

# *Trichothecium roseum*的酸碱属性及pH值对其胞外酶活性和致病性的影响

王振宇<sup>1</sup>, 胡慧敏<sup>1</sup>, 龚迪<sup>2</sup>, 张国军<sup>1</sup>, Dov PRUSKY<sup>1,3</sup>, 毕阳<sup>1,\*</sup>

(1.甘肃农业大学食品科学与工程学院, 甘肃 兰州 730070; 2.甘肃农业大学园艺学院, 甘肃 兰州 730070;  
3.以色列农业研究组织凡卡尼中心, 中央区 Bet Dagan 50250)

**摘要:** 目的: 明确粉红单端孢 (*Trichothecium roseum*) 侵染果实的酸碱性质, 测定3种pH值孢子悬浮液接种对苹果果实病斑直径及胞外酶活性的影响。方法: 用*T. roseum*接种“富士”苹果, 测定果实病斑处的pH值变化。用pH值分别为3、5和7的孢子悬浮液接种果实, 观察接种对果实病斑直径及病斑处果胶酶和纤维素酶活性的影响。结果: *T. roseum*接种后果实病斑处的pH值显著升高, 由第0天的3.54升高至第12天的4.84, 提高了36.7%。3种pH值孢子悬浮液接种果实后, 以pH 7接种的果实病斑直径最大, 第9天时分别高出pH 5与pH 3接种的35.2%与68.0%。pH 7接种的果实病斑处具有最高的果胶酶及纤维素酶活性, 第9天时的果胶甲酯酶、果胶甲基多聚半乳糖醛酸酶、多聚半乳糖醛酸酶活性分别为pH 3接种的2.95、1.61倍和1.68倍, 为pH 5接种的2、1.25倍和1.39倍。此外, pH 7接种的果实病斑处纤维素酶和 $\beta$ -葡萄糖苷酶第9天的活性分别为pH 3接种的1.97倍和1.64倍, 为pH 5接种的1.33倍和1.3倍。结论: *T. roseum*属碱化菌, 中性或偏碱环境可提高该菌损伤接种苹果果实病斑处的胞外酶活性, 增强其致病性。

**关键词:** 苹果果实; pH值; 致病性; 胞外酶

Acid-Base Property of *Trichothecium roseum* and Effect of pH on Its Extracellular Enzyme Activities and Pathogenicity

WANG Zhenyu<sup>1</sup>, HU Huimin<sup>1</sup>, GONG Di<sup>2</sup>, ZHANG Guojun<sup>1</sup>, Dov PRUSKY<sup>1,3</sup>, BI Yang<sup>1,\*</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;  
2. College of Horticulture, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;  
3. The Volcani Center, Agricultural Research Organization, Bet Dagan 50250, Israel)

**Abstract:** Objective: The study aimed to define the acid-alkali property of *Trichothecium roseum* when inoculated to apple fruit and to determinate the effect of inoculation with its spore suspensions at three different pH values (3, 5 and 7) on lesion diameter and extracellular enzymes activities in apple fruit. Method: ‘Fuji’ apple fruit was artificially wounded and inoculated with *T. roseum*, and the pH change in lesion tissue was detected during incubation. Meanwhile, the lesion diameter and the activities of pectinase and cellulase in the inoculated fruit were determined. Results: The pH of lesion tissue increased by 36.7% from 3.54 on day 0 to 4.84 on day 12 after inoculation. The fruit inoculated with the spore suspension at pH 7 showed the largest lesion diameter, which was respectively 35.2% and 68.0% higher than that of the spore suspensions at pH 5 and pH 3 on day 9 after inoculation. The fruit inoculated with the spore suspension at pH 7 also had the highest activities of pectinase and cellulose in lesion tissue. The activities of pectin methylesterase, pectin methyl polygalacturonase and polygalacturonase were 2.95, 1.61 and 1.68 folds higher than those in the fruit inoculated with the spore suspension at pH 3, and were 2, 1.25 and 1.39 folds higher than those in the fruit inoculated with the spore suspension at pH 5, respectively. Moreover, the activities of cellulase and  $\beta$ -glucosidase in the fruit inoculated with the spore suspension at pH 7 were 1.97 and 1.64 folds higher than those in the fruit inoculated with the spore suspension at pH 3, and 1.33 and 1.3 folds higher than those in the fruit inoculated with the spore suspension at pH 5, respectively. Conclusion: *T. roseum* can

收稿日期: 2018-10-17

基金项目: 甘肃省自然科学基金项目(1610RJZA092); 甘肃农业大学盛彤笙科技创新基金项目(GSAU-STS-1629)

第一作者简介: 王振宇(1994—)(ORCID: 0000-0002-0097-9023), 男, 硕士研究生, 研究方向为采后生物学与技术。

E-mail: 18709493393@163.com

\*通信作者简介: 毕阳(1962—)(ORCID: 0000-0002-0269-4818), 男, 教授, 博士, 研究方向为采后生物学与技术。

E-mail: beyang62@163.com

produce alkaline substances. A neutral or alkaline environment increases the activities of extracellular enzymes in lesions, and enhances the pathogenicity of the pathogen.

