

蒙氏假单胞菌 3A 菌株对烟草漂浮育苗中 TMV 的钝化效果

袁莲莲¹, 王耀锋², 刘相甫³, 靳志伟⁴, 张静⁵, 李伟⁵,
董石飞⁵, 赵存孝², 黄明迪⁶, 王凤龙¹, 杨金广^{1*}

(1. 中国农业科学院烟草研究所, 国家烟草行业烟草病虫害监测与综合治理重点开放实验室, 青岛 266101;
2. 甘肃省烟草公司庆阳市公司, 庆阳 745000; 3. 中国烟叶公司, 北京 100055; 4. 甘肃省烟草公司,
兰州 741306; 5. 红云红河烟草(集团)有限责任公司, 昆明 650231; 6. 甘肃省烟草公司陇南市公司, 陇南 746000)

摘要 选用对烟草花叶病毒 *Tobacco mosaic virus* (TMV) 具有显著拮抗活性的蒙氏假单胞菌 *Pseudomonas monteilii* 3A 菌株对烟草漂浮育苗过程中被 TMV 污染的育苗棚、育苗盘、基质及剪叶机械等进行生物钝化, 并利用 real-time RT-PCR 对污染基质中 TMV 的含量进行了定量检测。结果显示, 200、400 倍及 600 倍 *P. monteilii* 3A 菌悬液稀释液均可显著钝化病毒残留干叶及干根中的 TMV; 剪叶机械经不同稀释倍数的 *P. monteilii* 3A 菌悬液处理后, 在一定程度上抑制了 TMV 的发生, 相对防效达 51.42%~100%; 基质经不同稀释倍数的 *P. monteilii* 3A 菌悬液处理后, 其中 TMV 的含量也下降了 72.73%~88.46%, 对 TMV 的相对防效达 61.56%~87.46%。其中, 200 倍 *P. monteilii* 3A 菌悬液处理育苗棚、育苗盘 20 min 以上, 浸泡剪叶机械 1 min 以上对 TMV 钝化效果最好。

关键词 烟草普通花叶病毒(TMV); 蒙氏假单胞菌 3A 菌株; 漂浮育苗

中图分类号: S 435.72 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.02.006

Passivation effect of *Pseudomonas monteilii* 3A on *Tobacco mosaic virus* in tobacco float seedlings

Yuan Lianlian¹, Wang Yaofeng², Liu Xiangfu³, Jin Zhiwei⁴, Zhang Jing⁵, Li Wei⁵,
Dong Shifei⁵, Zhao Cunxiao², Huang Mingdi⁶, Wang Fenglong¹, Yang Jinguang¹

(1. *Tobacco Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Tobacco Pest Monitoring, Controlling & Integrated Management, Qingdao 266101, China*; 2. *Qingyang Tobacco Company, Gansu Tobacco Cooperation, Qingyang 745000, China*; 3. *China National Leaf Tobacco Corporation, Beijing 100055, China*; 4. *Gansu Tobacco Cooperation, Lanzhou 741306, China*; 5. *Hongyun and Honghe Tobacco (Group) Co., Ltd., Kunming 650231, China*;
6. *Longnan Tobacco Company, Gansu Tobacco Cooperation, Longnan 746000, China*)

Abstract *Pseudomonas monteilii* 3A strain was selected to evaluate the passivation effect on *Tobacco mosaic virus* (TMV) in tobacco seedlings by real-time RT-PCR, combined with the incidence and disease index of the virus disease. The results showed that *P. monteilii* 3A bacterial liquid with different concentration gradients (200, 400 and 600×) had significant passivation effects on TMV in the residual dry roots and leaves of the old seedling sheds and trays. Meanwhile, using the clipping tool treated with *P. monteilii* 3A bacterial liquid could reduce the incidence and disease index of the virus disease, and the relative control effect was 51.42%—100%. *P. monteilii* 3A bacterial liquid could reduce the amount of TMV in the matrix polluted with TMV through bio-passivation by 72.73%—88.46%, and the relative control effect on the virus disease was 61.56%—87.46%. The best dilution of *P. monteilii* 3A bacterial liquid was 1:200, and the optimum contact time on old seedling sheds and trays was no less than 20 min. Meanwhile, the clipping tools should be treated more than 1 min.

