

# 苹果树腐烂病菌产生细胞壁降解酶的种类及其活性分析

陈晓林, 牛程旺, 李保华, 李桂舫, 王彩霞

(青岛农业大学 农学与植物保护学院, 山东省植物病虫害综合防控重点实验室, 山东 青岛 266109)

**摘要:**通过对酶活性的分析, 研究证实苹果树腐烂病菌在活体外和寄主体内均能分泌一系列的细胞壁降解酶: 多聚半乳糖醛酸酶(PG)、果胶甲基半乳糖醛酸酶(PMG)、纤维素酶(Cx)、 $\beta$ -葡萄糖苷酶和木聚糖酶。不同碳源培养条件下, 腐烂病菌产生细胞壁降解酶的活性及达到酶活性高峰的时间存在显著差异; 诱导酶液对苹果愈伤组织具有明显的浸解作用, 其中木聚糖为碳源产生的细胞壁降解酶, 破坏能力最强。此外, 研究发现, 腐烂病菌在寄主体内产生细胞壁降解酶的活性变化规律不同, PMG和木聚糖酶在接种后最先被检测到活性显著升高, PMG酶活性于接种后第13天达到高峰, 随后活性降低, 而木聚糖酶和其他3种酶活性则随接种天数的增加活性不断增强; 5种细胞壁降解酶中, Cx最大酶活性最低, 而木聚糖酶活性最高, 是其他酶最大活性的1.74~7.44倍。

**关键词:** 苹果树腐烂病菌; 细胞壁降解酶; 致病作用; 木聚糖酶

中图分类号:S436.611 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2012)02-0207-06

## The Kinds and Activities of Cell Wall-Degrading Enzymes Produced by *Valsa ceratosperma*

CHEN Xiao-lin, NIU Cheng-wang, LI Bao-hua, LI Gui-fang, WANG Cai-xia

(Department of Agronomy and Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Key Lab of Integrated Crop Pest Management of Shandong, Qingdao 266109, China)

**Abstract:** Activities of the cell wall-degrading enzymes (CWDEs) produced by *V. ceratosperma* *in vitro* and *in vivo* were detected. The results showed that *V. ceratosperma* could produce a series of CWDEs including polygalacturonase (PG), polymethylgalacturonase (PMG), cellulase (Cx),  $\beta$ -glucosidase and xylanase. The different levels of enzyme activities were obtained with *V. ceratosperma* grown on five media differing in carbon sources. These corresponding days when maximum enzyme activity were detected varied also with the type of carbon source used. The CWDEs produced by *V. ceratosperma* grown on three different carbon source all could macerate apple callus, however, the CWDEs produced in xylan medium showed the most powerful macerating ability. In addition, time-course experiments showed that the changes of CWDEs activities in detached apple branches inoculated by *V. ceratosperma* were different. The activities of PMG and xylanase were first detected at enhanced levels in diseased branches. The PMG activity reached the peak at 13 days post-inoculation and then it decreased, while activities of the other four enzymes increased as the disease development. In all the CWDEs, the maximum activity of Cx was the lowest, and xylanase maximum activity was the highest which was 1.74–7.44 times of the other four enzymes.

**Key words:** *Valsa ceratosperma*; Cell wall-degrading enzymes; Pathogenicity; Xylanase

由黑腐皮壳菌(*Valsa ceratosperma*)引起的苹果树腐烂病, 是对苹果产业威胁最大的一种毁灭性病害, 该病在我国苹果产区发生普遍, 可造成果树主干

及整树死亡, 甚至毁园<sup>[1-2]</sup>。2008年, 国家苹果产业技术体系调查显示, 全国范围内苹果树腐烂病的总体发生率为52.7%, 部分地区发病率高达85%以

收稿日期: 2011-12-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31000891); 国家现代农业产业技术体系(CARS-28); 山东省科技攻关计划(2010GNC10918); 山东省“泰山学者”建设工程专项经费资助

作者简介: 陈晓林(1986-), 女, 山东滨州人, 在读硕士, 主要从事果树真菌病害研究。

通讯作者: 王彩霞(1977-), 女, 山东德州人, 副教授, 博士, 主要从事果树病害研究。

上,成为制约我国苹果生产的主要限制因子<sup>[3]</sup>。我国自 20 世纪 50 年代以来,对苹果树腐烂病的流行规律、防治技术及病原学等进行了系统研究,并取得了许多有意义的成果<sup>[1,4-5]</sup>,但目前该病仍然无法得到有效控制,其中一个重要原因是人们对腐烂病菌的分子和生化致病机理缺乏全面深入的了解。

