

DOI: 10.12264/JFSC2020-0289

暂养期健康海带和患病海带附生菌群落结构及多样性分析

冯磊^{1,2}, 钟晨辉², 林琪², 唐隆晨²

1. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;
2. 福建省水产研究所, 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室, 福建 厦门 361000

摘要: 为探究暂养期健康海带(*Saccharina japonica*)和患病海带附生菌群落结构差异及其与海水之间的关系, 本研究采用高通量测序技术, 分析了暂养期健康海带(HS)、患病海带(DS)、健康海带养殖区海水(HW)和患病海带养殖区海水(DW) 4个样本中微生物的 16S rRNA 序列。结果显示, 共识别出 32 个门, 77 个纲, 398 个科, 797 个属, 1772 个 OTUs。从门分类上来说, 海带样本的优势细菌门为变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes), 其中拟杆菌门、放线菌门和厚壁菌门在 HS 和 DS 样本中的相对丰度分别为 19.91%、10.79%、15.52%和 37.31%、1.65%、5.92%, 差异较大; 从科分类上来说, 黄杆菌科(Flavobacteriaceae)和红杆菌科(Rhodobacteraceae)在 HS 样本中的相对丰度分别为 10.7%和 12.55%, 均低于 DS 样本(33.47%和 21.17%)。多样性分析显示, HS 与 DS 样本之间的 Ace 和 Chao 指数无显著性差异($P>0.05$), Shannon 和 Simpson 指数具有显著性差异($P<0.05$)。SIMPER 分析显示, 患病海带中 3 个细菌科的 4 个 OTUs (OTU1169、OTU1111、OTU1351 和 OTU1353) 共提供 35.88% 的差异率。综上所述, 健康海带和患病海带优势附生菌的相对丰度具有较大差异, 种间分布具有显著性差异($P<0.05$), 但物种丰富度无显著性差异, 属于黄杆菌科的 OTU1169 和 OTU1111 是诊断海带是否感染疾病的主要指示菌。本研究从群落结构和多样性的角度分析附生菌与暂养期海带病害的互作关系, 为今后揭示暂养期海带病害发生的机制提供科学参考。

关键词: 海带; 暂养期; 附生菌; 多样性; 群落结构

中图分类号: S968

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)04-0460-10

海藻附生菌与其宿主有着复杂的关系, 一方面, 与海藻相关细菌以直接或间接的方式在海藻的形态发生和生长中起着关键的作用^[1]。例如, 与海藻相关的细菌代谢产物和固氮细菌负责海洋大型藻类的形态建成和生长发育^[2-3], 并且有益附生菌通过分泌次级代谢产物或抗菌剂产生化感作用来对抗有害微生物的定殖和侵染^[4]。而另一方面, 当环境恶化或宿主的免疫受损时, 一些对藻类有利的细菌也有可能成为致病菌^[5]。例如, 当藻体受到温度胁迫时, 共生型细菌群落中防御物质呋喃酮分泌减少, 将致使病原体的侵染力

增强, 导致红藻白化^[6-7]。同时大量研究还发现, 存在于海带(*Saccharina japonica*)表面的弧菌属(*Vibrio*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)和假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)与海带病害的发生密切相关^[8-11]。

点状白烂病是海带育苗期常见病害, 近年来, 该病害在海带养殖中大规模出现, 给海带养殖业造成巨大的经济损失^[12]。海区暂养是海带苗种培育的关键环节^[13], 迄今为止, 国内外学者对室内培育海带苗种的病害研究已有大量的报道^[14-16], 但是对海区暂养海带苗种的病害研究极少。海带

收稿日期: 2020-09-07; 修订日期: 2020-09-27.

基金项目: 农业农村部现代农业产业技术体系建设专项(CARS-50); 福建省水产种业创新与产业化工程项目(2017FJSCZY01); 福建省科技重大专项(2019NZ08003)

作者简介: 冯磊(1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向为藻类生理生态. E-mail: 1257470992@qq.com

通信作者: 林琪, 研究员, 研究方向为水产遗传育种. E-mail: xmqlin@sina.com

病害的发生与其表面附生菌的群落结构紧密关联,因此可从微生物群落结构的视角,探究细菌和暂养期海带病害间的关系。基于此,本研究采用高通量测序技术分析暂养期海带及其所处海水环境的细菌群落结构和多样性,旨在从微生物群落结构及多样性的角度掌握细菌与患病海带间的互动关系,为今后揭示暂养期海带病害发生的机制提供科学参考。

1 材料和方法

1.1 样本采集及处理

2018年12月,在福建省泉州市泉港区肖厝海区(图1A)采集了暂养期患病海带幼苗和患病海带养殖区水样,同一时间于临近海区(图1B)采集了同批苗种同一天下海暂养且长势良好的健康海带幼苗和健康海带养殖区水样。健康海带和患病海带及其所处养殖区海水样本均采集3个。采用Leica DMI8光学显微镜(德国莱卡公司)对海带样本进行显微观察和拍照(图2),之后从健康海带幼苗的叶片梢部附近切取约10 g的新鲜藻段,从患病海带叶片边缘的病烂部分切取同等大小藻段,经灭菌海水清洗数遍去除样本上的杂质后,装入无菌自封袋中,液氮速冻后于 -80°C 超低温冰箱内保存备用。实验中采集的海水样本,预先使用尼龙网(200 μm 孔径)过滤600 mL,去除碎屑后再

使用混合纤维膜(0.22 μm 孔径)过滤,该过程使用真空抽滤机(予华牌 SHZ-DIII)进行负压抽滤。

1.2 DNA提取、PCR扩增和测序

根据基因组DNA提取试剂盒(QIAamp DNA Mini Kit)的说明书要求,提取海带样本和海水样本的基因组DNA,以制备基因组DNA为模板,后使用16S rRNA基因V3~V4片段的通用引物338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')^[17-18]扩增目标DNA片段。使用低循环数对目标DNA进行扩增,且在扩增过程中保持各样本扩增循环数一致。20 μL 的PCR扩增体系的反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 下预变性3 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 下变性30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 下退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸45 s,共27个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸10 min。将所得的PCR产物混合后经过2%琼脂糖凝胶电泳检测,使用AxyPrepDNA凝胶回收试剂盒切胶回收PCR产物,Tris-HCl洗脱,后收集和纯化产物置于上海美吉生物医药有限公司的测序平台进行测序。

