



贝莱斯芽孢杆菌 L-1 对梨灰霉和青霉病菌的抑制作用评价及全基因组分析

孙平平, 崔建潮, 贾晓辉, 王文辉*

中国农业科学院果树研究所, 辽宁 兴城 125100

摘要: 【目的】明确贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) L-1 对梨灰霉和青霉病菌的抑制作用, 明确菌株 L-1 无菌发酵液拮抗活性的稳定性及可能的拮抗机制。【方法】通过离体测定、活体测定和病原菌菌丝形态观察, 评价菌株 L-1 对梨灰霉和青霉病菌的拮抗活性。以梨灰霉病菌为供试病原菌, 利用牛津杯法测定菌株 L-1 无菌发酵液拮抗活性的稳定性。利用 Pacbio RSII 三代测序技术测定 L-1 的全基因组序列, 将全基因组序列与基因蛋白质序列数据库进行 BLAST 比对分析, 预测菌株 L-1 可能产生的次生代谢产物及潜在的作用机制。【结果】菌株 L-1 对梨灰霉和青霉病菌的活体抑制率分别为 92.88% 和 77.47%, 能引起病原菌菌丝膨大、畸形。菌株 L-1 在含 10% NaCl 的培养液中仍能正常生长, 其无菌发酵液耐高温、酸、碱、紫外照射和蛋白酶降解, 对病原菌具有稳定的拮抗活性。全基因组序列分析结果显示菌株 L-1 有 112 个基因参与了多种碳源的代谢, 可以利用多种碳源进行生长; 含有参与亚精胺、海藻糖等与菌株抗逆性相关化合物合成的基因; 次生代谢产物预测结果显示: L-1 含有合成 surfactin、fengycin、bacillibactin、bacillaene、macolactin、difficidin、bacilysin 等多种肽聚糖和聚酮糖类抗性化合物的基因簇, 以及能够降解病原菌细胞壁的 β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶相关的基因; 此外菌株 L-1 含有生成乙偶姻等能够诱导植物抗性的基因。【结论】菌株 L-1 能有效拮抗多种梨果采后病害, 抗逆性强, 拮抗活性稳定, 预测菌株 L-1 能够通过产生多种拮抗活性化合物和细胞壁水解酶类以及诱导植物抗性实现防病效果, 具有很大的应用潜力。

关键词: 梨灰霉病, 梨青霉病, 生物防治, 贝莱斯芽孢杆菌, 全基因组序列

我国是世界上最大的梨生产和出口国, 2016 年我国梨果总产量达到 1930 万 t, 占到世界总产量的 75%^[1]。梨果含水量大、表皮脆弱并且内含

物丰富, 在生长和储藏过程中容易受到多种病原物侵染, 引起腐烂变质, 导致果实品质降低或失去经济价值。例如, 梨灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0400903-06); 国家现代农业产业技术体系(CARS-29-19)

*通信作者。Tel/Fax: +86-429-3598655; E-mail: wangwenhui@caas.cn

收稿日期: 2017-12-13; 修回日期: 2018-03-25; 网络出版日期: 2018-05-28

和青霉病菌(*Penicillium expansum*)能够从梨果伤口侵染果实,分别引起梨灰霉病和青霉病,造成严重损失^[2]。目前对梨果病害的防治主要采用化学药剂,如在幼果期、果实生长中期和采收前施用多菌灵、退菌特、乙磷铝、甲基硫菌灵等有机磷杀菌剂或波尔多液,而对其生物防治的研究较少^[3]。

作者在前期研究中筛选出对梨轮纹病菌(*Botryosphaeria berengeriana*)具有显著拮抗活性的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) L-1。菌株 L-1 能够抑制梨果轮纹病害的扩展,诱导果实抗性相关酶(POD、CAT)的表达,并且具有较广的抑菌谱,可以在果实伤口中快速克隆和繁殖,具有很大的应用潜力^[4]。芽孢杆菌属具有非常相似的生理和分子特性,最近一些芽孢杆菌属的菌株被重新分类^[5],其中 *Bacillus methylotrophicus* 与 *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* 被划定为 *Bacillus velezensis* 的同物异名^[6],因此菌株 L-1 被重新命名为贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis* L-1)。贝莱斯芽孢杆菌 L-1 对梨灰霉和青霉病菌的防治效果、防治效果的稳定性及其拮抗机制仍需进一步研究。随着 DNA 测序技术的发展,以及集高通量、快速度、长读长及低成本等多种优点于一身的第三代测序技术的出现,为从基因组学角度研究微生物提供了快速简便的途径^[7]。

本研究测定了贝莱斯芽孢杆菌 L-1 对梨灰霉和青霉病菌的防治效果,明确了该菌株拮抗活性的稳定性,并利用第三代测序技术测定了其全基因组序列,从基因角度分析其可能的作用机制及应用潜力,为菌株 L-1 的应用研究提供更多的参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验果: 试验用‘黄冠梨’于 2016 年 8 月中旬采自河北省晋州市,选择大小一致的健康果实装箱、运输(采收后 2 d 内)至本单位冷库(0 °C)保存备用。

1.1.2 培养基: 试验中所用培养基原材料均购自上海索桥生物技术有限公司,包括马铃薯葡萄糖粉、牛肉膏蛋白胨粉、琼脂粉。试验用马铃薯葡萄糖培养基(PDA)、牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(NBA)和牛肉膏蛋白胨(NB)培养液均按照说明进行配置。

