

张承康, 汪洋, 黄欣, 等. 稻瘟病菌 MoDock1 和 MoElmo1 蛋白的功能分析[J]. 福建农业学报, 2025, 40 (4): 406–414.

ZHANG C K, WANG Y, HUANG X, et al. Pathogenic Functions of MoDock1 and MoElmo1 in *Magnaporthe oryzae*[J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2025, 40 (4): 406–414.



稻瘟病菌 MoDock1 和 MoElmo1 蛋白的功能分析

张承康^{1,2}, 汪 洋², 黄 欣^{1,2}, 郭田龙^{1,2}, 林 伟¹

(1. 宁德师范学院生物科学与工程学院福建省科技厅产学研合作示范基地, 福建 宁德 352100; 2. 福建农林大学生物农药与化学生物学教育部重点实验室, 福建 福州 350002)

摘 要:【目的】稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 是引起水稻稻瘟病的病原菌, 探究其功能基因以揭示致病分子机理。【方法】通过生物信息学方法鉴定稻瘟病菌中 Dock180 和 ELMO 的同源蛋白, 对其编码基因进行敲除并对获得的基因缺失突变体进行表型分析, 再通过免疫共沉淀试验分析二者的互作关系。【结果】稻瘟病菌中鉴定得到 *MoDOCK1* 和 *MoELMO1* 基因, 并获得各自基因缺失突变体, 两种突变体具有几乎一致的表型。*MoDock1*、*MoElmo1* 的缺失影响了稻瘟病菌分生孢子的粘着, 造成芽管变长且有隔膜, 附着胞形成延缓。加入 8-Br-cAMP 或 IBMX 可以修复附着胞形成过程中的缺陷, 表明 *MoDock1*、*MoElmo1* 可能在稻瘟病菌 cAMP-PKA 信号途径中发挥功能。洋葱表皮侵染试验结果表明基因缺失突变体的侵染能力有所下降。水稻接种显示, *MoDock1*、*MoElmo1* 的缺失导致稻瘟病菌的致病性减弱。最后, 通过免疫共沉淀证明, *MoDock1* 和 *MoElmo1* 存在相互作用。【结论】*MoDock1* 和 *MoElmo1* 存在相互作用, 二者是稻瘟病菌分生孢子粘着能力、附着胞正常形成和完整致病性所必需的。

关键词: 稻瘟病菌; Dock1; Elmo1; 分生孢子粘着; 附着胞

中图分类号: S435

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2025) 04-0406-09

Pathogenic Functions of MoDock1 and MoElmo1 in *Magnaporthe oryzae*

ZHANG Chengkang^{1,2}, WANG Yang², HUANG Xin^{1,2}, GUO Tianlong^{1,2}, LIN Wei¹

(1. Industry and University Research Cooperation Demonstration Base of Science and Technology Agency in Fujian Province, College of Biological Science and Technology, Ningde Normal University, Ningde, Fujian 352100, China;
2. Key Laboratory of Biopesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: 【Objective】Roles of the genes associated with MoDock1 and MoElmo1 proteins in *Magnaporthe oryzae* played in rice blast disease were studied. 【Methods】Homologies of Dock180 and ELMO in *M. oryzae* were identified by bioinformatics method, and the coding genes knocked out to create mutants for determinations of phenotype and interactions between the two proteins by a co-immunoprecipitation test. 【Results】*MoDOCK1* and *MoELMO1* were identified in *M. oryzae* and deleted to obtain the mutants that were almost identical in phenotype. Absence of the two proteins in the mutants significantly affected the conidial adhesion resulting in long bud tubes with septum and delayed the appressoria formation. Since the defective appressoria formation could be repaired by the addition of 8-Br-cAMP or IBMX, it suggested that MoDock1 and MoElmo1 might be involved in the cAMP-PKA signaling pathway. To test that hypothesis, onion epidermis was infected with the mutants to show a declined infectious ability, and on a rice plant, a lowered pathogenicity. Furthermore, the co-immunoprecipitation experiment confirmed the MoDock1-MoElmo1 interaction as well. 【Conclusion】MoDock1 and MoElmo1 in *M. oryzae* provided the conidia adhesion and appressoria formation essential for the pathogenicity of the pathogen on rice.

Key words: *Magnaporthe oryzae*; Dock1; Elmo1; conidial adhesion; appressorium

收稿日期: 2024-11-14 修回日期: 2025-01-18

作者简介: 张承康 (1988—), 男, 博士, 副教授, 主要从事植物病原菌致病分子机理研究, E-mail: shin_ichi@126.com

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2021J05254); 宁德师范学院创新团队项目 (2022T01)

0 引言

【研究意义】水稻 (*Oryza sativa* L.) 作为全球性关键粮食作物, 关乎人类生存与健康。由稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 引起的稻瘟病严重影响世界粮食安全, 气候的变化有加重该病害发生的趋势^[1,2]。稻瘟病菌除了引起水稻叶片病害, 还能引起节瘟、穗颈瘟, 此外还能侵染小麦等禾本科植物^[3,4]。稻瘟病菌作为最早被全基因组测序的植物病原菌, 已成为研究宿主与病原微生物互作的模式生物^[5]。通过研究稻瘟病菌功能基因, 解析病原菌致病分子机理, 有助于挖掘潜在药物靶标, 对稻瘟病的防控具有重要意义。【前人研究进展】Rho 家族蛋白是一类小 GTP 酶, 在丝状真菌中通常包括 Rho1~Rho4 等 4 个 Rho 蛋白以及各 1 个 Rac1 和 Cdc42 蛋白^[6]。Rho 蛋白具有 GTP 结合的激活态和 GDP 结合的失活态, 鸟苷酸交换因子 (GEF) 促进 Rho 蛋白从 GDP 结合态转换成 GTP 结合态, 激活 Rho 蛋白的活性^[7]。在哺乳动物细胞中, Dock180 蛋白能与 ELMO 蛋白相互作用来充当 GEF 的角色, 活化 Rac、Cdc42, 参与细胞的迁移、凋亡细胞、神经元的极化等生命活动^[8,9]。Dock180 只有在和 ELMO 结合的时候才能活化 Rac, 单独的 Dock180 即便过表达也不能代替 ELMO 的角色^[9,10]。在植物病原真菌中, 已有不少对 Rho 蛋白的研究, 但对植物病原真菌 Rho 蛋白上游调控元件 GEF 的研究还很少。在禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*) 中, FgRho1 是菌株生存所必需的; FgRac1 和 FgCdc42 调控着病原菌的极性生长、两性发育和致病性; FgRho4 主要调控菌株隔膜形成和细胞核的分裂; FgRho2、FgRho3 则分别与营养生长和细胞壁敏感性相关^[11]。相对于对 Rho 蛋白较为系统的研究, 目前仅发现 FgBud3 这一 GEF 蛋白参与对 FgRho4 的调控^[12]。在稻瘟病菌中, MoRho3、MoCdc42 和 MoRac1 均与病原菌的致病性相关, 其中, MoRac1 通过 Chm1 和 Nox 通路来分别调控无性发育和致病性^[13-15]。在白色念珠菌 (*Candida albicans*) 中, Dock180 同源蛋白 Dck1 作为 Rac1 的 GEF, 调控着白色念珠菌的极性生长^[16,17]。【本研究切入点】目前, 已有很多关于稻瘟病菌功能基因的研究, 但暂未见关于稻瘟病菌潜在 Rho GEF 的研究。在哺乳动物中, Dock180 与 ELMO 协同作用以活化 Rac 蛋白^[10]。在稻瘟病菌可能也存在 Dock180 和 ELMO 的同源蛋白且通过对 MoRac1 蛋白的调控来参与稻瘟病菌的致病进程。【拟解决的关键问题】本研究对稻瘟病菌中 Dock180 和 ELMO 同源物进行分析, 探究二者在病原菌生长发育和致病进程中的作用以及是否充当

