

一株北里孢菌株的分离鉴定及其对松材线虫的致病性

王云 郑豪盈 樊永欣 杨建伟 张林 张成 陈慧茹 陈诚 牛秋红*

(南阳师范学院 生命科学与技术学院 河南 南阳 473061)

摘要:【目的】筛选、鉴定出对松材线虫杀灭活性较高的放线菌菌株，并确定生防菌株的毒力因子。【方法】采用平板活性测试及代谢杀虫活性检测方法进行筛选，采用形态学及 16S rDNA 序列分析等进行鉴定。对发酵液中的活性物质稳定性分析后，利用醇沉、萃取、层析、气相色谱/质谱分析等方法分离纯化出杀虫毒力因子。【结果】从河南南阳宝天曼的腐木及枯枝落叶样品中共分离获得了 79 株放线菌，从中筛选出对松材线虫有灭活作用的放线菌 6 株，其中分离株 C620 菌株对松材线虫的灭活性最高：该菌株的发酵液处理松材线虫 48、60 h 后线虫的死亡率分别达到 60.0%、81.5%。结合该菌株的形态学、生理学特征及 16S rDNA 序列分析等结果将其归为北里孢菌属中的一个种，菌株编号 *Kitasatospora* sp. strain C620。该菌株的发酵液中杀线虫活性物质的热稳定性、光稳定性及耐储藏性均较强，在中性偏碱性环境较稳定；经 pH 纸电泳层析初步确定该物质属于碱性水溶性物质。对菌株 C620 发酵液分离纯化，得到活性化合物为 1-苯基-3-(2-吡啶)-5-吡唑啉酮。【结论】获得一株松材线虫高效生防菌 *Kitasatospora* sp. strain C620，其活性物质为 1-苯基-3-(2-吡啶)-5-吡唑啉酮。

关键词：松材线虫，生防放线菌，北里孢菌，碱性物质

Screening, identification and the virulence factor of an actinomycete strain *Kitasatospora* sp. C620 to *Bursaphelenchus xylophilus*

WANG Yun ZHENG Hao-Ying FAN Yong-Xin YANG Jian-Wei ZHANG Lin
ZHANG Cheng CHEN Hui-Ru CHEN Cheng NIU Qiu-Hong*

(College of Life Science and Technology, Nanyang Normal University, Nanyang, Henan 473061, China)

Abstract: [Objective] The actinomycete strains with high nematocidal activity against *Bursaphelenchus xylophilus* were isolated and identified. The virulence factors were determined. [Methods] Strains were selected by plate activity test and insecticidal activity detection by metabolites. Strains were identified by phenotypic and genotypic characteristics. After analyzing the primary characteristics of the activity substances in the fermented broth, the virulence factor was

基金项目：国家自然科学基金项目(No. 31100104)；河南省教育厅科学技术研究重点项目基础研究计划项目(No. 13A180809)；河南省高等学校《生物工程专业综合改革试点》项目(教高【2012】859号-41)；河南省高等学校《生物科学专业核心课程教学团队》项目(教高【2012】1099号-19)；南阳师范学院青年基金项目(QN. 2011002)

*通讯作者：✉: qiuhongniu@hotmail.com

收稿日期：2014-03-09；接受日期：2014-09-09；优先数字出版日期(www.cnki.net)：2014-09-16

purified and identified using alcohol precipitation, extracted by chloroform, chromatographer, and GC-MS. [Results] Seventy nine actinomycetes were isolated and six strains which had nematocidal activity to *B. xylophilus* were totally found from the rotten wood, dry branches and fallen leaves in Baotianman Natural Reserves in Nanyang, Henan Province, China. Among which, an actinomycete strain C620, showed the highest nematocidal activity to *B. xylophilus*. The culture supernatant from the strain C620 separately killed 60.0% and 81.5% of *B. xylophilus* within 48 h and 60 h, which suggested the high toxic activity toward the nematodes. The actinomycete was classified to be *Kitasatospora* genus. The virulence factor in the fermented broth of C620 showed strong thermal stability, light stability and storage resistance. The bioactive substance was stable in alkaline environments and can be dissolved in water. Finally, the compound was found to be 1-phenyl-3-(2-pyridyl)-5-pyrazolone. [Conclusion] An actinomycete strain *Kitasatospora* sp. C620 with high killing activity against *B. xylophilus* was isolated and the virulence factor was 1-phenyl-3-(2-pyridyl)-5-pyrazolone.

