

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2026.05.003

韩海霞, 郭菊菊, 孙亚硕, 等. 香菇多糖对苹果炭疽叶枯病的诱抗效应分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2026, 48(5): 25-38.

# 香菇多糖对苹果炭疽叶枯病的诱抗效应分析

韩海霞, 郭菊菊, 孙亚硕, 陈嘉仪, 马锋旺, 李翠英, 梁微

作物抗逆与高效生产全国重点实验室/陕西省苹果重点实验室/西北农林科技大学园艺学院, 陕西杨陵 712100

**摘要:** 苹果炭疽叶枯病 (Glomerella Leaf Spot, GLS) 是由炭疽菌属 (*Colletotrichum*) 真菌引起的一种重要苹果叶部病害。为开发绿色防控策略, 以“嘎啦”苹果组培苗为试材, 通过浓度梯度法、含药平板抑菌和离体叶片接种试验, 筛选出 800 倍香菇多糖 (Lentinan, LNT) 稀释液为最佳喷施浓度。该处理下, LNT 对 GLS 的抑菌率达 32.49%, 病斑面积减少 93.58%。LNT 处理显著增强抗氧化酶活性, 超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化物酶 (POD) 活性分别提高至 CK+GLS 组的 1.42 和 2.05 倍, 同时降低  $H_2O_2$  和  $O_2^-$  含量, 减少胼胝质沉积。LNT 处理显著提升了水杨酸 (SA, 为 CK 组的 4.75 倍), 玉米素 (ZT)、吲哚-3-乙酸 (IAA)、6-苄氨基嘌呤 (6-BA) 和脱落酸 (ABA) 等激素含量。LNT 处理还促进了多种氨基酸的积累, 其中蛋氨酸和精氨酸含量分别较 CK+GLS 组提高 3.63 和 2.35 倍。此外, LNT 处理诱导了绿原酸、对香豆酸以及类黄酮物质 (异槲素和金丝桃苷) 的差异积累。基因表达分析显示, LNT 可显著上调病程相关基因 *PR1*、*PR4* 和 *PPO* 的表达水平。田间试验进一步证实, 喷施 800 倍 LNT 稀释液可有效降低苹果叶部病害发病率, 并促进植株生长。

**关键词:** 苹果炭疽叶枯病; 植物免疫诱抗剂; 香菇多糖;  
诱导抗病性

中图分类号: S436.611.1

文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 1673-9868(2026)05-0025-14

## Analysis of the Induced Resistance Effect of Lentinan on Apple Glomerella Leaf Spot

HAN Haixia, GUO Juju, SUN Yashuo, CHEN Jiayi,  
MA Fengwang, LI Cuiying, LIANG WeiState Key Laboratory for Crop Stress Resistance and High-Efficiency Production / Shaanxi Key Laboratory of Apple /  
College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling Shaanxi 712100, China

**Abstract:** Glomerella leaf spot (GLS), caused by *Colletotrichum*, is a serious apple leaf disease. To devel-

收稿日期: 2025-09-29

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(31601719); 杭州因太集科技有限公司技术开发项目(20240032300570)。

作者简介: 韩海霞, 硕士研究生, 主要从事苹果病害绿色防控技术研究。

通信作者: 梁微, 博士, 讲师, 硕士研究生导师。

op a green control strategy, tissue-cultured ‘Gala’ seedlings were treated with lentinan (LNT) using concentration gradient assays, antifungal plate tests, and detached leaf inoculation experiments. The 800-fold dilution of LNT was identified as the optimal spraying concentration, achieving an antifungal rate of 32.49% and reducing the lesion area by 93.58% compared with the CK+GLS group. LNT significantly enhanced antioxidant enzyme activities, increasing SOD and POD levels to 1.42 and 2.05 times those of the CK+GLS group, respectively, while decreasing  $H_2O_2$  and  $O_2^-$  levels and reducing callose deposition. LNT also elevated the contents of salicylic acid (SA, 4.75 times that of the CK group), zeatin (ZT), indole-3-acetic acid (IAA), 6-benzylaminopurine (6-BA), and abscisic acid (ABA), as well as various amino acids. Notably, the contents of methionine and arginine were increased by 3.63 and 2.35 times, respectively, compared with the CK+GLS group. Furthermore, LNT induced the differential accumulation of chlorogenic acid, p-coumaric acid, and flavonoids (isoquercitrin and hyperoside), and upregulated the expression levels of the pathogenesis-related genes *PR1*, *PR4*, and *PPO* significantly. Field trials confirmed that spraying the 800-fold diluted LNT solution effectively reduced the incidence of apple leaf diseases and promoted plant growth.

**Key words:** Glomerella leaf spot; plant immune inducers; lentinan; induced disease resistance

苹果炭疽叶枯病(Glomerella Leaf Spot, GLS)是由围小丛壳(*Glomerella cingulata*)侵染引起的一种真菌病害,其无性态为炭疽菌属(*Colletotrichum*)真菌<sup>[1-2]</sup>。该病害主要侵染叶片和果实,导致叶片焦枯脱落、果实褐斑腐烂,造成树势衰退、产量骤降及果实商品性丧失<sup>[3]</sup>。自1988年在巴西首次报道以来<sup>[4]</sup>,GLS因潜伏期长、暴发性强、防治难度大、为害严重,已成为影响我国苹果产业可持续发展的主要真菌病害之一。目前主要依赖传统化学防治,长期使用易引致抗药性和农药残留问题。利用植物免疫诱抗剂诱导激活植物自身抗病性,已成为绿色防控的重要策略,对苹果产业可持续发展具有重要意义。

植物免疫诱抗剂,又称植物疫苗,是一类新型生物农药。该类物质虽无直接杀菌或抗病毒活性,但能通过激活植物先天免疫系统,实现抗病、增产的效果,同时有助于减少化学农药的使用量,符合绿色植保理念。植物免疫诱抗剂主要分为5大类:无机化合物类、有机酸类、苯并噻二唑类、寡糖类、蛋白多肽类和免疫诱抗菌类<sup>[5]</sup>。其中,寡糖类植物免疫诱导剂在我国研究应用较早。该类诱导剂的分子结构与真菌细胞壁的降解产物高度相似,能够模拟病原菌侵染过程,从而激活植物体内病程相关蛋白的表达,有效诱导植物系统抗病性的形成<sup>[6]</sup>。香菇多糖(Lentinan, LNT)作为代表性寡糖类诱抗剂,是一种从香菇(*Lentinus edodes*)子实体或菌丝体中提取的天然 $\beta$ -葡聚糖,对植物、人畜和环境无害,符合绿色农业需求<sup>[7]</sup>。自1968年被日本学者千原吴郎首次分离以来,LNT除作为肿瘤辅助治疗药物外<sup>[8]</sup>,在植物保护领域也显示出良好的应用潜力。单宏英等<sup>[9]</sup>研究发现1% LNT溶液对烟草灰霉病的防治效果达85.08%;王胤等<sup>[10]</sup>发现其可显著抑制番茄灰霉病菌菌丝生长。在抗病毒方面,Wang等<sup>[11]</sup>研究表明LNT通过诱导 $H_2O_2$ 暴发及上调*PR2*、*Chitinase*、*PAL*等抗病基因表达,抑制烟草花叶病毒(TMV)侵染与复制;鄢兴祥<sup>[12]</sup>试验显示10 g/L LNT对番木瓜花叶病毒病防效为82.7%,并能提高番木瓜的株高和茎粗;姜莉莉等<sup>[13]</sup>发现LNT与化学杀菌剂混用可协同防治小麦纹枯病和根腐病,实现减药控害目标。因此,LNT作为一种高效安全的植物免疫诱抗剂,兼具抗病、促生和化学农药减量增效功能。然而,目前有关LNT对GLS防控效果的研究较少,其作用机制和实际应用价值尚待研究。

本研究拟以“嘎啦”苹果组培生根苗为试材,通过设置不同浓度的LNT喷施处理,结合含药平板抑菌与离体叶片接种试验,筛选出可诱导苹果植株产生最大GLS抗病性的最适LNT稀释浓度。在最佳浓度处理下,通过组织学方法观察LNT对病原菌侵染进程的抑制作用,并系统测定活性氧含量、抗氧化酶活性、内源激素水平、氨基酸和酚类次生代谢物的积累量,以及病程相关基因的表达动态,以初步解

析 LNT 提高苹果对炭疽叶枯病抗病性的生理与分子机制。基于室内研究结果,进一步开展田间防控试验,评估 LNT 对苹果叶部病害的实际防治效果,以明确其农业应用潜力,为苹果病害的绿色防控提供理论依据与实践指导。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

