植物学通报 *Chinese Bulletin of Botany* 2007, **24** (2): 147–153, www.chinbullbotany.com

·研究论文·

松材线虫携带一株荧光假单胞菌分泌毒素的初步研究

尹永华[1], 郭道森[2], 赵博光[3*], 杜希华[1], 赵遵田[1], 李荣贵[2*]

[1] 山东师范大学生命科学学院, 济南 250014; [2] 青岛大学生物系, 青岛 266071;

[3] 南京林业大学森林环境与资源学院, 南京 210037

摘要 本文研究了离体情况下松材线虫携带的致病菌一株荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens* GcM5-1A)在LB、NB和PD三种培养基中的毒性, 以及产生的毒素对黑松(*Pinus thunbergii*)切根苗和悬浮细胞的效应。结果显示, 菌体在LB和NB培养液的毒性较高, 其中 LB培养液的毒性最高, 且培养液的pH值为7时比pH值为5时毒性高, 而该菌在PD培养基中几乎不产毒。细菌培养液经硫酸铵分级沉淀, 得到了主要含有50 kDa蛋白的蛋白组分, 该蛋白组分对黑松悬浮细胞和切根苗均有较高的毒性, 并能改变黑松悬浮细胞细胞膜的透性, 导致胞内可溶性糖和游离氨基酸外渗。

关键词 松材线虫, 一株假单胞菌, 毒素

尹永华, 郭道森, 赵博光, 杜希华, 赵遵田, 李荣贵 (2007). 松材线虫携带一株荧光假单胞菌分泌毒素的初步研究. 植物学通报 **24**, 147–153.

松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)病是松树的一种毁灭性病害, 主要由松墨天牛(*Monochamus alternatus*)传播, 可危害多种松属(*Pinus*)植物。由于该病的发生和发展涉及寄主(松树)、媒介昆虫(主要是松褐天牛(*Monochamus alternatus*))、松材线虫以及微生物(细菌和真菌)等多种生物因素, 而这些因素之间关系复杂, 从而给致病机理的研究增加了难度。

松材线虫病的发病机理一直以来是林业领域研究的热点。松材线虫病是由松材线虫单一病原造成的单病原学说在森林病理学领域一直占主导地位(Mamiya, 1983; Myers, 1988; 杨宝君, 2002)。但是很多现象用松材线虫单一病原说很难或不能解释, 已有的研究证实松材线虫虫体经表面灭菌后即丧失了其致病性(Kawazu, 1997)。早在20世纪80年代初, Oku(1980)就观察到在患病组织的树脂道内和薄壁组织中有大量细菌存在。之后, 有关线虫携带细菌并且由细菌产生毒性物质导致松树致病的机理得到越来越多的证实(Kawazu, 1996,1997,1998,1999)。郭道森等(2002)证实感病黑松组织中分离到的每条线虫平均携带290个细菌。赵博光等(2003)通过扫描电镜直接观察到松材线虫虫体携带大量细菌。Zhao等(2003)对呈现松材线虫病典型症状的黑松和马尾松(*Pinus massoniana*)的病样, 采用病木组织分离法, 分离获得松材线虫所携带的细菌菌株24株, 利用传统的细菌鉴定方法和自动快速鉴定系统相结合, 对24个菌株进行了鉴定, 其中假单胞菌属(*Pseudomonas*)有11株, 泛菌属(*Pantoea*)有6株, 还有不解糖消化链球菌(*Peptostreptococcus asaccharolyticus*)、河生肠杆菌(*Enterobacter amnigenus*)、乡间步丘菌(*Buttiauxella agrestis*)和粘质沙雷菌(*Serratia marcescens*)。利用黑松无菌切根苗致萎生测方法测定的结果表明: 这24种细菌中的17种有不同程度的致萎能力, 所有11种假单胞菌属的菌株对无菌黑松切根苗均有致萎活性(Zhao, 2003)。综合以上研究, 赵博光等(2003)提出了松材线虫病是松材线虫和其携带细菌复合侵染性病害, 并且可通过抗生素控制致病细菌的方法控制该病。

