网络出版时间:2023 - 08 - 31 15:35:49 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20230831.1354.004

AGO 和 RDRP 基因参与黄曲霉压力应激反应

刘 翔[1,2],杨 碧[1,2],田 询[1,2],周建鸿[1,2],廖永慧[1,2],刘玲玲[1,2],禹文峰[1,2],齐晓岚[1,2],江银辉[1,2]

摘要 **目的** 探究 RNA 干扰(RNAi)机制中 Argonaute(Ago)基因和 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RDRP)基因在黄曲霉生长发育中的作用。**方法** 利用同源重组的方法构建黄曲霉 Ago1、Ago2、RDRP1、RDRP3 基因突变菌株,接种 10^6 CFU/mL 孢子悬液 3 μl 至马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)培养基上观察突变菌株的生长发育现象。在小量酵母提取物葡萄糖(YGM)培养基中加入 200、400 μg 细胞壁压力试剂刚果红(CR),0.8 mol/L、1.6 mol/L 渗透压药物氯化钠(NaCl),氧化压力试剂 2 mmol/L、4 mmol/L 过氧化氢(H_2O_2),基因组损伤剂 0.01%、0.02% 甲磺酸甲酯(MMS)试剂分析突变菌株的压力应激反应。**结果** 成功构建黄曲霉突变菌株 *ΔAgo1*、*ΔAgo2*、*ΔRDRP1*、*ΔRDRP3* 且生长发育正常。*ΔAgo1*、*ΔAgo2* 菌株相比对照可降低对细胞壁和渗透压的胁迫影响。Ago1 基因缺失可降低 H_2O_2 的影响,相反 RDRP3 基因缺失,H_2O_2 的抑制作用增加。ΔAgo2、ΔRDRP1 菌株能降低对基因损伤剂的作用。此外,*ΔRDRP1* 增加渗透压胁迫作用。**结论** 黄曲霉 *Ago1*、*Ago2*、*RDRP1*、*RDRP3* 基因不参与生长速率和无性繁殖调控,可以参与调节宿主菌对环境的应激反应。

关键词 黄曲霉;RNAi;应激反应

中图分类号 R 379.6

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2023)09 - 1442 - 08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2023.09.003

黄曲霉(*Aspergillus flavus*,*A. flavus*)是次于烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*,*A. fumigatus*)常见引起侵袭性和非侵袭性曲霉菌病(Invasive aspergillosis,IA)的条件致病菌[1]。针对曲霉病使用的抗真菌药物进行治疗,在一定程度上可导致曲霉产生耐药性而使治疗复杂化;此外,抗真菌药物有一定的副作用[2-3]。因此,寻找新的治疗靶点对于曲霉病的治疗具一定的重要性。RNA 干扰(RNA interference,RNAi)是一种保守的真核生物基因调控机制,可利用小的非编码 RNA 特异性的降解信使 RNA(messenger RNA,mRNA)抑制转录和翻译,使靶基因表达受到抑制[4]。有研究表明通过 RNAi 相关基因可以调控节真菌的生长发育和极端条件下适应力[5-6]。但黄曲霉中 RNAi 相关基因并未报道过是否参与其生长发育的调控及外界环境干扰下的调控作用。因此,选择性缺失 RNAi 中沉默基因 Argonaute(Ago)和 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase,RDRP)基因,阐明其是否参与对黄曲霉自身生长发育的调节及其对外界的环境的应激,为后续黄曲霉 RNAi 相关机制研究奠定一定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及培养条件质粒 尿嘧啶营养缺陷型的突变体菌株 *A. flavus* CA14(*Δku70ΔpyrG*)由福建农林大学汪世华教授惠赠。大肠杆菌 DH5α 购买于北京全式金生物公司。Pyrithiamine-resistant Ⅰ(pPTRI)质粒购自北京 Takara 生物技术有限公司。

1.1.2 培养基 Yeast extract Glucose Trace(YGT)+尿嘧啶尿苷(uracil uridine,UU)培养基:称量 1% 酵母提取物,2% 葡萄糖,吸取 1 ml 微量元素,0.5 mg/ml 尿嘧啶,0.5 mg/ml 尿苷,用 800 ml ddH_2O 溶解,定容至 1 000 ml,固体培养基加入 13 g 琼脂粉,于 121 ℃灭菌 20 min。

察氏培养基(czapek-dox agar,CZ)+UU:称量 $NaNO_3$ 3 g,KCl 0.5 g,$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1 g,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g,$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g,蔗糖 30 g,0.5 g 尿苷,0.5 g 尿嘧啶,琼脂粉 13 g,用 800 ml ddH_2O 溶解,定容至 1 000 ml、121 ℃灭菌 20 min。

小量酵母提取物葡萄糖(Yeast extract Glucose Minimum,YGM)+UU 培养基:1 g/L 酵母提取物,10 g/L 葡萄糖,13 g 琼脂粉,0.5 g 尿苷,0.5 g 尿嘧啶,用 800 ml ddH_2O 溶解,定容至 1 000 ml 121 ℃灭菌 20 min。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar,

2023 - 06 - 27 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:32000017、31660012);贵州省科技计划项目[编号:黔科合基础-ZK(2021)重点 030]

作者单位:[1]贵州医科大学分子生物学重点实验室,贵阳 550004

[2]贵州医科大学地方病与少数民族疾病教育部重点实验室,贵阳 550004

作者简介:刘 翔,男,硕士研究生;

江银辉,男,副教授,博士生导师,责任作者,E-mail:jyh5265@163.com

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

PDA)+UU:马铃薯 200 g,加水煮烂,4 层纱布过滤,葡萄糖 20 g,0.5 g 尿苷,0.5 g 尿嘧啶,琼脂粉 13 g,用 800 mL ddH_2O 溶解,定容至 1 000 mL,121 ℃灭菌 20 min。

