

# 柑橘绿霉病拮抗细菌的筛选及其抑制效果

安国栋 洪 鹏 胡美英 魏 娜 陈牧宇

华南农业大学农药与化学生物学教育部重点实验室, 广州 510642

**摘要** 从根际土壤中筛选出 1 株对柑橘绿霉病菌 *Penicillium digitatum* Sacc. 具有较强拮抗活性的菌株 HA-01。采用平板对峙法, 测定了该菌株对柑橘绿霉病菌、柑橘青霉病菌 *Penicillium italicum*、柑橘酸腐病菌 *Geotrichum candidum* 等 12 种果蔬病原菌的拮抗活性。结果表明, 菌株 HA-01 对 12 种供试病原菌均有不同程度的拮抗作用, 表现出广谱抗菌活性。菌落形态观察、生理生化特性分析、16S rDNA 序列同源性比对以及特异性 PCR 检测结果表明, 该菌株为解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*。对马水橘的活体接种试验表明, 菌株 HA-01 的发酵液、菌悬液和发酵滤液处理 3 d 后柑橘绿霉病的发病率均低于 20%, 病斑直径均在 2.00 cm 以下, 而对照发病率为 94.44%, 病斑直径为 3.60 cm。

**关键词** 柑橘绿霉病菌; 拮抗细菌; 解淀粉芽孢杆菌; 抑制效果

**中图分类号** S 436.661.1; S 476 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)03-0052-05

柑橘绿霉病(citrus green mold)是柑橘果实在采后贮藏中因受到柑橘绿霉病菌(*Penicillium digitatum* Sacc.)等病原菌侵害而引起的。目前, 柑橘采后病害的防治主要依靠化学药剂, 但长期大量使用化学药剂所产生的抗药性、农药残留和环境污染等问题已越来越受到社会的广泛关注, 迫使人们去寻求更安全有效的果蔬采后防病新技术。

近 20 年来, 国内外采用生防菌防治植物病害的研究取得了重大进展, 出现了大量的研究报告及发明专利, 已有部分菌株实现商品化应用<sup>[1]</sup>。美国迄今已有 4 株枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 生防菌株获得国家环保局 (Environmental Protection Agency, EPA) 商品化或有限商品化生产应用许可, 分别是 GBO3、MBI600、QST713 和解淀粉枯草芽孢杆菌变种 *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* FZB24, 其中生物杀菌剂 QST713 商品名为 Serenad, 主要用于防治采后病害 (<http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>)。

笔者从大田作物和柑橘根际土壤中筛选出 1 株对柑橘绿霉病菌具有较强拮抗活性的菌株 HA-01, 并测定其抑菌作用和防病效果, 旨在为采后柑橘绿霉病的生物防治研究与应用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

香蕉煤纹病菌 *Exserohilum rostratum*、柑橘绿霉病菌 *Penicillium digitatum*、柑橘青霉病菌 *Penicillium italicum*、柑橘酸腐病菌 *Geotrichum candidum*、荔枝炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides*、枇杷炭疽病菌 *Colletotrichum acutatum*、荔枝霜疫霉病菌 *Peronophythora litchii*、西瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*、香蕉炭疽病菌 *Colletotrichum musae*、番茄炭疽病菌 *Colletotrichum lycopersici*、番茄酸腐病菌 *Oospora lactis* Fr. var. *parasitica* 和番茄晚疫病菌 *Phytophthora infestans* 均由华南农业大学农药与化学生物学教育部重点实验室保存与提供。

供试果实采于广东省阳春市柑橘园。将九成熟新鲜的阳春马水橘采摘后当天进行处理, 先用手工分选, 齐根剪平果蒂, 择除病、虫、破、烂、畸的个体, 保证果实品种、成熟度和物理状态的基本一致。

培养基配制参照文献<sup>[2]</sup>的方法进行。其中, 拮抗菌株分离和培养采用 PDA 或 PDB 培养基; 病原菌培养及平板拮抗试验采用 PDA 培养基; 活体试

收稿日期: 2012-10-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071713)

