

# 香蕉枯萎病致病菌尖孢镰刀菌 4 号生理小种 micro-like RNA 及其靶标基因的鉴定

李静宇<sup>1</sup>, 许林兵<sup>2</sup>, 应帆<sup>1</sup>, 肖维强<sup>2</sup>, 陈谷<sup>1</sup>

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)(2. 广东省农业科学院果树研究所, 广东广州 510640)

**摘要:**香蕉枯萎病已严重威胁香蕉产业的发展, 为了分析香蕉枯萎病致病菌尖孢镰刀菌古巴专化型 4 号生理小种(*Fusarium oxysporum* F. sp. *ubense* race 4, Foc4) 中 miRNA-like (milRNA) 及其调控功能, 本研究构建了 3 个 Foc4 菌株小 RNA 测序文库, 测序得到原始数据 11783990 条, 其中可用于后续 milRNA 鉴定的有效数据 3351578 条, 通过与 miRbase 中植物 miRNA 和已报道的真菌 miRNA 进行比对, 共预测出 7 个保守的和 3 个新型的 milRNA。进而利用降解组测序预测 milRNA 靶基因, 共预测出 53 对 milRNA-mRNA。通过对靶基因进行 GO 和 KEGG 富集分析, 发现 milRNA 与多个代谢通路有关, 包括嘌呤代谢, 甘油磷脂代谢, 硫胺素代谢和三羧酸循环通路等, 对真菌生长发育有重要影响; 同时发现 milRNA 靶向 ABC 转运器 CDR4 和孢子壁成熟蛋白 DIT1, 可能对 Foc4 致病过程具有重要影响。本研究在高通量测序获得 milRNA 的基础上, 首次在香蕉枯萎病致病菌 Foc4 中利用降解组测序分析了 milRNA 靶基因, 对研究真菌 milRNA 调控提供了重要参考, 也为香蕉枯萎病的防治提供了新的思路。

**关键词:**香蕉枯萎病菌 4 号生理小种; milRNA; 降解组测序

文章编号: 1673-9078(2021)02-56-63

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.2.0300

## Identification of Micro RNA-like RNAs and Their Target Genes from *Fusarium oxysporum* F. sp. *ubense* Race 4

LI Jing-yu<sup>1</sup>, XU Lin-bing<sup>2</sup>, YING Fan<sup>1</sup>, XIAO Wei-qiang<sup>2</sup>, CHEN Gu<sup>1</sup>

(1.School of Food Sciences and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2.Institute of Fruit Tree Research, Guangdong Academy of Agriculture Sciences, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** *Fusarium* wilt has seriously threatened the development of the banana industry. In order to analyze the miRNA-like (milRNA) and its regulatory function in the *Fusarium oxysporum* F. sp. *ubense* race 4 (Foc4), three Foc4 mycelia small RNA sequencing libraries were constructed. Totally 11,783,990 raw reads were obtained by sequencing, of which 3,351,578 valid reads can be used for subsequent milRNA identification. Through the comparison with the plant miRNAs in miRbase and the reported fungal miRNAs, seven conservative milRNAs and three novel milRNAs were identified. A total of 53 pairs of milRNA-mRNAs were identified through degradome sequencing to predict milRNA target genes. Through GO and KEGG enrichment analysis of target genes, milRNA was found in association with multiple metabolic pathways, including purine metabolism, glycerophospholipid metabolism, thiamine metabolism, and tricarboxylic acid cycle pathways, and would have an important impact on fungal growth and development. In the meantime, milRNA targeted the ABC transporter CDR4 and spore wall mature protein DIT1, thereby probably influencing the pathogenic process of Foc4. This study is the first to analyze milRNA-targeted genes in the pathogen Foc4 via degradome sequencing after milRNA was obtained by high-throughput sequencing, which provides an important reference

引文格式:

李静宇, 许林兵, 应帆, 等. 香蕉枯萎病致病菌尖孢镰刀菌 4 号生理小种 micro-like RNA 及其靶标基因的鉴定[J]. 现代食品科技, 2020, 37(2):56-63

LI Jing-yu, XU Lin-bing, YING Fan, et al. Identification of micro RNA-like RNAs and their target genes from *Fusarium oxysporum* F. sp. *ubense* race 4 [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 37(2): 56-63

收稿日期: 2020-04-01

基金项目: 广东省公益研究与能力建设专项资金项目 (2015B020202005); 广州市科技计划项目基础与应用基础研究项目 (202002030051)

作者简介: 李静宇 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 功能基因组学

通讯作者: 陈谷 (1973-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 功能基因组学

for studying the regulatory functions of fungal miRNA and new ideas for the prevention and treatment of *Fusarium* wilt.

**Key words:** *Fusarium oxysporum* F. sp. *cubense* race 4; miRNA; degradome sequencing

香蕉枯萎病（也称为巴拿马病）是由真菌尖孢镰刀菌古巴专化型（*Fusarium oxysporum* F. sp. *cubense*, Foc）引起的土传性真菌流行病害，可造成香蕉枯萎黄化甚至死亡，严重威胁香蕉产业的发展<sup>[1,2]</sup>。它在 20 世纪中叶之前摧毁了大蜜哈类（Gros Michel, AAA）香蕉的出口贸易产业，并威胁到用来取代它的香蕉卡文迪许（Cavendish, AAA）品系的生存。卡文迪许品系，因果形大，产量高，货架期长，在产蕉区被广泛种植，卡文迪许品系产蕉量目前占有所有香蕉产量的约 45%。目前，卡文迪许品系仍是产蕉区主要种植品种。然而，香蕉枯萎病菌 4 号生理小种（Foc4）是侵染能力和毒性最强的尖孢镰刀菌生理小种，可以侵染所有卡文迪许品系<sup>[2]</sup>。因而详细研究 Foc4 具有重要科学意义和应用价值。

