

DOI:10.11937/bfyy.201701027

# 羊耳蒜内生真菌的分离鉴定与抑菌活性筛选

丁锐<sup>1,2</sup>, 李萌凯<sup>1</sup>, 任光宇<sup>1</sup>, 金字琦<sup>1</sup>, 张浩琪<sup>1</sup>, 陈旭辉<sup>1</sup>

(1. 沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 沈阳农业大学 土地与环境学院, 辽宁 沈阳 110866)

**摘要:**以兰科野生植物羊耳蒜为试材,采用常规无菌培养技术分离其根部的内生真菌,同时采用平板对峙的方法,研究了所获得的内生真菌菌株对常见植物病原真菌的抑菌活性。结果表明:从羊耳蒜的根中共分离获得43株内生真菌,经形态学鉴定分属于7个属,其中丝核菌属占优势。筛选得到4株具有较强抑菌活性的菌株,占分离菌株总数的9.3%,抑菌活性集中在油菜菌核病菌。结合分子生物学鉴定发现,这4株菌株分别为腐皮镰孢菌 *Fusarium solani*、柱孢霉属菌株 *Cylindrocarpus* sp.、轮枝菌属菌株 *Lecanicillium* sp. 和胶膜菌属菌株 *Tulasnella* sp.。

**关键词:**内生真菌;抑菌活性;羊耳蒜;兰科

**中图分类号:**Q 949.32 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)01-0126-05

内生真菌是指在其生活史中的某一段时期生活在植物组织内,对植物组织没有引起明显病害症状的真菌。自然界中,内生真菌与植物之间的共生关系广泛存在。研究表明,内生真菌在从植物中获取生存所需的营养及养分的同时,往往也会带给宿主一些选择性的优势,包括促进植物生长<sup>[1-2]</sup>、降低有毒物质积累<sup>[3]</sup>、增强植物抗病性<sup>[4-5]</sup>等。基于内生真菌的这些作用,目前越来越多的研究关注于有益真菌的发掘与利用,并且已从多种资源植物的内生真菌中筛选出具有生理活性和抑菌活性的菌株<sup>[6-9]</sup>,说明内生真菌可能成为生物防治中有潜力的微生物农药和增产菌。利用内生真菌控制植物病虫害、开发有益内生真菌可提高作物产量和品质,对农业可持续发展具有重要意义。

兰科(Orchidaceae)在被子植物中是仅次于菊科的第二大科,约有750多属,超过2万种,主要分布于热带、亚热带和温带地区。兰科植物具有很高的观赏价值和药用价值,是世界珍贵的野生植物资源之一。兰科植物种子在萌发及幼苗生长过程中必须有

合适的真菌共生,否则将不能生存。目前,国内外对兰科植物与其内生真菌的共生关系研究发现,兰科内生真菌具有丰富的数量和物种多样性。为了发掘和利用这一新生的微生物资源,该研究以东北地区分布的兰科野生植物资源羊耳蒜(*Liparis japonica*)为试材,对其根部的内生真菌进行分离、纯化及抑菌活性研究,并根据形态学结合ITS序列测序对抑菌活性菌株进行种属鉴定,以期获得对植物病原真菌具有优良抗菌活性的内生真菌,为兰科植物内生真菌资源的有效利用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试的羊耳蒜(*Liparis japonica*)于2011年6月采自辽宁省鞍山市千山自然保护区。剪取健康植株的根段,用封口袋带回实验室,24 h内进行内生真菌的分离。

拮抗指示菌:水稻恶苗病菌(*Fusarium moniliforme*)、小麦根腐病菌(*Cochliobolus sativus*)、小麦赤霉病菌(*F. graminearum*)、黄瓜枯萎病菌(*F. oxysporum*)、玉米黑粉菌(*Ustilagomaydis* (DC) Corola)、高粱靶斑病菌(*Bipolaris sorghicola*)和油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)菌株由沈阳农业大学植物病理学实验室提供。

