

网络出版时间:2012-07-18 11:13

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120718.1113.029.html>

穿心莲内酯衍生物对粘虫 3 种保护酶活力的影响

崔永红¹, 李孟楼²

(1 福建省林业调查规划院, 福建 福州 350001; 2 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】比较 4 种穿心莲内酯衍生物(A2、A4b、A4d、A4e)与羟基马桑毒素(Tutin)对粘虫生理代谢影响的差异, 为探索新型植物源杀虫剂提供依据。【方法】粘虫 3 龄幼虫采用 Tutin 和 A2、A4b、A4d、A4e 经活体和离体 2 种方法处理后制备粗酶液, 用比色法测定试虫超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)3 种保护酶的活力, 通过酶比活力对比分析活体处理不同时间酶活力的变化及 2 种处理方法酶活力水平的一致性。【结果】活体试验结果表明, Tutin、A2、A4b、A4d、A4e 对粘虫体内 POD、CAT 活力有抑制作用, 而对 SOD 活力有促进作用; 在 5 种化合物中, 整体而言, A4b 和 A4e 对 3 种保护酶的影响较大。离体测定结果表明, 粘虫体内 POD、CAT 和 SOD 活力的变化趋势与活体测定结果相似。【结论】A2、A4b、A4d、A4e 和 Tutin 通过对粘虫幼虫 3 种保护酶活性的干扰, 削弱了其对氧自由基和 H_2O_2 的解毒代谢功能, 表明 4 种穿心莲内酯衍生物可以作为新型植物源杀虫剂。采用活体与离体 2 种方法对粘虫比活力的测定结果一致。

【关键词】 羟基马桑毒素(Tutin); 穿心莲内酯衍生物; 粘虫; 活体和离体; 保护酶比活力

【中图分类号】 Q965.9

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2012)08-0100-06

Effects of andrographolide derivatives on three kinds of protection enzymes activities in *Mythimna separata*

CUI Yong-hong¹, LI Meng-lou²

(1 The Forest Inventory and Planning Academy of Fujian, Fuzhou, Fujian 350001, China;

2 College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The study was done in order to investigate the effects of four andrographolide derivatives (compounds A2, A4b, A4d, A4e) with Tutin on the physiological metabolism of *Mythimna separata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae), and to provide basis to explore the new plant source pesticides. 【Method】The enzyme activities of peroxidase (POD), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in 3rd instar larvae of *M. separata* treated by *in vivo* and *vitro* were determined by colorimetry method, and analysis of the enzyme's energy *in vivo* at different treat time and *in vitro* was performed. 【Result】The *in vivo* results indicated that the compounds Tutin, A2, A4b, A4d and A4e inhibited the activities of POD and CAT but promoted the SOD activity in the tested larvae. A2 and A4d were the optimal compounds to inhibit POD, CAT activities and promote the SOD activity, compared with the other two andrographolide derivatives. And the *in vitro* results were similar to *in vivo*. 【Conclusion】Tutin, A2, A4b, A4d and A4e inhibited the effects of detoxification metabolism on oxygen free radicals and H_2O_2 by interfering with POD, CAT and SOD activities in the tested larvae. It shows that A2, A4b, A4d, A4e can be used as a new plant source pesticides. The enzymatic energy tested *in vivo* was consistent with that *in vitro*.

* [收稿日期] 2011-12-20

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30872032)

[作者简介] 崔永红(1985—), 男, 山东日照人, 助理工程师, 硕士, 主要从事林业调查规划设计和森林保护研究。

[通信作者] 李孟楼(1957—), 男, 陕西富平人, 教授, 博士生导师, 主要从事森林保护研究。

Key words: Tutin; andrographolide derivatives; *Mythimna separata*; *in vivo* and *in vitro*; protection compare energy

