赵娟,张蕾,白格格,等.多糖EPS66A水剂研制及其对苹果花叶病的诱导抗性研究[J].山西农业大学学报(自然科学版),2025,45(2):50-59.
Zhao J, Zhang L, Bai G G,et al.Development of EPS66A polysaccharide aqueous formulation and its induced resistance to apple mosaic disease[J].Journal of Shanxi Agricultural University(Natural Science Edition), 2025,45(2):50-59.
doi: 10.13842/j.cnki.issn1671-8151.202411050

多糖EPS66A水剂研制及其对苹果花叶病的诱导抗性研究

赵娟[1],张蕾[1],白格格[1],骞天佑[2],韩立荣[1*]

(1.西北农林科技大学 林学院,陕西 杨凌 712100;2.渭南东旺农华生物科技有限公司,陕西 渭南 714000)

摘　要:[目的]探究长安链霉菌HL-66(*Streptomyces changanensis*. HL-66)发酵液中多糖提取物EPS66A对苹果花叶病的诱导抗性,可为开发植物免疫诱抗剂以防控病害提供科学依据。[方法]进行EPS66A水剂研制和质量评价,通过田间药效试验评价其对苹果花叶病的防治效果,并测定抗氧化酶活性等生理生化指标和分析抗病相关基因的表达水平。[结果]1% 多糖EPS66A水剂的最优配方为:1% 多糖EPS66A、5%AES、1% 卡松、1% 乙二醇、1%B-263消泡剂,补足水至100%。田间试验结果表明,1% 多糖EPS66A水剂200倍稀释液对苹果花叶病毒病防治效果最好,药后15 d的防治效果为73.99%,叶片中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性与对照相比分别提高了47.07%、70.34% 和50.92%;MDA含量为6.54 μmol/g,比对照降低了25.07%。qRT-PCR结果显示,1% 多糖EPS66A水剂200倍稀释液处理后0~45 d,苹果叶片的抗氧化酶基因(*CAT*、*SOD* 和 *POD*)、类黄酮代谢途径基因(*PAL1* 和 *C4H*)和病程相关蛋白基因(*PR1*、*PR10a* 和 *PR10b*)表达量均上调。[结论]研制的1% 多糖EPS66A水剂可防治苹果花叶病毒,能够促进苹果抗病基因上调表达,显著提高抗氧化酶活性和降低MDA含量,增强了苹果植株的抗病性,是防治苹果花叶病较为理想的诱抗剂。

关键词:免疫诱抗剂; 苹果花叶病; 田间防效; 抗氧化酶; 差异表达
中图分类号:S482.7　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1671-8151(2025)02-0050-10

Development of EPS66A polysaccharide aqueous formulation and its induced resistance to apple mosaic disease

Zhao Juan[1], Zhang Lei[1], Bai Gege[1], Qian Tianyou[2], Han Lirong[1*]

(*1. College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 2. Weinan Dowinnova Biotechnology Co., Ltd. Weinan 714000, China*)

Abstract: [Objective] The purpose of the current research was to explore the induced resistance of polysaccharide extract EPS66A from the fermentation broth of *Streptomyces changanensis* HL-66 against apple mosaic disease and to provide a scientific basis for the development of plant immune inducers to control plant diseases. [Methods] The preparation and quality evaluation of EPS66A aqueous solution were conducted according to national standards. Field efficacy trials were conducted to assess its control effect on apple mosaic disease. Physiological and biochemical indicators, such as antioxidant enzyme activities, were measured, and the expression levels of disease resistance-related genes were analyzed. [Results] The optimal formulation of the 1% EPS66A polysaccharide aqueous solution was: 1% EPS66A polysaccharide, 5% AES, 1% carboxymethyl cellulose, 1% ethylene glycol, 1% B-263 defoamer, and water added to 100%. Field trial results indicated that the 200-fold dilution of the 1% EPS66A polysaccharide aqueous solution had the best control effect on apple mosaic virus disease, with a control efficacy of 73.99% at 15 days post-treatment. The activities of SOD, POD, and CAT in the leaves increased by 47.07%, 70.34%,

收稿日期:2024-12-01　　**修回日期**:2025-01-26
基金项目:国家自然科学基金项目(32272594);陕西省技术创新引导专项(2024QCY-KXJ-097)
作者简介:赵娟(ORCID: 0000-0002-4105-9979),硕士研究生,研究方向:森林保护
*通信作者:韩立荣(ORCID: 0000-0002-0364-4712),教授,博士生导师,E-mail:hanlr@nwafu.edu.cn

and 50.92%, respectively, compared to the control. The MDA content was 8.58 μmol/g, a 25.07% reduction compared to the control. qRT-PCR results showed that from 0 to 45 days after treatment with the 200-fold dilution of 1% EPS66A polysaccharide aqueous solution, the expression levels of antioxidant enzyme genes (*CAT*, *SOD*, and *POD*), flavonoid metabolic pathway genes (*PAL1* and *C4H*), and pathogenesis-related protein genes (*PR1*, *PR10a*, and *PR10b*) in apple leaves were upregulated. [Conclusion] The developed 1% EPS66A polysaccharide aqueous solution meets quality standards. It promoted the upregulation of disease resistance genes in apples, significantly enhanced antioxidant enzyme activities, reduced malondialdehyde content, and enhanced the disease resistance of apple plants. It is an ideal inducer for controlling apple mosaic disease.

