

海南地区溶藻弧菌遗传多样性的 RAPD 分析

欧阳吉隆, 周永灿, 吴学贵, 戴小连, 王世锋, 谢珍玉

(海南大学 海南省热带水生生物技术重点实验室, 海南 海口 570228)

摘要: 以来源于泰国的菌株 TG06003 作对照, 对采自海南地区的 27 株溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*) 环境菌株进行了随机扩增多态性 DNA 标记(RAPD)分析, 其中 6 株为毒力菌株, 另外 22 株为非毒力菌株。实验共得到 70 个多态性条带, 多态性比率(PPB)为 98.6%。基因多样度的算术平均数和加权平均数分别为 0.922 和 0.454 4, Shannon's 信息指数的算术平均数和加权平均数分别为 0.139 1 和 0.171 3。遗传相似度为 0.442 9~0.885 7, 遗传距离为 0.121 4~0.752 0。将溶藻弧菌分为毒力菌株和非毒力菌株两个类群进行分析, 结果表明, 毒力菌株的遗传多样性丰富, 它们的基因多样度和 Shannon's 信息指数明显高于非毒力菌株; 毒力菌株 HN08811、HN08155、HN08809、HN08813 明显聚为一类, 另外 2 株毒力菌株分别与非毒力菌株 HN08304 和 HN08803 聚为一类, 溶藻弧菌毒力菌株存在多种遗传型。

关键词: 溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*); RAPD; 毒力菌株; 遗传多样性

中图分类号: S941.42

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2011)07-0030-07

溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)属于弧菌科(Vibrionaceae), 弧菌属(*Vibrio*), 革兰氏阴性短杆菌, 是海洋及河口环境中常见细菌种类, 广泛存在于海水养殖环境^[1]。该菌是一种条件致病菌, 严重威胁着海南的海水养殖业, 是凡纳滨对虾^[2](*Penaeus vannamei* Boone)、鲑点石斑鱼^[3](*Epinephelus fario*)、点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)^[4]、杂色鲍^[5](*Haliotis diversicolor*)等养殖品种的常见细菌性病原之一。2006 年至 2008 年间, 本实验室人员在海南岛及周边地区的主要海水养殖区采集并分离了 28 株溶藻弧菌, 经人工感染, 确定 6 株为毒力菌株, 另外 22 株为非毒力菌株。作者采用随机扩增多态性 DNA 标记(RAPD)技术, 分析毒力菌株与非毒力菌株的遗传多样性, 旨在揭示溶藻弧菌毒力菌株特异遗传型及其特异性分子标记, 为今后开展因溶藻弧菌引发的重大流行病的防治和其致病机理研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

共 28 株溶藻弧菌, 其中 27 株(表 1)采自海南岛, 另 1 株(TG06003)采自泰国, 分别为 HN08811、HN08155、HN08809、HN08813、HN08335、HN07006、HN08304、TG06003、HN08307、HN08810、HN08806、HN08803、HN08808、HN07011、HN08202、HN08801、HN07014、HN08303、HN08203、HN08805、HN08306、

HN07009、HN07005、HN07002、HN08201、HN07010、HN08305、HN08807, 由本实验室分离、鉴定及保种。鉴定方法参照谢珍玉等^[6]的方法。Taq 酶、dNTPs、MgCl₂ 购自上海申能博彩公司。DNA Maker(DL2000)购自大连宝生物公司。70 条 RAPD 引物(表 2)由上海生工合成。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 的提取

将保种的菌株接种于 2216E 海水营养培养基中, 35℃, 180 r/min 振荡培养 12 h。取 1.5 mL 菌液 4 000 r/min 离心 1 min, 去上清, 以 1 mL 无菌水洗洗涤细菌。细菌基因组 DNA 提取采用 SDS 裂解法^[7-8], 加入 50 μL TE 缓冲液, 储存于 4℃ 冰箱备用。

