

高永煌, 俞咪娜, 于俊杰, 等. 稻曲病病菌植物细胞壁降解酶活性测定及其与致病力的相关性分析[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(8):1490-1498.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2025.08.005

稻曲病病菌植物细胞壁降解酶活性测定及其与致病力的相关性分析

高永煌^{1,2}, 俞咪娜², 于俊杰², 曹慧娟², 宋天巧², 潘夏艳², 王淑琛², 王云鹏¹, 靳丛¹, 刘永锋²

(1.淮阴工学院, 江苏 淮安 223001; 2.江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 植物细胞壁降解酶(PCWDE)是病原菌的重要致病因子。为了明确植物细胞壁降解酶在稻曲病病菌侵染水稻过程中的作用,首先基于碳水化合物活性酶数据库(CAZy)成功鉴定了47个植物细胞壁降解酶编码基因。比较基因组学的分析结果表明,稻曲病病菌的植物细胞壁降解酶数量与其他活体营养型病原菌相似,显著少于半活体营养型病原菌、腐生型病原菌。转录组动态分析结果显示,稻曲病病菌中UV8b_01537、UV8b_03436和UV8b_04918等3个关键基因的相对表达量在接种水稻48 h后显著上调,其编码蛋白质分别参与纤维素、半纤维素和淀粉的降解。用对硝基苯酚显色底物检测2个具有强致病性菌株的酶活性发现,PS培养液、水稻叶组织培养液、穗组织培养液均能诱导病菌分别产生降解淀粉、纤维素、半纤维素的 α -葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶和 β -木聚糖酶; α -葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶和 β -木聚糖酶的总酶活性随着培养时间的增加呈动态变化,且在28℃恒温摇床上于180 r/min振荡培养的第4 d出现峰值,与致病力呈负相关;用水稻穗组织培养液诱导的Nj7菌株的3种酶(α -葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶和 β -木聚糖酶)的总活性显著低于用水稻叶组织培养液诱导的3种酶的总活性。本研究共鉴定出3个在侵染早期显著上调表达的植物细胞壁降解酶编码基因,为稻曲病病菌致病基因的克隆提供了关键候选基因。由结果还可以看出,稻曲病病菌可通过差异表达PCWDE基因及动态调节酶活性以适应水稻的组织特异性微环境。本研究结果可为深入解析稻曲病病菌特异性侵染水稻穗部的环境信号感知机制提供参考。

关键词: 稻曲病; 植物细胞壁降解酶; 酶活性; 水稻组织

中图分类号: S432.4⁺4 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2025)08-1490-09

Determination of plant cell wall-degrading enzyme activity in *Ustilagoidea virens* and analysis of its correlation with pathogenicity

GAO Yonghuang^{1,2}, YU Mina², YU Junjie², CAO Huijuan², SONG Tianqiao², PAN Xiayan², WANG Shuchen², WANG Yunpeng¹, JIN Cong¹, LIU Yongfeng²

(1. Huaiyin Institute of Technology, Huai'an 223001, China; 2. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

收稿日期: 2024-10-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(32272512); 海南省种业实验室项目(B23YQ1514/B23CQ15EP)

作者简介: 高永煌(1999-), 男, 四川茂县人, 硕士研究生, 主要从事水稻稻曲病致病机制的研究。(E-mail) 1059435886@qq.com

通讯作者: 刘永锋, (E-mail) liuyf@jaas.ac.cn

Abstract: Rice false smut, caused by *Ustilagoidea virens*, severely impacts rice yield and grain quality, posing a significant threat to food security. Plant cell wall-degrading enzymes (PCWDEs) are critical virulence factors for pathogens. To elucidate the role of PCWDEs in the infection of rice by *U. virens*, this study systematically identified 47 PCWDE-encoding genes based on the carbohydrate-active enzymes da-

tabase (CAZy). Comparative genomic analysis revealed that the number of *PCWDEs* in *U. virens* was similar to that of biotrophic pathogens, but significantly lower than that of hemibiotrophic and saprophytic pathogens. Dynamic transcriptomic profiling showed that the relative expression levels of three key genes such as *UV8b_01537*, *UV8b_03436*, and *UV8b_04918* were significantly up-regulated at 48 hours post-inoculation on rice. Their encoded proteins involved in the degradation of cellulose, hemicellulose, and starch, respectively. Enzymatic activity assays using p-nitrophenol chromogenic substrates indicated that PS culture medium, rice leaf tissue, and panicle tissue culture solutions induced the production of α -glucosidase, β -glucosidase, and β -xylanase in two highly virulent strains. These enzymes degrade starch, cellulose, and hemicellulose, respectively. Total enzyme activities exhibited dynamic changes over time, peaking on the fourth day of culture under shaking conditions at 28 °C and 180 r/min, and showing a negative correlation with pathogenicity. Notably, panicle tissue culture solutions induced significantly lower total enzyme activities compared to leaf tissue solutions. This study identified three *PCWDE*-encoding genes that were significantly upregulated during the early stages of infection, providing critical candidates for functional gene cloning. The findings also demonstrate that *U. virens* adapts to host tissue-specific microenvironments by differentially expressing *PCWDE* genes and dynamically regulating enzyme activities. These results offer insights into the environmental signaling mechanisms underlying the pathogen's specific infection of rice panicles and lay a foundation for further research.

