稻瘟病菌内切几丁质酶基因*MoENCH1*的功能分析

赵 娟[1*] 许立鹤[2] 石鑫怡[1] 邹欣梅[1] 吕柔柔[1] 赵 鑫[1] 刘 杰[1]

（1. 成都师范学院，特色园艺生物资源开发与利用四川省高校重点实验室，成都 611130；
2. 成都农业科技职业学院，成都 611130）

摘要：为明确稻瘟病菌*Magnaporthe oryzae*几丁质内切酶（endochitinase，ENCH）的功能，通过Split marker方法在稻瘟病菌中敲除编码该酶的*MoENCH1*基因获得敲除突变体，并构建回补菌株，系统分析其生物学功能，进一步采用转录组测序技术对其致病分子机制进行分析。结果表明：相较于野生型稻瘟病菌，*MoENCH1*基因敲除突变体在番茄燕麦（oatmeal agar，OMA）培养基、复杂完全培养基（complete medium，CM）和基本培养基（minimal medium，MM）上的生长速率均显著下降，在OMA培养基上的产孢量显著下降，孢子萌发率和附着胞形成率也均显著下降，且对细胞壁胁迫因子刚果红不敏感，对大麦和水稻的致病力显著下降。转录组分析结果显示，稻瘟病菌体内*MoENCH1*基因参与调控自噬、过氧化物酶体、泛素介导的蛋白酶解和甘油磷脂代谢通路。表明*MoENCH1*基因在稻瘟菌体内参与调控菌丝生长、产孢、孢子萌发、附着胞形成以及致病力。

关键词：稻瘟病菌；几丁质内切酶；致病力；转录组；产孢；孢子萌发；附着胞形成

Functional analysis of the endochitinase gene *MoENCH1* in rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*

Zhao Juan[1*] Xu Lihe[2] Shi Xinyi[1] Zou Xinmei[1] Lü Rourou[1] Zhao Xin[1] Liu Jie[1]

（1. Sichuan Provincial Key Laboratory for Development and Utilization of Characteristic Horticultural Biological Resources, Chengdu Normal University, Chengdu 611130, Sichuan Province, China;
2. Chengdu Agricultural College, Chengdu 611130, Sichuan Province, China）

Abstract: To investigate the function of the endochitinase (ENCH) gene *MoENCH1* in rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*, a *MoENCH1* knockout mutant was generated using the split-marker approach, and a complemented strain was subsequently constructed. The biological functions of *MoENCH1* were systematically characterized, and the molecular mechanisms underlying its role in pathogenicity were further investigated with transcriptome sequencing. The results showed that, compared with the wild-type strain, the *MoENCH1* knockout mutant significantly reduced growth rates on oatmeal agar (OMA), complete medium, and minimal medium. Sporulation on OMA was significantly decreased, accompanied by reduced conidial germination and appressorium formation rates. In addition, the mutant was insensitive to the cell wall stress agent Congo red and exhibited significantly reduced pathogenicity toward both barley and rice. Transcriptome analysis indicated that *MoENCH1* is involved in regulating pathways related to autophagy, peroxisomes, ubiquitin-mediated proteolysis, and glycerophospholipid metabolism in *M. oryzae*. These results demonstrate that *MoENCH1* plays important roles in regulating hyphal growth, sporulation, conidial germination, appressorium formation, and pathogenicity in *M. oryzae.*

基金项目：国家自然科学基金项目（32402340），四川省自然科学基金项目（2024NSFSC1320）

* 通信作者（Author for correspondence），E-mail：zhaojuan201809@163.com

收稿日期：2026-01-14

Key words: *Magnaporthe oryzae*; endochitinase; pathogenicty; RNA-Seq; sporulation; conidial germination; appressorium formation

稻瘟病菌*Magnaporthe oryzae*在水稻上引起的稻瘟病是全球性真菌病害（Elert，2014；Nalley et al.，2016；宁柠等，2024），且该病害在我国《农作物病虫害防治条例》中被列为一类农作物病虫害。稻瘟病菌不仅可以引起水稻病变，也可以侵染小麦等其他农作物（Takabayashi et al.，2002；Sesma & Osbourn，2004；Skamnioti & Gurr，2009）。，另外，稻瘟病菌遗传背景简单，操作容易，也被作为一种与植物互作的模式真菌（Liu et al.，2010；聂燕芳等，2021）。

几丁质酶在生物界分布广泛，在细胞营养获取、病原菌侵染、胚胎发育、昆虫蜕皮及免疫防御等关键生命活动中扮演着重要角色（Le & Yang，2019）。几丁质酶属于糖苷水解酶（glycoside hydrolase，GH），根据其作用方式和基于氨基酸序列相似性可分为内切几丁质酶（主要来源于GH18和GH19家族）和外切几丁质酶（主要来源于GH3、GH18和GH20家族）（Cantarel et al.，2009；Le & Yang，2019）。在真菌中，几丁质酶在侵染寄主和吸收营养等方面发挥了重要作用（Rafiei et al.，2021）。如在丝状真菌棉病囊菌*Ashbya gossyp*中，几丁质酶基因*AgCts2*的缺失会影响其孢子形成（Dünkler et al.，2005）；敲除构巢曲霉菌*Aspergillus nidulans*的几丁质酶基因*chiB*会抑制该菌几丁质酶的活性，影响其自噬进程（Yamazaki et al.，2007）；金龟子绿僵菌*Metarhizium anisopliae*中几丁质酶基因*chi2*的缺失会造成其对昆虫的毒性降低（Boldo et al.，2009）。因此，几丁质酶也是防治病害的重要靶标。

本研究拟通过Split marker方法对稻瘟病菌中内切几丁质酶（endochitinase，ENCH）基因*MoENCH1*（EnsemblFungi数据库编号MGG_00086）进行敲除，系统分析其在稻瘟病菌生长发育及致病过程中的生物学功能，并进一步利用转录组测序技术比较野生型与敲除突变体的差异表达基因，从而探讨几丁质酶参与致病调控的分子机制，以期为阐明稻瘟病菌的致病机理提供参考依据，也为其他病原菌中几丁质酶功能研究提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株、植物和载体：野生型稻瘟病菌菌株P131、水稻品种丽江新团黑谷种子和载体pKNTG均由华中农业大学陈小林老师实验室惠赠。水稻种子用清水浸泡3 d，待露白后取20粒播种于装有湿润营养土的10 cm×10 cm×10 cm育苗钵中，培养约1个月，待叶片完全展开后供试。大麦品种鄂麦9号种子和pCB1003载体由华中农业大学李国田老师实验室提供。取25粒大麦种子播种至装有湿润营养土的10 cm×10 cm×10 cm育苗钵中，约1周后待植物生长至1叶1心期供试。

