

淡紫拟青霉航天诱变菌株对南方根结线虫的致病力

王曦茁, 汪来发*, 孟繁丽, 郭民伟, 朴春根, 王 源

(中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 国家林业局森林保护学重点实验室, 北京 100091)

摘要: [目的] 为筛选对南方根结线虫具有高致病力的淡紫拟青霉航天诱变菌株, 通过淡紫拟青霉山东寿光菌株搭载神舟八号获得 10 个淡紫拟青霉航天诱变菌株。[方法] 以这 10 个航天诱变菌株对南方根结线虫卵进行寄生试验, 观察了其发酵液对南方根结线虫卵及二龄幼虫的作用, 并对与毒力相关的胞外酶几丁质酶和蛋白酶活性进行了测定。在此基础上, 通过盆栽试验方法, 检验菌株 Sd-m-9、Sd-m-16 和 Sd-m-26 对花椒南方根结线虫的防治效果。[结果] 结果表明: 10 个诱变菌株对南方根结线虫卵的寄生率与原始菌株存在分化, 其中有 3 个诱变菌株的寄生率增强, 即 Sd-m-9、Sd-m-16 和 Sd-m-26; 这 10 个诱变菌株的几丁质酶和蛋白质酶的活性与对南方根结线虫卵的寄生率之间呈正相关。在盆栽试验中, 菌株 Sd-m-9、Sd-m-16 和 Sd-m-26 对南方根结线虫的根结指数较原始菌株下降 88.34%~89.70%。[结论] 因此, 航天诱变菌株 Sd-m-9、Sd-m-16 和 Sd-m-26 可用于对南方根结线虫的防治。

关键词: 南方根结线虫; 淡紫拟青霉; 航天诱变; 致病力; 生物防治

中图分类号: S769

文献标识码: A

Pathogenicity of Aerospace Mutants of *Paecilomyces lilacinus* against *Meloidogyne incognita*

WANG Xi-zhuo, WANG Lai-fa, MENG Fan-li, GUO Min-wei, PIAO Chun-gen, WANG Yuan

(Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry;

The Key Laboratory of Forest Protection, State Forestry Administration, Beijing 100091, China)

Abstract: [Objective] To select some highly pathogenic strains in the aerospace mutants of *Paecilomyces lilacinus* obtained from its original strain Sd carried by the Shenzhou-8 spacecraft as biological control agents against southern root-knot nematodes *Meloidogyne incognita*. [Method] Their pathogenicity against *M. incognita* was evaluated by comparing their hyphal parasitizing rates on nematode eggs, inhibiting effect of their fermentation broths on egg hatching and juveniles. Their activities of such enzymes as protease and chitinase were also investigated. Based on these results, three optimum mutants (Sd-m-9, Sd-m-16 and Sd-m-26) were adopted for pot bioassay against *M. incognita* on pepper seedlings. [Results] The mutants Sd-m-9, Sd-m-16 and Sd-m-26 possessed the most evident virulence against *M. incognita* than the original strain Sd. Analysis of the relationships between the activities of protease, chitinase of aerospace mutants and parasitic rates indicated that the parasitic rate was significantly and positively correlated with the activities of protease and chitinase. The pot experiment of pepper seedlings planted in autoclaved soil showed that strains Sd-m-9, Sd-m-16 and Sd-m-26 were more effective for controlling *M. incognita*, the root-knot index was reduced by 88.34%~89.70% as compared with that of the original strain Sd. [Conclusion]

收稿日期: 2015-11-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31270685)和国家微生物资源平台项目(NIMR2013-7)

作者简介: 王曦茁(1980—), 女, 助理研究员, 主要研究方向: 森林病理学. 010-62889284. E-mail: ladydal@sina.com

* 通讯作者: 博士, 研究员. 主要研究方向: 森林病理学和林木线虫学. 010-62889529. E-mail: nema@caf.ac.cn

It is suggest that the aerospace mutants Sd-m-9, Sd-m-16 and Sd-m-26 are of application potential for biological control of *M. incognita*.

