

## 籼稻明恢 63 成熟种子愈伤组织的诱导 及转基因水稻的抗性检测

王莉江 明小天 安成才\* 苑华毅 陈章良

(北京大学蛋白质和植物基因工程国家重点实验室 北京 100871)

**摘 要** 利用不含附加营养成分的 2 A-D 培养基(2mg/L)诱导明恢 63 的成熟种子 9 天预诱导后获得了大量的愈伤组织。利用基因枪辅助的土壤农杆菌转化法将天花粉蛋白(Trichosanthin, TCS)基因转入籼稻明恢 63 的愈伤组织,并通过再生(含有 3mg/L 6-BA, 0.5mg/L ABA 和 1mg/L NAA 的 N6 培养基)获得了转基因植物。Southern blot 分析和 Western blot 检测证明外源基因已经插入到 T0 代明恢 63 的基因组中并获得了表达。初步研究结果表明,转基因水稻对稻瘟病菌侵染具有抗性。

**关键词** 愈伤组织,再生,籼稻,天花粉蛋白,抗真菌

中图分类号 Q943.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)03-0323-04

水稻品种中有 80% 以上是籼稻品种。因此对籼稻品种进行遗传改良具有特别重要的意义。目前籼稻转基因工作有许多成功的报道。这些工作大多使用易于诱导愈伤组织,易于再生的未成熟胚作材料,而很少使用成熟种子<sup>[1]</sup>。从许多籼稻品种的成熟种子诱导愈伤组织非常困难,影响了其在转基因工作中的应用。籼稻明恢 63 是目前中国大田推广品种之一。我们使用一种简便的方法,即将明恢 63 的成熟种子先置于不含营养成分的培养基上进行预诱导,得到了大量的愈伤组织。利用该愈伤组织进行基因枪辅助的土壤农杆菌转化,将天花粉蛋白基因导入到明恢 63 的基因组中并获得了再生植株。

根据核糖体灭活蛋白的分子结构,它可分成两类:I 型(只有一条肽链)和 II 型(由 A、B 两条肽链通过二硫键组成)。其中 A 链与 I 型核糖体灭活蛋白相似,B 链则具有凝集素(Lectin)的活性<sup>[2]</sup>。核糖体灭活蛋白可以作用于真核生物核糖体大亚基中 rRNA 保守颈环上的特定位点,使核糖体被破坏,影响核糖体与 EF-2/GTP 复合物的结合,从而导致细胞中蛋白质合成的抑制<sup>[3~6]</sup>。

天花粉蛋白(Trichosanthin)是从栝楼(*Trichosanthes kirilowii*)的块根中提取出的中药天花粉的主要活性成分,它属于 I 型核糖体灭活蛋白。1990 年,

Chow 等首先从栝楼核 DNA 中分离得到了天花粉蛋白的全长基因,该基因没有内含子,编码 289 个氨基酸,其中包括 23 个氨基酸的信号肽和 19 个氨基酸的 3' 附加序列<sup>[7]</sup>。1992 年,我们实验室的鲍一明等人也克隆到了天花粉蛋白基因<sup>[8]</sup>,该序列和 Chow 发表的序列有 5 个核苷酸的差异,与 show 等由 mRNA 得到的天花粉蛋白 cDNA 序列有 6 个核苷酸的不同。研究发现,I 型核糖体灭活蛋白,如美洲商陆抗病毒蛋白(PAP)、香石竹毒蛋白(Dianthins)、天花粉蛋白对植物病毒具有抗性<sup>[9~11]</sup>;PAP、大麦、玉米等的核糖体灭活蛋白对于立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*),粗糙脉胞菌(*Neurospora crassa*)等真菌具有抑制作用<sup>[9,12~14]</sup>。我们还发现,利用大肠杆菌表达的天花粉蛋白在体外实验中对 9 种真菌的生长具有抑制作用<sup>[15]</sup>,而且转天花粉蛋白基因的烟草和粳稻分别对烟草赤星病菌(*Alternaria longipes*),稻瘟病菌(*Piricularia oryzae*)的侵染产生抗性<sup>[16]</sup>。在本论文中,我们将天花粉蛋白基因转入籼稻明恢 63 中,希望能得到增强对稻瘟病菌抗性的转基因籼稻。

