

柠檬明串珠菌及相近种部分持家基因的系统发育分析

吕婧¹, 陈明², 徐海燕¹, 宋宇琴¹, 孙志宏¹, 丹彤¹, 孙天松^{1*}

¹ 内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室, 呼和浩特 010018

² 内蒙古大学生命科学学院生物学基地班, 呼和浩特 010018

摘要:【目的】利用 16S rRNA、*dnaA*、*murC* 和 *pyrG* 基因分子标记研究 *Leuconostoc citreum* (*Leu. citreum*) 及相近种间的种系发育关系, 并比较这些基因序列对 *Leu. citreum* 及相近种的区分能力。【方法】以分离自酸面团中的 7 株 *Leu. citreum* 为研究对象, 以 *dnaA*、*murC* 和 *pyrG* 基因片段为标记, 通过 PCR 扩增、测序, 结合已公布的近缘种及亚种相应序列, 计算遗传距离, 构建系统发育树, 并与 16S rRNA 基因进行比较。【结果】研究发现 *Leu. citreum* 及相近种间的 *dnaA*、*murC* 和 *pyrG* 基因构建的系统发育树拓扑结构与 16S rRNA 基因基本一致, 区别在于相似性的不同, 其分别为 75.5% - 97.2%、50.2% - 99.7%、65.0% - 99.8% 和 98.5% - 100%。【结论】在 *Leu. citreum* 及相近种间的种系发育关系中, *dnaA*、*murC* 和 *pyrG* 基因与 16S rRNA 基因系统进化关系都具有很好的 consistency, 但这三个持家基因的遗传距离显著高于 16S rRNA 基因。因此, 采用 *dnaA*、*murC* 和 *pyrG* 基因可以用于 *Leu. citreum* 及相近种的分类鉴定。

关键词: 柠檬明串珠菌, 系统发育分析, 16S rRNA 基因, 持家基因

中图分类号: **文献标识码:** **文章编号:** 0001-6209 (2013)07-0669-08

从 1878 年 Tieghem 首次提出明串珠菌属 (*Leuconostoc*), 并确立这一分类学地位。到目前为止, 明串珠菌属共发现 17 个种及亚种。随着研究手段的快速发展, 不断发现新的种及亚种, 同时伴随有种的整合、重命名等。*Leuconostoc citreum* 也经历很多分类学的整合事件, Takahashi 等^[1] 采用表型、生物化学和 DNA 杂交方法将 *Leuconostoc amelibiosum* 合并为 *Leu. citreum*。*Leu. citreum* 属于异型乳酸发酵, 常用于食品发酵工业, 可产生大量具有益生作用的物质, 诸如葡聚糖、果聚糖^[2-3], 因此, 对 *Leu. citreum* 的准确分类鉴定尤为关键。16S rRNA 基因

作为黄金标准广泛应用于原核生物的系统发育及分类研究中, 但由于其序列的高度保守和基因的多拷贝, 近年来也发现在一些细菌的分类鉴定中存在着缺陷^[4]。*Leu. citreum* 及相近种如 *Leu. lactis* 和 *Leu. mesenteroides* spp. 之间的相似性高达 98.5%, 尽管依据 16S rRNA 基因序列可以完成 *Leu. citreum* 相近种及亚种的分类鉴定, 但对于一些有争议菌株的分类仍需要采用其他方法更进一步的鉴定^[5]。

随着测序技术的发展和测序成本的降低, 采用多个基因位点分析菌株间的系统进化关系已成为可能。一些持家基因如 *dnaA* 基因 (chromosomal

基金项目: 内蒙古自治区科技应用项目 (20120242); 农业部现代农业产业技术体系建设项目 (CARS-37); 内蒙古自然科学基金开放课题 (20102010)

