

一株人参细菌性软腐病致病假单胞菌的基因组特征与毒力基因分析

刘坤^{1,2}, 孙文松^{*1,2}, 张天静^{1,2}, 沈宝宇^{1,2}, 李晓丽^{1,2}

1 辽宁省经济作物研究所, 辽宁 辽阳 111000

2 辽宁省农业科学院 药用植物研究所, 辽宁 辽阳 111000

刘坤, 孙文松, 张天静, 沈宝宇, 李晓丽. 一株人参细菌性软腐病致病假单胞菌的基因组特征与毒力基因分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(11): 4667-4686.

LIU Kun, SUN Wensong, ZHANG Tianjing, SHEN Baoyu, LI Xiaoli. Genomic characteristics and virulence genes of *Pseudomonas glycinae*, the causal agent of bacterial soft rot in ginseng[J]. Microbiology China, 2024, 51(11): 4667-4686.

摘要: 【背景】细菌性软腐病是植物根部主要病害之一, 可在作物生长期和储藏期造成巨大损失。2023年本团队首次发现并报道了由 *Pseudomonas glycinae* 引起的人参细菌性软腐病。【目的】探索 *Pseudomonas glycinae* XJFL-1 菌株的基因组特征, 并通过与属内和种内代表性菌株的比较基因组学分析, 初步探讨 *P. glycinae* 的遗传特性以及菌株 XJFL-1 基因组中可能编码的致病相关的毒力因子和II型、III型分泌系统效应因子。【方法】通过基因组注释、比较基因组学分析和基因家族分析等探索基因组的特征、遗传特性及毒力基因。【结果】基因组注释发现编码了碳水化合物、氨基酸和蛋白质代谢相关酶类, 以及与鞭毛运动、膜形成和群体感应相关的重要基因; 平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)、数字 DNA-DNA 杂交分析(digital DNA-DNA hybridization, dDDH)及共线性分析结果确认该菌株为 *P. glycinae*, 并且 *P. glycinae* 物种的直系同源基因集具有较高的种内保守性; 植物细胞壁降解酶系(plant cell wall degrading enzyme, PCWDE)分析结果显示, 菌株 XJFL-1 可编码 37 种 PCWDE, 主要为糖苷水解酶(glycoside hydrolase, GH)、碳水化合物酯酶(carbohydrate esterase, CE)和多糖裂解酶(polysaccharide lyase, PL); 预测到的II型分泌系统效应因子基因主要有编码脂肪酶的 *lapA*、*lapB* 和 *lapC*, 编码碱性磷酸酶的 *phoA2*, 编码磷脂酶的 *plcA* 和编码几丁质酶的 *cbpD*; III型分泌系统中 E3 泛素连接酶效应因子是 XJFL-1 编码的优势基因, 包括 *IpaH* 家族的 *ipaH9.8*、*ipaH7.8*、*ipaH4.5*、*ipaH3* 和 *ipaH1.4*, *SLRP* 家族的 *slrP*, 以及 *sspH2*、*sspH1* 和

资助项目: 国家中药材产业技术体系辽阳综合试验站项目(CARS-21-06); 辽宁省农业科学院学科建设项目(2019DD144221); 辽宁省应用基础研究计划(联合计划)项目(2022JH2/101300284); 辽宁省农业科学院协同创新专项(2022XTCX0503)

This work was supported by the China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-21-06), the Discipline Construction Plan of Liaoning Academy of Agricultural Sciences (2019DD144221), the Liaoning Applied Basic Research Program (2022JH2/101300284), and the Collaborative Innovation Project of Liaoning Academy of Agricultural Sciences (2022XTCX0503).

*Corresponding author. E-mail: sunwensong12@126.com

Received: 2024-03-19; Accepted: 2024-05-10; Published online: 2024-06-04

NGR_a03640, 但未注释到编码果胶酶的相关基因。果胶酶活力测定结果显示, 菌株 XJFL-1 确实不能分泌果胶酶类。【结论】比较基因组学和基因家族分析结果明确了菌株 XJFL-1 与假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 内代表性菌株的亲缘关系, 以及 *P. glycinae* 的种内遗传特性; 毒力基因预测结果发现, 菌株编码了丰富的 PCWDEs 基因和独特的与致病相关的 II 型和 III 型分泌系统效应因子。

关键词: 基因组; 比较基因组学分析; 效应因子; 植物细胞壁降解酶; *Pseudomonas glycinae* XJFL-1

Genomic characteristics and virulence genes of *Pseudomonas glycinae*, the causal agent of bacterial soft rot in ginseng

LIU Kun^{1,2}, SUN Wensong^{*1,2}, ZHANG Tianjing^{1,2}, SHEN Baoyu^{1,2}, LI Xiaoli^{1,2}

1 Liaoning Research Institute of Cash Crops, Liaoyang 111000, Liaoning, China

2 Institute of Medical Plants, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Liaoyang 111000, Liaoning, China

Abstract: [Background] Bacterial soft rot poses a significant threat to plant roots, resulting in substantial agricultural losses. Our team identified *Pseudomonas glycinae* as the causative agent of bacterial soft rot in ginseng in 2023. **[Objective]** To delve into the genomic characteristics of *P. glycinae* XJFL-1, conduct a comparative genomics analysis for XJFL-1 with intra- and intergenus strains, and predict putative virulence factors and effectors of type II and III secretion systems (T2SS and T3SS, respectively). **[Methods]** We performed genome annotation, comparative genomics analysis, and gene family analysis to predict the genomic characteristics, genetic characteristics, and virulence genes. **[Results]** Genome annotation revealed the presence of genes encoding the enzymes involved in carbohydrate, amino acid, and protein metabolism, as well as key genes associated with flagellar movement, membrane biogenesis, and quorum sensing. Strain XJFL-1 was identified as *P. glycinae* based on ANI, dDDH, and collinearity analyses, and a high degree of intraspecific gene conservation was found for *P. glycinae*. Strain XJFL-1 encoded 37 plant cell wall-degrading enzymes (PCWDEs) including glycoside hydrolases (GHs), carbohydrate esterases (CEs), and polysaccharide lyases (PLs). In addition, the strain carried the genes encoding effectors of T2SS (e.g. *lapA*, *lapB*, *lapC*, *phoA2*, *plcA*, and *cbpD*) and T3SS (e.g. *ipaH9.8*, *ipaH7.8*, *ipaH4.5*, *ipaH3*, *ipaH1.4*, *slrP*, *sppH2*, *sppH1*, and *NGR_a03640*). However, pectinase genes were conspicuously absent. The results of the pectinase activity assay indicated that strain XJFL-1 was unable to secrete pectinase. **[Conclusion]** The results of comparative genomics and gene family analyses clarified the genetic relationship of strain XJFL-1 with representative strains of *Pseudomonas* and the intraspecific genetic characterization of *P. glycinae*. Additionally, the strain carried abundant genes encoding PCWDEs and effectors of T2SS and T3SS associated with pathogenicity.

Keywords: genome; comparative genomics analysis; effectors; plant cell wall-degrading enzymes; *Pseudomonas glycinae* XJFL-1

人参(*Panax ginseng* C. A. Meyer)属五加科人参属的多年生草本植物,是东北主要药材品种,具有补元气、补脾、益肺、生津止渴和安神等功效^[1]。药理分析发现人参还有抗疲惫、提高记忆力、抗失血性休克、保护心脏和预防高血压及抗癌等作用。

近年来,辽宁人参产区人参根部病害发生严重,对人参的产量和品质构成威胁^[2],这与人参连作障碍密切相关^[3],使之成为人参栽培产业发展的主要瓶颈。细菌性软腐病,是人参根部的重要病害之一,目前研究较少。该病害常年田间平均发病率在 2%–5%,严重时可达 10%以上,病株根部产生褐色软腐病斑^[4-5],边缘清晰,带有刺激性气味儿,严重时整个根部组织褐变、软化解体,只剩下表皮空壳。

1995–2000 年,白容霖等^[6]和潘丽梅等^[7]通过致病性测定、电子显微镜形态观察和生理生化检测等先后鉴定出胡萝卜欧文氏菌胡萝卜软腐亚种(*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Dye)、胡萝卜欧文氏菌黑胫亚种(*E. carotovora* subsp. *atroseptica* Dye)和石竹假单胞菌 [*Pseudomonas caryophyll* (Burkholder) Starr & Burkholder]为人参细菌性软腐病病原细菌。2017 年, Zhang 等^[8]首次报道了由致病假单胞 *P. qessardii* 引起的人参细菌性软腐病。2023 年, Liu 等^[9]在抚顺新宾人参细菌性软腐病株病根上分离到致病假单胞菌,代表菌株定名为 XJFL-1,经致病性测定、生理生化检测、过敏性反应以及多位点序列分型(multi locus sequence typing, MLST)和比较基因组学分析,最终鉴定为 *P. glycinae*。

为进一步明确菌株 XJFL-1 基因组的遗传特征、探索致病机制,本研究开展基因组注释、基因组比较分析和基因家族分析,以及植物病原细菌致病相关的 II 型、III 型分泌系统效应因子和植物细胞壁降解酶系(plant cell wall degradative

enzyme, PCWDE)的预测研究,以期为后续揭示人参细菌性软腐病菌的侵入、抑制宿主免疫系统、定殖以及毒力因子释放等致病机制的研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品

病原细菌假单胞菌(*Pseudomonas glycinae*) XJFL-1^[9]和对照细菌枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 0417 均由本研究室保存,委托中国农业微生物菌种保藏管理中心鉴定。

1.2 培养基

果胶培养基(g/L):果胶 5.0、磷酸氢二钠 5.0、琼脂 20.0, pH 4.5。

1.3 主要试剂和仪器

多聚半乳糖醛酸酶活力检测试剂盒,苏州格锐思生物科技有限公司。酶标仪,北京市六一仪器厂;台式高速冷冻离心机,湖南赫西仪器装备有限公司。

1.4 基因预测与功能注释

使用 Clusters of Orthologous Groups of Proteins (COG)^[10]、Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST)^[11]和 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)^[12]数据库进行全基因组的基因鉴定和注释;使用 Virulence Factors of Pathogenic Bacteria (VFDB)数据库进行毒力因子预测^[13];使用 Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD)数据库进行抗生素耐药基因预测^[14];使用 antiSMASH 数据库进行次级代谢产物基因家族预测^[15];使用 SignalP 5.0 服务器推定基因组编码信号肽情况^[16]。

1.5 基因组比较分析

通过 GenBank 数据库下载相关 *Pseudomonas* 菌株的全基因组序列和编码的蛋白序列。利用 TBtools 软件的 fast ANI_w 插件与假单胞属内

group/subgroup 代表性菌株进行平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)分析^[17]; 利用 Genome-to-Genome Distance Calculator 3.0 软件开展数字 DNA-DNA 杂交(digital DNA-DNA hybridization, dDDH)分析^[18]; 使用 Mauve v2.3.1 软件进行与近缘菌株保守基因和直系同源基因集的共线性分析^[19]。其中, ANI 和 dDDH 值对同一物种的界定阈值分别为 95 和 70。

