河南农业科学,2020,49(2):104-110
Journal of Henan Agricultural Sciences
doi:10.15933/j.cnki.1004-3268.2020.02.013

1株林下参内生拮抗真菌的鉴定及发酵条件优化

周春元,许世泉,闫梅霞,崔丽丽,华　霜,王英平
(中国农业科学院 特产研究所,吉林 长春 130112)

摘要:从健康林下参叶片中分离筛选人参黑斑病内生拮抗真菌,为人参黑斑病生物防治提供优良菌种。采用组织分离培养法筛选人参黑斑病菌内生拮抗真菌,根据形态特征及基于18S rDNA序列的系统发育分析,对拮抗菌株进行了鉴定,通过单因素及正交试验优化该菌株最适培养基及产生抑菌活性物质的发酵条件。结果表明,从健康林下参叶片分离的内生真菌中,获得1株对人参黑斑病菌具有良好拮抗作用的内生菌株FS-01,经鉴定该内生真菌菌株为球毛壳菌(*Chaetomium globosum*)。该菌株最佳培养基配方与发酵条件:淀粉1.50%、酵母浸粉1.00%、磷酸氢二钾0.05%、硫酸镁0.10%,pH值为7.0,培养温度为30 ℃,接种量为6.0%,培养时间为5 d。筛选获得的林下参内生真菌 *Chaetomium globosum* FS-01对人参黑斑病菌具有显著的拮抗作用,可开发为人参黑斑病的生防菌株。

关键词:人参黑斑病;林下参;内生拮抗真菌;鉴定;球毛壳菌;发酵条件优化
中图分类号:S435.6　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1004-3268(2020)02-0104-07

Identification and Optimization of Fermentation Conditions of an Antagonistic Endophytic Fungus from Mountain-cultivated Ginseng

ZHOU Chunyuan,XU Shiquan,YAN Meixia,CUI Lili,HUA Shuang,WANG Yingping
(Institute of Special Wild Economic Animals and Plants,Chinese Academy of Agricultural Sciences,Changchun 130112,China)

Abstract:The antagonistic endophytic fungi were isolated and screened from healthy mountain-cultivated ginseng leaves,to provide good strains for the biological control of ginseng black disease. Tissue isolation method was used to isolate the endophytic fungi. The antagonistic fungi was identified based on morphological characteristics and phylogenetic analyses of 18S rDNA. The single factor experiment and orthogonal experiment were adopted to optimize the liquid fermentation medium and conditions. The results showed that endophytic fungi were isolated from healthy mountain-cultivated ginseng leaves. Among them,strain FS-01 was found to have strong antagonistic activity against *Alternaria panax*. Strain FS-01 was identified as *Chaetomium globosum*. The optimal medium was composed of 1.50% starch,1.00% yeast extract powder,0.05% dipotassium phosphate,0.10% magnesium sulfate and the optimal culture conditions were inoculation size of 6.0% and cultivated for 5 d at 30 ℃ with initial pH of 7.0. Strain FS-01 has strong antagonistic activity against *Alternaria panax*,and could be a biocontrol strain for developing against ginseng black disease.

Key words:Ginseng black disease;Mountain-cultivated ginseng;Antagonistic endophytic fungus;Identification;*Chaetomium globosum*;Fermentation condition optimization

---

收稿日期:2019-07-01
基金项目:吉林省省级医药健康产业发展专项(20170311053YY);吉林省自然科学基金项目(20170101011JC);中国农业科学院科技创新工程项目(CAAS-ASTIP-2016-ISAPS);国家重点研发计划课题(2017YFC1702102)
作者简介:周春元(1981-),女,吉林洮南人,助理研究员,博士,主要从事人参内生菌资源研究。
E-mail:zhouchunyuan66@163.com
通信作者:王英平(1967-),男,吉林长春人,研究员,博士,主要从事药用植物资源与育种研究。
E-mail:yingpingwang@163.com

