

# 辐射诱变贝莱斯芽孢杆菌及其对辣椒炭疽病抑菌效果

谢慧<sup>1</sup> 刘安<sup>2</sup> 陈亮<sup>2</sup> 武小芬<sup>2</sup> 齐慧<sup>2</sup> 张祺玲<sup>2</sup> 王振<sup>2</sup>  
邓明<sup>2</sup> 王克勤<sup>2</sup> 刘素纯<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(湖南农业大学食品科学技术学院 长沙 410125)

<sup>2</sup>(湖南省农业科学院湖南省核农学与航天育种研究所 长沙 410125)

**摘要** 采用<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 射线和电子束辐射诱变贝莱斯芽孢杆菌选育遗传稳定的突变菌株,用平板对峙法及四点法对突变菌株进行初筛和复筛,研究其对辣椒炭疽病菌的抑菌效果。结果表明:菌悬液经<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 射线辐照,贝莱斯芽孢杆菌 $D_{10}$ 值为2 366 Gy,在100~2 000 Gy诱变剂量范围内芽孢杆菌致死率随着辐照吸收剂量的增加而升高。在2 000 Gy辐照吸收剂量下,贝莱斯芽孢杆菌的致死率为81.8%,并筛选出5株(B004、B112、B114、B117、B118)突变菌株,其对辣椒炭疽病菌抑制率由出发菌株的51.2%分别提高到57.5%、58.0%、57.0%、57.7%和59.9%;贝莱斯芽孢杆菌菌悬液经电子束(10 MeV)辐照,贝莱斯芽孢杆菌 $D_{10}$ 值为499 Gy,在100~600 Gy诱变剂量范围内,芽孢杆菌致死率随着辐照吸收剂量的增加而升高,在400 Gy辐照吸收剂量下,贝莱斯芽孢杆菌致死率为91.8%,筛选出2株(D115和D243)突变菌株,其对辣椒炭疽病菌抑制率由出发菌株的55.2%分别提高到58.4%和58.1%;B004、B112、B117、B118贝莱斯芽孢杆菌诱变菌株对辣椒炭疽病菌抑菌效果在6代内遗传稳定。研究结果表明: $\gamma$ 射线和电子束辐照在贝莱斯芽孢杆菌的诱变育种中具有潜在的应用价值,本研究可为贝莱斯芽孢杆菌的诱变育种提供基础,为辣椒炭疽病病害的生物防治提供理论参考。

**关键词** 贝莱斯芽孢杆菌,辣椒炭疽病菌,<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 射线辐射诱变,电子束辐射诱变,抑菌

**中图分类号** TL99, S476.1

**DOI:** 10.11889/j.1000-3436.2023-0029

**引用该文:**

谢慧,刘安,陈亮,等.辐射诱变贝莱斯芽孢杆菌及其对辣椒炭疽病抑菌效果[J].辐射研究与辐射工艺学报,2023,41(03):030401. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2023-0029.

XIE Hui, LIU An, CHEN Liang, *et al.* Radiation mutagenesis of *Bacillus velezensis* and its antibacterial effect on *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2023, 41(03): 030401. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2023-0029.



## Radiation mutagenesis of *Bacillus velezensis* and its antibacterial effect on *Colletotrichum gloeosporioides*

基金资助:国家重点研发计划项目(2021YFE0111200-2)和湖南省农业科技创新项目(2022CX119)资助

第一作者:谢慧,女,1998年1月出生,2020年于湖南农业大学东方科技学院获工学学士学位,现为湖南农业大学生物与医药专业硕士研究生

通信作者:刘素纯,教授, E-mail: liusuchun@163.com; 王克勤,研究员, E-mail: wkq6412@163.com

收稿日期:初稿2023-03-29;修回2023-05-26

Supported by the National Key R & D Program of China (2021YFE0111200-2) and the Agricultural Science and Technology Innovation Project of Hunan Province (2022CX119)

First author: XIE Hui (female) was born in January 1998, and obtained her bachelor's degree in Engineering from Orient Science & Technology College of Hunan Agricultural University in 2020. Now she is a graduate student at Hunan Agricultural University, majoring in biology and medicine

Corresponding author: LIU Suchun, professor, E-mail: liusuchun@163.com; WANG Keqin, professor, E-mail: wkq6412@163.com

Received 29 March 2023; accepted 26 May 2023

XIE Hui<sup>1</sup> LIU An<sup>2</sup> CHEN Liang<sup>2</sup> WU Xiaofen<sup>2</sup> QI Hui<sup>2</sup> ZHANG Qiling<sup>2</sup> WANG Zhen<sup>2</sup>  
DENG Ming<sup>2</sup> WANG Keqin<sup>2</sup> LIU Suchun<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410125, China)

<sup>2</sup>(Engineering Technology Research Center of Agricultural Biological Irradiation, Hunan Institute of Nuclear  
Agricultural Science and Space Mutation Breeding, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, China)

**ABSTRACT** We used <sup>60</sup>Co- $\gamma$  ray and electron beam irradiation to mutate *Bacillus velezensis* to breed genetically stable mutant strains. The mutant strains were screened and re-screened by plate confrontation and the four-point method to study their antibacterial effects on *Colletotrichum gloeosporioides*. The results demonstrated that the  $D_{10}$  value of *Bacillus velezensis* suspension irradiated by <sup>60</sup>Co- $\gamma$  ray was 2 366 Gy, and the lethality rate increased with an increase in the irradiation coefficient dose in the range of 100–2 000 Gy. The lethality rate of *Bacillus velezensis* was 81.8% at 2 000 Gy irradiation coefficient dose, and five mutants (B004, B112, B114, B117, and B118) were screened. The inhibition rate against *Colletotrichum gloeosporioides* increased from 51.2% of the original strain to 57.5%, 58.0%, 57.0%, 57.7%, and 59.9%, respectively. The *Bacillus velezensis* suspension was irradiated by an electron beam (10 MeV), the  $D_{10}$  value was 499 Gy, and the lethality rate increased with an increase in the irradiation coefficient dose in the range of 100–600 Gy. The lethality rate of *Bacillus velezensis* was 91.8% at 400 Gy irradiation coefficient dose. Two mutant strains (D115 and D243) were screened, and their inhibition rates against *Colletotrichum gloeosporioides* increased from 55.2% of the emitted strains to 58.4 and 58.1%, respectively. The inhibitory effects of B004, B112, B117, and B118 mutants on *Colletotrichum gloeosporioides* were genetically stable within six generations. In conclusion,  $\gamma$ -ray and electron beam irradiation have potential application value in the mutation breeding of *Bacillus velezensis*. The results provide a basis for *Bacillus velezensis* mutation breeding and a theoretical reference for the biological control of *Colletotrichum gloeosporioides*.