Keywords: *Bursaphelenchus xylophilus*, Biocontrol actinomycete, *Kitasatospora*, Alkaline substance

植物寄生线虫病是一类世界范围内普遍发生的植物病害, 主要是由松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)、根结线虫(*Meloidogyne* spp.)和胞囊线虫(*Heterodera* spp.)引起的。全世界每年因线虫危害导致粮食和纤维作物损失约占 12.7%^[1], 线虫病害已成为农林生产上的重要问题^[2]。松材线虫寄生在松属树种体内取食营养而导致树木迅速死亡引发松树萎蔫病, 该病已被列为森林病虫害之首, 被称为“无烟的森林火灾”, 属国际重要检疫对象。目前对松材线虫的主要传播媒介松墨天牛的生物防治研究和利用的报道较多, 而直接对松材线虫生物防治研究重视的程度还不够^[3]。

在线虫的生物防治中, 抗生素的应用是较为有效的防治途径之一。放线菌作为抗生素的主要产生菌, 其代谢途径复杂, 产生的次生代谢产物在结构类型和生物活性等方面都呈现出与细菌和真菌不同的特点和多样性^[4]。利用放线菌的代谢产物控制线虫病害成为防治植物线虫病的重要发展方向^[5-6]。据统计, 从放线菌中发现的生物活性物质已经超过 13 700 余种, 占已发现的天然活性物质(33 500)的 40%以上^[7]。目前, 临床和农业上用于生防的 150 多种抗生素, 有 2/3 来自放线菌, 放线菌对人类健康做出的贡献是难以估量的^[8-9]。很多放线菌的代谢产物如阿维菌素(Avermectins)、南昌霉素(Nanchangmycin)等都具有较高的杀线虫活性^[10]。

研究表明, 一些放线菌的代谢产物对植物寄生线虫具有抑制或毒杀作用^[11-12], 将其代谢物或衍生物开发成生物农药可避免生防菌在复杂土壤环境中的生长繁殖问题^[13]。

本研究从南阳宝天曼自然保护区的腐木及枯枝落叶中分离得到的放线菌中筛选对松材线虫具有较高杀灭活性的菌株, 对筛选到的菌株进行鉴定, 并对高活性菌株可能的杀线虫毒性因子的理化性质进行了初步研究, 以便为生防放线菌菌株的开发利用提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 放线菌菌株的分离培养及发酵液的制备

将采集的腐木等样品用无菌水浸泡过夜, 梯度稀释法涂布于高氏一号培养基平板上^[11], 获得的放线菌单菌落在高氏一号培养基平板上纯化 3 次后, 保存于高氏一号斜面培养基。

将放线菌菌株单菌落接入高氏一号液体培养基 50 mL 的三角瓶中, 25 °C、180 r/min 培养 7 d 后, 布氏漏斗法对发酵液进行抽滤, 滤出菌丝后, 即为放线菌发酵滤液, 置于 4 °C 保存备用。

1.2 松材线虫生防放线菌的筛选

根据文献筛选具有杀松材线虫活性的放线菌菌株^[14]。详细步骤如下: 在培养基平板上铺 3 层灭菌的玻璃纸来防止线虫移动到培养基内, 将放线菌涂布在玻璃纸上, 在 25 °C 培养箱培养 7-10 d。

然后在玻璃纸中间加入待测线虫 *B. xylophilus*。将平板划分 20 个区域,每隔 12 h 后在解剖镜下随机选择 5 个区域观察记录线虫的成活情况。使用大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 平板作为阴性对照组,每组设 3 个平行实验,重复 3 次,取平均值。

