

研究报告

稗草生防真菌稗属炭疽菌(*Colletotrichum echinochloae*) B-48 的生物学特性及基因组测序分析

顾琼楠, 褚世海, 沈静, 黄启超, 李林, 陈安安, 李儒海*

湖北省农业科学院植保土肥研究所 农业农村部华中作物有害生物综合治理重点实验室 农作物重大病虫害草害防控湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430064

顾琼楠, 褚世海, 沈静, 黄启超, 李林, 陈安安, 李儒海. 稗草生防真菌稗属炭疽菌(*Colletotrichum echinochloae*) B-48 的生物学特性及基因组测序分析[J]. 微生物学通报, 2025, 52(5): 2302-2314.

GU Qiongnan, CHU Shihai, SHEN Jing, HUANG Qichao, LI Lin, CHEN An'an, LI Ruhai. Biological characterization and genomic sequencing of a biocontrol fungal strain *Colletotrichum echinochloae* B-48 for *Echinochloa crus-galli*[J]. Microbiology China, 2025, 52(5): 2302-2314.

摘要:【背景】稗草生防真菌稗属炭疽菌(*Colletotrichum echinochloae*) B-48 是从水稻田自然发病的稗草上分离鉴定得到的, 前期研究发现该菌株对稗草具有良好的生防效果, 对主要作物如水稻、小麦、玉米等具有良好的安全性。【目的】研究稗草生防真菌 B-48 的最佳生长和产孢的培养基、生长温度、pH、光照条件、碳氮源等生物学特性, 以便优化该菌株的培养和应用条件。解析该生防菌株的基因组序列信息, 挖掘其次级代谢产物基因资源, 为深入研究该菌株的除草活性天然产物及天然产物的生物合成机制奠定基础。【方法】对稗草生防真菌 B-48 的生长最适培养基、温度、pH、光照、生长碳氮源及致死温度等生物学特性进行研究。利用 Nanopore 及 Illumina 测序平台对稗草病原真菌 B-48 进行全基因组测序, 采用相关软件进行菌株基因组序列拼接、基因组结构预测, 以及基因组功能注释、并预测其次级代谢产物合成基因簇。【结果】稗草生防真菌 B-48 在马铃薯蔗糖琼脂(potato sucrose agar, PSA)培养基上生长产孢良好, 最适生长温度为 30 °C, 最适生长 pH 7.0, 最适光照条件为持续光照, 最适碳氮源分别为淀粉和酵母浸粉, 致死条件为 55 °C、10 min。全基因组序列结果显示该菌株基因组大小为 62.25 Mb, G+C 含量 46.59%, 预测到蛋白质编码基因 11 324 个, 预测到次级代谢产物生物合成基因簇 76 个。【结论】稗属炭疽菌 B-48 具有开发为稗草生物除草剂

资助项目: 国家自然科学基金(31901903); 农业农村部华中作物有害生物综合治理重点实验室/农作物重大病虫害草害防控湖北省重点实验室开放基金课题(2023ZTSJJ1); 湖北省农业科技创新中心创新团队项目(2024-620-000-001-011)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31901903), the Open Fund from Key Laboratory of Integrated Pests Management on Crops in Central China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Hubei Key Laboratory of Crop Diseases, Insect Pests and Weeds Control (2023ZTSJJ1), and the Innovation Team Program of Hubei Provincial Innovation Center for Agricultural Sciences and Technologies (2024-620-000-001-011).

*Corresponding author. E-mail: lirh@hbaas.com

Received: 2024-09-09; Accepted: 2024-10-31; Published online: 2024-12-03

的潜力, 其次级代谢产物生物合成基因簇预示着其具有合成除草活性天然产物的潜力。以上结果为该菌后续发酵培养、次级代谢生物合成研究及实际应用奠定了理论基础。

关键词: 稗属炭疽菌; 微生物除草剂; 生物学特性; 基因组测序分析; 次级代谢产物

Biological characterization and genomic sequencing of a biocontrol fungal strain *Colletotrichum echinochloae* B-48 for *Echinochloa crus-galli*

GU Qiongnan, CHU Shihai, SHEN Jing, HUANG Qichao, LI Lin, CHEN An'an, LI Ruhai*

Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Central China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Hubei Key Laboratory of Crop Diseases, Insect Pests and Weeds Control, Institute of Plant Protection and Soil Fertilizer, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, Hubei, China

Abstract: [Background] A fungal strain B-48 was isolated from diseased *Echinochloa crus-galli* in a paddy field in Hubei Province and identified as *Colletotrichum echinochloae*. This strain demonstrated a strong biocontrol effect on *E. crus-galli* and was safe for major crops including rice, wheat, and maize. [Objective] To optimize the cultural conditions for the growth and sporulation, analyze the genomic sequence information, and mine the gene resources of secondary metabolite synthesis of *C. echinochloae* B-48 for further research on the herbicidal natural products and their biosynthetic mechanisms. [Methods] *C. echinochloae* B-48 was characterized regarding the culture media, temperature, pH, light, carbon/nitrogen source, and lethal condition. Then, Nanopore and Illumina platforms were used for the whole-genome sequencing of the strain. Bioinformatic tools were used for the assembly of the genome sequence, prediction of the genome structure, functional annotation of the genome, and prediction of the biosynthetic gene clusters (BGCs) for secondary metabolites. [Results] *C. echinochloae* B-48 grew well on the PSA plate at 30 °C and pH 7.0 with constant light. Starch and yeast extract as an effective carbon and nitrogen source stimulating the growth and sporulation of strain B-48, respectively. The lethal conditions for the strain were incubation at 55 °C for 10 min. The genome of *C. echinochloae* B-48 had a total length of 62.25 Mb and G+C content of 46.59%, containing 11 324 protein-coding genes and 76 BGCs for secondary metabolites. [Conclusion] *C. echinochloae* B-48 has the potential to be developed as a mycoherbicide for the control of *E. crus-galli*. The BGCs for secondary metabolites in its genome indicate that the strain can produce natural products with herbicidal effects. The findings provide important genetic information for the further research and application of the strain for the production of secondary metabolites by fermentation.