Key words *Tobacco mosaic virus* (TMV); *Pseudomonas monteilii* 3A; float seedling

收稿日期: 2016-03-24 修订日期: 2016-06-07

基金项目: 甘肃省烟草公司科技项目(2015-08)

* 通信作者 E-mail:jinguangyang@126.com

烟草花叶病毒 *Tobacco mosaic virus* (TMV) 引起的病毒病可严重危害农作物的正常生长。TMV 在农作物上主要通过农事操作进行传播,烟草育苗过程中被 TMV 污染的育苗棚、育苗盘、基质及剪叶机械等是 TMV 的重要初侵染源^[1]。由于 TMV 拥有较高的侵染稀释限点,极微量的病毒颗粒就可以传播,且 TMV 的抗逆性较强,其病毒颗粒在基质中残留 10 年仍具有较强的侵染活性^[2-3];此外,生产上常用的育苗盘一般多孔,不易进行清洗和消毒,且经常会有一些烟苗残体黏附在苗盘上,TMV 可在干的烟苗残体中存活数年^[4];再者,烟草育苗期需进行多次剪叶,且育苗集中度高,一旦存在毒源则容易大面积传播^[5]。为了能够更有效地控制 TMV 侵染带来的危害,应从根本上减少其初侵染源,切断其传播途径^[6]。近些年,实际生产中主要通过喷施抗病毒药剂对 TMV 进行防治,但效果并不理想,且存在着严重的农药残留问题,导致农作物和环境被严重污染。1925 年,有研究发现被细菌污染的植物病毒提取液丧失了侵染能力,这为利用微生物及其代谢产物防治植物病毒病提供了新的思路^[7]。微生物农药为无公害生物制剂,具有安全可靠、对环境友好等优点,应用其防治 TMV 可避免环境污染和农药残留^[8]。因此,筛选有效、安全的生物制剂对烟草育苗过程中 TMV 的防控具有重要意义。

研究者曾对育苗过程中剪叶机械的消毒剂进行了筛选^[9-11],分析了蒸汽、部分药剂对旧漂浮盘残留物中 TMV 的钝化效果^[11-12],但少有喷施有效的生物制剂钝化育苗棚、育苗盘中病苗残留物(根、叶)、基质及剪叶机械中 TMV 的研究报道,而生物制剂如能同时用于育苗棚、苗盘、基质及剪叶机械等钝化 TMV,在实际生产上将更为经济方便。结合实际生产情况,本研究选用对 TMV 具有较强拮抗活性的蒙氏假单胞菌 *Pseudomonas monteilii* 3A 菌液喷施于育苗棚、剪叶机械、基质及育苗盘,比较几种常用浓度菌液钝化 TMV 的效果,以期为烟草育苗过程中钝化 TMV 的生物制剂的选择和科学使用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

供试烟草品种为‘NC89’,在中国农业科学院烟

草研究所试验基地培育至 4~6 叶期健康烟苗供试。TMV 毒源系及 *P. monteilii* 3A 菌株均由中国农业科学院烟草研究所分离纯化和鉴定,TMV 经过枯斑寄主三生烟单斑分离 3 次后接种于‘NC89’幼苗上,于 25~28℃ 防虫条件下保存备用,*P. monteilii* 3A 在 -70℃ 条件下于甘油中保存。抗 TMV 药剂对照为 8% 宁南霉素水剂,由德强生物股份有限公司提供。

