

黄颡鱼卵水霉病病原的分离鉴定及其无性繁殖特性

许佳露[△] 曹海鹏[△] 欧仁建 杨先乐^{*}

(上海海洋大学 国家水生动物病原库 上海 201306)

摘要:【目的】对黄颡鱼卵水霉病病原进行分离鉴定,并对其无性繁殖特性进行研究。【方法】采用传统方法从患水霉病的黄颡鱼卵上进行丝状真菌的分离,然后通过人工感染实验证实分离菌株的致病性,通过形态学观察和 ITS rDNA 序列分析对致病菌株进行鉴定,并进一步通过单因子法研究其无性繁殖特性。【结果】从患水霉病的黄颡鱼卵上分离了 4 株丝状真菌,经人工感染试验证实其中一株丝状真菌 HP 对黄颡鱼卵具有致病性,并进一步研究了其形态与无性繁殖特性,开展了 ITS rDNA 序列分析。实验结果表明,菌株 HP 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,游动孢子发育成熟后从孢子囊中释放出来,并迅速游离;能够产生第二孢子;新孢子囊以内层出的方式产生;藏卵器呈球形,与雄器同枝或异枝。菌株 HP 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%,与多子水霉菌株 Arg4S (GenBank 登录号 GQ119935)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 HP 为多子水霉(*Saprolegnia ferax*)。此外,菌株 HP 在 5 °C–35 °C、pH 4–10 范围内均能产生游动孢子,产生游动孢子的最适温度和 pH 分别为 20 °C 和 7,而且 5–25 mg/L 福尔马林和 0.25–1.25 mg/L 二硫氰基甲烷对菌株 HP 产生游动孢子具有明显的抑制作用。【结论】分离鉴定了黄颡鱼卵水霉病病原,并确定了其无性繁殖特性,可以作为该病防治用药的依据。

关键词: 黄颡鱼卵, 多子水霉, 鉴定, 无性繁殖

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2011AA10A216); 现代农业产业技术体系建设专项资金项目(No. CARS-46-12); 公益性行业(农业)科研专项(No. 201203085)

△ 共同第一作者

*通讯作者: Tel: 86-21-61900453; Fax: 86-21-61900452; ✉: xlyang@shou.edu.cn

收稿日期: 2011-09-23; 接受日期: 2011-11-11

Identification and asexual reproduction characterization of a *Saprolegnia ferax* pathogen from the egg of Yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)

XU Jia-Lu[△] CAO Hai-Peng[△] OU Ren-Jian YANG Xian-Le^{*}

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

Abstract: [Objective] The aim of the present study was to isolate and identify the pathogen of *Pelteobagrus fulvidraco* eggs suffering from saprolegniasis, and study its asexual reproduction characteristics. **[Methods]** Filamentous fungal strains were first isolated from the *Pelteobagrus fulvidraco* eggs suffering from saprolegniasis using the traditional method. The pathogenic strain was further confirmed through artificial infection experiment, and identified by using morphological observation and phylogenetic analysis based on its ITS rDNA sequence. Additionally, its asexual reproduction characteristics was studied using single factor method. **[Results]** Four filamentous fungal strains were isolated from *Pelteobagrus fulvidraco* eggs with saprolegniasis, and strain HP was proved to be pathogenic to *Pelteobagrus fulvidraco* eggs by artificial infection. Therefore, morphology and asexual reproduction characteristics of strain HP were studied, and the phylogenetic analysis based on its ITS rDNA sequence was further conducted. The experimental results showed that the hyphae of strain HP were aseptate, transparent and seldom branched. Its zoosporangia were often clavate and renewed internally. Primary zoospore was discharged in *Saprolegnia* fashion. New sporangium generated from the base of old sporangium by the way of internal proliferation. Spherical oogonia were attached by monoclinal or diclinal antheridium hyphae. The ITS rDNA sequences of strain HP were naturally clustered with ITS rDNA sequences of *Saprolegnia* sp. in GenBank with 99% of homology, and had closest relationship with *Saprolegnia ferax* strain Arg4S (GenBank accession number: GQ119935). Combined morphological characterization with phylogenetic analysis based on ITS rDNA sequence, strain HP was identified as *Saprolegnia ferax*. In addition, strain HP could produce zoospores at 5 °C–35 °C and pH 4–10, its optimum temperature and pH for the zoospore production were 20 °C and 7, respectively. It was greatly inhibited by 5–25 mg/L formalin and 0.25–1.25 mg/L dithiocyanomethane. **[Conclusion]** The pathogen of *Pelteobagrus fulvidraco* egg saprolegniasis was isolated and identified in the present study, and its asexual reproduction characteristics was also determined, which could serve as a foundation for the control of *Pelteobagrus fulvidraco* egg saprolegniasis.