Keywords: *Colletotrichum echinochloae*; mycoherbicide; biological characteristics; genome sequencing; secondary metabolites

稗(*Echinochloa crus-galli*)属于禾本科稗属植物,原产于欧洲和印度,现广泛分布于世界61个国家,在中国各地均有分布,多生于温暖潮湿区域,常见于水稻田及沟渠中^[1]。稗草为异源六倍体,其祖先种为四倍体稗草(*E. oryzicola*)和一未知二倍体稗草,采用C₄途径进行光合作用;由于C₄植物具有光能利用率高、CO₂补偿点和光补偿点低、净光合效率高等特点,使得稗草的生长速度比水稻快,虽然发芽晚于水稻,但其分蘖速度快、根系发达、抽穗早、竞争力强,导致其在水稻田中的发生尤为严重^[2]。

目前,稻田稗草的防除主要以化学防治为主,然而随着化学除草剂的大量使用,稗草抗药性问题日益加重,对水稻生产造成巨大的障碍^[3]。根据国际抗除草剂杂草数据库网站(<http://www.weedscience.org/>)的数据显示,目前已有85种稗草生物型对除草剂产生了抗药性。利用自然界生物中具有除草活性的微生物或天然产物来开发新的生物源除草剂,为稗草抗药性这一问题的解决提供了一种可行的方案^[4]。由于真菌物种和生态功能的多样性,真菌会产生许多新型结构和功能的天然产物,真菌来源的天然产物是先导化合物的重要来源,在农用抗生素等领域一直受到极大的关注^[5]。然而,从20世纪90年代末期开始,发现结构新颖的活性化合物的进程逐渐减慢,传统天然产物的系统分离策略或以生物活性为导向的分离策略,通常面临耗时长、盲目性大、出新率低、重复发现等问题^[6-7]。因此,如何高效地靶向分离新型天然产物已成为微生物天然产物研究领域的一个重要课题。随着基因组测序费用的显著降低和生物信息学技术的迅速发展,越来越多的科研人员将目光投向基于基因组信息的天然产物挖掘,这一趋势的兴起使得高效开发新型天然产物成为现实,为生物技术领域带来新的可能^[8]。微生物天然产物的合成相关基因多数在染色体上成簇存在,称为生物合成基因簇

(biosynthetic gene clusters, BGCs)。在生物合成基因簇中,骨架酶是催化生物合成途径中的关键步骤,常见的骨架酶包括聚酮类天然产物生物合成基因簇中的聚酮合酶(polyketide synthase, PKS)、多肽类天然产物生物合成基因簇中的非核糖体多肽合酶(non ribosomal peptide synthases, NRPS)及核糖体合成和翻译后修饰肽(ribosomal synthesis and post-translational modification of peptides, RiPPs)、萜类天然产物生物合成基因簇中的萜类合成酶(terpene synthase, TS)以及麦角生物碱类天然产物生物合成基因簇中的二甲烯丙基色氨酸合酶(dimethylallyl tryptophan synthases, DMATS)^[9]。通过对骨架酶的定位,可以快速锚定次级代谢产物的生物合成基因簇。此外,研究微生物天然产物生物合成基因簇中各基因的功能对于预测天然产物的结构信息至关重要,这为研究人员实现对目标天然产物的生物合成提供了有力支持。并且当天然产物生物合成基因簇在原始菌株中不表达或表达量较低时,可以通过启动子工程、途径特异性调控、基因遗传改造、异源表达、合成生物学、表观遗传调控等策略来激活该基因簇,从而获得其表达产物,从而显著拓宽微生物天然产物的发现范围^[10]。

研究前期我们收集了湖北省水稻田中自然发病的稗草样品,从中分离得到了一株强致病力菌株B-48,通过形态学及分子生物学将该菌株鉴定为稗属炭疽菌(*Colletotrichum echinocloeae*);并且对菌株B-48的生防效果及作物安全性进行了评估,菌株B-48对稗草具有良好的生防效果,对大多数作物,如小麦、玉米、水稻都表现出较好的安全性^[4]。基于以上结果,拟对稗草生防真菌B-48的生物学特性进行研究,旨在为后续大规模发酵培养提供科学基础。另外,对该菌株的全基因组进行Illumina二代与Nanopore三代联合测序分析,旨在对该菌株具有除草活性的天然产物的生物合成提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 样品

具有生防除草活性的稗属炭疽菌 B-48 由本实验室分离鉴定并保存^[4]。试验用杂草种子均由本实验室在湖北省农科院鄂州基地采集并保存。

1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基、马铃薯蔗糖琼脂(potato sucrose agar, PSA)培养基、燕麦琼脂(oatmeal agar, OA)培养基、燕麦番茄琼脂(oatmeal tomato agar, OTA)培养基、胡萝卜琼脂(carrot agar, CA)培养基、绿豆汁(mung bean agar, MBA)培养基、完全培养基(complete medium, CM)、玉米粉琼脂(corn meal agar, CMA)培养基、V8 培养基、查氏培养基(Czapek-Dox medium, CZA)等参考文献[11]配制。

1.3 主要试剂和仪器

植物 DNA 提取试剂盒 NuClean Plant Genomic DNA Kit, 康为世纪生物科技股份有限公司; SQK-LSK109 连接测序试剂盒, Oxford Nanopore Technologies 公司。超声波破碎仪, Covaris 公司; BluePippin 全自动核酸回收仪, Sage Science 公司; 荧光计, Thermo Fishers Scientific 公司; PromethION 测序仪, Oxford Nanopore Technologies 公司; NanoDrop, Thermo Fishers Scientific 公司; Megaruptor, Diagenode 公司。

1.4 病原菌生物学特性测定

对菌株 B-48 的生物学特性进行研究, 设置培养基、温度、光照条件、pH 值、碳源、氮源等 6 个变量。

采用 PDA、PSA、OA、OTA、CA、MBA、V8、CM、CMA 9 种培养基作为供试培养基, 观察菌株 B-48 在上述培养基中的生长及产孢情况。采用 5、10、15、20、25、30、35、40、45 °C 进行不同温度梯度的试验。采用连续光照、连续黑暗、12 h 光暗交替, 光照强度 12 000 lx

作为不同光照的试验条件。采用 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 进行不同 pH 的试验。将直径为 6 mm 的菌丝块接种于相应平板的中央, 在相应条件下培养 7 d, 7 d 后采用十字交叉法测量菌落直径, 并计算生长速率, 观察菌丝在培养基上的生长情况, 进行拍照记录; 用 5 mL 的 ddH₂O 刮洗平板, 经四层擦镜纸过滤菌丝后对孢子进行计数, 计算产孢量, 每个处理 5 次重复^[12]。

碳(氮)源对病原菌生长的影响: 不同碳源的试验以 CZA 为基础培养基, 用等质量碳元素的葡萄糖、麦芽糖、果糖、可溶性淀粉、乳糖、半乳糖、甘露醇、山梨醇、柠檬酸钠替代蔗糖, 以不加碳源的 CZA 培养基作为对照; 不同氮源的试验也以 CZA 培养基作为基础培养基, 用等质量氮元素的酵母浸粉、蛋白胨、甘氨酸、硝酸铵、氯化铵、硝酸钠代替硝酸钾, 以不加氮源的 CZA 培养基作为对照; 将上述不同碳(氮)源的培养基调节 pH 值至 7.0。打取直径为 6 mm 的菌丝块接至含不同碳(氮)源的平板上, 30 °C 连续光照条件下培养 7 d 后用十字交叉法测量菌落直径, 计算生长速率, 并对产孢量进行统计, 每个处理 5 次重复^[12]。

病原菌菌丝致死温度的测定: 将直径为 6 mm 的病原菌菌丝块接至加入 2 mL 灭菌 ddH₂O 的无菌 EP 管中, 将含有菌丝块的无菌 EP 管分别置于 35、40、45、50、55、60、65、70 °C 的水浴锅中加热 10 min, 每个处理 4 次重复, 然后挑出菌丝块, 将菌丝块接种于 pH 7.0 的 PSA 平板中央, 30 °C 光照培养, 7 d 后用十字交叉法测量菌落直径, 每处理 5 次重复。

