

文章编号: 1674-5566(2019)05-0782-10

DOI:10.12024/jso.20190102514

## 绿海龟背甲坏死病病原真菌的鉴定及其药敏特性

庞 激<sup>1,2</sup>, 张晓雨<sup>2,3</sup>, 潘连德<sup>1,2,3</sup>, 刘辰宇<sup>1,2</sup>, 刘 秀<sup>1,2</sup>, 窦 赞<sup>1,2</sup>

(1. 上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 中国科学技术部海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 国家水生动物病原库, 上海 201306)

**摘 要:** 人工饲养的绿海龟 (*Chelonia mydas*) 患背甲坏死病的背甲整体呈现“灰白甲”症状, 用伍德灯检查有荧光现象, 即疑似真菌感染; 从绿海龟背甲边缘病变坏死处分离纯化得到 1 株优势真菌, 编号为 SDABAI, 通过形态学观察、分生孢子形态并结合 ITS 18S rDNA 序列分析对疑似致病菌株进行鉴定, 进而构建系统发育树进行分析。结果表明: SDABAI 菌株 (登录号为: MK583351) 与 *Fusarium solani* (登录号为: KU377470.1) 基因相似性达 99%, 判定 SDABAI 菌株为腐皮镰刀菌 (*Fusarium solani*), 真菌菌丝形态、分生孢子产生和形态也符合该菌。将患病绿海龟背甲病灶处分离得到的 SDABAI 菌株, 接种到 4 mL 离心管中, 斜面培养生长 4~5 d 长出白色絮状菌苔后, 用光固化型树脂封闭在 2 只健康绿海龟 (A1、A2) 的背甲上各 2 只带菌离心管 (A1-1; A1-2; A2-1; A2-2) 内, 攻毒感染第 24 天, A1 出现被感染症状, 有荧光现象, 产生了和自然发病一样的症状, 并于背甲边缘生长纹处分离到了和 SDABAI 菌株一样的腐皮镰刀菌。A2 较 A1 症状较弱。根据绿海龟背甲整体呈现“灰白甲”症状和腐皮镰刀菌病原, 定名为绿海龟背甲坏死病。选用大蒜油、艾叶油和茶树油进行腐皮镰刀菌药敏试验, 结果表明, 三者均可起到一定抑制该菌生长的效果, 还可以抑制次生菌生长, 大蒜油的抑菌效果最佳。特比萘芬、克霉唑、咪康唑、制霉菌素、两性霉素 5 种药对腐皮镰刀菌药敏试验结果显示咪康唑和制霉菌素的抑菌效果较佳。

**关键词:** 绿海龟; 背甲坏死病; 腐皮镰刀菌; 药敏特性

**中图分类号:** S 852.661 **文献标志码:** A

绿海龟 (*Chelonia mydas*) 属爬行纲 (Reptilia) 龟鳖目 (Testudiformes) 海龟科 (Cheloniidae), 是世界濒危物种、我国二级野生保护动物<sup>[1]</sup>。目前所有存活海龟种类均列入《国际濒危动植物保护公约附录 I (CITES I)》和《国际自然保护联盟 (IUCN)》的保护物种名录。

我国广东省惠东港口建立了国家级海龟自然保护区, 并探索通过人工繁育, 开展海龟卵人工孵化<sup>[2]</sup>和增殖放流等科技手段来恢复野生海龟种群, 累积野放海龟近 7 万只<sup>[3]</sup>。2013 年起上海市渔政监督管理处联合上海海洋大学水族宠物医学实验室在东海进行海龟放流活动, 每年一次。以资源增值和保护为目的, 人工养殖逐渐兴起, 但由于养殖海龟活动空间受限, 以及环境条件和食物的改变导致海龟的生长受到较大影响,

常因水质变坏、体表外伤等原因感染疾病<sup>[4]</sup>。绿海龟养殖温度低于 15 °C 时, 其能量支出增加, 长期饲养下可能对绿海龟机体造成不可逆的损伤<sup>[5]</sup>。由病原引起的常见海龟疾病中病毒引起的海龟纤维乳头状瘤病, 导致海龟种群数量下降<sup>[6]</sup>。疱疹状病毒引起的海龟皮肤瘤疾病具有传染性, 暴发后死亡率高<sup>[7-8]</sup>。单胞菌引起绿海龟的腐皮病也有报道<sup>[9]</sup>。真菌性疾病对于海龟来说也是一个重大的威胁, 爪甲团囊菌科 (Onygenaceae) 和麦角菌科 (Clavicipitaceae) 会引起爬行动物的皮肤真菌病<sup>[10]</sup>。球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 引起海龟肺肉芽肿<sup>[11]</sup>等疾病也有报道。

镰刀菌是常见的土壤腐生菌和植物病原菌, 但近些年, 人类和动物感染该病的情况也在逐渐

收稿日期: 2019-01-11 修回日期: 2019-05-24

基金项目: 水产动物遗传育种上海市协同创新中心 (ZF1206); 上海海洋大学大学生创新项目 (X201810264001)

作者简介: 庞 激 (1998—), 女, 研究方向为海龟医学救护。E-mail: 350820410@qq.com

通信作者: 潘连德, E-mail: ldpan@shou.edu.cn

增加<sup>[12]</sup>。有报道海龟背甲<sup>[13]</sup>和皮肤<sup>[12-14]</sup>感染腐皮镰刀菌。镰刀菌属种类还会影响海龟卵孵化,导致孵化率降低<sup>[15-17]</sup>。镰刀菌也是德克萨斯陆龟背甲坏死病的病原<sup>[18]</sup>。

