小RNA生物合成途径主要元件调控稻瘟病菌 生长发育和致病性

张丽梅'项旭跃!齐敏!曹雪琦!王宗华!? 郑华坤!*

(1. 福建农林大学植物保护学院, 闽台作物有害生物生态防控国家重点实验室, 福州 350002;2. 闽江学院海洋研究院, 福州 350108)

摘要:为探究小RNA生物合成途径主要蛋白在稻瘟病菌 Magnaporthe oryzae生长发育、胁迫响应和致病过程中的作用,在野生型菌株 Guy11 背景下,分别构建其单基因敲除突变体 Δ Moago3、 Δ Modcl2、 Δ Mordrp2和双基因敲除突变体 Δ Moago3 Δ Modcl2、 Δ Moago3 Δ Modcl2、 Δ Moardrp2和双基因敲除突变体 Δ Moago3 Δ Modcl2、 Δ Moago3 Δ Modcl2、 Δ Moago3 Δ Modcl2、 Δ Moago3 Δ Modcl2 Δ

关键词:稻瘟病菌;小RNA;生长发育;致病性;胁迫响应

Major components of sRNA biogenesis pathway are required for development and pathogenicity in rice blast fungus

 Zhang Limei¹ Xiang Xuyue¹ Qi Min¹ Cao Xueqi¹ Wang Zonghua^{1,2} Zheng Huakun^{1*}
(1. State Key Laboratory of Ecological Pest Control for Fujian and Taiwan Crops, College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China; 2. Institute of Oceanography, Minjiang University, Fuzhou 350108, Fujian Province, China)

Abstract: To investigate the role of the major components of small RNA (sRNA) biosynthesis pathway in the development, stress response and pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*, the single-gene knockout mutants $\Delta Moago3$, $\Delta Modcl2$, $\Delta Mordrp2$ and double-gene knockout mutants $\Delta Moago3\Delta Modcl2$, $\Delta Moago3\Delta Mordrp2$ and $\Delta Modcl2\Delta Mordrp2$ were constructed in the wild type (Guy11) background, and the vegetative growth, conidiation, stress response, pathogenicity and invasive growth of these mutants were investigated. The results showed that, the fungal growth was only significantly reduced in the two double-gene deletion mutants, $\Delta Moago3\Delta Modcl2$ and $\Delta Moago3\Delta Mordrp2$,

基金项目:国家自然科学基金(31770156,U1805232,32172365)

^{*} 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: huakunzheng@163.com 收稿日期: 2021-05-19

compared with the wild type strain Guy11; conidiation of $\Delta Modcl2$ and $\Delta Modcl2\Delta Mordrp2$ was significantly reduced to 66.67% of that of wild type strain Guy11 and $\Delta Mordrp2$; compared with the wild type strain Guy11, the inhibition rates of all the six mutants were not significantly altered upon the treatment of sodium dodecylsulfate (SDS), NaCl, sorbitol and H₂O₂, while under the treatment of Congo red, the inhibition rates of $\Delta Moago3$, $\Delta Mordrp2$ and $\Delta Moago3\Delta Modcl2$ were significantly increased; moreover, pathogenicity was slightly compromised in $\Delta Moago3\Delta Modcl2$, $\Delta Mordrp2$ and $\Delta Modcl2\Delta Mordrp2$, and was severely compromised in $\Delta Moago3\Delta Modcl2$ and $\Delta Moago3\Delta Mordrp2$; consistently, the percentages of type 3 and type 4 invasive hyphae overtly decreased in $\Delta Moago3$, $\Delta Modcl2$, $\Delta Moago3\Delta Modcl2$, $\Delta Moago3\Delta Mordrp2$ and $\Delta Modcl2\Delta Mordrp2$. These results suggested that the major components of sRNA biogenesis are involved in the regulation of asexual development, stress response and pathogenicity in rice blast fungus.

Key words: rice blast fungus; sRNA; development; pathogenicity; stress response

稻瘟病由丝状子囊真菌稻瘟病菌 Magnaporthe oryzae 引起,该病每年可导致水稻减产10%~30% (Talbot, 2003),造成的经济损失高达660亿美元 (Pennisi, 2010),严重影响全球的水稻生产。我国各 水稻产区几乎每年都会发生中等规模以上的稻瘟病 害,且近20年中稻瘟病害呈现不断上升的趋势,其 中2013—2017年较严重,年平均危害面积达到 7500万hm²左右(曹妮等, 2019)。稻瘟病菌侵染机 制的多样性使其能够在寄主上成功定殖,而由转座 元件等介导的基因组快速变异则是稻瘟病菌逃避寄 主抗性蛋白识别、迅速恢复对抗性水稻品种侵染能 力的关键,也是稻瘟病难以防控的根本原因(Talbot, 2003;马军韬等, 2017; 王群等, 2020)。