1.2 蒙氏假单胞菌 3A 菌液对 TMV 体外抑制效果测定

将甘油中保存的 *P. monteilii* 3A 菌株,在 LB 固体培养基上画线培养,挑取单菌落接种于 3 mL LB 液体培养基中,于 28℃ 扩大培养 48 h,取纯化好的菌株涂片,进行革兰氏染色及运动力检测。纯化好的菌株进行生理生化测定,经菌株鉴定为 *P. monteilii* 3A 后,以 1:100 比例接种于 LB 液体培养基中,进行大规模发酵培养,最后用无菌水稀释成 1×10^8 cfu/mL 作为菌液备用。

利用局部枯斑法测定 *P. monteilii* 3A 菌液对 TMV 的抑制效果^[13]。称取 2 g 新鲜 TMV 病叶加 100 mL 灭菌磷酸缓冲液研磨成匀浆,用灭菌纱布过滤后取上清液作为接种液;*P. monteilii* 3A 菌液用无菌水稀释 200、400 倍和 600 倍。分别将不同浓度的 3A 菌液稀释液与 TMV 接种液等量混合,室温下分别静置 10、20 min 后摩擦接种,接种前叶片表面喷适量金刚砂。左半叶接种磷酸缓冲液处理的 TMV 接种液(对照),右半叶接种 *P. monteilii* 3A 菌液与 TMV 接种液的混合液,每半片叶接种 200 μ L。接种后用清水进行叶面冲洗,3 次重复。接种 3 d 左右后进行枯斑数统计,并计算抑制率。

抑制率(%) = $[1 - (\text{处理平均枯斑数} / \text{对照平均枯斑数})] \times 100$ 。

1.3 病苗残留干叶、干根的蒙氏假单胞菌 3A 菌液浸泡处理

选用稀释 200、400、600 倍的 *P. monteilii* 3A 菌液来模拟旧育苗盘、育苗棚的处理。将感染 TMV 的烟苗的细干根及干叶放置于烧杯中,分别加入 20 倍材料体积的不同稀释倍数的菌液浸泡 20 min,倒去菌液,用塑料薄膜密封烧杯口,室温下放置 2 d,随后加入 20 倍材料体积的去离子水研磨,过滤后取上清液进行接种;以 LB 液体培养液

浸泡感病组织作为对照。采用局部枯斑法测定, 接种 3 d 后统计枯斑数。

1.4 蒙氏假单胞菌 3A 菌液对 TMV 污染剪叶机械的浸泡处理

取新鲜 TMV 病叶 3~5 片, 用剪刀反复多次剪切病叶, 然后将感染 TMV 的剪刀分别在稀释 200、400、600 倍的 *P. monteilii* 3A 菌液中浸泡 10 s、1 min 和 5 min, 清水冲洗后剪叶, 另设清水对照。每个处理 6 株烟苗, 每株剪 3 片烟叶, 重复 3 次, 剪叶后每个处理分开单独培养。30 d 后统计发病率、病情指数。

发病率(%) = $100 \times \text{发病株数} / \text{调查总株数}$;

病情指数 = $100 \times (\sum \text{各级病株数} \times \text{该病级值}) / (\text{调查总株数} \times \text{最高级值})$;

控制效果(%) = $100 \times (\text{对照区病情指数} - \text{处理区病情指数}) / \text{对照区病情指数}$ 。

1.5 蒙氏假单胞菌 3A 菌液对 TMV 污染基质中 TMV 的钝化效果

10 g 新鲜 TMV 病叶加 100 mL 磷酸缓冲液研磨成匀浆, 按照 1:5 (mL/g) 比例浇灌基质。然后用不同浓度的 3A 菌液分别按照 1:5 (mL/g) 比例处理病毒汁液浇灌过的基质, 室温静置 15 d, 以此基质种植 4 叶期 'NC89' 幼苗。以 0.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 宁南霉素水剂按照 1:5 (mL/g) 比例处理病毒汁液浇灌过的基质为药剂对照, 无菌水处理为空白对照。30 d 后统计发病率、病情指数, 并再采集各处理的基质利用 real-time RT-PCR 测定其 TMV 相对含量。

