

胡宗浩, 方文婉, 周晓彤, 等. 黏质沙雷氏菌次生代谢产物杀灭松材线虫效果[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(19): 183–186.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.19.041

黏质沙雷氏菌次生代谢产物杀灭松材线虫效果

胡宗浩¹, 方文婉², 周晓彤², 何伟¹

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏南京 210046; 2. 南京师范大学中北学院, 江苏南京 210046)

摘要:为寻找研制新型绿色杀线虫生物制剂, 首次报道利用灵菌红素(prodigiosin, 简称 PGN)对混合虫龄松材线虫的生物活性, 灵菌红素是一种广泛分布于环境中的黏质沙雷氏菌的次生代谢产物, 试验测定不同浓度下灵菌红素的杀线虫活性及对松材线虫卵孵化率的影响。离体杀虫试验结果表明, 灵菌红素对松材线虫各虫龄段都有较高的生物活性, 32 h 时的 LC_{50} 为 (90.24 ± 1.41) mg/L, 阳性对照组硫酸铜的 LC_{50} 为 (60.60 ± 1.48) mg/L; 在离体虫卵孵化率测定试验中, 灵菌红素在较低浓度时就已经表现出较高的生物活性, 浓度为 9.5 mg/L 时, 卵的孵化率仅为 45.5%, 与此同时, 对照组的孵化率为 97.6%。灵菌红素以其杀虫效率高、环境污染小、来源广泛等优势, 在农林业生产中有极好的应用前景。

关键词:黏质沙雷氏菌; 次生代谢; 灵菌红素; 松材线虫; 孵化率; 杀虫活性; 生物活性; 应用前景

中图分类号: S432.4⁺5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)19-0183-04

植物寄生线虫是农林作物的主要病原物之一, 线虫病在世界各地普遍发生, 会对经济造成严重损失。松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)所到之处, 松树迅速成片枯萎, 对林业生产构成极大的威胁^[1]。全世界每年因松材线虫危害对农林业造成的损失超过 1 250 亿美元^[2]。1982 年中国首次

报道发现由松材线虫引起的松树枯萎病, 自此松材线虫在全国迅速扩散, 对农林业造成严重的影响^[3]。尽管人类在防治上已经作出了巨大的努力, 但收效甚微, 其危害范围仍在不断扩大^[4]。目前对松材线虫病的防治主要通过化学手段, 常用的化学药剂有丰索磷、乙拌磷、治线磷、灭线磷、虫线清等, 然而丰索磷、乙拌磷、治线磷等都是毒性较高的有机磷农药, 对哺乳动物存在严重的安全隐患^[5]。所以, 目前迫切须要找到一种环境友好型的杀虫剂。

灵菌红素(prodigiosin, 简称 PGN)是一类天然红色素家族的总称, 由多种细菌(沙雷氏菌、假单胞菌)和放线菌(链霉菌)产生的一类次级代谢产物^[6]。已有的研究结果显示, 灵菌红素在抗真菌^[7]、抗原生动物^[8]、抗癌^[9]、杀虫^[10]等方面都

收稿日期: 2016-05-09

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 41301564); 江苏高校优势学科建设工程。

作者简介: 胡宗浩(1995—), 男, 安徽芜湖人, 主要从事环境微生物技术研究。E-mail: huzonghao321@126.com。

通信作者: 何伟, 博士, 副教授, 主要从事环境微生物技术研究。E-mail: myway@njnu.edu.cn。

acid and its derivatives against plant pathogenic fungi[J]. Pest Management Science, 2010, 66(8): 825–831.

[8] 黄光强. 用木荷树皮粉末作为非杀伤性驱散武器填充剂的设想[J]. 森林公安, 2002(2): 20.

[9] 陈冀胜, 郑 硕. 中国有毒植物[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 584–586.

[10] 骆 悦, 曾鑫年, 居建华, 等. 40 种植物甲醇提取物的杀螺活性研究[J]. 植物保护, 2005, 31(1): 31–34.

