

坛紫菜叶状体的细菌性红烂病研究

严兴洪, 黄林彬, 周晓, 李琳

(上海水产大学, 农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海高校水产养殖学 E- 研究院, 上海 200090)

摘要: 本实验对发生在福建省平潭岛自然海区的野生坛紫菜 (*Porphyra haitanensis*) 叶状体上的红烂病进行了研究。患病叶状体上存在大小不等、肉眼可见的圆形或亚圆形病斑, 镜检发现病斑内存在大量铁锈红色的死细胞和少量已解离的发绿或发白死细胞。将患病叶状体与健康坛紫菜叶状体共培养 3 d 后, 后者也出现了相同的红烂病, 表明该病是由传染性病原侵入引起的。从患病叶状体中分离到一种病原菌, 能感染健康叶状体使其出现相同的病症。该病原菌具有分泌毒素和微弱的消化琼胶能力, 经高压灭菌或煮沸后的病原菌液, 其杀死紫菜细胞的能力比未处理的病原菌液增加了数倍, 这说明该菌可能通过释放内毒素来杀死叶状体细胞。鉴于此病是由于病原菌侵入叶状体并释放内毒素杀死紫菜细胞, 且死亡细胞呈铁锈红色, 故将其命名为“坛紫菜细菌性红烂病”。[中国水产科学, 2008, 15 (2): 313-322]

关键词: 坛紫菜; 叶状体; 红烂病; 病原菌; 内毒素

中图分类号: Q946.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)02-0313-10

坛紫菜 (*Porphyra haitanensis*) 和条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis*) 是中国主要的紫菜栽培品种, 坛紫菜在福建、浙江和广东等地, 条斑紫菜则在江苏和山东等地被广泛栽培^[1]。近年来, 随着紫菜养殖面积的不断增加, 海区环境的不断恶化和养殖人员管理上的疏漏, 导致在紫菜栽培期间每年都发生大规模的养殖病害。这不仅给紫菜生长带来了极大的危害, 而且用患病的紫菜制成干品, 严重影响商品质量, 直接导致了市场竞争力的下降^[1-2]。据中国水产养殖病害监测报告, 2005 年浙江养殖的坛紫菜发病率为 26.7%, 造成很大的经济损失^[3]。国外对于紫菜的病害研究起步较早也比较详细。1947 年新崎盛敏^[4]对甘紫菜 (*Porphyra tenera*) 赤腐病进行了研究, 并认为病原菌可能属真菌类, 由此开始了紫菜病害的微生物学研究。至今, 国内外已报道的条斑紫菜病害主要有赤腐病, 壶状菌病, 绿斑病^[5-12]等, 而坛紫菜的病害研究^[13-17]则比较少, 尤其是对于坛紫菜病害的病理学研究很不够, 基本上停留在病症和病害对策的研究, 远远落后于条斑紫菜的相关研究。

本研究的坛紫菜病害是 2004 年 2 月从福建省平潭岛自然岩礁上采回的野生坛紫菜叶状体上发现的。患病叶状体上存在很多的腐烂孔洞, 镜检发现存在大量的红色病斑, 其病症与紫菜绿斑病明显不同。本实验对该病害的病症、病原菌分离、病原菌特性以及致病机理等方面作了较详细的研究, 旨在探明细菌性红烂病的病因和病理, 并为建立防治该病的技术提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

患病坛紫菜叶状体于 2004 年 2 月采自福建省平潭岛自然岩礁上, 从患病叶状体上分离获得病原菌。用于做回感实验和毒素检测的健康坛紫菜叶状体均为实验室内采壳孢子培养而成, 其培养方法同文献^[18]。

1.2 方法

1.2.1 共培养实验 将采回的野生坛紫菜患病叶状体放在经蒸汽高压灭菌 (121 ℃, 20 min) 的海水中恢复培养, 随机挑取 6 棵患病叶状体, 每 3 棵为 1 组,

收稿日期: 2007-08-02; 修订日期: 2007-09-30.

基金项目: 国家高科技研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2006AA10A413, 2002AA603023); 国家自然科学基金资助项目 (30571443, 30170734); 上海市自然科学基金资助项目 (05RZ14110); 上海市重点学科建设项目 (Y1101); 上海市 E- 研究院水产养殖学科特聘研究员项目 (E030090); 上海市优秀学科带头人计划项目 (07XD14028)。

作者简介: 严兴洪 (1958-), 男, 博士生导师, 主要从事海洋生物生理生态、海藻生物技术和遗传育种研究。E-mail: xhyan@shfu.edu.cn

分别置于2个各含500 mL灭菌MES培养液^[19]的平底烧瓶(1 000 mL)中充气培养。冲入的空气先经硫酸铜溶液(20 g/L)和细菌滤膜(孔径0.45 μm)双重过滤除菌。另外,将室内培养的3棵健康坛紫菜叶状体放入其中的1瓶与患病叶状体共培养,每隔24 h镜检1次。培养条件:温度(23 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$;光周期10 L:14 D;光强2 200 lx,光源为40 W日光灯。

1.2.2 病原菌的分离与纯化 把从海区采回的患病叶状体上滴下的海水接种到含细菌分离培养基^[7]的培养皿($\Phi=90$ mm)中进行病原菌分离。待分离培养基上长出病原菌落后,将菌落挑出再次接种在细菌分离培养基上,连续2次划线分离纯化,最后获得病原菌的纯化菌落。培养条件:温度(19 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$;光周期10 L:14 D;光强500 lx,光源为40 W日光灯。