和绿海龟背甲坏死病一样,在龟类集约化养殖和家庭小规模养殖中经常出现宠物龟的“灰白甲”症状,但由于致病原因不明而无有效的治疗方法。国内外对“灰白甲”致病机理鲜有研究,使得该疾病的治疗缺乏参考。笔者对来自上海海洋大学水族宠物医学实验室患背甲坏死病绿海龟的病原进行研究,为该病的临床诊断和治疗提供理论依据和指导。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 自然发病的绿海龟

2018 年 4 月,取自上海海洋大学救护并饲养的绿海龟 B(雌性,6 龄,7.5 kg,背甲长 43 cm、宽 30 cm),该病初期不影响其进食,但随着病情的加重,出现活动迟缓,精神不佳,停食消瘦的情况,同时还伴有身体发红的症状,严重影响海龟健康。经初步观察,该病的临床表现为:早期症状为背甲上出现零星白点;中期症状为病龟背甲出现成片白斑;晚期症状为整片背甲均颜色灰白。根据这种典型的“灰白甲”临床症状,暂定为绿海龟背甲“灰白甲”病。

#### 1.1.2 主要试剂

主要试剂包括沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA)(北京三药科技开发公司);药敏纸片(杭州微生物公司);棉兰染液[(台资)珠海贝索生物技术有限公司];Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司];DreamTaq-TM DNA Polymerase[生工生物工程(上海)股份有限公司];SanPrep 柱式 DNA 回收试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司];DNA Ladder Mix maker[生工生物工程(上海)股份有限公司];PCR 扩增引物[生工生物工程(上海)股份有限公司];光固化型树脂(武汉高登齿科材料有限公司);粘结剂(杭州西湖生物材料有限公司);格鲁玛酸蚀剂(德国贺利氏品牌);大蒜油、艾叶油和茶树油(江西国盛天然香料有限公司);盐酸特比萘芬乳膏(福元药业股份有限公司);克霉唑乳膏(新乡华青药业有限公司);硝酸

咪康唑乳膏[华润三九(南昌)药业有限公司];两性霉素 B(杭州微生物公司);制霉菌素(杭州微生物公司)。

#### 1.1.3 主要仪器

主要仪器包括:DYCP-31DN DNA 电泳槽(北京六一仪器厂);DYY-5 稳压电泳仪(北京六一仪器厂);2720 thermal cycler PCR 仪(Applied Biosystems);FR980 凝胶成像仪(上海复日科技仪器有限公司);HC-2518R 冷冻高速离心机(Bio Basic Inc 生工生物工程股份有限公司);伍德灯(七外光品牌,008 号,5 颗灯珠);LED 光固化机(靓雅齿科器材有限公司)。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 伍德灯检测

在黑暗条件下,使用伍德灯照射患病海龟背部,观察是否产生荧光现象。

### 1.2.2 菌株分离纯化

无菌操作刮取患病龟背甲及边缘病变部位,取甲屑和白色絮状物置于沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA)上,控制 pH 为  $8.2 \pm 0.1$ ,25 °C 培养 48 h 后选取优势种于 SDA 培养基继续纯化,之后将纯化好的菌株划线到斜面液体石蜡液封,4 °C 保存,备用。

### 1.2.3 分离菌株鉴定

分离菌株的形态观察:挑取菌苔,使用乳酸酚棉蓝染色法<sup>[19]</sup>镜检菌丝和孢子,观察其形态学特征以及无性生殖过程。

菌株 ITS rDNA 序列分析及系统进化树构建:采用 Omega 的 Fungal DNA kit 提取真菌 DNA。PCR 扩增反应体系(20  $\mu$ L),其中 Premix Taq 10  $\mu$ L,上下游引物各 1  $\mu$ L,模板 1  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L。PCR 反应体系:94 °C 3 min;94 °C 30 s、55 °C 30 s、72 °C 40 s 35 个循环;72 °C 10 min。PCR 产物割胶纯化:PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,割取目的条带,按照天根回收试剂盒(DP214-03)纯化回收。交由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测序用的试剂盒为:BigDye v3. 1 Chemistry kit (Applied Biosystems, Foster City, CA)。通用引物 ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGC GG、ITS4 序列: TCCTCCGCTTATTGATATGC。

### 1.2.4 菌株药敏试验

K-B 药敏纸片法。大蒜油、艾叶油和茶树油

采用自制药敏片,每张无菌的药敏纸片滴加 0.01 mL 相应试验油,3 种油均未稀释;咪康唑、特比萘芬和克霉唑使用药膏,按照药敏片同样直径大小涂抹在平皿表面;两性霉素和制霉菌素为购买的药敏片。用无菌生理盐水制成浓度为  $10^7$  CFU/mL 的菌悬液,取 200  $\mu$ L 菌液均匀涂布于沙氏培养基上,贴上不同种类的药敏纸片,置于 25  $^{\circ}$ C 培养 36 h 后测量不同药敏纸片的抑菌圈直径。

### 1.2.5 病原菌的回感试验

采用上海市渔政监督管理处救护站的健康绿海龟[体质量( $5 \pm 1$ ) kg,背甲长( $20 \pm 2$ ) cm]幼体 6 只;2 只为试验组,分别编号为 A1 和 A2, A1 接种的两只离心管分别编号为 A1-1 和 A1-2; A2 接种的两只离心管分别编号为 A2-1 和 A2-2; 4 只(A3、A4、A5、A6)为对照组。参考德克萨斯陆龟的方法<sup>[18]</sup>并加以改进,将腐皮镰刀菌(SDABAI 菌株)接种到 4 mL 离心管中,采用斜面培养(条件同 1.2.2)菌株生长 4~5 d,沿斜面剪出椭圆形横截面,使得与待封闭的背甲吻合,为增强粘结程度,将背甲与离心管管壁粘结部位胶质层磨沙成相对应的椭圆形,先于背甲涂抹一层 EDTA 溶液,之后涂沫一层酸蚀剂,15 s 后使用 0.9% 无菌生理盐水冲洗,粘结剂涂抹椭圆形磨沙区域,直接涂抹第二层粘结剂,等 15 s 后轻吹 2 s,标准固化灯光照 20 s,粘结牙科树脂于处理部位,盖上离心管,固化灯边照射边修整直至凝固粘牢。尔后将绿海龟放回水中,水温为:( $24 \pm 2$ )  $^{\circ}$ C,进食正常,按时观察感染情况。

