

杀线虫活性放线菌的筛选及鉴定

朱国兴¹, 焦钰¹, 吴雅杰¹, 樊炳君¹, 叶秀娟¹, 曹艳茹^{1,2,3*}

(1. 昆明学院 农学与生命科学学院, 云南 昆明 650214; 2. 昆明学院 农业资源利用科技创新团队, 云南 昆明 650214;
3. 云南省高校蛭类资源开发与利用工程研究中心, 云南 昆明 650214)

摘要: 线虫是一种危害极大的植物病原生物, 给农业生产带来巨大危害。采用平板稀释法从轿子山土样和白云鄂博稀土矿样品中分离放线菌并鉴定, 利用 24 孔板液体模型筛选具有杀秀丽隐杆线虫的放线菌。结果表明, 分离的 257 株放线菌隶属 37 属、24 科, 有 5 株菌的发酵液对 2 龄秀丽隐杆线虫的致死率高于 70%, 经 16S rDNA 分析鉴定 5 株菌 KC 97, KC 107, KC 113, KC 36, KC 240 分别为 *Pseudonocardia seranimata*, *Micromonospora echinofusca*, *Pseudonocardia rhizophila*, *Micromonospora peucetia*, *Saccharothrix espanaensis*。获得的活性菌株为线虫的生物防治提供了丰富的微生物资源。

关键词: 秀丽隐杆线虫; 放线菌; 筛选; 鉴定

中图分类号: Q939.13; S432.43 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5639 (2022) 03-0093-07

DOI: 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2022.03.018

Screening and Identification of Active Actinomycetes for Control of Nematode

ZHU Guoxing¹, JIAO Yu¹, WU Yajie¹, FAN Bingjun¹, YE Xiujuan¹, CAO Yanru^{1,2,3*}

(1. School of Agriculture and Life Sciences, Kunming University, Kunming, Yunnan, China 650214;

2. Scientific and Technological Innovation Team for Agricultural Resource Utilization
Kunming University, Kunming, Yunnan, China 650214;

3. Engineering Research Center for Exploitation and Utilization of Leech Resources, Kunming, Yunnan, China 650214)

Abstract: Nematode is a plant pathogenic organism with great harm to farming. Actinomycetes from Jiaozi Mountain and Bayanobo rare earth mine samples were isolated and identified by plate dilution method and screened activity for killing *Caenorhabditis elegans* by 24 well plate liquid model. The results showed that 257 representative isolates were obtained belonging to 37 genera and 24 families, among which 5 strains' fermentation has high nematocidal activity against *C. elegans* with mortalities above 70%. Based on 16S rDNA sequence analysis, 5 Actinomycetes of KC 97, KC107, KC113, KC36 and KC240 were identified as *Pseudonocardia seranimata*, *Micromonospora echinofusca*, *Pseudonocardia rhizophila*, *Micromonospora peucetia*, *Saccharothrix espanaensis*. The active Actinomycete strains are good resource for researching biological control of plant-parasitic nematode disease.

Key words: *Caenorhabditis elegans*; Actinomycetes; screening; identification

线虫病是一种分布较广的土传病害, 其具有种类多、传播途径广、繁殖能力强、危害程度大、寄生范围广和休眠体存活时间长等特点^[1-3]。目前, 已知的线虫种类有 100 多种, 可侵染的植物高达

收稿日期: 2022-01-12

基金项目: 云南省地方本科高校(部分)基础研究联合专项资金项目(2018FH001-003); 云南省教育厅科学研究基金项目(2021Y733); 云南省“万人计划”青年拔尖人才资助项目(YNWR-QNBJ-2018-011); 省部共建云南生物资源保护与利用国家重点实验室开放课题(2019KF005); 国家自然科学基金项目(31660002)。

作者简介: 朱国兴(1995—), 女, 安徽亳州人, 硕士研究生, 主要从事微生物资源利用及植物保护研究。

* **通信作者:** 曹艳茹(1983—), 女, 内蒙古乌海人, 教授, 博士, 主要从事微生物研究, E-mail: yanrucao3@aliyun.com.

5 000 种, 大多数蔬菜、作物都能成为根结线虫的寄主。根结线虫主要通过风、灌溉水、种子、农用器械操作不当以及单一作物种植等方式传播^[4-5], 给农业、园林园艺等产业造成巨大损失, 全世界每年因线虫造成的经济损失高达 1 570 亿美元^[6]。线虫已被多数国家列为植物检疫对象。