1.2.3 回感实验 用打孔器($\Phi=10$ mm)从健康坛紫菜叶状体上取10个圆盘块,每5个1组,分别置于含250 mL灭菌MES培养液的平底烧瓶(250 mL)中进行充气培养。在一个瓶里接种病原菌,另一瓶不接种病原菌,作为对照组,培养条件与共培养实验相同。每隔12 h镜检并记录叶状体上出现的病斑数和死亡细胞数。

1.2.4 病原菌毒素实验 把一定量已纯化的病原菌接种到含500 mL细菌液体培养基^[7]的三角烧瓶里培养。培养温度为(23 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$,光强500 lx,每天摇瓶5次。培养5 d,测定菌液的细菌密度后,将菌液分成4份(每份100 mL),用不同的方法进行处理:I组,细菌液不作任何处理;II组,细菌液经细菌滤膜(孔径=0.45 μm)过滤除去细菌;III组,细菌液煮沸5 min;IV组,细菌液经高压灭菌处理;另外,用灭菌的细菌液体培养基作为空白对照。从健康坛紫菜叶状体上取50个圆盘块($\Phi=3$ mm),平均分成5组,分别置于培养皿($\Phi=6$ cm)中,加入上述4种经不同方法处理后的细菌液和作为对照用的灭菌细菌液体培养基各20 mL进行静止培养,培养条件同于共培养实验。每隔24 h镜检1次圆盘块上的细胞死亡情况等。

1.2.5 病原菌毒素的致死浓度实验 测定细菌密度后,取病原菌培养液200 mL,经高压灭菌,再经高速离心(12 000 r/min,15 min,4 $^{\circ}\text{C}$),然后,取上清液作为病原菌的毒素液,将此毒素液加入MES培养基,配成毒素液体积百分比浓度为1%、5%、10%、20%的毒素液培养基;另外,用灭菌MES培养液作为对照组。从健康坛紫菜叶状体上取45个圆

盘块($\Phi=3$ mm),平均分成9组,分别置于培养皿($\Phi=6$ cm)中,加入上述8种含毒素的培养液和灭菌MES培养液各20 mL进行静止培养,每隔24 h镜检1次圆盘块上的死亡细胞数。

2 结果与分析

2.1 病症观察

2.1.1 肉眼观察病症 刚采回的患病野生坛紫菜叶状体上有许多病斑(图版I-1),病斑呈圆形或亚圆形,大小不等,小的如针孔状,大的直径可达3~4 mm。患病叶状体在实验室内培养一段时间后,病症进一步加重,原来较小的病斑逐渐扩大与邻近的病斑相连成大病斑,最终,藻体腐烂解体。

2.1.2 显微观察病症 镜检发现,病斑的边缘部分为变形拉长的铁锈红色死细胞(图版I-2),原生质流出,细胞的内部构造如色素体和液泡等已无法辨别,失去了正常的细胞结构;病斑的中央部分为绿色或发白的游离死细胞,有的病斑中央由于死细胞流失,已形成空洞。随着病斑进一步扩大,叶状体上出现肉眼可见的烂洞(图版I-1)。

2.2 患病叶状体与健康叶状体的共培养实验

当患病叶状体与健康坛紫菜叶状体一起培养3 d后,原患病叶状体上出现了更大的病斑和烂洞;而原健康叶状体则被感染,出现了少量的病斑,镜检发现,健康叶状体上已出现与原患病叶状体上几乎完全一样的症状,即死亡细胞变形拉长,色呈铁锈红色,细胞内含物流出,最后细胞变绿或发白流失(图版I-3、4)。因此,初步确定该病害不是由于坛紫菜叶状体本身的生理原因或海区生态因素引起的。镜检发现叶状体的病斑周围有浅黄色的活动亮点,怀疑该病为细菌侵入所致,故进行病原菌分离实验。

2.3 病原菌的分离和纯化

将患病叶状体上滴下的海水接种到细菌分离培养基上。两天后,长出若干个边缘分界明显,直径约1~2 mm,且微凹的菌落。将下凹的菌落再次接种到细菌分离培养基上,3 d后又长出类似特征的菌落。将此细菌以划线分离培养方式再次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(图版II-1)。用透射电镜观察发现:本病原菌呈短杆状,两端较圆,菌体长约1.5 μm ,宽约0.75 μm ,具有极生单鞭毛,长约5 μm (图版

II -2); 用光镜观察发现它的运动十分活跃。

2.4 病原菌的回感实验

2.4.1 第1次回感实验 取5段室内培养的健康坛紫菜叶状体(每段长3~4 cm、宽约1 cm)放入含240 mL 灭菌 MES 培养液的平底烧瓶(250 mL)中充气培养,并接种10 mL 的病原菌培养液(病原菌密度为 5.2×10^9 /mL),此时测得培养液中的病原菌密度为 2.1×10^8 /mL。48 h后,叶状体上出现多个烂洞(图版II -3),镜检发现死细胞呈铁锈红色、变形拉长、细胞内物质流出,其病症与海区采回的患病叶状体完全相同,此时,培养液中的病原菌密度为 1.7×10^{10} /mL。72 h后,叶状体上出现较大面积的烂洞,培养液中的病原菌密度达到 1.4×10^{11} /mL;而对照组无病症出现。由此证实了此病害确系细菌感染所致。从患病的原健康叶状体上再次分离得到病原菌,并进行第2次回感实验。

