

文章编号: 1000-0615(2001)04-0355-05

褐藻酸降解菌诱发海带病烂的组织细胞学观察

杨震¹, 唐学玺¹, 严小军²

(1. 青岛海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 2. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 用褐藻酸降解菌对海带进行人为感染, 经培养使其产生烂斑, 通过组织显微切片观察表明: 1. 褐藻酸降解菌首先侵入内皮层, 然后再逐渐侵入到外皮层、髓部和表皮, 最终导致海带病烂。2. 感染后内皮层伤害最重, 其次是外皮层和髓部, 表皮的伤害最轻。3. 浸染海带内皮层的细胞中, 有大量颗粒状储藏物质, 其直径范围在 1.5~4.0 μm 之间, 平均直径为 2.7 μm。形状为椭圆或圆形。

关键词: 海带; 褐藻酸降解菌; 病烂; 组织细胞学

中图分类号: S917, S946.1 文献标识码: A

Histology and cytology observation on the rot disease of *Laminaria japonica* caused by alginic acid decomposing bacteria

YANG Zhen¹, TANG Xue-xi¹, YAN Xiao-jun²

(1. College of Marine Life Science, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China;

2. Institute of Oceanology, CAS, Qingdao 266071, China)

Abstract: The changes of histology and cytology in *Laminaria japonica* were studied by artificial infection and microscopic observation. The results showed as follows: 1. The endodermis was infected firstly by alginic acid decomposing bacteria; the exodermis, pith and epidermis were infected later. 2. The damage of endodermis was heaviest, exodermis and pith were damaged less heavily, and the effect of alginic acid decomposing bacteria on epidermis was least remarkable. 3. a lot of storage material was accumulated in endodermic cells of infected laminaria japonica compared with control; the diameter of storage particles was from 1.5 μm to 4.0 μm, and the average value was 2.7 μm.

Key words: *Laminaria japonica*; alginic acid decomposing bacteria; rot disease; histology and cytology

海带(*Laminaria japonica*)属于亚寒带藻类,是海洋植物中一类产量高、生长快、个体大、经济价值高的食用及工业用的大型海藻^[1]。随着人工养殖海带规模的不断扩大,海带病害问题表现得越来越突出,不仅严重影响了海带的规模生产,也给生产造成了很大的损失。多年来,科技工作者为解决海带病烂问题作了大量的工作^[2],从中我们不难看出,海带的病烂是由多方面引起的,致病的原因也非常复杂,其中微生物作用是不可忽视的重要因素之一。陈勇等^[3,4]通过一系列实验表明,褐藻酸降解菌(Alginic acid decomposing bacteria)是海带藻体上的主要附生细菌,而且在特定条件下参与海带的腐烂过程,导致烂苗

收稿日期: 2000-10-20

基金项目: 国家“973”资助项目(G1999012004)

第一作者: 杨震(1960-),男,上海市人,高级工程师,主要从事养殖生态学 Research. Tel: 0532-2032952. <http://www.cnki.net>

或掉苗。本实验用褐藻酸降解菌对正常海带进行人为感染,通过组织显微切片观察,比较感染海带各组织内细胞结构的变化,感染菌存在的位置及菌量,褐藻酸降解菌对海带组织的影响,分析海带病烂的原因,这对研究海带病烂的发生机制、提出更加合理的防治措施都有所裨益。我们在研究褐藻酸降解菌引起海带病烂问题的过程中,发现了位于内皮层细胞的储藏颗粒,并对此进行了初步探讨,以企为研究褐藻酸降解菌引起海带病烂发生的生物学研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用海带于2000年3月初采于日照海水养殖场。长度约1~1.5m,介于凹凸期与脆嫩期之间。选取完好的中带部备用。实验所用褐藻酸降解菌由青岛海洋大学海洋生命学院生态毒理实验室提供。

