

## 哈维氏弧菌的分子遗传多样性研究

徐芝亮<sup>1,2</sup>, 吴灶和<sup>2,3</sup>, 简纪常<sup>1,2\*</sup>, 黄郁葱<sup>1,2</sup>

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088;

2. 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室暨  
广东高等学校水产经济动物病害控制重点实验室, 广东 湛江 524025;

3. 仲恺农业工程学院, 广东 广州 510225)

**摘要:** 运用 RAPD 分型和 BOX 分型分子方法研究患病的海水鱼类体内和海水环境的 101 株哈维氏弧菌的分子遗传多样性。结果显示, 从 10 个 RAPD 引物中发现只有 PM2 引物的分辨率和重复性较好, 出现 15 条不同 RAPD 条带, 在相似度 65% 下, 101 株哈维氏弧菌可以分为 18 种不同型; BOX 分型出现 20 条不同的条带, 在相似度为 40% 的情况下, 可以把 101 株哈维氏弧菌分 15 种不同的型; 综合 RAPD PM2 和 BOX 分型, 发现在相似度 50% 下, 101 株哈维氏弧菌可分 18 种型。综合 RAPD 和 BOX 分型数据可以很好地克服各自的缺点, 得到更加准确的分型结果。

**关键词:** 哈维氏弧菌; 海水鱼类; BOX 分型; RAPD 分型

**中图分类号:** Q 933; S 917.4

**文献标志码:** A

随着水产养殖规模扩大和全球气候变暖, 养殖环境持续恶化, 海水养殖中细菌病暴发性流行, 已成为制约全球海水养殖业可持续健康发展的重要因素, 严重制约着海水养殖业的发展。弧菌病是海水动物养殖中危害最为严重的病害之一。该病呈现传播速度快, 病程短的趋势。哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 是引起弧菌病暴发的主要病原, 是一种人、水生动物共感染菌, 广泛存在于海水、近岸浮游生物和海洋动物中; 在水温高于 20 °C 时哈维氏弧菌可以大量繁殖, 能够感染多种海洋脊椎动物和无脊椎动物<sup>[1-3]</sup>。该病原菌在世界范围内都有出现, 主要分布在印度、泰国、澳大利亚、厄瓜多尔及中国等国家和地区; 其危害对象主要有甲壳类<sup>[4-10]</sup> 如凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*), 海水鱼如大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)<sup>[11]</sup>、大西洋棘白鲷 (*Chaetodi pterus faber*)、银色鲮 (*Mugil curema*)<sup>[12]</sup>、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[13]</sup> 等。

近年来, 哈维氏弧菌病频繁暴发, 但防治措

施目前仍不佳。因此, 建立一种简单、快速、可靠、实用的分型方法已迫在眉睫, 这对哈维氏弧菌病的流行病学研究也有十分重要的意义。本研究综合了 RAPD 分型和 BOX 分型两种分子分型数据对哈维氏弧菌分子遗传多样性进行研究, 为探讨哈维氏弧菌分子多样性提供理论依据, 也为哈维氏弧菌所引起疾病的防控提供参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要试剂

PCR 所用试剂购于大连宝生物技术有限公司; 琼脂糖购于 Pharmacia 公司; DNA 提取试剂盒购于北京全式金生物技术有限公司; TSB 培养基; 2216 培养基; 0.1 mol/L PBS 缓冲液。

#### 1.2 菌株的培养与基因组 DNA 的准备

用于本研究的菌株是采集于广东、海南、广西等地患病的海水鱼类或是养殖区海水中分离获得 101 株鉴定为哈维氏弧菌(表 1)。

收稿日期: 2011-12-03 修回日期: 2012-03-03

资助项目: 广东省科技计划国际合作项目(2009B050700040); 国家“九七三”前期专项(2011CB111601); 广东省科技计划重大项目(20080100014)

