

研究报告

杀鱼假交替单胞菌 P3 胞外产物抗紫菜腐霉机制及其对紫菜赤腐病防治效果评价

吴蕾^{1,2}, 李杰⁴, 莫照兰^{1,2}, 翁佩文⁴, 茅云翔^{1,2,3}, 唐磊^{*1,2,3}

1 中国海洋大学 三亚海洋研究院 海南省热带水产种质重点实验室, 海南 三亚 572024

2 中国海洋大学 海洋生命学院 海洋生物遗传育种教育部重点实验室, 山东 青岛 266003

3 海南热带海洋学院崖州湾创新研究院, 海南 三亚 572022

4 中国水产科学院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071

吴蕾, 李杰, 莫照兰, 翁佩文, 茅云翔, 唐磊. 杀鱼假交替单胞菌 P3 胞外产物抗紫菜腐霉机制及其对紫菜赤腐病防治效果评价[J]. 微生物学通报, 2025, 52(5): 2276-2290.

WU Lei, LI Jie, MO Zhaolan, WENG Peiwen, MAO Yunxiang, TANG Lei. Extracellular products of *Pseudoalteromonas piscicida* P3: mechanism of inhibiting *Pythium porphyrae* and control effect on red rot disease of *Neopyropia yezoensis*[J]. Microbiology China, 2025, 52(5): 2276-2290.

摘要:【背景】赤腐病是由紫菜腐霉(*Pythium chondricola/porphyrae*)引起的紫菜栽培期最主要病害, 而现有的防治方法效果有限。【目的】提取杀鱼假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas piscicida*) P3 的抗菌成分, 探究其抑制紫菜腐霉的机制及对赤腐病的防治效果。【方法】有机溶剂萃取法从无菌上清液(cell-free supernatant, CFS)中提取抗菌物质, 纸片扩散法及含毒介质法评价提取物对紫菜腐霉抑制效果; 在紫菜腐霉侵染前、后添加提取物评价其防治效果; 转录水平分析处理后的紫菜腐霉基因表达差异。【结果】拮抗菌 P3 乙酸乙酯提取物抑制紫菜腐霉效果最佳, 处理后紫菜腐霉菌丝表现为生长量下降、细胞壁弯曲变薄、细胞基质流失、出现藏卵器等; 在紫菜腐霉侵染前、后分别添加终浓度为 15 mg/L 的提取物, 病斑抑制率分别为 96.64%和 85.06%; 转录组分析显示紫菜腐霉在细胞质、膜、磷脂酰肌醇等通路基因下调。【结论】菌株 P3 的胞外产物对紫菜腐霉有显著抑制效果, 并且有效防治紫菜赤腐病, 为赤腐病的新型防治技术和药物开发提供了支持。

关键词: 紫菜; 赤腐病; 紫菜腐霉; 拮抗菌; 杀鱼假交替单胞菌; 生物防治

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFD2400101)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFD2400101).

*Corresponding author. E-mail: tanglei8284@ouc.edu.cn

Received: 2024-09-05; Accepted: 2024-10-08; Published online: 2024-11-28

Extracellular products of *Pseudoalteromonas piscicida* P3: mechanism of inhibiting *Pythium porphyrae* and control effect on red rot disease of *Neopyropia yezoensis*

WU Lei^{1,2}, LI Jie⁴, MO Zhaolan^{1,2}, WENG Peiwen⁴, MAO Yunxiang^{1,2,3}, TANG Lei^{*1,2,3}

1 Key Laboratory of Tropical Aquatic Germplasm of Hainan Province, Sanya Oceanographic Institution, Ocean University of China, Sanya 572024, Hainan, China

2 Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding (Ministry of Education), College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong, China

3 Yazhou Bay Innovation Institute of Hainan Tropical Ocean University, Sanya 572022, Hainan, China

4 Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, Shandong, China

Abstract: [Background] Red rot disease, caused by *Pythium chondricola/porphyrae*, is a major disease occurring in the cultivation of *Neopyropia yezoensis*, whereas the current control methods have limited control effects on this disease. [Objective] To extract the extracellular products of *Pseudoalteromonas piscicida* P3, investigate the mechanism of inhibiting *P. porphyrae*, and evaluate the control effect of the extracellular products on red rot disease. [Methods] Organic solvents were used to extract antimicrobial components from the cell-free supernatant (CFS). The disc diffusion method and dual culture bioassays were employed to evaluate the inhibitory effect of the extract on *P. porphyrae*. We then evaluated the control effect of the extract on red rot disease by adding it before and after *P. porphyrae* infection. The differences in gene expression of *P. porphyrae* after treatment were analyzed at the transcriptional level. [Results] The ethyl acetate extract of P3 exhibited the strongest inhibitory effect on *P. porphyrae*. The treatment with the extract resulted in decreased biomass, curved and thinned cell walls, loss of cellular contents, and oogonium appearance of *P. porphyrae*. The extract added at a final concentration of 15 mg/L before and after *P. porphyrae* infection demonstrated the inhibition rates of 96.64% and 85.06%, respectively. Transcriptome analysis revealed downregulation of the genes in pathways related to the cytoplasm, membrane, and phosphatidylinositol. [Conclusion] The extracellular products of P3 have a significant inhibitory effect on *P. porphyrae* and effectively control red rot disease in *N. yezoensis*. The findings provide support for the development of new control techniques and agents for red rot disease.

Keywords: *Neopyropia yezoensis*; red rot diseases; *Pythium porphyrae*; antagonistic strain; *Pseudoalteromonas piscicida*; biocontrol

紫菜是东亚地区主要的大型经济海藻养殖品种，然而，自紫菜养殖以来，赤腐病(red rot disease)就一直是其栽培期最主要的病害之一，严重影响紫菜的产量及质量，造成了巨大经济损失^[1-4]。

赤腐病主要由紫菜腐霉(*Pythium*

chondricola/porphyrae)引起，紫菜腐霉是一类卵菌病原菌，属于死体营养型，广泛分布于陆生及水生环境中^[5]。卵菌也是农作物的重要病原，其宿主包括马铃薯、西红柿、辣椒等农作物，对农业持续造成威胁^[6]，其传统防控手段主要依赖于化学药物，但容易导致环境污染且病原

菌会产生抗药性^[7],生物防治是近年来蓬勃发展的一种绿色防治技术,如 Zhang 等^[7]发现棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*) HG1 与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) Tpb55 的胞外产物显著抑制烟草疫霉(*Phytophthora nicotianae*),并且有效防治烟草黑胫病。目前针对紫菜赤腐病防治方法有酸洗、冷藏、干出等,但存在污染环境、增强病原菌耐酸性、防治效果有限等缺点^[8],而陆生植物病害所用的生物防治为海藻病害的防控提供了借鉴和参考。

前期研究发现,杀鱼假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas piscicida*) P3 对紫菜腐霉(*P. porphyrae*)抗菌效果显著^[9],本研究以菌株 P3 为研究材料,评价菌株 P3 乙酸乙酯提取物对紫菜腐霉的抑菌活性及对赤腐病的防治效果,同时通过分析基因转录表达水平差异探究菌株 P3 胞外产物对紫菜腐霉的抗菌机制,以期为紫菜赤腐病的生物防治提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 样品

