

DOI: 10.5846/stxb201307121881

倪郁, 宋超, 王小清. 核盘菌侵染对拟南芥表皮蜡质结构及化学组成的影响. 生态学报, 2014, 34(15): 4160-4166.

Ni Y., Song C., Wang X. Q. Effects of *Sclerotinia sclerotiorum* on the morphology and chemical constituents of epicuticular wax in *Arabidopsis thaliana* stems. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(15): 4160-4166.

核盘菌侵染对拟南芥表皮蜡质结构及化学组成的影响

倪 郁*, 宋 超, 王小清

(西南大学农学与生物科技学院, 重庆 400716)

摘要:以野生型拟南芥与蜡质突变体 *cer1*、*cer4* 为试验材料, 通过研究核盘菌胁迫对拟南芥茎表皮蜡质结构及组分含量的影响, 揭示核盘菌侵染与表皮蜡质的关系。扫描电镜结果显示, 野生型拟南芥蜡质晶体以垂直于表面的杆状、块状结构为主; 突变体 *cer1* 晶体类型以水平的松针状、块状结构为主; 突变体 *cer4* 蜡质晶体以垂直片层结构为主。核盘菌胁迫下, 拟南芥蜡质晶体结构及分布形态发生变化。蜡质层结构在核盘菌胁迫下表现为: 杆状、松针状蜡质晶体减少—蜡质晶体熔融—表皮“囊状凸起”—表皮膜层破裂。这些结构变化有利于病菌突破角质层屏障而侵入到植株体内。质谱分析结果显示: 与野生型相比, *cer1* 突变体烷、次级醇、酮类显著减少; *cer4* 突变体表现为一级醇含量减少。接种核盘菌后, 野生型拟南芥与蜡质突变体一级醇类显著增加(*cer1* 增加不显著); 烷类、次级醇类、酮类含量与蜡质总量均显著减少, 表明蜡质前体物质在受到核盘菌胁迫后更多地通过酰基还原途径生成一级醇, 从而减少了由脱羧基途径所生成的蜡质组分。核盘菌通过改变表皮蜡质晶体结构与化学组分分泌量来促进侵染。

关键词: 拟南芥; 表皮蜡质; 核盘菌; 晶体结构; 蜡质突变体

Effects of *Sclerotinia sclerotiorum* on the morphology and chemical constituents of epicuticular wax in *Arabidopsis thaliana* stems

NI Yu*, SONG Chao, WANG Xiaoqing

College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: Epicuticular waxes form the outermost layer over the membrane and are visible on *Arabidopsis* inflorescence stem surfaces as a bluish-white colored coating. In the current study, the effects of *Sclerotinia sclerotiorum* on epicuticular wax morphology and constituents in *Arabidopsis thaliana* stems were analyzed, aiming to elucidate the relationship between fungal invasion and plant epicuticular wax. Wax mutants *cer1* (the contents of alkanes, secondary alcohols, and ketones reduced significantly), *cer4* (the contents of primary alcohols reduced significantly), and one wild type of *A. thaliana* were selected as experimental materials. Scanning electron microscope technology was used to investigate the changes of crystalloid structure. Gas chromatography and mass spectrometry technology was used to measure the amounts of total wax and wax constituents. The results showed that wax morphology of *A. thaliana* wild type was composed primarily of vertical rods and plates, that of wax mutant *cer1* was composed primarily of horizontal needles and plates and the density and size of crystalloids reduced. Wax mutant *cer4* had a very high density of vertically oriented (relative to the horizontal cuticle surface) plate-like waxes. The infection of *S. sclerotiorum* altered the crystalloid morphology of epicuticular wax in stems. The changing pattern of wax crystalloid morphology under *S. sclerotiorum* infection might be as follows, decrease of “rod crystalloids - fusion of wax crystalloids into epidermis - surface protuberances - epidermis cracks. These changes of wax

基金项目: 国家自然科学基金(31000122, 31270450); 重庆市自然科学基金(cstc2012jjA80022); 教育部作物资源利用创新引智基地(B12006)联合资助

收稿日期: 2013-07-12; 修订日期: 2014-01-14

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: nmniyu@126.com

crystalloid morphology enabled *S. sclerotiorum* break through the cuticle barrier and infect plant. Infection also altered the secretion amounts of wax constituents. After inoculation with *S. sclerotiorum*, the content of primary alcohols in wild type and wax mutants increased significantly except *cer1*, while the content of alkanes, secondary alcohols, ketones and total wax decreased significantly. This suggested that more wax precursors converted to primary alcohol from acyl reduction pathway under *S. sclerotiorum* stress, resulting a decrease of wax amounts from decarbonylation pathway. The *S. sclerotiorum* promoted its penetration to epidermis by altering the crystalloid morphology and constituents of plant epicuticular wax.

