



稻瘟菌二肽基肽酶V基因 *DppV* 的功能分析

聂燕芳^{1,2} 冷梅钦^{2,3} 李冠军^{2,3} 李洁玲^{2,3} 李华平^{2,3} 李云锋^{2,3*}

(1. 华南农业大学制药工程系, 广州 510642; 2. 华南农业大学广东省微生物信号与作物病害重点实验室, 广州 510642; 3. 华南农业大学植物病理学系, 广州 510642)

摘要: 为明确二肽基肽酶V(dipeptidyl-peptidase V, DppV)在稻瘟菌 *Magnaporthe oryzae* 中的生物学功能,采用在线软件对稻瘟菌DppV进行生物信息学分析,利用实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)技术分析其在稻瘟菌分生孢子不同萌发时间的表达量,通过基因敲除和功能回补、致病力测定等方法对其功能进行分析。结果表明,稻瘟菌DppV蛋白含有信号肽,定位于胞外,不含跨膜结构域,没有GPI锚定位点,为经典分泌蛋白,含DAP2结构域;其与小麦顶囊壳 *Gaeumannomyces tritici*、早熟禾巨座壳 *Magnaporthiopsis poae*、新烟曲霉 *Aspergillus novofumigatus* 和巴斯德伊蒙菌 *Emergomyces pasteurianus* 蛋白序列的相似度较高,分别为68.92%、68.41%、51.09%和49.96%;在稻瘟菌分生孢子萌发早期DppV基因均有表达,但当萌发时间为24 h时,其相对表达量最高,为5.61;稻瘟菌DppV基因敲除突变体菌株的菌落生长速度明显下降,产孢量(8.18×10^4 个/cm²)和4个产孢相关基因 *MoHox2*、*MoCon8*、*MoSec22* 和 *MoCos1* 的相对表达量显著降低,分生孢子萌发率(56.21%)明显下降,对SDS、NaCl、山梨醇和H₂O₂胁迫更加敏感,对水稻的致病力显著降低,水稻植株内真菌生物量明显减少,而稻瘟菌DppV基因回补菌株的表型、耐胁迫能力和致病力等则恢复到稻瘟菌野生型菌株的水平。表明DppV基因在稻瘟菌营养生长、产孢、致病力、对外界胁迫的应答及其在水稻体内的定殖等方面起着重要作用。

关键词: 稻瘟菌; 二肽基肽酶V; 基因敲除; 产孢量; 致病力; 胁迫; 萌发率

Functional analysis of dipeptidyl-peptidase V gene *DppV* in rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*

Nie Yanfang^{1,2} Leng Meiqin^{2,3} Li Guanjin^{2,3} Li Jieliang^{2,3} Li Huaping^{2,3} Li Yunfeng^{2,3*}

(1. Department of Pharmaceutical Engineering, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong Province, China; 2. Guangdong Province Key Laboratory of Microbial Signals and Disease Control, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong Province, China; 3. Department of Plant Pathology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong Province, China)

Abstract: In order to explore the biological function of dipeptidyl-peptidase V (DppV) in rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*, bioinformatics analysis of its amino acid sequence characteristics was performed using on-line software. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to quantify the mRNA expression levels of *DppV* in *M. oryzae* at different stages of conidia germination of *M. oryzae*. The function of *DppV* in *M. oryzae* was investigated by using gene deletion, complementation experiments and pathogenicity test. The results showed that DppV in *M. oryzae* was a typical secreted protein with an N-terminal signal peptide, extracellular localization, no transmembrane domain and no GPI-anchor

基金项目: 国家自然科学基金(31671968), 广东省自然科学基金(2021A1515010643), 广州市科技计划项目(201804010119), 广东省现代农业产业共性关键技术研发创新团队建设项目(2019KJ134)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: yunfengli@scau.edu.cn

收稿日期: 2020-08-10

site, and contained a highly conserved DAP2 domain. The amino acid sequence of DppV in *M. oryzae* was highly similar to those of *Gaeumannomyces tritici* (68.92% similarity), *Magnaporthe oryzae* (68.41% similarity), *Aspergillus novofumigatus* (51.09% similarity) and *Emergomyces pasteurianus* (49.96% similarity). DppV in *M. oryzae* was transcribed at all stages of conidia germination of *M. oryzae*, and reached the highest level (5.61) at 24 h. DppV in *M. oryzae* deletion mutants ($\Delta MoDppV$) showed obvious phenotypic defects, including reduction in colony growth, sporulation quantity (8.18×10^4 spores/cm²) and conidial germination (56.21%) compared to the wild-type strain ZC13. Relative expression levels of four conidiation-related genes (*MoHox2*, *MoCon8*, *MoSec22* and *MoCos1*) were significantly decreased in $\Delta MoDppV$ strain. Deletion of DppV in *M. oryzae* also increased the sensitivity of *M. oryzae* to external stresses (SDS, NaCl, sorbitol and H₂O₂). Furthermore, $\Delta MoDppV$ showed a significant reduction in virulence and fungal biomass in rice seedlings. The complementation strain $\Delta MoDppV$ -*com* was able to restore all the defects of $\Delta MoDppV$ to a comparable level to the wild-type strain. Taken together, these results indicated that DppV played an important role in the mycelium growth, conidiation, tolerance to different stresses, colonization of rice plants and pathogenicity in *M. oryzae*.

Key words: *Magnaporthe oryzae*; dipeptidyl-peptidase V; gene deletion; conidiation; pathogenicity; stress; germination rate

稻瘟病是水稻生产上最重要的病害之一,严重影响水稻的高产和稳产,每年可造成10%~30%的产量损失(杜宜新等,2016;张晓玉等,2020),由稻瘟菌 *Magnaporthe oryzae* 引起。作为一种半活体营养型病原真菌,稻瘟菌在侵染早期与水稻植株建立活体营养型关系,其通过分生孢子粘附在水稻植株疏水性表面,萌发产生芽管和附着孢,附着孢随即形成侵入钉穿透水稻叶片的表皮细胞,并开始侵染邻近细胞,在稻瘟菌侵染后72~96 h,水稻植株开始出现病斑,并由此进入死体营养型阶段(Wilson & Talbot, 2009)。作为植物-病原真菌互作研究的模式系统,尽管学者们从不同角度开展了稻瘟菌与水稻互作机理研究,但对于稻瘟菌的致病分子机理仍不清楚。

分泌蛋白作为一类重要的致病因子,在稻瘟菌的菌丝生长、孢子形成和侵染寄主等过程中发挥着重要作用(Meng et al., 2019),尤其是在活体营养型阶段,稻瘟菌通过分泌大量蛋白质来帮助其侵入,进而抑制水稻的免疫反应(de Guillen et al., 2015),如MoUbp4、MoAbfB和MoSM1等分泌蛋白参与了与稻瘟菌侵染有关的形态发生或对寄主的致病性等过程(Que et al., 2020),AvrPiz-t/APIP5和BAS1-BAS4等分泌蛋白则参与了稻瘟菌从活体营养阶段向死体营养阶段的转变(Wang et al., 2019),PemG1、MoHirp1、MSP1和MoAbfB等分泌蛋白则被证实参与了稻瘟菌与水稻的早期识别和诱导水稻的防卫反应(Yang et al., 2019),但是绝大多数稻瘟菌分泌蛋白在致病性中的作用尚不明确。二肽基肽酶V(dipep-

tidyl-peptidase V, DppV)是一种分泌型的丝氨酸蛋白酶,属于S9家族,其主要裂解多肽,并产生寡肽和自由氨基酸(Vermout et al., 2008)。DppV是烟曲霉 *Aspergillus fumigatus*、黄曲霉 *A. flavus* 和断发毛癣菌 *Trichophyton tonsurans* 等多种人类病原菌所分泌的抗原(Ramirez-Garcia et al., 2018),其可作为毒力因子参与致病过程(Abad et al., 2010),但是在植物病原真菌中关于DppV生物学功能等方面的研究报道较少,虽然崔书建等(2018)采用液相色谱-串联质谱技术对稻瘟菌Guy11菌株中DppV等30个分泌蛋白进行了鉴定,但并未对DppV功能进行深入研究。

