

郑榕, 刘波, 刘国红, 等. 夏枯草内生菌及根际芽胞杆菌种群结构的研究 [J]. 福建农业学报, 2013, 28 (3): 249-261.

ZHENG R, LIU B, LIU G-H, et al. Study of the Population Structure of *Bacillus* Species Isolated from Medicinal Plant Selfheal and Its Rhizosphere Soil [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 28 (3): 249-261.

## 夏枯草内生菌及根际芽胞杆菌种群结构的研究

郑榕<sup>1,2</sup>, 刘波<sup>2</sup>, 刘国红<sup>2</sup>, 葛慈斌<sup>2</sup>

(1. 福建师范大学, 福建 福州 350108; 2. 福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福建 福州 350003)

**摘要:** 芽胞杆菌分布广泛, 主要分布于土壤、动植物体表。为了解采自武夷山的夏枯草 *Prunella vulgaris* 植株及其根际土壤芽胞杆菌的多样性, 以及药用植物内生芽胞杆菌的生物多样性, 采用稀释涂布平板法从夏枯草植株及其根际土壤样品中分离到芽胞杆菌菌株 27 株, 并采用 16S rDNA 序列测定法对 27 株芽胞杆菌进行鉴定。通过菌落形态特征观察及 16S rDNA 序列测定, 将 27 株芽胞杆菌归入 14 个种, 其中阿氏芽胞杆菌 5 株、蜡状芽胞杆菌 4 株、炭疽芽胞杆菌 4 株、苏云金芽胞杆菌 2 株、甲基营养型芽胞杆菌 2 株、嗜气芽胞杆菌 1 株、地衣芽胞杆菌 1 株、假蕈状芽胞杆菌 1 株、简单芽胞杆菌 1 株、短短芽胞杆菌 1 株、球形赖氨酸芽胞杆菌 1 株、解木糖赖氨酸芽胞杆菌 1 株、嗜几丁质类芽胞杆菌 1 株, 另外 2 株为芽胞杆菌疑似新种。研究表明, 夏枯草植株及其根际土壤存在着丰富的芽胞杆菌种类, 丰富了药用植物内生芽胞杆菌资源的研究。

**关键词:** 芽胞杆菌; 鉴定; 系统发育; 夏枯草

中图分类号: S 896

文献标识码: A

### Study of the Population Structure of *Bacillus* Species Isolated from Medicinal Plant Selfheal and Its Rhizosphere Soil

ZHENG Rong<sup>1,2</sup>, LIU Bo<sup>2</sup>, LIU Guo-hong<sup>2</sup>, GE Ci-bin<sup>2</sup>

(1. Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350108, China; 2. Agricultural Bio-resource Research Institute, Fujian academy of agricultural sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China)

**Abstract:** *Bacillus* is widespread around the world and mainly found in the soil and on the surface of plants and animals. We obtained 27 *Bacillus* isolates from selfheal and its rhizosphere soil using dilution plating technique in Wuyi mountain and then identified these strains by 16S rDNA sequencing to know the diversity of *Bacillus* inside the selfheal and its rhizosphere soil and enrich *Bacillus* distribution. Our results showed that 27 strains were classified into 14 *Bacillus* species and two strains may be new *Bacillus* species, suggesting that there was a diversity of *Bacillus* species in selfheal and its rhizosphere soil, and it enriched the study of the endogenous *Bacillus* in the medicinal plant.

**Key words:** *Bacillus*; identification; phylogenetic analysis; selfheal

中国是药用植物资源最丰富的国家之一, 药用植物的发现、使用和栽培有着悠久的历史。药用植物在医药中占有重要地位。夏枯草为唇形科夏枯草属植物, 是一味常用中药, 因其夏至后即枯而得名。夏枯草一般在夏季取其干燥果穗入药, 含有丰富的三萜类、甾体类、黄酮类、香豆素、多糖类及

挥发油等化学成分<sup>[1]</sup>, 具有清肝泻火、明目、散结消肿等功效<sup>[2]</sup>。近年来, 药理学相关研究表明, 夏枯草具有抗肿瘤、抗感染、抗菌及抗病毒、抗氧化、降血脂、降血压、降血糖、调节免疫系统和调节呼吸系统等作用<sup>[3]</sup>。夏枯草由于其重要的临床应用、开发价值, 成为一种具有潜力的药物资源。

收稿日期: 2013-02-01 初稿; 2013-02-26 修改稿

作者简介: 郑榕 (1988-), 女, 硕士, 研究方向: 微生物分子生物学 (E-mail: 360585496@qq.com)

通讯作者: 刘波 (1957-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 微生物生物技术与农业生物药物 (E-mail: liubofaas@163.com)

基金项目: 国家“973”计划前期项目 (2011CB111607); 国家“948”计划项目 (2011-G25); 国家国际合作项目 (2012DFA31120)

植物内生菌是指其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物的组织或器官内部的一类微生物,包括真菌、细菌和放线菌。内生菌在植物体内广泛存在,在植物的根、茎、叶、花、果实和种子等器官组织的细胞或细胞间隙均有发现。迄今为止,人们已经先后从番茄、棉花、辣椒、柠檬、红树、茶树、烟草和水稻等许多不同种类的植物中分离得到多种内生细菌<sup>[4-6]</sup>,其中以假单胞菌、芽孢杆菌、肠杆菌以及土壤杆菌为最常见的优势种群<sup>[7]</sup>。也有研究证明,药用植物内生菌具有合成与宿主植物相同或相似活性成分的功能,在生物防治、医药卫生等领域的应用潜力非常大<sup>[8]</sup>;但截至目前,尚未见有从夏枯草植株分离出内生芽孢杆菌的研究报道。为此,本研究对夏枯草植株不同部位的内生芽孢杆菌和夏枯草根际土壤芽孢杆菌进行分离,以期了解夏枯草植株内及其根际土壤芽孢杆菌的分布和种类状况及它们之间的联系,为发掘和利用药用植物内生芽孢杆菌资源提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 样品的采集 夏枯草植株及根际土壤采自武夷山自然保护区挂墩路口,采集时将夏枯草连根拔起、连同附着在根表的土壤一同装入无菌自封口塑料袋内,带回实验室进行分离。

1.1.2 主要仪器和试剂 LB培养基:胰蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,NaCl 10 g,琼脂 17.5 g,水 1 000 mL,pH7.0。NA培养基:牛肉浸膏 3 g,酵母浸膏 1 g,蛋白胨 5 g,葡萄糖 10 g,琼脂 17.5 g,水 1 000 mL,pH 7.0。DNA提取试剂:0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaCl,0.01 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl,0.001 mol·L<sup>-1</sup> EDTA,Tris-saturated phenol。PCR反应试剂:10× Buffer,dNTP(0.01 mol·L<sup>-1</sup>/each),Taq酶(2.5 U·μL<sup>-1</sup>)(上海博尚生工生物工程技术服务有限公司),100 bp Marker(上海英骏生物技术有限公司)。仪器:VP GelDoc-It TS Imaging System凝胶成像仪、华粤行仪器有限公司 Tpersonal Biometra 梯度 PCR仪、PowerPac Basic BIO-RAD 电泳仪、离心机(eppendorf Centrifuge 5418R)。

### 1.2 夏枯草内生菌及根际土壤芽孢杆菌的分离与纯化

夏枯草内生菌的分离:将夏枯草植株洗净、晾干;分别从根部、茎部、叶部称取样品 1 g,先用 75%乙醇处理 30 s,然后放入 10%次氯酸钠处理 8

min,再用无菌水漂洗 3 次(最后 1 遍的无菌水清洗液用于涂板,检查植株表面是否消毒彻底);将漂洗后的植株样品置于无菌研钵内,加入 1 mL 无菌水进行研磨,吸取 1 mL 清液,加入装有 9 mL 无菌水的试管,即配成 10<sup>-1</sup> 浓度,80℃水浴 10 min 后,再稀释至 10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>,各取 100 μL 稀释液涂于 LB 培养基平板上,每个梯度重复 3 次,30℃恒温箱内培养。

根际土壤芽孢杆菌的分离:用刮刀轻轻刮取附着在夏枯草根表的土壤,视为根际土壤;称取根际土壤 10 g 至盛有 90 mL 无菌水的三角瓶中,振荡 20 min,80℃水浴 10 min(每隔 5 min 振荡 1 次)后,吸取 1 mL 土壤悬液至装有 9 mL 无菌水的试管,即配成 10<sup>-2</sup> 浓度,再稀释至 10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>;各取 200 μL 10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup> 稀释液涂于 LB 平板上,每个梯度重复 3 次,30℃恒温箱内培养。