目前, 对线虫病的防治手段主要有农业防治、物理防治、化学防治和生物防治^[7]。传统的农业防治通过轮作、间作、选用无虫地块育苗等方式防治根结线虫, 但该方式见效慢、时间长、防治效率低, 很难控制线虫病的发生和危害。物理防治主要通过高温闷棚、水淹处理等方式进行防治, 方法虽然简便易行, 但无法杀死土壤更深层的线虫和虫卵。化学手段是目前最主要的线虫防治方法, 化学杀虫剂能够短时间内快速杀死线虫, 但杀虫剂的普遍使用带来了农残高、易造成人畜中毒、农业面源污染、线虫易产生抗药性等一系列问题^[8]。而生物防治有着不易产生抗性、生态安全等优点^[9-10], 生防微生物作为生物防治的方式之一, 近年来已逐渐成为研究热点。目前, 常用的微生物源杀虫剂主要有两大类, 一类是以淡紫拟青霉为代表的真菌杀线虫剂, 其不仅可以杀死幼虫, 而且还可以杀死成虫^[11]; 另一类是以阿维菌素为代表的微生物代谢产物制剂。目前杀线虫商品微生物制剂品种数量较少, 挖掘对线虫具有生物活性的优良微生物菌株, 可为高效生物杀线虫菌剂的开发提供研究资源。然而, 常规环境下的微生物菌种已被国内外的科研工作者反复筛选和利用, 因此从特殊环境或者微生物研究较少的生境中寻找新的活性菌株是快速获得目标微生物的有效途径^[12-13]。

放线菌 (Actinomycete) 在自然界中分布广泛, 其可以产生多种具有生物活性的次级代谢产物。世界上已发现的抗生素大约有 2/3 是由放线菌产生的^[14-17], 杀线虫农用抗生素—阿维菌素就是由链霉菌 (*Streptomyces avermitilis*) 发酵产生。为了挖掘更多活性放线菌资源, 人们把目光转向了特殊环境或者微生物研究较少的生境, 例如: 陈聪聪等^[18]用稀释涂布平板法对采自青岛近海海域的样品进行放线菌分离, 经筛选得到 HT-8 (*Streptomyces termitum*) 线虫校正死亡率为 88.30%; 阿尔新等^[19]从新疆高盐环境—阿勒泰福海县盐场和罗布泊中分离获得了 14 株具有杀线虫活性的放线菌; 曾庆飞

等^[20]从海南东寨港红树林等生境分离得到的放线菌 DA07118 杀线虫活性高达 100%。

云南轿子山地处昆明北部东川区与禄劝县交界处, 海拔 4 344.1 m, 被誉为滇中第一高峰, 地形复杂, 是探究生物多样性分布格局及其影响因素的理想之地^[21]。轿子山自然保护区还具有滇中地区最为完整和丰富的植被以及生境垂直带谱, 是一个巨大的天然物种基因库, 目前已有对该地动物和植物的相关调查报告, 但对于组成轿子山生态系统重要一员的微生物研究却为空白。轿子山土壤类型较丰富, 有红壤、黄棕壤、棕壤、暗棕壤、棕色针叶林土以及亚高山草甸土等类型^[22], 加之大面积连片存在的多种原生植被类型, 成了放线菌资源筛选的理想生境。白云鄂博稀土矿为本实验样品的另一个来源。白云鄂博位于内蒙古高原南部, 海拔为 2 000 ~ 3 000 m, 该矿区为一座大型的铁、铌、稀土等多种金属共生矿, 其稀土元素资源量占世界上已知稀土元素资源总量的 2/3 以上^[23]。白云鄂博稀土矿长达 60 余年的露天开采, 致使周围环境累积了大量重金属和放射性元素, 形成了典型的极端环境^[24-26]。樊永军等^[27]从白云鄂博稀土矿分离出 14 株耐高辐射元素放线菌; 曹艳茹等^[28-29]从该矿区分离得到新种 *Actinorectispora metalli* 和 *Kibdelosporangium metalli*。这表明白云鄂博稀土矿存在特殊的菌种资源, 但目前尚未见到对白云鄂博稀土矿放线菌杀线虫活性菌株的研究报道。

本研究利用稀释涂布平板法对轿子山自然保护区和白云鄂博稀土矿的放线菌进行分离, 并筛选分离放线菌的杀线虫活性, 以为杀线虫菌剂的研发提供菌种资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤采集

将从轿子山自然保护区和白云鄂博稀土矿采集得到的 90 份样品置于无菌袋中, 4 ℃ 保存以待分离。

1.1.2 供试线虫

秀丽隐杆线虫由于具有繁殖简单、生命周期短、基因组小、透明易观察、体积小易操作等优点, 作为生物模型被广泛用于农业生防、细胞生物学、神经科学和衰老研究等领域。此外, 秀丽隐杆

线虫操作简单、廉价、生命周期短的优点为本实验的顺利开展提供了保障。

在进行杀线虫活性筛选时, 先对线虫进行活化。用竹签挑取带有线虫的块状培养基, 接种在涂布有 250 μ L 大肠杆菌的 NGM 培养基上, 20 $^{\circ}$ C 培养 1 d 后显微观察。对处于排卵期的线虫进行同步化处理并继续培养至 2 龄幼虫进行洗脱备用。

1.1.3 放线菌分离培养基

根据放线菌的营养特点, 选用改良 HV 培养基^[30]、改良 Bennet 培养基^[30]、小米液体培养基^[30]、BP 培养基^[30]、淀粉酪蛋白培养基^[31]、几丁质培养基^[31]、可溶性淀粉-酵母提取物培养基^[32]、牛肉膏蛋白胨培养基^[33]、高氏 1 号培养基^[33]、无机盐淀粉琼脂培养基^[34] 共 10 种培养基进行放线菌的分离。