**KEYWORDS** *Bacillus velezensis*, *Colletotrichum gloeosporioides*, <sup>60</sup>Co- $\gamma$  ray radiation mutagenesis, electron beam radiation mutagenesis, Bacteriostasis

**CLC** TL99, S476.1

微生物诱变育种是通过人工诱变技术手段诱发微生物基因突变, 改变微生物的遗传结构和功能, 筛选出具有特定性状的优良突变型微生物。辐射诱变具有较高的微生物变异率、突变方向多样、效率高等优点<sup>[1-3]</sup>, 是微生物菌种选育的一个重要途径。

辣椒是我国的大宗蔬菜作物, 2020年辣椒产量约为1 960万吨<sup>[4-5]</sup>。但辣椒炭疽病可导致辣椒减产30%~50%<sup>[6-7]</sup>。目前辣椒炭疽病多采用化学防治, 长期使用会造成植物病虫害抗性增加、环境污染等问题。有文献报道多种细菌<sup>[8-10]</sup>、真菌<sup>[11-14]</sup>、放线菌<sup>[15-16]</sup>均对辣椒炭疽病具有生物防治作用。贝莱斯芽孢杆菌能产生具有抑菌活性的多种次生代谢产物, 如细菌素、抗菌蛋白、脂肽类抗生素、水解酶类、聚酮化合物等<sup>[17]</sup>, 能抑制多种病原菌的活性, 具有良好的生物安全性和益生功能<sup>[18-19]</sup>, 在生物防治及食品防腐保鲜方面具有重要的发展前景。

因此, 本研究选取贝莱斯芽孢杆菌作为出发菌株, 利用<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 射线和电子束对贝莱斯芽孢杆菌进行辐射诱变, 通过分离纯化培养、平板对峙法和四点法筛选获得高效抑制辣椒炭疽病的贝莱斯芽孢杆菌突变菌株, 实验流程如图1所示。比较两种诱变源的差异性, 为后续贝莱斯芽孢杆菌诱变育种和生防产品开发提供一定参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)由清华大学提供。辣椒炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)由湖南省农科院植物保护研究所提供。

#### 1.1.2 培养基及试剂

LB肉汤培养基: 蛋白胨 10 g/L、酵母膏粉 5 g/L、氯化钠 5 g/L、葡萄糖 1 g/L。

LB琼脂:蛋白胨 10 g/L、酵母膏粉 5 g/L、氯化钠 5 g/L、葡萄糖 1 g/L、琼脂 15 g/L。

PDA培养基:马铃薯浸粉 5 g/L、葡萄糖 20 g/L、琼脂 15 g/L。

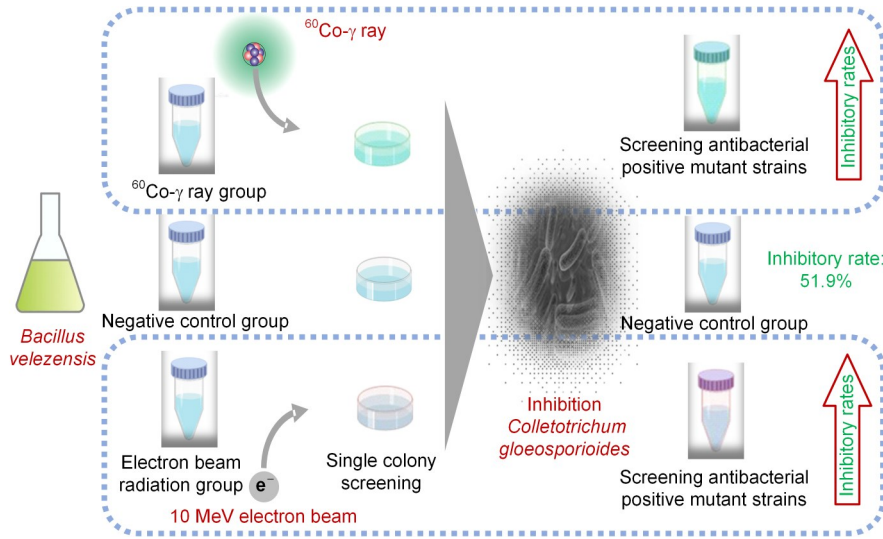


图1  $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线和电子束辐射诱变贝莱斯芽孢杆菌技术路线图  
Fig.1  $^{60}\text{Co-}\gamma$  ray and electron beam radiation mutagenesis technology roadmap for *Bacillus velezensis*

### 1.1.3 仪器及设备

UH5300型分光光度计:日本株式会社日立高新技术科学有限公司; THZ-82B气浴恒温振荡器:江苏金怡仪器科技有限公司; WPL-45BE电热恒温培养箱:天津市泰斯特仪器有限公司; LDZX-50KBS高压蒸汽灭菌器:上海申安; BCM-1000型生物净化工作台:苏州净化设备有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 贝莱斯芽孢杆菌辐射敏感性( $D_{10}$ )测定

将冻存的贝莱斯芽孢杆菌接种至液体培养基中,在气浴摇床中 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $180\text{ r/min}$ 振荡培养后,稀释涂布至平板培养基,挑取平板培养基中的单菌落接种至装液量为 $50\text{ mL}$ 的LB肉汤培养基三角瓶中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $180\text{ r/min}$ 摇瓶培养 $16\text{ h}$ 后进行稀释,制备浓度为 $1\times 10^7\text{ CFU/mL}$ 的菌悬液,分装于 $10\text{ mL}$ 无菌离心管中。分别采用 $100\text{ Gy}$ 、 $200\text{ Gy}$ 、 $400\text{ Gy}$ 、 $600\text{ Gy}$ 、 $800\text{ Gy}$ 、 $1\text{ }000\text{ Gy}$ 、 $1\text{ }200\text{ Gy}$ 、 $1\text{ }500\text{ Gy}$ 和 $2\text{ }000\text{ Gy}$ 辐照吸收剂量的 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线和电子束处理。将辐照后的菌悬液分别进行平板计数,参考GB4789.2-2016<sup>[20]</sup>中的方法计算不同吸收剂量处理菌悬液的活菌数。以吸收剂量为横坐标( $x$ ),活菌浓度的 $\lg$ 值为纵坐标( $y$ )作图,计算贝莱斯芽孢杆菌在 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线和电子束辐照下的 $D_{10}$ 值。

### 1.2.2 贝莱斯芽孢杆菌活菌浓度的测定

将冻存的贝莱斯芽孢杆菌接种至液体培养基中,在气浴摇床中 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $180\text{ r/min}$ 振荡培养后,稀释涂布至平板培养基,挑取平板培养基中的单菌落接种至装液量为 $50\text{ mL}$ 的LB肉汤培养基三角瓶中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $180\text{ r/min}$ 摇瓶培养 $16\text{ h}$ ,此为一级活化液。将一级活化培养液振荡摇匀后,分别取 $2\text{ mL}$ 接种到 $50\text{ mL}$  LB肉汤培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $180\text{ r/min}$ 摇瓶培养,同时以LB肉汤培养基做空白对照。每间隔 $4\text{ h}$ 进行1个三角瓶取样,以无菌的LB液体培养基作为空白对照,用紫外-可见分光光度计在 $600\text{ nm}$ 处测定其吸光值( $\text{OD}_{600}$ ),平板计数法计数此刻的活菌数浓度,以每 $4\text{ h}$ 的菌浓度的 $\lg(x)$ 值为横坐标,以 $\text{OD}_{600}$ 值( $y$ )为纵坐标,绘制标准曲线。

### 1.2.3 贝莱斯芽孢杆菌生长曲线的测定

一级活化液制备方式同§1.2.2,分别取 $2\text{ mL}$ 一级活化液接种至 $50\text{ mL}$ 的LB肉汤培养基,在气浴摇床中 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $180\text{ r/min}$ 振荡培养,同时以LB肉汤培养基做空白对照。每间隔 $2\text{ h}$ 进行取样,以无菌的LB肉汤培养基作为空白对照,用紫外-可见分光光度计在 $600\text{ nm}$ 处测定吸光值( $\text{OD}_{600}$ )。使用Origin软件绘制时间 $t$ 与吸光值 $\text{OD}_{600}$ 的生长关系曲线。

