



# *Vm-milR21* 调控苹果黑腐皮壳侵染致病的功能和机理

赵彬森<sup>1</sup>, 高承宇<sup>1</sup>, 张健<sup>1</sup>, 冯浩<sup>1,2\*</sup>, 黄丽丽<sup>1,2\*</sup>

1 西北农林科技大学植物保护学院, 陕西 杨凌 712100

2 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西 杨凌 712100

赵彬森, 高承宇, 张健, 冯浩, 黄丽丽. *Vm-milR21* 调控苹果黑腐皮壳侵染致病的功能和机理[J]. 微生物学报, 2023, 63(12): 4738-4751.

ZHAO Binsen, GAO Chengyu, ZHANG Jian, FENG Hao, HUANG Lili. Function and mechanism study of *Vm-milR21* in the infection of apple tree *Valsa* canker pathogen[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(12): 4738-4751.

**摘要:** 苹果黑腐皮壳(*Valsa mali*)引起的腐烂病是苹果最具毁灭性的枝干病害。微小核糖核酸(microRNA-like RNAs, miRNAs)在真菌生长发育、侵染致病和胁迫响应等过程中发挥重要作用。前期研究发现 *Vm-milR21* 在病菌侵染阶段特异性下调表达, 推测其可能参与 *V. mali* 的侵染致病过程。

**【目的】** 本文对 *Vm-milR21* 的功能进行研究。**【方法】** 制备 *Vm-milR21* 前体过表达和沉默转化株, 评价不同转化株与野生型菌株表型差异。进而, 通过实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR)和共转化技术验证 *Vm-milR21* 与其潜在靶标 *Vm-03494* 之间的靶向调控关系。在此基础上, 构建 *Vm-03494* 的基因敲除突变体, 并鉴定突变体表型。**【结果】** 与野生型菌株相比, 过表达转化株的菌丝生长速率以及对叶片和枝条的致病力均大幅降低, 而沉默转化株无明显变化。*Vm-milR21* 能够序列特异性地抑制 *Vm-03494* 表达。相较于野生型菌株, *Vm-03494* 敲除突变体菌丝生长速率和致病力均显著降低。**【结论】** *Vm-milR21* 能够调控靶标基因 *Vm-03494* 表达参与病菌侵染过程。研究结果丰富了对真菌 miRNAs 功能的认知, 同时为全面解析 *V. mali* 的致病机理提供了新的理论依据。

**关键词:** 苹果树腐烂病; 微小核糖核酸; 过表达; 基因敲除

资助项目: 国家自然科学基金(32172375)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32172375).

\*Corresponding authors. E-mail: FENG Hao, xiaosong04005@163.com; HUANG Lili, huanglili@nwsuaf.edu.cn

Received: 2023-05-05; Accepted: 2023-07-11; Published online: 2023-07-19

# Function and mechanism study of *Vm-milR21* in the infection of apple tree *Valsa* canker pathogen

ZHAO Binsen<sup>1</sup>, GAO Chengyu<sup>1</sup>, ZHANG Jian<sup>1</sup>, FENG Hao<sup>1,2\*</sup>, HUANG Lili<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

<sup>2</sup> State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, Yangling 712100, Shaanxi, China

**Abstract:** Apple *Valsa* canker caused by *Valsa mali* is a destructive disease of apple trees. MicroRNA-like RNAs (milRNAs) play an important role in fungal growth and development, pathogenicity, and stress responses. Our previous study had demonstrated that the expression of *Vm-milR21* was significantly down-regulated in the infection, suggesting *Vm-milR21* might be involved in the pathogenicity of *V. mali*. **[Objective]** To reveal the role of *Vm-milR21*. **[Methods]** The strains with overexpression and silencing of *Vm-milR21* precursor were constructed, and the phenotypic characteristics were compared between different transformants and the wild type. Furthermore, the targeting relationship between *Vm-milR21* and *Vm-03494* was verified by Quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and co-transformation. On this basis, the mutant with the knockout of *Vm-03494* was constructed and the phenotype of the mutant was characterized. **[Results]** Compared with the wild type, the transformant overexpressing *Vm-milR21* precursor presented slow mycelial growth and weakened pathogenicity, while the silencing of *Vm-milR21* did not cause significant changes. *Vm-milR21* inhibited the expression of *Vm-03494* in a sequence-specific manner. Compare with the wild type, the mutant without *Vm-03494* presented slow mycelial growth and diminished pathogenicity. **[Conclusion]** *Vm-milR21* plays a role in the infection of *V. mali* by regulating the expression of *Vm-03494*. The results enrich the understanding of the functions of fungal milRNAs and provide a new theoretical basis for comprehensively deciphering the pathogenesis of *V. mali*.

**Keywords:** apple *Valsa* canker; milRNA; overexpression; gene knockout

RNA 干扰(RNA interfering, RNAi)在真核生物中广泛存在, 是由 sRNAs 介导的通过降解 mRNA、抑制基因转录或翻译的转录水平或转录后水平调控机制<sup>[1-2]</sup>。RNAi 通路的核心组分主要包括 dicer (DCL)、argonaute (AGO) 和 RNA-dependent RNA Polymerase (RdRP)等<sup>[3]</sup>。参与 RNAi 的 sRNAs 主要包括 3 类, 即 microRNA (miRNAs)、small interfering RNA (siRNAs) 和 piwi-interacting RNA (piRNAs)<sup>[4]</sup>。

真菌中最早的 RNAi 现象是在粗糙脉胞菌 (*Neurospora crassa*) 中发现的<sup>[5]</sup>。真菌中 sRNAs

的种类和生成途径更为复杂。早期曾认为真菌中不存在 miRNA。直到 2010 年, 首次在 *N. crassa* 鉴定获得了一个与微小核糖核酸 miRNA 具有类似生成机制和作用机制的 sRNA, 被命名为 microRNA-like RNAs (milRNAs)<sup>[6]</sup>。之后, 关于真菌 milRNAs 的研究日渐增加。作为一类重要调控因子, 植物病原真菌 milRNAs 对其侵染致病能力具有重要贡献, 而这种调控机制主要分为两类: 一类 milRNAs 在侵染阶段上调表达, 通过跨界抑制寄主中靶标基因表达或抑制内源靶标基因表达来发挥作用。例如,

尖镰孢番茄专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)的 miRNAs 可通过跨界抑制番茄中的靶标基因表达从而干扰寄主的免疫反应<sup>[7]</sup>；而尖镰孢古巴专化型(*F. oxysporum* f. sp. *cubense*)的 miR-87 能够调控糖基水解酶 *FOIG\_15013* 的降解以增强病菌的致病力<sup>[8]</sup>；另一类 miRNAs 在侵染时期下调表达，通过上调相关靶标基因的表达发挥功能。例如，在大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)的侵染过程中，通过下调表达 *Vd-miR1* 来减少对致病相关基因 *VdHy* 的抑制，进而促进病菌的侵染<sup>[9]</sup>。类似的调控机制在对非苜蓿轮枝菌(*Verticillium nonalfalfae*)、新月弯孢(*Curvularia lunata*)、壳针孢(*Zymoseptoria tritici*)中均有发现<sup>[10-12]</sup>。可见，miRNAs 在植物病原菌侵染致病方面发挥关键作用。但相较于动植物，其功能和机理的研究仍然较少。