以“嘎啦-3”(GL-3)苹果组培苗为试材,经继代培养生根后移栽至营养钵。待幼苗长至 20 cm 高时,选取茎秆粗壮、木质化程度一致的植株用于试验。苹果炭疽叶枯病原菌由青岛农业大学李保华教授馈赠,2%香菇多糖水剂购自山东圣鹏科技股份有限公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 GLS 病原菌活化与苹果离体叶片接种

将 GLS 病原菌在 PDA 培养基上于 25 ℃ 黑暗条件下培养,取 5 mm 菌饼转接至 PDB 液体培养基中,25 ℃、140 r/min 振荡培养 4 d,收集孢子并调配浓度至  $1 \times 10^6$  CFU/mL。接种时,用喷雾器将孢子悬浮液均匀喷施于叶片表面,以叶片正反面均被细密雾滴完全覆盖,但无液滴形成为宜,叶柄基部包裹湿棉条保湿。接种后植株置于  $(30 \pm 1)$  ℃、相对湿度  $(90 \pm 5)\%$ 、黑暗的人工气候箱培养。

#### 1.2.2 试验设计

LNT 适宜浓度筛选:取 60 株苹果幼苗,随机分为 6 组(5 个处理组和 1 个对照组),每组 10 株。将 2% LNT 水剂分别稀释 200 倍、400 倍、600 倍、800 倍和 1 000 倍。分别对 5 个处理组叶面喷施上述对应浓度的 LNT 稀释液,每日 2 次,连续处理 2 d;对照组喷施等量清水。每处理组取 30 片苹果叶片接种 GLS 病原菌,72 h 后测定病斑面积和相对电导率(REL)等指标,以确定最佳诱抗浓度。

LNT 诱抗效应分析:取 80 株幼苗,随机分 4 组,每组 20 株。① CK 组(喷施清水,不接种 GLS 病原菌);② LNT 组(喷施 800 倍 LNT 稀释液,不接种);③ CK+GLS 组(喷施清水后接种);④ LNT+GLS 组(喷施 800 倍 LNT 稀释液后接种)。每组取 200 片健康叶片,于接种后 0、6、12、24、48 和 72 h 取样,液氮速冻后  $-80$  ℃ 保存,用于生理指标及基因表达分析。剩余叶片用于病斑面积统计和活性氧染色等组织化学观察。

#### 1.2.3 LNT 对 GLS 菌丝生长抑制效果的测定

分别将 500、250、166、125 和 100  $\mu$ L 的 2% LNT 水剂加入 45 ℃ 融化的 PDA 培养基中,定容至 100 mL,配制成稀释倍数分别为 200、400、600、800 和 1 000 倍的含药平板培养基,以加等量无菌水的 PDA 平板为对照。每组设 2 次重复。取直径 5 mm 的 GLS 菌饼接种于平板中央,25 ℃ 黑暗培养 5 d,交叉法测量菌落直径。计算菌丝生长抑制率:

$$\text{菌丝生长抑制率} = \frac{\text{对照组菌落直径} - \text{处理组菌落直径}}{\text{对照组菌落直径} - 5 \text{ mm}} \times 100\% \quad (1)$$

#### 1.2.4 叶片病斑面积测定

使用 EPSON perfection V700 photo 扫描仪获取叶片图像,采用 ImageJ Pro 软件定量分析病斑面积。

#### 1.2.5 相对电导率测定

分别于 0 d 和 3 d 时从各组采集幼嫩叶片 3~5 片,去离子水冲洗干净,吸干表面水分后测定相对电导率<sup>[14]</sup>。

#### 1.2.6 叶片切片制作及显微结构观察

取 1.5 cm $\times$ 1.5 cm 叶片样品,于 4 ℃ 下用 FAA 固定液固定 24 h。经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后,切成 8~10  $\mu$ m 厚度的切片,贴片烘干。切片脱蜡复水,苯胺蓝染色,再经脱水透明,中性树脂封片,于奥林巴斯 BX-53 显微镜下观察拍照。

### 1.2.7 DAB 和 NBT 组织化学染色

采用 DAB 染色检测  $H_2O_2$  (棕色), NBT 染色检测  $O_2^-$  (蓝色)。DAB 染色液为含 0.5% DAB 和 0.1% TritonX-100 的 PBS 缓冲液, NBT 染色液为含 0.5 g/L NBT 和 0.1% TritonX-100 的 HEPES 缓冲液(pH 值 7.5)。叶片分别浸入相应染色液, 抽真空避光静置(DAB 过夜, NBT 1 h)。染色后, 用脱色液(乳酸: 甘油: 无水乙醇=1: 1: 3)沸水浴脱色至叶绿素完全褪去, 制片镜检。

### 1.2.8 活性氧含量及抗氧化系统相关酶活性的测定

采用  $H_2O_2$ -2-Y、SA-2-G、SOD-2-Y 和 POD-2-Y 试剂盒(苏州科铭生物技术有限公司)分别测定叶片中  $H_2O_2$  和  $O_2^-$  含量以及超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)的酶活, 操作按说明书进行。

### 1.2.9 氨基酸的提取及含量测定

提取氨基酸并进行对应的含量测定<sup>[15]</sup>, 检测包括脯氨酸、精氨酸、赖氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、组氨酸、丝氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甘氨酸、谷氨酸和天冬氨酸等 16 种氨基酸的含量。

### 1.2.10 酚类物质的提取及含量测定

提取酚类物质并进行含量测定<sup>[15]</sup>, 分别检测根皮苷、肉桂酸、儿茶素、原花青素、芦丁、槲皮素、金丝桃苷、异槲素、表儿茶素、对香豆酸、没食子酸、山柰酚、原儿茶酸、阿魏酸和绿原酸等 15 种酚类物质的含量。

### 1.2.11 内源激素的提取及含量测定

提取激素并进行含量测定<sup>[16]</sup>, 检测包括玉米素(ZT)、生长素(IAA)、1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)、赤霉素( $GA_3$ )、水杨酸(SA)、6-苄氨基嘌呤(6-BA)和脱落酸(ABA)等 7 种激素的含量。

### 1.2.12 病程相关基因表达分析

于接种 GLS 后 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h 和 48 h 取样, 液氮速冻后  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  保存。采用 Fast Pure Universal Plant Total RNA Isolation Kit(Vazyme)试剂盒提取叶片总 RNA, HiScript IV All-in-one Ultra RT Super Mix for qPCR 试剂盒反转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板, 使用表 1 中 PR1、PR2、PR4、PR5、PAL、PPO 和 Chitinase 基因的引物进行 qRT-PCR。反应程序:  $95\text{ }^\circ\text{C}$  预变性 10 min;  $95\text{ }^\circ\text{C}$  变性 15 s,  $60\text{ }^\circ\text{C}$  退火 1 min, 共 30 个循环。采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法<sup>[17]</sup> 计算基因相对表达量。

表 1 qRT-PCR 引物序列

引物名称	序列(5'→3')
<i>qMdMDH-F</i>	CGTGATTGGGTACTTGGAAC
<i>qMdMDH-R</i>	TGGCAAGTGACTGGGAATGA
<i>qMdPR1-F</i>	GCAGCAGTAGGCGTTGGTCCCT
<i>qMdPR1-R</i>	CCAGTGCTCATGGCAAGGTTTT
<i>qMdPR2-F</i>	TGGGACTCGATACCCTAGCCTCT
<i>qMdPR2-R</i>	GCTTGATCACCACTTCAGAAGGC
<i>qMdPR4-F</i>	CCACCTCTACAATCCACAGCAAAAC
<i>qMdPR4-R</i>	GTCCGAAAAGGCAGTCCATCCA
<i>qMdPR5-F</i>	AACTAGCATCCAAAGCTAGCC
<i>qMdPR5-R</i>	CCACAGTCTGCAGTTTACAAG
<i>qMdPAL-F</i>	GACCAAACGGTCAGACCCTCAATG
<i>qMdPAL-R</i>	AGCCAAGCCAGAACCAACAGCAG
<i>qMdPPO-F</i>	TGCTGGGAGTTTTGTGAGTG
<i>qMdPPO-R</i>	CCGATCTTAACAGCCTGAGC
<i>qMdChitinase-F</i>	TGGAGGATGGGAAAGTGC
<i>qMdChitinase-R</i>	GGGTGAGTTGGATGGGTC

### 1.2.13 胼胝质沉积染色

将叶片切成  $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$  小块, 用 95% 乙醇脱色至透明(每 2 h 更换脱色液)。以含 0.01% 苯胺蓝的 150 mmol/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  缓冲液(pH 值 9.5)避光染色过夜。叶片于 50% 甘油中保存并制片, 在激发波长 400~485 nm 下观察胼胝质沉积。

