

## 合欢、金合欢和银合欢根瘤菌系统发育研究方法比较

王风芹<sup>1,2</sup>, 张勇法<sup>2,3</sup>, 刘杰<sup>2,4</sup>, 宋安东<sup>1</sup>, 刘全军<sup>1</sup>, 陈文新<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> 河南农业大学生命科学学院, 郑州 450002)

(<sup>2</sup> 农业部农业微生物资源及其应用重点开放实验室, 中国农业大学生物学院, 北京 100094)

(<sup>3</sup> 西北农林科技大学生命科学院, 杨凌 712100)

(<sup>4</sup> 青岛科技大学化工学院生物工程与技术系, 青岛 266042)

**摘要:** 利用位于染色体不同位点的多个基因序列进行分析是原核生物分类与系统发育研究的一个热点。本文采用 *atpD* 和 *gln II* 两个持家基因的部分序列对 9 株分离自我国合欢、金合欢和银合欢的根瘤菌进行系统发育研究, 并与以 16S rDNA 基因序列构建的系统发育树进行比较。结果表明三者属水平上基本一致, CCBAU43060、CCBAU61139 位于 *Rhizobium-Agrobacterium* 系统发育分支内; CCBAU51471、CCBAU35220、CCBAU51276 和 CCBAU61158 属于 *Mesorhizobium*, CCBAU35234、CCBAU61178 和 CCBAU35085 位于 *Bradyrhizobium* 系统发育分支; 在属内种间个别菌株(CCBAU61158、CCBAU43060、CCBAU61178)的系统发育地位存在差异, 表明属内种间存在较广泛的基因交流。因此利用 16S rDNA 确定属水平的分类地位比较可靠, 但利用系统发育的方法研究属内种间亲缘关系应采用多个功能保守的持家基因同时进行分析才能得出比较可靠的结论。

**关键词:** 根瘤菌; *atpD*; *gln*; 系统发育

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2008)01-0001-07

根瘤菌是一类能与豆科植物结瘤共生固氮的微生物的总称。它们能与其与豆科植物形成的微共生体根瘤中固定空气中的分子态氮供植物生长利用。根瘤菌的存在不仅可以减少化学氮肥的使用, 提高经济效益, 而且可以减轻由于化学氮肥的过量使用造成的环境污染<sup>[1,2]</sup>。许多豆科植物还是贫瘠荒漠地区的先锋植物, 因此根瘤菌在生态恢复中也具有重要的意义。

系统发育是研究生物体在整个进化谱系中所处的位置及其与其他生物体的亲缘关系。目前对原核生物的系统发育研究主要是基于 16S rDNA 的全序列分析, 但是由于基因重组、横向基因转移等现象的存在, 使得由单个基因构建的“基因树”并不能真实地反应生命进化的真实历史<sup>[3]</sup>, 因此细菌分类

学家建议采用多个功能保守的基因序列进行系统发育研究, 以建立一个“一致”的系统发育树<sup>[4,5]</sup>, 并在研究位于基因组不同位点的多个持家基因的基础上确定种群的划分标准, 以取代步骤繁琐、误差较大的 DNA-DNA 杂交技术, 目前该方面的工作正在探索之中。

我们曾采用 16S rDNA PCR-RFLP、全细胞蛋白电泳、数值分类、16S rDNA 全序列分析及 Rep-PCR 等方法对分离自我国亚热带地区合欢(*Albizia* spp.)、金合欢(*Acacia* spp.)和银合欢(*Leucaena leucocephala*)根瘤菌进行了多样性研究<sup>[6]</sup>, 在此基础上, 本文采用 *atpD* 和 *gln* 基因的部分序列对部分代表菌株的系统发育地位进一步研究, 并与 16S rDNA 全序列系统发育分析进行比较, 以便能更准

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30400001)

\*通讯作者。Tel: +86-10-62731854; Fax: +86-10-62734008; E-mail: wenxin\_chen@263.net

作者简介: 王风芹(1976-), 女, 河南安阳人, 博士, 主要从事微生物资源调查与应用研究。E-mail: w\_fengqin@163.com

收稿日期: 2007-09-03; 修回日期: 2007-10-18

确地揭示我国合欢、金合欢和银合欢根瘤菌的系统发育地位,寻找可能存在的横向基因转移、基因重组等现象,并为建立能真正揭示生物系统发育关系的研究奠定理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株:供试菌株 9 株,均为 16S rDNA