1.2.2 RAPD 扩增

RAPD 扩增方法主要参考陈偿等^[9]的方法并作适当改良。扩增体系为: 0.4 μL Taq 酶(5U/μL)、1 μL dNTPs(10 mmol/L)、2.5 μL buffer (含 MgCl₂)、1 μL 引物(100 μmol/L)、1 μL DNA 模板(基因组 DNA 稀释 10

收稿日期: 2010-09-12; 修回日期: 2011-03-21

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2009BAB44B02); 国家自然科学基金项目(30760190, 31060360); 霍英东教育基金会高等院校青年教师基金基础性研究课题(121030); 农业科技成果转化项目(2009GB2E200302)

作者简介: 欧阳吉隆(1986-), 男, 江西吉安人, 硕士研究生, 研究方向: 水生生物病害与控制, 电话: 15248929458, ouyangjilong23@yahoo.com.cn; 谢珍玉, 通信作者, 博士后, 副教授, xiezyscuta@163.com

倍), 加无菌水补至 25 μ L。PCR 反应在 Eppendorf Mastercycle Gradient PCR 扩增仪上进行。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 36 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 40 个循环, 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C

保存。首先以 HN08811、HN08155、HN08809、HN08307、HN08810 这 5 株细菌基因组 DNA 为模板作 PCR 扩增, 重复 3 次, 筛选特异性高且重复性好的引物进一步对所有菌株基因组 DNA 作扩增。

表 1 溶藻弧菌分离株的来源情况

Tab. 1 The sources of isolated *Vibrio alginolyticus*

菌株编号				采样时间(年-月)	采样地点	样品来源
HN08152	HN08155			2008-01	海南三亚	患病斜带石斑鱼及养殖水体
HN08201	HN08202	HN08203		2008-02	海南陵水	患病斜带石斑鱼及养殖水体
HN08303	HN08304	HN08305		2008-03	海南文昌	患病斜带石斑鱼及养殖水体
HN08306	HN08307					
HN08803	HN08805	HN08806	HN08807			
HN08808	HN08809	HN08810		2008-08	海南海口	患病斜带石斑鱼及养殖水体
HN08811	HN08813	HN088335				
HN07002	HN07005	HN07006		2007-05	海南陵水	患病斜带石斑鱼及养殖水体
HN07009	HN07010	HN07011	HN07014			

表 2 70 条 RAPD 引物

Tab. 2 70 RAPD primers

引物	序列	引物	序列	引物	序列
S103	agacgtccac	S2087	ccgtctatg	S335	cagggttttc
S11	gtagaccctgt	S2089	cccgtttcc	S36	agccagcgaa
S119	ctgaccagcc	S2090	aacgcggcct	S364	ccgcccaaac
S12	ccttgacgca	S2093	tcggtgagtc	S372	tggcctcac
S121	acggatcctg	S2094	ctttgcgcac	S377	cccagctgtg
S128	gggatatcgg	S2096	ctccacgact	S380	gtgtcgcgag
S13	ttcccccgct	S2098	ccaagccgtc	S42	ggaccaaac
S132	acggtaccag	S2099	aggccaacag	S420	aggtcttggg
S136	ggagtactgg	S21	caggcccttc	S44	tctgtgagg
S149	cttcacccga	S2100	caaaggcgtg	S49	ctctggagac
S15	ggagggtgtt	S2102	gacacactcc	S514	caggattccc
S14	tccgctctgg	S2103	tcccttgacc	S515	ggacaacgag
S152	ttatgcctcc	S225	tccgagagg	S53	ggggtgacga
S156	ggtgactgtg	S240	cagcatggtc	S55	catccgtgct
S158	ggactgcaga	S250	acctcgccac	S58	gagagccaac
S160	aacggtgacc	S262	accccgccaa	S73	aagcctcgtc
S171	acatgccgtg	S266	aggcccgatg	S76	cacactccag
S2008	ccacagccga	S268	gactgcctct	S80	acttcgccac
S2081	cactcctggt	S270	tcgcatccct	S81	ctacggagga
S2068	catacgggct	S275	acaccggaac	S85	ctgagacgga
S2082	acgcctgtag	S290	caaacgtggg	S9	tgggggactc
S2084	cccaagcgaa	S292	aagcctgcga	S93	ctctccgcca
S2045	gaggcgattg	S298	gtggagtcag		
S2085	ggaacgctac	S330	ccgacaaacc		