### 1.2.14 田间喷施 LNT 对苹果生长和叶部病害抗性诱导效应分析

田间试验于 2024 年在陕西省宝鸡市扶风县青龙庙村开展, 设处理和对照: 喷施 800 倍 LNT 稀释液, 对照喷施等量清水。每处理 120 棵树, 间隔一行果树以防交叉污染。5 月 10 日首次施药, 使用芝浦 ZP-LD-DYQ 背负式电动静电喷雾器(工作压力 0.2~0.4 MPa, 流量 1 L/min, 雾滴中径  $\leq 120\ \mu\text{m}$ )喷雾, 以叶片润湿不滴液为施药标准。每 15 d 喷施 1 次, 共 3 次, 试验期间未使用其他杀菌剂。末次喷施后第 7 d, 测定株高、新梢数量、新梢长度和冠径等生长指标, 并按照分级标准<sup>[18]</sup>调查发病情况、统计病级、计算病情指数和诱抗防治效果。

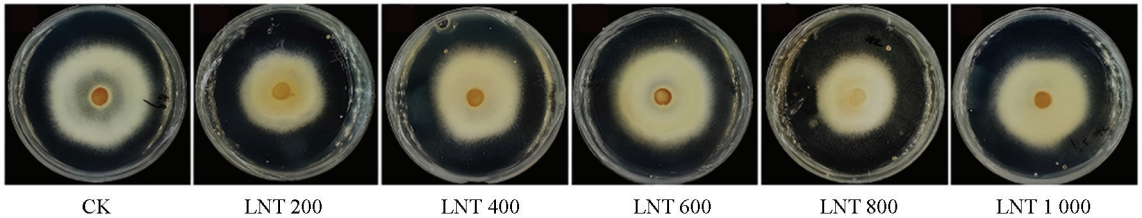
### 1.2.15 数据处理与分析

采用 GraphPad Prism v10.1.2 软件进行单因素方差分析(ANOVA)及 Tukey's 检验( $p < 0.05$ ), 数据以平均值  $\pm$  标准误(SE)表示。使用 Origin 2019 软件(OriginLab, Northampton, USA)绘图, TBtools 软件绘制氨基酸、酚类物质和激素含量热图。

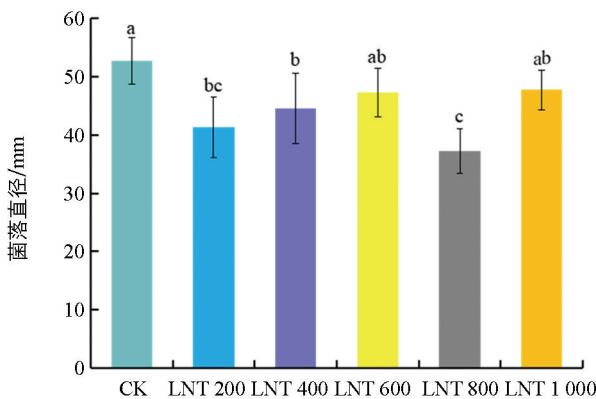
## 2 结果与分析

### 2.1 LNT 对 GLS 菌丝生长的抑制效果

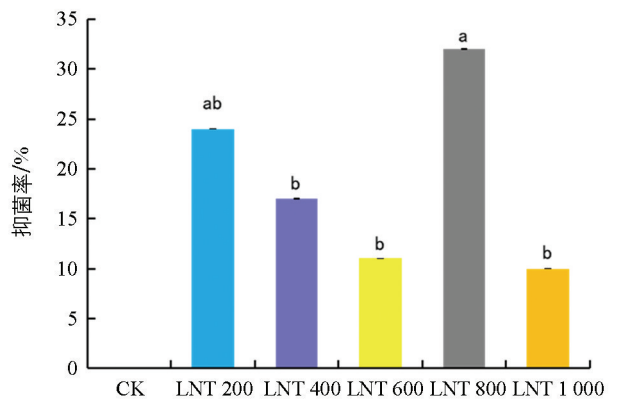
试验结果看出, CK 组的菌落直径最大, 600 倍和 1 000 倍 LNT 稀释液处理组与 CK 组无显著差异, 200 倍和 400 倍处理组的菌落直径小于 CK 组, 800 倍处理组的菌落直径最小, 为 37.20 mm(图 1a、b)。抑菌率分析表明, 800 倍稀释液的抑菌率最高, 为 32.49%(图 1c), 说明该浓度对 GLS 菌丝生长的抑制作用最强。



a. 不同浓度下LNT平板GLS菌丝生长状况



b. 各处理组菌落直径



c. 外源LNT抑菌率

图 1 不同浓度 LNT 对 GLS 菌丝生长的抑制效果

## 2.2 LNT 喷施处理诱导苹果抗病性的最适浓度筛选

苹果离体叶片接种 GLS 后, 200、400、600、800 和 1 000 倍 LNT 稀释液处理组的病斑面积均显著小于 CK 组(图 2a), 表明 LNT 能缓解病原菌造成的叶片组织坏死, 其中 800 倍稀释液处理组的病斑面积最小, 较 CK 组减小 93.58%(图 2b)。接种 3 d 后, 仅 800 倍处理组的相对电导率显著低于 CK 组, 降至 30.34%(图 2c)。以上结果表明, 800 倍 LNT 稀释液能有效抑制病斑扩展并减轻细胞膜损伤, 后续试验选用该浓度。

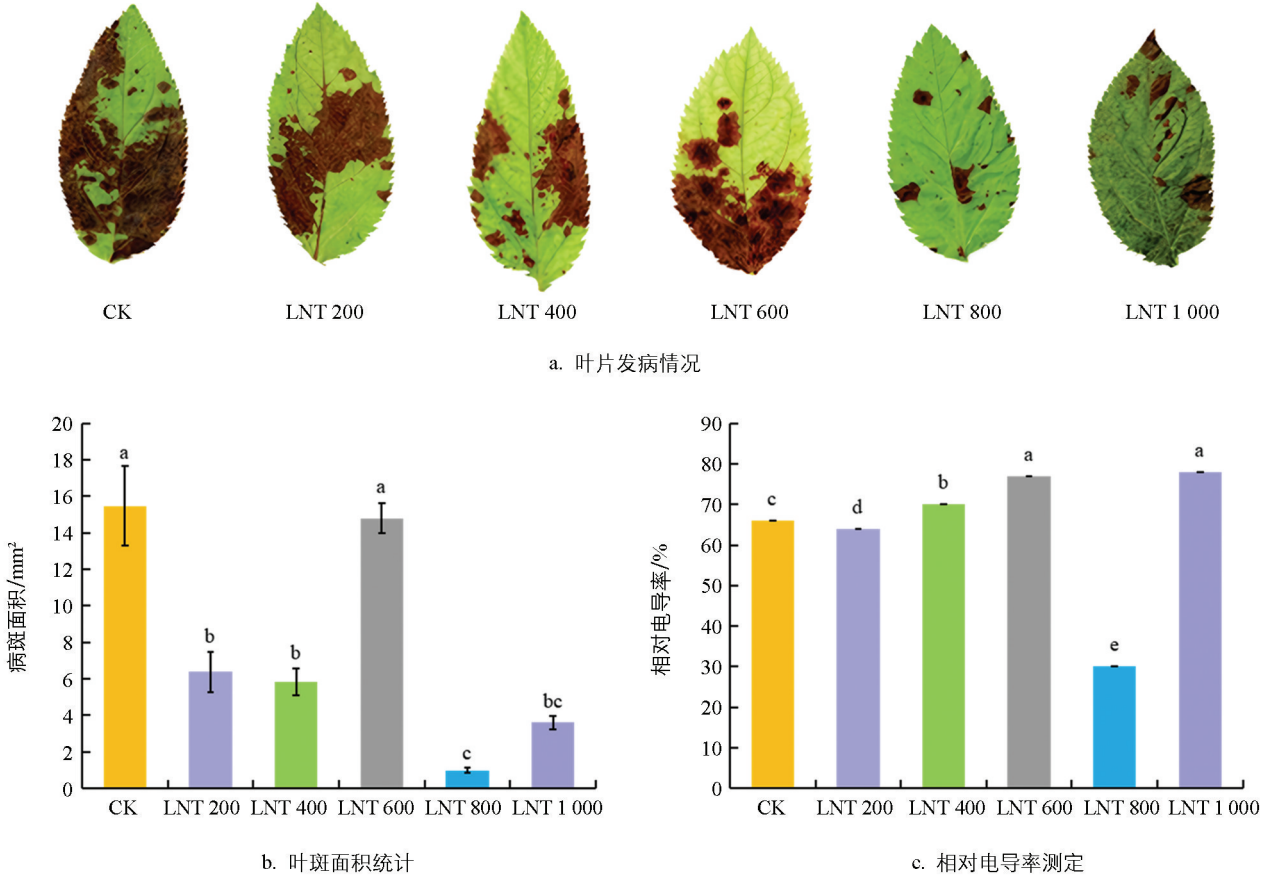


图 2 LNT 喷施处理诱导苹果叶片抗病性的最适浓度筛选

## 2.3 GLS 侵染下 LNT 对苹果叶片发病情况的影响

接种 GLS 后, CK 组病斑面积从 3 d 时的 36.30 mm<sup>2</sup> 扩大至 5 d 时的 60.80 mm<sup>2</sup>(图 3a)。相比之下, LNT 处理组的病斑扩展显著受限, 在 3 d 和 5 d 时的病斑面积分别为 4.55 mm<sup>2</sup> 和 10.69 mm<sup>2</sup>, 仅为同期 CK 组的 12.54% 和 17.68%(图 3 b)。表明 LNT 处理可显著抑制 GLS 侵染引起的病斑扩展。