1.6 Real-time RT-PCR

采集被 TMV 污染的基质, 依据 McGrath 等的方法进行离心处理^[14], 后利用 PowerSoilTM RNA Extraction Kit (MoBio, USA) 进行总 RNA 提取, 提取方法参照试剂和说明书进行操作, 每个样品进行 3 次重复提取。

参考试剂盒说明书合成 cDNA, 利用 PerlPrimer 软件设计 TMV 的特异性引物, 引物由宝生物工程(大连)有限公司 (TaKaRa) 合成, 烟草内参基因 qActinF: 5'-CAAGGAAATCACCGCTTTGG-3'; qActinR: 5'-AAGGGATGCGAGGATGGA-3'; qTMV5: 5'-ATTAGACCCGCTAGTCACAGCAC-3'; qTMV3: 5'-GTGGGGTTCGCTGATT-3'^[15]。根据 SYBR Premix Ex TaqTMII (Perfect real time) 的说

明书设定 PCR 反应体系及条件, 设置 5 个 cDNA 浓度梯度, 10、10²、10³、10⁴、10⁵, 每个梯度各 3 次重复, 利用 ABI 7500 Real-Time PCR system (ABI, USA) 自带的 SDS 软件进行数据分析, 生成标准曲线方程。同时, 通过 Real-Time PCR 检测 TMV 基因的积累量^[16]。

1.7 数据分析

所得数据均用 Excel 2010 软件处理, 同时利用 SPSS (version 14.0) 统计软件中单样本 *t*-test 对不同处理的差异显著性进行分析。

2 结果分析

2.1 蒙氏假单胞菌 3A 菌液对新鲜病叶中 TMV 的防控作用

不同稀释倍数的 *P. monteilii* 3A 菌液与 TMV 接种液等量混合并分别静置 10 min、20 min 后接种 'NC89', 以测试 *P. monteilii* 3A 对 TMV 的钝化效果。从表 1 中可看出, *P. monteilii* 3A 菌液稀释液对 TMV 的抑制率与混合后静置的时间呈正相关, 混合液静置 10 min 后进行接种, 其 200、400、600 倍稀释液对 TMV 的抑制率分别为 100.00%、76.34%、72.68%; 混合液静置 20 min 后接种, 对 TMV 的抑制率分别为 100.00%、82.77%、77.43%, 表明 *P. monteilii* 3A 菌液可显著钝化新鲜病叶中的 TMV, 钝化效率高达 72.68%~100.00%, 对 TMV 的钝化效果随混合液静置时间的延长而增强, 但均随菌液浓度的降低而下降, 采用 200 倍 *P. monteilii* 3A 菌液, 与 TMV 接种液的接触时间不少于 10 min 时抑制效果最佳。

2.2 蒙氏假单胞菌 3A 菌株对病苗残留干叶、干根中 TMV 的钝化作用

选用稀释 200、400、600 倍的 *P. monteilii* 3A 菌液浸泡感染 TMV 的病苗残留干叶及干根后接种健康烟苗测定 *P. monteilii* 3A 菌液对 TMV 的钝化作用。结果表明, 以 LB 液体培养基浸泡后的感病组织作为毒源接种健康烟苗, 接种叶片上出现较多枯斑, 而经不同倍数 *P. monteilii* 3A 菌液浸泡后的感病组织浸提液接种的叶片枯斑数量较少或者没有。表明不同浓度的 *P. monteilii* 3A 菌液均可显著钝化病苗残留干叶及干根中的 TMV, 200 倍 *P. monteilii* 3A 菌液的钝化效果最佳。

表 1 不同浓度蒙氏假单胞菌 3A 菌液对新鲜病叶中 TMV 的钝化效果

Table 1 Prevention effects of *Pseudomonas monteilii* 3A bacterial liquid on TMV in fresh tobacco diseased leaves