1.1.4 放线菌发酵培养基

采用改良酵母膏-麦芽汁液体培养基进行放线菌发酵液制备。培养基配方如下: 酵母膏 4 g、麦芽膏 5 g、葡萄糖 4 g、胰蛋白胨 2 g、植物蛋白胨 1 g、微量盐 1 mL、复合维生素微量, pH7.3, 121 $^{\circ}$ C 灭菌 30 min。

1.2 方法

1.2.1 放线菌分离

每份样品称取 2 g, 自然风干 7 d, 100 $^{\circ}$ C 干热处理 1 h。加入装有 18 mL 无菌水的三角瓶中, 于 28 $^{\circ}$ C、200 r/min 摇床震荡 30 min 得到土壤悬液, 再进行 10 倍梯度稀释, 稀释至 10^4 倍。吸取 0.2 mL 稀释液涂布于分离培养基上, 于 28 $^{\circ}$ C 培养 30 d, 挑取、纯化菌株后, 接种于改良酵母膏-麦芽汁斜面培养基和甘油管于 4 $^{\circ}$ C、-80 $^{\circ}$ C 保藏。

1.2.2 放线菌鉴定

观察菌落特征。根据菌落大小、形态、颜色、边缘整齐度以及色素等进行初步去重复后, 采用酶法提取菌株总 DNA^[35] 后, 以细菌通用引物 (上游引物 PA: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG-3', 下游引物 PB: 5'-AGGAGGTGATC-CAGCCGCA-3') 进行 16S rRNA 基因的特异扩增^[36], 产物检测合格后送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。测序结果利用 EZ BioCloud 网站^[37] 进行比对后确定放线菌分类地位。

1.2.3 放线菌发酵滤液的制备

挑取已经鉴定的放线菌单菌落接种至装有 100 mL 改良酵母膏-麦芽汁液体培养基中, 28 $^{\circ}$ C, 200 r/min 培养 7 d。5 000 r/min 离心 5 min 去除菌体, 取上清液, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.2.4 杀线虫活性放线菌筛选

向 24 孔透明板中分别加入 300 μ L 发酵滤液和 10 μ L 线虫洗脱液 (含线虫约 60 条) 混合均匀, 放入 20 $^{\circ}$ C 恒温培养箱进行培养。每株菌 3 次重复, 以改良酵母膏-麦芽汁液体培养基和清水为对照。12, 24, 36, 48 h 后镜检, 记录各处理组的线虫死亡情况。线虫保持 S 形且活跃运动即为存活; 僵直不动, 用牙签或挑针戳动仍然僵直不运动, 再使用清水复活后仍不动则判为死亡。线虫致死率为: 致死率 = [(处理前活线虫数量 - 处理后活线虫数量) / 处理前活线虫数量] \times 100%^[38]。对初筛有杀线虫活性的放线菌再次发酵, 并按上述方法进行复筛验证。

2 结果与分析

2.1 放线菌的分离结果

从轿子山土样和白云鄂博稀土矿样品中分离得到 586 株菌, 经 16S rRNA 基因测序鉴定去重复后, 共获得 257 株放线菌, 隶属 24 科, 37 属, 见表 1。

本次分离获得最多的放线菌是链霉菌属 (36 株), 占分离菌株的 14.0%; 假诺卡氏菌属 (30 株) 次之, 占 11.7%; 野野村菌属 (27 株) 第 3, 占 10.5%; 而诺卡氏菌属 (23 株)、韩国生工菌属 (20 株)、小单孢菌属 (18 株)、拟无枝酸菌属 (16 株) 分别占 8.9%, 7.8%, 7.0%, 6.2%。

本研究共获得稀有放线菌^[39-40] 221 株, 占分离菌株总数的 85.99%, 这表明轿子山土样和白云鄂博稀土矿蕴藏着丰富的放线菌资源, 可为杀线虫生防菌株的筛选提供丰富的菌种材料。

2.2 放线菌对秀丽隐杆线虫 J2 的活性筛选结果

利用 24 孔板筛选分离放线菌发酵液的杀模式生物秀丽隐杆线虫活性, 发现在供试的 257 株放线菌中, 有 33.46% 的菌株即 86 株放线菌发酵液有杀线虫活性, 其中有 23 株菌杀线虫致死率达 50% 以上, 见表 2。