1.6 基因家族分析

采用 OrthoMCL 算法(设置 P 值为 1×10^{-5} 、Inflation 值为 1.5)使用 Ortho Venn3 在线分析工具^[20]对假单胞菌属内近缘的 12 个菌株的全基因组蛋白序列进行过滤, 并进行基因家族分析和系统发育树分析; 采取同样方法对 *P. glyciniae* 种内已报道的 7 个菌株全基因组蛋白序列进行基因家族分析, 并对结果进行整理和可视化。

1.7 植物细胞壁降解酶预测

为明确菌株 XJFL-1 的致病机制, 对基因组可能编码的 PCWDE 进行预测分析。采用 dbCAN 数据库使用 HMMER: dbCAN、DIAMOND: CAZy 和 HMMER: dbCAN_sub 这 3 种算法工具进行 CAZyme 数据库的检索、比对和分析。

1.8 T2SS 和 T3SS 分泌系统效应蛋白分析

T2SS 和 T3SS 分泌系统与革兰氏阴性细菌的致病性和毒力因子的关系最密切, 2 个系统包含大量参与细菌-宿主互作、使宿主防御系统失活、从而引起细菌致病性和毒力作用的效应因子: T2SS 的底物包括各种水解酶和细菌毒素; T3SS 则是通过将效应物直接注射到宿主细胞的细胞质或质膜上来实现细菌对宿主的定殖和入侵^[21]。因此, 对病原细菌 T2SS 和 T3SS 分泌系统效应因子的注释和预测, 对研究致病假单胞致病机制意义重大。BastionHub 与以往专注于单一底物的数据库不同, 它整合了广泛的

功能模块和 5 种主要的革兰氏阴性菌分泌型底物类型, 并提供了先进的预测和可视化关系分析工具^[22]。本研究通过该数据库基于全基因组蛋白序列(长度不少于 50 aa, e 值为 e^{-5})对菌株 XJFL-1 的分泌系统进行预测, 并着重分析了 T2SS 和 T3SS 分泌系统效应因子的种类及分布情况。同时, 还使用 SignalP 5.0 服务器对该菌信号肽编码情况进行推测。

1.9 果胶酶活力的测定

为进一步验证基因组注释分析结果, 分别采用果胶培养基和果胶酶活力检测试剂盒, 检验菌株 XJFL-1 产果胶酶的能力和果胶酶活力。阳性对照为本研究室自有的能够产生果胶酶的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 0417。

2 结果与分析

2.1 基因预测与功能注释结果

将预测的基因分别与 COG、RAST、KEGG、VFDB、antiSMASH 和 CARD 等数据库进行 BLAST 比对, 注释基因功能, 总体情况见表 1。

2.1.1 RAST 注释结果

在 RAST 中, 共注释到 5 827 个条目, 平均长度 979 bp, 注释到功能基因 2 381 个, 涉及 25 个类别(category)、其中基因数 10 个以上的有 20 个类别、96 个亚类(subcategory)。分析

表 1 不同数据库基因组注释情况

Table 1 Genome annotation in different databases

Database	Gene number	Entry
KEGG	3 227	5 658
COG	2 913	5 476
RAST	2 381	5 827
VFDB	149	
antiSMASH	15	
CARD	6	

发现, 基因数最多的类别是氨基酸及其衍生物(amino acids and derivatives)、碳水化合物类别(carbohydrates)和蛋白质代谢(protein metabolism), 基因数分别为 480、244 和 205。

包含基因最多的亚类是蛋白质代谢(protein metabolism)类别的蛋白质生物合成(protein biosynthesis)亚类, 共包含 136 个基因, 主要涉及翻译的起始、延伸和终止, 以及翻译延长因子、各种氨基酸 tRNA 氨酰化和程序性移码等。此外, 碳水化合物类别(carbohydrates)中的中枢糖代谢(central carbohydrate metabolism)亚类所包含的基因也比较多, 有 94 个(图 1)。

2.1.2 KEGG 注释结果

如图 2 所示, 使用 KofamKOALA 工具, 共注释到蛋白条目 5 658 个, 功能基因 3 227 个, 在 KEGG 的 6 个分类条目中均有分布。其中, 代谢(metabolism)、环境信息处理(environmental information processing)和细胞过程(cellular processes) 3 个分类条目中注释的基因较多。代谢条目中, 除全局和总览图谱(global and overview maps)外, 碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)和氨基酸代谢(amino acid metabolism)基因最多, 分别为 340 个和 322 个。

使用 KEGG Mapper 重建分析发现, 注释的功能基因主要富集在 262 条通路(pathway)上, 其中富集基因数在 20 及以上的通路有 45 条, 主要涉及碳代谢、氨基酸生物合成(biosynthesis of amino acids)、ATP 结合盒式转运蛋白(ABC transporters)和双组分系统(two-component system)等 4 条代谢通路, 数量分别为 93、112、135 和 143。此外, 群体感应(quorum sensing)和生物膜形成(biofilm formation)等通路富集的基因数量也比较多, 可能与菌体的环境适应性

和与宿主植物的互作以及致病性有关(表 2)。

2.1.3 COG 注释结果

在 COG 中, 共注释到蛋白编码条目 5 476 个, 功能基因 2 913 个, 占比 54.67%, 主要分布在 20 个类别。如图 3 所示, 新陈代谢类别注释的基因数最多, 为 1 396, 占比 47.92%, 该类别下氨基酸的运输和代谢([E] amino acid transport and metabolism)子类注释的基因最多, 数量为 323; 细胞过程与信号类别注释的基因数为 658, 占比 22.59%, 该类别下细胞壁/膜/包膜的生物形成子类([M] cell wall/membrane/envelope biogenesis)注释到的基因数目最多, 为 206 个。

2.1.4 VFDB、antiSMASH 和 CARD 注释结果

在 VFDB 中, 共注释到毒力基因 149 个, 主要涉及细菌附着(adherence)、细菌毒素(氰化氢和植物毒素等)和分泌系统(secretion system), 以及铁离子吸收(iron uptake)和镁离子吸收(magnesium uptake)等。此外, 生物膜形成、免疫逃避(immune evasion)、群体感应和蛋白酶(碱性蛋白酶)等基因也有注释。

在 antiSMASH 中, 菌株 XJFL-1 的基因组序列共注释到 15 个基因簇, 其中 14 个与次级代谢产物相关, 1 个与基础代谢物相关, 分布在 NRP 和 other 这 2 个类别当中。其中, 2 个基因簇的相似度为 100%, 并且均属 NRP 类, 分别为 *bicornutinA1/bicornutinA2* 基因簇和 *luminmide* 基因簇。

此外, 在 CARD 中, 鉴定到 6 个抗性基因, 分别为 *AbaQ* (1 322 bp)、2 个 *adeF* (3 098 bp 和 3 191 bp)、*FosA* (416 bp)、*vanW* (824 bp)和 *soxR* (458 bp), 主要涉及抗生素外排(antibiotic efflux)、抗生素灭活(antibiotic inactivation)和抗生素靶点改变(antibiotic target alteration)等 3 种抗性机制。

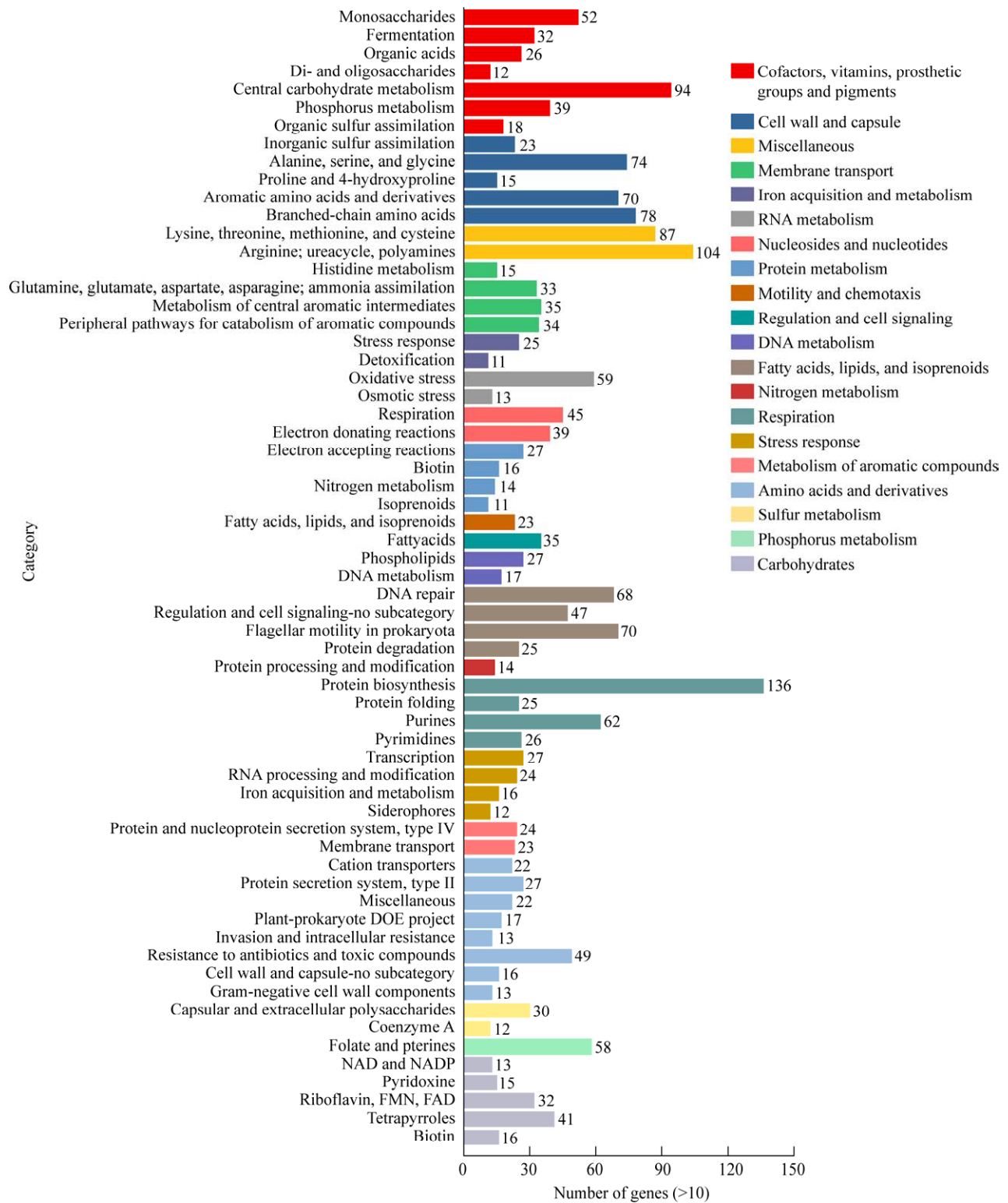


图 1 RAST 注释基因的分类条形图

Figure 1 Categorical bar chart of annotated genes in RAST.