2.4.2 第2次回感实验 用打孔器($\Phi=10$ mm)从健康坛紫菜叶状体上取10个圆盘块,平均分成2

组,分别放入含240 mL 灭菌 MES 培养液的平底烧瓶(250 mL)中进行充气培养。在其中的一瓶中接种第1次回感实验中分离得到的病原菌培养液10 mL(病原菌密度为 4.1×10^8 /mL)后,测得培养液中的病原菌密度为 1.6×10^7 /mL;另一瓶作为对照组,不接种病原菌,只加10 mL 灭菌 MES 培养液。12 h后,镜检发现实验组的各圆盘块边缘均已被感染,出现了少量的铁锈红色死细胞,而圆盘块的内部还没有发现死亡细胞。24 h后,实验组的各圆盘块边缘均出现肉眼可见的病斑,镜检发现圆盘块的内部也有少量细胞被感染后死亡,变成铁锈红色、变形拉长,此时测得病原菌密度为 3.5×10^8 /mL。36 h后检查发现,实验组叶状体圆盘块上出现多处大的烂洞,且病症与原患病叶状体相同(图版II -4、5),此时测得实验组中的病原菌密度达到 9.5×10^8 /mL,而对照组中的叶状体无病症出现(图版II -6)。随机取4个叶状体圆盘块,在显微镜下统计其病斑数和病斑大小等,其结果如表1所示。

表1 第2次回感实验中健康坛紫菜叶状体圆盘块接种病原菌培养36 h后的病症
Tab.1 The symptoms appearing on the healthy blade disks of *Porphyra haitanensis* at 36 h after inoculation with pathogen

检查内容 Examined item	接种病原菌后的圆盘块 Disks cultured with pathogen				未接种病原菌的圆盘块 Disks cultured without pathogen
	a	b	c	d	
病斑数 No. of pathological focus	5	6	17	27	0
病斑平均长度/mm Mean length of focus	0.3	0.2	0.1	0.3	0
病斑平均宽度/mm Mean width of focus	0.2	0.1	0.1	0.1	0
圆盘块长度/mm Length of disks	6.5	7.2	7.0	7.5	11.0
圆盘块宽度/mm Width of disks	6.2	6.4	6.5	7.0	10.6

注: a, b, c 和 d 分别代表随机选取的圆盘块; 圆盘块初始大小为直径10 mm。
Note: a, b, c and represent the 4 randomly selected disks, respectively; The initial size of the disks is 10 mm in diameter.

从表1可以看出,病原菌的侵染力较强,36 h内可使紫菜叶状体圆盘块上出现多处病斑,同时叶状体圆盘块的面积由于病原菌的消耗而减小,使圆盘块的长宽均减少了40%左右。72 h后检查发现感染组的圆盘块已基本被病原菌消耗掉了,说明该病原菌的传染和侵蚀力很强。

2.5 病原菌毒素实验

把病原菌接种到细菌液体培养基中培养5 d后,病原菌的密度达到 1.1×10^{10} /mL。此时,将菌液离心,再分成4等份分别用不同的方法进行处理。健康叶状体圆盘块在经不同方法处理后的病原菌液中培养24 h后,镜检发现实验组的叶状体均出现

了死细胞。36 h后,各叶状体上均出现大面积的死亡细胞。从表2、表3和图版III可以看出,该病原菌是通过产生毒素来杀死紫菜细胞,使细胞变成铁锈红色。I组(未处理组)中铁锈红色死亡细胞较少而边缘的病斑较多,是因为细菌处于存活状态,其内部的毒素尚未释放出来;另外,少量的死细胞发生了解离。在III组(煮沸组)和IV组(高压灭菌组)中,经过高温处理后,细菌菌体破裂后毒素被释放出来,因而造成大量的细胞死亡,但细胞没有被解离。而II组(过滤组)的细胞死亡数比其他组少很多,是因为病原菌被过滤掉后,培养液中毒素含量少,因而死亡细胞最少。镜检发现过滤组中未死细

胞的液泡很大,将其他内含物挤到一边,液泡进一步扩大后破裂,死亡细胞最后变成铁锈红色。48 h后过滤组的死亡细胞数约为 36 h 的 2 倍,5 d 后该组细胞也全部死亡。

表 2 健康叶状体圆盘块在经不同方法处理后的病原菌培养液中培养 24 h 后的病症
Tab.2 Symptoms appearing on the healthy blade disks after culture for 24 h in the bacterial culture treated with different ways

检查项目 Examination item	不同处理组 Different treatments				对照组 Control
	I	II	III	IV	
病症 Symptom	圆盘块边缘有多处半圆形病斑;内部有少量铁锈红色死亡细胞	圆盘块边缘和内部都出现极少量铁锈红色死亡细胞和液泡增大细胞	圆盘块边缘和内部均有较多的铁锈红色死亡细胞	圆盘块边缘和内部均出现了大量的铁锈红色死亡细胞	圆盘块边缘与内部都无死细胞
死亡细胞数/ind No. of dead cells	213	68	375	1 010	0

注: I: 细菌液不作任何处理; II: 细菌液经细菌滤膜除菌处理; III: 细菌液被煮沸 5 min; IV: 细菌液经高压灭菌处理; 对照组: 灭菌的细菌液体培养基; 死亡细胞数为 20 个视野 (40×) 内死亡细胞的平均数。
Note: I: untreated bacteria culture; II: filtered bacterial culture by 0.45 μm filter; III: boiled bacterial culture; IV: sterilized bacterial culture; control: sterilized culture medium; number of dead cells was the average dead cells of 20 yields (40×).