通讯作者: 简纪常, E-mail: jianjc@gmail.com

表 1 哈维氏弧菌详情  
Tab.1 List showing details of *V. harveyi* isolates

采集点 sampling site	宿主 isolated from	编号 isolate number	RAPD 和 BOX 综合型 RAPD and BOX cluster
广东 (n = 68) Guangdong	眼斑拟石首鱼 <i>Sciaenops ocellatus</i>	1205、1209、1213、1215、1227、1228、1229、1233、 1236、1242、1244、1246、1247、1248、1249、1252、 1253、1260、1286、1292、1293、1298	C1、C2(2)、C3(2)、C4、C6、C8、C9、 C10(4)、C12(2)、C13(2)、C14、 C16、C17、C18(4)
	红笛鲷 <i>Lutjanus sanguineus</i>	1210、1211、1234、1237、1238、1250、1251、1254、 1256、1257、1265、1277、1280、1281、1283、1287、 1290、1294、1295、1296、1297	C2、C9(3)、C10、C12、C13(4)、 C14(2)、C16、C17(2)、C18(4)
	褐篮子鱼 <i>Siganus fuscenssens</i>	1217、1223、1232、1240、1263、1288、1299	C1、C7、C8、C10、C18(3)
	斜带石斑鱼 <i>Epinephelus coioides</i>	1224、1225、1230、1231、1245、1259、1261、1262	C5、C10、C11(2)、C13、C14、C16 (2)、C18
	鲮 <i>Mugil cephalus</i>	1267、1279	C12、C18
	绿鳍马面鲀 <i>Navodon septentrionalis</i>	1235	C15
	卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	1241、1258、1264	C2、C14、C18
	鲈 <i>Lateolabrax japonicus</i>	1289	C18
	海水 seawater	1268、1269、1270	C1、C16、C18
	海南 (n = 17) Hainan	红笛鲷 <i>L. sanguineus</i>	1201、1202、1239
星点笛鲷 <i>Lutianusstellatus Akazaki</i>		1203、1204	C13(2)
褐篮子鱼 <i>S. fuscenssens</i>		1207	C13
斜带石斑鱼 <i>E. coioides</i>		1212	C13
豹纹棘刺鲈 <i>Plectropomus leopardus</i>		1214、1266	C4、C17
军曹鱼 <i>Rachycentron canadum</i>		1206、1216	C4、C14
眼斑拟石首鱼 <i>S. ocellatus</i>		1243、12100	C7、C8
海水 seawater		1271、1272、1273、1274	C12、C16(2)、C18
广西 (n = 16) Guangxi	眼斑拟石首鱼 <i>S. ocellatus</i>	1208、1255、1278	C14、C16、C18
	卵形鲳鲹 <i>T. ovatus</i>	1218、1219、1220	C5、C6(2)
	红笛鲷 <i>L. sanguineus</i>	1221、1222、1284、1285、1291	C7(2)、C8(2)、C18
	斜带石斑鱼 <i>E. coioides</i>	1226	C13
	海水 seawater	1275、1276、1282、12101	C12、C15、C18(2)

注:C 为菌株型号(出现次数),例 C10(2),C10 为菌株型号,2 为出现次数。

Notes:C for the strain model(times),such as C10(2),C10 for the strain model,2 for times.

把保存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  的哈维氏弧菌菌株接种到已经灭好菌的 TSB 液体培养基中在  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  的摇床中培养 12 ~ 16 h;培养的菌液经革兰氏染色及触酶检测无污染后,用 DNA 提取试剂盒提取菌株

基因组;并经电泳检测和分光光度计检测纯度后,保存在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下备用。

### 1.3 PCR 扩增 *toxR* 基因检测

分离菌株种的鉴定采用 *toxR* 基因特异性扩

增法进行,特异引物按文献[14],正向引物F序列为5'-GAAFCAGCACTCACCGAT-3',反向引物R序列为5'-GGTFAAGACTCATCAGCA-3'。