苹果是我国农业的重要组成部分，对巩固脱贫攻坚成果、助力乡村振兴和生态文明建设等具有重要支撑作用。然而，作为苹果最具毁灭性的病害，苹果树腐烂病严重威胁苹果产业高质量发展。该病害主要由子囊菌黑腐皮壳(*Valsa mali*)引起<sup>[13]</sup>，主要危害苹果树主干大枝，导致树皮腐解溃烂，枝干枯死，甚至死树毁园。已有研究表明，*V. mali* 的 miRNAs 是关键的致病调控因子，如 *Vm-milR16*、*Vm-milR37* 等能够通过调控 *VmSNF1*、*VmDODA*、*VmHy1* 和 *VmGP* 等多个致病相关基因的表达从而参与病菌的侵染致病过程<sup>[14-15]</sup>。同时，研究还发现 *Vm-milR1* 能够跨界抑制寄主免疫相关基因的表达从而促进病菌的侵染<sup>[16]</sup>。本研究在前期发现 *Vm-milR21* 在病菌侵染时期显著下调表达的基础上，进一步通过遗传学、分子生物学等技术揭示其在病菌侵染致病中的功能及调控机理，为全面解析腐烂病菌的致病机理奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料和载体

苹果树腐烂病菌野生型 03-8、 $\Delta$ Ku80 菌株<sup>[17]</sup>由西北农林科技大学植物保护学院果树病害病原生物学及综合防控研究团队分离保存；富士苹果(*Malus domestica* borkh. cv. 'Fuji')一年生枝条采自陕西省杨陵区实验果园；苹果组培叶片和本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)培养于 22 °C 恒温温室；大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态购自北京擎科生物科技股份有限公司；农杆菌 GV3101 感受态购自上海唯地生物技术有限公司。pDL2、pBIN 表达载体质粒由西北农林科技大学刘慧泉教授惠赠。

### 1.2 试剂和引物

miRcute 多糖多酚植物 miRNA 提取分离试剂盒 DP504 (Tiangen)、E.Z.N.A<sup>®</sup> Gel Extraction Kit (Omega)、Plasmid Mini Kit (Omega)、RevertAid RT 逆转录试剂盒(Thermo)、*Xho* I 限制性内切酶(Thermo)、Phanta Max Super-Fidelity DNA 聚合酶(Vazyme)、ClonExpress II 一步克隆酶(Vazyme)、miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Vazyme)、ChamQ SYBR qPCR Master Mix 预混液(Vazyme)、2 $\times$ ES *Taq* 预混液(Cowin)、崩潰酶(Sigma)、裂解酶(Sigma)、遗传霉素 G418 (Solarbio)、潮霉素 B (Roche)。研究所需引物均委托北京擎科生物科技股份有限公司合成(表 1)。

### 1.3 仪器

生物安全柜、超净工作台、PCR 扩增仪、电泳仪、双光子共聚焦显微镜、凝胶成像系统、NanoDrop 2000、LightCycler 96 real-time PCR machine、高速离心机、水浴锅、恒温摇床、烘箱、冰箱和超低温冰箱等。

### 1.4 *Vm-milR21* 过表达及沉默载体构建

设计引物扩增 *Vm-milR21* 前体序列，并将前体序列与 pDL2 载体连接，构建 *Vm-milR21*

表 1 本试验所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Primer usage
<i>Vm</i> -milR21OE-F	GTAGGAACCCAATCTTCAAATAGATTTTTGGGCGACTGAAGAA	Amplification of
<i>Vm</i> -milR21OE-R	TGAATGTTGAGTGGAATGATTAAGAGGAGCGACCGAAGGGAG	<i>Vm</i> -milR21 precursor
R21-STTM-F	GTAGGAACCCAATCTTCAAATTCGTAGGAACCCAATCTTCAAATA	Amplification of
R21-STTM-R	TGAATGTTGAGTGGAATGATGCCTGAATGTTGAGTGGAATGATGC	<i>Vm</i> -milR21 silencing vector
<i>Vm</i> -03494-1F	ACTCTGATTGTCTTCTGCTTGTGTC	Amplification of <i>Vm</i> -03494
<i>Vm</i> -03494-2R	CAGATACGGCAGAGAAATCGCAACCTCCTAGTGTAGTGATCTCCAG GGTCTC	upstream homologous arm
<i>Vm</i> -03494-3F	GTTTAGATTCCAAGTGTCTACTGCTGGCGAACAACCGACTTCAACA CAAA	Amplification of <i>Vm</i> -03494
<i>Vm</i> -03494-4R	CAACAGCAATACTACGGACACA	downstream homologous arm
<i>Vm</i> -03494-5F	AAGAGGAGGTCAACATGAACGG	Detection of <i>Vm</i> -03494
<i>Vm</i> -03494-6R	GGGGAAAGGATAGGTGAGGAAA	
<i>Vm</i> -03494-7F	AATAGAAGGCAAACAAATCGG	Detection of <i>Vm</i> -03494
<i>Vm</i> -03494-8R	CCACGGCAAGGTAACAGGCAG	replacement
<i>Vm</i> -03494-CF	TACTGGGACCGCTACTGTTGC	Amplification of <i>Vm</i> -03494
<i>Vm</i> -03494-CR	TGGGTTTCTGGTTCTGGATA	knockout vector
G852-F	TCGGCTATGACTGGGCACAACA	Detection of NEO gene
G850-R	GAGCGGCGATACCGTAAAGCAC	
G855-R	TGTTGGGTTTGAGCTAGGTGGGGTGA	Detection of NEO
G856-F	GAATGGTCAAATCAAACCTGCTAGATAT	replacement
Tar- <i>Vm</i> 03494-F	CATTTCATTGGAGAGGACCATGTTGATGGTGTATTTAAGGCCATAG	Amplification of <i>Vm</i> -03494
Tar- <i>Vm</i> 03494-R	GTTGTGTTGAGAATTCTCGATCCGTTCCAAGACGAACGAACACTG	CDS
DT- <i>Vm</i> 03494-1R	GCGATTCTTGAGGGAGGTTTG	Construction of <i>Vm</i> -03494
DT- <i>Vm</i> 03494-2F	CAAACCTCCCTCAAGAATCGC	point mutation fragment
qrt-milR21-F	CGCGTAGTCCTTCCCTCCAGC	Real-time amplification of
qrt-milRNA-TY	AGTGCAGGGTCCGAGGTATT	<i>Vm</i> -milR21
qrt- <i>Vm</i> 03494-F	GCGTGCTTGCTAGTCTTCCT	Real-time amplification of
qrt- <i>Vm</i> 03494-R	CTGCTCTTGTCCACCTGCTT	<i>Vm</i> -03494

过表达载体。参照 Wang 等<sup>[18]</sup>方法, 设计 *Vm*-milR21 的 STTM (short tandem target mimic) 序列, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 后将片段与 pDL2 载体片段相连, 构建 *Vm*-milR21 沉默载体。

### 1.5 *Vm*-milR21 过表达及沉默转化株制备和鉴定

使用聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)介导的原生质体转化法将过表达及沉默载体转化至 *V. mali* 原生质体中<sup>[19]</sup>。使用含潮霉素 B 的 PDA (potato dextrose agar) 平板对转化株进行筛

选。使用 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) 法提取转化株 DNA, 并进行 PCR 检测。

### 1.6 *Vm*-milR21 过表达水平及沉默效率测定

提取野生型和不同转化株的 miRNAs, 并进行实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测。设定 *V. mali* 核内 sRNA *VmU6* 作为内参基因, 表达水平按照  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算<sup>[20]</sup>。将野生型菌丝中 *Vm*-milR21 表达量设定为 1, 计算过表达和沉默转化株中 *Vm*-milR21 的相对表达量。