培养 2~3 d 后,观察各平板上的菌落形态,根据菌落的大小、颜色、干湿、形状、边缘、透明度等特征区分不同的菌落并进行编号、计数,计算各样品同类菌落的数量及各样品的芽孢杆菌总含量。挑取形态不同的单菌落进行划线培养,直至获得纯培养,并用-80℃甘油冷冻法保藏。经上述试验,共获得芽孢杆菌菌株 27 株,其具体信息见表 1。

表 1 分离自夏枯草植株及其根际土壤的菌株信息  
Table 1 Information of the strains isolated from selfheal and its rhizosphere soil

序号	菌株编号	分离来源
1	FJAT-17207	夏枯草根际土壤
2	FJAT-17208	夏枯草根际土壤
3	FJAT-17209	夏枯草根际土壤
4	FJAT-17210	夏枯草根际土壤
5	FJAT-17211	夏枯草根际土壤
6	FJAT-17212	夏枯草根际土壤
7	FJAT-17213	夏枯草根际土壤
8	FJAT-17214	夏枯草根际土壤
9	FJAT-17215	夏枯草根际土壤
10	FJAT-17216	夏枯草根际土壤
11	FJAT-17217	夏枯草根部
12	FJAT-17218	夏枯草根部

序号	菌株编号	分离来源
13	FJAT-17219	夏枯草根
14	FJAT-17220	夏枯草根
15	FJAT-17221	夏枯草根
16	FJAT-17222	夏枯草根
17	FJAT-17223	夏枯草根
18	FJAT-17224	夏枯草根
19	FJAT-17225	夏枯草根
20	FJAT-17226	夏枯草茎
21	FJAT-17227	夏枯草茎
22	FJAT-17228	夏枯草茎
23	FJAT-17229	夏枯草茎
24	FJAT-17230	夏枯草茎
25	FJAT-17231	夏枯草茎
26	FJAT-17232	夏枯草叶
27	FJAT-17233	夏枯草叶

### 1.3 芽胞杆菌 DNA 的提取、扩增和测序

采用苯酚-氯仿法提取 DNA。采用细菌通用 16S rDNA 引物<sup>[9]</sup> 9F 5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3' (9~27) 和 1542R 5'-AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC-3' (1542~1525) 进行 16S rDNA 序列扩增。PCR 反应体系 (25  $\mu$ L): 2.5  $\mu$ L 10  $\times$  Buffer、0.5  $\mu$ L 0.01 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> dNTP、引物各 1  $\mu$ L、0.3  $\mu$ L (5 U  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup>) 的 Taq 酶和 1  $\mu$ L DNA 模板。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物的检测: 取 2  $\mu$ L PCR 产物, 点样于 1.5% 的琼脂糖凝胶中, 以 100 bp Marker 作为标准分子量, 100 V 电压, 电泳 40 min, EB 染色, 用凝胶成像系统观察结果。PCR 产物由上海博尚生物技术有限公司进行测序, 并将测得的序列在细菌序列比对网站 EzTaxon<sup>[10]</sup> (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) 进行序列比对分析。

### 1.4 芽胞杆菌的分类鉴定

依据《伯杰氏细菌系统学分类手册》<sup>[11]</sup>、东秀珠等<sup>[12]</sup> 编著的《常见细菌系统鉴定手册》和 Gordon 等<sup>[13]</sup> 的《芽胞杆菌属》, 对分离到的 27 株芽胞杆菌进行形态特征观察, 并结合 16S rDNA 序

列比对结果, 将其鉴定到种, 确定其分类地位。

### 1.5 芽胞杆菌的系统发育分析

根据对 27 株芽胞杆菌的分类鉴定结果, 选择相关的参考菌株 16S rDNA 序列, 再经 Clustal X<sup>[14]</sup> 对齐后, 用软件 Mega 4.0<sup>[15-16]</sup> 对 27 株芽胞杆菌的 16S rDNA 序列进行聚类分析 (方法为 Neighbour-Joining), 构建聚类树。

### 1.6 夏枯草植株及其根际土壤中芽胞杆菌含量的分析

根据对夏枯草植株及其根际土壤中芽胞杆菌的分离和种类鉴定的结果, 对夏枯草植株不同部位及其根际土壤中芽胞杆菌的种类、数量以及同种芽胞杆菌在不同样品中的含量进行统计, 分析其分布规律。

## 2 结果和分析

### 2.1 芽胞杆菌的分离及其菌落形态

取最后一次漂洗材料后的无菌水涂布平板, 置于 30 $^{\circ}$ C 恒温箱内培养 2 d, 无菌落出现, 证明表面消毒彻底。从夏枯草植株及其根际土壤中分离得到的 27 株芽胞杆菌, 其菌落形态见图 1。根据菌落形态特征的不同, 如菌落颜色、表面干湿、表面是否光滑、菌落厚度、是否有光泽、边缘是否整齐以及透明度等, 对 27 株分离芽胞杆菌进行归类, 大致可以分为九大类: 第一大类包括 FJAT-17207、FJAT-17215、FJAT-17224 和 FJAT-17229, 其特征为菌落白色, 表面粗糙、扁平、无光泽、不透明, 边缘羽毛状; 第二大类包括 FJAT-17208、FJAT-17217、FJAT-17220、FJAT-17227、FJAT-17232 和 FJAT-17233, 其特征为菌落干燥、白色, 表面粗糙、扁平、无光泽、不透明, 边缘不整齐; 第三大类包括 FJAT-17209、FJAT-17211、FJAT-17216 和 FJAT-17219, 其特征为菌落湿润、浅黄色, 表面光滑、隆起、有光泽、不透明, 边缘整齐; 第四大类包括 FJAT-17210、FJAT-17213、FJAT-17221、FJAT-17225 和 FJAT-17231, 其特征为菌落圆形、湿润, 表面光滑、无光泽, 边缘整齐; 第五大类包括 FJAT-17218、FJAT-17226、FJAT-17228 和 FJAT-17230, 其特征为菌落湿润, 表面光滑、扁平、中部褶皱, 边缘整齐; FJAT-17212、FJAT-17214、FJAT-17222 和 FJAT-17223 菌落很小、湿润, 表面光滑、有光泽, 边缘整齐, 但其菌落颜色和透明度不同, 故各为一类。

