

豫陕两省 14 株鸡杆菌的 *gyrB*、16S rRNA 和 *rpoB* 基因序列比较分析

皇甫和平^{1,2}, 杨霞¹, 赵军¹, 王川庆^{1*}, 常洪涛¹, 陈陆¹, 王新卫¹,
李乔晶¹, 刘红英¹

(1, 河南农业大学 禽病研究所, 郑州 450002; 2, 郑州牧业工程高等专科学校, 郑州 450011)

摘要: 分析河南、陕西分离的 14 株鸡杆菌(*Gallibacterium*)之间的进化关系, 及 *gyrB* 基因序列比较在该菌进化分析中的作用。PCR 扩增鸡杆菌分离株的 *gyrB*、16S rRNA 和 *rpoB* 3 个看家基因, PCR 产物纯化后直接测序。将鸡杆菌分离株、国外参考株的 3 个看家基因序列进行比较分析, 用 Phylyip 3.67 软件构建进化树。结果表明, 14 株鸡杆菌与鸭源鸡杆菌 (*Gallibacterium anatis*) 模式株间的相似性为 96.3%~98.0% (*gyrB*)、97.7%~99.6% (16S rRNA) 和 97.7%~99.0% (*rpoB*); 14 株鸡杆菌与鸡杆菌复合群 1 (*Gallibacterium genomsp.* 1) 参考株间的相似性为 88.8%~89.9% (*gyrB*)、96.2%~97.5% (16S rRNA) 和 92.6%~93.6% (*rpoB*)。基于 3 个看家基因序列的进化分析, 均显示 14 株鸡杆菌和鸭源鸡杆菌模式株形成单独的一个群。14 株鸡杆菌分离株均属于鸭源鸡杆菌种; 在 3 个看家基因位点, 鸡杆菌河南株与陕西株之间、鸡杆菌输卵管炎病鸡分离株与健康鸡分离株之间均无明显遗传上的差异; *gyrB* 基因序列分析可用于鸡杆菌分离株的种类鉴定, 且对 14 株鸡杆菌与复合群 1 参考株的区别能力优于另外 2 个看家基因。

关键词: 鸡杆菌; 鸭源鸡杆菌; 16S rRNA; *rpoB*; *gyrB*; 进化分析

中图分类号: S852.612

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)07-1103-08

Sequence Analysis of Fourteen *Gallibacterium* Isolates from Henan and Shanxi Provinces Based on *gyrB*, 16S rRNA and *rpoB* Genes

HUANGH-FU He-ping^{1,2}, YANG Xia¹, ZHAO Jun¹, WANG Chuan-qing^{1*},

CHANG Hong-tao¹, CHEN Lu¹, WANG Xin-wei¹, LI Qiao-jing¹, LIU Hong-ying¹

(1. Institute of Poultry Diseases, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou 450011, China)

Abstract: The objective of this study was to analyze the evolutionary relationships of the fourteen *Gallibacterium* strains isolated from Henan and Shanxi Provinces, and the role of *gyrB* gene in phylogenesis analysis. 16S rRNA, *rpoB* and *gyrB* gene of all isolates were amplified by PCR and the purified PCR product were submitted directly for sequencing. Sequences of three housekeeping genes of 14 *Gallibacterium* isolates were compared, and used to generate the phylogenetic tree, with that of the *Gallibacterium* reference strains, using the software of DNASTar, Clustalx 1.81 and Phylyip 3.67. The sequence homology were 96.3%-98.0% (*gyrB*), 97.7%-99.6% (16S rRNA), 97.7%-99.0% (*rpoB*) among *Gallibacterium* isolates and *G. anatis* type strains, 88.8%-89.9% (*gyrB*), 96.2%-97.5% (16S rRNA), 92.6%-93.6% (*rpoB*) among *Gallibacterium* isolates and *Gallibacterium genomsp.* 1 strains. Three phylogenetic trees generated from housekeeping genes showed that 14 *Gallibacterium* isolates fell into the same branch with *G.*

收稿日期: 2011-10-25

基金项目: 柏林格公司项目(BIV, S. A. de C. V. 项目合同编号 43006167); 国家自然科学基金(30972187)

作者简介: 皇甫和平(1977-), 男, 河南博爱人, 讲师, 博士生, 主要从事动物疫病及发病机理研究, E-mail: hfhp888@163.com

* 通讯作者: 王川庆, E-mail: wchuanq@163.com

anatis type strains. 14 *Gallibacterium* isolates were classified in *G. anatis*. In the three gene locus of *gyrB*, *rpoB* and 16S rRNA genes, there were no apparent genetic difference between *Gallibacterium* strains isolated from Henan and Shanxi Provinces, and from healthy chickens and diseased chickens with salpingitis. *gyrB* gene could be used for classification of *Gallibacterium* isolates, furthermore, more obvious differences was noticed in the homology analysis based on *gyrB* gene sequence between *Gallibacterium* isolates and *G. genomosp.* 1 than that based on 16S rRNA and *rpoB* genes.

