

一株半滑舌鲷致病性假交替单胞菌的分离鉴定与药敏特性分析

鲍玉杰¹, 尚玉曼¹, 王恒¹, 袁增智^{1,2*}

(1. 天津师范大学生命科学学院, 天津 300387; 2. 天津市动植物抗性重点实验室, 天津 300387)

摘要 从患皮肤溃疡病的半滑舌鲷肝脏中分离到一株优势菌株 CSLG2, 根据细菌形态学观察、生理生化鉴定、16S rDNA 序列鉴定及系统发育进化树分析结果, 发现该菌株与假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*) 同源性最高。对该菌株进行药敏试验, 结果发现该菌对米诺环素、红霉素、头孢他啶、头孢曲松、氯霉素、诺氟沙星、氧氟沙星、环丙沙星等药物高度敏感, 而对红霉素、四环素、头孢唑啉、头孢拉定、青霉素和呋喃妥因具有一定的耐药性。

关键词 半滑舌鲷; 假交替单胞菌; 16S rDNA; 药敏特性

中图分类号 S941 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)08-0102-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.08.025



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Isolation and Identification of Pathogenic *Pseudoalteromonas* from *Cynoglossus semilaevis* Günther and Its Drug Sensitivity Analysis

BAO Yu-jie, SHANG Yu-man, WANG Heng et al (College of Life Sciences, Tianjin Normal University, Tianjin 300387)

Abstract A dominant strain CSLG2 was isolated from the liver of *Cynoglossus semilaevis* Günther with skin ulcer disease. According to the results of bacterial morphology observation, physiological and biochemical identification, 16S rDNA sequence identification and phylogenetic tree analysis, the results showed that this strain had the highest homology with *Pseudoalteromonas*. The drug sensitivity test results of this strain showed that the bacteria was highly sensitive to minocycline, erythromycin, ceftazidime, ceftriaxone, chloramphenicol, norfloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin. However, it had certain resistance to erythromycin, tetracycline, cefazolin, ceftriaxone, penicillin and nitrofurantoin.

Key words *Cynoglossus semilaevis* Günther; *Pseudoalteromonas*; 16S rDNA; Drug sensitivity

半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis* Günther) 是一种温水性近海大型底层鱼类, 隶属鲷形目 (Pleuronectiforme) 舌鲷科 (Cnoglossidae) 舌鲷属 (*Cynoglossus*), 由于其活动范围小、营养等级低、个体大、生长快, 目前已成为我国沿海地区海水养殖鱼类的优良品种之一^[1-2]。但是, 随着产业规模的不断扩大, 近年来养殖半滑舌鲷陆续发生各种疾病, 临床常见体表溃疡病、烂尾病、腹水症等^[3-5]。目前鲷类疾病主要有细菌性疾病、寄生虫性疾病、病毒性疾病 3 种类型, 其中报道最多的是细菌性疾病, 其主要病原有哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*)、溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*)、副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*)、河口弧菌 (*V. aestuarianus*)、鳃裂氏菌 (*Listonella anguillarum*)、海水屈挠杆菌 (*Tenacibaculum maritimum*)、鳃屈挠杆菌 (*T. soleae*)、迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 等^[6]。为进一步研究养殖半滑舌鲷溃疡病的病原及其发病机制, 笔者对患病半滑舌鲷进行了病原菌筛选, 主要从患病半滑舌鲷的体表、肾脏、脾脏、鳃、肠等部位分离出病原菌, 经过形态观察、生理生化鉴定、16S rDNA 序列分析及系统发育学分析鉴定出一株假交替单胞菌, 编号为 CSLG2, 并对其进行了药敏试验, 旨在进一步探究其致病机制并为半滑舌鲷溃疡病的防控提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株。菌株 CSLG2 分离自天津市某养殖场中养殖的患溃疡病的半滑舌鲷肝脏。

基金项目 天津师范大学博士基金资助项目 (52XB1412)。

作者简介 鲍玉杰 (1995—), 女, 山东淄博人, 硕士研究生, 研究方向: 水生生物分子生物学。* 通信作者, 讲师, 从事水产动物病害学研究。

收稿日期 2019-12-12

1.1.2 试剂。2216E 琼脂、TSB 培养基均购自北京陆桥技术股份有限公司; 2×Taq PCR Master Mix 酶、DNA Marker 购自博迈德生物有限公司; 生化鉴定管、生物药敏纸片购自杭州微生物试剂有限公司。