1.1.3 *主要试剂及仪器* 十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide,CTAB(北京博奥拓达科技有限公司);嘧啶磺胺(pyrithiamine,PT)A0098-100g(美国 GLPBIO 公司);Q5 High-Fidelity DNA Polymerase(美国 NEB 公司);蜗牛酶(Snailase)、纤维素酶 R-10(cellulasa)、溶菌酶(lysozyme)、氨苄青霉素(AMP)、尿苷 U8070、尿嘧啶 U8070 均采购于北京 Solarbio 科技有限公司;溶壁酶 L1412(lysing enaymes)(日本 Sigma 公司);IG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II(瑞士 Roche 公司);尼龙膜 Hybond N+(0.45um)(Amersham,美国)。

生化培养箱 SPX-250B(天津赛得利斯);通风橱(泸净净化 SW-TFG-15);杂交仪(MODEL 1000)(深圳市三莉科技有限公司),生物安全柜(HR40-ⅡA2)(青岛海尔特种电器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 *黄曲霉 Argonaute、RDRP 基因的生物信息学分析* 在 NCBI(National Center for Biotechnology Information)网址中找到黄曲霉 Argonaute 及 RDRP 基因:Ago1(GI:156128599)、Ago2(GI:156128535)、RDRP1(GI:64853798)、RDRP3(GI:64851326)利用比对工具 BLASTX(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)获得与黄曲霉 Ago1、Ago2、RDRP1、RDRP3 有一定同源性的其他曲霉属氨基酸序列,使用 MEGA7.0 软件和邻接法(NJ)构建系统发育树,其中 Bootstrap 重复设置为 1 000。NCBI 中 Domains & Structures 在线软件预测基因的结构域,用软件 TBtools 将结构域进行可视化。

1.2.2 *同源基因打靶片的构建* 利用 SnapGene 软件,按照 overlap 重叠延伸聚合酶链式反应(overlap polymerase chain reaction,overlap PCR)原理设计 Ago1、Ago2、RDRP1、RDRP3 基因上下游引物(分别携带 ptrA 抗性基因上下游引物序列),嘧啶磺胺抗性基因(pyrimidine resistance gene,ptrA)引物如表所 1 示,接种 CA14 菌株于含玻璃纸的 YGT+UU 培养基,30 ℃黑暗条件下培养 5 d,收集菌丝。用 CTAB 提取基因组,用表 1 中的引物使用 Overlap PCR 方法将 Ago1、Ago2、RDRP1、RDRP3 基因的侧翼序列与 ptrA 抗性基因融合在一起。

1.2.3 *原生质体制备及真菌转化与鉴定* 参考文献[7],略有调整。具体为:接种 CA14 菌株于 YGT+UU 培养基上,30 ℃黑暗条件下培养 5 d 收集孢子 10^8 CFU/ml 于 100 ml 的 YGT+UU 液体培养基中,30 ℃充分振荡培养 12 h,利用 100 μmol 细胞筛过滤收集菌丝,用 20 ml 无菌酶解液(0.8 mol/L NaCl,10 mmol/L Na_3PO_4,pH 6.0,1.5% 溶壁酶,1.5% 纤维素酶,1.5% 蜗牛酶,1% 溶菌酶)于 30 ℃ 80 r/min 消化 2 h,用 40 μmol 细胞筛过滤收集原生质体,4 000 r/min 离心 10 min,0.8 mol/L NaCl 洗涤 2 次,加入 1 ml 溶液Ⅰ[0.6 mmol/L KCl,50 mmol/L $CaCl_2$,10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)]。利用聚乙二醇(polyethylene glycol,PEG)4 000 介导的方式将融合 PCR 产物转化进入黄曲霉 CA14 原生质体中:取 160 μl 原生质体与 40 μl 溶液Ⅱ[40%(W/V)PEG 4 000,0.6 mmol/L KCl,50 mmol/L $CaCl_2$,10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)],加入 5 μg 构建的 DNA 片段轻缓混匀,冰浴 30 min,加入 1 ml 溶液Ⅱ轻缓混匀室温静置 20 min。加入 10 ml 含有 0.2 μg/ml PT CZ+UU 半固体培养基混匀,倒入预先倒好含有 0.2 μg/ml PT CZ+UU 的底层固体培养基中,置于 30 ℃静置培养 2 d,挑取转化子在 0.2 μg/ml PT CZ+UU 固体培养基中连续培养 5 代得到稳定的转化子。

1.2.4 *黄曲霉* RNAi 相关基因突变菌株鉴定 利用 CTAB 提取 CA14 突变菌株和正常菌株基因组 DNA 以检测引物 det-Ago1-F1/det-Ago1-R1、det-Ago2-F/det-Ago2-R、det-RDRP1-F/det-RDRP1-R、det-RDRP3-F/det-RDRP3-R 确定目的基因是否缺失。Ptr-F/Ptr-R 确认抗性基因 ptrA 片段是否插入成功。全长引物 Ago1-1F/Ago1-2R、Ago2-1F/Ago2-2R、RDRP1-1F/RDRP1-2R、RDRP3-1F/RDRP3-2R 片段变化来确认阳性转化子,PCR 反应体系:总体积 20 μl,2×Green Taq Mix 10 μl,上下游引物 10 μmol/L 各 1 μl,模板 DNA 1 μl,无菌双蒸水 7 μl。反应条件:95 ℃、5 min;95 ℃、30 s,55 ℃、30 s,72 ℃、40 s,30 个循环;72 ℃、5 min。PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。对比 Ago1、Ago2、RDRP1、RDRP2 基因敲除前后的序列变化,设计探针(表 1)。用适当的酶消化 CA14 突变菌株和野生型菌株基因组 DNA,采用试剂盒 IG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II,进行 sourthern blot 确认突变菌株。

