

魏冬梅,段魏魏,陈真,等. 新疆五家渠地区鱼类水霉病病原菌 18S rDNA 序列系统分类分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(15):194-199.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.15.046

新疆五家渠地区鱼类水霉病病原菌 18S rDNA 序列系统分类分析

魏冬梅,段魏魏,陈真,王咏星

(新疆大学生命科学与技术学院,新疆乌鲁木齐 830046)

摘要:在对新疆五家渠地区 15 株鱼类水霉病病原菌 18S rDNA 克隆测序的基础上,探讨相比传统分类方法,运用 18S rDNA 序列进行分子鉴定对水霉菌分类的可行性。结果显示,用 MEGA 5.0 软件构建邻接(NJ)树和最大似然(ML)树进行分类,15 株病原菌中 LF04、LF01、JX03、JX01 为寄生水霉,HL04、JY07、HZ、JY10、LY04、JY15、HL01 为镰刀菌,JX02 为腐霉,JY06 未鉴定出结果,与形态学分类结果差异巨大。

关键词:水霉病;系统发育树;分类;18S rDNA

中图分类号: S941.43⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)15-0194-06

水霉病(saprolegniasis)又称肤霉病、白毛病,是威胁淡水鱼类养殖的世界性病害,在很多淡水鱼的成鱼、鱼苗、鱼卵中都会发病。水霉病的病原目前已发现有几十种,主要是真菌门鞭毛菌亚门藻状菌纲水霉目水霉科的水霉属和绵霉属以及霜霉目腐霉科的腐霉属和疫霉属^[1-3],宿主一般在受伤之后易感染水霉病^[4]。水霉病病原菌通常具有一些真菌特征,但其作为非真菌的类真菌生物,对于其分类地位尚存争议^[5]。目前,随着分子生物学的快速发展,许多分子生物学手段已用于水霉的分类学研究^[6-10]。内转录间隔区(ITS)区域与 18S rDNA 因其高度保守且种间甚至种内高度变异被广泛应用于真菌种间分析和种的鉴定。新疆独特的气候特点使鱼类在经历严冬后的初春易患水霉病,鱼类水霉病的病情较我国其他地区更为严峻,而目前未见相关研究,因此对新疆地区鱼类水霉病病原菌的分离鉴定十分必要。

收稿日期:2018-04-10

基金项目:国家自然科学基金(编号:31560047)。

作者简介:魏冬梅(1990—),女,甘肃定西人,硕士研究生,主要从事鱼类水霉病病原菌多样性研究。E-mail:3169089561@qq.com。

通信作者:王咏星,硕士,副教授,主要从事水生生物研究。E-mail:wyxing65@126.com。

分开养殖。为了研究雌雄分开养殖是否会影响克氏原螯虾的性腺发育进程,本研究从苗种阶段开始对克氏原螯虾进行雌雄分开养殖,在其主要繁殖季节分别采集雌雄样本,通过外部形态和组织切片相结合的方法对雌雄分开养殖的克氏原螯虾性腺发育情况进行了观察,研究结果显示,雌雄分开养殖对克氏原螯虾的性腺发育不会产生明显的不利影响,本研究为后续开展克氏原螯虾家系培育研究积累了相关数据。

参考文献:

[1] Huner J V. *Procambarus* in north America and elsewhere [M]// Freshwater crayfish: biology, management and exploitation. London:

对于初学者而言,构建邻接(NJ)树和最大似然(ML)树,一般采用 MEGA 软件^[11]。MEGA 是 Nei 开发并设计的图形化软件,使用方便快捷。本研究以新疆五家渠地区分离纯化所得 15 株水霉病病原菌 18S rDNA 区域为分子标记,进行分子生物学鉴定,并与形态学的鉴定结果作对比,以期弥补国内水霉分类研究的不足,并为鱼类水霉病的病原鉴定及后期药物防治的研究提供数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

菌种:由笔者所在实验室早期分离纯化(于 2010—2017 年自新疆五家渠市水产养殖基地采样,带回实验室分离纯化菌种并进行形态、18S rDNA 测序分析等相关试验)获得并进行形态学初步鉴定。其中,HL01、HL02 和 HL04 分离自新疆五家渠患病河鲈鱼病灶处,HZ、HZ02 分离自新疆五家渠患病虹鳟鱼病灶处,JX01、JX02、JX03 分离自新疆五家渠患病江雪鱼病灶处,JY06、JY07、JY10、JY15 分离自新疆五家渠患病鲫鱼病灶处,LF01、LF04 分离自新疆五家渠患病罗非鱼病灶处,LY04 分离自新疆五家渠患病鲢鱼病灶处。

1.2 方法

1.2.1 菌株的活化 从长满水霉菌丝的平板上切取直径为

Croom Helm,1988.

[2] 李庆红,姚田玉. 克氏螯虾原池繁育方式亟待改进[J]. 科学种养,2009(3):40.

[3] 李飞,李喜莲,贾永义,等. 克氏原螯虾家系建立及幼虾生长比较的初步研究[J]. 安徽农业大学学报,2014,41(1):38-43.

[4] 李胜,赵维信. 克氏原螯虾大颚器在卵巢发育周期中的组织结构变化[J]. 上海水产大学学报,1999,8(1):12-18.

[5] 夏爱军,庞璐,严维辉,等. 雌性克氏原螯虾性腺发育及相关系数的周年动态研究[J]. 淡水渔业,2008,38(4):12-15.

[6] 成永旭,赖伟,堵南山. 十足类甲壳动物卵巢发育过程中脂肪的积累与肝胰腺脂肪的变化[J]. 动物学杂志,1997,32(2):57-60.

1 cm 的水霉琼脂块接种于水霉培养基平板中央,25 ℃ 培养 3~4 d。

1.2.2 DNA 提取及 PCR 扩增 采用十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 裂解法提取基因组 DNA^[12], 利用 1% 琼脂糖凝胶分离 PCR 产物。将分离的 PCR 产物与病原菌送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.2.3 序列比对及遗传距离分析 序列采用 Sequencing Analysis 5.2 (Applied Biosystems) 软件反复进行校对, 去除两端不确定的序列后, 在 GenBank 中进行 BLAST 比较搜索, 同时下载同源性序列。采用 Clustal X 2.1 对所选序列进行比对。采用 MEGA 5.0 1 软件中的 Kimura 双参数模型计算种间的遗传距离。

1.2.4 MEGA 5.0 系统进化树的构建 在 GenBank 中进行 BLAST 比较搜索, 下载同源性序列, 用 MEGA 5.0 软件构建 Neighbour - Joining (NJ) 树和 Maximum Likelihood (ML) 树, 自举值 (Bootstrap) 分析均采用 1 000 次重复抽样。

