

海南省橡胶树炭疽病病情监测及生防菌对炭疽菌的抑菌测试

邓 南¹, 郑肖兰^{1,2*}, 吴伟怀¹, 谭施北¹, 梁艳琼¹, 易克贤^{1,2*}

1. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所/海南省院士团队创新中心/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; 2. 中国热带农业科学院三亚研究院, 海南三亚 572025

摘 要: 橡胶树炭疽病是橡胶树叶部“两病”之一, 危害程度仅次于白粉病, 在我国橡胶树种植过程中对橡胶树胶乳的生产造成了严重经济损失。在此背景下, 本研究针对橡胶树炭疽病原菌展开基础生物学特性、分子鉴定、生防菌抑菌谱测定和绿色防控等研究。首先在海南省主要橡胶树栽培区进行炭疽病发病情况的调查, 对琼海、保亭、澄迈的橡胶林炭疽病病叶进行采样收集, 并进行病原菌的分离和纯化, 对收集到的病原菌菌株进行分子鉴定和生防菌抑菌谱测定, 最后对从保亭收集到的菌株 HZS-BT 进行基础生物学特性研究。结果表明: 通过对海南各地区田间橡胶树炭疽病病情的调查, 发现在总体上热研 73397、PR107、RRIM600 等海南主要种植的橡胶树品种在当前的气候及生态条件下对炭疽病并不具备良好的抗性。通过扩增相关核心基因、多基因测序、特异性引物检测, 并将其与 NCBI 数据库中模式菌株的基因组进行 BLAST 比对, 将从保亭收集到的病原菌 HZS-BT 鉴定为 *Colletotrichum siamense*。最适合参试炭疽菌株的生长温度为 28 °C; 最适 pH 为 8.0, 但参试炭疽菌的 pH 适应范围较广; 最适合其生长的碳源和氮源分别为山梨醇和牛肉浸膏。抑菌谱测定结果表明, 11 株生防菌均在对炭疽菌的生物防治上具有潜在的应用价值。本研究将为橡胶树炭疽病的绿色防控提供理论基础。

关键词: 橡胶树炭疽病; *Colletotrichum siamense*; 生物学特性; 生物防治; 分子鉴定

中图分类号: S763.7 文献标志码: A

Monitoring of Rubber Tree Anthracnose Disease in Hainan Province and the Antifungal Effect of Biocontrol Bacteria on *Colletotrichum* sp.

DENG Nan¹, ZHENG Xiaolan^{1,2*}, WU Weihuai¹, TAN Shibe¹, LIANG Yanqiong¹, YI Kexian^{1,2*}

1. Institute of Environment and Plant Protection, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Hainan Academician Team Innovation Center / Key Laboratory of Monitoring and Control of Tropical Agricultural and Forestry Pests, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Hainan Key Laboratory of Tropical Agricultural Pest Monitoring and Control, Haikou, Hainan 571101, China; 2. Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Sanya, Hainan 572025, China

Abstract: Rubber tree anthracnose is one of the two major foliar diseases of rubber trees, ranking second in severity only to powdery mildew. It has caused significant economic losses to rubber latex production during rubber tree cultivation in China. Against this backdrop, this study focuses on the pathogen of rubber tree anthracnose, investigating its fundamental biological characteristics, molecular identification, antifungal spectrum determination of biocontrol agents, and green prevention strategies. The research begins with a survey of anthracnose incidence in major rubber tree cultivation areas of Hainan province, collecting diseased leaves from rubber forests in Qionghai, Baoting and Chengmai. Pathogenic fungi were isolated and purified, followed by molecular identification and antifungal spectrum analysis by biocontrol agents. Finally, a strain (HZS-BT) isolated from Baoting was subjected to fundamental biological characte-

收稿日期 2025-09-01; 接受日期 2025-10-13

基金项目 海南省科技人才创新项目 (No. KJRC2023B18); 海南省重点研发计划项目 (No. ZDYF2024SHFZ043, No. ZDYF2024- XDNY250)。

作者简介 邓 南 (2003—), 本科生, 研究方向: 热带作物病害比较基因组学。*通信作者 (Corresponding author): 郑肖兰 (ZHENG Xiaolan), E-mail: orchidzh@163.com; 易克贤 (YI Kexian), E-mail: yikexian@126.com。

ristic studies. The findings reveal that, through field surveys of rubber tree anthracnose in various regions of Hainan, it was observed that currently predominant rubber tree varieties in Hainan, such as RY73397, PR107 and RRIM600, exhibit poor resistance to anthracnose under current climatic and ecological conditions. By amplifying core genes, multiplex gene sequencing, and specific primer detection, followed by BLAST comparison with genome sequences of standard strains in the NCBI database, the anthracnose pathogen strain HZS-BT isolated from Baoting was identified as *Colletotrichum siamense*. The optimal growth temperature for the tested anthracnose strain is 28 °C, with a preferred pH of 8.0, though the strain demonstrates a broad pH adaptability range. The most suitable carbon and nitrogen sources for its growth are sorbitol and beef extract, respectively. Antifungal spectrum analysis indicates that all 11 biocontrol strains possess potential for biological control applications against anthracnose. This study provides a theoretical foundation for the green prevention of rubber tree anthracnose.

Keywords: anthracnose of rubber tree; *Colletotrichum siamense*; biological characteristics; biocontrol; molecular identification

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2026.02.018

巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 是一种典型的热带作物, 其产生的胶乳是我国航空航天和国防领域的重要工业材料来源, 巴西橡胶树最早于 20 世纪 50 年代引进我国海南省进行推广种植, 为海南省第一大经济作物。橡胶树炭疽病主要由炭疽菌属 (*Colletotrichum*) 的胶孢炭疽菌复合群 (*C. gloeosporioides* species complex) 侵染引起, 其寄生范围广泛, 包括橡胶树、芒果、香蕉等热带作物。其侵染热带作物的途径主要为角质层下内部侵染和细胞内半活体营养性侵染^[1]。根据植物形态学的相关研究表明, 炭疽病病原菌主要侵染橡胶树的叶片、叶柄和嫩梢。

热带作物炭疽病的早期鉴定, 主要采用病征观察与病原菌子实体显微形态分析相结合的方法: 首先根据橡胶树发病叶片的病征进行初步判断, 再通过显微镜观察炭疽菌的菌丝与孢子形态特征, 从而准确鉴定侵染橡胶树的炭疽病病原菌种类。在 2008—2012 年期间随着分子生物学的鉴定手段的飞速发展^[2], 橡胶树炭疽病的病原鉴定, 已从传统方法转向基于 ITS 引物序列的分子检测, 并辅以炭疽菌形态学特征的比对, 以确定其病原菌小种。2012 年之后, 由于 ITS 单基因测序无法直接鉴定炭疽病病原菌, 多基因测序技术逐步成为橡胶树炭疽病以及其他作物病害的检测手段。目前主要采用 ITS、ACT、CHS-1、GAPDH、TUB2 等多个基因联合构建系统发育树, 根据亲缘关系远近来确定炭疽菌菌株的分类地位。陈清沁等^[3]通过比较基因组学和群体基因组学, 分析和设计暹罗炭疽菌 (*C. siamense*) 和果生炭疽菌 (*C. fruticola*) 的特异性引物, 为 *C. siamense* 和 *C. fruticola* 显微形态和叶片症状难以区分的问题提供了新的解决方案 (专利号: ZL 202411845598.4)。