Key Words: *Arabidopsis thaliana*; epicuticular wax; *Sclerotinia sclerotiorum*; crystalloid morphology; wax mutants

植物表皮蜡质是指覆盖在植物表皮细胞外的一层由亲脂性化合物构成的疏水层,一般呈绿灰色、灰白色霜状^[1]。作为植物与环境的第一接触面,具有特殊微晶体形态以及复杂化学组分的表皮蜡质可有效地协调植物与环境的关系。前人研究表明,植物蜡质具有很好的生态学功能^[2-4],例如,阻止植物组织的非气孔性水分散失、防止植物被有害光线损伤、保护植物避免某些昆虫的蚕食等功能。蜡质的物理和化学属性是其生态学功能得以实现的基础。在面对病原菌等生物环境因子胁迫时,一些植物叶片及水果表皮蜡质层的厚度和三维晶体结构可有效抵御真菌病原物的入侵^[5-6]。植物表皮蜡质的含量及化学组成与植株抗病性的强弱密切相关^[7-11],表皮蜡质也因此被认为是抵御病原物的第一道屏障^[12]。叶表面特性影响叶片润湿性、孢子萌发管方向及病菌从气孔侵入^[13]。大麦(*Hordeum vulgare*)叶表皮蜡质诱导了布氏白粉菌(*Blumeria graminis*)附着胞的分化,而非寄主植物叶蜡的诱导效果则很小;大麦叶蜡组分 C₂₆醛是诱导布氏白粉菌(*Blumeria graminis*)附着胞分化的主要因子^[14]。智利大麦(*Hordeum chilense*)、东部白松(*Pinus strobus*)等叶片气孔被角质层蜡质覆盖后,阻止了病原菌从气孔侵入^[13,15]。玫瑰抗黑斑病的强弱与叶表皮蜡质中的烷和脂类物质有关^[9];拟南芥蜡质突变体 *sma4/lacs2* 由于角质层膜透性的改变使得植株体内抗真菌物质可以更快地释放到植物表面而表现出对灰霉菌(*Botrytis cinerea*)的抗性增强^[16]。这些研究通过对植物蜡质特性的分析不同程度地解释了表皮蜡质影响真菌侵染的作用机制,但真菌病原物侵染对植物表皮蜡质物理结构及化学组成的影响还不清楚。近年来,随着植物化学、分子遗传学等相关学科的发展和渗透,植物蜡质的研究也得到进一步深入,其生态学功能

也得到重新评估。拟南芥作为研究遗传学和分子生物学的一种模式植物,具有典型的角质层结构及组分。其角质层结构主要由 3 层组成:最外层的蜡质层(EW)、真角质层(CP)和角化层(CL)^[3]。蜡质主要由可溶性的超长链脂肪酸、烷烃、一级醇、二级醇、脂肪醛、酮类、酯类等组成,并具有特定的晶体形态。因此拟南芥也常被用作角质层蜡质研究的模式材料。

核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)是世界上破坏性最强的植物病原物之一,引起的菌核病是导致许多作物减产的主要病害。实验室前期研究工作发现 *S. sclerotiorum* 侵染甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)后,抗性品种表皮蜡质中的烷类、醛类显著增加^[17]。为了揭示病原物侵染对植物表皮蜡质的影响机制以及如何突破表皮蜡质这一屏障,本试验以拟南芥野生型以及蜡质缺失突变体 *cer1*、*cer4* 为试验材料,从蜡质的晶体形态以及化学组分的变化来分析植物蜡质在 *S. sclerotiorum* 胁迫下的表现,以期进一步阐明植物表皮蜡质与病原物的互作机制,为生产实践中通过改变植物表面特征而改良植物抗病性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

哥伦比亚野生型(Col-0)拟南芥种子为西南大学植物生理生化研究室保存,表皮蜡质突变体 *cer1* (蜡质中烷、次级醇、酮含量减少)、*cer4* (蜡质中一级醇含量减少)种子均购于拟南芥资源中心(ABRC, USA)。将蛭石、珍珠岩和有机土按 1:1:1 的比例混匀后装入花盆(直径 7 cm×高度 8 cm),将低温春化后的种子播在花盆中,每盆 4 株,然后用塑料薄膜覆盖 5 d 以利于出苗。试验材料放置在人工气候培养

箱中培养,光照强度为 $125 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$,温度为 $21^\circ\text{C}/23^\circ\text{C}$ (黑夜/白天),光照每天 16 h,空气湿度为 75%。待植株生长至 5—6 周时进行核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 接种,以不接种为对照。