拮抗菌杀鱼假交替单胞菌(*P. piscicida*) P3 分离自条斑紫菜,保存于中国水产科学研究院黄海水产研究所,28℃静置培养于 2216E 琼脂培养基^[9];病原菌紫菜腐霉(*P. porphyrae*) NBRC 33253 购买于日本生物资源库,24℃静置培养于半海水玉米粉(semi-seawater corn meal, SCM)琼脂培养基及 24℃、100 r/min 培养于谷氨酸钠液体培养基^[9];条斑紫菜 RZ 品系由本实验室培育,15℃充气培养于添加 Pro-vasoli's enrichment solution (PES)的灭菌海水中,光照 62.5 μmol/(m²·s);光暗周期 L:D=12:12,每隔 3 d 更换海水^[9]。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

2216E 琼脂培养基、2216E 液体培养基、SCM 琼脂培养基、谷氨酸钠液体培养基、PES 均参考文献^[9]配制。

乙酸乙酯、石油醚、正丁醇、甲醇,上海麦克林生化科技有限公司;电镜固定液,武汉

塞维尔生物科技有限公司;乳酸酚棉蓝染色液,北京索莱宝科技有限公司;滤纸片,杭州微生物。光照培养箱、生化培养箱,上海力辰仪器科技有限公司。

1.3 胞外产物的提取

参考于敏^[10]的方法用有机溶剂萃取法对无菌上清液(cell-free supernatant, CFS)进行发酵粗提物制备。将菌株 P3 接种于 2216E 液体培养基,28℃、150 r/min 培养 48 h 后 5 000 r/min 离心 10 min,经 0.22 μm 滤膜过滤获得 CFS。用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇这 3 种有机溶剂对 CFS 进行萃取,20%甲醇溶解各层萃取样品,调整浓度为 15 mg/mL。

1.4 有机溶剂提取物的初筛

采用纸片扩散法^[11]筛选抑菌效果最佳的有机溶剂提取物。将直径 6 mm 紫菜腐霉菌饼接种于 SCM 琼脂培养基的平板中央,距腐霉菌饼 2 cm 处放置直径 6 mm 滤纸片,分别点接 100 μL 的有机溶剂提取物于滤纸片作为实验组,空白对照组点接 100 μL 20%甲醇。实验设置 3 个生物学重复,24℃静置培养 7 d 后测量紫菜腐霉生长长度并根据公式(1)计算抑菌率。

抑菌率(%)=(对照组腐霉长度-实验组腐霉长度)/对照组腐霉长度×100 (1)

1.5 乙酸乙酯提取物抑制紫菜腐霉评价

1.5.1 乙酸乙酯提取物对紫菜腐霉毒力分析

含毒介质法^[9]制备 SCM 琼脂培养基平板进行实验,计算乙酸乙酯提取物毒力回归方程及半致死浓度 EC₅₀。具体步骤:设置实验组平板含不同浓度的乙酸乙酯提取物,依次为 6.72、13.45、20.17、26.90 和 33.62 mg/L,空白对照组不含提取物,每组 3 个平行。将直径 6 mm 紫菜腐霉菌饼接种于平板中央,28℃静置培养 7 d 后测量菌落直径,根据公式(2)计算抑菌率。采用 DPS 软件对提取物浓度及抑菌率分析,计算毒力回归方程和 EC₅₀。

抑菌率(%)=(对照组腐霉面积-实验组腐霉面积)/(对照组腐霉面积-菌饼面积)×100 (2)

1.5.2 紫菜腐霉菌丝生长量变化

取 0.4 g 紫菜腐霉菌丝分别加入实验组及空白对照组,实验组的谷氨酸钠液体培养基含不同浓度乙酸乙酯提取物,依次为 15、30 和 60 mg/L,空白对照组则不含提取物,每组设 3 个平行,24 °C、100 r/min 培养 14 d 后取各组菌丝吸水并烘干,称量菌丝干重,根据公式(3)计算抑菌率。

抑菌率(%)=(对照组菌丝干重-实验组菌丝干重)/对照组菌丝干重×100 (3)

1.5.3 紫菜腐霉菌丝形态变化

含毒介质法^[9]制备 SCM 培养基的平板,观察腐霉菌丝在提取物处理前后的形态变化。实验组平板含 15 mg/L 乙酸乙酯提取物,空白对照组不含提取物,每组 3 个平行,平板晾干后接种直径 6 mm 紫菜腐霉菌饼,28 °C 静置培养 7 d,用乳酸酚棉蓝染色液染色后制片^[9],光学显微镜观察变化。

取 0.2 g 紫菜腐霉菌丝分别加入实验组及空白对照组,实验组谷氨酸钠液体培养基含 15 mg/L 乙酸乙酯提取物,空白对照组则不含提取物,每组 3 个平行,24 °C、100 r/min 培养 12 h,取实验组及空白对照组菌丝置于戊二醛电镜固定液,透射电镜观察其细胞形态变化。

1.6 乙酸乙酯提取物抗腐霉侵染试验

参考文献[12-13]的方法诱导紫菜腐霉游动孢子进行侵染试验。

方案一:乙酸乙酯提取物在紫菜腐霉游动孢子侵染前 6 h 加入紫菜培养体系。实验组起始添加 15 mg/L 提取物,6 h 后添加终浓度为 10⁵ spores/mL 游动孢子。如表 1 分别设置阴性对照组、阳性对照组和空白对照组,每组设 3 个平行,各组紫菜均放于含 100 mL 半海水的 250 mL 锥形瓶中静置培养,每瓶 3 根紫菜(日龄 30 d),每隔 3 d 添加 1 次 PES^[9],培养条件同 1.1。至第 7 天时采用 ImageJ 软件测量叶片面积和病斑面积,计算病斑率及病斑抑制率^[9]。

方案二:乙酸乙酯提取物在紫菜腐霉游动

孢子侵染 72 h 后加入紫菜培养体系。实验组在浓度为 10⁵ spores/mL 的游动孢子侵染 72 h 后(即第 4 天出现针尖大小病斑时)添加终浓度 15 mg/L 的提取物。如表 2 设置阴性对照组、阳性对照组和空白对照组。在第 7 天时进行测量和分析,培养条件、观察和数据分析方法同方案一。

1.7 紫菜腐霉转录组测序与分析

取 0.2 g 紫菜腐霉菌丝分别加入实验组及空白对照组。实验组谷氨酸钠液体培养基含 15 mg/L

表 1 紫菜腐霉侵染前添加乙酸乙酯提取物

Table 1 Addition of ethyl acetate extract before infection with *Pythium porphyrae*

Group	Ethyl acetate extract	<i>Pythium</i> zoospore
Experimental group	+	+
Negative control group	+	-
Positive control group	-	+
Blank control group	-	-

+: 添加终浓度为 15 mg/L 的乙酸乙酯提取物或终浓度为 10⁵ spores/mL 的紫菜腐霉游动孢子;-: 不添加上述物质。

+: Ethyl acetate extract with a final concentration of 15 mg/L or *Pythium* zoospores with a final concentration of 10⁵ spores/mL were added; -: No addition of the above substances.

表 2 紫菜腐霉侵染后添加乙酸乙酯提取物

Table 2 Addition of ethyl acetate extract after infection with *Pythium porphyrae*

Group	1st day	4th day (Needle-tip-sized lesions appear)
Experimental group	<i>Pythium</i> zoospore	Ethyl acetate extract
Negative control group	-	Ethyl acetate extract
Positive control group	<i>Pythium</i> zoospore	-
Blank control group	-	-

+: 不添加终浓度为 15 mg/L 的乙酸乙酯提取物或终浓度为 10⁵ spores/mL 的紫菜腐霉游动孢子。

+: No addition of ethyl acetate extract at a final concentration of 15 mg/L or *Pythium* zoospores at a final concentration of 10⁵ spores/mL.