植物是生物活性物质的天然宝库,其产生的次生代谢产物超过 40 万种,其中大多数化学物质如萜烯类、生物碱、类黄酮、甾体、酚类、独特的氨基酸和多糖等,均具有杀虫和抗菌活性^[1-2]。植物次生代谢产物对人畜毒性低,并且可开发为生物可降解和害虫低抗药性的植物源农药。植物源农药的发展目标是对植物次生代谢产物的生物活性进行初级筛选,并对活性较高的物质进行结构修饰,以期得到毒力活性更高的化合物^[3]。马桑内酯在我国中医史上广泛应用于治疗精神疾病,是一种很好的神经麻醉剂。Reyes 等^[4]发现,羟基马桑毒素是其主要活性成分。羟基马桑毒素(Tutin)存在于植物马桑的根、茎、叶和种子中,是一种有效的杀虫抑菌活性物质,其对多种害虫具有神经毒性、胃毒和拒食作用^[5]。研究表明,羟基马桑毒素的毒力活性与其结构和官能团紧密相关^[6],且其毒力活性可以通过结构修饰得到提高^[7]。穿心莲内酯是植物穿心莲中的主要活性物质,其衍生物具有抑菌和抗病毒作用^[8-9],因此作为药品广泛应用于中国和印度的传统医药体系。羟基马桑毒素和穿心莲内酯衍生物均为植物中提取的萜类化合物,且具有相似的结构骨架和带有自由羟基的相似内酯环结构。但目前有关穿心莲内酯衍生物对昆虫是否具有与 Tutin 相似的毒力作用尚未见研究报道。

昆虫等生物体内的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)构成的保护酶系统,能够清除对其生理代谢系统具有破坏作用的氧自由基,从而防止其产生毒害^[10-11]。昆虫保护酶系统的活力与逆境和杀虫剂等密切相关。杀虫剂可以使昆虫体内保护酶系统代谢平衡紊乱,导致昆虫抗药性降低乃至死亡并产生毒害^[12-13]。本研究采用活体和离体 2 种方法处理粘虫 3 龄幼虫,探讨羟基马桑毒素和 4 种穿心莲内酯衍生物对粘虫 3 龄幼虫保护酶 POD、CAT、SOD 活力的影响,以阐明穿心莲内酯衍生物对昆虫保护酶系统的影响,为探索新型植物源杀虫剂提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试虫 供试粘虫(*Mythimna separata* Walker)购于西北农林科技大学无公害农药研究中

心,于养虫室((25±0.5)℃,空气相对湿度 70%~80%,日照 12 h/d)用新鲜小麦叶人工饲养,挑取健康、个体整齐一致、蜕皮后 2 d 的 3 龄粘虫幼虫供试。

1.1.2 羟基马桑毒素和穿心莲内酯衍生物 将马桑种子晒干并压碎,以酒精为溶剂进行超声波萃取(物液质量比 1:15,50℃下萃取 80 min,重复 3 次)。萃取液浓缩得浸膏,最终以硅胶柱色谱进行分离纯化,得到 Tutin。穿心莲内酯衍生物包括脱氧穿心莲内酯(14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide didehydroandrographolide, A2),15-对氯苯亚烷基化脱氧穿心莲内酯(15-chlorobenzylidene-14-Deoxy-11,12-didehydroandrographolide didehydroandrographolide, A4b),15-对氟苯亚烷基化脱氧穿心莲内酯(15-fluorobenzylidene-14-Deoxy-11,12-didehydroandrographolide, A4d)和 15-对溴苯亚烷基化脱氧穿心莲内酯(15-Bromoacetylbenzylidene-14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide, A4e),由郑州大学合成。

1.2 试虫处理

1.2.1 活体试虫处理 以丙酮为溶剂,将 Tutin 和穿心莲内酯衍生物配制成 2.0 mg/mL 的药液^[6]。将新鲜小麦叶片制成直径 10 mm 的圆形叶碟,并均匀涂抹 5 μL 的药液,挥干后即带毒叶碟,对照组叶片涂抹 5 μL 丙酮溶液。挑选 10 头蜕皮后 2 d 的粘虫 3 龄幼虫,饥饿 12 h 后放置于直径 9 cm、底部铺 1 层湿滤纸的培养皿中,采用非限制性叶碟法饲喂。每个处理 50 头粘虫(5 皿),重复 3 次。分别于处理后 4,8,12,24 和 48 h 取相应试虫称质量后制备粗酶液。

1.2.2 离体试虫处理 挑选蜕皮后 2 d 的粘虫 3 龄幼虫 10 头(0.082 g/头),采用 1.3 中的方法制备酶液 3 mL(0.027 g/mL),在测定 POD、CAT、SOD 活力时分别加入药液 5,1,1 μL,以不加药物的处理为对照组。

1.3 粗酶液的制备

分别取上述处理不同时间的试虫 10 头(0.082 g/头),加入适量 0.05 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液冰浴下匀浆,匀浆液于 4℃、8 000 r/min 离心 10 min,取上清液定容至 3 mL(0.027 g/mL)即为粗酶液,4℃下保存待用。

