

广藿香青枯病菌致病相关基因的筛选及分析

张泳, 贺红, 李巧, 王邦伟 (广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 对广藿香青枯病菌致病相关基因进行筛选及分析。**方法** 以广藿香青枯病菌菌株 PRS-84 的 Tn5 转座子插入突变株为材料, 通过伤根浸泡法分别接种于广藿香植株, 筛选致病性减弱的突变株; 对筛选获得的突变株进行生长速率、泳动性和生物膜形成等表型分析; 再利用反向 PCR 扩增致病性减弱突变株 Tn5 转座子插入位点的侧翼序列并进行序列测定与生物信息学分析。**结果** 筛选得到了 2 个致病性减弱的突变株 (PRS-84-11-33、PRS-84-11-123), 它们对广藿香植株的致病性均明显低于野生株 PRS-84。与野生株相比, 致病性减弱突变株的菌落形态无明显变化, 突变株 PRS-84-11-123 在培养后期生长速率有所升高。突变株 PRS-84-11-33 及 PRS-84-11-123 的泳动能力及生物膜形成能力均低于野生株。突变株 Tn5 转座子插入位点侧翼序列的生物信息学分析表明, 这 2 个致病性减弱突变株的 Tn5 转座子插入位点基因分别为 *lptE* 基因和 *lon* 基因。**结论** 该研究筛选获得了与广藿香青枯病菌致病性相关的基因, 为了解青枯病菌的致病机制、寻找有效防治广藿香青枯病的方法提供了基础信息。

关键词: 广藿香; 青枯病菌; Tn5 转座子插入突变株; 致病相关基因

中图分类号: R282.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2022)02-0249-06

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2022.02.015

Screening and Analysis of Virulence-related Genes of *Ralstonia solanacearum* Isolated from *Pogostemon cablin*

ZHANG Yong, HE Hong, LI Qiao, WANG Bangwei (School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To screen and analyse the genes involved in virulence of *Ralstonia solanacearum* isolated from Guanghuoxiang (*Pogostemon cablin*, patchouli). **Methods** The *Ralstonia solanacearum* strain PRS-84 was isolated from diseased patchouli plants and its Tn5 transposon insertion mutants were constructed in our previous study. In this study, mutants were inoculated to patchouli plants to screen virulence-attenuated mutant strains. Then several phenotypes such as growth rate, swimming motility and biofilm formation of the mutant strains were tested. Flanking sequences adjacent to Tn5 transposon insertion site in virulence-attenuated mutant strains were amplified by inverse PCR and PCR products were sequenced and analysed. **Results** Compared with wild-type strain PRS-84, two mutant strains named PRS-84-11-33 and PRS-84-11-123 showed significantly reduced virulence to patchouli plants. Their colony morphology was similar to that of wild-type strain, while mutant strain PRS-84-11-123 grew more rapidly during late-exponential growth phase than wild-type strain. The ability of swimming and biofilm formation in two virulence-attenuated mutant strains were decreased compared with wild-type strain. Bioinformatic analysis of flanking sequences of Tn5 insertion sites indicated that Tn5 had inserted into *lptE* gene and *lon* gene in the two mutants, respectively. **Conclusion** In this study, two virulence-related genes in strain PRS-84 were obtained, which might prompt the understanding of the molecular mechanism of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity, and explore effective methods to control patchouli bacterial wilt.

收稿日期: 2021-07-23

作者简介: 张泳, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药生物技术。Email: 2766077121@qq.com。通信作者: 贺红, 女, 研究员, 研究方向: 中药生物技术。Email: hehong67@aliyun.com。

基金项目: 广东省自然科学基金面上项目(2019A1515012151); 国家自然科学基金面上项目(81373901)。

Keywords: *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.; *Ralstonia solanacearum*; Tn5 transposon insertion mutant strains; virulence-related genes

广藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. 为唇形科刺蕊草属植物, 以干燥地上部分入药, 具有芳香化浊、和中止呕、发表解暑的功效。广藿香在种植过程中常会受到青枯病的危害, 该病是由青枯雷尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* (简称青枯菌) 引起的一种细菌性维管束病害。青枯菌首先通过鞭毛运动定位于宿主植物根部, 然后在菌毛作用下附着于根表面并由此入侵木质部导管。青枯菌随着维管系统的输导作用或通过自身运动在宿主体内扩散及繁殖, 产生胞外多糖阻塞维管束, 同时分泌多种细胞壁降解酶和效应蛋白等, 破坏维管系统, 导致输水功能障碍, 造成植株萎蔫死亡^[1-2]。青枯菌的致病性是一系列基因复杂调控的结果, 研究致病相关基因及其在侵染过程中所起的作用, 可促进青枯菌致病机理的解析。本实验室前期从感染了青枯病的广藿香植株中分离得到了青枯病病原菌株 PRS-84^[3], 并利用 Tn5 转座子插入突变技术构建了突变株^[4]。本研究在此基础上, 从菌株 PRS-84 的 Tn5 转座子插入突变株中, 筛选致病性减弱的突变株; 研究致病性减弱突变株生长速率、泳动能力及生物膜形成能力等表型的变化; 并对 Tn5 转座子插入位点基因进行检测和分析。本研究旨在筛选与广藿香青枯病菌致病性相关的基因, 为了解病原菌的致病机制, 寻找有效的防治广藿香青枯病的方法提供基础信息。

1 材料与方法

1.1 材料 广藿香青枯病病原菌株 *Ralstonia solanacearum* PRS-84 (简称 PRS-84), 由本实验室采用组织分离法从感染了青枯病的广藿香植株中分离获得^[3]。PRS-84 的 Tn5 转座子插入突变株由本实验室构建得到^[4]。广藿香植株的培养采取叶片进行离体培养, 选择生长健壮、根系发达的组培苗移栽至营养钵培养 45 d 左右, 用于菌株的致病性检测。

1.2 突变株的致病性检测 取保存在 -80 ℃ 的野生株 PRS-84 和各突变株分别划线接种于 NA 固体培养基上, 30 ℃ 培养 48 h。分别挑取单菌落接种于 NA 液体培养基中, 28 ℃ 下以 200 r·min⁻¹ 振荡培养 24 h, 菌液用无菌水稀释至浓度为 5×10⁸ cfu·mL⁻¹。采用伤

根浸泡法, 将各菌株菌液分别接种于广藿香植株^[5], 对照组采用相同量的无菌水代替菌液。接种后的植株及对照植株置于相对湿度为 80% 左右的温室环境中, 观察并记录植株发病情况。

1.3 致病性减弱突变株的表型分析

1.3.1 菌落形态及生长速率 将野生株 PRS-84 和致病性减弱突变株分别划线接种于 TTC 培养基上, 30 ℃ 培养 36 h, 观察菌落形态特征。将野生株 PRS-84 和致病性减弱突变株分别划线接种于 NA 固体培养基上, 挑取单菌落接种于 NA 液体培养基中, 28 ℃ 下以 200 r·min⁻¹ 振荡培养, 每隔 2 h 取菌液稀释 10 倍后检测其在 600 nm 下的吸光度值 ($A_{600\text{ nm}}$)。以培养时间为横坐标, $A_{600\text{ nm}}$ 值为纵坐标, 绘制菌株生长曲线。

1.3.2 泳动性 将野生株 PRS-84 和致病性减弱突变株分别划线接种于 NA 固体培养基上, 30 ℃ 培养 48 h。分别挑取单菌落接种于 NA 液体培养基中, 28 ℃ 以下 200 r·min⁻¹ 振荡培养 6 h 后, 菌液用无菌水稀释至浓度为 2×10⁸ cfu·mL⁻¹。取 3 μL 菌液接种于含不同琼脂浓度 (1% 和 0.3%) 的 NA 培养基上, 30 ℃ 静置培养 48 h, 观察并记录结果。

