

DOI:10.11937/bfyy.201521030

苹果采后青霉病拮抗菌株的分离、鉴定和低能 N^+ 注入诱变

付瑞敏^{1,2}, 邢文会¹, 谷亚楠², 薛婷婷², 郭彦钊², 陈五岭²

(1. 河南教育学院 生命科学院, 河南 郑州 450046; 2. 西北大学 生命科学院, 陕西 西安 710069)

摘要:以苹果表面分离到拮抗扩展青霉的菌株 BA-16 为试材, 经形态学、生理生化及 16S rRNA 序列分析, 该菌被鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。为了增强该菌株防治青霉病的能力, 通过低能 N^+ 注入技术对其进行诱变选育, 获得抑菌性能显著提高且遗传性能稳定的突变株 BA-16-8。为检测该突变株防治青霉病的增强效果, 分别对野生株 BA-16 和突变株 BA-16-8 的菌悬液和无细胞发酵液进行果实生防检测。结果表明: 突变株的菌体及代谢产物的抗病性能显著高于野生菌株, 对于苹果采后青霉病的生物防治具有良好的应用开发前景。

关键词:苹果; 采摘后; 青霉病; 解淀粉芽孢杆菌; 低能 N^+ 注入

中图分类号:S 661.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)21-0116-05

我国是水果种植和出口的大国, 其中苹果产量蝉联世界首位。然而采摘后病害的侵染造成果实腐烂严重, 给苹果种植业及副产品加工行业带来巨大的经济损失。其中, 青霉病是苹果采摘后致其腐烂的重要病害之一, 该病的有效防治成为苹果产业亟待解决的问题。研究表明, 引起青霉病的主要致病菌是扩展青霉(*Penicillium expansum*)^[1]。

目前控制扩展青霉的主要方式仍是以化学杀菌剂和冷藏等物理手段为主, 化学杀菌剂虽然能够有效控制病原菌扩展青霉的生长, 但是随着病原菌抗药性能和人们健康环保意识的不断增强, 化学防治方法已逐渐不被人们认可甚至有些杀菌剂因存在毒性风险而已被禁止使用。诸如冷藏等物理方法虽然一定程度上可以阻止病原菌的生长但容易影响水果的风味和营养价值, 且处理不当会造成冻害, 此外, 处理成本也相对较高。而采用拮抗性生物抑制病原菌生长从而达到水果防腐和保

鲜的生物防治方法作为水果采摘后病害防治的新方法, 不仅不会改变水果的营养和风味, 还可以消除由于化学药剂对人体健康所造成的隐患, 故近几年已成为水果防腐保鲜的研究热点。

近年来已经有不少关于苹果青霉病的生物防治的研究报道, 采用的生物防治菌主要集中于生防酵母。LI 等^[2]研究研究粘质红酵母防治苹果采后灰霉病和青霉病的机制发现, 该酵母通过诱导苹果中过氧化物酶和多酚氧化酶的活性和高度抑制苹果脂质过氧化作用从而诱导苹果中防御机制依赖性酶的活化, 此外, 该酵母通过和病原菌的空间和营养竞争抑制病原菌生长。后来, 人们陆续发现芽孢杆菌属的一些菌株可以抑制扩展青霉的生长。HONG 等^[3]人从盐生植物根际分离出枯草芽孢杆菌 S16 并研究了该菌对苹果、桃和油桃采摘后青霉病的生物防治作用, 发现该菌可有效抑制扩展青霉的生长。研究发现, 芽孢杆菌所产的抗菌脂肽具有显著的抗真菌功效, 在水果采摘后霉菌性疾病防治中发挥着重要作用, 而作为细菌的次级代谢产物, 野生菌株的抗菌脂肽产量普遍不高。为了更大程度地发挥抗菌剂的生物防治潜力, 寻找可有效拮抗病原性真菌的菌株, 并通过诱变等手段选育抗菌脂肽高产菌株是目前亟待解决的问题。

将离子注入菌体细胞可形成能量沉积和动量传递, 同时还伴随电荷的中和与交换等联合作用, 采用离子注入技术对菌种进行改良可获得更为广泛的突变谱, 故该技术已被广泛应用于菌株遗传性能的改造。

课题组从苹果表面分离筛选到一株对扩展青霉具

第一作者简介:付瑞敏(1981-), 女, 河南郑州人, 博士研究生, 讲师, 现主要从事农业及食品微生物等研究工作。E-mail: angel-aminmin@163.com.