植物病原物在对寄主的侵染致病过程中可产生一系列的细胞壁降解酶,通过酶解植物多糖来破坏和分解细胞壁,以提供病原菌自身营养并促进其对寄主组织的侵入和扩展<sup>[6-7]</sup>。诸多研究表明,细胞壁降解酶是多种植物病原真菌的重要致病因子<sup>[8-9]</sup>,苹果树腐烂病菌具有典型的细胞壁降解症状,不少研究者认为,酶类物质在其致病过程中起重要作用。刘福昌等和王娟等<sup>[10-11]</sup>先后研究发现,苹果树腐烂病菌在寄主体内和活体外可产生果胶酶,该酶液对番茄幼苗具有一定的浸解作用,但腐烂病菌是否产生其他类型的细胞壁降解酶及其致病作用等尚不明确。本研究对苹果树腐烂病菌产生细胞壁降解酶的种类进行测定,分析了不同碳源对腐烂病菌体外诱导细胞壁降解酶活性的影响,并对其在寄主体内分泌的细胞壁降解酶活性变化进行了测定,以为苹果树腐烂病菌致病因子的研究提供有价值的参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试菌株与植物材料

腐烂病菌菌株 LXS080601(采自山东栖霞)和 LXS081601(采自山东胶南)均分离自商品富士苹果园采集的发病枝干,由本实验室成员进行单菌丝分离,纯化后鉴定为苹果黑腐皮壳菌(*Valsa ceratosperma*),离体枝条接种进行致病力测定均为强致病力菌株。

供试植物材料为 2~3 年生富士苹果枝条,采集自青岛农业大学试验田;富士苹果愈伤组织离体培养于青岛农业大学病害流行实验室。

### 1.2 供试培养基

苹果树腐烂病菌细胞壁降解酶的诱导方法参照 DiPietro 等<sup>[12]</sup>报道稍作改进,以改良的察氏培养基( $\text{NaNO}_3$  1 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g,  $\text{KCl}$  0.25 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g)为基本培养基,分别添加 5 种不同的碳源:2~3 年生富士苹果树皮 20 g,蔗糖 20 g,木聚糖 2 g(含酵母提取物 1 g),橘皮果胶 5 g,羧甲基纤维素(CMC) 10.0 g(含酵母提取物 1 g),用蒸馏水定容至 1 000 mL, pH 值调节至 5.0,按 100 mL/250 mL 的装瓶量进行分装,121℃ 灭菌 20 min。

### 1.3 细胞壁降解酶的体外诱导与纯化

分别以苹果树腐烂病菌菌丝和分生孢子两种初始状态进行接种。将腐烂病菌于 PDA 培养基上暗培养 3 d,在菌落边缘打取直径 6 mm 的菌饼,每瓶培养基接种 5 个菌饼,分生孢子的接种量为  $10^6$  个/100 mL,于 26℃、150 r/min 条件下恒温振荡培养 15 d,定期取样,每次处理 3 个重复。培养液于 4℃ 条件下 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液进行酶活性的测定。

细胞壁降解酶的纯化参照李宝聚等<sup>[13]</sup>的方法,取离心后的上清液按 60% 饱和度加入硫酸铵进行沉淀,用醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 值 5.0)溶解沉淀,后透析除盐,最后获得纯化的酶。−20℃ 下保存备用。

### 1.4 苹果离体枝条的接种及粗酶液的制备

采用电烙铁烫伤法接种 2~3 年生富士苹果离体枝条,在烫伤处分别接种腐烂病菌强致病力菌株 LXS080601 和 LXS081601 的孢子悬浮液( $10^6$  个/mL) 100  $\mu\text{L}$ ,用保鲜膜密封保湿 48 h,于 25℃ 恒温 95% 相对湿度下暗培养。定期切取病健交界处的树皮组织 5 个接种点为一重复,液氮进行研磨,每克干质量组织加入 10 mL 提取液(50 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L KCl, pH 值 7.2),冰浴振荡 30 min,离心后取上清液备用。以健康枝条树皮组织的提取液作为对照。