1.3 数据分析

使用fastp和FLASH软件优化样本测序数据,之后确定海带宿主叶绿体和线粒体的序列,将其从数据中去除。使用Usearch软件对优化后的序列进行聚类分析^[19],后采用RDPclassifier软件中的贝叶斯算法对97%相似性水平OTU代表序列

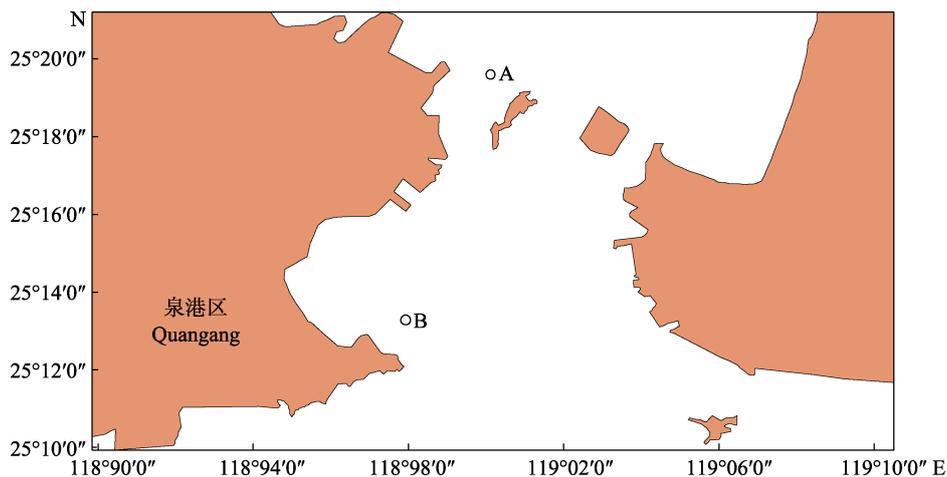


图1 海带幼苗和海水采样点

A: 患病样本采样点; B: 健康样本采样点.

Fig. 1 Sampling sites for the seedlings of kelp *Saccharina japonica* and seawater
A: sampling site of diseased samples; B: sampling site of healthy samples.

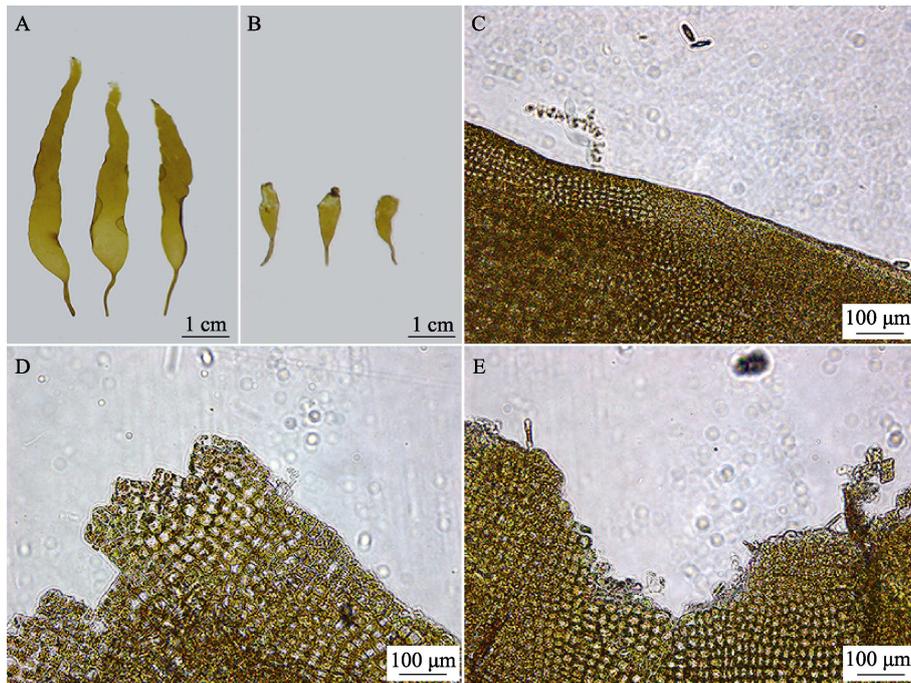


图 2 海带幼苗样本及其显微观察

A: 健康幼苗; B: 患病幼苗; C: 健康幼苗边缘部致密的细胞; D、E: 患病幼苗边缘部解离的细胞。

Fig. 2 Samples of the seedlings and their microscope observations

A: healthy seedlings; B: diseased seedlings; C: compact cells in the marginal part of healthy seedlings;

D, E: dissociative cells in the marginal part of diseased seedlings.

进行分类学分析^[20], 比对 Silva 数据库, 在不同分类学水平上统计各样本的细菌群落组成。选择 97%相似性的 OTU, 利用 mothur 软件计算不同随机抽样下的 Alpha 多样性指数, 包括物种丰富度指数(abundance based coverage, ACE)、Chao 指数、香农指数(Shannon index)、辛普森指数(Simpson index)和覆盖率(coverage)^[21]。使用 Qiime 软件计算 beta 多样性距离矩阵^[22], 利用 vegan 软件进行 nMDS 和 Anosim 分析, 利用 R 语言工具绘制群落结构组分图和 Venn 图。使用 SPSS 20.0 软件对多样性指数和关键细菌 OTUs 进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 样本测序数据

将健康海带、患病海带及其所处海域海水的样本经高通量测序及序列优化, 并对嵌合体、叶绿体和线粒体序列进行质量过滤和去除后, 共获得 602739 条优化序列(表 1)。序列平均长度为 433 bp, 其中长度处于 421~440 bp 的优化序列有 428036 条, 441~460 bp 的优化序列有 174180 条, 两者占全部优化序列的 99.91%。各样本覆盖率均超过 99.5%, 表明该测序深度捕获了样本绝大部

表 1 各样本序列结果统计

Tab. 1 Statistics of the sequencing results of samples

样品 sample	序列数 sequence	平均序列长度/bp average length	最短序列长度/bp minimum length	最长序列长度/bp maximum length	覆盖率/% coverage
HS	167707	431.45	224	468	99.94
DS	116032	432.33	277	475	99.66
HW	167379	432.89	284	507	99.58
DW	151621	434.74	279	512	99.64

注: DS 代表患病海带; DW 代表患病海带养殖区海水; HS 代表健康海带; HW 代表健康海带养殖区海水。

Note: DS means diseased kelp; DW means seawater from diseased kelp breeding areas; HS means healthy kelp; HW means seawater from healthy kelp breeding areas.