### 1.2.4 贝莱斯芽孢杆菌菌悬液的制备

一级活化液制备同§1.2.2,取 $2\text{ mL}$ 一级活化液

接种至 50 mL 的 LB 肉汤培养基, 在气浴摇床中 37 °C、180 r/min 振荡培养至对数期后, 用紫外-可见分光光度计在 600 nm 处测定其吸光值( $OD_{600}$ )。依据§1.2.3 中的生长关系曲线得出贝莱斯芽孢杆菌的菌群浓度, 用生理盐水进行稀释, 调节菌悬液浓度为  $1 \times 10^7$  CFU/mL 左右, 吸取 9 mL 菌悬液放入 10 mL 离心管中, 4 °C 保存待用。

### 1.2.5 贝莱斯芽孢杆菌菌悬液辐射诱变条件及致死率测定

使用§1.2.4 中制备的菌悬液进行辐射诱变,  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  射线剂量率为 5 Gy/min, 辐照吸收剂量分别为 100 Gy、200 Gy、400 Gy、600 Gy、800 Gy、1 000 Gy、1 200 Gy、1 500 Gy 和 2 000 Gy。电子束束流能量为 10 MeV, 剂量设定分别为 100 Gy、200 Gy、400 Gy、600 Gy、800 Gy、1 000 Gy、1 200 Gy、1 500 Gy 和 2 000 Gy。

参照 GB4789.2—2016 对不同剂量诱变过后菌悬液进行平板计数, 以未诱变的菌落数( $A$ )作为空白对照, 计数诱变后菌悬液菌落数( $B$ ), 计算诱变菌悬液致死率( $C$ ), 公式如式(1)所示。

$$C(\%) = \frac{(A - B)}{A} \times 100\% \quad (1)$$

挑取致死率在 80%~90% 处理平板里的单菌落纯化培养并编号,  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  射线诱变编号以 B 开头, 电子束诱变以 D 开头。

### 1.2.6 贝莱斯芽孢杆菌诱变菌株拮抗指数测定

制备贝莱斯芽孢杆菌出发菌株和诱变菌株菌悬液, 测定其吸光值并计算浓度, 将浓度调至相近。参照邹立飞等<sup>[21]</sup>的方法用打孔器在长好的辣椒炭疽病菌平板边缘打大小相同的 8 mm 菌饼, 接种在新的 PDA 培养基平板中央, 在距辣椒炭疽病菌菌饼中央 2.5 cm 处的两端放置滤纸片, 分别吸取 10  $\mu\text{L}$  菌悬液滴于滤纸片上, 一端为出发贝莱斯芽孢杆菌标(CK), 一端为诱变后的贝莱斯芽孢杆菌, 每个做 3 个平行。然后置于 28 °C 恒温培养箱中培养 6 d, 测量抑菌圈半径( $E$ )和拮抗菌半径( $F$ ), 计算诱变菌株拮抗指数( $G$ )与出发菌株 CK 的拮抗指数( $H$ )及诱变菌株拮抗指数提高量( $I$ ), 见公式(2)、(3)。

抑菌圈半径为拮抗菌菌饼中心至辣椒炭疽病菌菌丝边缘的距离。

$$H(G) = \frac{(E - F)}{F} \quad (2)$$

$$I(\%) = \frac{(G - H)}{H} \times 100\% \quad (3)$$

### 1.2.7 诱变菌株对辣椒炭疽病菌抑制率测定

分别挑取出发菌株和§1.2.6 中抑菌效果提高的诱变菌株接种至装液量为 50 mL 的 LB 肉汤培养基三角瓶中, 37 °C、180 r/min 摇瓶培养, 16 h 后测量其吸光值, 计算菌群浓度, 用 LB 肉汤培养基将所有菌液浓度调至接近。

参照崔文会等<sup>[22]</sup>的方法, 用打孔器在长好的辣椒炭疽病菌边缘打大小相同的 8 mm 菌饼接在新的 PDA 培养基平板中间, 用十字交叉法在距病原菌菌饼中央 2.5 cm 处的四端放置滤纸片, 分别吸取 10  $\mu\text{L}$  菌悬液滴于滤纸片上, 同时做空白对照, 空白为滤纸片上接 10  $\mu\text{L}$  无菌水, 28 °C 培养 6 d, 测量空白对照菌落生长直径( $P$ )、处理菌落生长直径( $Q$ ), 每个处理做 3 个平行, 计算出发菌株抑制率( $R$ )、诱变菌株抑制率( $S$ )及诱变菌株抑制率提高量( $T$ ), 见公式(4)、(5)。

$$R(S)(\%) = \frac{(P - Q)}{Q} \times 100\% \quad (4)$$

$$T = S - R \quad (5)$$

### 1.2.8 贝莱斯芽孢杆菌诱变菌株抑菌稳定性的测定

贝莱斯芽孢杆菌抑菌率测定方法及公式同§1.2.7。挑选§1.2.7 中较出发菌株 CK 抑制率提高的菌株进行传代培养, 传至第 6 代后, 测量第 1 代、第 5 代、第 6 代菌株对辣椒炭疽病菌抑制率效果, 将同一菌株第 5 代、第 6 代的抑菌率与第 1 代进行对比, 并对比每一代诱变菌株相对于出发菌株的抑菌提高率, 评估贝莱斯芽孢杆菌诱变菌株 6 代内的抑菌稳定性。

## 1.3 数据处理

采用 SPSS26 对数据进行单因素 ANOVA 分析, Origin2022 作图,  $p < 0.05$  即有统计学意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同射线种类对贝莱斯芽孢杆菌辐射敏感性的影响

贝莱斯芽孢杆菌菌悬液经  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  射线辐照和电子束辐照诱变后, 菌株存活量与辐照吸收剂量的

关系如图2所示。由图2可知， $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线辐照吸收剂量与贝莱斯芽孢杆菌存活率的lg值关系曲线为： $y=7.3062-0.0003521x$ ， $R^2=0.9592$ ；电子束辐照吸收剂量与贝莱斯芽孢杆菌存活率的lg值关系曲线为： $y=5.612-0.0013x$ ， $R^2=0.9162$ 。依据公式算出 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线辐照吸收剂量的 $D_{10}$ 值约为2366 kGy，电子束辐照吸收剂量的 $D_{10}$ 值约为499 Gy。贝莱斯芽孢杆菌对 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线不敏感， $D_{10}$ 值较高，对电子束敏感， $D_{10}$ 值较低。

