

· 研究论文 ·

天然化合物丁香酚对灰葡萄孢菌丝脂质过氧化和膜损伤的影响

王春梅¹, 张杰², 陈浩¹, 石志琦¹, 范永坚^{*1}

(1. 江苏省农业科学院 食品质量安全与检测研究所, 南京 210014; 2. 江苏省南京市瓜埠高级中学, 南京 211511)

摘要:研究了天然化合物丁香酚对灰葡萄孢菌丝细胞膜的影响。结果表明,丁香酚可以作用于真菌的膜系统,诱导菌丝膜脂质过氧化,使膜受到损伤,透性改变,丙二醛(MDA)流出细胞。进一步研究发现,丁香酚处理使得菌丝内过氧化氢含量逐渐升高;菌丝内钙离子浓度先升高,30 min后逐渐下降,这可能是由于细胞膜破损导致钙离子外流的缘故。同时,通过DNA梯状条带的检测,初步表明丁香酚不能诱导灰葡萄孢菌丝细胞凋亡。

关键词:天然化合物;丁香酚;灰葡萄孢;膜脂质过氧化

中图分类号:S481.1;S482.292

文献标志码:A

文章编号:1008-7303(2009)01-0104-05

Lipid Peroxidation and Membrane Disruption by Natural Compound Eugenol in Mycelia of *Botrytis cinerea*

WANG Chunmei¹, ZHANG Jie², CHEN Hao¹, SHI Zhiqi¹, FAN Yongjian^{*1}

(1. Institute of Food Safety, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;

2. Guabu High School in Jiangsu Province, Nanjing 211511, China)

Abstract: Effect of eugenol on mycelial membrane of *Botrytis cinerea* was studied. The results showed that eugenol could cause damage to cytoplasmic membrane including induction of lipid peroxidation and membrane disruption, alteration of membrane permeability and leach out of MDA. Further study showed that the content of H₂O₂ in mycelia increased after treatment with eugenol, and a remarkable increase of the concentration of Ca²⁺ in mycelia within 30 min and thereafter decrease was observed. It was speculated that the efflux of Ca²⁺ was attributed to the damage of cytoplasmic membrane. Meanwhile, the result of DNA electrophoresis suggested that eugenol may not induce apoptosis of cell of *B. cinerea*.

Key words: natural compound; eugenol; *Botrytis cinerea*; lipid peroxidation

天然化合物丁香酚(4-烯丙基-2-甲氧基苯酚)是丁香 *Flos caryophylli* 及丁香罗勒油 (*Oleum ocimum gratissimum*) 的主要成分,具有抑菌、麻醉、解热、抗氧化、抗肿瘤、促进透皮吸收、祛蚊等药理活

性^[1]。近年来国外研究发现丁香酚对食品微生物李斯特菌 *Listeria monocytogenes*、米酒乳杆菌 *Lactobacillus sakei*、酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、植物病原真菌白腐真菌如采绒革盖菌 *Coriolus versicolor*、

收稿日期:2008-08-12;修回日期:2008-09-29.

作者简介:王春梅(1979-),女,江苏盐城人,硕士,助理研究员,主要从事生物农药研究;E-mail:wangchunmei_1979@163.com; *通讯作者(Author for correspondence):范永坚(1956-),男,江苏无锡人,博士,研究员,博士生导师.联系电话:025-84390023;E-mail:fanyj3239@yahoo.com

基金项目:国家高技术研究发展计划("863计划")农业生物药物重大项目(2006AA10A209);江苏省农业高技术研究项目(BG2006325).

