

筛选诱导烟草对烟草花叶病毒产生系统抗性的真菌

李娜¹, 李锡宏², 许汝冰², 薛守聪¹, 郭利³, 任加庆¹,
霍瑞¹, 王晓丽³, 杜修智³, 赵秀云^{1*}

(1.华中农业大学农业微生物国家重点实验室, 武汉 430070; 2.湖北省烟草科研所, 武汉 430030;
3.湖北省襄阳市烟草公司, 湖北 襄阳 441003)

摘要: 真菌产生的代谢产物可激活烟草体内抗病防御相关酶的表达, 诱导烟草产生系统抗性, 增强烟草对病毒的抗性。本研究对 38 种植物病原真菌及 45 种分离自(恩施、襄樊)土壤、烟叶中的真菌进行了过敏性反应实验和系统抗性实验。结果表明, 筛选出了对烟草花叶病毒抗性较强的真菌。在烟草上产生过敏反应的菌株有 32 个; 系统抗性实验中对烟草花叶病毒抑制率较高的菌株有 16 个, 其中, 油茶炭疽菌、棉花黄萎病菌、esf-13、esf-3、小麦赤霉、立枯丝核菌、E1、esf-6、xfpf-6 等菌株的抗性较高, 枯斑抑制率均大于 70%, 最高可达 96.44%。抗性较高的真菌可开发为烟草病毒病诱抗剂。

关键词: 烟草; 花叶病毒; 真菌; 过敏性反应; 系统抗性; 枯斑抑制率

中图分类号: S572.08

文章编号: 1007-5119(2014)04-0079-06

DOI: 10.13496/j.issn.1007-5119.2014.04.015

Selecting Fungi Which Can Induce Tobacco Creating Systemic Resistance against Tobacco Mosaic Virus

LI Na¹, LI Xihong², XU Rubing², XUE Shoucong¹, Guo Li³, REN Jiaqing¹, Huo Rui¹,
WANG Xiaoli³, DU Xiuzhi³, ZHAO Xiuyun^{1*}

(1. State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070 China;
2. Tobacco Research Institute of Hubei Province, Wuhan 430030, China;
3. Xiangyang Tobacco Company of Hubei Province, Xiangyang, Hubei 441003, China)

Abstract: Fungi could produce a large number of metabolites, which can activate the expression of relevant enzymes in tobacco, which will induce tobacco creating systemic resistance and help against tobacco virus. We have selected 38 kinds of pathogenic fungi and 45 kinds of fungi separated from the tobacco leaf and the soil of enshi, xiangfan through the experiments of allergic reaction and systemic resistance. There are 32 fungi which can produce hypersensitive response, and 16 of them can inhibit against tobacco mosaic virus. Among these fungi, the highest ability of resistance to tobacco mosaic virus are *Colletotrichum camelliae*, *Verticillium dahliae*, esf-13, esf-3, *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia solani*, E1, esf-6 and xfpf-6. The percentage of lesion inhibition are greater than 70%, with a highest inhibition rate at 96.44%. These fungi with high activity will be used as resistance inducer against tobacco virus.

Keywords: tobacco; TMV; fungi; hypersensitive response; induced systemic resistance; percentage of lesion inhibition

烟草病毒病是引起烟草产量损失的重要病害。烟草普通花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV)是烟草上一种主要病毒, 具有极为广泛的宿主范围(超过 350 种植物), 全世界每年由 TMV 造成的损失就达一亿美元以上^[1-2]。目前, 主要施用化学药剂控制烟草病毒病, 但化学药剂防治烟草病毒病的效果极其有限, 而长期使用化学农药, 使环境受到严

重污染, 农药残留对人畜造成较大危害^[3]。目前, 尚无理想的抗病毒药剂。生物防治具有无毒、无害、无污染、高效且不产生抗药性等优点, 成为开发和研究的热点^[4]。从真菌代谢产物中寻找能诱导烟草对病毒病产生抗性的真菌激发子, 提高烟草抗病毒病能力, 是防治病毒病的新途径。

自然界真菌资源丰富, 本研究拟从长势良好的

基金项目: 湖北省烟草公司科技项目“烟草主要病毒病快速检测及防控新技术研究集成与示范”(027Y2013-006)