1.2 处理材料

用灭过菌的棉球沾取无菌海水擦洗海带中带部小切块,反复多次再经无菌水漂洗后,置于灭菌培养皿中待用。取灭过菌的小刀在海带块上划2mm左右的刀口,然后取褐藻酸降解菌接种到海带划伤处,加入适量的无菌海水并置于无光线直射处静置培养。

1.3 取材、固定、制片、染色

实验组:取海带上的有绿烂、白烂处,大小:3mm×3mm。对照组:取未接菌处的正常海带,大小同上。固定液:卡诺氏液(纯酒精:冰醋酸=3:1),固定时间:3h。将固定好的材料参照文献[5]的方法,经过冲水、脱水、透明、侵蜡、包埋等步骤,用旋转式切片机制成厚度为8 μ 的切片。切片用苏木精染液染色30~60min后脱水,封藏。

1.4 生物显微照相

用OLYMPUS BH-2型显微镜观察切片;PM-10AD系统进行显微照相。

2 结果

2.1 病烂海带的外型观察

海带经人为感染后,经过2~3天,划线处变绿,5天后斑点继续扩大,有变烂的趋势。接菌后8天,在划线处绿斑外有明显的白圈。而非接菌区域,海带的色泽正常,未出现烂斑。

2.2 病烂海带与正常海带组织学观察

对照组海带切片中未见细菌,细胞形态正常,原生质和色素体都很丰富,细胞排列整齐而紧密。由外到内明显分三部分:表皮、内、外皮层、髓部(图版-1)。病烂海带中,褐藻酸降解菌已侵入海带的内皮层细胞,并在其内繁殖,造成了个别细胞破裂,形成空腔,最终导致内皮层细胞完全破碎,而病烂海带表皮细胞基本完好(图版-2,3,4),相对海带的其它组织而言,内皮层最容易破坏,外皮层、髓部次之。

2.3 褐藻酸降解菌在海带各组织间分布与细胞受伤害程度的比较

受侵染的海带,经大量的组织切片观察,发现褐藻酸降解菌在海带组织内的分布有着明显的差异。在内皮层分布最广,且含量最大(版图-2,3)。其次为髓部、外皮层。在表皮细胞中未见细菌侵染。从褐藻酸降解菌在海带组织中的分布和其受伤害的程度比较发现,内皮层受到的伤害最大,特别是菌侵染较严重的海带,内皮层细胞为褐藻酸降解菌占据,有些细胞被完全解离,形成一些不规则的空腔,内含有大量的菌体,侵染严重的细胞完全破碎,褐藻酸降解菌则散落于各处(图版-4)。在内皮层周边的外皮层和髓部细胞,将视受侵染的程度不同而有不同。受侵染较轻的材料没有发现菌,而受侵染较重的材料则有少量菌,但细胞结构相对较完整,表皮细胞没有发现褐藻酸降解菌,细胞结构完整,部分侵染较轻的

材料,还能看到细胞核。

2.4 经褐藻酸降解菌处理的海带内皮层细胞中发现有大量的储藏颗粒

经观察发现,未经褐藻酸降解菌处理的海带,未发现储藏颗粒的出现(图版-1),而在褐藻酸降解菌侵染的海带切片中,发现在其内皮层细胞中有大量颗粒状储藏物质(图版-5,版图-6),形状为椭圆或圆形,大小不均一,平均直径为 $2.7\mu\text{m}$,直径范围在 $1.5\sim 4.0\mu\text{m}$ 之间。褐藻酸降解菌侵染较轻材料内皮层的细胞中,其储藏颗粒轮廓清晰明了,颗粒物质小而紧密(图版-5)。随着褐藻酸降解菌侵染时间的延长,储藏颗粒有逐渐瓦解的趋势,颗粒变大而疏松,并聚集成团,且周围伴有大量的褐藻酸降解菌出现,最后颗粒彻底瓦解、消失,细菌散落于海带的组织各处(图版-6)。从中可以看出,褐藻酸降解菌的侵染诱导海带内皮层细胞积累大量的储藏物质,至于这些储藏物质的作用有待于进一步研究。

