

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (5) :551 – 563; 4 May 2015
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140366

武夷山地衣表生和内生芽孢杆菌种群的多样性

葛慈斌¹, 刘波^{1*}, 车建美¹, 陈梅春¹, 刘国红¹, 魏江春²

¹福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福建 福州 350003

²中国科学院微生物研究所, 真菌学国家重点实验室, 北京 100101

摘要: 【目的】分析武夷山地衣表生和内生芽孢杆菌种群的多样性。【方法】从武夷山自然保护区采集扁枝衣属 (*Evernia*)、珊瑚枝属 (*Stereocaulon*)、孔叶衣属 (*Menegazzia*) 等分属于 7 科 9 属的地衣样品 9 份, 分离地衣表面附生 (表生) 和内生芽孢杆菌, 并根据 16S rRNA 基因序列同源性对分离得到的芽孢杆菌进行种的鉴定。【结果】未从扁枝衣属、树花属 (*Ramalina*) 和茶渍属 (*Lecanora*) 的 3 个样品中分离出表生或内生芽孢杆菌, 从另外 6 个样品中分离出芽孢杆菌 34 株, 分别鉴定为芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*)、短芽孢杆菌属 (*Brevibacillus*)、赖氨酸芽孢杆菌属 (*Lysinibacillus*) 和绿芽孢杆菌属 (*Viridiibacillus*) 的 24 个种。类芽孢杆菌属、芽孢杆菌属是这些地衣表生、内生芽孢杆菌的优势种群, 分别占分离得到菌株的 41.2% (14 株) 和 35.3% (12 株); 短芽孢杆菌属、赖氨酸芽孢杆菌属和绿芽孢杆菌属为首次报道从地衣中分离获得。从不同的地衣样品分离的表生和内生芽孢杆菌的种类、数量存在差异。蜈蚣衣属 (*Physcia*) 表生的芽孢杆菌数量最多、可达 3.85×10^6 cfu/g, 而珊瑚枝属表面附生和内生芽孢杆菌的种类最多、共有 12 个种。分离到的芽孢杆菌大部分来自单独的一种地衣; 台中类芽孢杆菌 (*Paenibacillus taichungensis*)、土壤短芽孢杆菌 (*Brevibacillus agri*) 等 4 个种存在于 2 – 3 种地衣中; 蕈状芽孢杆菌 (*Bacillus mycoides*) 分布最广, 在蜈蚣衣属、珊瑚枝属等 4 种地衣中都有存在。【结论】武夷山地衣表生和内生芽孢杆菌存在种类和数量的多样性。

关键词: 地衣, 内生, 芽孢杆菌, 多样性, 武夷山

中图分类号: Q939 文章编号: 0001-6209 (2015) 05-0551-13

地衣是由真菌与藻类或蓝细菌经过漫长的生物演化形成的一类具有高度遗传稳定性的共生联合复合有机体^[1]; 但在本质上, 地衣是一大类专业化真菌有控制地寄生于光合微生物——藻类或蓝细菌, 因此地衣亦称为地衣型真菌^[2]。地衣在自然界广泛分布, 目前, 全世界已描述的地衣有 500 余属、

26000 余种, 中国有 232 属 1766 种^[3]。地衣由于其共生的特殊性, 能产生多种初生代谢产物 (多糖类) 和次生代谢产物 (酚酸类), 构成了天然有机化合物的独特类群宝库^[4]。地衣还可以作为草药^[5]、食品^[6] 和饲料^[7] 等直接利用; 地衣能够促使岩石分化和土壤形成, 为其他植物开辟了生长的土地, 故也称

基金项目: 科技部 973 前期项目 (2011CB111607); 国家自然科学基金项目 (31370059); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201303094); 科技部国际合作项目 (2012DFA31120)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-591-87861601; E-mail: fzliubo@163.com

作者简介: 葛慈斌 (1973 –), 男, 副研究员, 主要从事微生物生物技术研究。E-mail: benci2000@sohu.com

收稿日期: 2014-07-23; 修回日期: 2015-01-07

作是自然界的先锋植物^[8];地衣对环境质量尤其空气质量要求较高、对大气污染物敏感,可利用其作为指示生物监测、评定大气质量^[9]。正是由于地衣存在诸多特殊性,因此对地衣的形态学、生理学、生态学、系统分类学等方面的研究已经、并将持续引起各国学者的重视。

关于地衣表生和内生细菌的研究,有过许多的报道。Selbmann等^[10]分析了采自南极洲的16份地衣样品中可培养细菌的群落状况,结果从5份样品的表面和内部分别分离出20、10个菌株,其中大部分属于放线菌纲,少部分菌株分别属于类芽孢杆菌属、芽孢杆菌属、假单胞菌属和奇异球菌属。Massimiliano等^[11]从奥地利、法国的 *Cladonia*、*Hypogymnia*、*Pseudevernia* 和 *Roccella* 属11种地衣中分离出34株细菌,其中类芽孢杆菌属和芽孢杆菌属的菌株分别有9株、4株,其余的菌株分别归于8个属。Grube等^[12]采用荧光原位杂交、共聚焦激光显微扫描等方法分析了 *Cladonia arbuscula*、*Lecanora polytropa*、*Umbilicaria cylindrica* 中细菌群落的多样性,结果表明可培养细菌主要是不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、伯克氏菌属、甲基杆菌属 (*Methylobacterium*)、芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属等,优势菌群为 α -变形菌纲 (Alphaproteobacteria)。Grube等^[13]和 Aschenbrenner等^[14]分析了不同肺衣伴生细菌 (associated bacteria) 群落的状况,结果表明这些细菌的大部分属于变形杆菌门,同时还有鞘脂杆菌门 (*Sphingobacteria*)、酸杆菌门 (*Acidobacteria*)、放线菌门 (*Actinobacteria*) 等。Lee等^[15]从采自南极、北极的地衣中分离出68个菌株,经16S rRNA序列鉴定为26个种,其中变形杆菌门有44株,放线菌

门有17株,类芽孢杆菌属有2株。Liba等^[16]从巴西的5个地衣样品中分离出能固氮的菌株16株,经16S rRNA序列鉴定,均属于变形杆菌门。张群林等^[17]也从地衣分离到6个苏云金芽孢杆菌菌株。而关于地衣中细菌对地衣生长的作用,也主要认为是固氮、解磷、分泌生长激素、产生抗菌物质等^[10-14, 16]。这表明,截至目前,对地衣中芽孢杆菌研究的较少,其种类分布、种群结构、生理功能、与地衣的相互作用等有待于更多的研究,对地衣表生及内生芽孢杆菌种类的调查是研究地衣与芽孢杆菌相互作用的基础。

武夷山自然保护区是世界上同纬度带现存面积最大、保存最完整的中亚热带森林生态系统,以“生物模式标本”名扬海内外。武夷山自然保护区的地衣资源丰富,分布着多种稀有的地衣类群^[18]。本研究对采自武夷山自然保护区的地衣进行表面附生和内生芽孢杆菌的分离,以期了解该保护区地衣表面附生和内生芽孢杆菌的分布状况,丰富芽孢杆菌的菌株资源,并为研究地衣与芽孢杆菌间的相互关系提供基础。

