



## 一株虹鳟源嗜冷黄杆菌 CH06 的基因组进化及毒力相关基因分析

陈福广, 李绍戊, 卢彤岩\*

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所,  
黑龙江省水生动物病害与免疫重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070)

**摘要:** 为了深入揭示我国鱼类病原菌嗜冷黄杆菌的基因组进化及其致病机制, 本实验对嗜冷黄杆菌毒力菌株 CH06 进行全基因组测序, 比较基因组分析并挖掘其毒力相关基因。基因组测序结果显示, CH06 的基因组大小为 2 836 981 bp, GC 含量为 32.56%, 注释出 2 437 个编码基因。通过平均核苷酸一致性 (ANI) 分析结果显示, CH06 与 12 株嗜冷黄杆菌的 ANI 值均高于 99%, 菌株 CH06 应属于嗜冷黄杆菌分支。基因组序列分析发现, CH06 含有 5 个插入序列、4 个基因岛和 3 个前噬菌体, 揭示这些可移动遗传元件推动了 CH06 的基因组进化。系统进化树和基因组共线性分析发现, CH06 与菌株 CSF259-93 和 FPG101 亲缘关系较近。分泌系统分析显示, CH06 中存在 I 型分泌系统 (type I secretion system, T1SS) 和 IX 型分泌系统 (T9SS)。通过蛋白结构域特征分析发现, CH06 包含 56 个 T9SS 效应蛋白和 29 个双组分系统元件, 表明嗜冷黄杆菌可能存在复杂的致病机制和调控机制。本研究对 CH06 的基因组进化以及毒力相关基因进行分析, 为我国鱼类病原嗜冷黄杆菌的进化、多样性及致病机制研究提供参考。

**关键词:** 虹鳟; 嗜冷黄杆菌; 全基因组测序; 进化; 毒力相关基因

**中图分类号:** S 941.42

**文献标志码:** A

黄杆菌属 (*Flavobacterium*) 细菌可对全世界范围内的鱼类产生严重的危害, 可引起鱼类急性、亚急性和慢性感染, 其主要临床症状是鳃损伤、皮肤损伤和深度坏死性溃疡。目前嗜鳃黄杆菌 (*F. branchiophilum*)、柱状黄杆菌 (*F. columnare*) 和嗜冷黄杆菌 (*F. psychrophilum*) 均已被报道对淡水鱼养殖业造成严重的经济损失<sup>[1]</sup>。嗜冷黄杆菌是一种对虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、银鲑 (*O. kisutch*)、大西洋鲑 (*Salmo salar*) 等鲑科 (*Salmonidae*) 鱼类危害较重的病原菌<sup>[2]</sup>。目前, 多个与嗜冷黄杆菌致病相关的研究均为本研究团队在国内首次报道<sup>[3]</sup>。

虹鳟是鲑科太平洋鲑属 (*Oncorhynchus*) 的一种冷水性鱼类, 是世界范围养殖最广泛的鱼类, 因富含不饱和脂肪酸和人体必需氨基酸等营养成分而深受广大群众的青睐。虹鳟自 20 世纪 80 年代引入我国养殖以来, 已在青海、甘肃、吉林、辽宁、贵州和云南等 20 多个省淡水冷水资源丰富地区广泛养殖, 年产量约 3 万 t, 是目前我国重要的水产养殖品种之一<sup>[3-4]</sup>。然而规模化和集约化养殖也引起严重的细菌性病害问题。2017 年, 本研究团队在甘肃省某养殖场发现虹鳟幼鱼发生严重的细菌性病害, 约 30% 的幼鱼发生死亡, 经分离

收稿日期: 2020-09-17 修回日期: 2021-04-25

资助项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (HSY201902Q); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项 (2020TD43)

第一作者: 陈福广 (照片), 从事鱼类病害防控方面研究, E-mail: chenfuguang@hrfri.ac.cn

通信作者: 卢彤岩, 从事鱼类病害防控方面研究, E-mail: lutongyan@hrfri.ac.cn



鉴定, 该细菌性病害是由嗜冷黄杆菌 CH06 引起的细菌性冷水病 (bacterial cold-water disease, BCWD)。该报道是国内首次发现的由嗜冷黄杆菌引起的 BCWD, 具体发病症状表现为肌肉严重溃烂, 体色发黑, 鳍条溃烂, 脾脏肿大、肠炎并伴有腹水, 最终幼鱼死亡<sup>[3]</sup>。尽管目前本研究团队已确认 CH06 是引起本次虹鳟细菌性冷水病的病原菌, 但是仍不清楚 CH06 引起虹鳟细菌性冷水病的致病机制。除了 CH06 分离于我国之外, 现阶段报道的嗜冷黄杆菌均来自于丹麦、法国、德国、瑞士、俄罗斯等欧洲国家, 美国、加拿大等北美洲国家, 智利等南美洲国家以及日本和韩国等亚洲国家, 如 OSU THCO2-90 和 CSF259-93 分离于美国, FPG101 分离于加拿大, FPS-D10 分离于丹麦, FPS-F15 分离于芬兰, FPS-R7 分离于俄罗斯, FPS-S6 分离于瑞士, MH1 分离于智利, FPS-G1 分离于德国, JIP 02/86 分离于法国, FPRT1 则分离于韩国<sup>[2,5]</sup>。然而甘肃源 CH06 与国外菌株之间的遗传亲缘关系和进化特征等尚不清楚。

为此, 本研究对甘肃源的嗜冷黄杆菌 CH06 进行全基因组测序、可移动遗传元件分析、毒力相关基因分析以及与国外的嗜冷黄杆菌做比较基因组分析, 这对于研究我国嗜冷黄杆菌的基因组进化和多样性及其致病机制具有重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株来源

CH06 是由本研究团队从甘肃某虹鳟养殖场分离得到, 菌种保存于黑龙江省水生动物病害与免疫重点实验室。实验室前期通过 16S *rRNA* 和 *gyrB* 基因序列测定, 初步将该菌株鉴定为嗜冷黄杆菌, 虹鳟幼鱼模型攻毒实验表明 CH06 为毒力菌株<sup>[3]</sup>。

### 1.2 细菌培养与基因组 DNA 提取

挑取-80 °C 保存的 CH06 在 TYES 琼脂平板上划线, 18 °C 静置培养 3~4 d。挑取单菌落于 TYES 液体培养基中, 18 °C、150 r/min 培养 2 d。取 4 mL 的细菌培养物, 按照德国 QIAGEN 公司的 Genomic-tip20/G 试剂盒步骤提取 CH06 基因组 DNA。基因组 DNA 用赛默飞世尔科技公司的 NanoDrop8000 核酸浓度检测仪检测纯度, 确保 OD<sub>260/280</sub> 为 1.8~2.0, 浓度大于 10 µg/µL。