安国栋, 硕士研究生, 研究方向: 天然源农药. E-mail: iamagd@163.com

通讯作者: 胡美英, 教授, 研究方向: 天然源农药和昆虫毒理. E-mail: humy@scau.edu.cn

验培养基采用 LB 液体培养基。

## 1.2 拮抗细菌的分离

从广东省广州、韶关等地的柑橘园区和大田采集根际土样。采用平板稀释分离法分离拮抗菌<sup>[2]</sup>。称取 10 g 土壤样品,置于装有 90 mL 无菌水的 250 mL 三角瓶中,于 28 °C、180 r/min 摇床中振荡 30 min,然后静置 5 min,吸取上清液 1 mL,采用 10 倍稀释法梯度稀释,取已稀释的混悬液各 100 μL 涂布于 PDA 平板上,置于 26~28 °C 培养 2~3 d,挑取形态不同的细菌菌落,经过平板划线纯化后编号保存。

## 1.3 拮抗细菌的筛选

采用平板对峙培养法<sup>[3]</sup>进行筛选。在每个平板中央放置 1 块生长 5 d 左右长势一致的病原菌菌饼(直径 0.6 cm),同时每个平板内相对于该菌饼约 2.5 cm 的 4 个对称位置分别点接拮抗菌株,再以不接拮抗菌的平板为对照,设 3 个重复,25 °C 恒温培养,3 d 后测量病原菌菌落直径,并计算抑菌率。

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{对照病原菌直径} - \text{处理病原菌直径}}{\text{对照病原菌直径} - 0.6} \times 100\%$$

## 1.4 拮抗菌抑菌谱的测定

采用平板对峙培养法<sup>[3]</sup>测定菌株 HA-01 对柑橘青霉病菌和柑橘酸腐病菌等其他 11 种采后病原菌的拮抗活性。

## 1.5 拮抗菌株 HA-01 的鉴定

1) 形态观察。将活化后的菌株 HA-01 划线接种于 PDA 平板上,30 °C 培养 24~48 h,观察菌落特征,同时挑取适量菌落进行革兰氏染色,另取适量菌落制样,然后进行扫描电镜观察<sup>[2]</sup>。

2) 生理生化特性的测定。参照文献<sup>[4]</sup>的方法进行。

3) 菌株 HA-01 的分子鉴定。采用 DNA 提取试剂盒(TaKaRa 公司)提取菌株 HA-01 的总 DNA。PCR 扩增采用细菌通用 16SrDNA 引物<sup>[5]</sup>: 正向引物 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'。反应体系(25 μL): Buffer 2.5 μL, Taq 酶 0.5 μL, dNTP 2 μL, 引物各 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足。扩增条件: 94 °C 10 min; 94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物测序由上海博尚生物技术有限公司完成。将所得序列与 GenBank 中已知 16S rDNA 进行 BLAST 分析。特异 PCR 采用文献<sup>[6]</sup>的方法,以拮抗菌株 HA-01 总 DNA

为模板,用特异性引物进行 PCR 反应。其中,枯草芽孢杆菌特异引物为: FS 5'-CAGGCTCA-CACTTTGTCTTG-3'; RS 5'-TGAACACAGTC-CTGGGTTAG-3'。解淀粉芽孢杆菌特异引物为: FA 5'-TCGGTTTCACATCCTTCATC-3'; RA 5'-TTTGTACAGCGTGTCTTCTG-3'。反应程序: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min 30 s; 35 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

## 1.6 菌株 HA-01 对柑橘绿霉病的抑制作用

1) 菌株 HA-01 处理液的制备。在 PDA 斜面上活化菌株 HA-01 后,取一环接种于 LB 培养液中,装液量 50 mL/250 mL,37 °C、200 r/min 振荡培养 12 h 得到种子液,取 4.5 mL 种子液接种于新的 LB (100 mL/500 mL) 培养液中,37 °C、200 r/min 振荡培养 12 h 后,配制成 3 种处理液: A. 培养液(细菌浓度为 10<sup>8</sup> cfu/mL); B. 滤液(培养液在 8 000 r/min 离心 10 min 后,取上清用 0.22 μm 聚砜醚滤膜过滤); C. 菌悬液(培养液在 8 000 r/min 下离心 10 min,弃上清,将菌体用无菌水清洗后再离心,加入无菌水,调节细菌浓度为 10<sup>8</sup> cfu/mL)。