1.5 菌株 B-48 的基因组测序与组装

基因组的提取及纯化: 使用 NuClean Plant Genomic DNA Kit 提取菌株 B-48 的基因组 DNA, 分别经琼脂糖凝胶电泳、NanoDrop 和 Qubit 进行质量检测。

Illumina 测序: 通过超声波破碎仪将纯化的基因组 DNA 随机打断成长度为 300 bp 的小片

段,对片段化的DNA进行修复及末端制备,获得DNA文库。库检合格后利用Illumina NovaSeq高通量测序平台对菌株B-48的DNA文库进行测序。

Nanopore 测序:用Megaruptor对质检合格的基因组DNA进行随机打断,对大片段DNA进行磁珠纯化富集,采用BluePippin全自动核酸回收仪分离回收大片段DNA文库。使用SQK-LSK109连接测序试剂盒制备测序文库,首先对片段化的基因组DNA进行修复及末端制备,再对文库进行接头的连接及纯化,最后用Qubit对建好的DNA文库进行精确定量检测。将构建好的文库加入到Flow cells中进行上样,然后将Flow cells转移到PromethION测序仪进行实时单分子测序。

基因组组装:使用NECAT软件进行基因组纠错和拼接,得到初始拼接结果;然后使用Racon v1.4.11软件基于三代测序数据对拼接结果进行两轮纠错,最后进行两轮二代reads的Pilon v1.23纠错,去杂合后得到最终的组装结果。通过二代比对率、覆盖度及BUSCO对基因组组装效果进行评价。

1.6 菌株 B-48 的基因组结构预测及功能注释

基因组结构预测:采用BRAKER软件v2.1.4对基因组结构进行预测,结合转录组数据在GeneMark-EX、AUGUSTUS软件中进行训练后对基因组进行注释。结合序列比对工具Infernal v1.1.2和Rfam数据库对基因组非编码RNA进行注释,并进行分类统计。使用RepeatModeler软件v1.0.4构建自身的repeat库,合并rebase库后,使用RepeatMasker v4.0.5进行基因组的重复序列注释。

基因功能注释:根据非冗余(non-redundant, NR)蛋白质数据库、蛋白质家族(protein families, Pfam)数据库、同源蛋白簇(clusters of orthologous groups, COG)、京都基因与基因组

百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)、基因本体(gene ontology, GO)等数据库对基因功能进行注释。次级代谢产物生物合成基因簇分析:采用antiSMASH 7.0、CusProSe对稗属炭疽菌的次级代谢产物生物合成基因簇进行分析。

1.7 数据分析

数据采用DPS 15.10软件和Excel统计分析,用最小显著差异(least significant difference, LSD)法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 稗草生防真菌菌株 B-48 的生物学特性分析

2.1.1 不同培养基对菌株 B-48 的生长及产孢的影响

对菌株B-48在不同培养基上的生长及产孢进行了分析(图1),结果表明,菌株B-48在V8、PSA、OTA、CA培养基上长势相对较好,生长速度较快,菌丝生长速度分别为0.97、0.95、0.95、0.93 cm/d。但在不同培养基上产孢有明显差别,在PSA、CA、CMA、PDA上产孢情况无显著差异,产孢较好,产孢量分别为 2.28×10^4 、 1.50×10^4 、 1.50×10^4 、 1.25×10^4 个孢子/皿,在OTA和MBA固体培养基上产孢较差,几乎不产孢(表1)。后续其他试验采用PSA作为该菌株的基础培养基。

2.1.2 不同温度对菌株 B-48 生长及产孢的影响

不同温度对菌株B-48的菌丝生长的影响差异显著,菌株B-48在20–30 °C的温度范围内均生长较好,其中30 °C最适合菌丝生长,在该温度下生长速度为0.95 cm/d,在该温度下产孢量也最高,产孢量为 2.40×10^4 个孢子/皿;在5 °C及45 °C时,菌株B-48的菌丝停止生长(表2)。后续其他试验采用30 °C作为该菌株的培养温度。

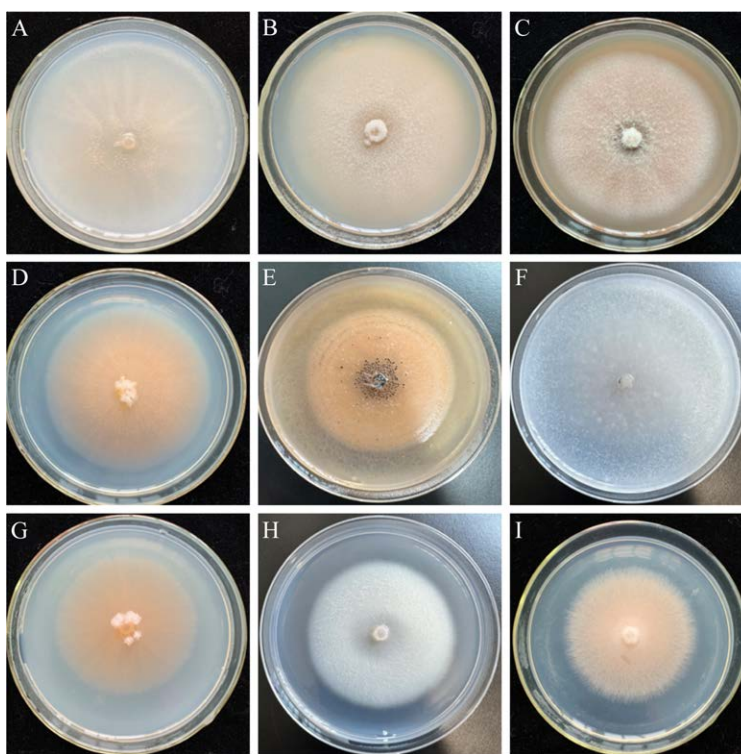


图 1 菌株 B-48 在不同培养基下的菌落形态 A: V8 培养基; B: PSA 培养基; C: CA 培养基; D: OTA 培养基; E: MBA 培养基; F: OA 培养基; G: CMA 培养基; H: CM 培养基; I: PDA 培养基。
Figure 1 The fungal colony of strain B-48 under different growth media. A: V8; B: PSA; C: CA; D: OTA; E: MBA; F: OA; G: CMA; H: CM; I: PDA.

