

## 基于 16S rRNA 和 HSP60 基因序列分析粘细菌孢囊杆菌亚目形态分类的种属之间的亲缘关系

蒋德明, 周秀文, 田晓翔, 吴志红, 李越中\*

(山东大学生命科学院, 微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

摘要:【目的】利用 16S rRNA 和 HSP60 基因分子标记分析鉴定形态分类特征不稳定的粘细菌种属。

【方法】利用粘细菌的传统分离纯化方法从土壤中分离粘细菌, 根据菌株的形态特征进行分类, PCR 方法扩增菌株的 16S rRNA 和 HSP60 基因序列并进行系统发育关系分析。【结果】根据形态特征, 分离得到的 15 株粘细菌菌株归入孢囊杆菌亚目 (Cystobacterineae) 的 2 个科 3 个属。其中 11 株粘细菌具有典型的所在种属的子实体结构, 而菌株 0085-4、0121-3、NM03 和 Myx9736 的子实体结构发生了不同程度退化。15 株粘细菌的 16S rRNA 基因序列的相似性在 95.4% 到 99.5% 之间。而 HSP60 基因序列差异较大。【结论】在属水平上, 粘细菌形态分类特征和 16S rRNA 基因系统进化关系具有很好的一致性; 在揭示粘细菌种间系统发育关系中, HSP60 基因序列更为适用。

关键词: 粘细菌; 分类; 形态; 16S rRNA 基因; HSP60 基因

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 06-0711-06

粘细菌由于具有复杂的细胞社会行为 (social behavior) 和能形成多细胞聚集、形态特异的子实体结构而被视为“高等细菌”<sup>[1,2]</sup>。具有鲜明色彩的子实体是在环境条件恶劣或营养条件贫瘠的情况下, 由成千上万的营养细胞聚集并分化发育而成的<sup>[3]</sup>。由于子实体及其内含粘孢子的抗逆性, 粘细菌能够广泛地分布在地球的各个地方, 特别在土壤、腐木、树皮和动物粪便中最为普遍<sup>[4,5]</sup>。同时这种独特的子实体结构及其形成条件也成为粘细菌分离纯化的有效手段和分类的主要依据。

目前粘细菌的分类是以前形态特征为主要依据, 如营养细胞和粘孢子的大小、形态, 菌落的形态及子实体结构特征等。根据形态特征, 粘细菌可分为 3 个亚目, 5 个科, 17 个属和 50 多个不同的种<sup>[1,2,6]</sup>。粘细菌种属分类的主要依据是子实体形态。但由于子实体结构经过传代培养很容易退化甚至是丢失, 给这些

菌株的准确分类带来了很大的困难, 这也是粘细菌形态分类的局限性, 尤其在粘球菌属 (*Myxococcus*) 与珊瑚球菌属 (*Corallococcus*), 原囊菌属 (*Archangium*) 与孢囊杆菌属 (*Cystobacter*), 小囊菌属 (*Nannocystis*) 与堆囊菌属 (*Sorangium*) 和多囊菌属 (*Polyangium*) 的种属鉴定时, 种与种或属与属之间的子实体形态的差异不显著且易于变化, 存在着很大主观臆断性<sup>[1,2]</sup>。

16S rRNA 基因序列作为系统发生关系的分子计时器, 已广泛应用于细菌分类研究中, 在粘细菌分类学上也得到了广泛的应用<sup>[7-9]</sup>。这对传统的形态分类进行了很好的补充, 同时也纠正了一些形态分类的错误。粘细菌在 16S rRNA 基因序列的系统进化上位于多变细菌 (Proteobacteria) 的 delta 分支, 粘细菌目 (Myxococcales) 包含 3 个明显的系统进化分支, 这 3 个分支分别对应形态分类上的 3 个亚目, 即孢囊杆

基金项目: 国家自然科学基金 (30671192, 30470001); 国家资源平台项目 (2005DKA21208-3)