1 材料和方法

1.1 地衣的采集

地衣样品采自武夷山自然保护区内的黄岗山、桐木关、大竹岚等地;采集时,用采集刀小心地将地衣从其附着的岩石、土壤或其它基质表面剥离,放入无菌袋内,带回实验室进行芽孢杆菌的分离。采集的地衣的相关信息见表1。

表1 采集的地衣的基本信息

Table 1. Information of the lichen sampled from Wuyi mountain

Lichen genus	Location	Habitat type	Date
<i>Evernia</i>	peak of the Huanggang mountain (黄岗山顶部)	rock	2012. 6. 19
<i>Lecanora</i>	peak of the Huanggang mountain (黄岗山顶部)	rock	2012. 6. 19
<i>Hypogymnia</i>	foot of the Huanggang mountain (黄岗山底部)	tree trunk	2012. 6. 19
<i>Menegazzia</i>	foot of the Huanggang mountain (黄岗山底部)	tree trunk	2012. 6. 19
<i>Umbilicaria</i>	peak of the Huanggang mountain (黄岗山顶部)	rock	2012. 6. 19
<i>Stereocaulon</i>	Tongmu guan (桐木关)	small stone	2012. 6. 19
<i>Cladonia</i>	Dazhu lan (大竹岚)	rock	2012. 6. 20
<i>Ramalina</i>	foot of the Huanggang mountain (黄岗山底部)	small stone	2012. 6. 19
<i>Physcia</i>	foot of the Huanggang mountain (黄岗山底部)	tree trunk	2012. 6. 19

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1000 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 1000 mL, pH 7.0。DNA 提取试剂: 0.1 mol/L NaCl, 0.01 mol/L Tris/HCl, 0.001 mol/L EDTA, Tris-saturated phenol。PCR 反应试剂: 10 × Buffer, dNTP (0.01 mol/L /each), *Taq* 酶 (2.5 U/μL) (上海博尚生物技术有限公司), 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、Tpersonal Biometra 梯度 PCR 仪、PowerPac Basic BIO-RAD 电泳仪、Eppendorf Centrifuge 5418R 离心机。

1.3 地衣表面附生(表生)及内生芽孢杆菌的分离

将采集的地衣放置在干净的培养皿上, 小心地用手术刀切下地衣的叶状体(或子实体), 称重, 然后将叶状体用 20 mL 的无菌水浸泡、振荡 30 min; 取少量浸泡地衣后的无菌水、80°C 水浴 10 min 后涂 LB 培养基平板, 30°C 培养箱内培养, 分离地衣表面附生(简称表生)的芽孢杆菌。

将浸泡后的叶状体用 75% 酒精浸泡处理 30 s, 用 10% 次氯酸钠溶液浸泡消毒 5 min, 再用无菌水漂洗 3 遍(取少量最后一遍的无菌水漂洗液涂 LB 培养基平板, 以检查地衣表面是否消毒干净), 放置于无菌研钵中, 加入 2 mL 无菌水, 充分研磨至匀浆状, 转移入无菌试管, 80°C 水浴 10 min 后进行 10 倍系列稀释至 10^{-3} , 分别取 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 稀释液各 0.2 mL 涂 LB 培养基平板(每个浓度重复 3 次), 放置在 30°C 培养箱内培养。

培养 3 d 后, 观察各平板上的菌落生长状况, 描述不同菌落的形态、颜色、大小等特征, 并进行编号、计数, 计算各地衣样品同类菌落的数量及芽孢杆菌总含量。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°C 甘油冷冻法保藏。

1.4 芽孢杆菌 DNA 的提取和 16S rRNA 基因序列的扩增与测定

采用苯酚-氯仿法提取 DNA; 采用细菌 16S rRNA 基因序列的通用引物^[19] 9F 5'-GAGTTTGCCTGGCTCAG-3' (9-27) 和 1542R 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3' (1542-1525) 进行 16S rRNA 基因序列扩增。PCR 反应体系 (25 μL): 2.5 μL 10 × Buffer、0.5 μL 0.01 mol/L dNTP、引物各 1 μL、0.3 μL (5 U/μL) 的 *Taq* 酶和 1 μL DNA 模板。PCR 反应程序: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 45 s, 72°C 延伸 1 min 30 s, 35 个循环; 最后 72°C 延伸 10 min。PCR 产物的检测: 取 2

μL PCR 产物, 点样于 1.5% 的琼脂糖凝胶中, 电压 100 V 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, 并将测得的序列在网站 EzTaxon^[20] (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) 进行比对。

1.5 芽孢杆菌的系统发育分析

根据对分离得到的芽孢杆菌 16S rRNA 基因序列鉴定的结果, 分析、统计各个地衣分离出的芽孢杆菌的种类和数量状况; 选择相关参考菌株的 16S rRNA 基因序列, 再经 ClustalX^[21] 对齐后, 用软件 Mega 4.0^[22-23] 对芽孢杆菌的 16S rRNA 基因序列进行聚类分析(方法为 Neighbour-Joining), 构建聚类树。

1.6 地衣表生、内生芽孢杆菌种群多样性分析

引入群落生态学多样性指数香农-威纳(Shannon-Wiener)指数(H), 对不同属地衣表生、内生芽孢杆菌的种类和数量的多样性指数进行分析; Shannon-Wiener 多样性指数(H)按照公式(1)计算

$$H = - \sum P_i \ln P_i \quad \text{公式(1)}$$

式中 $P_i = N_i/N$, N_i 为 i 种芽孢杆菌的数量, N 为某个属的表生(或内生)芽孢杆菌的总量。

为区分不同地衣属芽孢杆菌的种群数量, 以芽孢杆菌的数量为指标、以芽孢杆菌种类为样本, 用欧氏距离法对芽孢杆菌的种群数量进行系统聚类, 分析各类群的特点。

2 结果和分析

2.1 地衣表生与内生芽孢杆菌的分离与鉴定

在供试的 9 个地衣样品中, 未从扁枝衣属(*Evernia*)、树花属(*Ramalina*)和茶渍属(*Lecanora*)等 3 个样品中分离出表生或内生芽孢杆菌, 从袋衣属(*Hypogymnia*)、脐衣属(*Umbilicaria*)和蜈蚣衣属(*Physcia*)3 个样品中只分离出表生菌, 从珊瑚枝属(*Stereocaulon*)、孔叶衣属(*Menegazzia*)和石蕊属(*Cladonia*)的 3 个样品中分离得到表生和内生芽孢杆菌; 分离出的表生及内生芽孢杆菌共 34 株(表 2)。经 16S rRNA 基因序列测定、比对, 可初步将这 34 株芽孢杆菌鉴定为 24 个种。

从珊瑚枝属地衣中分离出的芽孢杆菌种类最多, 有 8 种表生菌和 4 种内生菌; 表生芽孢杆菌包括菌株 FJAT-17065、FJAT-17066、FJAT-17067 等, 内生

芽孢杆菌分别为菌株 FJAT-17069、FJAT-17070、FJAT-17071 和 FJAT-17178; 表生芽孢杆菌的数量也比内生芽孢杆菌的数量大。从孔叶衣属地衣中分离出的芽孢杆菌种类数其次, 有 6 种表生菌和 4 种内生菌; 表生芽孢杆菌包括菌株 FJAT-17087、FJAT-17277、FJAT-17284 等, 内生芽孢杆菌分别为 FJAT-17091、FJAT-17092、FJAT-17274 和 FJAT-17275; 其中 FJAT-17284、FJAT-17274 均为解木糖赖氨酸芽孢