1.1.3 仪器。超净工作台 (SW-CJ-1FD, 江苏通净净化设备有限公司); 高压灭菌锅 (SX-500, 江阴滨江医疗有限公司); 离心机 (Centrifuge 5415R Eppendorf); PCR 仪 (BIO-BAO); 恒温培养箱 (SPX-105B-D, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂); pH 计 (METTER TOLEDO, 北京六一仪器厂); 数显恒温水浴锅 (HH-3A 型, 金坛市金南仪器制造有限公司); 电泳仪 (DYY-6C 型, 北京六一仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 病原菌的分离与纯化。在无菌条件下, 用接种环蘸取患病半滑舌鲷的皮肤溃烂处、肝脏、脾脏、肾脏、肠道等, 并在 2216E 琼脂、TSB 等固体培养基上划线, 置于 28 ℃ 恒温箱中培养 24 h。挑取形态特征一致的优势单菌落, 再次接种到 2216E 固体培养基上进行分离纯化, 连续分离、纯化 3 次后, 挑取优势单菌落置于灭菌的 2216E 液体培养基中, 28 ℃ 恒温培养 24 h, 将获得的纯化菌株加入 20% 的甘油保种, 于 -80 ℃ 超低温冰箱中保存备用。

1.2.2 形态结构观察。首先在载玻片中央滴 1 滴水, 用接种环挑取少量单菌落在载玻片上涂片固定, 然后进行革兰氏染色, 在油镜下观察细菌形态。

1.2.3 生理生化鉴定。将纯化得到的 CSLG2 菌株在 2216E 固体培养基上划线, 28 ℃ 培养 24 h 后, 使用无菌牙签挑取单菌落接种于细菌生化鉴定管中, 并滴加 1 滴液体石蜡油, 置于 35 ℃ 恒温培养箱中培养 24 h, 观察其颜色变化。参照《伯杰氏鉴定细菌学手册》和《伯杰氏分类细菌学手册》^[7], 确定

其生理生化特性。

1.2.4 16S rDNA 检测鉴定与系统发育分析。

1.2.4.1 16S rDNA 的 PCR 扩增。从患病半滑舌鲷肝脏处分离到优势菌株 CSLG2,将纯化得到的 CSLG2 菌株接种在 2216E 液体培养基中,28 ℃、220 r/min 恒温摇床中培养 16 h 后,取 200 μL 菌液在 100 ℃沸水中煮 10 min,然后 1 200 r/min 离心 10 min,上清即为 DNA。以此 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。PCR 反应体系如下:模板 DNA 1 μL、上下游引物各 0.5 μL、2×Taq PCR MasterMix 6.25 μL、无菌水 4.25 μL。PCR 反应条件如下:94 ℃预变性 3 min、94 ℃变性 30 s、55 ℃退火 30 s、72 ℃延伸 45 s、72 ℃终延伸 5 min。其中,PCR 所用引物为细菌 16S rDNA 通用引物,正向引物为 27 F(AGAGTTTGATCCTGGCTCAG),反向引物为 1492 R(GGT-TACCTTGTACGACTT),引物由六合华大基因合成。

1.2.4.2 PCR 产物的检测及序列分析。取 2 μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,其余送交上海生工生物工程有限公司进行测序,测序结果通过 NCBI 网站的 BLAST 检索系统进行同源系列比对分析,从中选取高度相似的序列,使用 MEGA 6 (molecular evolutionary genetic analysis, MEGA) 软件构建 16S rDNA 的系统发育进化树。

1.2.5 药物敏感性测定。采用 K-B 纸片琼脂扩散法进行药敏试验^[8],取纯化菌株 CSLG2 接种于 2216E 液体培养基中,于 28 ℃恒温培养箱中培养 16 h 后,进行梯度稀释,采用平板计数方法配制 1.0×10⁸ CFU/mL 的菌液,吸取 100 μL 涂布在 2216 E 固体培养基平板上。然后,用无菌镊子将抗生素纸片轻轻贴在培养基表面,28 ℃恒温培养 24 h 后,测定抑菌圈直径,结果判定标准分为敏感(S)、中敏(I)、耐药(R)。

2 结果与分析

2.1 临床症状 患病的半滑舌鲷前期体表掉鳞,随着病情的加重,体表肌肉溃烂,溃疡面积不断增大;腹部肿胀,严重的有脱肛现象,经解剖后腹腔中有大量腹水,严重时可致死(图 1)。