\*通讯作者。Tel/Fax: +86-531-88564288; E-mail: lilab@sdu.edu.cn

作者简介: 蒋德明 (1978-), 男, 浙江人, 博士研究生, 研究方向为微生物生态学和系统分类。E-mail: jiangdeming@mail.sdu.edu.cn

收稿日期: 2007-11-14; 修回日期: 2008-02-25

菌亚目( Cystobacterineae ) 堆囊菌亚目( Sorangineae ) 和小囊菌亚目( Nannocystineae ), 3 个分支之间的 16S rRNA 基因同源性在 73%~85% 之间。在这 3 个进化分支水平上, 只有少数菌株其系统进化位置与形态分类的位置不一致<sup>[7,8]</sup>。但在种属水平上, 16S rRNA 基因的系统发育关系与形态分类并不对应。因此 16S rRNA 基因序列相似性分析不能为粘细菌相近种属的分类提供可靠的依据。

近年来的研究表明, 一些持家基因如 HSP60 (heat shock protein) 基因具有高度保守的一级结构, 且广泛存在于细菌和真核细胞内, 是系统进化分析的有效分子标记, 在近缘细菌间的系统发育关系的分析中显示优于 16S rRNA 基因序列分析之处<sup>[10]</sup>。本文对 15 株孢囊杆菌亚目的粘细菌根据形态特征进行了分类, 然后分析了菌株的 16S rRNA 基因和 HSP60 基因序列, 及其形态分类和序列系统发生的相关性。结果表明粘细菌在属水平上, 形态分类和 16S rRNA 基因的系统进化关系具有很好的一致性; 但在粘细菌种水平上, HSP60 基因序列分析显示出优于 16S rRNA 基因的解决方法, 能够有效的揭示粘细菌种间的系统发育关系, 是区分相近粘细菌的可靠分子方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂和仪器:** 本研究所用的 Baker yeast 和 Casitone 购自 Oxford 公司; pGEM-T Easy Vector 载体购自 Promega 公司; PCR 引物由上海生工生物技术公司合成; Universal Genomic DNA Extraction kit 和 Taq DNA 聚合酶购自大连宝生物技术有限公司; Authorized Thermal Cycler (Eppendorf, USA)。

**1.1.2 菌株的分离和纯化:** 通过粘细菌传统分离纯化方法从土壤样品中分离和纯化粘细菌, 在此使用了兔粪便诱导平板、大肠杆菌 WCX 平板、酵母 WCX 平板等多种诱导平板<sup>[1,11,12]</sup>。分离得到的菌株使用传统的纯化方法进行纯化<sup>[11,12]</sup>

**1.1.3 菌株和培养条件:** 本实验所用菌株如表 1 所示。所有菌株都在分离纯化后用滤纸片法保存<sup>[2]</sup>, 使用 VY/2[Baker yeast 0.5%, Cyanocobalamin(vb12) 0.5 mg/L, CaCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O 0.1%, Argose 1.3% PH 7.0] 斜面活化后分别转接 CYE (Casitone 0.3%, Yeast extract 0.1%, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.1%, MgSO<sub>4</sub> 0.5% pH 7.5)液

体培养基和 VY/2 固体平板, 30 °C 培养。

### 1.2 形态分类

在相差显微镜下对培养 3 d 的营养细胞进行大小测量, 测量总数 100 个, 取平均值。粘孢子大小通过将培养 7 d 的子实体从 VY/2 平板中挑取至载玻片上进行测量, 同样测量总数 100 个, 取平均值。对于菌落 (Swarm) 和子实体形态我们依照 Myxobacteria<sup>[6]</sup> 及伯杰系统细菌学手册<sup>[1]</sup>进行文字描述, 同时在解剖镜下直接进行显微拍照。

### 1.3 扩增 16S rRNA 及 HSP60 基因序列

收集液体培养到第 5 天的营养细胞, 用直径 3 mm 的玻璃珠打匀, 8000 × g 离心 10 min, 菌体用蒸馏水冲洗 2 遍后悬浮于 STE 溶液中 (0.1 mol/L NaCl, 0.01 mol/L Tris · Cl PH 8.0, 0.0001 mol/L EDTA), 使用试剂盒提取菌体染色体 DNA。