2) 人工接种。用灭过菌的打孔针在马水橘腰部位置各刺 1 个深 3 mm、宽 3 mm 的伤口,晾干后分别接种 20 μL 上述 3 种处理液和 CK。4 h 后再分别接种 1×10<sup>5</sup> 个/mL 的柑橘绿霉病菌孢子悬浮液 15 μL。待伤口晾干后,将果实摆放在长 400 mm、宽 300 mm、高 100 mm 的塑料框内,外部套塑料袋以保持 95% 左右的相对湿度,于 25 °C 贮藏。72 h 后分别测定果实的发病率和病斑直径。每处理 12 个果实,重复 3 次。

## 1.7 数据处理

采用 SAS 6.08 软件进行试验数据统计,并用 Duncan's 新复极差多重比较法进行差异显著性分析( $P < 0.05$ )。

# 2 结果与分析

## 2.1 拮抗细菌的分离

在采集的 50 份根际土样中分离出细菌 104 株。通过平板对峙培养,共获得 7 株对柑橘绿霉病菌平板抑菌率大于 55% 的菌株,占细菌纯化菌株总数的 6.73%。其中,菌株 HA-01 的抑菌效果最好,抑菌率为 70.85%。根据筛选结果,选取菌株 HA-01 作后续试验。

## 2.2 拮抗菌株 HA-01 的抑菌谱测定

由表 1 可知,菌株 HA-01 对所有供试病原菌均具有不同程度的拮抗活性,表现出良好的广谱抗菌特性。其中,菌株 HA-01 对柑橘绿霉病菌、柑橘青霉病菌、柑橘酸腐病菌、香蕉炭疽病菌、枇杷炭疽病菌、香蕉煤纹病菌以及番茄炭疽病菌的抑菌率均大于 60%,显示了较强的抑制活性。

表 1 菌株 HA-01 对 12 种病原菌的抑制作用<sup>1)</sup>

Table 1 Inhibition activity of the strain HA-01 against 12 pathogens

病原菌 Pathogens	抑菌率/% Inhibition rate
柑橘绿霉病菌 <i>Penicillium digitatum</i>	84.91±2.37 a
香蕉炭疽病菌 <i>Colletotrichum musae</i>	70.83±0.97 b
枇杷炭疽病菌 <i>Colletotrichum acutatum</i>	70.50±0.42 b
番茄晚疫病菌 <i>Phytophthora infestans</i>	69.82±0.18 b
香蕉煤纹病菌 <i>Exserohilum rostratum</i>	67.89±0.27 bc
西瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	63.83±2.84 cd
柑橘青霉病菌 <i>Penicillium italicum</i>	63.00±0.98 cde
柑橘酸腐病菌 <i>Geotrichum candidum</i>	62.06±0.37 def
番茄炭疽病菌 <i>Colletotrichum lycopersici</i>	60.18±0.37 def
荔枝炭疽病菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	58.13±0.75 ef
番茄酸腐病菌 <i>Oospora lactis</i> Fr. var. <i>parasitica</i>	57.25±1.08 f
荔枝霜疫霉菌 <i>Peronophythora litchii</i>	43.28±4.97 g

1) 数据后字母相同表示在 5% 水平上差异不显著 (DMRT,  $P>0.05$ , 下表同)。

Data with the same letters in column are not significant difference at 5% level (the same as following tables).