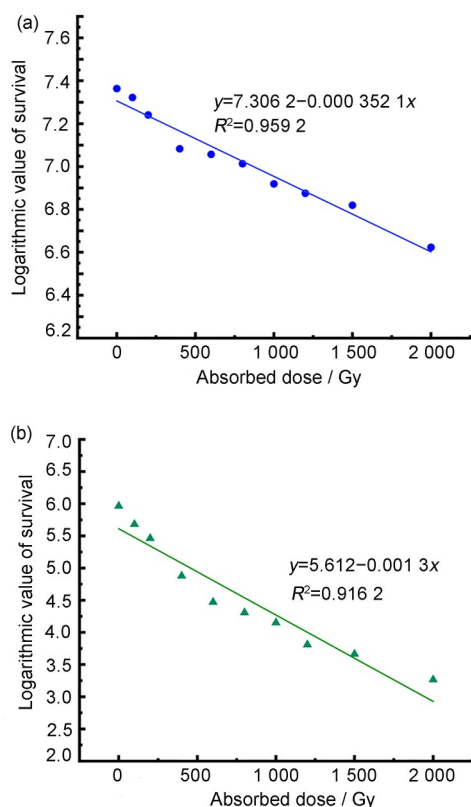


图2 吸收剂量对贝莱斯芽孢杆菌存活量的影响：  
(a) $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线；(b)电子束  
Fig.2 Effect of absorbed dose on survival of *Bacillus velezensis*: (a)  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  ray; (b) electron beam

## 2.2 贝莱斯芽孢杆菌活菌浓度与 $\text{OD}_{600}$ 值的相关性

为确定贝莱斯芽孢杆菌浓度与吸光值( $\text{OD}_{600}$ )的关系，以贝莱斯芽孢杆菌浓度的对数值 $\lg(x)$ 为横坐标， $\text{OD}_{600}$ 为纵坐标，进行线性拟合，得到回归曲线： $y=1.7461x-13.9582$ ， $R^2=0.9931$ (图3)。制备诱变菌悬液是利用公式计算菌悬液的活菌浓度，将菌悬液的浓度调整为 $10^7$  CFU/mL左右，缩小实验的误差<sup>[23]</sup>。

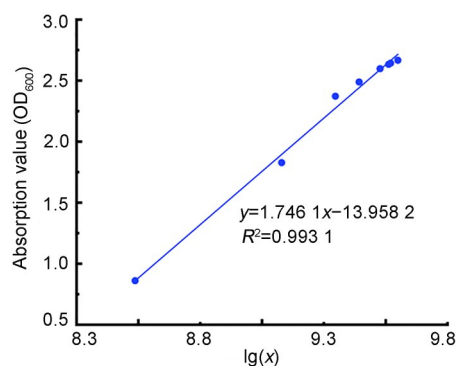


图3 贝莱斯芽孢杆菌活菌浓度与 $\text{OD}_{600}$ 的相关曲线  
Fig.3 Correlation curve between viable cell concentration and  $\text{OD}_{600}$  of *Bacillus velezensis*

## 2.3 贝莱斯芽孢杆菌生长曲线

贝莱斯芽孢杆菌的生长曲线如图4所示。由图4可知，0~2 h为贝莱斯芽孢杆菌的延滞期，2~12 h为贝莱斯芽孢杆菌的对数期，12 h后贝莱斯芽孢杆菌进入平稳期，在22 h时，贝莱斯芽孢杆菌的数量达到最大( $\text{OD}_{600}=2.699$ )，22 h后贝莱斯芽孢杆菌进入衰亡期，菌群浓度逐渐降低。研究发现，贝莱斯芽孢杆菌的延滞期较短，其原因可能是菌的接种浓度较高，因此达到对数期所需菌群浓度的时间缩短<sup>[24]</sup>，2~12 h为贝莱斯芽孢杆菌的对数期，该时期菌体繁殖迅速，DNA复制频繁，对于各种化学物质以及环境中物理因子的刺激比较敏感，所以在诱变时一般选用对数期的菌体进行诱变，这样能保证诱变实验时壮健的菌体细胞足够多，以增加变异细胞的量，使突变率较高且重现性较好<sup>[25]</sup>。因此，选择对数时期生长的贝莱斯芽孢杆菌进行辐射诱变。

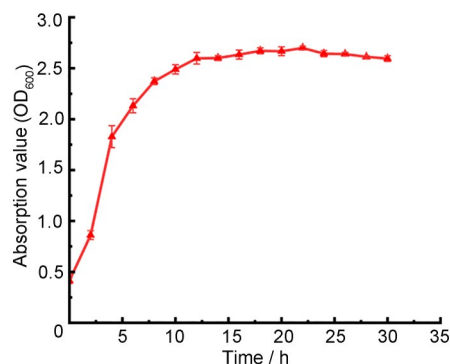


图4 贝莱斯芽孢杆菌生长曲线  
Fig.4 Growth curve of *Bacillus velezensis*

## 2.4 贝莱斯芽孢杆菌辐射诱变剂量的确定

$^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线和电子束辐射诱变贝莱斯芽孢杆菌菌悬液后，吸收剂量与致死率之间的关系如图5所

示： $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线辐照在100~2 000 Gy剂量下，贝莱斯芽孢杆菌致死率与诱变剂量呈正相关，电子束辐照在100~400 Gy剂量下贝莱斯芽孢杆菌致死率均与诱变剂量呈正相关； $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线辐照剂量在600 Gy时，菌悬液芽孢杆菌致死率为50.6%，吸收剂量在2 000 Gy时，菌悬液芽孢杆菌致死率达到81.8%；电子束的辐照剂量在100 Gy时，芽孢杆菌致死率达到47.8%，辐照剂量在400 Gy时，菌悬液芽孢杆菌致死率达到91.8%。已有研究表明<sup>[26]</sup>，致死率在80%~90%时突变效果较好，获得目标菌株的可能性较高。因此，选用芽孢杆菌致死率为81.8%和91.8%的诱变菌悬液进行初筛、复筛后续实验。

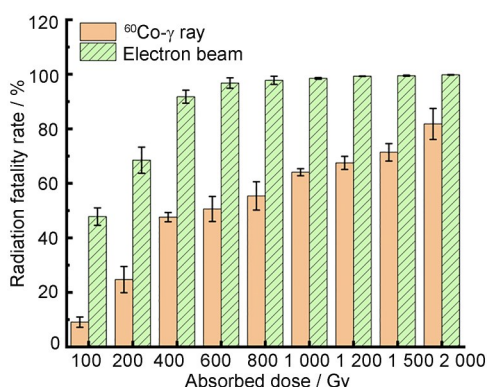


图5  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线与电子束辐照不同吸收剂量下贝莱斯芽孢杆菌的致死率

Fig.5 Lethal rate of *Bacillus velezensis* under different absorbed doses of  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  ray and electron beam irradiation

有研究表明，不同菌株对 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线敏感度具有差异，枯草芽孢杆菌JNFE1126在 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线辐照下最佳诱变剂量为400 Gy<sup>[27]</sup>，肠膜明串珠菌的最佳诱变剂量为800 Gy<sup>[28]</sup>，真菌抗生素产生菌UEZC的最佳诱变剂量可达1 000 Gy<sup>[29]</sup>。相较于上述菌株，研究发现，贝莱斯芽孢杆菌对 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线的敏感度稍低，其原因可能是贝莱斯芽孢杆菌辐照菌悬液中有许多芽孢，芽孢的抗逆性比较强， $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线杀灭其的难度增大。

前人研究黑曲霉在10 MeV能量电子束辐照下最佳诱变剂量为200 Gy<sup>[30]</sup>，酵母电子束辐照的最佳剂量为500~900 Gy<sup>[31]</sup>，丙酮丁醇梭菌电子束辐照的最佳剂量为450~800 Gy<sup>[32]</sup>。研究发现，贝莱斯芽孢杆菌电子束的适宜诱变剂量为400 Gy，与前人研究诱变剂量相近。其原因可能是黑曲霉是孢子用于诱变、酵母菌具有细胞壁、丙酮丁醇梭菌与贝莱斯芽孢杆菌都产芽孢，这些特征使得其抗逆性接近，电子束对其的诱变效果接近。

