

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200225002

http://www.yyqxjz.cn/

何礼娟, 杨慧超, 李杰, 唐磊, 刘聪, 莫照兰. 一起条斑紫菜拟油壶菌病的诊断. 渔业科学进展, 2021, 42(4): 177-183
HE L J, YANG H C, LI J, TANG L, LIU C, MO Z L. Diagnosis of *Oplidiopsis* disease in *Pyropia yezoensis*. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(4): 177-183

一起条斑紫菜拟油壶菌病的诊断*

何礼娟^{1,2} 杨慧超^{2,3} 李杰² 唐磊¹ 刘聪¹ 莫照兰^{1,2,3①}

(1. 中国海洋大学海洋生命学院 山东 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266071; 3. 水产科学国家级实验教学示范中心 上海海洋大学 上海 201306)

摘要 赤腐病(red rot disease)和拟油壶菌病(*Oplidiopsis* disease)是海上栽培紫菜(*Pyropia*)的主要病害,常引起紫菜大面积病烂。2019年1月江苏省盐城市大丰区某条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)栽培海区有134 hm²发生了紫菜病烂,本研究对该起病烂进行了病害调查和病原鉴定。结果显示,患病紫菜的病症与拟油壶菌病一致,主要表现为发病初期,在叶片边缘、基部和中部出现粉红色的病斑,随着病程发展,病斑逐渐褪色并扩大;发病后期,整个叶片颜色变浅,叶片组织溃烂脱落;在显微镜下可观察到紫菜细胞内寄生1~4个圆球状菌体,菌体内有多个油滴状物质。以病烂紫菜叶片或其匀浆液为感染源,分别在10℃和20℃条件下进行人工感染实验,二者均能使正常紫菜出现拟油壶菌病的病症。对现场采集及人工侵染后的病烂紫菜疑似病原进行*cox1*基因测序和系统发育学分析。研究表明,所测*cox1*基因均与紫菜拟油壶菌(*Oplidiopsis porphyrae*、*O. pyropiae*、*O. porphyrae* var. *koreana*)聚为一支,相似度为100%。综上所述,该起条斑紫菜的病烂由紫菜拟油壶菌(*Oplidiopsis* sp.)引起。

关键词 条斑紫菜; 拟油壶菌病; *cox1*; 紫菜拟油壶菌

中图分类号 S946.2 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2021)04-0177-07

紫菜(*Pyropia*)是倍受喜爱的食用藻类,具有很高的营养价值和经济价值,广泛栽培于中国、日本、韩国等国家,随着紫菜栽培面积的扩大及环境污染、种质退化、气候变暖等原因,紫菜病害发生越来越频繁,每年由于病害造成的损失超过10% (Im *et al.*, 2019)。

目前,已报道的常见紫菜病害有赤腐病(red rot disease)、拟油壶菌病(*Oplidiopsis* disease)、绿斑病(green spot disease)、黄斑病(yellow spot disease)等 (Taniguchi *et al.*, 1970; Sekimoto *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2015; 李杰等, 2019)。紫菜拟油壶菌病是由拟油壶菌(*Oplidiopsis* sp.)侵染造成的一种卵菌性病害(Migita,

1969),与赤腐病同为紫菜栽培期的主要病害。拟油壶菌为活体营养型专性细胞内寄生致病菌,目前,尚没有体外分离培养的方法(Sekimoto *et al.*, 2008),其鉴定和检测只能依靠高分辨率的油镜观察以及分子生物学手段。该病最早于1960年在日本报道(Arasaki, 1960),由于被感染的紫菜细胞呈壶状而被称为壶状菌病(chytrid blight disease); Sekimoto等(2008)根据其18S rRNA和*cox2*基因的分析及形态学观察,将该病原正式命名为紫菜拟油壶菌(*Oplidiopsis porphyrae*),属卵菌纲(Oomycetes)、拟油壶菌目(Oplidiopsidales)、拟油壶菌科(Oplidiopsidaceae)、拟油壶菌属(*Oplidiopsis*)。

* 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助 [This work was supported by China Agriculture Research System of MOF and MARA]. 何礼娟, E-mail: Helijuan741@163.com

① 通讯作者: 莫照兰, 教授, E-mail: mzl@ouc.edu.cn

收稿日期: 2020-02-25, 收修改稿日期: 2020-04-12

马家海(1992)通过显微观察首次发现了江苏省南部沿海栽培的条斑紫菜(*P. yezoensis*)存在壶状菌病,于2007年将该病更名为拟油壶菌病(Olpidiops-disease)(马家海等,2007)。

江苏省是我国条斑紫菜栽培的主产区,产量占全国的97%以上。每年10月至翌年4月期间为条斑紫菜海上栽培阶段。2019年1月4日,据国家藻类体系南通综合试验站报告,江苏省盐城市大丰区沿岸某条斑紫菜栽培海区出现大面积病烂。本研究对大丰区病烂紫菜进行了调查和病原的鉴定分析,期望为紫菜流行病学研究和病害防控提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 紫菜和栽培条件