### 1.7 *Vm-milR21* 靶标基因表达量检测

提取野生型和不同转化株的总 RNA，并进行 qRT-PCR 检测。设定 *V. mali* 核内 *VmG6PDH* 作为内参基因，转录水平计算按照  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法<sup>[20]</sup>。将野生型菌丝中靶标基因表达量设定为 1，计算过表达和沉默转化株中靶标基因的相对表达量。

### 1.8 烟草共表达载体构建

分别扩增 miRNAs 前体序列和靶标基因含靶向区域的序列，将序列分别与 pBIN 表达载体进行连接，得到 pBIN-pri-R21 和 pBIN-含靶向区域片段-绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)表达载体。使用试剂盒对靶标基因表达载体进行序列突变，获得 pBIN-突变的含靶向区域片段-GFP 的表达载体。

### 1.9 *Vm-milR21* 与靶标基因调控关系验证

将不同载体转化至 GV3101 感受态中，参照 Feng 等<sup>[15]</sup>的方法分 4 个处理进行烟草共表达试验。在双光子共聚焦显微镜(奥林巴斯)下观察烟草叶片 GFP 荧光信号并拍照，使用 ImageJ 软件进行 GFP 荧光强度统计<sup>[21]</sup>。提取不同处理的烟草叶片蛋白，通过 Western blotting 试验检测 GFP 蛋白表达水平，使用 ImageJ 软件统计蛋白印迹灰度。使用 GraphPad Prism 5 对数据进行分析处理，并采用 Student's *t*-test 方法进行差异显著性分析。

### 1.10 *Vm-03494* 保守结构域预测

使用美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 搜索并获取 *Vm-03494* 蛋白序列，使用 Conserved domains (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/cdd/wrpsb/cgi>)对基因的保守结构域进行预测分析。

### 1.11 靶标基因敲除突变体制备

设计靶标基因敲除引物(图 1)，使用 Double-joint PCR 技术构建基因敲除盒<sup>[22]</sup>。将敲除盒转化至 *V. mali* 原生质体中，使用含 G418 抗生素的 PDA 平板筛选转化子。提取转化子 DNA，并进行 PCR 检测。当转化子 DNA 不含目的基因片段(*Vm-03494-5F/Vm-03494-6R*)，含有抗性基因片段(G850F/G852R)且抗性片段替换位置(*Vm-03494-7F/G855R*、*G856F/Vm-03494-8R*)正确时，认为该转化子为基因敲除突变体。

### 1.12 营养生长速率测定

将不同菌株分别接种至定量 PDA 培养基上，25 °C 避光培养 48 h 后，测量菌落直径并拍照。每个菌接种 6 个平板，试验重复 3 次。使用 GraphPad Prism 5 对数据进行分析处理，并采用 Student's *t*-test 方法进行差异显著性分析。

### 1.13 致病力评价

参考韦洁玲等<sup>[23]</sup>的研究方法，选取苹果叶片和一年生枝条进行接种。室温静置 1 d 后，测

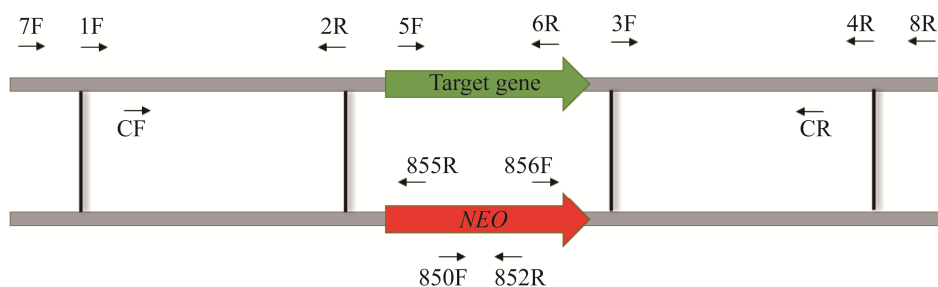


图 1 目的基因敲除载体构建示意图

Figure 1 Diagram of strategy of generation target gene knockout constructs.

量叶片病斑并拍照。每个菌株接种 6 枚叶片；室温静置 3 d 后，测量枝条病斑并拍照。每个菌株接种 6 根枝条，试验重复 3 次。使用 GraphPad Prism 5 对数据进行分析处理，并采用 Student's *t*-test 方法进行差异显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Vm-milR21* 前体过表达转化株与沉默转化株筛选鉴定

通过 PCR 检测，筛选获得 13 个含过表达载体片段和 9 个含沉默载体片段的阳性转化株。利用 qRT-PCR 技术检验各转化子中 *Vm-milR21* 的表达量，获得了过表达和沉默效率较高的转化菌株，*Vm-milR21OE-1*、*Vm-milR21OE-2* 的过表达倍数分别是 7.4 和 11.3 (图 2A)；*Vm-milR21S-6* 和 *Vm-milR21S-11* 的沉默效率分别是 29.4% 和 30.8% (图 2B)。

### 2.2 *Vm-milR21* 过表达转化株表型测定

对野生型菌株和过表达转化株表型进行测定(表 2)，并采用 Student's *t*-test 方法进行差异

显著性分析。相较于野生型菌株，*Vm-milR21* 过表达转化株的菌落明显变小(图 3A)，过表达转化株生长速率分别降低 12.1% 和 18.6% (图 3B)。致病力水平评价发现，*Vm-milR21* 过表达转化株对离体枝条的致病力明显低于野生型菌株(图 3C)，*Vm-milR21OE-1* 和 *Vm-milR21OE-2* 的病斑长度分别降低 62.4% 和 71.3%，差异显著(图 3D)；同时发现，相较于野生型菌株，*Vm-milR21* 过表达转化株对叶片的致病力也明显下降(图 3E)，病斑面积分别降低 47.3% 和 78.4% (图 3F)。

### 2.3 *Vm-milR21* 沉默转化株表型测定

对野生型菌株和沉默转化株表型进行测定(表 3)，并采用 Student's *t*-test 方法进行差异显著性分析。结果表明，*Vm-milR21* 沉默转化株的菌丝生长速率比野生型菌株高 5% (图 4A、4B)，*Vm-milR21* 沉默转化株对枝条致病力不变(图 4C)，其病斑长度与野生型菌株相近(图 4D)；相较于野生型菌株，*Vm-milR21* 沉默转化株对叶片致病力也无明显变化(图 4E、4F)。

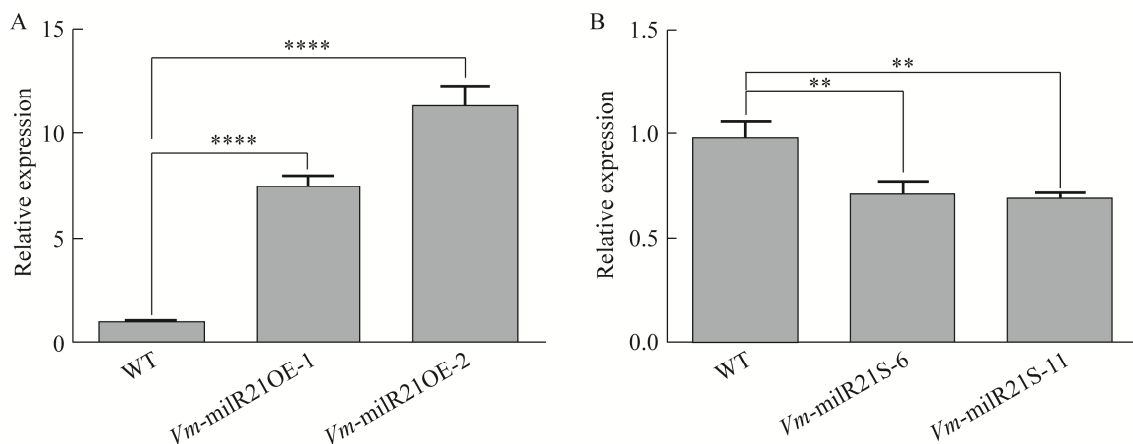


图 2 *Vm-milR21* 前体过表达转化株(A)和沉默转化株(B)效率鉴定

Figure 2 Identify the efficiency of *Vm-milR21* precursor overexpression (A) and silencing transformants (B). Data are  $\bar{x} \pm s$ . Data significant differences were analyzed by Student's *t*-test. \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