乙酸乙酯提取物, 空白对照组不含提取物, 每组设 3 个平行, 24 °C、100 r/min 培养 12 h, 分别取适量菌丝二代转录组测序, 分析方法参考唐磊^[5]。

1.8 数据统计方法

利用 SPSS 27.0 对数据进行单因素 ANOVA 检验, 最终结果用平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示, $P < 0.05$ 表示显著性差异。

2 结果与分析

2.1 胞外产物的提取物筛选

实验结果表明, CFS 的不同溶剂提取物的抑菌效果各不相同, 抑菌率及抑菌效果见图 1、图 2。乙酸乙酯提取物抑菌率为 60.67%, 显著高于石油醚提取物抑菌率 15.57%及正丁醇提取物抑菌率 1.76% ($P < 0.05$), 所以选择乙酸乙酯提取物进行下一步实验。

2.2 乙酸乙酯提取物对紫菜腐霉生长的影响

如表 3 所示, 乙酸乙酯提取物对紫菜腐霉的抑菌率随乙酸乙酯提取物的浓度升高而增加, 最高抑制率为 92.60%, 经计算其毒力回归方程为 $y = -0.7205 + 4.7896x$ ($R^2 = 0.99$), 半致死浓度 $EC_{50} = 14.92$ mg/L (后续 EC_{50} 均采用 15 mg/L)。

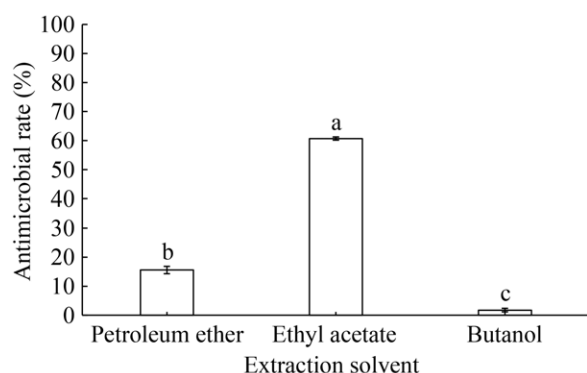


图 1 菌株 P3 提取物的抑菌率 不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Figure 1 Antimicrobial rate of strain P3 extract. Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

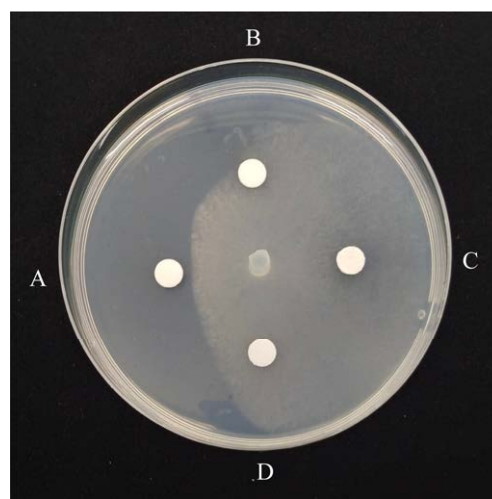


图 2 菌株 P3 提取物的抗菌效果图 A: 乙酸乙酯提取物; B: 石油醚提取物; C: 正丁醇提取物; D: 空白组。

Figure 2 Antimicrobial effect of strain P3 extract. A: Ethyl acetate extract; B: Petroleum ether extract; C: Butanol extract; D: Blank group.

表 3 不同浓度乙酸乙酯提取物对紫菜腐霉抑制率
Table 3 Inhibition rate of different concentrations of ethyl acetate extract on *Pythium porphyrae*

Ethyl acetate extract (mg/L)	Antimicrobial rate (%)
CK	0.00d
6.72	3.80±1.19d
13.45	50.75±3.15c
20.17	78.45±5.64b
26.90	90.79±0.19a
33.62	92.60±0.42a

CK 代表空白对照组; 不同小写字母表示数据存在显著差异($P < 0.05$); 相同字母表示数据无显著差异($P > 0.05$)。

CK represents the blank control group; Different lowercase letters indicate significant differences in the data ($P < 0.05$) and the same letters indicate no significant differences in the data ($P > 0.05$).

菌丝生长量随乙酸乙酯提取物浓度增加而显著下降, 60 mg/L 提取物处理时菌丝生长抑制率达 66.04% (表 4)。如图 3 所示, 15 mg/L 提取物处理紫菜腐霉后, 菌丝特化变粗, 观察到藏卵器(图 3B), 细胞壁变薄且出现弯曲, 细胞基质大量减少, 出现大的空泡, 胞质基质和部分细胞器消失, 细胞内部结构变得模糊(图 3D)。

表 4 不同浓度乙酸乙酯提取物处理后紫菜腐霉菌丝重量变化

Table 4 Changes in weight of *Pythium porphyrae* after treatment with different concentrations of ethyl acetate extract

Ethyl acetate extract (mg/L)	Dry weight of mycelium (mg)	Antimicrobial rate of mycelium (%)
CK	53.00±2.37a	0.00d
15	31.33±0.51b	40.88±0.97c
30	27.33±1.37c	48.43±2.58b
60	18.00±0.89d	66.04±1.69a

CK 代表空白对照组; 不同小写字母表示菌丝在干重或抑菌率的数据存在显著差异($P<0.05$)。

CK represents the blank control group; Different lowercase letters indicate significant differences in the dry weight or antimicrobial rate data of mycelium ($P<0.05$).

2.3 乙酸乙酯提取物抗腐霉侵染效果评价

当乙酸乙酯提取物在腐霉侵染前加入, 至实验结束, 实验组、阴性对照组、阳性对照组及空白组紫菜状态如图 4 所示。表 5 可知各组紫菜病斑率及病斑抑制率, 实验组紫菜的病斑率为 2.36%, 显著低于阳性对照组紫菜的病斑率 70.28% ($P<0.05$), 病斑抑制率高达 96.64%, 空白组与阴性对照组紫菜正常生长。如图 5 所示, 当紫菜腐霉游动孢子侵染紫菜 72 h 后出现针尖大小病斑。乙酸乙酯提取物在侵染至出现针尖大小病斑时加入, 至实验结束, 实验组、阴性对照组、阳性对照组及空白组紫菜状态如