分细菌, 能够全面地反映海带样本和海水样本的细菌群落结构。

2.2 海带和海水细菌群落结构

按最小样本序列数对样本序列进行抽平, 将抽平后的样本 16S rRNA 序列结果与 Silva 物种分类数据库中的参考序列进行比对注释, 共识别出 32 个门、77 个纲、219 个目、398 个科、797 个属、1772 个 OTUs。

选择门级别进行分类学水平的分析(图 3), 结果显示, 除去所有样本中丰度占比均小于 1% 的物种后, 海带附生菌首要优势门为变形菌门 (Proteobacteria) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes), 其中变形菌门在 HS 和 DS 样本所占比例相近, 分别为 43.84% 和 49.29%, 而 HS 样本中拟杆菌门的相对丰度 (19.91%) 远低于 DS 样本 (37.31%); 次要优势门为放线菌门 (Actinobacteria) 和厚壁菌门 (Firmicutes), 两者的相对丰度在 HS 和 DS 样本中也有差别, 放线菌门在 HS 样本中所占比例为 10.79%, 高于 DS 样本 (1.65%), 厚壁菌门在 HS 样本中所占比例为 15.52%, 高于 DS 样本 (5.92%); 其他优势门为蓝细菌门 (Cyanobacteria)、疣微菌门 (Verrucomicrobia)、绿弯菌门 (Chloroflexi)、酸杆菌门 (Acidobacteria), 其相对丰度较低。在所有海水样本中首要的优势菌门均为变形菌门, 其在 HW 和 DW 样本的微生物组成中所占比例分别为 46.4% 和 55.69%; 次要的优势菌门为拟杆菌门、

放线菌门和蓝细菌门, 其中拟杆菌门和放线菌门在 HW 和 DW 样本中的相对丰度分别为 13.22%、13.27% 和 12.89%、16.52%, 而蓝细菌门在 HW 样本中所占比例为 25.44%, 高于 DW 样本 (10.88%)。

选择科作为分类阶元进行分类学分析(图 4), 结果显示, DS 样本中黄杆菌科 (Flavobacteriaceae) 和红杆菌科 (Rhodobacteraceae) 分别以 33.47% 和

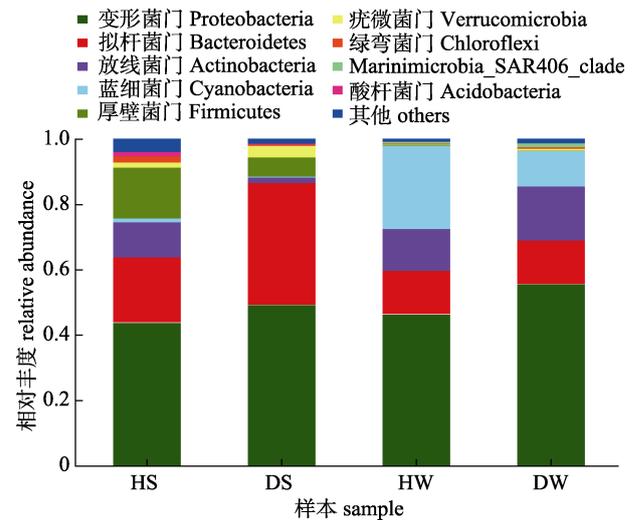


图 3 海带和海水门水平的细菌群落组成

DS: 患病海带; DW: 患病海带养殖区海水; HS: 健康海带; HW: 健康海带养殖区海水。

Fig. 3 Bacterial communities of kelp *Saccharina japonica* and seawater at phylum level

DS: diseased kelp; DW means seawater from diseased kelp breeding areas; HS: healthy kelp; HW: seawater from healthy kelp breeding areas.

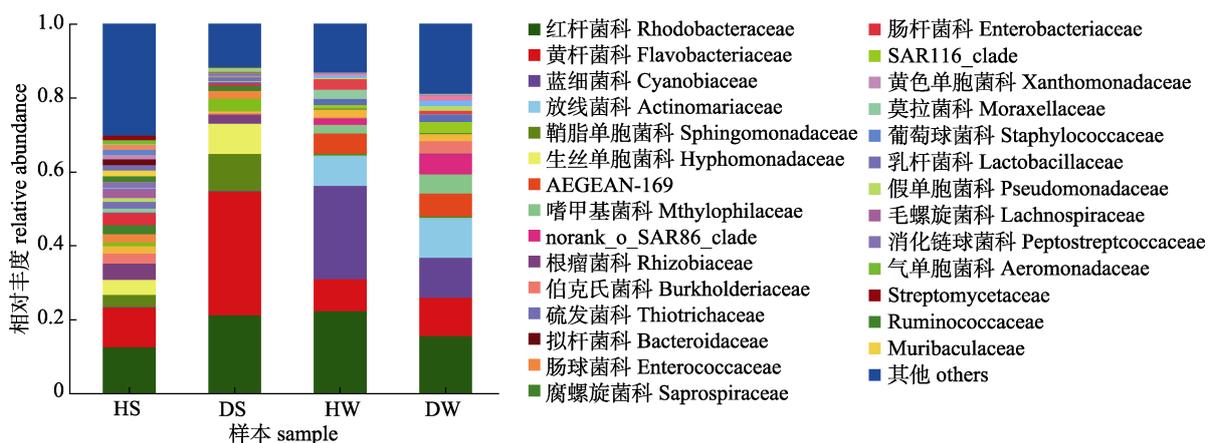


图 4 海带和海水科水平的细菌群落组成

DS: 患病海带; DW: 患病海带养殖区海水; HS: 健康海带; HW: 健康海带养殖区海水。

Fig. 4 Bacterial communities of kelp *Saccharina japonica* and seawater at family level

DS: diseased kelp; DW: seawater from diseased kelp breeding areas; HS: healthy kelp; HW: seawater from healthy kelp breeding areas.

