

冯越, 张美红, 李笑影, 等. 柑橘采后病原菌意大利青霉 *PacC* 基因的克隆及表达分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(4): 145–152. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060169

FENG Yue, ZHANG Meihong, LI Xiaoying, et al. Cloning and Expression Analysis of *PacC* from *Penicillium italicum* of Citrus Fruits Postharvest Pathogen[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(4): 145–152. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060169

· 生物工程 ·

柑橘采后病原菌意大利青霉 *PacC* 基因的克隆及表达分析

冯 越, 张美红, 李笑影, 李倩如, 彭丽桃*
(华中农业大学食品科技学院, 湖北武汉 430070)

摘 要: 为初步分析柑橘采后病原菌意大利青霉 (*Penicillium italicum*) pH 信号传导途径中转录因子 *PacC* 的功能特性, 克隆了 *PacC* 基因并对其进行生物信息学和表达模式分析。结果表明: *PacC* 基因全长 1921 bp, 有 1 个内含子, 编码蛋白质的氨基酸数量为 636 个, 共包含 3 个转录因子典型的锌指蛋白结构域。进化树分析显示, *PacC* 与指状青霉 (*Penicillium digitatum*) 和产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*) 亲缘关系较近。离体培养条件下 *PacC* 在意大利青霉生长中稳定表达; 培养基 pH 影响意大利青霉生长与 *PacC* 表达, 酸性条件下表达量显著下调 ($P<0.05$), 碱性条件下表达量显著上调 ($P<0.05$); 碳源条件影响该基因表达, 葡萄糖饥饿和回补均显著提高 *PacC* 表达 ($P<0.05$); 低浓度蔗糖引起培养液 pH 碱化, 显著刺激 *PacC* 表达 ($P<0.05$), 高浓度蔗糖引起培养液 pH 酸化, *PacC* 表达逐渐下调 ($P<0.05$)。活体结果表明, 不同品种柑橘果实接种意大利青霉会导致果皮 pH 下降; 接种初始 pH 影响意大利青霉的致病力, *PacC* 在侵染柑橘果实期间表达较为稳定。这些结果表明, 环境 pH 和碳源供应均能影响意大利青霉 *PacC* 表达, 影响意大利青霉的致病性。

关键词: 柑橘, 意大利青霉, *PacC*, pH 信号通路, 生物信息学分析, 致病力

中图分类号: TS255.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)04-0145-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060169



本文网刊:

Cloning and Expression Analysis of *PacC* from *Penicillium italicum* of Citrus Fruits Postharvest Pathogen

FENG Yue, ZHANG Meihong, LI Xiaoying, LI Qianru, PENG Litao*

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: In order to analyze the function of *PacC*, a pH-signaling transcription factor of *Penicillium italicum*, which was a postharvest pathogen of citrus fruits. The gene had 1921 bp cDNA and an intron, which encoded 636 amino acids and contains three typical zinc finger domains of transcription factors. Phylogenetic tree analysis showed that the *PacC* was clustered with *Penicillium digitatum* and *Penicillium chrysogenum*. *In vitro* test, the *PacC* gene was stably expressed during the growth of *P.italicum*. The pH of the medium affected the growth of *P.italicum* and the expression level of *PacC*, and the expression level was significantly down-regulated under acidic conditions ($P<0.05$), but significantly up-regulated under alkaline conditions ($P<0.05$). Carbon source conditions affected the expression of *PacC*. The expression of *PacC* was significantly increased by glucose starvation and supplementation ($P<0.05$). The pH alkalization of the medium was caused by low concentration sucrose, which significantly stimulated the expression of *PacC* ($P<0.05$), while the pH acidification of the medium was caused by high concentration sucrose, which gradually decreased the expression of *PacC* ($P<0.05$). *In vivo* test, the inoculation of different citrus varieties with *P.italicum* would lead to the decrease of citrus peel, and the initial pH of inoculation had an important effect on the pathogenicity of *P.italicum*. The *PacC* gene was stably expressed throughout

收稿日期: 2021-06-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31871850)。

作者简介: 冯越 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 果蔬贮藏保鲜, E-mail: 1115083246@qq.com。

* 通信作者: 彭丽桃 (1974-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 果蔬贮藏保鲜, E-mail: penglt12@mail.hzau.edu.cn。

the infection process of *P.italicum* on citrus. These results indicated that both environmental pH and carbon source could affect the expression of *PacC* and the pathogenicity of *P.italicum*.

Key words: citrus fruits; *Penicillium italicum*; *PacC*; pH-signaling transcription factor; bioinformatics analyses; virulence

由意大利青霉(*Penicillium italicum*)和指状青霉(*Penicillium digitatum*)引起的青绿霉病害,通常造成柑橘采后总损失的 90%^[1]。意大利青霉较耐低温^[2],因此在低温贮藏期间更易发病,由意大利青霉引发的青霉病害在全世界可造成柑橘采后损失的 10%~30%^[3-4]。化学杀菌剂是预防和控制采后柑橘病害的常用方法^[5],近年来,随着人们对化学农药的日益关注,以及大量使用化学农药会导致病原菌的抗药性显著增强^[6],引发食品安全和环境污染的风险,生产上需要安全有效的替代病害控制方法^[7]。深入研究意大利青霉与柑橘果实采后贮藏期间的相互作用对于防治青霉病具有重要意义^[8]。

研究表明,环境 pH 会影响真菌的生长发育和代谢功能^[9]。为了适应各种复杂严酷的生长环境,真菌存在一套响应和适应环境 pH 变化的机制^[10-11]。目前已经对构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中的 pH 响应机制进行了充分研究,此机制命名为 PAL/RIM^[12]。PAL/RIM 已被确定由 6 个 Pal 蛋白 PalA、PalB、PalC、PalF、PalH、PalI 及关键转录因子 *PacC* 构成^[13]。真菌在感受环境 pH 后, PAL/RIM 通过信号传导,激活关键转录因子 *PacC*,从而对环境 pH 做出响应^[14]。