* 通信作者。Tel: +86-471-4319940; Fax: +86-471-4300122; E-mail: sts9940@sina.com

作者简介: 吕婧 (1987-), 女, 内蒙古鄂尔多斯人, 硕士研究生, 研究方向为乳品生物技术。E-mail: lqiang0603@126.com

收稿日期: 2013-01-14; **修回日期:** 2013-03-14

replication initiation protein)、*murC* 基因 (UDP-N-acetylmuramate-L-alanine ligase) 和 *pyrG* 基因 (CTP synthetase), 几乎普遍存在于细菌中且具有保守性, 但不同的种或菌株间又存在差异即变异性^[6]。目前, 选择某些持家基因作为系统进化分析的有效分子标记, 尤其在亲缘关系较近菌株间的分析中显示优于 16S rRNA 基因。本研究以 *dnaA*, *murC* 和 *pyrG* 基因对 7 株 *Leu. citreum* 分离株以及相近种的参考菌株在种和亚种水平上进行分类鉴定, 并与 16S rRNA 基因方法比较, 综合评价 *dnaA*, *murC* 和 *pyrG* 基因序列分析用于 *Leu. citreum* 相近种间鉴定的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株: 本研究所用 7 株 *Leu. citreum* 由内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室提供, 具体菌株号和 16S rRNA 基因序列号见表 1。

表 1. 试验所用菌株及 16S rRNA、*dnaA*、*murC* 和 *pyrG* 基因序列号

Table 1. Strains and accession numbers of 16S rRNA, *dnaA*, *murC* and *pyrG* genes used in this study

Strains	16S rRNA	<i>dnaA</i>	<i>murC</i>	<i>pyrG</i>
IMAU10225	GU138553	KC352464	KC352471	KC352478
IMAU10208	GU138536	KC352465	KC352472	KC352479
IMAU10241	GU138569	KC352466	KC352473	KC352480
IMAU10227	GU138555	KC352467	KC352474	KC352481
IMAU10220	GU138548	KC352468	KC352475	KC352482
IMAU10186	GU138514	KC352469	KC352476	KC352483
IMAU10182	GU138510	KC352470	KC352477	KC352484

1.1.2 主要试剂和仪器: 普通 MRS 培养基, PCR 试剂为 TaKaRa 公司产品, Applied Biosystems PCR 仪, ND-1000 型微量紫外分光光度计, CDS8000 型 UPV 凝胶成像分析系统, Eppendorf 5810R 高速冷冻离心机, DYY-12 电泳仪等。

1.1.3 试验所用引物: 本研究通过比较基因组学分析, 选择 *dnaA*、*murC* 和 *pyrG* 三个单拷贝且含有多变区的基因为目标序列, 结合序列比对信息, 采用 primer 5.0 设计通用引物, 引物见表 2, 所有引物由上海桑尼生物科技有限公司合成。

表 2. PCR 扩增引物

Table 2. Primers used in PCR in this study

Gene	Primer	Sequence (5'→3')	Size/bp
<i>dnaA</i>	d-F	AAAACGACGCCCTTCTGCTC	19
	d-R	ACTTGTGAATACGCTCCA	19
<i>murC</i>	m-F	CGACGACATTTCAAGGATT	19
	m-R	CGTGAATAAGTATGTGGCTGA	19
<i>pyrG</i>	p-F	TCCTAGCGGCTTCACTTGG	21
	p-R	CGATGACTGCATCAGGCTC	19

1.2 DNA 提取、PCR 扩增和测序

采用 CTAB-冻融法提取菌株基因组 DNA^[7]。将提取的基因组 DNA 稀释到 100 ng/μL 左右作为 PCR 扩增模板, 采用 50 μL 反应体系。对于 *dnaA* 基因的扩增, 循环条件: 95°C 5 min 预变性; 95°C 1 min, 52°C 45 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。*murC* 和 *pyrG* 基因的 PCR 扩增循环条件除了退火温度为 50°C 和 48°C 外, 其余反应条件均与 *dnaA* 基因一致。PCR 产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 并将扩增成功的产物送上海桑尼生物技术有限公司测序。

1.3 序列分析与系统进化树的构建

7 株试验菌株的 *dnaA*、*murC* 和 *pyrG* 基因扩增产物经纯化、测序, 获得 3 个基因选定片段的核苷酸序列。然后从 GenBank 数据库中下载试验菌株、模式菌株和已完成基因组测序参考菌株的 16S rRNA 基因序列, 以及 *dnaA*、*murC* 和 *pyrG* 基因序列 (表 1 和表 3), 采用 Clustal W 比对, 并用 Mega 4.0 软件计算菌株进化距离, 运用邻接法 (Neighbor-joining, N-J) 分别构建试验菌株、模式菌株和参考菌株的 16S rRNA 基因和 *dnaA*、*murC*、*pyrG* 基因的系统发育树, 数据自展重抽样次数 1000 次。

