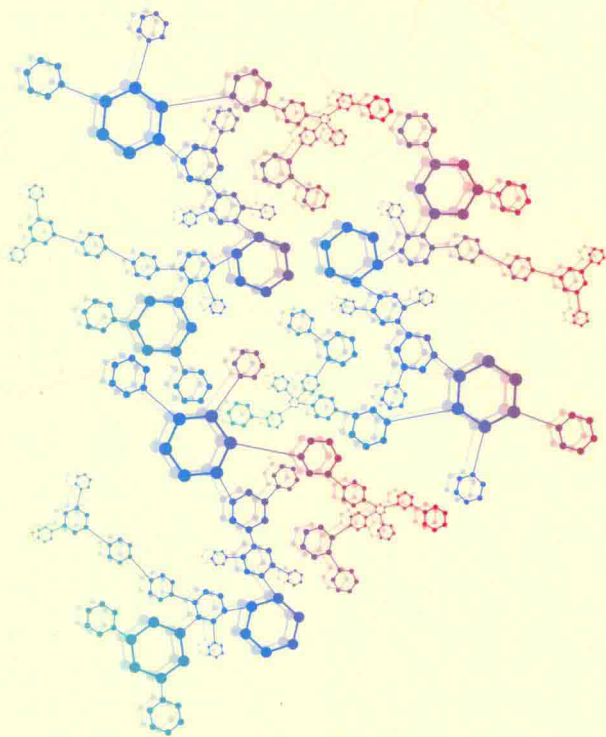


# 橡胶树白粉病害和草甘膦药害 生理与分子响应机制

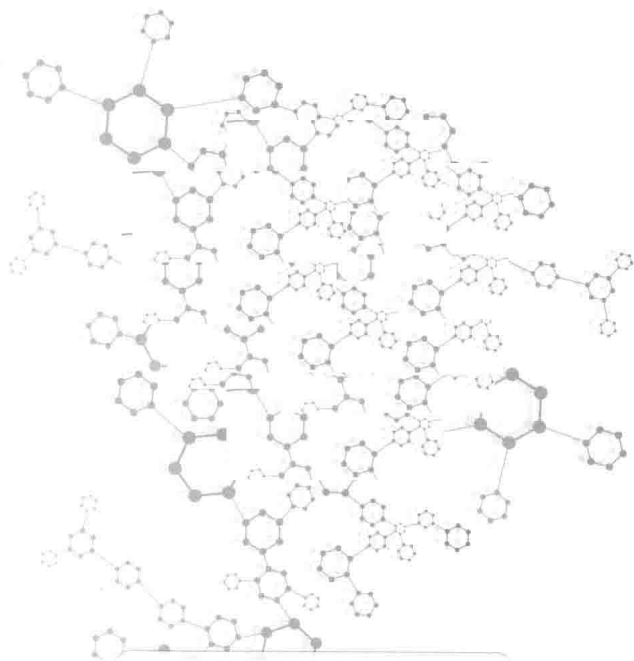
张宇 王萌 郑服丛 著



中国农业科学技术出版社

# 橡胶树白粉病害和草甘膦药害 生理与分子响应机制

张宇 王萌 郑服丛 著



中国农业科学技术出版社

## 图书在版编目 (CIP) 数据

橡胶树白粉病害和草甘膦药害生理与分子响应机制 / 张宇, 王萌, 郑服丛著. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2016. 10

ISBN 978-7-5116-2808-4

I. ①橡… II. ①张…②王…③郑… III. ①橡胶树-病虫害防治  
IV. ①S763.741

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 259673 号

责任编辑 姚 欢

责任校对 马广洋

出版者 中国农业科学技术出版社

北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电 话 (010)82106636(编辑室) (010)82109702(发行部)  
(010)82109709(读者服务部)