## 2 结果

### 2.1 用伍德灯检测患病绿海龟背甲病灶

患病绿海龟湿身症状(图版 I-1)不如干身,将绿海龟从水中取出干露 1 h 左右,可见其背甲出现成片白斑,且背甲边缘生长纹处有透明状物质附着,引起该处背甲缺失,且具有明显的“灰白甲”症状(图版 I-2),而在未完全干的背甲症状相比较弱。同时患病龟还伴有身体发红的炎症症状。在黑暗环境中,用伍德灯照射患病绿海龟的背甲(图版 I-3,4),可观察到干身有更加明显的蓝色荧光现象,由此可以初步判定患病龟背甲有真菌感染,或具有荧光物质附着。

## 2.2 分离菌株鉴定

### 2.2.1 分离菌株外部形态及显微观察

患病背甲处分离得到菌株 SDABAI,直接观察为白色絮状菌苔的真菌,随着培养时间的延长中间颜色加深变为黄褐色(图 1)。

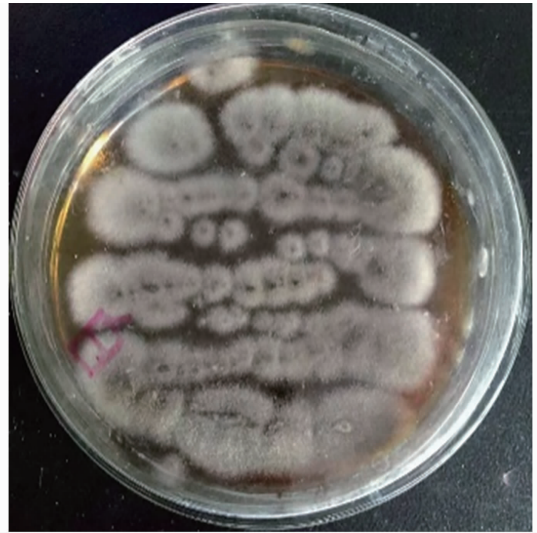


图 1 患病绿海龟背甲接种纯化的 SDABAI 菌株菌苔形态

Fig.1 The external morphology of SDABAI strain obtained by inoculation and purification of the infected green sea turtle

乳酸酚棉蓝染色及未染色镜检观察菌丝,发现 SDABAI 菌株菌丝呈分枝状,有分隔。分生孢子是从菌丝顶端释放的,有两种产孢子的形式:一种为从未端逐个释放(图版 II-1,2),孢子从菌丝末端连续释放,菌丝隔膜分开,即将释放孢子(图版 II-3,4);一种以孢子梗形式大量释放(图版 II-5,6,7)。SDABAI 菌株的生殖方式是形成呈镰刀型的大分生孢子(macroconidia)(图版 II-8)、椭圆形或圆形的小分生孢子(microconidia)和后膜孢子(chlamyospore)。

### 2.2.2 菌株 ITS 序列测定及系统发育分析

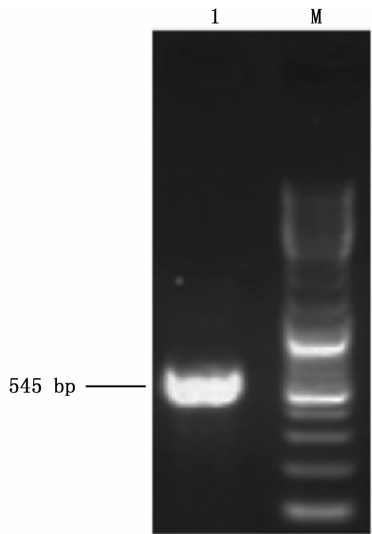
以 SDABAI 菌株的基因组 DNA 为模板,采用通用引物 ITS1、ITS4 对菌株的相关基因进行扩增,得到该菌株的 DNA 片段。经过琼脂糖凝胶电泳分离检测后,得到唯一一条带,其片段长度约 600 bp(图 2)。回收片段进行测序,SDABAI 菌株的序列长度为 545 bp,该菌株已提交至 GenBank,

登录号为:MK583351。将得到的 DNA 序列与 GenBank 数据库中的序列进行局部同源性比对,结果表明,SDABAI 菌株与 *F. solani* 有高达 99% 的同源性。通过最大简约法构建系统发育树,结果(图 3)进一步表明,SDABAI 菌株与 *F. solani* 的亲缘关系最近。结合形态特征和 ITS 序列鉴定的结果,判定 SDABAI 菌株为腐皮镰刀菌 (*Fusarium solani*)

乳膏、硝酸咪康唑乳膏、制霉菌素和两性霉素 B,5 种药均对 SDABAI 菌株有抑制效果。盐酸特比萘芬乳膏、克霉唑乳膏和硝酸咪康唑乳膏中,硝酸咪康唑乳膏对 SDABAI 菌株的抑菌效果最佳,但由于药膏扩散性差,导致抑菌圈较小。两性霉素 B 和制霉菌素中,制霉菌素对 SDABAI 菌株的抑菌效果最佳。另外采用大蒜油,艾叶油,茶树油进行抑菌试验,结果显示这 3 种油均对于 SDABAI 菌株有抑制效果,并且还可以抑制次生菌生长。三者中,大蒜油效果最佳,药敏片周围完全无菌长出,而艾叶油,茶树油组抑菌圈周围会有零星菌长出。