## 2.4 GLS 侵染下 LNT 对苹果叶片显微结构的影响

接种 GLS 后, CK 组与 LNT 组叶片显微结构差异显著(图 4)。第 0 d, 叶片结构完整, 细胞饱满。接种 3 d 后, CK 组表皮细胞受损, 栅栏组织和海绵组织褐变; LNT 组仅轻微损伤, 结构良好。接种 5 d 时, CK 组结构严重崩解; LNT 组损伤加重, 但完整性相当于 CK 组第 3 d 水平, 细胞仍可辨。表明 LNT 处理能延缓 GLS 引起的组织破坏, 维持细胞完整性, 减轻病害。

## 2.5 GLS 侵染下 LNT 对 ROS 含量与抗氧化酶活性的影响

DAB 和 NBT 染色显示, 第 0 d 时两组叶片均无明显染色。接种 GLS 后, CK+GLS 组叶片中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (棕色) 和 O<sub>2</sub><sup>-</sup> (蓝色) 大量积累, 而 LNT 处理后两者显著减少(图 5a)。定量结果与染色一致: LNT 组

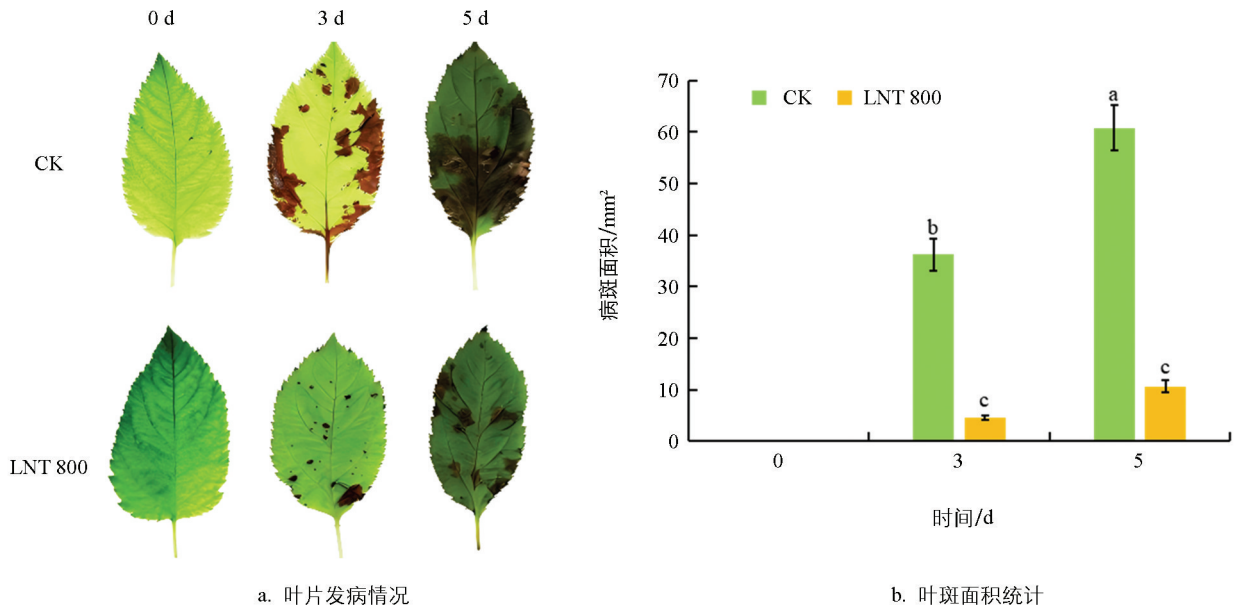


图 3 800 倍 LNT 稀释液喷施处理对苹果炭疽叶枯病发病情况的影响

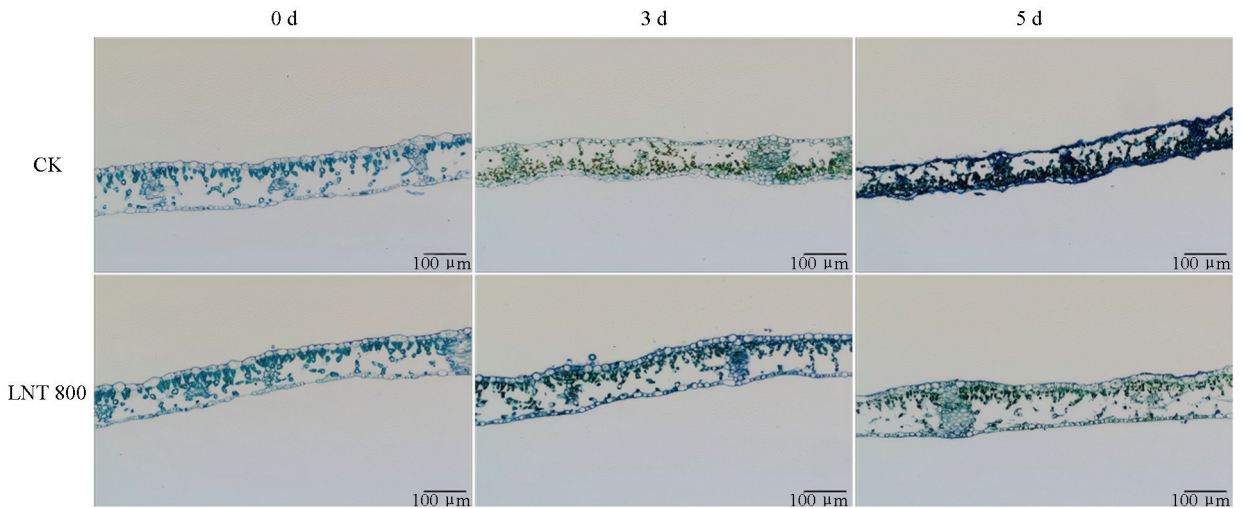


图 4 GLS 侵染下 LNT 对苹果叶片显微结构的影响

$H_2O_2$  含量低于 CK 组, 接种 GLS 后, CK+GLS 组升高, 而 LNT+GLS 组较 CK+GLS 组降低 23.47% (图 5b)。 $O_2^-$  含量变化趋势类似, LNT+GLS 组较 CK+GLS 组降低 11.11% (图 5c)。SOD 活性以 CK 组最低(43.35 U/g), LNT 处理后升高, 接种 GLS 后, CK+GLS 组进一步升高, LNT+GLS 组达到最高值(151.54 U/g), 显著高于 CK+GLS 组(图 5d)。POD 活性变化趋势相同, LNT+GLS 组最高, 显著高于 CK+GLS 组(图 5e)。上述结果表明, LNT 处理能增强 SOD 和 POD 活性, 减少 GLS 侵染诱导的活性氧(ROS)积累, 缓解氧化胁迫, 提高苹果叶片抗病性。

## 2.6 GLS 侵染下 LNT 对苹果叶片中氨基酸、酚类物质和内源激素含量的影响

在氨基酸代谢方面(图 6a), 与 CK 组相比, LNT 处理使甘氨酸和苯丙氨酸含量升高了 29% 和 12%, 精氨酸等下降。CK+GLS 组中多数氨基酸含量最低, 其中脯氨酸和精氨酸分别仅为 CK 组的 11.29% 和 17.09%。LNT+GLS 组中各氨基酸含量均较 CK+GLS 组显著提高, 以甲硫氨酸增幅最大(3.63 倍)。聚类分析显示, 脯氨酸和精氨酸在 CK 组中最高, 接种 GLS 后降低, 聚为一簇; 苯丙氨酸和酪氨酸变化趋势相似, 聚为另一簇; 甘氨酸和谷氨酸变化不同, 单独成簇。