### 1.2 试验方法

1.2.1 内生真菌的分离与纯化 将羊耳蒜的根段用流水冲洗干净,先表面消毒,用75%的酒精浸泡

**第一作者简介:**丁锐(1984-),男,博士,讲师,研究方向为微生物代谢工程。E-mail:enixer2002@163.com

**责任作者:**陈旭辉(1981-),女,博士,讲师,硕士生导师,研究方向为植物与内生真菌的互作。E-mail:chenxh017@163.com

**基金项目:**辽宁省科学事业公益研究基金资助项目(2015003013);国家自然科学基金资助项目(31670378)。

**收稿日期:**2016-09-26

10 s, 无菌水漂洗 3 次, 每次 30 s, 0.1% 升汞溶液浸泡 5 min, 无菌水漂洗 3 次, 每次 30 s, 最后一次冲洗后将根段保存在无菌水中。然后用无菌解剖刀将根段切成长度约 5 mm 的小段, 置于灭菌 PDA 培养基上, 封口, 25 °C 恒温培养箱中暗培养。接种后每天观察, 当有致密的菌丝从根段切口处长出时, 挑取菌丝并将其转移到新的 PDA 培养基上, 培养 7 d 后, 再从颜色质地均匀的菌落边缘挑取一小块菌丝, 接种到新的 PDA 培养基上, 如此反复 3~5 次, 以获得羊耳蒜根部的内生真菌单菌落。菌种于 4 °C 冰箱保藏。

1.2.2 消毒可靠性检验 用组织印迹法检查消毒效果。具体操作步骤: 用灭菌镊子夹住已消毒过的羊耳蒜根段, 使其表面分别与 PDA 平板接触 3 min 后取出, 放置于与内生真菌分离平皿相同的条件下进行培养, 观察培养基上是否有菌落生长。

1.2.3 菌株活化 将分离纯化获得的内生真菌菌株接种于 PDA 培养基上培养 5~14 d, 用 5 mm 直径的打孔器打孔, 制成菌饼备用。拮抗指示菌菌株的活化方法同上。

1.2.4 抑菌活性检测 采用平板对峙法<sup>[10]</sup>。挑取 1 块拮抗指示菌菌饼接种到 PDA 平板中央, 距离菌饼 3 cm 处的 2 个点对称接种内生真菌菌饼, 25 °C 恒温暗培养。每处理重复 3 次, 交叉试验, 逐日观察抑菌作用, 当内生真菌与拮抗指示菌相交后或菌落直径不再增加后, 测量并记录各组合抑菌圈的大小。

表 1 羊耳蒜根部内生真菌的形态特征及数量

Table 1 Genus distribution and morphological characteristics of the 43 fungal isolates from *Liparis japonica*

种属分类 Genus	数量 Quantity	菌落颜色 Colony color	菌落质地 Colony texture	生长速率 Growth rate /(mm · d <sup>-1</sup> )	气生菌丝 Aerial mycelium	分生孢子形状 Conidial shape	分生孢子大小 Conidia Size/μm
丝核菌属 <i>Rhizoctonia</i>	22	白色	革质, 致密	11.9±1.5	缺乏	—	—
拟茎点属 <i>Phomopsis</i>	6	粉红色到棕褐色	革质, 有放射状褶皱	4.9±0.5	缺乏	椭圆形, 圆柱形	(6~8)×(3~4)
轮枝菌属 <i>Lecanicillium</i>	6	白色/浅黄色	棉质, 较疏松	5.7±0.4	较少	纺锤形	5×(1.0~1.5)
镰孢菌属 <i>Fusarium</i>	3	白色	棉质, 疏松	11.8±0.5	丰富	卵圆形, 圆柱形	圆柱形: (15~20)×(5~10) 卵圆形: 4×3
毛壳菌属 <i>Chaetomium</i>	4	起初白色, 后变为橄榄绿色	垫状, 致密	4.8±0.5	缺乏	柠檬形	(8~9)×(4~5)
粘帚霉属 <i>Gliocladium</i>	1	白色	棉质, 较疏松	5.0±0.2	丰富	柠檬形	(6~8)×(3~5)
柱孢霉属 <i>Cylindrocarpon</i>	1	黄褐色	棉质, 致密	5.2±0.2	丰富	棒状, 椭圆形	40×(5~10)

## 2.3 内生真菌的抑菌活性

对上述 43 株内生真菌分别进行抑菌活性筛选, 由表 2、图 1 可知, 共有 4 株真菌对至少 1 种供试拮抗指示菌有抑菌活性, 分别为丝核菌属 1 株(编号 F-3)、轮枝菌属 1 株(编号 F-15)、镰孢菌属 1 株(编号 F-27)、柱孢霉属 1 株(编号 F-34), 占分离菌株总数的 9.3%。抑菌活性集中在油菜菌核病菌。其中, 镰孢