目前, 橡胶树炭疽病的防治以化学防治为主, 农业防治和生物防治为辅。化学防治快速、高效、成本低, 但是化学防治会对自然环境造成严重污染^[4], 此外, 许多研究表明使用单一的化学农药可使橡胶树炭疽病病原菌产生不同程度的抗药性^[5-7]。近年来, 生物防治因其对生态环境的友好性、低毒性和高效性成为橡胶树炭疽病绿色防控研究的热点。

本研究通过田间表型识别、形态学鉴定、ITS 单基因测序、多基因构建系统发育树以及 *C. siamense* 和 *C. fruticola* 特异性引物对病原菌进行检测鉴定, 并对从海南省保亭县分离到的菌株进行碳源、氮源、pH 等基础生物学特性指标的研究, 测定 11 株生防菌对橡胶树炭疽病病菌的抑菌率。本研究结果可为海南省橡胶树炭疽病的绿色防控提供相应的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

参试菌株 HZS-BT、HZS-QH、HZS-CM 分别从保亭、琼海、澄迈橡胶林的炭疽病病叶中分离获得, 并保存在中国热带农业科学院环境与植物保护研究所生物多样性控病研究组。

试验所用培养基见表 1, 固体培养基需加入琼脂粉 18 g/L, 121 °C, 20 min 高压蒸汽灭菌, 以确保完全灭菌。

主要仪器: 超净工作台、培养箱、普通冰箱、灭菌专用高压灭菌锅、水平电泳仪等。

1.2 方法

1.2.1 海南省橡胶树炭疽病疫情田间调查与监测 2025 年 1—5 月期间, 先后对海南省儋州市、琼中县、乐东县、万宁市、白沙县、澄迈县等

表 1 培养基
Tab. 1 Culture medium

培养基 Media	配料及用量 (1 L) Ingredients and dosage (1 L)
PDA	马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂粉 18 g
NYG	胰蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, 琼脂粉 18 g
SDA	胰蛋白胨 10 g, 葡萄糖 40 g, 琼脂粉 18 g
SDAY	胰蛋白胨 10 g, 葡萄糖 40 g, 酵母粉 10 g, 琼脂粉 18 g
MBM	胰蛋白胨 5 g, 磷酸二氢钾 1 g, 硫酸镁 0.5 g, 酵母粉 2 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂粉 18 g
CZ	硝酸钾 2 g, 磷酸氢二钾 1 g, 氯化钾 0.05 g, 七水硫酸镁 0.5 g, 硫酸亚铁 0.01 g, 蔗糖 30 g, 琼脂粉 18 g
YEPD	酵母粉 10 g, 胰蛋白胨 20 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂粉 18 g

橡胶树主要的栽培区进行橡胶树炭疽病随机调查。根据橡胶树叶片上的发病症状进行区分(尖孢炭疽菌复合种侵染橡胶树的症状主要是病斑凸起,胶孢炭疽菌复合种侵染橡胶树的症状主要是水渍状病斑及叶尖叶缘卷曲。)

1.2.2 致病性测定 取淡绿期的橡胶树叶片,使用 75%乙醇对叶片表面消毒。使用灭菌后的昆虫针在叶片上点刺出多个微小伤口,刮取病原菌株 HZS-BT 的分生孢子并将其配置成 1×10^6 spores/mL 的孢子悬浮液,对试验组的橡胶树叶片进行喷洒,并设置 1 组对照喷施等量无菌水,重复 3 次,28 ℃ 黑暗保湿培养,2~6 d 的时间周期里定期观察,拍照和记录。

1.2.3 形态观察 菌株在 PDA 培养基上培养 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、分生孢子梗等微观形态,并记录其大小。参考《普通植物病理学》^[8]和《植物病原真菌学》^[9]对菌株进行形态上的初步分类鉴定。

1.2.4 病原菌株基因组 DNA 提取 将炭疽病病原菌株接种至 PDA 培养基上,28 ℃ 培养 7 d,刮取菌丝,使用真菌基因组 DNA 专用提取试剂盒(美国飞扬生物科技有限公司)进行病原菌株基因组 DNA 的提取。

1.2.5 多基因测序 选择核糖体转录间隔区(ITS)、 β -微管蛋白基因(TUB2)、3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(GAPDH)、几丁质合成酶 1 基因(CHS-1)、肌动蛋白基因(ACT)和超氧化物歧化酶 2 基因(SOD2)部分序列进行多基因系统发育分析。所用引物见表 2,PCR 扩增体系(总体积 25 μ L): 2.5 mmol/L dNTP Mixture 2 μ L;

表 2 基因及引物
Tab. 2 Genes and primers

基因 Gene	引物 Primer	引物序列 (5'-3') Primers sequence (5'-3')
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
TUB2	T1	AACATGCGTGAGATTGTAAGT
	Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC
ACT	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGTTTCGC
	ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT
SOD2	SODglo2-F	CAGATCATGGAGCTGCACCA
	SODglo2-R	TAGTACGCGTGCTCGGACAT
GAPDH	GDF	GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA
	GDR	GGGTGGAGTCGTACTTGAGCATGT
CHS-1	CHS-79F	TGGGGCAAGGATGCTTGAAGAAG
	CHS-354R	TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG
CS-F/CS-R ^[3]	CS-F	GTGAGTACATTTTACCACCA
	CS-R	GACCACACATCTGGCCAT
CF-F/CF-R ^[3]	CF-F	GTGACCTTCTCCCTGTAT
	CF-R	CTGTATTGTCTCCCAAAGC

TaKaRa LA *Taq* 高保真酶 0.5 μ L; 2 $\times$ GC buffer 12.5 μ L; 10 μ mol/L 上、下游引物各 1 μ L; ddH₂O 7 μ L; 模版 DNA 1 μ L。PCR 反应程序为: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 45 s, 57 ℃ 退火 45 s, 72 ℃ 延伸 50 s, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min, 于 4 ℃ 保存。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 的 BLAST 进行比对分析。

