

毁灭炭疽菌诱抗蛋白的分离纯化及对烟草抗病促生作用

田 华^{1,2}, 陈光勇³, 董 瑜³, 王 静¹, 王贻鸿^{1,2}, 孔凡玉^{1*}

(1. 中国农业科学院烟草研究所, 青岛 266101; 2. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081; 3. 云南省曲靖市烟草公司会泽分公司, 云南 会泽 654200)

摘要: 为明确诱抗蛋白能够对烟草产生抗病促生作用, 采用加热、离心、硫酸铵分级沉淀、透析和凝胶色谱柱等方法, 从毁灭炭疽菌 (*Colletotrichum destructivum*) 中分离纯化出一种诱抗蛋白, 并采用喷雾接种和摩擦接种的方法研究其预防保护作用。结果表明, 经 SDS-PAGE 显示该诱抗蛋白分子量约为 38 kD, 且目的蛋白存在于 Pro-P2-TX 组份中; 对烟株进行烟草普通花叶病毒病的接种试验, 接种 3 d 后, 诱抗蛋白处理组烟草叶片枯斑数明显少于清水对照组, 对 TMV 的诱抗效果为 73.79%; 该诱抗蛋白能够明显促进烟草的生长, 诱导处理 40 d 后, 烟草的株高、叶宽和茎围与清水对照相比明显增加, 其中株高增长 72.43%, 叶宽和茎围分别增加 61.06% 和 29.05%。因此, 试验结果说明毁灭炭疽菌诱抗蛋白具有诱导烟草产生抗病性和促进烟草生长的作用。

关键词: 诱抗蛋白; 毁灭炭疽菌; 分离纯化; 诱导抗病性; 烟草生长

中图分类号: S435.72

文章编号: 1007-5119 (2016) 04-0068-06

DOI: 10.13496/j.issn.1007-5119.2016.04.012

Purification of a Protein Elicitor from *Colletotrichum destructivum* and Its Biological Activity in Inducing Tobacco Resistance and Facilitating Growth

TIAN Hua^{1,2}, CHEN Guangyong³, DONG Yu³, WANG Jing¹, WANG Yihong^{1,2}, KONG Fanyu^{1*}

(1. Tobacco Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China, 3. Huize Branch of Qujing, Yunnan Province Tobacco Company, Huize, Yunnan 654200, China)

Abstract: To functionally investigate the mechanisms of disease resistance and tobacco growth, we have isolated a protein elicitor from mycelium of *Colletotrichum destructivum* by heating, centrifugation, precipitation, dialysis and gel chromatography column. We then measured the prevention and protection effects of this protein using spray and friction inoculation methods. The results showed that the protein elicitor appeared in Pro-P2-TX and the molecular weight was approximately 38 kD on silver-stained SDS-PAGE. The inhibitory effect to tobacco mosaic virus (TMV) was 73.79%. The protein elicitor could remarkably increase the individual plant height by 72.43%, leaf width by 61.06% and stem circumference by 29.05% respectively. Taken together, the protein elicitor has the role of inducing tobacco resistance and facilitating growth.

Keywords: protein elicitor; *Colletotrichum destructivum*; inductive resistance; isolation and purification; tobacco growth

烟草普通花叶病毒病由烟草花叶病毒 (Tobacco mosaic virus, TMV) 引起, 在世界各个烟区普遍发生, 是造成烟草产量损失的重要因子之一。此病自苗床至大田整个生育期均可连续发生, 传播途径简单, 危害面广^[1-2], 经济损失大, 目前防治该病主要应用化学药剂, 但是过多依赖化学药剂会导致病原体产生抗药性及环境污染^[3], 所以生物防治逐渐成

为防治植物病害的研究热点。生物农药产品无毒, 不引起病虫害的抗药性, 在植物体和土壤中易分解, 无残留, 可大幅度提高烟草质量和国际竞争力。目前有许多生物抗病毒剂已经投入到烟草生产的实用阶段, 但是预防和防治效果并不显著, 因此研究和开发有效的抗病毒病生物制剂是烟草生产上亟待解决的问题^[4]。