1.2.5 *突变菌株表型与生长速率观察* 取新鲜的

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 引物及探针列表(5′-3′)

基因名称	基因序列(5′-3′)	长度(bp)/作用
Ago1-1	F:CCACACCGAACTATATGTAG	1 194(上游)
	R: GAGGTGCCGTAAAGCACTAAAGAGGT GAAACCATAAGTGT	
Ago1-2	F: TGGATGGAGGCGGATAAAGTCTCCACT TGACAGCTGTACC	820(下游)
	R:GTGAGAACGGTCGAGAAGA	
det-Ago1	F:CAAGACCAGCACCGAGGTCC	539(检测)
	R:ATGGTCTTGTCTTACGGTCG	
Ago2-1	F:ATGGAGGAATTCGAAGTCGT	1 240(上游)
	R: GAGGTGCCGTAAAGCACTAACGATGA TGTACTTGCTCGCA	
Ago2-2	F:TGGATGGAGGCGGATAAAGTGATACCT TTGGTGGACGCTA	837(下游)
	R:CTAGATGTACCAAACTGCGA	
det-Ago2	F:TACCAGACCTCGCAGATGAT	527(检测)
	R:GGTATGTGAACGAGTTCTTGT	
RDRP1-1	F:CGGCACGTTTTGAGATCGT	897(上游)
	R: GAGGTGCCGTAAAGCACTAAGATTGG ACTTGAGCAGCATG	
RDRP1-2	F:TGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCGAAT CCGACAGTCAGG	793(下游)
	R:CATATCAATGGCGCTGGTTG	
det-RDRP1	F:CCTTGAGAAACCTTGCTGTC	1 200(检测)
	R:CCTTCATCCCACCACTAGC	
RDRP3-1	F:ATGGCGTTTCCTCACACC	1 000(上游)
	R: GAGGTGCCGTAAAGCACTAAATGGC-CCG TAGTGAAGGAG	
RDRP3-2	F: GGATGGAGGCGGATAAAGTCACTTTG-GTC TTGAGGAACA	996(下游)
	R:TCACTCCACGGAGAGATCA	
det-RDRP3	F:TGCTGCGAGAAAGTATAGCC	885(检测)
	R:GAAGCATTGCAGCGCTACTG	
Ago1-prob	F:CTAGTGCGATTGCCATTGAG	457(探针)
	R:GTACACGAGGCAGCATCTC	
Ago2-prob	F:CTGTCCATCCATGTGGGAAG	485(探针)
	R:GGCTGAGTCAAACAAGATAC	
RDRP1-prob-	F:GTGACGATATAGCTCAAGTC	621(探针)
	R:CGCAAGGAGGTATACGGTGA	
RDRP3-prob	F:GCATCAAGATCATGCTACTCC	632(探针)
	R:CGCAGGACCATCTCATGATAT	
Ptr	F:TTAGTGCTTTACGGCACCTCG	2 926(抗性基因)
	R:ACTTTATCCGCCTCCATCCAG	

10^6 CFU/ml 孢子悬液 3 μl 接种于 PDA 固体培养基中央,置于 30 ℃黑暗条件下连续测定培养 5 d 的生长速率,7 d 后观察表型变化。

1.2.6 突变菌株抗压力分析 取新鲜的 10^6 CFU/ml 孢子悬液 3 μl 接种于携带不同试剂的以下培养基中:对照组不加任何试剂的 YGM + UU 固体培养基;①细胞壁压力:加入 200 μg/ml,400 μg/ml 刚果红(Congo red,CR)的 YGM + UU 培养基;②渗透压测定:含 0.8 mol/L,1.6 mol/L NaCl 的 YGM + UU 固体培养基;③基因组损伤胁迫测定:加入 0.01%、0.02%甲磺酸甲酯(methyl methanesulfonate,MMS)的 YGM + UU 固体培养基;④氧化压力测定:含 2 mmol/L、4 mmol/L 的 H_2O_2 YGM + UU 固体培养基。接种完毕后置于 30 ℃黑暗条件下采用十字交叉法连续测量培养 5 d 的生长直径,并计算生长抑制率。每个菌株 5 个重复,每个实验 3 次重复。生长抑制率计算公式如下:

$$\text{生长抑制率} = \frac{\text{对照组生长直径} - \text{实验组生长直径}}{\text{对照组生长直径}} \times 100\%$$

1.2.7 产孢量测定 在 PDA + UU 培养基上接种突变菌株 10^6 CFU/mL 孢子悬液 3 μl,培养 7 d 后,用 6 mL 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)洗脱分生孢子,4 层擦镜纸过滤后采用血细胞计数板统计。

1.2.8 统计学处理 采用 Graphpad prism 7.0 软件统计分析作图,所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 系统发育树构建及功能域预测 用黄曲霉的 Ago1、Ago2、RDRP1、RDRP3 的基因序列通过 NCBI(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)查询并分别选取了 12、13、9、10 种与黄曲霉相似的曲霉氨基酸序列构建系统发育树。结果表明,黄曲霉 Ago1(RAQ49550.1)与 Aspergillus oryzae(XP_023089033.1)、Aspergillus novoparasiticus(KAB8219177.1)、Aspergillus parasiticus(KAB8212225.1)和 Aspergillus transmontanensis(KAE8309012.1)同源性达 90%以上;黄曲霉 Ago2(XP_041143074.1)与 Aspergillus oryzae(XP_001819808.1)有 99%的同源性,与 Aspergillus minisclerotigenes(KAB8267698.1)有 85%的同源性。此外黄曲霉 RDRP1(XP_041151040.1)、RDRP3(XP_041148631.1)蛋白序列分别与 Aspergillus oryzae RDRP1(XP_001826725.3)、RDRP3(OOO08449.1))存在 84%、88%的同源性(图 1A)。另外,通过保守功能结构域的预测,黄曲霉 RNAi 中 Ago1、Ago2、RDRP1、RDRP3 基因编码的蛋白序列结构域高度保守(图 1B)。