1.2.6 病原菌基因组 DNA 测序及分析 在 NCBI 的 GenBank 数据库中下载胶孢炭疽菌复合群所用模式种的序列和 *C. siamense* 的模式菌株的 ITS、TUS2、SOD2、CHS-1、GAPDH、ACT 以及其他核心基因的序列,利用 MEGA v. 11.0 软件对所获得的序列分别进行比对,删除不确定的序列,将病原菌菌株的 ITS、TUB2、SOD2、CHS-1、GAPDH、ACT、CS(特异性片段)基因片段与模式菌株和相关参考序列进行聚类分析,利用 MEGA v. 11.0 中的 Maximum Likelihood 方法构建系统发育树,以 *C. gloeosporioides*、*C. fruticola*、*C. boninense* 和 *C. nupharicola* 作为参考近缘种^[10-11],重复 1000 次。使用 CS-F/R(*C. siamense* 特异性引物)和 CF-F/R(*C. fruticola* 特异性引物)对病原菌株 HZS-BT 的特定定位点基因组进行扩增,并进行琼

脂糖凝胶电泳检测。

1.2.7 不同 pH 对菌株 HZS-BT 生长的影响 用 1 mol/L 的 NaOH 和 HCl 溶液调节 PDA 培养基的 pH 至 4、6、8、10 共 4 组处理,将 3 mm 菌饼接种于上述的不同 pH 的 PDA 培养基的平板中央,每个处理重复 3 次,28 ℃ 黑暗培养 7 d,使用十字交叉法^[12]测量菌落直径,每次测量 3 次,取平均值。

1.2.8 不同碳源对菌株 HZS-BT 生长的影响 用山梨醇、玉米淀粉、蔗糖、甘露醇对察氏琼脂培养基中的碳源蔗糖进行等碳量替换,以无碳源的察氏琼脂培养基作为对照^[13],将 3 mm 的菌饼接种于上述培养基平板中央,每个处理重复 3 次,28 ℃ 黑暗培养 7 d,使用十字交叉法测量菌落直径,每次测量 3 次,取平均值。

1.2.9 不同氮源对菌株 HZS-BT 生长的影响 用谷氨酰胺、甘氨酸、牛肉浸膏、氯化铵和硫酸铵对察氏琼脂培养基中的氮源硝酸钠进行等氮量替换,以无氮源作为对照^[14],将 3 mm 菌饼接种于上述培养基平板中央,每个处理重复 3 次,28 ℃ 黑暗培养 7 d,使用十字交叉法测量菌落直径,每次测量 3 次,取平均值。

1.2.10 不同温度对菌株 HZS-BT 生长的影响 将 3 mm 菌饼接种至察氏琼脂培养基上,设定 4、10、15、20、25、28、37 ℃ 不同的温度组别,每组分别设置 3 次重复,黑暗培养 7 d^[15-16],使用十字交叉法测量菌株的生长直径,每次测量 3 次,取平均值。

1.2.11 不同培养基对菌株 HZS-BT 生长的影响 将 3 mm 菌饼接种于不同琼脂培养基^[17]的平板中央,每个处理重复 3 次,28 ℃ 黑暗培养 7 d,使用十字交叉法测量菌落直径,每次测量 3 次,取平均值。

1.2.12 生防菌抑菌能力测定 采用平板对峙法对生防菌株进行筛选,将 3 mm 的菌饼接种在 PDA 平板中心,在距平板中心约 3 cm 处的垂直对称 4 位点接种生防菌株。生防菌株为中国热带农业科学院环境与植物保护研究所生物多样性控病研究组保存,名称编号为 TH21、K13、Aghncj、Yg-1、2N1、30、1、PBST-9、10、13、大田芒果 11 株生防菌,每组设置 3 次重复,并以不接种生防菌的平板为对照,28 ℃ 黑暗培养至对照组病原菌株接近长满平板,结束培养并计算抑菌率,依据抑菌率筛选出对病原菌有拮抗作

用的菌株^[18]。

1.3 数据处理

试验数据使用 Microsoft Excel 2016 软件进行统计。

2 结果与分析

2.1 海南橡胶树炭疽病田间调查与监测结果

根据此次海南各地区田间橡胶树炭疽病病情调查,结果显示,总体上热研 73397、PR107、RRIM600 等海南主要栽培种植的橡胶树品种在当前的气候及生态条件下对炭疽病并不具备良好的抗性;在橡胶树生长周期中,橡胶树炭疽病主要发生在橡胶树的抽芽期至淡绿期,即每年的 2—4 月橡胶树抽新叶的过程中,如果在此期间出现连续低温、阴雨和高湿的气候条件,极易导致橡胶树炭疽病疫情大规模爆发,因此,每年的 2—4 月为橡胶树炭疽病进行防控的关键时期。病情调查发现,在儋州市西联农场橡胶树炭疽病的病原主要是胶孢炭疽菌复合种;在乐东县保显农场、白沙县大岭农场,发现导致橡胶树产生炭疽病的主要病原菌是尖孢炭疽菌复合种;而从其他地区的橡胶树炭疽病发病情况的调查中,也发现尖孢炭疽菌和胶孢炭疽菌混合侵染的发病情况;在橡胶树生产苗圃中,橡胶树苗因为取芽条一直处于抽芽抽叶时期,导致橡胶树苗炭疽病常年发病,比如儋州市宝岛新村试验场、乐东保显农场、白沙大岭农场等种植的橡胶树小苗发生炭疽病相对来说比较严重和普遍(表 3、图 1)。

2.2 致病性检测结果

根据致病结果显示,喷施孢子悬浮液 3 d 后,发病部位呈现黑色轮纹状病斑,边缘有黄色晕圈产生,与田间症状一致(图 2)。对橡胶叶片发病部位进行分离,通过柯赫氏法则确定菌株 HZS-BT、HZS-QH 和 HZS-CM 为橡胶树炭疽病的病原菌。

2.3 形态学鉴定结果

菌株 HZS-BT、HZS-QH 和 HZS-CM 的分生孢子梗无色,直立,顶端呈瓶梗状;分生孢子单胞、无色、长椭圆形至镰刀形,两端尖锐或一端钝圆(图 3)。上述形态特征符合炭疽菌属(*Colletotrichum*)的典型产孢结构,故鉴定为炭疽菌属(*Colletotrichum* spp.)。

表 3 海南省橡胶树主产区主栽品种炭疽病发病情况
Tab. 3 Incidence of anthracnose disease in major rubber tree cultivars in Hainan primary production regions

地区 Region	PR107	RRIM600	DAFENG95	REYAN7-33-97	Haiken series	Other series
琼海	++ - -	++ - -	++ - -	++ - -	++ - -	++ - -
万宁	++ - -	++ - -	++ - -	++ - -		++ - -
定安	++ - -	++ - -	++ - -	++ - -	++ - -	++ - -
屯昌	++ - -	++ - -	++ - -	++ - -		
澄迈	++ - -	+ - - -	++ - -	++ - -	++ - -	++ - -
临高	++ - -	++ - -		++ - -	++ - -	++ - -
儋州	+++ -	++ - -	++ - -	++ - -	++ - -	++ - -
保亭	++ - -	++ - -	++ - -	++ - -	++ - -	++ - -
三亚	++ - -	++ - -		++ - -		
乐东	+ - - -	++ - -		++ - -		
东方	++ - -	++ - -		+ - - -	++ - -	
白沙	++ - -	+ - - -		+ - - -	+ - - -	++ - -
琼中	++ - -	++ - -	++ - -	++ - -	++ - -	++ - -
昌江	++ - -	++ - -	+++ -	+ - - -	++ - -	++ - -

注：+表示胶胞炭疽菌，-表示尖孢炭疽菌。
Note: + indicates *C. gloeosporioides*, - indicates *C. acutatum*.