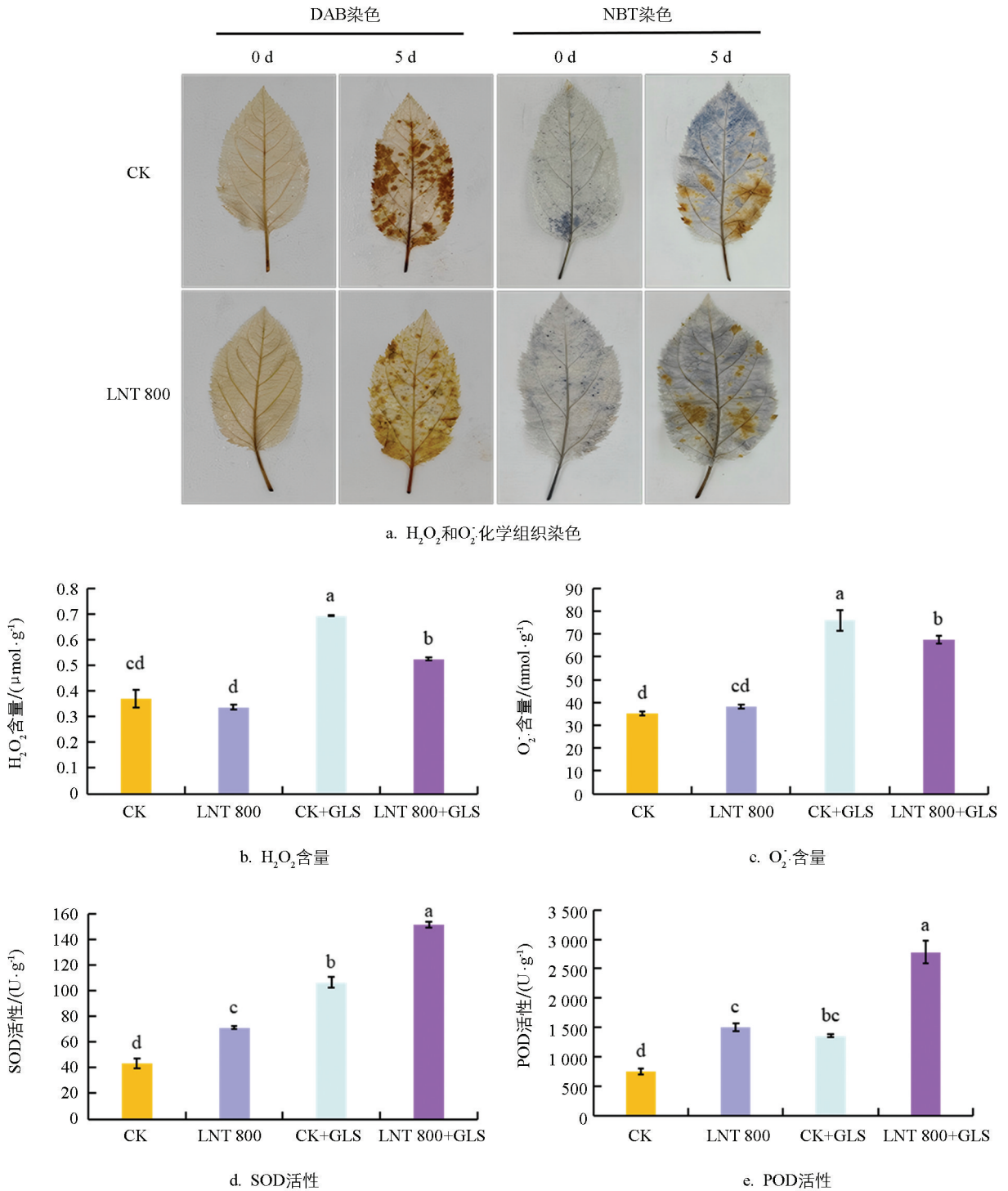


图 5 GLS 侵染下 LNT 对苹果叶片中 ROS 含量与抗氧化酶活性的影响

在酚类物质代谢方面(图 6b),与 CK 相比, LNT 处理使表儿茶素等 8 种酚类物质含量提高, 芦丁增幅最大, 提高了 59%。CK+GLS 组中原儿茶酸等 6 种酚类物质含量较 CK 组显著上升, 以绿原酸(10.73 倍)和对香豆酸(6.26 倍)最为显著。LNT+GLS 组中根皮苷等 9 种酚类物质较 CK+GLS 组进一步升高, 其中异栎素和金丝桃苷增加最明显, 分别提高了 39%和 31%, 而绿原酸等 4 种酚类物质则下降至 CK+GLS 组的 17.77%~66.10%。聚类分析显示, 芦丁、金丝桃苷、槲皮素等在 LNT 组积累较多, 对香豆酸和绿原酸等在 CK+GLS 组积累较高。

在激素调控方面(图 6c), 未接种 GLS 时, LNT 组中玉米素含量为 0.02 ng/g(CK 组未检出), 脱落

酸、6-苄氨基嘌呤和生长素分别较 CK 组提高 34%、130% 和 437%。接种 GLS 后, CK+GLS 组玉米素升至 0.06 ng/g, 水杨酸达峰值, 为 CK 组的 18.06 倍; 脱落酸、6-苄氨基嘌呤和生长素分别为 CK 组的 1.30、2.84 和 8.78 倍; 而 1-氨基环丙烷-1-羧酸和赤霉素与 CK 组差异不大。与 CK+GLS 组相比, LNT+GLS 组中 6-苄氨基嘌呤、1-氨基环丙烷-1-羧酸、玉米素、赤霉素和生长素分别升高至 1.34、1.79、2.99、3.10 和 3.04 倍, 而水杨酸和脱落酸分别降至 25.24% 和 8%。聚类分析表明, 玉米素和生长素在各处理组中依次升高, 聚为一簇; 1-氨基环丙烷-1-羧酸和赤霉素在 LNT+GLS 组中显著积累, 聚为另一簇; 水杨酸在接种 GLS 后急剧上升, 但 LNT 处理使其增幅减小, 单独成簇。

