

研究报告

Research Report

欧美杨细菌性溃疡病菌基因组测序与分析

张立春 肖丹丹 付田田 王延伟*

北京林业大学生物科学与技术学院, 林木育种国家工程实验室, 林木花卉遗传育种教育部重点实验室, 林木分子设计育种高精尖创新中心, 北京, 100083

* 通信作者, ywwang@bjfu.edu.cn

摘 要 欧美杨细菌性溃疡病菌(*Lonsdalea populi*)是引起杨树溃疡病的主要病原菌,它可引起树干形成层的破坏和树皮的局部坏死。为挖掘其致病基因,本研究利用二代和三代测序技术对欧美杨细菌性溃疡病菌 N-5-1 进行了全基因组测序。结果表明:该病菌菌株染色体和质粒大小分别为 3 832 567 bp 和 11 289 bp, GC 含量分别为 55.42% 和 56.32%。通过对基因组的分析,共预测到 3 556 个基因,在 GO、KEGG 和 COG 数据库分别注释到 2 348 个、2 785 个和 2 374 个基因。进一步利用 III 型分泌系统数据库注释到 501 个编码分泌蛋白的基因,在病原互作数据库中注释到了 427 个病原与宿主互作的基因,其中 13 个为效应子基因。通过与 *Lonsdalea* 属的其他病原菌的基因组进一步比较发现,菌株 *Lonsdalea populi* N-5-1 的基因组与 *Lonsdalea iberica* LMG 26264 和 *Lonsdalea populi* L2-3 的基因组存在良好的共线性关系,且与 *Lonsdalea populi* L2-3 的亲缘关系更近。本研究为解析欧美杨细菌性溃疡病菌的基因组结构、功能及亲缘关系提供了科学基础,并为后续深入研究其致病基因及开展树木抗病分子育种提供了基因组信息和基因资源。

关键词 欧美杨细菌性溃疡病菌;全基因组测序;比较基因组学;杨树;溃疡病

Whole-Genome Sequencing and Analysis of *Lonsdalea populi* Causing Poplar Canker

Zhang Lichun Xiao Dandan Fu Tiantian Wang Yanwei*

National Engineering Laboratory for Tree Breeding, Key Laboratory of Ministry of Education for Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plant, Beijing Advanced Innovation Center for Tree Breeding by Molecular Design, College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing, 100083

* Corresponding author, ywwang@bjfu.edu.cn

DOI: 10.13417/j.gab.041.000331

Abstract *Lonsdalea populi* is one of the major pathogenic bacteria causing poplar canker. It can cause the destruction of the cambium in trunks and local necrosis of the bark. In order to explore the pathogenic genes, the complete genome of *Lonsdalea populi* N-5-1 was sequenced and assembled in this investigation. Results showed that *L. populi* N-5-1 carries a chromosome of 3 832 567 bp with 55.42% GC and a plasmid of 11 289 bp with 56.32% GC. Through genomic analysis, 3 556 genes were predicted, and 2 348, 2 785, and 2 374 genes were annotated in the GO, KEGG and COG databases, respectively. 501 genes encoding type III secreted protein were found using T3SS database. 427 genes involved in pathogen-host interaction were annotated using PHI database, including 13 genes encoding effectors. After being compared with other pathogens in the *Lonsdalea* genus, the genome of *L. populi* N-5-1 strain was found to have a good synteny with those of *Lonsdalea iberica* LMG 26264 and *Lonsdalea populi* L2-3, and be more related to that of *Lonsdalea populi* L2-3. This

基金项目:本研究由国家自然科学基金项目(32071504; 31670671)共同资助

引用格式:Zhang L.C., Xiao D.D., Fu T.T., and Wang Y.W., 2022, Whole-genome sequencing and analysis of *Lonsdalea populi* causing poplar canker, *Genomics and Applied Biology*, 41(2): 331-343.(张立春, 肖丹丹, 付田田, 王延伟, 2022, 欧美杨细菌性溃疡病菌基因组测序与分析, *基因组学与应用生物学*, 41(2): 331-343.)

investigation provides a useful basis for understanding the structure, function and relationship of the genome of *Lonsdalea populi*, and genomic information and gene resources for the further study of the pathogenic genes and molecular breeding of trees with resistance to pathogens.

Keywords *Lonsdalea populi*; Whole-genome sequencing; Comparative genomics; Poplar; Canker

欧美杨细菌性溃疡病菌 (*Lonsdalea populi*) 是导致杨树树干形成层损伤和树皮局部坏死的主要病原。*Lonsdalea quercina* 过去被称为 *Brenneria quercina* 或 *Erwinia quercina*, 1997 年报道了由 *Brenneria quercina* 引起的西班牙橡树树皮溃疡病, 这是世界上首次报道由这种细菌引起的树皮溃疡病 (Soria and Lopez, 1997)。2006 年, 该病在河南省濮阳市 107 杨树人工林中发现。在病害发生初期, 树皮外部无明显异常, 直至发病旺期才出现溃疡病斑和粘液流出等现象。因此, 发病的隐蔽性为该病害的防治带来了较大的困难 (贺伟等, 2009)。任飞娟 (2011) 通过浸出液法和组织分离法从中林 46 杨和欧美 107 杨中获得了 *Brenneria quercina* 的分离物, 通过形态特征分析、16 S rRNA 基因测序及同源比较, 初步判定引起欧美杨细菌性溃疡病的主要病原体为 *B. quercina*, 编号为 N-5-1。李永 (2013) 采用组织分离法和科赫氏法对该病原菌进行进一步鉴定, 明确了此前初步得到鉴定的 *B. quercina* 菌株即为欧美杨细菌性溃疡病的病原细菌。此后, 基于核苷酸一致性、16 S rRNA 基因序列的系统发育分析及多位点序列比对将欧美杨细菌性溃疡病菌进一步定为新种 *Lonsdalea populi* sp. nov. (Li et al., 2017)。

目前, 对欧美杨细菌性溃疡病菌致病性的研究已取得了一定进展。Yang 等 (2014) 对该病菌的致病基因进行初步分析, 证明了 *L. populi* N-5-1 的致病力与 II 型分泌系统 T2SS 存在直接关系。李宾等 (2015) 用同源重组的方法对编码 III 型分泌系统的结构基因 *hrcJ* 进行了插入突变, 发现这一突变导致其致病能力下降。与之类似, 双组分信号转导系统感受蛋白编码基因 *lqHK1* 的突变同样会使其致病性减弱 (魏强等, 2017)。随后的研究发现, *kdpE* (编码反应调节蛋白 RR) 缺失突变体和 *kdpD* (编码含有跨膜结构的组氨酸激酶) 过表达菌株均能导致病原菌致病能力减弱 (Yang et al., 2018)。近年来, 研究人员还发现, 双组分信号转导系统的另一个调控蛋白编码基因 *lqRR2* 的缺失突变也会导致致病能力的下降 (李爱宁等, 2018)。

高通量测序技术为研究细菌的遗传和致病机理提供了有价值的基因组信息, 使不同菌株间的比较

分析变得更加容易。随着新一代测序技术的发展, 测序的经济和时间成本降低 (Wichmann et al., 2013), 越来越多的病原菌全基因组测序得以完成。目前在 NCBI 数据库中存在 37 株 *Lonsdalea* 属的全基因组信息, 分为 4 个种 *Lonsdalea britannica*、*Lonsdalea populi*、*Lonsdalea quercina* 和 *Lonsdalea iberica*, 但其中大多数基因组的组装程度只停留在 contig 级别。因此, 对欧美杨细菌性溃疡病菌进行全基因组测序和注释, 将有助于更深入理解 *Lonsdalea* 属的基因信息。

