

杜梨根癌病原菌质粒类型鉴定及 枯草芽孢杆菌对其抑制研究

焦延静, 邢瑞肖, 杜国强, 师校欣, 张玉星

(河北农业大学 园艺学院, 河北 保定 071001)

摘 要:以杜梨根瘤为试材,采用分子生物学方法、牛津杯法和指示植物接种法,研究了杜梨根癌病原菌的质粒类型及枯草芽孢杆菌对杜梨根癌病原菌的影响。结果表明:从1年生杜梨根部冠瘿瘤上分离、纯化、培养菌株,得到4株与根癌病原菌相似菌株,对之进行PCR扩增,此4株菌株均获得特异性目的条带,鉴定为根癌土壤杆菌胭脂碱类型。将病原菌接种指示植物向日葵幼苗,4株菌株均有致病性。经室内离体试验,供试的9株枯草芽孢杆菌对病原菌表现不同程度的抑菌效果;接种指示植物试验中,菌株9076和9161过滤发酵液能够完全抑制冠瘿瘤的生长。

关键词:杜梨;根癌病;PCR检测;致病性;枯草芽孢杆菌

中图分类号:S 436.612.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)18-0129-05

根癌病又称冠瘿病,是由根癌土壤杆菌侵染引起的一种细菌性病害,病菌主要在根系上形成肿瘤,从而破坏植株的皮层并阻塞输导组织,影响植株的水分及养分吸收,严重时导致植株死亡。根癌病菌可长时间存活于土壤中,并随苗木的调运进行远距离传播,许多人探究用化学药剂防治,但是都因为没有有效的化学药剂及持效时间短、成本高等而未在生产上广泛应用^[1],同时化学农药的使用会造成环境的污染和生态平衡的破坏。因此,生物防治果树根癌病成为国内外学者研究的重点,放射性土壤杆菌 HLB-2^[2],能够产生细菌素,可利用章鱼碱和胭脂碱作为氮源,抑制由葡萄土壤杆菌引起的冠瘿病;根癌土壤杆菌菌株 J73^[3],能够抑制所有的胭脂碱型、章鱼碱型和农杆菌碱型 Ti 质粒的菌株;葡萄土壤杆菌菌株 E26^[4],能够产生土壤杆菌素,并抑制由胭脂碱型、章鱼碱型、农杆菌碱型引起的冠瘿病。因此,明确杜梨根癌病原菌的质粒类型可为生物防治根癌病提供理论基础。张静娟等^[5]运用纸电泳法在对北京郊区根癌土壤杆菌质粒类型的鉴定中检测到梨根癌类型为胭脂碱型,但目前尚鲜见运用分子生物学方法鉴定杜梨根癌

菌质粒类型的报道,张洁等^[6]利用 iaaH-F2/iaaH-R1 及 TF/TR 引物检测出葡萄根癌病的病原菌,并确定其质粒类型为章鱼碱型。这为杜梨根癌病的病原菌检测和质粒类型鉴定提供了有益参考。

枯草芽孢杆菌是自然界广泛存在的非致病性细菌,具有生长快、营养简单、产生耐热抗逆芽孢的特性,有利于生产及在环境中存活、定殖与繁殖。枯草芽孢杆菌所产生的分泌物能够抑制梨轮纹病^[7]、棉花黄萎病^[8]、番茄灰霉病和辣椒疫霉病^[9]等真菌病害,也能抑制大肠杆菌和沙门氏菌^[10]及番茄根癌菌^[11]等细菌病害。但对杜梨根癌菌的拮抗作用鲜见报道,对其有效筛选和合理利用将为果树根癌病的生物防治提供一条有效途径。

该研究从田间杜梨根瘤取样,对其进行分离纯化并运用分子生物学检测冠瘿碱质粒类型,用指示植物鉴定其致病性,采用室内离体测验及接种指示植物分析不同枯草芽孢杆菌菌株对病原菌的拮抗作用,以期田间应用生防菌剂防治杜梨根癌病提供理论和实践依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

根瘤采自河北农业大学教学实习基地1年生杜梨根系,向日葵种子为河北省保定市奥富种子有限公司生产的“美葵567矮大头”。

供试的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)9株,编号为9076、9099、9108、9119、9140、9144、9161、9165、9178,由河北省农林科学院植物保护研究所马平教授惠赠。阳性菌

第一作者简介:焦延静(1989-),女,硕士,研究方向为果树生物技术。E-mail:chenxijy89@sina.com.