责任作者:陈五岭(1954-), 男, 陕西西安人, 硕士, 教授, 博士生导师, 现主要从事农业和环境及食品微生物等研究工作。E-mail: wuling.chen@263.net.

基金项目:农业部科技成果与转化资助项目(2012GB2G000451); 陕西省重大科技创新资助项目(2009ZKC04-16); 河南教育学院青年科研课题资助项目(20100103)。

收稿日期:2015-05-19

有拮抗作用的菌株 BA-16,结合该菌株的形态特征、生理生化及分子系统发育等特征分析结果对其进行鉴定,并采用低能 N^+ 注入技术对其进行诱变,以期获得高效抗青霉病的菌株,为今后将其应用于苹果采摘后青霉病的生物防治提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试材料 致病菌扩展青霉(*Penicillium expansum*)由陕西省微生物研究所惠赠,供试苹果采收于陕西洛川县。

1.1.2 试验仪器 N^+ 离子注入机 BNU-400(中科院北京市辐射中心研制, N^+ 离子能量为 25 KeV,束流 0.4 mA,真空度为 5×10^{-3} Pa)

1.1.3 培养基 YEB(牛肉膏蛋白胨培养基)用于拮抗菌的培养,具体配方参照文献[4];PDA(马铃薯培养基)用于病原性真菌的培养,具体配方参照文献[5];摇瓶发酵培养基用于发酵拮抗菌胞外抗菌性脂肽蛋白,具体配方参照文献[6]。

1.2 试验方法

1.2.1 细菌的分离 菌株分离自健康苹果果面。用无菌水清洗健康苹果,将所得液体经过 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 的梯度稀释,将 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 梯度稀释液分别涂布在 YEB 平板上,37℃ 培养 24 h。挑取各平板上的菌株分别进行纯化,得到单克隆,将其分别编号以作进一步研究。

1.2.2 初筛 采用平板对峙法^[7]对分离菌株进行拮抗能力的筛选。以扩展青霉为指示菌,将待测菌株和病原菌接种于 PDA 平板上,病原菌接种于平板中央,待测菌同病原菌间的距离为 2.5 cm,28℃ 培养 48 h 观察其生长状况,并测量抑菌带宽度,重复 3 次,挑取抑菌条带宽的菌株至 YEB 平板上,保存备用。

1.2.3 复筛 将初筛所得菌株接种于液体发酵培养基中,摇瓶震荡培养 72 h(37℃,150 r/m)。参照韩欣宇等^[8]的方法制备菌株无细胞发酵液,将所制的发酵液 200 μ L 接入牛津杯中,采用牛津杯法^[9]检测菌株无细胞发酵液拮抗扩展青霉的能力。28℃ 培养 24 h 后,测量记录牛津杯周围出现的抑菌圈直径,挑选直径最大的菌株作进一步研究。整个试验以无菌水作为对照,重复 3 次。

1.2.4 菌株的形态学与生理生化鉴定 将复筛所选菌株经染色、光学显微镜观察菌体个体及群体形态。参照《微生物学实验指导》^[10]和《伯杰细菌鉴定手册》^[11]就菌株的生理生化特征进行初步鉴定。

1.2.5 16S rRNA 基因序列分析 提取菌株的总基因组 DNA 为模板^[12],利用细菌 16S rRNA 基因的通用引物 27F(5'-AGAGTTTGTATCATGGCTCAG-3')和 1492R(5'-CTACGGTTACCTT GTTACGAC-3')进行