## 2.3 拮抗菌株 HA-01 的鉴定

1) 菌落和菌体。菌株 HA-01 在 PDA 培养基上的菌落浅黄色,近圆形,边缘不整齐,划线培养 24 h 后菌落表面凸起,单菌落呈透明球状,48 h 后破裂,有皱褶,无光泽,不透明。PDB 液体生长时菌体絮状,静置培养时表面产生菌膜。显微镜下观察菌体为杆状,产芽孢,芽孢椭圆形。革兰氏染色为阳性。扫描电镜下,菌体表面粗糙,大小为 1.4~2.1  $\mu\text{m}$ 。

2) 生理生化特性。拮抗菌株 HA-01 的生理生化特征鉴定结果显示,HA-01 菌株为 1 株产芽孢的杆菌,可水解淀粉,不产生吲哚,可利用柠檬酸盐、丙酸盐等(表 2)。大部分生理生化结果与解淀粉芽孢杆菌一致,但不能确定菌株的准确种类,需借助分子手段进一步确定其种属。

表 2 菌株 HA-01 的生理生化特性<sup>1)</sup>

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of the strain HA-01

特性 Characteristics	结果 Results
革兰氏染色 Gram staining	+
利用柠檬酸盐 Citrate utilization	+
产生吲哚 Indole production	-
利用丙二酸盐 Propionate utilization	+
甲基红(MR) Methyl red test	-
NaCl 生长 Tolerance to NaCl	<10%
V-P 反应 V-P reaction	+
D-葡萄糖产酸 Acid production from D-glucose	+
水解淀粉 Starch hydrolysis	+
L-阿拉伯糖产酸 Acid production from L-arabinose	+
水解尿素 Propionate	-
产生 H <sub>2</sub> S H <sub>2</sub> S production	-

1) “+”表示阳性或可利用,“-”表示阴性或不可利用。

“+” show positive reaction; “-” show negative reaction.

3) 16S rDNA 序列测定。对菌株 HA-01 的 16S rDNA 序列进行扩增并测序得其全长为 1 514 bp (该基因序列已提交到 GenBank 数据库,登录号为: JX915740.1)。Blast 分析发现该菌株与枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* (登录号 AB501113.1、FJ528074.1、EU723210.1 和 GU972603.1) 和解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* (登录号 HE774679.1、CP00-0560.1、AB735995.1 和 CP003332.1) 的同源性均为 99%。

以相似性为基础选取 7 株细菌构建系统发育树,结果如图 1 所示,结合生理生化特征分析可判断菌株 HA-01 为解淀粉芽孢杆菌或枯草芽孢杆菌。

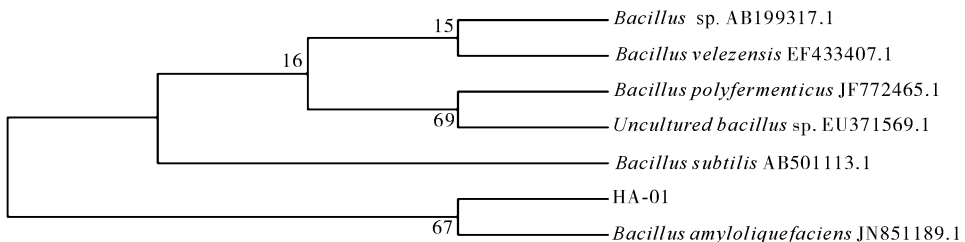
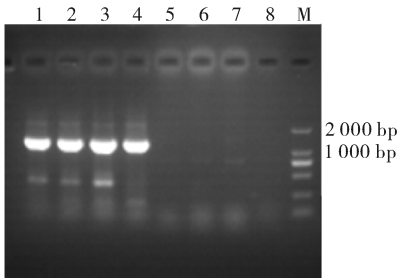


图 1 菌株 HA-01 的 16S rDNA 系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequence of the strain HA-01 and relating species

4) 特异 PCR 检测。以菌株 HA-01 的 DNA 为模板, 利用枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌特异引物进行 PCR 扩增, 结果显示, 以解淀粉芽孢杆菌特异引物扩增的泳道 1~4 出现长约 1 500 bp 的目的条带, 与预期产物大小一致; 而枯草芽孢杆菌特异性引物扩增泳道 5~8 均无条带(图 2)。结合生理生化特征及 16S rDNA 序列分析可确定菌株 HA-01 为解淀粉芽孢杆菌。



M: DNA Marker DL 2000; 1~4: 引物为解淀粉芽孢杆菌特异引物 Amplification with the specific primer of *Bacillus amyloliquefaciens*; 5~8: 引物为枯草芽孢杆菌特异引物 Amplification with the specific primer of *Bacillus subtilis*.