杆菌 (*Lysinibacillus xylanilyticus*), 该菌在孔叶衣属地衣的表面和内部都有存在, 而且内生的数量比表生的多。从石蕊属地衣中分离出 3 种表生菌, 即菌株 FJAT-17164、FJAT-17165、FJAT-17166 和 2 种内生菌, 即菌株 FJAT-17167、FJAT-17168; 其中 FJAT-17166、FJAT-17167 均为蕈状芽孢杆菌 (*Bacillus mycooides*), 该菌在石蕊属地衣的表面和内部都有存在, 而且也是内生的 *B. mycooides* 含量比表生的大。

表 2. 从不同地衣样品中分离出的表生、内生芽孢杆菌的种类与数量

Table 2. Strains and quantification isolated from different samples of lichen

Lichen	External/ internal	No. of strain	Closest species	GenBank accession No.	Identity/%	Quantification /cfu/g
<i>Stereocaulon</i>	external	FJAT-17065	<i>Paenibacillus terrigena</i>	KM111192	97.91	0.77×10^2
		FJAT-17066	<i>Bacillus aryabhatai</i>	KM111193	100.00	3.83×10^2
		FJAT-17067	<i>Paenibacillus panacisoli</i>	KM203371	99.84	3.83×10^2
		FJAT-17174	<i>Bacillus tequilensis</i>	KM203390	99.85	1.64×10^3
		FJAT-17175	<i>Brevibacillus agri</i>	KM203391	99.34	1.69×10^4
		FJAT-17266	<i>Bacillus mycooides</i>	KM203393	99.84	0.30×10^2
		FJAT-17267	<i>Paenibacillus odorifer</i>	KM203394	98.58	0.61×10^2
		FJAT-17270	<i>Bacillus endoradicis</i>	KM203395	99.04	0.30×10^2
	internal	FJAT-17069	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	KM203372	99.69	7.66×10^2
		FJAT-17070	<i>Paenibacillus uliginis</i>	KM203373	98.51	7.66×10^2
FJAT-17071		<i>Brevibacillus invocatus</i>	KM203374	98.96	7.66×10^2	
FJAT-17178		<i>Paenibacillus taichungensis</i>	KM203392	100.00	1.48×10^4	
<i>Menegazzia</i>	external	FJAT-17087	<i>Paenibacillus chondroitinus</i>	KM203378	98.03	3.18×10^2
		FJAT-17277	<i>Bacillus acidicer</i>	KM203398	99.33	0.52×10^2
		FJAT-17279	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	KM203399	100.00	6.88×10^2
		FJAT-17280	<i>Bacillus luciferensis</i>	KM203400	98.84	8.47×10^3
		FJAT-17283	<i>Bacillus mycooides</i>	KM203401	99.85	1.16×10^3
		FJAT-17284	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	KM203402	99.85	1.72×10^2
	internal	FJAT-17091	<i>Paenibacillus odorifer</i>	KM203379	99.57	1.02×10^4
		FJAT-17092	<i>Paenibacillus taichungensis</i>	KM203380	100.00	6.35×10^2
		FJAT-17274	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	KM203396	100.00	6.07×10^2
		FJAT-17275	<i>Viridibacillus arenosi</i>	KM203397	100.00	0.34×10^2
<i>Cladonia</i>	external	FJAT-17164	<i>Bacillus aerophilus</i>	KM203385	99.86	1.31×10^2
		FJAT-17165	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	KM203386	100.00	1.31×10^2
		FJAT-17166	<i>Bacillus mycooides</i>	KM203387	100.00	2.62×10^2
	internal	FJAT-17167	<i>Bacillus mycooides</i>	KM203388	100.00	6.57×10^2
		FJAT-17168	<i>Paenibacillus chitinolyticus</i>	KM203389	99.71	0.36×10^2
<i>Physcia</i>	external	FJAT-17096	<i>Paenibacillus castaneae</i>	KM203381	98.93	6.43×10^5
		FJAT-17100	<i>Bacillus mycooides</i>	KM203382	100.00	4.87×10^5
		FJAT-17102	<i>Paenibacillus taichungensis</i>	KM203383	100.00	2.68×10^6
		FJAT-17106	<i>Paenibacillus durus</i>	KM203384	96.34	4.38×10^4
	internal	-	-	-	-	-
<i>Hypogymnia</i>	external	FJAT-17080	<i>Brevibacillus agri</i>	KM203375	99.36	3.47×10^2
		FJAT-17082	<i>Bacillus nealsonii</i>	KM203376	99.03	3.47×10^2
	internal	-	-	-	-	-
<i>Umbilicaria</i>	external	FJAT-17083	<i>Paenibacillus humicus</i>	KM203377	97.61	2.63×10^3
	internal	-	-	-	-	-

在只分离出表生芽孢杆菌的 3 个地衣属样品中,从蜈蚣衣属中分离出芽孢杆菌种类最多、有 4 种,分别为菌株 FJAT-17096、FJAT-17100、FJAT-17102 和 FJAT-17106;蜈蚣衣属表生芽孢杆菌的数量也最大,特别是 FJAT-17102,含量达 2.68×10^6 cfu/g。从袋衣属地衣中分离出 2 种表生芽孢杆菌,即菌株 FJAT-17080 和 FJAT-17082;从脐衣属地衣中只分离出 1 种表生芽孢杆菌,即菌株 FJAT-17102。

利用 Clustal X 软件,将从各地衣样品中分离出的 34 株芽孢杆菌及其对应参考菌株的 16S rRNA 基因序列进行比对,再用 MEGA 4 软件构建的系统进化树如图 1 所示。从图中可以看出,这 34 株芽孢杆菌主要聚为 3 大类:第一类包括 *Bacillus* 属的 8 个种、*Viridibacillus* 的 1 个种和 *Lysinibacillus* 等属的 2 个;第二类为 *Brevibacillus* 属的 2 个种;第三类为 *Paenibacillus* 属的 11 个种。*Paenibacillus* 属、*Bacillus* 属为地衣表生及内生芽孢杆菌的优势属。

2.2 地衣表生芽孢杆菌种类分布特征

对从各地衣样品中分离出的表生芽孢杆菌,按不同的地衣属进行归类,结果见表 3。6 个不同属的地衣共分离出表生芽孢杆菌 24 株、19 个种,其中石蕊属、孔叶衣属中都有分离出 *Lysinibacillus xylanilyticus*,袋衣属、珊瑚枝属中都有 *Brevibacillus agri*,孔叶衣属、蜈蚣衣属、珊瑚枝属中都有 *Bacillus mycooides*;上述种类之外的芽孢杆菌,则为各地衣属特有的种类,如石蕊属的 *Bacillus aerophilus*,袋衣属的 *Bacillus nealsonii* 等。不同属的地衣,分离出表生芽孢杆菌种类数不同,珊瑚枝属的最多、有 8 种,孔叶衣属和蜈蚣衣属分别有 6、4 种;石蕊属和袋衣属都是 2 种;在表生芽孢杆菌中,不同芽孢杆菌属的比例也不同,石蕊属、袋衣属、珊瑚枝属和孔叶衣属地衣分离出的表生芽孢杆菌,*Bacillus* 属的种类均占 50%;蜈蚣衣属的表生芽孢杆菌中,*Paenibacillus* 属的占 75%。总的来看,表生芽孢杆菌中,*Bacillus* 属、*Paenibacillus* 属的种类各有 8 个,*Lysinibacillus* 属的 2 个,*Brevibacillus* 属的种类 1 个。