1.2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 在凝胶成像系统(Universal Hood II, Biorad)上观察记录实验结果。

1.2.3 数据处理

电泳图中相同迁移位置上有条带的记 1、无条带的记 0, 以 1、0 数列矩阵形式记录 PCR 产物的扩增

位点。利用 popgene 32 软件对数据进行分析, 得出 Nei's 基因多样性、Shannon's 信息指数、遗传相似度、遗传距离等数据, 并根据遗传距离利用 Mega 4 构建 UPGMA 系统进化树^[10-12]。

2 实验结果

2.1 RAPD 引物筛选和扩增产物多态性

从 70 条引物中筛选并获得 8 条特异性高且重复性好的引物, 具体见表 3。引物 S2103、S2084 和 S330 的电泳指纹图谱分别见图 1、图 2 和图 3。

8 条随机引物共产生了 71 条带, 其中多态性条带 70 条, 多态性比率(PPB)为 98.6%。平均每条引物产生了 7.8 条多态性条带, 产物大小在 100~2 000 bp 之间。Nei's 基因多样性的算术平均数为 0.922, 加权平均数为 0.454 4。Shannon's 信息指数的算术平均数为 0.139 1, 加权平均数为 0.171 3。遗传相似度为 0.442 9~0.885 7, 遗传距离为 0.121 4~0.752 0。以引物 S330 扩增时, 毒力菌株 HN08811、HN08155、HN08809 和 HN08813 基因组产生了分子质量约为 1 200 bp 的特异性条带。

2.2 毒力菌株和非毒力菌株的遗传多样性分析

毒力菌株和非毒力菌株的遗传统计数据详见表 4。将毒力菌株和非毒力菌株分为两个类群进行数据分析, 毒力菌株产生了 54 个多态性位点, 非毒力菌株产生了 59 个多态性位点。毒力菌株的 Nei's 基因多样性的算术平均数与加权平均数以及 Shannon's 信息指数的算术平均数与加权平均数分别为 0.301 6、

表 3 筛选引物名称与扩增结果

Tab. 3 The coding of primers and the amplification results

引物	扩增条带数 (条)	多态条带数 (条)	产物大小 (bp)
S268	8	8	200~2 000
S262	9	8	100~1 500
S2100	7	7	200~1 500
S2008	11	11	100~2 000
S2103	11	11	100~2 000
S2082	7	7	200~2 000
S330	8	8	200~1 500
S2084	10	10	200~2 000

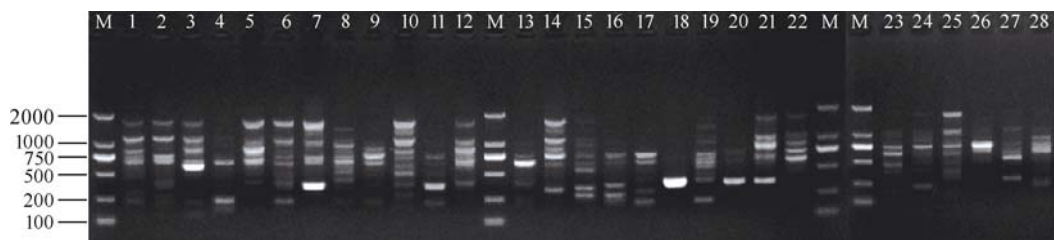


图 1 引物 S2103 对 28 株溶藻弧菌的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification profiles of 28 strains of *Vibrio alginolyticus* by primer S2103

