

长叶轮钟草根腐病病原菌的分离鉴定及 4 种芳香中药植物挥发油对其病原菌的抑制作用

李映涛¹, 苟珈棋², 李桥峰², 李园园², 秦苗², 普春霞^{1*}, 张赵丽^{1*}

1 云南中医药大学, 云南省南药可持续利用研究重点实验室, 云南 昆明 650500

2 云南中医药大学 中药学院, 云南 昆明 650500

李映涛, 苟珈棋, 李桥峰, 李园园, 秦苗, 普春霞, 张赵丽. 长叶轮钟草根腐病病原菌的分离鉴定及 4 种芳香中药植物挥发油对其病原菌的抑制作用[J]. 微生物学报, 2025, 65(1): 303-322.

LI Yingtao, GOU Jiaqi, LI Qiaofeng, LI Yuanyuan, QIN Miao, PU Chunxia, ZHANG Aili. Isolation and identification of pathogens causing root rot in *Campanumoea lancifolia* and inhibitory effects of essential oils from four aromatic medicinal plants on the pathogenic fungi[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(1): 303-322.

摘要: 长叶轮钟草[*Campanumoea lancifolia* (Roxb.) Merr.]是一种具有药食两用价值的新资源, 开发利用前景广阔。田间调研发现, 随着其种植面积的扩大, 根腐病问题日益严重, 在根腐病严重的田间, 损失可高达 40%, 占长叶轮钟草所有病害造成损失的 75%–90%, 直接导致了果实产量及品质的下降, 影响了商品价值及农户的收入, 开展长叶轮钟草根腐病的防治工作迫在眉睫。

【目的】分离和鉴定长叶轮钟草根腐病病原菌, 同时提取 4 种芳香中药植物的挥发油, 研究其对长叶轮钟草病原菌生长的抑制作用。**【方法】**采用常规组织分离法对典型根腐病症状的长叶轮钟草病害植株进行病原菌的分离纯化, 结合形态学和分子生物学手段鉴定病原菌种类, 并进行科赫氏法则验证。采用水蒸气蒸馏法从芳香中药植物中提取挥发油, 通过牛津杯法评估挥发油的抑菌效果, 并通过 96 孔板法研究了其最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentrations, MICs)。**【结果】**从患病的长叶轮钟草植株根系中分离并鉴定到 4 株病原菌, 将分离得到的 4 株病原菌回接后, 植物出现了与大田一致的根腐病症状。经形态学和分子生物学鉴定, 4 株菌分别为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、茄腐镰刀菌(*Fusarium solani*)、麦冬炭疽菌(*Colletotrichum liriopes*)和蔓枯病菌(*Stagonosporopsis pogostemonis*)。挥发油抑菌实验发现, 4 种挥发油对尖孢镰刀菌、茄腐镰刀菌、蔓枯病原菌和麦冬炭疽菌均有很强的抑制效果, 抑制率在 32.94%–95.29%之间。此外, 4 种

资助项目: 国家自然科学基金(32260102); 云南省应用基础研究项目(202201AT070218); 云南省基础研究计划中医联合专项(202301AZ070001-005, 202101AZ070001-230)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32260102), the Yunnan Provincial Applied Basic Research Project (202201AT070218), the Yunnan Provincial Basic Research Program-Traditional Chinese Medicine Joint Project (202301AZ070001-005, 202101AZ070001-230).

*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Aili, zhangailibb@126.com; PU Chunxia, puchunxia@ynucm.edu.cn

Received: 2024-07-03; Accepted: 2024-11-06; Published online: 2024-11-07

挥发油对 4 株病原菌 MICs 在 0.031–4.000 mg/mL 之间。【结论】本研究表明，尖孢镰刀菌、茄腐镰刀菌、蔓枯病原菌和麦冬炭疽菌均为长叶轮钟草的致病菌，且茄腐镰刀菌、蔓枯病原菌和麦冬炭疽菌为首次报道的长叶轮钟草根腐病病原菌。此外，基于中医“芳香避秽”的思想理论，本研究选取的 4 种芳香植物的挥发油对长叶轮钟草的根腐病病原菌均有较强的抑制作用。本研究为长叶轮钟草根腐病植物源农药的开发和未来该资源的绿色种植奠定了科学基础。

关键词：长叶轮钟草；根腐病；尖孢镰刀菌；茄腐镰刀菌；麦冬炭疽菌；蔓枯病原菌；挥发油

Isolation and identification of pathogens causing root rot in *Campanumoea lancifolia* and inhibitory effects of essential oils from four aromatic medicinal plants on the pathogenic fungi

LI Yingtao¹, GOU Jiaqi², LI Qiaofeng², LI Yuanyuan², QIN Miao², PU Chunxia^{1*}, ZHANG Aili^{1*}

¹ Key Laboratory of Sustainable Utilization of Southern Medicinal Resources in Yunnan Province, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, Yunnan, China

² School of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, Yunnan, China

Abstract: *Campanumoea lancifolia* (Roxb.) Merr. is a new plant species with both medicinal and edible values, demonstrating broad prospects for development and utilization. However, as its cultivation area expands, root rot has become increasingly severe. In the fields with severe root rot, the losses can reach up to 40%, accounting for 75% to 90% of the losses caused by all diseases affecting *C. lancifolia*. Root rot directly leads to declines in fruit yield and quality, affecting the commercial value of the fruits and reducing farmers' incomes. Thus, it is urgent to address the root rot in *C. lancifolia*. **[Objective]** To isolate and identify the pathogens causing root rot in *C. lancifolia* and investigate the inhibitory effects of essential oils extracted from four aromatic medicinal plants on the growth of these pathogens. **[Methods]** Pathogens were isolated from *C. lancifolia* plants displaying typical root rot symptoms by the tissue culture method. The pathogens were identified based on morphological and molecular evidence and verified according to Koch's postulates. Essential oils were extracted from four aromatic medicinal plants by steam distillation. The Oxford cup method was employed to examine the inhibitory effects of the essential oils on the pathogens, and the 96-well plate method was used to determine the minimum inhibitory concentrations (MICs) of the essential oils. **[Results]** Four pathogenic strains were isolated and identified from the roots of diseased *C. lancifolia* plants. Re-inoculation of these pathogens induced root rot symptoms consistent with those observed in the field. The pathogens were identified as *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum liriopes*, and *Stagonosporopsis pogostemonis*. The essential oils exhibited strong inhibitory effects on these pathogens, with inhibition rates ranging from 32.94% to

95.29%. Additionally, the MICs of the four essential oils against the pathogens ranged from 0.031 mg/mL to 4.000 mg/mL. **[Conclusion]** This study demonstrates that *F. oxysporum*, *F. solani*, *C. liriopes*, and *S. pogostemonis* are pathogenic to *C. lancifolia*. This is the first report of *F. solani*, *C. liriopes*, and *S. pogostemonis* causing root rot in *C. lancifolia*. Furthermore, the essential oils extracted from the selected four aromatic plants exhibited strong inhibitory effects on the pathogens causing root rot in *C. lancifolia*, which coincides with the theory of aromatic plants dispelling pathogens in traditional Chinese medicine. The findings lay a scientific foundation for the development of botanical pesticides against root rot in *C. lancifolia* and the eco-friendly cultivation of this plant.

Keywords: *Campanumoea lancifolia*; root rot; *Fusarium oxysporum*; *Fusarium solani*; *Colletotrichum liriopes*; *Stagonosporopsis pogostemonis*; essential oils

长叶轮钟草[*Campanumoea lancifolia* (Roxb.) Merr.]系桔梗科金钱豹属植物, 分布于我国云南(东南部)、四川、贵州、湖北西部、湖南、广西、广东、福建、台湾等地山区, 喜生长于海拔 1 500 m 以下的林木、灌丛及沟谷中^[1-2]。其果实算盘状, 又形如“蜘蛛”, 名红果参、蜘蛛果、算盘果、肉算盘、山葶芥等^[3]。长叶轮钟草茎叶及根均可入药, 具有润肺止咳、理气补虚、祛瘀止痛等功效, 用于治疗跌打损伤、气虚乏力、肠绞痛、肺癆咳嗽、疝气等病症^[4], 研究表明, 长叶轮钟草主含黄酮类^[5]、生物碱类^[6]、挥发油类^[7]、多糖类^[8]和花青素^[9]等多种化学成分^[10], 具有抗氧化^[11-14], 防治神经病变、冠心病, 延缓衰老、抗癌、抗病毒等作用^[15-18]。除了药用, 民间老百姓常采集其成熟果实作为水果食用, 其果肉紫红、香脆、汁多、无渣, 味道鲜美。由此可见, 长叶轮钟草是一种集药用、食用和保健功能于一身的特色药食两用新资源, 现已开发了红果参酒、茶叶、饼干等保健食品^[19], 开发利用前景十分广阔。

目前长叶轮钟草在云南丽江、施甸、文山^[20]等多地种植, 仅 2023 年, 云南省文山壮族苗族自治州马关县种植红果参就达 547 hm², 预

计可实现产值 3 亿元^[21]。通过田间调研发现, 随着种植面积不断扩大, 长叶轮钟草根腐病也日益严重, 发病严重时损失高达 40%, 占长叶轮钟草各种病害的 75%–90%, 已成为影响长叶轮钟草果实产量、品质及商品价值的严重病害之一, 直接导致农户的减收。土传病害最有效的防治方法是轮作和化学防治法, 但是轮作会涉及土地的大面积使用; 而化学防治法会造成环境污染、农药残留等问题, 危害人体健康。中医就有“芳香避秽”的思想理论^[22], 芳香中药自古就被认为具有“辟秽”“除恶”作用。医学上, 将芳香辟秽理论应用在病原微生物的防治中已历史悠久。中药中的“芳香”主要由挥发油发挥作用, 其不仅有药用功效, 还具有杀虫、驱虫、抗菌的特性。因挥发油具有不易产生抗性、低残留、易降解等特点^[23], 现已成为了最重要的植物源抗菌资源之一。目前发现的具有植物病原菌抗菌活性的挥发油大部分集中在菊科、唇形科和木兰科等植物中, 相关研究也最为广泛和成熟。鉴于此, 基于课题组长期对唇形科植物的研究基础, 我们筛选了唇形科常见的 4 种中药(牛至、石香薷、野草香和勐腊毛麝香), 开展挥发油的分离提取和成分鉴定, 并通过体外

的抑菌试验和测定最小抑菌浓度验证这 4 种中药材挥发油的抑菌作用和抗菌能力, 为开发和应用新型高活性的挥发油植物源农药提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 长叶轮钟草材料