基金项目: 福建省烟草公司南平市公司科技项目“烟草根茎病害系统控制技术”(201203)

作者简介: 田 华, 女, 在读硕士, 研究方向为烟草病害防治。E-mail: 376609425@qq.com。*通信作者, E-mail: kongfanyu123@163.com

收稿日期: 2016-02-24

修回日期: 2016-04-12

激发子是一类能够诱导寄主或非寄主植物产生防卫反应的特殊化合物^[5-6]，依据生物化学结构，生物源激发子主要有寡糖和蛋白质两种类型^[7]。近年来，利用蛋白质类激发子控制植物病害的研究愈来愈受到重视。2001年美国 Eden 生物公司成功将梨火疫病病原细菌 (*Erwinia amylovora*) 中的一种蛋白质开发为抗病生防农药 Messenger^[8]，被称为作物生产和食品安全的一次绿色革命。国内学者已经从交链孢菌 (*Alternaria* spp.)、镰刀菌 (*Fusarium* spp.) 等多种真菌中分离出一类蛋白质激发子^[9]，虽然来源不同，但都可以诱导植株产生抗病性，并能促进植株生长、改善品质以及增加产量。其中邱德文用稻瘟菌蛋白质激发子处理烟草普通花叶病毒病，其控制效果在 75% 以上^[10]。李杰等^[11]研究发现，极细链格孢菌 66 kD 诱抗蛋白可以诱导烟草抗 TMV，枯斑抑制率可达 49%。用激活蛋白制剂处理烟株，能显著促进烟草生长，使烟草株高、叶面积和留叶数都显著增加，并能明显改善烤烟品质^[10]。卜冰武等^[12]研究发现，大丽轮枝菌蛋白质激发子能够诱导棉花抗黄萎病，病害减轻率达 35.04%。

根据前人的研究，本试验从毁灭炭疽菌 (*Colletotrichum destructivum*) 中分离纯化出一种 38 kD 的诱抗蛋白，观察其对 TMV 的诱抗效果以及对烟草的促生作用，为以后的田间防治应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试植株及菌株：烟草品种是小黄金 1025，TMV 普通株系 (TMV-U1) 毒源以及枯斑寄主材料是三生烟 (*Nicotiana tabacum* var. samsun NN)，由中国农业科学院烟草研究所提供；毁灭炭疽菌由本实验室 4 保存备用。

培养基：马铃薯葡萄糖琼脂 (potato dextrose agar, PDA) 培养基：马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 mL (PDA 液体培养不加琼脂)。

1.2 试验方法

1.2.1 毁灭炭疽菌菌丝的培养 将保存的毁灭炭疽菌菌种接种于 PDA 培养基活化后，用打孔器分别打取直径为 5 mm 的 3 个菌饼接种于 PDA 液体培养基中，28 °C，180 r/min 恒温振荡培养 3 d。真空抽滤收集菌丝体，抽滤过程中用双蒸水洗涤 4 次，冻存于 -20 °C 冰箱保存备用^[13]。

1.2.2 毁灭炭疽菌诱抗蛋白的粗提 将冻存的菌丝体用液氮研磨为粉状，加入到 30 mmol/L 的 HEPES 缓冲液 (pH 7.1) 中，缓冲液的体积为 PDA 培养基的十分之一，混合后沸水浴 30 min，4 °C，13 000 r/min 离心 20 min，收集上清液。在上清液中加入 0.1% 的活性碳和 0.1% 的鱼精蛋白^[14]置于冰盒中缓慢搅拌 10 min，然后 4 °C，13 000 r/min 离心 20 min，收集上清。将收集的上清进行 30% 的硫酸铵沉淀，4 °C，13 000 r/min 离心 30 min，收集上清弃沉淀。再将上清进行 70% 的硫酸铵沉淀，4 °C，13 000 r/min 离心 30 min，收集沉淀，再次溶解于 HEPES 缓冲液中，4 °C 条件下透析 2 d，冷冻干燥，获得毁灭炭疽菌粗蛋白，并采用 SDS-PAGE 电泳检测蛋白分子量。