25  $\mu\text{L}$  反应体系:DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  Buffer ( $\text{Mg}^{2+}$  Plus) 2.5  $\mu\text{L}$ , dNTPs (各 2.5 mmol/L) 1.5  $\mu\text{L}$ , Ex *Taq* 酶 (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.25  $\mu\text{L}$ , 引物 各 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补足体系。扩增条件:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 55  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  再延伸 7 min。反应结束后,取 5  $\mu\text{L}$  于 1% 琼脂糖电泳检查结果。

#### 1.4 RAPD 分析

实验所用的 10 条 RAPD 随机引物由生工生物工程(上海)有限公司合成,引物序列见表 2。对 10 条引物进行筛选,选取最佳引物进行后续分型实验,RAPD 扩增反应体系为 25  $\mu\text{L}$ ,反应终浓度为 DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  Buffer ( $\text{Mg}^{2+}$  Plus) 2.5  $\mu\text{L}$ , dNTPs (各 2.5 mmol/L) 1.5  $\mu\text{L}$ , Ex *Taq* 酶 (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.25  $\mu\text{L}$ , 引物 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补足体系; 扩增条件为 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  再延伸 7 min。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖在 75 V 的电压下电泳,自动凝胶成像系统拍照,得到电泳图谱,运用 Gel-Pro analyzer 分析电泳图,运用 PAST 软件分析相似性。

#### 1.5 BOX 分析

用通用的引物 BoxA1R,对 101 株哈维氏弧菌进行 BOX-PCR 扩增; PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖在 75 V 的电压下电泳,自动凝胶成像系统拍照,得到电泳图谱,运用 Gel-Pro analyzer 分析电泳图,运用 PAST 软件分析相关性。

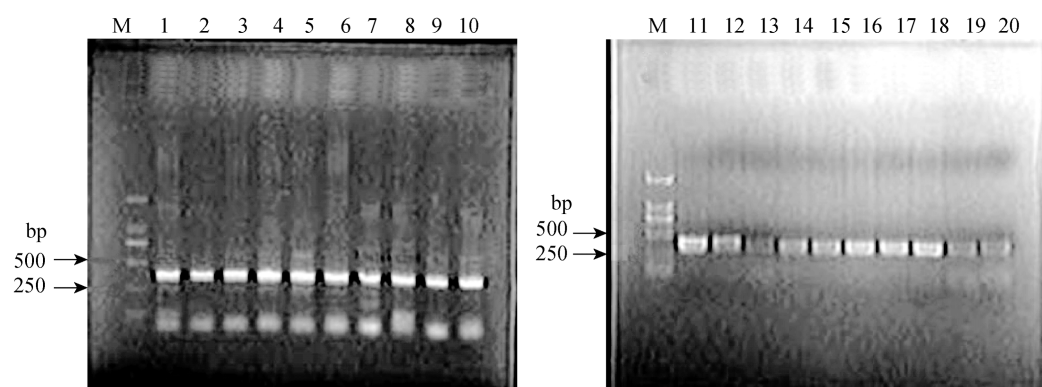


图 1 细菌 *toxR* 基因扩增部分结果

M. marker 2000; 1 ~ 20. 菌株 1201 ~ 1220。

Fig. 1 The part of PCR products of bacteria *toxR* gene

M. 2000 bp DNA ladder; 1 - 20. isolate number 1201 - 1220.

表 2 RAPD-PCR 所用引物

Tab. 2 Primers used in RAPD-PCR

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence	参考文献 reference
M1	GCCCCTGGAG	[15]
PM2	AACGGGCAGG	[15]
PM3	GGCTGCGGTA	[15]
PM4	GCGGAGGTCC	[15]
PM5	CGACGCCCTG	[15]
PM6	GCGTCGAGGG	[15]
CRA22	CCGCAGCCAA	[16]
CRA23	GCGATCCCA	[16]
CRA25	AACGCGCAAC	[16]
CRA26	GTGGATGCGA	[16]