1.1.3 供试菌株及其菌饼制备: 本实验涉及菌株包括梨灰霉病原菌(*B. cinerea* LHM)、梨青霉病原菌(*P. expansum* LQM)和贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) L-1。LHM 和 LQM 由本实验室分离自储藏过程中表现出典型灰霉和青霉病症状的梨果,并经过光学显微镜和致病性验证。病原菌接种 PDA 培养基,在 25 °C 培养 5 d,取菌落生长前沿的菌饼(直径 6 mm)用于离体和活体活性测定。*B. velezensis* L-1 由作者于 2015 年 9 月从梨树根际土壤中分离得到,−20 °C 保存于 20%甘油中。将菌株 L-1 接种 NBA 培养基,32 °C 培养 2 d,取直径 6 mm 的菌饼用于离体活性测定。菌株 L-1 已于 2017 年 06 月 30 日提交至中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为 CGMCC14373。

1.1.4 菌株 L-1 发酵液、孢悬液及无菌发酵液制备: 采用摇瓶发酵培养法用 200 μL 菌株 L-1 孢子(20%甘油−20 °C 保存)接种 100 mL 的 NB 培养液,180 r/min、32 °C 培养 48 h,获得种子液。将种

子液按 10% (*V/V*)接种到新的 NB 培养液中, 于 180 r/min、32 °C 培养 48 h, 得到发酵液。发酵液经过 8000 r/min 离心 20 min, 分别收集沉淀和上清。沉淀用蒸馏水稀释, 血球计数板观察调节孢子浓度至 10^8 CFU/mL 得到孢悬液; 上清液经微孔滤膜(孔径 0.22 μ m)过滤去除孢子, 得到无菌发酵液。

1.2 菌株 L-1 对梨灰霉和青霉病菌的离体活性防效及菌丝生长的影响

平板对峙法^[8]测定 L-1 对梨灰霉病菌的拮抗活性。取灰霉病菌(LHM)菌饼置于 PDA 平板中央, 用无菌打孔器在菌饼两侧 3 cm 处对称打孔, 在孔中倒置接种 L-1 菌饼。接种的平板置于 25 °C 培养。不接种 L-1 的平皿为对照。每个处理重复 3 次。待对照菌落长满平板时, 测量抑菌圈直径。

参照 Wiggins & Kinkel 方法^[9]测定 L-1 对青霉菌的拮抗活性。青霉菌(LQM)接种 PDA, 25 °C 培养 5 d, 用无菌刀将长有菌落的培养基切成小块, 加入 50 mL 蒸馏水, 用无菌搅拌器打碎, 得到青霉菌孢悬液。将 10 mL 孢悬液加入到 500 mL 50 °C 的 PDA 培养基中, 混合均匀后倒平板。在含有青霉菌孢子的平板距平皿边缘 20 mm 的位置对称放置 2 个牛津杯, 每个杯中加入 100 μ L 菌株 L-1 的发酵液, 25 °C 恒温培养, 测量并记录抑菌圈直径。

挑取上述各处理及对照的梨灰霉菌、青霉菌菌丝, 在光学显微镜下观察菌丝和孢子形态, 并进行比较。

1.3 菌株 L-1 对梨灰霉和青霉病菌的活体防效

参考 Sadeghian 等^[10]的方法测定菌株 L-1 对梨灰霉和青霉病菌的活体防效。将健康新鲜的‘黄冠梨’果实放置于 0.2% (*V/V*)次氯酸钠中浸泡 3 min, 自来水冲洗后晾干。用无菌打孔器在梨果实赤道

部两侧各打孔 1 个, 孔径 5 mm、深 3 mm。每孔中加入 20 μ L 菌株 L-1 孢悬液(1×10^8 CFU/mL), 以加入 20 μ L 蒸馏水作为阴性对照。处理后的果实用保鲜膜封口, 20 °C 保湿培养。培养 1 d 后, 在孔内贴置灰霉(LHM)或青霉病菌(LQM)菌饼, 置于 20 °C 继续培养, 定时(每 2 d/5 d)测定不同处理的病斑直径, 并按如下公式计算防效。每个处理重复 3 次, 每个重复 6 个果。

防治效果(%)=(1-处理病斑直径/对照病斑直径) \times 100。

1.4 菌株 L-1 耐盐性及其无菌发酵液抗菌作用的稳定性

1.4.1 菌株 L-1 耐盐性: 将不同量的 NaCl 加入到 NB 培养液中, 配制成含 0.1%、0.5%、1.0%、2.0%、5.0%、10.0%、12.0%、15% NaCl (*W/V*)的 NB 培养液, 接种 1 mL 菌株 L-1 的种子液, 180 r/min、32 °C 培养 48 h, 600 nm 测定 OD 值。

参照葛平华等^[11]、Olfa Kilani-Feki 等^[12]评估菌株 L-1 无菌发酵液抗菌作用的稳定性。菌株 L-1 无菌发酵液经不同处理后(见下文描述), 用牛津杯法测定其对梨灰霉病菌的拮抗活性。在 PDA 平板中央接种灰霉病菌(LHM)菌饼, 距培养皿边缘 20 mm 位置处对称放置无菌牛津杯, 每杯内加 200 μ L 处理的无菌发酵液, 测定经不同处理后菌株 L-1 无菌发酵液的拮抗活性。