1.4 酶活力测定

POD 活力测定采用愈创木酚比色法^[14],CAT 活力测定参照高俊凤^[15]的方法,SOD 活力测定采用邻苯三酚自氧化法^[16]。

比活力=药物处理组活力/对照组活力。当比活力>1 时,药物作用促进相应酶活力;比活力=1 时,药物作用不影响酶活力;比活力<1 时,药物作用抑制相应酶活力。

1.5 数据处理

试验数据均采用 SPSS 18.0 软件进行方差分析,显著水平选择 $P=0.05$,采用 Duncan's 新复极差法(SSR 法)进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 粘虫经供试药物活体和离体处理后 POD 比活力的变化

由图 1 可见,在 Tutin 和穿心莲内酯衍生物作用下,粘虫 POD 比活力均受到抑制,并随处理时间延长表现出先降低后升高的趋势;在处理 24~48 h,Tutin 和穿心莲内酯衍生物处理组的 POD 比活力均显著低于对照组($P<0.05$)。上述结果表明,Tutin 和穿心莲内酯衍生物对试虫体内 POD 活力的影响是一致的,均起抑制作用。

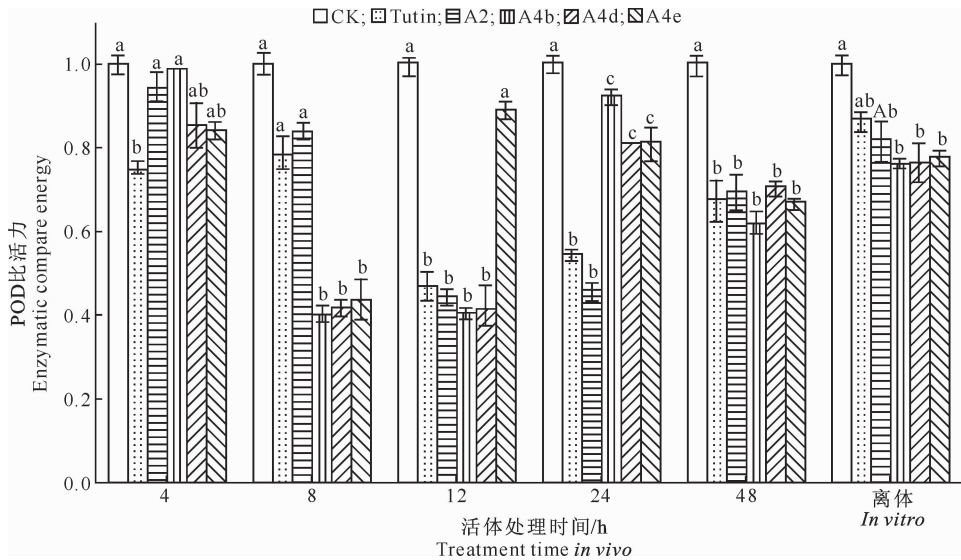


图 1 活体和离体条件下羟基马桑毒素和穿心莲内酯衍生物对粘虫 POD 比活力的影响

图中数据以“平均值±标准误”表示($n=9$),且同一时间下标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下图同

Fig.1 *In vivo* and *in vitro* POD compare energy in *M. separata* exposed to Tutin and A2,A4b,A4d,A4e

Data are shown by “means±standard error” ($n=9$). Different lowercase letters at the same test time represent significant differences ($P<0.05$). The same as next figures

离体测定结果(图 1)显示,各药物作用于粘虫粗酶液后,POD 比活力均小于 1,表明供试药物在活体和离体 2 种处理方法下的作用效果一致,均为抑制粘虫 POD 活力。整体而言,4 种穿心莲内酯衍生物对粘虫 POD 活力的抑制效果依次为 $A4b>A4d>A2>A4e$ 。

2.2 粘虫经供试药物活体和离体处理后 CAT 比活力的变化

由图 2 可知,经 Tutin 和穿心莲内酯衍生物处理后,粘虫 CAT 比活力均低于对照组。在 Tutin 和穿心莲内酯衍生物作用于粘虫活体后 4 h,各处理组 CAT 比活力均显著低于对照组($P<0.05$);在各处理时间下,经 Tutin 和 A4b 处理的粘虫 CAT 比活

