

文章编号: 1674-5566(2014)01-0080-10

## 我国淡水养殖动物主要致病性水霉菌病原的分析

张楠<sup>1</sup>, 王浩<sup>1</sup>, 丁庆忠<sup>2</sup>, 唐明虎<sup>3</sup>, 吕利群<sup>1</sup>

(1. 上海海洋大学 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; 2. 北京通州区水产技术推广站, 北京 100026; 3. 江苏广陵长江系家鱼原种场, 江苏 扬州 225000)

**摘要:** 应用 ITS (internal transcribed spacer, ITS) 区分子系统发育进化分析法和限制性片段长度多态性分析法 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) 相结合, 对近年来分别采集于中国上海、江苏、江西、四川、河北、浙江、湖北等 7 个主要淡水养殖区的 60 株疑似致病性水霉菌 (*Saprolegnia*) 进行鉴定分类, 并系统分析了我国已报道的致病性水霉菌的分类情况, 比较了分别分离自鱼体和卵的多子水霉的生物学特性。研究结果表明, 60 株疑似水霉菌分为 10 个基因型, 其 ITS-LPCR-LRFLP 谱型一致属于典型多子水霉 (*Saprolegniales ferax*)、寄生水霉 (*Saprolegniales parasitia*) 和澳大利亚水霉 (*S. australis*) 分组类型; ITS 系统发育进化分析结果显示, 我国致病性水霉菌以多子水霉和寄生水霉为主, 二者为我国淡水养殖主要的致病性水霉菌病原。此外, 对鱼体和卵来源的多子水霉生物学特征进行比对后发现, 二者没有明显差异, 同一致病菌株既可感染鱼体也可感染卵。此研究的开展丰富了我国致病性水霉菌分类统计的生物学资料, 为水霉病预警和药物防治技术的开发提供了重要的参考价值。

**研究亮点:** 水霉病是淡水养殖的常见病害, 其发病地域广, 对宿主无选择性, 感染品种多, 给水产养殖业造成了严重的危害。由于水霉菌各种间遗传性状重叠难以进行形态学分类, 本研究应用 ITS 分子鉴定技术和 RFLP 法对近年来分离的 60 株致病性水霉菌进行鉴定分类, 并结合我国水霉菌病原研究历史, 确定了我国主要致病性水霉菌为多子水霉和寄生水霉。对分别分离自鱼体和卵的多子水霉生物性状进行了探讨, 确定了其对宿主并无选择性, 这些研究为水霉病的病原学研究与有效预防提供理论参考。

**关键词:** 多子水霉; 寄生水霉; ITS 区; RFLP

**中图分类号:** S 941.43

**文献标志码:** A

水霉病 (*Saprolegniasis*) 是一种世界性分布的淡水动物疾病, 淡水动物在拉网、运输、相互摩擦等情况下发生机械性损伤, 以及在孵化过程中卵未受精成功出现坏卵、死卵时, 均易受到水霉菌入侵。水霉菌在淡水动物体表或卵上滋生大量棉絮状菌丝, 导致淡水动物免疫力下降、游动异常、食欲减退和孵化过程中大量卵的死亡变质降低孵化率, 严重危害水产养殖业的健康发展。水霉病的主要病原为水霉菌, 隶属于卵菌纲 (*Oomycetes*)、水霉目 (*Saprolegniales*)、水霉科 (*Saprolegniaceae*) 的一些种类<sup>[1]</sup>。水霉菌多达 17

属 122 种, 但是对淡水动物危害较大的种类并不多, JOHNSON 等<sup>[2]</sup> 报道能够对淡水动物产生致病性的水霉菌种类主要有多子水霉、同丝水霉 (*S. monoica*)、异丝水霉 (*S. diclina*) 和寄生水霉等。近年来我国科研人员开展了一系列水霉病的病原分离鉴定的研究, 报道了黄颡鱼卵、黄颡鱼、彭泽鲫卵、施氏鲟和花鲈等各种淡水动物及其卵的水霉病及其病原<sup>[3-7]</sup>, 但关于我国主要的致病性水霉菌种类并没有系统研究, 因此开展我国致病性水霉菌株的病原分类归纳及其生物学研究, 对有效防治水霉病的暴发具有重要的意

收稿日期: 2013-06-14 修回日期: 2013-10-23

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-46-12, CARS-46-26); 上海海洋大学研究生创新能力培养 - 优秀研究生论文培育计划 (B-5201-11-000105); 上海海洋大学水产与生命学院一流学科项目 (B-5005-12-0001-207)

作者简介: 张楠 (1987—), 男, 硕士研究生, 研究方向为临床兽医。E-mail: znsxau722@163.com

通信作者: 吕利群, E-mail: lqlv@shou.edu.cn

义。

传统的水霉鉴定主要通过菌丝形态、游动孢子释放方式、新孢子囊产生形式等形态学特征来鉴定,而属内具体种类的分类鉴定则需要基于有性繁殖器官的准确描述,包括卵原细胞、雄器及卵孢子分化位置及数目等<sup>[8]</sup>,这些方法鉴定周期较长操作繁琐,由于水霉菌种间菌丝形状、细胞器形态等非常相似所以难以辨别。水霉菌属包括的水霉菌种类繁多分类复杂,单一的形态学鉴定很难将其鉴定到种。近年来应用分子生物学手段开展水霉菌种鉴定的相关研究有了很大的进展,可小丽等<sup>[4]</sup>以核糖体 rDNA 内部转录间隔区(Internal Transcribed Spacer, ITS)区域为分子标记,建立了水霉菌株 ITS 区域 PCR 鉴定的方法。FRANCIS 等应用限制性片段长度多态性分析(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)方法将现有水霉菌种类分为 8 种类型<sup>[9]</sup>。鉴于此,本实验利用近年来对我国水霉病流行病学调查期间采集的来自于中国上海、江苏、江西、

四川、河北、浙江、湖北等 7 个主要淡水养殖区的致病性水霉菌株,进行 ITS rDNA 序列扩增比对,进行 ITS-RFLP 分析,结合我国之前已经报道的致病性水霉病原构建我国致病性水霉菌株的系统发育树,初步鉴定出我国淡水养殖主要的水霉菌是多子水霉和寄生水霉,填补了关于我国淡水养殖主要致病性水霉菌病原的研究空白。我们还比较了从草鱼和草鱼卵分离得到的致病性多子水霉菌株生物学特征,以期为我国水霉病的综合防控提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株来源和分离采集

