

鱼类镰刀菌的研究

I. 从大口黑鲈病灶上分离的镰状镰刀菌的研究

黄文芳 陈红 胡朝晖 黎振昌 温桂芳 张剑英

(华南师范大学生物系, 广州 510631)

提 要

本文报道了从网箱养殖的大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)皮肤溃烂病灶上分离到一株镰刀菌 Ful-2, 人工感染大口黑鲈鱼苗获得成功。Ful-2 菌株经鉴定认为是镰状镰刀菌(*Fusarium fusarioides*)。组织病理切片可见到感染的菌丝。Ful-2 玉米碎低温培养物毒素粗提物中尚未发现有 9 种单端孢霉烯族毒素, 但对豌豆发芽、兔子皮肤反应和三种鱼苗均显示出毒性, 提示该培养物存在 9 种单端孢霉烯族之外的毒素。Ful-2 对硫酸铜、氯化铜、食盐、小苏打等不敏感, 对孔雀绿、亚甲基蓝、升汞等敏感。

关键词 大口黑鲈, 溃烂, 镰刀菌, 毒性, 单端孢霉烯族

大口黑鲈[*(Micropterus salmoides)* Lacépède]又称加州鲈。1991 年从粤西的一个水库网箱养殖的大口黑鲈中, 发现一种危害严重的皮肤溃烂病。病灶多发生在头部和背鳍两侧尾部的体表, 附有大量的丝状物, 酷似水霉, 随着病情加重, 病鱼不断地死亡。从病鱼溃烂处分离出一株镰刀菌, 经鉴定初步认为是一株镰状镰刀菌[*Fusarium fusarioides* (Frag. Scif) Booth]。镰刀菌在植物病害、兽医学上研究颇多^[1,2], 近 20 多年来发现镰刀菌对虾、蟹等甲壳动物危害也很大^[3]。有关镰刀菌感染鱼类的报道只见 Muhvich 等^[4]和 Ostland 等^[5]。在我国从鱼体上分离到镰刀菌, 尚未见有报道。现将从大口黑鲈溃烂处分离的 Ful-2 镰刀菌株的形态、生理特性、组织病理、毒性、毒素成分分析及对药物敏感性等研究报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料来源 大口黑鲈病鱼采于粤西一个水库网箱养殖场。

1.2 镰刀菌的分离纯化 按照文献[6]所介绍的方法制备好分离培养基。取病鱼溃烂处组织用无菌水冲洗 2—3 次, 置于含有抗生素溶液中浸泡 20—30min。把一小块组织接种到斜面或者平板培养基上, 28℃ 下恒温培养 3—5d, 待长出孢子后, 进一步分离纯化。

广东省八五攻关项目内容之一。镰刀菌毒素分析得到中国军事医学科学院毒物药物研究所罗毅研究员的精心指导, 在此表示衷心感谢。

1995 年 7 月 4 日收到; 1996 年 6 月 21 日修回。

将培养数天的斜面菌种,用无菌生理盐水制备成孢子悬液。取 20 尾健康的 3—5cm 大口黑鲈鱼苗,用 0.4% 食盐溶液处理 20min。其中 10 尾把左侧背擦伤,另 10 尾不擦伤。各取 5 尾擦伤和未擦伤的鱼苗浸泡于菌丝、孢子液中 30min,连同孢子液一起置于水族箱中观察;剩下的鱼苗放入不含孢子液的水族箱中作对照观察。水族箱水温 20℃ 左右,用充气泵不断充气,每天投喂经 0.4% 食盐溶液处理的水丝蚓。

1.3 形态、培养特性观察 (1)PSA 三点培养、米饭培养和马铃薯块培养、载玻片培养根据^[7]文献的方法进行;(2)扫描电镜观察:取一小块培养 2—3d 的菌块,用 3% 戊二醛固定,分级酒精脱水、醋酸异戊酯置换、临界点干燥、离子喷金后,置扫描电镜 H-300 型电镜的 3010 扫描附件中观察及拍片。

