

DOI: 10.3969/j.issn.2095-9869.20250903003

http://www.yykxjz.cn/

梁甘霖, 单体锋. 海带单性与有性生殖孢子体的附生微生物群落结构差异研究. 渔业科学进展, 2026, 47(2): 49–63
LIANG G L, SHAN T F. Differences in epiphytic microbial community structure between sporophytes of *Saccharina japonica* derived from sexual reproduction and apomixes. Progress in Fishery Sciences, 2026, 47(2): 49–63

海带单性与有性生殖孢子体的 附生微生物群落结构差异研究*

梁甘霖^{1,2,3,4} 单体锋^{1,2,3①}

- (1. 水产品种创制与高效养殖全国重点实验室 中国科学院海洋研究所 山东 青岛 266000;
2. 青岛海洋科技中心海洋生物学与生物技术功能实验室 山东 青岛 266037;
3. 中国科学院海洋研究所实验海洋生物学实验室 山东 青岛 266000; 4. 中国科学院大学 北京 100049)

摘要 海带(*Saccharina japonica*)除经由有性生殖形成孢子体外, 还存在两种无性生殖产生孢子体的方式, 分别为孤雌生殖与无配生殖。为深入了解海带不同生殖方式来源孢子体的微生物群落结构差异, 本研究对海带单性生殖方式形成的孢子体(畸形和正常)的附生微生物进行 16S rRNA 和 18S rRNA 基因测序, 与正常生长的有性生殖孢子体附生微生物群落进行比较, 分析二者在细菌和真核生物群落组成与多样性方面的差异, 并通过线性判别分析效应量(LEfSe)分析, 筛选出各个样本中存在显著差异的标志物种。细菌和真核生物群落组成分析表明, 各个样本在属水平上的优势物种存在区别。在细菌和真核生物群落物种丰度和多样性上, 畸形生长的孤雌生殖孢子体要显著高于正常有性生殖孢子体, 而其他生长类型的孢子体虽高于正常生长的有性生殖孢子体, 但差异并不显著。非度量多维标定法分析与相似性分析结果显示, 各个样本在细菌和真核生物群落组成上均存在显著差异。LEfSe 分析结果显示, 畸形生长的孤雌生殖孢子体所识别的标志物种最多, 真核生物群落中仅有正常生长的孤雌生殖孢子体、畸形生长的孤雌生殖孢子体、正常生长的无配生殖孢子体存在显著差异的标志物种。上述结果不仅丰富了单性生殖孢子体微生物群落的组成和结构信息, 也为未来深入探究单性生殖孢子体与附生微生物相互作用机制以及发掘单性生殖孢子体的育种价值奠定了坚实基础。

关键词 海带; 单性生殖; 孢子体; 附生微生物; 高通量测序

中图分类号 S968.42+1 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2026)02-0049-15

海带(*Saccharina japonica*)作为一种重要的大型褐藻, 具有极高的经济和生态价值。在现代社会, 除了食用, 海带在工业生产、生物饲料以及医疗产品等多个领域均有广泛应用(Vásquez *et al*, 2014)。在复杂的海洋生态系统中, 海带作为初级生产者, 为众多生物(包括微生物)提供了丰富的营养物质和适宜的栖息

场所, 对提升生态系统的生物多样性具有不可忽视的作用(Duarte *et al*, 2022)。自 20 世纪 50 年代起, 我国便开始了海带养殖技术的探索与研究。经过数十年的发展, 我国海带养殖及种苗培育技术已日趋成熟(Hu *et al*, 2021)。2023 年, 我国海带养殖年产量已突破 177 万 t, 位居全球首位, 为海带的生产及应用领域做出

* 山东省重点研发计划(农业良种工程)(2025LZGC010; 2023LZGCQY002)、中国科学院生物遗传资源库能力提升运行实施方案(E429A401X1T01)和国家现代农业产业技术体系(CARS-50)共同资助。梁甘霖, Email: ggliang@qdio.ac.cn

① 通信作者: 单体锋, 研究员, Email: shantifeng@qdio.ac.cn

收稿日期: 2025-09-03, 收修改稿日期: 2025-10-05

了重要贡献(农业农村部渔业渔政管理局等, 2024)。

海带的生活史呈现出单倍配子体与二倍孢子体的世代交替特征(Liu *et al.*, 2016)。单倍的孢子萌发后会形成雌、雄各半的配子体, 成熟的雌、雄配子体分别排出卵子和精子, 二者结合形成二倍的受精卵, 孢子与配子体均属于微观世代, 受精卵经过有丝分裂逐渐发育成宏观可见的孢子体。孢子体成熟后, 其表面会形成孢子囊群, 孢子囊经减数分裂形成游孢子, 从而进入新的生命周期。除了通过有性生殖, 海带还可以通过孤雌生殖和无配生殖两种无性生殖方式形成孢子体, 本文将二者统称为单性生殖(apomixis)。海带的孤雌生殖是指雌配子体排出的卵子未经受精直接发育为孢子体的过程(白逢伟等, 1998); 无配生殖则是雄配子体不产生配子, 直接从体细胞发育为孢子体的过程(戴继勋等, 2000)。孤雌生殖产生的孢子体大部分为畸形, 然而有少量二倍的孢子体形态正常, 可达到成熟从而放散孢子, 但仅产生雌性配子体; Li 等(2025)研究发现, 无配生殖孢子体无论单倍还是二倍都具有不育的特点。Yue 等(2024)研究发现, 海带雄配子体也可排出“卵子样的配子”进行孤雌生殖产生孢子体, 雌配子体同样具备无配生殖的能力。

近年来, 关于海带单性生殖孢子体的研究主要集中在生长发育模式及可育性方面(Li *et al.*, 2025; Yue *et al.*, 2024), 而对其附生微生物群落的组成以及与微生物之间的相互作用的研究则相对较少。附生微生物对大型海藻而言至关重要, 它们之间通过分泌代谢物进行相互作用(Egan *et al.*, 2013)。海藻可分泌海藻多糖、海藻酸盐等化合物供微生物利用(Sun *et al.*, 2022, Mancuso *et al.*, 2023; Nakata *et al.*, 2024), 而微生物不仅能促进海藻的生长、发育和生殖, 还能控制和缓解海藻的病害状况(Gardiner *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2022; Ma *et al.*, 2023)。例如, 石莼属(*Ulva*) (Wichard, 2023) 和水云属(*Ectocarpus*)海藻(Tapia *et al.*, 2016)在经过无菌处理后会发育畸形, 需要特定细菌群落协同作用才能恢复正常形态。海带单性生殖产生的大部分孢子体呈现畸形, 除了染色体倍性嵌合的原因外, 是否也与附生的微生物群落有关, 尚未可知。此外, 研究表明, 某些红藻孢子的释放受微生物控制(Weinberger *et al.*, 2007)。海带作为一种冷水性大型海藻, 对温度十分敏感。全球气候变化所导致的海洋变暖、海洋酸化和极端天气正严重威胁野生和养殖海带的生长(Mancuso *et al.*, 2023; Veenhof *et al.*, 2025)。有证据表明, 微生物可以帮助海藻适应上述环境变化(Zhang *et al.*, 2024)。然而, 并非所有微生物群落都有利于大型海藻的生存。在大型海藻养殖中, 存在多种由微生物

直接或间接导致的疾病, 如黄斑病(Yang *et al.*, 2020)、白化病(Zhang *et al.*, 2022)、绿腐病(Ahmad *et al.*, 2021)和烂孔病(张丽, 2019)等。因此, 研究有性与单性生殖孢子体的附生微生物群落组成对于提高野生与栽培海带群体的环境适应性、培育抗逆新品种以及病害防控均具有重要意义。

本研究将首次系统比较海带单性生殖与正常有性生殖孢子体的附生微生物群落特征, 探索海带单性生殖孢子体与其附生微生物之间的关系。通过运用生物多样性分析技术(包括物种组成分析、Alpha 及 Beta 多样性分析等), 旨在揭示两类孢子体表面微生物在组成、结构和关键差异物种方面的区别。这将为阐明海带单性生殖孢子体生长发育与附生微生物群落的潜在关联提供关键基础数据, 并为后续提高海带单性生殖在育种育苗中的应用价值奠定基础。

1 材料与方法

1.1 海带单性生殖孢子体的培养及附生微生物获取

将海带的 6 个雌配子体克隆系和 15 个雄配子体克隆系置于光照培养箱(GXZ-380C, 宁波江南)中, 分别进行孤雌与无配生殖诱导, 诱导和培育条件为温度 10 °C、光照 40 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光照周期为白天 12 h : 黑夜 12 h, 培养基为用煮沸后冷却的自然海水配置的 PES (Provasoli, 1966), 同时培育 3 组有性生殖孢子体培养系作为对照。其中, 6 个雌配子体和 9 个雄配子体克隆系成功诱导出单性生殖(包括孤雌与无配生殖)的孢子体(图 1)。待孢子体的平均长度达到 1 cm 时, 将孢子体转到 80 L 玻璃水缸中进行培养, 培养基为添加 NaNO_3 (70 mg/L)和 NaH_2PO_4 (10 mg/L)的自然海水, 所用自然海水源于大连旅顺近海(经纬度: 38°44'N, 121°12'E), 经砂滤后使用。实验期间, 所有孢子体均使用相同批次的水, 维持环境变量一致。海水温度变化范围为 4~10 °C, 光强 60 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光照周期为白天 12 h : 黑夜 12 h。在水缸中培育 75 d 后进行附生菌落采集。利用无菌棉签擦拭孢子体中部(图 1)后分别装入无菌离心管中, 后将离心管置于干冰中直至 DNA 提取。本研究用 3 个正常生长的有性生殖孢子体培养系作为对照, 分别采集 3 个正常生长的孤雌生殖孢子体培养系及无配生殖孢子体培养系, 3 个畸形生长的孤雌生殖孢子体培养系及无配生殖孢子体培养系作为实验组, 一共 15 个培养系, 每个培养系采集 3 个个体作为生物学重复。由于孤雌生殖孢子体形态正常的培养系在微生物采样时仅剩 1 个培养系, 因此本实验共采集 13 个培养系(39 个个体)的

