张雪, 韩笑, 武冉祥, 等. 指状青霉与柑橘果实互作中的乙烯释放规律及来源研究 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(17): 253−259. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025100005

ZHANG Xue, HAN Xiao, WU Ranxiang, et al. Ethylene Biosynthesis and Its Origins in the *Penicillium digitatum*-Citrus Interaction[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(17): 253−259. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025100005

·生物工程·

指状青霉与柑橘果实互作中的乙烯释放规律及来源研究

张　雪[1], 韩　笑[1,+], 武冉祥[1], 张津源[1], 杨佳丽[1,2,*]

（1.山西农业大学食品科学与工程学院, 山西晋中 030801;
2.山西省果蔬贮藏保鲜与加工技术创新中心, 山西晋中 030801）

摘　要: 为了系统探究指状青霉（*Penicillium digitatum*）与柑橘互作过程中的乙烯释放规律及其来源，本研究检测了指状青霉侵染过程中果实不同侵染区域（绿色孢子区，白色菌丝区，浸渍区和健康区）的乙烯释放量、1-氨基环丙烷-1-羧酸（1-aminocyclopr-opane-1-carboxylic acid，ACC）含量及 1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶（1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase，ACO）的基因表达水平；并利用植物乙烯合成抑制剂 *α*-（氨基氧基）乙酸（*α*-aminooxyacetic acid，AOA）、病原菌乙烯合成前体物质 *α*-酮戊二酸（*α*-ketoglutaric acid，*α*-KG）和 2-酮-4-甲硫基丁酸（2-keto-4-methylthiobutyric acid，KMBA）处理果实，监测侵染过程中的乙烯释放规律。结果显示，*P. digitatum* 侵染过程中乙烯释放量显著增加，并呈现先升后降的趋势，同时被侵染区域的乙烯含量均高于健康区，且绿色孢子区最高；利用 AOA 阻断柑橘乙烯合成后，侵染过程中的乙烯虽有减少但依然会不断产生；相较于健康区，绿色孢子区积累的 ACC 含量最高，且 *ACO1* 和 *ACO2* 基因表达几乎被抑制；KMBA 和 *α*-KG 处理不仅显著提升了乙烯释放量，还进一步加剧了病害发展。综上，*P. digitatum* 与柑橘互作中乙烯释放量显著增加，且不同侵染区域对乙烯合成的贡献存在差异，同时乙烯的释放来源可能与果实和病原菌两者均相关，尤其病原菌自身合成的乙烯在其致病过程中可能发挥重要作用，这为深入解析 *P. digitatum* 的侵染机制提供了新视角。

关键词: 采后病害, 柑橘果实, 病原菌, 乙烯合成, 乙烯前体

中图分类号: Q935　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)17−0253−07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025100005

本文网刊:

Ethylene Biosynthesis and Its Origins in the *Penicillium digitatum*-Citrus Interaction

ZHANG Xue[1], HAN Xiao[1,+], WU Ranxiang[1], ZHANG Jinyuan[1], YANG Jiali[1,2,*]

（1.College of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China;
2.Shanxi Provincial Technology Innovation Center for Fruit and Vegetable Storage, Preservation and Processing, Jinzhong 030801, China）

Abstract: To investigate the patterns and origins of ethylene release in *Penicillium digitatum*-citrus interaction, ethylene biosynthesis was analyzed both during the infection process and across distinct infection zones (green sporulation zone, white mycelial zone, macerated zone, and healthy zone) by gas chromatography. Additionally, the content of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and the expression levels of ACC oxidase genes (*ACO1* and *ACO2*) were measured in different infection zones. Citrus were treated with the plant ethylene biosynthesis inhibitor *α*-aminooxyacetic acid (AOA), as well as the fungal ethylene precursors *α*-ketoglutaric acid (*α*-KG) and 2-keto-4-methylthiobutyric acid (KMBA), to deter-

收稿日期: 2025−10−10　　+并列第一作者

基金项目: 山西省基础研究计划资助项目（20210302124070）; 国家自然科学基金项目（32302189）。

作者简介: 张雪（2001−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品贮藏与加工, E-mail: 207422961@qq.com。
韩笑（1997−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品贮藏与加工, E-mail: zx4262@163.com。

*** 通信作者:** 杨佳丽（1984−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 农产品贮藏与加工, E-mail: jiayang@sxau.edu.cn。

mine the ethylene level. The results showed that ethylene production significantly increased during *P. digitatum*-citrus interaction, characterized by an initial increase followed by a sharp decline. All infected zones accumulated significantly higher ethylene levels compared to the healthy zone, with the most pronounced accumulation in the green sporulation zone. Following the pharmacological inhibition of ethylene biosynthesis in citrus by AOA, ethylene production was partially suppressed. The highest ACC accumulation was observed in the green sporulation zone, while the expressions of *ACO1* and *ACO2* were nearly completely inhibited. Application of KMBA or α-KG resulted in markedly enhanced ethylene emission and accelerated disease development. In conclusion, ethylene production is significantly enhanced during the *P. digitatum*-citrus interaction, with varying contributions from different infection zones. Ethylene produced during infection originates from both the host fruit and the pathogen, with the fungal-derived ethylene functioning as a virulence factor. These findings provide new insights to understand the possible pathogenic mechanisms of *P. digitatum*.

