

研究报告

## 灰葡萄孢侵染垫缺失突变体的筛选及其 相关生物学特性的研究

汤洁静<sup>1</sup> 范雷<sup>2</sup> 张静<sup>1\*</sup> 吴明德<sup>1</sup> 杨龙<sup>1</sup> 李国庆<sup>1</sup>

(1. 华中农业大学 农业微生物学国家重点实验室 湖北 武汉 430070)

(2. 武汉市武昌区园林局 湖北 武汉 430060)

**摘要:**【目的】从农杆菌介导获得的灰葡萄孢 RoseBC-3 的突变体库中筛选侵染垫缺失突变体菌株, 并明确其相关生物学特性。【方法】将菌株接种于洋葱表皮, 利用棉兰染色观察侵染垫形成情况, 筛选得到一个侵染垫缺失突变体(AT19)。采用形态学方法、离体叶片接种法、钉红染色法、小麦种子幼芽生长抑制法分别对该菌株的菌落培养性状、侵染垫产生情况、致病力、产果胶酶能力以及产植物毒性代谢产物能力进行测定。【结果】筛选灰葡萄孢突变体 168 株, 根据侵染垫形成可分为三类: 快速形成侵染垫型(158 株)、缓慢形成侵染垫型(9 株)和侵染垫形成缺陷型(1 株, AT19)。AT19 在接种洋葱 120 h 后依然无法形成成熟侵染垫。该菌株生长较为缓慢, 菌落扩展均匀, 可以产生分生孢子, 对烟草、草莓、蚕豆和豌豆叶片均不能致病, 可以产生果胶酶和植物代谢毒性物质。【结论】突变体菌株 AT19 可以产生果胶酶和植物代谢毒性物质, 其致病力缺失与侵染垫产生缺陷相关。研究结果为了了解灰葡萄孢侵染垫形成分子机制提供基础材料。

**关键词:** 灰葡萄孢, 侵染垫, 特性

### Screening and biological characterization of infection cushion-deficient mutants in *Botrytis cinerea*

TANG Jie-Jing<sup>1</sup> FAN Lei<sup>2</sup> ZHANG Jing<sup>1\*</sup> WU Ming-De<sup>1</sup> YANG Long<sup>1</sup> LI Guo-Qing<sup>1</sup>

(1. Huazhong Agricultural University, State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Wuhan, Hubei 430070, China)

(2. Bureau of Horticulture & Forestry Science of Wuchang District, Wuhan, Hubei 430060, China)

**Abstract:** [Objective] To screen infection cushion-deficient mutants in *Botrytis cinerea* strain RoseBC-3 transformed with *Agrobacterium tumefaciens*. [Methods] Mycelial plugs of *B. cinerea* were inoculated on onion epidermal strips, which were then incubated for 12 to 120 h, stained with Medan dye and finally examined with a light microscope. Colony morphology, formation of infection cushions, pathogenicity, and production of pectinase and toxic metabolites by the selected mutants were determined using routine methods. [Results] One hundred and sixty-eight transformed mutants of *B.*

基金项目: 国家公益行业(农业)科研专项项目(No. 201303025); 高等学校博士学科点专项科研基金新教师类资助课题项目(No. 20110146120032)

\*通讯作者: 信箱: zhangjing1007@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2015-01-21; 接受日期: 2015-04-10; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-04-24

*cinerea* were divided into three types: the rapid formation type (158 mutants), the slow formation type (9 mutants), and the defective formation type (only one isolate, namely AT19). On potato dextrose agar, isolate AT19 grew slowly, produced conidia and formed colonies with the normal appearance. However, it could hardly infect leaves of tobacco, strawberry, broadbean and pea, although it was detected to be able to produce pectinase and some toxic metabolites. **[Conclusion]** Formation of infection cushions appears important for *B. cinerea* to infect plant tissues.