### 1 材料和方法

#### 1.1 菌种和质粒

土壤农杆菌菌种 EHA105 由澳大利亚 Cambia 中

收稿日期 2001-11-12,修回日期 2002-03-01。

基金项目:国家重点基础研究发展规划 973 项目(No. G2000016204)和国家转基因植物研究与开发专项(No. J00-A-005)资助。

\* 联系作者。Tel: 86-10-62752405; Fax: 86-10-62751841; E-mail: chcaic@pku.edu.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

心的 Richard Jefferson 博士提供。菌种使用 LB 培养基培养后置于  $-70^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。pC1300-HY 质粒的构建同以前的报道<sup>[16]</sup> (质粒构成图见图 1)。稻瘟病菌为本实验室保存菌株 (*Pyricularia oryzae*)。

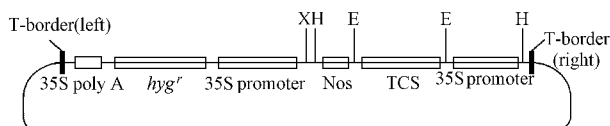


图 1 质粒 pC1301-HY 的示意图

Fig. 1 Construction of the plasmid pC1301-HY

35S promoter: Cauliflower mosaic virus 35S promoter; TCS: Trichosan-thin gene; Nos: Nos 3' terminator; *hyg<sup>r</sup>*: hygromycin<sup>r</sup>; 35S poly A: Cauliflower mosaic virus 35S poly A; T-border (Left): *Agrobacterium* T-DNA left border; T-border (Right): *Agrobacterium* T-DNA right border; E/H/X: Restriction enzyme *EcoR* I/*Hind*III/*Xba* I

## 1.2 土壤农杆菌感受态的制备和转化

1 mL EHA105 在液体 LB 培养液中  $28^{\circ}\text{C}$  培养 48 h 后转入 50 mL 新鲜 LB 培养基继续培养 3 h。于  $4^{\circ}\text{C}$  4000 r/min 离心 5 min, 去除上清后加入 8 mL 预冷的  $0.1\text{ mol/L}$   $\text{CaCl}_2$  和  $0.05\text{ mol/L}$   $\text{MgSO}_4$  重悬, 同上离心。去上清后再加入 0.8 mL 上述溶液混匀。取  $200\mu\text{L}$  感受态细胞, 加入  $5\mu\text{L}$  ( $0.5\mu\text{g}$ ) pC1300-HY 质粒冰上放置 40 min, 液氮冷冻 50 s 后立即放入  $42^{\circ}\text{C}$  水浴热击 90 s, 冰上放置 5 min。加入  $800\mu\text{L}$  LB 培养基于  $28^{\circ}\text{C}$  恢复培养 1 h。将培养后的菌铺在含  $50\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素的 LB 培养基上  $28^{\circ}\text{C}$  培养 2 d。

## 1.3 明恢 63 愈伤组织的诱导

明恢 63 成熟种子由中科院遗传所张文俊博士提供。种子去壳后消毒。接种在 3 种培养基上: (1) N6 培养基 (分别含  $2\text{ mg/L}$ ,  $3\text{ mg/L}$  或  $4\text{ mg/L}$  2, 4-D); (2) MS 培养基 2, 4-D 含量同上; (3) 蒸馏水加 8% 琼脂粉 ( $2\text{ mg/L}$  2, 4-D)。在 (1) 和 (2) 两种培养基上的种子经 3 d 暗培养后将盾片切下, 分别接种在相应的 N6 或 MS 培养基上继续暗培养。在 (3) 即蒸馏水培养基上培养的种子经 9 d 暗培养后将盾片切下接种到新鲜 MS 培养基 ( $2\text{ mg/L}$  2, 4-D) 上, 继续暗培养 4 周可以获得较好的愈伤组织。新生的愈伤组织转移到新鲜的 N6 培养基 ( $3\text{ mg/L}$  2, 4-D) 上, 每隔 4 周继代 1 次, 继代 2~3 次后获得的愈伤组织可用于转化。