表 3 健康叶状体圆盘块在经不同方法处理的病原菌培养液中培养 36 h 和 48 h 后的死亡细胞数
Tab.3 Number of dead cells on the healthy blade disks after culture for 36 h and 48 h in the bacterial culture treated with different ways

培养时间 /h Culture time	不同处理组 Different treatments				对照组 Control
	I	II	III	IV	
36	941	156	1 458	—	0
48	—	307	—	—	0

注: I: 细菌液不作任何处理; II: 细菌液经细菌滤膜除菌处理; III: 细菌液被煮沸 5 min; IV: 细菌液经高压灭菌处理; 对照组: 灭菌的细菌液体培养基。死亡细胞数为 20 个视野 (40×) 内死亡细胞的平均数; “—”代表细胞全部死亡。
Note: I: untreated bacterial culture; II: filtered bacterial culture by 0.45 μm filter; III: boiled bacterial culture; IV: sterilized bacterial culture; control: sterilized culture medium; number of dead cells was the average dead cells of 20 yields (40×); “—” means that cells were all dead.

2.6 病原菌毒素的致死浓度实验

病原菌在液体培养基中培养 6 d 后,密度达到 1.56×10^{11} /mL。该病原菌培养液经高压灭菌和离心后,取上清液即为毒素母液,然后通过加入灭菌 MES 培养液,把它稀释成含不同浓度毒素液的培养液用来培养健康叶状体圆盘块。培养 24 h、48 h 和 72 h 后,分别从每组培养皿中随机取 3 个圆盘块,每个圆盘块随机取 20 个视野统计细胞死亡情况

(表 4)。
从表 4 可看出,未经稀释的毒素液杀死细胞的能力最强,24 h 后圆盘上的细胞全部被杀死。毒素液浓度越高,死亡细胞数越多;较低浓度(体积百分比浓度为 20%)的毒素液在 72 h 后也造成大量细胞死亡,这说明此毒素的毒性较强,稀释到较低浓度也能致细胞死亡。

表 4 健康叶状体圆盘块在含不同浓度细菌毒素液的培养液中培养 24 h、48 h、72 h 后的死亡细胞数
Tab.4 The number of dead cells appearing on the healthy blades after culture for 24 h, 48 h and 72 h respectively in the culture medium with different concentration of toxin solution ind

毒素液浓度 /% Toxin concentration	培养时间 /h Culture time		
	24	48	72
0	0	0	0
1	0	0	0
5	0	0	0
10	0	0	0
20	0	0	505
40	186	—	—
60	485	—	—
80	1 447	—	—
100	—	—	—

注: 死亡细胞数为 20 个视野 (40×) 内死亡细胞数的平均数; “—” 代表细胞全部死亡。

Note: the number of dead cells was the average dead cells of 20 yields (40×); “—” means all cells were dead.

3 讨论

细菌性红烂病病害是在福建省平潭岛海区自然生长的野生坛紫菜群体中发现的, 海区采回的患病叶状体带回实验室后, 置灭菌 MES 培养液中进行充气培养, 数天后发现叶状体的病症不但没有改善, 反而更加严重, 叶状体上出现了更多更大的病斑, 最后叶状体腐烂解体。健康的坛紫菜叶状体与患病叶状体放在同一个充气瓶中培养 3 d 后, 健康的叶状体也被感染, 出现了与患病叶状体相同的症状, 这说明本病害不是由于叶状体本身生理因素或养殖海区生态因素造成的, 而是一种传染性病害, 且传染性很强。

从患病叶状体上分离获得的一种细菌, 用于回感健康坛紫菜叶状体, 可以使叶状体出现与海区患病叶状体相同的病症, 说明分离到的细菌为本病害的病原菌。该病原菌为短杆菌, 具有一根长鞭毛, 运动活跃, 可在以琼脂为唯一碳源的合成培养基上生长, 消耗琼脂后微微下凹。从该菌的形态和营养特征来看, 它与导致紫菜绿斑病的柠檬假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas citrea*)^[12] 相似, 但其准确的分类地位和生理生化特性正在深入研究中, 其结果将另文报道。

从肉眼观察, 本病的病症与已报道的紫菜绿斑病相似, 因为两者都使叶状体出现多处腐烂孔洞, 且孔洞中央呈绿色; 但镜检发现两者的症状很不相同: 本病的病斑边缘部分为变形拉长的铁锈红色死

亡细胞, 这些细胞最后会游离变绿或发白流失; 而患绿斑病的病斑内部是被解离的单细胞, 大部分变绿死去, 但细胞不变形 (图版 I-5)。另外, 两者的发病机理也完全不同。紫菜绿斑病是病原菌侵入叶状体的伤口, 分泌能分解紫菜胶质层和细胞壁的消化酶将细胞解离下来, 游离的紫菜细胞在其细胞壁和细胞膜被消化后变绿死亡^[6-8]; 而细菌性红烂病是坛紫菜叶状体细胞先被病原菌分泌的毒素杀死, 颜色变成铁锈红色, 原生质流出, 大部分死亡细胞变成不规则的形状, 随后逐渐解离, 最后变绿或发白流失。本病也完全不同于已报道的紫菜赤腐病, 因为赤腐病是由于真菌侵入紫菜叶状体细胞并将其杀死造成的, 在被感染的紫菜细胞中可以看到真菌菌丝穿过其中^[4, 10]。