使用细菌通用引物 P1 : 5'-AGAGTTTGATCCTTGGCTCAG-3' 和 P2 : 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3' PCR 扩增 16S rRNA 基因全序列, 引物分别位于 16S rRNA 基因序列的 10-30 和 1522-1541 位的碱基位置 (以 *E.coli* 的 16S rRNA 基因序列碱基位置为准<sup>[13]</sup>)。PCR 采用 50 μL 反应体系, 扩增条件: 96 °C 3 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。对于 HSP60 基因的扩增, 我们利用兼并引物 H279 和 H280<sup>[14]</sup>来扩增大约长度为 600 bp 的 HSP60 基因部分序列。PCR 采用 50 μL 反应体系, 循环条件: 96 °C 3 min; 94 °C 1 min, 46 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物利用琼脂糖电泳分离, 切胶回收后与 T 载体相连, 转化导入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109。具有插入片断的质粒送到上海生工测序中心测序, 所有测得序列输入到 GenBank 中, 16S rRNA 基因序列号为 EU262991 到 EU263004, HSP60 基因序列号为: EU262986 到 EU262990。

### 1.4 序列分析与系统进化树的构建

16S rRNA 基因序列和 HSP60 基因序列与 GenBank 中的已知序列进行了分析比对, 从 GenBank 中取得相关序列作为参考菌株序列, 首先使用 ClustalX<sup>[15]</sup>将序列进行完全比对, 然后用 Neighbor-joining 法<sup>[16]</sup>取得序列的进化距离。使用程序 Mega<sup>[17]</sup>作出系统进化树, 数据自展重抽样次数 1000 次。16S rRNA 基因序列进化树以 *Desulfotomaculum reducens* (GenBank 序列号: M34113) 作为进化树的根, HSP60 基因进化树为无根树。

2 结果

2.1 粘细菌的形态分类

表 1 描述了 15 株粘细菌的主要形态特征，包括营养细胞、粘孢子、菌落和子实体结构等形态特征。所有菌株都有比较相近的营养细胞形态，即具有细长棒状结构，且末端多少有点尖，长度在 5~8  $\mu\text{m}$  之间，除了 Cb9737 和 Bj41 营养细胞达到了 13  $\mu\text{m}$ ，明显大于其他的菌株。粘孢子在形态上明显分为两大类，一类是明显小于营养细胞的短棒状粘孢子（Cb9737 和 Bj41），另一类是具有圆形的粘孢子。在具有圆形孢子的菌株中其粘孢子的大小也会有区别，大致可以分为两个大小范围：1.2~1.5  $\mu\text{m}$  和 1.5~2.0  $\mu\text{m}$ ，而 0121-3 和 Myx9736 菌株的粘孢子明显大于其他菌株，

达到了 2.0~2.5  $\mu\text{m}$ 。粘细菌菌落形态很大程度上依赖于所使用的培养基，因此我们统一使用了 VY/2 培养基。所有菌株都具有典型的粘细菌菌落形态，即以接种点为中心成薄膜状向外扩展，但扩展程度却有很大的不同。我们在分离纯化粘细菌过程中发现，孢囊杆菌属的菌株菌落边缘都会出现放射线状的形态，因此也比其他粘细菌种属的菌株更容易得到纯菌株。

根据子实体形态特征，我们将菌株 0148-1，0159-5，0189-5，0195-1 和 0198-1 归到粘球菌属，其中根据子实体颜色又将这 5 株呈橘红色的菌株定位到 *Mx. fulvus*。菌株 0185-2，0007-3 和 0198-2 具有典型指状突起被定为珊瑚状珊瑚球菌（*Cc. coralloides*）。菌株 Bj41 和 Cb9734 具有丛生的孢子囊定为孢囊杆菌属。对于以下具有不规

表 1 15 株粘细菌形态分类  
Table 1 The morphological classification of 15 myxobacteria strains

