

条斑紫菜赤腐病的初步研究

马家海

(上海水产大学, 200090)

提 要 本文对近年来发生在江浙一带的条斑紫菜病烂进行了研究,通过对发病症状和病原体形态构造、生长、繁殖的显微和超显微观察,以及菌丝体的培养结果表明,病源为紫菜腐霉(*Pythium porphyrae*),属赤腐病。在不同培养温度条件下试验结果表明,20~24℃时菌丝繁殖蔓延得最快;而且高盐度对菌丝体有抑制和杀灭作用。

关键词 条斑紫菜,赤腐病,紫菜腐霉

近年来,条斑紫菜的养殖业在江苏取得了飞速的发展,并已经延伸到浙江、山东等地,同时,在1994年度江苏南部沿海海区以及1995年度浙江沿海海区暴发了严重的传染性病害,这是一种危害条斑紫菜生产最严重的病害之一,已经引起各级水产部门、生产单位和研究机关的重视。笔者根据野外调查和室内培养确认为赤腐病。据查,该病由新崎盛德[1947]首先报导、定名,后在1970年由高桥实等鉴定病原菌为紫菜腐霉 *Pythium porphyrae*[日本水产学会,1978],今井丈夫[1971]、资源协会[1986]等在其著作中也记载了该病,国内对此病尚无正式报导[曾呈奎等,1985]。

浙江省海洋水产研究所(1974)报导了坛紫菜的洞烂,刘恬敬等(1981)在研究坛紫菜人工增殖中,报告了发生于福建省的红泡病,以及刘恬敬等(1982)指出,出现于1976年、1977年的“病烂”,在一些病症的描述上与赤腐病有相似之处,另外,这些论文都报道了这种大面积的“病烂”给当时的紫菜生产造成很大的损失。

本文对近2年来发生于江浙一带海区的赤腐病进行了初步的研究和探讨,旨在为我国的条斑紫菜病害的研究提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究材料是1993年—1994年度采自江苏省南部沿海、1994—1995年度采自浙江省象

1995-11-21收到。

(1)浙江省海洋水产研究所,1974.坛紫菜叶状体病烂原因的初步调查及预防意见。海洋水产科技,(1):5-13。

(2)刘恬敬等,1981.中国坛紫菜(*Porphyra haitanensis* T. J. Chang et B. F. Zheng)人工增殖的研究。海洋水产研究,(3):19-67。

(3)——,1982.条斑紫菜(*Porphyra yezoensis* Ueda)的病烂原因与防治,海洋水产研究,(4):1-8。

山港海区的条斑紫菜,患病叶状体经采样阴干带回实验室培养及观察研究。

1.2 菌丝体的培养

将20克粉碎干燥的玉米粉放入500毫升的蒸馏水中煎煮1小时,用医用纱布过滤,并用蒸馏水补足500毫升,再注入500毫升天然海水(盐度为26‰),然后加入15克琼脂,加热至100℃,溶解后经120℃高压灭菌15分钟,用0.1N NaOH或0.1N HCl调整pH为7~9,制成培养基。把上述配好的培养基20毫升注入9厘米直径的培养皿内,以供菌丝平板培养用。取1平方厘米左右的病叶在无菌海水中浸泡4~5分钟,随后在无菌室内接种到培养基上,把平板培养基的培养皿置于22℃恒温培养箱内,4~5天后可见菌丝伸展,在查明无其他病菌侵入后,取菌丝体前端移入新的培养基再进行培养,如此反复操作2~3次,可得到纯化的腐霉菌丝体。