1.2.3 毁灭炭疽菌诱抗粗蛋白的纯化 Sephacryl S200 凝胶色谱柱分离纯化：根据蛋白混合物中各组分的分子量分布，选用 Sephacryl S200 (分离范围 5-250 kD) 凝胶色谱柱对其进行分离纯化。首先对蛋白液进行离心，上清冷冻干燥。干燥后样品用于 Sephacryl S200 凝胶渗透柱层析。取蛋白样品适量，用流动相溶解后过 0.22 μm 滤膜备用，按下列色谱条件进行纯化：Sephacryl S200 凝胶渗透色谱柱 (2.6×100 cm，柱体积 500 mL)；流动相：磷酸盐缓冲液 (含 100 mmol/L NaCl，pH 7.4)；流速：0.5 mL/min；柱温：室温；紫外检测波长：280 nm。合并收集各洗脱组分，离心浓缩，上清冷冻干燥。

采用 Sephacryl S200 凝胶渗透色谱获得的组份，为了减少上样体积，对其进行浓缩。浓缩后每个组份洗出大量的盐，上清部分通过 Sephadex G10 进行脱盐，盐析部分透析除盐。

Sephadex G10 凝胶色谱柱除盐：将 Sephacryl S200 凝胶渗透色谱获得组份的上清液过 0.22 μm 滤膜备用，各个组分 3 次上样，每次上样约 2 mL。色谱条件：Sephadex G10 凝胶渗透色谱柱（1.6 \times 100 mm，柱体积 180 mL）；流动相： H_2O ；流速：0.6 mL/min；柱温：室温；紫外检测波长：280 nm；每管收集 4 mL。合并收集各组分，调节磷酸盐缓冲液至终浓度为 20 mmol/L，冷冻干燥后于 -50 $^\circ\text{C}$ 冰柜中保存。

透析除盐：将浓缩液析出的盐部分透析，以 5 mmol/L PBS 为透析外液，透析袋截留量为 1000 Da，透析至透析外液电导值不再变化，透析内液分装冻干，并将各个组分分装冷冻干燥后于 -50 $^\circ\text{C}$ 冰柜中保存。

纯化组分的 SDS-PAGE 检测：每个组份各取一管冻干样品，加入 200 μL 水溶解，取 20 μL 溶液加入 5 μL SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液（5 \times ），100 $^\circ\text{C}$ ，3 min。然后进行 SDS-PAGE 检测。

1.2.4 诱抗蛋白对 TMV 的诱抗效果 采用 BCA^[15] 蛋白定量分析试剂盒将蛋白液浓度稀释为 6 mg/mL。当三生烟长至 6~8 片时，用纯化后浓度为 6 mg/mL 的诱抗蛋白进行整株喷雾处理，叶面均匀挂满雾滴不流淌即可，以喷施等量 HEPES 缓冲液和清水做为对照。诱导处理 3 d 后，采用常规的摩擦接种和半叶法^[16]接种病毒，用消毒棉棒蘸取少量病毒汁液，轻轻摩擦叶片，仅使叶片表皮细胞造成微伤口，每株接种 3 片展开叶。接种后喷清水冲洗残留汁液，25 $^\circ\text{C}$ 培养，3 d 后调查枯斑数，并计算诱抗效果。每个处理 5 株，共 3 次重复。诱抗效果 = (清水对照枯斑数 - 处理枯斑数) / 清水对照枯斑数 \times 100%

1.2.5 诱抗蛋白对烟草的促生作用 采用 BCA^[15] 蛋白定量分析试剂盒将蛋白液浓度稀释为 6 mg/mL。当小黄金烟草长至 6~8 片时，每隔 7 d 用 6 mg/mL 的诱抗蛋白进行整株喷雾处理，叶面均匀挂满雾滴不流淌即可，以喷施等量 HEPES 缓冲液和清水做为对照。40 d 后，定株调查株高、叶宽和茎围。设 3 次重复，每处理共 90 株。