Keywords: Immunostimulant, Apple mosaic disease, Field efficacy, Antioxidant enzymes, Differential expression

苹果(*Malus pumila* Mill.)是我国重要的经济果树。2022年,我国苹果总产量达4 757.18万t,陕西省苹果产量为1 302.71万t,占全国的27.38%,较上年增长了4.85%[1]。陕西省苹果种植区常见的病毒病害为苹果花叶病,其中苗木主产区苹果花叶病毒侵染率达52.15%,部分果园的发病率可高达62.7%,老龄果园感病后可导致平均减产30%[2-3],对苹果产业可持续健康发展造成威胁。据报道,苹果花叶病的主要病原包括苹果坏死花叶病毒(*Apple necrotic mosaic virus*,ApNMV),苹果花叶病毒(*Apple mosaic virus*,ApMV),李属坏死环斑病毒(*Prunus necrotic ringspot virus*,PNRSV)等[4]。病毒的不同株系能在叶片上引发多种症状,如斑驳、花叶、条斑、环斑和镶边等,导致苹果叶片叶绿素含量下降14.80%至38.72%,叶片净光合速率下降2.93%至45.83%[5]。此外,感染病毒的植株也会出现一年生枝条缩短,早落叶,果实减产和储藏性下降等症状[6-7]。苹果花叶病毒的传播途径主要通过嫁接传播,也可通过蚜虫等刺吸性昆虫传播[8]。目前,苹果花叶病化学防治效果不佳,且存在残留风险,因此亟需开发更有效、低毒性的新型防治药剂。

植物免疫诱抗剂能提升植物体内抗病物质的活性水平,通过强化植物的自身防御机制来预防或减轻病害发生与发展,是一种环境友好的新型农药。多糖EPS66A是从长安链霉菌HL-66(*Streptomyces changanensis*. HL-66)[9]发酵液中提取的微生物胞外多糖,是一种新型葡聚糖免疫激发子,具有开发成绿色、可持续植物免疫诱抗剂的潜力。前期研究表明,多糖EPS66A能引发植物超敏反应、增加活性氧和一氧化氮的产生、提高防御相关基因的表达以及促进抗病化合物如黄酮类和酚类物质的积累等防御反应,提高植物抗病性[10]。同时,多糖EPS66A源自微生物发酵产物,具有成本低、安全、高效等特点,有助于减少化学农药的使用,促进环保型农业的可持续发展。本研究以多糖EPS66A为有效活性成分,通过筛选助剂开发新型、安全无毒的植物免疫诱抗剂,并进行田间药效试验,以期为苹果花叶病的绿色防治药剂开发提供科学依据。

1　材料与方法

1.1　供试材料

1.1.1　供试菌株

长安链霉菌HL-66(CGMCC No. 22674),保存于西北农林科技大学森林病理实验室。

1.1.2　供试药剂

表面活性剂:AES、AEO-5、AEO-9、钾皂,购自江苏森禾化工科技有限公司;DO-04、DO-08、吐温20、吐温80、助剂903、助剂L、助剂P,购自江苏海安石油化工有限公司。

防腐剂:卡松、山梨酸钾、丙酸钙、对羟基苯甲酸甲酯,购自青岛九泰生物科技有限公司。

防冻剂:氯化钠、氯化钙、乙醇、乙二醇、丙三醇,购自广东光华技股份有限公司。

消泡剂:B-263、CK-801、CK-802、CK-2875、CK^{-1}075、BZ,购自广东中联邦精细化工有限公司。

对照药剂:5%氨基寡糖素水剂,购自上海沪联生物药业股份有限公司。

1.2　1%多糖EPS66A水剂的研制

1.2.1　表面活性剂的筛选

取适量水溶解1%多糖EPS66A,分别与11种5%供试表面活性剂混合制成样品,将样品放置于磁力搅拌器搅拌均匀,以常温、热贮和冷贮条件下样品的外观为指标,筛选出最优表面活性剂。

1.2.2　防冻剂的筛选

将5种1%供试防冻剂分别与其它助剂混合制成样品,以凝固温度和在常温、热贮和冷贮条件下样品的外观为指标,筛选出最优防冻剂。

1.2.3 防腐剂的筛选

将4种1%供试防腐剂分别与其它助剂混合制成样品,充分搅拌后密封,监测并记录其发霉或变质的时间,同时以常温、热贮和冷贮条件下样品的外观为指标,筛选出最优防腐剂。

1.2.4 消泡剂的筛选

将6种1%供试消泡剂分别与其它助剂混合制成样品。在200 mL量筒中加入100 mL样品,利用磁力搅拌器进行混合,同时记录从开始搅拌到泡沫堆积至150 mL刻度线所需时间,以抑泡时间和在常温、热贮和冷贮条件下样品的外观为指标,筛选出最优消泡剂。

1.2.5 制剂配方确定

根据上述筛选结果,配制水剂样品,以确定1%多糖EPS66A水剂的最终配方。

1.2.6 质量检测和色谱方法

采用国家标准参照国家标准GB/T 1603-2001《农药乳液稳定性测定方法》、GB/T 28137-2011《农药持久起泡性测定方法》、GB/T 1601-2023《农药pH值的测定方法》、GB/T 19136-2021《农药热储稳定性测定方法》和GB/T 19137-2003《农药低温稳定性测定方法》执行。分别测定农药稀释稳定性、持久起泡性和pH值。依据GB/T 19136-2003和GB/T 19137-2003测定农药热贮和冷贮稳定性。有效成分测定使用高效液相色谱法(HPLC),使用Agilent 1260 Infinity II高效液相色谱仪;色谱条件:色谱柱为TSK-gel G2000SWXL(7.8×300 mm,5 μm);检测器为1260 Infinity II RID;流动相为纯水;流速设定为1.0 mL/min;进样量为20 μL;柱温为30 ℃。对热贮和冷贮处理前后的EPS66A水剂,分别取1 mL样品,用纯水稀释至100 mL容量瓶中定容,过0.45 μm滤膜后根据上述的色谱条件进行检测,重复5次。