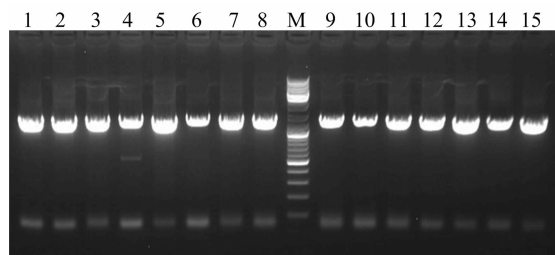
2 结果与分析

2.1 18S rDNA PCR 与测序结果

所得水霉病病原菌 18S rDNA PCR 琼脂糖凝胶电泳图谱见图 1。结果显示, 测序得到的序列大小在 1 300~1 400 bp 之间, 在美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 数据库中, 用所得序列进行 BLAST 比较搜索, 得到其同源序列, 本研究中其他 30 条 BLAST 序列的 GenBank 登录号如下: *Fusarium graminearum* (XR_893069.1)、*Fusarium graminearum* (XR_893066.1)、*Fusarium graminearum* (XR_893063.1)、*Fusarium oxysporum* (KR611565.1)、*Fusarium oxysporum* (JN604548.1)、*Fusarium oxysporum* (KM250373.1)、*Fusarium oxysporum* (JF807401.1)、*Fusarium oxysporum* (KR611565.1)、*Fusarium* sp. (EU710815.1)、*Fusarium* sp. (KU170627.1)、*Fusarium* sp. (JX273060.1)、*Fusarium* sp. (EU710821.1)、*Gibberella* sp. (KT351617.1)、*Gibberella* sp. (KT351617.1)、*Gibberella fujikuroi* (AB237662.1)、*Cordyceps confragosa* (AB111495.1)、*Cordyceps confragosa* (AB079127.1)、*Cordyceps caloceroides* (AY245654.1)、*Pythiaceae* sp. (FJ794931.1)、*Pythiaceae* sp. (FJ794935.1)、*Paecilomyces hepiali* (HM135172.1)、*Pleosporeles* sp. (KM096319.1)、*Pleosporeles* sp. (KM096309.1)、*Saprolegnia parasitica* (AB086898.1)、*Saprolegnia parasitica* (AB086899.1)、*Saprolegnia parasitica* (XR_001099855.1)、*Saprolegnia parasitica* (XR_001099850.1)、*Saprolegnia ferax* (AJ238655.1)、Uncultured *Dikarya* (HQ219381.1)、Uncultured *Dikarya* (HQ191403.1)。

2.2 18S rDNA 序列的遗传距离分析

采用 MEGA 5.0 1 软件中的 Kimura 双参数模型计算种间的遗传距离。由表 1 可知, LF01、LF04、JX01、JX03 这 4 株菌与 *Saprolegnia parasitica* (寄生水霉) 菌株的遗传距离最近在 0.000~0.002 之间; JY07、JY10、JY15、HZ、LY04、HL01、HL04 等 7 株菌与 *Fusarium oxysporum* (尖孢镰刀菌) 和 *Fusarium graminearum* (禾谷镰刀菌) 的遗传距离最近在 0.001~0.006 之间; JX02 与 *Pythiaceae* sp. (腐霉) 的遗传距离最近在 0.000~0.001 之间。



1~15—LF04、LF01、JY10、JY017、HL04、3JX01、JY15、LY04、HL01、HL02、JX03、JY06、HZ、HZ02、JX02

图1 水霉病病原菌 18S rDNA PCR 产物电泳图谱

2.3 MEGA 5.0 软件序列及系统发育分析

将 NCBI 数据库 BLAST 得到的同源序列用 MEGA 5.0 构建 Neighbour - Joining 树和 Maximum Likelihood 树, 由图 2、图 3 可知, 运用 MEGA 5.0 软件构建的 NJ 树和 ML 树, 因 2 种算法差异, 使 2 种树在遗传距离和小的聚群排列上有细微不同。但在大的聚类上, 都可以将 15 株菌株分为 2 个大的聚群, 根据大聚群分枝, 15 株菌大致分成了 5 类结果。由表 2 可知, LF01、LF04、JX01 和 JX03 聚类在鞭毛菌门卵菌纲水霉目水霉科水霉属的寄生水霉; HZ、JY15、LY04、HL01、JY07、HL04 和 JY10 聚类在子囊菌亚门肉座菌科赤霉属的尖孢镰刀菌或禾谷镰刀菌; JX02 聚类在鞭毛菌门卵菌纲霜霉目腐霉科腐霉属腐霉; HL02 聚类在虫草科; JY06 未知。

2.4 15 株菌 18S rDNA 序列比对与形态学鉴定结果比较

查阅笔者所在实验室前期工作总结《新疆五家渠水霉病原菌多样性的初步研究》与《鱼类水霉病原真菌的分离筛选》形态分类鉴定结果^[13-14], 与 18S rDNA 序列分类鉴定结果进行比较, 由表 3 可见, 2 种分类方法结果差异明显。除 LF01、LF04、JX01、JX03 这 4 株菌都被分在水霉属外, 其余菌均不在同一属, 甚至科、目都不相同。

3 讨论

依据传统分类学标准, 水霉属鉴定主要依据第 1 代游动孢子的释放模式, 种的鉴定则要求对藏卵器、雄器及卵孢子分化位置及数目等有性器官作详细的描述^[15]。水霉的生活史复杂, 进一步提升了对其分类的难度^[16], 且很多从鱼体病灶处分离纯化的水霉, 通常在实验室培养条件下不能或很难形成有性器官, 有些种的有性器官在不同的生活环境中形状不稳定^[17-19]。因此, 应用传统的分类学标准很难甚至无法将病灶处水霉鉴定到种的水平。本研究中所用的 15 株菌, 在形态观察的培养过程中发现, 在不同的培养基, 或相同培养基不同温度、不同 pH 值等条件下培养时, 其菌落特征及无性形态特征均有差异。在对 15 株菌进行形态鉴定的过程中发现, 水霉科的属特征与毛霉科、半知菌类的一些特征存在交叉, 在形态鉴定时不能完全确定为哪个属, 因为这些菌是在患水霉病的鱼体中分离获得的, 最终按水霉科来进行形态分类, 故形态分类结果可能存在偏差。再者水霉病的病原种类繁多, 其病原范围可能更广。

对于水霉菌的分子鉴定, 国内外研究也较少, 从而使数据库数据量较少, 无法从数据库中得到足够数据, 故搜索到的同源序列大多为其他种属序列, 导致在分子分类分析时出现偏差。真菌全基因组 GC 含量具有种间特异性, 但由于测序分

表 1 Kimura 参数模型 18S rDNA 的种间遗传距离(左下)和序列比值差异(右上)