传 真 (010)82106650

网 址 <http://www.castp.cn>

经 销 者 各地新华书店

印 刷 者 北京科信印刷有限公司

开 本 880mm×1 230mm 1/32

印 张 7.5

字 数 250 千字

版 次 2016 年 10 月第 1 版 2016 年 10 月第 1 次印刷

定 价 50.00 元

— 版权所有 · 翻印必究 —

# 《橡胶树白粉病害和草甘膦药害生理与分子响应机制》

## 著 者 名 单

- |     |                  |
|-----|------------------|
| 张 宇 | 海南大学环境与植物保护学院    |
| 王 萌 | 海南大学环境与植物保护学院    |
| 郑服丛 | 海南大学环境与植物保护学院    |
| 覃 碧 | 中国热带农业科学院        |
| 李晓娜 | 中国热带农业科学院        |
| 何海霞 | 海南大学环境与植物保护学院    |
| 唐桂云 | 云南省临沧市耿马县地方产业发展办 |
| 张海东 | 中国热带农业科学院        |
| 王达明 | 海南省澄迈县农业技术推广中心   |

## 作者单位

海南大学环境与植物保护学院

Environment and Plant Protection College, Hainan University,  
Haikou, Hainan 570228, China

中国热带农业科学院

Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou,  
Hainan 571737, China

云南省临沧市耿马县地方产业发展办

Local Industry Development Office of Gengma Town,  
Lincang City, Yunnan Province, 677500, China

海南省澄迈县农业技术推广中心

Chengmai County Agricultural Technology Promotion center,  
Hainan Province, 571900, China

## 前 言

巴西橡胶树是天然橡胶和木材的重要来源，其栽培起源于南美亚马逊流域，是南美洲和亚洲重要的经济树木。天然橡胶是我国重要的战略物资，但目前我国自给率低，需求缺口巨大。随着我国社会经济的快速发展，我国天然橡胶的供需缺口还会加大。理论上，有5条途径可提高我国天然橡胶的总产量，从而降低进口依赖性：一是扩大种植面积，但限于橡胶树生境要求，我国适宜种植橡胶树的面积极其有限且已经趋于饱和，依靠扩大种植规模来保证中国天然橡胶供应已不现实；二是通过选育高产品系或品种以提高单产，但橡胶树的选育种周期漫长，难度大，而且产量提高幅度有限；三是通过施肥和栽培技术措施提高产量，而我国在这方面已经有比较深入的研究，进一步提高橡胶树产量的潜力比较小；四是通过橡胶树病虫害的有效防治，减少产量损失；五是选育高抗品系。从多种角度考虑，通过病虫害预测预报降低防治成本，提高有效防治，选育高抗品系减少产量损失确实具有较大的潜力可以挖掘。

病虫害是制约橡胶种植业持续发展的重要因素，造成产量损失一般在15%以上，其有效防控一直是国内外面临的难题。药剂防治使用不当，对橡胶树造成药害也是制约橡胶树生产的一个因素。我国橡胶树每年因病虫害造成的损失理论上超过 $6 \times 10^7$ kg，价值10亿元人民币。按照目前防治效果75%、防治覆盖面60%计算，理论上在病虫害防治方面还有约 $3 \times 10^7$ kg的产量潜力。国内外橡胶树的主要病虫害包括白粉病、炭疽病、南美叶疫病、根病、季风性落叶病、死皮病



(褐皮病)、棒孢霉落叶病、割面条溃疡病、六点始叶螨、介壳虫和小蠹虫等。

橡胶树白粉病是由半知菌类粉孢属白粉菌 (*Oidium heveae* Steinmann) 引起的真菌性病害,在我国以及全世界各植胶国家普遍发生。橡胶树白粉菌通常侵害橡胶树的嫩叶、嫩芽和花序。通常在早春发生,可导致橡胶树二次落叶,其症状为叶片卷曲、变黄、脱落,导致橡胶树生长迟缓,胶乳产量降低。对橡胶树白粉病流行规律的研究结果表明,该病害在低温、湿度大的条件下大规模暴发,国内外长期以来一直使用硫磺粉防治橡胶树主要叶部病害白粉病,硫磺粉具有价格较便宜、施药操作简单的优点,但其防病效果受天气条件制约严重,施药时要求基本静风、橡胶树叶片上有露水、施药后当天天气晴朗或至少无雨,这样才能达到理想的防治效果,因此往往因为天气问题不能施药或施药后遇雨天而防效不好,且耽误防治最佳时机。为了解决此问题,国内在 20 世纪 90 年代研制了粉锈宁(三唑酮)烟雾剂,后各科研单位又研制咪唑酮热雾剂、丙环唑超低容量油剂等高扬程药剂,其比施用硫磺粉的扬程高并对病害有铲除作用,但其作用位点比较单一,长期连续应用后病原菌易产生抗药性因此受到推广的限制,但可以作为硫磺粉的辅助药剂。而与化学防治相比,培育和推广抗白粉病品种是控制白粉病的最环保和有效的途径。