PCR 扩增^[12]。PCR 反应体系 25 μ L,热循环参数如下:94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 1 min,55℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 2 min,循环 30 次,72℃ 延伸 10 min。所得 PCR 产物经回收纯化后提交至上海生工进行测序,测序结果与 NCBI 数据库中相关菌种的 16S rRNA 序列用 BLAST 程序进行比对分析,利用 MEGA 4.1 构建系统发育树^[13]。

1.2.6 高效拮抗菌的低能 N^+ 注入诱变选育 1)样品处理^[14]:以复筛所得菌株为出发菌株,将其转接至新鲜斜面并培养 24 h 后,用 5 mL 的生理盐水清洗斜面菌苔,并将其倒入含有玻璃珠的锥形瓶内,充分振荡后,采用分光光度计法测量其 600 nm 处的光吸收值,调整菌悬液浓度使其 OD_{600} 为 0.986,此时菌悬液浓度为 10^8 cfu/mL。用微量移液器吸取 0.1 mL 菌悬液将其接种于 90 mm 的无菌平皿中,无菌条件下涂布均匀并风干制成菌膜。2)离子注入:将待处理平皿置于离子注入室,打开皿盖,室内抽真空,注入能量为 25 KeV 的低能 N^+ 离子束,注入剂量分别为 1.0×10^{15} 、 1.5×10^{15} 、 2.0×10^{15} 、 2.5×10^{15} 、 3.0×10^{15} ions/cm²。3)突变株的筛选:用无菌生理盐水 1 mL 冲洗离子注入后的平板,将所得液体进行梯度稀释到 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} ,分别取各稀释的菌悬液 0.1 mL 将其接种于 YEB 平板上,37℃ 培养 48 h,观察所得突变株的菌落形态并进行菌落计数。

1.2.7 正变株的筛选及遗传稳定性检测 选取抑菌圈直径较大的突变株,将其转接至 YEB 平板上,37℃ 培养 24 h,作为第一代,后每隔 24 h 传一代,每代均随机选取 3 个克隆,采用牛津杯法检测其无细胞发酵液抗扩展青霉的活性,进行遗传稳定性检测。

1.2.8 果实生防检测^[15] 选择 15 个大小、成熟度相同的健康成熟苹果,将其逐一消毒后,用 6 mm 规格的无菌打孔器在每个苹果表面打宽 6 mm,深 5 mm 的孔。设置 5 组处理组:T1(BA-16 菌悬液 10 μ L+病原菌孢子液 10 μ L),T2(BA-16 无细胞发酵液 10 μ L+病原菌孢子液 10 μ L),T3(BA-16-8 菌悬液 10 μ L+病原菌孢子液 10 μ L),T4(BA-16 无细胞发酵液 10 μ L+病原菌孢子液 10 μ L),对照组(CK)(无菌水 10 μ L+病原菌孢子液 10 μ L),将各处理组的混合液分别滴加于打孔处理的苹果表面,每处理组 3 次重复。将处理后的苹果分装,置于温度为 28℃、湿度为 95% 的培养箱,定期观察拮抗菌对青霉病的抑制情况,以只加病原菌不添加拮抗菌的苹果为阳性对照。

1.3 项目测定

将突变株的发酵液接种于 PDA 平板上,采用牛津杯法检测各突变株抗扩展青霉能力。规定抑菌圈直径大于出发菌株的为正变株,参照下列公式计算存活率与正变率:存活率(%)=诱变后的活菌数/诱变前的活菌

数 $\times 100$;正变率(%)=正突变的菌株数/诱变后的活菌数 $\times 100$ 。

1.4 数据分析

数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 扩展青霉拮抗菌株的分离和筛选

经过初筛从苹果表面分离获得 18 株菌。其中酵母 4 株,细菌 14 株。通过平板对峙试验,筛选出可拮抗扩展青霉的 6 株菌株。采用牛津杯法检测 66 个菌株的无细胞发酵液抗扩展青霉活性,所得结果如表 1 所示。结果表明,6 个菌株的菌株细胞和无细胞发酵液拮抗扩展青霉的效果表现出了显著的差异。其中,BA-16 的拮抗效果最强,故将其挑选出来做后续研究。