Key words: *Gallibacterium*; *Gallibacterium anatis*; 16S rRNA; *rpoB*; *gyrB*; evolution analysis

2003 年, Christensen 等^[1] 根据鸡杆菌 16S rRNA 基因序列分析特征和微生物学特征, 建议将原来的鸭巴氏杆菌 (*Pasteurella anatis*)、溶血性巴氏杆菌 (*Pasteurella haemolytica*) 和输卵管炎放线杆菌 (*Actinobacillus salpingitidis*) 合并, 组成巴氏杆菌科中的 1 个新属——鸡杆菌属 (*Gallibacterium*)。鸭源鸡杆菌 (*Gallibacterium anatis*) 为该属的代表种, 有溶血和非溶血 2 个表型。鸡杆菌是鸡上呼吸道和下生殖道的一种常在菌^[2-3]。近年来的研究表明: 鸡杆菌与蛋鸡输卵管炎、输卵管囊肿等疾病关系密切, 并具有条件致病性^[4-6], 鸡杆菌人工感染可引起鸡的输卵管炎、腹膜炎和败血症等疾病^[6-7]。

2008 年, 王川庆等^[5] 首次报道了我国蛋鸡场鸭源鸡杆菌 (当时误译为“鸭卡氏杆菌”) 的感染情况。结果显示, 所调查的 12 个鸡场均有鸭源鸡杆菌感染, 平均抗体阳性率为 48.4%。郑鹿平等^[8] 对河南和山东部分养鸡场进行细菌分离, 从 101 只鸡中分离鉴定出 45 株鸡杆菌。上述报道提示: 我国鸡群中鸡杆菌的感染可能非常普遍。张金来等^[9] 采用 *rpoB*、*infB* 和 *atpD* 基因多序列比较分析的方法, 证实了 9 株河南省鸡杆菌分离株属于鸭源鸡杆菌; HUANG-FU^[4]、高冬生^[10]、田明星^[11] 等采用 16S rRNA 基因序列分析的方法, 证实了河南、山西和四川部分鸡杆菌分离株也均属于鸭源鸡杆菌, 而且分离株与国外鸭源鸡杆菌参考株间的相似性很高, 均在 96% (16S rRNA) 以上。

gyrB 基因是编码 DNA 解旋酶 B 亚单位的基因。近年来的研究表明 *gyrB* 基因是 16S rRNA 基因以外适合细菌鉴别的又一理想靶基因, 优点是基因进化率较快, 碱基替换频率较高, 适合于细菌近缘种的鉴别^[12-14]。因此, 本研究选用 *gyrB* 基因结合 16S rRNA 和 *rpoB* 基因序列分析的方法, 对河南和

陕西省分离的 14 株鸡杆菌进行遗传进化分析, 在更大范围内分析我国鸡杆菌的流行种类, 同时分析 *gyrB* 基因在鸡杆菌系统发育分析中的作用。

1 材料与方法

1.1 菌株

鸭源鸡杆菌参考株 Yu-ZZ-HL-1-SLG 和 14 株鸡杆菌分离株均由河南农业大学禽病研究所分离鉴定, 并保存。14 株鸡杆菌分离株中, 11 株分离于河南省, 3 株分离于陕西省; 11 株分离于输卵管炎病鸡, 3 株分离于健康鸡。14 株鸡杆菌分离株信息见表 1。

1.2 仪器与试剂

PCR 仪 (HBPX2220), 美国 Thermo 公司产品; 凝胶自动成像系统 (AlphaImager EP), 美国 alpha 公司产品; 10% 绵羊血琼脂平板, 郑州安图生物工程有限公司产品; *Taq* 酶、DL2000 Marker, 日本 TaKaRa 公司产品; GoldView I 型核酸染料, 北京索莱宝科技有限公司产品; DNA 凝胶回收试剂盒, 上海生工生物工程技术有限公司产品。

1.3 引物

参考 Weisburg 等^[15] 和 Christensen 等^[16] 的方法分别设计 16S rRNA、*rpoB* 基因的 PCR 引物, 参考 Yamamoto 等^[17] 的方法设计 *gyrB* 基因的 PCR 引物 (UP1、UP2r) 和测序引物 (UP1S、UP2rS)。引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成, 序列见表 2。

1.4 菌株的复苏及 DNA 的制备

取 -70 °C 冻存的鸡杆菌分离株, 接种于 10% 绵羊血琼脂平板上, 37 °C 温箱中培养 24 h, 再挑取单个菌落接种于含 5% 小牛血清的 LB 肉汤中, 于 37 °C 振荡培养 12~16 h。参考 HUANG-FU 等^[4] 的方法提取鸡杆菌基因组 DNA, -20 °C 保存备用。