Micro RNA (miRNAs) 是一类内源性的具有调控功能的非编码 RNA，其大小长约 20~24 个核苷酸<sup>[3]</sup>。MiRNA 在动物，植物，病毒和藻类中广泛存在，在植物中成熟体 miRNA 能通过切割互补配对的靶基因 mRNA 抑制其表达，而动植物中都存在成熟体 miRNA 结合到与其互补的 mRNA 的位点抑制靶基因的翻译<sup>[4]</sup>。真菌中 miRNA 产生机制与动植物中 miRNA 产生机制不同，动植物中 miRNA 成熟体依赖 Dicer 酶剪切作用产生，而在真菌中除了有依赖 Dicer 酶作用产生 miRNA 外，还发现有和 Argonaute 蛋白 QDE-2、核酸外切酶 QIP 和包含 RNase III 结构域的蛋白 MRPL3 结合产生 miRNA 的机制，所以在真菌中它们被称为 miRNA-like (milRNA)<sup>[5,6]</sup>。从 2010 年在链孢霉 (*Neurospora*) 中真菌 milRNA 首次被发现以来，在西瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* F. sp. *niveum*)、红色毛癣菌 (*Trichophyton rubrum*)、小麦锈菌 (*Puccinia triticina*)、金龟子绿僵菌 (*Metarhizium anisopliae*)、葡萄座腔菌 (*Botryosphaeria dothidea*)、新月弯孢霉 (*Curvularia lunata*)、核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*)、马尔尼菲青霉菌 (*Penicillium marneffei*)、番茄枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* F. sp. *lycopersici*)、里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 和灰盖鬼伞菌 (*Coprinopsis cinerea*) 中相继报道了 milRNA 的鉴定和分析<sup>[4,5,7-16]</sup>。大部分真菌 milRNA 鉴定均先通过与 miRbase 中植物或动物前体和成熟体比对鉴定保守 milRNA，再通过发夹结构原则鉴定新型 milRNA；进而根据利用软件预测 milRNA 的靶标基因，预测其潜在功能。并发现真菌 milRNA 对真菌生

长发育及致病机制具有重要调控作用。

迄今为止，国内外尚未见期刊文献报道香蕉枯萎病致病菌尖孢镰刀菌(Foc)的小分子 RNA(miRNA)，仅在孟春亮的硕士论文中提及对 Foc4 进行的小分子 RNA 测序鉴定<sup>[17]</sup>，但未对 Foc4 进行降解组测序寻找 miRNA 的靶基因并深入研究。相对于植物和动物，真菌滞后的 miRNA 研究阻碍了 Foc4 miRNA 的研究和应用。因而，本研究通过小分子 RNA 高通量测序鉴定 Foc4 菌丝中 miRNA，并通过降解组测序预测 miRNA 的靶基因，阐述 Foc4 中 miRNA 可能的调控功能，为更好地研究 Foc4 和香蕉枯萎病奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本实验所用香蕉枯萎病菌 4 号生理小种购于广东省微生物研究所菌种保藏与应用重点实验室。购回后在本实验室进行活化培养，使用 18S 测序鉴定其种属。挑取 Foc4 菌丝于 PDA 培养基中 28 °C 中恒温培养 9 d，收集平板上真菌菌丝保存于负 80 °C 冰箱中，用于后续测序。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 小 RNA 文库构建及测序

将实验样本 Foc4 菌丝送至杭州联川生物有限公司进行小 RNA 及降解组测序。采用天根 DP441 试剂盒提取其总 RNA，然后采用 TruSeq Small RNA Sample Prep Kits (Illumina, San Diego, USA) 试剂盒按照标准流程进行小 RNA 文库制备。文库制备工作完成后，对构建好的文库使用 Illumina HiSeq2000/2500 进行测序，测序读长为单端 1×50 bp。

#### 1.2.2 小 RNA 测序数据处理

首先对下机的原始数据进行测序质量评估，评估之后再对数据进行处理。本实验使用联川生物 miRNA 数据分析软件 ACGT101-miR (LC Sciences, Houston, Texas, USA) 进行分析，该软件的分析流程如下：(1) 去除 3' 接头和垃圾序列；获取 clean data；(2) 长度筛选：筛选出 clean data 中碱基长度在 18~25 nt 的数据；(3) 各种 RNA 数据库比对分析：将 18~25 nt 序列与不包含 miRNA 的 mRNA、RFam<sup>[18]</sup> 和 Rfam 数据库进行比对，若比对上这些数据库，则过滤这些非 miRNA 数据，剩余序列为有效数据。

### 1.2.3 miRNA 鉴定

将有效数据与miRBase<sup>[19]</sup>数据库中植物miRNA和文献中报道的真菌<sup>[4,7,9,10,12]</sup>的前体及成熟体序列比对,详见附表3,其中使用的Foc4参考基因组为第三代测序组装所得<sup>[20]</sup>,并且根据其比对情况对其进行分组,gp1a是测序物种本身已报道的,known miRNAs; gp1b, 2a, 2b, 3是保守的conservative miRNAs, gp2有基因组位置支撑, gp3没有基因组位置支撑, gp2a有前体基因支撑, gp2b没有前体基因支撑; gp4是新的novel miRNAs; 具体各组分类标准如下所示:

