

## 海南橡胶树炭疽病调查及喀斯特炭疽病菌的鉴定

郑肖兰, 刘先宝, 郑行恺, 李博勋, 时 涛, 冯艳丽, 黄贵修\*

中国热带农业科学院环境与植物保护研究所/院士团队创新中心/农业农村部热带农林有害生物入侵监测与控制重点开放实验室/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

**摘要:** 天然橡胶是四大工业原料中唯一的可再生资源, 由炭疽病菌侵染引起的橡胶树炭疽病是当前我国橡胶生产上最为严重的两大叶部病害之一。本研究通过调查海南省主栽橡胶树品种(系)及监测炭疽病发生流行情况, 调查发现 PR107 和 RRIM600 种植面积最大, 分别占 51.06% (102 000 hm<sup>2</sup>) 和 43.39% (86 700 hm<sup>2</sup>); 在对橡胶树炭疽病的随机踏查和固定监测中发现, 该病在实生苗、嫁接苗、增殖苗、各主栽品种幼龄树和成龄胶园中全年均可发生, 3—4 月为盛发期; 海南省橡胶树种植面积大, 且品种(系)单一, 因此炭疽病在适宜发病条件下易暴发流行。通过形态观察、致病性测定和多基因系统发育分析发现, 分离自琼中县阳江农场苗圃橡胶树叶片上的菌株 HCKHNQZ1736 为喀斯特炭疽菌 (*Colletotrichum karstii*), 这是首次在海南省橡胶树上发现该类病菌。致病力评价发现其对 PR107、RRIM600、热研 7-33-97 和大丰 95 四个主推品种均有强致病力。杀菌剂敏感性测定结果表明, 菌株 HCKHNQZ1736 和分离自云南保山的同种菌株 MeCkYN1705 对咪鲜胺锰盐差异不显著且不具抗药性, EC<sub>50</sub> 分别为 0.0784 μg/mL 和 0.0775 μg/mL。HCKHNQZ1736 对多菌灵表现出高抗药性, EC<sub>50</sub> 达 1107.2654 μg/mL, 而 MeCkYN1705 的 EC<sub>50</sub> 仅为 0.0554 μg/mL。

**关键词:** 橡胶树炭疽病; 病害调查; 喀斯特炭疽菌; 分子鉴定

中图分类号: S763.7 文献标识码: A

## Investigation of *Colletotrichum* sp. and Identification of *C. karstii* of Rubber Trees in Hainan

ZHENG Xiaolan, LIU Xianbao, ZHENG Xingkai, LI Boxun, SHI Tao, FENG Yanli, HUANG Guixiu\*

Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Hainan Innovation Center of Academician Team / Key Laboratory of Monitoring and Control of Tropical Agricultural and Forest Invasive Alien Pests, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Hainan Key Laboratory for Monitoring and Control of Tropical Agricultural Pests, Haikou, Hainan 571101, China

**Abstract:** Rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is the only renewable resource among the four major industrial raw materials. The rubber tree anthracnose which infected by the *Colletotrichum* sp. is one of the most serious foliar disease of rubber production in China. In this study, we investigated the main rubber tree varieties (strains) and monitoring the occurrence and prevalence of anthracnose in Hainan province. It was found that PR107 and RRIM600 had the largest planting area, accounting for 51.06% (102 000 hm<sup>2</sup>) and 43.39% (86 700 hm<sup>2</sup>) respectively. The anthracnose of mature rubber plantations and value-added nurseries in Yangjiang Farm was occurred all year round, with the peak period from March to April; Therefore, the rubber tree planted in Hainan province was large, and the variety (strain) was single, so it was easy to break out and spread when the anthracnose was suitable. HCKHNQZ1736 isolated from the leaves of the rubber nursery of Yangjiang Farm in Qiongzong County, was identified as a new strain of *Colletotrichum karstii*, which had highly pathogenic to four main varieties of rubber tree, PR107, RRIM600, Reyan 7-33-97 and Dafeng 95. Studied on the results of carbendazim and prochloraz-manganese sensitivity test of HCKHNQZ1736 and MeCkYN1705 showed that the

收稿日期 2022-09-01; 修回日期 2023-01-05

基金项目 海南省自然科学基金项目 (No. 2019RC279); 国家重点研发计划项目 (No. 2018YFD0201100); 海南省重点研发计划项目 (No. ZDYF20182402)。

作者简介 郑肖兰 (1976—), 女, 硕士, 副研究员, 研究方向: 植物病理学。\*通信作者 (Corresponding author): 黄贵修 (HUANG Guixiu), E-mail: hgxiu@vip.163.com。

two strains had no resistance to prochloraz-manganese, while the  $EC_{50}$  was 0.0784  $\mu\text{g/mL}$  and 0.0775  $\mu\text{g/mL}$  respectively. However, HCKHNQZ1736 showed high resistance to carbendazim, at this time, the  $EC_{50}$  was 1107.2654  $\mu\text{g/mL}$ , while MeCKYN1705 had only 0.0554  $\mu\text{g/mL}$ .

**Keywords:** rubber tree anthracnose; disease investigation; *Colletotrichum karstii*; molecular identification

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.12.021

天然橡胶、钢铁、煤炭、石油并称为世界四大工业原料，其中天然橡胶是其中唯一的可再生资源。1906 年斯里兰卡发现并报道全球首例橡胶树炭疽病，1962 年海南国营大丰农场发现并报道我国首例橡胶树炭疽病<sup>[1]</sup>。截至目前，橡胶树炭疽病已经几乎遍布全球所有植胶地，其中非洲中部、南美洲、亚洲南部和东南部等植胶国家最为严重<sup>[2-4]</sup>。

海南是我国橡胶树种植的主要省份，也是海南省第一大经济作物。但由于胶价下跌，胶农积极性受损，加上橡胶树树龄老化，品种种植变化或更替情况不甚明确，为了更好地了解橡胶种植情况和橡胶炭疽病发生流行，为橡胶树炭疽病和白粉病两病防控制定更合理的措施，因此很有必要对橡胶品种（系）及其种植情况进行详细了解。鉴于此，本研究联合海南天然橡胶产业集团股份有限公司对海南省橡胶种植情况进行了调研。炭疽病是由炭疽菌属（*Colletotrichum* Corda）真菌引起的一种重要真菌病害，在热带、亚热带、温带等地区广泛分布，导致粮食、果蔬、花卉甚至高大乔木等 600 多种植物均受其危害<sup>[5-8]</sup>。在橡胶树上，炭疽病的危害近年来又有上升趋势。

橡胶树炭疽菌为刺盘孢属（*Colletotrichum*）尖孢炭疽菌复合种（*C. acutatum* species complex）和胶孢炭疽菌复合种（*C. gloeosporioides* species complex）<sup>[9-10]</sup>。传统的形态学、培养特征和 ITS 分类限制了对这些复合种的认识，一直以来，众多学者均一致认为橡胶树炭疽病主要由胶孢炭疽菌导致，少数为尖孢炭疽菌，将其分别划分为 *C. gloeosporioides* 和 *C. acutatum* 2 个种群，但随着分类学的发展和分析方法的进步，基于多位点的系统发育分析有助于科学家发现和明确更多的橡胶树炭疽病菌复合种<sup>[11-13]</sup>。目前确认与橡胶树相关的有胶孢炭疽、尖孢炭疽和博宁炭疽 3 个复合种<sup>[14]</sup>。研究表明，国内橡胶树炭疽病原主要属于胶孢炭疽菌和尖孢炭疽菌复合种，其中胶孢炭疽复合种包括果生刺盘孢（*C. fructicola*）、暹罗炭疽（*C. siamense*）和乐东炭疽（*C. ledongense*），尖