21.17%的相对丰度占据绝对的优势;次要优势科为鞘脂单胞菌科(Sphingomonadaceae)和生丝单胞菌科(Hyphomonadaceae),相对丰度分别为 10.07%和 8.11%,DS 样本中有 10 个细菌科的相对丰度超过 1%。HS 样本中的优势附生菌属于红杆菌科(12.55%)、黄杆菌科(10.7%)、鞘脂单胞菌科(3.29%)和生丝单胞菌科(4.02%),其相对丰度均低于 DS 样本。与 DS 相比,HS 样本附生菌科类丰富,有 24 个细菌科的相对丰度超过 1%。在海水样本中,细菌科类丰富,但并不存在占绝对优势的细菌科。相对丰度较高的细菌科有红杆菌科、黄杆菌科、蓝细菌科(Cyanobiaceae)和放线菌科(Actinomarinaceae),其中红杆菌科、黄杆菌科和放线菌科在 HW 和 DW 样本的细菌组成中所占比例相近,分别为 22.29%、8.62%、8.26%和 15.53%、10.37%、10.74%。而蓝细菌科在 HW 样本中所占比例为 25.23%,高于 DW 样本(10.86%)。

通过微生物 16S rRNA V3~V4 区测序结果,构建 Venn 图来识别健康海带和患病海带及其所处养殖区海水样本的优势菌群(图 5)。健康海带和患病海带及其所处养殖区海水样本共有 1772 个细菌 OTUs,其中相同的 OTUs 个数为 118 个,有 685 个 OTUs 只存在于 HS 样本,166 个 OTUs 只存在于 DS 样本,45 个 OTUs 只存在于 HW 样本,

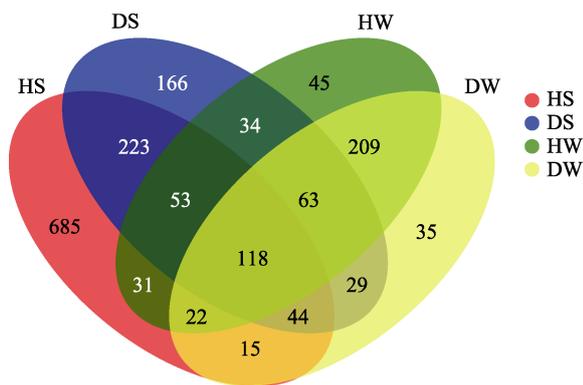


图 5 海带和海水微生物 OTU 的维恩图

DS: 患病海带; DW: 患病海带养殖区海水; HS: 健康海带;
HW: 健康海带养殖区海水。

Fig. 5 Venn diagram of the OTU of microflora of kelp *Saccharina japonica* and seawater

DS: diseased kelp; DW: seawater from diseased kelp breeding areas; HS: healthy kelp; HW: seawater from healthy kelp breeding areas.

35 个 OTUs 只存在于 DW 样本。HS 样本单独富集的细菌菌群数量最多,细菌菌群数量排序依次为 HS>DS>HW>DW。

2.3 海带和海水细菌群落丰富度和多样性

为探究海带和海水样本中细菌群落丰富度和多样性的差异,基于测序数据,对其进行 Alpha 多样性分析,得到 Ace、Chao、Simpson 和 Shannon 指数后,进行了显著性差异分析(图 6)。结果显示,HW 与 DW 样本的各项指数均无显著性差异,表明健康海带和患病海带所处养殖区海水的细菌群落结构丰富度和多样性差异不显著。HS 与 DS 样本之间的 Ace 和 Chao 指数无显著性差异,但两者之间的 Shannon 和 Simpson 指数具有显著性差异($P<0.05$),表明健康海带和患病海带表面附生菌的物种丰富度差异不显著,但两者附生菌的群落分布具有显著性差异($P<0.05$)。与 HS 相比,DS 样本中的 Ace 和 Chao 指数的标准差都较高,这说明健康海带和患病海带附生菌中某些特定细菌的丰度具有较大的差异。

为进一步解析细菌群落结构的多样性,基于 Bray_Curtis 距离算法进行 nMDS 分析,以阐明细菌群落结构的聚类关系(图 7)。结果显示,海带和海水的细菌群落呈离散型分布,而非按照健康状况聚集,这说明健康海带和患病海带及其所处养殖区海水的微生物群落结构丰富度无显著性差异。同时进行 Anosim 与 Adonis 分析(表 2),结果显示海带样本和海水样本之间的 P 值均大于 0.05,这再次说明健康海带和患病海带及其所处养殖区海水的微生物群落结构丰富度无显著性差异。

2.4 关键细菌 OTU 的鉴定

通过 SIMPER 分析,筛选出 8 个关键的 OTUs(海带中 4 个,海水中 4 个),解释了健康海带和患病海带及其所处养殖区海水细菌群落结构的差异(图 8)。

对于海带样本而言,患病海带附生菌群落中与黄杆菌科(OTU1169 和 OTU1111)、红细菌科(OTU1351)和鞘脂单胞菌科(OTU1353)相关 OTUs 的相对丰度较健康海带显著增加($P<0.05$)。其中 OTU1169 仅在患病海带中发现且相对丰度最高,提供了 21.36%的差异率,是潜在引起海带发病的