2023 年, 在云南省文山市马关县长叶轮钟草种植基地采样。样本显示以下典型特征: 植株高约 60–90 cm, 茎直立且有分枝, 叶形为狭长披针形, 边缘有细锯齿。花序为总状花序, 花冠呈漏斗形。经云南中医药大学黄衡宇教授鉴定, 确认为长叶轮钟草 [*Campanumoea lancifolia* (Roxb.) Merr.]。采集具有典型根腐病症状的病株, 包括根部腐烂、变色和组织坏死, 带回实验室立即分离。用于接种病原菌的长叶轮钟草无菌组培苗由云南中医药大学黄衡宇教授提供。

1.1.2 挥发油原材料

牛至原材料产地为云南省香格里拉市虎跳峡镇, 被云南中医药大学普春霞副教授鉴定为唇形科牛至 (*Origanum vulgare* Linn.), 具有卵形或椭圆形叶片, 边缘有锯齿, 紫红色小花成伞形花序, 茎四棱形且有细毛, 且散发浓郁的芳香气味。石香薷原材料产地为江西省赣州市兴国县, 经普春霞副教授鉴定为唇形科石芥苻属石香薷 (*Mosla chinensis* Maxim.), 其特征包括狭长披针形叶片, 白色或淡紫色小花成轮伞花序, 直立茎上有细毛, 带有淡淡的辛香味。野草香原材料产地为云南省昭通市鲁甸, 经普春霞副教授鉴定为唇形科香薷属野草香 [*Elsholtzia cyprianii* (Pavolini) S. Chow ex P. S. Hsu], 其特征为狭披针形或线状披针形叶片, 紫红色小花成轮伞花序, 茎直立且有细毛, 具有强烈的香味。勐腊毛麝香原材料产地为云南省西双版纳傣族自治

州勐腊县勐仑镇, 经普春霞副教授鉴定为勐腊毛麝香 (*Adenosma buchneroides* Bonati), 其叶片为卵形或披针形, 淡紫色小花呈总状花序, 茎直立且有细毛, 散发强烈的麝香味。

1.1.3 主要试剂和仪器

丙酮, 云南杨林工业开发区汕滇药业有限公司; 环己烷和无水硫酸钠, 天津市致远化学试剂有限公司; 无水乙醇, 天津市优谱化学试剂有限公司; 正己烷, 天津市风船化学试剂科技有限公司; 马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA), 北京索莱宝科技有限公司。

超纯水机, 南北仪器有限公司; 电子分析天平, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 电子调温电热套, 北京科伟永兴仪器有限公司; 挥发油提取器, 云南飞鸣经贸有限公司; 气相色谱-质谱联用仪, 安捷伦科技有限公司; 旋转蒸发器, 上海爱朗仪器有限公司。

1.2 病原菌分离纯化

采用常规组织分离法对病原菌进行分离^[24], 先用自来水冲洗以去除植物表面泥土, 然后加无菌水没过样品, 超声处理 5–10 min (整个过程保证无菌水澄清透明), 最后再用无菌水彻底清洗表面, 洗净的样品放入含滤纸的无菌培养皿中干燥。之后置于 75% 乙醇中消毒 45 s, 然后于 1% NaClO 溶液中消毒 1 min, 用灭菌水漂洗 3 次后将组织放在灭菌的滤纸片上晾干水分, 在病根的病健交界处切取 5 mm×5 mm 的组织, 转移到 PDA 平板上, 每皿放 4 块组织, 置于 25 °C 黑暗恒温培养, 待 3–4 d 长出菌落后, 挑取菌丝进行纯化, 多次纯化直至菌落形态一致, 最后将菌落转接到 PDA 培养基上, 4 °C 保存备用。

1.3 病原菌形态学鉴定

将分离到的菌株接种到 PDA 平板上, 25 °C 恒温黑暗培养 3 d 时测量菌落直径, 每天观察

并拍照记录菌丝形状、菌落特征等。显微镜观察和测量分生孢子形态和大小,对病原菌的初步鉴定参照 Váradi 等^[25]的方法进行。

1.4 DNA 提取及分子鉴定

将菌株接种于 PDA 平板中央, 25 °C 黑暗培养 4 d 后, 收集菌丝于 1.5 mL 的无菌管中, 采用真菌提取试剂盒进行病原菌 DNA 提取。利用真菌内转录间隔 ITS I 区和 ITS II 区的通用引物 ITS 1 (5'-TCCGTAG-GTGAACCTGCGG-3') 和 ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATT-GATATGC-3'), 对菌丝基因组 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μ L): Premix Taq 扩增酶(TaKaRa 公司) 45 μ L, 正、反向引物(10 μ mol/L)各 2 μ L, DNA 模板 1 μ L。PCR 反应条件: 98 °C 预变性 2 min; 98 °C 变性 10 s, 56 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸(根据片段长度设定延伸时间为 10 s/kb), 共 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经过凝胶电泳检测后, 委托擎科生物(上海)科技有限公司进行测序, 将测序后的核苷酸序列经组装拼接后使用 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 进行序列比对, 并依据菌株内部转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS) 基因序列, 采用 MEGA 11.0 中的邻接法(neighbor-joining method) 构建系统发育树^[26]。系统发育树的构建基于从 NCBI GenBank 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 下载的基因序列。

1.5 盆栽试验致病性检测

菌丝长势相同的分离菌株菌盘, 接入 LB 液体培养基中进行产孢培养, 25 °C、200 r/min 培养 5 d, 使用 4 层无菌纱布过滤 2 次除去杂质和菌丝, 滤液 4 °C、10 000 r/min 离心 3 min 后获得孢子悬浮液。采用离体接种和活体接种方式进行致病性检测。

采用离体接种法评价病原菌对长叶轮钟草叶片的影响。从组培苗中收集大小相似叶片,

将叶子的叶柄插在培养皿中, 在每个叶的中间部分用针刺法注入 5 μ L 1×10^6 CFU/mL 分生孢子悬浮液, 对照组接入等量无菌水, 每个处理 6 个重复, 保持培养皿在 22 °C 的光照培养箱中生长, 16 h 和 8 h 的光周期感染 72 h。

进行活体接种时, 采取浸孢子液的方法进行致病性检测。将健康根茎表皮用无菌接种针刺伤, 浸入 10^7 CFU/mL 的孢子悬浮液 0.5–1 h, 以浸无菌水为对照, 接种后转移至盛满灭菌土的小钵钵中。每个处理 6 个重复, 置于温度 25 °C、相对湿度 75% 和 12 h 光照/12 h 黑暗条件下培养。培养期间, 观察盆栽中长叶轮钟草的生长状况, 待植株萎蔫后挖出长叶轮钟草根, 观察其是否烂根。烂根后从病健交界处再次进行病原菌分离与鉴定。试验重复 3 次。评估相对病情指数, 病情指数从 0–10 表示依次增加。

1.6 挥发油抑菌盆栽试验

将 6 种挥发油溶解于 Hoagland 营养液中, 配制成最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentrations, MICs), 通过向无菌土壤中添加不同的挥发油(essential oils, EOs), 获得含有精油的土壤。无菌土壤由蛭石和自然土灭菌后组成(蛭石的质量分数为 33.3%, 自然土的质量分数为 66.7%)。然后, 将土壤在机械搅拌后密封, 放置在阴凉处 5 d, 使其充分混合。在这个熏蒸过程之后, 将 250 g 处理过的土壤分别移入每个花盆中。每个花盆中种植 1 株长叶轮钟草幼苗, 这些幼苗的根部已在浓度为 1×10^6 CFU/mL 的 4 种混合孢子悬液中浸泡 3 h。将幼苗种植在不含精油的无菌土壤中的组作为阳性对照组 CK; 而用恶霉灵处理的组为阴性对照组。实验进行了 3 次重复。在培养 21 d 后, 当阳性对照组的幼苗表现出明显病状时, 评估相对病情指数, 病情指数采用公式(1)进行计算, 0–10 代表病情指数依次增加。

$$DI=(d_1/t_1)\times 100\% \quad (1)$$

式中: DI 为浸染率, d_1 为坏死长度, t_1 为根总长。

1.7 生长速率及孢子显微测定

取在 PDA 培养基培养 4 d 的 4 株病原菌, 用直径 5 mm 的打孔器沿菌落边缘打取生长一致的菌丝块, 接种于新的 PDA 培养基中央, 放置于 28 °C 培养箱恒温培养, 每个处理设 5 个重复。采用“十”字交叉法, 每 24 h 测量 1 次菌落直径。取培养 7 d 的菌盘, 使用 5 mL 医用无菌注射器分多次加入 30 mL 无菌水冲洗菌盘, 再用 4 层纱布过滤, 10 000 r/min 离心 3 min 后获得孢子提取液。

1.8 挥发油的提取方法和成分测定

对石香薷、野草香、牛至、勐腊毛麝香分别进行挥发油的提取。分别取样品 500 g, 按照刘婷等^[27]的方法利用水蒸气蒸馏法提取挥发油, 提取时间为 6 h, 重复 3 次。收集挥发油, 用无水硫酸钠干燥, 环己烷萃取, 得到挥发油提取物, 置于棕色玻璃瓶中 4 °C 保存。利用 GC-MS 法分析检测其挥发油主要成分及含量。GC 条件, 色谱柱: Agilent (安捷伦科技有限公司), HP-5 (5% Phenyl Methyl Siloxan, 50 m×0.32 mm×0.52 μm); 进样口温度 250 °C, 检测器(氢火焰离子检测器, FID)温度 250 °C; 柱箱升温程序: 50 °C 升到 250 °C, 每分钟升 5 °C; 进样量 1 μL; 分流比 20:1; 进样口压力 102.28 kPa; 体积流量 2.1 mL/min; 载气: 高纯度 He。MS 条件: 电子轰击离子源(electron impact ionization source, EI), 电子能量 70 eV, 扫描范围 50–550 m/z; 离子源温度 230 °C; 四极杆温度 150 °C。溶剂延迟时间设置为 6 min。定量方法: 手动积分, 相对峰面积归一化法; 谱库 NIST 20。

1.9 挥发油的牛津杯抑菌试验

将挥发油、恶霉灵溶于 10/1 000 DMSO 和 1/1 000 吐温-80 (1-DMSO-T) 混悬液中, 之后, 挥发油和恶霉灵混悬液用 0.22 μL 的有机滤头

进行过滤, 得到无菌滤液。在无菌操作条件下, 将高压蒸气灭菌后的 PDA 培养基, 每个培养皿倒 20 mL 培养基冷却。用 5 mm 打孔器取生命力旺盛的菌丝块, 放入已冷却的培养皿的正中央, 将 4 个牛津杯等距离(25 mm)放在菌丝块四周。分别吸取过滤的 200 μL 挥发油或恶霉灵混悬液, 注入牛津杯中的挥发油样品和恶霉灵浓度均为 50 mg/mL, 以 1-DMSO-T 混悬液为阴性对照, 以恶霉灵混悬液为阳性对照。每个处理设 5 个重复, 于 28 °C 微生物培养箱恒温培养, 用直尺测量菌落直径计算抑制率来衡量不同挥发油溶液对长叶轮钟草根腐病菌落生长的影响。计算公式如公式(2)所示。

$$GI=(d_n-d_1/d_n)\times 100\% \quad (2)$$

式中: GI 菌落生长抑制率, d_n 为阴性对照菌落直径, d_1 为处理样品菌落直径。

1.10 挥发油的最小抑菌浓度(MICs)

