



## 解淀粉芽孢杆菌 B15 抑菌物质对葡萄灰霉病灰葡萄孢的抑菌机理

潘虹余<sup>1</sup>, 金玮璠<sup>1</sup>, 张晓蒙<sup>1</sup>, 宋绪磊<sup>1</sup>, 闫寅卓<sup>1\*</sup>, 严斌<sup>2</sup>, 薛洁<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 中国食品发酵工业研究院, 北京 100015

<sup>2</sup> 中粮华夏长城葡萄酒有限公司, 河北 秦皇岛 710068

**摘要:**【目的】利用荧光显微镜和激光共聚焦扫描显微镜技术初步探讨解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloquefaciens*) B15 菌株发酵液中的抑菌混合物伊枯草菌素 A (iturin A)和芬芥素(fengycin)对葡萄灰霉病病原菌灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)的抑菌机理。【方法】采用琼脂稀释法讨论解淀粉芽孢杆菌 B15 发酵液对灰葡萄孢的抑菌活性。利用台盼蓝(trypan blue)染色、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)、双氢罗丹明 123 (DHR123)、钙离子探针 fluo-3/am 和 Annexin V-PI 探针染色来观察解淀粉芽孢杆菌 B15 发酵液对灰葡萄孢细胞膜和菌丝形态、细胞核、活性氧、钙离子和磷脂酰丝氨酸层的影响。【结果】抑菌活性实验发现解淀粉芽孢杆菌 B15 发酵液对灰葡萄孢具有良好抑菌效果。荧光显微镜台盼蓝染色观察发现, 经 B15 发酵液处理过的灰葡萄孢出现菌丝畸形、菌丝体粗大、尖端肿胀并被染成蓝色和明显的液泡化现象。同时未在处理组中观察到细胞内容物泄漏, 说明处理组菌丝细胞膜未发生破损。该结果表明在此次试验中, B15 发酵液中的抑菌有效物质不以破损细胞膜的方式直接导致灰葡萄孢的死亡。激光共聚焦显微镜观察结果发现, 处理组的灰葡萄孢菌丝出现典型的细胞凋亡现象、染色质固缩、细胞核裂解、磷脂酰丝氨酸层外翻、活性氧和钙离子积累。【结论】该实验表明解淀粉芽孢杆菌 B15 发酵液以诱导细胞凋亡的形式来抑制灰葡萄孢菌丝的生长。

**关键词:** 解淀粉芽孢杆菌 B15, 细胞凋亡, 抑菌机理, 激光共聚焦扫描显微镜, 灰葡萄孢

由真菌引起的葡萄病害每年都会造成不同程度的经济损失<sup>[1]</sup>。灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 是葡萄等多种植物灰霉病的病原菌, 它除了感染葡萄之外, 还可以感染多种树木、花草和蔬菜<sup>[2-3]</sup>。灰霉

病是在葡萄的植保中比较难以防治的一种病害, 灰葡萄孢以菌核的形式在作物残留物中生存很长时间, 使其有效防治变得困难<sup>[4]</sup>。目前, 人们普遍使用化学试剂作为葡萄灰霉病的主要控制手段, 农

基金项目: 河北省科技计划(16222901D); 北京市科技新星计划(z181100006218004)

\*通信作者。薛洁, Tel: +86-10-53218262, E-mail: lxxuejie@126.com; 闫寅卓, Tel: +86-10-53216460, E-mail: yyz@163.com

收稿日期: 2017-08-08; 修回日期: 2017-11-03; 网络出版日期: 2017-12-05

药的频繁使用带来环境污染、农药抗性和农药残留等问题<sup>[5]</sup>。与传统化学农药相比,生物农药具有对人畜安全、环境兼容性好、毒性低、不易产生抗性、易于保护生物多样性和来源广泛等众多优点,因此高效生物农药的开发应用对人类健康、环境保护和农业可持续发展都具有重要意义<sup>[6-8]</sup>。

解淀粉芽孢杆菌通过非核糖体途径合成分子量小、热稳定性好、抗高温高压、抗逆和具有较强耐受蛋白酶水解及有机溶剂作用的脂肽类物质<sup>[9-10]</sup>。解淀粉芽孢杆菌分布广、繁殖速度快、营养条件要求简单等特点使其成为十分具有研发前景的生物农药菌种。与化学杀菌剂相比,脂肽物质具有广谱抗菌性、低毒性、良好稳定性、易降解的能力,且不易使病原菌产生抗性菌株<sup>[11]</sup>。脂肽根据其结构主要分为表面活性素(surfactin)、伊枯草菌素(iturin A)和芬芥素(fengycin)等三大类。其中伊枯草菌素和芬芥素对细菌、真菌具有广谱抑菌性,而表面活性素是很好的表面活性剂,并具有抗病毒、抗肿瘤和抗支原体活性<sup>[12-14]</sup>。

有研究表明伊枯草菌素 A 可通过影响真菌细胞膜的表面张力,导致细胞膜微孔的形成和促使重要离子的渗漏,最后引起细胞死亡<sup>[15]</sup>。脂肽抑菌的机制可能不仅仅局限于此,近几年不断有研究报道脂肽能诱导细胞凋亡。有文章提出在低浓度的情况下,以诱导细胞凋亡的方式抑制黑根霉菌的生长<sup>[16]</sup>。细胞死亡方式分为被动死亡即细胞坏死,和主动死亡即细胞凋亡。细胞凋亡是一种程序性细胞死亡类型,涉及一系列基因的激活、表达以及调控等的作用,在丝状真菌的发育、繁殖、衰老等过程中具有重要的作用<sup>[17-18]</sup>。丝状真菌细胞凋亡有和动物细胞相似的典型凋亡特征,如活性氧的累积、染色质固缩和核裂解、细胞膜上的磷脂酰丝氨酸层从细胞膜内侧翻到外侧、线粒