收稿日期: 2006-07-18; **接受日期**: 2006-12-25

基金项目: 国家自然科学基金(No.30430580)和青岛市科技发展计划项目(No.05-1-JC-96)

* **通讯作者**。E-mail: boguangzhao@yahoo.com; lrg@qdu.edu.cn

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-236

Oku(1979)根据接种松材线虫后松树迅速枯萎的特点,首先提出发病过程可能涉及毒素。Mamiya(1980)也指出,染病松树薄壁组织和泌脂细胞在松材线虫侵害之前就已经发生变性和死亡,说明毒素参与了病理学变化。目前已经从感病松树中分离得到了以下几种毒素:苯甲酸、邻苯二酚、2-氢松柏醇、2-羟基香芹鞣酮、10-羟基马鞭草烯酮、苯乙酸和2-甲氧基肉桂酸(Oku, 1979, 1988, 1990)。

Oku(1979)在研究松材线虫病毒素时,曾怀疑致蔫毒素是由一种与松材线虫有关的假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)产生的。Kusunoki(1987)用电子显微镜观察松材线虫病的感病组织时,发现受到破坏的树脂道内和薄壁组织细胞间存在大量细菌,细胞壁酶解类型与细菌引起的病害相似。Kawazu(1990)推测松材线虫的共生菌可能是松材线虫病的致病原因。此后,他从松材线虫上分离得到了3种致病细菌:枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)和巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*),并且分离鉴定出这3种菌所产生的毒性物质为苯乙酸。

本文对松材线虫携带的一株荧光假单胞菌所产生的毒素进行研究,并对细菌的生长及产毒条件进行了初步探讨,以此来探讨松材线虫携带的细菌在松材线虫病发生和发展中的作用,为进一步研究松材线虫病的致病机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

南京林业大学提供的从松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)虫体上分离得到的一株荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens* GcM5-1A)。

1.2 黑松愈伤组织培养

组织培养参照Zhao(2003)的方法进行。挑选饱满的黑松种子,除去硬皮,浸泡于无菌水中1-2天,换水1-2次。将泡好的种子放在50 mL的烧杯中,用75%的乙醇表面消毒45秒,然后用0.1%的升汞溶液处理4分钟,无菌水冲洗5次。在超净工作台上无菌操作剥除胚乳,取出成熟的胚,接入愈伤组织诱导培养基上(1/2MS培养基,附加0.5 mg·L^{-1} NAA、0.1 mg·L^{-1} IBA、1.0 mg·L^{-1} GA_3、1.0 mg·L^{-1} 2,4-D、100 mg·L^{-1} LH和30 mg·L^{-1}蔗糖,pH值调至5.86),置于27 °C的温箱中黑暗培养。培养2周左右,选取未褐变的愈伤组织进行继代培养。

1.3 黑松幼苗培养

将黑松种子用蒸馏水冲洗5次后,放入0.1%的升汞溶液中浸泡10-15分钟。再用无菌水冲洗5次,然后平摆于铺有3层无菌滤纸的大培养皿中并用无菌水湿润,盖上盖,放在27 °C的温箱中催芽。每隔3-4天加1次水,每周换1次无菌滤纸。待胚根长到3-4 cm长时,移到灭菌珍珠岩中,先置于27 °C的光照培养箱培养,后置于室温培养,根长至7-8 cm时取出备用。

1.4 细菌培养

取斜面培养的*P. fluorescens* GcM5-1A两环接种于30 mL LB液体培养基中,30 °C培养24小时,各取30 μL分别接种于30 mL的LB、NB和PD培养基中,同样的条件下继续培养24小时。

1.5 细菌培养液对黑松悬浮细胞毒性的测定

细菌培养液经17172×*g*离心20分钟,取上清。分别取400 μL的黑松愈伤组织单细胞悬浮液加入具塞无菌试管中,加入上述上清液100 μL。分别以加入100 μL未接种细菌的LB、NB和PD培养基的细胞悬液为对照,27 °C恒温培养。定期取样,细胞用双醋酸盐荧光素进行染色后,荧光显微镜下统计细胞死亡率,具体方法参照赵博光等(2005)建立的荧光染色显微生测法。每次统计100个细胞。