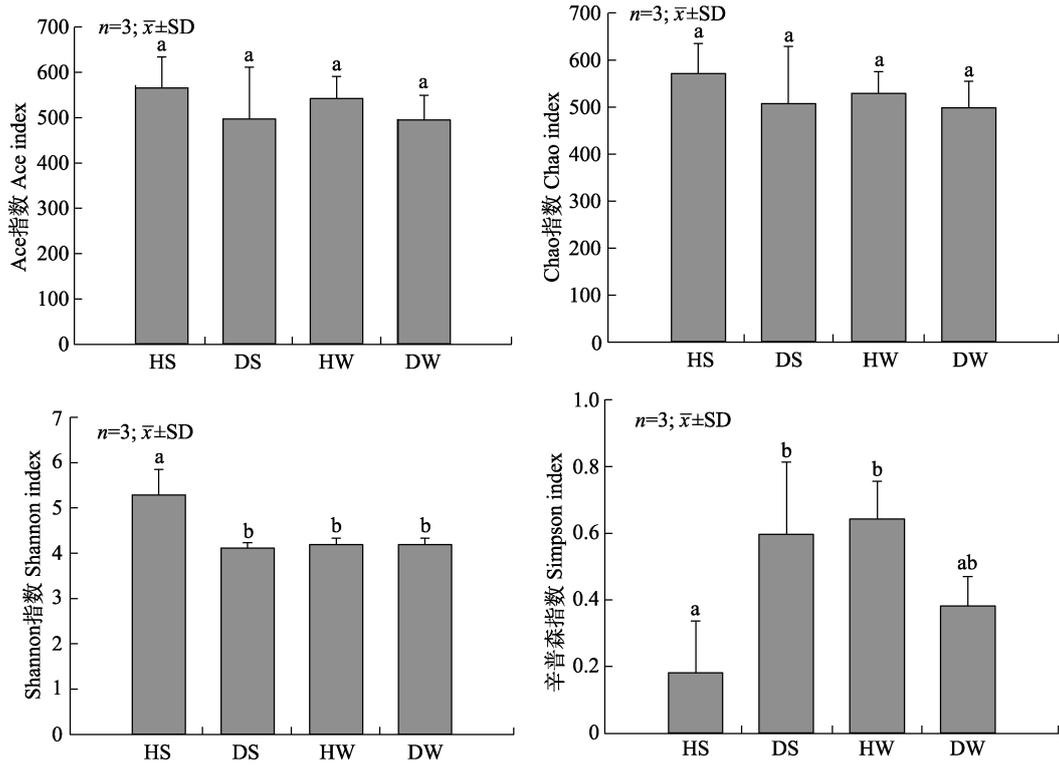


图 6 海带和海水细菌群落多样性指数的比较

柱上不同字母表示差异显著($P<0.05$); DS 代表患病海带; DW 代表患病海带养殖区海水; HS 代表健康海带; HW 代表健康海带养殖区海水。

Fig. 6 Comparisons of diversity indices for kelp *Saccharina japonica* and seawater bacterial communities. Different letters on the top of the columns indicate significant differences ($P<0.05$); DS means diseased kelp; DW means seawater from diseased kelp breeding areas; HS means healthy kelp; HW means seawater from healthy kelp breeding areas.

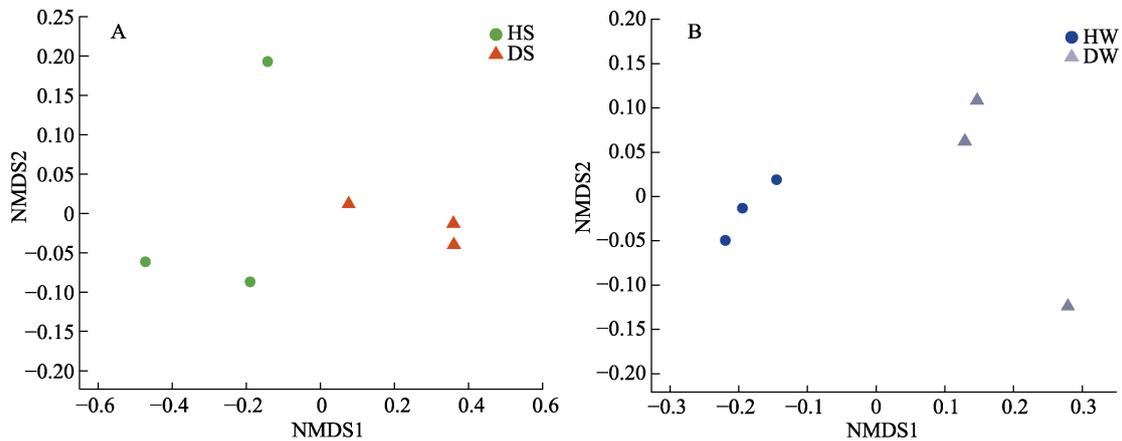


图 7 基于 Bray-Curtis 距离矩阵的非度量多维标度图

A、B 分别表示海带和海水的非度量多维标度图; DS: 患病海带; DW: 患病海带养殖区海水; HS: 健康海带; HW: 健康海带养殖区海水。

Fig. 7 Non-metric multidimensional scaling (nMDS) plot based on a Bray-Curtis distance matrix. A and B indicate the nMDS of kelp and seawater, respectively; DS: diseased kelp; DW: seawater from diseased kelp breeding areas; HS: healthy kelp; HW: seawater from healthy kelp breeding areas.

表 2 基于 Bray-Curtis 差异性对海带和海水相关细菌群落结构差异的显著性检验

Tab. 2 Significance tests of the differences of kelp *Saccharina japonica* and seawater associated bacterial community structures, respectively on the basis of Bray-Curtis dissimilarities

群落比较 communities comparison	相似性分析 Anosim		置换多因素方差分析 Adonis	
	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i> ²	<i>P</i>
HS vs DS	0.778	0.098	0.600	0.1
HW vs DW	0.667	0.195	0.609	0.2

注: *R* 值表示组间差异, 越接近 1 表示组间差异越大; *R*² 值表示分组因素对样本差异的解释度; *P* 值表示健康状态之间的显著差异; DS 代表患病海带; DW 代表患病海带养殖区海水; HS 代表健康海带; HW 代表健康海带养殖区海水。

Note: *R* values indicate the difference between groups, and the closer to 1, the greater the difference between groups; *R*² values indicate the interpretation of grouping factors on sample differences; *P* values indicate significant differences between health statuses; DS means diseased kelp; DW means seawater from diseased kelp breeding areas; HS means healthy kelp; HW means seawater from healthy kelp breeding areas.