责任作者:杜国强(1966-),男,博士,教授,研究方向为果树生物技术。E-mail:gdu@hebau.edu.cn.

基金项目:农业部公益性行业(农业)科研专项资助项目(201203075-05)。

收稿日期:2015-05-25

株为根癌土壤杆菌 2-2-1(*Agrobacterium tumefaciens*),由河北农业大学林学院杜克久教授惠赠。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌的分离 于2014年4月上旬采集杜梨根部幼嫩冠瘿,放入自封袋中带回实验室,4℃保存。取根瘤内部新鲜组织,75%乙醇表面消毒1 min,无菌水清洗3次,置于研钵中加少量无菌水混合,捣碎,静置,取上清液按 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 稀释,各取50 μL涂布于YEB培养基平板上,28℃培养48 h。挑选表面光滑、圆形突起的菌落在YEB培养基平板上纯化2次,放在4℃保存备用。

1.2.2 病原菌的分子生物学检测 采用菌液PCR法。PCR扩增引物序列及用途见表1,引物由上海生工

表1

PCR引物及用途

Table 1

Primers used for PCR and their purpose

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	用途 Purpose
iaaH-F2/iaaH-R1	ACATGCATGAGTTATCGTTTGAAT GCATCAAGGTCATCGTAAAAGTAGGT	扩增章鱼碱型和胭脂碱型土壤杆菌 T-DNA 上 <i>iaaH</i> 基因 <i>iaaH</i> gene amplification in <i>Agrobacterium</i> T-DNA of octopine and nopaline types
RBF/RBR	TGACAGGATATATTGGCGGGTAA TGCTCCGTCGTCAGGCTTTCCGA	扩增胭脂碱型基因 Nopaline gene amplification
NF/NR	TTAACCCAAATGAGTACGATGACGA TTATTTCGGTACTGGATGATATTAG	扩增胭脂碱型土壤杆菌 Ti 质粒的 6b 基因 6b gene amplification in <i>Agrobacterium</i> Ti plasmid of nopaline type

1.2.3 病原菌的致病性鉴定 将检测到有目的基因片段的菌株接种到 YEB 液体培养基中,28℃下以 200 r/min 震荡培养至对数期。以划伤接种方式将菌悬液接种到株高 5~10 cm 的向日葵幼苗茎秆上,2-2-1 为阳性对照,无菌水为阴性对照,每株 10 棵,7 d 后观察并记录发病状况。

1.2.4 枯草芽孢杆菌对病原菌的体外抑菌作用 将枯草芽孢杆菌接种在 LB 固体培养基上,28℃培养 24 h,挑取单菌落于 LB 液体培养基中,28℃,200 r/min 震荡培养至菌悬液浓度为 10^9 CFU/mL,再以2%的接种量接种到发酵培养基中,28℃,200 r/min 震荡培养 96 h后,将发酵液高速低温离心 20 min,其上清液用 0.22 μm 滤膜过滤除菌,获得无菌过滤物。吸取病原菌菌悬液 50 μL 加到 5 mL 融化后冷却到 50℃的固体 YEB 培养基中,待晾干后将牛津杯插到培养基中,每个牛津杯注入 150 μL 发酵液,置于 28℃恒温培养箱中 48 h,每个处理 3 次重复,用十字交叉法测其抑菌圈直径。

1.2.5 枯草芽孢杆菌温室防治病原菌效果检测 以向日葵为指示植物,将枯草芽孢杆菌的过滤发酵液与病原菌菌悬液以 1:1 混合,用无菌注射器吸取 10 μL 接种到株高 5~10 cm 的向日葵幼苗茎段上,30 d 后观察结瘤情况并称瘤重,每个处理 10 棵,以单独接种病原菌为对照。