褐腐菌硫磺菌 *Laetiporus sulphureus*、白腐菌桦革褶菌 *Lenzites Betulina* 和蚕豆赤斑病菌 *Botrytis fabae* 等有不同程度的抑制作用^[2-5]。Gill等通过研究丁香酚对大肠杆菌 *Escherichia coli* 和李斯特菌的作用机制,表明丁香酚主要抑制菌体细胞膜的 ATPase 活性^[2]。Ghosh 等认为丁香酚通过抑制 E2F1 转录活性从而抑制黑色素瘤的生长^[6]。有关丁香酚对植物病原真菌的作用机制尚未见报道。前文已报道了丁香酚对灰葡萄孢不同发育阶段的影响^[7]。江苏省农业科学院已研制出 10% 丁香酚微乳剂,其在 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下对西瓜炭疽病和葡萄霜霉病的防治效果分别为 84.82% 和 89.29% (结果将另文发表)。笔者于光学显微镜下观察到丁香酚处理后灰葡萄孢菌丝内溶物的释放 (结果将另文发表),初步研究结果表明丁香酚可能作用于灰葡萄孢的细胞膜^[7]。丙二醛 (MDA) 是膜脂质过氧化作用的产物,已被广泛用作衡量脂质过氧化损伤的指标。脂质过氧化主要是由活性氧、自由基特别是 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2\cdot$ 启动经连锁反应生成,MDA 积累越多,表明活性氧、自由基等含量越高^[8-10]。过量的自由基攻击细胞膜形成脂质过氧化物,从而使膜离子转运紊乱,导致膜钙通透性增高。有文献报道活性氧、自由基可以直接通过影响基因转录,改变细胞的表型特征或作用于细胞膜,诱发膜脂过氧化,从而影响细胞的信号传递,激发有关的基因调控,导致细胞凋亡^[11],而有关丁香酚在植物病害防治中的应用已有报道,如江苏省南通剂神雨绿色药业有限公司等企业研制的 0.3% 丁香酚可溶性液剂已获得农药临时登记 (登记证号:LS20052323),用于番茄灰霉病的防治^[12],故本研究从细胞膜着手探讨了丁香酚对灰霉病菌的作用机制。

1 材料与方法

1.1 供试病菌

灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 由江苏省农业科学院食品质量与安全检测研究所提供。

1.2 供试化合物及试剂

纯度为 99% 的丁香酚 (eugenol) 购自 Sigma 公司,用 70% 的乙醇配制成 $4 \times 10^4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的母液。

Fluo-3AM (钙离子荧光探针) 购于碧云天生物技术研究所,母液浓度为 5 mmol/L,用 10 mmol/L、pH 7.4 的 HEPES 缓冲液稀释至终浓度为 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$,

4 冰箱中避光保存。

1.3 丁香酚对菌丝膜脂质过氧化的影响

将摇培 2 d 的菌丝过滤,用 0.05 mol/L、pH 7.2 的 PBS 缓冲液冲洗 3 次,转移到 30 mL PBS 缓冲液中,加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 丁香酚处理,于处理 0、6、12、24 h 后分别取菌丝和 PBS 缓冲液用于丙二醛 (MDA) 的测定。

MDA 的测定采用 2 硫代巴比妥酸 (TBA) 法^[13-15]。称取 1 g 菌丝 (湿重),加入液氮,冰浴下研磨,同时加入 4 mL 0.05 mol/L pH 7.2 的 PBS 缓冲液,10 000 r/min 下匀浆,4 离心 10 min,取上清液 2 mL (余下上清液供蛋白浓度测定) 加入质量分数为 10% 的三氯乙酸 (TCA) (含 0.67% TBA),混匀后置于 100 $^\circ\text{C}$ 水浴中 15 min,冰浴迅速冷却终止反应,于 10 000 r/min、4 $^\circ\text{C}$ 下离心 10 min,取上清液测定其在 450、532、600 nm 的吸光值,由公式 $c = 6.45(\text{OD}_{532} - \text{OD}_{600}) - 0.56 \text{OD}_{450}$ 计算 MDA 浓度。式中 c 为 MDA 浓度,单位: $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。PBS 缓冲液中 MDA 含量测定方法同菌丝,按体积比 5:2 的比例加入反应液。蛋白浓度测定采用考马斯亮蓝 G-250 比色法^[16]。