60 株致病性水霉菌分别采样自上海、江苏、江西、四川、河北、浙江、湖北等暴发水霉病的养殖场(表 1)。将分离菌株先用 70% 酒精漂洗 3 s,用无菌水冲洗两次后接种于加有双抗的马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)平板上,按常规方法分离纯化菌株<sup>[11]</sup>,常规保存,定期传种。

表 1 菌株来源及背景

Tab. 1 Source and background of the strains

地域	菌株数	菌株名称(分离时间/分离地点/来源)
上海	17	SH01(2011/南汇/鲫鱼), SH02(2011/南汇/鲫鱼), SH03(2011/南汇/鲫鱼), SH04(2011/南汇/鲫鱼), SH05(2011/南汇/鲫鱼), SH06(2011/南汇/鲫鱼), SH07(2011/南汇/鲫鱼), SH08(2011/南汇/鲫鱼), SH09(2011/南汇/鲫鱼), SH10(2011/金山/鲫鱼), SH11(2011/金山/鲫鱼), SH12(2011/金山/鲫鱼), SH13(2011/金山/鲫鱼), SH14(2011/金山/鲫鱼), SH15(2011/青浦/黄颡鱼卵), SH16(2011/青浦/黄颡鱼卵), SH17(2011/青浦/黄颡鱼卵)
江苏	14	JS01(2010/苏州/草鱼), JS02(2010/苏州/草鱼), JS03(2010/苏州/草鱼), JS04(2010/苏州/草鱼), JS05(2010/苏州/草鱼), JS06(2010/苏州/草鱼), JS07(2010/苏州/草鱼), JS08(2010/苏州/草鱼), JS09(2010/扬州/鲫鱼), JS10(2010/扬州/鲫鱼), JS11(2010/扬州/鲫鱼), JS12(2010/扬州/鲫鱼卵), JS13(2010/扬州/鲫鱼卵), JS14(2010/扬州/鲫鱼卵)
江西	6	JX01(2010/南昌/草鱼), JX02(2010/南昌/草鱼), JX03(2010/南昌/草鱼), JX04(2010/南昌/草鱼), JX05(2010/南昌/草鱼), JX06(2010/南昌/草鱼)
四川	6	SC01(2010/成都/草鱼卵), SC02(2010/成都/草鱼卵), SC03(2010/成都/草鱼卵), SC04(2010/成都/草鱼卵), SC05(2010/成都/草鱼卵), SC06(2010/成都/草鱼卵)
河北	4	HB01(2011/石家庄/鲟鱼卵), HB02(2011/石家庄/鲟鱼卵), HB03(2011/石家庄/鲟鱼卵), HB04(2011/石家庄/鲟鱼卵)
浙江	5	ZJ01(2011/湖州/虹鳟), ZJ02(2011/湖州/虹鳟), ZJ03(2011/湖州/虹鳟), ZJ04(2011/湖州/虹鳟), ZJ05(2011/湖州/虹鳟)
湖北	8	HuB01(2011/仙桃/虹鳟卵), HuB02(2011/仙桃/虹鳟卵), HuB03(2011/仙桃/虹鳟卵), HuB04(2011/仙桃/虹鳟卵), HuB05(2011/仙桃/虹鳟卵), HuB06(2011/仙桃/虹鳟卵), HuB07(2011/仙桃/虹鳟卵), HuB08(2011/仙桃/虹鳟卵)

### 1.2 试剂

主要试剂包括 PDA 培养基(北京陆桥公司), *Bst* UI 酶(NEB 公司), *Hha* I、*Hin* fl、*Msp* I 酶(TaKaRa 公司), SYBR Green I(北京百泰克生物公司), Taq 酶 PCR 反应试剂, DNA Marker DL5

000 等(Takara 公司), agrose(Gene 公司), ITS 引物等合成于上海生工生物工程有限公司。

### 1.3 DNA 提取

将供试菌株接种于 PDA 培养基上 20 ℃ 培养 3~7 d, 收集生长良好的菌丝, DNA 提取参照可

小丽等<sup>[9]</sup>。

#### 1.4 rDNA-ITS 区 PCR 扩增

扩增引物采用真菌核糖体基因转录间隔区 (ITS) 通用引物 ITS1 和 ITS4, 引物序列 ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATAT-3'。PCR 反应体系为 50  $\mu$ L, 反应条件为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 68  $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 40 个循环, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min<sup>[4]</sup> PCR 产物经纯化后, 送交上海生工生物工程公司进行 DNA 双向测序, 测序引物为 PCR 扩增引物。序列用 Chromas. exe 软件进行修订后提交 GenBank, 并用 BLASTn 进行同源性比较。

#### 1.5 RFLP 分析

分别利用限制性内切酶 *Bst* UI、*Msp* I、*Hin* fl 和 *Hha* I 对 10 株菌的 PCR 产物进行单酶切<sup>[10]</sup>, 各酶切体系为 20  $\mu$ L, 其中 PCR 产物 10  $\mu$ L, 内切酶 (5U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, 10  $\times$  酶切缓冲液 2  $\mu$ L, 超纯水 7.5  $\mu$ L。在每种酶的适宜酶切温度下孵育 3 h。酶切产物经质量分数为 2% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 凝胶成像系统记录结果。

#### 1.6 系统发育树的构建

将测得的 ITS-rDNA 序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对并申请 GenBank 登录号。下载

相关菌株的 ITS 序列, 使用 MEGA 5.0 软件 ClustalX 方法进行系统发育分析, 以 Neighbour-joining 法构建分子系统发育树, 从而确定菌株的亲缘关系及分类地位。

#### 1.7 分离菌株的无性和有性生殖

将分离自患病草鱼得到 JS01、JS02、JS03、JS04、JS05、JS06、JS07、JS08、JS09、JS10、JS11、JS12、JS13 和 JS14 以及分离自患病草鱼卵得到的 SC01、SC02、SC03、SC04、SC05 和 SC06 共 20 个菌株接种于放有无菌油菜籽粒的 PDA 平板上, 于 20  $^{\circ}$ 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  $^{\circ}$ C 和 20  $^{\circ}$ C 恒温培养, 连续 3 周在倒置显微镜下观察游动孢子囊、游动孢子的释放以及藏卵器和雄器等形态特征。