培养基：简单完全培养基成分为蔗糖10 g/L、酵母提取物6 g/L、酸水解酪蛋白6 g/L；复杂完全培养基（complete medium，CM）成分为硝酸盐溶液（每升溶液含有硝酸钠120 g、氯化钾10.4 g、七水合硫酸镁10.4 g、磷酸二氢钾30.4 g）50 mL/L、微量元素溶液（每升溶液含有生物素0.1 g、吡哆醇0.1 g、硫胺素0.1 g、核黄素0.1 g、对氨基苯甲酸0.1 g、烟酸0.1 g）1 mL/L、葡萄糖10 g/L、蛋白胨2 g/L、酵母提取物1 g/L、酸水解酪蛋白1 g/L、维生素溶液（每升溶液含有七水合硫酸锌2.2 g、硼酸1.1 g、四水合氯化锰0.5 g、七水合硫酸亚铁0.5 g、六水合氯化钴0.17 g、五水合硫酸铜0.16 g、二水合钼酸钠0.15 g）1 mL/L、琼脂18 g/L，氢氧化钠调节pH至6.5；基本培养基（minimal medium，MM）成分为硝酸盐溶液50 mL/L、微量元素溶液1 mL/L、维生素溶液1 mL/L、葡萄糖10 g/L、琼脂粉18 g，氢氧化钠调节pH至6.5；番茄燕麦（oatmeal agar，OMA）培养基成分为西红柿汁150 mL/L、燕麦40 g/L、碳酸钙0.6 g/L、琼脂18 g/L；TB3液体培养基成分为酸水解酪蛋白6 g/L、酵母提取物6 g/L、蔗糖200 g/L；TB3液体培养基中添加18 g琼脂粉即可制得TB3固体培养基。

试剂和仪器：真菌DNA提取试剂盒，北京索莱宝科技有限公司；溶壁酶，广东省微生物菌种保藏中心；真菌RNA提取试剂盒，武汉纳磁生物科技有限公司；BM Seamless Cloning Kit，北京博迈德基因技术有限公司；TSE003 2×TSINGKE Master Mix、1.1×金牌Mix、大肠杆菌*Escherichia coli*感受态细胞TOP10，北京擎科生物科技股份有限公司；Easy*Taq*® DNA Polymerase，北京全式金生物技术股份有限公司；FastDigest *Hin*d III和FastDigest *Kpn* I，美国Thermo Scientific公司；NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit for Illumina®，美国NEB公司；HiSeq PE Cluster Kit v4-cBot-HS，美国Illumina公司；SYBR

Green Pro *Taq* HS 预混型 qPCR 试剂盒 III、Evo M-MLV RT Mix Kit with gDNA Clean for qPCR 反转录试剂盒，湖南艾科瑞生物工程有限公司；其余试剂均为国产分析纯。PGX-380 光照培养箱，宁波科晟实验仪器有限公司；PR-96P PCR 仪，杭州米欧仪器有限公司；QuantStudio 6 Flex 荧光定量 PCR 仪，美国 ABI 公司；X3R 台式冷冻离心机，美国 Thermo Fisher Scientific 公司；Kaiao K5500®分光光度计，北京凯奥科技发展有限公司；Agilent 2100 Bioanalyzer 系统，美国 Agilent Technologies 公司。

1.2 方法

1.2.1 *MoENCH1* 基因敲除体和回补菌株的构建

利用 Split marker 方法敲除稻瘟病菌体内 *MoENCH1* 基因。取野生型稻瘟病菌菌株 P131 接种至 OMA 平板上，于 28 ℃活化 7 d，取少量菌丝体，利用真菌 DNA 提取试剂盒提取其 DNA，备用。以获得的 DNA 为模板，用 Primer Premier 5.0 软件设计引物 MoENCH1-1F/MoENCH1-2R、MoENCH1-3F/MoENCH1-4R（表 1），分别扩增 *MoENCH1* 基因上下游侧翼序列，预期目的片段大小分别为 1 013 bp 和 958 bp。本研究所有引物均由北京擎科生物科技股份有限公司合成。50 μL PCR 反应体系：TSE003 2× TSINGKE Master Mix 25 μL、0.2 μmol/L 上下游引物各 1 μL、模板 DNA 约 1 μg，用 ddH_2O 补足至 50 μL；PCR 扩增程序：94 ℃预变性 3 min；94 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，35 个循环；72 ℃终延伸 5 min。同时，用上述软件设计引物 HYG-F/HYG-R（表 1），从 pCB1003 载体上扩增潮霉素 *hph* 基因片段，PCR 反应体系和程序同上。利用 Double joint PCR 方法将 *MoENCH1* 基因上下游侧翼片段分别与 *hph* 片段连接起来，获得上游侧翼+*hph* 基因和下游侧翼+*hph* 基因融合片段。50 μL Double joint PCR 反应体系：10×Easy*Taq*® Buffer 5 μL、2.5 mmol/L dNTPs 4 μL、Easy*Taq*® DNA Polymerase 1 μL、上游或下游侧翼片段+*hph* 基因片段各 50 ng，用 ddH_2O 补足至 50 μL；扩增程序：94 ℃预变性 3 min；94 ℃变性 30 s，60 ℃退火 5 min，72 ℃延伸 2 min，15 个循环；72 ℃终延伸 10 min。然后在上游测序片段+*hph* 基因片段的反应体系中再加入 0.2 μmol/L 引物 MoENCH1-7F 和 HY/R 各 1 μL，在下游侧翼片段+*hph* 基因片段的反应体系中再加入 0.2 μmol/L 引物 YG/F 和 MoENCH1-8R 各 1 μL，分别进行扩增，PCR 扩增程序：94 ℃预变性 3 min；94 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，35 个循环；72 ℃终延伸 5 min。