**Keywords:** *Botrytis cinerea*, Infection-cushion, Characterization

植物灰霉病(Grey mould)是由葡萄孢属真菌(*Botrytis* spp.)侵染引起的世界性分布的真菌病害。目前已报道的葡萄孢属真菌种类多达 30 种,其中广寄主病菌灰葡萄孢危害最重,其他种类寄主范围较窄。蔬菜受灰霉病危害后,产量可降低 20%以上,甚至绝产。而自 20 世纪 80 年代后期,水果和蔬菜种植模式的快速发展更是加重了灰霉病的发生,茄果类、瓜类、葱韭类、浆果类果树都受到巨大的经济损失。可见,灰霉病是限制产量和品质的重要因素之一<sup>[1]</sup>。当前,生产上仍然没有持续有效并且稳定的防治措施。灰霉病菌的分生孢子是翌年病害的主要初侵染来源,其适应能力极强,借助气流、雨水、农事操作等进行传播和侵染危害。当分生孢子落到寄主植物表面,如果环境条件适宜就会萌发产生芽管,芽管伸长后会通过植物表面的气孔或伤口等孔口侵入植物组织<sup>[2]</sup>,芽管顶端形成类似附着胞的结构(Appressorium-like structures)——侵染垫,随后穿透寄主细胞壁侵染植物并在植物组织内扩展,引起病害发生<sup>[3-6]</sup>。现阶段,其他病原菌中与侵染垫形成相关的基因已有一定的研究,如: cAMP 腺苷酸环化酶基因 *sacI*<sup>[7]</sup>,  $\gamma$ -谷氨酰胺转移酶基因 *Ss-GgtI*<sup>[8]</sup>, 含假定  $Ca^{2+}$ 结合 EF-hand 功能域的分泌蛋白编码基因 *Ss-CafI*<sup>[9]</sup>。但是,灰葡萄孢侵染垫的形成机制还不清楚。本实验从农杆菌介导获得的灰葡萄孢 RoseBC-3 的突变体库中筛选得到一株不能形成成熟侵染垫的菌株,对该菌株的相关生物学特性进行了测定,有助于进一步研究灰葡萄孢侵染垫形成的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料和培养基

供试菌株:灰葡萄孢野生型菌株 RoseBC-3,实

验室 RoseBC-3 的突变体库<sup>[10]</sup>,所有菌株含有潮霉素抗性,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

供试植物:洋葱(*Allium cepa*),烟草(*Nicotiana tabacum*),草莓(*Fragaria ananassa*),蚕豆(*Vicia faba*),豌豆(*Pisum sativum*),品种不详。

培养基<sup>[11]</sup>:马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA, g/L):马铃薯 200.0,葡萄糖 20.0,琼脂 13.0;马铃薯葡萄糖培养液(PDB, g/L):马铃薯 200.0,葡萄糖 20.0;多聚半乳糖醛酸琼脂培养基:0.1%多聚半乳糖醛酸,1%琼脂, pH 4.2。

试剂:棉兰染色液:苯酚 20 g,乳酸 20 mL,甘油 40 mL,甲基蓝 0.05 g,蒸馏水 20 mL。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 侵染垫形成突变体的筛选:**在 PDA 平板上活化突变体菌株,待菌落直径达到约 5-7 cm 时,用打孔器打取菌落边缘菌饼(直径 6 mm)。用接种针挑取单个菌饼,接种到洋葱鳞茎片(大小为:4 cm×5 cm)上,每片洋葱鳞茎片接种 2-3 个菌饼,以不接菌的琼脂块为对照,20 °C 培养。每个菌株观察 3 个接种菌饼的洋葱鳞茎片,在菌饼周围用刀片划取 1 cm×1 cm 的小正方形,棉兰染色液染色后用镊子撕下表皮层,分别于 12、24、48、72、96、108 和 120 h 在显微镜下观察侵染垫形成情况<sup>[12]</sup>。

**1.2.2 侵染垫缺失突变体与野生型菌株的菌落培养性状观察:**将侵染垫缺失突变体菌株与野生型菌株分别接种到 PDA 平板上,待菌落直径达 5-7 cm,用打孔器打取菌落边缘菌饼(直径 6 mm)。用接种针将菌饼接种到新的 PDA 平板中央,20 °C 培养。每个菌株设置 5 个皿,逐日观察菌落形态的发展状况,同时,每隔 24 h 采用十字交叉法测一次菌落直径,菌落生长速度(mm/d)=(48 h 所测菌落直径 - 24 h 所

测菌落直径)/2, 15 d 后, 记录成熟的菌落形态, 随机挑选 50 个分生孢子测量大小, 随机挑选 20 根分生孢子梗测量长度。

**1.2.3 侵染垫缺失突变体与野生型菌株致病力的测定:** 将侵染垫缺失突变体菌株与野生型菌株分别接种到 PDA 平板上, 待菌落直径达 5–7 cm, 用打孔器打取菌落边缘菌饼(直径 6 mm)。用接种针挑取单个菌饼, 分别接种新鲜健康烟草、草莓、蚕豆和豌豆叶片, 烟草和草莓叶片上接种 2 个菌饼/片, 蚕豆和豌豆叶片上接种 1 个菌饼/片, 每个菌株 10 个接种点, 20 °C 培养 72 h, 测量病斑直径。