为区分不同芽孢杆菌在地衣表面分布的种群数量,以芽孢杆菌的数量为指标、以芽孢杆菌种类为样

本,用欧氏距离法对地衣表生芽孢杆菌的种群数量进行系统聚类,结果见图 2。当 $\lambda = 5.8$ 时,可将这些表生芽孢杆菌种群分为 3 类:第一类有 *Bacillus aryabhatai*、*Paenibacillus panacisoli*、*Paenibacillus odorifer* 等 15 种芽孢杆菌,其特征是种群数量较少;第二类有 *Paenibacillus castaneae* 和 *Bacillus mycooides* 两种芽孢杆菌,种群数量较多;第三类只有 *Paenibacillus taichungensis* 一种,其特征是种群数量大。

为区分不同地衣属的表生芽孢杆菌种群数量,以芽孢杆菌的数量为指标、以地衣属为样本,用欧氏距离法对不同表生芽孢杆菌种群数量的地衣属进行系统聚类,结果见图 3。当 $\lambda = 3.0$ 时,可将不同的地衣属分为 3 类:第一类有 *Cladonia*、*Hypogymnia*、*Umbilicaria* 和 *Stereocaulon* 4 个属的地衣,其特征是表生芽孢杆菌种群数量较少;第二类是 *Menegazzia*,其特征是表生芽孢杆菌种群数量较大;第三类是 *Physcia*,其特征是表生芽孢杆菌种群数量大,达 3.85×10^6 cfu/g。

2.3 地衣内生芽孢杆菌种类分布特征

对从各地衣样品中分离出的内生芽孢杆菌,按不同的地衣属进行归类,结果见表 4。3 个不同属的地衣共分离出内生芽孢杆菌 10 株,归为 9 个种,其中孔叶衣属、珊瑚枝属都分离出 4 种内生芽孢杆菌,石蕊属分离出 2 种。孔叶衣属、珊瑚枝属都分离出 *P. taichungensis*,其它的芽孢杆菌,则为各属地衣特有的种类,如石蕊属的 *B. mycooides* 和 *Paenibacillus chitinolyticus*,孔叶衣属 *P. odorifer*、*L. xylanilyticus*、*Viridibacillus arenosi*,珊瑚枝属的 *Brevibacillus invocatus*、*Paenibacillus amylolyticus*、*Paenibacillus uliginis*。在内生芽孢杆菌中,*Paenibacillus* 属的芽孢杆菌有 5 种、占 55.6%,为地衣内生芽孢杆菌中的优势属;*Bacillus* 属、*Brevibacillus* 属、*Lysinibacillus* 属、*Viridibacillus* 属的芽孢杆菌都只有 1 种。

在种群数量上,珊瑚枝属的内生芽孢杆菌数量也最大、达 1.71×10^4 cfu/g,孔叶衣属的内生芽孢杆菌数量其次、为 1.15×10^4 cfu/g,石蕊属的最少,只有 6.93×10^2 cfu/g。

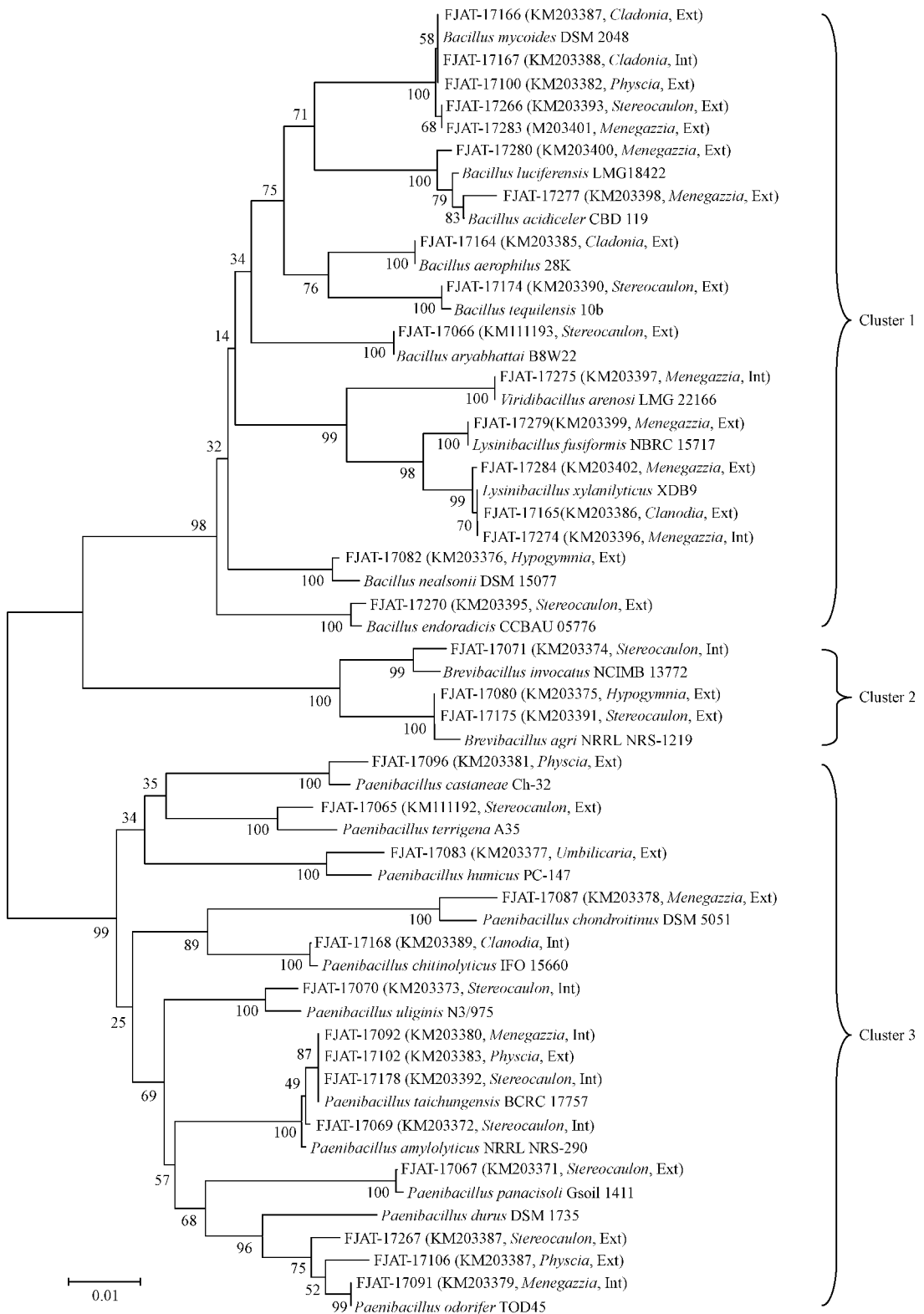


图 1. 基于 16S rRNA 基因序列构建的地衣表生/内生芽孢杆菌的系统发育树

Figure 1. Phylogenetic tree of strains isolated from lichens based on 16S rRNA gene sequences by using neighbor-joining method. Numbers at branching points refer to bootstrap values (1000 resamplings), 0.01 was sequence divergence. The sequences accession number in GenBank and the source lichens of the strains were shown in parentheses. Ext: strains isolated from the surface of the lichen; Int: strains isolated from the internal thallus of the lichen.

