

稻瘟病菌 *Mofbox* 基因缺失突变体构建及生物学表型分析

喻海峰, 高飞, 朱小蕾, 高智谋, 郭敏*

(安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230036)

摘要: 采用啤酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)F-box 蛋白的氨基酸序列对稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 全基因组数据库进行 Blastp 分析, 找到一个与之同源的、具有典型 F-box 结构域的蛋白编码基因, 命名为 *Mofbox*。采用同源重组原理, 将构建的基因敲除载体转化稻瘟病菌, 获得该基因缺失突变体 2 个。研究表明, 在稻瘟病菌中, *Mofbox* 缺失后可导致稻瘟病菌生长速率显著下降, 分生孢子产孢量和附着胞形成率显著降低, 对外源过氧化氢敏感, 改变细胞壁完整性, 同时降低对大麦和水稻敏感品种 CO-39 的致病性。

关键词: 稻瘟病菌; *Mofbox* 突变体; 附着胞; 致病性

中图分类号: S435.111.41

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2013)05-0751-07

Deletion mutant construction and biology phenotype analysis of *Mofbox* gene in *Magnaporthe oryzae*

YU Hai-feng, GAO Fei, ZHU Xiao-lei, GAO Zhi-mou, GUO Min

(School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: *Magnaporthe oryzae* is an important plant-pathogenic fungus of rice that severely endanger the yield and quality of rice. We characterized a F-box protein *Mofbox* in *M. oryzae*, a homolog of F-box in *Saccharomyces cerevisiae*. The F-box possessed typical domains of F-box. The gene knockout vector was transformed into *Magnaporthe oryzae* to get two gene deletion mutants by principle of homologous recombination. The mutant caused retarded vegetative growth of mycelia, and significantly reduced the conidium production and appressorium formation rate, and the mutant exhibited higher sensitivity to hydrogen peroxide (H_2O_2), and changed cell wall integrity, and could significantly reduce virulence on barley and rice cultivar CO-39.

Key words: *Magnaporthe oryzae*; *Mofbox* mutant; appressorium; pathogenicity

水稻作为世界范围内的重要粮食作物之一, 维系全球近一半人口的生存。而稻瘟病菌作为危害水稻生长的重要致病菌之一, 持续威胁着世界各国粮食的安全生产^[1]。近年来, 随着该菌全基因组数据公布, 使得对其致病相关基因的挖掘突飞猛进^[2-3], 而从分子水平解析稻瘟病菌的致病机理, 可为有效指导病害的控制和治理, 进而促进水稻的安全生产提供重要理论依据。

在真核生物中, 由泛素介导的蛋白降解途径与细胞分裂、发育、代谢、免疫等诸多复杂的生理过程密切相关^[4]。F-box 蛋白质通过参与 SCF 复合体的形成, 介导了泛素化蛋白底物的特异性识别, 在

其降解过程中发挥关键作用。已有研究发现, 酵母、果蝇、线虫、植物以及哺乳动物中均存在大量的 F-box 结构域蛋白, 并具有不同的功能^[5]。在哺乳动物中, 它们参与肢体的发育及细胞周期转换等调节过程^[6-7]; 在拟南芥和金鱼草中, 它们分别参与生长素信号转导、花器官发育和叶片衰老等生物学过程^[8]; 在酵母中, F-box 蛋白与葡萄糖的诱导反应及氨基酸的生物合成相关^[6,9]。在丝状真菌中, F-box 蛋白参与玉蜀黍赤霉 (*Gibberella zeae*)、尖孢镰孢 (*Fusarium oxysporum*) 以及禾谷镰孢 (*Fusarium graminearum*) 菌丝的生长^[10]、子囊孢子的形成^[11]及致病性^[10,12]等过程。

收稿日期: 2013-04-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31101401) 资助。

作者简介: 喻海峰, 男, 硕士研究生。

* 通信作者: 郭敏, 男, 博士, 副教授。E-mail: kandylemon@163.com

本研究通过啤酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)F-box 蛋白的氨基酸序列,对稻瘟病菌全基因组数据库进行 Blastp 分析,找到一个与之高度同源的 F-box 蛋白编码基因 *Mofbox*。该基因调控稻瘟病菌菌丝生长速率、分生孢子分化、细胞壁完整性、附着胞发育及对水稻致病等生物学过程。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 野生型菌株 Guy11 来自安徽农业大学真菌实验室。*Mofbox* 基因敲除突变体菌株及回补菌株均在本研究中获得。