PCR-RFLP 分析各酶切图谱类型(rDNA type)的代表菌株<sup>[6]</sup>(表 1)。

1.1.2 引物:表 2 中显示的是本研究中使用的引物,由北京华大中生科技发展有限公司合成。

1.1.3 主要试剂和仪器:Taq DNA 聚合酶、dNTP 和凝胶回收纯化试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司。

表 1 供试菌株及其相关特征

Table 1 Bacterial strains used in this study and their relevant characteristics

Strain	rDNA type <sup>[6]</sup>	Phylogeny position(similarity, %)			Host	Geographic origin
		16S rDNA <sup>[6]</sup>	<i>atpD</i>	<i>gln II</i>		
CCBAU35220	5	—	<i>M. plurifarium</i> (97%)	<i>M. plurifarium</i> (93%)	<i>Ac. mangium</i>	Fujian (福建)
CCBAU51471	5	<i>M. plurifarium</i> (99%)	<i>M. plurifarium</i> (96%)	<i>M. plurifarium</i> (98%)	<i>Ac. mangium</i>	Guangdong (广东)
CCBAU51276	5	<i>M. plurifarium</i> (99%)	—	<i>M. plurifarium</i> (92%)	<i>L. leucocephala</i>	Guangdong (广东)
CCBAU61158	6	<i>Mesorhizobium</i> 外围 (97–98%)	<i>M. chacoense</i> (95%)	<i>M. chacoense</i> (87%)	<i>Al. kalkora</i>	Sichuan (四川)
CCBAU43060	10	<i>R. leguminosarum-R. etli</i> (98%)	<i>R. yanglingense-R. mongolense-R. sullae</i> (93%)	<i>R. leguminosarum-R. etli</i> (92%–94%)	<i>Al. julibrissin</i>	Hubei (湖北)
CCBAU61139	18	<i>A. tumefaciens</i> (100%)	<i>A. tumefaciens</i> (100%)	<i>A. tumefaciens</i> (93%)	<i>Al. julibrissin</i>	Sichuan (四川)
CCBAU61178	20	<i>Bradyrhizobium</i> (96.5–99.4%)	<i>B. liaoningense</i> (97%)	<i>B. japonicum</i> (96%)	<i>Al. kalkora</i>	Sichuan (四川)
CCBAU35085	22	<i>B. yuanmingense</i> (99.7%)	<i>B. yuanmingense</i> (99.7%)	<i>B. yuanmingense</i> (100%)	<i>Ac. confusa</i>	Fujian (福建)
CCBAU35234	23	<i>B. elkanii</i> (100%)	<i>B. elkanii</i> (100%)	<i>B. elkanii</i> (99%)	<i>Ac. confusa</i>	Fujian (福建)

表 2 PCR 引物序列

Table 2 Primers used for PCR and sequencing

Primer	Sequence(5 → 3)*
atpD-294 <sup>[7]</sup>	ATCGGCGAGCCGGTGCACGA
atpD-771 <sup>[7]</sup>	GCCGACACTCCGAACNGCCTG
GS -1 <sup>[8]</sup>	AACGCAGATCAAGGAATTCG
GS -2 <sup>[8]</sup>	ATGCCCGAGCCGTTCCAGTC
GS -3 <sup>[8]</sup>	AGRTYTTTCGCAAGGGYTC
GS -4 <sup>[8]</sup>	GCGAACGATCTGGTAGGGGT

\*Y=C or T; B=C, T or G; R=A or G; S=C or G; K=G or T; N=A, C, G or T.

### 1.2 *atpD* 和 *gln II* 基因扩增

1.1.2 总 DNA 的提取:总 DNA 提取采用 GUTC 快速提取法,具体提取步骤见文献<sup>[9]</sup>。

1.2.2 PCR 扩增和测序:采用 50 $\mu$ L 反应体系。

*atpD* 基因扩增程序:95 5 min; 94 45 s, 50 60 s, 74 90 s, 30 个循环; 74 6 min。*gln* 基因扩增:利用引物 GS -1/2 和 GS -3/4 分别扩增、测序 *gln* 基因的 5 端和 3 端,然后将两个片断进行拼接得到全长的 *gln* 基因序列,或直接利用 GS 1/4 扩增、测序 *gln* 基因序列。GS -1/2 (55 退火)和 GS -3/4(50 退火)扩增反应程序:

95 2 min; 92 40 s, 50 或 55 40 s, 72 90 s, 30 个循环; 72 10 min; GS -1/4 扩增反应程序: 97 3 min; 92 60 s, 50 90 s, 72 2 min, 30 个循环; 72 10 min。

琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,紫外凝胶扫描仪扫描、照相,检测扩增片段长度与产量。经凝胶回收纯化后送北京华大中生科技发展有限公司直接进行测序。

### 1.3 数据处理

将测序所得序列及 GeneBank 中获得的参比菌株的相应基因序列经 ClustalX 序列比对后,采用 TREECONW 中的邻接法(Neighbor-joining)进行系统发育树的构建,自展值(bootstrap)为 1000。

## 2 结果和分析

### 2.1 基于 *atpD* 基因部分序列的系统发育研究

*atpD* 是编码膜蛋白 ATP 合成酶  $\beta$  亚基的基因,对生物能量的产生起关键作用。本研究对供试菌株的 *atpD* 基因部分序列进行了测序,测序长度均大于 470bp,采用邻接法构建系统发育树,结果见图 1。

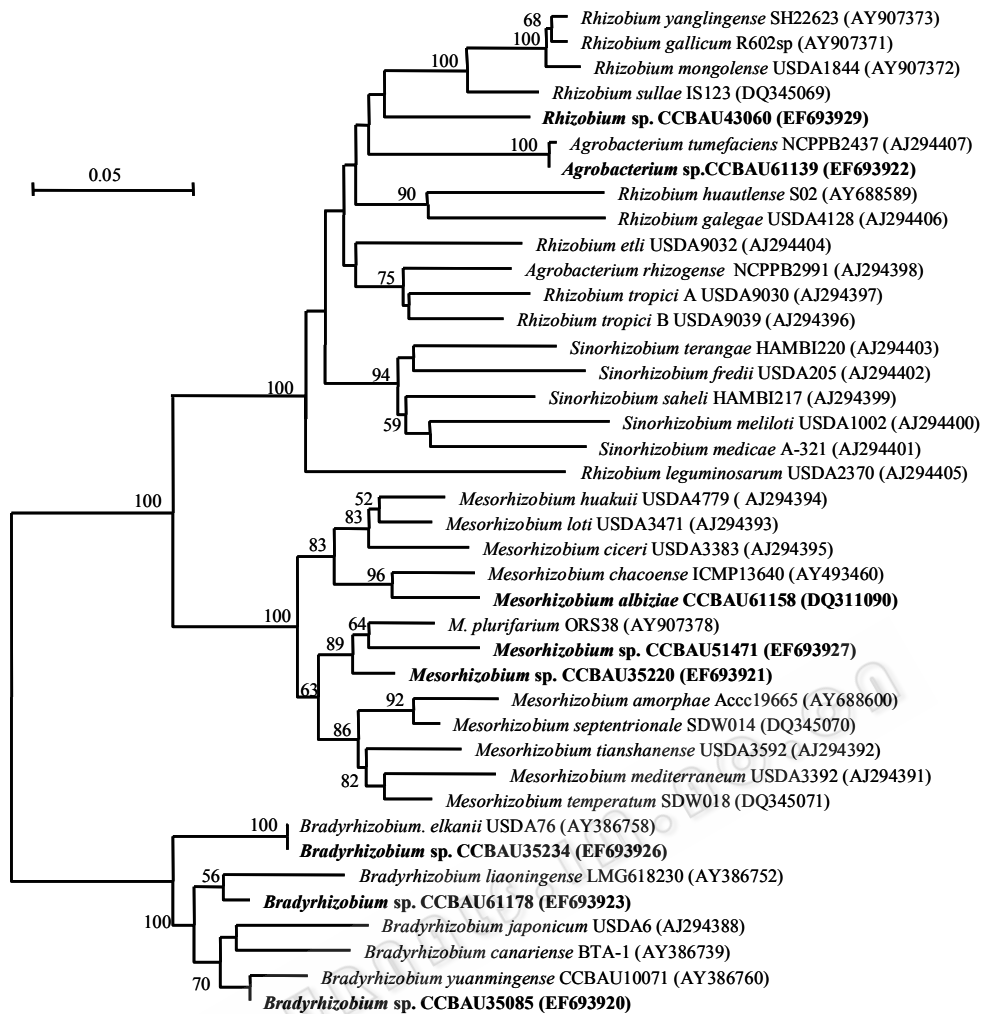


图 1 以 *atpD* 基因部分序列构建的根瘤菌系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the isolates and the reference strains based on the partial sequences of *atpD* genes. Bootstrap confidence levels greater than 50% are indicated at the internodes. GeneBank accession numbers are shown in the parentheses. Bar=5% nucleotide divergence.