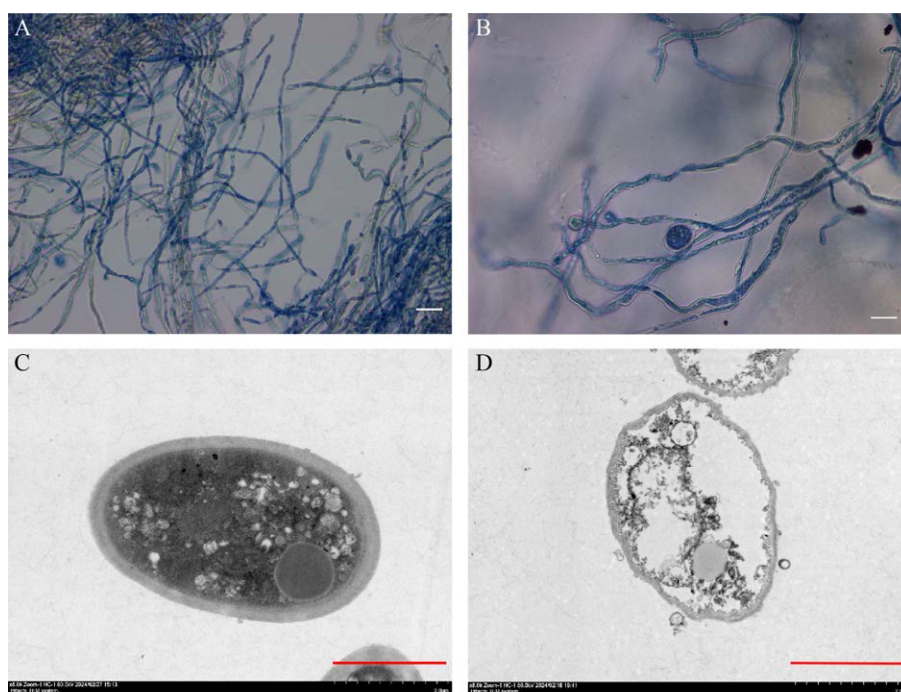


图 3 乙酸乙酯提取物处理对紫菜腐霉形态影响 A: 空白组紫菜腐霉菌丝外观光学显微镜图像(比例尺: 20 μm); B: 15 mg/L 提取物处理组紫菜腐霉菌丝外观光学显微镜图像(比例尺: 20 μm); C: 空白组紫菜腐霉超微结构透射电镜图像(比例尺: 2 μm); D: 15 mg/L 提取物处理组紫菜腐霉超微结构透射电镜图像(比例尺: 2 μm)。

Figure 3 Effects of ethyl acetate extract treatment on the morphology of *Pythium porphyrae*. A: Optical microscope image of the mycelium of *P. porphyrae* in the blank group (scale bar: 20 μm); B: Optical microscope image of the mycelium of *P. porphyrae* in the 15 mg/L extract treatment group (scale bar: 20 μm); C: Transmission electron microscope image of the ultrastructure of *P. porphyrae* in the blank group (scale bar: 2 μm); D: Transmission electron microscope image of the ultrastructure of *P. porphyrae* in 15 mg/L extract treatment group (scale bar: 2 μm).

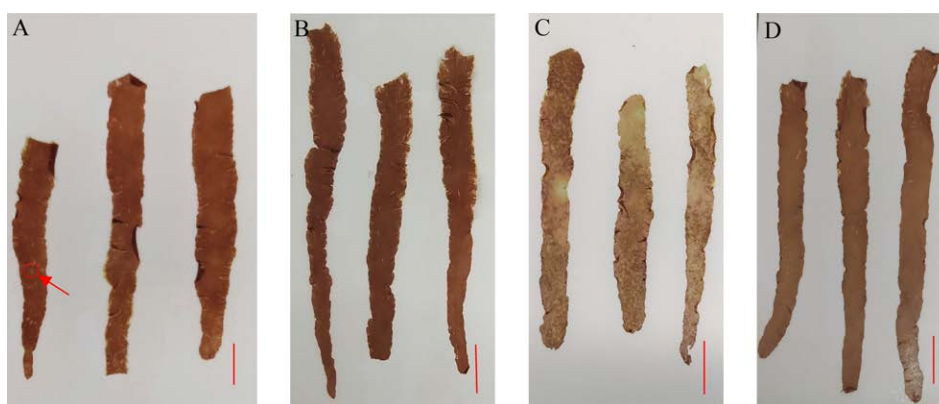


图 4 紫菜腐霉侵染前添加乙酸乙酯提取物 A: 实验组; B: 阴性对照组; C: 阳性对照组; D: 空白对照组。比例尺: 1 cm; 图中箭头和圆圈所指为紫菜腐霉侵染 7 d 后的病斑。

Figure 4 Addition of ethyl acetate extract before infection with *Pythium porphyrae*. A: Experimental group; B: Negative control group; C: Positive control group; D: Blank control group. Scale bar: 1 cm; The arrows and circles in the figure indicate the lesions 7 days after infection with *P. porphyrae*.

表 5 紫菜腐霉侵染前添加乙酸乙酯提取物的抑制效果

Table 5 Inhibitory effect of adding ethyl acetate extract before infection of *Pythium porphyrae*

Group	Experimental group setup		Disease spot rate (%)	Disease spot inhibition rate (%)
	Ethyl acetate extract	<i>Pythium</i> zoospore		
Experimental group	+	+	2.36±0.72b	96.64±1.03
Negative control group	+	—	0	0
Positive control group	—	+	70.28±11.70a	0
Blank control group	—	—	0	0

+: 添加终浓度为 15 mg/L 的乙酸乙酯提取物或终浓度为 10^5 spores/mL 的紫菜腐霉游动孢子; —: 不添加上述物质; 不同字母表示数据存在显著差异 ($P<0.05$)。

+: Ethyl acetate extract with a final concentration of 15 mg/L or *Pythium* zoospores with a final concentration of 10^5 spores/mL were added; —: No addition of the above substances; Different letters indicate significant differences in the data ($P<0.05$).

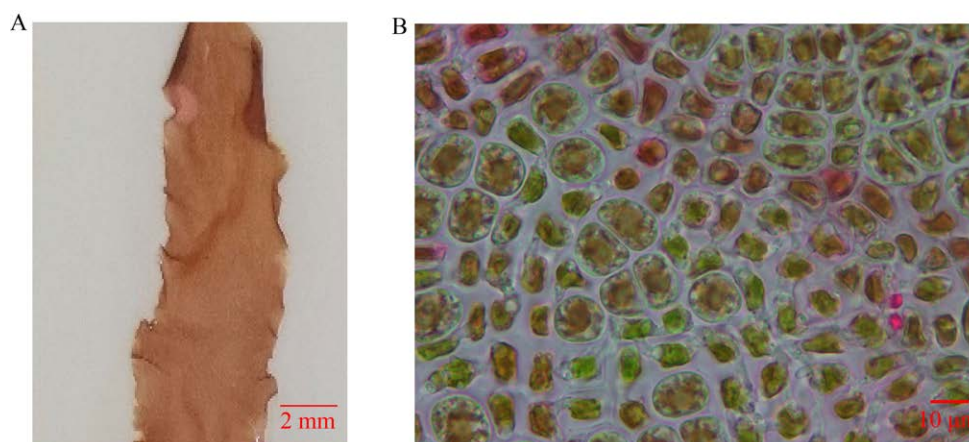


图 5 紫菜病斑宏观观察(A)和显微镜观察(B)

Figure 5 Macroscopic observation (A) and microscopic observation (B) of *Neopyropia yezoensis* lesions.

图 6 所示。表 6 可知各组紫菜病斑率及病斑抑制率，实验组紫菜的病斑率为 9.42%，显著低于阳性对照组紫菜的病斑率 63.04% ($P<0.05$)，病斑抑制率高达 85.06%，空白组与阴性对照组紫菜正常生长。实验结果显示在腐霉侵染前添加乙酸乙酯提取物对赤腐病的预防效果更佳。

2.4 转录组学分析

2.4.1 差异表达分析

以 $P<0.05$ 且 $|\log_2 \text{fold change}|>1$ 作为差异表达基因(differential expressed genes, DEGs)的

筛选标准，共获得 667 个 DEGs，其中 176 个 DEGs 上调表达，491 个 DEGs 下调表达(图 7)。

2.4.2 转录组差异表达基因的 KEGG 富集分析

如图 8 所示，对差异表达基因进行 KEGG 富集分析发现，差异基因多与代谢途径相关，共有 132 个上调表达的 DEGs 定位到 39 个代谢通路中，包括嘧啶代谢、嘌呤代谢和谷胱甘肽等大分子生命物质的代谢相关通路，与卵菌的正常生长与繁殖发育相关。277 个下调表达的 DEGs