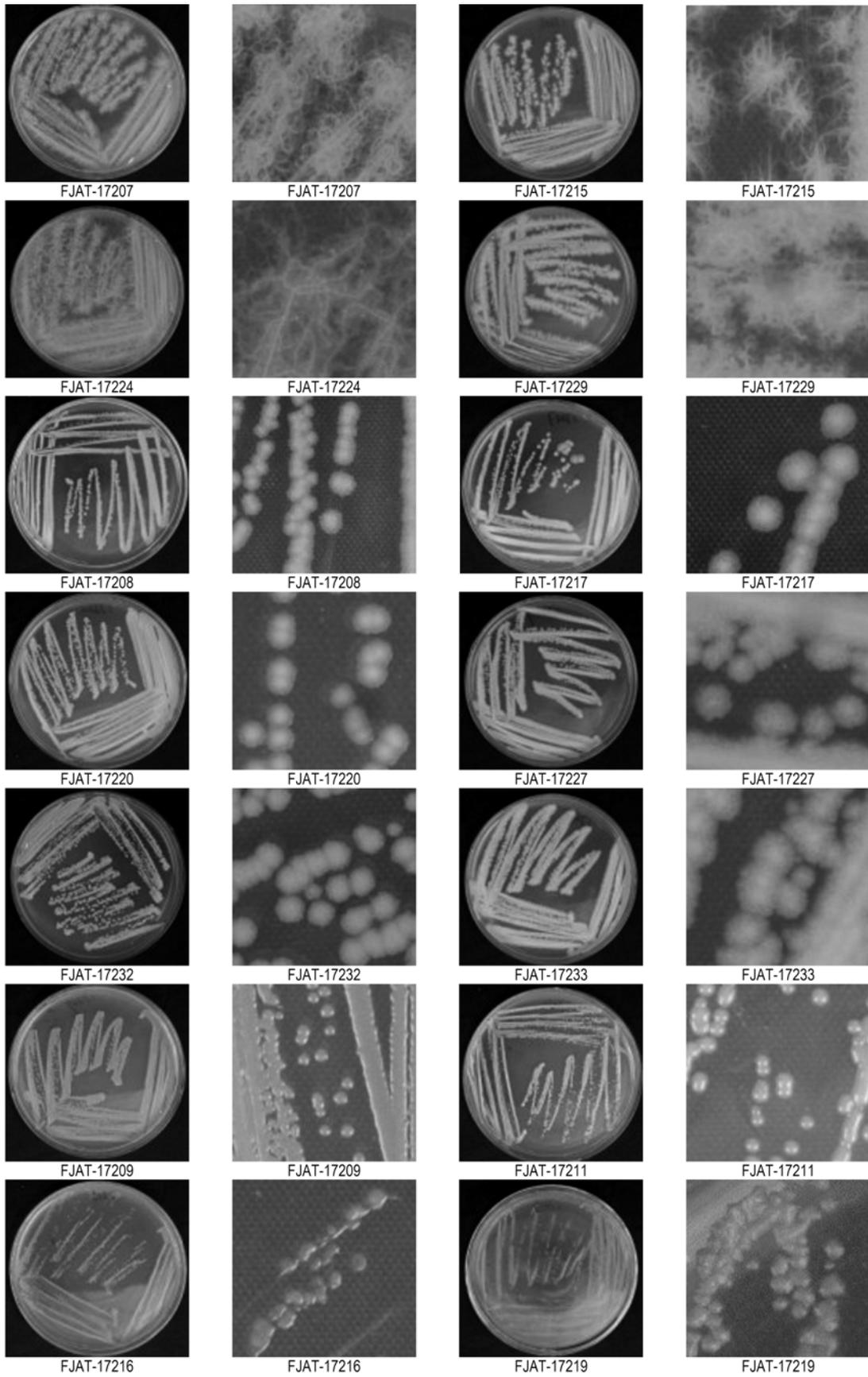


图 1 27 株芽胞杆菌的菌落特征  
Fig. 1 Colony pictures of 27 *Bacillus* strains

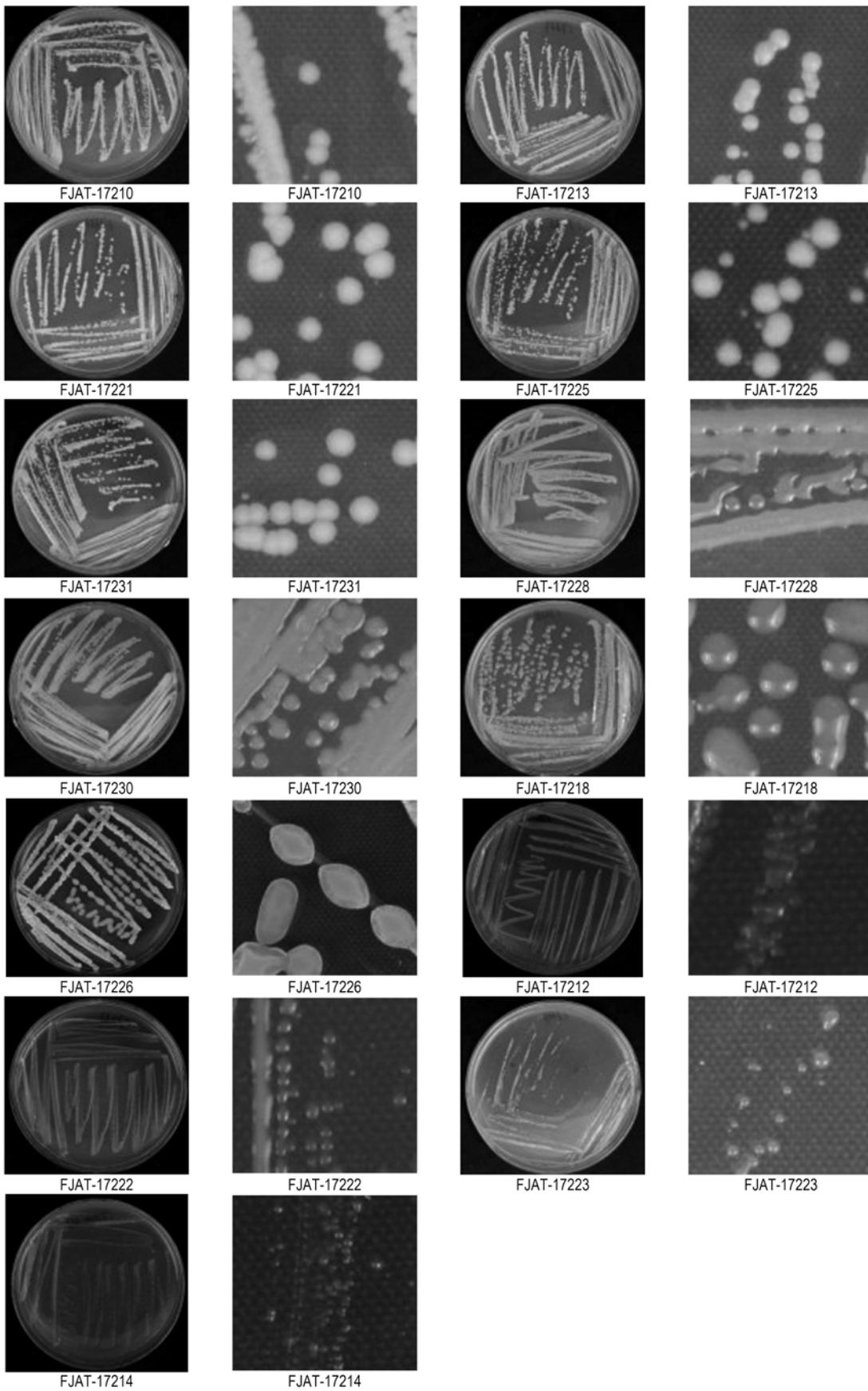


图 1 27 株芽胞杆菌的菌落特征 (续)  
Fig. 1 Colony pictures of 27 *Bacillus* strains

2.2 芽胞杆菌 16S rDNA 序列测定

用 16S rDNA 通用引物对 27 株芽胞杆菌的 16S rDNA 序列进行 PCR 扩增, 将 PCR 产物直接

进行测序, 得出这 27 株芽胞杆菌的 16S rDNA 基因部分序列。为了方便芽胞杆菌研究者, 在此列出了每株菌的 16S rDNA 全部碱基序列, 具体如下:

FJAT-17207 假蕈状芽胞杆菌 *Bacillus pseudomycolides* 16S rDNA 序列, 784 bp

tcgagcgaatggaatgaagctgctctatgaagtagcggcggacgggtgagtaaacagtgaggtaacctgccataaagctgggataactccggaaaccggggctaataccggataaacatlltgaccgcagtgctcgaaattcaaggcggctcggctgctcaactltaggtagaccgcgctgcaltagctagtggtgaggtaacggctaccaggcaacgatcgtagccgacctgagagggatgacggccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggagcagcagtagggaaatctccgcaatggacgaaagctgacggagcaacggcggctgagtgatgaaggcttccggctgtaaaactctgltgtagggaagaacaagtgctagllgaataagctggcactltagcgtlactaaccagaaagccacggctaacctagcggcagcggcgtlaalacgtaggtggcaagcgttalcggaaatlalggcgtaaaagcgcgcaggggtllctlaagctgtagtgaaagcccagctcaaccctggagggtcaltggaaactgggagactltagtgcaagaagagaaagtggaaltccalgtgtagcgggtaaatgcgtagagatalgggaaacacagctggcgaaggcgactllctgctgtaactgacactgaggcgcgaaagcgtggggagcgaacaggatlagataacctg

FJAT-17208 蜡样芽胞杆菌 *Bacillus cereus* 16S rDNA 序列, 777 bp

alcatgcatgagcgacagagaaggagctgctcttcgacgttagcggcggacgggtgagtaaacagtgaggcaacctctatagllgggataactccggaaaccggggctaataccgaataatctatllactlcatgggtaataactgaaagacgglltcggctgctcatalaagatgggcccggcggcaltagctagllggtgaggtaacggctaccaaggcgacgatcgtagccgacctgagagggatgacggccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggagcagcagtagggaaatctccacaatggcgaaagcctgtaggagcaacggcggcgtgagtgaaagaglltccggactgtaaaactctgltgtaagggaagaacaagtagcagtagtaactggctgactltagcggtagcttallagaagccacggctaacctagcggcagcggcggtaatacgtaggtggcaagcgtlccggaaatlalggcgtaaaagcgcgcagggcggctcctlaagctgtagtgaaagcccagctcaaccctggagggtcaltggaaactggggactltagtgcaagaagagaaagtggaaltccaaagctgtagcgggtaaatgcgtagagatllgggaaacacagctggcgaaggcactllctgctgtaactgacgtgaggcgcgaaagcgtggggagcgaacaggatlagataacctgtagtccacggcgtaaacgatgagtgtaagtgtagggg