1.3 高活性放线菌的分类鉴定

1.3.1 形态特征:菌落特征:观察菌落的颜色、大小,气生菌丝和基内菌丝颜色,有无色素等。

菌丝特征:采用平皿插片法观察菌株的形态特征,在高氏一号培养基平板上密集划线接种,无菌操作镊子取灭菌盖玻片以约 45 度角插入平板接种线上,28 °C 倒置培养 3-5 d,用镊子小心取出盖玻片,用纸擦去背面培养物,有菌面朝上放在载玻片上,用光学显微镜观察气丝、基丝形态以及是否有横隔、断裂、膨大等特征^[15]。

1.3.2 16S rDNA 序列分析:放线菌基因组的提取及 16S rDNA 的扩增参照文献[16]。采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3')和 1492R (5'-ACGGATACCTTGTTACGACTT-3') 进行 16S rDNA 的 PCR 扩增。PCR 扩增条件:94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 45 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。

扩增产物纯化后连接到 pMD18-T (TaKaRa)克隆载体中,筛选阳性克隆并进行测序(上海生工生物技术有限公司)。将所得序列利用 BLAST 软件在 GenBank 数据库中进行相似性搜索,选取同源性比较高的典型菌株的 16S rRNA 基因序列作为参比对象,然后用 ClustalX 软件进行多序列比对并计算供试菌株与参比菌株之间的序列相似性^[17-18],采用邻位相接法(Neighbor-Joining)^[19],应用 MEGA 3.1 软件构建供试菌与参比菌之间的系统进化树^[20]。用于检验支持率的重复抽样次数为 1 000 次。结合序列相似性比对结果以及系统进化树对放线菌进行初步鉴定。

1.4 高活性放线菌的发酵液稳定性测定

1.4.1 发酵液热稳定性测试:将发酵液分别于 30、40、50、60、70、80、90、100 °C 恒温水浴锅中

处理 1 h 后,放置常温下检测杀线虫活性,以未处理发酵液和无菌水为对照,每个处理重复 3 次。

1.4.2 酸碱稳定性测定:首先,用 pH 计测定菌株 C620 的原始发酵上清液,精确为 pH 7.3。然后分别用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 将发酵液调至 pH 值为 2.0-12.0,静置 24 h 后,再调 pH 值为原上清液的 pH 值(7.3)后,检测杀线虫活性,以空白的高氏一号液体培养基为阴性对照,每个处理重复 3 次。

1.4.3 光稳定性测定:将发酵液置于 25 °C 下贮存于自然光照 1、5、10、15、20、25、30 d 后,检测杀线虫活性,以未处理的发酵液和无菌水为对照,每个处理重复 3 次。

1.4.4 耐贮藏性测定:将发酵液置于 25 °C 黑暗条件下贮存 30、60、90、120、150、200 d 后,检测杀线虫活性,以未处理的发酵液和无菌水为对照,每个处理重复 3 次。

1.5 高活性放线菌活性物质的初步鉴别

采用 pH 纸层析法测定活性物质的离子特性^[21]。首先配置 pH 4.0-8.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液以及 pH 9.0-12.0 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液。分别用以上不同 pH 的缓冲液处理滤纸条,晾干后点样 5 μL。在水饱和的正丁醇中展层 15 cm 后取出,自然晾干,待用。

生物检测方法参照文献[22]。将纸条自然晾干后,置于 55 °C 烘箱中,碘蒸气显色,用铅笔标出斑点位置,待碘完全褪色后,把斑点处纸条剪成碎块置于无离子水中,浸泡 24 h,取出碎纸片,加入松材线虫作活体测定,计算活性斑点位置 R_f 值。