1.3.3 生物膜形成 将野生株 PRS-84 和致病性减弱突变株分别划线接种于 NA 固体培养基上, 30 ℃ 培养 48 h。分别挑取单菌落接种于 NA 液体培养基中, 28 ℃ 下以 200 r·min⁻¹ 振荡培养 6 h 后, 菌液用无菌水稀释至浓度为 5×10⁶ cfu·mL⁻¹。取 150 μL 稀释后的菌液于 96 孔聚苯乙烯微量板中, 30 ℃ 培养 1~3 d 后进行染色。弃尽菌液, 加入 200 μL 0.1% 结晶紫染色 60 min, 弃尽染液, 无菌水洗涤, 加入 200 μL 95% 乙醇洗脱, 用酶标仪检测洗脱液在 570 nm 下的吸光度值 ($A_{570\text{ nm}}$)^[6]。

1.4 致病性减弱突变株 Tn5 转座子插入位点基因的分析 以 Tn5 转座子序列为基础, 利用反向 PCR 技术获取致病性减弱突变株 Tn5 转座子插入位点的侧翼序列^[7]。采用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Sca* I 对突变株的基因组 DNA 依次酶切, T4 连接酶连接后, 根据 Tn5 转座子序列的特异性引物 KAN-2 FP-1 (5'-ACC TACAACAAAGCTCTCATCAACC-3') 和 KAN-2 RP-1

(5'-GCAATGTAACATCAGAGATTTTGTAG-3')对连接产物进行反向 PCR 扩增。PCR 产物经序列测定后进行 BLAST 比对以确定插入位点基因,并基于美国国立生物技术信息中心(NCBI)数据库对 Tn5 转座子插入位点基因及其编码产物进行生物信息学分析。

2 结果与分析

2.1 致病性减弱突变株的筛选 图 1 为筛选获得的 2 个致病性减弱突变株的表现(接种第 4 天的植株)。可以看出,无菌水处理的植株(图 1-A)保持健康;接种野生株 PRS-84 的植株(图 1-B)发病严重,叶片萎蔫下垂明显,表现为典型的青枯病症状;接种突变株 PRS-84-11-33 的广藿香植株(图 1-C)少数叶片有所下垂;接种突变株 PRS-84-11-123 的广藿香植株(图 1-D)基本正常。结果显示,这 2 个突变株的致病性明显低于野生株,表明成功筛选得到 2 个致病性减弱的突变株,它们的 Tn5 转座子插入位点基因与青枯菌的致病性相关。

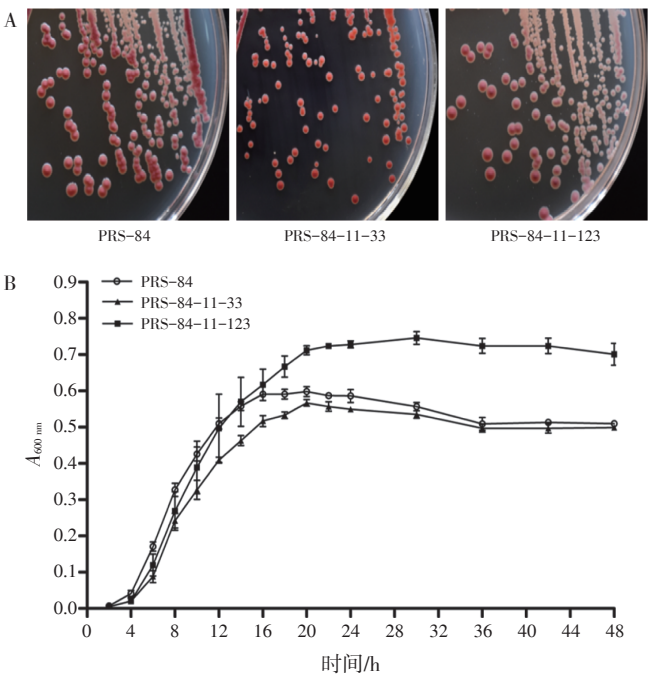


注: A. 无菌水处理的植株; B. 接种野生株 PRS-84 的植株; C. 接种突变株 PRS-84-11-33 的植株; D. 接种突变株 PRS-84-11-123 的植株

