

一株引起坛紫菜绿斑病病原的分离鉴定及致病性研究

韩晓娟¹, 茅云翔¹, 李 杰^{2,3}, 李贵阳^{2,3}, 李 晨^{2,3}, 刘 莉^{2,3}, 莫照兰^{2,3*}

(1. 中国海洋大学海洋生命学院遗传与育种实验室, 山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;

3. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产生过程功能实验室, 山东 青岛 266237)

摘要: 为了明确引起坛紫菜绿斑病的病原, 对 2012 年发生在福建省莆田养殖海区坛紫菜叶状体绿斑病开展了病原的分离鉴定和致病性研究。利用 2216E 海水培养基平板, 从患病藻体分离得到一株优势细菌 X5; 在实验室条件下将 X5 进行回接感染实验, 在显微镜下观察到坛紫菜叶状体发生组织病理变化, 出现绿斑病症状: 感染初期出现黄绿色小斑点, 病斑逐渐扩大出现空洞, 最后导致紫菜叶片流失; 用浓度为 $10^4 \sim 10^8$ cfu/mL 的 X5 感染坛紫菜时, 在 7 d 内引起紫菜出现 10% ~ 100% 病斑面积, 这些结果表明 X5 为坛紫菜绿斑病的病原。利用生理生化和多基因序列分析方法对 X5 进行鉴定, 结果显示该菌为革兰氏阴性菌, 大小为 $0.6 \mu\text{m} \times 0.4 \mu\text{m} \sim 1.0 \mu\text{m} \times 0.4 \mu\text{m}$, 无鞭毛, 在温度 $4 \sim 42 \text{ }^\circ\text{C}$ 、盐度 50 ~ 150、pH 6 ~ 10 范围内生长, 最适生长温度为 $16 \text{ }^\circ\text{C}$, 最适生长盐度为 50, 最适 pH 为 7, 对甲硝唑、林可霉素和青霉素耐药, 对 25 种抗生素敏感, Biolog 和 API ID-32E 细菌鉴定系统的结果显示 X5 为弧菌属细菌 (*Vibrio* sp.); 基于多基因序列 (16S rRNA, *rpoA*, *recA*, *pyrH*) 构建的系统进化树分析显示, X5 与 *V. casei*、*V. littoralis*、*V. rumoiensis* 聚为一支, 进化距离为 0.095 ~ 0.108, 这些结果说明 X5 为弧菌属的一个新种或是 *V. casei*、*V. littoralis*、*V. rumoiensis* 之一的一个新亚种。本研究报道了弧菌 X5 能够引起坛紫菜绿斑病, 为紫菜流行病学及疾病防治提供了理论支撑。

关键词: 坛紫菜; 绿斑病; 弧菌; 鉴定; 致病性

中图分类号: Q 946; S 946.2

文献标志码: A

中国是紫菜养殖的大国, 坛紫菜 (*Pyropia haitanensis*) 和条斑紫菜 (*P. yezoensis*) 为主要的养殖品种, 前者主要在福建、浙江和广东等地养殖, 后者主要在江苏和山东等地广泛栽培, 是当地重要的支柱产业^[1]。随着养殖规模的扩大、养殖环境的恶化、种苗的退化以及养殖管理不当, 病害出现日益频繁, 对紫菜的产量和品质造成严重的影响。有研究报道在紫菜养殖过程中会发生细菌或真菌引起的多种疾病, 如绿斑病、赤腐病、壶状菌病、拟油壶菌病、丝状细菌症、癌肿病、缩曲症、黄斑病和色圈病等^[2-10]。绿斑病是紫菜养殖过程中常见的疾病, 在环境骤变如水温升高或突降

大雨时容易发生。日本学者从患病的条斑紫菜叶状体中分离出微球菌、假单胞菌和弧菌^[4]; 闫咏等^[9]从患病的条斑紫菜中分离出多株细菌, 经回接感染实验确证柠檬假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas citrea*) 为致病菌, 这些研究说明在不同的养殖环境中引起紫菜绿斑病的病原有所不同。2012 年, 福建省莆田南日岛养殖的坛紫菜发生了绿斑病, 根据研究结果, 该起坛紫菜绿斑病的病原是一种新的弧菌。本实验开展了此病原鉴定及致病性研究工作, 旨在探明引起紫菜疾病的病原, 为丰富紫菜流行病学和疾病防治提供支撑。

收稿日期: 2015-02-08 修回日期: 2015-05-19

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2012AA10A406, 2012AA10A401, 2012AA100815); 国家自然科学基金 (31372517); 山东省自主创新计划 (2013CX80202)

通信作者: 莫照兰, E-mail: mozl@ysfri.ac.cn

1 材料与方法

1.1 发病紫菜和健康紫菜来源

患病坛紫菜的叶状体于2012年12月采自福建莆田南日岛紫菜养殖场,低温保存运回实验室,在24 h内进行分析。健康紫菜采自福建海区,在实验室条件下进行培养,培养温度20℃,盐度30,光照 $62.5 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光暗周期L:D=12:12,充气培养,每隔3 d更换1次PES海水培养液^[7]。选取生长状态良好的坛紫菜用于后续实验。