1.4.2 酸碱稳定性: 用 1 mol/L 的 NaOH 或 HCl, 将菌株 L-1 无菌发酵液的 pH 值分别调为 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12, 静置 24 h 后调回原发酵液 pH 6.5 备用。测定不同酸碱度对其活性的影响。

1.4.3 紫外线稳定性: 将菌株 L-1 无菌发酵液置于 30 W 紫外灯下, 分别照射 10、20、30、40、

50、60、90、120 min, 紫外灯与无菌发酵液垂直, 距离为 30 cm。不经紫外线照射的无菌发酵液为对照, 测定紫外线对其活性的影响。

1.4.4 热稳定性: 将菌株 L-1 无菌发酵液分别在 40、50、60、70、80、90、100 °C 金属浴 20 min 后, 冷却至室温。未经高温处理的无菌发酵液为对照, 测定不同高温处理后其活性的变化。

1.4.5 酶稳定性: 在菌株 L-1 无菌发酵液中分别加入胰蛋白酶、胃蛋白酶和蛋白酶 K, 使酶的最终浓度为 1 mg/mL, 37 °C 反应 1 h, 然后在 80 °C 处理 30 min, 4 °C 立即冷却, 测定不同蛋白酶处理后菌株 L-1 无菌发酵液的拮抗活性。

1.5 菌株 L-1 全基因组测定

细菌完整基因组测序与拼接见 Sun 等^[13]。利用细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒(B518225, 生工, 上海)提取菌株 L-1 的总 DNA, 经过浓度检测后递交北京百迈克公司, 利用三代测序平台

Pacbio RSII 对其进行全基因组测序。通过 Prodigal version 2.5 软件对编码基因进行预测, 借用蛋白质功能数据库 COG (Clusters of Orthologous Groups)、GO (Gene Ontolog)、代谢通路数据库 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)等功能数据库与该基因组预测的氨基酸序列逐一进行比对, 分别对其蛋白质功能和生物学代谢通路进行预测。利用 antiSMARSH version 4.0.2 软件^[14] (<https://antismash.secondarymetabolites.org>)分析菌株 L-1 的主要次生代谢产物。

2 结果和分析

2.1 菌株 L-1 对梨灰霉菌、青霉菌的离体活性及菌丝生长的影响

菌株 L-1 在离体条件下能够显著抑制梨灰霉、青霉菌菌丝的生长, 形成明显的抑菌圈(图 1-A, B)。挑取对照及抑菌圈前沿的病原菌菌丝进行观

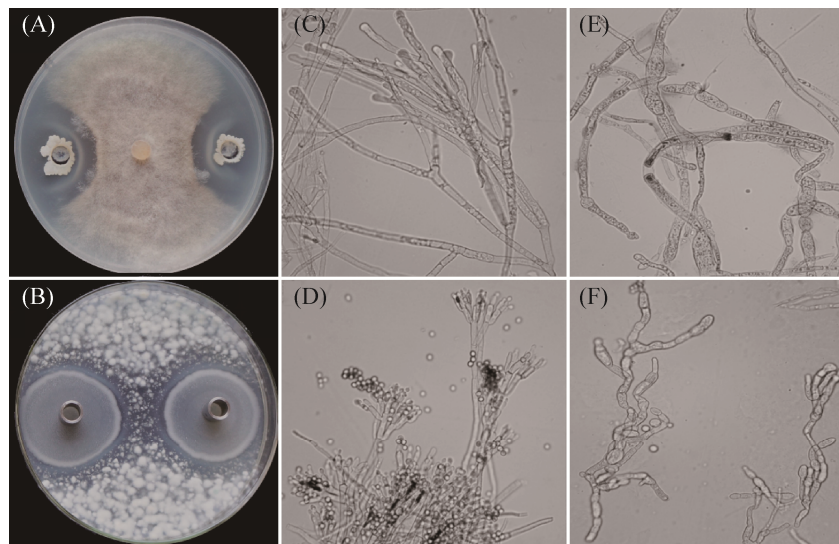


图 1. 菌株 L-1 对梨灰霉、青霉菌的离体抑制活性及其菌丝形态影响

Figure 1. The inhibitory effect of strain L-1 on pear gray mold and blue mold *in vivo* and its influences on the morphological characters of the pathogens. The antagonistic role of strain L-1 against *B. cinerea* (A) or *P. expansum* (B) was shown by dual culture detection. (C–F) showed the phenotypes of *B. cinerea* (C, E) or *P. expansum* (D, F) in the absence (C, D) or presence (E, F) of strain L-1 under microscope.