2 结果和分析

2.1 基于 16S rRNA 基因的系统发育分析

7 株试验菌株和参考菌株的 16S rRNA 基因序列下载自 GenBank 核酸序列数据库。通过多序列比对, 获得比对整齐的序列文件, 计算菌株间的进化距离, 构建系统发育树 (图 1)。结果显示, 共划分出 3 个较为稳定的亚群 (A、B、C) 和 2 个大类群 (I、II)。其中, A 亚群即 7 株试验菌株和 *Leu. citreum* 聚为一类, 它们的 16S rRNA 基因相似性为 99.9%; B 亚群 3 株菌之间的相似性均在 99.9% 以上; C 亚

表 3. 参考菌株及基因序列

Table 3. Strains and GenBank accession numbers of the reference sequences used in this work

Strains	16S rRNA	<i>dnaA</i>	<i>pyrG</i>	<i>murC</i>
<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293 ^T	AB596935	NC_008531	NC_008531	NC_008531
<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> ATCC 19254 ^T	AB023247	NZ_ACKV01000118	NZ_ACKV01000077	NZ_ACKV01000069
<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> J18	GU470981	CP003101	CP003101	CP003101
<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> CECT 912 ^T	AB023246	DQ335697	-	-
<i>Leu. citreum</i> CECT 4025 ^T	AF111948	DQ335700	-	-
<i>Leu. citreum</i> KM20	DQ489736	NC_010471	NC_010471	NC_010471
<i>Leu. citreum</i> LBAE C10	-	CAGE01000013	CAGE01000014	CAGE01000007
<i>Leu. pseudomesenteroides</i> CECT 4027 ^T	X95979	DQ335702	-	-
<i>Leu. pseudomesenteroides</i> KCTC 3652	HM443958	NZ_AEOQ01000004	NZ_AEOQ01000426	NZ_AEOQ01000015
<i>Leu. lactis</i> KCTC 3528	AB59694	NZ_AEOR01000714	NZ_AEOR01000570	NZ_AEOR01000674
<i>Leu. argentinum</i> KCTC 3773	AF175403	NZ_AEGQ01000005	NZ_AEGQ01000008	NZ_AEGQ01000025
<i>Leu. lactis</i> ATCC 19256 ^T	AB023968	-	-	-

Note: “-”, The gene is not sequenced.

群即 *Leu. mesenteroides* 的 3 个亚种, 它们处于同一分支, 相似性为 100%。另外, 第 I 大类群中两个分支 A 和 B 的相似性差异为 0.9% ; 第 II 大类群即

Leu. pseudomesenteroides 和 *Leu. mesenteroides* spp. 的相似性差异较小, 仅为 0.4%, 这主要由于 16S rRNA 基因进化速率比较低而造成的。

