

齐中强, 杜 艳, 沈乐融, 等. 转录因子 MoOaf22 对稻瘟病菌营养生长、细胞壁完整性和胁迫应答的调控[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(6): 1242-1248.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.06.007

转录因子 MoOaf22 对稻瘟病菌营养生长、细胞壁完整性和胁迫应答的调控

齐中强, 杜 艳, 沈乐融, 余振仙, 于俊杰, 俞咪娜, 宋天巧, 张荣胜, 刘永锋
(江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 为了研究油酸激活型转录因子 MoOaf22 编码基因 *MoOAF22* (MGG_03413) 在稻瘟病菌生长发育及致病过程中的功能, 利用基因敲除方法将其进行了缺失突变并对突变体进行了一系列的生物学表型分析。结果表明该基因缺失突变体在完全培养基 (CM) 上营养生长加快, 但在基本培养基 (MM) 上生长变慢, 同时该突变体原生质体释放速度变慢, 对荧光增白剂 (CFW) 和刚果红 (Congo Red) 耐受性增强, 对十二烷基磺酸钠 (SDS)、氯化钠 (NaCl) 和山梨醇 (Sorbitol) 敏感, 但该突变体在产孢量、附着胞形成及致病性等方面较野生型没有明显变化。说明 MoOaf22 在稻瘟病菌的营养生长、细胞壁完整性和对外界的胁迫应答过程中具有重要的调控作用。

关键词: 稻瘟病菌; 转录因子 MoOaf22; 细胞壁完整性; 胁迫

中图分类号: S435.111.4⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)06-1242-07

Regulation of transcription factor MoOaf22 in vegetative growth, cell wall integrity and stress response in *Magnaporthe oryzae*

QI Zhong-qiang, DU Yan, SHEN Le-rong, YU Zhen-xian, YU Jun-jie, YU Mi-na, SONG Tian-qiao, ZHANG Rong-sheng, LIU Yong-feng

(Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: To study the function of oleate-activated transcription factor MoOaf22 coding gene *MoOAF22* (MGG_03413) on growth and pathogenicity, the deletion mutant was identified using the knock out method in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. The results indicated that the deletion mutant showed increased growth and reduced growth in complete medium (CM) and minimal medium (MM), respectively. Meanwhile, the rate of protoplast release of the mutant was slower than that of the wild type, and the mutant was more resistant to calcofluor white (CFW) and congo red, in contrast, the mutant was more sensitive to sodium dodecyl sulfate (SDS), sodium chloride (NaCl) and sorbitol. However, the mutant showed no difference in conidiation, appressorium formation and pathogenicity compared with wild type. In summary,

MoOaf22 is involved in vegetative growth, cell wall integrity and response to stress of *M. oryzae*.

Key words: *Magnaporthe oryzae*; transcription factor MoOaf22; cell wall integrity; stress

收稿日期: 2017-05-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31401697); 江苏省自然科学基金项目 (BK20140749); 江苏省农业科技自主创新基金项目 (CX15-1054)

作者简介: 齐中强 (1985-), 男, 河南驻马店人, 博士, 副研究员, 主要从事稻瘟病菌功能基因研究。(Tel) 025-84391810; (E-mail) qizhongqiang2006@126.com

通讯作者: 刘永锋, (Tel) 025-84391002; (E-mail) liuyf@jaas.ac.cn

稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 引起的稻瘟病是水稻生产上最为重要的一种病害, 已经严重威

胁世界粮食安全生产^[1-3]。该病原菌是一种子囊菌,因其经济重要性、遗传转化的易操作性和全基因组序列测序及注释结果的公布,稻瘟病菌-水稻互作研究已经成为病原菌-寄主互作研究的模式^[4]。稻瘟病菌主要通过分生孢子侵染危害水稻,侵染过程同样受水稻和外界环境的影响^[5]。氧化压力可以帮助植物抵抗病原菌的侵染,细胞壁和渗透压胁迫经常作为药剂设计的靶标,稻瘟病菌细胞壁是感受这些压力最重要的结构。因此稻瘟病菌细胞壁完整性在其致病过程中同样发挥着重要的作用。转录因子在真菌生长发育和侵染循环中起着关键作用,精密调控真菌形态建成和侵染过程中基因的时空表达^[6]。真核生物中,依据 DNA 结合区域的结构特征,转录因子主要分为 4 种类型:螺旋-转角-螺旋(Helix-turn-helix, HTH)、锌指结构(Zinc finger)、碱基亮氨酸拉链(Basic leucine zipper, bZIP)和螺旋-环-螺旋(Helix-loop-helix, HLH)^[7]。