物技术有限公司合成。20 μL 反应体系中含有各引物(10 μmol/L) 0.6 μL,10 × Easy Taq Buffer 2 μL,2.5 mmol/L dNTPs 1.6 μL,Easy Taq DNA polymerase 0.2 μL,模板 1 μL,无菌 ddH₂O 补足至 20 μL。以根癌土壤杆菌 2-2-1 为阳性对照,无菌水为阴性对照。反应程序:扩增 *iaaH* 基因(94℃预变性 1 min;32 个循环为 92℃变性 1 min,54℃退火 1 min,72℃延伸 1.5 min;最后延伸 72℃ 3 min);扩增 *RBF/RBR* 基因(94℃预变性 2 min;35 个循环为 94℃变性 1 min,60℃退火 1 min,72℃延伸 1 min;最后延伸 72℃ 5 min);扩增 *NF/NR* 基因(94℃预变性 1 min;32 个循环为 92℃变性 1 min,58℃退火 1 min,72℃延伸 1.5 min;最后延伸 72℃ 3 min)。反应结束后进行琼脂糖凝胶电泳并照相。

防治效果(%)^[12]=(对照根癌瘤鲜重-处理根癌瘤鲜重)/对照根癌瘤鲜重×100。

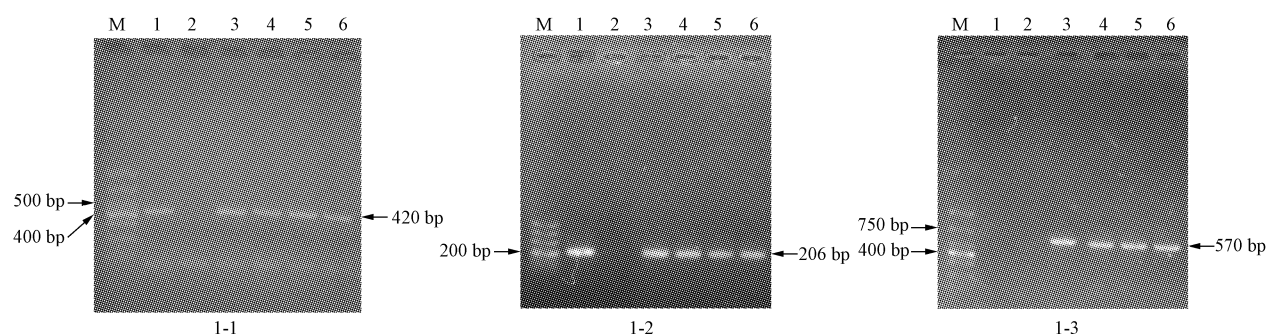
2 结果与分析

2.1 病原菌的分离及质粒类型测定

典型的土壤杆菌菌落在琼脂培养基上呈现白色、圆形、半透明状^[6]。从杜梨根部幼嫩冠瘿处共分离到 4 株与病原菌相似的菌株,分别用扩增章鱼碱型和胭脂碱型土壤杆菌 T-DNA 上 *iaaH* 基因的引物进行 PCR 扩增,编号分别为 1-5、2-1、2-4、3-1 的菌株获得 420 bp 的片段(图 1-1),用扩增胭脂碱型基因的引物进行 PCR 扩增,此 4 株获得 206 bp 的目的片段(图 1-2),表明其冠瘿碱类型为胭脂碱型。再以扩增胭脂碱型土壤杆菌 Ti 质粒的 6b 基因引物进行 PCR 扩增,此 4 株菌株均检测到 570 bp 的片段(图 1-3),表明此 4 株菌株均属根癌土壤杆菌胭脂碱型类型。

2.2 致病性鉴定

将有目的条带的 4 菌株菌悬液分别接种到向日葵上,菌株 2-2-1 和 2-4 在第 7 天开始发病,12 d 后其余菌株均表现不同程度的致病性(表 2),菌株 1-5、2-1、2-4 的发病率均为 80%,菌株 3-1 的发病率为 70%,阴性对照发病率为 0,阳性对照发病率为 100%。



注:M,DNA 分子标记;1,阳性对照;2,阴性对照(2-2-1);3,菌株 1-5;4,菌株 2-1;5,菌株 2-4;6,菌株 3-1。
Note:M,DNA marker;1,positive control;2,negative control(2-2-1);3,strain 1-5;4,strain 2-1;5,strain 2-4;6,strain 3-1.

