

桃褐腐病菌(*Monilia fructigena*)原生质体制备及再生条件

薛伟 赵筱萌 刘素花 赵晓燕* 刘正坪*

(北京农学院 植物科学技术系 北京 102206)

摘要: 以桃褐腐病菌(*Monilia fructigena*)为供试菌株,研究了酶系组成、液体培养基、菌龄、酶解温度、酶解时间对原生质体制备的影响,以及等渗液、固体再生培养基、酶解时间对原生质体再生的影响。结果表明:Fries(1/2)液体培养基培养 24 h,在 10 mg/mL 崩溃酶 + 5 mg/mL 纤维素酶 + 20 mg/mL 蜗牛酶 + 10 mg/mL 溶菌酶的混合酶液中 28°C 酶解 4 h 为桃褐腐病菌原生质体制备的最佳条件。采用液体再生涂布平板法,以含 Ca^{2+} 的 STC 为等渗液的液体培养基和含蔗糖及 Ca^{2+} 的 Fries(1/2)固体培养基为桃褐腐病菌原生质体再生的最佳条件。经过观察与测定,再生菌株保持了原有的培养性状和致病性,接种桃果实后发病率为 100%。

关键词: 桃褐腐病菌,原生质体,再生

Protoplast Preparation and Regeneration of *Monilia fructigena*

XUE Wei ZHAO Xiao-Meng LIU Su-Hua ZHAO Xiao-Yan* LIU Zheng-Ping*

(Plant Science and Technology College, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract: The condition of protoplast preparation and regeneration of *Monilia fructigena* was studied in this research. The results showed that the composition of cell wall degradative enzymes, liquid medium, mycelial age, digesting temperature and time duration affected the preparation of protoplast. More protoplast of *M. fructigena* were yielded when mycelia incubated in Fries(1/2) for 24 h were digested by enzyme mixture of 10 mg/mL driselase, 20 mg/mL snailase, 5 mg/mL cellulase and 10 mg/mL lysozyme for 4 h at 28°C. The protoplast regeneration rate was affected by osmotic solution, solid regeneration medium, and digesting time. The best regeneration of protoplast of *M. fructigena* was achieved by using STC as isotonic solution and Fries(1/2) solid medium as regeneration medium. The regenerated strain of *M. fructigena* was same as original strain in colony morphology and pathogenicity.

Keywords: *Monilia fructigena*, Protoplast, Regeneration

基金项目:北京市教委资助项目(No. KM200710020003, PXM2008-014207-055664);北京农学院引进人才科研启动基金

*通讯作者:刘正坪:✉ liuzhengping8882000@yahoo.com

赵晓燕:Tel: 86-10-80794280; ✉ zhaoxy777@163.com

收稿日期:2009-07-20;接受日期:2009-09-09

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

原生质体技术作为基因工程的手段之一,可以直接作为外源 DNA 的导入、质粒转移、病毒传递等的受体以表达外源基因,具有无比的优越性。目前,原生质体技术已经逐渐成为研究丝状真菌病害的重要手段,这方面研究的深入将逐步揭示病原真菌致病性以及寄主和病菌相互作用的分子机制,进而为病原菌和植物的遗传改造以及开拓真菌病害防治新途径提供有意义的线索^[1-2]。桃褐腐病为近年来危害桃的主要真菌病害之一,主要侵染桃果实,不仅降低了桃的产量,还常引起贮藏、运输和销售中的大量烂果,给桃产业造成非常严重的损失^[3]。本实验室于 2005 年至 2008 年间于北京市桃主产区平谷区桃园中采集了大量的桃褐腐病发病果实,经分离纯化与鉴定,确定了优势菌株为半知菌亚门丛梗孢科仁果丛梗孢(*Monilia fructigena*)。为了深入研究桃褐腐病菌的致病机理,本文对影响桃褐腐病菌原生质体制备及再生的因素进行了比较系统的研究,旨在为采用限制性内切酶介导的整合(REMI)技术对桃褐腐病菌的致病性相关基因进行研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株:桃褐腐病菌(*M. fructigena*),由北京平谷区桃园采集的病果上分离纯化获得并保存提供。

