

彭泽鲫卵源致病性水霉的鉴定及其生物学特性

夏文伟[△] 曹海鹏[△] 王浩 张世奇 杨先乐*

(上海海洋大学 国家水生动物病原库 上海 201306)

摘要: 从患病的彭泽鲫卵上分离 3 株丝状真菌, 经人工感染试验证实其中 1 株丝状真菌 JL1 对彭泽鲫卵具有致病性, 并进一步研究了其形态与生长特性, 开展了 ITS rDNA 序列分析。实验结果表明, 菌株 JL1 菌丝为透明管状结构, 中间无横隔, 分枝较少; 游动孢子囊多数呈棒状, 游动孢子呈多排排列, 发育成熟后从孢子囊中释放出来, 并迅速游离; 藏卵器呈球形, 与雄器同枝或异枝。菌株 JL1 的 ITS rDNA 序列与 GenBank 基因库中水霉属菌株自然聚类, 同源性高达 99%, 与 *Saprolegnia* sp. H (登录号: EF460351) 的亲缘关系最近。结合形态特征与 ITS 序列鉴定的结果, 判定菌株 JL1 为水霉菌(*Saprolegnia* sp.)。此外, 菌株 JL1 在 5 °C-30 °C、pH 4-11 范围内均能生长, 最适生长温度和 pH 范围分别为 25 °C-30 °C 和 6-9。同时菌株 JL1 对 NaCl 敏感, 质量分数为 2% 的 NaCl 即可抑制其生长, 可以作为该病防治的依据。

关键词: 卵, 水霉, 鉴定, 生物学特性

Identification and biological characteristics of a pathogenic *Saprolegnia* sp. from the egg of Pengze crucian carp (*Carassius auratus pengzesis*)

XIA Wen-Wei[△] CAO Hai-Peng[△] WANG Hao ZHANG Shi-Qi YANG Xian-Le*

(National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Three filamentous fungal strains were isolated from *Carassius auratus* eggs with Saprolegniasis, and strain JL1 was proved to be pathogenic to *Carassius auratus* eggs by artificial infection. Therefore, morphology and growth characteristics of strain JL1 were studied, and the phylogenetic analysis based on its ITS rDNA sequence was further conducted. The experimental results showed that the hyphae of strain JL1 was aseptate, transparent and seldom branched. Its zoosporangia were often clavate and renewed internally. Primary zoospore was multi-row arrangement in zoosporangia and dis-

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金项目(No. nycytx-49-17); 上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金项目(No. ssc-07006); 农业部水产种质资源与利用重点开放实验室资助(No. KFT2008-5); 对虾养殖管理信息系统研究与建立项目(No. nyhyzx07-042); 淡水鱼类出血性疾病综合防治技术集成示范项目(No. 200803013)

* 通讯作者: Tel: 86-21-61900453; ✉ xlyang@shou.edu.cn

[△] 共同第一作者

收稿日期: 2010-07-12; 接受日期: 2010-10-13

charged in *Saprolegnia* fashion. Spherical oogonia was attached by monoclinous or diclinous antheridium hyphae. The ITS rDNA sequences of strain JL1 was naturally clustered with ITS rDNA sequences of *Saprolegnia* sp. submitted to GenBank with 99% of homology, and had closest relationship with *Saprolegnia* sp. H (accession number: EF460351). Combined morphological characterization with phylogenetic analysis based on ITS rDNA sequence, strain JL1 was identified as *Saprolegnia* sp.. In addition, strain JL1 could grow at 5 °C–30 °C and pH 4–11, its optimum growing temperature and pH were 25 °C–30 °C and 6–9, respectively. Strain JL1 was sensitive to sodium chloride, its growth could be completely inhibited by 2% NaCl, which could serve as a foundation for the Saprolegniasis control.