2.4 回感试验结果

将患病绿海龟背甲病灶处分离纯化得到 SDABAI 菌株(即腐皮镰刀菌)菌株白色絮状菌苔和部分培养基封闭在健康绿海龟 A1(图版 III-1)和 A2 的背甲,第 24 天,同 1.2.1 用伍德灯照射感染 SDABAI 菌株的试验组和对照组结果(图版 III-2)显示 A1-1, A1-2, A2-1 有荧光现象, A2-2 由于试验过程中脱落,荧光现象不明显,对照组 A3-6 无荧光反应。A1 人工感染后现象明显,出现了和自然发病绿海龟 B 一样的背甲边缘坏死症状(图版 III-1),且伍德灯下背甲边缘生长纹处也有荧光现象(图版 III-3), A2 症状不明显,但封闭处 A2-1 有荧光反应。刮取 A1 背甲边缘生长纹病灶组织用显微镜检查发现同患病绿海龟 B 相同的腐皮镰刀菌(图版 III-4)。回感试验结果证明腐皮镰刀菌导致绿海龟生长纹处组织坏死,并导致背甲坏死病。



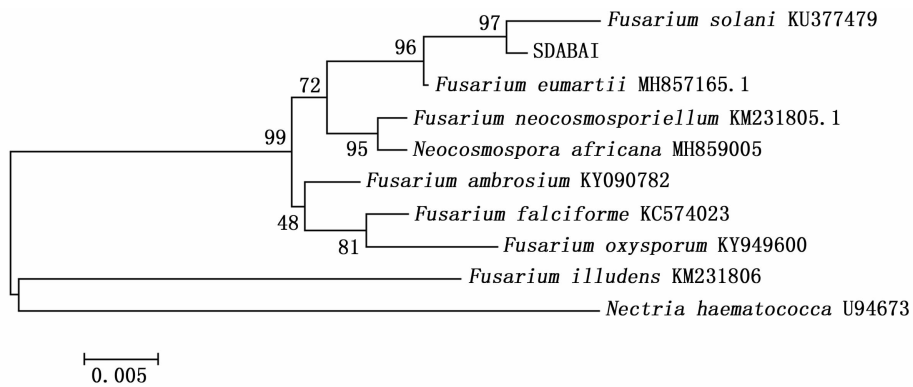
M. 10 000 bp 分子量标准; 1. SDABAI 菌株 ITS 序列扩增产物  
M. 10 000 bp marker; 1. PCR product of ITS of SDABAI strain

图 2 SDABAI 菌株电泳结果图

Fig. 2 SDABAI electrophoresis result

2.3 菌株药敏试验结果

结果(表 1)显示,盐酸特比萘芬乳膏、克霉唑



分支点上的数字表示 1 000 次 Bootstrap 重抽样分析的支持百分比;后面的序号表示 GenBank 数据库中的登录号

The number at each branch point is percentage supported by bootstrap for 1 000 times. The number parenthesis is GenBank accession number

图 3 基于菌株 SDBAI 序列所构建的系统发育树

Fig. 3 The phylogenetic tree constructed based on ITS rDNA sequence of isolate SDABAI

表 1 SDABAI 药敏实验结果

Tab. 1 Antibiotic sensitivity test of strain SDABAI

药物 Drug	抑菌圈直径 Inhibitory zone diameter/mm	敏感性 Sensitivity
大蒜油 Garlic oil	>20	S
艾叶油 Wormwood oil	>20	S
茶树油 Tea tree oil	>20	S
盐酸特比萘芬乳膏 Terbinafine hydrochloride	12	I
克霉唑乳膏 Clomazole	17	I
硝酸咪康唑乳膏 Miconazole nitrate	19	S
两性霉素 B Bamphotericin B	17	I

注: S. 高度敏感; I. 敏感; R. 不敏感(耐药)

Notes: S. Highly sensitive; I. Moderately sensitive; R. Insensitive (drug-resistant)

### 3 讨论

#### 3.1 绿海龟背甲坏死病的诊断

龟类“灰白甲”的临床症状病例十分常见,绿海龟在人工养殖环境下发现也有“灰白甲”。在干露状态下肉眼可以看到龟的背甲或腹甲灰白色斑块,或整个龟甲灰白色,再用伍德灯照射有荧光现象,就可以作出初步诊断。按照典型的灰白甲临床症状,可以定名为龟灰白甲病;按照致病病原,可以定名为龟真菌性甲壳溃疡病;按照组织病理特征,可以定名为龟背甲坏死病。本研究定名为(由腐皮镰刀菌感染的)绿海龟背甲坏死病。

参见伍德灯用于人类和宠物辅助皮肤科诊断的实用工具,采用伍德灯检查辅助诊断绿海龟背甲坏死病,实现无创、简便、快速和实用的临床效果,并弥补一些肉眼难以确定的“灰白甲”症状以及其他皮肤病。伍德灯的应用在真菌病中特异性良好,但存在敏感性不足的缺陷<sup>[20]</sup>。本试验在未知该病因前初步用伍德灯进行照射,观察到荧光现象,既有利于后续试验的进行,也适用于临床快速检验。