1.2 细菌分离

取症状明显的坛紫菜叶片,用刷子除去表面杂质,在无菌海水中漂洗3次后,用无菌剪刀把病斑处剪下置于无菌的研钵中研磨匀浆,匀浆液用无菌海水梯度稀释,每个稀释度吸取适量稀释液涂布于2216E海水琼脂培养基,在28℃恒温培养箱中培养24~48 h,观察菌落生长和形态,挑取形态一致的优势菌落在新鲜培养基上重复划线纯化3次以上。分离纯化后的菌株置于20%甘油、-80℃保存。

1.3 人工感染实验及组织病理观察

将从患病紫菜中分离得到的优势菌用于人工回接感染实验。挑取优势菌落置于2216E海水液体培养基培养过夜后,在室温条件下5 000 g离心10 min。收集菌体,用无菌PES海水培养液洗涤细菌3次,用无菌PES海水配制成终浓度为 10^8 cfu/mL 的菌悬液,分装至200 mL锥形瓶中,在每个锥形瓶中放入3张健康坛紫菜成体(每张长度7~8 cm、宽度1.5~2 cm),以不加菌的无菌PES海水培养液为对照组,每组实验设置3个重复。所有实验组置于25℃光照培养箱中培养,每天肉眼观察紫菜发病情况,切取患病部位叶片进行常规制片,在光学显微镜下观察组织细胞形态及病理变化,同时取患病叶片进行细菌分离和鉴定,以确定分离菌株是否为感染所用的菌株。

1.4 病原菌的生理生化和药物敏感分析

按常规方法观察细菌的革兰氏染色、鞭毛染色及其脂酶、淀粉酶、明胶酶分泌的情况^[11],用透射电镜观察细菌形态。观察温度、盐度、pH对细菌生长的影响,进行温度实验时,温度设置为4、10、16、28、32、37和42℃,盐度为30,pH 7.0;进行盐度实验时,盐度设置为0、50、100、150和200,

pH 7.0,培养温度为28℃;进行pH实验时,pH设置为2、4、6、7、8、9和10,盐度为30,培养温度为28℃。每个实验设置3个平行组,48 h后取样检测 OD_{600} 。用Biolog细菌鉴定系统(Microstation™, USA)、API ID-32E细菌鉴定系统(bioMerieux, 法国)分析细菌的生理生化特征,用ATB VET(bioMerieux, 法国)分析细菌药物敏感谱。

1.5 病原菌的多基因位点序列分析

根据文献方法[12]扩增病原菌的16S rRNA、*recA*、*rpoA*和*pryH*基因部分序列,所得测序在GenBank中进行BLAST同源性比对,获取其他相关菌的基因序列用于进化树分析。进行4个基因位点的组合序列分析时,将每个基因序列进行比对、截齐,按16S rRNA-*recA*-*rpoA*-*pryH*顺序进行组合,得到的序列用于系统发育树构建。采用ClustalW软件进行多序列比对,应用Mega5.3软件采用邻接法(neighbor-joining)构建系统发育树,模型为Kimura 2-paramete,并以自展法(Bootstrap)进行各分支的置信度检验,共循环1 000次。

1.6 不同病原菌浓度感染紫菜的程度

在实验室条件下研究不同病原菌浓度对坛紫菜的感染程度,实验体系同1.3,感染浓度为 10^2 、 10^4 、 10^6 和 10^8 cfu/mL ,感染体系温度为23℃、盐度为30。设置不加菌液的实验组为对照,各个处理组和对照组设置3个平行组。实验期间,每天观察紫菜病程发展情况,以肉眼可观察到病斑出现时为疾病发生时间,一周后用叶面积仪(Yaxin-124,北京雅欣仪科有限公司)计算紫菜叶片病斑面积占总紫菜叶片面积的百分比。

2 结果

2.1 患病坛紫菜症状及细菌分离

发病初期,坛紫菜叶状体出现针尖大小的绿点,2~3 d后病斑发展为1~3 mm大小的绿斑,在海水冲击下破裂形成圆形或近圆形的孔,相近的孔连接在一起形成较大的洞(图1),随着病程发展,紫菜叶片出现不同程度的缺口,导致养殖紫菜组织流失。从病斑组织分离到一种优势菌,在2216E海水培养基培养24 h时的菌落直径 $\leq 1 \text{ mm}$,乳白色、表面湿润、凸起、边缘整齐。将分离到的菌株命名为X5。

2.2 人工感染实验及组织病理的观察

以浓度为 10^8 cfu/mL 的 X5 菌悬液感染坛紫菜,感染后的第 2 天可肉眼观察到藻体出现黄绿色斑点;在感染后的第 3 天,病斑增多、增大至直径 3 mm 以上,有的病斑变成水泡状(图版-1);第 4 天病斑中央出现破损,变成烂洞;第 5 天时大小不同的病斑连接成片形成腐烂的孔洞(图版-2),最后导致腐烂组织流失。实验期间,对照组藻体没有观察到病斑。

在显微镜下观察,感染初期,病斑处的紫菜细胞间隙明显增大,少数细胞收缩呈绿色,与周围细胞形成明显的对比(图版-3);随着时间推移,病灶区收缩病变的细胞增多,病变细胞周围有较多数量的细胞内容物变模糊、浓缩,颜色呈橄榄绿(图版-4);病变的细胞渐渐地连成片,在显微镜下形成明显区别于正常细胞的病斑区域(图版-5);最后病斑处的细胞流失,形成孔洞(图版-6);对照组紫菜细胞没有出现病理变化(图版-7)。从患病叶片分离得到形态一致的菌落,命名为 X5S, X5S 的菌落形态与 X5 相同,其 16S rRNA 序列与 X5 一致。