Keywords: Eggs, *Saprolegnia* sp., Identification, Biological characteristics

水霉 (*Saprolegnia*) 隶属于茸鞭生物界 (Stramenopila)、卵菌纲 (Oomycetes)、水霉目 (Saprolegniales)、水霉科 (Saprolegniaceae)^[1], 是淡水水体中的常见种类。据报道, 寄生水霉 (*Saprolegnia parasitica*)、多子水霉 (*S. ferax*)、异枝水霉 (*S. diclina*) 是危害极大的淡水致病菌, 几乎能够感染包括斑点叉尾鲷、虹鳟、花鲈等^[2-4]在内的所有淡水鱼类。因此, 开展水霉病病原学研究对有效预防水产动物水霉病的爆发具有重要的意义。目前国内学者报道了花鲈、大鲵、施氏鲟等水产动物水霉病及其病原^[4-6], 而关于鱼卵水霉病的病原学研究极为匮乏。2010年5月份, 仙桃市沙湖水产技术推广站人工繁殖的彭泽鲫卵发生严重的水霉病, 因生长迅速的水霉菌丝在一定程度上导致鱼卵周围的水流减缓, 阻碍氧气的运输, 引起鱼卵死亡, 使孵化率降低^[7]。鉴此, 本实验从患水霉病的彭泽鲫受精卵上分离了一株致病性水霉菌, 并对其生物学特性进行了研究, 以期鱼卵水霉病的有效防治提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 菌株的分离与纯化

将发病鱼卵用75%酒精浸洗2-3s, 然后用无菌蒸馏水冲洗数次, 置于加有100 mg/L 链霉素-青霉素的马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)平板上, 在25 °C 恒温培养24 h后即在长出的菌落边缘放置无菌油菜籽, 在25 °C 恒温继续培养, 待油菜籽上覆盖菌丝后将其取出并置于灭菌过滤河水中, 于25 °C 培养直至游动孢子释放。无菌吸取100 μL 孢子悬液至PDA 平板上均匀涂布, 25 °C 恒温培养并切取单

菌落琼脂块到PDA 平板上进行纯化培养, 于4 °C 保存待用。

1.2 分离菌株的人工感染试验

将长有菌丝的油菜籽放到灭菌过滤河水中, 于25 °C 恒温培养直至产生大量游动孢子, 然后用3层无菌纱布过滤制成终浓度为 5×10^3 个/mL 的孢子悬液。分别取40粒彭泽鲫受精卵放入装有孢子悬液的培养皿中, 用吸管多次吹打以充氧, 以放入灭菌过滤河水(不加孢子)的受精卵为对照。彭泽鲫受精卵在无菌水中清洗后, 镜检没有菌丝或孢子附着才用于试验。在显微镜下观察和记录卵的感染情况, 并计算感染率(%)。以镜检卵膜出现明显菌丝为感染。

1.3 分离菌株的鉴定

1.3.1 分离菌株的形态观察: 将原分离菌株接种于放有无菌油菜籽粒的PDA 平板上, 于25 °C 恒温培养直至油菜籽粒上长满菌丝, 然后将长满菌丝的油菜籽转至装有灭菌过滤河水的6孔板中, 分别于15 °C 和25 °C 恒温培养, 连续2周在倒置显微镜下观察初生孢子囊、游动孢子的释放与排列及藏卵器和雄器等形态特征。

1.3.2 分离菌株的 ITS rDNA 序列分析: 参考可小丽等^[8]的方法对分离菌株DNA 提取和ITS rDNA 序列PCR 扩增。PCR 产物测序由上海生工生物工程有限公司完成。将测得ITS rDNA 序列用DNAMAN 软件编辑后, 在NCBI 中利用BLASTn 软件与GenBank 数据库中已知序列进行同源性比较, 选取同源性较高的序列并利用软件BioEdit 7.0 和MEGA 4.0 进行多重比较后通过最大简约(Maximum-Parsimony, MP)法构建系统发育树。