用注射器吸取 1/4 PDB 液体培养基冲洗长满菌落的培养基, 得到孢子悬浮液调整浓度为 1.0×10^6 CFU/mL。将挥发油和恶霉灵用 20/1 000 DMSO 和 1/1 000 吐温-80 (2-DMSO-T) 混悬液溶解后过滤, 得到无菌滤液。滤液均采用二倍稀释法进行稀释, 得到 10 个浓度梯度。挥发油的初始浓度为 8 mg/mL, 恶霉灵的初始浓度为 8 mg/mL。在 96 孔板中, 以 150 μL 的 1/4 PDB 和 50 μL 的 2-DMSO-T 混合液作为空白对照, 150 μL 真菌悬浮液和 50 μL 的 2-DMSO-T 作为阴性对照, 阳性对照仅含 150 μL 真菌悬浮液, 在 28 °C 微生物培养箱中恒温培养 36 h。采用酶标仪在吸光度为 595 nm 处测定每个孔的吸光度, 当吸光度小于 0.1 视为真菌不生长, 此时对应的浓度即为挥发油最小抑菌浓度。每个浓度设置 8 个重复。

1.11 数据处理及统计

试验数据用 SPSS 19.0 软件和 Microsoft

Excel 进行处理、统计分析和显著性水平检验, 结果表示为 3 个重复数据的“平均值±均值标准误”。

2 结果与分析

2.1 病害田间症状

根腐病在长叶轮钟草整个生长期均可以发生, 田间 5 月初开始发病, 8 月是发病盛期。苗期发病植株地上部分长势衰弱, 叶色淡绿, 甚至矮小发黄(图 1B), 严重时整株叶片枯死、脱落。成株期发病植株地上部失绿萎蔫, 并随着时间的推迟自下而上枯死(图 1C)。病根受害部位出现深褐色、不规则形病斑, 表皮粗糙, 发褐, 产生根皮与髓部分离; 发病特别严重的整个根全部变褐色和黑色, 腐烂(图 1D)。有时根腐病部位着生着白色菌丝体, 植株受害地上部的叶片常出现枯萎, 甚至枯死(图 1E)。

2.2 菌落形态与孢子特征

通过真菌分离纯化获得 4 种菌落形态不同

的菌株, 分别命名为 CF-5、CF-14、CF-16、CF-19。各菌株之间在菌落生长速度、颜色和分生孢子形态方面具有较大的差异, 可分为以下 4 类。

第 1 类为 CF-5, 其菌丝白色疏松, 菌落低平, 呈放射状分布(图 2A), 背面呈奶油色(图 2B)。分生孢子梗产生分生孢子, 小型分生孢子无隔或 1 隔, 椭圆形; 大型分生孢子镰刀形或纺锤形, 3-5 隔; 厚垣孢子壁厚, 表面光滑, 球形(图 2C、2D)。形态学结果表明 CF-5 为茄腐镰刀菌(*Fusarium solani*)。

第 2 类为 CF-14, 在 PDA 培养基培养 4 d 后菌丝白色或淡紫色絮状, 菌落凸起, 基质不变色(图 2E), 菌落背面有淡紫色圈(图 2F)。分生孢子梗产生分生孢子, 其中小型分生孢子无隔或 1 隔, 肾形; 大型分生孢子镰刀形, 通常 3 隔(图 2H); 厚垣孢子近球形, 表面光滑, 壁厚。根据形态学特征初步鉴定为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)。



图 1 长叶轮钟草根腐病田间发病症状。A: 健康植株; B、C: 病害植株地上部分; D、E: 病害植株病根。比例尺: 1 cm。

Figure 1 Symptoms of *Campanumoea lancifolia* (Roxb.) Merr. root rot in the field. A: Healthy plants; B, C: Overground parts of diseased plants; D, E: Roots of diseased plants. Scale: 1 cm.

第3类为CF-16, 在PDA培养基培养4 d后, 菌落为圆形, 边缘整齐, 气生菌丝发达, 向外生长, 初为白色, 后变深灰色绒状(图2I、2J)。分生孢子盘散生, 黑褐色。分生孢子圆柱形, 两端钝圆, 中间有1个油球(图2K、2L)。根据培养性状和形态特征将CF-16菌株初步鉴定为麦冬炭疽菌(*Colletotrichum liriopes*)。

第4类为CF-19, 其菌落为圆形, 边缘整齐, 白色至橙红色, 25 °C条件下培养7 d的菌落直径

为78 mm, 具同心圆环, 由外到内颜色逐渐变深(图2M); 21 d后, 颜色进一步加深, 表面呈橙红色, 背面呈红棕色(图2N)。在PDA上培养30 d以上形成少数半埋式分生孢子器。显微镜下观察分生孢子器呈球形或近球形, 顶端有开口, 开口处分泌乳白色蜜露, 内含大量分生孢子(图2O)。分生孢子呈长椭圆形, 有隔膜和小油滴(图2P)。根据上述形态特征, 将CF-19菌株初步鉴定为蔓枯病原菌(*Stagonosporopsis pogostemonis*)。

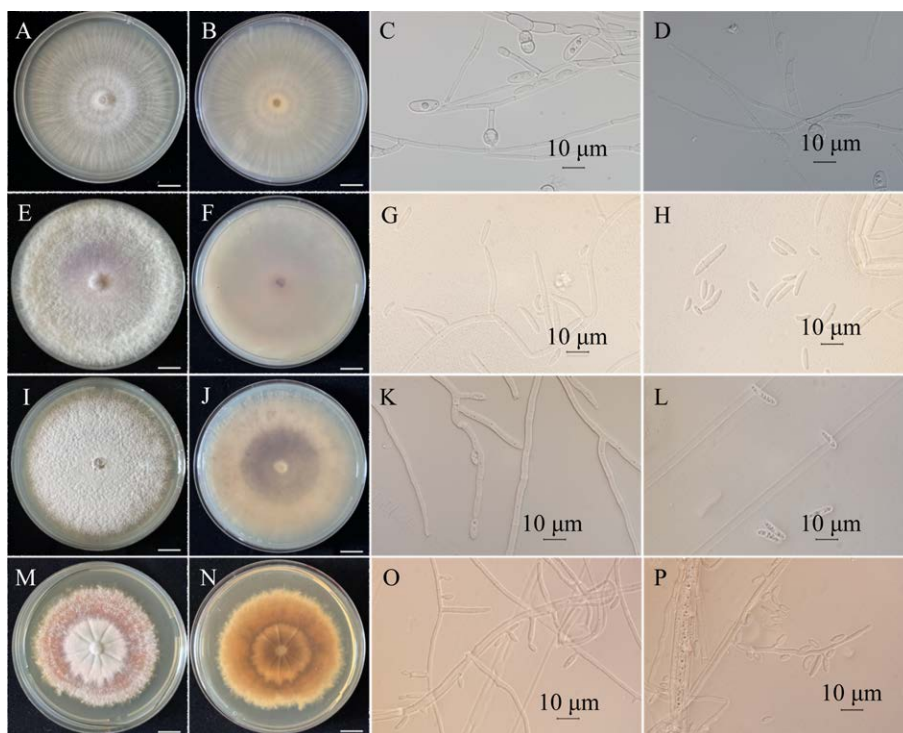


图2 真菌菌株CF-5、CF-14、CF-16、CF-19在PDA培养基上的形态特征。A: CF-5的菌落正面; B: CF-5的菌落反面; C: CF-5的菌丝; D: CF-5的菌落分生孢子; E: CF-14的菌落正面; F: CF-14的菌落反面; G: CF-14的菌丝; H: CF-14的菌落分生孢子; I: CF-16的菌落正面; J: CF-16的菌落反面; K: CF-16的菌丝; L: CF-16的菌落分生孢子; M: CF-19的菌落正面; N: CF-19的菌落反面; O: CF-19的菌丝; P: CF-19的菌落分生孢子。A、B、E、F、I、J、M、N比例尺: 1 cm; C、D、G、H、K、L、O、P比例尺: 10 μm 。

Figure 2 Morphological characteristics of fungal strains CF-5, CF-14, CF-16, and CF-19 on PDA medium. A: The colony front of CF-5; B: The reverse of the colony of CF-5; C: The mycelium of CF-5; D: Colony conidia of CF-5; E: The colony front of CF-14; F: The reverse of the colony of CF-14; G: The mycelium of CF-14; H: Colony conidia of CF-14; I: The colony front of CF-16; J: The reverse of the colony of CF-16; K: The mycelium of CF-16; L: Colony conidia of CF-16; M: The colony front of CF-19; N: The reverse of the colony of CF-19; O: The mycelium of CF-19; P: Colony conidia of CF-19. Scale A, B, E, F, I, J, M, N: 1 cm; Scale C, D, G, H, K, L, O, P: 10 μm .