CCBAU43060、CCBAU61139 位于 *Rhizobium-Agrobacterium* 系统发育分支内。CCBAU43060 与 *R. yanglingense* SH22623、*R. mongolense* USDA 1844、*R. sulae* IS123 的同源性最高为 93%，而与 *R. tropici* type B USDA9039 及 *R. etli* USDA9032 的同源性为 91%。CCBAU61139 与 *A. tumefaciens* NCPPB2991 的序列同源性为 100%。

CCBAU51471 和 CCBAU35220 与 *M. plurifarium* ORS38 共同形成一个系统发育亚分支，其序列同源性分别达到 97% 和 96%。菌株 CCBAU61158 位于 *Mesorhizobium* 系统发育分支，与 *M. chacoense* ICMP13640 亲缘关系最近，序列同源性为 95%。

CCBAU35234、CCBAU61178 和 CCBAU35085 位于 *Bradyrhizobium* 系统发育分支，其中 CCBAU35234 与 *B. elkanii* USDA76 的序列同源性为 100%；CCBAU61178 在系统发育树上与 *B. liaonin-*

*gense* LMG61823 亲缘关系最近，其序列同源性为 97%。CCBAU35085 与 *B. yuanmingense* CCBAU 10071 在同一个系统发育亚分支上，序列同源性为 99%。

## 2.2 基于 *gln II* 基因部分序列的系统发育研究

谷氨酰胺合成酶(GS)是氮同化过程中的一个关键酶，其功能相同且保守。GS 有两种类型：GS 和 GS<sub>2</sub>，其中 GS 存在于所有的细菌中，而不存在于真核生物中，GS<sub>2</sub> 主要存在于真核生物中，只有少数细菌(包括根瘤菌)中表达 GS<sub>2</sub>。本研究对供试菌株的 *gln II* 基因部分序列进行了测序，并构建了该基因的系统发育树(邻接法，Neighbour-joining)，由于 *gln II* 基因只在少数细菌中存在，以 *gln II* 基因部分序列构建的系统发育树难找到一个合适的菌株作为树根，因此构建的 *gln II* 系统发育树为放射状的无根树(图 2)。

