

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2021)01-0052-07
DOI: 10.19918/j.cnki.1672-3635.2021.01.008

马铃薯病毒外壳蛋白融合基因转化马铃薯及其抗病性分析

胡新元^{1,2}, 贾小霞^{2,3,4}, 刘石^{2,3,4}, 陈晓艳⁵, 黄伟^{2,3,4}, 齐恩芳^{2,3,4*}

(1. 甘肃省农业科学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省马铃薯种质资源创新工程实验室, 甘肃 兰州 730070;
3. 甘肃省农业科学院马铃薯研究所, 甘肃 兰州 730070; 4. 农业部西北旱作马铃薯科学观测实验站, 甘肃 渭源 748201;
5. 哈密市伊州区种业研究开发中心, 新疆维吾尔自治区 哈密 839001)

摘要: 将多种病毒的有效核酸片段拼接成融合基因转入马铃薯可获得多抗马铃薯材料。针对马铃薯生产中分布广泛、危害严重并经常混合感染的马铃薯X病毒(PVX)、马铃薯Y病毒(PVY)、马铃薯卷叶病毒(PLRV)和马铃薯S病毒(PVS), 开展了利用基因工程方法获得兼抗4种马铃薯病毒转基因马铃薯材料的研究。试验在前期获得含4种马铃薯病毒外壳蛋白基因片段的质粒pART27-XSYV-rh的基础上, 通过根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导转化马铃薯(*Solanum tuberosum*)品种‘陇薯3号’, PCR扩增和PCR-Southern杂交证明, 4价融合基因已整合到马铃薯基因组中。qRT-PCR分析表明, 该融合基因在转基因植株中能正常表达。3株转基因植株的抗病性鉴定结果表明, 2株对4种病毒同时具有抗性; 1株对PLRV侵染表现阳性, 对另外3种病毒同时具有抗性。

关键词: 马铃薯病毒; 融合基因; 转基因马铃薯; 抗病性

Transformation of Potato Virus Coat Protein Fusion Gene into Potato and Analysis of Its Disease Resistance

HU Xinyuan^{1,2}, JIA Xiaoxia^{2,3,4}, LIU Shi^{2,3,4}, CHEN Xiaoyan⁵, HUANG Wei^{2,3,4}, QI Enfang^{2,3,4*}

(1. Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070, China; 2. Gansu Engineering Laboratory of Potato Germplasm Resources Innovation, Lanzhou, Gansu 730070, China; 3. Potato Research Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070, China; 4. Northwest Dry Farming Potato Scientific Observation and Experimental Station of Ministry of Agriculture, Weiyuan, Gansu 748201, China; 5. Seed Industry Research and Development Center, Hami, Xinjiang Uyghur Autonomous Region 839001, China)

Abstract: The effective nucleic acid fragments of multiple viruses were spliced into fusion genes and transferred to potato to obtain multi-resistant potato materials. Potato diseases, such as potato virus X (PVX), potato virus Y (PVY), potato leafroll virus (PLRV) and potato virus S (PVS), are becoming more and more rampant, which greatly reduces potato yield, especially multi-virus complex infection. Genetic engineering methods were used to obtain transgenic potato materials with the ability to resist these four potato virus infections. On the basis of the previously obtained plasmid pART27-XSYV-rh containing four potato virus coat protein gene fragments, the potato (*Solanum tuberosum*) variety 'Longshu 3' was transformed using *Agrobacterium tumefaciens* as a vector, and PCR and PCR-Southern analyses proved that the fusion gene has been integrated into the potato genome. The results of qRT-PCR indicated that the

收稿日期: 2020-07-21

基金项目: 国家自然科学基金(31360353, 31560172, 31860401); 甘肃省科技重大专项计划(19ZD2WA002)。

作者简介: 胡新元(1973-), 男, 硕士, 副研究员, 主要从事马铃薯栽培生理研究。

*通信作者(Corresponding author): 齐恩芳, 研究员, 从事马铃薯遗传育种, E-mail: qefang@126.com。

fusion gene could be normally expressed in the transgenic plants. The disease resistance identification results of three transgenic plants showed that two of them were highly resistant to the PVX, PVY, PVS and PLRV infection; the other one was positive for PLRV infection, but was resistant to other three viruses.