小RNA(small RNA, sRNA)是一类不具有蛋白 编码功能、但对基因组防御和基因表达调控具有重 要作用的序列(Bühler & Moazed, 2007; 邱艳红等, 2019)。sRNA主要分为P元件诱导的无用睾丸(Pelement induced wimpy testis, PIWI)相互作用 RNA (PIWI-interacting RNA, piRNA)、小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)和小分子 RNA(microRNA, miRNA)3类。不同sRNA的生物合成机制略有不 同,如植物 siRNA 的生物合成需要 RNA 依赖性 RNA聚合酶(RNA dependence RNA polymerse, Rdrp)、 限制性核酸内切酶(dicer, Dcl)和具有保守结构的结 合蛋白(argonaute, Ago), 而 miRNA 的生物合成则 只需 Dcl 和 Ago(Qiao et al., 2021)。在动植物和真 菌中,sRNA是维护基因组稳定和调节基因转录水 平的重要调控因子 (Bühler & Moazed, 2007; Moazed, 2009;梁丽琴等, 2018), 例如在酵母中, siRNA可以介导组蛋白H3K9的甲基化和异染色质 的形成,发挥基因转录调控功能(Jain et al., 2016; Jih et al., 2017)。同时, sRNA 在真核生物生长发育 与胁迫过程中也发挥着重要作用,例如,水稻 miRNA既可正调控或负调控稻瘟病抗性,也可以同 时调控稻瘟病抗性和水稻产量(Li et al., 2019)。在 真菌中,sRNA参与调控生长发育(Carreras-Villaseñor et al., 2013; Torres-Martínez & Ruiz-Vázquez, 2017; Gaffar et al., 2019)、胁迫响应(Bai et al., 2015)、致病 性(Weiberg et al., 2013; Kusch et al., 2018; Zanini et al.,2019)和抗病毒(Segers et al.,2007;Campo et al., 2016; Wang et al., 2016)等过程。在稻瘟菌属中, sRNA不但可以维持基因组的稳定性,还参与生长 发育和寄主互作等过程(Murata et al., 2007; Raman et al., 2017; Nguyen et al., 2018)。稻瘟病菌基因组 共编码8个sRNA生物合成途径的蛋白,即3个Rdrp 蛋白(MoRdrp1、MoRdrp2和MoRdrp3),2个Dcl蛋 白(MoDcl1 和 MoDcl2)和3个 Ago 蛋白(MoAgo1、 MoAgo2 和 MoAgo3) (Nakayashiki, 2005),其中 MoRdrp2(GenBank登录号为MGG 13453)、MoDcl2 (GenBank 登录号为 MGG 12357)和 MoAgo3(Gen-Bank登录号为MGG 01294)蛋白负责 sRNA 的生物 合成(Raman et al., 2017)。在稻瘟病菌菌株70-15中, MoRdrp2、MoDcl2和MoAgo3这3个蛋白主要负责 sRNA生物合成的蛋白,也参与调控稻瘟病菌生长 发育,并且在稻瘟病菌侵染大麦离体叶片的过程中 也有一定作用(Raman et al., 2017)。因此, 研究稻 瘟病菌 sRNA 生物合成途径主要元件的功能对于 稻瘟病的防治具有重要意义。

为进一步探究稻瘟病菌中sRNA生物合成途径 主要元件的功能以及这3个主要元件之间是否存在 遗传互作,本研究构建MoRdrp2、MoDcl2和MoAgo3 的单基因敲除突变体 ΔMoago3、ΔModcl2、ΔMordrp2 和不同组合的双基因敲除突变体ΔMoago3ΔModcl2、 ΔMoago3ΔMordrp2和ΔModcl2ΔMordrp2,测定不同 突变体的营养生长、产孢过程、对不同胁迫的响应、 致病性及侵染菌丝类型,明确MoAgo3与MoDcl2或 MoRdrp2的互作关系及其在调控稻瘟病菌菌丝生 长和致病过程中的作用,以期为深入解析sRNA在 维护稻瘟病菌基因组稳定性及毒性变异机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株与植株:稻瘟病菌野生型菌株Guy11 由法国Didier Tharreau博士惠赠,本研究所用突变 体均以野生型菌株Guy11为背景菌株。水稻普感品 种CO39由本实验室保存,于盆口直径8.5 cm、盆底 直径5.5 cm、高7 cm的盆中种植,每盆种植10株,待 3叶1心期时进行致病性测定,取生长4周的水稻叶 片,剪成长度8~10 cm的叶鞘进行接种试验。

培养基:完全培养基(complete medium,CM)成 分为蔗糖10g/L、蛋白胨6g/L、酵母提取物6g/L、琼 脂粉20g/L;固体米糠培养基(rice bran medium, RBM)成分为米糠40g/L、琼脂粉18g/L,pH6.5; TB3培养基成分为蛋白胨3g/L、蔗糖200g/L、酵母 提取物3g/L、琼脂粉15g/L。培养基均为121℃高 压灭菌20min。

试剂及仪器:高效植物基因组DNA 提取试剂 盒、DNA凝胶纯化回收试剂盒、2×Taq PCR Mix 和 DNA Marker, 天根生化科技(北京)有限公司; Hybond-N⁺膜,英国 Amersham Pharmacia Biotech 公 司; DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I标记和检测试剂盒,瑞士Roche公司; Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase 高保真 DNA 聚合酶,南京诺唯赞生物技术有限公司;裂解酶,德 国Sigma公司;限制性内切酶Hind III和Pst I,美国 Thermo Scientific公司;其他试剂均为国产分析纯。 Olympus BX51 显微镜, 日本 Olympus 公司; PRX-350B培养箱,宁波赛福实验仪器有限公司;ETC811 型PCR仪,北京东胜创新生物科技有限公司;PowerPac HC 电泳仪,美国 Bio-Rad 公司;3500R 凝胶成 像仪、5200型化学发光成像仪,上海天能生命科学 有限公司;HL-2000组合型分子杂交炉,美国UVP 公司;C1564照相机,日本Canon公司。

1.2 方法

1.2.1 稻瘟病菌敲除突变体的构建和验证 利用野生型菌株对新霉素和潮霉素敏感的特 性,体外克隆目的基因以及对应的抗生素基因,基于 同源重组的原理利用抗性基因替换 MoAgo3、 MoDcl2或 MoRdrp2基因的开放阅读框(open reading frame, ORF),获得目的基因的敲除突变体。以 单基因突变体 ΔMoago3为例叙述突变体的构建方 法及 Southern blot验证。其他单基因敲除突变体的 构建方法和 Southern blot 验证同 ΔMoago3 突变体, 双基因敲除突变体的构建过程与单基因敲除突变体 一致,只是在单基因敲除突变体的基础上再敲除另 外1个基因。