R_f =原点至色斑中心的距离/原点至展层剂前沿的距离

1.6 活性物质的分离纯化

这部分工作由湖北省疾病预防控制中心毒物检测中心协助完成。首先离心将菌丝体去除,醇沉去除大分子杂质,氯仿萃取有机溶剂,薄层层析、硅胶柱层析,最后将以上步骤获得的具有杀虫活性组分溶于甲醇,进行气相色谱/质谱(GC/MS)分析。

2 结果与分析

2.1 松材线虫生防放线菌的分离和筛选

对 200 份腐木样品进行放线菌分离,共分离到 79 株放线菌。对这 79 株放线菌的杀线虫活性进行了初步筛选,发现 7 株放线菌(B62、C620、E61、E62、G52、H45 和 H46)菌株对松材线虫具有明显的杀线虫活性,其中放线菌 C620 在 72 h 内对松材线虫的致死率达 100%,具体阳性结果见表 1。结果表明,菌株 C620 的杀线虫活性最强。

表 1 放线菌的杀线虫活性初步测定			
Table 1 Determination of nematocidal activity against <i>B. xylophilus</i>			
菌株编号 No. of strains	发酵液杀线虫活性(致死率%) Mortalities of culture supernatants (%)		
	24 h	48 h	72 h
B62	70	75	80
C620	80	90	100
E61	60	70	75
E62	50	60	65
G52	60	65	75
H45	50	60	70
H46	55	65	70
空白培养基对照 Control	5	5	5

2.2 放线菌 C620 菌株的杀线虫活性结果

选取初筛活性最强的菌株 C620 进行松材线虫活性复测,在第 60、72 h 时死亡率分别为 81.5%和 95.8%,无菌水对照死亡率为 0。如图 1 所示,放线菌菌株 C620 的发酵液对松材线虫具有明显的毒性。当作用 60 h 时,大部分待测线虫均处于死亡状态(图 1A),当作用 72 h 时,线虫开始出现部分被降解的情况(图 1B),但是在从培养基和水的对照实验中,直到 72 h 线虫的死亡率还低于 5%(图 1C)。

2.3 放线菌 C620 菌株的鉴定

2.3.1 表型特征:该放线菌在高氏一号平板上的菌落颜色为灰白色,基内菌丝为橘黄色,无色素生成。该菌株的气生孢子丝形态为直线状,无螺旋,无横隔、断裂,一级轮生。孢子形态为卵圆形。

2.3.2 16S rDNA 序列分析:为了进一步鉴定分离菌株 C620,通过 PCR 扩增,测序得到该菌株的约 1.5 kb 左右的 16S rDNA 序列。将得到的序列递交至 NCBI,GenBank 登录号为 KF052128。此序列在数据库比对后,取与其相似性最大的前 7 个相关种属的 16S rDNA 序列,以此为基础构建了包括 7 株相关种属的放线菌系统发育树。如图 2 所示,分离菌株 C620 与 *Kitasatospora setae* NBRC 14216 (AB184576)在同一分支,两者序列相似性为

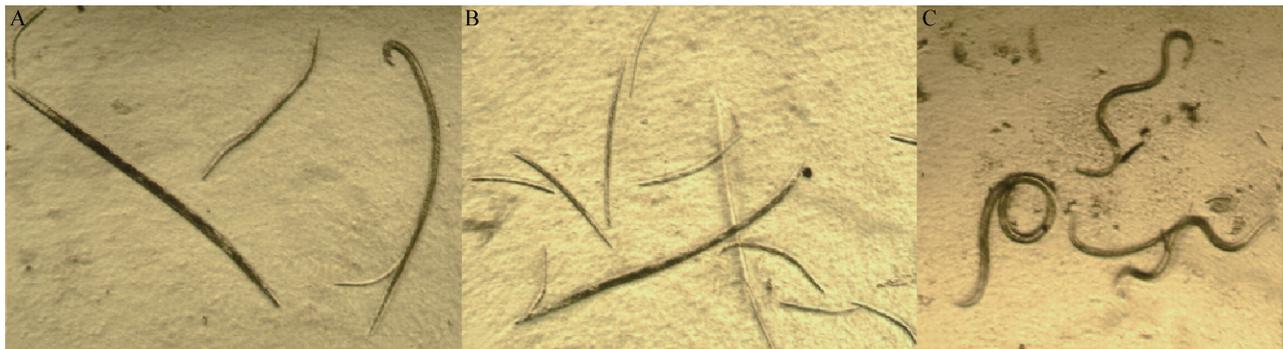


图 1 光学显微镜下观察到 C620 的发酵液对线虫 *B. xylophilus* 的作用(100×)