1.3 防治苹果花叶病的田间试验

1.3.1 田间试验设计

试验地设在陕西省渭南市临渭区秦刘村苹果园(34.58 N,109.53 E),园内苹果树龄为6年,长势良好,株行距为3 m×4 m。该地区土壤为垆土,pH值呈中性,栽培品种一致,管理条件一般,历年苹果花叶病发生危害较严重。试验小区随机排列,分别喷施1%多糖EPS66A水剂200倍、400倍和800倍稀释液,以5%氨基寡糖素水剂400倍稀释液为药剂对照组,以清水处理为空白对照组,各处理均重复3次。采用电动背负式喷雾器进行均匀喷雾,直至叶面有药液滴落。试验首次施药日期为2024年5月8日,每隔7 d施药1次,共施药4次。

1.3.2 防治效果评价

于最后1次施药后15、30、45 d各调查1次药效。每小区随机调查3棵样树,每棵样树分东、南、西、北、中5个方位各调查10个叶片。病叶分级和计算公式如下[11]:

0级:叶片无病斑;

1级:叶片病斑覆盖面积低于10%;

3级:叶片病斑覆盖面积在11%~25%;

5级:叶片病斑覆盖面积在26%~40%;

7级:叶片病斑覆盖面积在41%~65%;

9级:叶片病斑覆盖面积在65%以上。

$$\text{病情指数}/\% = \frac{\sum(\text{各级病株数} \times \text{该病级数})}{\text{调查总株数} \times \text{最高病级数}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{防治效果}/\% = \frac{\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}}{\text{对照病情指数}} \times 100 \quad (2)$$

1.3.3 抗氧化酶活性和过氧化产物含量测定

称取各处理的0.5 g苹果叶片置于研钵中,加入1.5 mL的50 mmol/L磷酸缓冲液(内含2 mmol/L EDTA、3%聚乙烯基吡咯烷酮,pH为7.8),冰浴匀浆后4 ℃、5000 g离心15 min收集上清液,4 ℃保存,该提取液用于苹果叶片超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性和丙二醛(MDA)含量的测定。

SOD活力:采用氮蓝四唑(NBT)法[12]测定,定义反应中氮蓝四唑光氧化还原反应抑制率达50%时所对应的酶量为1个SOD活力单位(U),酶活性用U/g表示;

POD活力:采用愈创木酚法[13]测定,定义体系中每克鲜组织每分钟A_{470}值变化0.10为1个POD活力单位(U),酶活性用U/g表示;

CAT活力:采用紫外吸收法[14]测定,定义体系中每克鲜组织每分钟A_{240}值降低0.10为1个CAT活力单位(U),酶活性用U/g表示;

MDA含量:采用硫代巴比妥(TBA)显色法[15]

测定,为去除组织中糖类物质对MDA-TBA反应的干扰,采用下式计算MDA在反应体系中的浓度,进一步可计算得出单位重量苹果叶片鲜组织中MDA含量(μmol/g)。

$$\mathrm{MDA}(\mu\mathrm{mol/g})=\frac{6.45A_{532}-0356A_{450}}{W} \quad (3)$$

式中A532和A450为吸光值,W为样品鲜重(g)。

1.3.4　实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测

根据已公布苹果转录组数据或参考相关文献对苹果抗氧化酶、类黄酮、病程相关蛋白基因进行RT-qPCR检测,引物信息如表1所示。RT-qPCR反应体系(25 μL)为:2×Hieff®PCR Master Mix(10102ES03,上海翌圣生物科技股份有限公司)12.5 μL,正反引物(10 nmol/mL)各1 μL,模板cDNA 2 μL,ddH_2O 8.5 μL。RT-qPCR仪器使用LightCycler480(罗氏诊断产品有限公司),反应程序采用三步法:94 ℃预变性5 min,而后94 ℃变性30 s,56 ℃退火30 s,72 ℃延伸45 s,共35个循环,最后72 ℃ 10 min终延伸,溶解曲线为仪器默认设置,每个基因重复3次。以肌动蛋白基因Actin为内参基因,使用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法分析各基因相对表达量。

表1　RT-qPCR中基因信息及引物序列

Table 1　Gene information and primer sequences in RT-qPCR

基因名 Gene name	正向引物 Forward primer (5′→3′)	反向引物 Reverse primer (5′→3′)
SOD	GTTCGATCCATCAAACGCCG	ATGAAGTCCAGGCTTGAGGC
POD	TGAAGAAACTGCTGGGGGTC	AACGTCCAAATTCGCATTGAT
CAT	GCAGCCAGTTGGACGTTTG	CTGCAGATAGTTCGGGCCAA
PAL	CTCCGTGGTGGTTTTTAAGT	GGAGGCAGAAACAGTACCAT
C4H	ACCCGAAACGTCGTCTTTGA	GACGGTGAACACCATGTCCT
PR10a	ACGCCTACACTTTGATTGA	AGTGGCTGATACTCTTGATG
PR10b	CAAGAGCACCAGCCACTA	ATCATTGAAGCAGCAGAAG
PR1	TTAGGCTCAGTCCTTATCCA	CCTGCTACTTTGTCATCCC