微生物群落(表 1)。

1.2 DNA 基因扩增以及 Illumina NovaSeq 6000 测序

用基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限

公司, DP712)提取细菌的基因组 DNA, 使用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3')和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对原核生物 16S rRNA 基因 v3~v4 可变区进行 PCR 扩增(朱晓彤等, 2025),

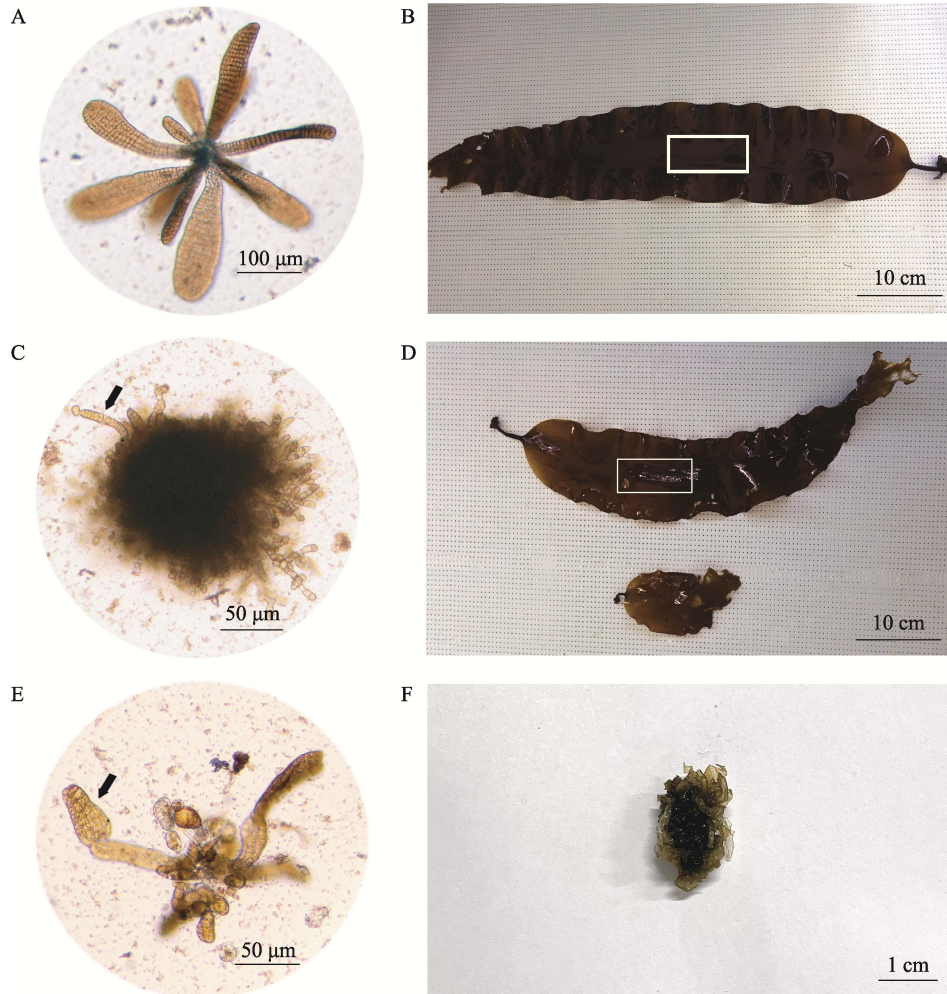


图 1 海带不同生殖方式的幼孢子体及大孢子体样本

Fig.1 Seedlings and large sporophytes of *S. japonica* produced via different kinds of reproduction

A: 有性生殖幼孢子体; B: 有性生殖大孢子体, 白框内为菌落采集部位; C: 无配生殖幼孢子体; D: 无配生殖大孢子体, 白框内为菌落采集部位; E: 孤雌生殖幼孢子体; F: 孤雌生殖孢子体。

A: Sporelings from sexual reproduction; B: Large sporophyte from sexual reproduction, white box indicates the site of colony collection; C: Apogamous sporelings; D: Apogamous large sporophytes, white box indicates the site of colony collection; E: Parthenogenetic sporelings; F: Parthenogenetic sporophytes.

表 1 各个样本编号

Tab.1 The sample ID of *S. japonica*

样本 Samples	编号 Sample ID
正常有性生殖孢子体 Normal sporophytes resulting from sexual reproduction	S1, S2, S3
正常孤雌生殖 Normal sporophytes resulting from parthenogenesis	PN
正常无配生殖 Normal sporophytes resulting from apogamy	AN1, AN2, AN3
畸形孤雌生殖 Malformed sporophytes resulting from parthenogenesis	PA1, PA2, PA3
畸形无配生殖 Malformed sporophytes resulting from apogamy	AA1, AA2, AA3

使用引物 TAREuk454FWD1(5'-CCAGCASCYGC GGTAATTC-3')和 TAREukREV3(5'-ACTTTCGTTCTTGA TYRA-3') (Stoeck *et al.*, 2010)对真核生物的 18S rRNA 基因 v4 可变区进行 PCR 扩增。将扩增产物进行纯化、定量和均一化,建成测序文库并进行质检,质检合格的文库利用 Illumina NovaSeq 6000 进行双端(2 × 250 bp)测序。测序数据已上传 NCBI 数据库中,序列号为 PRJNA1313392。

1.3 数据处理以及统计分析

利用 Trimmomatic v0.33 软件对二代测序的原始序列进行质量过滤,用 Cutadapt v1.9.1 识别和去除引物序列,使用 USEARCH v10 拼接双末端序列,用 UCHIME v8.1 去除嵌合序列,最终得到用于后续分析的高质量序列。利用 USEARCH 软件对 Reads 在 97.0% 相似度水平进行聚类,获得操作分类单元(OTU)。

以 SILVA 为参考数据库进行物种注释与分类分析,利用 QIIME 软件进行物种注释及分类学分析、Alpha 与 Beta 多样性分析。利用 R 制作箱线图展示 Alpha 多样性分析的 Chao1 指数与 Shannon 指数来体现不同样本的物种丰富度差异与多样性差异(Chen *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012),采用 *t* 检验验证不同组之间指数差异的显著性。利用基于加权 Bray-Curtis 算法的 NMDS 分析比较各样本间在物种组成方面的相似程度(Looft *et al.*, 2012),并通过 Anosim 分析检验不同样本之间的差异是否显著。使用 Python 的 LEfSe 软件包进行组间样品分析,找到丰度有显著差异的类群(Segata *et al.*, 2011),采用线性判别分析(LDA, linear discriminant analysis)来估算每个物种丰度对差异效果影响的大小。

2 结果与分析

2.1 测序质量评估

本研究对 39 个样品的 16S rRNA 基因测序后共获得 3 113 206 对 Reads,经双端 Reads 质控、拼接后共产生 2 823 435 条高质量 Clean Reads,每个样品产生的 Clean Reads 至少在 65 550 条以上,平均产生 72 396 条 Clean Reads。18S rRNA 基因测序共获得 2 391 025 对 Reads,经双端 Reads 质控、拼接后共产生 1 802 416 条高质量 Clean Reads,每个样品至少产生 31 484 条 Clean Reads,平均产生 46 216 条 Clean Reads。

稀释性曲线可检测测序的深度(图 2)(Wang *et al.*, 2012)结果表明,随着测序数的增加,曲线趋于平缓,

说明物种数目不会随着序列数的增加再急剧增加,测序数量足够充分,各个样本的大部分物种已被测出。

图 3 展示了各个分组共有及特有的 OTU 数目,在原核生物测序数据中,5 类样本一共存在 3 743 个 OTU,OTU 数目排序为 PA 组(2 164 个)>AA 组(1 422 个)>S 组(1 366 个)>AN 组(1 202 个)>PN 组(810 个),其中共有的 OTU 数目为 306(8.2%),PA 组特有的 OTU 数目最高(26.3%)。在真核生物测序数据中,一共测出 432 个 OTU,OTU 数目排序为 PA 组(176 个)>AA 组(160 个)>AN 组(155 个)>S 组(139 个)>PN 组(99 个),共有的 OTU 数目为 17(3.9%),同样是 PA 组特有的 OTU 数目最多(17.4%)。PN 组、S 组、AA 组这 3 组样本之间没有共有的 OTU。

2.2 不同样本属水平上的群落结构

使用朴素贝叶斯分类器结合比对的方法对 OTU 进行分类学注释,最后将所有样本的原核生物群落归属于 44 个门、110 个纲、281 个目、542 个科、1 188 个属、1 840 个种。将原核生物群落属分类水平排名前十的物种归纳于图 4A 中,结果显示, *Litorimonas*