**1.2.4 侵染垫缺失突变体与野生型菌株侵染垫的显微观察:** 将侵染垫缺失突变体菌株与野生型菌株分别接种到 PDA 平板上, 待菌落直径达 5–7 cm, 用打孔器打取菌落边缘菌饼(直径 6 mm)。用接种针挑取单个菌饼接种到洋葱鳞茎片(大小为: 3 cm × 5 cm)上, 每片洋葱鳞茎片接种 1 个菌饼, 以不接菌的琼脂块为阴性对照, 20 °C 培养。每隔 12 h 采用棉兰染色法观察一次。每个菌株随机选取 5 片接菌的洋葱鳞茎片, 在 10×显微镜下, 随机选取的 5 个视野中统计 5 片洋葱鳞茎片上形成的侵染垫总数<sup>[11]</sup>。

**1.2.5 侵染垫缺失突变体与野生型菌株产果胶酶的能力:** 采用钉红染色法。将侵染垫缺失突变体菌株与野生型菌株分别接种于 PDA 平板, 待菌落直径达 5–7 cm, 用打孔器打取菌落边缘菌饼(直径 6 mm)。在多聚半乳糖醛酸琼脂培养基上十字交叉状摆放 4 片微孔滤膜(孔径 0.22 μm, 上海新亚净化器件厂), 在中央放滴有 20 μL 的浓度为 125 U/mL 的果胶酶标准品酶液(果胶酶标准品购自 Sigma 公司, 来自黑曲霉, P17389)的滤纸片(中速 102, 杭州新华纸业业有限公司)。微孔滤膜上接种待测菌株菌饼。45 °C 培养 24 h 后除去菌饼、滤纸片和微孔滤膜, 用 10 mL 0.03% (质量体积比)钉红溶液(现配现用)4 °C 染色 2 h, 水洗 15 min, 观察滤膜所在部位是否有透明圈产生<sup>[11]</sup>。每个菌株设置 5 个皿, 整个实验重复 3 次。

**1.2.6 侵染垫缺失突变体与野生型菌株产植物毒**

**性代谢产物的能力:** 采用小麦种子幼芽生长抑制的方法测定菌株产生植物毒性代谢产物的能力。将菌株分别在 PDA 平板上活化, 用打孔器打取菌落边缘菌饼(6 mm), 用接种针分别接种至含有 PDB 的三角瓶中(100 mL/瓶), 每瓶接 6 个菌饼, 每个菌株接种 5 瓶, 20 °C 黑暗静置培养 22 d, 滤纸过滤即得培养滤液。以无菌水和不接菌的 PDB 为对照, 20 °C 条件下黑暗浸泡小麦种子 8 h。然后在无菌条件下, 挑选饱满一致的小麦种子摆放在铺有并用培养滤液浸湿的两层定性滤纸的培养皿中, 20 °C 黑暗条件培养 72 h, 测定种子萌发个数和芽的长度<sup>[11]</sup>。每瓶处理有 5 个皿, 每个皿中摆放 20 粒小麦种子。芽萌发抑制百分率(%)=种子萌发个数×100/总种子个数。芽伸长抑制百分率(%)=[对照芽长-处理芽长]×100/对照芽长。

## 2 结果与分析

### 2.1 侵染垫形成突变体的筛选

经过筛选 168 个突变体菌株, 发现 158 个菌株在 12 h 后可形成完全成熟的侵染垫且在侵染垫周围形成透明的侵染菌丝(图 1A), 9 个菌株虽形成侵染垫的过程较为缓慢, 但在 24–48 h 后仍然可以形成成熟侵染垫(图 1B)。1 个菌株(AT19)在培养 120 h 后依然难以形成成熟侵染垫(图 1C)。

### 2.2 侵染垫缺失突变体与野生型菌株培养性状比较

野生型菌株 RoseBC-3 和突变体菌株 AT19 的培养性状存在一定差异(表 1, 图 2)。结果表明: 在 20 °C 条件下, 菌株 RoseBC-3 生长 4 d 后便能铺满整个皿, 第 4 天开始产生分生孢子, 15 d 后分生孢子极为浓密, 通常不产菌核, 但偶尔会形成较小黑色菌核 10–15 个; 菌株 AT19 则生长 5 d 铺满整个培养皿, 第 6 天开始产生分生孢子, 培养 15 d 后, 形成黑色菌核 2–6 个。

对突变体菌株 AT19 和野生型菌株 RoseBC-3 进行菌落生长速度的测定, 经过方差分析(SAS 8.1)发现两者在  $P < 0.05$ , 存在明显差异, 菌株 RoseBC-3