表 1 鸡杆菌分离株的基本信息

Table 1 Essential information of *Gallibacterium* isolates

编号 No.	菌株 Strain	分离部位 Isolate site	来源 Source	宿主健 康状况 Host health statu	分离 时间 Isolation date	编号 No.	菌株 Strain	分离 部位 Isolate site	来源 Source	宿主健 康状况 Host health status	分离 时间 Isolation date
1	Yu-JZ-WZ- YQ-5-SLG	输卵管	河南	输卵管炎	2008.4	8	Yu-XX- HJ-6-SLG	输卵管	河南	输卵管炎	2009.12
2	Yu-XX-HJ- 6-QG	气管	河南	输卵管炎	2009.12	9	Yu-ZK-XC- 13-QG	气管	河南	输卵管炎	2008.11
3	Yu-PDS-JX- 3-QG	气管	河南	健康	2010.3	10	Yu-XX-HJ- 4-SLG	输卵管	河南	输卵管炎	2009.12
4	Yu-ZZ-XMZ- 46-XZQ	泄殖腔	河南	健康	2010.10	11	Yu-ZZ-XY- 1-QG	气管	河南	输卵管炎	2009.12
5	Yu-ZZ-XY- 1-SLG	输卵管	河南	输卵管炎	2009.12	12	Shan-XY- 8-XZQ	泄殖腔	陕西	输卵管炎	2010.10
6	Yu-PDS- RZ-1-SLG	输卵管	河南	输卵管炎	2008.4	13	Shan-XY- 4-FZ	肺脏	陕西	输卵管炎	2010.10
7	Yu-ZZ-ZD- 26-XZQ	泄殖腔	河南	健康	2010.10	14	Shan-XY- 4-SLG	输卵管	陕西	输卵管炎	2010.10

表 2 引物序列及扩增基因

Table 2 Primer sequence and the target gene

引物序列(5'-3')	基因 Gene	目的片段大小/bp Size
Primer sequence		
rpoB-L: GCA GTG AAA GAR TTC TTT GGT TC (23 bp)	<i>rpoB</i>	560
rpoB-R: GTT GCA TGT TIG IAC CCA T (19 bp)		
UP1: GAA GTC ATC ATG ACC GTT CTG CAY GCN GGN GGN AAR TTY GA (41 bp)	<i>gyrB</i>	1 200
UP2r: AGC AGG GTA CGG ATG TGC GAG CCR TCN ACR TCN GCR TCN GTC AT (44 bp)		
UP1S: GAA GTC ATC ATG ACC GTT CTG CA (23 bp)		
UP2rS: AGC AGG GTA CGG ATG TGC GAG CC (23 bp)		
F1: CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CAT GGC TCA G (37 bp)	16S rRNA	1 600
R1: CCC GGG ATC CAA GCT TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T (37 bp)		

1.5 3 个看家基因的 PCR 扩增及测序

1.5.1 16S rRNA 基因的 PCR 扩增 PCR 反应体系:10 × Buffer(含 Mg^{2+}) 5 μ L, dNTP (10 U) 1 μ L, 引物 F1 和 R1(25 pmol · μ L⁻¹) 各 1 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 2.5 U, 模板 DNA 2 μ L, 最后补充去离子水至 50 μ L。PCR 反应程序:95 °C 预变性 3 min,

再行 30 个循环,每个循环的反应参数:95 °C 45 s, 62 °C 30 s,72 °C 2 min;循环结束后,72 °C 延伸 10 min。反应结束后电泳检测。

1.5.2 *rpoB* 基因的 PCR 扩增 PCR 反应体系:10 × Buffer(含 Mg^{2+}) 5 μ L, dNTP(10 U) 1 μ L, 引物 *rpoB*-L 和 *rpoB*-R(25 pmol · μ L⁻¹) 各 1 μ L,

Taq DNA 聚合酶 2.5 U, 模板 DNA 2 μ L, 最后补充去离子水至 50 μ L。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 再行 35 个循环, 每个循环的反应参数: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min; 循环结束后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应结束后电泳检测。

1.5.3 *gyrB* 基因的 PCR 扩增 PCR 反应体系: 10 \times Buffer(含 Mg^{2+}) 5 μ L, dNTP(10 U) 1 μ L, 引物 UP1 和 UP2r(25 pmol \cdot μ L $^{-1}$) 各 1 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 2.5 U, 模板 DNA 1 μ L, 最后补充去离子水至 50 μ L。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 再行 30 个循环, 每个循环的反应参数: 94 $^{\circ}$ C 1 min, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min; 循环结束后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10

min。反应结束后电泳检测。

1.5.4 3 个看家基因的测序 PCR 产物经电泳检测后, 利用 DNA 凝胶回收试剂盒纯化。然后, 将纯化产物提交上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.6 基于 3 个看家基因的系统发育树构建