主要致病菌科。这 3 个细菌科的 4 个 OTUs 共提供 35.88% 的差异率。

与患病海带养殖区海水相比, 在健康海带养殖区海水中存在 2 个较高丰度的细菌目: 聚球藻菌目(OTU1743 和 OTU1476, Synechococcales)和红杆菌目(OTU1407, Rhodobacterales), 其在两个样本间的相对丰度具有显著差异($P < 0.05$), 提供

17.96% 的差异率。寡营养类群 SAR86 在患病海带养殖区海水中的丰度更高, 与健康海带养殖区海水存在显著差异($P < 0.05$)。

3 讨论

本研究, 通过高通量测序技术发现暂养期健康海带和患病海带的优势细菌门为变形菌门、拟杆菌门、放线菌门和厚壁菌门, 这些细菌门在一些藻类表面中也被发现^[23-27]。相关丰度较高的细菌类群普遍存在于大型藻类中, 如极北海带(*Laminaria hyperborea*)^[28]、*Saccharina latissima*^[29]和南方石莼(*Ulva australis*)^[5]。黄杆菌科和红杆菌科在暂养期健康海带和患病海带附生菌中的相对丰度具有较大差异, 相关研究已经证实, 黄杆菌谱系菌类是分解繁殖期藻体有机物的重要菌类^[30-31]。这提示黄杆菌科和红杆菌科与海带感染病害可能有密切的联系。

多样性指数分析显示, 健康海带和患病海带两者之间的 Ace 和 Chao 指数无显著性差异, Simpson 和 Shannon 指数存在显著差异($P < 0.05$), 表明病害可能对海带表面附生菌的物种丰富度无显著性影响。这一观点在研究其他褐藻物种, 如:*Saccharina latissima*^[32]和巨藻(*Macrocystis pyrifera*)^[33]中也有相似的报道。相关研究已表明海带

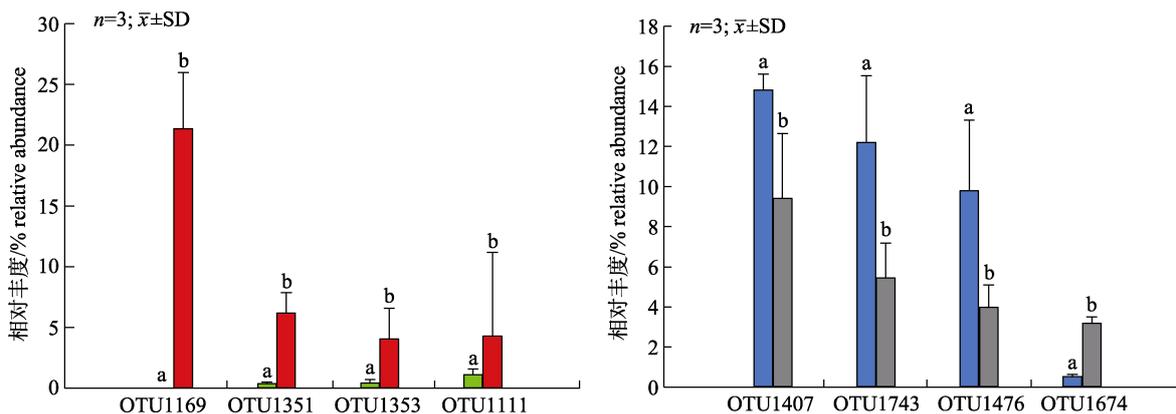


图 8 海带和海水关键细菌 OTUs 相对丰度的比较

绿色、红色、蓝色、灰色条分别表示健康海带、患病海带、健康海带养殖区海水、患病海带养殖区海水。柱形图上方字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 8 Comparisons of the relative abundance of OTUs of kelp *Saccharina japonica* and seawater

Green, red, blue, and grey bars indicate healthy kelp, diseased kelp, seawater from healthy kelp breeding areas, and seawater from diseased kelp breeding areas, respectively. Different letters on the top of the columns indicate significant differences ($P < 0.05$).

表面的微生物群落受时空变化的影响大于受疾病的影响^[34], 并且海藻的养殖条件是导致其群落结构差异的主要因素^[35]。因此, 海带样本采集的地点和时机对细菌群落总体的影响强于藻体的健康状态。从多样性指数也可以发现, 患病海带附生菌群多样性指数的标准差都很高, 表明海带中某些特定的细菌发生了较大的变化, 这说明造成海带感染疾病的原因很大程度上是由于少数细菌类群数量的变化所导致的。

通过 SIMPER 分析, 海带中 4 个关键 OTUs 的丰度差异显著, 其中属于黄杆菌科的 OTU1169 和 OTU1111 的相对丰度最高, 这也提示黄杆菌科与海带感染病害有密切的联系。然而, 也有研究认为黄杆菌科是海带潜在的抗菌资源, 具有抗微生物活力^[36], 微生物中的黄杆菌还能够释放形态发生素, 促进石莼(*Ulva mutabilis*)的形态建成^[37]。由此推断, 海带附生菌中大量存在的黄杆菌科可能在对抗病害发生的过程中发挥了拮抗作用, 是诊断海带是否感染疾病的主要指示菌。与此同时, 目前大多数与养殖生物健康状态相关的细菌类群, 也在海水中被发现^[38-39], 海水中丰度变化明显的细菌群落也可以反映出养殖生物的健康状态^[40-41]。在本研究中, 海水中的细菌群落也出现了组成结构的变化, 主要为特定 OTUs (OTU1407、OTU1743、OTU1476 和 OTU1674)的丰度变化。因此, 海水中显著变化的细菌类群可以作为海带健康状况的诊断指标。

