

文章编号:1004-4213(2011)03-0443-5

# 提高拮抗菌 WB3 对番茄灰霉病菌拮抗能力的 He-Ne 激光与氯化锂复合诱变技术

任涛涛,田永永,谢云,陈五岭

(西北大学 生命科学学院,西安 710069)

**摘 要:**利用 He-Ne 激光(波长 632.8 nm,功率 12 mW)与氯化锂复合诱变一株番茄灰霉病菌拮抗菌 WB3,获得 14 株拮抗效果突出的菌株,其最大抑菌带宽为 15.7 mm. 综合单一诱变组里菌株致死率以及拮抗能力的大小,其中辐照时间为 30 min,氯化锂浓度为 1.2% 时为复合诱变最佳条件. 经过复合诱变,L8 拮抗菌最高抑菌带宽可提高 14% 以上,而单一 He-Ne 激光诱变后抑菌带宽提高 8.8%,单一氯化锂诱变后抑菌带宽提高 9%. L8 菌株生长迅速,经传代培养证明其抑菌性能具有稳定遗传性. 该实验研究 He-Ne 激光与氯化锂复合诱变枯草芽孢杆菌 WB3 的方法可应用于番茄灰霉病的生物防治领域.

**关键词:**He-Ne 激光;氯化锂;番茄灰霉病菌;拮抗菌 WB3;复合诱变

**中图分类号:**Q933

**文献标识码:**A

**doi:**10.3788/gzxb20114003.0443

## 0 引言

番茄灰霉病是由半知菌亚门灰葡萄孢属(*Botrytis cinerea*)真菌侵染所致,是一种严重的世界性病害. 目前,生产上对番茄灰霉病防治主要依靠抗病品种和化学防治,但由于病菌抗药性迅速产生使化学药剂防治效果大大下降,并且严重污染农产品和环境,危及人畜健康,国家已经禁止一些高毒、高残留的化学农药的使用<sup>[1]</sup>. 因此,近年来人们通过筛选和利用抗灰霉病的有益微生物及其次生代谢产物,使生物防治日益成为灰霉病控制中的一条重要而有效的途径<sup>[2]</sup>.

He-Ne 激光诱变是一种高效的诱变育种新技术,具有能量密度高、靶点小、单色性和方向性好,以及诱变当代就可出现遗传性突变等特点,因此在微生物育种中得到广泛的应用. 激光是一种量子流,直接或间接地影响生物有机体,能够引起细胞 DNA 或 RNA、质粒、染色体的畸变效应,酶的激活或钝化,以及细胞分裂和细胞代谢活动的改变. 一般认为,激光对菌体的影响主要是由于热效应、压力效应、光效应和电磁场效应共同使 WB3 的遗传物质发生改变,从而提高拮抗菌 WB3 的拮抗效果. 光效应是通过一定波长的光子被吸收<sup>[3]</sup>,跃迁到一定能

级,引起菌体分子变异;热效应引起酶失活、蛋白质变性<sup>[4]</sup>,导致菌体的生理、遗传变异;压力效应使组织变形、破裂,引起生理及遗传变异;电磁场效应<sup>[5]</sup>产生自由基导致 DNA 损伤,引起突变.

最近,利用低能激光诱变技术获得的突变菌株已经引起了关注<sup>[6-8]</sup>. Kohli 等已经报道用经 He-Ne 激光(632.8 nm)照射大肠杆菌(*Escherichia coli*) KY706/pPL-1 菌株,可诱导 *phr* 基因的表达<sup>[9-10]</sup>; Karu 等确定了大肠杆菌经 He-Ne 照射后细胞数量变化的机制<sup>[11]</sup>. 国内利用激光诱变育种也有许多成功的例子<sup>[12-16]</sup>. 但是,将 He-Ne 激光与氯化锂复合诱变应用于芽孢杆菌遗传变异的研究和环境微生物诱变育种领域的研究还比较少,如利用复合诱变选育拮抗能力提高的突变株. 本文主要以芽孢杆菌 WB3 菌株为供试菌株,利用 He-Ne 激光与氯化锂复合诱变,选育对番茄灰霉病菌拮抗能力有显著提高的突变菌株,以期得到拮抗效果更好、稳定性更强的生防菌株,为微生物育种提供资料,为实用、高效的生物农药开发奠定基础.