1.6 细菌培养液对黑松切根苗毒性的测定

无菌条件下,选择茎长的苗,将黑松幼苗用刀片在其根茎相接处切开。取盖上有孔的(使黑松幼苗刚好插入)无菌Eppendorf管,加入150 μL的待测溶液,放入光照培养

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-236

箱内28 °C进行光照培养, 每24小时观察1次, 记录萎蔫情况。每组测定50 株幼苗。

1.7 细菌培养液中毒蛋白的毒性分析

细菌培养液4 °C、15 093×*g* 离心20 分钟, 取上清进行硫酸铵分级沉淀。分别取20%、20%-60% 饱和度的沉淀, 用蒸馏水溶解。对大量蒸馏水透析过夜后, 用Amicon Ultra超滤浓缩管(5 kDa)浓缩。浓缩液用无菌水稀释到一定浓度后用于对黑松悬浮细胞和切根苗的毒性分析。

1.8 蛋白质浓度的测定

用考玛斯亮蓝法测定蛋白质浓度, 蒽酮比色法测定可溶性糖, 茚三酮比色法测定游离氨基酸的浓度。详细步骤参照张志良(1990)的方法。

2 结果分析

2.1 不同培养基的产毒情况

松材线虫携带的一株假单胞菌在3种培养基中均能良好的生长。实验结果表明: 3种培养基对细菌的产毒情况明显不同, 其中在PD培养基中供试菌的培养液无论对黑松悬浮细胞还是对黑松切根苗都几乎没有毒性; 而LB和NB培养基本身对这2种实验材料均有一定毒性, 但细菌培养液的毒性明显高于对照。处理2天后, LB培养液中悬浮细胞的死亡率较对照高2.09倍, 黑松切根苗的死亡率较对照高1.03倍; NB培养液中悬浮细胞的死亡率较对照高0.33倍, 黑松切根苗的死亡率较对照高0.67倍。

2.2 培养基pH值对细菌产毒条件的影响

以LB作为细菌生长的培养基, 实验结果表明: 培养基pH值对细菌生长影响不大, 却对产毒情况有明显的影响, pH7.0的培养液的毒性明显高于pH5.0的培养液。用pH7.0的培养液处理3天后, 悬浮细胞的死亡率已达88%, 而用pH5.0的培养液处理相同时间的悬浮细胞其死亡率仅为44%。用切根苗为材料进行的实验也得到了相似的结果, 用pH7.0的培养液处理3天后, 黑松切根苗的萎蔫率已达74%, 而用pH5.0的培养液处理3天后, 黑松切根苗的萎蔫率为34%。

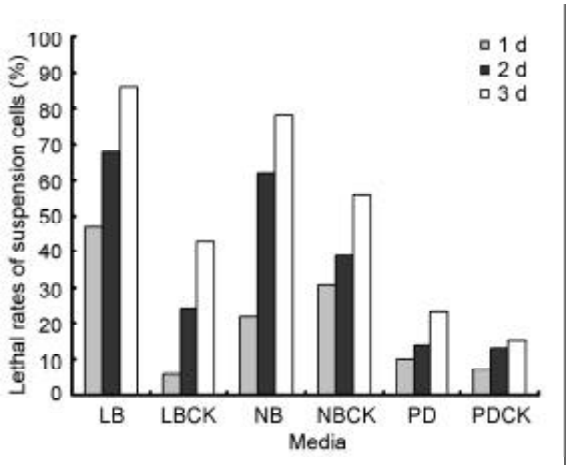

图1 不同培养基培养荧光假单胞菌的培养液对黑松悬浮细胞的毒性

Figure 1 Toxicities of different media cultures of *Pseudomonas fluorescens* GcM5-1A to Japanese black pine suspension cells