1.4 生理特性试验 用 NaCl 配制 0—14% 梯度为 1% 不同浓度 NaCl 的 PD 液体培养基,接种培养 3d 后记录生长情况。配制不同 pH 的 PD 液体培养基,接种后 28℃ 培养 3d 后观察生长情况,用 pHB-4 便携式酸度计或 CORNING 120pH 计测定接种前后的 pH 值。

1.5 病理组织切片观察 按照芮菊生等^[8]所介绍的方法进行。

1.6 毒性测定 产毒培养、粗毒素的制备、豌豆发芽抑制试验和家兔皮肤反应试验均按照文献^[9]进行。用水配制成浓度不同的粗毒素提取物的溶液,另设丙酮、纯玉米碎提取物作为空白对照,将健康的 7—14 尾鱼苗投入上述溶液中,观察 24—96h,记录结果。

1.7 毒素成分分析 样品提取、分离纯化和岛津 GC-MS2000 型气相色谱-质谱联仪分析均按照罗毅^[10]介绍的方法进行。

1.8 药物敏感试验 所用药物有亚甲基蓝、孔雀绿、福尔马林、重铬酸钾、红汞、氯化汞、多菌灵、托布津、硫酸铜、氯化铜、小苏打、食盐等。

2 结果

2.1 大口黑鲈皮肤溃烂症状

病鱼的头部、背鳍、背部和尾部的皮肤表皮开始先充血发炎,随着病情的发展,发炎的皮肤肌肉逐渐溃烂形成圆形或椭圆形的溃烂病灶,并“长出”大量细小的丝状物,类似水霉(图版 I:1)。溃烂严重时可使骨骼裸露,很快死亡。取溃烂处组织镜检,发现有大量的细菌,固着纤毛虫和具有分隔的真菌菌丝,并可观察到镰刀状的分生孢子。从用抗生素处理过的溃烂组织中分离获得一株镰刀菌。

2.2 人工感染与镰刀菌的再分离

人工感染大口黑鲈鱼苗结果表明。发现只有擦伤的鱼才被感染,感染的皮肤和肌肉有轻度溃烂,但没有自然发病严重。溃烂处长菌丝,长势较弱,没有自然发病时的菌丝长得旺盛。从人工感染的病鱼病灶上重新分离到一株镰刀菌,代号为 Ful-2。其它试验组均未感染。

2.3 Ful-2 镰刀菌的形态、培养性状和分类鉴定

2.3.1 Ful-2 菌丝为分枝分隔多细胞菌丝,直径大小为 2.3—5.2 μm (图版 I:6);具大型分生孢子,弯曲呈纺锤形或镰刀形(图版 I:2.7.8.10)。在气生菌丝的侧生单瓶状小梗上长出大分生孢子(图版 I:3.8.9)少数长出两个大分生孢子(图版 I:4);小型分生孢子呈椭圆形或棍棒形(图版 I:10);厚垣孢子出现在菌丝中间或顶端,单生或串生,圆形或椭圆形,表面光滑(图版 I:5)。

2.3.2 Ful-2 在 PSA 培养基上呈棉絮状菌丝, 颜色从白色变为淡褐色, 培养基的颜色从培养基本色变为黑褐色; 在 PDA 培养基上, 菌丝颜色从白色变为黄色, 培养基的颜色变为黄褐色, 其它特征与 PSA 上基本相似。在马铃薯块上, 菌丝从白色变为黄绿色, 3d 长满菌丝, 14d 可见大量成串的厚垣孢子; 在米饭培养基上, 菌丝从白色变为粉红色再变为褐色, 3d 菌丝只长到 2—2.5cm 培养基。