1.1.2 试剂:细胞壁降解酶:崩溃酶 Driselase, Sigma 产品编号: D-9515, 蜗牛酶 Snailase 产品编号: M051 国产, 纤维素酶 Cellulase, Japan 产品编号: M011, 溶菌酶 Lysozyme, Amresco 产品编号: 0663。

等渗液: 0.7 mol/L 的 NaCl 溶液; ST 等渗液(山梨醇 1 mol/L; Tris-HCl 20 mmol/L, pH 7.5); STC 等渗液(山梨醇 1.2 mol/L; Tris-HCl 10 mmol/L, pH 7.5; CaCl₂ 50 mmol/L)。

1.1.3 培养基:固体培养基: PDA 培养基(马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 琼脂 20 g/L); PDSA 培养基(PDA 培养基中加入 7%的蔗糖); Fries(1/2)固体培养基(蔗糖 15 g/L, 酒石酸胺 5 g/L, NaCl 0.1 g/L, CaCl₂ 0.1 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, 脲 0.5 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L, 酵母浸粉 0.5 g/L, 琼脂 20 g/L); CM 固体培养基(酶水解干酪素 0.5 g/L, 酸水解干酪素 0.5 g/L, 酵母浸粉 1 g/L, 蔗糖 20 g/L, 琼脂 20 g/L); YPD 固体培养基(酵母膏 10 g/L, 蛋白胨

20 g/L, 琼脂 20 g/L, 葡萄糖 10 g/L)。

液体培养基: PD(马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L); Fries(1/2)(蔗糖 15 g/L, 酒石酸胺 5 g/L, NaCl 0.1 g/L, CaCl₂ 0.1 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, 脲 0.5 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L, 酵母浸粉 0.5 g/L); CM(酶水解干酪素 0.5 g/L, 酸水解干酪素 0.5 g/L, 酵母浸粉 1 g/L, 蔗糖 20 g/L); YPD 液体培养基(酵母膏 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 葡萄糖 10 g/L)。

液体再生培养基: 各种等渗液中加入 0.5%酵母膏和 0.7%葡萄糖。

1.2 试验方法

1.2.1 原生质体制备:桃褐腐病菌于 PDA 平板上 28°C 培养 4 d, 用接种针挑菌丝接种于装有 150 mL 液体培养基的三角瓶中, 置于 28°C、120 r/min 的摇床上振荡培养。无菌条件下, 用 3 层灭菌擦镜纸过滤, 获得菌丝, 再用 0.7 mol/L 的 NaCl 溶液清洗 2 遍。以 500 mg 菌丝/mL 酶液的比例放入离心管中, 恒温酶解。取出后用 0.7 mol/L 的 NaCl 溶液稀释 6 倍, 并以 44 × g 的速度离心 10 min, 取上层原生质体悬浮液滴于血球板计数板上, 显微镜下观察计数, 得出原生质体产量。

(1) 细胞壁降解酶对原生质体制备的影响: 以浓度为 10 mg/mL 的崩溃酶、纤维素酶、蜗牛酶、溶菌酶等 4 种细胞壁降解酶单独酶解桃褐腐菌丝细胞壁, 并用 4 种酶混合设计正交试验 L₉(3⁴), 正交表见表 1。比较不同酶系统对桃褐腐病菌原生质体制备的影响, 确定酶解菌丝细胞壁的最佳酶系统。其他固定条件为: Fries(1/2)液体培养基培养, 菌龄 24 h, 酶解温度 28°C, 酶解时间 4 h。

(2) 液体培养基对原生质体制备的影响: 用 PD、CM、Fries(1/2)、YPD 4 种液体培养基培养桃褐腐病菌, 比较其对原生质体制备的影响。其他固定条件: 10 mg/mL 崩溃酶 + 5 mg/mL 纤维素酶 + 20 mg/mL 蜗牛酶 + 10 mg/mL 溶菌酶混合酶系统, 菌龄 24 h, 酶解温度 28°C, 酶解时间 4 h。

(3) 菌龄对原生质体制备的影响: 将桃褐腐病菌在液体培养基中分别培养 12、18、24、30、36 h 后进行原生质体制备, 比较不同菌龄对原生质体制备的影响。其他固定条件: 10 mg/mL 崩溃酶 + 5 mg/mL 纤维素酶 + 20 mg/mL 蜗牛酶 + 10 mg/mL 溶菌酶混合酶系统, Fries(1/2)液体培养基, 酶解温度 28°C, 酶解时间 4 h。