欧美杨细菌性溃疡病菌的致病性是通过毒力决定因子介导的, 这些因子有助于病原菌侵染寄主植物并引起溃疡病的发生。*L. populi* 与肠杆菌科的其他细菌 (如 *Pectrobacteria carotovorum* 和 *Pectrobacteria amylovora* 等) 有着较近的亲缘关系, 这些细菌主要通过细胞壁降解酶作为毒力决定因子引起寄主植物的软腐病症状。除了细胞壁降解酶类外, 分泌系统在病程的发展中也起着重要作用, 其中 III 型分泌系统 (T3SS) 尤为重要 (Wichmann et al., 2013)。T3SS 是一种多蛋白质复合结构系统, 许多革兰氏阴性病原体用 T3SS 直接将致病效应蛋白传送到宿主细胞 (Delcher et al., 2007)。一些效应蛋白可以抑制宿主免疫系统的功能而加速其发病。效应蛋白还可以触发宿主防御机制的第二个分支, 即效应子触发的免疫 (ETI), 许多效应蛋白直接或间接地被宿主抗性 (R) 蛋白识别并迅速触发宿主免疫应答, 包括与防御相关的基因表达、活性氧爆发和蛋白激酶活性等 (McDowell, 2019)。ETI 与超敏反应 (hypersensitive response, HR) 及细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD) 类似, 在感染部位有局部细胞死亡 (Zhang et al., 2010)。然而, *L. populi* 的发病机制迄今还不完全清楚, 微生物基因组学和生物信息学的应用将有助于揭示其致病基因的特性及调控途径。

近年来, 随着杨树人工林种植面积的日益扩大, 环境胁迫等不良因素频发, 加上品种相对单一, 导致杨树人工林遭大面积破坏, 病原菌造成的杨树病害是影响最为重要的因素之一, 其中欧美杨细菌性溃疡病菌对杨树有致死作用。*L. britannica* 和 *L.*

iberica 均从受到感染的橡树组织中被分离出来,二者都与英国的橡树急性衰退和西班牙的栎属树皮溃疡病有关(Li et al., 2017),而其是否可以感染杨树目前尚未发现相关报道。*L. populi* 可以侵染杨树和柳树的茎干,导致宿主表现出典型的溃疡病症状。由于该种病菌侵入部位在树皮中,化学防治基本无效。因此,对欧美杨细菌性溃疡病菌进行基因组测序并了解其致病机理,将为林木抗逆育种提供基因信息。

本研究对 *L. populi* N-5-1 进行了全基因组测序和分析,利用 COG、GO 和 KEGG 等数据库进行了基因功能注释和富集分析。随后将 *L. populi* 与 *L. britannica*、*L. quercina* 和 *L. iberica* 等 4 种病原菌进行了共线性分析和系统发育分析,进而确定其亲缘关系,并在 *L. populi* N-5-1 中鉴定得到与致病性相关的基因,研究结果可为该病原菌致病性相关分子机制的深入解析提供科学依据。

1 结果与分析

1.1 欧美杨细菌性溃疡病菌基因组序列组装及基本信息

二代测序共获得 721 Mb 的原始数据,经过质控分析,共获得 694 Mb 的数据,总 Reads 数为 4 807 680,其中过滤掉的 Reads 占 3.65%,低质量的 Reads 占 3.01%。三代测序获得总碱基读数为 6 005 374 817 bp, Reads N50 为 25 925 bp; Reads N90 为 7 548 bp。基于 BGISEQ 平台的二代测序和 Nanopore 平台的三代测序有效数据对样品的 Clean Data 进行了组装,最终得到的基因组大小为 3 843 856 bp,GC 占比为 55.42%,包含 1 条长 3 832 567 bp 的染色体和大小为 11 289 bp 的质粒,GC 占比分别为 55.42% 和 56.32% (NCBI BioProject number: PRJNA719304) (图 1; 表 1)。

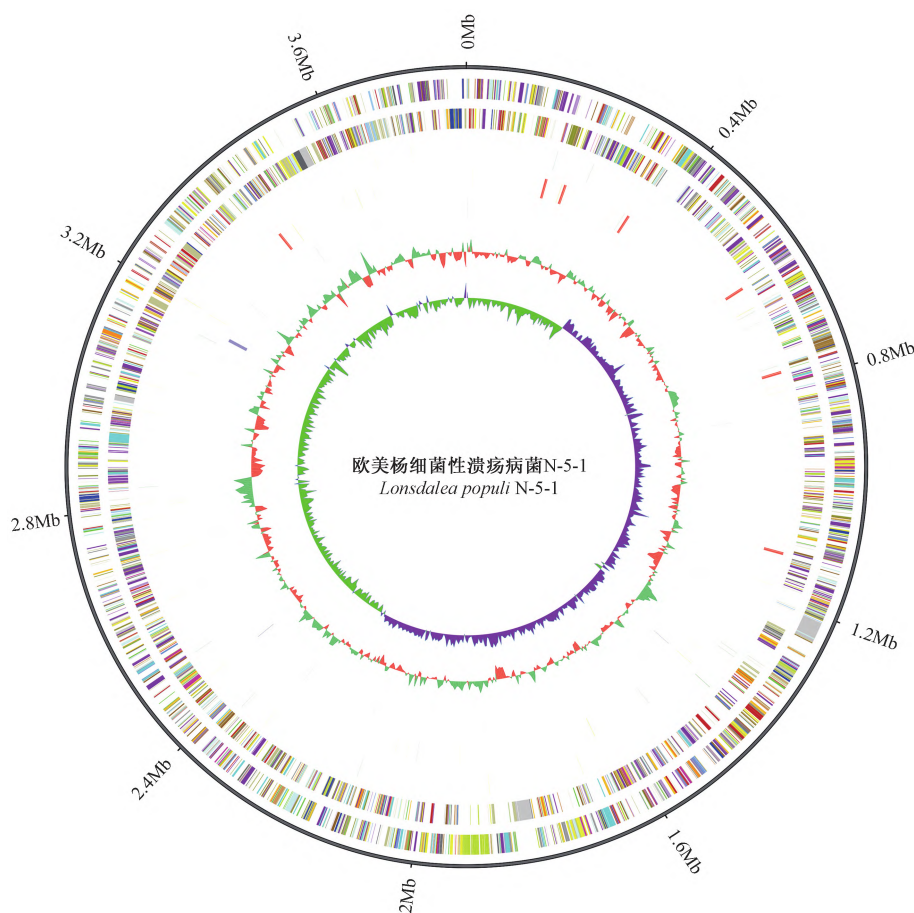


图 1 欧美杨细菌性溃疡病菌 N-5-1 基因组

Figure 1 Circular representation of *Lonsdalea populi* N-5-1 genome

本研究预测到欧美杨细菌性溃疡病菌 N-5-1 的蛋白编码基因共 3 556 个,基因总长度为

3 248 568 bp,基因平均长度为 913.55 bp,GC 占比 56.81%。重复序列占比 0.295 7%,其中串联重复序

列数量为 51,小卫星 DNA 数量为 20,微卫星 DNA 数量为 15。非编码 RNA 占比 1.047 3%,其中 tRNA 拷贝数为 74,rRNA 拷贝数为 22,sRNA 拷贝数为 19 (表 1)。

表 1 欧美杨细菌性溃疡病菌 N-5-1 基因组的基本信息

Table 1 Basic information of *Lonsdalea populi* N-5-1 genome

<i>L. populi</i> N-5-1 基本信息类型	数值
The basic information types of <i>L. populi</i> N-5-1	Value
基因组大小(bp)	3 843 856
Genome size(bp)	
基因组 GC 占比(%)	55.42
GC content in genome(%)	
染色体大小(bp)	3 832 567
Chromosome size(bp)	
染色体 GC 占比(%)	55.42
GC content of chromosome(%)	
质粒大小(bp)	11 289
Plasmid size(bp)	
质粒 GC 占比(%)	56.32
GC content of plasmid(%)	
基因总长度(bp)	3 248 568
Total length of genes(bp)	
基因平均长度(bp)	913.55
Average length of genes(bp)	
基因 GC 含量(%)	56.81
GC content in gene region(%)	
编码基因数目	3 556
Number of coding genes	
重复序列数目	51
Number of tandem repeat	
小卫星 DNA 数目	20
Number of minisatellite DNA	
微卫星 DNA 数目	15
Number of microsatellite DNA	
tRNA 数目	74
Number of tRNA	
5S rRNA 数目	8
Number of 5S rRNA	
16S rRNA 数目	7
Number of 16S rRNA	
23S rRNA 数目	7
Number of 23S rRNA	
sRNA 数目	19
Number of sRNA	