察,发现对照的灰霉菌、青霉菌菌丝生长均匀(图 1-C, D),而经过 L-1 处理的病原菌菌丝表现出明显的膨大和畸形(图 1-E, F)。

2.2 菌株 L-1 对梨灰霉菌、青霉菌的活体抑制活性

在活体条件下菌株 L-1 能够显著抑制梨灰霉与青霉菌的扩展。常温条件接种灰霉菌后,对照的病斑直径快速扩张,9 d 达到(39.35±2.71) mm,而经 L-1 菌株处理的病斑直径扩展缓慢,接种 9 d 时的病斑直径为(2.80±3.47) mm,防效达到 92.88% ($P \leq 0.001$)(图 2)。常温条件下接种 25 d 后,青霉病斑直径为(31.80±9.75) mm,而经 L-1 处理的病斑直径为(7.16±5.70) mm,防效达到 77.47% ($P \leq 0.001$)(图 3)。

2.3 菌株 L-1 耐盐性及其无菌发酵液抗菌作用的稳定性

菌株 L-1 在含 10% NaCl 的培养液中仍能生长(图 4),其无菌发酵滤液拮抗活性的最适 pH 为 6-7,耐酸碱,在 pH 为 12 时对病原菌的拮抗活性仍达到 40%以上(图 5-A)。紫外照射 2 h 之内对 L-1 无菌发酵液的拮抗活性无显著影响(图 5-B)。不同高温处理对 L-1 无菌发酵液的拮抗活性无显著影

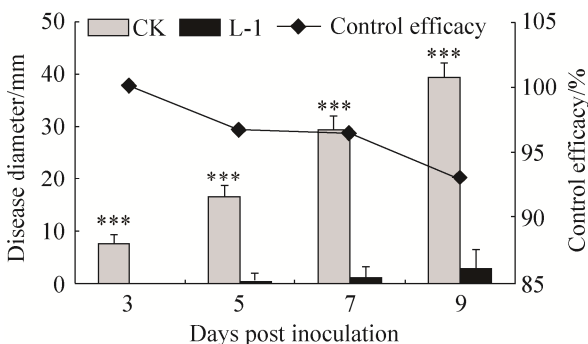


图 2. 菌株 L-1 对梨灰霉菌的活体防效
Figure 2. The effect of strain L-1 on *B. cinerea* in 'Huangguan' pears. ***: $P \leq 0.001$.

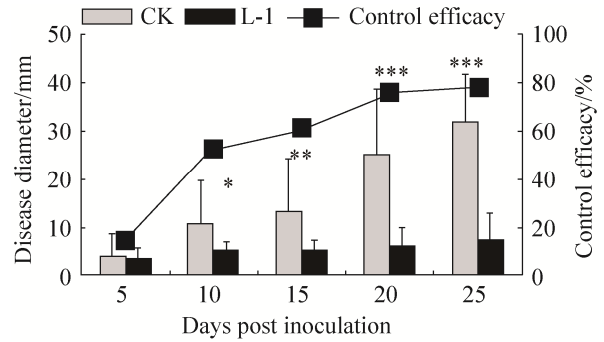


图 3. 菌株 L-1 对梨青霉菌的活体防效
Figure 3. The effect of strain L-1 on *P. expansum* in 'Huangguan' pears. *: $P \leq 0.05$, ***: $P \leq 0.001$.

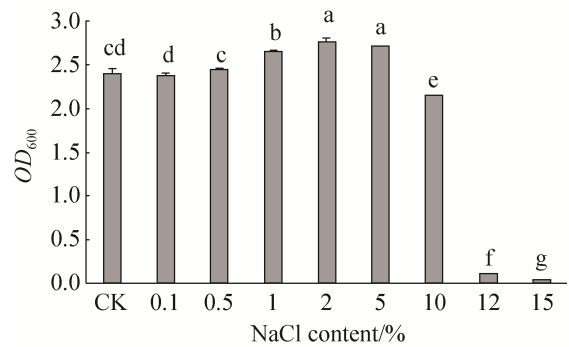


图 4. 菌株 L-1 的耐盐性
Figure 4. The resistance of strain L-1 to high salt. Strain L-1 were grown under different concentrations of NaCl for 48 h, and the value of OD_{600} were respectively measured. The letters above the bars indicate significant difference ($P < 0.05$) between the samples.

响(图 5-C),胰蛋白酶、胃蛋白酶与蛋白酶 K 处理对 L-1 无菌发酵液产物的拮抗活性没有影响,推测其活性化合物不属于蛋白(图 5-D)。

2.4 菌株 L-1 全基因组分析

菌株 L-1 全基因组在 GenBank 的登录号为 CP023859。该菌基因组全长为 4090582 bp, GC 含量为 46.52%。基因组包含 3978 个编码序列(CDS, coding sequences),在与 COG 功能富集分析、KEGG 代谢通路富集分析、GO 功能富集分析