表 1 菌株 B-48 在不同培养基下的生长速率及产孢量

Table 1 The growth rate and spore yield of strain B-48 under different growth media

Media	Growth rate (cm/d)	Spore yield ($\times 10^4$ spore/plate)
PDA	0.81 $\pm$ 0.09D	1.25 $\pm$ 0.58AB
PSA	0.95 $\pm$ 0.02AB	2.28 $\pm$ 0.58A
OA	0.92 $\pm$ 0.05ABC	0.75 $\pm$ 0.58BC
OTA	0.95 $\pm$ 0.01AB	0.00 $\pm$ 0.00C
MBA	0.91 $\pm$ 0.01ABC	0.00 $\pm$ 0.00C
CA	0.93 $\pm$ 0.02AB	1.50 $\pm$ 0.58AB
V8	0.97 $\pm$ 0.02A	1.00 $\pm$ 0.00B
CM	0.85 $\pm$ 0.01CD	0.75 $\pm$ 0.58BC
CMA	0.88 $\pm$ 0.04BC	1.50 $\pm$ 0.58AB

表中数据为平均数 $\pm$ 标准差。同列数字后不同大写字母表示经 LSD 检验在 $P<0.01$ 水平差异显著。下同。

Data are mean $\pm$ SD. Different letters in the same column indicate significant difference at 0.01 level by LSD test. The same below.

表 2 菌株 B-48 在不同温度下的生长速率及产孢量
Table 2 The growth rate and spore yield of strain B-48 under different temperature

Temperature ($^{\circ}$ C)	Growth rate (cm/d)	Concentration ($\times 10^4$ spore/plate)
5	0.00 $\pm$ 0.00E	0.00 $\pm$ 0.00E
10	0.10 $\pm$ 0.00E	0.40 $\pm$ 0.55DE
15	0.62 $\pm$ 0.02C	1.20 $\pm$ 0.45BCD
20	0.69 $\pm$ 0.01BC	1.60 $\pm$ 0.55ABC
25	0.75 $\pm$ 0.02B	2.00 $\pm$ 0.71AB
30	0.95 $\pm$ 0.08A	2.40 $\pm$ 0.55A
35	0.18 $\pm$ 0.01D	0.80 $\pm$ 0.45CDE
40	0.11 $\pm$ 0.01E	0.40 $\pm$ 0.55DE
45	0.00 $\pm$ 0.00E	0.00 $\pm$ 0.00E

2.1.3 不同光照条件对菌株 B-48 生长及产孢的影响

不同光照条件对菌株 B-48 菌丝的生长有一定影响。在连续光照条件下培养, 菌丝生长

速度最快, 生长速度为 0.97 cm/d; 连续黑暗和 12 h 光暗交替条件下培养的菌丝生长速度差异不显著, 均显著低于连续光照条件下培养的菌丝生长速度。不同光照条件对菌株 B-48 的产孢无显著影响(表 3)。后续其他试验采用连续光照作为该菌株的光照条件。

2.1.4 不同 pH 对菌株 B-48 生长及产孢的影响

不同 pH 对菌株 B-48 菌丝生长及产孢有一定影响。菌株 B-48 在 pH 4.0–10.0 的培养基上均能生长, 菌株在 pH 4.0–9.0 的 PSA 培养基上生长速度无差异, 但是在 pH 10.0 的 PSA 培养基上生长速度减慢, 在 pH 7.0 时生长速度、产孢量最高, 分别为 0.95 cm/d、 2.25×10^4 个孢子/皿; 当 pH>9.0 时生长速率及产孢开始受到抑制(表 4)。后续其他试验均将 pH 值调节至 7.0。

2.1.5 不同碳源对菌株 B-48 生长及产孢的影响

菌株 B-48 在 10 种不同碳源的培养条件下,

表 3 菌株 B-48 在不同光照条件下的生长速率及产孢量

Table 3 The growth rate and spore yield of strain B-48 under different illumination

Illumination condition	Growth rate (cm/d)	Concentration ($\times 10^4$ spore/plate)
Continuous light	0.97 $\pm$ 0.04A	2.33 $\pm$ 1.53A
Continuous dark	0.87 $\pm$ 0.07B	2.00 $\pm$ 1.00A
Light/dark alteration	0.76 $\pm$ 0.02B	2.33 $\pm$ 0.58A

表 4 菌株 B-48 在不同 pH 条件下的生长速率及产孢量

Table 4 The growth rate and spore yield of strain B-48 under different pH conditions

pH value	Growth rate (cm/d)	Concentration ($\times 10^4$ spore/plate)
4.0	0.77 $\pm$ 0.03AB	0.75 $\pm$ 0.50BC
5.0	0.80 $\pm$ 0.02AB	1.25 $\pm$ 0.50ABC
6.0	0.81 $\pm$ 0.01AB	1.50 $\pm$ 0.58ABC
7.0	0.95 $\pm$ 0.03A	2.25 $\pm$ 0.50A
8.0	0.81 $\pm$ 0.05AB	1.75 $\pm$ 0.53AB
9.0	0.73 $\pm$ 0.07B	1.25 $\pm$ 0.53ABC
10.0	0.52 $\pm$ 0.02C	0.50 $\pm$ 0.58C

对不同碳源的利用程度不同, 大部分均能够生长, 但无法利用乳糖及半乳糖。在不同碳源的 CZA 培养基中, 菌株 B-48 对淀粉的利用率最高, 且产孢效果最好, 平均生长速度为 1.00 cm/d, 其产孢量可达到 11.00×10^4 个孢子/皿; 其次利用率较高的是蔗糖和麦芽糖, 对柠檬酸钠利用率最差; 无法利用半乳糖和乳糖, 菌株在这 2 种作为碳源的 CZA 培养基上无法生长(表 5)。

2.1.6 不同氮源对菌株 B-48 生长及产孢的影响

在 7 种不同氮源的培养条件下, 菌株 B-48 对酵母浸粉的利用率最高, 菌丝生长速度为 1.02 cm/d, 产孢效果最好, 其产孢量可达到 24.00×10^4 个孢子/皿, 并且菌丝生长速度显著高于其他处理。其次利用率较高的为蛋白胨、硝酸钠和硝酸钾, 在这 3 种为氮源的 CZA 培养基中生长速度显著低于以酵母浸粉为氮源的 CZA 培养基中的生长速度, 但是在以蛋白胨为氮源的培养基中产孢效果较好。对甘氨酸利用率最差, 生长缓慢(表 6)。

2.1.7 致死温度的测定结果

采用不同温度的水浴对供试菌株的菌丝块进行处理, 处理后置于 PSA 平板上培养, 并对菌丝的生长进行持续观察。结果表明, 菌丝块

表 5 菌株 B-48 在不同碳源条件下的生长速率及产孢量

Table 5 The growth rate and spore yield of strain B-48 under different carbon source

Carbon source	Growth rate (cm/d)	Concentration ($\times 10^4$ spore/plate)
CK	0.45 $\pm$ 0.03E	1.00 $\pm$ 1.00BC
Fructose	0.70 $\pm$ 0.01D	1.33 $\pm$ 0.58B
Starch	1.00 $\pm$ 0.02A	11.00 $\pm$ 1.00A
Mannitol	0.49 $\pm$ 0.01E	0.67 $\pm$ 0.58C
Galactose	0.00 $\pm$ 0.00G	0.00 $\pm$ 0.00E
Sorbitol	0.44 $\pm$ 0.01E	0.67 $\pm$ 0.58C
Maltose	0.77 $\pm$ 0.06C	1.33 $\pm$ 0.58B
Sodium citrate	0.15 $\pm$ 0.01F	0.33 $\pm$ 0.58D
Sucrose	0.83 $\pm$ 0.04B	1.33 $\pm$ 0.58B
Lactose	0.00 $\pm$ 0.00G	0.00 $\pm$ 0.00E
Dextrose	0.72 $\pm$ 0.05CD	1.33 $\pm$ 0.58B