图 1 致病性减弱突变株的筛选

Figure 1 Screening of virulence-attenuated mutant strains

2.2 致病性减弱突变株的菌落形态观察及生长速率测定 结果见图 2。由图 2-A 可见,致病性减弱突变株与野生株的菌落形态无明显差异,菌落中央均



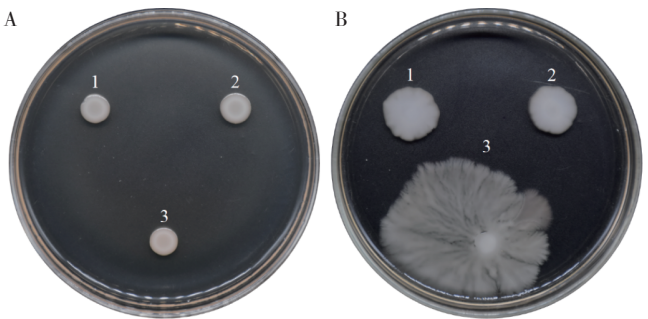
注: A. 菌落形态; B. 生长曲线

图 2 致病性减弱突变株与野生株的菌落形态及生长速率

Figure 2 Colony morphology and growth rate of virulence-attenuated mutant strains and wild-type strain

呈鲜红色,周围有白边,具有流动性,其中突变株 PRS-84-11-33 菌落较小。图 2-B 可以看出,突变株 PRS-84-11-33 与野生株的生长速率相近,而突变株 PRS-84-11-123 在培养后期生长速率有所升高。

2.3 致病性减弱突变株的泳动性检测 结果见图 3。在 1%琼脂浓度的 NA 培养基上(图 3-A),各菌株无明显泳动扩散,只在接种处形成较小的近似圆形的生长轨迹,突变株与野生株相比无明显差异。在 0.3%琼脂浓度的 NA 培养基上(图 3-B),野生株 PRS-84 以点样处为中心向周围呈放射状扩散,扩散



注: A. 菌株在 1% NA 培养基; B. 菌株在 0.3% NA 培养基。1. 突变株 PRS-84-11-33; 2. 突变株 PRS-84-11-123; 3. 野生株 PRS-84

图 3 致病性减弱突变株与野生株的泳动性

Figure 3 Swimming motility of virulence-attenuated mutant strains and wild-type strain

范围较大,泳动性强。突变株 PRS-84-11-33 和 PRS-84-11-123 只在接种处生长,泳动性明显低于野生株。结果表明 2 个致病性减弱突变株的 Tn5 转座子插入位点基因可能与菌株的泳动能力相关。

2.4 致病性减弱突变株的生物膜形成能力测定 结果见图 4。培养第 1 天,野生株 PRS-84 的 $A_{570\text{ nm}}$ 值最大,生物膜形成能力最强,突变株 PRS-84-11-33 和 PRS-84-11-123 的 $A_{570\text{ nm}}$ 值较小,生物膜形成能力明显低于野生株。培养第 2 天,各菌株的生物膜形成能力均有所下降,但 2 个突变株的生物膜形成能力仍明显低于野生株。培养第 3 天,各菌株生物膜形成能力持续降低,突变株与野生株没有明显差异。本研究表明 Tn5 转座子的插入位点基因可能影响菌株侵染早期的生物膜形成能力。