处理 Treatment	稀释 倍数/倍 Dilution multiple	接触 10 min 的枯斑数/个 No. of local necrotic lesions after contact for 10 min		抑制率/% Inhibition rate	接触 20 min 的枯斑数/个 No. of local necrotic lesions after contact for 20 min		抑制率/% Inhibition rate
		对照 CK	处理 Treatment		对照 CK	处理 Treatment	
		蒙氏假单胞菌 <i>P. monteilii</i> 3A	200		55.30	0	
	400	35.50	8.40	76.34	38.30	6.60	82.77
	600	142.40	38.90	72.68	133.80	30.20	77.43



左半叶：病样经LB液体培养基浸泡后进行接种；右半叶：病样经不同稀释倍数的*P. monteilii* 3A菌悬液浸泡后进行接种；
a: 600倍3A菌悬液处理；b: 400倍3A菌悬液处理；c: 200倍3A菌悬液处理
The left half-leaf was inoculated with TMV treated with LB liquid medium, and the right half-leaf was inoculated with TMV
treated with different concentrations of *P. monteilii* 3A bacterial suspension. a: 600-fold bacterial suspension; b: 400-fold
bacterial suspension; c: 200-fold bacterial suspension

图 1 不同稀释倍数的蒙氏假单胞菌 3A 菌株菌悬液对 TMV 的钝化作用

Fig. 1 Passivation of *Pseudomonas monteilii* 3A on TMV at different concentrations of bacterial suspension

2.3 蒙氏假单胞菌 3A 菌株对被污染剪叶机械上 TMV 的钝化效果

表 2 列出了蒙氏假单胞菌 3A 菌株对被污染剪刀中 TMV 的钝化效果。从表中可看出，剪刀经清水浸泡处理的对照，TMV 发病率为 34%左右，而剪刀经过不同稀释倍数的 *P. monteilii* 3A 菌悬液处理

后，在一定程度上抑制了烟草普通花叶病的发生，相对防效达 51.42%~100%。随着 *P. monteilii* 3A 菌悬液处理浓度升高，或处理时间延长，TMV 发病率显著下降，防治效果明显增加。剪刀经稀释 200 倍的 *P. monteilii* 3A 菌悬液浸泡不少于 1 min 时对 TMV 的钝化效果最好，防治效果达 100%。

表 2 蒙氏假单胞菌 3A 菌株对污染剪刀中 TMV 的钝化效果¹⁾

Table 2 Passivation effect of *Pseudomonas monteilii* 3A on TMV in clipping tools

处理 Treatment	稀释倍数/倍 Dilution multiple	发病率/% Disease incidence			相对防效/% Relative control effect		
		10 s	1 min	5 min	10 s	1 min	5 min
		蒙氏假单胞菌 <i>P. monteilii</i> 3A	200	(7.28±0.04)dA	(0.00±0.00)dB	(0.00±0.00)dB	(77.30±0.07)aB
	400	(11.24±0.03)cA	(5.59±0.07)cB	(1.24±0.04)cC	(65.43±0.03)bC	(86.34±0.02)bB	(91.32±0.10)bA
	600	(18.34±0.10)bA	(11.56±0.09)bb	(4.64±0.09)bC	(51.42±0.12)cC	(65.24±0.11)cB	(88.05±0.12)cA
无菌水 Sterile water	0	(34.24±0.17)aA	(34.65±0.10)aA	(34.42±0.22)aA	—	—	—

1) 同行数据后具有不同大写字母者表示在 0.05 水平差异显著；同列数据后具有不同小写字母者表示在 0.05 水平差异显著。
The data in the same row followed by different capital letters are significantly different ($P < 0.05$); the data in the same column followed by different lowercase letters are significantly different ($P < 0.05$).

