

DOI: 10.3969/j.issn2095-9869.20250409002

http://www.yykxjz.cn/

王纯, 朱明, 李杰, 王珊珊, 阎永伟. 海带高、低畸形率幼孢子体的附生菌群的比较分析. 渔业科学进展, 2026, 47(2): 79–88  
WANG C, ZHU M, LI J, WANG S S, YAN Y W. Comparative analysis of epiphytic bacterial communities on *Saccharina japonica* sporelings with low and high malformation disease severity. Progress in Fishery Sciences, 2026, 47(2): 79–88

# 海带高、低畸形率幼孢子体的附生菌群的比较分析\*

王纯<sup>1,2</sup> 朱明<sup>1</sup> 李杰<sup>2,3</sup> 王珊珊<sup>4</sup> 阎永伟<sup>2,3①</sup>

1. 江苏海洋大学 江苏省海洋生物资源与环境重点实验室 江苏 连云港 222005;
2. 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东 青岛 266071;
3. 青岛海洋科技中心海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266237;
4. 哈尔滨理工大学荣成校区 山东 荣成 264300)

**摘要** 幼孢子体畸形病(sporeling malformation disease)是制约海带育苗产业发展的重要病害之一,其发生机制尚未明确。本研究以威海某育苗基地不同畸形率(低发病率组 Low vs.高发病率组 High)海带幼孢子体为对象,利用高通量测序分析了其附生菌群的多样性、结构及功能途径,揭示了附生菌群结构和功能变化与病害发生的关联。结果显示,除 Shannon 指数外,High 组菌群 Alpha 多样性指数均显著降低( $P<0.05$ ),表明菌群丰富度显著降低。基于 Bray-Curtis 距离的主坐标分析及组间距离比较分析表明,两组幼孢子体附生菌群结构差异显著( $P<0.05$ )。两组最主要的细菌类群包括  $\alpha$ -变形菌纲(Alphaproteobacteria)、 $\gamma$ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)、 $\delta$ -变形菌纲(Deltaproteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes),但 Low 组富集数量更多的差异菌群。其中,生丝单胞菌(*Hyphomonas*)、无形杆菌(*Amorphus*)、短小杆菌属(*Curtobacterium*)及拟杆菌门细菌等与生长发育相关的细菌在 Low 组显著富集,而 High 组显著性富集海棒杆菌(*Pelagibacterium*)、食酸菌(*Acidovorax*)及红球菌(*Rhodococcus*)等潜在病原菌。功能预测结果显示,Low 组显著富集嘧啶代谢、维生素和辅酶 A 合成、免疫防御等与生长发育和保护性相关的通路,而 High 组显著富集苯甲酸、类固醇和烯类降解以及多糖合成等与侵染相关的通路。本研究为阐明海带畸形病的微生物驱动机制提供了新视角,对病害防控具有重要的指导意义。

**关键词** 海带; 幼孢子畸形; 附生菌群; 功能途径

中图分类号 S917.3 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2026)02-0079-10

幼孢子体畸形病是海带(*Saccharina japonica*)苗期的重要病害之一,几乎每年都会在育苗前期暴发(Wang et al, 2014; Yan et al, 2023)。发病的幼孢子体部分或全部细胞产生不正常的生长和分裂,部分细胞增大至直径为正常细胞的几倍以上或分裂后排列不整齐,最终形成畸形并解体(吴超元等, 1979)。发病后,病势发展迅速,采取换水、洗刷、降温等措施都不能

真正控制病势的蔓延,严重时几天内幼孢子体大量死亡,成为海带夏苗繁育过程中的技术瓶颈。

早期研究表明,硫酸盐还原菌或产  $H_2S$  的腐生细菌可能是导致疾病发生的主要原因, $H_2S$  对幼体的毒害作用使其产生畸形(吴超元等, 1979)。苗期细菌分离的结果显示,苗帘上附着的褐藻酸降解菌与好氧异养细菌比例的增高与幼体畸形病之间存在时

\* 国家现代农业产业技术体系(CARS-50)资助。王纯, Email: JOU\_wangchun@163.com

① 通信作者: 阎永伟, Email: yanyw@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2025-04-09, 收修改稿日期: 2025-05-07

间上的一致性,推测附生褐藻酸降解菌的大量增殖与畸形发生之间具有密切关系(王伟伟等,2017),且只有当褐藻酸降解菌的数量级达到  $10^6$  时才会致病(盛宝利等,2016)。除微生物因素外,苗帘处理程度、种海带成熟程度以及光照条件等均为导致发病的潜在因素(叶秀芝,2011;盛宝利等,2016)。前期研究证实,过长的光照条件及不恰当的种海带成熟度均可导致显著更高的幼孢子体畸形率(Yan *et al.*, 2023)。

综上,海带幼孢子体畸形病的发生可能与附生细菌的功能密切相关,且环境因子等外部条件起到了诱导发病的作用,但究竟有哪些微生物与病害发生相关及其致病机理等问题仍不清楚。然而,对于海带苗期病害的研究长期以来主要围绕褐藻酸降解菌展开且以基于培养的方法为主,缺乏对附生微生物类群及其功能的深入性综合研究,严重阻碍了对海带病害发生的认识。利用高通量测序技术研究藻类附生微生物与藻类病害的报道已屡见不鲜,且研究表明藻类病害的发生是胁迫环境条件下附生菌群紊乱的结果(Zozaya-Valdés *et al.*, 2015、2017; Zhang *et al.*, 2024)。前期利用实验室模拟实验发现,过长的光照时间或不恰当的种海带成熟度可能使幼孢子体处于胁迫环境下,附生菌群的结构和功能也会发生紊乱,这反过来又通过改变宿主-细菌的相互作用(例如缺乏足够的功能来满足宿主的生长和发育需求或诱导潜在病原体操纵细胞过程)显著增加了畸形病的严重程度(Yan *et al.*, 2023)。

然而,这些发现仍需要更多的数据和实验进行支持。

在前期基础上,本研究以原位发病样品(即育苗场中患不同程度畸形病的海带幼孢子体)为研究对象,比较分析其附生菌群变化并预测功能组成变化,以期为该病致病机理的阐明提供更多的数据支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样品采集