## 1.4 基因枪辅助的土壤农杆菌法转化水稻

转化方法同以前的报道<sup>[17]</sup>。

## 1.5 转基因植株的再生

明恢 63 愈伤组织转化后去除头孢噻肟 (Cefotaxime), 然后转入预再生培养。在预再生 N6 培养基 ( $3\text{ mg/L}$  2, 4-D,  $5\text{ mg/L}$  ABA) 上光照培养 2 周后转

入另一预再生 N6 培养基 ( $2\text{ mg/L}$  BA,  $1\text{ mg/L}$  ABA), 经 4 周培养转移后即可出苗。待苗生根后转入不含激素的 MS 培养基中。以上所有培养基均需加入  $50\text{ mg/L}$  潮霉素 (Hygromycin) 进行筛选。

明恢 63 转基因植株再生条件的考察: (1) 预再生条件 预再生培养基选用不同浓度的 ABA, 并考察不同的预再生培养时间。预再生后均转入相同的再生培养基 ( $1\text{ mg/L}$  ABA,  $2\text{ mg/L}$  6-BA,  $1\text{ mg/L}$  NAA)。 (2) 再生条件 预再生培养基 ( $3\text{ mg/L}$  2, 4-D,  $5\text{ mg/L}$  ABA) 相同, 再生培养基选不同浓度的 ABA 和 NAA。

## 1.6 Southern blot 和 Western blot 检测

同以前的报道<sup>[16]</sup>。

## 1.7 抗真菌实验

稻瘟病菌孢子的获得同以前的报道<sup>[16]</sup>。待再生出的转基因水稻苗长出较多的根后将其移至土壤中。再继续生长 2 周后, 用浓度约为  $1.5 \times 10^6$  个/mL 的稻瘟病菌孢子悬浮液喷洒接种。每隔 3 d 喷 1 次, 共喷洒 2 次, 并保持植物置于高湿度的温室条件。

# 2 结 果

## 2.1 明恢 63 愈伤组织的诱导

利用明恢 63 成熟种子在 N6 或 MS 培养基上直接诱导愈伤组织非常困难。在 N6 和 MS 培养基 ( $2\text{ mg/L}$  或  $3\text{ mg/L}$  2, 4-D) 上直接从成熟种子诱导愈伤组织时, 种子盾片虽然在 2 周内迅速膨胀, 但 3 周后膨大的盾片由浅黄色变成白色致密形态, 显示出分化迹象。随后继续培养不再形成蓬松的愈伤组织形态。继代后即使提高 2, 4-D 浓度也无法获得满意的愈伤组织。而在  $4\text{ mg/L}$  2, 4-D 的培养基上诱导的膨大盾片组织边缘在 2~3 周内出现褐色而不能正常生长。只有在无盐无维生素无糖的蒸馏水 (含有  $2\text{ mg/L}$  2, 4-D) 培养基上进行愈伤组织预诱导, 才可以在 3 周内获得蓬松的愈伤组织。获得愈伤组织的频率为 47/112 (出愈伤种子数/接种种子数)。在此时将该愈伤组织转移到含  $3\text{ mg/L}$  2, 4-D 的 N6 培养基上继代 1~2 次 (每次 3 周) 即可用于基因转化。

## 2.2 愈伤组织的转化效率和转基因植株的再生

愈伤组织的转化效率见表 1。明恢 63 的转化效率最高可以达到 30%, 而最低只有 10%, 较中花 8 号稍低<sup>[17]</sup>。抗性愈伤组织去除 Cefotaxime 后转入预再生培养基培养 2 周, 其形态无重大改变。考察表明, 预再生条件选用  $3\text{ mg/L}$  2, 4-D 和  $5\text{ mg/L}$  ABA 处理 2 周, 则对以后的再生具有较好的效果 (见表 2)。而再生培养基除附加  $3\text{ mg/L}$  6-BA 外, 还须加入