作者简介: 李娜, 女, 硕士, 研究方向为生物防治。E-mail: 13476268782@163.com。*通信作者, E-mail: xiuyunzh@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2013-10-10

修回日期: 2014-03-07

健康烟草根际土壤中分离真菌、同时广泛收集植物病原真菌,从这些真菌中筛选能诱导烟草对 TMV 产生系统抗性的真菌。获得能诱导烟草产生过敏反应,同时可诱导烟草对 TMV 产生系统抗性,有抗病毒效果的菌株。开发病毒诱抗剂,用于烟草花叶病毒的控制,促进烟草生长和提高烟草品质,为烟草生产提供一种新的抗病毒生物制剂。

1 材料与方法

1.1 材料

过敏反应实验采用心叶烟和云烟 87。系统抗性实验采用心叶烟(中国农科院烟草研究所提供),普通烟种子由华中农业大学植物科学技术学院提

供。过敏性反应实验和系统抗性实验于 2013 年 4—9 月在华中农业大学温室内进行。

烟草普通花叶病毒(TMV)由中国农业科学院烟草研究所提供,保存在云烟 87 上。

石英砂(分析纯 AR)、氯化钠(分析纯 AR)、氯化钾(分析纯 AR)、磷酸二氢钾(分析纯 AR)、磷酸氢二钾(分析纯 AR)、蔗糖(分析纯 AR)、琼脂粉、链霉素等。2013 年 3 月烟田土壤采集信息如表 1 所示。

实验室共保存植物病原真菌菌株 38 种,其中 24 种已知病菌真菌见表 2。E1、E2、E3、E4、E5、E6、E7、E8、t2、E9、E10、F4、E11 为未鉴定的植物病原真菌。C1 为恩施土壤中分离未鉴定菌株。

表 1 土壤采集信息

Table 1 The collection message of soil

土壤样品	采样地点	经纬度	海拔/m	土壤类型	前作
襄阳平原烟区土壤	枣阳市七方镇梁家村	经: 112°34'32.8"E 纬: 32°10'26.0"N	129.9	黄棕壤	烟草(中烟 100)
襄阳山地烟区土壤	南漳县李庙镇堰沟村	经: 111°37'00.5"E 纬: 31°50'22.0"N	815.7	黄棕壤	烟草(K326)
恩施山地烟区土壤	咸丰县高乐山镇小模村	经: 109°06'141"E 纬: 31°50'054"N	754.0	黄棕壤	玉米

表 2 植物病原真菌

Table 2 The plant pathogen fungi

菌株	拉丁名
玉米小斑病菌	<i>Helminthosporium maydis</i>
杨树溃疡病菌	<i>Cryptodiaporthe populea</i>
辣椒炭疽病菌	<i>Gloeosporium piperatum</i>
油茶炭疽病菌	<i>Colletotrichum camelliae</i>
灰葡萄孢	<i>Botrytis cinerea</i>
哈茨木霉菌	<i>Trichoderma harzianum</i>
茶轮斑病菌	<i>Pestalotiopsis theae</i>
立枯丝核菌	<i>Rhizoctonia solani</i>
草莓灰霉病菌	<i>Botrytis cinerea</i>
松针褐斑病菌	<i>Lecanosticta acicola</i>
苹果轮纹病菌	<i>Macrophoma kawatsukai</i>
赤星病菌	<i>Alternaria alternata</i>
茶树叶枯病菌	<i>Colletotrichum camelliae</i>
棉花立枯丝核菌	<i>Mycelia sterillia</i>
小麦赤霉病菌	<i>Fusarium graminearum</i>
暗灰鹅膏菌	<i>Amanita vaginata</i>
棉花枯萎病菌	<i>Fusarium oxysporum</i>
可可球二孢	<i>Botryodiplodia theobromae</i>
杨树大斑溃疡病菌	<i>Dothichiza popul</i>
球毛壳菌	<i>Chaetomium globosum</i>
棉花黄萎病菌	<i>Verticillium dahliae</i>
油菜菌核病菌	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
辣椒灰霉病菌	<i>Botrytis cinerea</i>
甘薯长喙壳菌	<i>Ceratocystis fimbriata</i>

1.2 方法

1.2.1 真菌的分离、纯化和发酵 采集烟草根系表层 0~15 cm 的土壤,5 点取样法混合而成。采用稀释涂布法分离土壤和烟叶中的真菌,并采用孢子稀释法纯化所分离出的真菌。活化实验室保存的病原真菌。

