

# 一株重寄生枝孢菌的基因组测序及重寄生机制分析

梅超, 范世昌, 艾小满, 李靖\*

西南林业大学生命科学学院, 云南 昆明 650224

梅超, 范世昌, 艾小满, 李靖. 一株重寄生枝孢菌的基因组测序及重寄生机制分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3310-3323

Mei Chao, Fan Shichang, Ai Xiaoman, Li Jing. Genome sequencing and mycoparasitism mechanism of a *Cladosporium* sp. strain[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3310-3323

**摘要:**【背景】枝孢菌 SYC63 是一株具有重寄生作用和抗菌活性的潜在生防菌株, 目前尚无研究报道该菌株的全基因组序列, 因此限制了其开发与利用。对该菌株进行基因组测序与分析, 将进一步了解其重寄生的分子机制, 为在生物防治上的应用奠定研究基础。【目的】解析枝孢菌 SYC63 基因组序列信息, 初步探究该菌的重寄生作用机制。【方法】利用二代高通量测序平台对枝孢菌 SYC63 进行全基因组测序, 运用相关软件对其测序数据进行基因组组装、基因功能注释、预测次级代谢产物合成基因簇并分析重寄生相关的碳水化合物酶类基因等。【结果】基因组组装后共得到 17 个 contigs, 总长度为 31 912 211 bp, GC 含量为 52.80%, 预测到 12 327 个编码基因。其中, 4 029、949 和 6 595 个基因分别能在 KEGG、COG 和 GO 数据库中被注释到, 同时还预测到 25 个次级代谢产物合成基因簇。对重寄生机制相关的碳水化合物酶类进行分析并与重寄生菌株(拟盘多毛孢菌、木霉及盾壳霉)比较, 发现该菌具有较多的糖苷水解酶和糖脂酶基因, 而且细胞壁降解酶类基因经锈菌孢子壁处理后在转录组测序中显著上调表达, 初步分析了该菌与重寄生木霉在分子水平上的差异及不同于木霉真菌的寄生机制。【结论】从基因组层面解析了枝孢菌的重寄生机制, 为深入探究其寄生机制及次生代谢产物的挖掘提供参考信息, 对后续开发与利用具有重要意义。

**关键词:** 重寄生; 枝孢菌; 全基因组; 基因功能注释; 次级代谢

基金项目: 云南省农业基础研究联合专项面上项目(2017FG001-043); 中央引领地方科技发展专项资金(219001); 云南省教育厅科学研究基金(2021Y270)

**Supported by:** Agricultural Basic Research Joint Special Area Project of Yunnan Province (2017FG001-043); Special Funds for Local Scientific and Technological Development Guided by the Central Government of China (219001); Scientific Research Fund of Yunnan Provincial Department of Education (2021Y270)

\*Corresponding author: E-mail: lijingcas@163.com

Received: 2021-12-01; Accepted: 2022-02-08; Published online: 2022-03-13

# Genome sequencing and mycoparasitism mechanism of a *Cladosporium* sp. strain

MEI Chao, FAN Shichang, AI Xiaoman, LI Jing\*

College of Life Sciences, Southwest Forestry University, Kunming 650224, Yunnan, China

**Abstract:** [Background] *Cladosporium* sp. SYC63 is a potential biocontrol strain with mycoparasitism and antimicrobial activity. Little is known about the whole genome sequence of this strain, which limits its development and utilization. Genome sequencing and analysis will help us understand the mycoparasitism mechanism of this strain. [Objective] The aim is to analyze the genome sequence of SYC63 and preliminarily explore the mechanism of its mycoparasitism. [Methods] The whole genome of SYC63 was sequenced on the high-throughput sequencing platform, and the genomics tools were employed for sequence assembly, gene prediction and functional annotation, prediction of secondary metabolite synthesis gene clusters, and statistical analysis of carbohydrate-active enzyme genes related to mycoparasitism. [Results] A total of 17 contigs were obtained after genome assembly, with the total length of 31 912 211 bp, the GC content of 52.80%, and 12 327 coding genes. Among them, 4 029, 949 and 6 595 genes were annotated in KEGG, COG and GO databases, respectively. At the same time, 25 gene clusters for secondary metabolite synthesis were predicted. The strain SYC63 had more glycoside hydrolase and glycolipase genes than other mycoparasitic strains (*Pestalotiopsis* sp., *Trichoderma* sp. and *Coniothyrium minitans*). After treatment of the spore wall with rust fungus, the expression of cell wall-degrading enzyme genes was significantly up-regulated, which revealed that the mycoparasitism mechanism of SYC63 was different from that of *Trichoderma*. [Conclusion] We explored the mycoparasitism mechanism of *Cladosporium* at the genome level, providing reference information for further studying the mycoparasitism mechanism and mining the secondary metabolites, which is of great significance for the subsequent development and utilization of *Cladosporium*.

**Keywords:** mycoparasitism; *Cladosporium* sp.; whole genome; gene function annotation; secondary metabolism

重寄生(mycoparasitism)指的是在自然界中,一种真菌以另一种真菌(主要是病原菌)为营养源正常生长、代谢和繁殖的现象<sup>[1]</sup>。在植物病害系统中,重寄生菌的存在减少了寄主植物受到的伤害,寄主植物—病原菌—重寄生菌通过营养关系形成一条食物链,从这3个营养级入手,利用重寄生菌控制病原菌,是农林生物保护可持续发展的重要手段<sup>[2-3]</sup>。

目前,重寄生作用机制的研究主要包括酶和毒素两方面。酶指的是重寄生菌可产生寄主

真菌细胞壁降解酶,细胞壁的降解导致细胞渗透压失衡,从而造成细胞死亡,因此,扰乱细胞壁合成是一种潜在的抗真菌手段<sup>[4-5]</sup>。对广谱性生防真菌木霉菌基因组的研究表明,碳水化合物酶类(carbohydrate-active enzyme, CAZyme)中真菌细胞壁降解酶(fungal cell wall degrading enzyme, FCWDE)类相关基因的数目显著增加,其在重寄生作用过程中分泌一系列细胞壁降解酶(如内切 $\beta$ -1,6葡聚糖酶、内切/外切 $\beta$ -1,3葡聚糖酶和几丁质酶等)<sup>[6]</sup>。毒素是指重寄生菌与

寄主菌相互作用产生抗菌次级代谢物,能够杀死寄主真菌,毒素作用后的病原菌生长会受到抑制,但其细胞壁不会受到破坏,而是出现细胞变形,内含物浓缩溢出使细胞死亡<sup>[3,7-8]</sup>。

枝孢属(*Cladosporium*)真菌通常发生在与锈病有关的叶面真菌区系中,其中多个种是锈菌的寄生菌,已被发现能直接影响锈菌孢子的形成和散布或穿透锈菌孢子<sup>[9]</sup>。在锈病寄生菌的分离过程中,最常见的是曲霉属(*Aspergillus*)、短梗霉属(*Aureobasidium*)、青霉属(*Penicillium*)和枝孢属真菌,特别是枝孢属和锈生座孢属(*Tuberculina*)的真菌已经克服寄主障碍,这有利于生防菌的开发和利用<sup>[10]</sup>。枝孢菌作为生防菌时,在对蚕豆灰霉病菌(*Botrytis fabae*)、辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)和水稻文氏菌(*Venturia oryzae*)等病原菌的研究中已有报道<sup>[11]</sup>。