表 1 扩展青霉拮抗菌株筛选结果

Table 1 The screening results of antagonistic strains against *Penicillium expansum* mm

菌株 Strain	抑菌带宽 Width of inhibition belt	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter
BA-3	4.196 \pm 0.025	3.338 \pm 0.026
BA-6	4.980 \pm 0.035	4.013 \pm 0.028
BA-8	5.980 \pm 0.016	4.580 \pm 0.023
BA-12	6.650 \pm 0.033	5.380 \pm 0.024
BA-17	6.880 \pm 0.003	5.560 \pm 0.002
BA-16	7.050 \pm 0.016	5.880 \pm 0.036

2.2 扩展青霉拮抗菌株的形态学与生理生化鉴定

菌株 BA-16 经革兰氏染色阳性,显微镜镜检为杆菌,有芽孢,有荚膜,具有运动性。该菌株在 LB 平板上形成乳白色菌落。菌落边缘不整齐,干燥不透

明,中间有凸起。生理生化反应结果见表 2。参照《常见细菌系统鉴定手册》和《伯杰氏细菌鉴定手册》,结合菌株 BA-16 的形态、染色及生理生化特征,可将该菌株初步鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。

表 2 菌株 BA-16 的生理生化特征

Table 2 Characteristics of physiology and chemistry of BA-16 strains

特征 Characteristic	结果 Result	特征 Characteristic	结果 Result
厌氧生长	+	2% NaCl	+
明胶水解	+	7% NaCl	-
淀粉水解	+	30℃ 培养	+
柠檬酸盐利用	-	50℃ 培养	-
酪氨酸反应	-	D-葡萄糖	+
V.P 试验	+	麦芽糖	+
吡啶试验	+	D-甘露醇	+

注: +/ - 表示在生理生化鉴定中阳性/阴性反应。

Note: +/ - indicates positive/negative reaction in the physiological and biochemical identification.

2.3 16S rRNA 基因序列分析

提取菌株 BA-16 的总 DNA 进行 PCR 扩增,凝胶电泳回收扩增序列,得到一段长 1 468 bp 的 16S rRNA 基因,所获序列同 GenBank 中相近种属进行 BLAST,对 BLAST 结果进行分析,通过 MEGA 4.1 软件构建系统发育树(图 1)。发现菌株 BA-16 与 *Bacillus amyloliquefaciens* AY603658 的同源性达到 99%,结合上述的生理生化鉴定结果,可将菌株 BA-16 最终鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。

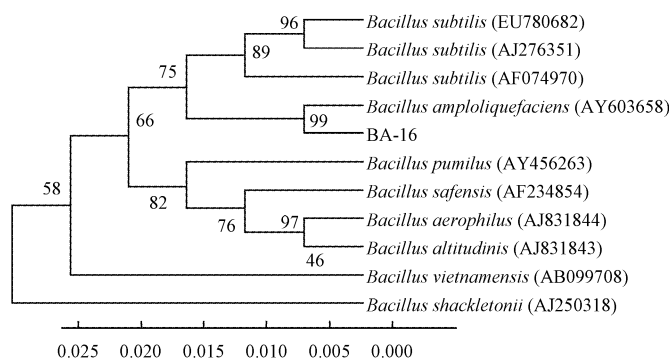


图 1 菌株 BA-16 16S rRNA 基因序列发育进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of 16S rRNA sequences of isolated strain BA-16

2.4 离子注入诱变结果

2.4.1 最佳诱变剂量的确定 采用低能 N^+ 注入诱变 BA-16,野生株在该离子能量作用下发生突变,不同注入剂量对菌株的存活率和正变率影响如图 2 所示。可以看出,一定范围内,高剂量的离子注入可导致菌株正变率的增加,同时也会导致菌株存活率的下降,一般认