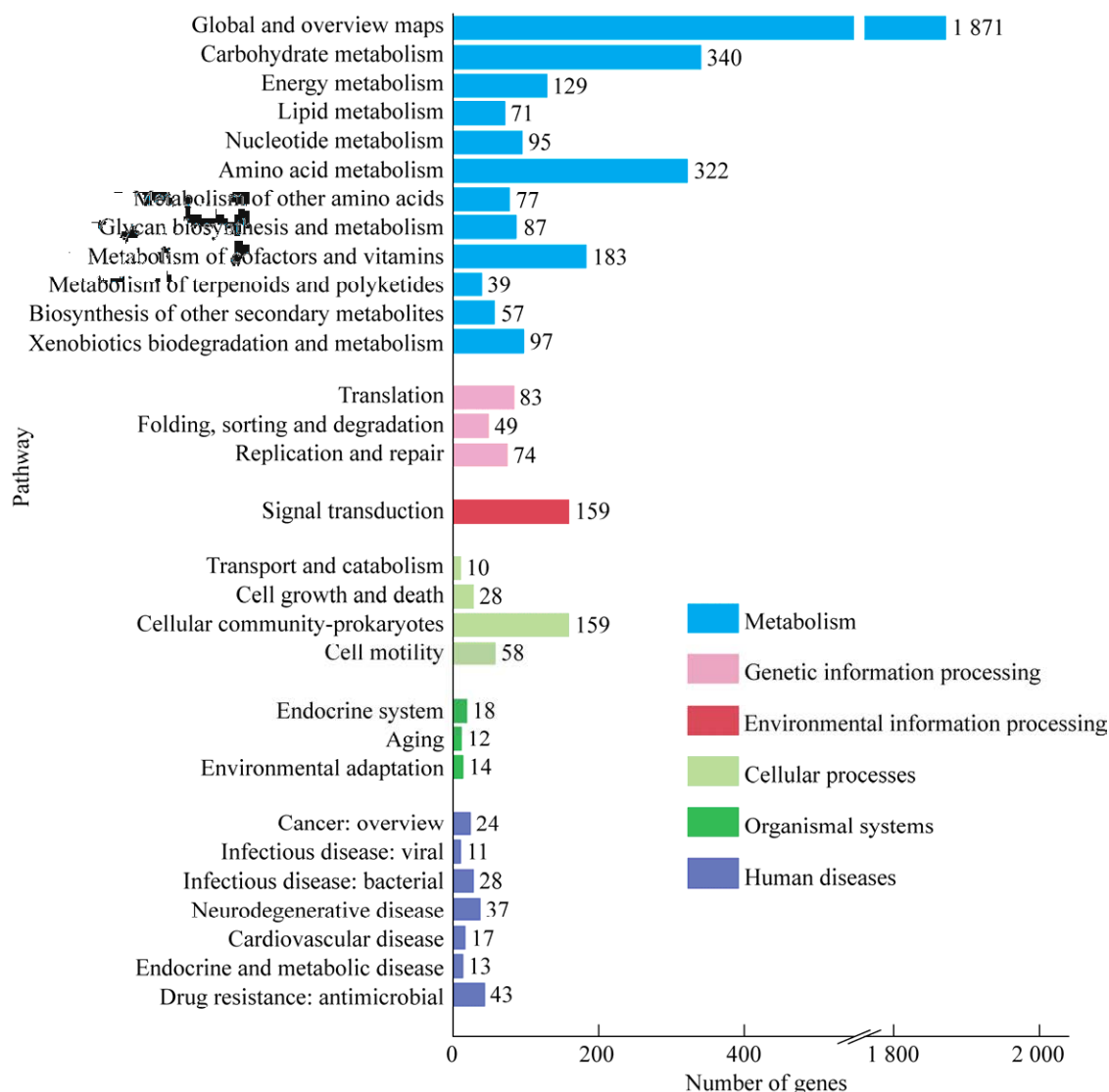


图 2 KEGG 注释基因的分类条形图

Figure 2 Categorical bar chart of annotated genes in KEGG.

2.2 基因组比较分析结果

将菌株 XJFL-1 基因组序列与假单胞属内 group/subgroup 代表性菌株的基因组序列进行 ANI 和 dDDH 分析^[23]。结果显示,与 *P. glycinae* MS586 和 *P. kribbensis* 46-2 的 ANI 值和 dDDH 值相对较高,分别为 95.94 和 86.90,以及 91.56 和 76.40,说明菌株 XJFL-1 与二者的亲缘关系比较近,并且 ANI 和 dDDH 值同时支持将菌株 XJFL-1 与菌株 MS586 界定为同

一物种,而菌株 46-2 则仅有 dDDH 值支持将其与菌株 XJFL-1 界定同一物种(表 3)。如图 4 所示,共线性分析与上述结果一致,但菌株 XJFL-1 与菌株 46-2 中发现了较大区域的反转,并且同源基因的位置也不同。而与菌株 MS586 之间在同源基因方面的变异则相对较少,但由于 2 个菌株不同的来源、生境和宿主,这些变异最终也导致了 2 个菌株不同的生物学功能。

表 2 KEGG 通路富集分析

Table 2 Enrichment analysis of KEGG pathways

Entry	Name	Gene number \geq 20
map01200	Carbon metabolism	93
map01210	2-oxocarboxylic acid metabolism	26
map01212	Fatty acid metabolism	24
map01230	Biosynthesis of amino acids	112
map01232	Nucleotide metabolism	40
map01220	Degradation of aromatic compounds	20
map00010	Glycolysis/Gluconeogenesis	27
map00020	Citrate cycle (TCA cycle)	23
map00030	Pentose phosphate pathway	32
map00051	Fructose and mannose metabolism	20
map00520	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	39
map00620	Pyruvate metabolism	38
map00630	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	33
map00640	Propanoate metabolism	26
map00650	Butanoate metabolism	26
map00190	Oxidative phosphorylation	49
map00720	Carbon fixation pathways in prokaryotes	25
map00680	Methane metabolism	21
map00564	Glycerophospholipid metabolism	21
map00230	Purine metabolism	63
map00240	Pyrimidine metabolism	32
map00250	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	27
map00260	Glycine, serine and threonine metabolism	47
map00270	Cysteine and methionine metabolism	41
map00280	Valine, leucine and isoleucine degradation	25
map00310	Lysine degradation	21
map00220	Arginine biosynthesis	24
map00330	Arginine and proline metabolism	32
map00540	Lipopolysaccharide biosynthesis	24
map00541	O-antigen nucleotide sugar biosynthesis	24
map00760	Nicotinate and nicotinamide metabolism	21
map00790	Folate biosynthesis	28
map00860	Porphyrin metabolism	42
map00362	Benzoate degradation	23
map03010	Ribosome	54
map00970	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	26
map03440	Homologous recombination	22
map02010	ABC transporters	135
map03070	Bacterial secretion system	35
map02020	Two-component system	143
map02024	Quorum sensing	45
map05111	Biofilm formation- <i>Vibrio cholerae</i>	29
map02025	Biofilm formation- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48
map02026	Biofilm formation- <i>Escherichia coli</i>	27
map01503	Cationic antimicrobial peptide (CAMP) resistance	23

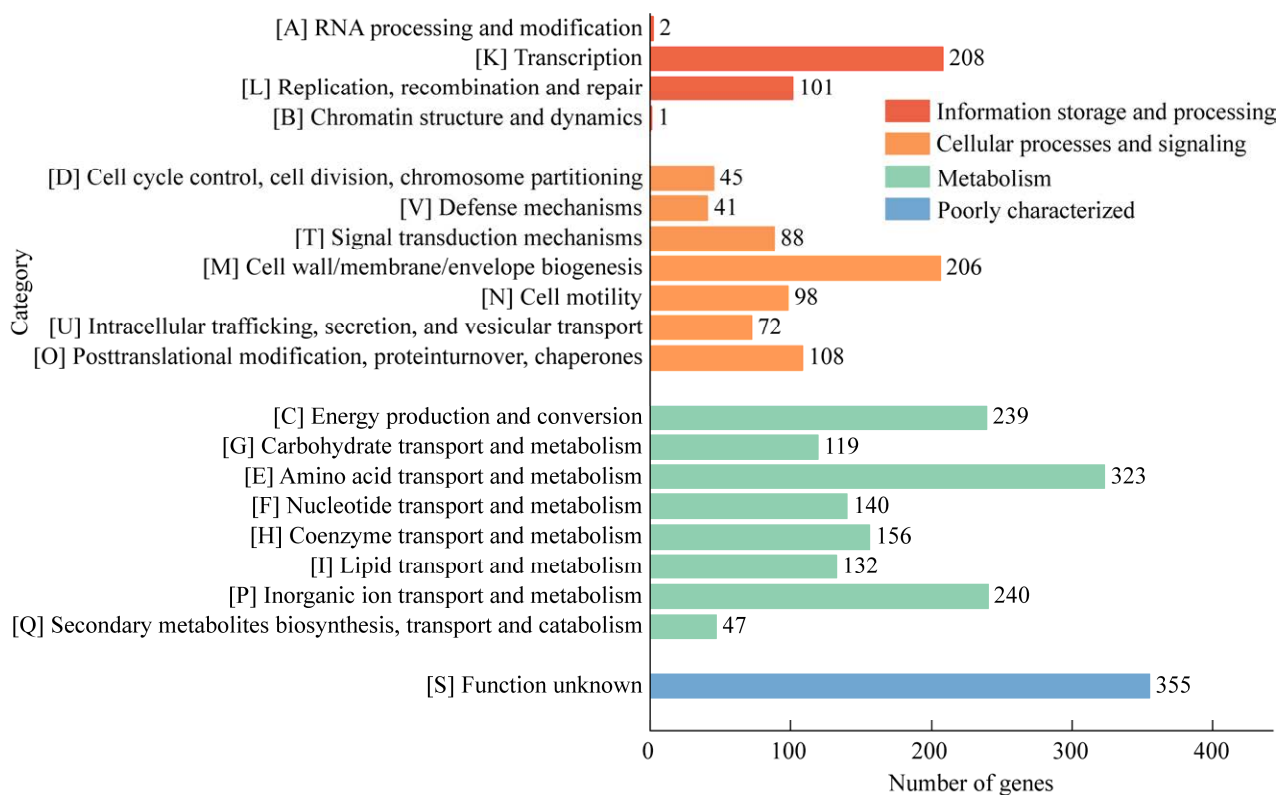


图3 COG 注释基因的分类条形图

Figure 3 Categorical bar chart of annotated genes in COG.

