



# 大豆灰斑病菌 Race 15 的全基因组测序分析

顾鑫,杨晓贺,姚亮亮,高雪冬,张茂明,刘伟,赵海红,丁俊杰

(黑龙江省农业科学院 佳木斯分院/国家大豆产业技术体系佳木斯综合试验站/农业部佳木斯作物有害生物科学观测试验站,黑龙江佳木斯 154007)

**摘要:**大豆灰斑病菌新小种 Race 15 具有强致病力和明显的生理分化现象,可导致传统抗病大豆品种的抗性丧失。为在基因组水平解析其致病机理,本研究对 Race 15 菌株进行全基因组测序和基因功能注释,并分析其毒力相关基因的代谢途径。结果表明:大豆灰斑病菌 Race 15 的全基因组 de novo 测序共产生 601 794 个 PacBio 读数,得到 6 038 283 778 bp 数据,经过组装得到 12 个 contigs, N50 长度为 4.9 Mb, 组装后得到的总序列长度为 40.12 Mb。共预测到 12 607 个编码基因, 基因密度约 314 个·Mb<sup>-1</sup>, 预测得到了 200 个 tRNA, 2 个 sRNA 和 13 个 snRNA。共有 680 个基因在病原与宿主互作数据库中注释, 340 个基因在碳水化合物酶数据库中注释, 777 个基因预测为次生代谢物相关基因, 此外还有 766 个基因预测为分泌蛋白。这些与毒力相关的致病基因主要涉及细胞壁分解酶、真菌的形态构成、毒素和色素生物合成等。

**关键词:**大豆灰斑病; Race 15; 全基因组测序; 基因功能注释; 毒力相关基因

## Whole-Genome Sequencing and Analysis of *Cercospora Sojina* Race 15

GU Xin, YANG Xiao-he, YAO Liang-liang, GAO Xue-dong, ZHANG Mao-ming, LIU Wei, ZHAO Hai-hong, DING Jun-jie

(Jiamusi Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences/Jiamusi Comprehensive Test Station of National Soybean Industrial Technology System/Ministry of Agriculture Harmful Biology of Crop Scientific Monitoring Station Jiamusi Experiment Station, Jiamusi 154007, China)

**Abstract:** The new Race 15 of *Cercospora sojina* has infectivity and physiological race differentiation, which has caused the breakdown of resistance in most soybean cultivars. To analyze its infection mechanism at the genome level, this research adopted the whole-genome sequencing for preliminary genomics research. The results showed that 601 794 high quality reads were generated by PacBio sequencing, covering 6 038 283 778 bp in total, and having a mean length of 10 033 bp and an N50 length of 13 900 bp. The genome of the Race 15 strain of *Cercospora sojina* (40.12 Mb) consisted of 12 curated contigs, with an 4.9 Mb N50, and 12 607 coding genes were predicted with a gene density of approximately 314 genes per Mb. Additionally, non-coding genes were predicted, with 200 tRNA, 2 sRNA and 13 snRNA genes being predicted in the genome of Race 15. A total of 680 genes were annotated and classified using the PHI database, 340 genes were annotated in the CAZy database, 777 genes were predicted to be related to secondary metabolism and 766 genes were predicted as secretory proteins. These virulence-related pathogenic genes are mainly involved in cell wall degrading enzymes, fungal morphology, toxins and pigment biosynthesis.

**Keywords:** *Cercospora sojina*; Race 15; Whole genome sequencing; Gene function annotation; Virulence-associated genes

大豆灰斑病是一种由 *Cercospora sojina* Hara 引起的世界性病害,该病原菌具有侵染性强、生理小种多、危害性大等特点,能够侵染大豆植株地上部分的所有器官<sup>[1]</sup>。中国东北春大豆产区的气候条件较适宜大豆灰斑病的发生发展,现阶段国内外防治大豆灰斑病最有效的方法就是种植抗病品种,但

是大豆灰斑病菌具有明显的生理小种分化现象和高度的变异性,往往能够突破大豆的抗性<sup>[2]</sup>。在美国,种植抗病品种对防控大豆灰斑病取得了较好的效果,但是单一抗性往往只能维持 3~5 年,例如含有单一显性抗病基因 *RCSI* 的大豆品种 Clark 和 Wabash 一直对 Race 1 小种具有良好抗性,但是到

收稿日期:2021-02-18

基金项目:黑龙江省应用技术与开发计划(GA20B104);财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS04CES05);农业科技创新跨越工程(HNK2019CX14);黑龙江省自然科学基金(JJ2021LH1520)。

第一作者:顾鑫(1980—),男,博士,副研究员,主要从事作物病虫害防治研究。E-mail:guxin1111@163.com。

通讯作者:丁俊杰(1974—),男,博士,研究员,主要从事大豆病虫害研究。E-mail:me999@126.com。

20 世纪 50 年代末,抗性纷纷丧失。Athow 等<sup>[3-4]</sup>研究发现新小种 Race 2 的出现导致这些品种由抗病变为感病,随后美国大豆灰斑病菌 Race 3、Race 4 和 Race 5 等 11 个小种陆续被鉴别出来。Yorinori 等<sup>[5]</sup>采用 10 个巴西大豆品种组成的鉴别体系鉴别出 20 多个巴西小种。在中国最早由黄桂潮等<sup>[6]</sup>采用 6 个中国大豆品种组成的鉴别体系鉴别出了 5 个中国小种。近些年随着种植结构的改变及新抗病品种的推广,共有 15 个小种被鉴别出来<sup>[7-9]</sup>,小种之间存在着毒力差异<sup>[10]</sup>。姜翠兰等<sup>[11]</sup>研究发现抗病品种绥农 10 在 2004 年前对灰斑病表现为高抗,2004 年后则表现为高感,近年来的鉴定结果表明新出现的 15 号小种是其抗性丧失的原因。对中国灰斑病小种的长期监测发现 Race 1、Race 7 和 Race 10 为优势小种,但最近几年分离频率逐渐降低,新发现的 Race 15 分离频率有上升的趋势<sup>[12]</sup>,在黑龙江省一些大豆产区已成为优势小种<sup>[13-14]</sup>。