2　结果与分析

2.1　制剂研发

2.1.1　表面活性剂筛选

表面活性剂可以提高农药的延展性和附着力,增加农药制剂与植物接触面积和接触时间。表面活性剂的筛选结果(表2)显示,在常温下,采用AEO-5、DO-04和钾皂作为表面活性剂,溶液出现少量沉淀;以DO-04和助剂L配制的水剂出现分层现象;以AES、吐温80和助剂P配制的水剂外观均一透明。进一步对表面活性剂进行热贮稳定性与冷贮稳定性的检测,AES和吐温80均达到要求,结合成本选用1%AES作为本制剂的表面活性剂。

2.1.2　防冻剂的筛选

防冻剂能降低溶液的冰点,可以有效防止农药制剂在低温储存和运输过程中结冰而受损。防冻剂的筛选结果(表3)显示,乙二醇在防冻效果、常温、热贮和冷贮稳定性等方面均符合要求,因此本制剂选用1%乙二醇作为防冻剂。

2.1.3　防腐剂筛选

防腐剂可以抑制微生物生长,保持农药制剂的稳定性和有效性。防腐剂的筛选结果(表4)显示,以卡松作为防腐剂,在观察试验的60 d内样品保持正常,未发生霉变或变质,不仅变质时间长于其它防腐剂,其常温、热贮和冷贮稳定性也均达到要求,因此本制剂选用1%卡松作为防腐剂。

2.1.4　消泡剂筛选

消泡剂可以降低液体表面张力,避免泡沫的产生,提高农药制作过程的稳定性和均匀性。消泡剂的筛选结果(表5)显示,消泡剂B-263的抑泡时间最长,其常温、热贮和冷贮稳定性也均达到要求,故本制剂选用1% B-263作为消泡剂。

2.1.5　质量检测

根据以上试验结果,确定了1%多糖EPS66A水剂的配方为:1%多糖EPS66A、5% AES、1%卡松、1%乙二醇、1% B-263消泡剂、补足水至100%。制剂外观呈无色透明的均相液体,流动性佳。制剂

表2 表面活性剂的筛选结果

Table 2 Screening results of surfact

表面活性剂 Surfactants	常温 Room temperature	热储 Heat storage	冷储 Cold storage	结果 Results
AEO－5	少量沉淀	少量沉淀	少量沉淀	不合格
AEO－9	均一透明	浑浊	均一透明	不合格
AES	均一透明	均一透明	均一透明	合格
DO－04	分层	分层	分层	不合格
DO－08	少量絮状物	少量絮状物	少量絮状物	不合格
钾皂 Potassium soaps	少量沉淀	少量沉淀	少量沉淀	不合格
吐温20 Tween(R) 20	均一透明	均一透明	微量沉淀	不合格
吐温80 Tween(R) 80	均一透明	均一透明	均一透明	合格
助剂903 Surfactant 903	均一透明	微量沉淀	微量沉淀	不合格
助剂L Surfactant L	分层	分层	分层	不合格
助剂P Surfactant P	均一透明	浑浊	浑浊	不合格

表3 防冻剂的筛选结果

Table 3 Screening results of antifreeze agents

防冻剂 Antifreeze	凝固温度/℃ Freezing point	常温 Room temperature	热储 Heat storage	冷储 Cold storage
乙醇 Ethanol	0	合格	合格	合格
乙二醇 Ethylene glycol	－2	合格	合格	合格
丙三醇 Glycerol	－1	合格	合格	合格
氯化钠 Sodium chloride	1	合格	合格	合格
氯化钙 Calcium chloride	0	合格	合格	凝固
空白对照 CK	1	合格	合格	合格

表4 防腐剂的筛选结果

Table 4 Results of preservative screening

防腐剂 Preservative	变质时间/d Spoilage time	常温 Room temperature	热储 Heat storage	冷储 Cold storage
卡松 Kathon	＞60	合格	合格	合格
对羟基苯甲酸甲酯 Methyl paraben	25	沉淀	沉淀	沉淀
山梨酸钾 Potassium sorbate	40	合格	合格	合格
丙酸钙 Calcium propionate	20	沉淀	合格	合格
空白对照 CK	15	合格	合格	合格

pH平均值为6.73±0.14,呈中性偏酸。稀释稳定性、持久起泡性均合格,达到商品水剂要求标准。

在热贮、冷贮稳定性测试中,贮存14 d后,1%多糖EPS66A水剂仍均一透明,未出现沉淀、气泡、分层等现象。热贮、冷贮后平均分解率(表6)分别为4.20%±0.27%、2.90%±0.60%,均符合要求。

2.2 苹果花叶病毒病的田间防效试验

2.2.1 防治效果评价

不同药剂处理对苹果花叶病毒病的防治效果如表7所示,与清水对照组相比具有明显差异,说明试验中的4种处理对苹果花叶病毒病均能起到一定的控制效果(图1)。1%多糖EPS66A水剂防治效果显著,药后15 d,200倍稀释液处理的防治效果达到73.99%,与其他处理具有显著性差异($P<0.05$)。药后45 d,200倍和400倍稀释液处理防效分别为63.66%和58.76%,均显著优于对照药剂5%氨基寡糖素水剂400倍稀释液,防效为47.34%。随稀释倍数增大,EPS66A水剂防效有

表5　消泡剂的筛选结果

Table 5　Screening results of defoamers

消泡剂 Defoamers	抑泡时间/s Suppressing time	常温 Room temperature	热储 Heat storage	冷储 Cold storage
B－263	256	合格	合格	合格
CK－801	162	合格	合格	合格
CK－802	95	分层	分层	分层
CK－2875	156	合格	合格	合格
CK－1075	189	合格	合格	合格
BZ	209	合格	合格	合格
空白对照 CK	34	合格	合格	合格

表6　1%多糖EPS66A水剂的热贮、冷贮稳定性测定结果

Table 6　Results of thermal storage and cold storage stability tests for 1% polysaccharide EPS66A aqueous solution

处理 Treatments	有效成分/% Active ingredient		分解率/% Decomposition rate
	处理前 Pre－treatment	处理后 Post－treatment	
常温 Room temperature	1.035 7	1.001 2	3.33b
热贮 Heat storage	1.029 3	0.986 1	4.20a
冷贮 Cold storage	1.033 0	1.003 0	2.90b

注:同列不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。

Note: The different lowercase letters indicate significant differences among treatments in the same column ($P<0.05$).