在本研究中, 海带附生菌群落组成的变化与藻体健康状态密切相关, 其中以黄杆菌科最为明显, 养殖海区海水中的细菌群落结构变化也是如此。本研究结果揭示了暂养期海带苗种病害的发生与海带和海水中微生物群落之间的关系, 海带样本中的 4 个 OTUs 和海水样本中的 4 个 OTUs 可能是评估海带健康状态的潜在指标, 可以作为诊断海带是否感染病害的指示菌。然而, 为了建立用于精准防控海带病害发生的检测技术, 在今后的研究中仍需要开展附生菌株系的分离和培养, 并进行体内抗菌试验, 以便于清晰地阐明这些菌株对海带疾病发生和健康生长的重要作用。

参考文献:

- [1] Singh R P, Reddy C R K. Seaweed-microbial interactions: key functions of seaweed-associated bacteria[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2014, 88(2): 213-230.
- [2] Matsuo Y, Imagawa H, Nishizawa M, et al. Isolation of an algal morphogenesis inducer from a marine bacterium[J]. Science, 2005, 307(5715): 1598.
- [3] Singh R P, Bijo A J, Baghel R S, et al. Role of bacterial isolates in enhancing the bud induction in the industrially important red alga *Gracilaria dura*[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2011, 76(2): 381-392.
- [4] Goecke F, Labes A, Wiese J, et al. Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria[J]. Marine Ecology Progress Series, 2010, 409: 267-299.
- [5] Egan S, Gardiner M. Microbial dysbiosis: rethinking disease in marine ecosystems[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 991.
- [6] Steinberg P D, Rice S A, Campbell A H, et al. Interfaces between bacterial and eukaryotic "neuroecology"[J]. Integrative and Comparative Biology, 2011, 51(5): 794-806.
- [7] Fernandes N, Steinberg P, Rusch D, et al. Community structure and functional gene profile of bacteria on healthy and diseased thalli of the red seaweed *Delisea pulchra*[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e50854.
- [8] Yumoto I, Yamaguchi K, Yamada K, et al. Relationship between bacterial flora and occurrence of the *Alteromonas* sp., the causative agent of red-spots on the culture bed of makonbu *Laminaria japonica*, in the coastal area of Funak Bay[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1989, 55(11): 1907-1914.
- [9] Sawabe T, Makino H, Tatsumi M, et al. *Pseudoalteromonas bacteriolytica* sp. nov., a marine bacterium that is the causative agent of red spot disease of *Laminaria japonica*[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1998, 48(Pt 3): 769-774.
- [10] Sawabe T, Tanaka R, Iqbal M M, et al. Assignment of *Alteromonas elyakovii* KMM 162^T and five strains isolated from spot-wounded fronds of *Laminaria japonica* to *Pseudoalteromonas elyakovii* comb. nov. and the extended description of the species[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50(1): 265-271.
- [11] Wang G G, Shuai L, Li Y, et al. Phylogenetic analysis of epiphytic marine bacteria on hole-rotten diseased sporophytes of *Laminaria japonica*[J]. Journal of Applied Phycology, 2008, 20(4): 403-409.
- [12] Yang H C, Li J, Yan Y W, et al. Pathogens, virulence mechanism, and disease control in economic marine macroalgae[J]. Marine Sciences, 2019, 43(1): 101-111. [杨慧超, 李杰, 阎永伟, 等. 经济海藻病害及防控技术的研究进展[J]. 海洋科学, 2019, 43(1): 101-111.]
- [13] Duan D L, Miao G R, Wang X L, et al. Aquacultural biology of *Saccharina japonica*[M]. Beijing: Science Press, 2015: 163-166. [段德麟, 缪国荣, 王秀良, 等. 海带养殖生物学