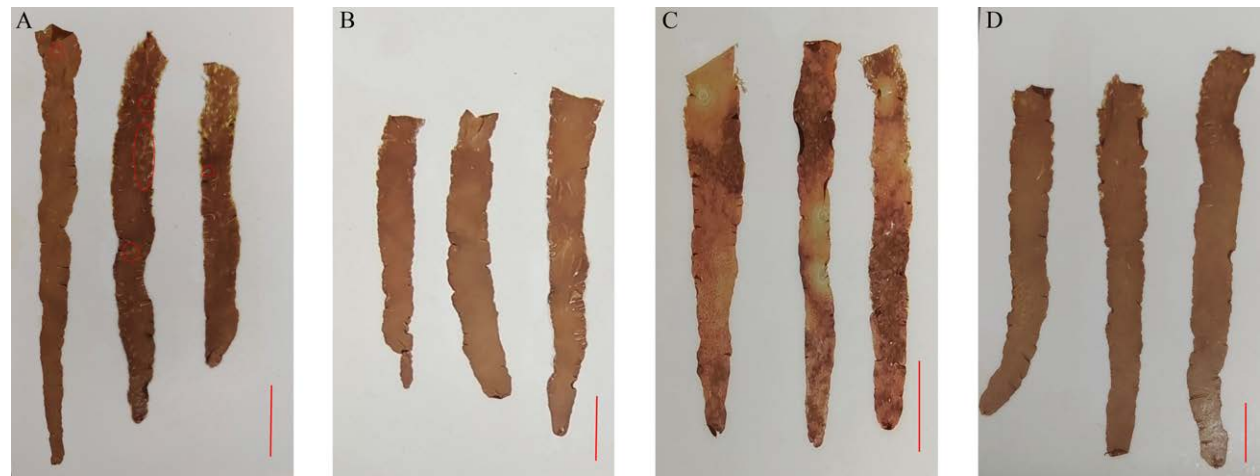


图 6 紫菜腐霉侵染后添加乙酸乙酯提取物 A：实验组；B：阴性对照组；C：阳性对照组；D：空白对照组。比例尺：1 cm；图中圆圈为紫菜腐霉侵染 7 d 后的病斑。

Figure 6 Addition of ethyl acetate extract after infection with *Pythium porphyrae*. A: Experimental group; B: Negative control group; C: Positive control group; D: Blank control group. Scale bar: 1 cm; The circles in the figure indicates the lesions after 7 days of infection with *P. porphyrae*.

表 6 紫菜腐霉侵染后添加乙酸乙酯提取物的抑制效果

Table 6 Inhibitory effect of adding ethyl acetate extract after infection of *Pythium porphyrae*

Group	Experimental group setup		Disease spot rate (%)	Disease spot inhibition rate (%)
	1st day	4th day (needle-tip-sized lesions appear)		
Experimental group	<i>Pythium</i> zoospore	Ethyl acetate extract	9.42±4.71b	85.06±7.48
Negative control group	—	Ethyl acetate extract	0	0
Positive control group	<i>Pythium</i> zoospore	—	63.04±11.55a	0
Blank control group	—	—	0	0

+: 添加终浓度为 15 mg/L 的乙酸乙酯提取物或终浓度为 10⁵ spores/mL 的紫菜腐霉游动孢子；-：不添加上述物质；不同字母表示数据存在显著差异($P<0.05$)。

+: Ethyl acetate extract with a final concentration of 15 mg/L or *Pythium* zoospores with a final concentration of 10⁵ spores/mL were added; -: No addition of the above substances; Different letters indicate significant differences in the data ($P<0.05$).

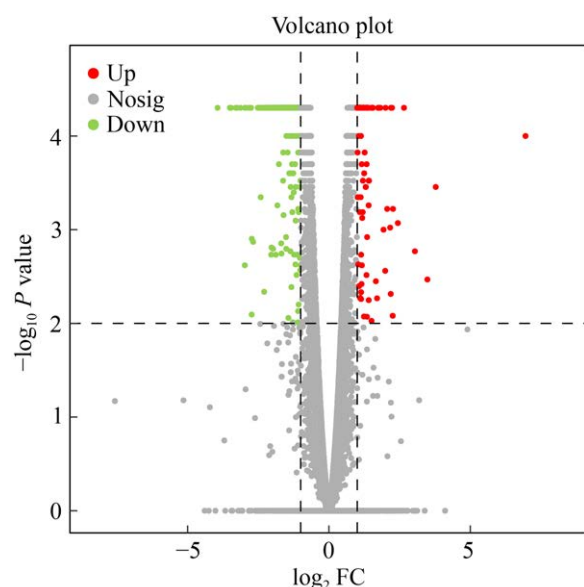


图7 不同处理紫菜腐霉 DEGs 火山图 红色点和绿色点分别表示上调 DEGs 和下调 DEGs, 灰色点表示基因表达无差异。

Figure 7 Volcano plot of DEGs of *Pythium porphyrae* under different treatments. Red and green dots indicate up-regulated DEGs and down-regulated DEGs, respectively, and gray dots indicate no difference in gene expression.

定位到 42 个代谢通路中, 包括磷酸肌醇代谢、磷脂酰肌醇信号系统、剪接体、吞噬体、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路等, 与其正常生长及致病性有关。

2.4.3 转录组差异表达基因的 GO 富集分析

GO 富集分析结果显示, 上调和下调表达的 DEGs 包括生物过程 (biological process) 15 个亚群、细胞组分 (cellular component) 10 个亚群和分子功能 (molecular function) 6 个亚群 (图 9)。

与 KEGG 富集结果相似, 上调基因与生长繁殖相关, 主要分布在生物过程及分子功能大类中, 富集上调基因富集前 20 名的途径主要集中在杂环化合物结合 (heterocyclic compound binding)、有机环状化合物 (organic cyclic compound binding)、核苷酸结合 (nucleotide binding) 等途径中。下调表达的 DEGs 在膜组分中分布较多。

富集下调基因富集前 20 名的途径主要集中在细胞质 (cytoplasm)、膜部件 (membrane part)、线粒体 (mitochondrion) 等细胞结构相关的途径中, 与菌丝生长有关。

2.4.4 重要差异基因的功能及表达模式分析

如图 10 所示, 在下调基因中注释到 10 个与细胞代谢过程相关的基因, 包括精氨酸酶、UDP-N-乙酰葡萄糖胺 O-酰基转移酶、DNA 修复蛋白、谷胱甘肽-S-转移酶、丙酮酸脱氢酶等代谢相关的重要基因, 涉及糖代谢、氨基酸代谢、DNA 复制或损伤修复、多糖合成等生物学过程, 说明乙酸乙酯提取物处理后, 紫菜腐霉多个生物大分子的代谢过程中的关键基因被抑制, 这可能引起细胞无法维持正常的代谢过程进而导致细胞死亡; 8 个基因与紫菜腐霉毒力相关, 包括 CRN 家族蛋白 (crinkler effector protein family)、角质酶、鞭毛相关蛋白、RXLR 家族蛋白 (Arg-X-Leu-Arg effector protein family) 和海藻糖酶, 涉及胞外细胞壁降解酶、卵菌毒力效应因子和侵染宿主的黏附过程等相关基因, 这些基因的下调表达可能引起紫菜腐霉感染能力和毒力的下降。上调基因中注释到多个与细胞生长分化、氧化应激相关的基因, 包括 STE/STE11 蛋白激酶 (Sterile/Sterile 11 protein kinase)、NAD⁺ 合成酶、L-天冬氨酸氧化酶、ULK/FUSED 蛋白激酶 (Unc-51-like/Fused protein kinase) 等, 在抑菌物质存在的条件下, 紫菜腐霉提高氧化应激水平应对抑菌物质的胁迫; 同时 STE/STE11 蛋白激酶是调控细胞增殖的停止和向生殖状态分化的重要因子, 该基因的上调可能与抑菌物质存在下紫菜腐霉出现藏卵器等生殖结构有关。

3 讨论

生物防治是应对卵菌病害的有效方案, 近年来在陆生农作物中研究较广, 如地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) BL06、嗜线虫致病杆菌 (*Xenorhabdus bovienii*) YL002 等对辣椒疫霉



图 8 差异基因 KEGG 通路气泡图 A: 上调差异基因; B: 下调差异基因。

Figure 8 Bubble diagram of KEGG pathway of differentially expressed genes. A: Up-regulated differential genes; B: Down-regulated differential genes.