## 2 结果与分析

### 2.1 ITS rDNA 基因片段 PCR 扩增及测序结果

通过对 60 个分离菌株的 ITS 区序列进行扩增, 分别获得 750 bp 左右的片段, 利用 DNAMAN 软件进行序列比对。如表 2 所示, 60 个分离菌株得到了 10 个不同的 ITS 区序列, 并上传 GenBank 获得 10 个菌株登录号。

表 2 ITS 序列比对结果  
Tab.2 The results of ITS rDNA analysis

登录名称	登录号	菌株名称(分离时间/分离地点/来源)
GH1	JQ266009	JS01(2010/苏州/草鱼), JS02(2010/苏州/草鱼), JS03(2010/苏州/草鱼), JS04(2010/苏州/草鱼), JS05(2010/苏州/草鱼), JS06(2010/苏州/草鱼), JS07(2010/苏州/草鱼), JS08(2010/苏州/草鱼)
JY1	JX535248	JS09(2010/扬州/鲫鱼), JS10(2010/扬州/鲫鱼), JS11(2010/扬州/鲫鱼)
JY2	JX535255	SH01(2011/南汇/鲫鱼), SH02(2011/南汇/鲫鱼), SH03(2011/南汇/鲫鱼), SH04(2011/南汇/鲫鱼), SH05(2011/南汇/鲫鱼), SH06(2011/南汇/鲫鱼), SH07(2011/南汇/鲫鱼), SH08(2011/南汇/鲫鱼), SH09(2011/南汇/鲫鱼), SH10(2011/金山/鲫鱼), SH11(2011/金山/鲫鱼), SH12(2011/金山/鲫鱼)
JE1	JX535247	JS12(2010/扬州/鲫鱼卵), JS13(2010/扬州/鲫鱼卵), JS14(2010/扬州/鲫鱼卵)
CY1	JX535254	JX01(2010/南昌/草鱼), JX02(2010/南昌/草鱼), JX03(2010/南昌/草鱼), JX04(2010/南昌/草鱼), JX05(2010/南昌/草鱼), JX06(2010/南昌/草鱼)
CYL	JX535251	SC01(2010/成都/草鱼卵), SC02(2010/成都/草鱼卵), SC03(2010/成都/草鱼卵), SC04(2010/成都/草鱼卵), SC05(2010/成都/草鱼卵), SC06(2010/成都/草鱼卵)
HS1	JX535250	SH13(2011/金山/鲫鱼), SH14(2011/金山/鲫鱼), SH15(2011/青浦/黄颡鱼卵), SH16(2011/青浦/黄颡鱼卵), SH17(2011/青浦/黄颡鱼卵)
HZL1	JX535253	HuB01(2011/仙桃/虹鳟卵), HuB02(2011/仙桃/虹鳟卵), HuB03(2011/仙桃/虹鳟卵), HuB04(2011/仙桃/虹鳟卵), HuB05(2011/仙桃/虹鳟卵), HuB06(2011/仙桃/虹鳟卵), HuB07(2011/仙桃/虹鳟卵), HuB08(2011/仙桃/虹鳟卵)
SXL	JX535252	HB01(2011/石家庄/鲟鱼卵), HB02(2011/石家庄/鲟鱼卵), HB03(2011/石家庄/鲟鱼卵), HB04(2011/石家庄/鲟鱼卵)
HZY1	JX535249	ZJ01(2011/湖州/虹鳟), ZJ02(2011/湖州/虹鳟), ZJ03(2011/湖州/虹鳟), ZJ04(2011/湖州/虹鳟), ZJ05(2011/湖州/虹鳟)

## 2.2 限制性片段长度多态性 ITS-RFLP 分析结果

获得 GenBank 登录号的 10 个菌株的 ITS rDNA 琼脂糖电泳结果如图 1 所示,均得到了 750 bp 的 PCR 扩增产物,与预期目的条带大小一致。分别用 *Bst* UI、*Hha* I、*Msp* I 和 *Hin* fl 4 种酶对 10 株菌的 ITS rDNA 片段进行酶切,如图 2 所示 4 种酶切共产生 9 个酶切片段,特征片段长度分别是

*Bst* UI,600 bp、260 bp;*Hha* I,400 bp、260 bp、150 bp;*Msp* I,500 bp、400 bp;*Hin* fl,400 bp、200 bp。10 个菌种的 PCR-RFLP 谱型一致,无多态性,其特征性片段与 FRANCIS 等<sup>[10]</sup>报道的多子水霉,澳大利亚水霉,寄生水霉分组类型一致,属于该 3 个种类的 RFLP 分型,表明这 10 个菌种亲缘关系较近。

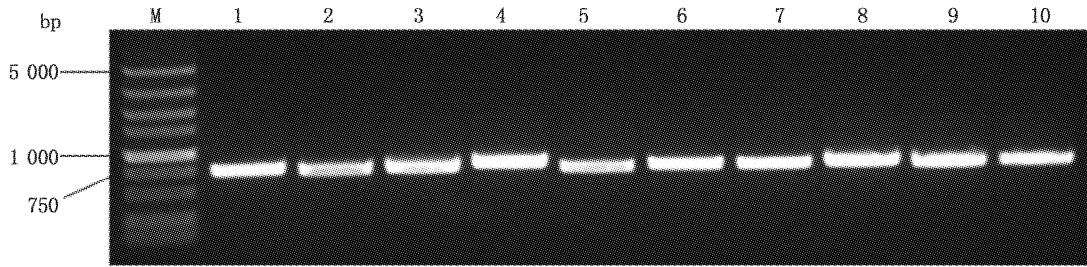


图 1 10 株菌 ITS rDNA 基因片段 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis pattern of PCR products of rDNA ITS amplified from ten *Saprolegnia* 1-10. 分别为 GH1, JY1, JY2, HS1, CY1, CYL, SXL, JE1, HZL1, HZY1。