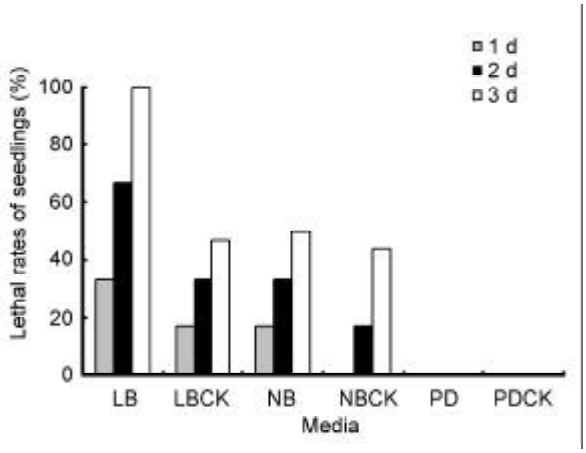

图2 不同培养基培养荧光假单胞菌的培养液对黑松幼苗的毒性

Figure 2 Toxicities of different media cultures of *Pseudomonas fluorescens* GcM5-1A to Japanese black pine seedlings

2.3 细菌培养液中蛋白组分的初步纯化

为了研究培养液中毒素的化学本质, 假单胞菌的LB培养

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-236

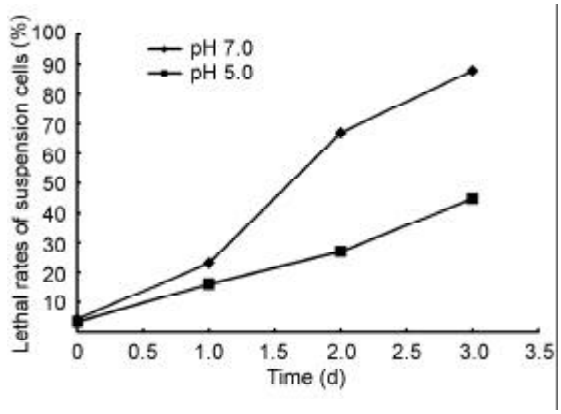

图3 不同pH值的LB培养基的细菌培养液对黑松悬浮细胞的毒性

Figure 3 Effect of pH values of LB medium on the toxicities of cultures to Japanese black pine suspension cells

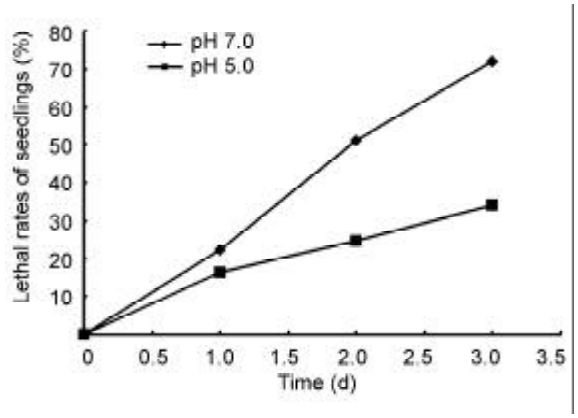

图4 不同pH值的LB培养基的细菌培养液对黑松幼苗的毒性

Figure 4 Effect of pH values of LB medium on the toxicities of cultures to Japanese black pine seedlings

液分别经饱和硫酸铵、20%饱和度的硫酸铵和20%-60%饱和度的硫酸铵沉淀, 沉淀溶解后对蒸馏水透析脱盐, 然后进行SDS-PAGE分析, 并分别测定其对黑松悬浮细胞和切根苗的毒性。结果表明: 3种处理方式得到的样品均对实验材料产生很强的毒性, 说明该假单胞菌分泌的毒素中有部分是蛋白质。SDS-PAGE分析结果显示, 细菌分泌的胞外蛋白主要是分子量为50 kDa蛋白,20%饱和度的硫酸铵可将部分该蛋白沉淀, 所得样品中其它杂蛋白量已非常少。活性分析结果显示: 初步纯化的该蛋白对黑松悬浮细胞和切根苗均具毒性(图6, 图7), 推测该蛋白可能是细菌分泌的一种毒素。此外, 由图8可以看出, 60%饱和度的硫酸铵沉淀出的蛋白毒性