表 1 混合酶 L₉(3⁴)正交试验结果
Table 1 L₉(3⁴) Orthogonal experiment of mixed enzyme

处理 Treatment	崩溃酶(mg/mL) Driselase	溶菌酶(mg/mL) Lysozyme	蜗牛酶(mg/mL) Snailase	纤维素酶(mg/mL) Cellulase	原生质体产量(个/mL) Protoplast yield
1	5	5	5	5	5.23 × 10 ⁶
2	5	10	10	10	6.19 × 10 ⁶
3	5	20	20	20	5.50 × 10 ⁶
4	10	5	10	20	7.56 × 10 ⁶
5	10	10	20	5	10.08 × 10 ⁶
6	10	20	5	10	9.72 × 10 ⁶
7	15	5	20	10	5.78 × 10 ⁶
8	15	10	5	20	3.16 × 10 ⁶
9	15	20	20	5	3.03 × 10 ⁶
k1	16.92 × 10 ⁶	18.57 × 10 ⁶	18.11 × 10 ⁶	18.34 × 10 ⁶	
k2	27.36 × 10 ⁶	19.43 × 10 ⁶	16.78 × 10 ⁶	21.69 × 10 ⁶	总和 = 56.25 × 10 ⁶
k3	11.97 × 10 ⁶	18.25 × 10 ⁶	21.36 × 10 ⁶	16.22 × 10 ⁶	
R	15.39 × 10 ⁶	1.18 × 10 ⁶	4.58 × 10 ⁶	5.47 × 10 ⁶	

(4) 酶解温度对原生质体制备的影响: 设 24°C、26°C、28°C、30°C、32°C 5 个酶解温度梯度, 比较酶解温度对原生质体制备的影响。其他固定条件: 10 mg/mL 崩溃酶 + 5 mg/mL 纤维素酶 + 20 mg/mL 蜗牛酶 + 10 mg/mL 溶菌酶混合酶系统, Fries(1/2)液体培养基, 菌龄 24 h, 酶解时间 4 h。

(5) 酶解时间对原生质体制备的影响: 将桃褐腐病菌菌丝分别酶解 1、2、3、4、5 h, 比较不同酶解时间对原生质体制备的影响。其他固定条件: 10 mg/mL 崩溃酶 + 5 mg/mL 纤维素酶 + 20 mg/mL 蜗牛酶 + 10 mg/mL 溶菌酶混合酶系统, Fries(1/2)液体培养基, 菌龄 24 h, 酶解温度 28°C。

1.2.2 原生质体的再生: 吸取 400 μL 稀释后的桃褐腐病菌原生质体悬浮液加入液体再生培养基中, 28°C 静置培养 5 h 后, 吸取 400 μL 混合液涂布于原生质体再生培养基平板上, 于 28°C 恒温培养箱中培养 2–3 d, 统计再生菌落数。

(1) 等渗液对原生质体再生的影响: 用无菌水、0.7 mol/L NaCl 溶液、ST、STC 4 种不同等渗液分别制成桃褐腐病菌原生质体再生的液体再生培养基, 比较不同等渗液对桃褐腐病菌原生质体再生的影响, 确定桃褐腐病菌原生质体再生的最佳等渗液。

(2) 固体再生培养基对原生质体再生的影响: 将于液体再生培养基中培养 5 h 后的桃褐腐病菌原生质体分别涂布于 PDA、PDSA、YPD、Fries(1/2)、CM 等 5 种固体培养基上, 于 28°C 恒温培养箱中培

养 2–3 d, 统计再生菌落数, 比较不同固体再生培养基对桃褐腐病菌原生质体再生的影响, 确定桃褐腐病菌原生质体再生的最佳固体培养基。

(3) 酶解时间对原生质体再生的影响: 将桃褐腐病菌菌丝分别酶解 1、2、3、4、5 h 后进行再生, 计算不同酶解时间的原生质体产量, 确定桃褐腐病菌原生质体再生的最佳酶解时间。

