

实时定量 PCR 法预测禾谷丝核菌 *Rhizoctonia cerealis* 基因组大小

张春燕^{1,2} 李伟² 孙海燕² 邓渊钰² 张爱香² 陈怀谷^{2*} 王志伟^{1*}

(1. 南京农业大学 生命科学学院 江苏 南京 210095)

(2. 江苏省农业科学院植物保护研究所 江苏 南京 210014)

摘要:【目的】准确测定基因组大小是进行禾谷丝核菌 *Rhizoctonia cerealis* 全基因组序列测定和拼接的基础, 本研究旨在利用实时定量 PCR 方法预测禾谷丝核菌的基因组大小。【方法】首先克隆了禾谷丝核菌 R0301 菌株翻译延伸因子 A 基因(*tef A*)的部分序列, Southern 杂交明确该基因在该病菌基因组中为单拷贝。以已测序立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*) AG1-IA 融合群菌株 GD118 为对照, 采用实时定量 PCR 的方法进行了禾谷丝核菌基因组大小的预测。【结果】实时定量 PCR 的方法可以比较准确的测定立枯丝核菌基因组的大小, 研究首次预测了禾谷丝核菌的基因组大小位于 32.2–36.6 Mb 之间。【结论】实时定量 PCR 法是一种快速和简便的预测丝核菌基因组大小的方法。

关键词: 禾谷丝核菌, 基因组大小, 翻译延伸因子 A, 单拷贝, 实时定量 PCR

Genome size estimation of *Rhizoctonia cerealis* with quantitative real-time PCR

ZHANG Chun-Yan^{1,2} LI Wei² SUN Hai-Yan² DENG Yuan-Yu² ZHANG Ai-Xiang²
CHEN Huai-Gu^{2*} WANG Zhi-Wei^{1*}

(1. College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

(2. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014, China)

Abstract: [Objective] Understanding the genome size of *Rhizoctonia cerealis* is the basis for the genome sequencing and assembly. In this study, we estimated the genome size of *R. cerealis* via the quantitative real-time PCR method. [Methods] The partial translation elongation factor A gene (*tef A*) of *R. cerealis* strain R0301 was cloned and sequenced. Southern blot analysis indicated *tef A* was a single copy in the genome. Finally, we used the quantitative real-time PCR method to calculate the genome size of *R. cerealis* strain R0301 with the sequenced *R. solani* AG1-IA strain GD118 as the control. [Results] The quantitative real-time PCR method could accurately determine the genome size of *R. solani* and the genome size of *R. cerealis* R0301 was between 32.2–36.6 Mb. [Conclusion]

基金项目: 国家小麦产业体系项目(No. CARS-3-1-17)

*通讯作者: 陈怀谷; Tel: 86-25-84390386; 信箱: huaigu@hotmail.com

王志伟; Tel: 86-25-84395531; 信箱: zwwang@njau.edu.cn

收稿日期: 2013-12-09; 接受日期: 2014-01-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-09

Quantitative real-time PCR was a fast, highly accurate and reliable method for the genome size estimation of *Rhizoctonia*.

Keywords: *Rhizoctonia cerealis*, Genome size, Translation elongation factor A, Single copy, Real-Time quantitative PCR

丝核菌(*Rhizoctonia*)类群庞大,分布极广,其中大多数类群是植物病原菌,可造成多种植物的严重病害^[1-3]。按照菌丝体内细胞核的数量,可分为单核、双核和多核丝核菌;按照菌丝融合的情况,被分为不同的融合群^[2-4]。由双核 AGD 融合群禾谷丝核菌(*Rhizoctonia cerealis*)侵染小麦引起的纹枯病是世界各温带小麦种植区常见病害,可导致小麦严重减产^[5]。由于耕作栽培制度的改变和感病品种的应用,小麦纹枯病已成为我国长江中下游和黄淮麦区的重要病害^[6-8]。