1.3 数据分析

试验数据采用 Microsoft excel 2003 和 DPS 13.0 软件进行统计分析，并采用 Duncan 新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果

2.1 毁灭炭疽菌诱抗蛋白的粗提

毁灭炭疽菌菌丝经过加热、离心、硫酸铵分级沉淀和冷冻干燥后，分离提取获得诱抗粗蛋白，经 SDS-PAGE 电泳检测显示诱抗粗蛋白分子量大小约为 38 kD（图 1）。

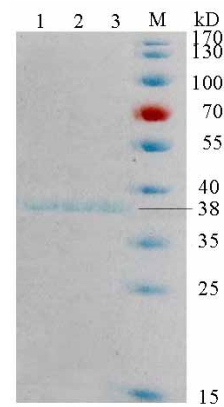


图 1 诱抗粗蛋白 SDS-PAGE 电泳图（1、2、3：诱抗蛋白，M：低分子量标准蛋白）

Fig. 1 Crude protein in SDS-PAGE (1, 2, 3: protein elicitor, M: marker)

2.2 毁灭炭疽菌诱抗粗蛋白的纯化

Sephacryl S200 凝胶色谱柱分离纯化：按上述色谱条件进行纯化后，其色谱图如图 2 所示。从图中可以看出，在洗脱体积 400 mL 之前，4 次洗脱重

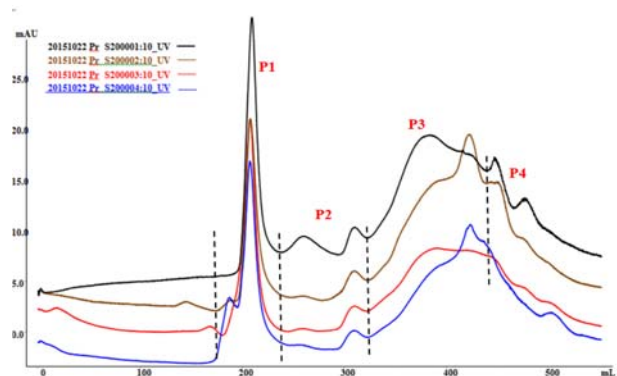


图 2 蛋白样品的 Sephacryl S200 分离图（上样 4 次）

Fig. 2 Sephacryl S200 separation of the protein elicitor

现性较好,但在洗脱体积 450 mL 左右每次洗脱色谱图均有所差别,但大体趋势类似。按峰收集了 4 个组分,分别命名为 Pro-P1 TX、Pro-P2 TX、Pro-P3 TX、Pro-P4 TX。合并收集后,每个组分旋转蒸发浓缩,等待冻干后通过 Sephadex G10 色谱柱脱盐。

Sephadex G10 凝胶色谱柱除盐:将 Pro-P1、Pro-P2、Pro-P3 和 Pro-P4 进行 Sephadex G10 脱盐处理,每个组分 3 次上样的重现性良好,蛋白样品与盐可以很好的分离。收取 60~75 mL 处浓缩后的洗脱液,加入 100 mmol/L 的 PBS 缓冲液至终浓度为 20 mmol/L,冷冻干燥后于 -50 °C 柜中保存。

SDS-PAGE:各个组份加水溶解后,其中 Pro-P1 TX 和 Pro-P2 TX 相当于浓缩 10 倍,Pro-P3 TX 和 Pro-P4 TX 相当于浓缩 15 倍。结果显示,Pro-P1~P4 TX 样品经电泳可以看到微弱的电泳条带,且从 P1 到 P4 电泳迁移率增大,表明从 P1 到 P4,蛋白的分子量降低;其中在 Pro-P2 TX (lane 2) 中发现了目的蛋白条带,其他组分中未发现;目的蛋白在浓缩时出现盐析现象,并存在于浓缩后的沉淀中;经追踪检测,目的蛋白存在于 Pro-P2-TX 组分中(图 3)。