人参(*Panax ginseng* C. A. Mey)为五加科人参属多年生草本植物,主要分布在我国东北地区,其中吉林省长白山麓是人参的主产区。近年来,随着人参产业的迅速发展,人参病害逐年加重。人参黑斑病(*Alternaria panax*)是人参生产中发生较普遍、无害较严重的病害之一,其发病率为 20%~30%,严重的可达 70%以上甚至绝收[1]。该病害主要危害叶片、茎和果实,造成人参叶片早期落叶,植株提前枯萎,不结实及参根减产等[2]。目前,生产上人参黑斑病防控以化学防治为主,通过施用嘧菌酯等化学药剂控制病情蔓延[3],但化学防治容易导致农药残留、病原菌产生耐药性,并对环境造成一定的污染[4]。生物防治可以抑制人参病害的发生,且具有绿色、安全、高效等特点,是目前较为理想的病害防治方法,但利用此法进行人参黑斑病防治的报道较少。因此,寻找能够有效防治人参黑斑病的微生物菌种资源显得尤为重要。

植物内生真菌是指在其生活史的一定阶段或全部阶段,生活于健康植物各种组织内,不会引起宿主植物发生明显病害的一类微生物类群[5]。内生真菌产生的次生代谢产物可防治植物病害[6]、促进植物生长[7]、提高植物抵抗病原菌的能力[8]等,近年来,有关内生真菌的研究逐渐受到关注。因此,以健康林下参叶片内生真菌为研究对象,将对人参黑斑病菌具有良好拮抗作用的内生菌株进行鉴定,并优化培养基配方和发酵条件,以期为利用林下参内生真菌进行人参黑斑病的生物防治奠定理论基础。

1　材料和方法

1.1　材料

1.1.1　*供试林下参叶片*　2018 年 7 月,于吉林省抚松县林下参种植地,根据 5 点取样法,采集 15 年生健康植株的叶片,装入自封袋带回实验室,4 ℃保存备用。

1.1.2　*供试病原菌*　人参黑斑病菌(*Alternaria panax*)、人参锈腐病菌(*Cylindrocarpon destructans*)、人参立枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、人参根腐病菌(*Fusarium solani*)、人参灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、人参菌核病菌(*Sclerotinia schinseng*)、人参疫病菌(*Phytophthora cactorum*)均由吉林农业大学植物病理实验室提供。

1.1.3　*培养基*　基础发酵 PD 培养基:葡萄糖 20.0 g、蛋白胨 10.0 g、氯化钠 5.0 g、碳酸钙 1.0 g,调节 pH 值 7.0,蒸馏水定容至 1 L[9]。

1.2　林下参内生真菌的分离纯化

采用组织分离培养法[10]分离林下参叶片内生真菌。将采集的健康林下参叶片用自来水冲洗,除去表面的泥土,置于无菌操作台上,进行表面消毒处理。无菌水换洗 3 次,75%乙醇浸 2 min。无菌水换洗 3 次,0.1 %升汞浸 1.5 min。无菌水换洗 3 次,用无菌刀片将叶片剪成长 0.5 cm×0.5 cm 小方块,用无菌镊子将叶片移至 PDA 平板上,每个培养皿放置 5 块,于 25 ℃恒温培养箱中培养,逐日观察。待长出真菌菌丝时,挑取菌落边缘菌丝接入新的 PDA 培养基上,进行纯化培养。吸取 5 mL 最后一次换洗的无菌水,涂在 PDA 培养基上,验证消毒是否彻底。

1.3　皿内拮抗抑菌试验

采用平板对峙法筛选内生拮抗真菌。将活化的林下参内生真菌和人参病原菌用 5 mm 无菌打孔器打成菌饼,用灭菌针将内生真菌和人参病原菌接种到同一 PDA 平板上,2 种菌相距 3 cm,以只接种人参病原菌的 PDA 平板为对照。每个处理 3 个重复,于 25 ℃恒温培养箱中培养,7 d 后采用十字交叉法测量人参病原菌菌落直径,计算林下参内生真菌对人参病原菌的抑菌率[11]。