Key words: rice false smut; plant cell wall-degrading enzymes; enzyme activity; rice tissues

水稻稻曲病(Rice false smut disease)是由子囊菌亚门稻曲病菌[*Ustilaginoidea virens* (Cook.) Tak.] 侵染水稻穗部后引起的水稻主要真菌病害之一, 严重威胁着中国粮食生产安全^[1]。稻曲病的发生可导致水稻空秕率升高, 千粒重下降, 从而造成减产。2008–2016年, 中国稻曲病的年均发病面积为 3.06×10^6 hm², 年均防控面积为 6.92×10^6 hm², 造成水稻年产量损失达 1.586×10^8 kg^[2]。同时, 稻曲病菌还会产生多种影响植物生长的毒素, 进而影响稻米品质, 甚至危害人畜健康^[3-4]。解析稻曲病菌的致病机制可为病害防控提供关键分子靶点与理论依据, 从而指导研究者开发靶向杀菌剂或进行抗病育种研究。

病原真菌分泌的植物细胞壁降解酶(*PCWDE*) 在侵染寄主植物的过程中具有重要作用。李宝聚等^[5]在研究黄瓜黑星病菌(*Cladosporium cucumerinum*)时发现, 果胶酶、纤维素酶等植物细胞壁降解酶在病菌与宿主之间发生相互作用的过程中起到重要作用。王鹏程等^[6]发现, 枣黑斑病菌(*Isariopsis imdica*)细胞壁降解酶 β -葡萄糖苷酶在其致病过程中起到关键作用。在离体、活体条件下, 干根腐病菌巴豆丝核菌(*Rhizoctonia bataticola*)的果胶酶活性均与病原菌的毒力相关^[7]。*PCWDE*能够有效分解寄主细胞壁中的果胶、纤维素和木聚糖等组分, 使细胞壁的完整性受损, 不仅可为病原菌侵染过程提供营养, 也更利于病原菌侵入植物细胞。康振生等^[8]研究发现, 禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)在侵染小麦穗组织时能够分泌果胶酶, 导致宿主细胞壁

松弛, 从而促进病原菌的侵染。

稻曲病菌是一种活体营养型病原菌, 具有独特的侵染过程, 其菌丝侵染水稻花器后仅在细胞间隙延伸。目前, 国内外研究者对稻曲病菌致病相关基因功能的研究, 涉及效应因子与水稻靶蛋白识别、免疫信号通路调控网络等多个层面, 加深了人们对稻曲病菌致病机制的认识^[9-11]。在与细胞壁降解酶相关的研究方面, 通过基因组数据分析发现, 与腐生、半活体营养型病原菌相比, 稻曲病菌编码的*PCWDE*基因数量较少, 这一现象与其他活体营养型寄生病原菌相似, 推测稻曲病菌可通过降低植物细胞壁降解酶的产生量, 减少酶对寄主细胞壁的降解作用, 从而降低由宿主细胞壁碎片引起的免疫反应, 使病菌适应水稻体内的活体营养方式^[2, 12]。然而, 目前对稻曲病菌*PCWDE*的具体数量、功能及其在侵染致病过程中的作用还知之甚少。本研究拟利用基因组数据、CAZy数据库(<http://bcb.unl.edu/dbCAN2/>)预测稻曲病菌中的植物细胞壁降解酶基因, 再结合转录组分析、酶活性检测等方法, 探究稻曲病菌中植物细胞壁降解酶基因的基因组成及酶活性, 为阐明稻曲病菌侵染机制与致病机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株与水稻材料

供试菌株: 笔者从江苏省不同水稻种植区采集稻曲病菌粒菌球, 并用组织分离法从病粒中分离稻

曲病菌,经单孢纯化、PCR 验证,获得 52 个稻曲病菌菌株,于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。在使用前,取少量保存的菌液涂布于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基上进行活化,病菌于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光培养。于 2021 年、2022 年在江苏省农业科学院植物保护研究所试验地对水稻感病品种两优培九进行人工注射接种,鉴定不同菌株的致病力。本研究以筛选到的与本实验室保存的强致病力菌株 P1 致病力相当的 2 个菌株 Nj7、Nj17(表 1)为研究对象,进行稻曲病菌的植物细胞壁降解酶相关信息分析。

供试水稻品种为两优培九,为稻曲病菌的感病品种。于 2021 年、2022 年每年接种 3 次,每次接种 10 穗两优培九,于接种 21 d 后统计每穗病粒数,平均每穗病粒数=各次接种得到的每穗病粒数的平均值 \pm 标准误。用单因素方差分析(One-way ANOVA)方法检验穗病粒数的差异。

表 1 供试稻曲病菌菌株及其每穗病粒数

Table 1 Strains and their number of false smut balls per panicle

菌株	2021 年和 2022 年平均每穗病粒数(粒)
Nj7	35.25 \pm 19.37a
Nj17	31.75 \pm 16.18a
P1	27.63 \pm 10.24a

同列数据后标有相同小写字母表示不同菌株形成的每穗病粒数间不存在显著差异($P>0.05$)。

1.2 供试培养基

马铃薯蔗糖(PS)培养液配方:200 g 马铃薯,20 g 蔗糖,加水定容到 1 L,于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min。马铃薯蔗糖固体(PSA)培养基配方:200 g 马铃薯,20 g 蔗糖,15 g 琼脂,加水定容到 1 L,于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min。水稻叶片组织培养液的配制:取 20 g 水稻叶片组织,用匀浆机破碎后,加 PS 培养液定容到 1 L,于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min,取上清液进行摇菌培养。水稻稻穗组织培养液的配制:取 20 g 水稻孕穗期稻穗组织,用匀浆机破碎后,加 PS 培养液定容到 1 L,于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min,取上清液进行摇菌培养。

1.3 主要试剂

对硝基苯酚(pNP)、对硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷、对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷和对硝基苯基- β -D-木糖苷均购自上海麦克林生化科技有限公司;1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)缓冲液($\text{pH}=7.5$)购自北京索莱宝科技有限公司; Na_2CO_3 购自国药集团化学试剂有限公司。