(4) 桃褐腐病菌原生质体再生菌株培养性状观察及致病性测定: 将原生质体再生后得到的菌株接在 PDA 平板上, 28°C 培养 7 d, 观察培养性状、形态特征; 同时将再生菌株采用有伤接种法接种于桃果实上, 以桃褐腐病菌原始菌株为对照, 测定致病性。

2 结果与分析

2.1 原生质体的制备

2.1.1 酶系统对原生质体制备的影响: 以崩溃酶、蜗牛酶、纤维素酶、溶菌酶 4 种细胞壁裂解酶单独及混合制成酶液酶解桃褐腐病菌细胞壁, 观察不同酶系统对原生质体制备的影响, 结果见图 1、2。

如图 2 显示, 4 种细胞壁裂解酶单独酶解时, 崩溃酶酶解的效果最好, 原生质体的产量最高, 为 3.2 × 10⁶ 个/mL, 蜗牛酶次之, 纤维素酶酶解效果最差。

如表 1 所示, 混合酶正交试验的 9 组试验中第 5 组配比为 10 mg/mL 崩溃酶 + 5 mg/mL 纤维素酶 + 20 mg/mL 蜗牛酶 + 10 mg/mL 溶菌酶的组合对桃褐

腐病菌细胞壁酶解效果最好,原生质体产量最高,为 10.08×10^6 个/mL。如图 1 所示,经极差分析得出崩溃酶、纤维素酶、蜗牛酶、溶菌酶在混合酶液中所起的作用大小依次为崩溃酶 > 纤维素酶 > 蜗牛酶 > 溶菌酶。

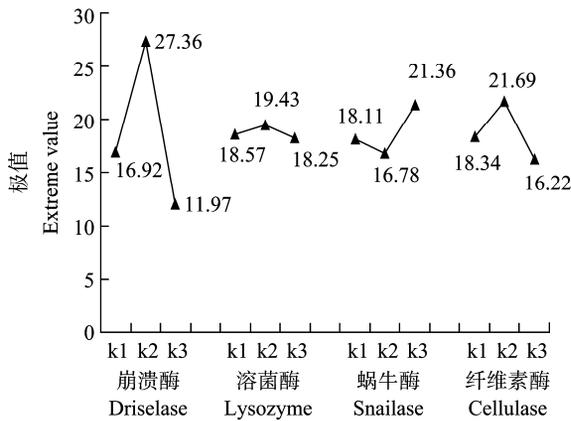


图 1 混合酶 L₉(3⁴) 正交试验结果的极差分析
Fig. 1 Range analysis of L₉(3⁴) orthogonal test of mixed enzyme

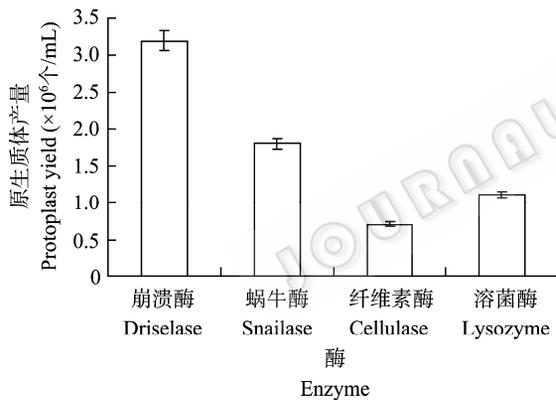


图 2 细胞壁降解酶对桃褐腐病菌原生质体制备的影响
Fig. 2 Effect of enzyme system on preparation of protoplasts of *Monilia fructigena*

从图 2 及表 1 中还可以看出,混合酶正交试验的 9 组试验中,有 7 组的桃褐腐病菌原生质体产量都明显高于崩溃酶单独裂解的原生质体产量,最终确定 10 mg/mL 崩溃酶 + 5 mg/mL 纤维素酶 + 20 mg/mL 蜗牛酶 + 10 mg/mL 溶菌酶的混合酶组合为制备桃褐腐病菌原生质体的最佳酶系统,制备得到的原生质体见图 3。

2.1.2 液体培养基对原生质体制备的影响: 比较 PD、CM、Fries(1/2)、YPD 4 种液体培养基培养桃褐腐病菌,对其原生质体制备的影响,结果如图 4

