

文章编号: 1674-5566(2010)02-0226-06

紫菜叶状体的红烂病研究

黄林彬^{1,2}, 严兴洪¹

(¹上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

²上海海洋大学教育部水产种质资源发掘与利用省部共建重点实验室, 上海 201306)

摘要:从福建省平潭岛野生坛紫菜群体中发现有患细菌性红烂病的叶状体,从患病的叶状体上分离得到病原细菌一株,经16S rDNA序列分析发现其与细菌域海螺菌目(Oceanospirillales)、盐单胞菌科(Halomonadaceae)、Cobetia属的海科贝特菌(Cobetia marina)的相似度达100%。病原细菌经液体培养基扩大培养后,将适量的菌液接种到不同种紫菜和坛紫菜不同品系的叶状体圆盘块上进行人工回复感染试验以确定其感染特性。结果发现该病原细菌能感染健康野生坛紫菜且出现的病症与海区患病坛紫菜相同,且该病原细菌对不同种紫菜(坛紫菜、条斑紫菜、未定名紫菜)的叶状体圆盘块和不同品系的坛紫菜(AN-2, YZ-6, JIU-7, ZS-1)叶状体圆盘块均能快速感染,所产生的病症与野生坛紫菜叶状体感染红烂病的症状相同,均出现了铁锈红色的死亡细胞,且同时含有少量被解离的单离细胞。上述结果说明分离到的病原细菌是坛紫菜红烂病的病原细菌,可以快速感染各种不同的紫菜叶状体。

关键词:坛紫菜;条斑紫菜;叶状体;病原菌;感染;红烂病

中图分类号: S 946.2 **文献标识码:** A

Study on the red-rotting disease of Porphyra blades

HUANG Lin-bin^{1,2}, YAN Xing-hong¹

(¹ College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

² Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China)

Abstract: A strain of pathogenic bacterium was isolated from the blades of wild type *Porphyra haitanensis* with red-rotting disease collected from the wild population along the coasts of Pingtan Island of Fujian Province. The bacterium had a 100% similarity with *Cobetia marina* (Oceanospirillales, Proteobacteria) according to analysis of the 16S rDNA array. After the pathogenic bacterium was cultured in liquid medium for a period of time, an amount of bacterial suspension was inoculated onto the blades of different *Porphyra* in an artificial re-infection. It was found that the isolated bacterium could infect the healthy wild type *P. haitanensis* blades with the same symptoms to the diseased blades in the field, and the different species of *Porphyra* (*P. haitanensis*, *Porphyra yezoensis* and *Porphyra* sp.) blades and different strains of *P. haitanensis* (AN-2, YZ-6, JIU-7, ZS-1) blades were all infected rapidly with the same symptoms to the wild type *P. haitanensis* blades in which the infected cells were in rust color and several single cells were enzymatically decomposed.

收稿日期: 2009-10-12

基金项目: 上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金项目(SSC-07009);教育部水产种质资源发掘与利用省部共建重点实验室资助项目(KFT2008-9);上海市教育委员会重点学科建设项目(J50701)

作者简介: 黄林彬(1983-),男,硕士,助理实验师,主要从事海洋生物生理生态学方面的研究。E-mail: lbhuang@shou.edu.cn

通讯作者: 严兴洪, E-mail: xhyar@shou.edu.cn

from the blades. It was concluded that the bacterium isolated was the pathogen of red-rotting disease of *P. haitanensis* blades and could also infect blades of *Porphyr*a spp. rapidly.

Key words: *Porphyr*a *haitanensis*; *Porphyr*a *yezoensis* blades; pathogen; infection; red-rotting disease

坛紫菜是我国重要的海水养殖品种之一,近年来由于其栽培的面积和密度不断扩大和长期使用种质退化的野生种,导致坛紫菜的病害频繁发生,这不仅给紫菜生长带来了很大的危害,而且病菜被制成干品后,品质明显降低^[1-2]。据中国水产养殖病害监测结果显示,2005年浙江省人工养殖的坛紫菜发病率为26.70%,造成经济损失达1 163.01万元^[3]。

至今,病因较清楚的紫菜病害主要有:由真菌腐霉菌引起的赤腐病^[4-5]、由壶状菌引起的壶状菌病^[6-7]以及由假单胞杆菌和弧菌共同作用引起的绿斑病^[8-9],而对于其它传染性病害则研究较少。本文研究的坛紫菜红烂病是严兴洪等^[10]于2008年报道的一种野生坛紫菜叶状体病害,该病害能迅速感染野生坛紫菜叶状体并在短时间内导致叶状体腐烂解体,是一种传染性和危害性较大的病害。本文对福建平潭地区野生坛紫菜叶状体红烂病的病原菌进行了16S rDNA序列分析鉴定,研究其感染不同种紫菜叶状体和坛紫菜不同品系叶状体的症状,以期为该病害的防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 紫菜叶状体材料