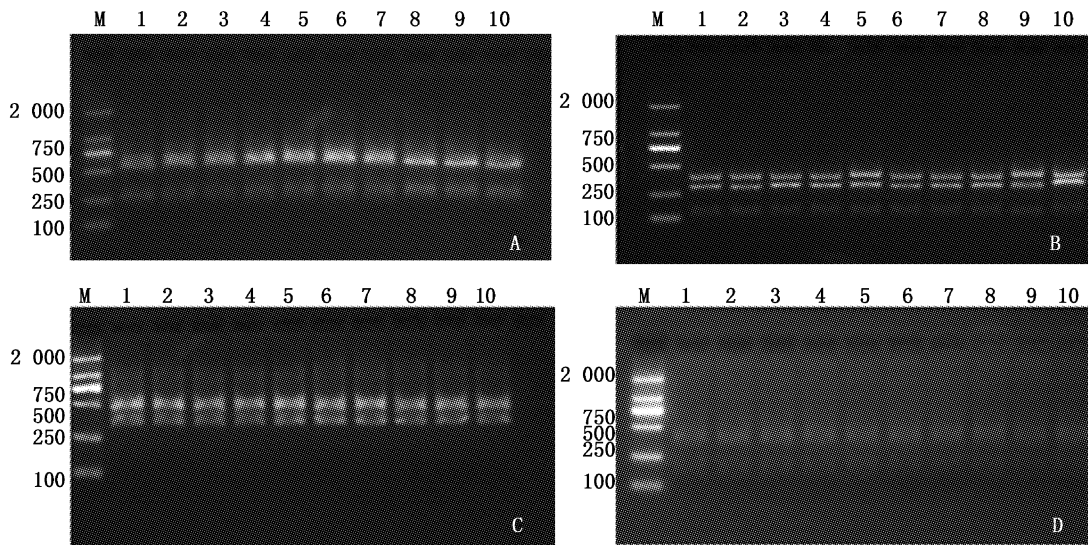


图 2 10 株菌 ITS rDNA PCR 产物酶切图谱

Fig. 2 Macrorestriction map of rDNA ITS PCR products from ten *Saprolegnia*

M. DL200; *Bst* UI 酶切图谱(A); *Hha* I 酶切图谱(B); *Msp* I 酶切图谱(C); *Hin* fl 酶切图谱(D)。

## 2.3 rDNA-ITS 序列聚类分析

将获得的 ITS 区序列导入 GenBank 数据库, BLAST 结果显示 10 个菌株序列均与数据库中水霉菌属的菌株自然聚类, 同源性高达 99%。将近年来我国报道的主要致病性水霉菌株和 GenBank

中典型的水霉菌株, 同本次鉴定得到 10 个菌株序列构建系统发育树。如图 3 所示, 邻接法(NJ)构建的系统发育树表明, 本次鉴定得到的菌株 GH1、JY1、HZY1、HS1、CYL、SXL 与可小丽<sup>[4,12]</sup>、许佳露<sup>[3]</sup>、夏文伟<sup>[5]</sup>报道的多子水霉菌株自然聚

类属于同一系统发育树分支;JE1、HZL1、CY1 与寄生水霉菌株自然聚类属于同一系统发育树分支;JY2 同澳大利亚水霉亲缘关系较近属于同一

分支。结合 ITS-PCR-RFLP 分析结果确定,本次鉴定得到的 10 个菌株序列中 6 个为多子水霉,3 个为寄生水霉,1 个为澳大利亚水霉。

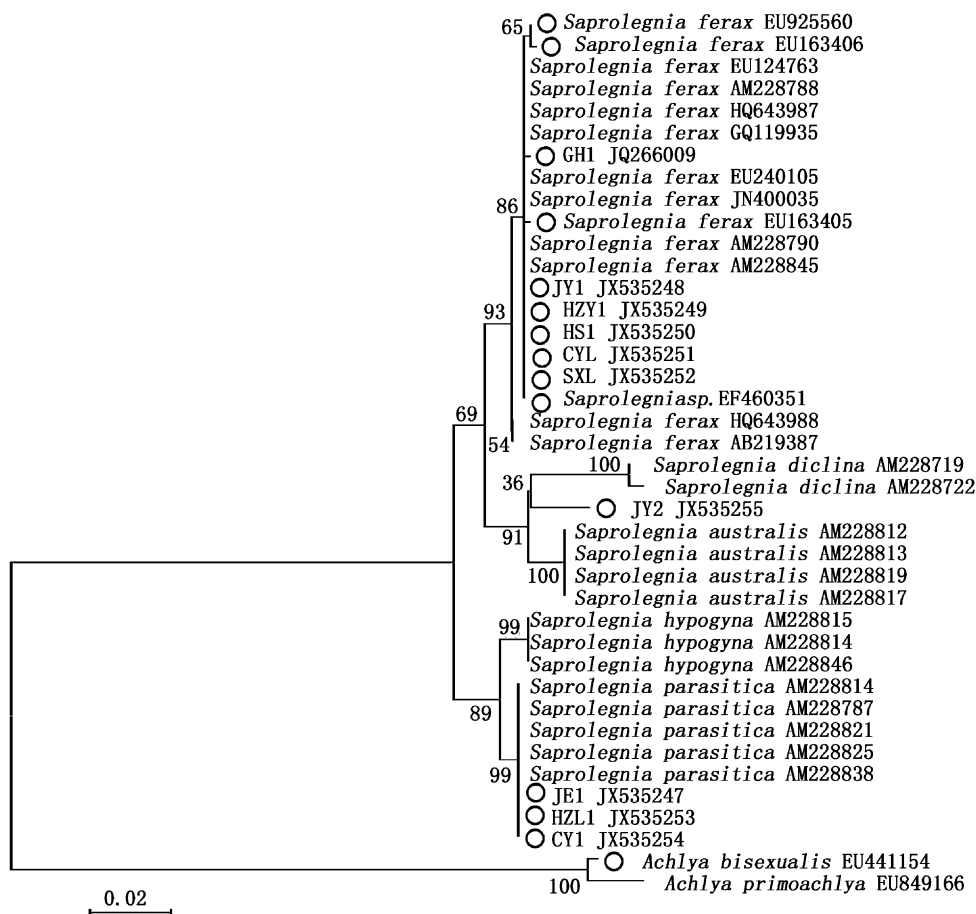


图3 *Saprolegnia* NJ 系统进化树

Fig.3 Neighbor-Joining phylogeny tree of *Saprolegnia*

分支点上的数字表示 1 000 次 Bootstrap 重抽样分析的支持百分比;序号表示 GenBank 数据库中登录号;○表示分离自我国的水霉菌株。

#### 2.4 无性繁殖

在 15~20 °C 下,无论分离自草鱼还是草鱼卵的菌株菌丝均生长良好。它们无性繁殖无明显区别,菌丝中间有横隔(图版 I-2),分枝较少,细长;均有游动孢子囊产生,侧生或顶生于菌丝(图版 I-6);其游动孢子囊呈棒状(图版 II-2),也有呈纺锤形(图版 I-1)或船形的。有新孢子囊从老孢子囊中部再生(图版 II-1);游动孢子呈多排排列,发育成熟后从孢子囊顶端释放出来,并迅速游离(图版 I-3、图版 II-3),孢子