CCBAU61139 与 *A. tumefaciens* C58 位于同一个

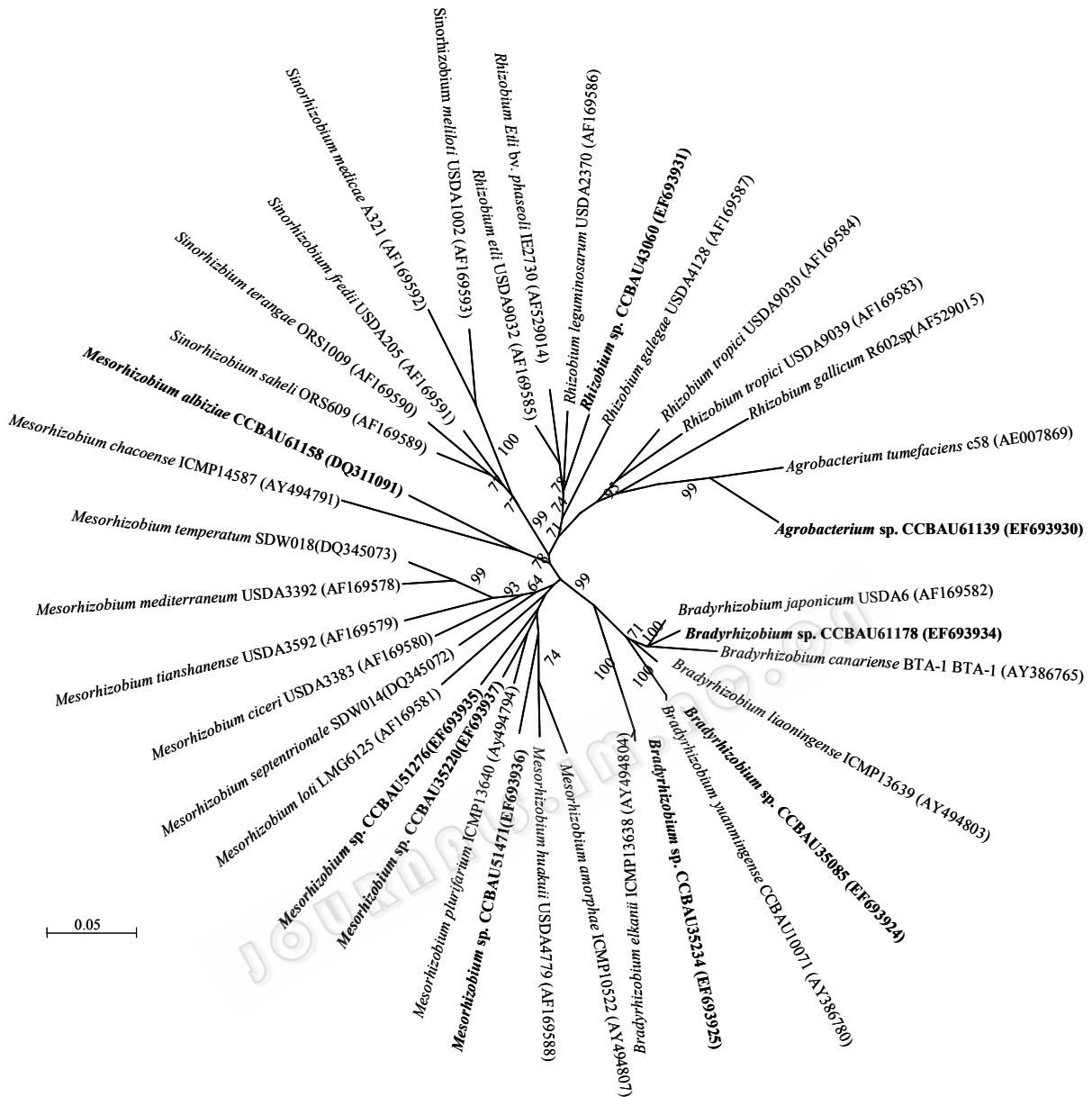


图 2 以 *gln II* 部分序列构建的根瘤菌系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the isolates and the reference strains based on the partial sequences of *gln II* genes.

The annotation was the same as in Fig. 1.

系统发育亚分支上, 序列同源性分别为 93% 和 90%。CCBAU43060 与 *R. leguminosarum* USDA2370 和 *R. etli* USDA9032、IE2730 位于同一个分支上, 序列同源性分别为 94%、92% 和 94%。

CCBAU51471、CCBAU35220 和 CCBAU51276 与 *M. plurifarium* ICMP13640 具有最高的序列同源性, 分别为 88%、93% 和 92%。CCBAU61158 与 *M. chacoense* ICMP14587 形成一个独立分支, 位于 *Mesorhizobium* 系统发育分支之外, 序列同源性只有 87%。

位于 *Bradyrhizobium* 系统发育分支的三株菌

CCBAU35234、CCBAU35085 和 CCBAU61178 分别与 *B. elkanii* ICMP13638、*B. yuanmingense* CCBAU10071 和 *B. japonicum* USDA6 位于同一个亚分支上, 序列同源性分别为 99%、100% 和 96%。

2.3 基于 *atpD*、*gln II* 和 16S rDNA 序列的系统发育分析比较

比较以 16S rDNA、*atpD* 和 *gln II* 3 个基因序列构建的系统发育树可以看出(表 1), 三者属水平上基本一致, CCBAU43060、CCBAU61139 位于 *Rhizobium*-*Agrobacterium* 系统发育分支内; CCBAU51471、

CCBAU35220、CCBAU51276 和 CCBAU61158 属于 *Mesorhizobium*, CCBAU35234、CCBAU61178 和 CCBAU35085 位于 *Bradyrhizobium* 系统发育分支。

