

研究报告 Original Papers

甘蓝型油菜叶表皮蜡质组分及结构与菌核病抗性关系

王婧*, 刘泓利*, 宋超, 倪郁**

西南大学农学与生物科技学院, 重庆 400716

摘要: 本试验选用6个抗病性不同的甘蓝型油菜品种, 研究其叶表皮蜡质组成及结构与菌核病抗性的关系。结果表明, 抗病品种在去除叶表皮蜡质后病情指数显著增加; 感病品种无显著变化。不同抗性品种(系)间除酯类组分含量无显著差异外, 其余蜡质组分含量差异显著。相关分析表明, 蜡质组分中酯类含量与病情指数呈显著负相关关系, 醇类、酮类含量与病情指数呈显著正相关, 其余组分和蜡质总量与病情指数无显著相关关系。抗性品种叶表皮蜡质中烷类及酯类所占比重较高, 而易感品种酮类比重较高。扫描电镜结果显示, 抗病品种(系)的蜡质晶体主要为颗粒状、杆状、丝状; 而感病品种(系)的蜡质晶体中不规则片状晶体所占比例较大。这些结果说明油菜叶表皮蜡质的组分及结构可能是抗病品种抵抗和延迟病原菌侵入的机制之一。

关键词: 甘蓝型油菜; 表皮蜡质; 抗性; 菌核病

Relationship between *Brassica napus* Epicuticular Wax Composition and Structure and Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*

WANG Jing*, LIU Hong-Li*, SONG Chao, NI Yu**

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

Abstract: Six cultivars of *Brassica napus* with different resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* were selected to investigate the composition and crystalloid structure of leaf epicuticular. The results showed that the disease index increased significantly in the resistant cultivars after the surface wax was removed, while no significant change was observed for the susceptible cultivars. The contents of wax constituents differed significantly among cultivars except for esters. Correlation analysis indicated that the disease index was negatively correlated with the contents of esters, positively correlated with the contents of alcohols and ketones, insignificantly correlated with the contents of other wax constituents and total wax. The weight proportions of alkanes and esters in total waxes of the resistant cultivars were higher than those of the susceptible cultivars, while the weight proportion of ketones in total waxes of the susceptible cultivars was higher than that of the resistant cultivars. The SEM analysis showed that crystalloid structure of epicuticular waxes on leaves of the resistant cultivars mainly included granulars, rods and filamentous, while more plates were appeared on leaves of the susceptible cultivars. These results suggested that the constituents of the wax and their crystalloid structure might be one of the mechanisms for resistant cultivars to resist and delay the pathogen invasion.

Key words: *Brassica napus*; epicuticular wax; resistance; *Sclerotinia sclerotiorum*

表皮蜡质是植物地上部分与环境的分界线, 一般呈绿灰色、灰白色霜状。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。国内外研究表明, 蜡质层与植物的抗病性密切相关, 如抗黄曲霉病玉米(Russin等1997)、抗纹枯病水稻(陈志谊等1992)、抗灰斑病大豆(李海英等2002)、抗芝麻斑病番茄(康立功等2010)、抗细菌性枯萎病木薯(Zinsou等2006)、抗曲叶病棉花

(Ashraf和Zafar 1999)等品种的叶片蜡质含量均显著高于其感病品种。拟南芥表皮蜡质缺失突变体 *cer6*和*cer2*中, 病程相关蛋白基因*PR*的表达显著降

收稿 2012-09-07 修定 2012-09-29

资助 国家自然科学基金(31000122)、重庆市科委自然科学基金计划(cstc2012jjA80022)和中央高校基本科研业务费专项资金(XDJK2011C007)。

* 共同第一作者。

** 通讯作者(E-mail: nmniyu@126.com; Tel: 023-68251264)。

低(Garbay等2007)。然而,也有报道表明,大豆锈病与大豆叶表皮蜡质含量之间无相关性(Furtado等2009)。拟南芥中超表达控制烷类物质合成的蜡质基因*CER1*导致植株对细菌、真菌病原物更加易感(Bourdenx等2011)。由于不同物种的蜡质含量、成分和形态结构本身存在差异,并且同一植株不同组织器官、不同生长时期的蜡质分布和表达也会有所不同,因此,植物表皮蜡质特征与抗病性之间的关系还有待进一步研究。