大豆灰斑病菌新小种的出现是因为近些年抗性品种大量种植,在选择压力下灰斑病菌发生基因突变。因此探明菌株产生毒力差异的原因、解析大豆灰斑病侵染的分子机制一直是研究人员的首要任务。刘学敏等<sup>[15]</sup>等用 RAPD 技术研究发现,小种间毒力的相似系数与毒力标记呈正相关。大豆灰斑病菌全基因组测序是灰斑病菌组学研究的开端、核心和基础,通过全基因组 *de novo* 测序可以获得该物种基因组的全部序列,从基因水平全面剖析大豆灰斑病菌的生物学问题。Zeng 等<sup>[16]</sup>于 2017 年采用 Illumina GA IIx 测序技术对美国乔治亚洲的大豆灰斑病菌株 S9 进行了全基因组测序,发现其基因组含有参与菌丝体生长发育、生长素生物合成等蛋白及 ABC 转运蛋白(ATP-binding cassette transporters)的编码基因,ABC 转运蛋白被证实是一种重要的毒力因子,主要用来调节宿真菌分泌特定寄主毒素,这些基因对真菌的致病性和在寄主内定殖也起着重要的作用,这些 ABC 转运蛋白一旦发生突变,会导致真菌 ABC 转运蛋白在转运次生代谢产物过程中及对胁迫的响应等方面发生变化,进而影响真菌的毒力<sup>[17]</sup>。在分类学上 *Cercospora sojina* Hara 属于尾孢菌属,国内外研究发现尾孢菌属的其他真菌在侵染时会分泌一种尾孢菌素<sup>[18]</sup>,这种生物合成物质是侵染过程中必不可少的,但是目前无法在实验室菌丝体或受感染植物组织中检测到大豆灰斑病菌分

泌尾孢菌素,其基因组是否含有这种分泌尾孢菌素的基因或者其他影响侵染的基因等问题都需要通过对基因组的深入研究进行解答。

目前国内外已有大豆灰斑病菌 Race 1<sup>[19]</sup>(中国菌株)、FLS21<sup>[20]</sup>(美国菌株)和 S9<sup>[21]</sup>(美国菌株)的基因组测序结果。Luo 等<sup>[19]</sup>于 2019 年对中国的大豆灰斑病菌 Race 1 进行了全基因组测序,发现 Race 1 基因组包含大量参与次生代谢产物合成的基因簇,包括真菌毒素和色素。然而,与其他植物病原真菌相比,大豆灰斑病菌基因组中编码糖类结合蛋白的基因较多,在侵染早期代谢物合成并与效应蛋白基因显著富集,可能发挥重要致病性作用。Shrestha 等<sup>[20]</sup>于 2015 年对采自美国密西西比的菌株 FLS21 进行了初步测序,发现基因组大小、基因数量及总长度等均明显小于中国的 Race 1 菌株,推测可能是因为测序技术的不同所导致,也有可能是两者面对的生存环境及寄主选择压力不同所导致。丁俊杰等<sup>[14]</sup>通过遗传多样性分析发现 Race 15 的采集地点与 Race 1 重合,SSR 聚类分析发现其亲缘关系与 Race 1 小种最近,推测 Race 15 是由 Race 1 变异演化过来的,但其显示出较强的毒性,克服了目前黑龙江省大多数主栽品种的抗性。

为了探明毒力变异的原因,本研究利用 Illumina + PacBio 测序技术对强毒力菌株 Race 15 进行全基因组测序,明确其基因组遗传特征,为进一步推动毒力相关基因鉴定与功能分析、真菌与植物互作机制及分子抗病育种等研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Race 15 菌株采自宝泉岭地区的大豆田,由黑龙江省农业科学院佳木斯分院分离、鉴定并保存。

### 1.2 方法

1.2.1 菌株分离 采用挑针法直接从叶片上获取 Race 15 菌株孢子。具体方法为:取单一病斑叶片,用 75% 酒精消毒 30 s 左右,再在 0.1% 酸性生汞水溶液中浸 3 ~ 5 min,然后用无菌水冲洗 3 次,后用镊子夹起小块病斑置于灭菌后的滤纸上吸干多余水分,挑针灭菌后在无菌水中湿润一下,从消毒后叶片上粘取少许孢子,依次在切好的 WA 培养基小块(5 mm × 5 mm)上轻点一下,在 10 × 10 视野下找到灰斑病菌单孢的琼脂块,用挑针将有单孢的琼脂块

转移至 V8 果汁培养基上,孢子一面向上。每个菌株连续进行 5 次单孢分离,然后置于 27 ℃ 培养箱中培养<sup>[21]</sup>。

1.2.2 菌株培养及 DNA 提取 采用液体摇瓶培养法培养 Race 15 菌株。用无菌手术刀切取 5 块 5 mm × 5 mm 菌丝琼脂块,无菌条件下接种至 100 mL 马铃薯葡萄糖液体培养基中。27 ℃、240 r·min<sup>-1</sup> 震荡培养 7 d,用 450 目无菌纱布过滤,菌丝经灭菌水洗涤,无菌滤纸吸干水分后,称取 100 mg 分装至 1.5 mL 灭菌离心管中,室温下 1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 后放入 -80 ℃ 超低温冰箱保存备用<sup>[22]</sup>。DNA 提取采用 CTAB 法<sup>[23]</sup>。DNA 样品经电泳检测合格后,进行 HiSeq 平台及 PacBio 平台建库<sup>[24-27]</sup>。

1.2.3 基因组测序与组装 库检合格后,将 Race 15 的基因组送至北京诺和致源生物信息公司测序,在 Illumina HiSeq 2500-PE150 平台上采用大规模平行测序(MPS)技术进行全基因组测序。对原始 reads 进行过滤:去除 3' 端 adapter,去除平均质量值小于 20 的 reads,去除含未知碱基的 reads。过滤后的 reads 为 clean reads,用于后续的组装<sup>[28]</sup>。

同时采用第三代测序仪 PacBio 进行测序。在去除低质量序列后获得 clean data。统计 clean data 后获得数据总量、reads 读长、质量值分布等信息,用 SMRT Link (version 5.0.1) 软件组装 reads 后获得初步组装结果,并去除结果中冗余的序列,再在组装序列上比对 reads,从而统计出 reads 的分布情况<sup>[29]</sup>。

1.2.4 基因组组分分析 对各样品最终组装结果(≥500 bp)进行 ORF (Open Reading Frame) 预测及过滤;采用 Augustus 2.7 软件<sup>[30]</sup> 预测真菌的相关编码基因;采用 RepeatMasker (version 4.0.5) 软件预测散在重复序列;采用 TRF<sup>[31]</sup> (Tandem Repeats Finder, version 4.07b) 软件搜寻 DNA 序列中的串联重复序列。采用 tRNAscan-SE 软件预测<sup>[32]</sup> tRNA 区域和 tRNA 的二级结构;通过比对 rRNA 库查找与数据库近缘的 rRNA,采用 rRNAmmer 软件<sup>[33]</sup> 预测新出现及未被注释的 rRNAs;采用 Rfam 软件进行 Rfam database 比对注释<sup>[34-35]</sup>,随后用 cmsearch 程序 (version 1.1rc4) 确定最终的 sRNA。

1.2.5 基因功能注释 对预测的编码基因进行功能注释:采用 GO 数据库 (Gene Ontology, <http://geneontology.org/>)<sup>[36]</sup> 对基因和蛋白质功能进行限