### 1.3 全基因组测序与组装

经 Qubit 和 NanoDrop 检测 CH06 DNA 合格后, 将该基因组 DNA 片段化, 再使用 G-tubes 末端处理 DNA, 下一步用于构建 SMRTbell DNA 文库 (20 kb); SMRT 文库由百迈客生物在 Pacific Biosciences RS II 测序仪上进行三代测序, 获得 fast5 格式原始测序数据。通过 guppy3.2.6 软件进行 base calling 后将 fast5 格式数据转换为 fastq 格式, 经进一步过滤接头、低质量及短片段的 reads 后, 获得总的数据集; 使用 Canu v1.5 和 wtdbg v2.2 软件对过滤后 subreads 进行组装, 从而获得完整的环状 DNA 结构的基因组序列<sup>[6-7]</sup>。

### 1.4 平均核苷酸一致性 (ANI) 分析

ANI (average nucleotide identity) 是鉴定细菌基因组亲缘关系远近的重要指标之一, 反映细菌基因组之间的进化距离关系。从 GenBank 数据库中下载 13 株嗜冷黄杆菌、1 株嗜鳃黄杆菌、1 株柱状黄杆菌和 1 株约氏黄杆菌 (*F. johnsoniae*) 的基因组序列, 菌株信息见表 1 和表 2。使用 JSpecies-WS 软件中的 MUMmer 模块对 16 株黄杆菌的 ANI 值进行计算, 从而对 CH06 进一步物种鉴定<sup>[8]</sup>。

### 1.5 基因组注释

将获得的 CH06 全基因组序列分别使用 Gli-

表 1 本研究中的菌株

Tab. 1 Strains used in this study

菌株 strains	宿主 host	序列分型 sequence typing	国家 country	年份 year	大小/Mb size	GC 含量/% GC content	GenBank 登录号 GenBank accession number
<b>嗜冷黄杆菌 <i>F. psychrophilum</i></b>							
CH06	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	12	中国 China	2017	2.84	32.60	CP046374.1
FPG101	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	78	加拿大 Canada	2008	2.84	32.60	CP007206.1
FPS-D10	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	92	丹麦 Denmark	2017	2.86	32.90	CP059178.1
FPS-F15	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	2	芬兰 Finland	2017	2.86	32.90	CP059093.1
FPS-R7	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	328	俄罗斯 Russia	2017	3.21	32.60	CP059075.1

· 续表 1 ·

菌株 strains	宿主 host	序列分型 sequence typing	国家 country	年份 year	大小/Mb size	GC含量/% GC content	GenBank 登录号 GenBank accession number
FPS-S6	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	92	瑞典 Sweden	2017	2.86	32.50	CP039119.2
MH1	大西洋鲑 <i>S. salar</i>	21	智利 Chile	2008	2.85	32.60	CP010275.2
OSU THCO2-90	虹鳟 <i>O. kisutch</i>	9	美国 USA	1990	2.78	32.60	LT670843.1
FPS-G1	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	89	德国 Germany	2017	2.86	32.90	CP059076.1
JIP02/86	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	20	法国 France	1986	2.86	32.50	AM398681.2
CSF259-93	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	10	美国 USA	1993	2.90	32.50	CP007627.1
PG2	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	12	智利 Chile	2009	2.85	32.50	CP010276.2
FPRT1	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	/	韩国 South Korea	2018	2.80	32.60	CP059061.1
V2-20	—	2	丹麦 Denmark	—	2.69	32.40	CP008880.1
FPG3	虹鳟 <i>O. kisutch</i>	13	美国 USA	—	2.72	32.70	CP007207.1
strain 950106-1/1	—	2	丹麦 Denmark	1995	2.84	32.60	CP059135.1
160401-1/5N	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	92	丹麦 Denmark	2016	2.83	32.51	CP039120.2
950106-1/1	淡水鱼 freshwater fish	2	丹麦 Denmark	1995	2.74	32.40	CP008902.1
FPS-F30	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	20	芬兰 Finland	2017	2.86	32.50	CP059575.1
5	—	12	智利 Chile	2013	2.85	32.50	CP010274.2
VQ50	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	2	智利 Chile	—	2.81	32.60	CP010277.2
3	—	12	智利 Chile	2013	2.81	32.60	CP010278.2
030522-1/1	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	2	丹麦 Denmark	2003	2.86	32.70	CP059098.1
010418-2/1	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	2	丹麦 Denmark	2001	2.86	32.70	CP059094.1
F164	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	79	瑞典 Sweden	1996	2.86	32.90	CP059077.1
K9/00	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	79	芬兰 Finland	2000	2.86	32.90	CP059104.1
FPS-D15	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	10	丹麦 Denmark	2017	2.86	32.90	CP059179.1
FPS-F32	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	2	芬兰 Finland	2017	2.86	32.90	CP059705.1
FPS-F27	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	2	芬兰 Finland	2017	2.86	32.90	CP059100.1
141127-1/2N	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	92	丹麦 Denmark	2014	2.86	32.90	CP059095.1
990512-1/2A	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	2	丹麦 Denmark	1999	2.86	32.90	CP059096.1
FPS-S11A	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	92	瑞典 Sweden	2017	2.86	32.90	CP059103.1
FPS-S11B	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	92	瑞典 Sweden	2017	2.86	32.90	CP059105.1
P7-7B/10	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	92	芬兰 Finland	2010	2.86	32.90	CP059175.1
FPS-F33	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	2	芬兰 Finland	2017	2.86	32.90	CP059708.1
160401-1/5M	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	92	丹麦 Denmark	2016	2.86	32.90	CP059097.1
P30-2B/09	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	91	芬兰 Finland	2009	2.86	32.60	CP059177.1
FPS-F16	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	91	芬兰 Finland	2017	2.86	32.90	CP059101.1
P15/8B-11	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	2	芬兰 Finland	2011	2.86	32.90	CP059176.1
FPS-S10	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	2	瑞典 Sweden	2017	2.86	32.90	CP059102.1
FPS-F22	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	125	芬兰 Finland	2017	2.86	34.50	CP059706.1
FPS-F21	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	125	芬兰 Finland	2017	2.86	34.50	CP059707.1
FPS-S9	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	2	瑞典 Sweden	2017	2.86	33.10	CP059099.1
<b>嗜鳃黄杆菌 <i>F. branchiophilum</i></b>							
FL-15	欧洲鲂 <i>Silurus glanis</i>	/	匈牙利 Hungary	1983	3.56	32.90	FQ859183.1
<b>柱状黄杆菌 <i>F. columnare</i></b>							
94-081	胡子鲇 <i>S. asotus</i>	/	美国 USA	1994	3.32	30.80	CP013992.1
<b>约氏黄杆菌 <i>F. johnsoniae</i></b>							
FJ001	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	/	美国 USA	2016	5.86	34.00	CP031763.1