显微镜直接镜检病灶处背甲组织,可以检到腐皮镰刀菌,辅助诊断。

#### 3.2 腐皮镰刀菌是绿海龟背甲坏死病的病原

水产动物也常出现体表溃烂、坏死等症状,相关研究有很多,但多数是由细菌引起的。例

如:腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)引起一些淡水鱼出现皮肤坏死的症状<sup>[21]</sup>,丹毒杆菌引起观赏鱼坏死性皮炎<sup>[22]</sup>,灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)引起刺参腐皮综合征<sup>[23]</sup>等等。另外,一种类似立克次体的生物体也被报道引起太平洋银鲑(*Oncorhynchus kisutch*)皮肤溃疡<sup>[24]</sup>。由细菌<sup>[9]</sup>、病毒<sup>[6-8]</sup>和真菌<sup>[10]</sup>造成的龟鳖类皮肤和背甲疾病也有相关报道。

关于真菌传统的分类鉴定方法,主要以形态特征为依据,但有些真菌在形态上不稳定,种间存在重叠情况,因此很难对种进行鉴定和命名。随着分子生物学技术的快速发展,基于 ITS rDNA 序列分析的分子生物学鉴定技术进一步弥补了真菌传统分类鉴定方法的不足,SCHÖCH 等<sup>[25]</sup>提出 rDNA ITS 为真核生物域的第二大界——真菌界的 DNA 条形码,利于真菌多型分类生态学和生物多样性的研究。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,因此其在真菌种的分子鉴定、种群间的系统发育关系分析方面得到了广泛应用。采用 rDNA ITS 序列在属的水平上对菌株进行复核相对准确<sup>[26]</sup>。

镰刀菌是真菌中最难鉴定的菌属之一,形态学则是分类鉴定的基础,1935 年德国人 WOLLENWEBER 等<sup>[27]</sup>把镰刀菌划分为 16 组 65 种分类系统以来,各国学者对该属进行了大量形态学研究。一直以来,人们采用形态学或基于形态学的改进方法鉴定了大量的镰刀菌。但是,由于镰刀菌某些性状不稳定,单凭形态学鉴定难以准确反映其系统发育关系。因此,有必要结合分子生物学技术对镰刀菌进行更加准确、系统的鉴定。DNA 测序是目前最可靠的准确鉴定镰刀菌属内菌种的方法,FERNANDO 等<sup>[28]</sup>利用内部转录间隔区(ITS)和部分 28S 核糖体 DNA(nrDNA)准确地鉴定出 *Fusarium keratoplasticum* 菌株。SARMIENTO-RAMIREZ 等<sup>[16]</sup>通过 nrDNA 区域系统发育分析,结合镰孢菌物种复合体的一些参考序列,发现其中 23 个分离株与 *F. keratoplasticum* 相对应。本试验结合传统的形态鉴定方法与 ITS rDNA 序列系统发育分析,确定菌株为 *F. solani*。同时,参照并改进德克萨斯陆龟<sup>[18]</sup>试验,结果与该试验吻合,证明绿海龟背甲坏死病是由于镰刀菌引起的。

另有研究<sup>[29]</sup>表明,镰刀菌属的一些种类会产生毒素,例如丁烯酸内酯等,会对人畜造成伤害。因此,推测绿海龟背甲坏死可能与镰刀菌代谢产生的毒素有关,需进一步试验验证。

### 3.3 腐皮镰刀菌的药物敏感性和临床治疗建议

本试验绿海龟背甲坏死病采用一些真菌类药物,有的是常规使用的,有的是有应用前景的植物提取物(油)进行药敏试验,结果显示咪康唑和制霉菌素对 SDABAI 菌株有较好的抑菌效果。本试验选择大蒜油、艾叶油和茶树油进行试验,结果显示三者对 SDABAI 菌株有明显的抑制效果,其中大蒜油的效果最佳,建议临床为治疗由腐皮镰刀菌引起的绿海龟背甲坏死病首选药物为咪康唑、制霉菌素和大蒜油,同时也可以为宠物龟类具有“灰白甲”的临床治疗提供用药参考。但仍需继续进行试验确定最适的药物配伍、浓度等关键问题,更好地对龟类进行治疗。