海带的幼孢子体样品于 2018 年采自威海某海带育苗厂中的 1 个育苗车间。车间共有 200 多个育苗池,每个育苗池  $20\text{ m}^2$  左右。每年育苗期该育苗厂都会观察到幼孢子体畸形病的发生。在幼孢子体发育至 2~8 列细胞时,随机从 6 个育苗池中选取 6 个可观察到幼孢子体畸形的苗帘,再在每个苗帘上随机选取 3~5 个苗绳位点并剪取小片段苗绳(约 1 cm 左右)于光学显微镜下对幼孢子体的畸形情况进行观察和统计(图 1),计算苗帘上幼孢子体的平均畸形率。根据平均畸形率,将上述 6 个苗帘分成低发病率(畸形率分别为 2%、4%和 6%左右)和高发病率(畸形率分别为 10%、11%和 12%左右)两组,分别命名为 Low 组和 High 组。为了不影响后续的育苗,用灭菌棉拭子在每个苗帘的苗绳位点附近轻轻擦拭苗绳以采集幼孢子体附生微生物样品。每个苗帘分别用 2 个棉拭子擦拭上述苗绳位点的上下表面并合并为 1 个样品。

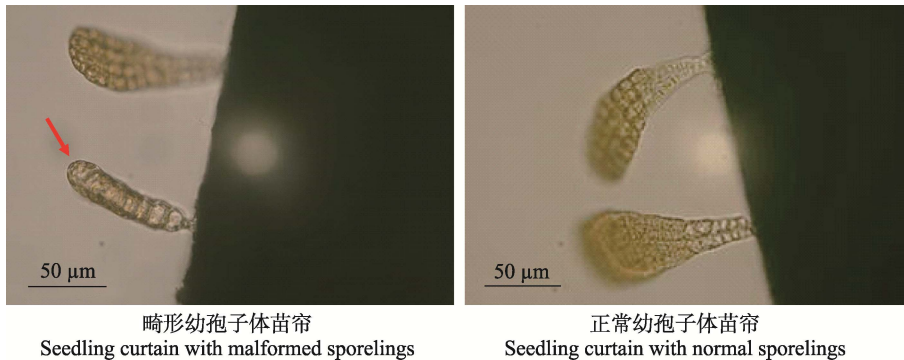


图 1 光学显微镜下观察苗绳上的海带幼孢子体

Fig.1 Observation of juvenile sporophytes of *S. japonica* on seedling ropes under a light microscope

### 1.2 附生菌群 DNA 提取、PCR 扩增及高通量测序

先用生物样本均质器 Precellys<sup>TM</sup>-24 (Bertin, 法国)对棉拭子进行 2 次研磨处理(每次 6 800 r/min 研磨 30 s),再用 DNeasy Powersoil Kit (QIAGEN, 德国)提取附生菌群总 DNA。最后,用 100  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  DNA 用 Q5 高保真 DNA 聚合酶及不扩增叶绿体的 16S rRNA 基因扩增引物 799F (5'-AACMG GATTAGATACCCKG-3')和 1193R (5'-ACGTCATCCC CACCTTCC-3')扩增 V5~V7 可变区(Zhang *et al.*, 2019)。每一个样品进行扩增时,799F 引物 5'端会附加 6 碱基的 barcode 以对不同样品加以区分。扩增条件为: 98  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min; 98  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火

30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 25~27 个循环; 72 °C 后延伸 5 min。每个样本的 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 NovaSeq 平台进行 2 × 250 的双端测序。

### 1.3 数据基本分析

每个样品的双端下机序列用 USEARCH (version 10.0.240)进行拼接、质控、去除嵌合体, 用 unoise3 算法聚类成 ZOTU (zero-radius OTU) (Edgar, 2010)。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 ZOTU 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 Alpha 多样性、Beta 多样性、附生菌群组成等。用 R(version 4.0.3)和 Excel 对菌群多样性及群落结构进行统计分析, 包括各个类群相对丰度统计、Alpha 多样性指数的 Wilcoxon 秩和检验(Wilcoxon rank sum test)、主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA)及不同组的 Bray-Curtis 距

离的单因素方差分析(one-way ANOVA), 显著差异水平为  $P < 0.05$ 。

### 1.4 差异菌群及功能分析

用 LEfSe [line discriminant analysis (LDA) effect size] (Segata *et al.*, 2011)分析不同畸形率幼孢子体附生菌群中的差异类群。其中, LDA score 值  $> 3.0$  且  $\alpha < 0.05$  时, 认为细菌类群在两组之间存在显著差别。用 PICRUST2 软件(Douglas *et al.*, 2020)对 16S rRNA 基因测序数据进行宏基因组功能预测并获得 KEGG 的代谢通路信息, 用 STAMP 软件(version 2.1.3) (Parks *et al.*, 2014)基于 Welch's *t*-test 比较不同发病率样品中的差异通路, 显著差异水平为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同发病程度样品菌群多样性

Good's coverage 结果显示, Low 组和 High 组的覆盖率分别为  $0.999 \pm 0.000$  和  $0.999 \pm 0.001$ , 表明序列能够覆盖绝大多数检测到的微生物。Low 组的 Alpha 多样性指数普遍高于 High 组, 除了 Shannon 指数未表现出显著差异(Low 组为  $7.67 \pm 0.18$ , High 组为  $7.34 \pm 0.12$ )外, 其余多样性指数结果均有显著差异(图 2)。