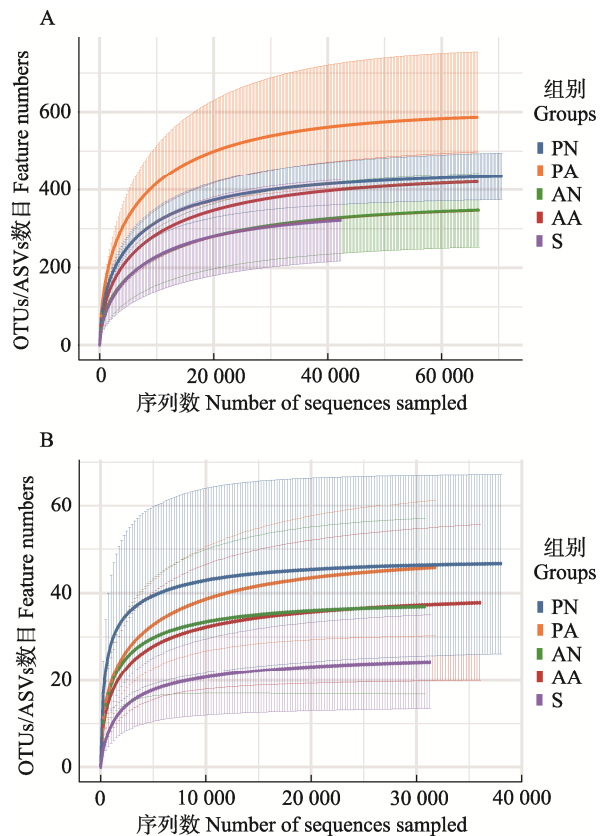


图 2 不同样本原核生物群落(A)以及真核生物群落(B)稀释性曲线

Fig.2 Rarefaction curves of prokaryotic communities (A) and eukaryotic communities (B) for different samples

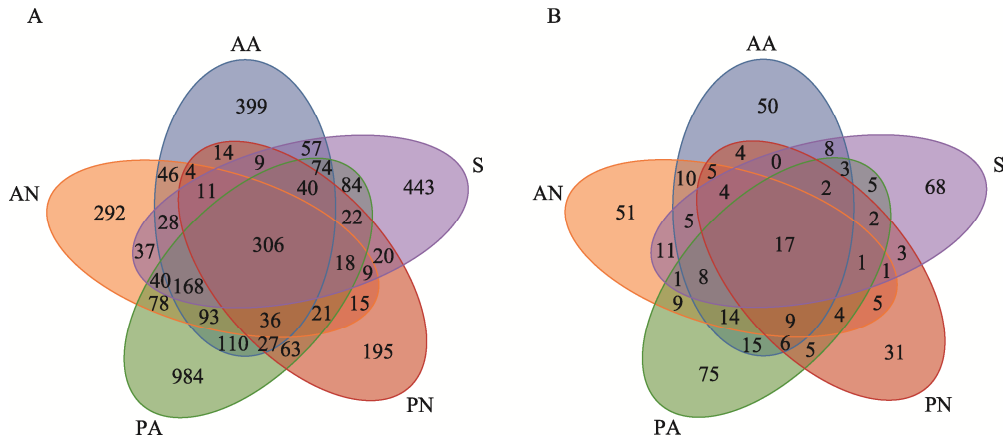


图 3 不同样本之间共有或特有的 OTU 数目
Fig.3 The number of shared or unique OTUs among different samples

A: 原核生物群落; B: 真核生物群落

A: Prokaryotic communities; B: Eukaryotic communities

属相对丰度最高(21%), 其为生丝单胞菌科(Hyphomonadaceae)下的一属, 排名第七的 *Fretibacter* 属(2%)也同样位于生丝单胞菌科下。除此之外, 还有同属于疣微菌科(Verrucomicrobiaceae)下的另外 2 个属, 分别是相对丰度为 0.01% 的玫瑰芽孢杆菌属(*Roseibacillus*)与相对丰度为 16% 的 *Persicirhabdus* 属。比较特殊的是在 3 种畸形生长的孤雌生殖孢子体样本(PA1 组、PA2 组和 PA3 组)中, 优势菌群均为未知分类的蓝细菌目(Cyanobacteriales)下的一属(unclassified_Cyanobacteriales), 并且相对丰度均占 19%, 蓝细菌目下还有螺旋藻科(Spirulinaceae)、颤藻科(Oscillatoriaceae)等。另外, 玫瑰芽孢杆菌属在 S3 样本中的相对丰度占比最高(21%), 而在其他样本中含量很少甚至没有。

所有样本的真核生物群落归属于 30 个门、71 个纲、147 个目、179 个科、217 个属、251 个种, 可见真核生物群落的物种丰富度要远远低于原核生物群落。在真核生物属分类水平中(图 4B), 除 PA2 组样本外, 其他样本的优势属皆为孔叶藻属(*Agarum*), 该属仅有 1 个物种(*Agarum clathratum*), 占比为(40%)。而 PA2 组样本的优势属为位于线虫动物门(Nematoda)下的 *Halomonhystera* 属(0.1%), 仅有 *Halomonhystera disjuncta* 一个物种, 另外未分配的真核生物(Unassigned)在该样本中相对丰度占比最高(7%), 在其他样本中相对较少。3 种有性生殖孢子体样本(S1 组、S2 组和 S3 组)除了孔叶藻属之外, 其他的菌群相对丰度占比普遍不高。

2.3 Alpha 多样性分析

在上述分类学分析中可初步了解样本属水平的

物种组成及相对丰度, 而 Alpha 多样性分析可通过多种指标进一步衡量样本的物种丰富度以及多样性。本研究建立的测序文库覆盖度均达到 99% 以上, 可以很好地反映测序的深度与可靠性, 在此基础上, 利用 Alpha 多样性的 Chao1 指数以及 Shannon 指数对样本进行评估(图 5), 并对不同样本间进行统计检验, Chao1 指数的高低与物种丰富度成正比, 是衡量样本中物种总数大小的指标之一, Shannon 指数可用于衡量物种的丰富度以及均匀度(Grice *et al.*, 2009)。

在原核生物群落中, 畸形生长的海带孤雌生殖孢子体(PA 组)的 Chao1 指数与 Shannon 指数均显著高于其他样本($P < 0.05$), 特别是 Shannon 指数($P < 0.01$), 说明 PA 组不管是物种丰富度还是多样性均显著高于其他组(图 5A、B)。相比之下, 正常生长的有性生殖孢子体(S 组)的 Chao1 指数与 Shannon 指数均为最低水平, 此结果与 OTU 数量分析结果一致。在真核生物群落分析中(图 5C、D), S 组的 Chao1 指数与 Shannon 指数均属于最低水平。从 Chao1 指数来看, PA 组的真核生物群落丰富度远远大于 S 组($P < 0.01$), 从 Shannon 指数来看, S 组的真核生物群落的丰富度与均匀度显著低于其他组($P < 0.05$), 这说明在 S 组的真核生物群落物种多样性显著低于其他组。

2.4 Beta 多样性分析

Beta 多样性分析聚焦于各样本间微生物群落组成的差异。原核生物群落的 NMDS 结果显示(图 6A), 5 组之间有一定距离, 说明不同组的物种组成存在一定差异, Anosim 结果也证明, 组间确实存在差异($R = 0.499$, $P = 0.001$), 其中 PA 组与其他组距离最远, 说明 PA 组与其他组的细菌组成相似性最低, 结合

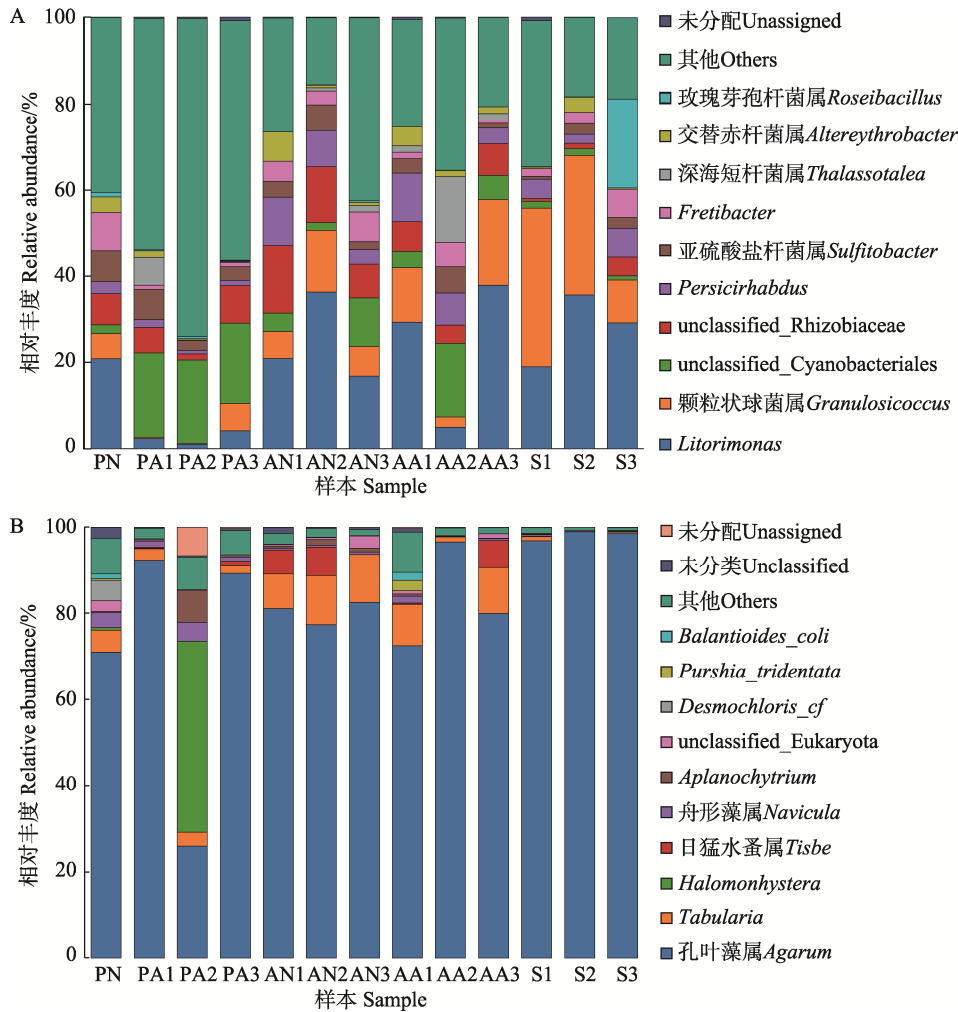


图 4 不同样本的属水平物种组成及相对丰度

Fig.4 The taxonomic composition and relative abundance at the genus level among different samples

A: 原核生物群落; B: 真核生物群落。

不同颜色代表不同的属, 柱子越高代表相对丰度越高, 仅展示属分类水平相对丰度排名前十的属。

A: Prokaryotic communities; B: Eukaryotic communities. Different colors represent different genera. The higher the bar, the greater the relative abundance. Only the top ten genera in terms of relative abundance are shown.