表 2 过表达转化株表型数据统计

Table 2 Phenotypic data of overexpression transformants

Strain	Colony diameter (cm)	Lesion length (cm)	Lesion size (cm <sup>2</sup> )
WT	7.70±0.08a	2.62±0.07a	0.66±0.10a
<i>Vm-milR21OE-1</i>	6.77±0.18b	0.98±0.10b	0.35±0.06b
<i>Vm-milR21OE-2</i>	6.27±0.17b	0.75±0.08b	0.14±0.05b

Different letters in the same line are significant compare with wild-type stain ( $P<0.05$ ).

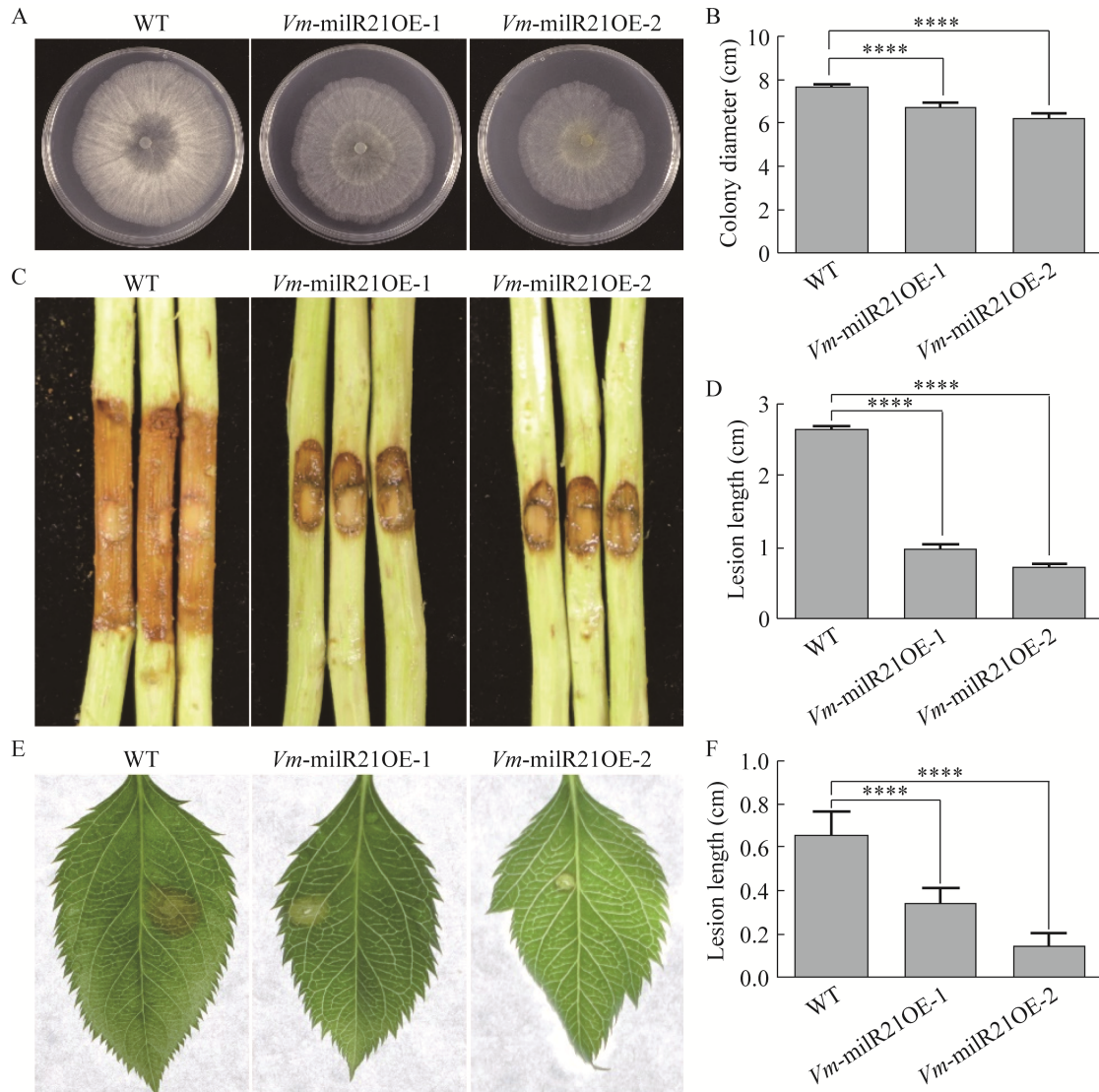
图 3 *Vm-milR21* 前体过表达转化株表型

Figure 3 Phenotype of *Vm-milR21* precursor overexpression transformants. A, B: Vegetative growth rate detection and data statistics of *Vm-milR21* precursor overexpression transformants. C, D: Pathogenicity detection and data statistics of *Vm-milR21* precursor overexpression transformants on twigs. E, F: Pathogenicity detection and data statistics of *Vm-milR21* precursor overexpression transformants on leaves. Data are  $\bar{x} \pm s$ . Data significant differences were analyzed by Student's *t*-test. \*\*\*\*:  $P<0.0001$ .

表 3 沉默转化株表型数据统计

Table 3 Phenotypic data of silencing transformants

Strain	Colony diameter (cm)	Lesion length (cm)	Lesion size (cm <sup>2</sup> )
WT	6.99±0.13a	3.32±0.21a	1.55±0.21a
<i>Vm-milR21S-6</i>	7.37±0.07b	3.23±0.35b	1.35±0.44b
<i>Vm-milR21S-11</i>	7.38±0.05b	3.21±0.48b	1.61±0.37b

Different letters in the same line are significant compare with wild-type stain ( $P < 0.05$ ).