[11] 邓志勇, 邓业成, 刘艳华. 木荷提取物对小菜蛾和菜青虫的拒食活性[J]. 农药, 2007, 46(12): 854–856.

[12] 邓志勇, 邓业成, 刘艳华, 等. 60 种植物提取物对小菜蛾的杀虫活性筛选[J]. 河南农业科学, 2007, 36(9): 57–60.

[13] 严 伟. 抗稻瘟病菌植物源提取物组方研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2011.

[14] Saha S, Walia S, Kumar J, et al. Screening for feeding deterrent and insect growth regulatory activity of triterpenic saponins from *Diploknema butyracea* and *Sapindus mukorossi* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(1): 434–440.

[15] 周小燕, 王德凤, 姜于兰. 不同杀菌剂对柑橘煤烟病菌的室内毒力测定[J]. 南方农业学报, 2011, 42(9): 1062–1065.

[16] 陈 立, 徐汉虹, 赵善欢. 应用均匀设计获取复配农药最佳增效配方[J]. 华南农业大学学报, 2000, 21(3): 33–35.

[17] 张国权, 吕小欢, 罗志刚. 均匀设计的方法与应用[J]. 华南农业大学学报, 1998, 19(2): 91–96.

[18] 李秀昌, 韩曦英, 孙 健. 利用 DPS 数据处理系统进行均匀试验设计与分析[J]. 中国卫生统计, 2010, 27(2): 201–203.

[19] 中华人民共和国农业部. 农药室内生物测定实验准则 杀菌剂 第 6 部分: 混剂的联合作用测定: NY/T 1156.1—2006 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.

[20] 盛 姣. 十八烷基三甲基氯化铵对稻瘟病菌生物活性及作用机理研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2006.

[21] 孙澈沁. 水稻稻瘟病及其防治[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.

[22] 国家质量技术监督局. 农药 田间药效试验准则(一) 杀菌剂防治禾谷类种传病害: GB/T 17980.19—2000 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2000.

[23] 黄 星. 水稻稻瘟病菌对三环唑的抗性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2002.

[24] 车淑静. 黑龙江省稻瘟病菌对稻瘟灵和三环唑的敏感性研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2008.

具有优良表现。试验发现,灵菌红素在同样浓度下对爪哇根结线虫和香蕉穿孔线虫的杀害作用优于硫酸铜^[11]。

本试验通过黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)生产灵菌红素,并对其进行分离纯化和鉴定,进而研究灵菌红素对松材线虫的杀虫活性,为获得新型的绿色杀虫剂提供技术指导。

1 材料与方法

1.1 材料

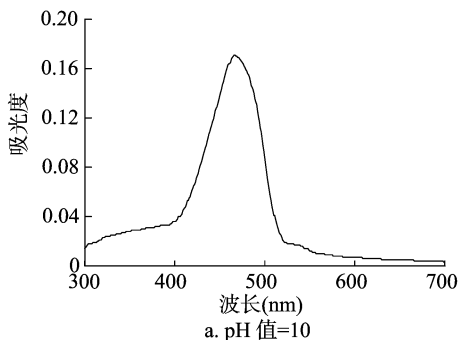
黏质沙雷氏菌为笔者所在实验室保藏,供试松材线虫及其培养所需的灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)均由南京师范大学微生物所惠赠。

仪器:GWT-P270A 恒温培养箱(合肥达斯卡特科学器材有限公司);722S 型可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司);高速冷冻离心机(Eppendorf 公司);YS2-H 显微镜(Nikon 光学仪器有限公司);UV-1800PC 全波长光谱扫描紫外可见分光光度计(上海美谱达公司)。