近几十年来,国内外学者在禾谷丝核菌组成^[3]和病害防治^[6]等方面开展了较多的研究,但对禾谷丝核菌的基因组研究较少。Zheng 等采用高通量测序技术对一个引起水稻纹枯病的多核丝核菌 AG1-IA 融合亚群的菌株进行了全基因组测序,并组装出 36.94 Mb 的该病菌全基因组框架图^[9]。另外 Schlüter 等对引起生菜根腐病的多核丝核菌 AG1-IB 融合亚群的 7/3/14 菌株进行了全基因组测序,并组装出 48.51 Mb 的该病菌基因组草图^[10]。

基因组大小,也叫“C”值,指单倍体中 DNA 含量或是碱基对的数量,是生物的基本特征,在物种分类、鉴定和进化等方面有重要意义^[11]。基因组大小的测定方法有多种,脉冲场凝胶电泳较适合于测定原核生物或单细胞真核生物等基因组较小的物种^[12]。测定细胞内 DNA 磷含量的方法因很难获得纯的 DNA 样品和容易混入其他来源的磷而导致测定结果偏高^[13]。流式细胞术法目前国际上还没有统一的测量 DNA 含量的标准参照物,且采用不同的核荧光染料所检测出的结果也有明显差异^[14]。Wilhelm 等运用实时荧光定量 PCR (Real-Time qPCR)技术,通过基因组 DNA 样品中单拷贝基因的绝对定量,来测定基因组大小^[15]。这种方法对于多种真核生物基因组大小的测定结

果都是准确、有效的^[16]。

本研究选择了翻译延伸因子 A (*tefA*)基因,克隆了禾谷丝核菌该基因的部分序列,并用 Southern 杂交试验证实该基因在基因组中为单拷贝。运用实时荧光定量 PCR 方法预测了禾谷丝核菌 R0301 的基因组大小,研究旨在为禾谷丝核菌全基因组测序和拼接等提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌

禾谷丝核菌菌株 R0301 (AG-D 融合群)以及丝核菌 AG1-IA、AG1-IB、AG1-IC、AG3、AG5、AG6、AG9、AG-G 和 AG-K 等融合群标准菌株由本实验室保存。水稻纹枯病菌 GD118 (AG1-IA 融合亚群)菌株由华南农业大学周而勋教授馈赠。

1.2 DNA 提取

刮取约 100 mg 在铺有玻璃纸的 PDA 平板上培养 6 d 的菌丝体,采用植物基因组 DNA 提取试剂盒(QIAGEN)提取基因组 DNA,提取的 DNA 通过琼脂糖凝胶电泳后溴乙锭染色,紫外灯下显色。运用核酸蛋白仪 BIOMATE 3S (THERMO, 美国)测定所有样品的浓度和纯度。每一样品的浓度测定 3 次。

1.3 *tefA* 基因部分序列的克隆和测序

真菌样品的模板为基因组 DNA,扩增序列为翻译延伸因子基因部分序列。上游引物 EF983F 的序列为 5'-GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT-3'、下游引物 1953R 序列为 5'-CCRGCRACRGTRTG TCTCAT-3' (Rehner 2001),扩增产物 1 048 bp 用于探针和标准品制备。反应体系总体积为 25 μ L,其中模板 DNA 1 μ L,上下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 2.5 μ L 10 \times Buffer (50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris HCl, pH 8.8), 5 μ L Mg²⁺ (25 mmol/L), 2 μ L dNTPs (0.25 mmol/L), 0.25 μ L *Taq* (5 U/ μ L)。PCR 反应条

件为: 95 °C 5 min ; 95 °C 45 s , 56 °C 45 s , 72 °C 45 s , 共 35 个循环 ; 72 °C 15 min。PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳 30 min (120 V) , EB 染色 , 凝胶成像系统观察拍照。试剂盒方法切胶回收和克隆转化后 , 进行序列测定。本研究获得的序列用 BioEdit 软件比对分析。同一融合群可以分为不同的融合亚群 , 所以本研究也分析了 AG1 的 3 个融合亚群和 AGB 的两个融合亚群^[3]。根据序列比对结果 , 以 MEGA 4.0 软件构建最大简约系统发育树。