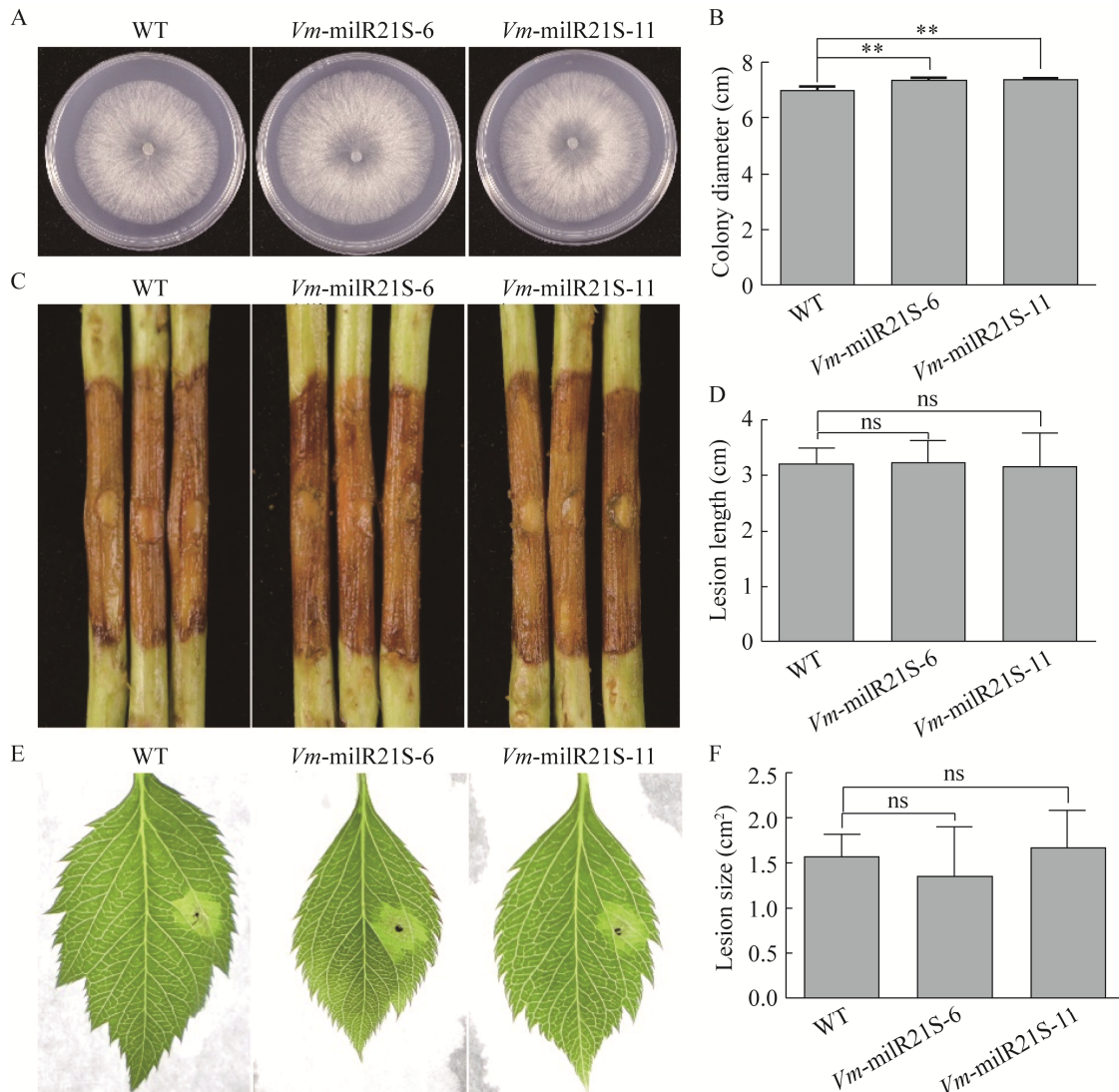
图 4 *Vm-milR21* 前体沉默转化株表型

Figure 4 Phenotype of *Vm-milR21* precursor silencing transformants. A, B: Vegetative growth rate detection and data statistics of *Vm-milR21* precursor silencing transformants. C, D: Pathogenicity detection and data statistics of *Vm-milR21* precursor silencing transformants on twigs. E, F: Pathogenicity detection and data statistics of *Vm-milR21* precursor silencing transformants on leaves. Data are  $\bar{x} \pm s$ . Data significant differences were analyzed by Student's *t*-test. \*\*:  $P < 0.01$ ; ns: No significant difference.



## 2.4 靶标基因鉴定及调控关系验证

基于降解组数据分析<sup>[16]</sup>, 发现 *Vm-03494* 是 *Vm-milR21* 的潜在靶标基因。利用 qRT-PCR 技术检测了 *Vm-03494* 在野生型菌株 03-8、*Vm-milR21* 前体过表达转化株和沉默转化株中的表达情况。结果显示, *Vm-03494* 在过表达转化株内表达量显著下降, 而在沉默转化株中表达量上升(图 5), 初步说明 *Vm-03494* 的表达可能受 *Vm-milR21* 的调控。

进而利用烟草共转化技术验证了 *Vm-milR21* 对靶标基因的调控作用。当 *Vm-milR21* 与靶标基因混合共表达时, GFP 荧光强度明显减弱(图 6A)。统计分析发现, 与对照组相比, 共表

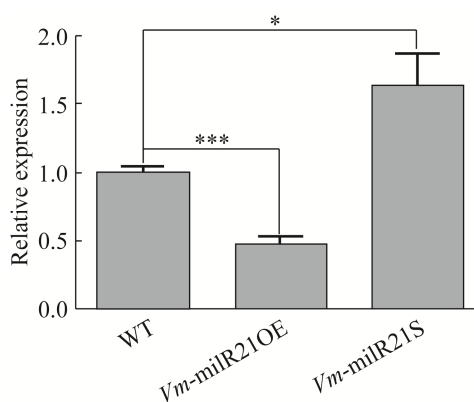


图 5 靶标基因 *Vm-03494* 表达量检测

Figure 5 Detection of target gene *Vm-03494* expression level. Data are  $\bar{x} \pm s$ . Data significant differences were analyzed by Student's *t*-test. \*:  $P < 0.1$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