2.2 基因敲除与验证 用同源重组的方法敲除黄曲霉 RNAi 中 Ago1、Ago2、RDRP1、RDRP3 结果表明:Ago1、Ago2、RDRP1、RDRP3 全长 4 857 bp、3 017 bp、4 185 bp、3 872 bp 分别被 4 900 bp、4 963 bp、4 616 bp、4 922 bp 同源片段所取代并带有 ptrA 抗

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

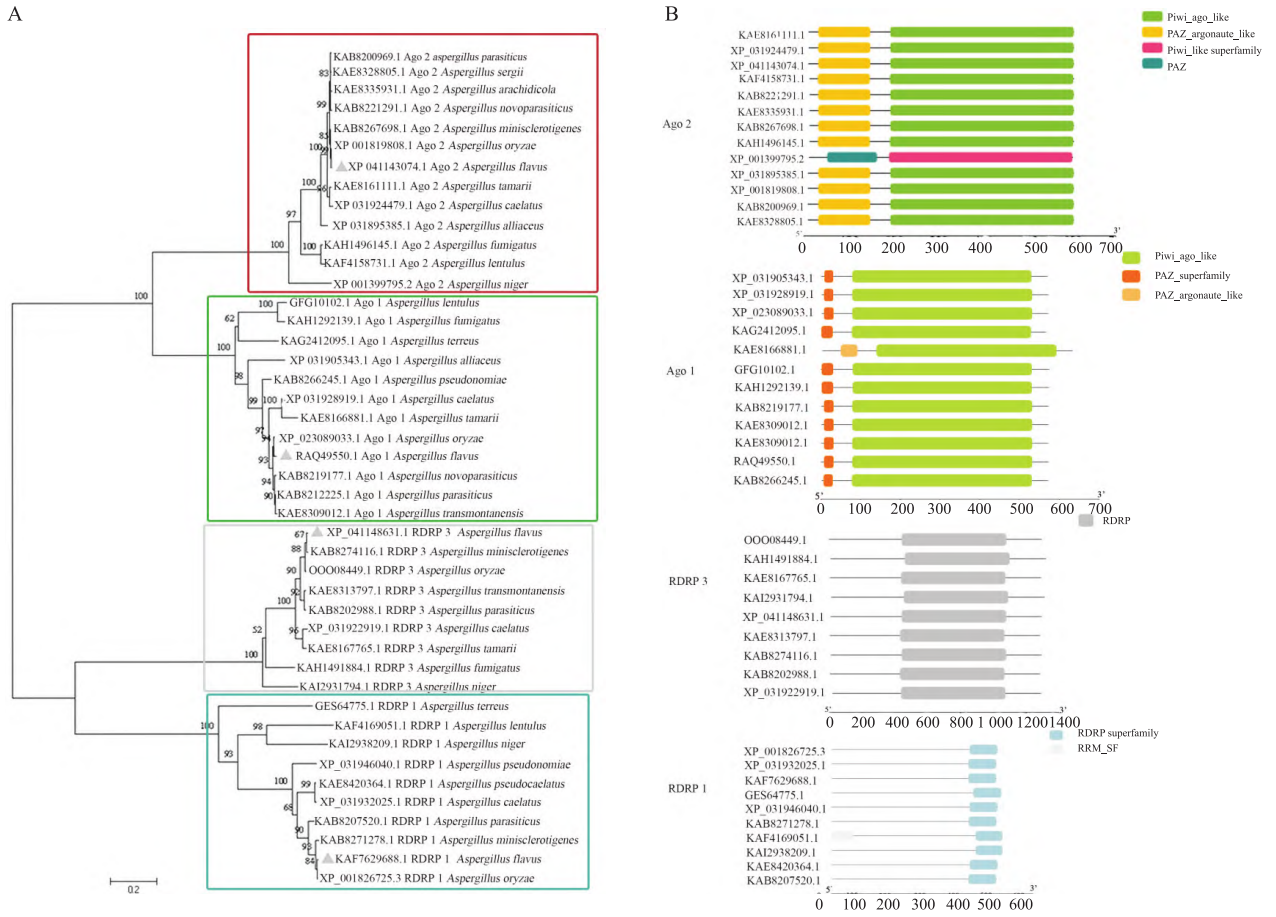

图 1　黄曲霉 Ago 与 RDRP 基因鉴定

A：系统发育树构建；B：保守结构域预测；图由上至下分别表示：Ago2、Ago1、RDRP1、RDRP3 蛋白的系统发育树和保守结构域

性基因 2 926 bp。用检测引物均不能检测到突变菌株中的目的基因（图 2A）。用的限制性酶 Sac Ⅱ处理 *ΔAgo1* 和 *ΔRDRP1*，Nde Ⅰ处理 *ΔAgo2*、*ΔRDRP3* 基因组 DNA，Sourthern blot 确认获得突变菌株（图 2B），并分别命名为 *ΔAgo1*、*ΔAgo2*、*ΔRDRP1*、*ΔRDRP3*。