1.2 *Mofbox* 氨基酸序列获得及分析

使用啤酒酵母菌(*S. cerevisiae*)的 F-box 蛋白的氨基酸序列,对稻瘟病菌全基因组数据库(http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/magnaporthe_grisea/Home.html)进行 Blastp 分析,获得 1 个与之高度同源的 F-box 蛋白序列(MGG_06351.6)。将该序列在 NCBI 数据库中进行 Blastp 比对,获得其它物种的同源蛋白序列(score >300)。采用

ClustalW (Thompson et al., 1994)和 Mega3.0 Beta (Kumar et al., 2004)软件(参数为默认值)构建系统发育树。借助在线工具 Smart Server (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)进行结构域的预测。

1.3 *Mofbox* 敲除载体构建及突变体鉴定

1.3.1 *Mofbox* 敲除载体构建及稻瘟病菌原生质体转化 参照 Guo 等^[13]的方法,分别设计引物 GL247FB1/GL248FB2 和 GL249FB3/GL250FB4 (表 1) 扩增 *Mofbox* 的上、下臂片段,扩增产物经引物 GL247FB1/GL250FB4 完成连接。将连接产物插入 pMD18-TS 载体 (TaKaRa, Dalian, China),再将潮霉素磷酸转移酶基因 (HPH) 插入上、下臂连接处,获得敲除载体 pMDTS::*fbox*::*HPH*。将转化载体纯化后转化稻瘟病菌原生质体。

1.3.2 *Mofbox* 突变体的筛选及验证 参照 Guo 等^[13]的方法,使用 FZFB-p1 / FZFB-p2 引物 (表 1),对抗 HPH 转化子进行初筛,扩增出 776 bp 条带的为未敲除或异位整合的转化子,没有扩出目的条带的转化子为敲除突变体。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')
GL247FB1	TCTTCTTGAAGTGACCCGACTC
GL248FB2	CTGATCGAGTCTGAACACCCTTGATATCTGCGAGATGCGAACTCGGTTAT
GL249FB3	ATAACCGAGTTCGCATCTCGCAGATATCAAGGGTGTTTCAGACTCGATCAG
GL250FB4	TCTCTCTTCAAGGGAGTGATCC
FZ FB-p1	ATATCAACCATAGCCTACCG
FZ FB-p2	CCAATTATCAACCACAGTCC
FB-F	ATGGCAACCCACGGCATATCTCT
FB-R	TTATTCGAGCGGGTCGTCCTCTATG
FB-HB-F	GAATTCAGTCAGTCTACTGAGTACTGCCA
FB-HB-R	GTCGACCTGACGAAACAATGGGTCCAAGA

使用引物 FB-F / FB-R (表 1) 分别检测野生型及上述突变体的 cDNA,将不能够扩增出 1.57 kb 条带的转化子鉴定为敲除突变体。试验以 *Actin* 基因的扩增结果作为对照。

1.3.3 *Mofbox* 突变体的基因回补 根据 *Mofbox* 基因侧翼序列,预测启动子区域。采用引物 FB-HB-F / FB-HB-R 扩增包括 *Mofbox* 起始密码子上游 1.3 kb 和终止密码子下游 0.5 kb 基因序列。产物经 *EcoR* I 及 *Sal* I 酶切,连接至含氯嘧啶隆(Sur)抗性标记的质粒 pCB1532 上^[14],形成回补载体 pCB1532::*Mofbox*。参照 Wang 等的方法^[15],将回补质粒转入 *Mofbox*-20

菌株。使用引物 FZ FB-p1 / FZFB-p2 和 FB-F / FB-R (表 1) 对抗 Sur 菌株进行 PCR 及 RT-PCR 验证,判断该基因是否导入及正常转录。

1.4 *Mofbox* 突变体生物学表型分析

1.4.1 *Mofbox* 突变体在不同培养基上的生长速率比较 从活化后菌株的菌落边缘切取约 5 mm×5 mm 的菌丝块,接种于 CM 及 RDC 培养平板中,28 °C 恒温、黑暗培养 5 d,观察并记录菌落直径。每个菌株设 3 个重复,试验重复 3 次。

1.4.2 *Mofbox* 突变体对几种胁迫因子的敏感性分析 从活化后菌株的菌落边缘切取约 5 mm×5 mm

的菌丝块, 分别接种于含不同浓度药剂的 CM 平板中, 28℃、黑暗培养 5 d, 记录菌落直径并拍照, 每菌株每个浓度设 3 个重复, 试验重复 3 次。抑制率 = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / 对照菌落直径 × 100%。

