

药用植物内生芽孢杆菌的多样性和系统发育研究

陈兰¹, 张小平^{1*}, Kristina Lindstrom²

(¹ 四川农业大学资源环境学院, 雅安 625000)

(² Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki, Helsinki 00014, Finland)

摘要: 【目的】了解药用植物内生芽孢杆菌的生物多样性。【方法】采用数值分类、16S rDNA PCR-RFLP、BOX-PCR 指纹图谱和 16S rDNA 序列分析技术对分离于几种药用植物的内生芽孢杆菌和已知参比菌株进行表型、遗传多样性及系统发育研究。【结果】供试菌株在数值分类聚类分析中在 84% 的相似水平上产生 13 个表观群。16S rDNA PCR-RFLP 分析表明供试菌株表现出丰富的遗传多样性。BOX-PCR 指纹图谱分析进一步证明药用植物的内生芽孢杆菌的基因组也具有多样性, 聚群的结果与数值分类有较好一致性。用软件在 Genbank 中进行所得序列的同源性检索, 并构建系统发育树。由 16S rDNA 序列分析可知, 供试的代表菌株 SCAU11 与球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus*)亲缘关系最近, SCAU78 和 SCAU25 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的两个亚种, 代表菌株 SCAU39 与巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)的亲缘关系最近。【结论】研究结果表明药用植物内生芽孢杆菌具有明显的表型和遗传多样性。

关键词: 芽孢杆菌; 多样性; 数值分类; 16S DNA PCR-RFLP; BOX-PCR 指纹图谱; 系统发育

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 04-0432-07

中国是药用植物资源最丰富的国家之一, 对药用植物的发现、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, 医学上用于防病、治病的植物也是兽医用药的植物资源。葛淑俊等^[1]指出遗传多样性研究是保护和利用药用植物资源的前提和基础, 也是研究物种起源和演化的依据, 有效地结合多种方法才能全面准确地了解物种的遗传多样性并采取行之有效的保护和利用措施。芽孢杆菌是一类重要的微生物类群, 由于在食品、农业、工业、医学、冶金、林业、环保乃至军事等诸多方面均有重要的应用价值, 其分类学研究具有极其重要的意义。

近几年来, 一些更先进的技术被用到芽孢杆菌的分类鉴定研究中。Reva 等^[2]从植物和土壤中分离出 17 株芽孢杆菌, 测定了它们的 16S rRNA 基因、消旋酶基因(*gyrA*)和组氨酸激酶基因(*cheA*)的部分序列, 并在此基

础上分析这 17 株菌的系统发育关系。国内研究者做了大量芽孢杆菌的分离与鉴定工作, 但主要侧重于土壤来源芽孢杆菌, 尤其是苏芸金芽孢杆菌的资源调查上, 在芽孢杆菌分类方面的研究工作比较缓慢。到目前为止, 尚未见有关药用植物内生芽孢杆菌的系统分类报道。为此, 本文以分离于药用植物的内生芽孢杆菌为对象, 通过采用表型性状测定、16S rDNA PCR-RFLP 分析、16S rDNA 序列分析和 BOX-PCR 指纹图谱分析技术对它们的表型、遗传多样性及系统发育进行研究, 为进一步发掘和利用性状优良的内生芽孢杆菌种质资源提供依据, 也为芽孢杆菌的应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集、分离纯化及保藏: 采集姜黄、射干、

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金(20060626006)

*通讯作者: Tel: +86-835-2882710; Fax: +86-835-2883166; E-mail: aumdwbsb@sicau.edu.cn

作者简介: 陈兰(1983-), 女, 四川自贡人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物及微生物分子生态方面的研究。E-mail: chenlanmail@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-11-06; 修回日期: 2007-12-19

金银花、芍药和紫苏的健康植株分别称取 5g 植物组织根、茎、叶经清水冲洗后, 在无菌操作台上依次进行表面消毒 95%酒精 3min, 0.1%升汞 5min, 再用无菌水漂洗 4 次, 将最后一次清洗液 0.5mL 转入无菌培养皿, 采用混菌法于 28℃ 培养以检测消毒是否彻底, 三次重复。若培养后发现皿中无菌落出现, 证明表面灭菌彻底, 否则该分离结果不使用。消毒后的材料转入

无菌研钵, 并用 LB 培养基分离内生芽孢杆菌。

在分离过程中, 挑取单个菌落重复划线 2~3 次, 同时镜检其纯度, 直至获得纯培养。挑取菌落特征不同的菌株进行转管保存采用 -70℃ 甘油管及 4℃ 冰箱两种方法保藏备用。经上述实验, 获得供试的内生芽孢杆菌 50 株。参比菌株和分离菌株如表 1 所示。