### 参考文献:

- [1] 成奇,潘连德. 绿海龟健康幼体心肝肾功能血液生化指标参考值研究[J]. 上海海洋大学学报, 2016, 25(4): 534-540.  
CHENG Q, PAN L D. Research on the plasma biochemistry of cardiac function, liver function and renal function from healthy larval green turtles (*Chelonia mydas*) in captivity [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2016, 25(4): 534-540.
- [2] 陈华灵,叶明彬,林日锦,等. 海龟卵人工移植试验[J]. 四川动物, 2007, 26(2): 456-457.  
CHEN H L, YE M B, LIN R J, et al. Methods of sea turtles tags in China combining transplant with in-situ incubation for hatching *Chelonia mydas* Eggs [J]. Sichuan Journal of Zoology, 2007, 26(2): 456-457.
- [3] 叶明彬,陈华灵,古河祥,等. 人工培育幼年绿海龟的卫星追踪试验[J]. 四川动物, 2015, 34(1): 15-20.  
YE M B, CHEN HL, GU HX, et al. Satellite tracking of migration for three captive-reared Juvenile green turtles from Huidong national sea turtle reserve [J]. Sichuan Journal of Zoology, 2015, 34(1): 15-20.
- [4] 朱龙. 人工饲养条件下蠵龟的常见病[J]. 水产科学, 2005, 24(3): 24-26.  
ZHU L. The common diseases found in cultured loggerhead turtle [J]. Fisheries Science, 2005, 24(3): 24-26.
- [5] 成奇,潘连德. 温度对绿海龟心、肝、肾功能生化指标的影响[J]. 海洋学研究, 2016, 34(2): 93-98.  
CHENG Q, PAN L D. Effect of water temperature on the plasma biochemistry indexes of cardiac function, liver function and renal function from Green Turtles (*Chelonia mydas*) [J]. Journal of Marine Sciences, 2016, 34(2): 93-98.
- [6] LI T H, HSU W L, LAN Y C, et al. Identification of *Chelonid herpesvirus 5* (ChHV5) in endangered green turtles (*Chelonia mydas*) with fibropapillomatosis in Asia [J]. Bulletin of Marine Science, 2017, 93(4): 1011-1022.
- [7] CHALOUPEK M, WORK T M, BALAZS G H, et al. Cause-specific temporal and spatial trends in green sea turtle strandings in the Hawaiian Archipelago (1982-2003) [J]. Marine Biology, 2008, 154(5): 887-898.
- [8] FLINT M, PATTERSON-KANE J C, LIMPUS C J, et al. Health surveillance of stranded green turtles in southern Queensland, Australia (2006-2009): an epidemiological analysis of causes of disease and mortality [J]. EcoHealth, 2010, 7(1): 135-145.
- [9] 项楠,王荣丹,曹露露,等. 绿海龟腐皮病病原体的生物学鉴定[J]. 北京农业, 2015, (5): 81-83.  
XIANG N, WANG R D, CAO L L, et al. Identification of the pathogen Biology of green sea turtle rot skin disease [J]. Beijing Agriculture, 2015, (5): 81-83.
- [10] SCHMIDT V. Fungal infections in reptiles – an emerging problem [J]. Journal of Exotic Pet Medicine, 2015, 24(3): 267-275.
- [11] SCHMIDT V, KLASSEN L, SCHNEIDER J, et al. Pulmonary fungal granulomas and fibrinous pneumonia caused by different hypocrealean fungi in reptiles [J]. Veterinary Microbiology, 2018, 225: 58-63.
- [12] CABAÑES J, ALONSO J M, CASTELLÁG, et al. Cutaneous hyalohyphomycosis caused by *Fusarium solani* in a loggerhead sea turtle (*Caretta caretta* L.) [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1997, 35(12): 3343-3345.
- [13] REBELL G. *Fusarium* infections in human and veterinary medicine [M] // NELSON P E, TOUSSON T A, COOK R J. *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*. Pennsylvania: The Pennsylvania State University Press, 1981: 210-220.
- [14] WILLIAMS S R, SIMS M A, ROTH-JOHNSON L, et al. Surgical removal of an abscess associated with *Fusarium solani* from a Kemp's ridley sea turtle (*Lepidochelys kempi*) [J]. Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 2012, 43(2): 402-406.
- [15] SIDIQUE S N M, AZUDDIN N F, JOSEPH J. First report of *Fusarium* species at nesting sites of endangered sea turtles in Terengganu and Melaka, Malaysia [J]. Malaysian Applied Biology, 2017, 46(3): 195-205.
- [16] SARMIENTO-RAMÍREZ J M, SIM J, VAN WEST P, et al. Isolation of fungal pathogens from eggs of the endangered sea turtle species *Chelonia mydas* in Ascension Island [J]. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 2017, 97(4): 661-667.
- [17] SARMIENTO-RAMÍREZ J M, ABELLA-PÉREZ E, PHILLOTT A D, et al. Global distribution of two fungal pathogens threatening endangered sea turtles [J]. PLoS One, 2014, 9

- (1): e85853.
- [18] ROSE F L, KOKE J, KOEHN R, et al. Identification of the etiological agent for necrotizing scute disease in the Texas tortoise[J]. *Journal of Wildlife Diseases*, 2001, 37(2): 223-228.
- [19] 张宏, 廖万清, 郭宁如. 实用临床真菌病学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2009: 10-13.  
ZHANG H, LIAO W Q, GUO N R. Practical clinical mycology[M]. Beijing: People's Military Medical Publisher, 2009: 10-13.
- [20] 王再兴, 王绥, 徐钰. 伍德灯和共聚焦激光扫描显微镜在部分皮肤浅部真菌感染诊断中的应用价值评估[J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2015, 29(7): 752-755.  
WANG Z X, WANG S, XU Y. Application of wood's lamp and confocal laser scanning microscopy in the diagnosis of partial superficial cutaneous fungal infection [J]. *The Chinese Journal of Dermatovenereology*, 2015, 29(7): 752-755.
- [21] PEKALA A, KOZI NSKAA, PA ZDZIORE, et al. Phenotypical and genotypical characterization of *Shewanella putrefaciens* strains isolated from diseased freshwater fish[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2015, 38(3): 283-293.
- [22] POMARANSKI E K, REICHLEY S R, YANONG R, et al. Characterization of spaC-type *Erysipelothrix* sp. isolates causing systemic disease in ornamental fish[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2018, 41(1): 49-60.
- [23] 王印庚, 张凤萍, 李胜忠, 等. 刺参腐皮综合征病原灿烂弧菌检测探针的制备及应用[J]. *水产学报*, 2009, 33(1): 119-125.  
WANG Y G, ZHANG F P, LI S Z, et al. Detection of *Vibrio splendidus* causing skin ulcer syndrome of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) with DNA probes [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2009, 33(1): 119-125.
- [24] BRANSON E J, DIAZ-MUNOZ D N. Description of a new disease condition occurring in farmed coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), in South America [J]. *Journal of Fish Diseases*, 1991, 14(2): 147-156.
- [25] SCHOCH C L, SEIFERT K A, HUHDORF S, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(16): 6241-6246.
- [26] 姜雨萌, 牛永春, 邓晖. rDNA ITS 序列在 ACCC 真菌鉴定中的应用[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(5): 942-947.  
JIANG Y M, NIU Y C, DENG H. Applying rDNA internal transcribed spacer sequences to identify fungal strains preserved at agricultural culture collection of China [J]. *Microbiology China*, 2016, 43(5): 942-947.
- [27] WOLLENWEBER H W, REINKING O A. Die fusarien, ihre beschreibung, schadwirkung und bekämpfung [M]. Berlin: Paul Parey, 1935.
- [28] FERNANDO N, HUI S W, TSANG C C, et al. Fatal *Fusarium solani* species complex infections in elasmobranchs: the first case report for black spotted stingray (*Taeniuramelanopsila*) and a literature review [J]. *Mycoses*, 2015, 58(7): 422-431.
- [29] GUO J, ZHANG L S, WANG Y M, et al. Study of embryo toxicity of *Fusarium* mycotoxin butenolide using a whole rat embryo culture model [J]. *Toxicology in Vitro*, 2011, 25(8): 1727-1732.

