

薏苡黑粉菌基因组测序揭示其物种分类及适应性进化

李祥栋^{1,2*}, 郑传奇¹, 陆秀娟^{1,2}, 潘虹^{1,2}, 魏心元^{1,2}, 石明², 付瑜华³, 陆平⁴, 高爱农⁴, 周美亮^{4*}

1 黔西南州农业林业科学研究院, 贵州 兴义 562400

2 贵州省薏苡工程技术研究中心, 贵州 兴义 562400

3 贵州省亚热带作物研究所, 贵州 兴义 562400

4 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081

摘要: 以薏苡黑粉菌病瘿为研究对象, 采用固体和液体培养方法对薏苡黑粉菌进行分离纯化培养和形态观察; 利用 Illumina、Pacbio 测序和 Hi-C 辅助基因组组装技术对黑粉菌进行测序、组装和注释, 分析其基因组结构和组成特征。通过与其他 6 个黑粉菌物种基因组进行比较基因组学研究, 分析薏苡黑粉菌的基因家族进化和系统发育关系。在 pH 7 的固体 PDA 和液体 PDB 培养基中实现了薏苡黑粉菌的纯化培养, 固体培养菌落表现为白色、表面隆起、具褶皱, 较湿润且不透明的形态特征。Illumina、Pacbio 和 Hi-C 组装结果显示, 薏苡黑粉菌具有 20 对染色体(2n=40), 基因组大小 20.093 417 Mb, GC 含量 53.81%; 共预测和注释到 7 476 个蛋白编码基因和 164 个非编码基因, 占整个基因组长度的 61.02%和 0.285 3%; 查找到 3 674 个散在重复序列和 8 139 个串联重复序列, 分别占整个基因组长度的 2.754 4%和 1.605 4%。同源基因家族聚类显示, 7 个黑粉菌物种 *Ustilago coicis*、*U. bromivora*、*U. maydis*、*U. hordei*、*Sporisorium reilianum*、*S. scitamineum* 和 *S. graminicola* 的编码基因被聚类为 6 999 个基因家族, 其中共有基因家族 5 379 个。薏苡黑粉菌包含 5 339 个单拷贝基因、105 个多拷贝基因、89 个特异基因、752 个其他基因和 188 个未分类基因。基因家族进化和系统发育聚类表明, 薏苡黑粉菌 *U. coicis* 在~60.9 MYA 分化出来, 与雀麦黑粉菌 *U. bromivora*、大麦坚黑粉菌 *U. hordei* 聚为一支, 表现为更近的亲缘关系; 而玉米黑粉菌 *U. maydis* 在~66.6 MYA 分化出来与 3 个孢堆黑粉菌物种 *S. scitamineum*、*S. graminicola* 和 *S. reilianum* 聚为一支。

关键词: 黑粉菌; 基因组; 系统发育; 薏苡

基金项目: 第三次全国作物种质资源普查收集——杂粮种质资源繁殖编目入库(19210866); 贵州省现代农业产业体系(黔财农[2019]15 号); 黔西南州科技计划项目(2020-1-03)

Supported by Project of Collection, Expanding, Cataloging and Warehousing of Minor Crop Germplasm Resources, the Third National Survey and Collection Action on Crop Germplasm Resources (19210866), Construction of Modern Agricultural Industrial System in Guizhou Province ([2019]15), and Southwest Guizhou Science and Technology Program (2020-1-03).

*Corresponding authors. E-mail: lixiangdongsiji@163.com, zhoumeiliang@caas.cn

Received: 2022-02-27, accepted: 2022-04-21

[引用本文] 李祥栋, 郑传奇, 陆秀娟, 潘虹, 魏心元, 石明, 付瑜华, 陆平, 高爱农, 周美亮, 2022. 薏苡黑粉菌基因组测序揭示其物种分类及适应性进化. 菌物学报, 41(12): 1960-1970

Li XD, Zheng CQ, Lu XJ, Pan H, Wei XY, Shi M, Fu YH, Lu P, Gao AN, Zhou ML, 2022. Sequencing of adlay smut fungus genome provides insights into pathogen taxonomy and adaptive evolution. Mycosystema, 41(12): 1960-1970

Sequencing of adlay smut fungus genome provides insights into pathogen taxonomy and adaptive evolution

LI Xiangdong^{1,2*}, ZHENG Chuanqi¹, LU Xiujuan^{1,2}, PAN Hong^{1,2}, WEI Xinyuan^{1,2}, SHI Ming², FU Yuhua³, LU Ping⁴, GAO Ainong⁴, ZHOU Meiliang^{4*}

1 Southwest Guizhou Institute of Agricultural and Forestry Sciences, Xingyi 562400, Guizhou, China

2 Adlay Engineering Technical Research Centre in Guizhou, Xingyi 562400, Guizhou, China

3 Subtropical Crop Research Institute of Guizhou Province, Xingyi 562400, Guizhou, China

4 Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: Affected tissues of adlay (*Coix L.*) were selected as research materials and the adlay smut *Ustilago coicis* were separated, purified and observed in solid and liquid nutrient medium. The smut fungus genome were sequenced, assembled and annotated by Illumina, Pacbio and Hi-C technologies. The homology gene family evolution and phylogeny were studied by comparative genetics among adlay smut fungus and the other six smut fungus species. *Ustilago coicis* was successfully cultured and purified in solid PDA and liquid PDB media at pH 7. The colony on PDA is pulvinate and wrinkly, with white color, moist and opaque. Illumina, Pacbio and Hi-C sequencing and assembly showed that the whole genome of adlay smut fungus has 20 chromosome pairs (2n=40), with a size of 20.093 417 Mb and 53.81% GC content. There were a prediction and annotation of 7 476 protein-coding and 164 non-coding genes with a length ratio of 61.02% and 0.285 3% respectively. A sum of 3 674 dispersed duplications and 8 139 tandem duplications was hunted, occupying 2.754 4% and 1.605 4% of the whole genome length. Homology gene clustering exhibited that protein-coding genes of *U. coicis*, *U. bromivora*, *U. maydis*, *U. hordei*, *Sporisorium reilianum*, *S. scitamineum*, and *S. graminicola* were clustered into 6 999 gene families in which shared gene families totaled 5 379. There were 5 339 single-copy orthologs, 105 multiple-copy orthologs, 89 unique paralogs, 752 other othologs and 188 unclustered genes in *U. coicis*. The gene family evolution and phylogeny clustering also revealed that *U. coicis* was split in ~60.9 MYA, and clustered with *U. bromivova* and *U. hordei*, hinting their closer relatives; however, *U. maydis*, a species parasitized corn, was split in ~66.6 MYA, and clustered with *S. scitamineum*, *S. graminicola* and *S. reilianum*.

