

银杏内生真菌菌株 R2 的鉴定 及其抑菌活性

汪 涯^{1△} 李希茜^{2△} 张志斌³ 颜日明^{1 3} 曾庆桂³ 朱 笃^{1 3*}

(1. 宜春学院 江西省天然药物活性成分研究重点实验室 江西 宜春 336000; 2. 江西中医学院 科技学院 江西 南昌 330025; 3. 江西师范大学 生命科学学院 江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室 江西 南昌 330022)

摘要: 以金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 3种微生物为指示菌,采用杯碟法对分离自药用植物银杏(*Ginkgo biloba* L.)的36株内生真菌进行抗菌活性检测。并通过形态学特征观察和 ITS-rDNA 序列系统发育分析对强抑菌活性菌株进行鉴定。结果发现,菌株 L1、L4、L5、L7、T2、T3、R1 和 R2 等8株内生真菌的发酵粗提物具有抑菌活性,其中以内生真菌 R2 的抑菌活性最高,抑菌圈直径分别为 20 mm、20 mm 和 21 mm。结合形态学特征和 ITS-rDNA 序列分析确定菌株 R2 为尖孢枝孢菌(*Cladosporium oxysporum*)。

关键词: 银杏; 内生真菌; 抑菌活性; 鉴定

中图分类号: S792.95 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)04-0718-06

Identification of Endophytic Fungi Strain R2 from *Ginkgo biloba* and Its Antimicrobial Activity

WANG Ya^{1△} , LI Xi-xi^{2△} , ZHANG Zhi-bin³ ,
YAN Ri-ming^{1 3} , ZENG Qing-gui³ , ZHU Du^{1 3*}

(1. Key Laboratory for Research on Active Ingredients in Natural Medicine of Jiangxi Province , Yichun University , Yichun 336000 , China; 2. College of Science and Technology , Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine , Nanchang 330025 , China; 3. Key Laboratory of Protection and Utilization of Subtropic Plant Resources of Jiangxi Province , Jiangxi Normal University , Nanchang 330022 , China)

Abstract: The antimicrobial activity of 35 endophytic fungi isolated from traditional Chinese medicinal plant *Ginkgo biloba* were detected by the method of cylinder plate test with *Staphylococcus aureus* , *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* as indicator microorganisms. Observation on the morphological characters and internal transcribed spacers ribosomal DNA (ITS-rDNA) sequence analysis were conducted to identify the strain. The results showed that the extracts of 8 isolated endophytic fungi strain L1 , L4 , L5 , L7 , T2 , T3 , R1 and R2 had antibiotic activity against some indicator microorganisms. Especially the extract of strain R2 obviously exhibited strongest antibiotic activity against those indicator microorganisms , the inhibition zones diameters were 20 mm , 20 mm and 21 mm respectively. Based on the morphological characters and ITS-rDNA sequence analysis , the endophytic fungi strain R2 was identified as *Cladosporium oxysporum*.

收稿日期: 2012-02-15 修回日期: 2012-05-27

基金项目: 江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室开放基金资助(YRD201203)

作者简介: △同等贡献 汪涯(1986—)男,助教,硕士,主要从事微生物与生化药理学研究, E-mail: jxwangya@126.com 李希茜(1987—)女,助教,主要从事微生物资源领域研究; * 通讯作者: 朱笃,教授,博士, E-mail: zhudu12@163.com。

Key words: *Ginkgo biloba*; endophytic fungi; antimicrobial activity; identification

植物内生真菌是指那些生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物各种组织和器官内部或细胞间隙而没有引起宿主明显病害症状的真菌^[1]。它是一个多样性十分丰富的生物类群,并具有强大的生物学活性,不但能够有效地促进宿主植物生长,增强宿主抗病能力和对环境胁迫的抗性^[2],而且也可产生与宿主植物相同或相似的生物活性物质等功能^[3]。例如产紫杉醇的红豆杉内生真菌 *Taxomyces andreanae*^[4]和产石杉碱甲的蛇足石杉内生真菌 *Shiraia* sp. Slf14^[5]、*Aspergillus flavus* LF40^[6]等。当前,对药用植物内生真菌进行“生物勘探”(bioprospecting)^[7],筛选产生生物活性物质的菌株已成为抗菌抗肿瘤等药用活性化合物来源的新途径^[8]。