Strains	Cell/ $\mu\text{m}$	Myxospore/ $\mu\text{m}$	Fruiting body		Morphological classification
			color	sporangium	
0007-3	5-7	Regular spheres 1.5-2.0	Orange red	Finger-like	<i>Cc. coralloides</i>
0082-2	7	Regular spheres 1.5-2.0	Orange red	Coral-like	<i>Cc. coralloides</i>
0085-4	5-7	Ovoid spheres 2.0	Red brown	Aberrant	<i>Cb. velatus</i>
0121-3	5-6	Regular spheres 2.0-2.5	Green yellow	Spot set	<i>Mx. xanthus</i>
0148-1	6-8	Regular spheres 1.5-2.0	Pink	spherical, short stalk	<i>Mx. fulvus</i>
0159-5	5-7	Regular spheres 1.2-1.5	Pink	Spherical short stalk	<i>Mx. fulvus</i>
0185-2	5-7	Regular spheres 1.5	Orange red	Coral-like	<i>Cc. coralloides</i>
0189-5	5	Regular spheres 1.2-1.5	Pink	Spherical, non-stalk	<i>Mx. fulvus</i>
0195-1	5-7	Regular spheres 1.2-1.5	Pink	Spherical non-stalk	<i>Mx. fulvus</i>
0198-1	5-8	Regular spheres 1.2	Orange red	Spherical, non-stalk	<i>Mx. fulvus</i>
0198-2	5-7	Regular spheres 1.5-2.0	Orange red	Coral-like	<i>Cc. coralloides</i>
Bj41	10-12	Short stick 1.5 $\times$ 4	Brown	Slim sheet, cluster	<i>Cb. fuscus</i>
Cb9737	10-13	Short stick 1.5 $\times$ 4-5	Black brown	Slim sheet, cluster	<i>Cb. fuscus</i>
Myx9736	8	Regular spheres 2.0-2.5	Pink	Aberrant	<i>Mx. macrosporus</i>
NM03	7	Regular spheres 1.5-2.0	Pink	Coral-like	<i>Cc. coralloides</i>

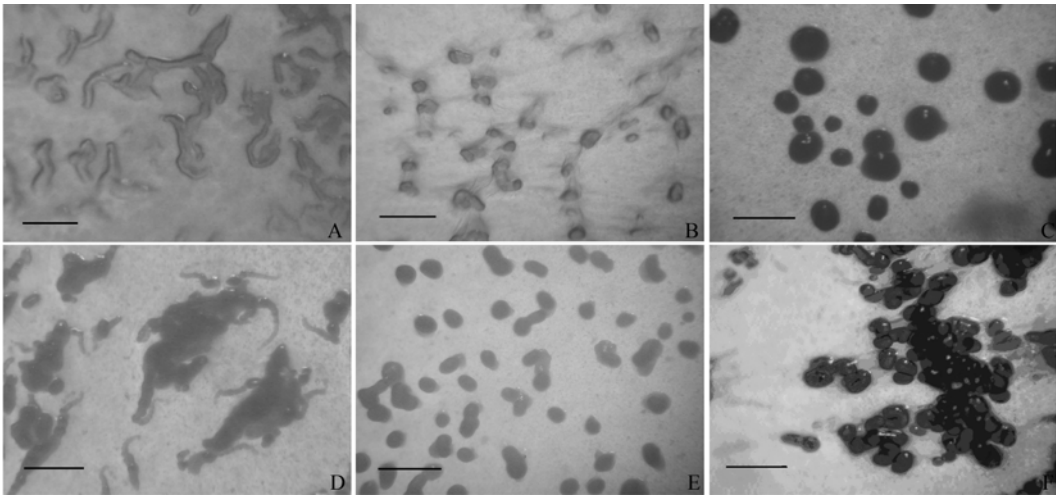


图 1 部分粘细菌菌株子实体形态

Fig. 1 Morphological characteristics of some studied Myxobacteria strains. A: *Mx. macrosporus* Myx9736; B: *Cb. velatus* 0085-4; C: *Mx. xanthus* 0121-3; D: *Cc. coralloides* NM03; E: *Mx. fulvus* 0159-5; F: *Cb. fuscus* Bj41. Bars = 100  $\mu\text{m}$  except in A and D, where bar = 50  $\mu\text{m}$ .