图 1 橡胶树炭疽病田间病征
Fig. 1 Field symptoms of anthracnose in rubber trees



图 2 致病性测定结果
Fig. 2 Pathogenicity determination results

2.4 分子生物学鉴定结果

菌株 HZS-QH、HZS-BT 和 HZS-CM 的 *ITS* 基因的部分片段大小均为 700~750 bp。将所测序的序列在 NCBI 数据库中进行对比,使用 MEGA 11.0

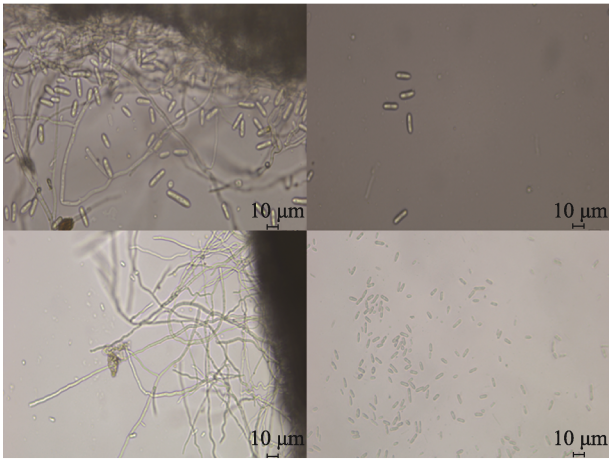


图 3 病原形态
Fig. 3 Pathogen morphology

软件对下载的各菌株的 *ITS* 序列进行系统发育树构建。如图 4~图 6 所示, 3 个菌株与炭疽属的菌株聚为 1 支, 综合田间表型观察, 将 3 株病原菌鉴定为炭疽菌属 (*Colletotrichum* spp.)。

采用橡胶树炭疽菌 *C. siamense* 和 *C. fructicola* 的特异性引物检测, 发现 CS-F/CS-R 在琼脂糖凝胶电泳测试中检测出条带, 大小约为 100 bp, CF-F/CF-R 未产生条带(图 7), 因此推测 HZS-BT 为 *C. siamense*。

如图 8 所示, 基于系统发育树分析, HZS-BT 的相关核心基因 *ACT*、*ITS*、*TUB2*、*CHS-1*、*SOD*、*GADPH*、CS (*C. siamense* 特异性引物) 在进化关