图 1 利用 PCR 鉴定杜梨根癌病原菌类型

Fig. 1 PCR analysis to identify biotype of *Agrobacterium* strains causing grown gall disease in *Pyrus betulaefolia* Bge

表 2 不同根癌菌株对
向日葵幼苗的致病性

Table 2 Pathogenicity of different strains in sunflower seedlings

菌株 Strain	接种数 Number of seedling inoculated /株	初始发病时间 Time of initial gall appeared /d	发病数 Number of diseased seedling /株	发病率 Disease rate /%
1-5	10	10	8	80
2-1	10	12	8	80
2-4	10	7	8	80
3-1	10	11	7	70
2-2-1	10	7	10	100
CK	10	0	0	0

2.3 枯草芽孢杆菌对病原菌的离体抑菌效果

9 株不同的枯草芽孢杆菌过滤发酵液对杜梨根癌病原菌的抑菌效果见表 3,除枯草芽孢杆菌 9099 的过滤发酵液对杜梨根癌病原菌 1-5、2-1、2-4 和 9178 对病原菌 1-5 无抑菌作用外,其余菌株均对病原菌具有不同程度的抑菌效果。菌株 9165 对病原菌株 2-4 产生的抑菌圈直径最大,为 14.8 mm。菌株 9161 对病原菌 4 株菌株均能产生直径大于 10.0 mm 的抑菌圈,抑菌效果较好。

表 4 不同株枯草芽孢杆菌发酵液对病原菌的防治效果

Table 4 Efficiency of biocontrol of different supernatant of *Bacillus subtilis* against *Agrobacterium* strains

菌株 Strain	1-5		2-1		2-4		3-1	
	瘤重 Weight of tumor /mg	防治效果 Efficiency of biocontrol /%	瘤重 Weight of tumor /mg	防治效果 Efficiency of biocontrol /%	瘤重 Weight of tumor /mg	防治效果 Efficiency of biocontrol /%	瘤重 Weight of tumor /mg	防治效果 Efficiency of biocontrol /%
9076	0	100.0	0	100.0	0	100.0	0	100.0
9099	0	100.0	8	91.3±0.21	0	100.0	0	100.0
9108	70	41.3±0.32	0	100.0	0	100.0	0	100.0
9119	0	100.0	6	98.9±0.03	0	100.0	59	37.5±0.48
9140	0	100.0	39	55.9±0.20	0	100.0	0	100.0
9144	0	100.0	0	100.0	138	—43.2±1.15	0	100.0
9161	0	100.0	0	100.0	0	100.0	0	100.0
9165	0	100.0	0	100.0	17	82.3±0.20	0	100.0
9178	31	73.8±0.41	0	100.0	0	100.0	0	100.0
CK	119	—	89	—	96	—	94	—

表 3 枯草芽孢杆菌发酵液对
杜梨根癌病原菌的抑菌圈直径

Table 3 The inhibition of different supernatant of *Bacillus subtilis* against *Agrobacterium* strains

菌株编号 Strain	抑菌圈直径 Inhibition zone/mm			
	1-5	2-1	2-4	3-1
9076	7.3±0.6 ^a	6.7±0.6	9.6±0.5	4.2±0.8
9099	0	0	0	5.7±0.4
9108	5.6±0.5	7.5±0.5	11.0±1.0	5.3±0.6
9119	7.1±0.9	8.8±0.7	4.8±0.4	11.3±0.6
9140	7.4±1.1	9.7±0.6	9.8±0.5	8.9±0.7
9144	10.0±0.6	7.4±0.7	6.8±0.8	12.7±0.6
9161	14.2±0.8	12.0±1.0	12.6±0.5	10.7±0.6
9165	5.8±0.3	8.5±0.5	14.8±1.7	12.3±0.6
9178	0	8.3±0.6	9.2±1.0	11.0±1.0

注:^a为标准差,下同。
Note:^a stands for standard deviation, the same below.