1.4 植物细胞壁降解酶类的注释

根据 Zhang 等^[12]对稻曲病菌 Uv8b 菌株基因组中植物细胞壁降解酶编码基因的分析结果,结合 CAZy 数据库(<http://bcbl.unl.edu/dbCAN2/>,访问时间为 2024 年 8 月 25 日)中稻曲病菌基因组碳水化合物活性酶基因的预测结果,推测稻曲病菌中的 PCWDE 及其底物。根据 CAZy 数据库的预测结果,分析 3 种不同营养型病原菌(每种营养型各选 3 种病原菌)的植物细胞壁降解酶数量和分布。

1.5 酶活性的测定

1.5.1 Nj7、Nj17 菌株的培养 在活化菌落外围打 2 个菌碟(直径 7 mm),将菌碟转接至 50 mL PS 培养液中,于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养,并在培养的第 3 d、4 d、5 d、6 d、7 d、8 d 分别取培养液,进行酶活性测定。在活化的菌落外围打 2 个菌碟(直径 7 mm),将菌碟转接至 50 mL 水稻稻叶或穗组织培养液中,于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 4 d,取培养液进行酶活性的测定。

1.5.2 酶液的提取 取培养获得的培养菌液 1 mL,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 2 min,所得上清液即为粗酶液。

1.5.3 酶活性的检测 使用连接有对硝基苯酚的底物进行酶活性的测定^[13]。首先分别制备 0 nmol/mL、5 nmol/mL、10 nmol/mL、25 nmol/mL、50 nmol/mL、80 nmol/mL、100 nmol/mL、250 nmol/mL 对硝基苯酚溶液,在 405 nm 波长处测定对硝基苯酚溶液的吸光度,绘制标准曲线(以标准品的数值为横坐标,测定数值为纵坐标)。然后在 96 孔板中加入总体积为 100 μL 的标定缓冲液[包含 50 μL Tris-HCl 缓冲液($\text{pH}=7.5$)、10 μL 连有对硝基苯酚的底物(100 mmol/L)、20 μL 超纯水、20 μL 菌液上清液]。在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 3 h 后,加入浓度为 0.25 mol/L 的 100 μL Na_2CO_3 溶液终止反应,用分光光度计测定 405 nm 处反应液的吸光度,根据标准曲线计算样品中的对硝基苯酚吸收值。

本试验采用连接有对硝基苯酚的底物进行酶活性的检测,其中用对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷测定 α -葡萄糖苷酶活性(以 pNP 释放量计,下同),用对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷测定 β -葡萄糖苷酶活性(以 pNP 释放量计,下同),用对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷测定 β -木聚糖酶活性(以 pNP 释放量计,下同)。试验设 4 次重复。

1.6 致病力的测定

参考李燕等^[14]的方法进行接种, 在接种后第 21 d 调查穗病粒数, 每个菌株、每次接种调查 10 穗。参考稻曲病抗性鉴定相关农业行业标准《稻曲病抗性鉴定技术规程》(NYT 3625—2020), 统计分析稻曲病发生的严重度。

病情指数的计算方法: 病情指数 = Σ (各级病穗数 × 相应级数) / (调查总穗数 × 最大病级数) × 100。

2 结果与分析

2.1 稻曲病病菌中植物细胞壁降解酶的分析

通过基因组数据及 CAZy 网站预测, 分析不同营养型病菌的 CAZymes 基因。由表 2 可知, 稻曲病病菌共包含 252 个 CAZymes 基因, 其中有 47 个 PCWDE 编码基因^[15]。纤维素降解酶类主要包括糖基水解酶、碳水化合物结合模块家族等 2 个亚家族 (GH5、GH6、

GH7、GH9、GH12、GH45、GH61、GH74、CBM1), 在稻曲病病菌中共发现 7 个编码基因; 木聚糖降解酶类主要包括糖基水解酶、碳水酯酶等 2 个亚家族 (GH10、GH11、GH27、GH29、GH31、GH36、GH39、GH43、GH51、GH53、GH54、GH62、GH67、GH115、CE1), 在稻曲病病菌中共发现 12 个编码基因; 果胶降解酶类主要包括糖基水解酶、碳水酯酶、果胶裂解酶等 3 个亚家族 (GH28、GH35、GH43、GH51、GH53、GH54、GH78、GH88、GH93、GH105、PL1、PL3、PL4、PL11、PL9、CE1、CE8、CE12、CE13), 在稻曲病病菌中共发现 9 个编码基因; 其他植物细胞壁降解酶 (GH1、GH3、GH131、GH32、CE5、GH2、CBM43、CBM52、CBM42、CBM38) 在稻曲病病菌中共发现 19 个编码基因^[12, 15-16]。综上所述, 稻曲病病菌与其他活体营养型病原菌的植物细胞壁降解酶编码基因数量相近, 但明显少于半活体营养型、腐生营养型病原菌。

表 2 稻曲病病菌和其他病原真菌菌株中降解植物组分的植物细胞壁降解酶的数量与占比分析

Table 2 The number and composition of plant cell wall-degrading enzymes (PCWDEs) in *Ustilagoideae virens* and other pathogenic fungi strains

营养方式	病原菌	CAZymes 基因数量 (个)	植物细胞壁降解酶数量(个)					植物细胞 壁降解酶 占比(%)
			纤维素 降解酶类	木聚糖 降解酶类	果胶降 解酶类	其他	总和	
活体营养型	稻曲病病菌-8b(<i>Ustilagoideae virens</i> , Uv-8b)	252	7	12	9	19	47	18.65
	玉米黑粉菌 521(<i>Ustilago maydis</i> 521)	223	17	16	12	10	55	24.66
	丝孢堆黑粉菌 SRZ2(<i>Sporisorium reilianum</i> SRZ2)	214	16	18	14	11	59	27.57
半活体营养型	稻瘟病菌 70-15(<i>Magnaporthe oryzae</i> 70-15)	536	50	64	45	60	219	40.86
	禾谷镰孢菌 PH-1(<i>Fusarium graminearum</i> PH-1)	513	24	55	76	55	210	40.94
	禾谷炭疽菌 M1.001(<i>Colletotrichum graminicola</i> M1.001)	595	54	65	73	51	243	40.84
腐生营养型	灰霉菌 T4(<i>Botrytis cinerea</i> T4)	429	43	31	63	36	173	40.33
	大丽轮枝菌 Ls.17(<i>Verticillium dahlia</i> , VdLs.17)	555	60	59	113	49	281	50.63
	核盘菌 V1.0(<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> V1.0)	437	44	28	50	24	146	33.41

