

СБОРКА ГЕНОМОВ ТРЕХ СЛАБОВИРУЛЕНТНЫХ ШТАММОВ

Fusarium oxysporum f. sp. *lini*

© 2022 г. А.А. Канапин*, А.А. Самсонова*, М.П. Банкин*, А.А. Логачев*,
Т.А. Рожмина**, М.Г. Самсонова*

*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29

**Институт льна — обособленное подразделение Федерального научного центра лубяных культур,
172002, Торжок Тверской области, ул. Луначарского, 35

E-mail: m.samsonova@spbstu.ru

Поступила в редакцию 07.12.2021 г.

После доработки 07.12.2021 г.

Принята к публикации 12.12.2021 г.

Фузариозное увядание — наиболее разрушительное грибковое заболевание, ограничивающее возделывание льна во всех основных странах, выращивающих лен. Его возбудитель — гриб *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. В работе сообщается о сборках генома трех слабопатогенных штаммов *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*, а именно F200, F418 и F365. Геном штамма F418, секвенированного гибридным методом по технологиям PacBio и Illumina, собран в хромосомы на основании данных референсного генома MI39. Эти результаты закладывают прочную основу для сравнительных геномных исследований грибковых патогенов растений, эволюции факторов патогенности и вирулентности, лежащих в основе динамики взаимодействий между хозяином и патогеном, что в конечном итоге предлагает решения для борьбы с этим заболеванием.

Ключевые слова: лен, геномика, секвенирование, фузариозное увядание.

DOI: 10.31857/S0006302922020053

Fusarium oxysporum — это генетически разнообразный видовой комплекс, состоящий из различных специальных форм (*formae speciales*, f. sp.), которые демонстрируют узкую адаптацию к хозяину и используют широкий спектр экологических ниш [1]. *Fusarium oxysporum* f. sp. включают в себя как непатогенные, так и патогенные штаммы, способные вызывать серьезные заболевания у растений, подвергая опасности производство экономически важных сельскохозяйственных культур [2].

В последние годы были секвенированы многие геномы *Fusarium oxysporum* [3–8]. Безусловно, наиболее точно секвенированный геном *F. oxysporum* — это изолят *Fusarium oxysporum lycopersici* 4287, собранный из фрагментов секвенирования по методу дробовика с последующей привязкой сборок к оптической карте [5].

Fusarium oxysporum f. sp. *lini*, один из наиболее опасных грибковых возбудителей льна, является возбудителем фузариозного увядания. Он проникает в растение через корни и распространяется внутри сосудистого пучка. После прорастания у

него развиваются микроконидии, блокирующие поток воды и питательных веществ, что приводит к увяданию растений, пожелтению нижних частей и гибели [9–12]. Грибок продуцирует микотоксины и ферменты, гидролизующие компоненты клеточной стенки (целлюлазы, пектиназы, глюкуронидазы и др.), которые облегчают проникновение в ткани хозяина.

Большинство сортов льна обладают высокой или средней устойчивостью к фузариозному увяданию. Однако быстрое уменьшение генетического разнообразия сортов льна и нескончаемая «гонка вооружений» между растением и патогеном способствуют значительному увеличению риска развития болезней. Кроме того, изменение климата может привести к повышенной агрессивности отдельных рас патогенов и потере устойчивости сортов льна.

Учитывая экономическую важность выращивания льна, вышесказанное требует быстрых действий, включая всестороннюю характеристику популяции патогенов на геномном уровне, что ускоряет создание сортов льна-волокна и масличного с эффективной устойчивостью к патогенам. Ранее мы осуществили секвенирование и

сборку геномов пяти различных высокопатогенных штаммов *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*: MI39, F329, F324, F282, F287. Геном MI39 был секвенирован как по технологии Illumina, так и по технологии PacBio, что позволило выполнить его сборку на уровне хромосом [13]. Здесь мы секвенировали и выполнили сборку геномов еще трех слабовирулентных штаммов *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*, F200, F418 и F365.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для выделения ДНК культуры штаммов F200, F418 и F365 были получены на жидкой среде Чапека. ДНК из мицелия выделяли с помощью коммерческого набора NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel, Германия), контроль качества ДНК проводили при помощи агарозного гель-электрофореза Sekweniowanie с использованием флуориметра Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США) и набора Qubit dsDNA high-sensitivity (Thermo Fisher Scientific, США) по методике производителя. Отсутствие загрязнения выделенной геномной ДНК оценивали с использованием спектрофотометра NanoPhotometer Pearl UV/Vis (IMPLEN, Германия) по соотношению длин волн 260/280 нм.