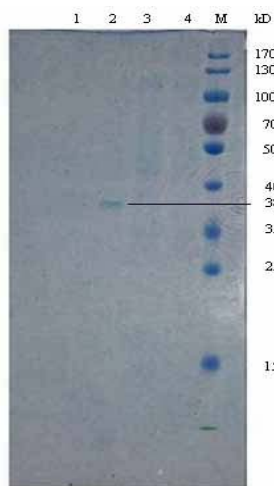


图 3 蛋白样品 SDS-PAGE 图 (1~4: Pro-P1~P4 TX; M: 低分子量标准蛋白)

Fig. 3 Purification of the protein in SDS-PAGE (1~4: Pro-P1~P4 TX; M: Marker)

2.3 诱抗蛋白对 TMV 的诱抗效果

纯化后的诱抗蛋白对 TMV 有一定的诱抗作用,

TMV 采用半叶法接种 3 d 后,可以观察到,诱抗蛋白处理组的枯斑数明显少于 HEPES 缓冲液和清水对照组的枯斑数(表 1)。诱抗蛋白液处理组枯斑数平均每半叶为 10.22 个,清水和 HEPES 缓冲液对照组枯斑数为 39.00 和 34.78,差异显著,而 HEPES 缓冲液与清水处理的烟株枯斑数无显著差异,诱抗蛋白对 TMV 的诱抗效果为 73.79%,说明诱抗蛋白对 TMV 有一定的预防保护作用。

2.4 诱抗蛋白对烟草的促生作用

纯化后的诱抗蛋白能够明显促进烟草的生长,表现为株高、叶宽和茎围的增加。诱抗蛋白诱导处理 40 d 后,与清水对照相比,诱抗蛋白处理组烟草株高约为 17.14 cm,增长 72.43%,叶宽约为 10.11 cm,增长 61.06%,茎围约为 0.63 cm,增长 29.50%,且差异显著(表 2)。

表 1 诱抗蛋白对 TMV 的诱抗效果

Table 1 Anti-tobacco TMV activity induced by the protein elicitor

处理	每半叶枯斑数	诱抗效果/%
诱抗蛋白液	10.22±2.95 b	73.79
HEPES	34.78±9.20 a	-
CK	39.00±5.26 a	-

注:同列数字后小写字母不同表示处理间差异显著 ($p<0.05$),下同。

表 2 诱抗蛋白对烟草的促生作用 cm

Table 2 Facilitating the growth of tobacco induced by the protein elicitor cm

处理	株高	叶宽	茎围
蛋白	17.14	10.10	0.63
水	9.94	6.27	0.49
HEPES	9.21	5.88	0.49

3 讨论

毁灭炭疽菌诱抗蛋白是本研究小组从毁灭炭疽菌中分离纯化出的一种蛋白质类激发子。由于诱抗蛋白是一类耐热性的蛋白质类激发子,因此在分离提取的过程中,本研究小组采取了加热离心的方法,首先去除其中大部分的非耐热性杂蛋白质。由于诱抗蛋白的分子量较小,一般为 30~70 kDa^[9],所以利用 30% 硫酸铵分级沉淀的方法,可以去除掉一些大分子的蛋白质。整个分离提取过程要在 4 °C 低

温条件下进行,以有效抑制蛋白酶对粗蛋白组分的分解作用。色素有紫外吸收作用,核酸可以扰乱蛋白溶液 pH 值,所以本试验通过加入活性炭和鱼精蛋白^[13]的方法,离心沉淀去除了大部分的色素和核酸物质,所有这些分离提取技术为后续的蛋白纯化鉴定了一定的基础。SDS-PAGE 是一种常用的电泳技术,经常应用于提纯过程中纯度的检测,其具有较高的灵敏度,一般只需要不到微克量级的蛋白质,而且通过电泳还可以同时得到关于分子量的情况^[17]。所以本实验室采用 SDS-PAGE 技术对分离纯化得到的蛋白组分进行检测,得到目的蛋白存在于 Pro-P2-TX 组分中,分子量大小约为 38 kDa。