(1) gp1a为可以比对到miRBase已知的首选物种前体(pre-miRNAs), 并且前体可以进一步比对到基因组。

(2) gp1b Reads可以比对到miRBase已知的选择物种的前体(pre-miRNAs), 并且前体可以进一步比对到基因组。

(3) gp2a Reads可以比对到miRBase选择物种的前体(pre-miRNAs), 前体不能进一步比对到该物种的基因组, 但是reads可以比对到基因组上。延伸的基因组序列可以形成满足11条原则发夹结构。

(4) gp2b Reads可以比对到miRBase选择物种的前体(pre-miRNAs), 前体不能进一步比对到该物种的基因组, 但是reads可以比对到基因组上。延伸的基因组序列不可以形成满足11条原则发夹结构。

(5) gp3a Reads可以比对到miRBase选择物种的前体(pre-miRNAs), 前体不能进一步比对到基因组, reads也不可以比对到基因组上。cluster中比对上的Reads数目拷贝数>1, 代表性的Reads分值>260, 没有错配。

(6) gp4a Reads不能比对到miRBase选择物种的前体(pre-miRNAs), reads可以比对到基因组上。延伸的基因组序列可以形成满足11条发夹结构原则。

### 1.2.4 降解组文库构建及测序

降解组测序的原理: 在植物体内绝大多数的miRNA是利用剪切作用调控靶基因的表达, 且剪切常发生在miRNA与mRNA互补区域的第十位核苷酸上。靶基因经剪切产生两个片段, 5'剪切片段和3'剪切片段。其中3'剪切片段, 包含有自由的5'单磷酸和3'polyA尾巴, 可被RNA连接酶, 连接产物可用于下游高通量测序; 而含有5'帽子结构的完整基因, 含有帽子结构的5'剪切片段或是其他缺少5'单磷酸基团的RNA是无法被RNA酶连接, 因而无法进入下游的测序实验; 对测序数据进行深入地比对分析, 可以直观地发现在mRNA序列的某个位点会出现一个波峰, 而该处正是候选的miRNA剪切位点。

降解组文库包含以下步骤: 1.通过磁珠捕获mRNA, 3.5'adaptor连接; 2.Biotinylated Random Primers和mRNA的混合反转录; 3.PCR扩增, 完成整个文库制备工作后, 构建好的文库用Illumina HiSeq2000/2500进行测序, 测序读长为单端1×50 bp。

### 1.2.5 降解组测序数据处理及分析

将下机后的降解组数据进行如下分析:

(1)测序获得的原始数据通过一系列数据处理得到可用于后续分析的可比对测序序列。

(2)将可比对序列与测序物种的cDNA数据库序列比对生成降解组密度文件(degradome density file)。

(3)通过剪切位点预测软件(GSTAr)预测出与测序物种小RNA序列配对的靶基因mRNA序列。

(4)将预测的miRNA对应的靶基因和生成降解组密度文件中的mRNA进行结合运算, 找出共同具有的mRNA, 该mRNA即为miRNA的靶基因。并给出降解组的峰值分类和分值, 并对产生的预测结果进行作图(t-plots)。降解组峰值分类Category 0表示原始数据片段在该位置, 丰度等于该转录RNA上的丰度最大值, 并且只有1个最大值; Category 1表示原始数据片段在该位置, 丰度等于该转录RNA上的丰度最大值, 并且不只1个丰度最大值; Category 2表示原始数据片段在该位置, 丰度小于该转录RNA上的丰度最大值, 但却大于该转录RNA上的丰度中间值; Category 3表示原始数据片段在该位置, 丰度小于或等于该转录RNA上的丰度中间值; Category 4表示原始数据片段在该位置, 只有1个与该转录RNA比对上。降解组等级代表miRNA剪切靶基因得到片段的丰度情况, 降解组等级越低代表预测的靶基因越可靠。

### 1.2.6 miRNA 功能分析

对通过降解组测序获得的miRNA靶基因进行GO和KEGG功能富集分析, 并结合KEGG数据库中的代谢通路描述、基因功能预测和基因注释信息, 查阅相关文献中基因功能, 对miRNA靶基因功能进行解析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 小RNA测序数据的统计与分析

如表1所示, 小RNA测序共获得11783990条原始数据(raw reads), 原始数据去除重复数据后得到unique reads为2326111条。首先去除原始数据中接头和垃圾序列等低质量片段, 然后对清洁读数进行长度筛选, 保留18~25 nt长度的序列。图1为18~25 nt长

度序列的统计分布。将 18~25 nt 序列与不包含 miRNA 的 mRNA、RFam 和 Repbase 数据库进行比对, 若比对上这些数据库, 则过滤这些非 miRNA 数据, 剩余序列为有效数据 (valid reads)。比对数据库后, 获得有效数据条数 3351578 条, 占原始数据的比例为 28.44%。有效数据去除重复后得到 unique reads 为 744349 条, 用于鉴定 Foc4 中 miRNA。

表 1 小 RNA 文库组成

Table 1 Composition of the small RNA library

Library type	Total reads/%	Unique reads/%
Raw reads Cut adapter and length filter	11783990 (100.00)	2326111 (100.00)
Junk reads	7553814 (64.10)	1563106 (67.20)
Rfam	26180 (0.22)	4822 (0.21)
Repeats	847665 (7.19)	13691 (0.59)
Valid reads	6201 (0.05)	179 (0.01)
	3351578 (28.44)	744349 (32.00)