1.4 分离菌株生长特性的测定

1.4.1 温度对分离菌株生长的影响: 参照 Hussein 等^[9]的方法用打孔器制备直径为 6 mm 的菌饼, 将其置于 PDA 平板中央, 然后分别于 5 °C、10 °C、15 °C、20 °C、25 °C、30 °C、35 °C 等温度下恒温培养 48 h 后, 用十字交叉法测量菌落直径(mm), 计算菌落的生长速度(mm/h), 每组 3 次重复。

1.4.2 pH 对分离菌株生长的影响: 配制 PDA 培养基, 常规灭菌后, 用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 调节 pH 值分别为 3、4、5、6、7、8、9、10、11。参照 Hussein 等^[9]的方法用打孔器制备直径为 6 mm 的菌饼, 将其分别置于不同 pH 值的 PDA 平板中央, 然后置于 25 °C 恒温培养 48 h 后, 用十字交叉法测量菌落直径(mm), 计算菌落的生长速度(mm/h), 每组 3 个重复。

1.4.3 NaCl 对分离菌株生长的影响: 参照 Hussein 等^[9]的方法用打孔器制备直径为 6 mm 的菌饼, 将其分别置于含 NaCl 质量浓度为 0、0.5%、1.0%、1.5%、2.0% 的 PDA 平板中央, 然后置于 25 °C 恒温培养 48 h 后, 用十字交叉法测量菌落直径(mm), 计算菌落的生长速度(mm/h), 每组 3 个重复。

1.5 实验数据处理方法

所有数据通过 SPSS11.5 软件用 ANOVA 进行方差分析, Duncan's 进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离与人工感染试验

从发病彭泽鲫卵上分离了 3 株优势丝状菌, 经

过人工回归试验观察发现菌株 JL1 对彭泽鲫受精卵具有致病性, 感染率为 35%(表 1)。镜检人工感染的卵, 其表面生有明显的丝状菌丝, 将菌丝进行再次分离, 其形态特征与原分离菌株基本一致。因此, 菌株 JL1 是该水霉病的致病菌。

2.2 致病菌株的鉴定

菌株 JL1 菌丝为透明管状结构, 中间无横隔, 分枝较少。其游动孢子囊多数呈棒状, 游动孢子呈多排排列, 发育成熟后从孢子囊中释放出来, 并迅速游离(图 1)。藏卵器呈球形(图 2), 与雄器同枝或异枝。这是水霉属菌株的典型形态特征^[10]。此外, 通过对菌株 JL1 的 ITS 序列进行扩增, 获得 752 bp 大小的片段, 此序列在 GenBank 上的登录号为: HM637287。通过 NCBI 网站对菌株 JL1 的 ITS 序列与 GenBank 数据库中已知序列进行同源性比较后发现, 菌株 JL1 与 GenBank 基因库中水霉属的菌株自然聚类, 同源性高达 99%。通过最大简约法构建的系统发育树结果(图 3)进一步表明, 菌株 JL1 与 *Saprolegnia* sp. H (登录号: EF460351) 的亲缘关系最近。结合形态特征与 ITS 序列鉴定的结果, 判定菌株 JL1 为水霉菌(*Saprolegnia* sp.)。

2.3 致病菌株的生长特性

2.3.1 温度对致病菌株生长的影响: 实验结果表明(图 4), 菌株 JL1 在 5 °C–30 °C 范围内均能生长, 其最适生长温度范围为 25 °C–30 °C。具体表现在: 菌株 JL1 在 5 °C–25 °C 恒温培养时, 随着培养温度的升高, 其生长速度显著增大; 然而在 30 °C 恒温培养时, 其生长速度较在 25 °C 恒温培养时低 7.69% ($P>0.05$), 而且在 35 °C 恒温培养时, 菌株 JL1 不生长。

表 1 分离菌株对彭泽鲫卵的人工感染情况

Table 1 Artificial infection of the isolates to Pengze crucian carp

菌株 Strain	受精卵数 Number of fertilized eggs	孢子浓度 Concentration of zoospores (spores/mL)	感染数 Number of infected eggs					感染率 Infection rate (%)
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	
–	40	0	0	0	0	0	0	0
JL1	40	5×10^3	0	3	7	14	14	35
JL2	40	5×10^3	0	0	0	0	0	0
JL3	40	5×10^3	0	0	0	0	0	0