孢炭疽复合种包括华南炭疽（*C. australisense*）、版纳炭疽（*C. bannanense*）和 *C. laticiphilum*，前期病害调查发现海南橡胶树炭疽病的胶孢炭疽菌复合群主要有 *C. siamense* 和 *C. fructicola* 2 个种<sup>[15-18]</sup>。博宁炭疽复合种喀斯特炭疽菌在橡胶树上仅在云南省绿春县于 2016 年发现，而其他产区包括海南未见报道<sup>[19]</sup>。

本研究通过对海南省主栽橡胶树品种（系）调查和炭疽病发生流行进行常规监测，在此过程中从琼中县阳江农场的苗圃橡胶树叶上获得菌株 HCKHNQZ1736，并对该菌株进行了鉴定、致病力测定等，发现该菌株为橡胶树新发炭疽菌——喀斯特炭疽菌（*C. karstii*），为海南橡胶产区首次发现，此外通过药剂敏感性测定发现该菌株对多菌灵产生高抗药性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 供试菌株 喀斯特炭疽菌株 MeCKYN1705 分离自云南保山，由中国热带农业科学院环境与植物保护研究所分离、鉴定和保存；喀斯特炭疽菌株 HCKHNQZ1736 分离自海南琼中，为本研究中采集、分离和鉴定获得。

1.1.2 植物材料和样地 热研 7-33-97、RRIM600、PR107 等供试橡胶苗由中国热带农业科学院橡胶研究所国家种质资源圃提供，保存于中国热带农业科学院环境与植物保护研究所演丰基地。

1.1.3 培养基 PDA、LB、察氏培养基、AEA 培养基、SNA 培养基均为常规配置培养基。

### 1.2 方 法

1.2.1 橡胶树炭疽病疫情随机踏查与固定监测方法 2017—2018 年，对海南省植胶区进行橡胶树品种（系）、面积以及炭疽病害调查。调查方法参考农业行业标准 NY/T 3197—2018《热带作物种质资源抗病虫鉴定技术规程 橡胶树炭疽病》进行。

2017—2019 年，选择海南省琼中县阳江农场的多年生增殖苗圃作为海南省橡胶树炭疽病疫情动态变化的固定监测点，每年 2—10 月对监测点

的病情指数变化情况 etc 数据进行记录和整理。橡胶树炭疽病样品采集、分离、纯化与保存均采用常规植物病理学实验方法<sup>[20]</sup>进行。

1.2.2 形态观察 供试菌株在 PDA 平板上培养 7 d 后, 观察菌落形态, 通过 AEA 培养基和 SNA 培养基促进菌株产孢, 显微镜下观察分生孢子、分生孢子梗和附着胞等微观形态, 并记录其大小。形态鉴定参考《普通植物病理学》<sup>[9]</sup>和《植物病原真菌学》<sup>[10]</sup>对菌株进行形态上的初步分类鉴定。

1.2.3 系统发育分析 (1) 菌株基因组 DNA 提取。将已鉴定、纯化培养的菌株接种于 PDA 平板, 置于 28 °C 培养箱内培养 7 d, 用 CTAB 法提取菌株 DNA<sup>[6]</sup>。

表 1 基因及相应引物  
Tab. 1 Gene and primers

基因 Gene	引物 Primer	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	反应程序 Reaction system
ITS <sup>[21]</sup>	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 57 °C 45 s, 72 °C 50 s, 34 个循环; 72 °C 5 min, 于 4 °C 保存
	ITS4	TCCTCC GCTTATTGATATGC	
<i>tub</i> <sup>[22]</sup>	T1	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 56 °C 45 s, 72 °C 1 min, 34 个循环; 72 °C 5 min, 于 4 °C 保存
	Bt-2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	
<i>GAPDH</i> <sup>[21]</sup>	GDF	GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA	94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 62 °C 45 s, 72 °C 30 s, 34 个循环; 72 °C 5 min, 于 4 °C 保存
	GDR	GGGTGGAGTCGTACTIONTGTGAGCATGT	

(3) 构建系统发育树。在 NCBI 的 GenBank 数据库中下载博宁炭疽复合种所用模式种的序列, 利用 MEGA v. 6.0 软件对所获得的序列分别进行比对, 删除不确定的序列, 利用 Sequence Matrix 1.7.8 软件对 ITS、*tub* 和 *GAPDH* 进行序列拼接, 获得完整的序列数据。利用 MEGA v. 6.0 中 Model 进行模块预测, 再利用该软件 Phylogeny 中的 Maximum Likelihood 方法构建系统发育树, 以 *C. truncatum* 作为外群, 1000 重复。

1.2.4 致病力测定 采用孢子悬浮液接种法, 将孢子悬浮液 (孢子浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL) 接种至海南省橡胶树主栽品种 (大丰 95、PR107、热研 7-33-97、RRIM600) 离体古铜期叶片上, 以接种菌株 MeCkYN1705 孢子悬浮液为阳性对照, 以接种无菌水为阴性对照, 每个处理 3 片叶子, 每片叶子处理 3 个点, 3 次重复共 9 片叶子, 25 °C 恒温保湿培养 3 d 后检查发病情况, 用十字交叉法测量病斑直径, 以病斑直径评价其致病力。

1.2.5 药剂敏感性测定 (1) 多菌灵和咪鲜胺药剂母液配置。称取 98% 多菌灵原药粉剂 (江苏新跃达生物科技有限公司) 0.5 g 溶解于 1 mol/L 稀

(2) 多基因测序。选择核糖体转录间隔区 (ITS)、 $\beta$ -微管蛋白基因 (*tub*) 和 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因 (*GAPDH*) 部分序列进行多基因系统发育分析。所用引物见表 1, PCR 扩增体系 (总体积 25  $\mu$ L): 2.5 mmol/L dNTP Mixture 2  $\mu$ L; TaKaRa LA *Taq* 高保真酶 0.5  $\mu$ L; 2 $\times$ GC buffer I 12.5  $\mu$ L; 10  $\mu$ mol/L 上、下游引物各 1  $\mu$ L; ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L; Template 1  $\mu$ L。PCR 反应程序见表 1。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 利用天根生化科技 (北京) 有限公司回收试剂盒回收目的片段。将回收纯化的 PCR 产物送深圳华大基因科技有限公司进行测序, 将测序结果置于 NCBI 上 BLAST 进行比对分析。

盐酸中, 待粉末完全溶解后用无菌水定容至 50 mL, 过滤、灭菌, 获得 10 000  $\mu$ g/mL 的母液, 于 4 °C 保存。

称取 96% 咪鲜胺锰盐原药 (江苏辉丰农化股份有限公司) 0.05 g 粉剂溶解于甲醇中, 用无菌水定容至 50 mL, 过滤、灭菌, 获得 1000  $\mu$ g/mL 的母液, 于 4 °C 保存。

(2) 含药培养基配置。在融化后降温至 55 °C 左右的 PDA 培养基中添加不同体积的多菌灵和咪鲜胺母液, 分别制成不同浓度的多菌灵和咪鲜胺含药 PDA 培养基。不同药剂处理浓度梯度见表 2。

(3) 敏感性评价。参考刘艳<sup>[6]</sup>的方法, 进行

表 2 供试药剂浓度  
Tab. 2 Concentration of test fungicide

菌株 Bacterial strain	药剂 Fungicide	浓度 Concentration ( $\mu$ g $\cdot$ mL <sup>-1</sup> )
HCgHNQZ1736	98% 多菌灵原药	600, 800, 1000, 1200, 1400
	96% 咪鲜胺锰盐原药	0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16
MeCkYN1705	98% 多菌灵原药	0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06
	96% 咪鲜胺锰盐原药	0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16

敏感性测定并计算回归方程和  $EC_{50}$ 。

### 1.3 数据处理

按随机区组试验设计的数据处理方法整理试验数据,使用 SPSS 和 Excel 软件对试验数据进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 海南省橡胶树炭疽病疫情分析

2.1.1 海南省橡胶主栽区与主栽品种概况 为了更好地了解橡胶种植情况和橡胶炭疽病的发生流行,笔者联合海南天然橡胶产业集团股份有限公司对海南省橡胶主栽品种和分布进行调查统计,结果见表 3 和图 1。经调查,现海南省橡胶主产