2.4 枯草芽孢杆菌对病原菌的温室抑菌效果

枯草芽孢杆菌的过滤发酵液与杜梨根癌病原菌的菌悬液共接种到指示植物向日葵,1 个月后调查。由表 4 可知,枯草芽孢杆菌 9076 和 9161 的过滤发酵液能够完全抑制 4 株菌株病原菌引起的根癌病的发生,菌株 9144 对病原菌 2-4 无抑制效果,且平均瘤重大于病原菌。

3 讨论

目前国内外对于梨根癌菌的分离与检测报道很少。对病原菌质粒类型的鉴定,常规方法运用高压纸电泳法确定其质粒类型^[5],过程复杂且耗时间。PCR 技术因其具有简便、快速和灵敏度高特点,被应用于病原菌检测上^[6,13]。该试验用菌液直接 PCR,运用扩增章鱼碱型和胭脂碱型土壤杆菌的引物及扩增胭脂碱型的引物进行 PCR 检测,再以扩增胭脂碱型土壤杆菌 Ti 质粒 6b 基因的引物进行 PCR 鉴定,最终确定病原菌菌株质粒类型为根癌土壤杆菌胭脂碱类型,简化了操作程序,更大量的节约时间。采用分子生物学方法确定冠瘿类型,接种指示植物向日葵确定其致病性,大大缩短了鉴定时间。

生物防治根癌病具有对环境、生态和人类健康安全的优点,在世界各国受到广泛的重视,发挥着越来越重要的作用^[14]。枯草芽孢杆菌能够通过定殖到植物根际、体表或者是体内,从而与病原菌竞争植物周围的营养,也能通过分泌抗菌物质抑制病原菌的生长,同时能诱导植物产生抗性抵御病菌的侵入^[15]。但红侠等^[16]在枯草芽孢杆菌防治棉花枯黄萎病的抑制研究中表明,枯草芽孢杆菌对枯黄萎病菌具有明显的营养竞争和空间竞争,且可以溶解致病菌菌丝,导致菌丝畸形,达到生防目的。何红^[17]分离的内生枯草芽孢杆菌对辣椒、白菜、香蕉炭疽病具有很好的防治效果,其菌株分泌的抗菌物质能够抑制病原菌菌丝的生长、分生孢子的产生和萌发,并且能够主动进入植株内生定殖,抢先占领病菌的入侵位点,达到防治目的。该试验利用牛津杯法和指示植物接种法研究了枯草芽孢杆菌对杜梨根癌菌的拮抗作用,结果表明供试的 9 株枯草芽孢杆菌对杜梨根癌菌有不同程度的抑制作用,菌株 9076 和 9161 的过滤发酵液能够完全抑制冠瘿瘤的发生,这表明枯草芽孢杆菌菌株的代谢产物中存在的抑菌物质在生物防治中起到更为重要的作用。菌株 9144 在离体试验下够抑制病原菌的生长,但在活体抑菌测验中,冠瘿瘤平均重量却大于对照菌株,反而促进了冠瘿瘤的生长;菌株 9099 在离体条件下对病原菌无抑菌活性,但在活体试验中能够完全抑制冠瘿瘤的生长。虽然人们在筛选生防菌株时采用离体和