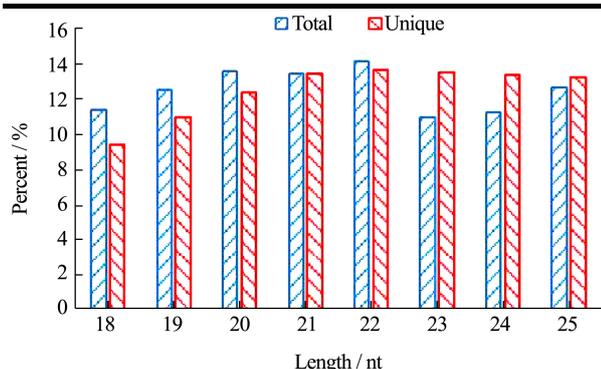


图 1 小 RNA 长度分布

Fig.1 Size distribution of small RNAs

## 2.2 miRNA 的鉴定分析

将测序得到的 valid reads 与 miRbase 中植物和文献中收集得到的真菌 miRNA 成熟体及前体序列 (附表 3) 比对, 如表 2 所示, 鉴定获得 Foc4 中 7 个保守的 (conservative) miRNA, 包括 4 个与真菌比对上的 miRNA (Foc-milR1, Foc-milR2, Foc-milR3 和 Foc-milR4) 和 3 个与植物比对上的 miRNA (Foc4-milR5, Foc4-milR6 和 Foc4-milR7), 还有 3 个新型的 (novel) miRNA (Foc4-novel milR1, Foc4-novel milR2 和 Foc4-novel milR3), 详细信息见表 1。其中 4 个与真菌比对上的 miRNA 分组为 gp1b, 即比对到 miRbase 已知的选择物种的前体 (pre-miRNAs), 并且前体可以进一步比对到基因组。例如, Foc4 中预测的 Foc4-milR4 与番茄枯萎病菌 (Fon) 中 fon-miR-1-m0017 比对上, R-1 代表 Foc4-milR4 右端少掉 1 个碱基, 且其前体可以进一步比对到 Foc4 基因组。三个与植物比对上的 miRNA 分

组为 gp2a, 表示可与植物前体比对上, 但该植物前体并不能比对上 Foc4 基因组, 该成熟体 miRNA 可以比对到 Foc4 基因组上, 且在成熟体 miRNA 周围延伸的基因组序列可以形成满足 11 条发夹结构原则的前体。Foc4-milR5, Foc4-milR6 和 Foc4-milR7 分别与多个 miRbase 已知 miRNA 比对上被注释为: mtr-MIR5229a-p3\_2ss16AG18TG, ppe-MIR399k-p5\_2ss13GC20GA 和 zma-MIR162-p3\_2ss4GA19AT。Foc4-milR7 的注释为 zma-MIR162-p3\_2ss4GA19AT 表示可与 miRbase 中玉米 (Zea mays) 前体 MIR162 比对上且位于前体的 3' 端, 且 2ss4GA19AT 表示在第 4 个碱基 G 由 A 替换, 在第 19 个碱基 A 由 T 替换, 共计 2 个替换, 且其分组为 gp2b, 表示玉米前体 MIR162 不能比对上 Foc4 基因组。可以发现, 三个与植物比对上的 Foc4-miRNA 成熟体中都存在两个碱基的替换, 且比对上的前体都不能比对上 Foc4 基因组, 表明 miRNA 虽然在植物和真菌间有保守的成熟体, 但其前体在植物和真菌间变化差异较大。

3 个 novel miRNA 其分组为 gp4a, 表示该序列不能比对上 miRbase 中已选择物种的前体, 但可以比对上 Foc4 基因组上, 且延伸基因组序列可以形成满足 11 条发夹结构原则的前体。

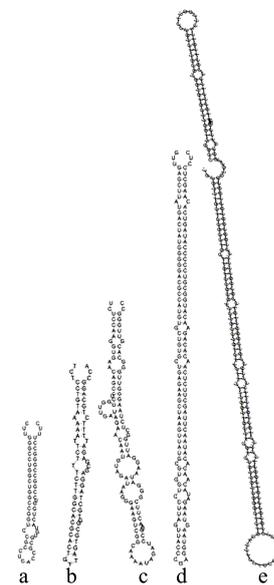


图 2 miRNAs 前体发夹结构

Fig.2 The hairpin structures of miRNAs precursors

注: a: Foc4-milR7; b: Foc4-milR6; c: Foc4-milR5; d: Foc4-novel milR2 和 Foc4-novel milR3; e: Foc4-novel milR1。

在十个鉴定 miRNA 中, Foc4-milR3 和 Foc4-novel milR3 的表达量较高, 表明香蕉枯萎病菌 Foc4 的 miRNA 可能具有重要作用。图 2 所示为 gp2a 分组和 gp4a 分组 miRNA 的前体发夹结构。所鉴定的 miRNA 中最短的 Foc4-milR7 的前体长度为 56 nt, 而最长的