Figure 1 The action of fermentation extract of strain C620 against nematode *B. xylophilus* observed under a dissecting microscope (100×)

注: A: 无菌水作用线虫 72 h 内观察到的对照实验; B: C620 的发酵液作用线虫 60 h; C: C620 的发酵液作用线虫 72 h。

Note: A: Control treated with sterile water for 72 h; B: C620 treated for 60 h; C: C620 treated for 72 h.

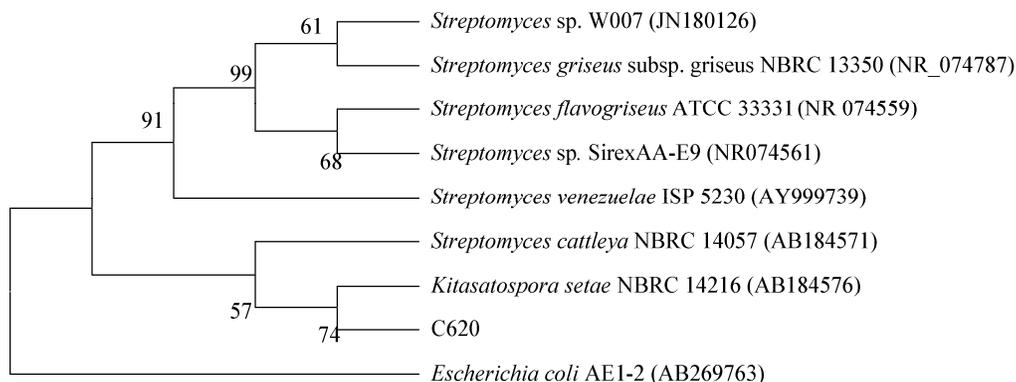


图2 放线菌分离株 C620 的系统发育学分析

Figure 2 Phylogenetic dendrogram obtained by distance matrix analysis of 16S rDNA sequences

注: 发育树节点的数字表示 Bootstrap 值; 括号中的数字为序列登录号。

Note: The numbers at each branch points indicate the percentage supported by bootstrap. Numbers in parentheses are accession numbers of sequence in GenBank.

98.6%。根据 16S rDNA 同源性比较结合菌株的形态学观察和生理学特征可基本将分离的菌株归属为北里孢属中的一个种 *Kitasatospora* sp. C620。

2.4 放线菌分离株 C620 的发酵液稳定性

2.4.1 热稳定性: 试验结果表明, C620 发酵液经不同温度处理, 60 h 后线虫的最低致死率为 85.33%, 最高致死率为 90.33%, 各个温度处理后的杀虫活性与对照之间差异不显著(表 2)。发酵液中杀线虫活性物质对温度不敏感, 即使高温处理对杀线虫活性物质的活性影响也较小, 可见 C620 通过次生代谢产生了热稳定的、对松材线虫具有高活性的物质, 可贮存于室温下。

2.4.2 酸碱稳定性(表 3): 菌株 C620 的发酵液在中性偏碱性环境较稳定, 在强酸强碱下其杀线虫活性下降, 表明中性偏碱活性物质起主要的杀线虫作用。因此, 在 C620 发酵液活性物质提取过程中避免过酸过碱。