Keywords: *Meloidogyne incognita*; *Paecilomyces lilacinus*; space mutagenesis; pathogenicity; biological control

淡紫拟青霉(*Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson)是研究较为广泛的一种植物线虫生防菌,该菌可寄生在一些植物线虫的卵、幼虫及成虫上,尤其对线虫卵具有较高的寄生率,对南方根结线虫(*Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood)的卵寄生率高达60%~70%^[1-2]。许多试验表明,淡紫拟青霉杀线活性与化学杀线剂相比较无明显差别,甚至超过化学杀线剂^[3-4],而且还能促进植物的生长,达到增产的目的^[5]。目前,国内外已有商品化的淡紫拟青霉制剂,且为孢子活菌制剂,如“Biocon”和“大豆保根剂”等。淡紫拟青霉被认为是一类非常有发展前途的重要生防真菌之一^[6]。和其它生防真菌制剂一样,淡紫拟青霉制剂存在着受环境影响较大、防治效果不稳定以及自身抗逆性较差等缺点。因此,通过诱变选育新的高致病力的优良性状菌株,对植物线虫的生物防治具有十分重要的意义。

航天诱变是空间条件处理微生物诱变育种的有效方法之一^[7-8],通过航天诱变已筛选出高致病力的昆虫病原真菌菌株^[9-10],作者所在实验室已将淡紫拟青霉(*P. lilacinus*)山东菌株(Sd)成功搭载“神舟八号”宇宙飞船,筛选出了一些诱变菌株,并进行了生物学特性的研究^[11]。本文在此基础上,对一些诱变菌株进行致病力方面的相关研究,旨在为植物线虫生防的淡紫拟青霉制剂的研制及开发奠定坚实基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:本实验室将山东寿光用于防治根结线虫的生产菌株淡紫拟青霉(*P. lilacinus*)山东菌株(Sd)于2011年11月1日搭载“神舟八号”宇宙飞船,历时6 d 20 h。返回地面后,筛选获得10个航天诱变菌株,分别是Sd-m-1、Sd-m-8、Sd-m-9、Sd-m-14、Sd-m-16、Sd-m-21、Sd-m-25及Sd-m-26,菌种保藏在中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所森林病理学实验室,其中诱变菌株Sd-m-9、Sd-m-16和Sd-m-26已保存于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,编号分别是CGMCC No. 7768、CGMCC No. 7769和CGMCC No. 7770。

供试线虫:南方根结线虫(*M. incognita*)由中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所提供。

线虫卵囊、卵粒和二龄幼虫的获得:按文献方法获得^[12-13]。

1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂固体培养基(PDA),配制方法:马铃薯200 g·L⁻¹、葡萄糖20 g·L⁻¹、琼脂20 g·L⁻¹,121℃灭菌20 min。马铃薯葡萄糖液体培养基(PD),配制方法:马铃薯200 g·L⁻¹、葡萄糖20 g·L⁻¹,121℃灭菌20 min。

液体几丁质培养基:KH₂PO₄1 g, MgSO₄0.5 g, CaCl₂0.2 g, NaCl 0.2 g, 1% (W/V) 胶体几丁质100 mL,以蒸馏水定容至1 000 mL, pH7。250 mL三角瓶装100 mL液体培养基。

菌株发酵液的制备:在PDA上生长6 d的菌落边缘用直径6 mm的打孔器打取菌饼,然后接入盛有50 mL PD液体培养基的250 mL三角瓶中,接种量为3个菌饼。进行恒温振荡摇床培养,温度25℃,转速120 r·min⁻¹,摇瓶培养4 d。将发酵菌液于4℃、8 000 r·min⁻¹离心机中离心10 min,取上清液用灭菌滤纸过滤,即为发酵滤液。

1.3 菌株对南方根结线虫的致病力测定

1.3.1 菌株对南方根结线虫卵的寄生率测定 在直径6 cm无菌培养皿中放入3个经表面消毒的卵囊,然后加浓度为1.0×10⁶个孢子·mL⁻¹的航天诱变菌株菌悬液5 mL,以淡紫拟青霉山东寿光原始菌株(Sd)作对照,设3次重复。6 d后镜检,每皿随机计数100粒卵,统计被寄生的卵数,计算各菌株的卵寄生率。卵寄生率(%)=(该菌株3次重复试验中被寄生卵数的平均值/100)×100%。

1.3.2 菌株发酵液对线虫卵孵化影响的测定 用无菌水配制10³·mL⁻¹南方根结线虫卵粒悬浮液,在24孔细胞培养板中加入不同菌株发酵原液各1 mL,卵粒悬浮液各100 μL,以加1 mL无菌水(代替发酵液)和100 μL卵粒悬浮液作为对照。在25℃培养箱中孵化培养,3 d后观察线虫卵孵化情况,试验设三次重复。