Alpha 分析来看, PA 组与其他组的原核生物群落结构差异最大。真核生物群落的 NMDS 结果也显示出 PA 组的特殊性, 另外 4 组之间虽然重叠部分高, 距离较近, 但仍有差异(Anosim, $R=0.179$, $P=0.002$)。

2.5 组间样品 LEfSe 分析

组间 LEfSe 分析是一种有效识别驱动群落结构差异的关键标志物种的方法(Segata *et al*, 2011)。依据 LDA 得分大于 4 且 $P < 0.05$ 的筛选标准, 筛选出的显著差异标志物种通过系统发育分支图进行展示(见图 7)。系统发育分支图自内圈至外圈依次表示界(domain)、门(phylum)、纲(class)、目(order)、科(family)、属(genus)、种(species)等分类层级。总体而言, 从门的水平上看, 5 种

不同生长类型的孢子体在原核生物群落中均存在显著差异的关键标志物种(图 7A), 主要聚焦于变形菌门(Proteobacteria)下, 包括 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria)、 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)。畸形生长的孤雌生殖孢子体(PA 组)富集的差异标志物种最多, 较为特殊的是该组富集了蓝细菌门(Cyanobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes), 这 2 个门在其他组均未显著富集。畸形生长的无配生殖孢子体(AA 组)富集的显著差异标志物种最少, 包括 *Litorimonas* 属下的 *Litorimonas taeanensis* 以及深海短杆菌属(*Thalassotalea*), 并且深海短杆菌属仅在 AA2 组相对丰度较高。正常生长的无配生殖孢子体(AN 组)富集了除变形菌门之外的浮霉菌门(Planctomycetota), 体现其特殊性。正常生长

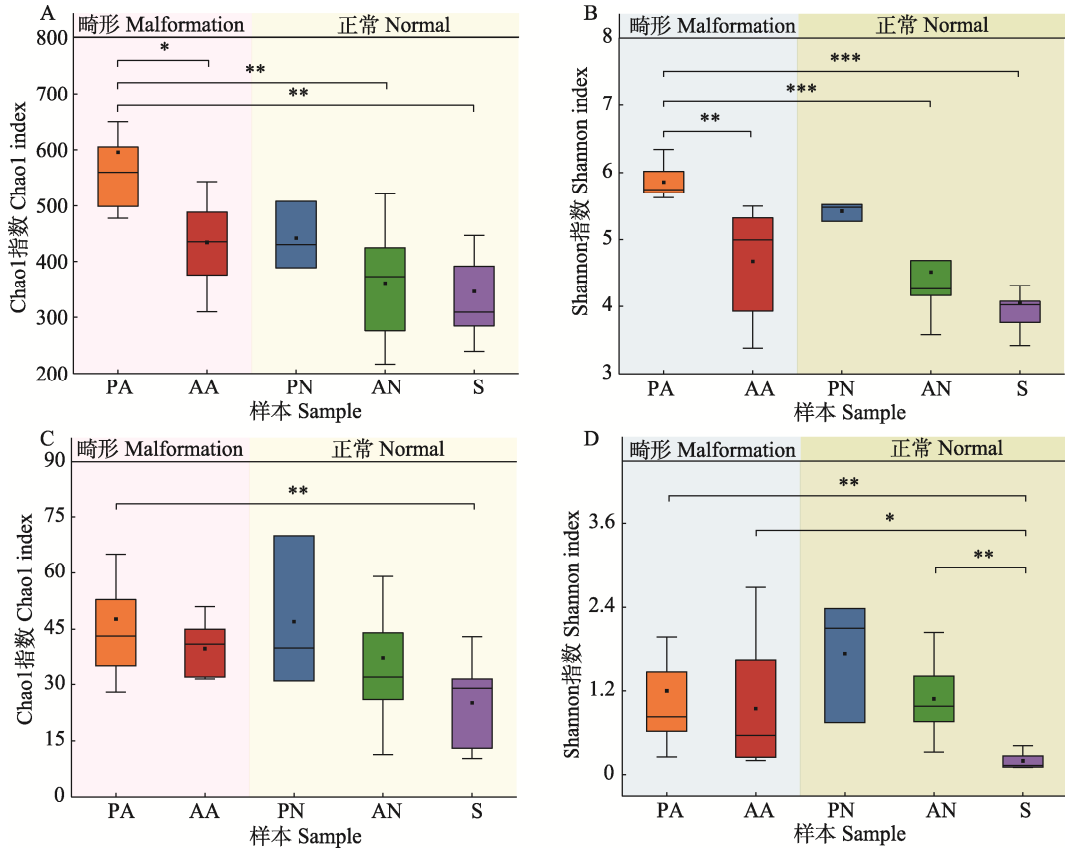


图 5 不同样本微生物群落的 Alpha 多样性分析

Fig.5 Alpha diversity analysis of microbial communities in different samples

A、B: 原核生物群落; C、D: 真核生物群落。不同颜色代表不同分组, *代表组间差异显著(0.05 > P ≥ 0.01), **代表 0.01 > P ≥ 0.001, ***代表 P < 0.001。P < 0.01 代表组间差异极显著, P > 0.05 不显示。

A and B: Prokaryotic communities; C and D: Eukaryotic communities. Different colors represent different groups. Statistical significance between groups is indicated as follows: * for 0.05 > P ≥ 0.01, ** for 0.01 > P ≥ 0.001, and *** for P < 0.001. Differences with P < 0.01 are considered highly significant, while P > 0.05 indicates no significant difference and is not shown.

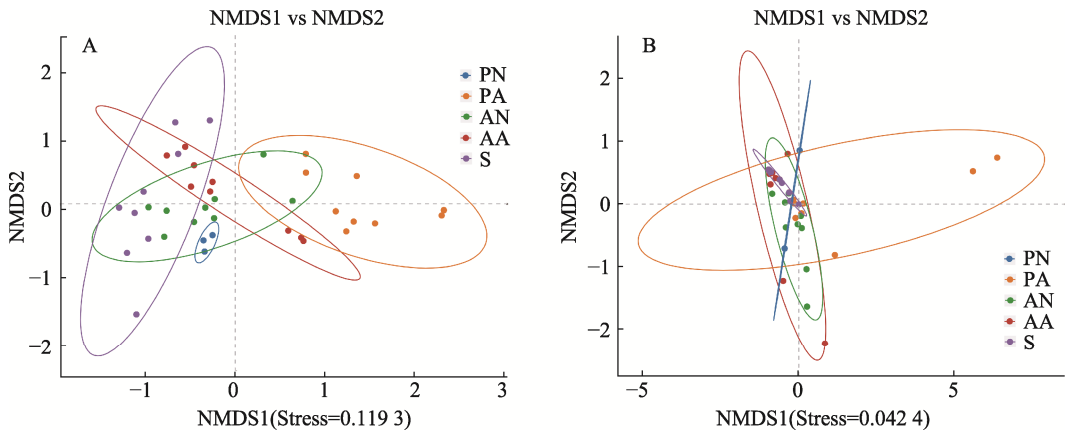


图 6 基于 Bray-Curtis 算法的 NMDS 分析

Fig.6 NMDS analysis based on the Bray-Curtis algorithm

A: 原核生物群落; B: 真核生物群落。

不同颜色代表不同分组, 点与点之间的距离表示差异程度, Stress < 0.2 表明 NMDS 分析结果可靠。

A: Prokaryotic communities; B: Eukaryotic communities. Different colors represent different groups. The distance between points indicates the degree of dissimilarity. A stress value of less than 0.2 indicates that the NMDS analysis results are reliable.