0.5mg/L ABA 和 1mg/L NAA 则对再生有利。如再生培养基中只有 6-BA 时,愈伤组织可迅速出现绿点,但不再继续出芽(见表 3);有 6-BA 和 ABA 时,也几乎不出芽,加入 NAA 后,出芽率明显增加,其中含有 0.5mg/L ABA 和 1mg/L NAA 的组合为最佳。参见明恢 63 的转基因再生苗(文前彩图 Plate I-A),再生条件为 3mg/L 6-BA,0.5mg/L ABA 和 1mg/L NAA。

表 1 基因枪辅助的土壤农杆菌 EHA105/pC1300-HY 转化明恢 63 的转化效率

Table 1 The efficiency of *Agrobacterium* EHA105-mediated transformation with the help of bombardment (the plasmid pC1300-HY was transformed into calli of indica rice minghui 63)

| Total calli No. | Hyg <sup>r</sup> calli No. | Ratio/ % |
|-----------------|----------------------------|----------|
| 150             | 45                         | 30.0     |
| 131             | 32                         | 24.4     |
| 184             | 47                         | 25.5     |
| 207             | 21                         | 10.1     |
| 132             | 25                         | 18.9     |

表 2 预再生条件筛选 在含有相同 3mg/L 2 A-D 的条件下,不同浓度的 ABA 及预再生时间的比较

Table 2 Selection of pre-regeneration condition : comparison of different concentration of ABA and period of pre-regeneration with 3mg/L 2 A-D medium

| Concentration of ABA (mg/L) | Calli No. / bottle No. | Bottle No.                    |                               |                               |                               | Period of pre-regeneration /Weeks |
|-----------------------------|------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
|                             |                        | >3                            | 2                             | 1                             | 0                             |                                   |
|                             |                        | regenerated seedlings /bottle | regenerated seedlings /bottle | regenerated seedlings /bottle | regenerated seedlings /bottle |                                   |
| 2.5                         | 48/8                   | 0                             | 0                             | 0                             | 8                             | 2                                 |
|                             |                        | 0                             | 0                             | 0                             | 8                             | 3                                 |
|                             |                        | 0                             | 0                             | 1                             | 7                             | 4                                 |
| 5.0                         | 46/8                   | 3                             | 1                             | 0                             | 4                             | 2                                 |
|                             |                        | 3                             | 0                             | 1                             | 4                             | 3                                 |
|                             |                        | 0                             | 2                             | 1                             | 5                             | 4                                 |
| 7.5                         | 48/8                   | 1                             | 0                             | 1                             | 6                             | 2                                 |
|                             |                        | 0                             | 3                             | 1                             | 4                             | 3                                 |
|                             |                        | 0                             | 1                             | 2                             | 5                             | 4                                 |

表 3 再生培养基中 NAA 和 ABA 的组成比例对明恢 63 出苗的影响

Table 3 The effect of NAA/ABA ratio in medium on regeneration of indica rice minghui63 calli

| Concentration of NAA (mg/L) | Concentration of ABA (mg/L) | Bottle No.                    |                               |                               |                               |
|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|                             |                             | 0                             | 1                             | 2                             | >3                            |
| 0                           |                             | regenerated seedlings /bottle | regenerated seedlings /bottle | regenerated seedlings /bottle | regenerated seedlings /bottle |
|                             | 0                           | 10                            | 0                             | 0                             | 0                             |
|                             | 0.5                         | 10                            | 0                             | 0                             | 0                             |
|                             | 1.0                         | 9                             | 0                             | 0                             | 1                             |
| 1.0                         | 0                           | 7                             | 0                             | 2                             | 1                             |
|                             | 0.5                         | 4                             | 2                             | 0                             | 4                             |
|                             | 1.0                         | 5                             | 1                             | 1                             | 3                             |

2.3 转基因植物的分子检测

首先对转基因再生植株中的天花粉蛋白基因进

行了 PCR 检测(结果未显示),之后对 PCR 表现为阳性的 6 棵植株进行了 Southern blot 分析(彩图 Plate I-B)结果表明天花粉蛋白基因已经整合到明恢 63 的基因组中。转基因水稻的 Western blot 分析结果表明,天花粉蛋白在转基因水稻明恢 63 中得到了正常的表达(彩图 Plate I-C)。

