

橡胶树杂交 F₁ 代抗病种质鉴定及其抗病性分析

李博勋^{1,2}, 黄贵修^{1*}, 和丽岗³, 蔡吉苗¹, 冯艳丽¹, 余文才³, 刘忠亮³

1. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所/农业农村部热带作物有害生物综合治理重点实验室/海南省热带农业有害生物监测与控制重点实验室, 海南海口 571101; 2. 云南农业大学植物保护学院, 云南昆明 650201; 3. 云南省热带作物科学研究所, 云南景洪 666100

摘要: 橡胶树棒孢霉落叶病 (*Corynespora* leaf fall disease, CLFD) 是全球主要植胶国最为严重的叶部病害之一, 可造成严重的产量和经济损失, 而抗病种质鉴定与创制利用是该病最为有效的防治策略。本研究对云研 277-5×IAN 873、RRIC103×热研 8-79 和云研 277-5×热垦 525 三个杂交组合的 821 份 F₁ 代群体进行了抗棒孢霉落叶病的评价, 明确了 F₁ 代群体的抗病性水平, 并从符合正态分布的 2 个杂交组合中筛选出 32 份候选 F₁ 代单株进行芽接, 再分别利用 3 个亚型的多主棒孢病菌和 2 种评价方法对候选 F₁ 代无性系种苗进行抗病性复筛, 最终获得 5 份抗病性较好的 F₁ 代新种质。通过对 5 份抗病新种质防御酶活性的测定, 以及抗病相关基因表达特性的分析, 进一步证实了 5 份抗病新种质与多主棒孢病菌在侵染过程中的互作关系, 明确了其在病原菌接种不同时间段的差异表达特征。本研究为橡胶树棒孢霉落叶病抗病性早期鉴定、抗病种质培育与创制利用提供了很好的种质材料和理论支撑。

关键词: 橡胶树; 棒孢霉落叶病; 杂交 F₁ 代; 鉴定; 抗病性

中图分类号: S794.1 文献标识码: A

Selection and Analysis of Disease-Resistant Germplasms in Hybrid F₁ Generations of Rubber Tree

LI Boxun^{1,2}, HUANG Guixiu^{1*}, HE Ligang³, CAI Jimiao¹, FENG Yanli¹, YU Wencai³, LIU Zhongliang³

1. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Integrated Pest Management on Tropical Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Hainan Key Laboratory for Monitoring and Control of Tropical Agricultural Pests, Haikou, Hainan 571101, China; 2. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China; 3. Yunnan Institute of Tropical Crops, Jinghong, Yunnan 666100, China

Abstract: *Corynespora* leaf fall disease is one of the most severe leaf diseases in major rubber planting countries worldwide, which can cause serious yield and economic losses. The selection, creation, and utilization of resistant germplasms are the most effective prevention and control strategies for this disease. This study evaluated the disease resistance of 821 F₁ populations from three hybrid combinations Yunyan 277-5×IAN 873, RRIC103×Reyan 8-79, Yunyan 277-5×Reken 525 and identified the level of disease resistance. Based on the evaluation results of disease resistance, 32 candidate F₁ generation individual plants were selected from two hybrid combinations that conform to normal distribution. Using three divergent clusters of *Corynespora cassiicola* and two evaluation methods to identify the resistant candidate F₁ clone seedlings, five resistant germplasms were ultimately obtained by measuring the activity of defense enzymes and analyzing the expression characteristics of disease-related genes in five new resistant germplasms. Further investigation confirmed that the interaction relationship between five new resistant germplasms and multi host *C. cassiicola* during the infection process. This study provides excellent germplasm materials and a theoretical support for the early selection, cultivation, and utilization of resistant germplasms for the disease resistance of *Corynespora* leaf fall disease.

Keywords: rubber tree; *Corynespora* leaf fall disease; hybrid F₁ generations; selection; disease resistance

收稿日期 2023-07-03; 修回日期 2023-09-07

基金项目 海南省重点研发计划项目 (No. ZDYF2021XDNY153); 国家重点研发计划项目 (No. 2019YFD1000500)。

作者简介 李博勋 (1986—), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 橡胶树叶部病害监测与控制技术。*通信作者 (Corresponding author): 黄贵修 (HUANG Guixiu), E-mail: hgxiu@vip.163.com。

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.11.017

橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 原产于南美洲亚马孙河流域, 是典型的多年生热带高大乔木, 主要种植在 22°01'50"N, 100°78'11"E, 海拔 549 m 的热带地区, 我国橡胶树种植突破了传统的植胶区, 主要分布在海南省、云南省南部和广东省雷州半岛等区域^[1]。橡胶树棒孢霉落叶病是继南美叶疫病之后的第二个威胁世界天然橡胶产业的重要叶部病害, 在南亚、东南亚以及中非等植胶国的成龄胶园暴发流行, 严重发生时可导致干胶产量损失 20%~25%, 并且种苗芽接成活率不足 20%^[2]。该病主要为害橡胶树叶片、嫩梢、嫩枝, 并形成最具代表性的“鱼骨状”病斑, 其病原多主棒孢病菌 (*Corynespora cassiicola*) 释放的寄主专化性毒素能延叶脉传导, 导致叶片大量脱落, 只剩光秃秃的树枝, 严重影响胶树的长势和产量^[3]。该病于 2006 年首次在我国报道发生^[4], 目前已经在云南、海南、广东等植胶区的实生苗、幼龄胶树及部分开割成龄胶树上普遍发生, 潜在威胁巨大^[5]。国际上, 对于棒孢霉落叶病的防治主要采取抗病种质选育。20 世纪 80 年代, 斯里兰卡遭受棒孢霉落叶病的为害, 致使许多高产的橡胶品种 (系) 大面积停割和死亡, 通过 9 年时间, 该国选育出 RRIC100、RRIC102、RRIC121、RRISL203、RRISL205、RRISL211 等 18 个抗病品种 (系), 并逐渐替代当时主栽的感病品种 (系), 挽救了斯里兰卡的天然橡胶产业。随着棒孢霉落叶病在亚洲植胶国大面积暴发流行, 马来西亚筛选出 PB86、PB213、RRIM712、RRIM628; 泰国筛选出 PB260、RRIC101、KRS156; 印度尼西亚筛选出 IRR100 和 IRR200, 印度筛选出 IAN873、GT1、IIRR208 等一系列的品种 (系) 在田间都表现出较好的抗病性, 并在一定程度上控制了病害所造成的产量损失^[6-7]。之后由于多主棒孢病菌优势种群和生理小种的变异, 一些表现为抗病的品种 (系), 在种植过程中也变得感病, 许多国家也尝试着采用化学防治和生物防治等措施来控制该病的发生与流行, 但防治效果均不理想^[8-10]。为此, 对于橡胶树这种多年生的高大乔木来说, 抗病种质资源的收集、评价与创制利用是防治该病最为经济有效且绿色环保的途径。