力均显著低于对照($P<0.05$)。上述结果表明,Tutin 和穿心莲内酯衍生物对粘虫体内 CAT 活力均具有抑制作用,其中 A4b 与 Tutin 对粘虫 CAT 活力的抑制作用显著且抑制效果相似。离体测定结果表明,各药物作用于粘虫粗酶液后,其 CAT 比活力均小于 1 且显著低于对照。上述结果表明,药物通过活体和离体 2 种处理方法作用于粘虫后,均可抑制粘虫的 POD 活力。整体而言,4 种穿心莲内酯衍生物对粘虫 CAT 活力的抑制效果依次为 $A4b>A2>A4d>A4e$ 。

2.3 粘虫经供试药物活体和离体处理后 SOD 比活力的变化

图 3 表明,经 Tutin 和穿心莲内酯衍生物处理

后,粘虫活体 SOD 活力均被激活。Tutin、A2、A4b、A4d 处理组粘虫 SOD 比活力为对照组的 2.35~2.80 倍,均显著高于对照($P<0.05$),其对粘虫 SOD 活力的促进作用显著且效果相似,但是 A4e 的作用效果相对较差。在经各药物活体和离体处理后,粘

虫 SOD 比活力均大于 1,表明 2 种处理方法各药物对粘虫 SOD 活力均为一致的促进作用。整体而言,4 种穿心莲内酯衍生物对粘虫 SOD 活力的促进效果依次为 A4b>A2>A4d>A4e。

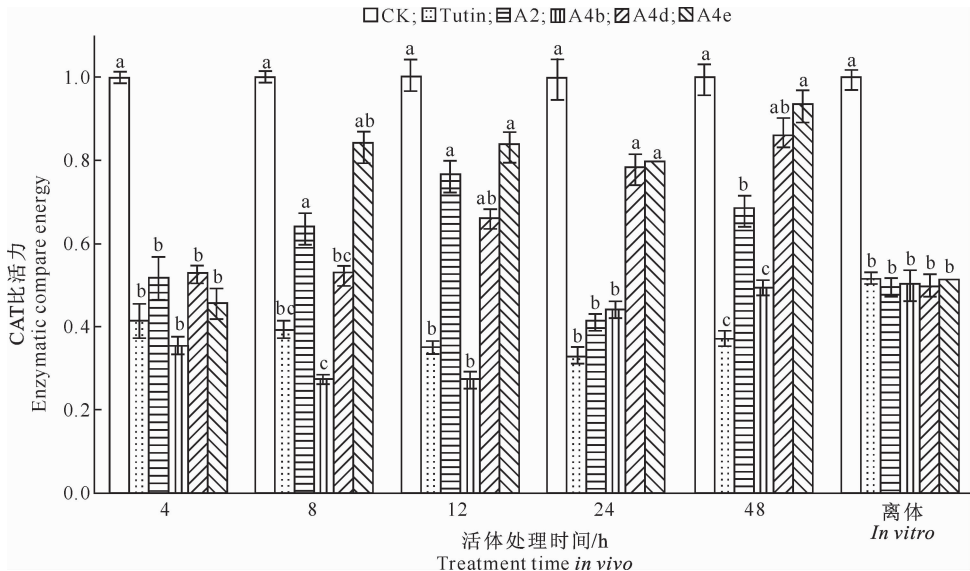


图 2 活体和离体条件下羟基马桑毒素和穿心莲内酯衍生物对粘虫 CAT 比活力的影响

Fig. 2 *In vivo* and *in vitro* CAT compare energy in *M. separata* exposed to Tutin and A2, A4b, A4d, A4e