表 1 分离菌株的属分布

菌种属名	数量/株	菌种属名	数量/株
假诺卡氏菌属 (<i>Pseudonocardia</i>)	30	糖多孢菌属 (<i>Saccharopolyspora</i>)	5
拟无枝酸菌属 (<i>Amycolatopsis</i>)	16	拟孢囊菌属 (<i>Kibdelosporangium</i>)	2
糖丝菌属 (<i>Saccharothrix</i>)	11	伦茨氏菌属 (<i>Lentzea</i>)	2
涅什瓦列菌属 (<i>Lechevalieria</i>)	3	小单孢菌属 (<i>Micromonospora</i>)	18
多态放线菌 (<i>Actinopolymorpha</i>)	1	类诺卡氏菌属 (<i>Nocardioides</i>)	5
韩国生工菌属 (<i>Kribbella</i>)	20	姜氏菌属 (<i>Jiangella</i>)	3
链霉菌属 (<i>Streptomyces</i>)	36	野野村菌属 (<i>Nonomuraea</i>)	27
链孢囊菌属 (<i>Streptosporangium</i>)	2	游动单孢菌属 (<i>Planomonospora</i>)	1
拟诺卡氏菌属 (<i>Nocardiopsis</i>)	1	马杜拉放线菌属 (<i>Actinomadura</i>)	2
诺卡氏菌属 (<i>Nocardia</i>)	23	红球菌属 (<i>Rhodococcus</i>)	5
分枝杆菌属 (<i>Mycobacterium</i>)	2	迪茨氏菌属 (<i>Dietzia</i>)	7
棒杆菌属 (<i>Corynebacterium</i>)	1	威廉姆氏菌属 (<i>Williamsia</i>)	2
微球菌属 (<i>Micrococcu</i>)	2	节杆菌属 (<i>Arthrobacter</i>)	7
考克氏菌属 (<i>Kocuria</i>)	2	涅斯捷连科氏菌属 (<i>Nesterenkonia</i>)	1
微杆菌属 (<i>Microbacterium</i>)	3	壤霉菌属 (<i>Agromyces</i>)	2
无色杆菌属 (<i>Leucobacter</i>)	1	原小单孢菌属 (<i>Promicromonospora</i>)	8
短状杆菌属 (<i>Brachybacterium</i>)	2	糖霉菌属 (<i>Glycomyces</i>)	1
隐孢囊菌属 (<i>Cryptosporangium</i>)	1	芽球菌属 (<i>Blastococcus</i>)	1
塔里菌属 (<i>Actinotalea</i>)	1		

表 2 杀线虫致死率在 50% 以上的放线菌信息

编号	菌种	致死率/%	编号	菌种	致死率/%
KC 97	<i>Pseudonocardia seranimata</i>	90.0	KC 107	<i>Micromonospora echinofusca</i>	87.0
KC 113	<i>Pseudonocardia rhizophila</i>	87.0	KC 36	<i>Micromonospora peucetia</i>	82.4
KC 240	<i>Saccharothrix espanaensis</i>	75.0	KC 159	<i>Deinococcus radiotolerans</i>	69.0
KC 135	<i>Bradyrhizobium erythrophlei</i>	67.0	KC 183	<i>Planomonospora venezuelensis</i>	67.0
KC 62	<i>Nonomuraea turkmeniaca</i>	64.0	KC 16	<i>Pseudonocardia zijingensis</i>	63.0
KC 161	<i>Micromonospora citrea</i>	58.0	KC 361	<i>Promicromonospora iranensis</i>	56.0
KC 288	<i>Kribbella jejuensis</i>	55.0	KC 47	<i>Nocardia fluminea</i>	54.0
KC 212	<i>Saccharothrix texasensis</i>	52.0	KC 359	<i>Actinomycetospira lutea</i>	50.0
KC 121	<i>Actinopolymorpha pitospori</i>	50.0	KC 119	<i>Amycolatopsis alba</i>	50.0
KC 250	<i>Kibdelosporangium aridum</i>	50.0	KC 52	<i>Micromonospora auratinigra</i>	50.0
KC 76	<i>Nocardia abscessus</i>	50.0	KC 28	<i>Nocardioides luteus</i>	50.0
KC 214	<i>Pseudonocardia alaniniphila</i>	50.0			

假诺卡氏菌属是本研究分离最多的稀有放线菌类群（30 株），占分离菌株的 11.7%。由于该属菌株多数能产生抗生素^[41]、免疫调控因子^[42]以及降解芳香烃类^[43]、卤代化合物^[44]、环醚污染物等^[45]，因而在生物技术、制药、农业和环境修复等领域备受关注。本研究分离到的 30 株假诺卡氏

菌中，KC 97，KC 113，KC 16，KC 214（表 2）对秀丽隐杆线虫的致死率达 50% 以上，且 4 株菌都为首次报道对秀丽隐杆线虫有致死活性，其中 KC 97（*Pseudonocardia seranimata*）对秀丽隐杆线虫的致死率则高达 90%，具有较大的线虫生防菌剂开发潜力。

此外, 本研究分离获得的小单孢菌属菌株也较多, 有 18 株, 占分离菌株的 7.0%。小单孢菌属菌株产生的活性次级代谢产物多达 700 多种, 如刺孢霉素和庆大霉素^[46]以及能抑制沙门氏菌、产肠毒素大肠杆菌、耻垢分枝杆菌、脓肿分枝杆菌的次级代谢产物^[47]。在本研究分离到的 18 株小单孢菌中, 筛选到 KC 107 和 KC 36 对秀丽隐杆线虫的致死率达 80% 以上, KC 161 和 KC 52 对秀丽隐杆线虫的致死率为 50% 以上 (表 2), 均为首次报对其对线虫有致死活性。