表 6 菌株 B-48 在不同氮源条件下的生长速率及产孢量

Table 6 The growth rate and spore yield of strain B-48 under different nitrogen source

Nitrogen source	Growth rate (cm/d)	Concentration ($\times 10^4$ spore/plate)
CK	0.50 $\pm$ 0.03D	0.33 $\pm$ 0.58F
Yeast	1.02 $\pm$ 0.02A	24.00 $\pm$ 3.61A
Peptone	0.89 $\pm$ 0.02B	10.00 $\pm$ 2.00B
Glycine	0.39 $\pm$ 0.02E	1.33 $\pm$ 0.58D
Ammonium nitrate	0.70 $\pm$ 0.01C	2.00 $\pm$ 1.00C
Ammonium chloride	0.68 $\pm$ 0.05C	1.33 $\pm$ 0.58D
Sodium nitrate	0.87 $\pm$ 0.02B	1.00 $\pm$ 1.00E
Potassium nitrate	0.81 $\pm$ 0.06B	1.33 $\pm$ 1.15D

经过 35–50 °C 水浴处理 10 min 培养 5 d 后均可长出菌丝；而经 55–70 °C 水浴处理 10 min 培养 14 d 后仍未观察到菌丝生长，由此可以得出结论，病原菌菌丝在 55 °C 以上持续处理 10 min 会导致菌株 B-48 的菌丝死亡。

2.2 全基因组测序和功能预测

2.2.1 全基因组测序分析及结构预测

经过二代 Illumina 及三代 Nanopore 测序后获得原始序列，原始序列经拼接得到菌株 B-48 的基因组，将测序原始数据上传至 NCBI 数据库，获得基因组版本号 JADEZT000000000.1，生物项目编号 BioProject: PRJNA672254，生物样本编号 BioSample: SAMN16551125。菌株 B-48 的基因组含有 21 个 contigs，序列总长度为 62 246 358 bp，N50 值为 5 346 453 bp，G+C 含量为 46.59%。基因组二代数据比对率为 99.62%，覆盖率为 99.89%，BUSCO 评价为 99.3%，认为该基因组组装较好。对菌株 B-48 的基因组结构进行了预测，预测该菌株基因组编码 11 324 个基因(表 7)。非编码 RNA 注释中 tRNA 有 269 个、rRNA 有 101 个、snRNA 有 27 个、sRNA 有 3 个。重复序列总共注释到 41 778 个。

2.2.2 基因组的功能注释及预测

对 *Colletotrichum echinochloae* B-48 的基因组进行 NR、GO、COG、Pfam 及 KEGG 等数据库的比对注释。NR 数据库中共注释到

表 7 *Colletotrichum echinochloae* B-48 基因组的数据统计Table 7 Summary statistics of *C. echinochloae* B-48 strain genomes

Category	Statistic
Variables	<i>C. echinochloae</i>
Isolate	CCTCC2020689
NCBI accession	JADEZT000000000.1
BioProject	PRJNA672254
BioSample	SAMN16551125
Tissue sampled	Leaf
Sequencing technology	ONT PromethION & Illumina NovaSeq 6000
Genome assembly	
Assembly size (bp)	62 246 358
Number of contigs	21
Scaffold N50 length (bp)	5 346 453
Scaffold N90 length (bp)	3 463 513
G+C (%)	46.59
Average scaffold length (bp)	2 964 112.29
Longest scaffold (bp)	8 328 496
Shortest scaffold (bp)	25 553
Genome Completeness	
Complete BUSCOs	288
Complete and single BUSCOs	288
Complete and duplicated BUSCOs	0
Fragmented BUSCOs	1
Missing BUSCOs	1

11 165 条基因，占基因注释总数的 98.60%，NR 数据库注释结果显示菌株 B-48 的基因比对到高梁炭疽菌(*C. sublineola*)基因数最多，占 37.35%，其次是禾谷炭疽菌(*C. graminicola*) M1.001，占 33.06% (图 2)。

通过 GO 注释到 6 397 条基因，GO 注释的基因占菌株基因总数的 56.49%；GO 注释将菌株 B-48 的基因组注释为生物过程(biological process)、细胞组分(cellular component)和分子功能(molecular function)三大类，其中在生物过程大类中分别在跨膜转运(transmembrane transport)、致病力(pathogenesis)和蛋白转运(protein transport)中基因富集较多，在细胞组分

大类中细胞核(nucleus)、质膜的组成部分(integral component of plasma membrane)和细胞质(cytoplasm)注释基因较多。

通过 COG 数据库对基因进行直系同源分类, COG 功能分析注释得到 962 个基因, 注释率为 8.50%。基因功能注释结果共分为 24 类,

其中参与 G 类(碳水化合物转运和代谢)、I 类(脂质转运与代谢)、E 类(氨基酸的转运和代谢)的注释结果最多, 分别有 121、105、96 个。另外, 参与 Q 类(次级代谢产物的生物合成、转运和代谢)有关的基因有 57 个, 表明菌株 B-48 具有产生多种次级代谢产物的能力(图 3)。

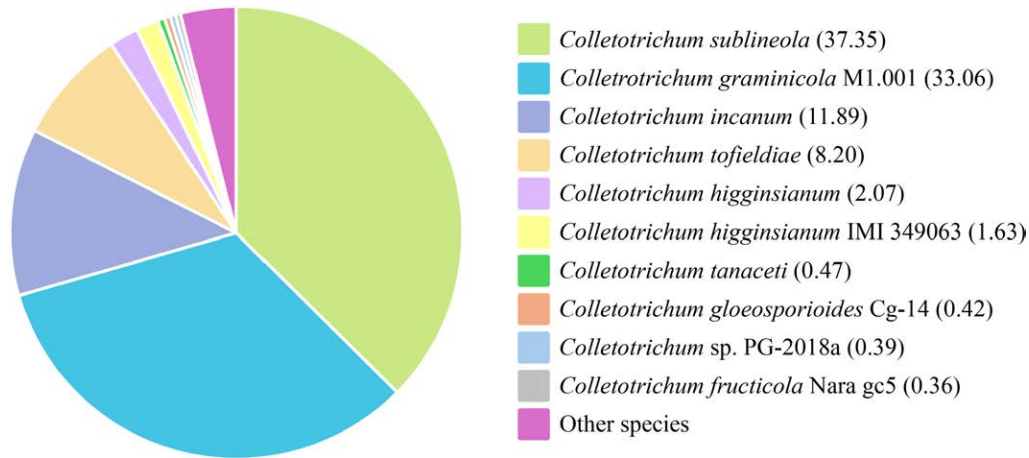


图 2 NR 数据库比对到序列的物种分布及占比

Figure 2 Map of species distribution from the NR database in relation to sequences.