利用稻瘟病菌遗传转化法将上述获得的上游侧翼+*hph* 基因和下游侧翼+*hph* 基因融合片段分别转入稻瘟病菌野生型菌株 P131 的原生质体中。具体步骤如下：将在 OMA 平板上培养的稻瘟病菌菌块接入简单完全培养基中，28 ℃、120 r/min 摇培 36 h，用 3 层擦镜纸过滤收集菌丝，经灭菌 ddH_2O 冲洗压干后转移至三角瓶中。用含 0.1 g 溶壁酶的 0.7 mol/L NaCl 溶液酶解菌丝，30 ℃、90 r/min 处理 2 h，过滤后冰浴，收集含有原生质体的滤液，经 NaCl 洗涤和 STC 溶液（甘露醇 218.4 g、$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 7.351 g、0.5 mol/L Tris-HCl（pH 8.0）100 mL，ddH_2O 定容至 1 L）反复离心洗涤，用 STC 溶液调节原生质体浓度至 10^8 个/mL。取 200 μL 原生质体与 3~5 μg 上游侧翼+*hph* 基因融合片段（或下游侧翼+*hph* 基因融合片段）混匀静置 20 min，每 200 μL 加入 1 mL PTC（PEG3350 20 g，加 STC 溶液溶解，ddH_2O 定容至 50 mL）后静置 20 min 进行转化，随后加入 5 mL TB3 液体培养基过夜恢复，经含终浓度为 100 μg/mL 潮霉素的 TB3 固体培养基筛选阳性转化子，挑取单克隆转接至 OMA 平板上于 28 ℃培养并鉴定。用上述软件设计 3 对引物 MoENCH1-5F/MoENCH1-6R（确认基因是否敲除）、MoENCH1-1F/MoENCH1-9R 和 MoENCH1-10F/MoENCH1-4R（确认上下游侧翼片段中 *hph* 基因是否插入）（表 1）对阳性转化子进行 PCR 鉴定，反应体系和程序同 *MoENCH1* 基因上下游侧翼序列扩增，最终获得 *MoENCH1* 基因敲除突变体 M5 和 M92。

针对 *MoENCH1* 基因上游序列，采用上述软件设计引物 MoENCH1-CPF/MoENCH1-R 进行 *MoENCH1* 启动子和全长序列的扩增，预期目的片段大小分别为 1 496 bp 和 1 517 bp。以稻瘟病菌野生型菌株 P131 的 DNA 为模板进行 PCR 扩增，50 μL 反应体系：1.1× 金牌 Mix 45 μL、0.2 μmol/L 上下游引物各 1 μL、模板 DNA 约 1 μg，用 ddH_2O 补足至 50 μL；反应程序：98 ℃预变性 2 min；98 ℃变性 10 s，55 ℃退火 15 s，72 ℃延伸 1 min，35 个循环；72 ℃终延伸 10 min。用 BM Seamless Cloning Kit 将所得扩增序列连入经限制性内切酶 FastDigest *Hin*d III 和 FastDigest *Kpn* I 酶切后的 pKNTG 载体中，并转入大肠杆菌感受态细胞 TOP10 中，委托北京擎科生物科技股份有限公司测序，序列正确即得到回补载体 pKNTG-MoENCH1。将回补载体参照上述稻瘟病菌遗传转化法转入构建的 *MoENCH1* 基因敲除突变体 M5 的原生质体（制备方法同上）中，用含终浓度为 100 μg/mL 的 G418 的 TB3 固体平板进行筛选，获得回补菌株 CP1。

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	序列(5′−3′) Sequence (5′−3′)
MoENCH1-1F	TATTGGCGCATTCGAGGT
MoENCH1-2R	TTTGACCTCCACTAGCTCCAGCCAAGCCATGTTGCAGAGTTGAGTTGGC
MoENCH1-3F	GAATAGAGTAGATGCCGACCGCGGGTTAGTGCGTTGGTGCAGGAT
MoENCH1-4R	CTAGGCACCAAACATTTTGC
MoENCH1-5F	TTTGTCAACTGGTGAGGCTG
MoENCH1-6R	TGTACAGCTGCTTGACGCA
MoENCH1-7F	GATTCGACGACAAGGAGGAA
MoENCH1-8R	AATTAGCAAGGCGGCTCTT
MoENCH1-9F	GTCGATGCGACGCAATCGT
MoENCH1-10R	GCTGATCTGACCAGTTGC
HYG-F	GGCTTGGCTGGAGCTAGTGGAGGTCAA
HYG-R	AACCCGCGGTCGGCATCTACTCTATTC
YG-F	GATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCT
HY-R	GTATTGACCGATTCCTTGCGGTCCGAA
MoENCH1-CPF	AGGGAACAAAAGCTGGGTACCTGTCTGCTGCTCAAGATTAACA
MoENCH1-CPR	GCCCTTGCTCACCATAAGCTTCTACTCCCCCGGCAACCC
PMC1-F	ATGGCGGACAATAAGGACGA
PMC1-R	CATCGTCTGTCGGCGAGAT
EMP1-F	ACCAACAGCAACTTCGTTGTTG
EMP1-R	AGAAGCGTCCAGGGTGACAGT
NOX1-F	CCTGGCTGGTCTGAACACTCT
NOX1-R	GGATCTTGGGCCTGATCCA
Actin-F	CCATGTACCCTGGTCTTTCG
Actin-R	TTCGAGATCCACATCTGCTG

1.2.2 *MoENCH1*基因敲除突变体的表型分析

将稻瘟病菌野生型菌株、*MoENCH1*基因敲除突变体和回补菌株分别接种在OMA、CM和MM平板上，在28 ℃、8 h光照/16 h黑暗条件下培养6 d，采用十字交叉法测量菌落直径并拍照，每株菌株重复5次，每个重复1个平板。将上述3株菌株分别接种在OMA平板上，相同条件下培养6 d，用5 mL无菌分生水冲洗平板，用擦镜纸过滤后定容至10 mL获得分生孢子液，用血球计数板计算每个培养皿中分生孢子数，统计产孢量，每株菌株至少重复5次，每个重复1皿。取10 μL孢子液滴于疏水玻片上，置于保湿盒内于28 ℃黑暗培养，分别在2 h和12 h观察并统计孢子萌发和附着胞形成情况，计算孢子萌发率和附着胞形成率。当有芽管从孢子两端萌出记为孢子萌发，当芽管末端形成黑色附着胞记为附着胞形成，异常附着胞不计入，以50个为1组，统计5组。