定和描述;采用 KEGG 数据库 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>)<sup>[37-38]</sup> 查找基因所在的生物学通路;采用 COG (Cluster of Orthologous Groups of proteins, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) 中的 KOG 数据库分析真菌基因组规模蛋白质的功能和进化;采用非冗余蛋白质数据库 (Non-Redundant Protein Database, NR 数据库)<sup>[39]</sup>,根据基因注释到的物种情况,统计注释到的物种及基因数目;采用 TCDB (Transporter Classification Database)<sup>[40]</sup> 数据库对膜转运蛋白进行分类。使用 Diamond 软件将目标物种的氨基酸序列与各功能数据库进行比对,在 Swiss-Prot (<http://www.ebi.ac.uk/uniprot/>)<sup>[41]</sup> 查找蛋白质序列的注释信息,在碳水化合物活性酶数据库 (Carbohydrate-Active Enzymes Database, CAZy)<sup>[42]</sup> 查找能够合成或者分解复杂碳水化合物和糖复合物的酶类基因,把目标物种的基因和其相对应的功能注释信息结合起来,得到注释结果。

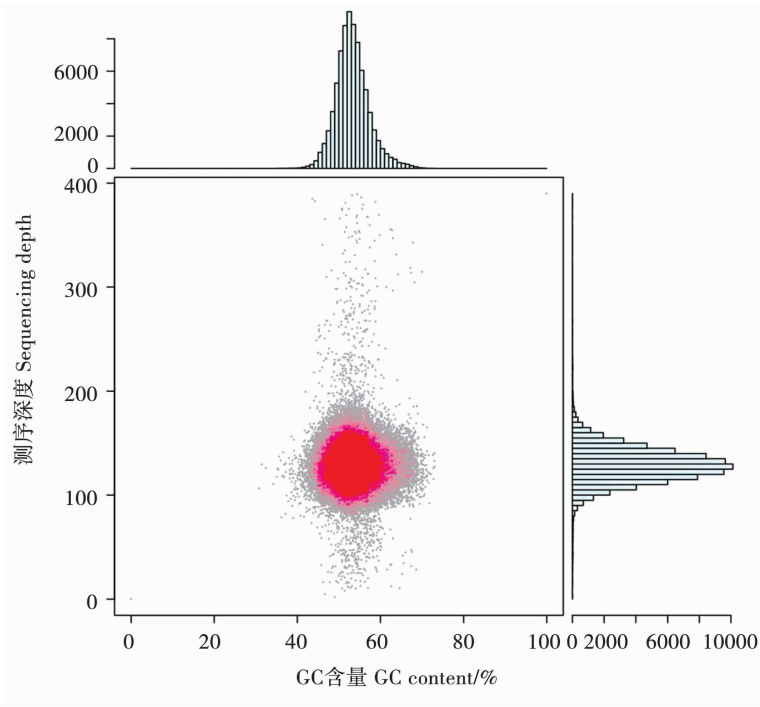
## 2 结果与分析

### 2.1 Race 15 基因组组装及评价

使用 SMRT Link (version 5.0.1) 软件对 reads 进行组装并将 reads 比对到组装序列,得到的最终组装结果为:测序得到 6 038 283 778 bp 数据,经过组装得到 12 个 contigs, N50 长度为 4 908 823 bp, 组装后得到的总序列长度为 40 115 976 bp, 其中 G + C 含量为 53.4%。组装得到的序列中,最大的 contig 长度 5 892 303 bp。Race 15 菌株基因组 GC-depth 的散点图均集中于 40% ~ 60% 区间内, GC-depth 分布图上的点较为集中,未出现杂菌污染 (图 1)。

### 2.2 Race 15 基因组组分分析

利用 Augustus 软件共预测到 12 607 个灰斑病菌编码基因,基因密度约为 314 个·Mb<sup>-1</sup>。基因长度分布集中在 400 ~ 1 700 bp 和 > 2 500 bp 范围内,其中, > 2 500 bp 的基因最多,达到 2 297 个 (图 2)。预测到 200 个 tRNA、2 个 sRNA 和 13 个 snRNA。对 Race 15 进行全基因组 *de novo* 测序,共鉴定出 2 140 679 bp 重复序列,占 Race 15 基因组的 5.34%,其中包括 777 个 DNA 转座子、1 892 个 LTR 反转录转座子等共计 4 442 个散在重复序列。共鉴定出 4 846 个 TRF、3 236 个 Minisatellite DNA 和 972 个 Microsatellite DNA。



右方是测序深度分布;上方是 GC 含量分布。  
The right is the depth distribution of the sequence; The top is the GC content distribution.

图 1 大豆灰斑病菌 Race 15 的 GC 含量与测序深度关联分析统计图  
Fig. 1 The statistical graph of correlation analysis on GC content and genomic sequences depth of *Cercospora soja* Race 15

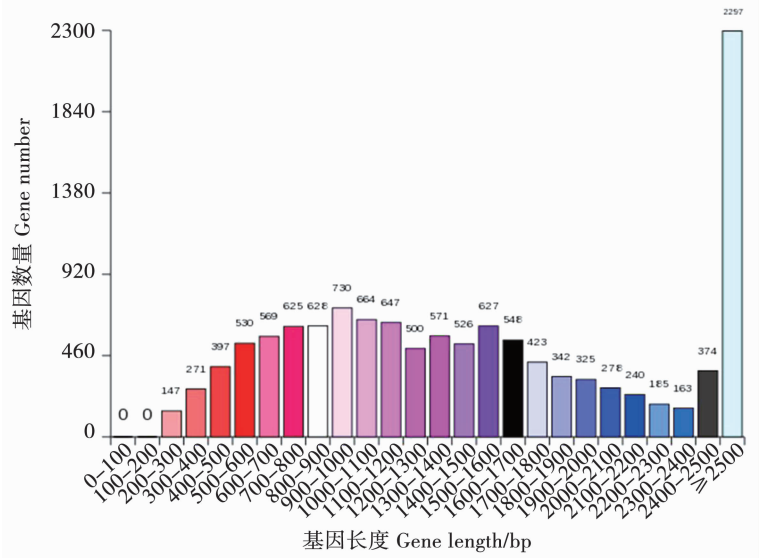


图 2 大豆灰斑病菌 Race 15 基因长度分布  
Fig. 2 The gene length distribution of *Cercospora soja* Race 15

2.3 Race 15 基因功能注释

在 NR 数据库中注释到9 242个基因和 20 个相对应的物种和功能条目,其中注释到芭蕉亚球壳菌(*Sphaerulina musiva*) 基因数目最多,达到5 830个;在 SwissProt 数据库中注释到2 937个基因;在 KEGG 数据库中注释到8 678个基因,其中注释到的碳水化合物代谢通路基因最多,为 301 个;在 KOG 数据库中注释到2 023 个基因;在 TCDB 数据库中注释到410 个基因,其中电化学势驱动转运蛋白(electrochemical potential-driven transporter)最多,达到 178 个;在 GO 数据库中注释到8 423个基因,其中分子功能大类中的催化活性(catalytic activity)类别基因最多,达到4 987个;在 P450 数据库中注释到 160 个基因;在病原与宿主互作数据库(PHI)中注释到 680 个基因;在碳水化合物酶数据库(CAZy)中注释到 340 个基因;766 个基因被预测为分泌蛋白(secretory protein)编码基因,777 个基因被预测为次生代谢物(secondary metabolism)相关基因。已有研究表明注释为 PHI、CAZy、secretory protein 和 secondary metabolism 的基因最可能与真菌毒力相关<sup>[19]</sup>,因此有必要对这些功能基因的整体情况进行进一步统计分析。