油菜是我国的主要油料作物,种植遍及全国各地。由核盘菌引起的菌核病是油菜的一种重要病害,在我国各油菜产区都有发生。针对油菜菌核病,国内外抗病育种研究已有60余年的历史,多年来大量研究结果表明,*S. sclerotiorum*致病力极强,油菜抗性资源稀缺,大多品种只有部分抗性,目前为止很少有高抗品种,阻碍了对菌核病的持久有效控制(Hegedus和Rimmer 2005; 韦善君等2004)。中国油料所筛选出的3个抗病品种所具有的共同形态特点是叶片蜡粉多、分枝为上生型、较紧凑、茎秆坚硬等(罗宽和周必文1994),但油菜叶表皮蜡质的抗病性机制并不清楚。本研究以抗(耐)菌核病不同的6个甘蓝型油菜品种(系)为试验材料,采用盆栽试验,分析油菜叶表皮蜡质特征与菌核病抗性的关系,探讨油菜表皮蜡质的抗(耐)病性机制,为抗性品种的选育提供理论依据。

材料与amp;方法

1 供试菌株

*Sclerotinia sclerotiorum*的菌核分离自油菜(*Brassica napus*)病株,由西南大学植物生理生化研究室提供,经表面消毒后在常规PDA培养基上培养,液体培养时则不加琼脂。

2 供试植物材料

6个供试油菜分别为‘中双9’、‘中双11’、‘中油821’、‘渝油19’、‘油研10’和‘W10网6’,均由西南大学油菜工程中心提供。采用盆栽试验,每盆2株,待幼苗长出5片真叶时对叶片进行去蜡处理,并与未去蜡处理同时接种,统计病情指数,每处理8个重复。以不接种为对照。

3 试验方法

3.1 叶片去蜡方法

参考Mohammadian等(2007)方法,去蜡处理组

的活体叶片正反两面用蓝汀胶粘除蜡质。

3.2 活体喷雾接种法

参考臧宪朋等(2010)的方法,取生长于固体PDA培养基上的菌丝块接种于液体PDA培养基中,在25℃、150~200 r·min⁻¹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,进行喷雾接种。接种后将植株放于25℃,空气湿度大于90%的空间,72 h后测定叶片病斑面积,统计病情指数。

病害分级标准参考宋志荣和官春云(2008)、李姝江等(2011):0级,叶片无病斑;1级,叶片病斑面积为1 cm²以下;2级,叶片病斑面积为1~2 cm²;3级,叶片病斑面积为2~4 cm²;4级,叶片病斑面积为4 cm²以上。根据病害级别求病情指数=[Σ(病害级别×病叶数)/(叶数总和×发病最重病级数)]×100。

抗性差异以病情指数为划分标准进行分类:高抗≤20.0,20.0<中抗≤30.0,30.0<中感≤40.0,高感>40.0。

3.3 蜡质含量和组分的GC-MS分析

参考Kim等(2007)的方法,用气相色谱仪(AOC-20i, GC-2010, E)测定蜡质含量。幼苗长出5片真叶时,自植株顶部采集第2位展开叶片,除去叶柄,迅速进行叶面积测定,然后用氯仿浸提叶表皮蜡质,C₁₆烷作为内部标准事先加入氯仿中。用氮吹仪蒸发干浸提液,加入衍生剂BSTFA+TMCS(99:1)100 μL,在80℃下消煮1 h后,将多余的BSTFA在氮吹仪下蒸干,产物溶于1 mL正己烷,转入试样瓶中进行GC分析。GC毛细管柱长12 m,直径0.2 mm;以氮气为载气;FID检测器;柱膜和FID检测器的温度分别为300℃和320℃。程序升温方式:初温80℃,每分钟15℃升温至260℃,保持10 min。然后每分钟5℃升温至320℃,保持15 min。蜡质量化基于FID峰值。用单位叶面积上的微克数(μg·cm⁻²)来表示蜡质含量(叶面积包括叶片正面和反面的总面积)。叶面积测定采用数字化扫描仪(EPSON V750)和WinRHIZO根系分析系统软件(Regent Instrument Inc, Canada)进行分析并记录。