使用的药剂及浓度为: SDS (0.01%), NaCl (0.7 mol·L⁻¹), CFW (200 μg·mL⁻¹), Congo Red (200 μg·mL⁻¹), H₂O₂ (3 mmol·L⁻¹), 试验设不含药剂的 CM 平板为对照处理。

1.4.3 *Mofbox* 突变体原生质体释放观察 参照 Song 等^[16]的方法, 分别每隔 30 min 用血球计数器, 在显微镜下统计各供试菌株释放出的原生质体数目。每处理 3 个重复, 试验重复 3 次。

1.4.4 *Mofbox* 突变体产孢量测定 参照 Guo 等^[17]的方法, 分别统计野生型、*Mofbox* 突变体及回补转化子分生孢子产量。每菌株 3 个重复, 试验重复 3 次。

1.4.5 *Mofbox* 突变体附着胞形成及膨压测定 参照 Guo 等^[17]的方法, 分别测定 2 h、8 h、12 h 及 24 h 后各供试菌株附着胞形成率。参照 Zhang 等^[18]的方法, 分别测定供试菌株形成的附着胞在 2、3 及 4 mol·L⁻¹ 甘油处理条件下的皱缩率。每处理 3 个重复, 试验重复 3 次。

1.5 *Mofbox* 突变体致病性分析

1.5.1 *Mofbox* 突变体对大麦致病性测定 参照 Zhang 等^[18]的方法, 分别测定野生型、突变体及回补转化子对大麦叶片的致病力, 5 d 后观察结果并拍照。试验重复 3 次。

1.5.2 *Mofbox* 突变体对水稻致病性测定 参照 Zhang 等^[18]的方法, 分别测定野生型、突变体及回补转化子对水稻叶片的致病力, 6 d 后观察结果并拍照。每菌株接种水稻秧苗 30 株, 试验重复 3 次。

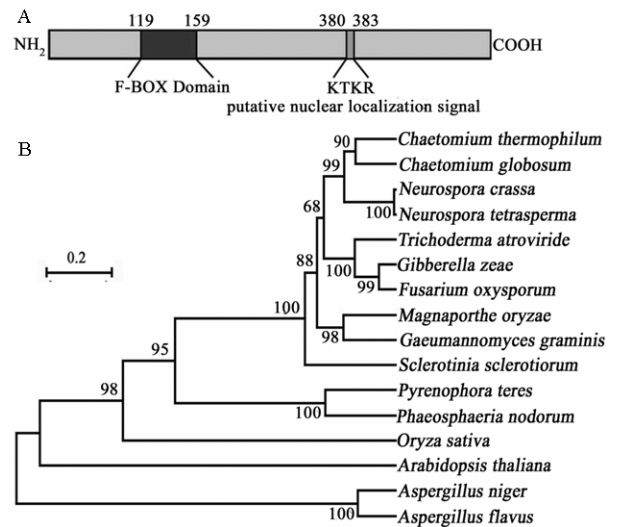
2 结果与分析

2.1 MGG_06351.6 基因的生物信息学分析

采用啤酒酵母菌 F-box 蛋白的氨基酸序列, 对稻瘟病菌全基因组数据库进行 Blastp 分析, 获得 1 个高度同源的 F-box 蛋白编码基因, 命名为 *Mofbox*。对其进行结构域预测, 发现其 N 端 (第 119 至 159 位) 存在 1 个典型的 F-box 结构域, C 端存在 1 个核定位序列 (KTKR), 位于第 380 至 383 位氨基酸之间 (图 1-A)。

系统进化树结果表明, 来自稻瘟病菌中的 F-box 蛋白与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 及黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 的 F-box 蛋白序列同源性分别

为 39% 和 25%, 而与来自包括禾顶囊壳小麦变种 (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*)、尖孢镰孢以及玉蜀黍赤霉中等丝状植物病原真菌中的 F-box 蛋白序列同源性分别为 64%、53% 和 53%。表明, F-box 蛋白序列在丝状植物病原真菌中具有较高的保守性 (图 1-B)。



A: *Mofbox* 功能域分析 Functional domains identification of *Mofbox*; B: *Mofbox* 进化树构建 Phylogenetic tree construction of *Mofbox*

图 1 稻瘟病菌 *Mofbox* 功能域分析及进化树的构建

Figure 1 Functional domains identification and phylogenetic tree construction of *Mofbox*