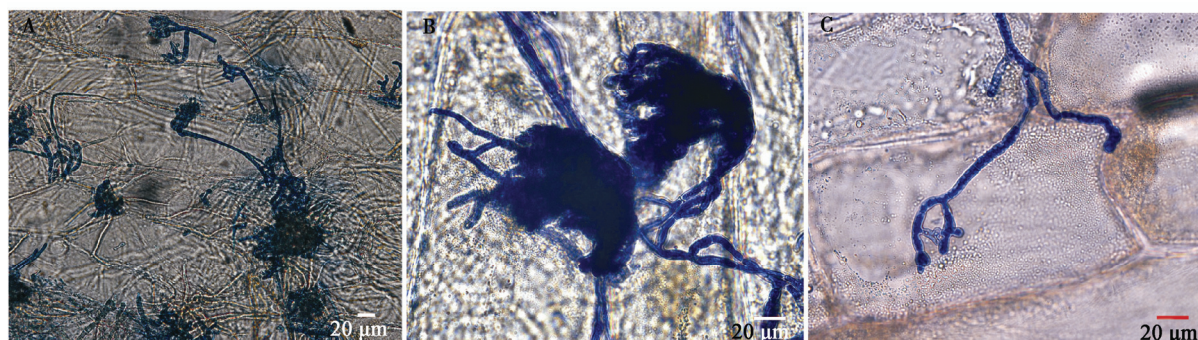


图 1 3 个突变体菌株在洋葱鳞茎上形成侵染垫比较(20 °C)

Figure 1 Comparison of formation of infection cushions by the three mutants of *Botrytis cinerea* on onion epidermal strips (20 °C)

注: A: 培养 12 h 形成成熟侵染垫的突变体; B: 培养 48 h 可以产生成熟侵染垫的突变体; C: 培养 120 h 后菌株 AT19 仍无法形成成熟侵染垫。

Note: A: A mutant formed mature infection cushions after 12 h; B: A mutant formed mature infection cushion after 48 h; C: Isolate AT19 did not form any mature infection cushions after 120 h.

表 1 野生菌株 RoseBC-3 和突变体 AT19 培养特性比较

Table 1 Comparison of the colony and morphological characteristics between strains RoseBC-3 and AT19

菌株 Strain	菌落 Colony	分生孢子 Conidia	分生孢子梗 Conidiophore	菌核 Sclerotium
RoseBC-3	形态规则, 圆形; 分生孢子密集; 菌落颜色深	单胞, 无色, 卵圆形或圆形; 大小为(13.96–10.47) μm × (20.94–17.45) μm (平均 16.47 μm × 13.35 μm)	细长, 有横隔, 顶端分枝, 末端着生小梗, 小梗上有分生孢子; 长度为 2 792.00–3 783.16 μm (平均 3 472.55 μm)	几乎不产菌核, 转代培养多次后偶尔会产菌核, 菌核大小约 0.15 cm × 0.20 cm
AT19	形态规则, 圆形; 分生孢子不密集; 菌落颜色较浅	单胞, 无色, 卵圆形或圆形; 大小为(10.47–8.73) μm × (20.94–14.66) μm (平均 15.12 μm × 11.10 μm)	细长, 有横隔, 顶端分枝, 末端着生小梗, 小梗上有分生孢子; 长度为 2 778.04–3 587.72 μm (平均 3 195.10 μm)	菌核较少, 皿中产小的不成熟菌核, 菌核大小约为 0.10 cm × 0.20 cm

菌落生长速度为 15.60 mm/d, AT19 则为 12.99 mm/d (图 3)。

### 2.3 侵染垫缺失突变体与野生型菌株致病力比较

离体叶片上接种 72 h 后, 野生型菌株 RoseBC-3 和突变体菌株 AT19 的致病力差异显著(图 4), 野生型菌株 RoseBC-3 在烟草、草莓、蚕豆、豌豆叶片上均可产生褐色至黑褐色病斑, 病斑直径平均值分别为: 29.9、16.5、16.4、15.7 mm。突变体菌株 AT19 接种的叶片都不产生病斑。

### 2.4 侵染垫缺失突变体与野生型菌株侵染垫产生数量比较

野生型菌株 RoseBC-3 和突变体菌株 AT19 在侵染垫形成方面差异显著。野生型菌株 RoseBC-3 接种洋葱鳞茎 12 h 即可产生成熟侵染垫, 周围形成透明的侵染菌丝, 突变体菌株 AT19 则接种洋葱 120 h 依然无法形成成熟侵染垫但可以形成少量未成熟侵染垫(图 1C)。