2.4 蒙氏假单胞菌 3A 菌株对 TMV 污染的植烟土壤 中 TMV 的钝化效果

经 AB7500 Real-time PCR system 自带的 SDS 软件分析 Real-time PCR 检测所得的数据,可生成 TMV 和 *Actin* 基因的标准曲线,经稀释 $10 \sim 10^5$ 5 个梯度处理的 cDNA 起始模板量和循环阈值 *Ct* 的线性关系曲线。TMV 基因的标准曲线方程: $y = -3.8675x + 33.5, R^2 = 0.9960$; *Actin* 的标准曲线方程: $y = -2.4021x + 30.931, R^2 = 0.9972$ 。 R^2 均达 0.98 以上,熔解曲线峰单一,无非特异性扩增,定量准确,符合实时荧光定量 PCR 要求。

表 3 显示了蒙氏假单胞菌 3A 菌株对 TMV 污

染基质中 TMV 的钝化效果。可看出,与无菌水处理相比,经不同稀释倍数 *P. monteilii* 3A 菌悬液处理后,基质中 TMV 的含量显著降低, TMV 的发病率也显著下降,相对防效达 61.56%~87.46%。随着 *P. monteilii* 3A 菌悬液浓度的升高, TMV 发病率显著下降,防治效果明显增强,其中,400 倍 *P. monteilii* 3A 菌悬液处理对基质中 TMV 的钝化效果与宁南霉素相近,相对防效在 75%左右。处理后基质中 TMV 的含量下降了 72.73%~88.46%,表明 *P. monteilii* 3A 菌悬液可明显减少植烟基质中 TMV 的含量。200 倍 *P. monteilii* 3A 菌悬液对 TMV 的钝化作用最佳。

表 3 蒙氏假单胞菌 3A 菌株对基质中 TMV 的钝化作用¹⁾

Table 3 Passivation effect of *Pseudomonas monteilii* 3A on TMV in matrix

处理 Treatment	发病率/% Disease incidence	相对防效/% Relative control effect	基质中 TMV 拷贝数/个·g ⁻¹ Amount of TMV in matrix
1:200 <i>P. monteilii</i> 3A	(7.08±0.01)d	(87.46±0.04)a	(2 864.02±5.02)d
1:400 <i>P. monteilii</i> 3A	(16.26±0.04)c	(76.59±0.09)b	(4 573.12±7.13)c
1:600 <i>P. monteilii</i> 3A	(28.68±0.07)b	(61.56±0.08)c	(6 747.34±8.03)b
宁南霉素(阳性对照) Ningnanmycin (positive control)	(17.33±0.02)c	(74.46±0.14)b	(4 457.26±7.52)c
无菌水(空白对照) Sterile water (negative control)	(53.24±0.10)a	—	(24 745.64±10.82)a

1) 基质中 TMV 拷贝数为 6 个采样点的平均值,同列数据后具有不同小写字母者表示在 0.05 水平差异显著。

The TMV copies in matrix are means of six sampling sites. The data in the same column followed by different lowercase letters are significantly different ($P < 0.05$).

3 讨论与结论

烟草生产过程中易受到多种病毒的危害,比较不同病毒的体外保毒期、钝化温度、稀释限点及传播方式等可看出, TMV 抗逆性最强、最易通过育苗过程传播,且烟苗一旦被 TMV 侵染,则无法进行有效防治^[5]。因此,本研究测定生防菌株蒙氏假单胞菌 3A 菌株对烟草漂浮育苗中 TMV 的钝化效果,通过消灭初侵染源和切断传播途径来进行防治,同时,对生产上利用生物制剂防治烟草漂浮育苗过程中其他病毒具有指导意义。

本研究选用对 TMV 具有显著拮抗活性的生防菌株蒙氏假单胞菌 3A 菌株,对烟草漂浮育苗过程中被 TMV 污染的育苗棚、育苗盘、基质及剪叶机械等进行生物钝化,并利用 real-time RT-PCR 对污染基质中 TMV 的含量进行了定量检测。结果显示,不同倍数 *P. monteilii* 3A 菌悬液均可显著钝化感病烟苗残留干叶及干根中的 TMV;剪叶机械经不同稀释倍数的 *P. monteilii* 3A 菌液处理后,在一定程度上可抑制 TMV 的发生,相对防效达 51.42%~100%;基