的有性生殖孢子体(S 组)富集了除变形菌门之外的疣微菌门(Verrucomicrobiota), 该门之下的玫瑰芽孢杆菌属相对丰度在 S3 组要远远高于其他组。从在真核生物群落分析结果来看(图 7B), 仅 AN 组、PA 组及 PN 组富集了显著差异标志物种, 各个组富集显著差异标志物种系统发育分类距离较远。PN 组富集显著差异标志物种数量最多, 且与 AN 组同样富集了淡色藻门(Ochrophyta)下的分类层级; 除此之外, 还

有纤毛虫门(Ciliophora)下的内毛目(Entodiniomorpha)及其下级分类, 绿藻门(Chlorophyta)石莼纲(Ulvophyceae)丝藻目(Cladophorales)及其下级分类。AN 组主要富集与硅藻纲(Bacillariophyceae)同属淡色藻门的 Fragilariophyceae 纲, 具体至 *Tabularia* 属, 该属在属级别相对丰度排名第二。PA 组显著富集线虫动物门(Nematoda)色矛纲(Enoplia)及其下级分类, 具体涵盖 *Halomonhystera* 属。

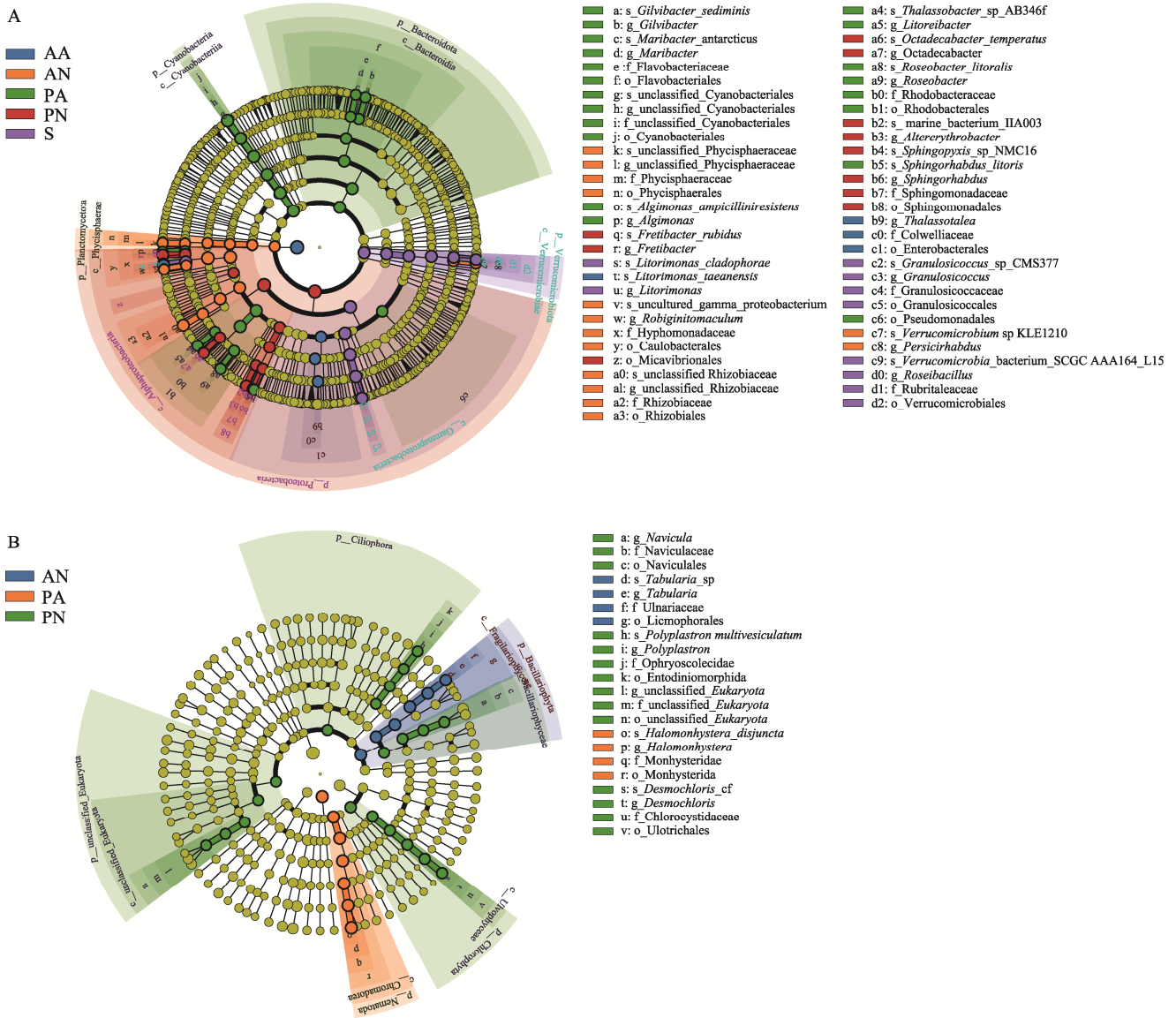


图 7 原核生物群落(A)及真核生物群落(B)的 LEfSe 分析结果

Fig.7 Results of LEfSe analysis for prokaryotic communities (A) and eukaryotic communities (B)

左边为进化分支图, 不同颜色代表不同分组内与其他组间有显著差异的物种(标志物种), 该图展示由界到种的分类级别, 每个标志物种 LDA 得分>4, P<0.05, 普通黄色圆圈代表没有显著差异的物种, 右边对应进化分支图中分类级及物种名称。

The left panel shows the cladogram, where different colors represent significantly different species (biomarker species) among different groups. The cladogram displays taxonomic levels from domain to species. Each significantly different species has an LDA score > 4 and P < 0.05. The common yellow circle represents species that do not show significant differences.

The right panel corresponds to the taxonomic levels and species names in the cladogram.

3 讨论

微生物在海藻的生长与发育过程中发挥着关键作用。海带作为一种具有重要生态和经济价值的海藻,除了有性生殖外,还存在孤雌生殖及无配生殖两种单性生殖方式。然而,目前尚缺乏关于海带单性生殖孢子体与有性生殖孢子体附生微生物群落结构差异的系统研究。为深入了解不同类型孢子体间的微生物群落差异,并探索单性生殖在海带育种育苗中的创新应用,本研究基于 5 种生长类型的海带孢子体,开展了其附生微生物群落的多样性分析。结果显示,不同生长类型孢子体的附生微生物群落在组成和结构上存在显著差异,并通过 LEfSe 分析进一步筛选出各生长类型的显著差异标志物种。从原核生物群落的组成与结构来看,畸形生长的孤雌生殖孢子体的物种丰度及多样性显著高于其他组样本;无配生殖孢子体(无论正常还是畸形生长)的物种丰富度及多样性普遍高于正常生长的有性生殖孢子体,但差异并不显著。基于 Bray-Curtis 距离的 NMDS 分析进一步表明,5 种生长类型的孢子体在物种组成上存在显著差异。从真核生物群落的组成与结构来看,正常生长的有性生殖孢子体在物种丰度和多样性指数上显著低于畸形生长的孤雌生殖孢子体,虽与其他样本之间存在差异,但未达到统计显著水平。LEfSe 分析结果显示,在原核生物群落中,畸形生长的孤雌生殖孢子体富集的差异标志物种最多,而畸形生长的无配生殖孢子体富集的差异物种最少;真核生物群落,仅有孤雌生殖孢子体与正常生长的无配生殖孢子体存在显著差异标志物种。后续研究将结合多种因素分析可能导致群落结构差异产生的原因。

3.1 海藻对其附生微生物群落结构的影响

海藻能够分泌多糖、蛋白质、有机硫化物及抗菌化合物等多种代谢产物(Burgunier-Delamare *et al.*, 2024),这些物质可吸引对宿主生长有益的微生物,抑制有害致病菌的附着(Saha *et al.*, 2019)。在本研究中,畸形的孤雌生殖或无配生殖的孢子体由于染色体倍性呈现嵌合状态,与有性生殖孢子体相比,生长与生理状态均处于劣势,对环境的适应能力下降,分泌的黏液物质明显减少,黏液物质里包含孢子体在生长过程中分泌的多种代谢物,进而导致其附生微生物群落结构的变化,未来研究可结合代谢组学和转录组学技术,系统揭示宿主代谢产物分泌与微生物群落重塑的关系。

在海带目的另一种褐藻 *Ecklonia radiata* 中发现,其无性繁殖产生的二倍体孢子体的基因型和形态学差异是驱动微生物组组成差异的主要因素(Vadillo Gonzalez *et al.*, 2023)。在海带畸形病研究中,发现畸形病严重程度越高,其附生原核生物群落内存在更复杂的相互作用(Yan *et al.*, 2023)。在本研究中,单性生殖的孢子体的基因型可能是单倍体,也可能是纯合二倍体或多倍体,而有性生殖的孢子体是杂合体,二者之间基因型以及杂合度均存在明显的差异。在形态学方面,畸形生长的无配生殖孢子体大多生长缓慢,其叶片与正常形态的孢子体相比长度存在差异,畸形程度要远远小于畸形的孤雌生殖孢子体。孤雌生殖孢子体叶片褶皱结构可能增加了可利用的生态位,促进了更多微生物的附着,导致群落结构显著差异,而畸形程度较小的无配生殖孢子体与正常生长的孢子体存在差异,但并不显著。因此,在未来可将海带孢子体的基因型、形态学特征联系起来探究其与附生微生物组结构之间的潜在关联。

3.2 附生微生物对海带孢子体生长发育的影响

结合各样本在属水平的分类及 LEfSe 分析来看,各样本分别存在多种与孢子体生长发育、形态恢复等方面相关的菌群。首先,正常形态孢子体与畸形孢子体的优势属存在差异,*Litorimonas* 属为多种样本的优势属,在原核生物群落的属分类水平中相对丰度排名第一(图 4A)。研究表明,*Litorimonas* 属可与多种大型海藻共生(James *et al.*, 2020),持续存在于海带孢子体的生长过程中,因而被视为核心细菌(Han *et al.*, 2021),在大型藻类生长发育过程中具有重要作用。近年来发现其海带幼孢子体绿腐病发病期间被归类为机会致病菌(Li *et al.*, 2020),但具体作用机制尚不明确。除了 *Litorimonas* 属,颗粒状球菌属(*Granulosicoccus*)的相对丰度在海带绿腐病发病期间也会显著升高,其拥有特殊的光合异养生存方式,被认为是多种大型藻类表面含量最为丰富的菌群(Brunet *et al.*, 2025)。在本研究中,颗粒状球菌属为正常的有性生殖孢子体的优势属。Weigel 等(2022)组装了 *Nereocystis luetkeana* 叶片的微生物组基因发现,颗粒状球菌属包含了完整的维生素 B₁₂ (钴胺素)合成基因簇,表明该菌群可能为藻类宿主提供自身无法合成的维生素,肯定了颗粒状球菌属与藻类宿主的共生关系。优势属的不同会导致微生物群落结构的变化,进而菌群提供的功能具有差异性,可能会对孢子体的生长发育产生重大影响,这或许是探索附生微生物群落结构对孢子体形态发育影响的关键。

