makanan buatan dengan komposisi sebagaimana diuraikan oleh Miyahara (1977). Penetasan dilakukan secara bertahap sehingga toksin benar-benar terserap. Pelet yang telah diberi toksin dikering-anginkan dalam laminar air-flow sebelum diberikan pada larva uji. Untuk setiap ulangan perlakuan dipergunakan 15 larva.

Sebagai kontrol negatif, larva disuntik dengan 1 ml larutan PBS atau diberi makan buatan yang telah ditetesi PBS. Setiap perlakuan diulang tiga kali. Larva yang telah disuntik ditempatkan dalam cawan petri dan diberi pelet sebagai makanannya. Pengamatan terhadap jumlah larva yang mati dilakukan selama 2 hari.

HASIL

Pengendapan protein toksin kasar

P. luminescens HJ merupakan bakteri patogen serangga yang memiliki toksisitas tinggi terhadap larva serangga uji *Tenebrio molitor*. Uji toksisitas dengan teknik injeksi hemolimfa yang dilakukan menunjukkan bahwa baik sel maupun cairan kultur isolat tersebut sangat toksik terhadap larva serangga uji (Pratiwi *et al.*, 2005).

Sebagai tahap awal dalam pemurnian protein, dilakukan optimasi pengendapan dengan garam ammonium sulfat. Hasil pengendapan pada berbagai tingkat kejenuhan amonium sulfat disajikan pada Tabel 1.

Hasil pengendapan protein cairan kultur pada kejenuhan ammonium sulfat 60%, 70%, dan 80% menunjukkan bahwa semakin tinggi tingkat kejenuhan, semakin tinggi *recovery* total proteinnya (Tabel 1). Namun total protein *recovery* tinggi belum tentu identik dengan aktivitas toksin insektisidal yang tinggi. Oleh karena itu untuk mengetahui kejenuhan yang efektif untuk mengendapkan toksin insektisidal harus dilakukan bioesei. Hasil bioesei toksin kasar tersebut dipaparkan pada Tabel 2.

Untuk membantu penentuan tingkat kejenuhan optimum pengendapan protein toksin, dilakukan pendugaan konsentrasi toksin kasar yang menghasilkan tingkat mortalitas yang sama dengan cara meregresikan data pada Tabel 2 menggunakan

persamaan regresi linier. Tingkat mortalitas yang dipilih adalah 50%. Hal ini dilakukan tanpa menggunakan analisa probit karena toksin yang dipakai masih kasar dan tujuan dari perlakuan bukan untuk menentukan LD₅₀. Oleh karena itu agar tidak menimbulkan kerancuan dengan definisi LD₅₀, maka untuk keperluan ini digunakan simbol MC₅₀. Persamaan regresi linier dan nilai MC₅₀ untuk masing-masing tingkat kejenuhan amonium sulfat tersaji pada Tabel 3 berikut ini.

Pemurnian protein toksin kasar dengan kolom Hi Prep 16/60 Sephacryl S-200 HR menghasilkan 4 fraksi yaitu P1, P2, P3 dan P4 (Gambar 1). P1 mulairelusi pada menit ke 120 dan mencapai puncaknya pada menit ke 129. Puncak fraksi P2, P3 dan P4 berturut-turut masing-masing tercapai pada menit ke 174, 268 dan 374.

Berdasarkan kromatogram tersebut, maka masing-masing puncak fraksi diuji toksisitasnya dengan bioesei secara oral maupun injeksi. Konsentrasi fraksi protein toksin yang disuntikkan ke larva sebesar $1,95 \times 10^{-2}$ ig/il. Hasil bioesei secara injeksi menunjukkan bahwa hanya P1 yang bersifat toksik, sedangkan ketiga fraksi lainnya tidak toksik (Tabel 4). Berbeda dengan hasil bioesei yang dilakukan dengan teknik injeksi hemolimfa, uji toksisitas yang dilakukan secara oral ternyata tidak memberikan hasil yang diharapkan. Sampai akhir pengamatan, tidak satupun larva yang mati akibat perlakuan tersebut (data tidak ditampilkan).