体膜电位的变化以及线粒体结构的改变等<sup>[17-18]</sup>。

为了区别凋亡和其他类型的细胞死亡,在丝状真菌中常采用几种方法联合检测凋亡特征。在凋亡的早期细胞都会出现活性氧的累积现象,活性氧的累积可以通过多种荧光染色物质,例如双氢罗丹明 123(DHR123)和 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA),进行检测<sup>[19]</sup>。染色质固缩、细胞核裂解也可通过吖啶橙(AO)或 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色后使用荧光显微镜观察<sup>[20]</sup>。Annexin V 是一种可以特定地与磷脂酰丝氨酸层结合发出绿色荧光的重组蛋白,因而 Annexin V 可以用来检测磷脂酰丝氨酸层的外翻<sup>[17]</sup>。菌丝死亡可以用台盼蓝(trypsin blue)染色或平板计数法来检测<sup>[21]</sup>。

朱弘元<sup>[22]</sup>通过对本课题组前期筛选出的一株解淀粉芽孢杆菌 B15 菌株的发酵液进行抑菌活性测定和 MALDI-TOF 分析,发现其发酵液对灰葡萄孢具有明显抑制效果, MALDI-TOF 分析结果表明其发酵液中的抑菌有效物质为 C14-16 伊枯草菌素 A 和芬芥素<sup>[22]</sup>。本次研究通过琼脂稀释法讨论 B15 发酵液对灰葡萄孢的抑菌活性。并通过荧光染色法对菌丝细胞核、活性氧、钙离子和磷脂酰丝氨酸层进行染色,并使用激光共聚焦显微镜和荧光显微镜以初步研究 B15 菌株发酵液中的抑菌物质对植物病原菌灰葡萄孢的抑菌机理。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和设备

**1.1.1 菌株:** 解淀粉芽孢杆菌 B15 (*Bacillus amyloquelaciens* B15)由中国食品发酵工业研究院酿酒部提供;灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)由中国典型培养物保藏中心(CCTCC)提供;

**1.1.2 主要仪器和试剂:** PDA 培养基, NB 培养

基, Landy 培养基, 双氢罗丹明 123 (Sigma 公司), 台盼蓝(北京博奥拓达科技有限公司), fluo-3/am (百灵威科技有限公司), DAPI (北京博奥拓达科技有限公司), Annexin V-PI 试剂盒(Sigma 公司), 纤维素酶(北京博奥拓达科技有限公司), 蜗牛酶(北京博奥拓达科技有限公司), 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, Olympus 荧光显微镜, Zeiss 激光共聚焦显微镜 LSM710 3-channel, 冷冻离心机, LRH-250 生化培养箱。

## 1.2 解淀粉芽孢杆菌 B15 无菌发酵液的制备

将保存于 4 °C 的 B15 菌种接种于 NB 液体培养基(250 mL 锥形瓶, 装液量 100 mL), 37 °C、120 r/min 摇床培养 24 h。按 4%接种量接种于 Landy 发酵培养基(250 mL 锥形瓶, 装液量 100 mL) 中, 于 30 °C、180 r/min 振荡培养 48 h。随后将发酵液在 4 °C、10000 r/min 下离心 10 min, 收集上清液; 将上清液过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤除菌, 收集无菌滤液于 4 °C 下保存备用。

## 1.3 解淀粉芽孢杆菌 B15 抗菌活性的测定

本实验采用琼脂稀释法探讨 B15 无菌发酵液对灰葡萄孢的抑菌活性, 将保存于 4 °C 的灰葡萄孢接种到 PDA 平板于 28 °C 培养 4 d 进行活化, 随后将直径为 7 mm 的灰葡萄孢菌饼接种到含 B15 无菌发酵液(1:20)的 PDA 平板中央, 并以菌饼接种在不含 B15 发酵液的 PDA 平板上做对照。所有平板放在 28 °C 恒温培养箱中培养 4 d, 观察菌种生长情况。

## 1.4 台盼蓝染色分析

挑取灰葡萄孢菌丝于载玻片上, 用 PBS 洗 2 遍, 然后用 B15 无菌发酵液处理 6 h, PBS 洗 2 遍后用台盼蓝染色 30 min, 置于荧光显微镜下观察。

## 1.5 激光共聚焦显微镜观察

### 1.5.1 DAPI 染色

接种灰葡萄孢于附有薄层 PDA 培养基的载玻片上, 28 °C 培养 18 h 以形成菌丝, 然后用 B15 无菌发酵液处理菌丝 6 h, 并以滴加 PBS 的处理作为对照。处理完后 PBS 冲洗菌丝 2 遍, 用固定液(PBS, 5.0%二甲基亚砷, 3.7%甲醛)固定 10 min, PBS 清洗以除去固定液。再用 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 DAPI 染色 3 min。染色完后用 PBS 洗菌丝 2 遍, 滴加 50%甘油封片, 用激光共聚焦显微镜在 350 nm 激发波长和 461 nm 发射波长下观察。