将真菌进行液体发酵,用接种环挑取少量真菌菌丝于马铃薯蔗糖液体培养基中,在 25 °C,转速为 200 r/min 的摇床中恒温振荡培养 1 周。收集真菌发酵液,用 4 层纱布进行过滤,过滤液于 4 °C,3000 r/min 离心 10 min,去除沉淀,收集上清液,进行过敏性反应和系统抗性实验。

1.2.2 烟草花叶病毒的接种与病毒液的制备 病毒接种于 5~6 叶期的健康云烟 87。取感染 TMV 的云烟 87 叶片与健康烟草的心叶摩擦,在温室内培养 2~3 周后,云烟 87 表现出典型的花叶症状。

取感染 TMV 的云烟 87 病叶,按照 1:40(W/V)的比例加入 0.01 mol/L 的 PBS 磷酸盐缓冲液(pH 7.2),在研钵中加入少量石英砂进行研磨,研磨后

用4层纱布过滤,收集滤液,获得烟草花叶病毒汁液。

1.2.3 过敏性反应实验 实验对象为长势健康的心叶烟和云烟87,取生长健康且完整的叶片,采用半叶法的注射方法,叶子左边为清水对照,右边为真菌的发酵液。采用不带针头的微量注射器在每个点注射20 μL发酵液或水。6 d后将叶片剪下并照相,观察叶片上是否出现过敏斑,以及过敏斑的形态。若出现过敏斑,则表明该真菌可引起烟草的过敏性反应,可能诱导烟草对病毒产生抗性,进一步通过系统抗性实验检测其抗性。

1.2.4 系统抗性实验 实验对象为长势健康、6~7叶期的心叶烟。选取烟草上部的两片叶子,用微量注射器注射真菌发酵液,每片叶子左右半叶各注射3次,每次注射20 μL发酵液。24 h后,选取烟株下部叶片,用脱脂棉蘸取病毒汁液,并蘸取少量石英砂,沿着叶脉小心且均匀地涂抹在整片叶子上,病毒通过摩擦产生的伤口感染烟草,并在感染点形成枯斑。每种真菌发酵液均设置2个重复,注射0.01 mol/L PBS磷酸盐缓冲液作为对照。1周后,测量记录枯斑的面积、数量,并与对照进行对比。

按照如下公式计算枯斑抑制率:

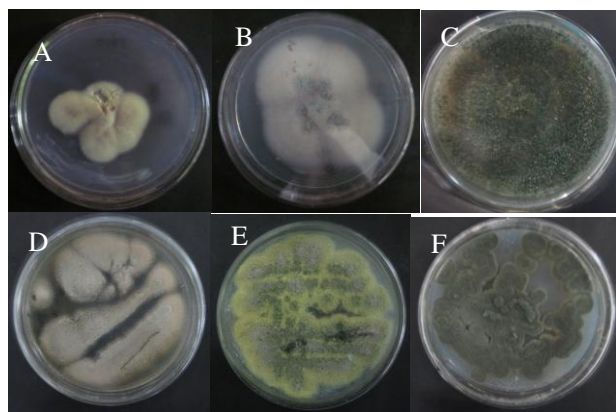
枯斑面积抑制率=(对照组枯斑面积占叶片总面积百分比-实验组枯斑面积占叶片总面积百分比)/对照组枯斑面积占叶片总面积百分比×100%

枯斑数量抑制率=(对照组平均每片叶子枯斑总数量-实验组平均每片叶子枯斑总数量)/对照组平均每片叶子枯斑总数量×100%

2 结果

2.1 土壤真菌和烟叶真菌的分离

按照上述方法对恩施土样、襄樊平原土壤、襄樊山地土壤和烟叶中的真菌进行稀释涂布分离。恩施土壤中分离的真菌编号为esf-1~esf-13、襄樊平原土壤中分离的真菌编号为xfpf-1~xfpf-12、襄樊山地土壤中分离的真菌编号为xfsf-1~xfsf-17,烟叶中分离的真菌编号为xfyf-1~xfyf-5。共分离到了45株真菌。部分真菌培养形态如图1所示。