在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中,油酸激活型转录因子 Oaf1 属于 Zn(2)Cys(6)类转录因子,作为 Pip2 异质二聚体的一个亚基,构成 Pip2-Oaf1 复合物,与一些基因启动子区的油酸反应元件结合,共同调控脂肪酸氧化酶、过氧化物酶的生物合成,同时调控端粒染色质的沉默^[8]。在轮状镰刀霉菌(*Fusarium verticillioides*)中,转录因子 Oaf1 调控病原菌对氮源和碳源的利用^[9]。为了明确油酸激活型转录因子在稻瘟病菌中的功能,本研究通过基因敲除的方法对油酸激活型转录因子 MoOaf22 功能进行解析,以了解其在稻瘟病菌生长发育、细胞壁完整性及致病过程中的作用,为研发新农药靶标提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)野生型菌株 Guy11 及水稻感病品种 CO39,由南京农业大学植物保护学院卵菌与真菌分子生物学实验室提供。

完全培养基(Complete medium, CM)、基本培养基(Minimal medium, MM)、产孢培养基(Rice decoc-tion & corn medium, SDC)、燕麦培养基(Oatmeal me-dium, OM)配制方法参照 Zhang 等的方法^[10]。荧光增白剂(Calcofluor white, CFW)和几丁质裂解酶

(Lysing enzymes)购自 Sigma 公司,刚果红(Congo Red)、氯化钠(NaCl)、十二烷基磺酸钠(Sodium do-decyl sulfate, SDS)、山梨醇(Sorbitol)购自上海生工公司。

1.2 敲除载体构建及稻瘟病菌敲除转化

从真菌基因组序列网站(<http://fungidb.org/fungidb/>)下载油酸激活型转录因子 MoOaf22 编码基因 *MoOAF22* (MGG_03413) 的序列。敲除载体构建方法:将 *MoOAF22* 基因上、下游各 1 kb 左右的 DNA 序列作为同源重组的左、右两臂,利用潮霉素基因作为抗性筛选标记进行敲除载体构建。以野生型 Guy11 基因组 DNA 为模板,分别用引物 oaf22-p1 (F)/oaf22-p2 (R) 和 oaf22-p3 (F)/oaf22-p4 (R) 扩增该基因上、下游片段。PCR 产物纯化后作为模板,用引物 oaf22-p1 (F)/oaf22-p4 (R) 进行 over-lap PCR 扩增。约 2 kb 左右的 PCR 产物纯化后连接到 pMD19-T simple vector (TaKaRa 公司产品) 获得质粒 pMD::OAF22。随后,以质粒 pCB1003 为模板,用引物 FL1111 (F) / FL1112 (R), 利用高保真 PCR 扩增潮霉素基因(*HPH*)作为抗性筛选基因。所用的高保真酶为 Primer STAR (TaKaRa 公司产品)。反应程序为:98 ℃ 10 s, 57 ℃ 15 s, 72 ℃ 1 min, 32 个循环。扩增得到的平末端 PCR 产物切胶回收后插入 *EcoRV* 酶切过的质粒 pMD::OAF22 中, 获得敲除载体 pMD::OAF22::HPH。以该质粒为模板,用引物 oaf22-p1 (F)/oaf22-p4 (R) 扩增得到约 3.4 kb 的 DNA 片段,该片段用于稻瘟病菌原生质体转化。原生质体转化参照 Qi 等的方法^[11]。引物序列见表 1。

1.3 转化子验证及 Southern 杂交

原生质体转化后 7 d, 在含有潮霉素 (300 μg/ml) 的 CM 板上挑取转化子, 培养 3 d 后, 采用 CTAB 法提取转化子基因组, 用引物 oaf22-p5 (F)/oaf22-p6 (R) 进行 PCR 验证。再通过 Southern blot 方法进一步确定疑似转化子是否成功敲除, 用地高辛标记的探针与尼龙膜 (Amersham HybondTM-N⁺) 上专一酶切后的转化子和野生型 Guy11 基因组进行杂交。探针引物 oaf22-p5 (F)/oaf22-p6 (R), 大小为 801 bp, 分别用 *EcoRI* 和 *HindIII* 进行基因组酶切。Southern 杂交步骤主要参照 Digoxigenin high-prime DNA labeling and the detection starter 试剂盒 (Roche 公司产品) 操作手册。引物序列见表 1。