ΔMoago3突变体的构建:参照He(2000)方法提 取野生型菌株Guy11的基因组DNA作为模板。从 NCBI数据库中下载 MoAgo3 基因组 DNA 序列,选 取开放阅读框上下游各1kb的序列作为同源片段A 和 B,设计引物对 MoAgo3AF/MoAgo3AR 和 MoAgo3BF/MoAgo3BR(表1),利用高保真DNA聚 合酶分别扩增MoAgo3基因的A片段和B片段。50 µL 目的片段扩增体系:2×Phanta Buffer(含2 mmol/L MgSO₄)25 µL、10 µmol/L 正反向引物各2 µL、dNTP $1 \mu L$ 、基因组 DNA 1 μL 、高保真 DNA 聚合酶 1 μL 、 ddH₂O 18 µL。PCR 反应程序:95 ℃预变性3 min; 95 ℃变性 15 s,60 ℃退火 15 s,72 ℃延伸 30 s,30 个 循环;72 ℃再延伸2 min。利用重叠延伸剪接法将 MoAgo3基因的A片段和B片段分别与新霉素抗性 基因的C端序列和N端序列融合,将融合片段共转 化原生质体,置于含新霉素的TB3平板上培养,挑 取单克隆到新的CM平板上培养3~5d。按照高效 植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取野生型菌 株 Guy11 和突变体 $\Delta Moago3$ 的基因组 DNA, 利用引 物对 MoAgo3tF/MoAgo3tR 检测转化子中 MoAgo3 基因的ORF是否已被敲除,若PCR检测结果为阴 性,则进一步利用引物对MoAgo3DBR/G250R检测 MoAgo3基因ORF是否被新霉素抗性基因替换。20 µL 转化子体系: 2×Taq PCR Mix 10 µL、10 µmol/L 正反 向引物各0.5 µL、基因组DNA 0.5 µL、ddH,O 8.5 µL。 PCR 反应程序:94 ℃预变性3 min;94 ℃变性30 s, 58 ℃退火 30 s,72 ℃延伸1 min,30 个循环;72 ℃再 延伸5 min。当利用引物 MoAgo3DBR/G250R 进行 PCR 检测, 检测结果为阳性的则将其作为候选突变 体进行 Southern blot 验证。

 $\Delta Moago3$ 突变体的 Southern blot 验证:参照 He (2000)方法提取野生型菌株 Guy11 和候选突变体的 基因组 DNA,每个菌株各取 10 μ g DNA,利用 Hind III 限制性内切酶对其酶切 48 h,酶切产物利用 1.5%

琼脂糖凝胶电泳进行分离,将分离后的DNA转移到 Hybond-N⁺膜上。利用高保真DNA聚合酶及引物对 MoAgo3AF/MoAgo3AR扩增*MoAgo3*基因的A片段 制备探针(表2)。PCR扩增体系和程序同目的片段 扩增体系和程序。按照DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I标记和检测试剂盒 说明书进行探针标记、杂交和显色。突变体菌株接 种到铺有1 cm×1 cm滤纸片的RBM培养基上,光照 培养7 d后收集滤纸片置于保菌袋中,于室温下干燥,于-20℃保存。

表1	本研究所用引	物
- M - I		123

Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	序列(5'-3') Sequences (5'-3')	用途Application	
MoAgo3AF	CAACCTCACATCTCGACGGGCT	克隆MoAgo3的A片段	
MoAgo3AR	GTACATGCATGTTGCATGATGATCCCAG- TTTTCCCGCTCGCTCA	Cloning of the A fragment of MoAgo3	
MoAgo3BF	GAAATTGTAAGCGTTAATCTAGAGAAG- GCCAGTTTGCGACGGTAG	克隆 <i>MoAgo3</i> 的B片段 Cloning of the B fragment of <i>MoAgo3</i>	
MoAgo3BR	AAGCGTCGTCAAGTCTTCCCCA		
MoAgo3DBR	CTTAAACTTTGACGGGGGCTGCA	转化子基因型验证	
MoAgo3tF	TGTCCGAGTTCAAAGCCAAGGT	Genotyping of the transformants	
MoAgo3tR	CGACATTTGGACAAATTCCCTCA		
MoDcl2AF	ACGTTATCCGAATGTCGTCCCA	克隆MoDcl2的A片段	
MoDcl2hygAR	TTGACCTCCACTAGCTCCAGCCAAGCC- AGCTCCCTCAGGCTTTTGGGTG	Cloning of the A fragment of <i>MoDcl2</i>	
MoDcl2hygBF	GAATAGAGTAGATGCCGACCGCGGGTT- GCTGGATTTTGTTGTGGGGGGCA	克隆 <i>MoDcl2</i> 的B片段 Cloning of the B fragment of <i>MoDcl2</i>	
MoDcl2BR	GTAGTAGGTAGGCCGCGGTTTC		
MoDcl2UAF	TTGAATAACCAATCCGCTGCCT	转化子基因型验证	
MoDcl2tF	GCATTGTCGAGGCATGGGAGA	Genotyping of the transformants	
MoDcl2tR	CTTTGAGAACGGCTGACCACCT		
MoRdrp2AF2	CAACAGGGCTGGAAACCCAAC	克隆MoRdrp2的A片段	
MoRdrp2g418AR	GTACATGCATGTTGCATGATGATCAATG- TAATGCAATGCGCGTCA	Cloning the A fragment of <i>MoRdrp2</i>	
MoRdrp2hygAR	TTGACCTCCACTAGCTCCAGCCAAGCC- CACTTCAAAGCAAGTCGGGTGA		
MoRdrp2g418BF	GAAATTGTAAGCGTTAATCTAGACACTT- CAAAGCAAGTCGGGTGA	克隆 MoRdrp2 的 B 片段 Cloning the B fragment of MoRdrp2	
MoRdrp2hygBF	GAATAGAGTAGATGCCGACCGCGGGTT- CAATGTAATGCAATGCGCGTCA		
MoRdrp2BR	GGGAGCATAGAAATGGCTGGT		
MoRdrp2DBR	CACTACACCGGCAATTCCCAG	转化子基因型验证	
MoRdrp2tF	TTCCATTGCCATGACTCGCACT	Genotyping of the transformants	
MoRdrp2tR	TACGGTGATGAGAATCCGCAGA		
YG/F	GATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCT	克隆潮霉素磷酸转移酶N	
HYG/R	AACCCGCGGTCGGCATCTACTCTATTC	Cloning of the N fragment of hygromycin resistance gene	
HY/R	GTATTGACCGATTCCTTGCGGTCCGAA	克隆潮霉素磷酸转移酶C	
HYG/F	GGCTTGGCTGGAGCTAGTGGAGGTCAA	Cloning of the C fragment of hygromycin resistance gene	
G418NF	TCTAGATTAACGCTTACAATTTC	克隆新霉素磷酸转移酶N Cloning of the N fragment of G418 resistance gene	
G418NR	CGGCCACAGTCGATGAATCCAG		
G418CF	GCACAACAGACAATCGGCTGCT	克隆新霉素磷酸转移酶C Cloning of the C fragment of G418 resistance gene	
G418CR	ATCATCATGCAACATGCATGTAC		
H853	GACAGACGTCGCGGTGAGTT	转化子基因型验证	
G250R	AATGTCGTCAAGCGGGAACCA	Genotyping of the transformants	