FJAT-17209 解木糖赖氨酸芽胞杆菌 *Lysin Bacillus xylanilyticus* 16S rDNA 序列, 774 bp

alcatgcatgagcgacagagaaggagctgctcttcgacgttagcggcggacgggtgagtaaacagtgaggcaacctctatagllgggataactccggaaaccggggctaataccgaataatctatllactlcatgggtaataactgaaagacgglltcggctgctcatalaagatgggcccggcggcaltagctagllggtgaggtaacggctaccaaggcgacgatcgtagccgacctgagagggatgacggccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggagcagcagtagggaaatctccacaatggcgaaagcctgtaggagcaacggcggcgtgagtgaaagaglltccggactgtaaaactctgltgtaagggaagaacaagtagcagtagtaactggctgactltagcggtagcttallagaagccacggctaacctagcggcagcggcggtaatacgtaggtggcaagcgtlccggaaatlalggcgtaaaagcgcgcagggcggctcctlaagctgtagtgaaagcccagctcaaccctggagggtcaltggaaactggggactltagtgcaagaagagaaagtggaaltccaaagctgtagcgggtaaatgcgtagagatllgggaaacacagctggcgaaggcactllctgctgtaactgacgtgaggcgcgaaagcgtggggagcgaacaggatlagataacctgtagtccacggcgtaaacgatgagtgtaagtgtagggg

FJAT-17210 阿氏芽胞杆菌 *Bacillus aryabhattai* 16S rDNA 序列, 773 bp

gagcgaatggaatgaagctgctctatgaagtagcggcggacgggtgagtaaacagtgaggtaacctgccataaagctgggataactccggaaaccggggctaataccggataaacatllgaactgcatggllcgaatlgaaggcggctcggctgctcatalaagatgggcccggcggcaltagctagllggtgaggtaacggctaccaaggcaacgatcgtagccgacctgagagggatgacggccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggagcagcagtagggaaatctccgcaatggacgaaagctgacggagcaacggcggcgtgagtgaaagcttccggctgtaaaactctgltgtagggaagaacaagctagllgaataagctggcactltagcggtagctaacgaaagccacggctaacctagcggcagcggcggtaatacgtaggtggcaagcgttalcggaaatlalggcgtaaaagcgcgcaggggtllctlaagctgtagtgaaagcccagctcaaccctggagggtcaltggaaactgggagactltagtgcaagaagagaaagtggaaltccalgtgtagcgggtaaatgcgtagagatalgggaaacacagctggcgaaggcactllctgctgtaactgacactgaggcgcgaaagcgtggggagcaaca

FJAT-17211 蜡样芽胞杆菌 *Bacillus cereus* 16S rDNA 序列, 730 bp

gtcagcgaatggaatggaagctgctctatgaagtagcggcggacgggtgagtaaacagtgaggtaacctgccataaagctgggataactccggaaaccggggctaataccggataaacatllgaactgcatggllcgaatlgaaggcggctcggctgctcatalaagatgggcccggcggcaltagctagllggtgaggtaacggctaccaaggcgacgatcgtagccgacctgagagggatgacggccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggagcagcagtagggaaatctccgcaatggacgaaagctgacggagcaacggcggcgtgagtgaaagcttccggactgtaaaactctgltatcagggaagaataagtaaccgtgtaactaacggactltagcggtagctgaccagaaagccacggctaacctagcggcagcggcggtaatacgtaggtggcaagcgtlccggaaatlalggcgtaaaagcgcgcaggggtllctlaagctgtagtgaaatctcggctcaaccctgagcggctcaltggaaactgggagactltagtgcaagaagagaaagtggaaltccalgtgtagcgggtaaatgcgtagagatalgggaaacacagctggcgaaggcggctllctgctgtaactgacactgaggcgcgaaagcgtggggagcaaca

FJAT-17212 *Bacillus galactosidilyticus* 16S rDNA 序列, 720 bp

ltagcgtgagcgaactgallagaagctgctctatgacgttagcggcggacgggtgagtaaacagtgaggcaacctgctcagactgggataactcgggaaaccgagcgaataaccggatagatctctcctcalgggagatgallgaagatgglltcggctatacctacagatgggcccggcggcaltagctagllggtgaggtaacggctaccaaggcgacgatcgtagccgacctgagagggatgacggccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggagcagcagtagggaaatctccgcaatggacgaaagctgacggagcaacggcggcgtgagtgaaagcttccggctgtaaaactctgltatcagggaagaataagtagtagagataactgctgactltagcggtagctaacgaaagccacggctaacctagcggcagcggcggtaatacgtaggtggcaagcgtlccggaaatlalggcgtaaaagcgcgcaggggtllctlaagctgtagtgaaatctcggctcaaccctgagcggctcaltggaaactgggagactltagtgcaagaagagaaagtggaaltccalgtgtagcgggtaaatgcgtagagatalgggaaacacagctggcgaaggcggctllctgctgtaactgacactgaggcgcgaaagcgtggggagcgaacaggatlagataacctgtagtccacggcgtaaacg

FJAT-17213 阿氏芽胞杆菌 *Bacillus aryabhattai* 16S rDNA 序列, 771 bp

gtcagcgaagggtctcggaccctagcggcggacgggtgagtaaacagtaggcaacctgctcagactgggataactcgggaaactatgtaataaccggataggtlllggatcgcgatccgaaagaaaagatggctcggctatcactggagatgggctcggcggcaltagctagllggtgaggtaacggctaccaaggcgacgatcgtagccgacctgagagggatgaccggccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggagcagcagtagggaaatllccacaatggacgaaagctgtagggagcaacggcggcgtgaaagcttccggatgtaaaactctgltgtagggagaaatagatgacggcgaatggactltagcggtagcagagaaagccacggctaacctagcggcagcggcggtaatacgtaggtggcaagcgtlccggaaatlalggcgtaaaagcgcgcagggcggctltagaagctgtagtgaaagcccagctcaaccctgagcggctcaltggaaactgggagactltagtgcaagaagagaaagtggaaltccalgtgtagcgggtaaatgcgtagagatalgggaaacacagctggcgaaggcggctllctgctgtaactgacactgaggcgcgaaagcgtggggagcgaacaggatlagataacctgtagtccacggcgtaaacg

FJAT-17214 短短芽胞杆菌 *Brevibacillus brevis* 16S rDNA 序列, 733 bp

ltagcgtgagcgaatggaatggaagctgctctatgaagtagcggcggacgggtgagtaaacagtgaggtaacctgccataaagctgggataactccggaaaccggggctaataccggataaatllgaactgcatggllcgaatlgaaggcggctcggctgctcatalaagatgggcccggcggcaltagctagllggtgaggtaacggctaccaaggcgacgatcgtagccgacctgagagggatgacggccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggagcagcagtagggaaatctccgcaatggacgaaagctgtagggagcaacggcggcgtgagtgaaagcttccggactgtaaaactctgltgtagggaagaacaagctagllgaataagctggcactltagcggtagctaacgaaagccacggctaacctagcggcagcggcggtaatacgtaggtggcaagcgtlccggaaatlalggcgtaaaagcgcgcaggggtllctlaagctgtagtgaaagcccagctcaaccctggagggtcaltggaaactgggagactltagtgcaagaagagaaagtggaaltccalgtgtagcgggtaaatgcgtagagatalgggaaacacagctgggaaaggcactllctgctg

FJAT-17215 炭疽芽胞杆菌 *Bacillus anthracis* 16S rDNA 序列, 697 bp

Igcagtcgagcgalgallaagagcttgccttataagtlagcggcggcgggtgagtaaacctgggtaacctgccataaagactgggaaactccgggaaaccgggctaataaccggataatlltgaactgcatgg  
ttcgaatllgaaagcggcttccgtctcactltaggalggaccgcgctcattagctagttggtaggtaaacggctcaccaggcaacgatcgtagccgacctgagagggtagcggccacactgggactgagacac  
ggccagactcctacgggagcagcagtagggaatctccgaatggacgaaagctgacggagcaacggccgctgtagtgaagggcttccggctgtaaaactctgtttagggaagaacaagtgctagtgaata  
agctggcactltagcggtaactaaccagaagccacggcctaactcgtccagcagccgggtaalatcgtagggcaagcgtatccggaaatltagggcgtaaagcgcgcagggttcttaagctgatg  
aagccacggctcaaccgtggggctcattggaactgggagactgagtcgagaagagaaagtgaaatlccatgtagcgggtaaatgctagagatggggaacaccagtgccgaagcacttctggc

FJAT-17216 球形赖氨酸芽胞杆菌 *Lysinibacillus sphaericus* 16S rDNA 序列, 779 bp

Igcagtcgagcgalgallaagagcttgccttctatgatltagcggcggcgggtgagtaaacctgggtaacctgccataaagactgggaaactccgggaaaccgggctaataaccgataatctalltctctc  
atgaggaactgaaagcggcttccgtctcactltaggalggaccgcgctcattagctagttggtaggtaaacggctcaccaggcaacgatcgtagccgacctgagagggtagcggccacactggg  
actgagacacggccagactcctacgggagcagcagtagggaatctccgaatggacgaaagctgtagggagcaacggccgctgagtagaagggcttccggctgtaaaactctgtttagggaagaaca  
agtagactagtaactggctgactltagcggtaactatagaagaccagggtaactcgtccagcagccgggtaalatcgtagggcaagcgttctcggaaatltagggcgtaaagcgcgcagggtt  
cttaagctgatgtaaagccacggctcaaccgtggggctcattggaactgggagactltagtcgagaagagaaagtgaaatlccaaagtagcgggtaaatgctagagatggggaacaccagtgcc  
gaagcgaactlctgctgtaactgacactgagcgcgaaagcgtggggagcaaacagatagataccttggtagtccacggcgtaaacgatgagtc