**Keywords:** *Trichothecium roseum*; apple fruit; pH; pathogenicity; extracellular enzymes

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181017-173

中图分类号: TS255.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2019) 22-0161-06

引文格式:

王振宇, 胡慧敏, 龚迪, 等. *Trichothecium roseum*的酸碱属性及pH值对其胞外酶活性和致病性的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(22): 161-166. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181017-173. <http://www.spkx.net.cn>

WANG Zhenyu, HU Huimin, GONG Di, et al. Acid-base property of *Trichothecium roseum* and effect of pH on its extracellular enzyme activities and pathogenicity[J]. Food Science, 2019, 40(22): 161-166. (in Chinese with English abstract)  
DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181017-173. <http://www.spkx.net.cn>

粉红单端孢(*Trichothecium roseum*)是一种重要的采后病原真菌, 可侵染苹果、梨甜瓜、杏、番茄等多种果实<sup>[1]</sup>。由该病原物引起的心腐病是苹果果实采后的重要病害<sup>[2]</sup>, 心腐病不仅会导致苹果的品质劣变, 还会在果实体内产生真菌毒素<sup>[3]</sup>。通过伤口及自然孔口进入是*T. roseum*侵染果实的主要途径<sup>[2]</sup>, 但该病原菌侵染后如何在寄主体内扩展尚不明了。

采后真菌在侵染果实的早期, 会分泌氨或有机酸来调控侵染点周边的pH值, 从而营造有利于侵染的微环境<sup>[4]</sup>。有些真菌会分泌氨使寄主pH值升高, 如*Colletotrichum*属真菌侵染鳄梨<sup>[5]</sup>, *Alternaria alternata*侵染柿子<sup>[6]</sup>。有些则会分泌有机酸使寄主pH值降低, 如*Penicillium expansum*和*Penicillium digitatum*侵染苹果<sup>[7]</sup>。由于病原真菌的这些酸化或碱化特性, 故将其分为酸化菌与碱化菌两类。当敲除碱化菌*Colletotrichum gloeosporioides*分泌氨的基因GDH2时, 其对番茄的致病性显著降低<sup>[8]</sup>。进一步研究发现, 环境pH值直接调控了病原真菌胞外酶的分泌与活性。当pH值大于5.8时, *C. gloeosporioides*开始分泌果胶裂解酶, pH值低于5.7时则不分泌<sup>[9]</sup>。*Phomopsis mangiferae*在pH 4时分泌的多聚半乳糖醛酸酶活性显著高于pH 7<sup>[10]</sup>。编码*Monilinia fructicola*的两个多聚半乳糖醛酸酶基因MFPG2和MFPG3, 在pH 3.6~3.7时的表达量显著高于pH 4.5<sup>[11]</sup>。*A. alternata*分泌的内切1,4-β-葡聚糖酶在pH 6时的活性明显高于pH 4<sup>[12]</sup>。

虽然已有多种采后病原真菌通过改变宿主pH值影响其致病性的报道, 但是*T. roseum*侵染苹果后病部pH值如何变化, 环境pH值如何调控该病原菌的致病力和胞外酶活性却鲜有报道。本研究以“富士”苹果为试材, 采用*T. roseum*损伤接种果实, 观察接种果实病斑处的pH值变化, 研究3种pH值孢子悬浮液接种对果实病斑的影响, 分析损伤接种果实病斑处果胶酶及纤维素酶活性变化。以期明确*T. roseum*的酸碱特性, 为揭示该病原物的部分致病机理提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试*T. roseum*由甘肃农业大学采后生物学与技术实验室提供。

供试“富士”苹果于2017年10月采自甘肃省景泰县国营条山集团苹果生产基地, 选取外观整齐、大小一致、无病虫害、无机械损伤的果实, 单果套网套后入瓦楞纸包装箱, 于当天运抵本实验室, 于常温(20~25℃)、相对湿度70%~80%条件下贮藏待用。

### 1.2 仪器与设备

SW-CJ-2FD超净工作台 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司; LDZX-30KBS立式压力蒸汽灭菌锅 上海申安医疗器械厂; DHP-9272B型恒温培养箱 上海一恒科技有限公司; CX21FSIC光学显微镜 奥林巴斯工业有限公司; PHS-3C型pH计 上海仪电科学仪器股份有限公司; H-1850R型台式高速冷冻离心机 长沙湘仪离心机有限公司; 1510-04087型酶标仪 赛默飞世尔科技有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 不同pH值孢子悬浮液的配制