Keywords: smut; genome; phylogeny; adlay

薏苡为一年生或多年生草本植物,是与玉蜀黍属、摩擦禾属和高粱属平行的分类学属。薏苡作为药(医)食同源作物的典型代表,在中国

的产业分布区域性强,主要分布在贵州、云南、广西、浙江和福建各省,安徽、河北、辽宁和台湾等地亦有零星种植。薏苡黑穗病是严重影

响薏苡产量和品质的病害之一,生产上品种单一化种植、常年连作和种子带菌是薏苡黑穗病害发生的重要因素,严重时发病率可达50%–100%,薏苡黑穗病菌基因组信息解析对于深入研究其侵染机制、抗性育种和绿色防控具有重要意义。黑穗病,又称黑粉病,往往是由担子菌亚门、黑粉菌目、黑粉菌科真菌引发的系统病害,致病菌属于活体寄生型致病真菌,能够侵染多种植物或作物,主要病症是在发病部位形成黑色粉状物。目前,在玉米(贺字典等 2006; 张小飞等 2010)、甘蔗(杨志才等 2010; 吴伟怀等 2020)、高粱(吴新兰等 1982; Prom *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2011)和糜子(吴恩果等 2020)等众多作物中均广泛存在,但在不同作物中均为不同的生物学属(种),而且对宿主侵染具有专一性,如 *Sporisorium scitamineum* 类群专一寄生甘蔗, *Sporisorium reilianum* 则专一寄生高粱。薏苡黑粉菌主要危害薏苡穗部,也可危害茎、叶,形成病瘿。Small (1927)首次发现薏苡黑粉病菌并命名为 *Ustilago coicis* Bref;其后 Mundkur (1940)用自己的名字进行了命名;1946 年印度学者将上述薏苡黑粉菌定义为 *Ustilago coicis* (Chowdhury 1946),并一直沿用至今。Zhang *et al.* (2011)在亚显微水平解析了黑粉病菌和寄主相互作用及冬孢子发育过程,并利用核糖体 DNA 序列(ITS 和 LSU)探讨了其系统发育地位。本研究团队在前期研究中,利用 ITS 高通量测序技术对薏苡的黑粉病瘿检测,在属分类水平发现 2 个与黑粉病相关的近缘真菌属 *Sporisorium* 和 *Ustilago* (Li *et al.* 2020)。迄今为止,有关薏苡黑粉菌的侵染机制、菌群的遗传分化仍知之甚少,其菌体形态学和生物学特征、遗传基础等方面的研究也基本空白。本研究通过对薏苡黑粉病菌进行分离纯化,旨在对其基因组进行 *de novo* 组装和比较基因组学分析,阐明其分类学及系统发育地位,为薏苡的抗病育种和绿色防控提供强有力的理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为薏苡黑粉菌病瘿,2020 年采集于贵州省兴义市万峰林基地的薏苡黑粉菌发病总苞,选择感病但未破裂的完整薏苡幼果,装入干净的信封,阴干,备用。

1.2 方法

1.2.1 薏苡黑粉菌的分离培养及形态学

选取完整的感病薏苡总苞,用镊子剥开表面消毒后的薏苡总苞,轻轻挑取总苞内黑粉(冬孢子或厚垣孢子)接种于含有土豆 200 g/L、琼脂粉 15 g/L 和葡萄糖 20 g/L 的 PDA 固体培养基中,放入 25 °C 温室中培养 10 d 左右直至长出特定菌落,然后挑取无杂菌污染的黑粉菌菌落放入新配制的 PDA 固体培养基中,如此重复 2–3 次,得到高纯度的黑粉菌菌株(SM20200810);用 5 mm 菌落打孔器在分离提纯的单菌落上打孔取样,取样后接种于分装体积为 100 mL 的 PDB 液体培养基,获得黑粉菌的液体培养菌液,并采用光学显微镜观察菌株孢子和菌落的显微结构。

1.2.2 总 DNA 提取及检测

选取提纯的固体培养菌株,采用 Omega 试剂盒进行总 DNA 提取,利用 Qubit3.0 DNA 检测试剂盒对基因组 DNA 精确定量。

1.2.3 Illumina 和 Pacbio 测序

用 TruSeq™ Nano DNA Sample Prep Kit 方法构建 300–500 bp 的短片段文库,利用 Illumina NovaSeq 进行 PE150 bp 双末端测序;Pacbio 测序采用 G-tubes 方法将基因组 DNA 处理成 8–10 kb 的片段并构建长片段测序文库,Pacbio Sequel HiFi 测序平台对黑粉菌株进行高通量测序。

1.2.4 Hi-C 建库和测序

以目标菌株液体培养菌丝为试验材料,使用甲醛处理细胞,将 DNA 与蛋白质交联,固定 DNA 的构象;裂解细胞后,用限制性内切酶处

理交联的 DNA，产生黏性末端；末端补平修复，并同时引入生物素，标记寡核苷酸末端；使用 DNA 连接酶连接临近的 DNA 片段，用蛋白酶消化解除与 DNA 的交联状态，纯化 DNA 并打断至长度为 500–700 bp 的片段；使用亲和素磁珠捕获标记的 DNA，进行二代 Illumina 建库测序，通过添加 Hi-C 数据进一步提高组装指标，并构建菌株染色体。