区共种植橡胶树约 200 000  $hm^2$ , 开割面积达到约 163 000  $hm^2$ 。其中,儋州和琼中为海南省主要的植胶地区,总面积均达到 30 000  $hm^2$  以上;其次,澄迈、乐东、白沙的种植面积达 20 000  $hm^2$  左右,亦为海南省橡胶产业的中坚力量;其余地区橡胶种植相对较少。

在调查地区中,PR107 的种植面积约为 102 000  $hm^2$ ,占 51.06%;RRIM600 的种植面积约为 86 700  $hm^2$ ,占 43.39%;热研 7-33-97 的种植面积约为 4333  $hm^2$ ,占 2.17%;大丰 95 的种植面积约为 1800  $hm^2$ ,占 0.90%;海垦系列的种植面积约为 2613  $hm^2$ ,占 1.31%;其他橡胶品种均为零星种植,总种植面积约为 2347  $hm^2$ ,占 1.18%。

表 3 海南省橡胶主产区主栽品种统计

Tab. 3 Statistics of main cultivation varieties of rubber in the main production areas of Hainan province

地区 Location	不同品种面积 Area of different varieties/ $hm^2$						总面积 Total area/ $hm^2$	开割林段 Cutting forest section	
	PR107	RRIM600	大丰 95 Dafeng	热研 7-33-97 Reyan7-33-97	海垦系列 Haiken series	其他 Other		面积 Area/ $hm^2$	占比 Proportion/%
琼海	3306.67	4693.33	60.00	46.67	20.00	6.67	8133.33	6572.54	80.81
万宁	4426.67	9453.33	60.00	113.33	0.00	153.33	14 200.00	13 081.04	92.12
定安	2673.33	2706.67	6.67	40.00	946.67	106.67	6480.00	4952.66	76.43
屯昌	9573.33	5473.33	40.00	426.67	0.00	0.00	15 513.33	12 554.94	80.93
澄迈	12 060.00	4920.00	33.33	186.67	753.33	206.67	18 160.00	14 578.85	80.28
临高	2926.67	1713.33	0.00	140.00	53.33	33.33	4853.33	3703.58	76.31
儋州	23 786.67	5220.00	66.67	1133.33	226.67	93.33	30 526.67	25 459.24	83.40
保亭	5546.67	5753.33	573.33	746.67	66.67	293.33	12 980.00	10 042.63	77.37
三亚	426.67	6133.33	0.00	153.33	0.00	0.00	6713.33	6169.55	91.90
乐东	626.67	17 966.67	0.00	900.00	0.00	0.00	19 486.67	15 281.45	78.42
东方	526.67	5946.67	0.00	6.67	20.00	0.00	6500.00	5342.35	82.19
昌江	2053.33	3080.00	13.33	253.33	40.00	86.67	5520.00	4419.31	80.06
白沙	13 073.33	7106.67	0.00	133.33	126.67	233.33	20 673.33	16 294.72	78.82
琼中	21 000.00	6506.67	953.33	66.67	366.67	1120.00	30 020.00	25 006.66	83.30
总计	102 000.00	86 673.33	1800.00	4333.33	2613.33	2346.67	199 773.33	163 015.04	81.60

2.1.2 炭疽病疫情踏查与监测结果 (1) 随机踏查结果。2017—2018 年,对海南省儋州市、琼中县、乐东县、万宁市、白沙县、澄迈县等主栽区进行了橡胶树炭疽病随机踏查(表 4)。根据发病症状进行区分,尖孢炭疽菌复合种症状主要是病斑凸起,胶胞炭疽菌导致的发病症状主要是水渍状病斑及叶尖叶缘卷曲(图 2)。调查结果表明,炭疽病在各个主栽区普遍发生,苗圃、定植胶园及开割胶林均有发生。儋州市西联农场主要受胶

孢炭疽菌复合种侵染的影响,乐东县保显农场、白沙县大岭农场主要受尖孢炭疽菌复合种侵染的影响,而其他地区尖孢炭疽菌和胶孢炭疽菌同时发生,属于尖孢炭疽菌和胶孢炭疽菌混合侵染。

总体来说,在田间条件下热研 7-33-97、PR107、RRIM600 等海南省主栽橡胶树品种对橡胶炭疽病均不具备良好的抗性,炭疽病主要发生在橡胶树抽芽期至淡绿期,2—4 月橡胶树抽叶时遇连续低温、阴雨、高湿天气,致使疫情暴发成灾,该

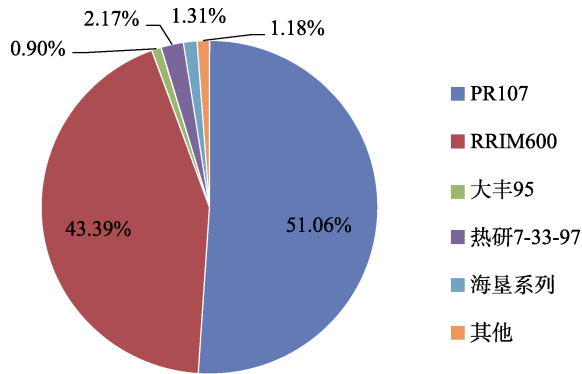


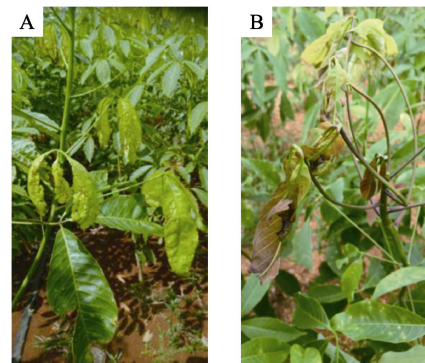
图 1 海南省橡胶主产区主栽品种占比

Fig. 1 Proportion of main cultivation varieties in the main rubber production areas of Hainan province

时期为防治关键期；在苗圃地若栽培管理措施较粗放则橡胶树炭疽病终年发生，如乐东保显农场、白沙大岭农场和儋州市等地的苗圃和增殖圃均普遍发生炭疽病，典型症状见图 2。

(2) 固定监测结果。2017—2019 年，对固定监测点开展了炭疽病的年度消长动态调查，监测点为琼中县阳江农场苗圃，林地类型为多年生增殖苗圃，品种为 PR107，炭疽病在调查期间全程均有发生。调查发现，病原菌可以侵染为害全年中任何时候萌发的橡胶树嫩叶。橡胶树叶片开芽至展叶期（小古铜期）为最感病阶段，大古铜至变色期为中度感病阶段，淡绿叶只是轻度感病，

而老化叶基本不再感病。橡胶树发芽时病害即可发生，最初为害萌发的嫩叶，随后古铜期和淡绿期的叶片也受感染。病害消长动态如图 3 所示，每年 2—3 月炭疽病害暴发型增长，为炭疽病疫情的暴发流行期，3—4 月病情指数达到最高，随后病情指数逐级下降并趋于平缓，这一发病情况与橡胶树的萌芽抽叶期吻合，同时受气候条件的影响大，物候、降雨量和温湿度满足时病害亦会加重。监测结果显示，2019 年的病情指数显著低于 2017 年和 2018 年，推测 2019 年是由于气候条件



A: 乐东县保显农场; B: 儋州西联农场。

A: Baoxian Farm in Ledong county; B: Xilian Farm in Danzhou.