本研究对课题组分离获得的一株重寄生枝孢菌 SYC63 利用二代高通量测序平台进行全基因组测序,对基因组数据进行基因预测和功能注释,同时与重寄生拟盘多毛孢菌、木霉及盾壳霉的基因组信息进行 CAZyme 比较,结合在锈孢子细胞壁诱导后的转录组数据进行分析,以期对枝孢菌的重寄生机制阐明提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

重寄生枝孢菌 SYC63 经鉴定为 *Cladosporium cladosporioides*, 分离自感石楠叶锈病的锈孢子堆,现保存于西南林业大学生命科学学院生化教研室。

### 1.2 菌株培养与全基因组测序分析

取冻存的枝孢菌 SYC63 使用 PDA 培养基<sup>[12]</sup>活化 2 代后,第 3 代接种在 PSKA 培养基<sup>[12]</sup>中,

26 °C 恒温培养 5 d,待菌丝体长出后使用无菌手术刀刮取长势较好的菌丝体至灭菌离心管,液氮速冻送武汉贝纳生物公司利用高通量测序平台 Illumina NovaSeq 进行全基因组测序,并对基因组数据进行功能注释及分析(Nr、COG、KEGG、GO 及毒力因子等)。获得的全基因组序列信息已上传至 NCBI,获得登录号为 GCA\_022457075.1。

### 1.3 重寄生机制研究

利用 dbCAN 在线工具(<https://ccb.unl.edu/dbCAN2/blast.php>)对枝孢菌 SYC63 进行 CAZyme 预测,并将确定为 CAZyme 的基因统计到植物细胞壁降解酶(plant cell wall degrading enzyme, PCWDE)及 FCWDE 两大类别中<sup>[6,13]</sup>。再将其与重寄生拟盘多毛孢菌(*Pestalotiopsis* sp. cr013, cr013、*Pestalotiopsis* sp. PG52, PG52)、木霉(*Trichoderma harzianum* CBS 226.95, Triha1、*Trichoderma atroviride*, Triat2、*Trichoderma virens* Gv29-8, Trivi2)及盾壳霉(*Coniothyrium minitans* ZS-1, CMZSB)基因组编码的 CAZyme 进行比较,将有助于理解枝孢菌 SYC63 的重寄生机制。其次,运用 antiSMASH 在线网站对枝孢菌 SYC63 中次级代谢产物合成基因簇进行预测,并利用 NCBI 的 Conserved Domain Database 进行基因簇核心基因结构域分析<sup>[14]</sup>,可为其抗菌次生代谢产物的挖掘与开发奠定理论基础。

参照周航等<sup>[15]</sup>锈菌孢子壁诱导的方法,利用石楠叶锈病菌锈孢子壁对枝孢菌 SYC63 进行诱导处理,未经处理的作为对照,在 PSKA 培养基上培养 5 d 后收集样品送北京百迈客生物科技有限公司进行转录组测序,以期为更好地理解枝孢菌 SYC63 的重寄生机制提供理论支撑。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组 DNA 质量

枝孢菌 SYC63 基因组 DNA 经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 1), 可以看出基因组分子量大在 23 kb 左右, NanoDrop 检测核酸浓度为 141.4 ng/ $\mu$ L,  $A_{260}/A_{280}$  为 1.87, 说明提取的基因组 DNA 质量良好, 可用于进一步的建库分析。

### 2.2 基因组组装结果和基因组组分分析

对原始测序数据 raw data 经过滤后得到有

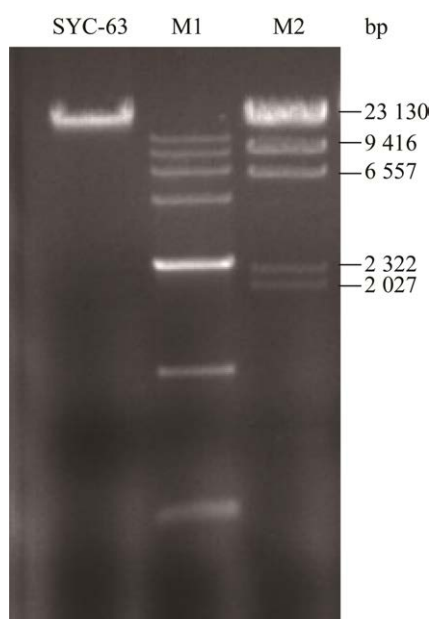


图 1 菌株 SYC63 DNA 电泳图

Figure 1 DNA electrophoresis image of strain SYC63. M1: 1.5 kb DNA Marker; M2:  $\lambda$ DNA/*Hind* III.

表 1 菌株 SYC63 与相近物种的基因组比较

Table 1 Genome comparison of strain SYC63 with similar species

菌株 Strain	大小 Size (Mb)	重叠群 Contigs	GC 含量 GC content (%)	N50 (bp)	GenBank 登录号 GenBank accession No.
SYC-63	31.91	17	52.80	1 981 920	GCA_022457075.1
<i>Cladosporium cladosporioides</i> TYU	33.23	67	52.30	1 992 403	GCA_002901145.1
<i>Cladosporium cladosporioides</i> F8_5S_3F	34.03	132	52.60	965 801	GCA_018408295.1
<i>Cladosporium cladosporioides</i> F8_5S_2F	34.03	130	52.60	1 102 510	GCA_018408335.1
<i>Cladosporium cladosporioides</i> F8_5S_4F	33.87	234	52.70	634 743	GCA_018408255.1

效测序数据, 结果共检测出 reads 的数量为 29 793 838 个, 碱基的数量是 4 469 075 700, Phred 数值大于 20 和 30 的碱基占总体碱基的百分比分别为 98.6% 和 95.6%, 其 GC 含量为 52.80%。经过组装分析基因组序列共得到 17 个 contigs, 总碱基长度达到 31 912 211 bp, 其中最短的序列长度为 65 287 bp, 最长的序列长度为 3 588 128 bp, N50 的长度为 1 981 920 bp, GC 含量为 52.80%。将枝孢菌 SYC63 基因组与已经完成基因组测序的 *C. cladosporioides* 物种进行比较, 基因组大小相近, GC 含量也与表 1 所列 4 种枝孢菌相近, 符合枝孢菌属基因组的基本特征。

基因组完成组装后, 对编码基因进行预测, 共预测到 12 327 个编码基因, 编码基因的平均长度为 1 610.51 bp, 非编码 RNA 包括 rRNA、tRNA、snRNA、sRNA 等多种已知功能的 RNA, 还包括一些未知功能的 RNA 是不编码蛋白质的 RNA, 该基因组共检测到 357 条 ncRNA, 包括 88 条 rRNA、232 条 tRNA 和其他非编码 RNA。基因组重复序列分析显示共出现 DNA 转座子 274 个, 简单重复序列 4 851 个及低复杂度序列 443 个。

### 2.3 基因功能注释

基因的功能注释是指根据已有数据库对基因功能和所参与的代谢途径进行标注, 包括结构域、蛋白质功能及所在的代谢通路等信息的

预测。为获得全面的基因功能信息进行了通用数据库的基因功能注释,其中 Nr 共注释了 11 030 个基因(占预测基因总数的 89.48%); KEGG 共注释 4 029 个基因、GO 共注释 6 595 个基因,还包括 Pfam、COG、毒力因子、PHI 等数据库的注释。