银杏(*Ginkgo biloba* L.)又名白果,为银杏科银杏属珍贵药用植物,是我国特有的古老孑遗植物,被称为“活化石”植物。近年来的研究表明,银杏中富含多种黄酮类、内酯类和酚酸类化合物,具有很好的抗菌、抗衰老、降血压和软化血管等功效,对保护中枢神经系统和心血管系统也有很好的作用^[9-11]。此外,在银杏漫长的生长过程中很少感染病虫害且寿命极长。从内生真菌与宿主植物两者互利共生的理论来推断,银杏中很有可能存在着特殊的内生真菌,通过产生特殊的次生代谢产物帮助增强银杏的抗病能力^[4]。迄今,国内外有关银杏内生真菌的研究已有部分报道,鉴于药用植物内生真菌具有的潜在重要应用价值,本研究对药用植物银杏的叶片内生真菌进行分离,并筛选具抑菌活性的菌株,以期勘探获得产抑菌活性次生代谢产物的药用真菌,为后续活性代谢产物的分离纯化研究奠定工作基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源 供试病原细菌金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)等3株指示菌均为江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室保存菌种。

1.1.2 培养基 内生真菌的活化培养及保藏采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)^[12],液体发酵培养采用马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB),病原细菌的培养采用牛肉膏蛋白胨培养基^[13]。

1.2 方法

1.2.1 内生真菌的分离 取新鲜的银杏叶经自来水冲洗干净,晾干后置于 $\varphi = 75\%$ 的酒精浸泡1 min,接着用无菌水漂洗3次,再置于 $\varphi = 0.1\%$ 升汞浸泡2 min,无菌水冲洗4次。无菌条件下将消毒好的银杏叶放在无菌滤纸片上晾干,将其剪成0.5 cm × 0.5 cm的小切片,接入PDA培养基上,28℃培养20 d。期间将切口处新长出的菌丝转接至PDA培养基纯化培养3代。将最后一次清洗样品所用无菌水涂布于PDA平板上作为对照,同样条件下培养、观察,以确保表面消毒彻底,保证分离到的菌株确实是内生真菌。

1.2.2 内生真菌的液体培养及发酵粗提物制备 挑取经活化的内生真菌菌丝或孢子接种于PDB液体培养基中,500 mL三角瓶装液量120 mL,28℃、120 r/min摇瓶培养10 d;过滤收集发酵液,减压浓缩经95%乙醇浸提24 h,再减压浓缩制得发酵粗提液样品,4℃保存待用^[8]。

1.2.3 内生真菌发酵粗提物的抗菌活性测定 参照戴文君等报道的杯碟法^[14]对内生真菌发酵粗提物进行抑菌活性测定。将金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌分别制成一定浓度的菌悬液(10^7 CFU/mL),用涂布器将其均匀涂布于供试无菌LB培养基平板,制成含菌平板,每个平板放置4个牛津杯(直径为6 mm),分别取真菌发酵粗提样品150 μ L加入其内,每处理重复3次,硫酸庆大霉素(5 μ /mL)为阳性对照,37℃培养16~24 h,观察病原细菌生长情况、透明圈大小,测量并记录抑菌圈直径。

1.2.4 银杏内生真菌 R2 菌株的鉴定 (1) 银杏内生真菌 R2 菌株的形态学鉴定。参照真菌的分类鉴定方法^[15],将活化的菌株孢子,分别按点植培养法(观察菌落)和插片法(观察孢子及菌丝体形态)接种于PDA培养基上,25℃培养10 d,期间定时观察菌落形态特征。同时,按郭素枝^[16]的方法制备扫描电镜样品,利用FEI-Quanta200F扫描电子显微镜观察分生孢子梗和分生孢子的形态。