MoRac1 蛋白 GEF 的角色, 以期探明稻瘟病菌致病分子机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

稻瘟病菌菌株 *Δku80*、*ΔModock1-3*、*ΔModock1-10*、*ΔMoelmo1-10* 和 *ΔMoelmo1-34* 由福建农林大学生物农药与化学生物学教育部重点实验室保存。病原菌接种试验所用水稻品种为 'CO39'。CM 培养基、SYM 培养基和燕麦培养基 (50 g·L⁻¹ 燕麦, 20 g·L⁻¹ 蔗糖, 20 g·L⁻¹ 琼脂粉) 均经高压灭菌, 室温保存^[14]。

1.2 试验方法

1.2.1 MoDock1 与 MoElmo1 氨基酸序列的获得与蛋白结构域分析

利用智人 (*Homo sapiens*) Dock180 和 Elmo1 的氨基酸序列, 在稻瘟病菌基因组数据库进行比对以探寻稻瘟病菌同源蛋白。利用 Pfam、InterPro 数据库对蛋白进行结构域分析^[18,19]。

1.2.2 MoDOCK1 与 MoELMO1 基因的敲除

扩增 MoDOCK1 基因上游片段, 用 Hind III 和 EcoR I 双酶切后插入 pCX62 载体的潮霉素磷酸转移酶基因 (HYG) 上游; 扩增下游片段, 用 BamH I 和 Xba I 双酶切后插入 HYG 下游, 从而获得 MoDOCK1 基因敲除载体 (表 1)。不同于构建含有同源重组片段的敲除载体的方法, MoELMO1 基因的敲除采用融合 PCR 方式获取同源重组片段 AHY 和 YGB (表 1)。上述载体或片段转化入 *Δku80* 原生质体中。

原生质体的制备及转化参照 He 等的方法, 采用潮霉素来筛选转化子^[20]。提取转化子基因组 DNA 作为模板, 利用各自基因的 OF/OR 和 UA/H853 这 2 对引物组合, 通过 PCR 筛选转化子中的目的基因缺失突变体, 利用 OF/OR 引物, 通过反转录 PCR (RT-PCR) 检测菌株转录物中是否含有目的基因以及 Southern 杂交来进一步确认相应突变体 (表 1)。

1.2.3 基因缺失突变体的表型分析

参照 Li 等^[21]的方法, 测量在 SYM 培养基上生长 10 d 的菌落直径, 收集 10 日龄燕麦培养基上的分生孢子并计算产孢量。参照 Bac 等^[22]的方法, 将孢子液滴加在疏水膜上, 在不同时间点用水冲洗后统计孢子粘着率。参照 Li 等^[23]的方法, 观察菌株不同时间点的附着胞形成情况。通过滴加 Calcofluor 染液, 使 Calcofluor 终浓度为 0.005%, 于荧光显微镜下观察隔膜。加入 8-Br-cAMP 或 IBMX 观察附着胞形成时, 终浓度分别为 5 mmol·L⁻¹ 和 2.5 mmol·L⁻¹。参照 Xu 等^[24]的方法进行洋葱表皮侵染试验观察附着