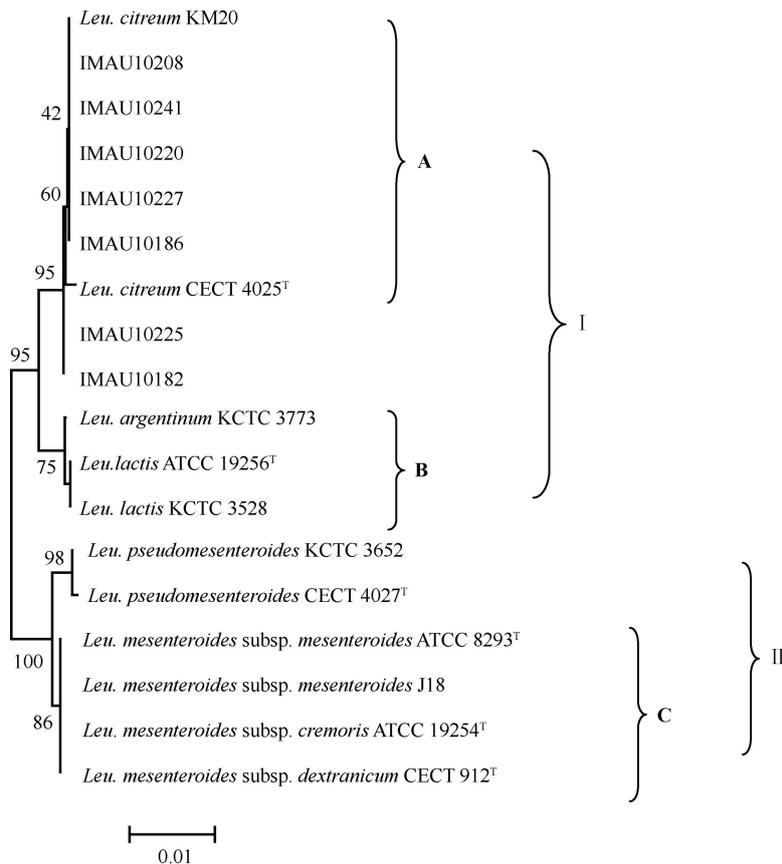


图 1.7 株试验菌株与参考菌株的 16S rRNA 基因系统发育树

Figure 1. The phylogenetic tree constructed by the 16S rRNA gene sequences of 7 strains and references. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 1% sequence divergence. A: 7 strains and *Leu. citreum*, B: *Leu. lactis* and *Leu. argentinum*, C: *Leu. mesenteroides* spp.; I: A and B, II: C and *Leu. pseudomesenteroides*.

1997年, Villani等^[8]采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳方法, 把 *Leu. citreum*、*Leu. lactis*、*Leu. pseudomesenteroides* 和 *Leu. mesenteroides* 及 3 个亚种划分为一类, 因为它们具有完全相同的蛋白指纹图谱。而本试验通过分析发现上述菌株间的 16S rRNA 基因序列相似性均大于 98.5%, 因此, 从 16S rRNA 基因水平佐证了 Villani 的试验结果。

2.2 基于 *dnaA*, *murC* 和 *pyrG* 基因部分序列的系统发育分析

本研究测定 7 株 *Leu. citreum* 相应的 *dnaA*, *murC* 和 *pyrG* 基因部分序列 (表 1), 采用与 16S rRNA 基因相同的方法构建系统发育树。通过比较 16S rRNA、*dnaA*、*murC* 和 *pyrG* 基因的系统发育树发现, 试验菌株与参考菌株的 16S rRNA 基因和 3 个不同持家基因位点构建的系统发育树基本一致, 均可划分为 3 个明显的系统进化分支, 但菌株间的相互进化距离具有明显的差异性。

在 *dnaA* 基因部分序列构建的系统发育树中, 7 株试验菌株与 *Leu. citreum* CECT 4025^T 聚为一类 (A 亚群), 其相似性为 99.6%, 而与 *Leu. lactis* KCTC 3528 相似性仅为 83.2%。*Leu. mesenteroides* 三个亚种的相似性均大于 98.0%, 而与 *Leu. pseudomesenteroides* 的种间相似性仅为 80.2%。B 亚群两株菌种间的相似性为 97.8%。

同样地, 在 *murC* 基因构建的系统发育树中, 7 株试验菌株与 *Leu. citreum* KM20 的相似性为 98.1%, 聚为一类构成 A 亚群, 但与 *Leu. lactis* KCTC 3528 种间相似性仅为 34.5%。*Leu. mesenteroides* 两个亚种的种内相似性大于 99.5%, 它们与另一分支的 *Leu. pseudomesenteroides* 的种间相似性为 51.2%。

pyrG 基因系统发育树中, 7 株试验菌株与 *Leu. citreum* KM20 以 99.6% 的相似性聚为一类, 与 *Leu. lactis* KCTC 3528 相似性为 79.9%。*Leu. mesenteroides* 两个亚种的种内相似性高达 98.6%, 与 *Leu. pseudomesenteroides* 的种间相似性为 80.2%。