注: A~F分别为真菌esf-3、esf-13、esf-6、xfpf-4、xfsf-8、xfpf-6的菌落形态。

图1 部分分离的真菌形态

Fig. 1 Morphology of some isolated fungi

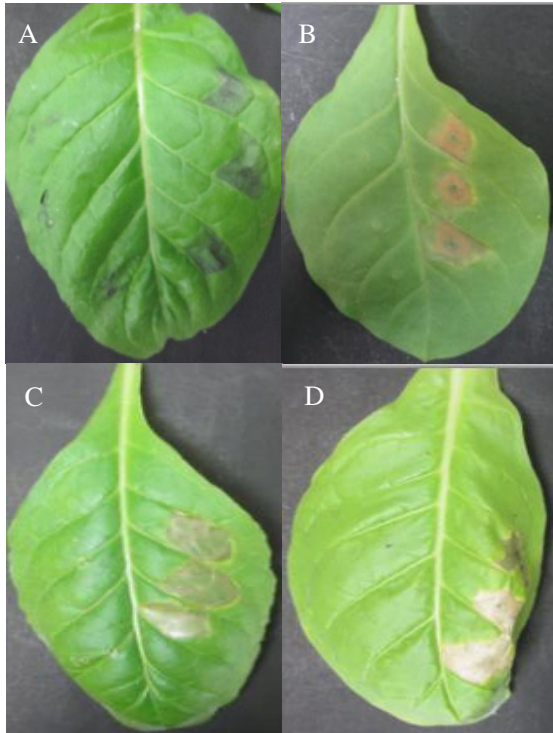
2.2 过敏性反应

产生明显过敏性反应的真菌共有32个菌株,包括:C1、E1、T2、E2、辣椒灰霉病菌、辣椒炭疽病菌、立枯丝核菌、小麦赤霉病菌、棉花黄萎病菌、esf-1、esf-3、esf-6、esf-13、E11、棉花枯萎病菌、苹果轮纹病菌、F4、E4、赤星病菌、xfsf-8、xfsf-10、xfsf-11、xfsf-12、xfsf-16、xfsf-17、xfyf-3、xfyf-6、xfyf-8、xfpf-4、xfpf-6、xfpf-8和xfpf-10。典型过敏性反应产生的过敏斑如图2所示。

在上述能诱导烟草产生明显过敏性反应的真菌中,C1、E1、E2、辣椒灰霉病菌、立枯丝核菌、小麦赤霉病菌、棉花黄萎病菌、esf-1、esf-3、esf-5、esf-13在第1天就可出现过敏斑。T2、xfpf-6、xfpf-10、xfsf-1、xfsf-2、xfsf-5、xfsf-8、xfsf-16在注射部位产生的过敏斑为黄色,E2、esf-3、F4、xfpf-4、xfpf-8、xfsf-12、xfsf-17、xfsf-6在注射部位形成的过敏斑略小于其他真菌。

2.3 系统抗性

对上述能诱导烟草产生过敏性反应的真菌进行系统抗性实验。共有28种真菌对烟草花叶病毒产生系统诱导抗性,结果如表3所示,其中esf-3菌株的枯斑面积抑制率最高,为96.44%。esf-6菌株的抑制率次之,为79.04%。这些真菌对病毒的抑制率多集中在50%~80%。



注：A~D分别为辣椒灰霉病菌、xfpf-6、esf-13、esf-6发酵液产生的过敏性反应。

图2 真菌发酵液产生的过敏性反应

Fig. 2 Allergic reaction produced by fermentation broth of fungi

由表3可知,通过过敏性反应实验筛选的真菌绝大多数都对烟草花叶病毒有一定的抗性,但E5和棉花枯萎病菌,不仅对烟草花叶病毒没有抗性,反而促进了病毒对植物的入侵,其原因还有待于进一步的分析。

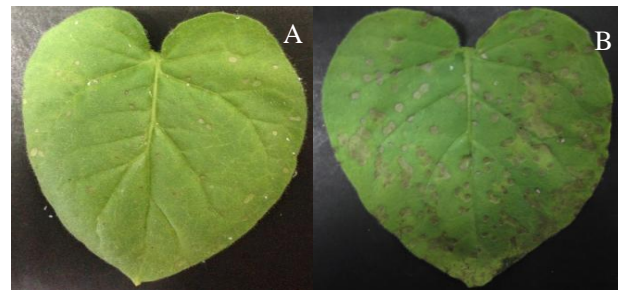
在检测的病原真菌和土壤真菌中,对烟草花叶病毒的枯斑数抑制率超过50%的仅有立枯丝核菌和esf-6,但多个真菌对病毒产生的枯斑面积抑制率超过了50%,包括:E11、esf-1、辣椒灰霉病菌、C1、辣椒炭疽病菌、油茶炭疽病菌、棉花黄萎病菌、esf-13、esf-3、小麦赤霉病菌、立枯丝核菌、E1、esf-6、苹果轮纹病菌、xfpf-4、xfpf-6、xfsf-8和xfpf-8。