表2 Southern blot 验证稻瘟病菌不同突变体所用酶切位点和制备探针所用 DNA 片段

Table 2 Restriction enzymes and DNA fragments for probes used in Southern blot assays

for different mutants of Magnaporthe oryzae

突变体Mutant	制备探针所用DNA 片段DNA fragment for probe	限制性内切酶 Restriction enzyme
$\Delta Moago3$	MoAgo3基因A片段The A fragment of MoAgo3 gene	Hind III
$\Delta Modcl2$	MoDcl2基因A片段The A fragment of MoDcl2 gene	Pst I
$\Delta Mordrp2$	MoRdrp2基因B片段The B fragment of MoRdrp2 gene	Pst I

1.2.2 不同稻瘟病菌突变体的营养生长情况

为了探究 MoAgo3、MoRdrp2和 MoDcl2基因在 稻瘟病菌生长发育过程中是否存在遗传互作,观察 不同突变体在 CM上的营养生长情况。将稻瘟病菌 野生型菌株 Guy11和突变体 ΔMoago3、ΔModcl2、 ΔMordrp2、ΔMoago3ΔModcl2、ΔMoago3ΔMordrp2、 ΔModcl2ΔMordrp2分别接种至 CM平板上,培养 3~ 4 d后用直径 5 mm的打孔器从菌落边缘打取菌饼接 种至新的 CM平板上,28 ℃倒置培养 7 d后,观察菌 落形态并拍照,测量菌落直径。每个试验技术重复 3次,生物学重复 3次。

1.2.3 不同稻瘟病菌突变体的产孢过程

为检测 MoAgo3、MoRdrp2 和 MoDcl2 基因在稻 瘟病菌无性繁殖过程中是否发挥协同调控作用,对 不同突变体的产孢过程进行观察。分生孢子梗观察 和产孢量测定参照Liu et al. (2010)方法。稻瘟病菌 野生型菌株 Guy11 和突变体 AMoago3、AModcl2、 $\Delta Mordrp2$, $\Delta Moago3\Delta Modcl2$, $\Delta Moago3\Delta Mordrp2$, △Modcl2△Mordrp2的培养方法同1.2.2,用直径5mm 的打孔器从菌落边缘打取菌饼,将其分别接种到固 体RBM上,置于28℃恒温箱中全黑暗倒置培养7d 后,用灭菌玻璃载玻片轻轻刮掉固体RBM表面的气 生菌丝,用无菌手术刀片切取长倒梯形状的菌丝块, 置于干净的载玻片上,其载玻片置于保湿盒中,于 28 ℃光照培养24 h,利用显微镜观察菌丝块侧面生 长出的分生孢子梗及其上着生的孢子数量。每个菌 株观察100个孢子梗。将表面刮掉气生菌丝的固体 RBM 置于28 ℃恒温培养箱中光照培养3~4 d,用 5 mL 双蒸水将孢子从培养基表面洗脱,并用2层擦 镜纸将孢子液过滤到10mL离心管中,用双蒸水定 容到10 mL,吸取10 μL孢子液至血球计数板中,显 微下计数并记录。每个试验技术重复3次,生物学重复 3次。

1.2.4 不同稻瘟病菌突变体对不同胁迫的响应试验 将十二烷基硫酸钠(sodium dodecylsulfate, SDS)、NaCl、山梨醇、H₂O₂和刚果红分别加入到融化 的CM中,摇匀,使其终浓度分别为0.005%、0.5 mol/L、 1 mol/L、10 mmol/L和200 µg/mL。稻瘟病菌野生型 菌株Guy11和不同突变体的培养方法同1.2.2,用直径 5 mm的打孔器从菌落边缘打取菌饼,将其分别接种 到含5种胁迫剂的CM平板上,于28℃下倒置培养 7 d,观察菌落形态并拍照,测量菌落直径,计算抑制 率。抑制率=(对照的菌落直径-处理的菌落直径)/ 对照的菌落直径×100%。每个试验技术重复3次, 生物学重复3次。