Секвенирование геномов штамма F200, F365, F418 было выполнено в BGI с помощью платформы Illumina HiSeq400. По данным секвенирования покрытие по образцам составило 30x, а длина парных прочтений — 150 п.н. Также с использованием платформы PacBio RS II System было проведено секвенирование штамма F418 со средним покрытием 100x. Гибридная сборка генома F418 была проведена в три этапа:

1) при помощи программы Canu (версия 1.4), была проведена первичная сборка контигов фрагментов секвенирования PacBio [14];

2) с использованием программы Pilon (версия 1.23), осуществляли корректировку собранных контигов с учетом коротких фрагментов секвенирования Illumina. Доля позиций с низким качеством сборки составила $5.4 \cdot 10^{-5}$ (после коррекции) [15];

3) на базе программы RagTag (версия 2.1) [16], а также на основании данных референсного генома MI39 была проведена сборка скорректированных контигов в хромосомы.

Сборку геномов штаммов F365 и F200 проводили в два шага. В рамках первого этапа с помощью программы abyss-pe из пакета ABYSS (версия 2.1.5) были собраны в контиги фрагменты секвенирования Illumina [17]. Дальнейшая сборка была проведена на основе референсного генома MI39 с помощью программы RagTag (версия 2.1) [16]. Программа RagTag значительно лучше аналогичной программы RaGOO [18], использованной ранее при сборке геномов штам-

мов F329, F324, F282 и F287. Поэтому эти геномы были пересобраны с использованием программы RagTag. Оценку качества сборки генома осуществляли с использованием программы QUAST (версия 5.0.2) [19]. Сравнительный анализ геномных последовательностей различных штаммов с референсной последовательностью MI39 проводился с использованием программы GSAAlign (версия 1.0.19) [20]. С использованием программы RepeatMasker была проведена аннотация участков геномов, содержащих повторы. Функциональную аннотацию кодирующих генов, а также их предсказание осуществляли с помощью пакета программ BUSCO (версия 4.0.4) [21]. «Nuprocrales_odb10» был использован в качестве параметра «-l», описывающего таксономическую принадлежность организма.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Геном штамма F418, секвенированного гибридным методом по технологиям PacBio и Illumina, собран в хромосомы на основании данных референсного генома MI39 [13]. Сборка остальных геномов штаммов F365 и F200, секвенированных по методу Illumina, также проведена относительно референсного генома MI39. Также проведена пересборка геномов ранее секвенированных штаммов F282, F287, F324, F329.

Гибридная сборка генома F418 с учетом референсного генома MI39 оказалась высоко эффективной, включив в свой состав более 90% контигов. Сборки других геномов, основанные на данных секвенирования только по технологии Illumina, демонстрируют относительно низкую долю повторяющихся последовательностей по сравнению с эталонным геномом MI39. Поскольку ассемблеры обычно генерируют контиги низкого качества из прочтений, соответствующих повторяющимся участкам генома, недопредставленность повторяющихся областей генома в сборках не удивительна.

Общие данные, характеризующие собранные геномы и качество сборки приведены в таблице. Данные о геномах пяти сильно вирулентных штаммов MI39, F282, F287, F324, F329 внесены в банк данных NCBI GenBank, их идентификаторы — JABJUA000000000, JABJUB000000000, JABJUC000000000, JABJUD000000000, JABJUE000000000 соответственно.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-16-00030).

Статистика сборки геномов штаммов *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*

Тип статистики	Штамм							
	MI39	F418	F200	F282	F287	F324	F329	F365
Технология секвенирования	PacBio, Illumina	PacBio, Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina
Покрытие	100 + 200	100 + 200	60	60	60	60	60	60
Число скафолдов	26	75	2549	3879	3605	3233	3216	3024
Размер генома (п.о.)	69,459,321	54,615,159	72,471,920	73,301,706	73,796,401	77,268,611	74,544,230	60,916,722
Содержание GC (%)	48.08	48.51	48.54	48.49	48.25	48.52	48.26	48.14
N50 (п.о.)	5,280,230	5,107,914	5,379,025	4,622,580	5,437,438	4,568,139	4,601,953	5,207,443
L50	5	5	5	5	5	5	5	5
Максимальная длина контига (п.о.)	9,704,848	9,201,571	8,332,100	7,985,000	8,419,045	7,978,509	8,159,604	7,929,600
Число контигов с длиной > 50 kB	20	27	62	68	70	72	66	78
Аннотация BUSCO (%)	97.9	97.9	98.0	98.0	98.0	98.0	98.0	97.9
Число предсказанных уникальных белков	6682	6701	6474	6434	6437	6474	6431	6307