BOX-PCR 反应体系为 25  $\mu\text{L}$ ,反应终浓度为 DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  Buffer ( $\text{Mg}^{2+}$  Plus) 2.5  $\mu\text{L}$ , dNTPs (各 2.5 mmol/L) 3  $\mu\text{L}$ , Ex *Taq* 酶 (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.25  $\mu\text{L}$ , BoxA1R 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补足体系; 扩增条件为 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  3 s, 92  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 52  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 65  $^{\circ}\text{C}$  8 min, 35 个循环; 65  $^{\circ}\text{C}$  再延伸 10 min。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增 *toxR* 基因检测

101 株哈维氏弧菌 PCR 扩增后,经电泳可发现在 382 bp 处均出现条带,随机挑取 10 株菌株条带,测序比对,与哈维氏弧菌的相似度在 95% 以上,进一步证实了 101 株菌均为哈维氏弧菌(图 1)。

## 2.2 RAPD 分型

选择 25 株菌株(菌株号:1201~1225)通过 PCR 对 10 条引物进行多次重复性扩增,发现引物 PM1、PM3、CRA22、CRA26 只出现 0~3 条带,且重复性较差,而引物 PM4、PM5、PM6、CRA23、CRA25 虽有 2~6 条条带出现,但是重复性仍较差;只有引物 PM2 的效果最佳,每株菌出现条带 3~8 条,且重复性较好。用引物 PM2 对 101 株菌株进行 PCR 扩增(图 2)。运用 Gel-Pro analyzer 分析电泳图,再运用 PAST 软件分析各个条带间的相关性,形成相关性树。在相似度 65% 下,101 株哈维氏弧菌可以分为 A1~A18,18 种不同型,以 A2 型和 A7 型为主,广东菌株以 A7 和 A10 为主,分别有 8 和 9 株;海南菌株主要以 A2 和 A7 为分别有 4 和 5 株;而广西菌株为 A10 型为主有 5 株。

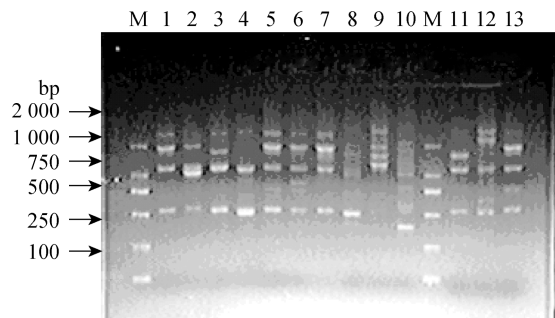


图 2 细菌 PM2 引物扩增结果

M. marker 2000; 1~13. 菌株 1205、1209、1210、1211、1215、1201、1202、1203、1204、1218、1219、1220、1221。

Fig. 2 The PCR products of bacteria primer PM2

M. 2000 bp DNA ladder; 1-13. isolate number 1205, 1209, 1210, 1211, 1215, 1201, 1202, 1203, 1204, 1218, 1219, 1220, 1221.

## 2.3 BOX 分型

用通用的引物 BoxA1R,对 101 株哈维氏弧菌进行 BOX-PCR 扩增,经电泳得到电泳图谱,发现各个菌株都能得到 5~14 条带(图 3)。运用 Gel-Pro analyzer 分析电泳图,再运用 PAST 软件分析各个条带间的相关性,形成相关性数;在相似度为 40% 的情况下,可以把 101 株哈维氏弧菌分为 B1~B15,15 种不同的型,主要有 6 种型为 B1、B5、B6、B7、B8、B10。广东菌株主以 B1、B5、B6、B8 型 3 种型为主,分别有 4、3、6、8 株;海南菌株以 B10 和 B13 型 2 种型为主,分别有 4 和 6 株;而广西菌株以为 B7 型为主,有 5 株。