长期以来, 我国一直把高产、耐寒、抗风、幼态性状良好、胶木兼优等农艺性状作为橡胶树

育种的目标^[11], 却忽略了抗病种质的鉴选与创制利用。先后引进和选育的近 80 个品种 (系), 以及生产上大面积种植的 PR107、RRIM600、GT1、热研 7-33-97 等主栽橡胶品种 (系) 对棒孢霉落叶病的抗病性明显不足^[12]。目前, 我国收集保存有 6185 份橡胶树种质资源, 其中野生种质资源 5710 份^[13], 如何利用这些丰富的种质资源, 在保证上述选育种目标的同时还兼具抗病性, 将为优质橡胶树选育以及抗病种质的鉴选与创制利用提供有力支撑。2009—2013 年, 云南省热带作物科学研究所利用国内外高产、速生的魏克汉种质与 1981'IRRDB 种质作为父母本, 采用人工授粉方式获得 28 个组合的 5616 株杂交 F₁ 代群体 (内部资料未发表)。本研究从这 28 个组合中, 根据父母本的抗病性水平, 挑选了其中 3 个杂交组合云研 277-5×IAN873、云研 277-5×热垦 525、RRIC103×热研 8-79 共 821 份 F₁ 代群体, 采取初筛和复筛 2 轮评价, 利用 3 个类群的多主棒孢病菌, 对这些 F₁ 代群体进行抗病性早期鉴定, 最终获得 5 份 F₁ 代抗病新种质。本研究旨在分析不同杂交组合选育出的橡胶树新种质的抗病性水平, 以期获得一批具有抗病性潜力的种质材料, 为橡胶树抗病种质的鉴选、早期抗病性诊断以及创制利用提供良好的种质材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 橡胶树种质材料 供试亲本为橡胶树优良品种无性系 IAN873、RRIC103、云研 277-5、热垦 525、热研 8-79, 橡胶树杂交组合是由云南省热带作物科学研究所于 2009—2011 年春花期进行人工杂交授粉, 同年 8—9 月采种并播种于沙床催芽, 待小苗古铜期移栽至营养袋培育。供试的 3 个杂交组合及其 F₁ 代种质材料均由云南省热带作物科学研究所和丽岗研究员团队提供。亲本信息、品种特性和杂交后代株数详见表 1。

1.1.2 供试病原菌 供试的多主棒孢病原菌为不同遗传类群的代表性菌株 HCcYN49 (Cas5 亚型)、CC01 (Cas2 亚型) 和 HCcJPZ01 (Cas0 亚型) 均由中国热带农业科学院环境与植物保护研究所黄贵修研究团队分离、鉴定和保存。

1.1.3 培养基和试剂 用于培养病原菌的 PDA

表 1 供试橡胶树杂交组合及其亲本信息
Tab. 1 Hybrid combinations and parental information of rubber trees

杂交组合 Hybrid combination	授粉年份 Artificial pollination year	F ₁ 代群体总株数 Total number of seedlings	亲本 Parent	亲本来源 Parent of origin	选育单位 Breeding departments	亲本品种特性 Variety characteristics
IAN873 [♂] × 云研 277-5 [♀]	2009	268	IAN873 云研 277-5	PB86×FA1717 PB5/63×Tjir1	巴西北方农业研究所 云南省热带作物科学研究所	抗寒 ^[14] 速生、高产 ^[15]
云研 277-5 [♂] × 热垦 525 [♀]	2010	343	云研 277-5 热垦 525	PB5/63×Tjir1 INA873×RRIM803	云南省热带作物科学研究所 中国热带农业科学院橡胶研究所	高产 ^[15] 速生、高产 ^[16]
RRIC103 [♂] × 热研 8-79 [♀]	2011	210	RRIC103 热研 8-79	RRIC52×PB86 热研 88-13×热研 217	斯里兰卡橡胶研究所 中国热带农业科学院橡胶研究所	高产 ^[15] 高产 ^[17]

培养基和用于多主棒孢粗毒素发酵的 Fries 3 号改良的培养液参照李博勋等^[12]的研究方法配制。用于实施荧光定量分析的 *HbNPR1* 和 *HbGLP01* 基因引物 (表 2) 均由深圳华大基因科技有限公司合成; PCR 扩增反应所需的 Buffer、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP、DNA Marker 等购自天根生化科技 (北京) 有限公司。植物总 RNA 提取试剂盒

(DP441)、FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒 (KR106)、SYBR Green SuperReal 荧光定量预混试剂 (FP205) 均购自天根生化 (北京) 科技有限公司。过氧化物酶 (POD) 测试盒 (ml092949)、超氧化物歧化酶 (SOD) 测试盒 (mlsh0386) 均购自上海酶联生物科技有限公司。其他化学试剂、药品等均为国产分析纯。

表 2 PCR 引物
Tab. 2 PCR primer

基因 Gene	引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	片段大小 Fragment size/bp
<i>18S rRNA</i>	18s-F	GCTCGAAGACGATCAGATACC	146
	18s-R	TTCAGCCTTGCGACCATAAC	
<i>HbGLP01</i>	GLP-F	TAATATTGCCAGCGAAACTTC	124
	GLP-R	CCATTGCTTCATAATCGATA	
<i>HbNPR1</i>	NPR-F	GAGAATACACCGGGCTTTGG	138
	NPR-R	AGCTCAGTGGTAGTCTTTGC	

1.1.4 仪器设备 Bio-Rad T100 型梯度 PCR 仪, 美国伯乐公司; UVI FireReader 凝胶成像系统, 英国 UVitec 公司; ABI 实时荧光定量 PCR 仪 7500 型, 美国 ABI 公司。

1.2 方法

1.2.1 橡胶树 F₁ 代种质抗病性评价 本研究采

用病原菌菌饼接种、粗毒素生物萎蔫和田间活体接种 3 种方法, 以及抗病性方案设计、评价方法和病情分级标准均参照农业行业标准 NY/T 3195—2018《热带作物种质资源抗病虫鉴定技术规程 橡胶树棒孢霉落叶病》^[18], 抗病性评价分级标准参见表 3。

表 3 橡胶树棒孢霉落叶病抗病性评价分级标准^[18]
Tab. 3 Classification standard of *Corynespora* leaf fall disease^[18]

病斑直径 Spot diameter/cm	萎蔫指数 Wilting index	病情指数 Disease index	抗病性等级 Disease resistance level
病斑直径 < 0.5	萎蔫指数 < 10	DI < 15	高抗 (HR)
0.5 ≤ 病斑直径 < 1.0	10 ≤ 萎蔫指数 < 20	15 ≤ DI < 20	中抗 (MR)
1.0 ≤ 病斑直径 < 1.5	20 ≤ 萎蔫指数 < 30	20 ≤ DI < 30	轻感 (S)
1.5 ≤ 病斑直径 < 2.0	30 ≤ 萎蔫指数 < 40	30 ≤ DI < 40	中感 (MS)
病斑直径 ≥ 2.0	萎蔫指数 ≥ 40	DI ≥ 40	高感 (HS)

1.2.2 防御酶活性测定 为分析抗、感 F₁ 代种质防御酶活性的变化情况, 选取淡绿期的抗、感种

质叶片, 采用浓度为 1 × 10⁶ 个孢子/mL 的 HCCYN-49 菌株孢子悬浮液喷雾接种到橡胶树叶片背面,

每个种质接种 3 片复叶, 每片复叶为 1 个重复, 以接种无菌水的作为空白对照。分别于接种后 0、12、24、48、72 h 取样。过氧化物酶 (peroxidase, POD) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 提取方法及注意事项参照试剂盒说明书。