1.2.5 菌种鉴定 按照真菌形态鉴定的方法<sup>[11-12]</sup>, 将纯化菌株接种于 PDA 培养基上, 25 °C 培养, 根据菌落形态、生长速率、分生孢子的大小、形态和着生方式等对所得内生真菌进行形态学初步鉴定。对具有抗菌活性的菌株进一步进行 rDNA-ITS 序列扩增和分子鉴定。采用 CENIS<sup>[13]</sup> 的方法快速提取基因组 DNA, 用 WHITE 等<sup>[14]</sup> 设计的引物 ITS1 和 ITS4 进行扩增。PCR 扩增程序: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物送到上海生工生物工程公司测序。用 GenBank 中的 BLAST 程序搜索同源序列, 挑选与菌株序列相近的参考序列进行系统发育分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 消毒可靠性检验结果

组织印迹法所用平皿培养 7 d 后, 观察发现均无菌落生长, 表明对羊耳蒜根部的表面消毒彻底, 分离平皿上长出的是内生真菌。

### 2.2 羊耳蒜内生真菌的分离与形态鉴定

从羊耳蒜植株的根部分离获得的内生真菌菌株经纯化培养后, 共得到 43 株内生真菌(表 1)。经形态学初步鉴定, 分属于 7 个属, 分别为丝核菌属(*Rhizoctonia*)、拟茎点属(*Phomopsis*)、轮枝菌属(*Lecanicillium*)、镰孢菌属(*Fusarium*)、毛壳菌属(*Chaetomium*)、粘帚霉属(*Gliocladium*)和柱孢霉属(*Cylindrocarpon*), 其中丝核菌属占优势地位。

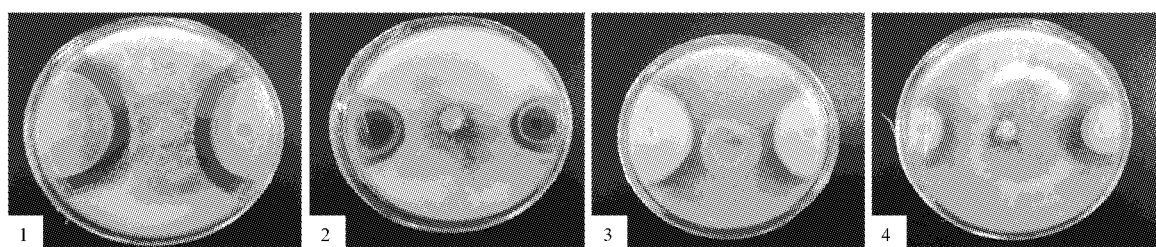
菌属真菌的抑菌活性最显著, 对油菜菌核病菌的抑菌圈直径为 0.57 cm。其次为柱孢霉属真菌, 对油菜菌核病菌的抑菌圈直径为 0.31 cm, 轮枝菌属和丝核菌属真菌对油菜菌核病菌的抑菌圈直径则分别为 0.30 cm 和 0.29 cm。所有分离获得的羊耳蒜内生真菌对小麦根腐病菌、小麦赤霉病菌、黄瓜枯萎病菌、玉米黑粉病菌和高粱靶斑病菌均无抑菌活性。

表 2 羊耳蒜根部内生真菌的抑菌活性(抑菌圈直径±标准差)

拮抗指示菌 Antagonistic fungal strains	内生真菌 Endophytic fungi			
	F-3 (丝核菌属菌株)	F-15 (轮枝菌属菌株)	F-27 (镰孢属菌株)	F-34 (柱孢霉属菌株)
	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Lecanicillium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Cylindrocarpon</i> sp.
水稻恶苗病菌 <i>Fusarium moniliforme</i>	—	—	—	—
小麦根腐病菌 <i>Cochliobolus sativus</i>	—	—	—	—
小麦赤霉病菌 <i>Fusarium graminearum</i>	—	—	—	—
黄瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	—	—	—	—
玉米黑粉菌 <i>Ustilagomaydis corola</i>	—	—	—	—
高粱靶斑病菌 <i>Bipolaris sorghicola</i>	—	—	—	—
油菜菌核病菌 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	0.29±0.03	0.30±0.02	0.57±0.03	0.31±0.03