稻瘟菌在侵染水稻时会分泌大量的蛋白质来帮助其完成侵染过程(Bai et al., 2019; 廖静静等, 2019; Wang et al., 2019),但目前其大部分分泌蛋白的功能尚不清楚。本课题组在稻瘟菌分泌蛋白质组研究中鉴定了1个分泌蛋白DppV,并应用非标记蛋白定量技术对其进行了分析,发现当稻瘟菌分生孢子萌发24 h时DppV基因表达量显著升高,推测其可能与分生孢子发育有关(数据另文发表)。为进一步研究稻瘟菌DppV分泌蛋白的生物学功能及在致病过程中的作用,本研究通过生物信息学方法分析稻瘟菌DppV分泌蛋白的分子特征,利用实时荧光定量PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 技术分析其在稻瘟菌分生孢子不同萌发时间的相对表达量,通过基因敲除和基因回补技术分析DppV基因在稻瘟菌生长发育和致病性等方面的作用,以期为更全面揭示稻瘟菌致病分子机理奠定理论基础,同

时为更深入了解DppV蛋白在其他植物病原真菌中的作用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株与植物:稻瘟菌野生型菌株ZC13,由广东省农业科学院朱小源研究员惠赠;水稻感病品系CO39,由本实验室保存,将种子种植在装有稻田土、长24 cm、宽18 cm、高7 cm的塑料盆中,每盆35株,置于温度24~26℃、光周期14 L:10 D的植物生长室中培养,采取常规方法管理,待其第4片叶完全展开时进行致病性试验。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基成分为马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂15 g,用ddH₂O定容至1 L;酵母浸膏葡萄糖(yeast-extract dextrose agar, YDA)培养基成分为酵母浸膏5 g、葡萄糖22 g、琼脂粉17 g,用ddH₂O定容至1 L;西红柿燕麦(tomato oatmeal agar, TOA)培养基成分为燕麦片40 g、西红柿汁150 mL、碳酸钙0.06 g、琼脂粉25 g,用ddH₂O定容至1 L。

试剂及仪器:真菌DNA Kit、真菌RNA Kit、Gel Extraction Kit、Plant DNA Extraction Kit,美国Omega Bio-Tek公司;PrimeScript™ RT Reagent Kit、TB Green Premix Ex Taq™ II、大肠杆菌*Escherichia coli*菌株DH5α感受态细胞和pCT74载体、Ex Taq DNA聚合酶、所有内切酶、连接酶和DNA Marker等,宝生物工程(大连)有限公司;DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit,德国Roche公司;PVDF膜,美国Millipore公司;潮霉素B和博来霉素,美国Sigma公司。AP-0650010血球计数板,德国Marienfeld公司;T100™ PCR仪、PowerPac™电泳仪、CFX Connect™实时荧光定量PCR仪,美国Bio-Rad公司;Nanodrop 2000微量核酸蛋白分析仪,美国Thermo Scientific公司;Tanon 2500凝胶成像系统,上海天能科技有限公司;GXZ智能型光照培养箱,宁波江南仪器厂;RPX-250B智能人工气候箱,上海福玛实验设备有限公司;荧光显微镜DMi8-M,徕卡显微系统(上海)贸易有限公司。

1.2 方法

1.2.1 稻瘟菌DppV蛋白的生物信息学分析

从Uniprot数据库(<https://www.uniprot.org/>)中获取稻瘟菌DppV蛋白质序列。参考何艳秋等(2020)方法,利用SignalP 5.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、WoLF PSORT ([\[script.com/psort/wolf_psort.html\]\(http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/\)\)、TMHMM 2.0 \(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>\)和big-PI Predictor \(\[http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi_server.html\]\(http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi_server.html\)\)等在线软件对其进行分析。将稻瘟菌DppV蛋白序列在NCBI数据库进行BLASTP检索,获得同源蛋白序列;利用MEGA 7.0软件采用邻接法对稻瘟菌DppV蛋白及同源蛋白序列进行系统进化树分析,自举分析1 000次;利用The-MEME-Suite 5.3.3软件\(<http://meme-suite.org/>\)对稻瘟菌DppV蛋白及同源蛋白序列进行保守结构域分析\(Ryabovol & Minibayeva, 2014\);并利用Clustal X 2.0和DAN-MAN 9软件对与稻瘟菌DppV蛋白亲缘关系较近的蛋白进行同源性分析。](http://www.gen-</p>
</div>
<div data-bbox=)

1.2.2 不同萌发时间稻瘟菌DppV基因的表达分析

将稻瘟菌野生型菌株ZC13接种到YDA培养基上于25℃培养箱中黑暗培养10 d,用直径5 mm打孔器在菌落边缘打取菌块,将其接种到TOA培养基上于25℃培养箱中光照培养3 d,去除气生菌丝,再于25℃培养箱中光照培养3 d,向培养皿中加入适量灭菌ddH₂O,用4层擦镜纸过滤后收集分生孢子液,用血球计数板进行计数,将其分生孢子悬浮液浓度调至1×10⁶个/mL。

参考Jung et al.(2012)方法,将浓度为1×10⁶个/mL的稻瘟菌野生型菌株ZC13分生孢子悬浮液均匀涂布于PVDF膜上,置于培养皿中,于28℃培养箱中黑暗保湿培养,分别于培养8、12、24和48 h时取样,每个处理重复3次。参照真菌RNA Extraction Kit提取试剂盒说明书提取不同培养时间样品总RNA;参照PrimeScript™ RT Reagent Kit反转录试剂盒说明书制备cDNA;参照TB Green Premix Ex Taq™ II说明书对DppV基因的转录水平进行定量,使用2^{-ΔΔCt}方法计算相对表达水平(Livak & Schmittgen, 2001)。25 μL qRT-PCR反应体系:TB Green Premix Ex Taq II 12.5 μL、10 μmol/L上下游引物各1 μL、稻瘟菌cDNA模板2 μL,灭菌ddH₂O补足至25 μL。按照说明书采用两步法进行扩增,扩增程序:95℃预变性30 s;95℃变性5 s,60℃退火30 s,60℃延伸30 s,30个循环。所用引物均为qMoDppV-F (5'-AACCCGCTTCGCTACATTGA-3')/qMoDppV-R (5'-GACCTGGAGCAGGTTGAACA-3'),内参基因MoActin引物为qMoActin-F (5'-TCGACGTCCGAAAGGATCTGT-3')/qMoActin-R (5'-ACTCCTGCTTCGAGATCCACATC-3'),所有引物均委托广州擎科生物技术有限公司合成。

1.2.3 稻瘟菌*DppV*基因敲除载体的构建

以稻瘟菌野生型菌株ZC13基因组DNA为模板,分别利用引物MoDppV-upF(5'-GGTACCAG-CAGCCTTATAGGACAACAGTCT-3')/MoDppV-upR(5'-GGGCCCCGATTGATAGTTCGACAAGGATCGTC-3')和MoDppV-downF(5'-GAATTCAGCTGAAAACTAGGTTGAGGTTTAG-3')/MoDppV-downR(5'-ACTAGTAGCCAGTGGTATGTAGTTAATTGGT-3')对稻瘟菌*DppV*基因上、下游各1 000 bp的DNA片段进行PCR扩增,获得稻瘟菌*DppV*基因的上下游同源片段。参照Ex Taq DNA聚合酶说明书进行PCR反应。50 μ L PCR体系:Ex Taq 0.25 μ L、10 $\times$ Buffer 5 μ L、dNTP Mixture 4 μ L、DNA模板1 μ L、10 μ mol/L上下游引物各1 μ L,加灭菌ddH₂O至50 μ L。扩增程序:94 $^{\circ}$ C预变性5 min;98 $^{\circ}$ C变性10 s,55 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸1 min,30个循环;72 $^{\circ}$ C再延伸10 min。将上述基因同源片段构建到质粒pCT74的*Kpn* I/*Apa* I和*Eco*R I/*Spe* I酶切位点间,获得稻瘟菌*DppV*基因重组质粒,将其转入大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中,经PCR验证和双酶切鉴定后获得的产物即为稻瘟菌敲除载体pCT74-Mo*DppV*-KO,PCR扩增程序和体系同上。