注：“/”表示菌株在MLST数据库(<https://pubmlst.org/>)中没有序列分型；“—”表示不详

Notes: “/” means there is no sequence typing in the MLST database (<https://pubmlst.org/>); “—” means unknown

表 2 不同黄杆菌属细菌间的 ANI 值

Tab. 2 ANI values among different *Flavobacterium* species

	CH06	FPG101	FPS-D10	FPS-F15	FPS-R7	FPS-S6	MH1	OSU THCO2-90	FPS-G1	JIP 02/86	CSF259-93	PG2	FPRT1	FL-15	94-081	FJ001
CH06																
FPG101	99.89															
FPS-D10	99.91	99.83														
FPS-F15	99.91	99.84	99.93													
FPS-R7	99.47	99.46	99.46	99.47												
FPS-S6	99.88	99.81	99.91	99.89	99.46											
MH1	99.87	99.82	99.89	99.89	99.46	99.87										
OSU THCO2-90	99.38	99.39	99.39	99.39	99.38	99.39	99.39									
FPS-G1	99.89	99.83	99.92	99.94	99.46	99.88	99.89	99.40								
JIP 02/86	99.90	99.85	99.93	99.96	99.46	99.90	99.89	99.40	99.94							
CSF259-93	99.93	99.89	99.88	99.88	99.45	99.87	99.84	99.38	99.87	99.89						
PG2	99.91	99.87	99.90	99.91	99.46	99.87	99.88	99.39	99.89	99.91	99.91					
FPRT1	99.90	99.84	99.91	99.91	99.46	99.88	99.88	99.37	99.91	99.92	99.86	99.90				
FL-15	84.50	84.44	84.49	84.49	85.37	84.19	84.18	84.77	84.77	84.53	84.18	84.50	84.40			
94-081	83.90	83.90	84.09	84.09	83.88	83.71	83.86	84.11	83.73	84.08	83.91	83.74	83.91	83.58		
FJ001	84.17	83.73	84.17	84.18	84.22	83.93	84.17	83.92	84.17	84.05	84.05	84.17	84.19	84.93	83.97	

mmer v3.02 软件 (<http://ccb.jhu.edu/software/glimmer/index.shtml>)、tRNAscan-SE 和 RNAmmer 进行编码基因、转运 RNA (tRNA) 和核糖体 RNA (rRNA) 的预测<sup>[9-10]</sup>。使用 Blast Ring Image Generator (BRIG) version 0.95 将 CH06 基因组的 GC 含量、GC 偏移值 (GC skew)、tRNA、rRNA 和正义链或负义链上的编码基因分别展示到基因组圈图上<sup>[11]</sup>。假定的编码基因使用直系同源基因簇数据库 (COG), 从而注释编码基因的功能。

## 1.6 CH06 基因组序列分析

质粒、插入序列、整合子、原噬菌体和基因岛是细菌典型的可移动遗传元件, 促进了细菌基因组的进化和多样性。分别利用 IslandViewer 4、PHASTER、ISfinder 和 INTEGRALL 软件对 CH06 基因组中的基因岛、原噬菌体、插入序列和整合子进行预测分析<sup>[12-15]</sup>。使用 CRISPRFinder 软件对 CRISPR 序列进行预测<sup>[16]</sup>。

使用 MacSyFinder 软件对 CH06 基因组上的分泌系统进行预测<sup>[17]</sup>; 双组分系统和 T9SS 效应蛋白由 HMMER 软件包将 CH06 所有编码基因的蛋白序列与 PFAM 结构域模型数据库进行比对<sup>[18]</sup>。通过查找包含 HisKA、HisKA\_2、HisKA\_3 (或 Hpt) 以及 HATPase\_c 功能域的蛋白获得假定的组氨酸激酶 (histidine kinase, HK) 元件, 查找包含 Response\_

reg 功能域的蛋白获得假定的反应调节蛋白 (response regulator, RR) 元件, HisKA、Hpt 功能域的阈值设为  $E < 1$ , HATPase\_c、Response\_reg 功能域的阈值设为  $E < 10^{-5}$ 。使用 TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 对所有的 HK 元件和 RR 元件的跨膜结构进行预测。通过查找包含 TIGR04131 或 TIGR04183 功能域的蛋白, 获得假定的 T9SS 效应蛋白。使用 SignalP 软件预测 T9SS 效应蛋白的氨基端信号肽<sup>[19]</sup>。

## 1.7 嗜冷黄杆菌菌株间的比较基因组分析

从 GenBank 数据库下载 43 株嗜冷黄杆菌的全基因组序列, 使用 kSNP3 软件计算并构建嗜冷黄杆菌的系统进化树, 使用 EasyFig 软件进行嗜冷黄杆菌间的共线性分析<sup>[20-21]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 CH06 基因组的重要特征

三代测序产生的原始序列经过过滤后获得 68 060 条高质量的测序序列、平均长度为 13 141 bp, 共计 894 362 567 bp; Canu 软件组装成 2 836 981 bp 的基因组序列, 经过过滤后的序列其基因组覆盖倍数达 150 倍。该基因组组装程度达到单一长序列片段的水平, 基因组内部没有缺失片段。CH06

基因组的大小为 2 836 981 bp, GC 含量为 32.60%。CH06 基因组上共预测到 2 437 个编码基因, 总长占基因组大小的 86.90%; 在这些编码基因中, 有 1 318 个基因 (占有所有基因的 54.08%) 被注释上了确定的功能, 701 个基因 (占有所有基因的 28.76%) 被注释为未知功能的蛋白, 454 个基因被注释为新功能蛋白。CH06 基因组还拥有 50 个 tRNA, 18 个 rRNA (5S *rRNA*、16S *rRNA* 和 23S *rRNA* 各 6 个)。在 CH06 基因组上共预测到 5 个插入序列、3 个前噬菌体、4 个基因岛和 1 个 CRISPR 基因座 (图 1)。CH06 完整的基因组序列及注释信息已上传至 NCBI, 获得 BioSample: SAMN13381501; BioProject: PRJNA591399; Assembly: GCA\_009730675.1; GenBank 登录号: CP046374.1。