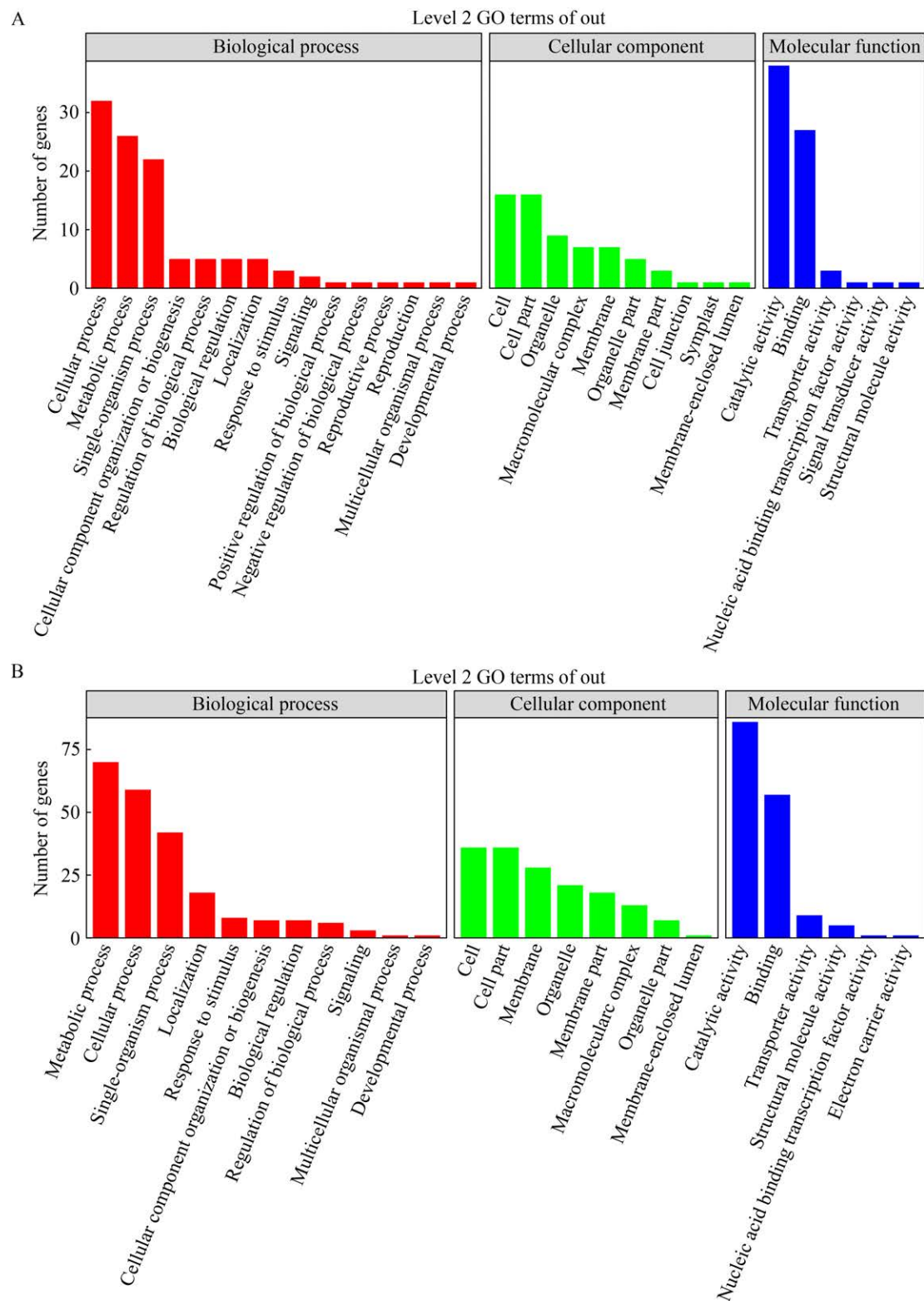


图 9 差异基因 GO 注释分类统计图 A: 上调差异基因; B: 下调差异基因。
Figure 9 GO annotation classification statistics of differentially expressed genes. A: Up-regulated differential genes; B: Down-regulated differential genes.