图 2 菌株 HA-01 的特异性 PCR 电泳检测

Fig. 2 Specific PCR detection for the strain HA-01

### 2.4 菌株 HA-01 对柑橘绿霉病的抑制效果

活体接种试验结果表明, 菌株 HA-01 的各种处理液均能有效抑制柑橘绿霉病的发生与扩展, 果实病斑直径和发病率均显著低于清水对照(表 3), 其中培养液和无菌滤液的抑制效果最好, 但二者差异不显著。果实接种病菌后于 25 °C 贮藏 3 d, 经培养液和无菌滤液处理的果实发病率均为 0。

另外, 拮抗菌株 HA-01 菌悬液也有显著的抑制效果, 但与培养液和无菌滤液处理相比效果较差, 发病率为 13.89%, 病斑平均直径为 2.00 cm; 而对照发病率为 94.44%, 病斑直径为 3.60 cm。这说明拮抗菌株 HA-01 对柑橘绿霉病具有抑制作用。

表 3 菌株 HA-01 对柑橘绿霉病的抑制效果

Table 3 Inhibitory effect of the strain HA-01 on citrus green mold

处理 Treatment	病斑直径/cm Lesion diameter	发病率/% Disease incidence
培养液 Cell culture	0 c	0 c
滤液 Cell-free filtrate	0 c	0 c
菌悬液 Cell suspension	2.00±0.12 b	13.89±2.78 b
对照 CK	3.60±0.15 a	94.44±2.78 a

## 3 讨论

解淀粉芽孢杆菌与枯草芽孢杆菌表型相似, 仅

从同源性上很难精确划定其分类地位, 而利用特异 PCR 技术能够实现两者的精确分类。Oleg 等<sup>[7]</sup>利用枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌 *yyaR*、*yyaO* 和 *tetB-tetL* 基因序列的差异设计特异引物, 通过特异 PCR 将两者区分; Idriss 等<sup>[8]</sup>根据枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶基因差异, 通过特异 PCR 鉴定菌株。笔者利用枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌基因组中  $\beta$ -甘露聚糖酶基因的特异性设计引物, 通过特异 PCR 方法对菌株 HA-01 进行鉴定。该方法既简便易行, 又节约成本。

菌株 HA-01 的菌悬液与培养液和无菌滤液处理相比效果较差, 说明菌株 HA-01 可以通过产生拮抗物质抑制病原菌生长, 这与 Arrebola 等<sup>[9]</sup>的研究结果一致。研究表明, 解淀粉芽孢杆菌可以通过产生拮抗物质、营养与空间的竞争和诱导寄主产生抗病性发挥其生防效能<sup>[10-14]</sup>。

土壤是发掘有重要应用潜力的生防菌种的主要来源之一。近年来, 从土壤中分离解淀粉芽孢杆菌的报道越来越多。况福元等<sup>[15]</sup>从土壤中分离筛选获得 2 株解淀粉芽孢杆菌, 对菜心炭疽病希金斯炭疽病菌 *Colletotrichum higginsianum* 具有较强的抑制作用; 陈成等<sup>[16]</sup>从广州地区土壤中分离得到 1 株产抗真菌物质的解淀粉芽孢杆菌菌株 HN06, 对黑曲霉病菌 *Aspergillus niger*、稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae*、水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solani* 和苦瓜枯萎病菌 *Cucurbit wilt* 均有良好的抑制作用。将解淀粉芽孢杆菌应用于水果采后病害防治的研究报道也日益增多<sup>[17-18]</sup>, 但未见将其用于柑橘果实采后保鲜的报道。本试验结果表明, 解淀粉芽孢杆菌 HA-01 具有广谱抑菌活性, 对马水橘采后绿霉病显示出良好的离体和活体抑制作用, 其发酵液也具有生防效果, 是很有开发潜力的拮抗菌, 但要将其真正应用于生产实践, 还需对发酵条件、制剂生产、应用方式和生防机制等进行系统研究。