病烂的条斑紫菜样品取自江苏省盐城市大丰区海域半浮动筏式条斑紫菜栽培区(33.20°N, 120.47°E),水温为(4.07±0.06)°C,海水盐度为29.64±0.06。用于人工感染实验的紫菜为中国海洋大学藻类遗传实验室提供的条斑紫菜RZ品系,在实验室的正常栽培条件:PES海水培养液(马家海,1996),温度为10°C,盐度为30,光照强度为62.5 μmol/(m²·s),光周期为L:D=12:12,充气培养,每隔3 d更换1次PES海水培养液。

1.2 样品采集及病理观察

乘船至栽培海域调查病害的基本情况,现场咨询栽培面积和发病情况,观察病烂紫菜外观症状,采集多个区域不同网帘上的发病紫菜样品,分别置于无菌样品袋中并存放于低温保温箱,带回实验室进行后续研究。在实验室的无菌操作台内,用无菌海水冲洗紫菜样品3~5次,然后,用灭菌的毛笔去除表面杂质,再用无菌刀片切取面积约为1 cm²的条斑紫菜典型病烂部位,在显微镜下观察、记录病烂紫菜的组织病理变化。取部分病烂紫菜样品进行匀浆,将匀浆液涂布于PDA培养基(海博生物,青岛)上,进行可培养微生物的分离,培养温度为25°C(邱丽萍,2018),每天观察培养基上是否有微生物生长,持续观察2周。

1.3 人工感染实验

由于在PDA培养基上未分离到微生物,分别采用患病紫菜的完整叶片和匀浆液,在10°C和20°C条件下,使用500 mL的锥形瓶进行人工感染实验。每个锥形瓶中添加200 mL无菌PES海水,放入5片正常条斑紫菜叶状体(湿重约0.1 g)。感染实验分为共培

养感染和匀浆感染。共培养感染:取3~5片病烂的紫菜叶片加入上述体系,对照组不添加病烂紫菜叶片。匀浆感染:将病烂紫菜用玻璃匀浆器研磨至无肉眼可见颗粒的匀浆液,取1 mL匀浆液加入上述体系,对照组不添加匀浆液。每个实验组设置3个平行,分别置于10°C和20°C的光照培养箱中培养,光照强度为62.5 μmol/(m²·s),光周期为L:D=12:12,每天观察记录紫菜叶片的病理变化。

1.4 病原PCR鉴定

紫菜病烂多由腐霉(*Pythium* sp.)和拟油壶菌引起(Gachon *et al*, 2010; Im *et al*, 2019)。为确定本研究病原的种类,验证显微镜观察的结果,采用扩增紫菜腐霉*cox1*序列的特异引物*cox1-pyth-F* (5'-ATTAGAATGGAATTAGCACAAAC-3')和*cox1-pyth-R* (5'-CTTAAAC CWGGAGCTCTCAT-3')(Lee *et al*, 2015),扩增拟油壶菌*cox1*序列的特异引物*cox1-olpi-F* (5'-CGGAGCTTT TTCTGGTGT-3')和*cox1-olpi-R* (5'-GCTCCGGCTAAA ACAGGTA-3')(Kwak *et al*, 2017)进行PCR鉴定。现场采集和人工侵染的病烂紫菜样品用无菌海水冲洗3~5次,去除叶片表面杂质后,用真菌基因组DNA提取试剂盒(思科捷,青岛)提取基因组DNA作为PCR扩增模板。25 μL PCR反应体系:2×ExTaq Mix (TaKaRa, 日本) 12.5 μL,正反向引物各1 μL (0.4 μmol/L),提取的基因组模板1 μL, ddH₂O 9.5 μL,同时,设置1组以ddH₂O作为模板的阴性对照组。PCR反应程序:95°C预变性5 min; 95°C变性30 s; 55°C退火30 s, 72°C延伸40 s,共35个循环; 72°C保温10 min。PCR扩增产物通过1%琼脂糖凝胶电泳进行检测,目的片段使用胶回收试剂盒(OMEGA, 美国)进行回收和纯化,所得DNA用pCloneEZ-TA-AMP载体连接试剂盒(中美泰和,北京)连接T载体后,转化到DH10β大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态细胞中,将阳性克隆送青岛派森诺公司测序。所得序列在GenBank中进行BLAST同源性比对,采用Mega 5.0软件邻接法来构建系统发育进化树,模型选择为Kimura2-parameter,同时,通过自展法(bootstrap)进行各个分支的置信度检验,循环次数设置为1000次,其他参数设为默认。

