

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210326002

http://www.yykxjz.cn/

阎永伟, 杨慧超, 莫照兰, 李杰. 患拟油壶菌病条斑紫菜表面附生菌群分析. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 165–175
YAN Y W, YANG H C, MO Z L, LI J. Epiphytic microbial communities associated with *Neopyropia yezoensis* with *Oplidiopsis* disease. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 165–175

患拟油壶菌病条斑紫菜表面附生菌群分析*

阎永伟¹ 杨慧超^{1,2} 莫照兰^{1,2,3} 李杰^{1①}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 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 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306;

3. 中国海洋大学三亚海洋研究院 热带海洋生物种质资源开发与种业工程实验室 海南 三亚 572024)

摘要 拟油壶菌病(*Oplidiopsis* disease)是海上栽培紫菜(*Porphyra sensu lato*)的主要病害之一,常引起紫菜大面积病烂并造成严重经济损失。本研究利用拟油壶菌感染海区内不同健康状态下的条斑紫菜(*Neopyropia yezoensis*)[未发生任何病烂(PyOlpH)、部分紫菜发生病烂(PyOlpM)和发生严重病烂(PyOlpS)],分析其附生菌群多样性、群落结构和主要类群之间的相互作用。结果显示,3种紫菜附生菌群 α 多样性指数不存在显著差异,但PyOlpM组指数高于其他组。3种紫菜附生菌群共有可操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)数仅占总OTU数的22.7%,菌群之间存在显著差异(置换多元方差分析, $R^2=0.405$, $P<0.05$)。紫菜感染程度越高,与PyOlpH之间的差异类群数量越多。共注释出23门208属, α -变形菌纲(α -Proteobacteria)、 γ -变形菌纲(γ -Proteobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes)在所有样品中均占优势,相对丰度前20个属中有16个也位于这3个类群中,且随着感染程度的增加分别出现递增或递减的趋势。其中,贪铜菌属(*Cupriavidus*)和鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)是共现网络中连接度最高的细菌类群,二者及其依靠正相互作用连接的细菌类群之间存在负相互作用。本研究可为阐明拟油壶菌致病的微生态机制及寻找生防细菌提供一定的数据支持。

关键词 条斑紫菜; 拟油壶菌病; 附生菌群; 细菌互作

中图分类号 S917.1 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)03-0165-11

紫菜(*Porphyra sensu lato*, 亦称 laver)是一种深受世界人民喜爱的高营养价值海洋红藻,其广泛栽培主要集中在中国、韩国和日本等亚洲国家。由于部分海区的水质贫瘠、潮流不通、水体污染、温度不适、养殖管理不当等因素,近年来我国紫菜栽培业饱受频发病害的困扰(黄健等, 2000),部分栽培海区的病烂面积可达40%~50%(Yan *et al.*, 2019; 何礼娟等, 2021)。拟油壶菌病(*Oplidiopsis* disease)是海上栽培紫菜的重要病害之一,可在短时间内蔓延并导致大面积

病烂(Klochkova *et al.*, 2016)。已确定该病原属于专性细胞内寄生的卵菌纲拟油壶菌属(*Oplidiopsis*),已发现的*Oplidiopsis pyropiae*、*O. porphyrae*、*O. porphyrae* var. *korenae*、*O. porphyrae* var. *scotiae*、*Oplidiopsis bostrychiae*、*O. heterosiphoniae*以及*O. muelleri*等7种菌均具有感染紫菜的能力(West *et al.*, 2006; Sekimoto *et al.*, 2008、2009; Klochkova *et al.*, 2016; Kwak *et al.*, 2017; Badis *et al.*, 2019)。我国最早于1992年在江苏省南部栽培的条斑紫菜(*Neopyropia yezoensis*, 原名

* 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]. 阎永伟, E-mail: yanyw@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 李杰, 副研究员, E-mail: lijie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-03-26, 收修改稿日期: 2021-04-19

Pyropia yezoensis [Yang *et al.*, 2020])中发现该病(马家海, 1992), 并先后在栽培条斑紫菜和坛紫菜(*Neoporphyra haitanensis*, 原名 *Porphyra haitanensis* [Yang *et al.*, 2020])中发现感染该病(马家海等, 2007; 刘一萌等, 2012; 何礼娟等, 2021)。拟油壶菌病是对紫菜栽培威胁最大的病害之一, 目前对病原尚没有体外分离培养的方法(Sekimoto *et al.*, 2008), 因此, 对其致病机制还知之甚少, 也缺乏对该病害长期有效的防控方法。已经施用的措施包括降低栽培密度、网帘干出以及酸洗等, 但效果并不理想(Kim *et al.*, 2014)。因此, 探索病害发生的机理及其生物防控方法十分有必要。

近年来, 附生细菌逐渐成为探究藻类病害发生机理和生物防控的热点和靶点。这是因为藻类附生细菌除了为藻类生长提供重要的营养物质和生长因子、帮助藻类完成生命周期等重要作用(Goecke *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2014), 还与藻类病害密切相关。一方面, 环境胁迫条件下藻类附生微生物的生态失调是导致病害的重要原因。某些致病微生物类群或其毒力相关的功能基因群在受胁迫个体上大量富集并最终致病(Egan *et al.*, 2014、2016)。另一方面, 藻类附生细菌还能通过分泌抗菌物质或群感效应(quorum sensing, QS)抑制剂等次级代谢产物干扰和抵抗致病菌的附着, 保护海藻不受环境中病原的感染等(Egan *et al.*, 2014)。据统计, 藻类附生细菌中约有 12%~50%的菌株具有抗菌活力, 是生防菌和抗病物质的重要来源(Singh *et al.*, 2015)。

此外, 对植物和动物卵菌病害的研究也充分体现了附生细菌在促病、防病方面的重要作用。一方面, 植物表面附生细菌可产生卵菌毒力必需的细菌毒素或通过共感染以加强卵菌效应基因表达来促进卵菌的致病性(Larousse *et al.*, 2017)。另一方面, 附生细菌能抑制卵菌病原的附着或者利用其基因产物抑制卵菌孢子的萌发及菌丝的生长。例如, 大西洋鲑(*Salmo salar* L.)的卵受水霉病侵染时, 低发病率的鱼卵上附着的高丰度叶居菌属(*Fronidhabitans*)细菌能有效抑制病原的附着(Liu *et al.*, 2014); 而阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)则能利用 *fadB* 和 *fadL* 基因表达的氧化酶和蛋白与终极腐霉(*Pythium ultimum*)竞争植物产生的不饱和脂肪酸, 从而抑制腐霉的萌发并达到抑病的效果(van Dijk *et al.*, 2000)。

然而迄今为止, 附生细菌与紫菜拟油壶菌病的关系尚未明确, 一定程度上阻碍了附生细菌在促病、抗病方面的研究进展。因此, 研究紫菜附生细菌与拟油壶菌病之间的关系, 对病害的生物防控具有十分重要的意义。本研究分析了受拟油壶菌病感染的不同健康