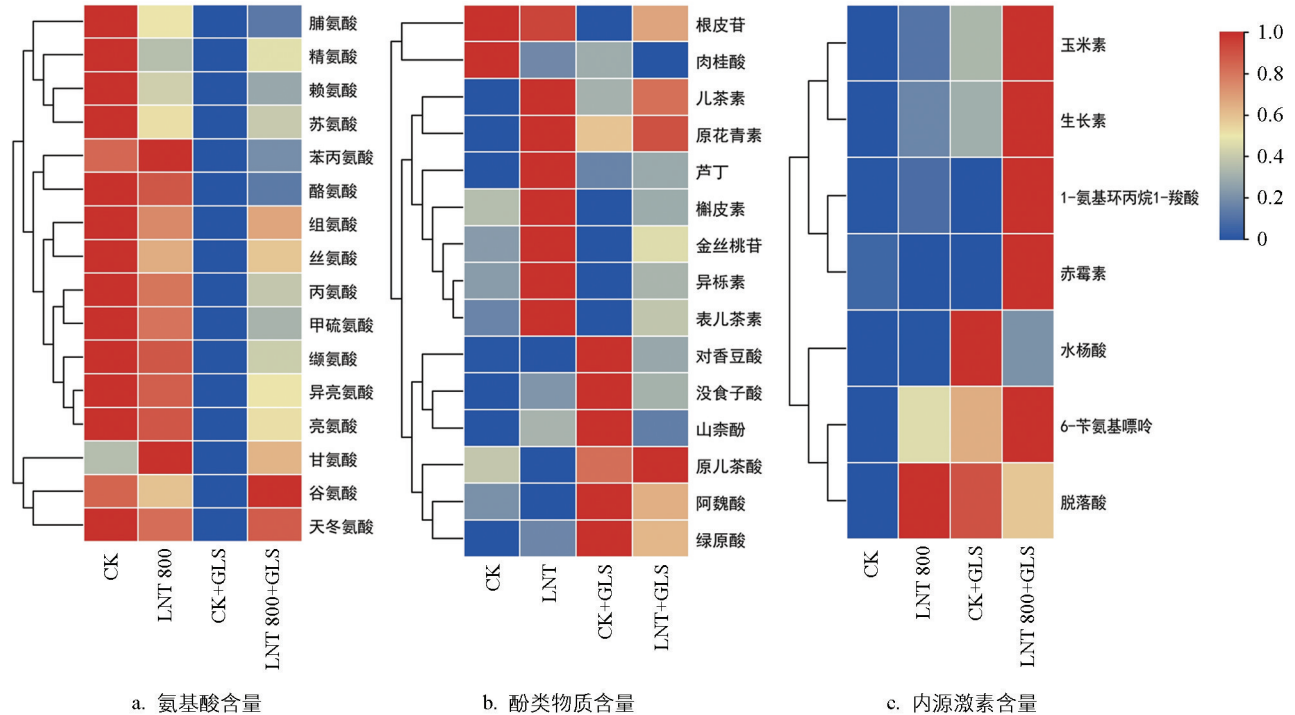


图 6 GLS 侵染下 LNT 对苹果叶片中氨基酸、酚类物质和内源激素含量的影响

## 2.7 GLS 侵染下 LNT 对苹果叶片病程相关基因表达量的影响

如图 7 所示, 0 h 时各组基因表达无显著差异。接种 GLS 后, 各基因表达均被诱导。PR1 基因在 24 h 和 48 h 时, LNT+GLS 组表达量显著高于其他组, 分别为 CK 组的 9.51 倍和 19.34 倍(图 7a)。PR2 基因在 0~6 h 以 CK+GLS 组表达较高, 24~48 h 则以 LNT+GLS 组更高(图 7b)。PR4 和 PR5 基因表达趋势相似, LNT+GLS 组在各时间点均高于 CK+GLS 组, 24 h 时分别为后者的 3.31 倍和 3.95 倍, 48 h 时两组均快速上升并达到峰值(图 7c、d)。PPO 基因在 3 h 和 6 h 时, LNT+GLS 组表达量高于 CK+GLS 组(图 7e)。PAL 基因在 3 h 时 CK+GLS 组较高, 之后下降, 而 LNT+GLS 组在 24 h 前缓慢上升(图 7f)。Chitinase 基因表达趋势与 PPO 相似, 12 h 达峰值(图 7g)。综上, GLS 侵染显著诱导 7 个病程相关基因上调, LNT 处理进一步增强其转录水平, 提高苹果对 GLS 的防御能力。

## 2.8 GLS 侵染下 LNT 对苹果叶片胼胝质沉积的影响

为探究 GLS 侵染下 LNT 处理对苹果叶片胼胝质积累的影响, 分别对 CK+GLS 组和 LNT+GLS 组在第 0 d 和接种后第 3 d 的叶片进行胼胝质染色。如图 8 所示, 接种前(第 0 d), 两组胼胝质沉积量无显著差异。接种后第 3 d, CK+GLS 组沉积量显著增强, 而 LNT+GLS 组胼胝质信号强度显著低于同期 CK+GLS 组。

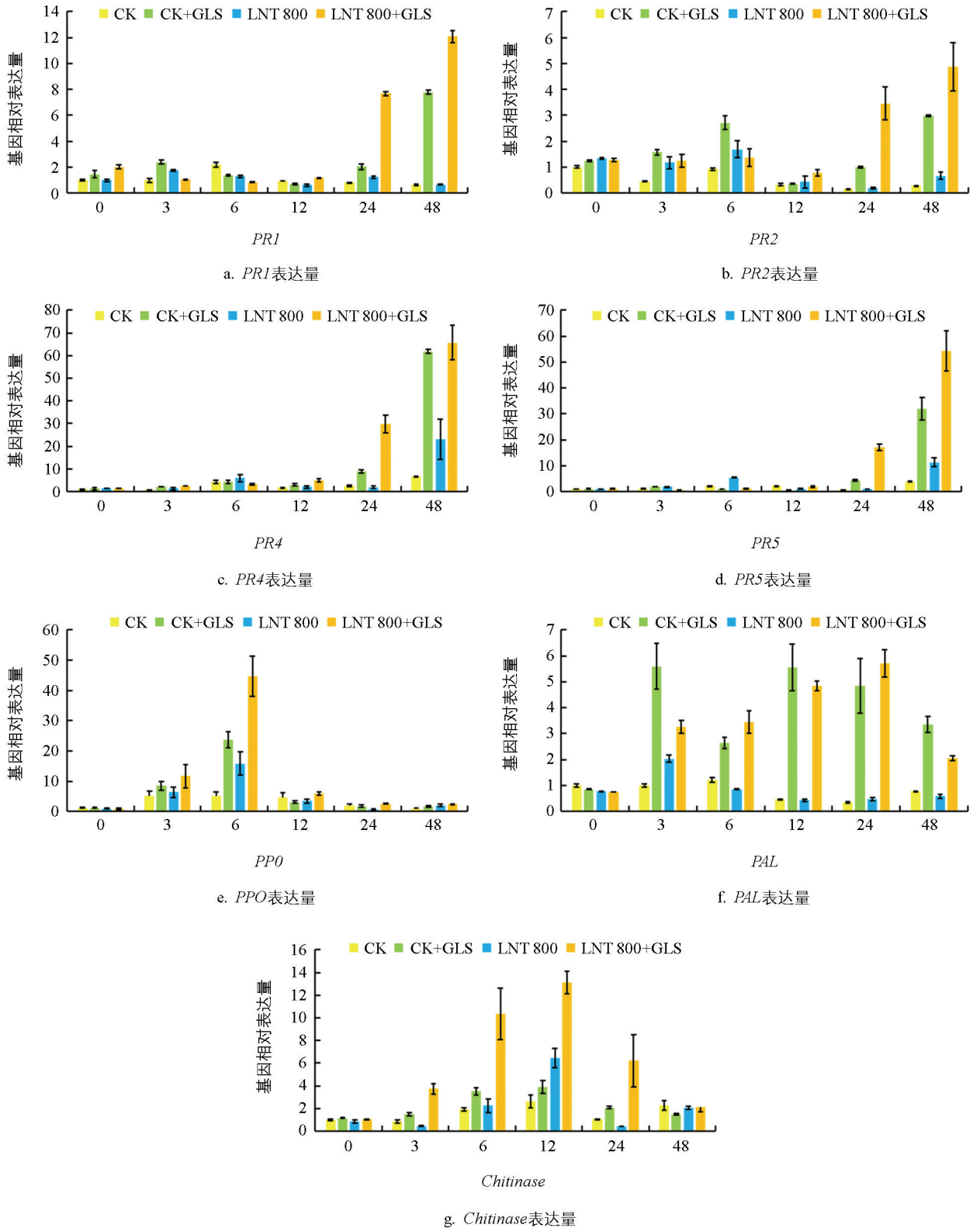


图 7 GLS 侵染下 LNT 对苹果叶片中病程相关基因表达量的影响

## 2.9 田间喷施 LNT 对苹果生长和叶片病情指数的影响

田间喷施 800 倍 LNT 稀释液可显著降低苹果叶片病害, 病情指数较 CK 组下降 17.96%, 免疫诱抗效果达 33.56%。同时, 株高、新梢数量、新梢长度、东西和南北冠径等生长指标均优于 CK 组, 较 CK 组分别提高了 9.47%、32.79%、28.10%、34.23% 和 29.52%, 其中东西冠径增长最显著(表 2)。表明喷施

800 倍 LNT 稀释液可有效降低苹果叶片病害的发病率并促进树体生长。

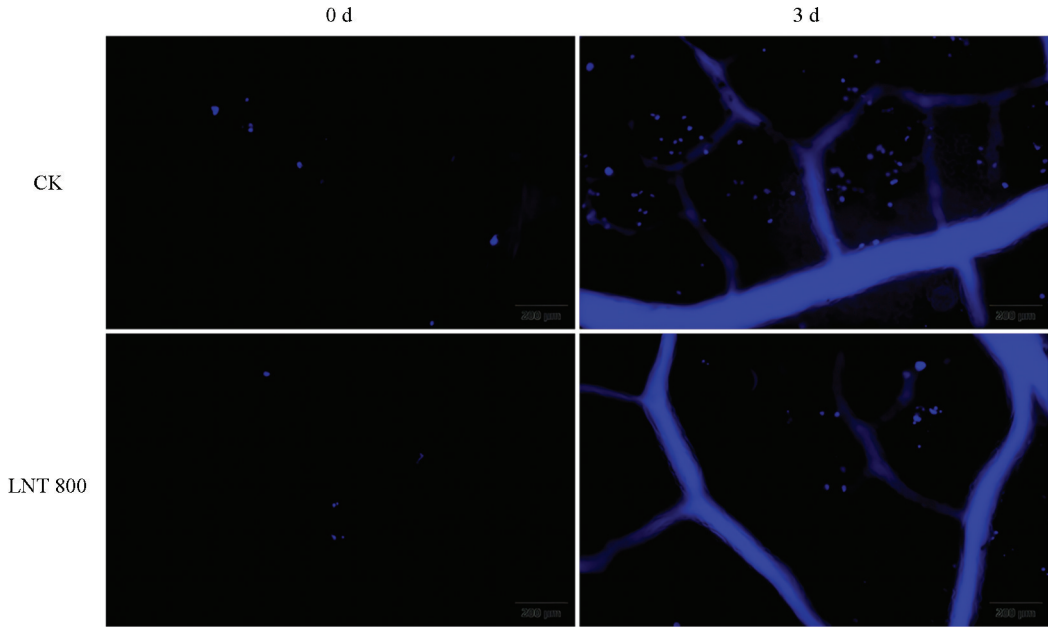


图 8 GLS 侵染下 LNT 对苹果叶片胼胝质沉积的影响

表 2 田间 800 倍 LNT 稀释液喷施处理对苹果生长和叶片病情指数的影响

处理	株高/ cm	新梢数量/ 个	新梢长度/ cm	冠径/cm		病情指数/ %	诱抗效果/ %
				东西	南北		
CK	169.57±26.82b	11.65±3.45b	52.95±8.10b	74.38±19.75ab	76.12±16.74b	53.52	—
LNT 800	185.04±29.38a	15.47±1.66a	67.83±9.58a	99.84±24.27a	98.59±27.47a	35.56	33.56