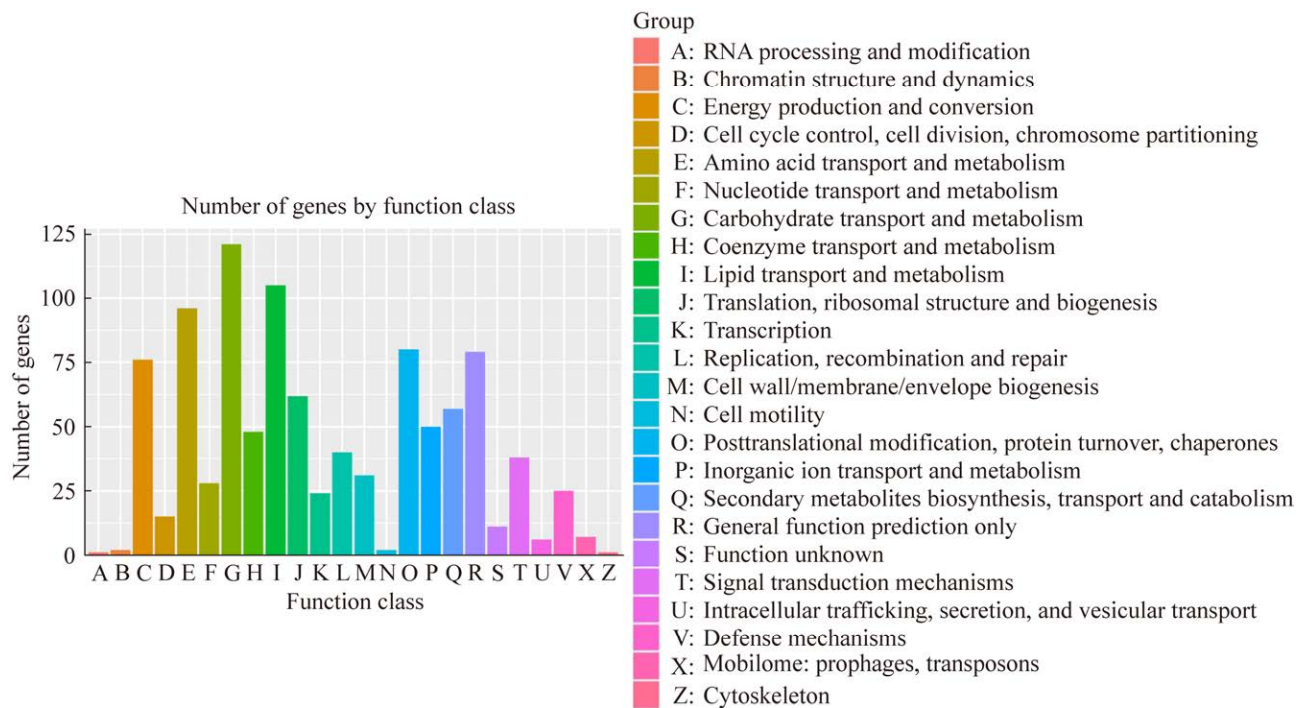


图 3 *Colletotrichum echinocloeae* B-48 的全基因组的 COG 功能分类

Figure 3 Gene annotation and functional classification in COG database of *Colletotrichum echinocloeae* B-48.

Pfam 结构域预测得到 8 852 条基因, 其中 major facilitator superfamily (MFS)超家族转运蛋白和糖转运蛋白(sugar transporter)注释得最多, 分别为 365 (4.12%)和 204 (2.30%)。

KEGG 通路分析结果显示, 总共有 3 900 个基因被注释, 占菌株基因总数的 34.44%, 其中碳水化合物代谢、氨基酸代谢及信号传导是最主要的 3 种代谢通路, 分别有 380 (9.7%)、327 (8.4%)和 319 (8.2%)个基因注释结果。

2.2.3 次级代谢产物基因簇分析

通过 antiSMASH 7.0、CusProSe 软件对菌株 B-48 的基因组进行次级代谢产物基因簇预测, 菌株 B-48 的基因组中共预测出了 76 个次级代谢产物生物合成相关的基因簇, 相关统计结果见图 4。经统计, 菌株 B-48 的次级代谢产物生物合成基因簇中, 包括 PKS 生物合成基因簇 23 个, NRPS 生物合成基因簇 15 个, PKS-NRPS 生物合成基因簇 5 个, DMATS 生物合成基因簇 6 个, TS 生物合成基因簇 8 个, 其他基因簇有 19 个, 其中 PKS 生物合成基因簇数量最多。

3 讨论

近年来我国农田杂草种群结构复杂多变, 恶性杂草发生密度不断增加, 主要农田杂草的抗药性持续上升, 给种植业生产安全带来严重威胁^[13]。前人研究发现, 已有多种杂草分别对几类常见除草剂产生了抗性^[14-15], 并伴随交互抗性和多抗性问题的发生^[16-17]。此外, 随着转基因技术的发展, 全球抗除草剂转基因作物种植面积、种植品种的不断扩大, 以及草甘膦、草铵膦等非选择性除草剂极大规模地使用^[14], 导致新除草剂的研发进度缓慢, 新作用靶标或新化学类别的除草剂品种仍极其缺乏^[18]。因此, 深入挖掘除草天然产物、除草作用靶标, 可为新型除草剂的研发提供重要的理论依据。

微生物尤其是真菌来源的天然产物是作为开发新型生物源除草剂的有利资源^[19]。炭疽菌作为微生物除草剂已应用于防除多种杂草, 例如胶孢炭疽菌 (*C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*)作为第一例商用微生物除草剂

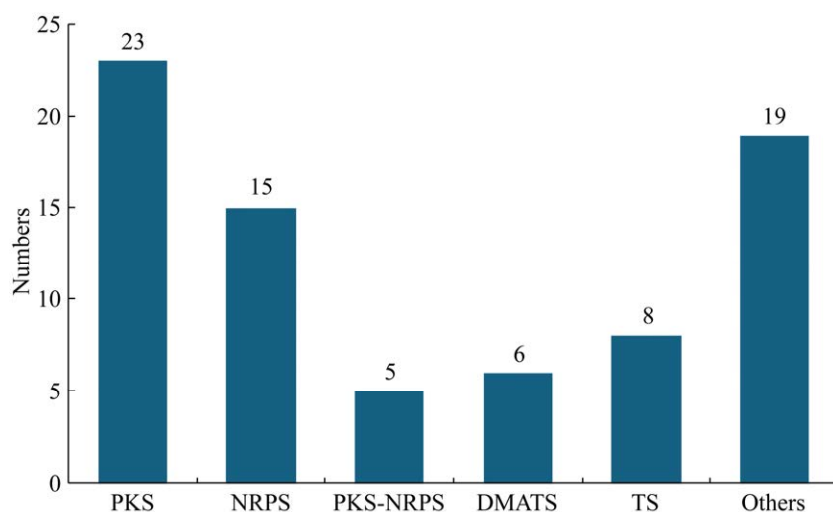


图 4 菌株 B-48 基因组的次级代谢基因簇统计 PKS: 聚酮合酶; NRPS: 非核糖体多肽合酶; PKS-NRPS: 杂合聚酮-非核糖体多肽合酶; DMATS: 二甲烯丙基色氨酸合酶; TS: 萜类合成酶; Others: 其他生物合成基因簇。

Figure 4 Statistics of secondary metabolite gene clusters. PKS: Polyketide synthase; NRPS: Non ribosomal peptide synthetases; PKS-NRPS: Polyketide synthase-non ribosomal peptide synthetase hybrids; DMATS: Dimethylallyl tryptophan synthases; TS: Terpene synthase; Others: Other biosynthetic gene clusters.