表 1 本研究中使用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列
Oaf22-p1 (F)	5'-ACATCCGCGAGCTTGGCACT-3'
Oaf22-p2 (R)	5'-CACACACTACTCGCCAAGGCTCGGAACGGCGAGCCCCG-3'
Oaf22-p3 (F)	5'-CGGGGCTCGCCGTTCCGAGCCTTGGCGAGTACTGTGTG-3'
Oaf22-p4 (R)	5'-ACCAGAGATCTACAATGCCG-3'
Oaf22-p5 (F)	5'-ATGTCCTCGAGCTACGCGCC-3'
Oaf22-p6 (R)	5'-ACATTCTACGTTCAACGAGC-3'
Oaf22-p7 (F)	5'-ACTCACTATAGGGCGAATTGGGTTACTCAAATTGGTTACATCCGCGAGCTTGGCA-3'
Oaf22-p8 (R)	5'-CACCACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTATCCATTGACCTATCGC-3'
FL1111	5'-GGAGGTCAACACATCAATG-3'
FL1112	5'-CTCTATTCTTTGCCCTCG-3'

1.4 互补载体构建及互补转化子获得

以 Guy11 基因组为模板,用引物 oaf22-p7 (F)/oaf22-p8 (R) 扩增 *MoOAF22* 启动子区和编码区序列片段,纯化后的片段与经 *Xho* I 酶切线性化的 pYF11 质粒载体共同导入酵母菌株 XK-125 感受态细胞中,提取阳性克隆质粒转入大肠杆菌 JM109 中,PCR 验证并测序。将测序结果正确的质粒转入突变体菌株中,挑取转化子接种到含有 1 mol/L 和 2 mol/L 山梨醇的 CM 平板中,生长速率和野生型没有差异的为互补转化子。

1.5 *MoOAF22* 基因敲除突变体产孢量测定

将敲除突变体和野生型菌株接种到产孢培养基 (SDC) 上,28 ℃ 黑暗培养 5 d 左右,将表面气生菌丝刮除,黑光灯下照射 3 d,诱导产孢。用毛笔将孢子刷下,4 层擦镜纸过滤后收集待用。

1.6 突变体附着胞形成率测定

将收集到的孢子悬浮液浓度调至 1 ml 5×10^4 个,滴加 40 μ l 孢子悬浮液于盖玻片上,28 ℃ 黑暗保湿培养,分别于 8 h 和 24 h 后观察附着胞形成率。试验设置 3 个重复。

1.7 突变体对水稻和大麦的致病性测定

将基因敲除突变体孢子悬浮液 (1 ml 5×10^4 个,含有 0.25% 明胶),喷施到生长 14 d 的 CO39 水稻植株叶片上,28 ℃ 黑暗培养 24 h 后保持高湿状态。5~7 d 后,观察发病情况并拍照记录。

剪取生长 7 d 的大麦叶片置于保湿培养皿中,每片叶片滴加 3 滴 20 μ l 基因敲除突变体孢子悬浮

液 (1 ml 5×10^4 个,含有 0.25% 明胶),每个样品 3 片叶片,以滴加清水作为对照。28 ℃ 黑暗培养 24 h 后放置到 28 ℃ 光暗交替培养室中,接种 5~7 d 后,观察发病情况并拍照记录。

1.8 突变体原生质体释放速率测定

待测菌株在 CM 培养基上培养 3 d 后,切取 3 mm \times 3 mm 的菌丝块置于 CM 培养液中,28 ℃、150 r/min 培养 48 h,用无菌滤纸过滤收集菌丝,并用吸水纸吸干。称取 0.2 g 菌丝体置于 2 ml 10 μ g/ml 酶解液 (含有 0.7 mol/L NaCl) 中进行酶解。每隔 30 min 取样并终止反应,用血球计数板统计原生质体释放数目。试验重复 3 次,每次设置 3 个重复。