FJAT-17217 炭疽芽胞杆菌 *Bacillus anthracis* 16S rDNA 序列, 729 bp

ctatcagcagtcgagcgalgallaagagcttgccttctatgatltagcggcggcgggtgagtaaacctgggtaacctgccataaagactgggaaactccgggaaaccgggctaataaccgataatllt  
aactcagctggctgaaatlgaagcggcttccgtctcactltaggalggaccgcgctcattagctagttggtaggtaaacggctcaccaggcaacgatcgtagccgacctgagagggtagcggccacac  
tgggactgagacacggccagactcctacgggagcagcagtagggaatctccgaatggacgaaagctgtagggagcaacggccgctgagtagaagggcttccggctgtaaaactctgtttagggaaga  
acaagtgctagtgaataagctggcactltagcggtaactaaccagaagaccagggtaactcgtccagcagccgggtaalatcgtagggcaagcgttccggaaatltagggcgtaaagcgcgcagg  
tggcttctaaagctgatgtaaagccacggctcaaccgtggggctcattggaactgggagactltagtcgagaagagaaagtgaaatlccatgtagcgggtaaatgctagagatggggaacaccag  
tggcgaagcgaacttctggctgtaactgacactgagcgcgaaagcgtggggagcaaacagatagataccttggtagtccacggcgtaaacgatgagtc

FJAT-17218 甲基营养型芽胞杆菌 *Bacillus methylotrophicus* 16S rDNA 序列, 842 bp

cagtcgagcggacagagggagcttgcctcctgatltagcggcggcgggtgagtaaacctgggtaacctgccataaagactgggaaactccgggaaaccgggctaataaccgataatlltgaaccgat  
ggctcagacataaaagggcttccgtctcactltaggalggaccgcgctcattagctagttggtaggtaaacggctcaccaggcaacgatcgtagccgacctgagagggtagcggccacactgggact  
gagacacggccagactcctacgggagcagcagtagggaatctccgaatggacgaaagctgtagggagcaacggccgctgagtagaagggcttccggctgtaaaactctgtttagggaagaacaagtg  
ccgtlcaaatagggcggcactltagcggtaactaaccagaagaccagggtaactcgtccagcagccgggtaalatcgtagggcaagcgttctcggaaatltagggcgtaaagcgcgcagggtt  
ttagctgactltaggtaaaagcccccggctcaaccggggagggctcattggaactggggaactltagtcgagaagagaaagtgaaatlccatgtagcgggtaaatgctagagatggggaacaccagtgccg  
aagcgcactctggctgtaactgacgttagggagcgaagcgtggggagcgaacagatagataccttggtagtccacggcgtaaacgatgagtcgtaagctgtagggggcttccggctttagctgagct  
aacgtaagcactccgctggggagla

FJAT-17219 解木糖赖氨酸芽胞杆菌 *Lysinibacillus xylanilyticus* 16S rDNA 序列, 623 bp

cagtcgagcggacagagggagcttgcctcctgatltagcggcggcgggtgagtaaacctgggtaacctgccataaagactgggaaactccgggaaaccgggctaataaccgataatctalltcaactcat  
ggtaaaactgaaagcggcttccgtctcactltaggalggaccgcgctcattagctagttggtaggtaaacggctcaccaggcaacgatcgtagccgacctgagagggtagcggccacactgggact  
actgaaacacggcccaactcctacgggagcagcagtagggaatctccgaatggacgaaagctgtagggagcaacggccgctgagtagaagggcttccggctgtaaaactctgtttagggaagaaca  
agtagactatlaactcgtctgactltagcggtaactaaccagaagaccagggtaactcgtccagcagccgggtaalatcgtagggcaagcgttctcggaaatltagggcgtaaagcgcgcaggcgtcct  
ttagctgtagtgaagccacggctcaaccgtggggctcattggaactggggagactltagtcgagaagagaaag

FJAT-17220 苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis* 16S rDNA 序列, 732 bp

gtcagcgaatggatgagagcttgcctcctaaagtltagcggcggcgggtgagtaaacctgggtaacctgccataaagactgggaaactccgggaaaccgggctaataaccgataatctlltgaactgcat  
ggctgaaatlgaagcggcttccgtctcactltaggalggaccgcgctcattagctagttggtaggtaaacggctcaccaggcaacgatcgtagccgacctgagagggtagcggccacactgggactg  
agacacggccagactcctacgggagcagcagtagggaatctccgaatggacgaaagctgtagggagcaacggccgctgagtagaagggcttccggctgtaaaactctgtttagggaagaacaagtg  
ctagltgaataagctggcactltagcggtaactaaccagaagaccagggtaactcgtccagcagccgggtaalatcgtagggcaagcgttccggaaatltagggcgtaaagcgcgcagggttct  
laagctgtagtgaagccacggctcaaccgtggggctcattggaactgggagactltagtcgagaagagaaagtgaaatlccatgtagcgggtaaatgctagagatggggaacaccagtgccgga  
agcgaactlctgctgtaactgacactgagcgcgaaagcgtggggagcaaa

FJAT-17221 阿氏芽胞杆菌 *Bacillus aryabhattai* 16S rDNA 序列, 743 bp

lataatcagtcgagcgaactgallagaagcttgcctctatgatltagcggcggcgggtgagtaaacctgggtaacctgccataaagactgggaaactccgggaaaccgggctaataaccgataatctllt  
tctctatgggagatgallgaagagcttccgtctcactltaggalggaccgcgctcattagctagttggtaggtaaacggctcaccaggcaacgatcgtagccgacctgagagggtagcggccacact  
gggactgagacacggccagactcctacgggagcagcagtagggaatctccgaatggacgaaagctgtagggagcaacggccgctgagtagaagggcttccggctgtaaaactctgtttagggaaga  
acaagtagcagaglaactcctgactltagcggtaactaaccagaagaccagggtaactcgtccagcagccgggtaalatcgtagggcaagcgttccggaaatltagggcgtaaagcgcgcagg  
cggcttctaaagctgatgtaaagccacggctcaaccgtggggctcattggaactggggaactltagtcgagaagagaaagtgaaatlccatgtagcgggtaaatgctagagatggggaacacc  
agtgccgaagcggcttlltggctgtaactgacactgagcgcgaaagcgtggggagcaaacag

FJAT-17222 嗜几丁质类芽胞杆菌 *Paenibacillus chitinolyticus* 16S rDNA 序列, 686 bp

aagtcgagcggactltaggagaagcttgcctctgagagtltagcggcggcgggtgagtaaacctgggtaacctgccataaagactgggaaactccgggaaaccgggctaataaccgataatctlltccgca  
tggagagactgtaaacacggagcaacttccgtctcactltaggalggaccgcgctcattagctagttggtaggtaaacggctcaccaggcaacgatcgtagccgacctgagagggtagcggccacactgggactg  
agacacggccagactcctacgggagcagcagtagggaatctccgaatggacgaaagctgtagggagcaacggccgctgagtagaagggcttccggctgtaaaactctgtttagggaaga  
agagtaactcctllggctgacggtaactgagaagaagcccccggtaactcgtccagcagccgggtaalatcgtagggcaagcgttccggaaatltagggcgtaaagcgcgcagggttcttaagct  
gggttlaaccggagctcaactcgtctcaccggaaactgggagactggagtcgaggagagaaagtgaaatlccatgtagcgggtaaatgctagagatggggaacaccagtgccgaagcgaac

FJAT-17223 简单芽胞杆菌 *Bacillus simplex* 16S rDNA 序列, 830 bp

gaactgagggagcttgcctcctgagatlagcggcggcgggtgagtaaacctgggtaacctgccataaagactgggaaactccgggaaaccgggctaataaccgataatctlltctcagtagagaagatgga  
aagcgglltctcactltaggalggaccgcgctcattagctagttggtaggtaaacggctcaccaggcaacgatcgtagccgacctgagagggtagcggccacactgggactgagacacggccagactc  
ctacgggagcagcagtagggaatctccgaatggacgaaagctgtagggagcaacggccgctgtagcgaagaagcctcggctgtaaaactctgtttagggaagaacaagtagcagagtaactlctgact  
ttagcggtaactaaccagaagccagggtaactcgtccagcagccgggtaalatcgtagggcaagcgttccggaaatltagggcgtaaagcgcgcagggttcttaagctgatgtaaagccacag  
tcaaccgtggggctcattggaactggggaactltagtcgagaagagaaagtgaaatlccaaagtagcgggtaaatgctagagatggggaacaccagtgccgaagcgaactlctgactgtagcact  
gagcgcgaaagcgtggggagcaaacagatagataccttggtagtccacggcgtaaacgatgagtcgaaagctgtagagatggggaacaccagtgccgaagcgaac