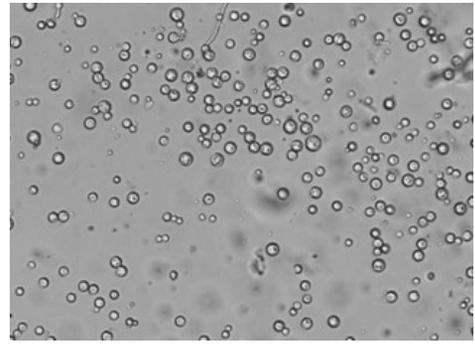


图 3 桃褐腐病菌原生质体显微图片($\times 10$)
Fig. 3 Micrograph of protoplasts of *Monilia fructigena*($\times 10$)

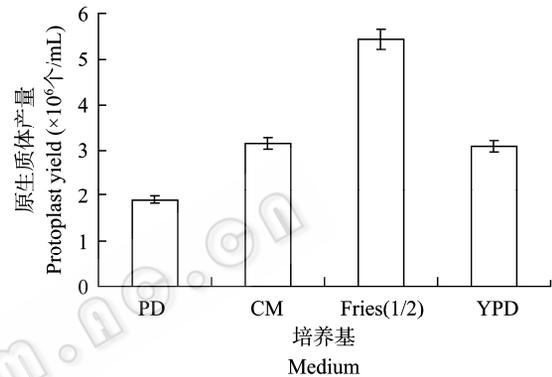


图 4 液体培养基对桃褐腐病菌原生质体制备的影响
Fig. 4 Effect of liquid medium on preparation of protoplasts of *Monilia fructigena*

所示,利用 Fries(1/2)培养基培养的菌丝体酶解后原生质体产量最高,达到 5.44×10^6 个/mL,CM 和 YPD 次之,分别为 3.15×10^6 个/mL 和 3.07×10^6 个/mL,PD 效果最差,只有 1.9×10^6 个/mL。

2.1.3 菌龄对原生质体制备的影响: 将桃褐腐病菌在液体培养基中分别培养 12、18、24、30、36 h 后,比较不同菌龄对原生质体制备的影响,试验结果如图 5 显示。在培养 24 h 以内,随着在液体培养基中培养时间的延长,原生质体产量逐渐升高,菌龄为 24 h 时原生质体制备量达到最高,为 9.3×10^6 个/mL,之后呈下降趋势。所以培养 24 h 为桃褐腐病菌原生质体制备的最佳菌龄。

2.1.4 酶解温度对原生质体制备的影响: 对桃褐腐病菌原生质体制备的最佳酶解温度进行筛选,试验结果如图 6 所示。28°C 时桃褐腐病菌原生质体制备量最高,达到 8.91×10^6 个/mL; 30°C 时效果最差,制备量为 4.35×10^6 个/mL,确定 28°C 为桃褐腐病菌原生质体制备的最佳酶解温度。

2.1.5 酶解时间对原生质体制备的影响: 比较不同酶解时间对桃褐腐病菌原生质体制备的影响, 结果如图 7 所示, 在供试时间内, 桃褐腐病菌原生质体产量随酶解时间的延长而不断升高, 至 4 h 为最高点, 达到 8.91×10^6 个/mL, 之后开始呈下降趋势, 所以 4 h 为桃褐腐病菌原生质体制备的最佳酶解时间。

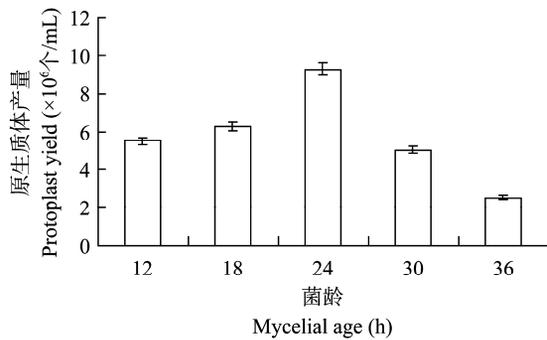


图5 桃褐腐病菌的菌龄对原生质体制备的影响
Fig. 5 Effect of mycelial age on preparation of protoplasts of *Monilia fructigena*