Key words: postharvest decay; citrus fruit; pathogen; ethylene biosynthesis; ethylene precursors

乙烯是植物体内唯一的气态激素，不仅参与生长发育、成熟衰老等多个生理代谢过程，而且在植物应对生物和非生物胁迫的防御反应中也发挥着重要作用[1−3]。乙烯在植物与病原菌互作中的作用非常复杂，其既可以作为植物对病原菌侵染应答的信号分子之一，参与抗病反应，同时也可作为致病因子，促进植物病害的发生，这与植物与病原菌的种类有关[4−6]。指状青霉（*Penicillium digitatum*）是引致柑橘采后绿霉病的病原菌，因其造成的巨大经济损失而被视为全球柑橘产业最具破坏性的病原真菌之一[7−8]。关于指状青霉的致病机制虽已被广泛研究，但关键致病因子尤其是乙烯在果实与病原菌互作中的作用依然不清楚[9−11]。有研究报道，苹果与其寄主型病原菌扩展青霉和非寄主型病原菌指状青霉互作过程中，病原菌侵染能力的差异可能与果实乙烯合成代谢的改变有关系[12]。对于非跃变型果实柑橘，乙烯在其与指状青霉的互作过程中的作用尚有争议。一方面，利用乙烯受体抑制剂 1-MCP 处理后的果实对指状青霉更为敏感，另一方面，外源乙烯可加速果实的衰老进程，尤其是长时间或较高浓度的乙烯处理会增加果实的腐烂[13−14]。

目前关于乙烯合成和信号路径的研究主要集中于植物，对病原菌自身合成乙烯的能力及其在互作中的作用机制仍缺乏系统研究[15]。Ilag 等[16] 经过对 228 种真菌产乙烯情况进行研究，发现其中有 58 种真菌自身具有合成乙烯的能力。以甲硫氨酸或 2-酮-4-甲硫基丁酸（2-keto-4-methylthiobutyric acid, KMBA）为底物的 KMBA 途径和以 α-酮戊二酸（α-ketoglutaric acid, α-KG）为前体物质的乙烯合成酶（ethylene forming enzyme, EFE）途径是微生物合成乙烯的两条主要路径[17−18]。前人对病原菌合成乙烯虽开展了一些研究，但对其在植物与病原菌互作中的作用依然存有大量争议。有研究报道了 *Botrytis cinerea* 在侵染跃变型果实番茄时，其自身释放的乙烯量虽然与病原菌在果实体内的生长密切相关，但侵染过程中产生的乙烯并不是由病原菌乙烯所引起，有关 *B. cinerea* 合成乙烯在侵染宿主时的作用依然不明确[19]。Zhu 等[20] 利用光照可以促进 *B. cinerea* 合成乙烯而对葡萄果实无影响的特点，发现光照条件比黑暗条件下果实的腐烂程度会更高，推断在 *B. cinerea* 与葡萄互作过程中病原菌合成乙烯可能介入对果实病害的调控。当用 2,2-联吡啶抑制稻平脐蠕孢有性态 *Cochliobolus miyabeanus* 的 EFE 乙烯合成途径后可以显著提高水稻叶片的抗性，推断该病原菌释放的乙烯可能是一个非常重要的致病因子[21]。

目前，有关指状青霉合成乙烯在其与柑橘果实互作中的研究仍较为缺乏。在体外环境的培养条件下，指状青霉可以通过 KMBA 途径合成乙烯[22]，也可以 α-KG 为前体物质利用 EFE 酶合成乙烯[23]。Johansson 等[24] 从指状青霉中克隆了编码 EFE 酶的基因，在酿酒酵母中的异源表达显示其与乙烯合成能力密切相关。最近有研究提出 EFE 介导的乙烯合成途径是指状青霉在培养基体外生长和侵染过程中的主要乙烯合成途径[25]。前期实验发现指状青霉的乙烯合成途径与其所在的生长环境条件密切相关，当将其置于空间和营养较为有限的试管固体培养基上时，KMBA 和 α-KG 均可作为乙烯合成的前体物质；而当将指状青霉培养于平板培养基或液体培养基时，仅有 KMBA 途径被激活[26]。这一结果提示，指状青霉在与柑橘果实互作过程中，可能会根据不同的营养或环境条件激活相应适宜的乙烯合成途径，从而影响其致病性。基于上述现状，本文系统研究了指状青霉与柑橘果实互作过程中的乙烯释放时空变化规律及其来源，这将有助于更加全面揭示乙烯在果实与病原菌互作中的作用，进一步解析指状青霉的侵染机制，为制定采后病害控制措施提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

‘春见’柑橘果实（*Citrus reticulata* Blanco. cv. Chun jian） 采收于四川省眉山市果园中，选用大小均一、无机械损伤及病虫害的八成成熟度健康果实；指状青霉 *Penicillium digitatum*（CGMCC3.15410）购于中国普通微生物菌种保藏管理中心；α-（氨基氧基）乙酸（α-aminooxyacetic acid, AOA）（纯度≥98%）、1-氨基环丙烷-1-羧酸（1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC）（纯度≥97%）、α-酮戊二酸（α-ketoglutaric acid, α-KG）（纯度≥99%）、2-酮-4-甲

硫基丁酸（2-keto-4-methylthiobutyric acid, KMBA）（纯度≥97%）　购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司；RNAiso Plus、Fruit-mate™ for RNA Purification、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒、TB Green® Premix Ex Taq™ Ⅱ Fast qPCR 试剂盒　购于日本 Takara Bio 公司。