为,诱变菌株存活率在 10%~20%,所得菌株正变率相对较高^[16]。该试验中,注入剂量在 1.0×10^{15} ions/cm² 和 2.0×10^{15} ions/cm² 时存活率接近该范围,而后的正变率远高于前者,综合考虑,以 2.0×10^{15} ions/cm² 注入剂量为最佳诱变剂量。

2.4.2 BA-16 突变株的筛选及遗传稳定性分析 采用

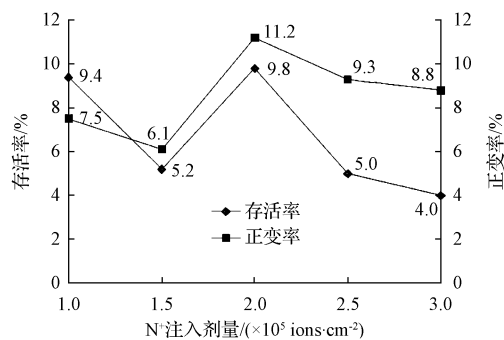


图 2 不同 N⁺ 注入剂量对突变株的影响
Fig. 2 The effect of different does of N⁺ implantation on mutants

表 3 突变株抗扩展青霉筛选结果

Table 3 The screening results of mutants against *Penicillium expansum* mm

菌株 Strain	抑菌带宽 Width of inhibition belt	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter
BA-16-1	7.250±0.016	6.060±0.018
BA-16-2	8.180±0.036	7.013±0.026
BA-16-3	8.980±0.013	7.580±0.033
BA-16-4	9.850±0.022	8.380±0.022
BA-16-5	10.880±0.021	9.560±0.011
BA-16-6	11.850±0.028	10.680±0.036
BA-16-7	12.650±0.012	12.010±0.016
BA-16-8	13.660±0.036	12.990±0.006

不同剂量的 N⁺ 注入,共筛选出 8 株抗扩展青霉高于野生株解淀粉芽孢杆菌 BA-16 的正突变株,分别对这 8 株突变株进行平板对峙试验和牛津杯试验,结果如表 3 所示。选取抑菌带宽和抑菌圈直径在 12 mm 以上的 2 株突变型菌株:BA-16-7 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 和 BA-16-8 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 进行传代培养,并通过牛津杯法检测各代拮抗病原菌的遗传稳定性,结果如表 4 所示。可知,经过传代,突变株 BA-16-8 抗菌性能差异不显著 ($P>0.05$),说明该突变株的遗传稳定性较好,而 BA-16-7 的抗菌能力在不同世代差异显著且呈现逐渐下降的趋势,说明该突变株的遗传稳定性较差,菌株退化较为严重。故选取突变株 BA-16-8 进行后续研究。

表 4 突变株拮抗扩展青霉的遗传稳定性分析结果

Table 4 The results of genetic stability analysis of mutants against *Penicillium expansum* mm

代数	BA-16-7	BA-16-8
1	11.88±0.011 ^a	12.98±0.001 ^a
2	11.56±0.001 ^{ab}	12.97±0.013 ^a
3	11.05±0.016 ^b	12.97±0.012 ^a
4	10.18±0.024 ^c	12.97±0.016 ^a
5	9.58±0.036 ^d	12.97±0.024 ^a

2.4.3 果实生防试验 接种 6 d 后,各处理对扩展青霉的抑制结果如表 5 所示。可与对照组相比,拮抗菌 BA-16 与其突变株 BA-16-8 的菌悬液和代谢产物均可对扩展青霉在苹果表面的生长产生不同程度的抑制作用。相对比无细胞发酵液,用野生株 BA-16 菌悬液处理的果实(T1)其病斑直径要小于代谢产物处理组(T2),推测可能原因是拮抗菌菌体细胞本身也和病原菌之间存在着空间竞争和营养竞争^[17],故对病原菌的抑制效果大于单纯的代谢产物。此外,突变株 BA-16-8 对病原菌的抑制效果,特别是代谢产物的抑菌效果(T3、T4),较野生株有了显著提升。表现为可完全抑制扩展青霉菌丝体的生长。