畸形生长的孤雌生殖孢子体优势属为未分类的蓝细菌门,且蓝细菌门下物种为该样本显著富集的关键差异物种之一,*Litorimonas* 属仅占该样本相对丰度的3%。蓝细菌门物种通常具备光合自养能力,赋予其较强的环境适应性,在复杂的孢子体形态中也能有力生长。此外,该类群能分泌抗菌物质以抑制其他细菌生长(Kulik, 1995)。例如,*Lyngbya majuscula* 能产生具有显著抗菌活性的天然产物马莱酰菌素(Dobretsov *et al*, 2010),基于以上两点,蓝细菌门物种才能在畸形程度高、结构复杂的孤雌生殖孢子体表面成为优势菌群。正因如此,以该优势菌群为主所形成的群落结构可能为孤雌生殖孢子体的形态发育和恢复提供一定的有利条件,具体表现在:畸形生长的孤雌生殖孢子体中可能对形态恢复有利的菌群相对丰度要显著高于其他孢子体。研究表明,栖海杆菌属(*Maribacter* sp. MS6)菌株能释放促进藻类生长及形态发生的因子 thallusin,与玫瑰杆菌属(*Roseobacter* sp. MS2)菌株协同作用可促进 *Ulva mutabilis* 从愈伤组织恢复正常形态(Weiss *et al*, 2017)。在畸形生长的孤雌生殖孢子体中,栖海杆菌属与玫瑰杆菌属的相对丰度显著高于正常孢子体,猜测两属在畸形程度高的孤雌生殖孢子体表面显著富集,可能也具备形态恢复的相关作用,但现有文献尚不能推断其对海带孢子体形态变化的直接因果作用。除此之外,亚硫酸盐杆菌属(*Sulfitobacter*)与 *Roseobacter* sp. MS2 的功能相似,可以释放特定的调节因子与 *Maribacter* sp. MS6 相互作用促进 *U. mutabilis* 形态恢复(Spoerner *et al*, 2012),但在本研究中,亚硫酸盐杆菌属存在于每个样本中。在未来研究中,可通过分离上述目标菌株并开展共培养或回接种实验,进一步验证其对海带孢子体发育过程的具体影响。

畸形生长的无配生殖孢子体其中一组样本的优势属同样位于蓝细菌门下(AA2组),该样本形成的微生物群落结构与畸形生长的孤雌生殖孢子体类似(PA1组),显著特点是深海短杆菌属的相对丰度均高于其他样本。深海短杆菌属归类于 γ -变形菌纲,广泛存在于海水、沿海沉积物、藻类及多种水生动物中(Sheu *et al*, 2016; Zhang *et al*, 2014)。羊栖菜(*Sargassum fusiform*)较长的梭形幼苗表面会显著富集该物种,富集之后的附生微生物群落在固氮、磷矿化等方面的基因表达会显著提高(Liu *et al*, 2023)。畸形生长的无配生殖孢子体叶片长度较短,表面略有褶皱,存在与畸形生长的孤雌生殖孢子体类似的形态结构,推测深海短杆菌属的显著富集与孢子体的形态结

构存在一定的联系,包括其在内形成的微生物群落结构可能提供有利于畸形形态的孢子体的生长发育功能。

此外,本研究还发现多种对孢子体的生长发育起到正向促进作用的关键差异物种,例如,正常生长的无配生殖孢子体显著富集的未分类的根瘤菌科物种(unclassified Rhizobiaceae)、有性生殖孢子体所显著富集的玫瑰芽孢杆菌属。根瘤菌以固定空气中的氮供给植物生长发育而闻名,常见于多种豆科、小麦等经济作物中(Bulgarelli *et al*, 2015; Gopalakrishnan *et al*, 2015; Zarraonaindia *et al*, 2015), Zhang 等(2025)最近揭示与海带共生的根瘤菌科(Rhizobiaceae)物种对于调节孢子体内的氧化反应过程以及氮代谢具有潜在作用。在对海带的幼孢子体附生微生物进行研究时, Zhuang 等(2024)描述玫瑰芽孢杆菌属可能会影响孢子体附生细菌群落的组成与稳定性,进而影响微生物群落功能,并将其确定为核心菌群。

在真核生物群落方面,大部分样本的优势属为孔叶藻属,仅有 *A. clathratum* 为已知物种,属于海带目,可附着于大型海藻表面(Sakanishi *et al*, 2022)。该物种曾被报道寄生于红藻(*Orculifilum denticulatum*)配子体内,且在营养丰富条件下可快速扩张(Sasaki *et al*, 2003)。畸形生长的孤雌生殖孢子体显著富集 *Halomonhystera* 属,相关研究表明该属为一种以细菌为食的常见寄生物种(Tchesunov *et al*, 2015),常寄生于活体或腐烂的大型植物组织表面(Abraham *et al*, 2014)。畸形孢子体形态异常且细菌含量丰富,为该寄生物的繁殖提供了适宜环境。

4 总结

目前,我国海带新品种培育主要采用连续近交或自交的传统选择育种及种内或近缘种间杂交等方式,育苗多依赖大量游孢子放散(Hu *et al*, 2021)。由于海带单性生殖孢子体普遍存在较高的畸形率、生长缓慢及不育等问题(白逢伟等, 1998; 戴继勋等, 2000),除早期方宗熙等(1983)利用纯系孤雌生殖孢子体培育出品系“单海1号”外,单性生殖孢子体在育种育苗方面的应用研究较为有限。先前研究主要将单性生殖孢子体高畸形率和高死亡率归因于染色体变异或隐性基因表达(赛珊, 2018)。结合本研究发现的单性生殖孢子体与有性生殖孢子体微生物群落结构差异,表明其微生物群落结构可能在一定程度上影响孢子体的生长与发育。已有研究证实,接种有益微生物可显著提升小麦(Kaur *et al*, 2015)、玉米(Hameeda *et al*, 2008)

和 水 稻 (Bakhshandeh *et al.*, 2015) 等 作 物 的 产 量 (Osborne *et al.*, 2023), 未 来 或 可 通 过 调 控 海 带 单 性 生 殖 孢 子 体 的 微 生 物 群 落 结 构 改 善 其 生 长 状 况 (Macrae *et al.*, 2025; Park *et al.*, 2025)。例 如, 可 将 有 益 微 生 物 制 备 成 接 种 剂, 降 低 单 性 生 殖 孢 子 体 死 亡 率, 改 善 孢 子 体 畸 形 状 况, 预 防 疾 病 发 生 (Li *et al.*, 2023)。

本 研 究 基 于 高 通 量 测 序 技 术, 系 统 分 析 了 海 带 单 性 生 殖 孢 子 体 与 有 性 生 殖 孢 子 体 的 附 生 微 生 物 多 样 性, 发 现 无 论 原 核 生 物 还 是 真 核 生 物 群 落, 单 性 生 殖 孢 子 体 的 群 落 结 构 与 有 性 生 殖 孢 子 体 存 在 显 著 差 异, 尤 其 是 畸 形 生 长 的 孤 雌 生 殖 孢 子 体, 通 过 LEfSe 分 析 筛 选 出 的 显 著 差 异 物 种 不 仅 丰 富 了 单 性 生 殖 孢 子 体 微 生 物 群 落 的 组 成 和 结 构 信 息, 也 为 未 来 深 入 探 究 单 性 生 殖 孢 子 体 与 附 生 微 生 物 相 互 作 用 机 制 提 供 了 坚 实 基 础。