Keywords: *Pelteobagrus fulvidraco* eggs, *Saprolegnia ferax*, Identification, Asexual reproduction

黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)是一种小型名优淡水鱼类, 味道鲜美, 营养丰富, 深受广大消费者的喜爱, 在日本、韩国、东南亚等国家具

有巨大的市场, 是我国出口创汇的优质特种鱼类^[1]。然而, 黄颡鱼在鱼卵孵化过程中因水温等环境因素的变化易患水霉病而大批死亡, 严重影

响了苗种生产的规模化进程^[2]。因此,开展黄颡鱼卵水霉病的病原学研究对其苗种繁殖生产具有重要的意义。2011年6月份,仙桃市沙湖水产技术推广站人工繁殖的黄颡鱼卵发生了严重的水霉病,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。鉴于此,本实验从患水霉病的黄颡鱼卵上分离了一株致病性水霉菌HP,并观察了温度、pH、福尔马林、二硫氰基甲烷对其游动孢子产生的影响,以期为黄颡鱼卵水霉病的病原学研究与有效预防提供理论参考。

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2-3 s,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℃恒温培养24 h后立即在长出的菌落边缘放置无菌油菜籽,在25℃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℃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℃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℃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℃恒温培养直至产生大量游动孢子,然后用三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粒黄颡鱼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。黄颡鱼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℃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℃和25℃恒温培养,连续2周在倒置显微镜下观察游动孢子囊、游动孢子的释放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:参照可小丽等^[3]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邻接法构建系统发育树。

1.4 分离菌株无性繁殖特性的测定

1.4.1 温度对分离菌株游动孢子产生的影响:参照Hussein等^[4]的方法用打孔器制备直径为6 mm的菌饼,将其置于5 mL无菌蒸馏水中,然后分别于5℃、10℃、15℃、20℃、25℃、30℃、35℃等温度下恒温培养0、6、12、18、21、27、36、42、48、54、60、66、72 h后,参照Ko等^[5]的方法无菌操作取样计数并测定游动孢子的浓度,每组3个平行。

1.4.2 pH对分离菌株游动孢子产生的影响:配制PDA培养基,常规灭菌后,用1 mol/L HCl和1 mol/L NaOH调节pH分别为4、5、6、7、8、9、10。参照Hussein等^[4]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的5 mL无菌蒸馏水中,然后置于20℃恒温培养0、6、12、18、21、27、36、42、48、54、60、66、72 h后,参照Ko等^[5]的方法无菌操作取样计数并测定游动孢子的浓度,每组3个平行。

1.4.3 福尔马林对分离菌株游动孢子产生的影响: 参照 Hussein 等^[4]的方法用打孔器制备直径为 6 mm 的菌饼, 将其分别置于含福尔马林质量浓度为 0、5%、10%、15%、20%、25%、30% 的 5 mL 无菌蒸馏水中, 然后置于 20 °C 恒温培养 0、6、12、18、21、27、36、42、48、54、60、66、72 h 后, 参照 Ko 等^[5]的方法无菌操作取样计数并测定游动孢子的浓度, 每组 3 个平行。

1.4.4 二硫氰基甲烷对分离菌株游动孢子产生的影响: 参照 Hussein 等^[4]的方法用打孔器制备直径为 6 mm 的菌饼, 将其分别置于含二硫氰基甲烷质量浓度为 0、0.25%、0.50%、0.75%、1.00%、1.25% 的 5 mL 无菌蒸馏水中, 然后置于 20 °C 恒温培养 0、6、12、18、21、27、36、42、48、54、60、66、72 h 后, 参照 Ko 等^[5]的方法无菌操作取样计数并测定游动孢子的浓度, 每组 3 个平行。

1.5 实验数据处理方法

所有数据通过 SPSS 11.5 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

从发病黄颡鱼卵上分离的 4 株优势丝状菌,

经过人工回归试验观察发现菌株 HP 对黄颡鱼卵具有致病性, 感染率为 45% (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 HP 是该水霉病的致病菌。