M 代表 Maker DL2000, 1-28. 分别代表菌株 HN08811、HN08155、HN08809、HN08813、HN08335、HN07006、HN08304、TG06003、HN08307、HN08810、HN08806、HN08803、HN08808、HN07011、HN08202、HN08801、HN07014、HN08303、HN08203、HN08805、HN08306、HN07009、HN07005、HN07002、HN08201、HN07010、HN08305、HN08807



图 2 引物 S2084 对 28 株溶藻弧菌的 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification profiles of 28 strains of *Vibrio alginolyticus* by primer S2084

M 代表 Maker DL2000, 1-28. 分别代表菌株 HN08811、HN08155、HN08809、HN08813、HN08335、HN07006、HN08304、TG06003、HN08307、HN08810、HN08806、HN08803、HN08808、HN07011、HN08202、HN08801、HN07014、HN08303、HN08203、HN08805、HN08306、HN07009、HN07005、HN07002、HN08201、HN07010、HN08305、HN08807

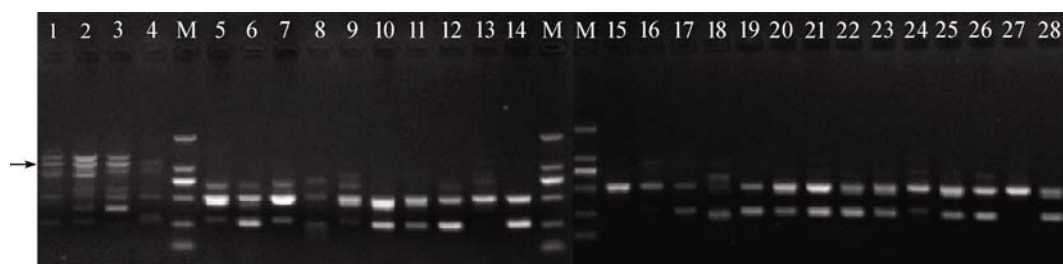


图3 引物 S330 对 28 株溶藻弧菌的 PCR 扩增结果

Fig. 3 PCR amplification profiles of 28 strains of *Vibrio alginolyticus* by primer S330

M 代表 Maker DL2000, 1-28. 分别代表菌株 HN08811、HN08155、HN08809、HN08813、HN08335、HN07006、HN08304、TG06003、HN08307、HN08810、HN08806、HN08803、HN08808、HN07011、HN08202、HN08801、HN07014、HN08303、HN08203、HN08805、HN08306、HN07009、HN07005、HN07002、HN08201、HN07010、HN08305、HN08807。黑色箭头所指的条带为毒力菌株 HN08811、HN08155、HN08809 和 HN08813 的特异性条带

表4 溶藻弧菌毒力菌株和非毒力菌株的遗传统计数据

Tab. 4 Genetic statistics of virulent strains and non-virulent strains of *Vibrio alginolyticus*

类群	基因多样性		Shannon's 信息指数		多态性位点
	H-mean	H-St.Dev	I-mean	I-St.Dev	
毒力菌株	0.301 6	0.184 5	0.444 1	0.259 7	54
非毒力菌株	0.255 6	0.162 5	0.397 4	0.224 6	59
所有菌株	0.292 2	0.139 1	0.454 4	0.171 3	70

注: H=Nei's (1973) gene diversity, I=Shannon's information index [Iewontion (1972)]

0.444 1、0.184 5 和 0.259 7, 非毒力菌株对应的数据分别为 0.255 6、0.397 4、0.162 5 和 0.224 6。毒力菌株的两种 Nei's 基因多样性和两种 Shannon's 信息指数均高于非毒力菌株。毒力菌株之间的遗传相似度为 0.514 3~0.757 1, 遗传距离为 0.278 2~0.665 0, 非毒力菌株之间的遗传相似度为 0.471 4~0.885 7, 遗传距离为 0.121 4~0.752 0。