(2) 银杏内生真菌 R2 菌株的 ITS-rDNA 序列扩增和测定。ITS-rDNA 序列 PCR 扩增引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^[3] 由上海生工生物

工程技术服务有限公司合成; DNA 模板提取采用 CTAB 的方法^[17], PCR 反应体系为: 模板 DNA 2 μL、10 × PCR buffer 5 μL、*Taq* DNA 聚合酶 2.5 Unit、dNTP (2.5 mmol/L) 4 μL、引物各 3 μL, 补充去离子水至 50 μL。反应条件: 94 °C 5 min 94 °C 40 s 60 °C 40 s 72 °C 40 s 34 个循环; 72 °C 5 min。PCR 产物经 10 g/L 凝胶电泳检测后送交上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

(3) ITS - rDNA 序列分析。将测得的 ITS-rDNA 序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对并申请 GenBank 登录号。下载相关菌株的 ITS 序列, 使用 MEGA 4.0 软件 ClustalX 方法进行系统发育分析, 以 Neighbour - joining 法构建分子系统发育树, 在分支上标记 1 000 次重复获得的自展检验 Bootstrap 值, 以评估系统发育树的置信度, 从而确定菌株的亲缘关系及分类地位^[3]。

2 结果与分析

2.1 银杏内生真菌 36 个菌株的分离结果

从表面消毒的银杏叶片中共分离获得 36 株内生真菌, 而同期表面消毒效果检测用 PDA 平板上没有任何菌落长出, 由此证明植物组织表面消毒彻底, 分离到的 36 株真菌均是内生真菌。

2.2 抑菌活性内生真菌的筛选

通过对 36 株内生真菌菌株进行抑菌活性测定, 结果发现有 8 株内生真菌至少对一种指示病原细菌显示了抑制活性(表 1), 占菌株总数的 22.2%。菌株 L1、R1 和 R2 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及枯草

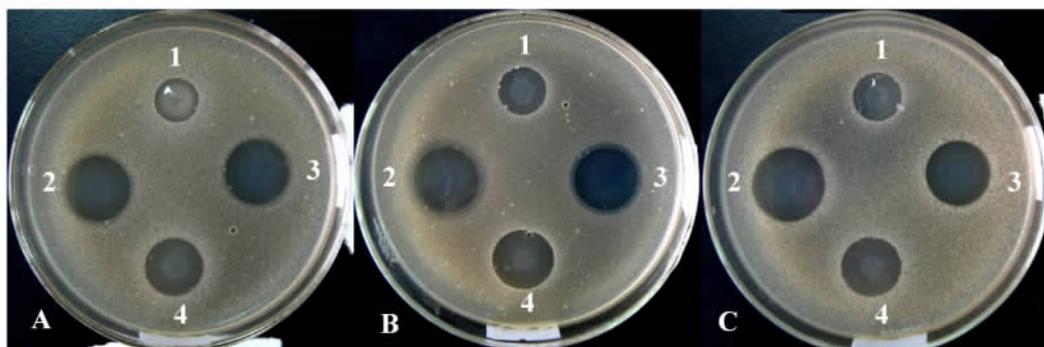
表 1 内生真菌的抗菌活性

Tab.1 Antibacteria activity of endophytic fungi

分离菌株(成份) Isolation endophytic fungi (component)	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>
L1 发酵粗提物 L1 Fermentation extract	+++	+++	++
L4 发酵粗提物 L4 Fermentation extract	-	+	-
L5 发酵粗提物 L5 Fermentation extract	+	+	-
L7 发酵粗提物 L7 Fermentation extract	-	++	-
T2 发酵粗提物 T2 Fermentation extract	+	-	-
T3 发酵粗提物 T3 Fermentation extract	-	+	-
R1 发酵粗提物 R1 Fermentation extract	+	+	+
R2 发酵粗提物 R2 Fermentation extract	+++	+++	+++

+++ : 抑菌直径 >20 mm; ++ : 10 mm < 抑菌直径 <20 mm; + : 抑菌直径 <10 mm; - : 无抑菌圈。

+++ : Diameter of inhibition zone >20 mm; ++ : 10 mm < Diameter of inhibition zone <20 mm; + : Diameter of inhibition zone <10 mm; - : Without inhibition zone.