利用气谱-质谱联用仪(GCMS-QP2010 plus)鉴定蜡质组分,用HP-5MS毛细管气相色谱柱将各成分分离。程序升温方式:初温80℃,保持2 min;每分钟15℃升温至200℃,保持2 min。然后每分

钟3 ℃升温至320 ℃, 保持15 min。

3.4 蜡质形态结构的观察

幼苗长出5片真叶时, 自植株顶部采集第2位展开叶片, 从叶中间沿叶脉切割, 分正反两面, 距中间叶脉0.5 cm处剪取样品, 分别固定在样品台上, 放入离子溅射仪内喷镀金属膜, 制成扫描电镜样品, 在扫描电子显微镜(S3000-N, Hitachi)下进行形态观察。

3.5 数据分析

采用单因素方差分析比较品种间病情指数、蜡质及其组分含量差异, 品种内去蜡和不去蜡处理对病情指数的影响(GenStat 13.0)。采用GenStat 13.0软件分析蜡质组分含量与病情指数之间的相关性。显著性水平为 $P < 0.05$ (LSD)。

实验结果

1 去除表皮蜡质对不同甘蓝型油菜品种(系)菌核病发病程度的影响

油菜幼苗经活体喷雾接种*S. sclerotiorum*后, 12 h时部分品种叶片出现病斑, 72 h时部分品种叶片呈现萎蔫状。分析病情指数结果表明不同品种(系)油菜抗病性有显著差异, 其中‘中双9’表现为高抗, ‘中油821’、‘中双11’表现为中抗, ‘W10网6’、‘油研10’表现为中感, 而‘渝油19’表现为高感(表1)。采用蓝汀胶活体去除叶表皮蜡质后放入扫描电子显微镜下进行观察, 电镜扫描结果显示, 去除表皮蜡质后, 叶表面光滑, 无其他结构, 表明此方法可以有效去除叶表皮蜡质, 并且对叶片无机械

表1 去除蜡质对不同油菜品种(系)病情指数的影响

Table 1 The effects of wax removal on the disease index of different *Brassica napus* cultivars inoculated with *Sclerotinia sclerotiorum*

品种	抗性	病情指数	
		未去蜡	去蜡
‘中双9’	高抗	17.50 ^{Bd}	31.25 ^{Ab}
‘中油821’	中抗	26.67 ^{Bc}	35.00 ^{Ab}
‘中双11’	中抗	30.00 ^{Ac}	35.00 ^{Ab}
‘W10网6’	中感	38.75 ^{Ab}	36.25 ^{Ab}
‘油研10’	中感	40.00 ^{Ab}	35.00 ^{Ab}
‘渝油19’	高感	47.50 ^{Aa}	42.50 ^{Aa}

表中同列数据后小写字母不同或同行数据后大写字母不同表示0.05或0.01水平差异显著。

损伤(图1)。去除叶表皮蜡质后, 抗病品种(系)菌核病病情指数均有所增加, 其中‘中双9’增幅高达78.57%, ‘中油821’增幅为31.23%。感病品种(系)病情指数与未去蜡植株相比无显著变化。

2 不同油菜品种(系)的蜡质组分和含量

油菜叶表皮蜡质主要由烷类、醇类、酮类、酸类、醛类、酯类以及少量未知物质组成。六个油菜品种(系)叶表皮蜡质总量在3.27~9.02 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, 其中‘中油821’、‘渝油19’与‘油研10’蜡质含量显著高于‘中双9’、‘中双11’和‘W10网6’(图2)。总体上, 除酯类组分在各品种(系)间无显著差异外, 其余蜡质组分在品种(系)间差异显著, 其中抗性品种‘中双9’的烷类含量、醇类含量、酸类含量显著低于易感品种‘渝油19’。

各品种(系)蜡质中醇类所占比重为15.59%~22.30%, 品种间无显著差异。烷类所占比重最高, 各品种(系)均在50%以上, 其中‘中双9’和‘中双11’烷类及酯类所占比重均显著高于其它品种(表2)。
‘渝油19’酮类比重最高, 为23.71%, 显著高于‘中双9’(16.10%)和‘中双11’(15.51%)。