2.2 稻曲病病菌侵染早期的植物细胞壁降解酶分析

根据稻曲病病菌注射接种水稻前、注射接种 48 h 后的水稻转录组数据, 并用数据分析工具 DESeq2 对数据进行基因差异表达分析, $|\log_2 FC| \geq 1$ (FC 为差异倍数), 调整后的 P 值 < 0.05 。水稻接种稻曲病病菌后, 病菌中参与纤维素降解的内切葡聚糖酶 B 基因(编号: *UV8b_01537*)、参与半纤维素降解的糖基水解酶基因(编号: *UV8b_03436*)及参与淀粉降解的葡萄糖淀粉酶基因(编号: *UV8b_04918*)等 3 个关键 PCWDE 基因均上调表达(表 3), 表明这 3 个基因在稻曲病病菌侵染水稻的过程中发挥了重要作

用, 稻曲病病菌对纤维素、半纤维素和淀粉的降解可能与其侵染活动相关。

表 3 稻曲病病菌在接种后 48 h 上调表达的植物细胞壁降解酶编码基因

Table 3 Upregulated plant cell wall-degrading enzymes (PCWDEs)-encoding genes in *Ustilagoideae virens* at 48 hours post-inoculation

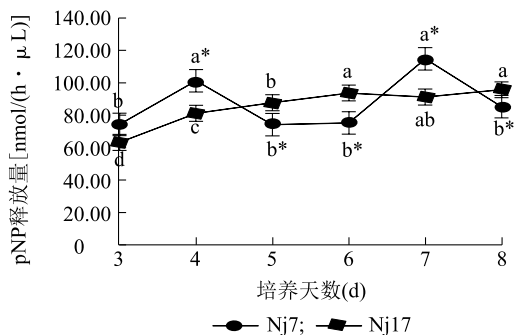
基因编号	基因功能注释	底物	相对表达量 上调倍数(倍)
<i>UV8b_01537</i>	内切葡聚糖酶 B	纤维素	1.22
<i>UV8b_03436</i>	糖基水解酶 <i>GH62</i>	半纤维素	3.58
<i>UV8b_04918</i>	葡萄糖淀粉酶 <i>GMY2</i>	淀粉	2.42

2.3 稻曲病病菌进行 PS 培养后 3 种植物细胞壁降解酶的变化

进一步用连接有对硝基苯酚的显色底物进行酶活性的测定,分析在离体培养阶段稻曲病病菌降解淀粉相关的 α -葡萄糖苷酶、降解纤维素相关的 β -葡萄糖苷酶及降解半纤维素相关的 β -木聚糖酶的活性^[13]。由于从 PS 摇瓶培养的第 3 d 开始,在菌碟边缘即可明显看到菌丝产生,培养液中也可见少量菌丝和分生孢子,因此本研究从摇瓶培养第 3 d 开始测量培养液中稻曲病病菌产生的 3 种酶活性。

2.3.1 α -葡萄糖苷酶活性的变化 从图 1 可以看出,将 2 种稻曲病病菌在 PS 培养液中进行摇瓶培养后,均能检测到培养液中 pNP 的释放,表明 2 个菌株均能产生 α -葡萄糖苷酶,但酶活性存在差异,并且随着培养时间增加,酶活性呈现不同的变化趋势。

用 PS 培养液摇瓶培养菌株 3 d、4 d、5 d、6 d、7 d、8 d 后,分别测量每个菌株的 α -葡萄糖苷酶 pNP 释放量,用 One-way ANOVA 方法检验 pNP 释放量的差异。由图 1 可以看出,菌株 Nj7 的 α -葡萄糖苷酶 pNP 的释放量在摇瓶培养第 4 d、第 7 d 出现峰值,分别为 (101.20 ± 3.54) nmol/(h· μ L)、 (114.70 ± 9.90) nmol/(h· μ L),且 2 个值之间没有显著差异。菌株 Nj17 的 α -葡萄糖苷酶 pNP 的释放量在摇瓶培养 3~6 d 逐渐增加,6~8 d 逐渐保持稳定。



对于同一菌株,不同培养时间对应的线条上标有不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$); * 表示同一培养时间的不同菌株间差异显著($P < 0.05$)。

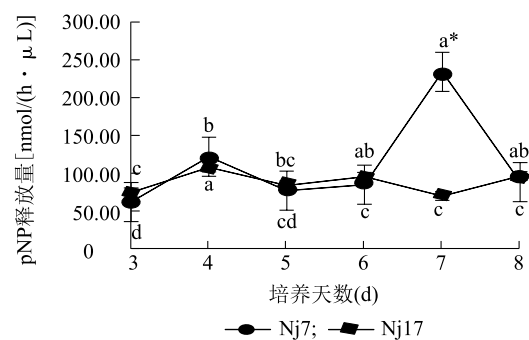
图 1 2 种稻曲病病菌培养液中 α -葡萄糖苷酶的对硝基苯酚(pNP)释放量

Fig.1 Amount of p-nitrophenol (pNP) released by α -glucosidase in two *Ustilagoideae* culture media