2.3　突变菌株表型及生长速率鉴定　为研究黄曲霉突变菌株 *ΔAgo1*、*ΔAgo2*、*ΔRDRP1*、*ΔRDRP3* 在表型和生长速率上是否存在差异，对其经行验证。结果显示，与 CA14 对照组相比，敲除 Ago1、Ago2、RDRP1、RDRP3 基因后对生长速率和表型均无影响（$P>0.05$）（图 3A，B）。

2.4　突变菌株压力应激的反应　关于黄曲霉 RNAi 中 Ago1、Ago2、RDRP1、RDRP3 基因是否参与外界环境压力应激的调控而稳定自身发育，实验中选择在 YGM + UU 培养基中添加细胞壁压力试剂刚果红（CR），渗透压药物 NaCl，氧化压力试剂过氧化氢（H_2O_2）及基因组损伤剂甲磺酸甲酯（MMS）进行实验。结果显示相比 CA14，在 200 μg/mL 浓度下 *ΔAgo1* 和 *ΔAgo2* 抑制率降低（$P<0.001$），随着浓度的增加每个突变菌株的抑制率随之增加；400 μg/mL 的浓度中，对比 CA14，*ΔAgo2* 菌株抑制率较低（$P<0.05$），而 *ΔRDRP1*、*ΔRDRP3* 没有显著差异（图 4 A）。在渗透压胁迫实验中，0.8 M NaCl 条件下所有菌株均显示促进的作用，但 *ΔAgo2* 相比 CA14 显示对生长的促进作用较低（$P<0.05$），对 *ΔAgo1*、*ΔRDRP1*、*ΔRDRP3* 没有影响；1.6 M NaCl 条件下 *ΔAgo1* 和 *ΔAgo2* 较 CA14 抑制作用低（$P<0.001$），而 *ΔRDRP1* 却凸显为抑制率增高（$P<0.001$）（图 4 B）。基因组损伤胁迫环境下，甲磺酸甲酯浓度为 0.01% 的条件下 *ΔAgo1* 和 *ΔRDRP1* 相对 CA14 的抑制率较低（$P<0.05$），*ΔAgo1* 和 *ΔRDRP3* 对基因损伤剂没有显著差异（图 4 C）。对于氧化压力胁迫实验而言，H_2O_2 在 2 mmol/L 浓度下与 CA14 比较，*ΔAgo1* 在表现为抑制率降低（$P<0.001$），相反 *ΔRDRP1*、*ΔRDRP3* 表现为抑制作用有一定的增加

