



Vibrio mediterranei 117-T6引发的坛紫菜黄斑病的初步研究

徐梦雅, 杨锐*, 刘棋琴, 何应芸, 陈海敏

(宁波大学浙江省海洋生物工程重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 以一株黄斑病致病菌 *Vibrio mediterranei* 117-T6 感染坛紫菜的自由丝状体, 研究了环境因子对该菌株生长的影响及其最易感条件, 检测了该条件下 *V. mediterranei* 117-T6 引发的坛紫菜丝状体的抗氧化酶(SOD、POD)活性以及藻胆蛋白、叶绿素 a(Chl. a)、可溶性蛋白、游离脯氨酸(Pro)和丙二醛(MDA)含量等生理指标的变化。结果显示, *V. mediterranei* 117-T6 的最优生长条件为 30 °C、pH 7.0、盐度 20, 最易感条件为 30 °C、pH 6.0、盐度 20。在易感条件下培养 12 h 后, 感染组坛紫菜丝状体的 SOD 和 POD 的活性, 藻胆蛋白、可溶性蛋白以及游离 Pro 含量等指标均显著高于对照组; MDA 含量峰值出现在 6 h, 显著高于对照组; 在 24 h 后, 感染组的 Chl. a 含量达到峰值, 亦显著高于对照组。研究表明, 短期内弧菌感染虽然可以刺激坛紫菜丝状体产生胁迫应激反应, 但是随着感染时间的延长, 致病菌感染引发的藻体内活性氧及渗透压胁迫加剧, 最终导致紫菜死亡。高温和酸化等不良的环境会加剧 *V. mediterranei* 117-T6 引发的坛紫菜黄斑病的恶化, 其作用程度依次为温度、pH 和盐度。

关键词: 坛紫菜; *Vibrio mediterranei* 117-T6; 环境因子; 病理

中图分类号: S 946.2

文献标志码: A

中国是紫菜养殖大国, 其中条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)和坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)是最重要的栽培物种。条斑紫菜主要在江苏海域栽培, 坛紫菜则主要栽培于中国浙江、福建等地区。近年来, 海区环境恶化、病原菌侵染以及种质退化等问题, 导致紫菜病害频发, 造成巨大损失。

目前关于紫菜病害的报道多集中于由病原菌引发的紫菜疾病。例如, 在叶状体阶段多发如海洋假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas marina*) Y1 和柠檬假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas citrea*)导致的紫菜绿斑病^[1-2]、由海科贝特菌(*Cobetia marina*)引起的细菌性红烂病^[3]、由紫菜腐霉(*Pythium porphyrae*)导致的赤腐病^[4]、由拟油壶菌(*Olpidiopsis*)导致的拟油壶菌病^[5]和由赤潮所致的缩曲症等^[6]。在紫菜贝壳丝状体育苗期间发

生的由假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas*)引起的黄斑病^[7]和由茎点菌(*Phoma porphyrae*)导致的丝状体白斑病等^[8]。这些研究分离到个别致病菌, 但是在多数情况下, 难以确定这些致病菌是唯一的病原菌^[9]。然而, 紫菜的致病因素除了病原感染之外, 还受到紫菜自身健康状况和环境条件的多重影响。例如, 因光线过强引起的叶状体绿变病^[10]、由于氮缺乏引起的丝状体绿烂病^[11]、由于光线减弱及通风不良引起的丝状体泥红病^[12]。此外, 环境的变化还会改变藻际微生物的组成和功能, 并引发条件致病菌或其他微生物的爆发, 导致或加剧藻体病烂^[13]。随着分子生物技术的提高, 人们更加关注栽培藻类的藻际共附生微生物的研究^[14-15]。沈梅丽等^[16]发现在坛紫菜的不同养殖阶段, 藻际微生物中包括多种与

收稿日期: 2019-07-04 修回日期: 2019-10-24

资助项目: 国家自然科学基金(31772871); 浙江省重大科技专项(2016C02055-6B); 藻类产业技术体系(CARS-50)

通信作者: 杨锐, E-mail: yangrui@nbu.edu.cn

已报道的紫菜致病菌高度相似的菌株,但是未曾引起藻体病烂,并提出致病菌存在与否与病害发生没有必然联系。目前,人们对紫菜生理学的研究多集中于光合生理及抗逆适应等方面,在紫菜高温耐受机理、抗渗透压胁迫、抗紫外辐射等方面进行了基于基因组、代谢组和蛋白组的系统研究,而对紫菜病理学的研究则相对欠缺^[17-19]。对紫菜病害原因及机理认知的缺乏导致难以实施有效的病害防控,成为限制紫菜栽培产业健康发展的短板。

在众多病害中,黄斑病(yellow spot disease)是一种紫菜丝状体育苗阶段常见的严重疾病,会导致紫菜栽培生产的根本性损失。一般认为该病由嗜盐细菌引发,传染性极强。黄斑病一般初见于6月,高发于7、8月。发病初期,在贝壳丝状体边缘出现针头大小的黄色斑点,之后逐渐扩大成黄色斑块,健康和病斑的交界部分则呈现赤褐色,病壳逐渐由红变黄,最后变成白色,该病由此得名。紫菜丝状体黄斑病的案例屡见报道,有研究认为黄斑病是由假交替单胞菌属(*Pseudomonas*)引起的;也有报道认为水温偏高、突降大雨,河道中有机物进入养殖海区等因素是造成紫菜黄斑病的原因,目前关于紫菜黄斑病的报道仅限于病原菌分离与鉴定的层面^[7,20]。本实验从暴发黄斑病的典型患病样本中分离鉴定了菌株*Vibrio mediterranei* 117-T6,证实其可导致坛紫菜丝状体发生黄斑病^[20]。本实验拟通过观察环境对*V. mediterranei* 117-T6生长和感染特性的影响以及该病原菌导致紫菜丝状体生理生化和病理变化,进一步明确由弧菌导致的紫菜丝状体黄斑病的感染特点和病理特征,为该病的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 坛紫菜丝状体及其培养条件

鉴于自由丝状体容易观察,便于操作,本研究采用坛紫菜“浙东1号”自由丝状体(浙江省海洋生物工程重点实验室大型海藻种质库提供)开展实验。

坛紫菜丝状体常规培养 选取色泽鲜红、生长状态良好的自由丝状体,培养温度20℃,pH 8.0±0.2,海水盐度25,光周期12L:12D,光强30 μmol/(m²·s);每天定时摇藻3次,每隔5 d更换一半培养液。培养液为宁大III号营养海水(每