### 1.5 细胞壁降解酶活性测定

采用紫外-可见光分光光度法测定细胞壁降解酶的活性。多聚半乳糖醛酸酶(PG)、果胶甲基半乳糖醛酸酶(PMG)、纤维素酶(Cx)、 $\beta$ -葡萄糖苷酶和木聚糖酶的活性测定参考 Douaiher 和 Siah 等<sup>[14-15]</sup>报道,利用二硝基水杨酸(DNS)在 540 nm 处测定反应混合物消光值,根据酶反应所释放的还原糖量计算酶活性。Cx 和  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性测定所用底物为 1% CMC, PG 和 PMG 所用底物为 1% 橘皮果胶,木聚糖酶底物为 0.5% 木聚糖。酶活单位为 50℃ 下每分钟每毫升酶液(每毫克酶蛋白)催化底物释放 1  $\mu\text{mol}$  还原糖(U/mL 或 U/mg total proteins)。

PGTE 和 PMTE 的活性测定参考文献报道<sup>[13]</sup>,在 232 nm 处测定反应混合物消光值,按相应公式计算酶活性。30℃ 下每分钟每毫升酶液催化底物释放 1  $\mu\text{mol}$  不饱和醛酸为一个酶活单位(U/mL)。酶蛋白浓度按 Bradford 方法,用考马斯亮兰 G-250 显色,在 595 nm 下比色测定,用牛血清作标准曲线。所有酶活性测定试验均重复 3 次。

### 1.6 腐烂病菌产生细胞壁降解酶对苹果愈伤组织的浸解作用

将 1.3 中纯化得到的 3 种酶液(木聚糖为碳源,

CMC 为碳源,橘皮果胶为碳源) 分别无伤接种生长势一致的苹果愈伤组织,每愈伤组织接种 4~5 个点,共 20 μL 酶液,每处理接种 5 块愈伤组织,试验重复 3 次。以接种煮沸灭活酶液的愈伤组织为对照,25℃ 恒温放置 72 h,定期观察记录不同酶液对愈伤组织的浸解作用。

1.7 数据分析

采用 SAS 8.0 进行数据统计,用 Tukey test 多重对比法进行显著性分析( $P < 0.05$ ),利用 Sigma Plot 软件作图并进行分析。

2 结果与分析

2.1 苹果树腐烂病菌在活体外和寄主体内产生的细胞壁降解酶

对接种腐烂病菌(LXS080601、LXS081601) 的树皮培养基和苹果离体枝条定期进行细胞壁降解酶活性测定,结果见表 1,未检测到 PGTE 和 PMTE 酶活性,但均能检测到高活性的 Cx、β-葡萄糖苷酶、木聚糖酶、PG 和 PMG,表明苹果树腐烂病菌可产生多种类型的细胞壁降解酶。LXS080601 和 LXS081601 在活体外产生的细胞壁降解酶活性高低依次为木聚糖酶、PMG、PG、β-葡萄糖苷酶和 Cx;在寄主体内酶活性依次为木聚糖酶、PG、β-葡萄糖苷酶、PMG 和 Cx,由此可见,腐烂病菌在活体外和寄主体内产生的细胞壁降解酶活性均存在差异,其中 Cx 活性最低,而木聚糖酶活性均最高。除 PMG 外,LXS080601 在活体外和寄主体内产生的其余 4 种细胞壁降解酶活性均高于 LXS081601。

表 1 苹果树腐烂病菌在树皮培养基和离体枝条中产生细胞壁降解酶的活性

Tab.1 Maximal activities of cell wall-degrading enzymes produced by *Valsa ceratosperma* in apple bark medium and detached branch

细胞壁降解酶 Cell wall degrading enzyme	树皮培养基/(mU/mL) Apple bark medium		苹果离体枝条/(U/mg) Apple detached branch	
	菌株 Strain	菌株 Strain	菌株 Strain	菌株 Strain
	LXS080601	LXS081601	LXS080601	LXS081601
Cx	96.81	77.32	78.24	63.29
β-glucosidase	102.43	60.78	152.23	114.07
PMG	262.34	315.84	184.36	295.51
PG	393.51	215.04	281.24	252.64
Xylanase	538.36	486.59	451.33	447.93
PGTE	0.00	0.00	0.00	0.00
PMTE	0.00	0.00	0.00	0.00

2.2 初始接种体对细胞壁降解酶体外诱导效果的影响

以强致病力菌株 LXS080601 的菌丝和分生孢子分别接种添加树皮和木聚糖的液体培养基,以细

胞壁降解酶的最大活性水平和相应测定时间评价其体外诱导效果。表 2 结果显示,LXS080601 菌饼和分生孢子接种不同碳源的培养基均可诱导产生 5 种细胞壁降解酶,但其最大酶活性水平存在显著差异,