2 结果

2.1 紫菜病害调查及症状

发病区域位于江苏省盐城市大丰区某条斑紫菜栽培海区,海区面积约为1334 hm²,其中,条斑紫菜

栽培面积约为334 hm², 出现病烂的海区面积约为134 hm²。发病初期, 在局部区域的个别网帘出现病烂紫菜, 之后病烂逐步向四周传播, 在1周内致使约134 hm²的紫菜脱苗(图1B)。发病紫菜长度约为3 cm, 病程较轻的叶片边缘、基部和中部可见粉色的病斑, 病程严重的叶片出现褪色甚至溃烂、脱落(图1A)。在显微镜下观察发现, 病灶部位的紫菜细胞内寄生1~4个不规则圆球形或椭圆形的原生质团, 寄生菌体大小不一(长约为10~15 μm, 宽约为10~20 μm), 内有颗粒状和发亮的油滴状物质, 寄主紫菜细胞被挤压变形, 色素体被挤到细胞边缘, 呈绿色突起状, 部分紫

菜细胞出现萎缩或藻红素解体(图1C)。还可观察到, 拟油壶菌孢子囊伸出典型的释放管结构和释放的游动孢子(图1D、图1E), 孢子囊呈球形, 直径为3~12 μm, 游动孢子为圆球状, 直径约为2 μm, 释放管径为2~3 μm, 供游动孢子单行通过, 与已报道的拟油壶菌孢子囊和游动孢子结构相同(Sekimoto *et al.*, 2009; Klochkova *et al.*, 2016; Kwak *et al.*, 2017)。孢子释放完后留下孢子囊空壳, 释放管长度约20 μm(图1F)。另外, 本研究观察发现, 拟油壶菌可感染紫菜的精子囊(图1G)。上述特征与国内外报道的紫菜拟油壶菌病的病理变化特征一致(Ding *et al.*, 2005; 马家海

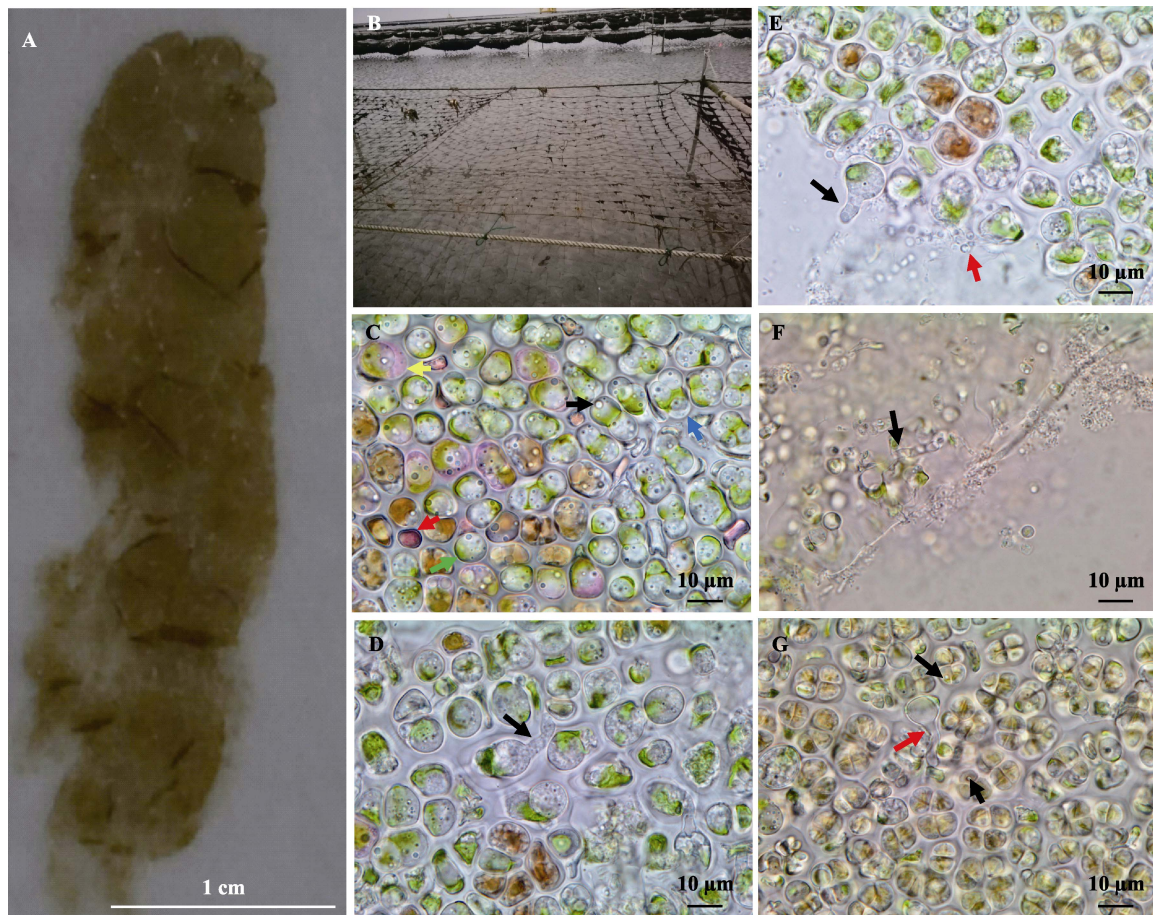


图1 海区患病条斑紫菜的病理症状

Fig.1 Histopathology of natural fungal infection in cultured diseased *P. yezoensis*