在侵染垫的产生数量上, 野生型菌株 RoseBC-3 接种洋葱鳞茎 12 h 和 24 h 形成成熟侵染垫的数量分别为 341 和 429 个, 突变体菌株 AT19 在接种 72、

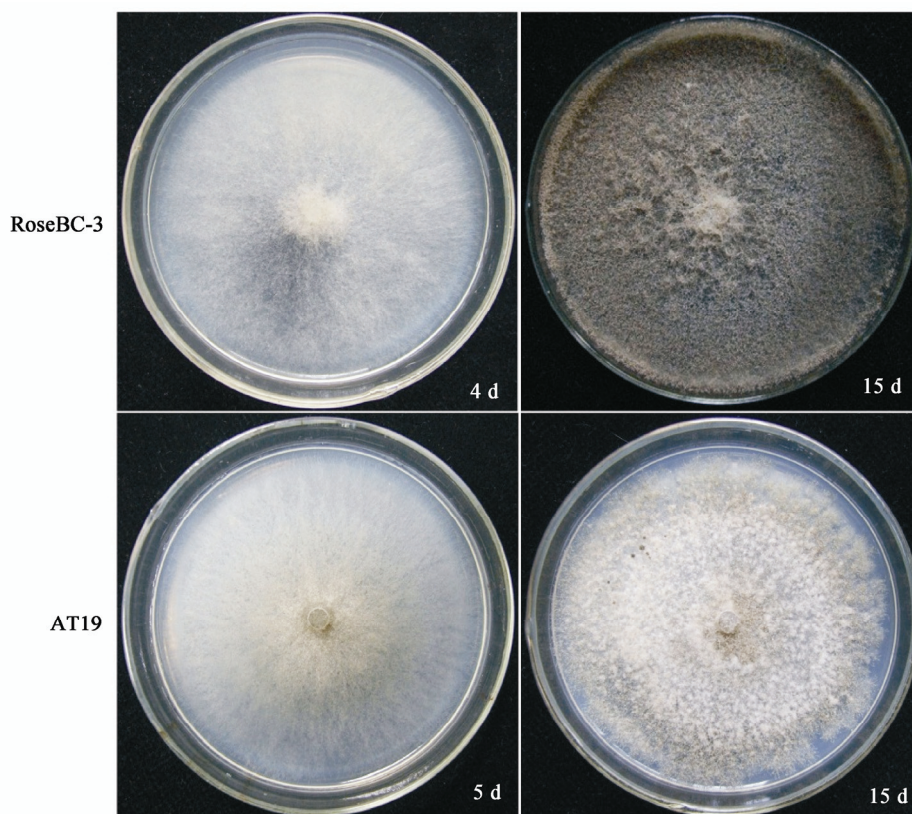


图2 菌株 RoseBC-3 和 AT19 在 PDA 培养基上形成的菌落比较(20 °C)  
Figure 2 Colonies of strains RoseBC-3 and AT19 formed on PDA at 20 °C

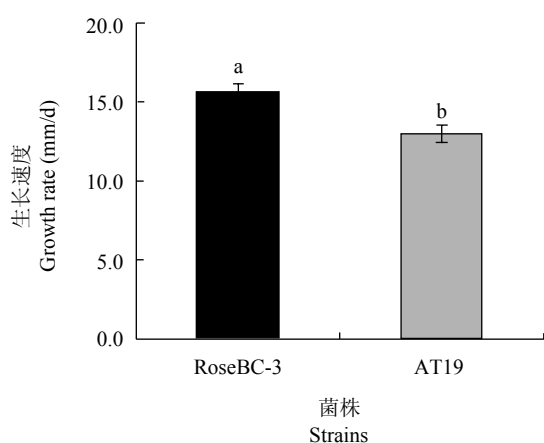


图3 菌株 RoseBC-3 和 AT19 的在 PDA 培养基上菌丝生长速度(20 °C)

Figure 3 Mycelial growth rates by strains RoseBC-3 and AT19 on PDA at 20 °C

注: 标有不同字母代表两者存在显著差异( $P < 0.05$ ).

Note: The bars with different letters indicate significant differences at  $P < 0.05$ .