3 油菜叶表皮蜡质组分含量与病情指数的关系

相关性分析结果表明, 蜡质组分中酯类含量与病情指数呈显著负相关, 醇类、酮类含量与病情指数呈显著正相关, 其余组分和蜡质总量与病情指数无显著相关关系(表3)。

4 油菜品种(系)叶表皮蜡质晶体结构

通过扫描电镜观察了不同抗性油菜品种(系)叶片正面和背面的表皮蜡质晶体结构, 结果如图3所示。油菜叶表皮蜡质晶体结构包括颗粒状、丝状、柱状、片状四种类型, 晶体无特定方向, 呈不规则排列, 多种晶体结构相互叠加缠绕。叶片

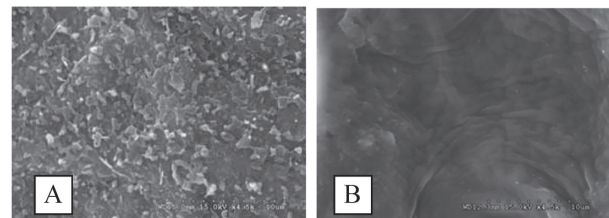


图1 油菜叶片表皮蜡质去除前(A)与去除后(B)电镜扫描图
Fig.1 Scanning electron microscope analysis of the leaf surface of *Brassica napus* with wax (A) and with wax removed by Blu-Tack (B)