所降低,呈现剂量依赖性。800倍稀释液处理15、30和45 d防效分别为50.16%、46.55%和40.54%,均低于对照药剂5%氨基寡糖素水剂400倍稀释液处理。

2.2.2　抗氧化酶活性和丙二醛含量测定

不同药剂处理明显提高了过氧化产物苹果叶片的抗氧化酶活性及降低了丙二醛含量,结果如图2所示。施药处理前苹果植株的SOD、POD和CAT活性以及MDA含量均无明显差异,而药剂处理后叶片的抗氧化酶活性在时间上均呈现先上升后降低的趋势,MDA含量均呈现上升的趋势。药剂处理后15 d,SOD、POD和CAT活性均达到活性高峰,其中1%EPS66A水剂200倍稀释液处理的SOD、POD和CAT活性最高分别为130.04 U/g、222.89 U/g和107.85 U/g,显著高于5%氨基寡糖素水剂400倍稀释液处理($P<0.05$),相较于清水对照分别显著增加了47.07%、70.34%和50.92%,随后酶活性逐渐下降且趋于平稳。经处理后叶片中MDA含量均低于对照,其200倍稀释液处理后第15 d相对含量达到最低,为6.54 μmol/g,比对照显著降低了25.07%。随

表7　1%多糖EPS66A水剂防治苹果花叶病毒病的田间试验

Table 7　Field trials of 1% polysaccharide EPS66A solution for the control of apple mosaic disease

处理 Treatments	稀释倍数 Dilution factor	病情指数 Disease index			防治效果/% Control effectiveness		
		15 d	30 d	45 d	15 d	30 d	45 d
1%多糖EPS66A水剂 1% Polysaccharide EPS66A water solution	200	3.22	5.71	8.12	73.99a	67.59a	63.66a
	400	4.23	7.46	8.76	65.67b	56.40a	58.76a
	800	6.02	8.13	9.79	50.16c	46.55c	40.54b
5%氨基寡糖素水剂 5% Amino oligosaccharide water solution	400	4.66	7.78	10.15	63.36b	53.73b	47.34c
对照 CK	清水	10.88	15.37	18.41	－	－	－

注:同列不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。

Note: The different lowercase letters indicate significant differences among treatments in the same column ($P<0.05$).



A：1% 多糖EPS66A稀释200倍；B：1% 多糖EPS66A稀释400倍；C：1% 多糖EPS66A稀释800倍；D：5% 氨基寡糖素稀释400倍；E：清水对照

A：1% polysaccharide EPS66A at 200 times dilution；B：1% polysaccharide EPS66A at 400 times dilution；C：1% polysaccharide EPS66A at 800 times dilution；D：5% amino oligosaccharide at 400 times dilution；E：water control

图1 1%EPS66A水剂对苹果花叶病的田间防效

Fig.1 Field efficacy of 1% EPS66A aqueous solution against apple mosaic disease

1%EPS66A水剂稀释倍数减小，SOD、POD和CAT活性上升，MDA积累相对减少，呈现剂量依赖性。结果表明外源施用EPS66A水剂明显提高了苹果叶片的抗氧化酶活性和减少了丙二醛积累，可通过激活苹果抗氧化酶体系，提高其抵抗花叶病毒侵染的能力。