1.4 Southern 杂交

禾谷丝核菌全基因组 DNA (约 50 μg) 经 *EcoR* I 酶切过夜后在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳 (20 V, 16 h) 分离 , 然后转移到硝酸纤维素膜上用于 Southern 杂交分析。地高辛标记 PCR 扩增的 *tef A* 序列 , 胶回收约 1 048 bp 产物用作探针。在杂交液中加入探针 , 48 °C 温和振荡孵育 17 h。杂交和严谨洗涤后加入新鲜配制的底物显色液 室温黑暗中静置孵育 16 h , 出现斑点时用 50 mL ddH₂O 或 TE 缓冲液终止反应。

1.5 Real-Time qPCR

根据已克隆的 *tef A* 基因的部分序列 , 进行荧光定量 PCR 的引物设计 , 设计准则为 : 引物 T_m 值控制在 60±1 °C , 长度为 18–25 bp , GC 含量为 40%–60% , PCR 扩增产物大小为 60–150 bp。用普通 PCR 和实时荧光定量 PCR 验证引物的扩增效果。实时荧光定量 PCR 反应体系为 20 μL , 其中上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.4 μL , DNA 模板 1 μL , ROX reference dye (50×) 0.4 μL , SYBR Premix Ex *Tap*TM (2×) 10 μL , 以双蒸水补足总反应体积。使用 *iQ*TM SYBR Green Supermix (Bio-Rad) 法进行 PCR 反应 , PCR 反应条件为 : 95 °C 1 min ; 95 °C 30 s , 60 °C 30 s , 72 °C 30 s , 共 45 个循环 , 最后收集熔解曲线 , 即 60 °C 10 s , 每个循环增加 0.5 °C , 共 80 个循环。每个样品 3 个梯度 , 每个梯度样品和标准品均重复 3 次。实时荧光定量 PCR 反应结束后 , 运用 View Post-Run Data 模块自动产生分析回归曲线、相关系数以及待测样品拷贝数。使用 ABI StepOne 荧光定量 PCR 仪 (美国) 进行荧光定量 PCR。

1.6 基因组大小的计算

C 值是模板 DNA 的质量 (m , 由紫外分光光度法测定) 与目标序列拷贝数 (N , 由实时 PCR 测定) 的比值 : $C = m \times N^{-1}$ 。基因组大小 , 也就是单倍体基因组中碱基对的数量 , 通过以下公式计算得到 : $G = C \times NA \times M_{Bp}^{-1}$, NA 是阿伏伽德罗常数 , M_{Bp} 是碱基的平均摩尔质量 (660 g/mol)^[15]。

2 结果与分析

2.1 禾谷丝核菌 *tef A* 基因部分序列的测定

用真菌翻译延伸因子 A 基因通用引物从禾谷丝核菌 R0301、立枯丝核菌 AG1-IA 融合亚群菌株 GD118 以及本实验室保存的其他融合群标准菌株中都能扩增到一条大小为 1 kb 左右的单一片段。克隆测序后获得了一条大小为 1 048 bp 左右的序列 , BLAST 分析结果表明与该序列相似性较高的大多为担子菌门伞菌纲真菌 *tef A* 基因的部分序列。应用丝核菌不同融合群标准菌株的 *tef A* 基因序列 , 对这些丝核菌进行系统发育学分析 , 结果表明 , *tef A* 基因可以用于丝核菌的系统进化分析 , 能够很好地把多核丝核菌和双核丝核菌区分开来 , 且可以区分融合亚群 (图 1)。

2.2 禾谷丝核菌基因组中 *tef A* 基因拷贝数

将待测禾谷丝核菌的 DNA 样品与标记的核酸探针进行杂交 , 在与探针有同源序列的固相 DNA 的位置上显示出一个较强的杂交信号 , 大小接近 2 kb。结果表明 , 该基因在禾谷丝核菌基因组中为单拷贝 (图 2)。

2.3 禾谷丝核菌基因组大小的预测

根据荧光定量 PCR 的引物设计原则设计了引物并进行了筛选。PCR 验证的结果表明 , 根据 *tef A* 基因保守区域设计的引物对 RTEF1f (5'-AATCGG TCCTCGCTCCACT-3')/RTEF1r (5'-TCTCCTTGCC TTCCTCTTGG-3') , 所扩增的特异序列长度为 140 bp 左右 , 可以很好地对丝核菌进行扩增 (图 3)。