2.3 分子鉴定与系统发育分析

将测序获得的病原菌 rDNA-ITS 基因序列提交至 GenBank 数据库, 进行 BLAST 同源性比对, 并使用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树进行分析。结果显示, CF-5 rDNA-ITS 序列与茄腐镰刀菌的序列具有最高的同源性, 其与茄腐镰刀菌(登录号: MN795744.1)共享一个节点, 节点的置信值为 63 (图 3)。结合形态学鉴定结果, 最终将参试的病原菌鉴定为茄腐镰刀菌 (*Fusarium solani*)。菌株 CF-14 rDNA-ITS 序列信息与尖孢镰刀菌(登录号: MT530243.1)共享一个节点, 节点的置信值为 99, 并与镰刀属的其他菌株分支明显, 结合形态学鉴定结果, 最终将参试的病原菌鉴定为尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)。CF-16 rDNA-ITS 序列信息与茄腐镰刀菌序列同源性最高, 其与麦冬炭疽菌(登录号: MK571776.1)共享一个节点, 置信值为 99 (图 3)。结合形态学鉴定结果, 最终

将参试的病原菌鉴定为麦冬炭疽菌 (*Colletotrichum liriopes*)。菌株 CF-19 rDNA-ITS 序列信息与蔓枯病原菌(登录号: OR789150.1)共享一个节点, 置信值为 45, 结合形态学鉴定结果, 最终将参试的病原菌鉴定为蔓枯病原菌 (*Stagonosporopsis pogostemonis*)。

2.4 病原菌致病性测定

离体接种 72 h 后, 接种部位均开始出现水渍状病斑, 之后病斑逐渐扩展, 5 d 后病斑几乎占据了整个叶片, 表面覆盖白色菌丝(图 4N、4O、4P、4Q), 而无菌水处理的对照组叶片无任何症状出现(图 4M)。

活体接种结果显示, 在 4 种长叶轮钟草根腐病病原菌中, 尖孢镰刀菌的相对发病率最高并且相对病情指数最强, 分别为 47.6%和 9.5; 其次为茄腐镰刀菌, 相对发病率和相对病情指数分别为 37.4%和 8.8; 两者根部症状相似, 均出现接种部位为发黑或发黄湿润型病斑, 表皮腐朽

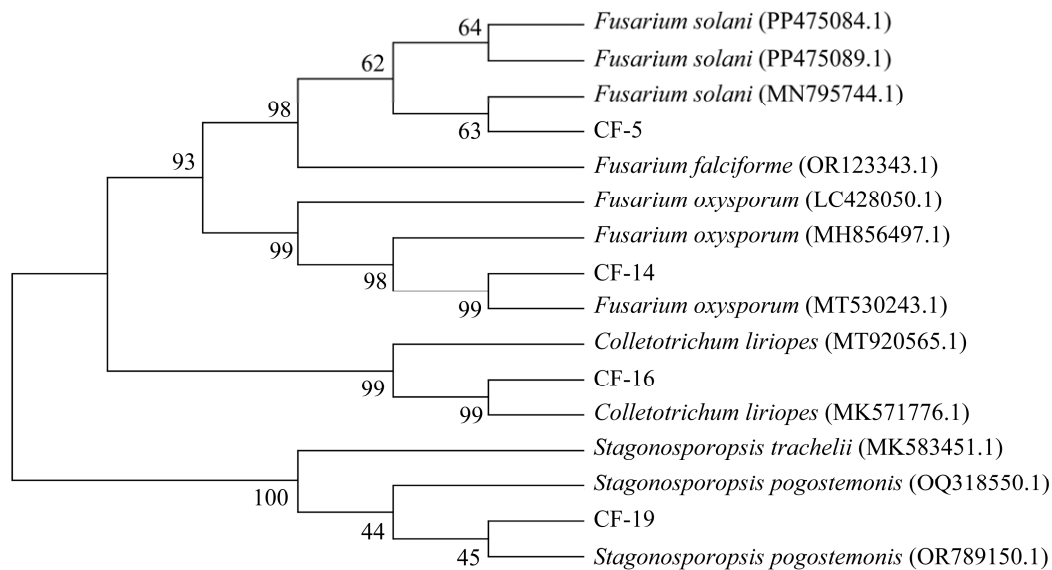


图 3 基于 ITS 序列采用邻接法构建代表菌株及其相似菌株的系统发育树。每株菌名后的序列号依次对应其 ITS 序列号; 分支点上的数字代表置信值。

Figure 3 A phylogenetic tree of representative strains and their similar strains was constructed based on ITS sequences using the neighbor-joining method. The sequence number following each fungal species corresponds to its ITS sequence number; The numbers at the branch points represent the confidence values.

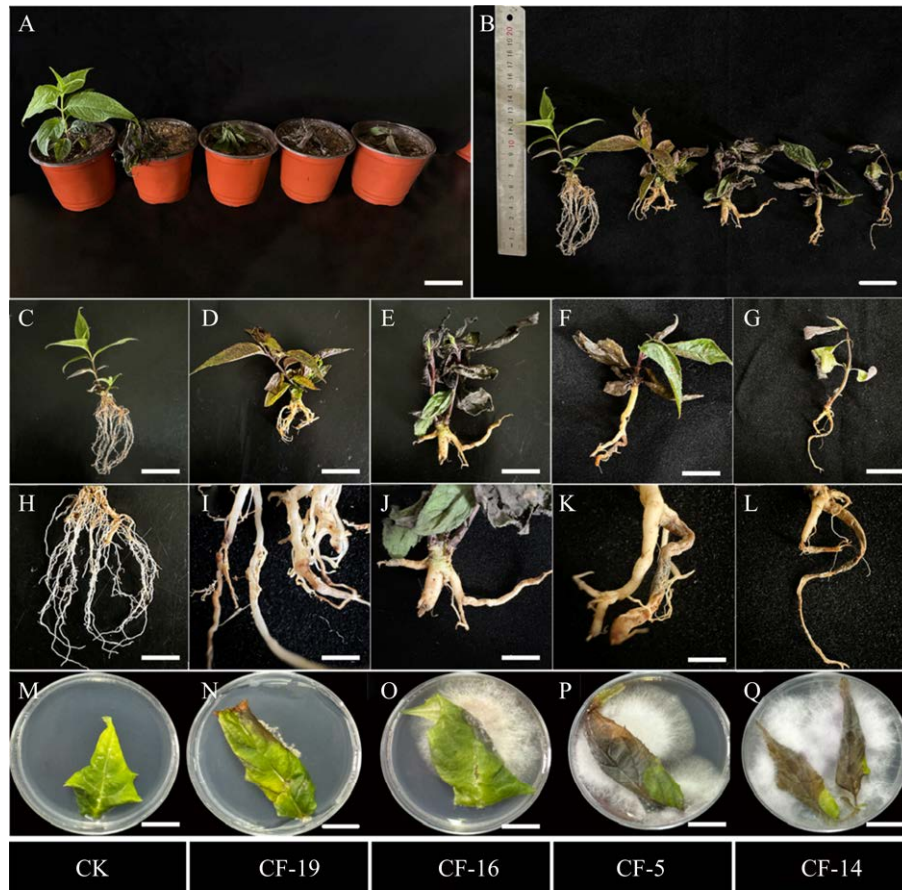


图 4 活体接种和离体接种测定致病性。接种不同的潜在病原体对长叶轮钟草植株的影响，每个处理有 5 个生物学重复，接种菌株的植物显示出与田地相似的疾病特征，按病害等级低到高从左往右依次排列。A、B：回接盆栽试验；C：活体空白对照 CK；D：蔓枯病原菌(*Stagonosporopsis pogostemonis*)；E：麦冬炭疽菌(*Colletotrichum liriopes*)；F：腐皮镰孢菌(*Fusarium solani*)；G：尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)；H：活体根部空白对照 CK；I、J、K、L 依次为活体接种不同病原菌后放大的根部腐坏症状；M：空白对照 CK；N、O、P、Q 依次为叶片离体接种不同病原菌的腐坏症状。比例尺：10 mm。
Figure 4 Pathogenicity determination by living inoculation and *in vitro* inoculation. Effects of inoculation with different potential pathogens on the plants of *Campanumoea lancifolia*. Each treatment has five biological repeats. Plants inoculated with the strain showed similar disease characteristics to fields. Arranged from left to right according to the disease grade. A, B: Tieback pot experiment; C: Living blank control CK; D: *Stagonosporopsis pogostemonis*; E: *Colletotrichum liriopes*; F: *Fusarium solani*; G: *Fusarium Oxysporum*; H: CK, I–L are the root rot symptoms after inoculation with different pathogens *in vivo*; M: CK; N–Q are the rot symptoms of leaves inoculated with different pathogens *in vitro*. Scale: 10 mm.

状，病斑相互连接后整个根部呈褐色软腐状，病根上长出白色菌丝(图 4F、4G、4K、4L、4P、4Q)。麦冬炭疽菌和蔓枯病原菌相对发病率及相对病情指数均较低。其中麦冬炭疽病原菌相对

发病率和相对病情指数分别为 29.5%和 7.5；蔓枯病原菌相对发病率和相对病情指数分别为 25.5%和 7.0；两者病斑褐色至黑色凹陷状病斑，并伴随少量纵向延伸的裂口。根部呈现黑色，

由根的中柱向表皮蔓延扩散(图 4D、4E、4I、4G、4N、4O), 对照组未出现病症(图 4C、4H、4M)。从长叶轮钟草发病部位重新分离菌株, 并进行形态学和序列比对分析, 确定其与先前接种的病菌一致, 符合柯赫氏法则。因此, 长叶轮钟草根腐病病原菌鉴定为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、茄腐镰刀菌(*Fusarium solani*)、麦冬炭疽菌(*Colletotrichum liriopes*)和蔓枯病菌(*Stagonosporopsis pogostemonis*)。

2.5 挥发油提取及其化学成分的测定

2.5.1 牛至(*Origanum vulgare*)挥发油 EO 2304

牛至(*Origanum vulgare* Linn.)挥发油 EO 2304 化学成分剔除数据值小于 0.50%的变量, 样品总百分含量在 94.33%, 结果见表 1。共鉴

定出 19 种化合物, 其中主要成分包括香芹酚(carvacrol), 含量为 24.568%; 其次为对异丙基甲苯(1-isopropyl-4-me, 15.820%)和丁香酚(thymol, 13.625%), α -萜品烯(α -terpinene)和 γ -萜品烯(γ -terpinene)的含量分别为 1.524%和 10.479%。

2.5.2 石香薷(*Mosla chinensis* Maxim.)挥发油 EO 2303

石香薷(*Mosla chinensis*)挥发油 EO 2303 成分剔除数据值小于 0.50%的变量, 样品总百分含量在 98.78%, 结果见表 2。共鉴定出 10 种化合物, 其中主要成分为百里香酚(thymol), 含量为 59.439%, 其次为香芹酚(carvacrol), 含量为 23.822%。

表 1 牛至挥发油的化学成分

Table 1 Chemical composition of *Origanum vulgare* Linn. essential oil

No.	RT	RI	Compound	CAS No.	Molecular formula	Percentage total (%)
1	13.749	929	3-thujene	2867-05-2	C ₁₀ H ₁₆	1.019
2	14.047	937	Alpha-pinene	80-56-8	C ₁₀ H ₁₆	0.580
3	15.590	980	1-octen-3-ol	3391-86-4	C ₈ H ₁₆ O	0.510
4	15.865	986	3-octanone	106-68-3	C ₈ H ₁₆ O	0.767
5	16.055	991	Myrcene	123-35-3	C ₁₀ H ₁₆	0.924
6	17.070	1 017	α -terpinene	99-86-5	C ₁₀ H ₁₆	1.524
7	17.359	1 025	1-isopropyl-4-me	99-87-6	C ₁₀ H ₁₄	15.820
8	18.536	1 060	γ -terpinene	99-85-4	C ₁₀ H ₁₆	10.479
9	21.763	1 164	(\pm)-isomenthone	491-07-6	C ₁₀ H ₁₈ O	0.545
10	22.209	1 170	Borneol	464-45-9	C ₁₀ H ₁₈ O	0.792
11	22.524	1 182	L-terpinen-4-ol	20126-76-5	C ₁₀ H ₁₈ O	0.788
12	24.125	1 235	2-isopropyl-5-methylanisole	1076-56-8	C ₁₁ H ₁₆ O	1.555
13	24.436	1 244	Carvacrol methyl ether	6379-73-3	C ₁₁ H ₁₆ O	14.809
14	25.749	1 291	Thymol	89-83-8	C ₁₀ H ₁₄ O	13.625
15	26.091	1 299	Carvacrol	499-75-2	C ₁₀ H ₁₄ O	24.568
16	29.721	1 440	(+)-aromadendrene	489-39-4	C ₁₅ H ₂₄	3.573
17	31.698	1 495	Bicyclogermacren	24703-35-3	C ₁₅ H ₂₄	0.841
18	33.741	1 576	Spathulenol	6750-60-3	C ₁₅ H ₂₄ O	0.584
19	33.857	1 581	(-)-caryophyllene oxide	1139-30-6	C ₁₅ H ₂₄ O	1.023

No.: 序号; RT: 相对保留时间; RI: 保留指数; Percentage total (%): 相对百分含量; (-)-: 左旋异构体; (+)-: 右旋异构体; (\pm)-: 外消旋体。

No.: Serial number; RT: Retention time; RI: Retention index; Percentage total (%): Relative percentage content; (-)-: Levorotatory isomer; (+)-: Dextrorotatory isomer; (\pm)-: Racemic mixture.