两种不同辐射源辐照剂量对贝莱斯芽孢杆菌的致死率相差较大，其原因可能是贝莱斯芽孢杆菌对两种辐射源的敏感程度不同，两种辐射源的作用机理及辐照效率不同。 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线产生电磁波，通过破坏细胞的遗传物质，导致合成蛋白质受阻，改变细胞渗透压，从而导致微生物死亡；电子束是由电子经过高压电场加速后产生的一种高速的电子流，带有负电荷，对辐照的物质产生一定的生物学效应<sup>[33]</sup>。10 MeV能量电子束能量高，辐照束流集中定向，能源利用充分，辐照效率高，因此电子束辐照对贝莱斯芽孢杆菌的致死率更高。

## 2.5 贝莱斯芽孢杆菌辐射突变菌株的筛选

### 2.5.1 抑菌效果提高的贝莱斯芽孢杆菌诱变菌株初筛

分别将2 000 Gy  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线辐照诱变菌悬液和400 Gy电子束辐照诱变菌悬液进行稀释涂布平板，挑选出单菌落进行纯化培养并编号。以拮抗指数较CK提高量为指标对纯化的诱变菌株进行初筛，结果如图6所示。 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线和电子束辐射分别筛选出19株和18株诱变菌株，两种辐射源对贝莱斯芽孢杆菌的初筛结果相似。

### 2.5.2 贝莱斯芽孢杆菌辐射突变菌株对辣椒炭疽病菌抑制效果的影响

将初筛后拮抗指数较CK提高的19株 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线诱变菌株和18株电子束诱变菌株进行复筛。从图7、8可知， $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线诱变菌株复筛得到5株对辣椒炭疽病菌抑制率显著提高突变菌株，即B004、B112、B114、B117和B118；出发菌株CK对辣椒炭疽病菌的抑制率为51.2%，与出发菌株CK相比，B004、B112、B114、B117和B118对辣椒炭疽病菌的抑制率分别为57.5%、58.0%、57.0%、57.7%和59.9%，分别提高了6.3%、6.8%、5.8%、6.5%和8.7%。电子束诱变菌株复筛获得2株对辣椒炭疽病菌抑制率显著提高的突变菌株，为D115和D243；出发菌株CK对辣椒炭疽病的抑制率为55.2%，D115和D243对辣椒炭疽病的抑制率分别提高到58.4%和58.1%，较CK分别提高了3.2%和2.9%。由于外界因素对菌株状态会有影响，因此每组实验均以CK进行组间比较，降低实验误差。

7株诱变菌株中对辣椒炭疽病抑制率最高达到59.9%。这与李国光等<sup>[34]</sup>研究中拮抗菌对辣椒炭疽

病菌的抑制率为 63.33% 的结果比略低。抑制率略低的原因是由实验过程中拮抗菌和病原菌的接种距离不同造成的,拮抗菌接种距病原菌越近,对病原菌的抑制效果一般越明显,表现出抑制率越高。

李国光等实验中拮抗菌与病原菌的距离为 5 mm,本研究中拮抗菌接种距病原菌 25 mm。由于本实验中接种的距离与李国光等实验中的距离相比较远,造成了效果与其略有差异。

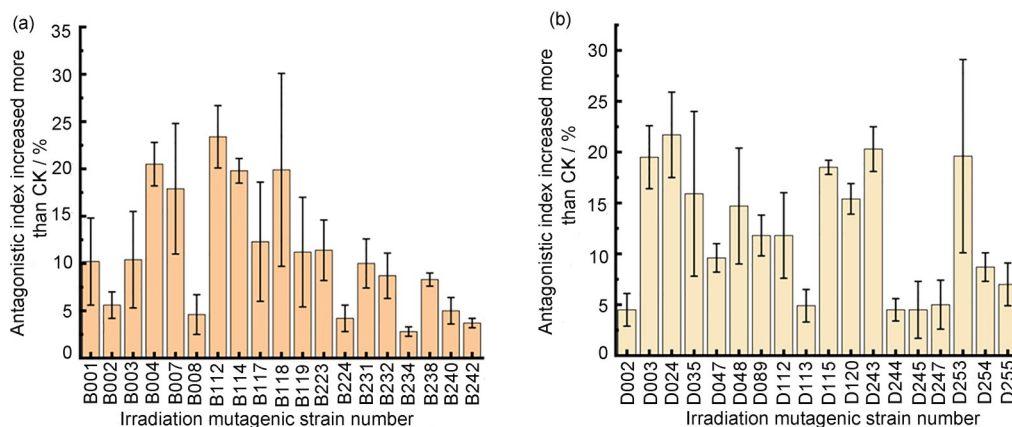


图6 辐照诱变菌株拮抗炭疽病菌的提高量:(a) $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线;(b)电子束  
Fig.6 Radiation mutagenesis strains antagonistic *Colletotrichum gloeosporioides* increased amount: (a)  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  ray; (b) electron beam

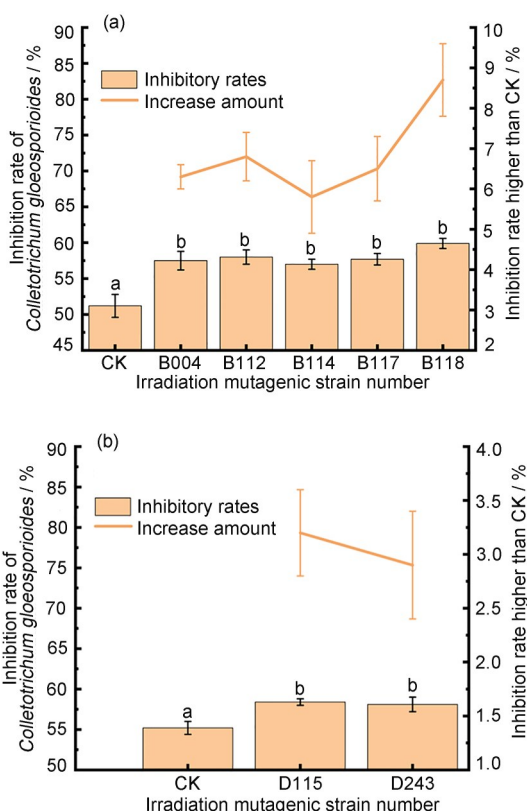


图7 出发菌株和辐射诱变菌株对炭疽病菌的抑制率:  
(a) $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线;(b)电子束

字母与CK不同,则与CK相比具有显著差异( $p < 0.05$ )

Fig.7 Inhibition rate of original strain and radiation mutagenesis strain on *Colletotrichum gloeosporioides*:

(a)  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  ray; (b) electron beam

The letters were different from CK, and there was a significant difference compared with CK ( $p < 0.05$ )