或是退化的子实体结构的菌株,我们只有通过其他特征来分类,如菌株 Myx9736 虽然子实体结构发生了退化,但由于具有较大的粘孢子而定为 *Mx. macrosporus*, 0082-2 和 NM03 都具有较短的指状突起定位为 *Cc. coralloides*, 0085-4 的子实体结构不规则,但具有明显的透明褶皱的粘液层可以定位到 *Cb. velatus*, 0121-3 子实体结构也不规则,但能产生大量的黄绿色色素被定为到

*Mx. xanthus*。需要指出的是,由于子实体结构不规则或是退化,上述几株菌株的分类并不可靠,需要分子系统进化分析来进一步确证。

## 2.2 系统进化关系分析

利用程序 Mega 中的 Neighbor-joining 法对 15 株粘细菌作系统进化树,比较了它们之间的进化距离(图 2),结果显示 15 株粘细菌都位于粘细菌的孢囊

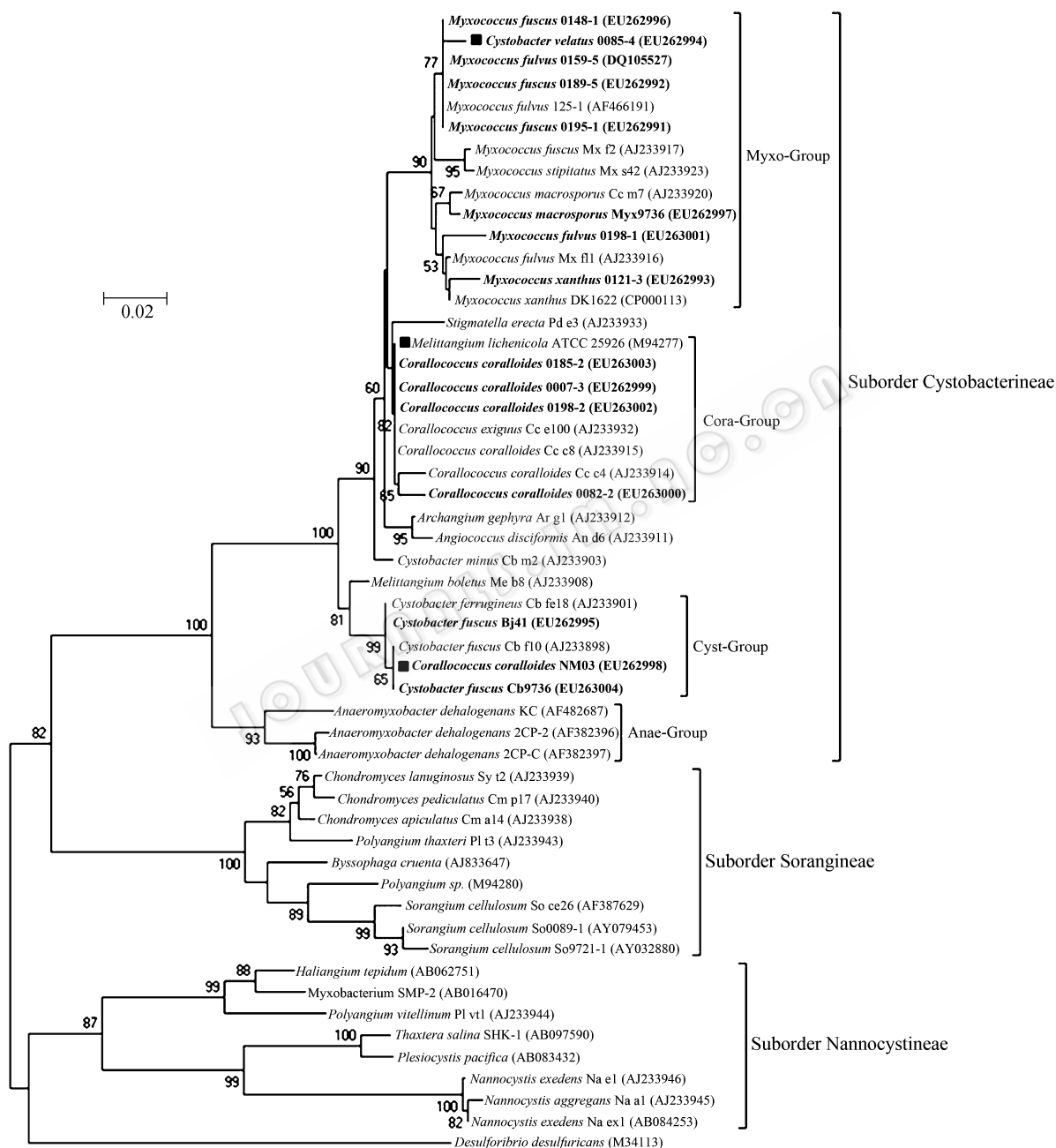


图 2 15 株粘细菌及对照菌株的 16S rRNA 基因系统进化树

Fig. 2 The phylogenetic tree constructed by the 16S rRNA gene sequences of the 15 myxobacteria strains and references. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 2% sequence divergence. The bold represents the studied myxobacterial strains. *Desulfotomaculum reducens* is used as the outgroup to root the tree. Abbreviations: Myxo, *Myxococcus*; Cora, *Coralloccoccus*; Cyst, *Cystobacter*; Anaer, *Anaeromyxobacter*.

Means the strains that were not located in their own morphological genus branch.