1 000 mL母液分别含100 g/L KNO₃、10 g/L KH₂PO₄、2.5 g/L FeSO₄、0.25 g/L MnSO₄和20 g/L EDTA-Na₂),用0.22 μm微孔滤膜过滤除菌。使用时,将宁大III号母液与灭菌海水以1:1 000(v/v)稀释。

1.2 坛紫菜丝状体除菌处理

坛紫菜自由丝状体放入灭菌海水中,将丝状体藻球用搅拌机打碎至长约200 μm左右的藻丝段,用复合抗生素进行除菌处理^[21](氨苄青霉素终浓度为300 μg/mL、卡那霉素终浓度为100 μg/mL、庆大霉素终浓度为100 μg/mL),避光处理18 h。用灭菌海水清洗紫菜丝状体3次,转入新鲜培养液培养12 h后更换培养液,以彻底去除残留抗生素,再次转入新鲜培养液培养48 h,备用。

1.3 *V. mediterranei* 117-T6及培养条件

菌株*V. mediterranei* 117-T6于2016年分离自罹患黄斑病的条斑紫菜贝壳丝状体,保存于浙江省海洋生物工程重点实验室。保藏菌种于室温下解冻后接种于100 mL TSB培养基,在28℃,110 r/min的摇床中活化12 h。扩培条件与活化条件一致,培养过夜后,离心去除培养液,再用灭菌海水悬浮洗涤离心3次。以平板菌落计数法计算菌悬液浓度,调整菌悬液浓度为10⁸ CFU/mL左右,备用。感染实验按菌液:培养液=1:10的比例接种菌液。感染条件根据实验设计而异。

1.4 环境因子对*V. mediterranei* 117-T6生长的影响

在温度(15、20、25、30、35℃)、pH(6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)和盐度(10、15、20、25、30)水平上设计单因子实验,培养8 h后,用比色法测定OD₆₀₀的吸光度,分析环境因子对*V. mediterranei* 117-T6生长的影响。以不加菌的培养基为参照。

1.5 环境因子影响*V. mediterranei* 117-T6感染特性的响应面分析

根据“1.4”的结果并结合紫菜丝状体的实际生长条件,设计环境因子的响应面分析实验(表1)。观察并统计藻丝的死亡率。根据结果筛选最易感染条件。

1.6 易感条件下*V. mediterranei* 117-T6感染坛紫菜丝状体的生理生化参数检测

将200 mL无菌营养海水加至500 mL的三角瓶中,接种0.2 g处理过的坛紫菜自由丝状体与

表 1 响应面实验因素水平表

Tab. 1 Factors and levels of RSA test

因素 factor	编码 No.	水平 level		
		-1	0	1
温度/°C temperature	A	20	25	30
盐度 salinity	B	15	25	35
pH	C	6.0	7.0	8.0

20 mL约 10^8 CFU/mL的菌株 *V. mediterranei* 117-T6, 设置3个平行。根据1.5的实验结果确定最易感染条件为: 30 °C, pH6.0, 盐度20, 光强30 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 光周期12L:12D。以经抗生素处理的坛紫菜自由丝状体为对照, 培养条件与感染组相同。分别于0、6、12、24、36、48、72 h取样, 测定相关参数。以下所有实验参数测定均设置3个平行, 4次重复。

坛紫菜自由丝状体的Evan's Blue染色与光镜观察 取适量坛紫菜丝状体, 用Evan's Blue避光染色8 min后, 洗去染色液, 400×光学显微镜下观察并拍照记录。被染成蓝色的丝状体为死亡细胞, 不变色的为健康藻丝。通过计算同一视野下蓝色藻丝的比例确定藻体的死亡率。每次观察20个以上视野。

坛紫菜自由丝状体生理生化指标测定 采用南京建成生物科技公司的T-SOD试剂盒(A001-1, 羟胺法), POD测定试剂盒(A084-3, 比色法)测定超氧化物歧化酶活性(superoxidie dismutase, SOD)和过氧化物酶(peroxidase, POD)活性, 按产品说明书进行操作。藻红蛋白(R-phycoerythrin, RPE)、藻蓝蛋白(R-phyocyan, RPC)和别藻蓝蛋白(allo-phyocyan, APC)含量测定参考文献^[13]的方法。叶绿素a(Chlorophyll a, *Chl. a*)含量测定参考文献^[22]方法。可溶性蛋白(soluble protein)含量测定采用考马斯亮蓝G250法。游离脯氨酸(free proline, Pro)含量测定采用茚三酮法。丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量测定采用硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)比色法。

1.7 数据统计与分析

数据采用Excel 2010、Design-expert-10.0、Origin 2019(中文版)和SPSS 17.0统计软件进数据处理及统计分析, 采用单因素及多因素方差(One-Way ANOVA, Multi-Factor ANOVA)和t-test分析, 以 $P < 0.05$ 为显著水平。

2 结果

2.1 环境因子对 *V. mediterranei* 117-T6生长的影响

当培养温度介于15 °C至30 °C范围内时, *V. mediterranei* 117-T6的生物量随着培养温度的升高而上升, 但在培养温度为35 °C时, *V. mediterranei* 117-T6的生物量迅速下降, 甚至低于25 °C的数值(图1-a)。*V. mediterranei* 117-T6在偏碱性培养条件下较在酸性培养条件下生长得更好, 且有显著性差异($P < 0.05$)(图1-b)。菌株 *V. mediterranei* 117-T6表现出嗜盐细菌的明显特征。当盐度为10时, 菌株的生长速率较低; 随着盐度增高, 菌株的生长也迅速提升($P < 0.05$); 当盐度大于20时, 各组菌株的生长情况无明显差别($P > 0.05$)(图1-c)。通过One-Way ANOVA分析发现温度、pH和盐度的改变均能显著影响 *V. mediterranei* 117-T6的生长。

2.2 环境因子影响 *V. mediterranei* 117-T6感染性的响应面分析

预测值K对编码自变量的A、B、C的二次多项回归方程: $K = 84.33 + 4.58 \times A - 1.46 \times B - 4.38 \times C + 0.000 \times A \times B + 1.67 \times A \times C + 3.75 \times B \times C + 6.79 \times A^2 - 4.46 \times B^2 - 0.29 \times C^2$ (表2, 图2)。