序号	菌株名称	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	L04		0.001 0	0.041 3	0.041 4	0.040 3	0.000 0	0.041 0	0.040 4	0.040 1	0.040 1	0.001 0	0.040 7	0.040 2	0.037 1	0.009 5	0.041 5	0.041 5	0.041 5	0.041 6	0.041 0	0.041 3	0.041 3
2	L01		0.001 5	0.041 8	0.039 5	0.040 0	0.000 7	0.041 7	0.041 7	0.040 0	0.041 2	0.000 7	0.041 0	0.041 5	0.037 1	0.009 4	0.042 0	0.042 0	0.042 0	0.042 1	0.041 7	0.041 8	0.041 8
3	JY10		0.215 8	0.219 7		0.003 1	0.002 2	0.039 7	0.000 7	0.000 7	0.000 4	0.004 0	0.004 4	0.001 3	0.014 0	0.041 8	0.001 3	0.001 3	0.001 3	0.000 7	0.001 4	0.001 9	0.001 9
4	JY07		0.216 2	0.208 8	0.010 6		0.000 7	0.039 4	0.003 1	0.002 8	0.001 8	0.005 5	0.039 8	0.005 5	0.002 8	0.014 3	0.041 5	0.004 3	0.004 3	0.003 9	0.003 2	0.003 1	0.003 1
5	H104		0.212 1	0.210 7	0.006 1	0.000 8		0.039 6	0.002 1	0.002 1	0.001 9	0.005 0	0.040 0	0.005 3	0.002 1	0.014 2	0.041 7	0.002 4	0.002 4	0.002 1	0.002 1	0.001 0	0.001 0
6	JX01		0.000 0	0.000 8	0.209 2	0.207 8	0.208 9		0.039 8	0.039 7	0.039 7	0.039 9	0.000 0	0.040 1	0.039 8	0.037 0	0.009 5	0.039 6	0.039 6	0.039 7	0.039 7	0.039 4	0.039 4
7	JY15		0.215 1	0.219 1	0.000 8	0.010 6	0.005 3	0.209 4		0.000 0	0.000 7	0.003 8	0.040 1	0.004 6	0.001 1	0.013 7	0.041 8	0.001 9	0.001 9	0.001 4	0.001 8	0.002 4	0.002 4
8	LY04		0.212 4	0.218 9	0.000 8	0.009 1	0.005 3	0.209 2	0.000 0		0.000 7	0.003 8	0.040 1	0.004 6	0.001 1	0.013 7	0.041 8	0.001 7	0.001 7	0.001 2	0.001 8	0.002 2	0.002 2
9	HL01		0.211 2	0.210 7	0.001 5	0.003 8	0.004 5	0.208 9	0.000 8	0.000 8		0.003 9	0.040 1	0.004 6	0.001 3	0.013 6	0.041 8	0.001 7	0.001 7	0.000 8	0.000 8	0.001 9	0.001 9
10	HL02		0.210 2	0.216 0	0.014 5	0.022 3	0.019 3	0.209 4	0.013 7	0.013 7	0.014 6		0.040 0	0.004 2	0.003 8	0.013 9	0.042 6	0.003 9	0.003 9	0.004 2	0.004 6	0.005 1	0.005 1
11	JX03		0.001 5	0.000 8	0.211 2	0.210 0	0.211 1	0.000 0	0.211 4	0.211 4	0.211 1	0.209 8		0.040 5	0.040 3	0.037 1	0.009 5	0.040 1	0.040 1	0.040 1	0.040 1	0.039 8	0.039 8
12	JY06		0.212 7	0.214 5	0.015 2	0.020 7	0.019 9	0.209 8	0.016 1	0.016 1	0.016 1	0.016 8	0.014 6	0.211 7		0.004 2	0.015 0	0.042 9	0.003 7	0.003 7	0.004 4	0.005 0	0.005 0
13	HZ		0.218 7	0.218 7	0.002 3	0.009 1	0.005 3	0.210 0	0.001 5	0.001 5	0.002 3	0.013 7	0.212 2	0.014 6	0.014 0		0.042 3	0.001 2	0.001 2	0.001 2	0.002 1	0.002 2	0.002 2
14	HZ02		0.197 2	0.197 4	0.074 8	0.076 3	0.075 5	0.196 7	0.073 2	0.073 2	0.073 2	0.074 0	0.196 9	0.080 0	0.074 8	0.039 8	0.014 1	0.014 1	0.014 1	0.013 9	0.013 9	0.014 6	0.014 6
15	JX02		0.047 3	0.046 4	0.218 5	0.217 0	0.218 1	0.047 2	0.218 5	0.218 3	0.218 1	0.221 6	0.047 3	0.223 0	0.221 0	0.209 8		0.042 2	0.042 2	0.041 8	0.041 8	0.041 5	0.041 5
16	<i>Fusarium graminearum</i> XR 893069.1		0.217 2	0.221 3	0.002 2	0.016 6	0.006 8	0.209 0	0.004 5	0.003 8	0.003 8	0.014 5	0.211 2	0.012 9	0.002 3	0.075 6	0.220 2		0.000 0	0.001 4	0.001 9	0.002 0	0.002 0
17	<i>Fusarium graminearum</i> XR 893066.1		0.217 2	0.221 3	0.002 2	0.016 6	0.006 8	0.209 0	0.004 5	0.003 8	0.003 8	0.014 5	0.211 2	0.012 9	0.002 3	0.075 6	0.220 2	0.000 0		0.001 4	0.001 9	0.002 0	0.002 0
18	<i>Fusarium graminearum</i> XR 893063.1		0.217 2	0.221 3	0.002 2	0.016 6	0.006 8	0.209 0	0.004 5	0.003 8	0.003 8	0.014 5	0.211 2	0.012 9	0.002 3	0.075 6	0.220 2	0.000 0	0.000 0		0.001 4	0.001 9	0.002 0
19	<i>Fusarium oxysporum</i> JN604548.1		0.217 0	0.221 2	0.000 7	0.015 1	0.005 3	0.208 9	0.003 0	0.002 3	0.000 8	0.016 0	0.211 1	0.016 0	0.003 8	0.073 9	0.218 1	0.003 0	0.003 0	0.003 0		0.001 2	0.001 7
20	<i>Fusarium oxysporum</i> KM250373.1		0.214 7	0.219 1	0.003 0	0.011 3	0.005 3	0.208 9	0.004 5	0.004 5	0.000 8	0.018 3	0.211 1	0.016 0	0.006 0	0.073 9	0.218 1	0.005 2	0.005 2	0.005 2	0.002 2		0.002 2
21	<i>Fusarium oxysporum</i> KR611565.1		0.215 9	0.220 1	0.004 5	0.011 3	0.001 5	0.207 8	0.006 7	0.006 0	0.004 5	0.019 9	0.210 0	0.018 3	0.006 0	0.078 1	0.217 0	0.005 2	0.005 2	0.003 7	0.006 0	0.000 0	
22	<i>Fusarium</i> sp. EU1710815.1		0.215 9	0.220 1	0.004 5	0.011 3	0.001 5	0.207 8	0.006 7	0.006 0	0.004 5	0.019 9	0.210 0	0.018 3	0.006 0	0.078 1	0.217 0	0.005 2	0.005 2	0.003 7	0.006 0	0.000 0	
23	<i>Fusarium</i> sp. KU170627.1		0.217 0	0.219 1	0.003 7	0.014 3	0.005 3	0.208 9	0.009 0	0.005 3	0.000 8	0.020 7	0.211 1	0.016 0	0.006 0	0.073 9	0.218 1	0.010 4	0.010 4	0.007 4	0.001 5	0.011 2	