2.2 致病菌株的鉴定

菌株 HP 菌丝为透明管状结构, 中间无横隔, 分枝较少, 菌丝细长。其游动孢子囊多呈棒状, 游动孢子发育成熟后从孢子囊顶端释放出来, 并迅速游离(图 1A), 能够产生第二孢孢子(图 1B)。第二个游动孢子囊以内层出的方式产生(图 1C)。藏卵器呈球形(图 1D), 与雄器同枝或异枝。这是水霉属菌株的典型形态特征^[6]。此外, 通过对菌株 HP 的 ITS 序列进行扩增, 获得 784 bp 大小的片段, 此序列在 GenBank 上的登录号为 JN400035。通过 NCBI 网站对菌株 HP 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 HP 与 GenBank 基因库中水霉属的菌株自然聚类, 同源性高达 99%。邻接法构建的系统发育树结果(图 2)进一步表明, 菌株 HP 与多子水霉(*Saprolegnia ferax*)菌株 Arg4S (GenBank 登录号: GQ119935)的亲缘关系最近。结合形态特征与 ITS rDNA 序列系统发育分析的结果, 判定菌株 HP 为多子水霉(*Saprolegnia ferax*)。

表 1 分离菌株对黄颡鱼卵的人工感染情况
Table 1 Artificial infection of the isolates to *Pelteobagrus fulvidraco* eggs

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
HP	40	5×10^3	0	4	8	18	18	45
HP1	40	5×10^3	0	0	0	0	0	0
HP2	40	5×10^3	0	0	0	0	0	0
HP3	40	5×10^3	0	0	0	0	0	0

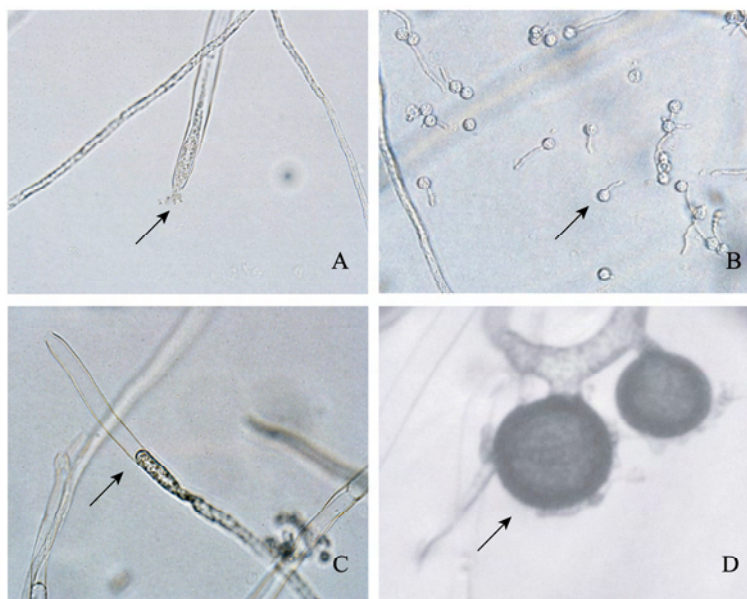


图 1 菌株 HP 的形态特征

Fig. 1 Morphological characterization of strain HP

注: A: 游动孢子的释放; B: 第二孢孢子的萌发; C: 新游动孢子囊以内层出方式产生; D: 未成熟的藏卵器。

Note: A: Saprolegnoid discharge of zoospores; B: Germinating zoospores; C: Sporangial renewal by internal proliferation; D: Immature oogonium.