1.9 突变体对细胞壁胁迫因子的敏感性测定

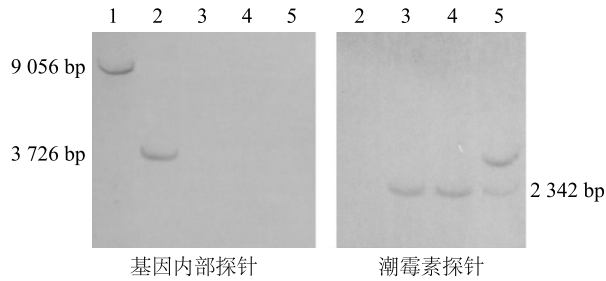
从 CM 培养基上生长 6 d 的菌落边缘上,切取 3 mm \times 3 mm 的菌丝块,接种于直径 60 mm、加入不同浓度胁迫因子的 CM 平板中,28 ℃ 黑暗培养 6 d 后测量菌落直径并拍照,试验重复 3 次,每次设 3 个重复。胁迫因子及浓度为:0.005% 十二烷基磺酸钠,0.010% 十二烷基磺酸钠,0.020% 十二烷基磺酸钠;200 μ g/ml 荧光增白剂,400 μ g/ml 荧光增白剂;200 μ g/ml 刚果红,400 μ g/ml 刚果红;0.5 mol/L NaCl,1.0 mol/L NaCl;1 mol/L 山梨醇,2 mol/L 山梨醇。

2 结果与分析

2.1 *MoOAF22* 基因敲除突变体的获得

根据同源重组原理对 *MoOAF22* 基因进行敲除,

通过初步验证获得 3 个疑似敲除突变体#23、#31 和 #32。进一步进行 Southern 杂交验证,发现 3 个疑似突变体均没有基因探针杂交条带 (3.7 kb 和 9.0 kb),但有潮霉素探针杂交条带 (2.3 kb),表明 *MoOAF22* 基因已被潮霉素基因替换。但是#32 突变体出现 2 条杂交条带,所以#23 和#31 为敲除突变体 (图 1),以下试验均已#23 突变体作为研究对象。



1:野生型菌株 Guy11 基因组 (*Eco* R I 酶切); 2:野生型菌株 Guy11 基因组 (*Hind* III 酶切); 3:敲除突变体 (Δ *Mooaf22*) #23 基因组 (*Hind* III 酶切); 4:敲除突变体 (Δ *Mooaf22*) #31 基因组 (*Hind* III 酶切); 5:敲除突变体 (Δ *Mooaf22*) #32 基因组 (*Hind* III 酶切)。

图 1 *MoOAF22* 敲除突变体 Southern 杂交验证

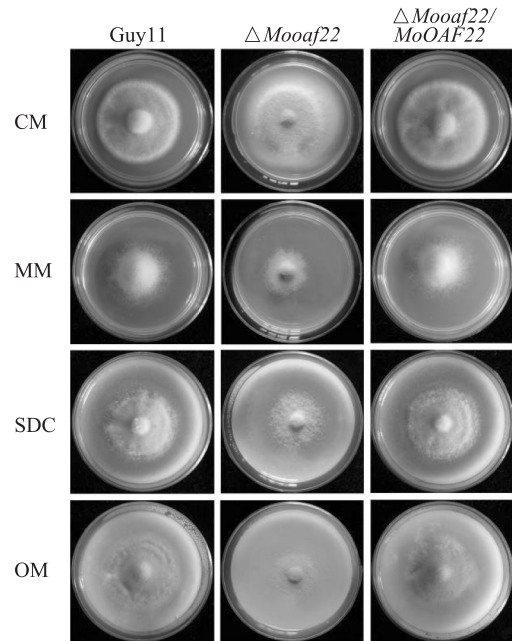
Fig.1 Southern blot of *MoOAF22* deletion mutants

2.2 *MoOAF22* 基因参与病菌对营养的吸收利用过程

油酸激活型转录因子 Oaf1 能够调控微生物对营养的吸收和利用^[9]。为了研究 MoOaf1 在稻瘟病菌对营养吸收和利用过程中的作用,将野生型 Guy11 和#23 突变体及互补转化子分别接种到 CM、MM、SDC、OM 培养基上检测其生长情况。结果显示,在完全培养基 CM 上,突变体生长速率显著上升,但在基本培养基上突变体生长速率显著下降,在另外两种天然培养基上生长速率与野生型没有差别,但是气生菌丝减少 (图 2、图 3)。不同培养基上生长情况显示 *MoOAF22* 参与了稻瘟病菌对营养物质的吸收利用过程。

2.3 *MoOAF22* 基因敲除突变体细胞壁完整性变化

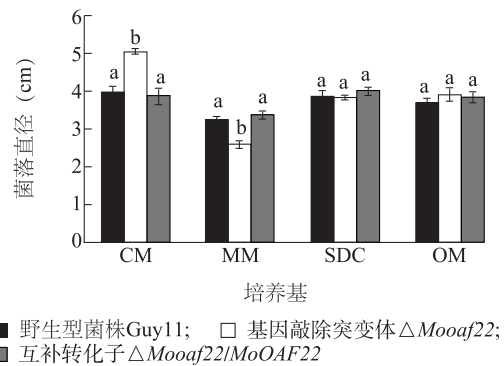
将野生型、*MoOAF22* 基因敲除突变体和互补转化子进行 28 °C 培养,随后放入 0.75% 几丁质裂解酶液中,30 min、60 min 和 90 min 后对释放的原生质体进行计数。结果 (图 4) 显示,基因敲除突变体原生质体释放速率较野生型变慢,表明其细胞壁完整性发生了改变。