1.3.3 菌株发酵液对二龄幼虫的毒力测定 在24孔细胞培养板中加入不同菌株发酵原液各1 mL,然

后分别加入二龄线虫 100 条/孔,以加 1 mL 无菌水(代替发酵液)和 100 条/孔二龄线虫作为对照。在 25℃ 培养箱中培养,分别在 6 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h 观察线虫死亡情况。设三次重复。

1.4 菌株的胞外酶活性测定

1.4.1 几丁质酶活力测定 采用 DNS(3,5-二硝基水杨酸)法测定发酵液中几丁质酶的活性^[14]。将孢子悬液按 1% 的量接入几丁质酶诱导培养基中,27℃、200 r·min⁻¹ 旋转式摇床培养 7 d,滤纸过滤,所得滤液即为酶液。在 1.0 mL 胶体几丁质中,加入酶液 0.5 mL,50℃ 反应 1 h,用 DNS 法测定产生的还原糖。以 1 mL 发酵液每分钟水解脱乙酰胶体几丁质产生 1 μmol 氨基葡萄糖所需的酶量定义为一个酶活力单位。每天测定 1 次,重复三次。

1.4.2 蛋白酶活力测定 采用 Folin-酚法^[15],将孢子悬液按 1% 的量(体积分数,下同)接种到 PD 培养基中,25℃、150 r·min⁻¹ 旋转式摇床培养 7 d,滤纸过滤,所得滤液即为酶液。将 2% 酪蛋白 1 mL 加到 1 mL 酶液中,40℃ 反应 10 min,加 2 ml 0.4 mol·L⁻¹ 三氯醋酸溶液中止反应,保温至完全沉淀。过滤后用 Folin 试剂检测,以 1 mL 发酵液每分钟水解酪蛋白产生 1 μmol 酪氨酸所需的酶量定义为一个酶活力单位。每天测定 1 次,重复三次。

1.5 钵栽试验

实验参照汪来发等方法^[13],钵盆(直径 25 cm × 高 15 cm)装入 1 kg 灭菌土(15 磅灭菌 1h),加入南方根结线虫卵 300 粒(1 000 粒·mL⁻¹ 悬浮液 0.3 mL),试验菌剂同时加入钵盆(基本上使每钵中活菌数在 1.0 × 10⁹ 个左右),对照只加卵和加菌剂,加等量未接菌的草炭载体,7 d 后每钵栽入一株出苗 60 d 的花椒苗(品种大红袍),每处理 10 株,温室培养,常规管理,根结分级按百分数分级,计算根结级数,并进行防效比较。

1.6 数据处理与分析

采用 Microsoft Excel 软件对数据进行处理。应用 SPSS 19.0 处理数据,采用单因素分析检验不同菌株之间的差异。

2 结果与分析

2.1 航天诱变菌株对南方根结线虫卵寄生的影响

淡紫拟青霉航天诱变菌株的致病力产生了明显的变异,对根结线虫卵的寄生率存在正负双向变异。其中,菌株 Sd-m-9、Sd-m-16 和 Sd-m-26 的致

病力显著提高,寄生率分别为 90.00%,89.33% 和 92.33%,平均比原始菌株提高了 11.22%;致病力最低的菌株为 Sd-m-17,其寄生率仅为 16.33%。经方差分析显示,菌株 Sd-m-1、Sd-m-9、Sd-m-14、Sd-m-16、Sd-m-17、Sd-m-25 和 Sd-m-26 对根结线虫卵的寄生率与原始菌株之间存在显著差异($P < 0.05$),其它 3 个菌株与原始菌株差异不显著($P > 0.05$)(表 1)。

表 1 淡紫拟青霉航天诱变菌株对南方根结线虫卵的寄生率

菌株编号	寄生率/%	菌株编号	寄生率/%
CK(Sd)	79.33 ± 1.53 ^c	-	-
Sd-m-1	64.67 ± 1.53 ^d	Sd-m-16	89.33 ± 0.58 ^b
Sd-m-6	79.67 ± 1.15 ^e	Sd-m-17	16.33 ± 1.15 ^g
Sd-m-8	79.33 ± 1.15 ^e	Sd-m-21	77.33 ± 0.58 ^c
Sd-m-9	90.00 ± 1.00 ^b	Sd-m-25	52.67 ± 2.52 ^e
Sd-m-14	36.33 ± 1.15 ^f	Sd-m-26	92.33 ± 1.15 ^a