PacC 被广泛报道在许多病原菌中起着正向调节作用。在核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)和指状青霉中^[15], *PacC* 缺失可以延缓病原菌的生长、降低病原菌的致病力以及减少次生代谢产物合成。在赭曲霉(*Aspergillus ochraceus*)中, *PacC* 缺失对其生长、分生孢子形成和萌发、菌丝形态会产生影响^[9]。*PacC* 也被报道在尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)^[16]和禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)^[17]致病力中起着负调节作用。表明 *PacC* 有一个复杂的调控网络来控制不同真菌病原体的致病力。关于 *PacC* 在意大利青霉中的具体功能未见报道。本试验克隆意大利青霉 *PacC* 基因,观察了 *PacC* 在酸碱处理、葡萄糖饥饿及回补、极限碳浓度诱导等条件下和致病过程中的表达规律,并研究了意大利青霉致病力与环境 pH 的

关系,为进一步研究该基因在意大利青霉与柑橘果实互作中的调控作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

意大利青霉(*Penicillium italicum*)菌株 P-5 从自然发病柑橘果实上分离,接种表现出典型的青霉病症状,经进一步鉴定后, PDA 培养基中保存; PDA、PDB、LB 培养基 实验室自制;脐橙、冰糖橙、皇帝柑等橙子 均购于湖北省武汉市洪山区华中农业大学农贸市场;胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒、真菌 RNA 抽提试剂盒 上海生工有限公司;荧光定量 PCR 试剂盒、DNA Marker、Ex Taq 聚合酶、T4 连接酶 宝生物工程(大连)有限公司;HiScript® II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)反转录试剂盒 南京诺唯赞生物科技有限公司。

qTOWER2.2 实时定量 PCR 仪 德国耶拿分析仪器股份有限公司;Gel Doc XR+凝胶成像仪 美国伯乐 Bio-Rad 公司;SHZ-82A 气浴恒温振荡箱 金坛市宏华仪器厂;YXQ-LS-18SI 手提式压力蒸汽灭菌器 上海博讯实业有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 *PacC* 基因的克隆 从 GenBank 上分别下载 *Penicillium digitatum*(GenBank 登录号: XP014537353.1)、*Penicillium chrysogenum*(GenBank 登录号: NW003020078.1)、*Aspergillus niger*(GenBank 登录号: AAA32690.1)和 *Penicillium decumbens*(GenBank 登录号: AGY46356.1)的 *PacC* 同源序列,并用 DNAMAN 软件进行多序列比对,获得 *PacC* 基因及其上、下游序列,将其分为 A、B、C、D 四段,每段之间设有重叠区域以确保结果可信度,使用 Primer Preimer5 软件设计引物,见表 1。

用真菌 RNA 抽提试剂盒提取意大利青霉的 RNA,以提取的 RNA 为模板用 HiScript® II Q RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)反转录试剂盒反转录得到 cDNA,操作均参照试剂盒说明书,以合成的 cDNA 为模板, *PacC*-U-F/*PacC*-U-R、*PacC*-1-F/*PacC*-1-R、*PacC*-2-F/*PacC*-2-R、*PacC*-D-F/*PacC*-D-

表 1 PCR 扩增所用引物序列

Table 1 Primer sequences used for PCR amplification

引物名称	引物序列	引物名称	引物序列
PacC-U-F	TTCGGCTGGCTAAGCCAATG	PacC-D-F	CCTGGGTTGAGAAGGTCC
PacC-U-R	AATACCGCTTTGCTAAGCCTGG	PacC-D-R	ATGGCGTATGTTGGGTG
PacC-1-F	CGGTCTTGGTCTTCTGGT	Actin-F	CATTGAGCACGGTGTGTCTCA
PacC-1-R	CGGCATAGGAGTTAGGGTC	Actin-R	CTGGGTCTCTTCTCACGGT
PacC-2-F	CCTATCAATGGCATCAACG	Q-PacC-F	CGCAAAGCACCAACAACCT
PacC-2-R	GACGGACCTTCTCAACCC	Q-PacC-R	CTTCAAATCTGGGGACGCT

R(表 1)为引物对 A、B、C、D 四个片段进行 PCR 扩增,并进行电泳检测。PCR 扩增反应体系为: Ex Taq 聚合酶 0.1 μL , 2.5 mmol/L dNTP Mixture 1.6 μL , 10 $\times$ PCR Buffer 2 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各 1 μL , cDNA 1 μL , 双蒸水补足体积至 10 μL 。反应程序为: 预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 退火 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s/kb, 30 个循环; 保温 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。将扩增得到的四个片段进行纯化回收,送至上海生工生物技术公司进行测序。将测序结果使用软件 Seqman 进行拼接,得到意大利青霉的 *PacC* 基因及其上下游序列。

1.2.2 *PacC* 基因的生物信息学分析 对 *PacC* 基因上游序列进行启动子区域和顺式调控元件预测 (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html; <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)。利用 MEGA7.0 软件进行 *PacC* 蛋白的系统进化树构建,并对其相关结构域进行预测(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)。

1.2.3 *PacC* 基因的定量表达分析

1.2.3.1 菌龄对意大利青霉生长过程中 *PacC* 基因表达的影响 参考范明等^[18]的方法,取在 PDA 培养基上的意大利青霉孢子,制备 1×10^6 CFU/mL 孢子菌悬液,并涂布于含玻璃纸的 PDA 培养基上,于 26 $^{\circ}\text{C}$ 培养,分别取培养 2、4、6、8、10 和 12 d 的菌丝,液氮速冻后-80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2.3.2 酸碱处理对意大利青霉生长和 *PacC* 基因表达的影响 参考 Yang 等^[19]的方法,略有修改。取 200 μL 孢子悬液均匀涂布于 25 mL PDA 培养基中,待长出白色的幼嫩的菌丝后,用 1 cm 的打孔器打取菌饼,反贴于含 20 mL 不同 pH 的 PDA 培养基的培养皿中,5 d 后观察并通过十字交叉法测量菌落直径。