参 考 文 献

- 白 逢 伟, 秦 松, 李 永 祺. 海 带 丝 状 雌 配 子 体 孤 雌 生 殖 的 初 步 研 究. 海 洋 科 学, 1998, 22(6): 32–35 [BAI F W, QIN S, LI Y Q. Study on parthenogenesis of filamentous gametophytes of *Laminaria japonica* (Phaeophyta). Marine Sciences, 1998, 22(6): 32–35]
- 戴 继 勋, 崔 竞 进, 韩 宝 芹, 等. 海 带 雄 配 子 体 单 性 生 殖 叶 状 体 的 特 性. 海 洋 通 报, 2000, 19(2): 20–24 [DAI J X, CUI J J, HAN B Q, *et al.* Properties of monogenetic thalli from male gametophytes of *Laminaria japonica* Aresch. Marine Science Bulletin, 2000, 19(2): 20–24]
- 方 宗 熙, 崔 竞 进, 欧 毓 麟, 等. 海 带 “单 海 1 号” 新 品 种 的 选 育——用 海 带 单 倍 体 材 料 培 育 新 品 种. 山 东 海 洋 学 院 学 报, 1983(4): 63–70, 95 [FANG Z X, CUI J J, OU Y L, *et al.* Breeding of the new variety “Danhai No.1” of *Laminaria japonica* by using a female haploid clone of the kelp. Journal of Shandong College of Oceanology, 1983(4): 63–70, 95]
- 农 业 农 村 部 渔 业 渔 政 管 理 局, 全 国 水 产 技 术 推 广 总 站, 中 国 水 产 学 会. 2024 中 国 渔 业 统 计 年 鉴. 北 京: 中 国 农 业 出 版 社, 2024: 23 [Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center. China fishery statistical yearbook 2024. Beijing: China Agriculture Press, 2024: 23]
- 赛 珊. 环 境 条 件 对 海 带 雌 配 子 体 孤 雌 生 殖 的 影 响. 烟 台 大 学 硕 士 研 究 生 学 位 论 文, 2018 [SAI S. Effects of environmental factors on parthenogenesis of *Laminaria japonica* female gametophyte. Master’s Thesis of Yantai University, 2018]
- 张 丽. 莆 田 近 岸 海 域 海 带 烂 孔 病 起 因 的 初 步 研 究. 应 用 海 洋 学 学 报, 2019, 38(3): 433–439 [ZHANG L. Preliminary study on the causes of kelp spoilage sickness in coastal Putian. Journal of Applied Oceanography, 2019, 38(3): 433–439]
- 朱 晓 彤, 荣 小 军, 李 彬, 等. 国 家 级 大 连 刺 参 原 种 场 核 心 区 生 态 环 境 质 量 和 微 生 物 群 落 结 构 周 年 变 化 及 其 相 关 性 分 析. 渔 业 科 学 进 展, 2025, 46(1): 1–14 [ZHU X T, RONG X J, LI B, *et al.* Annual changes in the ecological environment and microbial community structure and their correlation analyses in the core area of Dalian national sea cucumber stock field of China. Progress in Fishery Sciences, 2025, 46(1): 1–14]
- ABRAHAM W R, ROHDE M. The family Hyphomonadaceae. The Prokaryotes. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014, 283–299
- AHMAD R, CHEN Y, ZHUANG Y R, *et al.* Isolation and identification of a pathogenic bacterium, *Exiguobacterium oxidotolerans* XP-2, from the abnormal diseased mature sporophytes of a commercially cultivated brown seaweed *Saccharina japonica*. Journal of Applied Phycology, 2021, 33(5): 3239–3249
- BAKSHANDEH E, RAHIMIAN H, PIRDASHTI H, *et al.* Evaluation of phosphate-solubilizing bacteria on the growth and grain yield of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in northern Iran. Journal of Applied Microbiology, 2015, 119(5): 1371–1382
- BRUNET M, LE DUFF N, BARBEYRON T, *et al.* Year-round quantification, structure and dynamics of epibacterial communities from diverse macroalgae reveal a persistent core microbiota and strong host specificities. Environmental Microbiology Reports, 2025, 17(2): e70077
- BULGARELLI D, GARRIDO-OTER R, MÜNCH P C, *et al.* Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. Cell Host & Microbe, 2015, 17(3): 392–403
- BURGUNTER-DELAMARE B, SHETTY P, VUONG T, *et al.* Exchange or eliminate: The secrets of algal-bacterial relationships. Plants, 2024, 13(6): 829
- CHEN H B, BOUTROS P C. VennDiagram: A package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. BMC Bioinformatics, 2011, 12(1): 35
- DOBRETSOV S, TEPLITSKI M, ALAGELY A, *et al.* Malynoglide from the cyanobacterium *Lyngbya majuscula* interferes with quorum sensing circuitry. Environmental Microbiology Reports, 2010, 2(6): 739–744
- DUARTE C M, GATTUSO J P, HANCKE K, *et al.* Global estimates of the extent and production of macroalgal forests. Global Ecology and Biogeography, 2022, 31(7): 1422–1439
- EGAN S, HARDER T, BURKE C, *et al.* The seaweed holobiont: Understanding seaweed–bacteria interactions. FEMS Microbiology Reviews, 2013, 37(3): 462–476
- GARDINER M, FERNANDES N D, NOWAKOWSKI D, *et al.* VarR controls colonization and virulence in the marine macroalgal pathogen *Nautella italica* R11. Frontiers in

- Microbiology, 2015, 6: 1130
- GOPALAKRISHNAN S, SATHYA A, VIJAYABHARATHI R, *et al.* Plant growth promoting rhizobia: Challenges and opportunities. 3 Biotech, 2015, 5(4): 355–377
- GRICE E A, KONG H H, CONLAN S, *et al.* Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. Science, 2009, 324(5931): 1190–1192
- HAMEEDA B, HARINI G, RUPELA O P, *et al.* Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. Microbiological Research, 2008, 163(2): 234–242
- HAN Q, ZHANG X Y, CHANG L R, *et al.* Dynamic shift of the epibacterial communities on commercially cultivated *Saccharina japonica* from mature sporophytes to sporelings and juvenile sporophytes. Journal of Applied Phycology, 2021, 33(2): 1171–1179
- HU Z M, SHAN T F, ZHANG J, *et al.* Kelp aquaculture in China: A retrospective and future prospects. Reviews in Aquaculture, 2021, 13(3): 1324–1351
- JAMES A K, ENGLISH C J, NIDZIEKO N J, *et al.* Giant kelp microbiome altered in the presence of epiphytes. Limnology and Oceanography Letters, 2020, 5(5): 354–362
- KAUR G, REDDY M S. Effects of phosphate-solubilizing bacteria, rock phosphate and chemical fertilizers on maize-wheat cropping cycle and economics. Pedosphere, 2015, 25(3): 428–437
- KULIK M M. The potential for using cyanobacteria (blue-green algae) and algae in the biological control of plant pathogenic bacteria and fungi. European Journal of Plant Pathology, 1995, 101(6): 585–599
- LI J S, WEINBERGER F, DE NYS R, *et al.* A pathway to improve seaweed aquaculture through microbiota manipulation. Trends in Biotechnology, 2023, 41(4): 545–556
- LI J S, WEINBERGER F, SAHA M, *et al.* Cross-host protection of marine bacteria against macroalgal disease. Microbial Ecology, 2022, 84(4): 1288–1293
- LI J, PANG S J, SHAN T F, *et al.* Changes of microbial community structures associated with seedlings of *Saccharina japonica* at early stage of outbreak of green rotten disease. Journal of Applied Phycology, 2020, 32(2): 1323–1327
- LI J, PANG S J. Evidence of sterility of the male sporophytes of the brown alga *Saccharina japonica* (Phaeophyceae) in culture irrespective of their ploidy levels. Journal of Phycology, 2025, 61(1): 241–249
- LIU F, PANG S J, GAO S Q. Growth performance of unialgal gametophytes of the brown alga *Saccharina japonica* in mass culture conditions. Journal of Applied Phycology, 2016, 28(2): 1145–1152
- LIU W, ZOU H X, WU S W, *et al.* Growth promotion of *Sargassum fusiforme* by epiphytic microbes is dependent on the extent of interspecific interactions of the microbial community. Science of the Total Environment, 2023, 897: 165449
- LOOFT T, JOHNSON T A, ALLEN H K, *et al.* In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(5): 1691–1696
- MA M Y, ZHUANG Y R, CHANG L R, *et al.* Naturally occurring beneficial bacteria *Vibrio alginolyticus* X-2 protects seaweed from bleaching disease. mBio, 2023: e00065–e00023
- MACRAE O C, VICKERS C J. The significance of microbiota in New Zealand seaweed aquaculture. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 2025, 59(3): 509–536
- MANCUSO F P, MORRISSEY K L, DE CLERCK O, *et al.* Warming and nutrient enrichment can trigger seaweed loss by dysregulation of the microbiome structure and predicted function. Science of the Total Environment, 2023, 879: 162919
- NAKATA S, TAKASE R, KAWAI S, *et al.* Potential role of alginate in marine bacteria-yeast interactions. Applied and Environmental Microbiology, 2024, 90(12): e01683–e01624
- OSBORNE M G, MOLANO G, SIMONS A L, *et al.* Natural variation of *Macrocystis pyrifera* gametophyte germplasm culture microbiomes and applications for improving yield in offshore farms. Journal of Phycology, 2023, 59(2): 402–417
- PARK J, KOHN E, SCHENK S, *et al.* An experimental test of the influence of microbial manipulation on sugar kelp (*Saccharina latissima*) supports the core influences host function hypothesis. Applied and Environmental Microbiology, 2025, 91(6): e00301–e00325
- PROVASOLI L. Media and prospects for the cultivation of marine algae. Cultures and Collections of Algae, 1966
- SAHA M, WEINBERGER F. Microbial “gardening” by a seaweed holobiont: Surface metabolites attract protective and deter pathogenic epibacterial settlement. Journal of Ecology, 2019, 107(5): 2255–2265
- SAKANISHI Y, KASAI H, TANAKA J. Photosynthetic and respiratory characteristics of the shade-tolerant kelp *Agarum clathratum*. Fisheries Science, 2022, 88(5): 555–563
- SASAKI H, LINDSTROM S C, WAALAND J R, *et al.* Occurrence of the gametophyte of *Agarum clathratum* (Laminariales, Phaeophyceae) as an endophyte in *Orculifilum denticulatum* (Gigartinales, Rhodophyceae). Phycological Research, 2003, 51(3): 192–202
- SEGATA N, IZARD J, WALDRON L, *et al.* Metagenomic biomarker discovery and explanation. Genome Biology, 2011, 12(6): R60
- SHEU S Y, LIU L P, TANG S L, *et al.* *Thalassotalea euphylliae* sp. nov., isolated from the torch coral *Euphyllia glabrescens*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(12): 5039–5045
- SPOERNER M, WICHARD T, BACHHUBER T, *et al.* Growth