其他类群的稀有放线菌, 如 KC 119 (*Amycolatopsis alba*) 能够产生新的抑菌活性和细胞毒活性的吡啶盐衍生物^[49]、KC 250 (*Kibdelosporangium aridum*) 能产生杀死肠道病毒的活性多肽化合物、KC 28 (*Nocardioideus luteus*) 能将脱乙酰巴卡汀 III

转化成浆果赤霉素 III 等, 本研究首次发现了以上菌株具有较好的杀线虫活性 (表 2), 且是杀线虫生防菌剂开发的潜力菌株。

经 16S rRNA 基因测序和序列比对^[50], 分析了对秀丽隐杆线虫 (J2) 致死率在 70% 以上的 5 株活性放线菌的系统进化地位 (图 1)。由图 1 可以看出, KC 97, KC 113 分别与 *Pseudonocardia seranimata* 和 *Pseudonocardia rhizophila* 聚在一支, 且都被高达 99% 的自举值所支持; KC 36 和 KC 107 分别与 *Micromonospora peucetia* 和 *Micromonospora echinofusca* 聚在一支, 且分别被 100% 和 99% 的自举值所支持; 杀线虫致死率为 75% 的 KC 240 与 *Saccharothrix espanaensis* 聚为一支, 自举值为 96%。以上高自举值表明了 5 株菌系统进化分析的稳定性和可靠性。