在过去的 20 年里,我国在巴西橡胶树病虫害防治技术和理论机制研究领域取得了显著的进步。本书着重阐述了编者研究橡胶树对白粉病和草甘膦药害的生理响应与分子机制的最新研究进展。

著者

2016 年 6 月

# 目 录

1	橡胶树白粉病流行病学研究进展 .....	(1)
1.1	橡胶树白粉病的症状识别 .....	(1)
1.2	橡胶树白粉病流行病学规律 .....	(1)
1.3	橡胶树粉孢菌侵染对橡胶树生理活性影响 .....	(3)
1.4	橡胶树白粉病防治的分子生物学进展 .....	(4)
1.5	橡胶树白粉病测报技术 .....	(4)
1.5.1	监测站和固定观察点的设立和管理 .....	(4)
1.5.2	橡胶树物候调查和气象数据采集 .....	(6)
1.5.3	橡胶树白粉病病情数据的调查 .....	(9)
1.6	橡胶树白粉病的防治方法 .....	(12)
1.6.1	化学防治 .....	(12)
1.6.2	农业防治 .....	(15)
2	橡胶树对白粉菌侵染的生理响应 .....	(16)
2.1	橡胶树白粉菌侵染叶片的表型 .....	(16)
2.2	橡胶树白粉菌侵染后叶片的生理活性 .....	(17)
3	橡胶树对草甘膦药害的生理和分子响应 .....	(28)
3.1	植物草甘膦药害研究进展 .....	(28)
3.1.1	草甘膦简介 .....	(28)
3.1.2	草甘膦在植物中的作用机理 .....	(28)
3.1.3	草甘膦在植物中吸收和迁移 .....	(29)
3.1.4	草甘膦对植物生理变化的影响 .....	(30)
3.1.5	草甘膦作用靶标酶 EPSPS 研究进展 .....	(36)
3.1.6	抗草甘膦转基因作物 .....	(37)





3.2	转录组测序技术的发展与应用 .....	(38)
3.3	橡胶树对草甘膦药害的生理响应 .....	(40)
3.3.1	草甘膦对巴西橡胶树芽接苗浓度效应 .....	(40)
3.3.2	喷施草甘膦后不同时期橡胶树芽接苗叶片形态 ...	(41)
3.3.3	草甘膦对巴西橡胶树芽接苗生理变化的影响 .....	(41)
3.4	橡胶树对草甘膦药害的分子响应 .....	(53)
3.4.1	巴西橡胶树 <i>EPSPS</i> 基因的克隆及生物信息学 分析 .....	(53)
3.4.2	巴西橡胶树 <i>HbEPSPS</i> 基因的表达分析 .....	(56)
3.4.3	草甘膦作用下橡胶树芽接苗叶片转录组分析 .....	(63)
4	橡胶树 <i>Mlo</i> 基因家族在白粉菌抗性反应中的作用 .....	(93)
4.1	<i>Mlo</i> 基因家族功能研究进展 .....	(93)
4.1.1	<i>Mlo</i> 基因家族与白粉菌抗性 .....	(93)
4.1.2	<i>Mlo</i> 基因的其他功能 .....	(94)
4.1.3	参与 <i>Mlo</i> 介导的白粉菌抗性反应的辅助因子 .....	(95)
4.1.4	<i>Mlo</i> 基因的新功能 .....	(97)
4.1.5	<i>Mlo</i> 蛋白的系统发育分析 .....	(97)
4.1.6	同源或异源的 <i>Mlo</i> 成员具有功能互补作用 .....	(99)
4.1.7	<i>Mlo</i> 在抗病育种中的应用 .....	(99)
4.2	橡胶树 <i>HbMlo</i> 成员结构与功能分析 .....	(101)
4.2.1	巴西橡胶树 <i>HbMlo1</i> 基因的克隆与表达分析 .....	(102)
4.2.2	巴西橡胶树 <i>HbMlo1-1</i> 基因的克隆与表达分析 ...	(111)
4.2.3	巴西橡胶树 <i>HbMlo7</i> 基因的克隆与表达分析 .....	(119)
4.2.4	巴西橡胶树 <i>Mlo8</i> 基因的克隆与表达分析 .....	(127)
4.2.5	巴西橡胶树 <i>HbMlo9</i> 基因的克隆和表达分析 .....	(135)
4.2.6	橡胶树 5 个 <i>Mlo</i> 基因是植物 <i>Mlo</i> 家族成员 .....	(145)
5	橡胶树白粉病抗性基因 <i>HbSGT1s</i> 结构与功能分析 .....	(151)
5.1	<i>SGT1</i> 基因参与植物 <i>R</i> 基因反应 .....	(151)
5.2	<i>AtSGT1s</i> 参与生长素信号介导的发育调控 .....	(151)