96 h 和 120 h, 形成未成熟侵染垫数量分别为 9、6 和 11 个(图 5)。

### 2.5 侵染垫缺失突变体与野生型菌株产果胶酶能力的测定

定性测定的结果表明, 野生型菌株 RoseBC-3 和突变体菌株 AT19 的菌饼以及果胶酶标准品(CK)都可以在多聚半乳糖醛酸琼脂培养基上产生明显的透明圈(图 6)。由此表明, 突变体菌株 AT19 具有产生果胶酶的能力。

### 2.6 侵染垫缺失突变体与野生型菌株产植物毒性代谢产物能力的测定

用野生型菌株 RoseBC-3 和突变体菌株 AT19 的培养滤液处理小麦种子, 均能抑制小麦种子的萌发和芽伸长; 菌株 RoseBC-3 和 AT19 培养滤液中的植物毒性代谢物质对小麦种子的平均芽萌发抑制率分别为 13.98% 和 7.53%, 对小麦种子芽伸长

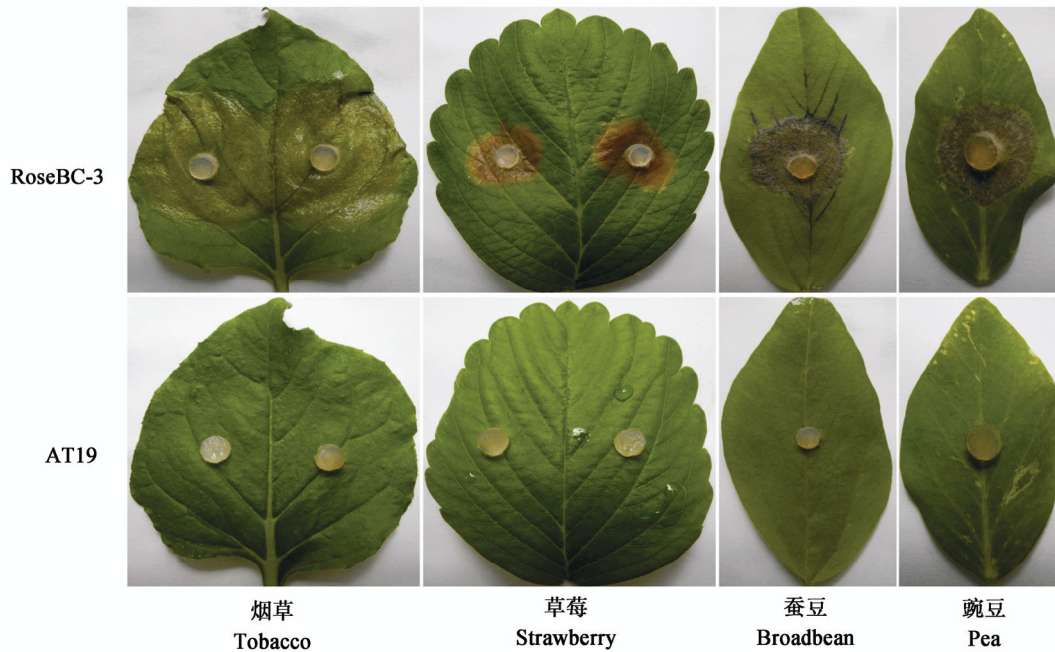


图 4 菌株 RoseBC-3 和 AT19 的致病力比较(20 °C, 72 h)  
Figure 4 Pathogenicity comparison between strains RoseBC-3 and AT19 (20 °C, 72 h)

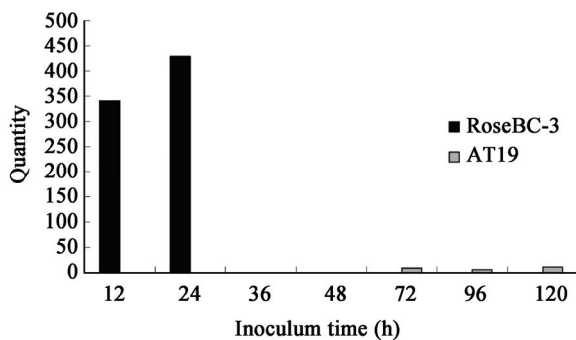


图 5 菌株 RoseBC-3 和 AT19 洋葱鳞茎上侵染垫形成数量  
Figure 5 Number of infection cushions formed by strains RoseBC-3 and AT19 of on onion epidermis

注: 菌株 AT19 在培养后 72-120 h 产生的侵染垫为未成熟的侵染垫。

Note: Isolate AT19 formed immature infection cushions after incubation for 72 to 120 h.