## 1 实验材料

### 1.1 菌种

从陕西省渭北番茄果园土壤中分离得到枯草芽

基金项目:山西省自然科学基金(No. 20031096)资助

通讯作者:任涛涛(1984-),男,硕士研究生,主要研究方向为微生物和激光诱变育种. Email:rentaotaol@163.com

导师简介:陈五岭(1954-),男,教授,主要研究方向为生物、生化,农副产品加工等. Email:wuling.chen@263.com

收稿日期:2010-08-17;修回日期:2010-10-25

孢杆菌 WB3(*Bacillus subtilis* WB3). 番茄灰霉病菌为该试验的目标植物病原菌,由本实验室陈亮博士分离筛选获得.

## 1.2 激光器

本实验采用 T3 型 He-Ne 激光器(腔长 1 m,波长 632.8 nm)照射时使用功率 12 mW,使用光斑 1.5 mm.

## 1.3 培养基

1) 摇瓶种子培养基;2) 牛肉膏蛋白胨琼脂培养基;3) 马铃薯培养基(PDA).

牛肉膏蛋白胨培养基用于菌株 WB3 的培养和细菌菌株的保藏,马铃薯培养基(PDA)用于拮抗性检测.

## 2 实验方法

### 2.1 He-Ne 激光诱变

#### 2.1.1 制备菌悬液

无菌条件下,将 WB3 培养液以 1% 的接种量转接到新鲜的摇瓶种子培养液中,30 °C 下,100 r/min 振荡培养 12 h,取 10 mL 离心(4 000 r/min) 15 min,弃去上清液将菌体沉淀用无菌生理盐水清洗制成一定浓度的菌悬液.采用光电比浊记数法调节 OD<sub>600</sub> 值为 0.986,经测定菌悬液浓度约为 108 cfu/mL,随后磁力搅拌 15 min 以搅匀菌悬液.

#### 2.1.2 He-Ne 激光诱变 WB3 菌体

分别取 0.3 mL 搅拌均匀的菌悬液于 5 个无菌小试管(管直径 1 cm,壁厚 0.1 cm)中进行 He-Ne 激光辐照,将此 5 管样品按辐照时间分别为 0、10 min、20 min、30 min、40 min 分为 5 组,取不经辐照的菌悬液作为对照组.辐照时,保持激光的发射源点与样品受照面间的垂直距离为 15 cm ( $\lambda = 632.8 \text{ nm}$ ,  $p = 12 \text{ mW}$ ),黑暗条件下进行辐照.辐照后,对各时间组的样品分别做梯度稀释( $10^{-1} \sim 10^{-8}$ ),并于  $10^{-6} \sim 10^{-8}$  的稀释度下,各取吹吸均匀的 0.1 mL 菌液涂布于无菌牛肉膏蛋白胨琼脂培养基上,每个稀释度各做三个涂布的平行样,于 30 °C 下培养 24 h,最后进行平板菌落计数,计算致死率,每个照射时间设 3 次重复,试验重复 2 次<sup>[17]</sup>.

致死率 = (对照组生长菌落数 - 辐照诱变组生长菌落数) / 对照组生长菌落数  $\times 100\%$

根据所得的致死曲线,对菌株采用 70% 左右致死率的诱变条件进行诱变.

### 2.2 氯化锂诱变

出发菌株在完全培养基中培养到生长对数期,3000 r/min 离心 5 min,去上清液,加生理盐水制成菌悬液.0.2 mL 的菌体稀释涂布于氯化锂浓度梯度

平板上(氯化锂质量分数分别是 0.4%、0.8%、1.2%、1.6%、2.0%),在 30 °C 培养,挑取菌落进行筛选.根据所作得的致死曲线,对菌株采用 80% 左右致死率的诱变条件进行复合诱变.