多因素方差分析结果显示该模型差异显著($P = 0.0217$), 获得的最优实验点为: 30 °C、pH 6.0、盐度19.16, 该条件即为最易感染条件。以此条件作为后续观察与实验的感染条件(出于操作考虑, 盐度设定为20)。在25 °C、pH 8.0、盐度35的条件下, 丝状体的死亡率最低。3种环境因子对 *V. mediterranei* 117-T6感染坛紫菜自由丝状体能力的影响程度为温度>pH>盐度。

2.3 易感条件下 *V. mediterranei* 117-T6对坛紫菜丝状体感染的观察

在易感条件下, *V. mediterranei* 117-T6在较短时间内即可导致坛紫菜丝状体细胞死亡(图版)。*V. mediterranei* 117-T6感染坛紫菜自由丝状体24 h后染色, 光镜下即可观察到紫菜丝状体细胞呈明显蓝色, 48 h时, 藻细胞死亡率超过65%, 到72 h丝状体细胞死亡率超过85%。

2.4 易感条件下 *V. mediterranei* 117-T6对坛紫菜丝状体生理生化的影响

SOD和POD是植物体内的活性氧清除酶,

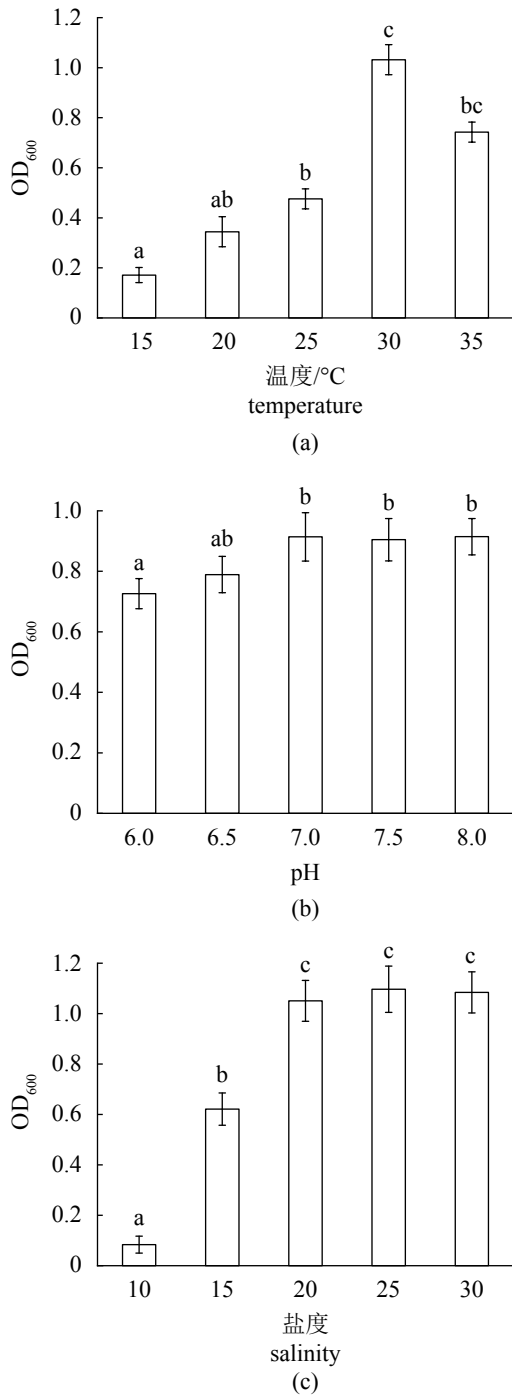


图1 *V. mediterranei* 117-T6 在不同培养条件下培养 8 h 后在 600 nm 处的 OD 值

(a) 培养基温度不同 (pH 7, 盐度 30); (b) 培养 pH 值不同 (28 °C, 盐度 30); (c) 培养基盐度不同 (28 °C, pH 7)

Fig. 1 OD₆₀₀ of medium after 8 hours of incubation under different culture conditions

(a) five different temperatures (pH 7, salinity 30), (b) five different pH values (28 °C, salinity 30), (c) five different salinities (28 °C, pH 7)

该酶系统的动态变化反映了植物机体的抗性。一般来讲, SOD 活性与植物抗氧化能力呈正相

表 2 响应面实验设计及数据处理

Tab. 2 Program and results of RSA test

编号 No.	A	B	C	死亡率/% death rate
1	0	-1	1	73.33
2	0	-1	-1	93.33
3	1	0	-1	95.00
4	-1	1	0	81.67
5	-1	0	-1	91.67
6	0	1	1	73.33
7	-1	0	1	83.33
8	-1	-1	0	80.00
9	0	1	-1	78.33
10	1	0	1	93.33
11	1	1	0	93.33
12	1	-1	0	91.67
13	0	0	0	81.67
14	0	0	0	83.33
15	0	0	0	83.33
16	0	0	0	86.67
17	0	0	0	78.33

关。易感条件下, 感染组和对照组的 SOD 酶活性 (图 3-a) 在 12 h 时均显著升高 ($P < 0.05$), 且 6~72 h 的感染组 SOD 酶活性显著高于对照组。感染组和对照组样品的 POD 酶活性整体呈先上升后下降的趋势 (图 3-b), POD 酶活性显著上升 ($P < 0.05$), 在 12 h 达到最高, 24 h 后虽显著下降 ($P < 0.05$), 但下降后的酶活依旧高于对照组。对照组 6 h 的酶活显著上升, 高于感染组, 但 12 h 后 POD 酶活均显著低于感染组 ($P < 0.05$)。结果显示, 感染组坛紫菜的抗氧化酶表现出更高的活性以应对更强烈的活性氧胁迫。

藻胆蛋白是水溶性色素蛋白, 存在于红藻、蓝藻、隐藻和某些甲藻体内, 是这些藻类特有的捕光色素, 是鉴定紫菜品质优良的重要指标。本实验中, *V. mediterranei* 117-T6 在感染初期对坛紫菜藻胆蛋白的合成有一定的刺激作用。感染组和对照组中 3 种藻胆蛋白 (RPE、RPC、APC) 的含量都是先升后降 (图 4)。感染组的 RPE、RPC、APC 含量在 6 h 到 72 h 均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 且藻胆蛋白 RPE、RPC、APC 含