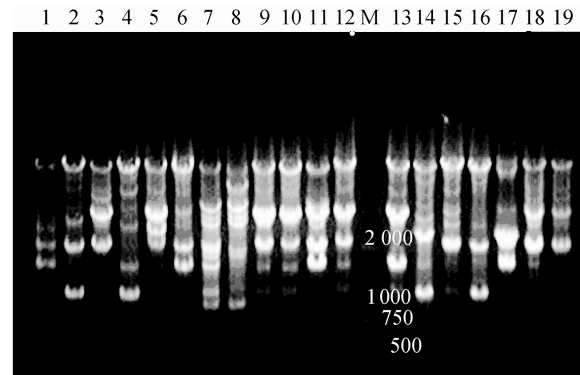


图 3 细菌 BoxA1R 引物扩增部分结果

M. marker 2000; 1~13. 菌株 1205、1209、1210、1211、1215、1280、1281、1282、1201、1202、1203、1204、1207、1212、1218、1219、1220、1221、1222。

Fig. 3 The part of PCR products of bacteria primer BoxA1R

M. 2000 bp DNA ladder; 1-13. isolate number 1205, 1209, 1210, 1211, 1215, 1280, 1281, 1282, 1201, 1202, 1203, 1204, 1207, 1212, 1218, 1219, 1220, 1221, 1222.

## 2.4 RAPD 和 BOX 分型综合分析

综合 RAPD 和 BOX 分型数据发现,在相似度为 50% 的情况下,可以把 101 株哈维氏弧菌分为 C1~C18,18 中不同的型,以 C13 和 C18 为主(图 4)。广东菌株以 C10、C13、C18 型 4 种型为主,分别有 7、7 和 15 株;海南菌株以 C13 型为主,有 6 株;而广西菌株以 C18 为主,有 4 株。

## 3 讨论

Goarant 等<sup>[17]</sup>利用 RAPD 对虾类的弧菌病原进行分子分型,发现在虾类弧菌病流行病学研究中,RAPD 是一种快速、有效的分型方法;而 Sudheesh 等<sup>[18]</sup>用 RAPD 方法对 24 株副溶血弧菌和溶藻弧菌进行分型,结果将 15 株副溶血弧菌和 9 株溶藻弧菌分为 2 个类型,其中溶藻弧菌又被分为 2 个亚组。本研究运用 RAPD 分型技术分析了 101 株哈维氏弧菌,结果显示在相似度 65% 下,101 株哈维氏弧菌可以分为 A1~A18,18 种不同型,以 A2 型和 A7 型为主,结果和 Wong 等<sup>[19]</sup>相似,他们应用 RAPD 分型技术对 308 株副溶血弧菌临床分离株进行分析,通过分析可得到 16 个型(A~P),其中以 A、B、C、D 和 E 5 种为主。故根据扩增产生条带大小数目的差异,可分析物种间亲缘关系或是不同种基因间的差异。此方法的优点在于它的简便性和快捷性(无需预先