1.1.2 主要试剂和仪器: 溶菌酶(Promega), EDTA

表1 供试菌株
Table 1 Strains used in the study

Strain code	Host plant	Isolation site	Strain code	Host plant	Isolation site
SCAU62	<i>Curcuma longa</i>	Root	SCAU23	<i>Belamcanda chinensis</i>	Stem
SCAU64	<i>Belamcanda chinensis</i>	Stem	SCAU57	<i>Curcuma longa</i>	Leaf
SCAU82	<i>Flos lonicerae</i>	Root	SCAU76	<i>Flos lonicerae</i>	Room
SCAU2	<i>Paeonia lactiflora</i>	Root	SCAU60	<i>Perilla frutescens</i>	Room
SCAU21	<i>Flos lonicerae</i>	Stem	SCAU58	<i>Perilla frutescens</i>	Leaf
SCAU50	<i>Belamcanda chinensis</i>	Root	SCAU37	<i>Belamcanda chinensis</i>	Leaf
SCAU45	<i>Curcuma longa</i>	Stem	SCAU26	<i>Flos lonicerae</i>	Root
SCAU59	<i>Paeonia lactiflora</i>	Stem	SCAU7	<i>Belamcanda chinensis</i>	Root
SCAU42	<i>Flos lonicerae</i>	Leaf	SCAU11	<i>Curcuma longa</i>	Root
SCAU80	<i>Curcuma longa</i>	Stem	SCAU83	<i>Curcuma longa</i>	Root
SCAU6	<i>Perilla frutescens</i>	Root	SCAU10	<i>Paeonia lactiflora</i>	Root
SCAU40	<i>Paeonia lactiflora</i>	Leaf	SCAU19	<i>Curcuma longa</i>	Stem
SCAU47	<i>Flos lonicerae</i>	Root	SCAU4	<i>Perilla frutescens</i>	Leaf
SCAU38	<i>Belamcanda chinensis</i>	Root	SCAU28	<i>Flos lonicerae</i>	Stem
SCAU78	<i>Belamcanda chinensis</i>	Stem	SCAU29	<i>Belamcanda chinensis</i>	Stem
SCAU25	<i>Flos lonicerae</i>	Root	SCAU68	<i>Perilla frutescens</i>	Root
SCAU15	<i>Belamcanda chinensis</i>	Root	SCAU49	<i>Paeonia lactiflora</i>	Stem
SCAU33	<i>Flos lonicerae</i>	Stem	SCAU35	<i>Flos lonicerae</i>	Root
SCAU41	<i>Perilla frutescens</i>	Stem	SCAU71	<i>Curcuma longa</i>	Leaf
SCAU65	<i>Flos lonicerae</i>	Stem	SCAU18	<i>Curcuma longa</i>	Leaf
SCAU51	<i>Belamcanda chinensis</i>	Leaf	10237	<i>B mycoides</i>	
SCAU39	<i>Perilla frutescens</i>	Stem	10239	<i>B pumilus</i>	
SCAU5	<i>Belamcanda chinensis</i>	Root	10241	<i>B sphaericus</i>	
SCAU55	<i>Flos lonicerae</i>	Stem	10517	<i>B lentus</i>	
SCAU69	<i>Paeonia lactiflora</i>	Root	10228	<i>B circulans</i>	Reference
SCAU46	<i>Paeonia lactiflora</i>	Stem	10236	<i>B licheniformis</i>	Strains
SCAU36	<i>Belamcanda chinensis</i>	Stem	10229	<i>B coagulans</i>	
SCAU22	<i>Curcuma longa</i>	Root	10263	<i>B cereus</i>	
SCAU17	<i>Paeonia lactiflora</i>	Leaf	10243(2)	<i>B subtilis</i>	
SCAU8	<i>Belamcanda chinensis</i>	Leaf	10245	<i>B megaterium</i>	

(Sangon), 蛋白酶 K(Proteinase K, Merck), Tris base (Amersco), Taq 酶(TaKaRa), SDS(Sigma), dNTPs (TaKaRa), 各种限制性内切酶(Sangon), DNA Marker(Sangon), 其他生化试剂均为国产分析纯。PCR 扩增仪(Bio-rad Mycycler)。

1.2 生理生化性状测定及聚类分析

生理生化试验均设 3 个重复及阳性和阴性对照。对供试菌株和已知菌株进行生理生化性状测定分析,

包括 28 种碳、氮源及 8 种染料(刚果红、溴甲酚紫、甲酚红、溴甲酚绿、结晶紫、孔雀绿、亚甲基蓝和溴甲酚蓝)和 1 种化学药物亚硝酸钠的耐受性试验终浓度为 0.1%(w/v), 不同生长温度(10、30、55、65℃), 不同 NaCl 浓度(2%、5%、7%和 10%)的耐受性以及 L-苯丙氨酸脱氨酶、淀粉水解试验、石蕊牛奶反应, 肉汤利用, 过氧化氢酶试验、酪素水解和硝酸盐还原反应测定等, 具体方法见参考文献[3]。将测定