24	<i>Fusarium</i> sp. JX273060.1		0.215 9	0.214 8	0.004 5	0.009 0	0.001 5	0.207 8	0.006 0	0.006 0	0.004 5	0.020 0	0.210 0	0.018 3	0.006 1	0.078 1	0.217 0	0.005 2	0.005 2	0.003 7	0.003 8	0.000 0	0.000 0
25	<i>Fusarium</i> sp. EU1710821.1		0.217 0	0.210 7	0.001 5	0.008 3	0.004 5	0.208 9	0.000 8	0.000 8	0.000 0	0.014 6	0.211 1	0.016 8	0.002 3	0.072 2	0.218 1	0.003 8	0.003 8	0.000 7	0.000 8	0.004 5	0.004 5
26	<i>Gibberella</i> sp. KT351617.1		0.217 2	0.218 8	0.000 0	0.015 8	0.006 1	0.209 0	0.001 5	0.001 5	0.001 5	0.015 3	0.211 2	0.015 2	0.003 0	0.074 8	0.218 3	0.002 2	0.002 2	0.000 7	0.001 5	0.004 5	0.004 5
27	<i>Gibberella fujikuroi</i> AR237662.1		0.217 2	0.221 3	0.000 0	0.015 8	0.006 1	0.209 0	0.002 2	0.001 5	0.001 5	0.015 2	0.211 2	0.015 2	0.003 0	0.074 8	0.218 3	0.002 2	0.002 2	0.000 7	0.003 0	0.004 4	0.004 4
28	<i>Cordeya confragosa</i> AB111495.1		0.217 6	0.221 8	0.013 6	0.029 7	0.019 9	0.209 4	0.015 8	0.015 1	0.015 3	0.001 5	0.211 6	0.013 7	0.015 2	0.075 7	0.221 6	0.012 7	0.012 7	0.014 2	0.016 6	0.017 9	0.017 9
29	<i>Cordeya confragosa</i> AB079127.1		0.217 6	0.221 8	0.013 6	0.029 7	0.019 9	0.209 4	0.015 8	0.015 1	0.015 3	0.001 5	0.211 6	0.013 7	0.015 2	0.075 7	0.221 6	0.012 7	0.012 7	0.014 2	0.016 6	0.017 9	0.017 9
30	<i>Cordeya calcearoides</i> AY245654.1		0.217 4	0.221 5	0.009 0	0.025 0	0.015 2	0.209 2	0.011 3	0.010 6	0.010 7	0.009 1	0.211 4	0.007 6	0.010 6	0.077 3	0.221 4	0.008 2	0.008 2	0.009 7	0.012 0	0.013 4	0.013 4
31	<i>Pythiaceae</i> sp. FJ794935.1		0.057 1	0.057 6	0.187 7	0.229 4	0.219 3	0.048 6	0.219 2	0.218 7	0.219 5	0.220 4	0.050 0	0.223 8	0.221 3	0.211 0	0.001 5	0.218 6	0.218 6	0.216 6	0.220 0	0.215 5	0.215 5
32	<i>Paeclonolaeas lepidi</i> HMI135172.1		0.217 6	0.221 8	0.013 6	0.029 7	0.019 9	0.209 4	0.015 8	0.015 1	0.015 3	0.001 5	0.211 6	0.013 7	0.015 2	0.075 7	0.221 6	0.012 7	0.012 7	0.014 2	0.016 6	0.017 9	0.017 9
33	<i>Pleosporales</i> sp. KM096309.1		0.204 4	0.198 2	0.073 0	0.080 1	0.074 8	0.196 3	0.072 4	0.072 5	0.071 6	0.073 9	0.198 6	0.078 4	0.074 3	0.000 0	0.209 6	0.073 4	0.073 4	0.071 7	0.072 2	0.075 8	0.075 8
34	<i>Uncultured Dikarya</i> HQ219381.1		0.217 6	0.221 8	0.015 1	0.029 7	0.019 9	0.209 4	0.017 3	0.016 7	0.016 8	0.015 3	0.211 7	0.000 0	0.015 2	0.079 9	0.222 8	0.012 7	0.012 7	0.015 7	0.018 1	0.017 9	0.017 9
35	<i>Uncultured Dikarya</i> HQ191403.1		0.217 6	0.221 8	0.015 1	0.029 7	0.019 9	0.209 4	0.017 3	0.016 7	0.016 8	0.015 3	0.211 7	0.000 0	0.015 2	0.079 9	0.222 8	0.012 7	0.012 7	0.015 7	0.018 1	0.017 9	0.017 9
36	<i>Fusarium oxysporum</i> JF807401.1		0.219 1	0.213 4	0.000 0	0.008 6	0.004 7	0.211 3	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.014 4	0.213 4	0.015 9	0.001 6	0.072 7	0.219 3	0.002 3	0.002 3	0.000 0	0.000 0	0.003 9	0.003 9
37	<i>Pleosporales</i> sp. KM096319.1		0.204 4	0.199 1	0.073 8	0.080 1	0.074 8	0.196 3	0.072 4	0.072 5	0.071 6	0.073 9	0.198 6	0.079 2	0.074 3	0.000 0	0.209 6	0.074 2	0.074 2	0.072 5	0.073 0	0.076 6	0.076 6
38	<i>Suprolegnia parasitica</i> AB086898.1		0.000 0	0.002 3	0.211 1	0.209 7	0.210 8	0.000 0	0.211 3	0.211 1	0.210 8	0.210 0	0.002 3	0.211 6	0.211 4	0.197 2	0.047 2	0.210 8	0.210 8	0.210 6	0.210 8	0.209 5	0.209 5
39	<i>Suprolegnia parasitica</i> AB086899.1		0.001 5	0.002 3	0.210 2	0.208 7	0.209 9	0.001 5	0.210 4	0.210 2	0.210 9	0.003 8	0.212 5	0.210 4	0.196 3	0.047 2	0.209 8	0.209 8	0.209 8	0.210 7	0.209 9	0.208 6	0.208 6
40	<i>Suprolegnia parasitica</i> XR 01099855.1		0.000 0	0.002 3	0.209 6	0.208 1	0.209 2	0.000 0	0.209 8	0.209 6	0.210 2	0.002 3	0.210 0	0.209 8	0.197 8	0.047 3	0.209 2	0.209 2	0.209 2	0.209 0	0.209 2	0.208 0	0.208 0
41	<i>Suprolegnia parasitica</i> XR 01099850.1		0.000 0	0.000 8	0.206 9	0.205 6	0.206 8	0.000 0	0.206 9	0.206 9	0.206 8	0.207 3	0.000 0	0.207 3	0.207 7	0.196 2	0.047 9	0.206 9	0.206 9	0.206 8	0.206 8	0.205 6	0.205 6
42	<i>Suprolegnia ferox</i> A238655.1		0.005 3	0.012 8	0.207 8	0.214 3	0.209 6	0.005 3	0.208 7	0.209 1	0.209 6	0.208 6	0.005 3	0.212 0	0.210 1	0.198 0	0.049 7	0.206 7	0.206 7	0.206 7	0.206 6	0.209 9	0.205 5
43	<i>Pythiaceae</i> sp. FJ794931.1		0.056 3	0.056 8	0.217 8	0.228 4	0.218 3	0.047 8	0.218 2	0.217 8	0.218 5	0.219 4	0.049 2	0.222 8	0.220								