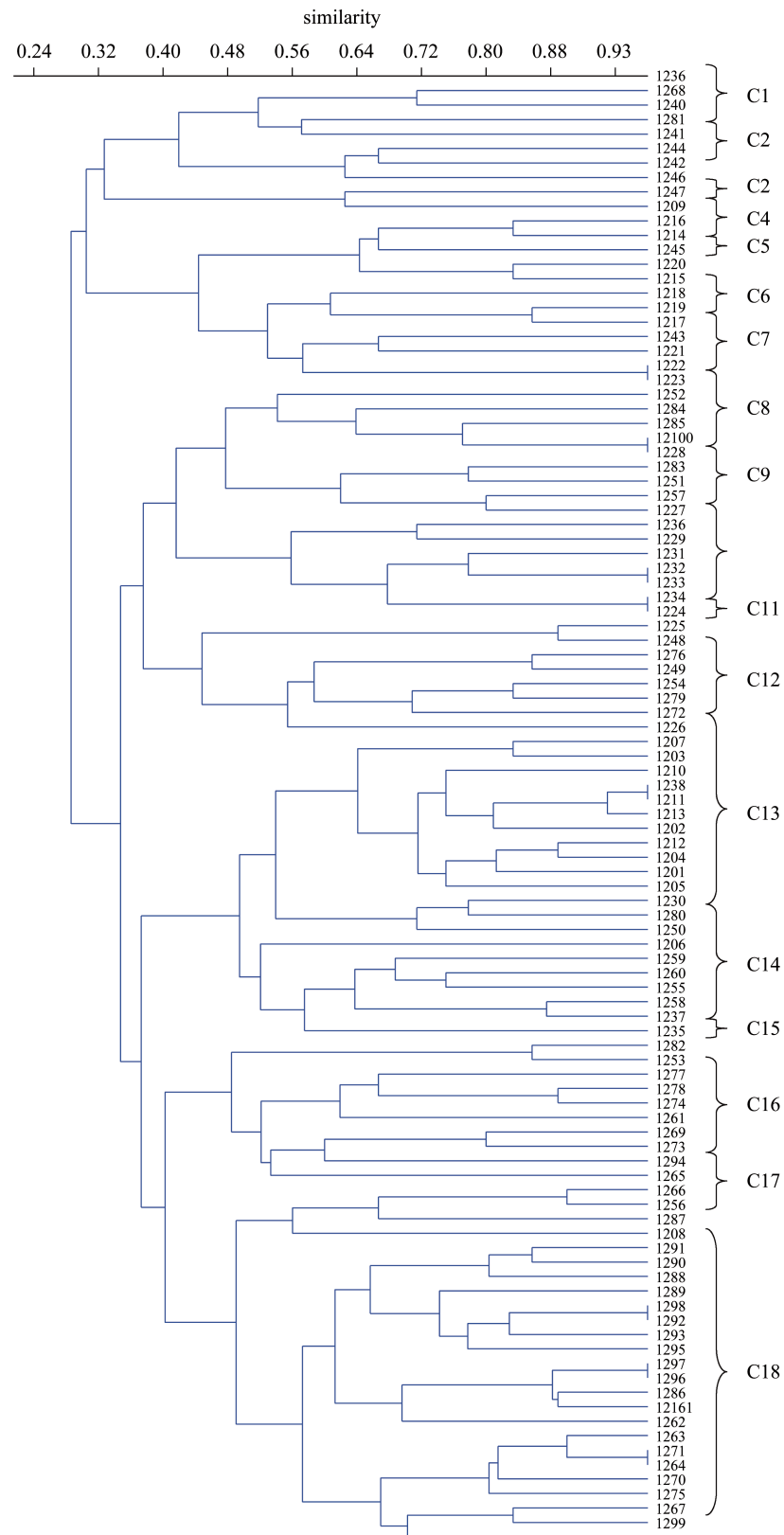


图4 细菌 RAPD 和 BOX 综合数据相似树

在相似度为 50% 分为 C1 ~ C18 型。

Fig.4 Combined dendrogram for *V. harveyi* isolates generated by combining the RAPD-PCR profiles and BOX profiles  
C1-C18 represent the different RAPD and BOX types resolved at 50% similarity.

了解目的基因和相应的序列);但由于该反应对条件依赖,不同的条件,不同的操作者会得出不同的结果,并扩增图谱受引物、模板浓度的比率、离子浓度、DNA 聚合酶等的影响;单个引物的分辨率较差,可以使用 2 个或 2 个以上引物提高分辨率。2009 年 Maiti 等<sup>[20]</sup>筛选了两个 RAPD 引物对 65 株哈维氏弧菌进行 RAPD 分型,从而提高了分辨率,但很难提高其可重复性。