1.2.5 基因组组装、注释和质量评估

基于 Illumina 与 Pacbio 测序数据，首先用软件 MaSuRCA v3.4.3 (<http://www.genome.umd.edu/masurca.html>)对 Illumina reads 和 Pacbio long reads 进行混合组装。其次用软件 Canu v2.1.1 (<https://github.com/marbl/canu>)进行三代 Pacbio long-reads 的高质量组装，然后用软件 MUMer v4.0 (<http://mummer.sourceforge.net/>)整合上述组装结果并去冗余；采用软件 Racon (<https://github.com/isovic/racon>)对整合后的基因组序列进行 3 轮 polish，然后再用软件 Pilon (<https://github.com/broadinstitute/pilon/wiki>)进行至少 3 轮碱基校正，基本上保证组装基因组序列 99.9%的准确性。最后，根据 Hi-C 结果，使用软件 ALLHiC (<https://github.com/tanghaibao/allhic>)对基因组 contigs 或 scaffolds 进行连接，将 contigs 或者 scaffolds 进行聚类、排序和定向，得到染色体水平基因组。根据基因组组装结果，将预测基因的蛋白序列分别与 NR、Swiss-Prot、eggNOG、KEGG 和 GO 数据库进行 blastp 比对，获得蛋白

编码基因的注释信息。采用 RNAmmer 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/RNAmmer/>)预测 rRNA，tRNAscan 软件(<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/index.html>)预测 tRNA 区域和 tRNA 的二级结构，Rfam 软件(<http://eddylab.org/inferral/>)预测 sRNA。通过 RepeatMasker 软件(<http://www.repeatmasker.org>)识别散在重复序列，TRF 软件(<https://tandem.bu.edu/trf/trf.html>)搜寻 DNA 序列中的串联重复序列。RepeatMasker 通过将序列与已知重复序列数据库 Repbase 进行比对来搜索散在重复序列，TRF 通过百分比验证和邻接模式拷贝 InDels 频率来模拟串联重复序列并使用统计学标准来对串联重复序列进行识别，用软件 Buscov3.0.2 (<https://busco.ezlab.org/>)评估组装结果。

1.2.6 基因家族分析及系统聚类

以薏苡黑粉菌测序基因组和 NCBI 数据库中其他 6 种黑粉菌基因组(表 1)进行比较基因组学分析。采用 OrthoMCL v2.0.3 软件(<http://orthomcl.org/orthomcl/>)对 7 个物种的氨基酸序列进行比对和同源基因家族聚类；在此基础上选取参与分析的物种都含有且为单一拷贝的同源基因，利用 MUSCLE v3.8.31 软件(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>)进行多序列比对；采用 jModeltest v2.1.10 软件(<http://darwin.uvigo.es/>)对模型参数进行最大似然估计，然后用 PhyML v3.0 (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>)构建 ML (maximum likelihood)系统进化树；通过网站

表 1 不同黑粉菌物种的基因组信息
Table 1 Information of different smut fungus genomes

BioProjects	中文名称 Chinese name	学名 Scientific name	宿主 Host	文献来源 Reference
PRJEB7751	雀麦黑粉菌	<i>Ustilago bromivora</i>	二穗短柄草 <i>Brachypodium</i>	Rabe <i>et al.</i> 2016
PRJNA14007	玉米黑粉菌	<i>Ustilago maydis</i>	玉米 Maize	Kämper <i>et al.</i> 2006
PRJNA727466	大麦坚黑粉菌	<i>Ustilago hordei</i>	大麦 Barley	Laurie <i>et al.</i> 2012
PRJEB19311	高粱丝孢堆黑粉菌	<i>Sporisorium reilianum</i>	高粱 Sorghum	Schweizer <i>et al.</i> 2018
PRJNA275631	甘蔗鞭孢堆黑粉菌	<i>Sporisorium scitamineum</i>	甘蔗 Sugarcane	Que <i>et al.</i> 2014
PRJNA554127	禾生孢堆黑粉菌	<i>Sporisorium graminicola</i>	梯牧草 <i>Plenum pratense</i>	Solano-González <i>et al.</i> 2019

(<http://www.timetree.org/>)获取物种的化石分化时间,使用 PAML MCMCtree (<http://abacus.gene.ucl.ac.uk/software/paml.html>)估计分歧时间,把物种的化石分化时间插入到系统发育树中。根据基因家族以及分歧时间树的结果,利用 CAFE 软件模拟一个随机的基因出生和死亡率 λ ,预测不同物种在各进化支上基因家族的进化情况。

2 结果与分析

2.1 薏苡黑粉菌的生长形态

薏苡黑粉菌的厚垣孢子在苗期萌发侵入幼芽,此后随着植株的生长点生长,侵入子房、茎和叶形成病瘿,造成全株发病。发病时期主要集中在薏苡的抽穗开花期,发病后子房膨大、茎叶弯曲变形,形成瘤状体,内部充满黑褐色粉状物(图 1A),即厚垣孢子(或冬孢子)。厚垣孢子呈球形至椭圆形,壁厚,表面具刺突(图 1B)。挑取厚垣孢子在 pH 7 的 PDA 培养基上进行纯化培养,菌落形态为白色、表面隆起、具褶皱,较湿润且不透明(图 1C);将固体培养菌落接种至液体 PDB 培养基上,黑暗振荡培养 3–5 d,即

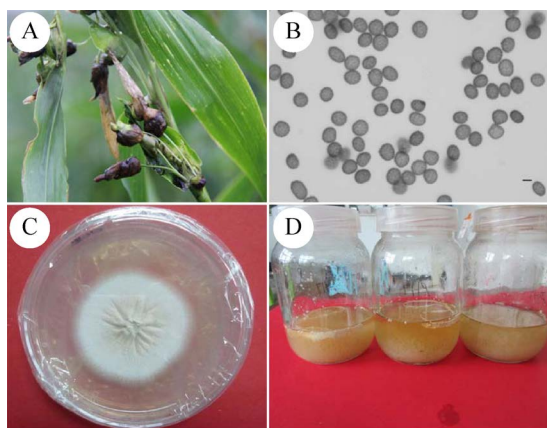


图 1 薏苡黑粉菌主要形态特征 A: 发病总苞; B: 厚垣孢子; C: 固体培养菌落; D: 液体培养菌丝。标尺=5 μm

Fig. 1 Phenotypic characteristics of adlay smut fungus *Ustilago coicis*. A: Pathogenetic involucre; B: Chlamydospore; C: Colony on solid nutrient medium; D: Hyphae in liquid nutrient medium. Bar=5 μm .