注:“—”表示无抑菌活性。

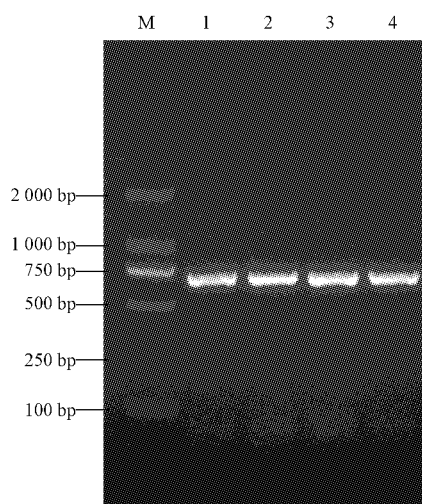
Note:“—” represents negative.



注:1. 镰孢属真菌-油菜菌核病菌;2. 柱孢霉属真菌-油菜菌核病菌;3. 轮枝菌属真菌-油菜菌核病菌;4. 丝核菌属真菌-油菜菌核病菌。

Note:1. *Fusarium* sp.-*Sclerotinia sclerotiorum*;2. *Cylindrocarpon* sp.-*Sclerotinia sclerotiorum*;3. *Lecanicillium* sp.-*Sclerotinia sclerotiorum*;4. *Rhizoctonia* sp.-*Sclerotinia sclerotiorum*.

图 1 羊耳蒜根部内生真菌的抑菌活性

Fig. 1 Antimicrobial activity of endophytic fungi of *Liparis japonica*

注:M: Marker DL 2 000。

Note:M: Marker DL 2 000.

图 2 羊耳蒜根部内生真菌 ITS 序列

Fig. 2 ITS sequences of endophytic fungi isolated from roots of *Liparis japonica*

## 2.4 具抑菌活性菌株的分子鉴定

对具有抑菌活性的 4 个菌株的 rDNA-ITS 基因

片段进行扩增,由图 2 可知,4 个菌株均只得到一条扩增产物,片段大小约为 640 bp。序列测序后,在 GenBank 数据库中进行有效种的序列相似性搜索并对其进行分子鉴定和序列提交,得到这 4 个菌株的鉴定结果及所得 GenBank 序列号分别为腐皮镰孢菌 *F. solani*(KT719204)、柱孢霉属菌株 *Cylindrocarpon* sp. (KT719190)、轮枝菌属菌株 *Lecanicillium* sp. (KT719189) 和胶膜菌属菌株 *Tulasnella* sp. (KF537652)。

## 3 讨论

植物内生真菌普遍存在于各种植物体内,且生物多样性丰富,从中可发现一些极具生理活性的菌株,这对寻求天然、绿色、安全的新型生防菌和增产菌均具有重要的研究价值<sup>[15-16]</sup>。在目前的研究中,体外抑菌试验常被作为抑菌研究的主要方法<sup>[17-19]</sup>,能准确地揭示供试菌株的抑菌效果,不受环境条件的干扰,且具有重复性好的特点。该研究从羊耳蒜根部共分离获得 43 株内生真菌菌株,并筛选到 4 株具有较强抑菌活性的菌株,分属于 4 个不同的属。在活性菌株中,有 1 株的抑菌活性较强,展现出较好的应用开发价值,表明羊耳蒜的内生真菌中蕴藏着

具有抑菌活性的菌株资源,也进一步证实了植物内生真菌是一类有着广阔应用前景的潜在的抑菌药物资源。

据报道,兰科根部的共生真菌的种类涉及4个门50余属,其中主要以担子菌和半知菌为主,并且多数真菌缺乏稳定的形态学和培养特征,鉴定存在困难<sup>[20-21]</sup>。目前对兰科内生真菌的鉴定主要采用形态学结合分子鉴定方法进行种属鉴定,极少数能鉴定到种。该研究中,经形态学结合 ITS 基因序列分析,具有抑菌活性的内生真菌中有1株鉴定到种,有3株只能鉴定到属。具有抑菌活性的镰孢菌属真菌也在兰科石斛属植物中分离获得<sup>[22]</sup>,这些活性真菌的分类学地位、抑菌作用机制、抑菌活性物质的组分及相应化学结构都有待进一步研究。