表 3. 不同地衣的表生芽孢杆菌种类及数量

Table 3. Species and quantification of bacillus isolated from the surface of different lichen samples

Strain	Quantification of bacillus / $\times 10^2$ cfu/g					
	<i>Cladonia</i>	<i>Hypogymnia</i>	<i>Menegazzia</i>	<i>Physcia</i>	<i>Stereocaulon</i>	<i>Umbilicaria</i>
<i>Bacillus acidicer</i>	0	0	0.52	0	0	0
<i>Bacillus aerophilus</i>	1.31	0	0	0	0	0
<i>Bacillus aryabhatai</i>	0	0	0	0	3.83	0
<i>Bacillus endoradicis</i>	0	0	0	0	0.30	0
<i>Bacillus luciferensis</i>	0	0	847	0	0	0
<i>Bacillus mycoides</i>	2.62	0	11.6	4870	0.30	0
<i>Bacillus nealsonii</i>	0	3.47	0	0	0	0
<i>Bacillus tequilensis</i>	0	0	0	0	16.4	0
<i>Brevibacillus agri</i>	0	3.47	0	0	169	0
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	0	0	6.88	0	0	0
<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	1.31	0	1.72	0	0	0
<i>Paenibacillus castaneae</i>	0	0	0	6430	0	0
<i>Paenibacillus chondroitinus</i>	0	0	3.18	0	0	0
<i>Paenibacillus durus</i>	0	0	0	438	0	0
<i>Paenibacillus humicus</i>	0	0	0	0	0	26.3
<i>Paenibacillus odorifer</i>	0	0	0	0	0.61	0
<i>Paenibacillus panacisoli</i>	0	0	0	0	3.83	0
<i>Paenibacillus taichungensis</i>	0	0	0	26800	0	0
<i>Paenibacillus terrigena</i>	0	0	0	0	0.77	0
total	5.24	6.94	870.9	38538	195.04	26.3

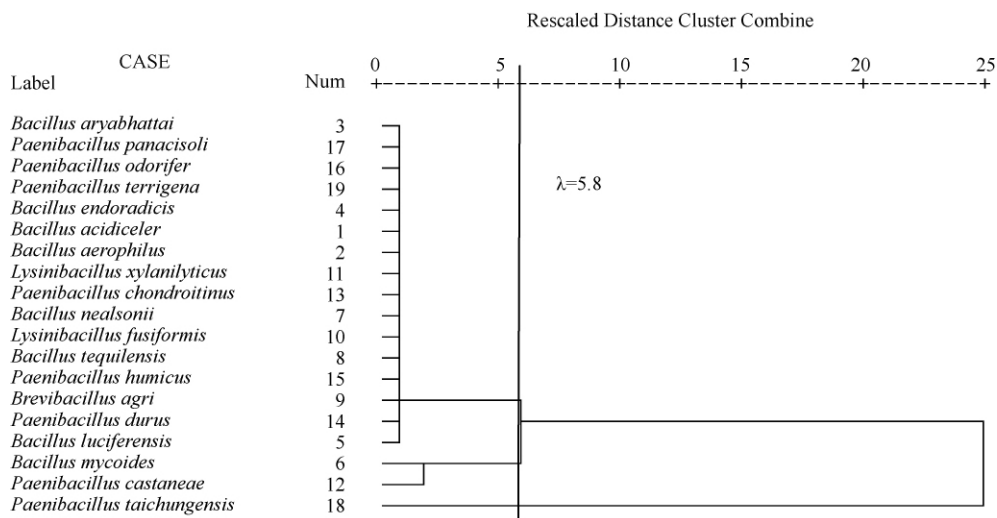


图 2. 基于地衣属的表生芽孢杆菌种群数量的聚类分析

Figure 2. Clustering analysis of the quantification of bacillus colonizing on the surface based on the lichen samples.

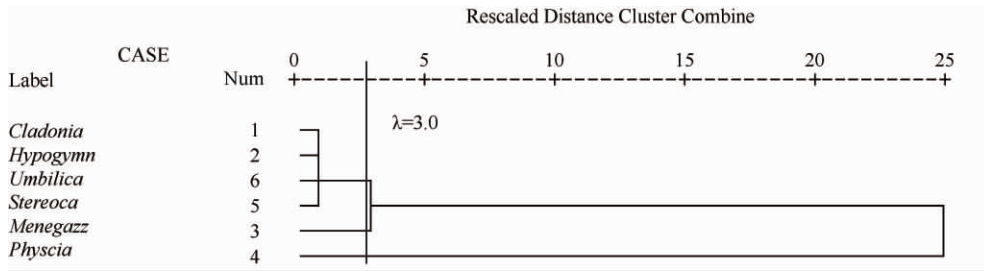


图 3. 基于表生芽孢杆菌种群数量的地衣属聚类分析

Figure 3. Clustering analysis of the lichen samples based on the quantification of bacillus isolated from the surface.

表 4. 不同属地衣的内生芽孢杆菌种类及数量

Table 4. Species and quantification of bacillus endophyte in different lichen samples

Strain	Quantification of bacillus endophyte in different lichen samples ($\times 10^2$ cfu/g)		
	<i>Cladonia</i>	<i>Menegazzia</i>	<i>Stereocaulon</i>
<i>Bacillus mycoides</i>	6.57	0	0
<i>Brevibacillus invocatus</i>	0	0	7.66
<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	0	6.07	0
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	0	0	7.66
<i>Paenibacillus chitinolyticus</i>	0.36	0	0
<i>Paenibacillus odorifer</i>	0	102	0
<i>Paenibacillus taichungensis</i>	0	6.35	148
<i>Paenibacillus uliginis</i>	0	0	7.66
<i>Viridibacillus arenosi</i>	0	0.34	0
total	6.93	114.76	170.98

为区分不同内生芽孢杆菌的种群数量,以芽孢杆菌的数量为指标、以芽孢杆菌种类为样本,用欧氏距离法对地衣内生芽孢杆菌的种群数量进行系统聚类,结果见图 4。当 $\lambda = 17.9$ 时,可将这些内生芽孢杆菌种群分为 3 类:第一类有 *P. uliginis*、

Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)

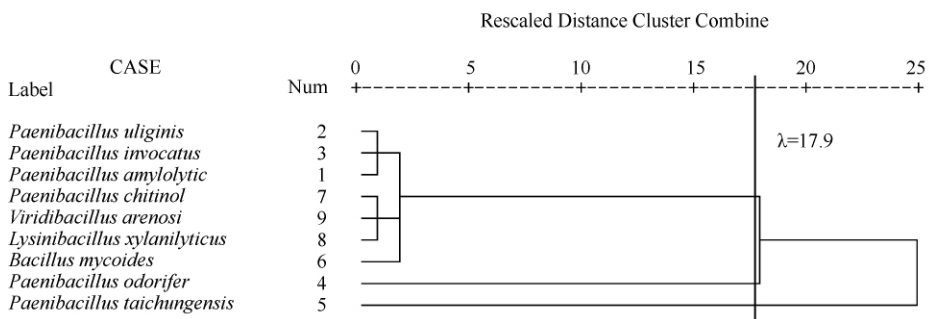


图 4. 基于地衣属的内生芽孢杆菌种群聚类分析

Figure 4. Clustering analysis of endophyte quantification of bacillus based on the lichen samples.