## 2.2 ANI 分析

为了基于全基因组序列准确地对 CH06 进行种属鉴定, 本实验将 CH06 与 12 株嗜冷黄杆菌和 3 株其他黄杆菌进行 ANI 分析。利用 JSpecies WS 获得 ANIm 值。结果显示, CH06 与 FPG101、FPS-

D10 和 FPS-F15 等 12 株嗜冷黄杆菌的 ANI 值均高于 99%。然而菌株 CH06 与嗜鳃黄杆菌 FL-15、柱状黄杆菌 94-081 和约氏黄杆菌 FJ001 的 ANI 值均低于 90% (表 2)。依据 ANI 值 95% 的种间鉴定标准, CH06 应属于黄杆菌属嗜冷黄杆菌分支。

## 2.3 CH06 基因功能注释分析

将 CH06 基因组中预测的蛋白序列与 COG 数据库比对, 获得相应的功能注释结果。与 COG 数据库比对分析, 发现共有 1 528 个基因 (占全基因组的 61.70%) 具有 COG 功能分类, 分为 21 类。其中, 参与细菌转运与代谢相关过程 (包括氨基酸转运和代谢、核苷酸转运和代谢、碳水化合物的运输和新陈代谢、辅酶转运和代谢、脂质运输和新陈代谢、无机离子转运和代谢, 次级代谢产物的生物合成、转运和分解代谢) 一共有 321 个基因, 占较大比例, 达到 COG 功能分类的 21.00%; 此外, 18.10% 的基因 COG 分类缺乏明显特征, 功能尚不明确 (图 2)。

## 2.4 嗜冷黄杆菌基因组的系统进化树和共线性分析

为了解嗜冷黄杆菌 CH06 的基因组进化情况, 本实验选取了 42 株已完成全基因组测序, 来源于欧洲、亚洲、北美洲和南美洲的嗜冷黄杆菌, 使用 kSNP3 软件对 43 株嗜冷黄杆菌构建系统发育进化树。结果显示, 除了菌株 FPS-R7、FPG3、OSU THCO2-90、FPS-F21 和 FPS-F22 之外, 所有的嗜冷黄杆菌的分支长度相似, 进化距离较短。其中, CH06 与美国源菌株 CSF259-93 和加拿大源菌株 FPG101 的亲缘关系较近 (图 3)。使用 EasyFig 软件对 CH06、CSF259-93 和 FPG101 的全基因组序列进行共线性分析。结果表明, CH06 与美国菌株 CSF259-93 和加拿大菌株 FPG101 的全基因组共线性关系较好, 相似度较高, 亲缘关系较近。然而 CH06 与 CSF259-93 和 FPG101 的基因组之间仍存在大片段的倒位以及小片段的插入和缺失 (图 4)。

## 2.5 CH06 的毒力相关基因分析

**分泌系统** CH06 基因组中存在 I 型分泌系统 (type I secretion system, T1SS) 和 IX 型分泌系统 (T9SS) 相关基因。其中, T1SS 相关基因包括 3 个, 分别是 GMY06\_00185、GMY06\_00190 和 GMY06\_00190, T9SS 相关基因 13 个, 分别是 *porV* (GMY06\_04040)、*sprE* (GMY06\_02575)、*sprA* (GMY06\_12145)、*gldN* (GMY06\_11375)、*gldK*

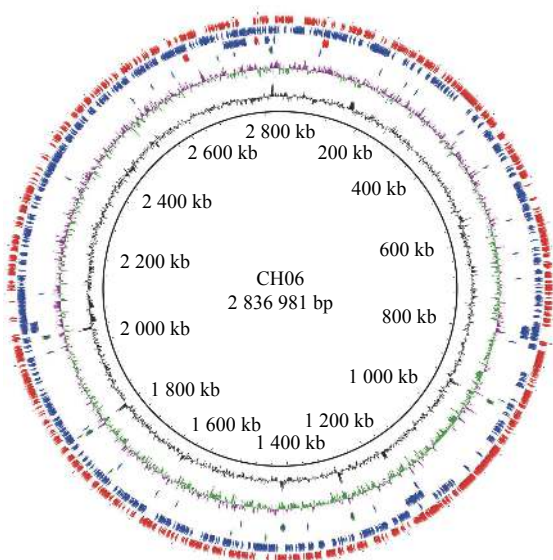


图 1 CH06 的基因组圈图

图 1 和图 2 (从外到内), 顺时针转录的编码基因 (红色) 和逆时针转录的编码基因 (蓝色); 圈 3. 核糖体 RNA (绿色) 和转运 RNA (蓝色); 圈 4. 插入序列 (绿色), 前噬菌体 (红色) 和基因岛 (蓝色); 圈 5. GC 偏移; 圈 6. GC 含量

Fig. 1 Circular representation of the CH06 genome

Circles 1 and 2 (from outside to inside), genes transcribed clockwise (in red) and counterclockwise (in blue); circle 3. rRNA genes (in green) and tRNA genes (in purple); circle 4. insertion sequences (in green), prophages (in red) and genomic islands (in blue); circle 5. GC skew; circle 6. GC content

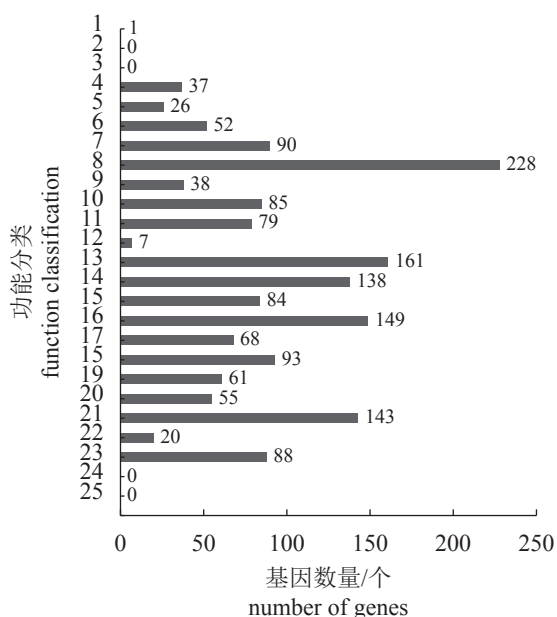


图2 基于 COG 的嗜冷黄杆菌 CH06 编码蛋白的功能分类

1. 骨架, 2. 细胞核结构, 3. 胞外结构, 4. 防御机制, 5. 胞内运输、分泌和囊泡运输, 6. 信号转导机制, 7. 未知功能, 8. 一般功能预测, 9. 次级代谢产物的生物合成、转运和分解代谢, 10. 无机离子转运和代谢, 11. 翻译后修饰, 蛋白质周转, 伴侣蛋白, 12. 细胞运动, 13. 细胞壁/膜/被膜生物合成, 14. 复制, 重组和修复, 15. 转录, 16. 翻译、核糖体结构和生物合成, 17. 脂质运输和新陈代谢, 18. 辅酶转运和代谢, 19. 碳水化合物的运输和新陈代谢, 20. 核苷酸转运和代谢, 21. 氨基酸转运和代谢, 22. 细胞周期控制、细胞分裂和染色体分割, 23. 能量生产和转换, 24. 染色质结构和动力学, 25. RNA 加工和修饰