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Y. Zhang and L. J. Ma, Adv. Genet. **100**, 179 (2017).
2. D. D. Johnson, G. K. Flakerud, R. D. Taylor, and V. Satyanarayana, in *Agricultural economics report 396* (Department of Agricultural Economics, North Dakota State University, 1998).
3. A. D. Armitage, A. Taylor, M. K. Sobczyk, et al., Sci. Rep. **8**, 13530 (2018).
4. F. Garcia-Bastidas, N. Ordonez, J. Konkol, et al., Plant Dis. **98**, 694 (2013).
5. L.-J. Ma, H. C. van der Does, K. A. Borkovich, et al., Nature **464**, 367 (2010).
6. S. M. Schmidt, J. Lukasiewicz, R. Farrer, et al., New Phytologist **209**, 307 (2016).
7. S. Seo, A. Pokhrel, and J. J. Coleman, Mol. Plant Microbe Interact. **33**, 138 (2020).
8. A. H. Williams, M. Sharma, L. F. Thatcher, et al., BMC Genomics **17**, 191 (2016).
9. C. B. Michielse and M. Rep, Mol. Plant Pathol. **10**, 311 (2009).
10. C. Olivain, S. Trouvelot, M. N. Binet, et al., Appl. Environ. Microbiol. **69**, 5453 (2003).
11. Т. А. Рожмина и Н. И. Лошакова, С.-х. биология **51** (3), 310 (2016).
12. Т. А. Рожмина, Биология в сельском хозяйстве **4** (17), 10 (2017).
13. A. Kanapin, A. Samsonova, T. Rozhmina, et al., Mol. Plant-Microbe Inter. **33** (9), 1112 (2020). DOI: 10.1094/MPMI-05-20-0130-SC
14. S. Koren, B. P. Walenz, K. Berlin, et al., Genome Res. **27**, 722 (2017).
15. B. J. Walker, T. Abeel, T. Shea, et al., PLoS One **9**, e112963 (2014).

16. M. Alonge, L. Lebeigle, M. Kirsche1, et al., bioRxiv **2021**, 469135 (2021). DOI: 10.1101/2021.11.18.469135
17. J. T. Simpson, K. Wong, S. D. Jackman, et al., Genome Res. **19**, 1117 (2009).
18. M. Alonge, S. Soyk, S. Ramakrishnan, et al., Genome Biol. **20**, 224 (2019).
19. A. Gurevich, V. Saveliev, N. Vyahhi, and G. Tesler, Bioinformatics **29**, 1072 (2013).
20. H. N. Lin and W. L. Hsu, BMC Genomics **21**, 182 (2020). DOI: 10.1186/s12864-020-6569-1
21. M. Seppey, M. Manni, and E. M. Zdobnov, Methods Mol. Biol. **1962**, 227 (2019).

Assembly of Three Weakly Virulent *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* Strains

A.A. Kanapin*, A.A. Samsonova*, M.P. Bankin*, A.A. Logachev*,
T.A. Rozhmina**, and M.G. Samsonova*

*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, ul. Polytekhnicheskaya 29, St. Petersburg, 195251 Russia

**Flax Institute — a separate subdivision of the Federal Scientific Center for Bast Crops,
ul. Lunacharskogo 35, Thorzhok, Tver Region 172002 Russia

Fusarium wilt is the most destructive fungal disease, limiting flax cultivation in all main flax and linseed growing countries. The causative agent is seedborne and soilborne fungus *F. oxysporum* f. sp. *lini*. Here, we report for the first time genome assemblies of five highly pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*, namely F200, F418 и F365. Genome of F418 strain sequenced with both Illumina and PacBio RS II technologies was assembled into chromosomes using the MI39 genome assembly as a reference. These results lay a solid foundation for comparative genomics studies of plant fungal pathogens, evolution of pathogenicity and virulence factors underlying the dynamics of host-pathogen interactions, thus eventually offering solutions to Fusarium disease control.

Ключевые слова: *flax*, *genomics*, *sequencing*, *Fusarium wilt*