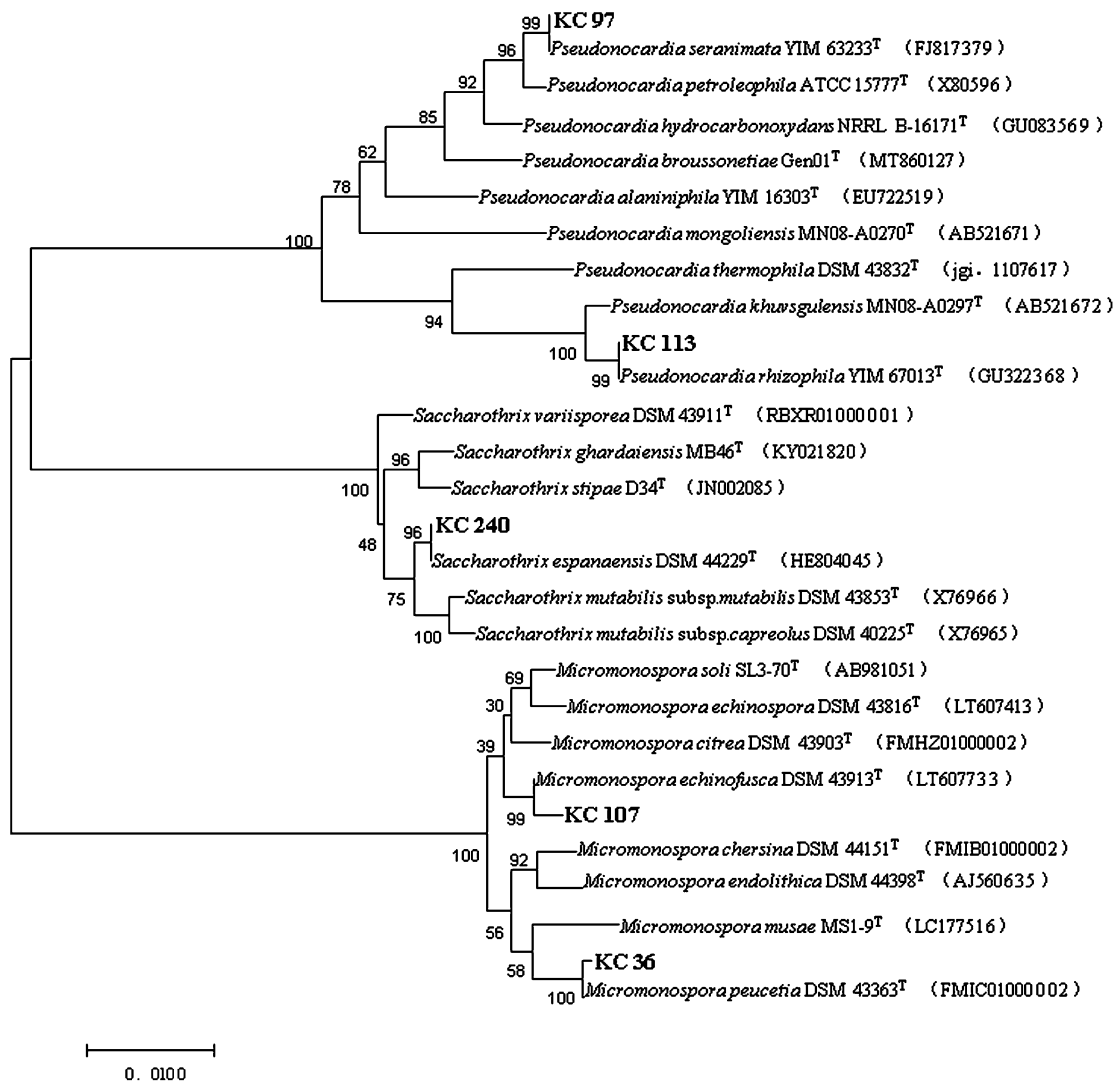


图 1 对秀丽隐杆线虫致死率高于 70% 的放线菌 16S rRNA 基因系统发育树

3 讨论与结论

3.1 讨论

根结线虫是农业尤其是蔬菜的主要病害之一, 每年给农业产业造成巨大的经济损失。由于农业防治和物理防治效果不理想, 而化学防治危害性大, 易造成环境污染、农药残留、抗药性等一系列的负面效应, 因此生物防治已成为目前重视程度较高、研究较多的一种防治措施, 且该防治方法符合生态农业、环境友好的现代理念。目前, 根结线虫的生物防治研究虽然已取得了一定成果, 但很多研究仍处于实验阶段, 应用于农业生产的产品较少。此外, 见效慢、易受环境影响等问题使得生物防治的开发利用还有待进一步研究。

本研究从稀土元素含量高、辐射较强的白云鄂博稀土矿和生物资源较丰富的轿子山两地采样, 共分离获得 257 株放线菌, 其中有 86 株放线菌发酵液有杀线虫活性, 杀线虫致死率达 50% 以上的菌株有 23 株。假诺卡氏菌属的 KC 97 (*Pseudonocardia seranimata*) 和 KC 113 (*Pseudonocardia rhizophila*) 对秀丽隐杆线虫 (J2) 的致死率分别高达 90.0% 和 87.0%。*Pseudonocardia* (假诺卡氏) 属菌株能产生很多有用的代谢产物, 如杀菌素、新的制霉菌素的衍生物、萜烯类化合物、铁载体、杰鲁霉素等^[51-52], 本研究首次发现了该属菌株具有较好的杀线虫活性。KC 107 (*Micromonospora echinofusca*) 和 KC 36 (*Micromonospora peucetia*) 对秀丽隐杆线虫 (J2) 的致死率分别为 87.0% 和 82.4%, 其中 KC 36 发酵液处理线虫 12 h 的致死率达到了 82.4%, 表明该菌具有高效杀线虫的潜力。KC 240 (*Saccharothrix espanaensis*) 发酵液的线虫致死率为 75.0%。Kalinovskaya 等^[48] 早先报道了 *Saccharothrix espanensis* 能产生新的安古环素和抗菌活性的二酮哌嗪类化合物, 而本研究首次报道了该菌株具有杀线虫活性。

3.2 结论

保障国家农产品安全是一个永恒课题, 需要大家不断为之努力。本研究共分离获得 257 株放线菌, 隶属 37 属、24 科, 其中有 5 株放线菌菌株 KC 97 (*Pseudonocardia seranimata*), KC 113 (*Pseudonocardia rhizophila*), KC 107 (*Micromonospora echinofusca*), KC 36 (*Micromonospora peucetia*) 和 KC 240

(*Saccharothrix espanensis*) 具有较高的杀线虫活性, 为线虫病害的生物防治菌剂开发提供了丰富的微生物菌种资源。但这 5 株放线菌的杀线虫活性物质、杀虫机制以及生防菌剂的研发等仍需进一步探索, 以期为农业生产中的线虫病害防控提供理论基础和研究资源。

[参考文献]

- [1] 苏会宁. 细菌和放线菌杀线虫活性筛选及其活性成分的研究 [D]. 昆明: 云南大学, 2015.
- [2] 彭双. 具杀线虫活性植物内生细菌和根际放线菌的筛选及防效研究 [D]. 南京: 南京师范大学, 2011.
- [3] ABAD P, FAVERY B, MARIE-NOLLE R, et al. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2003, 4 (4): 217-224.
- [4] 王亚新. 蔬菜根结线虫病防治难的原因及综合防治措施 [J]. *河南农业*, 2020 (10): 40.
- [5] 赵宝刚. 根结线虫病的重发原因及防治对策 [J]. *河南农业*, 2020 (11): 36-37.
- [6] 刘晓艳, 闵勇, 饶萍, 等. 杀线虫剂产品研究进展 [J]. *中国生物防治学报*, 2021, 37 (3): 595-597.
- [7] 韩冰洁, 张立君, 张建君. 作物根结线虫病防治研究进展 [J]. *长江蔬菜*, 2021 (21): 44-48.
- [8] 王玉芳. 南方根结线虫生防细菌的筛选及影响因子研究 [D]. 南京: 南京师范大学, 2017.
- [9] 周春霞. 蔬菜根结线虫无公害防治技术 [J]. *河南农业*, 2018 (12): 24-25.
- [10] 曹广禄. 大豆胞囊线虫病的发病规律及常见的防治方法 [J]. *新农业*, 2021 (8): 50-51.
- [11] 王金峰, 江连强, 刘东阳, 等. 烟草根结线虫病防治方法及发展趋势 [J]. *植物医生*, 2021, 34 (2): 9-12.
- [12] 李文均, 徐平, 徐丽华, 等. 极端环境中的放线菌资源 [J]. *微生物学通报*, 2003, 30 (4): 125-127.
- [13] 姜午春, 解修超, 彭浩, 等. 陕西略阳铁矿尾矿放线菌的分离、鉴定及抗菌活性 [J]. *陕西理工大学学报 (自然科学版)*, 2018, 34 (2): 65-71.
- [14] 刘莲娜, 刘淑艳, 王梦珂, 等. 土壤中稀有放线菌选择性分离方法 [J]. *河北北方学院学报 (自然科学版)*, 2021, 37 (3): 54-60.
- [15] 李朝阳, 刘恺, 陈勇, 等. 轿子山自然保护区植被类型及其分布特点研究 [J]. *山东林业科技*, 2010, 40 (2): 32-35.
- [16] 刘志恒, 王剑, 张立新. 基因组时代的放线菌系统学及其研究进展 [J]. *微生物学报*, 2011, 51 (2):