图 2 橡胶树苗圃炭疽病侵染发病症状

Fig. 2 Symptoms of anthracnose infection in rubber nurseries

表 4 海南省橡胶主产区主栽品种炭疽病发病情况

Tab. 4 The incidence of anthracnose of main cultivation varieties in the main rubber production areas of Hainan province

地区 Location	PR107	RRIM600	大丰 95 Dafeng95	热研 7-33-97 Re- yan 7-33-97	海垦系列 Haiken series	其他 Other
琼海	++--	++--	++--	++--	++--	++--
万宁	++--	++--	++--	++--		++--
定安	++--	++--	++--	++--	++--	++--
屯昌	++--	++--	++--	++--		
澄迈	++--	++--	+---	++--	++--	++--
临高	++--	++--		+++	+++	++--
儋州	+++	++--	+++	++--	++--	++--
保亭	++--	++--	++--	++--	++--	++--
三亚	++--	++--		++--		
乐东	+---	+---		++--		
东方	++--	++--		+---	++--	
昌江	++--	++--	+++	+---	+---	++--
白沙	+---	+---		++--	+---	++--
琼中	++--	++--	++--	++--	++--	++--

注：+表示胶胞炭疽菌，-表示尖孢炭疽菌；+、-不同个数表示炭疽病发病严重程度。

Note: + indicates *C. gloeosporioides*, - indicates *C. oxysporum*, +, - different numbers indicate the severity of incidence of anthracnose.

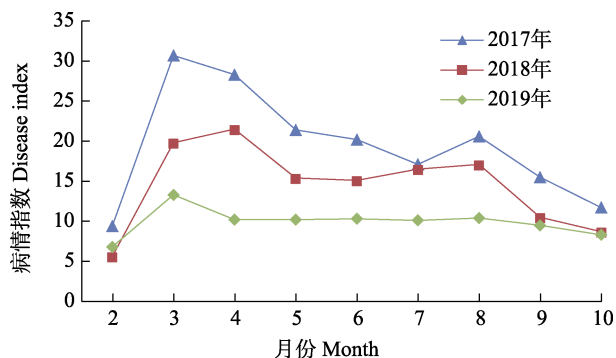


图 3 琼中县阳江农场橡胶树炭疽病情指数变化趋势  
Fig. 3 Change trend of anthracnose disease index of rubber trees in Yangjiang Farm, Qiongzong county

良好，不利于病原菌暴发导致。

## 2.2 菌株分离与致病性测定

2017—2018 年，从海南省主要橡胶种植区采集病样 264 份，获得炭疽病分离物 140 份，结果发现，分离物的菌丝菌落形态与常规尖孢炭疽菌和胶胞炭疽菌差异不大，进行抽样初步分析孢子形态，发现菌落色素也与尖孢炭疽菌和胶胞炭疽菌差异不大，仅其中采自琼中县阳江农场苗圃的炭疽病样品中有 1 株炭疽病菌菌落颜色异常，菌落背面产生橙红色色素，初筛发现其对多菌灵有抗性，因此对该菌株进行进一步研究。柯赫氏法

则验证结果表明（图 4），证明该菌株能引起橡胶树炭疽病，用无菌超纯水进行菌株保存，编号为 HCKHNQZ1736。

## 2.3 形态鉴定结果

对菌株 HCKHNQZ1736 和 MeCkYN1705 进行培养和观测（图 5），结果表明，在 PDA 培养基上气生菌丝为毛毡状，菌丝平伏、边缘整齐，呈圆形，28℃ 培养箱内菌落生长速率约为  $(10.5 \pm 1.5)$  mm/d，生长初期 2 个菌株背面均为乳白色至奶黄色，生长后期菌株 HCKHNQZ1736 背面逐渐转变为橙红色。此外，通过显微镜观察 2 个菌株的显微结构基本一致，子囊壳近球形，表面呈蜂窝状斑纹，直径为 80.4~90.6 μm；子囊孢子单行或双行排列，边缘整齐，一端钝圆一端呈锥形或弯曲，大小为  $(4.2 \pm 0.9)$  μm ×  $(14.2 \pm 1.1)$  μm；分生孢子圆柱状，边缘整齐，两端钝圆，大小为  $(4.8 \pm 0.7)$  μm ×  $(15.2 \pm 0.9)$  μm，有 1~2 个油滴；附着胞为深棕色至黑褐色，呈椭圆形或近圆形，边缘整齐，大小为  $(5.4 \pm 0.4)$  μm ×  $(8.2 \pm 0.6)$  μm；孢子梗透明至淡褐色，光滑，有隔膜和分支，多为簇状分布，长度约为 50 μm。根据上述菌落形态和显微结构等特征初步推测菌株 HCKHNQZ1736 为博宁炭疽菌复合种。

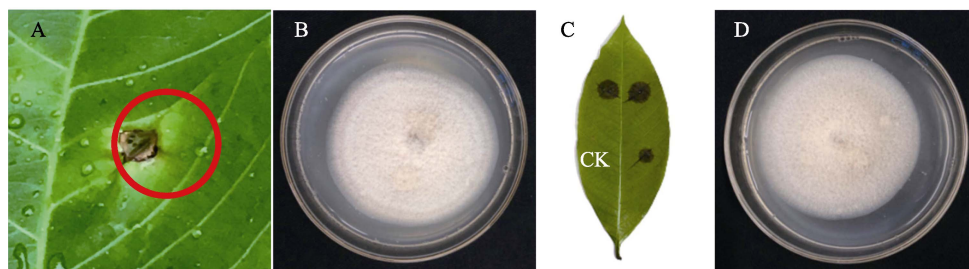


图 4 菌株 HCKHNQZ1736 的科赫氏法则验证  
A: 田间发病症状; B: 分离获得菌株 HCKHNQZ1736; C: 接种 HCKHNQZ1736 (左下角接种点为 CK); D: 再次分离获得 HCKHNQZ1736.  
A: Field symptoms; B: Separation to obtain HCKHNQZ1736; C: Inoculate with HCKHNQZ1736 (inoculation point at the lower left is CK); D: HCKHNQZ1736 was isolated again.

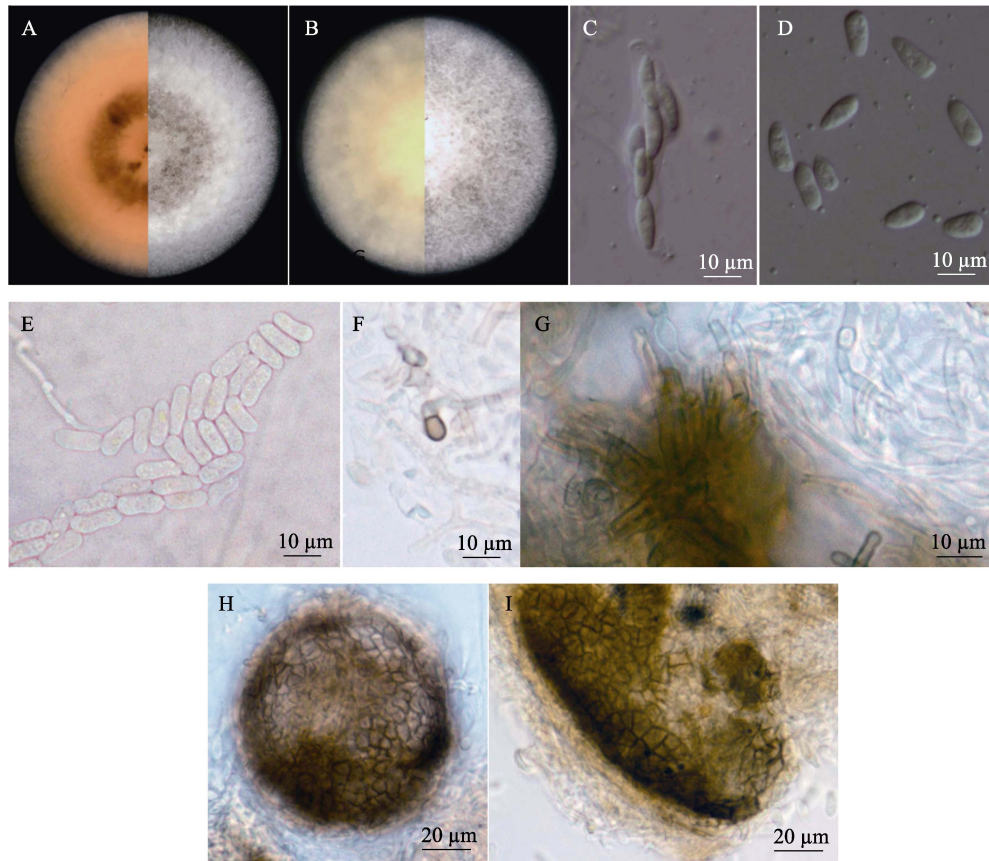
## 2.4 系统发育分析

图 4 菌株 HCKHNQZ1736 的科赫氏法则验证  
Fig. 4 Verification of Koch's Rule of strain HCKHNQZ1736