### 2.3 He-Ne 与氯化锂复合诱变

分别取菌悬液 0.3 mL 搅拌均匀的菌悬液于 3 个无菌小试管(管直径 1 cm,壁厚 0.1 cm)中,以 He-Ne 激光辐照,辐照时间均为 30 min.辐照时,保持激光的发射源点与样品受照面间的垂直距离为 15 cm ( $\lambda = 632.8 \text{ nm}$ ,  $p = 12 \text{ mW}$ ),黑暗条件下进行辐照.辐照后,对样品做梯度稀释( $10^{-1} \sim 10^{-8}$ ),并于  $10^{-6} \sim 10^{-8}$  的稀释度下,各取吹吸均匀的 0.1 mL 菌液涂布于含 1.2% 氯化锂的高渗平板上 30 °C 培养,每个稀释度各做三个涂布的平行样,实验重复三次.

### 2.4 筛选

将已活化的番茄灰霉病菌接于无菌固体 PDA 培养基中央,30 °C 下培养 50 h,使菌落直径达到约 15 mm.随后分别从上述不同辐照时间组、不同氯化锂浓度组以及复合诱变组样品培养基上随机挑取 50 个单菌落,按相同间隔接种于中央着生有番茄灰霉病菌落的 PDA 培养基上,保证每个平板上均接有对照菌株,并各自作好标记,继续培养 30 h 后观察抑菌带宽大小.对照菌株为未处理的原始菌株,其抑菌带宽  $\Phi_1$  作为对照,突变株抑菌带宽为  $\Phi_2$ .若  $\Phi_2 > \Phi_1$ ,则初步视其为正突变,反之为负突变.

正变率 = 不同时间辐照组  $\Phi_2 > \Phi_1$  的菌落数 / 相对应辐照组挑取菌落总数  $\times 100\%$ .

### 2.5 诱变结果验证

各组诱变后,分别对初步认为发生正突变的菌株,进行平板对峙培养,带宽测定后,挑出带宽有显著提高的菌株.复合诱变之后,初步筛选出 14 株正变菌株,为了验证所测结果的显著度,以 50 株对照菌株中的最大抑菌带宽为参照,运用  $t$  值检验方法,对拮抗结果进行分析.

### 2.6 正变菌株拮抗遗传稳定性分析

采用连续传代培养的方法,把拮抗效果有最显著提高的菌株进行传代培养,在单一诱变组里培养 2 代,拮抗菌株的遗传稳定性.对复合诱变所得拮抗效果最突出的菌株连续培养 7 代,并对每次传代的拮抗结果进行记录,将所有数据用 SPSS13.0 软件进行分析观察并记录各代菌株的抑菌带宽数据,判断最佳正变菌株拮抗能力的遗传稳定性.

## 3 结果与分析

### 3.1 激光辐射对 WB3 的致死作用

He-Ne 激光可以诱发细菌 DNA 分子损伤,从

而引起细胞遗传物质改变及代谢活动变化.一方面这为诱变育种提供了有力条件;另一方面,其也会造成部分菌体死亡.因而致死率在生物理化诱变中是极为重要的指标,常被用作判断最佳诱变条件的依据之一.

由图 1 可知,低剂量辐照对 WB3 的致死作用有限.随着辐照剂量的进一步加大,激光对菌体的致死作用逐渐显现,细菌的存活量大大幅度减少,表明高剂量的辐照对 WB3 有较强的致死作用.辐照时间为 30 min 时对 WB3 的致死率为 77%,40 min 时致死率为 83%.因此本实验选 30 min 为激光辐照时间.