3 讨论

随着分类鉴定研究手段的不断更新, 倾向于从分子水平揭示菌株的亲缘关系, 在明串珠菌属中, 一些种或亚种依据亲缘关系被划分到其他属, 如魏氏

菌属 (*Weissella*) 和酒球菌属 (*Oenococcus*)^[9]。这些也表明了明串珠菌属中存在模糊、有争议的种及亚种。到目前为止, 依据现代的分子生物学方法, 如 16S rRNA 基因序列分析可在种的水平进行准确的鉴定, 但在一些亲缘关系较近的种或亚种的分类鉴定中, 只能给出一个不确定的结果。明串珠菌属内部分种及亚种之间的 16S rRNA 基因相似性较高, 单纯由 16S rRNA 基因序列分析无法准确地区分开来。为了克服 16S rRNA 基因在相近菌株之间难以准确鉴定, 相继有学者开始尝试采用持家基因作为原核生物系统发育的分子标记。2007 年, Chelo 等^[9]使用 16S rRNA、*dnaA*、*gyrB*、*rpoC* 和 *dnaK* 基因作为系统发育的标记, 快速准确对明串珠菌、魏氏菌和酒球菌进行鉴定。Bruyne 等^[10]也采用分析 *pheS*、*rpoA* 和 *atpA* 基因序列的方法成功地完成了分离自发酵咖啡中乳酸菌的鉴定, 值得一提的是 *Leu. holzapfelii* 与 *Leu. citreum* 和 *Leu. lactis* 的 16S rRNA 基因相似性分别为 99.6%、99.0%, 又依据 *pheS*、*rpoA* 和 *atpA* 基因序列具有较大的遗传距离, 命名了 1 个新种 *Leuconostoc holzapfelii* sp. nov.。2008 年, 东京农业大学的 Endoa 等^[11]根据 16S-23S rRNA 基因间序列、*rpoC*、*recA* 和 16S rRNA 基因序列构建系统发育树, 将 *Leu. durionis*、*Leu. ficulneum*、*Leu. fructosum* 和 *Leu. pseudoficulneum* 菌株重新分类为 *Fructobacillus* gen. nov.。在我们的结果中, 采用不同持家基因分析 *Leu. citreum* 近缘种均显示出高的遗传距离。这些结果都表明运用持家基因序列分析近缘种是一种行之有效的方法。

大量的研究表明, *Leu. citreum* 和 *Leu. lactis* 的 16S rRNA 基因序列相似性大于 99.0%。2000 年, Lee^[12]设计种特异性引物成功的把 *Leu. citreum* 和 *Leu. lactis* 的区分开来, 本研究分析上述两种菌的 *dnaA*、*murC* 和 *pyrG* 基因序列, 它们的相似性分别为 83.2%、34.5% 和 79.9%, 显著优于 16S rRNA 基因序列分析, 结果表明采用上述 3 个持家基因位点的分析可以作为 *Leu. citreum* 和 *Leu. lactis* 快速准确鉴定方法。2006 年, Vacanney^[13]等人研究 *Leu. argentinum* 和 *Leu. lactis* 的 16S rRNA 基因序列相似性为 99.6%, 经重复基因外回文序列 (REP)、DNA-DNA 杂交、SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳、限制性片段长度多态性 (AFLP) 等分析, 把 *Leu. argentinum* 重新归类为 *Leu. lactis*。本研究从持家