3 讨论

3.1 褐藻酸降解菌能够引起海带的病烂

通过用褐藻酸降解菌对正常海带进行感染,5~8天后海带外表不同程度出现烂斑,烂斑处的组织内部发现有褐藻酸降解菌,细胞结构遭到不同程度的破坏。但远离烂斑处,海带表面着色正常。

3.2 褐藻酸降解菌导致海带病烂的过程分析

褐藻酸降解菌首先侵染内皮层,对内皮层的细胞进行破坏,然后再逐渐侵染外皮层、髓部,直至造成海带的完全病烂。我们认为这种现象的发生应归于内皮层特殊的组成成分与褐藻酸降解菌的生长之间的关系。褐藻细胞壁的组成成分很复杂,含有褐藻胶及多种多糖,褐藻胶是褐藻细胞壁的填充物质^[6]。褐藻酸降解菌产生的褐藻酸酶使海带藻体明显软化、胞间质松弛,而褐藻酸酶的酶解底物为褐藻胶^[7]。内皮层又是含有褐藻胶较为丰富的地方,这可能是褐藻酸降解菌首先攻击内皮层的原因之一。其次,皮层有储藏的功能,其细胞的原生质内含有很多有机物质。丁美丽曾经报道^[6]褐藻酸降解菌不仅能利用褐藻酸作为碳源,大都还能利用甘露醇、葡萄糖、淀粉和蔗糖等糖作为碳源。这些有机物支持了褐藻酸降解菌的增殖,有利于它们的进一步侵入。虽然在显微镜中观察到的首先是细菌存在的细胞及周边细胞原生质体的分解、色素的缺失,其次才是细胞壁的破裂,通过研究我们认为,褐藻酸降解菌可能首先利用了细胞壁中的褐藻胶,剩下只有纤维素的空壳,使细胞壁丧失其生理功能,然后利用了细胞中的储藏物质作为营养,进入细胞进行增殖,并进一步侵入其它组织,造成组织的瓦解,最终导致海带病烂。

3.3 褐藻酸降解菌侵入海带组织的途径分析

从病烂海带的组织切片中不难看出,海带的内皮层均发现了大量的褐藻酸降解菌。受菌侵染较重的材料的内皮层细胞,细菌量很大(图版-3),并且其周围的外皮层和髓部的细胞中也发现有少量菌侵染的现象。说明褐藻酸降解菌首先侵染内皮层,对内皮层的细胞进行破坏,然后再逐渐侵染外皮层、髓部,直至造成海带的完全破坏。我们分析褐藻酸降解菌进入内皮层可能有两途径:(1)从损伤处直接进入内皮层。(2)从损伤处通过组织间的细胞间隙进入内皮层。

3.4 褐藻酸降解菌与内皮层细胞中储藏颗粒之间关系的探讨

文献[8]指出在皮层细胞大的液胞中有较浓厚的储藏物质与嗜碱性很深的圆球形或不规则的内含物。文献[9]也表明,海带褐藻淀粉作为储藏物质,其含量在夏秋较丰富,在生长季节中,储藏物质逐渐积累,而生殖时期或新的组织重建的时候含量则减少,褐藻酸降解菌不仅能利用褐藻酸作为碳源,大都还能利用甘露醇、葡萄糖、淀粉和蔗糖等作为碳源。这些有机物支持了褐藻酸降解菌增殖的营养条件,进而得以大量繁殖和侵染,引起海带病烂的发生。文献[10]显示:本文所探讨的储藏颗粒是在研究褐藻酸降解菌引起海带病烂的组织观察过程中发现的,所以推测内皮层细胞中储藏颗粒的出现与褐藻酸降解菌的侵染密切相关,反过来,这些储藏颗粒又为褐藻酸降解菌的进一步繁殖和侵染提供了物质基础。至于储藏物质的化学成份还有待进一步研究。有资料^[10]显示:褐藻储藏物质多以碳水化合物形式存