参照Eshel等<sup>[6]</sup>方法并修改。先将保存的*T. roseum*回接到果实上以活化其致病力, 将活化分离成功的菌种在25℃培养7 d, 分别加入pH值为3、5、7的无菌磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液10 mL/皿, 用涂布器轻轻刮下培养基表面的孢子, 经4层纱布过滤后, 将滤液转入50 mL三角瓶中, 加入大约0.05% Tween-80后摇匀, 在旋涡混合器上振荡数秒, 使孢子分布均匀, 采用血球计数板法将孢子悬浮液浓度调至 $1.0 \times 10^6$  spores/mL。

#### 1.3.2 损伤接种

参照李灿婴等<sup>[12]</sup>的方法。挑选果形端正、大小均匀、成熟度、色泽一致、无病虫害和机械伤的果实, 用自来水冲洗干净后自然晾干, 再用1%的次氯酸钠对果实表面进行消毒, 晾干后, 用70%乙醇棉球对果接种部位

进行表面擦拭消毒，然后用灭菌铁钉于果实中部打4个深3 mm、直径3 mm的接种孔。孔内分别接入上述不同pH值的孢子悬浮液10 μL，以接入等量含0.05% Tween-80的无菌水为对照，稍作晾干后装入聚乙烯袋中（6个/袋），于室温（(22±3) °C）、相对湿度85%~90%下贮藏待测。分别在接种后的0、3、6、9 d和12 d测量病斑直径，每处理每一时间点用果实20个，重复3次。

### 1.3.3 果实腐烂组织与健康组织pH值的测定

参照Bi Fangchen等<sup>[8]</sup>方法，用无菌手术刀取样组织并在无菌研磨机中研磨，将研磨的组织以10 621×g离心5 min，将上清液用pH计进行测定。每处理每一时间点用果实20个，重复3次。

### 1.3.4 接种部位pH值的维持

参照Eshel等<sup>[6]</sup>方法，自接种伊始，每隔12 h分别向接种孔中注入pH值为3、5及7的无菌磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液，直至取样结束。

### 1.3.5 生化测定取样

参照李灿婴等<sup>[12]</sup>方法。取病斑组织及病健交界处3 mm以内的果肉组织。切碎后称取3 g，铝箔纸包裹，液氮速冻后于-80 °C超低温冰箱中保存待用。每处理每一时间点用果实10个，重复3次。

### 1.3.6 胞外酶活性测定

#### 1.3.6.1 粗酶液的提取

果胶甲基多聚半乳糖醛酸酶（pectin methyl polygalacturonase, PMG）、多聚半乳糖醛酸酶（polygalacturonase, PG）、纤维素酶（cellulase, Cx）和 $\beta$ -葡萄糖苷酶（ $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -Glu）的提取参考刘耀娜等<sup>[13]</sup>的方法。取3 g冷冻组织，置于预冷的研钵中，加入6 mL预冷的95%乙醇溶液，在冰浴条件下研磨匀浆后，全部转入离心管，然后4 °C、10 000×g离心10 min，倾去上清液，向沉淀物中再加入3 mL预冷的80%乙醇溶液，振荡，低温放置10 min，然后在相同条件下离心，再倾去上清液，向沉淀物中加入5 mL预冷的提取缓冲液，于4 °C放置提取20 min，再经过离心后收集上清液即为粗酶液。

果胶甲酯酶（pectin methylesterase, PME）粗酶液的提取参照Hagerman等<sup>[14]</sup>方法并修改。取3 g冷冻组织，置于冰浴的研钵中，加入5 mL 8.8% NaCl溶液在冰浴条件下研磨成匀浆，将匀浆全部转入到离心管中，4 °C、10 000×g离心10 min，收集上清液，用0.1 mol/L的NaOH溶液调pH值至7.5后即为粗酶液。

果胶裂解酶（pectatelyase, PL）粗酶液提取参照陈夕军等<sup>[15]</sup>方法。取3 g冷冻组织，置于冰浴的研钵中，加入6 mL的提取缓冲液（50 mmol/L、pH 8.0的Tris-HCl缓冲液，含1 mol/L NaCl），在冰浴条件下研磨成匀浆，将匀浆全部转入到离心管中，4 °C、10 000×g离心10 min，收集上清液，即为粗酶液。

### 1.3.6.2 酶活性的测定

PMG活性的测定参照刘耀娜等<sup>[13]</sup>方法。取0.5 mL粗酶液，加入到0.5 mL 10 g/L果胶溶液和1.0 mL 50 mmol/L的乙酸-乙酸钠缓冲液（pH 5.5）中，37 °C水浴1 h，加入1.5 mL的3,5-二硝基水杨酸并立即沸水浴5 min，迅速冷却后加蒸馏水8 mL之后混匀，540 nm波长处测定吸光度。PMG活性用每克样品组织（鲜质量）每小时将多聚半乳糖醛酸在37 °C催化水解生成半乳糖醛酸的质量表示，即mg/ (h·g)。