运用 DNASTar 软件中的 Jotun hein 算法, 以多杀性巴氏杆菌参考株为外群, 对 14 株鸡杆菌分离株和其它不同鸡杆菌参考株(表 3), 进行 3 个看家基因位点的相似性比较。分子进化树用 PHYLIP 3.67 构建, 进化的可靠性用 bootstrap 进行分析, 用 1 000 个重复。利用 MEGA 5.05 绘制进化树。

表 3 鸡杆菌参考株信息

Table 3 Information of the reference *Gallibacterium* strains

菌株 Strain	种 Species	基因 Gene	登录号 Accession number	菌株 Strain	种 Species	基因 Gene	登录号 Accession number
CCUG 17976	多杀性巴氏杆菌	16S rRNA <i>rpoB</i>	AF294410 AY170216.1	19060/1120	鸡杆菌 复合群 3	16S rRNA	EU339203.1
F149	鸭源鸡杆菌	16S rRNA <i>gyrB</i>	AF228001.1 AY258266.1	CCUG 15563	鸭源鸡 杆菌	<i>rpoB</i>	AY314032.1
F150	输卵管炎鸡杆菌	16S rRNA <i>rpoB</i>	EU424000.1 EU424018	CCM 5974	鸡杆菌 复合群 1	<i>rpoB</i>	AY314033.1
52-S3-90	海藻糖发酵鸡杆菌	16S rRNA <i>rpoB</i>	NR_044470.1 EU424012	59/S3/89	鸡杆菌 复合群 2	<i>rpoB</i>	EU424017.1
F450	虎皮鸚鵡鸡杆菌	16S rRNA <i>rpoB</i>	NR_044495.1 EU424003	P427	多杀性 巴氏杆菌	<i>gyrB</i>	AY258264.1
Gerl. 2740/89	鸡杆菌复合群 1	16S rRNA	AF228018.1	CCUG23139	鸡杆菌 复合群 1	<i>gyrB</i>	AY258267.1
CCM 5976	鸡杆菌复合群 2	16S rRNA	AF228017.1				

2 结果

2.1 3 个看家基因的 PCR 扩增与测序

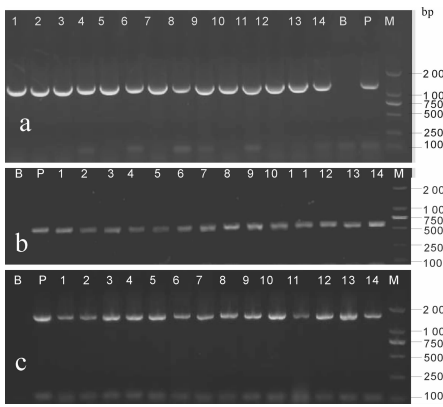
3 个看家基因的 PCR 产物电泳结果见图 1。由图可知, 3 对引物均扩增出了相应的目的片段, 片段大小与预期一致。3 个看家基因的序列均已递交 GenBank, 登录号见表 4。

2.2 基于 3 个看家基因序列的进化分析

2.2.1 系统发育分析 以多杀性巴氏杆菌为外

群, 采用 NJ 法进行了 3 个看家基因系统发育树的构建, 结果见图 2~4。基于 3 个看家基因构建的进化树均显示, 14 株鸡杆菌分离株和鸭源鸡杆菌模式株明显地存在于同一个分支中。

2.2.2 相似性分析 根据 3 个看家基因序列的比对结果, 14 株鸡杆菌之间的相似性为 97.1%~100.0% (*gyrB*)、97.5%~100% (16S rRNA) 和 98.2%~100% (*rpoB*)。14 株鸡杆菌与其它参考株之间的相似性见表 5, 由表可知 14 株鸡杆菌与鸭源



a, b 和 c 分别为 *gyrB*、*rpoB* 和 16S rRNA 基因扩增片段。M. DL2000 DNA marker; B. 空白对照; P. 鸡杆菌参照株 Yu-ZZ-HL-1-SLG; 1-14 分别为表 1 中 1-14 号鸡杆菌

a, b and c were the figure of *gyrB*, *rpoB* and 16S rRNA genes, respectively. M. DL2000 DNA marker; B. Blank control; P. Reference strain Yu-ZZ-HL-1-SLG; 1-14 represented *Gallibacterium* isolates No. 1-14 in Table 1

图 1 鸡杆菌分离株 3 个看家基因的 PCR 产物检测

Fig. 1 Detection of the PCR product of three housekeeping genes of *Gallibacterium* isolates