荧光定量 PCR 检测 , 扩增完成后观察 C_t 值和熔解曲线 , 当模板为丝核菌 DNA 时 , 荧光信号明

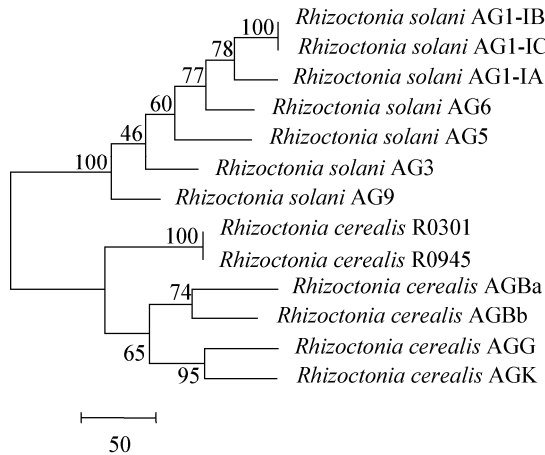


图1 禾谷丝核菌与其他丝核菌基于翻译延伸因子A基因的最大简约系统发育树(MP)

Figure 1 The phylogenetic analysis of *tefA* from *Rhizoctonia cerealis* and other *Rhizoctonia* AGs, the tree was built using the maximum parsimony method

注：分支点上的数字为 Bootstrap 值，代表分类单位被聚在一起的几率；比例尺显示水平线的长度，代表碱基替换数。

Note: The numbers of nodes indicate bootstrap values, and represent the percentages of 1 000 bootstrap replications in which the taxa to the right are placed together. The scale bar represents the horizontal branch lengths and the number of substitutions per nucleotide position.

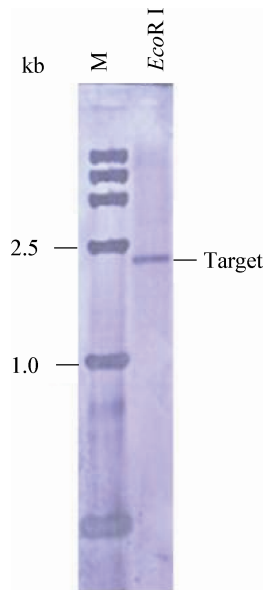


图2 禾谷丝核菌 *tefA* 基因的 Southern 杂交分析

Figure 2 A Southern hybridization analysis of *Rhizoctonia cerealis tefA*

Note: Target: The band detected with the *tefA* probe.

显，溶解曲线峰单一($T_m=82\text{ }^\circ\text{C}$)，且峰值较高(图4)；无模板对照(ddH₂O)没有扩增或30个循环之后微量扩增可以证明扩增是基因组的扩增，没有其他杂质污染(图5)。对荧光定量扩增产物进行电泳分析，产物也是单一的目的条带。结果表明该对引物可以用于禾谷丝核菌和其他丝核菌的荧光定量PCR反应。

禾谷丝核菌 R0301 菌株的实时定量 PCR 扩增效率为 0.952，标准曲线为 $y=-3.444x+38.003$ ，其相关系数为 0.999，3 个不同浓度重复测定的禾谷丝核菌基因组大小分别为 32.2、33.8 和 36.6 Mb。3 个浓度重复测定得到的立枯丝核菌 1-IA 融合群菌株 GD118 菌株的基因组大小分别为 36.6、37.4 和 38.2 Mb；AG1-IB 标准菌株基因组大小为 49.1、50.0 和 52.4 Mb (表 1)。

3 讨论

近几年来，随着测序技术的快速发展，约 75 种广义真菌或菌物的基因组测序工作已经组装完成或正在组装。基因组信息对全面了解物种的分子进化、系统发生学及基因功能研究等方面有着非常重要的意义^[17-19]。尽管基因组测序取得很大进步，但仍存在一些技术挑战。重复序列是装配基因组序列数据中存在的最大困难^[20-22]。而基因组大小预测有助于全基因组测序数据拼接、测序成本的降低^[23]。