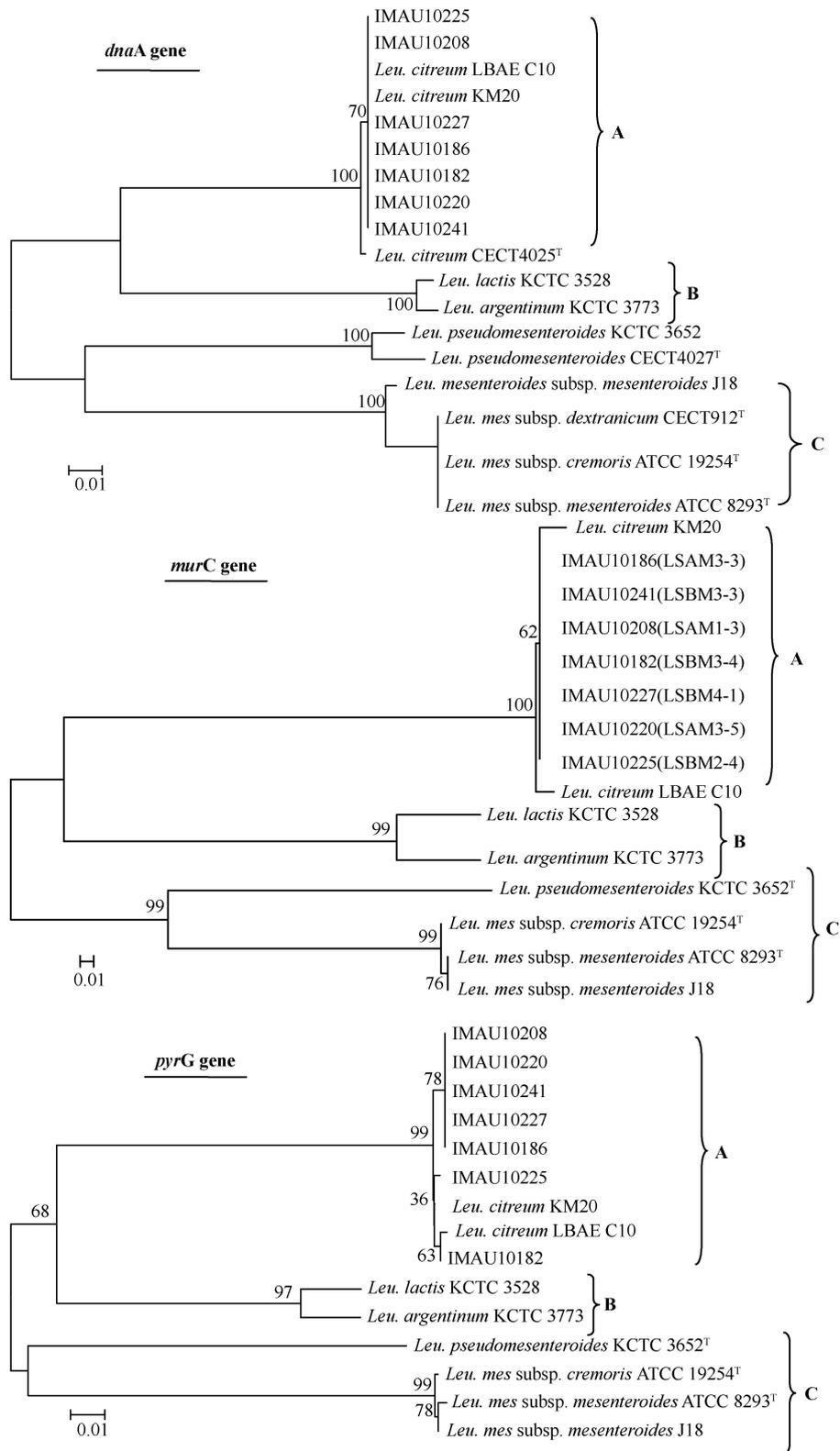


图 2. 采用邻接法构建的 *dnaA*, *murC* 和 *pyrG* 基因系统发育树

Figure 2. Phylogenetic trees derived from *dnaA*, *murC* and *pyrG* gene sequences by N-J method. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 1% sequence divergence. A: 7 strains and *Leu. citreum*, B: *Leu. lactis* and *Leu. argentinum*, C: *Leu. pseudomesenteroides* and *Leu. mesenteroides* spp. .

基因方面分析也得到同样的结果,即 *Leu. argentinum* 和 *Leu. lactis* 的 *dnaA*、*murC* 和 *pyrG* 基因序列相似性差异较小,分别为 2.2%、11.2% 和 2.2%。*Leu. pseudomesenteroides* 和 *Leu. mesenteroides* 及其亚种之间难以准确区分^[14],2010 年,Wawa^[12] 分析了 *Leu. mesenteroides* 和 *Leu. pseudomesenteroides* 的 16S rRNA 基因序列,发现只有 5 个碱基不同,而本研究基于 *dnaA*、*murC* 和 *pyrG* 基因序列和系统发育树,明显的把 *Leu. pseudomesenteroides* 和 *Leu. mesenteroides* 两个亚种分为两个独立的分支,但是 *Leu. mesenteroides* 亚种之间的进化关系没有区分开来,需要以后进一步的研究。