1.2 基因功能注释分析

为进一步解析欧美杨细菌性溃疡病菌基因组的功能,将其基因组序列在 CAZY、PHI、COG、GO、KEGG、NR 和 T3SS 共 7 个数据库中进行注释

(表 2)。其中,在 CAZY 数据库中注释到 104 个基因,PHI 数据库中注释到 427 个基因,COG 数据库中注释到 2 784 个基因,GO 数据库中注释到 2 348 个基因,KEGG 数据库中注释到 2 472 个基因,NR 数据库中注释到 3 302 个基因,T3SS 数据库中注释到 501 个基因。

表 2 欧美杨细菌性溃疡病菌 N-5-1 基因组注释结果统计

Table 2 Genes annotation statistics of *Lonsdalea populi* N-5-1

名称	数据库	注释基因数目
Name	Database	Number of annotated genes
	CAZY	104
	PHI	427
欧美杨细菌性溃疡病菌	COG	2 784
N-5-1	GO	2 348
<i>Lonsdalea populi</i> N-5-1	KEGG	2 472
	NR	3 302
	T3SS	501

1.2.1 GO 分析

L. Populi N-5-1 中共有 2 348 个基因在 GO 数据库中得以注释(图 2),其中 1 986 个基因(84.5%)与分子功能有关,816 个基因(34.7%)与细胞组分有关,1 889 个基因(80.4%)与生物学过程有关。在生物学过程方面主要的 5 个过程是代谢过程(Metabolic process 基因数 1 324)、细胞过程(Cellular process 基因数 1226)、定位(Localization 基因数 463)、生物调节(Biological regulation 基因数 288)以及生物过程调节(Regulation of biological process 基因数 273)。细胞组分中被注释最多的是膜(Membrane 基因数 560)、细胞(Cell 基因数 410)、细胞部件(Cell part 基因数 410)以及膜部件(Membrane part 基因数 322)。分子功能方面被注释最多的是催化活性(Catalytic activity 基因数 1 328)、结合(Binding 基因数 971)和转运活性(Transporter activity 基因数 261)(图 2)。

1.2.2 COG 分析

在 COG 数据库中,2 785 个基因被注释为 24 个功能类别。在这些类别中,氨基酸转运与代谢(Amino acid transport and metabolism)功能富集了 364 个基因,是富集到的基因数量最多的功能类别;其次是“翻译,核糖体结构与生物发生”(Translation, ribosomal structure and biogenesis)功能类别,富集到了 236 个基因;转运(Translocation)和一般功能预测(General function predication only)功能类别,分别富集到了 223 个和 225 个基因,但是,仍有 152 个特性和功能未知的基因(图 3)。

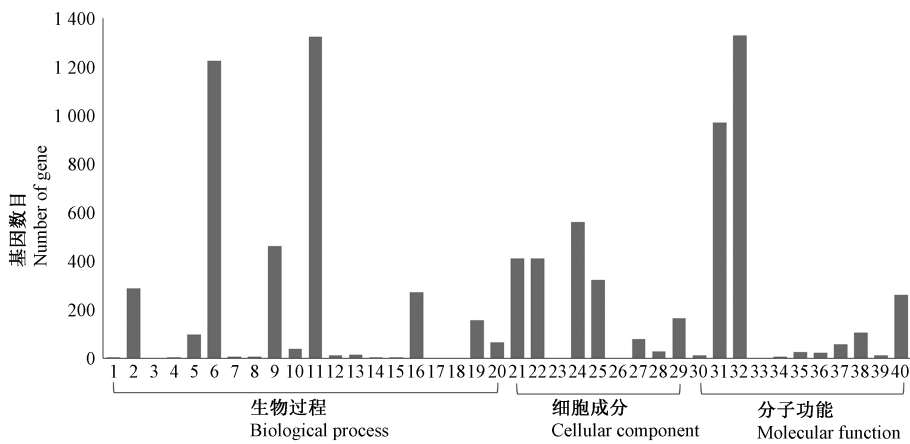


图2 欧美杨细菌性溃疡病菌 N-5-1 基因组 GO 注释统计

注: 1: 生物黏附; 2: 生物调节; 3: 碳水化合物利用; 4: 碳利用; 5: 细胞成分组织或生物合成; 6: 细胞过程; 7: 去毒化; 8: 发育过程; 9: 定位; 10: 运输; 11: 代谢过程; 12: 多种生物过程; 13: 生物过程的负调节; 14: 氮利用; 15: 生物过程的正调控; 16: 生物过程调控; 17: 增殖; 18: 生殖过程; 19: 刺激反应; 20: 信号; 21: 细胞; 22: 细胞部分; 23: 细胞外区域; 24: 膜; 25: 膜部件; 26: 类核; 27: 细胞器; 28: 细胞器部分; 29: 蛋白复合物; 30: 抗氧化活性; 31: 结合; 32: 催化活性; 33: 分子载体活性; 34: 分子功能调节; 35: 分子传感器活性; 36: 小分子传感器活性; 37: 结构分子活性; 38: 转录调节活性; 39: 翻译调节活性; 40: 转运活性

Figure 2 GO annotation of *Lonsdalea populi* N-5-1 genome

Note: 1: Biological adhesion; 2: Biological regulation; 3: Carbohydrate utilization; 4: Carbon utilization; 5: Cellular component organization or biogenesis; 6: Cellular process; 7: Detoxification; 8: Developmental process; 9: Localization; 10: Locomotion; 11: Metabolic process; 12: Multi-organism process; 13: Negative regulation of biological process; 14: Nitrogen utilization; 15: Positive regulation of biological process; 16: Regulation of biological process; 17: Reproduction; 18: Reproductive process; 19: Response to stimulus; 20: Signaling; 21: Cell; 22: Cell part; 23: Extracellular region; 24: Membrane; 25: Membrane part; 26: Nucleoid; 27: Organelle; 28: Organelle part; 29: Protein-containing complex; 30: Antioxidant activity; 31: Binding; 32: Catalytic activity; 33: Molecular carrier activity; 34: Molecular function regulator; 35: Molecular transducer activity; 36: Small molecule sensor activity; 37: Structural molecule activity; 38: Transcription regulator activity; 39: Translation regulator activity; 40: Transporter activity

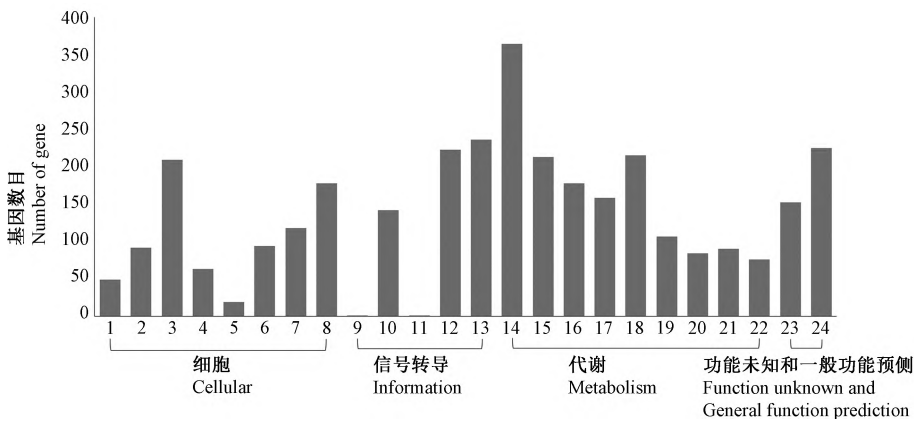


图3 欧美杨细菌性溃疡病菌 N-5-1 基因组 COG 的功能分类

注: 1: 细胞周期控制、细胞分裂和染色体分区; 2: 细胞运动; 3: 细胞壁/膜/包膜生物发生; 4: 防御机制; 5: 细胞外结构; 6: 细胞内运输、分泌和囊泡运输; 7: 翻译后修饰、蛋白质更新和伴侣; 8: 信号转导机制; 9: 染色质结构与动力学; 10: 复制、重组和修复; 11: RNA 加工和修饰; 12: 转录; 13: 翻译、核糖体结构和生物发生; 14: 氨基酸转运和代谢; 15: 碳水化合物的运输和代谢; 16: 辅酶的运输和代谢; 17: 能量生产与转化; 18: 无机离子的运输与代谢; 19: 脂质运输和代谢; 20: 转座子和噬菌体; 21: 核苷酸转运和代谢; 22: 次生代谢产物的生物合成、转运和分解代谢; 23: 功能未知; 24: 通用功能预测