表 1 本研究所用到的引物
Table 1 Primers applied

引物 Primers	序列 (5' - 3') Sequences (5' - 3')	用途 Application
dockAF	GCGAAGCTTGAGCACATCCATGCGGTAG	扩增 <i>MoDOCK1</i> 上游片段
dockAR	GCGAATTCGCAATCGGGACTGTAGGC	
dockBF	GCGGGATCCCGTTGAGAAGAGGGTGCT	扩增 <i>MoDOCK1</i> 下游片段
dockBR	AGCTCTAGAACCAGAAAGCGGCCTGAAA	
dockOF	GCGATCCTTCACTAGCGTT	扩增 <i>MoDOCK1</i> ORF、筛选 <i>MoDOCK1</i> 缺失突变体
dockOR	AGGAATTGGCCTTCAACGT	
dockUA	TGTCCTGTTACTTGTCTGG	筛选 <i>MoDOCK1</i> 缺失突变体
H853	GACAGACGTCGCGGTGAGTT	
dockRTF	GCGAGTACCACAGCCGATTC	<i>MoDOCK1</i> 缺失突变体RT-PCR验证
dockRTR	GCCAGACATTTCTTGCGTTTT	
dockPF	GGTACGACTTTAGACCAAATA	扩增 <i>MoDOCK1</i> 缺失突变体, Southern杂交验证验证探针
dockPR	TTCGAGAGGTCTGTGTGA	
elmoAF	TCTGCGCCGACTGATTGCA	扩增 <i>MoELMO1</i> 上游片段
elmoAR	TTGACCTCCACTAGCTCCAGCCAAGCCAGTAGGCGAGGGTGTTC	
elmoBF	GAATAGAGTAGATGCCGACCGGGTTCAAGGACGTGCTAGAGGTTG	扩增 <i>MoELMO1</i> 下游片段
elmoBR	ATTGTGATCTTGGTGGTCG	
elmoOF	GCTCATCATGACCACTGGT	扩增 <i>MoELMO1</i> ORF、筛选 <i>MoELMO1</i> 缺失突变体
elmoOR	AACCATGCTGACGGCAAAGCT	
elmoUA	GTCCTGTGCAGTGGGCAACAA	筛选 <i>MoELMO1</i> 缺失突变体
elmoRTF	TGGAAGGAGGTCCGTGTGC	<i>MoELMO1</i> 缺失突变体RT-PCR验证
elmoRTR	GTGCTCGTAAAGAACCATGCTGA	
elmoAF2	CAGTATGGGATGAGCACC	扩增 <i>MoELMO1</i> 缺失突变体, Southern杂交验证验证探针
elmoAR2	CAGAGTCGCCGAGTCTTA	
dockFlgF	CAGATCTTGGCTTTCGTAGGAACCCAATCTTCAATGCCCTGGCACCCCTTTGCC	构建pDOCK:FLAG载体
dockFlgR	CTTTATAATCACCGTCATGGTCTTTGTAGTCTTCTCATCGACGCTTCCCATG	
elmoGF	CAGATCTTGGCTTTCGTAGGAACCCAATCTTCAATGGACCAGGCCGACATAC	构建pELMO:GFP载体
elmoGR	CACCACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACGACCTCGTAGTAGTAATTCTCATCCAG	

胞的穿透能力，并喷雾接种三叶一心期的水稻，5 d 后观察发病情况。

1.2.4 免疫共沉淀试验

利用引物 elmoGF/GR 扩增出带有自身启动子序列不含有终止密码子序列的 *MoELMO1* 的 ORF 序列连接入载体 pDL2 的 GFP 基因的上游，构建出 pELMO:GFP 质粒；利用引物 dockFlgF/FlgR 扩增出带有自身启动子序列不含有终止密码子序列的 *MoDOCK1* 的 ORF 序列接入载体 pFL7 的 FLAG 基因的上游，构建出 pDOCK:FLAG 质粒。将上述 2 种质粒同时转化入

Aku80 原生质体中，通过 PCR 筛选出同时含有 *MoELMO1*:GFP 和 *MoDOCK1*:FLAG 序列的转化子菌株 DF+EG。提取 DF+EG 菌株的总蛋白，并于含有 GFP 抗体的琼脂糖珠子共同孵育。洗脱被珠子吸附的蛋白后进行 Western 杂交，分别用 FLAG 和 GFP 的抗体检测^[25]。

2 结果与分析

2.1 稻瘟病菌 *MoDock1* 与 *MoElmo1* 蛋白结构域分析

通过同源比对找到 *MoDOCK1* (MGG_03275.7)

与 *MoELMO1* (MGG_09944.7), *MoDOCK1* 编码 2050 个氨基酸, *MoELMO1* 编码 745 个氨基酸。结构域分析发现, *MoDock1* N 端含有 SH3 结构域和 DHR1 结构域, C 端则是 DHR2 结构域; *MoElmo1* 的 N 端由 ARM repeat 组成, 中段是该家族的标志性 ELMO 结构域 (图 1)。

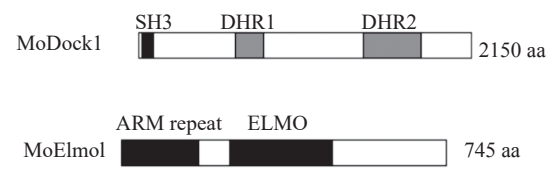


图 1 *MoDock1* 与 *MoElmo1* 蛋白结构域分布
Fig. 1 Distribution of domains of *MoDock1* and *MoElmo1*

2.2 *MoDOCK1* 与 *MoELMO1* 的敲除

基因缺失突变体的验证, 以 *MoDOCK1* 的敲除为例, 转化后得到若干具潮霉素抗性的转化子, 使用引物对 dockOF/OR 和 dockUA/H853 分别进行 PCR 扩增, 筛选获得 *MoDOCK1* 的缺失突变体 Δ *Modock1-3* 和 Δ *Modock1-10*。随后通过 RT-PCR, 验证 Δ *Modock1-3* 和 Δ *Modock1-10* 菌株的转录物中不含有 *MoDOCK1* 的转录产物。进一步通过 Southern 杂交, 菌株 Δ *Modock1-3* 和 Δ *Modock1-10* 杂交结果中含有预期 2.3 kb 的条带, 区别于 *Aku80* 中的 3.0 kb 条带, 证明 Δ *Modock1-3* 和 Δ *Modock1-10* 是正确的 *MoDOCK1*

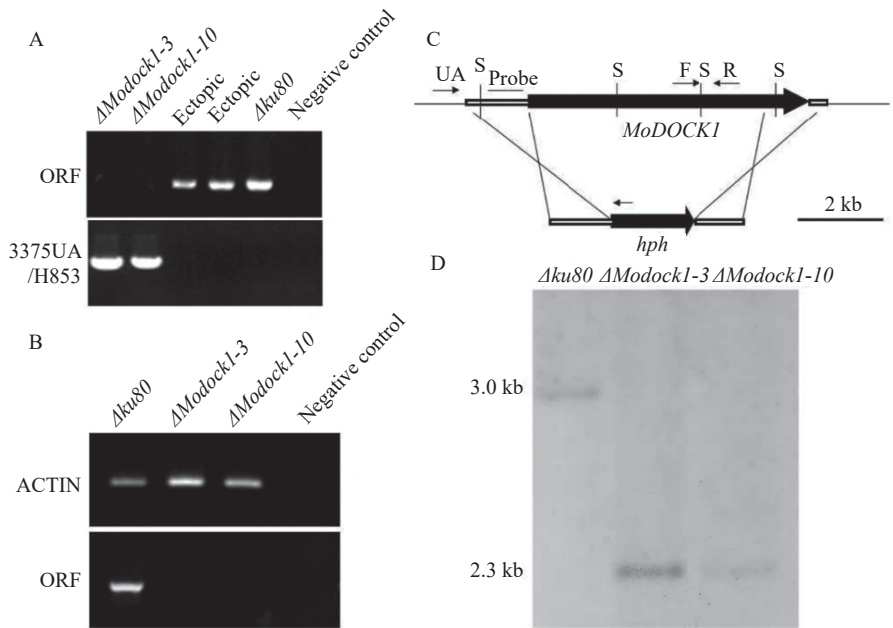
的缺失突变体菌株 (图 2)。通过同样的 3 种验证方法, 得到 *MoELMO1* 的缺失突变体菌株 Δ *Moelmo1-10* 和 Δ *Moelmo1-34* (图 3)。