2.4 Race 15 毒力相关基因注释

2.4.1 PHI 数据库注释基因分析 如图 3 所示,共

有 680 个基因注释到 PHI 数据库中,将病原基因进行功能分类,注释为导致病原菌致病能力减弱的基因(reduced virulence)最多,为 292 个;其次是注释为对病原菌致病性没有影响的基因(unaffected pathogenicity),为 252 个;注释为导致病原菌致病能力丧失的基因(loss of pathogenicity)为 72 个;注释为致死因子(lethal)的为 34 个;注释为抗药性(chemistry target:resistance to chemical)的为 5 个;注释为致病效应基因(effector: plant avirulence determinant)的有 1 个。注释为导致病原菌毒力增强的基因(increased virulence, hypervirulence)的共计 24 个,其中基因 A07111、A07645、A03961 和 A12191 为 *Vic4* ( PHI: 3457 ),在新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)中参与磷酸盐的获取及存储,与黑色素形成、巨噬细胞存活及病菌毒力有关<sup>[43]</sup>。基因 A01545 和 A07701 编码小柱孢酮脱水酶(scytalone dehydratase, SCD, PHI: 2313)。基因 A06125 和 A02404 编码 1,3,8-三羟基萘还原酶(anisopliae),参与黑色素的生物合成<sup>[44]</sup>。黑色素能够促进植物病原真菌对环境的适应性,敲除这些基因导致稻瘟病菌、炭疽菌、新型隐球菌白化,变异菌株毒力也显著降低<sup>[45-47]</sup>,因此这些与黑色素形成相关的基因有待于后续深入研究。

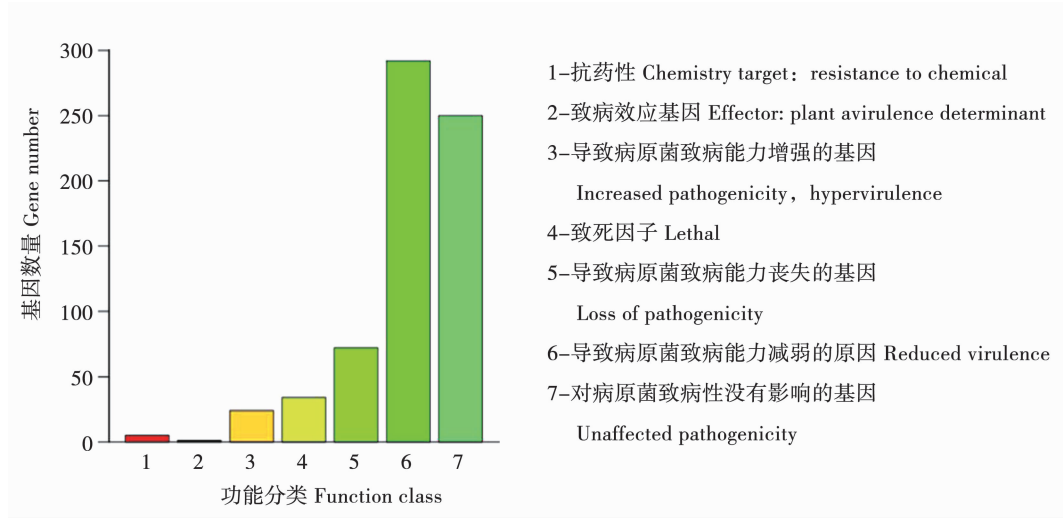


图3 在 PHI 数据库注释到的大豆灰斑病菌 Race 15 基因数量分析

Fig.3 The analysis of number on genes annotated in PHI database of Cercospora soja Race 15

2.4.2 Cazy 数据库注释基因分析 植物病原真菌能够通过碳水化合物酶分解利用植物细胞壁多糖,碳水化合物酶(Cazy)相关的专业数据库包括能催化碳水化合物降解、修饰以及生物合成的相关酶系

家族,其包含 5 个主要分类:糖苷水解酶(Glycoside Hydrolases, GHs)、糖基转移酶(Glycosyl Transferases, GTs)、多糖裂解酶(Polysaccharide Lyases, PLs)和糖类酯解酶(Carbohydrate Esterases, CEs)、氧化还原酶

(Auxiliary Activities, AAs)。如图 4 所示,共有 340 个大豆灰斑病菌 Race 15 基因在 CAZy 数据库中有注释信息,可分为 5 大类和 1 个结构域,一些基因可同时注释为两个或两个以上分类。其中,49 个基因注

释为 AAs,17 个基因注释为 CEs,195 个基因注释为 GHs,66 个基因注释为 GTs,6 个基因注释为 PLs,27 个基因注释为碳水化合物结合模块 (Carbohydrate-Binding Module, CBM)。

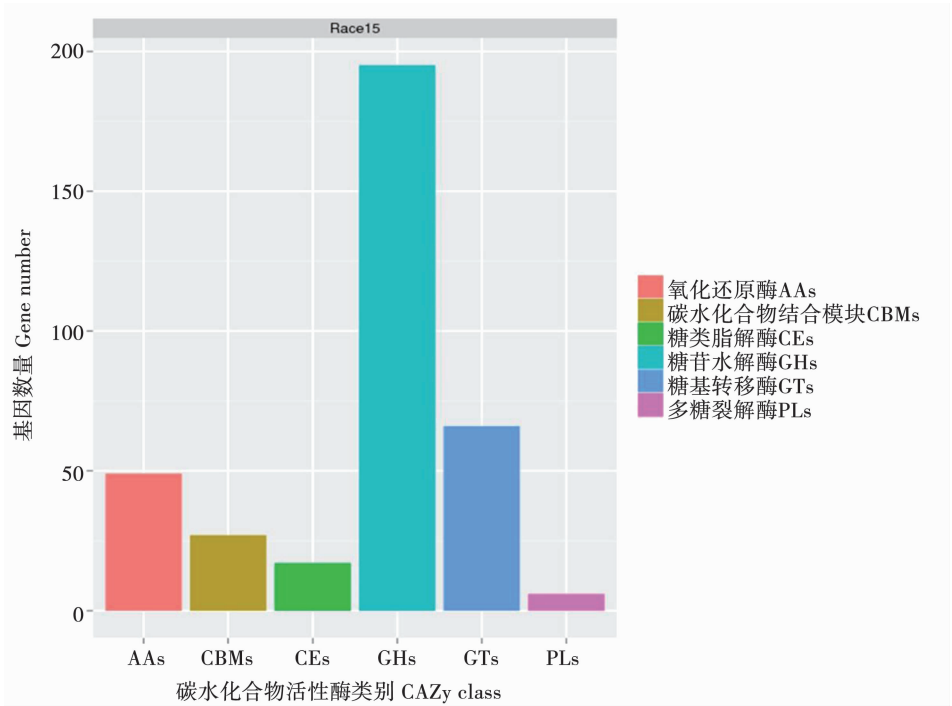


图 4 大豆灰斑病菌 Race 15 基因在 CAZy 数据库中的基因注释  
Fig. 4 The gene annotation in CAZy database of *Cercospora soja* Race 15