FJAT-17233 蜡状芽胞杆菌 *Bacillus cereus* 16S rDNA 序列, 788 bp

```

Tgcagtcgagcgaatggattaagagcttctctatgaagtlagcggcggaggggtgagtaacacgtggtaacctgcccaalaagactgggataactcgggaaaccgggctaataccggataacatlltgaacc
gcatggctcgaatgaaagcggcttcggctgtcactltaggalggaccgcgtcgcaltagctagllggtaggtaacggctcaccaggcaacgatcgtagccgacctgagaggggtgacggccacactgg
gactgagacacggccagactcctacgggagggcagcagtagggaaatcctccgaatggacgaaagctgacggagcaacgccgctgagtgatgaaggcttccggctgtaaaactctgtttagggaagaac
aagtgctagtgataaagctggcacttgacggctaaccaagaagccacggtaactactgcccagcagcgcggtaatacgtaggtggcaagcgtatccggaatattgggcgtaaaagcgcgcaggtg
gtttctaagctgatgaaagccacggctcaaccgtggaggctcattgaaactgggagacttgagtcagaaagggaaagtggaattccatgtagcgggtaaalgcgtagagatalggggaacaccagt
ggcgaagcgcacttctgtctgtaactgacactgagcgcgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctgtagtcacgccgtaaacgatgagtgtaagtgtagagggttccgcc
    
```

2.3 芽胞杆菌的鉴定

27 株芽胞杆菌的 16S rDNA 序列经 EZTaxon 在线比对, 得到 27 株芽胞杆菌和参考菌株之间的同源性 (表 2)。根据比对结果, 可将这 27 株菌初步鉴定为 14 个种, 即 FJAT-17210、FJAT-17213、FJAT-17221、FJAT-17225、FJAT-17231 为阿氏芽胞杆菌 *Bacillus aryabhattai*; FJAT-17208、FJAT-17211、FJAT-17227、FJAT-17223 为蜡状芽胞杆菌 *Bacillus cereus*; FJAT-17215、FJAT-17229、FJAT-17217、FJAT-17224 为炭疽芽胞杆菌 *Bacillus anthracis*; FJAT-17218、FJAT-17226 为甲基营养型芽胞杆菌 *Bacillus methylotrophicus*;

FJAT-17220、FJAT-17232 为苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis*; FJAT-17230 为嗜气芽胞杆菌 *Bacillus aerophilus*; FJAT-17228 为地衣芽胞杆菌 *Bacillus licheniformis*; FJAT-17207 为假蕈状芽胞杆菌 *Bacillus pseudomycooides*; FJAT-17223 为简单纯芽胞杆菌 *Bacillus simplex*; FJAT-17214 为短短芽胞杆菌 *Brevibacillus brevis*; FJAT-17216 为球形赖氨酸芽胞杆菌 *Lysinibacillus sphaericus*; FJAT-17209 为解木糖赖氨酸芽胞杆菌 *Lysinibacillus xylanilyticus*; FJAT-17222 为嗜几丁质类芽胞杆菌 *Paenibacillus chitinolyticus*; FJAT-17212 和 FJAT-17219 可能为芽胞杆菌属的新种。

表 2 27 株芽胞杆菌与参考菌株的 16S rDNA 同源性

Table 2 The 16S rDNA homology between 27 *Bacillus* strains and the reference strains

序号	菌株编号	菌种名称	同源性/%
1	FJAT-17230	嗜气芽胞杆菌 <i>Bacillus aerophilus</i>	100.00
2	FJAT-17215	炭疽芽胞杆菌 <i>Bacillus anthracis</i>	99.86
3	FJAT-17217		99.86
4	FJAT-17224		99.57
5	FJAT-17229		99.75
6	FJAT-17210	阿氏芽胞杆菌 <i>Bacillus aryabhattai</i>	100.00
7	FJAT-17213		100.00
8	FJAT-17221		99.33
9	FJAT-17225		100.00
10	FJAT-17231		99.84
11	FJAT-17208	蜡状芽胞杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	99.87
12	FJAT-17211		99.86
13	FJAT-17227		99.75
14	FJAT-17233		100.00
15	FJAT-17212	— <i>Bacillus galactosidilyticus</i>	96.81
16	FJAT-17228	地衣芽胞杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>	99.41
17	FJAT-17218	甲基营养型芽胞杆菌 <i>Bacillus methylotrophicus</i>	99.88
18	FJAT-17226		99.70
19	FJAT-17207	假蕈状芽胞杆菌 <i>Bacillus pseudomycooides</i>	100.00
20	FJAT-17223	简单纯芽胞杆菌 <i>Bacillus simplex</i>	99.88
21	FJAT-17220	苏云金芽胞杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i>	100.00
22	FJAT-17232		100.00
23	FJAT-17214	短短芽胞杆菌 <i>Brevibacillus brevis</i>	99.59
24	FJAT-17216	球形赖氨酸芽胞杆菌 <i>Lysinibacillus sphaericus</i>	97.69
25	FJAT-17209	解木糖赖氨酸芽胞杆菌 <i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	100.00
26	FJAT-17219		96.26
27	FJAT-17222	嗜几丁质类芽胞杆菌 <i>Paenibacillus chitinolyticus</i>	99.85

2.4 基于 16S rDNA 的芽胞杆菌系统发育分析

采用 Neighbour-Joining 方法构建聚类树, 遗传距离为 0.02。从夏枯草植株及其根系土壤中分离到的 27 株芽胞杆菌和 24 株参考菌株构建的 16S rDNA 进化树如图 2 所示, 由系统发育树可以得出 27 株菌均为芽胞杆菌, 27 株芽胞杆菌主要分成 8 个类群。类群 I 包含 11 株菌, 由菌株 FJAT-17232、FJAT-17227、FJAT-17220、FJAT-17217、FJAT-17211、FJAT-17208、FJAT-17233、FJAT-17207、FJAT-17224、FJAT-

17229、FJAT-17215 组成; 类群 II 包含 4 株菌, 由菌株 FJAT-17230、FJAT-17228、FJAT-17218、FJAT-17226 组成; 类群 III 包含 5 株菌, 由菌株 FJAT-17210、FJAT-17213、FJAT-17221、FJAT-17231、FJAT-17225 组成; 类群 IV 包含 3 株菌, 由菌株 FJAT-17216、FJAT-17209、FJAT-17219 组成; 类群 V 包含 1 株菌, 即 FJAT-17223; 类群 VI 包含 1 株菌, 即 FJAT-17212; 类群 VII 包含 1 株菌, 即 FJAT-17214; 类群 VIII 包含 1 株菌, 即 FJAT-17222。