Figure 3 COG annotation of *Lonsdalea populi* N-5-1 genome

Note: 1: Cell cycle control, cell division and chromosome partitioning; 2: Cell motility; 3: Cell wall/ membrane/envelope biogenesis; 4: Defense mechanisms; 5: Extracellular structures; 6: Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport; 7: Posttranslational modification, protein turnover and chaperones; 8: Signal transduction mechanisms; 9: Chromatin structure and dynamics; 10: Replication, recombination and repair; 11: RNA processing and modification; 12: Transcription; 13: Translation, ribosomal structure and biogenesis; 14: Amino acid transport and metabolism; 15: Carbohydrate transport and metabolism; 16: Coenzyme transport and metabolism; 17: Energy production and conversion; 18: Inorganic ion transport and metabolism; 19: Lipid transport and metabolism; 20: Prophages and transposons; 21: Nucleotide transport and metabolism; 22: Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism; 23: Function unknown; 24: General function prediction only

1.2.3 KEGG 分析

利用 KEGG 数据库共注释了 *L. populi* N-5-1 基因组 2 374 个基因, 分别属于细胞过程 (Cellular processes)、环境信息加工 (Environmental information processing)、遗传信息加工 (Genetic information processing)、代谢 (Metabolism) 及代谢和生物机体系统 (Metabolism and organismal systems) (图 4)。在这些类别中, 代谢 (Metabolism) 为富集最多的类别 (基因数占比 76%), 主要包括氨基酸代谢 (Amino acid metabolism)、碳水化合物代谢 (Carbohydrate metabolism)、能量代谢 (Energy metabolism) 等。五大类中富集最少的是生物机体系统 (Organismal system), 仅占全部富集基因数的 1.4%。

1.3 *L. populi* N-5-1 的致病基因分析

Ⅲ型分泌系统 (Type Ⅲ secretion system, T3SS) 效应蛋白与革兰氏阴性致病菌的致病机理有关 (Yuan et al., 2020)。本研究, 将 3 556 个蛋白编码基因在 T3SS 数据库中注释到了 501 个编码Ⅲ型分

泌系统效应蛋白的基因; 在 PHI 数据库中注释到了 427 个与宿主互作的基因, PHI 数据库中注释到的属于Ⅲ型分泌系统效应蛋白的基因有 53 个。在 PHI 注释到的 427 个基因中, 302 个基因在突变后会导致病原菌致病性降低, 39 个基因在突变后会使病原菌丧失致病性。此外, 有 36 个基因在突变后会使得病原菌的致病性增强。

在侵染植物的过程中, 病原菌分泌一系列效应子, 在植物与病原菌的相互作用中起着重要作用。效应子能否有效控制宿主是病原菌成功定殖的关键 (Jones and Dangl, 2006)。本研究在 *L. populi* N-5-1 基因组中注释到了 13 个编码效应子的基因 (表 3), 其中 4 个基因 (*L. populi* N-5-1 GL002582、*L. populi* N-5-1 GL002632、*L. populi* N-5-1 GL003401 和 *L. populi* N-5-1 GL003451) 属于 *Hopa1* 类基因。研究表明, 在 *Pseudomonas cichorii* 中将 *Hopa1* 突变不仅可以使其侵染番茄叶片的能力下降, 还会使其生物膜形成和群集运动能力减弱 (Hung et al., 2014)。

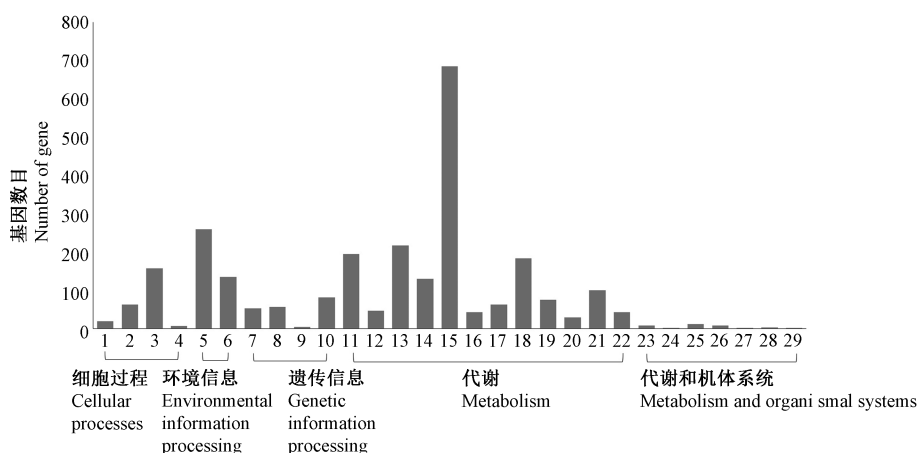


图 4 欧美杨细菌性溃疡病菌 N-5-1 基因组的 KEGG 通路分类

注: 1: 细胞生长与死亡; 2: 细胞运动; 3: 细胞群落-原核生物; 4: 运输和分解代谢; 5: 膜运输; 6: 信号转导; 7: 折叠、分类和降解; 8: 复制和修复; 9: 转录; 10: 翻译; 11: 氨基酸代谢; 12: 次生代谢产物的生物合成; 13: 碳水化合物代谢; 14: 能量代谢; 15: 全局和总览图; 16: 聚糖生物合成与代谢; 17: 脂质代谢; 18: 辅助因子和维生素的代谢; 19: 其他氨基酸代谢; 20: 萜类化合物和聚酮类化合物的代谢; 21: 核苷酸代谢; 22: 外源生物降解与代谢; 23: 衰老; 24: 消化系统; 25: 内分泌系统; 26: 环境适应; 27: 排泄系统; 28: 免疫系统; 29: 神经系统

Figure 4 KEGG annotation of *Lonsdalea populi* N-5-1 genome

Note: 1: Cell growth and death; 2: Cell motility; 3: Cellular community-prokaryotes; 4: Transport and catabolism; 5: Membrane transport; 6: Signal transduction; 7: Folding, sorting and degradation; 8: Replication and repair; 9: Transcription; 10: Translation; 11: Amino acid metabolism; 12: Biosynthesis of other secondary metabolites; 13: Carbohydrate metabolism; 14: Energy metabolism; 15: Global and overview maps; 16: Glycan biosynthesis and metabolism; 17: Lipid metabolism; 18: Metabolism of cofactors and vitamins; 19: Metabolism of other amino acids; 20: Metabolism of terpenoids and polyketides; 21: Nucleotide metabolism; 22: Xenobiotics biodegradation and metabolism; 23: Aging; 24: Digestive system; 25: Endocrine system; 26: Environmental adaptation; 27: Excretory system; 28: Immune system; 29: Nervous system