2.3.3 不同浓度 NaCl 和 pH 值对 Ful-2 生长的影响(表 1、2)。从表 1 发现在 0—13%NaCl 的马铃薯葡萄糖培养基上, Ful-2 菌丝均可生长; 在 1—3%NaCl 浓度时生长最好, 13%时生长极差, 14%以上不能生长。从表 2 可知, pH 在 1.98 以下时, Ful-2 不生长; pH 在 2.57—3.85 时, 生长极差, 不产生分生孢子; pH5.47—9.86 时生长很好, 产生许多分生孢子。接种前后的培养液 pH 值变化不大。

综上所述, 参照有关文献[11,12], 初步确定 Ful-2 为镰状镰刀菌 *F fusarioides*。

表 1 不同浓度的氯化钠对 Ful-2 的影响
Tab.1 Effects of different concentration of sodium chloride to Ful-2

NaCl 浓度(%) NaCl concentration	菌落大小(cm) Colony size	菌丝生长 Hyphae growth	分生孢子 Conidia
0	5.0	+++	多
1-3	6.0-7.0	++++	多
4-6	4.5-5.0	++++	多
7-8	3.5-4.5	+++	较少
9-10	2.3-3.5	++	很少
11-13	1.1-2.1	+	无
14	0	-	无

注: +示生长; ++示生长较好; +++示生长好; ++++示生长很好; -示不生长

表 2 不同 pH 值对 Ful-2 生长的影响
Tab.2 Effects of different pH values to Ful-2

接种前 pH pH values before inoculation	接种后 pH pH values after inoculation	生长情况 Growth cases
1.98	1.97	不生长
2.57	2.58	菌丝极少, 有厚垣孢子
3.85	3.84	菌丝很少, 有厚垣孢子
4.32	4.32	菌丝较多, 有少量分生孢子
5.23	5.24	菌丝较多, 有较多分生孢子
5.47(自然 pH)	5.47	菌丝多, 有较多分生孢子
6.45	6.44	有大量菌丝和分生孢子
7.62	7.62	有大量菌丝和分生孢子
8.75	8.76	有大量菌丝和分生孢子
9.86	9.86	有大量菌丝和分生孢子

2.4 病理变化观察结果

组织病理切片(图版 I : 11)显示,表皮已不存在,真皮细胞坏死,局部有大量菌丝;肌肉细胞也部分溶解,有些部位也见到菌丝。正常组织见不到菌丝存在(图版 I : 12)。

2.5 Ful-2 玉米碎培养物生物毒性

2.5.1 抑制豌豆发芽能力如表 3。三个温度培养的玉米碎毒素粗提物对豌豆发芽均有抑制作用,显出毒性。低温(13℃)下 28d 的毒素粗提物处理的豌豆发芽虽达到 30%,但芽非常短,只有 1.5mm 左右,显出强的毒性。将 40μl 毒素滴到刮干净毛的兔子皮肤上 7d 天后出现微红色至深红色,表现出弱毒性反应。

表 3 玉米培养物毒素粗提物对豌豆发芽抑制作用(发芽温度为 25℃)

Tab.3 Inhibiting effects of corn culture crude extract on pea seed germination

材 料 Material	发芽率(%) Germination rate	毒 性 Toxicity
30℃ 培养 7d 后 13℃ 培养 21d 的提取物	50	弱
13℃ 培养 7d 后 30℃ 培养 21d 的提取物	70	弱
13℃ 培养 28d 的提取物	30	强
CK1 玉米提取物	100	无
CK2 丙酮液	100	无

表 4 玉米培养物毒素粗提物对鱼苗的毒害作用(20-24℃)

Tab.4 Toxicity of corn culture crude extract to fry

鱼苗 Fry	时间 Time (h)	存活鱼苗数 Number of survival				
		粗提物(mg /ml)			丙酮对照(μl /ml)	玉米对照(mg /ml)
		5	10	15	45	45
大口黑鲈 <i>M. salmoides</i>	0	7	7	7	7	7
	24	7	0	0	7	7
	48	1			6	7
	72	0			6	7
海鲤 <i>Cyprinus acutidorsalis</i>	0	14	14	14	14	14
	24	14	0	0	14	14
百花鲫 <i>Carassius auratus</i>	0	10	10	10	10	10
	24	8	7	0	10	10
	48	8	5		10	10
	72	7	1		10	10
	96	5	0		10	10