1.2 核盘菌培养及接种方法

核盘菌菌核分离自油菜病株,经表面消毒后在马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)上培养。病菌培养参考臧宪朋等^[18]方法,先活化核盘菌菌,即从核盘菌平板菌落外缘用灭菌的打孔器切取直径为 6 mm 的菌丝块,移至新 PDA 培养基平板中央,在 25°C 培养箱内活化培养 2 d,然后以同样方法再次转接到新的 PDA 平板上培养,3 d 后从菌落边缘新生的菌丝中用灭菌的打孔器取直径为 6 mm 的菌丝块,按 10 块/100 mL 加入到 PDA 液体培养基中,在 25°C 、150—200 r/min 下振荡培养 4—6 d,待培养基中充满细小菌丝时,用组织匀浆机粉碎,制成菌丝悬浮液并将浓度调至 OD_{600} 值为 1.0,进行喷雾接种。接种后调节空气湿度大于 90% 培养拟南芥植株,接种 72 h 后取样进行蜡质结构及组分分析。以喷施不含核盘菌的 PDA 液体培养基为对照。

1.3 表皮蜡质结构的扫描电镜观察

在预试验及相关文献报道^[1]中,拟南芥叶片在电镜观察下无明显蜡质晶体结构,且蜡质含量远远低于茎秆,因此本试验所用材料除特殊说明外均为拟南芥茎秆。分别取对照与接种处理的拟南芥植株,将其干燥后剪取中部 1 cm 长茎段,贴于电镜载物台上,进行离子溅射镀金后在扫描电镜(S3000-N, Hitachi)下观察、拍照。每处理 3 个重复。

1.4 表皮蜡质的提取

分别从对照与接种处理材料莲座叶根部剪下拟南芥茎秆,去茎生叶及种荚。将整株茎秆放入含有 10 mL 氯仿的试管中浸提 30 s,以提取表面蜡质,氯仿中加入 C_{16} 烷作为内部标准。氮吹仪吹干浸提液,在 100°C 下用 80 μL BSTFA 衍生 20 min,再经氮气吹干后,溶于 200 μL 正己烷中,进行色谱-质谱分析。每 3 株茎秆为一个重复用于提取表面蜡质,每处理 3 个重复。

1.5 表皮蜡质组分及含量的 GC-MS 分析

拟南芥表皮蜡质组成及含量利用气相色谱-质谱联用仪(GCMS-QP2010 plus)进行分析测定。程序升温方式:初温 80°C ,保持 2 min;每分钟 15°C 升温

至 260°C ,保持 10 min。然后每分钟 10°C 升温至 320°C ,保持 5 min。基于 FID 峰值量化蜡质,根据内部标准物(C_{16} 烷)的浓度计算各蜡质组分含量。蜡质含量用单位面积上的微克数($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)进行表示。茎秆面积测定采用数字化扫描仪(EPSON V750)和 WinFOLIA 专业叶片图像分析系统(Regent Instrument Inc, Canada)进行分析并记录。

1.6 数据分析

采用 SPSS13.0 软件分析接种核盘菌对拟南芥茎表皮蜡质组分含量的影响。显著水平为 $P < 0.05$ (LSD 检验)。

2 结果与分析

2.1 拟南芥对核盘菌的感病性

将核盘菌喷雾接种 24 h 后,拟南芥野生型及各突变体材料叶片、茎秆不同程度地变褐,其中 *cer4* 突变体发病较轻。喷雾接种 72 h 后,所试材料均整株发病而呈现枯黄。

2.2 核盘菌胁迫下拟南芥蜡质晶体结构的变化

拟南芥茎秆表面分布有不同类型的蜡质晶体。扫描电镜显示,野生型(WT)拟南芥蜡质晶体分布密度高,晶体类型以垂直于表面的杆状、块状结构为主(图 1a,b)。接种核盘菌后,野生型拟南芥杆状蜡质晶体显著减少,蜡质晶体呈现出似融入表皮的趋势,晶体边界模糊,表皮凹凸不平,呈“囊状凸起”;部分区域表皮呈“撕裂”状(图 1c—f)。表皮蜡质突变体 *cer1* 与野生型相比,蜡质晶体分布密度显著减少,体积变小,晶体类型以水平的松针状、块状结构为主(图 2a,b)。接种处理后,突变体 *cer1* 茎秆表面可观察到纵横交错的菌丝(图 2c),松针状结构显著减少或消失,其余蜡质晶体边缘变得模糊,晶体结构呈现出与野生型接种处理后相似的变化,部分区域表皮呈“囊状凸起”或“撕裂”状(图 2d—f)。突变体 *cer4* 蜡质晶体表现出与野生型完全不同的结构,晶体类型以垂直片层结构为主(图 3a,b)。接种处理后,突变体 *cer4* 晶体分布密度减少,部分区域垂直片层结构消失,表皮凹凸不平,呈“囊状凸起”(图 3c—e)。