2.4 转基因植物的抗真菌试验

经检测筛选的转基因阳性水稻 5 株(T0 代)和 6 株未转基因水稻苗(作为对照)分别用稻瘟病菌的孢子悬浮液喷洒感染,并保持在高湿的生长环境。接菌 7d 后,未转基因对照植株的叶片上出现可见的褐色稻瘟病斑,而在转基因植株叶片上观察到可见病斑至少要推迟 2d。接菌 2 周后对照植株和转基因植株叶片上的病斑扩散程度出现明显差异(彩图 Plate I-D)。在转基因植株叶片上的病斑数目少、扩散慢且病斑小,表现出对稻瘟病菌的侵染及其扩大感染的抗性增强。

3 讨 论

籼稻在水稻的组织培养和基因转化中较难操作,其原因是:1)从籼稻成熟种子诱导愈伤组织较难;2)籼稻愈伤组织的植株再生率较低。由于成熟种子取材容易,所以解决籼稻成熟种子的组织培养、基因转化及其再生技术,将对籼稻的分子育种及其品种改良具有现实意义。

按照通常的愈伤组织诱导方法,无论在 MS 或 N6 培养基上直接从明恢 63 的成熟种子中诱导愈伤组织都很困难。因此设计了一个预培养步骤,即先将明恢 63 种子在除 2 A-D 以外不含任何营养成分的培养基上萌发 9d,然后再转移到含 2 mg/L 2 A-D 的 MS 培养基上,可以在随后的 4 周内获得大量的愈伤组织。明恢 63 愈伤组织的转化效率从 10% 到 30% 不等,与 Hiei 等的报道相近<sup>[1]</sup>。另外,愈伤组织再生时需要在培养基中加入 1mg/L 的 NAA。

在成功地建立了从籼稻明恢 63 的成熟种子中诱导愈伤并获得再生苗的体系后,我们将天花粉蛋白基因转入明恢 63 的愈伤组织中,Southern blot 和 Western blot 分析证明了天花粉蛋白基因已整合到再生植株的基因组中并得到了表达。通过与转天花粉蛋白基因的粳稻中花 8 号的抗性特征比较<sup>[16]</sup>,转天花粉蛋白基因的籼稻明恢 63 对稻瘟病菌的感染同样具有抑制作用。这一结果进一步表明,在高等禾谷类作物中表达核糖体灭活蛋白基因能够增强作物对真菌病害的抗性,减轻真菌病害对作物的感染及