1.4 丁香酚对菌丝内过氧化氢浓度的影响

采用 Sagisaka 方法测定总 H_2O_2 含量^[17]。收集摇培菌丝 0.5 g,加入 4 mL 磷酸缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.5) 冰浴研磨后,加入 2.8 mL 质量分数为 5% 的三氯乙酸,于 10 000 r/min 下离心 10 min。取上清液 1.6 mL 与 0.4 mL 50% 的三氯乙酸、0.4 mL 10 mmol/L 的硫酸亚铁铵和 0.2 mL 2.5 mmol/L 的硫氰酸钾混合,于 480 nm 下测定上清液的吸光值 (OD_{480}),由 H_2O_2 测定的标准曲线计算 H_2O_2 含量,进而得出 H_2O_2 变化量^[17,18]。

1.5 丁香酚对菌丝内钙离子浓度的影响

将孢子悬浮液接入 PD 液体培养基中,于 25 $^\circ\text{C}$ 、140 r/min 下摇培 2 d,挑取菌丝,放入浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的丁香酚中,处理 5、15、30、60、120 min 后,分别用蒸馏水洗涤除去丁香酚,加入荧光染料 Fluo-3AM,25 $^\circ\text{C}$ 黑暗条件下染色 1 h,用 LEICA TCS SP2 激光共聚焦扫描显微镜观察菌丝体内 Ca^{2+} 浓度变化。激发波长为 488 nm,发射波长为 525 nm^[19,20]。每处理设 3 次重复。

1.6 细胞凋亡特征的检测

摇培 2 d 的灰葡萄孢菌丝用丁香酚 (处理浓度

为 100、200 和 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理, 分别于处理后 0、2、4、8、12 和 24 h, 取菌丝顶端, 按文献方法^[21]提取总 DNA, 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA, 观察是否出现 DNA 梯状条带。

2 结果与分析

2.1 丁香酚对灰葡萄孢菌丝脂质过氧化的影响

MDA 是膜脂过氧化的产物, 其含量可反映膜脂过氧化的程度, 是膜系统受伤害的重要指标之一^[22]。MDA 是水溶性的小分子, 细胞膜破损时会释放到细胞外的培养液中^[15]。丁香酚处理后菌丝和 PBS 缓冲液中 MDA 总量升高, 但菌丝内 MDA 含量逐渐减少, 低于对照菌丝; 而 PBS 缓冲液中 MDA 含量高于对照, 处理 24 h 后达到最高水平, 其中处理 6 h 后 PBS 缓冲液中 MDA 含量开始超过菌丝内并保持始终高于菌丝内 (图 1)。这表明丁香酚可能诱导灰葡萄孢菌丝膜脂质过氧化, 使膜受到损伤, 透性改变, 导致 MDA 流出细胞。

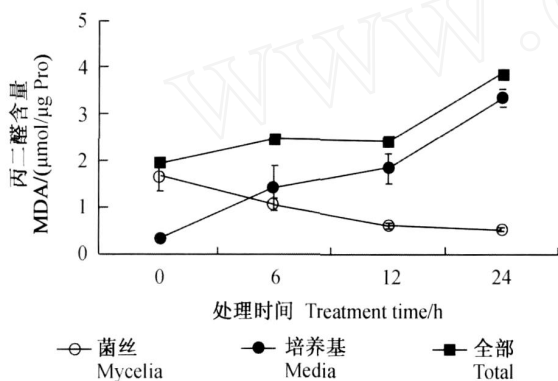


图 1 丁香酚对灰葡萄孢菌丝脂质过氧化的影响

Fig. 1 Effects of eugenol on lipid peroxidation of *B. cinerea*

2.2 丁香酚对菌丝内过氧化氢浓度的影响

随着丁香酚处理时间的延长, 菌丝内过氧化氢含量逐渐升高, 处理 0 h 后吸光值为 0.089, 处理 8 h 后吸光值为 1.14, 而对照 0 h 吸光值为 0.067, 8 h 为 0.10 (图 2)。说明丁香酚可以诱导菌丝产生过量的过氧化氢。过氧化氢是活性氧的一种, 其高活性可引发脂质、蛋白质和核酸分子的氧化性损伤, 从而导致细胞结构的损伤乃至破坏^[23]。