2.3 核盘菌胁迫下拟南芥表皮蜡质组分的变化

本试验中,拟南芥被检测到的表皮蜡质组分主要有—级醇类、醛类、酸类、烷类、次级醇类及酮类,其中烷类在蜡质总量中所占的比重最高(34%—

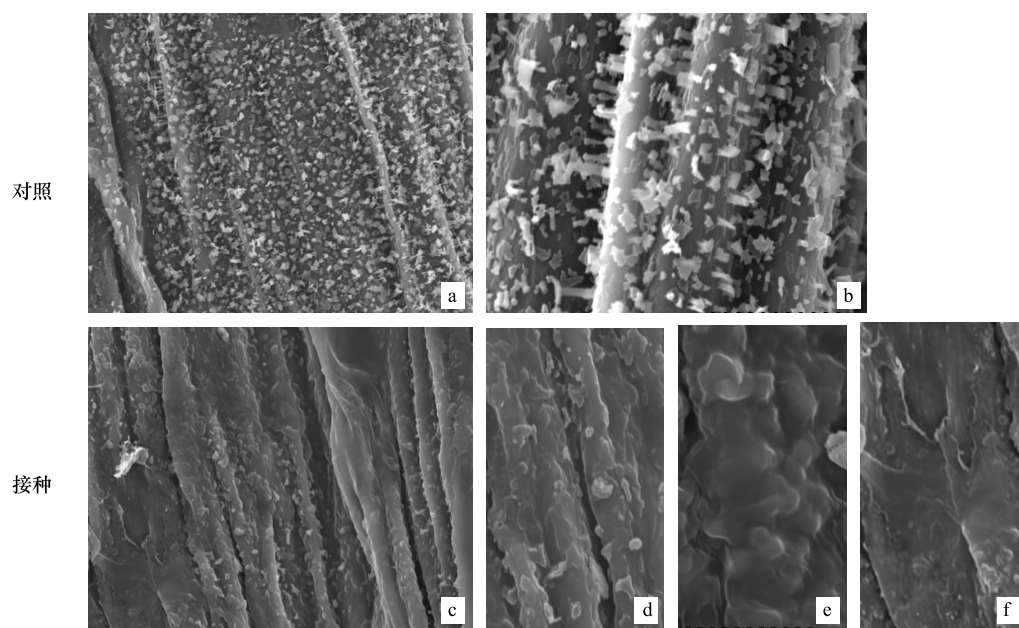


图1 核盘菌胁迫下野生型(WT)拟南芥茎表皮蜡质晶体结构的变化

Fig.1 Effects of *Sclerotinia sclerotiorum* on crystalloid structures of epicuticular wax in stems of *Arabidopsis thaliana* wild type
a、c 标尺 = 50 μ m, b、d、e、f 标尺 = 10 μ m; 其中 d、e、f 是接种处理中出现的不同蜡质形态

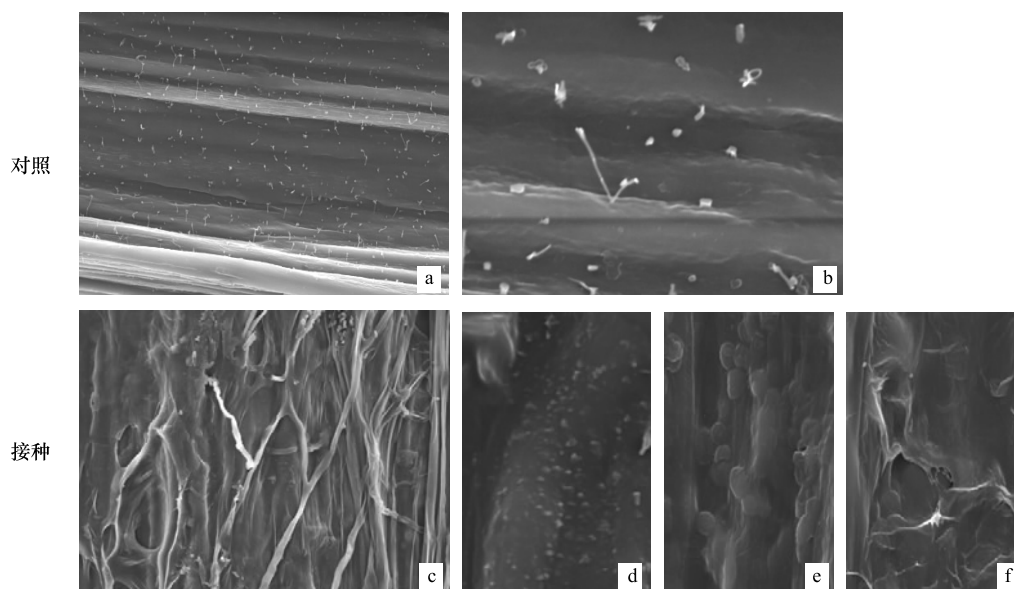


图2 核盘菌胁迫下拟南芥 *cer1* 突变体茎表皮蜡质晶体结构的变化

Fig.2 Effects of *Sclerotinia sclerotiorum* on crystalloid structures of epicuticular wax in stems of *Arabidopsis thaliana* mutants *cer1*
a、c 标尺 = 50 μ m, b、d、e、f 标尺 = 10 μ m; 其中 d、e、f 是接种处理中出现的不同蜡质形态