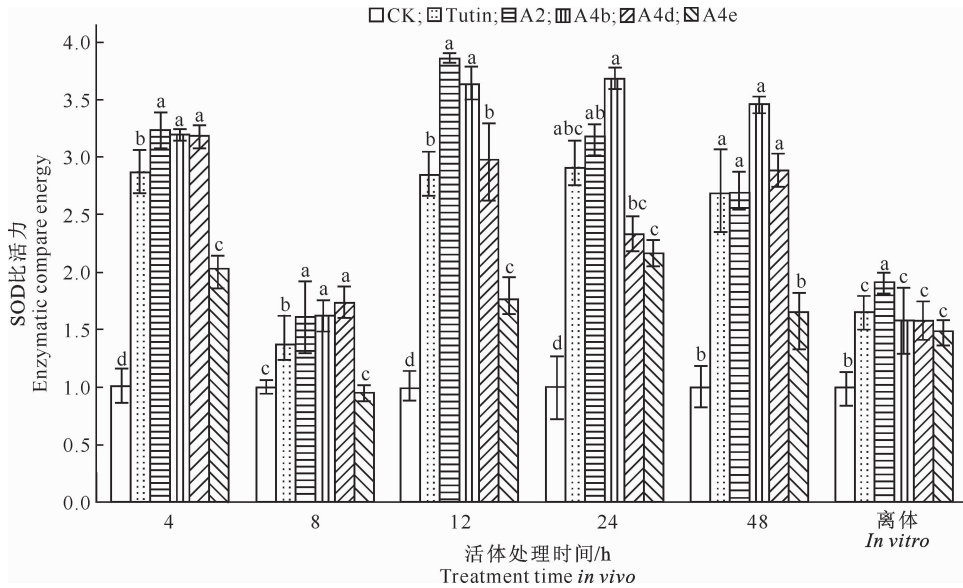


图 3 活体和离体条件下羟基马桑毒素和穿心莲内酯衍生物对粘虫 SOD 比活力的影响

Fig. 3 *In vivo* and *in vitro* SOD compare energy in *M. separata* exposed to Tutin and A2, A4b, A4d, A4e

3 讨 论

3.1 Tutin 和穿心莲内酯衍生物对粘虫体内保护酶的影响

Graham^[17]研究表明,SOD 活力增加可能是药物毒力导致试虫体内的超氧自由基浓度升高,高浓

度的超氧自由基又激活了试虫体内的 SOD 原,使其变为有活性的 SOD 并催化超氧自由基发生歧化反应,从而减轻超氧自由基对生物体造成的破坏。研究发现,利用溴氰菊酯处理菜粉蝶、褐刺蛾和褐边绿刺蛾后,虫体中的 SOD 活力均高于正常虫体^[11]。McCord 等^[18]报道,生物体在高温、干旱、缺氧、杀虫

剂等逆境条件下,体内的自由基($O^{\cdot-2}$)、单线态氧(1O_2)、过氧化氢(H_2O_2)和氢氧自由基($HO\cdot$)等活性将增强,并诱导 SOD 活性增加,催化超氧自由基的歧化反应,生成的 H_2O_2 又可被体内的 POD 和 CAT 清除。本研究结果表明,Tutin 和 4 种穿心莲内酯衍生物处理粘虫 3 龄幼虫后,各处理组的 SOD 活力明显高于空白对照组 1~2 倍,粘虫体内 SOD 活力增高的原因也可能与 Graham^[17] 和 McCord 等^[18] 的研究结论相似。

以磷化氢(PH_3)处理的谷象,其体内的 SOD、CAT 和 POD 均会发生变化,并引起 H_2O_2 的积累和虫体死亡^[19]。醚菊酯作用于马尾松毛虫 5 龄幼虫后,在其临近死亡时,虫体内的 CAT 和 POD 活力均低于对照^[20]。蒋志胜等^[21]报道, α -三噻吩(α -T)对库蚊体内保护酶活性的抑制是其造成试虫正常生理功能失衡、直至死亡的主要原因。本研究结果表明,Tutin 及 A2、A4b、A4d、A4e 均降低了粘虫体内的 CAT 和 POD 活力,CAT 和 POD 酶活性的降低将削弱虫体代谢 H_2O_2 的功能,也可能是导致试虫中毒死亡的原因之一^[22-23]。

在 Tutin 及 4 种穿心莲内酯衍生物中,Tutin、A2、A4b、A4d 对 SOD 活力的作用效果相近,并显著优于 A4e 的作用效果;5 种药液对粘虫 POD 的作用效果基本相同;Tutin、A4b 对粘虫 CAT 的抑制程度高于 A2、A4d、A4e,这可能与其所携带的官能团不同有关,A4d 具有的“-F”、A4e 具有的“-Br”可能是造成其与 A4b 对 3 种保护酶影响差异的原因,也可能是 A2、A4d、A4b、A4e 的构象不同所致。由本研究结果可以看出,A4e 对 POD 和 CAT 活力的抑制作用以及 A4b 对 SOD 活力的促进作用,表明二者是 4 种穿心莲内酯衍生物中最优的化合物,因此有关 Tutin 和穿心莲内酯衍生物上所携带的不同官能团对其功能的影响还需深入研究。