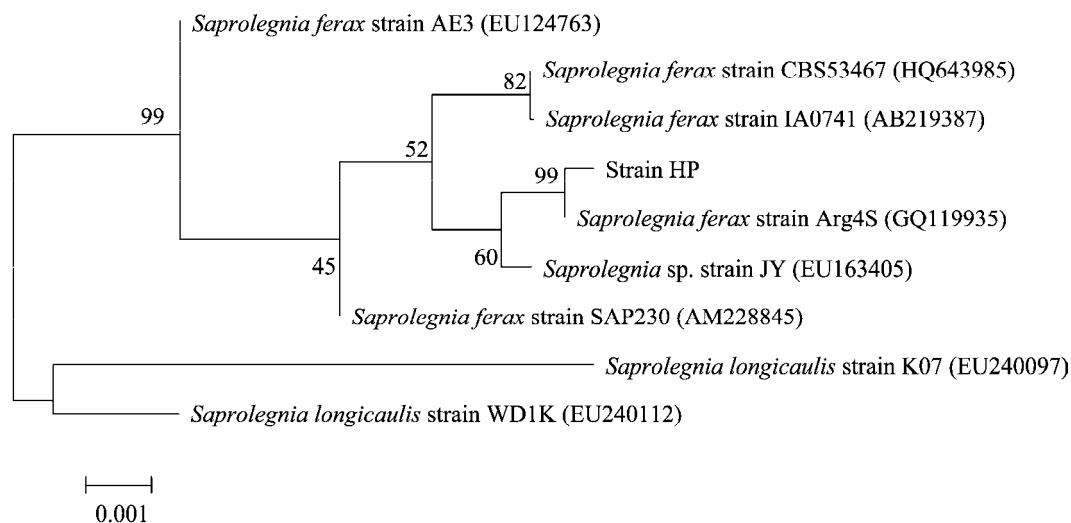


图 2 基于菌株 HP ITS rDNA 序列所构建的系统发育树

Fig. 2 The constructed phylogenetic tree based on ITS rDNA sequence of isolate HP

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 致病菌株的生长特性

2.3.1 温度对致病菌株游动孢子产生的影响: 实验结果表明(图 3), 菌株 HP 在 5 °C–35 °C 范围内均能产生游动孢子, 其产生游动孢子的最适温度为 20 °C。具体表现在: 菌株 HP 在 5 °C–20 °C 恒温培养时, 其产生游动孢子的最高浓度随着培养温度的升高而显著增大; 然而在 20 °C–35 °C 恒温培养时, 产生游动孢子的最高浓度随着培养温度的升高而显著降低, 其在 35 °C 恒温培养时产生游动孢子的最高浓度仅为 20 °C 时的 3.38% ($P<0.05$)。

2.3.2 pH 对致病菌株游动孢子产生的影响: 实验结果表明(图 4), pH 对菌株 HP 游动孢子的产生具有明显影响, 其产生游动孢子的最适 pH 为 7。具体表现在: 菌株 HP 在 pH 4–7 培养时, 其产生游动孢子的最高浓度随着 pH 的增大而显著增大; 然而在 pH 7–10 培养时, 其产生游动孢子的最高浓度随着 pH 的增大而显著降低。菌株 HP 在 pH 10 培养时产生游动孢子的最高浓度仅为 pH 7 培养时的 6.91% ($P<0.05$)。

2.3.3 福尔马林对致病菌株游动孢子产生的影响: 实验结果表明(图 5), 菌株 HP 在福尔马林

浓度为 0–25 mg/L 范围内均能够产生游动孢子, 但福尔马林对其游动孢子的产生具有明显的抑制作用。具体表现在: 随着福尔马林浓度的不断增加, 菌株 HP 产生游动孢子的最高浓度显著降低, 其在福尔马林浓度为 5 mg/L 时的游动孢子最高浓度较不加福尔马林时降低 63.78% ($P<0.05$), 而在福尔马林浓度为 25 mg/L 时的游动孢子最高浓度仅为不加福尔马林时的 2.89% ($P<0.05$)。

2.3.4 二硫氰基甲烷对致病菌株游动孢子产生的影响: 实验结果表明(图 6), 菌株 HP 在二硫氰基甲烷浓度为 0–1.25 mg/L 范围内均能够产生游动孢子, 但二硫氰基甲烷对其游动孢子的产生具有明显的抑制作用。具体表现在: 随着二硫氰基甲烷浓度的不断增加, 菌株 HP 产生游动孢子的最高浓度显著降低, 其在二硫氰基甲烷浓度为 0.25 mg/L 时的游动孢子最高浓度较不加二硫氰基甲烷时降低了 45.09% ($P<0.05$), 而在二硫氰基甲烷浓度为 1.25 mg/L 时的游动孢子最高浓度仅为不加二硫氰基甲烷时的 1.09% ($P<0.05$)。