活体方法,但二者之间相关性不高^[18],必须通过田间试验进一步检测。

参考文献

- [1] 王慧敏. 植物根癌病的发生特点与防治对策[J]. 世界农业, 2000(7): 28-30.
- [2] 游积峰, 谢学梅, 陈培民, 等. 放射土壤杆菌 HLB-2 菌株防治葡萄根癌病的研究[J]. 生物防治通报, 1990, 6(1): 35-37.
- [3] WEBSTER J, THOMSON J. Genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* strain producing an agrocin active against biotype 3 pathogens[J]. Molecular and General Genetics, 1988, 214: 142-147.
- [4] 梁志宏, 王慧敏, 王建辉. E26 防治植物根癌病的效果及其稳定性初步研究[J]. 中国农业大学学报, 2001, 6(1): 91-95.
- [5] 张静娟, 那淑敏, 余茂效, 等. 北京郊区根癌土壤杆菌生物型及质粒类型的鉴定[J]. 微生物学报, 1984, 24(4): 369-375.
- [6] 张洁, 师校欣, 焦延静, 等. 葡萄根癌病原菌类型鉴定及几种杀菌剂和抗菌素对其抑菌效果[J]. 河北农业大学学报, 2013, 36(3): 77-81.
- [7] 张丽丽, 常有宏, 丁芳兵, 等. 2 株枯草芽孢杆菌对梨轮纹病的室内抑制作用研究[J]. 果树学报, 2010, 27(5): 823-827.
- [8] 李社增, 鹿秀云, 马平, 等. 防治棉花黄萎病的生防细菌 NCD-2 的田间效果评价及其鉴定[J]. 植物病理学报, 2005, 35(5): 451-455.
- [9] 刘慧芹, 韩巨才, 赵廷昌, 等. 果树内生拮抗细菌的筛选鉴定及其生防作用研究[J]. 园艺学报, 2014, 41(2): 335-342.
- [10] 秦瑶, 王苇, 郭秉娇, 等. 2 株枯草芽孢杆菌对大肠杆菌和沙门氏菌的体外抑菌试验研究[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(1): 207-210.
- [11] HAMMAMI I, RHOUMA A, JAOUADI B, et al. Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. strains[J]. The Society for Applied Microbiology, 2009, 48: 253-260.
- [12] 陈凡. 水生拉恩氏菌 HX2 菌株防治葡萄根癌病的初步研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2007.
- [13] TAN B S, YABUKI J, MATSUMOTO S, et al. PCR primers for identification of opine types of *Agrobacterium tumefaciens* in Japan[J]. Journal of General Plant Pathol, 2003, 69: 258-266.
- [14] FILO A, SABBATINI P, SUNDIN G W, et al. Grapevine crown gall suppression using biological control and genetic engineering: a review of recent research[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2013, 64: 1-14.
- [15] 赵新林, 赵思峰. 枯草芽孢杆菌对植物病害生物防治的作用机理[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(15): 3025-3028.
- [16] 但红侠, 董宁, 万素梅, 等. 枯草芽孢杆菌对棉花枯、黄萎病的抑制作用研究[J]. 新疆农业科学, 2010, 47(11): 2221-2225.
- [17] 何红. 辣椒内生枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)防病促生作用的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2003.
- [18] 高晓岗. 生防细菌菌株 GXG-2-2 的筛选、鉴定及其产生的抑菌活性物质的初步研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.

Identification of Bacteria Plasmid Type Collected From Crown Gall and Efficacy of *Bacillus subtilis* to Their Control in *Pyrus betulaefolia* Bge

JIAO Yanjing, XING Ruixiao, DU Guoqiang, SHI Xiaoxin, ZHANG Yuxing
(College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001)

魔芋葡甘聚糖对‘宁海白’枇杷保鲜效果的研究

王衍鹏¹, 黄坚钦¹, 杨娇娇¹, 冯健君², 秦巧平¹

(1. 浙江农林大学 农业与食品科学学院, 浙江 临安 311300; 2. 浙江省宁海县林特技术推广总站, 浙江 宁海 315600)