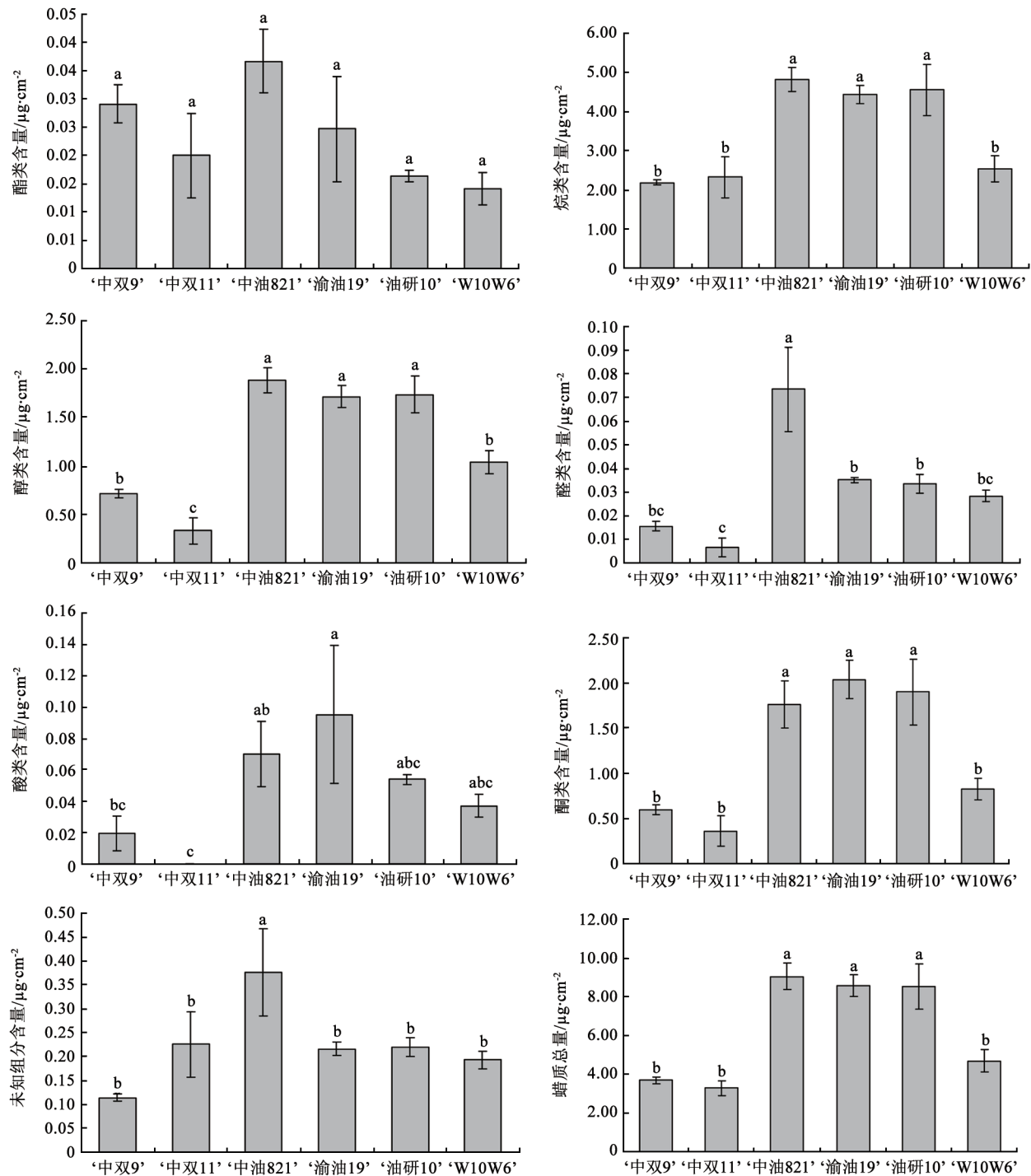


图2 不同抗感菌核病油菜品种(系)叶表皮蜡质含量的比较

Fig.2 The contents of epicuticular wax in leaves of resistant and susceptible cultivars of *Brassica napus*

数据柱上不同小写字母表示0.05水平差异显著。

正、背面表皮蜡质晶体结构稍有不同,但数量无明显差异。不同油菜品种(系)间蜡质晶体的类型、数量有所不同,其中抗病品种(系)的蜡质晶体

主要为颗粒状、杆状、丝状,片状晶体较少也较小;而感病品种(系)的蜡质晶体中不规则片状晶体所占比例较大。

表2 不同抗感菌核病油菜品种(系)叶表皮蜡质各组分在蜡质总量中的百分比

Table 2 The weight proportions of wax constituents in leaves of resistant and susceptible cultivars of *Brassica napus*

	酯类/%	烷类/%	醇类/%	醛类/%	酸类/%	酮类/%	未知组分/%
‘中双9’	0.79 ^a	59.54 ^a	19.52 ^a	0.42 ^{bc}	0.51 ^{ab}	16.10 ^c	3.11 ^b
‘中双11’	0.93 ^a	60.49 ^a	15.59 ^a	0.32 ^c	0.00 ^b	15.51 ^c	7.17 ^a
‘中油821’	0.40 ^b	53.64 ^b	20.90 ^a	0.79 ^a	0.74 ^{ab}	19.23 ^{abc}	4.31 ^b
‘渝油19’	0.28 ^b	51.99 ^b	20.01 ^a	0.42 ^{bc}	1.07 ^a	23.71 ^a	2.52 ^b
‘油研10’	0.20 ^b	53.46 ^b	20.69 ^a	0.40 ^{bc}	0.67 ^{ab}	21.86 ^{ab}	2.72 ^b
‘W10网6’	0.30 ^b	54.20 ^b	22.30 ^a	0.62 ^{ab}	0.77 ^{ab}	17.63 ^{bc}	4.17 ^b

同列数据后不同小写字母表示0.05水平差异显著。

表3 油菜叶表皮蜡质组分含量与病情指数之间的相关性

Table 3 Correlation between the contents of wax constituents and the disease index of *Brassica napus*

蜡质组分	与病情指数的相关性	蜡质组分	与病情指数的相关性
酯类	-0.415 [*]	酸类	0.218
烷类	0.313	酮类	0.413 [*]
醇类	0.407 [*]	未知组分	0.181
醛类	0.212	蜡质总量	0.377