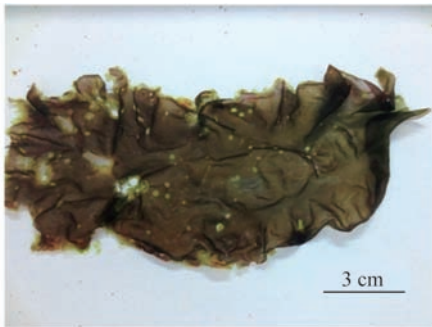


图 1 养殖海区患病坛紫菜临床症状

Fig. 1 The clinical symptom of *P. haitanensis* collected from cultured sea area

2.3 病原菌的生理生化特征及多位点序列基因系统发育学分析

X5 为革兰氏阴性菌,短杆状,大小 $0.6 \mu\text{m} \times 0.4 \mu\text{m} \sim 1.0 \mu\text{m} \times 0.4 \mu\text{m}$,无鞭毛(图 2);在温度 $4 \sim 42 \text{ }^\circ\text{C}$ 、盐度 $50 \sim 150$ 、pH $6 \sim 10$ 的范围内生长,最适生长温度为 $16 \text{ }^\circ\text{C}$ 、最适生长盐度为 50、最适 pH 为 7。该菌明胶酶、淀粉酶、Tween 20 反应为阴性,过氧化酶和 DNA 酶反应为阳性。Biolog 检测结果显示,X5 对 N-乙酰-D-葡萄糖胺、D-纤维二糖、D-果糖、D-海藻糖、麦芽糖、D-甘

露醇、D-甘露糖、蔗糖和 α -D-葡萄糖反应为阳性;API ID-32E 检测结果显示,X5 对 α -葡萄糖苷酶、 α -半乳糖苷酶和 β -半乳糖苷酶的反应呈阳性,与系统数据库中的弧菌相似性较高。ATB VET 检测结果显示,X5 对甲硝唑、林可霉素、青霉素不敏感,对其余 25 种抗生素敏感。从回接感染紫菜分离得到的菌株 X5S 的生理生化特征与 X5 相同。

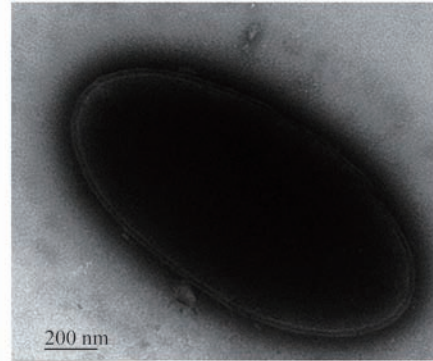


图 2 X5 菌株的透射电镜照片

Fig. 2 X5 morphology observed under transmission electronic microscope

通过 PCR 扩增和序列测定,得到的 X5 16S rRNA、*recA*、*rpoA*、*pyrH* 基因部分序列的长度分别为 1 448、865、903 和 643 bp,在 GenBank 的存储号分别为 KR758751、KR709245、KR709246 和 KR709244。BLAST 结果显示,上述序列与弧菌属(*Vibrio*)细菌有最高相似性。具体为,X5 16S rRNA 序列与 *V. rumoiensis* 有最高相似性,为 98%,与其他弧菌的相似性为 95%~97%,在基于 16S rRNA 序列构建的系统发育树中,X5 与 *V. casei*、*V. rumoiensis* 和 *V. littoralis* 聚为一支(图 3)。X5 *recA* 序列与 *V. haliotocoli* 有最高相似性,为 87%,与其他弧菌的相似性在 84%~86%,基于 *recA* 序列的系统发育树将 X5 与 *V. haliotocoli* 聚为一支(图 4)。X5 *rpoA* 序列与 *V. littoralis* 有最高相似性,为 94%,与其他弧菌的相似性在 90%~93%,基于 *rpoA* 序列的系统发育树将 X5 与 *V. littoralis*、*V. rumoiensis*、*V. casei* 聚为一支(图 5)。X5 *pyrH* 序列与 *V. logei* 有最高相似性,为 84%,与其他弧菌的相似性在 80%~83%,基于 *pyrH* 序列的系统发育树将 X5 与多种弧菌聚为一支(图 6)。为了得到更准确的 X5 进化地位信息,将 4 个基因序列组合构建多基因位点系统发

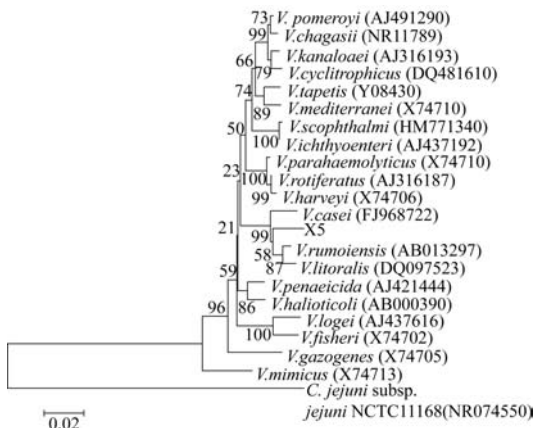


图 3 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育进化树
 Fig. 3 Phylogenetic tree constructed by neighbor joining method based on sequences of 16S rRNA