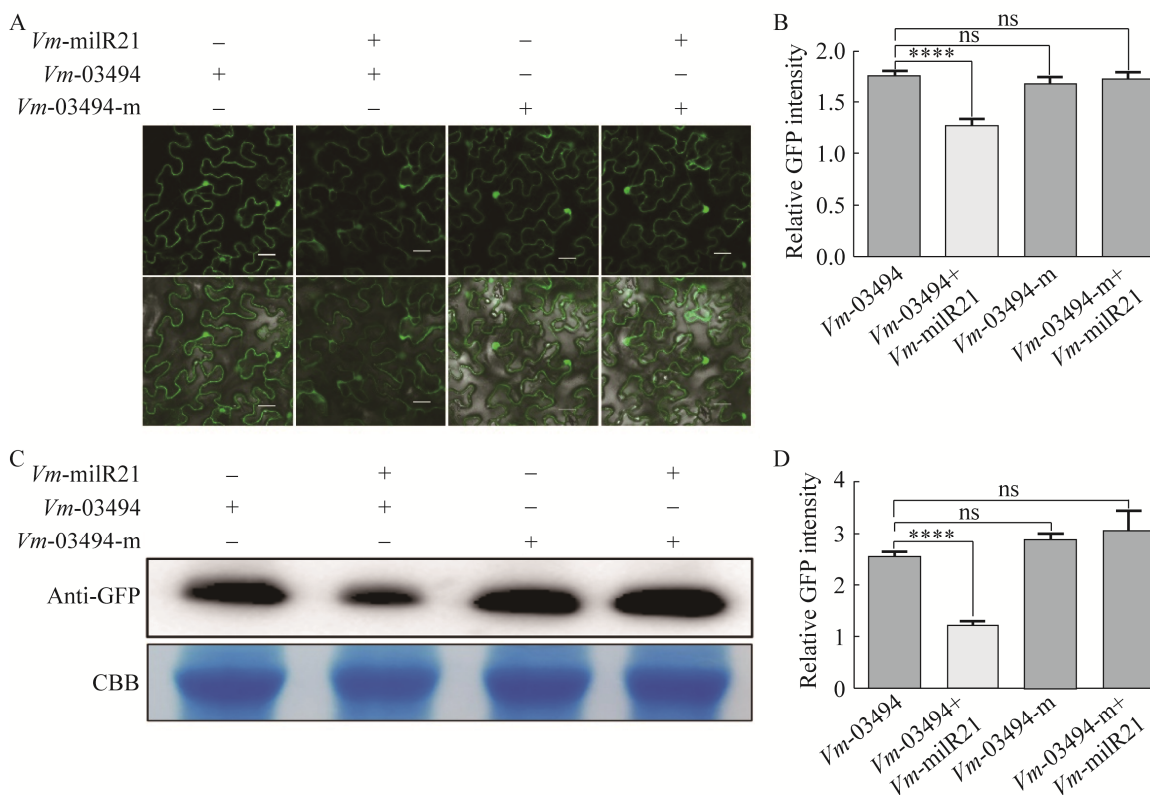


图 6 *Vm-milR21* 与 *Vm-03494* 调控关系验证

Figure 6 Validation of the regulatory relationship between *Vm-milR21* and *Vm-03494*. A, B: Fluorescence expression and fluorescence intensity statistics of GFP of different treatments. Bar=50  $\mu\text{m}$ . *Vm-03494-m*: The mutant of *Vm-03494*. + or - indicates transient expression of the corresponding protein is or isn't expressed in *N. benthamiana*. Blots were stained with Coomassie brilliant blue (CBB) to verify equal loading. C, D: GFP expression and gray level statistics of different treatments. Data are  $\bar{x} \pm s$ . Data significant differences were analyzed by Student's *t*-test. \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ ; ns: No significant difference.

达后荧光强度降低 31.1%，差异显著(图 6B)。进一步检测不同处理组 GFP 蛋白表达情况，发现共表达后 GFP 蛋白量明显减少(图 6C)，表达量减少 51.5%，差异显著(图 6D)。而其他组合之间的 GFP 荧光强度和蛋白表达量与对照相比无明显差异。表明 *Vm-milR21* 与靶标基因 *Vm-03494* 之间存在基于序列特异性的靶向调控关系。

### 2.5 *Vm-03494* 基因功能鉴定

对 *Vm-03494* 的蛋白序列进行分析，发现含有一个 PgsA 结构域，该结构域通常属于 CDP (cytidine diphosphate)-醇磷脂酰转移酶家族，与磷脂生物合成有关。

对靶标基因 *Vm-03494* 进行敲除。通过 4 对

引物检测，从 131 个转化子中筛选获得 2 个阳性转化子，将其命名为  $\Delta Vm-03494-2$  和  $\Delta Vm-03494-5$  (图 7)。

对野生型菌株和敲除突变体表型进行测定(表 4)，并采用 Student's *t*-test 方法进行差异显著性分析。相较于野生型 03-8，*Vm-03494* 敲除突变体的菌丝生长速率明显下降(图 8A)，平均降低 25.1% (图 8B)。对敲除突变体的致病力进行评价，发现突变体菌株对枝条和叶片的致病力与野生型菌株相比均显著降低(图 8C、8E)。 *Vm-03494* 敲除突变体菌株在枝条上的病斑长度平均降低 10.2% (图 8D)，在叶片上的病斑面积平均降低 44.2% (图 8F)。

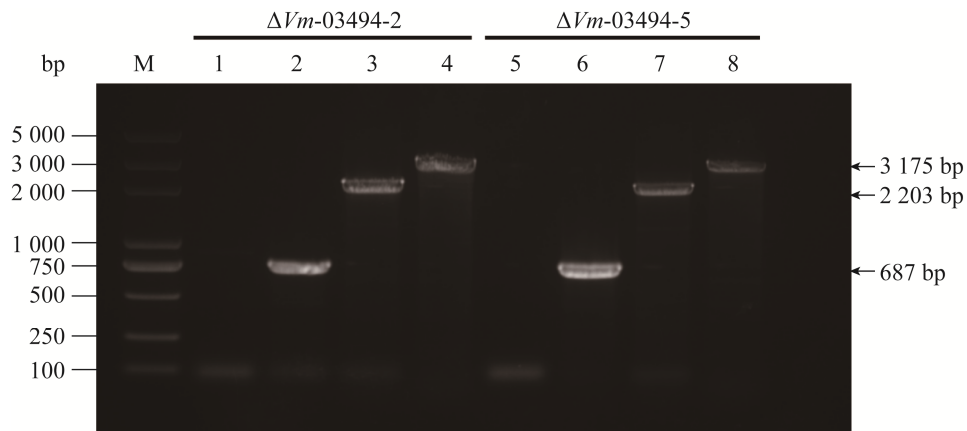


图 7 *Vm-03494* 敲除突变体检测

Figure 7 Detection of *Vm-03494* knockout mutants. M: DNA marker; Lane 1, 5: *Vm-03494* target band; Lane 2, 6: G418 resistant fragment; Lane 3, 7: Knockout carrier upstream homologous arm; Lane 4, 8: Knockout carrier downstream homologous arm.

表 4 敲除突变体表型数据统计

Table 4 Phenotypic data of knockout mutants

Strain	Colony diameter (cm)	Lesion length (cm)	Lesion size (cm <sup>2</sup> )
WT	6.52±0.12a	3.27±0.17a	1.46±0.15a
$\Delta Vm-03494-2$	4.83±0.13b	2.92±0.16b	0.79±0.21b
$\Delta Vm-03494-5$	4.93±0.13b	2.95±0.19b	0.83±0.20b

Different letters in the same line are significant compare with wild-type stain ( $P < 0.05$ ).

## 3 讨论与结论

病菌对寄主的侵染过程中需要多种致病因子的参与，包括毒素、效应蛋白和 sRNA 等<sup>[24-26]</sup>。milRNAs 是真菌重要的一类 sRNA。在早前研究中，已经发现真菌 milRNAs 能够通过调控自身靶标基因的表达参与对寄主的侵染致病过