5.3	巴西橡胶树 <i>HbSGT1a</i> 基因的克隆与表达分析	(154)
5.3.1	巴西橡胶树 <i>HbSGT1a</i> 基因的克隆及其序列特征分析	(154)
5.3.2	巴西橡胶树 <i>HbSGT1a</i> 基因的表达模式分析	(157)
5.4	巴西橡胶树 <i>HbSGT1b</i> 基因的克隆与表达分析	(161)
5.4.1	巴西橡胶树 <i>HbSGT1b</i> 基因的克隆及其序列特征分析	(161)
5.4.2	巴西橡胶树 <i>HbSGT1b</i> 基因的表达模式分析	(161)
5.5	<i>HbSGT1s</i> 基因是 SGT1 家族成员, 受多因素差异调控	(167)
6	橡胶树白粉病生理与分子生物学研究方法	(169)
6.1	橡胶树材料及处理	(169)
6.2	橡胶树生理学研究方法	(170)
6.2.1	完整线粒体的提取	(170)
6.2.2	$\text{NAD}^+$ -苹果酸脱氢酶活性的测定	(171)
6.2.3	细胞色素 C 氧化酶活性测定	(171)
6.2.4	过氧化氢酶活性的测定	(171)
6.2.5	乙醇脱氢酶活性的测定	(171)
6.2.6	线粒体稳定性和完整性的测定	(172)
6.2.7	线粒体对 NADH 氧化的检测	(172)
6.2.8	叶绿素和 $\beta$ -胡萝卜素的测定	(172)
6.2.9	叶绿素荧光动力学参数的测定	(173)
6.2.10	脯氨酸含量的测定	(173)
6.2.11	丙二醛 (MDA) 含量的测定	(173)
6.2.12	蛋白标准曲线测定	(173)
6.2.13	莽草酸含量测定	(174)
6.2.14	激素含量测定	(174)
6.3	橡胶树分子生物学研究方法	(177)
6.3.1	生物信息学分析	(177)



6.3.2	橡胶树 <i>Mlo</i> 家族成员的扩增 .....	(177)
6.3.3	<i>HbMlo</i> 及 <i>HbSGT1</i> 表达分析 .....	(185)
6.3.4	草甘膦作用下橡胶树叶片转录组测序 .....	(188)
6.4	统计分析和作图软件 .....	(195)
	本书发表相关论文 .....	(196)
	参考文献 .....	(197)
	致谢 .....	(230)

# 1 橡胶树白粉病流行病学研究进展

## 1.1 橡胶树白粉病的症状识别

仅为害橡胶树的幼嫩组织，包括嫩叶、嫩芽、嫩梢和花序。嫩叶感病初期，在叶面或叶背上出现辐射状的银白色菌丝，似蜘蛛丝，以后在病斑上出现一层白粉，形成大小不一的白粉病斑，这是本病最显著的特征。嫩叶感病初期若遇高温，菌丝生长受到抑制而病斑变为红褐色。红褐色遇适宜的温度还能恢复产生分生孢子，使病斑继续扩大。发病严重时，病叶布满白粉，叶肉组织皱缩、畸形、变黄，最后脱落。不脱落的病叶，随着叶片的老化和气温升高，病斑上的白粉逐渐消失，留下白色癣状斑或黄褐色坏死斑。花序感病后出现一层白粉。病害严重时花蕾全部脱落，只留下光秃秃的花轴（图1）。