## Identification of etiological agent for necrotizing scute disease and sensitivity in green sea turtle

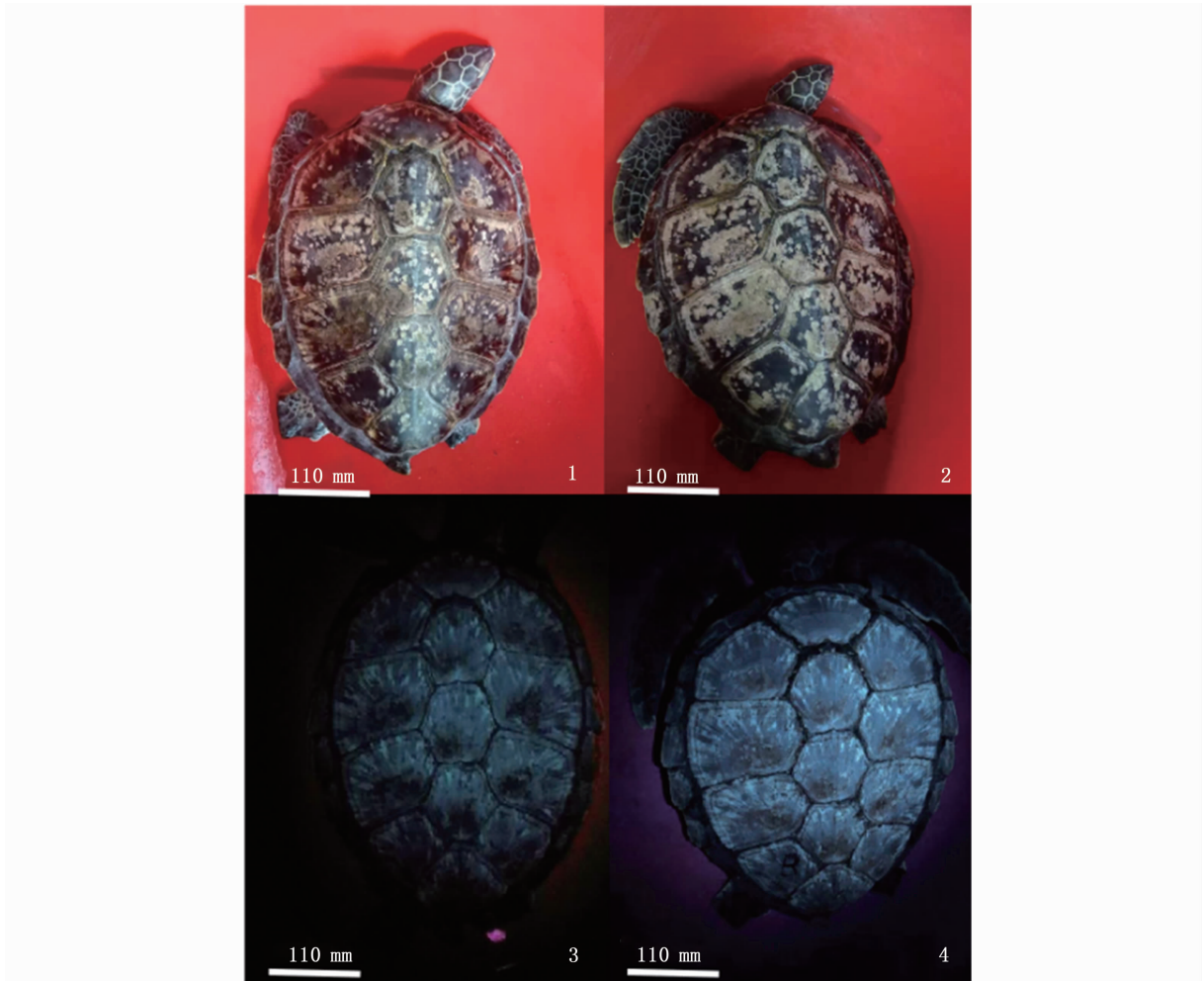
PANG Wei<sup>1,2</sup>, ZHANG Xiaoyu<sup>2,3</sup>, PAN Liande<sup>1,2,3</sup>, LIU Chenyu<sup>1,2</sup>, LIU Xiu<sup>1,2</sup>, DOU Yun<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Green sea turtle (*Chelonia mydas*) in captivity that suffered from necrotizing scute disease showed the symptoms of “grey-white scute”, Wood lamp fluorescence phenomenon, suspected of the presence of fungal infection; One dominant fungus was isolated and purified from the edge necrosis of the carapace of the green turtles, which was numbered SDABAI. The pathogenic strain was identified by morphological observation, conidia morphology, and combined with ITS 18S rDNA sequence analysis, and the phylogenetic analysis was constructed. The results showed that the SDABAI strain (accession number: MK583351) and *Fusarium solani* (accession number: KU377470.1) had 99% genetic similarity, so SDABAI was determined to be *F. solani*, and the fungal morphology and conidia morphology were also consistent. The SDABAI strain was inoculated into a 4 mL centrifuge tube and cultured on an inclined plane for 4-5 days. After growing white flocculent fungi, the fungus was sealed on the dorsal plates of 2 healthy green sea turtles (A1 and A2) using light-curable composite resin. Each turtle had 2 germ-bearing centrifuge tubes (A1-1; A1-2; A2-1; A2-2). On the 24th day of infection, the infected symptoms of A1 appeared, with fluorescence, which produced the same symptoms as the natural disease, and *Fusarium solani* similar to SDABAI were isolated at the edge of shell of A1. A2 had weaker symptoms than A1. According to the whole dorsal shell of green sea turtles showing “grey-and-white scute” symptoms and the pathogen of *Fusarium solani*, it was named green sea turtle necrotizing scute disease. Garlic oil, wormwood oil and tea tree oil were selected for drug sensitivity test. The results showed that all of them could inhibit growth to a certain extent, and also inhibit the growth of secondary bacteria, with the best antifungal effect of garlic oil. The results showed that five drugs, including terbinafine, clotrimazole, miconazole, nystatin and amphotericin, had better antifungal effect on SDABAI.