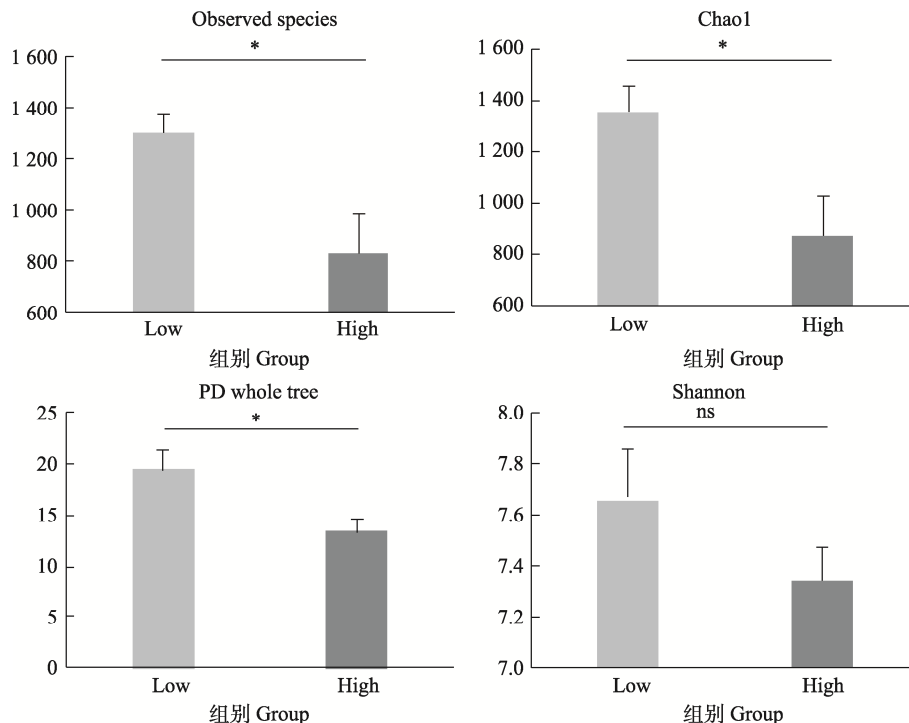


图 2 Low 组与 High 组的 Alpha 多样性指数比较

Fig.2 Comparisons of Alpha diversity indices of epiphytic bacterial communities between Low and High groups

\*:  $P < 0.05$ ; ns: 无显著差异。下同。

\*:  $P < 0.05$ ; ns: Not significantly different. The same below.

基于 Bray-Curtis 距离的 PCoA 图显示(图 3A), Low 组和 High 组样品的附生菌群之间存在明显分离 (Adonis  $R^2=0.28$ ,  $P=0.10$ ), 其中第 1 轴的解释度为 32.74%, 第 2 轴的解释度为 23.38%。进一步用基于 Bray-Curtis 距离的 ANOVA 分析来比较组间及组内距离差异。结果显示, Low 组内与 Low-High 组间的距离存在显著差异 (Tukey's test  $P=0.029$ ,  $<0.05$ ) (图 3B)。这些结果表明, Low 组和 High 组之间群落结构确实存在显著差异。

## 2.2 细菌群落结构

Low 组和 High 组中最主要的细菌类群包括  $\alpha$ -变形菌纲 (Alphaproteobacteria),  $\gamma$ -变形菌纲

(Gammaproteobacteria),  $\delta$ -变形菌纲 (Deltaproteobacteria) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes), 这 4 个类群在两组中占的比例均大于 95% (图 4)。其中,  $\alpha$ -变形菌纲的比例在两组中占到一半以上, 相对丰度分别为 51.91% 和 51.86%。 $\gamma$ -变形菌纲相对丰度分别为 18.55% 和 21.08%,  $\delta$ -变形菌纲分别为 14.92% 和 13.80%, 拟杆菌门分别为 10.86% 和 8.50%。

从属水平来看, 在各组样品中相对丰度较高的细菌类群包括盐贪食杆菌属 (*Halobacteriovorax*)、海旋菌属 (*Thalassospira*)、甲基娇养杆菌属 (*Methylotenera*)、小海员杆菌属 (*Nautella*) 和海杆菌属 (*Marinobacter*) 等 (图 5)。其中, 只有甲基娇养杆菌属在 Low 组中的相对丰度 ( $3.72\% \pm 0.01\%$ ) 高于 High 组中的相对丰度

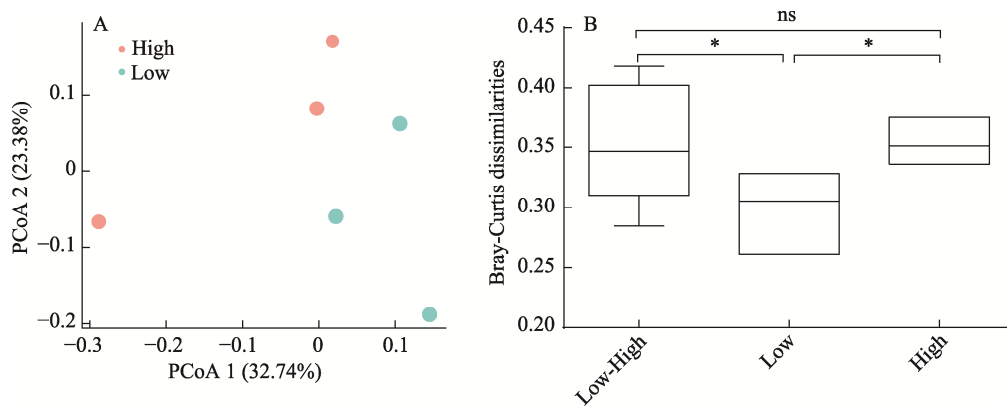


图 3 主坐标分析(A)及 Bray-Curtis 距离比较(B)

Fig.3 Principal coordinates analysis (A) and comparisons based on Bray-Curtis distance (B)