3.2 活体与离体处理后粘虫体内酶活力的对比分析

活体试验前期需饲喂试虫,制备带毒叶碟,选择试虫适宜的生存条件,且持续时间较长,饲喂完成之后再制备粗酶液,测定药物对试虫的影响;而离体测定只需选定合适的试虫,直接制备粗酶液,且在 0.5~2 h 内即可迅速测定药物对试虫的影响,大大提高了工作效率,并且操作过程简单。通过本研究探索发现,活体与离体 2 种方法测定粘虫 POD、CAT、SOD 比活力的结果一致。

虽然活体和离体处理酶活力的变化趋势相似,

但酶活力水平存在差异,这与活体和离体处理方法的反应条件不同有直接关系。在昆虫体内,适宜的生理条件有利于粘虫对药物作用后的适应性调节;而在离体处理时,试验提供的条件与昆虫最适生理代谢条件存在差异,从而导致 2 种处理酶活力水平存在差异。

参考文献

- [1] Swain T. Secondary compound as protective agents [J]. Annual Review of Plant Physiology, 1977, 28: 479-501.
- [2] Grainge M, Ahmed S. Handbook of plants with pest control properties [M]. Honolulu: East-West Center, 1988.
- [3] Pillmoor B O, Wright K, Terry S A. Natural products as a source of agrochemicals and leads for chemical synthesis [J]. Pesticide Science, 1993, 39: 134-141.
- [4] Reyes A, Garcia-Quintana H G, Romero M, et al. Tutin and other metabolites obtained from *Coriaria rusciifolia* [J]. Bol Soc Chil Quim, 1998, 43: 87-89.
- [5] Matsumura F, Ghiasuddin S M. Evidence for similarities between cyclodiene type insecticides and picrotoxinin in their action mechanisms [J]. Journal of Environment Science and Health, 1983, B18: 1-14.
- [6] Kudo Y, Niwa H, Tanaka A, et al. Actions of picrotoxinin and related compounds on the frog spinal cord: The role of a hydroxyl-group at the 6-position in antagonizing the actions of amino acids and presynaptic inhibition [J]. British Journal of Pharmacology, 1984, 81: 373-380.
- [7] Li M L, Cui J, Qin R H, et al. Semisynthesis and antifeedant activity of new acylated derivatives of Tutin, a sesquiterpene lactone from *Coriaria sinica* [J]. Heterocycles, 2007, 71: 1155-1162.
- [8] Gupta S, Choudhry M A, Yadava J N S, et al. Anti-diarrhoeal activity of diterpenes of *Andrographis paniculata* (Kalmegh) against *Escherichia coli* enterotoxin in *in vivo* models [J]. International Journal of Crude Drug Research, 1990, 28: 273.
- [9] Najib Nik A, Rahman N, Furuta T, et al. Antimalarial activity of extracts of Malaysian medicinal plants [J]. Journal of Ethnopharmacology, 1999, 64: 249-254.
- [10] Fridovich I. Oxygen is toxic [J]. Bioscience, 1997, 27: 462-467.
- [11] Felton G W, Summers C B. Antioxidant systems in insects [J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 1995, 29: 187-197.
- [12] Wang Y, Oberley L W, Murhammer D W. Evidence of oxidative stress following the viral infection of two lepidopteran insect cell lines [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2001, 31: 1448-1455.
- [13] Grubor-Lajsic G, Block W, Jovanovic A, et al. Antioxidant enzymes in larva of the Antarctic fly, Belgica Antarctica [J]. Cryo-Letters, 1996, 17: 39-42.
- [14] Simon L M, Fatrai Z, Jonas D E, et al. Study of peroxide meta-

blism enzymes during the development of *Phaseolus vulgaris* [J]. Biochemistry and Physiology of Pflanzen,1974,166:387-392.

[15] 高俊凤. 植物生理学实验技术 [M]. 西安:世界图书出版公司,2000.

Gao J F. Plant physiology experiment technology [M]. Xi'an:World Publishing Corporation,2000. (in Chinese)

[16] 朱广廉,钟海文,张爱琴. 植物生理学实验 [M]. 北京:北京大学出版社,1990.

Zhu G L,Zhong H W,Zhang A Q. Experimental plant physiology [M]. Beijing,Peking University Press,1990. (in Chinese)

[17] Graham T L. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seeding tissues and in seed and root exudates [J]. Plant Physiology,1991,95:594-603.