质经不同稀释倍数的 *P. monteilii* 3A 菌液处理后,其中 TMV 的含量也下降了 72.73%~88.46%,对 TMV 的相对防效 61.56%~87.46%。总体来说, *P. monteilii* 3A 对烟草漂浮育苗中 TMV 的钝化效果显著。

本研究中使用的 TMV 浓度较高,在实际生产上剪叶机械、苗盘、基质和人为操作等的带毒浓度远比试验浓度低,因此,试验中确定的最佳浓度和使用时间同样可应用于实际生产。试验结果显示,200 倍 *P. monteilii* 3A 菌液对 TMV 钝化效果最好,与育苗棚、育苗盘的接触时间应不少于 20 min,剪叶机械应浸泡 1 min 以上。与其他化学抗病毒制剂或消毒剂相比, *P. monteilii* 3A 菌液主要表现为具有活性的生防菌,安全、持续、无污染和低碳。这就为当前有机无公害生态农产品的生产提供了必要的条件,值得推广应用。

国内外已有很多有关假单胞菌作为生防菌的研究,结果表明, *P. monteilii* 可以胞外分泌酯酶^[17]。徐丽等的研究显示 *P. monteilii* 可作为五味子植株根内生菌抑制五味子茎基腐病菌、穿山龙黑斑病菌

及人参锈腐病菌的活性^[18]。翟熙伦的研究表明,蒙氏假单胞菌 4A1 菌株发酵液中的活性物质可破坏 TMV 粒体,对病毒产生钝化作用,破坏病毒蛋白亚基之间的作用力,使病毒粒体缺乏完整性,从而无法在寄主体内增殖,降低病毒的侵染能力^[19]。本研究的 3A 菌株为蒙氏假单胞菌,对烟草漂浮育苗中 TMV 的钝化效果显著,对植物病毒病的防治有潜在的应用价值,但是其与 TMV 在烟草植株内的作用机制还有待进一步深入研究。

参考文献

[1] 刘勇,江红甲,布云红,等.烟草漂浮苗花叶病毒病重要初侵染源的探讨[J].浙江农业科学,2008(4):483-485.

[2] Zasadzinski J A N, Sammon M J, Meyer R B, et al. Freeze-fracture imaging of ordered phases of *Tobacco mosaic virus* in water [J]. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 1986, 138 (1): 211-229.

[3] Pande S, Rao J N, Upadhyaya H D, et al. Farmers' participatory integrated management of foliar diseases of groundnut [J]. *International Journal of Pest Management*, 2001, 47(2): 121-126.

[4] 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,2002:196-197.

[5] 曹毅,郭玉双,陆宁,等.3种消毒剂对烟草漂浮育苗中 TMV 的钝化效果[J].湖北农业科学,2012,51(19):4280-4283.

[6] 王凤龙.烟草病毒病综合防治技术[J].烟草科技,2002(4):43-45.

[7] Mulvania M. Cultivation of the virus of tobacco mosaic by the method of Olitsky [J]. *Science*, 1925, 62: 37.

[8] 于银霞,张飞云,田兆丰,等.微生物源抗植物病毒物质及其

抗病毒机理的研究进展[J].生物技术通报,2009(2):54-58.

[9] 吴德喜,杨程,李凡,等.二氧化氯对烟草漂浮育苗剪叶刀具的消毒作用研究[J].云南农业大学学报,2006,21(2):188-191.

[10] 刘勇,杨宇虹,陈学军,等.烟草漂浮育苗中剪叶工具消毒剂评价[J].中国烟草学报,2007,13(1):41-43.

[11] 刘勇.漂浮育苗池中烟草花叶病毒消毒剂的筛选[J].河南农业大学学报,2008,42(1):40-45.

[12] 曾嵘,滕永忠,张庆刚,等.污染 TMV 的烤烟漂浮育苗盘和育苗池的消毒方法研究[J].云南农业大学学报,2004,19(6):692-695.