2.5.2 从表 4 可看出, Ful-2 毒素粗提物对大口黑鲈、海鲤、百花鲫鱼苗均显出毒性。大口黑鲈和海鲤鱼苗特别敏感。

2.6 镰刀菌毒素的气相色谱-质谱联用(GC / MS)检测

图 1 为 9 种标准单端孢霉烯族化合物的总离子流图, 9 个峰代表 9 种标准毒素。图 2 为检测样品 Ful-2 低温玉米培养物提取物的总离子流图, 与图 1 比较, 其中峰 270 的保留时间为 6.5min 附近, 与图 1 中标准蔗草镰刀菌烯醇 SCP 的保留时间 6.501min 很相近, 且 SCP 的离子联合质量为 270。虽然具有相同的保留时间, 还不能确定为同一物质, 因此进一步进行质谱分析。图 3 为标准 SCP 的质谱图, 其主要碎片离子峰为 m/z : 656, 628, 415 318, 105, 以此为特征离子对 SCP 和 Ful-2 低温玉米培养物提取物进行选择离子监测, 证实无 SCP 存在, 其结果如图 4 所示, 在 6.501min 处于 Ful-2 样品无 SCP 的特征离子峰。

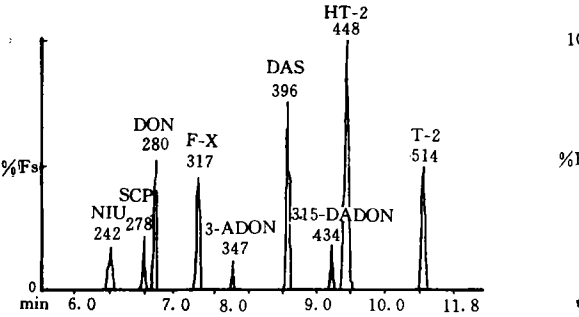


图 1 9 种标准单端孢霉烯族化合物总离子流图
Fig.1 TIC chart of 9 standard trichothecenes

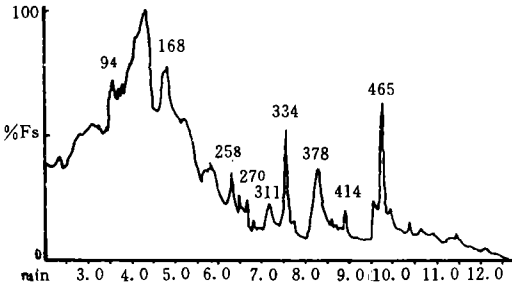


图 2 Ful-2 低温玉米培养物总离子流图
Fig.2 TIC chart of Ful-2
strain corn culture at low temperature