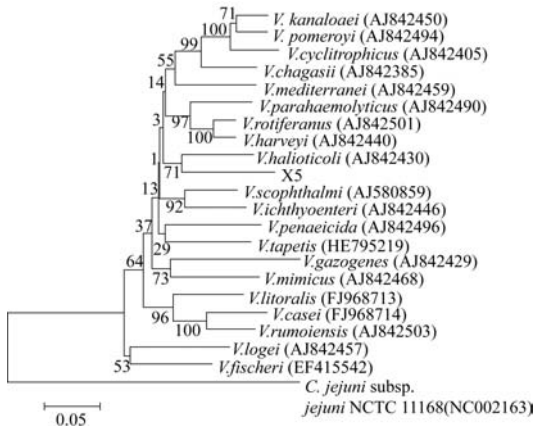


图 4 基于 recA 基因序列构建的系统发育进化树
 Fig. 4 Phylogenetic tree constructed by neighbor joining method based on sequences of recA

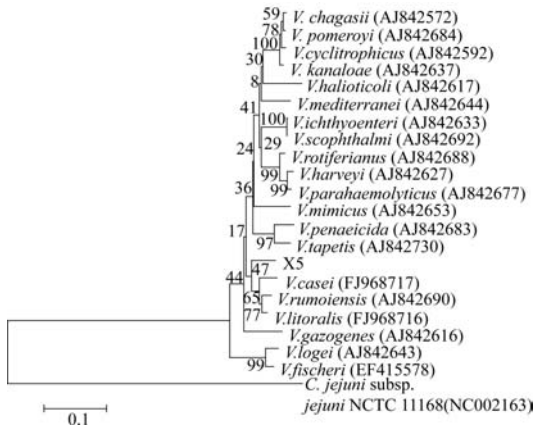


图 5 基于 rpoA 基因序列构建的系统发育进化树
 Fig. 5 Phylogenetic tree constructed by neighbor joining method based on sequences of rpoA

育树,结果显示 X5 与 *V. casei*、*V. littoralis* 和 *V. rumoiensis* 聚为一支(图 7),与它们的进化距离分

别为 0.108、0.095 和 0.097(图 8)。基于基因序列分析的结果与 16S rRNA、*rpoA* 序列的分析结果较为一致。上述结果表明, X5 与 *V. casei*、*V. littoralis*、*V. rumoiensis* 的亲缘关系很近,同时与它们存在进化距离,因此认为 X5 是弧菌属的一个新种或是 *V. casei*、*V. littoralis* 和 *V. rumoiensis* 之一的一个新亚种。

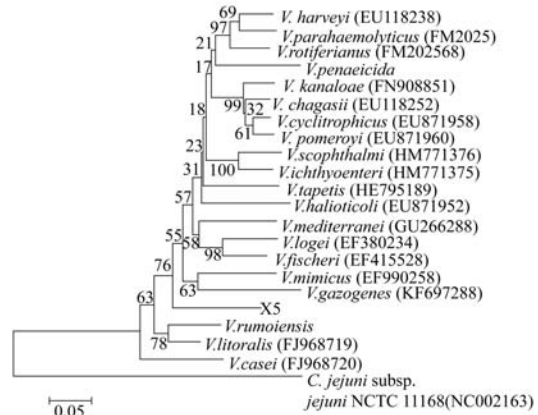


图 6 基于 pyrH 基因序列构建的系统发育进化树
 Fig. 6 Phylogenetic tree constructed by neighbor joining method based on sequences of pyrH

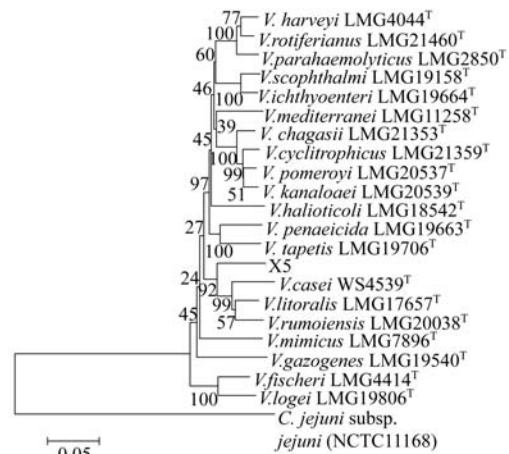


图 7 基于 16S rRNA-recA-rpoA-pyrH 基因序列构建的 N-J 系统发育树
 Fig. 7 Phylogenetic tree constructed by neighbor joining method based on the concatenated sequences of 16S rRNA-recA-rpoA-pyrH

2.4 不同浓度的 X5 菌悬液感染坛紫菜的程度

以不同浓度的 X5 菌悬液感染坛紫菜叶片。菌悬液浓度越高,出现病症时间越早,在实验期间,10² cfu/mL 浓度组没有出现感染症状,其他浓度组出现病症的时间分别为 2 d (10⁸ cfu/mL

组)、3 d(10⁶ cfu/mL 组)和 3 d(10⁴ cfu/mL 组); 感染浓度越高,病斑出现面积越大,在第 7 天时,病斑面积分别为 100% (10⁸ cfu/mL 组)、75.8%