2.5 致病性减弱突变株的 Tn5 转座子插入位点基因的检测和分析 图 5 所示为 2 个突变株的侧翼序列,灰色部分为转座子残余序列,其中突变株 PRS-

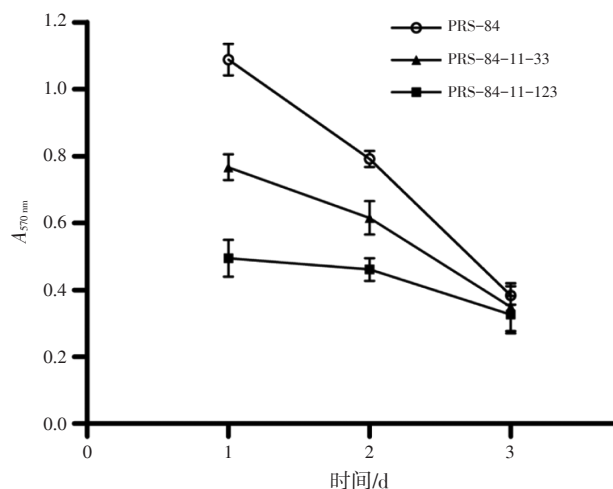


图 4 致病性减弱突变株与野生株的生物膜形成能力

Figure 4 Biofilm formation abilities of virulence-attenuated mutant strains and wild-type strain

84-11-33 侧翼序列大小为 958 bp(图 5-A),突变株 PRS-84-11-123 侧翼序列大小为 995 bp(图 5-B)。利用 NCBI 的 BLAST 工具对上述 2 个致病性减弱突



注: A. 突变株 PRS-84-11-33; B. 突变株 PRS-84-11-123

图 5 致病性减弱突变株的 Tn5 转座子插入位点侧翼序列

Figure 5 The flanking sequences adjacent to Tn5 transposon insertion site in virulence-attenuated mutant strains

变株的 Tn5 转座子插入位点侧翼序列进行比对, 并分析插入位点基因及其编码产物, 结果见表 1。突变株 PRS-84-11-33 插入位点基因为 *lptE*, 预测编码产物为脂多糖转运组装膜蛋白 LptE (LPS-assembly lipoprotein, LptE), 突变株 PRS-84-11-123 插入位点基因为 *lon*, 预测编码产物为 Lon 蛋白酶(Lon protease, Lon)。

表 1 致病性减弱突变株的 Tn5 转座子插入位点基因分析
Table 1 The gene coding product of Tn5 transposon insertion site in virulence-attenuated mutant strains

突变株	侧翼序列 片段长度/bp	突变位点 基因	预测编码产物
PRS-84-11-33	958	<i>lptE</i>	脂多糖转运组装膜蛋白 LptE
PRS-84-11-123	995	<i>lon</i>	Lon 蛋白酶

3 讨论

本实验室前期利用 Tn5 转座子插入突变技术获得了菌株 PRS-84 的突变株。由于 Tn5 转座子插入到各突变株的基因组中, 使得插入位点处基因发生突变并导致其相关功能活性丧失。根据突变株表型变化, 可了解 Tn5 转座子插入位点基因的功能。本研究通过致病性筛选获得了广藿香青枯病菌菌株 PRS-84 的致病相关的 *lptE* 基因和 *lon* 基因。基因 *lptE* 的编码产物 LptE 是脂多糖运输蛋白之一, 其与 LptD 组成的膜蛋白复合体参与脂多糖的转运和组装, 在维持细菌外膜稳定性中具有重要作用^[8-9]。Lo 等^[10]发现假单胞菌的 *lptE* 基因突变株生长略有变慢, 致病性明显低于野生型。基因 *lon* 编码产物 Lon 蛋白酶是 ATP 依赖蛋白酶家族成员, 可降解错误折叠蛋白, 维持胞内蛋白质稳态平衡^[11]。Muselius 等^[12]发现 *lon* 基因的缺失可促进肺炎克雷伯氏菌的生长, 表明 Lon 蛋白酶在菌株生长和增殖过程中发挥了作用。Duong 等^[13]发现 *lon* 基因的缺失导致玉米细菌性枯萎病菌毒力明显减弱。本研究发现青枯菌菌株 PRS-84 的 *lptE* 基因突变株(PRS-11-33)和 *lon* 基因突变株(PRS-84-11-123)对广藿香植株的致病性明显降低, 提示这 2 个基因与菌株 PRS-84 对广藿香的侵染及致病性相关。

青枯菌的致病性与许多致病因子相关, 如运动性、生物膜形成、胞外多糖及Ⅲ型分泌系统的效应蛋白等, 这些致病因子受多个基因的表达调控, 相关基因的突变可导致基因功能缺陷进而影响病原菌的致病力^[14-15]。泳动性是运动性的一种, 在液体环境