2.4.3 光稳定性: 试验结果表明, 随着自然光照天数的增加, 180 d 处理后观察对线虫的最低致死率为 88.33%, 最高致死率为 90.33%, 各个处理之间的差异不显著(表 4)。可见 C620 通过次生代谢产生了耐光照且对松材线虫具有活性的物质。揭示了该杀线代谢产物具有田间适用性。

表 2 温度对 C620 杀线虫活性物质稳定性的影响
Table 2 Affection of temperature on nematocidal activity of C620 against *B. xylophilus*

温度 Temperature (°C)	致死率 Mortality (%)			
	1	2	3	平均值 Average
30	91	90	88	89.67
40	90	88	90	89.33
50	87	91	90	89.33
60	87	85	89	87.00
70	88	86	88	87.33
80	87	88	87	87.33
90	86	85	85	85.33
100	85	86	86	85.67
Control	89	90	92	90.33

2.4.4 耐贮藏性: 试验结果表明, 随着贮存天数的增加, C620 发酵液中活性物质的活性并未出现明显衰减, 72 h 处理后观察对线虫的最低致死率为 85.67%, 最高致死率为 87.67%, 各个处理之间的差异不显著(表 5)。可见 C620 通过次生代谢产生了可以长时间保留的对松材线虫具有活性的物质, 揭示了该杀线代谢产物具有广阔的市场开发应用潜力。

表3 pH对C620杀线虫活性物质稳定性的影响
Table 3 Affection of pH on nematocidal activity of C620 against *B. xylophilus*

pH	致死率 Mortality (%)			
	1	2	3	平均值 Average
2	20	23	18	20.33
3	25	24	20	23.00
4	30	32	30	30.67
5	37	35	39	37.00
6	60	56	58	58.00
7	77	78	77	77.33
8	82	85	86	84.33
9	80	82	83	81.67
10	72	70	72	71.33
11	50	52	50	50.67
12	31	33	30	31.33
Control	2	3	3	2.67

表4 光照时间对C620杀线虫活性物质稳定性的影响
Table 4 Affection of illumination time on nematocidal activity of C620 against *B. xylophilus*

光照时间 Illumination time (d)	致死率 Mortality (%)			
	1	2	3	平均值 Average
1	89	86	88	87.67
5	87	85	85	85.67
10	85	86	86	85.67
15	86	87	86	86.33
20	88	85	85	86.00
25	87	87	87	87.00
30	85	88	86	86.33
Control	0	0	0	0

2.5 C620 杀线虫物质的初步鉴别

在 pH 12.0 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液中 400 V 电泳 2 h, 经生物测定其活性物质向负极有移动; 而在 pH 4.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中电泳时, 活性物质不移动。表明该发酵液中活性物质主要为碱性物质(图 3)。

2.6 C620 活性组分的气相色谱/质谱(GC/MS)分析

将分离收集到的活性组分溶于甲醇后进行气相色谱/质谱分析, 气相色谱结果如图 4 所示。发现出峰时间 14.778 min 的组分为分离得到的活性物

表5 储藏时间对C620杀线虫活性物质稳定性的影响
Table 5 Affection of storage time on nematocidal activity of C620 against *B. xylophilus*

储藏时间 Storage time (d)	致死率 Mortality (%)			
	1	2	3	平均值 Average
30	92	88	89	89.67
60	91	90	90	90.33
90	89	89	89	89.00
120	91	90	90	90.33
150	91	90	87	89.33
180	90	87	88	88.33
Control	0	0	0	0