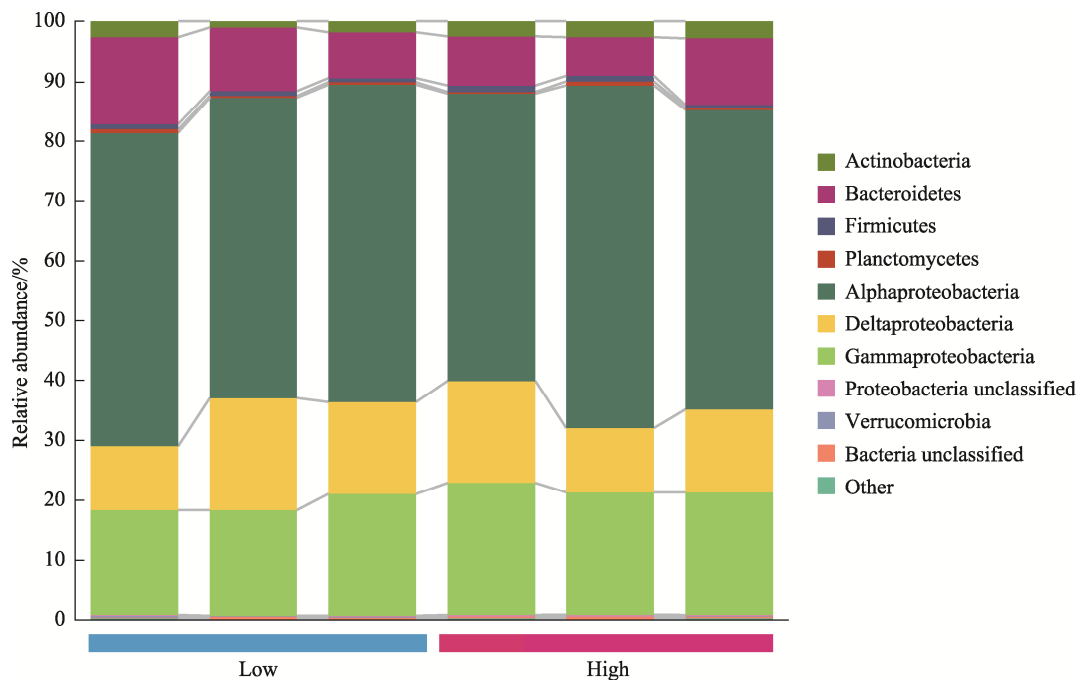


图 4 门及变形菌纲水平上细菌相对丰度的比较

Fig.4 Comparisons of bacterial relative abundance at the level of phylum or Proteobacterial classes

(3.58%±0.01%)。而盐贪食杆菌属(4.77%±0.02% vs. 4.92%±0.01%)，海旋菌属(4.10%±0.01% vs. 4.81%±0.01%)，小海员杆菌属(3.49%±0.01% vs.

3.74%±0.01%) 和海杆菌属(2.37%±0.02% vs. 3.30%±0.01%)在 Low 组中的相对丰度则低于 High 组中的相对丰度。



图 5 Low 组与 High 组中相对丰度前 30 个属的丰度热图

Fig.5 Abundance heatmap of the top 30 genera within the Low and High groups

### 2.3 差异菌群分析

LEfSe 结果显示, 两组样品之间差异细菌类群共有 43 个(图 6)。其中, 25 个在 Low 组中富集, 而 18 个在 High 组中富集。差异类群主要分布在  $\alpha$ -变形菌纲、 $\gamma$ -变形菌纲、拟杆菌门、放线菌门(Actinobacteria)以及疣微菌门(Verrucomicrobia)等。在属水平上, 两组之间共有 21 个差异类群。除去 uncultured 类群外, 共有 12 个属在 Low 组中具有显著更高的相对丰度, 包括厚壁菌门的链球菌属(*Streptococcus*)和微小杆菌属(*Exiguobacterium*),  $\alpha$ -变形菌纲的生丝单胞菌(*Hyphomonas*)和无形杆菌属(*Amorphus*), 放线菌门的弯曲杆状菌属(*Flexivirga*)和短小杆菌属(*Curtobacterium*), 以及拟杆菌门的 NS5 marine group、黄色棒菌属(*Flavirhabdus*)、海曲线菌属(*Marinoscillum*)、欧文维克斯菌属(*Owenweeksia*)、黏着杆菌(*Tenacibaculum*)和居绿藻菌(*Ulvibacter*)。在 High 组显著富集的有细菌属有 7 个, 包括拟杆菌门的金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)、 $\alpha$ -变形菌纲的海棒杆菌属(*Pelagibacterium*)和寺崎氏菌属(*Terasakiella*),  $\gamma$ -变形菌纲的食酸菌属(*Acidovorax*), 放线菌门的表皮杆状菌属(*Cutibacterium*)、考克氏菌属(*Kocuria*)和红球菌属(*Rhodococcus*)等。

### 2.4 差异功能分析

从功能角度来看, Low 组与 High 组的差异主要表现在代谢、降解、生物合成以及免疫相关的通路(图 7)。在 Low 组中显著富集的功能包括嘧啶代谢、泛酸盐和辅酶 A 合成、灵菌红素生物合成以及 Toll 和 Lmd 信号通路、细菌侵染等。在 High 组中显著富集的功能包括苯甲酸降解、类固醇降解、烯类降解、多糖物质合成(阿拉伯半乳聚糖和阿拉伯甘露糖脂)以及免疫信号途径等。

## 3 讨论

本研究首次以育苗厂内不同畸形率的海带幼孢子体为研究对象, 比较分析了不同畸形率海带幼孢子体附生菌群的多样性和组成差异, 并结合功能途径预测分析探究了幼孢子畸形病的微生态机制。

研究结果显示, Low 组附生菌群的 Alpha 多样性指数(如 Observed species、Chao1 和 PD 等丰富度指数)显著高于 High 组, 这与之前轻微发病样品中细菌的多样性高于严重发病样品的趋势明显类似(Yan *et al.*, 2019; 阎永伟等, 2022)。研究表明, 细菌群落多样性越高, 对病原菌入侵的抵抗力越强(Shi *et al.*, 2019)。不同的是, 之前研究中轻微和严重两种发病

状态的样品都发生了病烂,表明菌群已经开始向腐生的降解功能转变(Egan *et al*, 2016)。然而,本研究中两种不同畸形率的幼孢子样品中尚未出现降解情况。之所以出现不同的发病程度,可能归结于两方面原因:一是菌群紊乱程度不同导致高畸形率幼孢子体缺乏更多与幼孢子体正常发育相关的细菌类群;二是病原侵染导致致病菌或毒力因子的载量不同(Yan *et al*,

2023)。此外,我们还注意到两组样品之间的 Shannon 指数不存在显著差异。由于该指数同时反映群落的丰富度和均匀度,而 High 组某些类群相对丰度的显著变化可能一定程度上弥补了其丰富度的显著变化。综上,需要进一步对两种状态样品进行群落结构及功能组成的比较分析,这也有助于查明病害发生的微生态机制。