的生理生化性状结果按阳性记为“1”，阴性记为“0”，不能确定记为“N”进行编码后，输入计算机。采用平均连锁法进行聚类分析。

1.3 16S rDNA PCR-RFLP 分析

基因组 DNA 提取参照文献[4]。选用来源于大肠杆菌 16S rRNA 序列保守区域的两段引物 P1(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCT-3') 和 P6(5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCC-3') 扩增 16S rDNA。反应采用 25 μ L 体系。选取 *Msp*、*Hinf*、*Hae* 和 *Taq* 4 种限制性内切酶^[5] 酶切电泳分析。分析方法参见文献[6]和[7]。电泳结束后用凝胶成像系统扫描。

1.4 BOX-PCR 指纹图谱

用 BOXAIR 引物(5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') 扩增时，反应体系为 25 μ L 扩增反应程序见文献[8]。取 BOX-PCR 扩增产物 8 μ L 用 2% 的琼脂糖凝胶 60V，电泳 3h，电泳结束后，凝胶成像系统扫描。使用 NTSYS-pc2.1 软件进行相似性分析，采用平均连锁法(UPGMA)聚类，最后得到供试菌株和已知菌株的聚类树状图。

1.5 16S rDNA 序列测定

16S rDNA 序列分析可以揭示细菌分类的系统发育框架，是目前系统发育研究中很好的标记，是鉴定

种、属的标准方法之一，同样也是生物多样性研究中不可缺少的一部份。用于测序的 16S rDNA 产物扩增同 16S rDNA PCR-RFLP 分析，采用 PCR 产物直接测序，由大连宝生物工程有限公司完成。

将测得 16S rDNA 序列在 GenBank 中进行比对，将获得的同源序列和测定序列在 CLUSTAL.W 软件包中进行分析，形成一个多重序列匹配排列阵。用 phylip-3.62 软件包中的 SEPBOOT 程序生成 1000 个自展数据集，采用邻位相连(Neighbor-joining)法经 Consensus 程序计算构建系统发育树。

2 结果和分析

2.1 表型特征多样性

研究发现供试的 50 株药用植物内生芽孢杆菌表型性状具有丰富的多样性，采用平均连锁法对 50 株供试菌株和 11 株参比菌株进行聚类分析。参与数值分类的供试菌株在 84% 相似性水平上可分为 13 个表观群，聚类结果见图 1。

表观群 1 由 9 株分离于姜黄、射干、金银花和芍药的内生芽孢杆菌聚在一起。该群菌株能在 65 生长，耐酸性不强。在葡萄糖培养基中，无氧条件下，PH 低至 5.3~4.8，多数菌株能活跃生长。群 2 由 3 株菌组成，