Key Words: potato virus; fusion gene; transgenic potato; disease resistance

马铃薯是世界第四大粮食作物, 宜粮、宜菜、宜饲、宜做工业原料, 很多国家都非常重视马铃薯生产。种薯退化一直是制约马铃薯产业快速发展的重要问题, 病毒侵染是引起马铃薯种性退化的主要原因。马铃薯X病毒(Potato virus X, PVX)、马铃薯Y病毒(Potato virus Y, PVY)、马铃薯卷叶病毒(Potato leaf roll virus, PLRV)和马铃薯S病毒(Potato virus S, PVS)在中国分布广泛、危害严重, 是造成马铃薯种性退化的主要病毒^[1,2]。而且在田间马铃薯病毒病发生比较复杂, 经常混合感染, 2种甚至多种病毒混合侵染带来的损失远大于各病毒单独侵染。病毒侵染造成马铃薯种质退化, 产量降低, 品质变劣。

目前在世界上还没有发现较成功的化学方法来防治病毒病, 利用茎尖组织培养技术脱毒, 工作量大, 成本偏高, 由于病毒的田间再侵染, 能保持无病毒或低含量病毒的有效期限很短, 脱毒2~3年后因再侵染问题产量又会严重降低。用常规育种方法改良品种抗性, 由于马铃薯栽培种是同源四倍体作物, 育种周期长, 天然抗病毒基因资源缺乏, 杂交后代遗传分离广泛, 使得常规育种效率很低。

在自然界中, 一种植物往往是多种病毒的寄主, 病毒的共存会造成更严重的危害。将不同种类病毒的基因片段整合成融合基因, 转化获得具有多重抗病性的转基因植物, 是解决这一问题的有效途径。1986年, Abel等^[3]首次成功地将烟草花叶病毒(tmv)的外壳蛋白基因转化到烟草植物中。此外, 外壳蛋白基因介导的抗病毒基因工程还在西瓜^[4]、小麦^[5]、水稻^[6]、百合^[7-10]等多种植物中成功, 获得病毒抗性。在马铃薯抗病毒基因工程研究中, 宋艳茹等^[11]用PVX和PVY双价外壳蛋白基因转化了马铃薯‘虎头’和‘克新4号’, 张鹤龄等^[12]对转基因马铃薯的抗病性鉴定结果表明, 转基因马铃薯的多数株系的平均病毒含量均明显

低于非转基因的对照植株, 一些株系病毒积累较慢, 发病时间延迟。说明转PVX和PVY双价外壳蛋白基因的马铃薯, 对PVX和PVY复合侵染发生不同程度的抗性和保护作用。进而有些学者把不同病毒的基因或基因片段构建成融合基因导入植物, 亦获得了双抗转基因植株^[13-15]。

为了培育同时抗PVX、PVY、PLRV和PVS 4种病毒的转基因马铃薯, 本试验克隆了4种病毒CP基因300 bp左右较保守的基因片段并构建了融合基因的转化载体, 试验旨在通过基因工程使马铃薯获得对多种病毒的抗性, 探索一条获得多抗病毒转基因马铃薯的有效途径, 解决马铃薯种性退化问题。

1 材料与amp;方法

1.1 植物材料

以马铃薯品种‘陇薯3号’的脱毒试管苗为供试材料(甘肃省农业科学院马铃薯研究所种质资源与生物技术研究室提供), 马铃薯PVX、PVS、PVY和PLRV病毒株, 采自甘肃省农业科学院会川马铃薯育种试验站。

1.2 菌株与质粒

供试菌株LBA4404, 含有质粒pART27-XSYV-rh(由本实验室构建)^[9], pART27-XSYV-rh含4种病毒(PVX、PVS、PVY和PLRV)CP基因片段, 抗性标记为卡拉霉素(Kan)。

1.3 马铃薯的遗传转化与植株再生

采用“固体+液体”试管薯诱导方法获得‘陇薯3号’试管薯^[17]。以诱导10周、直径为0.5 cm的‘陇薯3号’试管薯为外植体, 参照张宁等^[18]方法进行转化, 将试管薯切成厚度为1 mm的薄片, 接种于试管薯片分化培养基[MS培养基1L、吲哚乙酸(Indole-3-acetic acid, IAA)1.0 mg、6-苄氨基嘌呤(6-benzyl-aminopurine, 6-BA)1.0 mg、玉米素核苷(Zeatinriboside, ZT)2.0 mg]上, 暗培养2 d后将