可得到液体培养菌丝,液体培养状态下,菌丝聚集成松散的小球,菌丝呈白色(图 1D)。

2.2 薏苡黑粉菌基因组组装、注释和结构特征

利用 Illumina、Pacbio 和 Hi-C 测序数据对薏苡黑粉菌基因组进行测序和染色体组装(Bioproject: PRJNA793722),Illumina 和 Pacbio 测序分别获得 5 495.6 Mb 和 2 764.1Mb 净数据产出,测序深度分别达到 273.5 $\times$ 和 137.5 $\times$;组装得到 20 对染色体($2n=40$),基因组大小 20.093 417 Mb, N_{50} 为 1 032 894 bp,GC 含量 53.81%,各条染色体的不确定碱基百分比均为 0,BUSCO 测试全部基因覆盖比例高达 98.3%,实现了基因组的高质量测序和组装(图 2A、表 2 和表 3)。根据组装结果,通过 NR、Swiss-Prot、eggNOG、KEGG 和 GO 数据库进行比对,进行蛋白编码基因识别和预测,共注释得到 7 476 个蛋白编码基因,占全部基因组长度的 61.02%;非编码 RNA 基因共 164 个,包括 110 个 tRNA、35 个 5S RNA、8 个 28S RNA、8 个 18S RNA 和 3 个 snRNA,约占基因组总长度的 0.285 3% (图 2B 和表 2)。通过对基因组中的重复序列检索和搜寻,共查找到 3 674 个散在重复序列,包括长末端重复(LTR)、DNA 转座子、长散在重复(LINE)、短散在重复(SINE)、滚环(RC)及其他未知类型,占基因组总长度的 2.754 4%;串联重复序列 8 139 个,占整个基因组长度的 1.605 4% (表 4)。

2.3 薏苡黑粉菌基因家族聚类

基因家族是具有共同祖先的一组基因,家族内不同基因往往具有相似的结构和功能。根据基因组注释结果对薏苡黑粉菌 *U. coicis* 和其他 6 个黑粉菌物种 *U. bromivora*、*U. maydis*、*U. hordei*、*S. reilianum*、*S. scitamineum* 和 *S. graminicola* 的预测编码蛋白进行同源基因家族分析。结果显示,7 个黑粉菌物种的基因蛋白编码基因在 6 476–7 449 个之间,被聚类为 6 999 个基因家族,其中共有基因家族 5 379 个,而 7 个物种的

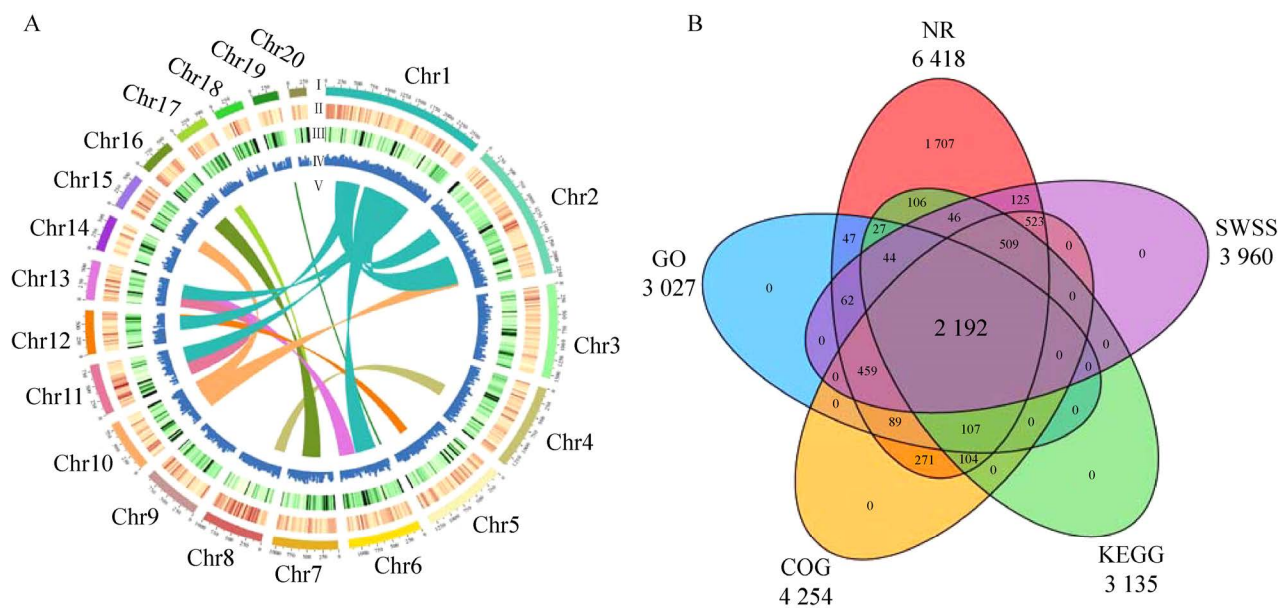


图 2 薏苡黑粉菌染色体框架(A)及基因注释(B) I：圆圈表示染色体；II–IV：分别为 30 kb 窗口下的基因密度、重复和 GC 含量；V：中间每条连线为 1 对同源基因
Fig. 2 Chromosome frame and gene annotation of *Ustilago coicis* genome. I：Circler represents the chromosome pseudomolecule; II–IV：Gene density, percentage of repeats, and GC content in 30 kb window; V：Each linking line in the center of the circle connects a pair of homologous genes.