## 2.4 系统发育分析

利用引物对 ITS1/ITS4、T1/Bt-2b、GDF/GDR 分别对菌株 HCKHNQZ1736 和 MeCkYN1705 的基因组 DNA 进行 PCR 扩增，分别获得 575、751、239 bp 的片段，验证测序后将获得的基因序列在 GenBank 中进行 BLAST 比对，供试菌株的 ITS 序列与 *C. boninense* 的同源性为 99%；供试菌株的 *tub* 序列与 *C. karstii* 的同源性为 99%；供试菌株的 *GAPDH* 序列与 *C. karstii* 的同源性为 99%。

下载博宁炭疽复合种中各种模式菌株的多基因序列，利用 MEGA v. 6.0 软件进行比对后手动校正，将各基因序列以首尾相接的方式进行连接，比对后包括外群 *C. truncatum* 在内共有 1245 个序列特征，序列 1~507 为 *ITS* 序列；508~1003 为 *tub2* 序列；1004~1245 为 *GAPDH* 序列。用最大似然法中的 Hasegawa-Kishino-Yano model 模块构建系统发育树（图 6），供试菌株与 *C. karstii* 聚为同一分支，节点支持率为 98%，表明供试菌株属于喀斯



A: HckHNQZ1736 菌落正背面形态; B: MeCkYN1705 菌落正背面形态; C: HckHNQZ1736 子囊孢子; D: HckHNQZ1736 分生孢子; E: MeCkYN1705 分生孢子; F: HckHNQZ1736 附着胞; G: HckHNQZ1736 分生孢子梗; H: HckHNQZ1736 完整子囊壳; I: MeCkYN1705 破碎子囊壳。

A: Colony front and back morphology of HckHNQZ1736; B: Colony front and back morphology of MeCkYN1705; C: Ascospores of HckHNQZ1736; D: Conidia of HckHNQZ1736; E: Conidia of MeCkYN1705; F: Appressorium of HckHNQZ1736; G: Conidiophores of HckHNQZ1736; H: Complete ascus of HckHNQZ1736; I: Broken ascus of MeCkYN1705.

图 5 菌株培养形态

Fig. 5 Culture morphology of strains

特炭疽 (*C. karstii*)。

## 2.5 致病力测定结果

通过致病力测定,发现菌株 HckHNQZ1736 和 MeCkYN1705 对 4 个主栽品种大丰 95、RRIM-600、PR107 和热研 7-33-97 均表现出很强的致病力,与菌株 MeCkYN1705 相比,菌株 HckHNQZ-1736 对 4 个海南主栽橡胶树品种古铜期叶片的致病力稍弱,发生侵染后 3 d 的平均病斑直径分别为 10.33、10.90、10.57、9.17 mm,其中对 RRIM-600 的致病力最强,对热研 7-33-97 的致病力较弱(表 5)。

## 2.6 喀斯特炭疽菌的药剂敏感性

菌株 HckHNQZ1736 和 MeCkYN1705 对不同浓度的 98%多菌灵原药和 96%咪鲜胺锰盐原药敏感性测定结果如表 6 所示,通过计算获得菌株 HckHNQZ1736 和 MeCkYN1705 在多菌灵和咪鲜

表 5 供试菌株的致病力

Tab. 5 Pathogenicity of tested strains

菌株 Strain	病斑直径 Spot diameter/mm			
	大丰 95 Dafeng 95	RRIM600	PR107	热研 7-33-97 Reyan 7-33-97
HckHNQZ1736	10.33 <sup>b</sup>	10.90 <sup>a</sup>	10.57 <sup>b</sup>	9.17 <sup>c</sup>
MeCkYN1705	10.83 <sup>c</sup>	11.80 <sup>b</sup>	11.90 <sup>b</sup>	12.17 <sup>a</sup>

注:同行不同小写字母表示品种间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Note: Different lowercase letters in the same row indicate significant difference among varieties ( $P < 0.05$ ).

胺锰盐筛选压力下的毒力回归方程、相关系数( $r$ )以及  $EC_{50}$  值。结果表明,在多菌灵的筛选压力下, HckHNQZ1736 产生非常强的抗药性,  $EC_{50}$  达到 1107.2654  $\mu\text{g/mL}$ , 而 MeCkYN1705 的  $EC_{50}$  仅为 0.0554  $\mu\text{g/mL}$ ; 在咪鲜胺锰盐的筛选压力下, 药剂对 HckHNQZ1736 和 MeCkYN1705 的作用效果相近, 2 个菌株均未表现出抗药性,  $EC_{50}$  分别为

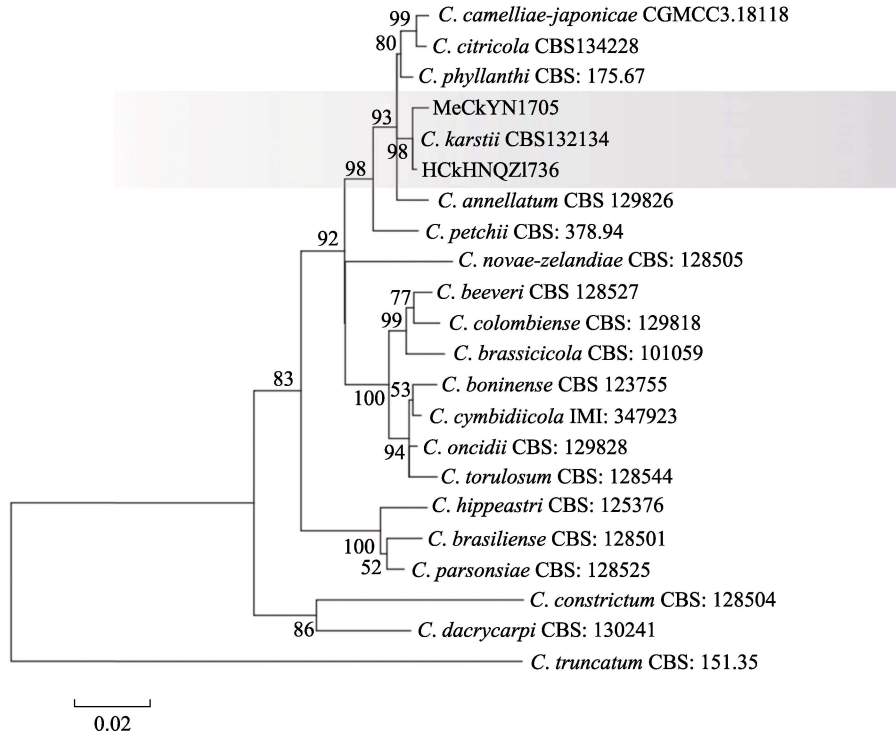


图 6 基于 ITS、*tub*、*GAPDH* 序列的系统发育树  
Fig. 6 Phylogenetic tree based on ITS, *tub*, *GAPDH* gene

表 6 供试菌株的药剂敏感性  
Tab. 6 Fungicide sensitivity of tested strains

药剂 Fungicide	菌株 Strain	回归方程 Regression equation	相关系数 <i>r</i>	EC <sub>50</sub> /(μg·mL <sup>-1</sup> )
98%多菌灵	HCKHNQZ1736	$y = -9.6805 + 4.8224x$	0.9882	1107.2654
	MeCkYN1705	$y = 8.5335 + 2.8120x$	0.9534	0.0554
96%咪鲜胺	HCKHNQZ1736	$y = 6.2068 + 1.0915x$	0.9762	0.0784
	MeCkYN1705	$y = 6.2202 + 1.0987x$	0.9962	0.0775