- A: 患病紫菜叶片; B: 病害导致紫菜网帘几乎全部脱落; C: 发病紫菜细胞萎缩(红色箭头), 内有明亮的油滴状物质(黑色箭头), 细胞内容物被挤压导致藻红素解体(黄色箭头), 细胞一端形成浓绿色突起(绿色箭头), 有些细胞内有多个菌体寄生(蓝色箭头); D: 释放管; E: 孢子囊伸出释放管(黑色箭头), 游动孢子释放(红色箭头); F: 空的孢子囊伸出长而弯曲的释放管; G: 精子囊细胞被感染(黑色箭头), 空的孢子囊(红色箭头)
- A: Diseased *P. yezoensis* blade; B: *P. yezoensis* fall off caused by disease; C: Diseased cells get smaller (red arrow), oil drop-like substances in the fungus (black arrow), the cell contents are squeezed and the phycoerythrobilin disintegrates (yellow arrow), one side of the cell with rich-green outgrowth (green arrow), several parasitic thalli in one cell (blue arrow); D: Liberation tube; E: Sporangium begins to push out the liberation tube (black arrow), zoospores are releasing (red arrow); F: Long and curved liberation tubes of the empty parasitic sporangium; G: Infected spermatangium cells (black arrows), and the empty sporangium (red arrow)

等, 2007; Sekimoto *et al.*, 2009; 刘一萌等, 2012; Klochkova *et al.*, 2016; Kwak *et al.*, 2017)。

2.2 人工感染实验

在 10℃ 和 20℃ 条件下, 患病紫菜的叶片和匀浆液均可引起紫菜发病。在 10℃ 条件下, 3 d 内可观察到紫菜叶片整体颜色变浅, 边缘呈透明的浅绿色(图 2A), 5~6 d 后, 变成无色并溃烂脱落, 病烂从叶片边缘逐渐往内部延伸发展, 7 d 内叶片全部溃烂。在 20℃ 条件下, 2 d 内即可观察到在叶片近中部出现肉眼可见的病斑, 病斑的中央为红色、边缘为绿色, 逐步发展为无色并溃烂成孔洞(图 2B), 4 d 内叶片全部溃烂。对照组紫菜叶片生长正常, 均未出现发病情况(图 2C), 在

显微镜下观察, 未发现紫菜细胞有明显变化(图 2E)。2 种温度条件下被感染紫菜的组织病理变化一致, 在紫菜细胞中均发现拟油壶菌感染的典型特征: 细胞内有溶出的藻红素、菌体内有大量的油滴状物质以及被拟油壶菌挤压到细胞边缘而呈绿色突起状的细胞质(图 2D)。

2.3 病原 PCR 鉴定

以采集和人工感染的病烂紫菜的基因组 DNA 作为模板, 分别用腐霉、拟油壶菌的 *cox1* 引物进行 PCR 扩增。结果显示, 采集和人工感染的病烂紫菜均检测到拟油壶菌 *cox1* 序列的特异条带, 未检测到腐霉的 *cox1* 序列条带。将扩增得到的 DNA 产物进行序列测定和 BLAST 同源性比对, 结果显示, 与紫菜拟油壶