A: 金黄色葡萄球菌; B: 大肠杆菌; C: 枯草芽孢杆菌; 1: 菌株 R1; 2: 菌株 R2; 3: 菌株 L1; 4: 阳性对照硫酸庆大霉素(5 U/mL)。

A: *Staphylococcus aureus*; B: *Escherichia coli*; C: *Bacillus subtilis*; 1: The strain R1; 2: The strain R2; 3: The strain L1; 4: Gentamycin sulfate for positive control (5 U/mL) .

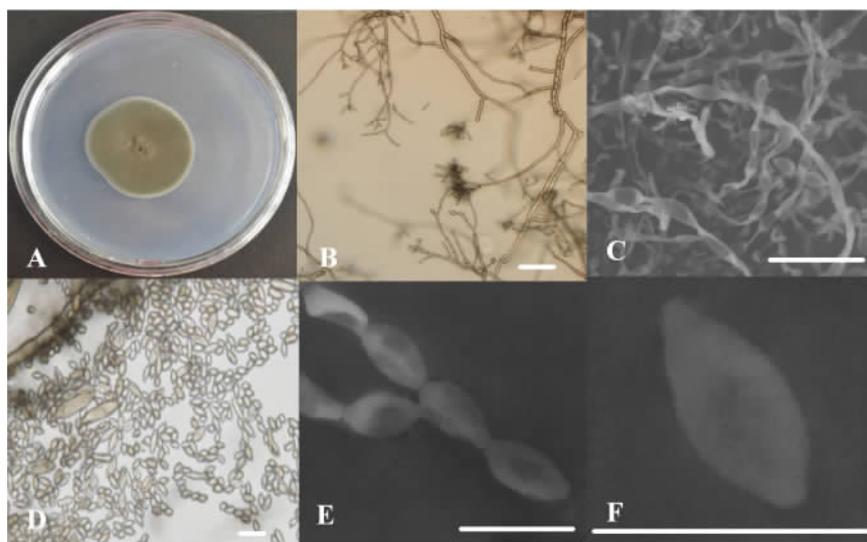
图 1 银杏内生真菌对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及枯草芽孢杆菌的抑制作用

Fig.1 Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Ginkgo biloba*

芽孢杆菌的均有一定的抑制活性(图1),其中尤以菌株 R2 的抑制活性最高,对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径分别为 20 mm、20 mm 和 21 mm。

2.3 银杏内生真菌 R2 菌株的鉴定

2.3.1 形态学鉴定 菌株 R2 在 PDA 培养基上 28 °C 培养 5 d 菌落直径可达 30 ~ 40 mm,橄榄绿色,平铺,菌丝表面干燥,分布有微小的深色颗粒,随着菌丝不断的成熟而逐渐变成棕褐色,深或浅(图 2 - A)。在光学显微镜下,分生孢子梗直立或弯曲,有节状的膨大,具有隔膜(图 2 - 4 - B),宽度约 3 ~ 6 μm(图 2 - C)。分生孢子链生,呈枝链分布,无色,椭圆形或柠檬形(图 2 - D),表面平滑(图 2 - E)直径 4 ~ 8 μm(图 2 - F)。参考相关菌物文献^[15,18],初步判断菌株 R2 为枝孢属 *Cladosporium* sp. 真菌中的一种。



A: PDA 菌落形态; B, C: 分生孢子梗(Bar = 20 μm); D, E, F: 分生孢子(Bar = 5 μm)。

A: Colony characteristics of R2 on PDA; B, C: Conidiophores (Bar = 20 μm); D, E, F: Conidiospores (Bar = 5 μm)。