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

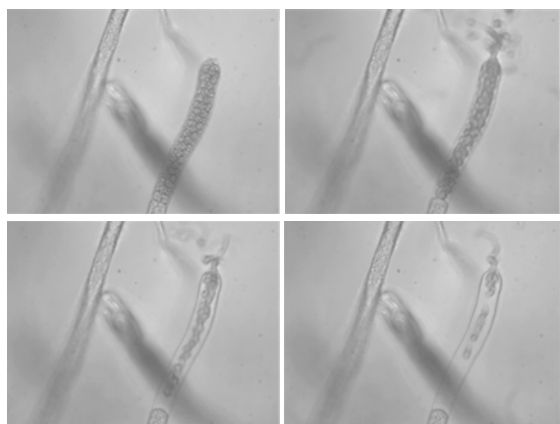


图1 菌株 JL1 游动孢子的释放过程($\times 10$)
Fig. 1 Saprolegnoid discharge of zoospores ($\times 10$)

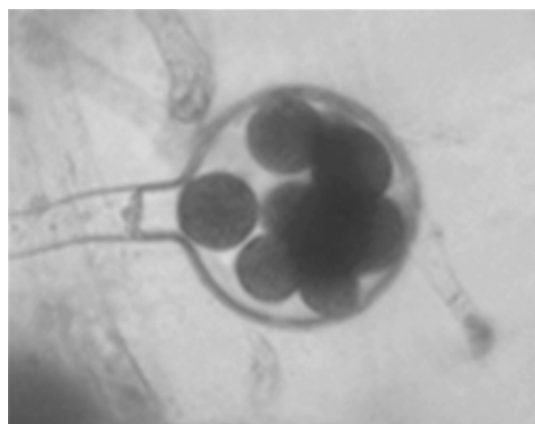


图2 菌株 JL1 成熟的藏卵器($\times 40$)
Fig. 2 The mature oogonium of strain JL1 ($\times 40$)

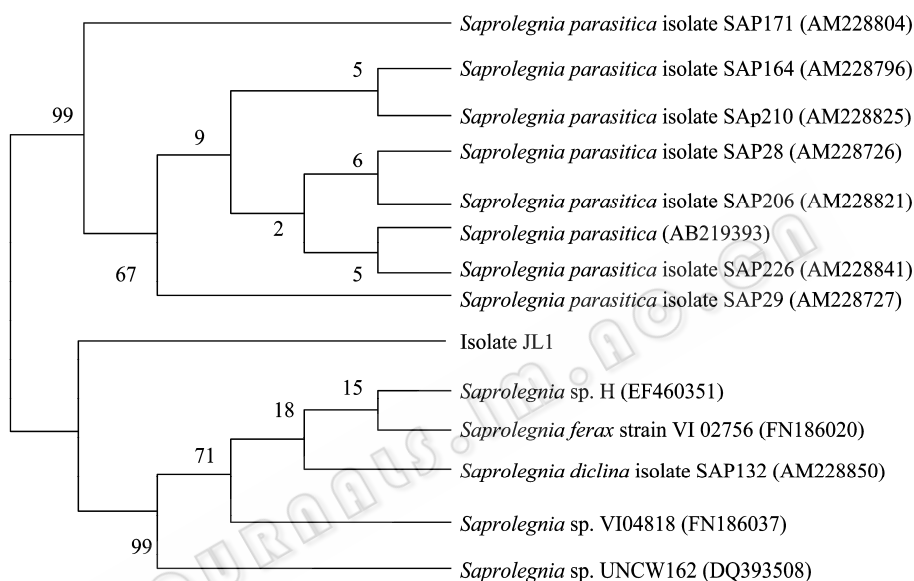


图3 基于菌株 JL1 ITS rDNA 序列所构建的系统发育树

Fig. 3 The constructed phylogenetic tree based on ITS rDNA sequence of isolate JL1

注: 分支点上的数字表示 1 000 次 Bootstrap 重抽样分析的支持百分比; 括号中的序号表示 GenBank 数据库中的登录号。

Note: The number at each branch points is percentage supported by bootstrap for 1 000 times. Date in parenthesis is GenBank accession number.