Hasil elektroforesis fraksi toksin memunculkan tiga pita protein (Gambar 2) dengan perkiraan berat molekul 19,5 kDa, 42 kDa, dan 66 kDa.

PEMBAHASAN

P. luminescens HJ merupakan bakteri patogen serangga yang memiliki toksisitas tinggi terhadap larva

Tabel 1. Hasil pengendapan protein dalam supernatan serta nilai *recovery*-nya

Sampel	Kejenuhan fNH ₄ SO ₄ (%)	SuiKtnatan		Qalisat		Total Protein Recovery (%)
		Volume (ml)	Konserirasi Protein (mgM)	Volume (ml)	Konsenteasi Protein (mp/mD)	
HT	60	75ml	0,05282	1,15	1,769	51,35
	70			1,225	2,737	84,64
	80			1,55	2,196	85,92

Tabel 2. Hasil bioesei toksin kasar terhadap larva *T. molitor*

(NH ₂ SO ₄ (%))	Konsentrasi Protein (mg/ml)	Mortalitas Larva (%)±SE
60	0,025	42 [^] ±2.2
	0,050	51,1 ±2.2
	0,125	82,0 ±2.2
	0,250	95,0 ±2.2
70	0,025	49,7 ±3.8
	0,050	66,6±0
	0,125	88,3 ±2.2
	0,250	100,0 ±0
80	0,025	41,7 ±2.2
	0,050	60,0±0
	0,125	86,3 ±3.8
	0,250	97,7 ±2.2
Kontrol (PBS)	0	0±0

Keterangan: SE = Standar error

Tabel 3. Perkiraan konsentrasi total protein yang dapat membunuh 50% larva serangga uji berdasarkan plot konsentrasi terhadap persen mortalitas menggunakan persamaan regresi linier.

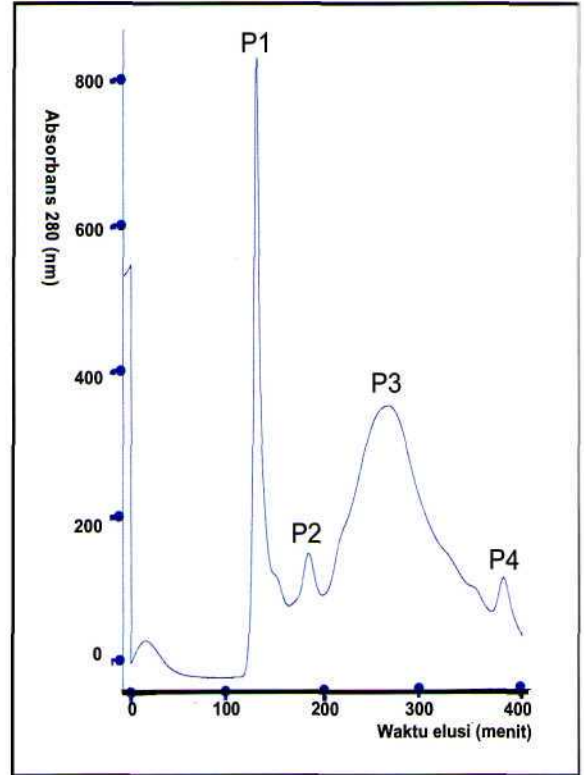
Kejuhan (NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	Persamaan regresi linier	MC50 (mg/ml)
60	$Y = 0,4x + 31,3$	0,046
70	$Y = 363,69x + 43,954$	0,017
80	$Y = 424x + 34,4$	0,037

* persamaan diperoleh dari perhitungan terhadap 3 tingkatan konsentrasi protein (0.025, 0.05, dan 0.125 mg/ml)

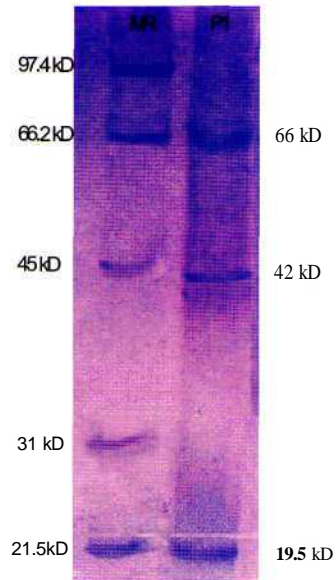
Tabel 4. Toksisitas fraksi hasil pemurnian terhadap larva *T. molitor*