2.4 芽孢杆菌在不同地衣中分布的多样性

不同芽孢杆菌在地衣中的分布状况见表 5。*B. mycoides* 是分布最广的芽孢杆菌种类,在蜈蚣衣属、珊瑚枝属、石蕊属和孔叶衣属的表生菌及石蕊属内

Brevibacillus invocatus、*P. amylolyticus* 等 7 种芽孢杆菌,其特征是种群数量较少;第二类有 *P. odorifer* 一种芽孢杆菌,种群数量较多;第三类也只有 *P. taichungensis* 一种,其特征是种群数量大。

生菌中都有存在,但由于其在地衣中的种群数量差异大,所以其多样性指数最低、仅为 0.04638; *L. xylanilyticus* 在石蕊属表面以及孔叶衣属的内部、表面都有分布,且多样性指数最大; *P. taichungensis*

也是存在 3 种存在状态, 且种群数量最大, 但多样性指数却较低; *B. agri* 和 *P. odorifer*, 都存在于 2 种地衣中, 分别为袋衣属、珊瑚枝属和珊瑚枝属、孔叶衣属,

但 *B. agri* 的多样性指数更大; *B. acidicer*、*P. panacisoli* 和 *V. arenosi* 等其他 19 种芽孢杆菌, 都只存在于一种地衣, 多样性指数为 0。

表 5. 不同芽孢杆菌在地衣中的分布

Table 5. Quantification of different bacillus colonizing on the surface and endophyte in different lichen samples

Strain	Quantification of different bacillus ($\times 10^2$ cfu/g)												SHANN-ON (H)
	<i>Cladonia</i>		<i>Hypogymnia</i>		<i>Menegazzia</i>		<i>Physcia</i>		<i>Stereocaulon</i>		<i>Umbilicaria</i>		
	Ext	Int	Ext	Int	Ext	Int	Ext	Int	Ext	Int	Ext	Int	
<i>Bacillus acidicer</i>	0	0	0	0	0.52	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus aerophilus</i>	1.31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus aryabhatai</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	3.83	0	0	0	0
<i>Bacillus endoradicis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0.30	0	0	0	0
<i>Bacillus luciferensis</i>	0	0	0	0	847	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus mycoides</i>	2.62	6.57	0	0	11.6	0	4870	0	0.30	0	0	0	0.0463
<i>Bacillus nealsonii</i>	0	0	3.47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus tequilensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	16.4	0	0	0	0
<i>Brevibacillus agri</i>	0	0	3.47	0	0	0	0	0	169	0	0	0	0.1421
<i>Brevibacillus invocatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7.66	0	0	0
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	0	0	0	0	6.88	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	1.31	0	0	0	1.72	6.07	0	0	0	0	0	0	1.2464
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7.66	0	0	0
<i>Paenibacillus castaneae</i>	0	0	0	0	0	0	6430	0	0	0	0	0	0
<i>Paenibacillus chitinolyticus</i>	0	0.36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Paenibacillus chondroitinus</i>	0	0	0	0	3.18	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Paenibacillus durus</i>	0	0	0	0	0	0	438	0	0	0	0	0	0
<i>Paenibacillus humicus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26.3	0	0
<i>Paenibacillus odorifer</i>	0	0	0	0	0	102	0	0	0.61	0	0	0	0.0525
<i>Paenibacillus panacisoli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	3.83	0	0	0	0
<i>Paenibacillus taichungensis</i>	0	0	0	0	0	6.35	26800	0	0	148	0	0	0.0523
<i>Paenibacillus terrigena</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0.77	0	0	0	0
<i>Paenibacillus uliginis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7.66	0	0	0
<i>Viridibacillus arenosi</i>	0	0	0	0	0	0.34	0	0	0	0	0	0	0
Total	2.62	6.93	6.94	0	870.9	114.76	38538	0	195.04	170.98	26.3	0	

为区分不同芽孢杆菌在各种地衣表面、内部分布的种群数量, 以芽孢杆菌的数量为指标、以芽孢杆菌种类为样本, 用欧氏距离法对芽孢杆菌的种群数量进行系统聚类, 结果见图 5。当 $\lambda = 5.9$ 时, 可将这些从地衣分离出的表生、内生芽孢杆菌种群分为 3 类: 第一类只有 *P. taichungensis* 1 种, 其特征是种群数量最大; 第二类有 *P. castaneae* 和 *B. mycoides* 2 种芽孢杆菌, 种群数量较大; 第三类有 *B. aryabhatai*、*P. panacisoli*、*P. odorifer* 等 21 种芽孢杆菌, 其特征是种群数量少。

3 讨论

尽管地衣是由共生菌(子囊菌或担子菌)与共

生藻(绿藻或蓝藻)组成的共生联合体, 但这也不妨碍另外的一些真菌、细菌参与到地衣共生体中。早期的研究表明, 地衣中存在着多种具有固氮作用的细菌, 如固氮菌属(*Azotobacter*)、梭菌属(*Clostridium*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)等^[11]; 近年来, 随着分子生物学和显微技术的发展, 酸杆菌门(Acidobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)等的多个属^[10-16]细菌被确认存在于地衣中, 其中变形菌纲是主要的类群。本研究从石蕊属、袋衣属、孔叶衣属等 6 个不同的地衣样品中分离到表生及内生芽孢杆菌 34 株, 分别属于 5 个属、24 个种(有 1 个种为疑似新种), 其中类芽孢杆菌属和芽孢杆菌属菌株分别有 14、12 株, 为优势菌株, 短芽孢杆菌属、赖氨酸芽孢

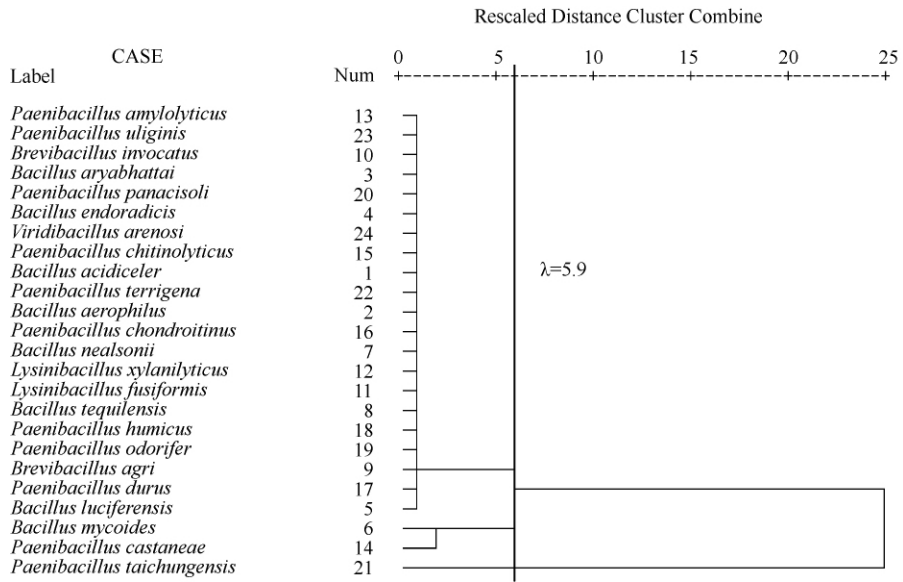


图 5. 不同芽孢杆菌的种群数量聚类分析

Figure 5. Clustering analysis on concentration of different bacillus colonizing on the surface and endophyte in different lichen samples.