抑菌率=(对照人参病原菌菌落直径-对峙培养人参病原菌菌落直径)/对照人参病原菌菌落直径×100%。

1.4　菌株发酵液抑菌试验

1.4.1　*发酵液的制备*　前期初筛到 1 株内生真菌,命名为 FS-01。将该菌株在 PDA 平板上活化 7 d 后,在无菌的条件下,用 5 mm 打孔器打取 10 个菌饼,转接到装有 100 mL PD 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中,于黑暗条件下 25 ℃、120 r/min 转速恒温摇床上振荡培养 7 d。无菌条件下,将培养的菌液经灭菌的双层纱布过滤除去菌丝,滤液经 5 000 r/min 离心 15 min 去除沉淀,上清液经孔径为 0.22 μm 的细菌过滤器过滤得到 FS-01 菌株无菌发酵液,置于冰箱(4 ℃)中保存备用[12]。

1.4.2　*发酵液对人参病原菌菌丝生长的抑制作用*　吸取 2 mL 制备好的发酵液,加至 45 ℃的 PDA 培养基中,混匀。以加入 2 mL 无菌水的平板作对照,将人参病原菌菌饼接种于平板中央,置于 25 ℃恒温培养箱中培养。培养 7 d 后采用十字交叉法测量菌落生长直径,计算 FS-01 菌株对人参病原菌的抑菌率,方法同 1.3。

1.5　内生拮抗菌的鉴定

1.5.1　*形态学鉴定*　将林下参内生真菌接种于 PDA 平板上,采用插玻片法将无菌盖玻片以 45°角

插入培养基中，置于 25 ℃恒温培养箱中培养 7 d 后，在显微镜下观察病原菌形态特征。

1.5.2 分子生物学鉴定 利用 DNA 试剂盒提取林下参内生真菌基因组，对 rDNA-ITS 区域进行 PCR 扩增，真菌通用引物 ITS1（5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′）和 ITS4（5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′），均由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。PCR 反应体系（25 μL）：10×PCR 缓冲液 2.5 μL，上、下游引物各 1.0 μL，2.5 mmol/L dNTP 2.0 μL，5 U/μL 的 *Taq* 酶 0.1 μL，DNA 模板为 1.0 μL，最后加双蒸水补足至 25 μL。PCR 扩增条件：95 ℃预变性 3 min；95 ℃变性 40 s，53 ℃退火 35 s，72 ℃延伸 30 s，共 35 个循环；最后 72 ℃延伸 10 min。

PCR 产物纯化和测序由生工生物工程（上海）股份有限公司完成。利用 BLAST 软件将测序结果在 NCBI 数据库中进行查找，应用 Clustal 软件进行 ITS 序列比对，最后用 MEGA 7.0 软件以邻接法构建系统发育树。

1.6 拮抗菌株抑菌图谱的测定

采用平板对峙法对拮抗菌株进行抑菌图谱的测定，方法参考 1.3。

1.7 拮抗菌株发酵条件优化

1.7.1 培养基成分优化 碳源优化：在其他条件不变的情况下，分别用麦芽糖、乳糖、玉米粉、淀粉和蔗糖等量替换基础发酵培养基中的葡萄糖，以基础发酵培养基为对照。

氮源优化：在其他条件不变的情况下，分别用酵母浸粉、牛肉膏、硝酸钾、尿素、氯化铵等量替换基础发酵培养基中的蛋白胨，以基础发酵培养基为对照。

无机盐优化：在其他条件不变的情况下，分别用磷酸氢二钾、硫酸锰、硫酸镁、硫酸锌和硫酸亚铁等量替换基础发酵培养基中的碳酸钙，以基础发酵培养基为对照。

1.7.2 培养基成分正交试验 根据培养基成分单因素试验的结果，选择最佳碳源（淀粉）、氮源（酵母浸粉）、无机盐（磷酸氢二钾和硫酸镁）共 4 个因素，设置 3 个水平，进行正交试验（表 1）。发酵试验设计 3 次重复，取 3 次试验的平均值作为发酵配方的试验结果。

表 1 培养基成分正交试验因素与水平

Tab. 1 Orthogonal factors and levels of culture medium %

水平	A（淀粉） A（Starch）	B（酵母浸粉） B（Yeast extract powder）	C（磷酸氢二钾） C（Dipotassium phosphate）	D（硫酸镁） D（Magnesium sulfate）
1	0.50	0.50	0.05	0.05
2	1.00	1.00	0.10	0.10
3	1.50	1.50	0.15	0.15