Guy11:野生型菌株; Δ *Mooaf22* 基因; 敲除突变体; Δ *Mooaf22*/*MoOAF22*;互补转化子。CM:完全培养基;MM:基本培养基;SDC:产孢培养基;OM:燕麦培养基。

图 2 *MoOAF22* 敲除突变体在 CM、MM、SDC 和 OM 培养基上的生长情况

Fig.2 The growth of *MoOAF22* deletion mutant on CM, MM, SDC and OM medium



不同字母表示差异达 0.05 显著水平。

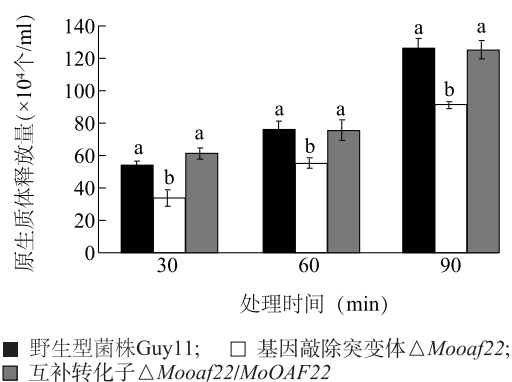
图 3 *MoOAF22* 敲除突变体在不同培养基上生长速率差异

Fig.3 Difference in growth rate of *MoOAF22* deletion mutant on different medium

2.4 *MoOAF22* 基因敲除突变体的胁迫耐受性

细胞壁对于真菌维持细胞形态,行使功能具有重要意义。将野生型 Guy11 和#23 突变体及互补转化子分别接种到含有不同浓度 CFW、刚果红、SDS、

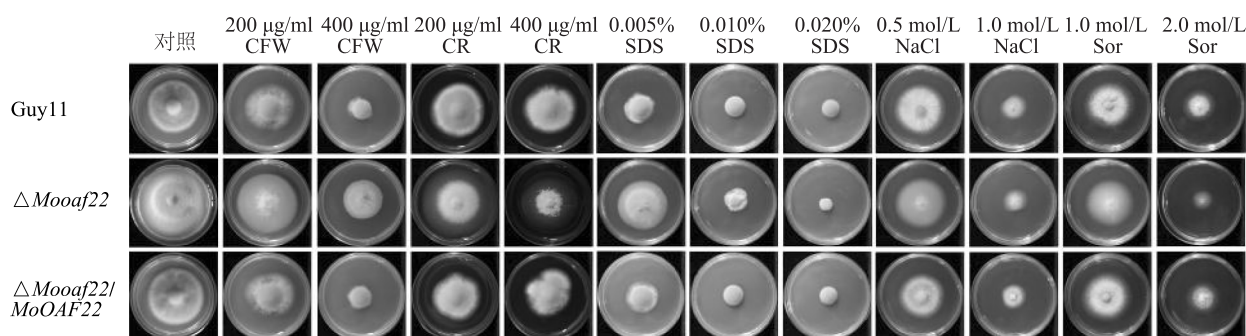
NaCl 和山梨醇的 CM 培养基中。28 ℃、黑暗培养 7 d 后,测量突变体和野生型的菌落直径,并且统计在不同浓度处理条件下的抑制率。结果显示 *MoOAF22* 基因敲除突变体在不同浓度细胞壁胁迫因子(SDS)、渗透压胁迫因子(NaCl 和山梨醇)条件下,生长速率显著下降(图 5),抑制率较野生型显著升高(图 6),表明该突变体对这 3 种胁迫更为敏感。在另外 2 种细胞壁胁迫因子 CFW 和刚果红处理中,*MoOAF22* 敲除突变体生长速率较野生型加快(图 5),抑制率较野生型显著下降(图 6),表明该突变体对这 2 种胁迫耐受性增强。说明 *MoOAF22* 参与了稻瘟病菌细胞壁对外界胁迫的应答过程。