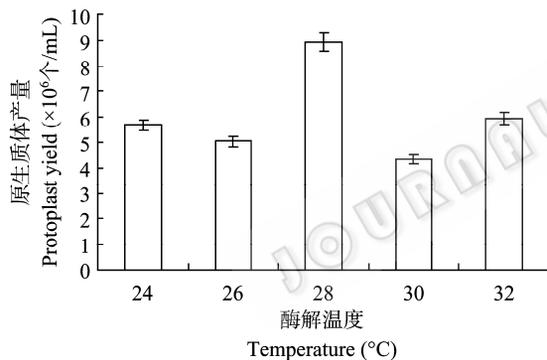


图6 酶解温度对桃褐腐病菌原生质体制备的影响
Fig. 6 Effect of digesting temperature on preparation of protoplasts of *Monilia fructigena*

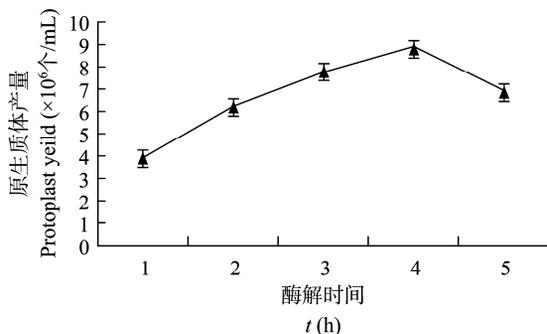


图7 酶解时间对桃褐腐病菌原生质体制备的影响
Fig. 7 Effect of digesting time on preparation of protoplasts of *Monilia fructigena*

2.2 原生质体再生

2.2.1 等渗液对原生质体再生的影响: 比较不同等渗液对于桃褐腐病菌原生质体再生的影响, 结果见图 8。在加入等渗液 STC 的液体培养基中桃褐腐病菌原生质体再生率可达到 5.28%, 为 ST 的 2 倍, 为 NaCl 的 19 倍, 而以无菌水作为等渗液时, 原生质体再生率为 0。所以, STC 为桃褐腐病菌原生质体再生的最适等渗液。

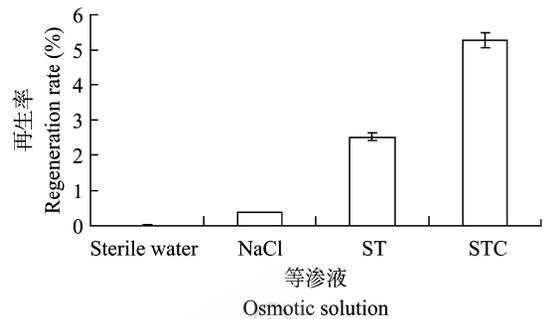


图8 等渗液对桃褐腐病菌原生质体再生的影响
Fig. 8 Effect of osmotic solution on regeneration of protoplasts of *Monilia fructigena*

2.2.2 固体再生培养基对原生质体再生的影响: 将于液体再生培养基中培养 5 h 后的桃褐腐病菌原生质体分别涂布于 PDA、PDSA、YPD、Fries(1/2)、CM 等 5 种固体培养基上进行原生质体再生, 结果如图 9。原生质体在 PDA 和 CM 上不能再生, 在 PDSA 和 Fries(1/2)上再生率都高于 5%, 其中在 Fries(1/2)上的再生率最高, 达到了 6.38%。所以 Fries(1/2)固体培养基为桃褐腐病菌原生质体再生的最适固体再生培养基。

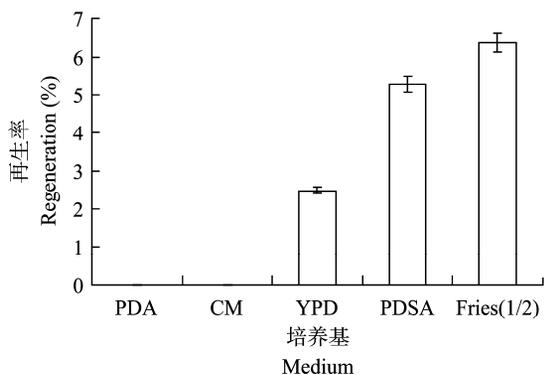


图9 固体再生培养基对桃褐腐病菌原生质体再生的影响
Fig. 9 Effect of solid medium on regeneration of protoplasts of *Monilia fructigena*