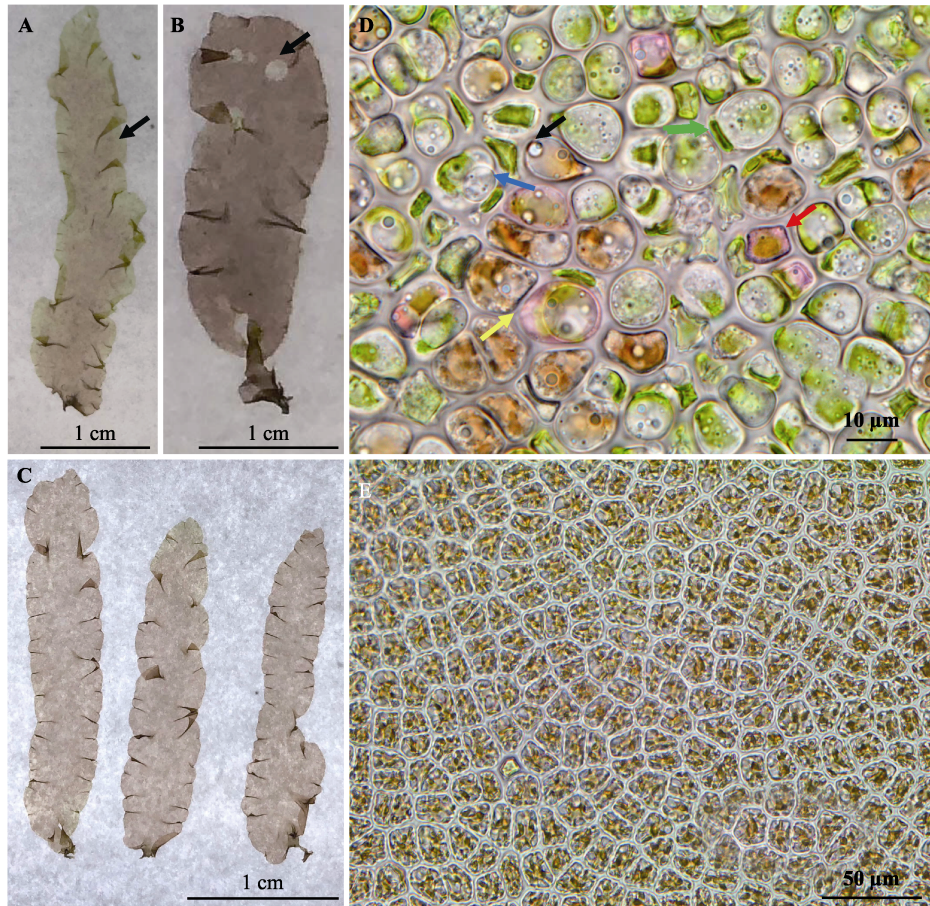


图 2 人工感染紫菜的病理观察

Fig.2 Histopathology of experimentally infected *P. yezoensis*

- A: 10℃ 侵染 3 d 时的紫菜叶片; B: 20℃ 侵染 2 d 时的紫菜叶片; C: 对照组紫菜叶片; D: 人工感染紫菜叶片, 紫菜细胞萎缩(红色箭头), 菌体内有明亮的油滴状物质(黑色箭头), 细胞内藻红素溶出(黄色箭头), 细胞一端形成浓绿色突起(绿色箭头), 3 个菌体寄生于同一细胞(蓝色箭头); E: 对照组紫菜细胞
- A: Infected *Pyropia* blade in 10℃ at the third day; B: Infected *Pyropia* blade in 20℃ at the second day; C: *Pyropia* blades in negative control group; D: Experimental infection *Pyropia* blade, the *Pyropia* cells shrink (red arrow), oil drop-like substances in the fungus (black arrow), the phycocyanin in the cell disintegrates (yellow arrow), one side of the cell product with rich-green outgrowth (green arrow), three parasitic thalli in one *Pyropia* cell (blue arrow); E: *Pyropia* cells in negative control group