注:表中数据为平均值 ± 标准差,数据后相同字母代表差异不显著($P > 0.05$)。

2.2 诱变菌株发酵液对线虫卵孵化率的影响

处理根结线虫卵 72 h 后,经菌株 Sd-m-14、Sd-m-17 和 Sd-m-25 发酵液处理的线虫卵的孵化率分别是 5.0%、3.3% 和 7.7%,经其余所有诱变菌株和原始菌株的发酵液处理的卵均不能孵化。说明其他诱变菌株和原始菌株一样,发酵液对南方根结线虫卵的孵化有显著的抑制作用,其可能是发酵液中胞外酶或次生代谢毒素的作用结果。

2.3 诱变菌株发酵液对二龄线虫的毒力效果

诱变菌株发酵液对根结线虫作用 6 h 时,原始菌株 sd 处理的二龄幼虫出现僵直现象,而在诱变菌株中,Sd-m-14、Sd-m-17 和 Sd-m-25 对二龄幼虫作用不显著,其致死率分别为 23.0%、4.3% 和 30.0%,其余诱变菌株对二龄幼虫的作用同原始菌株相似。12 h 后,所有诱变和原始菌株发酵液中的二龄幼虫全部死亡,试验结果说明在 6 h 时,突变体对二龄幼虫的致病力发生分化,12 h 时分化不明显,所有诱变菌株发酵液对根结线虫二龄幼虫都存在极强毒力,这可能与侵染过程中分泌蛋白、水解酶和次生代谢毒素表达量发生变化有关。

2.4 诱变菌株几丁质酶和蛋白酶的活性

2.4.1 几丁质酶活性 结果表明,淡紫拟青霉航天诱变菌株产几丁质酶高峰出现在第 3 d,其中菌株 Sd-m-9 和 Sd-m-26 具有较高的产几丁质酶能力,分别为 0.177 U·mL⁻¹ 和 0.188 U·mL⁻¹(图 1)。

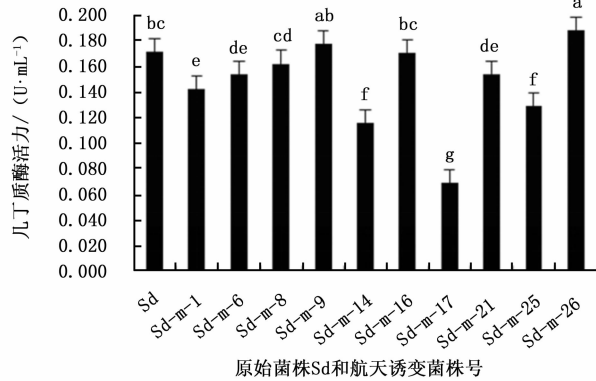


图1 不同菌株的几丁质酶活性

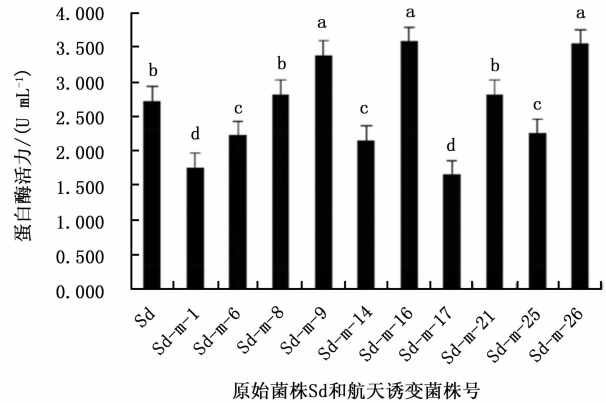


图2 不同菌株的蛋白酶活性

2.4.2 蛋白酶活性 从总体上看,淡紫拟青霉航天诱变菌株产蛋白酶一般在第6 d时达到最大值,7 d后又降到最低值。诱变菌株 Sd-m-9、Sd-m-16 和 Sd-m-26 都具有较高的产蛋白酶能力,第6 d时它们的蛋白酶活力分别为 $3.400 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $3.600 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $3.567 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ (图2),它们产蛋白酶的能力较原始菌株 Sd 显著提高。

2.5 菌株胞外酶活性与其寄生率的关系

供试10个淡紫拟青霉航天诱变菌株产生几丁质酶和蛋白酶活性存在较大差异,且菌株的酶活性

与其对根结线虫卵的寄生率之间存在一定的相关性:几丁质酶活性与寄生率之间的直线回归方程为 $y = 0.001x + 0.055$ ($r = 0.978$),说明这10个菌株的几丁质酶活性与其对根结线虫的寄生率呈正相关,相关性极显著;蛋白酶活性与寄生率之间的直线回归方程为 $y = 0.023x + 1.086$ ($r = 0.804$),说明这10个菌株的蛋白酶活性与其对根结线虫的寄生率呈正相关,相关性显著(表2)。