2. 4. 3 分泌蛋白和次生代谢物分析 真菌色素是一种与侵染有关的重要次生代谢物质,研究证明大豆灰斑病菌在氮饥饿及 cAMP 试验中都能分泌灰色素,说明色素与致病力有着密切关系<sup>[19]</sup>。如图 5 所示,共有 777 个基因预测为次生代谢物质相关基因,其中 16 个簇 229 个基因注释为 I 型聚酮合成酶 (Type I polyketide synthases, TIpks);1 个簇 3 个基因注释为嗜铁素/铁运载体 (Siderophore);5 个簇 36 个基因注释为萜 (Terpene);22 个簇 347 个基因注释为非核糖体肽合成酶 (Nrps);2 个簇 47 个基因注释为 TIpks-nrps。另外,8 个簇 115 个基因注释为其他。大多数植物病原真菌在与植物相互作用中分泌许多蛋白质和代谢物,这些分泌蛋白和代谢物在真菌穿透、定植和病斑形成不同感染阶段起着重要作用。共有 766 个基因预测为分泌蛋白。

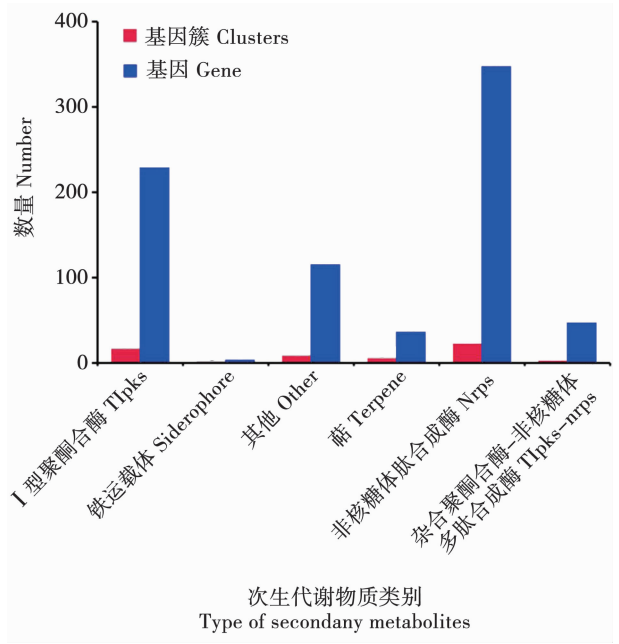


图 5 预测为次生代谢物质的大豆灰斑病菌 Race 15 基因  
Fig. 5 The gene predicted as secondary metabolite in *Cercospora soja* Race 15

3 讨论

本研究对菌株 Race 15 进行了全基因组测序, 组装的基因组序列为 40.12 Mb, N50 长度为 4.9 Mb, 共产生 601 794 个 PacBio 读数。通过分析 Race 15 测序结果、Race 1<sup>[19]</sup> (中国菌株)、FLS21<sup>[20]</sup> (美国菌株) 和 S9<sup>[21]</sup> (美国菌株) 的基因组测序结果, 发现 Race 15 的基因组大小、基因数目和基因总长度与 Race 1 的基因组大小相近, 而中国菌株 Race 1 和 Race 15 的基因组大小明显大于美国的 FLS21 和 S9 菌株, 这可能与这些中国菌株的测序精度或环境适应性有关。通常基因组越大, 它越有可能包含有关代谢相关基因和胁迫耐受性基因的遗传信息<sup>[48]</sup>。

Luo 等<sup>[19]</sup> 对 Race 1 基因组研究发现其富含羧基糖苷 GH109 家族酶 (glycoside hydroxylase GH109 family), 该基因家族编码 1 种  $\alpha$ -N-乙酰半乳糖胺酶 ( $\alpha$ NAGAL), 这种酶可以从结合蛋白上裂解 N-乙酰半乳糖胺<sup>[49]</sup>, 同时已有研究发现植物凝集素可以专门结合 N-乙酰半乳糖胺, 而植物凝集素是植物细胞壁的主要组成部分<sup>[50]</sup>。因此,  $\alpha$ NAGAL 可能与大豆凝集素竞争结合 N-乙酰半乳糖胺。大豆凝集素和其他植物凝集素可以通过结合真菌 (如青霉菌和曲霉菌) 的细胞壁成分来抑制菌丝生长和孢子萌发<sup>[51-52]</sup>。因此 Luo 等<sup>[19]</sup> 推测大豆灰斑病菌 Race 1 富含的 GH109 家族能够帮助克服大豆中凝集素介导的抗病性, 从而有益于病菌的侵染。但本研究没有在菌株 Race 15 的基因组序列中发现 GH109 家族酶, 而富含最多的是 GH3 家族酶, 该家族酶主要为细胞壁降解酶。植物细胞壁是植物防止病原菌入侵的重要屏障, 而侵染过程中病原菌产生的细胞壁降解酶是决定入侵成功与否的重要因子, 细胞壁降解酶不仅是病原菌主要致病因子, 而且也是寄主抗病反应的主要诱导因子, 其活性与病原菌的致病性、植物的抗病性、细胞壁降解酶种类、外界环境均有一定关系<sup>[53-54]</sup>, 同时强毒力菌株的产酶能力强于弱毒力菌株<sup>[55-56]</sup>。Race 15 基因组中 GH3 家族酶编码最多的为  $\beta$ -葡萄糖苷酶 ( $\beta$ -glucosidase), 该酶在病斑处具有显著活性, 并且与真菌致病性显著相关, 这种酶被证实能够分解寄主细胞壁的纤维素, 从而有助于真菌的侵染<sup>[57]</sup>。王鹏程等<sup>[58]</sup> 研究发现枣黑斑病菌致病过程中起主要作用的细胞壁降解酶是  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 其在含外源诱导物的培养基中和侵染后的枣果体内都具有较强活性。 $\beta$ -葡萄糖苷酶在不同发病部位活性均明显高于其他细胞壁降

解酶, 通过对比不同部位的细胞壁降解酶活性, 发现病健交界处  $\beta$ -葡萄糖苷酶的活性明显高于其他部位。田呈明等<sup>[59]</sup> 发现杨栅锈菌与寄主互作过程中,  $\beta$ -葡萄糖苷酶也在杨栅锈菌入侵中发挥着重要作用。