在 3 个系统发育树中, CCBAU35220、CCBAU51471 和 CCBAU51276 与 *M. plurifarium* 位于同一个系统发育亚分支; CCBAU61139、CCBAU35085 和 CCBAU35234 分别与 *A. tumefaciens*、*B. yuanmingense* 和 *B. elkanii* 的亲缘关系最近。CCBAU61158 在以 16S rDNA 序列构建的系统发育树中位于 *Mesorhizobium* 系统发育分支的外围, 与 *Mesorhizobium* 已知种的序列同源性的 95%~97%, 而在 *atpD* 和 *gln II* 基因序列构建的系统发育树中与 *M. chacoense* 亲缘关系最近, 序列同源性分别为 95% 和 87%。CCBAU43060 在 16S rDNA 和 *gln II* 构建的系统发育树中与 *R. etli* 和 *R. leguminosarum* 位于同一系统发育分支, 在 *atpD* 系统发育树中与 *R. yanglingense*、*R. mongolense*、*R. sullae*、*R. gallicum* 同源性最高。CCBAU61178 在以 16S rDNA 序列构建的系统发育树中位于 *B. betae*-*B. canariense*-*B. japonicum*-*B. liaoningense*-*B. yuanmingense* 亚分支中, 序列相似性达到 98.4~99.5%, 在以 *atpD* 构建的系统发育树中与 *B. liaoningense* LMG61823 亲缘关系最近, 其序列同源性为 97%, 在 *gln II* 构建的系统发育树中与 *B. japonicum* USDA6 位于同一个亚分支上, 序列同源性为 96%。这些菌种在属内种间的系统发育关系不一致, 表明属内种间存在较广泛的基因交流<sup>[10]</sup>。

### 3 讨论

#### 3.1 系统发育研究与横向基因转移

系统发育是指生物种族的进化历史<sup>[3]</sup>, 即生物体在整个进化谱系中所处的位置及与其它生物体的亲缘关系。长期以来, 由于 16S rDNA 功能保守、进化缓慢、分子大小适中等众多优点, 一直是原核生物分类与系统发育研究的首选指标。但随着研究的不断深入, 人们逐渐发现 16S rDNA 中存在基因重组、嵌合基因结构<sup>[11]</sup>、序列完全不同的多拷贝<sup>[12]</sup>等现象, 在中慢生根瘤菌中 16S rDNA 在种间还可以完全转移<sup>[13]</sup>, 因此仅以 16S rDNA 一个基因研究原核生物的系统发育关系存在不确定的因素。利用位于染色体不同位点的多个保守基因序列进行系统发育研究, 能够得到一个一致的系统发育树, 更直观地反映生物的进化历史, 通过对这些基因的序列分析可以揭示这些基因上存在的基因重组、基因水平转移和突变等, 避免这些因素对系统发育研究的

影响。

本文采用 *atpD* 和 *gln* 两个基因序列对部分供试菌株的系统发育进行了研究, 并与 16S rDNA 构建的系统发育树进行比较, 与已有报道结果相同, 三者属水平上基本一致<sup>[8,9]</sup>, 在三个系统发育树中, 属内种间一些菌株(CCBAU61158、CCBAU43060、CCBAU61178)的系统发育关系不一致, 表明属内种间存在较广泛的基因交流<sup>[10]</sup>。序列比对发现 CCBAU61158 的 16S rDNA 序列的 5'端有一段 80bp 的插入序列<sup>[6,14]</sup>, CCBAU43060 的 16S rDNA 中存在有嵌合的基因结构, 其 16S rDNA 序列相对于 *E. coli* 16S rRNA 基因的 122~167 个碱基之间约 45 个碱基与 *R. lossense* 所处系统发育亚分支的序列同源, 而其它的序列与 *R. leguminosarum* 的序列同源性最高。CCBAU43060 所代表的菌群可能为一个新种群, 有待于进一步研究, 但是回接实验表明该菌并不能与其原宿主 *Albizia julibrissin* 共生结瘤, 也未扩增到其共生基因。CCBAU61158 插入序列的获得及 CCBAU43060 的嵌合基因结构的存在可能是由基因的横向转移及重组造成的, 而 CCBAU43060 不能与其原宿主共生结瘤则可能是由于共生基因的丢失导致。

#### 3.2 系统发育研究在细菌种群地位确定中的作用

目前原核生物种群的界定主要采用三种不同的方法: 基因组界定(包括 DNA-DNA 杂交、G+C mol%、基因组大小及 DNA 指纹图谱分析等)、表型特征(包括数值分类、脂肪酸组成、全细胞蛋白电泳、多位点酶等)和系统发育地位的确定, 因此原核生物种群可以定义为“具有单一的系统发育分支、基因组高度相关的一群微生物, 它们在许多特征上高度相似, 具有明显的鉴别特征<sup>[15]</sup>”。从这一概念我们可以看出, 系统发育是原核生物种群界定的必要指标之一, 也是现代微生物分类的基础。