PG活性的测定参照刘耀娜等<sup>[13]</sup>方法。取0.5 mL粗酶液，加入到0.5 mL 10 g/L多聚半乳糖醛酸溶液和1.0 mL 50 mmol/L的乙酸-乙酸钠缓冲液（pH 5.5）中，37 °C水浴1 h，加入1.5 mL的3,5-二硝基水杨酸试剂并立即进行5 min沸水浴，迅速冷却，加蒸馏水8 mL之后混匀，540 nm波长处测定吸光度。PG活性用每克样品组织（鲜质量）每小时将多聚半乳糖醛酸在37 °C催化水解生成半乳糖醛酸的质量表示，即mg/ (h·g)。

Cx活性的测定参照刘耀娜等<sup>[13]</sup>方法。取0.5 mL粗酶液，加入到1.5 mL 10 g/L羧甲基纤维素钠溶液混匀，37 °C水浴1 h，迅速将1.5 mL 3,5-二硝基水杨酸试剂加入并进行5 min的沸水浴，迅速冷却后加蒸馏水8 mL进行混匀，540 nm波长处测定吸光度。Cx活性以每克样品组织（鲜质量）每小时将羧甲基纤维素在37 °C催化水解并生成还原糖（葡萄糖）的质量表示，即mg/ (h·g)。

$\beta$ -Glu活性的测定参照刘耀娜等<sup>[13]</sup>的方法。取0.5 mL粗酶提取液，加入1.5 mL 10 g/L水杨苷溶液，37 °C水浴1 h，迅速加入3,5-二硝基水杨酸试剂1.5 mL，再进行5 min沸水浴后迅速冷却，加入蒸馏水8 mL并混匀，在540 nm波长处测定吸光度。 $\beta$ -Glu活性以每克样品组织（鲜质量）每小时将水杨苷在37 °C水解成还原糖（葡萄糖）的质量表示，即mg/ (h·g)。

PME活性的测定参照Hagerman等<sup>[14]</sup>方法。反应液包括4 mL 0.5%果胶溶液、0.3 mL 0.01%溴麝香草酚蓝，在加入粗酶液前初始 $A_{620\text{nm}}$ 约为0.091，加500  $\mu\text{L}$ 粗酶液，反应2 min后测定其吸光度，酶活性以每分钟吸光度的变化值 $\Delta A_{620\text{nm}}$ 表示。

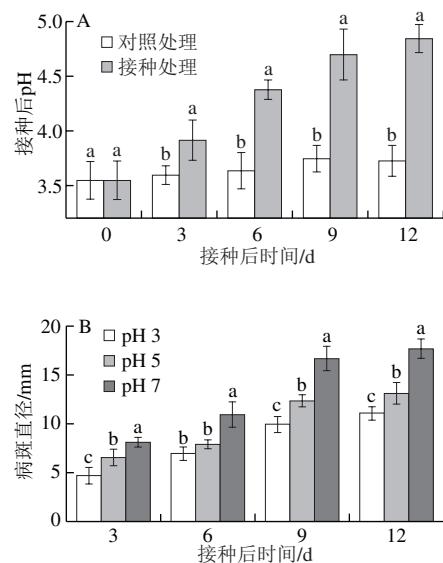
PL活性参照陈夕军等<sup>[15]</sup>方法。取2.0 mL的0.5%果胶溶液于试管中，40 °C水浴平衡5 min，加入0.5 mL粗酶液，40 °C水浴平衡10 min，取上述反应混合物0.5 mL，加入4.5 mL 0.01 mol/L的HCl溶液中，充分混和终止反应。在235 nm波长处测定吸光度。每分钟235 nm波长处吸光度增加1.0定义为1单位PL活性，以 $\Delta A_{235\text{nm}}$ 表示。

### 1.4 数据统计与分析

实验至少重复3次，全部数据用Excel 2007计算 $\bar{x}\pm s$ ，用SPSS 17.0进行Duncan多重差异显著性分析（ $P<0.05$ ，差异显著）。

## 2 结果与分析

### 2.1 病部组织pH值的变化及3种pH值孢子悬浮液接种对果实病斑直径的影响



同一时间字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )，下同。

图1 接种 *T. roseum* 后果实病斑处pH值的变化 (A) 及3种pH值孢子悬浮液接种对病斑直径 (B) 的影响

Fig. 1 pH change in lesion of fruit inoculated with *T. roseum* (A), and effect of inoculation with spore suspensions at three different pH values on lesion diameter (B)

如图1A所示，果实接种 *T. roseum* 后，病部组织的pH值随接种时间的延长明显上升，由第0天的3.54增加到第12天的4.84，提高了36.7%。对照组织的pH值虽然也有升高，但增加幅度不大。由于接种病原物的组织pH值在接种3 d后均显著高于对照 ( $P < 0.05$ )，表明 *T. roseum* 碱化了果实伤口处的微环境，该菌属碱化菌。