鸡杆菌模式株之间的相似性为 96.3%~98.0% (*gyrB*)、97.7%~99.6% (16S rRNA) 和 97.7%~99.0% (*rpoB*), 14 株鸡杆菌与复合群 1 参考株之间的相似性为 88.8%~89.9% (*gyrB*)、96.2%~97.5% (16S rRNA) 和 92.6%~93.6% (*rpoB*)。

3 个看家基因序列比对结果显示: 鸡杆菌陕西株与河南株之间的相似性为 97.3%~99.8% (*gyrB*)、98.1%~99.9% (16S rRNA) 和 98.6%~

100% (*rpoB*); 鸡杆菌健康鸡分离株与发病鸡分离株之间的相似性为 97.1%~99.5% (*gyrB*)、98.0%~99.9% (16S rRNA) 和 98.6%~100% (*rpoB*)。

表 4 鸡杆菌分离株的 3 个看家基因登录号

Table 4 Accession numbers of three housekeeping genes of *Gallibacterium* isolates

菌株 Strain	<i>gyrB</i> 基因 <i>gyrB</i> gene	16S rRNA 基因 16S rRNA gene	<i>rpoB</i> 基因 <i>rpoB</i> gene
Yu-JZ-WZ-YQ-5-SLG	JN828478	JN828469	JN828499
Yu-XX-HJ-6-QG	JN828486	JN828463	JN828495
Yu-PDS-JX-3-QG	JN828484	JN828470	JN828492
Yu-ZZ-XMZ-46-XZQ	JN828481	JN828473	JN828497
Yu-ZZ-XY-1-SLG	JN828476	JN828460	JN828490
Yu-PDS-RZ-1-SLG	JN828485	JN828472	JN828501
Yu-ZZ-ZD-26-XZQ	JN828483	JN828462	JN828493
Yu-XX-HJ-6-SLG	JN828487	JN828465	JN828494
Yu-ZK-XC-13-QG	JN828475	JN828471	JN828491
Yu-XX-HJ-4-SLG	JN828480	JN828464	JN828498
Yu-ZZ-XY-1-QG	JN828477	JN828461	JN828489
Shan-XY-8-XZQ	JN828482	JN828467	JN828496
Shan-XY-4-FZ	JN828479	JN828468	JN828488
Shan-XY-4-SLG	JN828474	JN828466	JN828500

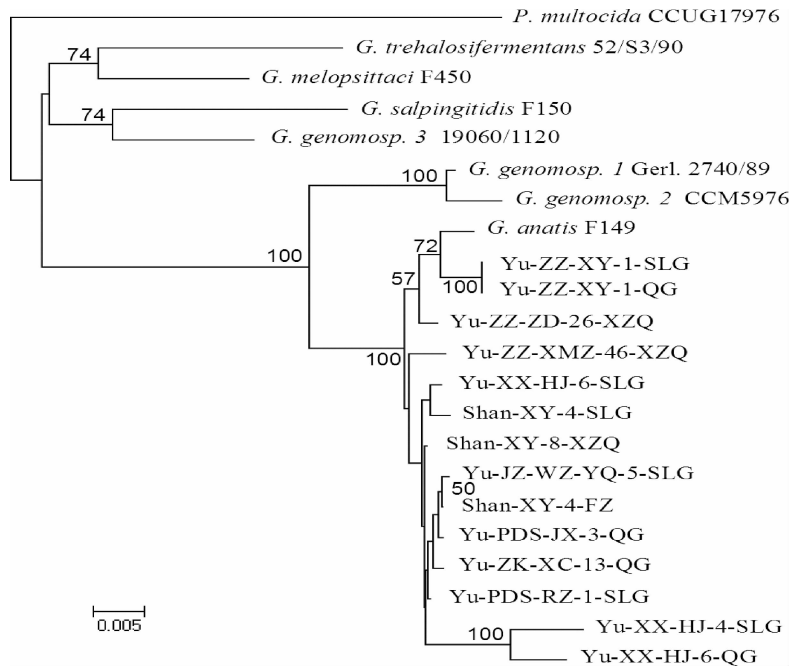
表 5 鸡杆菌分离株与其它参考株之间的序列比对结果

Table 5 Sequence comparison results among *Gallibacterium* isolates and other reference strains