表 1 (续)

序号	菌株名称	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
1	LJ04	0.041 6	0.041 3	0.041 6	0.041 6	0.041 6	0.041 8	0.041 8	0.041 7	0.011 2	0.041 8	0.038 8	0.042 0	0.042 0	0.042 2	0.038 8	0.000 0	0.001 0	0.000 0	0.000 0	0.002 0	0.011 1
2	LJ01	0.041 7	0.040 6	0.040 0	0.041 6	0.042 1	0.042 3	0.042 3	0.042 2	0.011 2	0.042 3	0.037 3	0.042 5	0.042 5	0.040 7	0.037 5	0.001 2	0.001 2	0.001 2	0.000 7	0.003 4	0.011 1
3	JY10	0.001 6	0.001 9	0.001 0	0.000 0	0.000 0	0.003 7	0.003 7	0.003 0	0.042 0	0.003 7	0.013 7	0.004 3	0.004 3	0.000 0	0.013 8	0.040 1	0.039 8	0.039 7	0.039 3	0.039 5	0.041 8
4	JY07	0.003 8	0.002 7	0.002 8	0.004 1	0.004 1	0.006 8	0.006 8	0.005 9	0.044 2	0.006 8	0.015 0	0.006 9	0.006 9	0.002 9	0.015 0	0.039 8	0.039 5	0.039 3	0.039 0	0.040 7	0.044 0
5	HL04	0.002 1	0.001 0	0.001 9	0.002 2	0.002 2	0.005 1	0.005 1	0.004 3	0.041 9	0.005 1	0.014 0	0.005 3	0.005 3	0.002 0	0.014 0	0.040 0	0.039 8	0.039 6	0.039 2	0.039 8	0.041 7
6	JY01	0.039 7	0.039 4	0.039 7	0.039 7	0.039 7	0.039 9	0.039 9	0.039 8	0.009 8	0.039 9	0.037 0	0.040 1	0.040 1	0.040 3	0.037 0	0.000 0	0.001 0	0.000 0	0.000 0	0.002 0	0.009 6
7	JY15	0.002 6	0.002 2	0.000 7	0.001 0	0.001 2	0.004 1	0.004 1	0.003 4	0.041 9	0.004 1	0.013 5	0.004 7	0.004 7	0.000 0	0.013 5	0.040 1	0.039 9	0.039 7	0.039 3	0.039 6	0.041 7
8	LY04	0.001 9	0.002 3	0.000 7	0.001 0	0.001 0	0.004 0	0.004 0	0.003 4	0.041 8	0.004 0	0.013 6	0.004 7	0.004 7	0.000 0	0.013 6	0.040 1	0.039 9	0.039 7	0.039 3	0.039 7	0.041 6
9	HL01	0.000 8	0.001 9	0.000 0	0.001 0	0.001 0	0.004 1	0.004 1	0.003 2	0.042 0	0.004 1	0.013 4	0.004 6	0.004 6	0.000 0	0.013 4	0.040 0	0.039 8	0.039 6	0.039 2	0.039 8	0.041 8
10	HL02	0.004 9	0.005 1	0.003 9	0.004 1	0.004 1	0.001 0	0.001 0	0.002 9	0.042 2	0.001 0	0.013 9	0.004 3	0.004 3	0.004 0	0.013 9	0.040 0	0.039 8	0.039 6	0.039 5	0.039 7	0.042 0
11	JX03	0.040 1	0.039 8	0.040 1	0.040 1	0.040 1	0.040 3	0.040 3	0.040 2	0.010 0	0.040 3	0.037 4	0.040 5	0.040 5	0.040 7	0.037 4	0.001 2	0.001 6	0.001 2	0.000 0	0.002 0	0.009 8
12	JY06	0.004 4	0.005 0	0.004 6	0.004 4	0.004 4	0.004 0	0.004 0	0.002 5	0.043 1	0.004 0	0.014 7	0.000 0	0.000 0	0.004 5	0.014 8	0.040 5	0.040 7	0.040 1	0.039 6	0.040 7	0.043 0
13	HZ	0.002 1	0.002 2	0.001 3	0.001 5	0.001 5	0.004 1	0.004 1	0.003 3	0.042 2	0.004 1	0.013 9	0.004 3	0.004 3	0.001 1	0.013 9	0.040 1	0.039 9	0.039 7	0.039 4	0.039 8	0.042 1
14	HZ02	0.013 9	0.014 6	0.013 6	0.014 0	0.014 0	0.014 2	0.014 2	0.014 4	0.040 1	0.014 2	0.000 0	0.015 0	0.015 0	0.013 7	0.000 0	0.037 1	0.066 9	0.037 2	0.036 9	0.037 3	0.039 9
15	JX02	0.041 8	0.041 5	0.041 8	0.041 8	0.041 8	0.042 6	0.042 6	0.042 5	0.001 0	0.042 6	0.039 8	0.042 9	0.042 9	0.042 2	0.039 8	0.009 5	0.009 6	0.009 6	0.009 7	0.010 2	0.000 7
16	<i>Fusarium graminearum</i> XR 893069.1	0.002 8	0.002 1	0.001 7	0.001 3	0.001 3	0.003 5	0.003 5	0.002 7	0.041 9	0.003 5	0.013 7	0.003 6	0.003 6	0.001 4	0.013 8	0.040 0	0.039 7	0.039 5	0.039 2	0.039 2	0.041 8
17	<i>Fusarium graminearum</i> XR 893066.1	0.002 8	0.002 1	0.001 7	0.001 3	0.001 3	0.003 5	0.003 5	0.002 7	0.041 9	0.003 5	0.013 7	0.003 6	0.003 6	0.001 4	0.013 8	0.040 0	0.039 7	0.039 5	0.039 2	0.039 2	0.041 8
18	<i>Fusarium graminearum</i> XR 893063.1	0.002 8	0.002 1	0.001 7	0.001 3	0.001 3	0.003 5	0.003 5	0.002 7	0.041 9	0.003 5	0.013 7	0.003 6	0.003 6	0.001 4	0.013 8	0.040 0	0.039 7	0.039 5	0.039 2	0.039 2	0.041 8
19	<i>Fusarium oxysporum</i> JN604548.1	0.002 2	0.001 7	0.000 8	0.000 7	0.000 7	0.003 8	0.003 8	0.003 0	0.041 6	0.003 8	0.013 4	0.004 3	0.004 3	0.000 0	0.013 6	0.040 0	0.039 7	0.039 6	0.039 2	0.039 2	0.041 4
20	<i>Fusarium oxysporum</i> KM250373.1	0.000 9	0.001 8	0.000 8	0.001 0	0.001 4	0.004 3	0.004 3	0.003 4	0.042 1	0.004 3	0.013 5	0.004 7	0.004 7	0.000 0	0.013 7	0.040 0	0.039 8	0.039 6	0.039 2	0.039 9	0.042 0
21	<i>Fusarium oxysporum</i> KR611565.1	0.003 1	0.000 0	0.001 9	0.001 9	0.001 9	0.004 8	0.004 8	0.004 0	0.041 3	0.004 8	0.014 2	0.004 9	0.004 9	0.001 8	0.014 3	0.039 7	0.039 5	0.039 3	0.039 0	0.039 0	0.041 1
22	<i>Fusarium</i> sp. EU710815.1	0.003 1	0.000 0	0.001 9	0.001 9	0.001 9	0.004 8	0.004 8	0.004 0	0.041 3	0.004 8	0.014 2	0.004 9	0.004 9	0.001 8	0.014 3	0.039 7	0.039 5	0.039 3	0.039 0	0.039 0	0.041 1