Fig. 2 The function classification of proteins in *F. psychrophilum* CH06 based on COG

1. cytoskeleton, 2. nuclear structure, 3. extracellular structures, 4. defense mechanisms, 5. intracellular trafficking, secretion and vesicular transport, 6. signal transduction mechanisms, 7. function unknown, 8. general function prediction only, 9. secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism, 10. inorganic ion transport and metabolism, 11. posttranslational modification, protein turnover, chaperones, 12. cell motility, 13. cell wall/membrane/envelope biogenesis, 14. replication, recombination and repair, 15. transcription, 16. translation, ribosomal structure and biogenesis, 17. lipid transport and metabolism, 18. coenzyme transport and metabolism, 19. carbohydrate transport and metabolism, 20. nucleotide transport and metabolism, 21. amino acid transport and metabolism, 22. cell cycle control, cell division, and chromosome partitioning, 23. energy production and conversion, 24. chromatin structure and dynamics, 25. RNA processing and modifications

(GMY06\_11390)、*sprT* (GMY06\_00680)、*gldM* (GMY06\_11380)、*gldL* (GMY06\_11385)、*gldJ* (GMY06\_04030)、*porU* (GMY06\_04035) 和 *porQ* (GMY06\_10085)。Sec 分泌途径 (general secretory pathway, Sec pathway) 是细菌中蛋白跨内膜转运

的主要途径。在嗜冷黄杆菌 CH06 中, 与 Sec 分泌途径相关的基因包括 9 个, 分别是 *secA*(GMY06\_06830)、*secY*(GMY06\_04375)、*secE*(GMY06\_05065)、*secG*(GMY06\_11440)、*secDF*(GMY06\_06550)、*yajC* (GMY06\_06585)、*yidC*(GMY06\_11025)、*lepB*(GMY06\_05345) 和 GMY06\_01235。双精氨酸转运系统 (twin-arginine translocation system, Tat) 是细菌中存在的另一种跨内膜转运蛋白的途径。在 CH06 中, *tatA* (GMY06\_02485) 和 *tatC* (GMY06\_04795) 参与了 Tat 的形成。

**效应蛋白** 通过对嗜冷黄杆菌 CH06 所有编码蛋白进行功能域分类, 预测出 56 个蛋白包含 TIGR04131 或 TIGR04183 蛋白功能域, 为假定的 T9SS 效应蛋白。其中, 54 个效应蛋白含有氨基端信号肽, 2 个效应蛋白缺少氨基端信号肽 (表 3)。

**双组分系统** 通过对嗜冷黄杆菌 CH06 编码的所有蛋白进行功能域分类, 发现 11 个编码蛋白包含 HisKA(或 HisKA3) 和 HATPase\_c 功能域, 为假定 HK 蛋白; 16 个蛋白包含 Response\_reg 功能域, 为假定 RR 蛋白 (表 4)。使用 TMHMM 软件对所有的 HK 蛋白、RR 蛋白进行跨膜结构预测, 发现 8 个 HK 蛋白具有跨膜结构 (表 4)。因此这 8 个 HK 蛋白可能感知胞外信号刺激。3 个 HK 蛋白不具有跨膜结构, 他们可能位于细胞质中, 感知胞内信号刺激。上述 16 个 RR 蛋白均不含有跨膜结构, 因此这些 RR 蛋白均为细胞质蛋白并在细胞质内行使效应蛋白功能。经典的双组分系统是由 HK 和 RR 2 个元件组成。然而绝大多数细菌中还存在着复杂的杂交型 HK 等系统。杂交型 HK 除了具有 HisKA 或 HATPase\_c 功能域之外, 还含有 Response\_reg 功能域。嗜冷黄杆菌 CH06 上有 1 个杂交型 HK 蛋白 GMY06\_05860。因为 GMY06\_06035 和 GMY06\_08470 仅含有 Hpt 功能域, 所以他们是 Hpt 蛋白。GMY06\_00510 与 GMY06\_00515、GMY06\_05620 与 GMY06\_05625、GMY06\_06190 与 GMY06\_06195 以及 GMY06\_10660 与 GMY06\_10665 的基因相邻, 彼此很可能组成一套完整的双组分系统。然而其他 HK 元件和 RR 元件在 CH06 基因组上却是单独存在的。