如图1B所示，不同pH值孢子悬浮液接种后果实的病斑直径存在显著差异，其中pH 7的病斑直径最大，其次为pH 5，pH 3最小。接种后第9天，pH 7孢子悬浮液接种果实的病斑直径分别高出pH 5和pH 3的35.2%和68.0% ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 3种pH值孢子悬浮液接种对果实病斑处果胶酶活性的影响

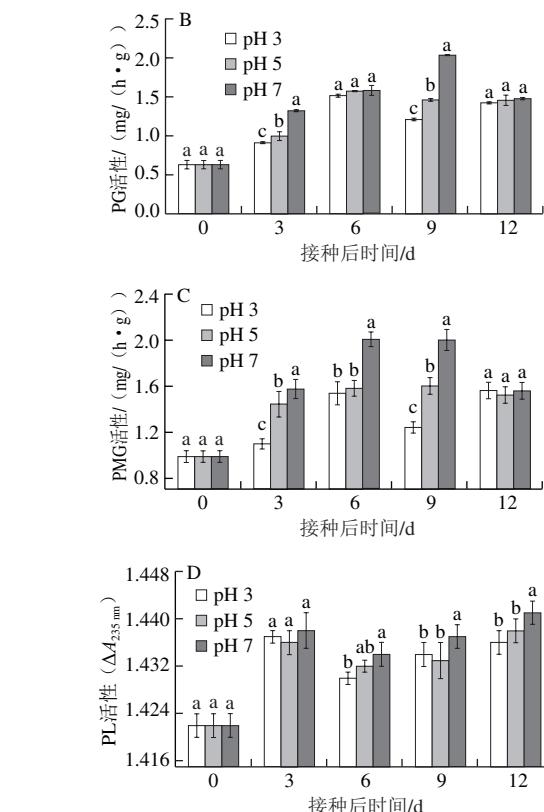
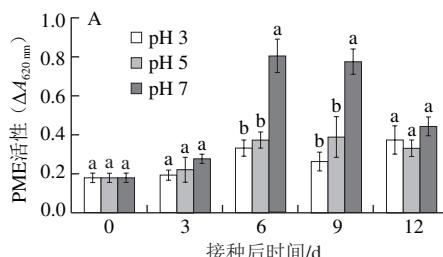


图2 3种pH值孢子悬浮液接种对果实病斑处PME (A)、PG (B)、PMG (C) 和PL (D) 活性的影响

Fig. 2 Effects of inoculation with spore suspensions at three different pH values on the activities of PME (A), PG (B), PMG (C) and PL (D)

3种pH值孢子悬浮液接种后病斑处的果胶酶活性表现各异，整体上以pH 7的活性最大(图2)。pH 7孢子悬浮液接种后果实病斑处的PME活性在第6天和第9天最高，显著高于pH 5和pH 3孢子悬浮液接种，接种后第9天，分别为pH 5与pH 3处理的2倍与2.95倍 ( $P < 0.05$ ) (图2A)；虽然pH 5孢子悬浮液接种果实病斑处的PME活性在第3、6、9天也高于pH 3孢子悬浮液接种，但两者之间无显著差异。pH 7孢子悬浮液接种后果实病斑处的PG活性在第9天最大，显著高于pH 5与pH 3孢子悬浮液接种的活性。接种后第9天，pH 7孢子悬浮液接种的PG活性分别为pH 5与pH 3接种的1.39倍和1.68倍 ( $P < 0.05$ )；第3天与第9天，pH 5孢子悬浮液接种的PG活性也显著高于pH 3孢子悬浮液 ( $P < 0.05$ ) (图2B)。pH 7孢子悬浮液接种后果实病斑处的PMG活性在第6天和第9天最高，显著高于pH 5与pH 3孢子悬浮液接种的活性，接种后第9天，pH 7孢子悬浮液接种的PMG活性分别为pH 5与pH 3接种的1.25倍和1.61倍 ( $P < 0.05$ )；第3天与第9天pH 5孢子悬浮液接种的PMG活性也显著高于pH 3孢子悬浮液接种 ( $P < 0.05$ ) (图2C)。pH 7孢子悬浮液接种后果实病斑处的PL活性在第12天最大，显著高于pH 5和pH 3孢子悬浮液，pH 5与pH 3孢子悬浮液接种后病斑处PL活性

如图2D所示，接种后第3天与第9天，pH 5孢子悬浮液接种的PL活性显著高于pH 3孢子悬浮液接种的活性，接种后第9天，pH 7孢子悬浮液接种的PL活性分别为pH 5与pH 3接种的1.39倍和1.68倍 ( $P < 0.05$ )；第3天与第9天，pH 5孢子悬浮液接种的PL活性也显著高于pH 3孢子悬浮液 ( $P < 0.05$ ) (图2D)。