菌(*O. pyropiae*, *O. porphyrae*)的 *cox1* 基因序列相似度为 100%。在系统发育进化树的分析上, 现场采集

(OlpBL201901)及人工感染(OlpRZ201901)的拟油壶菌序列与紫菜拟油壶菌聚为一支(图 3)。

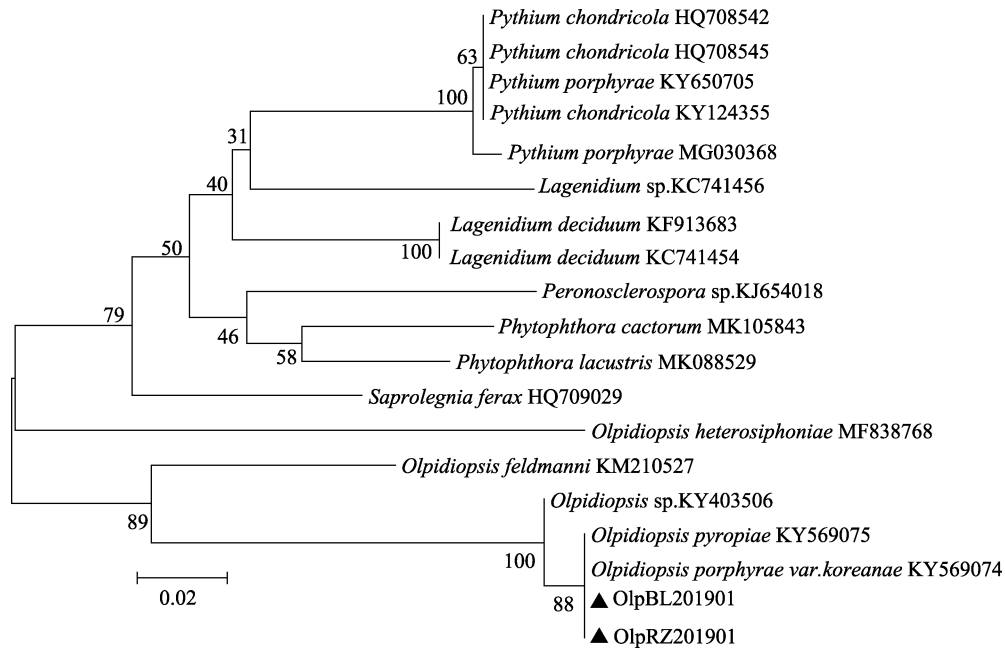


图 3 基于 *cox1* 序列的系统发育进化树

Fig.3 Phylogenetic tree constructed based on *cox1* gene sequences

3 讨论

本研究对江苏省盐城市大丰区条斑紫菜栽培海区的病烂紫菜进行了调查和病原分析鉴定, 综合发病紫菜的病理症状、人工感染实验、病原 PCR 鉴定的结果, 确定了引起此次条斑紫菜大面积病烂的病原为紫菜拟油壶菌(*Olpidiopsis* sp.)。

本调查发现, 病烂的条斑紫菜叶片长约为 3 cm, 为幼叶期紫菜, 细胞生长和分裂速度快, 且细胞壁薄, 拟油壶菌更易穿过紫菜边缘未完全形成的细胞壁而寄生(Migita, 1969)。紫菜细胞壁是抵御病原的重要屏障, 厚度与其应对卵菌侵染能力密切相关(Park *et al.*, 2014)。因而, 拟油壶菌病更易在紫菜的幼叶期或收割后发生(Migita, 1969; Klochkova *et al.*, 2016)。在发病初期, 有红色病斑出现在紫菜叶片的边缘、基部、中部, 病斑处的紫菜细胞被圆形菌体感染, 菌体内可见多个油滴状物质。随着病程的发展, 病斑颜色变浅, 从而导致整个叶片颜色变浅, 最后溃烂溶解。拟油壶菌孢子囊呈球形, 直径为 3~12 μm , 孢子囊的释放管径为 2~3 μm ; 游动孢子从释放管逸出, 全部释放完后留下孢子囊空壳, 此时, 释放管长度可达 20 μm ; 游动孢子为圆球状, 直径为 2 μm 左右。这些特征与紫菜拟油壶菌病感染症状一致(Ding *et al.*, 2005;

马家海等, 2007; Sekimoto *et al.*, 2009; 刘一萌等, 2012; Klochkova *et al.*, 2016; Kwak *et al.*, 2017)。拟油壶菌不仅能侵染紫菜叶状体营养细胞, 还能寄生于生殖细胞和丝状体细胞。Arasaki (1960)通过显微镜观察发现, 拟油壶菌可偶见于甘紫菜(*P. tenera*)果孢、未成熟的果孢子及丝状体中, 但并不存在于精细胞中。刘一萌等(2012)研究发现, 拟油壶菌亦可侵染坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)的精细胞。本研究发现, 拟油壶菌也可寄生于条斑紫菜的精细胞中, 其可能通过精细胞与果孢的有性生殖进行传递, 寄生于果孢子中, 果孢子萌发后而在丝状体中存活, 使拟油壶菌能在夏季存活于海区, 并在温度合适时释放游动孢子, 成为紫菜栽培期的病原。因而, 在育苗过程中, 应对果孢子或自由丝状体进行镜检, 避免拟油壶菌的引入。

拟油壶菌属种类繁多, 形态特征相近, 由于具有明显差异的形态特征较少, 一般通过寄生的宿主以及分子生物学的方法进行分类。Dick(2001)根据拟油壶菌的寄生宿主将其划分为 3 个属: 寄生陆生植物及淡水藻类的拟油壶菌属(*Olpidiopsis* sp.)、寄生海洋红藻的桥壶菌属(*Pontisma* sp.)及寄生海洋绿藻的离壶菌属(*Sorplidium* sp.)。但其对拟油壶菌属的重新分类由于仅仅基于寄生宿主, 而没有基于任何超微结构和分子数据而受到质疑(Sekimoto *et al.*, 2008)。随着分子生

生物学技术的发展,越来越多适合卵菌分类的分子标记被报道,如 18S rRNA、*cox1* 和 *cox2* 等基因序列(Sekimoto *et al.*, 2009; Klochkova *et al.*, 2016; Kwak *et al.*, 2017),使紫菜卵菌病害的病原鉴定更加便利。本研究分析了采集和人工感染病烂紫菜疑似病原的 *cox1* 序列,结果显示,与紫菜拟油壶菌 *cox1* 序列相似性为 100%,在系统发育上聚为一支。目前,已报道的有 3 种拟油壶菌可以感染紫菜的叶状体,分别为韩国鉴定的致病菌 *O. pyropiae* (Klochkova *et al.*, 2016),日本鉴定的致病菌 *O. porphyrae* (Sekimoto *et al.*, 2008)及其变种 *O. porphyrae* var. *koreana* (Kwak *et al.*, 2017);另有一种拟油壶菌 *O. bostrychiae* 可以感染紫菜丝状体(West *et al.*, 2006)。Klochkova 等(2016)通过分析日本致病菌和韩国致病菌的 18S rRNA 基因,发现韩国致病菌与日本致病菌相比缺少第 1 类内含子,因而将韩国致病菌鉴定为 *O. pyropiae*。Kwak 等(2017)研究发现,1 株韩国致病菌的 18S rRNA 基因在第 2 和第 3 内含子之间插入了 1 个第 5 内含子,因此将此韩国致病菌鉴定为 *O. porphyrae* 的变种 *O. porphyrae* var. *koreanae*。本研究尝试根据已有文献的引物扩增 18S rRNA 基因序列,进一步鉴定拟油壶菌的分类地位,但未能扩增出相应的条带,推测可能由于本次发病的拟油壶菌 18S rRNA 基因序列与以往的菌株存在部分差别,具体原因有待进一步验证。因此,不能判断本研究鉴定的病原菌属于 *O. porphyrae* 还是 *O. pyropiae*,暂时鉴定为 *Oplidiopsis* sp.。