表 2 初始接种体对苹果树腐烂病菌细胞壁降解酶活性的影响

Tab.2 The effect of initial inoculants on maximal activities of cell wall-degrading enzymes produced by *Valsa ceratosperma* isolate LXS080601

细胞壁降解酶 Cell wall degrading enzyme	树皮培养基 Apple bark medium				木聚糖培养基 Xylan medium			
	菌饼 Mycelia plug		孢子悬浮液 Spores suspension		菌饼 Mycelia plug		孢子悬浮液 Spores suspension	
	Maximum	Date	Maximum	Date	Maximum	Date	Maximum	Date
Cx	89.65 <sup>A</sup> a	(3)	33.12 b	(2)	93.49 a	(7)	68.03 b	(3)
β-glucosidase	118.10 a	(3)	107.38 a	(7)	101.11 a	(3)	38.96 b	(3)
PMG	309.48 a	(3)	196.75 b	(6)	167.08 a	(3)	87.85 b	(3)
PG	364.67 a	(3)	154.57 b	(5)	140.99 a	(5)	98.59 b	(5)
Xylanase	561.36 a	(3)	374.52 b	(7)	873.13 a	(11)	584.00 b	(17)

注:以相同处理的同一种酶进行 2 个接种状态之间差异的比较分析(Tukey test 法),相同字母表示差异不显著( $P > 0.05$ );<sup>A</sup>.最大酶活性及相应测定时间。

Note: Levels of each enzyme activity in the same treatment tagged with the same letter are not significantly different ( $P > 0.05$ ) using the Tukey test;  
<sup>A</sup>. The maximal enzyme activities (mU/mL) were detected on the day given in brackets.

菌饼作为初始接种体产生的酶活性较高,其在树皮为碳源的培养基中产生的 Cx 活性相比分生孢子接种提高了 2.71 倍,在木聚糖为碳源的培养基中产生的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性提高了 2.60 倍。此外,酶活性达到高峰的时间也存在一定差异,接种病菌分生孢子产生的细胞壁降解酶除 Cx 外,其余 4 种酶达到活性高峰的时间普遍较晚。因此,选择菌丝作为腐烂病菌体外诱导细胞壁降解酶的初始接种体进行深入研究。

### 2.3 不同碳源培养条件下腐烂病菌产生细胞壁降解酶的活性比较

在 5 种碳源培养条件下,苹果树腐烂病菌 LXS080601 均能产生 Cx、PMG、PG、木聚糖酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶,但在不同碳源的培养基中酶活性存在一定差异,且达到最大酶活性水平的时间不同(表 3)。

表 3 不同碳源培养条件下苹果树腐烂病菌产生细胞壁降解酶的活性

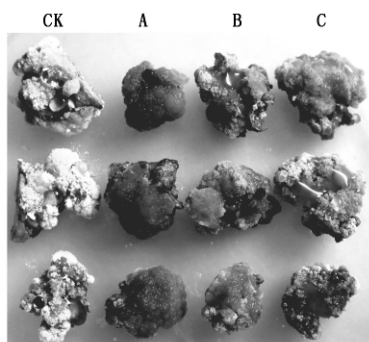
Tab.3 Maximal activities of cell wall-degrading enzymes produced by *Valsa ceratosperma* isolate LXS080601 grown on five media differing in carbon sources

培养基 Medium	Cx		$\beta$ -glucosidase		PMG		PG		Xylanase	
	Maximum	Date	Maximum	Date	Maximum	Date	Maximum	Date	Maximum	Date
Apple bark	89.84 A c	(3)	106.27 c	(3)	279.57 b	(3)	389.22 b	(3)	581.87 b	(3)
Sucrose	134.62 b	(15)	133.41 b	(15)	272.56 b	(11)	318.21 c	(13)	422.05 c	(15)
Xylan	69.69 d	(7)	106.71 c	(3)	115.38 c	(3)	124.98 d	(5)	905.73 a	(11)
CMC	185.91 a	(13)	201.29 a	(13)	47.67 d	(6)	53.19 e	(6)	382.46 d	(17)
Pectin	70.09 d	(15)	64.77 d	(15)	672.91 a	(11)	634.26 a	(11)	56.00 e	(15)