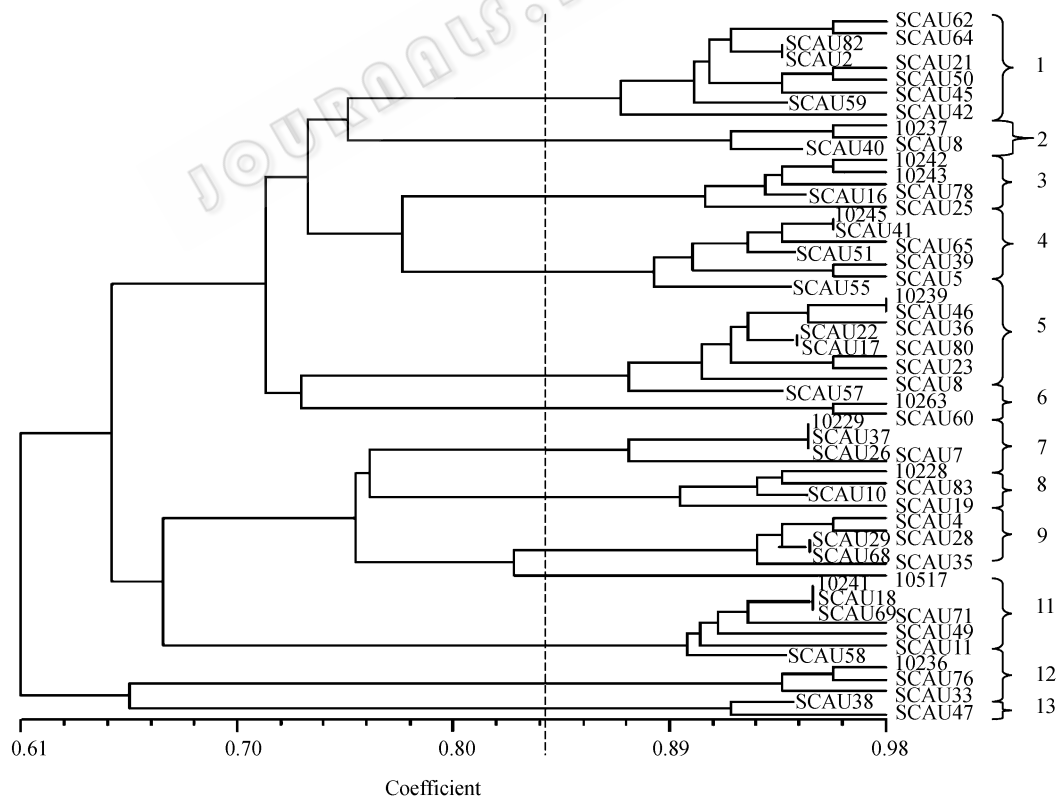


图 1 数值分类树状图

Fig. 1 Dendrogram generated from numerical taxonomy.

其中 1 株是编号为 10237 的参比菌株, 另外 2 株中 1 株分离于紫苏, 1 株分离于芍药。该群区别于其它菌株最大的特点是其菌落呈现树根状。群 3 包括编号为 10242 和 10243 的两个参比菌株及 3 株分别来自射干和金银花的菌株。该群在培养基上的菌落圆或不规则形, 表面色暗, 变厚和不透明可以变为奶油色或褐色。能还原石蕊牛奶, 不产生卵磷脂酶, 不利用丙酸盐。群 4 由分别来自金银花、射干和紫苏的 5 株菌株以及 1 株编号为 10245 的参比菌株聚为一群。该群能以铵盐或硝酸盐和葡萄糖作为唯一的碳氮源, 明胶液化快, 从阿拉伯糖、木糖和甘露醇通常产酸, 利用柠檬酸盐, 卵黄反应呈阴性。群 5 中包括 1 株编号为 10239 的参比菌株和 8 株未知菌株, 其中 3 株分离于姜黄, 2 株分离于芍药和 3 株来自射干。该群菌落特征是光滑并变为淡黄色, 硝酸盐还原阴性, 利用丙酸盐而不利用柠檬酸盐。

表观群 6 仅有 1 株编号为 10263 的参比菌株和 1 株分离于紫苏的菌株组成。该群能分解酪氨酸, 卵黄反应呈阳性, 从阿拉伯糖、木糖和甘露醇不产酸。群 7 中 1 株为编号 10229 的参比菌株, 另 3 株分离于射干和金银花。该群苯丙氨酸不脱氨, 在石蕊牛奶培养液中产酸。群 8 包括 3 株分别来自姜黄和芍药的菌株和 1 株编号为 10228 的参比菌株。该群能从葡萄糖、阿拉伯糖、木糖和甘露醇产酸, V-P 反应呈阴性, 能水解淀粉。群 9 主要特征为能在 7% 的 NaCl 上生长, 但在 pH 值为 5.7 营养肉汤中不生长, 在石蕊牛奶培养液中不产酸。群 11 不从葡萄糖、阿拉伯糖、木糖和甘露醇产酸, 不水解酪氨酸, 不水解淀粉。群 12 中包括 1 株编号为 10236 的参比菌株和分离于金银花的 2 株未知菌株。该群能从葡萄糖、阿拉伯糖、木糖和甘露醇产酸, 能还原硝酸盐为亚硝酸盐, 能水解淀粉。表观群 13 由 1 株分离于射干的菌株和 1 株分离于金银花的菌株聚在一起。该菌群接触酶实验呈阴性, 能从葡萄糖产酸, 但不能从阿拉伯糖、木糖和甘露醇产酸, 在 2%、5%、7% 和 10% 的 NaCl 中均不生长, 也不能水解酪氨酸。

2.2 遗传多样性

16S rDNA 扩增产物分别用 4 种限制性内切酶 (*Msp*、*Hinf*、*Hae* 和 *Taq*) 切割, 经电泳分离后, 得到各种酶切图谱。比较可知, *Msp* 酶切图谱所反映的遗传信息量最丰富(图 2 B), 其次是 *Hae* (图 2-A)。因此, *Msp* 和 *Hae* 是研究药用植物内生芽孢杆菌种间遗传多样性很有用的酶类。