利用 UPGMA 法对 28 株溶藻弧菌进行聚类分析(图 4), 其中 4 株毒力菌株(HN08811、HN08155、HN08809、HN08813)的亲缘关系很近, 明显聚为一类。图 3 中黑色箭头所指的条带是该类菌株的特异多态性条带; 毒力菌株 HN08335 与非毒力菌株 HN08803 聚为一类, 它们的遗传相似度和遗传距离分别为 0.814 3 和 0.205 4; 毒力菌株 HN07006 与非毒力菌株 HN08304 聚为一类, 它们的遗传相似度和遗传距离也分别为 0.814 3 和 0.205 4。毒力菌株 HN08335 和 HN07006 与另外 4 株毒力菌株的遗传相似度和遗传距离详见表 5。

3 讨论

Warner 等^[13]认为包括溶藻弧菌在内的多种弧菌具有很强的遗传多样性; Ripabelli^[14]和 George^[15]的实验都证明相同生物来源的溶藻弧菌菌株具有明

显差异; 陈偿等^[8]发现, 海南省三亚与陵水地区的高密度对虾养殖场中, 溶藻弧菌的基因型也表现为较高的多样性。本实验结果表明, 溶藻弧菌变异性强, 6 株毒力菌株之间的遗传距离变幅为 0.242 8, 22 株毒力菌株之间的遗传距离变幅为 0.630 6, 菌株遗传多样性丰富, 这与前人的研究结果基本一致; 而且, 毒力菌株的 Nei's 基因多样性和 Shannon's 信息指数都明显高于非毒力菌株, 这很可能是由于毒力菌株比非毒力菌株变异性更高所致。前人的研究表明, 溶藻弧菌的毒力基因主要存在于基因组中, 而与质粒无关^[16-17]。因此, 作者推测溶藻弧菌的毒力相关功能基因可能是导致毒力菌株与非毒力菌株之间产生明显遗传差异主要原因之一, 这些毒力相关功能基因应该存于染色体基因组中, 而且, 溶藻弧菌毒力基因系统并非简单的由一个或者几个基因构成, 更可能是由许多相关基因^[18-20]组成, 这些基因直接影响整个基因组遗传多样性。

本实验结果还表明, 在遗传距离为 0.21 处, 所有菌株可分为 4 个组, 其中第 1 组含有 2 株毒力菌株(HN08335 和 HN07006)和 20 株非毒力菌株; 第 2 组只含有 1 株细菌, 即 TG06003, 表明来源于泰国的菌株与海南地区的菌株遗传差异较大, 属于不同的地理种群; 第 3 组也只含有 1 株细菌, 为 HN08303, 这