1.2.3 *MoENCH1*基因敲除突变体的致病力测定

参照1.2.2方法制备稻瘟病菌野生型菌株、*MoENCH1*基因敲除突变体和回补菌株的分生孢子液，用0.025%吐温溶液调节浓度至10^5个/mL。取生长至1叶1心期的大麦幼苗，将上述分生孢子液喷施至大麦叶片上，每盆(25株植株)共喷施10 mL，7 d后观察并统计每株大麦上的病斑数量。同时滴加10 μL分生孢子液到刺伤的1月龄水稻叶片上，5 d后观察并统计每个侵染点的病斑面积。

1.2.4 *MoENCH1*基因敲除突变体对环境压力响应的测定

将稻瘟病菌野生型菌株、*MoENCH1*基因敲除突变体和回补菌株的菌丝块分别置于含0.2 mg/mL刚果红的CM平板上，于28 ℃、8 h光照/16 h黑暗条件下培养6 d，采用十字交叉法测量菌落直径。以在未添加刚果红的CM平板上培养为对照。每株菌株5次重复，每个重复1个平板。

1.2.5 *MoENCH1*基因敲除突变体的转录组分析

将稻瘟病菌野生型菌株、*MoENCH1*基因敲除突变体的菌丝经液氮研磨后，使用真菌RNA提取试剂盒提取菌丝总RNA，利用分光光度计检测总RNA纯度，利用Agilent 2100 Bioanalyzer系统检测总RNA的完整性与浓度。每组合格样品取2 μg总RNA，使用NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit for Illumina®参照说明书构建测序文库，并通过添加Index

标签序列以区分各样品。利用HiSeq PE Cluster Kit v4-cBot-HS进行桥式PCR聚类。聚类完成后，委托武汉伯远科技有限公司在Illumina测序平台完成测序，生成150 bp双末端读数。测序数据使用FastQC软件进行质控（Brown et al.，2017）。将质控数据使用HISAT2软件与稻瘟病菌菌株MG8参考基因组进行比对，参数默认。使用featureCounts软件对基因表达水平进行量化（Liao et al.，2014；Kim et al.，2019）。使用DESeq2软件筛选野生型菌株和*MoENCH1*基因敲除突变体间的差异表达基因，判断标准$P \leqslant 0.05$且$\log_2FC \geqslant 2$，FC为差异倍数（fold-change）（Love et al.，2014）。利用clusterProfiler 3.8软件对筛选出的差异表达基因进行KEGG通路富集分析。

为验证转录组分析结果，筛选3个差异表达基因MGG_02487（*PMC1*）、MGG_00527（*EMP1*）和MGG_00750（*NOX1*）进行实时荧光定量PCR验证。以野生型菌株和*MoENCH1*基因敲除突变体的总RNA为模板，参照Evo M-MLV RT Mix Kit with gDNA Clean for qPCR说明书反转录合成cDNA，以其为模板，使用 PMC1-F/PMC1-R、EMP1-F/EMP1-R、NOX1-F/NOX1-R引物（表1）分别进行这3个基因的扩增，以*Actin*为内参基因，引物为Actin-F/Actin-R（表1）。20 μL反应体系：2×SYBR qPCR Master Mix 10 μL、10 μmol/L上下游引物各0.4 μL、cDNA模板1 μL，以RNase-Free Water补足。反应程序：95 ℃预变性30 s；95℃变性5 s，60℃退火/延伸30 s，40个循环；最后在95 ℃ 15 s、60 ℃ 60 s程序下以0.05 ℃/s升温至95 ℃进行熔解曲线分析。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法对测定的荧光数据进行分析，计算基因表达量（杜巧丽等，2022）。

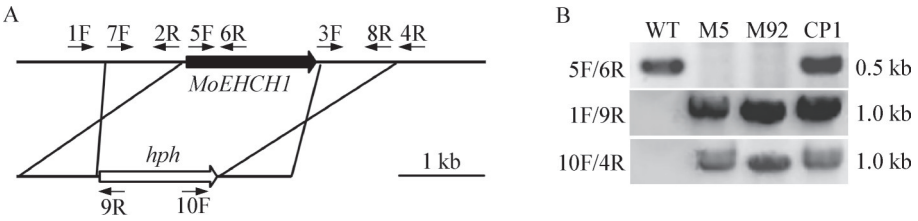
1.3 数据分析

本试验数据采用Graphpad Prism 10软件进行统计分析，使用*t*检验法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 *MoENCH1*基因敲除与回补菌株的获得

用Double joint PCR方法将潮霉素*hph*基因上下游片段与*MoENCH1*基因侧翼序列相连（图1-A），转入稻瘟病菌野生型菌株P131的原生质体中，并在含有潮霉素的TB3固体培养基上筛选阳性转化子。通过PCR筛选鉴定出两个*MoENCH1*基因敲除突变体M5和M92。同时将测序正确的回补载体转入*MoENCH1*基因敲除突变体M5的原生质体中，经G418抗生素筛选鉴定到回补菌株CP1。利用引物MoENCH1-5F/MoENCH1-6R、MoENCH1-1F/MoENCH1-9R和MoENCH1-10F/MoENCH1-4R对野生型、M5和CP1菌株的基因型进行验证，发现基因上设计的引物MoENCH1-5F/MoENCH1-6R扩增后无片段，上下游侧翼和*hph*基因融合片段上设计的引物MoENCH1-1F/MoENCH1-9R和MoENCH1-10F/MoENCH1-4R有扩增片段，说明*MoENCH1*基因被替换成了*hph*基因片段（图1-B）。表明成功构建了*MoENCH1*基因敲除突变体和回补菌株。



