

王庆容,王福群. 埃里格孢的生物学特性及致病性初步研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(2):269-271.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.078

埃里格孢的生物学特性及致病性初步研究

王庆容, 王福群

(遵义师范学院生命科学学院/贵州省赤水河流域植物资源保护与应用研究特色重点实验室, 贵州遵义 563002)

摘要:从患病鳊鱼鳃部分离到1个菌株,通过分子鉴定和形态鉴定,初步鉴定为埃里格孢(*Embellisia allii*)。将该菌株在不同温度和不同pH值条件下培养,根据二者对其生长速率的影响来进行生物学特性初步研究;再以草鱼和鲤鱼为感染对象,用该菌进行回复感染,对其致病性作初步研究。结果表明:埃里格孢在pH值为5.0~11.0下均能生长,以pH值为9.0~11.0时生长最佳;在5~35℃时,该菌都能生长,以20℃时生长最快,温度为40℃时该菌几乎不能生长。在实验室条件下,单一菌株对草鱼和鲤鱼不具有致病性。

关键词:埃里格孢(*Embellisia allii*);生物学特性;致病性;鳊鱼;草鱼;鲤鱼

中图分类号:S941.43 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)02-0269-03

埃里格孢(*Embellisia allii*)属于暗色砖格分生孢子真菌埃里格孢属,它可以寄生于大蒜鳞茎,引起黑褐色病斑,后期病斑凹陷失水干燥,表面密生黑色霉层,菌丝体表生至埋生;在PDA和PCA培养基上生长迅速,菌落呈正圆形、黑色,产生大量分生孢子,菌丝部分细胞可膨大形成厚垣孢子。其分生孢子在水中,25℃下4h左右即可萌发。萌发时主要从两端细胞开始,也可以从中间细胞开始,萌发芽管生长迅速,48h左右萌发的芽管即可分化形成菌丝或次生分生孢子梗,产生次生分生孢子。萌发的分生孢子细胞可产生1至数个芽管,分生孢子梗亦可萌发产生芽管,亦可很快转变成次生分生孢子梗^[1]。

埃里格孢通常是从植物体表分离,本研究首次从患病鳊鱼鳃部分离到,未见从其他动物体表分离到的报道。通过不同温度和不同pH值对其生长速率影响来进行生物学特性初步研究后,再以草鱼和鲤鱼为感染对象,用该菌进行回复感染,对其致病性进行初步研究,进一步了解埃里格孢对动物的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

从鳊鱼的鳃部分离到的菌株,在PDA培养基上纯培养,将纯培养的菌种保存于4℃冰箱备用。

1.2 方 法

1.2.1 菌株的分离鉴定 提取菌株DNA,扩增其18S rRNA基因。扩增使用的引物是通用引物NS1与NS6^[2],将菌株的18S rRNA基因序列输入GenBank数据库中,查找相似菌种。将真菌接种到PDA培养基上,25℃恒温培养3~12d,每天观察菌落形态与颜色。再在显微镜下观察其产孢结构,分生孢子梗着生情况,孢子形态、大小与颜色等。采用分子鉴定和形态鉴定方法与步骤,具体步骤见文献^[3]。

1.2.2 不同pH值对埃里格孢的影响 供试pH值为5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0和11.0的PDA平板,共7个处理,平行做3次。切取菌龄一致的菌饼(直径8mm),将其置于平板中央,在28℃下恒温培养,观察并记录菌落的生长速率,培养24h后采用十字交叉法测定菌落直径^[4],试验周期为7d。

1.2.3 不同温度对埃里格孢的影响 供试温度为5、10、15、20、25、30、35、40℃共8个温度梯度,平行培养3次,切取菌龄一致的菌饼(直径8mm),将其置于平板中央,在28℃下恒温培养,观察并记录菌落的生长速率,培养24h后采用十字交叉法测定菌落直径,试验周期为7d。

1.2.4 埃里格孢的致病性 用埃里格孢回复感染草鱼和鲤鱼,提前买一批供试鱼,等到供试鱼在自然条件下生长稳定,开始进行回复感染。将鱼分装到养鱼箱中,每箱数量为10尾,平行做3次,1箱对照组,2箱试验组。对照组不进行任何处理;试验组用浸泡法(在鱼的胸鳍处用小刀割1个3~5cm

收稿日期:2015-01-29

基金项目:贵州省科技创新人才团队建设项目[编号:黔科合人才团队(2012)4004];贵州省遵义市科技项目[编号:遵市科合社字(2009)26号]。

通信作者:王庆容(1972—),女,贵州遵义人,教授,研究方向为动物分子生物学、养殖动物疾病的中草药防治。E-mail:610194977@qq.com。

Diabetes,1989,38(7):881-886.