TMV 是烟草整个生育期比较严重的病害,本研究小组用分离纯化后的诱抗蛋白处理烟草植株,使烟草植株产生诱导抗病性,其诱抗效果为 73.79%,说明该诱抗蛋白可以有效的预防 TMV 的发生。目前提高烟叶的生产质量与产量,增加烟农的收入,成为整个烟草行业亟待解决的问题,本试验研究发现,经该诱抗蛋白处理后,烟草植株的株高、叶宽和茎围较对照有明显的增加。诱抗蛋白作为一种生物防治方法,不存在化学农药的弊端,比如抗药性和食品安全等问题。为了更广泛的利用诱抗蛋白,本实验室还需要进一步的研究诱抗蛋白对烟草其他病虫害以及对不同品种植物的诱抗作用,同时需要增加田间的试验,以期对病害生物防治提高更有效的方法。

前人研究发现真菌源蛋白质类激发子可以通过不同的代谢途径实现信号传导,引起基因表达,激活植物自身防御系统和生长系统,促进植物生长,提高作物产量和产品品质^[18]。袁肖寒研究发现,经诱抗蛋白处理后,水稻过氧化物酶、多酚氧化酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶活性及过氧化氢含量有了显著变化^[19]。PR-1a、PR-1b 和 NPR1 基因都是病程相关蛋白基因,基因 PR-1 常作为植物系统抗性的重要特征以及水杨酸信号传导(Salicylic acid, SA)途径的标记基因^[20],NPR1 是植物系统获得抗性(Systemic acquired resistance, SAR)信号途径中的一个关键的调控因子^[21]。所以本研究小组在以后的试

验中,应该对该诱抗蛋白的作用机理进行探索,包括相关防御酶的活性变化,相关抗性基因的表达以及诱抗蛋白信号传导途径中的关键作用因子等,为该诱抗蛋白真正广泛应用于病害防治,并开发成一种新型的生物农药打下良好的基础。

参考文献

- [1] 朱贤朝,王彦亭,王智发. 中国烟草病害[M]. 北京:中国农业出版社,2002.
- [2] 刘华山,杨素勤,韩锦峰,等. 中草药剂对烟草普通花叶病毒病的防治效果[J]. 河南农业科学,2002(12):22-24.
- [3] 石晶盈,陈维信,刘爱媛. 植物内生菌及其防治植物病害的研究进展[J]. 生态学报,2006,26(7):2395-2401.
- [4] 邱德文,杨秀芬,刘峥,等. 植物激活蛋白对烟草抗病促生和品质的影响[J]. 中国烟草学报,2005(6):33-36.
- [5] Ebel J, Scheel D. Elicitor recognition and signal transduction[C]// Boller T, Meins F, eds, Plant Gene Research. Vienna: Springer Verlag, 1990: 292-295.
- [6] Templeton M D, Lamb C J. Elicitors and defense gene activation[J]. Plant Cell Environ, 1998, 11: 395-401.
- [7] 孙柏欣,邱德文,纪明山,等. 植物蛋白激发子研究进展[J]. 农业生物灾害预防与控制研究,2005:292-297.
- [8] Wei Z M, Laby R J, Zumoff C H, et al. Harpin elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*[J]. Science, 1992, 257(5066): 85-88.
- [9] 邱德文. 微生物蛋白农药研究进展[M]. 中国生物防治,2004,20(2):91-94.
- [10] 邱德文,肖友伦,姚庆,等. 植物激活蛋白对黄瓜的促生诱抗相关酶的影响[J]. 中国生物防治,2005,21(1):44.
- [11] 李杰,邱德文,杨秀芬,等. 极细链格孢菌 66 kDa 激活蛋白的纯化及诱导烟草抗 TMV 的功能[J]. 河北农业大学学报,2008(6):51-54.
- [12] 卜冰武,邱德文,曾洪梅,等. 大丽轮枝菌蛋白激发子 PevD1 诱导棉花抗病性及作用机理[J]. 植物病理学报,2014(3):254-264.
- [13] 李杰. 极细链格孢菌 66kDa 激活蛋白的纯化、理化性质和生物活性分析[D]. 兰州:甘肃农业大学,2008.
- [14] J E. 科林根. 精编蛋白质科学实验指南[M]. 李慎涛,译. 北京:科学出版社,2007.
- [15] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.