23	<i>Fusarium</i> sp. KU170627.1	0.001 7	0.000 8	0.001 0	0.002 4	0.002 4	0.005 1	0.005 1	0.004 2	0.043 6	0.005 1	0.013 4	0.005 5	0.005 5	0.000 0	0.013 6	0.040 0	0.039 7	0.039 6	0.039 2	0.040 8	0.043 5
24	<i>Fusarium</i> sp. JX273060.1	0.003 7	0.001 9	0.001 9	0.001 9	0.001 9	0.004 8	0.004 8	0.004 0	0.041 8	0.004 8	0.014 2	0.005 0	0.005 0	0.001 8	0.014 3	0.039 7	0.039 5	0.039 3	0.039 0	0.039 3	0.041 6
25	<i>Fusarium</i> sp. EU710821.1	0.000 7	0.004 5	0.001 0	0.001 0	0.001 0	0.004 0	0.004 0	0.003 2	0.042 3	0.004 0	0.013 3	0.004 6	0.004 6	0.000 0	0.013 3	0.040 0	0.039 7	0.039 6	0.039 2	0.039 8	0.042 1
26	<i>Gibberella</i> sp. KT351617.1	0.001 5	0.004 5	0.001 5	0.001 5	0.001 5	0.013 4	0.000 0	0.002 5	0.042 3	0.000 0	0.013 8	0.003 9	0.003 9	0.003 9	0.013 9	0.040 2	0.040 0	0.039 8	0.039 5	0.039 5	0.042 2
27	<i>Gibberella fujikuroi</i> AR237662.1	0.008 2	0.004 5	0.001 5	0.000 0	0.000 0	0.003 7	0.003 7	0.002 9	0.041 6	0.003 7	0.013 6	0.004 3	0.004 3	0.000 0	0.013 7	0.040 0	0.039 8	0.039 6	0.039 3	0.039 2	0.041 4
28	<i>Cardiopsis confusa</i> AB111495.1	0.021 7	0.018 1	0.015 1	0.013 5	0.013 4	0.000 0	0.000 0	0.002 5	0.042 3	0.000 0	0.013 8	0.003 9	0.003 9	0.003 9	0.013 9	0.040 2	0.040 0	0.039 8	0.039 5	0.039 5	0.042 2
29	<i>Cardiopsis confusa</i> AB079127.1	0.021 7	0.018 1	0.015 1	0.013 5	0.013 4	0.000 0	0.000 0	0.002 5	0.042 3	0.000 0	0.013 8	0.003 9	0.003 9	0.003 9	0.013 9	0.040 2	0.040 0	0.039 8	0.039 5	0.039 5	0.041 8
30	<i>Cardiopsis calocroides</i> AY245654.1	0.017 2	0.013 5	0.010 6	0.009 0	0.008 9	0.007 4	0.007 4	0.002 5	0.042 2	0.002 5	0.014 0	0.002 5	0.002 5	0.003 1	0.014 1	0.040 1	0.039 9	0.039 7	0.039 4	0.039 4	0.042 1
31	<i>Phytocaea</i> sp. FT794935.1	0.226 9	0.217 8	0.220 3	0.218 5	0.216 8	0.220 0	0.220 0	0.219 8	0.042 3	0.040 4	0.042 7	0.042 7	0.042 7	0.042 7	0.040 5	0.010 3	0.010 4	0.010 3	0.009 8	0.010 2	0.000 7
32	<i>Paeclomyces hepiali</i> HMI35172.1	0.021 7	0.018 1	0.015 1	0.013 5	0.013 4	0.000 0	0.000 0	0.007 4	0.220 0	0.073 5	0.013 8	0.003 9	0.003 9	0.003 9	0.013 9	0.040 2	0.040 0	0.039 8	0.039 5	0.039 5	0.042 2
33	<i>Pleosporales</i> sp. KM096309.1	0.071 7	0.075 8	0.070 9	0.072 6	0.072 6	0.073 5	0.073 5	0.075 1	0.211 9	0.073 5	0.000 0	0.013 8	0.003 9	0.003 9	0.000 0	0.037 3	0.037 1	0.037 4	0.036 9	0.037 1	0.040 2
34	<i>Uncultured Dikarya</i> HQ219381.1	0.023 3	0.018 1	0.016 7	0.015 0	0.014 9	0.013 4	0.013 4	0.007 4	0.221 1	0.013 4	0.077 6	0.014 5	0.014 5	0.000 0	0.004 5	0.014 7	0.040 4	0.040 0	0.039 6	0.040 0	0.042 5
35	<i>Uncultured Dikarya</i> HQ191403.1	0.023 3	0.018 1	0.016 7	0.015 0	0.014 9	0.013 4	0.013 4	0.007 4	0.221 1	0.013 4	0.077 6	0.014 5	0.014 5	0.000 0	0.004 5	0.014 7	0.040 4	0.040 0	0.039 6	0.040 0	0.042 5
36	<i>Fusarium oxysporum</i> JF807401.1	0.000 0	0.003 9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.014 1	0.014 1	0.009 4	0.221 2	0.014 1	0.071 2	0.015 7	0.015 7	0.071 2	0.013 4	0.040 5	0.040 2	0.040 1	0.039 7	0.040 3	0.042 6
37	<i>Pleosporales</i> sp. KM096319.1	0.072 5	0.076 6	0.070 9	0.073 4	0.073 4	0.074 3	0.074 3	0.075 8	0.212 8	0.074 3	0.000 0	0.078 4	0.078 4	0.071 2	0.013 4	0.037 3	0.037 1	0.037 4	0.036 9	0.037 3	0.040 4
38	<i>Saprolegnia parasitica</i> AB086899.1	0.210 6	0.209 5	0.210 6	0.210 8	0.210 8	0.211 2	0.211 2	0.211 0	0.052 3	0.211 2	0.198 1	0.211 2	0.211 2	0.212 5	0.198 1	0.037 3	0.037 1	0.037 0	0.036 0	0.037 3	0.040 4
39	<i>Saprolegnia parasitica</i> AB086899.1	0.209 7	0.208 6	0.209 7	0.209 8	0.209 8	0.210 2	0.210 2	0.210 0	0.052 3	0.210 2	0.197 2	0.212 1	0.212 1	0.211 5	0.197 2	0.001 5	0.001 0	0.001 0	0.001 0	0.001 6	0.010 2
40	<i>Saprolegnia parasitica</i> XR 001099855.1	0.209 0	0.208 0	0.209 0	0.209 2	0.209 2	0.209 6	0.209 6	0.209 4	0.052 4	0.209 6	0.198 7	0.209 6	0.209 6	0.210 8	0.198 7	0.000 0	0.001 5	0.000 0	0.002 0	0.010 2	0.010 2
41	<i>Saprolegnia parasitica</i> XR 001099850.1	0.206 8	0.205 6	0.206 8	0.206 9	0.206 9	0.207 3	0.207 3	0.207 1	0.048 7	0.207 3	0.196 2	0.207 3	0.207 3	0.208 5	0.196 2	0.000 0	0.001 5	0.000 0	0.001 5	0.009 7	0.010 1
42	<i>Saprolegnia ferax</i> AJ238655.1	0.213 9	0.207 2	0.209 6	0.207 8	0.206 7	0.207 1	0.207 1	0.206 9	0.050 2	0.207 1	0.197 1	0.209 0	0.209 0	0.211 1	0.198 0	0.005 3	0.003 8	0.005 3	0.004 6	0.010 1	0.010 1
43	<i>Phytocaea</i> sp. FT794931.1	0.225 9	0.216 9	0.219 4	0.217 5	0.215 8	0.219 0	0.219 0	0.218 8	0.000 7	0.219 0</											