1.2.3 RNA 提取及反转录 参照 RNA 提取试剂盒说明书, 对抗、感橡胶叶片的总 RNA 进行提取, 经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 紫外分光光度计下测定其 260、280 nm 处的吸光值, 确保 RNA 样品的纯度。参照 FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒说明书对 RNA 进行反转录第一链。

1.2.4 实时荧光定量分析 参照 SYBR Green SuperReal 荧光定量试剂盒说明书, 以组成型表达基因 *18s rRNA* 做为内参基因, 分析 *HbNPR1* 和 *HbGLP01* 基因在橡胶树抗、感 F_1 代叶片受多主棒孢病菌 (HCcYN49) 接种不同时间段 (0、12、24、48、72 h) 的差异表达情况。每个样品均重复 3 次, 在 ABI 7500 实时 PCR 仪上进行, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算分析。 $2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-[(C_{tE}-C_{tF}) - (C_{tA}-C_{tB})]} = 2^{(C_{tF}-C_{tB}) - (C_{tE}-C_{tA})}$, 其中 C_{tA} 为处理前待测基因 C_t 值; C_{tB} 为处理前参照基因 C_t 值; C_{tE} 为处理后待测基因 C_t 值; C_{tF} 为处理后参照基因 C_t 值。

1.3 数据处理

橡胶树杂交 F_1 代群体的抗病性评价数据采用 WPS Office Excel 软件统计病斑直径和萎蔫指数, 采用 SPSS Statistics 20 软件中的 Kolmogorov-Smirnov test 进行变量分布形态检测与分析。实

时荧光定量的数据利用 SPSS Statistics 20 软件中的单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和 Duncan's 多重比较进行分析。

2 结果与分析

2.1 橡胶树 3 个杂交组合 F_1 代群体的抗病性评价

基于前期对我国橡胶树多主棒孢病菌遗传类群的划分依据^[19], 先选用国内橡胶树多主棒孢优势种群 Cas5 亚型的代表性菌株 HCcYN49 对 3 个杂交组合的 821 份 F_1 代群体进行抗病性评价, 并对平均病斑直径进行了正态分布检验。结果发现, 亲本的抗病性水平依次表现为: IAN873>云研 277-5>RRIC103>热研 8-79>热垦 525, 对于父母本均表现出较高抗病水平的杂交组合 IAN873×云研 277-5, 其 268 份 F_1 代群体中抗病的植株数占 87.68%, 高抗植株 70 份, 显著高于其他 2 个杂交组合的后代群体, 群体的平均抗病级次为中抗 (MR) (表 4)。杂交组合 IAN873×云研 277-5 F_1 代群体中病斑直径最大值为 1.33 cm, 最小值为 0.11 cm, 平均值 0.68 cm, 变异系数 38.23% (表 5), 抗病性呈现正偏态分布 (图 1、图 2), 说明该杂交组合的 F_1 代群体表现出较高抗病性, 群体样本趋于抗病遗传趋势。

杂交组合 RRIC103×热研 8-79 的 210 份 F_1 代群体中抗病植株树占 56.19%, 高抗植株 7 份, 群体平均抗病级次为轻感 (S) (表 4)。 F_1 代群体中病斑直径最大值为 2.30 cm, 最小值为 0.33 cm,

表 4 3 个杂交组合 F_1 代群体的抗病性评价结果

Tab. 4 Evaluation results of disease resistance in F_1 generation of three hybrid combinations

杂交组合 Hybrid combination	亲本抗病等级 Parent disease resistance level	F_1 代抗感植株数量 Number of overall resistant and susceptible plants in F_1 generation					总数 Total	F_1 代抗病植株比率 Ratio of F_1 generation disease-resistant plants/%	F_1 代平均感病级次 F_1 generation average disease level
		高抗	中抗	轻感	中感	高感			
		HR	MR	S	MS	HS			
IAN873 [♂] ×云研 277-5 [♀]	HR [♂] ×HR [♀]	70	165	33	0	0	268	87.68	MR
RRIC103 [♂] ×热研 8-79 [♀]	MR [♂] ×S [♀]	7	111	71	17	4	210	56.19	S
云研 277-5 [♂] ×热垦 525 [♀]	HR [♂] ×S [♀]	6	65	163	94	15	343	20.69	S

表 5 3 个杂交组合 F_1 代群体的病斑直径评价结果

Tab. 5 Evaluation results of lesion diameter in F_1 generation of three hybrid combinations

杂交组合/对照品种 Hybrid combinations/ control variety	平均病斑直径 Average lesion diameter/cm	最小值 Minimum/cm	最大值 Maximum/cm	变异系数 Coefficient of variation/%	小于对照的单株百分比 Percentage less than CK/%
IAN873 [♂] ×云研 277-5 [♀]	0.68	0.11	1.33	38.23	50.75
RRIC103 [♂] ×热研 8-79 [♀]	1.02	0.33	2.30	32.35	9.52
云研 277-5 [♂] ×热垦 525 [♀]	1.29	0.40	2.23	28.68	3.50
IAN873 (抗病对照)	0.67	0.35	0.85		

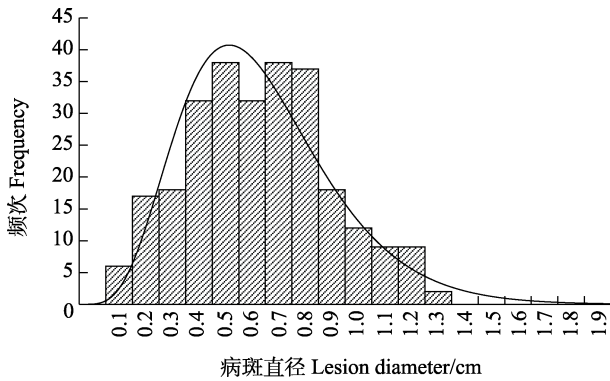


图 1 杂交组合云研 277-5×IAN 873 的 F₁ 代群体抗病性正态分布

Fig. 1 Normal distribution of disease resistance in F₁ generation of hybrid combinations Yunyan 277-5×IAN 873

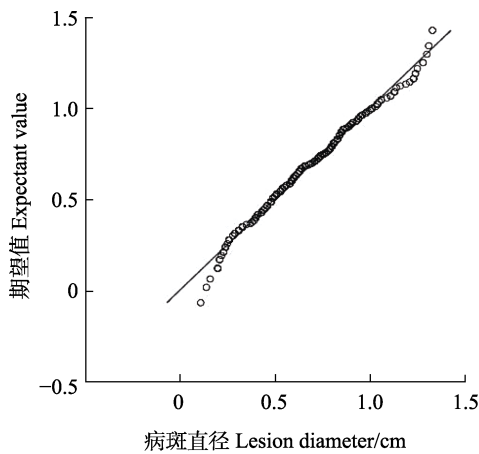


图 2 杂交组合云研 277-5×IAN 873 的 F₁ 代抗病性 Q-Q 概率

Fig. 2 The Q-Q probability plot for F₁ generation of hybrid combinations Yunyan 277-5 × IAN 873