种 Species	<i>gyrB</i> 基因 <i>gyrB</i> gene	16S rRNA 基因 16S rRNA gene	<i>rpoB</i> 基因 <i>rpoB</i> gene
鸭源鸡杆菌 (<i>G. anatis</i>)	96.3%~98.0%	97.7%~99.6%	97.7%~99.0%
鸡杆菌复合群 1 (<i>G. genomosp 1</i>)	88.8%~89.9%	96.2%~97.5%	92.6%~93.6%
鸡杆菌复合群 2 (<i>G. genomosp 2</i>)	-	95.7%~97.1%	-
鸡杆菌复合群 3 (<i>G. genomosp 3</i>)	-	93.1%~94.5%	87.9%~88.7%
输卵管炎鸡杆菌 (<i>G. salpingitidis</i>)	-	91.7%~93.2%	87.3%~88.3%
海藻糖发酵鸡杆菌 (<i>G. trehalosi fermentans</i>)	-	92.1%~93.4%	85.5%~86.5%
虎皮鸚鵡鸡杆菌 (<i>G. melopsittaci</i>)	-	93.0%~94.7%	86.7%~88.1%
多杀性巴氏杆菌 (<i>P. multocida</i>)	76.9%~77.5%	89.5%~91.0%	83.4%~84.2%

- 无该鸡杆菌种对应基因的序列

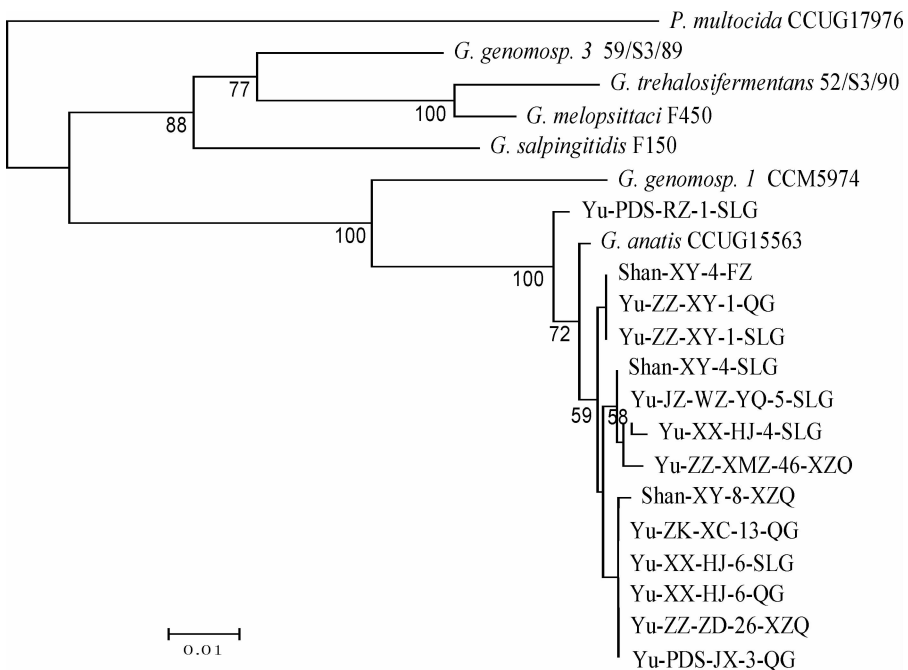
- No corresponding gene sequence of the *Gallibacterium* species



用 1 000 个重复, 仅显示大于 50% 的结点支持值, 标尺代表 0.005 substitutions/site
 Percent bootstrap support (>50%) from 1 000 replicates (analyzed by neighbour-joining methods) is indicated at each node. Scale bar indicated an evolutionary distance of 0.005 substitutions per site in the sequence

图 2 16S rRNA 基因遗传进化树

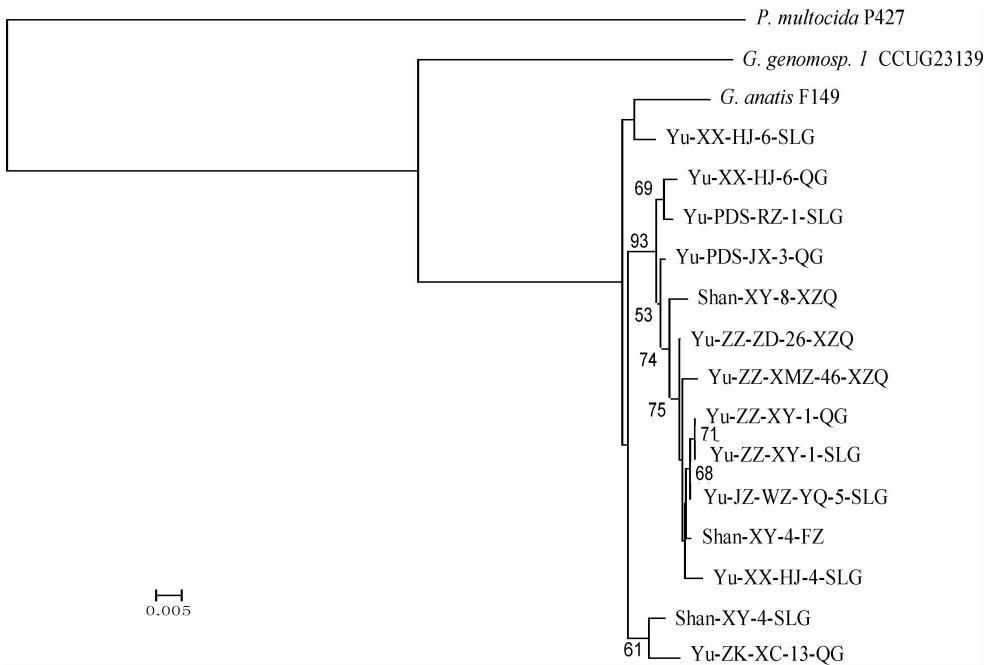
Fig. 2 Phylogenetic tree inferred from 16S rRNA gene sequences