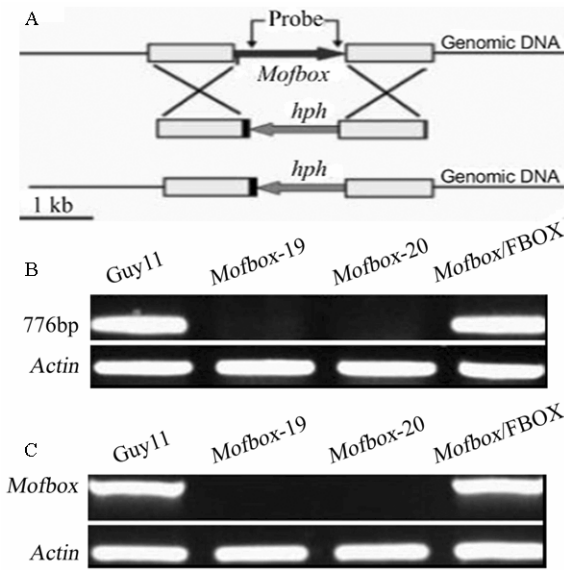
2.2 稻瘟病菌 *Mofbox* 突变体的构建、筛选与鉴定

为明确稻瘟病菌中的 *Mofbox* 功能, 采用图 2-A 中的策略, 构建了 *Mofbox* 敲除载体并转化稻瘟病菌野生型菌株。经基因组 PCR (图 2-B) 及 RT-PCR (图 2-C) 验证, 共获得 2 个敲除突变体 (*Mofbox-19* 与 *Mofbox-20*)。

为验证突变体的表型是由于 *Mofbox* 敲除引起的, 选择 *Mofbox-20* 作为受体菌株, 构建回补菌株。将构建好的回补质粒 pCB1532::*Mofbox* 转入 *Mofbox-20* 中, 经 PCR (图 2-B) 及 RT-PCR (图 2-C) 验证, 获得一个 *Mofbox* 回补的转化子 (*Mofbox/FBOX*)。

2.3 *Mofbox* 基因参与稻瘟病菌菌丝生长

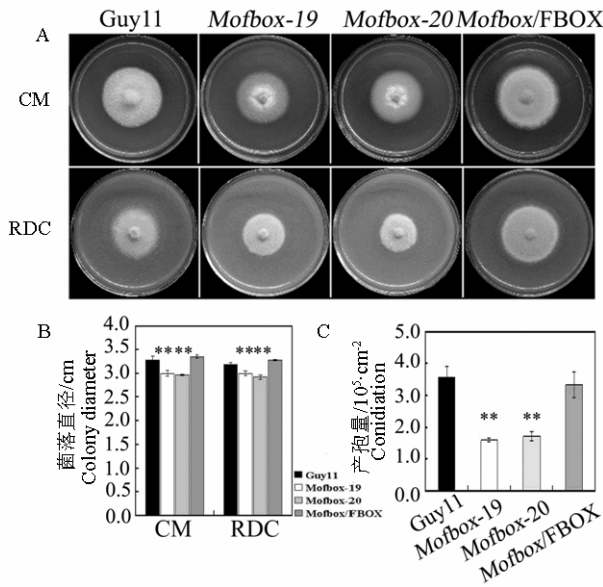
为明确 *Mofbox* 基因在稻瘟病菌生长发育过程中的调控机制, 将 Guy11、突变体及回补菌株分别接种到 CM 及 RDC 培养基上培养 5 d。结果表明, 突变体在上述 2 种基质上的生长速率均显著低于野生型菌株及回补菌株 (图 3-A, B), 表明 *Mofbox* 对调控稻瘟病菌菌丝生长发育具有重要作用。



A: *Mofbox* 的缺失突变体构建 The deletion mutant construction of *Mofbox* gene; B: *Mofbox* 突变体 PCR 验证 PCR validation of *Mofbox* mutants; C: *Mofbox* 突变体 RT-PCR 验证 RT-PCR validation of *Mofbox* mutants

图 2 *Mofbox* 的敲除载体构建策略及突变体验证

Figure 2 *Mofbox* targeted gene deletion strategy and validation of mutants



A: *Mofbox* 突变体在 CM 和 RDC 培养基上的菌丝生长 The mycelia growth of *Mofbox* mutants on CM and RDC medium; B: *Mofbox* 突变体的菌落直径 The colony diameter of *Mofbox* mutants; C: *Mofbox* 突变体的产孢量 The conidiation of *Mofbox* mutants; **为 0.01 水平上的显著性差异。下同