1.2 方法

1.2.1 灵菌红素的分离与纯化 将黏质沙雷氏菌涂布于 LB 培养基上,于 30 ℃ 下培养 2 d,用双蒸水洗脱菌体后 8 000 r/min 离心 10 min,收集菌体和蛋白沉淀物,按体积比 1:10 在离心沉淀物中加入 pH 值为 3 的酸性甲醇溶液,萃取灵菌红素。再通过离心后,获取上清液,将上清液与三氯甲烷以体积比 2:1 混合均匀后,在分液漏斗中萃取。得到灵菌红素的三氯甲烷溶液,以正己烷与乙酸乙酯的混合液(体积比 1:1)为流动相,经硅胶柱层析,除去蛋白质、多糖、黄色素等杂质,洗脱液经过旋转蒸发浓缩得到灵菌红素样品。将得到的样品进行紫外全波长扫描鉴定。

1.2.2 线虫的培养 将灭菌后的 PDA 培养基(马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 15 g、1 L 蒸馏水)趁热在超净工作台上制成平板,待冷却,接种灰葡萄孢,在 25 ℃ 培养箱中黑暗培养至菌株长满平皿时备用^[12]。在无菌操作台上挑取少量松材线虫,放入培养好的灰葡萄孢培养基中。然后置于 25 ℃ 培养箱中黑暗培养 5 d 左右,采用布氏漏斗法获得大量混合虫龄的线虫,无菌水洗涤离心后,得到 10 000 条/mL 线虫悬液^[13]。



1.2.3 离体杀虫活性测定 以二甲基亚砷(DMSO)为助溶剂,以无菌水为溶剂配制最高浓度为 200 mg/L 的灵菌红素溶液,并按梯度稀释得到 5 个浓度的药剂,分别为 200.0、100.0、50.0、25.0、12.5 mg/L(DMSO 终浓度应小于 1%);以硫酸铜为阳性对照,浓度梯度相同,为 200.0、100.0、50.0、25.0、12.5 mg/L;以 1% DMSO 水溶液为对照组(CK)。每个浓度处理设置 4 个重复,每个重复取 150 μL 供试药剂加入 96 孔板中,而后加入混合均匀的线虫悬液 50 μL/孔。最终灵菌红素的浓度梯度为 150.0、75.0、37.5、19.0、9.5 mg/L,硫酸铜的浓度梯度为 150.0、75.0、37.5、19.0、9.5 mg/L,处理 0、8、16、24、32 h 时进行镜检,计算死亡率。

1.2.4 离体虫卵孵化率测定 用 DMSO 作助溶剂(终浓度应小于 1%),以无菌水为溶剂配制最高浓度为 300 mg/L 的灵菌红素溶液,并按梯度稀释得到 5 个浓度的药剂,分别为 300.0、150.0、75.0、37.5、19.0 mg/L。以 1% DMSO 水溶液为对照组(CK)。每个浓度处理设置 4 个重复,每个重复取 150 μL 供试药剂加入 96 孔的孔板中。而后加入混合均匀的线虫卵悬液 150 μL/孔,最终灵菌红素的浓度梯度为 150.0、75.0、37.5、19.0、9.5 mg/L。处理 24 h 后,检测每组线虫卵的孵化率。

1.2.5 数据分析 应用 SPSS 软件得出各处理与对照的差异显著性,利用 Excel 软件分析得出供试药剂的毒力回归方程式、致死中浓度 LC₅₀ 值及 LC₉₀ 值,利用 Origin 8.0 软件处理得到各处理的柱形图;用 SPSS 22.0 软件,通过单因素方差分析 LSD 检验来分析数据的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 灵菌红素的物理和化学分析

蒸发浓缩的灵菌红素溶解于甲醇中,分别用 HCl、NaOH 调整 pH 值为 3、10,在 300~800 nm 波长范围内进行全波段扫描。pH 值为 3 时,所得灵菌红素溶液在 535 nm 左右有最大吸收峰,溶液为鲜红色;pH 值为 10 时,所得灵菌红素在 466 nm 左右有最大吸收峰,溶液为橘黄色(图 1),与已报道的灵菌红素的吸收光谱^[14]一致。