对烟草花叶病毒枯斑面积抑制率高的真菌,其枯斑数抑制率也较高,如esf-6、立枯丝核菌、E1,推测这些菌株既能抑制病毒的侵染,也能抑制病毒的复制。E1系统抗性实验效果如图3所示,A图为接病毒24h后用真菌发酵液处理的叶片,B图为清水对照。可以看到,处理组的枯斑数量明显减少,

表3 各真菌对烟草花叶病毒的抑制率 %

Table 3 Inhibition rate to TMV of each fungi

菌株	枯斑数抑制率	枯斑面积抑制率
辣椒灰霉病菌	46.78	61.93
T2	29.17	7.71
棉花枯萎病菌	-52.5	-5.12
esf-13	31.28	75.76
棉花黄萎病菌	46.90	68.93
油茶炭疽病菌	32.98	68.58
E4	30.35	55.68
E5	-67.82	-205.57
C1	26.42	63.10
esf-1	24.32	59.25
辣椒炭疽病菌	10.36	66.48
esf-3	46.58	96.44
E11	10.00	0.34
小麦赤霉病菌	47.60	76.38
立枯丝核菌	62.05	77.57
E1	48.99	84.09
esf-6	62.69	79.04
苹果轮纹病菌	31.86	59.65
F4	28.03	36.34
xfpf-4	-15.04	81.60
xfsf-16	-98.99	43.31
xfyf-8	-85.10	35.08
xfsf-6	-106.68	-37.68
xfpf-10	-283.39	-141.30
xfpf-6	30.03	82.24
xfsf-8	-0.66	59.61
xfpf-8	-0.76	58.39
xfsf-12	2.96	46.83



注：A为E1；B为对照。

图3 E1诱导烟草对TMV的系统抗性

Fig. 3 The systemic resistance of tobacco against TMV induced by E1

枯斑面积也较对照组显著减少。

3 讨论

目前,已经有很多关于不同种类的真菌、细菌、放线菌以及它们产生的次级代谢产物能够抑制病毒活性的报道,有些微生物及其代谢产物(如噬肽霉素、宁南霉素)已经进入大规模应用阶段^[5]。19世纪50年代前人报道称,从一些真菌中分离出高分子化合物和抗生素,可对烟草普通花叶病毒(TMV)起到一定的抑制和钝化作用,这些真菌包括黑根霉、蓝绿边青霉、亮白曲霉、哈茨木霉、立

枯丝核、果生核盘菌等。19世纪90年代,有报道香菇的培养水浸液和抽提物都能对烟草花叶病毒起到一定的抑制作用^[6],抗病毒活性成分为葡萄糖、甘露糖、半乳糖、吡喃糖和15种氨基酸组成的复合物^[7]。从杏鲍菇中分离得到的多个蛋白组分对烟草花叶病毒都有拮抗作用,抑制率均高于70%,最高可达到99%^[8]。

这些具有抗病毒效果的物质能够引发植物一系列的生理生化反应,诱发植物的抗性和防御反应,称为激发子(elicitor)^[9-11]。激发子作为植物诱抗因子用于植物病害的生物防治日益受到重视。激发子来源广泛,不同种类的细菌、真菌、植物与病原菌互作后均能产生不同类型的激发子^[12]。从多种病原真菌如稻瘟菌(*Magnaporthe grisea*)、交链孢菌(*Alternaria* sp.)、黄曲霉菌(*Aspergillus* sp.)、葡萄孢菌(*Botrytis* sp.)等分离到一系列的蛋白激发子^[13-14]。病原真菌产生的激发子可诱导植物产生过敏反应,引起感染部位的植物组织快速坏死,把病菌限制在其中,导致病菌死亡,病害不能发展。过敏反应不仅是一种抗病反应,同时也诱导植物产生系统抗性。激发子诱导植物产生系统抗性后,植物体内抗性相关的酶活性增强,木质素含量提高,抗性基因上调表达^[15-18]。真菌激发子诱导植物产生系统抗性后,表现出抗病毒的作用。我们首先筛选能诱导烟草产生过敏性反应的抗性真菌,进一步通过系统抗性实验,筛选出对烟草花叶病毒有良好抗性的9种真菌,枯斑抑制率均在70%以上。该方法可快速有效地筛选出对烟草病毒抗性效果好的真菌,且实验结果明显易观察,是一种筛选抗病毒制剂的有效方法。