Fraksi	Mortalitas (%)	SE
P1	80	0
P2	0	0
P3	0	0
P4	0	0

Keterangan: SE = Standar Error



Gambar 1. Kromatogram cairan kultur HJ setelah melewati kolom Hi Prep 16/60 Sephacryl S-200 HR



Gambar 2. SDS PAGE dari hasil pemurnian toksin isolat HJMR: standar protein berat molekul rendah, P1: Fraksi P1.

serangga uji *Tenebrio molitor*. Uji toksisitas dengan teknik injeksi hemolimfa yang dilakukan menunjukkan bahwa baik sel maupun cairan kultur dari kedua isolat tersebut sangat toksik terhadap larva serangga uji (Pratiwi *et al.*, 2005). Untuk mengetahui potensi penggunaannya, maka perlu dilakukan pengkajian terhadap toksin insektisidal yang dihasilkan oleh bakteri tersebut.

Hasil pengendapan protein cairan kultur pada kejenuhan ammonium sulfat 60%, 70%, dan 80% menunjukkan bahwa semakin tinggi tingkat kejenuhan, semakin tinggi recovery total proteinnya (Tabel 1). Namun total protein recovery tinggi belum tentu identik dengan aktivitas toksin insektisidal yang tinggi. Oleh karena itu untuk mengetahui kejenuhan yang efektif dan efisien untuk pengendapan protein toksin insektisidal harus dilakukan bioesei. Bioesei dilakukan pada empat seri konsentrasi protein karena diharapkan diantara konsentrasi tersebut terdapat konsentrasi yang memberikan tingkat mortalitas yang rendah, sedang, serta 100%.

Berdasarkan hasil regresi linear konsentrasi toksin terhadap persen mortalitas larva, diperkirakan untuk membunuh 50% larva diperlukan protein hasil pengendapan amonium sulfat 60%, 70%, dan 80% berturut-turut sebanyak 0,046, 0,017, dan 0,037 mg/ml (Tabel 3). Data tersebut menunjukkan bahwa pengendapan pada kejenuhan 70% paling optimum untuk protein toksin insektisidal karena untuk membunuh 50% larva diperlukan konsentrasi protein paling rendah. Hal ini disebabkan karena pada kejenuhan 60% masih banyak protein toksin yang belum terendapkan, sedangkan pada kejenuhan 80% lebih banyak protein lain yang terendapkan.

Pemurnian protein toksin kasar hasil dialisis dengan kolom Hi Prep 16/60 Sephacryl S-200 HR menghasilkan beberapa 4 fraksi, yaitu P1, P2, P3, dan P4. Dari keempat fraksi tersebut ternyata hanya P1 yang mengandung toksin. Sedangkan P2, P3, dan P4 merupakan fraksi non-toksin karena tidak mampu membunuh larva pada bioesei yang dilakukan.

Hingga kini telah diketahui 3 kelas toksin insektisidal *Photorhabdus* yang terkarakterisasi dengan baik. Kelas pertama terdiri dari toksin kompleks yang aktif secara oral terhadap larva serangga hama

(Bowen *et al.*, 1988). Saat ini para peneliti di luar negeri sedang menggunakan toksin jenis ini untuk merakit tanaman transgenik (Liu *et al.*, 2003). Toksin "Makes caterpillar floppy" (Mcf1 dan Mcf2) merupakan kelas toksin kedua. Mcf adalah toksin yang aktif bila diinjeksikan ke larva serangga (Daborn, *et al.*, 2002; Waterfield *et al.*, 2003). Kelas ketiga dan terbaru adalah "Photorhabdus insect-related protein" (PirAB). Kelompok toksin ini bersifat biner karena aktif bila diberikan secara injeksi (Waterfield *et al.*, 2005) maupun oral pada beberapa serangga (Duchaud *et al.*, 2003). Namun jika dilihat dari sekuen genomnya, selain ketiga kelas toksin tersebut *Photorhabdus* juga diperkirakan memproduksi berbagai toksin insektisidal lain yang sampai saat ini masih belum diketahui (Yang *et al.*, 2006).