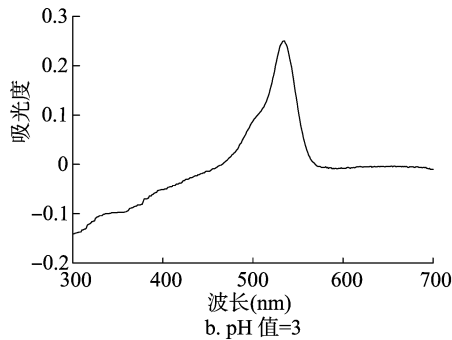


图1 灵菌红素的紫外可见吸收光谱

2.2 离体杀虫活性测定

浓度为 150.0 mg/L 的灵菌红素在处理 8 h 后,线虫的存活率仅为 20.7%,处理 24 h 后,线虫存活率为 0(图 2-A),用同样浓度的硫酸铜处理 8 h 后,线虫存活率为 24.0%,处理 24 h 后,存活率降低为 0(图 2-B);当浓度降为 75.0 mg/L

时,处理 8 h 后灵菌红素组和硫酸铜组线虫的存活率差异并不显著,分别为 22.5%、29.5%,处理 24 h 后,灵菌红素组的存活率降为 13.2%,而硫酸铜组则迅速降为 0。随着浓度继续降低,浓度为 37.5、19.0 mg/L 的灵菌红素的杀虫活性明显低于相同浓度的硫酸铜,处理 32 h 后,灵菌红素组线虫存活

率为 50.8%、52.5%，而硫酸铜组的为 3.7%、37.1%。当二者浓度继续下降到 9.5 mg/L 时，处理 32 h 后灵菌红素组的线虫存活率为 83.9%，硫酸铜组的存活率为 79.0%，对照组的存活率为 91.3%（图 2）。可以初步得出，灵菌红素在较高浓度时的杀虫活性较同浓度的硫酸铜仍有优势，当处于较低浓度时，杀虫能力有限。尽管硫酸铜的杀虫活性较强，但其作为一种重金属盐，对环境的危害较大。当进入土壤中，会对微生物的复合生态产生不可逆的影响^[14]。进入水体后，会产生更严重影响，水中的鱼类会对 Cu^{2+} 进行富集，进而通过食物

链进入人体，使人体产生重金属中毒现象^[15]。而灵菌红素作为一种微生物的次生代谢物，即使在较高浓度时，对生态环境中的微生物区系和植物区系都不会产生不利影响^[16]。并且灵菌红素具有光解特性，较高浓度的灵菌红素在产生效用之后，被逐渐稀释，而低浓度的灵菌红素在正常光照度下会被缓慢光解，进一步减少二次污染的可能性^[17]。由此可见，灵菌红素可作为一种环境友好型的绿色药剂替代硫酸铜以及其他一些包括有机磷农药在内的对环境有害的药剂来防治松材线虫，其应用前景十分广阔。