### 2.3.1 KEGG 代谢途径分析

KEGG 数据库是系统分析基因功能和基因组信息的数据库,根据它们参与的 KEGG 代谢通路进行分类,枝孢菌 SYC63 基因组 334 条代谢途径中富集了 4 029 个基因。如图 2 所示,其中涉及基因数目最多的代谢途径是碳水化合物代谢途径(ko00052) (593 个基因),其次是氨基酸代谢途径(ko00360) (512 个基因)和信号转导途径(ko04012) (414 个基因)。

### 2.3.2 COG 数据库注释

COG 数据库是基于细菌、藻类、真核生物的系统进化关系构建得到的数据库,利用 COG

数据库可以对基因进行直系同源分类。如图 3 所示,枝孢菌 SYC63 基因组共 949 个基因被注释到相应的功能,占预测基因总数的 53.5%。数目最多的功能类别分别是:碳水化合物的运输与代谢(G) 123 个,脂质的运输和代谢(I) 105 个,氨基酸运输和代谢(E) 104 个,以及一般功能预测(R) 94 个,表明该菌株具有丰富的碳水化合物代谢。

## 2.4 重寄生机制分析

### 2.4.1 CAZyme 分析

碳水化合物活性酶在细胞壁的识别与降解中发挥了重要作用,许多真菌的 CAZyme 和分泌的蛋白质直接参与了其与宿主间的相互作用。根据图 4 可以看出,与重寄生的其他菌株比较,重寄生枝孢菌 SYC63 基因组中有 652 个基因在 CAZyme 数据库匹配到相关酶,不考虑糖基结合模块相关酶编码基因数目,其编码 CAZyme

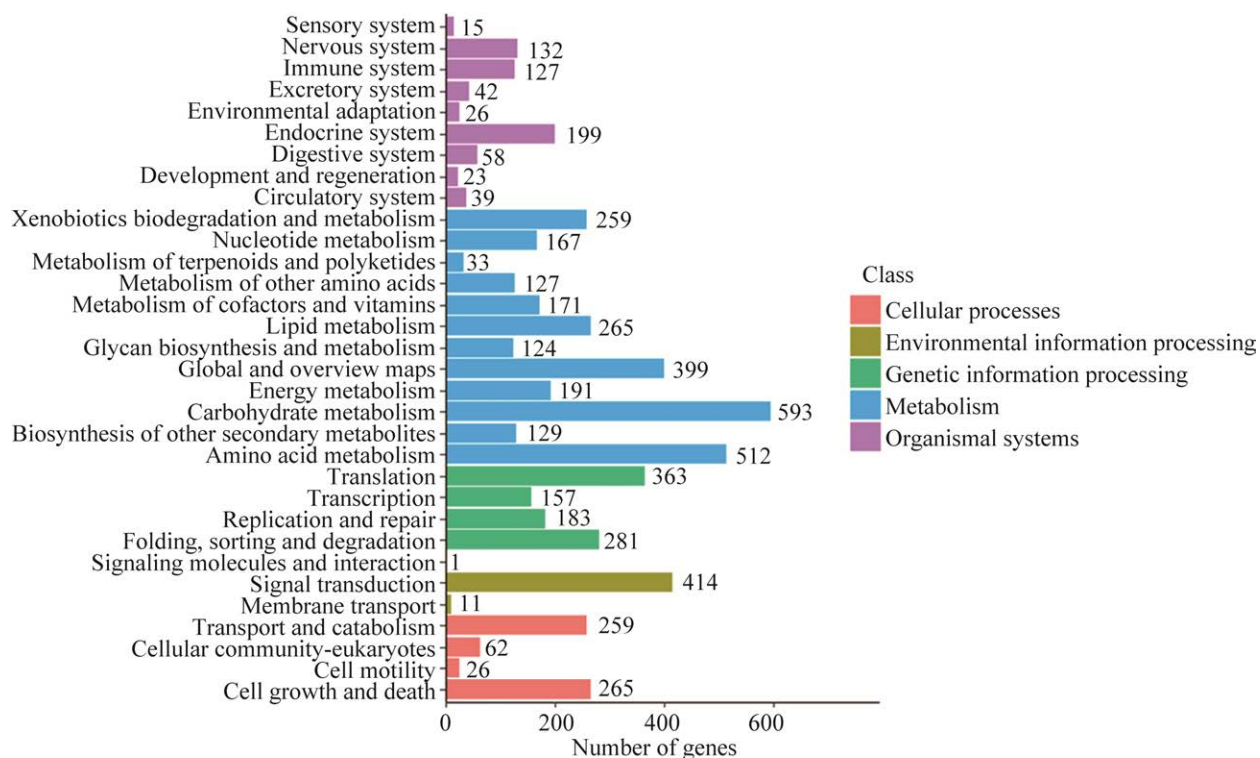


图 2 SYC63 基因组 KEGG 功能分析

Figure 2 KEGG functional analysis of SYC63 genome.

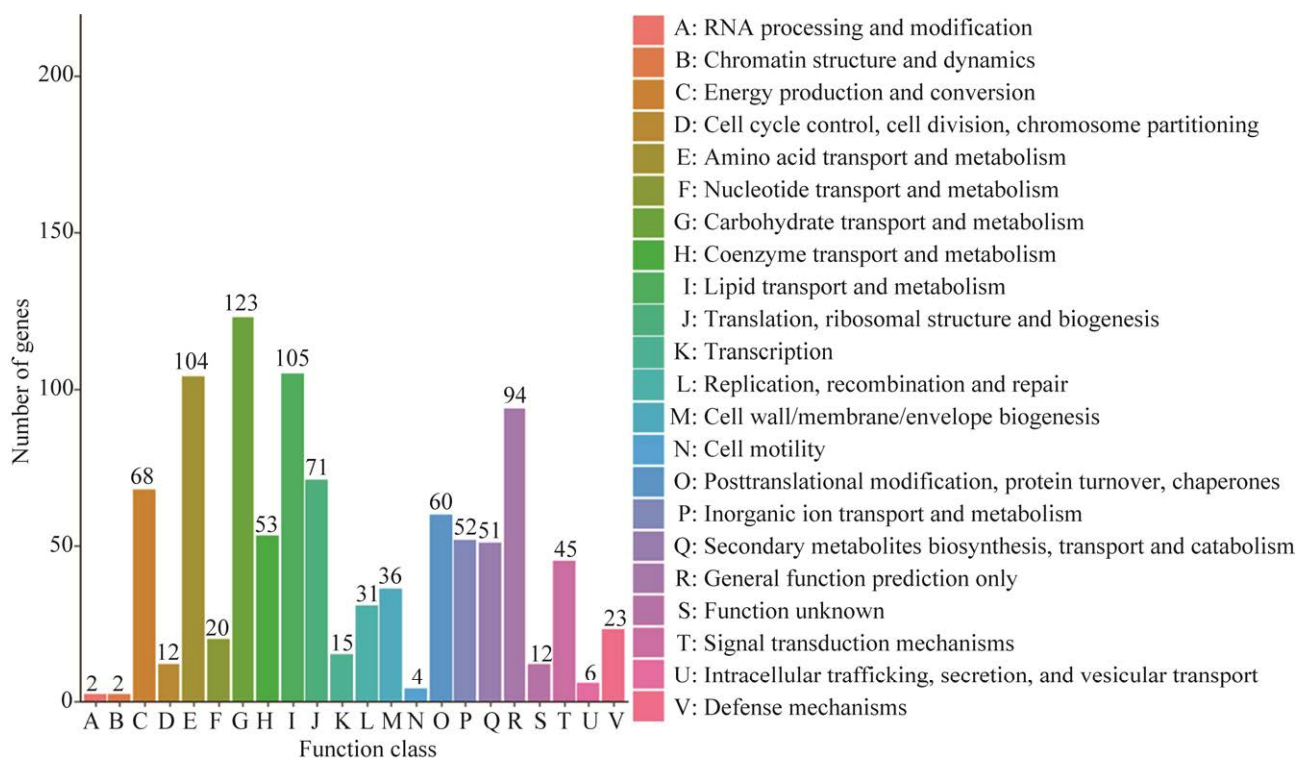


图3 SYC63 基因组 COG 功能分析

Figure 3 COG functional analysis of SYC63 genome.