Agilent7890A 气相色谱仪　美国安捷伦科技有限公司；RE-5203 旋转蒸发仪　上海亚荣生化仪器厂；NanoDropl000 超微量分光光度计　美国应用生物系统（ABI）公司；QuantStudio 6 实时荧光定量 PCR 仪　美国应用生物系统（ABI）公司；C1000 Touch PCR 仪　美国 Bio-Rad 公司。

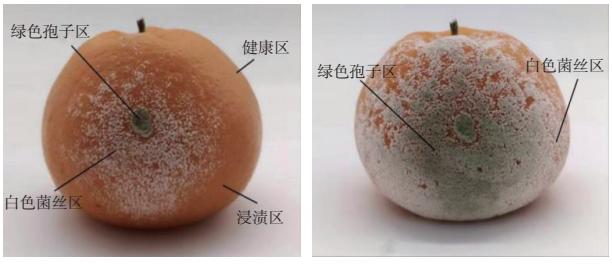
1.2　实验方法

1.2.1　病原菌孢子悬浮液制备　将病原菌指状青霉接种于 PDA 培养基中，在 25 ℃ 黑暗条件下培养 7~14 d，随后用无菌水冲洗收集孢子，采用血球计数板测定孢子浓度，并稀释至所需实验浓度。

1.2.2　果实处理

1.2.2.1　果皮接种处理　柑橘果实在 0.1% 次氯酸钠溶液中处理 2 min，用水冲洗干净后备用。用灭菌打孔器分别在 5 个果实上各取 1 个橘皮圆盘（直径 5 mm），将 5 个圆盘组织称重后置于 20 mL 试管内，随后每管接种 500 μL 浓度为 1×10^6 CFU/mL 的指状青霉孢子悬浮液（PD），放置于恒温恒湿培养箱（25 ℃，相对湿度 95%）。以无菌水作为对照，每 2 d 检测一次乙烯释放量，共检测 8 d。

1.2.2.2　果皮侵染区域取样　用灭菌打孔器在果实赤道部位穿刺形成一个直径 3 mm 的伤口，并加入 1×10^6 CFU/mL 的指状青霉孢子悬浮液 40 μL。在恒温恒湿培养箱（25 ℃，相对湿度 95%）内培养 4~5 d 后，如图 1 所示，柑橘果实表面会形成 4 个侵染区域：绿色孢子区（G），白色菌丝区（W），浸渍区（M）以及健康区（H）。用无菌手术刀在不同区域分别取相同重量的组织置于 50 mL 锥形瓶后，立即用橡胶塞密封检测乙烯释放量。



(a)　(b)

图 1　柑橘果实接种指状青霉后第 4 d(a)和 5 d(b)的发病症状

Fig.1　Disease symptoms of citrus fruit at 4 d (a) and 5 d (b) after inoculation with *P. digitatum*

1.2.2.3　AOA 处理　按照 1.2.2.1 所述处理方法将获取的橘皮圆盘（直径 5 mm）随机分为两组，一组用 2 mmol/L AOA 溶液浸泡 2 min，另一组以无菌水浸泡处理。随后将处理过的橘皮置于 20 mL 试管内，并加入 500 μL 指状青霉孢子悬浮液（1×10^6 CFU/mL）放置于恒温恒湿培养箱（25 ℃，相对湿度 95%），每 2 d 检测一次乙烯释放量，共检测 8 d。

1.2.2.4　病原菌乙烯合成前体物质处理　按照 1.2.2.1 所述处理方法将获取的橘皮圆盘（直径 5 mm）称重后放置于 20 mL 试管内，分别加入 500 μL 无菌水（作为对照）、10 mmol/L α-KG 和 10 mmol/L KMBA，而后每管接种 500 μL 指状青霉孢子悬浮液（1×10^6 CFU/mL）置于恒温恒湿培养箱（25 ℃，相对湿度 95%），每 2 d 检测一次乙烯释放量，共检测 8 d。

1.2.3　乙烯释放量测定　每次乙烯检测前，将试管或锥形瓶的硅胶塞换为橡胶塞，密封 2 h 后用注射器抽取 1 mL 气体注入气相色谱仪进行测定。参照 Yang 等[26] 的方法并稍作修改，气相色谱的工作条件为：柱箱温度：60 ℃，进样口温度：60 ℃，检测器（FID）温度：300 ℃，载气 N_2 流速：60 mL/min，燃气 H_2 流速：40 mL/min，空气流速：400 mL/min，以已知浓度的标准乙烯作外标，结果以 μL/(g·h)表示。

1.2.4　ACC 含量测定　参照 Adouli 等[27] 的方法，按照 1.2.2.2 节所述处理方法，用无菌手术刀分别在果实表面 4 个侵染区域取 5 g 组织于液氮中迅速研磨成粉，粉末经 10 mL 95% 乙醇沸水浴浸提 20 min，冷却后 10000×g 离心 15 min，收集上清液；残渣再以 10 mL 80% 乙醇于 70 ℃ 浸提 30 min，离心后合并两次浸提液。浸提液经 40 ℃ 旋转蒸发至干，所得残留物用蒸馏水溶解，即为 ACC 制备液。测定时，取 1 mL ACC 制备液，加入 40 μL 25 mmol/L $HgCl_2$ 溶液，随即用橡胶塞密封试管冰浴 10 min，而后加入 200 μL 冰浴预冷的 5% NaClO-饱和 NaOH 混合液（v/v，2∶1）迅速振荡，继续冰浴反应 5 min，最后抽取 1 mL 顶空气体进行乙烯浓度检测，结果以 nmol/g FW 表示。