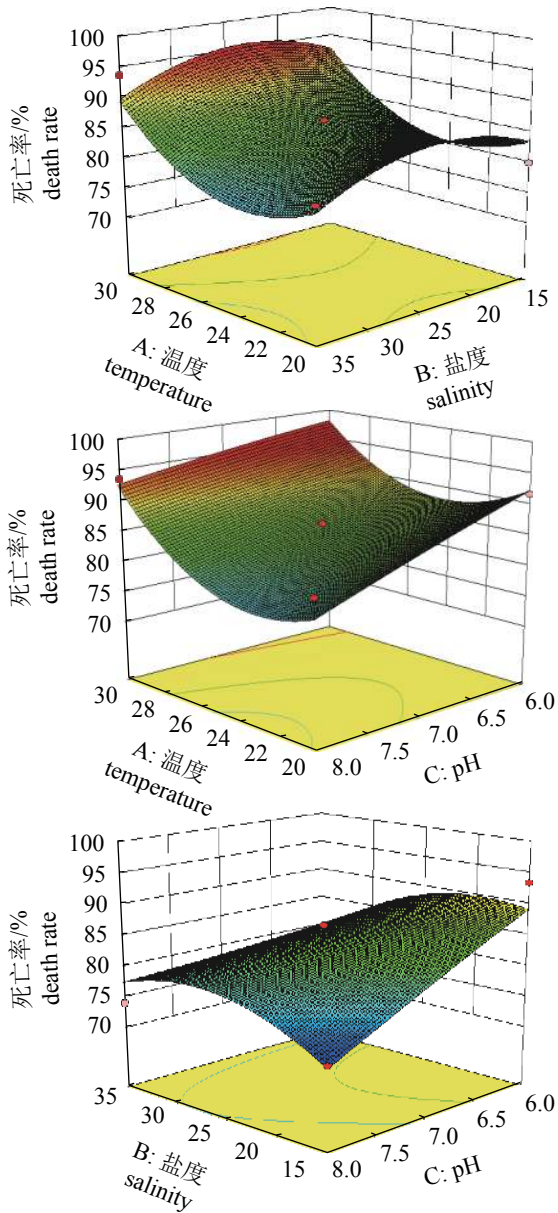


图2 响应面法立体分析图

Fig. 2 Stereo analysis of RSM

量均在12 h达到峰值。

叶绿素是紫菜叶绿体的主要色素,也是光合作用过程中最重要的光合色素。感染组的 $Chl. a$ 含量总体呈先降后升再降的趋势,而对照组的 $Chl. a$ 含量随时间变化呈下降趋势(图4-d)。在6 h到72 h,感染组和对照组的 $Chl. a$ 含量差异显著($P<0.05$),其中6 h、12 h感染组的 $Chl. a$ 含量显著低于对照组,在24 h达到峰值后感染组的 $Chl. a$ 含量一直显著高于对照组。

可溶性蛋白是一种重要的渗透调节物质和营养物质,它的积累和增加能够提高细胞的保

水能力,起到保护细胞生命物质以及生物膜的作用。感染组和对照组的可溶性蛋白含量总体呈现先增后减的趋势(图5)。感染组和对照组的可溶性蛋白含量在12到48 h存在显著性差异($P<0.05$)。除48 h外,感染组的可溶性蛋白含量均显著高于对照组。处理12 h后感染组和对照组的可溶性蛋白含量显著性增加,达到最高值。

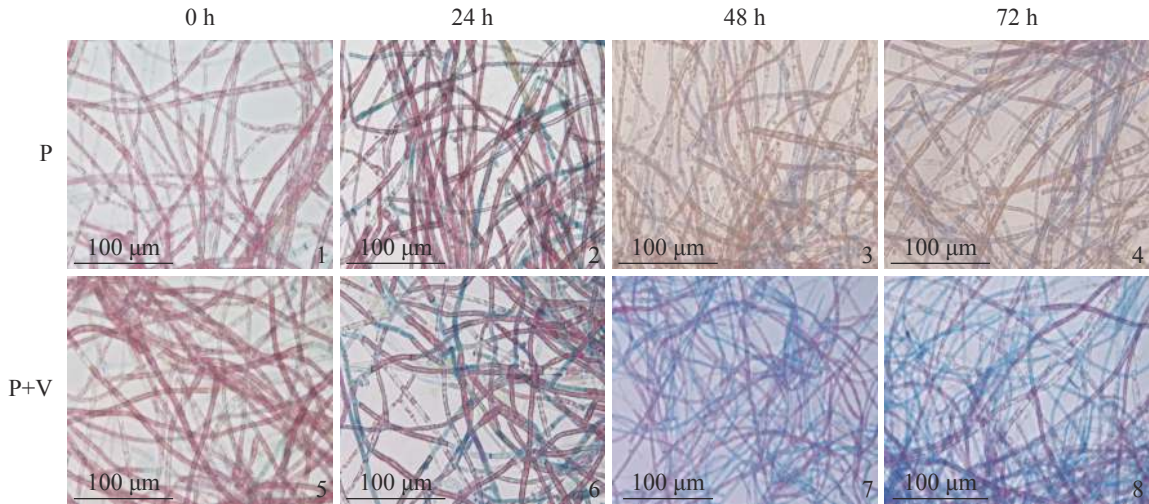
游离脯氨酸含量的多少与植物所受环境胁迫正相关,是植物细胞重要的渗透调节物质之一。感染组和对照组的Pro含量变化显著($P<0.05$),总体趋势是先升后降,在12 h达到峰值。除了48 h,感染组的Pro含量均高于对照组,其余时间,感染组的Pro含量均有高于对照组($P<0.05$)(图6)。

MDA是衡量膜脂过氧化程度的一个重要指标,MDA能强烈地与细胞内各种成分发生反应,从而严重损伤细胞内酶和细胞膜,降低膜电阻及膜的流动性,最终破坏内膜系统的结构及功能。感染组的MDA含量均呈先升后降的总趋势,变化显著($P<0.05$)(图7)。处理6 h后,紫菜体内的MDA含量达到峰值,感染组的MDA含量在48 h前均高于对照,之后下降到对照组之下。

在致病菌感染过程中,坛紫菜丝状体的 $Chl. a$ 含量随着培养时间的延长先降后升再下降,超氧化物歧化酶和过氧化物酶的活性,藻胆蛋白、可溶性蛋白、游离脯氨酸、丙二醛等含量均随着感染时间的延长先升后降。这表明细菌感染导致藻体出现了应激性生理反应,而且随着感染时间的延长,藻体各方面机能全面下降,最终死亡。