目前,在明串珠菌属中已有 9 个菌种完成全基因组测序,其中 *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293^T 和 *Leu. citreum* KM20 是最早完成测序工作的^[15],由于缺乏基因方面的信息,限制了明串珠菌属在全基因组水平上的比较分析^[16]。基于现状,许多学者将具有较高分辨率的一些持家基因作为靶点,为明串珠菌属系统发育和分子进化研究提供了一种新思路。本研究以 *dnaA*、*murC* 和 *pyrG* 基因作为分子标记,成功的将 16S rRNA 基因无法分开的菌株,如 *Leu. citreum* 和 *Leu. lactis*,*Leu. pseudomesenteroides* 和 *Leu. mesenteroides* 亚种准确鉴定,但不能清晰地区分 *Leu. mesenteroides* 3 个亚种。这可能是由于选用的持家基因在 *Leu. mesenteroides* 三个亚种中发生过基因的水平转移和重组事件,或者是 *Leu. mesenteroides* 三个亚种的 *dnaA*、*murC* 和 *pyrG* 基因相对保守^[17],从而导致区分效果不理想,在后续的研究中,可通过选择其他持家基因来探讨 *Leu. mesenteroides* 三个亚种之间的关系。

综上分析,结果表明采用 *dnaA*、*murC* 和 *pyrG* 基因部分序列分析的方法可以完成 *Leu. citreum* 和 *Leu. lactis*, *Leu. pseudomesenteroides* 和 *Leu. Mesenteroides* 相近种的准确鉴定。

参考文献

- [1] Takahashi M, Okada S, Uchimura T, Michio K. *Leuconostoc amelibiosum* Schillinger, Holzapfel, and Kandler 1989 Is a Later Subjective Synonym of *Leuconostoc citreum* Farrow, Facklam, and Collins 1989. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1992, 42: 649-651.
- [2] Yang LL, Zhi XY, Li WJ. Phylogenetic analysis of *Nocardiopsis* species based on 16S rRNA, *gyrB*, *sod* and *rpoB* gene sequences. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(6): 951-955. (in chinese)
杨玲玲, 职晓阳, 李文均. 拟诺卡氏菌 16S rRNA, *gyrB*, *sod* 和 *rpoB* 基因的系统发育分析. *微生物学报*, 2007, 47(6): 951-955.
- [3] Choi H, Kim YW, Wang HI, Kim J, Yoon S. Evaluation of *Leuconostoc citreum* HO12 and *Weissella koreensis* HO20 isolated from kimchi as a starter culture for whole wheat sourdough. *Food Chemistry*, 2012, 134: 2208-2216.
- [4] Cheng WY, Jin HX. Research progress on *Leuconostoc* genes. *China Brewing*, 2012, 31 (2): 24-28. (in chinese)
成文玉, 金红星. 明串珠菌的基因研究进展. *中国酿造*, 2012, 31(2): 24-28.
- [5] Laguerre S, Amari M, Vuillemin M, Robert H, Loux V, Klopp C, Morel S. Genome Sequences of Three *Leuconostoc citreum* Strains, LBAE C10, LBAE C11, and LBAE E16, Isolated from Wheat Sourdoughs. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194: 1610-1611.
- [6] Schillinger U, Boehringer B, Wallbaum S, Caroline L, Gonfa A, Huch M, Holzapfel WH. A genus-specific PCR method for differentiation between *Leuconostoc* and *Weissella* and its application in identification of heterofermentative lactic acid bacteria from coffee fermentation. *Federation of European Microbiological Societies*, 2008, 286: 222-226.
- [7] Wu RN, Zhang HP, Menghe BLG. 16S rDNA sequence