A：*MoENCH1*基因敲除策略，分别用引物MoENCH1-1F/MoENCH1-2R和MoENCH1-3F/MoENCH1-4R扩增*MoENCH1*上游和下游侧翼片段，并通过Double joint PCR与*hph*片段连接。B：使用引物MoENCH1-5F/MoENCH1-6R、MoENCH1-1F/MoENCH1-9R和MoENCH1-10F/MoENCH1-4R验证野生型菌株P131（WT）、*MoENCH1*突变体M5、M92和回补菌株CP1。A: Strategy for *MoENCH1* gene deletion. The upstream and downstream flanking fragments of *MoENCH1* were amplified using primer pairs MoENCH1-1F/MoENCH1-2R and MoENCH1-3F/MoENCH1-4R, respectively, and fused with the *hph* cassette by double-joint PCR. B: Validation of the wild-type strain P131 (WT), *MoENCH1* knockout mutants M5 and M92, and the complemented strain CP1 using primer pairs MoENCH1-5F/MoENCH1-6R, MoENCH1-1F/MoENCH1-9R and MoENCH1-10F/MoENCH1-4R.

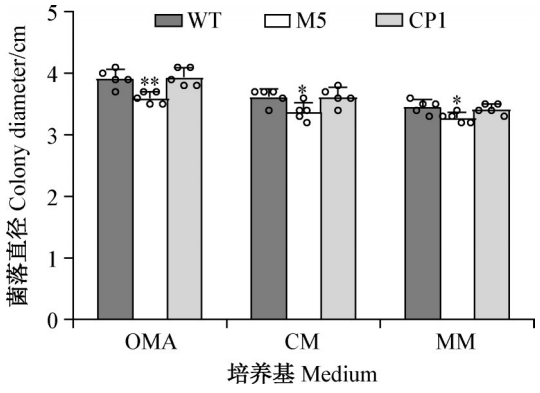
图1 稻瘟病菌*MoENCH1*敲除突变体构建策略及验证

Fig. 1 Construction strategy and validation of the *MoENCH1* knockout mutant in *Magnaporthe oryzae*

2.2 *MoENCH1*基因敲除突变体的表型分析

与野生型菌株和回补菌株相比，*MoENCH1*敲除突变体M5在OMA培养基上的生长速率分别极显著降低7.6%和8.6%，在CM平板上的生长速率分别显著降低6.6%和7.1%，在MM平板上的生长速率分别显著降低5.2%和4.1%；而回补菌株在3种培养基上

的生长速率与野生型菌株均无显著差异（图2）。表明*MoENCH1*基因参与稻瘟病菌菌丝的营养生长。



WT：野生型菌株；M5：*MoENCH1*敲除突变体；CP1：回补菌株。WT: Wild-type strain; M5: *MoENCH1* knockout mutant; CP1: complemented strain.

图2 稻瘟病菌*MoENCH1*敲除突变体在不同培养基上的菌落直径

Fig. 2 Colony diameter of the *MoENCH1* knockout mutant of *Magnaporthe oryzae* on different culture media

图中数据为平均数±标准差。*和**分别表示敲除突变体与野生型菌株间经*t*检验法检验差异显著（$P<0.05$和$P<0.01$）。Data are presented as the mean±SD. * and ** indicate significant differences between the *MoENCH1* knockout mutant and the wild-type strain according to Student's *t* test ($P<0.05$ and $P<0.01$).

2.3 *MoENCH1*基因敲除突变体产孢与致病表型分析

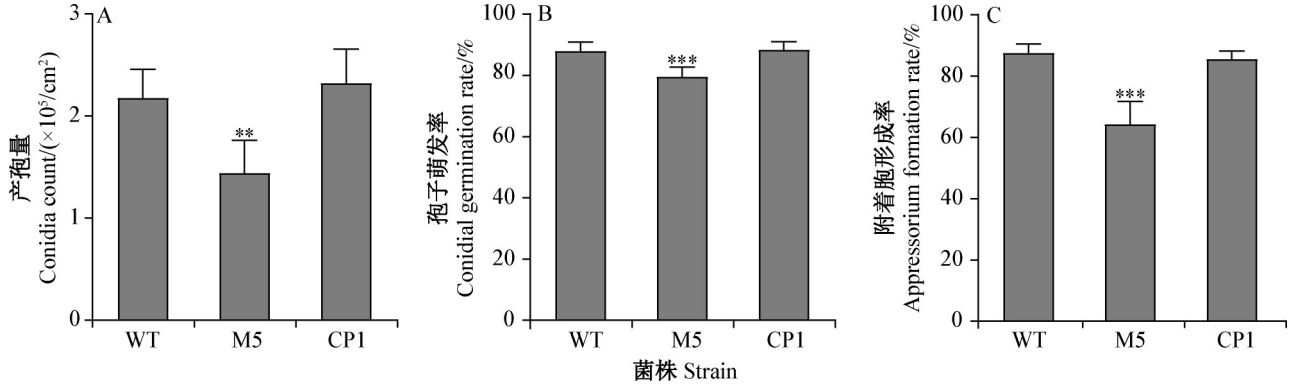
与野生型菌株和回补菌株相比，*MoENCH1*敲除突变体在OMA培养基上的产孢量分别极显著降低了33.9%和37.9%，孢子萌发率分别极显著降低了9.5%和9.9%，附着胞形成率分别极显著降低了26.5%和24.8%；回补菌株在产孢量、孢子萌发率和附着胞形成率上与野生型菌株均无显著差异（图3），表明*MoENCH1*基因参与稻瘟病菌产孢、孢子萌发和附着胞形成。

2.4 *MoENCH1*基因敲除突变体对细胞壁胁迫的响应

在含刚果红的CM平板上，*MoENCH1*敲除突变体的菌落直径较野生型菌株和回补菌株分别显著增加了9.1%和8.5%；而回补菌株在含刚果红的CM平板上的菌落直径与野生型菌株均无显著差异（图4），表明*MoENCH1*敲除突变体对刚果红不敏感。

2.5 *MoENCH1*基因敲除突变体的致病力

与野生型菌株和回补菌株相比，*MoENCH1*敲除突变体在大麦叶片上侵染形成的病斑数量分别显著减少了40.6%和35.8%（图5-A~B）；敲除突变体在水稻叶片上侵染形成的病斑面积分别显著减少了43.1%和37.5%（图5-C~D）；而回补菌株在大麦和水稻上的致病力与野生型菌株均无显著差异，表明*MoENCH1*基因参与调控稻瘟病菌的致病力。



WT：野生型菌株；M5：*MoENCH1*敲除突变体；CP1：回补菌株。WT: Wild-type strain; M5: *MoENCH1* knockout mutant; CP1: complemented strain.