自 Wilhelm 等首次提出实时荧光定量 PCR 技术来预测基因组大小以来，很多研究者运用此方法进行基因组大小的估测。如 Mounsey 等通过荧光

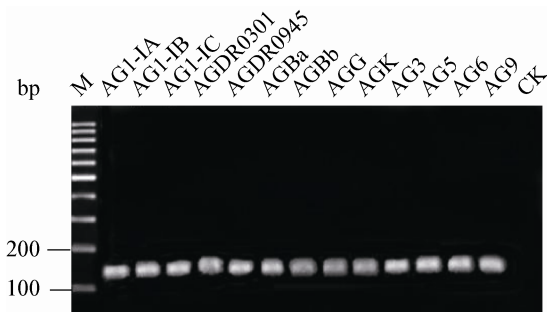


图3 实时定量 PCR 引物对于不同丝核菌的特异性扩增
Figure 3 Real-Time PCR primer specificity for *Rhizoctonia*

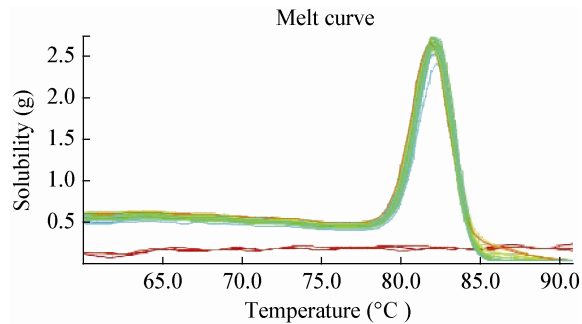


图 4 禾谷丝核菌 R0301 的实时定量 PCR 溶解曲线
Figure 4 Real-Time PCR melting curve of *Rhizoctonia cerealis* R0301

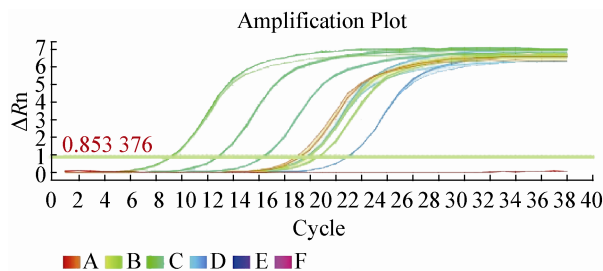


图 5 R0301 的实时扩增曲线用于定量禾谷丝核菌基因组 *tefA* 的数量

Figure 5 Real-Time PCR amplification curves used for quantification of the *tefA* sequence from *R. cerealis*

注: 标准品的扩增曲线从左到右依次是 10^8 , 10^7 , ..., 10^4 。标准品右边第二条位置为样品的扩增, 每条曲线 3 个重复。水平线确定 C_T 值。

Note: The curves obtained for the standards with (from left to right) 10^8 , 10^7 , ..., 10^4 . The curves for the genomic sample is in the second to the right. Each curve repeated three times. The threshold for the determination of the C_T values is indicated by the horizontal line.

定量 PCR 技术以单拷贝核基因 *EF1* 的定量来研究散光螨的基因组大小, 结果证明这种方法快速、可靠^[24]。Jeyaprakash 和 Hoy 等也以此基因的定量对捕食螨 *Metaseiulus occidentalis* 的基因组大小进行预测^[25]。另外 Park 和 kim (2012) 也运用荧光定量 PCR 技术通过对单拷贝己糖激酶基因进行定量来预测菜蛾盘绒茧蜂 (*Cotesia plutellae*) 的基因组大小。*tefA* 在不同的物种中基因序列保守性较好, 被广泛地用来进行种系发生分析^[26]。且其在很多生物中以单拷贝方式存在, 也很适合用于荧光定量 PCR 技术进行基因组大小的估测。本研究运用实时荧光定量 PCR 的方法以 *tefA* 的绝对定量来预测禾谷丝核菌的基因组大小。通过 Southern 杂交分析明确禾谷丝核菌基因组中 *tefA* 基因为单拷贝, 说明 *tefA* 基因可用于该病菌基因组大小的预测。