16S rDNA PCR-RFLP 分析是目前广泛采用的一

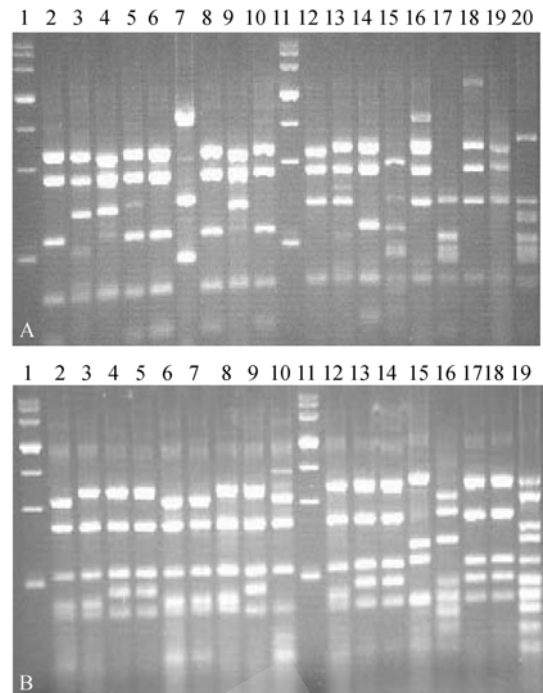


图 2 供试菌株的 16S rDNA PCR-RFLP 酶切图谱

Fig. 2 Patterns of 16S rDNA PCR-RFLP of the tested strains. A: *Hae*III. 1. Marker; 2. SCAU82; 3. 10243; 4. SCAU64; 5. SCAU39; 6. SCAU60; 7. SCAU78; 8. SCAU15; 9. SCAU21; 10. SCAU22; 11. Marker; 12. SCAU26; 13. 10228; 14. SCAU25; 15. SCAU18; 16. 10239; 17. SCAU4; 18. 10242; 19. 10263; 20. 38. B: *Msp*I. 1. Marker; 2. 10242; 3. SCAU64; 4. SCAU39; 5. SCAU82; 6. 10243; 7. 10228; 8. SCAU26; 9. SCAU78; 10. 10239; 11. Marker; 12. SCAU21; 13. SCAU22; 14. SCAU15; 15. SCAU18; 16. SCAU4; 17. SCAU25; 18. SCAU60; 19. SCAU47.

种研究细菌种内遗传多样性和种间系统发育关系的简便、快速的方法。其限制性酶切图谱的类型具有种、有时甚至菌株的特异性。反映种间的系统发育关系, 关键在于用于切割的酶类。Laguerre 等^[9]发现 *Cfo*、*Hinf*、*Msp* 和 *Ndl* 四种酶的组合能准确地反映快生型根瘤菌种之间的遗传多样性和系统发育关系。但是, 揭示芽孢杆菌种间或种内菌株的遗传多样性和系统发育关系的限制性内切酶, 目前尚无报道。本试验所用的 4 种内切酶中, *Msp* 酶切图谱提供的遗传信息量最丰富, 能反映菌株之间的遗传差异性。

2.3 BOX-PCR 指纹图谱

由图 3 可以看出供试菌株的 BOX-PCR 指纹图谱产生的条带较多, 能够反映不同菌株在染色体水平上的差异, 在 87% 的相似性水平上分为 27 个遗传群。从整体来看, BOX-PCR 聚群的结果与数值分类聚群的结果有较好的一致性, 但也有交叉。BOX-PCR 指纹图谱分析中的第 9、20 和 23 遗传群分别与数值分