### 1.5.2 活性氧积累的检测

B15 无菌发酵液在室温下处理灰葡萄孢菌丝 6 h, 以滴加 PBS 处理的菌丝作为对照。用 PBS 洗菌丝 2 遍, 1%的蜗牛酶和纤维素酶在 30 °C、180 r/min 下处理 4 h。PBS 洗菌丝 2 遍, 离心收集原生质体, 用 5  $\mu\text{mol}/\text{mL}$  的双氢罗丹明 123 室温下染色 30 min。PBS 洗涤菌丝 2 遍后, 50%的缓冲甘油封片, 激光共聚焦显微镜在激发波长 507 nm、发射波长 529 nm 下观察。

### 1.5.3 Annexin V-PI 试剂盒检测

按上述方法制得原生质体后, 按照试剂盒操作方法对菌丝进行染色, 染色完后 PBS 洗涤菌丝 2 遍, 50%的缓冲甘油封片, 激光共聚焦显微镜下观察。

### 1.5.4 钙离子水平检测

按上述方法获得灰葡萄孢菌丝后, 用 B15 无菌发酵液处理菌丝 6 h, 以滴加 PBS 处理的菌丝做对照, PBS 洗菌丝 2 遍, 5  $\mu\text{mol}/\text{L}$  fluo-3/am 于 37 °C 下避光染色菌丝 30 min, PBS 漂洗 3 次, 用 50%的缓冲甘油封片。将盖玻片置于激光共聚焦显微镜载物台上, 选择激发波长 506 nm, 发射波长 526 nm。

## 2 结果和分析

### 2.1 B15 无菌发酵液抗菌活性的测定

从图 1 可观察到灰葡萄孢菌丝对照组(图 1-A)生长形势良好, 而处理组(图 1-B)灰葡萄孢菌丝的

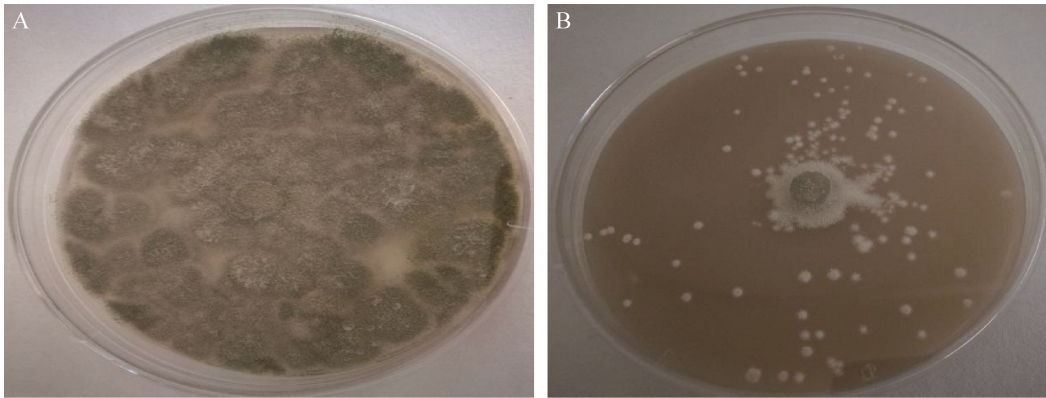


图 1. B15 无菌发酵液对灰葡萄孢的抑菌活性

Figure 1. *In vitro* interaction between *B. amyloquefaciens* B15 and *B. cinerea* on PDA plate at 4th day after incubation at 28 °C. A: a 7 mm agar plug of *B. cinerea* on center of PDA plate; B: a 7 mm agar plug of on center of PDA plate containing B15 culture supernatant at the concentration of 1:20.

生长遭到明显抑制，说明 B15 无菌发酵液能有效抑制灰葡萄孢的生长。

## 2.2 台盼蓝染色结果

台盼蓝可以透过丧失活性细胞的破损细胞膜将菌丝染成蓝色，而正常的活细胞不能被染色，

因为活细胞的完整细胞膜排斥台盼蓝，使其不能够进入胞内<sup>[23]</sup>。从图 2-B、2-C 中可看出处理组菌丝体膨胀，顶端膨大明显，并被染成蓝色，液泡化严重，菌丝皱缩，然而并未在图中观察到细胞内容物的溢出。图 2-A 对照组则未被染色。处理