58%)。与野生型相比, *cer1* 突变体表皮蜡质中醛、烷、次级醇和酮含量以及蜡质总量均显著减少; *cer4* 突变体表皮蜡质中一级醇水平显著下降。接种核盘菌后, 野生型拟南芥与蜡质突变体 *cer1*、*cer4* 一级醇含量分别增加了 152%、54% 和 883%, 其中野生型与突变体 *cer4* 一级醇类增加显著。各材料蜡质组分中

烷类、次级醇类、酮类含量与蜡质总量在接种核盘菌后均显著减少, 烷类分别减少了 35% (WT)、48% (*cer1*)、33% (*cer4*)。接种核盘菌后, 酸类减少 (*cer1*、WT) 或无显著变化 (*cer4*); 醛类含量变化在各材料中不一致 (图 4)。

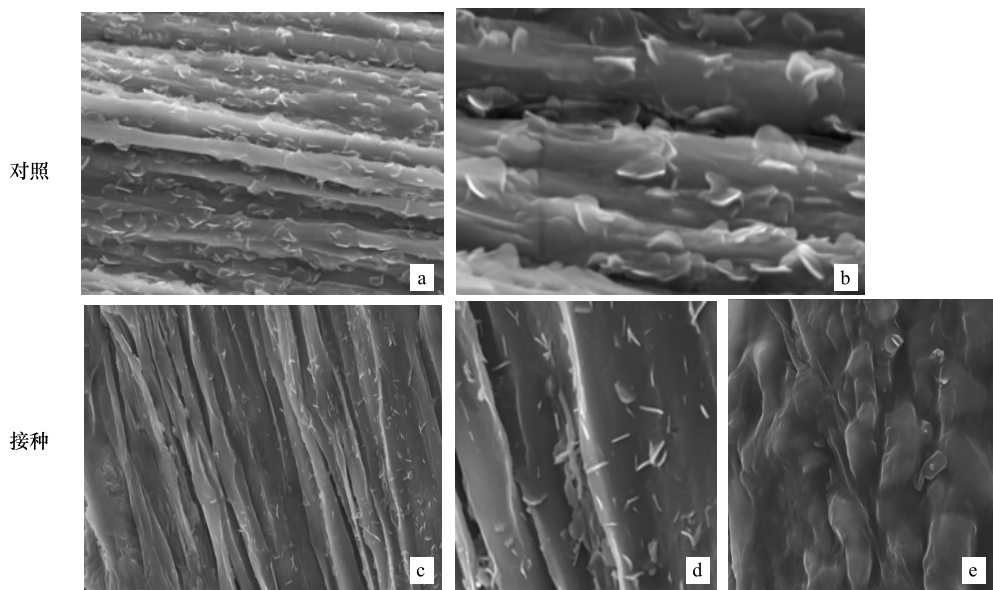


图 3 核盘菌胁迫下拟南芥 *cer4* 突变体茎表皮蜡质晶体结构的变化

Fig.3 Effects of *Sclerotinia sclerotiorum* on crystalloid structures of epicuticular wax in stems of *Arabidopsis thaliana* mutants *cer4*
a、c 标尺=50μm,b、d、e 标尺=10μm;其中 d、e 是接种处理中出现的不同蜡质形态