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

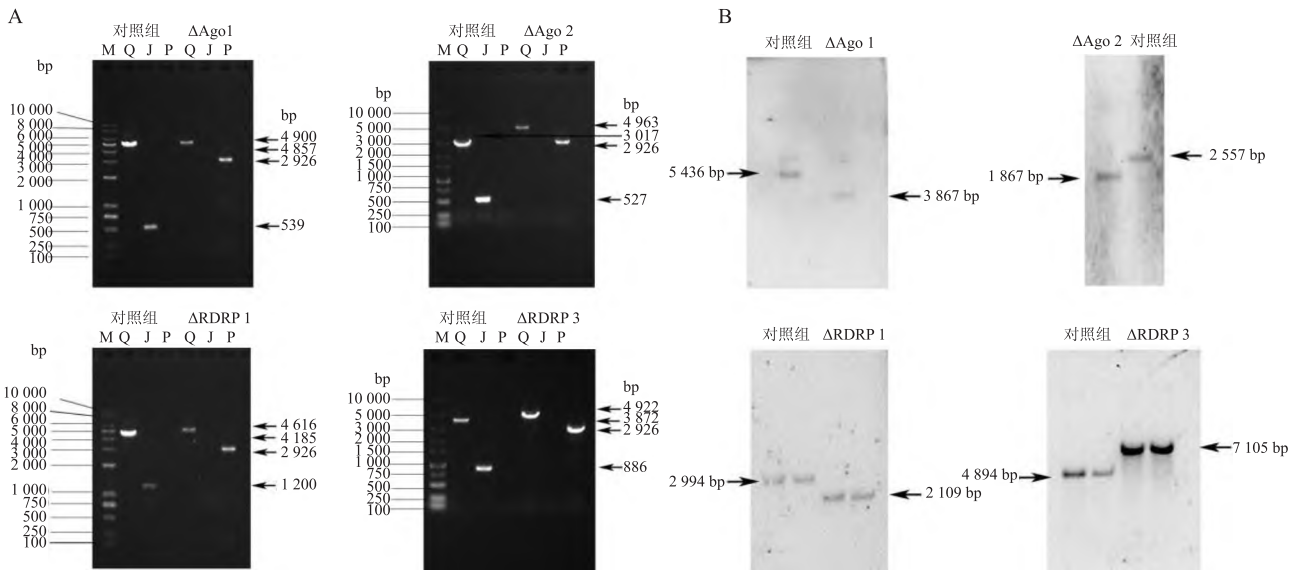

图 2 基因敲除与验证

A:琼脂糖凝胶电泳检测;B:sourthern blot 确认突变菌株;M:Marker;Q:全长片段检测;J:目的基因检测;P:ptrA 基因检测

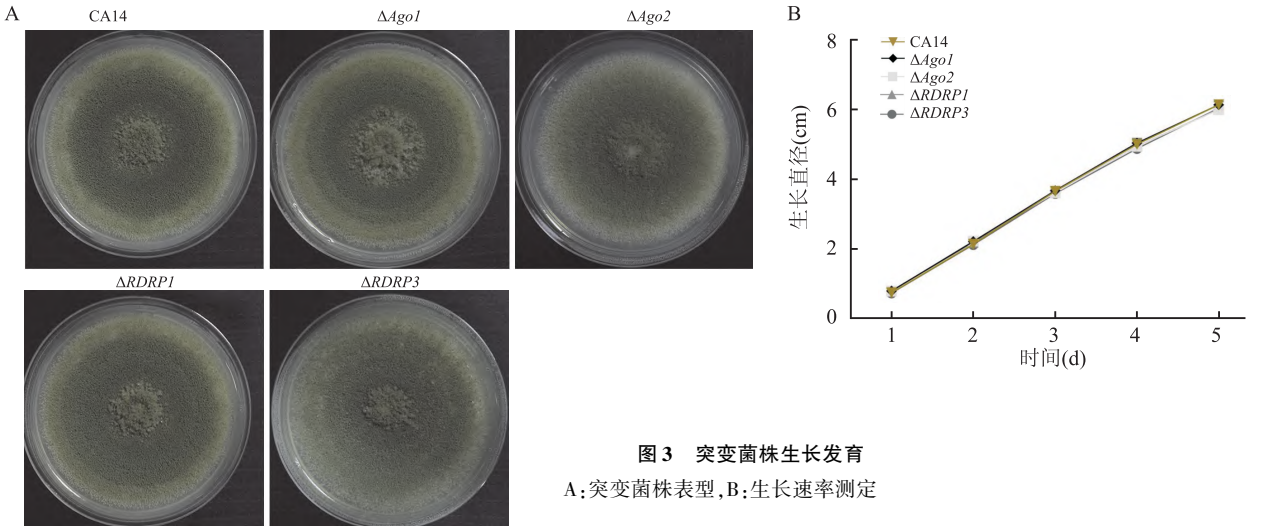

图 3 突变菌株生长发育

A:突变菌株表型,B:生长速率测定

(图 4 D);4 mM 的条件下相比 CA14,ΔAgo1 抑制率降低,ΔRDRP3 增加。这些压力应激的结果表现为 RNAi 机制中不同基因应对环境有着不同的调节作用。

2.5 突变菌株产孢与菌核产量的测定 分生孢子是黄曲霉的一种无性繁殖,是生长发育的一种形式。在此实验中我们对黄曲霉突变菌株产孢量测定观察,发现 Ago1、Ago2、RDRP1、RDRP3 的基因缺失与对照组相比均没有显著的差异,$P>0.05$(图 5)。

3 讨论

真菌中 RNAi 机制参与着生物发育的过程,是一种保守的机制,它通过产生小 RNA(sRNAs)来抑制基因表达以此调节自身的发育或防御外界的侵扰[8]。丝状真菌中,RNAi 机制中包含有三类成分且分别执行着不同的功能,每一种成分包含着一个以上的基因,可能参与调控宿主菌的生长发育[9]。为探究黄曲霉的 Ago 和 RDRP 基因是否参与了黄曲霉的生长发育,我们选择性敲除黄曲霉 Ago1、Ago2、RDRP1、RDRP3 基因,对突变菌株 *ΔAgo1*、*ΔAgo2*、*ΔRDRP1*、*ΔRDRP3* 生长发育进行初步研究。结果发现,Ago1、Ago2,RDRP1、RDRP3 基因的缺失不影响黄曲霉的表型、生长速率和无性繁殖(图 3,图 5)。在隐球菌中 ΔAgo2 突变体在营养有限条件下的生