表 3 PHI 数据库中注释到的效应子基因

Table 3 The effector in PHI database

基因编号 Gene ID	E 值 E value	基因名称 Gene name	突变表型 Mutant phenotype	参考文献 References
<i>L. populi</i> N-5-1 GL000939	2. 30E-167	<i>Lpda</i>	致病效应基因 Effector	(Mattinen et al., 2007)
<i>L. populi</i> N-5-1 GL001391	8. 30E-40	<i>Xc_3703</i>	致病效应基因, 弱致病性 Effector, weakly pathogenic	(Zhao et al., 2016)
<i>L. populi</i> N-5-1 GL002059	1. 50E-101	<i>Sssb</i>	致病效应基因 Effector	(Sontag et al., 2016)
<i>L. populi</i> N-5-1 GL002582	9. 70E-76	<i>Hopa1</i>	致病效应基因, 弱致病性 Effector, weakly pathogenic	(Hung et al., 2014)
<i>L. populi</i> N-5-1 GL002632	2. 60E-75	<i>Hopa1</i>	致病效应基因, 弱致病性 Effector, weakly pathogenic	(Hung et al., 2014)
<i>L. populi</i> N-5-1 GL002645	2. 40E-65	<i>Vash</i>	致病效应基因 Effector	(Kitaoka et al., 2011)
<i>L. populi</i> N-5-1 GL002895	1. 40E-73	<i>Sseb</i>	致病效应基因 Effector	(Sontag et al., 2016)
<i>L. populi</i> N-5-1 GL003401	8. 60E-45	<i>Hopa1</i>	致病效应基因, 弱致病性 Effector, weakly pathogenic	(Hung et al., 2014)
<i>L. populi</i> N-5-1 GL003451	8. 60E-45	<i>Hopa1</i>	致病效应基因, 弱致病性 Effector, weakly pathogenic	(Hung et al., 2014)
<i>L. populi</i> N-5-1 GL003523	0. 00E+00	<i>Vask</i>	致病效应基因 Effector	(Ryu, 2015)
<i>L. populi</i> N-5-1 GL003526	7. 80E-201	<i>Vash</i>	致病效应基因 Effector	(Kitaoka et al., 2011)
<i>L. populi</i> N-5-1 GL003527	3. 20E-295	<i>T6ss2</i>	致病效应基因 Effector	(Choi et al., 2020)
<i>L. populi</i> N-5-1 GL003542	8. 60E-130	<i>Vgrg</i>	致病效应基因 Effector	(单长林, 2014)

1.4 比较基因组学分析

1.4.1 *Lonsdalea* 属的基本信息

比较 *Lonsdalea* 属中 3 个亲缘关系较近的菌种的基因组特征,发现 *Lonsdalea* 属基因组大小相似,但也略有不同;*L. populi* N-5-1(3 843 856 bp)略大于 *L.*

populi L2-3(3 651 504 bp)和 *L. berica* LMG 26264(3 781 823 bp),略小于 *L. britannica* 477(4 015 569 bp)。在这 4 个物种的全基因组信息中,*L. britannica* 477 可预测到的编码基因和 RNA 数量最多(表 4)。

表 4 *Lonsdalea* 属 3 个种及本研究测序的 *Lonsdalea populi* N-5-1 的基因组信息Table 4 Genomic information of three strains belonging to *Lonsdalea* genus and *Lonsdalea populi* N-5-1 with genome sequenced in this investigation

项目 Item	<i>L. populi</i> N-5-1	<i>L. britannica</i> 477	<i>L. iberica</i> LMG 26264	<i>L. populi</i> L2-3
基因组大小 (bp) Genome size (bp)	3 843 856	4 015 569	3 781 823	3 651 504
编码基因数目 Number of coding gene	3 556	3 501	3 284	3 088
rRNA 数目 Number of rRNA	22	22	5	12
tRNA 数目 Number of tRNA	74	83	48	68

1.4.2 基因组共线性分析

使用 MUMmer 软件对目标基因组 (*L. populi* N-5-1) 和参考基因组 (*L. britannica* 477、*L. iberica* LMG 26264 和 *L. populi* L2-3) 进行比对, 确认基因组序列之间的共线性关系及结构变异情况 (图 5)。 *L.*

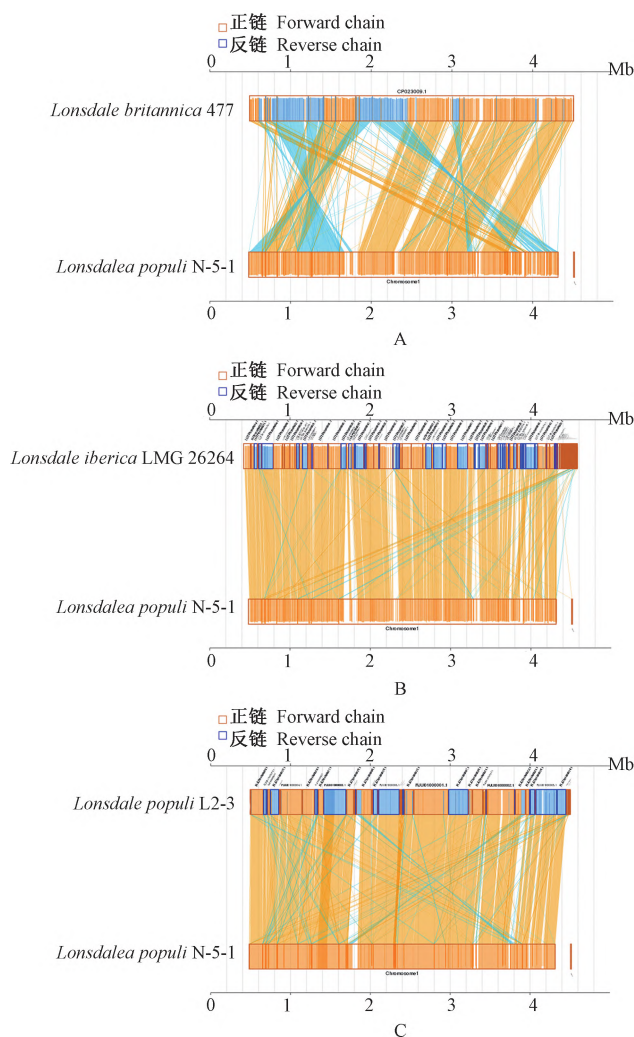


图 5 *Lonsdalea populi* N-5-1 与 *Lonsdalea britannica* 477、*Lonsdalea iberica* LMG 26264 及 *Lonsdalea populi* L2-3 的基因组共线性分析

注: A: *Lonsdalea populi* N-5-1 和 *Lonsdalea britannica* 477 共线性分析; B: *Lonsdalea populi* N-5-1 和 *Lonsdalea iberica* LMG 26264 共线性分析; C: *Lonsdalea populi* N-5-1 和 *Lonsdalea populi* L2-3 共线性分析

Figure 5 Global genome alignment of *Lonsdalea populi* N-5-1 with *Lonsdalea britannica* 477, *Lonsdalea iberica* LMG 26264 and *Lonsdalea populi* L2-3

Note: A: Global genome alignment of *Lonsdalea populi* N-5-1 and *Lonsdalea britannica* 477; B: Global genome alignment of *Lonsdalea populi* N-5-1 and *Lonsdalea iberica* LMG 26264; C: Global genome alignment of *Lonsdalea populi* N-5-1 and *Lonsdalea populi* L2-3

populi N-5-1 与 *L. britannica* 477 之间共有 419 个比对块, 覆盖 *L. populi* N-5-1 基因组的 82.62% (图 5A); *L. populi* N-5-1 与 *L. iberica* LMG 26264 之间共有 441 个比对块, 覆盖 *L. populi* N-5-1 基因组的 79.62% (图 5B); *L. populi* N-5-1 与 *L. populi* L2-3 之间共有 358 个比对块, 覆盖 *L. populi* N-5-1 基因组的 93.00% (图 5C)。根据比对结果可知, *L. populi* N-5-1 与 *L. britannica* 477 的共线性明显低于 *L. populi* N-5-1 与其他两个菌种基因组的共线性, *L. populi* N-5-1 与 *L. populi* L2-3 及 *L. iberica* LMG 26264 存在良好的共线性关系, 但是存在少量的倒位和易位等基因组重排事件。