(10⁶ cfu/mL 组)、10.5% (10⁴ cfu/mL 组)和 0% (10² cfu/mL 组)。各实验组之间均有极显著性的差异($P < 0.01$)(图 9)。

1	<i>V. parahaemolyticus</i> LMG2850 ^T	
2	<i>V. harveyi</i> LMG4044 ^T	0.038
3	<i>V. fisheri</i> LMG4414 ^T	0.135 0.133
4	<i>V. mimicus</i> LMG7896 ^T	0.126 0.122 0.152
5	<i>V. mediterranei</i> LMG11258 ^T	0.094 0.098 0.129 0.129
6	<i>V. litoralis</i> LMG17657 ^T	0.113 0.109 0.135 0.137 0.119
7	<i>V. haliotocoli</i> LMG18542 ^T	0.101 0.103 0.142 0.135 0.111 0.114
8	<i>V. scophthalmi</i> LMG19158 ^T	0.090 0.087 0.140 0.123 0.099 0.120 0.104
9	<i>V. gazogenes</i> LMG19540 ^T	0.139 0.142 0.158 0.139 0.137 0.149 0.156 0.138
10	<i>V. penaeicida</i> LMG19663 ^T	0.109 0.105 0.141 0.131 0.107 0.116 0.111 0.107 0.141
11	<i>V. ichthyenteri</i> LMG19664 ^T	0.086 0.087 0.134 0.117 0.096 0.112 0.098 0.035 0.137 0.111
12	<i>V. tapetis</i> LMG19706 ^T	0.102 0.104 0.129 0.132 0.096 0.119 0.113 0.098 0.149 0.085 0.101
13	<i>V. rumoiensis</i> LMG20038 ^T	0.125 0.121 0.140 0.146 0.125 0.051 0.128 0.126 0.144 0.124 0.123 0.125
14	<i>V. pomeroyi</i> LMG20537 ^T	0.087 0.089 0.123 0.132 0.088 0.104 0.100 0.084 0.149 0.113 0.085 0.097 0.113
15	<i>V. kanaloaei</i> LMG20539 ^T	0.095 0.093 0.124 0.133 0.096 0.111 0.102 0.093 0.144 0.113 0.090 0.101 0.110 0.026
16	<i>V. chagasii</i> LMG21353 ^T	0.082 0.081 0.124 0.131 0.085 0.109 0.097 0.086 0.140 0.110 0.089 0.096 0.120 0.032 0.041
17	<i>V. cyclitrophicus</i> LMG21359 ^T	0.092 0.095 0.121 0.140 0.095 0.107 0.108 0.092 0.146 0.119 0.095 0.104 0.109 0.028 0.032 0.041
18	<i>V. rotiferatus</i> LMG21460 ^T	0.044 0.029 0.128 0.114 0.092 0.101 0.102 0.080 0.134 0.100 0.083 0.100 0.112 0.083 0.089 0.078 0.089
19	<i>V. casei</i> WS4539 ^T	0.144 0.138 0.150 0.151 0.135 0.076 0.140 0.138 0.158 0.136 0.128 0.132 0.069 0.126 0.120 0.126 0.128 0.134
20	<i>V. logei</i> LMG19806 ^T	0.145 0.143 0.071 0.166 0.142 0.142 0.142 0.150 0.165 0.146 0.138 0.144 0.152 0.131 0.124 0.127 0.125 0.133 0.166
21	X5	0.121 0.124 0.144 0.136 0.125 0.095 0.122 0.130 0.141 0.122 0.130 0.131 0.097 0.122 0.121 0.121 0.122 0.118 0.108 0.150
22	<i>C. jejuni</i> sp. <i>Jejuni</i> NCTC 11168	0.709 0.710 0.678 0.687 0.710 0.662 0.691 0.728 0.687 0.678 0.716 0.697 0.662 0.717 0.714 0.720 0.709 0.694 0.658 0.681 0.681

图 8 不同弧菌的多基因位点序列之间的进化距离

Fig. 8 Estimates of evolutionary distance between multilocus sequence

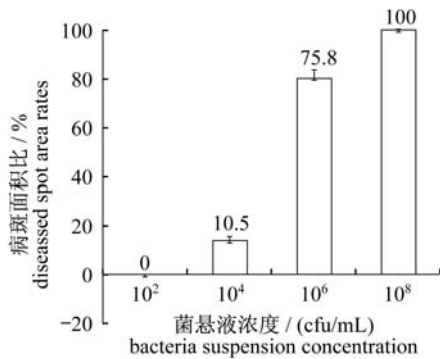


图 9 不同 X5 浓度感染坛紫菜 7 d 后出现病斑的面积

Fig. 9 Rates of disease expansion in *P. haitanensis* infected with various concentrations of X5 at 7 days

3 讨论

实验从患绿斑病坛紫菜叶状体分离得到一株优势细菌 X5,并对其开展了鉴定和致病性研究。在细菌的分类鉴定中,生理生化特征和保守基因序列特征被一同用于细菌的准确鉴定。应用 Biolog 和 API ID 32E 细菌鉴定系统分析 X5 的生理生化特征,发现 X5 与弧菌属细菌相似,但不能