2.3.2 pH 对致病菌株生长的影响: 实验结果表明(图 5), 菌株 JL1 在 4–11 范围内均能生长, 其最适生长 pH 范围为 6–9。具体表现在: 菌株 JL1 在 pH 3–6 培养时其生长速度随着 pH 的增大而显著增大; 然而在 pH 7–11 培养时, 其生长速度随着 pH 的增大而缓慢降低。菌株 JL1 在 pH 11 培养时的生长速度仅为 pH 7 培养时的 0.51 倍($P < 0.05$)。

2.3.3 NaCl 对致病菌株生长的影响: 实验结果表

明(图 6), 菌株 JL1 在 NaCl 浓度为 0–1.5% 范围内均能生长, 但 NaCl 对其生长具有明显的抑制作用。具体表现在: 菌株 JL1 在 NaCl 浓度为 0–2.0% 培养时, 其生长速度随着初始 NaCl 浓度的升高而显著降低, 其中, 当 NaCl 浓度为 0.5% 时菌株 JL1 的生长速度是 NaCl 浓度为 0 时的 0.66 倍($P < 0.05$); 当 NaCl 浓度为 2.0% 时菌株 JL1 不生长。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

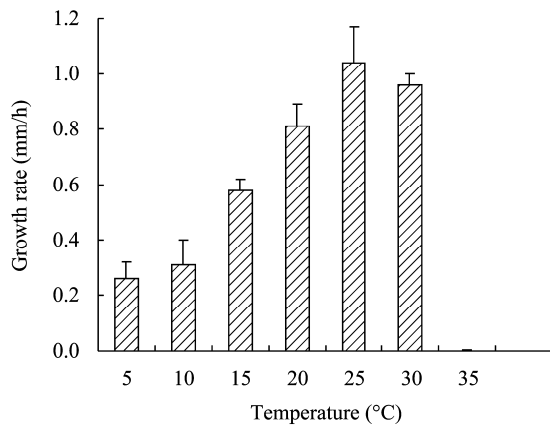


图 4 温度对菌株 JL1 生长的影响

Fig. 4 Effect of temperature on the growth of strain JL1

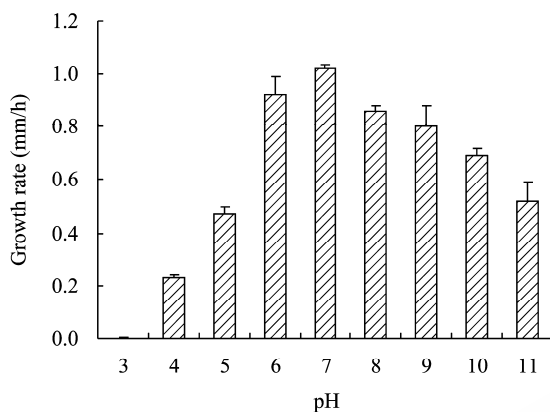


图 5 pH 对菌株 JL1 生长的影响

Fig. 5 Effect of pH on the growth of strain JL1

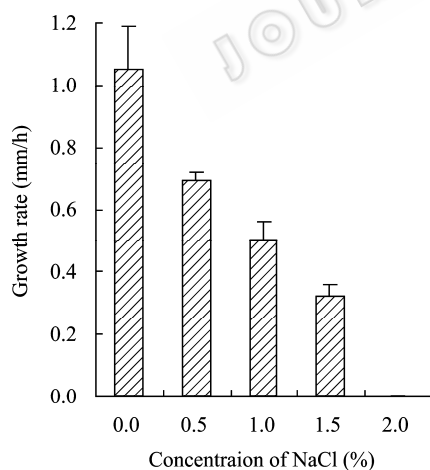


图 6 NaCl 对菌株 JL1 生长的影响

Fig. 6 Effect of NaCl on the growth of strain JL1

3 讨论

水霉病是淡水水产动物最常见的真菌性疾病之一, 目前在我国淡水水产动物体表及卵上发现的水霉主要是水霉属(*Saprolegnia*)和绵霉属(*Achlya*)的一些种类^[11]。因此, 阐明水霉病发生原因对水霉病病原进行形态与生物学特性研究很重要。鉴于此, 本实验从患水霉病的彭泽鲫卵上分离了一株致病性水霉菌株 JL1, 并研究了其形态、生长等生物学特性, 以期丰富鱼卵水霉病病原生物学资料, 为鱼卵水霉病的防治提供理论依据。