文献报道从棉花黄萎病菌(*V. dahliae*)中分离出了一种蛋白激发子^[19]。赤霉菌(*G. subinetti*)、立枯丝核菌(*R. solani*)的代谢物质有抑制或钝化TMV的能力^[2],但相关抗性物质尚未分离和鉴定,其作用机理也不清楚。我们对棉花黄萎病菌、赤霉菌和立枯丝核菌以及土壤真菌的发酵液诱导烟草的系统抗性进行了初步的研究,并将进一步鉴定土壤真菌的种属地位、分析激发子的结构和化学组成。

4 结 论

本研究通过过敏性实验和系统抗性实验,筛选了多株对烟草普通花叶病毒有较好诱导抗性的真菌: E4、辣椒灰霉、C1、油茶炭疽、棉花黄萎、esf-13、esf-3、小麦赤霉、立枯丝核、E1、esf-6、苹果轮纹菌、xfpf-6。可进一步从其代谢产物中分离激发子或诱导物,通过测定抗病防御相关酶活性的变化、抗病标志基因表达量的变化以及SA等信号分子含量的变化来研究激发子诱导植物抗病防卫反应产生的分子机理和信号途径,从而寻找和挖掘新的抗植物病毒物质。将有利于扩大植物病毒抑制物的筛选谱,获得新的抗植物病毒抑制物,为研制具有自主知识产权的新型多功能药物打下良好的基础,促进我国生物农药的研究开发。

参考文献

- [1] McGrath M T, Shishkoff N. Evaluation of biocompatible products for managing cucurbit powdery mildew[J]. *Crop Protection*, 1999, 18(7): 471-478.
- [2] 吴艳兵, 颜振敏, 谢荔岩, 等. 天然抗烟草花叶病毒大分子物质研究进展[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(7): 1096-1101.
- [3] 李金鞠, 廖甜甜, 潘虹, 等. 土壤有益微生物在植物病害防治中的应用[J]. *湖北农业科学*, 2012, 50(23): 4753-4757.
- [4] 姚琳. 微生物生物防治的研究综述[J]. *林区教学*, 2009(5): 123-125.
- [5] 陈力力, 高必达. 微生物抗植物病毒活性物的研究进展[J]. *中国生物防治*, 2006, 22(4): 255-260.
- [6] 林中正. 植物源抗烟草花叶病毒活性物质的筛选和作用机理初探 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012.
- [7] 严凯. 新型抗烟草花叶病毒药物的筛选及作用机理初步研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2008.
- [8] 付鸣佳, 林健清, 吴祖健, 等. 杏鲍菇抗烟草花叶病毒蛋白的筛选[J]. *微生物学报*, 2003, 43(1): 29-34.
- [9] Hahn M G. Microbial elicitors and their receptors in plants[J]. *Annual review of phytopathology*, 1996, 34(1): 387-412.
- [10] Darvill A G, Albersheim P. Phytoalexins and their elicitors—a defense against microbial infection in plants[J]. *Annual Review of Plant Physiology*, 1984, 35(1): 243-275.
- [11] Templeton M D, Lamb C J. Elicitors and defence gene activation[J]. *Plant Cell & Environment*, 1988, 11(5): 395-401.
- [12] Ebel J, Cosio E G. Elicitors of plant defense responses[J].