囊前端成为空囊(图版 I-4),新的孢子囊由内部扩散重新形成(图版 II-6)。第一代游动孢子能够产生第二游动孢子(图版 I-5);第二游动孢子囊以内层出的方式产生(图版 II-5)。水霉属无性繁殖特征主要是孢子囊粗大,多为棍棒形,较常见的还有纺锤形<sup>[13]</sup>,第一代游动孢子释放便游开,这都符合典型的水霉菌属形态特征,可以观察到的菌丝横隔符合多子水霉和寄生水霉形态特征<sup>[14]</sup>。

表3 部分我国典型致病性水霉菌菌株背景  
Tab.3 Part of Chinese typical pathogenic *saprolegnia*

名称	菌种	登录号	来源(寄主/地点)	无性生殖		有性繁殖			作者
				菌丝直径	隔	有/无	藏卵器 温度	卵壁	
HSY	<i>S. ferax</i>	EU925560	黄颡鱼/湖北	NR	NR	有	15 °C	S	可小丽 <sup>[9]</sup>
BMY	<i>S. ferax</i>	EU163406	斑马鱼/湖北	25 ~ 60 μm	无	有	15 °C/18 °C	S/SP/P	可小丽 <sup>[12]</sup>
JY	<i>S. ferax</i>	EU163405	银鲫/湖北	25 ~ 60 μm	无	有	15 °C	SP/P	可小丽 <sup>[12]</sup>
HP	<i>S. ferax</i>	GQ119935	黄颡鱼卵/湖北	NR	有	有	NR	S	许佳露 <sup>[2]</sup>
JL1	<i>S. p</i>	EF460351	彭泽鲫鱼卵/湖北	NR	无	有	NR	S	夏文伟 <sup>[3]</sup>
Achlya	<i>S. achlya</i>	EU441154	河川沙塘鳢/浙江	NR	NR	NR	NR	NR	周志明 <sup>[13]</sup>
Lateolabrax	<i>S. p</i>	NR	花鲈鱼/山东	8.5 ~ 14.6 μm	有	无	NR	NR	李爱华 <sup>[5]</sup>
GH1	<i>S. ferax</i>	JQ266009	草鱼/江苏	40 ~ 50 μm	有	有	15 °C	S	张楠
JY1	<i>S. ferax</i>	JX535248	鲫鱼/江苏	40 ~ 50 μm	有	有	15 °C	S	张楠
JY2	<i>S. parasitica</i>	JX535255	鲫鱼/上海	40 ~ 50 μm	有	有	15 °C	S	张楠
JE1	<i>S. parasitica</i>	JX535247	鲫鱼卵/上海	40 ~ 50 μm	有	有	15 °C	S	张楠
CY1	<i>S. parasitica</i>	JX535254	草鱼/江西	40 ~ 50 μm	有	有	15 °C	S	张楠
CYL	<i>S. ferax</i>	JX535251	草鱼卵/四川	40 ~ 50 μm	有	有	15 °C	S	张楠
HS1	<i>S. ferax</i>	JX535250	黄颡鱼卵/上海	40 ~ 50 μm	有	有	15 °C	S	张楠
HZL1	<i>S. parasitica</i>	JX535253	虹鳟/湖北	40 ~ 50 μm	有	有	15 °C	S	张楠
SXL	<i>S. ferax</i>	JX535252	鲟鱼/河北	40 ~ 50 μm	有	有	15 °C	S	张楠
HZY1	<i>S. ferax</i>	JX535249	虹鳟/浙江	40 ~ 50 μm	有	有	15 °C	S	张楠

注:1. NR = not reported, 尚未有报道; 2. 卵壁 SP = smooth and pitted, 表面光滑有凹陷; S = smooth, 表面光滑; P = papillate, 有凸起

## 2.5 有性繁殖

分离自草鱼和草鱼卵的水霉菌在 15°C 培养 3 周均能产生大量的藏卵器, 卵细胞亦分化良好。藏卵器呈球形(图版 III、IV), 藏卵器多属顶生(图版 III, IV - 2), 卵壁光滑, 藏卵器内卵原孢子数量较多; 藏卵器主枝粗壮(图版 III - 2)。成熟藏卵器呈球形, 与雄器多是同枝(图版 III, IV - 3, 4), 依据 JOHNSON 等<sup>[15]</sup>形态鉴定检索表发现, 这些都与寄生水霉、多子水霉和异丝水霉的有性生殖器官相似。CHAPLITSKI 等<sup>[16]</sup>研究也显示多子水霉和寄生水霉形态上存在高度的亲缘关系, 通常显示它们是一种。

## 3 讨论

引起水霉病的病原是水霉菌, 其广泛分布于世界各地淡水水域, 是一种常见的水生真菌。水霉菌是水霉目水霉科的一些种类, 据报道水霉菌属种类众多, 但其致病性不尽相同<sup>[8]</sup>。因此, 开展我国致病性水霉菌分类归纳工作对水霉病的防控工作尤为重要。鉴于此, 我们对本实验室近

年来在上海、江苏、江西、四川、河北、浙江、湖北等 7 个主要淡水养殖区进行水霉病流行病学调查期间采集到的 60 株致病性水霉菌, 进行系统分类鉴定, 发现多子水霉和寄生水霉是我国主要的致病性水霉病原, 这一结果对以这两种水霉菌作为抗水霉药物模型提供了理论依据。