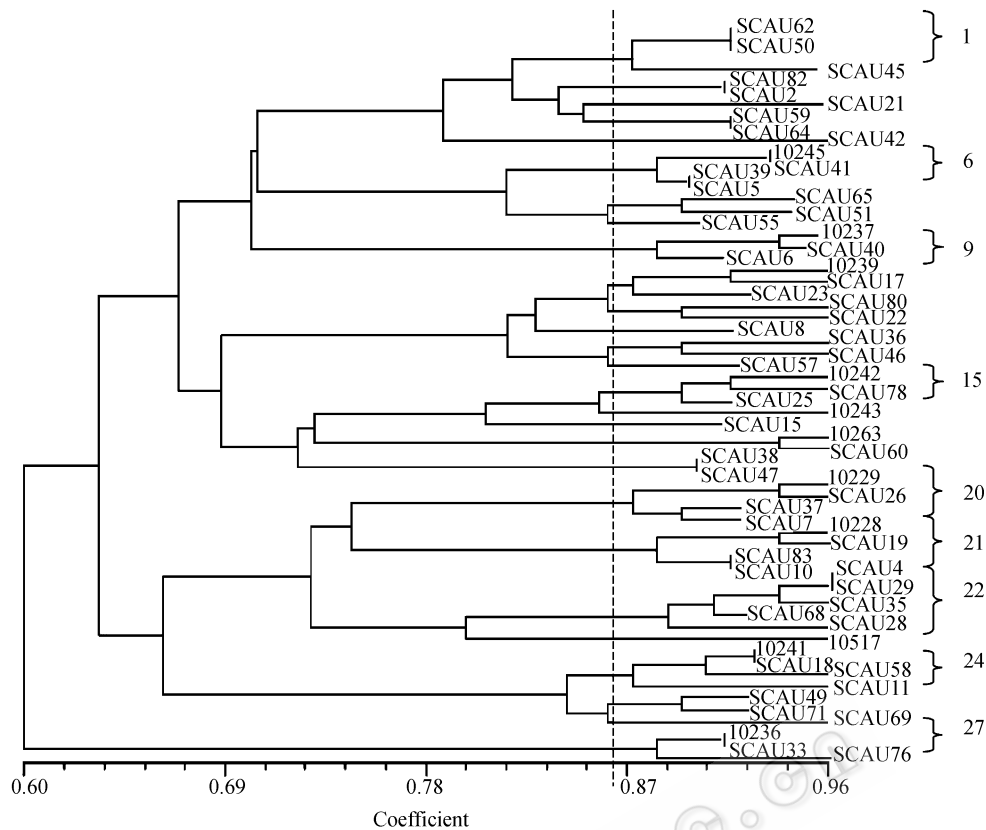


图3 BOX-PCR 指纹图谱聚类分析树状图

Fig. 3 Analysis of BOX-PCR fingerprinting.

类中的第 2、7 和 10 表观群一致；菌株 10517 仍独立成群；BOX-PCR 聚类中的第 6、7 和 8 遗传群则组成了数值分类中的第 4 表观群，这些在遗传分析中存在差异的菌株在表型上有些聚在一起。数值分类反映的是菌株表型性状的差异，而 BOX-PCR 指纹图谱分析反映的是菌株重复一致序列的差异。

2.4 依据 16S rDNA 序列的系统发育关系

从数值分类各聚类群中挑选了 4 个分离于姜黄、射干、紫苏和金银花的代表菌株各一株 SCAU11、SCAU78、SCAU39 和 SCAU25 为研究材料，测定了 16S rDNA 约 1.5kb 的序列。所测定的菌株编号及其 16S rDNA 部分序列在 GenBank 中的索取号分别为：SCAU (EU246954)、SCAU78(EU221672)、SCAU39 (EU244583) 和 SCAU25 (EU221673)。

通过 NCBI 的查找比对，选取已知菌株的 16S rDNA 部分序列。将所有这些序列通过 PHYLIP 软件和 CLUSTAL.W 程序进行 Alignment 比较分析，然后由 Neighbor-joining 法生成发育树状图(图 4)。由图 4 可见，代表菌株 SCAU11 与球形芽孢杆菌(*B. sphaericus*)构成一个分支，亲缘关系最近，序列相似性较

性较高。代表菌株 SCAU78 和 SCAU25 与枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)具有较近的亲缘关系，构成一个分支，在生理生化测定中 SCAU78 有别于 SCAU25 的主要特征为细胞较大(约 1 微米)，孢子表面较易着色，菌落更光滑，有光泽，在肉汤中混浊，对硝酸盐无作用。在 16S rDNA PCR-RFLP 分析中两株菌的限制性酶切图谱存在一定的差异。测序报告显示两株菌具有不同的结果，分别为枯草芽孢杆菌的两个亚种，代表菌株 SCAU39 与巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)的亲缘关系最近。另外，由于芽孢杆菌属中各个种之间具有较近的亲缘关系，在种的系统发育上也存在一定的交叉，各菌株间序列差异较小。

3 讨论

近年来，多相分类的应用使细菌的分类得到了巨大的发展。遗传学特征作为分类的主要依据之一，能直接揭示生物个体之间的亲缘关系。本文首次对药用植物中分离的内生芽孢杆菌的表型性状和遗传特性进行了研究，结果表明，分离的内生芽孢杆菌存在明显的表型和遗传多样性。数值分类是细菌分类研究