本研究测定了已完成基因组测序的 AG1-IA 融合亚群 GD118 菌株的基因组, 其大小在 36.6–38.2 Mb, NCBI 上已公布该菌株基因组大小为 36.94 Mb, 其大小在我们预测的范围内。估测 AG1-IB 融合亚群标准菌株的基因组大小为 49.1–52.4 Mb, Wibberg 等(2013)报道的其中一个菌株 7/3/14 基因组大小为 48.51 Mb, 也与本研究所估测的相近。说明实时荧光定量 PCR 方法所预测的基因组大小与实际基因组大小较接近。

NCBI 上已公布了很多真菌的基因组大小, 其中本文预测的禾谷丝核菌 R0301 的基因组大小与

表 1 预测的 3 个丝核菌菌株的单倍体基因组大小

Table 1 Estimated haploid genome sizes of three strains of *Rhizoctonia*

样品 Sample	样品浓度 Sample concentration (mg/L)	产物长度 Product length (bp)	标准曲线(R^2) Calibration curve	目标拷贝数 Target copies (μ L)	C value (pg)	Γ (Mb)
R0301	10.0	135	$y = -3.444x + 38.003$ (0.999)	2.83×10^5	0.035	32.2
	6.7			1.83×10^5	0.037	33.8
	4.5			1.12×10^5	0.040	36.6
GD118 (AG1-IA)	14.0	135	$y = -3.49x + 33.835$ (0.998)	3.49×10^5	0.040	36.6
	8.2			1.96×10^5	0.042	38.2
	4.8			1.17×10^5	0.041	37.4
(AG1-IB)	12.0	135	$y = -3.543x + 39.440$ (1.000)	2.09×10^5	0.057	52.4
	5.0			0.93×10^5	0.054	49.1
	2.1			0.38×10^5	0.055	50.0

Fusarium graminearum PH-1 (36.35)和 *Rhizoctonia solani* GD118 (36.94)的较接近, 与伞菌纲真菌 *Laccaria bicolor* (64.88)和 *Cryptococcus neoformans* (19.05)的相差较大。有研究人员认为基因组大小与生物体复杂性、系统发育等关系不大, 称之为“C值谜”^[27]。

获得禾谷丝核菌的遗传学和病原学信息需要进行全基因组测序工作, 而禾谷丝核菌是双核的, 测序和拼接存在很大困难。因此基因组大小的预测是测序工程关键的一步。本研究运用实时荧光定量PCR技术首次研究了禾谷丝核菌的基因组大小, 对于物种分类、鉴定、系统发育和其致病机制等方面有重要意义, 也是全基因组测序和拼接的基础, 同时对于研究病原菌与植物互作也有一定的意义。