杆菌亚目 (Cystobacterineae)。菌株 0159-5, 0195-1, 0189-5 和 0148-1 位于粘球菌属分支内的一个亚分支上, 它们的同源性在 99% 以上。但属于同一种的菌株 0198-1 与其他菌株在 16S rRNA 基因上的同源性差异较大, 达到了 4.4%。菌株 0195-1 和 Myx9736 分别属于粘球菌属的两个不同种, 但它们的 16S rRNA 基因同源性却也在 99% 以上。

从图 2 中可以看出, 粘细菌在属水平上, 形态分类和系统进化关系仍具有很好的一致性。如图中 Myxo-Group 分支内, 基本上都是由粘球菌属菌株所组成。而在子实体形态不规则的 Cora-Group 分支内, 大部分则由珊瑚球菌属组成。但是菌株 0085-4 和 NM03 并不在其所在属的进化分支上, 菌株 0085-4 在形态分类上被归于孢囊杆菌属, 在系统进化树上却位于粘球菌属 Myxo-Group 分支上, 而形态分类上属于珊瑚球菌的 NM03 在系统进化树上却位于孢囊杆菌属 Cyst-Group 分支上。这种根据形态归于不同粘细菌属的菌株在系统进化关系上处于同一个分支内的其他例子如蜂窝囊球菌。如图 2 所示, 菌株 *Melittangium lichemicola* ATCC 25926 在进化关系上位于珊瑚球菌属 (Cora-Group 分支) 内。另一个比较特殊的菌株是 *Polyangium vitellinum* Pl vt1, 它在形态分类上属于多囊菌属 (位于堆囊菌亚目分支内), 在系统进化关系上却位于小囊菌亚目分支的嗜盐粘细菌亚分支内。由于其特殊的系统进化位置已被重新定位到新的一个属 *Kofleria* 属中<sup>[1]</sup>。

粘细菌种与种之间的形态分类和 16S rRNA 基因系统发育关系要复杂的多。菌株 0195-1, 0189-5, 0159-5 和 0148-1 在形态特征上都非常的相似, 且菌株之间的 16S rRNA 基因同源性在 99% 以上, 而菌株 0198-1 和上述菌株在形态特征上也非常相似, 但它们的 16S rRNA 基因同源性较低。总的来说, 这种同一属不同种的粘细菌菌株在系统进化的位置上的交错分布现象较为普遍。这也表明在粘细菌的种水平上, 形态分类和 16S rRNA 基因系统进化关系并不具有较好的一致性。