1.4.3 系统发育分析

根据测序物种与参考物种的 16 S rRNA 序列构建的进化树拓扑结构显示, 4 个参考物种 (*L. populi* L2-3、*L. britannica* 477、*L. iberica* LMG 26264 和 *L. quercina* ATCC 29281) 和 1 个测序物种 (*L. populi* N-5-1) 可明显被聚类为 3 类, 其中, *L. populi* N-5-1 与同种 *L. populi* L2-3 亲缘关系最近, 为 I 类, *L. iberica* LMG 26264 与 *L. quercina* ATCC 29281 亲缘关系最近, 为 II 类, *L. britannica* 477 单独划分为 III 类 (图 6)。

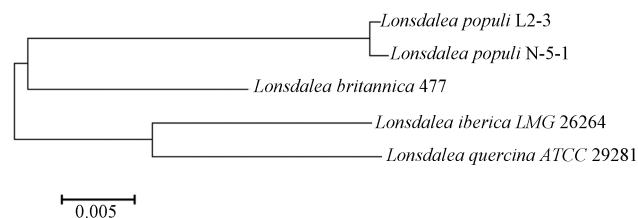


图 6 *Lonsdalea populi* L2-3、*Lonsdalea britannica* 477、*Lonsdalea iberica* LMG 26264、*Lonsdalea quercina* ATCC 29281 和 *Lonsdalea populi* N-5-1 的进化树

Figure 6 Phylogenetic analysis of *Lonsdalea populi* L2-3, *Lonsdalea britannica* 477, *Lonsdalea iberica* LMG 26264, *Lonsdalea quercina* ATCC 29281 and *Lonsdalea populi* N-5-1

2 讨论

本研究结合二代和三代测序技术, 对欧美杨细菌性溃疡病菌进了全基因组精细测序, 并对该基因组的基本特征 (序列长度、GC 含量、基因数量和功能注释等) 进行了分析。虽然 *Lonsdalea* 属已经有 37 种基因组被公布 (Ibarra et al., 2014), 但由于相同物种的不同菌株在基因和蛋白结构上存在一定差异。本研究将 *L. populi* N-5-1 基因组序列同 Nt 数据库比对发现, 所有蛋白序列匹配的同源蛋白序列来源于 2 个物种, 即 *L. britannica* (99.71%) 和胡萝卜软腐果胶

杆菌(*Pectobacterium carotovorum*) (0.29%)。 *P. carotovorum* 最初被划分为欧文氏菌属(*Erwinia*), 定名为胡萝卜软腐欧文氏菌(*E. carotovorum*) (Winslow et al., 1917), 直到 1945 年, 分类学家才把欧文氏菌属中的一些种划分为一个新属, 即果胶杆菌属(*Pectobacterium*)。胡萝卜软腐果胶杆菌和欧美杨细菌性溃疡病菌最初被鉴定的分类一样, 也是划分到欧文氏菌一类, 即(*E. quercina*)。迄今为止, 具有完整的基因组或染色体的 12 株果胶杆菌属(*Pectobacterium* spp.) 的菌株中已经测序的包括 5 株胡萝卜软腐果胶杆菌(*P. carotovorum*) (Yu et al., 2019), 虽然在 Nt 数据库的比对结果中胡萝卜软腐果胶杆菌只占同源蛋白序列的 0.29%, 但其完整的基因组序列的组装和注释有助于全面认识病菌与寄主互作过程中的致病性变异。

与其他植物病原菌一样, *L. populi* N-5-1 在侵染寄主过程中需要经历侵入期、潜育期和发病期三个不同侵染过程(Yu et al., 2019)。在接触过程中, 病原菌会分泌一些细胞壁降解酶类, 包括胶质酶、果胶酶、半纤维素酶、纤维素酶和蛋白酶等。本研究发现在 CAZy(碳水化合物相关酶)数据库中, *L. populi* N-5-1 的 109 个基因分别注释为 54 个相关酶类, 其中糖苷水解酶(Glycoside Hydrolases, GH)注释得最多, 有 47 个基因, 占全部碳水化合物相关酶的 43%, 而辅助功能(Auxiliary Activities, AAs)则没有注释到相关基因。研究表明, 糖苷水解酶通过水解糖苷键释放糖类产物, 用于生物体代谢途径。糖基转移酶(Glycosyltransferase, GT)参与细胞内多种生命活动, 将体内活性物质的单糖部分转移到蛋白质、脂质、糖和核酸中形成糖基化。这些酶在生物体的次级代谢活动中起着不可替代的作用(郭淑等, 2012)。在注释到的糖苷水解酶中, 4 个为纤维素酶基因, 分别是 *L. populi* N-5-1 GL000269、*L. populi* N-5-1 GL000336、*L. populi* N-5-1 GL000949 和 *L. populi* N-5-1 GL002673, 此外, *L. populi* N-5-1 GL000949 和 *L. populi* N-5-1 GL002673 基因在 *L. britannica* 477 中也同样注释为纤维素酶基因, 表明这两种溃疡病菌在侵染各自宿主时可能释放同样的纤维素酶降解植物细胞壁。本研究在 *L. populi* N-5-1 基因组中共注释到果胶酶基因 11 个, 纤维素酶基因 4 个。而在 *Pcb* BZA12 菌株基因组中果胶酶相关基因就多达 24 个。已知 *Pcb* BZA12 可以引发胡萝卜软腐病, 而果胶酶基因是该病原菌引发致病性的关键因子(Yu et al., 2019)。而将 *L. populi* N-5-1 中 3 个编码果胶酶的 *pel*

基因进行插入突变后, 发现果胶酶基因的突变体并没有表现出明显的致病性变化(杨莉, 2013)。由此推测, 不同病原菌的致病因子并不完全相同, 病原菌侵染宿主可能还涉及多种致病因子的协同作用。

在 PHI 数据库中共有 25 个基因被注释为 T6SS 相关基因, 其中 2 个基因为蛋白质分解伴侣蛋白基因, 7 个假定蛋白基因, 7 个 T6SS 蛋白基因, 其余基因为 *VgrG* 和 *hcp*。研究表明, *VgrG* 和 *hcp* 是 VI 型分泌系统 T6SS 中的效应子, 水稻细菌性褐条病菌(*Avenae avenae* subsp. *Avena*)中的 *vgrG1/vgrG2* 基因突变可导致病原菌的致病性丧失(单长林, 2014)。最新研究表明, T6SS 能够将效应蛋白转移到受体革兰氏阴性菌的细胞周质中, 在细菌间的对抗中取得竞争优势(Coulthurst, 2013)。T6SS 的效应子主要有 3 类, 包括破坏细胞壁的效应子、破坏细胞膜的效应子及增加种间竞争优势和破坏核酸的效应子。在本研究中, 注释到了与破坏细胞壁有关的 *VgrG* 效应子基因, 由此推测当该病原菌侵入宿主植物的形成层中时, 病原菌的 T6SS 可能会与形成层中的土著微生物形成种间竞争, 病原菌通过释放破坏细胞壁的效应子在种间竞争中形成优势, 从而使侵染范围进一步扩大, 但这有待实验进一步证实。

在 PHI 数据库中注释到的 36 个基因在突变后会使得病原菌的致病性增强(Yang et al., 2018), 其中 *Kdpe*(*L. populi*.N-5-1GL001552)和 *Qseb*(*L. populi*.N-5-1GL000333)属于双组分信号转导系统, 该系统通过感应细胞内外的信号刺激从而特异性调节基因表达和细胞的生理生化功能(Galperin, 2006)。在欧美杨细菌性溃疡病菌中, 对 *KdpD-KdpE* 突变会使病原菌毒力下降(Yang et al., 2018), 相反, 在 *Salmonella enterica* 中对其突变会使毒力增强。通过进一步挖掘 *L. populi* N-5-1 基因组中的重要功能基因, 将有可能解析 *L. populi* N-5-1 菌株的致病性分子机制。