2.2.3 酶解时间对原生质体再生的影响: 比较不同酶解时间制备的桃褐腐病菌原生质体的再生率, 结果如图 10。酶解 3 h 的桃褐腐病菌原生质体再生率最高, 达到 6.56%, 酶解 4 h 的次之, 1 h 的最低。因此酶解 3 h 为桃褐腐病菌原生质体再生的最佳酶解时间。

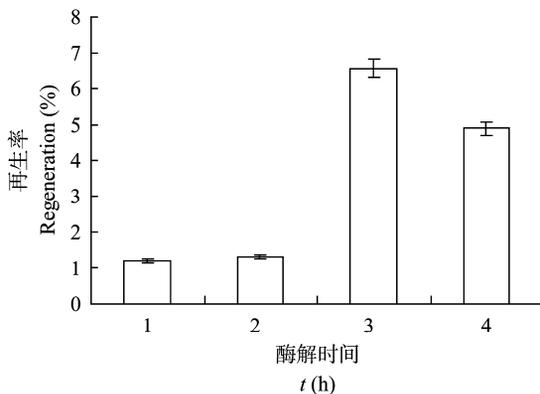


图10 酶解时间对桃褐腐病菌原生质体再生的影响
Fig. 10 Effect of digesting time on regeneration of protoplasts of *Monilia fructigena*

2.2.4 桃褐腐病菌原生质体再生菌株的培养性状观察及致病性测定: 观察原生质体再生得到的桃褐腐病菌菌落培养性状, 与原始纯化的桃褐腐菌株相比并无明显差别, 菌落均为灰褐色, 分生孢子层呈轮纹状生长。桃褐腐病菌再生菌株及原始菌株同时接种桃果实后观察发病情况, 发病率均为 100%。

3 讨论

原生质体制备以及再生的效率是影响相关试验的重要因素之一。由于不同真菌的细胞壁存在差异, 制备原生质体所需的酶系、酶解条件以及原生质体再生所需的条件和方法也不尽相同, 所以根据不同的真菌筛选适合的原生质体制备及再生的条件成为获得较高原生质体产量和较高再生率的最重要的因素^[4]。伏建国等(2005)^[5]报道(REMI)限制性内切酶介导整合转化用的原生质体低于 10^6 几乎得不到转化子。本试验中桃褐腐病菌原生质体的制备量均高于 10^6 , 基本可以满足进行 REMI 转化的需要, 但还有待更多试验来提高原生质体的制备效率。

本文对桃褐腐病菌(*M. fructigena*)原生质体的制备及再生条件的研究尚属首次, 通过试验得出: 桃褐腐病菌接入 Fries(1/2)液体培养基培养 24 h, 菌丝在 10 mg/mL 崩溃酶 + 5 mg/mL 纤维素酶 +

20 mg/mL 蜗牛酶 + 10 mg/mL 溶菌酶混合酶液中, 28°C 酶解 4 h 为桃褐腐病菌原生质体制备的最佳条件; 酶解 3 h 所获得的原生质体经 STC 等渗液预处理后, 涂 Fries(1/2)固体再生培养基上原生质体再生效果最好, 再生菌株培养性状无明显变化, 且依然具备侵染桃果实的能力, 发病率为 100%。

真菌原生质体制备最重要的是找到合适的酶系统对菌丝细胞壁进行酶解, 本试验首先利用崩溃酶、纤维素酶、蜗牛酶、溶菌酶 4 种酶单独对桃褐腐菌丝进行酶解, 但原生质体的产量不是很高, 继而采取正交试验的方法进行混合酶系统的筛选, 利用混合酶酶解桃褐腐病菌制备原生质体, 使桃褐腐病菌原生质体制备率得到了大幅度的提升。在混合酶正交试验 $L_9(3^4)$ 的结果中, 10 mg/mL 崩溃酶 + 5 mg/mL 纤维素酶 + 20 mg/mL 蜗牛酶 + 10 mg/mL 溶菌酶的组合原生质体产量最高, 达到 10.08×10^6 个/mL。试验结果经极差分析, 配比为 10 mg/mL 崩溃酶 + 10 mg/mL 纤维素酶 + 20 mg/mL 蜗牛酶 + 10 mg/mL 溶菌酶的组合在理论上原生质体产量应该最高, 而在 9 组试验中并无此配比, 所以进行了补充试验, 但所得结果表明 10 mg/mL 崩溃酶 + 10 mg/mL 纤维素酶 + 20 mg/mL 蜗牛酶 + 10 mg/mL 溶菌酶的组合并未使桃褐腐病菌原生质体产量高出 10 mg/mL 崩溃酶 + 5 mg/mL 纤维素酶 + 20 mg/mL 蜗牛酶 + 10 mg/mL 溶菌酶的组合, 因此 10 mg/mL 崩溃酶 + 5 mg/mL 纤维素酶 + 20 mg/mL 蜗牛酶 + 10 mg/mL 溶菌酶的组合依然为桃褐腐病菌原生质体制备的最佳酶系统。