平均值 1.02 cm，变异系数 32.35%（表 5、图 3），群体的抗病性符合标准正态分布（图 4、图 5），总体分布趋势及平均抗病级次在 3 个杂交组合中最平稳，在一定程度上代表了总体的抗病期望值，说明当群体数量足够大时，其抗病分布应符合正态分布。

杂交组合云研 277-5×热垦 525 的 343 份 F₁ 代群体中抗病植株数占 20.69%，高抗植株 6 份，群体平均抗病级次为轻感（S）（表 4），F₁ 代群体中病斑直径最大值为 2.23 cm，最小值为 0.40 cm，平均值 1.29 cm，变异系数 28.68%（表 5），群体的抗病性同样符合正态分布（图 6、图 7），该组合的 F₁ 代群体可作为候选抗病种质进入到无性系的高级系比。

2.2 候选抗病 F₁ 代种质的鉴定

橡胶树杂交 F₁ 代种质早期抗病性鉴定是根据

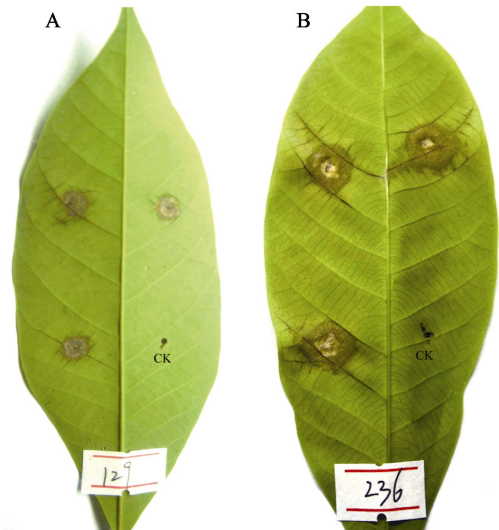


图 3 代表性抗、感 F₁ 代植株病原接种图

Fig. 3 *Corynespora* pathogen inoculation in F₁ generation plants with resistance and susceptibility

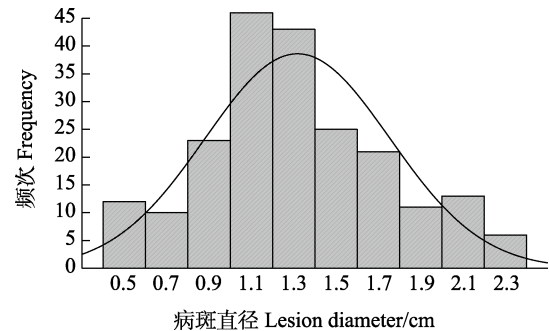


图 4 杂交组合 RRIC103×热研 8-79 的 F₁ 代群体抗病性正态分布

Fig. 4 Normal distribution of disease resistance in F₁ generation of hybrid combinations RRIC103×Reyan 8-79

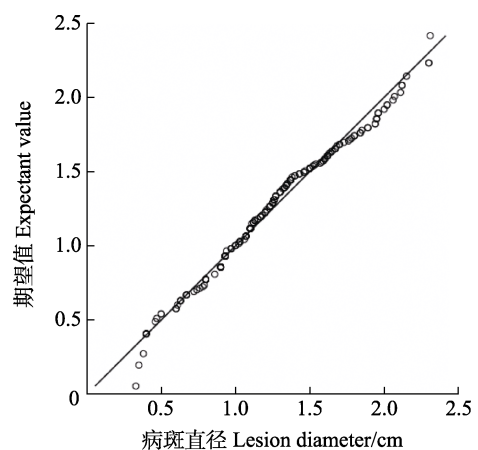


图 5 杂交组合云研 RRIC103×热研 8-79 的 F₁ 代抗病性 Q-Q 概率

Fig. 5 The Q-Q probability plot for F₁ generation of hybrid combinations RRIC103×Reyan 8-79

目标性状评价筛选出抗病性较好的优良单株，再

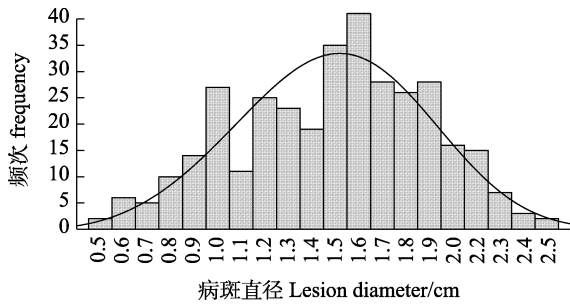


图 6 杂交组合云研 277-5×热垦 525 的 F₁ 代群体抗病性正态分布

Fig. 6 Normal distribution of disease resistance in F₁ generation of hybrid combinations Yunyan 277-5×Reken 525

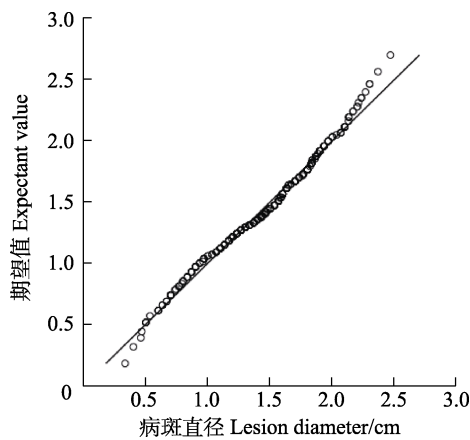


图 7 杂交组合云研 277-5×热垦 525 的 F₁ 代抗病性 Q-Q 概率

Fig. 7 The Q-Q probability plot for F₁ generation of hybrid combinations Yunyan 277-5×Reken 525

将优良单株繁殖成无性系进入高一级系比试验。因此,根据 3 个杂交组合共 821 份 F₁ 代群体的抗病性评价结果,选择符合正态分布的 RRIC103×热研 8-793 和云研 277-5×热垦 525 两个杂交组合中病斑直径小于对照 IAN873 的 32 份优良单株为候选抗病 F₁ 代种质,并将其进行芽接,每个单株编号芽接不少于 10 株,共获得 297 株 F₁ 代无性系种苗(表 6)。利用多主棒孢病菌 3 个亚型的代

表性菌株 HCcYN49 (Cas5 亚型)、CC01 (Cas2 亚型) 和 HCcJPZ01 (Cas0 亚型),致病力强弱依次为: HCcYN49>CC01>HCcJPZ01,对 32 份候选 F₁ 代无性系种苗进行抗病性复筛。结果发现,杂交组合 RRIC103×热研 8-79 中的 265、129、134 三个 F₁ 代单株(表 7),以及杂交组合云研 277-5×热垦 525 中的 3162、3528 两个 F₁ 代单株(表 8)不管是采用粗毒素生物萎蔫法还是田间活体接种法,在 3 个亚型多主棒孢病菌的接种下均表现出较好的抗病性水平。其中 265 和 129 这 2 个 F₁ 代种质在田间活体接种后,其病斑出现的时间较晚,病情指数也显著低于其他种质(表 7)。在这些 F₁ 代种质中,对 3 个亚型多主棒孢的抗病性也存在明显差异,如 167 和 3262 等种质表现出对 Cas2 亚型的高度感病性,对 Cas0 亚型较为免疫;而 125 和 3303 等种质表现出对 Cas5 亚型的高度感病性,不同的种质对不同亚型的病原菌敏感性不同(表 7、表 8)。