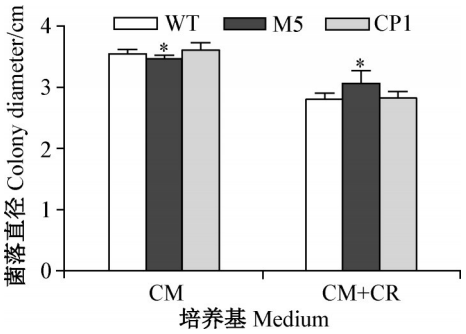
图3 稻瘟病菌*MoENCH1*敲除突变体的产孢量（A）、孢子萌发率（B）与附着胞形成率（C）

Fig. 3 Conidia count (A), conidial germination (B) and appressorium formation rates (C) of the *MoENCH1* knockout mutant of *Magnaporthe oryzae*

图中数据为平均数±标准差。**和***分别表示敲除突变体与野生型菌株间经*t*检验法检验差异显著（$P<0.01$和$P<0.001$）。Data are presented as the mean±SD. ** and *** indicate significant differences between the *MoENCH1* knockout mutant and the wild-type strain according to Student's *t* test ($P<0.01$ and $P<0.001$).

2.6 *MoENCH1*基因敲除突变体的转录水平差异

经与参考基因组对比，从稻瘟病菌野生型菌株和*MoENCH1*敲除突变体菌丝中共鉴定到11 937个基因。对基因表达量进行差异分析，与野生型菌株相比，*MoENCH1*敲除突变体中上调表达基因有921个，下调表达基因有1 444个。KEGG富集分析发现差异表达基因主要聚集在自噬、过氧化物酶体、泛素介导的蛋白酶解和甘油磷脂代谢通路中（图6）。



WT：野生型菌株；M5：*MoENC+H1* 敲除突变体；CP1：回补菌株。WT: Wild-type strain; M5: *MoENCH1* knockout mutant; CP1: complemented strain.

图4 刚果红对稻瘟病菌*MoENCH1*敲除突变体的影响

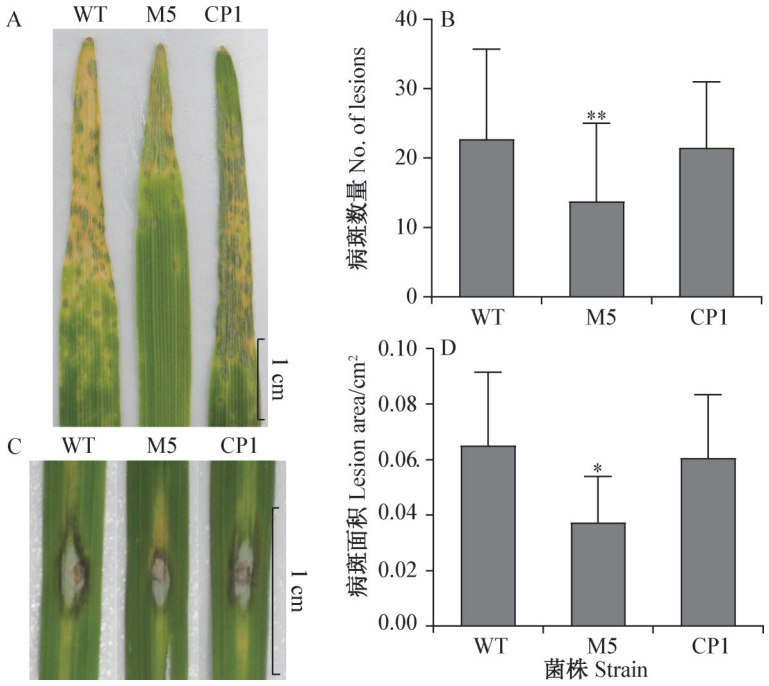
Fig. 4 Effect of Congo red (CR) on the *MoENCH1* knockout mutant of *Magnaporthe oryzae*

图中数据为平均数±标准差。*分别表示敲除突变体与野生型菌株间经 *t* 检验法检验差异显著（$P<0.05$）。Data are presented as the mean±SD. * indicates a significant difference between the *MoENCH1* knockout mutant and the wild-type strain according to Student's *t* test ($P<0.05$).

实时荧光定量PCR检测结果显示，*MoENCH1* 敲除突变体中差异表达基因MGG_02487（*PMC1*）、MGG_00527（*EMP1*）和MGG_00750（*NOX1*）的相对表达量较野生型菌株显著升高或降低，与转录组分析趋势一致（图7），表明本研究转录组分析结果可靠。

3 讨论

几丁质酶作为真核生物中重要的细胞壁水解酶，在病原真菌侵染寄主过程中发挥着重要作用。稻瘟病菌 *MoENCH1* 基因编码的内切几丁质酶调控其对水稻的侵染进程，若该酶缺失会影响其菌丝生长、产孢、孢子萌发。在白色念珠菌 *Candida albicans*、烟曲霉 *Aspergillus fumigatus*、新生隐球菌 *Cryptococcus neoformans* 中，几丁质酶缺失会造其致病力下降（Baker et al., 2011; Free, 2013; Preechasuth et al., 2015）。与人类三大条件致病性真菌相似，稻瘟病菌 *MoENCH1* 基因也调控其在孢子植物叶片上的附着胞形成过程以及致病力。



WT：野生型菌株；M5：*MoENCH1* 敲除突变体；CP1：回补菌株。A~B：施用孢子液后7 d大麦叶片的发病情况及统计结果；C~D：在水稻叶片上点接孢子液后5 d的发病情况及统计结果。WT: Wild-type strain; M5: *MoENCH1* knockout mutant; CP1: complemented strain. A−B: Disease symptoms and statistical analysis of lesion number on barley leaves 7 days after spray inoculation with conidial suspensions. C−D: Disease symptoms and statistical analysis of lesion area on rice leaves 5 days after point inoculation with conidial suspensions.