用 1 000 个重复, 仅显示大于 50% 的结点支持值, 标尺代表 0.01 substitutions/site
 Percent bootstrap support (>50%) from 1 000 replicates (analyzed by neighbour-joining methods) is indicated at each node. Scale bar indicated an evolutionary distance of 0.01 substitutions per site in the sequence

图 3 *rpoB* 基因遗传进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree inferred from *rpoB* gene sequences



用 1 000 个重复,仅显示大于 50%的结点支持值,标尺代表 0.005 substitutions/site
Percent bootstrap support (>50%) from 1 000 replicates (analyzed by neighbour-joining methods) is indicated at each node. Scale bar indicated an evolutionary distance of 0.005 substitutions per site in the sequence

图 4 *gyrB* 基因遗传进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree inferred from *gyrB* gene sequences

3 讨论

16S rRNA 基因序列比较在鸡杆菌分类研究中具有重要价值,但对亲缘关系非常近(相似性大于 97%)的种却难以区分^[18]。资料显示鸭源鸡杆菌与鸡杆菌复合群 1、2 之间的相似性大于 97%^[4],因此本研究同时选用 *gyrB* 和 *rpoB* 2 个看家基因位点进行相似性分析。基于 3 个看家基因位点的系统发育分析显示:14 株分离株与鸭源鸡杆菌模式株处于同一个群中。由 3 个看家基因的序列比对结果可知,14 株分离株与鸭源鸡杆菌模式株之间的相似性非常高,均高于 96.3%。上述结果表明:14 株鸡杆菌分离株均属于鸭源鸡杆菌种,*gyrB* 基因可用于鸡杆菌种类鉴定及系统发育分析。

鸡杆菌分离株与复合群 1 参考株之间的相似性分析结果(表 5)显示:基于 *gyrB* 基因序列比较的相似性明显比基于 16S rRNA、*rpoB* 基因序列比较的相似性要低。从而表明 *gyrB* 基因在鸡杆菌近缘种相似性分析时能显示出较大的差异,更适合于区别近缘种。

试验结果显示:陕西的 3 株鸡杆菌与河南的 11 株鸡杆菌之间的相似性非常高,介于 97.3%~

100.0%。它们在进化树中处于同一个群,没有形成各自的分支;健康鸡分离的 3 株鸡杆菌与输卵管炎病鸡分离的 11 株鸡杆菌间的相似性介于 97.1%~100.0%,在进化树中处于同一个群,没有形成各自的分支。上述结果表明:在 *gyrB*、*rpoB* 和 16S rRNA 3 个看家基因位点,鸡杆菌河南株与陕西株之间、鸡杆菌输卵管炎病鸡分离株与健康鸡分离株之间均无明显遗传上的差异。该结论为鸡杆菌分子流行病学调查奠定了基础,对豫陕 2 省鸡杆菌感染的防治有一定的参考意义。

根据 2009 年 Bisgaard 等^[19]的研究结果,该属目前包括 4 个已命名的种:鸭源鸡杆菌(*Gallibacterium anatis*)、输卵管炎鸡杆菌(*Gallibacterium salpingitidis*)、虎皮鸚鵡鸡杆菌(*Gallibacterium melopsittaci*)和海藻糖发酵鸡杆菌(*Gallibacterium trehalosifermentans*),以及 3 个复合群(*Genomospecies* 1、2 和 3)。本研究中的 14 株鸡杆菌经鉴定均属于鸭源鸡杆菌种,结合张金来^[9]、高冬生^[10]等的研究结果,截止目前,国内分离的鸡杆菌均为鸭源鸡杆菌种,而未鉴定出其它种,具体原因仍不清楚。笔者认为:除了高冬生等^[10]所分析的几个原因(鸭源鸡杆菌是我国鸡群中的优势流行菌株、样本数量