2.3.2 β -葡萄糖苷酶活性的变化 由图 2 可以看出,将 2 种稻曲病病菌在 PS 培养液中进行摇瓶培养后,2

个稻曲病病菌培养液中均能检测到 pNP 的释放,表明 2 种菌株均能产生 β -葡萄糖苷酶,但酶活性的变化趋势存在差异。

将 2 个菌株用 PS 培养液摇瓶培养 3 d、4 d、5 d、6 d、7 d、8 d 后,分别测量每种菌株的 β -葡萄糖苷酶 pNP 释放量,用 One-way ANOVA 方法检验 pNP 释放量的差异。由图 2 可见,菌株 Nj7 的 β -葡萄糖苷酶的 pNP 释放量在摇瓶培养第 7 d 出现峰值,为 (233.20 ± 0.71) nmol/(h· μ L);菌株 Nj17 的 β -葡萄糖苷酶的 pNP 释放量在摇瓶培养第 4 d 达到最大值,为 (107.70 ± 5.67) nmol/(h· μ L),之后保持稳定。



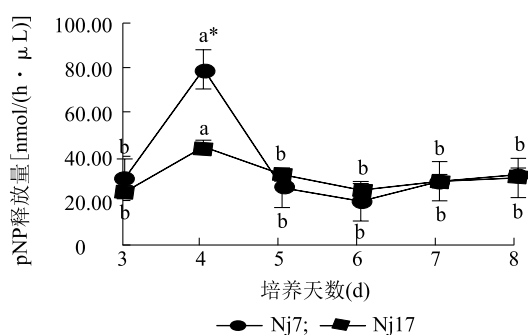
对于同一菌株,不同培养时间对应的线条上标有不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$); * 表示同一培养时间的不同菌株间差异显著($P < 0.05$)。

图 2 2 种稻曲病病菌培养液中 β -葡萄糖苷酶的对硝基苯酚(pNP)释放量

Fig.2 Amount of p-nitrophenol (pNP) released by β -glucosidase in two *Ustilagoideae* culture media

2.3.3 β -木聚糖酶活性的变化 由图 3 可以看出,将 2 种稻曲病病菌在 PS 培养液中进行摇瓶培养后,均在摇瓶培养第 4 d 出现 β -木聚糖酶活性的峰值,其中菌株 Nj7 的酶活性波动幅度较大,在摇瓶培养第 4 d 达到 (79.20 ± 0.71) nmol/(h· μ L),约为菌株 Nj17 酶活性 $[(44.20 \pm 4.95)$ nmol/(h· μ L)]的 2 倍。而在摇瓶培养第 5 d,菌株 Nj7 的酶活性显著下降至与 Nj17 接近的水平。

综上所述,2 个菌株在 PS 摇瓶培养中均可产生 α -葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶及 β -木聚糖酶,且 3 种酶活性随着培养时间的增加而发生改变,不同菌株的酶活性变化趋势不同。其中, α -葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶的活性要高于 β -木聚糖酶的活性。从 3 种酶的总酶活性看,Nj7 的峰值出现在第 4 d $[302.15$ nmol/(h· μ L)]和第 7 d $[376.71$ nmol/(h· μ L)];Nj17 的酶活性峰值



对于同一菌株,不同培养时间对应的线条上标有不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$); *表示同一培养时间的不同菌株间差异显著($P < 0.05$)。

图3 2种稻曲病菌培养液中 β -木聚糖酶的对硝基苯酚(pNP)释放量

Fig.3 Amount of p-nitrophenol (pNP) released by β -xylanase in two *Ustilago virens* culture media

出现在第4 d [233.22 nmol/(h · μ L)],且在第5~8 d一直维持在较高水平[201.74~224.17 nmol/(h · μ L)]。

2.4 水稻组织对稻曲病菌3种酶活性的影响

稻曲病菌侵染水稻具有明显的组织特异性,主要侵染孕穗期水稻小花的花丝。为了从植物细胞壁降解酶角度分析水稻不同组织对稻曲病菌侵染的响应情况,本研究比较了含有不同水稻组织的培养液对稻曲病菌产生的3种酶活性的影响,将稻曲病菌接种至含有水稻叶片或稻穗组织的PS培养液中。由于在PS培养液中,2个菌株的酶活性在摇瓶培养第4 d出现峰值,因此本研究主要检测稻曲病菌在水稻组织培养液中摇瓶培养4 d后的3种酶活性。

图4A显示,相对于PS培养液,2个菌株的 α -葡萄糖苷酶活性在叶组织培养液、穗组织培养液中均显著下降,但2个菌株的 α -葡萄糖苷酶活性在穗组织培养液中没有显著差异。图4B显示,菌株Nj7在叶组织培养液、穗组织培养液中的 β -葡萄糖苷酶活性与PS培养液中的 β -葡萄糖苷酶活性相比差异不显著。图4C显示,与PS培养液中的 β -木聚糖酶活性相比,菌株Nj7在叶组织培养液中的 β -木聚糖酶活性显著增加,而在穗组织培养液中的 β -木聚糖酶活性显著降低;与PS培养液中的 β -木聚糖酶活性相比,菌株Nj17的 β -木聚糖酶活性在叶组织培养液、穗组织培养液中均显著下降。

分析3种酶的总酶活性可知,菌株Nj7在穗组织培养液中的总酶活性[180.10 nmol/(h · μ L)]低

于PS [302.13 nmol/(h · μ L)]和叶组织培养液 [277.60 nmol/(h · μ L)],菌株Nj17在穗组织培养液中的总酶活性[169.60 nmol/(h · μ L)]高于叶组织培养液 [158.60 nmol/(h · μ L)],低于PS培养液 [233.12 nmol/(h · μ L)]。