鉴定到种的位置。在分子特征上,Tompson 等^[12]认为同种细菌之间在 16S rRNA、*recA*、*rpoA* 和 *pryH* 基因序列的相似性至少分别大于 99%、94%、98% 和 94%。本研究发现,X5 在上述基因序列上分别与 *V. rumoiensis* (相似性 98%)、*V. haliotocoli* (相似性 87%)、*V. litoralis* (相似性 94%) 和 *V. logei* (相似性 84%) 有最高相似性,但根据序列最大相似性值均未能鉴定到种的位置。基于单个基因的系统发育学分析也显示 X5 与多种弧菌存在亲缘关系,因此根据单个看家基因序列的相似性分析和系统发育学分析均未能将 X5 鉴定到种。一般认为基于多个基因位点的系统发育学分析能够为细菌的分类鉴定提供更准确的判断依据,本研究进一步根据 4 个基因联合序列构建的系统发育学数据表明,X5 与 3 种弧菌(*V. casei*、*V. litoralis* 和 *V. rumoiensis*)聚为一支,与它们存在 0.095~0.108 的遗传距离,说明 X5 在遗传上与它们存在差异。根据上述分析,认为 X5 为弧菌属的一个新种或是 *V. casei*、*V. litoralis* 和 *V. rumoiensis* 之一的新亚种。X5 鉴定到种的位置需要增加 DNA-DNA 杂交、脂肪酸和呼吸

醌组成等更多的数据来确证。本研究暂将 X5 鉴定到弧菌属的地位。

在人工回接感染中,发现 X5 菌引起坛紫菜的组织细胞发生病理变化,观察到的发病症状与以往报道的条斑紫菜绿斑病的症状基本一致,所不同的是本研究观察到的初期症状是黄绿色病斑逐步发展为绿色病灶,而以往报道的初期症状是红色病斑发展为绿色病斑^[13-14]。中尾羲房等^[4]的研究认为绿斑病是由病原菌侵入藻体受伤部位进行增殖,分泌酶破坏叶状体组织引起。在坛紫菜和条斑紫菜中观察到的发病初期症状病斑颜色的不同可能是不同病原菌分泌不同的酶,酶对紫菜藻胆蛋白的作用机制不同引起的。弧菌是海水养殖动物常见病原,它们可分泌多种活性胞外酶引起动物组织或细胞损伤^[15-16]。紫菜主要由蛋白质和紫菜多糖组成,紫菜多糖成分为半乳糖硫酸酯,由半乳糖、3,6-内醚半乳糖和硫酸基组成^[17]。本研究分离到的弧菌不产生蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶等胞外酶,但产生 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶,它们能水解含半乳糖苷键物质。因此推测弧菌 X5 产生的半乳糖苷酶可能是破坏坛紫菜组织,从而引发绿斑病的一个重要因子。

本研究观察到的坛紫菜绿斑病发生时间在 12 月份,该期间正值紫菜叶状体密度增加,由于养殖水体有机物增多,水温骤然上升,降雨引起盐度变化等原因,容易引起紫菜生理变化。同时,弧菌是海洋环境中的正常菌群,在有机物丰富、水温合适的条件下容易繁殖生长,当养殖水体病原数量增多时极易侵染处于生理应激状态的紫菜,导致疾病发生。在实验室条件下,X5 在 $10^4 \sim 10^8$ cfu/mL 浓度感染紫菜,可导致绿斑病发生,浓度越高,发病时间越短、发病程度越大。因此,在养殖生产中发现养殖水体弧菌数量超过 10^4 cfu/mL 时,应当采取措施预防绿斑病发生。根据 X5 对多种抗生素敏感的结果,利用潮退期对紫菜喷洒安全的抗生素药液,是防止绿斑病的一个方法。

参考文献:

- [1] Zeng C K, Wang S J, Liu S J, *et al.* Marine Algae Cultivation Science[M]. Shanghai: Shanghai Science press, 1985: 204 - 206. [曾呈奎, 王素娟, 刘思俭, 等. 海藻栽培学. 上海: 上海科学出版社, 1985: 204 - 206.]
- [2] Seibin A. A chytridean parasite on the *Porphyra*[J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1960, 26(6): 543 - 548. [新崎盛敏. アマノリ類に寄生する壺状菌について. 日本水産学会誌, 1960, 26(6): 543 - 548.]
- [3] 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.
- [4] Yoshifusa N, Takayuki O, Takayuki M, Yuji F, Buhei Z, *et al.* Bacteriological studies on diseases of cultured Laver—I. Green spot rotting - like deterioration of laver frond by bacteria, *in vitro*[J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1972, 38(6): 561 - 564 [中尾羲房, 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. 日本水産学会誌, 1972, 38(6): 561 - 564.]
- [5] Yuji F. Maceration of laver frond by enzymes of bacteria causing green spot rotting - like deterioration [J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1973, 39(8): 911 - 915. [藤田雄二. ノリに緑斑病様障害なおす細菌の粗酵素による葉体崩裂. 日本水産学会誌, 1973, 39(8): 911 - 915.]
- [6] Ma J H. An investigation of chytrid-disease in *Porphyra yezoensis* in the coastal water of south Jiangsu [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 1992, 1(3): 185 - 188. [马家海. 江苏南部沿海条斑紫菜壶状菌病的调查研究. 上海水产大学学报, 1992, 1(3): 185 - 188.]
- [7] Ma J H. A Preliminary study on the red rot disease of *Porphyra yezoensis* [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 1996, 5(1): 1 - 7. [马家海. 条斑紫菜赤腐病的初步研究. 上海水产大学学报, 1996, 5(1): 1 - 7.]
- [8] Ma J H, Zhang L M, *et al.* Studies on crape disease of *Porphyra yezoensis* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1999, 6(2): 82 - 88. [马家海, 张礼明, 等. 条斑紫菜缩曲症的研究. 中国水产科学, 1999, 6(2): 82 - 88.]
- [9] 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. [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. 中国水产科学, 2002, 9(4): 353 - 358.]
- [10] Chen Q P, Jiang Z X. A preliminary analysis of the causes of extensive rotting from diseases of *P.*