试管薯薄片转移到含 50 mg/L Kan、500 mg/L Crb 的分化培养基上, 25℃、16 h/d 光照培养, 诱导抗性芽, 长至 1.5 cm 左右时剪下接入含 50 mg/L Kan、500 mg/L Crb 的 1/2 MS 培养基上生根培养, 然后进行生根筛选, 能正常生根及生长的小苗为抗性植株。

1.4 转基因植株的筛选

1.4.1 PCR 检测

用 CTAB 法提取转基因马铃薯植株及非转基因马铃薯植株总 DNA, 以 pART27-XSYV-rh 质粒为阳性对照, 非转基因马铃薯为阴性对照, 以 4 种病毒融合基因的引物: X1 (5' - CGGACTAGT Spe I GCAACTCCTGCCACGGCTT - 3'), V2 (5' - CGAGCTC Sac I CTAATTTGGAATTTGTTGACGTAG - GACTG - 3') 进行 PCR 扩增, 预期扩增片段大小为 1 200 bp。

1.4.2 PCR-Southern 检测

参照于凤丽等^[19]的方法, 质粒 pART27-XSYV-rh PCR 扩增产物电泳回收的 1 200 bp 片段, 转移到尼龙膜上, 以地高辛标记后作为探针进行杂交。采用瑞士 Roche 公司的 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 试剂盒进行探针标记、膜杂交和显色处理。

1.4.3 qRT-PCR 检测

分别提取 DNA 检测呈阳性植株的总 RNA, 用 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒反转录成 cDNA。以马铃薯 *Eflα* 基因 (*Eflα*-F: 5'-ATTGGAAACGGATATGCTCCA-3' 和 *Eflα*-R: 5'-TCCTTACCTGAACGCCCTGTCA-3') 为内参, 用 X1/V2 为特异性引物, 根据 RealMasterMix (SYBR Green) 试剂盒 (TIANGEN), ABI QuantStu 5 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI, USA) 进行 qRT-PCR 分析。95℃ 2 min; 95℃ 10 s, 60℃ 34 s, 72℃, 30 s; 45 个循环。同时进行荧光值变化曲线和溶解曲线分析, 并根据公式 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 算出融合基因在转基因植株中的相对表达量。

1.5 转基因植株的抗病性鉴定

将繁殖获得的转基因马铃薯无性系和非转基因马铃薯‘陇薯 3 号’脱毒苗移栽到营养盆中, 苗龄约为 6 叶期左右接种病毒。PVX、PVY、PVS 采用机械摩擦接种[每株接种 2 片中上部叶片, 取毒

源叶片分别按 1:10(w/v) 比例用磷酸缓冲液 (PB, pH 7.4) 进行研磨, 取汁液摩擦接种]; PLRV 采用蚜虫接种(将无毒桃蚜在感染 PLRV 的马铃薯植株上饲毒 3 d, 然后用带毒桃蚜接种, 每株 10 头, 接种 5 d 后杀蚜)。接种方式为 PVX、PVY、PVS、PLRV 依次接种(间隔 3 d, 每份材料分别接 10 株)。接种 20 d 后, 用双抗体夹心酶联免疫吸附鉴定法 (Double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay, DAS-ELISA) 检测病毒含量, 检测过程按 DAS-ELISA 试剂盒说明书进行, 显色反应结束后用 IMARK 型酶标仪 (Bio-Rad, 美国) 测定 405 nm 处的吸光值。接种病毒的非转基因马铃薯‘陇薯 3 号’脱毒苗为阳性对照, 未接种病毒的非转基因马铃薯‘陇薯 3 号’脱毒苗为阴性对照, 测试样品吸光值等于或大于 2 倍阴性对照吸光值, 判断为阳性。

数据统计分析采用 DPS v13.5 软件。

2 结果与分析

2.1 转基因马铃薯的获得

携带 pART27-XSYV-rh 质粒的农杆菌侵染‘陇薯 3 号’试管薯薯片, 在选择培养基上培养 2~3 周后, 从薄片上直接再生出抗性小芽, 待抗性芽长到 1 cm 时, 将其切下转入生根培养基经过 3 周 Kan 抗性筛选, 转基因植株生根并正常生长, 未转化植株不能正常生根, 共获得 10 株抗性转化植株 (图 1)。