2.3 丁香酚对灰葡萄孢菌丝内钙离子浓度的影响

Fluo-3 AM 是最常用的检测细胞内钙离子浓

度的荧光探针之一, 可以穿透细胞膜。Fluo-3 AM 的荧光非常弱, 进入细胞后可以被细胞内的酯酶剪切形成 Fluo-3, 继而与钙离子结合产生较强的荧光。细胞质中的钙离子在细胞信号传导中起着重要作用, 并可调节细胞的多种生理功能^[19]。本研究测定了丁香酚处理后菌丝内钙离子浓度的变化。结果表明, 随着处理时间延长, 菌丝内钙离子浓度逐渐升高, 30 min 后达到最大值, 比处理 5 min 时荧光强度升高了 229.4%, 之后又逐渐下降 (图 3)。这可能是因为细胞膜破损导致钙离子外流所致。

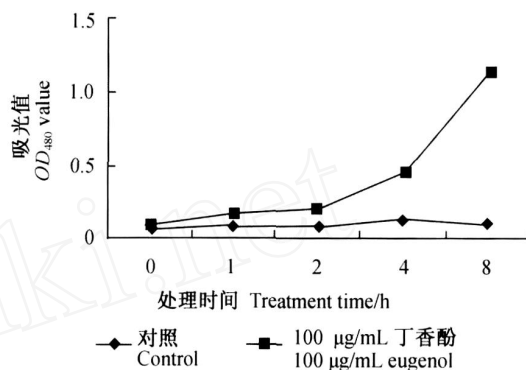


图 2 丁香酚处理后菌丝内过氧化氢浓度的变化
Fig. 2 Chang of H_2O_2 in the mycelia of *B. cinerea* after eugenol treatment

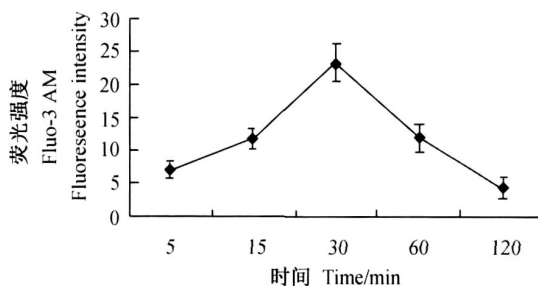


图 3 丁香酚处理后菌丝内部游离钙离子浓度的变化
Fig. 3 Change of intracellular free Ca^{2+} measured in *B. cinerea* mycelia incubated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eugenol for different time

图 4 是丁香酚处理不同时间的荧光强度照片, 从图中可以看出处理 30 min 后荧光强度最强。

2.4 细胞凋亡特征检测

细胞发生凋亡时, DNA 发生特征性的核小体间的断裂, 产生大小不同的片段, 但均为 180 ~ 200 bp 的整数倍。凋亡细胞中提取的 DNA 在进行常规的琼脂糖凝胶电泳, 并用溴乙锭染色时, 这些大小不同的 DNA 片段就呈现出梯状条带。绝大多数

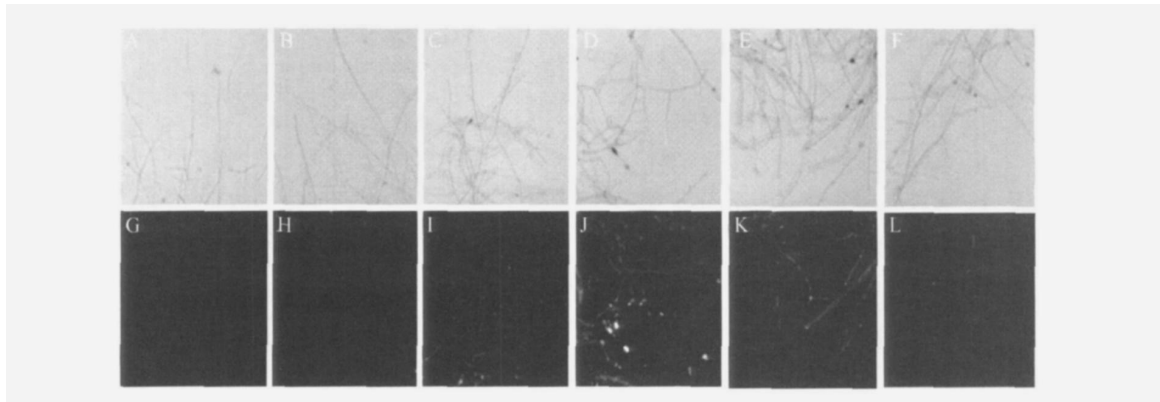


图 4 共聚焦显微镜下灰葡萄孢菌丝内部游离钙离子的分布 (钙荧光探针 Fluo-3, 染色)