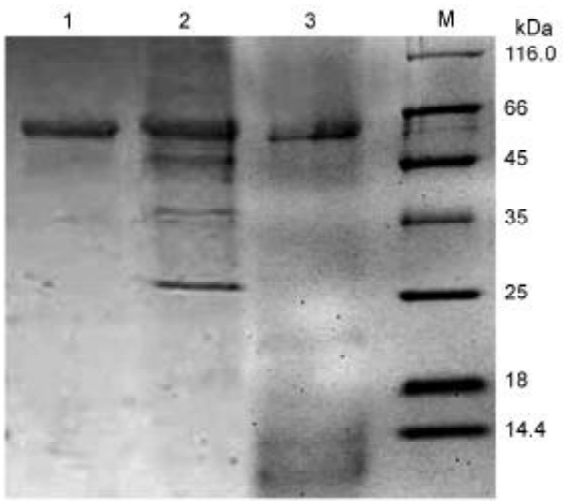

图5 荧光假单胞菌培养液及初步纯化蛋白的SDS-PAGE分析

1: 20%饱和度硫酸铵沉淀的蛋白; 2: 60%饱和度硫酸铵沉淀的蛋白; 3: 荧光假单胞菌培养液; M: 蛋白标准

Figure 5 SDS-PAGE analysis of total proteins in the culture of *Pseudomonas fluorescens* GcM5-1A and primarily purified proteins

1: Proteins precipitated by ammonium sulfate of 20% saturation; 2: Proteins precipitated by ammonium sulfate of 60% saturation; 3: Culture of *Pseudomonas fluorescens* GcM5-1A; M: Protein marker

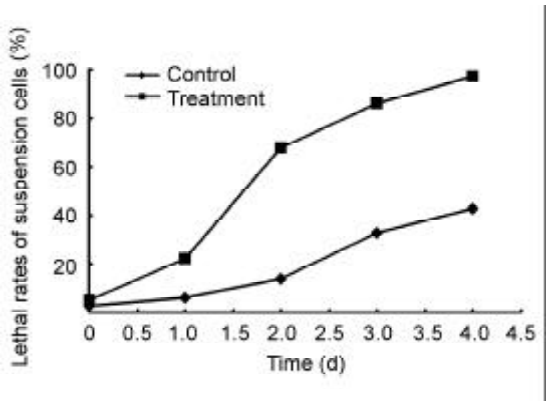

图6 初步纯化的50 kDa蛋白对黑松悬浮细胞的毒性

Figure 6 Toxicity of the primarily purified 50 kDa proteins to Japanese black pine suspension cells

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-236

比 20% 饱和度的硫酸铵沉淀出的蛋白毒性稍强。

2.4 初步纯化的50 kDa蛋白对悬浮细胞膜通透性的影响

2.4.1 毒蛋白对悬浮细胞可溶性糖外渗的影响

悬浮细胞经毒蛋白处理后, 导致胞内可溶性糖的大量外渗, 胞外可溶性糖的含量随着处理时间的延长而逐渐增高, 处理 3 天后较对照组的胞外可溶性糖含量提高了 2.55 倍。这说明细胞膜的结构经毒蛋白处理后发生了改变, 导致细胞膜通透性增加, 胞内可溶性糖外渗(图 9)。

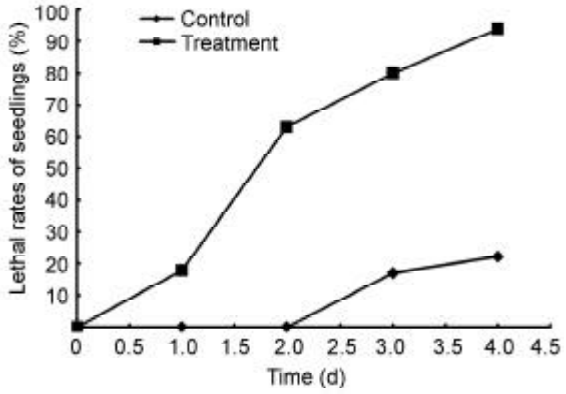

图 7 初步纯化的 50 kDa 蛋白对黑松幼苗的毒性

Figure 7 Toxicity of the primarily purified 50 kDa proteins to Japanese black pine seedlings