Berdasarkan data bioesei yang diperoleh (Tabel 4) pada penelitian ini serta pengkelasan toksin insektisidal tersebut, maka toksin *P. luminescens* HJ yang diperoleh dari pemurnian ini termasuk toksin Mcf (kelas kedua) karena bersifat toksik jika diberikan secara injeksi tapi tidak toksik secara oral. Di samping itu, hasil amplifikasi DNA dengan menggunakan primer yang spesifik untuk gen *mcf* juga menunjukkan hasil positif (Pratiwi, *et al.*, 2005). Ditinjau dari tipe aktivitasnya, maka toksin ini tidak cocok digunakan sebagai bahan perakit tanaman transgenik, karena tidak aktif secara oral. Walaupun demikian tidak berarti bahwa *P. luminescens* HJ tidak memiliki atau tidak dapat memproduksi jenis/ kelas toksin lainnya, karena secara genetik species bakteri ini memiliki gen-gen toksin lainnya sebagaimana diuraikan diatas. Kuantitas dan stabilitas toksin yang rendah serta kondisi fisiologis yang tidak sesuai diduga menjadi salah satu penyebab tidak terdeteksinya jenis toksin oral yang mungkin dapat dihasilkan oleh bakteri ini.

Analisa SDS-PAGE fraksi P1 cairan kultur *P. luminescens* HJ menghasilkan tiga pita protein (Gambar 2) dengan perkiraan berat molekul yaitu 19,5 kDa, 42 kDa, dan 66 kDa. Ketiga pita protein yang diperoleh pada penelitian ini belum diketahui apakah masing-masing merupakan sub unit penyusun dari suatu toksin insektisidal atau masing-masing memiliki aktivitas toksin tersendiri. Publikasi tentang protein toksin *Photorhabdus* menunjukkan berat molekul protein

toksin yang bervariasi dalam kisaran yang cukup besar. Pada tahun 1998, Daborn dan Ensign melaporkan kompleks toksin tipe injeksi dari isolat *P. luminescens* yang terdiri dari beberapa pita protein dengan BM mulai dari 30 kDa sampai lebih dari 212 kDa (Bowen dan Ensign, 1998). Salah satu toksin Mcf dari *P. luminescens* W14 yang telah berhasil diklon pada *E.coli* merupakan protein tunggal berukuran 324 kDa (Daborn *et al.*, 2002). Selain toksin-toksin tersebut, dilaporkan juga adanya suatu toksin tipe injeksi berukuran 42 kDa yaitu Txp40 yang diproduksi oleh *Xenorhabdus* maupun *Photorhabdus* (Brown *et al.*, 2006).

Oleh karena itu diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui apakah masing-masing pita protein toksin *P. luminescens* HJ bersifat toksik, atau merupakan sub unit penyusun dari suatu toksin insektisidal yang bersifat multimerik.

KESIMPULAN

Patogenisitas *Photorhabdus luminescens* HJ terhadap larva *Tenebrio molitor* disebabkan oleh protein toksin insektisidal yang diekspresikannya. Presipitasi optimum protein toksin dengan menggunakan amonium sulfat tercapai pada kejenuhan 70%. Pemurnian protein toksin menggunakan kolom Hi Prep 16/60 Sephacryl S-200 HR menghasilkan satu fraksi protein toksin. Analisa SDS-PAGE menunjukkan bahwa fraksi toksin tersebut terdiri dari tiga protein dengan beratmolekul 19,5, 42 dan 66 kDa. Berdasarkan bioesei, toksin insektisidal tersebut termasuk kelompok Mcf atau toksin tipe injeksi.

UCAPAN TERMAKASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari Proyek Penelitian APBN di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB Biogen) Tahun Anggaran (TA) 2005.