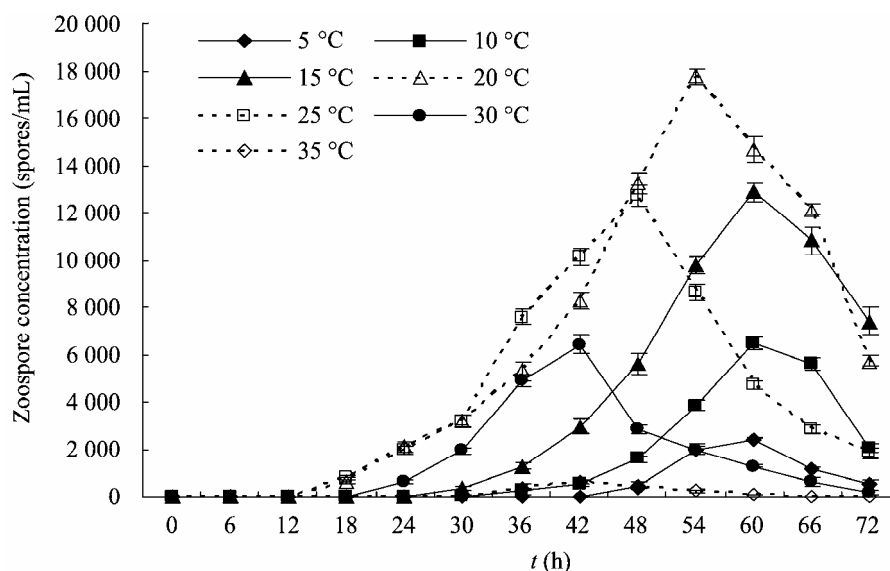


图 3 温度对菌株 HP 游动孢子产生的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the zoospore production of strain HP