本研究通过二代和三代测序技术对欧美杨细菌性溃疡病菌进行全基因组测序, 经过拼接后得到细菌基因组完成图, 大小为 3 843 856bp, 预测到 3 556 个基因, GC 占比 56.81%。重复序列 86 个, 占比 0.295 7%, 非编码 RNA 115 个, 占比 1.047 3%。通过数据库对组装基因进行 COG、GO 和 KEGG 富集及分析, 找到并注释了相关调控通路基因, 其中在 COG 数据库注释到 2 784 个基因, GO 数据库注释到 2 348 个基因, KEGG 数据库注释到 2 374 个基因。在 PHI 数据库中注释到了 427 个基因, 其中 13 个效应子基

因。在 T3SS 数据库中注释到 501 个 III 型编码分泌蛋白的基因,这些基因的注释有助于人们全面认识欧美杨细菌性溃疡病菌致病相关基因及其在与寄主互动过程中的致病性。

3 材料与方法

3.1 细菌菌株、培养基及培养条件

欧美杨细菌性溃疡病菌 N-5-1(*Lonsdalea populi*) 由北京林业大学森林保护学教育部重点实验室贺伟教授提供。使用 LB 液体培养基,在 28 ℃ 条件下 180 r/min 振荡培养 36 h 后进行基因组 DNA 提取。

3.2 细菌基因组 DNA 的提取

使用 SteadyPure 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(艾科瑞公司,湖南),开展欧美杨细菌性溃疡病菌基因组 DNA 的提取。

3.3 细菌基因组测序和组装

将经过 Qubit 和琼脂糖凝胶电泳检测合格的基因组 DNA 随机打断,并加上接头进行 cluster 制备。随后,进行文库制备。通过 BGISEQ 平台进行上机测序。在获得合格的高质量 DNA 后,采用 Oxford Nanopore Technologies 公司的建库试剂盒进行测序文库构建,最后在 Nanopore 平台进行上机测序。

通过对 BGISEQ 原始测序数据去除质量值连续 ≤ 20 的碱基数达到 40% 的 reads;去除含 N 的碱基数目总和达到 10% 的 reads;去除 adapter 污染;去除 duplication 污染的序列,得到 Clean Reads。通过对 nanopore 原始数据的长度筛选(阈值为 2 000 bp)得到 nanopore 的可靠数据。

使用 Unicycler(Delcher et al., 2007)软件来组装 BGISEQ 和 nanopore 的 reads,通过 Glimmer(Salzberg et al., 1998;Delcher et al., 1999)软件对组装结果进行基因模型预测。

3.4 基因功能注释

使用 RNAmmer(Lagesen et al., 2007)、tRNAscan-SE(Lowe and Eddy, 1997)、Rfam(Gardner et al., 2009)和 TRF(Benson, 1999)分别对完整的细菌基因组测序序列进行 rRNA、tRNA、sRNA 及重复序列的预测。预测到的编码序列利用 Gene Ontology(GO)、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)、Cluster of Orthologous Groups of Proteins(COG)、NR、Antibiotic Resistance Genes Database

(ARDB)、Pathogen Host Interactions (PHI)、Carbohydrate-Active Enzymes Database (CAZy)、Virulence Factor Database (VFDB)、Type III Secretion System Effector Protein (T3SS)、TransportDB(<http://www.membranetransport.org/transportDB2/index.html>)和 Antibiotic Resistance Gene-ANNOtation (ARG-ANNOt)数据库进行比对,注释功能基因。

3.5 比较基因组学分析

3.5.1 共线性分析

根据参考菌的基因组序列将目标菌的基因组序列进行基于 MUMmer(Kurtz et al., 2004)比对结果的排序,根据两个基因组的总长度将序列按比例缩小,然后分别构建二维共线性图中的 XY 坐标轴和线性共线性图中的上下坐标轴。之后分别将目标菌蛋白集 P1 与参考菌蛋白集 P2 进行 P1 对 P2、P2 对 P1 的 BLASTp 比对,对于库中的每个蛋白选取最佳的比对结果,得到蛋白对(Besthit)。最后保留两次比对一致的蛋白对,该蛋白对的一致值为两次比对一致值的均值。根据得到的蛋白对的位置信息,等比例缩小后标于图中。

3.5.2 系统发育分析

选取 NCBI 数据库中的 4 个具有全基因组序列的 *Lonsdalea* 属菌株进行系统发育树分析。在 NCBI 中下载 *L. populi* L2-3、*L. britannica* 477、*L. iberica* LMG 26264 和 *L. quercina* ATCC 29281 家族基因的 16 S rRNA 基因 fasta 格式序列,将序列文件导入 MEGA7.0 软件,采用近邻相接法(Neighbor-joining method, NJ)和 1 000 次重复(Replications)的 Bootstrap 值构建进化树。

作者贡献

张立春是本研究的实验设计和实验研究的执行人,完成了数据整理、分析和论文撰写工作;肖丹丹和付田田参与实验结果分析;王延伟是项目的构思者及负责人,指导实验设计、数据分析和论文写作与修改。全体作者都已阅读并同意最终的文本。

参考文献

Benson G., 1999, Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences, *Nucleic Acids Res.*, 27(2): 573-580.

- Caillaud M., Asai S., Rallapalli G., Piquerez S., Fabro G., and Jones J.D.G., 2013, A downy mildew effector attenuates salicylic acid-triggered immunity in *Arabidopsis* by interacting with the host mediator complex, *PLoS Biol.*, 11(12): e1001732.
- Choi Y., Kim N., Manna M., Kim H., Park J., Jung H., Han G., Lee H.H., and Seo Y.S., 2020, Characterization of type VI secretion system in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and its role in virulence to rice, *Plant Pathol.*, 36(3): 289-296.
- Coulthurst S.J., 2013, The type VI secretion system – a widespread and versatile cell targeting system, *Res. Microbiol.*, 164(6): 640-654.
- Delcher A.L., Bratke K.A., Powers E.C., and Salzberg S.L., 2007, Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with glimmer, *Bioinformatics*, 23(6): 673-679.
- Delcher A.L., Harmon D., Kasif S., White O., and Salzberg S.L., 1999, Improved microbial gene identification with GLIMMER, *Nucleic Acids Res.*, 27(23): 4636-4641.
- Galperin M.Y., 2006, Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations, *J. Bacteriol.*, 188(12): 4169-4182.
- Gardner P.P., Daub J., Tate J.G., Nawrocki E.P., Kolbe D.L., Lindgreen S., Wilkinson A.C., Finn R.D., Griffiths-Jones S., Eddy S.R., and Bateman A., 2009, Rfam: updates to the RNA families database, *Nucleic Acids Res.*, 37(Database issue): D136-D140.
- Guo X., Luo H.M., Song J.Y., Sun C., and Chen S.L., 2012, Research progress of glycosyltransferase in plant secondary metabolism, *World Science and Technology (Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica)*, 14(6): 2126-2130. (郭淑, 罗红梅, 宋经元, 孙超, 陈士林, 2012, 糖基转移酶在植物次生代谢途径中的研究进展, 世界科学技术(中医药现代化), 14(6): 2126-2130.)
- He W., Ren F.J., Guo L.M., Li Y., and Chang J.P., 2009, Pathogen identification of *Populus × euramericana* canker disease, *Scientia Silvae Sinicae*, 45(6): 104-108. (贺伟, 任飞娟, 郭利民, 李永, 常聚普, 2009, 欧美杨溃疡病的病原鉴定, 林业科学, 45(6): 104-108.)
- Hung N.B., Ramkumar G., and Lee Y.H., 2014, An effector gene *hopA1* influences on virulence, host specificity, and lifestyles of *Pseudomonas cichorii* JBC1., *Res. Microbiol.*, 165(8): 620-629.
- Ibarra Caballero J., Zerillo M.M., Snelling J., Cranshaw W., Boucher C., and Tisserat N., 2014, Genome sequences of strain ATCC 29281 and pin and northern red oak isolates of *Lonsdalea quercina* subsp. *quercina*, *Genome Announc.*, 2(3): e00584-14.
- Jones J.D.G., and Dangl J.L., 2006, The plant immune system, *Nature*, 444(7117): 323-329.
- Kitaoka M., Miyata S.T., Brooks T.M., Unterwiesing D., and Pukatzki S., 2011, VasH is a transcriptional regulator of the type VI secretion system functional in endemic and pandemic *Vibrio cholerae*, *J. Bacteriol.*, 193(23): 6471-6482.
- Kurtz S., Phillippy A., Delcher A.L., Smoot M., Shumway M., Antonescu C., and Salzberg S.L., 2004, Versatile and open software for comparing large genomes, *Genome Biol.*, 5(2): R12.
- Lagesen K., Hallin P., Rødland E.A., Staerfeldt H.H., Rognes T., and Ussery D.W., 2007, RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes, *Nucleic Acids Res.*, 35(9): 3100-3108.
- Li A.N., YANG R.L., WEI Q., and He W., 2018, Functional analysis of Orphan *LqRR2* gene in *Lonsdalea quercina* subsp. *populi*, *Acta Phytopathologica Sinica*, 48(4): 492-500 (李爱宁, 杨若兰, 魏强, 贺伟, 2018, 欧美杨细菌性溃疡病菌双组份系统反应调节基因 *LqRR2* 的功能研究, 植物病理学报, 48(4): 492-500.)
- Li B., Li A.N., Wei Q., Wang H.M., and He W., 2015, Functional analysis of *hrcJ* gene in *Lonsdalea quercina* subsp. *populi*, *Scientia Silvae Sinicae*, 51(12): 71-78 (李宾, 李爱宁, 魏强, 王海明, 贺伟, 2015, 欧美杨细菌性溃疡病菌 *hrcJ* 基因的功能分析, 林业科学, 51(12): 71-78.)
- Li Y., 2013, Fungal and bacterial communities in healthy and canker-infected bark of *Populus × euramericana* cv. '74/76' and *P. euramericana* cv. 'zhonglin 46', Dissertation for Ph.D., Beijing Forestry University, Supervisor: He W., pp.12-15 (李永, 2013, 健康与染溃疡病 107 杨、中林 46 杨树皮真菌和细菌群落研究, 博士学位论文, 北京林业大学, 导师: 贺伟, pp.12-15.)
- Li Y., Xue H., Guo L.M., Koltay A., Palacio-Bielsa A., Chang J., Xie S., and Yang X., 2017, Elevation of three subspecies of *Lonsdalea quercina* to species level: *Lonsdalea britannica* sp. nov., *Lonsdalea iberica*