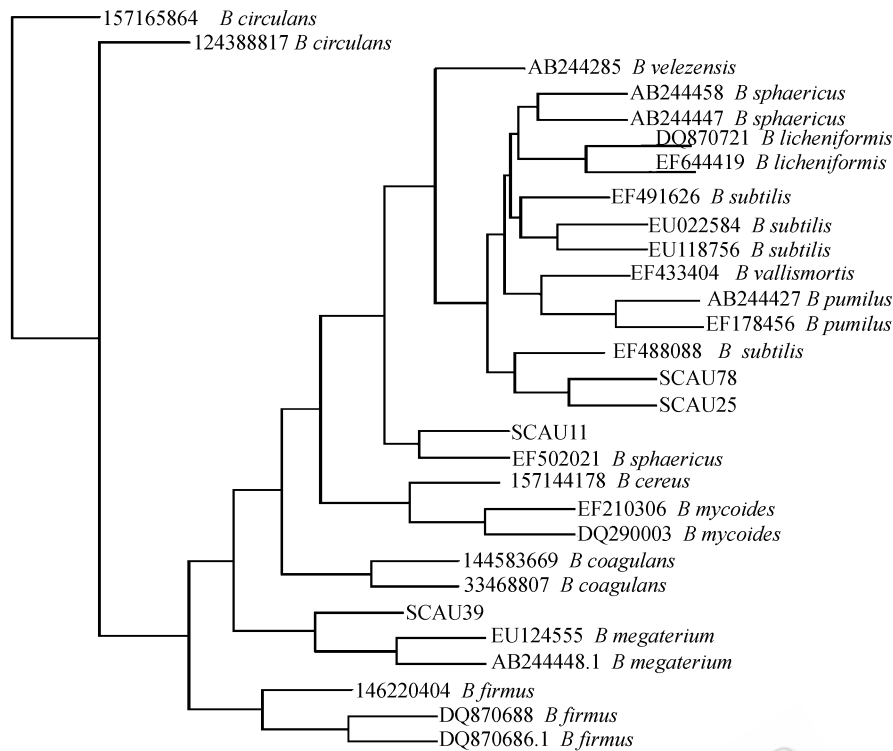


图 4 依据 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree derived from 16S rDNA sequences.

中传统的方法,能揭示菌株的具体表型特征,并能对大量菌株进行初步分群。本研究中采用数值分类和 16S rDNA PCR-RFLP 分析对供试菌株和已知菌株的表型和遗传型特征进行了比较,表明两种分析方法的结果基本一致。在数值分类聚群的芽孢杆菌有些在 16S rDNA PCR-RFLP 分析中也聚在一起。Sneath^[10]曾提出数值分类中相似性在 80%左右的表观群相当于种群。本试验结果表明数值分类中的试验菌株在 84%相似性水平上被划分为 13 个群,所选参比菌株基本上按种群分开。

本研究表明,药用植物植株中存在大量的内生芽孢杆菌,并且根、茎中内生芽孢杆菌数量远多于叶内。这是因为多数植物内生细菌不仅存在于植株体内,也常见于土壤^[11]。何红等^[12]对健康辣椒植株体内分离的内生细菌表明叶片中的内生细菌数量最多,其次为根,再次为茎,说明不同植株的内生菌分布情况是不相同的。所以药用植物内生芽孢杆菌可能大多来源于根际土壤,由土壤首先进入植株根和茎中,并在其内定殖。黎起琴^[13]等从番茄茎部分离具较强抑制番茄青枯病的内生枯草芽孢杆菌其最适生长 pH 为 5~6,最适生长温度为 35℃,培养基上的菌落乳白色等与分离于药用植物的有所差别(如菌落可变色为褐色,表面色暗,生长温度为 30℃),推测其可能与寄主植

物关系较为密切,另外,由于土壤中有机质含量的不同,氮源的利用也有一定的差异。16S rDNA PCR-RFLP 分析是目前广泛采用的一种研究遗传多样性和种间系统发育关系的方法,其限制性酶切图谱的类型具有种甚至菌株的特异性。本试验所用的 4 种内切酶中, *Msp* I 酶切图谱提供的遗传信息量最丰富,能反映菌株之间的遗传差异性。从酶切图谱看出这两种从不同角度进行分类的试验结果得到比较好的相互印证。

16S rRNA 部分序列的分析为药用植物内生芽孢杆菌的系统发育研究提供有力证据,其结果表明,与代表菌株 SCAU11 所表现出亲缘关系最近的为球形芽孢杆菌(*B. sphaericus*),与代表菌株 SCAU78 和 SCAU25 所表现出亲缘关系最近的为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*),分属于两个亚种,代表菌株 SCAU39 与巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)的亲缘关系最近。然而,仅仅依据 16S rRNA 序列分析等方法来确定其分类还不充分,因为某些属于不同种的 16S rRNA 基因之间可能发生重组,因此,还可应用其它分析方法如 (G+C)%、消旋酶基因(*gyrA*)、组氨酸激酶基因(*cheA*)和 DNA-DNA 同源性分析来进一步加以分析。BOX-PCR 指纹图谱分析是建立在 PCR 基础上的 DNA 指纹图谱分析技术中的一种,具有快速简便的优点,