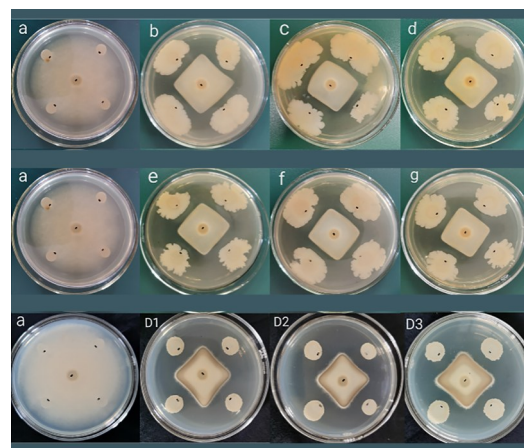


图8 四点法测定出发菌株和辐射诱变菌株的抑菌效果  
a:空白;b:CK;c:B004;d:B112;e:B114;f:B117;g:B118;  
D1:CK;D2:D115;D3:D243

Fig.8 Bacteriostatic effect of the original strain and the radiation mutagenic strain was determined by the four-point method

a: blank control; b: CK; c: B004; d: B112; e: B114; f: B117; g: B118; D1: CK; D2: D115; D3: D243

## 2.6 贝莱斯芽孢杆菌辐射突变菌株抑制辣椒炭疽病菌遗传稳定性

将出发菌株CK及抑制率提高量大于6%突变菌株进行传代培养,测量第1代、第5代、第6代的抑制率,结果见图9、10。

经过传代后,B004、B112、B117和B118突变菌株对辣椒炭疽病菌的抑制率依旧高于CK,传代

至第6代时,这4株菌对辣椒炭疽病菌的抑制率分别为59.4%、58.5%、59.0%和60.3%,抑菌提高率分别为6.1%、4.5%、5.4%和7.7%,与第1代相比,抑菌提高率没有显著差异,说明这4株突变菌株对辣椒炭疽病菌的抑制率在6代内遗传稳定,退化可能性小。

本实验研究可为贝莱斯芽孢杆菌辐射诱变育种以及辣椒炭疽病害的生物防治及防腐保鲜提供科学研究基础。后续可进行田间实验对遗传稳定的贝莱斯芽孢杆菌突变菌株抑制辣椒炭疽病菌的效果进行验证,并对其抑菌机理进行进一步的研究。

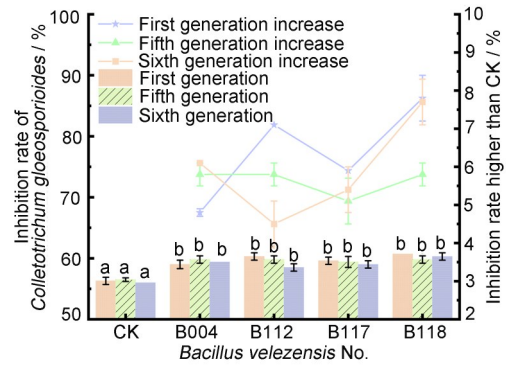


图9 <sup>60</sup>Co-γ射线辐射诱变菌株抑菌效果的遗传稳定性 (彩色见网络版)

字母与CK不同则与CK相比具有显著差异 ( $p < 0.05$ )

Fig.9 Genetic stability of antibacterial effect of <sup>60</sup>Co-γ ray radiation mutagenesis strains (color online)  
The letters were different from CK, and there was a significant difference compared with CK ( $p < 0.05$ )

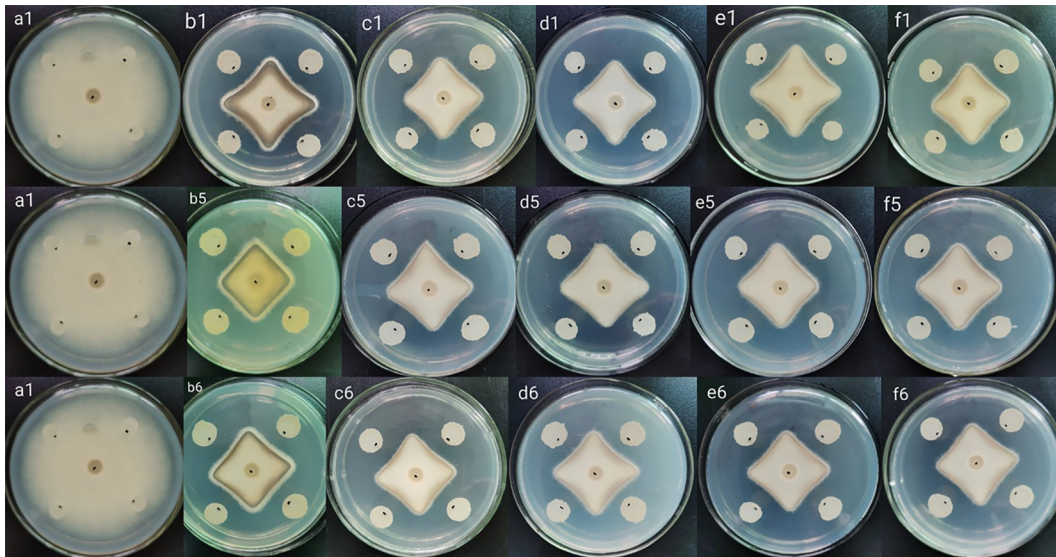


图10 四点法测定<sup>60</sup>Co-γ射线辐射诱变菌株的抑菌遗传稳定性

a1:空白;b1:CK;c1:B004;d1:B112;e1:B114;f1:B117;g1:B118;b5:CK第5代;c5:B004第5代;d5:B112第5代;e5:B114第5代;f5:B117第5代;g5:B118第5代;b6:CK第6代;c6:B004第6代;d6:B112第6代;e6:B114第6代;f6:B117第6代;g6:B118第6代

Fig.10 Four-point method was used to determine the antibacterial genetic stability of <sup>60</sup>Co-γ ray irradiated mutant strains  
a: blank control; b1: CK; c1: B004; d1: B112; e1: B114; f1: B117; g1: B118; b5: CK fifth generation; c5: B004 fifth generation; d5: B112 fifth generation; e5: B114 fifth generation; f5: B117 fifth generation; g5: B118 fifth generation; b6: CK sixth generation; c6: B004 sixth generation; d6: B112 sixth generation; e6: B114 sixth generation; f6: B117 sixth generation; g6: B118 sixth generation

### 3 结论

本研究采用<sup>60</sup>Co-γ射线、电子束两种不同射线源对贝莱斯芽孢杆菌进行诱变选育,两者均具有较好的诱变效果,说明辐射诱变可望成为一种优秀的微生物诱变育种手段。但辐射诱变剂量存在差异,<sup>60</sup>Co-γ射线适宜诱变剂量高于电子束诱变剂量。经<sup>60</sup>Co-γ射线辐射的诱变菌株对辣椒炭疽病菌抑制效果更好,在实验室环境下,诱变菌株B118

对炭疽病菌抑制率最高可达到59.9%。<sup>60</sup>Co-γ射线辐射诱变获得的B004、B112、B117、B118诱变菌株对辣椒炭疽病菌抑菌效果在6代内遗传稳定。本实验结果可为贝莱斯芽孢杆菌辐照诱变育种研究提供基础,为辣椒炭疽病害的生物防治及防腐保鲜提供理论参考,后续可进行田间实验对贝莱斯芽孢杆菌抑制辣椒炭疽病菌的效果进行验证,并对其抑菌机理进行进一步的研究,研究其对辣椒采后防腐保鲜效果。