特有基因分别在 170–654 个。薏苡黑粉菌基因组包含 5 339 个单拷贝基因，105 个多拷贝基因，89 个特异基因、752 个其他基因和 188 个未分类基因(图 3 和表 5)。

2.4 薏苡黑粉菌的系统发育

在同源基因分析的基础上，根据 5 231 个共有单拷贝基因序列绘制不同黑粉菌物种的系统发育树(图 4A)，结果显示，黑粉菌属 *Ustilago* 在~79.2 百万年前(million years ago, MYA)分化为 2 个进化支，玉米黑粉菌 *U. maydis* 在~66.6 MYA 分化出来，并与孢堆黑粉菌属 *Sporisorium* 的 3 个物种 *S. scitamineum*、*S. graminicola* 和 *S. reilianum* 聚为一支；薏苡黑粉菌 *U. coicis* 在~60.9 MYA 分化出来，与更年轻的 2 个物种雀麦黑粉菌 *U. bromivora*、大麦坚黑粉菌 *U. hordei* 聚为一支，两者分化时间~10.7 MYA，进一步确认该菌株属于 *Ustilago*，而且基因家族进化聚类与上述聚类结果相一致(图 4B)。

表 2 薏苡黑粉菌基因组组装、注释和质量评估
Table 2 Genome assembly, annotation and quality assessment in adlay smut fungus *Ustilago coicis*

基因组参数	数据
Genome specifics	Data
Illumina 测序净数据 Illumina clean data (Gb)	5.495 6
Pacbio 测序数据 Pacbio sequencing data (Gb)	2.764 1
Hi-C 测序净数据 Pacbio clean data (Gb)	5.495 6
基因组大小 Genome size (Mb)	20.093 417
组装重叠群 N ₅₀ Assemble N ₅₀ contig (Mb)	1.032 894
染色体数目 Chromosome number	20
GC 含量 GC content (%)	53.81
蛋白编码基因 Protein-coding gene number	6 476
蛋白编码基因长度	12 261.263
Total protein-coding gene length (Mb)	
编码蛋白基因密度	61.02
Protein-coding gene density (%)	
全部基因 BUSCO 覆盖比例	98.3
Complete BUSCO ratio (%)	
单拷贝基因 BUSCO 覆盖比例	98.1
Single-copy BUSCO ratio (%)	
多拷贝基因 BUSCO 覆盖比例	0.2
Duplicated BUSCO ratio (%)	

表 3 薹苡黑粉菌染色体组装

Table 3 Assembly of chromosomes in adlay smut fungus *Ustilago coicis*

染色体编号 Chromosome ID	长度 Length	GC 含量 GC content (%)	端粒到端粒结构 Structure of telomere to telomere	不确定碱基百分比 Ratio of uncertain base-pairs (%)
Chr1	2 654 953	54.20	CCCTAA-GGGTTA	0
Chr2	2 262 896	54.13	?-?	0
Chr3	1 561 492	54.09	CCCTAA-GGGTTA	0
Chr4	1 413 721	54.02	CCCTAA-?	0
Chr5	1 351 356	54.10	CCCTAA-GGGTTA	0
Chr6	1 198 697	53.68	CCCTAA-GGGTTA	0
Chr7	1 068 760	53.69	CCCTAA-?	0
Chr8	1 011 887	54.02	?-?	0
Chr9	948 124	53.62	?-GGGTTA	0
Chr10	857 450	54.07	CCCTAA-GGGTTA	0
Chr11	852 045	53.32	CCCTAA-GGGTTA	0
Chr12	732 500	53.82	CCCTAA-GGGTTA	0
Chr13	655 884	53.80	CCCTAA-GGGTTA	0
Chr14	607 143	53.63	CCCTAA-GGGTTA	0
Chr15	598 064	53.73	CCCTAA-GGGTTA	0
Chr16	565 403	53.66	CCCTAA-GGGTTA	0
Chr17	544 392	53.61	CCCTAA-GGGTTA	0
Chr18	483 864	53.61	CCCTAA-GGGTTA	0
Chr19	431 685	53.51	CCCTAA-GGGTTA	0
Chr20	293 101	52.98	CCCTAA-GGGTTA	0

注：? 表示端粒结构缺失

Note: ? means telomere absence.

表 4 薹苡黑粉菌基因组非编码 RNA 基因及重复序列统计

Table 4 Non-coding RNA genes and repeat sequences in adlay smut fungus *Ustilago coicis* genome

类型 Type	数目 Number	总长度 Total length (bp)	基因密度 Gene density (%)
非编码 RNA Non-coding RNA			
tRNA	110	11 411	0.056 8
5S	35	4 005	0.019 9
18S	8	14 384	0.071 6
28S	8	27 056	0.134 7
snRNA	3	467	0.002 3
合计 Total	164	57 323	0.285 3
散在重复 Dispersed duplication			
长末端重复序列 LTR	774	127 658	0.635 3
DNA 转座子 DNA transposons	1 173	150 028	0.746 7
长散在重复序列 LINE	608	48 838	0.243 1
短散在重复序列 SINE	10	592	0.002 9
滚环 RC	69	5 495	0.027 3
未知序列 Unknown	1 040	220 851	1.099 1
合计 Total	3 674	553 462	2.754 4
串联重复 Tandem duplication			
串联重复序列 TRF	4 669	178 881	0.890 2
小卫星 DNA Minisatellite DNA	1 902	77 901	0.387 7
微卫星 DNA Microsatellite DNA	1 568	65 801	0.327 5
合计 Total	8 139	322 583	1.605 4