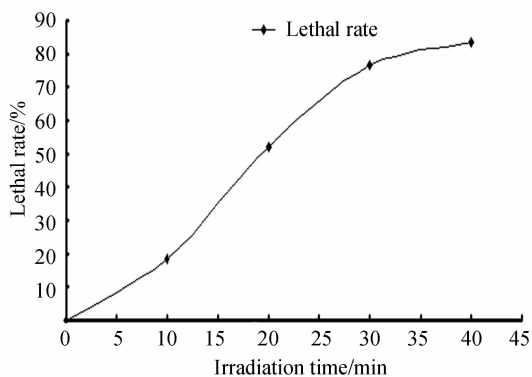


图 1 辐射时间对致死作用的影响

Fig.1 Effects of the irradiation time on the lethal action

### 3.2 激光诱变结果

挑出被辐照过的 25 株单菌落,在中央有番茄灰霉病菌的培养基上进行对峙培养,30 h 后挑出抑菌带宽比出发菌株 WB3 大的菌株 3 株如表 1.

表 1 He-Na 激光诱变结果

Table 1 Results of the He-Na mutation

Strain	WB3	H1	H2	H3
Inhibiting belt width/mm	13.7	14.7	14.8	14.7

将这 3 株高产菌株行传代培养,传代 2 代后,有 2 株菌的抑菌带宽稳定比出发菌株宽,见表 2.

表 2 He-Na 诱变后的传代稳定性结果

Table 2 Stability of the L-histidine productivity after the He-Na mutation

Strain	WB3	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>
1st generation/mm	13.6	14.9	14.5
2nd generation/mm	13.7	14.8	14.8
Mean value/mm	13.65	14.85	14.65

结果显示 H1 较 WB3 的抑菌带宽提高率为 8.8%.

### 3.3 氯化锂诱变结果

以氯化锂浓度为横坐标,致死率为纵坐标作图,得到 LiCl 诱变的致死曲线如图 2.

如图 2,随着氯化锂浓度的提高,菌株的死亡率上升.在 1.2% 时,菌株的致死率达到了 82.4%;1.6% 以后死亡率达到了 90%.本实验选择 1.2% 氯

化锂作为诱变剂量.

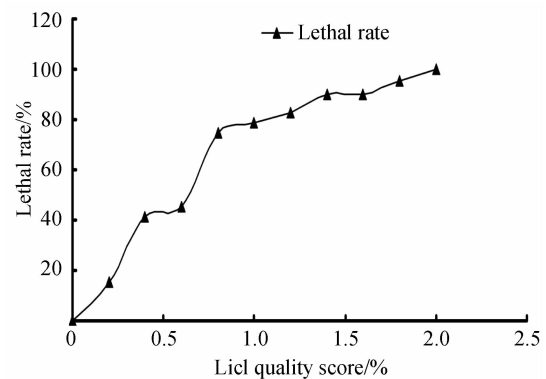


图 2 不同质量分数的氯化锂对 WB3 的致死率

Fig.2 Different concentrations of the lithium chloride on the death rate WB3

### 3.4 氯化锂诱变结果

表 3 氯化锂诱变结果

Table 3 Results of the LiCl mutation

Strain	WB3	D1	D2	D3	D4
Inhibiting belt width/mm	13.9	15	15.1	15	15

在中央接有番茄枯萎病菌的基本培养基平板上,挑取 25 株单菌落进行对峙培养,挑出抑菌带宽比出发菌株 WB3 宽的菌株 4 株,如表 3.

将这抑菌带宽稍高的菌株进行传代培养,并进行对峙培养,传代 2 次后,有 2 株的抑菌效果稳定且比出发菌株高,见表 4.

表 4 氯化锂诱变后的传代稳定性结果

Table 4 Stability of the L-histidine productivity after the LiCl mutation

Strain	WB3	D2	D3
1st generation/mm	13.9	15	15
2nd generation/mm	13.8	14.9	15.2
Mean value/mm	13.85	14.95	15.1

结果显示菌株 D3 较出发菌 WB3 所提高程度 9%.