## 1.2 橡胶树白粉病流行病学规律

橡胶树白粉病是典型的气候型病害。它的发生和流行同当地的气象、橡胶树物候期和病原菌数量这3个因素紧密相关（余卓桐和王绍春，1988；范会雄和谭象生，1997），该病主要发生在橡胶树的嫩叶期（肖建民和邓建明，2008），病害的严重程度主要受抽叶期间的天气影响（范会雄和谭象生，1997）。在我国，多年的研究成果表明，不同省份植胶区，白粉病流行过程与程度不同。通过对海南大量的数据进行统计分析，发现海南橡胶树白粉病的发生主要分为指数增长期也是白粉病流行过程的基础、逻辑斯蒂期也叫流行中期和衰退期或称流行末

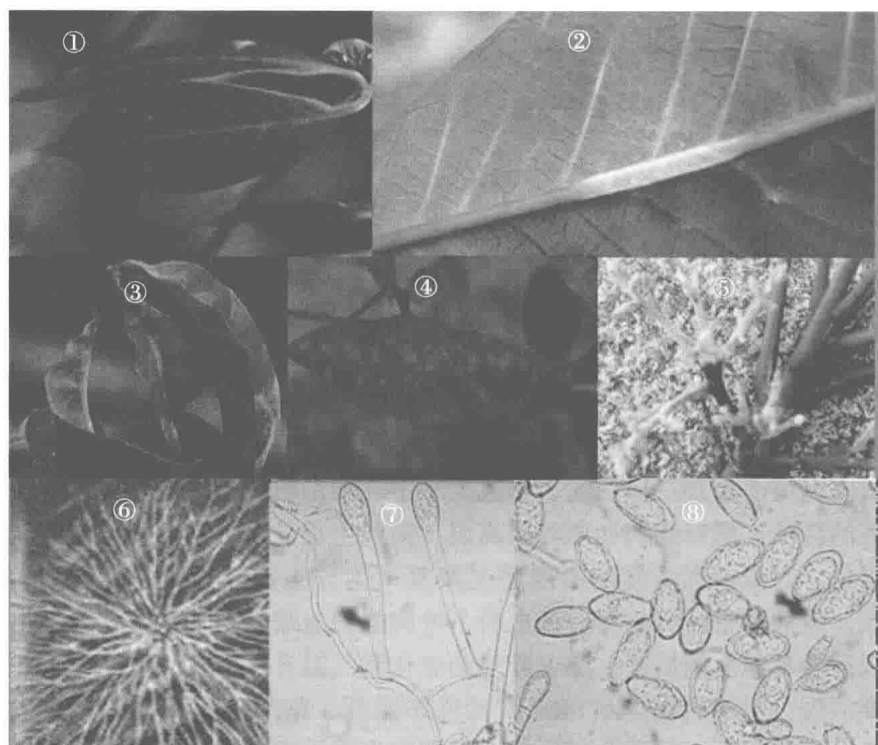


图 1 橡胶树白粉病的症状

Fig. 1 The symptoms of powdery mildew in rubber tree

- ①嫩叶正面的病斑。②嫩叶背面的病斑。③受害叶片畸形。④红褐色癣状病斑。  
⑤受害花序。⑥叶背上辐射状的银白色菌丝。⑦病原菌的分生孢子梗和未成熟的分生孢子。⑧成熟的分生孢子。

期(余卓桐和王绍春, 1988)。20世纪80年代, 通过时间动态研究法对云南省植胶区的橡胶树白粉病流行速度做了系统研究, 结果表明在温度和叶龄都相同的条件下, 流行速度主要取决于病情指数(邵志忠等, 1996)。采用大样本在云南垦区直接测定不同病情的橡胶树产量的损失发现, 轻病对产胶无明显影响, 中病不但不造成损失反而增产, 重及特重病才会造成减产(邵志忠等, 1995)。根据发病规律阐述了预



测预报技术并提出防治方法（唐建昆，2005；邵志忠等，1993，1995；陈瑶等，2008）。数理模式预报，方法简单易行、准确率高、预见性强、省工省钱，并使我国橡胶白粉病预报向定量预报的方向迈进了一步，为将来应用远程测报打下了良好的基础。但对芽接树则需建立新的模型才能测报（余卓桐等，1985）。通过在同一林段内不同病级植株的产量损失测定，得出病害级别与干胶损失呈直线关系的结果，并据此提出最终病情指数 22~24 为白粉病的经济阈值，超过这一病情指数就要进行全面防治（余卓桐等，1989）。