状态下的条斑紫菜附生菌群变化, 拟为探究病害发生的微生态机制及寻找潜在生防细菌类群提供一定的基础数据。

1 材料与方 法

1.1 样品采集

样品采集地点为条斑紫菜的重要栽培区域, 位于江苏省盐城市大丰区沿岸东沙海区(121°03'25.88"E, 33°20'11.28"N), 海区面积约为 1333 hm²。2018 年 10 月—2019 年 1 月, 该海区条斑紫菜栽培面积共约 333 hm²。2019 年 1 月 4 日开始, 约 133 hm² 区域条斑紫菜发生病烂, 病烂面积达 40%左右。从该区域选择 3 种不同状况的网帘进行条斑紫菜采样: 网帘上紫菜未发生任何病烂(PyOlpH)、网帘上部分紫菜已发生病烂(PyOlpM)以及网帘上紫菜已经发生严重病烂(PyOlpS)(图 1)。每种类型网帘均采集 3 个生物重复, 每个生物重复采集同一网帘上相对较为完整的多株(30~40 株)条斑紫菜藻体, 均匀混合后置于无菌采样袋中, 同时用无菌采水袋采集网帘下部的原位海水以浸没采样袋中的紫菜样品。采集好的紫菜样品存放于低温保温箱中带回实验室进行后续研究。在每个生物重复中随机挑选 5~6 株条斑紫菜, 通过镜检确认感染情况。然后, 在每个生物重复中再随机挑选 5~6 株紫菜藻体, 混合后用于附生菌群 DNA 提取及微生物群落分析。

1.2 病理观察及病原鉴定

病理观察及病原鉴定过程见何礼娟等(2021)。将紫菜样品用无菌海水冲洗 3~5 次后用灭菌的毛笔去除表面杂质, 并用无菌刀片切取面积约为 1 cm² 的条斑紫菜典型病烂部位, 在显微镜下观察后, 记录病烂紫菜的组织病理变化。未发生病烂网帘的紫菜则随机切取相同面积的组织进行显微观察。

用真菌基因组 DNA 提取试剂盒(思科捷, 青岛)提取 PyOlpM 和 PyOlpS 组样品基因组 DNA, 并分别用真菌 ITS 通用引物 ITS5 和 ITS4 (White *et al.*, 1990)、腐霉(*Pythium*) *cox1* 序列特异引物 *cox1-pyth-F* 和 *cox1-pyth-R* (Lee *et al.*, 2015)以及拟油壶菌 *cox1* 特异引物 *cox1-olpi-F* 和 *cox1-olpi-R* (Kwak *et al.*, 2017)进行 PCR 扩增。最后, PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测, 并将目的片段胶回收、T 载体连接及转化, 将阳性克隆进行测序分析。所得序列在 NCBI 中进行 BLAST 同源性比对, 并在 MEGA-X 软件中用邻接法(Neighbor-Joining, N-J)构建系统发育进化树, 模型选择为 Kimura2-paramete (Bootstrap 设置为 1000)。

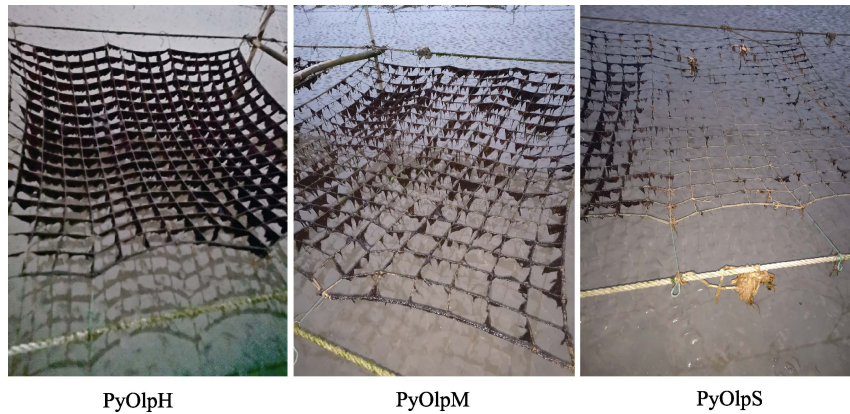


图1 不同健康状态下的紫菜栽培网帘比较

Fig.1 Comparison of laver cultivation nets in different statuses

1.3 附生菌群 DNA 提取、PCR 扩增及高通量测序

紫菜样品表面附生细菌群落 DNA 提取参照 Burke 等(2009)的方法并做适当修改: 每个生物重复的 5~6 株紫菜藻体先用灭菌海水清洗 3 次以去除松散结合的浮游微生物; 然后, 将藻体置于 15 mL CMFSW 缓冲液(含 0.45 mol/L NaCl、10 mmol/L KCl、7 mmol/L Na₂SO₄ 和 0.5 mmol/L NaHCO₃)中, 并添加 10 mmol/L EDTA 和 150 μL 过滤除菌的快速多酶消化液(3M, 澳大利亚)于室温下孵育 2 h; 移除藻体后, 清液用等体积的酚: 氯仿: 异戊醇(25: 24: 1)和氯仿: 异戊醇(24: 1)各抽提一次, 取上清液并加入 3 倍体积的无水乙醇和 0.1 倍体积的醋酸钠溶液(3 mol/L, pH 5.2), 混合均匀后于 -20℃ 过夜沉淀; 4℃ 20000 × g 离心 30 min 获得 DNA 沉淀后, 用 70% 的乙醇溶液洗涤 2 次; 最后, 用 200 μL 的无酶灭菌水溶解 DNA 并用琼脂糖凝胶电泳确定 DNA 片段大小及质量。

取 2 μL DNA, 用 Q5 高保真 DNA 聚合酶及地球微生物组计划(Earth Microbiome Project)推荐的 16S rRNA 基因通用引物 515F (5'-GTGYCAGCMGCCGCG GTAA-3') 和 926R(5'-CCGYCAATYMTTTRAGTTT -3') 扩增 V4~V5 可变区(Walters *et al*, 2016)。每个样品进行扩增时, 515F 引物 5'端会附加 6 碱基的 barcode 以对不同样品加以区分。扩增条件: 98℃ 预变性 2 min; 98℃ 变性 15 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 25~27 个循环; 72℃ 后延伸 5 min。每个样品的 PCR 产物用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒(Axygen, 美国)切胶回收, 并用 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (ThermoFisher Scientific, 美国)对 PCR 产物进行定量。PCR 扩增子在上海派森诺公司用 Illumina MiSeq 平台进行 2×300 的双端测序。

1.4 数据分析

每个样品的双端下机序列用 USEARCH 10.0.240 (Edgar, 2010)进行拼接、质控、去除嵌合体, 并按照 97% 的相似度聚类成可操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)。采用 RDP classifier 贝叶斯算法在 QIIME 1.9.1 (Caporaso *et al*, 2010)中基于 SILVA132 数据库对 OTU 代表序列进行分类(cutoff 值设为 0.8)并生成 OTU 表, 将注释为 Unassignable、Unclassified、Chloroplast 以及 Mitochondria 等的 OTU 信息从 OTU 表中去除, 所得 OTU 表用以计算 α 多样性、β 多样性和附生菌群组成等。用 R (R core team, 2014)和 Excel 对微生物多样性及群落进行统计分析, 包括各个类群相对丰度统计、α 多样性指数的单因素方差分析(one-way ANOVA)、韦恩图分析、主坐标分析(PCoA)及置换多元方差分析(PERMANOVA)。