- haitanensis in Tong Tou prefecture [J]. Journal of Zhejiang College of Fisheries, 1991, 10 (2): 144 - 148. [陈秋萍,江最新. 洞头县坛紫菜大面积病烂原因分析. 浙江水产学院报, 1991, 10 (2): 144 - 148.]
- [11] Yang G. Microbiology Experiment [M]. Beijing: Science Press, 2004. [杨革. 微生物学实验教程. 北京: 科学出版社, 2004.]
- [12] Thompson F L, Gevers D, Thompson C C, et al. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis [J]. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, 71 (9): 5107 - 5115.
- [13] Ding H Y. Study on development process of green spot disease in *Porphyra yezoensis* [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences. 2008, 36 (11): 4626 - 4628 [丁怀宇. 条斑紫菜绿斑病发病进程研究. 安徽农业科学, 2008, 36 (11): 4626 - 4628.]
- [14] Lin Q S, Min J, Yan Y, et al. Preliminary study of green-spot disease and its correlative ecological factor of *Porphyra yezoensis* [J]. Fishery Modernization, 2007, 34 (4): 44 - 46 [林秋生, 闵建, 闫咏, 等. 条斑紫菜绿斑病及其相关生态因子的初步研究. 渔业现代化, 2007, 34 (4): 44 - 46.]
- [15] Yang S L, Wang Y G, Dong S G. Progress of research on *Vibriosis* in marine cultured fish [J]. *Marine Fisheries Research*, 2005, 26 (4): 75 - 83 [杨少丽, 王印庚, 董树刚. 海水养殖鱼类弧菌病的研究进展. 海洋水产研究, 2005, 26 (4): 75 - 83.]
- [16] Mo Z L, Mao Y X, Chen S Y, et al. Classification for one pathogenic *Vibrio anguillarum* strain isolated from skin-ulcer flounder [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2002, 42 (3): 263 - 269 [莫照兰, 茅云翔, 陈师勇, 等. 一株牙鲆皮肤溃烂症病原菌的鉴定. 微生物学报, 2002, 42 (3): 263 - 269.]
- [17] Zhao B L, Zhang F Y, Li C J, et al. The extraction and chemical composition of *Porphyra* polysaccharides [J]. *Education In Chemistry*, 2010, (3): 52 - 65. [赵保力, 张英锋, 李长江, 等. 紫菜多糖的提取及化学成分. 化学教学, 2010, (3): 52 - 65.]

Identification and pathogenicity of a novel pathogen causing green rot disease in *Porphyra haitanensis*

HAN Xiaojuan¹, MAO Yunxiang¹, LI Jie^{2,3}, LI Guiyang^{2,3}, LI Chen^{2,3},
LIU Li^{2,3}, MO Zhaolan^{2,3*}

(1. Laboratory of Marine Genetics and Breeding, College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, The Ministry of Agriculture, Qingdao 266071, China;

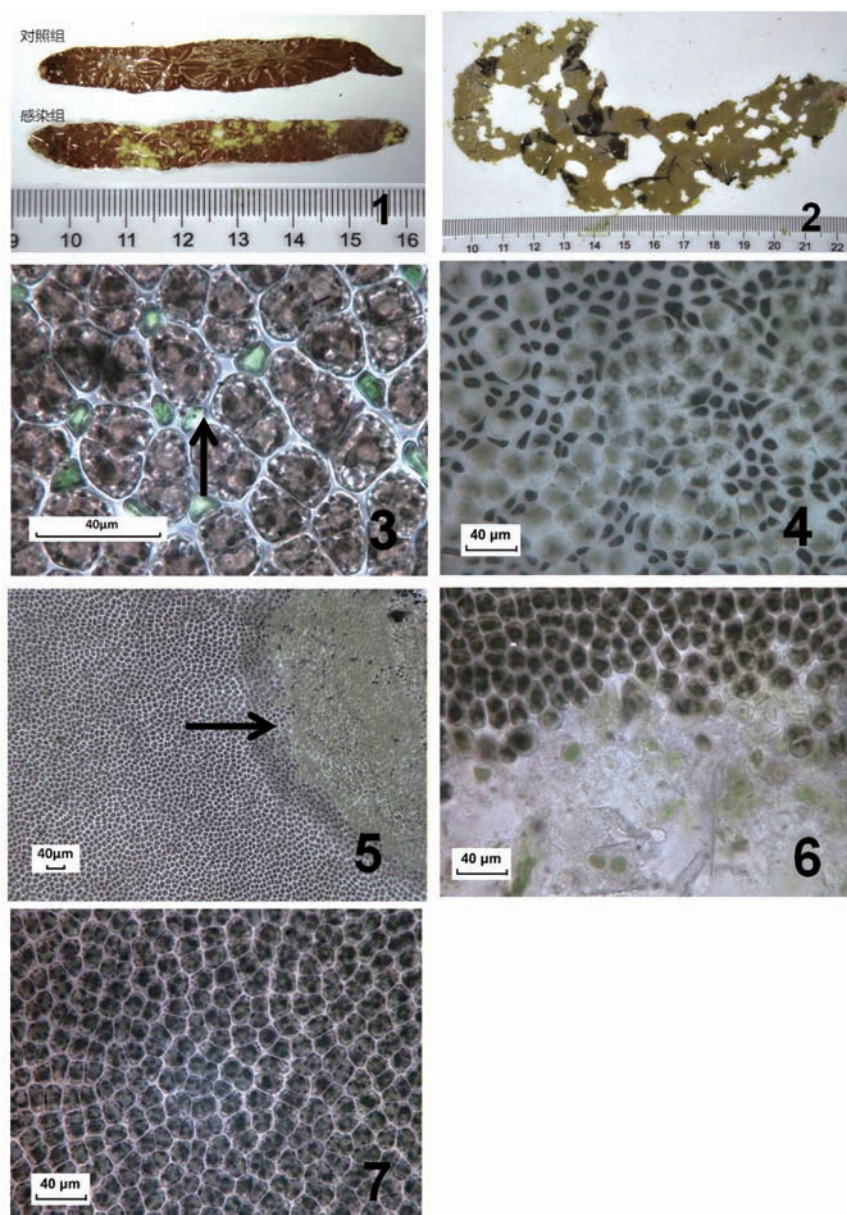
3. Laboratory for Marine Fisheries and Aquaculture, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China)