0.0784、0.0775 μg/mL。

### 3 讨论

通过调查发现，海南省目前种植的橡胶树品种中，51.06%为 PR107，43.39%为 RRIM600，2.17%为热研 7-33-97，0.90%为大丰 95，1.31%为海垦系列，其余品种共占 1.18%，可见海南省橡胶树主栽品种相对单一且面积大，主栽品种中，PR107 抽叶不整齐，在炭疽病侵袭时往往需要反复治理；RRIM600 开割后抽叶相对整齐，物候比较一致，整体上适合炭疽病的统防统治；热研 7-33-97 相对高产但不抗风，易受台风侵袭发生断树或倒伏，导致橡胶树林段物候不整齐，炭疽病常年均有发生，暴发期间需要反复治理。

为了解和掌握橡胶树炭疽病在田间的真实发生情况，2017—2019 年对海南省儋州市、琼中县、

乐东县、万宁市、白沙县、澄迈县等主栽区进行了橡胶树炭疽病的随机踏查，并设置琼中县阳江农场增殖苗圃作为橡胶树炭疽病病情长期动态监测点，结果发现橡胶树炭疽病的发生流行情况与橡胶树的品种（系）以及树龄关系小，而与橡胶树物候期及生态环境特别是气候相关性联系密切，抽芽至古铜期如果遇上持续的阴雨天气必导致炭疽病大暴发，因此橡胶树炭疽病防控措施的重点是结合天气预报提前预防，一旦发病后防治将变得极其困难，这与以往胶农反映的现象吻合，因此，落实抽叶至古铜期的橡胶树炭疽病统防统治措施要依据天气预报进行调整。

就目前而言，胶孢炭疽复合种和尖孢炭疽复合种仍是侵染海南省橡胶树的优势种<sup>[23]</sup>，本次常规调查主要也是调查尖孢炭疽菌和胶孢炭疽菌为主，国内橡胶树上未系统开展调查喀斯特炭疽菌，

而国内外对喀斯特炭疽菌的报道多在兰花、油茶、大叶桉、辣椒等作物上<sup>[24-26]</sup>，迄今为止国内在橡胶树上的喀斯特炭疽病仅在云南省红河绿春的戈兰和德宏瑞丽的莫里橡胶树上零星发生<sup>[19]</sup>。本研究于海南省橡胶树上首次发现喀斯特炭疽菌的发生为害，样品采自海南省琼中县阳江农场苗圃，菌株编号为 HCKHNQZ1736。通过形态观察该菌株在 PDA 平板上的生长状况，对子囊、分生孢子、子囊孢子、附着胞、孢子梗等结构进行初步鉴定，鉴定该菌株为博宁炭疽菌复合种；利用多基因分析对其 ITS、*tub* 和 *GAPDH* 三个基因进行同源性比较并构建系统发育树，进一步基于多位点的系统发育分析确定该菌株的分类地位<sup>[11-13, 27-28]</sup>，同源比较后鉴定该菌株为喀斯特炭疽 (*C. karstii*)。由此可见，博宁炭疽中的喀斯特炭疽菌已经在云南和海南橡胶产区发现，以后普查中应注意加强对该类菌株的监测，并对其生物学特性和流行病学进行深入研究，以便在生产上能更高效地全面防控橡胶树炭疽病。

本研究还开展了菌株 HCKHNQZ1736 对海南主栽橡胶树品种的致病力研究，并明确其对多菌灵和咪鲜胺的药剂敏感性，经过药剂敏感性测定发现该菌株对多菌灵具有高抗性，EC<sub>50</sub> 达到 1107.2654 μg/mL，且该菌株菌落背面颜色在生长 3 d 左右转变为橙红色，有别于敏感性菌株的奶黄色。郑肖兰等<sup>[29]</sup>克隆了该菌株的 *tub2* 基因，序列分析发现其所编码的第 198 氨基酸位点由谷氨酸 (Glu-E) 突变为丙氨酸 (Ala-A)，该氨基酸位点突变是导致该菌株产生多菌灵抗性的原因。上述研究结果与詹儒林<sup>[30]</sup>、李河等<sup>[31]</sup>的炭疽菌抗药性机理研究结果一致，高抗菌株为三联密码子第 198 位点从 GAG 突变为 GCG，导致第 198 位点的氨基酸由谷氨酸突变为丙氨酸。

植物病原炭疽菌对苯并咪唑类的抗药性研究主要集中在苯并咪唑类杀菌剂，该类杀菌剂是 20 世纪 60 年代末 70 年代初开发的一类含有苯并咪唑分子结构的高效且广谱的内吸性杀菌剂。尽管目前苯并咪唑类杀菌剂的抗药性问题已日趋严重，但这类杀菌剂仍被全世界广泛使用，用于防治多种植物病害<sup>[32]</sup>。苯菌灵是第一个应用于大田的苯并咪唑类杀菌剂，自 1967 年开始使用，1969 年 SCHROEDER 等<sup>[33]</sup>首次报道黄瓜白粉菌对苯菌灵产生了抗药性。随后在许多国家均陆续发现对该类药剂产生抗性，如 1982 年 SPALDING<sup>[34]</sup>

报道了芒果炭疽菌对多菌灵的抗性，1987 年周明国等<sup>[35]</sup>在灰霉菌中检测到多菌灵抗性菌株，1994 年 JOHNSON<sup>[36]</sup>报道了灰葡萄孢对苯菌灵的抗性，DE LAPEYRE 等<sup>[37]</sup>报道了香蕉炭疽菌对特克多的抗性。2001 年周明国等<sup>[38]</sup>报道了引起小麦赤霉病的禾谷镰孢菌对多菌灵出现了高抗药性，2003 年朱桂宁等<sup>[39]</sup>研究发现番茄灰霉病菌对多菌灵抗性很高；随后，詹儒林<sup>[30]</sup>、杨叶等<sup>[40]</sup>和徐大高等<sup>[41]</sup>均报道了海南芒果炭疽菌对多菌灵产生了抗药性。李洋<sup>[42]</sup>报道了葡萄炭疽菌对多菌灵产生了抗药性。因此科学合理地使用农药，延缓病菌对农药产生抗药性及科学治理抗药性是农药防治领域中具有重要意义的话题<sup>[40, 43]</sup>。本研究结果显示大田中橡胶树炭疽病已经产生了苯并咪唑类多菌灵高抗药性菌株，如果此类抗药性菌株传播速度快，适生性强，将会在生产上给橡胶树或其他作物带来极大的潜在危险，高抗性炭疽菌的普查将是下一步病害常规调查的重点，炭疽菌的抗药性基础研究、流行研究以及防控措施等相关研究将也是今后农业发展中高度重视的研究内容之一。因此今后的研究应重点关注和监测橡胶树炭疽菌抗药性发生情况，减少易产生抗药性杀菌剂的使用，并深入研究炭疽菌数量多、分布范围广的分子机制，为有效防治橡胶树炭疽病奠定基础。

## 参考文献

- [1] 冯淑芬, 刘秀娟, 王绍春, 张开明, 郑服丛. 橡胶树炭疽病流行规律研究[J]. 热带作物学报, 1998, 19(4): 39-45.  
FENG S F, LIU X J, WANG S C, ZHANG K M, ZHENG F C. Epidemic process of anthracnose of *Hevea brasiliensis*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 1998, 19(4): 39-45. (in Chinese)
- [2] 郑肖兰, 崔昌华, 郑服丛, 罗大全, 吴伟怀. 橡胶炭疽病原菌生物学特性初步研究[J]. 微生物学通报, 2006(2): 95-99.  
ZHENG X L, CUI C H, ZHENG F C, LUO D Q, WU W H. Study on biological characters of the pathogens caused anthracnose of rubber trees[J]. Microbiology China, 2006(2): 95-99. (in Chinese)
- [3] 郑肖兰, 傅帅, 郑服丛, 李锐, 吴伟怀, 贺春萍. 植物病原菌抗药性研究进展[J]. 热带农业科学, 2011, 31(1): 86-90.  
ZHENG X L, FU S, ZHENG F C, LI R, WU W H, HE C P. Research advances on fungicide resistance in plant pathogens[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2011, 31(1): 86-90. (in Chinese)
- [4] ZHENG X L, LIU Y, WEI X H, HE C P, WU W H, LIANG