- [M]. 北京: 科学出版社, 2015: 163-166.]
- [14] Chen D, Lin G H, Shen S Z. Studies on alginic acid decomposing bacteria I. Action of alginic acid decomposing bacteria and alginase on *Laminaria japonica*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1979, 10(4): 329-333,402. [陈騫, 林光恒, 沈世泽. 褐藻酸降解菌的研究 I. 褐藻酸降解菌与褐藻酸酶对海带藻体的作用[J]. *海洋与湖沼*, 1979, 10(4): 329-333,402.]
- [15] Chen D, Lin G H, Shen S Z. Studies on alginic acid decomposing bacteria II. Rot disease of *Laminaria* summer sporelings caused by alginic acid decomposing bacteria[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1981, 12(2): 133-137. [陈騫, 林光恒, 沈世泽. 褐藻酸降解菌的研究 II. 海带夏苗培育中褐藻酸降解菌与烂苗的关系[J]. *海洋与湖沼*, 1981, 12(2): 133-137.]
- [16] Chen D, Liu X Y, Liu X Z, et al. Studies on alginic acid decomposing bacteria III. The cause of the rot disease and detaching of *Laminaria* sporophytes in sporeling culture stations and their preventive measures[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1984, 15(6): 581-589. [陈騫, 刘秀云, 刘秀珍, 等. 褐藻酸降解菌的研究 III. 海带育苗系统中脱苗和烂苗原因分析及其预防措施[J]. *海洋与湖沼*, 1984, 15(6): 581-589.]
- [17] Lane D, Stackebrandt E, Goodfellow M. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*[M]. Chichester: John Wiley and Sons Press, 1991: 115-175.
- [18] McBain A J, Bartolo R G, Catrenich C E, et al. Microbial characterization of biofilms in domestic drains and the establishment of stable biofilm microcosms[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(1): 177-185.
- [19] Edgar R C, Haas B J, Clemente J C, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(16): 2194-2200.
- [20] Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M, et al. Naïve bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [21] Xu Y, Wang Y G, Zhang Z, et al. Variance analysis of bacterial community in the intestine of cultured spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) at different healthy levels and intervened with florfenicol[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(3): 388-398. [许燕, 王印庚, 张正, 等. 不同健康程度和抗生素氟苯尼考干预下斑石鲷肠道菌群的结构差异[J]. *水产学报*, 2018, 42(3): 388-398.]
- [22] Jiang X T, Peng X, Deng G H, et al. Illumina sequencing of 16S rRNA tag revealed spatial variations of bacterial communities in a mangrove wetland[J]. *Microbial Ecology*, 2013, 66(1): 96-104.
- [23] Duan D, Xu L, Fei X, et al. Marine organisms attached to seaweed surfaces in Jiaozhou Bay, China[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1995, 11(3): 351-352.
- [24] Wang Z F, Xiao T, Pang S J, et al. Isolation and identification of bacteria associated with the surfaces of several algal species[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2009, 27(3): 487-492.
- [25] Balakirev E S, Krupnova T N, Ayala F J. Symbiotic associations in the phenotypically-diverse brown alga *Saccharina japonica*[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39587.
- [26] Dimitrieva G Y, Crawford R L, Yüksel G Ü. The nature of plant growth-promoting effects of a pseudoalteromonad associated with the marine algae *Laminaria japonica* and linked to catalase excretion[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 100(5): 1159-1169.
- [27] 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*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(1): 58-65. [唐隆晨, 钟晨辉, 林琪, 等. 海带孢子体、配子体时期附生菌群落结构的比较[J]. *渔业科学进展*, 2020, 41(1): 58-65.]
- [28] Bengtsson M M, Sjøtun K, Øvreås L. Seasonal dynamics of bacterial biofilms on the kelp *Laminaria hyperborea*[J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2010, 60(1): 71-83.
- [29] Staufenberger T, Thiel V, Wiese J, et al. Phylogenetic analysis of bacteria associated with *Laminaria saccharina*[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 64(1): 65-77.
- [30] Riemann L, Steward G F, Azam F. Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(2): 578-587.
- [31] Pinhassi J, Sala M M, Havskum H, et al. Changes in bacterioplankton composition under different phytoplankton regimes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(11): 6753-6766.
- [32] Lemay M A, Martone P T, Keeling P J, et al. Sympatric kelp species share a large portion of their surface bacterial communities[J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(2): 658-670.
- [33] Weigel B L, Pfister C A. Successional dynamics and seascape-level patterns of microbial communities on the canopy-forming kelps *Nereocystis luetkeana* and *Macrocystis pyrifera*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 346-355.
- [34] Zhang R, Chang L R, Xiao L Y, et al. Diversity of the epiphytic bacterial communities associated with commercially cultivated healthy and diseased *Saccharina japonica* during the harvest season[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2020, 32(3): 2071-2080.
- [35] Marzlinelli E M, Campbell A H, Zozaya Valdes E, et al. Continental-scale variation in seaweed host-associated bacterial communities is a function of host condition, not geography[J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(10): 4078-4088.
- [36] Zheng L, Han X T, Chen H M, et al. Marine bacteria associated with marine macroorganisms: the potential antimicrobial resources[J]. *Annals of Microbiology*, 2005, 55(2): 119-124.

- [37] Weiss A, Costa R, Wichard T. Morphogenesis of *Ulva mutabilis* (Chlorophyta) induced by *Maribacter* species (Bacteroidetes, Flavobacteriaceae)[J]. *Botanica Marina*, 2017, 60(2): 197-206.
- [38] Na H, Kim O S, Yoon S H, et al. Comparative approach to capture bacterial diversity of coastal waters[J]. *The Journal of Microbiology*, 2011, 49(5): 729-740.
- [39] Teeling H, Fuchs B M, Bennke C M, et al. Recurring patterns in bacterioplankton dynamics during coastal spring algae blooms[J]. *eLife*, 2016, 5: e11888.
- [40] Xiong J, Zhu J L, Zhang D M. The application of bacterial indicator phylotypes to predict shrimp health status[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(19): 8291-8299.
- [41] Zhang D M, Wang X, Xiong J B, et al. Bacterioplankton assemblages as biological indicators of shrimp health status[J]. *Ecological Indicators*, 2014, 38: 218-224.

Community structure and diversity of epiphytic bacteria in healthy and diseased *Saccharina japonica* seedlings during a temporary rearing period

FENG Lei^{1,2}, ZHONG Chenhui², LIN Qi², TANG Longchen²

1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Key Laboratory of Cultivation and High-value Utilization of Marine Organisms in Fujian Province, Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361000, China

Abstract: To explore the bacterial community structure on the surface of healthy and diseased seedlings of *Saccharina japonica* during a temporary rearing period and their relationships with seawater, in this study, sequences of 16S rRNA from healthy kelp (HS), diseased kelp (DS), seawater from healthy kelp breeding areas (HW), and seawater from diseased kelp breeding areas (DW) were analyzed using Illumina sequencing technology. The results showed that 32 phyla, 77 classes, 398 families, 797 genera, and 1772 operational taxonomic units (OTUs) were identified. At the phylum level, the dominant bacteria in the kelp samples were Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, and Firmicutes. The relative abundances of Bacteroidetes, Actinobacteria, and Firmicutes in the HS and DS samples were 19.91%, 10.79%, 15.52%, 37.31%, 1.65%, and 5.92%, respectively, showing substantial differences. At the family level, the relative abundances of Flavobacteriaceae and Rhodobacteraceae in the HS samples were 10.7% and 12.55%, respectively, which was lower than those in the DS samples (33.47% and 21.17%, respectively). The diversity analysis showed that the Ace and Chao indexes between HS and DS samples showed no significant differences ($P>0.05$), whereas the Shannon and Simpson indexes showed significant differences ($P<0.05$). The SIMPER analysis showed that the four OTUs (OTU1169, OTU1111, OTU1351, and OTU1353) from the three bacterial families in the diseased kelp provided a difference rate of 35.88%. In summary, the relative abundances of dominant epiphytes in healthy and diseased kelp were significantly different, as was the distribution between species ($P<0.05$), but there was no significant difference in species richness. OTU1169 and OTU1111, belonging to the flavobacteria, were the main indicators for the diagnosis of diseases in kelp. This study analyzed the interaction between epiphytes and vegetative kelp diseases from the perspective of community structure and diversity and provided a scientific reference for revealing the mechanism of vegetative kelp diseases in the future.

Key words: *Saccharina japonica*; temporary rearing period; epiphytic bacteria; diversity; community structure

Corresponding author: LIN Qi. E-mail: xmqlin@sina.com