2.3 抗病 F₁ 代种质的抗病关联性分析

2.3.1 防御酶活性测定 已有研究表明,POD、SOD 等酶活作用能迅速降低体内活性氧积累给植物带来的损伤,从而提高植物对病原菌的防御能力^[20]。为了进一步分析复筛结果得到的 5 个高抗 F₁ 代种质其防御酶活性变化与病原菌侵染之间的关系,本研究对 265、129、134、3162、3528 五个抗病 F₁ 代种质和对照种质 PR107 的 POD 和 SOD 活性变化进行测定。结果发现,5 个 F₁ 代抗病种质以及对照品种 PR107 在多主棒孢病菌(HCcYN49)接种后均能引起 POD 和 SOD 防御酶活性的升高,在接种 24 h 时 POD 防御酶活性达到峰值,134 种质的峰值最高,48 h 后呈逐渐下降的趋势,相对于对照 PR107,5 个抗病 F₁ 代种质的防御酶活性普遍较高,72 h 后活性整体下降(图 8),而 SOD 防御酶活性的峰值在 5 个抗

表 6 候选 F₁ 代抗病单株信息

Tab. 6 Information on candidate F₁ resistant individual plants

杂交组合 Hybrid combination	候选 F ₁ 代单株编号及成活株数 F ₁ generation individual plants and number of budding seedling	单株总数 Total number
RRIC103 ^δ ×热研 8-79 [♀]	183(8)、173(7)、266(10)、187(10)、175(8)、267(8)、167(10)、154(10)、261(10)、269(10)、265(10)、125(8)、149(9)、182(9)、123(7)、134(10)、129(10)、100(8)、135(10)、262(10)	20(182)
云研 277-5 ^δ ×热垦 525 [♀]	3147(10)、3206(10)、3173(9)、3528(10)、3175(10)、3151(10)、3257(8)、3226(8)、3262(10)、3303(10)、3155(10)、3162(10)	12(115)

注:括号前面的数字为 F₁ 代单株的编号,括号内的数字是该编号下芽接成活的株数。

Note: The number before the parentheses represents the germplasm number, while the number inside the parentheses represents the number of plants that have survived budding.

表 7 杂交组合 RRIC103×热研 8-79 候选 F₁ 代单株抗病性复筛评价结果Tab. 7 Result of rescreening evaluation of disease resistance in candidate F₁ generation for RRIC103 × Reyan 8-79

F ₁ 代单株编号 F ₁ generation individual plant number	生物萎蔫指数 Biological wilting index			田间活体接种病情指数 Field disease index			综合抗病性评价水平 Synthetic evaluation of resistant level
	HCcYN49	CC01	HCcJPZ01	HCcYN49	CC01	HCcJPZ01	
265	9.57	6.33	5.36	6.43	4.37	3.69	HR
129	10.00	5.14	6.44	8.52	8.39	6.12	HR
134	12.07	6.52	8.20	10.37	6.52	5.97	HR
261	13.71	12.49	6.85	9.64	7.52	6.53	MR
183	13.33	9.42	6.31	11.77	9.37	8.43	MR
173	14.29	10.35	12.43	13.04	10.07	7.21	MR
266	13.41	9.37	9.22	9.25	13.27	6.44	MR
187	11.52	9.22	12.36	12.55	11.42	8.65	MR
175	15.64	12.08	10.37	13.43	13.97	9.24	MR
267	16.54	16.93	9.24	15.36	14.97	10.15	S
167	16.72	20.33	10.47	15.37	17.68	10.24	S
154	22.53	14.82	11.48	22.19	15.74	9.23	S
269	23.43	19.66	17.30	23.64	19.32	11.68	S
125	25.76	20.44	16.48	25.37	22.79	14.10	S
149	19.63	24.65	15.77	23.97	23.94	18.65	S
182	27.21	26.45	20.47	25.77	18.53	18.30	S
123	25.67	27.36	22.55	27.34	25.02	20.96	S
100	32.14	26.80	18.25	31.40	28.53	20.37	MS
135	27.97	33.86	25.47	33.47	27.62	23.14	MS
262	33.45	30.48	25.53	34.52	30.48	25.93	MS

表 8 杂交组合云研 277-5×热垦 525 候选 F₁ 代单株抗病性复筛评价结果Tab. 8 Result of rescreening evaluation of disease resistance in candidate F₁ generation for Yunyan 277-5×Reken 525

F ₁ 代单株编号 F ₁ generation indi- vidual plant number	生物萎蔫指数 Biological wilting index			田间活体接种病情指数 Field disease index			综合抗病评价水平 Synthetic evaluation of resistant level
	HCcYN49	CC01	HCcJPZ01	HCcYN49	CC01	HCcJPZ01	
3162	8.37	8.44	6.53	9.72	7.33	5.12	HR
3528	9.72	8.04	8.17	10.53	9.27	6.29	HR
3151	12.25	9.48	9.25	13.64	11.73	10.15	MR
3147	15.32	10.58	8.54	15.97	13.42	9.45	MR
3206	17.66	13.52	10.38	18.62	13.52	11.49	MR
3173	18.84	14.33	9.17	19.64	15.41	13.24	MR
3175	20.64	15.35	12.49	23.11	19.25	17.68	S
3257	23.21	17.94	15.31	25.97	22.40	19.37	S
3226	25.49	19.82	11.53	26.54	22.47	15.53	S
3262	20.11	23.14	13.67	29.31	24.34	17.14	S
3303	32.46	25.47	20.13	31.15	22.77	20.79	MS
3155	33.50	27.52	23.14	32.28	24.48	22.13	MS

病种质中均不相同, 129 和 134 在接种 12 h 时 SOD 活性达到峰值, 265、3162 和 3528 在接种 24 h 达到峰值, 48 h 后整体均呈下降趋势, 72 h 又有所升高 (图 9)。通过对 POD 和 SOD 两个防御酶

活性的变化可以看出, 5 个抗病 F₁ 代种质受病原菌侵染后, 均能诱导 POD 和 SOD 活性显著升高, 并在接种不同时间段, 通过防御酶活性的变化来抵御病原菌的进一步侵染。