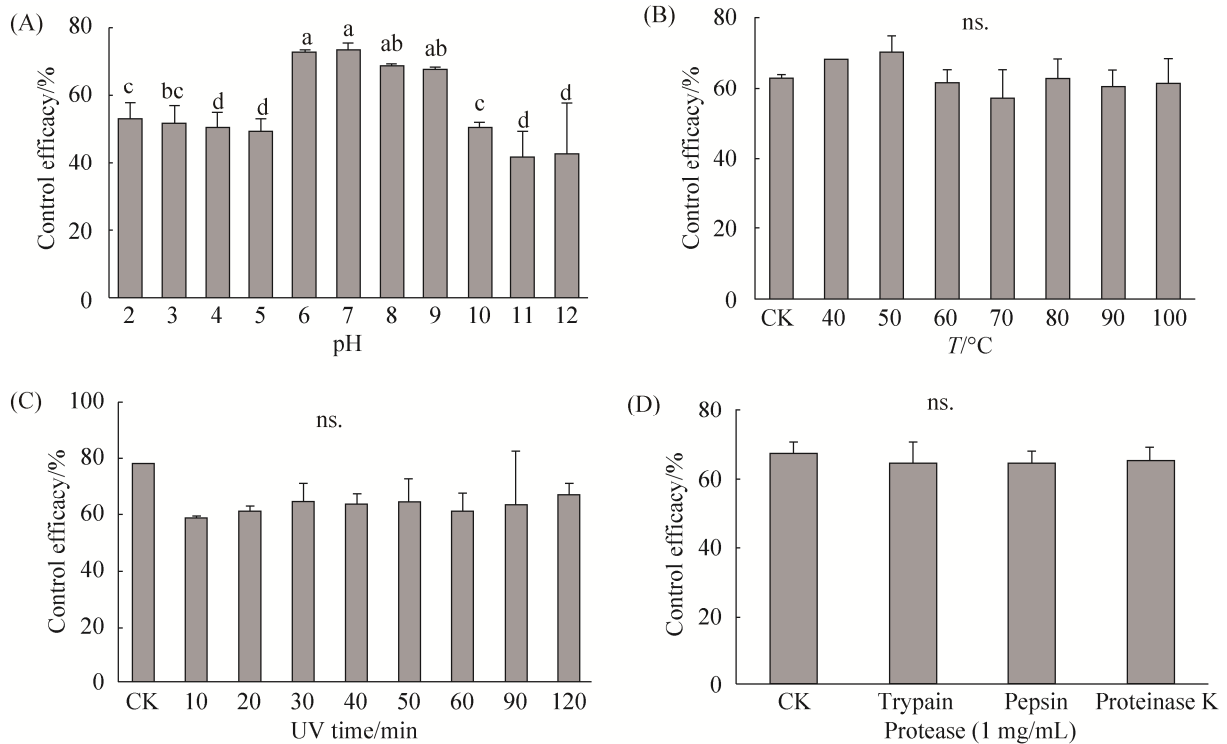


图 5. 菌株 L-1 无菌发酵液对梨灰霉病菌抗菌作用的稳定性

Figure 5. The inhibitory stability of the cell-free supernatant of strain L-1 against *B. cinerea*. The inhibitory effect of strain L-1 on *B. cinerea* was detected under different pH value (A), UV light amount (B), temperature (C), or protease amount (D). Different letters indicate significant difference between the samples with $P < 0.05$. ns. indicates no significant difference was found.

等数据库做 BLAST 比对后, 有 99.9% 的 CDS 序列得到功能分类。结合 antiSMARSH 结果, 菌株 L-1 可以产生 surfactin、fengycin、bacillibactin、bacillaene、macolactin、difficidin、bacilysin 等多种肽聚糖和聚酮糖类抗性化合物(图 6), 该类次生代谢产物的合成成为其防治病害的主要机制之一。

菌株 L-1 有 73.61% 的 CDS 序列在 COG 数据库得到功能分类。如图 7 所示, 其中参与次生代谢产物生物合成、运输和分解代谢功能的基因共有 121 个, 氨基酸转运与代谢基因 349 个, 脂类转运与代谢基因 118 个, 无机离子转运与代谢基因 214, 碳水化合物转运与代谢基因 255 个。有

13 个基因参与了非核糖体蛋白合成, 20 个基因参与了聚酮化合物合成, 7 个基因参与了含铁非核糖体脂肽合成。另外, 菌株 L-1 可以翻译 459 个碳水化合物酶类。

根据 KEGG 对该菌株的分析结果得知, 在 97 个代谢通路中有 40 个基因参与果糖、甘露糖、半乳糖等单糖代谢, 30 个基因参与淀粉、蔗糖以及其他多糖的代谢; 42 个基因参与氨基糖以及核苷酸糖类代谢。这类基因和代谢通路均与菌株对不同碳源利用及其快速生长、克隆以及防治病害的功能密切相关。