### 3 讨论和结论

#### 3.1 讨论

平板抑菌试验表明, LNT 在 200~1 000 倍稀释液浓度下均对 GLS 病原菌的生长表现出一定的抑制作用, 但抑制效果未达到显著水平, 该结果与已有研究结论一致, 即植物免疫诱抗剂主要通过激活系统获得性抗性(SAR)增强植物自身抗病能力, 而非直接抑制病原菌生长<sup>[19]</sup>。离体叶片接种试验进一步表明, 喷施 800 倍 LNT 稀释液能显著降低苹果叶片 GLS 发病率和病斑面积, 表明该浓度对 GLS 具有良好防控效果。相对电导率测定结果也证实 LNT 对叶片细胞膜结构具有保护作用。综上, 本研究最终选用 800 倍 LNT 稀释液进行后续试验以探究其诱导苹果抗病性的作用机制。

组织学观察发现, CK+GLS 组苹果叶片在接种 3 d 时表皮细胞出现损伤, 5 d 后结构明显破碎。该损伤源于 GLS 分生孢子形成附着胞与侵染钉, 穿透上表皮并引起细胞壁溶解, 同时病原菌分泌酶类降解角质层, 破坏表皮防御结构, 促进其进一步扩散与定殖。随侵染进展, 栅栏组织逐渐褐变, 可能与菌丝在胞内扩展有关, 最终形成典型褐色坏死斑<sup>[20]</sup>。相比之下, LNT 处理显著延缓了 GLS 的侵染进程, 减轻发病程度, 并维持了细胞结构完整性。有报道显示, 石莼多糖等植物免疫诱抗剂可通过抑制附着胞黑化阻碍 GLS 病原菌有效侵染, 提示 LNT 作为多糖类物质可能通过类似机制发挥防控作用<sup>[21]</sup>。

在植物—病原物互作过程中, ROS 暴发是常见的早期响应。为应对氧化胁迫, 植物会激活抗氧化酶系统, 合成 SOD、POD 等酶以清除 ROS, 减轻细胞损伤<sup>[22]</sup>。本研究显示, GLS 侵染诱导苹果叶片中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

积累,导致 ROS 水平升高;而 LNT 处理增强了 SOD 和 POD 活性,显著降低了 ROS 含量,表明 LNT 能够激活抗氧化系统,有效缓解由 GLS 引发的氧化损伤。在激素水平方面,LNT 处理显著提高了 ABA 含量,推测其作为免疫诱抗剂模拟病原菌侵染,激活防御信号、诱导 ABA 合成和促进气孔关闭,从而限制病原菌侵入<sup>[23-24]</sup>。另外,LNT 处理也使 ZT、IAA、ACC 和 GA<sub>3</sub> 含量有不同程度提高,说明 LNT 在诱导植物抗病性的同时,可能通过调节生长相关激素促进植物生长发育<sup>[25]</sup>。ACC 作为乙烯前体,其积累可能促使乙烯早期暴发,协同 SA 信号诱导 PR 蛋白表达<sup>[26]</sup>。LNT 可能通过提前积累 ACC,促使乙烯早期暴发,从而增强对 GLS 的早期抑制。

氨基酸代谢在植物抗病中发挥重要作用,不仅为蛋白质合成提供基础,还参与次生代谢、能量供应和抗氧化等多种抗病防御反应<sup>[27]</sup>。本研究发现,LNT 处理显著缓解 GLS 侵染引起的氨基酸消耗,并提高多种抗病相关氨基酸的水平,从而增强苹果对 GLS 侵染的适应能力。具体表现为:脯氨酸消耗减少,有助于细胞维持渗透平衡和功能稳定<sup>[28]</sup>;精氨酸含量回升,可能通过 NO 信号途径激活 PR 基因表达<sup>[29]</sup>;赖氨酸消耗受抑,推测其转化为谷氨酰胺等含氮防御物质参与抗病免疫反应;天冬氨酸含量上升,可能通过三羧酸(TCA)循环增强能量供给<sup>[30]</sup>;甘氨酸作为谷胱甘肽前体含量提高,有助于增强抗氧化能力<sup>[31]</sup>。综上,LNT 通过协同调控氨基酸代谢,在渗透调节、免疫信号、能量代谢和抗氧化防御等多方面增强苹果对 GLS 的抗性。

酚类物质在植物抗病中既可作为木质素等细胞壁组分的前体增强物理屏障<sup>[32]</sup>,又能通过类黄酮等次生代谢产物直接抑制病原菌生长<sup>[33]</sup>。本研究显示,LNT 处理可促进芦丁、金丝桃苷和槲皮素等类黄酮类物质积累,这些物质可能通过下游代谢增强对 GLS 的抗性;而 CK+GLS 组则大量积累阿魏酸和对香豆酸等酚酸类物质,其中阿魏酸参与细胞壁强化<sup>[33]</sup>,对香豆酸作为苯丙烷代谢的关键节点响应病害侵染<sup>[34]</sup>。因此,LNT 可能通过特异性激活类黄酮代谢途径诱导植物系统性抗性,其作用机制不同于病原菌直接侵染引发的广泛酚类积累反应。

在植物免疫中,病原菌侵染会触发病原相关分子模式激发的免疫反应(PTI)与效应蛋白激发的免疫反应(ETI),激活 SA 等防御信号通路并诱导 PR 蛋白表达<sup>[35]</sup>。LNT 可能通过模拟病原体相关的分子模式(PAMPs),经模式识别受体(PRRs)激活 PTI 免疫反应,与病原信号叠加增强防御响应,进而促进 SA 通路驱动 PR 基因表达。PR1 是植物防御反应的关键标志物<sup>[36]</sup>。本研究中,GLS 侵染诱导 SA 通路启动并上调 PR1 表达;LNT+GLS 组在 12 h 后表达量高于 CK+GLS 组,表明 LNT 具有免疫诱抗作用。PR2 是 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因,在 CK+GLS 组早期显著上调,而 LNT+GLS 组表达较缓,至 24 h 才明显升高,说明 LNT 可能延缓了病原体侵染进程。PAL 是苯丙氨酸解氨酶基因,在 GLS 侵染后迅速响应但逐渐减弱,LNT 处理则能增强其表达持续性,促进木质素合成以强化细胞壁<sup>[37]</sup>。

田间试验表明,喷施 LNT 可显著降低苹果叶部病害病情指数,并有效促进树体生长,表现为东西冠径和新梢数量的显著增加。前人研究也表明 LNT 具有促进油菜根系生长<sup>[38]</sup>和提升番茄产量等作用<sup>[39]</sup>,印证了 LNT 兼具诱导植物抗病性与促进生长的双重功能,符合植物免疫诱抗剂的典型特征。因此,以 LNT 为核心的植物免疫诱导技术有望成为苹果病害绿色防治的有效策略<sup>[40]</sup>。然而,LNT 的诱抗效果易受品种与田间环境因素影响,且当前研究多限于小区试验,缺乏规模化果园的长期验证,未来需结合区域生态与栽培管理,开展系统性田间集成示范,以推动该技术的产业化应用。

### 3.2 结论

本研究采用浓度梯度试验、平板抑菌及离体叶片接种等方法,确定 800 倍 LNT 稀释液为外源喷施诱导苹果对 GLS 抗性的最适浓度。组织学观察表明,LNT 处理有助于维持细胞结构完整性,减少防御物质