Louws 等<sup>[21]</sup>采用 BOX-PCR 对多种植物病原体和假单胞菌进行分子分型分析,发现 BOX-PCR 能很好地反映出基因的结构,能对大量菌株进行分类分析。本研究用 BOX-PCR 对 101 株哈维氏弧菌进行分型分析,发现在相似度为 40% 的情况下,可以把 101 株哈维氏弧菌分为 B1 ~ B15, 15 种不同的型,主要有 6 种型为 B1、B5、B6、B7、B8、B10。该方法的优点在于实验条件和方法的确定性和可重复性强,但是由于引物的单一性,准确性较差。

为了克服 RAPD 分型和 BOX 分型上各自的缺点,本研究综合 RAPD 分型和 BOX 分型数据分析,把 101 株哈维氏弧菌分为 C1 ~ C18,以 C13 和 C18 为主。通过对综合 RAPD 分型和 BOX 分型数据,可以克服 RAPD 分型的随机性和 BOX 分型引物单一引起的准确性差,大大提高了分型数据的可重复性和准确性。

实验还发现,哈维氏弧菌的分子型可以多达十几种(C1 ~ C18),但是主要的还是以 2 ~ 3 种型(C13 和 C18)为主。这对于哈维氏弧菌的流行病学的研究奠定了基础,为哈维氏弧菌所引起的疾病疫苗的研制提供依据。

感谢实验室蔡双虎老师在论文修改中给予的指导和实验室其他老师在实验过程中给予的关心和帮助。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 刘秀珍,邹晓理,莫小燕,等. 海水网箱养殖石斑鱼病原菌研究[J]. 热带海洋,1994,13(1):81 - 86.
- [ 2 ] Yii K C, Lee K K. Isolation and characterization of *Vibrio carchariae* causative agent of gastroenteritis in the grouper *Epinephelus coioides* [ J ]. Current Microbiology, 1997, 35(12): 109 - 115.
- [ 3 ] 徐伯亥,殷战,吴玉深,等. 淡水养殖鱼类爆发性传染病致病菌的研究[J]. 水生生物学报,1993, 17(3): 259 - 266.
- [ 4 ] Vandenberghe J, Li Y, Verdonk L, et al. *Vibrio* associated with *Penaeus chinensis* ( Crustacea, Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries [ J ]. Aquaculture, 1998, 169(4): 121 - 132.
- [ 5 ] Jiravanichpaisal P, Miyazaki T, Limsuwan C. Histopathology, biochemistry and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon* [ J ]. Journal of Aquatic Animal Health, 1994, 6(8): 27 - 35.
- [ 6 ] Karunasagar I, Pai R, Malathi G R, et al. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection [ J ]. Aquaculture, 1994, 128(4): 203 - 209.
- [ 7 ] Pizzuto M, Hirst R G. Classification of isolates of *Vibrio harveyi* virulent to *Penaeus monodon* larvae by protein profile analysis and M13 DNA fingerprinting [ J ]. Diseases of Aquatic Organisms, 1995, 32(6): 151 - 155.
- [ 8 ] Liu P C, Lee K K, Yii K C, et al. Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased Kuruma prawns *Penaeus japonicus* [ J ]. Current Microbiology, 1996, 33(11): 129 - 132.
- [ 9 ] Robertson P A W, Calderon J, Carrera L, et al. Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae [ J ]. Diseases of Aquatic Organisms, 1998, 32(5): 151 - 155.
- [ 10 ] Alarez J D, Austin B, Alvarez A M, et al. *Vibrio harveyi*: a pathogen of penaeid shrimps and fish in Venezuela [ J ]. Fish Disease, 1998, 21(9): 313 - 316.
- [ 11 ] 毛芝娟,刘国勇,陈昌福. 大黄鱼溃疡病致病菌的初步分离与鉴定[J]. 安徽农业大学学报, 2002, 29(2): 178 - 181.
- [ 12 ] Saeed M O. Association of *Vibrio harveyi* with mortalities in cultured marine fish in Kuwait [ J ]. Aquaculture, 1995, 136(8): 21 - 29.
- [ 13 ] Zhang X H, Austin B. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids [ J ]. Fish Disease, 2000, 23(3): 93 - 102.
- [ 14 ] Pang L, Zhang X H, Zhong Y, et al. Identification of *Vibrio harveyi* using PCR amplification of the toxR gene [ J ]. Microbiology, 2006, 43(9): 249 - 255.
- [ 15 ] Tassanakajon A, Pongsomboon S, Rimphanitchayakul V, et al. Random amplified polymorphic DNA ( RAPD ) markers for determination of genetic variation in wild population of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand [ J ]. Molecular