[18] McCord J M,Beauchamp C O,Goscin S,et al. Superoxide and superoxide dismutase [M]. Baltimore:University Park Press,1973.

[19] Bolter,Caroline J,Wiliam C. The effect of phosphine treatment on superoxide dismutase,catalase,and peroxidase in the granary weevil,*Sitophilus granaries* [J]. Pesticide Biochem Physiol,1990,36(1):52-60.

[20] 陈尚文. 马尾松毛虫过氧化物酶及过氧化氢酶与耐药性的关系 [J]. 昆虫学报,2001,44(1):9-14.

Chen S W. Correlation of catalase and peroxidase with pesticide tolerance in massonpine caterpillar [J]. Acta Entomologica Sinica,2001,44(1):9-14. (in Chinese)

[21] 蒋志胜,尚稚珍,万树青,等. 光活化杀虫剂 α -三嗪吩的电子自旋共振分析及其对库蚊保护酶系统活性的影响 [J]. 昆虫学报,2003,46(1):22-26.

Jiang Z S,Shang Z Z,Wan S Q,et al. ESR analysis of photo-activated insecticide and its effects on superoxide dismutase, peroxidase and catalase activity in *Cluex pipiens pallens* [J]. Acta Entomologica Sinica,2003,46(1):22-26. (in Chinese)

[22] 郭新荣,李亚峰,李孟楼. 马桑倍半萜内酯的活性研究 [J]. 西北林学院学报,2009,24(6):133-135.

Guo X R,Li Y F,Li M L. The study on biological activity of coriaria lactone I [J]. Journal of Northwest Forestry University,2009,24(6):133-135. (in Chinese)

[23] 郭新荣,张雅林,李孟楼. 马桑内酯对粘虫幼虫体内 3 种酶活性的影响 [J]. 西北植物学报,2007,27(8):1656-1660.

Guo X R,Zhang Y L,Li M L. Effect of Coriaria Lactone on the activities of three enzymes in *Mythimna separata* [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica,2007,27(8):1656-1660. (in Chinese)

(上接第 94 页)

[4] Hidehiko N,Haruo S,Noboru O. Studies on apple canker disease:The necrotic toxins produced by *Valsa ceratosperma* [J]. Agric Biol Chem,1982,46(8):2101-2106.

[5] Hiroki K,Tsutomu S. Possible role of breakdown products of phloridzin in symptom development by *Valsa ceratosperma* [J]. Ann,Phytopath Soc Japan,1982,48:521-528.

[6] Okuno T,Oikawa S,Goro T,et al. Structures and phytotoxicity of metabolites [J]. Agric Biol Chem,1986,50(4):997-1001.

[7] 陈磊,杨建荣,黄雪松. 高效液相色谱法快速测定红富士苹果渣中的 6 种多酚 [J]. 食品与发酵工业,2008,34(8):158-160.

Chen L,Yang J R,Huang X S. Determination of 6 polyphenols in Fuji apple pomace by high performance liquid chromatography [J]. Food and Fermentation Industries,2008,34(8):158-160. (in Chinese)

[8] Jayasankar N P,Bandoni R J,Towers G H N. Fungal degradation of phloridzin [J]. Phytochemistry,1969,8:379-383.

[9] 王娟,马强,庄霞,等. 苹果树腐烂病原菌分泌物中果胶酶的测定 [J]. 内蒙古农业科技,2009(4):39-40.

Wang J,Ma Q,Zhuang X,et al. Determination of pectinase in fungi secretion of apple tree canker [J]. Inner Mongolia Agricultural Science and Technology,2009(4):39-40. (in Chinese)

[10] 臧睿. 陕西省苹果树腐烂病菌不同分离株生物学特性及致病性研究 [D]. 陕西杨凌. 西北农林科技大学,2006.

Zang R. Study on biological characters and pathogenicity of different isolates of cytospora isolated from apple tree [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2006. (in Chinese)

[11] 刘福昌,李美娜,王永全. 苹果树腐烂病菌的致病因素:果胶酶的初步探讨 [J]. 中国果树,1980(4):45-48.

Liu F C,Li M N,Wang Y Q. Apple tree canker's pathogenic factors:Preliminary discuss to pectinase [J]. China Fruits,1980(4):45-48. (in Chinese)