参考范明等^[18]的方法,将孢子悬液于 PDB 培养基中,于 26 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床中 120 r/min 培养 2 d,过滤收集菌丝。称取 1.60 g 湿菌丝,移至不同 pH 的 PDB 培养基中继续培养 24 h。以 pH6 的 PDB 培养的菌丝作空白对照,收集菌丝,液氮速冻后-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.3.3 葡萄糖饥饿和回补对意大利青霉 *PacC* 基因表达的影响 按照 1.2.3.2 的方法培养并收集菌丝,参考范明等^[18]的方法,取 8.00 g 湿菌丝于 500 mL 锥形瓶中,加入 300 mL 50 mmol/L KCl 溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 饥饿 24 h,收集菌丝液氮速冻后-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。取饥饿 24 h 的菌丝过滤并冲洗,取 1.00 g 湿菌丝重悬于 20 mL 10%(w/v)葡萄糖溶液中进行回补,收集菌丝液氮速冻后-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.3.4 蔗糖浓度对意大利青霉生长过程中的 pH 和 *PacC* 基因表达的影响 按照 1.2.3.2 的方法培养并收集菌丝,取 2.00 g 湿菌丝,分别置于蔗糖浓度为 5、15、25、50、100、175 mmol/L 的培养基中,继续在

摇床振荡培养,每隔 24 h 吸取培养基上清液测量其 pH。用于 RNA 提取的样品,液氮速冻后-80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

以意大利青霉肌动蛋白基因(β -Actin)作为内参基因,检测在不同条件下 *PacC* 基因在转录水平上的相对表达量。收集各时间段的菌丝,提取总 RNA,反转录后通过 qRT-PCR 检测 *PacC* 的表达水平。qRT-PCR 反应体系为: SYBR Green PCR Master Mix 5 μL , 不同样本的 cDNA 1 μL , 上下游引物(β -Actin 引物: Actin-F/R; *PacC* 引物: Q-PacC-F/R, 见表 1) 10 $\mu\text{mol/L}$ 1 μL , 双蒸水补足体积至 10 μL 。反应程序为: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 延伸 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环收集荧光信号。每个样品三次重复,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式进行计算相关基因表达量。

1.2.4 环境 pH 与意大利青霉致病力的关系及侵染过程中 *PacC* 的表达分析

1.2.4.1 意大利青霉对不同柑橘品种果皮 pH 的影响

新鲜橙子在体积分数 0.1% 次氯酸钠溶液中浸泡 2 min, 蒸馏水冲洗 2 次晾干。用针刺在果实表面扎出深度为 0.2 cm 左右的孔。接种 10 μL 10^6 CFU/mL 孢悬于伤口处, 26 $^{\circ}\text{C}$ 放置。每隔 24 h 拿出 3 个品种的果实, 无菌刀片取样, 无菌研磨机研磨, 12000 $\times$ g 离心 5 min, 吸取上清液, 测果皮的 pH。

1.2.4.2 环境 pH 对意大利青霉致病力的影响 配制不同 pH 的溶液, 然后接种青霉至不同 pH 的溶液之中, 配成 1×10^6 CFU/mL 的孢悬。按上述条件处理脐橙并接种, 以无菌水做对照, 每天观察, 并隔 24 h 补加一次之前加的菌液。

1.2.4.3 侵染过程中 *PacC* 的定量表达分析 按照王萌等^[8]的方法, 新鲜橙子在 0.1% 次氯酸钠溶液中浸泡 2 min, 并用蒸馏水冲洗。在果实腰部造伤, 深度约 3 mm。将意大利青霉菌丝饼反贴至果实伤口处, 然后放置于 26 $^{\circ}\text{C}$ 下, 分别于 5、8、11、14、17、20 d 收集病部组织, 并抽提 RNA, 反转录得到 cDNA。以 cDNA 为模板, 利用意大利青霉 β -Actin 和 *PacC* 引物进行半定量 PCR, 循环数设置为 26, 确保扩增处于对数期(β -Actin 引物: Actin-F/R; *PacC* 引物: Q-PacC-F/R, 见表 1)。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。对不同样品 cDNA 分别扩增 β -Actin 和 *PacC*, PCR 扩增产物在含有溴化乙锭的 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳, 并进行拍照。

1.3 数据处理

用 Excel 软件进行数据处理和作图, 所有数据均为 3 次重复所得, 分析采用 SPSS 23 软件对试验数据进行单因素方差分析, 应用最小显著差数(LSD)法检验差异显著性($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 *PacC* 基因的克隆及生物信息学分析

利用引物对以意大利青霉 cDNA 为模板, 将 *PacC* 及侧翼序列分成 A、B、C、D 四个片段进行扩

增, 片段之间有重叠区域, 扩增后经电泳进行验证, 将目的条带割胶回收并克隆测序(图 1)。将测序结果用软件 Seqman 进行拼接, 得到 *PacC* 基因完整序列及其上下游部分序列信息。

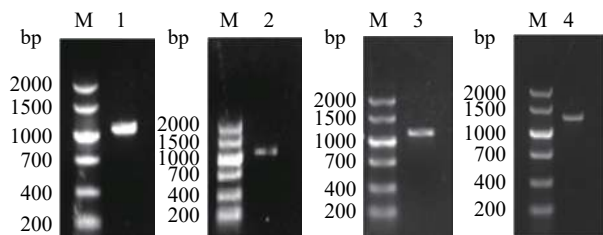


图 1 意大利青霉 *PacC* 序列的扩增

Fig.1 Amplification of *P. italicum PacC*

注: 1、2、3、4 分别代表 A 片段、B 片段、C 片段、D 片段 PCR 产物; M 表示 Marker。

意大利青霉菌基因组中只有单一的 *PacC* 基因, *PacC* 基因序列和 cDNA 开放阅读框(open reading frame, ORF)的大小为 1921 bp, 且编码蛋白质的氨基酸数量为 636 个。如图 2 所示, 预测 *PacC* 含有 3 个保守的 Cys₂His₂ 锌指蛋白结构域, 在 87~305 氨基酸之间有 1 个富含脯氨酸(PPPPPPP)的区域, 2 个 *PacC* 典型的 YPXL 基序, 3 个高度保守的区域, 在 192~400 氨基酸之间有一个 TFIIA 转录因子的区域, 它可以结合到启动子区域, 是基因表达所必需的通用转录起始因子。