2.3 基因家族分析结果

2.3.1 属内近缘菌株基因家族分析

基于基因组蛋白序列, 使用 Ortho Venn3 在线分析软件对 11 个属内近缘模式菌株进行基因家族分析(OrthoMCL 算法), 并构建系统发育树。如图 5 所示, 结果显示, 2 363 个基因家族为所有供试菌株所共有, 说明属内不同种类之间编码的蛋白具有较高的同源性。使用 MEGA 11 软件, 采用比邻法(neighbor-joining, NJ)、JTT+CAT 演化模型, 自举重复(bootstrap) 1 000 次, 基于全基因组蛋白序列构建系统发育树(图 6), 结果显示菌株 XJFL-1 与 *P. kribbensis* 46-2 和 *P. glycinae* MS586 处于同一分支, 并且菌株 XJFL-1 与 *P. glycinae* MS586 的亲缘关系更近, 与 ANI 值、dDDH 值和共线性分析的结果相一致。

2.3.2 *P. glycinae* 种内基因家族分析

如图 7 所示, 种内基因家族分析发现, 4 803 个基因家族为种内 7 个菌株所共有, 是 *P. glycinae* 的核心基因, 其中包含了菌株 MS586 的 4 820 个基因、菌株 XJFL-1 的 4 836 个基因、菌株 PSB00018 的 4 825 个基因、菌株 FSL M9-0544 的 4 826 个基因、菌株 BML-PP039 的 4 822 个基因、菌株 BML-PP024 的 4 826 个基因和菌株 FSL S12-0139 的 4 820 个基因, 共计 33 775 个保守基因。说明大多数基因家族在 *P. glycinae* 种内是高度保守的, 仅有少量基因家族为各个菌株单独持有, 其中菌株 PSB00018 所特有的基因家族为 6 个(含 12 个基因)、菌株 XJFL-1 为 3 个(含 8 个基因)、菌株 FSL M9-0544 有 1 个(含 2 个基因)、菌株 BML-PP039 有 1 个(含 2 个基因)、菌株 MS586 有 1 个(含 2 个基因)、菌株

表3 菌株 XJFL-1 与属内代表性菌株全基因组比较分析的 ANI 值和 dDDH 值

Table 3 ANI and dDDH values between strain XJFL-1 and other typical strains in genus *Pseudomonas*

NCBI RefSeq assembly	Species	Strain	ANI value	dDDH value
GCF_001594225.2	<i>P. glyciniae</i>	MS586	95.94	86.90
GCF_003352185.1	<i>P. kribbensis</i>	46-2	91.56	76.40
GCF_011369485.1	<i>P. atagonensis</i>	PS14	88.84	68.90
GCF_900101415.1	<i>P. koreensis</i>	LMG 21318	88.76	66.50
GCF_002813455.1	<i>P. baetica</i>	LMG 25716	88.20	53.20
GCF_900104905.1	<i>P. jessenii</i>	LMG 21605	86.36	42.10
GCF_019693255.1	<i>P. mandelii</i>	KGI_MA19	86.05	46.70
GCF_014524625.1	<i>P. chlororaphis</i>	qlu-1	85.07	39.40
GCF_000012265.1	<i>P. protegens</i>	Pf-5	84.08	34.20
GCF_001708425.1	<i>P. corrugata</i>	RM1-1-4	83.73	32.00
GCF_900101185.1	<i>P. gessardii</i>	LMG 21604	83.47	29.30
GCF_900215245.1	<i>P. fluorescens</i>	ATCC 13525	83.39	31.70
GCF_900105475.1	<i>P. asplenii</i>	ATCC 23835	83.01	29.40
GCF_015476275.1	<i>P. fragi</i>	NL20W	82.17	24.10
GCF_000412675.1	<i>P. putida</i>	NBRC 14164	81.38	22.40
GCF_003671975.1	<i>P. monteilii</i>	B5	81.29	22.90
GCF_000761155.1	<i>P. rhizosphaerae</i>	DSM 16299	81.28	20.90
GCF_018394375.1	<i>P. syringae</i>	Susan2139	81.10	21.20
GCF_000759445.1	<i>P. lutea</i>	DSM 17257	80.55	19.80
GCF_000297075.2	<i>P. oleovaran</i>	CECT5344	80.20	17.50
GCF_900105355.1	<i>P. anguilliseptica</i>	DSM12111	80.00	17.10
GCF_900112645.1	<i>P. straminea</i>	JCM 2783	79.96	18.10
GCF_000006765.1	<i>P. aeruginosa</i>	PA01	79.85	19.00
GCF_000423545.1	<i>P. resinovorans</i>	DSM 21078	79.82	18.40
GCF_900109175.1	<i>P. linyingensis</i>	LMG 25967	79.70	17.00
GCF_019704535.1	<i>P. stutzeri</i>	GOM4	79.20	16.40
GCF_000826105.1	<i>P. massiliensis</i>	CB1	79.14	16.90
GCF_900105995.1	<i>P. pohangensis</i>	DSM 17875	78.69	15.20
GCF_007665635.1	<i>P. oryzae</i>	DE0585	78.61	15.50
GCF_014646575.1	<i>P. pertucinogena</i>	JCM 11590	77.66	13.60

BML-PP024 有 1 个(含 2 个基因), 菌株 FSL S12-0139 没有特有的基因家族。

2.4 PCWDE 分析结果

通过 dbCAN 数据库共注释到 222 个碳水化合物活性酶蛋白, 排除糖基转移酶(glycosyl transferase, GT)、辅酶活性(auxiliary activitie AA)和碳水化合物结合模块(carbohydrate-binding module, CBM)蛋白后, 合计预测了 37 种 PCWDE,

分别为 28 个糖苷水解酶(glycoside hydrolase, GH) 基因家族、7 个碳水化合物酯酶(carbohydrate esterase, CE)基因家族和 2 个多糖裂解酶基因家族(polysaccharide lyase, PL) (图 8)。

2.5 T2SS 和 T3SS 效应因子预测结果

BastionHub 的预测结果显示, T1SS-T4SS 和 T6SS 分泌系统效应因子的相关基因在 XJFL-1

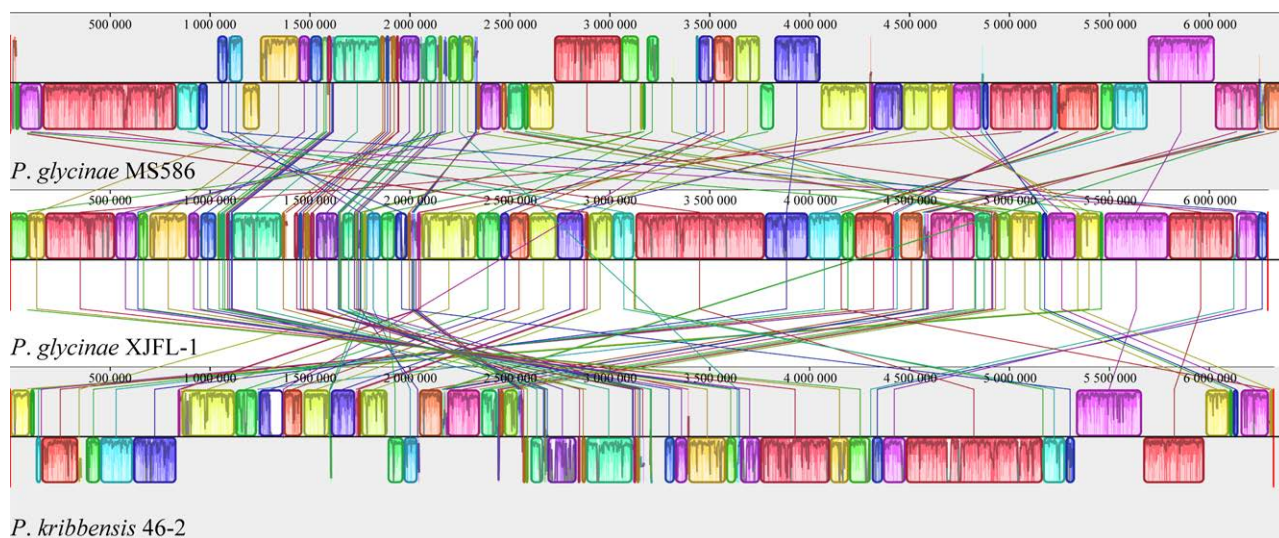


图 4 菌株 XJFL-1 与菌株 MS586、46-2 的共线性分析示意图
Figure 4 Collinearity analysis diagram of strain XJFL-1, MS586 and 46-2.

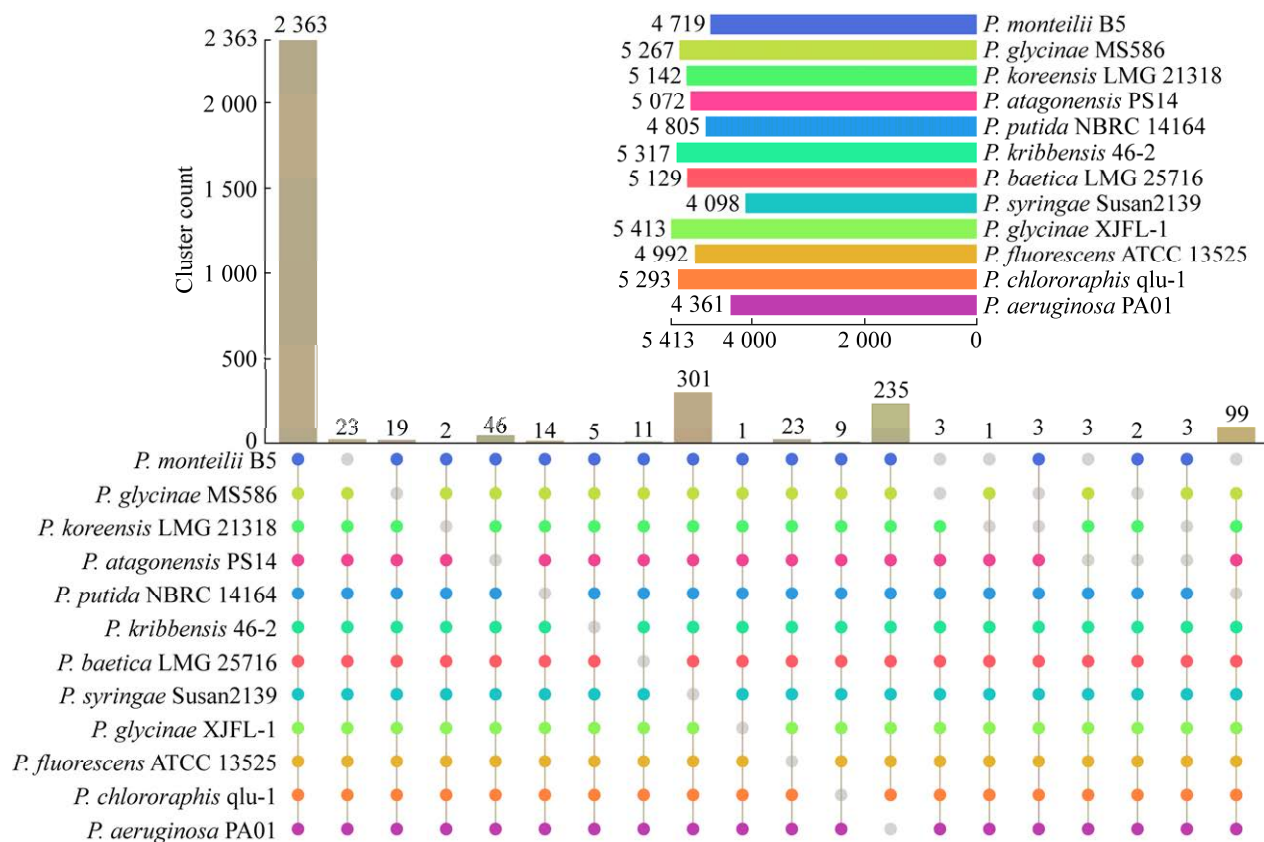


图 5 与属内近缘菌株 OrthoMCL 分析结果的 Upset 图(仅显示前 20 列)
Figure 5 Upset diagram of OrthoMCL analysis between XJFL-1 and closely-related strains in *Pseudomonas* (only the first 20 columns shown).