一般来说, 经过高压灭菌或煮沸处理后, 毒素会被分解或失活而无法杀死叶状体细胞。但本病原菌的培养液经过高压灭菌或煮沸处理后, 杀死叶状体细胞的能力反而增强, 这可能是因为病原菌经高温处理后, 细胞壁破裂, 释放出更多的毒素, 导致叶状体细胞死亡数增加。同时, 这也证明了该病原菌产生的毒素具有耐高温的特性。内毒素一般在细菌存活时不会分泌到体外, 仅在细菌死亡后自溶或人工裂解时才会释放到体外^[20], 这也可以解释为什么经高压灭菌或煮沸后的病原菌液对坛紫菜细胞的杀伤力会远远超过经除菌过滤的病原菌液。经高压灭菌后, 细菌破裂可能最为完全, 所有的毒

素都被释放出来,所以高压灭菌组的死亡细胞数远远超过其他实验组。内毒素有极强的化学稳定性,在 250℃ 下干热灭菌 2 h 才可完全灭活^[20]。本病原菌产生的毒素尽管经过高压灭菌或煮沸处理仍不失活,并可杀死大量的紫菜细胞,推测其为内毒素。该毒素的理化特性正在进一步研究中。

本病最初是在野生坛紫菜叶状体上发现的,但经过后来连续 3 年的养殖海区观察,发现在福建和浙江大规模人工栽培的坛紫菜叶状体上,每年的 12 月到次年的 3 月也暴发此病,分离得到的病原菌也可以感染健康的坛紫菜叶状体,出现的症状与本病完全一样。另外,用本病原菌去感染室内培养的健康条斑紫菜叶状体,也可以使条斑紫菜叶状体出现与坛紫菜一样的病症,详细研究结果将另文发表。

对本病的防治方法进行了初步的探索,将患病叶状体在实验室内完全铺平晾干 2~3 h,使叶状体的含水量降到 20% 左右,可杀死大部分病原菌,病症大大减轻,这说明本病原菌不耐干燥。自然海区的紫菜虽然每天能干露 4 h 左右,但是由于干露时叶状体没有完全分开,包裹在内部的紫菜不能完全干燥。所以,在坛紫菜养殖期间如果发生本病害,只要让紫菜多次充分干出,就可能有效地防治此病。

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检测报告 (三) [J]. 科学养鱼,2006,10: 48-49.
- [4] 新崎盛敏. 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.
- [5] 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.
- [6] 中尾義房,小野原隆幸,松原孝之等. 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.
- [7] 藤田雄二. ノリに緑斑病様障害をおよぼ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.
- [8] 藤田雄二,钱谷武平,中尾義房等. ノリ病害細菌学的研究—II. 養殖ノリの病害関連細菌類 [J]. 日本水産学会誌,1972,38 (6): 565-569.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 马家海,张礼明. 条斑紫菜缩曲症的研究 [J]. 中国水产科学,1999,6 (2): 82-88.
- [12] 闫咏,马家海,许璞,等. 1 株引起条斑紫菜绿斑病的柠檬假交替单胞菌 [J]. 中国水产科学,2002,9 (4): 353-358.
- [13] Lin D H, Lin Y S. Studies on the green disease of *Porphyra haitanensis* Chang & Zheng caused by nitrogen deficiency [J]. *Hydrobiologia*, 1984, 116-117 (1): 453-455.
- [14] 陈秋萍,江最新. 洞头县坛紫菜大面积病烂原因分析 [J]. 浙江水产学院报,1991,10 (2): 144-148.
- [15] 林星. 坛紫菜的主要病害与对策 [J]. 科学养鱼,2003, (2): 40-44.
- [16] 徐丽宁,杨锐. 紫菜病害及防治 [J]. 水利渔业,2005,25 (6): 103-105.
- [17] 谢双如. 坛紫菜几种常见病害防治技术 [J]. 中国水产,2007, (2): 64-65.
- [18] 严兴洪,梁志强,宋武林,等. 坛紫菜人工色素突变体的诱变与分离 [J]. 水产学报,2005,29 (2): 166-172.
- [19] 王素娟,张小平,徐志东,等. 坛紫菜营养细胞和原生质体培养的研究—I [J]. 海洋与湖沼,1986,17 (3): 217-221.
- [20] 周德庆. 微生物学教程 [M]. 第二版. 北京: 高等教育出版社,2002,287-288.

Study on a bacterial red-rotting disease of *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta)

YAN Xing-hong, HUANG Lin-bin, ZHOU Xiao, Li-lin

(Ministry of Agriculture Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecosystem, E-Institute of Shanghai Municipal Education Commission, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: A serious red-rotting disease was found on the gametophytic blades of wild *Porphyra haitanensis* collected from the coast of Pingtan Island in Fujian Province. In the foci of the diseased blades, most of the dead cells were reddish brown in color, some of which were isolated and became green or white in color. When the diseased blades were co-cultured with the healthy blades grown in the lab, the latter were infected and appeared the same symptoms after 3 days of culture. This result indicated that the disease was not caused by physiological and/or ecological factors. While the bacterium isolated from the diseased blades was inoculated on the healthy blades, the same symptoms appeared on the healthy blades after culture for 3 days. This result showed that the obtained bacterium was pathogen of the disease. The pathogen has weak ability to degrade agar of the solid medium and can secrete toxin to kill *Porphyra* cells. When the *Porphyra* blade was cultured in the sterilized or boiled culture of the pathogen, it was found that much more cells of the blades were killed than those cultured in the untreated culture of the pathogen, indicating that much more endotoxin was released after the cell walls of the bacteria were broken during sterilizing or boiling. This bacterial disease was named bacterial red-rotting disease of *Porphyra* blade for that the pathogen secretes endotoxin to kill the blade cells and the dead cells were reddish brown in color. [Journal of Fishery Science s of China, 2008, 15 (2): 313–322]