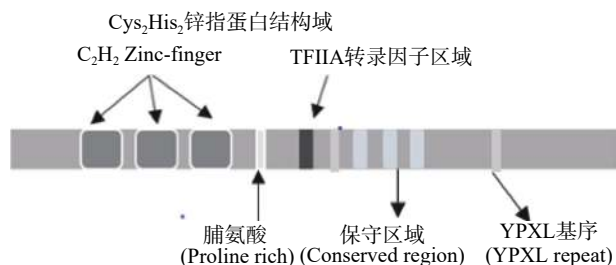


图 2 *PacC* 蛋白结构域

Fig.2 Protein domain of *PacC*

根据测序获得的 *PacC* 基因序列, 发现 *PacC* 上游序列片段大小为 1201 bp, 然后使用 BDGP 网址在线预测 *PacC* 基因的核心启动子, 预测结果显示该启动子可能位于 *PacC* 基因上游 101~801 bp, 并在基因上游序列可能含有 3 个 *PacC* 的 DNA 结合位点 5'-GCCARG-3', 表明 *PacC* 在不同条件通过积极调控自身的表达来适应各种环境条件。同时, 对部分顺式调控元件进行分析, 发现在该基因上游序列中, 存在核心启动子元件 TATA-box、增强子元件 CAAT-box, 从而增强基因转录的效率(图 3)。

将 *PacC* 序列进行蛋白比对, 对比结果发现, 意大利青霉 *PacC* 与指状青霉(*Penicillium digitatum*)和产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)的 *PacC* 的同源性较高, 其相似度达到 87.1% 以上。采用邻接法构建系统进化树, 发现意大利青霉 *PacC* 与指状青霉和产黄青霉亲缘关系近, 与白色念珠菌、尖孢镰刀菌



图 3 *PacC* 基因生物信息学分析

Fig.3 Bioinformatics analysis of *PacC*

注: 绿色表示假定的核心启动子区域; 划线部分表示顺式作用元件; 红色区域为假定的 *PiPacC* 基因 DNA 结合位点。

亲缘关系远(图 4)。

2.2 *PacC* 定量表达分析

2.2.1 生长过程中 *PacC* 基因的表达分析 对培养不同时间的意大利青霉 *PacC* 表达量进行了分析表明, *PacC* 在意大利青霉生长前期(2 和 4 d)、中期(6 和 8 d)、后期(10 和 12 d)表达量变化较为平缓且维持在较高表达水平(1.0 左右)。推测在意大利青霉生长过程中, *PacC* 维持意大利青霉生长所需的 pH, 从而维持意大利青霉生长所需的酸碱平衡(图 5)。

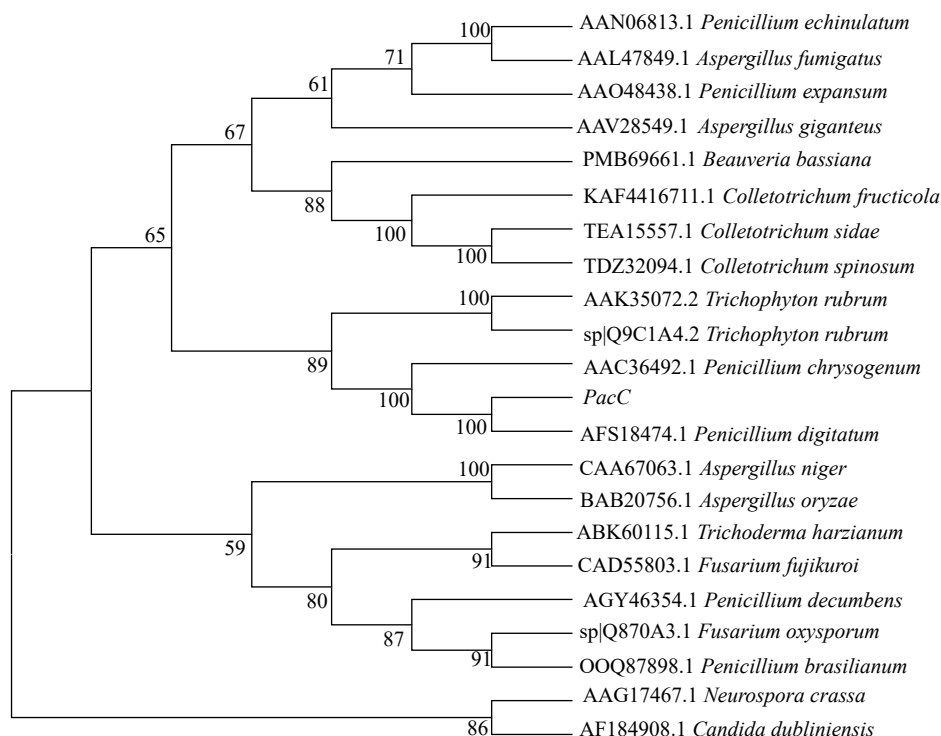
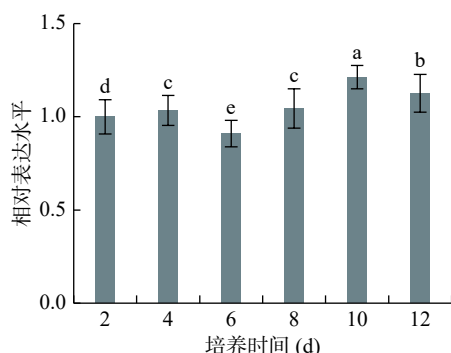
2.2.2 不同条件下 *PacC* 基因的表达分析