### 3 讨论

嗜冷黄杆菌已成为鲑科鱼类养殖业中一种重要的条件致病菌。北美洲、南美洲、亚洲和欧洲

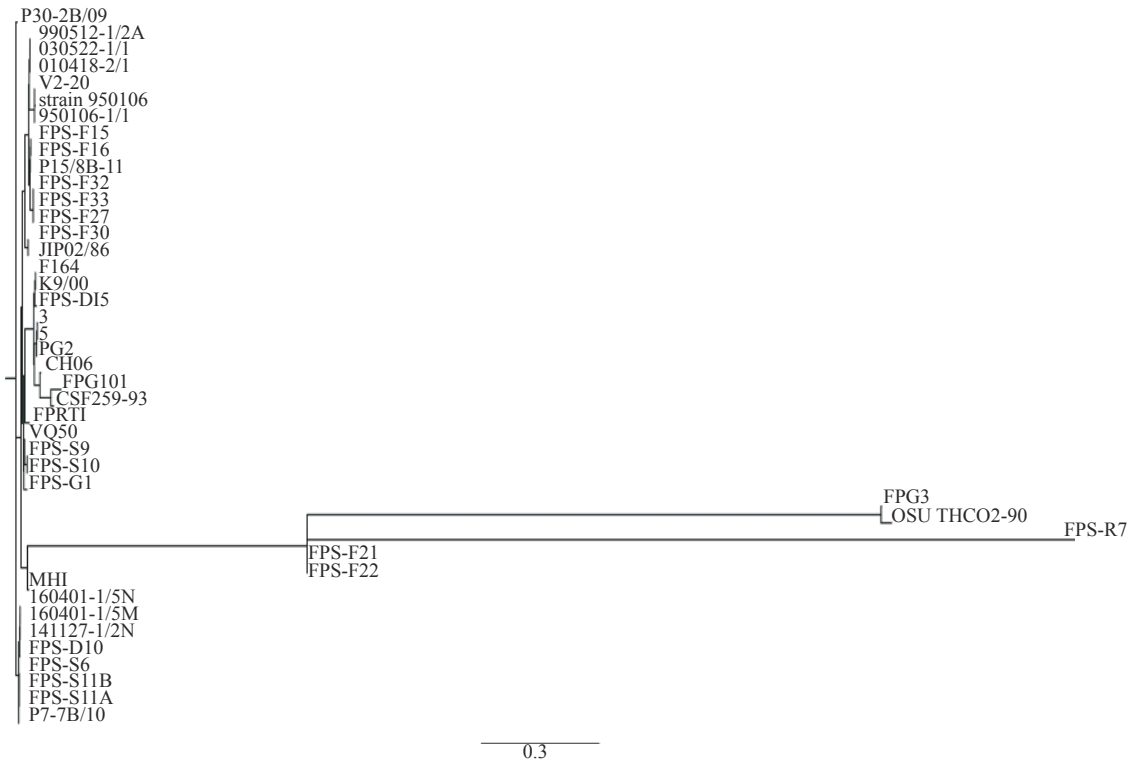


图 3 基于全基因组单核苷酸多态性的 43 株嗜冷黄杆菌的系统进化树

Fig. 3 Whole genome SNP-based phylogenetic tree of 43 *F. psychrophilum* strains

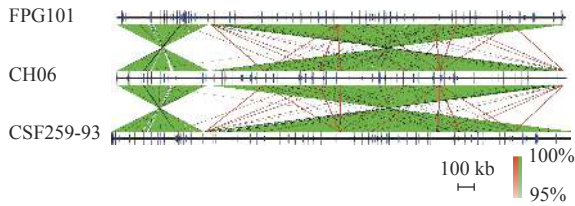


图 4 CH06 与 FPG101 和 CSF259-93 之间的基因组共线性分析图

Fig. 4 Map of genome collinearity analysis of CH06, FPG101 and CSF259-93

等多个国家均报道嗜冷黄杆菌可对鲑科鱼类养殖造成严重的危害，然而目前国内没有嗜冷黄杆菌的相关报道<sup>[2,5]</sup>。本研究团队前期研究表明嗜冷黄杆菌可对我国虹鳟养殖造成严重危害<sup>[3]</sup>。本实验以分离获得的毒力菌株 CH06 为研究对象，从基因组角度分析我国嗜冷黄杆菌的致病机制和基因组进化特征。

截止目前，GenBank 数据库现已收录 50 株嗜冷黄杆菌的基因组序列，基因组大小为 2.68~3.21 Mb，GC 含量为 32.4%~34.5%。从基因组长度和 GC 含量来看，CH06 基因组的长度和 GC 含量均处于较低水平。可移动遗传元件可对细菌的生物性状和进化有重要的贡献；它不仅能通

过自身携带的功能基因促进宿主生长和对环境的适应性，而且以多种方式推动细菌的进化。CH06 基因组中含有丰富的可移动遗传元件，包括 5 个插入序列、3 个前噬菌体和 4 个基因岛，这说明插入序列、前噬菌体和基因岛是推动嗜冷黄杆菌 CH06 基因组发生进化和多样性的主要方式。结合系统进化树和基因组共线性的分析结果，CH06 与美国菌株 CSF259-93 和加拿大菌株 FPG101 的亲缘关系较近，推测上述菌株来自于共同的祖先。

病原菌能够利用分泌系统分泌效应蛋白从而对宿主发生黏附和侵袭以及免疫逃避等，病原菌可利用 T1SS、T4SS、T6SS 和 T9SS 等 8 种分泌系统分泌效应蛋白<sup>[22]</sup>。尽管 T4SS 和 T6SS 广泛存在于革兰氏阴性病原菌中，但是嗜冷黄杆菌 CH06 不含有 T4SS 和 T6SS 相关基因。Kumru 等<sup>[1]</sup>不仅发现嗜冷黄杆菌等黄杆菌属细菌中存在完整的 T6SS 基因，而且发现柱状黄杆菌等黄杆菌属细菌中存在绝大多数的 T4SS 相关基因。说明嗜冷黄杆菌在长期进化过程中丧失了 T4SS 和 T6SS 的分泌功能。然而嗜冷黄杆菌 CH06 却存在 T1SS 和 T9SS。Barbier 等<sup>[23]</sup>发现嗜冷黄杆菌 T9SS 结构蛋白 GldN 缺失菌株减少了 T9SS 效应蛋白的分泌，

表 3 嗜冷黄杆菌 CH06 编码的假定 T9SS 效应蛋白

Tab. 3 Hypothetical T9SS effector proteins encoded by *F. psychrophilum* CH06

基因座标签	T9SS CTD类型	信号肽 (概率>0.57)	基因座标签	T9SS CTD类型	信号肽 (概率>0.57)
locus_tag	T9SS CTD type	signal peptide (probability>0.57)	locus_tag	T9SS CTD type	signal peptide (probability>0.57)
GMY06_00715	TIGR04131	+	GMY06_01790	TIGR04183	+
GMY06_00885	TIGR04183	+	GMY06_01970	TIGR04183	+
GMY06_00905	TIGR04183	+	GMY06_01995	TIGR04183	+
GMY06_01170	TIGR04183	+	GMY06_02325	TIGR04131	+
GMY06_01175	TIGR04183	+	GMY06_02335	TIGR04131	+
GMY06_01430	TIGR04183	+	GMY06_02375	TIGR04183	+
GMY06_01435	TIGR04183	+	GMY06_02595	TIGR04183	+
GMY06_01440	TIGR04183	+	GMY06_02855	TIGR04131	+
GMY06_01445	TIGR04183	+	GMY06_03390	TIGR04131	+
GMY06_01450	TIGR04183	+	GMY06_03950	TIGR04183	+
GMY06_01455	TIGR04183	+	GMY06_05120	TIGR04131	+
GMY06_01460	TIGR04183	-	GMY06_04615	TIGR04183	+
GMY06_01465	TIGR04183	+	GMY06_05715	TIGR04131	+
GMY06_01470	TIGR04183	+	GMY06_05820	TIGR04183	+
GMY06_01475	TIGR04183	+	GMY06_06900	TIGR04131	+
GMY06_01480	TIGR04183	+	GMY06_07015	TIGR04183	+
GMY06_01485	TIGR04183	+	GMY06_07395	TIGR04131	+
GMY06_01490	TIGR04183	+	GMY06_07435	TIGR04183	+
GMY06_01495	TIGR04183	+	GMY06_07560	TIGR04183	+
GMY06_01500	TIGR04183	+	GMY06_08455	TIGR04183	+
GMY06_01505	TIGR04183	+	GMY06_09790	TIGR04183	+
GMY06_01510	TIGR04183	+	GMY06_09820	TIGR04131	+
GMY06_01515	TIGR04183	+	GMY06_09825	TIGR04131	+
GMY06_01520	TIGR04183	+	GMY06_10175	TIGR04183	+
GMY06_01525	TIGR04183	+	GMY06_10335	TIGR04183	+
GMY06_01530	TIGR04183	+	GMY06_10400	TIGR04183	-
GMY06_01535	TIGR04183	+	GMY06_10680	TIGR04183	+
GMY06_01785	TIGR04183	+	GMY06_11320	TIGR04183	+