GO 数据库比对分析显示: 菌株 L-1 具有产生脲脘合酶(ATO09126)与海藻糖感受蛋白和运输蛋

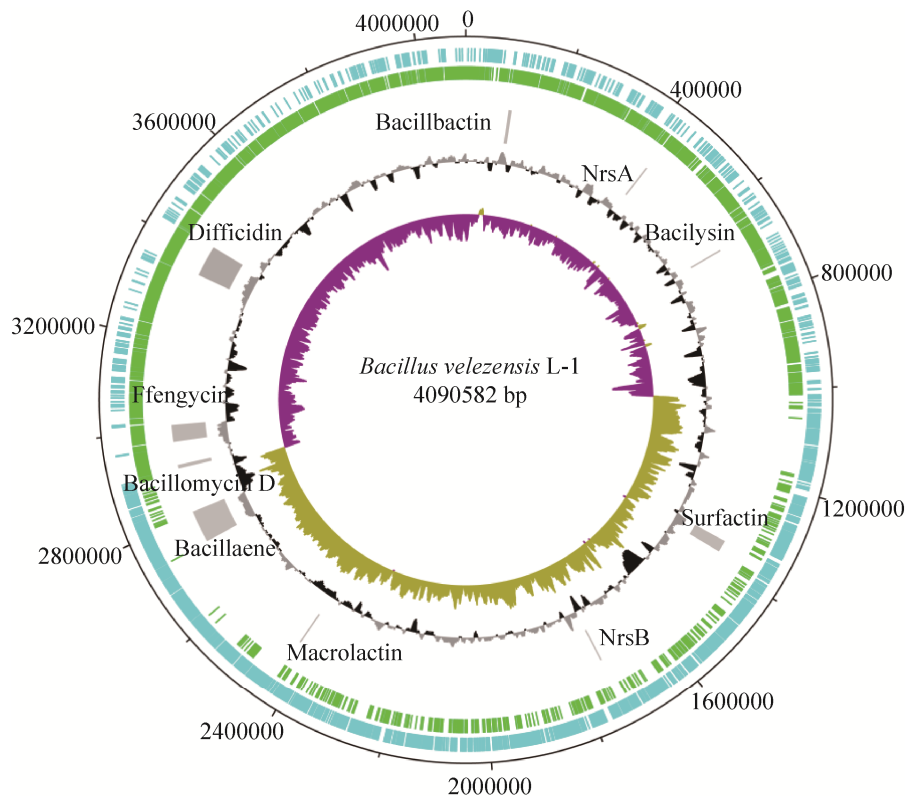


图 6. 贝莱斯芽孢杆菌 L-1 的全基因组环状图

Figure 6. Circular map of *B. velezensis* L-1 genome. The five circles (outer to inner) represent forward strand CDSs, reverse strand CDSs, nomenclature and locations of predictive secondary metabolite clusters, GC content and GC skew.

白(ATO10173、ATO10175)等与菌株的抗逆性密切相关的基因,进一步揭示了菌株 L-1 的抗逆性。含有生成乙酰乳酸合酶(由丙酮酸到乙酰乳酸, ATO11909、ATO12400、ATO08987)与乙酰乳酸脱羧酶(由乙酰乳酸到乙偶姻, ATO08986)等与诱导抗性相关的基因,从基因角度说明菌株 L-1 能够诱导寄主产生抗性。另外菌株 L-1 含有合成 β -1,3-葡聚糖酶(ATO11163、ATO09278)与几丁质结合蛋白(ATO11113)等拮抗活性相关基因,指出 L-1 具有通过产生水解酶类水解病原菌细胞壁的能力。

3 讨论

能够利用多种碳源成功、快速繁殖是生防菌

实现生防效果的基础^[15],前期研究中发现菌株 L-1 能够在果实伤口中成功、快速定殖^[4],本研究从基因学角度进一步阐明了菌株 L-1 含有 459 个基因与碳水化合物酶类合成相关,255 个基因参与碳水化合物转运与代谢,并且有 112 个基因参与到多种糖类代谢通路中,说明菌株 L-1 具有利用多种碳源进行快速生长和繁殖的潜力。

具有应用潜力的生防菌株需要能够耐受极端环境^[15]。本研究中的菌株 L-1 可以在含有 10% NaCl 培养液中生长繁殖,代谢产物耐高温、紫外照射、酸、碱以及蛋白酶降解。此外,菌株 L-1 具有产生亚精胺的脒脒合酶以及海藻糖运输和感受蛋白的基因,亚精胺不仅是植物生长调节剂,而且具有保护机体耐受高盐、低温、低湿和过氧

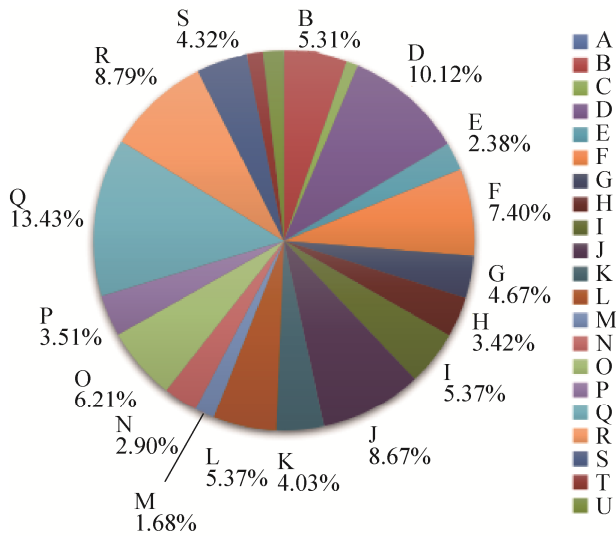


图 7. 菌株 L-1 全基因组序列 COG 功能分类

Figure 7. Function classification and percentage (A-T) of strain L-1 genome genes according to COG database. A: chromatin structure and dynamics; B: energy production and conversion; C: cell cycle control, cell division, chromosome partitioning; D: amino acid transport and metabolism; E: nucleotide transport and metabolism; F: carbohydrate transport and metabolism; G: coenzyme transport and metabolism; H: lipid transport and metabolism; I: translation, ribosomal structure and biogenesis; J: transcription; K: replication, recombination and repair; L: cell wall/membrane/envelope biogenesis; M: cell motility; N: post translational modification, protein turnover, chaperones; O: inorganic ion transport and metabolism; P: secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism; Q: general function prediction only; R: function unknown; S: signal transduction mechanisms; T: intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport; U: defense mechanisms.