- International review of cytology, 1994, 148: 1-36.
- [13] Qiu D. Microbe Protein Pesticide and It's Prospect [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2004, 20(2): 91-94.
- [14] Qiu D, Xiao Y, Yao Q, et al. Effect of activator protein on cucumber growth and the activities of dehydrogenase, peroxidase and phenylalanine ammonia lyase[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2004, 21(1): 41-44.
- [15] He C Y, Hsiang T, Wolyn D J. Induction of systemic disease resistance and pathogen defence responses in *Asparagus officinalis* inoculated with nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*[J]. Plant Pathology, 2002, 51(2): 225-230.
- [16] Li Y, Zhang Z, Jia Y, et al. 3-Acetyl-3-hydroxyindole: a new inducer of systemic acquired resistance in plants[J]. Plant biotechnology journal, 2008, 6(3): 301-308.
- [17] Wang W C, Liu Z H. Harpin PSS-induced peroxidase and lignin accumulation in tobacco during the hypersensitive response[J]. Functional Plant Biology, 1999, 26(3): 265-272.
- [18] Kessmann H, Staub T, Hofmann C, et al. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals[J]. Annual review of phytopathology, 1994, 32(1): 439-459.
- [19] 王炳楠, 王双超, 檀贝贝, 等. 大丽轮枝菌蛋白激发子 PevD1 诱导的烟草对烟草花叶病毒 (TMV) 系统获得性抗性及其分子机制[J]. 农业生物技术学报, 2012, 20(2): 188-195.

(上接第 78 页)

- 叶质量特点[J]. 生态学报, 2005, 25(10): 1748-1753.
- [3] 张久权, 张教侠, 刘传峰, 等. 山东烤烟生态适应性综合评价[J]. 中国烟草科学, 2008, 29(5): 11-17.
- [4] 何结望, 毕庆文, 袁家富, 等. 湖北烟区气候与土壤生态因素分析[J]. 中国烟草科学, 2006, 27(4): 13-17.
- [5] 梁荣. 湖北烟区生态因素分析[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(5): 1902-1904.
- [6] 李湘伟, 陈爱国, 戴培刚, 等. 南平烤烟种植生态适应性评价[J]. 中国烟草科学, 2006, 27(4): 13-17.
- [7] 黎妍妍, 丁伟, 李传玉, 等. 贵州烟区生态条件及烤烟质量状况分析[J]. 安全与环境学报, 2007(2): 96-100.
- [8] 肖金香, 刘正和, 王燕, 等. 生态气候因素对烤烟产量与品质的影响及植烟措施研究[J]. 中国生态农业学报, 2003(11): 158-160.
- [9] 张家智. 云烟优质适产的气候条件分析[J]. 中国农业气象, 2005, 21(2): 17-21.
- [10] 胡钟胜, 龙伟, 谭军, 等. 楚雄烟区烤烟生态气候因子评析[J]. 中国烟草科学, 2012, 33(1): 63-68.
- [11] 时鹏, 秦兴成, 向必坤, 等. 恩施州不同类型烟区气候特征及其适宜性分析[J]. 中国烟草科学, 2011, 32(增刊): 17-20.
- [12] 孙建峰, 丁云生, 刘加红, 等. 曲靖烟区土壤养分状况的综合评价[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(33): 16741-16744.
- [13] 朱杰, 赵会纳, 郭燕, 等. 河南烟区植烟土壤养分状况综合评价[J]. 郑州轻工业学院学报: 自然科学版, 2009, 24(1): 22-24.
- [14] 匡传富, 周国生, 邓正平, 等. 湖南郴州烟区土壤养分状况分析[J]. 中国烟草科学, 2010, 31(3): 33-37.
- [15] 李娟, 刘国顺, 宋晓华. 重庆烟区土壤养分状况分析及综合评价[J]. 江西农业学报, 2009, 21(7): 94-96.
- [16] 李敏. 广东烟区土壤养分状况与烟叶品质的关系研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(2): 699-700.
- [17] 郭治兴, 陈泽鹏, 王静, 等. 广东省烟草土壤生态适宜性评价[J]. 中国烟草科学, 2011, 32(4): 75-80.
- [18] 张小全, 王军, 陈永明, 等. 广东南雄烟区主要气候因素与烟叶品质特点分析[J]. 西北农林学报, 2011, 20(3): 75-80.
- [19] 李西开. 土壤农业化学常规分析方法[M]. 北京: 科学技术出版社, 1983.
- [20] 龙怀玉, 刘建利, 徐爱国, 等. 我国部分烟区与国际优质烟区烤烟大田期间某些气象条件的比较[J]. 中国烟草学报, 2003, 9(增刊): 41-47.