### 1.3 橡胶树粉孢菌感染对橡胶树生理活性影响

橡胶树白粉病是由橡胶树粉孢菌感染引起的世界橡胶树重要病害之一。本病为害橡胶树的嫩叶、嫩芽、嫩梢和花序，具有蔓延快，为害重的特点，病重时对橡胶树的生长和产量均有显著影响（刘静，2010）。采用硫磺粉和三唑酮等化学试剂的进行常规防治，费时费工。另外在进行主要品种抗病鉴定的基础上，对白粉菌离体培养（Tu 等，2012）、种质资源室内鉴定（涂敏等，2011）等方面均有初步进展。利用植物提取液抑制白粉菌新型生物防治剂（古鑫等，2012），采用低聚糖素诱导叶片防治白粉病感染（单家林等，2005；罗婵娟等，2011）也成为新型防治方法。尽管在橡胶树白粉病病菌分类（Limkaisang 等，2006；Limkaisang 等，2005）、流行病学等研究方向较为深入，但其感染机制和抗病机制尚不清楚。研究白粉菌的感染机制，培育抗病品种是解决白粉病病害的有效途径之一。

线粒体（mitochondrion）是存在于大多数真核生物细胞中的细胞器，是细胞内氧化磷酸化和形成 ATP 的主要场所，有细胞“动力工厂”之称，是半自主细胞器。在正常情况下，植物细胞内活性氧（reactive oxygen species, ROS）的产生和清除是平衡的。当植物体遭遇外来胁迫（包括生物和非生物胁迫，如极端温度、水分胁迫、病原菌入侵等）时，ROS 的产生和代谢将失去平衡，产生氧胁迫。低



浓度的 ROS 能提高植物细胞的抗氧化防御机制，从而清除活性氧，使细胞不受伤害。这是植物病理学的超敏反应，在多种植物与病原菌互作中存在并导致细胞程序性死亡（Greenberg 等，1994）。白粉菌侵染植物叶片将不可避免的影响光合作用和呼吸作用。在栗子（Huang 等，2012）、大麦（Edwards 等，1979；Williams 和 Ayres，1981）和甜菜中（Magyarosy，1976）研究中发现光呼吸与白粉病抗性紧密相关。然而，白粉病菌侵染对橡胶树叶片线粒体结构与功能影响尚不清楚。有必要采用人工接种白粉菌的方法，研究白粉菌对橡胶树叶片线粒体和光合活性的影响。

## 1.4 橡胶树白粉病防治的分子生物学进展

在长期的育种过程中，尽管人们已经对大量的橡胶树种质进行广泛的抗白粉病筛选，但至今橡胶树中有关白粉菌侵染以及抗白粉菌的分子机制研究尚未有报道。国内采用 RAPD 技术鉴定橡胶树与抗白粉菌基因连锁的分子标记。用 52 条 RAPD 引物对 1 个抗白粉病品系和 11 个感病品系进行分析，找到了 1 个和橡胶树抗白粉菌表型密切相关的 DNA 片段，此片段长 390 bp，命名为 *opv-390*（陈守才等，1994a，1994b）。

## 1.5 橡胶树白粉病测报技术

### 1.5.1 监测站和固定观察点的设立和管理

#### 1.5.1.1 监测站建设和管理

在橡胶树主栽区内，按照行政区，每个市县根据橡胶树种植面积设立不少于 1~3 个监测站。每个监测站配备负责人 1 名、监测员不少于 3 名，以及作物病害调查等所需的设备或设施。监测站应有具体的挂靠单位。各省（区）的橡胶树生产主管部门为监测站的业务主