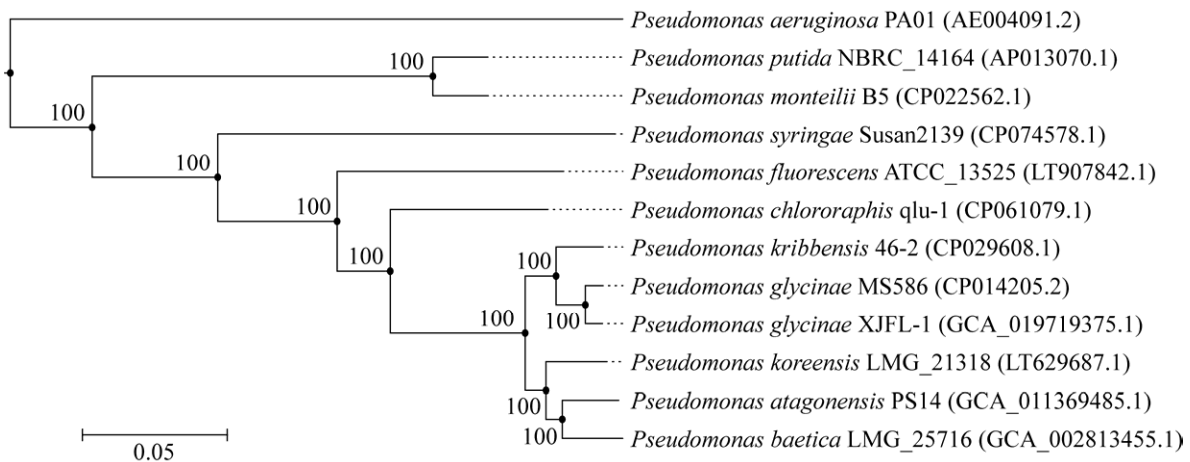


图 6 基于属内近缘菌株基因组蛋白序列构建的系统发育树 菌株名称后括号内序列号代表该菌株基因组序列的 NCBI GenBank 登录号；进化树分支点的数字代表该分支点的 bootstrap 值，数值以百分比(%)形式展示；标尺数字代表该长度的分支所代表的基因组遗传变异度

Figure 6 Phylogenetic tree based on genomic protein sequences of closely-related strains in *Pseudomonas*. The numbers within brackets following the bacterial strains indicate the NCBI GenBank accession numbers for their genome sequences; The numbers at the nodes of different branches in the phylogenetic tree indicate the bootstrap values, which are displayed in the form of percentage (%); The number of scale bar indicates the genetic variability of the genome sequences represented by the branch of this determined length.

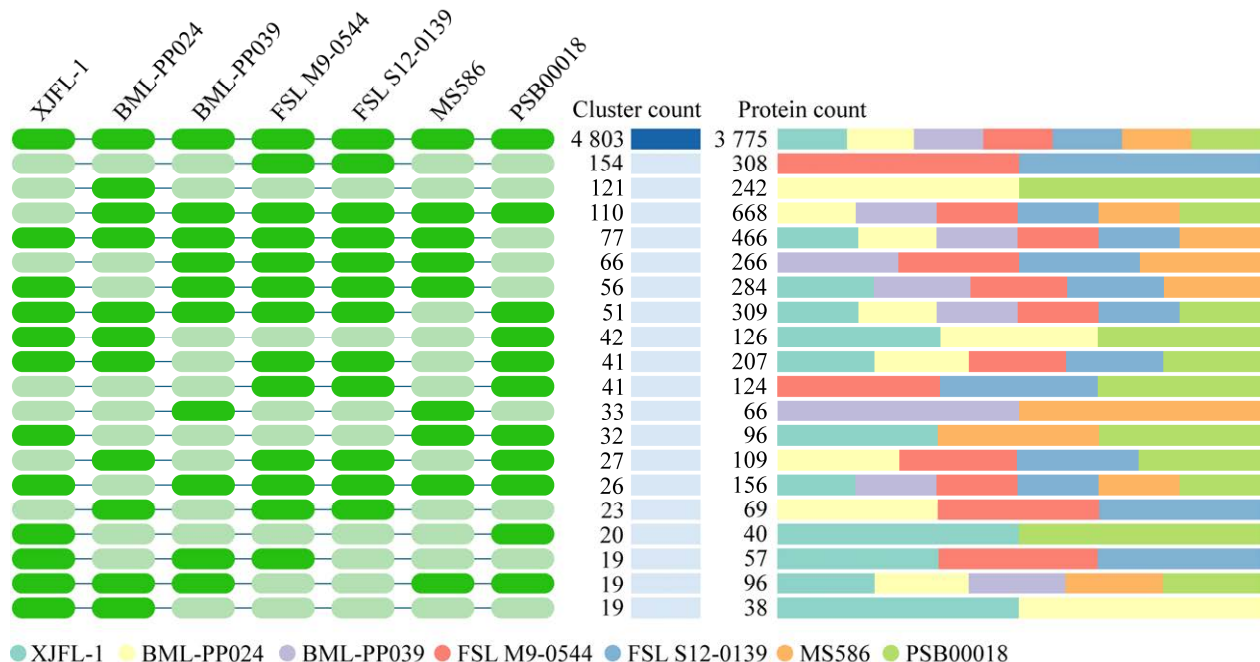


图 7 *P. glycinae* 种内 7 个菌株的基因组蛋白比较分析 Cluster-venn 示意图 仅显示前 20 行

Figure 7 Cluster-venn diagram of seven intraspecific strains of *P. glycinae*. Only the first 20 rows shown.

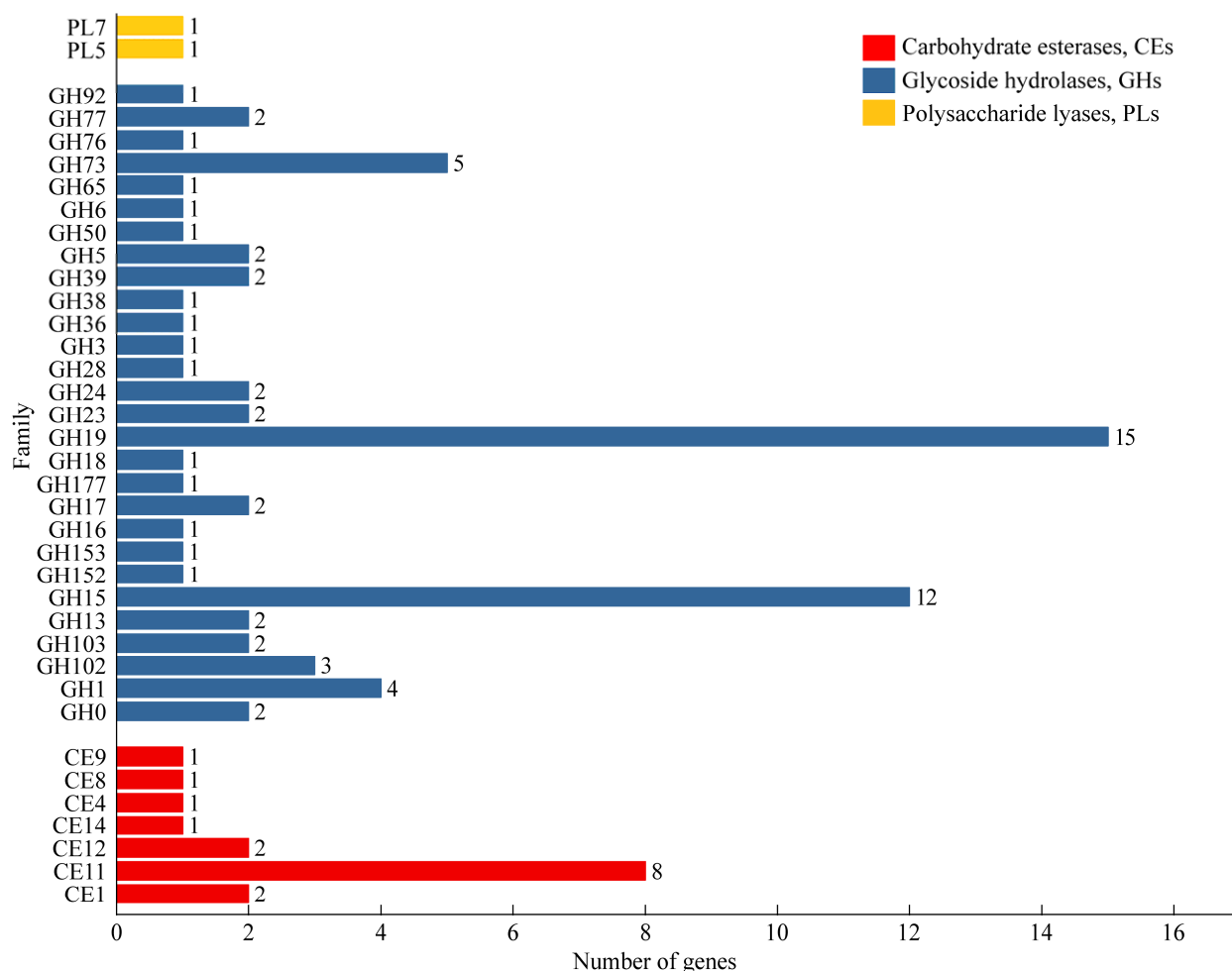


图 8 dbCAN 数据库注释到 PCWDE 基因的分类条形图 PCWDE: 植物细胞壁降解酶

Figure 8 Categorical bar chart of PCWDEs in dbCAN. PCWDE: Plant cell wall degradative enzyme.