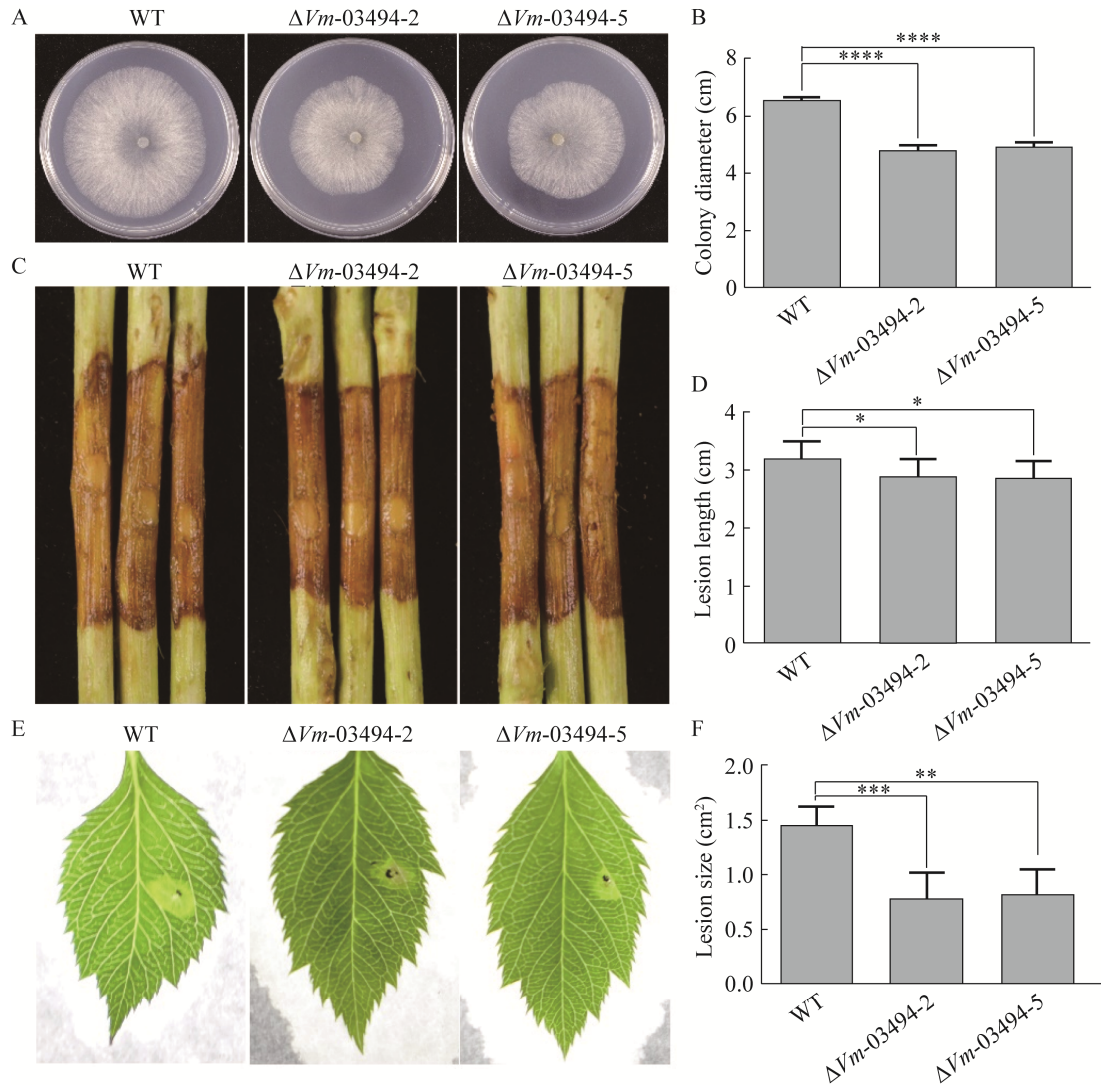


图 8 *Vm-03494* 敲除突变体表型

Figure 8 Phenotype of *Vm-03494* knockout mutants. A, B: Vegetative growth rate detection and data statistics of *Vm-03494* knockout mutants. C, D: Pathogenicity detection and data statistics of *Vm-03494* knockout mutants on twigs. E, F: Pathogenicity detection and data statistics of *Vm-03494* knockout mutants on leaves. Data are  $\bar{x} \pm s$ . Data significant differences were analyzed by Student's *t*-test. \*:  $P < 0.1$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

程。例如，稻巨座壳(*Magnaporthe oryzae*)中的 *Mo-milR236* 能够靶向调控 *MoHAT1* 的表达促进病菌的侵染<sup>[27]</sup>。立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*) 侵染寄主的过程中，*Rhi-milR16* 通过上调靶标基因的表达来增强病菌的致病力<sup>[28]</sup>。前期分析发现，*Vm-milR21* 在侵染时期特异性下调表达，推测其也是一个关键的致病调控因子。

目前，过表达和沉默是研究 *milRNAs* 功能的重要且有效的试验方法<sup>[12,15]</sup>。本文首先通过创建过表达菌株和沉默菌株探究 *Vm-milR21* 对病菌营养生长和致病力的影响。发现 *Vm-milR21* 过表达后对苹果的致病力显著降低，说明 *Vm-milR21* 可能是 *V. mali* 重要的致病调控因子。然而，*Vm-milR21* 沉默转化株的生长速率

在一定程度有所提升, 但致病力未发生显著变化, 推测与 *Vm-milR21* 沉默菌株的沉默效率不高有一定关系。

miRNAs 通过在转录水平或转录后水平降解 mRNA、抑制基因的转录或翻译而参与生物的生长发育、生物或非生物胁迫等各种生命进程<sup>[1-2]</sup>。这种特异的调控机制使得 miRNAs 的表达水平通常与靶标基因相异。因此在侵染时期, 病菌中下调表达的 miRNAs 往往调控与致病正相关的基因。基于降解组数据分析, 发现 *Vm-03494* 可能是 *Vm-milR21* 的潜在靶标基因。通过 qRT-PCR 和共转化技术明确了两者之间的调控关系。

为探究靶标基因功能, 在 *V. mali* 中对 *Vm-03494* 进行敲除, 发现突变体的生长速率及致病力均显著降低。*Vm-03494* 可能属于 CDP-醇磷脂酰转移酶家族蛋白, 该类蛋白在磷脂的生物合成、脂质的转运和代谢等过程中发挥作用<sup>[29]</sup>。本研究发现 *Vm-03494* 敲除突变体表型发生改变, 可能是该基因的缺失破坏了基础代谢, 影响了病菌的营养生长, 从而导致致病力下降。但 *Vm-03494* 敲除突变体的生长速率相较于致病力降低更为显著, 推测在侵染寄主过程中, 基础代谢得到一定程度的弥补, 恢复了部分致病力。然而, *Vm-03494* 的具体作用机理, 仍需进一步试验探究。

前期研究表明, 一个 miRNA 能够靶向多个基因, 而一个基因也可能受到多个 miRNAs 调控<sup>[30-31]</sup>。推测 *Vm-milR21* 可能具有多个致病相关的靶标基因。相较于 *Vm-03494* 敲除突变体, *Vm-milR21* 过表达转化株在生长和致病力方面降低更为显著, 说明转化株中可能有其他靶标基因共同发挥作用。沉默转化株的表型也间接说明 *Vm-milR21* 可能存在其他的靶标基因, 这些靶标受沉默效率影响而未得到足够的

调控, 导致转化株与野生型致病力无显著差异。在真菌中, 类似 *Vm-milR21* 的调控机制并不少见。病原菌在侵染时通过降低自身 miRNAs 的表达来上调致病相关基因的转录水平, 从而提高对寄主的毒力; 在营养生长期, 病原菌通过 miRNAs 抑制这些靶标基因的表达以减少消耗。这种调控机制可能是病原菌对生物能量合理利用的表现, 能够帮助病原菌更好地生存和繁育。

综上, 本研究发现 *Vm-milR21* 通过上调致病相关基因 *Vm-03494* 的表达促进 *V. mali* 的侵染。该结果丰富了对 *V. mali* 中 miRNAs 功能的认知, 为苹果树腐烂病的防控提供了新的理论依据。

## 参考文献

- [1] CHANG SS, ZHANG ZY, LIU Y. RNA interference pathways in fungi: mechanisms and functions[J]. Annual Review of Microbiology, 2012, 66: 305-323.
- [2] HOLOCH D, MOAZED D. RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression[J]. Nature Reviews Genetics, 2015, 16(2): 71-84.
- [3] DANG YK, YANG QY, XUE ZH, LIU Y. RNA interference in fungi: pathways, functions, and applications[J]. Eukaryotic Cell, 2011, 10(9): 1148-1155.
- [4] CHEN XM, RECHAVI O. Plant and animal small RNA communications between cells and organisms[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2022, 23(3): 185-203.
- [5] ROMANO N, MACINO G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences[J]. Molecular Microbiology, 1992, 6(22): 3343-3353.
- [6] LEE HC, LI LD, GU WF, XUE ZH, CROSTHWAITE SK, PERTSEMLIDIS A, LEWIS ZA, FREITAG M, SELKER EU, MELLO CC, LIU Y. Diverse pathways generate microRNA-like RNAs and Dicer-independent small interfering RNAs in fungi[J]. Molecular Cell, 2010, 38(6): 803-814.
- [7] JI HM, MAO HY, LI SJ, FENG T, ZHANG ZY, CHENG L, LUO SJ, BORKOVICH KA, OUYANG SQ.