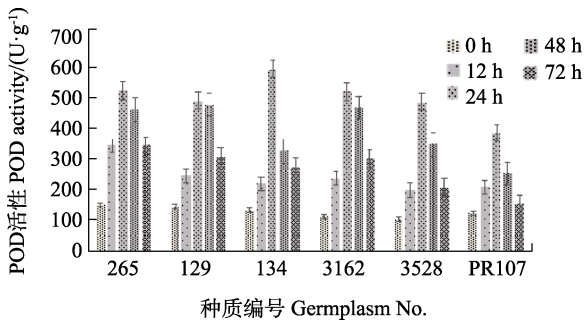


图 8 F₁代抗病种质 POD 酶活性变化

Fig. 8 Changes in POD enzyme activity of F₁ resistant germplasm

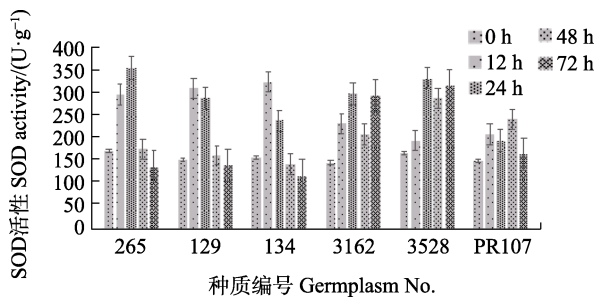


图 9 F₁代抗病种质 SOD 酶活性变化

Fig. 9 Changes in SOD enzyme activity of F₁ resistant germplasm

2.3.2 抗病相关基因表达分析 前期研究发现 *HbNPR1* 和 *HbGLP01* 基因是橡胶树棒孢霉落叶病的 2 个抗病相关基因, 在多主棒孢病菌侵染后能引起其表达量的明显变化, 并且这 2 个基因在橡胶树抗、感种质中的表达模式存在显著差异^[21-22]。因此, 分析这 2 个基因在 5 个抗病 F₁ 代种质中的表达情况, 将从基因水平明确种质的抗病关联性。从结果可以看出, 当多主棒孢病菌 (HCcYN49) 接种后 6 h 就能诱导 *HbNPR1* 基因表达量的升高, 并且在 24 h 时表达量均达到峰值, 265 和 3162 两个种质中 *HbNPR1* 基因的诱导表达量要高于其他几个种质, 在 48 h 时有所下降, 72 h 时表达量降至最低, 与对照 PR107 相比, 5 个抗病 F₁ 代种质的相对表达量都高于对照, 表达模式基本一致 (图 10)。对于 *HbGLP01* 基因, 265、129、134 在多主棒孢病菌接种 12 h 时表达量就达到峰值, 而 134、3162、3528 三种质以及对照 PR107 在 24 h 达到峰值, 48 h 之后表达量均下降, 5 个 F₁ 代种质中 *HbGLP01* 基因的表达模式存在一定差异 (图 11)。研究表明, *NPR1* 是植物中广谱抗性的基因, 参与水杨酸抗病信号转导途径, 与 TGA 转录因子相互作用, 引起下游抗病基因的表达^[23]。而 GLP 是一类重要的结构性蛋白, 具有草酸氧化酶

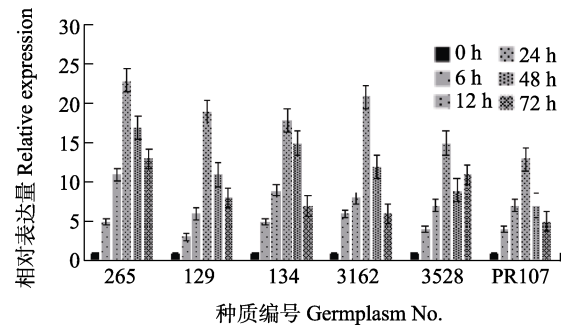


图 10 *HbNPR1* 基因在 F₁ 代抗病种质中的表达特性

Fig. 10 *HbNPR1* gene expression characteristics of F₁ resistant germplasm

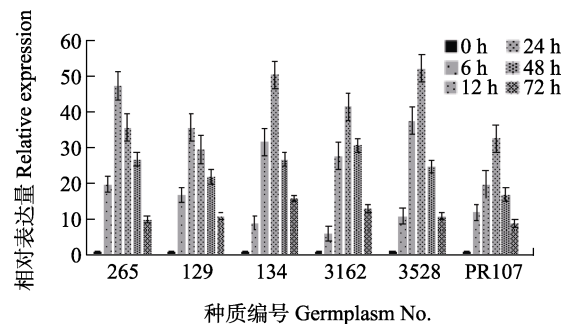


图 11 *HbGLP01* 基因在 F₁ 代抗病种质中的表达特性

Fig. 11 *HbGLP01* gene expression characteristics of F₁ resistant germplasm

(OXO) 和 SOD 活性, 能抑制活性氧的产生, 增强细胞壁的稳定性的, 在病原菌侵染早期起到关键作用^[24-25]。

3 讨论

橡胶树棒孢霉落叶病是主要植胶国家橡胶树上暴发流行最为严重的病害之一, 也是国际天然橡胶产业健康持续发展的主要生物限制因素^[26]。国际上, 对该病的防治主要采用抗病育种的方式, 而抗病品种的鉴定和创制利用是抗病种质选育的关键。

橡胶树是一种基因型高度杂合且育种周期长达 30 年的热带高大乔木, 杂交育种是橡胶树最常规也是选育优良橡胶树种质常用的方法^[27], 从具有优良性状的亲本杂交组合中选择 F₁ 代优良单株, 并进行无性系的繁育, 是橡胶树优良种质创制的基本策略^[28]。近年来, 通过杂交育种选育出如速生高产的热垦 525 和云研 277-5^[16]、抗寒性状良好的湛试 327-13^[29] 等优良品种 (系), 都较好地遗传了亲本的性状特征, 反映了亲本杂交的有效性, 缩短了育种进程。因此, 建立橡胶树棒孢霉落叶病的早期抗病性鉴定技术体系, 通过对杂交组合 F₁ 代群体早期抗病性的评价以及抗病表

型特征观察，从中选出抗病性较好的优良 F₁ 代单株并进行无性系的繁育，将有助于获得抗病的无性系种质材料，对橡胶树优良品种（系）的选育具有重要意义。

抗病性鉴定在实施过程中的方案设计、评价方法、病情分级标准以及接种的病原菌对抗病性评价结果都至关重要。本研究严格按照农业行业标准 NY/T 3195—2018《热带作物种质资源抗病虫鉴定技术规程 橡胶树棒孢霉落叶病》实施，选用的病原菌是来自 3 个亚型的多主棒孢病菌代表性菌株。由于多主棒孢病菌与橡胶树上的其他真菌性病害的病原在致病机制上存在明显差异，它是一种死体营养型的病原真菌，在侵染初期能产生寄主专化性毒素 *cassiicolin*，该物质是导致橡胶叶片坏死的重要致病因子，根据 *cassiicolin* 的毒素类型，将多主棒孢病菌划分成了不同的亚型（Cas1~Cas6），我国存在 Cas0、Cas2 和 Cas5 三种亚型，其中 Cas5 亚型为橡胶树上的优势种群^[30]。不同的橡胶种质对这 3 个亚型多棒孢病菌的抗病性存在明显差异^[19]。为了客观全面地分析橡胶树杂交 F₁ 群体的抗病性水平，进而选出抗病性较好的优良 F₁ 代种质，本研究采取 2 轮抗病性评价，第一轮评价是利用多主棒孢病菌优势种群 Cas5 亚型的代表性菌株，采用离体菌饼接种法，对 3 个杂交组合共 821 份 F₁ 代种质进行大规模的抗病性评价，从中获得 32 份候选抗病 F₁ 代单株，并对每个单株进行基部芽接，获得 F₁ 代无性系种苗；第二轮评价是利用 Cas0、Cas2 和 Cas5 三个亚型多主棒孢病菌的代表性菌株，分别采用粗毒素生物萎蔫和田间活体接种 2 种方法对候选的 32 份 F₁ 代无性系种苗进行抗病性复筛，经过 2 轮评价、不同亚型的多主棒孢病菌接种以及多种评价方法，最终获得 5 份抗病性较好的 F₁ 代种质，并从防御酶水平和抗病相关基因的角度进一步验证了 5 份 F₁ 代种质的抗病关联性。通过上述的抗病性鉴定技术，得到的抗病性评价结果以及获得的 F₁ 代抗病种质都具有较强的可靠性，客观反映出 3 个杂交组合 F₁ 代群体的抗病性。该技术体系能为后续橡胶树种质的选育提供较好的技术方案，评价结果也能为橡胶树优良品种的选育与创制利用提供较好的种质材料。