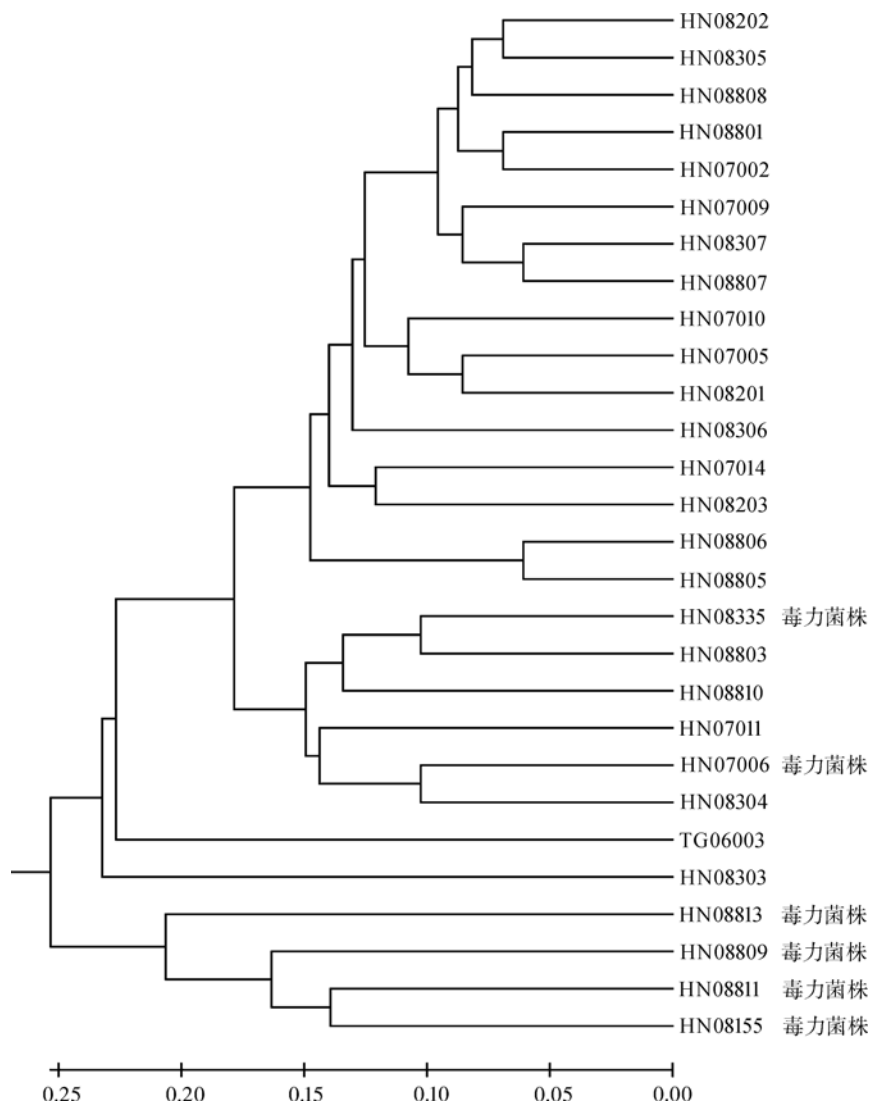


图 4 溶藻弧菌的 UPGMA 亲缘关系聚类图
Fig. 4 The UPGMA dendrogram of vibrio alginolyticus

表 5 溶藻弧菌毒力菌株之间的遗传多样度和遗传距离
Tab. 5 Genetic diversity and genetic distances among virulent strains of *Vibrio alginolyticus*

毒力菌株	HN08811	HN08155	HN08809	HN08813	HN08835	HN07006
HN08811	—	0.757 1	0.728 6	0.671 4	0.628 6	0.642 9
HN08155	0.278 2	—	0.714 3	0.657 1	0.557 1	0.542 9
HN08809	0.316 7	0.336 5	—	0.657 1	0.528 6	0.514 3
HN08813	0.398 3	0.419 9	0.419 9	—	0.642 9	0.571 4
HN08835	0.464 3	0.584 9	0.637 6	0.441 8	—	0.757 1
HN07006	0.441 8	0.610 9	0.665	0.559 6	0.278 2	—

注：表格对角线上数据为遗传多样度，对角线下数据为遗传距离

一菌株也与其他菌株差异较大；第 4 组则只含有 4 株毒力菌株，即 HN08811、HN08155、HN08809、HN08813，表明这 4 株细菌与其他 24 株的遗传差异较大，为一个相对独立的遗传型。本实验室采用抑制性差减杂交技术，以非毒力菌株 HN08801 为驱动子 (Driver)，构建了毒力菌株 HN08155 差减基因组文库，