1.2.5　实时荧光定量 PCR 检测　按照 1.2.2.2 所述处理方法，用无菌手术刀分别在果实表面 4 个侵染区域取 2 g 左右组织，迅速用液氮冷冻并于−80 ℃ 超低温冰箱中保存备用。参考路来凤[13] 的方法，利用实时荧光定量 PCR 方法测定植物乙烯合成路径上的关键基因 *ACO1* 和 *ACO2* 的表达量。引物序列如表 1 所示，以 *18SrRNA* 为内参基因，利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因的相对表达量[28]。

1.2.6　果实病害指标测定　在柑橘果实赤道部位上方，利用无菌打孔器制造 3 个等距的伤口（直径约 5 mm，深度约 2 mm），分别加入 30 μL 无菌水、10 mmol/L α-KG 和 10 mmol/L KMBA，随后于各伤口处接种 30 μL 指状青霉孢子悬浮液（1×10^5 CFU/mL）并置于恒温恒湿培养箱（25 ℃，相对湿度 95%）中贮藏，每天观察记录果实的发病情况，共计 4 d，结

表 1 实时荧光定量 PCR 分析所用引物序列

Table 1 Primer sequences used for qRT-PCR analysis

基因	引物序列(F 5'–3')	引物序列(R 5'–3')
18SrRNA	TCGGGTGTTTTCACGTCTCA	CGAAGGGTCGCCGTAGGT
ACO1	TGGAGCAAAGATTCAAGGAG	GAGGGAGGTGACGCACATAG
ACO2	GGACAAAGGAGGAACATCAATC	TACTATGGGCACTACCAAGCACT

果以平均发病率(%)和平均病斑直径(cm)表示。

$$发病率(\%) = \frac{发病果实数量}{总接种果实数量} \times 100$$

$$\overline{D} = \frac{\sum_{i=1}^{n} D_i}{n}$$

式中, $\overline{D}$为平均病斑直径(cm); D_i 为第 i 个发病果实的病斑直径; n 为该处理组发病果实总数。

1.3 数据处理

本实验至少进行 2 次独立重复, 且保证重复结果一致。实验数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 通过 Duncan 氏多重比较检验差异显著性(P<0.05 视为差异显著)。

2 结果与分析

2.1 指状青霉与柑橘果实互作时乙烯的时空变化规律

柑橘属典型非跃变型果实, 在其整个成熟衰老过程中通过乙烯合成系统Ⅰ释放的乙烯非常低, 如图 2 所示, 未被侵染的柑橘果皮组织乙烯含量一直处于较低水平, 而在被指状青霉侵染后的第 2、4 和 6 d, 乙烯释放量分别约为对照组的 2.96、9.12 和 4.45 倍, 均显著高于未被侵染组织(P<0.05), 且呈现先升后降的趋势。对柑橘果实不同侵染部位-健康区(H)、浸渍区(M)、白色菌丝区(W)和绿色孢子区(G)的空间分析显示, 乙烯释放呈现明显的梯度变化且差异显著(P<0.05), 其中绿色孢子区乙烯的释放量远高于健康区, 约为其 6.5 倍。由上可知, 指状青霉侵染柑橘果实的过程中, 乙烯释放量显著增加。

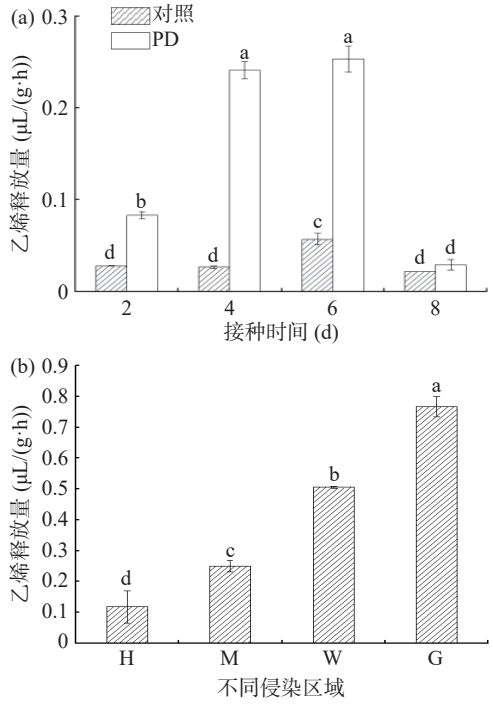


图 2 指状青霉与柑橘果实互作时乙烯释放的时间(a)和空间(b)变化

Fig.2 Temporal (a) and spatial (b) variations of ethylene emission in *P. digitatum*-citrus interaction

注: 不同字母表示处理组间差异显著(Duncan's test, P<0.05); 图 3~图 7 同。

2.2 AOA 处理对指状青霉与柑橘果实互作中乙烯释放量的影响

为了明确指状青霉与柑橘果实互作时乙烯释放的来源, 本文利用 AOA 阻断柑橘果皮组织乙烯合成后观察乙烯释放量的变化。如图 3 结果显示, 经 AOA 处理后的柑橘果皮组织在指状青霉侵染过程中乙烯释放量从第 4 d 开始显著降低(P<0.05), 尤其在第 6 d 和第 8 d 时分别降低了约 60.67% 和 71.71%, 显然果实的乙烯合成被显著抑制, 然而侵染过程中还会不断产生一定量的乙烯, 推测指状青霉侵染柑橘过程中, 乙烯的释放不仅与果实有关, 也可能与病原菌有关。