Foc4-novel milR1 的前体长度为 233 nt, 可以发现真菌 milRNA 的前体长度变化非常大, 有研究也发现在链

孢霉和灰盖鬼伞菌中 milRNA 的前体长度也非常的灵活<sup>[5,16]</sup>。

表 2 Known and predicted milRNA

Table 2 Summary of known and predicted milRNA in Foc4

milRNA name	milRNA sequence (5' to 3')	Abundance	Locus of Precursors	Group
Foc4-milR1	GGTGAGATGGCCGAGTTGGTTATG	1.24	GWHAAS_9_+_2047204_2047422	gp1b
Foc4-milR2	TAGGGGGTGGTTGGTTTCGTTTATG	1.10	GWHAAS_4_+_3440316_3440595	gp1b
Foc4-milR3	TGCGTTGGAGTCACAGCTCGTA	1215.79	GWHAAS_8_+_2774618_2774945	gp1b
Foc4-milR4	AGGGTGGCAGAGTGCAGGGGC	45.45	GWHAAS_7_-_1970802_1970944	gp1b
Foc4-milR5	AGGGTTGGTCACGTTGGGC	13.12	GWHAAS_2_-_4805057_4805169	gp2a
Foc4-milR5	AGGGTTGGTCACGTTGGGC	13.12	GWHAAS_2_-_4812929_4813128	gp2a
Foc4-milR6	TCTTTCTTGGCACGCACTGA	5.48	GWHAAS_4_-_1749188_1749257	gp2a
Foc4-milR7	TGTACTGGTCCGCGCGGT	35.04	GWHAAS_2_-_4808626_4808682	gp2a
Foc4-milR7	TGTACTGGTCCGCGCGGT	35.04	GWHAAS_2_-_4840113_4840191	gp2a
Foc4-novel milR1	TCTTGCTGTCGGGTAGAC	1.86	GWHAAS_3_+_4461889_4462122	gp4a
Foc4-novel milR2	TGGCGTCCCCATAGTCATAA	67.33	GWHAAS_4_+_4228668_4228815	gp4a
Foc4-novel milR3	TGTGACTATGGGGGACGCCA	1329.68	GWHAAS_4_+_4228668_4228815	gp4a

### 2.3 milRNA 靶基因的分析鉴定

进而对 Foc4 菌丝进行降解组测序, 产出原始数据 27984500 条, 去除重复后得到 unique raw reads 为 6695437 条, 除去 3' 接头后剪切位点标签较短 (<15 nt) 的序列后, 能比对上 Foc4 转录本数据库的序列 (Mapped Reads) 为 19773216 条, 占 raw reads 的比率为 70.66%, unique Mapped Reads 为 4848061 条, 占 Unique Raw Reads 的比率为 72.44% (表 3), 依此生成降解组密度文件。将 Targetfinder 软件根据碱基互补配对预测的靶基因和降解组测序所收集到的剪切片段结合运算, 找出共同拥有的 mRNA, 即为 Foc4 milRNA 的靶基因。

表 3 降解组数据总览

Table 3 Data summary of degradome sequencing

Sample	Foc4 (number)	Foc4 (ratio)/%
Raw Reads	27984500	-
Unique Raw Reads	6695437	-
reads < 15nt after removing 3' adaptor	101224	0.36
Mappable Reads	27883276	99.64
Unique reads < 15nt after removing 3' adaptor	28498	0.43
Unique Mappable Reads	6666939	99.57
Mapped Reads	19773216	70.66
Unique Mapped Reads	4848061	72.41
Number of input Transcript	15519	-
Number of Covered Transcript	13336	85.93

降解组测序总共预测出 53 对 milRNA-mRNA, 有 7 个 milRNA 通过降解组测序发现其潜在靶基因, 分别为 Foc4-milR2, Foc4-milR4, Foc4-milR5, Foc4-milR6, Foc4-milR7, Foc4-novel milR1 和 Foc4-novel milR3。其中, Foc4-novel milR1 所调控靶基因数目最多为 27 个, 其靶基因注释包括染色质结构重塑复合亚基 snf21 (Chromatin structure-remodeling complex subunit snf21), 腺苷酸脱氢酶 (AMP deaminase), 细胞壁合成蛋白 psu1 (Cell wall synthesis protein psu1), 线粒体 ATP 合成酶亚基  $\alpha$  (ATP synthase subunit alpha, mitochondrial), 苹果酸脱氢酶 (malate dehydrogenase), ABC 转运器 CDR4 (ABC transporter CDR4), 假定螺旋酶 mug81 (Putative helicase mug81), 线粒体细胞色素 b-c1 复合亚基 Rieske (cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial), 过氧化物生物发生因子 19 (Peroxisomal biogenesis factor 19) 和孢子壁成熟蛋白 DIT1 (Spore wall maturation protein DIT1) 等。此外, Foc4-milR5 调控 14 个靶基因, 其中靶基因编码 F 型转运氢离子的 ATPase 亚基 C (F-type H<sup>+</sup>-transporting ATPase subunit C), 碱性神经酰胺酶 (alkaline ceramidase), 羟异羟乙酸水解酶 (hydroxyisourate hydrolase) 和 CAMKK 蛋白激酶 (CAMKK protein kinase) 等。Foc4-novel milR3 是表达水平最高的 milRNA, 其靶基因编码乌头水合酶 (Aconitate hydratase), 3-植酸酶 A (3-phytase A) 和真核翻译起始因子 3 亚基 B (eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B) 等。其他 milRNA 靶基因详细信息见表 2。图 3 列出了几个 milRNA 与其靶标

基因的 T-plot 图, 例如图 3a 中, *Foc4-milR2* 靶向基因 *Foc4\_580068650*, 降解组等级 (category) 为 2, *milRNA* 剪切位点在靶基因 1880 处 (T-plot 图中红色点标记处)。