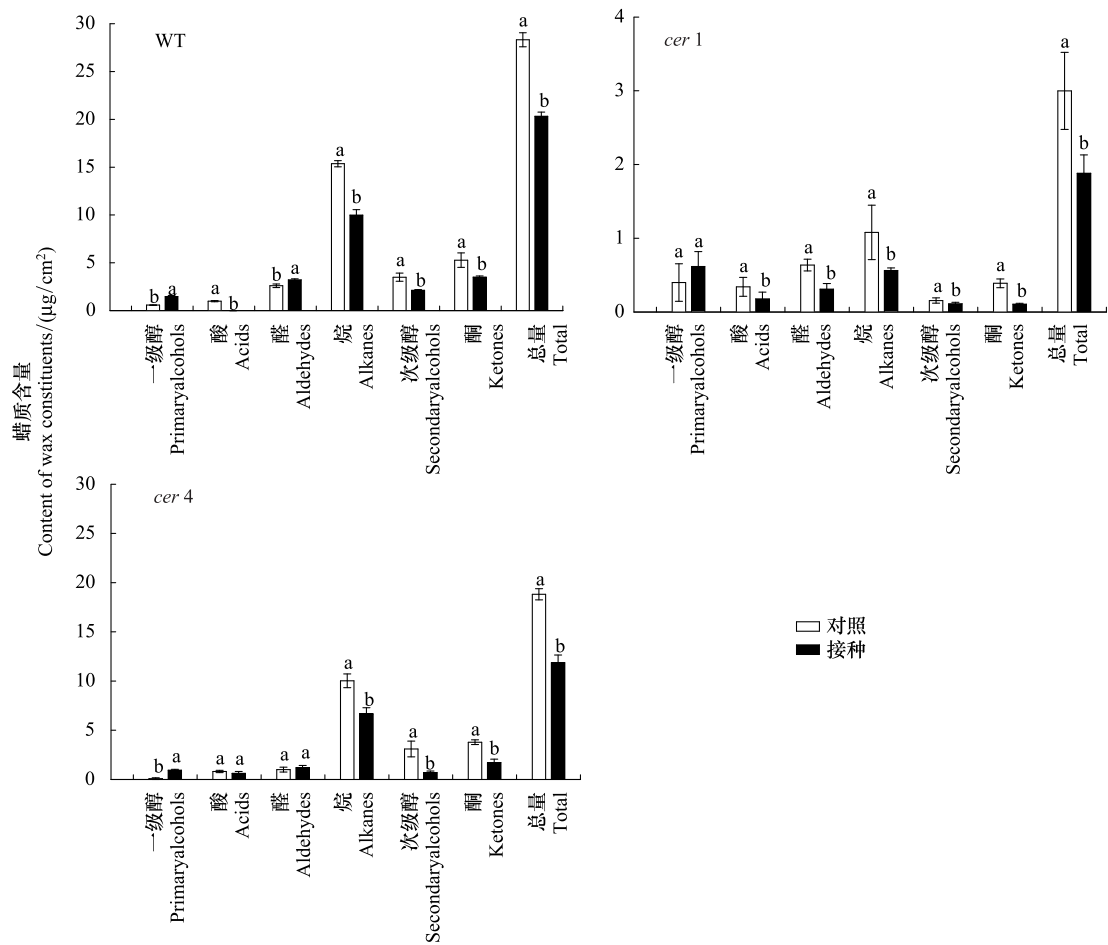


图 4 接种核盘菌对拟南芥表皮蜡质组分含量及蜡质总量的影响

Fig.4 Effects of *Sclerotinia sclerotiorum* on contents of wax constituents and total wax in stems of *Arabidopsis* wild type and mutants
数据柱上不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)

3 讨论

前人研究表明,蜡质具有特殊的微晶体形态以及复杂的化学组分,这是其生态学功能得以实现的基础,也为植物适应不同生境提供了保证^[19]。外界非生物因素能够影响植物表皮蜡质。柑桔在乙烯的诱导下表皮蜡质含量增加,蜡质结构发生变化^[20]。紫花苜蓿叶表蜡质结构在低空气湿度和水分胁迫下发生了不同程度的熔融变化^[21]。拟南芥茎秆表面分布有不同类型的蜡质晶体,例如,野生型拟南芥垂直于表面的杆状、块状晶体结构,突变体 *cer1* 的水平松针状、块状结构,突变体 *cer4* 的垂直片状结构。本研究表明生物因素也会影响植物表皮蜡质的特性。在核盘菌胁迫下,野生型拟南芥与蜡质突变体 *cer1* 分别表现出杆状、松针状蜡质晶体显著减少;野生型与突变体 *cer1*、*cer4* 部分区域蜡质晶体均表现出融入表皮趋势,表皮凹凸不平而呈现出“囊状凸起”现象,其中野生型与突变体 *cer1* 表皮膜层在这些“囊状凸起”的某些区域呈“撕裂”状。综合拟南芥野生型与突变体的这些蜡质结构变化,暗示了蜡质结构在病菌胁迫下的变化模式可能为:杆状等晶体减少,蜡质晶体熔融,表皮膜层“囊状凸起”,最终表皮膜层破裂。核盘菌在附着胞形成后依靠巨大膨压机械地穿透角质层及表皮细胞壁,而病菌一旦突破角质层及表皮细胞后,很快以分枝生长,遍布表皮及叶肉细胞^[22]。核盘菌胁迫下拟南芥表皮蜡质晶体的减少以及表皮膜层的破裂将更有利于病菌侵入到植株体内。

有研究报道,拟南芥抗病基因 *PR1* 的表达与叶表皮蜡质层中部分蜡质组分密切相关^[23]。紫花苜蓿 (*Medicago truncatula*) 抗锈菌突变体 *irg1* 与野生型相比,其叶片下表皮蜡质晶体结构缺失,疏水性减少,蜡质组分中 C_{30} 一级醇减少了 90% 以上,而 C_{29} 、 C_{31} 烷则显著增加^[24]。白粉菌 (*Erysiphe pisi*) 在豌豆 (*Pisum sativum*) 叶片近轴端的出芽率高于远轴端,蜡质组分分析结果表明,其叶片近轴端蜡质组分一级醇含量较高,而远轴端组分以烷类为主^[25]。本试验中,野生型拟南芥中一级醇含量 ($0.582 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 占自身蜡质总量的 2.057%,突变体 *cer1* 和 *cer4* 一级醇含量 ($0.399, 0.096 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 分别占其自身蜡质总量的 13.3% 和 0.51%。一级醇含量最低的 *cer4* 突变