在研究原核生物多样性时, 通过多个持家基因的序列分析可以确定部分菌株的种群地位, 如在以 *atpD*、*gln* 和 16S rDNA 构建的系统发育树中 CCBAU35220、CCBAU51471 和 CCBAU51276 均与 *M. plurifarium* 位于同一系统发育分支; CCBAU61139、CCBAU35085、CCBAU35234 分别与 *A. tumefaciens*、*B. yuanmingense* 和 *B. elkanii* 位于统一亚分支上, 可以较肯定地确定这些菌株所代表菌群的种群地位。CCBAU61158、CCBAU43060 和 CCBAU61178 在 3 个系统发育树中属内种间亲缘关系不一致, 则需要通过其它的方法才能准确确定其分类地位, 如通过表型特征、全细胞蛋白电泳、脂

肪酸分析、DNA-DNA 杂交等方法最终确定 CCBAU61158 代表的菌群为 *Mesorhizobium* 属的一个新种, 命名为 *M. albiziae*<sup>[14]</sup>。

目前原核生物种群确定依赖于表型特征、遗传特征以及 DNA 同源性分析等。其中 DNA 同源性是细菌新种群确定的必要标准之一。但 DNA 同源性分析各方法均存在一定的问题, 如操作复杂、费时耗力、测定结果误差较大、不同实验室测定的结果之间无法比较, 染色体外的 DNA 会影响种群地位的确定等, 探索快速而准确的能够替代 DNA-DNA 杂交的方法势在必行。多序列位点分型(Multilocus Sequence Typing, MLST)技术是利用测序技术对细菌的染色体上不同位点的保守基因序列进行比较分析, 以确定各种细菌的亲缘关系和分类地位<sup>[16,17]</sup>。该技术为细菌种或种内水平基因组相关性研究开辟了新的视野, 国际细菌分类委员会建议对位于染色体不同位点的持家基因序列(至少 5 个基因)进行分析, 寻找合适的序列相似性水平用于细菌种群的确定, 以代替 DNA-DNA 同源性测定, 该方法还在探索之中<sup>[18]</sup>。因此, 利用位于基因组不同位置的多种功能保守的基因来确定细菌的系统发育和分类地位, 是细菌分类发展的一个方向<sup>[19]</sup>, *atpD* 和 *gln* 可作为该项研究的可选基因。

### 参 考 文 献

- [1] 陈文新, 汪恩涛, 陈文峰. 2004 根瘤菌 - 豆科植物共生多样性与地理环境的关系. 中国农业科学(Scientia Agricultura Sinica), 37(1): 81-86 .
- [2] 陈文新. 建议将豆科植物根瘤菌共生固氮体系的应用纳入西部打开规划. 科学时报, 2000 年 4 月 17 日第一版 .
- [3] Brown JR, Doolittle WF. Archaea and the prokaryote-to-eukaryote transition. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997, 61: 456-502.
- [4] Wolf YI, Rogozin IB, Grishin NV, et al. Genome trees and the tree of life. *Trends in Genetics*, 2002, 18: 472-479.
- [5] Wolf YI, Rogozin IB, Grishin NV, et al. Genome trees constructed using five different approaches suggest new major bacterial clades. *BMC Evol Biol*, 2001, 1: 8-29.
- [6] Wang FQ, Wang ET, Zhang YF, et al. Characterization of Rhizobia Isolated from Albizia spp. in Comparison with Microsymbionts of Acacia spp. and Leucaena leucocephala Grown in China. *System Appl Microbiol*, 2006, 29: 502-517.
- [7] Gaunt MW, Turner SL, Rigottier-Gois L, et al. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, 51: 2037-2048.
- [8] Turner SL, Young JPW. The glutamine synthetases of rhizobia: Phylogenetics and evolutionary implications. *Mol Biol Evol*, 2000, 17: 309-319.
- [9] 刘杰, 陈文新. 我国中东部地区紫穗槐、紫荆、紫藤根瘤菌数值分类及 16S rDNA PCR-RFLP 研究. 中国农业科学(Scientia Agricultura Sinica), 2003, 36(1): 17-25 .
- [10] Wernergreen JJ, Riley MA. Comparison of the evolutionary dynamics of symbiotic and housekeeping loci: a case for the genetic coherence of rhizobial lineages. *Mol Biol Evol*, 1999, 16: 98-113.
- [11] Eardly BD, Wang FS, van Berkum P. Corresponding 16S rRNA gene segments on *Rhizobiaceae* and *Aeromonas* yield discordant phylogenies. *Plant Soil*, 1996, 186: 69-74.
- [12] Haukka K, Lindström K, Young JPW. Diversity of partial 16S rRNA sequences among and within strains of African rhizobia isolated from *Acacia* and *Prosopis*. *System. Appl Microbiol*, 1996, 19: 352-359.
- [13] Sullivan JT, Eardly BD, van Berkum P, et al. Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 2818-2825.
- [14] Wang FQ, Wang ET, Liu J, et al. *Mesorhizobium albiziae* sp. nov., a novel bacterium that nodulates *Albizia kalkora* in subtropical region of China. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, 57: 1192-1199.
- [15] Rosseló-Mora R, Amann R. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*, 2001, 25: 39-67.
- [16] Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, et al. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci*, 1998, 95: 3140-3145.
- [17] Spratt BG. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. *Curr. Opin. Microbiol.* 1999, 2: 312-316.
- [18] Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, et al. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2002, 52: 1043-1047.
- [19] Vinuesa P, Silva C. Species delineation and biogeography of symbiotic bacteria associated with cultivated and wild legumes. In: Werner D. ed. Biological Resources and Migration, Berlin: Springer Verlag, 2004, 143-161.