1.2.4 稻瘟菌*DppV*基因敲除突变体菌株的鉴定

参考Lu et al.(2007)方法,用*Kpn* I和*Spe* I对稻瘟菌*DppV*基因进行双酶切,回收酶切片段;利用聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)介导的原生质体转化法对稻瘟菌野生型菌株ZC13原生质体进行转化,并在含浓度为200 μ g/mL潮霉素B的PDA培养基上筛选抗性转化子。参照真菌DNA Kit试剂盒说明书提取潮霉素抗性转化子DNA,用稻瘟菌*DppV*基因引物MoDppV-F(5'-GAGCAAAAGGTTGGACGATATAAGC-3')/MoDppV-R(5'-CCTGGTGATGTGAAGCCCT-3')和潮霉素基因引物hph-F(5'-GT-TAACTGGTTCCCGGTCGGC-3')/hph-R(5'-GTTA-ACTGATATTGAAGGAGCATTTTTTGG-3')分别对上述转化子进行PCR验证,PCR扩增体系和程序均同1.2.3。选择用稻瘟菌*DppV*基因引物扩增无条带且用hph基因引物扩增有条带的为候选突变体,参照DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit试剂盒说明书对代表性候选突变体进行Southern blot验证分析;同时对代表性候选突变体*DppV*基因的表达进行qRT-PCR分析,方法同1.2.2。

1.2.5 稻瘟菌*DppV*基因回补菌株的鉴定

以稻瘟菌野生型菌株ZC13基因组DNA为模

板,以MoDppV-up2F(5'-GAATTCAGCAGCCTTAGGGACAACAGTCT-3')/MoDppV-up2R(5'-TC-TAGATCTACGGGTCTCACACAAGTAAATG-3')为引物扩增获得包含启动子和*DppV*基因全长序列的DNA片段,PCR扩增体系和程序均同1.2.3;以引物MoDppV-down2F(5'-GTCGACAGCTGAAACTAGGTTGAGGTTTAG-3')/MoDppV-down2R(5'-CTG-CAGAGCCAGTGGTATGTAGTTAATTGGT-3')为引物扩增获得稻瘟菌*DppV*基因下游同源片段,PCR扩增体系和程序均同1.2.3。以酵母表达载体pPICZ α A质粒DNA为模板,以ZeocinF(5'-TC-TAGACCCACACACCATAGCTTCAAATG-3')/ZeocinR(5'-GTCGACAGCTTGCAAATTAAGCCTTCGAGC-3')为引物扩增获得博来霉素基因片段,PCR扩增体系和程序同1.2.3。将这3个片段连接到质粒pBht2-K相应的酶切位点中,获得稻瘟菌回补载体。用*Eco*R I和*Pst* I双酶切回补载体,回收酶切片段;参考Lu et al.(2007)方法制备稻瘟菌*DppV*基因敲除突变体菌株的原生质体,利用PEG介导的原生质体转化法对敲除突变体菌株原生质体进行转化,并在含浓度为200 μ g/mL博来霉素的YDA培养基上进行筛选,用稻瘟菌*DppV*基因引物MoDppV-F/MoDppV-R对抗性转化子进行PCR验证,PCR扩增体系和程序同1.2.3,能扩增出条带的为稻瘟菌*DppV*基因回补菌株。选择代表性回补菌株对其分生孢子萌发24 h的*DppV*基因表达进行qRT-PCR分析,以检测回补菌株*DppV*基因的表达是否恢复到稻瘟菌野生型*DppV*基因的表达水平,qRT-PCR分析同1.2.2。

1.2.6 稻瘟菌*DppV*基因敲除突变体菌株特性

稻瘟菌*DppV*基因敲除突变体菌株的形态特征:将稻瘟菌野生型菌株、基因敲除突变体菌株和回补菌株在YDA培养基上活化10 d,用直径5 mm打孔器在其菌落边缘打取菌块,分别接种到新的YDA培养基上,置于25 $^{\circ}$ C培养箱中黑暗倒置培养9 d,采用十字交叉法测量菌落直径,并于显微镜下观察菌丝和分生孢子形态,每株菌株统计100个分生孢子,试验重复3次。

稻瘟菌*DppV*基因敲除突变体菌株的产孢量、萌发率和产孢相关基因表达量:将稻瘟菌野生型菌株、基因敲除突变体菌株和回补菌株在YDA培养基上活化9 d,用直径5 mm打孔器在其菌落边缘打取菌块,分别接种到TOA培养基上,置于25 $^{\circ}$ C培养箱中光照培养3 d后,去除气生菌丝,再于25 $^{\circ}$ C培养箱

中光照培养3 d,每个培养皿中加入3 mL灭菌ddH₂O,用4层擦镜纸过滤后收集分生孢子液,采用血球计数板计数每个培养皿中的分生孢子数量。将3种分生孢子液分别滴于载玻片上,置于25℃培养箱中黑暗培养12 h后,观察分生孢子萌发情况,每株菌株分别统计100个分生孢子,计算分生孢子萌发率。为了进一步验证稻瘟菌*DppV*基因敲除后对稻瘟菌产孢的影响,在*DppV*基因敲除突变体菌株分生孢子萌发24 h时进行取样,对*MoSec22*、*MoHox2*、*MoCos1*、*MoCon8*四个产孢相关基因的表达进行qRT-PCR分析,方法同1.2.2。所用引物分别为*MoCon8*-F (5'-CAGCAACTCGACCTCTTCCT-3')/*MoCon8*-R (5'-TTCCACATCTTGCCAAACAG-3')、*MoHox2*-F (5'-CGATAATTGCTCCACACCT-3')/*MoHox2*-R (5'-GAAGGAGTCGGTGGTGACAT-3')、*MoSec2*-F (5'-CTGAGGGACGTCACAAAGGT-3')/*MoSec2*-R (5'-AGCATGAGCTCCAGTTGAT-3')和*MoCos1*-F (5'-CCCTCAGCCCACATACAACT-3')/*MoCos1*-R (5'-AGCCTTCGCTCGATACTGA A-3'),试验均重复3次。

稻瘟菌*DppV*基因敲除突变体菌株对不同胁迫的响应:向YDA培养基中分别加入终浓度为0.8 mol/L的NaCl、终浓度为0.8 mol/L的山梨醇、质量体积比为0.005%的十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、浓度为5 mol/L的H₂O₂、浓度为0.2 g/L的刚果红、浓度为0.2 g/L的荧光增白剂,用直径为5 mm打孔器在活化的稻瘟菌野生型菌株、基因敲除突变体菌株和回补菌株菌落边缘打取菌块,并将其分别接种到上述培养基中,置于25℃培养箱中黑暗培养9 d后,测量菌落直径;每个处理重复3次,试验重复3次。抑制率=(对照菌落直径-胁迫下菌落直径)/对照菌落直径×100%。