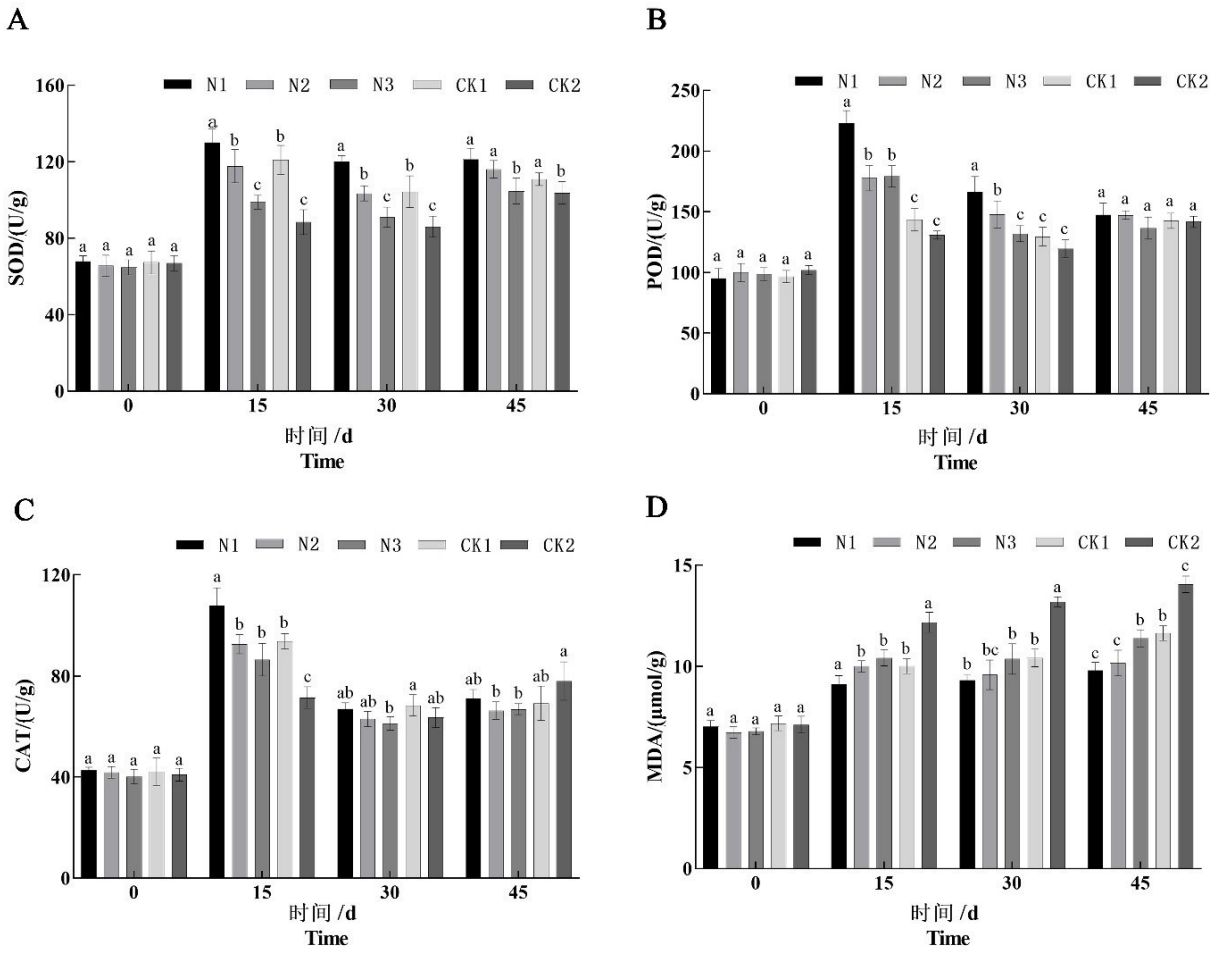
2.2.3 实时荧光定量PCR(RT－qPCR)检测

1% 多糖EPS66A水剂200倍稀释液处理苹果叶片，促进了苹果的抗氧化酶基因(*CAT*、*SOD*和*POD*)和病程相关蛋白基因(*PR1*、*PR10a*和*PR10b*)表达量(图3)。与对照叶片相比，水剂处理组叶片的抗氧化酶基因*CAT*、*SOD*和*POD*表达量与对照相比均显著增加，最高可分别上调至对照的3.08、5.54和6.35倍。处理组响应类黄酮代谢通路的关键基因*PAL*和*C4H*的相对表达量也显著提高，分别上调3.37倍和3.61倍。病程相关蛋白基因*PR10a*和*PR10b*相对表达量最高分别上调3.38倍和2.78倍，*PR1*基因在第15 d表达量达到峰值，倍数为5.51倍。以上结果表明，多糖EPS66A水剂可以通过激活抗氧化酶、类黄酮代谢和抗病相关蛋白等信号途径，增强苹果对花叶病的抗性。

3 讨论

植物病毒病发生广泛且防控难度大，对农业生产具有重大威胁[16]。植物免疫诱抗剂可以激活植物体内防御机制，从而有效降低病毒病的发生和传播，在植物病毒病的防治中得到广泛关注。本研究通过助剂筛选后得到了植物免疫诱抗剂1% 多糖EPS66A水剂的最优配方，其各项指标均满足国家关于农药水剂的相关标准。在田间试验中，1% 多糖EPS66A水剂防治苹果花叶病毒病效果显著，处理15 d后防治效果为73.99%，显著高于对照药剂5% 氨基寡糖素的63.36%。类似地，赵小明等[17-18]通过喷施2种生物农药2% 氨基寡糖水剂和寡聚半乳糖醛酸水剂，增强了苹果的免疫反应，有效防控了苹果花叶病，防治效果分别达到了93.85% 和92.08%，均显著高于对照药剂20% 毒克星。杨鸯[19]通过输液滴干的方式对感染花叶病毒的苹果树干施用6% 阿泰灵、2% 吗啉胍·铜、10% 病毒唑3种药剂，其中植物免疫诱抗剂6% 阿泰灵的防治效果最显著，达到了78%。这些研究结果进一步证实了植物免疫诱抗剂在苹果花叶病防治中的效果和潜力。

植物在受到病原侵染时，细胞内会产生大量活性氧(ROS)，导致植物的细胞组织损伤，进而干扰植物的正常生长发育和代谢活动[20]。为了调节ROS稳态，植物体内存在一套酶促抗氧化防御系统，包括SOD、POD和CAT等抗氧化酶[21]。本研究表明施用1% 多糖EPS66A水剂能够促进*CAT*、*SOD*和*POD*抗氧化酶合成基因的表达，其最高可分别上调至对照的3.08、5.54和6.35倍。类似地，段锐等[22]在向日葵施用‘锦苗标靶’诱抗剂后，其*CAT*基因转录水平比对照均上调了50倍，同时SOD、POD和CAT酶活性分别增加了69.77、5.44和1.88 U/g。本研究中水剂处理后苹果叶片中SOD、POD和CAT抗氧化酶的活性相较于对照组分别增加了47.07%、70.34% 和50.92%，同时叶片中MDA含量降低了25.07%。这与吴玉星等[23]的研究相似，其用6% 寡糖·链蛋白可湿性粉剂防治小麦白粉病，施药后植株中SOD、POD和CAT酶活性增强，有效减少了MDA的积