- Marine Biology and Biotechnology, 1997, 6(12): 110 – 115.
- [16] Neilan B A. Identification and phylogenetic analysis of toxigenic cyanobacteria by multiplex randomly amplified polymorphic DNA PCR [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61 ( 7 ): 2286 – 2291.
- [17] Goarant C, Merien F, Berthe F, *et al.* Arbitrarily primed PCR to type *Vibrio* spp. pathogenic for shrimp [ J ]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(3): 1145 – 1151.
- [18] Sudheesh P S, Jie K, Xu H S. Random amplified polymorphic DNA-PCR typing of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. alginolyticus* isolated from cultured shrimps [ J ]. Aquaculture, 2002, 207 ( 30 ): 11 – 17.
- [19] Wong H C, Liu C C, Pan T M, *et al.* Molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolates, obtained from patients involved in food poisoning outbreaks in Taiwan, by random amplified polymorphic DNA analysis [ J ]. Journal of Clinical Microbiology, 1999, 37(6): 1809 – 1812.
- [20] Maiti B, Shekar M, Khushiramani R, *et al.* Evaluation of RAPD-PCR and protein profile analysis to differentiate *Vibrio harveyi* strains prevalent along the southwest coast of India [ J ]. Genet, 2009, 88 (4): 273 – 279.
- [21] Louws F J, Fulbright D W, Stephens C T. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathogens and strains generated with repetitive sequences and PCR [ J ]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60 (7): 2286 – 2295.

## Molecular genetic diversity of *Vibrio harveyi*

XU Zhi-liang<sup>1,2</sup>, WU Zao-he<sup>2,3</sup>, JIAN Ji-chang<sup>1,2\*</sup>, HUANG Yu-cong<sup>1,2</sup>

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals & Key Laboratory of Diseases Controlling for Aquatic Economic Animals of Guangdong Higher Education Institutions, Zhanjiang 524025, China;

3. Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

**Abstract:** *Vibrio harveyi* is known to be a major pathogen in mariculture animal systems. Disease outbreaks attributed to *V. harveyi* have been reported in main mariculture animal farm production. In recent years, mass mortalities of many cultured kinds of maricultured fishes, such as *Litopenaeus vannamei*, *Pseudosciaena crocea*, and *Lutjanus sanguineus* have occurred frequently infected by *V. harveyi*. In this article the 101 isolates of *V. harveyi* were subjected to random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR and BOX-PCR analysis to investigate the genetic variability among *V. harveyi* strains. A total of 10 RAPD primers were designed for their specificity in detecting *V. harveyi*, and only the primer PM2 was highly reproducible and found suitable to use in RAPD-PCR. The genetic diversity among *V. harveyi* isolates assessed by RAPD-PCR by PM2 primer yielded 15 different RAPD patterns which clustered the isolates into 18 groups at 65% similarity level. Similarly, BOX-PCR clustered the 20 patterns into 15 groups at 40% similarity. However, with RAPD-PCR and BOX-PCR, 101 *V. harveyi* could be divided into 18 groups at 50% similarity. We could obtain the accurate results of molecular genetic diversity by both RAPD-PCR and BOX-PCR.

**Key words:** *Vibrio harveyi*; marine fish; BOX typing; RAPD typing

**Corresponding author:** JIAN Ji-chang. E-mail: jianjc@ gmail. com