在 Race 1 中鉴定出 31 个碳水化合物结合模块 (CBM) 蛋白, 其中鉴定出 1 个 CBM1 蛋白<sup>[19]</sup>, 而本研究鉴定出 23 个 CBM 蛋白, 其中有 4 个 CBM1 蛋白。不论是 Race 1 还是 Race 15 菌株, 其 CBM1 含量均显著低于其他植物病原真菌<sup>[60]</sup>。CBM1 主要来源于真菌, 作用是参与细胞壁水解, CBM1 将酶的催化区域锚定在不溶的纤维素上<sup>[61]</sup>, 使其能够附着在植物细胞壁上并可能提高酶的分解效率。真菌中许多糖苷水解酶都属于 CBM1。CBM1 不仅增加纤维素酶在不溶性纤维素上的聚集浓度, 还能提高纤维素酶的催化活性<sup>[62]</sup>。Song 等<sup>[63]</sup> 对两种真菌纤维素分解酶的比较蛋白质组学研究发现, CBM1 不仅能将酶锚定在不溶性纤维素上, 也能将酶锚定在木质素上。而大豆灰斑病菌基因组中缺乏 CBM1 可能是导致其侵染过程缓慢的原因之一。

大豆灰斑病菌 Race 15 基因组编码了 22 个 NRPS、16 个 PKS、5 个 terpene 和 2 个 Tlps-nrps, 与大豆灰斑病 Race 1 菌株基本相同<sup>[19]</sup>。基因灭活试验表明, 这些基因参与镰孢菌中伊快霉素 (Equisetin) 和镰刀菌毒素 (Fusarin) 的生物合成<sup>[64-65]</sup>。但 Luo 等<sup>[19]</sup> 通过对次生代谢产物生物合成基因的注释发现, 大豆灰斑病菌 Race 1 菌株缺乏杂合 PKS-NRPS 酶、PKS 样蛋白和二甲基烯丙基色氨酸合酶, 而研究表明 Race 15 却含有杂合 PKS-NRPS 酶, 虽然数量也不是很多。Bergmann 等<sup>[66]</sup> 对构巢曲霉菌 (*Aspergillus nidulans*) 的杂合 PKS-NRPS 基因的研究表明, 杂合 PKS-NRPS 参与两个新细胞毒素代谢, 它们属于吡啶酮类代谢物。通过对稻瘟病菌 PKS-NRPS 编码基因 *ace1*<sup>[67]</sup>, 该基因只能在侵染水稻植株叶片时表达, 推测 PKS-NRPS 基因与另一个 PKS 基因共同出现在同一个基因簇中, 敲除该基因导致水稻抗性品种无法识别稻瘟病菌的入侵。

Luo 等<sup>[19]</sup> 发现大豆灰斑病菌 Race 1 基因组含有大量次生代谢产物的基因簇, 将基因簇中 8 个参与尾孢菌毒素生物合成的基因进行同源比对, 发现这些基因与烟草尾孢菌 (*Cercospora nicotianae*) 具有高度一致的氨基酸序列, 并且这些基因在 cAMP 和氮饥饿试验中均显著上调。次生代谢产物参与真

菌色素、毒素生物合成,从而推断大豆灰斑病菌很有可能产生尾孢菌毒素,然而用传统分离方法没有发现尾孢菌毒素,而本研究在 Race 15 基因组中也发现大量的次生代谢产物编码基因。

4 结 论

通过对大豆灰斑病菌 Race 15 菌株全基因组 *de novo*测序,获得该病菌基因组的全部遗传信息。发现了大量与毒力相关的致病基因,主要涉及细胞壁分解酶、真菌的形态构成和色素生物合成等,还发现灰斑病菌含有大量参与毒素生物合成的基因,说明灰斑病在侵染过程中也能够产生尾孢菌毒素。与已测序 Race 1 菌株相比,Race 15 菌株存在大量的细胞壁纤维素分解酶 $\beta$ -葡糖苷酶以及参与毒素合成的杂合 PKS-NRPS 酶。同时还发现两个菌株均没有 *CBM1* 基因表达,推测 CBM1 的缺失是灰斑病菌侵染过程缓慢的原因之一。

参考文献

[1] Dashiell K E, Akem C N. Yield losses in soybeans from frogeye leaf spot caused by *Cercospora sojina*[J]. Crop Protection, 1991, 10(6): 465-468.

[2] Boerma H R, Specht J E, Boerma H R, et al. Soybeans: Improvement, production and uses[M]. Madison: ASA, CSSA, and SSSA, 2004: 679-763.

[3] Athow K L, Probst A H. The inheritance of resistance to frogeye leaf spot of soybean[J]. Phytopathology, 1952, 42(12): 660-662.

[4] Athow K L, Probst A H, Kurtzman C P, et al. A newly identified physiological race of *Cercospora sojina* on soybean [J]. Phytopathology, 1962, 52: 712-714.

[5] Yorinori J T, Homechin M. Races of *Cercospora sojina* in Parajme Brazil [C]//3rd. Munich: International Congress of Plant Pathology, 1978: 16-23.

[6] 黄桂潮,霍虹,张再兴,等. 大豆灰斑病菌(*Cercospora Sojina* Hara)生理小种鉴定结果初报[J]. 大豆科学, 1984, 3(3): 231-235. (Huang G C, Huo H, Zhang Z X, et al. Preliminary report on the identification results of physiological races of *Cercospora Sojina* Hara[J]. Soybean Science, 1984, 3(3): 231-235.)

[7] 霍虹,马淑梅,卢官仲. 黑龙江省大豆灰斑病菌(*Cercospora sojina* Hara)生理小种的研究[J]. 大豆科学, 1988, 7(4): 315-320. (Huo H, Ma S M, Lu G Z. Study on the physiological race of *Cercospora sojina* Hara in Heilongjiang Province [J]. Soybean Science, 1988, 7(4): 315-320.)

[8] 丁俊杰,文景芝,胡国华. 黑龙江省大豆灰斑病生理小种监测及主栽品种抗性分析[J]. 大豆科学, 2009, 28(1): 178-180. (Ding J J, Wen J Z, Hu G H. Physiological race monitoring of soybean gray spot disease in Heilongjiang Province and resistance analysis of main varieties[J]. Soybean Science, 2009,

28(1): 178-180.)

[9] 刘洋大川,潘春清,孙洪利. 2008—2009 年黑龙江省大豆灰斑病菌生理小种的监测[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(11): 10-16. (Liu Y D C, Pan C Q, Sun H L. Surveillance of the physiological races of gray leaf spot pathogen of soybean in Heilongjiang Province from 2008 to 2009[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2010, 41(11): 10-16.)

[10] 曹越平,李海英,刘学敏. 等. 大豆灰斑病菌(*Cercospora sojina* Hara)及其对寄主作用的研究[J]. 植物病理学报, 2003, 32(2): 116-120. (Chao Y P, Li H Y, Liu X M, et al. *Cercospora sojina* Hara and its effect on the host [J]. Chinese Journal of Phytopathology, 2003, 32(2): 116-120.)