2.3 *MoDOCK1*、*MoELMO1* 的缺失对稻瘟病菌营养生长的影响

为了分析 *MoDOCK1*、*MoELMO1* 的缺失对稻瘟病菌营养生长的影响, 在 SYM 培养基上接种了菌株, 生长 10 d 后观察菌落形态并测量菌落直径, 结果 (表 2) 显示, 相比于 *Aku80*, Δ *Modock1-3*、 Δ *Modock1-10*、 Δ *Moelmo1-10*、 Δ *Moelmo1-34* 的生长速率有所减缓, 但菌落形态正常 (图 4)。

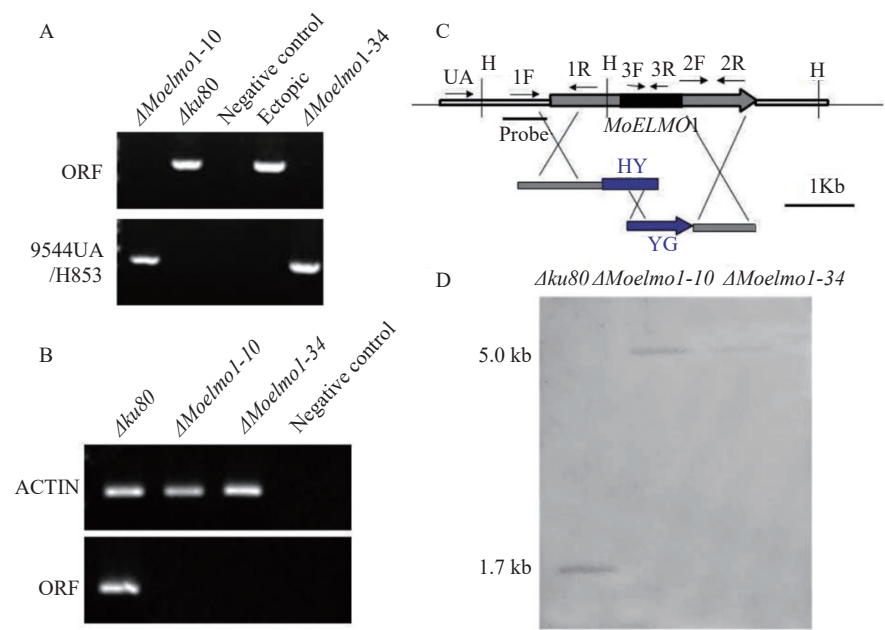
2.4 *MoDOCK1*、*MoELMO1* 的缺失对分生孢子粘着的影响

将菌株接种在燕麦培养基上 10 d 后收集分生孢子并统计产孢量。结果显示 Δ *Modock1-3*、 Δ *Moelmo1-10* 的产孢量较野生型 *Aku80* 没有明显区别 (表 2)。进一步观察分生孢子在疏水膜上的粘着情况发现, 在孢子滴接触到疏水膜上的 2 h 内, Δ *Modock1-3*、 Δ *Moelmo1-10* 的粘着率皆低于 20%, 远小于野生型 *Aku80* 60% 的粘着率。随着时间的延长, 在分生孢子滴接触到疏水膜上 4 h, 突变体及野生型的粘着率均有所上升, 但突变体黏附在疏水膜上的孢子数仍远低于对照组 *Aku80* (图 5)。这些结果表明 *MoDock1*、*MoElmo1* 与稻瘟病菌分生孢子的黏附能力相关。



A: *MoDOCK1* 基因敲除突变体的 PCR 验证; B: *MoDOCK1* 基因敲除突变体的 RT-PCR 验证; C: *MoDOCK1* 基因敲除和 Southern 杂交策略图, S 代表 *Sac* I; D: *MoDOCK1* 基因敲除突变体的 Southern 杂交验证。
A: verification of *MoDOCK1*-deleted mutants by PCR; B: verification of *MoDOCK1*-deleted mutants by RT-PCR; C: strategy of *MoDOCK1* deletion and Southern blot; S: *Sac* I; D: verification of *MoDOCK1*-deleted mutants by Southern blot.

图 2 *MoDOCK1* 基因敲除突变体的验证
Fig. 2 Verification of *MoDOCK1*-deleted mutants



A: *MoELMO1* 基因敲除突变体的 PCR 验证; B: *MoELMO1* 基因敲除突变体的 RT-PCR 验证; C: *MoELMO1* 基因敲除和 Southern 杂交策略略图, H 代表 *Hind* III; D: *MoELMO1* 基因敲除突变体的 Southern 杂交验证。

A: Verification of *MoELMO1*-deleted mutants by PCR; B: verification of *MoELMO1*-deleted mutants by RT-PCR; C: strategy of *MoELMO1* deletion and Southern blot; H: *Hind* III; D: verification of *MoELMO1*-deleted mutants by Southern blot.

图 3 *MoELMO1* 基因敲除突变体的验证

Fig. 3 Verification of *MoELMO1*-deleted mutants

表 2 菌株菌落直径与产孢量

Table 2 Colony diameter and conidiation of different strains

菌株 Strain	菌落直径 Colony diameter /cm	产孢量 Conidiation /(×10 ⁴ /皿)
<i>Δku80</i>	6.29±0.07 a	167.6±24.4 a
<i>ΔModock1-3</i>	5.04±0.14 c	163.3±37.3 a
<i>ΔModock1-10</i>	5.07±0.06 c	174.0±36.7 a
<i>ΔMoelmol-10</i>	5.25±0.08 b	173.2±30.0 a
<i>ΔMoelmol-1-34</i>	5.20±0.13 b	158.6±25.9 a

同列数据后不同的小写字母表示 0.05 水平上差异显著。
Data with different lowercase letters on same column indicate significant difference at 0.05 level.