数目仅次于 PG52 菌株(733 个), 远高于木霉(平均 380 个)及盾壳霉(430 个)所编码 CAZyme 数目。其次, 枝孢菌编码 117 个 PCWDE 相关基因少于重寄生拟盘多毛孢菌 PG52 菌株而多于木霉真菌所编码的基因数目; 编码的 80 个 FCWDE 相关基因与拟盘多毛孢菌 cr013 菌株及盾壳霉所编码基因数目的差异不显著, 明显少于木霉菌所编码的基因数目。由此推断, 虽然枝孢菌 SYC63 编码 CAZyme 的能力强于生防真菌木霉, 但其重寄生能力相对较弱, 在重寄生过程中水解病原菌细胞壁的能力可能低于木霉真菌, 而丰富的植物细胞壁降解酶类可能是与生活方式及生存环境相关。

枝孢菌编码细胞壁降解酶类的相关蛋白 GO 注释集中在内切葡聚糖  $\beta$ -1,3-葡糖苷酶活性(GO: 0052861)、水解酶活性(GO: 0004553)、

几丁质酶活性(GO: 0004568)等分子功能; 涉及细胞外区域(GO: 0005576)、膜的固定成分(GO: 0031225)及真菌细胞壁(GO: 0009277)等细胞组分; 以及细胞壁组织(GO: 0071555)、碳水化合物代谢过程(GO: 0005975)、真菌细胞壁生物生成(GO: 0009272)等生物过程(表 2)。

在枝孢菌 SYC63 编码的 80 个 FCWDE 基因中, 经锈菌孢子壁处理后, 全部被检测到基因表达, 其中鉴定到 25 个差异表达(将差异倍数 $\geq 2$  且错误发现率 $< 0.01$  作为筛选标准)基因(differentially expressed gene, DEG), 有 17 个基因显著上调表达(图 5A), 其表达量都是未经处理的 2 倍及以上, 内切- $\beta$ -1,3 葡聚糖酶基因(g2068、g2679)表达量是未处理的 5 倍,  $\alpha$ -葡萄糖苷酶基因(g3372)更是达到了 11 倍。其次, 在枝孢菌 SYC63 基因组编码的 117 个 PCWDE 基

因中,检测到 29 个 DEG, 其中显著上调表达的基因有 17 个(图 5B), 表明除真菌细胞壁降解酶类外,功能被鉴定为植物细胞壁降解酶类的基因也可能参与了枝孢菌 SYC63 的重寄生过程。

#### 2.4.2 次生代谢产物合成基因簇预测分析结果

次级代谢产物是具有重要生物活性的小分子物质(毒素、激素及抗生素等)。通过 antiSMASH 预测枝孢菌 SYC63 基因组共得到 25 个基因簇(表 3), 其中, 编码聚酮合酶(polyketide synthase, PKS)和非核糖体多肽合成酶(non-ribosomal peptide synthase, NRPS)的基因簇有 20 个, 占总基因簇的 80%。其中有 4 个 T1PKS, 10 个 NRPS-like, 5 个 NRPS, 4 个参与萜烯(terpene)合成, betalactone 和 T3PKS 各 1 个。

菌株 SYC63 基因组中 I 型 PKS 的 Cluster 19、Cluster 20 和 Cluster 25 分别与 4-epi-15-epi-brefeldin A、cercosporin 及黑色素(melanin)合成基因簇具有相似性, 相似性分别为 20%、31%和 100%。进一步分析表明 PKS 基因簇在结构上比较保守(图 6A), 含有聚酮合酶基本结构域(KS、AT 和 ACP)。值得关注的是, 经锈菌孢子壁处理后 NRPS 和 T1PKS-4 (Cluster 25)基因簇的核心基因表达显著上调(图 6B), 并且 NRPS-1、T1PKS-4 核心基因表达量是未经处理的 4 倍, 表明 NRPS-1、T1PKS-4 基因簇次级代谢物的产生可能与枝孢菌 SYC63 的重寄生过程有关, 值得对其进行具体的基因簇挖掘与产物合成研究。

#### 2.4.3 毒力因子分析

将枝孢菌 SYC63 预测得到的蛋白序列与毒力因子数据库进行比对, 分析菌株 SYC63 中存在的毒力相关基因表明, 枝孢菌 SYC63 含有 28 种毒力因子共 41 个基因, 大多是蛋白酶相关的基因。其中, 有 10 个金属蛋白酶、4 个天冬氨酸内肽酶和 7 个丝氨酸羧基肽酶, 此外, 还

有 1 个在细胞壁生物合成中起主要作用的几丁质合成酶基因。经锈菌孢子壁处理后, 转录组测序结果显示有 11 个毒力因子相关基因表达上调, 天冬氨酸内肽酶(g225)表达量是未经处理的 3.5 倍, 几丁质合成酶(g1077)表达量是未经处理的 2 倍(图 7), 说明相关的毒力因子在枝孢菌 SYC63 的重寄生过程中起作用。

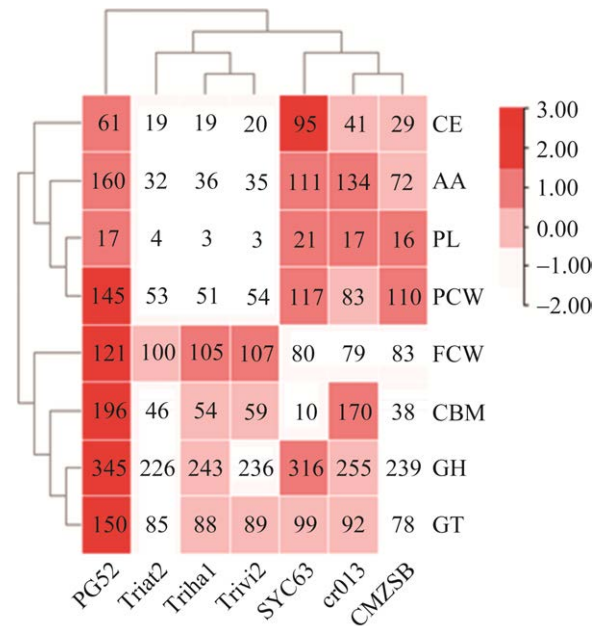


图 4 枝孢菌 SYC63 及其他重寄生真菌中 CAZyme 的分布 CE: 糖脂酶; AA: 辅助功能的酶; PL: 多糖裂合酶; PCW: 植物细胞壁降解酶; FCW: 真菌细胞壁降解酶; CBM: 糖基结合模块; GH: 糖苷水解酶; GT: 糖基转移酶。图中的数字表示各基因家族酶的数量

Figure 4 Family distributions of CAZyme encoded in genomes of *Cladosporium* sp. SYC63 and other mycoparasitism fungi. CE: Carbohydrate esterase; AA: Auxiliary activities; PL: Polysaccharide lyases; PCW: Plant cell wall degradation enzyme; FCW: Fungal cell wall degradation enzyme; CBM: Carbohydrate-binding modules; GH: Glycoside hydrolases; GT: Glycosyl transferases. The numbers indicate the number of enzymes in each gene family.