参 考 文 献

- [1] 李华荣. 丝核菌的菌丝融合群及其遗传多样性研究的新进展[J]. 菌物系统, 1999, 18(1): 100-107.
- [2] Sharon M, Kuninaga S, Hyakumachi M, et al. The advancing identification and classification of *Rhizoctonia* spp. using molecular and biotechnological methods compared with the classical anastomosis grouping[J]. Mycoscience, 2006, 47(6): 299-316.
- [3] Sharon M, Kuninaga S, Hyakumachi M, et al. Classification of *Rhizoctonia* spp. using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic basis of the classical anastomosis grouping[J]. Mycoscience, 2008, 49(2): 93-114.
- [4] Li W, Sun H, Deng Y, et al. The heterogeneity of the rDNA-ITS sequence and its phylogeny in *Rhizoctonia cerealis*, the cause of sharp eyespot in wheat[J]. Current Genetics, 2014, 60(1): 1-9.
- [5] Hamada MS, Yin Y, Chen H, et al. The escalating threat of *Rhizoctonia cerealis*, the causal agent of sharp eyespot in wheat[J]. Pest management science, 2011, 67(11): 1411-1419.
- [6] 刘朝晖, 张旭, 陆维忠. 小麦纹枯病的研究进展和对策[J]. 江苏农业学报, 2000, 16(3): 185-190.
- [7] 陈怀谷, 方正, 陈厚德, 等. 小麦纹枯病菌的分子检测[J]. 植物保护学报, 2005, 32(3): 261-265.
- [8] 陈莹, 李伟, 张晓祥, 等. 中国北纬 33 度地区小麦纹枯病菌的群体组成及致病力研究[J]. 麦类作物学报, 2009, 29(6): 1110-1114.
- [9] Zheng A, Lin R, Zhang D, et al. The evolution and pathogenic mechanisms of the rice sheath blight pathogen[J]. Nature communications, 2013, 4: 1424.
- [10] Wibberg D, Jelonek L, Rupp O, et al. Establishment and interpretation of the genome sequence of the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani* AG1-IB isolate 7/3/14[J]. Journal of Biotechnology, 2013, 167: 142-155.
- [11] 朱泽远, 杨杰, 施用晖, 等. SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 法测定中华绒螯蟹基因组大小[J]. 江苏农业科学, 2007, 164(5): 56.
- [12] Kaewkong W, Imtawil K, Maleewong W, et al. Genome size estimation of liver fluke *Opisthorchis viverrini* by real-time polymerase chain reaction based method[J]. Parasitology International, 2012, 61(1): 77-80.
- [13] Park B, Kim Y. Genome size estimation of an endoparasitoid wasp, *Cotesia plutellae*, using quantitative real-time polymerase chain reaction[J]. Journal of Asia-Pacific Entomology, 2012, 15(3): 349-353.
- [14] Johnston JS, Bennett MD, Rayburn AL, et al. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei[J]. American Journal of Botany, 1999, 86(5): 609-613.
- [15] Wilhelm J, Pingoud A, Hahn M. Real-time PCR-based method for the estimation of genome sizes[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(10): e56.
- [16] Gao J, Scott JG. Use of quantitative real-time polymerase chain reaction to estimate the size of the house-fly *Musca domestica* genome[J]. Insect Molecular Biology, 2006, 15(6): 835-837.
- [17] Hsiang T, Baillie DL. Issues in comparative fungal genomics[J]. Applied Mycology and Biotechnology, 2006, 6: 99-122.
- [18] 周建芬, 曾昭清, 高元钢, 等. 真菌基因组数据库概况[J]. 微生物学通报, 2008, 35(8): 1311-1318.
- [19] 刘万飞, 王西亮, 赵宇慧, 等. 基于第二代测序技术的细菌基因组与转录组研究策略简介[J]. 微生物学通报, 2011, 38(11): 1705-1714.
- [20] Wendel JF. Genome evolution in polyploids[M]. Berlin: Springer Netherlands, 2000(42): 225-249.
- [21] 余知和, 高元钢, 曾昭清, 等. 真菌基因组学研究进展[J]. 菌物学报, 2008, 27(5): 778-787.
- [22] Lynch M, Conery JS. The origins of genome complexity[J]. Science, 2003, 302(5649): 1401-1404.
- [23] Gregory TR. Synergy between sequence and size in large-scale genomics[J]. Nature Reviews Genetics, 2005, 6(9): 699-708.
- [24] Mounsey KE, Willis C, Burgess STG, et al. Quantitative PCR-based genome size estimation of the astigmatid mites *Sarcoptes scabiei*, *Psoroptes ovis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*[J]. Parasites & Vectors, 2012, 5(1): 1-7.
- [25] Jeyaprakash A, Hoy MA. The nuclear genome of the phytoseiid *Metaseiulus occidentalis* (Acari: Phytoseiidae) is among the smallest known in arthropods[J]. Experimental and Applied Acarology, 2009, 47(4): 263-273.
- [26] Geiser DM, del Mar Jiménez-Gasco M, Kang S, et al.

FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying Fusarium[M]. Berlin: Springer Netherlands, 2004: 473-479.

[27] Gregory T. Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma[J]. Biological Reviews, 2001, 76(1): 65-101.

~~~~~  
(上接 p.1863)

## 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。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。

## 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>