注: +. 表示这种编码蛋白含有氨基端信号肽; -. 表示这种编码蛋白缺少氨基端信号肽

Notes: + means there is a signal peptide located in the N-terminal of this protein; -. means there is no signal peptide located in the N-terminal of this protein

从而显著降低嗜冷黄杆菌的毒力。这说明 T9SS 及其分泌的效应蛋白是嗜冷黄杆菌 CH06 的重要毒力因子。通过对嗜冷黄杆菌 CH06 所编码的蛋白进行 T9SS 效应蛋白预测, 发现嗜冷黄杆菌 CH06 基因组上分布着多达 56 个效应蛋白。绝大多数效应蛋白还存在氨基端信号肽。由于嗜冷黄杆菌 CH06 含有 Sec 分泌途径和 Tat 分泌途径, 嗜冷黄杆菌 CH06 很可能通过这两种分泌途径将效应蛋白从细胞内转运到细胞周质中; 随后, 嗜冷黄杆菌利用 T9SS 将效应蛋白从细胞周质中转运

到细胞外面, 从而发挥效应蛋白的生物学功能。Fpp1 和 Fpp2 蛋白是 2 种重要的嗜冷黄杆菌毒力因子<sup>[24-25]</sup>, 而对其他 54 种效应蛋白的生物学功能尚不清楚, 对 T9SS 效应蛋白的结构和功能进行研究, 有助于揭示嗜冷黄杆菌的致病机制。

绝大多数病原菌是条件致病菌。在正常生活时, 这类病原菌对宿主无害而有益。但当它们侵入到宿主体内或进入到非正常生活的宿主组织中, 可能因环境发生改变而表达毒力蛋白, 转而为毒性生活来保护自己<sup>[26]</sup>。对于条件致病菌而言, 从



表 4 嗜冷黄杆菌 CH06 编码的假定 HK 和 RR 蛋白

Tab. 4 Hypothetical HKs and RRs encoded by *F. psychrophilum* CH06

基因座标签 locus_tag	分类 class	氨基酸数量 no. of amino acids	跨膜数量 no. of transmembrane	保守的结构域 conserved domains			
				HisKA/HisKA_3	Hpt	HATPase_c	Response_reg
GMY06_00510	HK	354	2	+	-	+	-
GMY06_00515	RR	228	0	-	-	-	+
GMY06_02165	HK	491	2	+	-	+	-
GMY06_03175	HK	381	2	+	-	+	-
GMY06_05620	RR	250	0	-	-	-	+
GMY06_05860	HK	729	0	+	-	+	+
GMY06_06035	Hpt	117	0	-	+	-	-
GMY06_06190	RR	227	0	-	-	-	+
GMY06_06195	HK	419	2	+	-	+	-
GMY06_07285	RR	387	0	-	-	-	+
GMY06_07505	HK	593	1	+	-	+	-
GMY06_07530	RR	222	0	-	-	-	+
GMY06_08235	RR	517	0	-	-	-	+
GMY06_08465	RR	241	0	-	-	-	+
GMY06_08470	Hpt	105	1	-	+	-	-
GMY06_08475	HK	341	0	+	-	+	-
GMY06_08485	HK	870	0	+	-	+	-
GMY06_08495	RR	137	0	-	-	-	+
GMY06_08615	HK	452	2	+	-	+	-
GMY06_09105	RR	232	0	-	-	-	+
GMY06_08895	RR	387	0	-	-	-	+
GMY06_09755	RR	253	0	-	-	-	+
GMY06_09950	HK	576	1	+	-	+	-
GMY06_09990	RR	446	0	-	-	-	+
GMY06_10660	RR	233	0	-	-	-	+
GMY06_10665	HK	527	2	+	-	+	-
GMY06_10785	RR	230	0	-	-	-	+
GMY06_11890	RR	209	0	-	-	-	+
GMY06_12455	RR	252	0	-	-	-	+

注: "+" 表示这种编码蛋白含有相关结构域; "-" 表示这种编码蛋白缺少相关蛋白结构域

Notes: "+" means this protein has a related protein domain; "-" means this protein lacks a related protein domain

正常生活到毒性生活的相互转变是其生存斗争的需要, 受到细菌感知系统的精确调控。双组分系统是细菌重要的信号转导系统, 调控细胞分裂、毒力和群体感应等绝大多数生命活动。CH06 基因组中存在 29 个双组分系统相关元件。Hesami 等<sup>[27]</sup>推测 HK 蛋白 FP1516 与嗜冷黄杆菌致病机制密切相关。目前, 尚不清楚其他菌种 HK 和 RR 的生物学功能。开展对 HK 和 RR 的研究, 有助于揭示嗜冷黄杆菌调控毒力蛋白表达的分子机制。

本研究首次对我国虹鳟源嗜冷黄杆菌的基因组进化及其毒力相关基因进行分析, 为阐明我国鱼类病原菌嗜冷黄杆菌的进化、多样性及其致病机制提供参考。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