下青枯菌通过泳动寻找合适的宿主及感染部位, 附着于细胞表面、侵入组织并在宿主体内进行扩散^[16]。Tans-Kersten 等^[17]将青枯菌与鞭毛合成相关的 *flhDC* 基因突变后, 其泳动能力受损, 致病性也明显降低。Choi 等^[18]发现缺失 *mur I* 基因的青枯菌泳动能力丧失, 并影响对番茄植株的致病力。细菌生物膜是指附着于有生命或无生命物体表面、被细菌胞外大分子包裹的有组织的细菌群体。青枯菌的生物膜可抵抗宿主的免疫防御, 聚集形成的菌群也可堵塞维管束, 导致萎蔫症状^[19]。Mori 等^[20]发现 *ralA* 基因的缺失可导致青枯菌微菌群和生物膜的形成减少, 对番茄的致病性明显降低。Corral 等^[21]发现青枯菌 *chpA* 基因缺失株的生物膜形成能力受阻, 对宿主的致病力减弱。本研究表明广藿香青枯病菌菌株 PRS-84 的 *lptE* 基因和 *lon* 基因的突变导致了泳动性和生物膜形成能力的下降, 对广藿香的致病性减弱。本研究为了解广藿香青枯病菌致病的分子机制、探索有效的防治青枯病的方法奠定了基础。

参考文献:

- [1] LOWE-POWER TM, KHOKHANI D, ALLEN C. How *Ralstonia solanacearum* exploits and thrives in the flowing plant xylem environment[J]. Trends Microbiol, 2018, 26(11): 929-942.
- [2] 徐燃, 贺红, 邓素坚, 等. 青枯菌侵染广藿香的组织病理学研究[J]. 广州中医药大学学报, 2013, 30(2): 236-239.
- [3] 刘丹, 贺红, 黄海波, 等. 广藿香青枯病菌的分离培养及致病性测定[J]. 中草药, 2011, 42(8): 1596-1599.
- [4] WANG Y Q, ZHANG Y Y, JIN H, et al. A practical random mutagenesis system for *Ralstonia solanacearum* strains causing bacterial wilt of *Pogostemon cablin* using Tn5 transposon[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2019, 35(1): 7.
- [5] CALDWELL D, KIM B S, IYER-PASCUZZI A S. *Ralstonia solanacearum* differentially colonizes roots of resistant and susceptible tomato plants[J]. Phytopathology, 2017, 107(5): 528-536.
- [6] SHEN F F, YIN W F, SONG S H, et al. *Ralstonia solanacearum* promotes pathogenicity by utilizing l-glutamic acid from host plants[J]. Mol Plant Pathol, 2020, 21(8): 1099-1110.
- [7] ZHANG M, WANG X, AHMED T, et al. Identification of genes involved in antifungal activity of *Burkholderia seminalis* against *Rhizoctonia solani* using Tn5 transposon mutation method[J]. Pathogens, 2020, 9(10): 797.
- [8] WU T, MCCANDLISH A C, GRONENBERG L S, et al. Identification of a protein complex that assembles lipopolysaccharide in the outer membrane of *Escherichia coli*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(31): 11754-11759.