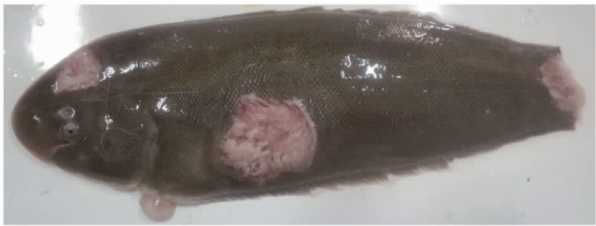


图 1 患病半滑舌鲷

Fig.1 Diseased *C.semilaevis* Günther

2.2 细菌形态学特征 菌株 CSLG2 在 2216E 琼脂培养基平板上划线得到单菌落,菌落呈圆形,表面光滑湿润、有光泽,中央凸起,呈淡黄色,不透明,边缘整齐(图 2)。革兰氏染色结果显示,菌株 CSLG2 为短杆状,呈红色,说明该菌株为革兰氏阴性菌(图 3)。

2.3 生理生化特征 从细菌生化鉴定管的结果来看,CSLG2 菌株对麦芽糖、N-乙酰葡萄糖胺的反应均呈阳性,并能利用葡萄糖,不能利用蔗糖,与侧金盏花醇反应呈阴性,其余反应也均呈阴性(表 1)。将生化管的鉴定结果结合《伯杰氏鉴定细

菌学手册》,其鉴定结果与假交替单胞菌最为相似。

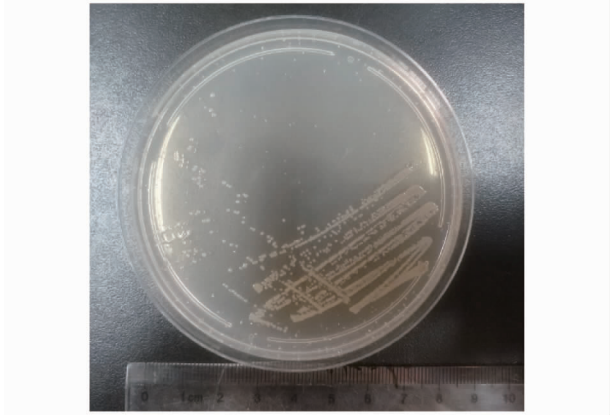


图 2 2216E 培养基上菌株 CSLG2 的菌落特征

Fig.2 The colony characteristics of CSLG2 strain on 2216E medium

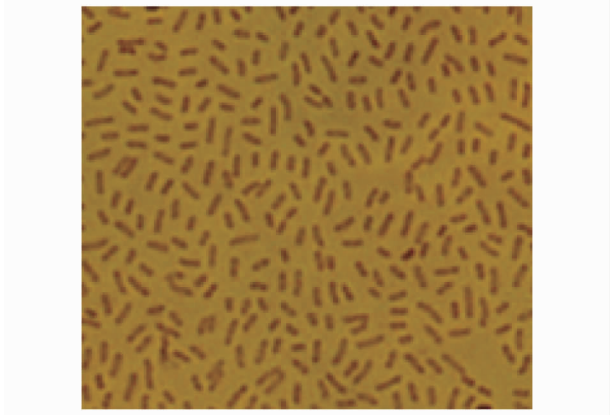


图 3 CSLG2 菌株的革兰氏染色结果

Fig.3 Gram staining results of CSLG2 strain

表 1 菌株 CSLG2 的生化鉴定结果

Table 1 Biochemical identification results of strain CSLG2

序号 No.	鉴定项目 Identification items	标准株 Standard strain	CSLG2
1	蔗糖	V	-
2	麦芽糖	+	+
3	半乳糖	-	-
4	赖氨酸	-	-
5	鼠李糖	-	-
6	葡萄糖酸盐	-	-
7	丙二酸盐	-	-
8	精氨酸水解	-	-
9	阿拉伯醇	-	-
10	N-乙酰葡萄糖胺	+	+
11	葡萄糖	V	+
12	纤维二糖	-	-
13	鸟氨酸	-	-
14	甘露醇	-	-
15	肌醇	-	-
16	阿拉伯糖	-	-
17	山梨醇	-	-
18	侧金盏花醇	V	-
19	尿素	-	-
20	β-半乳糖苷酶	-	-

注:“-”代表阴性,“+”代表阳性,“V”代表结果可变
Note:“-” means negative, “+” means positive, and “V” means variable result