由于水霉菌形态不稳定, 各种间存在重叠的遗传性状, 单独依赖于通过新孢子囊产生方式、游动孢子释放方式和菌丝形态等手段很难进行分类鉴定<sup>[18]</sup>。近年来, 随着分子生物学技术的迅速发展, 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<sup>[13]</sup>, 越来越多的研究人员利用 ITS 序列分析技术作为水霉种间分析和种内鉴定的分子标记<sup>[19]</sup>, 本研究利用 PCR 方法对实验室近年来在上海、江苏、江西、四川、河北、浙江、湖北等 7 个主要淡水养殖区进行水霉病流行病学调查期间采集到的 60 株致病性水霉菌的 ITS 区进行扩增、测序及序列比对分析。结果显示, 60 个菌株分为 10 个基因型, 利用 GenBank 数据库 BLAST

后均与水霉菌属的种类自然聚类, 同源性达 99%。

ITS rDNA 序列分析法相对于传统的真菌形态学鉴定方法具有简单、快速等优点, 但由于 ITS rDNA 序列保守性较强, 在种的水平上区分真菌存在一定困难<sup>[17]</sup>。本研究利用 RFLP 多态性分析, 分别用 *Bst* UI、*Hha* I、*Msp* I 和 *Hin* fl 4 种酶对获得 GenBank 登录号的 10 个菌株的 ITS rDNA 片段进行酶切, 结果显示 10 个菌株的 ITS-PCR-RFLP 谱型一致, 特征性片段与 FRANCIS 等<sup>[10]</sup>报道的多子水霉、澳大利亚水霉和寄生水霉谱型一致, 属于该 3 个种类 RFLP 分型。

将我国之前报道的不同来源的 7 株致病性水霉菌株<sup>[2-3,5,9,12,18]</sup>与本次分离鉴定的 10 个菌株进行对比研究结果显示(图 3, 表 3): 目前我国致病性水霉菌有多子水霉、寄生水霉、澳大利亚水霉和两性绵霉(*S. achlya*) 4 种。已鉴定的 17 株致病性水霉菌以多子水霉和寄生水霉为主, 前者有 10 株, 占总菌数的 59% 左右, 后者有 4 株, 占总菌数的 24% 左右。有研究报道国外淡水养殖中最常见的致病性水霉菌种是寄生水霉<sup>[20]</sup>, 而我国最主要的致病性水霉是多子水霉, 其次才是寄生水霉, 水霉病主要病原的明确对我国进一步制定有效的水霉病防治措施提供了理论借鉴。

我们分别对草鱼体和鱼卵分离的 20 株致病性水霉菌进行无性生殖和有性生殖对比研究, 结果显示(表 3, 图版 I, II, III, IV)分离自草鱼和草鱼卵水霉菌丝形态、无性生殖中孢子囊形态和有性生殖中藏卵器的形态等特征均无明显差异, 这 20 个菌株在形态学上都符合水霉菌的典型特征。此外, 通过对 20 个菌株的 ITS 序列扩增测序共获得 3 个菌株序列, 利用邻接法构建系统发育树结果显示这 3 个菌株序列与多子水霉亲缘关系最近, 在同一分支上, 判定这 20 个菌株都是多子水霉。结果表明水霉菌具有广泛的寄主谱, 对宿主没有选择性, 同一种致病性水霉菌对鱼体和鱼卵均有致病性, 该结果与周志明等<sup>[21]</sup>报道一致。

#### 参考文献:

- [1] 阿历索保罗 C J, 明斯 C W, 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] JOHNSON T W, SEYMOUR R L, PADGETT D E. Biology and systematics of the Saprolegniaceae [M]. Biology and Systematic of the Saprolegniaceae, 2002.
- [3] 许佳露, 曹海鹏, 欧仁建, 等. 黄颡鱼卵水霉病原的分离鉴定及其无性繁殖特性 [J]. 微生物学通报, 2012, 39(4): 579 - 587.
- [4] 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.
- [5] 夏文伟, 曹海鹏, 王浩, 等. 彭泽鲫卵源致病性水霉的鉴定及其生物学特性 [J]. 微生物学通报, 2011, 38(1): 57 - 62.
- [6] 张书俊, 杨先乐, 李聘, 等. 施氏鲟水霉病原的初步研究 [J]. 中国水产科学, 2009, 16(1): 89 - 96.
- [7] 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.
- [8] 陈本亮, 张其中. 水霉及水霉病防治的研究进展 [J]. 水产科学, 2011, 30(7): 429 - 434.
- [9] STUELAND S, HATAI K, SKAAR I. Morphological and physiological characteristics of Saprolegniaceae spp. Strains pathogenic to Atlantic salmon, *Salmo salar* L [J]. Journal of Fish Diseases, 2005, 28(8): 445 - 453.
- [10] MOLINA F I, JONG S C, MA G. Molecular characterization and identification of Saprolegnia by restriction analysis of genes coding for ribosomal RNA [J]. Biomedical and Life Sciences, 1995, 68(1): 65 - 74.
- [11] PAUL B, STECIOW M M. Saprolegnia multisporea, a new oomycete isolated from water samples taken in a river in the Burgundian region of France [J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 237(2): 393 - 398.
- [12] KE X L, WANG J G, GU Z M, 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.
- [13] HATAI K, HOSHIAI G, SKAAR I. Characteristics of two Saprolegnia species isolated from coho salmon with saprolegniasis [J]. J Aquat Anim Health, 1993, 5: 115 - 118.
- [14] YUASA K, HATAI K. Relationship between pathogenicity of Saprolegnia spp. isolates to rainbow trout and their biological characteristics [J]. Fish Pathology, 1995, 30(2): 101 - 106.
- [15] JOHNSON J R, SEYMOUR R L, PADGETT D E. Biology and systematics of the Saprolegniaceae [M/OL]. [http://www.illumina-dlib.org\(2002\)](http://www.illumina-dlib.org(2002)).
- [16] CHAPLITSKI A, GALIMOVA L M, BUBENSHCHIKOVA S N. The saprolegniaceae system examined by DNA analysis [J]. Journal of evolutionary biochemistry and physiology, 1986, 22(2): 20.
- [17] PERSSON Y, ERLAND S, JANSSON H. Identification of nematode-trapping fungi using RFLP analysis of the PCR-amplified ITS region of ribosomal DNA [J]. Mycological Research, 1996, 100(5): 531 - 534.
- [18] DIEGUEZ-URIBEONDO J, FREGENEDA-GRANDES J M, CERENIUS L, et al. Re-evaluation of the enigmatic species complex Saprolegnia diclina-Saprolegnia parasitic based on