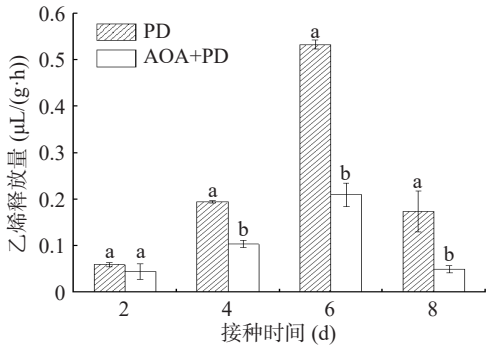


图 3 AOA 处理对指状青霉与柑橘果实互作中乙烯释放量的影响

Fig.3 Effect of AOA on ethylene production in *P. digitatum*-citrus interaction

2.3 指状青霉与柑橘果实互作时 ACC 的含量

为了进一步明确指状青霉与柑橘果实互作时释放的乙烯来源, 本文测定了果实不同侵染区域 ACC 的含量。ACC 是果实内源乙烯合成的直接前体物质, 其含量与植物乙烯释放量密切相关。由图 4 可知, 绿色孢子区(G)组织 ACC 含量最高(64.80 nmol/g FW), 约为健康区(H)组织 ACC 含量的 15 倍。结果说明随着侵染过程的发展, 尤其在绿色孢子区, 果实组织的 ACC 含量远远高于未被侵染的健康组织。

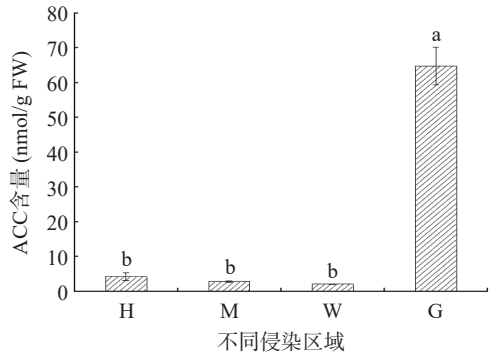


图 4　柑橘果实不同侵染区域组织的 ACC 含量

Fig.4　ACC content in differentially infected tissue zones of citrus fruit

2.4　指状青霉与柑橘果实互作时果实乙烯合成路径关键酶基因 *ACO* 表达量的变化

在植物乙烯生物合成路径中, ACO 是乙烯合成的最后一步关键酶, 可将 ACC 直接氧化为乙烯。为了了解指状青霉在侵染柑橘过程中对果实乙烯合成路径的影响, 本文测定了柑橘果实不同侵染区域 *ACO* 的基因表达情况。如图 5 所示, 相对于未被侵染的健康组织(H), 侵染区域的 *ACO1* 和 *ACO2* 基因均显著下调表达(P<0.05)。其中, 除了在浸渍区(M)中 *ACO1* 基因的相对表达量下降至 0.86 之外, 白色菌丝区(W)和绿色孢子区(G)中 *ACO1* 与 *ACO2* 基因的表达几乎完全被抑制。

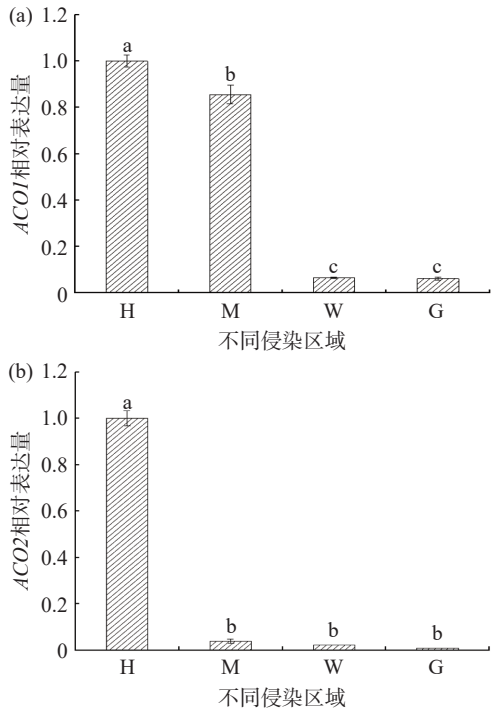


图 5　柑橘果实不同侵染区域组织 *ACO1*(a)和 *ACO2*(b)基因相对表达量

Fig.5　*ACO1* (a) and *ACO2* (b) relative expression levels in differentially infected tissue zones of citrus fruit

2.5　病原菌乙烯合成前体物质对病害乙烯释放量的影响

KMBA 途径和 EFE 途径是微生物合成乙烯的主要途径, 其中 α-KG 和 KMBA 分别是这两条路径的直接前体物质。如图 6 所示, 指状青霉在侵染柑橘果皮中产生的乙烯整体呈先升后降的趋势, 在第 6 d 时达到峰值。当利用病原菌乙烯合成途径的前体物质(α-KG 和 KMBA)处理果皮组织并接种病原菌后, 乙烯释放量明显升高。其中, KMBA 处理组乙烯释放量从第 4 d 起显著高于对照组(P<0.05), 早于 α-KG 处理组(第 6 d 出现显著差异)。至接种后第 6 d, α-KG 和 KMBA 处理组的乙烯生成量已分别达到对照组的 3.3 倍和 4 倍。