2.2 转基因马铃薯的分子生物学鉴定

以抗性苗总 DNA 为模板, 质粒 pART27-XSYV-rh 为阳性对照, 非转基因植株为阴性对照, 利用融合基因的 2 个特异引物 X1/V2 对部分转基因植株进行 PCR 鉴定, 结果阳性对照和 10 株抗性苗扩增出约 1 200 bp 的特异性扩增条带, 而阴性对照和空白对照无扩增条带 (图 2)。初步证明再生植株为转基因植株。为了排除假阳性的存在, 进一步鉴定 PCR 产物是 1 200 bp 的融合基因片段, 将 PCR 产物电泳转膜进行 Southern 杂交, 杂交结果 (图 3, 部分植株检测结果) 显示, 非转基因植株、空白对照无杂交带, 而阳性对照和各转基因植株有杂交带, 检测结果与前期 PCR 检测结果相吻合, 进一

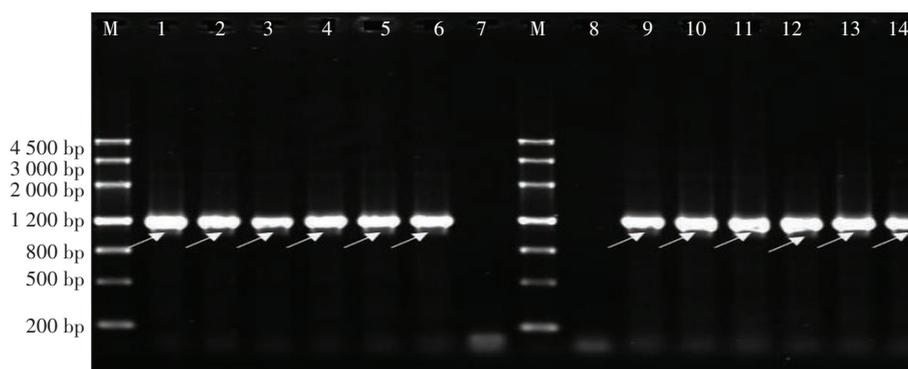


注: A. 共培养 2 d 的试管薯薄片; B. 分化培养基上的抗性苗; C. 生根培养基上的抗性苗。

Note: A. Microtuber discs 2 d after coculturing with *Agrobacterium*; B. Resistant seedlings regenerated on selected medium; and C. Resistant plant on root medium.

图 1 抗性苗诱导过程

Figure 1 Induction of resistant seedlings

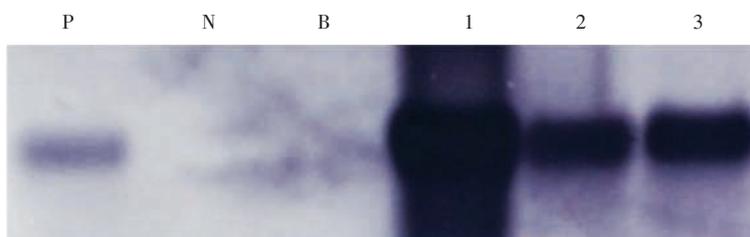


注: M. Marker III; 2~6、10~14. 引物 X1/V2 对部分转基因植株进行 PCR 鉴定; 1、9. 阳性对照 (pART27-XSYV-rh 质粒); 7. 空白对照 (ddH₂O); 8. 阴性对照 (非转基因植株)。

Note: M. Marker III; 2~6 and 10~14. Amplified by X1/V2 of potato transformant; 1 and 9. Positive control (pART27-XSYV-rh plasmid); 7. Blank control (ddH₂O); and 8. Negative control (non transgenic plant).

图 2 转基因植株 PCR 鉴定

Figure 2 PCR analysis of transgenic plants



注: B. 空白对照; N. 非转基因马铃薯植株; P. 阳性对照; 1~3. 马铃薯转基因植株。

Note: B. Blank control; N. Non transgenic potato plantlet; P. Positive control; and 1~3. Transgenic potato plant.