此外,羊耳蒜内生真菌的抑菌活性具有选择性和特异性的特点,抑菌活性主要集中在对油菜菌核病菌的抑制作用上,而对其它几种供试病原真菌均无抑菌活性。同属内不同菌株的抑菌活性有较大差异,例如在分离获得的22株丝核菌属真菌中只有1株具有抑菌活性,6株轮枝菌属真菌中也仅有1株具有抑菌活性等,且抑菌活性的强弱与菌株的多少和分离率无关。虽然与已报道的其它兰科植物相比,羊耳蒜根部具有广谱抗菌活性的真菌相对较少,但仍然有一些具有选择活性的菌株,可以针对这些菌株开展深入研究,从而为植物病虫害的防治提供有效手段,为进一步筛选有益真菌提供资源。

#### 参考文献

- [1] ARTURSSON V, FINLAY R D, JANSSON J K. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth[J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(1): 1-10.
- [2] PORRAS-SORIANO A, SORIANO-MARTÍN M L, PORRAS-PIEDRA A, et al. Arbuscular mycorrhizal fungi increased growth, nutrient uptake and tolerance to salinity in olive trees under nursery conditions[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2009, 166: 1350-1359.
- [3] FOMINA M A, ALEXANDER I J, COLPAERT J V, et al. Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37(5): 851-866.
- [4] YAO M K, TWEDDELL R J, DÉSILETS H. Effect of two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of micropropagated po-

tato plantlets and on the extent of disease caused by *Rhizoctonia solani* [J]. *Mycorrhiza*, 2002(12): 235-242.

- [5] SMITH S E, READ D J. *Mycorrhizal symbiosis* [M]. Cambridge: Academic Press, 2008.
- [6] 何建清, 张格杰, 陈芝兰, 等. 大花黄牡丹内生菌的分离鉴定及其抗菌活性菌株的筛选[J]. *西北植物学报*, 2011, 31(12): 2539-2544.
- [7] 马敏芝, 南志标. 黑麦草内生真菌对植物病原真菌生长的影响[J]. *草业科学*, 2011, 28(6): 962-968.
- [8] 闵长莉, 汪学军, 刘文博. 春兰内生真菌的分离及其抑菌活性的初步研究[J]. *西北植物学报*, 2012, 32(3): 596-599.
- [9] 杨明琰, 田稼, 马瑜, 等. 杜仲内生真菌的分离鉴定及抗菌活性研究[J]. *西北植物学报*, 2012, 32(1): 193-198.
- [10] 赵斌, 林会, 何绍江. *微生物学实验* [M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2014.
- [11] CURRAH R S, SHERBURNE R. Septal ultrastructure of some fungal endophytes from boreal orchid mycorrhizas[J]. *Mycological Research*, 1992, 96: 583-587.
- [12] MA M, TAN T K, WONG S M. Identification and molecular phylogeny of *Epulorhiza* isolates from tropical orchids[J]. *Mycological Research*, 2003, 107: 1041-1049.
- [13] CENIS J L. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification[J]. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20(9): 2380.
- [14] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]//INNIS M A, GELFAND D H, SNINSKY J J, et al, eds. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. San Diego, CA, USA: Academic Press, Inc., 1990: 315-322.
- [15] 文才艺, 吴元华, 田秀玲. 植物内生菌研究进展及其存在的问题[J]. *生态学杂志*, 2004, 23(2): 86-91.
- [16] 管文芳, 戴相群, 胡强, 等. 微生物肥料“宁盾”对草莓的促生防病效果初探[J]. *北方园艺*, 2016(2): 158-162.
- [17] 仇艳肖, 程辉彩, 周竞, 等. 黄瓜灰霉病菌拮抗菌 BBC-3 的筛选、鉴定及抑菌特性[J]. *北方园艺*, 2016(6): 84-88.
- [18] 刘雷, 潘峰, 杨远兵, 等. 川麦冬内生真菌分离和鉴定及抑菌活性初步研究[J]. *中草药*, 2016, 47(8): 1382-1391.
- [19] 李玲玲, 罗合春, 张先淑. 中华芦荟内生真菌抑菌活性研究[J]. *生物学杂志*, 2016, 33(2): 69-71.
- [20] 陈瑞蕊, 林先贵, 施亚琴. 兰科菌根的研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 2003, 9(1): 97-101.
- [21] DEARNALEY J D W, MARTOS F, SELOSSE M-A. Orchid mycorrhizas: molecular ecology, physiology, evolution and conservation aspects [M]. *Fungal Association*, 2<sup>nd</sup> ed. (ed. HOCK B), Berlin: Springer-Verlag, 2013: 207-230.
- [22] 张丽春, 郭顺星. 5种石斛内生真菌的分离及其抗菌活性研究[J]. *中国药理学杂志*, 2009, 44(20): 1540-1543