杆菌属和绿芽孢杆菌属为首次报道从地衣中分离出来;有些种类的芽孢杆菌,如蕈状芽孢杆菌、台中类芽孢杆菌,能从不同的地衣中分离得到;还有些芽孢杆菌,如解木糖赖氨酸芽孢杆菌、蕈状芽孢杆菌,能存在于同一种地衣的表面和内部。早期从地衣中分离出的细菌,大部分都具有固氮作用,而且类芽孢杆菌属的相当一部分菌株,也具有较强的固氮能力^[24];至于本研究分离出的芽孢杆菌、尤其是占优势地位的类芽孢杆菌属菌株是否具有固氮作用,有待于进一步研究。

本研究用于分离芽孢杆菌的 9 个地衣样品,归于不同的属,且生长基物、生长型存在差异。不同的地衣,分离出的表生芽孢杆菌和内生芽孢杆菌的种类和数量存在差别,扁枝衣属、树花属和茶渍属等 3 个样品中没有分离出芽孢杆菌;珊瑚枝属表生和内生芽孢杆菌的种类最多,而蜈蚣衣属表生的芽孢杆菌数量最多;不同的地衣,也可以分离出相同种类的表生或内生芽孢杆菌,即地衣表生或内生芽孢杆菌存在种类、数量的多样性,这可能是由于地衣表面及内部细菌群落的组成与结构,主要受地衣种类、地理位置、地衣生长的基物和生境等因素的影响^[25-26]。本研究从蜈蚣衣属分离出的芽孢杆菌数量达 3.85×10^6 cfu/g 以上,这验证了 Lenova 和 Blum^[27] 的说法,即某些地衣的每克叶状体存在的细菌数量可达

百万个以上;Grube 等^[12]、Cardinale 等^[28]、Bjelland 等^[29] 的研究结果也表明了部分地衣中存在着数量巨大 ($10^7 - 10^8$, 甚至达 10^{11}) 非蓝藻类细菌。

植物内生菌 (Plant Endophyte) 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和器官内部的一类微生物,包括真菌、细菌和放线菌。内生菌广泛存在于藻类、苔藓、蕨类、裸子和被子植物的根、茎、叶、花、果实和种子等组织的细胞或细胞间隙中,与宿主植物间形成了协同进化和互惠共生的关系。迄今为止,人们已经先后从玉米、马铃薯、红树、大蒜、水稻和烟草等许多植物中分离得到多种内生细菌^[30-35],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。地衣也可以被认为是由低等植物中的藻类与菌类中的真菌共生而成的一群特殊的植物,本研究从 3 个属的地衣样品中分离出内生芽孢杆菌 10 株、分属于 5 个属,其中以类芽孢杆菌属的菌株为最多。这表明,一些种类的地衣也存在着种类、数量不一的内生芽孢杆菌。至于地衣与其表生、内生芽孢杆菌之间的相互关系,也有待于进一步的研究。

参考文献

- [1] 裘维蕃. 菌物学大全. 北京:科学出版社,1998.
- [2] Deng H, Wei JC. Collection, preparation and preservation of lichen specimens. *Journal of Fungal*

- Research*, 2007, 5 (1): 55-58. (in Chinese)
- 邓红, 魏江春, 地衣标本的采集、制作与保存. 菌物研究, 2007, 5 (1): 55-58.
- [3] Wang QL, Fang MF, Hu ZH. Overview of germplasm resources and chemical composition of medicinal lichen in Taibai mountain. *Chinese Wild Plant Resources*, 2011, 30 (4): 1-6, 34. (in Chinese)
- 王启林, 房敏峰, 胡正海. 太白山药用地衣的种质资源及其化学成分的研究概况. 中国野生植物资源, 2011, 30 (4): 1-6, 34.
- [4] Huneck S. The significance of lichens and their metabolites. *Nat Wissenschaften*, 1999, 86 (12): 559-570.
- [5] 魏江春. 中国药用地衣. 北京: 科学出版社, 1982.
- [6] Cui GY, Duan H. A study on species of edible lichens in China. *Jiangsu Agricultural Research*, 2000, 21 (3): 59-62. (in Chinese)
- 崔桂友, 段海. 中国食用地衣种类的研究. 江苏农业研究, 2000, 21 (3): 59-62.
- [7] Gulijahan S, Pazilat B, Abdulla A. The effects of carbon sources to the tissue culture of *Umbilicaria virginis* schaeer in Xinjiang. *Journal of Xinjiang University (Natural Science Edition)*, 2004, 21 (z1): 110-114. (in Chinese)
- 古丽加汗·沙吾提, 帕孜来提·拜合提, 阿不都拉·阿巴斯. 碳源浓度对新疆淡肤根石耳地衣组织培养的影响. 新疆大学学报(自然科学版), 2004, 21 (z1): 110-114.
- [8] Thomson JW. American Arctic Lichens. 1. The Macrolichens. New York: Columbia University Press, 1984.
- [9] Pazilat B, Arzigul Y, Jumagul, Anwar T. Study of the bio-monitoring role of lichens to air pollution in Urumqi city, Xinjiang. *Biotechnolgy*, 2010, 20 (4): 79-82. (in Chinese)
- 帕孜来提·拜合提, 阿孜古力·玉苏甫, 居玛古丽, 艾尼瓦尔·吐米尔. 地衣对乌鲁木齐市空气污染生物指示的研究. 生物技术, 2010, 20 (4): 79-82
- [10] Selbmann L, Zucconi L, Ruisi MG, Cardinale M, Onofri S. Culturable bacteria associated with Antarctic lichens: affiliation and psychrotolerance. *Polar Biology*, 2010, 33: 71-83.
- [11] Massimiliano C, Anna MP, Martin G. Molecular analysis of lichen-associated bacterial communities. *Federation of European Microbiological Societies*, 2006, 57: 484-495.
- [12] Grube M, Cardinale M, Castro J V, Müller H, Berg G. Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbioses. *International Society for Microbial Ecology*, 2009, 3: 1105-1115.
- [13] Grube M, Cernava T, Soh J, Fuchs S, Aschenbrenner I, Lassek C, Wegner U, Becher D, Riedel K, Sensen C W, Berg G. Exploring functional contexts of symbiotic sustain within lichen-associated bacteria by comparative omics. *International Society for Microbial Ecology*, 2014, 1: 1-13.
- [14] Aschenbrenner I A, Cardinale M, Berg G. Grube M. Microbial Cargo: Do bacteria on symbiotic propagules reinforce the microbiome of lichens? *Environmental Microbiology*, 2014, DOI: 10.1111/1462-2920.12658
- [15] Lee Y M, Kim E H, Lee H K, Hong S G. Biodiversity and physiological characteristics of Antarctic and Arctic lichens-associated bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014, 30: 2711-2721.
- [16] Liba CM, Ferrara FI, Manfio GP, Fantinatti-Garboqqini F, Albuquerque RC, Pavan C, Ramos PL, Moreira-Filho CA, Barbosa HR. Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 101 (5): 1076-1086.
- [17] Zhang QL, Lin QX, Wu XF, Yu J, Guan X. Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* in lichens and identification with PCR-RFLP. *Journal of Fujian Teachers University (Natural Science)*, 2009, 25 (4): 84-89. (in Chinese)
- 张群林, 林群新, 吴小凤, 余洁, 关雄. 源于地衣的苏云金芽孢杆菌分离及 PCR-RFLP 分析. 福建师范大学学报(自然科学版), 2009, 25 (4): 84-89.
- [18] Zhang ER, Huang MR, Wei JC, Zhao ZT. Some taxa of *Stereocaulon* rare and new to China. *Mycosystema*, 2005, 24 (3): 356-359. (in Chinese)
- 张恩然, 黄满荣, 魏江春, 赵遵田. 中国珊瑚枝属地衣之新记录和稀有种. 菌物学报, 2005, 24 (3): 356-359
- [19] Yoon JH, Lee JS, Kook SY, Lee ST. Reclassification of nocardioideis simplex ATCC13260, ATCC9565, and ATCC19566 as *Rhodococcus erythropolis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1997, 47: 904-907.
- [20] Kim O S, Cho Y J, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, Park SC, Lee JH, Yi H, Won S, Chun J. Introducing Eztaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and*