- [9] RUIZ N, KAHNE D, SILHAVY T J. Transport of lipopolysaccharide across the cell envelope: the long road of discovery[J]. Nat Rev Microbiol, 2009, 7(9): 677-683.
- [10] LO SCIUTO A, MARTORANA A M, FERNÁNDEZ-PIÑAR R, et al. *Pseudomonas aeruginosa* LptE is crucial for LptD assembly, cell envelope integrity, antibiotic resistance and virulence[J]. Virulence, 2018, 9(1): 1718-1733.
- [11] TSILIBARIS V, MAENHAUT-MICHEL G, VAN MELDEREN L. Biological roles of the Lon ATP-dependent protease[J]. Res Microbiol, 2006, 157(8): 701-713.
- [12] MUSELIUS B, SUKUMARAN A, YEUNG J, et al. Iron limitation in *Klebsiella pneumoniae* defines new roles for Lon protease in homeostasis and degradation by quantitative proteomics[J]. Front Microbiol, 2020, 11: 546.
- [13] DUONG D A, JENSEN R V, STEVENS A M. Discovery of *Pantoea stewartii* ssp. *stewartii* genes important for survival in corn xylem through a Tn-Seq analysis[J]. Mol Plant Pathol, 2018, 19(8): 1929-1941.
- [14] MENG F. The virulence factors of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*[J]. J Plant Pathol Microbiol, 2013, 4(3): 168.
- [15] ZHANG Y, ZHANG W, HAN L, et al. Involvement of a PadR regulator PrhP on virulence of *Ralstonia solanacearum* by controlling detoxification of phenolic acids and type III secretion system[J]. Mol Plant Pathol, 2019, 20(11): 1477-1490.
- [16] CHABAN B, HUGHES H V, BEEBY M. The flagellum in bacterial pathogens: for motility and a whole lot more[J]. Semin Cell Dev Biol, 2015, 46: 91-103.
- [17] TANS-KERSTEN J, BROWN D, ALLEN C. Swimming motility, a virulence trait of *Ralstonia solanacearum*, is regulated by FlhDC and the plant host environment[J]. Mol Plant Microbe Interact, 2004, 17(6): 686-695.
- [18] CHOI K, SON G J, AHMAD S, et al. Contribution of the *mur I* gene encoding glutamate racemase in the motility and virulence of *Ralstonia solanacearum*[J]. Plant Pathol J, 2020, 36(4): 355-363.
- [19] HIKICHI Y. Interactions between plant pathogenic bacteria and host plants during the establishment of susceptibility[J]. J Gen Plant Pathol, 2016, 82(6): 1-6.
- [20] MORI Y, HOSOI Y, ISHIKAWA S, et al. Ralfuranones contribute to mushroom-type biofilm formation by *Ralstonia solanacearum* strain OE1-1[J]. Mol Plant Pathol, 2018, 19(4): 975-985.
- [21] CORRAL J, SEBASTIÀ P, COLL N S, et al. Twitching and swimming motility play a role in *Ralstonia solanacearum* pathogenicity [J]. Msphere, 2020, 5(2): e00740-19.

(编辑: 梁进权)

《中药新药与临床药理》征稿启事

《中药新药与临床药理》(Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology)由国家药品监督管理局主管,广州中医药大学、中华中医药学会主办,1990年6月创刊。标准刊号:ISSN 1003-9783, CN 44-1308/R,国内外公开发行,邮发代号:46-210。

本刊是一份全面报道中药新药研究与开发的专业学术性期刊,以弘扬中医药事业、促进中药现代化为使命,积极宣传和报道国内外中药新药及临床药理的研究成果和进展,对促进中药新药的研究开发及临床药理研究的学术交流具有引导性和权威性,同时也是中药新药研究领域的核心期刊和学术交流的重要平台。

本刊学科影响指标、影响因子以及学科排序在全国同类期刊中位居前列,并进入国内权威的核心期刊评价系统,是中国中文核心期刊、中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)、中国科学引文数据库来源期刊(CSCD)及RCCSE中国核心学术期刊,被WHO西太平洋地区医学索引(WPRIM)收录,还是美国《化学文摘》(CA)收录期刊。

主要栏目有:药效与毒理学研究、药物动力学研究、化学成分研究、质量分析研究、工艺研究、方法学研究、动物模型研究、不良反应与合理用药、专家述评、临床研究、新技术与新方法、学术探讨、综述等。

本刊为月刊,每月25日出版。欢迎大家积极投稿,具体的投稿要求及其他注意事项详见本刊投稿网站:www.zyxy.com.cn。(温馨提示:本刊只接受稿件采编系统投稿,不接收纸质和Email投稿,系统投稿不收取审稿费)

·《中药新药与临床药理》编辑部·