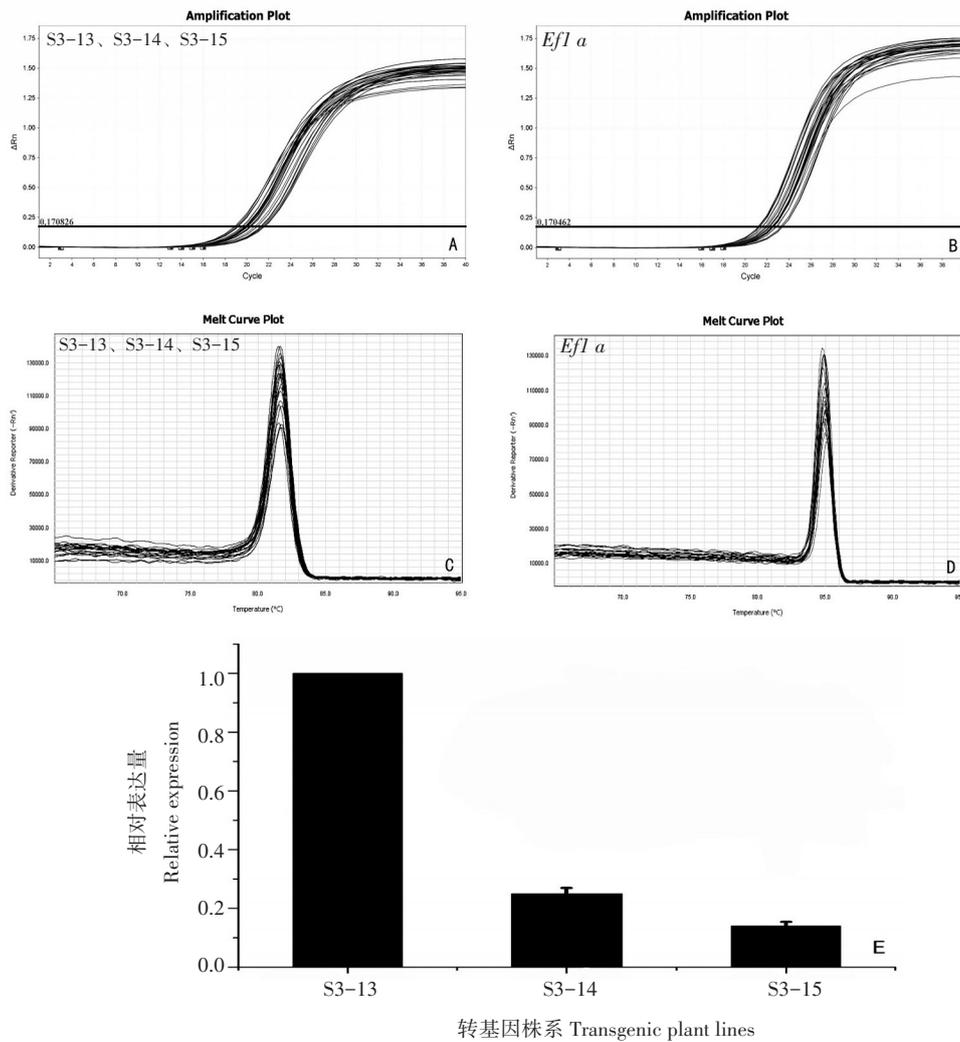
图 3 转基因马铃薯的 PCR-Southern 检测

Figure 3 PCR-Southern analysis of transgenic potato

步证明这些株系是阳性转基因植株。qRT-PCR 结果分析表明(图4), 转基因马铃薯植株有典型的荧光扩增曲线和溶解曲线, 而非转基因植株和空白对照的荧光扩增曲线和溶解曲线是一条直线。在转 pART27-XSYV-rh 株系中能检测到融合基因的表达, 但基因表达水平在不同植株中存在一定的差异。基因表达量最高为 S3-13, 其次为 S3-14, 表达量最低的是 S3-15。

2.3 转基因马铃薯抗性鉴定

对经过 qRT-PCR 检测的 3 个转基因株系 (S3-13、S3-14 和 S3-15) 经切段快繁后移栽到营养钵, 以非转基因‘陇薯 3 号’为对照, 培养至 6 叶期时对转基因株系和对照进行病毒接种。接种 20 d 后各无性系的抗病性鉴定结果(表 1 中仅列出了经 PCR-Southern 和 qRT-PCR 分析的转基因植株的 ELISA 检测结果)表明: 转 pART27-XSYV-rh 株系中,



注: A. 转基因株系扩增曲线; B. 内参扩增曲线; C. 转基因株系溶解曲线; D. 内参溶解曲线; E. 3 个不同的转基因株系。

Note: A. Amplification curve of transgenic lines; B. Internal reference amplification curve; C. Solution curve of transgenic lines; D. Internal parameter dissolution curve; and E. Three different transgenic plant lines.