- 141–153.
- [17] 金娜, 刘倩, 简恒. 植物寄生线虫生物防治研究新进展 [J]. 中国生物防治学报, 2015, 31 (5): 789–800.
- [18] 陈聪聪, 王超, 郭群群, 等. 杀松材线虫海洋放线菌 HT-8 的鉴定及培养条件的研究 [J]. 微生物学杂志, 2016, 36 (6): 54–60.
- [19] 阿尔新, 旭格拉, 张金辉. 新疆高盐极端环境可培养放线菌的种群及其生物活性初步研究 [J]. 环球中医药, 2013, 6 (S1): 11–13.
- [20] 曾庆飞, 李传浩, 黄惠琴, 等. 根结线虫拮抗放线菌菌株 DA07118 的筛选与鉴定及其发酵条件的优化 [J]. 中国生物防治, 2009, 25 (3): 255–259.
- [21] 解应波, 董洪进, 李新辉, 等. 云南轿子雪山种子植物多样性分布格局 [J]. 森林工程, 2020, 36 (6): 1–8.
- [22] 陈玉桥. 云南轿子山自然保护区土壤类型及分布规律初探 [J]. 林业调查规划, 2006 (3): 59–62.
- [23] 谢玉玲, 曲云伟, 杨占峰, 等. 白云鄂博铁、钨、稀土矿床: 研究进展、存在问题和新认识 [J]. 矿床地质, 2019, 38 (5): 983–1003.
- [24] 于晓燕. 白云鄂博矿山土壤污染分析及生态修复研究 [D]. 包头: 内蒙古科技大学, 2020.
- [25] 骆逸飞. 白云鄂博矿区土壤重金属污染特征与风险评估 [D]. 包头: 内蒙古科技大学, 2020.
- [26] 高叶青, 丁彩琴, 任冬梅, 等. 稀土元素富集对白云鄂博矿区 8 种常见藓类植物生长及其解剖结构特征的影响 [J]. 西北植物学报, 2017, 37 (1): 23–31.
- [27] 樊永军, 闫伟, 王黎元, 等. 白云鄂博稀土矿区土壤中放线菌特征调查研究 [J]. 微生物学杂志, 2011, 31 (4): 6–11.
- [28] CAO Y R, GUO Y, YANG X X, et al. *Actinorectispora metalli* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a mine and emended description of the genus *Actinorectispora* [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2018, 68 (4): 1023–1027.
- [29] CAO Y R, YANG W Q, DAO Y, et al. *Kibdelosporangium metalli* sp. nov., isolated from a rare earth mine [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67 (1): 101–107.
- [30] 贾文文. 南大西洋深海放线菌的分离与多样性分析 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2013.
- [31] 黄路枝, 胡兆农, 郭正彦, 等. 土壤稀有放线菌的选择性分离及其抗菌活性研究 [J]. 农药学报, 2007, 9 (1): 59–65.
- [32] 曾庆飞, 黄惠琴, 朱军, 等. 根结线虫拮抗放线菌的筛选及菌株 HA10002 的鉴定与活性物质分析 [J]. 植物保护, 2011, 37 (6): 159–163.
- [33] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2018.
- [34] ABDELMOHSEN U R, PIMENTEL-ELARDO S M, HANORA A, et al. Isolation, phylogenetic analysis and anti-infective activity screening of marine sponge-associated actinomycetes [J]. Marine Drugs, 2010, 8: 399–412.
- [35] 樊炳君, 曹艳茹, 纪开娟, 等. 桉树根际放线菌的分离、初步鉴定及酶活筛选 [J]. 昆明学院学报, 2020, 42 (3): 64–70.
- [36] MARCHESI J R, TAKUICHI S, WEIGHTMAN A J, et al. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64 (2): 795–799.
- [37] YOON S H, HA S M, KWON S, et al. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67: 1613–1617.
- [38] 赵晶, 邢志富, 田茂雄, 等. 微杆菌 *Sneb159* 杀线虫活性物质的分离与鉴定 [J]. 微生物学报, 2020, 60 (10): 2341–2349.
- [39] LAZZARINI A, CAVALETTI L, TOPPO G, et al. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2000, 78: 399–405.
- [40] LECHEVALIER H A, LECHEVALIER M P. Biology of actinomycetes [J]. Annual Review of Microbiology, 1967, 21: 71–100.
- [41] CARR G, DERBYSHIRE E R, CALDERA E, et al. Antibiotic and antimalarial quinones from fungus-growing ant-associated *Pseudonocardia* sp. [J]. Journal of Natural Products, 2012, 75 (10): 1806–1809.
- [42] LI J, ZHAO G Z, VARMA A, et al. An endophytic *Pseudonocardia* species induces the production of artemisinin in *Artemisia annua* [J]. PLoS One, 2012, 7 (12): 1–9.
- [43] KOHLWEYER U, THIEMER B, SCHRADER T, et al. Tetrahydrofuran degradation by a newly isolated culture of *Pseudonocardia autotrophica* strain K1 [J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, 186 (2): 301–306.