DAFTAR PUSTAKA

- Blackburn M, E Golubeva, D Bowen and RH Ffrench-Constant. 1998. A novel insecticidal toxin from *Photorhabdus luminescens*, toxin complex a (Tca), and its histopathological effects on the midgut of *Manduca sexta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64,3036-3041.
- Bowen DJ and JC Ensign. 1998. Purification and characterization of a High-molecular-weight insecticidal protein complex produced by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3029-3035.
- Bowen D, TA Rocheleau, M Blackburn, O Andreev, E Golubeva, R Bhartia and Ffrench-Constant RH. 1988. Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Science* 280,2129-2132.
- Brown SE, AT Cao, ER Hines, RJ Akhrust and PD East 2004. A novel secreted protein toxin from the insect pathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophila*. *The J. Biol. Chem.* 279,14595-14601.
- Brown SE, AT Cao, P Dobson, ER Hines, RJ Akhrust and PD East 2006. Txp40, a ubiquitous insecticidal toxin protein from *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 72,1653-1662.
- Daborn, PJ, N Waterfield, CP Silva, CPY Au, S Sharma and RH Ffrench-Constant. 2002. A single *Photorhabdus* gene, *makes caterpillars floppy (mcf)*, allows *Escherichia coli* to persist within and kill insects. *PNAS.* 99, 10742-10747.
- Duchaud E, C Rusniok, L Frangeul, C Buchrieser, A Givaudan, S Taourit, S Bocs, C Boursaux-Eude, M Chandler, JF Charles, E Dassa, R Derose, S Derzelle, G Freyssinet, S Gaudriault, C Medigue, A Lanois, K Powell, P Siguier, R Vincent, V Wingate, M Zouine, P Glaser, N Boemare, AA Danchin and F Kunst. 2003. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Nat. Biotechnol.* 21,1307-1313.
- Forst S and K Neelson. 1996. Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. *Microbiol. Rev.* 60, 21-43.
- Guo L, RO Fattig III, GL Orr, BW Schafer, JA Strickland, K Sukhapinda, AA Woodsworth and JK Petell. 1999. *Photorhabdus luminescens* W-14 insecticidal activity consists of at least two similar but distinct proteins. *The J. Biological Chemistry* 274, 9836-9842.
- Hazir S, HK Kaya, SP Stock and N Keskin. 2003. Entomopathogenic nematodes (*Steinernematidae* and *Heterorabtididae*) for biological control of soil pests. *Turk J. Biol.* 27, 181-202.
- Liu D, S Burton, T Glancy, ZS Li, R Hampton, T Meade and DJ Merlo. 2003. Insect resistance conferred by 283-kDa *Photorhabdus luminescens* protein TcdA in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Biotechnol.* 21,1222-1228.
- Miyahara Y. 1977. Rearing method of Spodoptera litura by artificial diet. *Annual Report Kyushu Nat. Agric. Expt. Sta.*, 34-37.
- Pratiwi E, A Akhdiya dan IM Samudra. 2005. Eksplorasi Gen Penyandi Toksin Insektisidal dari Bakteri S imbion Nematoda Patogen Serangga. *Laporan Hasil Penelitian Balai Besar Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian Tahun 2005.*
- Waterfield NR, PJ Daborn, AJ Dowling, G Yang, M Hares

and RH Ffrench-Constant. 2003. The insecticidal toxin makes caterpillar floppy 2 (Mcf2) show similarity to HrmA, an avirulence protein from a plant pathogen. *FEMS Microbiol. Lett.* **229**, 265-270.

Waterfield N, SG Kamita, BD Hammock and RH Ffrench-Constant. 2005. The *Photorhabdus* Pir toxins are similar to a developmentally regulated

insect protein but show no juvenile hormone esterase activity. *FEMSMicrobiol. Lett.* **229**,265-270.

Yang G, AJ Dowling, U Gerike, RH Ffrench-Constant and NR Waterfield. 2006. *Photorhabdus* virulence cassettes confer injectable insecticidal activity against the wax moth. *J.Bacteriol.* **188**,2254-2261.