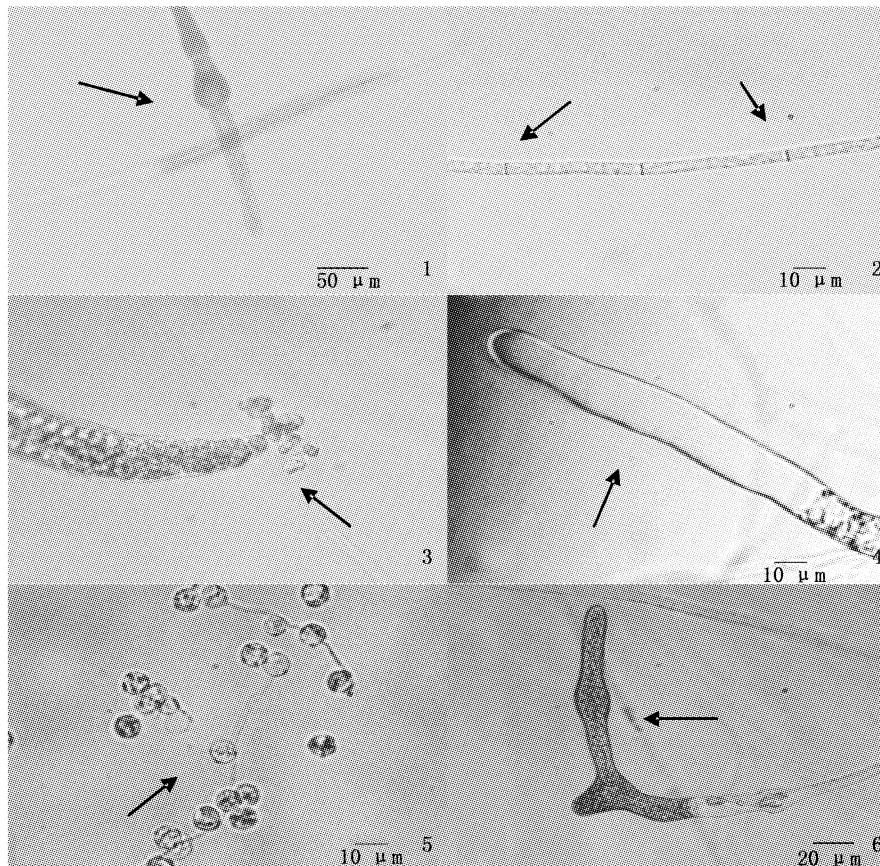
morphological, physiological and molecular data [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2007, 44(7): 585-601.

- [19] PAUL B, STECIOW M M. *Saprolegnia multispora*, a new oomycete isolated from water samples taken in a river in the Burgundian region of France [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 237(2): 393-398.

- [20] van der BERG A H, MCIAGGAN D, DIEGUEZ-URIBEONDO

J, et al. The impact of the water moulds *Saprolegnia diclina* and *Saprolegnia parasitica* on natural ecosystems and the aquaculture industry [J]. *Fungal Biology Reviews*, 2013, 27(2): 33-42.

- [21] 周志明, 曹铮, 沈锦玉, 等. 河川沙塘鳢致病真菌的特性及分子生物学鉴定 [J]. *淡水渔业*, 2011, 41(2): 69-72.