1.7.3 发酵条件优化 基于优化的发酵培养基，检测起始 pH 值、温度、接种量和发酵时间对菌株 FS-01 抑菌效果的影响。（1）起始 pH 值：设置 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 共 6 个起始 pH 值，接种后于 25 ℃、150 r/min 条件下培养 5 d，检测抑菌效果；（2）温度：设置 20、25、30、35、40、45 ℃共 6 个温度，接种后于 150 r/min 条件下培养 5 d，检测抑菌效果；（3）接种量：设置 3.0%、4.0%、5.0%、6.0%、7.0%、8.0%共 6 个接种量，接种后于 150 r/min 条件下培养 5 d，检测抑菌效果；（4）发酵时间：设置 2、3、4、5、6、7 d 共 6 个发酵时间，接种后于 25 ℃、150 r/min 条件下培养，检测抑菌效果。

2 结果与分析

2.1 林下参内生拮抗菌的分离筛选

从表 2 可以看出，菌株 FS-01 与人参病原菌对峙培养 7 d 时，对供试的 7 株病原菌均有不同程度的抑制作用，其中对人参黑斑病菌抑制效果最好，抑菌率为 35.83%；从表 3 可以看出，菌株 FS-01 的发酵液对 7 株病原菌也表现出较好的抑菌效果，在对峙培养第 7 天时，菌株 FS-01 的发酵液对人参黑斑病菌的抑菌效果最好，为 49.04%。

表 2 菌株 FS-01 对人参病原菌菌丝生长的抑制作用

Tab. 2 Inhibitory effect of FS-01 strain against mycelial growth of ginseng pathogens %

人参病原菌 Ginseng pathogen	抑菌率 Inhibition rate
人参黑斑病菌 *Alternaria panax*	35.83
人参锈腐病菌 *Cylindrocarpon destructans*	26.18
人参立枯病菌 *Rhizoctonia solani*	24.37
人参根腐病菌 *Fusarium solani*	19.07
人参灰霉病菌 *Botrytis cinerea*	18.53
人参菌核病菌 *Sclerotinia schinseng*	21.39
人参疫病菌 *Phytophthora cactorum*	17.67

2.2 拮抗菌株的鉴定

2.2.1 形态学鉴定 将筛选获得的拮抗菌株 FS-01 接种至 PDA 培养基中，培养 5 d 后，菌落呈淡黄

表 3　菌株 FS-01 发酵液对人参病原菌菌丝生长的抑制作用

Tab. 3　Inhibitory effect of FS-01 strain fermentation broth against mycelial growth of ginseng pathogens　%

人参病原菌 Ginseng pathogen	抑菌率 Inhibition rate
人参黑斑病菌 *Alternaria panax*	49. 04
人参锈腐病菌 *Cylindrocarpon destructans*	30. 38
人参立枯病菌 *Rhizoctonia solani*	33. 88
人参根腐病菌 *Fusarium solani*	29. 22
人参灰霉病菌 *Botrytis cinerea*	32. 02
人参菌核病菌 *Sclerotinia schinseng*	36. 83
人参疫病菌 *Phytophthora cactorum*	58. 47

色、边缘不规则形(图 1A)。培养 10 d 左右,有子囊果长出,子囊果椭圆形,子囊孢子褐色、柠檬形,两端突起,顶端具有萌发孔(图 1B)。

2.2.2　分子生物学鉴定　菌株 FS-01 的 18S rDNA 测序得到了 571 bp DNA 序列,将得到的序列与 NCBI 数据库 BLAST 比对,结果显示,FS-01 菌株与登录号为 KX421415.1 的球毛壳菌(*Chaetomium globosum*)亲缘关系最近,处于系统发育树的同一分支上(图 2)。结合菌株 FS-01 在 PDA 平板上的形态学特征,以及基于 18S rDNA 序列的系统发育分析结果,鉴定菌株 FS-01 为球毛壳菌(*C. globosum*),命名为 *C. globosum* FS-01。