图 2 菌株 R2 宏观及显微特征

Fig. 2 Macro and micro characteristics of strain R2

2.3.2 ITS - rDNA 序列登录号及系统发育分析 以 ITS1 和 ITS4 为引物,在菌株 R2 基因组 DNA 中扩增出一条 529 bp 的序列,提交 GenBank 获得登入号 HQ260961,并通过 Blast 程序与 GenBank 中已有的核酸序列进行比对,结果表明,菌株 R2 的 rDNA - ITS 序列和 *Cladosporium oxysporum* 的相应序列同源性高达 99%。图 3 中系统进化发育分析结果显示菌株 R2 与枝孢属 *Cladosporium* sp. 真菌中的尖孢枝孢菌

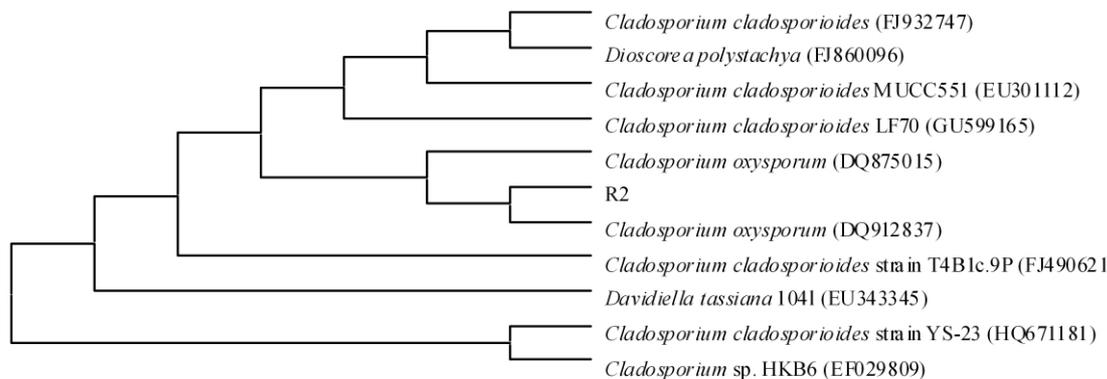


图 3 菌株 R2 基于 ITS - rDNA 的系统发育分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of strain R2 based on ITS-rDNA sequences

Cladosporium oxysporum 聚在一支。综合菌株 R2 的形态学特征和 ITS - rDNA 序列分析结果,最终将菌株 R2 确定为枝孢属 *Cladosporium* sp. 中的尖孢枝孢菌 *Cladosporium oxysporum*,命名为 *Cladosporium oxysporum* R2。

3 讨论与结论

植物内生真菌由于其独特的生存环境,与宿主在长期的生态系统演化中形成了互惠共生关系,可产生与宿主相同或者相似的具有生物活性的次生代谢产物,如红豆杉属植物及其内生真菌 *Taxomyces andreanae* 等均能合成抗癌药物紫杉醇^[4],蛇足石杉植物及其内生真菌 *Shiraia* sp. Slf14、*Aspergillus flavus* LF40 等均能代谢合成治疗老年痴呆症的药用活性成份石杉碱甲^[5-6]。因此,从药用植物中筛选产生物活性代谢产物的内生真菌,不但有利于野生药用植物资源的保护和开发利用,还为寻找新药和新型化合物开辟了新的有效途径。

银杏植物组织中含有丰富的黄酮类、银杏内酯和银杏酸等活性化合物^[9-11],韩晓丽等^[19]在对四川、贵州、山东等地的银杏内生真菌的研究中分离获得 7 株产黄酮内生真菌,严铸云等^[20]从 148 株银杏内生真菌中筛选获得 7 株产银杏内酯的内生真菌,刘小莉等^[21]从银杏树枝内生真菌 *Xylaria* sp. YX-28 中分离获得对多种病原菌有较高的抗菌活性的化合物 7-氨基-4-甲基香豆素。本研究从 36 株银杏内生真菌中筛选获得 8 株内生真菌至少对一种指示病原细菌显示了抑制活性,其中以菌株 R2 的抑菌范围和抑菌活性最强,根据菌株的形态特征和 ITS-rDNA 序列分析结果,将其最终鉴定为尖孢枝孢菌 *C. oxysporum*,与我们早先报道的一株蛇足石杉内生真菌^[22]属不同的类群。枝孢属的菌株遍布全球,分布广泛,易随空气扩散传播,通常在腐死的木本植物、稻草秸秆、土壤等中能发现^[15],作为内生真菌也有被分离的报道^[22-23]。目前,枝孢属真菌包括 30 多个种,尖孢枝孢菌 *C. oxysporum* 是其中常见种中的一种^[17]。研究表明,植物内生枝孢属真菌能够生长分泌石杉碱甲^[22]、紫杉醇等^[23]多种具有生物活性的次生代谢产物,具有重要的研究和应用价值。目前,我们正对本研究中筛选获得的抑菌活性菌株进行次生代谢产物研究,上述活性菌株能否代谢产生黄酮类和银杏内酯化合物,甚至是新的抑菌活性成分,还有待于我们进一步的研究证实。