注: 同列数字后不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ); A. 最大酶活性及相应测定时间。

Note: Levels of each enzyme activity in the same column tagged with the different letter are significantly different ( $P < 0.05$ ) using the Tukey test;

A. The maximal enzyme activities (mU/mL) were detected on the day given in brackets.



CK. 灭活酶液; A. 木聚糖诱导酶液; B. CMC 诱导酶液;

C. 橘皮果胶诱导酶液。

CK. Inactivated enzymes; A. Enzymes from xylan medium;

B. Enzymes from CMC medium; C. Enzymes from orange pectin.

图 1 腐烂病菌产生的细胞壁降解酶对苹果愈伤组织的浸解作用

Fig.1 The maceration on apple callus by cell wall-degrading enzymes produced by *Valsa ceratosperma* isolate LXS080601

### 2.4 腐烂病菌在活体外诱导产生细胞壁降解酶的浸解作用

以木聚糖、CMC 和橘皮果胶为碳源诱导产生的细胞壁降解酶,提纯后分别接种苹果愈伤组织,图 1

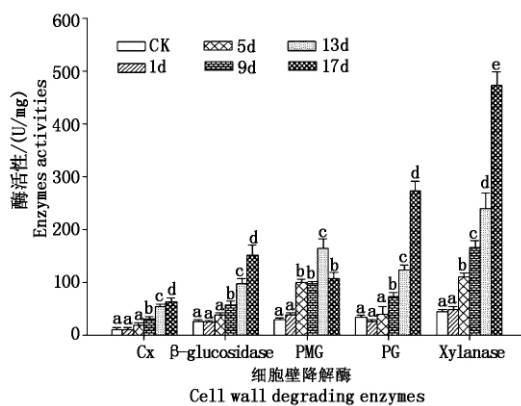
以苹果树皮和蔗糖为碳源时,菌株分泌的各种细胞壁降解酶活性均较高,但在树皮培养基中达到各酶活性高峰的时间仅为 3 d,而在蔗糖培养基中达到酶活性高峰至少需要 11 d 以上。在木聚糖培养基中,腐烂病菌产生的木聚糖酶活性为 905.73 mU/mL,明显高于其他 4 种酶,且显著高于其他培养基产生的木聚糖酶,同样,以橘皮果胶为碳源时产生的 PG 和 PMG 活性最高,分别为 634.26 mU/mL 和 672.91 mU/mL。Cx 和  $\beta$ -葡萄糖苷酶在 CMC 为碳源的培养基中活性最高为 181.91 mU/mL 和 201.29 mU/mL,但该培养基中腐烂病菌产生的木聚糖酶(382.46 mU/mL)比其他 4 种酶的活性高。以树皮为碳源的培养基中,Cx 活性最低,而木聚糖酶活性最高是 Cx 活性的 6.48 倍,蔗糖培养基中情况类似,木聚糖酶活性是  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的 3.16 倍。

结果显示,接种灭活酶液的对照在 72 h 内没有出现受害症状,愈伤组织始终保持健康生长状态,而 3 种不同处理的酶液均对愈伤组织有明显的浸解作用,但其破坏能力差异很大。木聚糖培养基中产生的细胞壁降解酶,纯化后得到的酶液接种愈伤组织后 24 h,即可观察到明显的组织褐化,接种 48 h 后组织出现水渍化症状,随后组织呈现出腐烂状(图 1-A); CMC 和橘皮果胶诱导的酶液接种愈伤组织 48 h 后,仅在接种点附近发现轻微的组织褐变,接种 72 h 时愈伤组织仅表现出局部水渍化(图 1-B, 1-C)。对接种植物愈伤组织的愈伤组织进行测定,均可检测到相应还原糖。

### 2.5 腐烂病菌在寄主内产生细胞壁降解酶的活性变化规律

苹果离体枝条接种腐烂病菌 3 ~ 5 d 后可观察到发病症状,随后病斑不断扩展,于接种后定期取样,测定寄主体内细胞壁降解酶活性的变化(图 2)。健康离体枝条中 5 种细胞壁降解酶的活性变化不显著,但接种腐烂病菌后第 9 天寄主体内 Cx、PG 和  $\beta$ -