表 2 石香薷挥发油的化学成分

Table 2 Chemical composition of *Mosla chinensis* Maxim. essential oil

No.	RT	RI	Compound	CAS No.	Molecular formula	Percentage total (%)
1	12.510	991	Myrcene	123-35-3	C ₁₀ H ₁₆	0.575
2	13.758	1 017	α -terpinene	99-86-5	C ₁₀ H ₁₆	0.990
3	14.105	1 025	1-isopropyl-4-me	99-87-6	C ₁₀ H ₁₄	4.819
4	15.629	1 060	γ -terpinene	99-85-4	C ₁₀ H ₁₆	3.434
5	21.238	1 177	Terpinen-4-ol	562-74-3	C ₁₀ H ₁₈ O	0.574
6	26.448	1 291	Thymol	89-83-8	C ₁₀ H ₁₄ O	59.439
7	26.874	1 299	Carvacrol	499-75-2	C ₁₀ H ₁₄ O	23.822
8	29.159	1 355	Phenol,5-methyl-2-1-methyleth	528-79-0	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	2.358
9	29.979	1 371	Carvacrol acetate	6380-28-5	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	0.592
10	33.862	1 454	Alpha-humulene	6753-98-6	C ₁₅ H ₂₄	2.176

No.: 序号; RT: 相对保留时间; RI: 保留指数; Percentage total (%): 相对百分含量。

No.: Serial number; RT: Retention time; RI: Retention index; Percentage total (%): Relative percentage content.

2.5.3 野草香 [*Elsholtzia cypriani* (Pavolini) S. Chow ex P. S. Hsu] 挥发油 EO 2303

野草香 [*Elsholtzia cypriani* (Pavolini) S. Chow ex P. S. Hsu] 挥发油成分 EO 2303 剔除数据值小于 0.50% 的变量, 样品总百分含量在 99.58%, 结果见表 3。共鉴定出 10 种化合物, 其中主要成分为 α -柠檬烯(α -citral), 含量为 43.060%, 其次为 β -柠檬烯(β -citral), 含量为 37.330%。

2.5.4 勐腊毛麝香 (*Adenosma buchneroides*) 挥发油

勐腊毛麝香 (*Adenosma buchneroides*) 挥发油根

据提取年份不同, 分为 EO 2306 A (1992 年)、EO 2306 B (2017 年)、EO 2306 C (2022 年), 成分剔除数据值小于 0.50% 的变量, 样品总百分含量在 91.89%–96.72%, 结果见表 4。表中共鉴定出 13 种化合物。主要成分包括 γ -萜烯(γ -terpinene), 在 EO 2306 A 中的含量为 37.209%, 而在 EO 2306 B 和 EO 2306 C 中的含量分别为 28.752% 和 21.355%。其次是香叶醇(carvacrol), 其在 EO 2306 A、EO 2306 B 和 EO 2306 C 中的含量分别为 15.887%、29.123% 和 30.588%。另外, 1-异丙基-4-甲基苯(1-isopropyl-4-me)的含量在 EO 2306 C 中最高, 达 19.951%。

表 3 野草香挥发油的化学成分

Table 3 Chemical composition of *Elsholtzia cypriani* (Pavolini) S. Chow ex P. S. Hsu. essential oil

No.	RT	RI	Compound	CAS No.	Molecular formula	Percentage total (%)
1	15.129	1 099	Linalool	78-70-6	C ₁₀ H ₁₈ O	1.252
2	17.093	1 170	Isoneral	72203-97-5	C ₁₀ H ₁₆ O	1.482
3	17.629	1 183	Isogeranial	55722-59-3	C ₁₀ H ₁₆ O	2.319
4	19.029	1 228	Nerol	106-25-2	C ₁₀ H ₁₈ O	1.796
5	19.477	1 240	β -citral	106-26-3	C ₁₀ H ₁₆ O	37.330
6	19.727	1 255	Geraniol	106-24-1	C ₁₀ H ₁₈ O	1.552
7	20.301	1 270	α -citral	141-27-5	C ₁₀ H ₁₆ O	43.060
8	24.751	1 419	Caryophyllene	87-44-5	C ₁₅ H ₂₄	3.384
9	25.642	1 454	Humulene	6753-98-6	C ₁₅ H ₂₄	1.164
10	28.943	1 581	Caryophyllene oxide	1139-30-6	C ₁₅ H ₂₄ O	0.964

No.: 序号; RT: 相对保留时间; RI: 保留指数; Percentage total (%): 相对百分含量。

No.: Serial number; RT: Retention time; RI: Retention index; Percentage total (%): Relative percentage content.

表 4 勐腊毛麝香挥发油的化学成分

Table 4 Chemical composition of *Adenosma buchneroides* Bonati essential oil

No.	RT	RI	Compound	CAS No.	Molecular formula	Percentage total (%)		
						EO 2306 A	EO 2306 B	EO 2306 C
1	10.090	929	3-thujene	2867-05-2	C ₁₀ H ₁₆	2.549	1.181	0.639
2	13.534	1 011	3-carene	13466-78-9	C ₁₀ H ₁₆	2.664	1.673	1.268
3	13.781	1 017	α -terpinene	99-86-5	C ₁₀ H ₁₆	3.964	1.953	–
4	14.138	1 025	1-isopropyl-4-me	99-87-6	C ₁₀ H ₁₄	15.273	12.875	19.951
5	14.326	1 031	D-limonene	5989-27-5	C ₁₀ H ₁₆	2.778	1.966	1.544
6	15.684	1 060	γ -terpinene	99-85-4	C ₁₀ H ₁₆	37.209	28.752	21.355
7	20.613	1 170	L-borneol	464-45-9	C ₁₀ H ₁₈ O	–	–	0.818
8	24.225	1 244	Methyl carvacrol	6379-73-3	C ₁₁ H ₁₆ O	9.881	11.132	10.762
9	26.325	1 291	Thymol	89-83-8	C ₁₀ H ₁₄ O	–	1.126	1.295
10	26.817	1 299	Carvacrol	499-75-2	C ₁₀ H ₁₄ O	15.887	29.123	30.588
11	33.883	1 454	Humulene	6753-98-6	C ₁₅ H ₂₄	1.501	0.932	–
12	35.886	1 509	β -bisabolene	495-61-4	C ₁₅ H ₂₄	5.014	5.464	4.644
13	40.265	1 606	Humulene epoxide II	19888-34-7	C ₁₅ H ₂₄ O	0.714	0.714	0.898

No.: 序号; RT: 相对保留时间; RI: 保留指数; Percentage total (%): 相对百分含量; –: 未检测到。

No.: Serial number; RT: Retention time; RI: Retention index; Percentage total (%): Relative percentage content; –: Not detected.

2.6 挥发油的抗菌试验

2.6.1 挥发油的抑菌率

本研究用 6 个挥发油样品对茄腐镰刀菌 (*Fusarium solani*)、尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)、麦冬炭疽菌 (*Colletotrichum liriopes*)、蔓枯病原菌 (*Stagonosporopsis pogostemonis*) 的抑菌效果进行检验。结果显示, 挥发油样品浓度为 50 mg/mL, 所选挥发油样品均对茄腐镰刀菌、尖孢镰刀菌、麦冬炭疽菌、蔓枯病原菌有较好的抑制作用(图 5), 抑制率为 32.94%–95.29% (表 5), 比对照组 CK 具有更显著的抑制效果。

EO 2304 对茄腐镰刀菌、尖孢镰刀菌、麦冬炭疽菌和蔓枯病原菌的抑制率分别为 32.94%、95.29%、81.71%和 95.00%。EO 2303 对茄腐镰刀菌、尖孢镰刀菌、麦冬炭疽菌和蔓枯病原菌的抑制率分别为 94.12%、95.29%、95.12%和 95.00%。EO 2305 对茄腐镰刀菌、尖孢镰刀菌、麦冬炭疽菌和蔓枯病原菌的抑制率分别为 85.88%、95.29%、95.12%和 95.00%。EO 2306 A 对茄腐镰刀菌、尖

孢镰刀菌、麦冬炭疽菌和蔓枯病原菌的抑制率分别为 47.06%、94.12%、93.90%和 95.00%。EO 2306 B 对茄腐镰刀菌、尖孢镰刀菌、麦冬炭疽菌和蔓枯病原菌的抑制率分别为 77.06%、95.29%、95.12%和 95.00%。EO 2306 C 对茄腐镰刀菌、尖孢镰刀菌、麦冬炭疽菌和蔓枯病原菌的抑制率分别为 65.29%、95.29%、93.90%和 95.00%。

2.6.2 盆栽试验探究挥发油对混合菌感染植物的影响

使用挥发油进行了盆栽试验, 以评估其对长叶轮钟草抗病的影响。接种 21 d 后的结果如图 5 所示。对于牛至挥发油 EO 2304、石香薷挥发油 EO 2303、野草香挥发油 EO 2305, 勐腊毛麝香挥发油 EO 2306 A、EO 2306 B、EO 2306 C 挥发油的处理发病率显著降低, 病情指数分别为 2.5、1.0、1.5 和 1.2、1.5、1.7。相比之下, 阳性对照组 CK 为 9.8, 更值得注意的是, 结果表明, 与未添加挥发油的对照组 CK 相比, 挥发油显著降低了长叶轮钟草的病情指数。

表 5 不同挥发油对茄腐镰刀菌、尖孢镰刀菌、麦冬炭疽菌和蔓枯病原菌的抑制率

Table 5 Inhibitory rates of different volatile oils on *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum liriopes*, and *Rhizoctonia pogostemonis* (%)

Essential oil	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Colletotrichum liriopes</i>	<i>Stagonosporopsis pogostemonis</i>
EO 2304	32.94	95.29	81.71	95.00
EO 2303	94.12	95.29	95.12	95.00
EO 2305	85.88	95.29	95.12	95.00
EO 2306 A	47.06	94.12	93.90	95.00
EO 2306 B	77.06	95.29	95.12	95.00
EO 2306 C	65.29	95.29	93.90	95.00
CK	0.00	0.00	0.00	0.00
Hymexazol	52.94	75.29	65.85	33.13

不同芳香中药植物挥发油对茄腐镰刀菌(*Fusarium solani*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、麦冬炭疽菌(*Colletotrichum liriopes*)、蔓枯病原菌(*Stagonosporopsis pogostemonis*)的抑制率统计; 恶霉灵(hymexazol)为阴性对照, 10/1 000 DMSO 和 1/1 000 吐温-80 混合物为 CK 阳性对照, 数值越大表示抑制率越大。

Inhibitory effects of different volatile oils on the growth of *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum liriopes*, and *Rhizoctonia pogostemonis*; The “mixed fungi” group represents the potted experiment where different essential oils were applied to a mixed spore suspension of the four pathogens. Hymexazol was used as the negative control, and a mixture of 10/1 000 DMSO and 1/1 000 Tween-80 served as the positive control (CK), The larger the value, the higher the inhibition rate.