**作者贡献声明** 谢慧完成了论文实验，实验数据的处理和分析，论文的撰写和修改；刘安指导了论文的实验设计，对文章进行了修改；陈亮对实验进行设计，并对文章进行修改；武小芬提供文章思路对文章进行修改；齐慧提供文章思路；张祺玲提供了本文的实验方案；王振、邓明对论文的构思做出了贡献；王克勤提供本文的研究思路及经费，对文章进行修改；刘素纯提供了研究思路，对文章进行了修改。全体作者均已阅读并同意最终文本。

## 参考文献

- 1 陈积红, 胡伟, 李文建. 重离子束辐照在优良工业微生物菌株创建中的应用实践[J]. 生物产业技术, 2017(1): 46-50. DOI: 10.3969/j.issn.1674-0319.2017.01.007.  
CHEN Jihong, HU Wei, LI Wenjian. The application of heavy ion irradiations for creating promising new strains of industrial microorganisms[J]. *Biotechnology & Business*, 2017(1): 46-50. DOI: 10.3969/j.issn.1674-0319.2017.01.007.
- 2 Yolmeh M, Khomeiri M. Effect of mutagenesis treatment on antimicrobial and antioxidant activities of pigments extracted from *Rhodotorula glutinis*[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2017, **10**: 285-290. DOI: 10.1016/j.bcab.2017.04.007.
- 3 Koksharova O A, Popova A A, Plyuta V A, *et al.* Four new genes of cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 are responsible for sensitivity to 2-nonanone [J]. *Microorganisms*, 2020, **8**(8): 1234. DOI: 10.3390/microorganisms8081234.
- 4 郑婕, 庄远航, 郭梓琪, 等. 南雄辣椒炭疽病菌的分离鉴定与药剂筛选[J]. 中国蔬菜, 2022(10): 58-65. DOI: 10.19928/j.cnki.1000-6346.2022.5040.  
ZHENG Jie, ZHUANG Yuanhang, GUO Ziqi, *et al.* Isolation, identification and pesticide screening of *Colletotrichum gloeosporioides* from Nanxiong pepper[J]. *China Vegetables*, 2022(10): 58-65. DOI: 10.19928/j.cnki.1000-6346.2022.5040.
- 5 邹学校, 马艳青, 戴雄泽, 等. 辣椒在中国的传播与产业发展[J]. 园艺学报, 2020, **47**(9): 1715-1726. DOI: 10.16420/j.issn.0513-353x.2020-0103.  
ZOU Xuexiao, MA Yanqing, DAI Xiongze, *et al.* Spread and industry development of pepper in China[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2020, **47**(9): 1715-1726. DOI: 10.16420/j.issn.0513-353x.2020-0103.
- 6 林清, 吕中华, 黄任中, 等. 辣(甜)椒抗 TMV、CMV、疫病及炭疽病材料筛选[J]. 西南农业学报, 2005, **18**(1): 108-110. DOI: 10.16213/j.cnki.scjas.2005.01.026.  
LIN Qing, LYU Zhonghua, HUANG Renzhong, *et al.* Screening of pepper germplasm for resistance to TMV, CMV, phytophthora blight and anthracnose[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2005, **18**(1): 108-110. DOI: 10.16213/j.cnki.scjas.2005.01.026.
- 7 杨佳文, 赵尊练, 张管曲, 等. 陕西线辣椒炭疽病原菌的鉴定及生物学特性研究[J]. 西北农业学报, 2017, **26**(11): 1695-1705. DOI: 10.7606/j.issn.1004-1389.2017.11.017.  
YANG Jiawen, ZHAO Zunlian, ZHANG Guanqu, *et al.* Identification and biological characterization of anthrax bacteria in xianlajiao chili pepper in Shaanxi Province[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2017, **26**(11): 1695-1705. DOI: 10.7606/j.issn.1004-1389.2017.11.017.
- 8 Lamsal K, Kim S W, Kim Y S, *et al.* Application of rhizobacteria for plant growth promotion effect and biocontrol of anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* on pepper[J]. *Mycobiology*, 2012, **40**(4): 244-251. DOI: 10.5941/MYCO.2012.40.4.244.
- 9 Shin J H, Park B S, Kim H Y, *et al.* Antagonistic and plant growth-promoting effects of *Bacillus velezensis* BS1 isolated from rhizosphere soil in a pepper field[J]. *The Plant Pathology Journal*, 2021, **37**(3): 307-314. DOI: 10.5423/PPJ.NT.03.2021.0053.
- 10 Kim D J, Jeon B J, Han J W, *et al.* Evaluation of the endophytic nature of *Bacillus amyloliquefaciens* strain GYL4 and its efficacy in the control of anthracnose[J]. *Pest Management Science*, 2016, **72**(8): 1529-1536. DOI: 10.1002/ps.4181.
- 11 Wonglom P, Suwannarach N, Lumyong S, *et al.* *Streptomyces angustmyceticus* NR8-2 as a potential microorganism for the biological control of leaf spots of *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* caused by *Colletotrichum* sp. and *Curvularia lunata*[J]. *Biological Control*, 2019, **138**: 104046. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2019.104046.
- 12 Thilagam R, Hemalatha N. Plant growth promotion and chilli anthracnose disease suppression ability of rhizosphere soil Actinobacteria[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2019, **126**(6): 1835-1849. DOI: 10.1111/jam.14259.
- 13 Supong K, Thawai C, Choowong W, *et al.* Antimicrobial