[11] 姜翠兰,丁俊杰,文景芝,等. 大豆对灰斑病菌 15 号小种的抗病基因定位及标记检测[J]. 植物保护学报, 2011, 38(2): 116-120. (Jiang C L, Ding J J, Wen J Z, et al. Identification and mapping of the *Cercospora sojina* race 15 resistance gene in soybean[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2011, 33(1): 57-61.)

[12] 顾鑫,丁俊杰,杨晓贺,等. 2008—2009 年黑龙江省大豆灰斑病生理小种的监测[J]. 大豆科学, 2010, 29(3): 540-542. (Gu X, Ding J J, Yang X H, et al. Surveillance of the physiological races of soybean gray spot disease in Heilongjiang Province from 2008 to 2009 [J]. Soybean Science, 2010, 29(3): 540-542.)

[13] 马淑梅. 2006—2010 年黑龙江省大豆灰斑病菌生理小种监测及部分主栽品种抗性鉴定[J]. 大豆科学, 2011, 30(3): 450-454. (Ma S M. Physiological race monitoring of gray leaf spot pathogen of soybean in Heilongjiang Province from 2006 to 2010 and identification of resistance of some main cultivated varieties [J]. Soybean Science, 2011, 30(3): 450-454.)

[14] 丁俊杰,顾鑫,杨晓贺,等. 黑龙江省大豆灰斑病菌生理小种及遗传关系分析[J]. 中国农业科学, 2012, 45(21): 4377-4387. (Ding J J, Gu X, Yang X X, et al. Analysis of the physiological race and genetic relationship of soybean gray leaf spot in Heilongjiang Province [J]. Chinese Agricultural Sciences, 2012, 45(21): 4377-4387.)

[15] 刘学敏,李利军,惠东威,等. 大豆灰斑病菌 DNA 指纹图谱初步分析[J]. 遗传学报, 1998(4): 362-366. (Liu X M, Li L J, Hui D W, et al. Preliminary analysis of DNA fingerprinting of soybean gray leaf spot pathogen[J]. Acta Genetics, 1998(4): 362-366.)

[16] Zeng F, Wang C, Zhang G R. Draft genome sequence of *Cercospora sojina* isolate S9, a fungus causing frogeye leaf spot (FLS) disease of soybean[J]. Genomics Data, 2017(12): 79-80.

[17] 刘林,李成云,杨静,等. 稻瘟病菌 ABC 转运蛋白基因中 SSR 的分布及其功能预测[J]. 植物病理学报, 2011, 41(4): 371-378. (Liu L, Li C Y, Yang J, et al. The distribution and function prediction of SSR in the ABC transporter gene of *Magnaporthe grisea*[J]. Acta Phytopathology, 2011, 41(4): 371-378.)

[18] Daub M E, Ehrenschaft M. The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: Contributions to plant disease and fundamental biology [J]. Annual Review of Phytopathology, 2000, 38: 461-490.

- [19] Luo X, Cao J, Huang J, et al. Genome sequencing and comparative genomics reveal the potential pathogenic mechanism of *Cercospora sojina* Hara on soybean[J]. DNA Research, 2017, 25(1): 25-37.
- [20] Shrestha S K, Cochran A, Mengistu A, et al. Genetic diversity, QoI fungicide resistance, and mating type distribution of *Cercospora sojina*—Implications for the disease dynamics of frogeye leaf spot on soybean[J]. Plos One, 2017, 12(5): e0177220.
- [21] 张伟. 捕食性真菌 *Duddingtonia flagrans* 全基因组测序及基于转录组分析的捕食相关基因研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2017: 17. (Zhang W. Predatory fungus *Duddingtonia flagrans* whole genome sequencing and predation-related genes based on transcriptome analysis [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2017: 17.)
- [22] 李焕宇, 付婷婷, 张云, 等. 5种方法提取真菌基因组DNA作为PCR模板效果的比较[J]. 中国农学通报, 2017, 33(16): 28-35. (Li H Y, Fu T T, Zhang Y, et al. Comparison of the effects of five methods for extracting fungal genomic DNA as PCR templates[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2017, 33(16): 28-35.)
- [23] 贾乐东. 甘蓝型油菜隐性杂合两型系SLAB育性候选基因的筛选鉴定[D]. 重庆: 西南大学, 2017: 32. (Jia L D. Screening and identification of SLAB fertility candidate genes in recessive heterozygous two-type lines of *Brassica napus* [D]. Chongqing: Southwest University, 2017: 32.)
- [24] 王义华. 葡萄属叶绿体基因组分析及其系统发育研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018: 15. (Wang Y H. Chloroplast genome analysis of *Vitis* and its phylogeny [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018: 15.)
- [25] 白健. 应用新一代基因组学技术的复杂疾病基因定位研究[D]. 北京: 中国科学院北京基因组研究所, 2013: 22-23. (Bai J. Research on gene mapping of complex diseases using new generation genomics technology [D]. Beijing: Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, 2013: 22-23.)
- [26] 张娜. 一株贫营养细菌的生物学特性及其对贫瘠土壤的改良作用[D]. 银川: 宁夏大学, 2017: 20. (Zhang N. The biological characteristics of a poor nutrient bacterium and its improvement on poor soil [J]. Yinchuan: Ningxia University, 2017: 20.)
- [27] 谢海坤, 焦健, 樊秀彩, 等. 基于高通量测序组装“赤霞珠”叶绿体基因组及其特征分析[J]. 中国农业科学, 2017, 50(9): 1655-1665. (Xie H K, Jiao J, Fan X C, et al. Assembling and characteristic analysis of the complete chloroplast genome of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon from high-throughput sequencing data [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2017, 50(9): 1655-1665.)
- [28] 张继垒. 犬埃立克体(*Ehrlichia canis*)分离鉴定、基因组学及动物感染模型的建立[D]. 扬州: 扬州大学, 2018: 110. (Zhang J L. *Ehrlichia canis* isolation and identification, genomics and animal infection model establishment [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2018: 110.)
- [29] Stanke M, Diekhans M, Baertsch R, et al. Using native and syntenically mapped cDNA alignments to improve de novo gene finding[J]. Bioinformatics, 2008, 24(5): 637-644.
- [30] Saha S, Bridges S, Magbanua Z V, et al. Empirical comparison of abinitio repeat finding programs[J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(7): 2284-2294.
- [31] Benson G. Tandem repeats finder: A program to analyze DNA sequences[J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(2): 573-580.
- [32] Lowe T M, Eddy S R. tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(5): 955-964.
- [33] Lagesen K, Hallin P, Rødland E A, et al. RNAmmer: Consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(9): 3100-3108.
- [34] Gardner P P, Daub J, Tate J G, et al. Rfam: Updates to the RNA families database[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(S1): 136-140.
- [35] Nawrocki E P, Kolbe D L, Eddy S R. Infernal 1.0: Inference of RNA alignments[J]. Bioinformatics, 2009, 25(10): 1335-1337.
- [36] Ashburner M, Ball C A, Blake J A, et al. Gene ontology: Tool for the unification of biology[J]. Nature Genetics, 2000, 25(1): 25-29.
- [37] Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, et al. The KEGG resource for deciphering the genome[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(S1): D277-D280.
- [38] Kanehisa M, Goto S, Hattori M, et al. From genomics to chemical genomics: New developments in KEGG [J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(suppl 1): D354-D357.
- [39] Li W, Jaroszewski L, Godzik A. Tolerating some redundancy significantly speeds up clustering of large protein databases [J]. Bioinformatics, 2002, 18(1): 77-82.
- [40] Milton S J, Vamsee S R, Dorjee G T, et al. The transporter classification database[J]. Nucleic Acids Research, 2014. doi: 10.1093/nar/gkt1097.
- [41] Amos B, Rolf A. The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000 [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(1): 45-48.
- [42] Cantarel B L, Coutinho P M, Rancurel C, et al. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(S1): D233-D238.
- [43] Kretschmer M, Reiner E, Hu G, et al. Defects in phosphate acquisition and storage influence virulence of *Cryptococcus neoformans* [J]. Infection and Immunity, 2014, 82(7): 2697-2712.
- [44] Tseng M N, Chung P C, Tzean S S. Enhancing the stress tolerance and virulence of an entomopathogen by metabolic engineering of dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis genes [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(13): 4508-4519.
- [45] Jacobson E S. Pathogenic roles for fungal melanins[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2000, 13: 708-717.