“***” refers to the significant difference at the 0.01 level. The same below

图 3 *Mofbox* 缺失突变体生长速率和产孢量下降

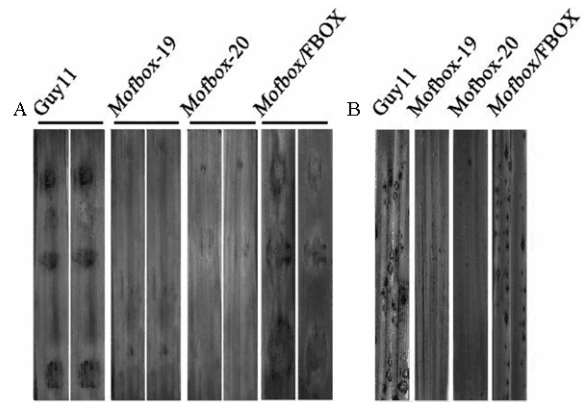
Figure 3 The deletion of *Mofbox* reduced the mycelia growth rate and conidiation of *M. Oryzae*

2.4 *Mofbox* 敲除影响稻瘟病菌产孢能力

分生孢子是稻瘟病菌无性繁殖的主要形式，其产生与否及产生的数量决定了该病害是否发生及严重程度。为明确 *Mofbox* 是否参与了稻瘟病菌分生孢子的分化，对突变体 *Mofbox* 的产孢能力进行测定。结果表明，*Mofbox* 缺失突变体产孢量明显少于野生型。其中，*Mofbox-19* 突变体单位面积产孢量仅为野生型的 45%左右，而 *Mofbox-20* 突变体的产孢量为野生型的 48%左右（图 3-C）。以上结果提示，*Mofbox* 参与了稻瘟病菌分生孢子的分化，对调控其产量具有重要的作用。

2.5 *Mofbox* 参与稻瘟病菌的致病性

为进一步明确 *Mofbox* 在稻瘟病菌致病过程中的作用，分别测定了突变体在 7 d 龄大麦离体叶片及 14 d 龄的水稻秧苗上的致病力。试验表明，*Mofbox* 突变体对大麦（图 4-A）和水稻（图 4-B）的致病性均显著降低。*Mofbox* 突变体在大麦叶片上形成的病斑显著小于野生型菌株（图 4-A）；在水稻叶片上形成的病斑数量较野生型菌株及回补转化子均显著降低，且突变体形成的褐色点状病斑多不能扩展（图 4-B），而将 *Mofbox* 重新导入突变体后，可回补上述表型，表明 *Mofbox* 对调控稻瘟病菌对水稻及大麦的致病性具有重要作用。



A: *Mofbox* 突变体对大麦的致病性 Pathogenicity of *Mofbox* mutants on barley; B: *Mofbox* 突变体对水稻的致病性 Pathogenicity of *Mofbox* mutants on rice

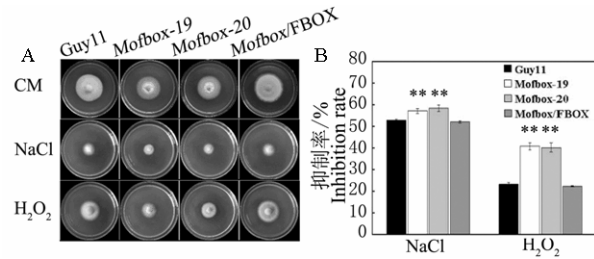
图 4 *Mofbox* 突变体致病性测定

Figure 4 Pathogenicity of *Mofbox* mutant strain

2.6 *Mofbox* 缺失影响稻瘟菌对外源胁迫的耐受性

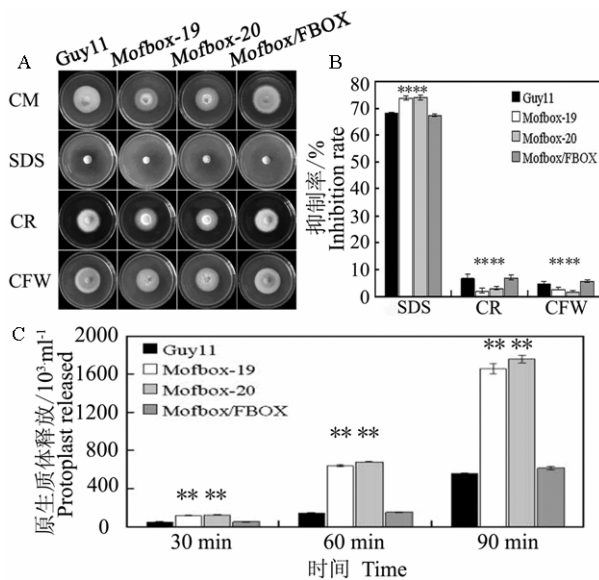
为明确 *Mofbox* 在调控稻瘟病菌对外源胁迫耐受性中的机制，将供试菌株分别接种到 0.7 mol·L⁻¹ NaCl、3 m mol·L⁻¹ H₂O₂ 的 CM 培养基上培养 5 d。结果表明，突变体的菌丝生长较 Guy11 及回补菌株