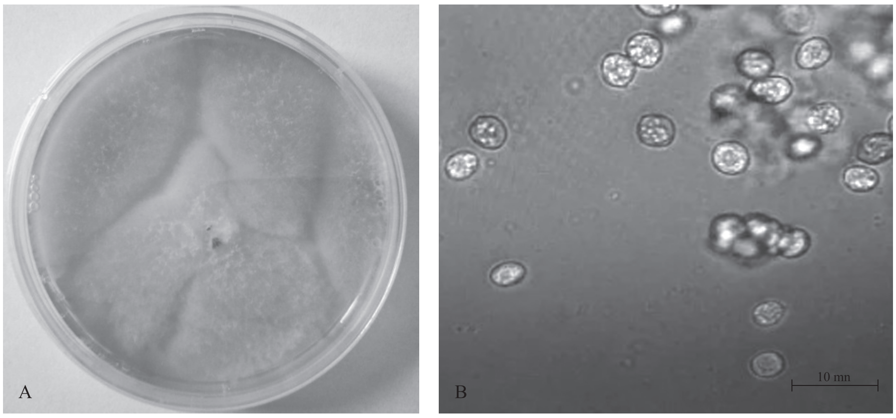

图 1　FS-01 菌株形态学特征

Fig. 1　Characteristics of FS-01 strain on PDA

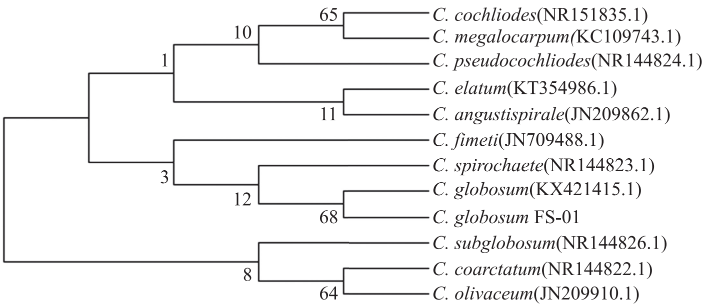

图 2　FS-01 菌株基于 18S rDNA 的系统发育树

Fig. 2　Phylogenetic tree of FS-01 strain based on 18S rDNA sequences

2.3　拮抗菌株抑菌谱的测定

平板对峙法结果表明,FS-01 菌株对多种人参病原菌具有较强的抑制作用,其中,对人参黑斑病菌抑制效果最佳,抑菌率高达 83.12%(表 4),可见菌株 FS-01 抑菌谱较广,可开发为人参黑斑病的生防菌株。

2.4　拮抗菌株发酵条件优化

2.4.1　培养基成分优化　不同碳、氮源和无机盐对 FS-01 菌株抑菌活性的影响如表 5 所示。在所有碳源中,以淀粉为碳源时抑菌圈最大,抑菌圈直径为 20.37 mm,因此淀粉为最适碳源;在所有氮源中,以

表 4　菌株 FS-01 的抑菌谱

Tab. 4　Spectrum of the strain FS-01　%

人参病原菌 Ginseng pathogen	抑菌率 Inhibition rate
人参黑斑病菌 *Alternaria panax*	83. 12±0. 78
人参锈腐病菌 *Cylindrocarpon destructans*	35. 74±0. 66
人参立枯病菌 *Rhizoctonia solani*	54. 48±0. 14
人参根腐病菌 *Fusarium solani*	67. 33±0. 42
人参灰霉病菌 *Botrytis cinerea*	26. 05±3. 37
人参菌核病菌 *Sclerotinia schinseng*	62. 12±2. 46
人参疫病菌 *Phytophthora cactorum*	23. 12±2. 54

酵母浸粉为氮源时抑菌圈最大,抑菌圈直径为 23.15 mm,因此酵母浸粉为最适氮源;在所有无机盐中,以磷酸氢二钾为无机盐时抑菌圈最大,抑菌圈直径为 23.85 mm,因此磷酸氢二钾为最适无机盐。

表 5 不同碳、氮和无机盐对菌株 FS-01 抑制作用的影响

Tab. 5 Effect of different carbon sources, nitrogen sources and inorganic salts on inhibitory effect of FS-01 strain mm

碳源 Carbon source	抑菌圈直径 Inhibition zone	氮源 Nitrogen source	抑菌圈直径 Inhibition zone	无机盐 Inorganic salt	抑菌圈直径 Inhibition zone
麦芽糖 Maltose	15.11b	酵母浸粉 Yeast extract powder	23.15e	磷酸氢二钾 Dipotassium phosphate	23.85e
乳糖 Lactose	16.96c	牛肉膏 Beef extract	21.67d	硫酸锰 Manganese sulfate	18.64c
玉米粉 Corn flour	14.32a	硝酸钾 Potassium nitrate	5.26b	硫酸镁 Magnesium sulfate	21.16d
淀粉 Starch	20.37e	尿素 Urea	4.51a	硫酸锌 Zinc sulfate	8.53b
蔗糖 Saccharose	18.45d	氯化铵 Ammonium chloride	7.36c	硫酸亚铁 Ferrous sulfate	3.26a

注:同列不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant differences(P<0.05).