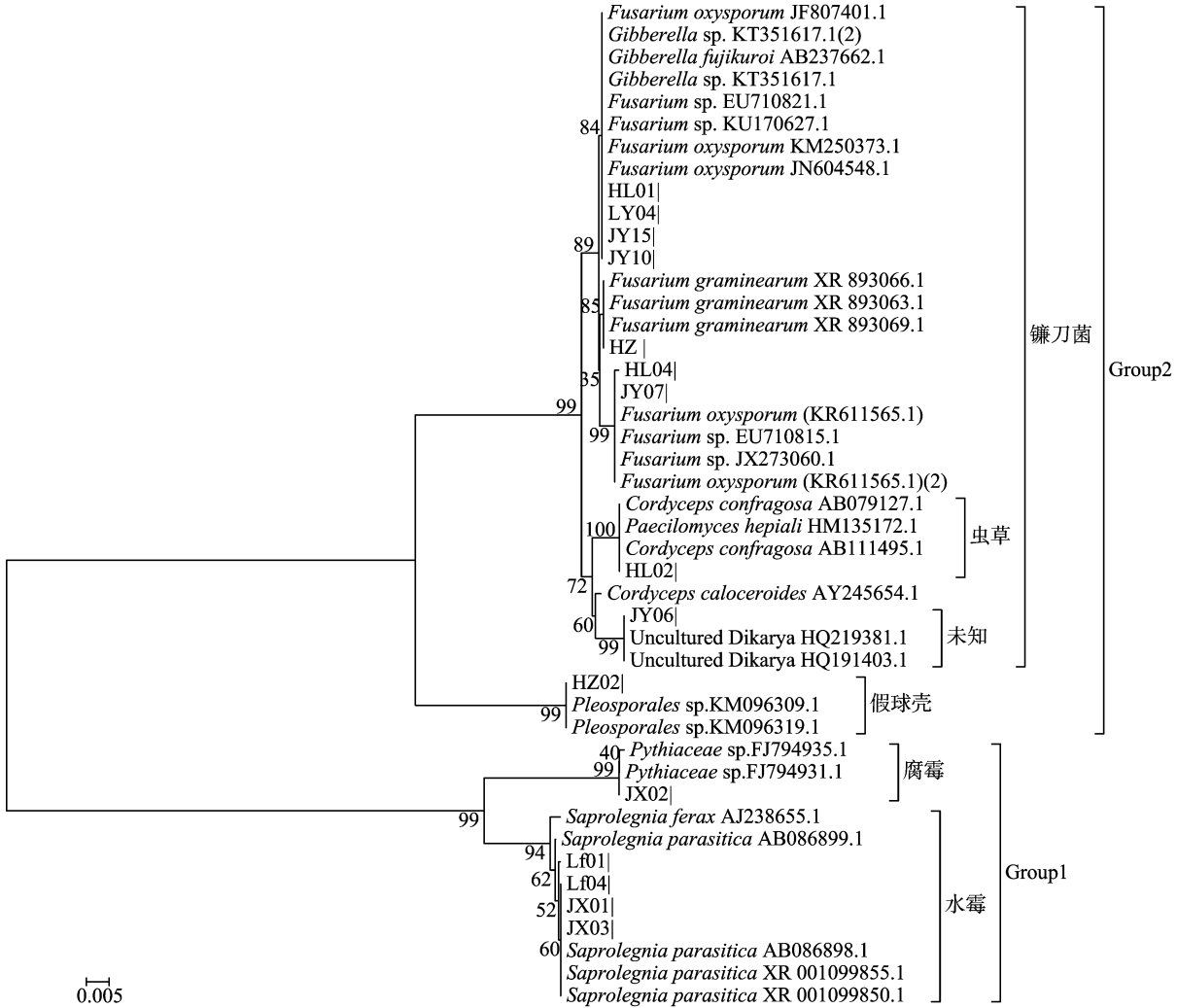


图2 MEGA 水霉病病原与其同源 18S rDNA 的系统发育树(NJ 树)

析的困难,故一般选用 18S rDNA 或 ITS rDNA 作分子分类分析,这种分类本身也存在一些偏差。综上,导致形态分类结果与分子分类结果差异巨大。

参考文献:

[1] Bruno D W, West P V, Beakes G W, et al. Saprolegnia and other Oomycetes[M]//Woo P T K, Bruno D W. Fish diseases & disorders. Wallingford, UK: CABI International, 2011.

[2] 王立宝, 刘文霞, 左万星, 等. 松罗酸对 3 种水霉病致病菌的抑菌作用[J]. 河北师范大学学报(自然科学版), 2017, 41(4): 354-357.

[3] Yang H L, Ou R J, Cao H P, et al. Morphological characteristics and ITS rDNA region of a pathogenic Saprolegnia sp. isolate from Carassius auratus Gibelio eggs [C]. Chinese Society of Fisheries Society of 2011, 2011.

[4] 孟思好, 孟长明, 陈昌福. 鱼类水霉病的发生原因与预防措施[J]. 渔业致富指南, 2016(15): 60-61.

[5] Tampieri M P, Galuppi R, Carelle M S, et al. Effect of selected essential oils and pure compounds on Saprolegnia parasitica [J]. Pharmaceutical Biology, 2003, 41(8): 584-591.

[6] Whisler H C. Identification of Saprolegnia spp. pathogenic in chinook salmon; final report [R]. Washington, D C: U S Department of

Energy, 1996.

[7] Dieguezuribeondo J, Cerenius L, Soderhall K. Physiological characterization of Saprolegnia parasitica isolates from brown trout [J]. Aquaculture, 1996, 140(3): 247-257.

[8] 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.

[9] Dieguez - Uribeondo J, Fregeneda - Grandes J M, Cerenius L, et al. Re - evaluation of the enigmatic species complex Saprolegnia diclina - Saprolegnia parasitica based on morphological, physiological and molecular data [J]. Fungal Genetics and Biology, 2007, 44(7): 585-601.