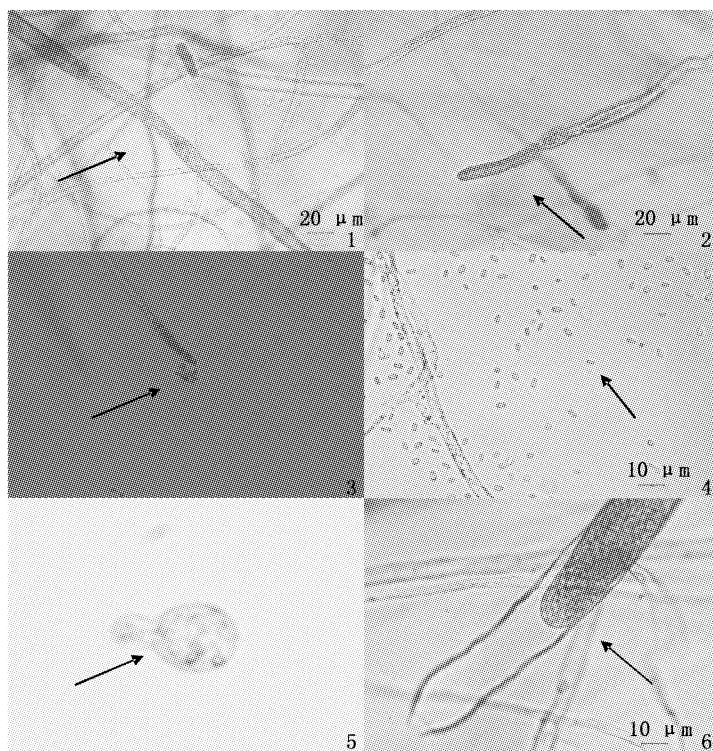


图版 I 鱼体分离水霉菌无性繁殖

Plate I Identical asexual reproduction of isolates fish *Saprolegnia*

1. 成熟的动孢子囊; 2. 菌丝中间的隔; 3. 游动孢子释放; 4. 释放完孢子的空孢子囊; 5. 第二游动孢子萌发; 6. 侧生的孢子囊。

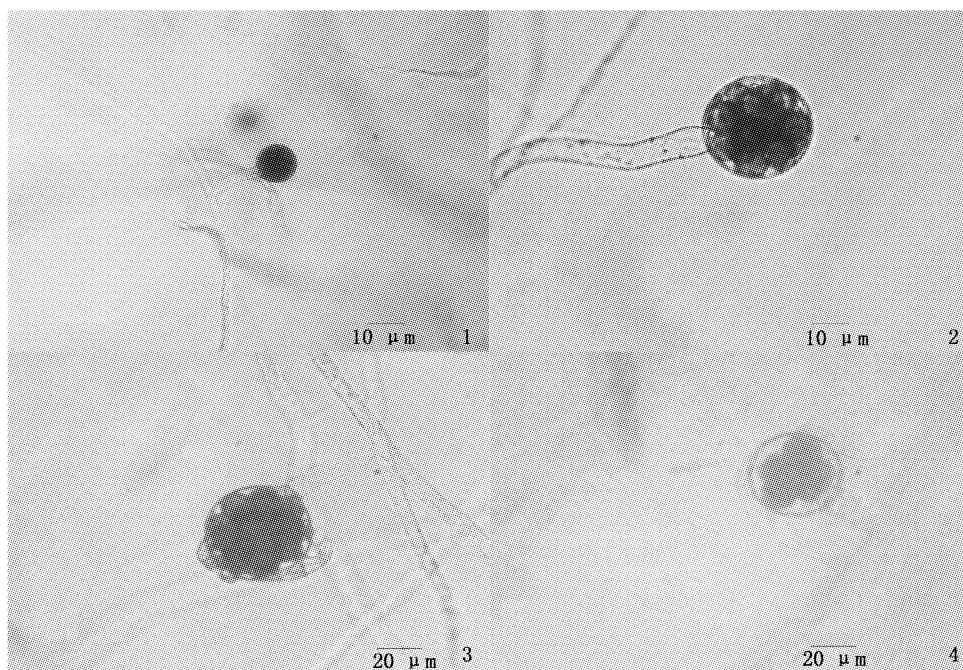




图版 II 鱼卵分离水霉无性繁殖

Plate II Identical asexual reproduction of isolates fish eggs *Saprolegnia*

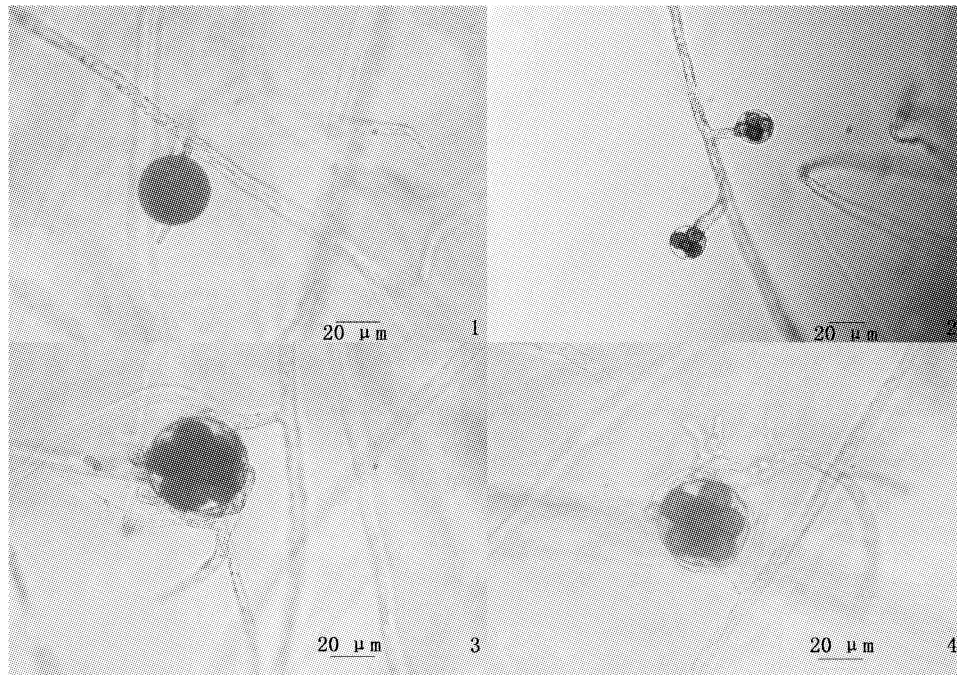
1. 新孢子囊从老囊中部再生; 2. 成熟的动孢子囊; 3. 游动孢子释放; 4. 第二游动孢子; 5. 第二游动孢子萌发; 6. 新游动孢子囊以内层出方式产生。



图版 III 鱼体分离水霉有性繁殖

Plate III Identical sexual reproduction of isolates fish *Saprolegnia*

1. 未成熟的顶生藏卵器; 2. 成熟的顶生藏卵器; 3-4. 有雄器围绕的包含多个卵孢子藏卵器。



图版IV 鱼卵分离水霉有性繁殖

Plate IV Identical asexual reproduction of isolates fish eggs *Saprolegnia*

1. 未成熟的侧生藏卵器; 2. 成熟的顶生藏卵器; 3. 有雄器围绕的包含多个卵孢子藏卵器; 4. 卵细胞分化中央型。

## Identification of major pathogenic *Saprolegnia* species in freshwater aquaculture of China

ZHANG Nan<sup>1</sup>, WANG Hao<sup>1</sup>, DING Qing-zhong<sup>2</sup>, TANG Ming-hu<sup>3</sup>, LÜ Li-qun<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources of Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Tongzhou Fisheries Technology Extension Station, Beijing 100026; 3. Yangzhou Kanjiang Fisheries Seed Farm, Yangzhou 225000, Jiangsu, China)

**Abstract:** This study used Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and Internal Transcribed Spacer (ITS) PCR sequencing technology to identify 60 isolates of suspected pathogenic *Saprolegnia* strains collected from 7 provinces including Shanghai, Jiangsu, Jiangxi, Sichuan, Hebei, Zhejiang and Hubei. Taxonomical analysis was also performed with strains of *Saprolegnia* reported in recent years. Comparative studies of physiological and molecular characteristics of pathogenic strains isolated from both infected fishes and eggs were carried out. The results showed that the 60 isolates could be classified into 10 special genotypes and all the isolates belonged to the clade of *S. ferax*, *S. australis* and *S. parasitia* by ITS-RFLP. Based on the phylogenetic tree, *S. ferax* and *S. parasitia* were the main Chinese pathogenic *Saprolegnia* strains. In addition, no significant difference existed in morphology of both asexual and sexual organs between the two *S. ferax* isolates from infected fishes and eggs. The same isolate could infect amphibian eggs and fishes. Thus, *S. ferax* and *S. parasitia* were identified as major pathogenic strains for both fish and eggs. The results could serve as a reference for the control of Saprolegniasis.

**Key words:** *Saprolegnia ferax*; *Saprolegnia parasitia*; internal transcribed spacer; restriction fragment length polymorphism