1.2.5 不同稻瘟病菌突变体的致病性测定

为探究 MoAgo3、MoRdrp2 和 MoDcl2 基因是否 参与调控稻瘟病菌致病性,采用喷雾接种法(Valent et al., 1991) 测定不同突变体对感病水稻品种 CO39 的致病力。用0.02% 吐温20 溶液分别将稻瘟病菌 野生型菌株和突变体 $\Delta Moago3$ 、 $\Delta Modcl2$ 、 Δ *Mordrp2*, Δ *Moago3* Δ *Modcl2*, Δ *Moago3* Δ *Mordrp2*, $\Delta Modcl2\Delta Mordrp2$ 的分生孢子洗脱,制备浓度均为 5×10⁴个/L的孢子悬浮液,各取10 mL将其分别接 种到3叶1心期的水稻上,每个处理接种3盆,接种 后将其置于黑暗保湿培养24h后光照培养6d,调查 水稻叶片的发病情况并拍照,按照稻瘟病斑等级分 类标准统计叶片上不同等级病斑的数目。每个处理 调查5片叶片,每个处理重复3次,共调查15个叶 片。稻瘟病斑等级分类标准(Valent et al., 1991):1级, 病斑均呈针点状;2级,中央黄褐色病斑直径大小为 0.5~1.0 mm;3级,中央灰色病斑直径大小为2.0 mm; 4级,病斑呈梭形,病斑直径约为3.0~4.0 mm;5级, 病斑直径约为5.0 mm,甚至叶片坏死。

1.2.6 不同稻瘟病菌突变体的侵染试验

为进一步检测 MoAgo3、MoRdrp2 和 MoDcl2 基因是否调控侵染菌丝的生长,显微镜下观察水稻叶鞘中不同突变体侵染菌丝的生长情况。孢子悬浮液的制备及浓度同1.2.5。参考 Kankanala et al.(2007)方法将浓度为1×10⁵个/L的孢子悬浮液接种到长度为8~10 cm的水稻叶鞘上,置于保湿盒中全黑暗培养24 h后取样观察,根据稻瘟病菌侵染菌丝分类标准统计各处理的侵染菌丝类型。每个处理调查3个叶鞘,每个处理重复3次,共调查9个叶鞘。稻瘟病

菌侵染菌丝分类标准:类型1,只形成附着胞,未形成侵染菌丝;类型2,侵染菌丝未形成分枝;类型3, 侵染菌丝已形成分枝,但未穿透相邻细胞;类型4, 侵染菌丝扩展到相邻的植物细胞。

1.3 数据分析

使用 GraphPad Prism 7.0 软件对试验数据进行 统计分析,应用 t 检验法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 稻瘟病菌敲除突变体的构建及验证

通过检测,分别获得2株 $\Delta Moago3$ 、3株 $\Delta Modcl2$ 、3株 $\Delta Mordrp2$ 、2株 $\Delta Moago3\Delta Modcl2$ 、2株 $\Delta Moago3\Delta Mordrp2$ 和5株 $\Delta Modcl2\Delta Mordrp2$ 突变 体。Southern blot验证结果显示,除ΔModcl2ΔMordrp2-10外其余所有候选突变体均未检测到异位插 入的抗性基因片段(图1)。每个突变体各选择1株 菌株进行后续研究。

2.2 不同稻瘟病菌突变体的营养生长

与稻瘟病菌野生型菌株 Guy11 相比, 所有突变体菌落 直径均有减小, 但只有双基因突变体 $\Delta Moago3\Delta Modcl2$ 和 $\Delta Moago3\Delta Mordrp2$ 的菌落直径较野生型菌株 Guy11显著减小(P<0.01), 而其他突变体 $\Delta Moago3$ 、 $\Delta Modcl2$ 、 $\Delta Modcl2\Delta Mordrp2$ 和 $\Delta Mordrp2$ 的菌落直径较野生型菌株 Guy11差异不显著(图 2-A), 表明 MoAgo3可能协同 MoDcl2 或MoRdrp2调控稻瘟病菌的营养生长。



1: 野生型菌株 Guy11; 2~3: 基因敲除突变体 $\Delta Moago3-4 \pi \Delta Moago3-15$; 4~6: 基因敲除突变体 $\Delta Modcl2-3$ 、 $\Delta Modcl2-8$ 和 $\Delta Modcl2-9$; 7~8:基因敲除突变体 $\Delta Moago3\Delta Modcl2-11$ 和 $\Delta Moago3\Delta Modcl2-20$; 9~11: 基因敲除突变体 $\Delta Mordrp2-50$ 、 $\Delta Mordrp2-55 \pi \Delta Mordrp2-92$; 12~13: 基因敲除突变体 $\Delta Moago3\Delta Mordrp2-45 \pi \Delta Moago3\Delta Mordrp2-47$; 14~18: 基因敲 除突变体 $\Delta Modcl2\Delta Mordrp2-5$ 、 $\Delta Modcl2\Delta Mordrp2-10$ 、 $\Delta Modcl2\Delta Mordrp2-19$ 、 $\Delta Modcl2\Delta Mordrp2-29 \pi \Delta Modcl2\Delta Mordrp2-46$ 。 1: Wild type strain Guy11; 2–3: gene knockout mutants $\Delta Moago3-4$ and $\Delta Moago3-15$; 4–6: gene knockout mutants $\Delta Modcl2-3$, $\Delta Modcl2-8$ and $\Delta Modcl2-9$; 7–8: gene knockout mutants $\Delta Moago3\Delta Modcl2-11$ and $\Delta Moago3\Delta Modcl2-20$; 9–11: gene knockout mutants $\Delta Moadcl2-9$; 7–8: gene knockout mutants $\Delta Moago3\Delta Modcl2-11$ and $\Delta Moago3\Delta Modcl2-20$; 9–11: gene knockout mutants $\Delta Mordrp2-50$, $\Delta Mordrp2-55$ and $\Delta Mordrp2-92$; 12–13: gene knockout mutants $\Delta Moago3\Delta Mordrp2-10$, $\Delta Modcl2\Delta Mordrp2-45$ and $\Delta Moago3\Delta Mordrp2-47$: 14–18: gene knockout mutants $\Delta Modcl2\Delta Mordrp2-5$, $\Delta Modcl2\Delta Mordrp2-10$, $\Delta Modcl2\Delta Mordrp2-46$.