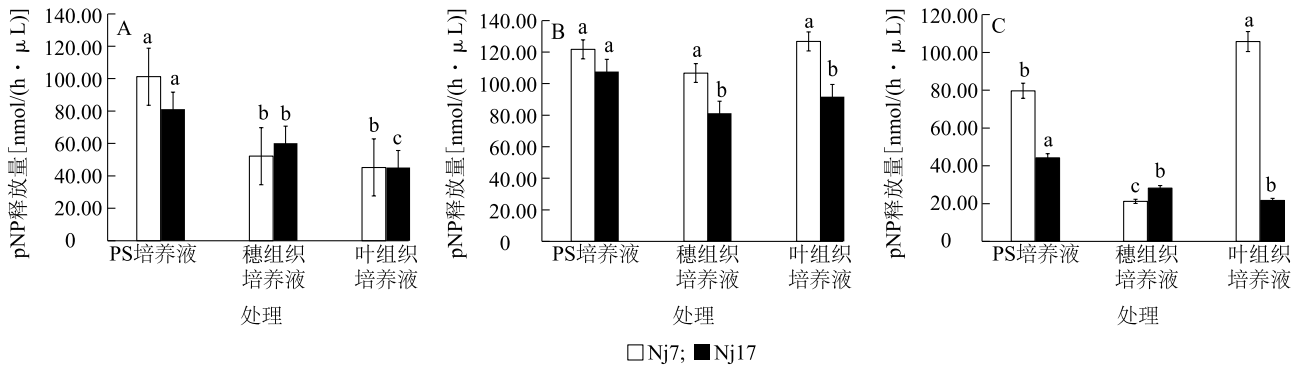
2.5 不同培养条件下稻曲病菌的致病力分析

分别用不同培养时间和不同培养液培养的Nj7、Nj17接种水稻感病品种两优培九,分析不同培养条件对稻曲病菌致病力的影响。结果(图5)显示,Nj7用PS培养液摇瓶培养3~6 d后,致病力没有显著变化,但是摇瓶培养7 d后,致病力较摇瓶培养3 d时显著下降(图5A),对Nj7的致病力有显著影响(图5C);Nj17用PS培养液摇瓶培养5~7 d后接种,致病力较强(图5B),并且穗组织培养液可以显著增加Nj17的致病力(图5C)。

3 讨论

植物病原菌产生的植物细胞壁降解酶,对于病菌打破寄主细胞壁物理屏障、成功在寄主体内定殖和扩增具有重要作用。本研究基于CAZy数据库,系统分析了稻曲病菌PCWDE基因编码的酶种类及数量,发现稻曲病菌的PCWDE基因数量与活体营养型病原菌如玉米黑粉菌(*Ustilago maydis*)、丝孢堆黑粉菌(*Sporisorium reilianum*)相近(约占病菌总CAZymes的25.00%),但显著少于半活体营养型病原菌如稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)(占病菌总CAZymes的40.00%左右)。这一现象可能与病原菌的营养策略密切相关,即活体营养型病原菌如稻曲病菌需要在侵染过程中维持宿主细胞的存活以持续获取营养,因此其植物细胞壁降解酶的分泌通常受到严格调控,从而避免过度破坏宿主组织,这也解释了稻曲病菌感染细胞排列松散的水稻雄蕊花丝,在感染后仅在细胞间隙扩增的特点,并符合稻曲病菌通过减少植物细胞壁降解酶分泌量以避免被寄主识别的侵染特性^[2]。

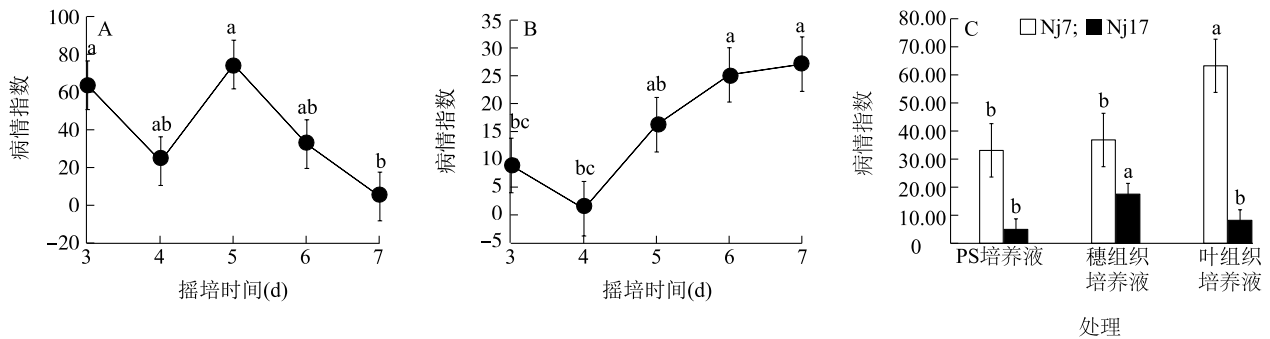
转录组动态分析发现,编号为UV8b_01537(内切葡聚糖酶B基因)、UV8b_03436(糖基水解酶GH62基因)和UV8b_04918(葡萄糖淀粉酶GMY2基因)的相对表达量在病菌接种水稻48 h后显著上调。结合稻曲病菌在接种36 h后启动花丝基部侵染的时空特征,推测上述基因的激活时间窗口与病原菌在宿主组织间隙延伸的关键阶段高度重叠,提示这些基因有助于病菌通过降解植物细胞间隙和



PS: 马铃薯蔗糖。同一菌株的不同处理间标有不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 4 2 个稻曲病菌菌株在不同培养液中摇瓶培养 4 d 后 α -葡萄糖苷酶的对硝基苯酚 (pNP) 释放量 (A)、 β -葡萄糖苷酶的 pNP 释放量 (B)、 β -木聚糖酶的 pNP 释放量 (C)

Fig.4 Amount of p-nitrophenol (pNP) released by α -glucosidase (A), β -glucosidase (B), and β -xylanase (C) from two *Ustilagoidea vires* strains after four days of shaken flask cultivation in different culture media