3 讨论

弧菌属于 γ -变形菌纲(γ -proteobacteria),是海洋环境中常见的一类重要的革兰氏阴性细菌^[23]。弧菌病是全球性的细菌性疾病,对海水养殖动植物造成严重危害,死亡率极高,经济损失严重^[24-25]。关于海洋弧菌引发的藻类病害也多有报道。Tanwar等^[26]报道弧菌和假交替单胞菌是导致江蓠白条病发生的条件致病菌。Wang等^[27]研究表明弧菌可能是海带孔烂病的潜在致病菌。韩晓娟等^[28]证实弧菌X5能够引起坛紫菜绿斑病。地中海弧菌*V. mediterranei*于1992年首次报道,该细菌能够引起珊瑚白化,对人和动物无害^[29]。本课题组首次报道了由*V. mediterranei* 117-T6引起的紫菜黄斑病^[20],发现该菌株可导致紫菜自由丝



图版 易感条件下，坛紫菜自由丝状体光镜观察

“P+V”表示感染组，“P”表示对照组；下同：蓝色藻丝为死的藻细胞

Plate Microscopic observation of free living conchocelis filaments of *P. haitanensis* under susceptible conditions

"P" represents the control group , "P+V" represents the infected group,; the same below: blue falements represents dead algae cells

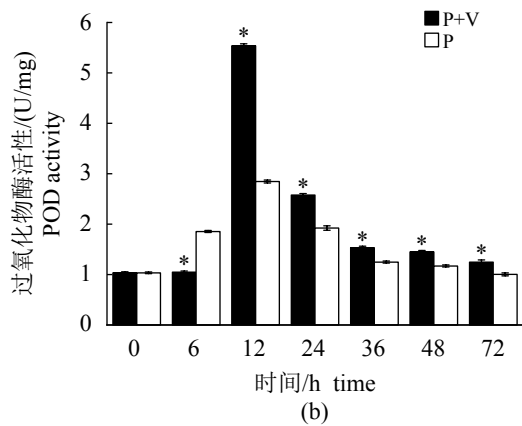
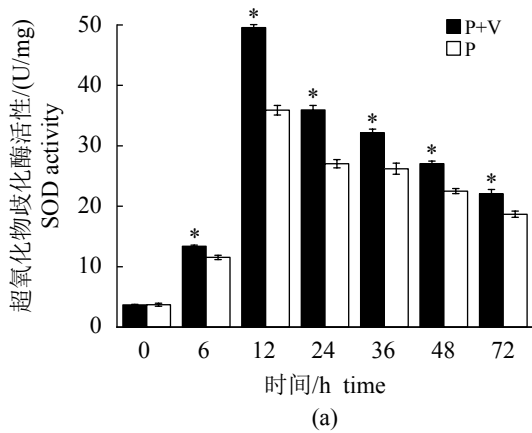


图 3 感染条件下紫菜的抗氧化酶活性

“*”表示同一时间点不同处理之间差异显著(P<0.05)

Fig. 3 Activity of a-SOD, b-POD in *P. haitanensis* when infected with *V. mediterranei* 117-T6

“*” means the difference between different treatments is significant(P<0.05)

状体空胞化，呈现病态。本研究显示由该弧菌导致的紫菜黄斑病，会引起丝状体内活性氧胁迫增强，渗透势改变，代谢紊乱等病理反应；藻体在短期内调动了抗氧化酶活性清除氧自由基，提高可溶性蛋白、游离Pro和MDA等渗透调节物质以及光合色素系统的合成。这表明在微生物感染初期藻体会进行胁迫应答试图完成机体的自我修复。然而，当胁迫条件激烈或随着胁迫时间的延长，紫菜丝状体的各生理机能明显下降，表明藻体的防御和修复能力难以维系，因而逐渐衰败并很快腐烂。这与高等植物受病原菌侵染后，体内的抗氧化酶系统、光合作用系统、渗透调节系统等表现的抗病反应相类似^[30]。

环境对微生物的影响是迅速而强烈的，如温度、pH、无机盐和有机碳影响着水体中微生物的种群分布，在水体环境发生改变的情况下，藻类表面菌群组成与数量也会发生极大改变^[31-32]。本研究显示，高温和酸化都会大大提高弧菌 *V. mediterranei* 117-T6 的生物量及其感染能力，其中温度对其致病性的影响最为显著。温度是影响海洋细菌的重要因素^[33]。紫菜的藻际微生物的多样性会随环境、藻种、藻体状态、养殖季节的变化而产生差异^[16]，并且高温会改变紫菜藻际细菌的生态功能，使适宜条件下的益生菌加剧藻体病烂^[13, 34]。同时，酸化也会影响藻际细菌的功能，宋丹丹等^[35]发现环境中假交替单胞