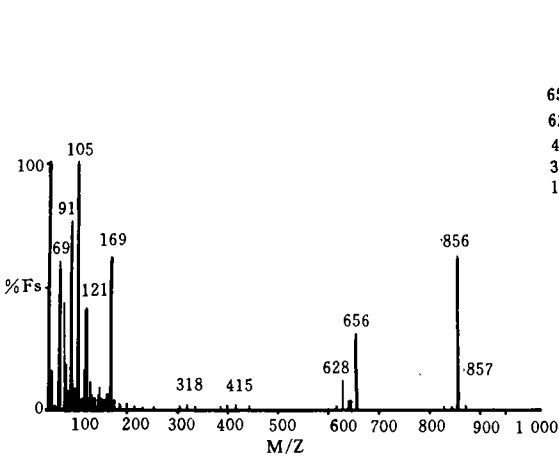


图 3 SCP 标准品的质谱图
Fig.3 Mass spectra of standard SCP

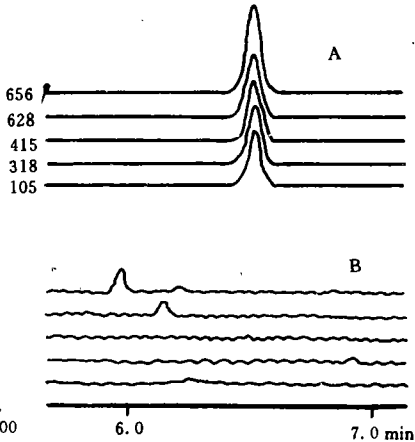


图 4 A 为 SCP 的选择离子监测图
B 为 Ful-2 低温玉米在相应时间离子图
Fig.4 Selected chromatograss of SCP(A) and Ful-2
strain corn culture at low temperature (B)

2.7 Ful-2 对药物敏感性

对药物敏感性试验结果表明, Ful-2 对亚甲基蓝(1mg/L)、孔雀绿(0.1mg/L)、氯化汞(2.5mg/L)最敏感;对福尔马林(10mg/L)、多菌灵(10mg/L)也很敏感,对重铬酸钾(80mg/L)较敏感;对硫酸铜、氯化铜、红汞、托布津、食盐、小苏打等均不敏感。

3 讨论

从自然发病大口黑鲈皮肤溃烂处不仅发现并分离到镰刀菌,同时也发现大量的细菌和一些固着性的纤毛虫,但尚未分离到水霉类真菌。因此大口黑鲈发生皮肤溃烂病,除了与镰刀菌的感染密切相关外,是否与细菌和原生动物的感染有关?还要作进一步的研究。

从试验中发现 Ful-2 对 pH 值适应能力很强,耐盐性也非常高。这就提示我们不能采取调节 pH 值或盐度来控制镰刀菌。

有关鱼类镰刀菌毒素和毒性的研究,目前在国内外未见有关报道。我们从 Ful-2 玉米培养物毒素粗提物对大口黑鲈、海鲤和百花鲫三种鱼苗的毒害试验及对豌豆发芽抑制试验和对兔子皮肤反应试验证明, Ful-2 玉米培养物中确实存在有毒物质,但目前尚未能确定为哪种毒素?美国的镰刀菌毒素研究专家 Mirocha^[13]曾报道过类似情况,他们从世界各地粮食样品中分离到 34 个串珠镰刀菌的大米培养物喂养大鼠以及用从饲料中分离到的 28 个串珠镰刀菌培养物喂养鸭子,发现都有不同程度的毒性,但这些菌株的培养物中都没有检出有单端孢霉烯族的镰刀菌毒素。我们尚未能确定 Ful-2 培养物中的镰刀菌毒素成份,其原因可能是,目前仅进行了 9 个常见单端孢霉烯族毒素的标准品对照检测;用数据库搜索,也只排除了不是这 9 种毒素以及 7-DON、15-ADON、4-15DACNIV 及 NS 等另四种该族毒素。而单端孢霉烯族毒素就有 70 多种,还有 50 多种未做对照检测,所以不能排除是其它单端孢霉烯族毒素的可能。另外,除了单端孢霉烯族外的镰刀菌毒素还有多种,如 FB1、FB2、FC 和 Wortmannin 等,这些毒素也没有进行对照检测。有关 Ful-2 产生的镰刀菌毒素成分,还需进一步的深入研究。