参考文献:

- [1] Stone J K, Bacon C W, White J F. An overview of endophytic microbes: Endophytism Defined [M] // Bacon C W, White J. Microbial Endophytes, New York: Marcel Dekker, 2000: 3-29.
- [2] 郭良栋. 内生真菌研究进展 [J]. 菌物系统, 2001, 20(1): 148-152.
- [3] Wang Y, Zeng Q G, Zhang Z B, et al. Isolation and characterization of endophytic Huperzine A-producing fungi from *Huperzia serrata* [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2011, 38(9): 1267-1278.
- [4] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific Yew [J]. Science, 1993, 260(9): 214-216.
- [5] Zhu D, Wang J, Zeng Q, et al. A novel endophytic Huperzine A-producing fungus, *Shiraia* sp. Slf14, isolated from *Huperzia serrata* [J]. J Appl Microbiol, 2010, 109(4): 1469-1478.
- [6] 汪涯, 颜日明, 曾庆桂, 等. 一株产石杉碱甲蛇足石杉内生真菌的分离和鉴定 [J]. 菌物学报, 2011, 30(2): 255-262.
- [7] Strobel G, Daisy B, Castillo U, et al. Natural products from endophytic microorganisms [J]. J Nat Prod, 2004, 67(2): 257-268.
- [8] 汪涯, 曾庆桂, 张志斌, 等. 蛇足石杉内生真菌分离及其抑制乙酰胆碱酯酶活性研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 734-740.
- [9] 王旋, 张慧灵, 顾振纶, 等. 银杏内酯药理作用的研究进展 [J]. 中草药, 2005, 3(11): 1741-1744.
- [10] 江德安. 叶用银杏研究进展 [J]. 林业科技, 2003, 28(4): 45-49.
- [11] 林光荣, 林清洪, 胡维冀, 等. 银杏酸的分离、鉴定及对 5 种蔬菜病原真菌的抑制作用 [J]. 江西农业大学学报, 2010, 32(3): 498-503.
- [12] 曾庆桂, 朱笃, 颜日明, 等. 一株拮抗真菌的蛇足石杉内生细菌分离鉴定及培养条件优化 [J]. 微生物学通报, 2008, 35(4): 512-518.
- [13] 倪国荣, 潘晓华, 张智平, 等. 生防菌弗氏链霉菌 S-221 所产抗菌物质的抗菌活性测定 [J]. 江西农业大学学报, 2011, 33(2): 355-359.
- [14] 戴文君, 戴好富, 陈苹, 等. 海南粗榧内生真菌抗肿瘤抗菌活性的筛选 [J]. 微生物学通报, 2009, 36(8): 1217-1221.
- [15] 张中义. 中国真菌志: 第 14 卷 [M]. 北京: 科学出版社, 2003: 138-139.
- [16] 郭素枝. 扫描电镜技术及其应用 [M]. 厦门: 厦门大学出版社, 2006: 1-169.