Key words: *Porphyra haitanensis*; gametophytic blade; red-rotting disease; pathogen; endotoxin

图版 III 说明

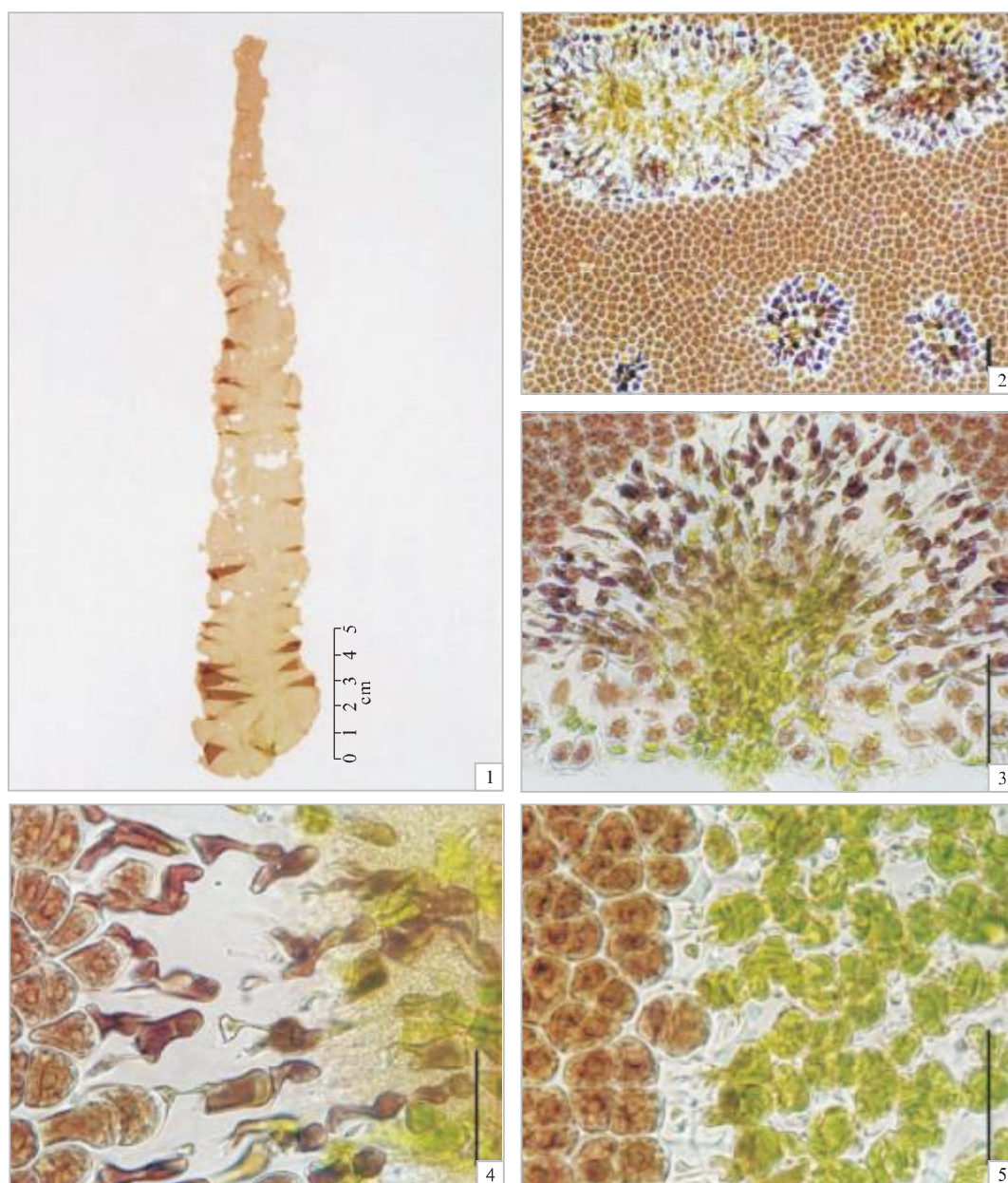
1-2. 原菌液组 (1. 圆盘块边缘病斑; 2. 圆盘块内部死细胞); 3-4. 细菌过滤组 (3. 圆盘块边缘的死细胞和液泡增大的细胞; 4. 圆盘块内部的死细胞和液泡增大的细胞); 5-6. 煮沸组 (5. 圆盘块边缘的死细胞和液泡增大的细胞; 6. 圆盘块内部的死细胞和液泡增大的细胞); 7-8. 高压灭菌组 (7. 圆盘块边缘的死细胞; 8. 圆盘块内部的死细胞); 9-10. 对照组 (9. 圆盘块边缘细胞; 10. 圆盘块内部细胞, 均无死细胞出现)。图中标尺均代表 50 μm , 图 3-10 放大倍数相同。

Explanation of plate III

1-2. Blades cultured in the untreated pathogen culture (1. Foci appearing on the edge of the blade; 2. dead cells appearing in the central part of the blade); 3-4. blades cultured in the filtrated pathogen solution (3. dead cells of the edge part, 4. dead cells in the central part of the blade); 5-6. blades cultured in the boiled pathogen culture (5. dead cells of the edge part; 6. dead cells in the central part of the blade); 7-8. blades cultured in the sterilized pathogen (7. dead cells on the edge part; 8. dead cells on the central part of the blade); 9-10. control group (9. dead cells appearing on the edge; 10. dead cells on the central parts of the blade). Scale bars = 50 μm ; figures of 3-10 were amplified similarly.