2.2.2.1 酸碱处理对 *PacC* 基因表达的影响 在菌丝生长过程中, 对照组(pH6)的菌饼直径均高于其他 pH 条件下的菌饼直径, 且弱碱条件(pH8)对意大利青霉菌丝生长的抑制高于弱酸条件(pH4), 表明环境 pH 对意大利青霉菌丝生长有显著影响($P < 0.05$), 碱性条件更能显著抑制意大利青霉的生长(图 6A~图 6B, $P < 0.05$)。进一步对环境 pH 调控因子 *PacC* 基因的表达进行分析, 发现 *PacC* 基因表达量在酸性条件下显著下调($P < 0.05$), 在碱性条件下显著增加($P < 0.05$), 表明 *PacC* 的表达依赖于环境 pH, 且 *PacC* 是一个碱性诱导基因(图 6C)。

2.2.2.2 葡萄糖饥饿和回补对 *PacC* 基因表达的影响

研究表明, 糖代谢信号传导途径可能影响 *PacC* 表达。Louw 等^[20] 研究发现由于成熟度不同的果实中糖的种类和含量不同, 病原菌对成熟度不同的果实感染时感染部位 pH 有所差异, 从而通过分泌小分子调节环境 pH, 这导致致病因子 *PacC* 上调。将意大利青霉菌丝进行葡萄糖饥饿及回补处理发现, 葡萄糖回补会使 *PacC* 基因的表达量显著上调($P < 0.05$), 且在回补 30 min 时 *PacC* 基因量上调为 2.46, 达到峰值, 这表明碳源(葡萄糖)通过分泌小分子会诱导意大利青霉 *PacC* 的表达(图 7)。

2.2.2.3 蔗糖浓度对意大利青霉生长过程中的 pH 及 *PacC* 表达的影响 为了进一步明确碳源对 *PacC* 表达的影响, 以蔗糖(水果中的主要糖)为主要碳源, 分析蔗糖浓度对意大利青霉生长过程中的 pH 调节

图 4 意大利青霉与其他物种 *PacC* 的系统进化树Fig.4 Phylogenetic tree of *PacC* from *P.italicum* and other species图 5 *PacC* 在意大利青霉生长中的表达分析Fig.5 Quantitative expression analysis of *PacC* during growth of *P. italicum*

注: 不同字母表示相同处理组间差异显著, $P < 0.05$; 图 6~图 9 同。

模式的影响, 结果发现(图 8A): 在不同蔗糖浓度下, 意大利青霉调节 pH 的模式不同。低蔗糖浓度下, 意大利青霉引起 pH 上升; 高蔗糖浓度下, 意大利青霉导致培养环境酸化, 如在 5 mmol/L 蔗糖条件下培养 96 h 后, 培养基 pH 上升到 7.89; 而在 175 mmol/L 蔗糖条件下, 培养基 pH 下降为 3.88。进而分析两种极端碳浓度下意大利青霉培养不同时间 *PacC* 基因的表达, 结果显示(图 8B): 在 5 mmol/L 蔗糖下, 随培养时间延长和培养基逐步碱化, *PacC* 的相对表达显著提高了 87.2 倍($P < 0.05$); 在 175 mmol/L 蔗糖下, 意大利青霉 *PacC* 的表达诱导作用较小。

2.3 环境 pH 与意大利青霉致病力的关系及侵染过程中 *PacC* 的表达分析

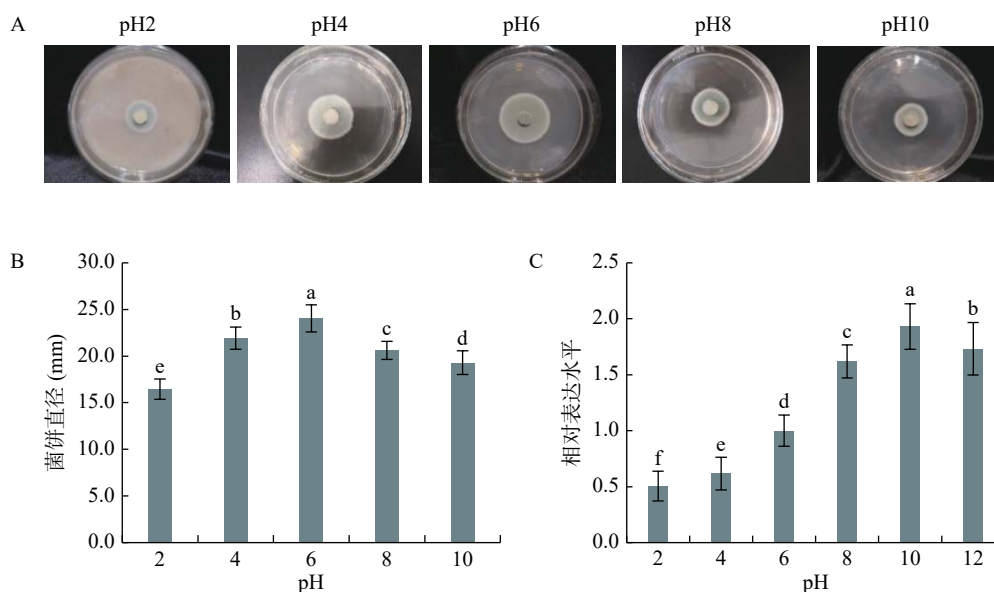
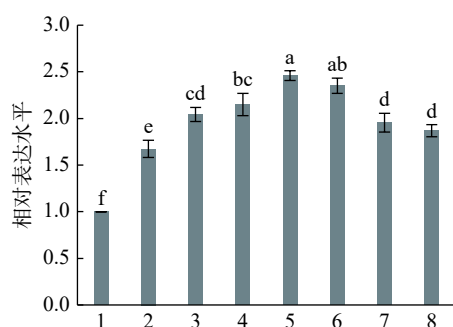
不同品种的柑橘果实, 接种处果皮 pH 均呈下降