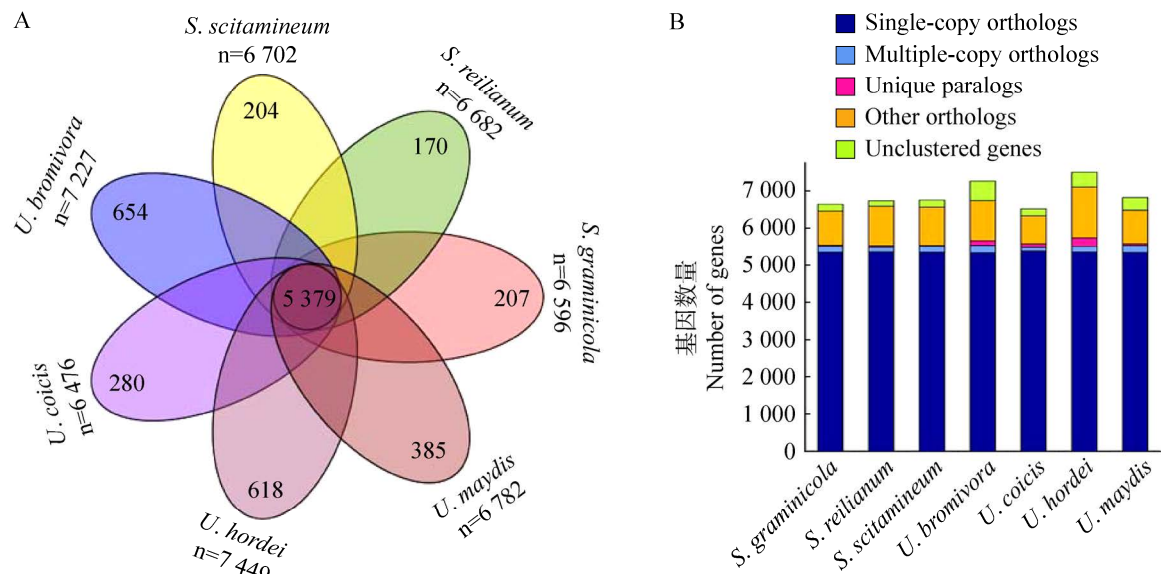


图 3 七个黑粉病菌物种的同源基因统计与分类 A: 同源基因统计 Venn 图; B: 同源基因分类条形图. 中间圆圈为所有样品同源基因家族数量, 椭圆为特异基因数量, 外围为物种及物种蛋白编码基因数量

Fig. 3 Statistics and clustering of homology genes in seven species of smut fungi. A: Venn plot of homology genes' statistics; B: Bar chart of orthologs' clustering. The middle circle represents all gene family number and the oval figures are unique genes, outside figures are species and their protein-coding numbers.

表 5 七个黑粉菌物种基因家族聚类的详细统计

Table 5 Statistics of orthologs' clustering in seven smut species

物种	单拷贝同源家族	多拷贝同源家族	特有基因家族	其他同源家族	未分类基因
Species	Single-copy orthologs	Multiple-copy orthologs	Unique paralogs	Other orthologs	Unclustered genes
<i>Sporisorium graminicola</i>	5 310	164	23	915	179
<i>S. reilianum</i>	5 318	135	28	1 059	142
<i>S. scitamineum</i>	5 311	159	19	1 028	185
<i>Ustilago bromivora</i>	5 297	195	118	1 081	522
<i>U. hordei</i>	5 317	149	224	1 365	394
<i>U. maydis</i>	5 302	189	45	906	328
<i>U. coicis</i>	5 339	105	89	752	188

3 讨论

3.1 薏苡黑粉菌的遗传多样性和生物学分类

在生物学分类上, 黑粉菌属于担子菌亚门、黑粉菌目、黑粉菌科 *Ustilaginaceae*, 其中以黑粉菌属 *Ustilago* 和孢堆黑粉菌属 *Sporisorium* 的物种在农业生产中最为常见, 如玉米黑粉菌 *Ustilago maydis* (Kämper *et al.* 2006)、大麦坚黑粉菌 *Ustilago hordei* (Laurie *et al.* 2012)、高粱丝

孢堆黑粉菌 *Sporisorium reilianum* (Schweizer *et al.* 2018)、甘蔗鞭孢堆黑粉菌 *Sporisorium scitamineum* (Que *et al.* 2014)和菰黑粉菌 *Ustilago esculenta* (李志兰等 2010)等均属于这两个分类学属。薏苡黑粉菌从 1927 年被命名至今, 即被划分为 *Ustilago*, 但是其分类学和系统发育关系仍不清晰。有学者利用核糖体 DNA 序列构建的系统发育树显示 *U. coicis* 与侵染稗属的黑粉菌 *U. trichophora* 亲缘较近(Zhang *et al.* 2013)。本研究

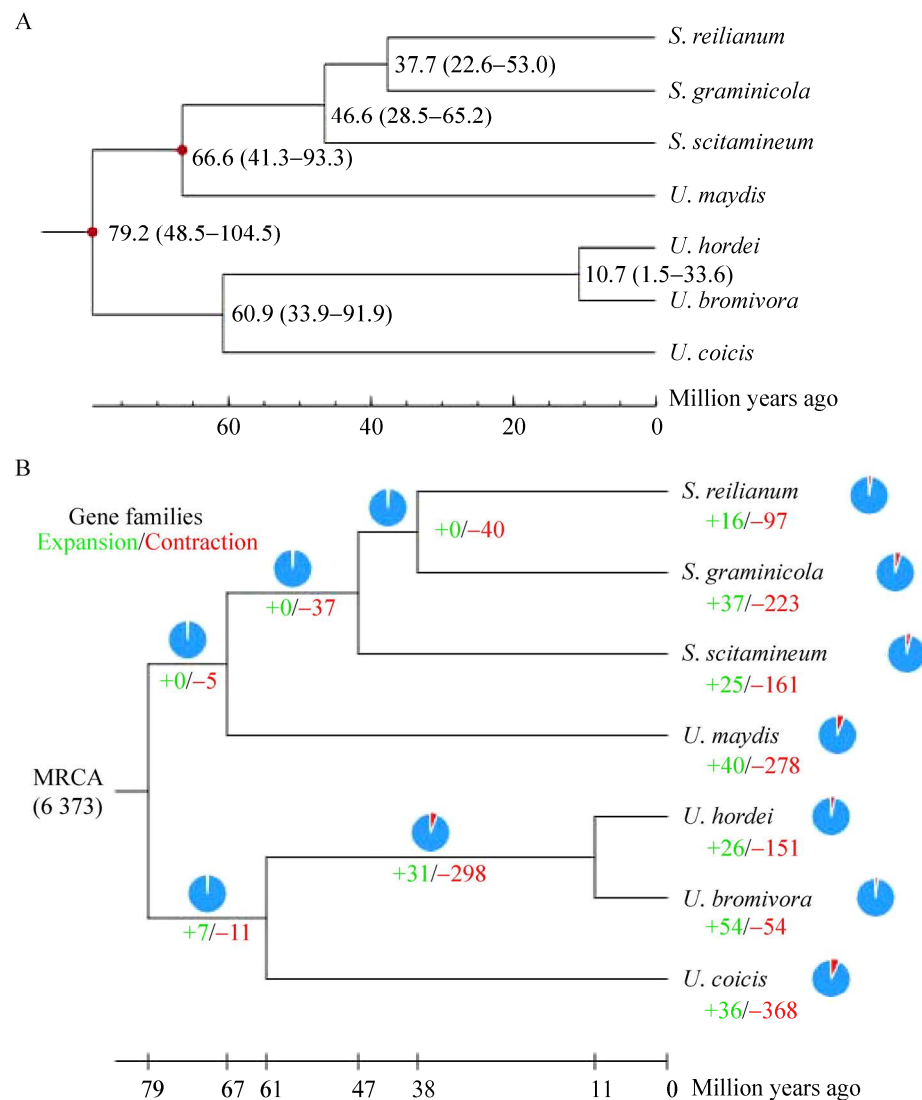


图 4 物种分歧时间树 A: 基于单拷贝基因的系统发育树; B: 基于基因家族的系统发育树

Fig. 4 Divergence time tree. A: Phylogenetic tree base on single copy genes; B: Phylogenetic tree base on gene families.