危害程度。天花粉蛋白的核糖体灭活功能使其在基因工程的应用中需要考察对宿主的毒性和生物安全性问题。虽然 Lam 等人<sup>[10]</sup>的报道显示天花粉蛋白基因对烟草宿主植物有一定的伤害,但是在我们的转基因水稻明恢 63 的生长过程中没有观察到与未转基因的水稻有明显的差异,而且我们以前关于转天花粉蛋白的中花 8 号水稻的研究中也没有发现天花粉蛋白影响转基因水稻的生长,种子成熟和结实率<sup>[17]</sup>。这可能是由于不同植物的核糖体对天花粉蛋白的敏感性不同或外源基因所插入位点的不同所致。在生物安全性方面可以通过选择保留原有抗真菌活性不变但免疫原性大大降低的突变体蛋白基因,以及选用幼苗发病期特异表达或组织特异性表达的启动子等方法来解决。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Hiei Y, Ohta S, Komari T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J*, 1994, **6**: 271 ~ 282
- [ 2 ] Luigi B, Maria G B, Fiorenzo S. Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1993, **1154**: 237 ~ 282
- [ 3 ] Brigotti M, Rambelli F, Zamboni M *et al.* Effect of  $\alpha$ -sarcin and ribosome-inactivating proteins on the interaction of elongation factors with ribosomes. *Biochem J*, 1989, **257**: 723 ~ 727
- [ 4 ] Stirpe F, Barbieri L, Battelli M G *et al.* Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Biotechnology*, 1992, **10**: 405 ~ 412
- [ 5 ] Taylor S, Massiah A, Lomonosoff G *et al.* Correlation between the activities of five ribosome-inactivating proteins in depurination of tobacco ribosomes and inhibition of tobacco mosaic virus infection. *Plant J*, 1994, **5**: 827 ~ 835
- [ 6 ] Endo Y and Tsunugi K. RNA-N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. *J Biol Chem*, 1987, **262**: 8128 ~ 8130
- [ 7 ] Chow T P, Feldman R A, Lovett M *et al.* Isolation and DNA sequence of a gene encoding  $\alpha$ -trichosanthin, a type I ribosome-inactivating protein. *J Biol Chem*, 1990, **265** (15): 8670 ~ 8674
- [ 8 ] BAO Y M (鲍一明), CHU R Y (储瑞银), HAN J H (韩晋华) *et al.* Cloning and sequencing of the gene encoding trichosanthin and its expressing in *E. coli* and transgenic tobacco. *Science in China Ser. B (中国科学 B 辑)*, 1992, **9**: 944 ~ 950
- [ 9 ] Pinger W, Oleg Z, Nilgun E T. Reduced toxicity and broad spectrum resistance to viral and fungal infection in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein II. *Plant Mol Biol*, 1998, **38**: 957 ~ 964
- [ 10 ] Lam Y H, Wang Y S, Wang B *et al.* Use of trichosanthin to reduce infection by turnip mosaic virus. *Plant Science*, 1996, **114**: 111 ~ 117
- [ 11 ] Hong Y, Saunders K, Hartley M R *et al.* Resistance to geminivirus infection by virus-induced expression of dianthin in transgenic plants. *Virology*, 1996, **220**: 119 ~ 127
- [ 12 ] Robert L, Henrik T, Ib S *et al.* Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. *J Biol Chem*, 1991, **266** (3): 1564 ~ 1578
- [ 13 ] Guido J, Birgit G, John M *et al.* Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J*, 1995, **8** (1): 97 ~ 109
- [ 14 ] Maddaloni M, Forlani F, Balmas V *et al.* Tolerance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* AG4 of transgenic tobacco expressing the maize ribosome-inactivating protein b-32. *Transgenic Research*, 1997, **6**: 393 ~ 402
- [ 15 ] HU H (胡苹), AN C C (安成才), LI Y (李毅) *et al.* Prokaryotic expressed trichosanthin and other two proteins has anti-fungal activity *in vitro*. *Acta Microbiologica Sinica (微生物学报)*, 1999, **39** (3): 234 ~ 240
- [ 16 ] Ming X T, Wang L J, An C C *et al.* Resistance to rice blast (*Pyricularia oryzae*) caused by the expression of trichosanthin gene in transgenic rice plants transferred through agrobacterium method. *Chinese Science Bulletin*, 2000, **45** (19): 1774 ~ 1778
- [ 17 ] Ming X T, Yuan H Y, Wang L J *et al.* Agrobacterium-mediated transformation of rice with help of bombardment. *Acta Botanica Sinica*. 2001, **43** (1): 72 ~ 76

## Callus Induction and Regeneration from Mature Seeds of Indica Rice Minghui 63 and Anti-fungal Assay of Transgenic Rice Plants

WANG Li-Jiang MING Xiao-Tian AN Cheng-Cai\* YUAN Hua-Yi CHEN Zhang-Liang

(National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, College of Life Science, Peking University, Beijing 100871, China)

**Abstract** A large number of callus from mature seeds of indica rice minghui 63 were obtained through pre-induction on medium with 2mg/L 2,4-D but without inorganic and organic components for 9 days. Trichosanthin gene was transferred into indica rice minghui 63 by using agrobacterium with the help of bombardment and the transgenic plants were obtained by inducing regeneration. Southern and Western blot analysis showed that the trichosanthin gene had been transferred into genome of minghui 63 and expressed in rice plants. The anti-fungal assay suggested that transgenic rice plants enhanced resistance to infection of *Pyricularia oryzae*.

**Key words** callus induction, regeneration, indica rice, trichosanthin, anti-fungal

Received: 11-12-2001

This work was supported by the Special Funds for Major State Basic Research "973" of China (No. G2000016204) and the Special Project of Research and Development of China (No. J00-A-005).

\* Corresponding author. Tel: 86-10-62752405; Fax: 86-10-62751841; E-mail: chencan@pku.edu.cn

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