患病坛紫菜叶状体于2004年2月采自福建省平潭岛的自然岩礁上,从患病叶状体上分离获得病原菌。坛紫菜野生品系(PT-001)由2002年1月采自福建省平潭岛自然岩礁上的一棵坛紫菜叶状体放出的一个果孢子长成。条斑紫菜品系(LS-001)由2001年从江苏吕泗海区养殖网帘上采回的一棵条斑紫菜叶状体放出的一个果孢子长成。未定名紫菜品系(*Porphyr*a sp.)由2004年从墨西哥沿海采回的一棵叶状体上放出的一个果孢子长成。4种坛紫菜改良品系由野生坛紫菜经⁶⁰Co- γ 射线辐射诱变后获得^[11]。上述材料均以自由丝状体的形式保存于实验室内,用于人工感染试验的健康的紫菜叶状体均为实验室内由贝壳丝状体采壳孢子培养而成^[11]。

1.2 病原菌的16S rDNA分析

分离和纯化过程同文献^[10]。纯化的病原菌经病原菌DNA提取、16S rDNA的PCR扩增(采用Takara公司的16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit)、回收目的片段后委托宝生物工程(大连)有限公司进行16S rDNA测序,经BLAST序列比对以分析病原菌的分类地位。

1.3 病原菌感染不同紫菜的叶状体试验

1.3.1 不同种紫菜的叶状体感染试验

取实验室内培养成的健康坛紫菜和条斑紫菜叶状体各一段(长约2 cm、宽约1.5 cm)、未定名的紫菜3片(直径约0.8 cm),分别加入500 mL灭菌培养液和等量的病原菌进行充气培养,每隔一定时间观察各种紫菜叶状体上出现的感染情况。培养温度为23℃,光周期为10 L:14 D,光强为90 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光源为40 W日光灯。

1.3.2 不同品系的坛紫菜叶状体感染试验

取实验室培养成的健康坛紫菜野生品系和4种改良品系的叶状体(AN-2、YZ-6、JLU-7和ZS-1),用直径为8 mm的打孔器分别从每个品系的叶状体上取6个圆盘块,各加入250 mL灭菌培养液和等量的病原菌进行充气培养。每隔一定时间检查各品系的叶状体圆盘块上出现的感染情况。培养温度为23℃,光周期为10 L:14 D,光强为90 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光源为40 W日光灯。

2 结果与分析

2.1 病原菌的16S rDNA分析

将病原细菌以划线培养方式接种到细菌分离培养基上,获得纯化菌落:呈乳白色、边缘光滑、不透明、微凹入固体培养基、逆光观察可见浅蓝色的荧光。用透射电镜观察发现:病原菌呈短杆状、两端较圆、具有极生单鞭毛。该病原菌各方面特征均与文献^[10]的研究相同。通过16S rDNA序列测定,经BLAST数据库比对,发现与海科贝特菌(*Cobetia marina*)^[12]的相似度达到

100% (数据库编号 AY628694.1), 初步确定该病原菌属于海螺菌目 (*Oceanospirillales*)、盐单胞菌科 (*Halomonadaceae*)、*Cobetia* 属。对于本病原菌的鉴定还需结合生理生化特性等研究, 才能最后确定其分类地位。

2.2 不同种紫菜叶状体感染试验

接种病原菌 6 h 后, 镜检发现坛紫菜叶状体切段和条斑紫菜叶状体切段边缘已被感染 (图版 I -1, 2), 坛紫菜叶状体切段的感染细胞呈铁锈红色、变形拉长, 释放出原生质, 最后变绿并流失; 条斑紫菜叶状体切段的感染症状与坛紫菜有所不同, 边缘出现较多的游离细胞, 而铁锈红色变形拉长细胞较少。未定名紫菜叶状体边缘在 24 h 后也被感染 (图版 I -3), 其感染细胞病症基本上与条斑紫菜叶状体切段相同, 变形拉长的细胞较少而解离的细胞较多。