通过基因组家族的系统发育聚类也显示,薹苣黑粉菌约在 60.9 MYA 分化出来,与 2 个 *Ustilago* 属物种 *U. bromivora* 和 *U. hordei* 聚为一个进化支,进一步验证了其分类学和系统发育地位。值得一提的是,虽然本研究对薹苣单个菌株实现了成功分离和基因组组装,但是在前期利用 ITS 宏基因组测序时发现薹苣黑粉病瘿中存在 *Ustilago* 和 *Sporisorium* 两个属的真菌类群(Li et al. 2020)。因此,侵染薹苣而引起黑粉病症的致病菌也可能存在 *Sporisorium* 类群或其他变种和

生理小种,薹苣黑粉菌的遗传多样性研究和其他菌株的分离纯化仍待进一步深入。

3.2 薹苣黑粉菌的侵染机制和绿色防控

黑粉菌属于活体寄生菌,而且往往具有宿主专一寄生性。目前已有研究证明,薹苣黑粉菌对宿主植物的侵染部位为嫩胚芽鞘,侵染时期为种子萌发至不完全叶抽出之前的幼苗期,而且不能使非寄生植物(如玉米、高粱和大刍草等)致病,也表现出严格的宿主寄生性(黄思良等 1988)。以玉米黑粉菌 *U. maydis* 为模式生物研究黑粉菌

与宿主植物的互作关系发现,黑粉菌成功定殖宿主并诱导形成肿瘤取决于与宿主植物多方位、多层次的相互作用以及该过程中发生的复杂细胞和分子事件,而且黑粉菌可以分泌数量庞大的效应因子,具有抑制植物防御反应、调控植物代谢和促进植物组织膨大等功能,使宿主植物更有利于玉米黑粉菌的生长与发育(罗西等 2020; 夏文强等 2021)。值得注意的是,黑粉菌物种均为双相型真菌,其生命周期分为无性繁殖的单倍体孢子体和有性生殖的双核菌丝体两个阶段:单倍体孢子体阶段具有腐生性,可以像酵母菌一样进行无性繁殖,即厚垣孢子萌发形成菌丝,二倍体细胞核迁入菌丝经过减数分裂形成单核的担孢子;在双核菌丝阶段,由两种异质的初级菌丝交配形成双核菌丝体,然后进入活体寄生、实现有性生殖的生长状态,而黑粉菌的有性生长过程就是对宿主植物的致病过程。已有研究证明, *U. maydis* 在交配型基因 *a* 位点和 *b* 位点是调控单倍体融合的关键,具有异源 *a* 位点和 *b* 位点的单倍体担孢子可以交配并形成具有侵染能力的双核菌丝 (Froeliger & Leong 1991; Brachmann *et al.* 2001)。薏苡黑粉菌与上述黑粉菌物种均有相似的生活史,虽然目前没有观测到单核配合现象,但是这种二相转化过程很可能是相似或相同的。因此,在薏苡黑粉菌基因组组装的基础上,深入了解薏苡和黑粉菌的互作机制和发掘病菌毒力因子基因,也是今后研究的重要方向。

致谢: 感谢上海凌恩生物科技有限公司的陶烨和林爱婷工程师在数据分析方面给予的无私帮助!

[REFERENCES]

- Brachmann A, Weinzierl G, Kämper J, Kahmann R, 2001. Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology*, 42(4): 1047-1063
- Chowdhury S, 1946. Some studies on the smut *Ustilago coicis* Bref. of Job's tears millet. *Journal of Indian Botanical Society*, 25: 123-130
- Froeliger EH, Leong SA, 1991. The *a* mating-type alleles of *Ustilago maydis* are idiomorphs. *Gene*, 100: 113-122
- He ZD, Chen J, Gao ZG, Zhuang JH, Qi HX, Yang WL, 2006. Research on physiological differentiation of *Sporisorium reilianum*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 22(7): 428-430 (in Chinese)
- Huang SL, Jian PM, Xiaoyuan ZX, 1988. Anatomical observation of earlier smut infection process to adlay. *Guangxi Plant Protection*, 4: 19-22 (in Chinese)
- Kämper J, Kahmann R, Bölker M, *et al.*, 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*, 444(7115): 97-101
- Laurie JD, Ali S, Linning R, Mannhaupt G, Wong P, Güldener U, Münsterkötter M, Moore R, Kahmann R, Bakkeren G, Schirawski J, 2012. Genome comparison of barley and maize smut fungi reveals targeted loss of RNA silencing components and species-specific presence of transposable elements. *The Plant Cell*, 24(5): 1733-1745
- Li XD, Shi M, Pan H, Lu XJ, Wei XY, Lu P, Lian QX, Fu YH, 2020. Diversity in metagenomic sequences reveals new pathogenic fungus associated with smut in Job's tears. *Journal of Integrative Agriculture*, 19(9): 2257-2264
- Li ZL, You WY, Zou KQ, Ye ZH, 2010. Morphological observation and phylogenetic analysis of *Ustilago esculenta*. *Journal of China University of Metrology*, 21(2): 140-145 (in Chinese)
- Luo X, Liu JQ, Zhang SS, Zhang JZ, Guo DP, 2020. Molecular mechanism of *Ustilago maydis* pathogenicity. *Plant Science Journal*, 38(6): 853-861 (in Chinese)
- Mundkur BB, 1940. A second contribution towards a knowledge of Indian Ustilaginales: fragments xxvi-l. *Transaction of the British Mycological Society*, 24(3-4): 312-336
- Prom LK, Perumal R, Erattaimuthu SR, Erpelding JE, Montes N, Odvody GN, Greenwald C, Jin ZY, Frederiksen R, Magill CW, 2011. Virulence and molecular genotyping studies of *Sporisorium reilianum* isolates in sorghum. *Plant Disease*, 95(5): 523-529
- Que YX, Xu LP, Wu QB, Liu YF, Ling H, Liu YH, Zhang YY, Guo JL, Su YC, Chen JB, Wang SS, Zhang CG, 2014. Genome sequencing of *Sporisorium scitamineum* provides insights into the pathogenic mechanisms of sugarcane smut. *BMC Genomics*, 15(1): 996
- Rabe F, Bosch J, Stirnberg A, Guse T, Bauer L, Seitner D, Rabanal FA, Czedik-Eysenberg A, Uhse S, Bindics J, Genencher B, Navarrete F, Kellner R, Ekker H, Kumlehn J, Vogel JP, Gordon SP, Marcel TC, Münsterkötter M, Walter MC, Sieber CM, Mannhaupt G, Güldener U, Kahmann R, Djamei A, 2016. A complete toolset for the study of *Ustilago bromivora* and