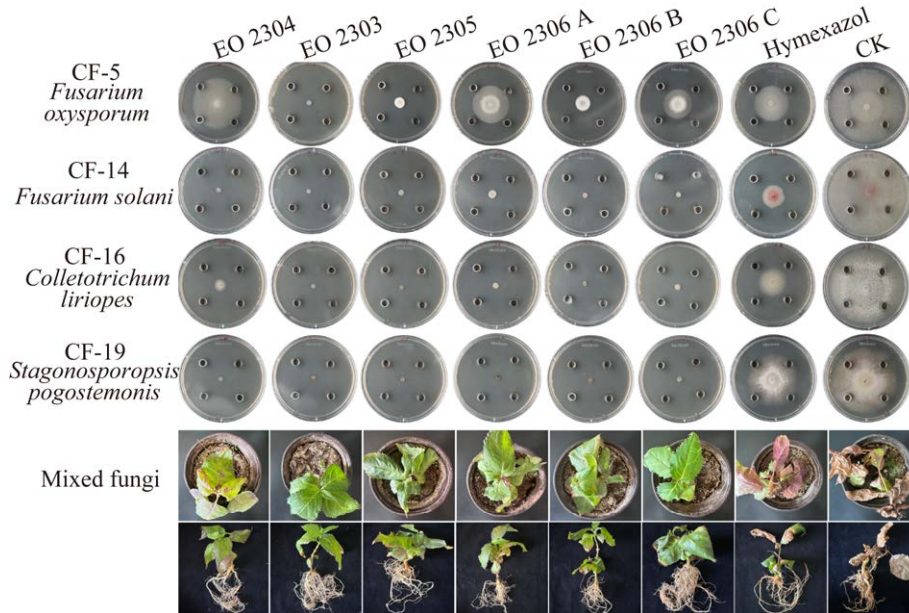


图 5 挥发油对菌丝生长的抑制作用和挥发油抗根腐的盆栽试验。不同芳香中药植物挥发油对茄腐镰刀菌(*Fusarium solani*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、麦冬炭疽菌(*Colletotrichum liriopes*)、蔓枯病原菌(*Stagonosporopsis pogostemonis*)生长的抑制作用; Mixed fungi 组为不同芳香中药植物挥发油对 4 种混合孢子悬浮液处理后的盆栽试验。Hymexazol 为阴性对照, 10/1 000 DMSO 和 1/1 000 吐温-80 混合物为 CK 阳性对照。

Figure 5 The inhibitory effect of essential oils on mycelial growth and pot experiment on the antifungal activity of essential oils against root rot. Inhibitory effects of different volatile oils on the growth of *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum liriopes*, and *Rhizoctonia pogostemonis*; The “mixed fungi” group represents the potted experiment where different essential oils were applied to a mixed spore suspension of the four pathogens. Hymexazol was used as the negative control, and a mixture of 10/1 000 DMSO and 1/1 000 Tween-80 served as the positive control (CK).

2.6.3 挥发油最小抑菌浓度

通过 MIC 法测定了挥发油、恶霉灵对 4 种长叶轮钟草根腐病原菌的最小抑菌浓度(表 6)。牛至挥发油 EO 2304 对病原菌的抑菌浓度分别为茄腐镰刀菌 0.031 mg/mL、尖孢镰刀菌 0.031 mg/mL、麦冬炭疽菌 2.000 mg/mL、蔓枯病原菌 1.000 mg/mL。EO 2303 对病原菌的抑菌浓度分别为茄腐镰刀菌 0.031 mg/mL、尖孢镰刀菌 0.031 mg/mL、麦冬炭疽菌 2.000 mg/mL、蔓枯病原菌 1.000 mg/mL。EO 2305 对病原菌的抑菌浓度分别为茄腐镰刀菌 0.500 mg/mL、尖孢镰刀菌 0.031 mg/mL、麦冬炭疽菌 2.000 mg/mL、蔓枯病原菌 2.000 mg/mL。EO 2306 A 对病原菌的抑菌浓度分别为茄腐镰刀菌 0.500 mg/mL、尖孢镰刀菌 0.250 mg/mL、麦冬炭疽菌 4.000 mg/mL、蔓枯病原菌 0.250 mg/mL。EO 2306 B 对病原菌的抑菌浓度分别为茄腐镰刀菌 0.500 mg/mL、尖孢镰刀菌 0.500 mg/mL、麦冬炭疽菌 4.000 mg/mL、蔓枯病原菌 1.000 mg/mL。EO 2306 C 对病原菌的抑菌浓度分别为茄腐镰刀菌 0.125 mg/mL、尖孢镰刀菌 0.125 mg/mL、麦冬炭疽菌 4.000 mg/mL、蔓枯病原菌 4.000 mg/mL。

3 讨论

根腐病是一种常见的毁灭性土传病害，具有“植物癌症”之称，中药材根腐病主要由真菌、细菌、线虫等引起，报道最多的是真菌性病害，其中镰刀菌(*Fusarium* sp.)所占比例最高，其寄生性和致病力也较强，是根腐病中危害性最大的病原菌^[28]。Thaines 等^[29]研究表明，中药材根腐病的症状多种多样，根据腐烂部位的组织性状、颜色、是否水渍状等可分为多种症状类型。

在本研究开展的长叶轮钟草根腐病的田间调查中，发现长叶轮钟草根腐病发病时，其叶基部开始逐渐变黄后枯萎，直至整株植株萎蔫、最终枯死。地下部分的根表皮粗糙，产生纵向裂纹，褐色和黑色，逐渐腐烂。植株一旦感染根腐病，其田间发病率约 40%，给农户带来巨大的经济损失。进一步，我们开展了田间患根腐病的长叶轮钟草病害植株的致病病原菌的分离和鉴定研究。结合形态学和分子学鉴定获得了 4 种菌株：尖孢镰刀菌、茄腐镰刀菌、蔓枯病原菌和麦冬炭疽菌。将分离得到的病原菌回接到健康的长叶轮钟草植株上，通过科赫氏法则验证了长叶轮钟草根茎腐病的致病菌为尖孢

表 6 不同挥发油对茄腐镰刀菌、尖孢镰刀菌、麦冬炭疽菌和蔓枯病原菌的 MICs

Table 6 MICs of volatile oils against *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum liriopes*, and *Rhizoctonia pogostemonis* (mg/mL)

Essential oil	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Colletotrichum liriopes</i>	<i>Stagonosporopsis pogostemonis</i>
EO 2304	0.031	0.031	2.000	1.000
EO 2303	0.031	0.031	2.000	1.000
EO 2305	0.500	0.031	2.000	2.000
EO 2306 A	0.500	0.250	4.000	0.250
EO 2306 B	0.500	0.500	4.000	1.000
EO 2306 C	0.125	0.125	4.000	4.000

不同芳香中药植物挥发油对茄腐镰刀菌(*Fusarium solani*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、麦冬炭疽菌(*Colletotrichum liriopes*)、蔓枯病原菌(*Stagonosporopsis pogostemonis*)的最低抑菌浓度(MICs)。

Minimum inhibitory concentrations (MICs) of volatile oils from various aromatic medicinal plants *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum liriopes* against and *Stagonosporopsis pogostemonis*.

镰刀菌、茄腐镰刀菌、蔓枯病原菌和麦冬炭疽菌，且尖孢镰刀菌和茄腐镰刀菌致病力更强。廖洪新等^[30]也发现尖孢镰刀菌可以导致长叶轮钟草发生根腐，这与本研究结果是一致的。其中茄腐镰刀菌、蔓枯病原菌和麦冬炭疽菌引起长叶轮钟草根腐病为本研究首次报道。

长期使用化学农药会对生态系统和人类健康造成严重危害。也会诱导病原真菌的抗药性，从而降低其使用效率^[31]。挥发油具有强大的抗真菌作用、易于分解和环境相容性，使其成为了最重要的植物源抗菌资源之一^[32]。有研究发现挥发油可以穿透真菌的细胞膜，与细胞膜上的酶发生反应，破坏真菌的酶促系统，并进一步破坏其遗传物质的功能^[33-34]。此外，挥发油还可以与细胞膜上的蛋白质发生反应，破坏磷脂双分子层和细胞结构，使更多的挥发油进入细胞，并最终导致真菌死亡^[35-36]。唇形科挥发油具有许多优点，如香气、较少的副作用和多靶点作用，使其成为开发天然杀菌剂的理想来源。Singh 等^[37-38]研究发现，唇形科植物小茴香挥发油具有潜在的抗氧化和抗真菌活性。Bouchra 等^[39]研究发现唇形科植物牛至和百里香、薄荷精油对番茄灰霉病菌的菌丝生长具有显著抑制作用。Inouye 等^[40]研究发现唇形科植物粗穗荆芥和线叶百里香及其主要成分通过气相接触表现出显著的抗真菌活性。本研究中，唇形科植物牛至挥发油 EO 2304、石香薷挥发油 EO 2303、野草香挥发油 EO 2305，勐腊毛麝香挥发油 EO 2306 A、EO 2306 B、EO 2306 C 对尖孢镰刀菌、蔓枯病原菌和麦冬炭疽菌均有很强的抑制效果，抑制率为 81.71%–95.29%，其抑制效果优于同剂量化药恶霉灵。在茄腐镰刀菌的抑制试验中，石香薷挥发油 EO 2303、野草香挥发油 EO 2305、勐腊毛麝香挥发油 EO 2306 B 对茄腐镰刀菌有很强的抑制效果，抑制