寄主植物与病原微生物相互作用的过程中会产生一系列生理生化反应，特别是引起酚类代谢相关酶活性增强，如 SOD、POD、CAT 以及 PAL

等，都是参与寄主防御反应的关键因子，而超氧化物歧化酶和过氧化物酶是细胞内减轻活性氧伤害的保护酶^[31]。本研究中，当多主棒孢病菌侵染初期，在 5 个抗病 F₁ 代种质中就能引起超氧化物歧化酶和过氧化物酶活性的升高，在一定程度上说明，多主棒孢病菌侵染能诱导这 2 个酶的活性进而增强寄主的抗病性，但这并不是在所有的种质中都有明显的相关性，因为代谢过程中的酶活性变化是根据寄主植物和病原微生物互作体系的不同而不同^[31]，比如同一个品种与不同病原生理小种（或种群）之间的互作体系，以及不同品种与同一个病原生理小种（或种群）之间的互作体系，都会导致病原菌在侵染过程中防御酶活性的变化。此外，植物的抗病性还与病原微生物关联分子模式引发的免疫反应（PTI）以及由病原效应子引发的免疫反应（ETI）密切相关，并且是由水杨酸、乙烯、茉莉酸等植物激素介导的抗病性^[32]。橡胶树 *HbNPR1* 基因在水杨酸抗病信号转导途径中起到了十分关键的作用，它能激活下游防御反应基因的表达，正向调控寄主的抗病性^[21]。*HbGLP01* 是一种类萌发素蛋白，在植物基础抗性方面发挥着重要作用，具有 OXO 和 SOD 活性，能催化草酸氧化，增强植物细胞壁结构，触发过氧化脂质反应和乙烯的合成^[22]。本研究中这 2 个基因在参与橡胶树与多主棒孢病菌相互作用初期都发挥着重要作用，在不同抗性水平 F₁ 代种质中的表达量明显不同，具有作为橡胶树棒孢霉落叶病抗病性早期分子鉴定靶标基因的潜力。

致谢 本文得到了海南省重点研发计划项目（No. ZDYF2021XDNY153）和国家重点研发计划项目（No. 2019YFD1000500）的支持。感谢云南省热带作物科学研究所提供的 3 个杂交组合共 821 份 F₁ 代种质材料和候选 F₁ 代单株的无性系种苗，以及用于开展抗病性评价有关的实（试）验条件。

参考文献

- [1] 黄华孙. 现代农业产业技术体系建设理论与实践 天然橡胶体系分册[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
HUANG H S. The theory and practice of modern agricultural industrial technology system construction natural rubber system[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2020. (in Chinese)
- [2] BARTHE P, PUJADE-RENAUD V, BRETON F, GARGANI D, THAI R, ROUMESTAND C, DE-LAMOTTE F. Struc-

- tural analysis of cassiicolin, a host-selective protein toxin from *Corynespora cassiicola*[J]. Journal of Molecular Biology, 2007, 367: 89-101.
- [3] 黄贵修, 许灿光, 李博勋. 中国天然橡胶病虫害识别与防治(第二版)[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2018. HUANG G X, XU C G, LI B X. Identification and control of diseases, pests and weeds of natural rubber in China (2nd edition)[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2018. (in Chinese)
- [4] PU J J, ZHANG X, QI Y X, XIE Y X, ZHANG H Q, ZHANG H. First record of *Corynespora* leaf fall disease of *Hevea* rubber tree in China[J]. Australasian Plant Disease Notes, 2007, 2(1): 35-36.
- [5] 李博勋, 刘先宝, 蔡吉苗, 黄贵修. 中国橡胶树棒孢霉落叶病疫情调查及其发生规律初探[J]. 热带作物学报, 2015, 36(11): 2058-2066. LI B X, LIU X B, CAI J M, HUANG G X. Investigation and occurrence regularity of *Corynespora* leaf fall diseases of rubber tree in China[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2015, 36(11): 2058-2066. (in Chinese)
- [6] 黄贵修, 时涛, 刘先宝. 巴西橡胶树棒孢霉落叶病[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2008. HUANG G X, SHI T, LIU X B. *Corynespora* leaf fall disease of *Hevea brasiliensis*[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2008. (in Chinese)
- [7] TAN A M, LOO T P, VADIVEL G, BACHIK M R. Survey of major leaf disease of rubber in Peninsular Malaysia[J]. Planter's Bulletin, 1992, 211: 51-62.
- [8] TRAN D H, TRAN P D. Field efficacy of chemical fungicides on rubber leaf fall disease (*Corynespora cassiicola*) in Central Vietnam[J]. Research on Crops, 2019, 20(3): 611-615.
- [9] MANJU M J, JACOB C K, IDICULA S P. *Corynespora* leaf fall disease management in *Hevea* using oil-dispersible and dust fungicide formulations[J]. Dispersible, 2002, 15(1): 45-48.
- [10] 张春霞, 何明霞, 李加智, 王进强, 蒋桂芝, 侯建勇. 橡胶树棒孢霉落叶病原菌的生物学特性[J]. 植物保护, 2010, 36(2): 98-101. ZHANG C X, HE M X, LI J Z, WANG J Q, JIANG G Z, HOU J Y. Biological characteristics of *Corynespora cassiicola* causing *Corynespora* leaf fall disease[J]. Plant Protection, 2010, 36(2): 98-101. (in Chinese)
- [11] 吴春太, 李维国, 高新生, 张晓飞, 张伟算. 我国橡胶树育种目标及发展策略探讨[J]. 广西农业科学, 2009, 40(12): 1633-1636. WU C T, LI W G, GAO X S, ZHANG X F, ZHANG W S. Rubber tree breeding: objectives and development strategies in China[J]. Guangxi Agricultural Sciences, 2009, 40(12): 1633-1636. (in Chinese)
- [12] 李博勋, 刘先宝, 林春花, 时涛, 黄贵修. 国内橡胶树主要种质对棒孢霉落叶病的抗性评价[J]. 植物保护, 2014, 40(5): 86-92. LI B X, LIU X B, LIN C H, SHI T, HUANG G X. Resistance evaluation of main *Hevea brasiliensis* germplasm to *Corynespora* leaf fall disease in China[J]. Plant Protection, 2014, 40(5): 86-92. (in Chinese)
- [13] 胡彦师, 周世俊, 安泽伟, 张晓飞, 方家林, 涂敏, 程汉, 曾霞, 黄华孙. 国家橡胶树种质资源圃资源安全保存[J]. 热带作物学报, 2022, 43(1): 78-86. HU Y S, ZHOU S J, AN Z W, ZHANG X F, FANG J L, TU M, CHENG H, ZENG X, HUANG H S. Safe conservation of rubber tree germplasm resources in the national rubber tree germplasm repository[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2022, 43(1): 78-86. (in Chinese)
- [14] 刘忠亮, 宁连云, 和丽岗. 橡胶树优良品种 IAN873 在云南的适应性[J]. 热带农业科技, 2010, 33(3): 13-15, 30. LIU Z L, NING L Y, HE L G. Adaptability study on *Hevea* clone IAN873 in Yunnan[J]. Tropical Agricultural Science & Technology, 2010, 33(3): 13-15, 30. (in Chinese)
- [15] 黄华孙. 中国橡胶树育种五十年[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005. HUANG H S. Fifty years of rubber tree breeding in China[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2005. (in Chinese)
- [16] 余文才, 宁连云, 邱彦芬, 和丽岗. 橡胶树胶木兼优品种热垦 525 杂交子代早期鉴定[J]. 热带农业科技, 2018, 41(4): 6-11. YU W C, NING L Y, QIU Y F, HE L G. Early identification of hybrids of timber/latex clone Renken 525 in *Hevea brasiliensis*[J]. Tropical Agricultural Science & Technology, 2018, 41(4): 6-11. (in Chinese)
- [17] 周建南, 曾霞. “一带一路”热带国家天然橡胶共享品种于技术[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2020. ZHOU J N, ZENG X. “Belt and Road” tropical countries share varieties of natural rubber with technology[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2020. (in Chinese)
- [18] 中华人民共和国农业农村部. 热带作物种质资源抗病虫鉴定技术规程 橡胶树棒孢霉落叶病: NY/T 3195—2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018. Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P. R. China. Technical specification for resistance identification to diseases and insects of tropical crops germplasm—*Corynespora* leaf fall disease of rubber tree: NY/T 3195—2018[S]. Beijing: Standards Press of China, 2018. (in Chinese)