3 小结

综上所述,本研究合成了 5 种具有均苯四甲酸二酐部分的聚酰亚胺,由于 Suzuki 偶联反应引入的芳基基团电荷特性不同,不仅导致聚酰亚胺分子中存在各向异性效应,而且扰乱了分子的共轭体系,致使聚酰亚胺特征峰在核磁氢谱中的化学位移存在差异,以及紫外-可见光谱图谱发生红移或蓝移。此外,由于聚酰亚胺的取代基不同,还可能会影响聚酰亚胺薄膜的吸水性、热稳定性和透明性等性质,对于该问题我们将在后续的工作中继续深入研究。

[参考文献]

- [1] LIU Y, ZHANG Y, LAN Q, et al. High-performance functional polyimides containing rigid nonplanar conjugated triphenylethylene moieties [J]. Chem Mater, 2012, 51 (6): 1302-1314.
- [2] YANG Y H, LU H, LIU J Q, et al. Synthesis and binary/ternary write-once read-many-times electrical memory behaviors of carbazole-based polyimides bearing flexible linkage segment [J]. Eur Polym J, 2018, 108: 10-19.
- [3] YANG Y, XIA J, ZHENG Y, et al. Synthesis and non-volatile electrical memory characteristics of triphenylamine-based polyimides with flexibility segments [J]. New J Chem, 2018, 42 (23): 19008-19019.
- [4] 苏志友, 蒋文伟, 王友林, 等. 含有柔性酰胺键链接部分的聚酰亚胺的合成 [J]. 昆明学院学报, 2020, 42 (3): 75-80.
- [5] 邢其毅, 裴伟伟, 徐瑞秋, 等. 基础有机化学: 上册 [M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2017.
- [6] 宋心琦, 周福添, 刘建波. 光化学: 原理·技术·应用 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2001.
- [44] KIM E J, JEON J R, KIM Y M, et al. Mineralization and transformation of monofluorophenols by *Pseudonocardia benzenivorans* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87 (4): 1569-1577.
- [45] MALLEY L A, CHRISTOPH G R, STADLER J C, et al. Acute and subchronic neurotoxicological evaluation of tetrahydrofuran by inhalation in rats [J]. Drug and Chemical Toxicology, 2001, 24 (3): 201-219.
- [46] IGARASHI Y, OGURA H, FURIHATA K, et al. Maklamycin, an antibacterial polyketide from an endophytic *Micromonospora* sp. [J]. Journal of Natural Products, 2011, 74 (4): 670-674.
- [47] TALUKDAR M, DAS D, BORA C, et al. Complete genome sequencing and comparative analyses of broad-spectrum antimicrobial-producing *Micromonospora* sp. HK10 [J]. Gene, 2016, 594 (1): 97-107.
- [48] KALINOVSKAYA N I, KALINOVSKY A I, ROMANENKO L A, et al. New angucyclines and antimicrobial diketopiperazines from the marine mollusk-derived actinomycete *Saccharothrix espanaensis* an 113 [J]. Natural Product Communications, 2010, 5 (4): 597-602.
- [49] DASARIA V R R K, MUTHYALAB M K K, NIKKUA M Y, et al. Novel Pyridinium compound from marine actinomycete, *Amycolatopsis alba* var. nov. DVR D4 showing antimicrobial and cytotoxic activities in vitro [J]. Microbiological Research, 2012, 167: 346-351.
- [50] YOON S H, HA S M, KWON S, et al. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67 (5): 1613-1617.
- [51] ARTAVIA-LEÓN A, PACHECO-LEIVA M, MOYA-ROMÁN C, et al. Antimicrobial symbionts are a new model for drug discovery [J]. Drug Discovery Today (Disease Models), 2018, 28: 27-33.
- [52] BATEY S F D, GRECO C, HUTCHINGS M I, et al. Chemical warfare between fungus-growing ants and their pathogens [J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2020, 59: 172-181.

(上接第 99 页)