图1 稻瘟病菌野生型菌株和不同基因敲除突变体的Southern blot验证

Fig. 1 Southern blot assay for wild type strain and different gene knockout mutants of Magnaporthe oryzae



图2 稻瘟病菌野生型菌株 Guy11 和不同突变体的菌落直径(A)和产孢量(B)

Fig. 2 Quantification of colony diameter (A) and conidiation (B) of wild type strain Guy11

and different mutants of Magnaporthe oryzae

数据为平均数±标准差。*和**分别表示野生型菌株与不同突变体之间经*t*检验法检验差异显著(*P*<0.05或*P*<0.01)。Data are mean±SD. * and ** indicate significant difference between wild type strain and different mutants by *t* test (*P*<0.05 or *P*<0.01).

2.3 不同稻瘟病菌突变体的产孢过程

稻瘟病菌单基因敲除突变体 ΔModcl2 和双基因 敲除突变体 ΔModcl2ΔMordrp2 产孢量分别较野生 型菌株 Guy11 和突变体 ΔMordrp2 显著下降 66.67% (P<0.05); 双基因敲除突变体 ΔModcl2ΔMordrp2 的 产孢量略少于野生型菌株 Guy11, 但两者之间差异 不显著(图 2-B), 表明在 sRNA 生物合成过程中切割 长双链 RNA 的 MoDcl2 在稻瘟病菌产孢过程中发挥 着重要作用。

2.4 不同稻瘟病菌突变体对胁迫的响应

在含 0.005% SDS 的 CM 上,稻瘟病菌双基因敲 除菌株 $\Delta Moago3\Delta Mordrp2$ 的抑制率低于单基因敲 除菌株 $\Delta Moago3$ 和 $\Delta Mordrp2$ 的抑制率,但差异不 显著,表明 MoAgo3 和 MoRdrp2 可能在 SDS 胁迫响 应中发挥负调控作用;在含 0.5 mol/L NaCl和1 mol/L

山梨醇的CM上,所有突变体的抑制率与野生型菌株Guy11的抑制率均差异不显著,表明sRNA生物合成途径主要蛋白MoDcl2、MoRdrp2和MoAgo3可能不参与稻瘟病菌渗透压胁迫响应;在含10mmol/LH₂O₂的CM上,突变体Δ*Modcl2、*Δ*Mordrp2*和Δ*Modcl2*Δ*Mordrp2*的抑制率略高于野生型菌株的抑制率,但差异不显著,表明sRNA生物合成途径主要蛋白MoDcl2、MoRdrp2和MoAgo3可能均不参与稻瘟病菌氧化胁迫响应;在含200 µg/mL刚果红的CM上,单基因敲除突变体Δ*Moago3*Δ*Modcl2*的抑制率明显小于野生型菌株Guy11的抑制率,且双基因敲除突变体Δ*Moago3*和MoRdrp2在维持细胞 壁完整性方面具有重要作用(图3)。



图3 不同胁迫下稻瘟病菌野生型菌株 Guy11 和不同突变体的菌丝生长抑制率

Fig. 3 Inhibition rates of wild type strain Guy11 and different mutants of *Magnaporthe oryzae* under different stresses
图中数据为平均数±标准差。***表示野生型菌株与不同突变体之间经t检验法检验差异显著(P<0.001)。Data are mean±
SD. *** indicates significant difference between wild type strain and different mutants by *t* test (*P*<0.001).

2.5 不同稻瘟病菌突变体的致病性

与稻瘟病菌野生型菌株Guy11相比,单基因敲 除突变体 ΔMoago3、ΔModcl2、ΔMordrp2和双基因 敲除突变体 ΔModcl2ΔMordrp2的致病性略微减弱, 而双基因敲除突变体 ΔMoago3ΔModcl2和 ΔMoago3ΔMordrp2的致病性则明显减弱,其产生 的病斑大部分都呈针点状(图4)。接种野生型菌株 Guy11后,水稻叶片的病斑类型主要以2级和3级为 主;接种单基因敲除突变体 ΔMoago3、ΔModcl2、 ΔMordrp2和双基因敲除突变体 ΔModcl2ΔMordrp2 后,水稻叶片病斑类型以1级和2级为主,3级病斑 数量少于接种野生型菌株Guy11的;而接种双基因 敲除突变体 Δ Moago 3Δ Modcl2和 Δ Moago 3Δ Mordrp2后,水稻叶片病斑类型则以1级为主(图5),表明 MoAgo3、MoRdrp2和MoDcl2参与调控稻瘟病菌的 致病性,并且MoAgo3分别与MoRdrp2或MoDcl2存在一定的互作关系。

2.6 不同稻瘟病菌突变体的侵染菌丝类型

水稻叶鞘中稻瘟病菌野生型菌株Guyl1的侵染 菌丝主要以类型3和类型4为主,水稻叶鞘中单基因 敲除突变体ΔMoago3、ΔModcl2、ΔModcl2和双基因 敲除突变体ΔModcl2ΔMordrp2的侵染菌丝主要以 类型1和类型2为主,类型3和类型4的数量少于野 生型菌株Guyl1,而水稻叶鞘中双基因敲除突变体 $\Delta Moago3\Delta Modcl2$ 和 $\Delta Moago3\Delta Mordrp2$ 的 侵 染 菌 丝则主要以类型 1 为主(图 6),表明 MoAgo3 可以分 别与 MoRdrp2 或 MoDcl2 互作,进而调控稻瘟病菌

侵染菌丝的生长,这个结果也能解释突变体 $\Delta Moago$ $3\Delta Modcl2和\Delta Moago3\Delta Mordrp2致病力减弱,产生的病斑大多数呈针点状。$







图5 接种稻瘟病菌野生型菌株 Guy11 和不同突变体后 水稻叶片病斑等级及其所占比例

Fig. 5 Lesion levels of rice leaves and their percentages inoculated with wild type strain Guy11 and different mutants of *Magnaporthe oryzae* 图中数据为平均数±标准差。Data are mean±SD.