从中获得了 80 个可能与毒力相关基因片段,并以上述 80 个毒力相关基因对这 28 个菌株作了基因型分析,结果也表明,HN08155、HN08809、HN08811、HN08813 这 4 株毒力菌株的亲缘关系更近(结果正在整理中)。因此,尽管溶藻弧菌不同菌株之间的变异性可能很高,但还是存在同一遗传型毒力菌株的可能。同时,本实验确定了 HN08155、HN08809、HN08811、HN08813 这 4 株毒力菌株的特异性条带(图 3),该条带可以作为鉴定这类遗传型毒力菌株的分子标记,可用于因这类遗传型溶藻弧菌引发的重大流行病的快速诊断。

参考文献:

- [1] 陶保华, 胡超群, 任春华. 海水鱼类病原弧菌对对虾的致病力及其疫苗的免疫预防作用[J]. 热带海洋学报, 2001, 20(4): 68-73.
- [2] 温崇庆, 薛明, 何红, 等. 两株对虾幼体弧菌病原的分离和鉴定[J]. 微生物学通报, 2008, 35(3): 346-352.
- [3] 黄志坚, 何建国. 鲑点石斑鱼细菌病原的分离鉴定的致病性[J]. 中山大学学报, 2002, 41(5): 64-67.
- [4] 陈晓燕, 胡超群, 陈偿, 等. 人工养殖点带石斑鱼弧菌病原菌的分离及鉴定[J]. 海洋学报, 2003, 27(6): 68-72.
- [5] 周晶, 蔡俊鹏, 杨洪志. 南方杂色鲍大规模死亡病原菌的分原鉴定及其回归感染实验[J]. 海洋湖沼通报, 2006, 03: 54-59.
- [6] Xie Z Y, Hu C Q, Chen C, et al. Investigation of seven *Vibrio* virulence genes among *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* strains from the coastal mariculture systems in Guangdong, China[J]. Letters in Applied Microbiology, 2005, 41(2): 202-207.
- [7] 李钧敏. 土壤可培养细菌 DNA 的提取及 RAPD 条件的优化[J]. 微生物学通报, 2003, 30(5): 5-9.
- [8] Picard C, Ponsonnet C, Paget E, et al. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(9): 2717-2722.
- [9] 陈偿, 胡超群, 张吕平, 等. 用 RAPD 技术对养殖环境溶藻弧菌遗传多样性的研究[J]. 热带海洋学报, 2002, 21(4): 49-54.
- [10] 江香梅, 温强, 叶金山, 等. 闽楠天然种群遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 生态学报, 2009, 29(1): 438-444.
- [11] 谢珍玉, 郑成木, 单加林. 海南部分野生菊科植物类缘关系的 RAPD 分析[J]. 海南大学学报(自然科学版), 2006, 24(3): 317-321.
- [12] Høi L, Dalsgaard A, Larsen J L, et al. Comparison of Ribotyping and randomly amplified polymorphic DNA PCR for characterization of *Vibrio vulnificus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(5): 1674-1678.
- [13] Warner J M, Oliver J D. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of clinical and environmental isolates of *Vibrio vulnificus* and other vibrio species[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(3): 1141-1144.
- [14] Ripabelli G, Sammarco M L, McLauchlin J, et al. Molecular characterisation and antimicrobial resistance of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio alginolyticus* isolated from mussels (*Mytilus galloprovincialis*) [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2003, 26(1): 119-126.
- [15] George M R, John K R, Iyappan T, et al. Genetic heterogeneity among *Vibrio alginolyticus* isolated from shrimp farms by PCR fingerprinting[J]. Letters in Applied Microbiology, 2005, 40(2): 369-372.
- [16] 谢珍玉, 胡超群. 弧菌毒力基因水平转移与进化的进展[J]. 海热海洋学报, 2005, 24(3): 86-95.
- [17] Zorrilla I, Morínigo MA, Castro D, et al, 2003. Intraspecific characterization of *Vibrio alginolyticus* isolates recovered from cultured fish in Spain [J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 95(5): 1106-1116.
- [18] 钱荣华, 于涟, 毛芝娟, 等. 溶藻弧菌铁调蛋白基因的克隆表达及其特征分析[J]. 科技通报, 2007, 23(5): 651-657.
- [19] 蔡双虎, 鲁义善, 吴灶和, 等. 溶藻弧菌 *asp* 基因在大肠杆菌中表达活性研究及条件优化[J]. 广东海洋大学学报, 2008, 28(3): 45-49.
- [20] Cai S H, Wu Z H, Jian J C, et al. Cloning and expression of the gene encoding an extracellular alkaline serine protease from *Vibrio alginolyticus* strain HY9901, the causative agent of vibriosis in *Lutjanus erythopterus* (Bloch) [J]. Journal of Fish Diseases, 2007, 30(8): 493-500.