[13] She Q B, Nagao I, Hayakawa T, et al. A simple HPLC method for the determination of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in rat tissues; the effect of vitamin B₆ deficiency on these concentrations in rat liver[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1994, 205(3): 1748-1754.

[14] Toyota T, Kai Y, Kakizaki M, et al. The endocrine pancreas in pyri-

doxine deficient rats[J]. The Tohoku Journal of Experimental Medicine, 1981, 134(3): 331-336.

[15] Jain S K. Vitamin B₆ (pyridoxamine) supplementation and complications of diabetes[J]. Metabolism, 2007, 56(2): 168-171.

[16] Chen A S, Taguchi T, Aoyama S, et al. Antioxidant activity of a Schiff base of pyridoxal and aminoguanidine[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2003, 35(11): 1392-1403.

长的小口,将PDA平板上生长的埃里格孢菌丝和分生孢子用刷子刷入养鱼箱中)和涂抹法(在鱼的胸鳍处用小刀割1个3~5 cm长的小口,用灭菌棉签沾取埃里格孢的分生孢子涂抹于伤口处)处理草鱼和鲤鱼,试验周期为15 d,观察埃里格孢的致病性。

2 结果与分析

2.1 埃里格孢的鉴定结果

将菌株的18S rRNA基因序列输入GenBank数据库中,经过用Blast工具比对,该菌株属于埃里格孢属。

经过形态观察,菌丝体表生至埋生;菌丝无色,具隔膜,壁光滑,宽2~4 μm。分生孢子梗直或弯曲,简单或具分枝,褐色至暗褐色,具隔膜,长达70 μm,宽6~8 μm,在上端产孢处屈膝状弯曲,具多个产孢孔,内壁芽生孔式产孢,合轴式延伸。产孢细胞单芽生至多芽生、合生,圆柱状,褐色。分生孢子淡褐色至褐色,单生,壁光滑,倒卵形、卵圆形、椭圆形或近圆柱形,直或形成各种弯曲,呈“乙”形或“S”形等,中间略粗、两端稍细,具多个横隔膜(通常3~6个),横隔膜加厚、色深,分隔处略隘缩,似桶箍状。偶有纵隔膜或斜隔膜,孢子脱落痕明显,(30~40) μm × (10~12) μm,可形成次生分生孢子梗(图1-a)。

分生孢子在水中,25℃时4 h左右即可萌发,主要从两端细胞萌发,也可从中间细胞萌发,萌发芽管生长迅速,48 h左右萌发的芽管即可分化形成菌丝或次生分生孢子梗,从上产



图1 菌株的分生孢子梗(a)及分生孢子(b)

生次生分生孢子。次生分生孢子可继续萌发产生细的芽管,其表面常生细小的疣突。萌发的分生孢子细胞可产生1至数个芽管,分生孢子梗亦可萌发产生芽管,多数再很快转变成次生分生孢子梗(图1-b)。

依据形态学特征,结合分子鉴定结果,初步鉴定为丝孢纲(Hyphomycetes)丝孢目(Moniliales)埃里格孢属(*Embellisia*)埃里格孢(*Embellisia allii*)^[5]。

2.2 不同pH值对埃里格孢生长速率的影响

在不同pH值条件下培养,观察pH值对埃里格孢生长的影响。由图2和表1可见,埃里格孢在pH值为5.0~11.0均能生长,差异极显著($P < 0.01$) (SPSS软件的单样本 t 检验),表明pH值对埃里格孢的生长影响非常明显。由表1可见,pH值为9.0、10.0和11.0时,菌丝生长速率相对较快,分别为34.45、36.38、36.56 mm/d。