1.3 电镜制片

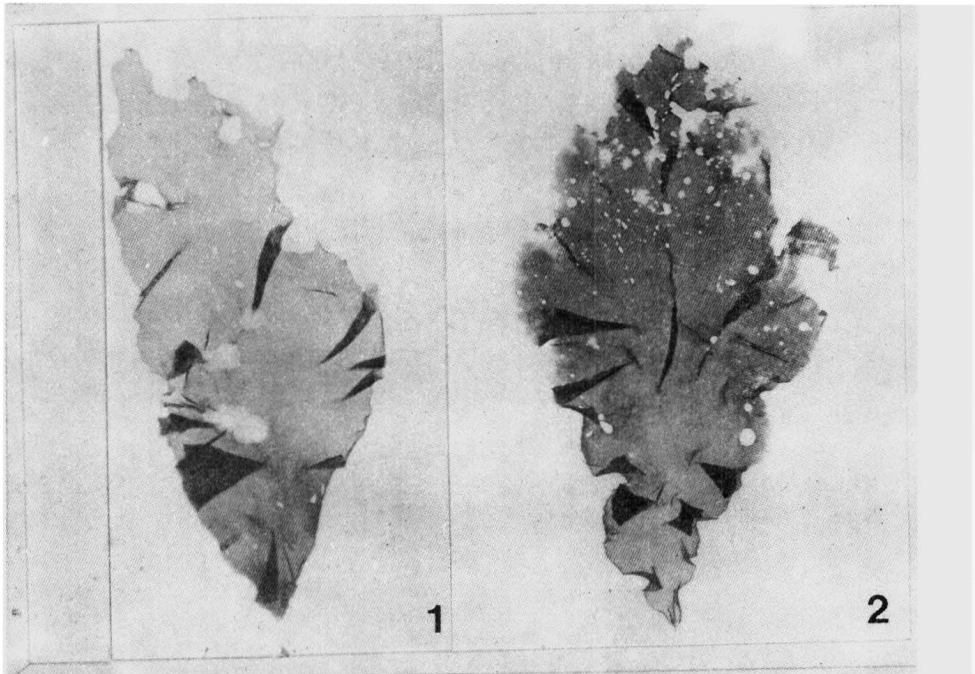
取患病叶状体小片置于用预冷的磷酸缓冲液调配成的25%戊二醛溶液中固定,然后顺浓度梯度酒精逐级脱水,经环氧树脂618浸透、包埋,在超薄切片后用醋酸双氧铀——柠檬酸铅双重染色,进行透射电镜观察。

2 结果与讨论

2.1 观察与培养结果

2.1.1 一般症状

赤腐病一般始发于紫菜叶状体的梢部,也有些个体一开始就出现在叶状体的中部或基部(图版I-1)。病斑呈锈红色斑点,斑点多呈圆形或亚圆形,大小不等,小到1毫米以下,大的可



图版 I 患赤腐病的条斑紫菜叶状体

Plate I The thallus of *Porphyra yezoensis* suffered with red rot disease

1. 叶状体中部或基部出现的病斑, 2. 叶状体梢部和中部出现的病斑。

达1~2厘米,但多数斑点开始发现时仅为肉眼依稀可辨的大小,之后相连成大的斑点,有时则似红色的水泡状。随着病情的进展,红色斑点逐渐变成黄绿色、淡黄色,其边缘部分有时则仍稍带红色,这些病斑不久即溃烂成洞,以致患病的叶状体出现了大小不等的许多的空洞(图版 I-2)。如果孔洞遍及叶状体的各个部分,此时藻体就会部分或全部腐烂脱落。

海区调查表明,最先得病的是大的条斑紫菜叶状体,而后,蔓延到小的成叶和幼苗,病情的发展极为迅速,在海况条件对赤腐病有利的情况下,从肉眼观察到叶状体出现红锈斑点到整个网帘紫菜病烂脱落流失,慢则一周左右,快则仅2~3天。