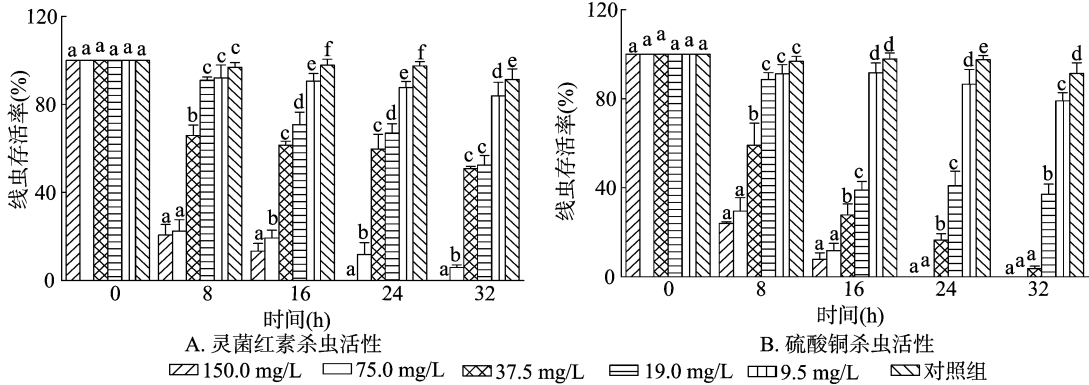


图2 灵菌红素和硫酸铜杀虫活性的比较

2.3 灵菌红素和硫酸铜的毒性比较

通过软件得到毒力回归方程，计算不同时间点对应的半致死量 (LC_{50}) 以及 90% 致死量 (LC_{90})，结果见表 1。处理 8 h 后，灵菌红素的 LC_{50} 、 LC_{90} 分别为 (58.02 ± 4.39)、(228.31 ± 67.48) mg/L；硫酸铜的 LC_{50} 、 LC_{90} 分别为 (58.80 ± 4.87)、(391.84 ± 67.77) mg/L，灵菌红素的杀虫活性略优于硫酸铜。但处理 32 h 后，灵菌红素的 LC_{50} 、 LC_{90} 分别为 (42.50 ± 1.95)、(90.24 ± 1.41) mg/L；硫酸铜的 LC_{50} 、 LC_{90} 分别为 (34.58 ± 1.37)、(60.60 ± 1.48) mg/L，硫酸铜的杀虫活性稍强于灵菌红素。

表 1 灵菌红素和硫酸铜毒性的比较

时间 (h)	灵菌红素		硫酸铜	
	LC_{50} (mg/mL)	LC_{90} (mg/mL)	LC_{50} (mg/mL)	LC_{90} (mg/mL)
8	$58.02 \pm 4.39\text{a}$	$228.31 \pm 67.48\text{a}$	$58.80 \pm 4.87\text{a}$	$391.84 \pm 67.77\text{a}$
16	$51.09 \pm 2.80\text{b}$	$152.45 \pm 23.71\text{b}$	$39.95 \pm 2.62\text{b}$	$89.51 \pm 10.33\text{b}$
24	$46.97 \pm 1.93\text{c}$	$103.90 \pm 6.27\text{c}$	$37.53 \pm 2.17\text{bc}$	$70.80 \pm 2.25\text{c}$
32	$42.50 \pm 1.95\text{d}$	$90.24 \pm 1.41\text{d}$	$34.58 \pm 1.37\text{c}$	$60.60 \pm 1.48\text{d}$

注：同列数字后不同小写字母表示相同浓度药剂作用不同时间下杀线虫活性差异显著 ($P < 0.05$)。

2.4 离体虫卵孵化率测定

由图 3 可见，对线虫卵用无菌水和不同浓度的灵菌红素处理 24 h 后，清水组的孵化率为 97.6%（48 h 后少数卵仍未孵化，可视的正常死亡的卵），最低浓度的灵菌红素（9.5 mg/L）处理 24 h 后，卵的孵化率仅为 45.5%。可见，灵菌红素在较低浓度时对卵的孵化率也能产生较大影响。随着灵菌红素浓度的上升，卵的孵化率进一步下降，当浓度上升至 150.0 mg/L 时，卵的孵化率仅为 6.0%，并且孵化的虫卵在孵化后的短时间内迅速死亡。可见，灵菌红素对卵和二龄线虫