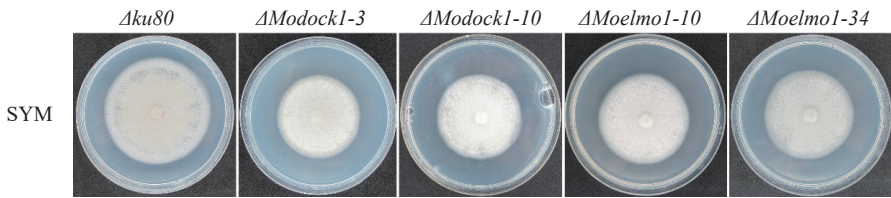


图 4 菌落生长形态

Fig. 4 Colony morphology of different strains

2.5 MoDock1、MoElmo1 对附着胞发育的调控

附着胞诱导试验结果显示, *MoDOCK1*、*MoELMO1* 的缺失导致附着胞形成有所延迟 (图 6A-C)。4 h 时, *Δku80* 的附着胞形成率约 50%, 而 *ΔModock1-3*、*ΔMoelmol-10* 还不到 20%; 8 h 时, *Δku80* 的附着胞形成率达近 90%, 而 *ΔModock1-3*、*ΔMoelmol-10* 还不

到 50%; 24 h 时, 相较于 *Δku80* 接近 100% 的附着胞形成率, *ΔModock1-3*、*ΔMoelmol-10* 仅有 70% 左右。不仅如此, *MoDOCK1*、*MoELMO1* 的缺失导致芽管变长 (图 6D、E)。

cAMP-PKA 信号通路调控着稻瘟病菌附着胞的发育, 通过外源添加 cAMP 类似物能够部分恢复因

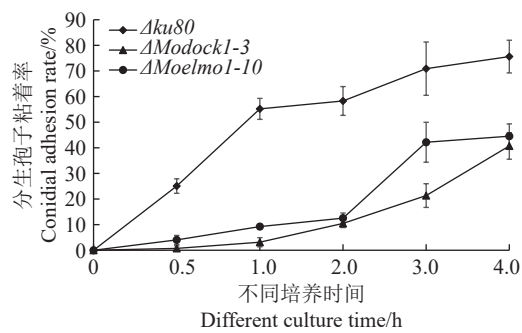
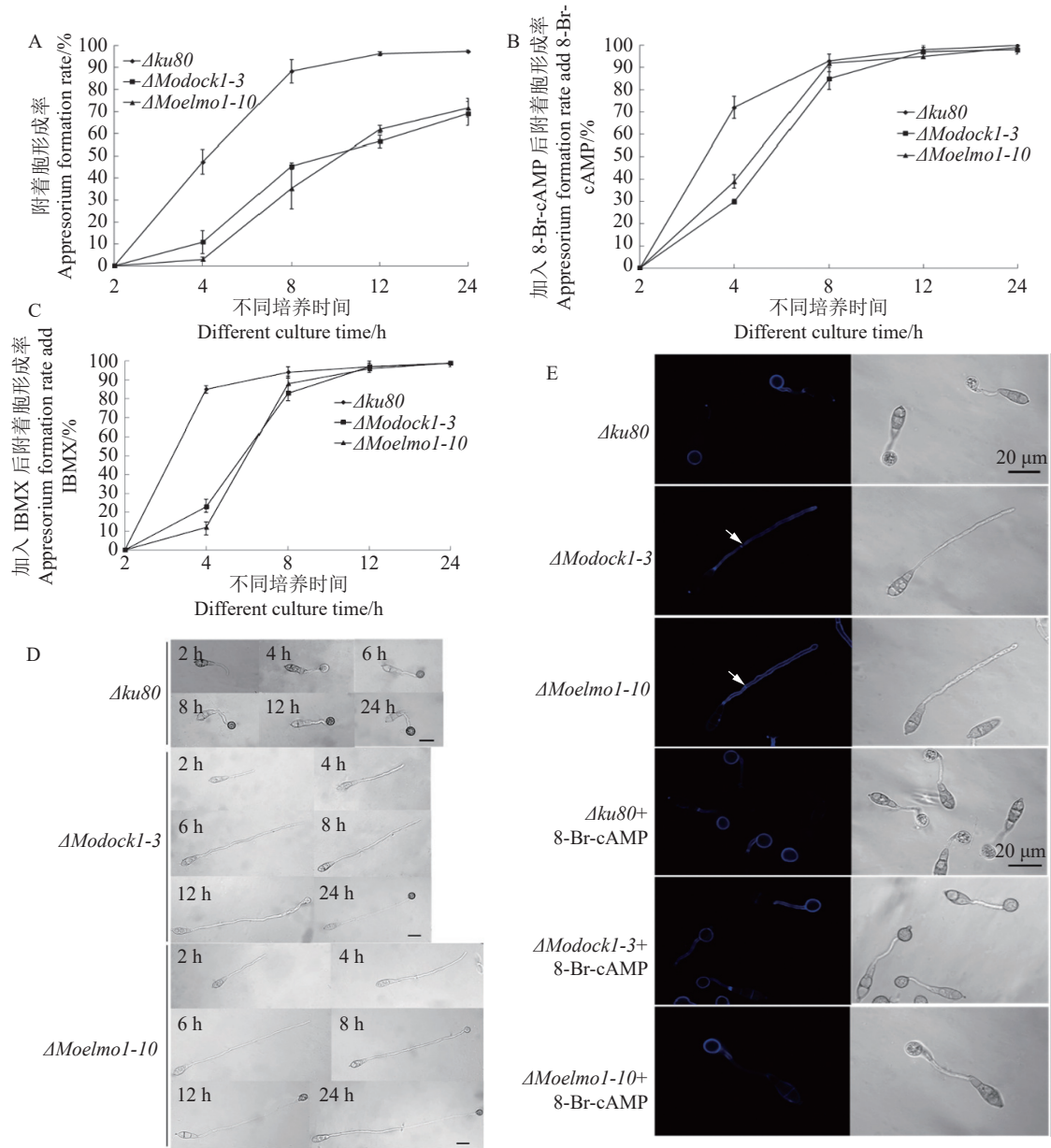