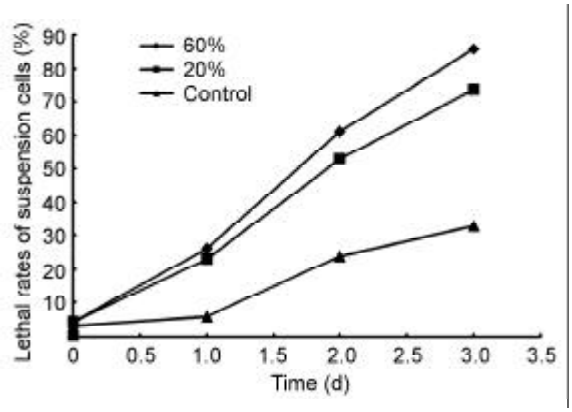

图 8 初步纯化的 50 kDa 蛋白对黑松悬浮细胞的毒性

Figure 8 Toxicities of the primarily purified 50 kDa proteins precipitated by ammonium sulfate of different saturations to Japanese black pine suspension cells

2.4.2 毒蛋白对悬浮细胞游离氨基酸外渗的影响

毒蛋白处理黑松悬浮细胞不但可以导致胞内可溶性糖的外渗, 而且也导致胞内游离氨基酸的大量外渗。毒蛋白处理3天后, 胞外溶液游离氨基酸的含量较对照高2.33倍。这说明毒蛋白改变了细胞膜的通透性, 导致游离氨基酸大量外渗(图 10)。

从图9和图10可以看出, 用毒蛋白处理愈伤组织后, 处理液内可溶性糖和游离氨基酸的含量都大大高于对照。这说明用毒蛋白处理愈伤组织后引起了细胞膜结

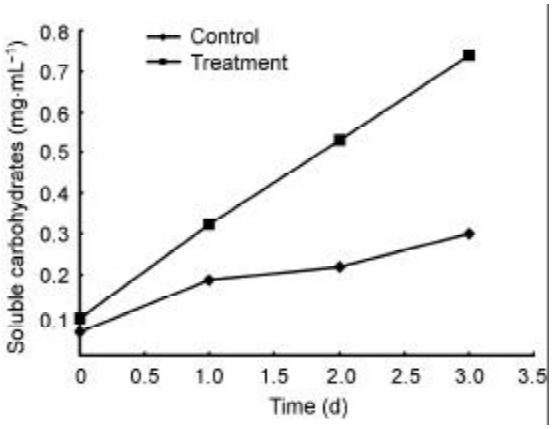

图 9 初步纯化的 50 kDa 蛋白对黑松细胞可溶性糖渗漏的影响

Figure 9 Effect of the primarily purified 50 kDa proteins on the leakage of soluble carbohydrates of suspension cells

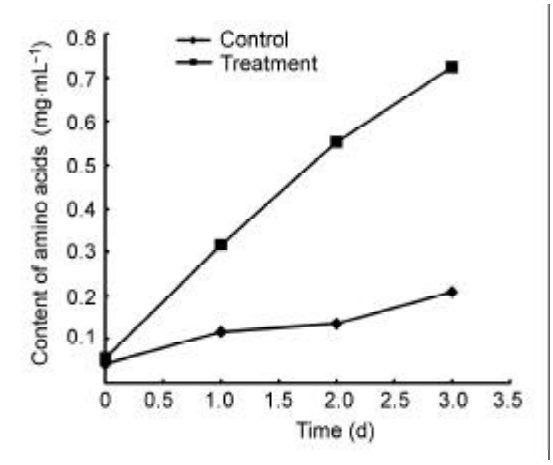

图 10 初步纯化的 50 kDa 蛋白对黑松细胞游离氨基酸渗漏的影响

Figure 10 Effect of the primarily purified 50 kDa proteins on the leakage of free amino acids of suspension cells of Japanese black pines

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-236

构的变化, 导致其通透性增加。

3 讨论

本文研究了松材线虫携带的一株假单胞菌在LB、NB和PD三种培养基中的产毒情况, 结果表明: 该菌在LB和NB培养基中培养时培养液的毒性最强, 而在PD培养基中生长良好, 培养液几乎没有毒性。比较这3种培养基的组成可以发现, LB和NB培养基中都含有动物蛋白的水解成分, 而PD培养基中仅含植物蛋白成分。考虑到该菌最初分离自松材线虫的体表, 是否在黑松体内松材线虫促进细菌毒素的分泌, 尚需更多的实验证实。我们在实验中还发现, LB培养基的pH值明显影响细菌的毒素分泌, 中性培养基的细菌培养液的毒性明显高于酸性培养液, 由于生长良好的松树体内为酸性环境, 因此推测细菌生长在线虫的体表也可促进毒素的分泌。