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

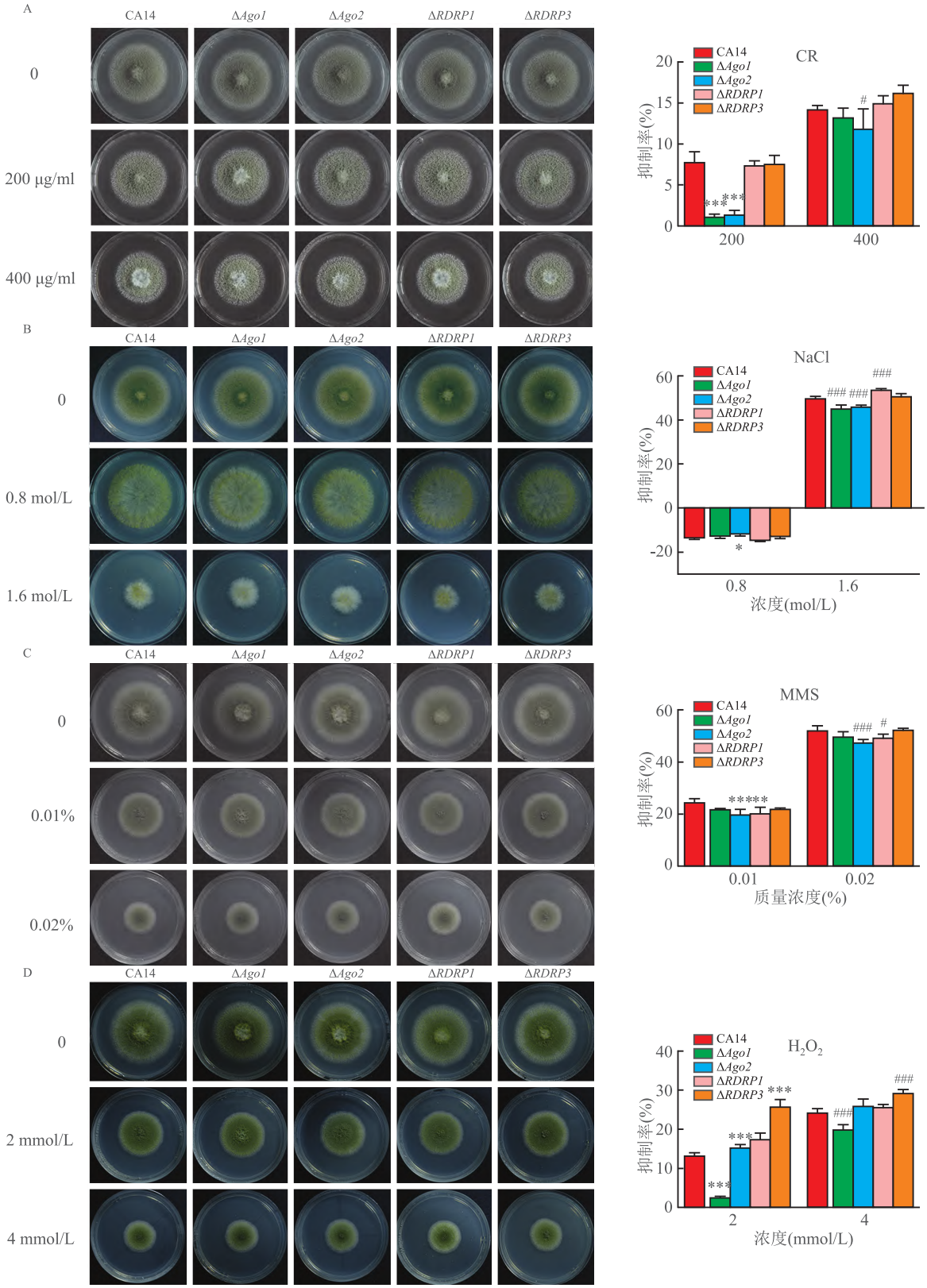

图 4　压力应激实验

A:突变菌株细胞壁胁迫实验;B:渗透压胁迫实验;C:基因组损伤压力实验;D:氧化压力实验;在低浓度下,与 CA14 突变菌株比较:$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$;在高浓度下,与 CA14 突变菌株比较:$^{\#}P<0.05$,$^{\#\#}P<0.01$,$^{\#\#\#}P<0.001$

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

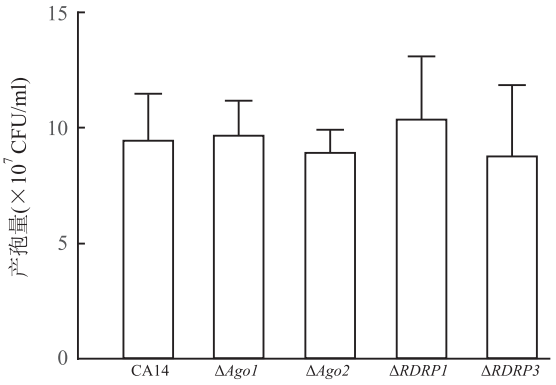

图 5 突变菌株产孢量测定

长显著降低[10]；Cervantes et al[11]发现卷枝毛霉(*Mucor circinelloides*)中 Ago1 基因的缺失参与了无性繁殖的调控,RDRP2 基因缺失具有营养应激自溶反应;除此之外,Rosa et al[12]发现 RDRP1、RDRP2 基因的缺失可降低 Mucor circinelloides 产孢量,这些结果与本实验的研究结果存在一定的差异。然而,炭疽病菌(*Colletotrichum higginsianum*)中[13],ΔAgo1 突变菌株相比野生型菌株不影响表型和生长速率;板栗疫病菌(*Cryphonectria parasitica*)中单敲菌株 rdr1、rdr2、rdr3、rdr4 及组合敲除 rdr1/2/3 对生长和表型没有影响[14]。这些结果与本实验缺失黄曲霉 Ago1、Ago2、RDRP1、RDRP3 基因对其生长发育没有影响有着一定的相似性。这些研究可能暗示着不同真菌 RNAi 中的 Ago、RDRP 基因执行的功能不同。此外,为了探索这些基因是否参与黄曲霉的压力应激反应调节,在实验中适当的向其施加一些外界环境的压力(图 4)。其中 Ago1,Ago2 基因缺失相比对照可以降低黄曲霉对细胞壁和渗透压的胁迫作用;Ago1 基因缺失降低了黄曲霉对氧化胁迫作用,而 RDRP3 基因的缺失却增加了黄曲霉对氧化的敏感性;Ago2 和 RDRP1 基因缺失降低了黄曲霉对基因组胁迫的作用。这些数据显示黄曲霉的 RNAi 途径中不同成分的基因可能在宿主处于各种压力下调控着不同应激反应,维持宿主的生长,而这些现象在标准条件不能被直接观察[15]。Francisco et al[6]研究发现毛霉中 RDRP,Ago1 突变体鉴定出许多 esRNA 可映射到外显子并调节许多蛋白质编码作用,这些 esRNAs 称为外显子 siRNA(ex-siRNA),可以根据其生物发生所需沉默蛋白。如毛霉 RDRP1 和 RDRP2 突变菌株在极端低 PH 条件提高了生长速率,说明 RDRP1 和 RDRP2 应该特异性地调节一组参与在极端 pH 条件下生长能力的基因,突出了 RNAi 机制参与对环境信号的反应[6]。

丝状真菌中 RNAi 机制相对保守,但是每一种曲霉的 RNAi 相关基因可能执行着一些相对不保守的功能[10-15]。本研究中初步的了解黄曲霉 Ago 和 RDRP 基因的功能,这些数据解释了黄曲霉 RNAi 相关基因的功能在宿主菌的生长发育中可能与其他曲霉不保守,各自承担的功能还有待进一步跟踪研究。RNAi 是否通过产生不同的 ex-siRNA 调节宿主菌对外界环境的作用值得探索,是本研究中未深入了解的机制,在后续的研究中将会在此部分进行探究。这些数据为后续黄曲霉 RNAi 的研究提供一些参考意义。

参考文献

[1] Rudramurthy S M, Paul R A, Chakrabarti A, et al. Invasive aspergillosis by *Aspergillus flavus*: Epidemiology, diagnosis, antifungal resistance, and management[J]. J Fungi (Basel), 2019, 5(3): 55.