图 5 不同菌株分生孢子的粘着率

Fig. 5 Conidia adhesion rate of different strains

通路上游部分基因缺失所造成的附着胞形成上的缺陷^[24, 26-28]。通过加入 cAMP 类似物，5 mmol·L⁻¹8-Br-cAMP 或 2.5 mmol·L⁻¹ IBMX 诱导后， $\Delta Modock1-3$ 、 $\Delta Moelmo1-10$ 突变体的附着胞形成率明显提升（图 6A-C）。这些结果表明，MoDock1、MoElmo1 可能在稻瘟病菌 cAMP-PKA 信号途径中发挥作用。

在附着胞形成初期，芽管与初始附着胞之间不会形成隔膜，待细胞核转移到附着胞后，附着胞与芽管的交界处才形成隔膜^[29]。通过隔膜染色发现， $\Delta Modock1-3$ 、 $\Delta Moelmo1-10$ 的芽管在疏水膜上诱导



A-C: 不同菌株在含有或不含有 8-Br-cAMP 或 IBMX 时的附着胞形成率; D: 不同菌株附着胞形态; E: 不同菌株在诱导 6 h 后的附着胞形态以及芽管隔膜染色，箭头指示隔膜。Bar=20 μ m。

A-C: appressorium formation rates of different strains with or without 8-Br-cAMP or IBMX; D: appressorium morphology of different strains; E: appressorium morphology and stained bud tube septum of different strains after inducing for 6 h. Arrow indicates septum. Bar = 20 μ m.

图 6 附着胞形成率与形态

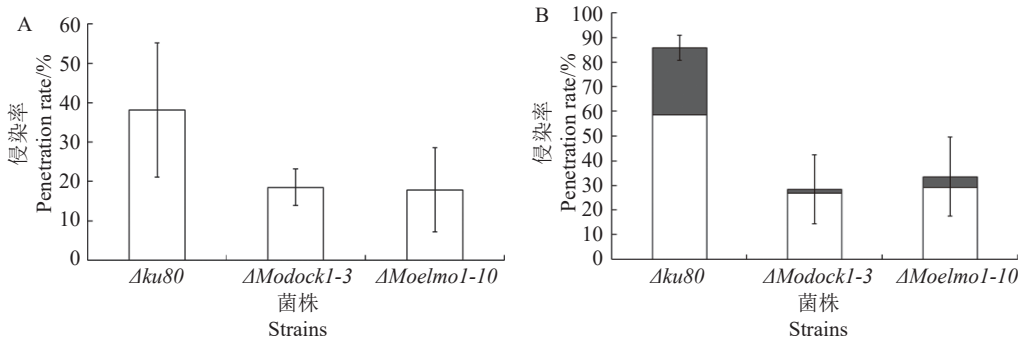
Fig. 6 Appressorium formation rate and appressorium morphology

6 h后就出现异常分隔,而 $\Delta ku80$ 的芽管中并未形成隔膜但已形成初始附着胞。突变体这种不正常隔膜现象在加入外源的 8-Br-cAMP 和 IBMX 后得到修复(图 6C)。上述结果说明 MoDock1、MoElmo1 调控稻瘟病菌附着胞的正常发育。

2.6 *MoDOCK1* 和 *MoELMO1* 的缺失对侵染能力的影响

通过洋葱表皮侵染试验表明, $\Delta ku80$ 和 $\Delta Modock1-3$ 、 $\Delta Moelmo1-10$ 在洋葱表皮都能形成附着

胞。接种洋葱表皮 24 h 后, $\Delta ku80$ 已有约 40% 附着胞产生了侵入栓并侵入第一个细胞,但并未扩展至相邻细胞,而这一数值在突变体中仅为不到 20%;接种 48 h 后, $\Delta ku80$ 超过 80% 的附着胞产生侵入栓并侵入细胞,其中约 1/3 已扩展到相邻细胞,而突变体大部分附着胞仍没有形成侵入栓。以上结果表明, *MoDOCK1* 和 *MoELMO1* 的缺失导致稻瘟病菌在洋葱表皮的侵染能力下降(图 7)。



A: 不同菌株侵染洋葱 24 h 后的侵染率; B: 不同菌株侵染洋葱 48 h 后的侵染率。柱子中的白色部分代表附着胞侵入细胞但并未扩展至相邻细胞这一状态占有附着胞的比例,灰色部分代表附着胞侵入细胞后继续扩展至相邻细胞这一状态占有附着胞的比例。
A: penetration rates of onions infected by different strains after 24 h; B: penetration rates of onions infected by different strains after 48 h. White part of column represents proportion of appressorium invaded a cell without entering neighboring cells; and grey part, that of appressorium extended invasion into neighboring cells.

图 7 不同菌株侵染洋葱的侵染率

Fig. 7 Penetration rates of onions infected by different strains

2.7 *MoDOCK1* 和 *MoELMO1* 的缺失对稻瘟病菌完整致病效果的影响

水稻喷雾接种试验显示, *MoDOCK1*、*MoELMO1* 缺失突变体在水稻叶片上依然能形成病斑且能扩展,但病斑数较对照组 $\Delta ku80$ 有所减少(图 8)。这些结果表明, *MoDOCK1* 和 *MoELMO1* 的缺失对稻瘟病菌的完整致病性有负面影响。



图 8 不同菌株的致病性分析
Fig. 8 Pathogenicity of different strains

2.8 *MoDock1* 和 *MoElmo1* 互作

$\Delta Modock1$ 与 $\Delta Moelmo1$ 几乎一致的表型特征表明, *MoDock1* 与 *MoElmo1* 之间很可能存在互作关系。在哺乳动物中, Dock180 和 Elmo1 可以形成复合体^[10]。通过构建 *MoDock1*:FLAG 和 *MoElmo1*:GFP 载体并共转化入 $\Delta ku80$ 菌株,对获得的共表达 *MoDock1*:FLAG 和 *MoElmo1*:GFP 的菌株进行免疫共沉淀,试验表明 *MoDock1* 与 *MoElmo1* 存在互作关系(图 9)。