[1] Kumru S, Tekedar H C, Blom J, *et al.* Genomic diversity

- in flavobacterial pathogens of aquatic origin[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 142: 104053.
- [ 2 ] Duchaud E, Rochat T, Habib C, *et al.* Genomic diversity and evolution of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 138.
- [ 3 ] 柴静茹, 王荻, 卢彤岩, 等. 虹鳟源嗜冷黄杆菌的分离鉴定及致病性[J]. 水产学报, 2021, 45(6): 929-939.  
Chai J R. Wang D. Lu T Y. *et al.* Isolation, identification and pathogenicity of *Flavobacterium psychrophilum* from *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(6): 929-939 (in Chinese).
- [ 4 ] 刘晓, 黄六一, 刘长东, 等. 光照颜色对虹鳟行为反应、血浆皮质醇和生化指标的影响[J]. 水产学报, 2021, 45(5): 740-747.  
Liu X, Huang L Y, Liu C D, *et al.* Effects of light colors on behavior response, plasma cortisol and biochemical indexes of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(5): 740-747 (in Chinese).
- [ 5 ] Sundell K, Landor L, Nicolas P, *et al.* Phenotypic and genetic predictors of pathogenicity and virulence in *Flavobacterium psychrophilum*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1711.
- [ 6 ] Koren S, Walenz B P, Berlin K, *et al.* Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive *k*-mer weighting and repeat separation[J]. *Genome Research*, 2017, 27(5): 722-736.
- [ 7 ] Ruan J, Li H. Fast and accurate long-read assembly with wtdbg2[J]. *Nature Methods*, 2020, 17(2): 155-158.
- [ 8 ] Richter M, Rosselló-Móra R, Glöckner F O, *et al.* JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison[J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(6): 929-931.
- [ 9 ] Lowe T M, Eddy S R. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(5): 955-964.
- [ 10 ] Lagesen K, Hallin P, Rødland E A, *et al.* RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(9): 3100-3108.
- [ 11 ] Alikhan N F, Petty N K, Zakour N L B, *et al.* BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 402.
- [ 12 ] Bertelli C, Laird M R, Williams K P, *et al.* IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(W1): 30-35.
- [ 13 ] Arndt D, Grant J R, Marcu A, *et al.* PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(W1): 16-21.
- [ 14 ] Kichenaradja P, Siguier P, Pérochon J, *et al.* ISbrowser: an extension of ISfinder for visualizing insertion sequences in prokaryotic genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(S1): 62-68.
- [ 15 ] Moura A, Soares M, Pereira C, *et al.* INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(8): 1096-1098.
- [ 16 ] Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(Web Server issue): W52-W57.
- [ 17 ] Abby S S, Cury J, Guglielmini J, *et al.* Identification of protein secretion systems in bacterial genomes[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 23080.
- [ 18 ] Potter S C, Luciani A, Eddy S R, *et al.* HMMER web server: 2018 update[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(W1): W200-W204.
- [ 19 ] Armenteros J J A, Tsirigos K D, Sønderby C K, *et al.* SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(4): 420-423.
- [ 20 ] Shea N G, Tom S, Barry G H. kSNP3.0: SNP detection and phylogenetic analysis of genomes without genome alignment or reference genome[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(17): 2877-2878.
- [ 21 ] Mitchell J S, Nicola K P, Scott A B. Easyfig: a genome comparison visualizer[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(7): 1009-1010.
- [ 22 ] Pena R T, Blasco L, Ambroa A, *et al.* Relationship between quorum sensing and secretion systems[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1100.
- [ 23 ] Barbier P, Rochat T, Mohammed H H, *et al.* The type IX secretion system is required for virulence of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(16): e00799-e00820.
- [ 24 ] Secades P, Alvarez B, Guijarro J A. Purification and

- properties of a new psychrophilic metalloprotease (Fpp2) in the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 226(2): 273-279.
- [25] Secades P, Alvarez B, Guijarro J A. Purification and characterization of a psychrophilic, calcium-induced, growth-phase-dependent metalloprotease from the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(6): 2436-2444.
- [26] Cheng S T, Wang F F, Qian W. Cyclic-di-GMP binds to histidine kinase RavS to control RavS-RavR phospho-transfer and regulates the bacterial lifestyle transition between virulence and swimming[J]. *PLoS Pathogens*, 2019, 15(8): e1007952.
- [27] Hesami S, Metcalf D S, Lumsden J S, *et al.* Identification of cold-temperature-regulated genes in *Flavobacterium psychrophilum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(5): 1593-1600.

## Genomic evolution and virulence-associated genes of the *Flavobacterium psychrophilum* CH06 isolated from *Oncorhynchus mykiss*

CHEN Fuguang , LI Shaowu , LU Tongyan \*

(Key Laboratory of Aquatic Animal Diseases and Immune Technology of Heilongjiang Province,  
Heilongjiang River Fisheries Research Institute,  
Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China)

**Abstract:** *Flavobacterium psychrophilum*, the causative agent of bacterial cold-water disease and rainbow trout fry syndrome, is currently an important pathogen causing great economic loss to the salmonid industry worldwide. Recently, the genomic evolution and pathogenic mechanisms of *F. psychrophilum* have been widely studied in many countries. However, these studies that originated from China are still rarely reported. In order to better understand the genomic evolution and pathogenesis of *F. psychrophilum* in China, the virulent strain CH06 was subjected to whole genome sequencing and analyzed using comparative genomics, and virulence-associated genes were predicted. The result of whole genome sequencing showed that the CH06 genome consists of a single circular chromosome of 2 836 981 base pairs (bp) harboring 2 437 protein-coding genes with an overall G+C content of 32.56%. The results of ANI analysis showed that ANI values between CH06 and 12 *F. psychrophilum* strains are higher than 99%, indicating that CH06 belongs to *F. psychrophilum*. Analysis of the genome sequence reveals that CH06 consists of 5 insertion sequences, 4 genomic islands and 3 prophage sequences, indicating that these mobile genetic elements led to the genome evolution of CH06. Collinear and phylogenetic analysis showed that CH06 is more closely related to CSF259-93 and FPG101. Secretion system analysis showed that CH06 carried type I (T1SS) and type IX (T9SS) secretion system. Among the coding proteins, 56 proteins are predicted to be secreted by the T9SS. Furthermore, CH06 was predicted to encode 11 histidine kinases (HKs) and 16 response regulators (RRs), revealing that CH06 has evolved sophisticated regulation mechanisms to export virulence factors across the bacterial cell envelope to sense and respond to environmental changes. In this study, the genomic evolution and virulence-associated genes of CH06 are analyzed, providing a basis for research on the genomic evolution and pathogenic mechanisms of this fish pathogen in China.

**Key words:** *Oncorhynchus mykiss*; *Flavobacterium psychrophilum*; whole genome sequencing; evolution; virulence-associated genes

**Corresponding author:** LU Tongyan. E-mail: lutongyan@hrfri.ac.cn

**Funding projects:** Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, HRFRI (HSY201902Q); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund (CAFS) (2020TD43)