## 参 考 文 献

[1] 刘普, 方静凡, 程运江, 等. 生防酵母菌防治果品采后病害机理的研究进展[J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(2): 134-140.  
 [2] 方中达. 植物研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 46-47, 89-107.  
 [3] 齐东梅, 惠明, 梁启美, 等. 枯草芽孢杆菌 H110 对苹果梨采后青霉病和黑斑病的抑制效果[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(2): 171-174.  
 [4] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版

- 社,2001:364-398.
- [5] WEISBURG W G, BARMS S M, PELLETIER D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697-703.
- [6] 刘勇, 李辉, 李金霞, 等. 特异 PCR 方法对枯草芽孢杆菌群的鉴定区分[J]. *饲料工业*, 2010, 31(4): 52-54.
- [7] OLEG N R, CHRISTINA D, JOHAN M, et al. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 48: 249-259.
- [8] IDRISSE E E, MAKAREWIC O, FAROUK A, et al. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect [J]. *Microbiology*, 2002, 148: 2097-2109.
- [9] ARREBOLA E, JACOBS R, KORSTEN L. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 108(2): 386-395.
- [10] SUN L J, LU Z X, BIE X M, et al. Isolation and characterization of a co-producer of fengycins and surfactins, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2 from *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 2006(12): 1259-1266.
- [11] WONG J H, HAO J, CAO Z, et al. An antifungal protein from *Bacillus amyloliquefaciens* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 105: 1888-1898.
- [12] 信珊珊, 祁高富, 朱发银, 等. 1 株解淀粉芽孢杆菌发酵条件的优化及其对油茶炭疽病的防效[J]. *华中农业大学学报*, 2011, 30(4): 411-415.
- [13] 王志远, 吴兴兴, 吴毅毅, 等. 解淀粉芽孢杆菌 B9601-Y2 抗性基因标记及其在作物根部的定殖能力[J]. *华中农业大学学报*, 2012, 31(3): 313-319.
- [14] 邱思鑫, 阮宏春, 宋美仙等. 内生解淀粉芽孢杆菌 TB2 菌株活性物质诱导辣椒果抗疫病的生化机理[J]. *热带作物学报*, 2010, 31(10): 1813-1820.
- [15] 况福元, 吴小丽, 吕凤青, 等. 菜心炭疽病菌拮抗细菌的筛选及鉴定[J]. *微生物学通报*, 2009(9): 1350-1355.
- [16] 陈成, 崔堂兵, 于平儒. 一株抗真菌的解淀粉芽孢杆菌的鉴定及其抗菌性研究[J]. *现代食品科技*, 2011, 27(1): 36-39.
- [17] ALVINDIA D G, NATSUAKI K T. Biocontrol activities of *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 isolated from banana fruit surface against banana crown rot-causing pathogens [J]. *Crop Protection*, 2009, 28: 236-242.
- [18] 孔维嘉, 王洋, 尚楠, 等. 扩展青霉拮抗菌的筛选鉴定及抗菌物质分析[J]. *食品科学*, 2011, 32(15): 153-157.

## Screening of antagonistic bacteria against citrus green mold and its inhibitory effects

AN Guo-dong HONG Peng HU Mei-ying WEI Na CHEN Mu-yu  
Key Laboratory of Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education,  
South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

**Abstract** A bacterial strain HA-01, isolated from rhizosphere soil, exhibited extensive antagonistic effect on 12 fruit and vegetable pathogens. The strain was identified as *Bacillus amyloliquefaciens* based on morphological observation, physiological and biochemical characteristics, 16S rDNA sequence homology and specific PCR detection. The effects of different treatments of strain HA-01 against disease caused by *Penicillium digitatum* Sacc. on inoculated mashui mandarin were also investigated. The results showed that the incidence of citrus green mold of mashui mandarin treated by cell culture, cell-free filtrate and cell suspension of strain HA-01 was less than 20% in all treatments while the incidence of control was 94.44%, and the lesion diameter was all below 2.00 cm while the lesion diameter of the control was 3.60 cm.

**Key words** *Penicillium digitatum* Sacc.; antagonistic bacteria; *Bacillus amyloliquefaciens*; inhibitory effects