**Key words:** *Chelonia mydas*; necrotic carapace; *Fusarium solani*; drug susceptibility



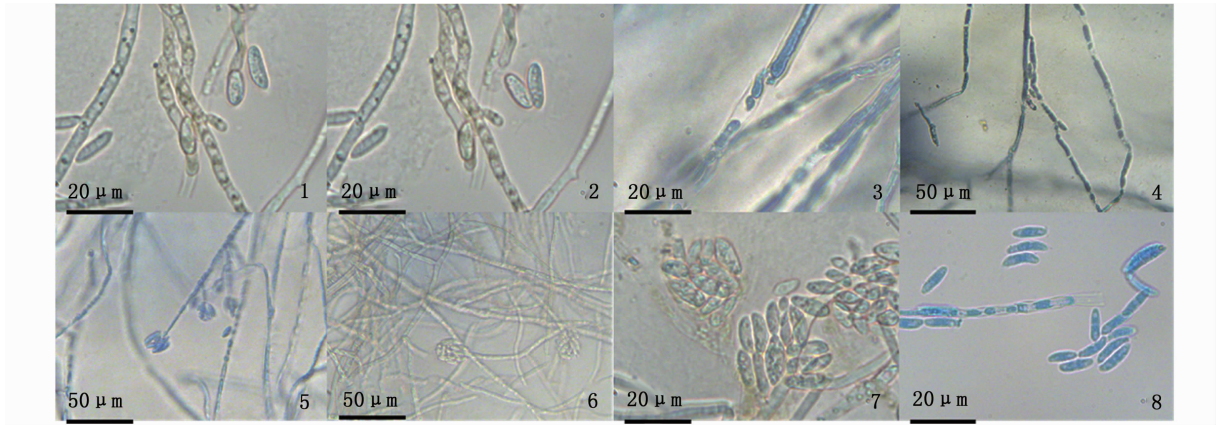


1. 自然光下患病海龟湿身背甲照片; 2. 自然光下患病海龟干身背甲照片; 3. 伍德灯下患病海龟湿身背甲照片; 4. 伍德灯下患病海龟干身背甲照片

1. photos of diseased turtles with incomplete dry carapace under natural light; 2. photos of dry body carapace of diseased turtles under natural light; 3. photos of wet body carapace of diseased turtles under wood light; 4. photos of diseased turtles' dry body carapace under Wood's lamp

图版 I 伍德灯检测比较患病海龟湿身、干身与正常海龟背甲

Plate I Wood lamp test comparing the wet body, dry body and normal sea turtle shell



1 和 2 显示分生孢子从菌丝前端产生(100 ×); 3(100 ×) 和 4(40 ×) . 菌丝中间断裂产生分生孢子过程; 5. 分生孢子梗(40 ×); 6. 大量孢子以分生孢子梗形式释放;营养菌丝(40 ×); 7. 大量孢子以分生孢子梗形式释放(100 ×); 8. 大量孢子释放(100 ×)  
 1 and 2 show that conidia are generated from the front end of the mycelium (100 ×); 3 (100 ×) and 4(40 ×) . the process of producing conidia by septal fracture in mycelium; 5. conidiophore (40 ×); 6. a large number of spores are released in the form of conidiophore; Nutritional hyphae (40 ×); 7. a large number of spores were released in the form of conidiophore (100 ×); 8. release of a large number of spores (100 ×)

**图版 II 显微镜 (Leica DM3000) 下真菌 SDABAI 菌株的孢子、菌丝以及孢子释放过程,物镜 40 × 和 100 ×**  
**Plate II Microscopic (Leica DM3000) examination of fungal (SDABAI) spores, hyphae, and the process of spore release, Objective 40 times and 100 times**



1. A1 全身照 (箭头所指处为局部放大部位); 2. 伍德灯照射回感阳性部位的荧光现象 ( I 和 II 是 A1-1 的荧光现象; III 是 A2-1 的荧光现象; IV 是 A1-2 的荧光现象); 3. A1 局部感染阳性部位荧光现象; 4. A1 被感染背甲边缘处采样显微镜检测到镰刀菌 (箭头所指为菌丝) (20 ×)  
 1. full body picture of A1 ( the arrow indicates the local magnification part ); 2. Fluorescence of the experimental site by Wood lamp irradiation ( I and II are the fluorescence of A1-1; III is the fluorescence phenomenon of A2-1; IV is the fluorescence phenomenon of A1-2); 3. A1 fluorescence at the site of local infection; 4. A1 microscopic examination of the edge of the dorsal nail ( the arrow points to mycelium ) (20 ×)

**图版 III 绿海龟回感试验结果**  
**Plate III Results of green turtles' host inoculation**