管部门。监测站负责其所辖地区橡胶树白粉病的系统观察，并将观察结果规范整理和报送监测站的业务主管部门。

监测站应相对稳定，无特殊情况不应撤销或更改。

#### 1.5.1.2 固定观察点建设和管理

在监测站辖区内，根据地形地貌、微气候、橡胶树品系、树龄、长势、往年病害发生等情况选择有代表性的橡胶树林段，作为固定观察点。

每个监测站内的固定观察点数目根据监测站辖区内橡胶树栽培面积大小、地形地貌和微气候的复杂性等具体情况而定，不少于2个观察点。

固定观察点的橡胶树应不少于220株。采用隔行连株法（图2）选择100株树进行编号，用于进行物候和白粉病病情的系统观察。

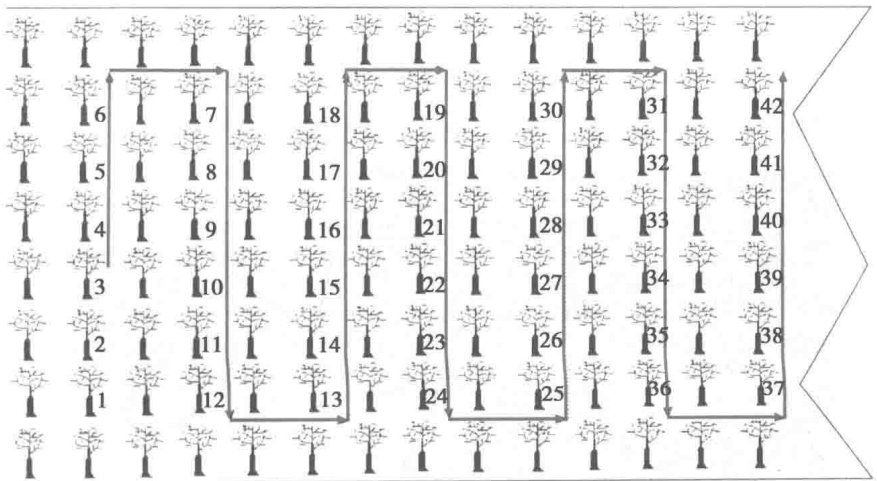


图2 隔行连株法选择系统观察橡胶树植株示意图

Fig. 2 Schematic diagram of observation rubber plant by interlaced even strain selection system

每个固定观察点应有1名监测员，负责白粉病的系统观察和其他病害的调查。

固定观察点的系统观察数据汇总到监测站。





## 1.5.2 橡胶树物候调查和气象数据采集

### 1.5.2.1 橡胶树物候调查

#### (1) 调查时间

每年2月第三周的星期一开始第一次调查，一直到固定观察点内的100株橡胶树中有95株的新叶片老化时停止调查。在物候特殊的年份，由项目牵头专家通知监测站调整确定第一次调查时间。

#### (2) 调查次数和频率

在从第一次调查至固定观察点内的100株树中有5株已经抽芽的期间，每周星期一调查1次，以后在每周的星期一和星期四各调查1次。

#### (3) 调查方法

对固定观察点内编号的100株橡胶树逐株察看，橡胶树叶片的物候期参照图3。根据表1中橡胶树物候的分级标准，用目测法判断每株树属于那个落叶级别和抽叶级别。调查完这100株树后，统计各个落叶级别和抽叶级别的总株数，填入表2的相应空格内。

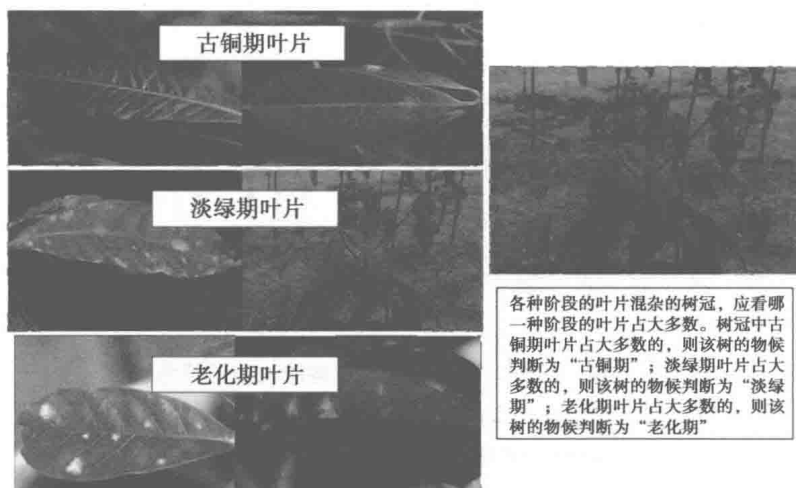


图3 橡胶树不同物候

Fig. 3 Different phenological images of rubber tree