环境^[16], 而海藻糖(trehalose)作为一种渗透保护剂, 具有保护有机体忍受高盐、低温和低湿环境的功能^[17]。以上结果均揭示了菌株 L-1 及其代谢产物具有耐极端环境的能力。

前期研究中发现菌株 L-1 能够拮抗梨轮纹病菌^[4], 本研究中菌株 L-1 对梨灰霉、青霉菌也表

现出显著的拮抗活性, 抑菌谱广。全基因组结果显示菌株 L-1 具有产生多种聚酮糖、肽聚糖和多肽类等抗性化合物相关的基因簇, 以及 β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶合成相关的基因。脂肽类化合物表面活性素(surfactins)以及其他非核糖体合成脂肽类化合物可以作为信号分子, 作用于生物膜诱导植物抗性来实现防病效果^[18], bacillibactin 可以作为含铁载体通过竞争铁离子实现防病效果, 多种脂肽类及肽聚糖类化合物菌具有拮抗病原菌的作用^[19]。 β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶是作用于病原菌细胞壁的酶类, 能够催化病原菌细胞壁水解, 引起病原菌坏死和细胞壁降解从而减少病害发生和水果腐烂^[20-21]。以上结果均说明菌株 L-1 具有产生拮抗病原菌的抗生素和水解酶类来实现病害防治的能力。

此外, 全基因组序列结果显示菌株 L-1 含有乙酰乳酸合酶与乙酰乳酸脱羧酶活性相关基因, 能够降解形成乙偶姻(acetoin), 乙偶姻具有诱导植物抗性的能力^[22], 说明菌株 L-1 具有诱导植物抗性来实现防病的目的。该结果与前期研究中菌株 L-1 能够诱导皇冠梨果实抗性相关酶活性表达^[4]的结果一致。

庞学群等^[23]总结拮抗菌控制果蔬采后病害的机制主要包括: 产生胞外抗生素, 微生物之间的空间、养分等竞争, 直接作用于病原菌, 产生几丁质酶和葡聚糖酶等能降解真菌细胞壁的胞外酶使病原菌细胞渗漏、破裂而受到抑制。前期研究结果显示菌株 L-1 能够显著拮抗梨轮纹病菌, 在果实伤口上快速定殖, 诱导植物抗性相关酶活性表达^[4], 本研究结果进一步表明菌株 L-1 对梨灰霉菌、青霉菌也具有显著的拮抗活性, 并从无菌发酵液拮抗活性的稳定性测定结合全基因组序列分析说明菌株 L-1 能够利用多种碳源进行生长, 菌株

抗逆性强,拮抗活性稳定,通过产生多种次生拮抗类化合物和水解病原菌的酶类,以及诱导寄主抗性多种作用机制实现防病目的。贝莱斯芽孢杆菌 L-1 是一株具有较大应用潜力的生防菌株,其最佳发酵条件、应用剂型以及主要次生代谢产物分离有待进一步研究和发掘。

参 考 文 献

- [1] Sun PP, Wang WH. 2016/2017 World production, market and trade of apple, pear, grape, peach and cherry. *China Fruits*, 2017, (2): 91–100. (in Chinese)
孙平平, 王文辉. 2016/2017 年世界苹果、梨、葡萄、桃及樱桃产量、市场及贸易情况. *中国果树*, 2017, (2): 91–100.
- [2] Spotts RA, Chen PM. Prestorage heat treatment for control of decay of pear fruit. *Phytopathology*, 1987, 77(11): 1578–1582.
- [3] Ma GM. The control effect of five fungicides against pear ring rot in field. *China Fruits*, 2007, (4): 64. (in Chinese)
马广民. 5 种杀菌剂对梨轮纹病的田间防效试验. *中国果树*, 2007, (4): 64.
- [4] Sun PP, Cui JC, Jia XH, Wang WH. Isolation and Characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* L-1 for Biocontrol of Pear Ring Rot. *Horticultural Plant Journal*, 2017, 3(5): 183–189.
- [5] Dunlap CA, Kim SJ, Kwon SW, Rooney AP. Phylogenomic analysis shows that *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* is a later heterotypic synonym of *Bacillus methylotrophicus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(7): 2104–2109.
- [6] Dunlap CA, Kim SJ, Kwon SW, Rooney AP. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and ‘*Bacillus oryzicola*’ are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(3): 1212–1217.
- [7] Cao CX, Han W, Zhang HP. Application of third generation sequencing technology to microbial research. *Microbiology China*, 2016, 43(10): 2269–2276. (in Chinese)
曹晨霞, 韩琬, 张和平. 第三代测序技术在微生物研究中的应用. *微生物学通报*, 2016, 43(10): 2269–2276.
- [8] Khamna S, Yokota A, Lumyong S. Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25(4): 649–655.
- [9] Wiggins BE, Kinkel LL. Green manures and crop sequences influence potato diseases and pathogen inhibitory activity of indigenous *Streptomyces*. *Phytopathology*, 2005, 95(2): 178–185.
- [10] Sadeghian M, Bonjar GHS, Sirchi GRS. Post harvest biological control of apple bitter rot by soil-borne Actinomycetes and molecular identification of the active antagonist. *Postharvest Biology and Technology*, 2016, 112: 46–54.
- [11] Ge PH, Ma GZ, FU HR, Wang SF, Liu ZP. The inhibitory spectrum and stability determination of marine *Bacillus amyloliquefaciens* GM-1 strain. *Agrochemicals*, 2012, 51(10): 730–732, 741. (in Chinese)
葛平华, 马桂珍, 付泓润, 王淑芳, 刘兆普. 海洋解淀粉芽孢杆菌 gm-1 菌株发酵液抗菌谱及稳定性测定. *农药*, 2012, 51(10): 730–732, 741.
- [12] Kilani-Feki O, Khedher SB, Dammak M, Kamoun A, Jabnoun-Khiareddine H. Daami-Remadi M, Tounsi S. Improvement of antifungal metabolites production by *Bacillus subtilis* v26 for biocontrol of tomato postharvest disease. *Biological Control*, 2016, 95: 73–82.
- [13] Sun PP, Cui JC, Jia XH, Wang WH. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* L-1, which has antagonistic activity against pear diseases. *Genome Announcements*, 2017, 5(48): e01271–17.
- [14] Weber T, Blin K, Duddela S, Krug D, Kim HU, Bruccoleri R, Lee SY, Fischbach MA, Müller R, Wohlleben W, Breitling R, Takano E, Medema MH. antiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(W1): W237–W243.
- [15] Wilson CL, Wisniewski ME. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Annual Review of Phytopathology*, 1989, 27(1): 425–441.
- [16] Alcázar R, Bitrián M, Bartels D, Koncz C, Altabella T, Tiburcio AF. Polyamine metabolic canalization in response to drought stress in Arabidopsis and the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Signaling & Behavior*, 2011, 6(2): 243–250.
- [17] Duan J, Jiang W, Cheng ZY, Heikkilä JJ, Glick BR. The complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. UW4. *PLoS ONE*, 2013, 8(3): e58640.
- [18] Aleti G, Lehner S, Bacher M, Compant S, Nikolic B, Plesko M, Schuhmacher R, Sessitsch A, Brader G. Surfactin variants mediate species-specific biofilm formation and root colonization in *Bacillus*. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(8): 2634–2645.
- [19] Wu LM, Wu HJ, Chen LN, Yu XF, Borriss R, Gao XW. Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens. *Scientific Reports*, 2015, 5: 12975.
- [20] Ippolito A, El Ghaouth A, Wilson CL, Wisniewski M. Control