[2] Hoffmann W J, McHardy I, Thompson GR, 3rd. Itraconazole induced hypertension and hypokalemia: Mechanistic evaluation[J]. Mycoses,2018,61(5): 337-9.

[3] Yang X, Chen W, Liang T, et al. A 20-year antifungal susceptibility surveillance (from 1999 to 2019) for aspergillus spp. and proposed epidemiological cutoff values for *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*: a study in a tertiary hospital in China[J]. Front Microbiol,2021,12: 680884.

[4] 赵 轩, 邓 竞, 马潇雨, 等. 真菌中 RNA 干扰的生物学功能[J]. 微生物学报, 2022, 62(5): 1656-68.

[5] Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez R M. The RNAi universe in fungi: a varied landscape of small RNAs and biological functions[J]. Annu Rev Microbiol,2017,71: 371-91.

[6] Nicolás F E, Vila A, Moxon S, et al. The RNAi machinery controls distinct responses to environmental signals in the basal fungus *Mucor circinelloides*[J]. BMC Genomics,2015,16(1): 237.

[7] Chang P K, Scharfenstein L L, Wei Q, et al. Development and refinement of a high-efficiency gene-targeting system for *Aspergillus flavus*[J]. J Microbiol Methods. 2010,81(3): 240-6.

[8] Nicolás F E, Garre V. RNA interference in fungi: retention and loss[J]. Microbiol Spectr,2016,4(6):10.

[9] Choi J, Kim K T, Jeon J, et al. funRNA: a fungi-centered genomics platform for genes encoding key components of RNAi[J]. BMC Genomics,2014,15 (9): S14.

[10] Ma X, Li C, Ma L, et al. RNAi machinery regulates nutrient metabolism and fluconazole resistance in the pathogenic fungus *Cryptococcus deneoformans*[J]. Med Mycol,2023, 61(2): myac095.

[11] Cervantes M, Vila A, Nicolás F E, et al. A single argonaute gene

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

participates in exogenous and endogenous RNAi and controls cellular functions in the basal fungus *Mucor circinelloides*[J]. PLoS One,2013,8(7): e69283.

[12] Ruiz-Vázquez R M, Nicolás F E, Torres-Martínez S, et al. Distinct RNAi pathways in the regulation of physiology and development in the fungus *Mucor circinelloides*[J]. Adv Genet,2015,91: 55 - 102.

[13] Campo S, Gilbert K B, Carrington J C. Small RNA-based antiviral defense in the phytopathogenic fungus *Colletotrichum higginsianum*[J]. PLoS Pathog,2016,12(6): e1005640.

[14] Zhang D X, Spiering M J, Nuss D L. Characterizing the roles of Cryphonectria parasitica RNA-dependent RNA polymerase-like genes in antiviral defense, viral recombination and transposon transcript accumulation[J]. PLoS One,2014,9(9): e108653.

[15] Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez R M. RNAi pathways in Mucor: A tale of proteins, small RNAs and functional diversity[J]. Fungal Genet Biol,2016,90: 44 - 52.

AGO and RDRP genes are involved in the stress response of *Aspergillus flavus*

Liu Xiang[1,2], Yang Bi[1,2], Tian Xun[1,2], Zhou Jianhong[1,2], Liao Yonghui[1,2], Liu Lingling[1,2], Yu Wenfeng[1,2], Qi Xiaolan[1,2], Jiang Yinhui[1,2]

([1]*Key Laboratory of Medical Molecular Biology of Guizhou Province, Guizhou Medical University, Guizhou* 550004; [2]*Guiyang & Key Laboratory of Endemic and Ethnic Diseases, Ministry of Education, Guizhou* 550004)

Abstract ***Objective*** To explore the role of Argonaute (Ago) gene and RNA-Dependent RNA Polymerase (RDRP) gene of *Aspergillus flavus* in the growth and development about the RNAi mechanism. ***Methods*** *A. flavus* Ago1, Ago2, RDRP1, RDRP3 gene mutant strains were constructed by homologous recombination. The growth and development of the mutant strains were observed on potato dextrose agar(PDA) + uracil uridine (UU) medium inoculated with 3 μl 10^6 CFU/mL spores. 200,400 μg cell wall pressure agent conidored (CR), 0.8 mol/L,1.6 mol/L osmotic pressure agent NaCl, 2 mmol/L,4 mmol/L oxidative pressure agent hydrogen peroxide (H_2O_2) and 0.01%,0.02% genomic damage agent methyl mesylate (MMS) were added to the Yeast extract Glucose Minimum (YGM) + UU medium to analyze the stress response of the mutant strains. ***Results*** *A. flavus* mutant strains about *ΔAgo1*, *ΔAgo2*, *ΔRDRP1*, *ΔRDRP3* were successfully constructed and its growth and development were normal. The ΔAgo1 and *ΔAgo2* strains reduced the stress effects on cell wall and osmotic pressure compared to the control. Ago1 gene deletion reduced the effect of H_2O_2, and conversely RDRP3 gene deletion increased the inhibition of H_2O_2. The Ago2 and RDRP1 strains reduced the effect on genetic damage agent. In addition, *ΔRDRP1* increased the effect of osmotic stress. ***Conclusion*** The Ago1, Ago2, RDRP1 and RDRP3 genes of *A. flavus* are not involved in the regulation of growth rate and asexual reproduction and can participate in the regulating of the host stress response to the environment.

Key words *Aspergillus flavus*; RNAi; stress response

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net