体在核盘菌胁迫下除部分区域表皮“囊状”凸起外,晶体类型无显著变化,也无表皮破裂现象。这部分地解释了突变体 *cer4* 在接种早期相对较慢的发病进程。*cer1* 突变体以及野生型拟南芥较高的一级醇含量可能与其受到核盘菌胁迫后表皮膜层的破裂有关。拟南芥各材料中烷类、次级醇类、酮类含量与蜡质总量在接种核盘菌后均显著减少,这与扫描电镜观察到的蜡质晶体在受到病菌胁迫后减少的趋势相符合。蜡质组分的变化说明核盘菌侵染对表皮蜡质的影响不仅仅是对结构的物理作用,同时在蜡质代谢层面也受到影响。而野生型拟南芥与蜡质突变体在接种后一级醇类含量的普遍增加是否与核盘菌侵染有关、以及蜡质化学组分的变化与晶体结构的相应关系还有待进一步研究。

在包括拟南芥在内的大多数植物中,角质层蜡质生物合成主要通过脱羧基途径与酰基还原途径进行。在拟南芥中,醛、次级醇、烷、酮等约 80% 的蜡质组分通过脱羧基途径产生,而一级醇、酯类等约 20% 的蜡质组分由酰基还原途径产生^[26]。本研究中,拟南芥在受到病害胁迫后烷类、次级醇、酮类含量的减少以及一级醇含量的普遍增加暗示了蜡质前体物质在受到病害胁迫后更多地通过酰基还原途径生成一级醇,从而减少了由脱羧基途径所生成的蜡质组分。由于烷类物质在拟南芥蜡质总量中所占的比重最高 (34%—58%), 因此即使一级醇含量增加,蜡质总量也因为烷类的减少而呈减少趋势。研究结果显示,生物逆境下拟南芥植株蜡质化学组分的变化可能是由于不利环境因子的作用改变了蜡质合成途径,从而影响了蜡质组分的分泌量。

4 结论

核盘菌侵染能改变植物表皮蜡质的晶体结构及化学组分的分泌量,并以此来促进对表皮层的侵入。

References:

- [1] Jenks M A, Eigenbrode S D, Lemieux B. Cuticular waxes of Arabidopsis. The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists, 2002, 1: e0016.
- [2] Shepherd T, Griffiths D W. The effects of stress on plant cuticular waxes. New Phytologist, 2006, 171(3): 469-499.
- [3] Bernard A, Joubès J. Arabidopsis cuticular waxes: Advances in synthesis, export and regulation. Progress in Lipid Research, 2013, 52(1): 110-129.