均显著减慢, 其生长抑制率较 Guy11 及回补菌株显著增加 (图 5)。表明 *Mofbox* 缺失后降低了稻瘟病菌对外源渗透压力及氧化胁迫的耐受性。



A: *Mofbox* 突变体在含 NaCl 和 H₂O₂ 的 CM 培养基上的菌丝生长 The mycelia growth of *Mofbox* mutants on CM medium supplemented with NaCl and H₂O₂; B: *Mofbox* 突变体生长抑制率 The growth inhibition of *Mofbox* mutants

图 5 *Mofbox* 突变体对 NaCl 及 H₂O₂ 的耐受性测定
Figure 5 Growth characteristics of *Mofbox* mutant on CM medium supplemented with NaCl and H₂O₂



A: *Mofbox* 突变体在含 SDS、CFW 以及 Congo Red 的 CM 培养基上的菌丝生长 The mycelia growth of *Mofbox* mutants on CM medium supplemented with SDS、CFW 以及 Congo Red; B: *Mofbox* 突变体生长抑制率 The growth inhibition of *Mofbox* mutants; C: *Mofbox* 突变体原生质体数 Protoplast number of *Mofbox* mutants

图 6 *Mofbox* 突变体细胞壁完整性检测
Figure 6 Cell wall integrity of *Mofbox* mutant strain

为明确 *Mofbox* 缺失是否改变了稻瘟菌的细胞壁及细胞膜的透性, 分别测定了 SDS、CFW 及 Congo Red 等细胞壁或细胞膜的胁迫因子对突变体生长的影响。结果表明, 在含 0.01% SDS 的 CM 平板上, 突变体菌株生长抑制率较野生型菌株及回补

菌株显著增加(图 6-A, B)。而在含 200 μg·mL⁻¹ CFW 或 200 μg·mL⁻¹ Congo Red 的 CM 平板上, 突变体菌株生长抑制率较野生型菌株及回补菌株显著降低 (图 6-A, B)。此外, 突变体原生质体释放速率较 Guy11 显著增加, 在裂解酶处理 30 min、60 min 及 90 min 后, 其释放的原生质体较野生型分别提高 137%、358%及 201%左右 (图 6-C)。以上表明, *Mofbox* 参与稻瘟病菌细胞膜及细胞壁发育, 该基因缺失可显著改变稻瘟病菌的细胞膜透性及细胞壁完整性。

2.7 *Mofbox* 缺失影响稻瘟病菌附着胞形成及膨压积累

附着胞及膨压能否正常形成和积累直接影响了稻瘟病菌对水稻的致病性。为明确 *Mofbox* 突变体的致病性降低与上述因素是否存在关联, 分别对其附着胞形成和膨压进行了分析。结果表明, 突变体在疏水界面上萌发 2 h、8 h、12 h 及 24 h 后, 其形成的附着胞较 Guy11 分别少 2%、50%、63%和 62%左右 (图 7-A)。进一步的附着胞膨压测定发现, 突变体附着胞膨压较野生型显著降低, 在甘油浓度为 2、3 和 4 mol·L⁻¹ 的条件下, 其附着胞皱缩率较 Guy11 分别提高 50%、29%及 21%左右 (图 7-B); 提示 *Mofbox* 通过调控稻瘟病菌附着胞形成及膨压积累, 进而影响其对水稻的致病性。