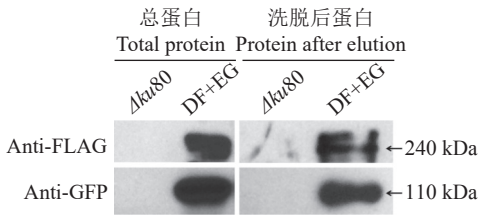


图 9 *MoDock1* 与 *MoElmo1* 之间的免疫共沉淀
Fig. 9 Immunoprecipitation between *MoDock1* and *MoElmo1*

3 讨论与结论

哺乳动物中, Dock180/ELMO 发挥着 Rac GEF 的功能参与诸多基础生命活动^[8]。在真菌中,关于 Dock180 或 ELMO 同源蛋白的研究还很少,尚未见其在植物病原真菌中的研究。稻瘟病菌 *Rac1* 调控着

菌株生长发育、无性繁殖和致病性等过程，尚未发现调控 Rac1 的 GEF，稻瘟病菌中 Dock180/ELMO 的同源物可能就充当这一角色^[14]。本研究通过氨基酸序列同源比对在稻瘟病菌中找到 Dock180/ELMO 的同源基因 *MoDOCK1* 与 *MoELMO1*，分析二者编码蛋白所含有的结构域，并通过基因敲除获得各自基因的缺失突变体。通过对基因缺失突变体表型的分析显示 MoDock1 与 MoElmo1 蛋白发挥着近乎一样的功能，二者主要参与了对稻瘟病菌分生孢子粘着能力和附着胞发育的调控，间接影响了稻瘟病菌对水稻的致病性。

MoDOCK1、*MoELMO1* 对稻瘟病菌的营养生长和产孢并非是不可缺少的，但 *MoDOCK1*、*MoELMO1* 的缺失严重影响了稻瘟病菌分生孢子的粘着。作为稻瘟病菌分生孢子侵染的初始活动，分生孢子尖端产生的尖端黏液使得分生孢子紧紧黏附在宿主表面，以防雨水的冲刷^[22, 30]。*MoDOCK1*、*MoELMO1* 的缺失使分生孢子粘着能力下降，很可能就是由于影响了尖端粘着液的产生。

MoDOCK1、*MoELMO1* 的缺失导致稻瘟病菌附着胞发育异常，外源 8-Br-cAMP 和 IBMX 可以修复。细胞表面信号传导相关蛋白 Pal1 的缺失造成稻瘟病菌附着胞发育的缺陷，亦可通过添加外源 cAMP 类似物可恢复表型缺陷^[27]。上述例子说明 MoDock1、MoElmo1 可能和 Pal1 蛋白的角色类似，处于稻瘟病菌 cAMP-PKA 信号途径腺苷酸环化酶 Mac1 的上游^[27, 28]。*ΔModock1-3*、*ΔMoelmo1-10* 长而直的芽管，可能是不能有效识别分生孢子所在表面的特性，变得没有方向性，从而导致附着胞形成的延迟。附着胞的形成与稻瘟病菌分生孢子即将萌发出芽管的细胞有丝分裂及分隔有关，*MoDOCK1*、*MoELMO1* 的缺失导致稻瘟病菌附着胞形成过程中出现分隔紊乱的现象，突变体在尚未形成附着胞时就在芽管中形成隔膜，外源 cAMP 类似物弥补这些缺陷。这些结果暗示着 MoDock1、MoElmo1 和 cAMP-PKA 信号通路参与附着胞形成过程中的核分裂以及隔膜形成。

喷雾接种的结果显示，*MoDOCK1*、*MoELMO1* 的缺失突变体仍然具有致病性，但病斑数下降，说明 MoDock1、MoElmo1 对于稻瘟病菌完整的致病性有一定的影响。分生孢子在水稻叶片表面的成功粘着是致病的关键。*MoDOCK1*、*MoELMO1* 的缺失导致的分生孢子粘着能力下降是导致致病性下降的重要因素。此外，洋葱表皮侵染试验显示 *MoDOCK1*、*MoELMO1* 的缺失导致分生孢子侵染效

率下降，这也是致病性有所下降的因素之一。

由于 *ΔModock1* 与 *ΔMoelmo1* 有着几乎完全一样的表型，MoDock1 与 MoElmo1 很可能与哺乳动物中同源蛋白类似，二者形成复合体共同发挥作用。免疫共沉淀试验证明证实了这一猜想。在已报道的其他物种中，Dock180/ELMO 作为 Rac 的 GEF 行使功能，然而将稻瘟病菌 *ΔModock1* 与 *ΔMoelmo1* 的表型与 *ΔMorac1* 相比较发现较大差异，推断在稻瘟病菌中 MoDock1 与 MoElmo1 并非激活 MoRac1 的主要 GEF，二者可能是在 cAMP-PKA 信号通路中发挥重要作用^[8, 9, 14]。在粗糙脉孢霉中的研究显示，Rho 蛋白与 Rho GEF 之间并非一一对应的关系，Rho4 就具有 2 个 GEF，而 Cdc24 却同时发挥着 Cdc42 和 Rac1 GEF 的角色^[31, 32]。在稻瘟病菌中，Cdc24 可能充当 Rac1GEF 的角色，还有待进一步的试验证明。

综上，本研究通过对稻瘟病菌中 MoDock1 与 MoElmo1 蛋白功能的研究，推断二者在 cAMP-PKA 信号通路中发挥重要作用，明确了二者在稻瘟病菌分生孢子粘着和附着胞发育过程中的重要作用，对稻瘟病菌完整致病性亦有一定的影响。本研究对进一步深入解析稻瘟病菌的致病分子机制有重要意义，间接助力于稻瘟病菌防治策略的制定。