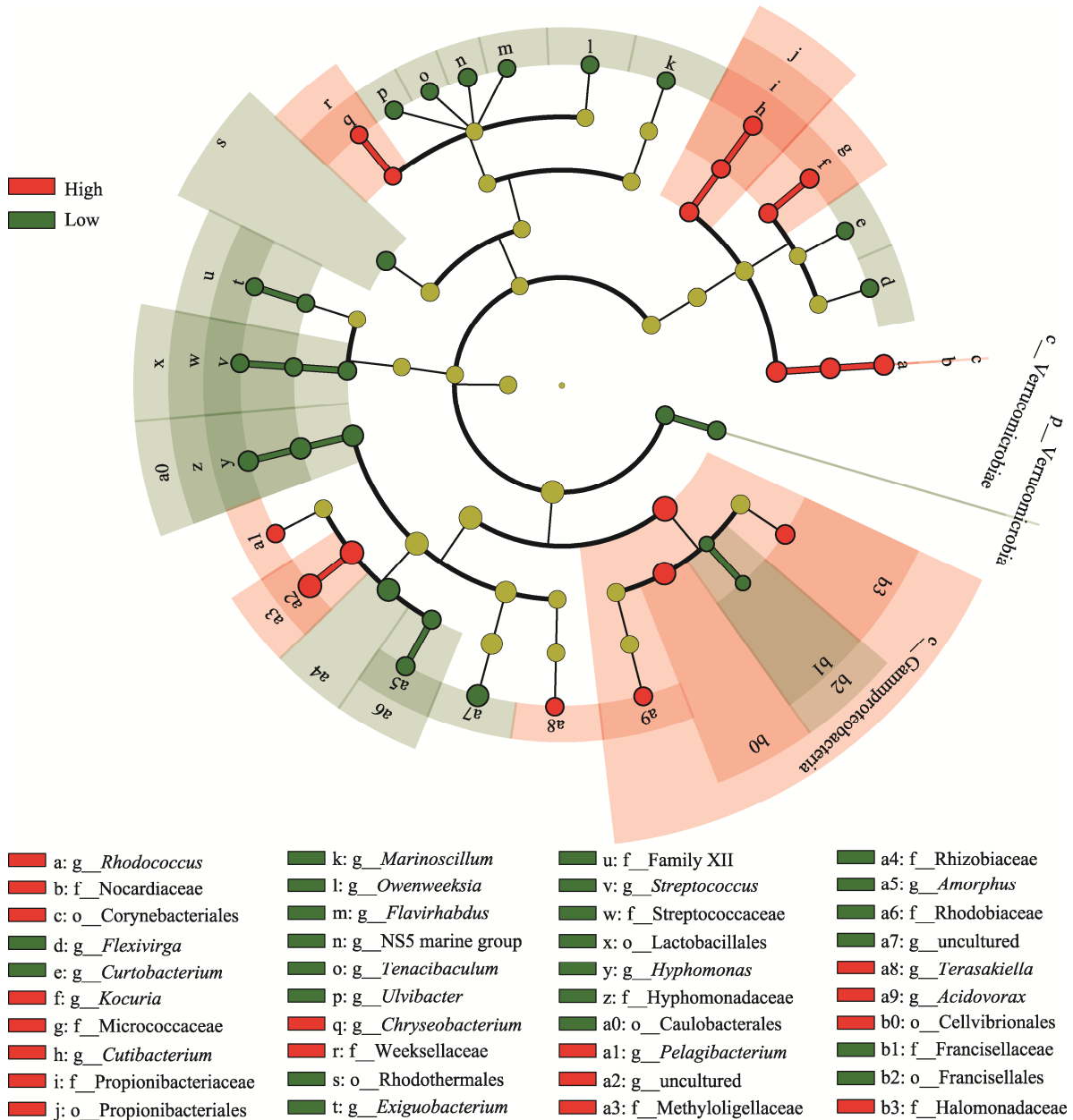


图 6 Low 组与 High 组的差异细菌类群

Fig.6 Differentially abundant bacterial taxa between Low and High groups

红色表示在 High 组中显著富集的细菌类群,绿色则表示在 Low 组中显著富集的细菌类群。

Red indicates significantly enriched bacterial taxa in High group, whereas green indicates those significantly enriched in Low group.