- Y Q, LI R, ZHENG F C. Generation and analysis of pathogenicity-related gene mutants of *Colletotrichum gloeosporioides* using a novel promoter trapping system[J]. *Plant Diseases and Pests*, 2013(3): 12-15, 19.
- [5] 刘艳, 贺春萍, 易克贤, 习金根, 吴伟怀, 梁艳琼, 郑金龙, 李秋洁, 郑肖兰, 郑服丛. 橡胶炭疽病菌致病相关突变体的筛选及表型分析[J]. *热带作物学报*, 2014, 35(11): 2278-2283.
- LIU Y, HE C P, YI K X, XI J G, WU W H, LIANG Y Q, ZHENG J L, LI Q J, ZHENG X L, ZHENG F C. Screening of pathogenicity-related mutants from a T-DNA insertional mutant library of *Colletotrichum gloeosporioides* and analysis on the phenotypes[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2014, 35(11): 2278-2283. (in Chinese)
- [6] 刘艳. 橡胶炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)致病相关突变体表型分析及插入位点定位[D]. 海口: 海南大学, 2010.
- LIU Y. The analysis on the phenotypes of *Colletotrichum gloeosporioides* pathogenicity-related mutants and the T-DNA flanking sequence[D]. Haikou: Hainan University, 2010. (in Chinese)
- [7] 范会雄, 李德威, 黄宏积, 吴多兴, 黄深武. 橡胶树炭疽病发生流行规律及防治研究[J]. *植物保护*, 1996, 22(5): 31-32.
- FAN H X, LI D W, HUANG H J, WU D X, HUANG S W. Study on the epidemic law and control of rubber tree anthracnose[J]. *Plant Protection*, 1996, 22(5): 31-32. (in Chinese)
- [8] 崔昌华. 橡胶老叶炭疽病原菌的生物学、对药物的敏感性及其 ITS 序列分析[D]. 儋州: 华南热带农业大学, 2006.
- CUI C H. Biological characters, sensitivity to fungicide and ITS sequence analysis of the pathogens caused anthracnose from rubber trees[D]. Danzhou: South China University of Tropical Agriculture, 2006. (in Chinese)
- [9] 许志刚. 普通植物病理学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2009.
- XU Z G. Common plant pathology[M]. Beijing: Higher Education Press, 2009. (in Chinese)
- [10] 陆家云. 植物病原真菌学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- LU J Y. Mycology of plant pathogens[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2000. (in Chinese)
- [11] 江涛, 刘先宝, 李博勋, 郑肖兰, 蔡吉苗, 冯艳丽, 黄贵修. 国内橡胶树尖孢炭疽复合种间分子系统发育及生物学特性分析[J]. *热带作物学报*, 2020, 41(9): 1856-1864.
- JIANG T, LIU X B, LI B X, ZHEGN X L, CAI J M, FENG Y L, HUANG G X. Interspecific molecular phylogeny and biological characteristics of *Colletotrichum acutatum* complex species causing *Colletotrichum* leaf disease on rubber trees in China[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2020, 41(9): 1856-1864. (in Chinese)
- [12] 江涛, 刘先宝, 李博勋, 冯艳丽, 郑肖兰, 黄贵修. 橡胶树尖孢炭疽复合种新菌株的报道及生物学特性分析[J]. *植物病理学报*, 2020, 50(5): 531-542.
- JIANG T, LIU X B, LI B X, FENG Y L, ZHENG X L, HUANG G X. Report and biological characteristics to new strain of *Colletotrichum acutatum* species complex causing anthracnose in rubber trees[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2020, 50(5): 531-542. (in Chinese)
- [13] 刘先宝, 李博勋, 孙懂懂, 时涛, 黄贵修. 橡胶树胶孢炭疽菌 P 型 ATP 酶基因 *CgATPase 01* 的敲除及表型分析[J]. *热带作物学报*, 2017, 38(5): 126-132.
- LIU X B, LI B X, SUN D D, SHI T, HUANG G X. Knock-out and phenotypic analysis of the *CgATPase 01* gene of *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2017, 38(5): 126-132. (in Chinese)
- [14] MARIN FY, GROENEWALD J Z, CAI L, CHEN Q, MARINCOWITZ S, BARNES I, BENSCH K, BRAUN U, CAMPORESI E, DAMM U, DE BEER Z W, DISSANAYAK A, EDWARDS J, GIRALDO A, HERNÁNDEZ R M, HYDE K D, JAYAWARDENA R S, LOMBARD L, LUANGSAARD J, MCTAGGART A R, ROSSMAN A Y, SANDOVAL D M, SHEN M, SHIVAS R G, TAN Y P, VAN DER LINDE E J, WINGFIELD M J, WOOD A R, ZHANG J Q, ZHANG Y, CROUS P W. Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1[J]. *Studies in Mycology*, 2017(86): 99-216.
- [15] LIU X B, LI B X, CAI J M, ZHENG X L, FENG Y L, HUANG G X. Diversity of *Colletotrichum* species causing anthracnose of rubber tree in China[J]. *Scientific Reports*, 2018(8): 10435.
- [16] 林春花, 孙董董, 韩丹, 黄贵修. 中国橡胶树苗圃 2 种炭疽病菌分子鉴定及分布分析[J]. *热带作物学报*, 2014, 35(9): 1802-1808.
- LIN C H, SUN D D, HAN D, HUANG G X. Identification of *Colletotrichum* species on the *Colletotrichum* leaf disease from rubber nurseries in China[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2014, 35(9): 1802-1808. (in Chinese)
- [17] 林春花, 杨欢, 赵晓宇, 潘潇涵, 刘文波, 缪卫国, 郑服丛. 海南橡胶树炭疽菌 *Colletotrichum siamense* 和 *C. fructicola* 的鉴定及系统发育分析[J]. *热带作物学报*, 2018, 39(1): 129-136.
- LIN C H, YANG H, ZHAO X Y, PAN X H, LIU W B, MIAO W G, ZHENG F C. Identification and phylogenetic analysis of anthracnose pathogen *Colletotrichum siamense* and *C. fructicola* isolated from rubber tree in Hainan[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2018, 39(1): 129-136. (in