参考文献：

- [1] KOBAYASHI K, WANG X H, WANG W Q. Genetically modified rice is associated with hunger, health, and climate resilience[J]. *Foods*, 2023, 12(14): 2776.
- [2] 卢宜君, 苏珍珠, 刘小红, 等. 稻瘟病菌致病机制及绿色防控新策略[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2022, 48(6): 721-730.
LU X J, SU Z Z, LIU X H, et al. Review on pathogenic mechanism of *Magnaporthe oryzae* and new green prevention and control strategy[J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)*, 2022, 48(6): 721-730. (in Chinese)
- [3] BAKER B, ZAMBRYSKI P, STASKAWICZ B, et al. Signaling in plant-microbe interactions[J]. *Science*, 1997, 276(5313): 726-733.
- [4] NIZOLLI V O, VIANA V E, PEGORARO C, et al. Wheat blast: The last enemy of hunger fighters[J]. *Genetics and Molecular Biology*, 2023, 46(1 suppl 1): e20220002.
- [5] DEAN R A, TALBOT N J, EBBOLD D J, et al. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*[J]. *Nature*, 2005, 434(7036): 980-986.
- [6] HARRIS S D. Cdc42/rho GTPases in fungi: Variations on a common theme[J]. *Molecular Microbiology*, 2011, 79(5): 1123-1127.
- [7] MOSADDEGHZADEH N, AHMADIAN M R. The RHO family GTPases: Mechanisms of regulation and signaling[J]. *Cells*, 2021, 10(7): 1831.
- [8] CÔTÉ J F, VUORI K. GEF what? Dock180 and related proteins help

- Rac to polarize cells in new ways[J]. *Trends in Cell Biology*, 2007, 17(8): 383–393.
- [9] GRIMSLEY C M, KINCEN J M, TOSELLO-TRAMPONT A C, et al. Dock180 and ELMO1 proteins cooperate to promote evolutionarily conserved rac-dependent cell migration[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(7): 6087–6097.
- [10] BRUGNERA E, HANEY L, GRIMSLEY C, et al. Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180–ELMO complex[J]. *Nature Cell Biology*, 2002, 4(8): 574–582.
- [11] ZHANG C K, WANG Y, WANG J Q, et al. Functional characterization of Rho family small GTPases in *Fusarium graminearum*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2013, 61: 90–99.
- [12] ZHANG C K, LUO Z H, HE D D, et al. FgBud3, a Rho4-interacting guanine nucleotide exchange factor, is involved in polarity growth, cell division and pathogenicity of *Fusarium graminearum*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1209.
- [13] ZHENG W, ZHAO Z Y, CHEN J S, et al. A Cdc42 ortholog is required for penetration and virulence of *Magnaporthe grisea*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2009, 46(6/7): 450–460.
- [14] CHEN J S, ZHENG W, ZHENG S Q, et al. Rac1 is required for pathogenicity and Chml-dependent conidiogenesis in rice fungal pathogen *Magnaporthe grisea*[J]. *PLoS Pathogens*, 2008, 4(11): e1000202.
- [15] ZHENG W, CHEN J S, LIU W D, et al. A Rho3 homolog is essential for appressorium development and pathogenicity of *Magnaporthe grisea*[J]. *Eukaryotic Cell*, 2007, 6(12): 2240–2250.
- [16] HOPE H, SCHMAUCH C, ARKOWITZ R A, et al. The *Candida albicans* ELMO homologue functions together with Rac1 and Dck1, upstream of the MAP Kinase Cek1, in invasive filamentous growth[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 60(6): 1572–1590.
- [17] HOPE H, BOGLIOLO S, ARKOWITZ R A, et al. Activation of Rac1 by the guanine nucleotide exchange factor Dck1 is required for invasive filamentous growth in the Pathogen *Candida albicans*[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2008, 19(9): 3638–3651.
- [18] PAYSAN-LAFOSSE T, BLUM M, CHUGURANSKY S, et al. InterPro in 2022[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(D1): D418–D427.
- [19] PUNTA M, COGILL P C, EBERHARDT R Y, et al. The pfam protein families database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(D1): D290–D301.
- [20] HE M, XU Y P, CHEN J H, et al. MoSnt2-dependent deacetylation of histone H3 mediates MoTor-dependent autophagy and plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. *Autophagy*, 2018, 14(9): 1543–1561.
- [21] LI C H, CAO S L, ZHANG C K, et al. *MoCDC14* is important for septation during conidiation and appressorium formation in *Magnaporthe oryzae*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2018, 19(2): 328–340.
- [22] BAE C Y, KIM S, CHOI W B, et al. Involvement of extracellular matrix and integrin-like proteins on conidial adhesion and appressorium differentiation in *Magnaporthe oryzae*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 17(7): 1198–1203.
- [23] LI L, XUE C Y, BRUNO K, et al. Two *PAK* kinase genes, *CHM1* and *MST20*, have distinct functions in *Magnaporthe grisea*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2004, 17(5): 547–556.
- [24] XU J R, URBAN M, SWEIGARD J A, et al. The *CPKA* gene of *Magnaporthe grisea* is essential for appressorial penetration[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1997, 10(2): 187–194.
- [25] LI Y, ZHANG X, HU S, et al. PKA activity is essential for relieving the suppression of hyphal growth and appressorium formation by MoSfl1 in *Magnaporthe oryzae*[J]. *PLoS Genetics*, 2017, 13(8): e1006954.
- [26] LI G T, ZHOU X Y, XU J R. Genetic control of infection-related development in *Magnaporthe oryzae*[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2012, 15(6): 678–684.
- [27] CHEN D, HU H, HE W H, et al. Endocytic protein Pal1 regulates appressorium formation and is required for full virulence of *Magnaporthe oryzae*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2022, 23(1): 133–147.
- [28] CHOI W, DEAN R A. The adenylate cyclase gene *MAC1* of *Magnaporthe grisea* controls appressorium formation and other aspects of growth and development[J]. *The Plant Cell*, 1997, 9(11): 1973–1983.
- [29] 林福呈. 稻瘟病菌附着胞形成的细胞生物学[J]. *植物病理学报*, 2001, 31(2): 97–101.
- LIN F C. Cell biology of appressorium formation of *Magnaporthe grisea*[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2001, 31(2): 97–101.
- [30] BRETH B, ODENBACH D, YEMELIN A, et al. The role of the Tra1p transcription factor of *Magnaporthe oryzae* in spore adhesion and pathogenic development[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2013, 57: 11–22.
- [31] ARAUJO-PALOMARES C L, RICHTHAMMER C, SEILER S, et al. Functional characterization and cellular dynamics of the CDC-42–RAC–CDC-24 module in *Neurospora crassa*[J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27148.
- [32] JUSTA-SCHUCH D, HEILIG Y, RICHTHAMMER C, et al. Septum formation is regulated by the RHO4-specific exchange factors BUD3 and RGF3 and by the landmark protein BUD4 in *Neurospora crassa*[J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 76(1): 220–235.

(责任编辑: 林海清)