表 5 不同处理对苹果青霉病的抑制效果

Table 5 The effect of different treatments on controlling apple blue mold rot decay

处理 Treatment	病斑直径 Diameter of disease decay/cm	病原菌生长状况 Growth of pathogenic fungi
T1	0.66±0.025	无明显菌丝
T2	0.86±0.014	无明显菌丝
T3	0.02±0.006	无菌丝
T4	0.06±0.024	无菌丝
对照(CK)	1.50±0.036	有明显菌丝

3 结论与讨论

该研究主要针对苹果采摘后主要致病菌扩展青霉,从苹果表面分离筛选出一株可有效拮抗扩展青霉的细菌 BA-16,经鉴定,该菌为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)。

为进一步提高菌株 BA-16 防治扩展青霉的能力,该研究采用低能 N⁺ 注入技术对其进行诱变,并研究了不同注入剂量对突变株存活率和正变率的影响(图 2)。研究发现,刚开始注入离子时,存活率急剧下降和正变率有所上升。推测其原因是带能的氮离子最初作用于菌体细胞,可导致菌体细胞损伤从而导致存活率下降;同时,能量在胞内的积累也可导致菌体发生突变,故正变率有所上升。而当注入剂量到达一定值 (1.5×10^{15} ions/cm²) 时,本来下降的存活率有了回升,而后又继续下降。推测其原因可能是当离子注入剂量达到一定程度,可通过作用于菌体细胞 DNA 而激活其修复机制,因而一直下降的存活率会有少量回升。而当离子注入剂量进一步加大,所致损伤已无法修复,故存活率又进一步下降。

通过检测突变株的菌体细胞和无细胞发酵液拮抗扩展青霉的能力,筛选出抗菌性能最强且遗传性能稳定的突变株 BA-16-8。将所得突变株和野生株的菌悬液和无细胞发酵液分别和病原菌孢子悬液混合后将其接种至苹果表面,以检测其对苹果储藏过程中的抑菌性能。结果显示,野生株和突变株均可不同程度地抑制病原菌在苹果上的生长,其中突变株的抗病性能要明显高于野

生株。

此外,研究还发现,拮抗菌株 BA-16 的菌悬液抑制病原菌扩展青霉的能力高于其无细胞发酵液。推测可能是由于芽孢杆菌属作用病原性真菌的机制比较复杂,除了它们自身分泌的代谢产物之外,菌株本身和病原性真菌也存在诸如空间和营养竞争等。而经过低能 N^+ 注入诱变之后,突变株 BA-16-8 的无细胞发酵液抗病原性真菌的能力有了显著提升,推测可能是离子注入细胞导致胞内能量的沉积,从而致使其产生大量的自由基,这些自由基可联合作用通过提高菌体突变率进而提高其正变率。当菌体中负责代谢过程调控的酶基因发生突变,就有可能导致代谢产物的过度积累^[18],即抗生素的产量提高,其具体机制还有待进一步试验进行论证研究。