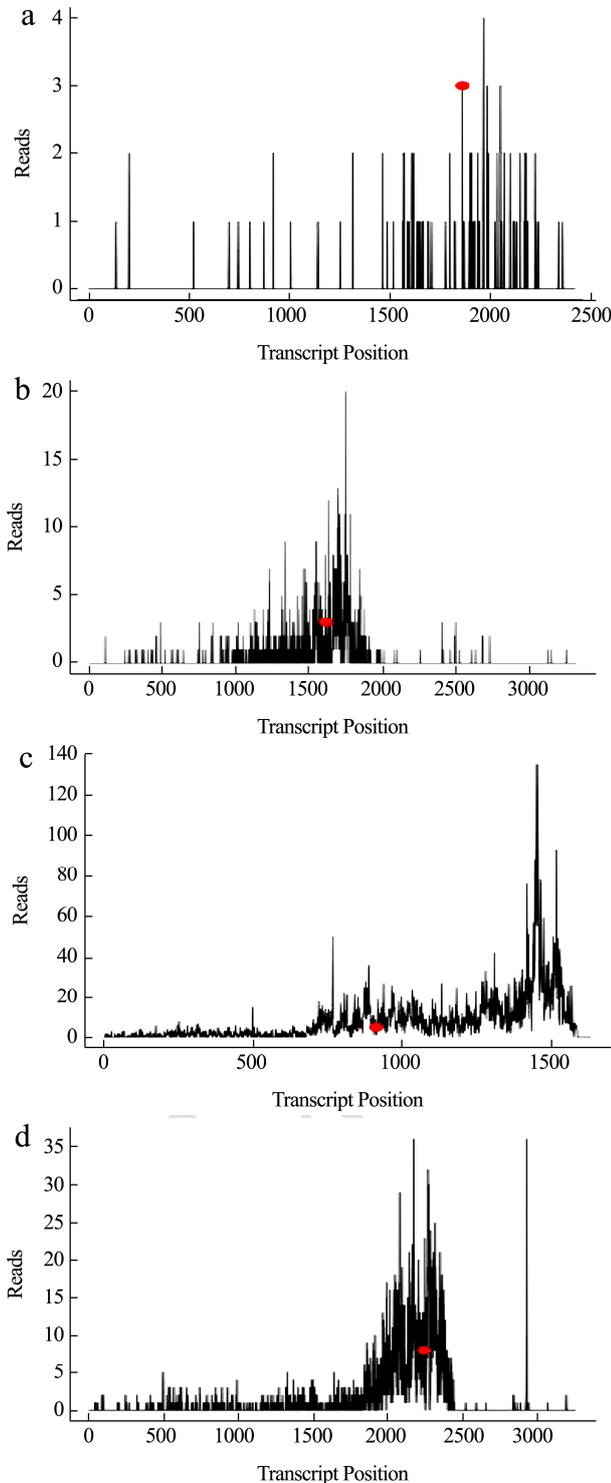


图 3 T-plot 图

Fig.3 T-plot images

注: 横坐标代表 mRNA 位置, 纵坐标代表读数, 红色圆点所在处的直线横坐标代表 *milRNA* 切割位点, 纵坐标表示该位点收集的 mRNA 片段的读数。

从表 2 中发现, Targetfinder 软件通过碱基互补配对对 *milRNA* 靶基因进行评分 (AllenScore), *milRNA* 所有靶基因均不是完全匹配的, 且匹配率最高的 *milRNA*-mRNA 的 AllenScore 为 3.5 分。在链孢霉中绝大多数 *milRNA* 也没有发现完美匹配的靶基因, 推断真菌 *milRNA* 可能靶向不完全互补的序列<sup>[5]</sup>。Foc4 中 *milRNA* 也可能是通过靶向不完全互补的基因发挥调控作用。

## 2.4 靶基因功能分析

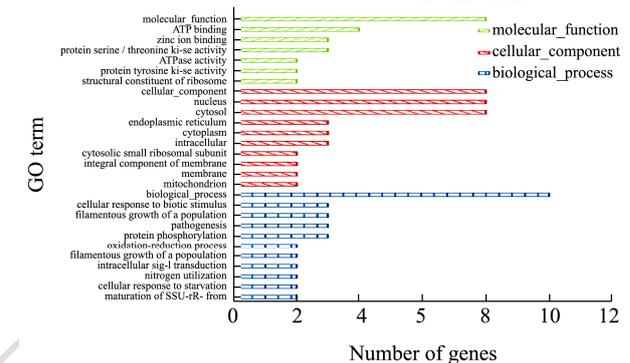


图 4 *miRNA* 靶基因 GO 分类

Fig.4 Gene ontology categories of the target genes of Foc4

*milRNAs*

对通过降解组测序预测的 *milRNA* 的靶基因进行 GO 富集分析, 从图 4 可以看出, 在分子功能 (molecular function) 分类中, 归类为分子功能的 ATP 结合 (ATP binding) 条目的基因较多。在细胞定位 (cellular component) 分类中, 细胞核 (nucleus) 条目和细胞质基质 (cytosol) 条目较多, 在生物学过程 (biological process) 分类中, 蛋白质磷酸化 (protein phosphorylation) 和致病机制 (pathogenesis) 条目中基因数较多。表明 Foc4 中 *milRNA* 可能调控多个生物学过程, 具有重要意义。