- [17] Guo L D , Hyde K D , Liew E C Y. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences [J]. *New Phytol* ,2000 ,147(3) : 617-630.
- [18] Tasic S , Miladinovic-Tasic N. *Cladosporium* spp. cause of opportunistic mycoses [J]. *Acta Fac Med Naiss* ,2007 24(1) : 15-19.
- [19] 韩晓丽 ,康冀川 ,何劲 等. 银杏产黄酮内生真菌的分离与鉴定 [J]. *菌物研究* ,2008 6(1) : 40-45.
- [20] 严铸云 ,庞 蕾 ,罗静. 银杏内生真菌中产生银杏内酯类菌株的筛选 [J]. *华西药学杂志* ,2007 22(5) : 491-493.
- [21] Liu X L , Dong M S , Chen X H , et al. Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp. YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin [J]. *Appl Microbiol Biotechnol* ,2008 78(2) : 241-247.
- [22] Zhang Z B , Zeng Q G , Yan R M , et al. Endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides* LF70 from *Huperzia serrata* produces Huperzine A [J]. *World J Microbiol Biotechnol* ,2011 27(3) : 479-486.
- [23] Zhang P , Zhou P P , Yu L J. An endophytic taxol-producing fungus from *Taxus media* , *Cladosporium cladosporioides* MD2 [J]. *Curr Microbiol* ,2009 59(3) : 227-232.

(上接第 705 页)

- [48] Bagchi G D , Jain D C , Kumar , et al. The phytotoxic effects of the artemisinin related compounds of *Artemisia annua* [J]. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences* ,1998 ,20(1) : 5-11.
- [49] Dayan F E , Hernandez A , Allen S N , et al. Comparative phytotoxicity of artemisinin and several sesquiterpene analogs [J]. *Phytochemistry* ,1998 ,50(4) : 607-614.
- [50] 慕小倩 ,马燕 ,王硕 等. 黄花蒿化感作用机理研究 [J]. *西北植物学报* ,2005 25(5) : 1025-1028.
- [51] Paramanik R C , Chikkaswamy B K , Roy D G , et al. Effect of biochemicals of *Artemisia annua* in plants [J]. *Journal of Phytological Research* ,2008 21(1) : 11-18.
- [52] Jassbi A R , Zamanizadehnajari S , Baldwin I T. Phytotoxic volatiles in the roots and shoots of *Artemisia tridentata* as detected by headspace solid - phase microextraction and gas chromatographic - mass spectrometry analysis [J]. *Journal of Chemical Ecology* ,2010 ,36(12) : 1398-1407.
- [53] Shalinder K , Daizy R B. Assessment of allelopathic potential of *Artemisia scoparia* against some plants [J]. *The Bioscan* ,2010 ,5(3) : 411-414.
- [54] 郝双红 ,祝木金 ,冯俊涛 等. 35 种菊科植物除草活性初步测定 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版* ,2004 32(5) : 23-26.
- [55] 慕小倩 ,罗玛霞 ,段琦梅 等. 10 种菊科植物水提液对小麦幼苗生长的影响 [J]. *西北植物学报* ,2003 ,23(11) : 2014-2017.
- [56] Barratt B I P , Lorimer S D , Perry N B , et al. A bioassay to evaluate native plant extracts as slug feeding deterrents [C]. *Proceedings of the Forty Sixth New Zealand Plant Protection Conference* , Christchurch , New Zealand ,1993.
- [57] Clark S J , Dodds C J , Henderson I F , et al. A bioassay for screening materials influencing feeding in the field slug *Deroceras reticulatum* (Muller) (Mollusca: Pulmonata) [J]. *Annals of Applied Biology* ,1997 ,130(2) : 379-385.
- [58] Sherbiny A H EL , Omar A M , Sisi A G , et al. Natural botanical extracts as repellants for the house sparrow , *Passer domesticus*. II. Efficacy under rice field conditions [J]. *Annals of Agricultural Science* , Moshtohor ,1994 32(2) : 1053-1064.
- [59] Bakry F A , Mohamed R T , Homossany K. Biological and biochemical responses of *Biomphalaria alexandrina* to some extracts of the plants *Solanum siniacum* and *Artemisia judaica* L. [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology* ,2011 99(2) : 174-180.