### 3.5 He-Ne 激光-氯化锂复合诱变结果

由图 3 可知,初筛所得的 14 株变异株与病原菌

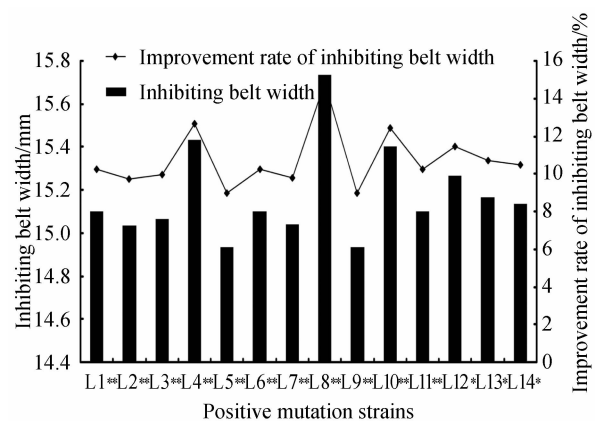


图 3 正变菌株抑菌带宽与出发菌株的  $t$  值检验结果

Fig.3 Test results of the inhibiting belt width of positive mutation strains and original strains

的菌落之间形成明显的抑菌带,病原菌外侧边缘的菌丝有明显的颜色变化,可确认为发生了正向突变.图中对照抑菌带宽为 13.70 mm; \* 表示在 0.05 水平存在差异, \*\* 表示在 0.01 水平存在差异. L1 表示首株被筛选出来的正变株,其他依次类推.

图 3 显示出复合诱变较单一诱变对出发菌株 WB3 的拮抗效果有显著的提高,最高可提高 14% 以上.经  $t$  值检验,发现 L8 号正变株的拮抗效果达到极显著水平,且抑菌效果突出.故筛选出 L8 突变株做下一步的研究.

### 3.6 L8 号菌拮抗能力遗传稳定性考察结果

由图 4(对照株抑菌带宽为 15.65 mm)可知,经传代 7 次后,从第 1 代正变株开始一直到所传第 7 代,其拮抗效果均无显著性差异,由此证明该正变菌株的拮抗能力可以进行稳定的遗传.

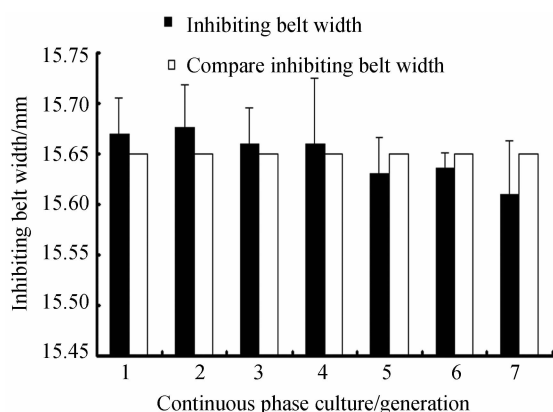


图 4 L8 遗传稳定性检验结果

Fig. 4 Test results of L8 genetic stability

L8 号正变菌株对番茄灰霉病菌的抑菌效果如图 5. 图 5 为四点法接入 L8, 中央为番茄灰霉病菌, 可明显看出抑菌效果.



图 5 L8 号菌对番茄灰霉病的拮抗效果

Fig. 5 The results of the antagonism of L8 strains on *Botrytis cinerea*

## 4 讨论

本实验采取 12 mW 的功率是因为遗传物质 DNA 碱基基态与第一激发态之间能量差在 2eV 左右,如胸腺嘧啶(T)为 2.05 eV、腺嘌呤(A)1.80 eV、鸟嘌呤(G)为 1.16 eV、胞嘧啶(C)为 2.00 eV. 12 mW 的 He-Ne 激光产生的光子能量约

为 2 eV,当其作用于 DNA 后,可以直接激发碱基或通过弛豫过程激发碱基,碱基对之间氢键质子能量改变,隧道效应提高,促使碱基错配进而通过掺入错误和复制错误导致了碱基置换突变,引起基因突变.如果随意升高或降低功率,就可能造成诱变效果不佳. Jiang 等报道说,当 He-Ne 功率为 15 mW,照射时间为 10 min 时,热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)致死率达 60%,可以获得 20% 的正突变率;若照射 20 min 时,致死率达到 80% 以上,这时正突变率接近 0. 在本试验中,采取 12 mW 的功率,当照射时间为 40 min 时,致死率才达 80% 以上;当照射 30 min 时,致死率有突然降低的趋势.可能是由于此功率对 DNA 损伤有修复功能,可刺激细胞酶生理活性的提高,促进芽孢杆菌生长繁殖速度加快;但随着时间的延长,致死效应大于修复效应,导致致死率上升.也可能是由于菌种本身的抗辐射特性及所处的生命周期阶段和生理活动阶段有关.