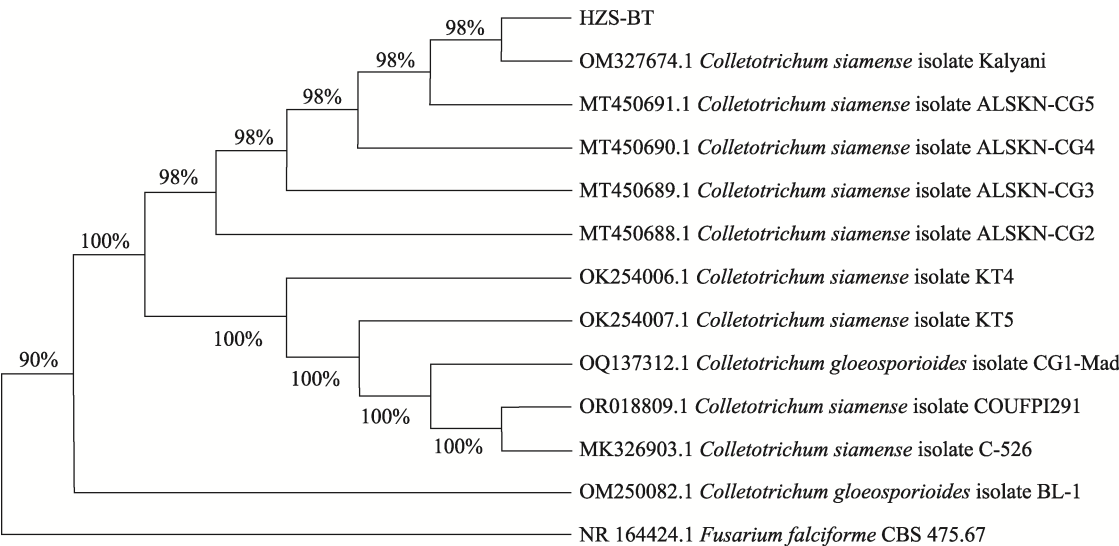


图 4 基于 ITS 基因的 HZS-BT 系统发育树构建

Fig. 4 Construction of HZS-BT phylogenetic tree based on ITS gene of HZS-BT

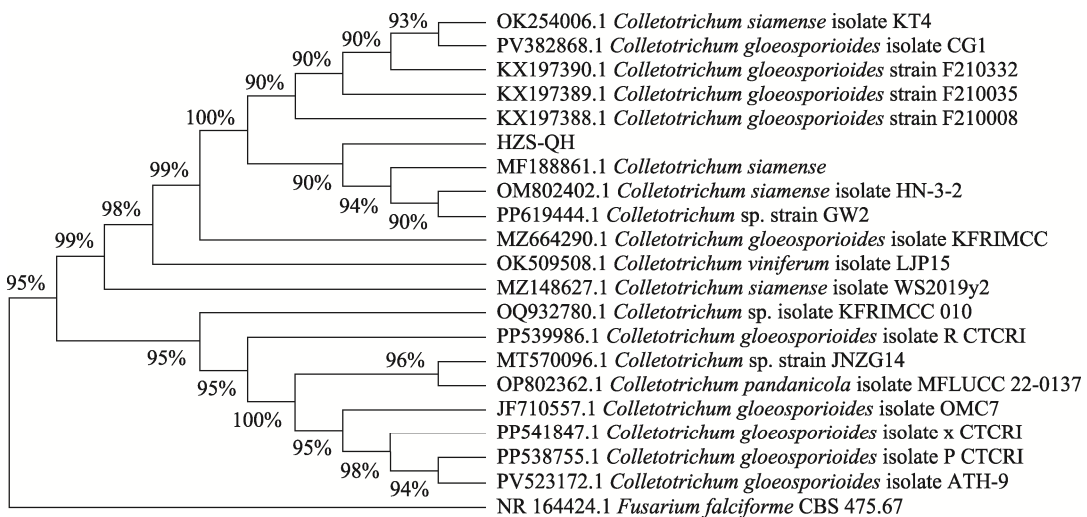


图 5 基于 ITS 基因的 HZS-QH 系统发育树构建

Fig. 5 Construction of phylogenetic tree based on ITS gene of HZS-QH

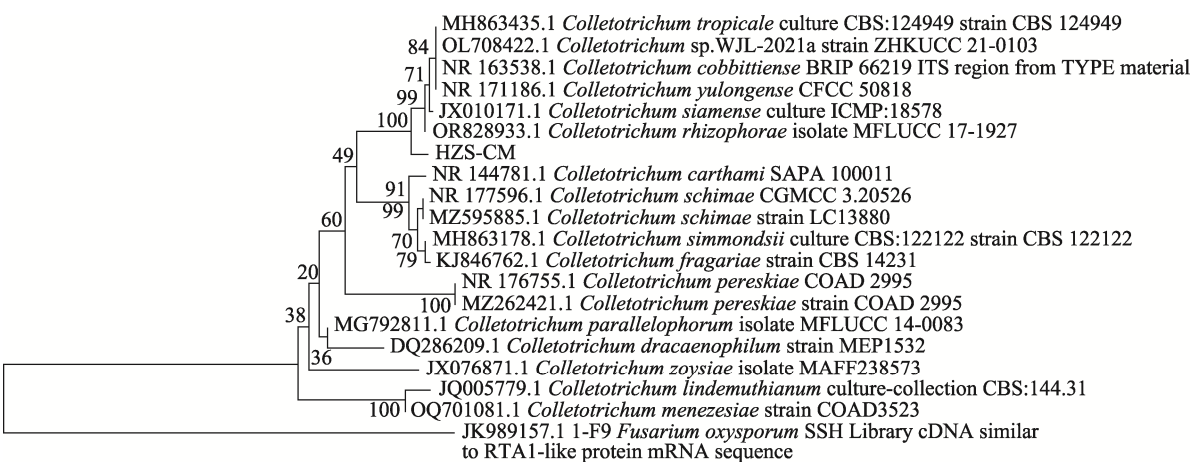


图 6 基于 ITS 基因的 HZS-CM 系统发育树构建

Fig. 6 Construction of phylogenetic tree based on ITS gene of HZS-CM

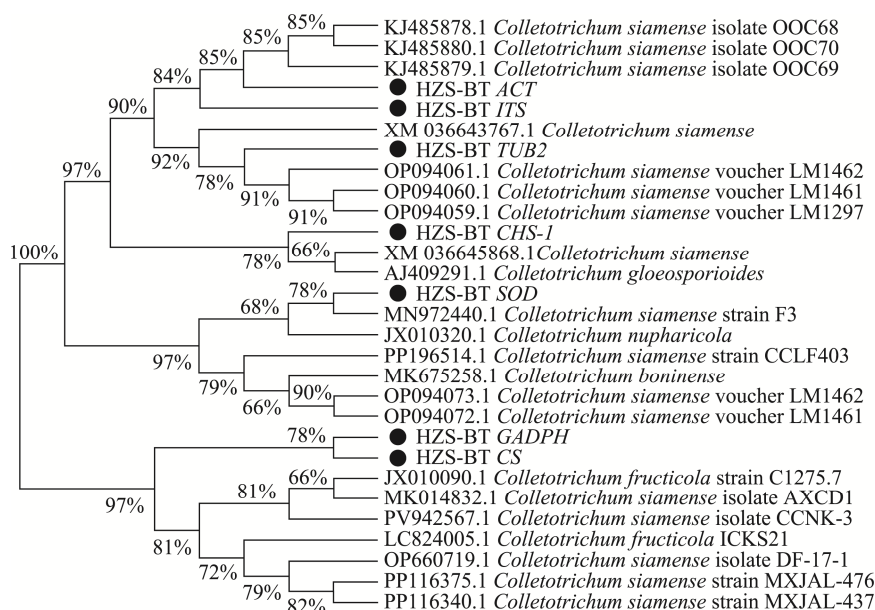


图 7 琼脂糖凝胶电泳检测

Fig. 7 Agarose gel electrophoresis detection

系上与 *C. siamense* 呈高度紧密的聚类特征。具体表现为这些基因与多个已经明确鉴定的模式菌株聚于同一分支。在分支支持率上, HZS-BT 核心基因与 *C. siamense* 聚类分支的支持率较高,

ACT 基因为 90%, *ITS* 基因为 84%, *TUB2* 基因为 92%, *CHS-1* 基因为 78%, *SOD2* 基因 (图 8 中标记为 HZS-BT *SOD*) 为 78%, *GADPH* 基因为 97%, 这些支持率表明, 该聚类结果有着高度的可靠性和稳定性, 有力证明了 HZS-BT 与 *C. siamense* 之间存在着紧密的亲缘关系。通过与系统中其他近缘种 *C. gloeosporioides*、*C. fructicola*、*C. boninense*、*C. nupharicola* 的序列对比发现, HZS-BT 与这些物种的分支存在明显分离, 且分支支持率较低, 进一步明确 HZS-BT 与 *C. siamense* 在进化上的独立性。综上所述, HZS-BT 被鉴定为 *C. siamense*。

图 8 基于 *ACT*、*ITS*、*TUB2*、*CHS-1*、*SOD2*、*GADPH*、*CS* 多基因的 HZS-BT 系统发育树构建Fig. 8 Phylogenetic tree construction of HZS-BT based on *ACT*, *ITS*, *TUB2*, *CHS-1*, *SOD2*, *GADPH*, *CS* multiple genes

2.5 病原菌株 HZS-BT 生物学特性探究结果

2.5.1 不同 pH 对 HZS-BT 生长影响 HZS-BT 在 pH 4~10 的范围内均能生长, 最适 pH 为 8, HZS-BT 菌落直径为(71.41±2.58)mm, 当 pH 为 4、6、10 时菌落直径分别为(45.84±0.34)、(63.98±4.35)、(67.63±2.53)mm, 这一结果说明 HZS-BT 对 pH 的适应范围较广, 其耐酸耐碱性能强 (图 9)。

2.5.2 碳源对 HZS-BT 生长的影响 在不同碳源的比对中, 以山梨醇为碳源, HZS-BT 菌落直径最大为(75.68±0.66)mm, 甘露醇、蔗糖、玉米淀粉为碳源, HZS-BT 菌落直径分别为(74.15±0.28)、(60.61±1.75)、(33.9±0.85)mm, 无碳源条件下 HZS-BT 生长最差, 菌落直径为(6.03±0.02)mm, 几乎无生长 (图 10)。

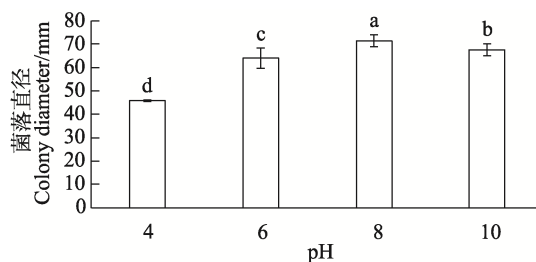
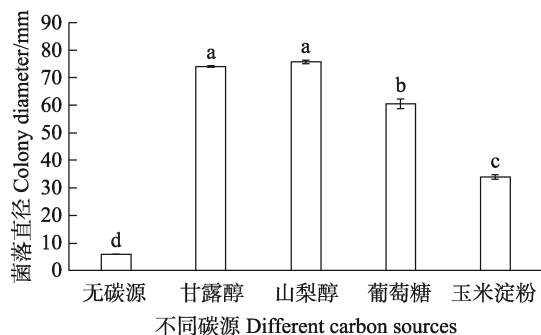
不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 9 不同 pH 下 HZS-BT 菌落直径