不同字母表示差异达 0.05 显著水平。

图 4 *MoOAF22* 突变体原生质体释放速率变化

Fig.4 Change of the rate of protoplast release of the *MoOAF22* mutant



Guy11:野生型菌株; Δ Mooaf22;*MoOAF22* 基因敲除突变体; Δ Mooaf22/*MoOAF22*;互补转化子。CFW:荧光增白剂;CR:刚果红;SDS:十二烷基磺酸钠;NaCl:氯化钠;Sor:山梨醇。

图 5 *MoOAF22* 敲除突变体在不同胁迫条件下的生长情况

Fig.5 The growth of *MoOAF22* deletion mutant on various stress conditions

2.5 *MoOAF22* 基因敲除突变体的致病性

为了分析 *MoOAF22* 基因对稻瘟病菌产孢量、附着胞形成率及致病性的影响,将敲除突变体和野生型菌株接种到产孢培养基(SDC)上培养,发现其产孢量与野生型没有差异,同时对其附着胞形成情况进行检测,发现附着胞形成率与野生型也没有差异(图 7、图 8)。随后利用孢子悬浮液,分别采用活体水稻喷雾和大麦离体点滴的方法进行致病性测定。结果显示,*MoOAF22* 敲除突变体在 2 种接种条件下,发病情况均与野生型没有明显差异。同时,还采用梯度稀释方法在大麦叶片上进行了致病性测定,结果显示敲除突变体和野生型没有明显差异(图 9)。上述结果表明 *MoOAF22* 基因不参与稻瘟病菌的致病过程。

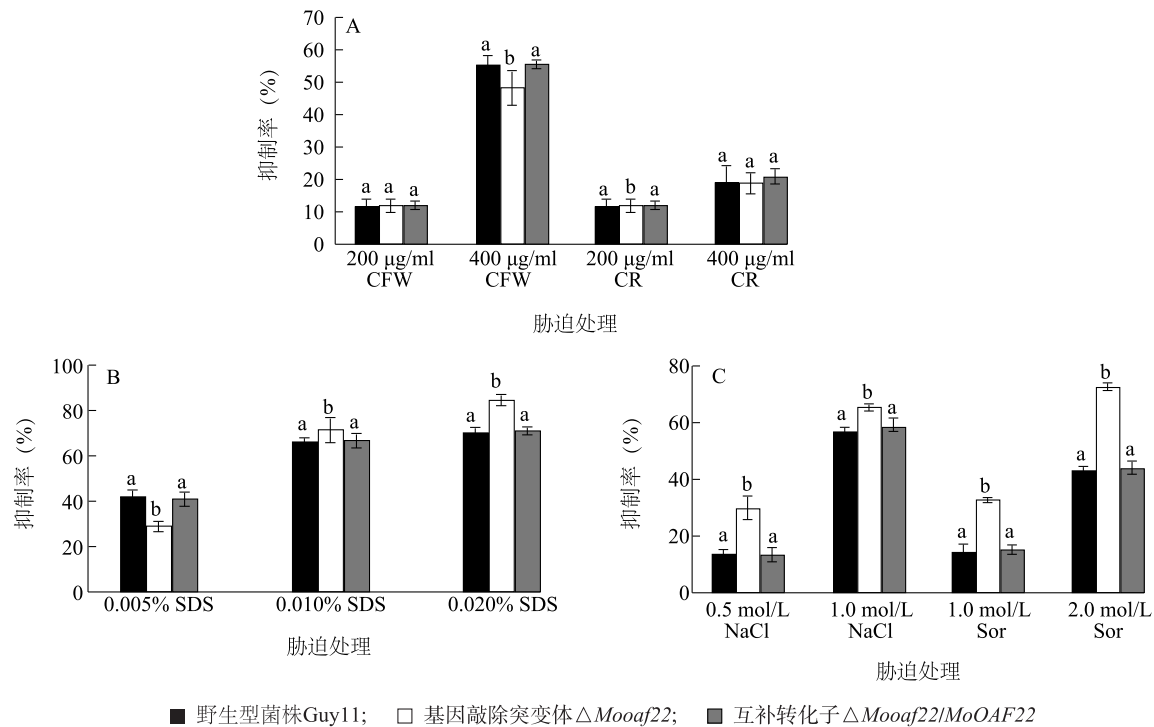
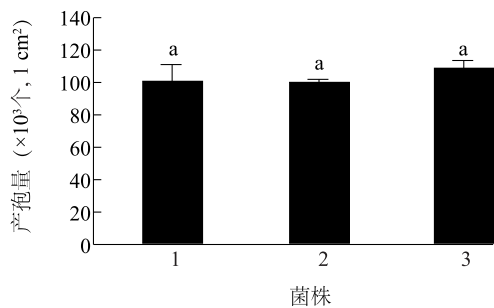
3 讨论