Oku (1979)根据接种线虫后松树迅速枯萎这一特点, 首先提出发病过程可能涉及毒素。从感病的3年生和15-25年生黑松、赤松(*P. densiflora*)、多脂松(*P. resinosa*)树上提取出4种健康松树所没有的有毒物质。关于毒素来源, 有人认为受害松树内产生的致萎毒素是由于线虫的侵染而使寄主产生异常代谢的产物 (Oku, 1990)。另有观点认为, 受害松树体内的有毒物质与线虫携带的细菌有关(Kawazu, 1996, 1998)。Kawazu等(1999)认为松材线虫本身并不致病,松材线虫病的真正病原是伴随线虫侵入的能产生苯乙酸的细菌, 而真正的病原毒素是苯乙酸(Kawazu, 1990,1997, 1999)。

本文研究发现, 松材线虫携带的一株假单胞菌在体外培养时能向培养基中分泌毒性蛋白, 初步分离纯化得到了一种分子量为50 kDa的蛋白组分。该组分能改变细胞膜的通透性, 导致黑松悬浮细胞内的可溶性糖和游离氨基酸的大量外渗。切根苗的生测结果表明, 该蛋白组分具有明显的致萎活性。由于黑松感染松材线虫出现的症状是真叶萎蔫, 因此, 若体内松材线虫携带的假单胞菌也能分泌蛋白类毒素, 而该蛋白又可随着水分运输传递到真叶, 从而导致真叶细胞的细胞膜通透性改变, 水分外渗造成萎蔫。体内情况是否如此, 需要进一步通过Western blot等方法来确定这些蛋白类毒素与细胞萎蔫的关系, 研究结果可为深入了解松材线虫病的发病机理以及抗松材线虫的育种奠定基础(袁翠萍等, 2006)。

参考文献

郭道森, 丛培江, 李丽, 赵博光 (2002). **松材线虫携带细菌的数量的测定及无菌松材线虫的培养**. **青岛大学学报 15**, 29-31.

杨宝君 (2002). **松材线虫致病机制的研究进展**. **森林病虫通讯 1**, 27-31.

袁翠萍, 常汝镇, 邱丽娟 (2006). **大豆胞囊线虫抗性基因定位与克隆研究进展**. **植物学通报 23**, 14-22.

张志良 (1990). **植物生理学实验指导(第二版)**. **北京**: **高等教育出版社**. pp.160-183.

赵博光, 郭道森 (2000). **松材线虫携带细菌部位的电镜观察**. **南京林业大学学报(自然科学版) 24**, 69-71.

赵博光, 梁波, 赵林果, 徐梅 (2005). **松材线虫对其携带的一株致病细菌产毒的影响**. **北京林业大学学报(自然科学版) 21**, 71-75.

Kawazu K (1990). Changes in constituent of pine wood by infection of pine wood nematode. *Nippon Nogeikagakn Kaishi* **64**, 1262-1264.

Kawazu K (1998). Pathogenic toxins of pine wilt disease. *Kagaku to Seibutsu* **36**, 120-124.

Kawazu K, Kaneko N (1997). Asepsis of the pine wood nematode isolate OKD-3 causes it to lose its pathogenicity. *Jpn J Nematol* **27**, 76-80.

Kawazu K, Kaneko N, Hiraoka K (1999). Reisolation of the pathogens from wilted red pine seedlings inoculated with the bacterium-carrying nematode, and the cause of difference in pathogenicity among pine wood nematode isolates. *Sci Rep Faculty Agric Okayama Univ* **88**, 1-5.

Kawazu K, Zhang H, Yamashita H, Kanzaki H (1996). Accumulation of benzoic acid in suspension cultured cells of *Pinus thunbergii* Parl. in response to phenylacetic acid administraton. *Biosci Biotech Biochem* **60**, 1410-1412.