在,而碳水化合物多是可溶的,储藏在液泡、细胞质或整个原生质体内,如海带淀粉。但也有文献^[6]指出,不溶海带淀粉在极北海带和糖海带中有一定含量,其它褐藻中没有或极少。所以海带的种类也是判断储藏物质类型的重要依据之一。

综上所述,从我们对褐藻酸降解菌对海带侵染的组织学研究中,可以得出以下结论:褐藻酸降解菌在海带受到机械损伤时,能够引起病烂。它首先侵入内皮层,利用细胞壁中的褐藻胶及细胞储藏物质作为营养物质,大量增殖,再侵入其它组织,最终导致海带病烂。海带内皮层储藏颗粒的出现,我们推测与褐藻酸降解菌的侵染密切相关,这些储藏颗粒是否为褐藻酸降解菌的进一步繁殖和侵染提供物质基础,还是对抵抗褐藻酸降解菌感染作出的积极防御反应有待于进一步的探讨。

参考文献:

- [1] 索如瑛,刘德厚,田铸平.海带养殖[M].北京:农业出版社.1985.1-280.
- [2] 周丽,宫庆礼,俞开康,等.海带的病烂[J].海洋湖沼通报.1996,(4):38-43.
- [3] 陈勇,林光恒,沈世泽,等.海带夏苗培育中褐藻酸降解菌与烂苗的关系[J].海洋与湖沼,1981,12(2):133-136.
- [4] 陈勇,刘秀云,刘秀珍,等.海带育苗系统中脱苗和烂苗原因分析及其预防措施[J].海洋与湖沼,1984,15(6):581-587.
- [5] 郑国编.生物显微技术[M].北京:人民教育出版社.1978.26-48.
- [6] 纪明侯.海藻化学[M].北京:科学出版社,1997.15-28.
- [7] 韩宝芹,刘万顺,戴继勋,等.褐藻酸降解菌的发酵培养及褐藻酸酶对褐藻细胞的解离作用[J].海洋科学,1997,(1):39-43.
- [8] 丁美丽.环境因子对褐藻酸降解菌引起海带病烂影响研究[J].海洋学报,1990,12(2):224-229.
- [9] 青岛海洋大学.海藻栽培学[M].1984.267.
- [10] 山东海洋学院.海藻学[M].北京:农业出版社.1962.130-131.

欢迎订阅 2002 年《水产养殖》

《水产养殖》是由江苏省水产学会、江苏省淡水水产研究所、江苏省海洋水产研究所主办的中国水产类中文核心期刊。国内外公开发行人。刊登内容包括鱼、虾、蟹、贝、藻等海淡水水产品的养殖技术、人工繁殖及苗种培育技术、病害防治及渔业资源与环境等各个方面。技术实用、信息量大,适合水产科研人员、水产院校师生、水产养殖专业户、生产管理人员阅读和参考。