是可以对大量高度相似的菌株进行区分的好方法^[14]。BOX-PCR 分析在数值分类基础上更进一步证实了供试菌株内部仍具有较为复杂的遗传多样性。在数值分类中聚在一起的菌株在 BOX-PCR 分析中有些独立成群, 其中 BOX-PCR 聚类中的第 6、7 和 8 遗传群则组成了数值分类中的第 4 表观群。综上所述, 药用植物内生芽孢杆菌具有明显的表型和遗传多样性, 既为优良菌株的选育提供了种质资源, 也为芽孢杆菌的应用奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 葛淑俊, 孟义江, 李广敏, 等. 我国药用植物遗传多样性研究进展. *中草药(Chinese traditional and herbal drugs)*, 2006, 37(10): 1584–1589.
- [2] Reva, ON, Dixelius, C, Meijer, J, *et al.* Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *subtilis*. *FEMS Microbiol.Ecol.*, 2004, 48: 249–259.
- [3] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [4] Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. Preparation of genomic from bacteria. In: Ausubel FM, Bent R (eds). *Current protocols in molecular biology*. New York (NY): J Wiley & Sons, 1987.
- [5] Zhang X P, Gisel Nick. Phylogeny and diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from the root nodules of peanut in sichuan, China. *Systematic and Applied Microbiology*, 1999, 22: 378–386.
- [6] Chen WX, Tan ZY, Gao JL, *et al.* *Rhizobium hainanense* sp. nov, isolated from tropical legumes. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1997, 47: 870–873.
- [7] Liu J, Wang ET, Chen WX. Diverse rhizobia associated with woody legumes *Wisteria sinensis*, *Cercis racemosa* and *Amorpha* grown in the temperate zone of China. *Systematic and Applied Microbiology*, 2005, 28: 465–477.
- [8] Gao JL, Terefework Z, Chen WX, *et al.* Genetic diversity of rhizobia isolated from *Astragalus* growing in different geographical region of China. *Journal of Biotechnology*, 2001, 91: 155–168.
- [9] Laguerre G, Allard M R, Revoy F, *et al.* Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR amplified 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60: 56–63.
- [10] Holt JG. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Baltimore: the Williams & Wilkins Company, 1984.
- [11] Lamb TG, Tonkyn DW, Kluepfel DA. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. *Can J Microbiol*, 1996, 42: 1112–1120.
- [12] 何红, 蔡学清, 洪永聪, 等. 辣椒内生细菌的分离及拮抗菌的筛选. *中国生物防治(Chinese Journal of Biological Control)*, 2002, 18(4): 171–175.
- [13] 黎起秦, 叶云峰, 蒙显英, 等. 内生细菌 B47 菌株的鉴定及其对番茄青枯病的防效测定. *中国生物防治(Chinese Journal of Biological Control)*, 2005, 21(3): 178–182.
- [14] Selenska-Pobell S, Gigova L, Petrova N. Strain-specific fingerprints of *Rhizobium galegae* generated by PCR with arbitrary and repetitive primers. *Journal of Applied Bacteriology*, 1995, 79: 425–431.

Phylogeny and diversity of endophytic *Bacillus* isolated from medicinal plants

Lan Chen¹, Xiaoping Zhang^{1*}, Kristina Lindstrom²

¹College of Resources and Environmental Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625000, China)

²Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki, Helsinki 00014, Finland)

Abstract: [Objective] The biodiversity of endophytic *Bacillus* isolated from Medicinal plants was studied. [Methods] Endophytic bacillus isolated from medicinal plants and reference strains were characterized by numerical taxonomy, 16S rDNA PCR-RFLP, BOX-PCR fingerprints and 16S rDNA sequence to describe the phenotypic and genetic diversity and phylogeny. [Results] The phenotypic characterization of these strains showed that most of these strains had high stress resistance. There were 13 clusters formed at 84% similarity by numerical taxonomy. The genetic diversity was highly revealed by 16S rDNA PCR-RFLP. The diversity of genomic level was described by BOX-PCR fingerprints. The results were correlated well with numerical analysis. Homology analysis was made by searching in Genbank with NCBI, and the phylogenetic tree was reconstructed. Sequence analysis of 16S rRNA gene showed that SCAU11 was highly related to *B. sphaericus*, SCAU78 and SCAU25 were identified as *B. subtilis* subspecies, SCAU39 was highly related to *B. megaterium*. [Conclusion] Overall, the study results demonstrated a high phenotypic and phylogenetic diversity of endophytic *Bacillus* isolated from Medicinal plants.

Keywords: *Bacillus*; diversity; numerical taxonomy; 16S rDNA PCR-RFLP; BOX-PCR fingerprints; phylogeny

Supported by the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (20060626006)

*Corresponding author. Tel: +86-835-2882710; Fax: +86-835-2883166; E-mail: aumdwsb@sicau.edu.cn

Received: 6 November 2007/ Revised: 20 Decembe 2007