趋势, 但果实发病部位 pH 的变化因品种不同有所差异, 皇帝柑的 pH 下降最快, 冰糖橙的 pH 下降偏慢(图 9A)。这表明, 意大利青霉侵染促使柑橘果皮 pH 下降。将不同 pH 下的意大利青霉孢子悬液接种脐橙, 10 d 后发现强酸强碱环境下(pH2 和 pH10)意大利青霉的致病力明显弱于其他 pH 环境。pH6 时意大利青霉的致病力最强且明显高于在弱酸弱碱环境中(pH4 和 pH8)的致病力(图 9B)。Peñalva 等^[21]研究发现病原菌在侵染宿主时会改变环境 pH, 从而激活 pH 转录因子 *PacC*, 以增强其致病力。从以上结果发现, 环境 pH 与意大利青霉致病力会相互影响, 故猜测可能与 *PacC* 有关。所以实验进一步观察侵染初期到侵染后期 *PacC* 的表达量, 发现 *PacC* 基因的表达较为稳定(图 9C~图 9D)。

3 讨论与结论

在田间收获、包装或运输过程中, 意大利青霉会通过果皮伤口侵染果实, 从而产生病害^[22]。在侵染过程中, 面对复杂多变的环境 pH 变化, 微生物必须迅速应对并及时调节以进行最适生长。目前在许多病原菌中存在一套响应和适应环境 pH 变化的机制, 这个机制通常由 PAL/RIM 全局调控。PAL/RIM 机制中的关键转录因子 *PacC* 在病原菌生长发育和致病力中有重要作用。

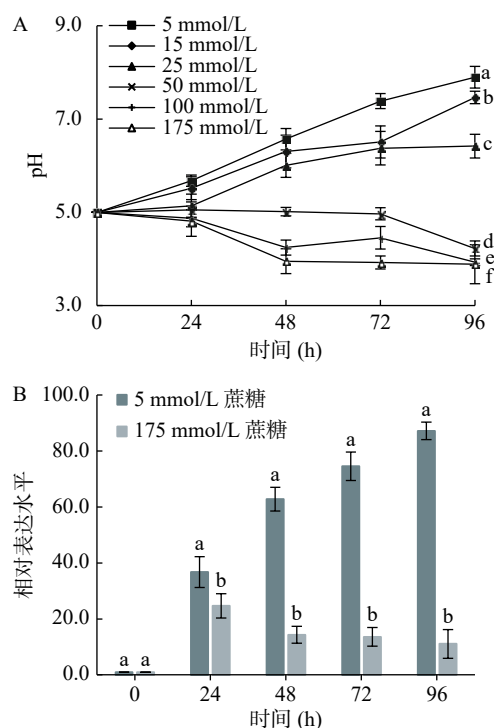
本试验成功克隆到意大利青霉 *PacC* 基因, 并对其生物信息学特性进行了初步分析。*PacC* 基因含有 3 个保守的 Cys₂His₂ 锌指蛋白结构域, 与指状青霉、构巢曲霉、酿酒酵母有相同的结构域^[12]。表明意大利青霉的 *PacC* 具有高度保守性和特异性, 且与其

图6 不同 pH 对意大利青霉生长及 *PacC* 基因表达的影响Fig.6 Effect of different pH value on growth of *P. italicum* and expression of *PacC* gene注: A: 菌落形态; B: 培养 5 d 后的菌饼直径; C: 不同 pH 下 *PacC* 基因的表达。图7 *PacC* 在葡萄糖饥饿和回补中的定量表达分析Fig.7 Quantitative expression analysis of *PacC* in glucoses starvation and supplementation

注: 1: 用于饥饿处理的菌丝; 2: 饥饿 24 h 的菌丝; 3~8: 回补 10、20、30、40、50、60 min 的菌丝。

他真菌中的 *PacC* 发挥着同样功能。研究表明 *PacC* 通过直接结合特定的 DNA 序列(5'-GCCARG-3')来调控基因表达^[23]。在酿酒酵母中, *PacC* 通过与自身启动子区域结合进行自我抑制调控^[24]。在意大利青霉 *PacC* 基因上游序列发现 3 个 *PacC* 的结合位点, 进一步表明这种自我抑制调控的可能性。

研究表明, *PacC* 作为环境 pH 的调节因子, 对微生物的生命活动起到关键作用, 在细胞壁生物合成、稳态、氧化还原过程、水解酶活性、跨膜转运和与真菌毒力相关的基因调控中具有直接调控功能^[25]。*PacC* 缺失会导致灵芝^[26]、粉色面包菌(*Neurospora crassa*)^[27]、赭曲霉和球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)^[27]的生长速率变慢。本试验研究也发现 *PacC* 在意大利青霉菌丝生长的整个过程中维持较高表达水平, 表明 *PacC* 在意大利青霉生长过程中发挥着重要作用。在外界环境 pH 下, 不同基因在维持细胞外环境 pH 稳定的过程中发挥着不同作用^[18]。Luo 等^[28]

图8 蔗糖浓度对意大利青霉生长过程中的 pH 及 *PacC* 表达的影响Fig.8 Effects of sucrose levels on pH and expression of *PacC* during the growth of *P. italicum*注: A: 不同蔗糖浓度下培养基的 pH; B: 极端蔗糖浓度下 *PacC* 基因的表达。

研究表明 *PacC* 缺失会导致球孢白僵菌在碱性条件下生长速率变慢。Chen 等^[15]对扩展青霉(*Penicillium expansum*)的研究中也有同样发现。本试验也发现碱性条件对意大利青霉生长的抑制高于酸性条件, 表明 *PacC* 在碱性条件下发挥着重要调控作用。研究表明, 在趾间毛癣菌(*Trichophyton interdigitale*)