- of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. *Postharvest Biology and Technology*, 2000, 19(3): 265–272.
- [21] Castoria R, de Curtis F, Lima G, de Cicco V. β -1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. *Postharvest Biology and Technology*, 1997, 12(3): 293–300.
- [22] Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Wei HX, Paré PW, Kloepper JW. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(8): 4927–4932.
- [23] Pang XQ, Zhang ZQ, Dong C. Biocontrol of postharvest disease of fruits and vegetables by antagonism. *Acta Horticulturae Sinica*, 2000, 27(S1): 546–552. (in Chinese) 庞学群, 张昭其, 董春. 拮抗菌控制果蔬采后病害研究进展. *园艺学报*, 2000, 27(S1): 546–552.

Complete genome analysis of *Bacillus velezensis* L-1 and its inhibitory effect on pear gray and blue mold

Pingping Sun, Jianchao Cui, Xiaohui Jia, Wenhui Wang*

Institute of Pomology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Xingcheng 125100, Liaoning Province, China

Abstract: [Objective] This work aimed to uncover the inhibitory effects of *Bacillus velezensis* L-1 on pear gray and blue mold, the inhibitory stability of its cell-free supernatant, and understand the molecular mechanism underlying the biocontrol processes. [Methods] We analyzed the inhibitory effects of strain L-1 on pear gray and blue mold both *in vitro* and *in vivo*, and observed the influences of strain L-1 on the mycelium growth of pathogens by microscopes. We determined the inhibitory stability of strain L-1 on *Botrytis cinerea* by oxford cup method and performed the complete genome sequencing of strain L-1 by Pacbio RSII platform. We also annotated the obtained sequences through different protein databases to predict the mechanisms involved in the biocontrol processes. [Results] The control efficacy of strain L-1 against pear gray and blue mold was 92.88% and 77.47% respectively, and strain L-1 caused the swallow and abnormal growth of the pathogens' mycelium. Strain L-1 could grow normally in the broth containing 10% (*W/V*) NaCl, and its cell-free supernatant showed stable inhibitory effects against pear gray mold under acid, alkali, UV light, heat and protease treatments. Complete genome sequence analysis showed that there were 112 genes involved in the metabolism of different carbons, indicating its ability to grow on different carbon sources. Strain L-1 contained genes encoding the alimine and trehalose, that are related to stress resistance. Strain L-1 contained gene clusters related to the biosynthesis of a variety of polypeptide and polyketide compounds, such as surfactin, fengycin, bacillibactin, bacillaene, macolactin, difficidin, and bacilysin, and the genes encoding enzymes like β -1,3-glucase and chitinase, that could hydrolyze the pathogen cell wall. In addition, strain L-1 contained genes related to the biosynthesis of actoin, which could induce host resistance. [Conclusion] *B. velezensis* L-1 has the potential as an effective biocontrol agent.

Keywords: pear gray mold, pear blue mold, biological control, *Bacillus velezensis*, complete genome sequence

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2016YFD0400903-06) and by the China Agriculture Research System (CARS-29-19)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-429-3598655; E-mail: wangwenhui@caas.cn

Received: 13 December 2017; Revised: 25 March 2018; Published online: 28 May 2018