[10] Paul B, Steciow M M. Saprolegnia multisporea, a new oomycete isolated from water samples taken in a river in the Burgundian region of France. FEMS [J]. Microbiology Letters, 2004, 237(2): 393-398.

[11] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5(2): 150-163.

[12] 可小丽, 汪建国, 顾泽茂, 等. 水霉菌总 DNA 提取方法研究[J]. 水生生物学报, 2008, 32(1): 68-73.

[13] 熊刚, 黄奕童, 王咏星. 新疆五家渠水霉病原菌多样性的初步研究[C] // 第九届全国微生物学青年学者学术研讨会论文集,

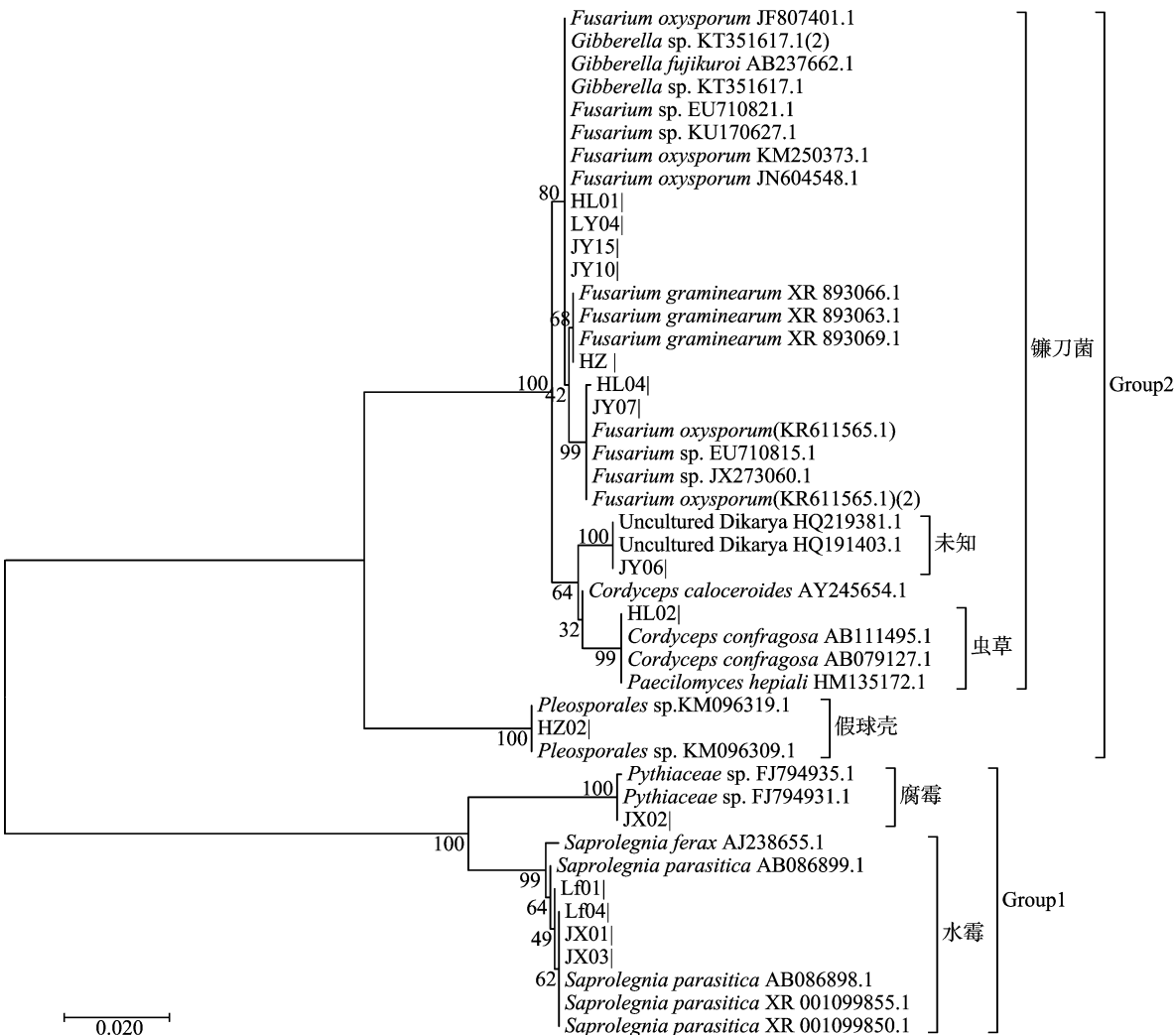


图3 MEGA 水霉病原与其同源 18S rDNA 的系统发育树(ML树)

表 2 MEGA 系统发育树分类结果

建树方法 (methods)	寄生水霉 (<i>S. parasitica</i>)	尖孢镰刀菌/禾谷镰刀菌 (<i>F. oxysporum</i> / <i>F. graminearum</i>)	腐霉 (<i>Pythiaceae</i> sp.)	虫草未知种 (unknown species of <i>Cordyceps</i>)	未知 (unknown)
NJ	Lf01 ,Lf04 ,JX01 ,JX03	HZ ,JY15 ,LY04 ,HL01 ,JY07 ,HL04 ,JY10	JX02	HL02	JY06
ML	Lf01 ,Lf04 ,JX01 ,JX03	HZ ,JY15 ,LY04 ,HL01 ,JY07 ,HL04 ,JY10	JX02	HL02	JY06

表 3 18S rDNA 序列比对鉴定与形态学鉴定结果比较

菌株	形态学分类	18S rDNA 鉴定
JX02	绵霉属	FM
JX01 Lf01 JX03	隐囊霉属	JS
HZ	破囊霉属	LDJ
HZ02	隐囊霉属	未知
HL01	破囊霉属	LDJ
HL04	破囊霉属	LDJ
JY06 HL02	水霉科	未知
JY07	水霉科	LDJ
JY10	破囊霉属	LDJ
JY15	破囊霉属	LDJ
LY04 Lf04	水霉属	LDJ

注:FM 标注鞭毛菌卵菌纲霜霉目腐霉科腐霉属腐霉;JS 标注鞭毛菌门卵菌纲水霉目水霉科的水霉属寄生水霉;LDJ 标注子囊菌亚门肉座菌科赤霉属尖孢镰刀菌或禾谷镰刀菌。

武汉,2012.

[14]熊 刚,尹思璐,梁永增,等. 河鲈水霉病病原菌的研究[J]. 安徽农业科学,2013,41(8):3411-3413,3439.

[15]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.

[16]余永年. 卵菌的系统学和分类学[J]. 武汉植物学研究,1986,4(4):399-410.

[17]Hatai K, Willoughby L G, Beakes G W. Some characteristics of saprolegnia obtained from fish hatcheries in Japan[J]. Mycological Research,1990,94(2):182-190.

[18]Leclerc M C, Guillot J, Deville M. Taxonomic and phylogenetic analysis of Saprolegniaceae (Oomycetes) inferred from LSU rDNA and ITS sequence comparisons[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2000,77(4):369-377.

[19]Seymour R L. The genus *Saprolegnia*[J]. Nova Hedwigia,1970,19(3):1-124.