Fig. 9 Colony diameter of HZS-BT under different pH conditions

2.5.3 氮源对 HZS-BT 生长的影响 HZS-BT 菌落生长 7 d 后, 在以牛肉浸膏为氮源的察氏琼脂培养基上 HZS-BT 菌落直径达到了(67.13±3.15)mm, 相对于其他氮源, HZS-BT 表现出更好的生长趋势,



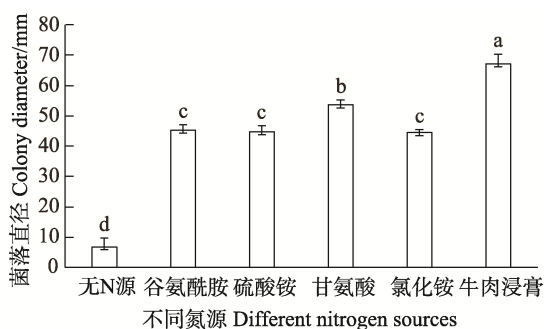
不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

图10 不同碳源下 HZS-BT 菌落直径

Fig. 10 Colony diameter of HZS-BT under different carbon sources

气生菌丝也较为密集；以甘氨酸、谷氨酰胺、硫酸铵、氯化铵作为氮源的察氏琼脂培养基上，HZS-BT 菌落直径分别为 (53.59 ± 1.58) 、 (45.32 ± 1.73) 、 (44.73 ± 2.04) 、 (44.44 ± 1.02) mm (图11)。



不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

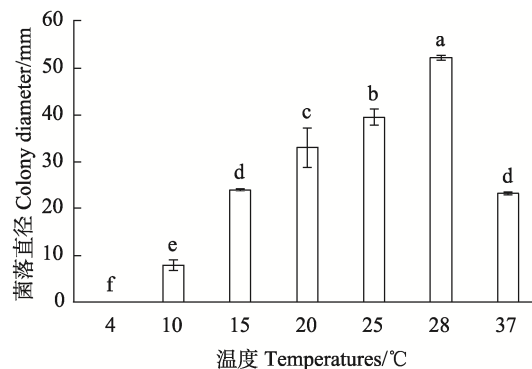
Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

图11 不同氮源下 HZS-BT 菌落直径

Fig. 11 Colony diameter of HZS-BT under different nitrogen sources

2.5.4 不同温度对 HZS-BT 的生长影响 在 4°C 条件下，菌株的生长机制受到抑制，菌落直径未出现增长，推测生长相关酶活性较低；在 37°C 条件下，菌落直径为 (22.75 ± 0.13) mm，显著低于在 28°C 条件下的菌落直径，因此，HZS-BT 的最适合生长温度为 28°C ，菌落直径为 (52.00 ± 0.5) mm，显著高于其他试验组 (图12)。

2.5.5 不同培养基对 HZS-BT 的生长影响 在所有供试的培养基中，PDA 为最适合 HZS-BT 生长的培养基，菌落直径为 (83.39 ± 0.02) mm，其他培养基中 HZS-BT 的生长情况见图13，HZS-BT 在 PDA 上产生大量粉红色孢子堆，且镜检发现大量分生孢子，而在 NYG 培养基上，HZS-BT 菌落直径相对较小，并且无大量粉红色孢子堆产生。

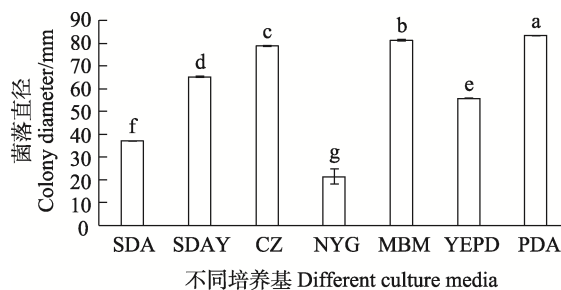


不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

图12 不同温度下 HZS-BT 菌落直径

Fig. 12 Colony diameter of HZS-BT under different temperatures



不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

图13 不同培养基上 HZS-BT 的菌落直径

Fig. 13 Colony diameter of HZS-BT on different culture media

2.6 抑菌谱测定

11 株生防菌均为芽孢杆菌属 (*Bacillus*)，生防菌对 HZS-BT、HZS-QH 和 HZS-CM 的抑菌谱测定和鉴定表明，对 3 株病原菌的拮抗效果均较显著，培养 7 d 后平均拮抗率均达 50% 以上 (表4)。在生防菌处理组中，病原菌生长缓慢，且可肉眼观察到生防菌与病原菌间产生明显拮抗带，而相比之下对照组中的病原菌处于正常生长状态。结果表明，11 株生防菌对 3 个参试炭疽菌均具有潜在的生物防治应用价值。11 株生防菌对 3 株病原菌的拮抗机制存在差异，针对 HZS-CM 的拮抗机制主要是分泌抗菌物质形成抑制带，生防菌 1 对 HZS-CM 的抑制带最宽、最清晰，表明 HZS-CM 对该生防菌产生的抗菌物质可能最为敏感。在生防菌株 PBST-9 与 HZS-CM 的拮抗生长中，可观察到 HZS-CM 的菌落形态发生变化，产生更多色素。生防菌 2N1 对 HZS-BT 的抑制率相对较低，且肉眼可见气生菌丝生长茂密，菌落边缘缓慢扩散，表明 HZS-BT 可能对生防菌 2N1 产生的几丁

表 4 生防菌平均抑菌率
Tab. 4 Average inhibition rate of biocontrol bacteria

生防菌 Biocontrol bacteria	平均抑菌率 Average inhibition rate/%		
	HZS-QH	HZS-BT	HZS-CM
CK	0	0	0
TH21	59.57 ^e	51.28 ^g	60.16 ^h
K13	73.77 ^d	64.30 ^f	71.99 ^f
Aghncj	77.32 ^c	59.37 ^g	74.16 ^e
Yg-1	79.49 ^c	69.92 ^e	74.85 ^e
2N1	83.04 ^b	71.70 ^e	80.67 ^d
30	86.59 ^a	78.21 ^d	71.89 ^f
1	84.91 ^b	86.29 ^b	83.93 ^c
PBST-9	84.42 ^b	70.02 ^e	68.05 ^g
10	82.94 ^b	82.84 ^c	73.37 ^e
13	83.93 ^b	90.43 ^a	87.67 ^b
大田芒果	73.57 ^d	81.85 ^c	91.12 ^a