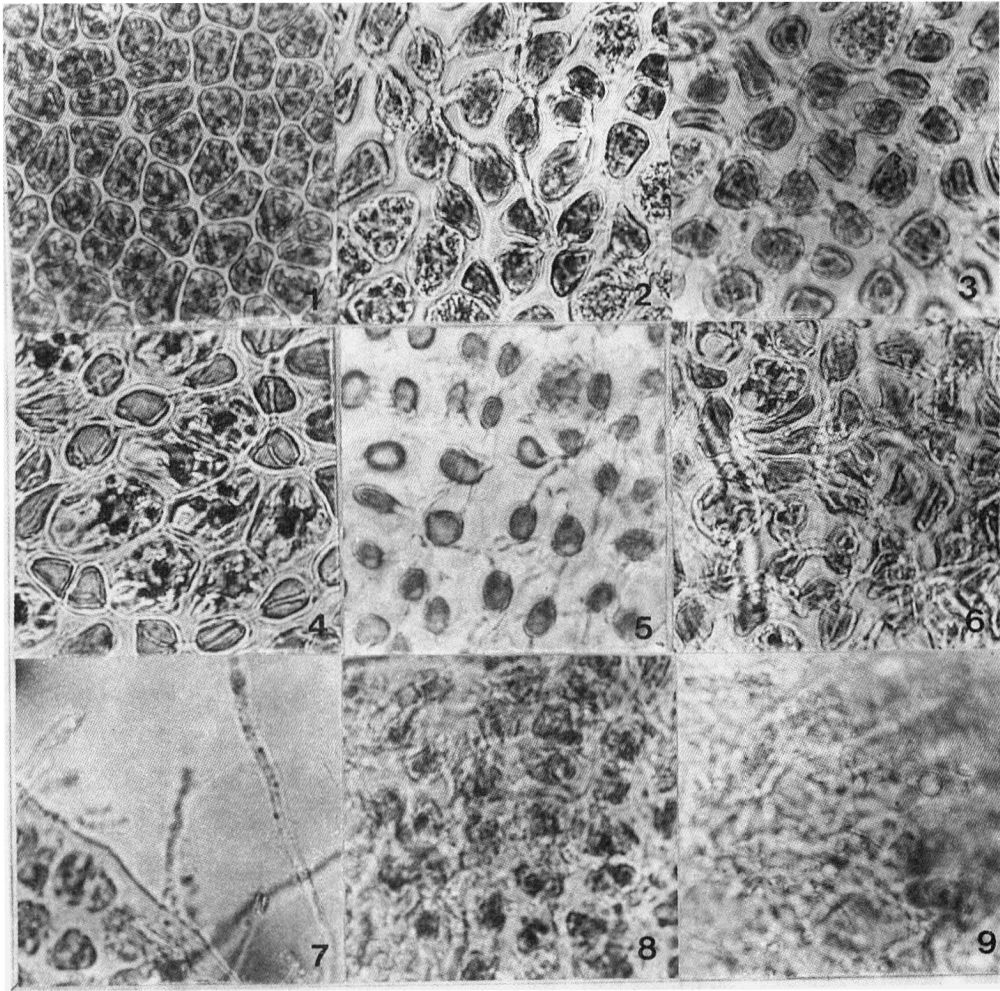
2.1.2 显微观察结果

作为赤腐病最显著的特点为,紫菜细胞被菌丝体穿透,这种现象是极易观察到的,因而赤腐病一般不难被及时发现。菌丝体直径约为2.0~3.8微米,无色呈半透明状,内有很多小颗粒,通常没有隔膜,但是在玉米抽提液琼脂培养基上可以看到一些老的菌丝体中存在着隔膜(图版 III-1)。

镜检病斑部分的病情发展过程可以发现,菌丝体产生对紫菜的损害是显而易见的。最初患病藻体上只有部分紫菜细胞被寄生,细胞中也只有1~2条菌丝体贯穿(图版 I-2),随着菌丝体的迅速蔓延,有些细胞被多达3~4条的菌丝体贯穿,被侵染的细胞也越来越多(图版 I-3)。紫菜细胞被菌丝体穿透后,用曙红染色表明,已呈现死亡状态,细胞体积明显小于正常细胞,细胞构造诸如色素体、液泡、原生质等变得难以辨认,整个细胞呈均一状,颜色由原来的深紫红色转为鲜紫红色(图版 I-4),有时还可发现在有的海区患病的紫菜细胞体积收缩得特别小,仅为原来细胞体积的1/7~1/8。寄生菌丝体在细胞间的距离特别长(图版 I-5),造成这种差异的原因尚不得而知。病情继续发展,菌丝体不仅贯穿于细胞之间,而且长到藻体表面(图版 I-6),或者长出藻体外呈游离状态(图版 I-7),此时,紫菜细胞开始逐渐解体,形态变得模糊不清,呈破碎状;色素溶出,在病斑部分可见不少色素溶出块,整个细胞进一步萎缩、坏死,且由鲜紫红色转为绿色或黄绿色,最后呈现腐烂状态(图版 I-8)。值得注意的是,一些腐烂藻体病斑上,菌丝体异常发达,大量的菌丝体游离在藻体外,在其末端有时膨大为囊体(图版 I-9),几乎在形成囊体的1~2分钟内,即可发现孢子囊形成,并分裂放出游孢子。