率为 77.06%–94.12%，其抑制效果优于同剂量化药恶霉灵，但是勐腊毛麝香挥发油 EO 2306 C 对茄腐镰刀菌的抑菌率与化药恶霉灵并无显著差异，牛至挥发油 EO 2304、勐腊毛麝香挥发油 EO 2306 A 对茄腐镰刀菌的抑制率甚至低于化药恶霉灵，这说明挥发油对不同病原菌的抑制作用也具有差异性。

在本研究中，4 种唇形科挥发油对 4 株病原菌最低抑菌浓度(MICs)在 0.031–4.000 mg/mL 之间。相较于对照药品，目前尚未形成一个广泛认可的标准来评判植物提取物抑菌活性的优劣。按照 Madbouly^[41]的标准：植物提取物和精油对某病原菌的 MIC<100 $\mu\text{g/mL}$ 时被认为对该菌具有显著的抑制活性，100 $\mu\text{g/mL}$ <MIC=625 $\mu\text{g/mL}$ 时被认为具有中度的抑菌活性，MIC>625 $\mu\text{g/mL}$ 时被认为具有弱的抑菌活性。同时，如果提取物的 MIC<100 $\mu\text{g/mL}$ 或纯化化合物的 MIC<10 $\mu\text{g/mL}$ 时，这样的抑菌活性被认为非常有效。这种分类对于判定植物提取物是否具有潜在的抗菌活性很有用。本研究中 4 种挥发油样品对茄腐镰刀菌(*Fusarium solani*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、麦冬炭疽菌(*Colletotrichum liriopes*)和蔓枯病原菌(*Stagonosporopsis pogostemonis*)进行的 MICs 试验。结果显示，各挥发油对病原菌的抑菌效果如下：所有挥发油对茄腐镰刀菌和尖孢镰刀菌抑制效果较强，抑制活性均被归类为显著或中度水平，因为其最低抑菌浓度均低于 100 $\mu\text{g/mL}$ 至 625 $\mu\text{g/mL}$ 的阈值，但对麦冬炭疽菌和蔓枯病原菌具有较弱的抑制活性，因为其 MICs>625 $\mu\text{g/mL}$ 。其中 EO 2303 和 EO 2304 对茄腐镰刀菌和尖孢镰刀菌、EO 2305 对尖孢镰刀菌均具有显著抑制活性，EO 2305 对茄腐镰刀菌和 EO 2306 A 对蔓枯病原菌具有中度抑菌活性，EO 2306 A、EO 2306 B 和 EO 2306 C 对茄腐镰

刀菌和尖孢镰刀菌具有中度抑菌活性。这些挥发油的抑制活性均被归类为显著或中度水平,说明这4种挥发油具有低剂量高效率的特点。

挥发油抗真菌活性主要归因于其主要成分的作用,以及可能与其他成分的协同效应。通过挥发油成分鉴定,发现香芹酚(carvacrol)在牛至中占总挥发油组分的24.568%、石香薷中占比23.822%、勐腊毛麝香中占比15.887%–30.588%。Zhang等^[42]研究发现,香芹酚对采后病原菌灰葡萄孢具有较强抗真菌活性。百里香酚(thymol)在牛至中占比13.625%、石香薷中占比59.439%。Marchese等^[43]报道了百里香酚对植物根腐病菌和霜霉病菌等病原菌有显著的抑制作用,能够减少病原菌的生物量和病害发生率。 α -香叶醛(α -citral)在野草香中占43.060%, β -香叶醛(β -citral)在野草香中占37.330%。Silva等^[44]研究发现香叶醛对念珠菌属具有强效的体外抗真菌活性。 γ -蒎烯(γ -terpinene)在勐腊毛麝香中占21.355%–37.209%。Tahvilian等^[45]研究结果表明,*Pistacia khinjuk*精油,特别是其中的 γ -蒎品烯成分,具有作为抗真菌剂的潜力,对植物病原菌具有抑制作用。通过减少病原菌的生长和活性,这些挥发油成分帮助植物抵御病害,显示出其在植物保护中的重要应用潜力。值得注意的是,抗真菌活性并不一定由挥发油中最高比例的成分引起,较少的化合物也应被考虑。

同时,在今后的研究中还应考虑将这些芳香中药与长叶轮钟草开展间作,增加作物多样性的同时还可以利用植物挥发或分泌的抗菌物质通过诱集、驱避、化感等方式防治病虫害,形成一个协同的抗菌环境,降低病害的发生率。然而,这些芳香中药与长叶轮钟草的间作模式及作用机制还有待进一步研究。

4 结论

本研究分离并鉴定了长叶轮钟草根腐病的

4种致病病原菌,分别为尖孢镰刀菌、茄腐镰刀菌、蔓枯病原菌和麦冬炭疽菌,其中茄腐镰刀菌、蔓枯病原菌和麦冬炭疽菌这3种致病病原菌是本研究首次报道的,这为长叶轮钟草根腐病的防治奠定了基础。同时,通过体外抑菌试验、最小抑菌浓度测定和盆栽试验,发现了4种唇形科芳香中药植物中所含的挥发油成分对长叶轮钟草根腐病原菌均有较强抑制作用。本研究的开展为后期开发防治长叶轮钟草根腐病的新型高活性植物源农药提供了科学依据,为开展长叶轮钟草的绿色种植奠定了基础,保证了云南这一重要的药食两用资源的可持续利用和发展。

作者贡献声明

李映涛:实验设计与开展实验,分析数据、撰写稿件;苟珈棋:病原菌分离;李桥峰:盆栽试验;李园园:挥发油提取;秦苗:挥发油化学成分测定;普春霞:挥发油原材料鉴定与挥发油提取实验设计;张爱丽:实验设计、资金获取、审阅与编辑稿件。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] 李东旭,孙庆文,郭文凯,王波,严福林.轮钟花繁育技术研究[J].种子,2019,38(11):146-150,156.
LI DX, SUN QW, GUO WK, WANG B, YAN FL. Study on breeding techniques of *Cyclocodon lancifolius*[J]. Seed, 2019, 38(11): 146-150, 156 (in Chinese).
- [2] 陈晓娟,陈聪颖,谭丽彬,李佳,顾仁勇.响应面法优化红果参油的提取工艺[J].山东化工,2019,48(16):14-17,20.
CHEN XJ, CHEN CY, TAN LB, LI J, GU RY. Optimization of extraction conditions of Hong Guo ginseng oil by response surface methodology[J]. Shandong Chemical Industry, 2019, 48(16): 14-17, 20 (in Chinese).

- [3] 林贵灿, 李泳宁, 林玲. 野生水果长叶轮钟草在福建地区引种驯化栽培技术[J]. 现代园艺, 2021, 44(19): 74-76.
LIN GC, LI YN, LIN L. Introduction, domestication and cultivation techniques of wild fruit clover in Fujian Province[J]. Contemporary Horticulture, 2021, 44(19): 74-76 (in Chinese).
- [4] 张富东, 朱敏凤, 欧阳志珏, 何德强, 乔石, 易辉. 四川乐山地区红果参栽培技术和产业发展研究[J]. 耕作与栽培, 2023, 43(4): 140-143, 146.
ZHANG FD, ZHU MF, OUYANG ZJ, HE DQ, QIAO S, YI H. Development status and countermeasures of Sichuan Leshan Hongguo ginseng culture and industry[J]. Tillage and Cultivation, 2023, 43(4): 140-143, 146 (in Chinese).
- [5] 王建霞, 郭洪伟, 刘一涵, 田云刚, 李明, 魏华. 轮钟花果实化学成分的研究II[J]. 中成药, 2022, 44(8): 2546-2549.
WANG JX, GUO HW, LIU YH, TIAN YG, LI M, WEI H. Chemical constituents from the fruits of *Cyclocodon lancifolius* II[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2022, 44(8): 2546-2549 (in Chinese).
- [6] 万晓霞, 孙庆文, 陈春伶, 徐文芬, 祝久洁, 陈亮. 红果参矿质元素含量测定及膳食营养评价[J]. 现代食品, 2022, 28(23): 109-114.
WAN XX, SUN QW, CHEN CL, XU WF, ZHU JJ, CHEN L. Determination of mineral elements in *Cyclocodon lancifolius* and evaluation of dietary nutrition[J]. Modern Food, 2022, 28(23): 109-114 (in Chinese).
- [7] 马梦洁. 轮钟花果实的化学成分及生物活性研究[D]. 上海: 中国医药工业研究总院硕士学位论文, 2022.
MA MJ. Study on chemical constituents and biological activity of the fruit of *Cirsium campanulata*[D]. Shanghai: Master's Thesis of the China National Pharmaceutical Industry Research Institute, 2022 (in Chinese).
- [8] 黄春跃, 马梦洁, 牛莉鑫, 靳建杰, 吴蔓, 田蓓, 胡晓. 红果参果化学成分及其 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(16): 65-73.
HUANG CY, MA MJ, NIU LX, JIN JJ, WU M, TIAN B, HU X. Phytochemical composition and α -glucosidase inhibitory activity of *Campanumoea lancifolia* (Roxb.) Merr. fruit[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(16): 65-73 (in Chinese).
- [9] 蒋寒林, 黄衡宇, 王元忠. 三种方法提取长叶轮钟草果实挥发油成分 GC-MS 分析[J]. 中药材, 2019, 42(2): 334-338.
JIANG HL, HUANG HY, WANG YZ. GC-MS analysis of volatile oil components extracted from the fruit of *Clonorchis longifolia* by three methods[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2019, 42(2): 334-338 (in Chinese).
- [10] 李斌, 李贵, 陈功锡, 李辉, 梁俊鹏, 陈雅. 红果参果实多糖的提取及其单糖组分研究[J]. 亚热带植物科学, 2015, 44(1): 13-17.
LI B, LI G, CHEN GX, LI H, LIANG JP, CHEN Y. Extraction and composition of polysaccharide from the Fruits of *Campanumoea lancifolia*[J]. Subtropical Plant Science, 2015, 44(1): 13-17 (in Chinese).
- [11] XIANG ZY, LIN CB, ZHU YQ, DENG JL, XIA C, CHEN J. Phytochemical profiling of antioxidative polyphenols and anthocyanins in the wild plant *Campanumoea lancifolia* (Roxb.) Merr.[J]. International Journal of Food Properties, 2021, 24(1): 105-114.
- [12] BENAMAR H, MAROUF A, BENNACEUR M. Phytochemical composition, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of aqueous extract and fractions of *Pistacia atlantica* subsp. *Atlantica* from algeria[J]. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants, 2018, 24(3): 229-244.
- [13] MA MJ, WU M, TIAN B, MAO XD, LIN S, HUANG CY, HU X. Polyacetylenes with xanthine oxidase inhibitory activity from the medicinal and edible fruits of *Cyclocodon lancifolius* (Roxburgh) Kurz[J]. Fitoterapia, 2023, 170: 105631.
- [14] 张富东, 乔石, 易辉, 赵静, 刘粤, 张婷, 王美容, 李懿, 朱敏凤, 袁茂华, 余敏灵, 杨璐, 陈丽, 欧阳志珏, 何德强. 红果参抗氧化面膜的研制[J]. 香料香精化妆品, 2023(1): 74-77, 106.
ZHANG FD, QIAO S, YI H, ZHAO J, LIU Y, ZHANG T, WANG MR, LI Y, ZHU MF, YUAN MH, YU ML, YANG L, CHEN L, OUYANG ZJ, HE DQ. Preparation of an antioxidative facial mask with Hong Guo Ginseng[J]. Flavour Fragrance Cosmetics, 2023(1): 74-77, 106 (in Chinese).
- [15] 陈莉华, 王晓静, 肖琴, 莫宇婷. 红果参果胶提取物的抗氧化作用研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(4): 143-145, 150.
CHEN LH, WANG XJ, XIAO Q, MO YT. Study on antioxidant activities of pectin from Hong Guo Ginseng[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(4): 143-145, 150 (in Chinese).
- [16] 王晓静, 陈莉华, 莫宇婷. 红果参黄酮与 Vc 的协同抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(12): 111-115.
WANG XJ, CHEN LH, MO YT. Cooperative antioxidant effects of flavonoids from Hong Guo Ginseng and Vc[J]. Food and Fermentation Industries, 2014, 40(12): 111-115 (in Chinese).
- [17] 陈莉华, 贺诚志, 谭林艳, 廖微, 王晓静. 红果参提取物的抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(2): 174-177, 201.
CHEN LH, HE CZ, TAN LY, LIAO W, WANG XJ. Investigation of antioxidant activities of extracts of Hong Guo Shen[J]. Natural Product Research and Development, 2014, 26(2): 174-177, 201 (in Chinese).
- [18] 陈莉华, 龙进国, 谭林艳, 廖微. 红果参多糖的提取纯化及抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(2): 170-173.
CHEN LH, LONG JG, TAN LY, LIAO W. Extraction and purification of polysaccharides from Hong Guo