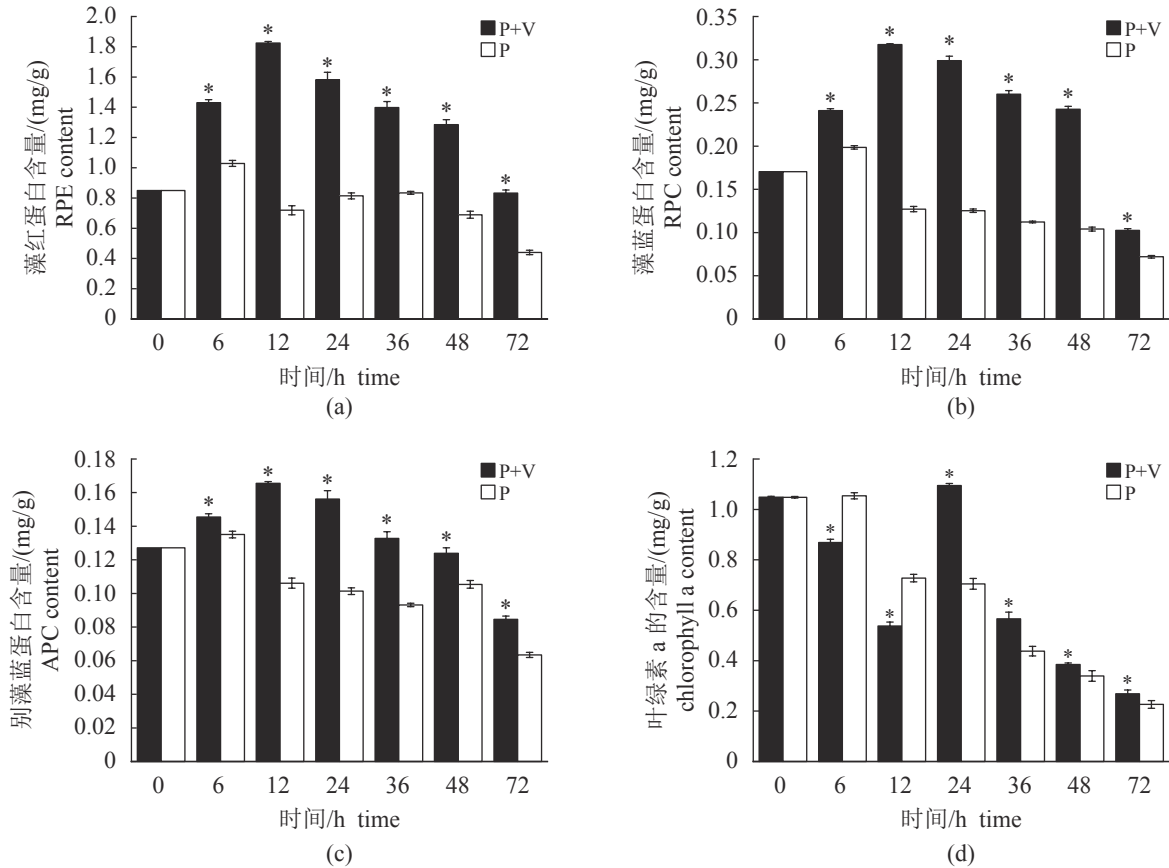


图4 感染条件下紫菜的光合色素含量

(a) 藻红蛋白含量, (b) 藻蓝蛋白含量, (c) 别藻蓝蛋白含量, (d) 叶绿素a含量

Fig. 4 Content of photosynthetic pigments in *P. haitanensis* when infected with *V. mediterranei* 117-T6

(a) phycoerythrin content, (b) phycocyanin content, (c) allophycocyanin content, (d) chlorophyll a content

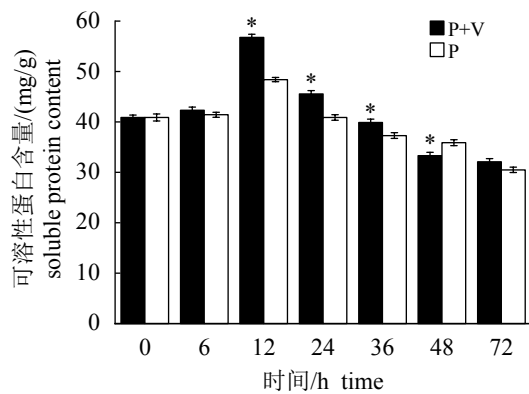


图5 感染条件下紫菜的可溶性蛋白含量

Fig. 5 Content of soluble protein in *P. haitanensis* when infected with *V. mediterranei* 117-T6

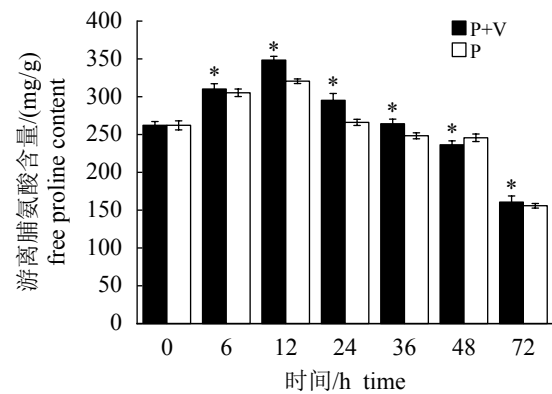


图6 感染条件下紫菜的游离脯氨酸含量

Fig. 6 Content of Pro in *P. haitanensis* when infected with *V. mediterranei* 117-T6

菌对颗石藻生长及钙化的抑制远大于海水pH降低等非生物因素的影响。Kamjunke^[36]发现低温下在菌藻共培养体系中, 细菌与藻类生物量均会增加, 而高温则会使细菌生物量增加而藻类生

物量减少, 推测可能原因为温度升高导致微生物与藻类竞争水中有机质的营养。Mo^[37]和Qiu^[38]等均证实环境变化与藻体发病有着密不可分的关系。综合考虑环境变化与疑似致病菌的相互

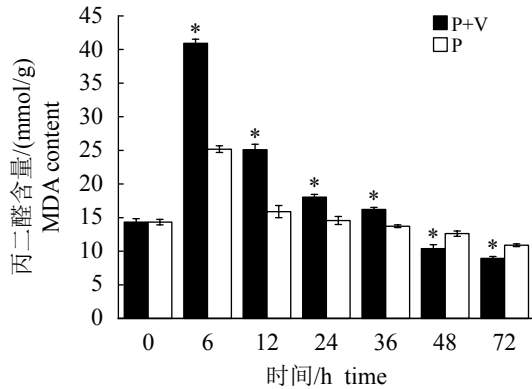


图7 感染条件下紫菜的丙二醛含量

Fig. 7 Content of MDA in *P. haitanensis* when infected with *V. mediterranei* 117-T6

作用, 检测不同环境条件对致病细菌感染特性及其对藻体生理变化的影响, 对于合理解释紫菜丝状体黄斑病的病因是必要的。

病害的发生及危害程度不仅取决于病原菌, 还受宿主本身和环境条件的影响^[39]。除了能增强致病菌本身的活性之外, 高温还减弱了寄主的抵抗力, 且长时间的高温胁迫会使藻体形成不可恢复的损伤^[40-41], 病原与环境的双重胁迫导致或加剧了藻体的病烂。本研究中, 在高温、酸性、低盐等易感条件下, 紫菜自身的生长情况变差, 生理代谢被抑制, 抵抗力减弱; 而这些环境更适宜菌株生活, 环境与微生物的双重胁迫大大增加了紫菜患病的可能, 导致并加剧藻类病烂。

综上, 紫菜黄斑病是由于致病菌和环境双重作用引发并逐步发展的, 我们应从环境和致病菌两个方面开展对紫菜黄斑病的综合治理。

参考文献:

- [1] 李杰, 牟宗娟, 杨慧超, 等. 条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)绿斑病病原菌的分离鉴定[J]. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 140-146.
- Li J, Mou Z J, Yang H C, et al. Isolation and identification the pathogen of *Pyropia yezoensis* green spot disease[J]. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(4): 140-146(in Chinese).
- [2] 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.
- Yan Y, Ma J H, Xu P, et al. *Pseudoalteromonas citrea*, the causative agent of green-spot disease of *Porphyra yezoensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2002, 9(4): 353-358(in Chinese).
- [3] 黄林彬, 严兴洪. 紫菜叶状体的红烂病研究[J]. 上海海洋大学学报, 2010, 19(2): 226-231.
- Huang L B, Yan X H. Study on the red-rotting disease of *Porphyra* blades[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2010, 19(2): 226-231(in Chinese).
- [4] Park C S, Kakinuma M, Amano H. Detection and quantitative analysis of zoospores of *Pythium porphyrae*, causative organism of red rot disease in *Porphyra*, by competitive PCR[J]. Journal of Applied Phycology, 2001, 13(5): 433-441.
- [5] Sekimoto S, Yokoo K, Kawamura Y, et al. Taxonomy, molecular phylogeny, and ultrastructural morphology of *Olpidiopsis porphyrae* sp. nov. (Oomycetes, Straminipiles), a unicellular obligate endoparasite of *Bangia* and *Porphyra* spp. (Bangiales, Rhodophyta)[J]. Mycological Research, 2008, 112(3): 361-374.
- [6] 马家海, 张礼明, 吉传礼, 等. 条斑紫菜缩曲症的研究[J]. 中国水产科学, 1999, 6(2): 82-88.
- Ma J H, Zhang L M, Ji C L, et al. Studies on crape disease of *Porphyra yezoensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1999, 6(2): 82-88(in Chinese).
- [7] 王洪斌, 李信书, 夏亚明, 等. 条斑紫菜丝状体黄斑病病原体分离鉴定及生物学特性研究[J]. 海洋环境科学, 2011, 30(3): 361-364.
- Wang H B, Li X S, Xia Y M, et al. Isolation, identification and biological pathogen of yellow spot disease in conchocelis of *Porphyra yezoensis*[J]. Marine Environmental Science, 2011, 30(3): 361-364(in Chinese).
- [8] Guan X Y, Li J B, Zhang Z, et al. Characterizing the microbial culprit of white spot disease of the conchocelis stage of *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta)[J]. Journal of Applied Phycology, 2013, 25(5): 1341-1348.
- [9] 盖珊珊, 张伟东. 基于第二代测序技术的条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)贝壳丝状体附生菌群研究[J]. 海洋与湖沼, 2016, 47(5): 990-996.
- Gai S S, Zhang W D. Microbiota of shell-boring conchocelis of *Pyropia yezoensis* determined by the next-generation sequencing[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2016, 47(5): 990-996(in Chinese).
- [10] 徐丽宁, 杨锐. 紫菜病害及防治[J]. 水利渔业, 2005, 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- 25(6): 103-105.
- Xu L N, Yang R. Laver diseases and control methods[J]. *Reservoir Fisheries*, 2005, 25(6): 103-105(in Chinese).
- [11] 贲秀林. 条斑紫菜丝状体培育的病害及防治[J]. *水产养殖*, 2007, 28(1): 43-44.
- Ben X L. Diseases and control of *Pyropia yezoensis* filament culture[J]. *Journal of Aquaculture*, 2007, 28(1): 43-44(in Chinese).
- [12] 于本淑. 紫菜丝状体的病害防治[J]. *齐鲁渔业*, 2002(2): 17.
- Yu B H. Disease control of *Pyropia* filaments[J]. *Shandong Fisheries*, 2002(2): 17(in Chinese).
- [13] 杨华田, 熊玉琴, 杨锐. 高温下芽孢杆菌对坛紫菜生长及生理的影响[J]. *水产学报*, 2018, 42(7): 1009-1018.
- Yang H T, Xiong Y Q, Yang R. Effects of *Bacillus* sp. on *Pyropia haitanensis* at high temperature[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(7): 1009-1018(in Chinese).
- [14] 杨锐, 方文雅, 单媛媛, 等. 条斑紫菜外生细菌的遗传多样性[J]. *海洋学报*, 2008, 30(4): 161-168.
- Yang R, Fang W Y, Shan Y Y, *et al.* Genetic diversity of epiphytic bacteria in *Porphyra yezoensis*[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2008, 30(4): 161-168(in Chinese).
- [15] 武洪庆. 不同养殖海藻表面附着细菌多样性分析[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2012.
- Wu H Q. Epibacterial community structure of several macroalgae[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2012 (in Chinese).
- [16] 沈梅丽, 杨锐, 骆其君, 等. 坛紫菜养殖周期中的藻际微生物多样性[J]. *微生物学报*, 2013, 53(10): 1087-1102.
- Shen M L, Yang R, Luo Q J, *et al.* Microbial diversity of *Pyropia haitanensis* phycosphere during cultivation[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(10): 1087-1102(in Chinese).
- [17] Brawley S H, Blouin N A, Ficko-Blean E, *et al.* Insights into the red algae and eukaryotic evolution from the genome of *Porphyra umbilicalis* (Bangiophyceae, Rhodophyta)[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(31): E6361-E6370.
- [18] Chen J J, Li M, Yang R, *et al.* Profiling lipidome changes of *Pyropia haitanensis* in short-term response to high-temperature stress[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(3): 1903-1913.
- [19] Xu Y, Chen C S, Ji D H, *et al.* Proteomic profile analysis of *Pyropia haitanensis* in response to high-temperature stress[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2014, 26(1): 607-618.
- [20] Liu Q Q, Xu M Y, He Y Y, *et al.* Complete genome sequence of *Vibrio mediterranei* 117-T6, a potentially pathogenic bacterium isolated from the conchocelis of *Pyropia* spp. [J]. *Microbiology Resource Announcements*, 2019, 8(3): e01569-18.
- [21] 周金梅, 杨锐, 方文雅, 等. 坛紫菜叶状体的无菌化培养及其应用[J]. *生物学杂志*, 2012, 29(3): 83-87.
- Zhou J M, Yang R, Fang W Y, *et al.* Study on the axenic culture and application of *Porphyra haitanensis* thallus[J]. *Journal of Biology*, 2012, 29(3): 83-87(in Chinese).
- [22] 刘露, 丁柳丽, 陈伟洲, 等. 不同温度下CO₂浓度增高对坛紫菜生长和叶绿素荧光特性的影响[J]. *生态学报*, 2013, 33(13): 3916-3924.
- Liu L, Ding L L, Chen W Z, *et al.* The combined effects of increasing CO₂ concentrations and different temperatures on the growth and chlorophyll fluorescence in *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta)[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(13): 3916-3924(in Chinese).
- [23] Thompson F L, Iida T, Swings J. Biodiversity of Vibrios[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68(3): 403-431.
- [24] Yin J F, Wang M Y, Chen Y J, *et al.* Direct detection of *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio alginolyticus* from Clinical and environmental samples by a multiplex touchdown polymerase chain reaction Assay[J]. *Surgical Infections*, 2018, 19(1): 48-53.
- [25] Li M F, Wang C L, Sun L. A pathogenic *Vibrio harveyi* lineage causes recurrent disease outbreaks in cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and induces apoptosis in host cells[J]. *Aquaculture*, 2011, 319(1-2): 30-36.
- [26] Tanwar N, Singh R P, Das A K, *et al.* The occurrence of bleaching stripe disease in *Gracilaria corticata* and controlling of the disease using quorum quenching approach[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2013, 346(2): 155-155.
- [27] Wang G G, Shuai L, Li Y, *et al.* Phylogenetic analysis of epiphytic marine bacteria on Hole-Rotten diseased