从细菌群落结构来看,主要的细菌类群(例如门或变形菌纲以及属)在所有样品中均存在。尤其是变

形菌纲和拟杆菌门,作为幼孢子体附生菌群中的优势类群已在之前研究中被报道过,表明了对幼孢子体发

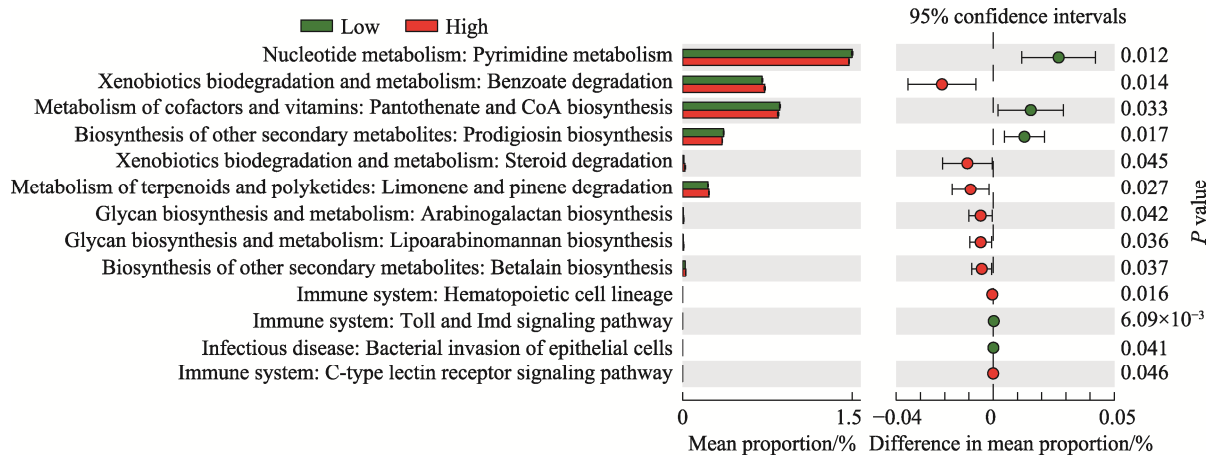


图 7 Low 组与 High 组的细菌差异功能

Fig.7 Differentially abundant bacterial functions between Low and High groups

育的重要作用(唐隆晨等, 2020)。然而, 不同畸形率幼孢子体附生细菌的群落结构存在显著差异。具体表现在两方面: 首先, 基于 Bray-Curtis 距离的 Beta 多样性分析证明不同畸形率样品之间的附生菌群结构显著不同; 其次, 主要细菌类群, 如盐贫食杆菌属、海旋菌属、甲基娇养杆菌属、小海员杆菌属和海杆菌属等的相对丰度发生了变化。其中, 海旋菌属和海杆菌属细菌均具有降解复杂有机物(如烷烃、琼脂、脂肪)的能力(Wang *et al*, 2016; Zeng *et al*, 2016; Rughöft *et al*, 2020), 甲基娇养杆菌属细菌具有代谢一碳化合物等的能力(Vorobev *et al*, 2013), 小海员杆菌属细菌为被报道过的藻类病原之一(Gardiner *et al*, 2017), 盐贫食杆菌属细菌则具有捕食病原菌从而具有调整微生物组结构和功能的作用(Welsh *et al*, 2016)。细菌群落结构的变化说明菌群结构乃至功能可能发生了转变, 从而通过细菌的相关活性与病害发生及其严重程度产生关联。

为了进一步探究菌群结构的具体变化, 我们使用 LEfSe 分析比较了不同畸形率样品附生菌群的显著变化。所得到的差异细菌类群虽不属于以上 5 个主要细菌类群, 但 Low 组显著富集的差异类群要更多。一方面说明低畸形率幼孢子体可能需要更多细菌类群维持健康, 另一方面表明高畸形率幼孢子体附生菌群发生了显著失衡。例如, Low 组显著富集的生丝单胞菌被证实具有诱导条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)形态发生的功能(Fukui *et al*, 2014); 无形杆菌属细菌具有产胞外多糖的功能(Wang *et al*, 2010), 具有这种活性的微生物可能与海藻互作并对其形态发生和生长发育具有积极作用(Singh *et al*, 2011); 弯曲杆状菌、短小杆菌等都具有显著促进植物生长的功能(Vimal *et al*, 2019; Kan *et al*, 2023); 此外, 拟杆菌门细菌通

常具有降解高分子量化合物的功能且偏好附着在颗粒或藻类表面上(Fernández-Gómez *et al*, 2013), 也具有诱导藻类形态发生的重要功能(Egan *et al*, 2013)。而 High 组中显著富集的细菌类群与病害的关系也值得关注。例如,  $\alpha$ -变形菌纲的海棒杆菌属、 $\gamma$ -变形菌纲的食酸菌属、放线菌门的红球菌属等。海棒杆菌的 FicT 毒素以及食酸菌属细菌的酚类物质降解活性均可能为病害的发生和发展提供便利。FicT 毒素被推测可以通过分泌系统进入真核宿主细胞并破坏宿主 DNA 拓扑结构最终导致宿主细胞的死亡(Harms *et al*, 2017)。某些食酸菌属细菌是重要的水稻病原(Liu *et al*, 2014), 有的还具有降解酚类物质的活性(Baek *et al*, 2003), 而酚类物质往往是藻类宿主及其附生细菌分泌的抗菌物质之一, 并用以抵抗病原入侵(Goecke *et al*, 2010)。红球菌中的一部分成员因为拥有包含毒力因子的线性质粒而具有重要致病性(Savory *et al*, 2017)。这一类病原能够干扰草本植物细胞分裂素的合成及功能, 使得植物细胞不正常分裂而畸形生长, 最终导致整个苗圃栽培过程的失败(Savory *et al*, 2017)。然而, 这类细菌在本研究的数据中以较低相对丰度存在(< 1%), 而且相关的毒力因子等存在情况也未可知, 对于其致病性仍需要侵染实验验证。因此, 与我们之前的研究类似(Yan *et al*, 2023), 不能排除病原侵染致病的可能性。

进一步用 PICRUST2 对菌群的功能进行了预测分析, 低畸形率样品中显著富集的核苷酸代谢、辅因子和维生素合成及次级代谢物合成相关的通路, 表明附生菌群在维系幼孢子体健康状态中的重要作用。其中, 附生菌维生素 B<sub>5</sub> (即泛酸 Pantothenate)的合成对于促进藻类生长发育具有重要意义(Kim *et al*, 2024); 而灵菌红素等次级代谢物的合成在使宿主抵抗外部

细菌、真菌和藻类侵染及 UV 等环境胁迫中具有重要作用(Stankovic *et al.*, 2014)。与之相比, High 组显著富集的功能途径则可能为病原的侵染提供了条件。例如,类固醇和烯类降解,这两类物质均具有抗菌活性,因而也具有抵抗病原入侵的潜能(Goecke *et al.*, 2010; Karpiński, 2020)。其次,一些多糖(阿拉伯半乳糖和阿拉伯甘露糖脂)合成途径,这些多糖一般是细菌细胞壁的重要组成部分(Rahlwes *et al.*, 2019),如阿拉伯半乳糖是红球菌属的细胞壁骨架的重要组成部分(Pátek *et al.*, 2021)。因此,这些途径的富集可能表明某些潜在致病菌在高畸形率样品中显著富集并增殖,从而导致病害的加重。