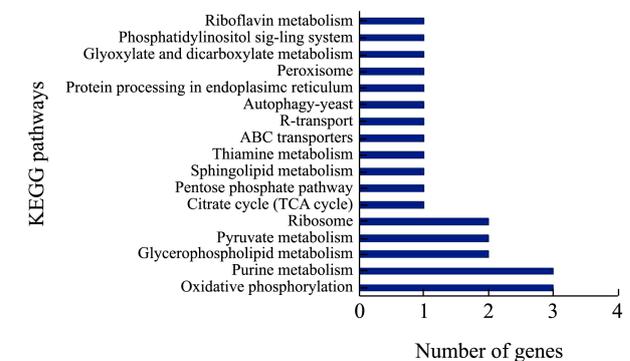


图 5 *miRNAs* 靶基因 KEGG 分类

Fig.5 KEGG pathways categories of the target genes of Foc4

*milRNAs*

*MilRNA* 的靶基因能归入 KEGG 通路中的基因有

20 个。如图 5 所示, 靶基因归入氧化磷酸化通路 (Oxidative phosphorylation) 和嘌呤代谢通路 (Purine metabolism) 的基因数最多, 脂代谢通路 (Glycerophospholipid metabolism), 丙酮酸盐代谢 (Pyruvate metabolism) 和核糖体通路 (Ribosome) 次之。从 KEGG 通路注释分类图, 可以发现 Foc4 miRNA 的靶基因参与多个代谢过程。其中表达量较高的 miRNA Foc4-miR4 的靶基因 *Foc4\_580004970* 编码假定蛋白参与调控甘油磷脂代谢通路 (Glycerophospholipid metabolism), Foc4-novel miR3 靶向的 *Foc4\_580043960* 基因编码 3-植酸酶 A (3-phytase A) 可参与调节硫胺素代谢 (Thiamine metabolism) 和核黄素代谢 (Riboflavin metabolism)。表明 Foc4 miRNA 可能对代谢过程有重要影响。香蕉枯萎病菌能量代谢过程对其生长发育和致病性有重要作用, 本实验中发现 Foc4-novel miR3 的靶基因通过编码乌头水合酶 (Aconitate hydratase) 参与调控三羧酸循环通路, Foc4-miR5 靶基因为 *Foc4\_580004190* 编码 F 型转运  $H^+$  的 ATPase 亚基 C 和 Foc4-novel miR1 靶基因 *Foc4\_580041730* 编码线粒体 ATP 合成酶亚基  $\alpha$ , 两者都是调控与 ATP 合成相关的酶参与氧化磷酸化通路。在葡萄座腔菌响应病毒胁迫时也发现差异表达 miRNA 调控代谢过程<sup>[10]</sup>。

真菌 miRNA 不仅可以调控代谢过程影响其生长发育, 也会影响其致病性。例如, 在西瓜枯萎病菌中, 发现 Fon-miR7696a-3p 和 Fon-miR6108a 分别靶向单端孢霉毒素 (trichothecene) 和乙烯诱导肽 1 (NEP1) 调节毒素合成<sup>[4]</sup>; 在金龟子绿僵菌和新月弯孢霉中发现 miRNA 对菌丝体生长和孢子的形成有重要调控作用, 可能影响致病性<sup>[9,11]</sup>。在本研究中也发现了一些 miRNA 调控致病性相关基因表达, 例如, Foc4-novel miR1 靶向基因 *Foc4\_580051390* 编码 ABC 转运器 CDR4。ABC (ATP binding cassette) 转运器由赋予特异性的跨膜结构域和含有高度保守的氨基酸基序的结构保守的核苷酸结合结构域组成, 它们不仅充当转运蛋白, 也是 ATP 水解产生的能量的受体或通道<sup>[21]</sup>。例如 CDR4 是链孢菌唑耐药的主要原因<sup>[22,23]</sup>, 而在葡萄座腔菌中 Bd-miRNA1147 靶向 ABC 转运器可能会抑制其侵染梨树<sup>[10,24]</sup>。在植物致病菌禾谷镰刀菌中敲除编码 ABC 转运器基因 *FgABC1* 和 *FgABCC9*, 发现其对小麦根系和小麦冠的毒力减弱<sup>[25,26]</sup>。推测 Foc4-novel miR1 可能通过调控 ABC 转运器 CDR4 影响其毒力。此外, Foc4-novel miR1 靶基因 *Foc4\_580122700* 编码孢子壁成熟蛋白 DIT1 (Spore wall maturation protein DIT1), 可能与 Foc4 孢子形成相关。

在新月弯孢霉中也发现 miRNA 参与孢子形成<sup>[11]</sup>。

Foc4 在宿主香蕉内的生长发育和致病性都是影响香蕉枯萎病的重要因素, 本研究将为香蕉枯萎病的防治提供新的思路和一定的参考。

### 3 结论

本研究利用小分子 RNA 测序对香蕉枯萎病致病菌 Foc4 进行测序, 共鉴定 7 个保守的 miRNA 和 3 个新型的 miRNA。利用降解组测序分析鉴定出 53 个受 miRNA 调控的潜在靶标基因, 它们参与调控多个代谢通路, 包括嘌呤代谢、甘油磷脂代谢、硫胺素代谢和三羧酸循环通路, 对真菌生长发育有重要作用; 同时鉴定到 miRNA 靶向 ABC 转运器 CDR4 和孢子壁成熟蛋白 DIT1, 可能对 Foc4 导致香蕉枯萎病发病具有重要影响。本研究首次在香蕉枯萎病致病菌 Foc4 中利用降解组测序预测 miRNA 靶基因, 对研究真菌 miRNA 调控功能提供了重要参考, 也为香蕉枯萎病的防治提供了新的思路。

### 参考文献

- [1] Aguilar-hawod K G I, De La Cueva F M, Cumagun C J R. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* F. sp. *ubense* Causing Panama wilt of banana in the Philippines [J]. *Pathogens*, 2019, 9(1): 1-23
- [2] Ploetz R C. *Fusarium* wilt of banana [J]. *Phytopathology*, 2015, 105(12): 1512-1521
- [3] Yu Y, Jia T, Chen X. The 'how' and 'where' of plant microRNAs [J]. *New Phytol*, 2017, 216(4): 1002-1017
- [4] Jiang X, Qiao F, Long Y, et al. MicroRNA-like RNAs in plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum* F. sp. *niveum* are involved in toxin gene expression fine tuning [J]. *3 Biotech*, 2017, 7(5): 354-366
- [5] Lee H C, Li L, Gu W, et al. Diverse pathways generate microRNA-like RNAs and Dicer-independent small interfering RNAs in fungi [J]. *Mol Cell*, 2010, 38(6): 803-814
- [6] Bartel D P. Metazoan microRNAs [J]. *Cell*, 2018, 173(1): 20-51
- [7] Wang L, Xu X, Yang J, et al. Integrated microRNA and mRNA analysis in the pathogenic filamentous fungus *Trichophyton rubrum* [J]. *Bmc Genomics*, 2018, 19(1): 933-947
- [8] Dubey H, Kiran K, Jaswal R, et al. Discovery and profiling of small RNAs from *Puccinia triticina* by deep sequencing and identification of their potential targets in wheat [J]. *Funct Integr Genomics*, 2019, 19(3): 391-407