1.5 差异菌群分析

用 LEfSe [line discriminant analysis (LDA) effect size] (Segata *et al*, 2011)分析不同感染程度紫菜与未感染紫菜附生菌群中的差异类群。其中, 本研究中 LEfSe 分析的参数分别设定为 LDA score > 2.5, α = 0.05。

1.6 共现网络分析

用相对丰度前 20 的细菌属构建共现网络(co-occurrence network)。用 psych 包中的 corr.test ()函数在 R 中计算各细菌属间成对的 Spearman 相关系数矩阵, 并用 Gephi 0.9.2 (Bastian *et al*, 2009)对共现网络进行可视化。网络图中的每一个节点(node)均代表某个细菌属, 节点之间的连线(也叫作边, edge)表示 2 个细菌属间具有显著的 Spearman 相关性(|r| > 0.6, 且 FDR 校正的 P < 0.01)。

2 结果

2.1 病理观察及病原鉴定结果

不同状况网帘上紫菜的显微观察结果见图2。如图2所示, PyOlpH组紫菜样品未观察到任何感染迹象。而PyOlpM和PyOlpS组样品在显微镜下观察到紫菜细胞受拟油壶菌感染后呈现的典型病理变化特征(红色箭头), 且后者病变程度明显高于前者。详细的病理观察结果及分析见何礼娟等(2021)。

利用ITS通用引物、腐霉*cox1*特异引物及拟油壶菌*cox1*特异引物对患病紫菜DNA进行检测, 发现仅ITS通用引物和拟油壶菌*cox1*特异引物出现扩增

条带(图3A), 经测序及构建N-J进化树发现该病原与*O. pyropiae*聚为一支(图3B), 说明引起大丰地区紫菜病烂的病原为拟油壶菌。

2.2 各样本测序结果统计

各样品16S rRNA基因高通量测序结果见表1。如表1所示, 下机序列经过拼接、质控等预处理, 共获得有效序列283 911条。经过OTU聚类、代表序列注释以及剔除无效序列等, 共获得247 657条高质量序列, 分属于432个OTU。对测序覆盖度进行统计, 结果显示, 各样本Good's coverage指数均大于0.99(表1), 表明该测序深度能够在很大程度上反映各样品中的附生菌群多样性。

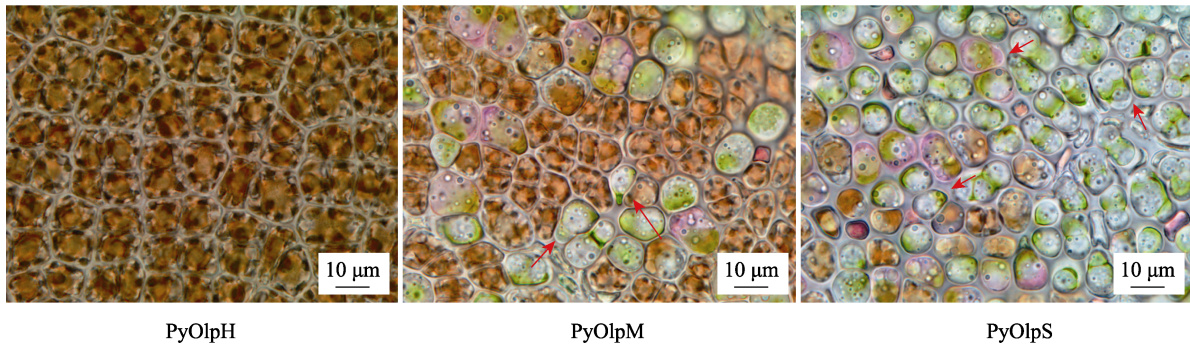


图2 不同状态网帘上条斑紫菜的显微观察

Fig.2 Microscopic observation of *N. yezoensis* on cultivation nets in different statuses

PyOlpS组条斑紫菜显微观察结果引自何礼娟等(2021)

Microscopic observation of *N. yezoensis* in PyOlpS is a quotation from He *et al* (2021)

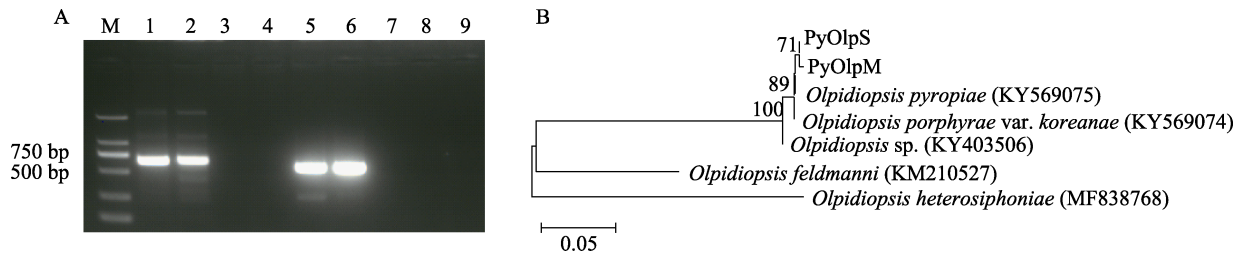


图3 江苏省大丰病烂条斑紫菜病原鉴定

Fig.3 Identification of pathogen causing *N. yezoensis* disease in Dafeng, Jiangsu Province

A: ITS和*cox1*基因扩增的琼脂糖凝胶电泳图; B: 基于*cox1*基因构建的N-J系统进化树

A: Argarose gel elecgtrophoresis for the amplification of ITS and *cox1*;

B: N-J phylogenetic tree constructed based on *cox1* gene sequences

M: DL2000 DNA分子量标准; 1、2: 严重和中度病烂紫菜ITS扩增; 3、4: 严重和中度病烂紫菜的腐霉*cox1*扩增; 5、6: 严重和中度病烂紫菜的拟油壶菌*cox1*扩增; 7、8和9分别为ITS、腐霉*cox1*和拟油壶菌*cox1*阴性对照(无菌水作模板)
M: DL 2000 DNA marker; 1, 2: ITS amplification for PyOlpS and PyOlpM; 3, 4: *Pythium cox1* amplification for PyOlpS and PyOlpM; 5, 6: *Olpidiopsis cox1* amplification for PyOlpS and PyOlpM; 7, 8 and 9: Negative controls using sterilized water as template for ITS, *Pythium cox1* and *Olpidiopsis cox1* amplification, respectively