College (又名 LockDown), 可以有效防除杂草弗吉尼亚合萌(*Aeschynomene virginica*)、合萌(*A. indica*)及大果田菁(*Sesbania exaltata*); 另外, 胶孢炭疽菌[*C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc. f. sp. *malvae*]作为商用除草剂 BioMal, 可以有效防除圆叶锦葵(*Malva pusilla*)及小花锦葵(*M. parviflora*); 辣椒炭疽菌(*C. coccodes*)可以用来防除苘麻(*Abutilon theophrasti*); 瓜类炭疽菌(*C. orbiculare*)对刺苍耳(*Xanthium spinosum*)有比较好的防除效果; 炭疽菌希金斯刺盘孢(*C. higginsianum*)产生的毒素对苦苣菜(*Sonchus arvensis*)、浮萍(*Lemna minor*)和分枝金雀花(*Phelipanche ramosa*)的生长也有抑制效果; 胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)对田野菟丝子(*Cuscuta campestris*)、南方菟丝子(*Cuscutae australis*)等均有良好的防效^[20]。

本研究前期从稻田发病稗草上分离出一株真菌菌株 B-48, 通过回接证明该菌株为稗草叶斑病的病原菌^[4]。通过形态特征、分子生物学序列分析将该菌株鉴定为稗属炭疽菌(*Colletotrichum echinocloa*)。另外, 寄主特异性、作物安全性等试验证明该菌株有良好的生防除草潜力, 这对开发新型绿色安全的微生物除草制剂和生物农药具有重要意义^[4]。本研究对该菌株的最佳生长和产孢的培养基、生长温度、pH、光照条件、碳氮源等生物学特性进行了探索。结果表明, 不同培养基、生长温度、pH、光照条件、碳氮源对该菌株的生长、产孢及菌落形态影响显著。总的来说, 淀粉、酵母浸粉作为碳源及氮源能够显著提高菌株 B-48 的生长及产孢。并且菌株 B-48 最适生长及产孢的条件为 PSA 培养基, 生长温度 30 °C, 最适 pH 值为 7.0, 最适光照条件为持续光照。不同炭疽菌的生长最适温度、营养条件也不尽相同^[21], 香蕉炭疽菌(*C. musae*)生长最适温度为 27–30 °C, 球炭疽菌(*C. coccodes*)生长最适温度在 20–30 °C, 莲属炭疽菌(*C. nymphaeae*)的最适生长温度为 25 °C, 最适 pH 值范围为 6.0–8.0, PDA 是该菌株生长

的最适培养基, 乳糖、酵母浸粉为该菌株的最适碳氮源^[22]。对该菌株的生物学特性的研究有助于了解该菌株的基本生长条件, 后续仍须进一步通过正交试验筛选出最适合菌株 B-48 生长发酵的营养条件及环境条件组合, 为后期对该菌株的大规模发酵培养提供科学基础。

利用微生物的天然产物来开发绿色环保的生物源除草剂是当前杂草绿色防控的一大发展方向。基因组测序及生物信息学的快速发展为炭疽菌次级代谢产物的挖掘起到了推动作用。虽然炭疽菌对寄主植物致病机理的研究较多, 但是炭疽菌的次级代谢产物如何参与杂草防除及次级代谢产物的生物合成机制的研究甚少。有研究表明胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)和瓜类炭疽菌(*C. orbiculare*)的基因组中含有大量致病相关基因, 如细胞壁降解酶及效应子等^[23]。此外, 有研究表明炭疽病菌的次级代谢产物能分泌吲哚乙酸, 吲哚乙酸的衍生物能成为除草剂的模板^[24]。前人报道中仅从炭疽菌中分离出 6 种具有除草活性的天然产物 dirhamnolipid、colletochlorin A、E、F、orcinol 和 tyrosol, 但是编码炭疽菌次级代谢产物的生物合成基因簇尚无相应解析^[25–28]。对禾谷炭疽菌的全基因组测序及比较基因组分析表明炭疽菌属真菌存在大量编码天然产物的生物合成基因簇, 但所报道的已知天然产物的数量远远低于理论水平, 还有大量的沉默的基因簇等待挖掘^[29]。本研究首次对稗属炭疽菌(*C. echinocloae*) B-48 的全基因组信息进行解析, 并对其次级代谢产物基因簇进行了初步挖掘, 研究结果将为后续稗属炭疽菌功能基因组学研究以及相关生物合成基因簇的异源表达等奠定基础, 为今后稗草生物防治相关研究的深入开展提供重要的数据参考。

4 结论

本研究对具有生防除草潜力的稗属炭疽菌菌株 B-48 的生物学特性进行了探索, 该菌株在 PSA 培养基上生长产孢良好, 最适生长温度为

30 °C, 最适生长 pH 值为 7.0, 最适光照条件为持续光照, 最适碳、氮源分别为淀粉和酵母浸粉, 致死条件为 55 °C、10 min。全基因组序列结果显示该菌株基因组大小 62.25 Mb, G+C 含量 46.59%, 预测到蛋白质编码基因 11 324 个, 预测到次级代谢产物生物合成基因簇 76 个。以上结果为该菌后续发酵培养、次级代谢生物合成研究及实际应用奠定了理论基础。