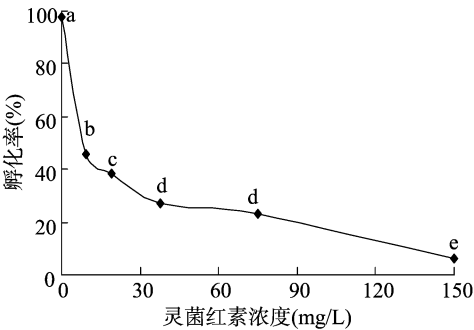


图3 灵菌红素处理 24 h 后对松材线虫卵孵化率的影响

的抑制作用更强。

3 结论与讨论

黏质沙雷氏菌被报道对部分线虫具有良好的抑制作用，通过与线虫形成共生体，进而使线虫死亡，如崇明拟异小杆线虫 (*Heterorhabditoides chongmingensis*)^[18]。但将黏质沙雷氏菌作为生防细菌直接投入到环境中对人和动物存在较大的安全隐患^[19-20]。一些报道发现，有些线虫能够识别黏质沙雷氏菌，并产生防御机制，使菌体难以进入虫体寄生，如秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*)^[21]。所以，利用黏质沙雷氏菌的次生代谢产物灵菌红素来代替菌体细胞，能够更高效且更安全的对线虫进行防治。国内外对灵菌红素的研究主要在医药方面，但近些年发现，灵菌红素在抗线虫方面也具有较好的防治效果，主要研究的线虫种类为根结线虫、香蕉穿孔线虫等^[11,22]。在防治松材线虫方面的研究仍为空白，松材线虫由于其特殊的生理结构和独特的生存环境，常规方法很难杀灭^[23-24]。本试验使用的杀虫物质灵菌红素为黏质沙雷氏菌的次生代谢产物，结果显示，当灵菌红素浓度为 150.0 mg/L

时,24 h 内能将松材线虫全部杀灭,浓度为 75.0 mg/L 时,在处理 32 h 后对松材线虫的致死率也能达到 95% 以上。以处理 24 h 的半致死量来看,灵菌红素 LC_{50} 为 46.97 mg/L,相比目前使用较广泛的杀线虫有机磷农药,如克百威 (LC_{50} = 488.47 mg/L)、灭线灵 (LC_{50} = 51.50 mg/L),无论在作用效果还是对环境的保护上,都具有更大的优势^[25]。经过多次重复试验验证,灵菌红素的杀虫活性稳定,对不同虫龄的松材线虫都具有较好的抑制作用。如果能将其投入到农林业保护的的实际应用中,势必将对世界森林松材线虫的防治产生重大影响。但目前而言,灵菌红素的产量难以达到农业生产应用的水平,并且灵菌红素的光解特性使其难以成为一种时效性的杀虫药剂。接下来,笔者将对灵菌红素的发酵工艺进行优化,药物制剂的最优配比以及安全性评价作更进一步的探究。

灵菌红素和硫酸铜杀虫活性比较试验显示,相同浓度的灵菌红素与硫酸铜的杀虫活性无明显差异,而硫酸铜作为一种常用的杀虫剂,对环境的污染太大,所以灵菌红素可作为一种有效的、绿色的新型农药制剂取代硫酸铜等对环境污染较大的农药。灵菌红素作为黏质沙雷氏菌等多种菌的次生代谢物,来源广泛,可通过发酵大量获取。

参考文献:

- [1] Wingfield M J, Blanchette R A, Nicholls T H, et al. Association of pine wood nematode with stressed trees in minnesota, iowa, and wisconsin [*Bursaphelenchus xylophilus*, *Dothistroma pini*, *Dioryctria zimmermani*, *Pinus* spp., insect vectors] [J]. Plant Diseases, 1982, 66:934 - 937.
- [2] Chitwood D J. Research on plant - parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service [J]. Pest Management Science, 2003, 59(6/7):748 - 753.
- [3] Zhao B G. Bacteria carried by the pine wood nematode and their symbiotic relationship with the nematode [J]. Pine Wilt Disease, 2008,1:264 - 273.
- [4] Daub M. Investigations on pathogenicity, invasion biology and population dynamics of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner und Buhrer 1934) Nickle 1970 in European conifers [M]. Berlin: Dissertationen Aus Dem JKI, 2011:1 - 10.
- [5] 安玉兴,徐汉虹,黄继光,等. 16% 虫线清乳油对松木中松材线虫的灭杀活性 [J]. 农药, 2009, 48(8):614 - 616.
- [6] Melvin M S, Tomlinson J T, Saluta G R, et al. Double - strand DNA cleavage by copper prodigiosin [J]. Journal of the American Chemical Society, 2000, 122(26):6333 - 6334.
- [7] Gulani C, Bhattacharya S, Das A. Assessment of process parameters influencing the enhanced production of prodigiosin from *Serratia marcescens* and evaluation of its antimicrobial, antioxidant and dyeing potentials [J]. Malays J Microbiol, 2012, 8(2):116 - 122.
- [8] Genes C, Baquero E, Echeverri F, et al. Mitochondrial dysfunction in trypanosoma cruzi; the role of *Serratia marcescens* prodigiosin in the alternative treatment of chagas disease [J]. Parasit Vectors, 2011, 4(8):263 - 272.
- [9] Tomás R P, Ruir C D, Montaner B. Prodigiosin induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in gastric cancer cell line hgt - 1 [J]. Histology and Histopathology, 2001, 16(2):415 - 421.
- [10] Patil C D, Patil S V, Salunke B K, et al. Prodigiosin produced by *Serratia marcescens* nmcc46 as a mosquito larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi* [J]. Parasitology Research, 2011, 109(4):1179 - 1187.
- [11] Rahul S, Chandrashekar P, Hemant B, et al. Nematicidal activity of microbial pigment from *Serratia marcescens* [J]. Natural Product Research, 2014, 28(17):1399 - 1404.
- [12] 贾爱玲,韩正敏,韩旭,等. 无菌松材线虫的获得及培养方法研究 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2008, 32(3):99 - 102.
- [13] Viglierchio D R, Schmitt R V. On the methodology of nematode extraction from field samples: comparison of methods for soil extraction [J]. Journal of Nematology, 1983, 15(15):450 - 444.
- [14] Wasserman H H, McKeon J E, Smith L A, et al. Studies on prodigiosin and the bipyrrrole precursor [J]. Tetrahedron, 1966, 22(S8):647 - 662.
- [15] 张倩茹,周启星,张惠文. 乙草胺与硫酸铜对黑土微生物的复合生态影响 [J]. 环境科学, 2007, 28(4):826 - 831.
- [16] 缪柳,洪俊明,林冰. 络合硫酸铜除藻剂应急治理水华对水质及鱼类的影响 [J]. 生态与农村环境学报, 2011, 27(5):63 - 66.
- [17] 刘伯雅,魏东芝,鲁思然,等. 灵菌红素对有害藻类的除藻活性研究 [J]. 中国环境科学, 2010, 30(4):477 - 482.
- [18] Zhang C X, Liu J R, Xu M X, et al. *Heterorhabditoides chongmingensis* gen. nov., sp. nov. (Rhabditida: Rhabditidae), a novel member of the entomopathogenic nematodes [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2008, 98(2):153 - 168.
- [19] Jeong H U, Mun H Y, Oh H K, et al. Evaluation of insecticidal activity of a bacterial strain, *Serratia* sp. eml - sel against diamondback moth [J]. The Journal of Microbiology, 2010, 48(4):541 - 545.
- [20] Yao C A, Wang D, Kulber D A. The story of *Serratia marcescens*: pathologic risk factors in breast implant surgery [J]. Archives of Plastic Surgery, 2014, 41(4):414 - 417.
- [21] Pradel E, Zhang Y, Pujol N, et al. Detection and avoidance of a natural product from the pathogenic bacterium *Serratia marcescens* by *Caenorhabditis elegans* [J]. Proceedings of The National Academy of Sciences, 2007, 104(7):2295 - 2300.
- [22] Mohamed Z K, El - Sayed S A, Radwan T E E, et al. Potency evaluation of *Serratia marcescens* and *Pseudomonas fluorescens* as biocontrol agents for root - knot nematodes in egypt [J]. Journal of Applied Sciences Research, 2009, 4:93 - 102.
- [23] 蒙春蕾,王勇勇,黄敏,等. 不同氮源对海洋真菌 BH0531 发酵液杀线虫活性的影响 [J]. 江苏农业科学, 2015, 43(5):121 - 123.
- [24] 吴晶,蔡正清,许忠祥,等. 热处理松材线虫在实际生存环境中的致死温度 [J]. 江苏农业科学, 2015, 43(7):123 - 125.
- [25] 洪森,王新荣,徐汉虹. 啞啞氧磷对松材线虫的有效杀线活性 [J]. 广东林业科技, 2014, 30(1):26 - 30.