- [9] Zhou Q, Wang Z, Zhang J, et al. Genome-wide identification and profiling of microRNA-like RNAs from *Metarhizium anisopliae* during development [J]. Fungal Biol, 2012, 116(11): 1156-1162
- [10] Hu W, Luo H, Yang Y, et al. Comprehensive analysis of full genome sequence and Bd-milRNA/target mRNAs to discover the mechanism of hypovirulence in *Botryosphaeria dothidea* strains on pear infection with BdCV1 and BdPV1 [J]. IMA Fungus, 2019, 10(1): 3-28
- [11] Liu T, Hu J, Zuo Y, et al. Identification of microRNA-like RNAs from *Curvularia lunata* associated with maize leaf spot by bioinformation analysis and deep sequencing [J]. Mol Genet Genomics, 2016, 291(2): 587-596
- [12] Zhou J, Fu Y, Xie J, et al. Identification of microRNA-like RNAs in a plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* by high-throughput sequencing [J]. Molecular Genetics & Genomics, 2012, 287(4): 275-282
- [13] Lau S K, Chow W N, Wong A Y, et al. Identification of microRNA-like RNAs in mycelial and yeast phases of the thermal dimorphic fungus *Penicillium marneffei* [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2013, 7(8): 2384-2398
- [14] Chen R, Jiang N, Jiang Q, et al. Exploring microRNA-like small RNAs in the filamentous fungus *Fusarium oxysporum* [J]. Plos One, 2014, 9(8): 104946-104956
- [15] Kang K, Zhong J, Jiang L, et al. Identification of microRNA-Like RNAs in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* by solexa sequencing [J]. Plos One, 2013, 8(10): 76281-76288
- [16] Lau A Y T, Cheng X, Cheng C K, et al. Discovery of microRNA-like RNAs during early fruiting body development in the model mushroom *Coprinopsis cinerea* [J]. Plos One, 2018, 13(9): 1-24
- [17] 孟春亮. 香蕉枯萎病菌 MicroRNA-like RNAs 的鉴定[M]. 海口: 海南大学热带作物学院, 2017  
MENG Chun-liang. Identification of microRNA-like RNAs in the Filamentous Fungus *Fusarium oxysporum* F. sp. *cubense* [M]. Hankou: Hainan University of Tropical Crops Institute, 2017
- [18] Ioanna K, Joanna A, Natalia Q O, et al. Rfam 13.0: shifting to a genome-centric resource for non-coding RNA families [J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(4): D335-D342
- [19] Ana K, Sam G J. Mirbase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data [J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(D1): D68-D73
- [20] Yun Y Z, Song A X, Bao J D, et al. Genome data of *Fusarium oxysporum* F. sp. *cubense* race 1 and tropical race 4 isolates using long-read sequencing [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2019, 32(10): 1270-1272
- [21] Stolarczyk E I, Reiling C J, Paumi C M. Regulation of ABC transporter function via phosphorylation by protein kinases [J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2011, 12(4): 621-635
- [22] Zhang Y, Zhang Z, Zhang X, et al. CDR4 is the major contributor to azole resistance among four Pdr5p-like ABC transporters in *Neurospora crassa* [J]. Fungal Biol, 2012, 116(7): 848-854
- [23] Xue W, Yin Y, Ismail F, et al. Transcription factor CCG-8 plays a pivotal role in azole adaptive responses of *Neurospora crassa* by regulating intracellular azole accumulation [J]. Curr Genet, 2019, 65(3): 735-745
- [24] Saier M H J R, Reddy V S, Tamang D G, et al. The transporter classification database [J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(Database issue): D251-258
- [25] Gardiner D M, Stephens A E, Munn A L, et al. An ABC pleiotropic drug resistance transporter of *Fusarium graminearum* with a role in crown and root diseases of wheat [J]. Fems Microbiol Lett, 2013, 348(1): 36-45
- [26] Qi P F, Zhang Y Z, Liu C H, et al. *Fusarium graminearum* ATP-binding cassette transporter gene *FgABCC9* is required for its transportation of salicylic acid, fungicide resistance, mycelial growth and pathogenicity towards wheat [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(8): 2351-2366

(上接第 48 页)

- [17] 冷超, 李大威, 李强. 不同强度的运动联合葛根素对非酒精性脂肪肝大鼠模型的治疗及其机制研究[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(2): 452-455, 29  
LENG Chao, LI Da-wei, LI Qiang. Study on the treatment and mechanism of different intensity exercise combined with Puerarin in rats with nonalcoholic fatty liver [J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine, 2018, 36 (2): 452-455, 29
- [18] 刘娇梅. 葛根素对妊娠期糖尿病大鼠的保护作用及机制研究[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(3): 43-47  
LIU Jiao-mei. The protective effect and mechanism of puerarin on gestational diabetic rats [J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2015, 31(3): 43-47