3 讨论

与动植物相似,真菌 sRNA 同样参与调控众多的细胞学过程(Bühler & Moazed, 2007; Moazed, 2009)。本研究通过对稻瘟病菌 sRNA 生物合成途径 3 个主要蛋白 MoAgo3、MoDcl2 和 MoRdrp2 的功能研究发现,它们同样参与不同稻瘟病菌的生长发育和侵染过程。目前已知拟康宁木霉 Trichoderma atroviride 的 sRNA 生物合成途径 Dcl2 和 Rdr3 两个

蛋白参与调控菌丝生长(Carreras-Villaseñor et al., 2013)。本研究结果显示,在野生型菌株Guy11背景 下,MoAgo3可能协同MoDcl2或MoRdrp2正向调控 稻瘟菌丝生长。但是与拟康宁木霉略有不同 (Carreras-Villaseñor et al., 2013), MoDcl2, MoAgo3 和MoRdrp2基因的缺失并未显著影响稻瘟病菌菌 丝的生长。Dcl2在稻瘟病菌菌株Guy11和70-15以 及拟康宁木霉中均参与产孢过程,表明该蛋白可能 具有较保守的功能(Carreras-Villaseñor et al., 2013; Raman et al., 2017)。Raman et al.(2017)研究结果 显示在稻瘟病菌菌株70-15背景下, Ago3和Rdrp2 也不同程度地调控产孢过程,但本研究发现在野生 型菌株 Guy11 背景下, MoAgo3 和 MoRdrp2 基因的 缺失并未导致产孢缺陷。在胁迫响应方面,已知黄 曲霉菌 Aspergillus flavus sRNA 参与环境胁迫响应 (Bai et al., 2015),本研究发现在刚果红胁迫下稻瘟 病菌 MoAgo3 和 MoRdrp2 基因的缺失导致其突变体 菌丝生长较野生型菌株显著抑制。此外,本研究还 发现稻瘟病菌 MoAgo3、MoDcl2 和 MoRdrp2 蛋白均 不同程度地调控侵染过程,并且MoAgo3与MoDcl2 或MoRdrp2还具有叠加效应。越来越多的证据表 明,病原真菌sRNA通过跨界调控寄主免疫反应。 例如,灰葡萄孢Botrytis cinerea sRNA可以劫持拟南 芥Ago蛋白,从而选择性地沉默免疫途径相关基因 (Weiberg et al., 2013); 而禾本科布氏白粉菌 Blumeria graminis sRNA也能靶向寄主基因(Kusch et al., 2018),但是在稻瘟病菌中sRNA是否跨界调控致病 性的机制仍有待进一步研究。





Fig. 6 Types of infected hyphae and their percentages of wild type strain Guy11 and different mutants of *Magnaporthe oryzae* in rice leaf sheath 图中数据为平均数±标准差。Data are mean±SD.

与其他功能相比,在稻瘟病菌中sRNA沉默转 座元件等重复序列以维持基因组稳定性的功能更值 得关注。转座元件等重复序列是介导稻瘟病菌无毒 基因快速变异,从而迅速恢复其对抗性水稻品种侵 染能力的主要驱动力(Wang et al.,2017)。因此,在 稻瘟病菌中研究转座元件转座活性的调控机制对于 阐明稻瘟群体毒性快速变异并致病成灾的机制极为 重要。Murata et al.(2007)和Nguyen et al.(2018)在 麦瘟研究中发现Ago3和Dcl2均参与外源转座元件 MAGGY的转座活性调控。但是迄今为止,稻瘟病 菌转座元件转座活性的调控机制仍不清楚。本研究 发现 MoAgo3可分别与 MoDcl2 或 MoRdrp2 互作, 表明它们可能共同调控某一类或若干具有重要功能 的 sRNA的生物合成。

综上所述,本研究结果对于阐明稻瘟病菌小 RNA生物合成途径介导的致病机理具有重要意义。 同时也为后续开展小RNA介导的稻瘟病菌毒性变 异机制提供了研究思路,但其作用机制仍有待进一 步研究。

参考文献(References)

Bai YH, Lan FX, Yang WQ, Zhang F, Yang KL, Li ZG, Gao PL, Wang SH. 2015. sRNA profiling in *Aspergillus flavus* reveals differentially expressed miRNA-like RNAs response to water activity and temperature. Fungal Genetics and Biology, 81: 113–119