图5 稻瘟病菌*MoENCH1*基因敲除体对大麦（A~B）和水稻（C~D）的致病力

Fig. 5 Pathogenicity of the *MoENCH1* knockout mutant of *Magnaporthe oryzae* on barley (A−B) and rice (C−D)

图中数据为平均数±标准差。*和**分别表示敲除突变体与野生型菌株间经 *t* 检验法检验差异显著（$P<0.05$ 和 $P<0.01$）。Data are presented as the mean±SD. * and ** indicate significant differences between the *MoENCH1* knockout mutant and the wild-type strain according to Student's *t* test ($P<0.05$ and $P<0.01$).

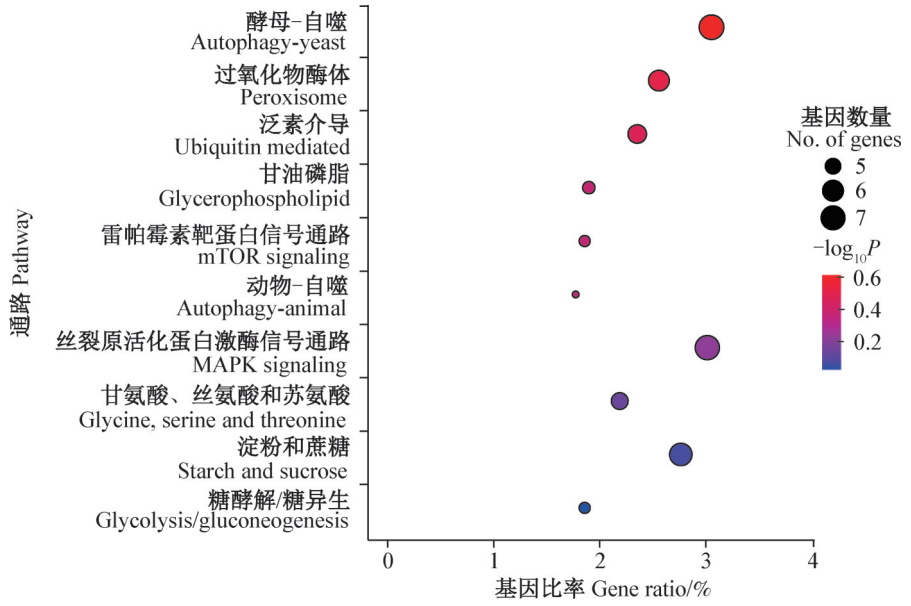
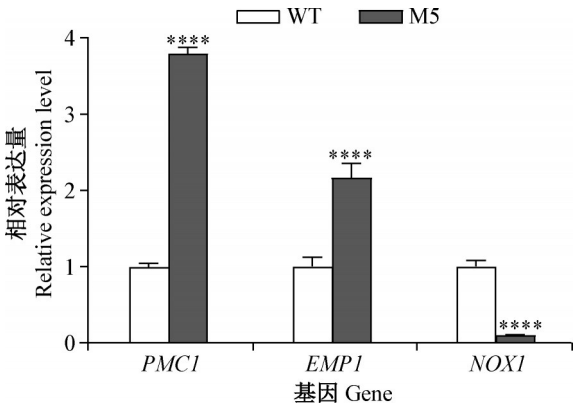


图6　稻瘟病菌*MoENCH1*基因敲除突变体差异表达基因的KEGG通路富集分析

Fig. 6　KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed genes in *MoENCH1* knockout mutant of *Magnaporthe oryzae*



WT：野生型菌株；M5：*MoENCH1*敲除突变体。WT: Wild-type strain; M5: *MoENCH1* knockout mutant.

图7　稻瘟病菌野生型菌株和*MoENCH1*基因敲除体之间差异表达基因的相对表达量

Fig. 7　Relative expression levels of differentially expressed genes in the wild-type strain and the *Moench1* knockout mutant of *Magnaporthe oryzae*

图中数据为平均数±标准差。****分别表示敲除突变体与野生型菌株间经*t*检验法检验差异显著（P<0.000 1）。Data are presented as the mean±SD. **** indicates a significant difference between the MoENCH1 knockout mutant and the wild-type strain according to Student's *t* test (P<0.000 1).

本研究发现*MoENCH1*基因缺失影响稻瘟病菌对细胞壁相关的压力响应。刚果红是一种能与纤维素和几丁质结合的染料，能干扰这些成分的正确组装，从而对细胞壁产生胁迫（Free，2013）。在真菌细胞壁合成抑制剂刚果红胁迫下，稻瘟病菌*MoENCH1*基因缺失突变体相较于野生型菌株变得不敏感，说明*MoENCH1*基因是稻瘟病菌细胞壁胁迫响应的负调控因子，其缺失可能通过重塑细胞壁结构或重编程胁迫信号通路，增强了突变体对细胞壁干扰剂的耐受能力。

另外本研究深入探究了*MoENCH1*基因在转录水平上影响稻瘟病菌致病力的分子机制，发现该基因的缺失造成多种重要通路中相关基因的差异表达。通过筛选分析和验证，发现*PMC1*、*EMP1*和*NOX1*基因可能参与*MoENCH1*基因调控稻瘟病菌致病力的过程。*PMC1*是稻瘟病菌体内编码质膜钙转运ATP酶的基因，其沉默会导致严重的生长和产孢缺陷（Nguyen et al.，2008）。*EMP1*基因作为镰刀菌黏附蛋白基因*FEM1*的同源基因，在稻瘟病菌中编码N-糖基化蛋白。该蛋白是一种GPI锚定、N-糖基化细胞外基质蛋白，在附着胞形成阶段特异性表达（Ahn et al.，2004）。在*MoENCH1*基因敲除突变体中，*PMC1*和*EMP1*上调表达，这意味着*MoENCH1*基因参与调控稻瘟病菌钙稳态与致病性发育的协同转换。值得注意的是，*NOX1*基因作为调控细胞壁构建的重要基因，该基因缺失导致稻瘟病菌无法穿破植物表皮进行侵染（Egan et al.，2007）。本研究还发现在*MoENCH1*基因敲除突变体中*NOX1*基因显著下调表达，这意味着*MoENCH1*基因可能通过参与调控稻瘟病菌体内活性氧的表达来控制致病力。本研究初步揭示了*MoENCH1*在稻瘟病菌生长发