参 考 文 献

- [1] 角田等著(孟照赫等译)。真菌毒素图解。北京:人民卫生出版社,1983。
- [2] 孟照赫等。真菌毒素研究进展。北京:人民卫生出版社,1979。
- [3] 孟庆显。养殖对虾疾病的诊断与防治。北京:海洋出版社,1991。
- [4] Muhvich A G, et al. *Fusarium solani* isolated from newborn bonnethead sharks, *Sphyrna tiburo* (L.) *Journal of Fish Diseases*. 1989, 12: 57—62
- [5] Ostland V E, et al. Case report: Granulomatous peritonitis in fish associated with *Fusarium solani*. *The veterinary record* 1987, 19 / 26: 595—596.
- [6] 中国科学院水生生物研究所鱼病研究室编著,鱼病调查手册(第二版)。上海:上海科技出版社,1981。
- [7] 周德庆。微生物学实验手册。上海:上海科技出版社,1986。
- [8] 芮菊生等。组织切片学技术。北京:高等教育出版社,1980。
- [9] 匡开源等。镰刀菌毒素的研究 I. T-毒素产生菌株的筛选。真菌学报。1994, 4(3): 193—196。
- [10] 罗毅等。玉米培养物中弯角镰孢菌代谢产物的分析与鉴定。真菌学报。1993, 12(1): 77—84。
- [11] 魏景超。真菌鉴定手册。上海:上海科技出版社,1979。
- [12] 布什著(陈其煥译)。镰刀菌属。北京:农业出版社,1988。
- [13] Mirocha C J. Absence of Trichothecenes in Toxicogenic Isolates of *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990, 56(2): 520—525.

STUDIES OF FISH FUSARIUM

I. STUDIES ON *FUSARIUM FUSARIOIDES* ISOLATED FROM *MICROPTERUS SALMOIDES*

Huang Wenfang, Chen Hong, Hu Zhaohui, Li Zhenchang,
Wen Guifang and Zhang Jianying

(Department of Biology, South China Normal University, Guangzhou, 510631)

Abstract

This paper reports a fungi, Ful-2, isolated from the ulcerous skin lesion of *Micropterus salmoides* culturing in net cage. Artificial infecting *Micropterus salmoides* fry were successful, Ful-2 was preliminarily identified as *Fusarium fusarioides*. Ful-2 grows very well in pH 2.57 to 9.86. It tolerates higher salinity and can survive in media with 13% NaCl. The infecting hyphae can be found from the histopathological sections. The crude extract of Ful-2 corn culture at low temperature was negative when tested for 9 kinds of trichothecenes toxin. The extract was toxic to pea seed germination, to rabbit skin response, to three kinds of fry, indicating the presence of a toxin other than 9 kinds of trichothecenes toxin. Ful-2 is highly sensitive to malachite green, methylene blue and mercury chloride etc, but isn't to cupric sulphate, cupric chloride, sodium chloride, sodium bicarbonate etc.

Key words *Micropterus salmoides*, Ulceration, *Fusarium*, Toxicity, Trichothecene.

图版说明

图版 I

1. 溃烂处长有大量棉絮状的菌丝体, 骨头裸露; 2. 大型分生孢子 $\times 660$, 相差; 3. 一个小梗上长一个大型分生孢子 $\times 660$, 相差; 4. 一个小梗上长二个大型分生孢子 $\times 660$, 相差; 5. 厚垣孢子 $\times 660$, 相差; 6. Ful-2 菌丝体的电镜扫描, $\times 1300$; 7. Ful-2 镰刀形大型分生孢子和菌丝体的电镜扫描, $\times 1300$; 8. 纺锤形大型分生孢子的电镜扫描, $\times 3200$; 9. 生长发育中的大型分生孢子的电镜扫描, $\times 600$; 10. 大型分生孢子和小型分生孢子 $\times 396$; 11. 病理切片, 箭头示为菌丝, $\times 330$; 12. 正常组织切片, $\times 330$