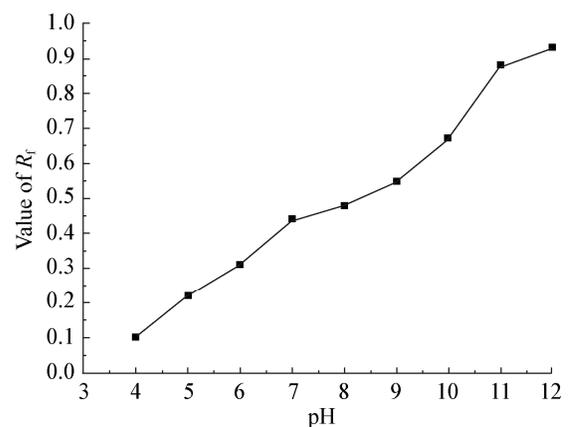


图3 放线菌 C620 的 pH-PC 层析结果分析
Figure 3 Results of pH-PC chromatography of C620

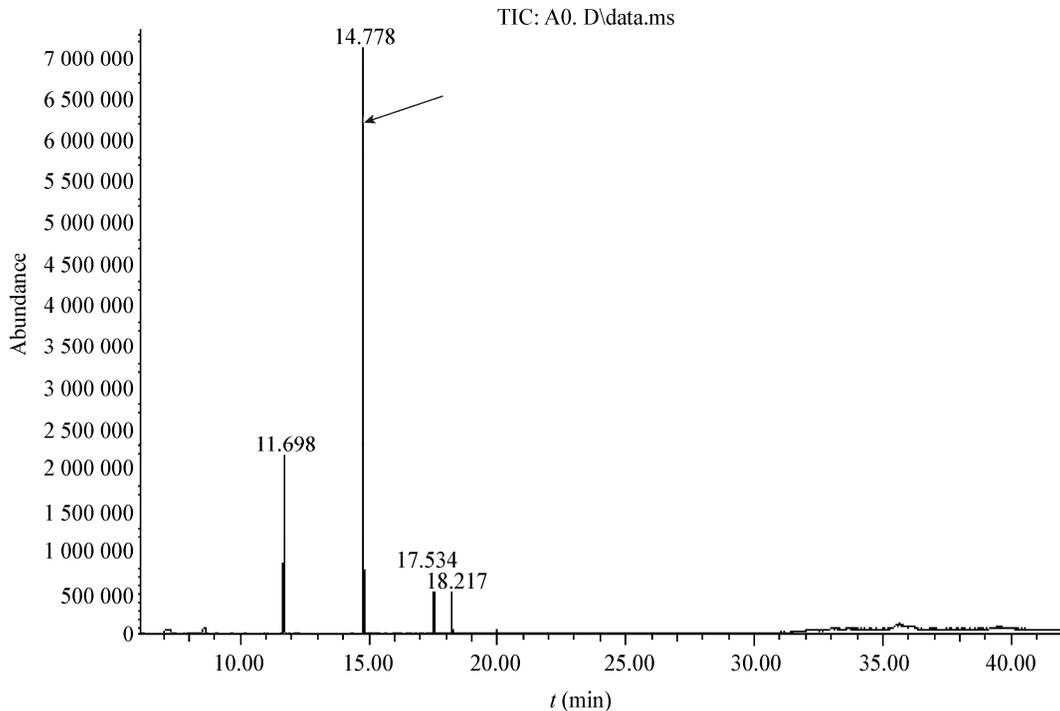


图4 放线菌 C620 活性组分的气相色谱图

Figure 4 The gas chromatography of activity component of C620

质。对该峰物质采用 Wiley 27.3 和 Nist 98 图谱库进行检索,发现活性物质为 1-苯基-3-(2-吡啶)-5-吡唑啉酮。

3 结论与讨论

通过对放线菌分离株 C620 所产生的杀线虫活性物质的稳定性检测发现:该物质具备很强的耐热性,耐光照及耐储存性,为该物质的发酵生产和保存提供了理论依据。从纸电泳实验结果可以分析得出,C620 产生的活性物质是一种强碱性、极性极强的水溶性抗生素。对该菌株的杀虫活性物质进一步分离纯化,经气相色谱/质谱分析,初步鉴定为 1-苯基-3-(2-吡啶)-5-吡唑啉酮。已有报道表明,这种化合物的多种衍生物在农药医药等多个领域都得到了广泛的应用。本研究只是通过气相色谱鉴定得到了活性物质的结构,后续试验还需要经红外光谱、质谱和核磁共振等方法进一步的证实。