- Ginseng and the comparison of antioxidant activity[J]. *Natural Product Research and Development*, 2013, 25(2): 170-173 (in Chinese).
- [19] 王健, 徐文芬, 孙庆文, 祝久洁, 陈春伶, 万晓霞, 田蓓. 红果参果酱加工工艺研究[J]. *农产品加工*, 2023(1): 20-25, 28.
WANG J, XU WF, SUN QW, ZHU JJ, CHEN CL, WAN XX, TIAN B. Study on processing technology of Hongguoshen jam[J]. *Academic Periodical of Farm Products Processing*, 2023(1): 20-25, 28 (in Chinese).
- [20] 陆玲, 顾怀珊, 赵凯玲, 侯玉波, 李明兵, 张万巧, 赵昶灵. 云南省马关县红果参产业发展现状、存在问题及其对策[J]. *果树资源学报*, 2024, 5(4): 98-102, 113.
LU L, GU HS, ZHAO KL, HOU YB, LI MB, ZHANG WQ, ZHAO CL. Development status, existing problems and their countermeasures of *Cyclocodon lancifolia* industry in Maguan county, Yunnan Province[J]. *Journal of Fruit Tree Resources*, 2024, 5(4): 98-102, 113 (in Chinese).
- [21] 万晓霞, 孙庆文, 陈春伶, 党友超, 王波, 王健, 黄园. 红果参生态适宜性区划研究[J]. *中国中医药信息杂志*, 2022, 29(12): 1-4.
WAN XX, SUN QW, CHEN CL, DANG YC, WANG B, WANG J, HUANG Y. Study on ecology suitability regionalization of *Cyclocodon lancifolius* (Roxburgh) kurz[J]. *Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine*, 2022, 29(12): 1-4 (in Chinese).
- [22] 董鲜, 李晴晴, 霍莹莹, 陈传娇, 曾子盈, 段素素, 马玉楠, 程永现. 中医“芳香辟秽”理论指导下芳香精油在农业生态种植中的应用潜力[J]. *中国现代中药*, 2020, 22(9): 1562-1575.
DONG X, LI QQ, HUO YY, CHEN CJ, ZENG ZY, DUAN SS, MA YN, CHENG YX. Application potential of aromatic essential oil in agroecological planting under guidance of “Filth avoidance by Aromatic” theory of traditional Chinese medicine[J]. *Modern Chinese Medicine*, 2020, 22(9): 1562-1575 (in Chinese).
- [23] YANG CH, CHANG HW, LIN HY, CHUANG LY. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities from 28 Chinese herbal medicines[J]. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2013, 2(1): 294-305.
- [24] van der WOLF JM, NIJHUIS EH, KOWALEWSKA MJ, SADDLER GS, PARKINSON N, ELPHINSTONE JG, PRITCHARD L, TOTH IK, LOJKOWSKA E, POTRYKUS M, WALERON M, de VOS P, CLEENWERCK I, PIRHONEN M, GARLANT L, HÉLIAS V, POTHIER JF, PFLÜGER V, DUFFY B, TSROR L, et al. *Dickeya solani* sp. nov, a pectinolytic plant-pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*)[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(Pt 3): 768-774.
- [25] VÁRADI L, LUO JL, HIBBS DE, PERRY JD, ANDERSON RJ, ORENGA S, GROUNDWATER PW. Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: past, present, and future[J]. *Chemical Society Reviews*, 2017, 46(16): 4818-4832.
- [26] TAMURA K, NEI M, KUMAR S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(30): 11030-11035.
- [27] 刘婷, 朱慧, 才让东珠, 成述儒, 罗志皓, 易雪娇, 陈欢. 水蒸气蒸馏提取肉桂精油工艺及成分的分析[J/OL]. *中国粮油学报*, 2024. <https://doi.org/10.20048/j.cnki.issn.1003-0174.000878>.
LIU T, ZHU H, CAI RD, CHENG SR, LUO ZH, YI XJ, CHEN H. Analysis of the process and composition of cinnamon essential oil extracted by water vapour distillation[J/OL]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2024. <https://doi.org/10.20048/j.cnki.issn.1003-0174.000878> (in Chinese).
- [28] ABBAS A, MUBEEN M, SOHAIL MA, SOLANKI MK, HUSSAIN B, NOSHEEN S, KASHYAP BK, ZHOU L, FANG XL. Root rot a silent alfalfa killer in China: distribution, fungal, and oomycete pathogens, impact of climatic factors and its management[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 961794.
- [29] THAINES BODAH E. Root rot diseases in plants: a review of common causal agents and management strategies[J]. *Agricultural Research & Technology: Open Access Journal*, 2017, 5(3): 555661.
- [30] 廖洪新, 凌翠琼, 闻进蕊, 聂红艳, 徐福荣, 吕小满, 董鲜. 长叶轮草根腐病原菌分离鉴定及生物学特性研究[J]. *中药材*, 2023, 46(9): 2117-2122. LIAO HX, LING CQ, WEN JR, NIE HY, XU FR, LÜ XM, DONG X. Isolation, identification and biological characteristics of pathogenic bacteria causing root rot of *Campanula longifolia*[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2023, 46(9): 2117-2122 (in Chinese).
- [31] HAWKINS NJ, BASS C, DIXON A, NEVE P. The evolutionary origins of pesticide resistance[J]. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 2019, 94(1): 135-155.
- [32] WANG HW, YANG ZX, YING GY, YANG MH, NIAN YJ, WEI F, KONG WJ. Antifungal evaluation of plant essential oils and their major components against toxigenic fungi[J]. *Industrial Crops and Products*, 2018, 120: 180-186.
- [33] HU YC, ZHANG JM, KONG WJ, ZHAO G, YANG MH. Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*[J]. *Food Chemistry*, 2017, 220: 1-8.
- [34] NI ZJ, WANG X, SHEN Y, THAKUR K, HAN JZ, ZHANG JG, HU F, WEI ZJ. Recent updates on the chemistry, bioactivities, mode of action, and industrial applications of plant essential oils[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 110: 78-89.

- [35] YUAN YH, LIU LX, GUO L, WANG L, LIU YG. Antibacterial mechanism of rose essential oil against *Pseudomonas putida* isolated from white *Hypsizygus marmoreus* at cellular and metabolic levels[J]. *Industrial Crops and Products*, 2023, 196: 116523.
- [36] NOURBAKHSH F, LOTFALIZADEH M, BADPEYMA M, SHAKERI A, SOHEILI V. From plants to antimicrobials: natural products against bacterial membranes[J]. *Phytotherapy Research*, 2022, 36(1): 33-52.
- [37] SINGH G, MARIMUTHU P, CATALAN C, de LAMPASONA MP. Chemical, antioxidant and antifungal activities of volatile oil of black pepper and its acetone extract[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2004, 84(14): 1878-1884.
- [38] SINGH G, MAURYA S, de LAMPASONA MP, CATALAN C. Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract[J]. *Food Control*, 2006, 17(9): 745-752.
- [39] BOUCHRA C, ACHOURI M, IDRISSE HASSANI LM, HMAMOUCHE M. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2003, 89(1): 165-169.
- [40] INOUE S, UCHIDA K, YAMAGUCHI H, MIYARA T, GOMI S, AMANO M. Volatile aroma constituents of three Labiatae herbs growing wild in the Karakoram-Himalaya district and their antifungal activity by vapor contact[J]. *Journal of Essential Oil Research*, 2001, 13(1): 68-72.
- [41] MADBOULY A. Efficacy of extracts of some plants in avoiding fungal diseases of stored cereals[J]. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2015, 7: 441-448.
- [42] ZHANG JH, MA S, DU SL, CHEN SY, SUN HL. Antifungal activity of thymol and carvacrol against postharvest pathogens *Botrytis cinerea*[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2019, 56(5): 2611-2620.
- [43] MARCHESE A, ORHAN IE, DAGLIA M, BARBIERI R, Di LORENZO A, NABAVI SF, GORTZI O, IZADI M, NABAVI SM. Antibacterial and antifungal activities of thymol: a brief review of the literature[J]. *Food Chemistry*, 2016, 210: 402-414.
- [44] SILVA CD, GUTERRES SS, WEISHEIMER V, SCHAPOVAL EES. Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp.[J]. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2008, 12(1): 63-66.
- [45] TAHVILIAN R, MORADI R, ZHALE H, ZANGENEH M, ZANGENEH A, YAZDANI H, HAJIALIANI M. Ethnomedicinal plants: study on antifungal activity of essential oil of *Pistacia khinjuk* (combined with the dominance γ -terpinene) against *Candida albicans*[J]. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2016, 8(10): 1369-1373.