Fig 4 Distribution of intracellular free Ca^{2+} under laser Scanning Confocal Microscope (Fluo-3, dye)

A ~ F: 光镜下灰葡萄孢菌丝; G ~ L: 共聚焦显微镜下灰葡萄孢菌丝; A, G: 对照菌丝; 丁香酚处理 5 min (B, H)、15 min (C, D)、30 min (D, J)、60 min (E, K)、120 min (F, L) 的菌丝。

A ~ F: B. cinerea mycelia viewed by DIC; G ~ L: B. cinerea mycelia viewed by fluorescence; A and G: control mycelia; mycelia treated 5 min (B and H), 15 min (C and D), 30 min (D and J), 60 min (E and K), 120 min (F and L) with eugenol, respectively.

凋亡细胞中 DNA 的断裂都表现出这种特征^[22], 但是本研究中各处理浓度下都没有检测到 DNA 梯状条带 (图 5)。

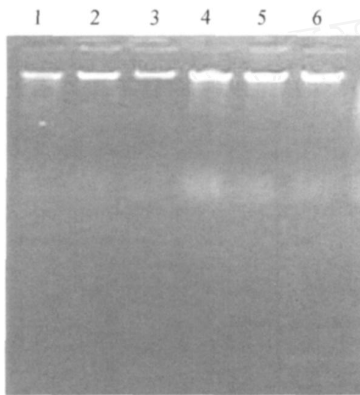


图 5 丁香酚处理对灰葡萄孢菌丝细胞影响的 DNA 检测

Fig 5 A agarose gel electrophoresis of DNA extracted from B. cinerea mycelia exposed to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eugenol

泳道 1~6 分别为丁香酚处理 0、2、4、8、12、24 h 的结果。

Lane 1~6 showed the result of 0, 2, 4, 8, 12, 24 h treated with eugenol, respectively.

3 讨论

细胞膜系统是细胞与外界环境进行物质交换和信息传递的界面和屏障,其稳定性是细胞进行正常生理功能的基础。PI (碘化丙啶)染色试验表明,丁香酚对灰葡萄孢孢子膜透性无明显影响,但在短时间 (15 min)内即可破坏菌丝膜的透性^[7]。笔者于光学显微镜下观察到丁香酚处理后灰葡萄

孢菌丝内溶物的释放。MDA 是细胞膜脂质过氧化作用的产物之一,MDA 从膜上产生的位置释放出后,可以与蛋白质、核酸反应,从而丧失功能,还可使纤维素分子间的桥键松弛,或抑制蛋白质的合成。前人研究表明^[15],乙烯菌核利可促使灰葡萄孢产生大量 MDA,表明发生了膜脂质过氧化,导致细胞内溶物释放。本研究通过测定 MDA 含量的变化,表明丁香酚能诱导灰葡萄孢菌丝膜脂质过氧化,使膜受到损伤。

活性氧 (ROS)可以氧化不饱和脂肪酸,并产生过氧化脂质^[23]。本研究发现,丁香酚处理后菌丝内过氧化氢含量升高,并且过氧化氢含量的变化早于 MDA 的变化,推测丁香酚诱导菌丝产生了过量的活性氧,导致细胞膜系统脂质过氧化,从而破坏细胞结构。前人研究表明^[1],丁香酚具有抗氧化作用,本试验结果与其相反,原因还需进一步探讨。