参考文献

- [1] ZHAO L,ZHANG H,LIN H,et al. Effect of trehalose on the biocontrol efficacy of *pichia caribbica* against post-harvest grey mould and blue mould decay of apples[J]. Pest Management Science,2013,69(8):983-989.
- [2] LI R,ZHANG H,LIU W,et al. Biocontrol of postharvest gray and blue mold decay of apples with *rhodotorula mucilaginosa* and possible mechanisms of action[J]. International Journal of Food Microbiology,2011,146(2):151-156.
- [3] HONG P,HAO W,LUO J,et al. Combination of hot water, *bacillus amyloliquefaciens* hf-01 and sodium bicarbonate treatments to control postharvest decay of mandarin fruit[J]. Postharvest Biol Tec,2014,88:96-102.
- [4] AFSHARMANESH H,AHMADZADEH M,JAVAN -NIKKHAH M, et al. Improvement in biocontrol activity of *bacillus subtilis* utb1 against *aspergillus flavus* using gamma-irradiation[J]. Crop Prot,2014,60:83-92.
- [5] 姚磊,徐良雄,薛璟花,等. 枝顶孢属真菌的抑菌活性及其代谢产物研究[J]. 热带亚热带植物学报,2012,20(2):192-196.
- [6] 刘雪,叶婧,穆长青,等. 枯草芽孢杆菌 b-332 菌株发酵条件的研究[J]. 农业科学与技术(英文版),2013(1):81-85.
- [7] 韩立荣,张华姣,高保卫,等. 放线菌 11-3-1 对油菜菌核病的防治作用与菌株鉴定[J]. 植物保护学报,2012(2):97-102.
- [8] 韩欣宇,陈志厚,罗定棋,等. Tpb55 菌株发酵液中活性代谢产物的抑菌作用及稳定性测定[J]. 中国农学通报,2012(27):260-264.
- [9] 韦婉,李少英,王梦姣,等. 益生乳酸菌对氟喹诺酮类药物的敏感性检测方法的研究[J]. 食品科技,2013(3):22-26.
- [10] 黄文芳,张松. 微生物学实验指导[M]. 广州:暨南大学出版社,2003.
- [11] 布坎南,吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京:科学出版社,1984.
- [12] 孙卓,杨利民. 人参病原菌拮抗细菌的分离筛选与鉴定[J]. 植物保护学报,2015(1):79-86.
- [13] PARENICOVA L,SKOUBOE P,FRISVAD J,et al. Combined molecular and biochemical approach identifies *aspergillus japonicus* and *aspergillus aculeatus* as two species[J]. Appl Environ Microb,2001,67(2):521-527.
- [14] 蒋益,郑惠华,刘广建,等. 低能 N^+ 离子注入诱变选育云芝高产抗病菌株的研究[J]. 育种驯化,2014(2):18-20.
- [15] YANEZ-MENDIZABAL V,ZERIOUH H,VINAS I,et al. Biological control of peach brown rot (*monilinia* spp.) by *bacillus subtilis* cpa-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides[J]. Eur J Plant Pathol,2012,132:609-619.
- [16] 张瑞,周俊,王舒雅,等. 产 γ -聚谷氨酸菌株的诱变选育及其种子液工艺优化[J]. 生物加工过程,2015,13(1):47-53.
- [17] 周小虹,闫冬,陆兆新,等. 酵母菌 a82-2 的分类鉴定及对桃软腐病菌的抑菌效果研究[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版),2013,39(1):75-83.
- [18] 朱兆香,王相晶. 利用代谢工程的方法提高放线菌次级代谢物的产量[J]. 中国科技论文在线,2011(1):1-13.

Isolation and Identification of Antagonistic Bacteria Against Postharvest Blue Mold Decay of Apple and Its Mutation by Low Energy N^+ Implantation

FU Ruimin^{1,2}, XING Wenhui¹, GU Yanan², XUE Tingting², GUO Yanzhao², CHEN Wuling²

(1. Department of Life Science, Henan Institute of Education, Zhengzhou, Henan 450046; 2. College of Life Science, Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069)

Abstract: Taking an antagonistic strain BA-16 which could inhibit *Penicillium expansum* isolated from apple surface as metarial, phenotypic, physiological, biochemical and phylogenetic (16SrRNA) charactors were studied. The strain BA-16 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. In order to enhance its antagonistic capability, the mutation of BA-16 was carried out by using low energy N^+ implantation. After the mutation, the mutant BA-16-8, which showed the strongest antagonist capability and stable hereditary stability was selected out. Aiming at estimating the increasing biological control effects of apple blue mold decay by mutant BA-16-8, the inhibition effects of bacterial broth and cell-free fermentation broth of mutant and wild-type strain were studied by biological control trial on fruit. The results showed that comparing with its wild type, the mutant displayed significantly higher effect on controlling apple blue mold disease. Therefore, the mutant BA-16-8 will be a potential biological control agent against apple blue mold decay.

Keywords: apple; postharvest; blue mold decay; *Bacillus amyloliquefaciens*; low energy N^+ implantation