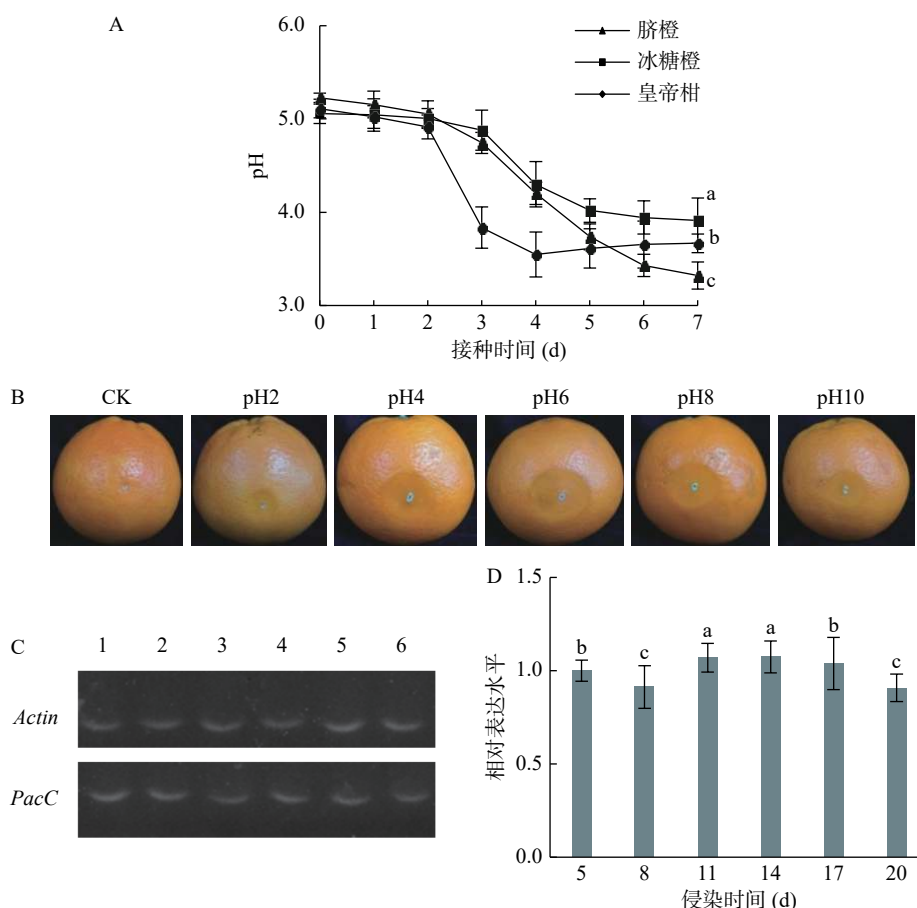


图9 pH与意大利青霉致病力的关系及在侵染过程中 *PacC* 表达

Fig.9 Relationship between pH and pathogenicity of *P.italicum* and expression of *PacC* during infection

注: A: 意大利青霉对不同柑橘品种 pH 的影响; B: 接种 10 d 后不同 pH 对意大利青霉致病力的影响; C~D: 不同侵染阶段 *PacC* 基因的半定量 PCR 和定量表达分析; 1、2、3、4、5、6 分别代表侵染 5、8、11、14、17 和 20 d。

中, *PacC* 表达与环境 pH 相关, 即酸性 pH 抑制 *PacC* 表达, 碱性 pH 诱导 *PacC* 表达^[14]。本研究也发现意大利青霉 *PacC* 在碱性条件下表达量显著上调, 表明 *PacC* 是一个碱性诱导基因。

研究发现, 病原菌可以通过碳浓度来调节致病菌分泌的小分子改变环境 pH, 从而导致 *PacC* 表达量发生变化^[29]。本试验研究发现意大利青霉经过葡萄糖回补处理, 导致 *PacC* 基因表达量上调, 推测碳源可能诱导了 *PacC* 表达。进一步以蔗糖为主要碳源, 发现意大利青霉对碳浓度的响应有所差异, 即在低碳浓度 (5 mmol/L) 下使培养基碱化, 高碳浓度 (175 mmol/L) 下使培养基酸化。分析极限碳浓度下 *PacC* 表达, 发现低碳浓度会诱导 *PacC* 的表达提高, 这个结果与 Bi 等^[29] 观察到低碳浓度诱导扩展青霉 *PacC* 表达提高 62.1 倍的结果一致, 表明 *PacC* 的表达与碳浓度有关。

病原菌与寄主互动过程中环境 pH 是影响病原菌致病力的重要因素, 这主要是环境 pH 调控因子 *PacC* 发挥作用。目前已发现 *PacC* 影响一些病原菌的致病力。汪汉成等^[30] 研究发现环境 pH 会严重影响烟草青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) 的致病力。本试验对意大利青霉和环境 pH 的关系进行研

究, 发现环境 pH 对意大利青霉的致病力有着重要影响, 且不同品种柑橘接种意大利青霉后会导致果皮 pH 下降。进一步观察了环境 pH 调控基因 *PacC* 在意大利青霉侵染柑橘过程中的表达, 发现 *PacC* 基因表达较为稳定, 表明 *PacC* 可能与意大利青霉致病性相关。

综上所述, *PacC* 对不同 pH 和碳源条件下意大利青霉的生长和致病力发挥重要调控作用, 进一步分析侵染过程中相关碳代谢重点基因与酸碱代谢的重点基因, 有助于深入认识 *PacC* 在意大利青霉致病过程中所起的作用。

参考文献

- [1] ZHANG Z F, ZHU Z R, MA Z H, et al. A molecular mechanism of azoxystrobin resistance in *Penicillium digitatum* UV mutants and a PCR-based assay for detection of azoxystrobin-resistant strains in packing or store-house isolates[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 131(23): 157-161.
- [2] ERASMUS A, LENNOX C L, KORSTEN L, et al. Imazalil resistance in *Penicillium digitatum* and *P. italicum* causing citrus postharvest green and blue mold: Impact and options[J]. Postharvest Biology and Technology, 2015, 107: 66-76.
- [3] CHEN C Y, QI W W, PENG X, et al. Inhibitory effect of 7-de-methoxytylophorine on *Penicillium italicum* and its possible mech-