A: 水稻感染稻曲病病情指数(用 PS 培养液摇瓶培养菌株 Nj7 不同时间后接种水稻); B: 水稻稻曲病发生的病情指数(用 PS 培养液摇瓶培养菌株 Nj17 不同时间后接种水稻); C: 水稻稻曲病发生的病情指数(用 PS 培养液、穗组织培养液、叶组织培养液摇瓶培养 Nj7、Nj17 菌株 4 d 后接种水稻)。对于图 A、图 B 而言,不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$); 对于图 C 而言,同一菌株的不同处理间标有不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 5 不同培养条件对稻曲病病菌致病力的影响

Fig.5 Influence of different culture conditions on the pathogenicity of *Ustilagoidea vires*

细胞壁多糖组分,在侵染早期建立致病优势,明确这 3 个基因的功能可为理解病原菌的致病机制、开发新型抗病技术提供理论依据。

通过前期致病力鉴定,筛选到 2 株具有强致病力的菌株,本研究通过连有对硝基苯酚显色底物的酶促反应检测这些菌株的 α -葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶和 β -木聚糖酶的活性,发现 2 株菌株在用 PS 培养液培养的过程中均能产生上述 3 种酶,且 α -葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶的酶活性[最高值分别为 (114.74 ± 9.90) nmol/(h· μ L) 和 (233.27 ± 0.71) nmol/(h· μ L)]整体高于 β -木聚糖酶[(79.24 ± 0.79) nmol/(h· μ L)],提示病菌优先利用纤维素、淀粉衍生物作为主要碳源,以满足侵染需求。在本研究中,

试供菌株摇瓶培养产生的酶活性峰值在 2 个菌株之间存在差异。Nj17 的 α -葡萄糖苷酶活性在摇瓶培养第 5~7 d 达到峰值,Nj7 的 α -葡萄糖苷酶活性在摇瓶培养第 4 d、第 7 d 出现 2 个峰值;Nj7、Nj17 的 β -葡萄糖苷酶活性分别在摇瓶培养第 7 d 和第 4 d 达到峰值;2 个菌株的 β -木聚糖酶活性最高值均出现在摇瓶培养第 4 d。上述结果显示,稻曲病病菌在培养液中动态调控植物细胞壁多糖降解酶的分泌时序与活性。

植物细胞壁降解酶在病原菌侵染植物寄主的过程中起着重要作用。柴莹等^[17-18]发现,黑龙江省马铃薯干腐病病菌产生的 β -葡萄糖苷酶、果胶酶活性与病原菌的致病力呈正相关,层生镰刀菌分泌的纤维素酶

活性与定殖能力呈正相关。在本研究中,我们通过分析同一菌株的3种酶活性与致病力的关系发现,Nj7菌株的3种酶的总酶活性分别在摇瓶培养第4 d、第7 d出现峰值,Nj17菌株的相应峰值分别出现在摇瓶培养第4 d、第8 d,而Nj7的致病力与酶活性表现的趋势相反,即在摇瓶培养第4 d、第7 d较低,尤其是摇瓶培养第7 d的致病力,较摇瓶培养第3 d、第5 d显著下降;Nj17的致病力在摇瓶培养第4 d最低。出现上述现象,可能由于作为死体营养型病原菌,植物细胞壁降解酶活性强,从而促进寄主细胞死亡,使病原体能够直接利用寄主细胞裂解产物,完成快速增殖,不依赖于寄主细胞的存活状态。而稻曲病病菌作为活体营养型病原菌,与葡萄霜霉菌(*Plasmopara viticola*)相似,一方面依赖寄主活细胞维持其营养供给,细胞壁降解酶的活性高可能会诱导水稻产生防卫反应,从而抑制病菌的致病力,保持较低的酶活性有利于病原菌逃避寄主的免疫识别,从而建立长期稳定的共生界面,确保病原菌持续从寄主获取营养^[19]。另一方面,稻曲病病菌产生的酶可通过干扰水稻的病原物相关分子模式诱发的植物免疫反应(PTI)信号通路来增强致病力,类似于分泌蛋白UvCBP1^[20]。Zhang等^[12]通过基因组分析鉴定了多个候选效应蛋白,如分泌型蛋白酶和几丁质结合蛋白,这些蛋白质可能通过抑制宿主免疫反应从而促进侵染,而各致病因子间的协调作用及其在稻曲病病菌致病过程中的作用还有待深入研究。在本研究中,稻曲病病菌产生的酶是否具有类似于寄主受体蛋白互作、抑制寄主免疫反应以促进侵染的分子机制还有待进一步分析。

分析稻曲病病菌在不同水稻组织培养液中的总酶活性发现,Nj7菌株水稻穗组织培养液相比叶组织培养液具有更低的酶活性,因此推测稻曲病病菌在侵染过程中可能存在应对寄主不同组织微环境的碳源异质性,这可以从植物细胞壁降解酶的角度解释稻曲病病菌不能侵染水稻叶片而可以侵染穗部的现象。在其他病原菌中,类似的适应性机制也有报道。例如,稻瘟病病菌的效应蛋白BAS1在侵染水稻叶片时高表达,而在侵染穗部时显著下调表达,提示不同组织微环境调控效应蛋白的表达^[21]。此外,灰霉病病菌在番茄果实与叶片中差异分泌果胶裂解酶(PL)和纤维素酶(CEL),果实中的高PL活性与其软组织结构适配,而叶片中的CEL主导降解含有更多纤维素的细胞壁^[22]。今后应结合转录组与代谢组学,鉴定

穗部微环境中的关键诱导信号(如特定糖类或次生代谢物),并利用基因敲除菌株验证植物细胞壁降解酶动态调控与致病性的因果关系,以组织特异性酶系作为靶标,可为稻曲病病菌的防控提供新思路。