*表示在0.05水平上差异显著。

讨 论

叶表皮蜡质层是植物与外界环境直接接触的界面。外源真菌在叶表面粘附与定植时,叶表皮蜡质层首先起到抵御作用。例如,去蜡处理的大麦属植物 *Hordeum chilense* 叶片有更多的附着胞生成,更易受到锈菌胁迫(Vaz Patto和Niks 2001)。本试验中,采用蓝汀胶去除油菜叶片蜡质后接种,抗病品种(系)变得易感,两个参试抗病品种(系)的菌核病病情指数与未去蜡植株相比均显著增加,而感病品种(系)病情指数则无明显变化。这说明油菜叶表皮蜡质在抗病品种(系)与感病品种(系)中抗菌核病侵染方面的作用机制是不同的,叶表皮蜡质可以使抗病品种(系)叶片抵抗病菌侵入的能力加强,而感病品种(系)叶表皮蜡质不具有直接的抗性作用。康立功等(2010)研究发现,番茄抗性品种叶片蜡质在抗芝麻斑病菌侵染方面的作用比感病品种要大。

多数研究认为,植物抗病品种叶片蜡质含量高于感病品种(陈志谊等1992;李海英等2002;Ashraf和Zafar 1999)。但在本试验中,油菜叶表皮蜡质总量的高低与油菜抗感性表现不一致,表皮蜡质总量与病情指数之间也无显著相关关系。这

与近年来其他一些研究结果一致,如大豆叶表皮蜡质含量与大豆锈病之间无显著关系(Furtado等2009);拟南芥抗病基因 *PR1* 的表达与叶表皮蜡质总量没有直接相关性,而与蜡质层中部分蜡质组分密切相关(Garbay等2007)。这些结果表明,蜡质层中蜡质组分可能较蜡质总量在抵御病原微生物入侵时发挥更重要作用。

真菌入侵植物,可以直接从气孔进入。东部白松(*Pinus strobus*)接种 *Cronartium ribicola* 后,抗性品种叶片气孔被蜡质层关闭的数量显著高于感性品种,且叶表面病原菌孢子的萌发率低于感性品种(Smith等2006)。更多的真菌通过产生入侵附着胞以进入植物内部。核盘菌侵染油菜叶片时,首先在叶片上形成复合附着器,然后通过角质层和表皮细胞壁侵入叶片内部(杨谦1994)。植物蜡质可影响附着胞的形成,进而刺激或抑制孢子的萌发。例如,大麦 *Hordeum vulgare* 蜡质层可以诱导真菌 *Blumeria graminis* 附着胞的分化(Tsuba等2002)。本试验中各油菜品种(系)蜡质所含组分基本相同,但抗病品种‘中双9’蜡质中酯类、烷类所占的比重显著高于其在感病品种(系)蜡质中所占比重,而酸类、酮类所占的比重显著低于其在易感病品种‘渝油19’蜡质中所占比重。相关性分析