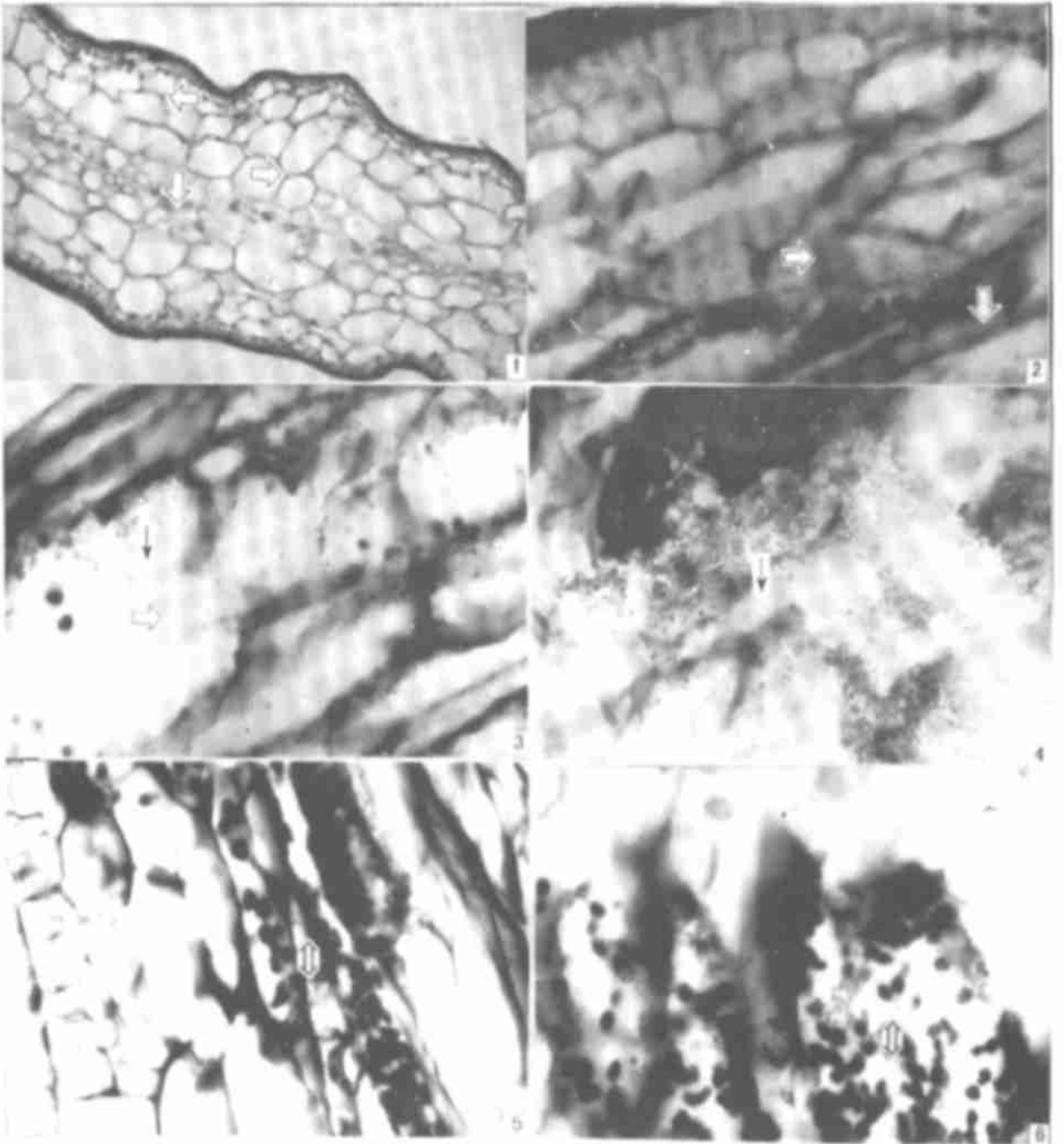
《水产养殖》目前为双月刊,每期定价 3.00 元,全年共计 18 元,全国各地邮局均可订阅,邮发代号 28-67。

地 址:南京市新模范马路 90 号 邮编:210003

电 话:025-3421419

国内发行:全国各地邮局

海外发行:中国出版对外贸易总公司(北京 782 信箱)



1. 对照组海带切片; 2. 细菌侵染内皮层的初期; 3. 细菌感染引起内皮层细胞破坏; 4. 内皮层完全细胞破裂细菌散落各处;
5. 褐藻酸降解菌侵染 3 天的海带; 6. 褐藻酸降解菌侵染 7 天的海带。内皮层(⇔); 外皮层(⇔); 髓部(↓); 褐藻酸降解菌(↓); 储藏颗粒(⇔)