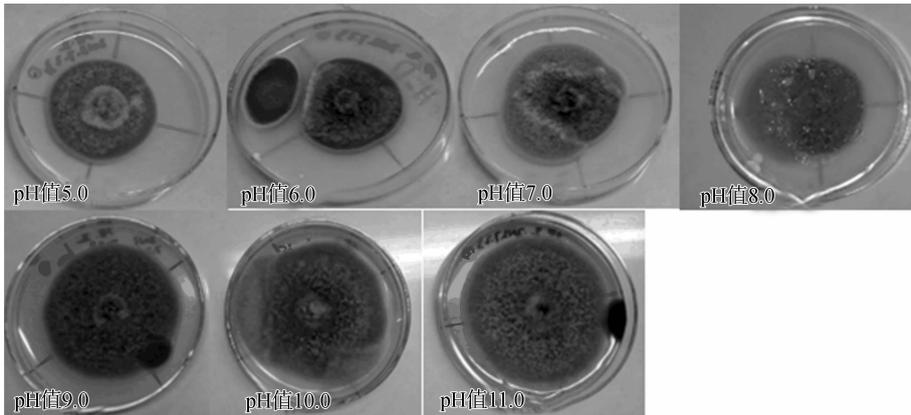


图2 不同pH值对埃里格孢的影响

表1 不同pH值对埃里格孢菌丝生长速率的影响

次数	菌落生长速率(mm/d)							差异显著性	
	pH值5.0	pH值6.0	pH值7.0	pH值8.0	pH值9.0	pH值10.0	pH值11.0	t 值	P 值(双侧)
1	26.21	30.29	28.36	29.57	34.36	33.86	43.79	14.722	0.000
2	25.43	26.79	26.14	35.29	35.29	38.07	32.71	16.030	0.000
3	32.21	24.93	25.07	28.64	33.71	37.21	32.57	17.650	0.000
平均	27.95	27.34	26.52	31.17	34.45	36.38	36.56	19.198	0.000

注:接种菌斑直径为8 mm。

2.3 不同温度对埃里格孢的影响

在不同温度条件下培养,观察温度对埃里格孢生长的影响。由表2、图3可见,在5~20℃温度范围内,菌丝生长速度随温度升高而增大;在20~35℃温度范围内,菌丝生长速率随温度升高而减慢。用SPSS软件的进行单样本 t 检验,差异极显著($P < 0.01$),表明温度对埃里格孢的生长影响非常

明显。25℃和30℃生长速率相差不大,菌斑分别达30.74 mm/d和30.57 mm/d,20℃生长最快,达38.83 mm/d,可视为最适温度。

2.4 埃里格孢的致病性

用浸泡法和涂抹法回复感染草鱼和鲤鱼,15 d之后,试验组的鱼身上没有发现明显的感染症状。在鱼体的伤口周围

表2 不同温度对埃里格孢菌丝生长速率的影响

次数	菌落生长速率(mm/d)								差异显著性	
	5℃	10℃	15℃	20℃	25℃	30℃	35℃	40℃	t值	P值(双侧)
1	10.07	12.00	14.29	35.21	33.86	33.29	14.57	8.00	4.848	0.002
2	9.86	11.76	15.57	41.86	30.93	32.07	17.64	8.00	4.783	0.002
3	10.00	11.57	15.14	39.43	27.43	26.36	18.14	8.00	5.119	0.001
平均	9.98	11.78	15.00	38.83	30.74	30.57	16.78	8.00	4.963	0.002