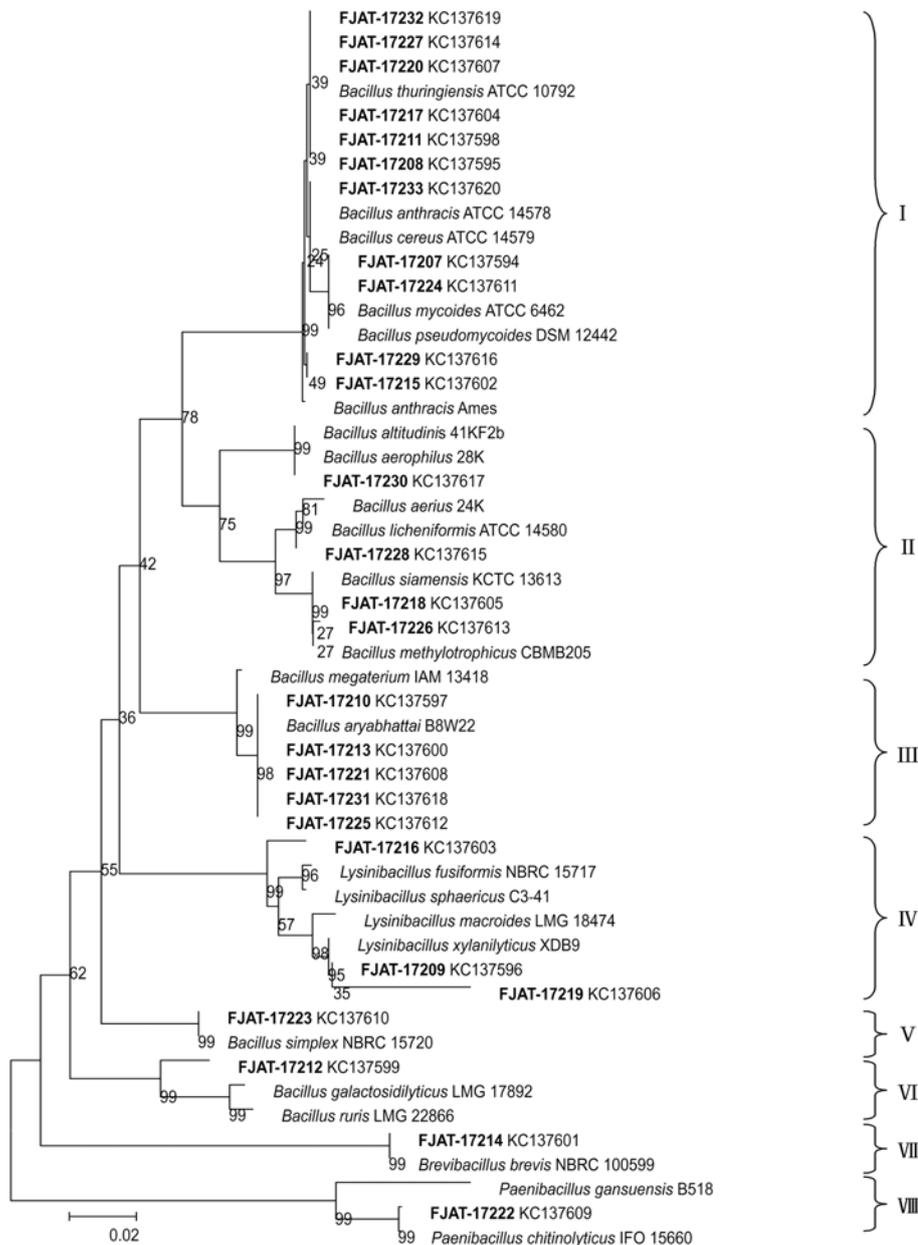


图 2 采用邻接法构建的 16S rDNA 系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic trees derived from 16S rDNA by neighbor-joining method

### 2.5 夏枯草不同部位芽胞杆菌种类分布

从表 3 可以看出从根系土壤所分离出的芽胞杆菌种类最多,有 9 种: *Bacillus anthracis*、*Bacillus aryabhattai*、*Bacillus cereus*、*Bacillus galactosidilyticus*、*Bacillus pseudomycooides*、*Brevibacillus brevis*、*Lysinibacillus sphaericus*、*Lysinibacillus xylanilyticus*、*Bacillus thuringiensis*;其次是根部组织,有 7 种: *Bacillus anthracis*、*Bacillus aryabhattai*、*Bacillus methylotrophicus*、*Bacillus simplex*、*Bacillus thuringiensis*、*Lysinibacillus xylanilyticus*、*Paenibacillus chitinolyticus*;再次是茎部组织,有 6 种: *Bacillus aerophilus*、*Bacillus anthracis*、*Bacillus aryabhattai*、*Bacillus cereus*、*Bacillus licheniformis*、*Bacillus methylotrophicus*;叶部组织最少,只有 1 种: *Bacillus cereus*。

表 3 夏枯草不同部位及根系土壤中分离到的芽胞杆菌种类及数量

Table 3 The species and content of *Bacillus* isolated form different part of the sample

样本名称	菌种名	含量/ ( $\times 10^4$ cfu $\cdot$ g $^{-1}$ )
根系土壤	<i>Bacillus anthracis</i>	0.37
	<i>Bacillus aryabhattai</i>	2.33
	<i>Bacillus cereus</i>	9.07
	<i>Bacillus galactosidilyticus</i>	0.33
	<i>Bacillus pseudomycooides</i>	0.97
	<i>Brevibacillus brevis</i>	2.00
	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	0.07
	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	2.07
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	2.37
根部组织	<i>Bacillus anthracis</i>	17.67
	<i>Bacillus aryabhattai</i>	1.53
	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	7.00
	<i>Bacillus simplex</i>	0.10
	<i>Bacillus cereus</i>	5.67
	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	2.00
	<i>Paenibacillus chitinolyticus</i>	1.67
茎部组织	<i>Bacillus aerophilus</i>	0.53
	<i>Bacillus anthracis</i>	0.07
	<i>Bacillus aryabhattai</i>	0.03
	<i>Bacillus cereus</i>	1.17
	<i>Bacillus licheniformis</i>	0.03
	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	0.67
叶部组织	<i>Bacillus cereus</i>	5.07

### 2.6 夏枯草不同部位芽胞杆菌数量分布

从图 3 可以看出,根部组织中所含的芽胞杆菌

数量最多,为  $35.64 \times 10^4$  cfu  $\cdot$  g $^{-1}$ ,其次是根系土壤 ( $19.58 \times 10^4$  cfu  $\cdot$  g $^{-1}$ )、叶部组织 ( $5.07 \times 10^4$  cfu  $\cdot$  g $^{-1}$ )、茎部组织中的芽胞杆菌数量最少,仅有  $2.50 \times 10^4$  cfu  $\cdot$  g $^{-1}$ 。

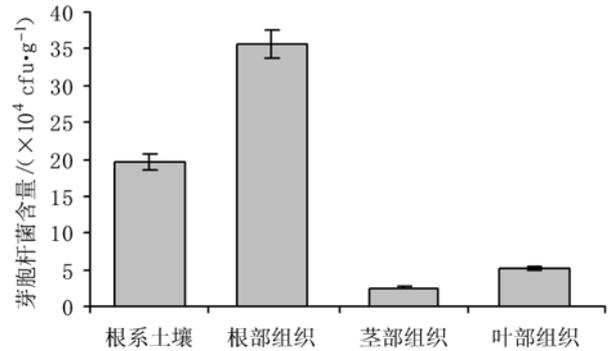


图 3 夏枯草标本及其根系中芽胞杆菌总含量比较图

Fig. 3 Comparison of the content of *Bacillus* isolated from the selfheal sample and its root system

### 2.7 芽胞杆菌在夏枯草不同部位的分布

从表 4 可以看出, *Bacillus aerophilus* 和 *Bacillus licheniformis* 只分布于茎部组织,含量分别为  $0.53 \times 10^4$  cfu  $\cdot$  g $^{-1}$ 、 $0.03 \times 10^4$  cfu  $\cdot$  g $^{-1}$ , *Bacillus simplex* 和 *Paenibacillus chitinolyticus* 只分布于根部组织,含量分别为  $0.10 \times 10^4$  cfu  $\cdot$  g $^{-1}$ 、 $1.67 \times 10^4$  cfu  $\cdot$  g $^{-1}$ ,这 4 种芽胞杆菌可能是夏枯草内生菌; *Bacillus anthracis* 分布于根系土壤、根部组织和茎部组织中,含量分别为  $0.37 \times 10^4$ 、 $17.67 \times 10^4$ 、 $0.07 \times 10^4$  cfu  $\cdot$  g $^{-1}$ ,根部组织含量最多; *Bacillus aryabhattai* 分布于根系土壤、根部组织和茎部组织中,含量分别为  $2.33 \times 10^4$ 、 $1.53 \times 10^4$ 、 $0.03 \times 10^4$  cfu  $\cdot$  g $^{-1}$ ,在叶部组织中没有; *Bacillus cereus* 在根系土壤、根部组织、茎部组织和叶部组织中均有分布,含量分别为  $9.07 \times 10^4$ 、 $5.67 \times 10^4$ 、 $1.17 \times 10^4$ 、 $5.07 \times 10^4$  cfu  $\cdot$  g $^{-1}$ ; *Bacillus methylotrophicus* 分布于根部组织和茎部组织中,含量分别为  $7.00 \times 10^4$ 、 $0.67 \times 10^4$  cfu  $\cdot$  g $^{-1}$ ,在根系土壤和叶部组织中没有分布,可能是夏枯草内生菌; *Bacillus galactosidilyticus*、*Bacillus pseudomycooides*、*Bacillus thuringiensis*、*Brevibacillus brevis* 和 *Lysinibacillus sphaericus* 只分布于根系土壤,含量分别为  $0.33 \times 10^4$ 、 $0.97 \times 10^4$ 、 $2.37 \times 10^4$ 、 $2.00 \times 10^4$ 、 $0.07 \times 10^4$  cfu  $\cdot$  g $^{-1}$ ,在植物组织内没有分布; *Lysinibacillus xylanilyticus* 分布于根系土壤和根部组织,含量分别为  $2.07 \times 10^4$ 、 $2.00 \times 10^4$  cfu  $\cdot$  g $^{-1}$ ,在茎部组