在各时间点均无显著差异。第12天时pH 7活性与pH 3差异最显著( $P<0.05$ ) (图2D)。

### 2.3 3种pH值孢子悬浮液接种对果实病斑处Cx和 $\beta$ -Glu活性的影响

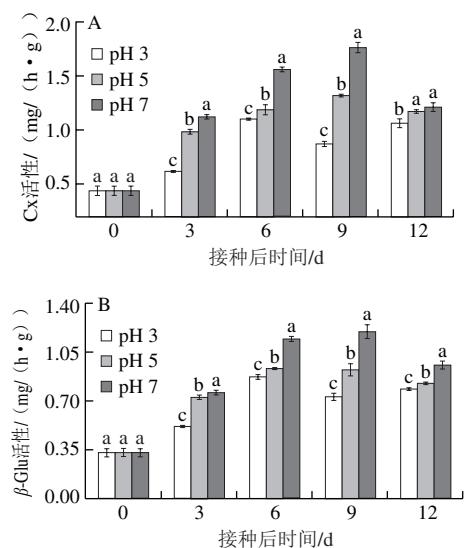


图3 3种pH值孢子悬浮液接种对果实病斑处Cx (A) 和 $\beta$ -Glu (B) 活性的影响

Fig. 3 Effects of inoculation with spore suspensions at three different pH values on the activities of Cx (A) and  $\beta$ -Glu (B)

3种pH值孢子悬浮液接种后病斑处的纤维素酶整体上以pH 7的活性最大, pH 5次之, pH 3最小(图3)。pH 7孢子悬浮液接种后果实病斑处Cx活性在第9天时最大, 分别为pH 5和pH 3接种的1.33倍与1.97倍( $P<0.05$ ), 且pH 5孢子悬浮液接种的Cx活性也高于pH 3接种的51.5% (图3A)。pH 7孢子悬浮液接种后果实病斑处 $\beta$ -Glu活性在第9天最大, 分别为pH 5与pH 3接种活性的1.3倍与1.64倍, pH 5孢子悬浮液接种高出pH 3接种的26.9% ( $P<0.05$ ) (图3B)。

### 3 结论与讨论

接种了*T. roseum*的苹果果实, 病斑处的pH值显著升高, 表明该菌属碱化菌。采用3种pH值孢子悬浮液接种后发现, pH 7处理苹果果实的病斑直径最大, 表明高pH值环境更有利于*T. roseum*致病。

pH 7孢子悬浮液接种导致了苹果果实病健交界处最高的果胶酶和纤维素酶活性, 而pH 3接种导致了最低的活性, 表明高pH值有利于*T. roseum*胞外酶的活化。果实受到真菌侵染后大多发生组织溃烂, 真菌分泌的胞外酶在其中发挥了重要作用<sup>[16]</sup>。伤口侵染性真菌分泌的胞外酶主要由果胶酶、纤维素酶、半纤维素酶等组成, 其中以果胶酶的功能最为强大。果胶酶是一组复合酶, 由PME、

PG、PMG、PL等组成, 主要在降解细胞壁及中胶层的果胶物质中发挥作用<sup>[17]</sup>。果实细胞壁和中胶层中果胶主链的多聚半乳糖醛酸结构单位被甲醇高度酯化, 故PME先催化主链的脱甲酯化并产生自由羧基群, 同时释放甲醇<sup>[18]</sup>。甲醇的释放导致细胞壁pH值降低, 从而更有利PG发挥作用<sup>[19]</sup>。PG可水解细胞壁和中胶层中的多聚半乳糖醛酸中的 $\alpha$ -1,4糖苷键, 生成低聚半乳糖醛酸和半乳糖醛酸, 从而导致中胶层破坏和细胞壁结构松散, 致使果实组织软化、溃烂<sup>[20]</sup>。本研究pH 7孢子悬浮液接种果实的病斑处具有较高的PME和PG活性, 与前人研究结果类似。Sakai等<sup>[21]</sup>研究发现, PME作用的最佳pH值为7左右。陈夕军<sup>[22]</sup>和宋丹丹<sup>[23]</sup>等也发现, PG在pH 7时的活性显著高于pH 3时的活性。PMG是一种专一水解底物糖苷键的水解酶, 对底物的酯化度具有高度的选择性, 可水解高度酯化的果胶酸酯的 $\alpha$ -1,4糖苷键<sup>[24]</sup>。本研究pH 7孢子悬浮液接种后病斑处PMG活性较高, 表明PMG在*T. roseum*的侵染中后期发挥了重要作用, 该结果与杨迎青等<sup>[24]</sup>研究类似。PL能够催化降解半乳糖醛酸, 通过 $\beta$ 消除作用, 在其非还原端产生带有4-脱氧- $\alpha$ -D-半乳糖-4-烯醛酸基团的不饱和低聚糖, 本研究pH 7孢子悬浮液接种后病斑处PL活性较高, 与周人纲等<sup>[25]</sup>研究结果类似。不同pH值导致的果胶酶活性差异与编码果胶酶的不同基因家族成员在不同的pH值环境水平下被激活有关<sup>[7]</sup>。例如, 碱化菌*C. gloeosporioides*仅在pH值高于5.7时, 编码PL的基因pel才会表达, 并表现出更强的PL活性<sup>[26]</sup>。当敲除*C. gloeosporioides*产生氨的基因GDH2后, 突变株接种后病斑处pH值未发生显著变化, 编码PG的基因表达量也明显降低<sup>[27]</sup>。