2.1.3 电镜观察结果

Kazama 和 Fuller[1970]观察到紫菜细胞被腐霉的菌丝体穿透后引起细胞的解体。本研究从患病条斑紫菜叶状体横切(图版 III-4)中显示,菌丝体侵入后,紫菜细胞壁遭到破坏,接着菌丝体突入紫菜细胞,寄主细胞的色素体类囊体、红藻淀粉等细胞器受到明显的挤压。众所周知,在陆生植物中,腐霉侵入寄主时,首先是分泌果胶酶,使寄主的壁达到某种程度的溶解,继而,腐霉菌丝体在一定的压力下,强制地突入寄主细胞内,在海水中紫菜在感染腐霉时,其机理也可能是菌丝体接触紫菜细胞,产生相应的甘露聚糖酶和半乳聚糖酶,进而溶解紫菜细胞壁,菌丝体强制侵入细胞生长繁衍。Kazama 和 Fuller[1970]还指出,腐霉在侵入紫菜细胞的菌丝体周围没有发现有插入鞘膜或插入鞘。本研究在电镜观察中,确有观察到有些菌丝体侵入寄主细胞后没有插入鞘膜或插入鞘,但是在某些菌丝体的周围也有一层类似于鞘膜的明显致密层组织(图版 III-5),这种现象也还有待于进一步深入探讨。



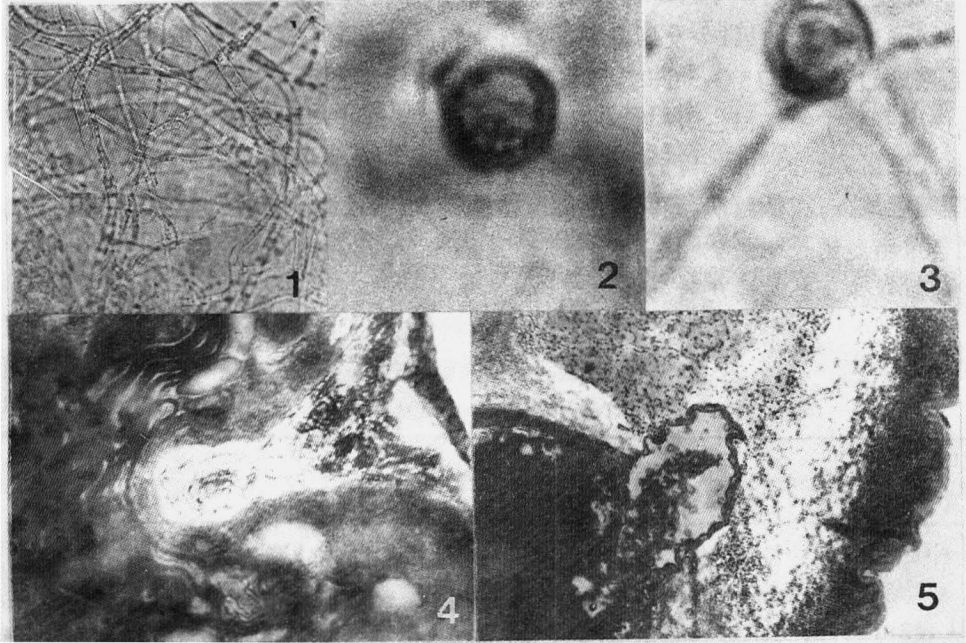
图版Ⅱ 赤腐病菌丝体寄生对紫菜细胞的影响

Plate II Effect of parasitism of mycelium on the cells of *Porphyra yezoensis*

1. 正常的紫菜(×400); 2. 菌丝体寄生贯穿紫菜细胞(×550); 3. 菌丝体大量繁殖时,1个紫菜细胞可贯穿2~4条菌丝体(×550); 4. 紫菜细胞死亡,内部构造呈均一状(×550); 5. 被贯穿的紫菜细胞体积极度缩小(×550); 6. 菌丝体穿过藻体,生长到叶体表面(×550); 7. 菌丝体长出藻体外(×550); 8. 紫菜细胞开始解体,色素溶出(×550); 9. 紫菜解体后集生于表面的大量菌丝体,顶端膨大开始形成囊体(×550)。