松材线虫由于其特殊的生理生态构造和独特

的生存环境,属于较难杀灭的线虫种类。本研究确定了一株放线菌 C620 对松材线虫的强毒杀作用,由于该菌株本身的稳定性及其代谢产物对松材线虫的毒杀作用的高效性,因而本研究具有一定的理论意义和应用价值。

参考文献

- [1] 刘维志. 植物线虫志[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 12.
- [2] 张克勤. 植物寄生线虫生物防治[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2004: 28.
- [3] 董锦艳, 李钊, 张克勤. 松材线虫生物防治研究进展[J]. 植物保护, 2005, 31(5): 9-11.
- [4] Dicklow MB, Acosta N, Zuckerman BM. A novel *Streptomyces* species for controlling plant-parasitic nematodes[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1993, 9(2): 159-173.
- [5] Chubachi K, Furukawa M, Fukuda S, et al. Suppressive effects of antinematodal *Streptomyces* spp. on root-knot nematodes of cucumber caused by *Meloidogyne incognita*[J]. *Biocontrol Science*, 2002, 7(1): 25-29.
- [6] Ruanpanun P, Laatsch H, Nuchanart T, et al. Nematicidal

- activity of fervenulin isolated from a nematocidal actinomycete, *Streptomyces* sp. CMU-MH021, on *Meloidogyne incognita*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(6): 1373-1380.
- [7] Bérdy J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading[J]. Journal of Antibiotics, 2012, 65(8): 385-395.
- [8] Bérdy J. Bioactive microbial metabolites, a personal review[J]. Journal of Antibiotics, 2005, 58(4): 1-26.
- [9] 李文均, 职晓阳, 唐蜀昆. 我国放线菌系统学研究历史、现状及未来发展趋势[J]. 微生物学通报, 2013, 40(10): 1860-1873.
- [10] 陈立杰, 陈井生, 董健, 等. 放线菌次生代谢产物对不同来源大豆胞囊线虫 J2毒性的研究[J]. 大豆科学, 2008, 27(4): 637-640.
- [11] Ruanpanun P, Yokota A, Lumyong S. Characterization of *Streptomyces* strain CMU-MH021, a nematocidal actinomycete isolated from plant-parasitic nematode-infested soil in northern Thailand[J]. Annals of Microbiology, 2012, 62(4): 1447-1452.
- [12] 李玲玉, 赵迪, 刘晓宇, 等. 放线菌 Snea253代谢产物及寡糖对南方根结线虫活性的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(93): 117-122.
- [13] Kruger GR, Xing LJ, LeRoy AR, et al. *Meloidogyne incognita* resistance in soybean under midwest condition[J]. Crop Science, 2008, 48: 716-726.
- [14] Rosen S, Sjollem K, Veehuis M, et al. A cytoplasmic lectin produced by the fungus *Arthobotrys oligospora* functions as a storage protein during saprophytic and parasitic growth[J]. Microbiology (UK), 1997, 143: 2593-2604.
- [15] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 72-73.
- [16] 徐平, 李文均, 徐丽华, 等. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA[J]. 微生物学通报, 2003, 30(4): 82-85.
- [17] Higgins DG, Bleasby AJ, Fuchs R. CLUSTAL V: Improved software for multiple sequence alignment[J]. Computer Applications in the Biosciences, 1992, 8: 189-191.
- [18] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 24: 4876-4882.
- [19] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree[J]. Molecular Biology Evolution, 1987, 4: 406-425.
- [20] Kumars S, Tamura K, Nei M. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5: 150-163.
- [21] 段玉玺, 谭可菲, 陈立杰, 等. 根结线虫生防菌 SneaF8代谢产物理化性质的初步研究[J]. 农药, 2008, 47(10): 754-756.
- [22] 陈立杰, 董健, 朱晓峰, 等. 生防放线菌 Snea253代谢产物的理化性质[J]. 农药, 2010, 49(1): 26-28.