严兴洪等：坛紫菜叶状体的细菌性红烂病研究

YAN Xing-hong et al: Study on a bacterial red-rotting disease of *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta)



图版 I 坛紫菜红烂病的病症及患病叶状体与健康叶状体共培养实验结果

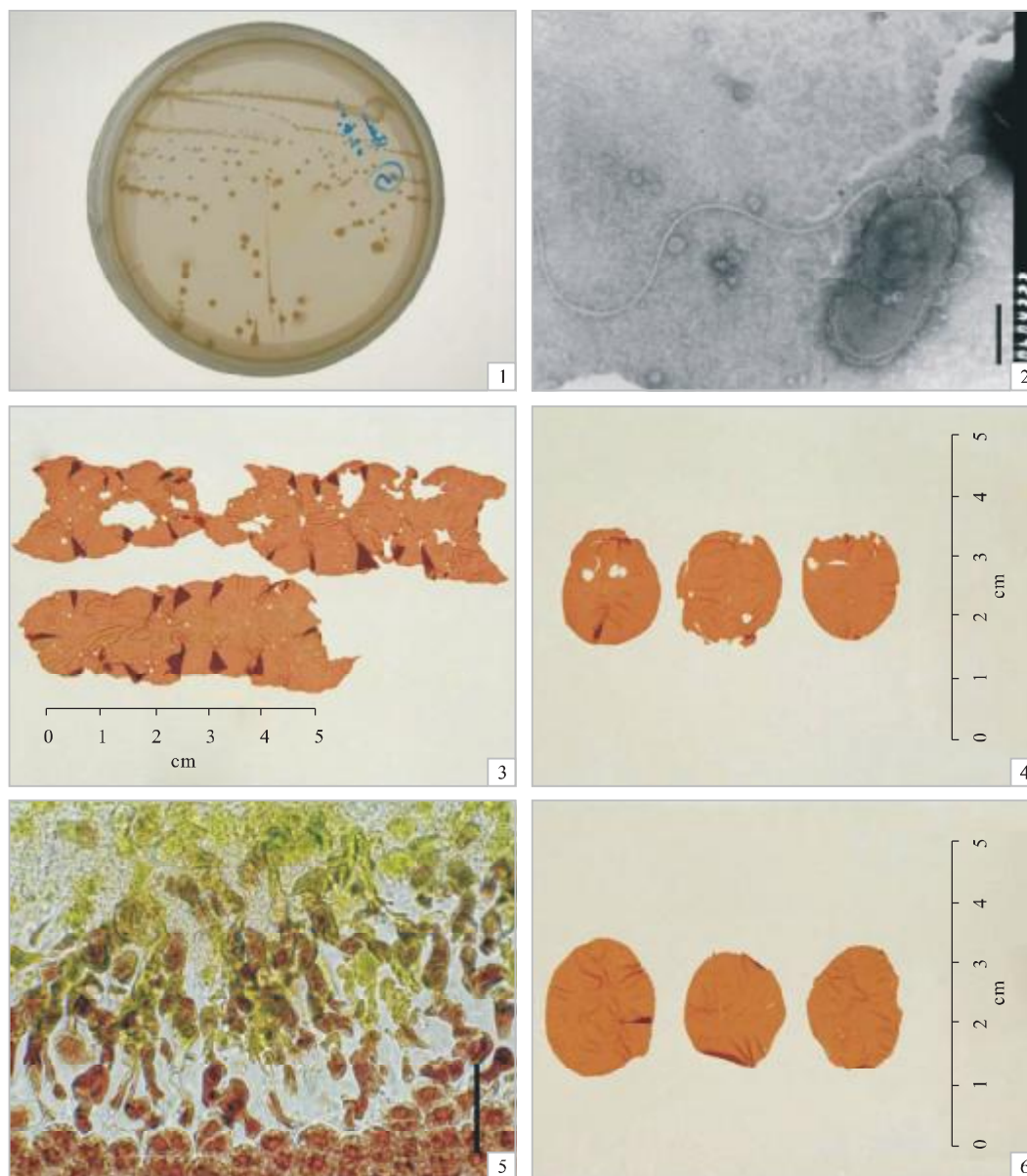
1. 海区采回的野生患病坛紫菜叶状体上有多处腐烂孔洞；2. 患病叶状体上的病斑和死细胞；3-4. 患病叶状体与健康叶状体共培养 3d 后，健康叶状体被感染后出现的病症（3. 圆盘块边缘病斑；4. 感染细胞）；5. 坛紫菜叶状体发生绿斑病的病症。图中标尺均代表 50 μm。

Plate I Symptoms of red-rotting disease of *Porphyra haitanensis* and the results of co-culture of diseased blades and healthy blades

1. Foci on the diseased blade of wild *P. haitanensis*; 2. foci and dead cells of the diseased blade; 3-4. symptoms appearing on the healthy blade after co-culture with the diseased blade for 3 days, (3. foci appearing on the blade edge; 4. infected cells of a focus); 5. symptoms of green-rotting disease of *P. haitanensis* blade. Scale bars=50 μm.