注：不同小写字母表示差异显著（ $P<0.05$ ）。
Note: Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

质酶等水解酶具有耐受性,相比之下,生防菌 2N1 对 HZS-QH 抑菌效果较好。生防菌株 13 对 HZS-BT 的抑制率最高为 90.43% (表 4、图 14)。综上所述,在实际应用生物防治的时候,须针对田间流行的特定炭疽病病原菌株系,筛选和匹配最有效的生防菌,才能达到最佳防治效果。

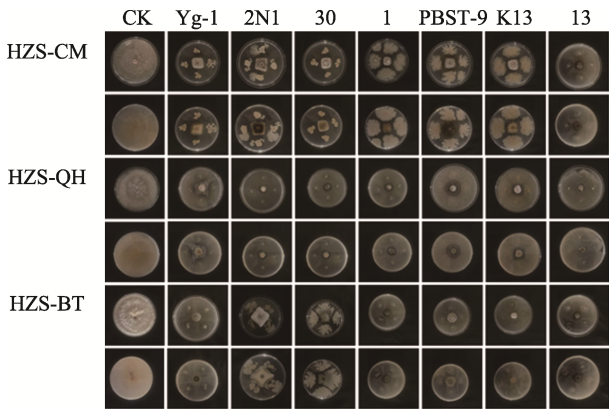


图 14 部分生防菌对 3 个参试炭疽菌的拮抗作用
Fig. 14 Antagonistic effect of some biocontrol bacteria against three tested pathogenic strains

3 讨论

与以往侧重于记录发病率和病情指数的病害流行调查相比,本次海南省橡胶树炭疽病病情调查将重点放在病原种类的田间识别与分布规律上,直接将田间现象与病原学基础联系起来,研究层次更深;以往的调查结论更偏向于全省统一

的防控建议,本次调查则明确了病原菌的地理分布差异,这对于提高防控效率、减少农药滥用具有重要意义。目前橡胶树主要的栽培品种有 PM600、热研 73397 等^[19], 尚未发现对炭疽病抗性良好的品种^[20], 因此培育橡胶树抗炭疽病品种仍是橡胶树炭疽病防控的紧迫任务, 当前防控手段仍以化学防治为主,生物防治和农业防治为辅,做好田间和栽培管理仍为预防橡胶树炭疽病爆发的有效措施。李裴春^[21]研究表明, 湛试 477-6、湛试 366-2、湛试 485-114、RO42 和湛试 41-3 是近期筛选出对炭疽病有潜在良好抗性的橡胶树品系。本研究采用多个核心基因系统发育分析, 并采用陈清沁等^[3]设计的 *C. siamense* 和 *C. fructicola* 特异性引物作为双重验证, 提升了结果的精准度和方法的实用性, 为田间快速检测提供新方案。相比于传统的形态学鉴定与单基因鉴定, 通过构建系统发育树和电泳检测鉴定病原菌的方法更为精准。该方法也为难以通过病叶表型、发病症状和病原菌子实体显微结构区分 *C. siamense* 和 *C. fructicola* 的问题提供了新的解决方案。

对于生物学特性的探究, 本研究对病原菌 HZS-BT 进行了多因子测试, 研究结果表明该病原菌具有强大的环境适应能力。本研究结果与褚凌龙等^[17]研究结果一致, HZS-BT 最适生长的培养基、碳源和氮源分别为马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA)、山梨醇和牛肉浸膏, 最适 pH 为 8.0。相比于无碳源的情况下, 在含有大量碳源的 PDA 培养基上, 炭疽菌表现出较高的生长速率并伴随着大量菌丝和孢子产生, 这表明碳源是促进炭疽菌生长发育的限制因子之一, 因此含碳量大的植物组织是炭疽菌定殖和繁衍的优势场所。未来将对炭疽菌利用和吸收碳源的机制和途径展开研究。此外, 炭疽菌的最适温度为 28 ℃。28 ℃为海南省的常态化温度, 因此海南省橡胶树易被炭疽菌侵入, 导致寄主发病。炭疽菌在 pH 为中性及偏碱性的条件下生长较快, 可推测在橡胶树栽培管理中, 栽培介质和肥料的 pH 为中性及偏碱性时, 易导致炭疽病的发生。本研究针对一株炭疽病病原菌进行生物学特性探究, 存在一定的局限性, 后续将对多种炭疽病病原菌的生物学特性展开研究。

本研究测试的生防菌对橡胶树炭疽病病原菌有着良好的拮抗活性, 并初步证实这些生防菌株具有良好的开发应用前景, 未来可对这些生防菌

株的生理生化指标、与炭疽菌互作的效果进行评价,以及对生防机理和田间防治效果等展开研究。

参考文献

- [1] 郑肖兰, 席琼琼, 梁艳琼, 吴伟怀, 习金根, 郑金龙, 李锐, 李秋洁, 贺春萍, 易克贤. 橡胶炭疽菌与寄生叶片互作的超微结构研究[C]//中国植物病理学会. 中国植物病理学会 2015 年学术年会论文集, 2015: 124.
ZHENG X L, XI Q Q, LIANG Y Q, WU W H, XI J G, ZHENG J L, LI R, LI Q J, HE C P, YI K X. Ultrastructural study on the interaction between rubber anthrax and parasitic leaves[C]//Chinese Society for Plant Pathology. Proceedings of the 2015 Annual Meeting of the Chinese Society of Plant Pathology, 2015: 124, (in Chinese)
- [2] 林春花, 张宇, 刘文波, 李潇, 缪卫国. 我国巴西橡胶树炭疽病的研究进展[J]. 热带生物学报, 2021, 12(3): 393-402, 268.
LIN C H, ZHANG Y, LIU W B, LI X, MIAO W G. Research progress of anthracnose in Brazilian rubber trees in our country[J]. Journal of Tropical Biology, 2021, 12(3): 393-402, 268. (in Chinese)
- [3] 陈清沁, 吴业豪, 王子睿, 臧毅宁, 林春花, 缪卫国, 李志刚. 橡胶树炭疽菌 *Colletotrichum siamense* 和 *C. fructicola* 双重 PCR 检测体系的建立[J/OL]. 植物病理学报, 1-10. (2025-03-14)[2025-08-08]. <https://doi.org/10.13926/j.cnki.apps.001688>.
CHEN Q Q, WU Y H, WANG Z R, ZANG Y N, LIN C H, MIAO W G, LI Z G. Establishment of duplex PCR detection system for *Colletotrichum siamense* and *C. fructicola* causing anthracnose on rubber tree[J/OL]. Acta Phytopathologica Sinica, 1-10. (2025-03-14)[2025-08-08]. <https://doi.org/10.13926/j.cnki.apps.001688>. (in Chinese)
- [4] 侯会霞, 郑肖兰, 易克贤, 习金根, 李慧, 吴伟怀, 陈河龙. 2 株有效抑制剑麻斑马纹病菌的生防细菌鉴定[J]. 热带作物学报, 2024, 45(1): 205-214.
HOU H X, ZHENG X L, YI K X, XI J G, LI H, WU W H, CHEN H L. Identification of two biocontrol bacteria effectively inhibiting Sisal Zebra disease[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2024, 45(1): 205-214. (in Chinese)
- [5] 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 β -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 β -TUB2 of HCKHNQZ1736 of rubber tree to carbendazim[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2021, 42(8): 2334-2341. (in Chinese)
- [6] 张新怡, 李雪, 高兆银. 热带亚热带水果胶孢炭疽菌对多菌灵的抗药性测定[J]. 热带农业科学, 2014, 34(11): 71-74.
ZHANG X Y, LI X, GAO Z Y. Carbendazim resistance of *Colletotrichum gloeosporioides* on tropical and subtropical fruits[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2014, 34(11): 71-74. (in Chinese)
- [7] 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, 29(1): 73-77.
YANG Y, HE S H, ZHANG S J, HU M J. Determination of resistance to carbendazim in *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. on Hainan mangoes[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2008, 29(1): 73-77. (in Chinese)
- [8] 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)
- [9] 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)
- [10] 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)
- [11] 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[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2016, 37(5): 943-951. (in Chinese)
- [12] 郑肖兰, 许沛冬, 李秋洁, 吴伟怀, 郑金龙, 习金根, 梁艳琼, 张驰成, 唐文, 贺春萍, 易克贤. 三种常用杀菌剂对 12 种橡胶炭疽菌的毒力测定[C]//中国植物保护