## Comparison of phylogeny analysis methods for rhizobia asolated from *Albizia* spp., *Acacia* spp. and *Leucaena leucocephala*

Fengqin Wang<sup>1,2</sup>, Yongfa Zhang<sup>2,3</sup>, Jie Liu<sup>2,4</sup>, Andong Song<sup>1</sup>, Quanjun Liu<sup>1</sup>, Wenxin Chen<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

(<sup>2</sup> Key laboratory of Agro-Microbial Resource and Application, Ministry of Agriculture; College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China.)

(<sup>3</sup> College of Life Science, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

(<sup>4</sup> Department of Bioengineering and Biotechnology, College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science & Technology, Qingdao 266042, China)

**Abstract:** Multilocus house-keeping gene sequence analysis is a hotspot of taxonomy and phylogeny of prokaryotes. In this research, we used *atpD* and *gln II* gene sequences to analyze the phylogeny of nine rhizobia strains of *Albizia* spp., *Acacia* spp. and *Leucaena leucocephala* and compared the results to that of 16S rDNA. The phylogenetic relationships based on the sequence analysis of these three genes were congruent at the genera level. CCBAU43060 and CCBAU 61139 were located in the branch of *Rhizobium-Agrobacterium*. CCBAU51471, CCBAU35220, CCBAU51276 and CCBAU61158 belonged to the genera of *Mesorhizobium*. CCBAU35234, CCBAU61178 and CCBAU35085 were assigned to *Bradyrhizobium*. Differences were found for some strains, for example CCBAU 61158, CCBAU43060, CCBAU61178, at the species level. Insertion fragment and mosaic gene were also found in some isolates. These results indicated that there was recombination between species in the same genera. It is reliable to determine the taxonomy status at genera levels based on the sequence analysis of 16S rDNA. If the relationships between strains belonging to the same genera were studied using the phylogeny methods, researches should be carried out with more than one house-keeping genes.

**Keywords:** rhizobia; *atpD*; *gln* ; phylogeny

Supported by the National Natural Science Foundation of China (project no. 30400001)

\*Corresponding author: Tel: +86-10-62731854; Fax: +86-10-62734008; E-mail: wenxin\_chen@263.com

Received: 3 September 2007/Revised: 18 October 2007

### 2008年起《微生物学报》改为月刊

自2004年《微生物学报》改为大开本(8个印张128页)以来,已经连续两次扩版(2005~2006年为160页,2007年为176页),发表周期有了明显的缩短。但是,由于近年来稿量不断增长,发表周期不得不再度延长,目前的双月刊已无法满足广大作者和读者的需要。为了加快科技信息更新速度,与国际接轨,在编辑部提议下,经主办单位同意并报主管部门正式批准,本刊自2008年开始将1989年以来一直沿用了19年的双月刊改为月刊(9个印张144页),发行日还是4日。

希望广大作者和读者一如既往地支持《微生物学报》!