由于拟油壶菌属于专性活细胞内寄生菌,尚无体外分离培养的方法(Sekimoto *et al.*, 2008)。目前,实验室人工感染实验均以发病紫菜叶片作为感染源,通过发病紫菜叶片与健康紫菜共培养来实现(马家海等, 2007; Sekimoto *et al.*, 2008、2009; Klochkova *et al.*, 2016; Kwak *et al.*, 2017)。本研究分别采用被感染的紫菜叶片及其匀浆液作为感染源进行人工感染实验,结果显示,二者均可使健康紫菜出现与海区病烂紫菜一致的症状和病理特征。马家海(1992)研究表明,拟油壶菌感染的最适水温为 15℃~20℃,本研究结果也显示,在 20℃ 条件下出现拟油壶菌病感染的症状早于 10℃ 条件下。一般认为,拟油壶菌的游动孢子在 10℃ 条件下的感染和寄生较慢,在 5℃ 下不感染(马家海, 1992)。目前,尚未有 10℃ 以下拟油壶菌感染紫菜的报道。本研究中的条斑紫菜拟油壶菌病发生于 1 月,海区水温约为 4℃,推测可能由于紫菜栽培温度受光照、潮汐和干出等的影响,局部温度升高引起拟油壶菌感染和传播,也可能是引起此次发病的拟油壶菌与以往报道存在差别,在低温下仍具有很强的致病力,其原因和机制有待进一步深入研究。

综上所述,本研究鉴定了引起江苏省盐城市大丰区条斑紫菜病烂的拟油壶菌为 *Oplidiopsis* sp.,可为我国栽培期紫菜的拟油壶菌病害防控提供有效参考。

参 考 文 献

- ARASAKI S. A chytridean parasite on the *porphyra*. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1960, 26(6): 543–548
- DICK M W. Straminipilous fungi systematics of the peronosporomycetes including accounts of the marine straminipilous protists, the plasmodiophorids and similar organisms. *Terrorism*, 2001, 13(4): 311–328
- DING H Y, MA J H. Simultaneous infection by red rot and chytrid diseases in *Porphyra yezoensis* Ueda. *Journal of Applied Phycology*, 2005, 17(1): 51–56
- GACHON C M M, SIME-NGANDO T, STRITTMATTER M, *et al.* Algal diseases: Spotlight on a black box. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(11): 633–640
- IM H, KLOCHKOVA T A, LEE D J, *et al.* Genetic toolkits of the red alga *Pyropia tenera* against the three most common diseases in *Pyropia* farms. *Journal of Phycology*, 2019, 55(4): 801–815
- KLOCHKOVA T A, SHIN Y J, MOON K H, *et al.* New species of unicellular obligate parasite, *Oplidiopsis pyropiae* sp. n. v., that plagues *Pyropia* sea farms in Korea. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(1): 73–83
- KWAK M S, KLOCHKOVA T A, JEONG S, *et al.* *Oplidiopsis porphyrae* var. *koreanae*, an endemic endoparasite infecting cultivated *Pyropia yezoensis* in Korea. *Journal of Applied Phycology*, 2017, 29(7): 2003–2012
- LEE S J, HWANG M S, PARK M A, *et al.* Molecular identification of the algal pathogen *Pythium chondricola* (Oomycetes) from *Pyropia yezoensis* (Rhodophyta) using ITS and *cox1* markers. *Algae*, 2015, 30(3): 217–222
- LI J, MOU Z J, YANG H C, *et al.* Isolation and identification the pathogen of *Pyropia yezoensis* green spot disease. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(4): 140–146 [李杰, 牟宗娟, 杨慧超, 等. 条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)绿斑病原菌的分离鉴定. *渔业科学进展*, 2019, 40(4): 140–146]
- LIU Y M, MA J H, WEN Q. Simultaneous infection by red rot and oplidiops disease in laver *Porphyra haitanensis*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2012, 27(6): 546–550 [刘一萌, 马家海, 文茜. 坛紫菜赤腐病与拟油壶菌病并发病的初步研究. *大连海洋大学学报*, 2012, 27(6): 546–550]
- MA J H, LIN Q S, MIN J, *et al.* Preliminary study on the oplidiops-disease of *Porphyra yezoensis*. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(6): 860–864 [马家海, 林秋生, 闵建, 等. 条斑紫菜拟油壶菌病的初步研究. *水产学报*, 2007, 31(6): 860–864]
- MA J H. A preliminary study on the red rot disease of *Porphyra yezoensis*. *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]
- MA J H. An investigation of chytrid-disease in *Porphyra yezoensis* in the coastal water of south Jiangsu. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 1992, 1(3/4): 185–188 [马家海. 江苏省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(3/4): 185–188]
- MIGITA S. *Oplidiopsis* disease of culture *Porphyra*. *Bulletin of the Faculty of Fisheries Nagasaki University*, 1969, 28: 131–