Abstract: In 2012, a green rot disease incidence occurred in a *Pyropia haitanensis* culture farm located in Putian, Fujian Province. The present study was carried out to investigate the pathogenic agent of green rot disease. The combination approach of biochemical tests and multilocus sequences analysis was used to identify the bacterial isolate, and the artificial infection experiment and histopathological observation were performed to determine the pathogenicity of the isolate. A dominant bacterial strain assigned as X5 was isolated from the diseased blades using 2216E medium plate. In artificial infection experiment on the *P. haitanensis* blades, X5 was able to cause the same characteristic histopathology of green rot disease seen in natural infections: small yellow greenish spots appeared over the blades, then gradually developed into large green holes, and finally leading to collapse of the whole blade. By infection with X5 at $10^4 - 10^8$ cfu/mL, the infected *P. haitanensis* blades were found to have lesion area rates from 10% to 100%. These results indicated that X5 was the etiological agent of green spot disease of *P. haitanensis*. X5 was gram - negative, short rod, non-flagellum bacterium with size of $0.6 \mu\text{m} \times 0.4 \mu\text{m} - 1.0 \mu\text{m} \times 0.4 \mu\text{m}$. It grew well at temperatures from 4 to 42 °C, salinities from 50 to 150 and pH from 6 to 10. The optimum growth condition was 16 °C, 50 salinity and pH 7. X5 was resistant to metronidazole, clindamycin and penicillin, while susceptible to 25 antibiotics. It was identified as a member of the genus *Vibrio* by Biolog and API ID-32E. Based on phylogenetic analysis of multilocus sequences (16S rRNA, *rpoA*, *recA*, *yprH*), X5 was showed to be highly related with *V. casei*, *V. littoralis* and *V. rumoiensis*, with the evolutionary distance of 0.095 - 0.108. These results indicate that X5 might be a novel species of the genus *Vibrio* or a novel subspecies of *V. casei*, *V. littoralis* or *V. rumoiensis*. The present study indicates that a *Vibrio* sp. strain can cause green rot disease in *P. haitanensis*, which will support the study on *P. haitanensis* epidemiology and disease control of *P. haitanensis*.

Key words: *Pyropia haitanensis*; green rot disease; *Vibrio* sp.; identification; pathogenicity

Corresponding author: MO Zhaolan. E-mail: mozl@ysfri.ac.cn

Funding projects: National High Technology Research and Development Program (2012AA10A406, 2012AA10A401, 2012AA100815); National Natural Sciences Foundation of China (31372517); Special Independent Innovation of Shandong Province (2013CX80202)



图版 X5 人工回接感染坛紫菜的组织病理观察

(1) X5 感染 3 d 后的坛紫菜, 示黄绿色病斑; (2) X5 感染 5 d 后的坛紫菜, 示组织流失后的空洞; (3) 紫菜病斑区部分细胞收缩呈绿色(箭头处); (4) 病灶区病变细胞增多, 病变细胞周围的细胞内容物均质化, 变绿色; (5) 病变面积扩大成明显的病斑区域(箭头处); (6) 病斑区细胞崩解、组织流失; (7) 无病理变化的对照组紫菜

Plate Histopathological changes of the *P. haitanensis* infected with X5

(1) The *P. haitanensis* blades infected with X5 at 3 days, showing yellow green spots; (2) the *P. haitanensis* blade infected with X5 at 5 days, showing loses of blade tissue; (3) the diseased spot area of *P. haitanensis* blade, showing cells being shrinkage and green; (4) the diseased spot area blade, showing abnormal cells being increased, and the around cells becoming homogenate and greenish; (5) the diseased spot of *P. haitanensis* blade expands distinctly; (6) the diseased area becomes decay and loss; (7) the control *P. haitanensis* without visible histopathological changes