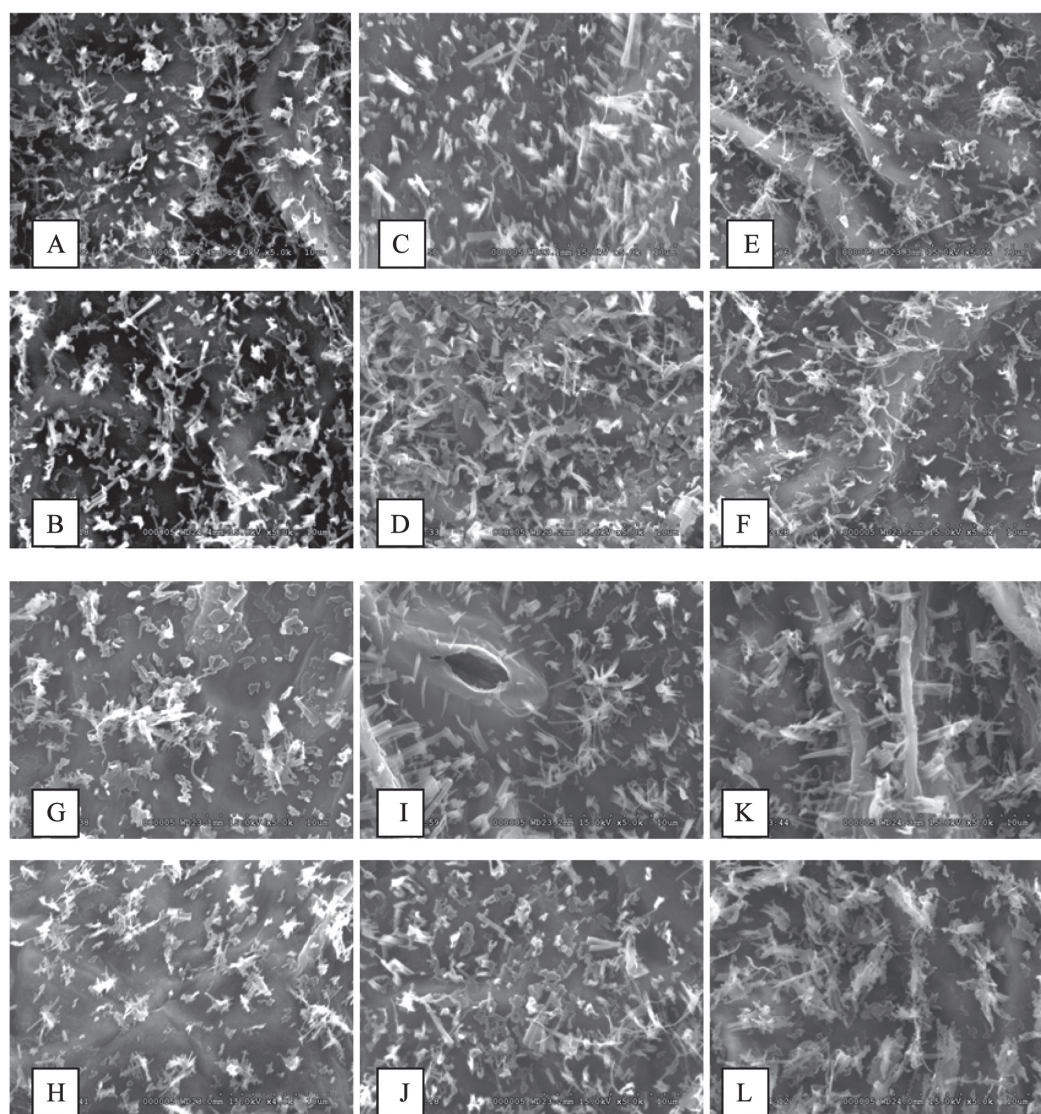


图3 不同油菜品种(系)叶表皮蜡质晶体结构(10 μm)

Fig.3 Scanning electron micrograph analysis of epicuticular wax crystal structure on leaves of different *Brassica napus* cultivars (10 μm)

A, C, E, G, I, K 为叶片正面; B, D, F, H, J, L 为叶片背面。A, B: '中双9'; C, D: '中油821'; E, F: '中双11'; G, H: 'W10网6'; I, J: '油研10'; K, L: '渝油19'。

表明,蜡质组分中酯类含量与病情指数呈显著负相关,而醇类、酮类含量与病情指数呈显著正相关。植物叶表皮蜡质组成的不同,与叶面入侵型病原真菌分泌的酯酶存在着对应关系,寄主的蜡质能诱导病原真菌分泌更多的胞外酯酶,且能被该酯酶降解得较为彻底;而非寄主的蜡质诱导病原菌分泌的酯酶较少,且不易被降解(Wang等2006;顾俊等2007)。在蜡质结构上,抗病品种(系)的蜡质晶体主要为颗粒状、杆状、丝状,片状晶体较少;而感病品种(系)的蜡质中片状晶体所占比例较