WB3 菌株长期使用激光诱变之后,除产生诱变剂“疲劳效应”外,还会引起菌种生长周期延长、孢子量减少、代谢减慢等,这对提高菌株的拮抗效果不利,因此再采用化学诱变剂—氯化锂继续处理 WB3,以便打破激光诱变剂产生的“疲劳效应”.氯化锂中的锂离子可直接与 DNA 相互作用,也可以与酶促防错修复系统相作用而继续产生突变,即可以进一步筛选出具有较高拮抗能力的 L8 号菌株.

## 5 结论

L8 号菌株对番茄灰霉病菌的拮抗能力较单一诱变有明显提高(14% 以上),而单一 He-Ne 激光诱变后抑菌带宽提高 8.8%,单一氯化锂诱变后抑菌带宽提高 9%. 复合诱变微生物会引起菌株发生变异,这在微生物遗传育种方面已有了一定应用,但在生产实践中的应用却很有限. 其中一个很重要的原因就是微生物变异菌株的不稳定性. 这往往表现在变异菌株传代四、五代后便逐渐退化了. 本试验经 He-Ne 激光与氯化锂复合诱变后的突变株传代 7 次后,其拮抗能力仍然没有退化,这就为生产实践中的应用提供了可能.

### 参考文献

- [1] MENG Xiang-dong, FU Jun-fan, YAN Xue-rui, *et al.* Research progress of biological control of *botrytis cinerea*[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2003, **34**(6): 472-475. 孟祥东,傅俊范,严雪瑞,等. 灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)生物防治研究进展[J]. 沈阳农业大学学报, 2003, **34**(6): 472-475.
- [2] KAMENSKY M, OVADIS M, CHET I, *et al.* Soil-borne strain IC14 of *serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *botrytis cinerea* and *sclerotinia sclerotiorum* diseases [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2003, **35**(2): 323-331.