少和宿主单一等)外,还可能与鸡杆菌分离鉴定的方法有关。资料显示在鸡杆菌属的7个种中,有溶血特性的种类包括:鸡杆菌复合群1和2,以及溶血表型的鸭源鸡杆菌,而其余4个种及非溶血表型的鸭源鸡杆菌均无溶血性^[20]。所以,在进行鸡杆菌分离时,溶血表型的菌株易于鉴别筛选,而非溶血表型的菌株容易漏检。因此,今后在鸡杆菌的分类及进化分析研究中,一方面要增加样本数量和宿主种类,另一方面要注意对非溶血性鸡杆菌的分离鉴定。

参考文献:

- [1] CHRISTENSEN H, BISGAARD M, BOJESEN A M, et al. Genetic relationships among avian isolates classified as *Pasteurella haemolytica*, *Actinobacillus salpingitidis* or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen. nov, comb. nov and description of additional genomospecies within *Gallibacterium* gen. nov [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, 53: 275-287.
- [2] BOJESEN A M, NIELSEN S S, BISGAARD M. Prevalence and transmission of haemolytic *Gallibacterium* species in chicken production systems with different biosecurity level [J]. *Avian Pathol*, 2003, 32(5): 503-510.
- [3] BISGAARD M. Incidence of *Pasteurella haemolytica* in the respiratory tract of apparently healthy chickens and chickens with infectious bronchitis. Characterisation of 213 strains [J]. *Avian Pathol*, 1977, 6(4): 285-292.
- [4] HUANG-FU H P, WANG C Q, CHEN L, et al. Molecular identification of *Gallibacterium* from hen and analysis of its 16S rRNA gene [J]. *Agri Sci & Tech*, 2009, 10(1): 43-46, 55.
- [5] 王川庆, 陈 陆, 杨 霞, 等. 蛋鸡群卡氏杆菌感染情况的初步研究 [J]. *河南农业科学*, 2008, 3: 97-100.
- [6] BOJESEN A M, NIELSEN O L, CHRISTENSEN J P. *In vivo* studies of *Gallibacterium anatis* infection in chickens [J]. *Avian Pathol*, 2004, 33(2): 145-152.
- [7] 郑鹿平. 我国鸡群鸡杆菌的首次分离鉴定及生物学特性初步研究 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2010.
- [8] 郑鹿平, 杨 霞, 陈 陆, 等. 45株鸡卡氏杆菌的分离鉴定 [J]. *中国兽医学报*, 2010, 30(3): 347-351.
- [9] 张金来, 杨 猛, 陈 陆, 等. 鸡杆菌河南分离株的分子进化分析 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2011, 39(6): 8-14.
- [10] 高冬生, 杨 霞, 陈 陆, 等. 河南山西部分鸡杆菌16S rRNA基因序列分析[CA]//中国畜牧兽医学会禽病学分会第十五次学术研讨会论文集, 2010.
- [11] 田明星, 林 艳, 邹年莉, 等. 鸡卡氏杆菌的分离与16S rRNA基因的分析鉴定 [J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(9): 57-61.
- [12] 张 嵘, 蔡加昌, 张书梅, 等. *gyrB*基因和16S rRNA基因序列分析在沙门菌属细菌鉴别中的临床应用评价 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2007, 27(4): 368-369.
- [13] 安 然, 易图永, 肖启明, 等. *gyrB*基因在细菌分类和检测中的应用 [J]. *江西农业学报*, 2010, 22(4): 18-20.
- [14] 李献梅, 王小芬, 杨洪岩, 等. 促旋酶(Gyrase)B亚单位基因 *gyrB* 在鉴别细菌近缘种中的应用 [J]. *微生物学报*, 2008, 48(5): 701-706.
- [15] WEISBURG W G, BARNS S M, PELLETIER D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. *J Bacteriol*, 1991, 173(2): 697-703.
- [16] CHRISTENSEN H, KUHNERT P, OLSEN J E, et al. Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the 16S rRNA gene within the *Pasteurellaceae* [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54(5): 1601-1609.
- [17] YAMAMOTO S, HARAYAMA S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* Genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *pseudomonas putida* strains [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(3): 1104-1109.
- [18] CHRISTENSEN H, KUHNERT P, BUSSE H J, et al. Proposed minimal standards for the description of genera, species and subspecies of the *Pasteurellaceae* [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, 57(1): 166-178.
- [19] BISGAARD M, KORCZAK B M, BUSSE H J, et al. Classification of the taxon 2 and taxon 3 complex of Bisgaard within *Gallibacterium* and description of *Gallibacterium melopsittaci* sp. nov., *Gallibacterium trehalosifermentans* sp. nov. and *Gallibacterium salpingitidis* sp. Nov [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2009, 59(4): 735-744.
- [20] KRISTENSEN B M, FREES D, BOJESEN A M. Expression and secretion of the RTX-toxin GtxA among members of the genus *Gallibacterium* [J]. *Vet Microbiol*, 2011, 153(1-2): 116-123.