2.4 16S rDNA 序列分析及系统发育进化树分析 以 CSLG2 菌株全 DNA 为模板,以通用引物 27F 和 1492R 扩增得到 CSLG2 菌株 16S rDNA,通过琼脂糖凝胶电泳得到一条 1 500 bp 左右的条带,条带清晰且单一(图 4)。其余 PCR 产物经测序得到 CSLG2 菌株 16S rDNA 的序列大小为 1 646 bp。将测序得到的拼接序列在 NCBI 网站上进行 BLAST 比对,发现菌株 CSLG2 与假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp. IG23 ,序列号 KU213138.1)同源性高达 99%,由此可初步判定 CSLG2 菌株为假交替单胞菌属。将 CSLG2 16S rDNA 序列与其同源性较高的序列进行系统发育进化树分析,结果显示其与 *Pseudoalteromonas* sp.IMCC17052 聚为一支,与 *Pseudoalteromonas* sp.IG23 同源性也较高(图 5),进一步说明菌株 CSLG2 菌株为假交替单胞菌。

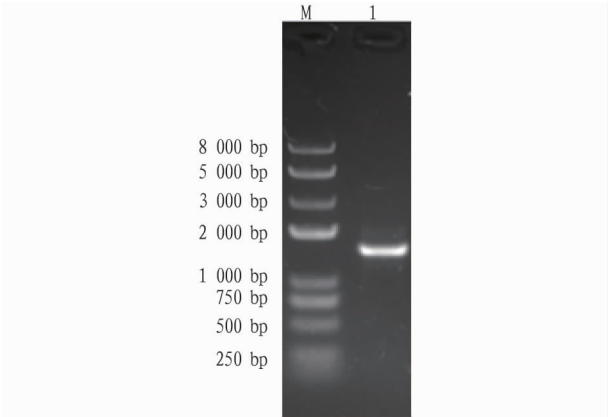


图 4 CSLG2 菌株 16S rDNA 序列的 PCR 扩增结果

Fig.4 PCR amplification results of 16S rDNA sequence of CSLG2 strain

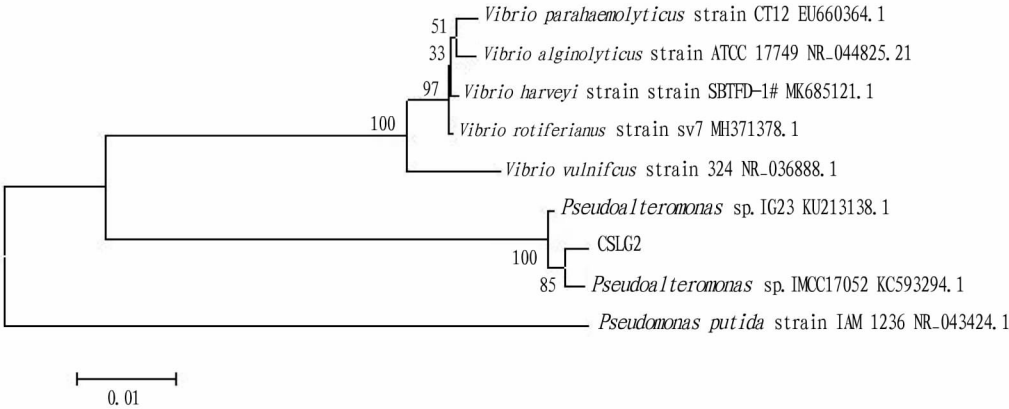


图 5 CSLG2 菌株 16S rDNA 序列的系统进化树分析

Fig.5 Phylogenetic tree analysis of 16S rDNA sequence of CSLG2 strain

2.5 药敏试验结果 药敏试验结果表明,CSLG2 菌株对红霉素、四环素、头孢唑啉、头孢拉定、青霉素、呋喃妥因均有耐药性,对链霉素、磺胺异噁唑表现为中度敏感,而其他 26 种

药物均具有一定的抑菌效果,其中米诺环素、红霉素、头孢他啶、头孢曲松、氯霉素、诺氟沙星、氧氟沙星、环丙沙星等具有较强的抑菌能力(表 2)。

表 2 CSLG2 菌株药敏试验结果

Table 2 Drug sensitivity test results of CSLG2 strain

抗生素分类 Types of antibiotics	抗生素名称 Name of antibiotics	抑菌圈直径 Inhibitory zone diameter//mm			CSLG2 抑菌圈直径 Inhibitory zone diameter of CSLG2//mm	敏感性 Sensitivity
		耐药 R	中介 I	敏感 S		
大环内酯类 Macrolides	米诺环素	≤14	15~18	≥19	37	S
	乙酰螺旋霉素	≤13	14~22	≥23	27	S
	红霉素	≤13	14~22	≥23	34	R
四环素类 Tetracyclines	四环素	≤14	15~18	≥19	9	R
	多西环素	≤12	13~15	≥16	18	S
氨基糖苷类 Aminoglycosides	丁胺卡那	≤14	15~16	≥17	21	S
	新霉素	≤12	13~16	≥17	19	S
	卡那霉素	≤13	14~17	≥18	18	S
	链霉素	≤11	12~14	≥15	12	I
β-内酰胺类 β-lactams	庆大霉素	≤12	13~14	≥15	18	S
	头孢氨苄	≤14	15~17	≥18	18	S
	头孢唑啉	≤14	15~17	≥18	13	R
	头孢拉定	≤14	15~17	≥18	13	R
	头孢呋辛	≤14	15~22	≥23	30	S
	头孢他啶	≤14	15~17	≥18	37	S