2.1.4 腐霉的培养结果

把病叶移入玉米提取液琼脂培养基中培养,约1周后,由于菌丝体的大量生长,形成了明显的菌落。把经过反复纯化了了的菌丝置于20~22℃恒温中培养,约1个多月后可发现为数不少的藏卵器和藏精器(图版Ⅲ-2)。藏卵器呈单细胞,在其周围有1~2个细小的藏精器。两者结合,产生受精的卵孢子(图版Ⅲ-3),卵孢子球形、厚壁,大小约14.2~16.4微米。



图版 III 紫菜腐霉的光镜照片和电镜照片

Plate III The Photomicrograph and electron micrograph of *pythium porphyrae*

1. 菌丝体($\times 400$); 2. 藏精器与藏卵器的接合($\times 750$); 3. 卵孢子($\times 750$); 4. 菌丝体侵入紫菜细胞($\times 6000$);
5. 贯穿于紫菜细胞壁寄生在细胞内的菌丝体($\times 6000$)。

根据以上观察与培养的结果表明,本研究与高桥实在1970年所得的试验结果是基本上一致的[日本水産學會,1978]。病名应为赤腐病,病源体属紫菜腐霉 *Pythium porphyrae*,它隶属于藻菌纲 Phycomycetae 霜霉目 Peronosporales 腐霉科 Pythiaceae[Smith, 1955]。

2.2 不同培养条件对腐霉菌丝体生长的影响

2.2.1 菌丝体生长与温度的关系

把分离纯化的菌丝体接种于培养基上,分别置于 $10^{\circ}\text{C}\sim 32^{\circ}\text{C}$ 的恒温箱内,1周后量取菌落的直径,试验结果列于表1。

表1 不同温度对赤腐病菌丝体菌落生长的影响

Tab. 1 Effect of different temperatures on the growth of bacterial colony

温度($^{\circ}\text{C}$)	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32
菌落直径(厘米)	1.2	1.6	1.9	2.3	3.0	3.6	4.0	5.0	5.2	3.9	3.5	2.8

注:pH=8, S=13%。

表1可见,在上述条件的培养基上,菌丝体的生长以 26°C 最快,在 $10^{\circ}\text{C}\sim 26^{\circ}\text{C}$ 范围内,随着温度的提高,菌落生长速度也增快。

由此可见,海区的高温是赤腐病病源——腐霉大量生长繁殖的一个诱发因素。在条斑紫菜叶状体能够忍耐的海水高温范围内,温度越高,赤腐病发病率越高,菌丝体蔓延也越快,病情也

就越重。而在低温期的1~2月份,菌丝体生长变慢,赤腐病也受到抑制。

根据调查,该病的第1个发病盛期是11月中旬至12月下旬之间。此间如遇晴好天气,连续几天水温超过17.5~18℃以上时,海区密集的栽培筏架上就会出现赤腐病的病斑,在2~3天内,很快席卷整个栽培海区,严重时出现空网,条斑紫菜叶状体全部流失殆尽。同时,无论在江苏或浙江海区,随着海况条件的变迁,有时病情也会好转或得到一定的控制,紫菜的采摘也会使病斑相应减少;在低温期,赤腐病的菌丝体潜伏着,一旦海况条件合适,在2~3月份水温回升时,又会重新蔓延开来。

2.2.2 菌丝体生长与盐度的关系

表2 不同盐度对赤腐病菌丝体菌落生长的影响

Tab. 2 Effect of different salinities on the growth of bacterial colony

盐度(%)	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
菌落直径(厘米)	2.0	3.2	5.3	8.0	6.8	6.1	5.2	4.4	4.0	3.1

注: pH=8, T=20℃。

从表2可见,菌丝体生长的最适盐度为20%,其次是25%。目前条斑紫菜栽培海区的盐度一般为25~33%,因而在大量降雨,盐度下降时,赤腐病的蔓延尤为迅速。

表3 赤腐病菌丝体在不同盐度中浸泡不同时间后的生存状况

Tab. 3 The survival of the mycelium suffered with red rot disease after being soaked in different salinities and hours