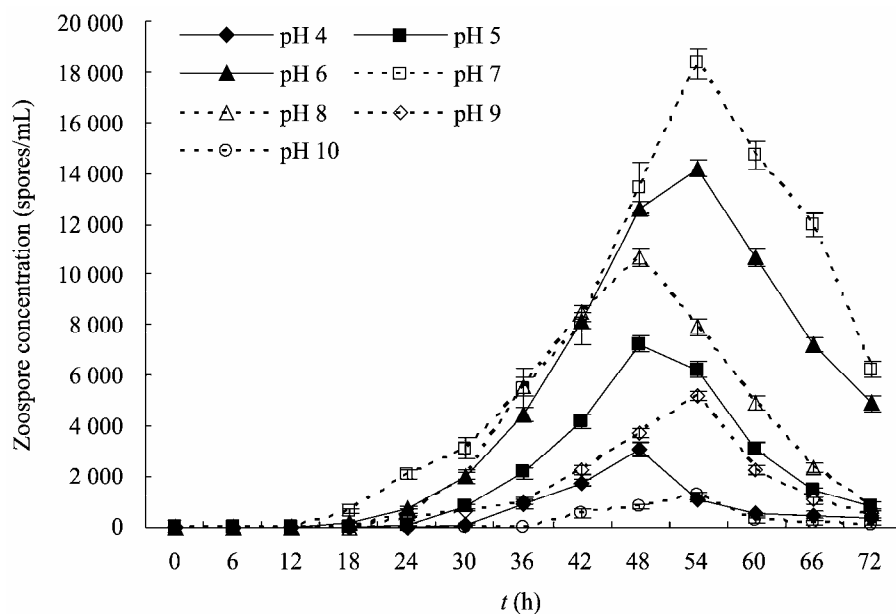


图 4 pH 对菌株 HP 游动孢子产生的影响

Fig. 4 Effect of pH on the zoospore production of strain HP

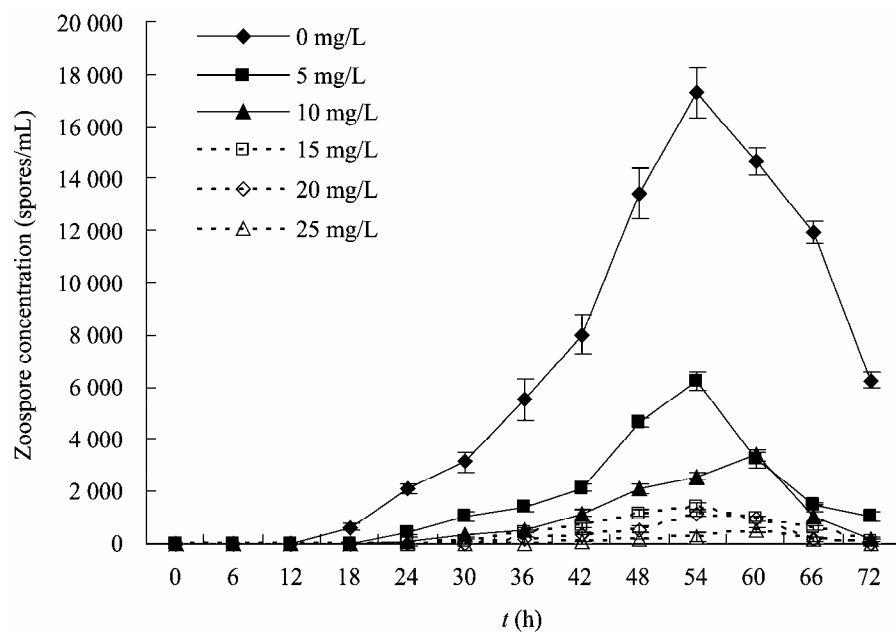


图 5 福尔马林对菌株 HP 游动孢子产生的影响

Fig. 5 Effect of formalin on the zoospore production of strain HP

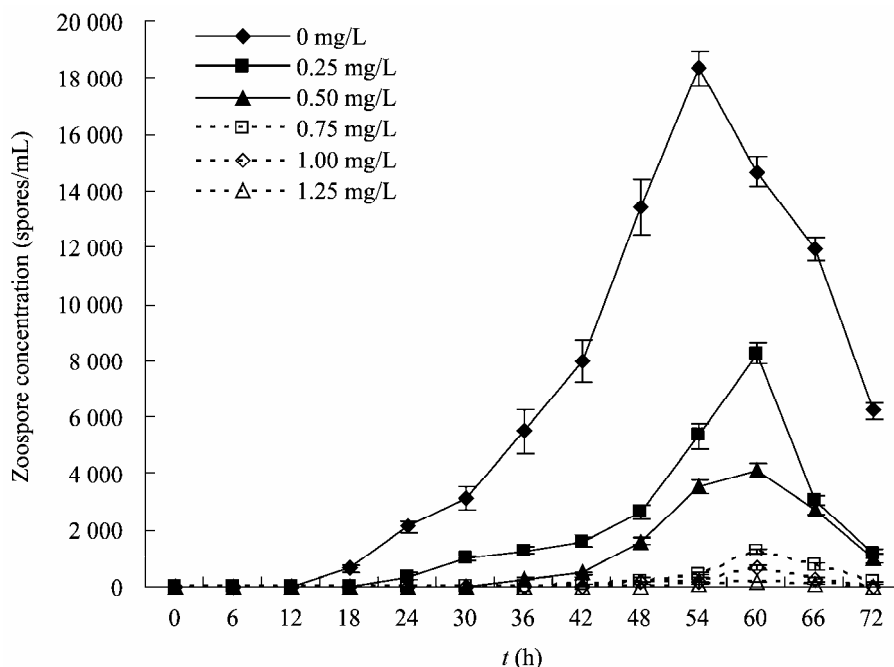


图 6 二硫氰基甲烷对菌株 HP 游动孢子产生的影响

Fig. 6 Effect of dithiocyano-methane on the zoospore production of strain HP

3 讨论

据报道,多子水霉是草鱼、鲢鳙鱼等养殖动物水霉病的病原菌^[3,7-8],对淡水养殖业的危害极大。然而,从现有文献资料来看,国内关于多子水霉引起黄颡鱼卵水霉病的研究报道尚未见到。本实验从患水霉病的黄颡鱼卵上分离了一株致病性菌株 HP,通过形态学观察、系统发育分析证实为多子水霉,并进一步研究了其无性繁殖特性,以期丰富黄颡鱼卵水霉病病原生物学资料,为黄颡鱼卵水霉病的防治提供理论依据。

目前,关于水霉菌传统的分类鉴定方法,主要以形态特征为依据,但有些水霉菌在形态上不稳定,种间存在重叠形状,很难对种进行鉴定和命名^[9]。近年来,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^[10],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-Urbeondo 等^[9]通过测定 ITS rDNA 序列,将 *Saprolegnia diclina-Saprolegnia parasitica* complex 分为 5 个型;Ke 等^[11]通过形态观察和 ITS rDNA 序列分析相结合的方法成功地将两个菌株 JY 和 BMY 鉴定为多子水霉。目前,国内通过基于 ITS rDNA 序列分析的分子生物学鉴定技术对水霉菌株进行鉴定研究还处于起步阶段,仅可小丽等^[3]、夏文伟等^[12]作了相关研究。因此,本实验结合传统的形态鉴定方法与 ITS rDNA 序列系统发育分析,确定菌株 HP 为多子水霉,进一步丰富了水霉菌分子鉴定研究资料。