大。说明油菜抗、感品种(系)间所表现出来的差异可能是由于叶表皮蜡质化学组分和结构的不同而造成抗、感叶片孢子萌发率的差异,具体原因有待进一步研究证实。

参考文献

- 陈志谊,王玉环,殷尚智(1992). 水稻纹枯病抗性机制的研究. 中国农业科学, 25 (4): 41-46
 顾俊,王飞,张鹏,胡梁斌,徐朗莱(2007). 植物叶表皮蜡质的生物学功能. 江苏农业学报, 23 (2): 144-148
 康立功,齐凤坤,许向阳,李景富(2010). 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, (18): 47~50
- 李海英, 刘亚光, 杨庆凯(2002). 大豆叶片结构与灰斑病抗性的研究 II. 大豆叶片组织结构与灰斑病抗性的关系. 中国油料作物学报, 24 (2): 74~76
- 李姝江, 朱天辉, 黄艳娜(2011). 防御酶系对山茶灰斑病诱导抗性的响应. 植物保护学报, 38 (1): 59~64
- 罗宽, 周必文(1994). 油菜病害及治理. 北京: 中国商业出版社
- 宋志荣, 官春云(2008). 甘蓝型油菜硫苷特性与对菌核病抗性关系. 湖南农业大学学报(自然科学版), 34 (4): 462~465
- 韦善君, 李国庆, 姜道宏, 王道本(2004). 草酸对重寄生真菌盾壳霉分生孢子萌发和菌丝生长的影响. 植物病理学报, 34 (3): 199~203
- 杨谦(1994). 核盘菌侵入油菜超微结构及侵染机制的研究. 植物病理学报, 24 (3): 245~249
- 臧宪朋, 徐幼平, 蔡新忠(2010). 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), 36 (4): 381~386
- Ashraf M, Zafar ZU (1999). Some physiological characteristics in resistant and susceptible cotton cultivars infected with cotton leaf curl virus. Biol Plantarum, 42 (4): 615~620
- Bourdenx B, Bernard A, Domergue F, Pascal S, Leger A, Roby D, Pervent M, Vile D, Haslam RP, Napier JA, et al (2011). Overexpression of *Arabidopsis ECERIFERUM1* promotes wax very-long-chain alkane biosynthesis and influences plant response to biotic and abiotic stresses. Plant Physiol, 156 (1): 29~45
- Furtado GQ, Alves SAM, Godoy CV, Salatino MLF, Massola NS (2009). Influence of light and leaf epicuticular wax layer on *Phakopsora pachyrhizi* infection in soybean. Trop Plant Pathol, 34 (5): 306~312
- Garbay B, Tautu MT, Costaglioli P (2007). Low level of pathogenesis-related protein 1 mRNA expression in 15-day-old *Arabidopsis cer6-2* and *cer2 eceriferum* mutants. Plant Sci, 172: 299~305
- Hegedus DD, Rimmer SR (2005). *Sclerotinia sclerotiorum*: When “to be or not to be” a pathogen? FEMS Microbiol Lett, 251 (2): 177~184
- Kim KS, Park SH, Jenks MA (2007). Changes in leaf cuticular waxes of sesame (*Sesamum indicum* L.) plants exposed to water deficit. J Plant Physiol, 164: 1134~1143
- Mohammadian MA, Watling JR, Hill RS (2007). The impact of epicuticular wax on gas-exchange and photoinhibition in *Leucadendron lanigerum* (Proteaceae). Acta Oecol, 31: 93~101
- Russin JS, Guo BZ, Tubajika KM, Brown RL, Cleveland TE, Widstrom NW (1997). Comparison of kernel wax from corn genotypes resistant or susceptible to *Aspergillus flavus*. Biochem Cell Biol, 87 (5): 529~533
- Smith JA, Blanchette RA, Burnes TA, Gillman JH, David AJ (2006). Epicuticular wax and white pine blister rust resistance in resistant and susceptible selections of eastern white pine (*Pinus strobes*). Phytopathology, 96 (2): 171~177
- Tsuba M, Katagiri G, Takeuchi Y, Takada Y, Yamaoka N (2002). Chemical factors of the leaf surface involved in the morphogenesis of *Blumeria graminis*. Physiol Mol Plant Pathol, 60: 51~57
- Vaz Patto MC, Niks RE (2001). Leaf wax layer may prevent appressorium differentiation but does not influence orientation of the leaf rust fungus *Puccinia hordei* on *Hordeum chilense* leaves. Eur J Plant Pathol, 107: 795~803
- Wang F, Zhang P, Qiang S, Xu LL (2006). Interaction of plant epicuticular waxes and extracellular esterases of *Curvularia eragrostidis* during infection of *Digitaria sanguinalis* and *Festuca arundinacea* by the fungus. Int J Mol Sci, 7: 346~357
- Zinsou V, Wydra K, Ahohuendo B, Schreiber L (2006). Leaf waxes of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in relation to eczong and resistance to *Xanthomonas* blight. Euphytica, 149: 189~198