异常沉积。在生理水平上, LNT 激活 SOD、POD 等抗氧化酶活性, 缓解氧化损伤; 同时调控激素和氨基酸代谢通路, 促进黄酮类等抗病次生代谢物积累。基因表达分析表明, LNT 诱导多种病程相关基因上调表达。综上, LNT 通过协同调控抗氧化防御、激素信号传导和次生代谢等多层次免疫响应, 系统增强苹果对 GLS 的抗性。田间试验进一步证实, 喷施 800 倍 LNT 稀释液可有效降低病情指数并促进植株生长, 展现出良好的应用潜力。

### 参考文献:

- [1] 刘禹彤, 徐瑞旋, 王洪涛, 等. 外源甜菜碱提高苹果对炭疽叶枯病的抗病性 [J]. 果树学报, 2022, 39(7): 1252-1261.
- [2] 马亚男, 郭洁, 李林光, 等. 苹果炭疽叶枯病研究进展 [J]. 山东农业科学, 2018, 50(5): 160-167.
- [3] LIU Y X, LAN J H, WANG C H, et al. Investigation and Genetic Mapping of a *Glomerella* Leaf Spot Resistance Locus in Apple [J]. *Plant Breeding*, 2017, 136(1): 119-125.
- [4] LEITE R P, TSUNETTA M, KISHINO A Y. Ocorrência De Mancha Foliar De *Glomerella* Em Macieira No Estado Do Paraná [J]. *Informe da Pesquisa-Fundacao Instituto Agronomico do Parana (Brazil)*, 1988(1): 81.
- [5] 邱德文. 我国植物免疫诱导技术的研究现状与趋势分析 [J]. *植物保护*, 2016, 42(5): 10-14.
- [6] 周杨蕾, 段灵涛, 周而勋. 植物免疫诱抗剂在作物病害绿色防控中的应用 [J]. *中国植保导刊*, 2025, 45(2): 64-68, 73.
- [7] 杨鑫, 樊吴静, 李丽淑, 等. 香菇多糖对马铃薯疮痂病抗性及其生理特性的影响 [J]. *西南农业学报*, 2019, 32(1): 98-103.
- [8] 田菲. 香菇多糖在抗肿瘤治疗中的应用进展 [C]. 第十二届全国中西医结合肿瘤学术大会, 2010: 371-373.
- [9] 单宏英, 沈小英, 陈德鑫, 等. 香菇多糖对烟草灰霉病的防治效果研究 [J]. *中国烟草学报*, 2012, 18(4): 56-61.
- [10] 王胤, 冯晓菁, 付思蕊, 等. 3种植物免疫诱抗剂对番茄灰霉病菌的抑制作用 [J]. *蔬菜*, 2023(8): 31-36.
- [11] WANG J, WANG H Y, XIA X M, et al. Inhibitory Effect of Sulfated Lentinan and Lentinan against Tobacco Mosaic Virus (TMV) in Tobacco Seedlings [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 61: 264-269.
- [12] 鄢兴祥. 几种生物农药诱导番木瓜抗 PRSV 的效果及其机理 [D]. 海口: 海南大学, 2019.
- [13] 姜莉莉, 张中霄, 王红艳, 等. 防治小麦纹枯病和根腐病高效药剂的筛选及其与香菇多糖联用的防效评价 [J]. *麦类作物学报*, 2018, 38(1): 113-118.
- [14] 唐仲文. 多巴胺在调控苹果重金属镉和铜胁迫中的功能研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2022.
- [15] 刘禹彤. 苹果炭疽叶枯病菌原菌侵染下外源甜菜碱和壳聚糖的诱抗效应分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2022.
- [16] 杨露露. 苹果 MdHB7 在应答炭疽叶枯病菌和腐烂病菌侵染中的功能鉴定 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2021.
- [17] 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.
- [18] 李广旭, 杨华, 戴启东, 等. 几种杀菌剂对苹果斑点落叶病和褐斑病的防效 [J]. *北方果树*, 2023(6): 11-13.
- [19] NAZ M, ZHANG D Q, LIAO K C, et al. The Past, Present, and Future of Plant Activators Targeting the Salicylic Acid Signaling Pathway [J]. *Genes*, 2024, 15(9): 1237.
- [20] MOREIRA R R, ZIELINSKI E C, CASTELLAR C, et al. Study of Infection Process of Five Species of *Colletotrichum* Comparing Symptoms of *Glomerella* Leaf Spot and Bitter Rot in Two Apple Cultivars [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2021, 159(1): 37-53.
- [21] 李宏利, 杨春颖, 李婷婷, 等. 石莼多糖通过抑制黑色素合成降低苹果炭疽叶枯菌分生孢子的侵染 [J]. *山东农业科学*, 2025, 57(3): 152-157.
- [22] SAHU P K, JAYALAKSHMI K, TILGAM J, et al. ROS Generated from Biotic Stress: Effects on Plants and Alleviation by Endophytic Microbes [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 1042936.
- [23] 孟凡晓. 褐藻胶寡糖诱导植物抗病的研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2021.

- [24] CHEN Z, AN Y Y, WANG L J. ALA Reverses ABA-Induced Stomatal Closure by Modulating PP2AC and SnRK<sub>2.6</sub> Activity in Apple Leaves [J]. Horticulture Research, 2023, 10(6): uhad067.
- [25] YANG S, CAI W W, SHEN L, et al. Solanaceous Plants Switch to Cytokinin-Mediated Immunity against *Ralstonia solanacearum* under High Temperature and High Humidity [J]. Plant, Cell & Environment, 2022, 45(2): 459-478.
- [26] BOLLER T. In the Plant Hormone Ethylene [M]. Boca Raton: CRC Press, 2018.
- [27] LIAO H S, CHUNG Y H, HSIEH M H. Glutamate: A Multifunctional Amino Acid in Plants [J]. Plant Science, 2022, 318: 111238.
- [28] YANG B, YANG S, ZHENG W Y, et al. Plant Immunity Inducers: From Discovery to Agricultural Application [J]. Stress Biology, 2022, 2(1): 5.
- [29] PRAKASH V, SINGH V P, TRIPATHI D K, et al. Nitric Oxide (NO) and Salicylic Acid (SA): A Framework for Their Relationship in Plant Development under Abiotic Stress [J]. Plant Biology, 2021, 23(S1): 39-49.
- [30] HAN M, ZHANG C, SUGLO P, et al. L-Aspartate: An Essential Metabolite for Plant Growth and Stress Acclimation [J]. Molecules, 2021, 26(7): 1887.
- [31] LU S C. Regulation of Glutathione Synthesis [J]. Molecular Aspects of Medicine, 2009, 30(1-2): 42-59.
- [32] LEE M, JEON H S, KIM S H, et al. Lignin-Based Barrier Restricts Pathogens to the Infection Site and Confers Resistance in Plants [J]. The EMBO Journal, 2019, 38(23): EMBJ2019101948.
- [33] LI A P, HE Y H, ZHANG S Y, et al. Antibacterial Activity and Action Mechanism of Flavonoids against Phytopathogenic Bacteria [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2022, 188: 105221.
- [34] LU C W, ZHANG L L, MAO S, et al. Exogenous P-Coumaric Acid Treatment Improves Phenolic Compounds Biosynthesis of Postharvest Cherry Tomatoes by Regulating Physiological Metabolism [J]. Journal of Food Science, 2024, 89(11): 7309-7323.
- [35] YUAN M H, JIANG Z Y, BI G Z, et al. Pattern-Recognition Receptors Are Required for NLR-Mediated Plant Immunity [J]. Nature, 2021, 592(7852): 105-109.
- [36] LAN L M, CAO L F, ZHANG L L, et al. A Novel Mode of WRKY1 Regulating *PRI*-Mediated Immune Balance to Defend against Powdery Mildew in Apple [J]. Molecular Horticulture, 2025, 5(1): 17.
- [37] FEDURAEV P, RIABOVA A, SKRYPNIK L, et al. Assessment of the Role of *PAL* in Lignin Accumulation in Wheat (*Triticum aestivum* L.) at the Early Stage of Ontogenesis [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(18): 9848.
- [38] 张国运. 香菇多糖对植物根生长及其基因表达的影响 [D]. 天津: 天津科技大学, 2015.
- [39] 付思蕊, 王胤, 陈雅奇, 等. 不同植物免疫诱抗剂对番茄的诱抗促生作用研究 [J]. 蔬菜, 2023(2): 43-48.
- [40] ZHU F, CAO M Y, ZHANG Q P, et al. Join the Green Team: Inducers of Plant Immunity in the Plant Disease Sustainable Control Toolbox [J]. Journal of Advanced Research, 2024, 57: 15-42.

责任编辑 王新娟