表 1 各样本测序结果统计
Tab.1 Statistics of the sequencing results of all samples

样品 Sample ID	原始序列 Raw reads	拼接 Merged	OTU 数 OTU No.	OTU 表中序列数 Sequence No. in OTU table	Good's coverage
PyOlpH1	31 240 × 2	30 431	108	22 963	0.999
PyOlpH2	30 832 × 2	29 863	116	23 377	1.000
PyOlpH3	37 366 × 2	35 249	146	32 601	0.999
PyOlpM1	40 263 × 2	38 097	134	32 430	1.000
PyOlpM2	39 302 × 2	37 238	129	31 060	0.999
PyOlpM3	39 741 × 2	38 732	152	30 002	0.999
PyOlpS1	34 329 × 2	32 500	116	28 579	0.999
PyOlpS2	35 833 × 2	33 815	150	21 950	0.999
PyOlpS3	34 855 × 2	32 869	111	24 695	0.999

2.3 α 多样性和 β 多样性

用 Observed species (Obs)、Chao1、PD whole tree (PD)和 Shannon 等指数来表征 α 多样性(图 4)。各组之间的多样性差异均不显著 ($P>0.05$, ANOVA, Tukey's HSD test)。但是, PyOlpM 组样品的 4 个 α 多样性指数(分别为 133.00、143.00、11.01 和 5.30)均高于 PyOlpH 组(分别为 122.00、134.00、10.40 和 5.26)和 PyOlpS 组(分别为 125.00、132.00、9.91 和 4.41), 而 PyOlpS 组除了 Obs 高于 PyOlpH 组外, 其余指数也均低于 PyOlpH 组。

根据各组间附生菌群落结构多样性的相互关系

在 OTU 水平上绘制了韦恩图(图 5A)。结果显示, 3 组样品特有的 OTU 分别为 77、86 和 92 个。有 98 个 OTU 在 3 组样品中均存在, 占 OTU 总数的 22.7%。3 组样品两两之间也存在共有 OTU, 其中, PyOlpH 和 PyOlpM 之间共有 31 个, PyOlpM 和 PyOlpS 之间共有 30 个 OTU, 而 PyOlpH 和 PyOlpS 之间仅共有 18 个 OTU。基于 Bray-Curtis 距离的 PCoA 显示, 紫菜附生菌群可根据条斑紫菜被侵染的程度而分开 (PCo1 解释度为 41.4%), 表明不同状态紫菜附生菌群之间存在明显差异(图 5B)。基于 Bray-Curtis 距离的 PERMANOVA 表明, 这种组间差异具有显著性 ($R^2=0.405, P=0.042<0.05$)。

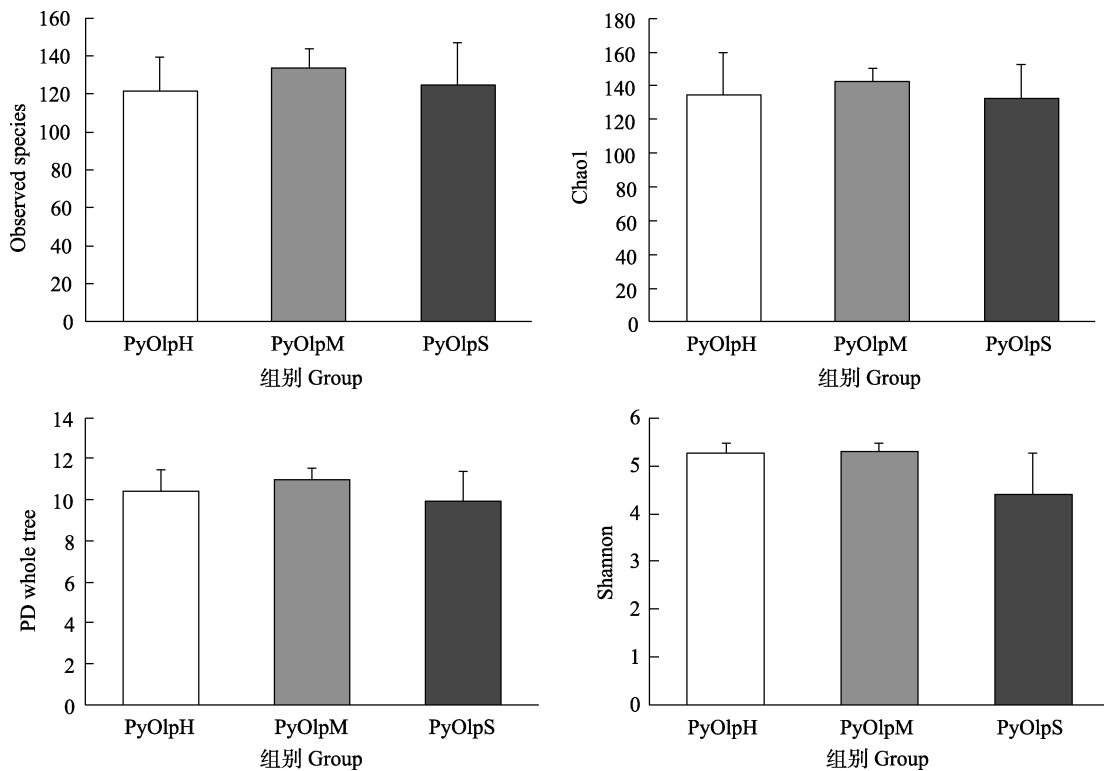


图 4 不同状态紫菜附生菌群的 α 多样性指数比较

Fig.4 Comparison of α diversity indices of epiphytic microbial communities of *N. yezoensis* in different statuses

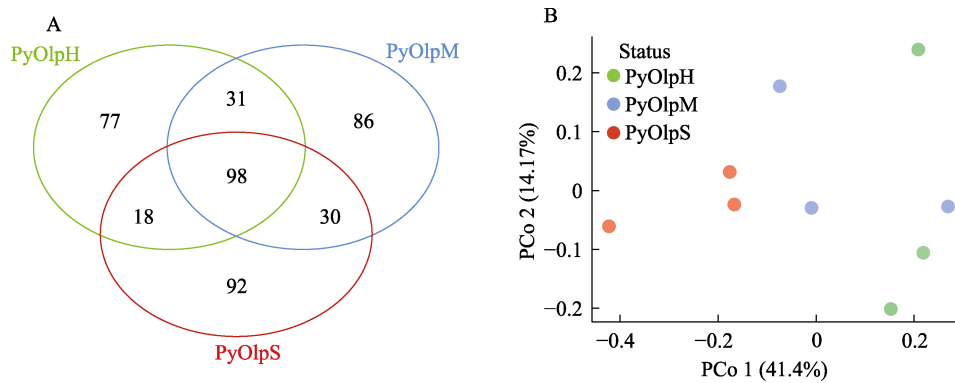


图5 基于 OTU 的韦恩图分析(A)和主坐标分析(B)