基因组中均有所编码。同时, SignalP 5.0 也预测到了多种信号肽编码基因。如表 4 和表 5 所示, 共发现了 14 个和 17 个 Pegs 分别与 T2SS 的 15 个效应因子 23 个条目和 T3SS 的 25 个效应因子 57 个条目存在一定相似性(e^{-5})。BLASTp 比对结果揭示, XJFL-1 编码的 T2SS 效应蛋白主要有脂肪酶(LipA 和 LipC)、蛋白酶(LasA)、几丁质酶(VC_1952 和 CbpD)、碱性磷酸酶(LapA)、磷脂酶(PlcA 和 PlaA)和胞外 DNA 降解蛋白(EddA), 多数与周质和膜相关, 依靠 Sec/Tat 途径转运至周质空间和胞外环境。

如表 5 所示, 在 T3SS 效应因子中, XJFL-1

同样注释到多种细菌-宿主互动与致病性相关的效应因子基因, 主要包括处于优势地位的 E3 泛素蛋白连接酶基因 *ipaH9.8*、*ipaH7.8*、*ipaH4.5*、*ipaH3*、*ipaH1.4*、*slrP*、*sspH2*、*sspH1* 和 *NGR_a03640*, 其功能主要通过干扰宿主的泛素化途径, 并对靶向宿主蛋白进行蛋白酶的降解, 从而改变宿主细胞的生理机能, 进一步促进细菌在宿主组织中的定殖和致病。其他注释到的效应因子则是通过其他途径在病菌的毒力方面发挥重要作用, 如 *AG1IA_05142* 能够抑制植物的基础防御从而促进病害发展, *soda* 基因能够与金属离子结合在细胞内产生有毒的超氧阴离

表 4 XJFL-1 与 T2SS 效应因子相关的蛋白质编码基因

Table 4 Protein encoding genes associated with T2SS secreted effectors in *P. glycinae* XJFL-1

Pegs**	BastionHub ID	Length (aa)	e value*	Gene name	NCBI ID	UniProt ID
Fig.1986	SS02158	520	0	<i>eddA</i>	AGV61862.1	Q9HXA3
Fig.706	SS02162	368	4e-179	<i>phoA2</i>	-	P35482
Fig.706	SS02163	370	7e-148	<i>PA0689</i>	NP_249380.1	Q9I5N7
Fig.706	SS02164	392	6e-98	<i>phoA2</i>	Q02HI0.1	Q02HI0
Fig.3612	SS02152	311	3e-75	<i>lipA</i>	WP_048521053.1	lipA
Fig.3612	SS02153	309	1e-71	<i>lipC</i>	-	Q9HUZ7
Fig.2016	SS02175	423	1e-90	<i>plcA</i>	AAM73854.1	-
Fig.813	SS02152	311	9e-65	<i>lipA</i>	WP_048521053.1	P26876
Fig.813	SS02153	309	7e-64	<i>lipC</i>	-	Q9HUZ7
Fig.3612	SS02193	324	3e-58	<i>lipA</i>	ABW70205.1	-
Fig.2952	SS02145	377	3e-06	<i>lasA</i>	AAA25873.1	P14789
Fig.813	SS02193	324	2e-47	<i>lipA</i>	ABW70205.1	-
Fig.333	SS02206	494	1e-12	<i>gbpA</i>	CAC83040.2	-
Fig.94	SS02169	337	1e-09	<i>lpg2848</i>	AAU28896.1	Q5ZRN2
Fig.3245	SS02161	383	1e-23	<i>glpQ</i>	-	Q9I6E6
Fig.333	SS02165	497	5e-20	<i>cbpE</i>	WP_012074647.1	A6V168
Fig.333	SS02148	389	1e-11	<i>cbpD</i>	WP_003114231.1	Q9I589
Fig.4757	SS02145	377	4e-07	<i>lasA</i>	AAA25873.1	P14789
Fig.333	SS02187	494	5e-14	<i>chiY</i>	CAC83040.2	-
Fig.437	SS02158	520	1e-06	<i>eddA</i>	AGV61862.1	Q9HXA3
Fig.334	SS02214	846	5e-25	<i>VC_1952</i>	EGQ97456.1	Q9KQP6
Fig.5573	SS02174	309	1e-12	<i>plaA</i>	AAN63820.1	-
Fig.3729	SS02158	520	7e-06	<i>eddA</i>	AGV61862.1	Q9HXA3

*: e value $\leq e^{-5}$. **: Protein encoding genes. -: No relevant record.

表 5 菌株 XJFL-1 中与 T3SS 效应因子相关的蛋白质编码基因

Table 5 Protein encoding genes associated with T3SS secreted effectors in strain XJFL-1

Pegs**	BastionHub ID	Length (aa)	e value*	Gene name	NCBI ID	UniProt ID
Fig.150	SS02426	363	1e-153	<i>XOO4042</i>	WP_011260398.1	Q5GVH7
Fig.5157	SS00757	413	8e-129	<i>hopAJI</i>	AAO54387.1	Q889A9
Fig.2041	SS00494	202	2e-89	<i>sodA</i>	WP_003721944.1	P28764
Fig.2085	SS00604	113	5e-67	<i>Psyr_1017</i>	AAY36073.1	Q4ZXP9
Fig.2961	SS00708	2 042	1e-48	<i>Psyr_0527</i>	AAY35597.1	Q7PC42
Fig.5178	SS00766	159	1e-41	<i>nodN</i>	AWO90898.1	Q89N83
Fig.2751	SS00653	208	2e-35	<i>hrpW</i>	Q60236.1	Q60236
Fig.2961	SS00850	466	7e-20	<i>ALO36_02932</i>	AAO54928.1	Q9L6W4
Fig.3467	SS00714	571	1e-18	<i>ipaH3</i>	WP_011069360.1	Q83RJ4
Fig.3467	SS00485	574	3e-17	<i>ipaH4.5</i>	WP_010921638.1	P18009
Fig.3467	SS00554	545	8e-17	<i>ipaH9.8</i>	WP_000936809.1	Q326Z6
Fig.3467	SS00576	545	1e-16	<i>ipaH9.8</i>	WP_000936807.1	Q3YTH5
Fig.2106	SS00708	2 042	2e-16	<i>Psyr_0527</i>	AAY35597.1	Q7PC42
Fig.3467	SS00204	545	2e-16	<i>ipaH9.8</i>	WP_000936806.1	D2AJU0

(待续)

(续表 5)

Pegs**	BastionHub ID	Length (aa)	e value*	Gene name	NCBI ID	UniProt ID
Fig.3467	SS00787	545	2e-16	<i>ipaH9.8</i>	WP_011114775.1	Q8VSC3
Fig.3467	SS00820	765	2e-16	<i>slrP</i>	-	Q8ZQQ2
Fig.3467	SS00195	765	2e-16	<i>slrP</i>	WP_000481997.1	D0ZRB2
Fig.3467	SS00111	545	4e-16	<i>ipaH9.8</i>	WP_012421769.1	B2TT54
Fig.3467	SS00549	545	5e-16	<i>ipaH9.8</i>	WP_000936800.1	Q31SH3
Fig.2836	SS02431	252	6e-16	<i>yggG</i>	EFX50805.1	Q7CPU3
Fig.3467	SS00196	700	2e-15	<i>sspH1</i>	WP_000481981.1	D0ZVG2
Fig.3467	SS00951	788	7e-15	<i>sspH2</i>	AG0786	-
Fig.3467	SS00490	565	7e-15	<i>ipaH7.8</i>	WP_010921637.1	P18014
Fig.3467	SS00683	575	9e-15	<i>ipaH1.4</i>	AAP79042.1	Q6XVT8
Fig.3467	SS00194	788	1e-14	<i>sspH2</i>	WP_001115840.1	D0ZPH9
Fig.3467	SS01110	788	1e-14	<i>sspH2</i>	CAR33808.1	-
Fig.3467	SS00470	788	1e-14	<i>sspH2</i>	WP_001115840.1	P0CE12
Fig.3467	SS00164	610	3e-14	<i>nopM</i>	BBC02569.1	C4PL85
Fig.4723	SS01133	490	3e-14	<i>pkn5</i>	CAX10239.1	-
Fig.4723	SS01135	490	3e-14	<i>pkn5</i>	CAX11132.1	-
Fig.2982	SS00714	571	4e-14	<i>ipaH3</i>	WP_011069360.1	Q83RJ4
Fig.2982	SS00164	610	1e-13	<i>nopM</i>	BBC02569.1	C4PL85
Fig.3467	SS00509	546	2e-12	<i>NGR_a03640</i>	AAB91674.1	P55456
Fig.2982	SS00767	585	5e-12	<i>blr1904</i>	AND87489.1	Q89TL5
Fig.2982	SS00787	545	2e-11	<i>ipaH9.8</i>	WP_000936806.1	D2AJU0
Fig.2982	SS00204	545	2e-11	<i>ipaH9.8</i>	WP_011114775.1	Q8VSC3
Fig.2982	SS00576	545	2e-11	<i>ipaH9.8</i>	WP_000936807.1	Q3YTH5
Fig.2982	SS00554	545	2e-11	<i>ipaH9.8</i>	WP_000936809.1	Q326Z6
Fig.2982	SS00111	545	2e-11	<i>ipaH9.8</i>	WP_012421769.1	B2TT54
Fig.2982	SS00549	545	3e-11	<i>ipaH9.8</i>	WP_000936800.1	Q31SH3
Fig.2982	SS00485	574	3e-11	<i>ipaH4.5</i>	WP_010921638.1	P18009
Fig.2982	SS00683	575	4e-11	<i>ipaH1.4</i>	AAP79042.1	Q6XVT8
Fig.2982	SS00490	565	1e-10	<i>ipaH7.8</i>	WP_010921637.1	P18014
Fig.3467	SS00767	585	2e-10	<i>blr1904</i>	AND87489.1	Q89TL5
Fig.4039	SS02454	302	3e-10	<i>AG11A_05142</i>	ELU40828.1	L8WVP3
Fig.2982	SS00195	765	5e-10	<i>slrP</i>	WP_000481997.1	D0ZRB2
Fig.2982	SS00820	765	6e-10	<i>slrP</i>	-	Q8ZQQ2
Fig.2982	SS00951	788	3e-09	<i>sspH2</i>	AG0786	-
Fig.2982	SS00194	788	4e-09	<i>sspH2</i>	WP_001115840.1	D0ZPH9
Fig.2982	SS01110	788	4e-09	<i>sspH2</i>	CAR33808.1	-
Fig.2982	SS00196	700	4e-09	<i>sspH1</i>	WP_000481981.1	D0ZVG2
Fig.2982	SS00470	788	4e-09	<i>sspH2</i>	WP_001115840.1	P0CE12
Fig.457	SS00868	428	4e-08	<i>CP_1108</i>	AAD18902.1	Q9Z7E2
Fig.2982	SS01097	788	6e-08	<i>sspH2</i>	WP_001115840.1	D0ZPH9
Fig.3467	SS00855	1 024	2e-07	<i>popC</i>	Q9RBS2.2	Q9RBS2
Fig.3277	SS00855	1 024	4e-07	<i>popC</i>	Q9RBS2.2	Q9RBS2
Fig.2982	SS00509	788	1e-05	<i>sspH2</i>	CAR33808.1	-

*: e value $\leq e^{-5}$. **: Protein encoding genes. -: No relevant record.