织和叶部组织中没有分布。

用相关系数,类平均法进行聚类。如图 3 所示,在欧氏距离为 5 时,14 种菌可以分为 4 类。第 1 类包含 5 种菌: *Bacillus pseudomycooides*、*Bacillus thuringiensis*、*Brevibacillus brevis*、*Lysinibacillus sphaericus* 和 *Bacillus galactosidilyticus*, 5 种芽胞杆菌均只分布于根系土壤中。第 2 类包含 3 种菌: *Bacillus aryabhatai*、*Lysinibacillus xylanilyticus* 和 *Bacillus cereus*, 3 种芽胞杆菌在根系土壤和根部组织中均有分布。第 3 类包含 4 种菌: *Bacillus simplex*、*Paenibacillus chitinolyticus*、*Bacillus anthracis* 和 *Bacillus methylotrophicus*, 主要分布在根部组织中。第 4 类包含 2 种菌: *Bacillus aerophilus* 和 *Bacillus licheniformis*, 2 种芽胞杆菌均只分布于茎部组织。

表 4 同种芽胞杆菌在植株不同部位的含量

菌种名	根系土壤	根部组织	茎部组织	叶部组织
<i>Bacillus aerophilus</i>	0	0	0.53	0
<i>Bacillus anthracis</i>	0.37	17.67	0.07	0
<i>Bacillus aryabhatai</i>	2.33	1.53	0.03	0
<i>Bacillus cereus</i>	9.07	5.67	1.17	5.07
<i>Bacillus galactosidilyticus</i>	0.33	0	0	0
<i>Bacillus licheniformis</i>	0	0	0.03	0
<i>Bacillus methylotrophicus</i>	0	7.00	0.67	0
<i>Bacillus pseudomycooides</i>	0.97	0	0	0
<i>Bacillus simplex</i>	0	0.10	0	0
<i>Bacillus thuringiensis</i>	2.37	0	0	0
<i>Brevibacillus brevis</i>	2.00	0	0	0
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	0.07	0	0	0
<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	2.07	2.00	0	0
<i>Paenibacillus chitinolyticus</i>	0	1.67	0	0

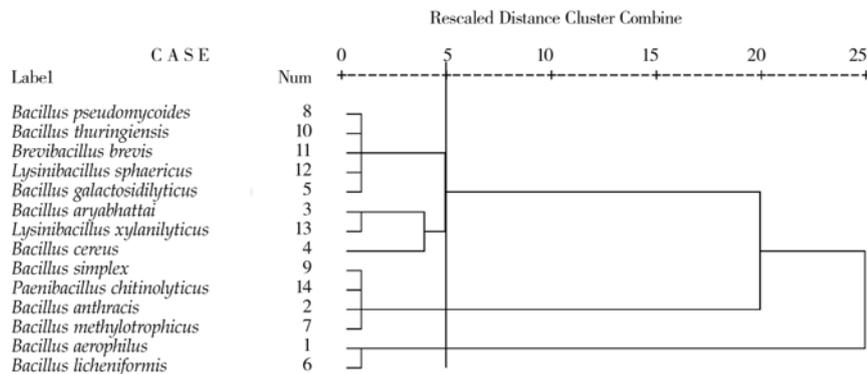


图 4 夏枯草标本及其根系中以种类为样本的芽胞杆菌聚类分析图

Fig. 4 Cluster diagram of *Bacillus* isolated from the selfheal sample and its root system based on species

### 3 讨论

芽胞杆菌属 *Bacillus* 是一类产生芽胞的革兰氏阳性细菌,菌体呈杆状,直或近直,(0.3~2.2)  $\mu\text{m} \times$  (2.1~7.0)  $\mu\text{m}$ ;多数运动;鞭毛典型侧生;形成抗热内生芽胞,在一个胞囊中,芽胞不多于 1 个;营好氧或兼性厌氧生活<sup>[17]</sup>。本研究采用稀释涂布平板法,首次从夏枯草标本及其根系土壤中分离到 27 株芽胞杆菌,结合形态特征和 16S rDNA 鉴定结果,将 27 株分离菌鉴定为 14 种芽胞杆菌,其中 2 株分离菌株为芽胞杆菌疑似新种,这丰富了极端环境下芽胞杆菌分布踪迹,对芽胞杆菌资源的应用也提供新的选择途径。

rDNA 进化速度十分缓慢,具有高度保守性,被

称为细菌的“活化石”。核糖体 16S rDNA 为所有细菌所共有,其基因大小适中(约 1.5 kb),同时具有保守性和变异性,既能反应物种间的亲缘关系,又能揭示物种的特征核酸序列,并且能通过测序技术快速得到核酸序列,已成为理想的基因鉴定靶序列<sup>[18]</sup>。根据 16S rDNA 的芽胞杆菌系统发育分析,27 株芽胞杆菌主要分成 8 个类群。从夏枯草根系土壤所分离出的芽胞杆菌种类最多(9 种),其次是根部组织(7 种),再次是茎部组织(6 种),叶部组织最少(1 种)。夏枯草根组织中所含的芽胞杆菌数量最多,其次是根系土壤、叶部组织,茎部组织中的芽胞杆菌数量最少。*Bacillus pseudomycooides*、*Bacillus thuringiensis*、*Brevibacillus brevis*、*Lysinibacillus sphaericus* 和 *Bacillus galactosi-*

*dilyticus* 均只分布于根系土壤中; *Bacillus aryabhatai*、*Lysinibacillus xylanilyticus* 和 *Bacillus cereus* 在根系土壤和根部组织中有分布; *Bacillus simplex*、*Paenibacillus chitinolyticus*、*Bacillus anthracis* 和 *Bacillus methylotrophicus* 主要分布在根部组织中; *Bacillus aerophilus* 和 *Bacillus licheniformis* 均只分布于茎部组织。

#### 参考文献:

- [1] 刘悦, 宋少江, 徐绥绪. 夏枯草的化学成分及生物活性研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 2003, 20 (1): 55-59.
- [2] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典: 一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 263.
- [3] 邓子煜, 徐先祥, 张小鸿, 等. 夏枯草药理学研究进展 [J]. 安徽医学, 2012, 33 (7): 937-939.
- [4] 崔林, 孙振, 孙福在. 马铃薯内生细菌的分离及环腐病接抗菌的筛选鉴定 [J]. 植物病理学报, 2003, 33 (4): 353-358.
- [5] 崔北米, 潘巧娜, 张陪陪. 大蒜内生细菌的分离及拮抗菌筛选与鉴定 [J]. 西北植物学报, 2008, 28 (11): 2343-2348.
- [6] 陈立军, 孙广宇, 张荣. 油菜内生真菌的分离鉴定 [J]. 石河子大学学报, 2004, 22 (S1): 66-68.
- [7] 陈泽斌, 夏振远, 雷丽萍, 等. 烟草可培养内生细菌 16s Rdnad Per-Rflp 和系统发育分析 [J]. 中国烟草学报, 2012, 18 (1): 92-100, 105.
- [8] 邓雪萍, 杨博. 药用植物内生菌及其产生的活性成分研究现状 [J]. 安徽农学通报, 2010, 16 (1): 72-74.
- [9] YOON J H, LEE J S, KOOK S Y, et al. Reclassification Of *Nocardioides Simplex* Atcc 13260, Atcc 19565, and Atcc 19566 As *Rhodococcus Erythropolis* [J]. *International of Systematic Bacteriology*, 1997: 904-907.
- [10] KIM O S, CHO Y J, LEE K, et al. Introducing Eztaxon-E: A Prokaryotic 16S rDNA Gene Sequence Database With Phylotypes That Represent Uncultured Species [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2012, 62: 716-721.
- [11] KRIEG N R, HOLT J G, WILLIAMS, et al. *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology* [M]. USA: The Williams and Wilkins Company, 1984.
- [12] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [13] GORDON R E, HAYNES W C, PANG H N. The Genus *Bacillus* [M]. New York: Agricultural Research Service, 1973: 107-108.
- [14] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAC F, et al. The Clustal-X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided By Quality Analysis Tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25: 4876-4882.
- [15] TAMURA K, DUKLEY J, NDI M, et al. Mega4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Mega) Software Version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24: 1596-1599.
- [16] TAMURA K, NEI M, KUMAR S. Prospects For Inferring Very Large Phylogenies By Using The Neighbor-Joining Method [J]. *Proceedings of the National Academy Of Sciences (UAS)*, 2004, 101: 11030-11035.
- [17] RE·布坎南, NE·吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册 [M]. 第8版. 北京: 科学出版社, 1984: 729-760.
- [18] 都立辉, 刘芳. 16S rDNA 基因在细菌菌种鉴定中的应用 [J]. *乳业科学与技术*, 2006, (5): 207-209.

(责任编辑: 张梅)