Fig.5 Venn diagram (A) and principal co-ordinates analysis (B) based on OTU

2.4 微生物群落组成及差异分析

经过序列注释及分类信息统计,所得高质量序列共注释出 23 门 208 属。其中,变形菌门(Proteobacteria)中的 α -变形菌纲(α -Proteobacteria)和 γ -变形菌纲(γ -Proteobacteria)以及厚壁菌门(Firmicutes)在所有样品中均占优势,在 PyOlpH、PyOlpM 和 PyOlpS 组中共分别占 84.7%、83.4%和 88.0% (图 6)。 α -变形菌纲(PyOlpH: 26.91%; PyOlpM: 24.59%; PyOlpS: 20.44%) 和厚壁菌门(PyOlpH: 17.29%; PyOlpM: 9.56%; PyOlpS: 5.95%) 相对丰度随着感染程度增加呈递减趋势,而 γ -变形菌纲相对丰度(PyOlpH: 40.5%; PyOlpM: 49.2%; PyOlpS: 61.6%) 则随着感染程度增加呈递增趋势。

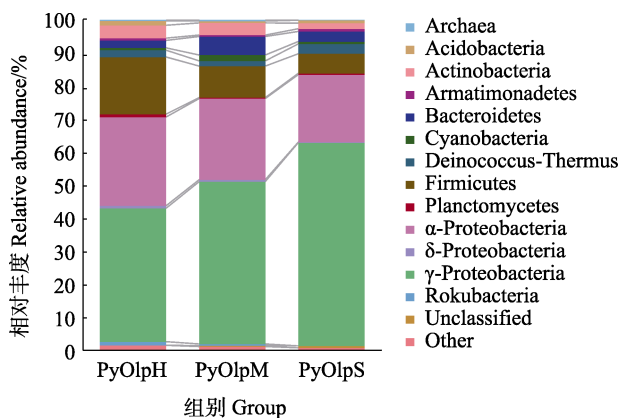


图6 不同状态条斑紫菜附生菌群在门(或变形菌纲)水平上的相对丰度变化

Fig.6 Changes in relative abundance of epiphytic microbial communities of *N. yezoensis* in different statuses at the phylum or Proteobacterial level

从细菌属水平来看,相对丰度前 20 的细菌属中共有 16 个属分布于 α -变形菌纲、 γ -变形菌纲和厚壁菌门(图 7)。例如, α -变形菌纲中的甲基杆菌属(*Methylobacterium*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*) 和柄杆菌属(*Caulobacter*), 前二者相对丰度随着感染

程度的增加而降低,而后者则相反; γ -变形菌纲中的贪铜菌属(*Cupriavidus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*) 和 *Methyloversatilis* 属的相对丰度均随感染程度增加而增加;厚壁菌门中的 *Kroppenstedtia* 属的相对丰度随感染程度增加而减少。

LefSe 分析得到的差异菌群结果显示, PyOlpM 与 PyOlpH 的附生菌群之间共有 16 个类群存在相对丰度的显著差异,其中鞘脂单胞菌目(Sphigomonadales)细菌在 PyOlpH 中显著富集,而黄单胞菌目(Xanthomonadales)则在 PyOlpM 中显著富集(图 8A)。PyOlpS 与 PyOlpH 的附生菌群之间相对丰度存在显著差异的菌群数量则达到 37 个,如 PyOlpS 中的假单胞菌目(Pseudomonadales) 和柄杆菌目(Caulobacterales),表明有更多的细菌类群参与到拟油壶菌的后期感染中(图 8B)。

2.5 附生细菌的共现网络分析

利用相对丰度前 20 的细菌属构建了一个节点数为 18、边数为 27 的共现网络,每个节点的平均度为 3,表示平均每个细菌属连接 3 个其他细菌属,正相互作用的边数为 14 (51.85%),负相互作用的边数为 13 (48.15%)。其中,贪铜菌属的度为最高(8),且与柄杆菌属、假单胞菌属和 *Methyloversatilis* 属之间存在正相互作用(图 9);鞘氨醇单胞菌属的度次之(7),该属细菌与甲基杆菌属、酸杆菌属(*Acidibacter*)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*) 以及高温放线菌属(*Thermoactinomyces*)之间存在正相互作用,且这些细菌属均与贪铜菌属细菌或与贪铜菌属细菌存在正相互作用的细菌类群之间具有负相互作用(图 9)。

3 讨论

本研究以江苏省大丰区某栽培海区遭受拟油壶菌感染的条斑紫菜为研究对象,分析了不同感染状态下条斑紫菜附生菌群的多样性和组成差异以及主要

	PyOlpH			PyOlpM			PyOlpS		
α -Proteobacteria_Methylobacterium	7.49%	10.07%	9.97%	12.50%	5.61%	5.15%	4.19%	5.03%	0.48%
α -Proteobacteria_Caulobacter	0.08%	4.14%	6.05%	0.26%	7.95%	4.85%	5.36%	12.05%	11.62%
γ -Proteobacteria_Cupriavidus	2.66%	3.47%	2.83%	2.71%	4.66%	6.84%	7.42%	7.49%	13.17%
α -Proteobacteria_Sphingomonas	6.78%	9.27%	8.00%	6.64%	5.61%	5.15%	3.69%	3.64%	1.62%
γ -Proteobacteria_Pseudomonas	0.88%	3.19%	2.70%	3.90%	2.67%	3.94%	5.32%	7.28%	8.01%
γ -Proteobacteria_Methyloversatilis	1.48%	0.01%	2.32%	1.99%	3.33%	5.65%	3.70%	7.33%	8.64%
Firmicutes_Kroppenstedtia	4.44%	2.96%	8.65%	7.46%	3.29%	1.12%	1.48%	3.47%	0.11%
γ -Proteobacteria_Herbaspirillum	5.13%	5.76%	1.89%	2.53%	7.43%	2.53%	1.43%	4.61%	0.06%
α -Proteobacteria_Ochrobactrum	3.11%	3.97%	4.13%	5.49%	2.62%	3.17%	2.48%	2.13%	0.18%
γ -Proteobacteria_Acinetobacter	2.23%	1.97%	3.50%	4.81%	1.18%	2.00%	1.66%	1.73%	0.67%
Deinococcus-Thermus_Thermus	0.10%	1.62%	1.59%	0.36%	2.33%	0.92%	4.74%	1.23%	1.69%
γ -Proteobacteria_Ralstonia	1.97%	0.05%	0.63%	0.01%	0.80%	4.43%	1.39%	1.23%	2.43%
Firmicutes_Thermoactinomyces	6.20%	0.03%	3.41%	2.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
Bacteroidetes_Vibrionimonas	0.72%	1.99%	0.91%	3.93%	0.94%	0.33%	0.12%	1.82%	0.03%
Firmicutes_Geobacillus	0.00%	3.10%	0.02%	0.00%	2.94%	0.00%	1.97%	0.01%	2.69%
γ -Proteobacteria_Delftia	0.87%	1.78%	1.71%	0.09%	1.77%	0.26%	0.82%	0.31%	1.94%
Actinobacteria_Rhodococcus	2.26%	1.15%	0.30%	1.85%	1.48%	0.64%	1.34%	0.50%	0.01%
Cyanobacteria_Cyanobium PCC-6307	1.64%	0.01%	0.00%	1.97%	1.72%	1.27%	0.43%	0.94%	0.00%
γ -Proteobacteria_Acidibacter	1.16%	1.72%	0.93%	1.07%	1.46%	0.31%	0.17%	0.49%	0.04%
Firmicutes_Lactobacillus	5.16%	0.00%	0.33%	0.00%	0.01%	0.77%	0.44%	0.00%	0.00%
Firmicutes_Scopulibacillus	0.00%	1.29%	0.44%	0.79%	0.00%	0.34%	2.63%	0.32%	0.14%
Firmicutes_Anoxybacillus	1.49%	0.00%	0.60%	1.57%	0.00%	0.05%	0.62%	0.75%	0.85%
Firmicutes_Bacillus	0.07%	2.01%	0.36%	1.13%	0.00%	1.42%	0.10%	0.21%	0.00%
Actinobacteria_Brevibacterium	0.00%	0.98%	2.31%	0.41%	0.64%	0.15%	0.51%	0.00%	0.00%
α -Proteobacteria_Asticcacaulis	0.00%	0.00%	0.38%	0.00%	0.72%	0.01%	1.56%	0.68%	1.51%
Firmicutes_Faecalibaculum	0.00%	4.80%	0.00%	0.00%	0.01%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%
Deinococcus-Thermus_Deinococcus	0.17%	0.44%	1.83%	0.27%	0.64%	0.12%	1.00%	0.15%	0.20%
Actinobacteria_Amycolatopsis	0.68%	0.36%	0.78%	0.77%	0.38%	0.53%	0.72%	0.35%	0.03%
γ -Proteobacteria_Stenotrophomonas	0.01%	0.14%	0.21%	0.56%	1.57%	0.55%	0.00%	1.41%	0.04%
γ -Proteobacteria_Polaromonas	0.00%	1.87%	2.20%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