表 2 细胞壁降解酶类相关蛋白 GO 功能富集

Table 2 GO enrichment analysis of cell wall degrading enzymes in *Cladosporium*

GO_ID	GO name	Class	Test
GO: 0005576	Extracellular region	Cellular component	29
GO: 0071555	Cell wall organization	Biological process	17
GO: 0005886	Plasma membrane	Cellular component	16
GO: 0031225	Anchored component of membrane	Cellular component	14
GO: 0005975	Carbohydrate metabolic process	Biological process	13
GO: 0009272	Fungal-type cell wall biogenesis	Biological process	12
GO: 0000272	Polysaccharide catabolic process	Biological process	11
GO: 0009277	Fungal-type cell wall	Cellular component	11
GO: 0004553	Hydrolase activity hydrolyzing O-glycosyl compounds	Molecular function	10
GO: 0004556	Alpha-amylase activity	Molecular function	9
GO: 0052861	Glucan endo-1,3-beta-glucanase activity C-3 substituted reducing group	Molecular function	9
GO: 0005618	Cell wall	Cellular component	8
GO: 0006032	Chitin catabolic process	Biological process	8
GO: 0007117	Budding cell bud growth	Biological process	8
GO: 0008496	Mannan endo-1,6-alpha-mannosidase activity	Molecular function	8
GO: 0046658	Anchored component of plasma membrane	Cellular component	8
GO: 0032450	Maltose alpha-glucosidase activity	Molecular function	7
GO: 0042973	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase activity	Molecular function	7
GO: 0004568	Chitinase activity	Molecular function	6
GO: 0005509	Calcium ion binding	Molecular function	6
GO: 0033201	Alpha-1,4-glucan synthase activity	Molecular function	6
GO: 0035840	Old growing cell tip	Cellular component	6
GO: 0005783	Endoplasmic reticulum	Cellular component	5
GO: 0016740	Transferase activity	Molecular function	5
GO: 0004574	Oligo-1,6-glucosidase activity	Molecular function	4
GO: 0005615	Extracellular space	Cellular component	4
GO: 0005737	Cytoplasm	Cellular component	4
GO: 0008152	Metabolic process	Biological process	4
GO: 0009405	Pathogenesis	Biological process	4
GO: 0031505	Fungal-type cell wall organization	Biological process	4



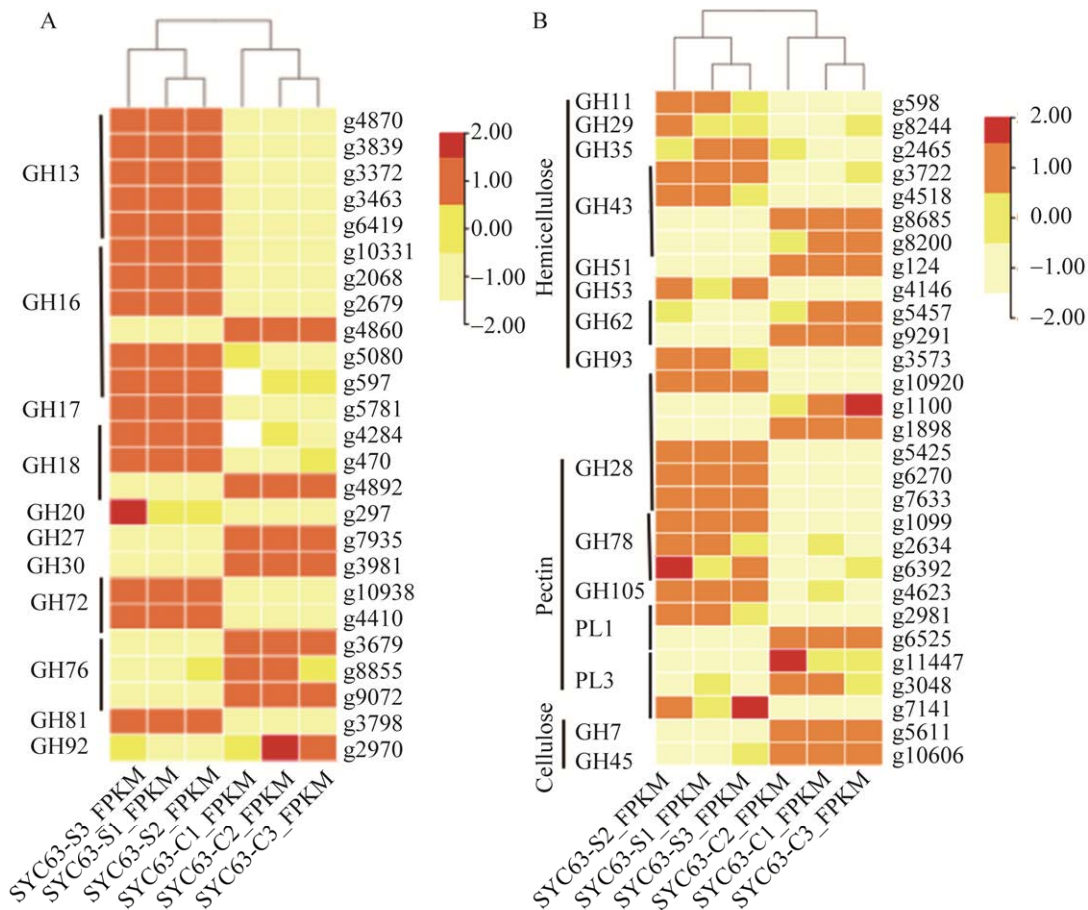


图 5 编码细胞壁降解酶类 DEG 的表达 A: 编码真菌细胞壁降解酶 DEG 的表达; B: 编码植物细胞壁降解酶 DEG 的表达

Figure 5 Expression of DEG of cell wall degrading enzymes in *Cladosporium*. A: Expression of DEG of fungal cell wall degrading enzymes; B: Expression of DEG of plant cell wall degrading enzymes.

### 3 讨论与结论

重寄生在自然界植物病原菌中普遍存在, 在生物防治上用重寄生菌制成的活细胞制剂不同于化学药剂, 无毒无害, 不会对目标植物产生有害副作用, 也不会对环境造成影响, 防治效果也具有持久性, 是现在生物防治的主流方向<sup>[16]</sup>, 已经越来越受到各国植物病理学家的重视, 利用基因组测序手段进行重寄生机制研究可极大地推动重寄生菌在生物防治上的应用。

对重寄生过程产生的大量降解病原菌细胞

壁的水解酶(主要是几丁质酶、葡聚糖酶等)及毒素(小分子次级代谢物)进行研究是探究重寄生机制所必需的<sup>[12]</sup>。孙青等<sup>[17]</sup>通过对哈茨木霉 Th-33 进行全基因组测序, 分析得到 38 种水解酶, 表明该菌株的重寄生过程中涉及细胞壁降解; 赵会长<sup>[6]</sup>对盾壳霉进行全基因组测序并结合转录组数据, 发现其降解寄主核盘菌的主要机制是编码 CAZyme 中的胞壁降解酶; 王勇超等<sup>[18]</sup>利用基因组分析了绿木霉 Gv29-8 丝氨酸蛋白酶 S8/S53 超家族基因特性及功能, 推测其可抑制植物病原真菌; 其次, 研究发现木霉菌