Bühler M, Moazed D. 2007. Transcription and RNAi in heterochro-

matic gene silencing. Nature Structural & Molecular Biology, 14 (11): 1041–1048

- Campo S, Gilbert KB, Carrington JC. 2016. Small RNA-based antiviral defense in the phytopathogenic fungus *Colletotrichum higginsianum*. PLoS Pathogens, 12(6): e1005640
- Cao N, Chen Y, Ji ZJ, Zeng YX, Yang CD, Liang Y. 2019. Recent progress in molecular mechanism of rice blast resistance. Chinese Journal of Rice Science, 33(6): 489–498 (in Chinese) [曹妮, 陈 渊, 季芝娟, 曾宇翔, 杨长登, 梁燕. 2019. 水稻抗稻瘟病分子机 制研究进展. 中国水稻科学, 33(6): 489–498]
- Carreras-Villaseñor N, Esquivel-Naranjo EU, Villalobos-Escobedo JM, Abreu-Goodger C, Herrera-Estrella A. 2013. The RNAi machinery regulates growth and development in the filamentous fungus *Trichoderma atroviride*. Molecular Microbiology, 89(1): 96–112
- Gaffar FY, Imani J, Karlovsky P, Koch A, Kogel KH. 2019. Different components of the RNA interference machinery are required for conidiation, ascosporogenesis, virulence, deoxynivalenol production, and fungal inhibition by exogenous double-stranded RNA in the head blight pathogen *Fusarium graminearum*. Frontiers in Microbiology, 10: 1662
- He YQ. 2000. Improvement of fungal mycelium culture and DNA extraction method. Mycosystema, (3): 434
- Jain R, Iglesias N, Moazed D. 2016. Distinct functions of argonaute slicer in siRNA maturation and heterochromatin formation. Molecular Cell, 63(2): 191–205
- Jih G, Iglesias N, Currie MA, Bhanu NV, Paulo JA, Gygi SP, Garcia BA, Moazed D. 2017. Unique roles for histone H3K9me states in RNAi and heritable silencing of transcription. Nature, 547 (7664): 463–467
- Kankanala P, Czymmek K, Valent B. 2007. Roles for rice membrane dynamics and plasmodesmata during biotrophic invasion by the blast fungus. The Plant Cell, 19(2): 706–724
- Kusch S, Frantzeskakis L, Thieron H, Panstruga R. 2018. Small RNAs from cereal powdery mildew pathogens may target host plant genes. Fungal Biology, 122(11): 1050–1063
- Li Y, Jeyakumar JMJ, Feng Q, Zhao ZX, Fan J, Khaskheli MI, Wang WM. 2019. The roles of rice microRNAs in rice-*Magnaporthe oryzae* interaction.Phytopathology Research, 1(1): 1–12
- Liang LQ, Du HY, Duan JY, Xie BY. 2018. Research advance on the generation and mechanism of small RNAs in fungi. Microbiology China, 45(7): 1563–1573 (in Chinese) [梁丽琴, 杜海燕, 段 江燕, 谢丙炎. 2018. 真菌小 RNA 的发生及其作用机制. 微生 物学通报, 45(7): 1563–1573]
- Liu W, Xie S, Zhao X, Chen X, Zheng W, Lu G, Xu JR, Wang Z. 2010. A homeobox gene is essential for conidiogenesis of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 23(4): 366–375
- Ma JT, Zhang GM, Zhang LY, Deng LW, Wang YL, Wang Y. 2017. Analysis of blast-resistance of rice germplasm and pathogenicity of rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in Heilongjiang Province. Journal of Plant Protection, 44(2): 209-216 (in Chinese) [马军韬,张国民,张丽艳,邓凌韦,王永力,王英. 2017. 黑龙江

省水稻种质抗瘟性及稻瘟病菌致病性分析.植物保护学报,44 (2):209-216]

- Moazed D. 2009. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. Nature, 457(7228): 413–420
- Murata T, Kadotani N, Yamaguchi M, Tosa Y, Mayama S, Nakayashiki H. 2007. siRNA-dependent and-independent post-transcriptional cosuppression of the LTR-retrotransposon MAGGY in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*. Nucleic Acids Research, 35(18): 5987–5994
- Nguyen Q, Iritani A, Ohkita S, Vu BV, Yokoya K, Matsubara A, Ikeda KI, Suzuki N, Nakayashiki H. 2018. A fungal argonaute interferes with RNA interference. Nucleic Acids Research, 46(5): 2495–2508
- Pennisi E. 2010. Armed and dangerous. Science, 327(5967): 804-805
- Qiao Y, Xia R, Zhai J, Hou Y, Feng L, Zhai Y, Ma W. 2021. Small RNAs in plant immunity and virulence of filamentous pathogens. Annual Review of Phytopathology, 59: 265–288
- Qiu YH, Wang CN, Zhang YJ, Zhu SF. 2019. Research advances in the roles of plant small RNAs during viral pathogenicity. Journal of Plant Protection, 46(1): 17-24 (in Chinese) [邱艳红, 王超楠, 张 永江, 朱水芳. 2019. 植物小 RNA 在病毒致病过程中的作用研 究进展. 植物保护学报, 46(1): 17-24]
- Raman V, Simon SA, Demirci F, Nakano M, Meyers BC, Donofrio NM. 2017. Small RNA functions are required for growth and development of *Magnaporthe oryzae*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 30(7): 517–530
- Segers GC, Zhang X, Deng F, Sun Q, Nuss DL. 2007. Evidence that RNA silencing functions as an antiviral defense mechanism in fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(31): 12902–12906
- Talbot NJ. 2003. On the trail of a cereal killer: exploring the biology of

Magnaporthe grisea. Annual Review of Microbiology, 57: 177-202

- Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM. 2017. The RNAi universe in fungi: a varied landscape of small RNAs and biological functions. Annual Review of Microbiology, 71: 371–391
- Valent B, Farrall L, Chumley FG. 1991. Magnaporthe grisea genes for pathogenicity and virulence identified through a series of backcrosses. Genetics, 127(1): 87–101
- Wang BH, Ebbole DJ, Wang ZH. 2017. The arms race between *Magnaporthe oryzae* and rice: diversity and interaction of *Avr* and *R* genes. Journal of Integrative Agriculture, 16(12): 2746–2760
- Wang Q, Lu L, He CX, Fu X, Xu MH, Li JB. 2020. Variation of avirulence gene *AVR-Pia* of *Magnaporthe oryzae* and the effectiveness of rice blast resistance gene *Pia* in Yunnan Province. Journal of Plant Protection, 47(3): 562–571 (in Chinese) [王群, 陆 琳, 何成兴, 伏雪, 许明辉, 李进斌. 2020. 云南省水稻稻瘟病菌 无毒基因 *AVR-Pia* 变异及水稻抗性基因 *Pia* 的有效性. 植物保 护学报, 47(3): 562–571]
- Wang SC, Li PF, Zhang JZ, Qiu DW, Guo LH. 2016. Generation of a high resolution map of sRNAs from *Fusarium graminearum* and analysis of responses to viral infection. Scientific Reports, 6: 26151
- Weiberg A, Wang M, Lin FM, Zhao H, Zhang Z, Kaloshian I, Huang HD, Jin H. 2013. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. Science, 342 (6154): 118–123
- Zanini S, Šečić E, Busche T, Kalinowski J, Kogel KH. 2019. Discovery of interaction-related sRNAs and their targets in the *Brachypodium distachyon* and *Magnaporthe oryzae* pathosystem. bioRxiv, DOI:10.1101/631945

(责任编辑:张俊芳)