稻瘟菌*DppV*基因敲除突变体菌株的致病力测定:浓度为1×10⁵个/mL的稻瘟菌基因敲除突变体菌株分生孢子悬浮液和回补菌株分生孢子悬浮液制备方法同1.2.2。参考Fan et al.(2018)分别采用离体接种法和活体接种法测定不同稻瘟菌菌株对水稻幼苗的致病力。(1)离体接种法。剪取水稻第4片叶,分别将终浓度均为1×10⁵个/mL的稻瘟菌野生型菌株、基因敲除突变体菌株和回补菌株的分生孢子悬浮液(含0.02% Tween20)5 μL滴加到水稻叶片上,每个处理接种6片叶,在叶片正面中部接种4个部位;接种后于温度25℃、相对湿度100%的人工气候箱中黑暗放置24 h后,再于14 L:10 D光周期下培养4 d,观察叶

片症状,试验重复3次。(2)活体接种法。将上述分生孢子悬浮液分别喷雾接种至4叶期水稻幼苗,每个处理接种105株,重复3次;于温度为25℃、相对湿度100%的人工气候箱中黑暗放置24 h后,再于14 L:10 D光周期下培养7 d后进行病情调查。稻瘟病分级标准参考Li et al.(2012)方法,计算病情指数。具体的分级标准如下,0级,不发病;1级,只有在最下面叶片有少量分散的病斑;2级,最下面叶片轻度发病,下面第2叶片上有分散的病斑;3级,下面第3叶片轻度发病,最下面叶片发病中等或较重;4级,下面叶片中度到轻度发病,扩展到植株1/2处,中点下叶片轻度发病或者只有分散的病斑;5级,下面叶片发病严重,植株1/2处以下叶片轻度或中度发病,植株1/2处以上叶片不发病;6级,植株下面1/3部分严重发病,植株1/2处叶片中度发病,植株1/2处以上叶片有零星病斑;7级,植株1/2处及以下叶片严重发病,上面病害扩展到剑叶下面的叶片,或者剑叶也有少量感染;8级,植株1/2处及以下叶片严重发病,植株上部1/3部分中度或严重发病,剑叶发病显著;9级,所有叶片都严重发病,穗状花序也有一定程度的发病。病情指数=Σ(各级病叶数×各级代表值)/(最高一级代表值等级×调查总叶数)×100。(3)真菌生物量测定参考Park et al.(2012)方法。取离体接种法处理5 d后的水稻叶片,每个处理取3片叶,每叶剪取3个约1 cm的接种部位叶段,参照Plant DNA Extraction Kit说明书提取水稻叶片DNA;以稻瘟菌*MoActin*基因为内参基因,利用*OsUbiquitin*基因上游引物(5'-TTCTGGTCCTTCCACTTTCAG-3')/下游引物(5'-ACGATTGATTAAACCAGTCCATGA-3')进行qRT-PCR分析,方法同1.2.2,每个处理重复3次。

1.3 数据分析

采用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析,应用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 稻瘟菌DppV蛋白的生物信息学分析

稻瘟菌DppV蛋白含有信号肽,亚细胞定位于胞外,不含跨膜结构域,没有GPI锚定位点,为经典分泌蛋白。在NCBI数据库中共BLASTP检索到12个同源蛋白。系统发育进化树显示稻瘟菌DppV蛋白与12个同源蛋白序列的相似性较高,尤其与小麦顶囊壳*Gaeumannomyces tritici*、早熟禾巨座壳*Magnaporthe oryzae*、新烟曲霉*Aspergillus novofumigatus*

和巴斯德伊蒙菌 *Emergomyces pasteurianus* 这4个蛋白序列的相似性更高, 亲缘关系更近(图1), 且这些蛋白序列都含有保守的二肽氨基肽酶2(dipeptidyl aminopeptidase 2, DAP2)结构域。同源性比较分析

显示, 稻瘟菌 DppV 蛋白与小麦顶囊壳、早熟禾巨座壳、新烟曲霉和巴斯德伊蒙菌蛋白序列的相似度分别为 68.92%、68.41%、51.09% 和 49.96%(图2)。

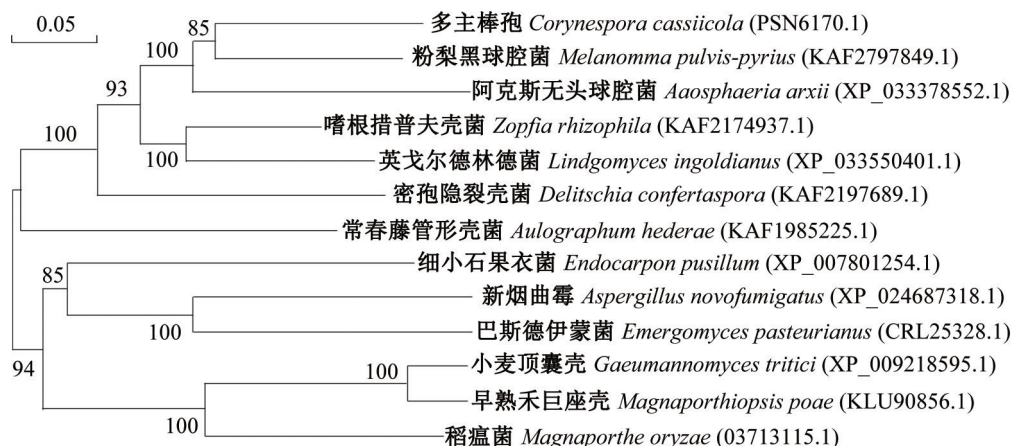
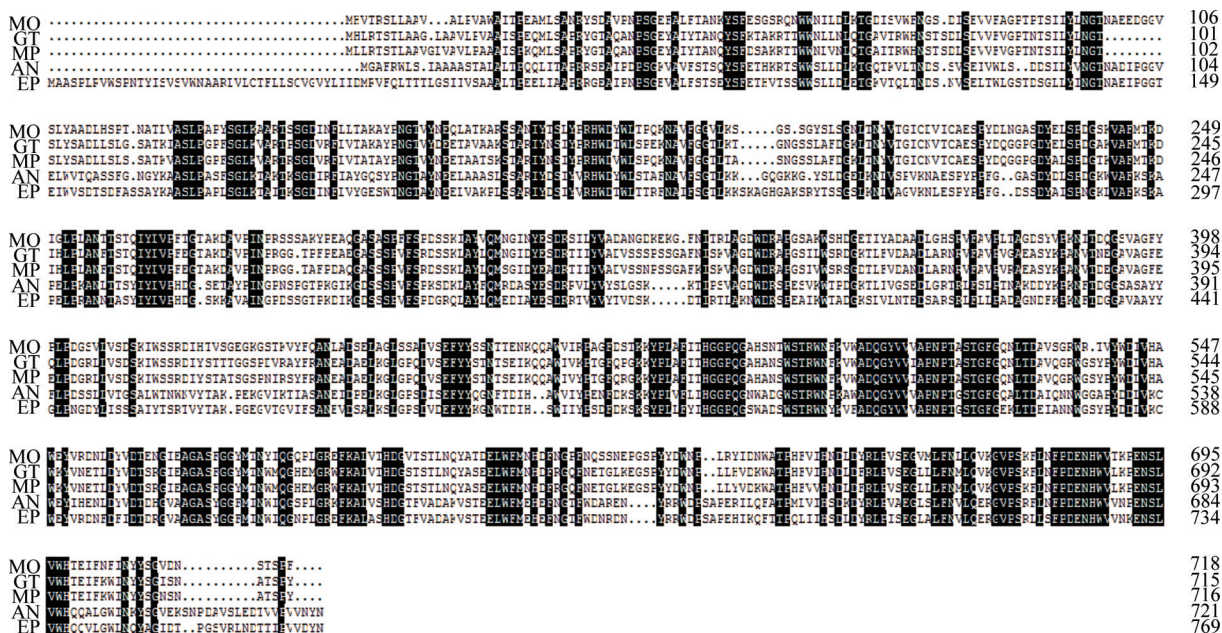


图1 稻瘟菌 DppV 蛋白与其他真菌同源蛋白的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of DppV protein in *Magnaporthe oryzae* and homologous proteins in other fungi



黑色阴影: 一致的氨基酸序列; 圆点: 氨基酸序列中的缺口; MO: 稻瘟菌; GT: 小麦顶囊壳; MP: 早熟禾巨座壳; AN: 新烟曲霉; EP: 巴斯德伊蒙菌。The shaded dark background: The common amino acids; the dots: gaps in the amino acid sequences; MO: *Magnaporthe oryzae*; GT: *Gaemannomyces tritici*; MP: *Magnaporthiopsis poae*; AN: *Aspergillus novofumigatus*; EP: *Emergomyces pasteurianus*.