摘要:以‘宁海白’枇杷为试验材料,采用 0.1%、0.5%和 1.0% 3 个魔芋葡甘聚糖浓度涂膜处理果实,以不作任何处理为对照,4±1℃贮藏,定期观察并测定各项指标,筛选最优保鲜贮藏方法。结果表明:与对照相比,魔芋葡甘聚糖涂膜处理后置于 4℃贮藏可以有效降低‘宁海白’枇杷腐烂率,延长保鲜期,其中以 0.5%处理效果最好,腐烂率低,可减缓可溶性固形物、可滴定酸、维生素 C 含量的下降速度,延缓衰老进程。

关键词:枇杷;采后生理;魔芋葡甘聚糖;贮藏保鲜

中图分类号:S 667.309⁺.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)18-0133-03

枇杷是深受消费者喜爱的淡季水果,但枇杷成熟正值高温高湿季节,果实极不耐贮藏,室温下极易腐烂,对长距离运输及异地销售影响极大。魔芋(*Amorphophallus konjac*)在我国西南部、中西部等地区都有广泛种植,因其低热、高膳食纤维、富含营养而倍受欢迎。魔芋中富含葡甘聚糖,魔芋葡甘聚糖是从各种魔芋植物块茎里提取出的水凝胶状多糖,溶于水后形成凝胶状溶液,果蔬经该凝胶状溶液涂膜后,在表面形成一层无色透明的膜,能有效隔离果实与外界环境,阻止 O₂ 进入果实内部,减缓呼吸,从而能有效达到保鲜的作用^[1-2]。‘宁海

白’枇杷是优质白沙枇杷新品种,其果大、含糖高、酸甜适口、风味浓郁,但是其皮薄不耐贮藏,种植经济效益受到很大影响。现研究不同浓度魔芋葡甘聚糖涂膜‘宁海白’枇杷果实的保鲜效果,筛选最优贮藏方式,旨在为‘宁海白’枇杷保鲜及长距离运输提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试‘宁海白’枇杷采自浙江省宁海县一市镇,采集的果实经预冷后运至实验室。

1.2 试验方法

试验设计 0.1%、0.5%、1.0% 3 个魔芋葡甘聚糖浓度涂膜处理果实,将枇杷浸渍于不同浓度涂膜液中 5 min 后取出,自然晾干后放置于塑料泡沫箱中,每处理 200 个果实,重复 3 次,以不作任何处理为对照,4±1℃贮藏,定期观察并测定各项指标。

1.3 项目测定

可溶性固形物(TSS)含量的测定采用 ATAGO

第一作者简介:王衍鹏(1990-),男,硕士研究生,研究方向为园艺植物生理与分子生物学。E-mail:yanpengw55@163.com.

责任作者:秦巧平(1975-),女,博士,副教授,研究方向为园艺植物生理与分子生物学。E-mail:qinqp@zafu.edu.cn.

基金项目:宁波市农业重大重点资助项目(2013C11022);浙江省科技厅果品农业新品种选育重大科技专项资助项目(2012C12904-5);国家自然科学基金面上资助项目(31170638)。

收稿日期:2015-05-25

Abstract: The plants of *Pyrus betulaefolia* Bge that affected by crown gall pathogen were applied in this experiment. Molecular biology methods were used to identify the plasmid of pathogen of *P. betulaefolia* Bge crown gall. The results showed that the bacteria sampled from the crown gall that grew on the roots of the one-year-old *P. betulaefolia* plants were cultured and purified. Four bacterium strains similar to *Agrobacterium* were obtained. PCR assay showed that four bacterium strains had specific band and could be classified to the type of nopaline. These strains caused crown gall after inoculated into the stems of the sunflower seedlings as index plants. The oxford cup method and the index plants inoculated with both *Bacillus subtilis* and the bacteria of crown gall were used to study the effect of *Bacillus subtilis* against the pathogen of *P. betulaefolia* Bge. The results showed that nine *Bacillus subtilis* strains showed inhibition to the *Agrobacterium* strains in *in vitro* test. Inoculating of the supernatant of *Bacillus subtilis* strains 9076 and 9161 showed completely resistance to the growth of the crown gall in the index plants.

Keywords: *Pyrus betulaefolia* Bge; crown gall; PCR assay; pathogenicity; *Bacillus subtilis*