纤维素酶主要由Cx和 $\beta$ -Glu等组成<sup>[28]</sup>, 通常是在腐烂发生的后期发挥作用<sup>[29]</sup>, Cx可分解纤维素中的 $\beta$ -1,4糖苷键, 最终形成纤维二糖<sup>[30]</sup>。本研究pH 7孢子悬浮液接种的Cx活性显著高于pH 3和pH 5孢子悬浮液接种, 该结果与耿丽平等<sup>[31]</sup>研究的草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)在pH 4~7时均可产生Cx, 但在pH 7时酶活性最高的结果一致。 $\beta$ -Glu主要水解非还原性末端的 $\beta$ -D-糖苷键生成 $\beta$ -D-葡萄糖<sup>[32]</sup>。本研究pH 7孢子悬浮液接种的 $\beta$ -Glu活性较高, 与周进等<sup>[33]</sup>的结果相似。不同的环境pH值会激活纤维素酶基因家族的不同成员<sup>[7]</sup>。

### 参考文献:

- [1] 毕阳. 果蔬采后病害原理与控制[M]. 北京: 科学出版社, 2016: 12-13.
- [2] GAO L ZHANG Q, SUN X Y, et al. Etiology of moldy core, core browning, and core rot of Fuji apple in China[J]. Plant Disease, 2013, 97(4): 510-516. DOI:10.1094/PDIS-01-12-0024-RE.
- [3] XUE H L, BI Y, TANG Y M, et al. Influence of storage temperature and cultivars on T-2 toxin and neosolaniol accumulation in apples inoculated with *Trichothecium roseum*[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2017, 42(2): 175-182. DOI:10.1111/jfpp.13424.