葡萄糖苷酶活性开始显著升高,木聚糖酶和 PMG 在接种后第 5 天酶活性相比对照已显著升高。PMG 酶活性变化呈现出先升高后下降的趋势,在接种后第 13 天达到活性高峰(165.07 U/mg total proteins),随后酶活性降低;其余 4 种细胞壁降解酶活性随接种天数的增加活性不断增强,在接种后第 17 天活性达到高峰,其中 Cx 酶活性增加较缓慢,最大酶活性仅为 63.64 U/mg total proteins, $\beta$ -葡萄糖苷酶最大活性与 PMG 相当,为 151.94 U/mg total proteins,而木聚糖酶活性最高,达到了 473.72 U/mg total proteins,PG 酶最大活性次之,为 272.82 U/mg total proteins。



CK. 健康苹果枝条; 1 ~ 17 d. 接种后天数。  
CK. Healthy apple branches; 1 ~ 17 d. Days post-inoculation.

图 2 腐烂病菌在苹果离体枝条中  
产生细胞壁降解酶的活性变化

Fig. 2 Time course of enzyme activities in detached apple branches inoculated by *Valsa ceratosperma* isolate LXS080601

### 3 讨论

目前,对于苹果树腐烂病菌生化致病机理的研究,主要集中在细胞壁降解酶和毒素上。早在 20 世纪 80 年代,日本学者已证实,腐烂病菌可产生 5 种类型的毒素:间苯三酚、对羟基苯丙酸、对羟基苯乙酮、对羟基苯甲酸和原儿茶酸,但有关其细胞壁降解酶的研究仅局限于检测到果胶酶的存在<sup>[10-11,16-17]</sup>。本研究证实,腐烂病菌在活体外和寄主体内均能分泌一系列的细胞壁降解酶,分别为木聚糖酶、PG、PMG、Cx 和  $\beta$ -葡萄糖苷酶,该结果对于揭示腐烂病菌的侵染致病机制有重要意义。

苹果树腐烂病菌不论在寄主体内,还是在以树皮和蔗糖为碳源的培养基中,产生的木聚糖酶活性均最高,且发病离体枝条中该酶首先被检测到活性显著升高,此外,以木聚糖为碳源诱导的细胞壁降解酶对苹果愈伤组织的浸解能力最强,上述结果暗示,

木聚糖酶在腐烂病菌侵染致病中发挥重要作用。目前,已研究发现,多种病原菌分泌的木聚糖酶与其致病力密切相关。小麦颖枯病菌(*Septoria nodorum*)分泌的木聚糖酶活性显著高于其他几种细胞壁降解酶<sup>[18]</sup>; Siah 等<sup>[15]</sup>研究证实,小麦壳针孢菌(*Mycosphaerella graminicola*)不同菌株间的致病力差异与其分泌的木聚糖酶密切相关,木聚糖酶活性越高其菌株侵染致病能力越强; Bitro 等<sup>[19]</sup>构建了灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)木聚糖酶基因 *xyn11A* 缺失突变体,发现其对番茄和葡萄浆果的致病力降低了 70%,从而证实木聚糖酶是该病原菌的重要致病因子。

腐烂病菌在不同碳源培养条件下,均能产生上述 5 种细胞壁降解酶,但其酶活性水平和达到酶活性高峰的时间存在明显差异。以树皮为碳源时培养 3 d 即可达到最大酶活性水平,而以蔗糖为碳源则需 11 d 以上,表明苹果树皮组织对腐烂病菌细胞壁降解酶的产生有促进作用。以橘皮果胶为碳源时,产生的 PG 和 PMG 活性明显高于其他酶,在木聚糖培养基中,产生的木聚糖酶活性最高,且 CMC 对 Cx 和  $\beta$ -葡萄糖苷酶的诱导效果优于其他碳源,这可能与相应酶有最合适的底物特异性有关。对病原菌活体外产生的细胞壁降解酶活性进行分析时,多考虑温度、pH 值、底物浓度等对酶活性的影响<sup>[20]</sup>,但本研究发现在相同碳源培养基中,初始接种体可显著影响腐烂病菌细胞壁降解酶的诱导效果,以菌丝接种产生的细胞壁降解酶活性明显高于分生孢子接种,且达到最大酶活性高峰的时间普遍较短,而其他病原菌是否存在类似现象尚未见报道。