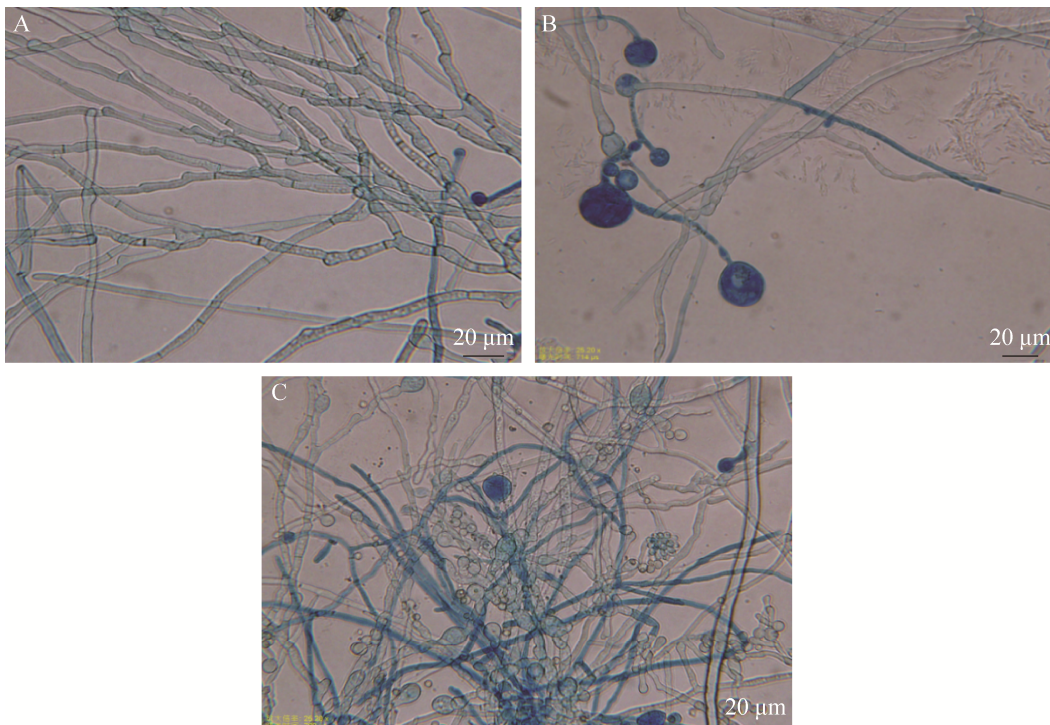


图 2. 荧光显微镜下观察灰葡萄孢台盼蓝染色结果

Figure 2. Observation of *B. cinerea* stained with trypan blue under fluorescence microscopy. A: untreated control group; B, C: treated group.

组虽观察到了明显被染色的膨大菌丝顶端, 然而菌丝的其他部分未被染色。此结果可能说明处理组的膨大菌丝顶端细胞膜通透性增大, 但细胞膜仍是完整的。由于未观察到细胞内容物的溢出现象, 可判断在本试验中, B15 无菌发酵液中的伊枯草菌素 A 组分对灰葡萄孢细胞膜无明显作用。

## 2.3 激光共聚焦显微镜观察结果

**2.3.1 DAPI 染色分析:** DAPI 能透过凋亡细胞的细胞膜对细胞核进行染色。经 B15 无菌发酵液处理的灰葡萄孢(图 3-B)细胞核被 DAPI 染成较强的蓝色荧光, 可见致密浓染的颗粒、新月体或环状荧光。另外处理组浓缩的细胞核数目明显多于对照组, 这可能说明处理组细胞核可能发生了断裂而使细胞核的数目增多(图 3-B)。而对照组(图 3-A)荧光较弱, 呈现分散均匀的圆形或椭圆形荧光。

**2.3.2 活性氧积累的检测:** 过量活性氧的积累会损伤细胞, 细胞中的活性氧能将本身没有荧光的双氢罗丹明 123 转换成具有红色荧光的罗丹明 123 (Rh123)。从图 4 可看出, 对照组(图 4-A)呈现很弱的红色荧光, 说明对照组有较少或无活性氧积累。处理组细胞(图 4-B)有很强烈的红色荧光, 说明经无菌发酵液处理后的细胞内活性氧有明显

的积累。活性氧水平的升高破坏菌丝的正常生理活性, 导致菌丝的代谢速率降低, 菌丝生长速率降低。

**2.3.3 Annexin V-PI 探针检测磷脂酰丝氨酸层外翻现象:** 细胞凋亡与细胞坏死的最关键区别是细胞膜的完整性, 坏死细胞的细胞膜完整性被破坏, 出现细胞内物质释放现象, 随后引起明显的炎症反应。发生细胞凋亡的细胞在凋亡早期细胞膜仍保持完整, 而在凋亡中晚期的细胞和死细胞则细胞膜通透性增大, 碘化丙啶(PI)可通过破损细胞膜将细胞核染成红色。磷脂酰丝氨酸层从细胞膜的内侧移位到外层的现象是细胞凋亡的早期特征<sup>[24]</sup>。因此 Annexin V 和 PI 对菌丝的同时染色可以区分正常( $\text{FITC}^-$ 、 $\text{PI}^-$ )、早期凋亡( $\text{FITC}^+$ 、 $\text{PI}^-$ )和晚期凋亡或坏死的菌丝( $\text{FITC}^+$ 、 $\text{PI}^+$ )。Annexin V-PI 探针对灰葡萄孢原生质体染色结果显示处理组有很明显的绿色荧光, 而红色荧光很浅, 说明灰葡萄孢细胞处于凋亡的早期阶段, 所以菌丝细胞膜完整, 未被碘化丙啶染色, 亦或是碘化丙啶正准备穿透处于细胞凋亡晚期或坏死细胞的细胞膜(图 5-B)。此外, 在对照组菌丝中观察到微弱的绿色荧光和红色荧光(图 5-A), 说明对照组菌丝正常生长, 未发生细胞凋亡。

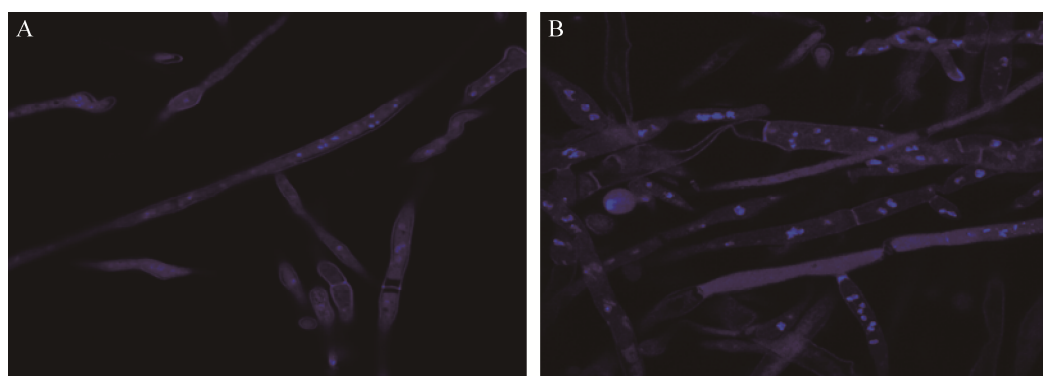


图 3. B15 无菌发酵液对灰葡萄孢细胞核的影响

Figure 3. Observation of *B. cinerea* strained with DAPI under LCSM. A: untreated control group; B: treated group.