2.4.2 正交试验 以淀粉(A)、酵母浸粉(B)、磷酸氢二钾(C)和硫酸镁(D)为因素,按 $L_9(3^4)$ 正交表设计四因素三水平的正交试验,通过测定 FS-01 菌株对人参黑斑病菌的抑菌活性大小,确定最佳发酵培养基配方。正交试验的极差分析表明,4 个因素对人参黑斑病抑菌率的影响为 A>B>D>C,最佳水平组合是 $A_2B_2C_1D_2$(表 6);方差分析结果表明,因素 A 对 FS-01 菌株发酵液抑菌活性影响显著,因此确定培养基的最佳配方:淀粉 1.50%、酵母浸粉 1.00%、磷酸氢二钾 0.05%、硫酸镁 0.10%。

表 6 发酵培养基正交设计 $L_9(3^4)$ 及试验结果

Tab. 6 $L_9(3^4)$ orthogonal design of fermentation culture medium and the test results

编号 No.	A	B	C	D	抑菌率/% Inhibition rate
	1	1	1	1	3.57
	1	2	2	2	12.36
	1	3	3	3	41.55
	2	1	2	3	13.78
	2	2	3	1	20.34
	2	3	1	2	80.23
	3	1	3	2	61.27
	3	2	1	3	62.89
	3	3	2	1	76.58
x_1	21.531	28.583	50.731	33.637	
x_2	39.462	35.442	34.166	53.852	
x_3	70.734	67.471	46.378	44.278	
R	50.629	39.664	18.553	22.639	

2.4.3 发酵条件优化 在已经确定的最佳培养基成分基础上,对 FS-01 菌株的发酵条件进行单因素优化试验(图 3)。结果表明,不同培养条件对 FS-01 菌株的抑菌活性影响较大,当 pH 值为 7 时,抑菌率最大为 28.54%,pH 值过高或过低,都会降低 FS-01 菌株的抑菌活性;当培养温度为 30 ℃时,抑菌率最大为 45.24%,FS-01 菌株的抑菌活性最强;当接种量为 6.0%时,抑菌率最大为 54.13%;抑菌率随发酵时间的延长先升高后降低,当发酵时间为 5 d 时抑菌率最大为 63.18%。由此可知,拮抗菌株 FS-01 最适发酵条件:pH 值为 7.0,最适培养温度为 30 ℃,最适接种量为 6.0%,最适培养时间为 5 d。