- [4] PRUSKY D, BARAD S, MENT D, et al. The pH modulation by fungal secreted molecules: a mechanism affecting pathogenicity by postharvest pathogens[J]. Israel Journal of Plant Sciences, 2016, 63(1): 1-9. DOI:10.1080/07929978.2016.1151290.
- [5] PRUSKY D, MCEVOY J L, LEVERENTZ B, et al. Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2001, 14(9): 1105-1113. DOI:10.1094/MPMI.2001.14.9.1105.
- [6] ESHEL D, MIYARA I, AILING T, et al. pH regulates endoglucanase expression and virulence of *Alternaria alternata* in persimmon fruit[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2002, 15(8): 774-779. DOI:10.1094/MPMI.2002.15.8.774.
- [7] PRUSKY D, MCEVOY J L, SAFTNER R, et al. Relationship between host acidification and virulence of *Penicillium* spp. on apple and citrus fruit[J]. Phytopathology, 2004, 94(1): 44-51. DOI:10.1094/PHYTO.2004.94.1.44.
- [8] BI F C, BARAD S, MENT D, et al. Carbon regulation of environmental pH by secreted small molecules that modulate pathogenicity in phytopathogenic fungi[J]. Molecular Plant Pathology, 2016, 17(8): 1178-1195. DOI:10.1111/mpp.12355.
- [9] YAKOBY N, KOBILER I, DINOOR A, et al. pH regulation of pectate lyase secretion modulates the attack of *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado fruits[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(3): 1026-1030. DOI:10.1128/AEM.66.3.1026-1030.2000.
- [10] DAVIDZON M, ALKAN N, KOBILER I, et al. Acidification by gluconic acid of mango fruit tissue during colonization via stem end infection by *Phomopsis mangiferae*[J]. Postharvest Biology and Technology, 2010, 55(2): 71-77. DOI:10.1016/j.postharvbio.2009.08.009.
- [11] CAL A D, SANDÍN-ESPAÑA P, MARTINEZ F, et al. Role of gluconic acid and pH modulation in virulence of *Monilinia fructicola* on peach fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2013, 86(7): 418-423. DOI:10.1016/j.postharvbio.2013.07.012.
- [12] 李灿婴, 葛永红, 朱丹实, 等. 采后茉莉酸甲酯处理对富士苹果青霉病和贮藏品质的影响[J]. 食品科学, 2015, 36(2): 255-259. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201502049.
- [13] 刘耀娜, 王毅, 毕阳, 等. 采前乙酰水杨酸处理对厚皮甜瓜果实后熟及软化的影响[J]. 中国农业科学, 2017, 50(10): 1862-1872. DOI:10.3864/j.issn.0578-1752.2017.10.011.
- [14] HAGERMAN A E, AUSTIN P J. Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methylesterase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1986, 34(3): 440-444. DOI:10.1021/jf00069a015.
- [15] 陈夕军, 张红, 徐敬友, 等. 水稻纹枯病菌胞壁降解酶的产生及致病作用[J]. 江苏农业学报, 2006, 22(1): 24-28. DOI:10.3969/j.issn.1000-4440.2006.01.006.
- [16] 葛永红, 李灿婴, 吕静祎, 等. 果蔬采后病原真菌分泌胞外酶的研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(15): 265-270. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201615045.
- [17] GUMMADI S N, PANDA T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases: a review[J]. Process Biochemistry, 2003, 38(7): 987-996. DOI:10.1016/S0032-9592(02)00203-0.
- [18] 梅晓宏, 陈燕卉, 高红岩, 等. 果胶甲酯酶抑制剂的研究进展[J]. 食品科技, 2008, 33(6): 64-68. DOI:10.3969/j.issn.1005-9989.2008.06.020.
- [19] 李明霞, 韩建群, 王琦, 等. 低强度微波处理对猕猴桃细胞壁降解酶活性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(11): 52-58. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.201511010.
- [20] 陈凯莉, 许轲, 张贤聪, 等. 果实中果胶代谢相关酶基因的研究进展[J]. 园艺学报, 2017, 44(10): 2008-2014. DOI:10.16420/j.issn.0513-353x.2016-0846.
- [21] SAKAI T, SAKAMOTO T, HALLAERT J, et al. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties, and applications[J]. Advances in Applied Microbiology, 1993, 39(4): 213-294. DOI:10.1016/S0065-2164(08)70597-5.
- [22] 陈夕军, 王友德, 左示敏, 等. 水稻纹枯病菌PG的分离纯化及其理化性质研究[J]. 植物病理学报, 2010, 40(3): 276-281. DOI:10.13926/j.cnki.apps.2010.03.006.
- [23] 宋丹丹, 孔庆军, 李鸿彬, 等. 蟠桃褐腐病原菌生物学特性及细胞壁降解酶活性[J]. 食品科学, 2017, 38(10): 42-48. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201710008.
- [24] 杨迎青, 孟凡, 兰波, 等. 芦笋茎枯病菌细胞壁降解酶活性的测定及条件优化[J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(2): 57-60. DOI:10.13300/j.cnki.hnlxb.2014.02.006.
- [25] 周人纲, 白玉山, GIERSCHNER K. 果胶裂解酶的分离提纯及其特征[J]. 微生物学通报, 1990, 17(2): 88-92. DOI:10.13344/j.microbiol.china.1990.02.009.
- [26] KRAMER-HAIMOVICH H, SERVI E, KATAN T, et al. Effect of ammonia production by *Colletotrichum gloeosporioides* on *pelB* activation, pectate lyase secretion, and fruit pathogenicity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(2): 1034-1039. DOI:10.1128/AEM.72.2.1034-1039.2006.
- [27] MIYARA I, SHAFRAN H, DAVIDZON M, et al. pH regulation of ammonia secretion by *Colletotrichum gloeosporioides* and its effect on appressorium formation and pathogenicity[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2010, 23(3): 304-316. DOI:10.1094/MPMI-23-3-0304.
- [28] 冯培勇, 常迪, 杨立红. 一株绿色木霉产纤维素酶的性质研究[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 185-187. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2006.12.038.
- [29] BARKAI-GOLAN R. Postharvest diseases of fruits and vegetables: development and control[M]. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 2001: 56-58.
- [30] 潘利华, 罗建平.  $\beta$ -葡萄糖苷酶的研究及应用进展[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 803-807. DOI:1002-6630(2006)12-0803-05.
- [31] 耿丽平, 陆秀君, 赵全利, 等. 草酸青霉菌产酶条件优化及其秸秆腐解能力[J]. 农业工程学报, 2014, 30(3): 170-179. DOI:10.3969/j.issn.1002-6819.2014.03.023.
- [32] 陈静, 郝伟伟, 王春梅, 等. 产 $\beta$ -葡萄糖苷酶真菌的筛选鉴定、纯化及酶学性质分析[J]. 食品科学, 2013, 34(5): 191-196. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201305040.
- [33] 周进, 银鹏. pH调控对里氏木霉产 $\beta$ -葡萄糖苷酶的影响机制[J]. 清华大学学报(自然科学版), 2012, 52(2): 271-276. DOI:10.16511/j.cnki.qhdxxb.2012.02.010.