接种病原菌 24 h 后, 检查发现坛紫菜叶状体切段边缘已出现了较大的显微可见病斑 (图版 I -4)。接种病原菌 30 h 后, 这些病斑扩大成肉眼可见 (图版 I -5)。48 h 后, 坛紫菜叶状体切段上出现两处直径约 2 mm 的圆形病斑, 边缘也出现多处大的半圆形病斑 (图版 II -2), 条斑紫菜叶状体切段在接种病原菌 54 h 后内部出现一个较小的肉眼可见病斑 (图版 I -6), 此时坛紫菜片上的原两个小病斑已继续扩大相连成一个大的病斑 (图版 II -3), 到 76 h 时进而扩大为一个大的椭圆形病斑 (图版 II -4), 81 h 时病斑进一步扩大, 使坛紫菜叶状体切段解体成两段 (图版 II -5)。

2.3 坛紫菜不同品系的叶状体感染试验

2.3.1 野生品系和改良品系的坛紫菜叶状体感染试验

接种病原菌 24 h 后检查发现: 野生品系和改良品系的叶状体圆盘均已被感染, 边缘出现了病斑 (图版 III -1, 2, 5, 6), 而对照组则正常 (图版 III -7, 8)。野生品系感染病害后也出现了部分细胞游离出来的现象 (图版 III -3, 4), 而改良品系中则没有。

2.3.2 4种改良品系的坛紫菜叶状体感染试验

接种病原菌后 4 h 检查发现 JIU-7 叶状体圆盘块上已出现一个显微可见病斑, 里面含有 8 个铁锈红色死亡细胞, 而其它 3 个品系坛紫菜叶状体圆盘块还未出现病斑和死亡细胞。8 h 后检查发现, 另外 3 种坛紫菜叶状体圆盘也出现了铁锈

红色死亡细胞, 其症状为红烂病的典型特征。16 h 时病斑继续扩大, 有的中央已形成了空洞, 死亡细胞数目已无法统计。接种后 4 h、8 h、10 h 和 12 h 时的叶状体圆盘上出现的病斑数和死亡细胞数如表 1 所示。

表 1 坛紫菜不同品系的叶状体圆盘块被感染后的病斑数和死亡细胞总数

Tab. 1 The total numbers of foci and dead cells appeared on the blades of different strains of *P. haitanensis* after incubation with pathogen

品系	被感染的时间 (h)			
	4	8	10	12
AN-2	0(0)	11(107)	19(153)	50(301)
YZ-6	0(0)	5(62)	12(97)	17(119)
JIU-7	1(8)	2(31)	10(64)	22(116)
ZS-1	0(0)	1(6)	7(73)	16(82)

注: 病斑数为随机取 40 个视野 ($\times 40$) 统计的总数; 括号内数字代表病斑内死亡细胞总数。

接种病原菌 24 h 后, 4 种品系的坛紫菜叶状体圆盘块均被病原菌感染且边缘出现肉眼可见病斑, 感染细胞呈铁锈红色, 变形拉长后释放出原生质, 最后死亡细胞变绿后流失, 而此时各圆盘块内部只有个别细胞出现感染现象 (图版 IV)。

接种病原菌 50 h 后, 4 种坛紫菜叶状体圆盘块的感染都已比较严重, 边缘均出现多处大病斑 (图版 V -2)。接种病原菌 72 h 后, YZ-6 圆盘块已基本烂光, 病烂情况最严重, 其次是 AN-2、JIU-7 和 ZS-1 (图版 V -3)。接种病原菌 96 h 后, 除 AN-2 外其它 3 个坛紫菜品系的叶状体均基本烂光, 有的仅剩余一小块 (图版 V -4)。