接下表

续表 2						
抗生素分类 Types of antibiotics	抗生素名称 Name of antibiotics	抑菌圈直径 Inhibitory zone diameter//mm			CSLG2 抑菌圈直径 Inhibitory zone diameter of CSLG2//mm	敏感性 Sensitivity
		耐药 R	中介 I	敏感 S		
氯霉素类 Chloramphenicols	头孢曲松	≤13	14~22	≥23	42	S
	头孢哌酮	≤15	16~20	≥21	31	S
	青霉素	≤19		≥20	15	R
	羧苄西林	≤13	14~16	≥17	32	S
	氨苄西林	≤19	20~22	≥23	30	S
	新生霉素	≤12	13~16	≥17	18	S
	阿莫西林	≤13	14~17	≥18	28	S
	哌拉西林	≤17	18~20	≥21	30	S
	氟苯尼考	≤12	13~17	≥18	38	S
	氯霉素	≤12	13~17	≥18	35	S
多黏多肽类 Polysticky polypeptides	多黏菌素 B	≤8	9~11	≥12	20	S
硝基呋喃类 Nitrofurans	呋喃妥因	≤14	15~16	≥17	10	R
	呋喃唑酮	≤14	15~16	≥17	20	S
磺胺类 Sulfonamides	复方新诺明	≤10	11~15	≥16	17	S
	磺胺异噁唑	≤12	13~16	≥17	16	I
喹诺酮类 Quinolones	诺氟沙星	≤12	13~16	≥17	39	S
	利福平	≤16	17~19	≥20	20	S
	氧氟沙星	≤12	13~15	≥16	38	S
	环丙沙星	≤15	16~20	≥21	38	S

注:“R”为耐药,“I”为中介,“S”为敏感
Note: “R” stands for resistant, “I” stands for intermediate, and “S” stands for sensitive

3 讨论与结论

假交替单胞菌属是 Gauthier 等^[9]根据细菌 16S rDNA 序列对交替单胞菌属 (*Alteromonas*)、希瓦氏菌属 (*Shewanella*)、弧菌属 (*Vibrio*) 以及假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 等若干菌株进行系统发育分析发现的区别于假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和交替单胞菌属 (*Alteromonas*) 的一个新属。该菌广泛分布于海洋环境中,是一类条件致病菌,能产生胞外毒素、胞外多糖、胞外酶以及病毒活性物质等与致病相关的多种物质^[10]。研究表明,假交替单胞菌可感染海水养殖藻类和养殖动物等,可引起藻类(如绿斑、黄斑^[11-12]等)和养殖动物体表溃烂^[13]等疾病。假交替单胞菌是引起海带 (*Laminaria*) 孢子体红点病^[14]和孔烂症^[15]的病原菌,假交替单胞菌还可引起刺参 (*Apostichopus japonicus*) 腐皮病^[16]、溃疡病^[17]等。Pujalte 等^[18]从患病的海鲈体内分离到 1 株假交替单胞菌,并发现其在养殖环境恶化时引起金头鲷和海鲈患病。乔迁等^[19]从皮肤溃烂的七带石斑鱼 (*Epinephelus septemfasciatus*) 中分离出一株假交替单胞菌,并发现其可引起剑尾鱼鳞片脱落、体表溃烂至死亡。白雪松等^[10]从群体死亡日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 蚤状幼体中分离到 1 株致病菌,经鉴定为假交替单胞菌,并通过回复感染证实其对蚤状幼体和仔虾具有致死性。

该研究从患病的半滑舌鲷肝脏处分离到一株优势菌株 CSLG2,根据菌落形态、细菌革兰氏染色特征、生理生化鉴定、16S rDNA 序列鉴定和系统发育学分析结果鉴定该菌株为假交替单胞菌。根据药敏试验结果,初步鉴定出 CSLG2 菌株对红霉素、四环素、头孢唑啉、头孢拉定、青霉素、呋喃妥因有耐药性,而米诺环素、红霉素、头孢他啶、头孢曲松、氯霉素、诺氟沙星、氧氟沙星、环丙沙星等具有较强的抑菌能力,该研究

结果有助于探讨鱼类疾病病原,并为防治该菌引起的半滑舌鲷及其他水生动物疾病提供参考。

参考文献

[1] 高桂生,张艳英,张召兴,等.半滑舌鲷皮肤溃疡病的病原分离鉴定与药物敏感性分析[J].中国兽医学报,2016,36(4):595-599.