图2 稻瘟菌 DppV 与其他真菌同源蛋白的氨基酸序列比较

Fig. 2 Comparison of amino acid sequences of DppV protein in *Magnaporthe oryzae* and homologous proteins in other fungi

2.2 不同萌发时间稻瘟菌DppV基因的表达

稻瘟菌分生孢子不同萌发时间下 DppV 基因表达存在显著差异。当萌发时间为 24 h, 稻瘟菌 DppV 基因表达量为 5.61, 显著高于其他萌发时间下的表达量 ($P < 0.05$), 当萌发时间为 8 h 时, 稻瘟菌 DppV 基因表达量为 0.78, 显著低于其他萌发时间下的表

达量 ($P < 0.05$, 图3)。

2.3 稻瘟菌DppV基因敲除突变体菌株的鉴定

潮霉素抗性转化子经稻瘟菌 DppV 基因引物和 hph 基因引物 PCR 扩增后, 共获得了 6 株候选突变体, 分别选取其中 $\Delta MoDppV-12$ 、 $\Delta MoDppV-15$ 和 $\Delta MoDppV-23$ 三株候选突变体进行 Southern blot 验

证。Southern blot分析结果显示,当以 *hph* 基因片段为探针时,稻瘟菌野生型菌株未检测到杂交条带,而 $\Delta MoDppV-12$ 、 $\Delta MoDppV-15$ 和 $\Delta MoDppV-23$ 三株突变体菌株均能检测到1条目的条带(图4-A);当以稻瘟菌 *DppV* 基因片段为探针时,稻瘟菌野生型菌株可检测到1条杂交条带,而3株突变体菌株均未检测到目的条带(图4-B)。经qRT-PCR检测,3株稻瘟菌基因敲除突变体菌株中 *DppV* 基因几乎不表达。

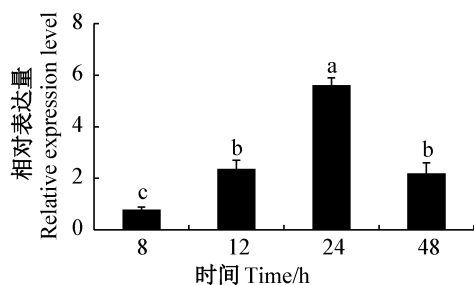
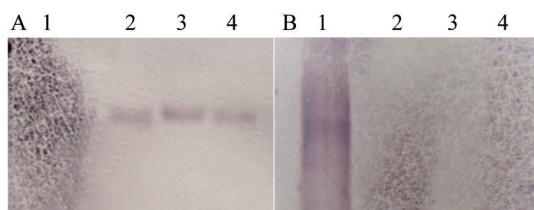


图3 稻瘟菌分生孢子不同萌发时间 *DppV* 基因相对表达量

Fig. 3 Relative expression of *DppV* gene in *Magnaporthe oryzae* at different stages of conidia germination

图中数据为平均数±标准误。不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different lowercase letters indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.



A和B: 分别以 *hph* 基因片段和 *DppV* 基因片段为探针。1: 稻瘟菌野生型菌株 ZC13; 2~4: *DppV* 基因敲除突变体菌株 $\Delta MoDppV-12$ 、 $\Delta MoDppV-15$ 和 $\Delta MoDppV-23$ 。A and B: *hph* and *DppV* gene fragment as a probe, respectively. 1: Wide-type strain of *Magnaporthe oryzae* ZC13; 2~4: *DppV* deletion mutant strains $\Delta MoDppV-12$, $\Delta MoDppV-15$ and $\Delta MoDppV-23$, respectively.

图4 稻瘟菌 *DppV* 基因敲除突变体菌株 Southern blot 鉴定

Fig. 4 Southern blot confirmation of *DppV* deletion mutant strains of *Magnaporthe oryzae*

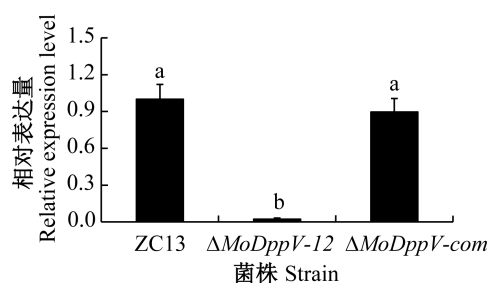
2.4 稻瘟菌 *DppV* 基因回补菌株的鉴定

利用PEG介导的原生质体转化法对基因敲除突变体菌株 $\Delta MoDppV-12$ 进行了基因回补。经PCR验证,共获得了8株稻瘟菌 *DppV* 基因回补菌株。qRT-PCR分析结果显示稻瘟菌回补菌株 $\Delta MoDppV-com$ 中 *DppV* 基因相对表达量与野生型菌株之间无差异,表明其得到了明显恢复(图5)。

2.5 稻瘟菌 *DppV* 基因敲除突变体菌株特性

2.5.1 稻瘟菌 *DppV* 基因敲除突变体菌株形态特征

与稻瘟菌野生型菌株 ZC13 和 *DppV* 基因回补菌株 $\Delta MoDppV-com$ 相比, *DppV* 基因敲除突变体菌株 $\Delta MoDppV-12$ 在 PDA 培养基上的生长速度减缓,气生菌丝稀疏(图6);培养9 d后, *DppV* 基因敲除突变体菌株 $\Delta MoDppV-12$ 菌落直径为 3.46 cm,野生型菌株 ZC13 和 *DppV* 基因回补菌株 $\Delta MoDppV-com$ 菌落直径分别为 4.26 cm 和 4.17 cm,显著高于 *DppV* 基因敲除突变体菌株 $\Delta MoDppV-12$ ($P<0.05$);但 $\Delta MoDppV-com$ 的菌丝形态和分生孢子形态与野生型菌株和 $\Delta MoDppV-com$ 无明显差别。

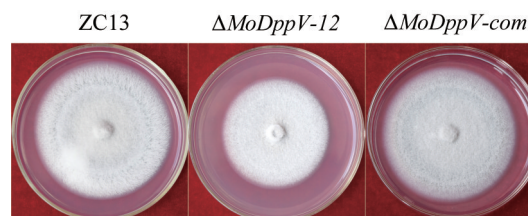


ZC13、 $\Delta MoDppV-12$ 和 $\Delta MoDppV-com$: 稻瘟菌野生型、*DppV* 基因敲除突变体和回补菌株。ZC13, $\Delta MoDppV-12$ and $\Delta MoDppV-com$: Wide-type, *DppV* gene deletion mutant and complemented strains of *Magnaporthe oryzae*.

图5 回补菌株中稻瘟菌 *DppV* 基因相对表达量的 qRT-PCR 检测

Fig. 5 qRT-PCR quantifying of relative expression of *DppV* gene in the complemented strain of *Magnaporthe oryzae*

图中数据为平均数±标准误。不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different letters indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.



ZC13、 $\Delta MoDppV-12$ 和 $\Delta MoDppV-com$: 稻瘟菌野生型、*DppV* 基因敲除突变体和回补菌株。ZC13, $\Delta MoDppV-12$ and $\Delta MoDppV-com$: Wide-type, *DppV* gene deletion mutant and complemented strains of *Magnaporthe oryzae*.