[46] Nosanchuk J D, Casadevall A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis[J]. Cellular Microbiology, 2010, 5(4): 203-223.

[47] Nosanchuk J D, Casadevall A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds[J]. Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 2006, 50(11): 3519-3528.

[48] Xue M, Yang J, Li Z, et al. Comparative analysis of the genomes of two field isolates of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* [J]. PLoS Genet, 2012, 8(8): e1002869.

[49] Liu Q P, Sulzenbacher G, Yuan H, et al. Bacterial glycosidases for the production of universal red blood cells [J]. Nature Biotechnology, 2007, 25(4): 454-464.

[50] Benhamou N, Ouellette G B. Ultrastructural localization of glycoconjugates in the fungus *Ascochyta blight*, the Sclerotinia canker agent of conifers, using lectin-gold complexes[J]. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1986, 34(7):855-867.

[51] Barkai-Golan R, Mirelman D, Sharon N. Studies on growth inhibition by lectins of *Penicillium* and *Aspergillus* [J]. Archives of Microbiology, 1978, 116(2): 119-121.

[52] Guo P, Wang Y, Zhou X, et al. Expression of soybean lectin in transgenic tobacco results in enhanced resistance to pathogens and pests[J]. Plant Science, 2013, 211(3): 17-22.

[53] 董章勇, 王振中. 植物病原真菌细胞壁降解酶的研究进展 [J]. 湖北农业科学, 2012, 51(21): 4697-4700. (Dong Z Y, Wang Z Z. Research progress on cell wall degrading enzymes of plant pathogenic fungi [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2012, 51(21): 4697-4700. )

[54] 陈夕军, 张红, 徐敬友, 等. 水稻纹枯病菌胞壁降解酶的产生及致病作用[J]. 江苏农业学报, 2006,22(1): 24-28. (Chen X J, Zhang H, Xue J Y, et al. Cell wall degrading enzymes produced by *Rhizoctonia solani* and their pathogenicity to rice plants [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2006, 22(1): 24-28. )

[55] 赵艳琴, 吴元华, 伏颖, 等. 烟草靶斑病菌(*Rhizoctonia solani*) 细胞壁降解酶活性分析及其致病作用[J]. 烟草科技, 2014(11): 84-88. (Zhao Y Q, Wu Y H, Fu Y, et al. Activity pathogenic effect of cell wall degrading enzyme in tobacco target spot pathogen *Rhizoctonia solani* [J]. Tobacco Science & Technology, 2014(11): 84-88. )

[56] 李庆亮, 李捷, 李夏鸣, 等. 细胞壁降解酶在苹果霉心病菌致病过程中的作用研究[J]. 中国农学通报, 2015, 31(31): 90-95. (Li Q L, Li J, Li X M, et al. The role of cell wall degradation enzymes in the pathogenic processes of apple mouldy core caused by *Alternaria alternata* and *Trichothecium roseum* [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2015, 31(31): 90-95. )

[57] Sasaki I, Nagayama H.  $\beta$ -Glucosidase from *Botrytis cinerea*: Its relation to the pathogenicity of this fungus [J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 1994, 58(4): 616-620.

[58] 王鹏程, 郝海婷, 王兰, 等. 枣黑斑病菌细胞壁降解酶活性测定及致病性分析 [J]. 果树学报, 2019, 36(7): 903-910. (Wang P C, Hao H T, Wang L, et al. Analysis of cell wall degrading enzymes from black spot pathogen and its pathogenicity [J]. Journal of Fruit Science, 2019, 36(7): 903-910. )

[59] 田呈明, 赵鹏, 曹支敏. 细胞壁降解酶在落叶松-杨栅锈菌与寄主互作过程中的作用 [J]. 林业科学, 2008, 44(5): 79-83. (Tian C M, Zhao P, Chao Z M. Role of cell wall-degrading enzymes in interaction of poplar and *Melampsora larici-populina* [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2008, 44(5): 79-83. )

[60] Boraston A, Bolam D, Gilbert H, et al. Carbohydrate-binding modules: Fine-tuning polysaccharide recognition [J]. Biochemical Journal, 2004, 382(3): 769.

[61] Receveur V, Czjzek M, Schulein M, et al. Dimension, shape, and conformational flexibility of a two domain fungal cellulase in solution probed by small angle X-ray scattering [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(43): 40887-40892.

[62] Varnai A, Siika-Aho M, Viikari L. Carbohydrate-binding modules (CBMs) revisited: Reduced amount of water counterbalances the need for CBMs [J]. Biotechnol Biofuels, 2013, 6(1): 30.

[63] Song W, Han X, Qian Y, et al. Proteomic analysis of the biomass hydrolytic potentials of *Penicillium oxalicum* lignocellulolytic enzyme system [J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9(1): 68.

[64] Sims J W, Fillmore J P, Warner D D, et al. Equisetin biosynthesis in *Fusarium heterosporum* [J]. Chemical Communications, 2005, 18(2): 186.

[65] Song Z, Cox R J, Lazarus C M, et al. Fusarin C biosynthesis in *Fusarium moniliforme* and *Fusarium venenatum* [J]. Combining Chemistry and Biology, 2004, 5(9): 1196-1203.

[66] Bergmann S, Schumann J, Scherlach K, et al. Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans* [J]. Nature Chemical Biology, 2007, 3(4): 213-217.

[67] Bohnert H U. A putative polyketide synthase/peptide synthetase from *Magnaporthe grisea* signals pathogen attack to resistant rice [J]. Plant Cell, 16(9): 2499-2513.