- Brachypodium* sp. as a fungal-temperate grass pathosystem. eLife, 5: e20522
- Schweizer G, Münch K, Mannhaupt G, Schirawski J, Kahmann R, Dutheil YJ, 2018. Positively selected effector genes and their contribution to virulence in the smut fungus *Sporisorium reilianum*. Genome Biology and Evolution, 10(2): 629-645
- Small W, 1927. Matter of phytopathological interest during 1926. Review of Application Mycological, 6: 273-274
- Solano-González S, Darby AC, Cossar D, Caddick MX, 2019. High-quality draft genome sequence and annotation of the basidiomycete yeast *Sporisorium graminicola* CBS10092, a producer of mannosylerythritol lipids. Microbiology Resource Announcements, 8(42): e00479-19
- Wu EG, Zhou Y, Zhu MQ, Liu JJ, Gao XL, Feng BL, 2020. Identification and biological characteristics of *Sporisorium destruens* in broomcorn millet. Journal of Plant Protection, 47(1): 101-109 (in Chinese)
- Wu WH, Zheng XL, Li R, Chen WJ, He CP, 2020. The biological characteristics of the pathogen of sugarcane smut disease. Chinese Journal of Tropical Crops, 31(8): 1388-1392 (in Chinese)
- Wu XL, Pang ZC, Tian LM, Hu JC, 1982. Physiological specialization of *Sphacelotheca reiliana* (Kühn) Clint. to sorghum. Acta Phytopathologica Sinica, 12(1): 13-18 (in Chinese)
- Xia WQ, Gao LD, Zhang YF, Yu XP, Ye ZH, 2021. Advances in *Ustilago maydis* effectors. Journal of Agricultural Biotechnology, 29(11): 2232-2247 (in Chinese)
- Yang ZC, Xiong GR, Chen XT, Zhang SZ, Yang BP, 2010. Isolation and identification of *Ustilago scitaminea* in Hainan Province. Chinese Journal of Tropical Crops, 31(5): 828-833 (in Chinese)
- Zhang FY, Ping J, Du Z, Cheng Q, Huang Y, 2011. Identification of a new race of *Sporisorium reilianum* and characterization of the reaction of sorghum lines to four races of the head smut pathogen. Journal of Phytopathology, 159(5): 342-346
- Zhang JZ, Guan PG, Tao G, Ojaghian MR, Hyde KD, 2013. Ultrastructure and phylogeny of *Ustilago coicis*. Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology), 14(4): 336-345
- Zhang XF, Gao ZG, Zhuang JH, Zhao H, Zhao BX, Sui H, 2010. Pathogenic differentiation research of *Sporisorium reilianum* on maize. Journal of Maize Sciences, 18(2): 100-103 (in Chinese)
- [附中文参考文献]
- 贺字典, 陈捷, 高增贵, 庄敬华, 齐惠霞, 杨文兰, 2006. 玉米丝黑穗病菌生理分化研究. 中国农学通报, 22(7): 428-430
- 黄思良, 兼平勉, 筱原正行, 1988. 薏苡黑穗病菌对薏苡侵染初期过程的解剖学观察. 广西植保, 4: 19-22
- 李志兰, 尤文雨, 邹克琴, 叶子弘, 2010. 菰黑粉菌孢子萌发过程形态学观察及系统发育研究. 中国计量学院学报, 21(2): 140-145
- 罗西, 刘蒋琼, 张申申, 张敬泽, 郭得平, 2020. 玉米黑粉菌致病的分子机制研究进展. 植物科学学报, 38(6): 853-861
- 吴恩果, 周瑜, 朱明旗, 刘佳佳, 高小丽, 冯佰利, 2020. 糜子丝黑穗病原菌鉴定及其生物学特性. 植物保护学报, 47(1): 101-109
- 吴伟怀, 郑肖兰, 李锐, 陈文坚, 贺春萍, 2020. 甘蔗黑穗病菌基础生物学特性. 热带作物学报, 31(8): 1388-1392
- 吴新兰, 庞志超, 田立民, 胡吉成, 1982. 高粱丝黑穗病菌 *Sphacelotheca reiliana* (Kühn) Clint. 的生理分化. 植物病理学报, 12(1): 13-18
- 夏文强, 高丽丹, 张雅芬, 俞晓平, 叶子弘, 2021. 玉米黑粉菌效应因子研究进展. 农业生物技术学报, 29(11): 2232-2247
- 杨志才, 熊国如, 陈雪婷, 张树珍, 杨本鹏, 2010. 海南蔗区甘蔗黑穗病菌的分离鉴定. 热带作物学报, 31(5): 828-833
- 张小飞, 高增贵, 庄敬华, 赵辉, 赵柏霞, 隋鹤, 2010. 玉米丝黑穗病菌致病性分化研究. 玉米科学, 18(2): 100-103