注:接种菌斑直径为8 mm。

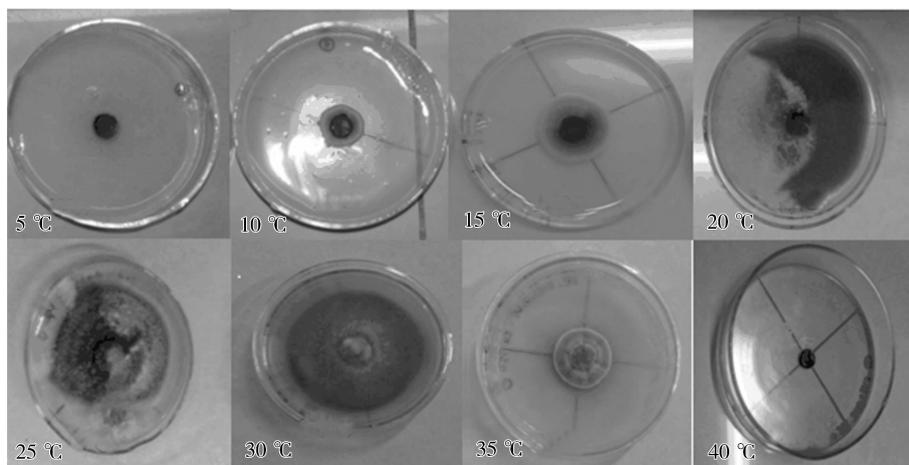


图3 不同温度对埃里格孢的影响

取材进行再培养,没有发现埃里格孢,初步判断埃里格孢对草鱼和鲤鱼无感染能力,单一菌株的埃里格孢可能对淡水鱼无致病性。

3 讨论

对从患病鳊鱼身上分离的埃里格孢进行生物学特性的初步研究,将菌株接种到不同 pH 值的 PDA 培养基上,于温度 25℃ 恒温培养,发现 pH 值为 9.0~11.0 时,埃里格孢的生长速率较快(表 1)。将菌株接种到 PDA 培养基上,在不同温度下恒温培养,在温度 5~20℃ 范围内,菌丝生长速率随温度升高而增大;温度 20~35℃ 内,菌丝生长速率随温度升高而减小,差异极显著;25℃ 和 30℃ 生长速度相差不大,20℃ 时埃里格孢生长最快,40℃ 时菌丝几乎不生长(表 2)。

陈伟群等报道埃里格孢寄生于大蒜鳞茎,引起黑褐色病斑,后期病斑凹陷失水干燥,表面密生黑色霉层^[5],但该菌是否致病于动物还未查到相关报道。本试验是针对从鳊鱼鳃部分离的埃里格孢通过不同温度和不同 pH 值对它的生长影响来进行生物学特性初步研究后,再以草鱼和鲤鱼为感染对象,用该菌进行回复感染,对其致病性作初步研究,试验结果表明,15 d 之后,试验组的鱼身上没有发现真菌埃里格孢,所以埃里格孢对草鱼和鲤鱼可能没有致病性。

据张月星等报道,常见的真菌性鱼病有水霉病、鳃霉病 2 种^[6]。鱼在换水或搬运时体表受伤,局部皮肤坏死,水霉菌便乘机入侵,主要症状为病变部位长着大量棉絮状的菌丝,像

一团团的毛,鱼体由于负担过重,游动失常,食欲减退,甚至会瘦弱而死。鳃霉病主要症状为病鱼鳃部呈苍白色,有时有点状充血或出血现象,此病常出现暴发性急剧死亡。埃里格孢单独回复感染草鱼和鲤鱼可能不病致,但与其他真菌一起能否引起鱼类致病还有待进一步研究。

综上所述,该株埃里格孢是从患病鳊鱼的鳃部分离到的,对其进行生物学特性及致病性初步研究,可以了解该真菌是否对淡水鱼具有致病性,在什么条件下会致病,从而为养殖鱼类的真菌性疾病防治提供理论依据,具有很重要的理论意义和适用价值。

参考文献:

- [1] 张天宇. 中国真菌志:第 31 卷 暗色砖格分生孢子真菌 26 属 [M]. 北京:科学出版社,2009:60-62.
- [2] 周小玲,沈微,饶志明,等. 一种快速提取真菌染色体 DNA 的方法[J]. 微生物学通报,2004,31(4):89-92.
- [3] 魏福伦,朱里鹏,王庆容. 3 株鲈鱼体表可疑性致病真菌的分离鉴定与生物学特性[J]. 江苏农业科学,2014,42(1):187-190.
- [4] 董国菊,申晚霞. 重庆地区玉米圆斑病菌生物学特性的测定[J]. 西南大学学报:自然科学版,2010,32(12):8-13.
- [5] 陈伟群,张天宇. 中国一新纪录属——埃里格孢属 (*Embellisia*) [J]. 真菌学报,1996,15(2):152-153.
- [6] 张月星. 观赏鱼真菌性疾病和寄生虫病的中草药治疗[J]. 水产科技情报,2002(4):187-188.