[2] 柳学周,庄志猛,马爱军,等.半滑舌鲷繁殖生物学及繁育技术研究[J].海洋水产研究,2005,26(5):7-14.

[3] WANG Y,HAN Y,LI Y,et al.Isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from diseased tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Gunther) in China[J].Acta microbiologica sinica,2007,47(5):763-768.

[4] 胡璇,孙敬锋,陈成勋,等.养殖半滑舌鲷腹水病的病原分离鉴定及药物敏感性分析[J].天津农学院学报,2014,21(3):12-16.

[5] 徐晓丽,邵蓬,李贺密,等.半滑舌鲷体表溃疡病病原的分离鉴定[J].中国海洋大学学报(自然科学版),2015,45(11):29-35.

[6] 姚志贤.半滑舌鲷皮肤溃疡病病原及免疫保护研究[D].厦门:集美大学,2012.

[7] 廖延雄.《伯杰氏鉴定细菌学手册》与《伯杰氏分类细菌学手册》[J].微生物学通报,1992,19(4):249.

[8] 谭瑶,赵清,舒为群,等.K-B 纸片扩散法药敏试验[J].检验医学与临床,2010,7(20):2290-2291.

[9] GAUTHIER G,GAUTHIER M,CHRISTEN R.Phylogenetic analysis of the genus *Alteromonas*,*Shewanella* and *Moritella* using genes coding for small subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera: *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas*, gen.nov.and proposal of two [J].International journal of systematic bacteriology, 1995, 45 (4):755-761.

[10] 白雪松,张晓君,毕可然,等.1 株假交替单胞菌的分离与鉴定[J].江苏农业科学,2013,41(10):211-216.

[11] 闫咏,马家海,许璞,等.1 株引起条斑紫菜绿斑病的柠檬假交替单胞菌[J].中国水产科学,2002,9(4):353-358.

[12] 王洪斌,李信书,夏亚明,等.条斑紫菜丝状体黄斑病病原体分离鉴定及生物学特性研究[J].海洋环境科学,2011,30(3):361-364,408.

[13] 谢建军,王印庚,张正,等.养殖刺参腐皮综合征两种致病菌 Dot-ELISA 快速检测[J].海洋科学,2007,31(8):59-64.

[14] SAWABE T,MAKINO H,TATSUMI M,et al.*Pseudoalteromonas bacteriolytica* sp.nov.a marine bacterium that is the causative agent of red spot disease of *Laminaria japonica*[J].International journal of systematic bacteriology, 1998, 48(3):769-774.