进一步, 我们利用 HSP60 基因分析了粘细菌种水平上的亲缘关系。HSP60 的进化树结构与 16S rRNA 基因基本一致 (图 3), 但 HSP60 基因具有更明显的序列差异。如粘球菌属内的 *Mx. fulvus* 菌株 0159-5 和 0189-5 的 HSP60 基因相似性在 99% 以上, 而与 *Mx. xanthus* 菌株却在 91% 左右。而菌株 0085-4 与 *Mx. fulvus* 菌株 0159-5 和 0189-5 位于同一分支上, 这个结果与 16S rRNA 基因结果一致, 说明 0085-4 被

错误分类, 根据 16S rRNA 基因和 HSP60 信息 0085-4 应该定为 *Mx. fulvus*。同样, 菌株 NM03 通过 16S rRNA 基因和 HSP60 分析结果也应该重新划分到 *Cb. fuscus*, 虽然在形态上 NM03 具有珊瑚球菌样的指状突起。



图 3 5 株粘细菌及对照菌株的 HSP60 基因系统进化树  
Fig.3 The phylogenetic tree constructed by HSP60 gene sequences of the five myxobacterial strains and the references. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 2% sequence divergence. The bold represents the studied myxobacterial strains.

### 3 讨论

孢囊杆菌亚目的粘细菌在营养细胞形态上都非常相似, 具有细长, 末端尖的特征。无论是否能形成典型子实体结构, 粘细菌在粘孢子和营养细胞的形态上都表现出良好的稳定性。但是作为种属分类主要依据的子实体形态稳定性较差。我们对子实体结构退化的粘细菌进行形态分类时, 只能遵照子实体特征外的其他形态特征, 如本实验中的菌株 Myx9736, NM03, 0085-4 和 0121-3 的子实体结构都发生了一定程度的退化, 我们分别根据粘孢子大小、子实体形态、菌落形态和产生的色素对菌株进行了形态分类。由于种水平上的分类往往立足于子实体之间的微小差异, 使我们鉴定一个种时往往带有很强的主观意向<sup>[1,2]</sup>。

近年来, 随着分子分类学的发展和完善, 特别是基于细菌 16S rRNA 基因序列的分子分类学的发展, 分子分类作为传统形态分类的补充, 在细菌系统分类学研究中起着越来越重要的作用。本实验通过对 15 株粘细菌的 16S rRNA 基因序列的系统进化关系的分析表明, 在形态上差异较小的菌株, 如菌株 0159-5, 0195-1, 0189-5, 0148-1 和 0198-1 在形态上非常相似, 都具有球形的粉红色子实体, 大小也非常的相近。但 0198-1 与另外 4 株菌在 16S rRNA 基因上的同源性差异较大, 最大差异达到了 4.4%。另一种有趣的现象是根据形态归为同一个属不同种的菌株, 如本实验中 0195-1 和 Myx9736 它们分别属于粘球菌属的二个不同种, 但它们的 16S rRNA 基因同源性却在 99% 以上。

大多数的粘细菌属在系统进化树上能形成各自独

立的分支。说明在属及属以上水平, 粘细菌形态分类和系统进化关系具有较好的一致性。但在种水平上形态分类和 16S rRNA 基因序列所揭示的系统进化关系可靠性较低, 而 HSP60 基因能够较为准确的揭示粘细菌种间的系统发育关系, 弥补 16S rRNA 基因在鉴定粘细菌种中的不足。