在最佳培养基成分和发酵条件下,进行 3 次验证试验,抑菌率为 92.65%。因此,优化后的发酵培养基成分和发酵条件有利于 FS-01 菌株抑菌活性物质的生成。

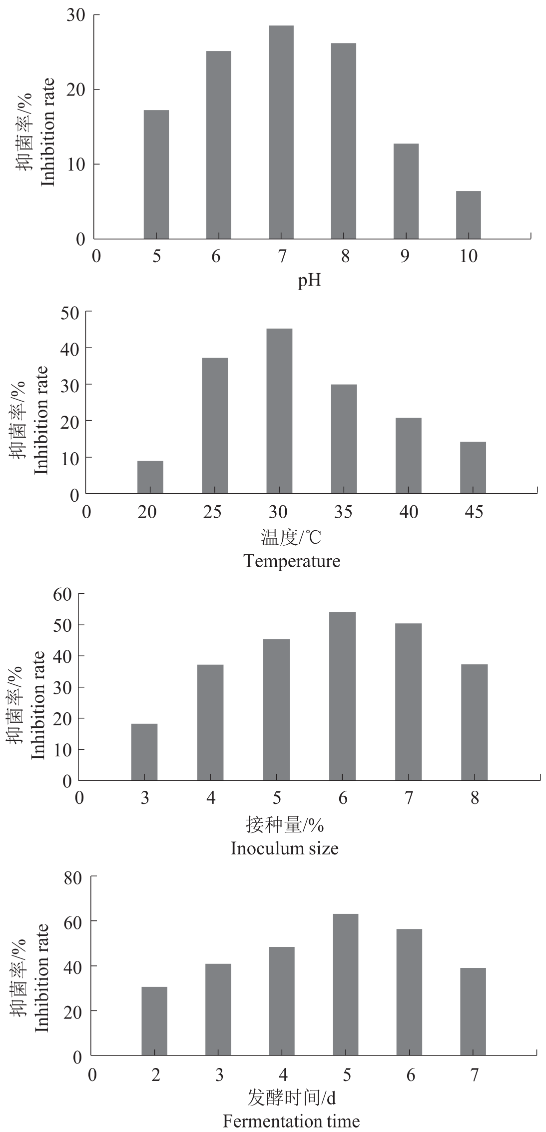

图 3　不同发酵条件对 FS-01 菌株发酵液抑菌活性的影响

Fig. 3　Effect of different fermentation conditions on the inhibition activity of FS-01 strain

3　结论与讨论

本研究从健康林下参叶片中筛选出 1 株内生拮抗真菌 FS-01 菌株,经鉴定为球毛壳菌(*Chaetomium globosum*),在最佳培养基成分和发酵条件下,该内生拮抗真菌对人参黑斑病的抑菌率为 92.65%。

球毛壳菌隶属于子囊菌亚门、毛壳菌科、毛壳属真菌,广泛分布于空气、土壤等多种自然环境中,也是常见的植物内生真菌。该属能产生生物活性的次级代谢产物[13],如球毛壳素类、鞘氨醇、嗜氮酮类等,具有促生、抑菌、抗病毒等生物活性[14]。球毛壳菌是毛壳属中的重要菌群,存在于各种植物体内,对植物病害起潜在的生防作用。兰楠等[15]从油菜幼苗中分离出的球毛壳菌对 4 种油菜病原菌有不同程度的抑制作用;岳会敏等[16]发现,球毛壳菌对 5 种植物病原菌有明显的抑制作用,主要是通过竞争作用、重寄生作用抑制病原菌生长;印容等[17]研究表明,内生真菌球毛壳菌产生的鞘氨醇次生代谢产物对油菜根肿病具有很好的生防作用。本研究从健康林下参叶片中分离获得的球毛壳菌 FS-01 菌株,对 7 种人参病原菌有抑制作用,尤其对人参黑斑病菌抑制效果最强,因此,该内生真菌可作为人参病害的生防菌。

抑菌活性物质受外界培养条件的影响,为了提高 FS-01 菌株抑菌活性物质的产量,通过单因素试验优化了培养基成分及发酵条件,后续将探究其抑菌机制,以期为将其大规模开发成一种新型生防菌剂奠定理论基础。

参考文献:

[1]　张雷鸣,徐娇,刘振鹏,等. 人参黑斑病拮抗菌的筛选[J]. 东北林业大学学报,2016,44(11):89-91.
ZHANG L M, XU J, LIU Z P, *et al.* Screening biocontrol fungi against ginseng black spot pathogen[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2016, 44(11): 89-91.

[2]　陈长卿,金辉,姜云,等. 生防菌株 NJ13 与化学农药复配对人参黑斑病的联合毒力及田间防效[J]. 农药,2019,58(5):381-384.
CHEN C Q, JIN H, JIANG Y, *et al.* Co-toxicity and field control effect of biocontrol strain NJ13 and its mixture with chemical fungicides against *Alternaria panax* [J]. Agrochemicals, 2019, 58(5): 381-384.

[3]　王迪,王诗然,杨明佳,等. 吉林省人参黑斑病菌对常用药剂的抗药性监测及交互抗药性测定[J]. 农药,2018,57(8):603-605.
WANG D, WANG S R, YANG M J, *et al.* Detection of the resistance of *Alternaria panax* and cross-resistance on ginseng in Jilin Province [J]. Agrochemicals, 2018, 57(8): 603-605.