表2 淡紫拟青霉航天诱变菌株的胞外酶活性

菌株编号	酶活力/(U·mL ⁻¹)		菌株编号	酶活力/(U·mL ⁻¹)	
	几丁质酶	蛋白酶		几丁质酶	蛋白酶
CK(Sd)	0.171 ± 0.002 ^{bc}	2.733 ± 0.551 ^b	-	-	-
Sd-m-1	0.142 ± 0.016 ^e	1.767 ± 0.058 ^e	Sd-m-16	0.171 ± 0.003 ^{bc}	3.600 ± 0.100 ^a
Sd-m-6	0.154 ± 0.003 ^{de}	2.233 ± 0.058 ^c	Sd-m-17	0.069 ± 0.003 ^g	1.667 ± 0.153 ^e
Sd-m-8	0.162 ± 0.011 ^{cd}	2.833 ± 0.208 ^b	Sd-m-21	0.153 ± 0.003 ^{de}	2.833 ± 0.058 ^b
Sd-m-9	0.177 ± 0.009 ^{ab}	3.400 ± 0.100 ^a	Sd-m-25	0.129 ± 0.008 ^f	2.267 ± 0.208 ^c
Sd-m-14	0.116 ± 0.007 ^f	2.167 ± 0.058 ^c	Sd-m-26	0.188 ± 0.004 ^a	3.567 ± 0.208 ^a

注:表中数据为平均值 ± 标准差,数据后相同字母代表差异不显著($P > 0.05$)。

2.6 菌株对南方根结线虫的防治效果

与原始菌株相较:Sd-m-9、Sd-m-16 和 Sd-m-26 这3个诱变菌株对南方根结线虫具有良好的防治效果,使根结指数下降 95.75%~98.30%,比原始菌株降低 88.34%~89.70%;Sd-m-9、同时,Sd-m-9、Sd-m-16 和 Sd-m-26 诱变菌株处理后的土壤中,每100 g 土壤内的二龄幼虫数减少 97.40~98.30%,大大高于原始菌株的 66.20%。所有试验不同菌株对花椒苗生长无不良影响。幼虫减少百分数 = (原始菌株幼虫减少数 - 诱变菌株幼虫减少数)/原始菌株幼虫减少数 × 100%,根结级数计算方法参照文献[13]。

表3 淡紫拟青霉航天诱变菌株对南方根结线虫的防治效果

菌株编号	平均根结级数	幼虫数减少/%	防效/%
CK(Sd)	17.58 ± 1.19 ^b	66.20	63.59
Sd-m-9	2.05 ± 0.12 ^a	97.50	95.75
Sd-m-16	1.98 ± 0.08 ^a	97.40	95.89
Sd-m-26	1.81 ± 0.07 ^a	98.30	96.25
不接菌对照	48.26 ± 2.51 ^c	-	-

3 结论与讨论

通过对10个淡紫拟青霉航天诱变菌株致病力测定,发现与原始菌株相比,10个诱变菌株对南方根结线虫卵的寄生率存在正变异和负变异,寄生率

增强的诱变菌株有 Sd-m-9、Sd-m-16 和 Sd-m-26; 酶活性研究表明, 10 个诱变菌株的几丁质酶和蛋白酶活性与对南方根结线虫卵的寄生率之间呈正相关。在盆栽试验中, 菌株 Sd-m-9、Sd-m-16 和 Sd-m-26 对南方根结线虫的根结指数较原始菌株下降 88.34%~89.70%。关于淡紫拟青霉分泌的几丁质酶和蛋白酶及可能的抑菌机制已有报道^[16-17], 但缺少其与杀线性的相关性研究。本研究发现淡紫拟青霉诱变菌株产生的蛋白酶、几丁质酶活性与其对南方根结线虫的寄生率间呈显著正相关, 即蛋白酶和几丁质酶活性越高的菌株, 其寄生率亦越大。因此, 可以认为淡紫拟青霉产生的蛋白酶和几丁质酶是构成其对根结线虫致病力的一个主要内在因素, 因此, 可以考虑以蛋白酶和几丁质酶活性指示其对根结线虫致病力的大小, 此法简便易行, 克服了耗时费工的生物测定方法的弊病, 为菌株毒力比较与高毒优良菌株筛选提供了理论支持, 同时, 也可能为淡紫拟青霉菌剂标准化提供了有效评价途径。