3 讨论

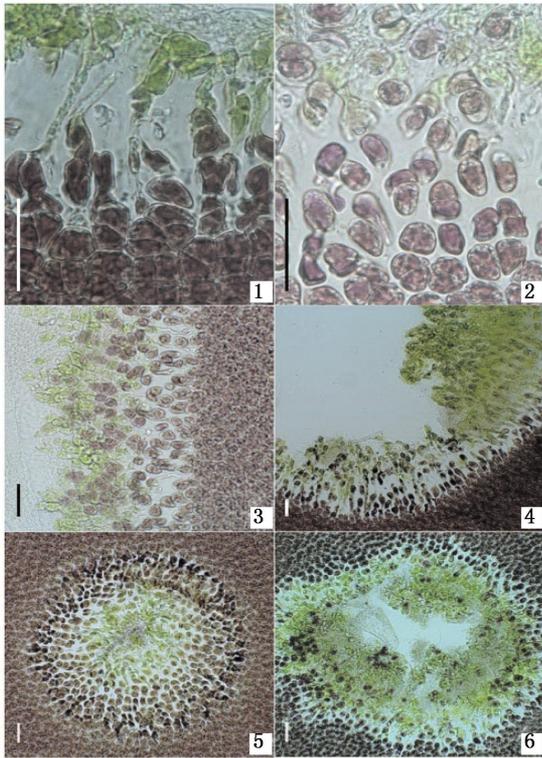
本研究证实坛紫菜细菌性红烂病病原菌能够感染不同种紫菜的叶状体 (坛紫菜、条斑紫菜和未定名紫菜) 以及经实验室选育的坛紫菜不同品系的叶状体 (JIU-7、AN-2、YZ-6 和 ZS-1), 并且感染的速度和症状基本相同。实验室内选育的坛紫菜改良品系和野生品系叶状体感染本病害后的病症基本相同, 说明这些改良品系对本病害的抗病力没有什么优势。目前紫菜优良品系的选育标准基本上都是围绕叶状体生长和品质两方面开展的^[13], 已筛选到的坛紫菜优良品系有能抗高温的品系^[14]和具有生长优势的品系^[15], 抗病紫菜品系的选育有待开展。

不同种紫菜的叶状体在感染本病后出现的症状有所不同(图版 I -1~3),推测病原菌在感染过程中会分泌少量的琼胶降解酶,但由于3种紫菜叶状体胶质层的厚薄不同,导致了病症的差异:叶状体较薄的紫菜在感染后容易游离出单细胞,而叶状体较厚的紫菜在感染后不易游离出单细胞,而是细胞变形拉长释放原生质后死亡降解。不同种紫菜的叶状体在厚薄方面具有明显差异^[16],条斑紫菜的叶状体为单层细胞,厚约35~50 μm ,胶质层的厚度约7~25 μm ;坛紫菜的叶状体大部分为单层细胞,局部为双层细胞,厚约65~110 μm ,胶质层的厚度约15~75 μm ,从上述数据可以看出坛紫菜的胶质层要比条斑紫菜的胶质层厚8~50 μm 左右,这就可以解释为什么条斑紫菜叶状体细胞比较容易游离出来,而坛紫菜的叶状体细胞较难游离出来。病原菌可能会分泌出一种以上的酶能降解紫菜胶质层,该酶对胶质层比较薄的条斑紫菜叶状体解离效果较好,而对于胶质层比较厚的坛紫菜叶状体则解离能力较弱。这就可以解释上述两种紫菜叶状体感染后病症的不同。另外,叶状体感染时边缘和内部的症状有所不同(图版 IV),边缘处的感染细胞数目多且症状比叶状体内部要严重,推测病原菌通过入侵边缘受伤细胞而后再进一步侵染叶状体内部,达到感染的目的。

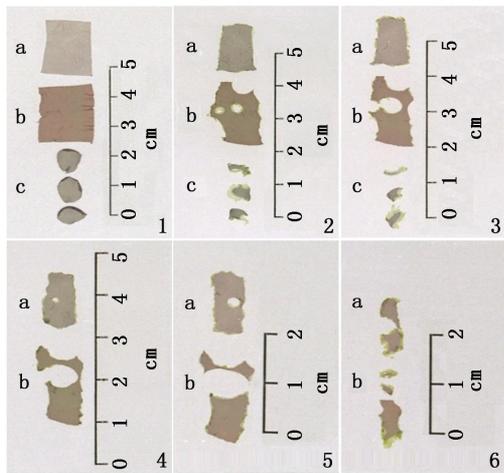
本病害侵染速度快,叶状体一旦被感染则很快会降解,在海区则会造成减产,养殖过程中应密切注意,并通过延长网帘干露时间等措施来防止本病的发生。

参考文献:

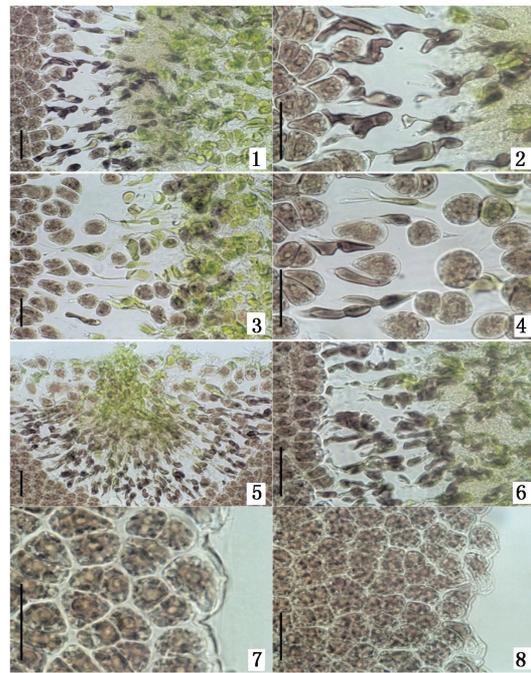
- [1] 曾呈奎,王素娟,刘思俭,等.海藻栽培学[M].上海:上海科学出版社,1985:204-206.
- [2] 福建省水产局.坛紫菜人工养殖[M].福州:福建人民出版社,1979:1-101.
- [3] 陈爱平.2005年中国水产养殖病害监测报告(三)[J].科学养鱼,2006,(10):48-49.
- [4] 马家海.条斑紫菜赤腐病的初步研究[J].上海水产大学学报,1996,5(1):1-7.
- [5] 新崎盛德.アサクサノリの腐れ病に関する研究[J].日本水産学会誌,1947,13(3):74-90.
- [6] 马家海.江苏南部沿海条斑紫菜壶状菌病的调查研究[J].上海水产大学学报,1992,1(3-4):185-188.
- [7] 新崎盛敏.アマノリ類に寄生する壺状菌について[J].日本水産学会誌,1960,26(6):543-548.
- [8] 中尾義房,小野原隆幸,松原孝之.ノリ病害細菌学的研究-I.細菌による緑斑病様障害の実験的病症[J].日本水産学会誌,1972,38(6):561-564.
- [9] 藤田雄二.ノリに緑斑病様障害なおてす細菌の粗酵素による葉体崩裂[J].日本水産学会誌,1973,39(8):911-915.
- [10] 严兴洪,黄林彬,周晓,等.坛紫菜叶状体的细菌性红烂病研究[J].中国水产科学,2008,15(2):313-322.
- [11] 严兴洪,梁志强,宋武林,等.坛紫菜人工色素突变体的诱变和分离[J].水产学报,2005,29(2):166-172.
- [12] 方呈祥.中国高等学校菌种目录[M].北京:化学工业出版社,2009:58.
- [13] 梁志强.坛紫菜遗传育种的初步研究[D].上海:上海海洋大学,2004:1-50.
- [14] 严兴洪,马少玉.坛紫菜抗高温品系的筛选[J].水产学报,2007,31(1):112-119.
- [15] 谢松平,宋武林,黄健,等.坛紫菜“申福1号”人工育苗技术[J].水产养殖,2006,27(5):39-44.
- [16] 李伟新,朱仲嘉,刘凤贤.海藻学概论[M].上海:上海科学技术出版社,1982:34-35.