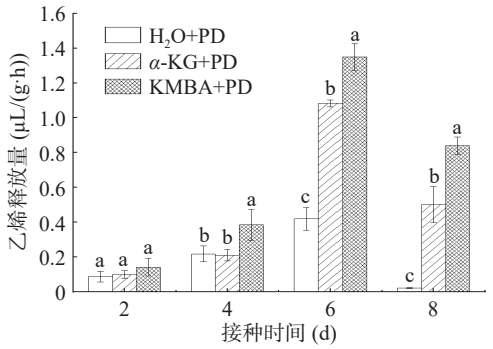


图 6　α-KG/KMBA 对指状青霉与柑橘果实互作中乙烯释放量的影响

Fig.6　Effect of α-KG/KMBA treatment on ethylene production in *P. digitatum*-citrus interaction

2.6　病原菌乙烯合成前体物质对柑橘果实病害的影响

如图 7 所示, 与对照组无菌水处理相比, 经 α-KG 和 KMBA 处理后的柑橘果实发病率及病斑直径

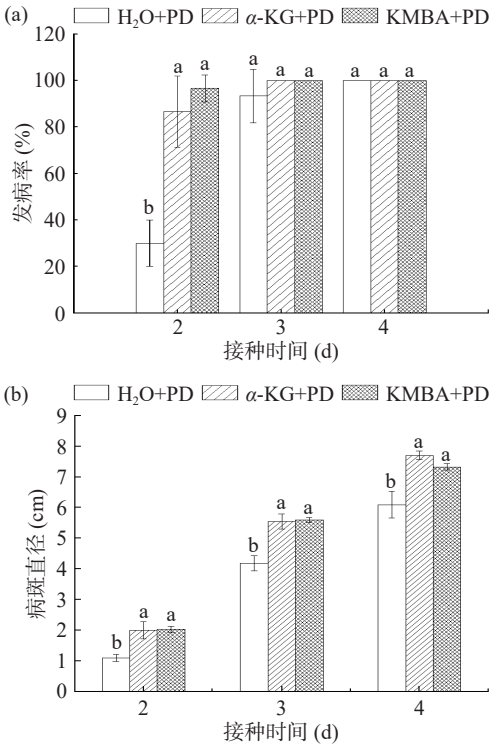


图 7　α-KG/KMBA 对柑橘果实发病率(a)和病斑直径(b)的影响

Fig.7　Effect of α-KG/KMBA treatment on the disease incidence (a) and lesion diameter (b) in citrus fruit

显著提高。具体来说，接种指状青霉后第 2 d，α-KG 与 KMBA 处理组柑橘的发病率较对照组分别升高了 56.67% 和 66.67%，病斑直径分别增加了 82.59% 和 85.21%。此外，在接种后第 3 d 与第 4 d，α-KG 和 KMBA 处理组的病斑直径均显著高于无菌水对照组（$P<0.05$）。

3 讨论与结论

植物与病原菌互作通常会诱导乙烯释放量显著增加，本研究在指状青霉与柑橘互作体系中观察到了这一典型现象。与 Ballester 等[25] 的报道一致，柑橘果实接种病原菌后乙烯水平逐渐上升至峰值，随后迅速下降。作为非跃变型果实的柑橘，在受到病原菌侵染时，随着侵染过程的发展，也被强烈诱导产生病害乙烯。指状青霉在柑橘果实上的侵染是一个动态连续的过程，伴随着时间和空间的变化，侵染的不同阶段会在果实表面形成不同的区域，本研究根据病害的发展进程将柑橘表面分为未被侵染的健康区，浸渍区，白色菌丝区和绿色孢子区 4 个不同侵染阶段区域。结果显示被侵染组织（浸渍区，白色菌丝区和绿色孢子区）的乙烯水平均显著高于未被侵染的健康组织，进一步验证了指状青霉与柑橘互作过程中乙烯释放量的增加。同时发现浸渍区、白色菌丝区与绿色孢子区的乙烯释放量逐渐升高，其中绿色孢子区的乙烯释放量最高，显然病害乙烯的合成在侵染部位不是均匀发生的，不同侵染阶段区域组织对乙烯合成的贡献存在显著差异。病害发展过程中乙烯释放量的动态变化，可能是果实与病原菌互作进程中关键的生理信号。

为了进一步明确病害乙烯的释放来源，本研究利用乙烯合成抑制剂 AOA 特异性阻断果实的乙烯合成路径。结果发现 AOA 处理并未完全抑制病害乙烯的释放，在柑橘自身乙烯合成途径被阻断后，互作体系中仍持续检测到一定量的乙烯。这一结果表明，在病原菌侵染过程中，除寄主果实合成的部分乙烯外，还有部分乙烯来源于非寄主途径，即可能由指状青霉自身合成。ACC 是植物乙烯生物合成的直接前体物质，在 ACO 的催化作用下，可通过单步氧化反应转化为乙烯[29−30]。本研究结果显示，随着侵染过程的发展，尤其是在绿色孢子区，果实组织内部积累的 ACC 含量显著高于未被侵染的健康组织。该结果与 Achilea 等[31] 的报道一致，即无论指状青霉是否具备产生乙烯的能力，寄主葡萄柚果皮组织中的 ACC 含量随病害发展而持续升高。然而，与 ACC 积累趋势相反，侵染区域（浸渍区、白色菌丝区和绿色孢子区）中乙烯合成关键基因 *ACO1* 和 *ACO2* 表达均显著下调，且在绿色孢子区中其表达几乎被抑制。这表明，处于侵染后期阶段的绿色孢子区，尽管果实组织中积累了大量的乙烯直接前体物质 ACC，但由于寄主乙烯合成路径中的关键酶基因 *ACO* 受到抑制，ACC 难以进一步转化为乙烯，导致寄主来源的乙烯合成在实质上被阻断。已有研究指出，柑橘在被指状青霉侵染后，其营养成分随病程进展发生显著变化[32]，且被侵染组织逐渐失去利用 ACC 合成乙烯的能力[33−34]。ACO 将 ACC 转化为乙烯的过程依赖于完整的细胞结构，在鳄梨的感病和过熟组织中也观察到，ACC 积累和乙烯生成速率下降的现象，这可能与细胞膜系统的瓦解密切有关[35]。基于上述认识，本研究进一步揭示，处于侵染后期阶段的绿色孢子区，果实细胞结构已遭到严重破坏，导致其将 ACC 转化为乙烯的能力显著下降。因此，尽管该区域 ACC 大量积累，但果实的乙烯合成路径被抑制，结合该区域仍检测到大量的乙烯释放，推断绿色孢子区所释放的乙烯可能主要来源于病原菌自身合成，而非寄主果实组织。