- Fol-milR1, a pathogenicity factor of *Fusarium oxysporum*, confers tomato wilt disease resistance by impairing host immune responses[J]. *New Phytologist*, 2021, 232(2): 705-718.
- [8] LI MH, XIE LF, WANG M, LIN YL, ZHONG JQ, ZHANG Y, ZENG J, KONG GH, XI PG, LI HP, MA LJ, JIANG ZD. FoQDE2-dependent miRNA promotes *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense virulence by silencing a glycosyl hydrolase coding gene expression[J]. *PLoS Pathogens*, 2022, 18(5): e1010157.
- [9] JIN Y, ZHAO JH, ZHAO P, ZHANG T, WANG S, GUO HS. A fungal miRNA mediates epigenetic repression of a virulence gene in *Verticillium dahliae*[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 2019, 374(1767): 20180309.
- [10] JESENIČNIK T, ŠTAJNER N, RADIŠEK S, MISHRA AK, KOŠMELJ K, KUNEJ U, JAKŠE J. Discovery of microRNA-like small RNAs in pathogenic plant fungus *Verticillium nonalfalfae* using high-throughput sequencing and qPCR and RLM-RACE validation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(2): 900.
- [11] LIU T, HU J, ZUO YH, JIN YZ, HOU JM. Identification of microRNA-like RNAs from *Curvularia lunata* associated with maize leaf spot by bioinformation analysis and deep sequencing[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2016, 291(2): 587-596.
- [12] YANG L, MU XY, LIU C, CAI JH, SHI K, ZHU WJ, YANG Q. Overexpression of potato miR482c enhanced plant sensitivity to *Verticillium dahliae* infection[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2015, 57(12): 1078-1088.
- [13] TOGASHI K. Some studies on a Japanese apple canker and its causal fungus, *Valsa mali*[J]. *Journal of the College of Agriculture, Hokkaido Imperial University*, 1925, 12: 265-324.
- [14] XU M, GUO Y, TIAN RZ, GAO C, GUO FR, VOEGELE RT, BAO JY, LI CJ, JIA CH, FENG H, HUANG LL. Adaptive regulation of virulence genes by microRNA-like RNAs in *Valsa mali*[J]. *New Phytologist*, 2020, 227(3): 899-913.
- [15] FENG H, XU M, GAO YQ, LIANG JH, GUO FR, GUO Y, HUANG LL. Vm-milR37 contributes to pathogenicity by regulating glutathione peroxidase gene *VmGP* in *Valsa mali*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2021, 22(2): 243-254.
- [16] XU M, LI GY, GUO Y, GAO YQ, ZHU LH, LIU ZY, TIAN RZ, GAO C, HAN PL, WANG N, GUO FR, BAO JY, JIA CH, FENG H, HUANG LL. A fungal microRNA-like RNA subverts host immunity and facilitates pathogen infection by silencing two host receptor-like kinase genes[J]. *New Phytologist*, 2022, 233(6): 2503-2519.
- [17] 许铭, 尹志远, 高明煜, 芦文博, 高小宁, 黄丽丽. 苹果树腐烂病菌高效基因敲除受体菌株 $\Delta VmKu80$ 的构建[J]. *西北农业学报*, 2016, 25(2): 298-305.
- XU M, YIN ZY, GAO MY, LU WB, GAO XN, HUANG LL. Construction of enhanced gene deletion frequency recipient strain  $\Delta VmKu80$  in *Valsa mali*[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2016, 25(2): 298-305 (in Chinese).
- [18] WANG YL, WANG ZX, YANG WJ, XIE XY, CHENG HY, QIN L, TANG GL, HUANG B. Degradation of fungal microRNAs triggered by short tandem target mimics is via the small-RNA-degrading nuclease[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(9): 118-131.
- [19] 高静, 李艳波, 柯希望, 康振生, 黄丽丽. PEG介导的苹果腐烂病菌原生质体转化[J]. *微生物学报*, 2011, 51(9): 1194-1199.
- GAO J, LI YB, KE XW, KANG ZS, HUANG LL. Development of genetic transformation system of *Valsa mali* of apple mediated by PEG[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(9): 1194-1199 (in Chinese).
- [20] SCHMITTGEN TD, LIVAK KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [21] WEIBERG A, WANG M, LIN FM, ZHAO HW, ZHANG ZH, KALOSHIAN I, HUANG HD, JIN HL. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways[J]. *Science*, 2013, 342(6154): 118-123.
- [22] YU JH, HAMARI Z, HAN KH, SEO JA, REYES-DOMÍNGUEZ Y, SCAZZOCCHIO C. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2004, 41(11): 973-981.
- [23] 韦洁玲, 黄丽丽, 郜佐鹏, 柯希望, 康振生. 苹果树腐烂病室内快速评价方法的研究[J]. *植物病理学报*, 2010, 40(1): 14-20.
- WEI JL, HUANG LL, GAO ZP, KE XW, KANG ZS. Laboratory evaluation methods of apple *Valsa* canker

- disease caused by *Valsa ceratosperma sensu Kobayashi*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2010, 40(1): 14-20 (in Chinese).
- [24] WANG B, SUN YF, SONG N, ZHAO MX, LIU R, FENG H, WANG XJ, KANG ZS. *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* microRNA-likeRNA 1 (*Pst*-milR1), an important pathogenicity factor of *Pst*, impairs wheat resistance to *Pst* by suppressing the wheat pathogenesis-related 2 gene[J]. New Phytologist, 2017, 215(1): 338-350.
- [25] WANG WD, WANG SL, GONG W, LV LQ, XU LS, NIE JJ, HUANG LL. *Valsa mali* secretes an effector protein VmEP1 to target a K homology domain-containing protein for virulence in apple[J]. Molecular Plant Pathology, 2022, 23(11): 1577-1591.
- [26] FENG YQ, YIN ZY, WU YX, XU LS, DU HX, WANG NN, HUANG LL. LaeA controls virulence and secondary metabolism in apple canker pathogen *Valsa mali*[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 581203.
- [27] LI Y, LIU XY, YIN ZY, YOU YM, ZOU YB, LIU MX, HE YL, ZHANG HF, ZHENG XB, ZHANG ZG, WANG P. MicroRNA-like milR236, regulated by transcription factor MoMsn2, targets histone acetyltransferase MoHat1 to play a role in appressorium formation and virulence of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2020, 137: 103349.
- [28] LIN RM, HE LY, HE JY, QIN PG, WANG YR, DENG QM, YANG XT, LI SC, WANG SQ, WANG WM, LIU HN, LI P, ZHENG AP. Comprehensive analysis of microRNA-Seq and target mRNAs of rice sheath blight pathogen provides new insights into pathogenic regulatory mechanisms[J]. DNA Research, 2016, 23(5): 415-425.
- [29] YAMAMOTO YH, NODA T. Autophagosome formation in relation to the endoplasmic reticulum[J]. Journal of Biomedical Science, 2020, 27(1): 1-6.
- [30] LI Y, CAO XL, ZHU Y, YANG XM, ZHANG KN, XIAO ZY, WANG H, ZHAO JH, ZHANG LL, LI GB, ZHENG YP, FAN J, WANG J, CHEN XQ, WU XJ, ZHAO JQ, DONG OX, CHEN XW, CHERN M, WANG WM. *Osa*-miR398b boosts H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and rice blast disease-resistance via multiple superoxide dismutases[J]. New Phytologist, 2019, 222(3): 1507-1522.
- [31] FENG H, XU M, ZHENG X, ZHU TY, GAO XN, HUANG LL. MicroRNAs and their targets in apple (*Malus domestica* cv. "fuji") involved in response to infection of pathogen *Valsa mali*[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 2081.