子自由基。XJFL-1 中预测的大多数 T3SS 效应因子与细胞外区域(GO: 0005576)、细胞质(GO: 0044164)和细胞核(GO: 0042025)相关, 与细菌致病性联系密切。

2.6 果胶酶活力测定结果

如图 9A 和图 9B 所示, 在果胶培养基平板上, 28 °C 培养 48 h, 菌株 XJFL-1 不能生长, 而对照菌株 0417 能够正常生长。多聚半乳糖醛酸酶(polygalacturonase, PG)活力测定结果显示, 菌株 XJFL-1 与对照菌株 0417 酶活力差异显著, 并且菌株 XJFL-1 的活力接近于 0 (图 9C)。

上述结果表明枯草芽孢杆菌菌株 0417 可以通过分泌果胶酶类(如多聚半乳糖醛酸酶)水解培养基中的果胶获取有机营养, 维持正常生长; 相比之下, 如前文分析, 由于基因组没有编码相关基因, 菌株 XJFL-1 不能产生果胶酶类, 不能有效利用果胶, 导致其在以果胶作为唯一有机营养源的培养基中受到抑制, 无法正常生长。

3 讨论与结论

假单胞菌是一类革兰氏阴性细菌, 自然界分布广泛, 水、土壤和动植物体内均有报道。属内菌株的生物学功能多样, 包含多种作物的病原细菌, 如猕猴桃溃疡病致病菌丁香假单胞菌猕猴桃致病变种(*P. syringae* pv. *actinidiae*)^[24]、番茄细菌性斑点病致病菌丁香假单胞番茄致病变种(*P. syringae* pv. *tomato*)^[25]、油菜黑斑病菌绿黄假单胞(*P. viridiflava*)^[26]和烟草野火病菌 *P. amygdali* pv. *tabaci*^[27]等, 也有多种植物病原菌的拮抗细菌, 如马铃薯青枯病拮抗细菌 *Pseudomonas* sp.^[28]、烟草镰刀菌根腐病拮抗细菌绿农假单胞菌(*P. aeruginosa*)^[29]和葡萄采后灰霉病拮抗细菌荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)^[30]等。

Jia 等^[31]2018 年首次从大豆炭腐病(charcoal rot)重发生田的根际土壤样品中分离出拮抗菌株 *Pseudomonas* sp. MS586。后经生理生化检测、脂肪酸检测、DNA 指纹鉴定及基因组学分

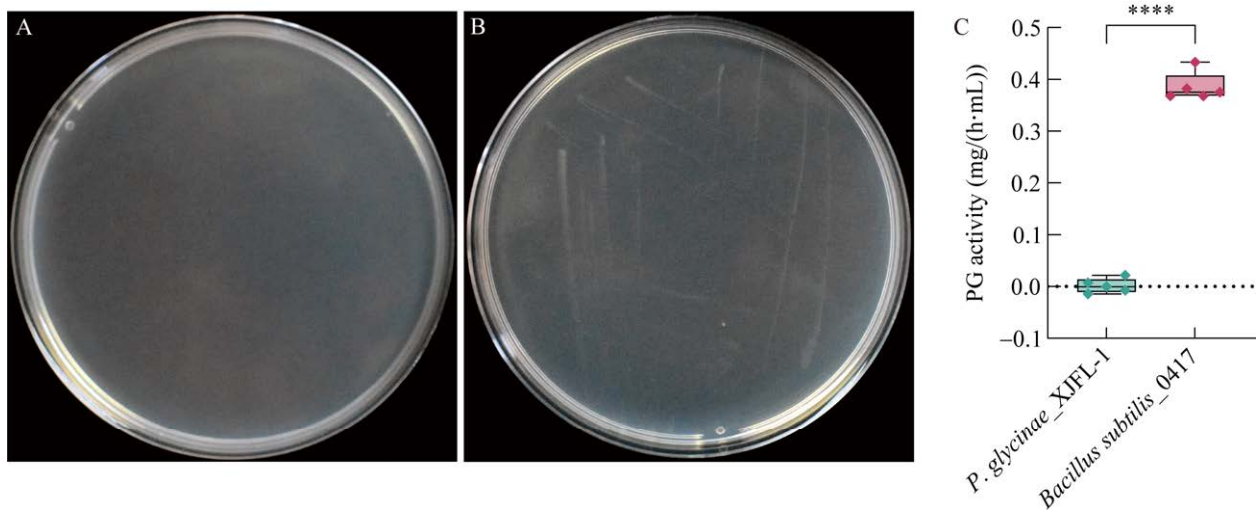


图 9 多聚半乳糖醛酸酶活力检测结果 A: *P. glycinae* XJFL-1. B: *B. subtilis* 0417. C: PG 活力检测结果箱线图. PG: 多聚半乳糖醛酸酶; ****: $P < 0.0001$

Figure 9 Results of PG activity assay. A: *P. glycinae* XJFL-1; B: *B. subtilis* 0417; C: Box plots of PG activity assay. PG: Polygalacturonase; ****: $P < 0.0001$.

析, 2020 年 Ma 等^[32]将其鉴定为假单胞菌属的一个新种, 命名为 *P. glycinae*。2023 年, Liu 等^[9]经研究发现 *P. glycinae* XJFL-1 是抚顺平地人参产区细菌性软腐病的致病菌。

本研究通过 ANI 值、dDDH 值和基于全基因组蛋白的系统发育树分析及共线性分析, 进一步确认菌株 XJFL-1 为 *P. glycinae*。通过基因家族分析, 研究还发现菌株 XJFL-1 与 *Pseudomonas* 属内 11 株 group/subgroup 代表菌株的共有基因家族为 2 363 个, 而与 *P. glycinae* 种内 7 个菌株的共有基因家族则多达 4 803 个, 说明该菌在 *Pseudomonas* 属内具有较高的种内保守性。此外, 菌株 XJFL-1 基因组中注释到与氨基酸和碳水化合物代谢、蛋白质转运、生物膜形成和群体感应相关的基因数量最多, 这些基因为菌体适应各种生存环境和宿主提供了保障, 同时也为本研究进一步解析基因组的基因功能奠定了基础。

PCWDE 有助于植物病原菌穿透宿主植物的根部组织, 是病原细菌重要的致病因子^[21]。本研究在菌株 XJFL-1 的基因组中预测到 37 种 PCWDE, 主要为 GH、CE 和 PL。细菌的分泌系统是一类跨膜细胞装置, 负责相关蛋白质(酶类)的合成、转运及向胞外分泌, 是实现细菌生物学功能的主要载体, 在病原体与宿主之间的识别过程中发挥直接作用^[21]。这些效应因子的预测、功能描述及生物信息分析有助于人们深入了解病原细菌对宿主植物的侵入、定殖和引发宿主病变等的过程。T2SS 在革兰氏阴性细菌中广泛存在, 属于两步分泌, 最终将蛋白质从周质运输到胞外环境, 并在此过程中由信号肽完成加工。植物病原细菌通过 T2SS 系统分泌多种细胞壁降解酶, 如脂肪酶(Lip)和磷脂酶(Plc)等^[33]。菌株 XJFL-1 中发现的 T2SS 效应因子包

括 *lapA*、*lapB* 和 *lapC* 编码的脂肪酶, *phoA2* 编码的碱性磷酸酶, *plcA* 编码的磷脂酶和 *cbpD* 编码的几丁质酶。通过 SignalP 5.0 服务器预测到菌株 XJFL-1 基因组编码蛋白序列中含有 761 个假定信号肽蛋白, 其中 681 个被预测为 Sec 转运子分泌信号肽、42 个为 Sec 转运子脂蛋白信号肽和 51 个为 Tat 信号肽。这些信号肽对于 T2SS 相关毒力因子的分泌、修饰和激活至关重要。上述基因的挖掘将为揭示菌株 XJFL-1 的致病相关毒力因子起到促进作用。

T3SS 分泌系统也属于两步分泌, 具体组成十分复杂, 其功能与细菌的定殖和入侵、抑制宿主免疫系统以及释放毒力因子等密切相关^[34]。菌株 XJFL-1 中预测了大量的 E3 泛素连接酶效应因子基因, 包括 *ipaH* 家族的 *ipaH9.8*、*ipaH7.8*、*ipaH4.5*、*ipaH3* 和 *ipaH1.4* 基因, SLRP 家族的 *slrP* 基因, 以及 *sspH2*、*sspH1* 和 *NGR_a03640* 基因。其中, *ipaH* 家族的 5 个效应因子基因在志贺氏菌(*Shigella*)中通过参与泛化和降解鸟苷酸蛋白(guanylate-binding protein, GBP)来抑制宿主的免疫系统^[35]。而 *sspH2* 基因在沙门氏菌(*Salmonella*)的干扰素信号通路中则通过影响 IRF3 的表达来调控 I 型干扰素信号通路, 从而影响宿主的泛素化途径^[36]。然而, 相较于其他常见的植物细菌性软腐病病原细菌, 如胡萝卜果胶杆菌(*Pectobacterium carotovorum*)^[37], 致病假单胞菌株 XJFL-1 的全基因组中并未注释到果胶酶相关基因, 经验证该菌不能产生果胶酶, 无法利用果胶营养来维持生长, 这可能与 *P. glycinae* 本身独特的致病机制有关, 需要进一步的分析和验证。

本研究全面表征了 *P. glycinae* XJFL-1 基因组的遗传特征。基因组注释结果显示, 存在大量编码致病性或毒力相关因子的基因, 如

PCWDEs、氰化氢等细菌毒素、致病相关的II型和III型分泌系统效应因子等。研究还预测了参与分泌途径的假定信号肽，并揭示了基因组中抗生素抗性基因的存在。同时，还比较分析了假单胞菌属内和 *P. glyciniae* 种内直系同源基因集的保守性等。总之，这些研究可为后续探索致病假单胞菌与宿主之间的相互作用、致病分子机制、与其他植物病原细菌之间的关系，以及挖掘分泌系统关键效应因子等研究提供理论依据。