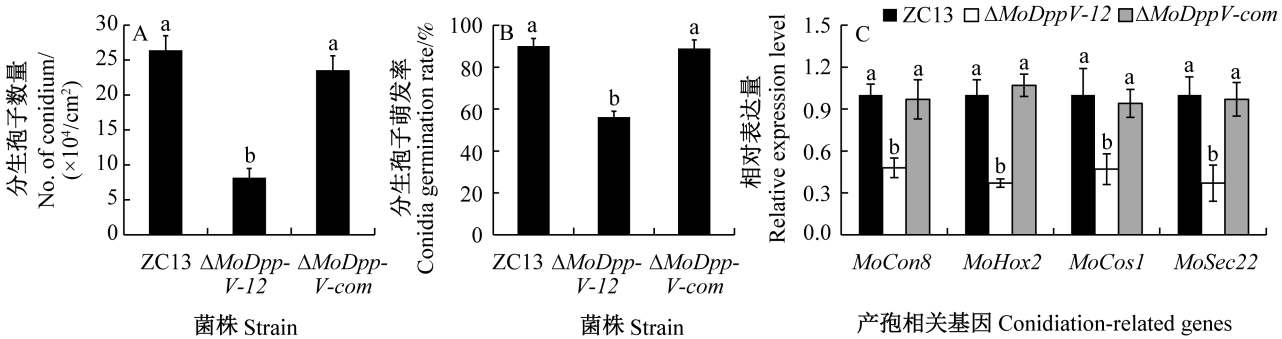
图6 稻瘟菌野生型、*DppV* 基因敲除突变体和基因回补菌株在 PDA 培养基上的形态特征

Fig. 6 Colony morphology of wild type, *DppV* gene deletion mutant and complemented strains of *Magnaporthe oryzae* on PDA mediums

2.5.2 产孢量、萌发率和产孢相关基因表达量

与稻瘟菌野生型菌株 ZC13 和 *DppV* 基因回补菌株 $\Delta MoDppV-com$ 相比, *DppV* 基因敲除突变体菌株 $\Delta MoDppV-12$ 的产孢量为 8.18×10^4 个/cm², 仅为野生型菌株 ZC13 (产孢量为 2.64×10^5 个/cm²) 和 *DppV* 基因回补菌株 $\Delta MoDppV-com$ (产孢量为 2.36×10^5 个/cm²) 的 30.96% 和 32.53% (图 7-A)。*DppV* 基因敲除突变体菌株 $\Delta MoDppV-12$ 的分生孢子萌发率为 56.21%,

显著低于野生型菌株 ZC13 (90.05%) 和 *DppV* 基因回补菌株 $\Delta MoDppV-com$ (87.94%, 图 7-B)。*DppV* 基因敲除突变体菌株 $\Delta MoDppV-12$ 中 *MoHox2*、*MoCon8*、*MoSec22* 和 *MoCos1* 四个产孢相关基因的相对表达量均显著低于野生型菌株 ZC13 和 *DppV* 基因回补菌株 $\Delta MoDppV-com$ (图 7-C), 表明 *DppV* 基因敲除影响了稻瘟菌分生孢子的产生和萌发。



ZC13: 稻瘟菌野生型菌株; $\Delta MoDppV-12$ 、 $\Delta MoDppV-com$: *DppV* 基因敲除突变体和回补菌株。 ZC13: Wide-type strain of *Magnaporthe oryzae*; $\Delta MoDppV-12$ and $\Delta MoDppV-com$: *DppV* gene deletion mutant and complemented strains.

图7 *DppV* 基因敲除对稻瘟菌分生孢子数量(A)、分生孢子萌发率(B)和产孢相关基因相对表达量(C)的影响

Fig. 7 Effects of *DppV* gene deletion on conidial production (A), conidia germination rate (B) and relative expression of the conidiation-related genes (C) of *Magnaporthe oryzae*

图中数据为平均数±标准误。不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。 Data are mean±SE. Different lowercase letters indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.5.3 对不同胁迫的响应

在含 CR 和 CFW 的 YDA 培养基上, 稻瘟菌 *DppV* 基因敲除突变体菌株 $\Delta MoDppV-12$ 与野生型菌株 ZC13 和 *DppV* 基因回补菌株 $\Delta MoDppV-com$ 的生长情况和抑制率之间也无显著差异 (图 8~9); 但在

含 SDS、NaCl、山梨醇和 H₂O₂ 的 YDA 培养基上, $\Delta MoDppV-12$ 的菌落生长缓慢, 且抑制率显著高于野生型菌株 ZC13 和 $\Delta MoDppV-com$ ($P<0.05$, 图 9), 表明 *DppV* 基因参与稻瘟菌对渗透压的应答, 并调控对氧化胁迫的反应, 但与细胞壁完整性无关。

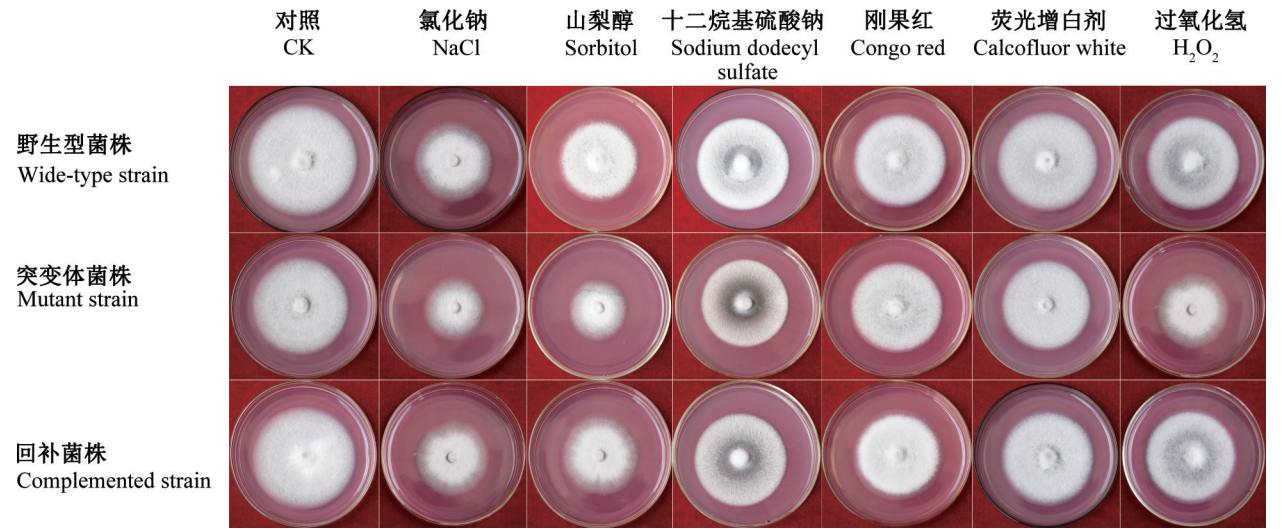


图8 不同胁迫下稻瘟菌野生型、*DppV* 基因敲除突变体和回补菌株的菌落形态

Fig. 8 Colony morphology by stresses for wild type, *DppV* gene deletion mutant and complemented strains of *Magnaporthe oryzae*