综上所述,本研究通过整合基因功能注释分析和酶活性检测分析,发现稻曲病病菌的PCWDE基因数量与其他活体营养型病原菌相近,但显著少于半活体营养型、腐生营养型病原菌,提示其致病机制具有进化适应性。此外,本研究鉴定出3个关键PCWDE基因,在侵染早期显著上调表达,暗示这3个基因在稻曲病病菌侵染寄主的过程中具有重要作用。通过离体培养发现,稻曲病病菌可产生 α -葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶和 β -木聚糖酶等3种酶,且总酶活性与致病力呈负相关;用水稻穗组织培养液诱导的Nj7菌株的3种酶的总活性显著低于用水稻叶组织培养液诱导的总酶活性,揭示稻曲病病菌可通过差异表达植物细胞壁降解酶基因及动态调节酶活性以适应水稻组织微环境的特异性和碳源异质性。本研究结果为解释稻曲病病菌侵染细胞排列松散的水稻雄蕊花丝,及其在侵染后仅在细胞间隙扩增的特点提供了理论依据,也为深入解析病菌特异性侵染水稻穗部的环境信号感知机制提供了研究线索。

参考文献:

- [1] 陈旭,邱结华,熊萌,等. 稻曲病研究进展[J]. 中国稻米, 2019, 25(5): 30.
- [2] SUN W X, FAN J, FANG A F, et al. *Ustilagoidea vires*: insights into an emerging rice pathogen[J]. Annual Review of Phytopathology, 2020, 58: 363-385.
- [3] LIN X Y, BIAN Y F, MOU R X, et al. Isolation, identification, and characterization of *Ustilagoidea vires* from rice false smut balls with high ustilotoxin production potential[J]. Journal of Basic Microbiology, 2018, 58(8): 670-678.
- [4] 谢子正,赵帅锋,许渭根,等. 籼粳杂交稻曲病病情分级标准研究[J]. 中国稻米, 2018, 24(1): 64-67.
- [5] 李宝聚,周长力,赵奎华,等. 黄瓜黑星病菌致病机理的研究 II 细胞壁降解酶及其在致病中的作用[J]. 植物病理学报, 2000, 30(1): 13-18.
- [6] 王鹏程,郝海婷,王兰,等. 枣黑斑病菌细胞壁降解酶活性测定及致病性分析[J]. 果树学报, 2019, 36(7): 903-910.
- [7] GAWADE D B, PERANE R R, SURYAWANSHI A P, et al. Extracellular enzymes activity determining the virulence of *Rhizoctonia bataticola*, causing root rot in soybean[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2017, 100: 49-56.
- [8] 康振生,黄丽丽,韩青梅,等. 禾谷镰刀菌侵染引致小麦穗组织

- 细胞壁成分变化的细胞化学研究[J]. 植物病理学报, 2007, 37(6): 623-628.
- [9] CAO H J, GONG H, YU M N, et al. The Ras GTPase-activating protein UvGap1 orchestrates conidiogenesis and pathogenesis in the rice false smut fungus *Ustilagoidea vires*[J]. Molecular Plant Pathology, 2024, 25(3): e13448.
- [10] SONG T Q, ZHANG Y, ZHANG Q, et al. The N-terminus of an *Ustilagoidea vires* Ser-Thr-rich glycosylphosphatidylinositol-anchored protein elicits plant immunity as a MAMP[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 2451.
- [11] YU M N, SONG T Q, YU J J, et al. UvVelC is important for conidiation and pathogenicity in the rice false smut pathogen *Ustilagoidea vires*[J]. Virulence, 2024, 15(1): 2301243.
- [12] ZHANG Y, ZHANG K, FANG A F, et al. Specific adaptation of *Ustilagoidea vires* in occupying host florets revealed by comparative and functional genomics[J]. Nature Communications, 2014, 5: 3849.
- [13] 陈一帆, 薛太强, 陈思桥, 等. 群结腐霉细胞壁降解酶的活性检测及基因表达分析[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(4): 46-51.
- [14] 李燕, 于俊杰, 刘永锋, 等. 稻曲病菌产孢能力及致病力测定[J]. 中国农业科学, 2012, 45(20): 4166-4177.
- [15] 陈相永, 陈捷胤, 肖红利, 等. 植物病原真菌寄生性与分泌蛋白组 CAZymes 的比较分析[J]. 植物病理学报, 2014, 44(2): 163-172.
- [16] BATTAGLIA E, BENOIT I, VAN DEN BRINK J, et al. Carbohydrate-active enzymes from the zygomycete fungus *Rhizopus oryzae*: a highly specialized approach to carbohydrate degradation depicted at genome level[J]. BMC Genomics, 2011, 12: 38.
- [17] 柴莹, 徐永清, 付瑶, 等. 马铃薯干腐病原镰孢菌体内产细胞壁降解酶特性研究[J]. 作物杂志, 2018(4): 154-160.
- [18] SHARAFADDIN A H, HAMAD Y K, EL KOMY M H, et al. Cell wall degrading enzymes and their impact on *Fusarium proliferatum* pathogenicity[J]. European Journal of Plant Pathology, 2019, 155(3): 871-880.
- [19] 潘凤英, 曲俊杰, 刘露露, 等. 葡萄霜霉菌糖基水解酶基因的表达模式与功能分析[J]. 中国农业科学, 2023, 56(5): 879-891.
- [20] LI G B, FAN J, WU J L, et al. The flower-infecting fungus *Ustilagoidea vires* subverts plant immunity by secreting a chitin-binding protein[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 733245.
- [21] YANG J, LIU L, WANG Y F, et al. Overexpression of *BAS1* in rice blast fungus can promote blast fungus growth, sporulation and virulence in planta [J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2017, 24(8): 1884-1893.
- [22] 陈乐天, 王慧婷, 韩靖鸾, 等. 植物果胶裂解酶的研究现状及展望[J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(5): 71-77.

(责任编辑:徐艳)