本研究分析了腐烂病菌产生的细胞壁降解酶在苹果离体枝条中的动态变化,在发病组织中首先检测到 PMG 和木聚糖酶的活性显著升高,表明这 2 种酶可能在腐烂病菌致病过程中最先发挥作用;除 PMG 外,其他几种细胞壁降解酶均随接种天数的增加活性持续升高,而木聚糖酶的活性最强,PG 酶活性次之,推测其在病斑扩展过程中起主要作用。由于苹果树腐烂病菌的生化致病机制非常复杂,至少有多种毒素和细胞壁降解酶的参与,但究竟以哪一种因子为主,各种因子间如何协调作用等,有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 陈 策. 苹果树腐烂病发生规律和防治研究 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社 2009: 9 - 17.
- [2] 陈 策, 李美娜, 史秀琴, 等. 苹果树腐烂病 (*Valsa mali* Miyabe et Yamada) 侵染时期的研究 [J]. 植物病理学报, 1987, 17(2): 65 - 68.

- [3] 曹克强, 国立耘, 李保华, 等. 中国苹果树腐烂病发生和防治情况调查 [J]. 植物保护, 2009, 35(2): 114 – 117.
- [4] 赵增锋, 曹克强. 苹果树腐烂病流行分析及防治建 [J]. 中国果树, 2011(1): 61 – 63.
- [5] Wang X L, Wei J L, Huang L L, *et al.* Reevaluation of pathogens causing Valsa canker on apple in China [J]. Mycologia, 2010, DOI: 10.3852/09 – 165.
- [6] Hématy K, Cherk C, Somerville S. Host-pathogen warfare at the plant cell wall [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2009, 12: 406 – 413.
- [7] Cantu D, Vicente A R, Labavitch J M, *et al.* Strangers in the matrix: plant cell walls and pathogen susceptibility [J]. Trends in Plant Science, 2008, 13(11): 610 – 617.
- [8] Brito N, Espino J J, González C. The Endo- $\beta$ -1,4-Xylanase Xyn11A is required for virulence in *Botrytis cinerea* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2006, 19(1): 25 – 32.
- [9] Gómez-Gómez E, Ruíz-Roldán M C, Pietro A D, *et al.* Role in Pathogenesis of two endo- $\beta$ -1,4-xylanase genes from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* [J]. Fungal Genetics and Biology, 2002, 35: 213 – 222.
- [10] 刘福昌, 李美娜, 王永淦. 苹果树腐烂病菌致病因素 – 果胶酶的初步探讨 [J]. 中国果树, 1980(4): 45 – 48.
- [11] 王娟, 马强, 庄霞, 等. 苹果树腐烂病病原菌分泌物中果胶酶的测定 [J]. 内蒙古农业科技, 2009(4): 39 – 40.
- [12] DiPietro A, Roncero M. Endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici: Purification, characterization, and production during infection of tomato plants [J]. Phytopathology, 1996, 86(12): 1324 – 1330.
- [13] 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, 2001, 30(1): 13 – 18.
- [14] Douaiher M N, Nowak E, Durand R, *et al.* Correlative analysis of *Mycosphaerella graminicola* pathogenicity and cell wall degrading enzymes produced in vitro: the importance of xylanases and polygalacturonases [J]. Plant Pathology, 2007, 56: 79 – 86.
- [15] Siah A, Deweera C, Duymec F, *et al.* Correlation of in planta endo- $\beta$ -1,4-xylanase activity with the necrotrophic phase of the hemibiotrophic fungus *Mycosphaerella graminicola* [J]. Plant Pathology, 2010, 59: 661 – 670.
- [16] Koganezawa H, Sakuma T. Possible role of breakdown products of phloridzin in symptom development by *Valsa ceratosperma* [J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 1982, 48: 521 – 528.
- [17] Natsume H, Seto H, Ōtake N. Studies on apple canker disease. The necrotic toxins produced by *Valsa ceratosperma* [J]. Agriculture Biology Chemistry, 1982, 46(8): 2101 – 2106.
- [18] Lalaoui F, Halamal P, Dumortier V, *et al.* Cell wall-degrading enzymes produced in vitro by isolates of *Phaeosphaeria nodorum* differing in aggressiveness [J]. Plant Pathology, 2000, 49: 727 – 33.
- [19] Brito N, Espino J J, González C. The Endo- $\beta$ -1,4-Xylanase Xyn11A is required for virulence in *Botrytis cinerea* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2006, 19(1): 25 – 32.
- [20] 高增贵, 陈捷, 高洪敏, 等. 玉米茎腐病菌产生的细胞壁降解酶种类及其活性分析 [J]. 植物病理学报, 2000, 30(2): 148 – 152.