图 7 不同状态条斑紫菜附生菌群中前 30 个细菌属的相对丰度热图

Fig.7 Relative abundance heatmap of the top 30 bacterial genera in epibacterial communities of *N. yezoensis* in different health statuses

绿色表示相对丰度较高(>1%)的属, 红色表示相对丰度较低(<1%)的属

Genus with high relative abundance (>1%) are marked in green, and those with low relative abundance (<1%) are marked in red

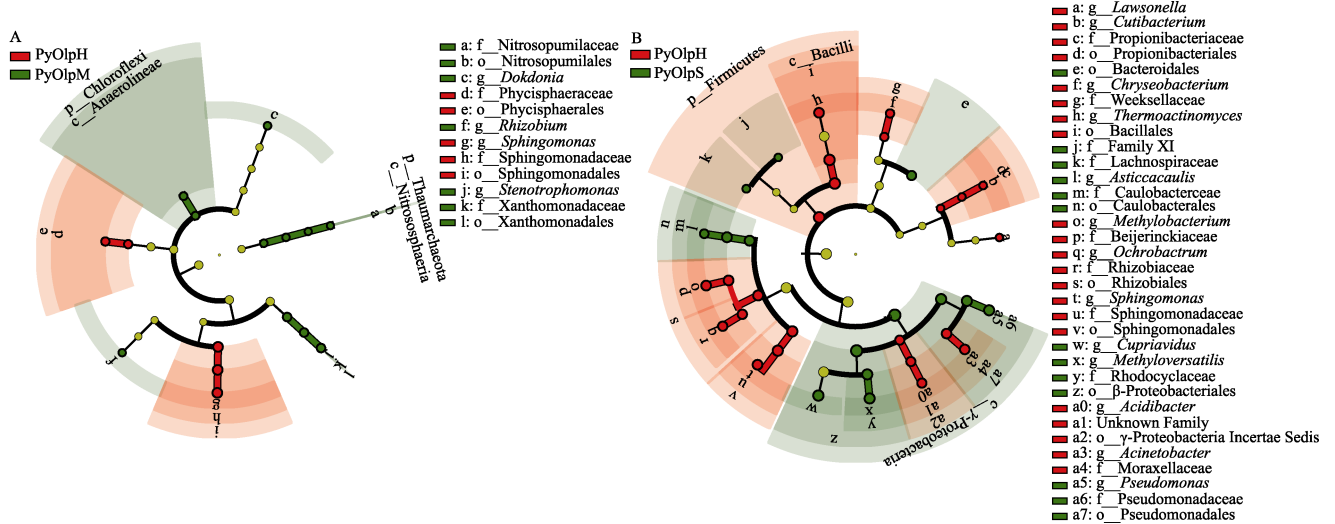


图 8 健康紫菜附生菌群与不同感染程度条斑紫菜附生菌之间的差异菌群分析

Fig.8 Analysis of differential microbial taxa between healthy *N. yezoensis* and those in different infection states

红色表示相对丰度在 PyOlpH 组显著更高的微生物类群, 绿色表示相对丰度在病烂紫菜中显著更高的类群
Microbial taxa with relative abundance significantly higher in PyOlpH are marked in red, and those with relative abundance significantly higher in diseased *N. yezoensis* are marked in green

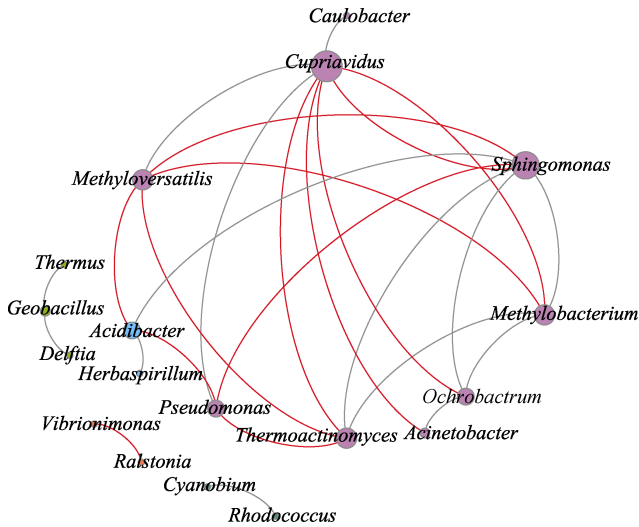


图9 前20个细菌属之间的共现网络

Fig.9 Co-occurrence network of top 20 bacterial genera

节点的大小与某一属连接其他属数量的多少成正相关;

边的粗细与 Spearman 相关系数的大小成正比,

其中灰色的边表示细菌属之间的正显著相互作用,

而红色的边则表示负显著相互作用

The size of each node is proportional to the number of connections. The thickness of the edge is proportional to the Spearman's correlation coefficient. The gray edge indicates significantly positive interaction between bacteria genera, while the red edge indicates significantly negative interaction