N1、N2、N3分别代表1%多糖EPS66A水剂稀释200、400、800倍,CK1、CK2分别代表5%氨基寡糖素水剂稀释400倍和清水对照;不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)A:SOD活性;B:POD活性;C:CAT活性;D:MDA含量

N1, N2 and N3 represent 1% polysaccharide EPS66A water solutions at 200, 400, and 800 times dilution, respectively, while CK1 and CK2 represent 5% amino oligosaccharides water solutions at 400 times dilution and the control with clear water, respectively. The different lowercase letters indicate significant differences among treatments ($P<0.05$). A: SOD activity; B: POD activity; C: CAT activity; D: MDA content

图2　1%EPS66A水剂不同稀释倍数对苹果叶片生理生化指标的影响

Fig.2　The impact of 1% EPS66A aqueous solution at different dilution rates on the physiological and biochemical indicators of apple leaves

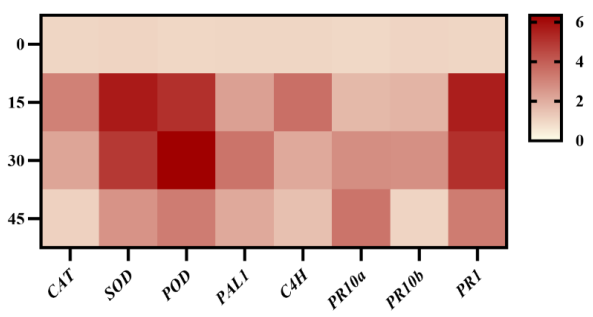


图3　EPS66A处理后苹果叶片抗病基因的表达

Fig.3　Expression of disease resistance genes in apple leaves after EPS66A treatment

累,减轻了对叶片细胞的损伤。

*PAL*和*C4H*是催化类黄酮合成的关键基因,其高效表达能增强黄酮类、花青素、酚类、查尔酮等次生代谢产物合成,对于减少病害的发生至关重要[24]。同时,病程相关蛋白(PR蛋白)的积累也可以提高植物对病毒的抵抗力和减少病害的损害。本试验中,外源施用多糖EPS66A水剂后*PAL*和*C4H*基因的相对表达水平分别上调了3.37倍和3.61倍;PR蛋白基因*PR10a*、*PR10b*和*PR1*相对表达量最高分别上调3.38、2.78和5.51倍,说明多糖EPS66A水剂可以激发类黄酮合成和PR蛋白等途径增强苹果的抗病性。这与孙宇波等[9]的结果相似,其在烟草上施用多糖EPS66A后发现*PAL*上调了17.79倍,PR蛋白基因*PR1α*、

*PR1β*和*PR5*相对表达分别增加了22.68、8.21和6.86倍。党海月等[25]对苹果树施用阿泰灵可湿性粉剂后,发现PR蛋白家族的核心基因*PR1a*表达量最高达到5.0倍,*PR10a*和*PR10b*分别达7.8倍和7.4倍,显著增强了苹果树对锈果类病毒的抗性。这些研究结果共同证实了多糖EPS66A水剂在激活苹果植物防御机制、增强植物抗病性方面的潜力。

4 结论

本研究所研制的植物免疫诱抗剂1%多糖EPS66A水剂符合质量标准,在田间应用中能激发苹果抗病基因的表达,显著提高抗氧化酶的活性,并减少MDA的积累,从而增强了苹果植株的抗病性,对于防治苹果花叶病具有显著效果,有利于推动苹果产业的可持续发展。

参 考 文 献

[1]2022年苹果产业发展概况(一)[J]. 中国果菜,2024,44(3):1-9.
China Apple Industry AssociationNational Apple Industry Technology System. Overview of apple industry development in 2022(Ⅰ)[J]. China Fruit & Vegetable,2024,44(3):1-9.

[2]王珏.陕西省苹果苗木质量调查及茎尖热处理脱除病毒研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2019.
Wang J. Quality investigation and analysis of apple nursery plants in Shaanxi province and removal of apple virus by stem tip. Yangling: Northwest A&F University, 2019.

[3]王永崇.作物病虫害分类介绍及其防治图谱——苹果花叶病及其防治图谱[J].农药市场信息,2015,(26):71.
Wang Y C. Crop pest and disease classification and introduction and their control atlas-apple mosaic disease and its control atlas [J]. Pesticide Market News, 2015, (26): 71.

[4]邢飞,王红清,李世访. 中国苹果花叶病病原研究现状分析[J]. 果树学报,2020,37(12):1953-1963.
Xing F, Wang H Q, Li S F. Advances in the identification of pathogens associated with apple mosaic disease of apple trees in China[J]. Journal of Fruit Science,2020,37(12):1953-1963.

[5]Hadidi A, Barba M, Candresse T, et al. Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits [M]. The American Phytopathological Society, 2011:25-28.

[6]贾晓君.三种病毒侵染对苹果生理、基因表达及代谢的影响[D].北京:中国农业科学院,2023.
Jia X J. The Effect of Three Viruses on the Physiology, Gene Expression and Metabolism of Apple [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences,2023.

[7]赵玲玲,宋来庆,刘美英,等. 苹果病毒病的主要症状、危害及传播途径分析[J]. 烟台果树,2013(3):5-6.
Zhao L L, Song L Q, Liu M Y, et al. Analysis of main symptoms, harm, and transmission routes of apple viral diseases [J]. Yantai Fruits,2013(3):5-6.

[8]陈荣鑫.3个苹果新品种主要病毒病的调查及RT-PCR检测采样条件的确定[D].杨陵:西北农林科技大学,2024.
Chen R X. Investigation of main virus diseases of three new apple cultivars and determination of sampling conditions for RT-PCR detection [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2024.