表 3 SYC63 基因组次级代谢基因簇

Table 3 genome secondary metabolic gene cluster of SYC63

基因簇编号	类型	起始位置	终止位置	核心基因数	最相似的已知基因簇	相似性
Cluster ID	Cluster type	Start position	End position	Number of core gene	Most similar known cluster	Similarity (%)
Cluster 1	NRPS-like	183 494	226 668	6	-	
Cluster 2	Terpene	250 607	273 816	2	-	
Cluster 3	T3PKS	1 150 090	1191 231	5	-	
Cluster 4	NRPS-like	1 924 059	1 969 317	4	-	
Cluster 5	NRPS-like	348 305	391 684	2	-	
Cluster 6	NRPS	1 199 769	1 243 609	5	-	
Cluster 7	NRPS-like	1 779 361	1 823 558	5	-	
Cluster 8	NRPS	916 556	973 659	3	-	
Cluster 9	NRPS-like	981 138	1 025 034	5	-	
Cluster 10	NRPS-like	1 019 865	1 062 535	5	-	
Cluster 11	NRPS	1 348 712	1 402 737	7	-	
Cluster 12	NRPS-like	1 415 015	1 454 966	5	-	
Cluster 13	NRPS-like	1 528 603	1 571 197	4	-	
Cluster 14	NRPS, RiPP	272 760	329 512	13	-	
Cluster 15	Terpene	478 218	501 760	4	-	
Cluster 16	NRPS-like	1 364 706	1 402 804	3	-	
Cluster 17	NRPS	1 674 678	1 718 748	9	-	
Cluster 18	T1PKS	78 391	125 498	9	-	
Cluster 19	T1PKS	1 237 604	1 238 774	8	4-epi-15-epi-brefeldin A	20
Cluster 20	T1PKS	1 530 675	1 577 973	6	Cercosporin	31
Cluster 21	Terpene	59 351	80 299	4	-	
Cluster 22	Terpene	1 146 988	1 168 280	9	-	
Cluster 23	NRPS-like	1 192 730	1 236 033	4	-	
Cluster 24	Betalactone	164 606	188 177	6	-	
Cluster 25	T1PKS	789 628	836 227	2	Melanin	100

注: -: 未预测到最相似的已知基因簇

Note: -: The most similar known gene cluster was not predicted.

产生的 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone 能够抑制镰刀菌毒素、丝氨酸和脱氧雪腐烯醇(deoxynivalenol, DON)的生物合成,而丝氨酸和 DON 又能调节几丁质酶基因的表达<sup>[19-22]</sup>;重寄生拟盘多毛孢菌 PG52 产生的毒素 3-硝基丙酸、康宁木霉菌产生的柠檬酸对林木锈菌锈孢子有致死作用<sup>[23]</sup>。

前人对重寄生枝孢菌的研究均表明其在生物防治方面是一大潜力菌株。Moricca 等<sup>[24]</sup>通过对 *C. tenuissimum* 寄生在 *Cronartium flaccidum* 和 *Periderium pini* 的研究表明,其已进化出几种攻破孢子壁进入组织的策略,锈菌孢子直接被寄

生,酶活性可导致锈菌细胞壁的溶解; *C. cladosporioides* 和 *C. pseudocladosporioides* 向菊花白锈病孢子方向生长并定殖,孢子的结构和细胞质发生了改变,降低了孢子生存能力,表明它们可能有潜力用于菊花白锈病的防治,但其作用机理不清楚<sup>[25]</sup>;从 *C. cladosporioides* 中分离得到的聚酮化合物 cladosporol A 是一种  $\beta$ -1,3-葡聚糖生物合成抑制剂,可导致辣椒疫霉菌丝畸形; cladosporol B-E 从 *C. tenuissimum* 中分离得到,对豆锈菌的夏孢子萌发有抑制作用,而且能抑制几种植物病原微生物的径向生长<sup>[9,24,26-27]</sup>。

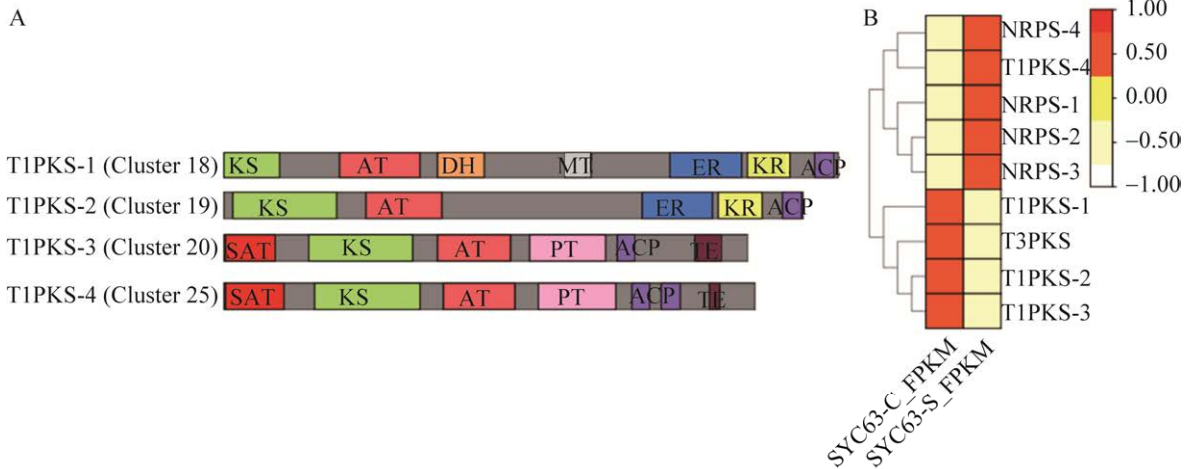


图 6 枝孢菌 SYC63 次级代谢合成基因簇结构(A)和基因表达(B) KS: 酮基合成酶; AT: 酰基转移酶; DH: 脱水酶; MT: 甲基转移酶; ER: 烯酰还原酶; KR: 酮基还原酶; ACP: 酰基载体白; SAT: 起始单元酰基转移酶; PT: 产物模板; TE: 硫酯酶。SYC63-C\_FPKM: 未经处理; SYC63-S\_FPKM: 经锈菌孢子壁诱导处理

Figure 6 Cluster structure (A) and gene expression (B) of secondary metabolic synthesis genes of *Cladosporium* SYC63. KS: Ketoacyl synthase; AT: Acyl transferase; DH: Dehydratase; MT: Methyltransferase; ER: Enoyl reductase; KR: Ketoreductase; ACP: Acyl carrier protein; SAT: Starting unit acyltransferase; PT: Product template; TE: Thioesterase. SYC63-C\_FPKM: Untreated; SYC63-S\_FPKM: The spore wall induction treatment of rust fungus.

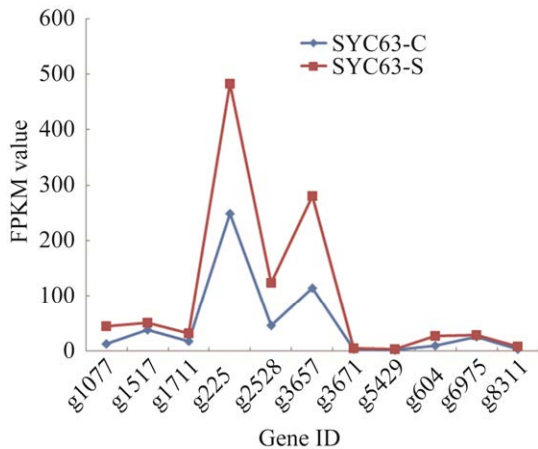


图 7 毒力因子相关基因表达的 FPKM 值

Figure 7 FPKM values for expression of virulence factor-related genes.