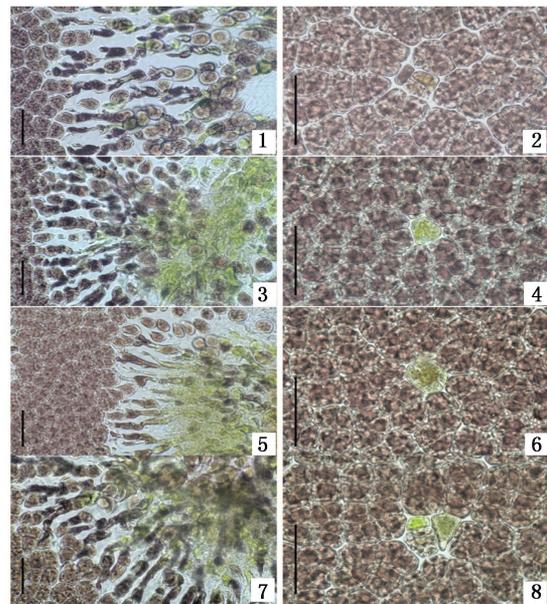
图版 I



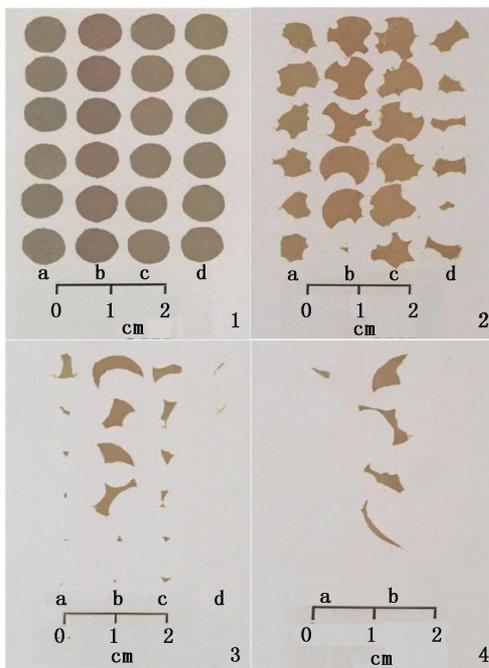
图版 II



图版 III



图版 IV



图版Ⅲ

图版Ⅲ 野生型与优良品系坛紫菜
感染病原菌的情况Plate III Symptoms of wild type and improved
type of *P. haitanensis* infected with pathogen

1—4 野生型坛紫菜感染病原菌 24 h 后的症状 (1. 示叶状体圆盘边缘死细胞; 2. 示叶状体圆盘边缘变形拉长细胞; 3. 示叶状体圆盘边缘死细胞; 4. 示叶状体圆盘边缘解离细胞); 5—6. 坛紫菜优良品系 YZ-6 感染病原菌后 24 h 的症状 (5. 示叶状体圆盘边缘病斑; 6. 示叶状体圆盘边缘死细胞); 7—8 对照组 (7. 示野生型坛紫菜叶状体圆盘边缘健康细胞; 8. 示优良品系 YZ-6 叶状体圆盘边缘健康细胞)。图中标尺均代表 50 μm 。

图版Ⅳ 4种不同品系坛紫菜感染
病原菌的情况 (微观)Plate IV Symptoms of 4 different strains of
P. haitanensis blades infected with
pathogen (microscopic)

1—2 坛紫菜 JIU-7 叶状体接种病原菌后 24 h 的症状 (1. 示叶状体圆盘边缘死细胞; 2. 示叶状体圆盘内部 3 个死细胞); 3—4. 坛紫菜 ZS-1 叶状体接种病原菌后 24 h 的症状 (3. 示叶状体圆盘边缘死细胞; 4. 示叶状体圆盘内部 1 个死细胞); 5—6. 坛紫菜 AN-2 叶状体接种病原菌后 24 h 的症状 (5. 示叶状体圆盘边缘死细胞; 6. 示叶状体圆盘内部 1 个死细胞); 7—8. 坛紫菜 YZ-6 叶状体接种病原菌后 24 h 的症状 (7. 示叶状体圆盘边缘死细胞; 8. 示叶状体圆盘内部 3 个死细胞)。图中标尺均代表 50 μm 。

图版Ⅴ 4种不同品系坛紫菜感染
病原菌的情况 (宏观)Plate V Symptoms of 4 different strains of
P. haitanensis blades infected with
pathogen (macroscopic)

1. 感染病原菌之前的 4 种不同品系的坛紫菜叶状体 (a. JIU-7, b. ZS-1, c. AN-2, d. YZ-6); 2. 感染病原菌 50 h 后的 4 种坛紫菜叶状体; 3. 感染病原菌 72 h 后的 4 种坛紫菜叶状体; 4. 感染病原菌 96 h 后的 4 种坛紫菜叶状体 (AN-2 和 YZ-6 已全部解体)。

图版Ⅰ 3种紫菜感染病原菌的情况 (微观)

Plate I Symptoms of 3 different *Porphyra*
blades infected with the pathogen (microscopic)

1. 接种病原菌 6 h 后, 坛紫菜片段边缘受感染; 2. 接种病原菌 6 h 后, 条斑紫菜片段边缘受感染; 3. 接种病原菌 24 h 后, 未定名紫菜圆盘边缘受感染; 4. 接种病原菌 24 h 后, 坛紫菜片段边缘出现大病斑; 5. 接种病原菌 30 h 后, 坛紫菜片段内部出现肉眼可见病斑; 6. 接种病原菌 54 h 后, 条斑紫菜片段内部出现肉眼可见病斑。图中标尺均代表 50 μm 。

图版Ⅱ 3种紫菜感染病原菌的情况 (宏观)

Plate II Symptoms of 3 different *Porphyra*
blades infected with the pathogen (macroscopic)

1. 接种病原菌之前 3 种紫菜叶状体的情况 (a. 条斑紫菜, b. 坛紫菜和 c. 未定名紫菜); 2~6. 三种紫菜叶状体感染病原菌后 48 h, 54 h, 76 h, 81 h, 96 h 的情况。