育、细胞壁完整性和致病力中的调控功能。未来将对不同真菌中几丁质酶的功能进行系统比较，评估以几丁质酶为靶标进行广谱病害防控的可行性。

参 考 文 献（References）

Ahn N, Kim S, Choi W, Im KH, Lee YH, 2004. Extracellular matrix protein gene, *EMP1* is required for appressorium formation and pathogenicity of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*[J]. Molecules and Cells, 17(1): 166–173

Baker LG, Specht CA, Lodge JK, 2011. Cell wall chitosan is necessary for virulence in the opportunistic pathogen *Cryptococcus neoformans*[J]. Eukaryotic Cell, 10(9): 1264–1268

Boldo JT, Junges A, do Amaral KB, Staats CC, Vainstein MH, Schrank A, 2009. Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*[J]. Current Genetics, 55(5): 551–560

Brown J, Pirrung M, McCue LA, 2017. FQC Dashboard: integrates FastQC results into a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool[J]. Bioinformatics, 33(19): 3137–3139

Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B, 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics[J]. Nucleic Acids Research, 37(Database issue): 233–238

Du QL, Liu JX, Chen MQ, Jiang JM, Ren MJ, Li XY, Jiang YL, Xie X, 2022. Identification of sorghum BR signal transcription factor BZR1 gene family and analysis of hormone response[J]. Journal of Plant Protection, 49(3): 848–856 (in Chinese) [杜巧丽, 刘均霞, 陈美晴, 蒋君梅, 任明见, 李向阳, 姜于兰, 谢鑫, 2022. 高粱BR信号转录因子BZR1基因家族的鉴定及激素应答分析[J]. 植物保护学报, 49(3): 848–856]

Dünkler A, Walther A, Specht CA, Wendland J, 2005. *Candida albicans CHT3* encodes the functional homolog of the Cts1 chitinase of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Fungal Genetics and Biology, 42(11): 935–947

Egan MJ, Wang ZY, Jones MA, Smirnoff N, Talbot NJ, 2007. Generation of reactive oxygen species by fungal NADPH oxidases is required for rice blast disease[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(28): 11772–11777

Elert E, 2014. Rice by the numbers: a good grain[J]. Nature, 514(7524): S50–S51

Free SJ, 2013. Fungal cell wall organization and biosynthesis[M]// Friedmann T, Dunlap JC, Goodwin SF. Advances in genetics, volume 81. Amsterdam: Elsevier, pp. 33–82

Kim D, Paggi JM, Park C, Bennett C, Salzberg SL, 2019. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype[J]. Nature Biotechnology, 37(8): 907–915

Le B, Yang SH, 2019. Microbial chitinases: properties, current state and biotechnological applications[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 35(9): 144

Liao Y, Smyth GK, Shi W, 2014. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features[J]. Bioinformatics, 30(7): 923–930

Liu JL, Wang XJ, Mitchell T, Hu YJ, Liu XL, Dai LY, Wang GL, 2010. Recent progress and understanding of the molecular mechanisms of the rice-*Magnaporthe oryzae* interaction[J]. Molecular Plant Pathology, 11(3): 419–427

Love MI, Huber W, Anders S, 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. Genome Biology, 15(12): 550

Nalley L, Tsiboe F, Durand-Morat A, Shew A, Thoma G, 2016. Economic and environmental impact of rice blast pathogen (*Magnaporthe oryzae*) alleviation in the United States[J]. PLoS ONE, 11(12): e0167295

Nie YF, Leng MQ, Li GJ, Li JL, Li HP, Li YF, 2021. Functional analysis of dipeptidyl-peptidase V gene *DppV* in rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. Journal of Plant Protection, 48(4): 712–722 (in Chinese) [聂燕芳, 冷梅钦, 李冠军, 李洁玲, 李华平, 李云锋, 2021. 稻瘟菌二肽基肽酶Ⅴ基因*DppV*的功能分析[J]. 植物保护学报, 48(4): 712–722]

Ning N, Yang N, Chen Q, 2024. Advance in the research on protein ubiquitination modification in the interactionbetween rice and blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. Journal of Plant Protection, 51(4): 752–763 (in Chinese) [宁柠, 杨南, 陈倩, 2024. 泛素化修饰在水稻与稻瘟病菌互作中的研究进展[J]. 植物保护学报, 51(4): 752–763]

Nguyen QB, Kadotani N, Kasahara S, Tosa Y, Mayama S, Nakayashiki H, 2008. Systematic functional analysis of calcium-signalling proteins in the genome of the rice-blast fungus, *Magnaporthe oryzae*, using a high-throughput RNA-silencing system[J]. Molecular Microbiology, 68(6): 1348–1365

Preechasuth K, Anderson JC, Peck SC, Brown AJP, Gow NAR, Lenardon MD, 2015. Cell wall protection by the *Candida albicans* class I chitin synthases[J]. Fungal Genetics and Biology, 82: 264–276

Rafiei V, Vélëz H, Tzelepis G, 2021. The role of glycoside hydrolases in phytopathogenic fungi and oomycetes virulence[J]. International Journal of Molecular Sciences, 22(17): 9359

Sesma A, Osbourn AE, 2004. The rice leaf blast pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi[J]. Nature, 431(7008): 582–586

Skamnioti P, Gurr SJ, 2009. Against the grain: safeguarding rice from rice blast disease[J]. Trends in Biotechnology, 27(3): 141–150

Takabayashi N, Tosa Y, Oh HS, Mayama S, 2002. A gene-for-gene relationship underlying the species-specific parasitism of *Avena*/*Triticum* isolates of *Magnaporthe grisea* on wheat cultivars[J]. Phytopathology, 92(11): 1182–1188

Yamazaki H, Yamazaki D, Takaya N, Takagi M, Ohta A, Horiuchi H, 2007. A chitinase gene, *chiB*, involved in the autolytic process of *Aspergillus nidulans*[J]. Current Genetics, 51(2): 89–98

（责任编辑：李美娟）