的平均抑制率分别为 52.90%和 48.39% (图 7)。经过 LSD 法方差分析(SAS 8.1), 在  $P < 0.05$  水平上, 野生型菌株 RoseBC-3 和突变体菌株 AT19 培养滤液处理小麦种子在芽萌发抑制百分率存在明显差异, 在芽伸长抑制百分率上没有差异。

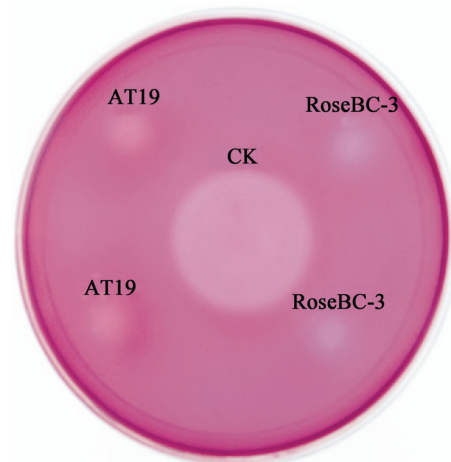


图 6 菌株 RoseBC-3 和 AT19 产生果胶酶比较  
Figure 6 Determination of pectinase produced by strains RoseBC-3 and AT19

### 3 结论

侵染垫是一种类似附着胞的“爪状”结构, 是灰葡萄孢侵染植物并致病的重要因素之一。经过透射电镜和扫描电镜观察, 灰葡萄孢菌丝顶端聚集形成侵染垫, 降解植物细胞壁以成功侵染<sup>[13]</sup>, 但侵染垫

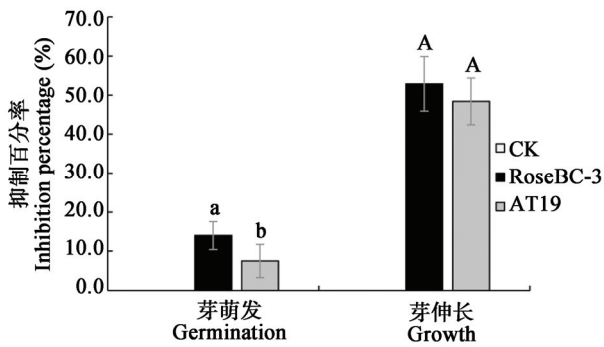


图 7 菌株 RoseBC-3 和 AT19 植物毒性代谢产物生物活性比较

Figure 7 Comparison of production of some toxic metabolites produced by strains RoseBC-3 and AT19

注: 菌株植物毒性代谢产物对小麦种子芽萌发和伸长的抑制百分率, 标有不同字母代表两者存在显著差异( $P < 0.05$ ).

Note: Inhibition of germination of wheat seeds and suppression of the following germ growth by the toxic metabolites produced by strains RoseBC-3 and AT19. Bars for each strain with different letters indicate significant difference at  $P < 0.05$ .

的形成机制目前没有完全清楚。近年来, 人们将 *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) 技术应用于真菌的遗传转化, 并借助所构建突变体库进一步研究基因功能。本文通过对灰葡萄孢 RoseBC-3 的 T-DNA 随机插入突变体库筛选, 得到一株侵染垫缺失突变体 AT19。

通过对侵染垫缺失菌株 AT19 和野生型菌株 RoseBC-3 的生物学特性比较, 发现两者存在一定差异。突变体菌株的生长速度较为缓慢, 分生孢子产量不高; 野生型菌株菌丝更为发达, 分生孢子梗长度, 分生孢子梗分枝上两者没有明显差异。此外, 两者都偶尔可以产生为数不多的菌核, 但菌核都基本不会长大, 直径在 0.1-0.3 cm 的范围内。尽管这两个菌株之间的生物学特性存在一定差异, 但由于灰葡萄孢种内存在丰富的多样性, 所以, 突变体菌株 AT19 应该在正常范围内。

突变体菌株与野生型菌株的致病力差异是极其显著的。20 °C 下培养 72 h, 接种野生型菌株的离体叶片可以产生病斑, 接种突变体菌株 AT19 的叶片则基本上没有病斑, 只是在接种菌饼周围有少量的菌丝。对菌株的侵染垫进行显微观察结果发

现: 野生型菌株 RoseBC-3 在接种的洋葱鳞茎上 12 h 便能够形成大量的“爪状”侵染垫结构, 侵染垫前端可以观察到透明的侵染菌丝。而突变体菌株 AT19 的菌丝尖端无法发育成为侵染垫, 一直到接种 120 h 都无法在洋葱鳞茎上观察到正常且成熟的侵染垫。此外, 对于侵染垫形成的数量统计结果也说明 AT19 不能形成成熟的侵染垫。这一结果也说明侵染垫缺失突变体菌株的致病力缺陷并非由于生长缓慢造成, 而与不能形成成熟侵染垫密切相关。