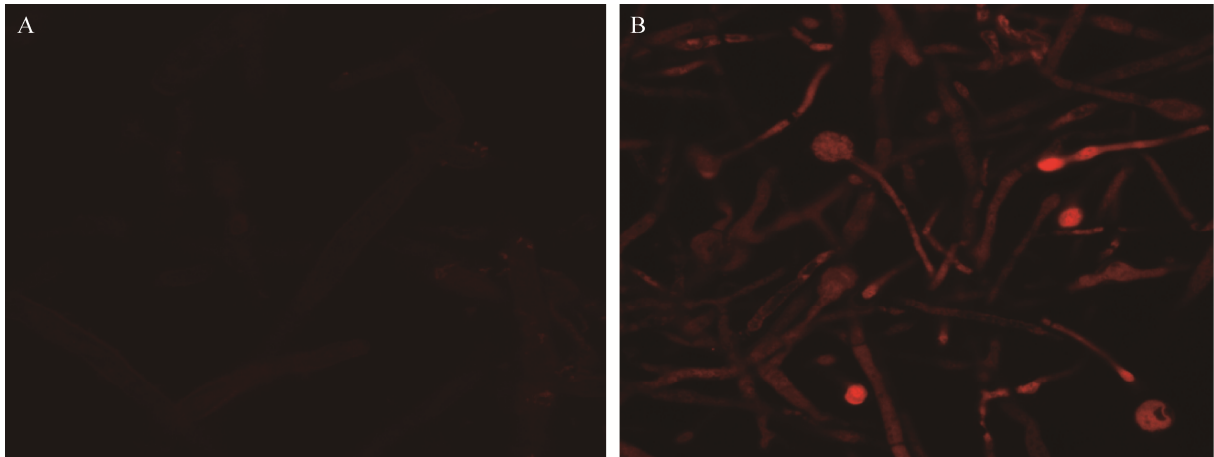


图 4. B15 无菌发酵液对灰葡萄孢细胞内活性氧积累的影响

Figure 4. The effect of B15 culture supernatant on the level of ROS in *B. cinerea*. A: untreated control group; B: treated group.

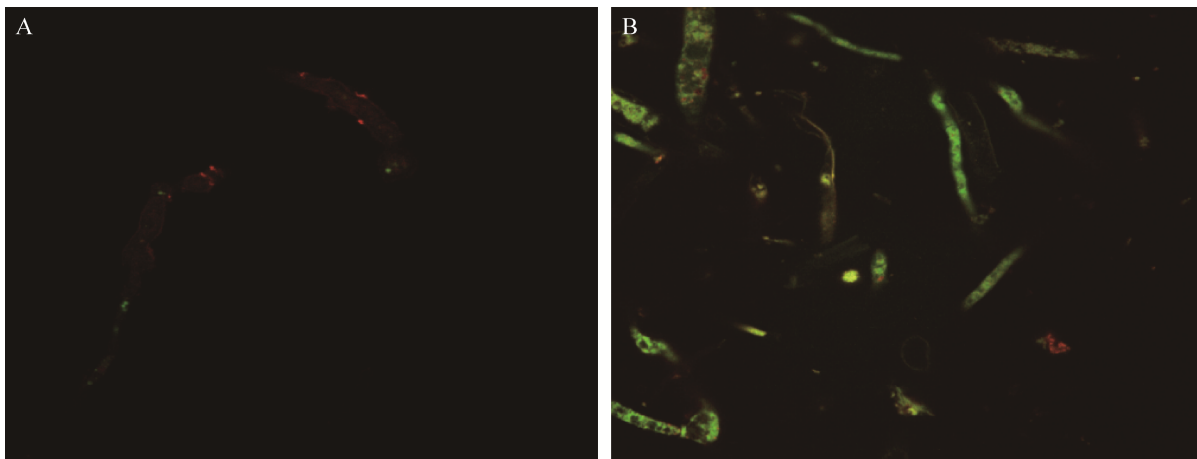


图 5. B15 无菌发酵液对灰葡萄孢细胞膜磷脂酰丝氨酸层的影响

Figure 5. The effect of B15 culture supernatant on PS externalization of *B. cinerea*. A: untreated control group; B: treated group.