油酸激活型转录因子 Oaf1 作为 Pip2 异质二聚

体的一个亚基,与 Pip2 构成 Pip2-Oaf1 复合体,该复合体诱导一些基因表达,主要参与脂肪酸 β 氧化。本研究通过基因敲除方法,发现稻瘟病菌中一个油酸激活型转录因子 *MoOaf22* 参与调控稻瘟病菌细胞壁完整性和对营养物质的吸收。

在酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中,油酸激活型转录因子 Oaf1 参与碳源代谢过程^[8]。在毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中,油酸存在条件下,Oaf1 活性被激活,而葡萄糖存在时,其活性受到抑制^[12]。在甘蔗梢腐病菌(*Fusarium verticillioides*)中,油酸激活型转录因子 Oaf1 参与调控氮源的代谢从而影响对甘蔗的致病性^[9]。

真菌细胞壁完整性对其生长发育和对外界环境的耐受性至关重要^[13]。在稻瘟病菌中,Mps1 MAPK 信号通路主要调控细胞壁完整性。该通路上 2 个蛋白 *MoMck1* 和 *MoMps1* 编码基因的敲除突变体细胞壁通透性发生改变,原生质体释放显著加快^[14-15]。

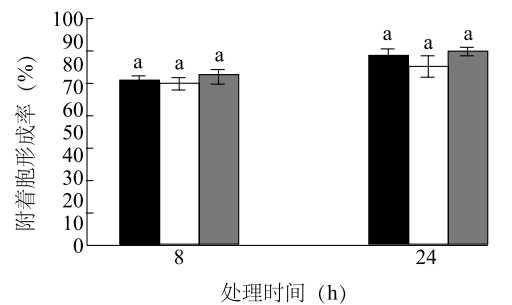
图 6 *MoOAF22* 敲除突变体在不同胁迫条件下的抑制率Fig.6 Inhibition rate of *MoOAF22* deletion mutant on various stress conditions

1: 野生型菌株 Guy11; 2: 基因敲除突变体 $\Delta MoOaf22$; 3: 互补转化子 $\Delta MoOaf22/MoOAF22$ 。不同字母表示差异达 0.05 显著水平。

图 7 *MoOAF22* 敲除突变体产孢量Fig.7 Conidial production of *MoOAF22* deletion mutant

本研究中, 敲除油酸激活型转录因子编码基因 *MoOAF22* 后, 其突变体原生质体释放速度变慢, 同时该突变体对细胞壁完整性胁迫因子 CFW 和刚果红的耐受性增强, 表明其细胞壁感知外界胁迫的能力变弱, 此外该突变体对另一胁迫因子 SDS 表现为敏感。CFW 和 SDS 主要通过绑定几丁质和 β -1, 4-葡聚糖对细胞壁产生应答^[16-18], 因此这种差异可能源于上述胁迫因子作用靶点不同。

在稻瘟病菌中, 乳酸脱氢酶合成转移酶 *MoPyr5* 调控稻瘟病菌对营养的吸收及致病性^[19]。对营养

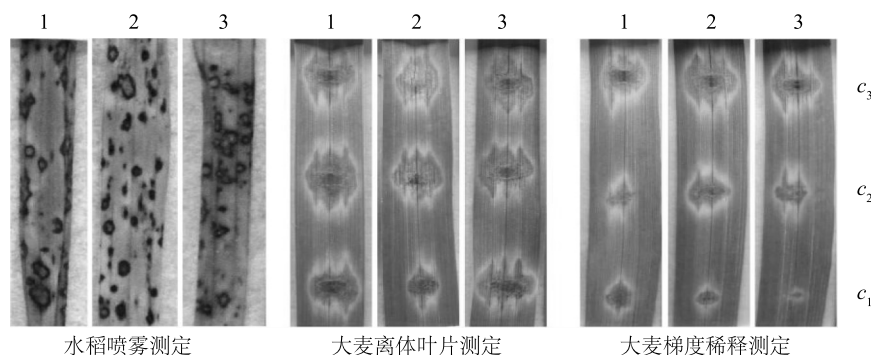


■ 野生型菌株Guy11; □ 基因敲除突变体 $\Delta MoOaf22$; ■ 互补转化子 $\Delta MoOaf22/MoOAF22$

不同字母表示差异达 0.05 显著水平。

图 8 *MoOAF22* 敲除突变体附着胞形成率Fig.8 Appressorium formation rate of *MoOAF22* deletion mutant