综上所述,本研究首次以育苗场样品为研究对象比较分析了高、低畸形率海带幼孢子体附生菌群的组成及功能组成的差异,并得出了与我们的模拟实验相类似的结论。这些发现表明,附生菌群的紊乱在病害从轻微到加重的演变过程中起到了重要作用,突显了维持健康微生物群落对于海带幼孢子体生长和发育的重要性,为阐明海带幼孢子体畸形病的微生态机制提供了一定的数据支持,并为疾病的预防和控制提供了潜在的靶点。例如,开发促生类益生菌或特异性生物防治剂以降低海带幼孢子体的畸形率。此外,还可以通过优化育苗环境条件,如调整光照强度、控制种海带的成熟度等,来维持健康的海带附生微生物群落结构,增强海带幼孢子体对病害的抵抗力。后续将采集更多显著不同幼孢子体畸形率的生物重复样品,采用多组学结合及附生细菌功能验证的方法查明发病的生态机制,并探索上述防控策略的可行性和有效性,为病害的精准防控提供基础数据,保证海带产业的持续健康发展。

## 参 考 文 献

- 盛宝利, 王青岩, 张壮志, 等. 生产中海带幼体畸形病的预防与治疗. 河北渔业, 2016, 274(10): 45–46 [SHENG B L, WANG Q Y, ZHANG Z Z, *et al.* Prevention and treatment of kelp larval malformation in production. Hebei Fisheries, 2016, 274(10): 45–46]
- 唐隆晨, 钟晨辉, 林琪, 等. 海带孢子体、配子体时期附生菌群结构的比较. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 58–65 [TANG L C, ZHONG C H, LIN Q, *et al.* Comparative study on the community structure of epiphytic bacteria in sporophyte and gametophyte stages of kelp *Saccharina japonica*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(1): 58–65]
- 王伟伟, 王娜, 张壮志, 等. 海带夏季育苗系统褐藻酸降解菌数量组成分析. 大连海洋大学学报, 2017, 32(1): 26–32 [WANG W W, WANG N, ZHANG Z Z, *et al.* Quantity and composition of alginic acid decomposing bacterial community in summer seedling system of kelp *Saccharina japonica*. Journal of Dalian Ocean University, 2017, 32(1): 26–32]
- 吴超元, 高难生, 陈德成, 等. 海带幼体畸形病的研究. 海洋与湖沼, 1979, 10(3): 238–247, 299–300 [WU C Y, GAO N S, CHEN D C, *et al.* Study on the malformation of *Laminaria japonica* larvae. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1979, 10(3): 238–247, 299–300]
- 阎永伟, 杨慧超, 莫照兰, 等. 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, *et al.* Epiphytic microbial communities associated with *Neopyropia yezoensis* with *Olpidiopsis* disease. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 165–175]
- 叶秀芝. 海带育苗中变形烂病的症状及防治措施. 齐鲁渔业, 2011, 28(7): 42–43 [YE X Z. Symptoms and prevention measures of deformity rot disease in *Saccharina japonica* seedling cultivation. Shandong Fisheries, 2011, 28(7): 42–43]
- BAEK S H, KIM K H, YIN C R, *et al.* Isolation and characterization of bacteria capable of degrading phenol and reducing nitrate under low-oxygen conditions. Current Microbiology, 2003, 47(6): 462–466
- 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
- DOUGLAS G M, MAFFEI V J, ZANEVELD J R, *et al.* PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. Nature Biotechnology, 2020, 38(6): 685–688
- EDGAR R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics, 2010, 26(19): 2460–2461
- EGAN S, GARDINER M. Microbial dysbiosis: Rethinking disease in marine ecosystems. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 991
- EGAN S, HARDER T, BURKE C, *et al.* The seaweed holobiont: Understanding seaweed-bacteria interactions. FEMS Microbiology Reviews, 2013, 37(3): 462–476
- FERNÁNDEZ-GÓMEZ B, RICHTER M, SCHÜLER M, *et al.* Ecology of marine Bacteroidetes: A comparative genomics approach. The ISME Journal, 2013, 7(5): 1026–1037
- FUKUI Y, ABE M, KOBAYASHI M, *et al.* Isolation of *Hyphomonas* strains that induce normal morphogenesis in protoplasts of the marine red alga *Pyropia yezoensis*. Microbial Ecology, 2014, 68(3): 556–566
- GARDINER M, BOURNAZOS A M, MATURANA-MARTINEZ C, *et al.* Exoproteome analysis of the seaweed pathogen *Nautella italica* R11 reveals temperature-dependent regulation of RTX-like proteins. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1203
- GOECKE F, LABES A, WIESE J, *et al.* Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria. Marine Ecology Progress Series, 2010, 409: 267–299