**2.3.4 细胞内钙离子 fluo-3/am 染色分析：**  
fluo-3/am 是一种检测细胞内钙离子的荧光探针。当其以游离配体形式存在时是不发出任何荧光的，但是当它进入细胞后与钙离子结合后可发出较强绿色的荧光。在外界刺激因素作用下，内质网释放出钙离子，然后线粒体摄取钙离子，线粒体钙超载导致线粒体损伤，细胞色素 C 释放，活

化半胱天冬酶，进而诱导细胞凋亡，升高的钙离子水平参与了凋亡早期信号转导和凋亡的执行阶段<sup>[25]</sup>。在激光共聚焦显微镜下能观察到处理组(图 6-A)的菌丝发出明显的绿色荧光，这说明钙离子大量积累在处理组灰葡萄孢细胞内。而对照组(图 6-B)的菌丝发出微弱绿色荧光，说明对照组钙离子水平正常。

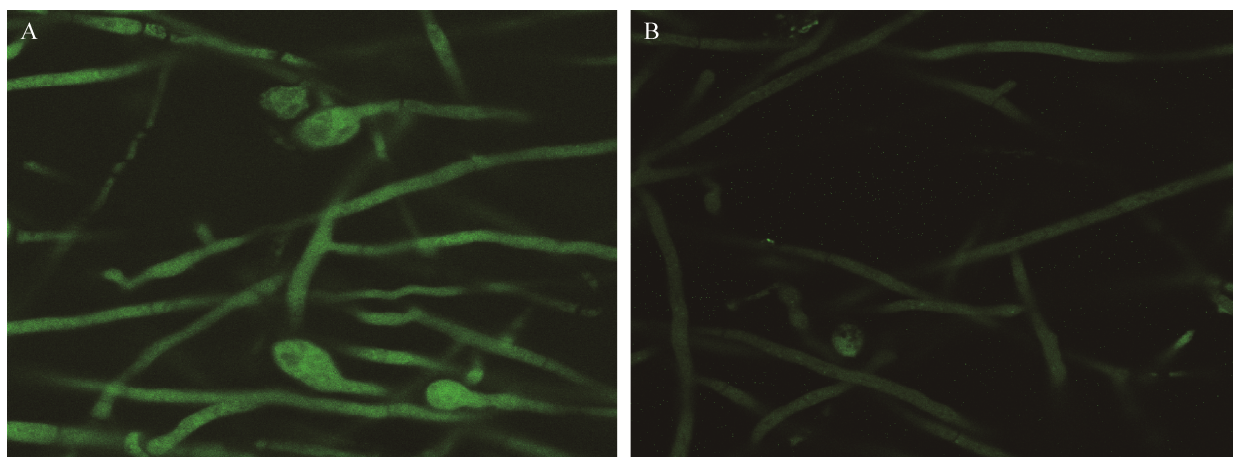


图 6. B15 无菌发酵液对 *B. cinerea* 细胞内钙离子累积的影响

Figure 6. The effect of B15 culture supernatant on the level of  $\text{Ca}^{2+}$  in *B. cinerea*. A: treated group; B: untreated control group.

### 3 讨论

因时间问题, 本实验并未分离纯化 B15 发酵液中的抑菌混合物伊枯草菌素 A 和芬芥素, 以及分别讨论纯化抑菌物质对灰葡萄孢的抑菌机理, 而是使用 B15 的无菌发酵液初步探讨发酵液中的抑菌混合物对葡萄灰霉病原菌的抑菌机理。

台盼蓝染色结果发现经 B15 发酵液处理过的菌丝细胞膜完整, 未观察到细胞内容物泄露现象, 因此判断 B15 发酵液中的伊枯草菌素 A 对灰葡萄孢菌丝细胞膜未产生影响。此结果与前人对伊枯草菌素 A 抑菌机制的研究结论, 即其能影响菌丝细胞膜并导致菌丝死亡, 并不冲突。朱弘元<sup>[22]</sup>通过对 B15 菌株产生的伊枯草菌素 A 和芬芥素的脂肽浓度测定发现, 当解淀粉芽孢杆菌 B15 菌株于 Landy 培养基中发酵时间为 48 h 时, 芬芥素和伊枯草菌素 A 在发酵液中的脂肽浓度分别约为 30 mg/L 和 32 mg/L<sup>[22]</sup>。B15 菌株产脂肽物质对灰葡萄孢最小抑菌浓度的测定结果是: C14–C16 伊枯草菌素

A 的最小抑菌浓度分别为 100.0、50.0、12.5 mg/L, 而芬芥素的最小抑菌浓度为 5 mg/L。虽然在本实验中, B15 发酵液里的伊枯草菌素 A 浓度为 30 mg/L, 已经达到了 C16 伊枯草菌素 A 的最低抑菌浓度, 但是在前期试验中朱弘元<sup>[22]</sup>并未测定 C16 伊枯草菌素 A 组分在伊枯草菌素 A 中所占比例和其在发酵液里的浓度<sup>[22]</sup>, 因此可能因为 C16 伊枯草菌素 A 在发酵液里浓度太低以致于伊枯草菌素 A 组分对灰葡萄孢细胞膜未产生作用。结合上述讨论, 本次试验结果或由以下 2 个原因共同造成: (1) 伊枯草菌素 A 中的 C14 伊枯草菌素 A 和 C15 伊枯草菌素 A 组分浓度太低未达到对灰葡萄孢的最小抑菌浓度; (2) C16 伊枯草菌素 A 组分在发酵液中浓度太低。

激光共聚焦扫描显微镜观察结果显示, 经 B15 无菌发酵液处理的灰葡萄孢菌丝出现了明显的细胞核裂解、活性氧积累、钙离子积累和磷脂酰丝氨酸层外翻这些典型的细胞凋亡特征, 这说明 B15 无菌发酵液可以诱导细胞凋亡的方式抑制灰葡萄孢的生长。但不能判断灰葡萄孢的细胞凋亡现