的吸收是生物体生存的必要条件。本研究中, *MoOAF22* 敲除突变体在完全培养基上生长速率较野生型变快, 但在基本培养基上生长速率显著变慢, 表明其在营养缺乏情况下对营养吸收能力下降; 此外, 在另外 2 种天然培养基 SDC 和 OM 上, 生长速率没有显著变化, 但是在 4 种培养基上气生菌丝均减少, 说明该突变体对营养吸收能力存在缺陷。综



1:野生型菌株 Guy11;2:敲除突变体 $\Delta MoOaf22$;3:互补转化子 $\Delta MoOaf22/MoOAF22$ 。 c_1 、 c_2 、 c_3 :孢子悬浮液浓度分别为 1 ml 5×10^2 个、 5×10^3 个、 5×10^4 个。

图 9 *MoOaf22* 敲除突变体对水稻和大麦的致病性

Fig.9 Pathogenicity of *MoOaf22* deletion mutant on rice and barley

上所述,本研究结果表明 *MoOaf22* 参与调控稻瘟病菌细胞壁完整性及对营养物质的吸收,这对认识稻瘟病菌的生理过程有重要意义。

参考文献:

- [1] 齐中强,薛延丰,张 猛,等.蛇床子素对稻瘟病菌侵染的影响[J].江苏农业学报,2015,31(6):1265-1269.
- [2] WILSON R A, TALBOT N J. Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*[J]. Nature Reviews Microbiology, 2009, 7: 185-195.
- [3] 姜少芸,郑 露,朱 斌,等.湖北省主栽水稻品种对稻瘟病的田间抗性鉴定[J].南方农业学报,2016,47(8):1303-1312.
- [4] 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.
- [5] HAMER J E, HOWARD R J, CHUMLEY F G, et al. A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus[J]. Science, 1988, 239: 288-290.
- [6] PEDLEY K F, WALTON J D. Regulation of cyclic peptide biosynthesis in a plant pathogenic fungus by a novel transcription factor[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98:14174-14179.
- [7] STEQMAIER P, KEL A E, WINGENDER E. Systematic DNA-binding domain classification of transcription factors[J]. Genome Inform, 2004, 15(2): 276-286.
- [8] TRZCINSKA D J, ISHIKAWA T, MICIALEWICZ A, et al. Yeast transcription factor Oaf1 forms homodimer and induces some oleate-responsive genes in absence of Pip2[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 374(4): 763-766.
- [9] LIN Z Y, WANG J H, BAO Y X, et al. Deciphering the transcriptomic response of *Fusarium verticillioides* in relation to nitrogen availability and the development of sugarcane pokkah boeng disease[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 29692.
- [10] ZHANG H F, TANG W, LIU K Y, et al. Eight RGS and RGS-like proteins orchestrate growth, differentiation, and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*[J]. PLoS pathogens, 2011, 7: e1002450.
- [11] QI Z Q, WANG Q, DOU X Y, et al. MoSwi6, an APSES family transcription factor, interacts with MoMps1 and is required for hyphal and conidial morphogenesis, appressorial function and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*[J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13: 677-689.
- [12] WANG X L, WANG Q, WANG J J, et al. Mit1 transcription factor mediates methanol signaling and regulates the alcohol oxidase1 (*AOX1*) promoter in *Pichia pastoris*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2016, 291 (12): 6245-6261.
- [13] PRASAD R, KAPOOR K. Multidrug resistance in yeast *Candida*[J]. Int Rev Cytol, 2005, 242: 215-248.
- [14] XU J R, STAIGER C J, HAMER J E. Inactivation of the mitogen-activated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 12713-12718.
- [15] 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.
- [16] WOOD P J, FULCHER R G. Dye interactions, a basis for specific detection and histochemistry of polysaccharides[J]. J Histochem Cytochem, 1983, 31: 823-826.
- [17] RAM A F, WOLTERS A, TEN H R, et al. A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white[J]. Yeast, 1994, 10: 1019-1030.
- [18] ZHANG H F, LIU K Y, ZHANG X, et al. Two phosphodiesterase genes, *PDEL* and *PDEH*, regulate development and pathogenicity by modulating intracellular cyclic AMP levels in *Magnaporthe oryzae*[J]. PLoS One, 2011, 6 (2): e17241.
- [19] QI Z Q, LIU M X, DONG Y H, et al. Orotate phosphoribosyl transferase MoPyr5 is involved in uridine 5'-phosphate synthesis and pathogenesis of *Magnaporthe oryzae*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2016, 100(8): 3655-3666.

(责任编辑:张震林)