- [36] LI H, WANG Y, WU M, et al. Genome-wide identification of AP2/ERF transcription factors in cauliflower and expression profiling of the ERF family under salt and drought stresses [J]. *Frontiers in plant science*, 2017, 8: 946.
- [37] MAWLONG I, ALI K, SRINIVASAN R, et al. Functional validation of a drought-responsive AP2/ERF family transcription factor-encoding gene from rice in *Arabidopsis* [J]. *Molecular breeding*, 2015, 35(8): 1-14.
- [38] PARK C S, GO Y S, SUH M C. Cuticular wax biosynthesis is positively regulated by WRINKLED4, an AP2/ERF-type transcription factor, in *Arabidopsis* stems [J]. *The plant journal*, 2016, 88(2): 257-270.
- [39] THAMILARASAN S K, PARK J I, JUNG H J, et al. Genome-wide analysis of the distribution of AP2/ERF transcription factors reveals duplication and CBFs genes elucidate their potential function in *Brassica oleracea* [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 1-13.
- [40] WANG X H, HAN H Y, YAN J, et al. A new AP2/ERF transcription factor from the oil plant *Jatropha curcas* confers salt and drought tolerance to transgenic tobacco [J]. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2015, 176(2): 582-597.
- [41] YANG Y Q, DONG C, LI X, et al. A novel AP2/ERF transcription factor from *Stipa purpurea* leads to enhanced drought tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant cell reports*, 2016, 35(11): 2227-2239.
- [42] 周媛媛, 董晓静, 吕娅, 等. 拟南芥分子生物学研究进展 [J]. *中国农学通报*, 2018, 34(30): 56-62.
- [43] 蔡洋, 王束钧, 桑园园, 等. 大白菜 YUCCA 基因家族的鉴定与生物信息学分析 [J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(3): 49-54.
- [44] 袁明月, 楼轶, 张竞, 等. 禾谷镰刀菌 AP 蛋白家族的生物信息学分析 [J/OL]. *基因组学与应用生物学*, 2019-03-01 [2019-08-16]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1369.Q.20190301.0942.002.html>.
- [45] 张书芹, 乐愉, 武斐, 陆地棉 GRF 基因家族的鉴定和生物信息学分析 [J]. *分子植物育种*, 2019, 17(12): 3817-3824.
- [46] 白羽聪, 李翔宇, 程占超, 等. 毛竹 PIN 基因家族的鉴定与生物信息学分析 [J]. *分子植物育种*, 2019, 17(16): 5238-5247.
- [47] 逢洪波, 潘英杰, 李嘉琦, 等. 向日葵 Hsp70 基因家族成员的全基因组鉴定与生物信息学分析 [J]. *分子植物育种*, 2019, 17(18): 5918-5929.
- [48] 郭栋, 杜娟, 周宝元, 等. 玉米 CCT 基因家族的鉴定与生物信息学分析 [J]. *植物遗传资源学报*, 2019, 20(4): 1001-1010.
- [49] 狄建军, 孙佳欣, 杨智慧, 等. 蓖麻 PLA2 α 基因启动子的克隆及生物信息学分析 [J]. *分子植物育种*, 2019, 17(15): 4961-4966.
- [50] 何焱, 李忠珏, 李卿, 等. 藏药翼首草角鲨烯合成酶的生物信息学分析 [J/OL]. *基因组学与应用生物学*, 2019-01-14 [2019-08-16]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1369.q.20190111.1501.002.html>.
- [51] 赵思华, 尹晗, 吕昊哲, 等. 大豆 GmTAA1-1 基因的生物信息及时空表达分析 [J]. *分子植物育种*, 2019, 17(21): 6946-6952.
- [52] 吴桂梅, 赵小峰, 汪瑶, 等. 大鼠单核细胞趋化蛋白-1 基因的生物信息学分析 [J]. *安徽农业科学*, 2019, 47(1): 93-95.
- [53] 张西燕, 付玉荣, 伊正君. 结核分枝杆菌 PE₄PGRS47 蛋白的生物信息学分析 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2019, 14(1): 44-49.
- [54] 徐小钦, 杜雪, 李国勤, 等. 白羽王鸽卵清蛋白关联蛋白 Y 基因 (OVALY) 克隆与生物信息学分析 [J]. *浙江农业学报*, 2019, 31(5): 704-708.
- [55] 冯立娟, 尹燕雷, 杨雪梅, 等. 石榴查尔酮合成酶蛋白的生物信息学分析 [J]. *山东农业科学*, 2019, 51(2): 7-12.
- [56] 宋雪, 秦彩艳, 霍金龙, 等. 版纳微型猪近交系 CPN10 克隆、亚细胞定位、组织表达和生物信息学分析 [J]. *云南农业大学学报*, 2019, 34(2): 255-262.
- [57] 姜铮, 王芳, 何湘, 等. 蛋白质磷酸化修饰的研究进展 [J]. *生物技术通讯*, 2009, 20(2): 233-237.
- [58] 李杰, 杭柏林, 宁春妹, 等. 牛源 cathelicidin 类抗菌肽的生物信息学分析 [J]. *河南科技学院学报 (自然科学版)*, 2019, 47(1): 40-45.