象是由 B15 发酵液中的伊枯草菌素 A 或芬芥素，或是两种物质的共同作用引起的。

在细胞凋亡中，钙离子是多种死亡信号转导的第二信使，与线粒体功能及活性氧之间有着错综复杂的关系<sup>[2]</sup>。活性氧和钙离子都可诱发线粒体通透性转换孔的(MPTP)开放，而 MPTP 开放一方面使活性氧大量升高，另一方面也使线粒体外膜破裂导致膜间腔钙离子释放，而钙离子的大量升高作为第二信使，启动多条信号转导途径，亦会使活性氧升高<sup>[3]</sup>。本试验并未讨论在细胞凋亡中钙离子与活性氧之间的关系，以及钙离子和活性氧分别在细胞凋亡中扮演的角色。下一步实验则可通过分别使用钙螯合剂，例如 BAPTA/AM，和活性氧清除剂，例如 n-乙酰半胱氨酸(NAC)，处理处于细胞凋亡阶段的菌丝，结合荧光染色法和激光共聚焦显微镜观察来讨论这些问题。

由于发酵液中的有效物质往往有多个作用机制，在研究中需考虑其他拮抗机制存在的可能性。例如，纯化伊枯草菌素 A 和芬芥素是否对不同植物病原菌具有不同的抑菌机制，亦或者是不同浓度的脂肽物质呈现不同的作用机制。这些问题都需要通过进一步的实验来解决。该问题可通过分离纯化 B15 无菌发酵液中的伊枯草菌素 A 和芬芥素，并于不同浓度的条件下分别讨论其对灰葡萄孢的作用方式。目前，对解淀粉芽孢杆菌抑菌机制的研究仍然有限，同时关于丝状真菌细胞凋亡的信息也很片面。需更多的研究从丝状真菌细胞凋亡的角度来探讨解淀粉芽孢杆菌对灰葡萄孢的抑制作用，发现更多的凋亡因子，了解凋亡基因在丝状真菌中的作用，讨论解淀粉芽孢杆菌 B15 抑菌有效物质诱导的灰葡萄孢细胞凋亡的信号传导途径。

## 致谢

本文所使用的激光共聚焦显微镜由清华大学细胞学生物平台所提供，在此深表谢意。

## 参考文献

- [1] Chen YF, Wen JZ, Li Lijun. Research advance of grape grey mould. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2006, 37(5): 693–699.
- [2] Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, van Kan JAL. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 2007, 8(5): 561–580.
- [3] Shlezinger N, Goldfinger N, Sharon A. Apoptotic-like programmed cell death in fungi: the benefits in filamentous species. *Frontiers in Oncology*, 2012, 2: 97.
- [4] Wedge DE, Smith BJ, Quebedeaux JP, Constantin RJ. Fungicide management strategies for control of strawberry fruit rot diseases in Louisiana and Mississippi. *Crop Protection*, 2007, 26(9): 1449–1458.
- [5] Huang X, Xu LL, Huang RS, Huang SS. Research advance in controlling plant diseases by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Bulletin*, 2010, (1): 24–29. (in Chinese)  
黄曦, 许兰兰, 黄荣韶, 黄庶识. 枯草芽孢杆菌在抑制植物病原菌中的研究进展. *生物技术通报*, 2010, (1): 24–29.
- [6] Guo R. Extension, application and developmental strategies of biopesticides in China. *Chinese Journal of Biological Control*, 2011, 27(1): 124–127. (in Chinese)  
郭荣. 我国生物农药的推广应用现状及发展策略. *中国生物防治学报*, 2011, 27(1): 124–127.
- [7] Zhu CX, Jiang XL, Ji JH, Sun DY, Tian YL. Research progress and some development suggestions on bio-pesticides in China. *Modern Chemical Industry*, 2003, 23(7): 1–4. (in Chinese)  
朱昌雄, 蒋细良, 姬军红, 孙东园, 田云龙. 我国生物农药的研究进展及对未来发展建议. *现代化工*, 2003, 23(7): 1–4.
- [8] Huang YX. Research and application of biocontrol pesticides. *Pesticide Market News*, 2000, (3): 14–15. (in Chinese)  
黄运霞. 生物农药的研究与应用概述. *农药市场信息*, 2000, (3): 14–15.
- [9] Dai S. Isolation and regulation mechanisms study of the antibiotics in *B. amyloliquefaciens*. Master Dissertation of