PD、CM、Fries(1/2)、YPD 4 种液体培养基中 Fries(1/2)液体培养基培养的桃褐腐病菌原生质体产量最高, 原因可能是 Fries(1/2)成分中无机盐居多, 培养的菌丝利于酶解。

影响原生质体再生率的因素有等渗液的种类、固体再生培养基的成分以及菌丝酶解的时间等。经过对试验结果的分析发现, 以 STC 为等渗液时桃褐腐病菌原生质体再生率最高, 因为 STC 等渗液中含有山梨醇以及 Ca^{2+} , 山梨醇起到了稳定原生质体渗透压的作用, 而 Ca^{2+} 利于菌丝细胞壁的形成。

在供试的 5 种固体再生培养基上, Fries(1/2)固体再生培养基最利于桃褐腐病菌原生质体的再生, 再生率高达 6.38%。Fries(1/2)中含有蔗糖和 Ca^{2+} , 说明以蔗糖为碳源的培养基比较利于原生质体再生, Ca^{2+} 有利于桃褐腐病菌细胞壁的形成。

参 考 文 献

- [1] 陈笑瑜, 国立耘, 骆勇, 等. 桃褐腐病菌(*Monilinia fructicola*)对三种杀菌剂的敏感性. 植物保护, 2006, 32(3): 25-28.
- [2] 王正逸, 李德葆. 限制酶介导的插入突变及其在丝状真菌中的应用. 菌物系统, 2001, 20(1): 142-147.
- [3] 杨海清, 赵晓燕, 魏艳敏, 等. 拮抗细菌CE抑菌物质对桃褐腐病菌的抑制作用及其机制. 植物保护学报, 2008, 35(2): 290-291.
- [4] 张志光, 李东屏, 方芳, 等. 丝状真菌原生质体技术的研究——培养条件对原生质体的影响(VII). 湖南师范大学学报, 1998(6): 67-71.
- [5] 伏建国, 强胜, 朱云芝. 链格孢菌原生质体的制备与限制性内切酶介导整合(REMI)转化的致病性诱变. 菌物学报, 2005, 24(3): 407-413.
- [6] 谭周进, 肖启明, 肖克宇. 原生质体融合技术在微生物菌种选育中的应用. 生物技术, 2003, 13(1): 35-36.
- [7] 姚婷婷, 王正祥. 黑曲霉原生质体的制备、再生及转化条件. 食品与生物技术学报, 2006, 25(4): 116-120.
- [8] Wiebe MG, Novakova M, Miller L, et al. Protoplast production and transformation of morphological mutants of the quorn myco-protein fungus, *Fusarium graminearum* A3/5, using the hygromycin bresistance plasmid pAN7-1. *Micol Res*, 1997, 101(7): 871-877.
- [9] Gherbawy AY. Effect of gamma irradiation on the production of cell wall degrading enzymes by *Aspergillus niger*. *Food Microbiol*, 1998(40):127-131.

(上接 p.70)

征 稿 简 则

3.4 摘要写作注意事项

3.4.1 英文摘要:

1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免好多长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.4.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

4 特别说明

4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲) 或 GenBank (美国) 或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.) 后再投来。

4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的) 版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊网站上传电子版修改稿, 待编辑部复审后将给作者发送稿件录用通知单, 请作者将修改稿纸稿和签字盖章后的承诺书一并寄回编辑部, 按照稿号顺序进入排队发表阶段。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊及单行本。

6 联系我们

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>