- anism[J]. *Microorganisms*, 2019, 7(2): 36.
- [4] TANNOUS J, BARDA O, LUCIANO R D, et al. New insight into pathogenicity and secondary metabolism of the plant pathogen *Penicillium expansum* through deletion of the epigenetic reader SntB[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 610.
- [5] WANG M S, RUAN R X, LI H Y. The completed genome sequence of the pathogenic ascomycete fungus *Penicillium digitatum* [J]. *Genomics*, 2021, 113(2): 439–446.
- [6] FERNANDES T R, SEGORBE D, PRUSKY D, et al. How alkalization drives fungal pathogenicity[J]. *Plos Pathogens*, 2017, 13(11): e1006621.
- [7] VYLKOVA S. Environmental pH modulation by pathogenic fungi as a strategy to conquer the host[J]. *Plos Pathogens*, 2017, 13(2): e1006149.
- [8] 王萌, 杨书珍, 刘寒寒, 等. 柑橘采后病原菌意大利青霉 *creA* 基因的克隆及表达分析[J]. 华中农业大学学报, 2019(4): 45–54. [WANG M, YANG S Z, LIU H H, et al. Cloning and expression analysis of *creA* from *Penicillium italicum*, a postharvest pathogen of citrus fruits[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2019(4): 45–54.]
- [9] WANG Y, LIU F, WANG L Q, et al. pH-signaling transcription factor *AopacC* regulates ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(17): 4394–4401.
- [10] VIRGILIO S, BERTOLINI M C. Functional diversity in the pH signaling pathway: An overview of the pathway regulation in *Neurospora crassa* [J]. *Current Genetics*, 2018, 64(3): 529–534.
- [11] CERVANTES J A, SILVA G A, PLIEGO A R, et al. The *UMAG_00031* gene from *Ustilago maydis* encodes a putative membrane protein involved in pH control and morphogenesis[J]. *Archives of Microbiology*, 2020, 202(4): 2221–2232.
- [12] LAMB T M, MITCHELL A P. The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes *NRG1* and *SMP1* in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2003, 23(2): 677–686.
- [13] CERVANTES J A, RUIZ H J. Identification of a novel member of the pH responsive pathway Pal/Rim in *Ustilago maydis* [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2019, 59(1): 14–23.
- [14] da-SILVA L G, MARTINS M P, SANCHES P R, et al. Saline stress affects the pH-dependent regulation of the transcription factor PacC in the dermatophyte *Trichophyton interdigitale* [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2020, 51(4): 1585–1591.
- [15] CHEN Y, LI B Q, XU X D, et al. The pH-responsive PacC transcription factor plays pivotal roles in virulence and patulin biosynthesis in *Penicillium expansum* [J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(11): 4063–4078.
- [16] CARACUEL Z, CASANOVA C, RONCERO M, et al. pH response transcription factor PacC controls salt stress tolerance and expression of the P-Type Na⁺-ATPase Ena1 in *Fusarium oxysporum* [J]. *Eukaryotic Cell*, 2003, 2(6): 1246–1252.
- [17] MERHEJ J, RICHARD F, BARREAU C. The pH regulatory factor Pad1 regulates *Tri* gene expression and trichothecene production in *Fusarium graminearum* [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2011, 48(3): 275–284.
- [18] 范明, 彭丽桃, 闫等, 等. *VmaH* 和 *PMA* 在指状青霉中的表达及其作为潜在杀菌作用靶点的可能性[J]. *食品科学*, 2021, 42(6): 126–133. [FAN M, PENG L T, YAN D, et al. Expression of *VmaH* and *PMA* in *Penicillium digitatum* and their potentials as antimicrobial targets[J]. *Food Science*, 2021, 42(6): 126–133.]
- [19] YANG S Z, LIU L M, LI D M, et al. Use of active extracts of poplar buds against *Penicillium italicum* and possible modes of action[J]. *Food Chemistry*, 2016, 196: 610–618.
- [20] LOUW J P, KORSTEN L. Impact of ripeness on the infection and colonization of *Penicillium digitatum* and *P. expansum* on plum[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2019, 149: 148–158.
- [21] PENALVA M A, TILBURN J, BIGNELL E, et al. Ambient pH gene regulation in fungi: Making connections[J]. *Trends in Microbiology*, 2008, 16(6): 291–300.
- [22] FADDA A, SARAIS G, LAI C, et al. Control of postharvest diseases caused by *Penicillium* spp. with myrtle leaf phenolic extracts: *In vitro* and *in vivo* study on mandarin fruit during storage[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2021, 101(10): 4229–4240.
- [23] YAN H B, FANG T S, XU H H, et al. The pH-sensing Rim101 pathway positively regulates the transcriptional expression of the calcium pump gene *PMR1* to affect calcium sensitivity in budding yeast[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, 532(3): 453–458.
- [24] RASCLE C, DIERYCKX C, DUPUY J W. The pH regulator PacC: A host-dependent virulence factor in *Botrytis cinerea* [J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2018, 10(5): 555–568.
- [25] MARTINS M P, MARTINEZ N M, SANCHES P R, et al. The pH signaling transcription factor PAC-3 regulates metabolic and developmental processes in pathogenic fungi[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10(10): 2076.
- [26] WU F L, ZHANG G, REN A, et al. The pH-responsive transcription factor PacC regulates mycelial growth, fruiting body development, and ganoderic acid biosynthesis in *Ganoderma lucidum* [J]. *Mycologia*, 2016, 108(6): 1104–1113.
- [27] VIRGILIO S, CUPERTINO F B, BERNARDES N E, et al. Molecular components of the *Neurospora crassa* pH signaling pathway and their regulation by pH and the PAC-3 transcription factor[J]. *Plos One*, 2016, 11(8): e0161659.
- [28] LUO Z B, REN H. The PacC transcription factor regulates secondary metabolite production and stress response, but has only minor effects on virulence in the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana* [J]. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(2): 788–802.
- [29] 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.
- [30] 汪汉成, 郭华, 蔡琳, 等. 不同渗透压及 pH 环境对烟草青枯病菌致病力的影响[J]. 植物保护学报, 2019, 46(4): 754–761. [WANG H C, GUO H, CAI L, et al. Effects of different osmolality and pH conditions on the pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* in tobacco leaves[J]. *Journal of Plant Protection*, 2019, 46(4): 754–761.]