- 学会. 病虫害绿色防控与农产品质量安全—中国植物保护学会 2015 年学术年会论文集, 2015: 675.
- ZHENG X L, XU P D, LI Q J, WU W H, ZHENG J L, XI J G, LAING Y Q, ZHANG C C, TANG W, HE C P, YI K X. Determination of the virulence of three commonly used fungicides against 12 species of rubber anthracnose[C]//Chinese Society for Plant Protection. Green Prevention and Control of Pests and Diseases and Quality Safety of Agricultural Products: Proceedings of the 2015 Annual Conference of the Chinese Society for Plant Protection, 2015: 675. (in Chinese)
- [13] 郑肖兰, 郑服丛, 吴伟怀, 李锐, 陈瑜, 贺春萍. 橡胶炭疽病菌菌丝生长和孢子萌发与碳、氮源关系的研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(11): 5711-5715, 5793.
- ZHENG X L, ZHENG F C, WU W H, LI R, CHEN Y, HE C P. Study on the relationship between hyphal growth and spore germination and carbon and nitrogen sources of rubber anthrax[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(11): 5711-5715, 5793. (in Chinese)
- [14] 郑肖兰, 贺春萍, 高亚男, 张广宁, 习金根, 郑金龙, 梁艳琼, 李锐, 吴伟怀, 易克贤. 咖啡炭疽病菌生物学特性及其毒力测定[J]. 热带农业科学, 2015, 35(12): 94-98, 102.
- ZHENG X L, HE C P, GAO Y N, ZHAQNG G N, XI J G, ZHENG J L, LIANG Y Q, LI R, WU W H, YI K X. Biological characteristics and toxicity determination of the *Colletotrichum gloeosporioides* penz from *Coffee arabica* Linn.[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2015, 35(12): 94-98, 102. (in Chinese)
- [15] 郑肖兰, 吴伟怀, 李锐, 刘笔灿, 贺春萍. 琼中绿橙炭疽病病原菌基础生物学特性研究[J]. 南方农业学报, 2011, 42(1): 54-57.
- ZHENG X L, WU W H, LI R, LIU B C, HE C P. The biological characteristics of pathogens causing anthracnose disease of Qiongzong green orange[J]. Journal of Southern Agriculture, 2011, 42(1): 54-57. (in Chinese)
- [16] 郑肖兰, 冯辉, 贺春萍, 李锐, 郑服丛. 胡椒炭疽菌的生物学特性研究[J]. 广西农业科学, 2009, 40(9): 1156-1159.
- ZHENG X L, FENG H, HE C P, LI R, ZHENG F C. Biological characteristic of *Colletotrichum piperatum*, isolated from different pepper plantations[J]. Journal of Southern Agriculture, 2009, 40(9): 1156-1159. (in Chinese)
- [17] 褚凌龙, 娄嘉雯, 刘文波, 靳鹏飞, 缪卫国. 橡胶树炭疽病菌 HD-1 的鉴定及拮抗药剂筛选[J]. 生物学杂志, 2023, 40(6): 32-38.
- CHU L L, LOU J W, LIU W B, JIN P F, MIAO W G. Identification of HD-1 and screening of antagonists in rubber tree anthracnose[J]. Journal of Biology, 2023, 40(6): 32-38. (in Chinese)
- [18] 翟纯鑫, 梁艳琼, 谭施北, 吴伟怀, 习金根, 李锐, 郑金龙, 黄兴, 陆英, 贺春萍, 易克贤. 橡胶炭疽病菌生防菌分离鉴定及生防作用研究[C]//中国植物病理学会. 中国植物病理学会 2019 年学术年会论文集, 2019: 502.
- ZHAI C X, LIANG Y Q, TAN S B, WU W H, XI J G, LI R, ZHENG J L, HUANG X, LU Y, HE C P, YI K X. Isolation and identification of biocontrol bacteria and biocontrol effect of rubber anthracnose bacteria[C]//Chinese Society of Plant Pathology. Proceedings of the 2019 Annual Meeting of the Chinese Society of Plant Pathology, 2019: 502. (in Chinese)
- [19] 郑肖兰, 刘先宝, 郑行恺, 李博勋, 时涛, 冯艳丽, 黄贵修. 海南橡胶树炭疽病调查及喀斯特炭疽病菌的鉴定[J]. 热带作物学报, 2023, 44(12): 2546-2557.
- ZHENG X L, LIU X B, ZHENG X K, LI B X, SHI T, FENG Y L, HUANG G X. Investigation of *Colletotrichum* sp. and identification of *C. karstii* of rubber trees in Hainan[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2023, 44(12): 2546-2557. (in Chinese)
- [20] 李博勋, 刘先宝, 陈丽琼, 时涛, 许力丹, 李超萍, 黄贵修. 橡胶树主要病害研究现状与展望[J]. 中国科学: 生命科学, 2024, 54(10): 1798-1813.
- LI B X, LIU X B, CHEN L Q, SHI T, XU L D, LI C P, HUANG G X. Current status and prospects of research on main diseases of rubber trees[J]. Scientia Sinica (Vita), 2024, 54(10): 1798-1813. (in Chinese)
- [21] 李裴春. 橡胶树抗炭疽病种质资源筛选及抗病机制初探[D]. 海口: 海南大学, 2023.
- LI P C. Screening of rubber tree germplasm resources for resistance to anthracnose and preliminary investigation of disease resistance mechanism[D]. Haikou: Hainan University, 2023. (in Chinese)