[4]　KALIA A, GOSAL S K. Effect of pesticide application on soil microorganisms[J]. Archives of Agronomy and Soil Science, 2011, 57(6): 569-596.

[5]　RODRIGUEZ R J, WHITE J F, AMOLD A E, *et al.* Fungal endophytes: Diversity and functional roles [J]. New Phytologist, 2009, 182: 314-330.

[6]　XIE J, STROBEL G A, FENG T, *et al.* An endophytic *Coniochaeta velutina* producing broad spectrum antimycotics [J]. Journal of Microbiology, 2015, 53(6): 390-397.

[7]　AMARESAN N, JAYAKUMAR V, KUMAR K, *et al.* Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria and their effect on tomato (*Lycopersicon esculentum*) and chilli (*Capsicum annuum*) seedling growth

[J]. Annals of Microbiology, 2012, 62(2): 805-810.

[8] SANTHANAM R, BALDWIN I T, GROTEN K. In wild tobacco, *Nicotiana attenuata*, variation among bacterial communities of isogenic plants is mainly shaped by the local soil microbiota independently of the plants' capacity to producejasmonic acid [J]. Communicative & Integrative Biology, 2015, 8(2): e1017160.

[9] 方翔,徐伟芳,牛娜,等. 一株桑树内生拮抗菌的分离、鉴定及发酵条件优化[J]. 微生物学报, 2018, 58(12): 2147-2160.

FANG X, XU W F, NIU N, *et al.* Screening, identification and optimization of fermentation conditions of an antagonistic endophytic bacterium from mulberry[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(12): 2147-2160.

[10] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京:中国农业出版社, 2001.

FANG Z D. Plant pathology research methods[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2001.

[11] 周春元,朴向民,闫梅霞,等. 人参黑斑病菌生防内生真菌的分离筛选鉴定及抑菌特性[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(2): 274-277.

ZHOU C Y, PIAO X M, YAN M X, *et al.* Isolation, screening and identification of endophytic fungi and detection of its antifungal effects against *Alternaria panax* [J]. China Journal of Chinese Medica, 2019, 44(2): 274-277.

[12] 宋勇,顾玉琴,李小玉,等. 一株鱼腥草内生真菌的菌种鉴定及抑菌活性初探 [J]. 现代预防医学, 2018, 45(11): 2052-2058.

SONG Y, GU Y Q, LI X Y, *et al.* Identification and the antimicrobial activity of an endophytic fungus isolated from houttuynia cordata thumb [J]. Morden Preventive Medicine, 2018, 45(11): 2052-2058.

[13] FATIMA N, MUHAMMAD S A, KHAN I, *et al.* *Chaetomium*, endophytes: A repositoryof pharmacologically active metabolites [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2016, 38(136): 1-18.

[14] 徐国波,张青艳,周孟. 毛壳菌属真菌的次级代谢产物及其生物活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(3): 515-525.

XU G B, ZHANG Q Y, ZHOU M. Review on the secondary metabolites and its biological activities from *Chaetomium* fungi [J]. Natural Product Research and Development, 2018, 30(3): 515-525.

[15] 兰楠,祁高富,喻子牛,等. 油菜内生真菌的分离鉴定及抑菌作用[J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(3): 270-275.

LAN N, QI G F, YU Z N, *et al.* Isolation, identification and anti-fungal action of endophytic fungi of rapeseed [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2011, 30(3): 270-275.

[16] 岳会敏,杨谦,宋金柱. 两种毛壳菌对几种植物病原菌的生防效果分析[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2009, 25(5): 593-596.

YUE H M, YANG Q, SONG J Z. Study on analysis of biological control effect two kinds of *Chaetomium* spp. on several patnogen [J]. Journal of Harbin University of Commerce (Natural Sciences Edition), 2009, 25(5): 593-596.

[17] 印容,高慧娟,赵秀云. 球毛壳菌及其产生的鞘氨醇对油菜根肿病的室内生防作用[J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(5): 58-62.

YIN R, GAO H J, ZHAO X Y. Biocontrol effect of *Chaetomium globosum* and sphingosine on *Plasmodiaphora brassicae* [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2016, 35(5): 58-62.