- sporophytes of *Laminaria japonica*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2008, 20(4): 403-409.
- [28] 韩晓娟, 茅云翔, 李杰, 等. 一株引起坛紫菜绿斑病病原的分离鉴定及致病性研究[J]. *水产学报*, 2015, 39(11): 1721-1729.
- Han X J, Mao Y X, Li J, *et al.* Identification and pathogenicity of a novel pathogen causing green rot disease in *Porphyra haitanensis*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(11): 1721-1729(in Chinese).
- [29] Kushmaro A, Rosenberg E, Fine M, *et al.* Bleaching of the coral *Oculina patagonica* by *Vibrio* AK-1[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1997, 147: 159-165.
- [30] Song H M, Wang H Z, Xu X B. Overexpression of *AtHsp90.3* in *Arabidopsis thaliana* impairs plant tolerance to heavy metal stress[J]. *Biologia Plantarum*, 2012, 56(1): 197-199.
- [31] Sunagawa S, Coelho L P, Chaffron S, *et al.* Structure and function of the global ocean microbiome[J]. *Science*, 2015, 348(6237): 1261359.
- [32] Ghiglione J F, Palacios C, Marty J C, *et al.* Role of environmental factors for the vertical distribution (0-1000 m) of marine bacterial communities in the NW Mediterranean Sea[J]. *Biogeosciences*, 2008, 5(6): 1751-1764.
- [33] Kritzberg E S, Arrieta J M, Duarte C M. Temperature and phosphorus regulating carbon flux through bacteria in a coastal marine system[J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2010, 58(2): 141-151.
- [34] Xiong Y Q, Yang R, Sun X X, *et al.* Effect of the epiphytic bacterium *Bacillus* sp. WPySW2 on the metabolism of *Pyropia haitanensis*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2018, 30(2): 1225-1237.
- [35] 宋丹丹, 杨锐, 任继锐, 等. 环境pH值和假交替单胞菌对颗石藻的影响[J]. *生物学杂志*, 2014, 31(5): 50-54.
- Song D D, Yang R, Ren J R, *et al.* Effects of environmental pH and *Pseudoalteromonas* sp. NPyS3 on the *Pleurochrysis carterae*[J]. *Journal of Biology*, 2014, 31(5): 50-54(in Chinese).
- [36] Kamjunke N. Temperature affects the response of heterotrophic bacteria and mixotrophic algae to enhanced concentrations of soil extract[J]. *Hydrobiologia*, 2010, 649(1): 379-383.
- [37] Mo Z L, Li S F, Kong F N, *et al.* Characterization of a novel fungal disease that infects the gametophyte of *Pyropia yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta)[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(1): 395-404.
- [38] Qiu L P, Mao Y X, Tang L, *et al.* Characterization of *Pythium chondricola* associated with red rot disease of *Pyropia yezoensis* (Ueda) (Bangiales, Rhodophyta) from Lianyungang, China[J]. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2019, 37(3): 1102-1112.
- [39] Scholthof K B G. The disease triangle: Pathogens, the environment and society[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5(2): 152-156.
- [40] Alker A P, Smith G W, Kim K. Characterization of *Aspergillus sydowii* (Thom et Church), a fungal pathogen of Caribbean sea fan corals[J]. *Hydrobiologia*, 2001, 460(1-3): 105-111.
- [41] Luo Q J, Zhu Z G, Zhu Z J, *et al.* Different responses to heat shock stress revealed heteromorphic adaptation strategy of *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta)[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e94354.

Yellow spot disease in *Pyropia* species infected by *Vibrio mediterranei* 117-T6

XU Mengya, YANG Rui*, LIU Qiqin, HE Yingyun, CHEN Haimin

(Key Laboratory of Marine Biotechnology of Zhejiang Province, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: *Pyropia* species were the most popular algae cultivated in China with great commercial importance. Yellow spot disease (YSD) was a high-incidence infectious disease in the conchocelis filament sporing stage of *Pyropia*, which seriously affects the production. In this paper, the free living conchocelis filament of *Pyropia haitanensis* were infected by *Vibrio mediterranei* 117-T6, a YSD pathogen. The effects of environmental factors on the growth of the strain and its infectious ability were studied. The activities of SOD, POD and the contents of phycobiliprotein, chlorophyll a (*Chl. a*), soluble protein, free proline (Pro) and malondialdehyde (MDA) in the algae were measured under susceptible infectious conditions. The results showed that the optimum growth conditions of *V. mediterranei* 117-T6 were 30 °C, pH 7.0 and salinity 20, while the most susceptible infectious conditions were temperature 30 °C, pH 6.0 and salinity 20. After it was infected by *V. mediterranei* 117-T6 under the susceptible infectious conditions for 12 hours, the activity of SOD, POD, the content of phycobiliprotein, soluble protein and free proline in *P. haitanensis* conchocelis filaments were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). The content of MDA reached the highest value at 6 hours and was significantly higher than that in the control ($P < 0.05$). After being infected for 24 hours, the content of Chl a in the infectious group achieved the highest, which was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). The study showed that in a short period, *V. mediterranei* 117-T6 could stimulate the algae to produce stress-response reactions. However, with the extension of the infection, the reactive oxygen species and osmotic pressure in the algae caused by pathogen increased and finally could lead to the death of *Pyropia*. Adverse environmental factors such as high temperature and acidification can exacerbate the infectious ability of *V. mediterranei* 117-T6, and the secondary factors were temperature, pH and salinity. The results suggested that the comprehensive treatment of *Pyropia* YSD should be carried out from the two aspects: the environment and the pathogenic bacteria.

Key words: *Pyropia haitanensis*; *Vibrio mediterranei*; environmental factors; pathology

Corresponding author: YANG Rui. E-mail: yangrui@nbu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31772871); Major Science and Technology Projects of Zhejiang Province (2016C02055-6B); Algae Industry Technology System (CARS-50)