在前期的体外实验中，指状青霉在含有病原菌 KMBA 乙烯合成路径的前体物质 KMBA 和 EFE 乙烯合成路径的前体物质 α-KG 的培养基上可以产生大量的乙烯[26]。本研究通过外源施加 KMBA 和 α-KG，证实二者均可显著提高指状青霉侵染柑橘果实过程中的乙烯释放量，表明该病原菌在侵染过程中具备利用 KMBA 与 α-KG 作为底物合成乙烯的能力。进一步分析其致病性变化发现，经上述两种物质处理的果实病斑扩展加快，病害程度加剧，初步推断由病原菌自身合成的乙烯在指状青霉的致病过程中可能起到促进作用，这与已有研究相呼应，如青枯雷尔氏菌（*Ralstonia solanacearum*）侵染拟南芥时可能会利用自身合成的乙烯，通过调控宿主代谢介入植物抗性信号路径[36]。

综上，本研究系统揭示了指状青霉与柑橘果实互作过程中乙烯的时空变化规律，病原菌侵染不仅显著提升了乙烯的整体释放水平，且不同侵染阶段区域组织（未被侵染的健康区，浸渍区，白色菌丝区，绿色孢子区）对乙烯合成的贡献存在差异，同时初步明确了病害乙烯的释放来源可能与果实和病原菌两者相关，尤其是病原菌合成乙烯可能介入指状青霉的侵染过程。未来研究可进一步采用遗传学手段，如利用基因编辑技术敲除指状青霉乙烯合成的关键基因，从而直接验证其在病害发展中的功能，为阐明病原菌乙烯的致病机制提供关键证据，进一步解析指状青霉的侵染机制，为柑橘采后病害绿色防控提供理论依据和技术支撑。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] HUANG J, ZHAO X, BÜRGER M, et al. The role of ethylene in plant temperature stress response[J]. Trends in Plant Science, 2023, 28(7): 808−824.

[2] WANG X, WEN H, SUPRUN A, et al. Ethylene signaling in regulating plant growth, development, and stress responses[J]. Plants, 2025, 14(3): 309.