REFERENCES

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(第四部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 8.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China Volume IV[S]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 8 (in Chinese).
- [2] 白容霖. 人参9种病害的症状和病原物[J]. 吉林农业大学学报, 2002, 24(2): 78-81.
BAI RL. Symptoms and pathogens of nine diseases of ginseng[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2002, 24(2): 78-81 (in Chinese).
- [3] 赵方杰. 陕西留坝西洋参连作障碍成因及消减措施初步研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2020.
ZHAO FJ. Preliminary study on the causes and reduction measures of continuous cropping obstacles of *Panax quinquefolium* L. in Liuba, Shaanxi[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2020 (in Chinese).
- [4] 潘丽梅, 田志成. 人参细菌性软腐病组织解剖研究[J]. 吉林林学院学报, 1996, 12(1): 27-29.
PAN LM, TIAN ZC. Histoanatomical study on bacterial soft rot of ginseng[J]. Journal of Jilin Forestry University, 1996, 12(1): 27-29 (in Chinese).
- [5] 潘丽梅, 田志成, 陈月静, 张晓薇. 人参软腐细菌感染的初步研究[J]. 吉林林学院学报, 1994, 10(1): 20-24.
PAN LM, TIAN ZC, CHEN YJ, ZHANG XW. Preliminary study on infection of ginseng soft rot bacteria[J]. Journal of Jilin Forestry University, 1994, 10(1): 20-24 (in Chinese).
- [6] 白容霖, 潘丽梅, 刘伟成. 吉林省人参细菌性软腐病病原[J]. 植物保护学报, 2000, 27(1): 63-68.
BAI RL, PAN LM, LIU WC. Studies on the pathogen of ginseng bacterial soft rot in Jilin Province[J]. Journal of Plant Protection, 2000, 27(1): 63-68 (in Chinese).
- [7] 潘丽梅, 杨贵, 赵金香. 吉林省人参细菌性软腐病的症状和病原[J]. 吉林林学院学报, 1995, 11(4): 205-209.
PAN LM, YANG G, ZHAO JX. Symptoms and pathogens of bacterial soft rot of ginseng in Jilin Province[J]. Journal of Jilin Forestry University, 1995, 11(4): 205-209 (in Chinese).
- [8] ZHANG AH, ZHANG XX, LEI FJ, ZHANG LX. First report of bacterial soft rot of ginseng caused by *Pseudomonas qessardii* in Jilin Province of China[J]. Plant Disease, 2018, 102(2): 437.
- [9] LIU K, SUN WS, LI XL, SHEN BY, ZHANG TJ. Isolation, identification, and pathogenicity of *Pseudomonas glyciniae* causing ginseng bacterial soft rot in China[J]. Microbial Pathogenesis, 2024, 186: 106497.
- [10] TATUSOV RL, GALPERIN MY, NATALE DA, KOONIN EV. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(1): 33-36.
- [11] BRETTIN T, DAVIS JJ, DISZ T, EDWARDS RA, GERDES S, OLSEN GJ, OLSON R, OVERBEEK R, PARRELLO B, PUSCH GD, SHUKLA M, THOMASON JA, STEVENS R, VONSTEIN V, WATTAM AR, XIA FF. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 8365.
- [12] KANEHISA M, GOTO S, KAWASHIMA S, OKUNO Y, HATTORI M. The KEGG resource for deciphering the genome[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(suppl_1): D277-D280.
- [13] LIU B, ZHENG DD, JIN Q, CHEN LH, YANG J. VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(D1): D687-D692.
- [14] ALCOCK BP, HUYNH W, CHALIL R, SMITH KW, RAPHENYA AR, WLODARSKI MA, EDALATMAND A, PETKAU A, SYED SA, TSANG KK, BAKER SJC, DAVE M, MCCARTHY MC, MUKIRI KM, NASIR JA,

- GOLBON B, IMTIAZ H, JIANG XJ, KAUR K, KWONG M, et al. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(D1): D690-D699.
- [15] BLIN K, SHAW S, STEINKE K, VILLEBRO R, ZIEMERT N, LEE SY, MEDEMA MH, WEBER T. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(W1): W81-W87.
- [16] ALMAGRO ARMENTEROS JJ, TSIRIGOS KD, SØNDERBY CK, PETERSEN TN, WINTHER O, BRUNAK S, von HEIJNE G, NIELSEN H. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37: 420-423.
- [17] CHEN CJ, CHEN H, ZHANG Y, THOMAS HR, FRANK MH, HE YH, XIA R. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [18] MEIER-KOLTHOFF JP, KLENK HP, GÖKER M. Taxonomic use of DNA G+C content and DNA-DNA hybridization in the genomic age[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(Pt 2): 352-356.
- [19] DARLING ACE, MAU B, BLATTNER FR, PERNA NT. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements[J]. *Genome Research*, 2004, 14(7): 1394-1403.
- [20] SUN JH, LU F, LUO YJ, BIE LZ, XU L, WANG Y. OrthoVenn3: an integrated platform for exploring and visualizing orthologous data across genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(W1): W397-W403.
- [21] 刘静, 张昭寰, 吴倩, 陶倩, 黄振华, 潘迎捷, 赵勇. 细菌分泌系统的结构及作用机制研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2022, 49(12): 2305-2327.
- LIU J, ZHANG ZH, WU Q, TAO Q, HUANG ZH, PAN YJ, ZHAO Y. Research progress on the structure and mechanism of bacterial secretion system[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics* 2022, 49(12): 2305-2327 (in Chinese).
- [22] WANG JW, LI JH, HOU Y, DAI W, XIE RP, MARQUEZ-LAGO TT, LEIER A, ZHOU TL, TORRES V, HAY I, STUBENRAUCH C, ZHANG YJ, SONG JN, LITHGOW T. BastionHub: a universal platform for integrating and analyzing substrates secreted by Gram-negative bacteria[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(D1): D651-D659.
- [23] GIRARD L, LOOD C, HÖFTE M, VANDAMME P, ROKNI-ZADEH H, van NOORT V, LAVIGNE R, de MOT R. The ever-expanding *Pseudomonas* genus: description of 43 new species and partition of the *Pseudomonas putida* group[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(8): 1766.
- [24] TAKIKAWA Y, SERIZAWA S, ICHIKAWA T, TSUYUMU S, GOTO M. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pv. nov.: the causal bacterium of canker of kiwifruit in Japan[J]. *Japanese Journal of Phytopathology*, 1989, 55(4): 437-444.
- [25] 李志栋. 内蒙古加工型番茄细菌性斑点病病原鉴定及种子带菌检测技术的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2010.
- LI ZD. Pathogen identification of bacterial spot of processing tomato in inner Mongolia and methods for detecting bacterium in seeds[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2010 (in Chinese).
- [26] MYUNG IS, LEE YK, LEE SW, KIM WG, SHIM HS, RA DS. A new disease, bacterial leaf spot of rape, caused by atypical *Pseudomonas viridiflava* in Korea[J]. *Plant Disease*, 2010, 94(9): 1164.
- [27] MATSUI H, NISHIMURA T, ASAI ST, MASUDA S, SHIRASU K, YAMAMOTO M, NOUTOSHI Y, TOYODA K, ICHINOSE Y. Complete genome sequence of *Pseudomonas amygdali* pv. *tabaci* strain 6605, a causal agent of tobacco wildfire disease[J]. *Microbiology Resource Announcements*, 2021, 10(28): e00405-21.
- [28] 李盛, 李翔, 朱美如, 王夏, 李昊阳, 谭欣如, 王海燕. 马铃薯青枯病拮抗菌的筛选及温室防治效果研究[J]. *作物杂志*, 2024(2): 242-248.
- LI S, LI X, ZHU MR, WANG X, LI HY, TAN XR, WANG HY. Screening and identification of antagonistic bacteria against *Ralstonia solanacearum* and their efficacy in controlling potato bacterial wilt in greenhouse[J]. *Crops*, 2024(2): 242-248 (in Chinese).
- [29] 邱睿, 李小杰, 白静科, 陈玉国, 姚晨斌, 苏新宏, 张盈盈, 房文祎, 李彩虹, 刘畅, 徐敏, 宋瑞芳, 李淑君. 烟草镰刀菌根腐病生防假单胞菌的筛选与鉴定[J]. *中国烟草学报*, 2023, 29(3): 84-93.
- QIU R, LI XJ, BAI JK, CHEN YG, YAO CX, SU XH, ZHANG YY, FANG WY, LI CH, LIU C, XU M, SONG RF, LI SJ. Screening and identification of

- Pseudomonas* against *Fusarium* root rot of tobacco[J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2023, 29(3): 84-93 (in Chinese).
- [30] 魏雪, 江孟遥, 钟涛, 张曼, 王智荣, ZSOLT Zalan, FERENC Hegyi, KRISZTINA Takacs, 杜木英. 荧光假单胞菌 ZX 对葡萄采后灰霉病的防治[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(22): 125-132.
- WEI X, JIANG MY, ZHONG T, ZHANG M, WANG ZR, ZALAN Z, HEGYI F, TAKACS K, DU MY. Control of gray mold in postharvest grapes with *Pseudomonas fluorescens* ZX[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(22): 125-132 (in Chinese).
- [31] JIA JY, WANG XQ, DENG P, MA L, BAIRD SM, LI XD, LU SE. *Pseudomonas glycinae* sp. nov. isolated from the soybean rhizosphere[J]. *Microbiology Open*, 2020, 9(9): e1101.
- [32] MA L, QU SX, LIN JS, JIA JY, BAIRD SM, JIANG N, LI HP, HOU LJ, LU SE. The complete genome of the antifungal bacterium *Pseudomonas* sp. strain MS82[J]. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 2019, 126(2): 153-160.
- [33] FILLOUX A. The underlying mechanisms of type II protein secretion[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1694(1/2/3): 163-179.
- [34] BURKINSHAW BJ, STRYNADKA NCJ. Assembly and structure of the T3SS[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1843(8): 1649-1663.
- [35] LI P, JIANG W, YU Q, LIU W, ZHOU P, LI J, XU JJ, XU B, WANG FC, SHAO F. Ubiquitination and degradation of GBPs by a *Shigella* effector to suppress host defence[J]. *Nature*, 2017, 551: 378-383.
- [36] 邵增玉. 沙门氏菌 E3 泛素连接酶 SspH2 和 SlrP 调控 I 型 IFN 信号通路的研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2019.
- SHAO ZY. The study on *Salmonella* E3 ubiquitin ligases SspH2 and SlrP regulating type I interferon signaling pathway[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019 (in Chinese).
- [37] MALLICK T, MISHRA R, MOHANTY S, JOSHI RK. Genome wide analysis of the potato soft rot pathogen *Pectobacterium carotovorum* strain ICMP 5702 to predict novel insights into its genetic features[J]. *The Plant Pathology Journal*, 2022, 38(2): 102-114.