同时, 研究也对突变体菌株 AT19 产生果胶酶、毒素的能力进行了测定。灰葡萄孢的次生代谢产物是一类具有植物毒素活性的物质, 其中 Botcinolide 具有抑制芽萌发的活性, Botrydial 能够引起植物黄萎、细胞溃解, 从而利于穿透和定殖<sup>[14]</sup>。实验结果表明: 相比于野生型菌株, 突变体菌株 AT19 的毒力因子中, 植物毒性代谢产物和果胶酶的产生并未受到明显抑制。因此, 这一结果也间接说明了侵染垫在致病过程中的重要性。当然, 在毒素测定实验中, 没有排除培养滤液含有的 PDB 中丰富的营养对小麦种子的影响, 这是一个缺陷。此外, 也不排除其他致病因素的可能, 如: 漆酶、草酸以及其他小分子物质, 甚至是信号通路等。

现阶段, 只是简单研究了该侵染垫缺失突变体的生物学特性, 今后可以通过基因敲除和互补实验对该突变体 T-DNA 插入位点破坏的基因的功能进行研究和验证。这将有助于了解灰葡萄孢侵染垫形成的分子机制。

## 参 考 文 献

- [1] Yang YT. The research progress in infection and control of gray mold disease on vegetable in protected conditions of China[J]. *Agrochemicals*, 2003, 42(1): 6-10 (in Chinese)  
杨燕涛. 国内保护地蔬菜灰霉病侵染规律及防治技术研究进展[J]. *农药*, 2003, 42(1): 6-10
- [2] Staples RC, Mayer AM. Putative virulence factors of *Botrytis cinerea* acting as a wound pathogen[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1995, 134(1): 1-7
- [3] Sharman S, Heale JB. Penetration of carrot roots by the grey mould fungus *Botrytis cinerea* Pers. ex Pers[J]. *Physiological Plant Pathology*, 1977, 10(1): 63-64, IN33-IN39, 65-71
- [4] Garcia-Arenal F, Sagasta EM. Scanning electron microscopy of *Botrytis cinerea* penetration of bean (*Phaseolus vulgaris*) hypocotyls[J]. *Journal of Phytopathology*, 1980, 99(1): 37-42
- [5] Backhouse D, Willetts HJ. Development and structure of

- infection cushions of *Botrytis cinerea*[J]. Transactions of the British Mycological Society, 1987, 89(1): 89-95
- [6] Fullerton RA, Harris FM, Hallet IC. Rind distortion of lemon caused by *Botrytis cinerea* Pers[J]. New Zealand Journal of Crop Horticultural Science, 1999, 27(3): 205-214
- [7] Jurick WM, Rollins JA. Deletion of thadenylate cyclase (*sac1*) gene affects multiple developmental pathways and pathogenicity in *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. Fungal Genetics and Biology 2007, 44(6): 521-530
- [8] Li MY, Liang XF, Rollins JA. *Sclerotinia sclerotiorum*  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (*Ss-Ggt1*) is required for regulating glutathione accumulation and development of sclerotia a compound appressoria[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2012, 25(3): 412-420
- [9] Xiao XQ, Xie JT, Cheng JS, et al. Novel secretory protein Ss-Caf1 of the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* is required for host penetration and normal sclerotial development[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2014, 27(1): 40-55
- [10] Fan L, Zhang J, Yang L, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Botrytis cinerea* strain RoseBC-3[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2013, 32(2): 30-35 (in Chinese)
- 范雷, 张静, 杨龙, 等. 农杆菌介导灰葡萄孢菌株 RoseBC-3 的遗传转化[J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(2): 30-35
- [11] Zhang L, Wu MD, Li GQ, et al. Effect of *Mitovirus infection* on formation of infection cushions and virulence of *Botrytis cinerea*[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2010, 75(1/2): 71-80
- [12] Gourgues M, Brunet-Simon A, Lebrun MH, et al. The tetraspanin BcPls1 is required for appressorium-mediated penetration of *Botrytis cinerea* into host plant leaves[J]. Molecular Microbiology, 2004, 51(3): 619-629
- [13] Cao JB, Zhang J, Zhang L, et al. Ultrastructural observation on infection cushion of grey mould fungus penetration the leaf of oilseed rape[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2013, 32(6): 46-50 (in Chinese)
- 曹剑波, 张静, 张蕾, 等. 灰霉病菌侵染垫侵染油菜叶片的超微结构观察[J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(6): 46-50
- [14] Colmenares AJ, Aleu J, Durán-Patrón R, et al. The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of *Botrytis cinerea*[J]. Journal of Chemical Ecology, 2002, 28(5): 997-1005

(上接 p.2150)

## 征稿简则

### 3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 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, 写完后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。

3.3.2 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系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。

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。

## 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。

## 6 联系方式

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/wwxtbcn>