作者贡献

顾琼楠是本研究的实验设计者和实验研究的执行人、负责人, 主要完成实验设计、数据分析, 论文初稿的写作与论文修改; 沈静、黄启超、李林和陈安安参与实验设计和试验结果分析; 褚世海和李儒海是项目的负责人, 指导实验设计、数据分析、论文写作与修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] NARAYANA RAO A. *Echinochloa colona* and *Echinochloa crus-galli*[M]//Biology and Management of Problematic Crop Weed Species. Amsterdam: Elsevier, 2021: 197-239.
- [2] WU DY, SHEN EH, JIANG BW, FENG Y, TANG W, LAO ST, JIA L, LIN HY, XIE LJ, WENG XF, DONG CF, QIAN QH, LIN F, XU HM, LU HB, CUTTI L, CHEN HJ, DENG SG, GUO LB, CHUAH TS, et al. Genomic insights into the evolution of *Echinochloa* species as weed and orphan crop[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 689.
- [3] DAMALAS CA, KOUTROUBAS SD. Herbicide-resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in global rice production[J]. Weed Biology and Management, 2023, 23(1): 23-33.
- [4] GU QN, CHU SH, HUANG QC, CHEN AN, LI L, LI RH. *Colletotrichum echinochloae*: a potential bioherbicide agent for control of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv.)[J]. Plants, 2023, 12(3): 421.
- [5] KELLER NP. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery[J]. Nature Reviews Microbiology, 2019, 17(3): 167-180.
- [6] DUKE SO, OWENS DK, DAYAN FE. Natural product-based chemical herbicides[M]//Weed Control. Boca Raton, FL: CRC Press, [2018]: CRC Press, 2018: 153-165.
- [7] DUKE SO, PAN ZQ, BAJSA-HIRSCHL J, BOYETTE CD. The potential future roles of natural compounds and microbial bioherbicides in weed management in crops[J]. Advances in Weed Science, 2022, 40(spe1): e020210054.
- [8] KENSHOLE E, HERISSE M, MICHAEL M, PIDOT SJ. Natural product discovery through microbial genome mining[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2021, 60: 47-54.
- [9] YAN Y, LIU QK, JACOBSEN SE, TANG Y. The impact and prospect of natural product discovery in agriculture: new technologies to explore the diversity of secondary metabolites in plants and microorganisms for applications in agriculture[J]. EMBO Reports, 2018, 19(11): e46824.
- [10] 谢丽媛, 姜逢霖, 胡友财. 微生物中自抗性基因导向的基因组挖掘及其在天然产物发现中的应用[J]. 药学进展, 2023, 47(4): 244-259.
- [11] XIE LY, JIANG FL, HU YC. Self-resistant gene-directed genome mining in microorganisms and its application in the discovery of natural products[J]. Progress in Pharmaceutical Sciences, 2023, 47(4): 244-259 (in Chinese).
- [12] 方中达. 植病研究法[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [13] FANG ZD. Research Method of Plant Pathology[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2001 (in Chinese).
- [14] 顾琼楠, 欧翔, 褚世海, 黄启超, 陈安安, 李儒海. 牛筋草生防菌 NJC-16 的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(4): 817-825.
- [15] GU QN, OU X, CHU SH, HUANG QC, CHEN AA, LI RH. Isolation, identification, and biological characteristics of the biocontrol fungi NJC-16 for *Eleusine indica*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2021, 37(4): 817-825 (in Chinese).
- [16] ZHU JW, WANG J, DiTOMMASO A, ZHANG CX, ZHENG GP, LIANG W, ISLAM F, YANG C, CHEN XX, ZHOU WJ. Weed research status, challenges, and opportunities in China[J]. Crop Protection, 2020, 134: 104449.
- [17] GAINES TA, DUKE SO, MORRAN S, RIGON CAG, TRANEL PJ, KÜPPER A, DAYAN FE. Mechanisms of evolved herbicide resistance[J]. Journal of Biological Chemistry, 2020, 295(30): 10307-10330.
- [18] SOLTANI N, DILLE JA, BURKE IC, EVERMAN WJ, VanGESSEL MJ, DAVIS VM, SIKKEMA PH. Potential corn yield losses from weeds in North America[J]. Weed Technology, 2016, 30(4): 979-984.
- [19] BARKER AL, PAWLAK J, DUKE SO, BEFFA R, TRANEL PJ, WUERFFEL J, YOUNG B, PORRI A, LIEBL R, APONTE R, FINDLEY D, BETZ M, LERCHL J, CULPEPPER S, BRADLEY K, DAYAN FE. Discovery, mode of action, resistance mechanisms, and plan of action for sustainable use of Group 14 herbicides[J]. Weed Science, 2023, 71(3): 173-188.
- [20] 蒋田田, 文君慧. 我国抗除草剂转基因作物面临的机遇和挑战[J]. 安徽农业科学, 2021, 49(22): 239-242.
- [21] JIANG TT, WEN JH. Opportunities and challenges facing genetically modified herbicide-resistant crops in China[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2021, 49(22): 239-242 (in Chinese).
- [22] QU RY, HE B, YANG JF, LIN HY, YANG WC, WU QY, LI QX, YANG GF. Where are the new herbicides?[J]. Pest Management Science, 2021, 77(6): 10307-10330.

- 2620-2625.
- [19] BENDEJACQ-SEYCHELLES A, GIBOT-LECLERC S, GUILLEMIN JP, MOUILLE G, STEINBERG C. Phytotoxic fungal secondary metabolites as herbicides[J]. *Pest Management Science*, 2024, 80(1): 92-102.
- [20] CHAKRABORTY A, RAY P. Mycoherbicides for the noxious meddlesome: can *Colletotrichum* be a budding candidate?[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 754048.
- [21] SALOTTI I, JI T, ROSSI V. Temperature requirements of *Colletotrichum* spp. belonging to different clades[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 953760.
- [22] MA T, YANG CD, CAI FF, CHEN ZH. Morpho-cultural, physiological and molecular characterisation of *Colletotrichum nymphaeae* causing anthracnose disease of walnut in China[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2022, 166: 105537.
- [23] GAN P, IKEDA K, IRIEDA H, NARUSAKA M, O'CONNELL RJ, NARUSAKA Y, TAKANO Y, KUBO Y, SHIRASU K. Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of *Colletotrichum* fungi[J]. *New Phytologist*, 2013, 197(4): 1236-1249.
- [24] GROSSMANN K. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action[J]. *Pest Management Science*, 2010, 66(2): 113-120.
- [25] MASI M, CIMMINO A, BOARI A, TUZI A, ZONNO MC, BARONCELLI R, VURRO M, EVIDENTE A. Colletochlorins E and F, new phytotoxic tetrasubstituted pyran-2-one and dihydrobenzofuran, isolated from *Colletotrichum higginsianum* with potential herbicidal activity[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(6): 1124-1130.
- [26] MASI M, ZONNO MC, CIMMINO A, REVEGLIA P, BERESTETSKIY A, BOARI A, VURRO M, EVIDENTE A. On the metabolites produced by *Colletotrichum gloeosporioides* a fungus proposed for the *Ambrosia artemisiifolia* biocontrol; spectroscopic data and absolute configuration assignment of colletochlorin A[J]. *Natural Product Research*, 2018, 32(13): 1537-1547.
- [27] DALLERY JF, Le GOFF G, ADELIN E, IORGA BI, PIGNÉ S, O'CONNELL RJ, OUZZANI J. Deleting a chromatin remodeling gene increases the diversity of secondary metabolites produced by *Colletotrichum higginsianum*[J]. *Journal of Natural Products*, 2019, 82(4): 813-822.
- [28] XU ZL, SHI MY, TIAN YQ, ZHAO PF, NIU YF, LIAO MD. Dirhamnolipid produced by the pathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* BWH-1 and its herbicidal activity[J]. *Molecules*, 2019, 24(16): 2969.
- [29] BUIATE ES, XAVIER KV, MOORE N, TORRES MF, FARMAN ML, SCHARDL CL, VAILLANCOURT LJ. Correction to: a comparative genomic analysis of putative pathogenicity genes in the host-specific sibling species *Colletotrichum graminicola* and *Colletotrichum sublineola*[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 686.