- [4] Yeats T H, Rose J K. The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiology*, 2013, 163(1): 5-20.
- [5] Schwab M, Noga G, Barthlott W. The significance of epicuticular waxes for defence of pathogens as shown for *Botrytis cinerea* infections in Kohlrabi and pea plants. *Gartenbauwissenschaft*, 1995, 60(3): 102-109.
- [6] Ficke A, Gadoury D M, Godfrey D, Dry I B. Host barriers and responses to *Uncinula necator* in developing grape berries. *Phytopathology*, 2004, 94(5): 438-445.
- [7] Russin J S, Guo B Z, Tubajika K M, Brown L, Cleveland T E, Widstorn N W. Comparison of kernel wax from corn genotypes resistant or susceptible to *Aspergillus flavus*. *Biochemistry and Cell Biology*, 1997, 87(5): 529-533.
- [8] Zinsou V, Wydra K, Ahohuendo B, Schreiber L. Leaf waxes of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in relation to ecozone and resistance to *Xanthomonas* blight. *Euphytica*, 2006, 149(1/2): 189-198.
- [9] Goodwin S M, Edwards C J, Jenks M A, Wood K V. Leaf cutin monomers, cuticular waxes, and blackspot resistance in rose. *HortScience*, 2007, 42(7): 1631-1635.
- [10] Alcerito T, Barbo F E, Negri G, Santos D Y A C, Meda C I, Young M C M, Cháve Z D, Blatt C T T. Foliar epicuticular wax of *Arabidopsis thaliana*: flavonoids and antifungal activity. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2002, 30(7): 677-683.
- [11] Kang L G, Qi F K, Xu X Y, Li J F. Relationship between tomato leaf wax and cutin layers with infection by *Helminthosporium carposaprum*. *China Vegetables*, 2010, (18): 47-50.
- [12] Jenk M A, Joly R J, Peters P J, Rich P J, Axtell J D, Ashworth E N. Chemically induced cuticle mutation affecting epidermal conductance to water vapor and disease susceptibility in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Plant Physiology*, 1994, 105(4): 1239-1245.
- [13] Niks R E, Rubiales D. Potentially durable resistance mechanisms in plants to specialised fungal pathogens. *Euphytica*, 2002, 124(2): 201-216.
- [14] Tsuba M, Katagiri C, Takeuchi Y, Takada Y, Yamaoka N. Chemical factors of the leaf surface involved in the morphogenesis of *Blumeria graminis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2002, 60(2): 51-57.
- [15] Smith J A, Blanchette R A, Burnes T A, Gillman J H, David A J. Epicuticular wax and white pine blister rust resistance in resistant and susceptible selections of eastern white pine (*Pinus strobus*). *Phytopathology*, 2006, 96(2): 171-177.
- [16] Tang D, Simonich M T, Innes R W. Mutations in LACS2, a long-chain acylcoenzyme A synthetase, enhance susceptibility to avirulent *Pseudomonas syringae* but confer resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2007, 144(2): 1093-1103.
- [17] Ni Y, Guo Y J, Wang J, Xia R E, Wang X Q, Ashe G, Li J N. Responses of physiological indexes and leaf epicuticular waxes of *Brassica napus* to *Sclerotinia sclerotiorum* infection. *Plant Pathology*, 2014, 63(1): 174-184.
- [18] Zang X P, Xu Y P, Cai X Z. Establishment of an inoculation technique system for *Sclerotinia sclerotiorum* based on mycelial suspensions. *Journal of Zhejiang University: Agriculture and Life Sciences*, 2010, 36(4): 381-386.
- [19] Li J J, Huang J H, Xie S C. Plant wax and its response to environmental conditions: an overview. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(2): 565-574.
- [20] Cajuste J F, González-Candelas L, Veyrat A, García-Breijo F J, Reig-Arminana J, Lafuente M T. Epicuticular wax content and morphology as related to ethylene and storage performance of 'Navelate' orange fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 2010, 55(1): 29-35.
- [21] Guo Y J, Ni Y, Guo Y J, Han L, Tang H. Effects of air humidity and soil water deficit on characteristics of leaf cuticular waxes in alfalfa (*Medicago sativa*). *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(18): 5273-5280.
- [22] Lan H Y, Chen Z H. Advances in molecular biology of plant-pathogenic fungus interaction. *Progress in Biotechnology*, 2000, 20(4): 16-22.
- [23] Garbay B, Tautu M T, Costaglioli P. Low level of pathogenesis-related protein 1 mRNA expression in 15-day-old *Arabidopsis cer6-2* and *cer2* eceriferum mutants. *Plant Science*, 2007, 172(2): 299-305.
- [24] Uppalapati S R, Ishiga Y, Doraiswamy V, Bedair M, Mittal S, Chen J, Nakashima J, Tang Y, Tadege M, Ratet P, Chen R, Schultheiss H, Mysore K S. Loss of abaxial leaf epicuticular wax in *Medicago truncatula* *irg1/palm1* mutants results in reduced spore differentiation of anthracnose and nonhost rust pathogens. *The Plant Cell*, 2012, 24(1): 353-370.
- [25] Gniwotta F, Vogg G, Carver T L W, Riederer M, Jetter R. What do microbes encounter at the plant surface? Chemical composition of pea leaf cuticular waxes. *Plant Physiology*, 2005, 139(1): 519-530.
- [26] Millar A A, Clemens S, Zachgo S, Giblin M, Taylor D C, Kunst L. *CUT1*, an *Arabidopsis* gene required for cuticular wax biosynthesis and pollen fertility, encodes a very-long-chain fatty acid condensing enzyme. *The Plant Cell*, 1999, 11(5): 825-838.

参考文献:

- [11] 康立功, 齐凤坤, 许向阳, 李景富. 番茄叶片蜡质和角质层与芝麻斑病菌侵染的关系. *中国蔬菜*, 2010, (18): 47-50.
- [18] 臧宪朋, 徐幼平, 蔡新忠. 一种基于菌丝悬浮液的核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 接种方法的建立. *浙江大学学报: 农业与生命科学版*, 2010, 36(4): 381-386.
- [19] 李婧婧, 黄俊华, 谢树成. 植物蜡质及其与环境的关系. *生态学报*, 2011, 31(2): 565-574.
- [21] 郭彦军, 倪郁, 郭芸江, 韩龙, 唐华. 空气湿度与土壤水分胁迫对紫花苜蓿叶表皮蜡质特性的影响. *生态学报*, 2011, 31(18): 5273-5280.
- [22] 蓝海燕, 陈正华. 植物与病原真菌互作的分子生物学及其研究进展. *生物工程进展*, 2000, 20(4): 16-22.