### 参 考 文 献

- [1] Reichenbach H. The Myxococcales. In: Garrity GM. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Part 3: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilon-proteobacteria. 2<sup>nd</sup> ed, New York: Springer-Verlag, 2005, 1059–1143.
- [2] Reichenbach H, Dworkin M. The myxobacteria. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M *et al.* The Prokaryotes. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Springer-Verlag, 1992.
- [3] Kaiser D. How and why myxobacteria talk to each other. *Curr opin microbial*, 1998, 1: 663–668.
- [4] Dawid W. Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, 24: 403–427.
- [5] Reichenbach H. The ecology of the myxobacteria. *Environ Microbiol*, 1999, 1: 15–21.
- [6] Reichenbach H. Biology of the myxobacteria: Ecology and taxonomy. In: Dworkin M, Kaiser D. Myxobacteria II. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1993.
- [7] Shinkets L, Woese CR. A phylogenetic analysis of the myxobacteria: basis for their classification. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 9459–9463.
- [8] Spröer C, Reichenbach H, Stackebrandt E. The correlation between morphogenetic classification of myxobacteria. *Int J Syst Bacteriol*, 1999, 49: 1255–1262.
- [9] Yan ZC, Wang B, Li YZ, *et al.* Morphologies and phylogenetic classification of cellulolytic Myxobacteria. *Syst Appl Microbiol*, 2003, 26: 104–109.
- [10] Viale AM, Arakaki AK, Soncini FC, *et al.* Evolutionary relationships among eubacterial groups as inferred from GroEL (chaperonin) sequence comparisons. *Int J Syst Bacteriol*, 1994, 44(3): 527–33.
- [11] 李越中, 李健, 周璐, 等. 我国粘细菌(Myxobacteria)资源的分离与鉴定. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2000, 40: 652–656.
- [12] Li YZ, Hu W, Zhang YQ, *et al.* A simple method to isolate salt-tolerant myxobacteria from marine samples. *J Microbiol Methods*, 2002, 50: 205–209.
- [13] Brosius J, Palmer ML, Kennedy PJ, *et al.* Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, 75: 4801–4805.
- [14] Goh SH, Potter S, Wood JO, *et al.* HSP60 gene sequences as universal targets for microbial species identification: studies with coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol*, 1996, 34(4): 818–23.
- [15] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, *et al.* The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 4876–4882.
- [16] Saitou N, Nei M. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol Biol Evol*, 1987, 4: 406–425.
- [17] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5: 150–163.

## Phylogenetic analysis of the 16S rRNA and HSP60 gene sequences of the morphology-based taxa of myxobacteria

Deming Jiang, Xiuwen Zhou, Xiaoxiang Tian, Zhihong Wu, Yuezhong Li\*

(State Key Laboratory of Microbial Technology, College of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China)

**Abstract:** [Objective] Using the 16S rRNA or HSP60 gene sequences to identify the myxobacteria taxa at the levels of species and genus, which were difficult to be classified by their morphological characteristics. [Methods] 15 myxobacterial strains were isolated using the traditional isolation methods, and classified based on their morphological characteristics. The 16S rRNA and HSP60 gene sequences were amplified by PCR methods, and phylogenetically analyzed. [Results] Eleven strains possessed typical morphological characteristics, while the other four strains 0085-4, 0121-3, NM03 and Myx9736 were degenerated of fruiting body structures in different extents. The strains were classified into the suborder Cystobacterineae, located in three genera of two families based on their morphological characteristics. The 16S rRNA gene sequences were 95.4% to 99.5% homology, which were in good consistence with the classification of the morphology-based genera; while the HSP60 gene sequences were in longer phylogenetic distances. [Conclusion] The present morphology-based classification of myxobacteria is highly consistent with the phylogenetic results of 16S rRNA gene sequences at the levels of genera or higher taxa; while HSP60 gene sequences provides a more efficient method for identification of closely related myxobacteria species.

**Keywords:** myxobacteria; taxonomy; morphology; 16S rRNA gene; HSP60 gene

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30671192, 30470001) and the National Resource Platform Projects (2005DKA21208-3)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-531-88564288; E-mail: lilab@sdu.edu.cn

Received: 14 November 2007/ Revised: 25 February 2008