- HARMS A, LIESCH M, KÖRNER J, *et al.* A bacterial toxin-antitoxin module is the origin of inter-bacterial and inter-Kingdom effectors of *Bartonella*. *PLoS Genetics*, 2017, 13(10): e1007077
- KAN Y T, ZHANG L, WANG Y, *et al.* Endophytic bacterium *Flexivirga meconopsidis* sp. nov. with plant growth-promoting function, isolated from the seeds of *Meconopsis integrifolia*. *Microorganisms*, 2023, 11(12): 2899
- KARPIŃSKI T M, KARPIŃSKI T M. Essential oils of Lamiaceae family plants as antifungals. *Biomolecules*, 2020, 10(1): 103
- KIM K H, KIM J M, BAEK J H, *et al.* Metabolic relationships between marine red algae and algae-associated bacteria. *Marine Life Science & Technology*, 2024, 6(2): 298–314
- LIU H, YANG C L, GE M Y, *et al.* Regulatory role of *tetR* gene in a novel gene cluster of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* RS-1 under oxidative stress. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 547
- PARKS D H, TYSON G W, HUGENHOLTZ P, *et al.* STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*, 2014, 30(21): 3123–3124
- PÁTEK M, GRULICH M, NEŠVERA J. Stress response in *Rhodococcus* strains. *Biotechnology Advances*, 2021, 53: 107698
- RAHLWES K C, SPARKS I L, MORITA Y S. Cell walls and membranes of Actinobacteria. *Bacterial cell walls and membranes*. Cham: Springer International Publishing, 2019: 417–469
- RUGHÖFT S, JEHLICH N, GUTIERREZ T, *et al.* Comparative proteomics of *Marinobacter* sp. TT1 reveals corexit impacts on hydrocarbon metabolism, chemotactic motility, and biofilm formation. *Microorganisms*, 2020, 9(1): 3
- SAVORY E A, FULLER S L, WEISBERG A J, *et al.* Evolutionary transitions between beneficial and phytopathogenic *Rhodococcus* challenge disease management. *eLife*, 2017, 6: e30925
- SEGATA N, IZARD J, WALDRON L, *et al.* Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 2011, 12(6): R60
- SHI W C, LI M C, WEI G S, *et al.* The occurrence of potato common scab correlates with the community composition and function of the geocaulosphere soil microbiome. *Microbiome*, 2019, 7(1): 14
- SINGH R P, SHUKLA M K, MISHRA A, *et al.* Isolation and characterization of exopolysaccharides from seaweed associated bacteria *Bacillus licheniformis*. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 84(3): 1019–1026
- STANKOVIC N, SENEROVIC L, ILIC-TOMIC T, *et al.* Properties and applications of undecylprodigiosin and other bacterial prodigiosins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(9): 3841–3858
- VIMAL S R, PATEL V K, SINGH J S. Plant growth promoting *Curtobacterium albidum* strain SRV4: An agriculturally important microbe to alleviate salinity stress in paddy plants. *Ecological Indicators*, 2019, 105: 553–562
- VOROBEEV A, BECK D A C, KALYUZHNYAYA M G, *et al.* Comparative transcriptomics in three *Methylophilaceae* species uncover different strategies for environmental adaptation. *PeerJ*, 2013, 1: e115
- WANG G G, LU B J, SHUAI L M, *et al.* Microbial diseases of nursery and field-cultivated *Saccharina japonica* (Phaeophyta) in China. *Algological Studies*, 2014, 145/146: 39–51
- WANG K, YAN P S. Optimization of Lipase production from a novel strain *Thalassospira permensis* M35-15 using Response Surface Methodology. *Bioengineered*, 2016, 7(5): 298–303
- WANG Y X, LIU J H, CHEN Y G, *et al.* *Amorphus orientalis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from salt mine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(8): 1750–1754
- WELSH R M, ZANEVELD J R, ROSALES S M, *et al.* Bacterial predation in a marine host-associated microbiome. *The ISME Journal*, 2016, 10(6): 1540–1544
- 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
- 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
- ZENG C, ZHANG L T, MIAO S, *et al.* Preliminary characterization of a novel  $\beta$ -agarase from *Thalassospira profundimonas*. *SpringerPlus*, 2016, 5(1): 1086
- ZHANG J Y, LIU Y X, ZHANG N, *et al.* NRT1.1B is associated with root microbiota composition and nitrogen use in field-grown rice. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(6): 676–684
- ZHANG Y Y, NAIR S, ZHANG Z H, *et al.* Adverse environmental perturbations may threaten kelp farming sustainability by exacerbating enterobacterales diseases. *Environmental Science & Technology*, 2024, 58(13): 5796–5810
- ZOZAYA-VALDÉS E, EGAN S, THOMAS T. A comprehensive analysis of the microbial communities of healthy and diseased marine macroalgae and the detection of known and potential bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 146
- ZOZAYA-VALDÉS E, ROTH-SCHULZE A J, EGAN S, *et al.* Microbial community function in the bleaching disease of the marine macroalgae *Delisea pulchra*. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(8): 3012–3024

## Comparative Analysis of Epiphytic Bacterial Communities on *Saccharina japonica* Sporelings with Low and High Malformation Disease Severity

WANG Chun<sup>1,2</sup>, ZHU Ming<sup>1</sup>, LI Jie<sup>2,3</sup>, WANG Shanshan<sup>4</sup>, YAN Yongwei<sup>2,3①</sup>

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Bioresources and Environment, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China; 2. State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao 266237, China; 4. Harbin University of Science and Technology Rocheng Campus, Weihai 264300, China)

**Abstract** Sporeling malformation disease, characterized by abnormal cell proliferation and tissue disintegration, causes catastrophic losses in the seedling production of kelp *Saccharina japonica*. Previous studies have linked disease occurrence to environmental stressors (e.g., inadequate light exposure), the maturity of parental kelp (e.g., immature or overmatured), and algininate-decomposing bacteria, among others. Traditional culture-dependent approaches have failed to explain the complex pathogenesis of this disease, and its precise microbial etiology remains elusive. Recent advances in holobiont theory and our previous work suggest that dysbiosis of epiphytic microbiota, rather than individual pathogens, may drive sporeling malformation by disrupting host-microbe interactions and exacerbating disease severity. In the present study, we analyzed the diversity, structure, and functional profiles of epiphytic bacteria on sporelings with different malformation rates to obtain more data related to the relationships between epiphytic bacterial communities and the incidence of sporeling malformations using *in situ* sporeling samples. Through microscopic observations, in 2018, two groups of biological samples (Low and High groups) were collected from a workshop in a typical kelp seedling hatchery in Weihai, China. Epiphytic bacterial communities from low (~2%–6%) and high (~10%–12%) malformation groups were analyzed using 16S rRNA sequencing. Bioinformatic analyses (QIIME, USEARCH, LEfSe, and PICRUST2) were used to assess community diversity, identify differential taxa, and predict functional profiles. Alpha diversity was lower in the high-malformation group. This indicated reduced bacterial richness. Community structure differed significantly between groups, with distinct shifts in dominant taxa. The low group demonstrated a higher presence of mutualistic and morphogenesis-associated bacteria. Meanwhile, the high group displayed more taxa associated with pathogenicity. The low group was more closely linked to metabolic and defense-related pathways. In contrast, the high group was associated with xenobiotic degradation and virulence-related functions. These findings highlight the importance of maintaining a healthy microbial community for sporeling growth and development and suggest potential targets for disease prevention and control. Future research should focus on changes in whole community functions using different omics methods and explore the interactions between the host, environment, and certain isolated bacterial strains in the context of disease development. This study not only enriches our understanding of the microbial ecology of kelp diseases but also has important practical implications for the kelp farming industry. Identifying key microbial taxa and functional pathways associated with disease may guide the development of microbial-based strategies for disease management, thereby contributing to the sustainable development of kelp cultivation.

**Key words** *Saccharina japonica*; Sporeling malformation; Epiphytic bacterial community; Functional pathway

① Corresponding author: YAN Yongwei, Email: yanyw@ysfri.ac.cn