[13] 陈年春.农药生物测定技术[M].北京:北京农业大学出版社,1991:219-226.

[14] McGrath K C, Thomas-Hall S R, Cheng Chuting, et al. Isolation and analysis of mRNA from environmental microbial communities [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2008, 75 (2):172-176.

[15] 翟熙伦,杨金广,申莉莉,等.一株对 TMV 和 PVY 具有拮抗活性生防菌的筛选与鉴定[J].中国农业科学,2012,45(11):2180-2188.

[16] 毕建华,杨金广,欧阳明安,等.黏质沙雷氏菌次生代谢物对 TMV 的抑制机理[J].中国农业科学,2014,(5):912-922.

[17] Wang S L, Lin Y T, Liang T W, et al. Purification and characterization of extracellular lipases from *Pseudomonas monteilii* TKU009 by the use of soybeans as the substrate [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2009, 36(1): 65-73.

[18] 徐丽,严雪瑞,傅俊范,等.五味子内生拮抗细菌的筛选与鉴定[J].植物保护,2009,35(3):47-50.

[19] 翟熙伦.蒙氏假单胞菌(*Pseudomonas monteilii*)的活性小分子物质对 TMV、PVY 的抑制作用[D].北京:中国农业科学院,2012.

(责任编辑:田 喆)

(上接 28 页)

[29] 伏建国,强胜,朱云枝.链格孢菌原生体的制备与限制性内切酶介导整合(REMI)转化的致病性诱变[J].菌物学报,2005,24(3):407-413.

[30] 刘振盼.玉米大斑病菌 REMI 转化体系的建立和分子核型的初步分析[D].保定:河北农业大学,2007.

[31] 刘丽华.限制性内切酶介导(REMI)玉米大斑病菌的遗传转化及其转化子表型分析[D].保定:河北农业大学,2007.

[32] Lu S, Lyngholm L, Yang G, et al. Tagged mutations at the Tox1 locus of *Cochliobolus heterostrophus* by restriction enzyme-mediated integration [J]. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91: 12649-12653.

[33] Granado J D, Kertesz-Chaloupkova K, Aebi M, et al. Restriction enzyme-mediated DNA integration in *Coprinus cinereus* [J]. *Molecular and General Genetics*, 1997, 256: 28-36.

[34] Shuster J R, Connelley M B. Promoter-tagged restriction enzyme-mediated insertion (PT-REMI) mutagenesis in *Aspergillus niger* [J]. *Molecular and General Genetics*, 1999, 262: 27-34.

[35] 张文芸,周益民,范永坚,等.稻瘟病菌限制酶介导整合 REMI 转化的致病性诱变[J].南京师大学报(自然科学版),2002,25

(2):17-21.

[36] 胡仕凤.木霉菌 REMI 突变株构建及其功能挖掘[D].长沙:湖南农业大学,2007.

[37] 周礼红,陈平,赵永霞,等. REMI 介导红曲霉遗传转化条件的优化[J].湖北农业科学,2012,51(18):4129-4133.

[38] 周礼红,王正祥,诸葛健.红曲霉不同转化方法的比较[J].遗传,2006,28(4):479-485.

[39] 冯建海,张玮,李兴红,等.甘蓝枯萎病菌 REMI 转化体系的建立[J].植物保护,2013,39(2):108-111.

[40] 夏淑春,王学武,张茹琴,等.玉米弯孢叶斑病菌 REMI 白化突变体的筛选与致病性测定[J].生物技术通报,2014,12:111-116.

[41] 张鑫,刘爱芬,张玮,等.葡萄溃疡病菌限制性内切酶介导整合方法的建立及转化子库的构建[J].微生物学通报,2013,40(7):1272-1278.

[42] 包其郁,孙永巧,王慧峰,等.影响电转化效率的几个因素探讨[J].温州医学院学报,2003,33(1):9-11.

(责任编辑:田 喆)