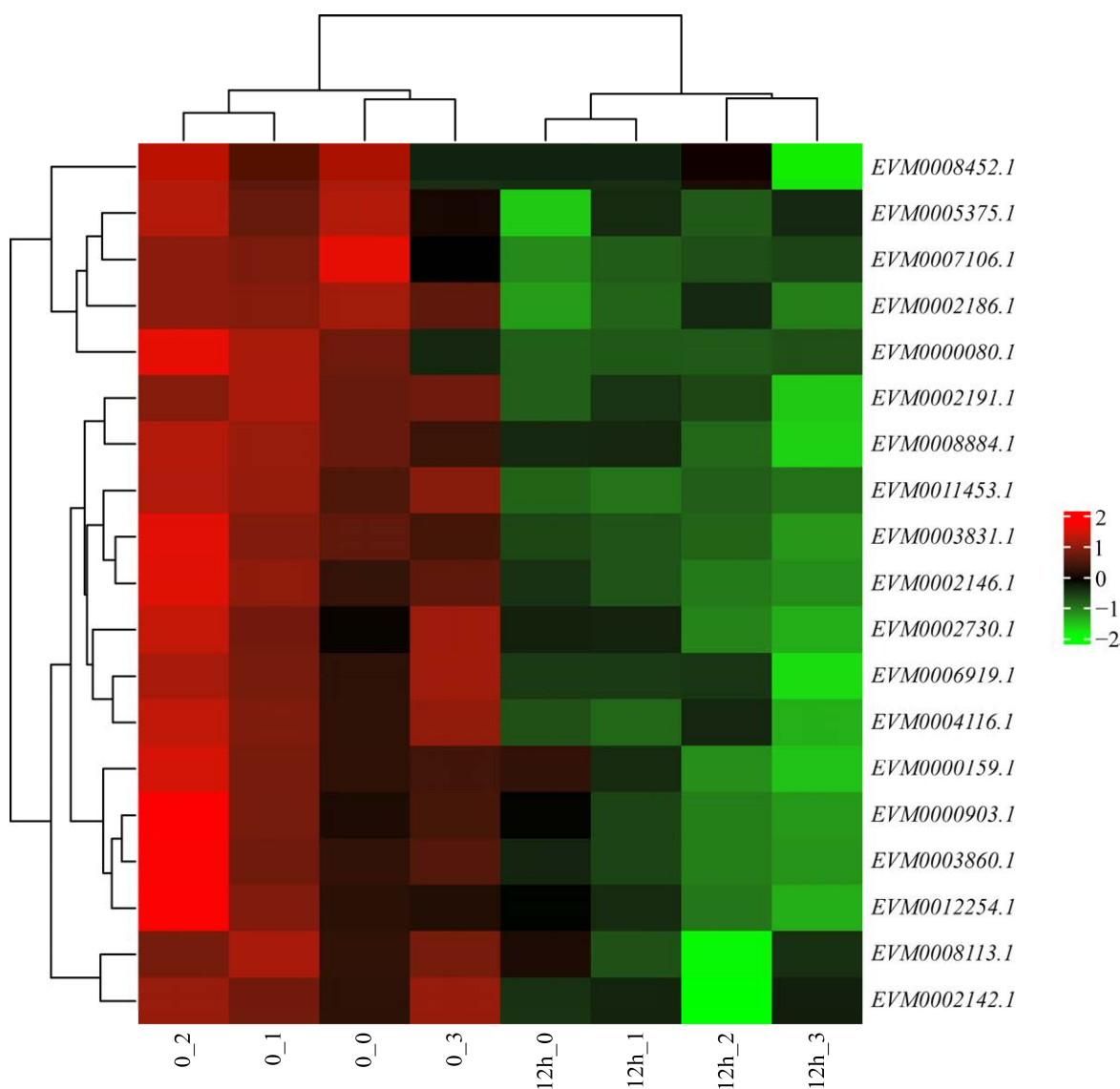


图 10 部分差异基因热图分析 基因功能注释见国家微生物科学数据中心，编号 NMDCX0001725。

Figure 10 Heat map analysis of some differentially expressed genes. Gene function annotations are provided in National Microbiology Data Center, No. NMDCX0001725.

具显著抑制效果，其中嗜线虫致病杆菌的甲醇提取物对辣椒疫病的治疗和保护效果分别为 68.14%和 65.46%^[14-15]。而假交替单胞菌属细菌是水产养殖领域广泛应用的生防菌，对细菌、真菌及病毒等具有良好的抑制效果^[10]，如水蛹假交替单胞菌(*P. undina*)能够有效抑制有害细菌和病毒生长，改善鱼类和甲壳类动物的生长^[16]；杀鱼假交替单胞菌(*P. piscicida*)可以抑制创伤

弧菌(*Vibrio vulnificus*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、宋内氏志贺氏菌(*Shigella sonnei*)等多种细菌^[17]。在大型海藻病害的生物防治方面，翁佩文^[9]从条斑紫菜栽培海区筛选到一株杀鱼假交替单胞菌 P3，对紫菜腐霉的抑制率达 95.79%，具有良好的拮抗效果。本研究筛得该拮抗菌 P3 的乙酸乙酯提取物显著抑制紫菜腐霉，并对其赤腐病防治效果和拮抗机制进行

进一步的研究。拮抗菌分离的抗菌物质主要是作用于病原菌的细胞壁、细胞膜等细胞结构,干扰破坏病原菌各方面系统的正常进行来抑制或消灭病原菌^[18]。拮抗菌棘孢木霉 HG1 与枯草芽孢杆菌 Tpb55 共培养的胞外产物处理烟草疫霉 (*P. nicotianae*) 12 h 后引起细胞变形、细胞壁和细胞膜模糊以及细胞器损伤等现象^[7]。与烟草疫霉相关研究一致,本研究中拮抗菌 P3 的乙酸乙酯提取物处理紫菜腐霉 12 h 后出现细胞壁弯曲变薄、细胞基质流失等现象。

基于提取物处理后紫菜腐霉的生长表型变化,进一步探究其对赤腐病的生物防治效果。目前国内外对于紫菜赤腐病的生物防治尚在研究中,Ding 等^[19]筛选获得一株枝孢菌(*Cladosporium* sp.) N5 能分泌苯乙酸、对羟基苯乙酸等多种抗菌物质,具有应用于藻类病害的生物防治的潜力;Vallet 等^[20]筛选到一株暗球腔菌(*Phaeosphaeria* sp.) AN596H,其胞外产物中分离到部分吡喃酮类化合物对紫菜腐霉侵染紫菜叶状体起到显著抑制作用。研究发现乙酸乙酯萃取物中的小分子化合物易扩散到植物细胞中,诱导植物抗性,可以提高对病害的防治效果^[21]。本研究中杀鱼假交替单胞菌 P3 乙酸乙酯提取物的抑制紫菜腐霉效果最佳,在紫菜腐霉侵染前、后分别添加终浓度为 15 mg/L 的提取物,病斑抑制率分别为 96.64%和 85.06%,进一步提升了菌株 P3 的防治应用效果。

转录组学分析揭示拮抗菌提取物抑制病原菌细胞膜及细胞质等相关基因表达,影响病原菌正常功能,从而抑制菌丝生长,同时多个与细胞质、膜、剪接体、吞噬体、磷脂酰肌醇、MAPK、毒力因子等通路相关的基因下调。研究发现,剪接体代谢通路表达下调可能造成真菌的生长发育受到抑制,如禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)中,剪接体通路的下调导致菌丝生长发育受阻^[22]。在真菌菌丝顶端生长过程中,胞吞作用通路下调可能同样导致真菌生长受到抑制。在稻瘟病菌(*Magnaporthe*

oryzae)中细胞自噬和内存相关基因下调表达阻碍稻瘟病菌的生长发育、降低致病能力^[23-24]。MAPK 和磷脂酰肌醇对疫霉入侵宿主过程发挥着重要的作用^[25-26],MAPK 级联反应可引起转录因子的激活和表达,大豆疫霉(*P. sojae*)中丝裂原激活蛋白激酶基因 *PsMPK7* 表达下调可以降低侵染的毒力^[27]。本研究还发现紫菜腐霉 RXLR 效应蛋白和 CRN 效应蛋白发生下调表达,两者属于胞内效应蛋白,在病原菌与宿主亲和互作中发挥作用,其基因表达下调同样降低病原菌侵染的毒力^[28]。在抑菌物质存在下,紫菜腐霉提高氧化应激相关基因的表达,提高应对胁迫的能力;同时上调表达细胞生殖分化相关通路,这与紫菜腐霉经提取物处理后出现藏卵器等有性生殖结构相一致,紫菜腐霉一般在无性生殖状态,处于不利条件时出现有性生殖^[29],这可能由于乙酸乙酯提取物中的抑菌物质对紫菜腐霉产生强烈的胁迫。

4 结论

杀鱼假交替单胞菌 P3 乙酸乙酯提取物显著抑制紫菜腐霉,处理后紫菜腐霉菌丝生长受到显著抑制,存在细胞结构改变、出现藏卵器、致病力下降等变化,细胞质、膜、剪接体、吞噬体、磷脂酰肌醇、效应因子等相关基因显著下调,在紫菜腐霉侵染前、后分别添加终浓度为 15 mg/L 的提取物,病斑抑制率分别为 96.64%和 85.06%,对赤腐病有良好的防治效果。本研究结果为紫菜赤腐病的新型防治药物和技术开发提供了支持。

作者贡献声明

吴蕾:负责实验方案的设计,实验具体操作,实验数据分析,文章撰写;李杰:负责指导修正实验方案,修改文章;莫照兰:负责指导修正实验方案;翁佩文:负责指导修正实验操作,修改文章;茅云翔:负责指导修正实验