- [19] 李博勋, 冯艳丽, 刘先宝, 蔡吉苗, 陆翠梅, 郑肖兰, 黄贵修. 我国热带作物多主棒孢种群多样性及致病力分化分析[J]. 热带作物学报, 2019, 40(12): 2456-2465.
LI B X, FENG Y L, LIU X B, CAI J M, LU C M, ZHENG X L, HUANG G X. Genetic diversity and pathogenic variability among isolates of *Corynespora cassiicola* from tropical crops in China[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2019, 40(12): 2456-2465. (in Chinese)
- [20] BERACOCHEA V C, ALMASIA N I, PELUFFO L, NAHIRNAK V, HOPP E H, PANIEGO N, HEINZ R A, VAZQUEZ-ROVERE C, LIA V V. Sunflower germin-like protein HaGLP1 promotes ROS accumulation and enhances protection against fungal pathogens in transgenic *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Cell Reports, 2015, 34(10): 1717-1733.
- [21] 李博勋, 时涛, 林春花, 刘先宝, 蔡吉苗, 黄贵修. 橡胶树抗病相关基因 *HbNPR1* 的克隆及其表达分析[J]. 热带作物学报, 2014, 35(6): 1076-1083.
LI B X, SHI T, LIN C H, LIU X B, CAI J M, HUANG G X. Cloning and expression analysis of resistance-related gene *HbNPR1* from *Hevea brasiliensis*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2014, 35(6): 1076-1083. (in Chinese)
- [22] 陈珊, 李博勋, 陈奕鹏, 刘先宝, 黄贵修. 橡胶树类萌发素蛋白基因 *HbGLP01* 的克隆及其表达分析[J]. 热带作物学报, 2016, 37(4): 715-721.
CHEN S, LI B X, CHEN Y P, LIU X B, HUANG G X. Cloning and expression analysis of Germin-like gene *HbGLP01* from rubber tree[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2016, 37(4): 715-721. (in Chinese)
- [23] NDAMUKONG I, ABDALLAT A A, THUROW C, FODE B, ZANDER M, WEIGEL R. SA - inducible *Arabidopsis* glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA - responsive PDF1. 2 transcription[J]. The Plant Journal, 2007, 50(1): 128-139.
- [24] SAKAMOTO A, NISHIMURA T, MIYAKI Y I, WATANABE S, TAKAGI H, IZUMI S. *In vitro*, and *in vivo*, evidence for oxalate oxidase activity of a germin-like protein from azalea[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2015, 458(3): 536-542.
- [25] KOMATSU S, KOBAYASHI Y, NISHIZAWA K, NANJO Y, FURUKAWA K. Comparative proteomics analysis of differentially expressed proteins in soybean cell wall during flooding stress[J]. Amino Acids, 2010, 39(5): 1435-1449.
- [26] 时涛, 李博勋, 冯艳丽, 刘先宝, 郑肖兰, 黄贵修. 橡胶树棒孢霉落叶病对中国天然橡胶及相关产业的安全性评估[J]. 热带农业科学, 2019, 39(8): 66-71.
SHI T, LI B X, FENG Y L, LIU X B, ZHENG X L, HUANG G X. Safety assessment of *Corynespora* leaf fall disease on natural rubber and related industries in China[J]. Chinese Journal of tropical agriculture, 2019, 39(8): 66-71. (in Chinese)
- [27] 李文秀, 贺军军, 张华林, 罗萍. SSR 分子标记鉴定橡胶树 F₁ 真伪杂种[J]. 热带作物学报, 2021, 42(5): 1305-1309.
LI W X, HE J J, ZHANG H L, LUO P. Identification of F₁ hybrids of *Hevea brasiliensis* by SSR markers[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2021, 42(5): 1305-1309. (in Chinese)
- [28] 吴春太, 李维国, 黄华孙. 近年来国内外橡胶树种质资源与育种方法研究新进展[J]. 西北林学院学报, 2013, 28(2): 118-124, 146.
WU C T, LI W G, HUANG H S. Research progresses on *Hevea* germplasm resources and breeding methods[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2013, 28(2): 118-124, 146. (in Chinese)
- [29] 李土荣, 贺军军, 吴青松, 王一承, 程儒雄, 罗萍. 橡胶树新品系湛试 327-13 抗寒性和产胶能力调查[J]. 热带农业科学, 2016, 36(6): 6-9.
LI T R, HE J J, WU Q S, WANG Y C, CHENG R X, LUO P. Investigation of cold resistance and rubber production capacity of rubber clone Zhanshi 327-13[J]. Chinese Journal of tropical Agriculture, 2016, 36(6): 6-9. (in Chinese)
- [30] 李博勋, 刘先宝, 冯艳丽, 解惠婷, 黄贵修. 橡胶树多主棒孢病菌 *Cassiicolin* 基因条形码数据库构建及分子检测技术[J]. 热带作物学报, 2019, 40(9): 1770-1782.
LI B X, LIU X B, FENG Y L, XIE H T, HUANG G X. Construction of *Cassiicolin* genes barcode database and molecular detection technology of *Corynespora cassiicola* from *Hevea brasiliensis* in China[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2019, 40(9): 1770-1782. (in Chinese)
- [31] 谢联辉. 普通植物病理学[M]. 北京: 科学出版社, 2006.
XIE L H. Regular plant pathology[M]. Beijing: Science Press, 2006. (in Chinese)
- [32] JONES J D G, DANGL J L. The plant immune system[J]. Nature, 2006, 444(7117): 323-329.