航天诱变微生物, 如同其它诱变微生物一样, 诱变后的微生物必需通过各种性状的检测, 才可以判断航天诱变的效应和筛选得到特定变异的目标菌株, 因此, 筛选工作量非常繁重。在前其研究工作基础上, 本文比较分析了诱变前后淡紫拟青霉对线虫卵寄生和杀线虫的相关因子(包括胞外酶和次生代谢产物), 为进一步探讨航天诱变机制提供了理论基础。在本研究中, 首先考察诱变菌株对南方根结线虫卵的寄生率, 再考察诱变菌株发酵液对南方根结线虫卵和二龄幼虫的作用, 并考察诱变菌株产生几丁质酶和蛋白酶的作用, 分析其与卵寄生率的相关性。本文筛选出三株淡紫拟青霉航天诱变菌株 Sd-m-9、Sd-m-16 和 Sd-m-26, 这三个菌株在盆栽实验中, 与原始菌株相比较, 表现出良好的防治效果, 表明这三个诱变菌株在今后南方根结线虫的防治中具有很大的应用潜力。

参考文献:

[1] Jatala P. Biological control of plant-parasitic nematodes[J]. Annual Review of Phytopathology, 1986, 24: 453-489.

- [2] Jatala P, Kaltenbach R. Biological control of *Meloidogyne incognita* and *Globodera pallida* on potatoes [J]. Journal of Nematology, 1979, 11: 303.
- [3] 高学彪, 邓穗儿, 周慧娟, 等. 淡紫拟青霉 MCWA18 菌株对南方根结线虫的寄生和防治作用[J]. 中国生物防治, 1998, 4(4): 163-166.
- [4] Vijaya N, Sujathamma P, Saviihyti G. Effect of biocontrol agents and Furadon 3G on the juvenile mortality of root knot nematode *Meloidogyne incognita* [J]. 浙江农业学报, 2002, 14(3): 159-162.
- [5] Khan M, Goswami BK. Evaluation of *Paecilomyces lilacinus* isolate against *Meloidogyne incognita* infecting tomato [J]. International Journal of Nematology, 2002, 12(1): 111-114.
- [6] Kerry BR. An assessment of progress towards microbial control of plant parasitic nematodes [J]. Journal of Nematology, 1990, 22: 621-631.
- [7] 张玲华, 田兴山. 微生物空间诱变育种的研究进展[J]. 核农学报, 2004, 18(4): 294-296.
- [8] 田兴山, 张玲华, 郭勇, 等. 空间诱变在微生物菌种选育上的研究进展[J]. 生物技术通讯, 2005, 1: 105-108.
- [9] 农向群, 张泽华, 胡攀, 等. 航天诱变对昆虫病原真菌的生物学效应[J]. 菌物学报, 2006, 25(4): 674-681.
- [10] 王曦苗, 汪来发, 马建伟, 等. 松褐天牛球孢白僵菌高毒力航天突变体的筛选[J]. 昆虫学报, 2014, 57(11): 1299-1305.
- [11] 王源, 汪来发, 王曦苗, 等. 航天诱变淡紫拟青霉的生物学效应[J]. 核农学报, 2014, 28(11): 1933-1940.
- [12] 汪来发, 王艳娜, 朴春根, 等. 淡紫拟青霉不同菌株对南方根结线虫卵寄生率三种处理方法的比较[J]. 林业科学研究, 2004, 17(6): 777-781.
- [13] 汪来发, 杨宝君, 李传道. 寄生真菌对根结线虫的致病力评价[J]. 林业科学, 1999, 35(3): 41-47.
- [14] 姚剑, 黄大庆. 球孢白僵菌蛋白酶、几丁质酶和 β -N-乙酰葡萄糖苷酶产生水平及其与毒力关系的研究[J]. 宿州学院学报, 2004, 19(4): 102-106.
- [15] 刘智辉, 陈守文, 郭志红, 等. 球孢白僵菌胞外蛋白酶和几丁质酶活性与对亚洲玉米螟毒力的相关性分析[J]. 华中农业大学学报, 2005, 24(4): 364-368.
- [16] Khan A, Williamns K L and Nevalainen H K M. Effect of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. Biological Control [J], 2004, 3: 346-352.
- [17] 赵培静, 缪承杜, 江杰芳, 等. 淡紫拟青霉产蛋白酶和几丁质酶活性的初步研究[J]. 广西轻工业, 2011, 153(8): 24-26.

(责任编辑: 崔 贝)