方案; 唐磊: 负责指导修正实验方案, 指导实验操作, 指导实验数据分析, 修改文章。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] SUGIMOTO M, OUCHI KZ, NAKAMURA Y. Comparison of contrast improvement of extracted laver cultivation area using parameters derived from polarimetric SAR data[C]//Remote Sensing of the Marine Environment II. Kyoto, Japan. SPIE, 2012: 80250R.
- [2] 胡闪闪. 广东省海域大型海藻对海洋化学环境变化的响应及其生态服务价值评估[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2022.
- HU SS. Study on the responses to marine chemical environment changes and the evaluation of ecological services of marine macroalgae in the waters of Guangdong Province, China[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China University of Technology, 2022 (in Chinese).
- [3] ARASAKI S. Studies on the rot of *Porohyra tenera* by *Pythium*[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1947, 13: 74-90.
- [4] KLOCHKOVA TA, SHIM JB, HWANG MS, KIM GH. Host-parasite interactions and host species susceptibility of the marine oomycete parasite, *Olpidiopsis* sp., from Korea that infects red algae[J]. Journal of Applied Phycology, 2012, 24(1): 135-144.
- [5] 唐磊. 条斑紫菜先天免疫系统及抗赤腐病机制[D]. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 2019.
- TANG L. Innate immunity system and red rot disease resistant mechanism in *Pyropia yezoensis*[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2019 (in Chinese).
- [6] LEE JY, SHERMAN DH, HWANG BK. *In vitro* antimicrobial and *in vivo* antioomycete activities of the novel antibiotic thiobutacin[J]. Pest Management Science, 2008, 64(2): 172-177.
- [7] ZHANG XF, LI QY, WANG M, MA SQ, ZHENG YF, LI YQ, ZHAO DL, ZHANG CS. 2E, 4E-decadienoic acid, a novel anti-oomycete agent from coculture of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma asperellum*[J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(4): e0154222.
- [8] 杨慧超, 李杰, 阎永伟, 唐磊, 茅云翔, 莫照兰. 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.
- YANG HC, LI J, YAN YW, TANG L, MAO YX, MO ZL. Research progress of economic seaweed diseases and their prevention and control techniques[J]. Marine Sciences, 2019, 43(1): 101-111 (in Chinese).
- [9] 翁佩文. 紫菜赤腐病生防菌的筛选与评价[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2022.
- WENG PW. Screening and evaluation of biocontrol bacteria against red rot disease of *Neopyropia*[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2022 (in Chinese).
- [10] 于敏. 金丽假交替单胞菌 JG1 抑菌机理研究[D]. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 2013.
- YU M. The antibacterial mechanism of *Pseudoalteromonas flavipulchra* JG1[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2013 (in Chinese).
- [11] 吕虎. 海洋微生物抗真菌活性菌株的分离及 *Aspergillus* sp. H075 抗真菌蛋白的纯化[D]. 武汉: 湖北大学硕士学位论文, 2012.
- LÜ H. Isolation of antifungal strain from ocean samples and purification of antifungal protein from an *Aspergillus* sp. H075[D]. Wuhan: Master's Thesis of Hubei University, 2012 (in Chinese).
- [12] UPPALAPATI SR, FUJITA Y. Carbohydrate regulation of attachment, encystment, and appressorium formation by *Pythium porphyrae* (Oomycota) zoospores on *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta)[J]. Journal of Phycology, 2000, 36(2): 359-366.
- [13] ADDEPALLI MK, FUJITA Y. Regulatory role of external calcium on *Pythium porphyrae* (Oomycota) zoospore release, development and infection in causing red rot disease of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta)[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 211(2): 253-257.
- [14] 李烨. 地衣芽孢杆菌 BL06 对辣椒疫病的生防作用及其抗菌机制初探[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2020.
- LI Y. Biological Control and mechanism of *Bacillus licheniformis* BL06 against pepper *Phytophthora* blight (*Phytophthora capsici*)[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [15] FANG XL, LI ZZ, WANG YH, ZHANG X. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of *Xenorhabdus bovienii* YL002 against *Phytophthora capsici* and *Botrytis cinerea*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 111(1): 145-154.
- [16] MAEDA M, NOGAMI K, KANEMATSU M, HIRAYAMA K. The concept of biological control methods in aquaculture[M]//Live Food in Aquaculture. Dordrecht: Springer Netherlands, 1997: 285-290.
- [17] RICHARDS GP, WATSON MA, NEEDLEMAN DS, UKNALIS J, FIDELMA BOYD E, FAY JP. Mechanisms for *Pseudoalteromonas piscicida*-induced killing of *Vibrios* and other bacterial pathogens[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(11): e00175-17.
- [18] HOLMSTRÖM C, KJELLEBERG S. Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1999, 30(4): 285-293.
- [19] DING L, QIN S, LI FC, CHI XY, LAATSCH H. Isolation, antimicrobial activity, and metabolites of fungus *Cladosporium* sp. associated with red *Alga Porphyra yezoensis*[J]. Current Microbiology, 2008, 56(3): 229-235.

- [20] VALLET M, STRITTMATTER M, MURÚA P, LACOSTE S, DUPONT J, HUBAS C, GENTA-JOUE G, GACHON CMM, KIM GH, PRADO S. Chemically-mediated interactions between macroalgae, their fungal endophytes, and protistan pathogens[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 3161.
- [21] FEI LW, XU XW, FENG JY, HAO LY. Inhibition of oil tea anthracnose by natural product extracts from *Bacillus* and *Pseudoalteromonas* isolates from mangrove soil[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2023, 10: 1299118.
- [22] YIN YN, WANG ZH, CHENG DN, CHEN X, CHEN Y, MA ZH. The ATP-binding protein FgArb1 is essential for penetration, infectious and normal growth of *Fusarium graminearum*[J]. *The New Phytologist*, 2018, 219(4): 1447-1466.
- [23] 朱学明. 稻瘟病菌细胞自噬和内吞途径调控因子功能研究[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2020.
- ZHU XM. Studies on the biological functions of the autophagy and endocytosis regulatory factors in the rice blast fungus[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2020 (in Chinese).
- [24] 宋雯雯. 稻瘟病菌 SNARE 蛋白的生物信息学分析及 Mgsec22 的功能研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2009.
- SONG WW. Bioinformatics analysis of snare proteins and functional characterization of *Mgsec22* in *Magnaporthe oryzae*[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2009 (in Chinese).
- [25] 卢珊. 磷脂酰肌醇 3-磷酸在本氏烟与疫霉互作中的功能研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2014.
- LU S. Functional characterizations of phosphatidylinositol 3-phosphate in interactions of *Nicotiana benthamiana* and *Phytophthora* pathogens[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [26] 叶文武, 李爱宁, 王晓莉, 王源超. 大豆疫霉 MAPK 基因的鉴定与转录分析[J]. *植物病理学报*, 2016, 46(3): 338-346.
- YE WW, LI AN, WANG XL, WANG YC. Identification and transcriptional analysis of the MAPK genes in *Phytophthora sojae*[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2016, 46(3): 338-346 (in Chinese).
- [27] GAO J, CAO MN, YE WW, LI HY, KONG L, ZHENG XB, WANG YC. PsMPK7, a stress-associated mitogen-activated protein kinase (MAPK) in *Phytophthora sojae*, is required for stress tolerance, reactive oxygenated species detoxification, cyst germination, sexual reproduction and infection of soybean[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2015, 16(1): 61-70.
- [28] UHSE S, DJAMEI A. Effectors of plant-colonizing fungi and beyond[J]. *PLoS Pathogens*, 2018, 14(6): e1006992.
- [29] DRENTA A. Genotypic diversity of *Phytophthora infestans* in the Netherlands revealed by DNA polymorphisms[J]. *Phytopathology*, 1993, 83(10): 1087.