主要细菌类群之间的互作关系。

研究结果显示, 附生菌群的 α 多样性指数在不同状态样品之间不存在显著差异。这与赤腐病感染紫菜的菌群多样性变化较为一致(Yan *et al*, 2019)。但两项研究均发现, 初期感染样品附生菌群的 α 多样性指数高于未发生感染样品, 而且 β 多样性的结果显示了不同感染状态样品附生菌群之间存在显著差异, 表明病原的感染与菌群的紊乱密切相关。另外, 拟油壶菌病的发生与栽培环境的变化紧密相关, 如水温的升高、海水盐度的降低、水流交换不佳以及干出时间不足等(马家海, 1992; Klochkova *et al*, 2012、2016)。综合两方面, 与 Egan 等(2016)提出的观点较为符合, 即环境胁迫条件下的微生物生态失调是造成藻类病害发生的主要原因, 因此, 藻类病害的发生发展是一个复杂的微生态过程。

研究表明, 变形菌门和厚壁菌门通常是海藻表面占主导地位的2个细菌类群, 在海藻表面广泛存在的细菌中它们可被看作是“微生物的杂草种类”(microbial weed species), 并且具有多种多样的生物功能, 例如帮助宿主抵抗多种胁迫环境因子、具有高效

的产能系统以及诱导宿主的形态发生和后续的生长, 表明这些类群的细菌对藻类宿主健康的重要性(Singh *et al*, 2014)。由于绝大多数细菌在藻类特别是紫菜叶状体上的功能还没有详尽的解析, 因此, 只能通过细菌在植物等宿主或者环境中的相应功能在一定程度上解析其在本研究中的生态功能。例如, α -变形菌纲中的主要类群(如甲基杆菌属和鞘氨醇单胞菌属)以及 γ -变形菌纲中的假单胞菌属是陆生植物的叶际最常检出的微生物类群。其中, 甲基杆菌属和假单胞菌属都能分泌 AHLs (acyl homoserine lactones), 是植物叶际 QS 的重要参与者, 且后者往往对植物具有致病性, 并通过 QS 分泌胞外聚合物增强其对附着生活的适应性(Vorholt, 2012)。此外, 甲基杆菌属细菌还具有竞争利用植物叶际碳源的功能, 因此, 它可能通过 QS 或底物竞争等形式调节微生物的正常附着和聚集(Vorholt, 2012)。而善于从植物叶际吸收低浓度营养物质的鞘氨醇单胞菌属细菌则对病原假单胞菌的感染具有强烈的抑制作用, 不仅能够抑制感染症状, 还能够减弱病原的生长(Innerebner *et al*, 2011)。另外, 土壤、水体以及植物等环境中常见的贪铜菌属细菌能利用多种碳源进行生长, 并且具有抗生素和消毒剂的抗性, 甚至可导致免疫力低下的人患上严重并发症(Balada-Llasat *et al*, 2010; Khan *et al*, 2016)。这些微生物的生态功能在一定程度上解释了这些细菌类群的相对丰度变化规律, 亦即对宿主健康有益的细菌则相对丰度随着感染程度增加而减少, 不利宿主健康的细菌则反之。

除此之外, 细菌之间的共现网络图也能比较直观地反映细菌的功能和互作关系。比如, 与鞘氨醇单胞菌属细菌具有正相互作用的细菌类群(如甲基杆菌等, 图9蓝色圆圈)往往与假单胞菌和贪铜菌等病害相关的细菌类群(图9紫色圆圈)具有负相互作用, 表明二者之间具有竞争、抑制的作用。这样的负相互作用为抑病生防菌的查找提供了重要的理论指导(Poudel *et al*, 2016)。研究还发现, PyOlpM 比 PyOlpH 组的附生菌群显著富集了黄单胞菌目的细菌, 这类细菌也是植物叶际表面 QS 的参与者之一。Berendsen 等(2018)研究表明, 叶片受霜霉病病原菌 *Hyaloperonospora arabidopsidis* 侵染的拟南芥在根际招募黄单胞菌目的黄单胞菌属、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)以及放线菌目(Actinomycetales)的微杆菌属(*Microbacterium*)等细菌协同帮助植物抵抗病害。因此可推测, 拟油壶菌对紫菜的感染也可使宿主招募某些类群的益生菌来抵抗病害。但是, 由于拟油壶菌和霜霉均为内寄生的病原, 而由益生菌诱导出

的宿主抗病力并不足以治愈已经感染的个体 (Berendsen *et al.*, 2018), 因此, 紫菜最终仍会被病原及后续生长起来的其他致病菌感染。

基于本研究结果可提出以下设想: 当环境条件变得适宜拟油壶菌感染时, 紫菜附生菌群发生紊乱并朝着利于病原及其他有害微生物附着生长的方向演变 (如甲基杆菌、鞘氨醇单胞菌丰度的不断降低, 贪铜菌和假单胞菌丰度的不断升高), 这使得拟油壶菌病原不断附着到紫菜上并感染、杀死宿主细胞; 随着病原的持续感染, 虽然紫菜会招募一些益生菌 (如黄单胞菌目细菌) 来帮助其抗病, 但并不足以使其痊愈; 贪铜菌和假单胞菌等有害细菌通过不断增殖甚至产生抵抗抗生素和消毒剂的能力, 导致病害难以控制, 紫菜组织持续腐烂并凋亡。

综上所述, 本研究探究了遭受拟油壶菌感染后不同健康状态下条斑紫菜的附生菌群多样性、群落结构和主要类群之间的相互作用, 发现不同健康状态下的紫菜附生菌群存在明显差异, 且主要细菌类群之间存在显著的互作关系, 表明附生菌群的变化和互作在病害发生过程中起到了重要的作用。这些结果为阐明拟油壶菌致病的微生态机制及寻找生防细菌提供了一定的数据支持, 今后仍需要大量实验验证发病的生态机制及附生细菌的生物功能。