游动孢子是水霉侵染鱼体及鱼卵的基本单位,它们通过在鱼体伤口处或死卵上萌发,并将菌丝穿入组织中吸收养料,导致鱼体或鱼卵死亡,但其产生受温度、pH 等环境因素的影响而存在较大的变化^[13]。例如,朱越雄等^[14]观察了温度对水霉游动孢子产生的影响后指出,水霉产生游

动孢子的最适温度为 25 °C; 而 Walker 等^[13]综述表明水霉在低于 12 °C 时有利于产生游动孢子。本实验结果证实菌株 HP 产生游动孢子的最适温度为 20 °C, 与朱越雄等^[14]和 Walker 等^[13]的观点均有所不同。此外, Peduzzi 等^[15]研究表明, 水霉游动孢子产生的最适 pH 为 6.2, 而本实验发现菌株 HP 产生游动孢子的最适 pH 为 7, 这与 Peduzzi 等^[15]的研究结果也稍有不同。出现这种现象的原因, 可能与菌株不同有关。

福尔马林、二硫氰基甲烷是养殖实践过程中水霉病防治的常用药物^[16-17]。例如, 高鹏等^[16]研究了福尔马林对水霉游动孢子的抑菌效果后发现, 福尔马林在 18.8 mg/L 以上时对水霉游动孢子具有明显的抑制作用; 夏文伟^[18]开展了二硫氰基甲烷对水霉孢子的抑菌实验后指出, 二硫氰基甲烷在 0.25 mg/L 以上时对水霉游动孢子具有明显的抑制作用。本实验结果也证实, ≥ 5 mg/L 福尔马林和 ≥ 0.25 mg/L 二硫氰基甲烷对菌株 HP 游动孢子具有明显的抑制作用, 与夏文伟^[18]的实验结论相同, 但与高鹏等^[16]的实验结果不同, 可能与菌株耐药性有关^[19]。

参 考 文 献

- [1] 黄峰, 严安生, 熊传喜, 等. 黄颡鱼的含肉率及鱼肉营养评价[J]. 淡水渔业, 1999, 29(10): 3-6.
- [2] 宋学宏, 陈葵, 王永玲, 等. EM 及重氢硫酸盐对黄颡鱼卵孵化中水霉的抑制作用[J]. 淡水渔业, 2007, 37(1): 9-13.
- [3] 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.
- [4] Hussein MMA, Hatai K. *Saprolegnia salmonis* sp. nov. isolated from sockeye salmon, *Onchyrhynchus nerka*[J]. Mycoscience, 1999, 40(5): 387-391.
- [5] Ko WH, Chase LL, Kunimoto RK. A microsyringe method for determining concentration of fungal propagules[J]. Phytopathology, 1973, 63(9): 1206-1207.
- [6] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 21-22.
- [7] Smith SN, Armstrong RA, Springate J, et al. Infection and colonization of trout eggs by Saprolegniaceae[J]. Transactions of the British Mycological Society, 1985, 85(4): 719-723.
- [8] 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.
- [9] Diéguez-Urbeondo J, Fregeneda-Grandes JM, 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] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] Walker CA, van West P. Zoospore development in the oomycetes[J]. Fungal Biology, 2007, 21(1): 10-18.
- [14] 朱越雄, 杨斐飞, 曹广力, 等. 草鱼养殖水体水霉的分离培养及孢子的诱生[J]. 水利渔业, 2005, 25(3): 70-72.
- [15] Peduzzi R, Käppeli F, Turian G. Repercussion de l'acidification de l'eau sur l'insurgence de la saprolegniose chez le poisson[J]. Sydowia, 1991, 43: 135-147.
- [16] 高鹏, 杨先乐, 张书俊. 几种常用水产消毒剂对水霉的体外作用效果[J]. 水产科技情报, 2007, 34(6): 247-249.
- [17] 张家松, 徐彦山. 二硫氰基甲烷在鱼类疾病中的应用[J]. 内陆水产, 2006, 31(5): 38-39.
- [18] 夏文伟. 鲫卵源致病性水霉的分离与鉴定及其生物学特性研究[D]. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 2011.
- [19] Beakes BGW, Gay JL. Effects of streptomycin on the growth and sporulation of *Saprolegnia* spp. [J]. Journal of General Microbiology, 1980, 119(2): 361-371.