目前, 关于水霉传统的分类鉴定方法, 主要以形态特征为依据。但是有些水霉在形态上不稳定, 种间存在重叠形状, 很难对种进行鉴定和命名^[12]。近年来, 随着分子生物学技术的飞速发展, 基于 ITS rDNA 序列分析的分子生物学鉴定技术进一步弥补了水霉菌传统分类鉴定方法的不足, 由于 ITS 区域具有种内相对一致、种间差异比较明显的保守性, 同时具有序列片段较小, 易于分析的优点^[13], 因而其在水霉菌种的分子鉴定、种群间的系统发育关系分析方面得到了广泛应用。如 Diéguez-Uribeondo 等^[12]通过测定 ITS rDNA 序列, 将 *Saprolegnia diclina*-*Saprolegnia parasitica* complex 分为 5 个型。Ke 等^[14]通过形态观察和 ITS rDNA 序列分析相结合的方法成功地将分别分离自异育银鲫、斑马鱼的 2 个菌株 JY 和 BMY 鉴定为 *S. ferax*。目前国内基于 ITS rDNA 序列分析对水霉菌株进行分子鉴定研究还处于起步阶段, 仅可小丽等^[8]作了相关研究。本实验结合传统的形态鉴定方法^[10]与 ITS rDNA 序列系统发育分析, 确定菌株 JL1 为 *Saprolegnia* sp.。

温度和 pH 是鱼卵孵化过程中重要的影响因素, 同时也是水霉生长的重要理化因子。Koepudsa 等^[15]研究发现, 从挪威、苏格兰、智利分离的 8 株水霉菌在 5 °C–30 °C、pH 4–11 范围内均能生长, 最适生长温度为 25 °C, 最适 pH 范围是 7–10; Hatai^[9]试验结果表明, 其分离的水霉菌株的生长温度范围为 3 °C–33 °C。本实验结果证实菌株 JL1 在 5 °C–30 °C、pH 4–11 范围内均能生长, 最适生长温

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

度范围为 25 °C–30 °C, 最适生长 pH 范围 6–9。这与 Koeypudsa 等和 Hatai 的研究结果基本一致。此外, Kitancharoen 等^[16]研究还发现, 由于水霉菌株所处的水质条件不同, 一些水霉菌株也能够 pH 3.5 条件下正常生长。这些研究均证实了水霉菌具有很强的环境适应性, 在鱼卵正常孵化的温度和 pH 范围内都能生存与繁殖。因此, 从水霉病的发病条件来看, 只有在鱼卵孵化过程中避免鱼卵损伤, 并及时挑出死卵, 才能有效预防鱼卵水霉病的发生。

众多研究表明, 水霉对盐度具有敏感性。Hussein 等^[17]分离的水霉菌株 NJM 9851 在 3.5% NaCl 条件下不生长, 张书俊等^[6]从患病施氏鲟分离的水霉菌 XJ001 在 3% NaCl 条件下也不生长。本实验也发现 2% NaCl 即可完全抑制菌株 JL1 的生长, 对 NaCl 的敏感性更强。这些研究结果证实了 NaCl 是防治水霉病的有效药物, 同时也从侧面说明了水霉病很少在咸水水体养殖水产动物中爆发的主要原因^[18]。然而, 在养殖过程中, 需要注意水霉菌株不同, 其对 NaCl 的敏感性程度也有所差异, 在使用 NaCl 对水霉病进行防治时, 要根据水霉菌株对盐度的敏感程度合理选择 NaCl 的用量。