在 G 蛋白偶联受体所介导的磷脂酰肌醇信号通路中,胞外信号分子与细胞表面 G 蛋白偶联受体结合,激活质膜上的磷脂酶 C (PLC),使质膜上的 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇 (PIP_2)水解成 1,4,5-三磷酸肌醇 (IP_3)和二酰基甘油 (DG)两个第二信使,使胞外信号转换为胞内信号。 IP_3 是一种水溶性分子,在细胞内动员内源 Ca^{2+} ,主要是将储存在内质网中的 Ca^{2+} 转移到细胞质基质中,使胞质中游离 Ca^{2+} 浓度提高。这一作用几乎发生在所有真核细胞中。在双信使系统中, Ca^{2+} 的作用占有极其重要的位置,它不但可以作为胞内第三信使参与广泛的生理过程,活化各种 Ca^{2+} 结合蛋白引起

细胞反应,而且在双信使系统本身功能的调节方面也非常重要^[23]。本研究发现,丁香酚处理后菌丝内游离 Ca^{2+} 浓度升高,这一变化早于过氧化氢和 MDA 含量变化,推测 Ca^{2+} 作为信号通路的第三信使参与了细胞的一系列变化。

Ito^[24]和 Wang 等^[25]通过研究植物和真菌的细胞凋亡,发现活性氧在诱导细胞凋亡的过程中发挥了重要作用。另外,凋亡过程中组织转谷氨酰胺酶 (tTG) 的活性依赖于 Ca^{2+} 浓度。在正常细胞中, Ca^{2+} 浓度较低, tTG 的活性也很低;当凋亡起始时, Ca^{2+} 浓度上升,使 tTG 活化,参与细胞凋亡过程^[23]。在本研究中作为细胞凋亡特征之一的 DNA ladders 并未出现,尽管前人的研究^[25~27]也曾发现在凋亡细胞中的这一现象,但本研究只是初步探讨,还需要进一步研究凋亡的其他特征来验证丁香酚处理后灰葡萄孢菌丝是否发生凋亡。

参考文献:

- PENG Zhai-biao (彭宅彪), ZHANG Qiong-guang (张琼光), DAI Hong-jian (代虹健), et al 丁香酚的药理学研究进展 [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research (时珍国医国药)*, 2006, 17(10): 2079-2081.
- GILL A O, HOLLEY R A. Mechanisms of Bactericidal Action of Cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of Eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* [J]. *Appl Environ Microb*, 2004, 70(10): 5750-5755.
- BENNIS S, CHAMIF, CHAMIN, et al Surface Alteration of *Saccharomyces cerevisiae* Induced by Thymol and Eugenol [J]. *Lett Appl Microbiol* 2004, 38: 454-458.
- WANG S Y, CHEN P F, CHANG S T. Antifungal Activities of Essential Oils and their Constituents from Indigenous Cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) Leaves against Wood Decay Fungi [J]. *Bioresource Technol*, 2005, 96: 813-818.
- OXENHAM S K, SVOBODA K P, WALTERS D R. Eugenol Reduces Growth and Increases Activity of S-Adenosylmethionine Decarboxylase in the Phytopathogenic Fungus *Botrytis fabae* [J]. *Phytoparasitica*, 2005, 33: 247-252.
- GHOSH R, NAD MINTY N, FITZPATRICK J E, et al Eugenol Causes Melanoma Growth Suppression through Inhibition of E2F1 Transcriptional Activity [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(7): 5812-5819.
- ZHANG Jie (张杰), WANG Chunmei (王春梅), CHENG Luo-gen (程罗根), et al 丁香酚对灰葡萄孢的抑制作用研究 [J]. *Chin J Pestic Sci (农药学报)*, 2008, 10(1): 68-74.
- HUANG Yu-shan (黄玉山), LUO Guang-hua (罗广华), GUAN Chairwen (关柴文). 镉诱导植物的自由基过氧化损伤 [J]. *Acta Bot Sin (植物学报)*, 1997, 39(6): 522-526.
- YANG Shu-shen (杨淑慎), GAO Jun-feng (高俊凤). 活性氧、自由基与植物的衰老 [J]. *Acta Bot Boreal Sin (西北植物学报)*, 2001, 21(2): 215-220.
- ESTERBAUER H, JORG R, ZOLLNER H. Chemistry and Biochemistry of 4-Hydroxynonenal, Malonaldehyde and Related Aldehyde [J]. *Free Rad Biol Med*, 1991, 11(1): 81-128.
- LI Ji (李忌), ZHENG Rong-liang (郑荣梁). 活性氧诱导细胞凋亡 [J]. *J Cell Biology (细胞生物学杂志)*, 1997, 19(3): 115-119.
- China Pesticide Information Network (中国农药信息网) [EB/OL]. <http://www.chinapesticide.gov.cn/service/asp/B3X.aspx?ajid=FUEUG>
- LI He-sheng (李合生). *Testing Principle and Technique of Plant Physiology and Chemistry (植物生理生化实验原理和技术)* [M]. Beijing (北京): Higher Education Press (高等教育出版社, 第1版), 2000: 260-261.
- GEORGIU C D, ZERVOUDA KIS G, PETROPOULOU K P. Ascorbic Acid Might Play a Role in the Sclerotial Differentiation of *Sclerotium rolfsii* [J]. *Mycologia*, 2003, 95(2): 308-316.
- CHOI G J, LEE H J, CHO K Y. Lipid Peroxidation and Membrane Disruption by Vinclozolin in Dicarboximide-susceptible and -resistant Isolates of *Botrytis cinerea* [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 1996, 55: 29-39.
- BRADFORD M M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248.
- SAGISAKA S. The Occurrence of Peroxide in Perennial Plant *Populus gebrica* [J]. *Plant Physiol*, 1976, 57: 308-309.
- VACCA R A, PINTO M C, VALENTID, et al Production of Reactive Oxygen Species, Alteration of Cytosolic Ascorbate Peroxidase, and Impairment of Mitochondrial Metabolism are Early Events in Heat Shock-induced Programmed Cell Death in Tobacco Brightyellow 2 Cells [J]. *Plant Physiol*, 2004, 134: 1100-1112.
- GIUDICIM, POVEDA J A, MOLINA M L, et al Antifungal Effects and Mechanism of Action of Viscotoxin A₃ [J]. *FEBS Journal*, 2006, 273: 72-83.
- LEVINA N N, LEW R R, HYDE G J, et al The Roles of Ca^{2+} and Plasma Membrane Ion Channels in Hyphal Tip Growth of *Neurospora crassa* [J]. *J Cell Sci*, 1995, 108: 3405-3417.
- READER U, BRODY P. Rapid Preparation of DNA from Filamentous Fungi [J]. *Lett Appl Microbiol*, 1985, 1: 17-20.
- ZHANG Yi-xian (张义贤), ZHANG Liping (张丽萍). 重金属对大麦幼苗膜脂过氧化及脯氨酸和可溶性糖含量的影响 [J]. *J Agro-environ Sci (农业环境科学学报)*, 2006, 25(4): 857-860.
- ZHAI Zhong-he (翟中和), WANG Xi-zhong (王喜忠), DING Ming-xiao (丁明孝). *Cell Biology (细胞生物学)* [M]. Beijing (北京): Higher Education Press (高等教育出版社), 2000: 140-141, 449-458.
- ITO S, IHARA T, TAMURA H. α -Tomatine, the Major Saponin in Tomato, Induces Programmed Cell Death Mediated by Reactive Oxygen Species in the Fungal Pathogen *Fusarium oxysporum* [J]. *FEBS Letters*, 2007, 581: 3217-3222.
- WANG W X, LIS H, ZHAO X M, et al Oligochitosan Induces Cell Death and Hydrogen Peroxide Accumulation in Tobacco Suspension Cells [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2008, 90: 106-113.
- MOUSAVISA A, ROBSON G D. Oxidative and Amphotericin B-mediated Cell Death in the Opportunistic Pathogen *Aspergillus fumigatus* is Associated with an Apoptotic-like Phenotype [J]. *Microbiology*, 2004, 150: 1937-1945.
- MOUSAVISA A, ROBSON G D. Entry into the Stationary Phase is Associated with a Rapid Loss of Viability and an Apoptotic-like Phenotype in the Opportunistic Pathogen *Aspergillus fumigatus* [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2003, 39: 221-229.

(Ed. JIN S H)