- and cluster analysis of *L. casei*. Zhang and ZL12-1 isolated from Koumiss. *China dairy industry*, 2005, 33 (6): 4-9. (in chinese)
- 乌日娜, 张和平, 孟和毕力格. 酸马奶中乳杆菌 *L. casei* Zhang, ZL12-1 的 16S rDNA 基因序列及聚类分析. *中国乳品工业*, 2005, 33(6): 4-9.
- [8] Villani F, Moschetti G, Blaiotta G, Coppola S. Characterization of strains of *Leuconostoc mesenteroides* by analysis of soluble whole-cell protein pattern, DNA fingerprinting and restriction of ribosomal DNA. *Journal of Applied Microbiology*, 1997, 02: 578-588.
- [9] Chelo IM, Ze'-Ze' LB, Tenreiro RR. Congruence of evolutionary relationships inside the *Leuconostoc-Oenococcus-Weissella* clade assessed by phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene, *dnaA*, *gyrB*, *rpoC* and *dnaK*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57: 276-286.
- [10] Bruyne KD, Schillinger U, Caroline L, Boehringer B, Cleenwerck I, Vancanneyt M, Vuyst LD. *Leuconostoc holzapfelii* sp. nov., isolated from Ethiopian coffee fermentation and assessment of sequence analysis of housekeeping genes for delineation of *Leuconostoc* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57: 2952-2959.
- [11] Endo A, Okada S. Reclassification of the *Leuconostoc* genus and proposals of *Fructobacillus fructosus* gen. nov., comb. nov., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58: 2195-2205.
- [12] Sawa N, Okamura K, Zendo T, Himeno K, Nakayama J, Sonomoto K. Identification and characterization of novel multiple bacteriocins produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* QU 15. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109: 282-291.
- [13] Vancanneyt M, Zamfir M, Wachter MD, Cleenwerck I, Hoste B, Rossi F, Dellaglio F, Vuyst LD, Swings J. Reclassification of *Leuconostoc argentinum* as a later synonym of *Leuconostoc lactis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56: 213-216.
- [14] Elizaquivel P, Chenoll E, Aznar R. ATaqMan-based real-time PCR assay for the specific detection and quantification of *Leuconostoc mesenteroides* in meat products. *Federation of European Microbiological Societies*, 2008, 278: 62-71.
- [15] Kim JF, Jeong H, Lee JS, Choi SH, Ha M, Hur CG, Kim JS, Lee S. Complete Genome Sequence of *Leuconostoc citreum* KM20. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190: 3093-3094.
- [16] Chelo IM, Ze'-Ze' LB, Tenreiro RR. Genome diversity in the genera *Fructobacillus*, *Leuconostoc* and *Weissella* determined by physical and genetic mapping. *Microbiology*, 2010, 156: 420-430.
- [17] Naser SM, Dawyndt P, Hoste B, Gevers D, Vandemeulebroecke K, Cleenwerck I, Vancanneyt M, Swings J. Identification of lactobacilli by *pheS* and *rpoA* gene sequence analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57: 2777-2789.

Phylogenetic analysis of closely related *Leuconostoc citreum* species based on partial housekeeping genes

Qiang Lv¹, Ming Chen², Haiyan Xu¹, Yuqin Song¹, Zhihong Sun¹, Tong Dan¹, Tiansong Sun^{1*}

¹ Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China

² National Basic Science Training Class, Department of Biology, College of Life Science, Inner Mongolia University, Hohhot 010018, China

Abstract: [**Objective**] Using the 16S rRNA, *dnaA*, *murC* and *pyrG* gene sequences, we identified the phylogenetic relationship among closely related *Leuconostoc citreum* species. [**Methods**] Seven *Leu. citreum* strains originally isolated from sourdough were characterized by PCR methods to amplify the *dnaA*, *murC* and *pyrG* gene sequences, which were determined to assess the suitability as phylogenetic markers. Then, we estimated the genetic distance and constructed the phylogenetic trees including 16S rRNA and above mentioned three housekeeping genes combining with published corresponding sequences. [**Results**] By comparing the phylogenetic trees, the topology of three housekeeping genes trees were consistent with that of 16S rRNA gene. The homology of closely related *Leu. citreum* species among *dnaA*, *murC*, *pyrG* and 16S rRNA gene sequences were different, ranged from 75.5% to 97.2%, 50.2% to 99.7%, 65.0% to 99.8% and 98.5% to 100%, respectively. [**Conclusion**] The phylogenetic relationship of three housekeeping genes sequences were highly consistent with the results of 16S rRNA gene sequence, while the genetic distance of these housekeeping genes were extremely high than 16S rRNA gene. Consequently, the *dnaA*, *murC* and *pyrG* gene are suitable for classification and identification closely related *Leu. citreum* species.

Keywords: *Leuconostoc citreum*, Phylogenetic analysis, 16S rRNA gene, Housekeeping genes

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Science Application Project of Inner Mongolia(20120242), by the Modern Agricultural Technology Projects of the Ministry of Agriculture(CARS-37) and by the National Natural Science Foundation of Inner Mongolia(20102010)

* Corresponding author. Tel: +86-471-4319940; Fax: +86-471-4300122; E-mail: sts9940@sina.com

Received: 14 January 2013/Revised: 14 March 2013