参 考 文 献

- [1] 阿历索保罗 CJ, 明斯 CW, 布莱克韦尔 M. 菌物学概论[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 599–601.
- [2] Quiniou SMA, Bigler S, Clem LM, et al. Effects of water temperature on mucous cell distribution in channel catfish epidermis: a factor in winter saprolegniasis[J]. Fish & Shellfish Immunology, 1998, 8(1): 1–11.
- [3] Diéguez-Urbeondo J, Cerenius L, Söderhäll K. Physiological characterization of *Saprolegnia parasitica* isolates from brown trout[J]. Aquaculture, 1996, 140(3): 247–257.
- [4] 李爱华, 聂品, 卢全章. 花鲈水霉病及其病原的初步研究[J]. 水生生物学报, 1999, 23(4): 389–391.
- [5] 安苗, 张龙, 姚俊杰, 等. 大鲵水霉病病原的形态学观察[J]. 贵州农业科学, 2009, 37(10): 146–149.
- [6] 张书俊, 杨先乐, 李聘, 等. 施氏鲟水霉病病原的初步研究[J]. 中国水产科学, 2009, 16(1): 89–96.
- [7] Kitancharoen N, Hatai K. Experimental infection of *Saprolegnia* spp. in rainbow trout eggs[J]. Fish pathology, 1996, 31(1): 49–50.
- [8] 可小丽, 汪建国, 顾泽茂, 等. 水霉菌的形态及 ITS 区分子鉴定[J]. 水生生物学报, 2010, 34(2): 293–301.
- [9] Hussein MMA, Hatai K. *Saprolegnia salmonis* sp. nov. isolated from sockeye salmon, *Onchyrhynchus nerka*[J]. Mycoscience, 1999, 40(5): 387–391.
- [10] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 21–22.
- [11] 黄琪琰. 水产动物疾病学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1993: 142–144.
- [12] Diéguez-Urbeondo J, Fregeneda-Grandes JM, Cerenius L, et al. Re-evaluation of the enigmatic species complex *Saprolegnia iclina-Saprolegnia parasitica* based on morphological, physiological and molecular data[J]. Fungal Genetics and Biology, 2007, 44(7): 585–601.
- [13] 陈剑山, 郑服丛. ITS 序列分析在真菌分类鉴定中的应用[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(13): 3785–3786, 3792.
- [14] Ke XL, Wang JG, Gu ZM, et al. Morphological and molecular phylogenetic analysis of two *Saprolegnia* sp. (Oomycetes) isolated from silver crucian carp and zebra fish[J]. Mycological Research, 2009, 113(5): 637–644.
- [15] Koeypudsa W, Phadee P, Tangtrongpiros J, et al. Influence of pH, Temperature and Sodium Chloride Concentration on Growth Rate of *Saprolegnia* sp.[J]. Journal of Scientific Research Chulalongkorn University, 2005, 30(2): 123–130.
- [16] Kitancharoen N, Yuasa K, Hatai K. Effects of *Saprolegnia diclina* and *S. parastica* isolated from various sources[J]. Mycoscience, 1996, 37(2): 385–390.
- [17] Hussein MMA, Hatai K. Pathogenicity of *Saprolegnia* species associated with outbreaks of salmonid saprolegniosis in Japan[J]. Fisheries Science, 2002, 68(5): 1067–1072.
- [18] Wood SE, Willoughby LG, Beakes GW. Preliminary evidence for inhibition of *Saprolegnia* fungus in the mucus of brown trout, *Salmo trutta* L., following experimental challenge[J]. Journal of Fish Diseases, 1986, 9(6): 557–560.