研究表明重寄生拟盘多毛孢菌能破坏其寄生的锈孢子,使锈孢子壁严重变形,但不完全破碎,内含物浓缩流失而造成死亡,这与木霉

的主要重寄生机制为分泌细胞壁降解酶是完全不同的,因此判定其为重寄生菌的毒素作用<sup>[12]</sup>。枝孢菌 SYC63 寄生后的石楠叶锈病菌锈孢子显微观察结果与上述一致,可推测其也是重寄生菌的毒素作用,而细胞壁降解酶类可能不是该菌主要的重寄生作用机制。目前,重寄生枝孢菌基因组层面的相关研究极少,这限制了对其进行开发与利用,本研究对重寄生的枝孢菌 SYC63 进行全基因组测序,为重寄生机制的阐明奠定了基础。本研究中的重寄生枝孢菌 SYC63 基因组数据在 KEGG 和 COG 数据库中分别注释到 593 个和 123 个基因参与了碳水化合物的代谢。CAZyme 统计分析表明其与重寄生拟盘多毛孢菌、木霉及盾壳霉存在差异,该菌株具有较多的细胞壁降解酶类(糖苷水解酶、多糖裂解酶和糖脂酶类)基因,通过 GO 分析表

明其参与了真菌细胞壁的形成与生物过程, 而经锈菌孢子壁处理后的真菌细胞壁降解酶类基因在转录水平显著上调表达, 也证明了其重寄生能力。同时, 还发现分类为植物细胞壁降解酶类的表达也受锈菌孢子壁的诱导, 说明其可能也参与了重寄生过程。本研究中也发现真菌细胞壁降解酶类的一些基因在经锈菌孢子壁诱导后表达下调, 推测其原因一方面可能是受时间和营养源的影响, 研究表明 CAZyme 的表达是复杂的, 在真菌生长不同发育阶段有不同的调控机理, 除碳源、氮源外还受光和温度的影响<sup>[6,28]</sup>; 另一方面是细胞壁降解酶不仅参与真菌寄生和几丁质的消化分解, 还参与老化和自溶期间细胞壁的循环及生长期间真菌细胞壁的重塑<sup>[29-30]</sup>。细胞壁降解酶编码基因的转录还与转录因子调控有关, 在里氏木霉降解纤维素和半纤维素的研究中表明, XYR1、ACE2 等转录激活因子及作为抑制因子的 CRE1 和 ACE1 参与了细胞内酶的表达<sup>[29,31-32]</sup>。此外, 天冬氨酸蛋白酶也被报道参与了真菌重寄生过程<sup>[33]</sup>, 本研究在锈菌孢子壁处理后发现, 毒力基因-天冬氨酸内肽酶的表达上调说明蛋白酶在该菌株的重寄生过程中有重要的作用。

在微生物代谢过程中, 聚酮合成途径和非核糖体合成途径是其合成次级代谢产物的主要途径, 产生了大量具有生物活性的天然产物, 现利用基因组挖掘潜在的新天然化合物基因, 再结合生物信息学技术分析预测基因编码的产物已成为主流<sup>[34-35]</sup>。通过对重寄生枝孢菌 SYC63 的次级代谢产物基因簇进行预测, 发现 PKS 和 NRPS 基因簇在转录水平上被大量表达, 并且黑色素合成基因簇受锈菌孢子壁的诱导, 而真菌黑色素的功能被认为可防止紫外线照射、酶裂解、氧化剂攻击和真菌感染等<sup>[36]</sup>, 在盾壳霉中也被认为其参与抗真菌物质的合成,

是重寄生的关键因素<sup>[6]</sup>。因此, 该菌株除了具有产新颖化合物潜力外, 还可能产生与重寄生过程有关的次级代谢物, 值得进行深度挖掘。

在本研究中, 我们首次报告了重寄生枝孢菌 SYC63 的全基因组序列信息, 并对其基因功能注释进行了分析, 同时与重寄生其他菌株进行比较分析了与重寄生相关的胞壁降解酶类基因, 并在转录组水平上验证了经锈菌孢子壁处理后的基因表达。以上结果可为重寄生机制的深入研究及枝孢菌 SYC63 在生防上的开发与利用奠定了研究基础。

## REFERENCES

- [1] 李利. 白粉菌重寄生真菌的分离鉴定及生物学特性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2016  
Li L. Studies on isolation and identification of mycoparasites from pathogens of powdery mildew and its biological characteristics[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2016 (in Chinese)
- [2] 陈广艳. 国内研究植物锈菌重寄生菌的现状[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(8): 1531-1532  
Chen GY. Research advance in mycoparasites of plant rusts in China[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2006, 34(8): 1531-1532 (in Chinese)
- [3] 杨艳红, 陈玉惠. 植物病原菌重寄生菌作用机理的研究进展[J]. 西南林学院学报, 2004, 24(2): 70-75  
Yang YH, Chen YH. Advances on mechanism of mycoparasites penetrating phytopathogens[J]. Journal of Southwest Forestry College, 2004, 24(2): 70-75 (in Chinese)
- [4] Deacon JW. Fungal Biology[M]. 4th ed. Oxford, UK: Blackwell Press, 2006
- [5] 王瑞. 两种  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的性质表征与功能分析[D]. 大连: 大连理工大学硕士学位论文, 2017  
Wang R. Characterization and functional analysis of  $\beta$ -1,3-glucanases from insect and bacterium[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian University of Technology, 2017 (in Chinese)
- [6] 赵会长. 盾壳霉基因组学及其重寄生机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2020  
Zhao HC. Genomics and mycoparasitic mechanism analysis of the mycoparasite *Coinithyrium minitans*[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2020 (in Chinese)