参 考 文 献

- BADIS Y, KLOCHKOVA T A, STRITTMATTER M, *et al.* Novel species of the oomycete *Olpidiopsis* potentially threaten European red algal cultivation. *Journal of Applied Phycology*, 2019, 31(2): 1239–1250
- BALADA-LLASAT J M, ELKINS C, SWYERS L, *et al.* Pseudo-outbreak of *Cupriavidus pauculus* infection at an outpatient clinic related to rinsing culturette swabs in tap water. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48(7): 2645–2647
- BASTIAN M, HEYMAN S, JACOMY M. Gephi: An open source software for exploring and manipulating networks. Dublin: Third International ICWSM Conference, 2009, 361–362
- BERENDSEN R L, VISMANS G, YU K, *et al.* Disease-induced assemblage of a plant-beneficial bacterial consortium. *ISME Journal*, 2018, 12(6): 1496–1507
- BURKE C, STAFFAN K, TORSTEN T. Selective extraction of bacterial DNA from the surfaces of macroalgae. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(1): 252–256
- CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335–336
- EDGAR R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460–2461
- EGAN S, FERNANDES N D, KUMAR V, *et al.* Bacterial pathogens, virulence mechanism and host defence in marine macroalgae. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(4): 925–938
- EGAN S, GARDINER M. Microbial dysbiosis: Rethinking disease in marine ecosystems. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 991
- GOECKE F, LABES A, WIESE J, *et al.* Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 2010, 409: 267–299
- HE L J, YANG H C, LI J, *et al.* Diagnosis of *Olpidiopsis* disease in *Pyropia yezoensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(4): 177–183 [何礼娟, 杨慧超, 李杰, 等. 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]
- HUANG J, TANG X X, YAN X J, *et al.* Review and forecast of the study on the disease of kelp and laver in China. *Marine Science*, 2000, 24(9): 26–27 [黄健, 唐学玺, 严小军, 等. 我国海带和紫菜病害的研究展望. *海洋科学*, 2000, 24(9): 26–27]
- INNEREBNER G, KNIEF C, VORHOLT J A. Protection of *Arabidopsis thaliana* against leaf-pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* strains in a controlled model system. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(10): 3202–3210
- KHAN S, BEATTIE T K, KNAPP C W, *et al.* Relationship between antibiotic- and disinfectant- resistance profiles in bacteria harvested from tap water. *Chemosphere*, 2016, 152: 132–141
- KIM G H, MOON K H, KIM J Y, *et al.* A reevaluation of algal diseases in Korean *Pyropia* (*Porphyra*) sea farms and their economic impact. *Algae*, 2014, 29(4): 249–265
- KLOCHKOVA T A, SHIM J B, HWANG M S, *et al.* Host-parasite interactions and host species susceptibility of the marine oomycete parasite, *Olpidiopsis* sp., from Korea that infects red algae. *Journal of Applied Phycology*, 2012, 24(1): 135–144
- KLOCHKOVA T A, SHIN Y J, MOON K H, *et al.* New species of unicellular obligate parasite, *Olpidiopsis pyropiae* sp. nov., 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.* *Olpidiopsis porphyrae* var. *koreanae*, an endemic endoparasite infecting cultivated *Pyropia yezoensis* in Korea. *Journal of Applied Phycology*, 2017, 29(7): 1–10
- LAROUSSE M, GALIANA E. Microbial partnerships of pathogenic Oomycetes. *PLoS Pathogens*, 2017, 13(1): e1006028
- 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
- LIU Y M, MA J H, WEN Q. Simultaneous infection by red rot and olpidiops 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]
- LIU Y, DE BRUIJN I, JACK A L, *et al.* Deciphering microbial landscapes of fish eggs to mitigate emerging diseases. *ISME Journal*, 2014, 8(10): 2002–2014
- MA J H, LIN Q S, MIN J, *et al.* Preliminary study on the olpidiops-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. 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]
- POUDEL R, JUMPPONEN A, SCHLATTER D C, *et al.* Microbiome networks: A systems framework for identifying candidate microbial assemblages for disease management. *Phytopathology*, 2016, 106(10): 1083–1096
- R CORE Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2014
- SEGATA N, IZARD J, WALDRON L, *et al.* Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 2011, 12(6): R60
- SEKIMOTO S, KLOCHKOVA T A, WEST J A, *et al.* *Olpidiopsis 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 *Olpidiopsis porphyrae* sp. nov. (Oomycetes, straminipiles), a unicellular obligate endoparasite of *Bangia* and *Porphyra* spp. (Bangiales, Rhodophyta). *Mycological Research*, 2008, 112(3): 361–374
- SINGH R P, KUMARI P, REDDY C R K. Antimicrobial compounds from seaweeds-associated bacteria and fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(4): 1571–1586
- SINGH R P, REDDY C R K. Seaweed-microbial interactions: Key functions of seaweed-associated bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 88(2): 213–230
- VAN DIJK K, NELSON E B. Fatty acid competition as a mechanism by which *Enterobacter cloacae* suppresses *Pythium ultimum* sporangium germination and damping-off. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(12): 5340–5347
- VORHOLT J A. Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10(12): 828–840
- WALTERS W, HYDE E R, BERG-LYONS D, *et al.* Improved bacterial 16S rRNA gene (V4 and V4-5) and fungal internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys. *mSystems*, 2016, 1(1): e00009–15
- WEST J A, KLOCHKOVA T A, KIM G H, *et al.* *Olpidiopsis* sp., an oomycete from Madagascar that infects *Bostrychia* and other red algae: Host species susceptibility. *Phycological Research*, 2006, 54(1): 72–85
- WHITE T J, BRUNS T, LEE S, *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS M A, GELFAND D H, SNINSKY J J, *et al.* PCR Protocols—A guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990, 315–322
- YAN Y W, YANG H C, TANG L, *et al.* Compositional shifts of bacterial communities associated with *Pyropia yezoensis* and surrounding seawater co-occurring with red rot disease. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1666
- YANG L E, DENG Y Y, XU G P, *et al.* Redefining *Pyropia* (Bangiales, Rhodophyta): four new genera, resurrection of *Porphyrella* and description of *Calidia pseudobolata* sp. nov. from China. *Journal of Phycology*, 2020, 56(4): 862–879

(编辑 马瑾艳)

Epiphytic Microbial Communities Associated with *Neopyropia yezoensis* with *Olpidiopsis* Disease

YAN Yongwei¹, YANG Huichao^{1,2}, MO Zhaolan^{1,2,3}, LI Jie¹①

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao, Shandong 266071, China; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Laboratory of Tropical Marine Germplasm Resources and Breeding Engineering, Sanya Oceanographic Institution, Ocean University of China, Sanya, Hainan 572024, China)

Abstract *Olpidiopsis* disease is one of the main diseases affecting laver cultivation in the sea, often causing large-scale rot and serious economic losses. Although the oomycetic genus *Olpidiopsis* has been identified as the pathogen, little is known regarding its mechanisms, including its interaction with epiphytic microbial communities. In the present study, diversities, structures, and major interactions of epiphytic microbial communities were analyzed using *Neopyropia yezoensis* in sea infected by *Olpidiopsis*. The *N. yezoensis* used in the experiment had different health statuses, including no infection (PyOlpH), partial infection (PyOlpM), and serious infection (PyOlpS). The results showed that no significant difference was observed for the α diversity indices among microbial communities associated with the three groups of *N. yezoensis*, but those of PyOlpM were higher than the other two. Shared operational taxonomic units (OTUs) among the three groups of communities only accounted for 22.7% of the total OTUs, in addition to significant community dissimilarity (permutational multivariate analysis of variance, $R^2=0.405$, $P<0.05$). More microbial taxa were obtained when communities associated with more seriously infected *N. yezoensis* compared to those associated with PyOlpH. In total, 208 genera belonging to 23 phyla were annotated, and α -Proteobacteria, γ -Proteobacteria, and Firmicutes were dominant in all samples. Sixteen of the top 20 genera were also assigned to the three groups, with their relative abundances increasing or decreasing across the infection status from none to severe. Among them, genera *Cupriavidus* and *Sphingomonas* were the most connected bacterial taxa in the co-occurrence network, and negative interactions were determined between the two taxa and their positively interacting bacterial taxa. This study provides primary datasets for clarifying the microbial ecological mechanisms and searching for probiotics for *Olpidiopsis* disease.

Key words *Neopyropia yezoensis*; *Olpidiopsis* disease; Epiphytic microbial communities; Bacterial interaction

① Corresponding author: LI Jie, E-mail: lijie@ysfri.ac.cn