1. Ulcerous skin foci with growing of a large number of hyphae analogous to cotton fibre, exposed bone; 2. Macroconidia, $\times 660$, phase; 3. One macroconidium at a conidiophore, $\times 660$, phase; 4. Two macroconidia at a conidiophore, $\times 660$, phase; 5. Chlamydospore, $\times 660$, phase; 6. Scanning electron microscopy of hyphae, $\times 1300$; 7. Scanning electron microscopy of sickle macroconidium and hyphae, $\times 1300$; 8. Scanning electron microscopy of fusiform macroconidium, $\times 3200$; 9. Scanning electron microscopy of developing macroconidia, $\times 600$; 10. Macroconidia and microconidia, $\times 396$; 11. Histopathological section, hyphae arrowed, $\times 330$; 12. Normal histologic section, $\times 330$

《水生生物学报》征稿简则

Notice of contributors

一、本刊是淡水生物学综合性学术刊物,主要登载以下诸方面新成果的论文报道,研究简报和综述评;淡水生物的生态、生物、生化、遗传、病理、毒理和分类区系;淡水生物的育种、培养、开发利用和病害防治;淡水生态及环境的评价和治理;淡水渔业生物学及有关湖沼科学的综合性调查和研究等。酌登有关新技术、新方法的应用,有关科研仪器的研制成果,重要书刊评价和国际学术会议简讯等。

二、来稿要求和注意事项:

1.稿件务必论点明确,行文力求简练,数据可靠,结构严谨。严格控制各类稿件的篇幅(即包括图表、提要、参考文献等):论文控制在8千字左右(排版后不超过6个印刷面),综述9千字左右(不超过8个印刷面),简报类3千字左右(不超过2个印刷面)。

2.来稿请用方格稿纸钢笔誊写,字迹务必工整清楚,切忌潦草或自创简化字,标点符号力求正确、清晰,并每符占一格;专业性外文字母、符号、公式等请书写正规,并用铅笔注明其文种、大或小写、正斜体及其相关的最低位置;名词术语、计量单位、人名或地名的译名,请遵循现行有关工具书的统一规定。

3.稿中图表、照片力求简明清晰,图片务必排列紧凑整齐。插图请用绘图纸黑墨精绘,曲线图和直方图的成果线要相对粗一些;各图请另附中、英文题目的简明底图(或原图复印)一份备排版后核对,并在正文的相应位置划一方框标明插图序号同时抄上中、英文图题和图例;图版照片请拼排成 $14 \times 16\text{cm}$ 大小一版,必须在图上用软铅笔标明图序号,图题下加注中、英文说明;表格设计力求简明扼要,切忌繁琐,所有表一律抄贴在文中相应的地方(表的英文题则请打字贴在中文表题下,表内小栏目的英文说明作为表的脚注打贴在表下,也可注在表栏内)。同时提出中、英文关键词(Key Words)2—6个分别列于中、英文摘要之末。

4.参考文献只择主要的,按引用文献出现的先后顺序连续编码。期刊书写格式为:序号作者(多作者可写第一作者,或者最多只写3人,后加等或 et al.)题名、期刊名,年,卷(期):页码。例:[1]崔奕波.鱼类生物能量学的理论方法.水生生物学报,1989,13(4):369.图书:序号 作者。(多作者同上;译文书用原著者,译者)书名.版次(第1版不标注),出版地:出版者,年:页码。例:伍献文等.中国鲤科鱼类志.上海:上海人民出版社,1977:430。

5.来稿必须每稿一式二份(其中1份可用复印件)。来稿必须同时交付处置费(论文或综述30元,简报类20元)及作者所在单位推荐信。审查修改过的稿件,经作者清稿后付印,校样不送作者,不作改动,出版稿以此清稿为准。本刊欢迎作者在清稿后交软盘,以利于计算机排版。

6.文章在本刊决定录用后,即向第一作者收取版面费,每篇文章包括图表不应超过本刊规定的篇幅,每面收45元,每超一面收超版费90元。稿件一经录用,即向作者付稿酬。

7.来稿请挂号寄武汉市武昌珞珈山中国科学院水生生物研究所《水生生物学报》编辑部收,邮政编码:430072。

《水生生物学报》编辑部