- Nankai University, 2011. (in Chinese)  
代森. 解淀粉芽孢杆菌抑菌物质分离和调控研究. 南开大学硕士学位论文, 2011.
- [10] Wang YG, Wang JH, Quan CS, Fan SD. Purification and antifungal characterization of an antifungal substance from *Bacillus amyloliquefaciens*. *China Biotechnology*, 2007, 27(12): 41–45. (in Chinese)  
王英国, 王军华, 权春善, 范圣第. 解淀粉芽孢杆菌抗菌活性物质的分离纯化及抑菌活性研究. 中国生物工程杂志, 2007, 27(12): 41–45.
- [11] Ongena M, Jacques P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 2008, 16(3): 115–125.
- [12] Vitullo D, Pietro AD, Romano A, Lanzotti V, Lima G. Role of new bacterial surfactins in the antifungal interaction between *Bacillus amyloliquefaciens* and *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology*, 2012, 61(4): 689–699.
- [13] Kotan R, Dikbas N, Bostan H. Biological control of post harvest disease caused by *Aspergillus flavus* on stored lemon fruits. *African Journal of Biotechnology*, 2009, 8(2): 209–214.
- [14] Kong HG, Kim JC, Choi GJ, Lee KY, Kim HJ, Hwang EC, Moon BJ, Lee SW. Production of surfactin and iturin by *Bacillus licheniformis* N1 responsible for plant disease control activity. *Plant Pathology Journal*, 2010, 26(2): 170–177.
- [15] Maget-Dana R, Ptak M, Peypoux F, Michel G. Pore-forming properties of iturin A, a lipopeptide antibiotic. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1985, 815(3): 405–409.
- [16] Tang QY, Bie XM, Lu ZX, Lv FX, Tao Y, Qu XX. Effects of fengycin from *Bacillus subtilis* fmbJ on apoptosis and necrosis in *Rhizopus stolonifer*. *Journal of Microbiology*, 2014, 52(8): 675–680.
- [17] Semighini CP, Harris SD. Methods to detect apoptotic-like cell death in filamentous fungi//Sharon A. *Molecular and Cell Biology Methods for Fungi*. New York: Humana Press, 2010: 269–279.
- [18] Glass NL, Dementhon K. Non-self recognition and programmed cell death in filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 2006, 9(6): 553–558.
- [19] Sharon A, Finkelstein A, Shlezinger N, Hatam I. Fungal apoptosis: function, genes and gene function. *FEMS Microbiology Reviews*, 2009, 33(5): 833–854.
- [20] Mousavi SAA, Robson GD. Entry into the stationary phase is associated with a rapid loss of viability and an apoptotic-like phenotype in the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology*, 2003, 39(3): 221–229.
- [21] Teparić R, Stuparević I, Mrša V. Increased mortality of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall protein mutants. *Microbiology*, 2004, 150(Pt 10): 3145–3150.
- [22] Zhu HY. Research of Active ingredients produced by *Bacillus amyloliquefaciens* B15. Master Dissertation of Xinjiang University, 2015. (in Chinese)  
朱弘元. 解淀粉芽孢杆菌 B15 的有效抑菌成分的研究. 新疆大学硕士学位论文, 2015.
- [23] Perry SW, Epstein LG, Gelbard HA. Simultaneous in situ detection of apoptosis and necrosis in monolayer cultures by TUNEL and trypan blue staining. *Biotechniques*, 1997, 22(6): 1102–1106.
- [24] Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 1994, 84(5): 1415–1420.
- [25] Hajnóczky G, Csordás G, Das S, Garcia-Perez C, Saotome M, Roy SS, Yi MQ. Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial  $Ca^{2+}$  uptake in apoptosis. *Cell Calcium*, 2006, 40(5/6): 553–560.

# Inhibition of antifungal substances from *Bacillus amyloquefaciens* B15 against *Botrytis Cinerea*—the agent of “gray mold” of grape

Hongyu Pan<sup>1</sup>, Weiyun Jin<sup>1</sup>, Xiaomeng Zhang<sup>1</sup>, Xulei Song<sup>1</sup>, Yinzhuo Yan<sup>1\*</sup>, Bin Yan<sup>2</sup>, Jie Xue<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Brewing Department, China National Research Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing 100015, China

<sup>2</sup> Technology Department, COFCO Huaxia Great Wall Wine Co., Ltd., Qinhuangdao 710068, Hebei Province, China

**Abstract:** [Objective] The present study aimed to investigate the inhibition of cyclic lipopeptides (iturin A and fengycin) produced by *Bacillus amyloquefaciens* B15 against *Botrytis cinerea* by using laser confocal scanning microscopy and fluorescence microscopy. [Methods] The agar diffusion method was applied to investigate the antifungal activity of B15 strain against *Botrytis cinerea*. A 7-mm agar plug of *Botrytis cinerea* was placed on the PDA plate containing B15 culture supernatant at the concentration of 1:20. The hyphal viability was determined by staining the hyphae of *Botrytis cinerea* with trypan blue. Then the classical cell apoptotic assay was applied by staining cell nucleus, reactive oxygen species, calcium ions, and phosphatidylserine of hyphae with DAPI, Dihydrorhodamine 123, fluo-3/am and Annexin V-PI probe. [Results] The antagonistic assay showed that the B15 strain displayed evident antifungal activity against *Botrytis cinerea*. From the trypan blue assay, it was evident to observe the distorted hyphal structure of *Botrytis cinerea* in treated group, including conglomeration of branch tips, swollen hyphae, hyphal vacuolation, and shrinkage under fluorescence microscopy. The laser confocal scanning microscopy observation of *Botrytis cinerea* showed that the typical cell apoptosis pattern appeared in the treated group, including the nuclear fragmentation and condensation, accumulation in reactive oxygen species and Ca<sup>2+</sup>, and the flip-flop of phosphatidylserine. [Conclusion] The combined results of the trypan blue assay and cell apoptotic assay indicated that B15 culture supernatant inhibited the growth of *Botrytis cinerea* in the way of inducing apoptotic-like cell death in *Botrytis cinerea*, instead of damaging the cell membrane and directly contributing to the death of mycelium.

**Keywords:** *Bacillus amyloquefaciens* B15, apoptotic-like programmed cell death, mechanisms of inhibition, laser confocal scanning microscopy, *Botrytis cinerea*

(本文责编: 李磊)

Supported by the Technology Project of Hebei Province (16222901D) and by the Beijing New-Star Plan of Science and Technology (z181100006218004)

\*Corresponding author. Jie Xue, Tel: +86-10-53218262, E-mail: lxxuejie@126.com; Yinzhuo Yan, Tel: +86-10-53216460, E-mail: yyz@163.com

Received: 8 August 2017; Revised: 3 November 2017; Published online: 5 December 2017