- [16] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 194.
- [17] 高艳利, 杨思文, 樊凯奇, 等. SDS-PAGE 电泳技术分析蛋白质的研究[J]. 辽宁化工, 2007(7): 460-463.
- [18] 冯飞. 交链孢一种真菌激活蛋白的分离纯化及其基因的克隆与表达[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2004.
- [19] 袁肖寒, 顾成波, 邱德文, 等. 新型真菌源激活蛋白诱导水稻抗病性及其生理机制[J]. 植物研究, 2013(2): 220-224.
- [20] Van Loon L I C, Van Strien E A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR1 type proteins[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1999, 55: 85-97.
- [21] Spoel S H, Koornneef A, Claessens S M C, et al. NPR1 modulates cross-talk between salicylate and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol[J]. Plant Cell, 2003, 15(3): 760-770.

《中国烟草学报》2016年第3期目次

- 1 S(-)-尼古丁在气相和水相存在形式的计算..... 蒋举兴, 吴俊, 王明锋, 等
- 10 超声萃取-气相色谱-质谱法测定烟用水基胶中的5种异噻唑啉酮杀菌剂..... 姬厚伟, 张丽, 赵新海, 等
- 17 极性搅拌磁子萃取-GC/MS分析主流烟气口腔模拟吸收液中的极性成分..... 李晶, 耿永勤, 徐济仓, 等
- 24 硝酸钾和柠檬酸钾对典型烤烟热解动力学及燃烧特性的影响..... 张亚平, 周顺, 何庆, 等
- 31 磁力式烟草穴盘精密播种机的设计与试验..... 何玉静, 谢珣, 史景钊, 等
- 37 CaCl₂对强光胁迫下烤烟光合特性的影响 魏明月..... 云菲, 刘国顺, 宋亮
- 44 基于高光谱分析的植烟土壤有机质和全氮含量预测研究..... 王一丁, 赵铭钦, 刘鹏飞, 等
- 52 烟草功能-结构模型 GreenLab-Tobacco 的构建..... 徐照丽, 孙艳, 吴茜, 等
- 60 石墨纳米溶胶对钾的吸附特性及对烟草钾吸收的影响..... 李玉磊, 梁太波, 王宝林, 等
- 67 基于非线性 PLS 的烟叶中 K 和 Cl 近红外光谱建模研究..... 陆伟, 宋楠
- 72 不同产地烟草花蕾精油的抑菌和抗氧化能力比较研究..... 许春平, 李萌姍, 谭兰兰, 等
- 79 云南陆良植烟土壤有效磷空间变异及其对烟叶质量和面源污染潜在风险的评估..... 李强, 刘晓颖, 王佩, 等
- 88 云南省烟田蓟马种类和分布调查..... 杨真, 谢永辉, 张宏瑞, 等
- 94 过表达 Lcy-b 基因对烟草类胡萝卜素代谢及香气物质的影响..... 杨永霞, 张嘉炜, 张洪映, 等
- 101 BABA 诱导烟草抵御镉胁迫初步研究..... 刘松, 郭家明, 何宽信, 等
- 109 烟草经济新常态下卷烟品牌营销策略分析..... 辜菊水, 王宏, 屈湘辉, 等
- 116 新常态下烟草经济增长的途径..... 蒋志兴, 施维, 龚明明, 等
- 121 论取消烟草专卖业务资格的法律属性..... 赵飞龙
- 126 烟草秸秆生物有机肥产业化绿色发展的现状与策略..... 韩非, 王瑞
- 133 烟农对专业化服务采纳的行为研究——基于资源基础和交易成本的视角..... 邓蒙芝, 李富欣