- 145
 PARK C S, HWANG E K. Isolation and evaluation of a strain of *Pyropia yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) resistant to red rot disease. *Journal of Applied Phycology*, 2014, 26(2): 811–817
- QIU L P. Isolation, identification and characterization of *Pythium porphyrae* JS151205. Master's Thesis of Ocean university of China, 2018 [邱丽萍. 紫菜腐霉 JS151205 的分离鉴定及生长特性研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2018]
- SEKIMOTO S, KLOCHKOVA T A, WEST J A, *et al.* *Oplidiopsis bostrychia* sp. nov.: An endoparasitic oomycete that infects *Bostrychia* and other red algae (Rhodophyta). *Phycologia*, 2009, 48(6): 460–472
- SEKIMOTO S, YOKOO K, KAWAMURA Y, *et al.* Taxonomy, molecular phylogeny, and ultrastructural morphology of *Oplidiopsis porphyrae* sp. nov. (Oomycetes, straminipiles), a unicellular obligate endoparasite of *Bangia* and *Porphyra* spp. (Bangiales, Rhodophyta). *Mycological Research*, 2008, 112(3): 361–374
- TANIGUCHI M. Studies on the yellow spot disease of conchocelis-I. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1970, 36(7): 686–691
- WEST J A, KLOCHKOVA T A, HOON K G, *et al.* *Oplidiopsis* sp., an oomycete from Madagascar that infects *Bostrychia* and other red algae: Host species susceptibility. *Phycological Research*, 2006, 54(1): 72–85

(编辑 马璀璨)

Diagnosis of *Oplidiopsis* Disease in *Pyropia yezoensis*

HE Lijuan^{1,2}, YANG Huichao^{2,3}, LI Jie², TANG Lei¹, LIU Cong¹, MO Zhaolan^{1,2,3①}

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 26603, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266071, China; 3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract Red rot and *Oplidiopsis* disease are the main diseases that occur during the farming of *Pyropia* (Bangiales, Rhodophyta) cultivated in the sea, which cause large areas of *Pyropia* to rot. *Oplidiopsis* disease is caused by *Oplidiopsis* sp., which is a biotrophic parasitic oomycete and there is currently no *in vitro* culture method for this species. The pathogen can only be identified by high-resolution microscopic observation and molecular methods. Experimental infection is typically undertaken by culturing diseased *Pyropia* with normal blades. In January 2019, 2000 acres of *Pyropia* disease occurred in a *P. yezoensis* cultivation area in Dafeng District, Yancheng City, Jiangsu Province, causing a large decrease of the *P. yezoensis* yield. We performed an investigation and pathogen identification of this disease. By macroscopic observation and studying the histopathology characteristics of the diseased thalli using a microscope, the *Pyropia* symptoms were found to be the same as that of the *Oplidiopsis* disease. The main symptoms were as follows: Pink spots appeared at the edge, base, and middle of the thallus at the beginning of the infection, which gradually faded and expanded as the disease progressed. During the late infection stage, the entire thallus became lighter and the tissue broke down and fell off. One to four spheroid parasitic oomycetes were found in one *Pyropia* cell, which contained multiple oil drop-like substances. Diseased thalli or their homogenates were used for experimental infection, with all causing *Oplidiopsis* disease symptoms in normal thalli at 10°C and 20°C. To identify the pathogen, *cox1* gene sequencing and phylogenetic analysis of the naturally and experimentally infected thalli were performed. The results showed that the pathogen sequences were clustered with *O. porphyrae*, *O. pyropiae* and *O. porphyrae* var. *koreana* with 100% similarity. In summary, the disease of *P. yezoensis* in Dafeng District was found to be caused by *Oplidiopsis* sp.

Key words *Pyropia yezoensis*; *Oplidiopsis* disease; *cox1*; *Oplidiopsis* sp.

① Corresponding author: MO Zhaolan, E-mail: mzl@ouc.edu.cn