- and thallus morphogenesis of *Ulva mutabilis* (chlorophyta) depends on a combination of two bacterial species excreting regulatory factors. *Journal of Phycology*, 2012, 48(6): 1433–1447
- STOECK T, BASS D, NEBEL M, *et al.* Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. *Molecular Ecology*, 2010, 19(s1): 21–31
- SUN X K, GONG Y, SHANG D D, *et al.* Degradation of alginate by a newly isolated marine bacterium *Agarivorans* sp. BZ047. *Marine Drugs*, 2022, 20(4): 254
- TAPIA J E, GONZÁLEZ B, GOULITQUER S, *et al.* Microbiota influences morphology and reproduction of the brown alga *Ectocarpus* sp. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 197
- TCHESUNOV A V, PORTNOVA D A, VAN CAMPENHOUT J. Description of two free-living nematode species of *Halomonhystera disjuncta* complex (Nematoda: Monhysterida) from two peculiar habitats in the sea. *Helgoland Marine Research*, 2015, 69(1): 57–85
- VADILLO GONZALEZ S, VRANKEN S, COLEMAN M A, *et al.* Host genotype and microbiome associations in co-occurring clonal and non-clonal kelp, *Ecklonia radiata*. *Molecular Ecology*, 2023, 32(16): 4584–4598
- VÁSQUEZ J A, ZUÑIGA S, TALA F, *et al.* Economic valuation of kelp forests in northern Chile: Values of goods and services of the ecosystem. *Journal of Applied Phycology*, 2014, 26(2): 1081–1088
- VEENHOF R J, MCGRATH A H, CHAMPION C, *et al.* The role of microbiota in kelp gametophyte development and resilience to thermal stress. *Journal of Phycology*, 2025, 61(3): 633–649
- WANG Y, SHENG H F, HE Y, *et al.* Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of Illumina tags. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(23): 8264–8271
- WEIGEL B L, MIRANDA K K, FOGARTY E C, *et al.* Functional insights into the kelp microbiome from metagenome-assembled genomes. *mSystems*, 2022, 7(3): e01422–e01421
- WEINBERGER F, BELTRAN J, CORREA J A, *et al.* Spore release in *Acrochaetium* sp. (Rhodophyta) is bacterially controlled 1. *Journal of Phycology*, 2007, 43(2): 235–241
- WEISS A, COSTA R, WICHARD T. Morphogenesis of *Ulva mutabilis* (Chlorophyta) induced by *Maribacter* Species (Bacteroidetes, Flavobacteriaceae). *Botanica Marina*, 2017, 60(2): 197–206
- WICHARD T. From model organism to application: Bacteria-induced growth and development of the green seaweed *Ulva* and the potential of microbe leveraging in algal aquaculture. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2023, 134: 69–78
- YAN Y W, WANG S S, LIU K M, *et al.* Divergence of epibacterial community assemblage correlates with malformation disease severity in *Saccharina japonica* seedlings. *Frontiers in Marine Science*, 2023, 10: 1089349
- YANG R, LIU Q Q, HE Y Y, *et al.* Isolation and identification of *Vibrio mediterranei* 117-T6 as a pathogen associated with yellow spot disease of *Pyropia* (Bangiales, Rhodophyta). *Aquaculture*, 2020, 526: 735372
- YUE S T, XUE N C, YI C L, *et al.* Apomixis in *Saccharina japonica*: Parthenogenesis in male and apogamy in female gametophytes. *Aquaculture*, 2024, 591: 741142
- ZARRAONAINDIA I, OWENS S M, WEISENHORN P, *et al.* The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. *mBio*, 2015, 6(2): e02527–e02514
- ZHANG J, LIU F L, CHEN Y N, *et al.* Combined analysis of reactive oxygen species and symbiotic bacteria profiles reveals their potential effects on the sorus development of *Saccharina japonica*. *Algal Research*, 2025, 91: 104122
- ZHANG X W, XI T L, WANG Y T, *et al.* Chemical interactions between kelp *Macrocystis pyrifera* and symbiotic bacteria under elevated CO₂ condition. *Marine Life Science & Technology*, 2024, 6(4): 700–712
- ZHANG X Y, CHEN Y, SAHA M, *et al.* *Pseudoalteromonas piscicida* X-8 causes bleaching disease in farmed *Saccharina japonica*. *Aquaculture*, 2022, 546: 737354
- ZHANG Y H, TANG K H, SHI X C, *et al.* Description of *Thalassotalea piscium* gen. nov., sp. nov., isolated from flounder (*Paralichthys olivaceus*), reclassification of four species of the genus *Thalassomonas* as members of the genus *Thalassotalea* gen. nov. and emended description of the genus *Thalassomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(Pt_4): 1223–1228
- ZHUANG Y R, SAHA M, BAI Y, *et al.* Microbial communities associated with the mature sporophytes and sporelings of the commercially cultivated seaweed *Saccharina japonica* in Southern China. *Journal of Applied Phycology*, 2024, 36(6): 3729–3739

Differences in Epiphytic Microbial Community Structure Between Sporophytes of *Saccharina japonica* Derived from Sexual Reproduction and Apomixes

LIANG Ganlin^{1,2,3,4}, SHAN Tifeng^{1,2,3①}

(1. State Key Laboratory of Breeding Biotechnology and Sustainable Aquaculture, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266000, China; 2. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao 266037, China; 3. Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266000, China; 4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract *Saccharina japonica*, the most extensively farmed seaweed globally, is of great ecological and economic importance. Its applications extend far beyond food consumption, as it is widely utilized in industrial production, biofeed, and medical products, while also playing an important role in marine ecosystems. Its life cycle is characterized by an alternation of generations between haploid gametophytes and diploid sporophytes, with sporophytes typically produced through sexual reproduction. However, *S. japonica* also exhibits two alternative apomixis reproductive strategies, namely parthenogenesis and apogamy, which bypass fertilization. These asexual modes have attracted increasing attention, as they broaden our understanding of kelp developmental biology and provide new possibilities for germplasm innovation. Epiphytic microorganisms play critical roles in algal growth, morphogenesis, and disease resistance. However, it remains unclear whether sporophytes from different reproductive pathways harbor distinct microbial communities. To address this knowledge gap, we compared bacterial and eukaryotic epiphytic communities of five types of *S. japonica* sporophytes, representing different reproductive origins and growth states, to reveal differences in community composition, structure, and key biomarker taxa, and explore potential implications for asexual sporophyte development and cultivation. Sporophytes were induced from six female and 15 male gametophyte clones under controlled conditions, including normally growing and malformed parthenogenetic and apogamous sporophytes, as well as normally growing sexually reproduced sporophytes. After 75 days of culture, 39 sporophyte samples were collected. DNA was extracted from surface swabs, and the v3–v4 region of the bacterial 16S rRNA gene and the V4 region of the eukaryotic 18S rRNA gene were sequenced using Illumina NovaSeq 6000 platform. Sequencing reads were quality-filtered, merged, and clustered into operational taxonomic units at 97% similarity based on the SILVA reference database. Alpha diversity was evaluated using Chao1 and Shannon indices, and differences were tested using Student's t-test. Beta diversity was assessed using non-metric multidimensional scaling (NMDS) based on Bray-Curtis distances and analysis of similarities (ANOSIM). Biomarkers were identified through linear discriminant analysis effect size (LEfSe) using a threshold LDA score >4 and $P < 0.05$. Alpha diversity analysis confirmed that malformed parthenogenetic sporophytes exhibited significantly higher bacterial richness and diversity than all other groups ($P < 0.01$). Sexual sporophytes showed the lowest alpha diversity in terms of both bacteria and eukaryotes. Apogamous sporophytes, regardless of morphology, generally had a higher diversity than sexual sporophytes, although the differences were not statistically significant. Beta diversity analysis revealed a clear separation of the five groups in the NMDS plots, with ANOSIM confirming significant dissimilarities for both bacterial ($R = 0.499$, $P = 0.001$) and eukaryotic communities ($R = 0.179$, $P = 0.002$). NMDS analysis further indicated that the five sporophyte growth

① Corresponding author: SHAN Tifeng, Email: shantifeng@qdio.ac.cn

types exhibited significant differences in species composition. In eukaryotic communities, normally growing sexually reproduced sporophytes exhibit the lowest richness and diversity, whereas malformed parthenogenetic sporophytes harbor the most structurally diverse epiphytic assemblages, which may be associated with their distinctive morphological and physiological statuses. Differential taxa among groups were identified using LEfSe and genus-level species composition analyses. Asexual sporophytes generally harbor more enriched bacterial taxa than sexual sporophytes. Malformed parthenogenetic sporophytes contained the highest number of biomarkers, whereas malformed apogamous sporophytes contained the lowest. At the genus level, *Litorimonas* emerged as the dominant bacterium across multiple groups and was particularly enriched in sexually reproduced sporophytes and malformed apogamous sporophytes. In contrast, the malformed parthenogenetic sporophytes were dominated by unclassified Cyanobacteria, with *Litorimonas* accounting for a small fraction of the community (3%). The consistent enrichment of Cyanobacteria, which possess an autotrophic capacity and produce antimicrobial metabolites, may partly explain their ecological success. In addition, *Maribacter antarcticus* was significantly enriched in malformed parthenogenetic sporophytes. Although its precise function remains unclear, its association with abnormal morphology warrants further experimental validation. Eukaryotic communities also exhibited notable variations. Most groups were dominated by *Agarum clathratum*, a kelp relative species capable of attaching to macroalgae and occasionally acting as a parasite under nutrient-rich conditions. However, malformed parthenogenetic sporophytes were enriched in *Halomonhystera*, a bacterivorous nematode-like taxon. Its occurrence coincided with higher bacterial loads in these samples, suggesting that host deformities and abundant microbial substrates provided favorable conditions for parasitic colonization. In summary, this study used high-throughput sequencing to systematically analyze the epiphytic microbial diversity of kelp sporophytes derived from sexual reproduction and apomixis. The results revealed significant differences in the microbial community structure between asexual and sexual sporophytes in both the bacterial and eukaryotic communities. Malformed parthenogenetic sporophytes exhibited the most distinct community structure. LEfSe analysis identified significantly different taxa, which enriched the understanding of microbial composition and structure in asexual sporophytes, and offered a solid foundation for future investigations into the interactions between asexual sporophytes and their epiphytic microbiota.

Key words *Saccharina japonica*; Parthenogenesis; Sporophyte; Epiphytic microbial community; High-throughput sequencing