- [59] 龙芳, 李绍鹏, 李茂富. 7 种植物 ALAD 基因的生物信息学分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2013, 32(6): 802-814.
- [60] 韩长志. 禾谷炭疽菌 RGS 蛋白生物信息学分析 [J]. *微生物学通报*, 2014, 41(8): 1582-1594.
- [61] 宋志忠, 杨顺斌, 金曼, 等. 杨树基因组 AMT 转运蛋白的生物信息学特性 (英文) [J]. *基因组学与应用生物学*, 2011, 30(6): 641-648.
- [62] 郭淑, 罗红梅, 陈士林. 灵芝 *GLUT1* 基因的全长 cDNA 克隆和生物信息学分析 [C] // 中药与天然药高峰论坛暨全国中药和天然药物学术研讨会论文集. 北京: 中国药学会, 2012.
- [63] 刘金鸽. 拟南芥 *AIDPBF4* 基因克隆及生物信息学分析与表达研究 [D]. 兰州: 兰州理工大学, 2013.
- [64] 张加强, 刘慧春, 周江华, 等. 植物赤霉素氧化酶 *G420ox* 基因的生物信息学分析 [J]. *分子植物育种*, 2019, 17(15): 4986-5002.
- [65] 皮博艺, 阮颖, 黄勇. 植物串联 CCCH 锌指蛋白 RR-TZF 家族研究进展及生物信息学分析 [J]. *分子植物育种*, 2019, 17(7): 2171-2177.
- [66] 唐跃辉, 包欣欣, 王健, 等. 小桐子 *Dof* 基因家族生物信息学与表达分析 [J]. *江苏农业学报*, 2019, 35(1): 15-25.
- [67] 王雁, 王小贝, 陈海江, 等. 桃 GLV 多肽受体 *PpRGI* 基因家族的生物信息学及表达分析 [J]. *园艺学报*, 2019, 46(5): 855-863.
- [68] 袁梦如, 杨杨, 张磊, 等. 沙柳 *SpsTAC2* 基因克隆、生物信息学及组织特异表达分析 [J]. *分子植物育种*, 2019, 17(7): 2144-2151.
- [69] 王丽珊. 拟南芥和水稻 Cel 基因家族的生物信息学分析 [J]. *闽西职业技术学院学报*, 2019, 21(1): 101-106.
- [70] 郭娟, 彭秋菊, 余明明, 等. 辣椒生育酚环化酶 (TC) 基因克隆和生物信息学分析 [J]. *分子植物育种*, 2019, 17(10): 3171-3179.
- [71] 阮先乐, 张杰, 张福丽, 等. 甘薯 *AP2* 基因家族的生物信息学分析 [J]. *分子植物育种*, 2017, 15(6): 2066-2072.
- [72] 谢腾, 王升, 周良云, 等. 新疆紫草 AP2/ERF 转录因子的电子克隆和生物信息学分析 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(12): 2251-2257.
- [73] 赵金玲, 姚文静, 王升级, 等. 杨树 AP2/ERF 转录因子家族生物信息学分析 [J]. *东北林业大学学报*, 2015, 43(10): 21-29.
- [74] 张丽丽, 李博, 谭燕华, 等. 玉米转录因子基因 *ZmASR* 家族的生物信息学分析 [J]. *分子植物育种*, 2016, 14(4): 803-811.
- [75] OKAMURO J K, CASTER B, VILLARROEL R, et al. The AP2 domain of *APETALA2* defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis* [J]. *Proceedings of the national academy of sciences*, 1997, 94(13): 7076-7081.
- [76] ZHANG J Y, BROECKLING C D, BLANCAFLOR E B, et al. Overexpression of *WXP1*, a putative *Medicago truncatula* AP2 domain-containing transcription factor gene, increases cuticular wax accumulation and enhances drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*) [J]. *Plant journal*, 2005, 42(5): 689-707.
- [77] LIN R C, PARK H J, WANG H Y. Role of *Arabidopsis* RAP2.4 in regulating light- and ethylene-mediated developmental processes and drought stress tolerance [J]. *Molecular plant*, 2008, 1(1): 42-57.
- [78] 庄静. 大白菜和甘蓝型油菜 AP2/ERF 家族转录因子的克隆与分析 [D]. 南京: 南京农业大学, 2009.

(上接第 105 页)

- [15] SAWABE T, TANAKA R, IQBAL M M, et al. Assignment of *Alteromonas elyakovii* KMM 162 (T) and five strains isolated from spot-wounded fronds of *Laminaria japonica* to *Pseudalteromonas elyakovii* comb. nov. and the extended description of the species [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, 50(1): 265-271.
- [16] 葛辉, 何丽斌, 林琪, 等. 福建海区网箱养殖刺参“腐皮综合症”病原分析与鉴定 [J]. *福建水产*, 2012, 34(2): 105-110.
- [17] 孟庆国, 吴刘记, 吴信忠, 等. 养殖刺参溃疡病病原学研究 [J]. *水产科学*, 2006, 25(12): 635-639.
- [18] PUJALTE M J, SITJÀ-BOBADILLA A, MACIÁN M C, et al. Occurrence and virulence of *Pseudalteromonas* spp. in cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Molecular and phenotypic characterisation of *P. undina* strain U58 [J]. *Aquaculture*, 2007, 271: 47-53.
- [19] 乔迁, 韩娜娜, 陈超, 等. 致病性假交替单胞菌的分离鉴定及药敏特性研究 [J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(26): 14224-14226, 14232.