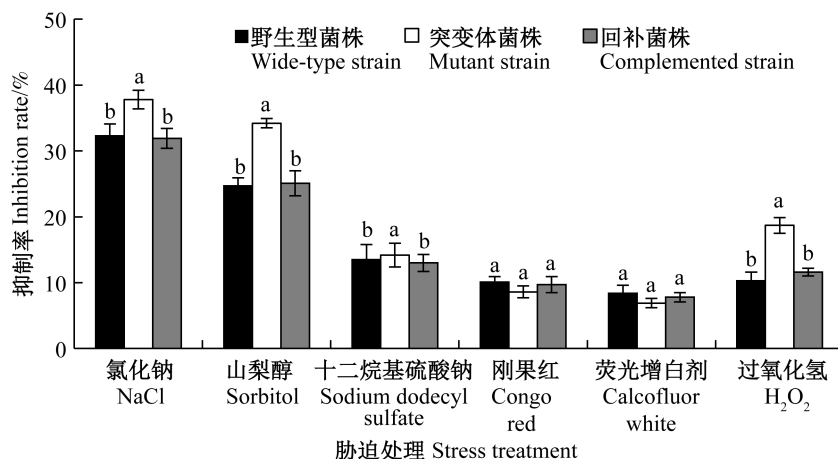


图9 不同胁迫下稻瘟菌 *DppV* 基因敲除突变体、野生型和回补菌株的抑制率

Fig. 9 Inhibition rates by stresses for wild type, *DppV* gene deletion mutant and complemented strains of *Magnaporthe oryzae*

图中数据为平均数±标准误。不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different lowercase letters indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.5.4 致病力

离体接种法接种稻瘟菌 *DppV* 基因敲除突变体菌株 $\Delta MoDppV-12$ 的水稻叶片病斑明显小于接种其他2株菌株时(图10),水稻植株内的真菌生物量为11.35,也显著低于其他2株菌株(图11-A)。喷雾法接种稻瘟菌 *DppV* 基因敲除突变体菌株 $\Delta MoDppV-12$ 后,水稻植株的病情指数为32.5,也显著低于接种其他2株菌株时,而 *DppV* 基因回补菌株 $\Delta MoDppV-com$ 的致病力则已经恢复到野生型菌株的水平(图11-B),表明 *DppV* 基因敲除影响了稻瘟菌在水稻体内的定殖,进而导致致病力显著下降。

结构进入到细胞内,或者分泌到水稻的细胞间隙而起作用(Meng et al., 2019)。在稻瘟菌侵染水稻过程中, *DppV* 蛋白是如何分泌到水稻植株体内并起作用,仍有待进一步研究。



图10 稻瘟菌 *DppV* 基因敲除对致病力的影响

Fig. 10 Effect of *DppV* gene deletion of *Magnaporthe oryzae* on pathogenicity

3 讨论

生物信息学分析发现稻瘟菌 *DppV* 蛋白含有信号肽,亚细胞定位于胞外,不含跨膜结构域,没有 GPI 锚定位点,属于经典分泌蛋白。一般稻瘟菌分泌蛋白通过侵染菌丝或者穿透寄主活体细胞的侵染

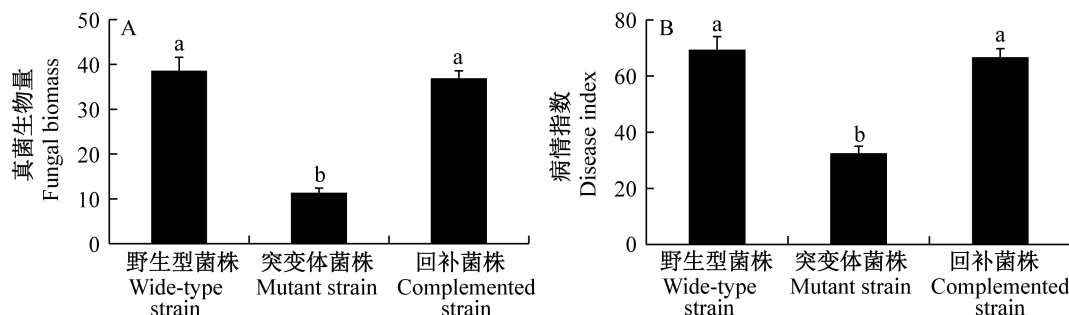


图11 稻瘟菌 *DppV* 基因敲除对水稻植株体内真菌生物量(A)及病情指数(B)的影响

Fig. 11 Effects of *DppV* gene deletion of *Magnaporthe oryzae* on fungal biomass (A) and disease index (B) in rice plants

图中数据为平均数±标准误。不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different letters indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

在人类病原真菌中, *DppV* 蛋白主要参与蛋白质降解产物的消解(Tomkinson, 2019), 如在烟曲霉中, *DppV* 可以降解入侵组织或调控免疫反应(Kumar et al., 2011); 从断发毛癣菌中获得的 *DppV* 同源蛋白可以诱导人的免疫反应(Woodfolk et al., 1998), 但在植物病原真菌中关于 *DppV* 功能研究的报道则较少。本研究采用 qRT-PCR 技术证实稻瘟菌分生孢子不同萌发时间 *DppV* 基因均有表达, 且当萌发时间为 24 h 时相对表达量显著高于其他萌发时间的相对表达量。Foster et al. (2017) 研究结果也表明分生孢子萌发 24 h 后为稻瘟菌附着孢形成和成功侵染水稻的关键时期, 因此推测其高水平表达可能与分生孢子的发育和定殖有关。本研究结果还显示, 稻瘟菌敲除 *DppV* 基因后可导致稻瘟菌的产孢量和分生孢子萌发率降低, 产孢相关基因的表达明显下调, 说明该基因与稻瘟菌产孢以及发育密切相关。本研究结果还表明 *DppV* 基因敲除引起稻瘟菌对水稻致病力明显下降, 接种 *DppV* 基因敲除突变体菌株后水稻植株内真菌生物量减少, 这与其菌落生长减慢、产孢量和分生孢子萌发率减少相吻合, 因为这些因素导致真菌生物量减少, 而敲除突变体菌株生物量的减少又导致其致病力的降低, 然而 *DppV* 基因在调控稻瘟菌致病力和生长发育过程中是否与其他基因存在互作关系还有待进一步研究。

二肽基肽酶属于丝氨酸蛋白酶 S9 肽酶家族, 是一类以丝氨酸为活性中心的重要蛋白水解酶, 生理作用广泛, 其中二肽基肽酶 IV (dipeptidyl-peptidase IV, *DppIV*) 和 *DppV* 等在真菌中广泛存在(Tomkinson, 2019), 如在人工感染的豚鼠中和在自然感染的猫中, 犬小孢子菌 *Microsporum canis* 中的 *DppIV* 和 *DppV* 均可表达; 在含有胞外基质蛋白的条件下, 犬小孢子菌中的 *DppIV* 和 *DppV* 基因也强烈表达; 因此推测这 2 个二肽基肽酶可能都与病原菌毒力相关, 并且可能存在协同作用(Vermout et al., 2008)。通过 Uniprot 数据库查询发现稻瘟菌中也存在这 2 个二肽基肽酶。本研究结果显示, *DppV* 基因的敲除显著降低了稻瘟菌的致病性, 推测 *DppV* 基因与稻瘟菌的毒力直接相关, 但 *DppIV* 是否也与稻瘟菌的毒力有关, 及其与稻瘟菌 *DppV* 之间是否也存在协同作用等还有待进一步研究。

本研究证实 *DppV* 基因在稻瘟菌分生孢子不同萌发时间均有表达, 并在附着孢形成和成功侵染水稻的关键时期表达量最高; *DppV* 基因敲除导致了稻瘟菌生长减缓, 产孢量降低, 分生孢子萌发率降低,

水稻植株内的真菌生物量减少, 对水稻的致病力显著降低, 表明 *DppV* 基因可能在稻瘟菌分生孢子发育及其在水稻定殖中发挥重要作用。本研究也是首次对植物病原真菌中 *DppV* 基因功能进行分析, 研究结果将为其他病原真菌中二肽基肽酶功能研究提供了参考。今后还需对稻瘟菌 *DppV* 蛋白的真核表达和翻译后修饰等进行研究, 以明确其蛋白特征和酶学特性; 开展稻瘟菌 *DppIV* 基因的功能研究, 明确其与稻瘟菌 *DppV* 基因是否存在协同作用等关系, 以更全面了解 *DppV* 基因在稻瘟菌中的生物学功能。