严兴洪等: 坛紫菜叶状体的细菌性红烂病研究

YAN Xing-hong et al: Study on a bacterial red-rotting disease of *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta)



图版 II 病原菌及回感实验结果

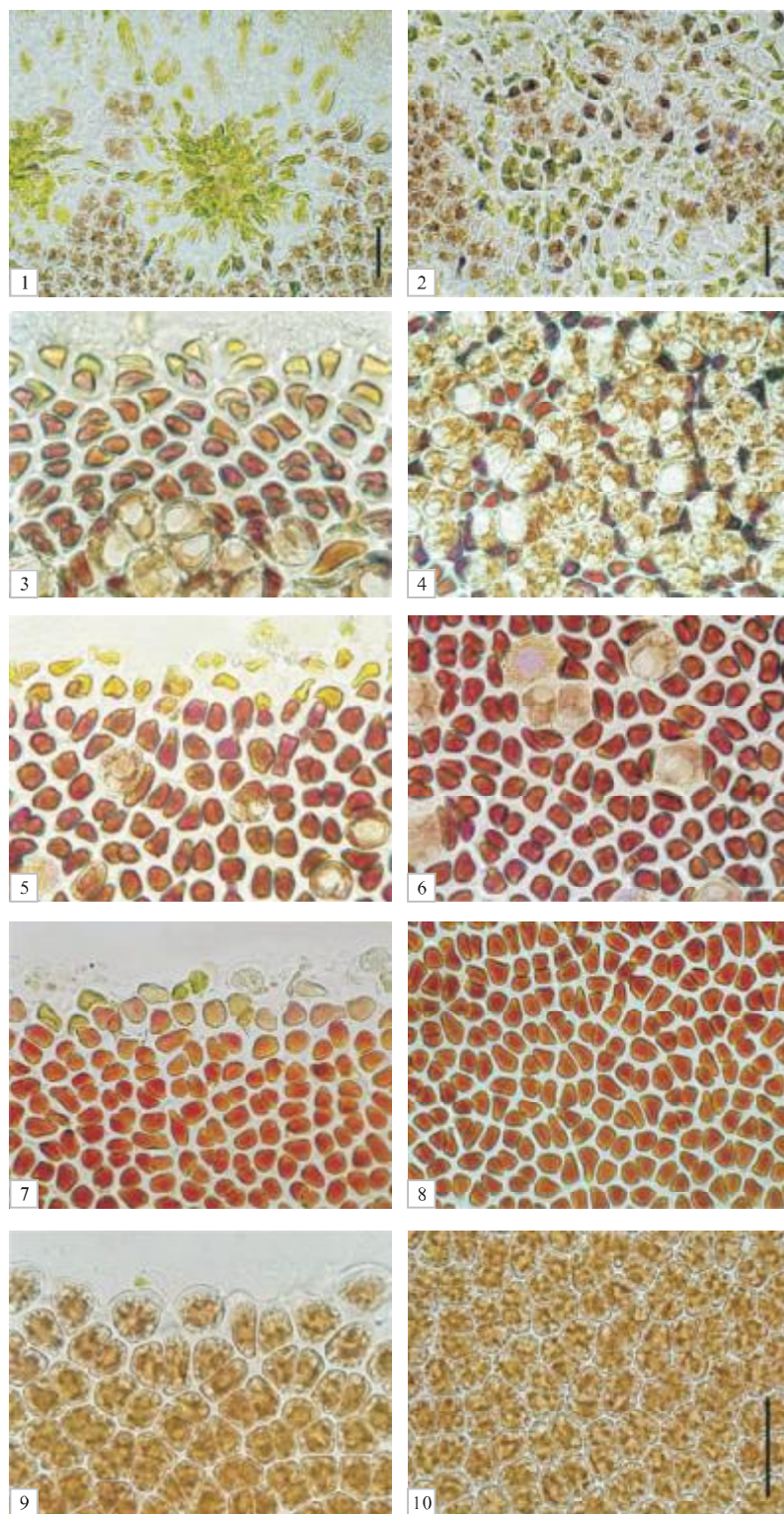
1. 分离纯化后的病原菌菌落; 2. 用透射电镜拍的病原菌菌体 (20 000 \times); 3. 接种病原菌 48 h 后, 原健康坛紫菜叶状体上出现多处腐烂孔洞; 4-6. 第 2 次回感实验 (4. 接种 2 次分离得到的病原菌 36 h 后在叶状体圆盘块上出现的腐烂孔洞; 5. 患病叶状体圆盘块的显微病症; 6. 对照组的圆盘块, 无感染)。图 2 标尺代表 0.5 μm ; 图 5 标尺代表 50 μm 。

Plate II Isolated pathogen and re-infection test

1. The purified isolates of pathogen; 2. pathogen under TEM; 3. rotting foci appearing on the blades after inoculation with the pathogen for 48 h; 4-6. the second re-infection test (4. rotting foci appearing on the blades after inoculation with the pathogen for 36 h; 5. microscopic symptoms of the infected blade; 6. disks of control. Scale bar: 0.5 μm in plate II -2 and 50 μm in plate II -5.

严兴洪等: 坛紫菜叶状体的细菌性红烂病研究

YAN Xing-hong et al: Study on a bacterial red-rotting disease of *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta)



图版 III 健康叶状体圆盘块在经不同方法处理后的病原菌培养液中培养 36 h 后出现的病症

Plate III Symptoms of the healthy blades after culture for 36 h in the medium of pathogen culture treated with different ways

图版 III说明见 320 页 . Explanation of plate III in page 320.