## Isolation and Identification of Endophytic Fungi From *Liparis japonica* and Screening for Antimicrobial Activities

DING Rui<sup>1,2</sup>, LI Mengkai<sup>1</sup>, REN Guangyu<sup>1</sup>, JIN Yuqi<sup>1</sup>, ZHANG Haoqi<sup>1</sup>, CHEN Xuhui<sup>1</sup>

(1. College of Bioscience and Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866; 2. College of Land and Environment, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866)

DOI:10.11937/bfyy.201701028

# 基于树干注射法的三种药剂对枣树害虫的防治效果

高 洁

(河北省献县林业局,河北 沧州 062250)

**摘 要:**以枣树为试材,以 30%乙酰甲胺磷、10%吡虫啉和 1.8%阿维菌素乳油为供试药剂,采用树干注射法,研究了 3 种药剂对枣树害虫的防治效果,以期对枣树害虫的防治提供参考依据。结果表明:枣树的主要害虫有枣尺蠖、枣瘿蚊、桃小食心虫、绿盲蝽蟥、红蜘蛛等;10 倍液乙酰甲胺磷或吡虫啉注射防治枣尺蠖、枣瘿蚊的效果较好,5 倍的吡虫啉防治桃小食心虫效果最好,3 种药剂对绿盲蝽蟥均有极好的防治效果,1.8%阿维菌素防治红蜘蛛效果最好。

**关键词:**树干注射;防治;枣树害虫

**中图分类号:**S 436.64 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)01-0130-05

受气候和环境的影响,常规喷药防治已不能适应农村果树产业发展的需求<sup>[1]</sup>。首先,农村年轻人出去打工,管理枣树以老年人和妇女为主,传统的喷雾方法防治病虫害喷洒次数多,劳动强度大,老年人无法承受,致使出现了大面积的刨树现象<sup>[2-3]</sup>;其次,由于喷雾防治有 90%以上的药剂滴落于土壤和漂移在空气中而损失掉,引起严重的空气、土壤和水污染,对有益昆虫以及人类自身造成伤害,造成次要有害生物成为主要为害种群和有害生物的再猖獗,防治成本越来越高,病虫害带来的损失越来越大,已不适应人们对环境和食品安全的要求。

因此研究一种操作简便、药效持续时间长的施药方法十分必要,枣树干注射药剂防治害虫的方法克服了喷雾法的上述缺点,注射的农药能够全部进入植物体内,不受天气和树体高度的影响,农药持效期长,应用范围广泛,局部用药无漂移、不污染环境、不伤天敌,而且劳动强度小、简便易用、易于推广<sup>[4]</sup>。

该试验采用树干打孔注射方法,选用 30%乙酰甲胺磷、10%吡虫啉和 1.8%阿维菌素乳油为供试药剂,研究不同药剂浓度对枣树害虫的防治效果,以期找到防治枣树害虫最合适的药剂浓度,达到最好的防治效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验区概况

试验地处河北省沧州市西南部献县刘庄村,年平均气温 12.3℃,极端最高气温 43.0℃,极端最低气温 -23.8℃,年无霜期 189 d,年平均日照时数

**作者简介:**高洁(1972-),女,本科,林业高级工程师,现主要从事林果技术与推广等工作。E-mail: gaojie4623103@126.com

**收稿日期:**2016-09-23

**Abstract:** *Liparis japonica* species (Orchidaceae) was used as test material, the endophytic fungi from the roots were isolated by routine sterile culture techniques and then their antimicrobial activities on several common crop pathogens were studied by using plate cultivation methods. The results showed that a total of 43 isolates of endophytic fungi were obtained. They were classified into seven different genus according to their morphological characters, and *Rhizoctonia* genus was the dominant genus. Four isolates (9.3% of the total isolates obtained) showed antimicrobial activities on the test crop pathogens, and the antimicrobial activities mainly focused on *Sclerotinia sclerotiorum*. The phylogenetic analysis of ITS sequences indicated these four isolates belonged to *Fusarium solani*, *Cylindrocarpus* sp., *Lecanicillium* sp. and *Tulasnella* sp., respectively.

**Keywords:** endophytic fungi; antimicrobial activity; *Liparis japonica*; Orchidaceae