盐度(%)	浸泡时间							
	5	10	15	20	30	40	50	60
80	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
100	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++
120	++++	++++	+++	+++	+++	++	++	++
140	++++	+++	++	++	++	+	+	+
160	+++	++	++	+	+	+	-	-
180	++	+	+	+	-	-	-	-
200	+	+	+	-	-	-	-	-
220	-	-	-	-	-	-	-	-

注: ++++菌落直径>3厘米, +++菌落直径2~3厘米, ++菌落直径1~2厘米, +菌落直径<1厘米, -菌落杀灭。

表3说明,高盐度对菌丝体具有杀灭作用。具体方法是把培养的菌丝体琼脂块侵入不同的高浓度盐溶液中,然后置于20~25℃培养箱里培养8天,观察菌落的生长情况。试验结果表明,100~160%高浓度盐溶液对菌丝体产生抑制作用。木下和生[1981]曾指出盐度达150%时,浸渍15分钟杀死菌丝体。本试验结果表明,盐度180%中浸泡30分钟,盐度200%浸泡20分钟后,菌丝体的菌落即被全部杀灭。

以上结果表明,在赤腐病蔓延严重时,可以考虑适当延长干出时间,通过叶面上水分的蒸发浓缩,海水加大盐度,同样可以起到抑制菌丝体的生长。

3 结语

(1) 1993~1994年度发生在江苏南部海区, 1994~1995年度发生在浙江海区的条斑紫菜大面积病烂, 经海区调查、光镜和电镜观察及菌丝体培养结果, 病原属紫菜腐霉 (*Pythium porphyrae*), 病害属赤腐病。

(2) 经培养, 菌丝体的菌落在10~32℃温度范围内, 以24~26℃生长蔓延最快, 随着温度的下降而被抑制, 这与海区调查的实际情况相符。高盐度对菌丝体有明显的抑制作用, 盐度180‰浸渍20分钟, 200‰浸渍30分钟可杀灭菌丝体。

(3) 以前我国报导过的坛紫菜红泡病, 洞烂, 以及条斑紫菜“病烂”是否亦属赤腐病还有待于今后进一步的研究和探讨。

本校海水养殖专业1995届学生于作家参加部分工作和资料整理; 张敏协助冲印显微照片, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 曾呈奎等, 1985. 海藻栽培学, 204—206. 上海科学技术出版社。
- [2] 今井丈夫, 1971. 浅海完全养殖, 67—68. 恒星社厚生阁(东京)。
- [3] 日本水产学会, 1978. のりの病气, 59—69 [佐藤重胜·佐佐木实, 1978]. 恒星社厚生阁(东京)。
- [4] 木下和生ら, 1981. 高盐分液浸渍によるあかぐさ水病の防除効果について。佐賀縣有明水産試験場。
- [5] 新崎盛徳, 1947. アサクサノリの腐敗病に関する研究。日本水产学会誌, 13(3)74—90。
- [6] 資源協會(社團法人), 1986. 浅海养殖, 502. 大成出版社(东京)。
- [7] Kzama, f. and M. S. Fuller, 1970. Ultrastructure of *Porphyra perforata* infected with *Pythium marinum*, a marine fungus, *Can. J. Bot.*, 48:2103~2107.
- [8] Smith, G. M., 1955. *Cryptogamic botany* Vol. 1, *Algae and Fung*, 401—409. McGraw-Hill Book Company, Inc. New York.

A PRELIMINARY STUDY ON THE RED ROT DISEASE OF *PORPHYRA YEZOENSIS*

Ma Jia-hai

(Shanghai Fisheries University, 200090)

ABSTRACT In this paper a preliminary study on the disease of *Porphyra yezoensis* which has recently occurred in the Jiangsu and Zhejiang coastal waters was performed. In accordance with the results of many investigations in the field and the culture of mycelium in the laboratory, some facts were found as follows:

1. The main disease occurred during the culture of *Porphyra yezoensis* was red rot disease caused by *Pythium porphyrae*.
2. The mycelium grew most rapidly at the temperature range of 20—24℃.
3. The mycelium was restrained and even killed off in higher salinity solution.

KEYWORDS *Porphyra yezoensis*, *Pythium porphyrae*, red rot disease