- Evolutionary Microbiology*, 2012, 62: 716-721.
- [21] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmouqin F, Hiqins DG. The clustal_X windowsinterface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25 (24): 4876-4882.
- [22] Tamura K, Dukley J, Nei M, Kumar S. Mega4: molecular evolutionary genetics analysis (mega) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24 (8): 1596-1599.
- [23] Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101 (30): 11030-11035.
- [24] Jin H, Lv J, Chen S. *Paenibacillus sophorae* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Sophora japonica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61, 767-771.
- [25] Grube M, Berg G. Microbial consortia of bacteria and fungi with focus on the lichen symbiosis. *Fungal Biology Reviews*, 2009, 23: 72-85.
- [26] Hodkinson BP, Gottel NR, Schadt CW, Lutzoni F. Photoautotrophic symbiont and geography are major factors affecting highly structured and diverse bacterial communities in the lichen microbiome. *Environmental Microbiology*, 2012, 14 (1): 147-161.
- [27] Lenova LI, Blum O. To the question on the third component of lichen. *Botanical Journal*, 1983, 68: 21-28.
- [28] Cardinale M, Castro J V, Müller H, Berg G, Grube M. *In situ* analysis of the bacterial community associated with the reindeer lichen *Cladonia arbuscula* reveals predominance of Alphaproteobacteria. *Federation of European Microbiological Societies*, 2008, 66: 63-71.
- [29] Bjelland T, Grube M, Hoem S, Jorgensen SL, Daae FL, Thorseth IH, Øverås L. Microbial metacommunities in the lichen-rock habitat. *Environmental Microbiology Reports*, 2011, 3 (4): 434-442.
- [30] Fisher PJ, Petrini O, Scott HML. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). *New Phytologist*, 1992, 122 (2): 299-305
- [31] Cui L, Sun Z, Sun FZ, Yuan J, Tian HX, Wang LQ, Xu HY. Isolation of endophytic bacteria from potato and selection of antagonistic bacteria to potato ring rot disease. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2003, 33 (4): 353-358. (in Chinese)
崔林,孙振,孙福在,袁军,田宏先,王利琴,徐惠云. 马铃薯内生细菌的分离及环腐病接抗菌的筛选鉴定. 植物病理学报,2003,33 (4):353-358.
- [32] Cui BM, Pan QN, Zhang PP, Zhao L, Wei GH. Isolation and identification of endogenetic bacteria and screening of their antagonistic bacteria in garlic. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2008, 28 (11): 2343-2348. (in Chinese)
崔北米,潘巧娜,张陪陪,赵亮,韦革宏. 大蒜内生细菌的分离及拮抗菌筛选与鉴定. 西北植物学报,2008,28 (11):2343-2348.
- [33] Lu NH, Yan YN, He H, Huang QZ. The spatiotemporal dynamic of endophytic bacteria in *Aegiceras corniculatum* and screening and identification of antagonistic bacteria against plant pathogens. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2014,35 (2): 323-328. (in Chinese)
卢乃会,严玉宁,何红,黄勤知. 桐花树内生细菌动态及拮抗植物病原菌株筛选鉴定. 热带作物学报,2014,35 (2):323-328.
- [34] Mano H, Morisaki H. Endophytic bacteria in the rice plant. *Microbes and Environments*, 2008, 23 (2): 109-117.
- [35] Chen ZB, Xia ZY, Lei LP, Chen HR. PCR-RFLP and phylogeny analysis of 16S rDNA of tobacco cultivable endophytic bacteria. *Acta Tabacaria Sinica*, 2012, 18 (1): 92-100, 105. (in Chinese)
陈泽斌,夏振远,雷丽萍,陈海如. 烟草可培养内生细菌 16S rDNA 的 PCR-RFLP 和系统发育分析. 中国烟草学报,2012,18 (1):92-100,105.

Diversity of *Bacillus* species inhabiting on the surface and endophyte of lichens collected from Wuyi Mountain

Cibin Ge¹, Bo Liu^{1*}, Jianmei Che¹, Meichun Chen¹, Guohong Liu¹, Jiangchun Wei²

¹Institute of Agrobiological Resources, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, Fujian Province, China

²State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: [Objective] The present work reported the isolation, identification and diversity of *Bacillus* species colonizing on the surface and endophyte in lichens collected from Wuyi Mountain. [Methods] Nine lichen samples of *Evernia*, *Stereocaulon*, *Menegazzia* and other 6 genera belonging to 7 families were collected from Wuyi mountain nature reserve. The bacillus-like species colonizing on the surface and endophyte in these lichens were isolated and identified by 16S rRNA gene sequence analysis. [Results] There was no bacillus-like species isolated from *Evernia*, *Ramalina* and *Lecarona*. A total of 34 bacillus-like bacteria were isolated from another 6 lichen samples. These bacteria were identified as 24 species and were classified into *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Lysinibacillus* and *Viridiibacillus*. *Paenibacillus* and *Bacillus* are the dominant genera, and accounting for 41.2% and 35.3% of all isolated bacteria respectively. *Brevibacillus*, *Lysinibacillus* and *Viridiibacillus* were first reported being isolated from lichens. There were different species and quantity of bacillus colonizing on the surface and endophyte in different lichens. The quantity of bacillus colonizing on the surface of *Physcia* was more than 3.85×10^6 cfu/g and was the largest in the isolated bacteria, while the species of bacillus colonizing on the surface and endophyte in *Stereocaulon* was the most abundant. Most of the isolated bacteria were colonizing on (in) one lichen genera, but *Paenibacillus taichungensis*, *Paenibacillus odorifer*, *Brevibacillus agri*, *Lysinibacillus xylanilyticus* was respectively colonizing on (in) 2-3 lichen genera and *Bacillus mycoides* was colonizing on (in) *Menegazzia*, *Cladonia Physcia*, and *Stereocaulon*. [Conclusion] There are species and quantity diversity of bacillus colonizing on (in) lichens.

Keywords: lichen, endophyte, bacillus, diversity, Wuyi Mountain

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2011CB111607), by the Natural Science Foundation of China (31370059), by the Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (201303094) and by the International Cooperation Project of Chinese Ministry of Science and Technology (2012DFA31120)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-591-87861601; E-mail: fzliubo@163.com

Received: 23 July 2014 / Revised: 7 January 2015