- sp. nov. and *Lonsdalea populi* sp. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 67(11): 4680-4684.
- Lowe TM., and Eddy SR., 1997, tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence, *Nucleic Acids Res.*, 25 (5): 955-964.
- Mattinen L., Nissinen R., Riipi T., Kalkkinen N., and Pirhonen M., 2007, Host-extract induced changes in the secretome of the plant pathogenic bacterium *Pectobacterium atrosepticum*, *Proteomics*, 7 (19): 3527-3537.
- McDowell JM., 2019, Focus on activation, regulation, and evolution of MTI and ETI, *Mol. Plant Microbe Interact.*, 32(1): 5.
- Ren FJ., 2011, Pathogen identification of *populus × euramerica* canker disease, Thesis for MS., Beijing Forestry University, Supervisor: He W., pp.1-10 (任飞娟, 2011, 欧美杨溃疡病原鉴定, 硕士学位论文, 北京林业大学, 导师: 贺伟, pp.1-10.)
- Russell AB., Peterson SB., and Mougous JD., 2014, Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose, *Nat. Rev. Microbiol.*, 12(2): 137-148.
- Ryu CM., 2015, Against friend and foe: type 6 effectors in plant-associated bacteria, *J. Microbiol.*, 53 (3): 201-208.
- Salzberg SL., Delcher AL., Kasif S., and White O., 1998, Microbial gene identification using interpolated Markov models, *Nucleic Acids Res.*, 26 (2): 544-548.
- Shan C.L., 2014, Study on the control of rice bacterial brown stripe by regulating *vgrG* gene of type VI secretion system, Thesis for MS., Zhejiang University, Supervisor: Li B., pp.20-30 (单长林, 2014, 调控VI型分泌系统 *vgrG* 基因控制水稻细菌性褐条病, 硕士学位论文, 浙江大学, 导师: 李斌, pp.20-30.)
- Sontag RL., Nakayasu ES., Brown RN., Niemann GS., Sydor M.A., Sanchez O., Ansong C., Lu S.Y., Choi H., Valleau D., Weitz KK., Savchenko A., Cambronne ED., and Adkins JN., 2016, Identification of novel host interactors of effectors secreted by *Salmonella* and *Citrobacter*, *Msystems*, 1(4): e00032-15.
- Soria S., and Lopez P.M., 1997, Sintomatologiy danos de *Erwinia quercina* en Espanay surpossible relation con la secada la encina, *Erologa*, 11: 298-301.
- Wei Q., Li AN., and He W., 2017, Functional analysis of *LqHK1* in *Lonsdalea quercina* subsp. *populi*, *Scientia Silvae Sinicae*, 53(4): 105-112 (魏强, 李爱宁, 贺伟, 2017, 欧美杨细菌性溃疡病菌双组分信号转导系统 *LqHK1* 基因的功能, *林业科学*, 53(4): 105-112.)
- Wichmann F., Vorhölter F.J., Hersemann L., Widmer F., Blom J., Niehaus K., Reinhard S., Conradin C., and Kölliker R., 2013, The noncanonical type III secretion system of *Xanthomonas translucens* pv. *graminis* is essential for forage grass infection, *Mol. Plant Pathol.*, 14(6): 576-588.
- Winslow C.E., Broadhurst J., Buchanan R.E., Krumwiede C., Rogers L.A., and Smith G.H., 1917, The families and genera of the bacteria: preliminary report of the committee of the society of american bacteriologists on characterization and classification of bacterial types, *J. Bacteriol.*, 2(5): 505-566.
- Yang L., 2013, Identification and characterization of the pathogenicity-related genes in *Lonsdalea quercina* N-5-1, Dissertation for PhD., Beijing Forestry University, Supervisor: He W., pp.12-15 (杨莉, 2013, 欧美杨溃疡病菌 (*Lonsdalea quercina*) N-5-1 致病相关基因的鉴定与分析, 博士学位论文, 北京林业大学, 导师: 贺伟, pp. 12-15.)
- Yang L., Xu B., He W., and Zhang L., 2014, The HrpW protein of *Lonsdalea quercina* N-5-1 has pectate lyase activity and is required for full bacterial virulence, *J. Basic Microb.*, 54 (10): 1126-1135.
- Yang RL., Deng C.Y., Wei J.W., He W., Li AN., and Qian W., 2018, A large-scale mutational analysis of two-component signaling systems of *Lonsdalea quercina* revealed that *KdpD-KdpE* regulates bacterial virulence against host poplar trees, *Mol. Plant Microbe Interact.*, 31(7): 724-736.
- Yu F.H., Liu C.Y., Wang H., Guan T., Li L., and Yu S., 2019, Bioinformatic analysis of the complete genome sequence of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* BZA12 and candidate effector screening, *J. Plant Pathol.*, 101(1): 39-49.
- Yuan X., Yu M., and Yang C.H., 2020, Innovation and application of the type III secretion system inhibitors in plant pathogenic bacteria, *Microorganisms*, 8 (12): 1956.
- Zhang J., Li W., Xiang T., Liu Z., Laluk K., Ding X., Zou Y., Gao M., Zhang X., Chen S., Mengiste T., Zhang Y., and Zhou J.M., 2010, Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune

- receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector, *Cell Host Microbe*, 7(4): 290-301.
- Zhao ZX., Wu Z., and Zhang J., 2016, Crystal structure of the YajQ-family protein XC_3703 from *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*, *Acta Crystallogr. F*, 72(Pt 9): 720-725.

(责任编辑 罗厚枚)