- Chinese)
- [18] SHI Y P, LIU Y X, LI L L. First report of *Colletotrichum laticiphilum* causing anthracnose of rubber tree in China[J]. Plant Disease, 2019, 103(3): 579-580.
- [19] 蒋桂芝, 石兆武, 刘一贤, 胡成云. 橡胶树上的一种新炭疽菌[J]. 热带农业科技, 2016, 39(4): 5-8.  
JIANG G Z, SHI Z W, LIU Y X, HU C Y. A new *Colletotrichum* isolated from *Hevea brasiliensis*[J]. Tropical Agricultural Science & Technology, 2016, 39(4): 5-8. (in Chinese)
- [20] 许文耀. 普通植物病理学实验指导[M]. 北京: 科学出版社, 2017.  
XU W Y. Experimental guidance on general plant pathology[M]. Beijing: Science Press, 2017. (in Chinese)
- [21] 林春花, 董瑛, 刘文波, 缪卫国, 郑服丛. 多基因序列比较分析海南橡胶树炭疽病菌遗传种群[J]. 热带作物学报, 2016, 37(5): 943-951.  
LIN C H, DONG Y, LIU W B, MIAO W G, ZHENG F C. Genetic diversity analysis of *Colletotrichum* spp. population isolated from rubber tree in Hainan based on multiple-gene phylogeny[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2016, 37(5): 943-951. (in Chinese)
- [22] 杨晓琦, 周小军, 朱丽燕, 陈向阳, 何晓婵, 张传清. 金线莲炭疽病原菌的分离鉴定及其对 9 种杀菌剂的敏感性[J]. 农药学报, 2020, 22(6): 951-958.  
YANG X Q, ZHOU X J, ZHU L Y, CHEN X Y, HE X C, ZHANG C Q. Isolation and identification of pathogen causing anthracnose on *Anoectochilus roxburghii* and its sensitivity to nine fungicides[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2020, 22(6): 951-958. (in Chinese)
- [23] CAO X R, XU X M, CHE H Y, WEST J S, LUO D Q. Three *Colletotrichum* species, including a new species, are associated to leaf anthracnose of rubber tree in Hainan, China[J]. Plant Disease, 2019, 103: 117-124.
- [24] 杨友联, 蔡磊, 喻子牛, 刘作易, HYDE K D. 兰科植物上炭疽菌属真菌系统学研究[C]//中国菌物学会. 2010 年中国菌物学会学术年会论文摘要集, 2010: 44-45.  
YANG Y L, CAI L, YU Z L, LIU Z Y, HYDE K D. *Colletotrichum* species on Orchidaceae[C]//Mycological Society of China. Abstracts of the Academic Annual Conference Papers of the Chinese Society of Microbiology in 2010, 2010: 44-45. (in Chinese)
- [25] TOZZE JUNIOR H J, MASSOLA JUNIOR N S, CÂMARA G M S, GIORIA R, SUZUKI O, BRUNELLI K R, BRAGA R S, KOBORI R F. First report of *Colletotrichum boninense* causing *Colletotrichum* on pepper in Brazil[J]. Plant Disease, 2009, 93(1): 106-106.
- [26] VELHO A C, STADNIK M J, CASANOVA L, MONDINO P, ALANIZ S. First report of *Colletotrichum karstii* causing *Glomerella* leaf spot on apple in Santa Catarina State, Brazil[J]. Plant Disease, 2014, 98(1): 157.
- [27] HUNUPOLAGAMA D M, CHANDRASEKHARAN N V, WIJESUNDERA W S S, KATHRIARACHCHIL H S, FERNANDOT H P S, WIJESUNDERAR L C. Unveiling members of *Colletotrichum acutatum* species complex causing *Colletotrichum* leaf disease of *Hevea brasiliensis* Sri Lanka[J]. Current Microbiology, 2017, 74(6): 747-756.
- [28] DAMM U, CANNON P F, WOUDEBERG J H C, CROUS P W. The *Colletotrichum acutatum* species complex[J]. Studies in Mycology, 2012, 73: 37-113.
- [29] 郑肖兰, 刘先宝, 李博勋, 郑行恺, 时涛, 冯艳丽, 黄贵修. 橡胶树炭疽菌 HCKHNQZ1736  $\beta$ -TUB2 基因对多菌灵的抗性相关性分析[J]. 热带作物学报, 2021, 42(8): 2334-2341.  
ZHENG X L, LIU X B, LI B X, ZHENG X K, SHI T, FENG Y L, HUANG G X. Preliminary analysis on resistance mechanism of  $\beta$ -TUB2 of HCKHNQZ1736 of rubber tree to carbendazim[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2021, 42(8): 2334-2341. (in Chinese)
- [30] 詹儒林. 芒果炭疽菌对多菌灵的抗药性研究[D]. 儋州: 华南热带农业大学, 2004.  
ZHAN R L. Studies on carbendazim-resistance of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz on mango[D]. Danzhou: South China Tropical Agricultural University, 2004. (in Chinese)
- [31] 李河, 李司政, 王悦辰, 刘君昂, 徐建平, 周国英. 油茶苗圃炭疽病原菌鉴定及抗药性[J]. 林业, 2019, 55(5): 85-94.  
LI H, LI S Z, WANG Y C, LIU J A, XU J P, ZHOU G Y. Identification of the pathogens causing anthracnose of *Camellia oleifera* in nursery and their resistance to fungicides[J]. Forestry, 2019, 55(5): 85-94. (in Chinese)
- [32] 李红霞. 四种植物病原真菌对多菌灵的抗药性分子遗传机制及其检测技术的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2003.  
LI H X. Molecular mechanism and detection techniques of resistance of four plant pathogenic fungi to carbendazim[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2003. (in Chinese)
- [33] SCHROEDER W T, PROVVIDENTY R. Resistance to benomyl in powdery mildew of cucurbits[J]. Plant Disease Reporter, 1969, 53: 271-275.
- [34] SPALDING D H. Resistance of mango pathogens to fungicides used to control postharvest diseases[J]. Plant Diseases, 1982, 66: 1185-1186.
- [35] 周明国, 叶钟音, 刘经芬. 南京市郊灰霉菌对苯并咪唑类杀菌剂田间抗性的检测[J]. 南京农业大学学报, 1987, 10(2): 53-57.  
ZHOU M G, YE Z Y, LIU J F. Detection of resistance of grey mold (*Botrytis cinerea*) to benzi midazoles in the field[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 1987, 10(2): 53-57. (in Chinese)

- [36] JOHNSON K B. Frequency of benzimidazole and dicarboximide-resistant strains of *Botrytis cinerea* in western Oregon small fruit snap bean plantings[J]. *Plant Disease*, 1994, 78: 572-577.
- [37] DE LAPEYRE DE BELLAIRE L, DUBOIS C. Distribution of thiabendazole-resistant *Colletotrichum musae* isolates from Guadeloupe banana plantations[J]. *Plant Diseases*, 1997, 81: 1378-1383.
- [38] 周明国, 王建新. 禾谷镰孢菌对多菌灵的敏感性基线及抗药性菌株生物学性质研究[J]. *植物病理学报*, 2001, 31(4): 365-370.  
ZHOU M G, WANG J X. Study on sensitivity basehline of *Fusarium graminearum* to carbendazim and biological characters of mbc-resistant strains[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2001, 31(4): 365-370. (in Chinese)
- [39] 朱桂宁, 黄福新, 蔡健和. 广西番茄灰霉病菌的多重抗药性检测[J]. *中国蔬菜*, 2003(4): 14-16.  
ZHU G N, HUANG F X, CAI J H. Multiple fungicide-resistance of tomato *Botrytis cinerea* in Guangxi[J]. *China Vegetables*, 2003(4): 14-16. (in Chinese)
- [40] 杨叶, 何书海, 张淑娟, 胡美姣. 海南芒果炭疽菌对多菌灵的抗药性测定[J]. *热带作物学报*, 2008(1): 73-77.  
YANG Y, HE S H, ZHANG S J, HU M J. Resistance of mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* to carbendazim in Hainan province[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2008(1): 73-77. (in Chinese)
- [41] 徐大高, 潘汝谦, 郑仲, 王振中. 芒果炭疽病菌对多菌灵的抗药性监测[J]. *华南农业大学学报*, 2004, 25(2): 34-36.  
XU D G, PAN R Q, ZHENG Z, WANG Z Z. Monitoring of the resistance of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango anthracnose to the fungicide carbendazim[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2004, 25(2): 34-36. (in Chinese)
- [42] 李洋. 辽宁葡萄炭疽病菌对多菌灵抗药性研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2009.  
LI Y. Study on carbendazim-resistant *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. in Liaoning[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2009. (in Chinese)
- [43] 詹儒林. 芒果炭疽病菌抗药性基因 *tub2* 的克隆及其转化金龟子绿僵菌的初步研究[D]. 儋州: 华南热带农业大学, 2007.  
ZHAN R L. Cloning of carbendazim-resistant gene *tub2* from mango anthracnose and its transfer to *Metarhizium anisopliae* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[D]. Danzhou: South China Tropical Agricultural University, 2007. (in Chinese)