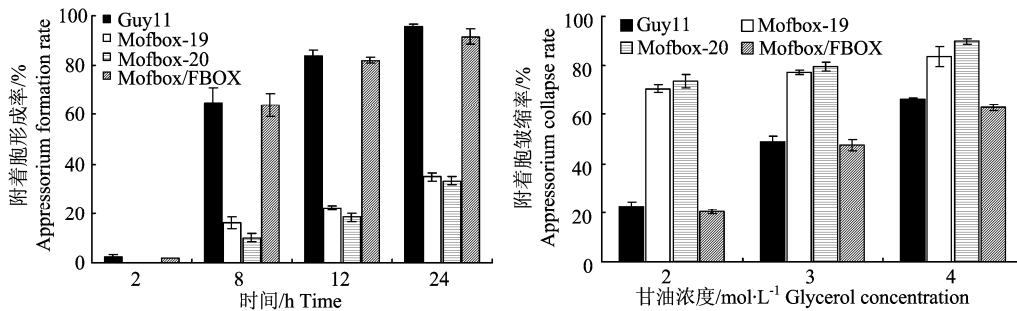
3 小结与讨论

本研究首次从稻瘟病菌中克隆了 1 个含 F-box 结构域的蛋白编码基因 *Mofbox*, 序列结构分析揭示其含有典型的 F-box 结构以及 KTKR 结构, 与丝状真菌的同源性较高, 序列在植物病原真菌中的保守性强。该基因在调控稻瘟病菌生长、产孢、附着胞形成、膨压积累及对水稻的致病性等生物学过程中起重要作用。

F-box 蛋白在不同物种中的生物学功能存在较大差异^[5], 在丝状植物病原真菌中, F-box 蛋白参与菌丝生长^[10]及致病性^[10,12]等过程。而在稻瘟病菌中, *Mofbox* 缺失可导致其菌丝生长速率显著减慢, 致病力降低, 与其它致病真菌种的报道结果较为一致。本研究结果也进一步揭示, 在丝状植物病原真菌中, F-box 蛋白不仅在序列结构上存在相似性, 同时在功能具有高度保守性。植物病原真菌对外源胁迫的耐受能力决定了它能否完成对寄主的致病作用^[19]。Duyvesteijn 和 Wilfried 等^[10, 20]研究报道, 将尖孢镰孢中的 *Fofrpl* 缺失后, 可影响其对外源胁迫的耐受能力, 且致病性降低。在本研究中, *Mofbox*

突变体对外源过氧化氢及氯化钠的耐受性显著降低,与已报道的结果较为一致,表明 *Mofbox* 的敲

除影响了对外源胁迫的耐受能力,揭示这可能是导致致病性降低的重要因素之一。



A: *Mofbox* 突变体的附着胞形成率 Appressorium formation rate of the *Mofbox* mutants; B: *Mofbox* 突变体的膨压 Appressorium turgor pressure of the *Mofbox* mutants

图 7 附着胞形成率和膨压测定

Figure 7 Measurement of appressorium formation rate and appressorium turgor pressure

在稻瘟病菌中,细胞壁的发育缺陷可影响其附着胞的形成及功能发挥,进而影响该病菌对水稻的致病性^[21]。Dou 等^[22]曾发现,将稻瘟病菌中的 *Movam7* 缺失后,可影响细胞壁合成相关酶向其合成位点的极性运输,造成菌丝体表面几丁质分布不均匀,从而提高其对 CFW 的耐受。在本研究中, *Mofbox* 突变体对 CFW 的耐受性显著增强,但原生质体释放速率较野生型显著加快,造成以上现象的原因可能与 *Movam7* 突变体中发现的相似,即是由于细胞壁中几丁质物质分布不均匀引起的。但造成 *Mofbox* 突变体细胞壁中几丁质分布不均匀的机制是否与 *Movam7* 突变体一致有待于进一步研究。

与其它病原真菌类似,稻瘟病菌需要通过分生孢子完成侵染循环^[23]。在水稻整个生育期中,稻瘟病的发生程度取决于该病菌在寄主体内的定殖及分生孢子分化的能力,其分生孢子分化减少能有效地抑制病害的发生^[24]。此外,附着胞是稻瘟病菌成功侵染的保证^[25]。由稻瘟病菌分生孢子形成的附着胞,可帮助其完成对寄主的侵染和定殖^[23]。在本研究中,发现 *Mofbox* 参与调控分生孢子的发育及附着胞的形成,突变体产生分生孢子的能力显著降低,其附着胞的形成及膨压的积累也明显降低,前者可影响稻瘟病菌在自然界的流行程度,而后者则是导致突变体致病性降低的直接因素。

参考文献:

- [1] Ou S H. Rice disease[M]. Surrey, UK: Commonwealth Mycological Institute, 1985: 8-24.
- [2] Dean R A, Talbot N J, Ebbole D J, et al. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*[J]. Nature, 2005, 434: 980-986.
- [3] Xu J R, Zhao X, and Dean R A. From genes to genomes: a new paradigm for studying fungal pathogenesis in *Magnaporthe oryzae*[J]. Adv Genet, 2007, 57:175-218.
- [4] Jackson P K, Eldridge A G, Freed E, et al. The lore of the Rings: Substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases[J]. Trends Cell Biol, 2000, 10: 429-439.
- [5] Kipreos E T, Pagano M. The F-box protein family[J]. Genome Biol, 2000, 10:3002.1-3002.7.
- [6] Patton E E, Willems A R, Tyers M. Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: Don't Skp the F-box hypothesis[J]. Trends Genet, 1998, 14:236-243
- [7] Jiang J, Struhl G. Regulation of the hedgehog and wingless signaling pathways by the F-box/WD40 repeat protein slimb[J]. Nature, 1998, 391: 493-496.
- [8] Callis J, Vierstra R D. Protein degradation in signaling[J]. Curr Opin Plant Biol, 2000, 3: 381-386.
- [9] Li F N, Johnston M. Grr1 of *Scerevisiae* is connected to the ubiquitination machinery through Skp1: Coupling glucose sensing to gene expression and the cell cycle[J]. EMBO J, 1997, 16: 5629-5638.
- [10] Han Y K, Kim M D, Lee S H, et al. A novel F-box protein involved in sexual development and pathogenesis in *Gibberella zeae*[J]. Mol Microbiol, 2007, 63:768-779.
- [11] Duyvesteijn R G, van Wijk R, Boer Y, et al. Frp1 is a *Fusarium oxysporum* F-box protein required for pathogenicity on tomato[J]. Mol Microbiol, 2005, 57: 1051-1063.
- [12] Jonkers W, Kan J A L, Tijm P, et al. The FRP1 F-box gene has different functions in sexuality, pathogenicity and metabolism in three fungal pathogens[J]. Mol Plant Pathology, 2011, 126: 548-563
- [13] Guo M, Guo W, Chen Y, et al. The basic leucine zipper transcription factor Moatf1 mediates oxidative stress responses and is necessary for full virulence of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. Mol Plant Microbe Interact, 2010, 23:1053-1068.
- [14] Sweigard J, Chumley F, Carroll A, et al. A series of vectors for fungal transformation[J]. Fungal Genet Newslett, 1997, 44: 52-53.

- [15] Wang Z Y, Thornton C R, Kershaw M J, et al. The glyoxylate cycle is required for temporal regulation of virulence by the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*[J]. Mol Microbiol, 2003, 47: 1601-1612.
- [16] Song W W, Dou X Y, Qi Z Q, et al. R-SNARE homolog MoSec22 is required for conidiogenesis, cell wall integrity, and pathogenesis of *Magnaporthe oryzae*[J]. PLoS ONE, 2010, 5: e13193
- [17] Guo M, Chen Y, Du Y, et al. The bZIP transcription factor MoAP1 mediates the oxidative stress response and is critical for pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. PLoS Pathog, 2011, 7(2): e1001302.
- [18] Zhang H F, Zhao Q, Liu K Y, et al. MgCRZ1, a transcription factor of *Magnaporthe grisea*, controls growth, development and is involved in full virulence[J]. FEMS Microbiol Lett, 2009, 293: 160-169.
- [19] Chi M H, Park S Y, Kim S, et al. A novel pathogenicity gene is required in the rice blast fungus to suppress the basal defenses of the host[J]. PLoS Pathog, 2009, 5: e1000401.
- [20] Wilfried J, and Martijn R. Mutation of CRE1 in *Fusarium oxysporum* reverts the pathogenicity defects of the FRP1 deletion mutant[J]. Molecular Microbiology, 2009, 74(5): 1100-1113.
- [21] Jeon J, Goh J, Yoo S, et al. A putative MAP kinase kinase, MCK1, is required for cell wall integrity and pathogenicity of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*[J]. Mol Plant Microbe Interact, 2008, 21: 525-534.
- [22] Dou X Y, Wang Q, Qi Z Q, et al. MoVam7, a conserved SNARE component involved in vacuole assembly, is required for growth, endocytosis, chitin distribution, ROS accumulation, and pathogenesis of *Magnaporthe oryzae*[J]. PLoS One, 2011, 6(1): e16439.
- [23] Kim S, Park S Y, Kim K S, et al. Homeobox transcription factors are required for conidiation and appressorium development in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. PLoS Genet, 2009b, 5:e1000757.
- [24] Teng P S, Klein-Gebbinck H W, and Pinnschmidt H. An analysis of the blast pathosystem to guide modeling forecasting[C]//Rice blast modeling and forecasting. International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines, 1991, 34:1-30.
- [25] Xu J R, Urban M, Sweigard J A, et al. The CPKA gene of *Magnaporthe grisea* is essential for appressorial penetration[J]. Mol Plant Microbe Interact, 1997, 10:187-194.