参 考 文 献 (References)

- Abad A, Victoria Fernández-Molina J, Bikandi J, Ramírez A, Margareto J, Sendino J, Luis Hernando F, Pontón J, Garaizar J, Rementez A. 2010. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen: genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Revista Iberoamericana De Micología*, 27(4): 155–182
- Bai PF, Park CH, Shirsekar G, Songkumarn P, Bellizzi M, Wang GL. 2019. Role of lysine residues of the *Magnaporthe oryzae* effector AvrPiz-t in effector- and PAMP-triggered immunity. *Molecular Plant Pathology*, 20(4): 599–608
- Cui SJ, Wang JY, Jiang H, Liang JS. 2018. Secretory proteomics of *Magnaporthe oryzae*. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 30(11): 1899–1906 (in Chinese) [崔建, 王教瑜, 姜华, 梁建生. 2018. 稻瘟病菌分泌蛋白组学研究. *浙江农业学报*, 30(11): 1899–1906]
- de Guillen K, Ortiz-Vallejo D, Gracy J, Fournier E, Kroj T, Padilla A. 2015. Structure analysis uncovers a highly diverse but structurally conserved effector family in phytopathogenic fungi. *PLoS Pathogens*, 11(10): e1005228
- Du YX, Ruan HC, Shi NN, Gan L, Yang XJ, Chen FR. 2016. Pathogenicity analysis of *Magnaporthe grisea* against major *Pi*-genes and main rice varieties in Fujian Province. *Journal of Plant Protection*, 43(3): 442–451 (in Chinese) [杜宜新, 阮宏椿, 石姐姐, 甘林, 杨秀娟, 陈福如. 2016. 福建省稻瘟病菌对主要抗瘟基因及主栽品种的致病性分析. *植物保护学报*, 43(3): 442–451]
- Fan JB, Bai PF, Ning YS, Wang JY, Shi XT, Xiong YH, Zhang K, He F, Zhang CY, Wang RY, et al. 2018. The monocot-specific receptor-like kinase SDS2 controls cell death and immunity in rice. *Cell Host & Microbe*, 23(4): 498–510
- Foster AJ, Ryder LS, Kershaw MJ, Talbot NJ. 2017. The role of glycerol in the pathogenic lifestyle of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Environmental Microbiology*, 19(3): 1008–1016
- He YQ, Yan R, Meng G, Yang WJ, Wang ZZ, Li YF, Nie YF. 2020. Genome-scale prediction and analysis of secreted proteins and effectors in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1. *Acta Phytopathologica Sinica*, 50(2): 129–140 (in Chinese) [何艳秋, 颜瑞, 蒙姑, 杨文静, 王振中, 李云锋, 聂燕芳. 2020. 香蕉枯萎病菌 1 号小种分泌蛋白与效应子的预测与分析. *植物病理学报*, 50

- (2): 129–140]
- Jung YH, Jeong SH, Kim SH, Singh R, Lee JE, Cho YS, Agrawal GK, Rakwal R, Jwa NS. 2012. Secretome analysis of *Magnaporthe oryzae* using *in vitro* systems. *Proteomics*, 12(6): 878–900
- Kumar A, Ahmed R, Singh PK, Shukla PK. 2011. Identification of virulence factors and diagnostic markers using immunosecretome of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Proteomics*, 74(7): 1104–1112
- Li YF, Zhang ZH, Nie YF, Zhang LH, Wang ZZ. 2012. Proteomic analysis of salicylic acid-induced resistance to *Magnaporthe oryzae* in susceptible and resistant rice. *Proteomics*, 12(14): 2340–2354
- Liao JJ, Xie H, Wang DD, He XH. 2019. Polymorphism analysis of *Avr-Pia*, *Avr-Pita1* and *Avr-Pii* in *indica/japonica*-borne *Magnaporthe oryzae* isolates in Yuanyang County, Yunnan. *Journal of Plant Protection*, 46(5): 1057–1064 (in Chinese) [廖静静, 谢华, 王殿东, 何霞红. 2019. 云南省元阳县籼/粳型稻瘟病菌无毒基因 *Avr-Pia*、*Avr-Pita1* 和 *Avr-Pii* 多样性分析. 植物保护学报, 46(5): 1057–1064]
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408
- Lu JP, Feng XX, Liu XH, Lu Q, Wang HK, Lin FC. 2007. Mnh6, a non-histone protein, is required for fungal development and pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genetics and Biology*, 44(9): 819–829
- Meng QF, Gupta R, Min CW, Kwon SW, Wang YM, Je BI, Kim YJ, Jeon JS, Agrawal GK, Rakwal R, et al. 2019. Proteomics of rice *Magnaporthe oryzae* interaction: what have we learned so far? *Frontiers in Plant Science*, 10: 1383
- Park CH, Chen SB, Shirsekar G, Zhou B, Khang CH, Songkumarn P, Afzal AJ, Ning YS, Wang RY, Bellizzi M, et al. 2012. The *Magnaporthe oryzae* effector AvrPiz-t targets the RING E3 ubiquitin ligase APIP₆ to suppress pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity in rice. *The Plant Cell*, 24(11): 4748–4762
- Que YW, Xu Z, Wang CY, Lv W, Yue XF, Xu L, Tang S, Dai H, Wang ZY. 2020. The putative deubiquitinating enzyme MoUbp4 is required for infection-related morphogenesis and pathogenicity in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Current Genetics*, 66(3): 561–576
- Ramirez-Garcia A, Pellon A, Buldain I, Antoran A, Arbizu-Delgado A, Guruceaga X, Rementeria A, Hernando FL. 2018. Proteomics as a tool to identify new targets against *Aspergillus* and *Scedosporium* in the context of cystic fibrosis. *Mycopathologia*, 183(1): 273–289
- Ryabovol VV, Minibayeva FV. 2014. Autophagic proteins ATG4 and ATG8 in wheat: structural characteristics and their role under stress conditions. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 458(1): 179–181
- Tomkinson B. 2019. Tripeptidyl-peptidase II: update on an oldie that still counts. *Biochimie*, 166: 27–37
- Vermout S, Baldo A, Tabart J, Losson B, Mignon B. 2008. Secreted dipeptidyl peptidases as potential virulence factors for *Microsporum canis*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 54(3): 299–308
- Wang CM, Li CQ, Duan GH, Wang YF, Zhang YL, Yang J. 2019. Overexpression of *Magnaporthe oryzae* systemic defense trigger 1 (MoSDT1) confers improved rice blast resistance in rice. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19): 4762
- Wilson RA, Talbot NJ. 2009. Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. *Nature Reviews Microbiology*, 7(3): 185–195
- Woodfolk JA, Wheatley LM, Piyasena RV, Benjamin DC, Platts-Mills TAE. 1998. *Trichophyton* antigens associated with IgE antibodies and delayed type hypersensitivity: sequence homology to two families of serine proteinases. *Journal of Biological Chemistry*, 273(45): 29489–29496
- Yang C, Yu YQ, Huang JK, Meng FW, Pang JH, Zhao QQ, Islam MA, Xu N, Tian Y, Liu J. 2019. Binding of the *Magnaporthe oryzae* chitinase MoChia1 by a rice tetratricopeptide repeat protein allows free chitin to trigger immune responses. *The Plant Cell*, 31(1): 172–188
- Zhang XY, Zhang YL, Jin XH, Zhou YL, Meng F, Wu JJ. 2020. Analysis of the fertility and mating type of rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in Heilongjiang Province. *Journal of Plant Protection*, 47(1): 93–100 (in Chinese) [张晓玉, 张亚玲, 靳学慧, 周弋力, 孟峰, 武菁菁. 2020. 黑龙江省稻瘟病菌育性及其交配型分析. 植物保护学报, 47(1): 93–100]

(责任编辑:张俊芳)