[9]Sun Y B, Wu H, Xu S S, et al. Roles of the EPS66A polysaccharide from *Streptomyces* sp. in inducing tobacco resistance to tobacco mosaic virus[J]. International Journal of Biological Macromolecules,2022,209(Pt A):885-894.

[10]Wu H, Sun Y B, Ma L, et al. Microbial exopolysaccharide EPS66A inducing walnut (*Juglans regia*) resistance to bacterial blight[J]. Food Chemistry,2024,435:137551.

[11]张知宇.苹果病虫害有机防控技术研究[D].太原:山西农业大学,2024.
Zhang Z Y. Research on the technology of organic prevention and control against apple diseases and pests [D]. Taiyuan: Shanxi Agricultural University, 2024.

[12]沈文飚,徐朗莱,叶茂炳,等. 氮蓝四唑光化还原法测定超氧化物歧化酶活性的适宜条件[J]. 南京农业大学学报,1996,19(2):101-102.
Shen W B, Xu L L, Ye M B, et al. The suitable conditions for determining SOD activity by Nitro Blue Tetrazolium (NBT) photoreduction method [J]. Journal of Nanjing Agricultural University,1996,19(2):101-102.

[13]赵炀,李永生,高秀峰. 基于愈创木酚荧光减量准确测定过氧化物酶活性的新方法[J]. 分析化学,2015,43(7):1040-1046.
Zhao Y, Li Y S, Gao X F. A new method for accurate determination of peroxidase activity based on fluorescence decrease of guaiacol [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry,2015,43(7):1040-1046.

[14]杨兰芳,曾巧,李海波,等. 紫外分光光度法测定土壤过氧化氢酶活性[J]. 土壤通报,2011,42(1):207-210.
Yang L F, Zeng Q, Li H B, et al. Measurement of catalase activity in soil by ultraviolet spectrophotometry [J]. Chinese Journal of Soil Science,2011,42(1):207-210.

[15]张永峰,殷波. 混合盐碱胁迫对苗期紫花苜蓿抗氧化酶活性及丙二醛含量的影响[J]. 草业学报,2009,18(1):46-50.
Zhang Y F, Yin B. Influences of salt and alkali mixed stresses on antioxidative activity and MDA content of *Medicago sativa* at seedling stage[J]. Acta Prataculturae Sinica,2009,18(1):46-50.

[16]Bos L. Crop losses caused by viruses [J]. Crop Protection, 1982, 1(3): 263-282.

[17]赵小明,李东鸿,杜昱光,等.2%氨基寡糖防治苹果花叶病[J].植物保护,2002,28(5):15-17.
Zhao X M, Li D H, Du Y G, et al. Field experiments on oligochitosan for controlling apple mosaic disease [J]. Plant Protection, 2002, 28(5): 15-17.

[18]赵小明,李东鸿,杜昱光,等.寡聚半乳糖醛酸防治苹果花叶病田间药效试验[J].中国农学通报,2004,(6):262-264.
Zhao X M, Li D H, Du Y G, et al. The field experiment of oligogalacturonides controlling apple mosaic [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2004, (6): 262-264.

[19]杨鸯.输液滴干对苹果花叶病毒病的防效及果实品质的影响[D].邯郸:河北工程大学,2019.
Yang Y. Control effect and fruit of infusion dripping on apple mosaic virus disease influence f of quality [D]. Handan: Hebei University of Engineering, 2019.

[20]薛鑫,张芊,吴金霞. 植物体内活性氧的研究及其在植物抗逆方面的应用[J]. 生物技术通报,2013,29(10):6-11.
Xue X, Zhang Q, Wu J X. Research of reactive oxygen species in plants and its application on stress tolerance [J]. Biotechnology Bulletin, 2013, 29(10): 6-11.

[21]田小敏.基于转录组水平的苹果抗白粉病基因筛选与感病叶片生理指标分析[D].杨凌:西北农林科技大学,2019.
Tian X M. Study on Physiological IndicatorsResponse to Powdery Mildew of Appleand Screening of the Resistant GeneBased on Transcriptome Analysis [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2019.

[22]段锐,刘志达,郭晓晴,等.'锦苗标靶'诱抗剂抑制列当寄生向日葵的机制研究[J].西北植物学报,2022,42(10):1769-1778.
Duan R, Liu Z D, Guo X Q, et al. Mechanism of 'Jinmiao Target' in inhibiting orobanche cumana parasitism of sunflower [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2022, 42(10): 1769-1778.

[23]吴玉星,王亚娇,韩森,等. 6%寡糖·链蛋白可湿性粉剂与杀菌剂混用防治小麦白粉病的农药减施技术研究[J]. 植物保护,2023,49(3):292-297,316.
Wu Y X, Wang Y J, Han S, et al. Application of oligosaccharins-plant activator protein 6% WP mixed with chemical fungicide to control wheat powdery mildew for the purpose of reducing the pesticide load [J]. Plant Protection, 2023, 49(3): 292-297, 316.

[24]Zhang M Y, Wang D J, Gao X X, et al. Exogenous caffeic acid and epicatechin enhance resistance against *Botrytis cinerea* through activation of the phenylpropanoid pathway in apples [J]. Scientia Horticulturae, 2020, 268: 109348.

[25]党海月,张妮妮,朱明旗,等. 阿泰灵对苹果锈果类病毒病田间防效及机制研究[J]. 西北农业学报,2022,31(1):123-128.
Dang H Y, Zhang N N, Zhu M Q, et al. Field effect and mechanism of atailing on apple scar skin viroid [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2022, 31(1): 123-128.

(编辑:吕俊俐)