- [7] 李靖, 周利, 陈玉惠, 李永和. 2 株茶蔗生柱锈重寄生木霉胞壁降解酶的基本性质研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(13): 85-91  
Li J, Zhou L, Chen YH, Li YH. The study on degrading enzymes of cell wall from two mycoparasites of *Cronartium ribicola*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(13): 85-91 (in Chinese)
- [8] 尤佳琪, 吴明德, 李国庆. 木霉在植物病害生物防治中的应用及作用机制[J]. 中国生物防治学报, 2019, 35(6): 966-976  
You JQ, Wu MD, Li GQ. Application and mechanism of *Trichoderma* in biological control of plant disease[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2019, 35(6): 966-976 (in Chinese)
- [9] Assante G, Maffi D, Saracchi M, Farina G, Moricca S, Ragazzi A. Histological studies on the mycoparasitism of *Cladosporium tenuissimum* on urediniospores of *Uromyces appendiculatus*[J]. Mycological Research, 2004, 108(2): 170-182
- [10] 赵桂华, 管斌, 刘国华. 林木锈病生物防治的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2010, 38(4): 115-116, 192  
Zhao GH, Guan B, Liu GH. Advances on biological control of forest rusts[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2010, 38(4): 115-116, 192 (in Chinese)
- [11] Chaibub AA, De Sousa TP, De Araújo LG, De Filippi MCC. Molecular and morphological characterization of rice phylloplane fungi and determination of the antagonistic activity against rice pathogens[J]. Microbiological Research, 2020, 231: 126353
- [12] 李靖, 刘凤路, 陈玉惠. 茶蔗生柱锈菌重寄生拟盘多毛孢产毒培养条件的筛选[J]. 江西农业大学学报, 2017, 39(2): 395-401  
Li J, Liu FL, Chen YH. Culture condition screening for toxin production of mycoparasites (*Pestalotiopsis* spp.) from *Cronartium ribicola*[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2017, 39(2): 395-401 (in Chinese)
- [13] Yin YB, Mao XZ, Yang JC, Chen X, Mao FL, Xu Y. dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(W1): W445-W451
- [14] 曹玉陵, 唐思敏, 张添, 包斌, 吴文惠. 一株稀有海洋真菌 *Stachybotrys longispora* FG216 的 *De Novo* 测序及基因组学分析[J]. 微生物学通报, 2021, 48(10): 3457-3471  
Cao YL, Tang SM, Zhang T, Bao B, Wu WH. *De Novo* sequencing and genomics analysis of a rare marine fungus *Stachybotrys longispora* FG216[J]. Microbiology China, 2021, 48(10): 3457-3471 (in Chinese)
- [15] 周航, 鲍泽然, 施玉玲, 李靖, 陈玉惠. 4 种木霉对松疱锈病菌细胞壁的破坏作用[J]. 西南林业大学学报(自然科学版), 2017, 37(4): 120-125  
Zhou H, Bao ZR, Shi YL, Li J, Chen YH. The destructive effects of 4 species of *Trichoderma* on *Cronartium ribicola*[J]. Journal of Southwest Forestry University: Natural Sciences, 2017, 37(4): 120-125 (in Chinese)
- [16] 乔宏萍, 宗兆锋. 用重寄生菌防治植物病害[J]. 中国生物防治, 2002, 18(4): 176-179  
Qiao HP, Zong ZF. Biological control of plant pathogens with hyperparasites[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2002, 18(4): 176-179 (in Chinese)
- [17] 孙青, 蒋细良, 庞莉, 王丽荣, 李梅. 哈茨木霉 Th-33 全基因组序列测定与分析[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(2): 205-214  
Sun Q, Jiang XL, Pang L, Wang LR, Li M. The genome sequence of *Trichoderma harzianum* Th-33[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2016, 32(2): 205-214 (in Chinese)
- [18] 王勇超, 刘志华, 安柳迪, 张丛兴, 王金杰. 绿木霉 Gv29-8 丝氨酸蛋白酶 S8/S53 超家族基因特性及功能[J]. 微生物学通报, 2020, 47(2): 532-541  
Wang YC, Liu ZH, An LD, Zhang CX, Wang JJ. Characterization of S8/S53 serine protease superfamily gene of *Trichoderma virens* Gv29-8[J]. Microbiology China, 2020, 47(2): 532-541 (in Chinese)
- [19] Cutler HG, Cox RH, Crumley FG, Cole PD. 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone from *Trichoderma harzianum*: ITS plant growth inhibitory and antimicrobial properties[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1986, 50(11): 2943-2945
- [20] Scarselletti R, Faull JL. *In vitro* activity of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone, a metabolite of *Trichoderma harzianum*, in the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici[J]. Mycological Research, 1994, 98(10): 1207-1209
- [21] El-Hasan A, Walker F, Buchenauer H. *Trichoderma harzianum* and its metabolite 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone suppress fusaric acid produced by *Fusarium moniliforme*[J]. Journal of Phytopathology, 2008, 156(2): 79-87
- [22] Cooney JM, Lauren DR, di Menna ME. Impact of competitive fungi on trichothecene production by *Fusarium graminearum*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(1): 522-526
- [23] 李靖, 谢津, 孔磊, 张登云, 隋国强, 陈玉惠. 两株锈菌重寄生菌毒素的分离鉴定及活性研究[J]. 生物学杂

- 志, 2022, 39(1): 42-45
- Li J, Xie J, Kong L, Zhang DY, Sui GQ, Chen YH. Toxins isolation and identification from two mycoparasites of plant rust and its activities[J]. Journal of Biology, 2022, 39(1): 42-45 (in Chinese)
- [24] Moricca S, Ragazzi A, Mitchelson KR, Assante G. Antagonism of the two-needle pine stem rust fungi *Cronartium flaccidum* and *Peridermium pini* by *Cladosporium tenuissimum* in vitro and in planta[J]. Phytopathology, 2001, 91(5): 457-468
- [25] Torres DE, Rojas-Martínez RI, Zavaleta-Mejía E, Guevara-Fefer P, Márquez-Guzmán GJ, Pérez-Martínez C. *Cladosporium cladosporioides* and *Cladosporium pseudocladosporioides* as potential new fungal antagonists of *Puccinia horiana* Henn., the causal agent of chrysanthemum white rust[J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0170782
- [26] Nasini G, Arnone A, Assante G, Bava A, Moricca S, Ragazzi A. Secondary mould metabolites of *Cladosporium tenuissimum*, a hyperparasite of rust fungi[J]. Phytochemistry, 2004, 65(14): 2107-2111
- [27] Sakagami Y, Sano A, Hara O, Mikawa T, Marumo S. Cladosporol,  $\beta$ -1,3-glucan biosynthesis inhibitor, isolated from fungus, *Cladosporium cladosporioides*[J]. Tetrahedron Letters, 1995, 36(9): 1469-1472
- [28] Donzelli BG, Harman GE. Interaction of ammonium, glucose, and chitin regulates the expression of cell wall-degrading enzymes in *Trichoderma atroviride* strain P1[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(12): 5643-5647
- [29] Hu G, Leger RJS. A phylogenomic approach to reconstructing the diversification of serine proteases in fungi[J]. Journal of Evolutionary Biology, 2004, 17(6): 1204-1214
- [30] Gruber S, Seidl-Seiboth V. Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*[J]. Microbiology: Reading, England, 2012, 158(Pt 1): 26-34
- [31] Akimitsu K, Isshiki A, Ohtani K, Yamamoto H, Eshel D, Prusky D. Sugars and pH: a clue to the regulation of fungal cell wall-degrading enzymes in plants[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2004, 65(6): 271-275
- [32] Seiboth B, Herold S, Kubicek CP. Metabolic engineering of inducer formation for cellulase and hemicellulase gene expression in *Trichoderma reesei*[J]. Sub-Cellular Biochemistry, 2012, 64: 367-390
- [33] Quoc NB, Chau NNB. The role of cell wall degrading enzymes in pathogenesis of *Magnaporthe oryzae*[J]. Current Protein & Peptide Science, 2017, 18(10): 1019-1034
- [34] 付博, 樊泽正, 杜毅涛, 郭子晟, 李忠玲. 微生物基因组挖掘的方法和研究策略[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(6): 2451-2458
- Fu B, Fan ZZ, Du YT, Guo ZS, Li ZL. Approaches and strategies of genome mining in microbes[J]. Genomics and Applied Biology, 2018, 37(6): 2451-2458 (in Chinese)
- [35] 杨杰. 枯草杆菌 fmb60 的 NRPS 和 I 型 PKS 基因簇代谢产物发掘及其生物活性研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2017
- Yang J. Genomics-driven discovery of NRPS and type I PKS metabolites from *Bacillus subtilis* fmb60 and their bioactivity[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2017 (in Chinese)
- [36] Ng KP, Yew SM, Chan CL, Soo-Hoo TS, Na SL, Hassan H, Ngeow YF, Hoh CC, Lee KW, Yee WY. Sequencing of *Cladosporium sphaerospermum*, a Dematiaceous fungus isolated from blood culture[J]. Eukaryotic Cell, 2012, 11(5): 705-706