[3] SHEKHAWAT K, FRÖHLICH K, GARCÍA-RAMÍREZ G X,

et al. Ethylene: A master regulator of plant-microbe interactions under abiotic stresses[J]. Cells, 2023, 12(1): 31.
[4] VAN LOON L C, GERAATS B P J, LINTHORST H J M. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants[J]. Trends in Plant Science, 2006, 11(4): 184−191.
[5] ELÍAS J M, GUERRERO-MOLINA M F, MARTÍNEZ-ZAMORA M G, et al. Role of ethylene and related gene expression in the interaction between strawberry plants and the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*[J]. Plant Biology, 2018, 20(3): 490−496.
[6] LI S, WU P, YU X, et al. Contrasting roles of ethylene response factors in pathogen response and ripening in fleshy fruit[J]. Cells, 2022, 11(16): 2484.
[7] BHATTA U K. Alternative management approaches of citrus diseases caused by *Penicillium digitatum* (green mold) and *Penicillium italicum* (blue mold)[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 12: 833328.
[8] LI Y, XIA M, HE P, et al. Developing *Penicillium digitatum* management strategies on post-harvest citrus fruits with metabolic components and colonization of *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Fungi, 2022, 8(1): 80.
[9] 钱鑫. 指状青霉侵染采后柑橘的机制研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2020. [QIAN X. Research on the mechanism of postharvest citrus infection by *Penicillium digitatum*[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2020.]
[10] BALLESTER A, LAFUENTE M T. LED blue light-induced changes in phenolics and ethylene in citrus fruit: Implication in elicited resistance against *Penicillium digitatum* infection[J]. Food Chemistry, 2017, 218: 575−583.
[11] LAFUENTE M T, GONZÁLEZ-CANDELAS L. Phytohormones in the *Penicillium digitatum*-citrus fruit interaction[J]. Postharvest Biology and Technology, 2024, 209: 112704.
[12] VILANOVA L, VALL-LLAURA N, TORRES R, et al. *Penicillium expansum* (compatible) and *Penicillium digitatum* (non-host) pathogen infection differentially alter ethylene biosynthesis in apple fruit[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2017, 120: 132−143.
[13] 路来风. 海洋拮抗酵母 *Rhodosporidium paludigenum* 对柑橘果实抗性的增强效应及其生物学机理研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2015. [LU L F. Research on the enhancement effect of marine antagonistic yeast *Rhodosporidium paludigenum* on the resistance of citrus fruits and its biological mechanism[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2015.]
[14] 孟详智. 1-甲基环丙烯和水杨酸诱导采后金桔对指状青霉抗性的机制研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2023. [MENG X Z. Research on the mechanism of postharvest kumquat resistance to *Penicillium digitatum* induced by 1-methylcyclopropene and salicylic acid[D]. Jinan: Qilu University of Technology, 2023.]
[15] GU S, XIE L, GUAN Q, et al. Effect of ethylene production by four pathogenic fungi on the postharvest diseases of green pepper (*Capsicum annuum* L.)[J]. International Journal of Food Microbiology, 2024, 418: 110729.
[16] ILAG L, CURTIS R W. Production of ethylene by fungi[J]. Science, 1968, 159(3821): 1357−1358.
[17] SHU P, LI Y, SHENG J, et al. Recent advances in dissecting the function of ethylene in interaction between host and pathogen [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(9): 4552−4563.
[18] WEINGART H, ULLRICH H, GEIDER K, et al. The role of ethylene production in virulence of *Pseudomonas syringae* pvs. *glycinea* and *Phaseolicola*[J]. Phytopathology, 2001, 91(5): 511−518.
[19] CRISTESCU S M, de MARTINIS D, te LINTEL HEKKERT S, et al. Ethylene production by *Botrytis cinerea in vitro* and in tomatoes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(11): 5342−5350.
[20] ZHU P, XU L, ZHANG C, et al. Ethylene produced by *Botrytis cinerea* can affect early fungal development and can be used as a marker for infection during storage of grapes[J]. Postharvest Biology and Technology, 2012, 66: 23−29.
[21] van BOCKHAVEN J, SPÍCHAL L, NOVÁK O, et al. Silicon induces resistance to the brown spot fungus *Cochliobolus miyabeanus* by preventing the pathogen from hijacking the rice ethylene pathway[J]. New Phytologist, 2015, 206(2): 761−773.
[22] BILLINGTON D C, GOLDING B T, PRIMROSE S B. Biosynthesis of ethylene from methionine. Isolation of the putative intermediate 4-methylthio-2-oxobutanoate from culture fluids of bacteria and fungi[J]. Biochemical Journal, 1979, 182(3): 827−836.
[23] FUKUDA H, FUJII T, OGAWA T. Preparation of a cell-free ethylene-forming system from *Penicillium digitatum*[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1986, 50(4): 977−981.
[24] JOHANSSON N, PERSSON K O, LARSSON C, et al. Comparative sequence analysis and mutagenesis of ethylene forming enzyme (EFE) 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenase homologs[J]. BMC Biochemistry, 2014, 15(1): 22.
[25] BALLESTER A, GONZÁLEZ-CANDELAS L. EFE-mediated ethylene synthesis is the major pathway in the citrus postharvest pathogen *Penicillium digitatum* during fruit infection[J]. Journal of Fungi, 2020, 6(3): 175.
[26] YANG J, GINÉ-BORDONABA J, VILANOVA L, et al. An insight on the ethylene biosynthetic pathway of two major fruit postharvest pathogens with different host specificity: *Penicillium digitatum* and *Penicillium expansum*[J]. European Journal of Plant Pathology, 2017, 149(3): 575−585.
[27] ADOULI B, ZAMANI Z, FATTAHI-MOHGADAM M R, et al. Effects of alternate bearing and 2,4-D application on fruit growth pattern, abscission enzymes activity, ACC content of calyx and carbohydrates partitioning of fruits in satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) cv. Mmiyagawa[J]. Scientia Horticulturae, 2018, 238: 58−65.
[28] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402−408.
[29] 王戬. 外源乙酰水杨酸调控猕猴桃果实乙烯生物合成的机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2022. [WANG J. Research on the mechanism of exogenous acetylsalicylic acid regulating ethylene biosynthesis in kiwifruit fruits[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2022.]
[30] KHAN S, ALVI A F, SAIFY S, IQBAL N, KHAN N A. The ethylene biosynthetic enzymes, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase (ACS) and ACC oxidase (ACO): The less explored players in abiotic stress tolerance[J]. Biomolecules, 2024, 14(1): 90.
[31] ACHILEA O, CHALUTZ E, FUCHS Y, et al. Ethylene biosynthesis and related physiological changes in *Penicillium digitatum*-infected grapefruit (*Citrus paradisi*)[J]. Physiological Plant Pathology, 1985, 26(2): 125−134.
[32] TANG N, CHEN N, HU N, et al. Comparative metabolomics and transcriptomic profiling reveal the mechanism of fruit quality deterioration and the resistance of citrus fruit against *Penicillium digitatum*[J]. Postharvest Biology and Technology, 2018, 145: 61−73.
[33] BALLESTER A, LAFUENTE M T, FORMENT J, et al. Transcriptomic profiling of citrus fruit peel tissues reveals fundamental effects of phenylpropanoids and ethylene on induced resistance[J]. Molecular Plant Pathology, 2011, 12(9): 879−897.
[34] LAFUENTE M T, BALLESTER A R, GONZÁLEZ-CANDELAS L. Involvement of abscisic acid in the resistance of citrus fruit to *Penicillium digitatum* infection[J]. Postharvest Biology and Technology, 2019, 154: 31−40.
[35] HOFFMAN N E, YANG S F. Changes of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content in ripening fruits in relation to their ethylene production rates[J]. Journal American Society for Horticultural Science, 1980, 105(4): 492−495.
[36] VALLS M, GENIN S, BOUCHER C. Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*[J]. Plos Pathogens, 2006, 2(8): 798−807.