Kusunoki M (1987). Symptom development of pine with disease-histopathological observations with electron microscope. *Ann Phytopath Soc Jpn* **53**, 622-629.

Mamiya Y (1980). Inoculation of the first year pine(*Pine densiflora*) seedling with *Brusaphelenchus lignicolus* and the histopathology of diseased seedlings. *J Jpn For Soc* **62**, 176-183.

Mamiya Y (1983). Pathology of the pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus*. *Ann Rev Phytopathol* **21**, 201-220.

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-236

Myers RF (1988). Pathogenesis in pine wilt caused by pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *J Nematol* **20**, 236-244.

Oku H (1988). Role of phytotoxins in pine wilt disease. *J Nematol* **20**, 245-251.

Oku H (1990). Phytotoxins in pine wilt disease. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **64**, 1254-1257.

Oku H, Shiraishi T, Kurozumi S (1979). Participation of toxin in wilting of Japanese pines caused by a nematode. *Naturwissenschaften* **66**, 210-211.

Oku H, Shiraishi T, Kurozumi S (1980). Pine wilt toxin, the metabolite of a bacterium associated with a nematod. *Naturwissenschaften* **67**, 198-199.

Zhao BG, Wang HL, Han SF, Han ZM (2003). Distribution and pathogenicity of bacteria species carried by *Bursaphelenchus xylophilus* in China. *Nemotology* **5**, 899-906.

Primary Study on the Toxins Secreted by *Pseudomonas fluorescens* GcM5-1A Carried by Pine Wood Nematodes

Yonghua Yin[1], Daosen Guo[2], Boguang Zhao[3*], Xihua Du[1], Zuntian Zhao[1], Ronggui Li[2*]

[1]*College of Life Sciences,Shandong Normal University, Jinan 250014, China;*

[2]*Department of Biology, QingDao University, Qingdao 266071, China;*

[3]*College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China*

Abstract *Pseudomonas fluorescens* GcM5-1A carried by pine wood nematodes was cultured in LB, NB and PD medium. The cultures free of bacteria were used to analyze their toxicity to suspension cells and shoot seedlings of *Pinus thunbergii*. The cultures of LB and NB were toxic, with LB culture showing the highest toxicity, whereas almost no toxicity was detected for PD culture. pH values of the LB medium affected the toxicity of the final culture: the culture with an initial pH 7.0 was more toxic than one with pH 5.0. The proteins in the LB culture were precipitated by ammonium sulfate, and toxicity analysis showed the proteins toxic to both suspension cells and seedlings. As well, a component mainly containing a protein of 50 kDa, which also showed relatively strong toxicity, was partially purified on precipitation with ammonium sulfate of 20% saturation; treatment with the component could lead to leakage of soluble carbohydrates and free amino acids.

Key words pine wood nematode disease, *Pseudomonas fluorescens* GcM5-1A, toxins

Yin YH, Guo DS, Zhao BG, Du XH, Zhao ZT, Li RG (2007). Primary study on the toxins secreted by *Pseudomonas fluorescens* GcM5-1A carried by pine wood nematodes. *Chin Bull Bot* **24**, 147–153.

* Author for correspondence. E-mail: boguangzhao@yahoo.com; lrg@qdu.edu.cn

(**责任编辑**: **白羽红**)

生物医学编辑——Laura Heraty 简介

Laura Heraty **是美国的一位著名生物医学编辑，有** 15 **年的英文编辑工作经验。目前她在法国和中国的大学、研究所及医院的许多期刊编辑部做兼职英文编辑。许多作者的英文文章经她编辑修改后，首次被国际顶尖刊物录用。她擅长编辑医学(心血管分子生物学、风湿病细胞生物学)、植物学(生物学、系统学、细胞生物学、分子生物学)及水稻和园艺方面的英文文章。她可以编辑英文文章手稿、论著、基金项目、文摘、书信和网页等。**

需要英文编辑服务的专家、学者、研究生可直接与 Laura Heraty **联系。**

联系人: Laura Heraty

家庭电话: 951-782-8904; **手机**: 951-313-0695

E-mail: heraty1@yahoo.com **网址**: http://www.biomededitting.com

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-236