- [3] CHEN Yun-lin, LIU Xiao-juan, WEN Jian-ping. Research progress in technique of laser inducing microorganism[J]. *Acta Biophysica Sinica*, 2003, **19**(4):353-358.  
陈云琳,刘娟娟,闻建平.激光诱变微生物技术的研究进展[J].生物物理学报,2003,19(4):353-358.
- [4] HANG Feng, CHEN Wei, GONG Guang-yu, *et al.* Mechanisms of microwave inactivation and biological effects[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2009, **30**(1):333-337.  
杭锋,陈卫,龚广予,等.微波杀菌机理与生物学效应[J].食品工业科技,2009,30(1):333-337.
- [5] PAN Yong-bin, HUANG Ling-zhen. Analyzing the model of oscillating electromagnetic field on cell ions[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2007, **7**(1):323.  
潘勇斌,黄玲珍.细胞离子在振荡电磁场作用下的受力模型分析[J].现代生物医学进展,2007,7(1):323.
- [6] JIANG Yan, WEN Jian-ping, CAI YIN Q, *et al.* Mutant AFM 2 of *Alcaligenes faecalis* for phenol biodegradation using He-Ne laser irradiation[J]. *Chemosphere*, 2006, **65**(7):1236-1241.
- [7] JIANG Yan, WEN Jian Ping, JIA Xiao-Qiang, *et al.* Mutation of *Candida tropicalis* by irradiation with a He-Ne laser to increase its ability to degrade phenol [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, **73**(1):226-231.
- [8] LAN Shi-le, LI Li-heng, WANG Jing, *et al.* Breeding of high cellulase yielding strain mutated by microwave and chemicals [J]. *Journal of Microbiology*, 2007, **27**(1):22-25.  
兰时乐,李立恒,王晶,等.微波诱变结合化学诱变选育纤维素酶高产菌的研究[J].微生物学杂志,2007,27(1):22-25.
- [9] KOHLI R, BOSE B, GUPTA P K. Induction of *phr* gene expression in *E. coli* strain KY706/pPL-1 by He-Ne laser (632.8 nm) irradiation [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2001, **60**(2-3):136-142.
- [10] KOHLI R, GUPTA P K. Irradiance dependence of the He-Ne laser induced protection against UVC radiation in *E. coli* strains[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2003, **69**(3):161-167.
- [11] KARU T, TIPHLOVA O, ESENALIEV R, *et al.* Two different mechanisms of low-intensity laser photo biological effects on *Escherichia coli*[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1994, **2**(3):155-161.
- [12] LU Wen-yu, WEN Jian-ping, JIA Xiao-qiang, *et al.* Effect of He-Ne irradiation on hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2008, **33**(1):34-42.
- [13] HAN J R, WANG Q. Laser mutagenesis of protoplasts of *Penicillium sp.* PT95 for the enhancement of carotenoid yield [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, **105**(5):1552-1559.
- [14] GUANG Hai, Yu, Xiao-qiang, JIA Jian-ping. Strain improvement of *Streptomyces roseosporus* for daptomycin production by rational screening of He-Ne laser and NTG induced mutants and kinetic modeling [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, **1**:9078-x
- [15] ZHU Hong-li, GUO Ai-lian, SONG Ji-rong. The breeding of high-yield pectinase producing bacteria using He-Ne laser irradiation on the cell and protoplasts [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2005, **34**(11):1693-1685.  
朱宏莉,郭爱莲,宋纪蓉.氦氖激光诱变细菌细胞及原生质体选育果胶酶高产菌株[J].光子学报,2005,34(11):1693-1685.
- [16] SHAO Yao-chun, FENG Fu-ru, XUE Lin-bao, *et al.* Quantum model of DNA mutation by He-Ne laser[J]. *Laser Biology*, 1992, **1**(3):104.  
邵耀椿,封福如,薛林宝,等. He-Ne 激光引起 DNA 突变的量子模式[J].激光生物学,1992,1(3):104.
- [17] ZHAO Meng-meng, WANG Wei-wei. Studies on the Mutagenesis of *Spirulina platensis* using He-Ne laser[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2005, **34**(3):400-403.  
赵萌萌,王卫卫. He-Ne 激光对钝顶螺旋藻的诱变效应[J].光子学报,2005,34(3):400-403.

## Improvement of Antagonistic Activity of Bacteria WB3 Against *Botrytis Cinerea* by He-Ne Laser and *l*icl

REN Tao-tao, TIAN Yong-yong, XIE Yun, CHEN Wu-ling  
(Life Science College, Northwest University, Xi'an 710069, China)

**Abstract:** He-Ne laser ( $\lambda = 632.8 \text{ nm}$ ,  $P = 12 \text{ mW}$ ) & *l*icl was used to irradiate *B. subtilis* WB3 which had an antagonistic ability on *Botrytis cinerea*. 14 strains that have prominent antagonistic effects were obtained, and the maximum inhibitory bandwidth is 15.7 mm. According to the mortality rates and the size of antagonistic of single mutagenesis group, the optimization condition of irradiation time of 30 min and the density of *l*icl of 1.2% were obtained. After multiplicity mutation, the max inhibiting belt width is L8 that raised more than 14%, however single He-Ne laser and *l*icl irradiation could only raise 8.8% and 9%. The strains grew rapidly with stable heredity. The proposed experimental results the He-Ne laser & *l*icl mutagenesis of *Bacillus subtilis* WB3 show a broad application prospect for the biological control of *botrytis cinerea*.

**Key words:** He-Ne laser; Lithium chloride; *Botrytis cinerea*; Antagonistic strain WB3