RAPD analysis of genetic diversity of *Vibrio alginolyticus* isolated from Hainan province

OU YANG Ji-long, ZHOU Yong-can, WU Xue-Gui, DAI Xiao-lian, WANG Shi-feng, XIE Zhen-yu

(Hainan University, Key Laboratory of Tropical Aquatic Biotechnology of Hainan Province, Haikou 570228, China)

Received: Sep., 12, 2010

Key words: *Vibrio alginolyticus*; RAPD, virulent strains; genetic diversity

Abstract: Taking the Thai strain TG06003 as a control, 27 strains of *Vibrio alginolyticus* collected from Hainan maricultural environment were analyzed using the random amplified polymorphic DNA marker (RAPD) method. Six strains were virulent and the other 22 strains were non-virulent. Seventy polymorphic bands were produced by PCR with eight selected primers, and the PPB was 98.6%. The arithmetic average and the weighted average of gene diversity were 0.922 and 0.454 4, respectively, and the arithmetic average and the weighted average of Shannon's information index were 0.1391 and 0.171 3, respectively. Distribution of genetic similarity was between 0.442 9 ~ 0.885 7, and genetic distances were distributed between the 0.121 4~0.752 0. Virulent strains HN08811, HN08155, HN08809, and HN08813 were clearly clustered together. However, the other two virulent strains were clustered with non-virulent strains. The gene diversity of virulent strains was high, and their genetic diversity and Shannon's information index were significantly higher than those of non-virulent strains. Our results indicate that virulent strains and non-virulent strains of *Vibrio alginolyticus* have multiple genetic types.

(本文编辑: 梁德海)

(上接第 29 页)

Isolation and biodiversity analysis of bacteria attached on the marine shellfish and selection of vibrios-antagmism bacteria

ZHANG Ke, DING Cui-ling, ZHANG Dong

(College of Marine ,Shandong University at Weihai, Weihai 264209, China)

Received: Oct., 12, 2010

Key words: bacterial diversity; marine shellfish; 16S rDNA; flora analysis; antagonistic

Abstract: A preliminary screening of bacteria attached on the marine shellfish from six marine shellfishes(*Mytilus edulis*, *Concha ostreae*, *Ruditapes variegata*, *Anadara uropygimelana*, *Placopecta magellanicus*, and *Ovula ovum*) in the coastal waters of Weihai yielded 100 isolates, among which 45 strains were selected for further analysis. To investigate the phylogenetic position of these strains, the 16S rDNA sequences were cloned, sequenced, and compared with those of related strains and a molecular phylogenetic dendrogram was constructed based on genetic distance analysis . The strains were classified as members of genera *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Bizionia*, *Brevundimonas*, *Cellulophaga*, *Cobetia*, *Gelidibacter*, *Kocuria*, *Krokinobacter*, *Lacinutrix*, *Marinobacter*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Paracoccus*, *Planomicrobium*, *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter*, *Salinibacterium*, *Shewanella*, *Tenacibaculum*, and *Vibrio*. The antimicrobial activity of the 100 strains were screened by the agar flat seeding method. The experiment results showed that 2 strains had obvious antimicrobial activity.

(本文编辑: 梁德海)