- compounds from endophytic *Streptomyces* sp. BCC72023 isolated from rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Research in Microbiology*, 2016, **167**(4): 290-298. DOI: 10.1016/j.resmic.2016.01.004.
- 14 Intra B, Greule A, Bechthold A, *et al.* Thailandins A and B, new polyene macrolactone compounds isolated from *Actinokineospora bangkokensis* strain 44EHW(T), possessing antifungal activity against anthracnose fungi and pathogenic yeasts[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, **64**(25): 5171-5179. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b01119.
- 15 Naziya B, Murali M, Amruthesh K N. Plant growth-promoting fungi (PGPF) instigate plant growth and induce disease resistance in *Capsicum annuum* L. upon infection with *Colletotrichum capsici* (syd.) butler & bisby[J]. *Biomolecules*, 2019, **10**(1): 41. DOI: 10.3390/biom10010041.
- 16 Yadav M, Dubey M K, Upadhyay R S. Systemic resistance in chilli pepper against anthracnose (caused by *Colletotrichum truncatum*) induced by *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* and *Paenibacillus dendritiformis*[J]. *Journal of Fungi*, 2021, **7**(4): 307. DOI: 10.3390/jof7040307.
- 17 张德锋, 高艳侠, 王亚军, 等. 贝莱斯芽孢杆菌的分类、拮抗功能及其应用研究进展[J]. *微生物学通报*, 2020, **47**(11): 3634-3649. DOI: 10.13344/j. microbiol. china. 190947.
- ZHANG Defeng, GAO Yanxia, WANG Yajun, *et al.* Advances in taxonomy, antagonistic function and application of *Bacillus velezensis*[J]. *Microbiology China*, 2020, **47**(11): 3634-3649. DOI: 10.13344/j. microbiol.china.190947.
- 18 刘霞, 陆喆晓, 马紫程, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 Bv-303 对水稻白叶枯病菌的拮抗活性及其应用[J]. *生物工程学报*, 2023, **39**(2): 741-754. DOI: 10.13345/j. cjb.220412.
- LIU Xia, LU Zhexiao, MA Zicheng, *et al.* Antagonistic activity and application of *Bacillus velezensis* strain Bv-303 against rice bacterial-blight disease caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, **39**(2): 741-754. DOI: 10.13345/j. cjb.220412.
- 19 杨海宁, 宁豫昌, 王昌毓, 等. 接种贝莱斯芽孢杆菌 SW5 菌株对发酵鳊鱼鱼露品质的影响[J]. *核农学报*, 2019, **33**(10): 2013-2022. DOI: 10.11869/j. issn. 100-8551. 2019.10.2013.
- YANG Haining, NING Yuchang, WANG Changyu, *et al.* Effects of inoculated fermentation on characters of anchovy fish sauce by *Bacillus velezensis* SW5[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2019, **33**(10): 2013-2022. DOI: 10.11869/j. issn.100-8551.2019.10.2013.
- 20 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定: GB 4789.2—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Administration for Food and Drug Administration. National food safety standard Food microbiological examination Determination of total number of colonies: GB 4789.2—2016[S]. Beijing: China Standards Press, 2017.
- 21 邹立飞, 侯宪文, 李光义, 等. 一株甜瓜枯萎病原拮抗菌的筛选与防治效果初报[J]. *广东农业科学*, 2013, **40**(1): 72-75. DOI: 10.16768/j. issn.1004-874x.2013.01.039.
- ZOU Lifei, HOU Xianwen, LI Guangyi, *et al.* Screening of a strain of antagonistic bacteria against muskmelon *Fusarium* wilt and a preliminary report of the control effect[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2013, **40**(1): 72-75. DOI: 10.16768/j. issn.1004-874x.2013.01.039.
- 22 崔文会, 炊春萌, 孙雪, 等. 贝莱斯芽孢杆菌对果蔬土传病害的抑菌效果研究[J]. *工业微生物*, 2020, **50**(5): 15-20. DOI: 10.3969/j. issn.1001-6678.2020.05.003.
- CUI Wenhui, CHUI Chunmeng, SUN Xue, *et al.* Bacteriostatic effects of *Bacillus velezensis* on soil borne diseases of fruits and vegetables[J]. *Industrial Microbiology*, 2020, **50**(5): 15-20. DOI: 10.3969/j. issn. 1001-6678.2020.05.003.
- 23 孟兆丽. 枯草芽孢杆菌 HS-A38 高产抗菌肽突变株筛选及抑菌机理的研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2018.
- MENG Zhaoli. Screening of high yield antibacterial peptides mutants from *Bacillus subtilis* HS-A38 and action mechanism of antibacterial peptides[D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2018.
- 24 阮思煜. 超声辅助适应性进化诱变体系构建及其在高产多肽芽孢杆菌选育中应用研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2021. DOI: 10.27170/d.cnki.gjsuu.2021.000071.
- RUAN Siyu. Construction of ultrasound-assisted adaptive evolution mutation system and its application in the breeding of high-yield peptides producing bacillus [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2021.
- 25 马艺萌. 枯草芽孢杆菌诱变株 mutHS-407 的筛选及所产活性物质的纯化和应用[D]. 大连: 大连工业大学, 2019. DOI: 10.26992/d.cnki.gdlqc.2019.000142.

- MA Yimeng. Screening of mutant strain mutHS-407 from *Bacillus subtilis* and purification and application of active substances produced[D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2019. DOI: 10.26992/d.cnki.gdlqc.2019.000142.
- 26 曹晓梅. 阿维菌素高产菌株的定向选育[D]. 无锡: 江南大学, 2018.  
CAO Xiaomei. Directive breeding of avermectin-high-producing strains[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018.
- 27 李芹, 周礼红, 钱仕元, 等. 抗真菌抗生素产生菌 UEZC 的<sup>60</sup>Co-γ射线诱变育种[J]. 贵州农业科学, 2009, 37(3): 55-57. DOI: 10.3969/j.issn.1001-3601.2009.03.019.  
LI Qin, ZHOU Lihong, QIAN Shiyuan, *et al.* The mutation breeding of the antifungal antibiotics producing strain UEZC by the treatment of <sup>60</sup>Co-γ ray[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2009, 37(3): 55-57. DOI: 10.3969/j.issn.1001-3601.2009.03.019.
- 28 Wang Y X, Wang J, Zhang X, *et al.* Genomic and transcriptomic analysis of *Bacillus subtilis* JNFE1126 with higher nattokinase production through ultraviolet combined <sup>60</sup>Co-γ ray mutagenesis[J]. LWT, 2021, 147: 111652. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.111652.
- 29 罗水忠, 齐路路, 潘利华, 等. 降解亚硝酸盐肠膜明串珠菌的<sup>60</sup>Co γ射线诱变选育[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(35): 12670-12672. DOI: 10.13989/j.cnki.0517-6611.2014.35.148.  
LUO Shuizhong, QI Lulu, PAN Lihua, *et al.* Mutagenesis and screening of *Leuconostoc mesenteroides* with enhanced nitrite degradation capability by treatment of <sup>60</sup>Co γ ray[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2014, 42(35): 12670-12672. DOI: 10.13989/j.cnki.0517-6611.2014.35.148.
- 30 崔敬爱, 邵智韬, 戴碧玮, 等. 电子束辐照诱变黑曲霉突变菌株对米酒风味的影响[J]. 中国酿造, 2019, 38(3): 65-69. DOI: 10.11882/j.issn.0254-5071.2019.03.013.  
CUI Jing'ai, SHAO Zhitao, DAI Biwei, *et al.* Effects of *Aspergillus niger* mutant irradiated by electron beam on the flavor of rice wine[J]. China Brewing, 2019, 38(3): 65-69. DOI: 10.11882/j.issn.0254-5071.2019.03.013.
- 31 韩晶晶, 吕江涛, 张琴, 等. 高能脉冲电子束诱变筛选高产酒精酵母及其发酵条件优化[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2011, 29(3): 154-158.  
HAN Jingjing, LYU Jiangtao, ZHANG Qin, *et al.* Mutation and screening of high-alcoholic-yield yeast by HEPE and optimization of the fermentation condition[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2011, 29(3): 154-158.
- 32 付玉洁, 吕江涛, 王言, 等. 高能脉冲电子束诱变筛选丙酮丁醇梭菌及发酵研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2011, 29(5): 297-301.  
FU Yujie, LYU Jiangtao, WANG Yan, *et al.* Mutagenesis of *Clostridium acetobutylicum* by HEPE and research of the fermentation[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2011, 29(5): 297-301.
- 33 徐岩. 高产γ-淀粉酶黑曲霉菌株的电子束诱变育种及其产酶糖化力研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2019. DOI: 10.27163/d.cnki.gjlnu.2019.000303.  
XU Yan. Electron beam mutagenesis breeding of high γ-amylase yield *Aspergillus niger* strain and its enzyme saccharifying power[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2019. DOI: 10.27163/d.cnki.gjlnu.2019.000303.
- 34 李国光, 田瑞华, 赵磊, 等. 辣椒炭疽病病原菌生物学特性及其拮抗菌防效研究[J]. 农产品加工, 2018(7): 11-15. DOI: 10.16693/j.cnki.1671-9646(X).2018.04.004.  
LI Guoguang, TIAN Ruihua, ZHAO Lei, *et al.* Biological characteristics of pepper anthracnose pathogens and their antagonistic bacteria biocontrol effects[J]. Farm Products Processing, 2018(7): 11-15. DOI: 10.16693/j.cnki.1671-9646(X).2018.04.004.