图 4 转基因植株的 qRT-PCR 检测
Figure 4 qRT-PCR analysis of transgenic potato

表1 转基因植株的ELISA检测(OD₄₀₅)
Table 1 ELISA analysis of transgenic potato plants (OD₄₀₅)

株系 Line	PVX	PVY	PVS	PLRV
S3-13	0.124 ± 0.004	0.149 ± 0.006	0.195 ± 0.007	0.202 ± 0.006
S3-14	0.110 ± 0.036	0.216 ± 0.004	0.224 ± 0.008	0.215 ± 0.005
S3-15	0.102 ± 0.015	0.275 ± 0.259	0.219 ± 0.010	1.231 ± 0.351
CK+	1.413 ± 0.397	1.958 ± 0.343	1.281 ± 0.079	2.915 ± 0.198
CK-	0.134 ± 0.004	0.123 ± 0.006	0.123 ± 0.004	0.128 ± 0.004

注: 数据是3个重复的平均吸光值(±SE)。CK+。接种病毒的非转基因马铃薯苗, CK-。阴性对照。

Note: Data are mean absorbance values over the three plants (± SE); CK+. Non transgenic plants inoculated with PVX, PVY, PVS and PLRV; and CK-. Negative control.

S3-13、S3-14的检测结果均为阴性, 对4种病毒均具有抗性; S3-15的PVS、PVX和PVY检测结果为阴性, PLRV检测结果为阳性, 但检测数值低于阳性对照。

3 讨论

PVX、PVY、PLRV和PVS 4种病毒分布广泛, 为害严重, 且多由蚜虫传播, 自然条件下难以控制。由于马铃薯病毒病往往同时发生, 单一抗性的品种改良已不能满足需要, 而传统育种方法很难将4个抗性基因通过四倍体遗传集中到一个品种中。利用基因工程方法, 将构建在不同载体上的多个基因转入同一受体, 因为载体间的相互影响, 致使效率大大降低^[20]。对于多病毒抗性, 国内外已开展诸多有关马铃薯转外壳蛋白基因抗病毒方面的研究^[21-23], 但主要针对PVX、PVY、PLRV 3种病毒复合侵染以及这3种病毒的两两复合侵染开展。PVS也是影响马铃薯产量和品质的主要病毒之一, 且分布广泛, 在世界各马铃薯种植区均有发生, PVS单独侵染时可减产10%~15%, 与其他病毒复合侵染时可造成减产11%~38%^[24], 齐恩芳等^[25]对甘肃省马铃薯主要病毒病发生情况调查发现, PVS发生比例最高, 且易和其他病毒混合侵染。该病毒不易觉察, 主要靠接触传毒, 通过热处理及茎尖脱毒技术较难脱除干净, 因此, 也应加强针对PVS抗性的品种改良。

本研究将含PVX、PVY、PLRV和PVS 4种病毒外壳蛋白基因片段的融合基因, 通过一次转化获得多抗转基因植株, 可大大提高育种效率, 对马铃薯的多基因转化可行性及马铃薯的抗病毒的研究具有重要的意义。

‘陇薯3号’是甘肃省生产主栽品种, 且易受病毒感染, 所以选为供试品种。因马铃薯是无性繁殖植物, 转基因植株无性后代不发生分离, 给转基因植株的检测、鉴定带来诸多方便。从试验结果分析来看, 本研究利用农杆菌介导法转化马铃薯的研究中, 分子检测证明融合基因已整合到‘陇薯3号’马铃薯基因组中, 并在转基因植株中转录表达, 抗病性鉴定结果也反映了某些转基因植株对4种病毒均具有抗性。

本试验用双抗体夹心酶联免疫吸附鉴定法(DAS-ELISA)检测病毒含量, 用ELISA读数所显示的病毒滴度来表达转基因植物对病毒的抗性, 转pART27-XSYV-rh株系中, S3-13、S3-14的4种病毒检测结果均为阴性, 虽然PVY、PVS、PLRV的检测数值高于阴性对照, 但对4种病毒均具有抗性; S3-15的PVS、PVX和PVY检测结果为阴性, PLRV检测结果为阳性, 但检测数值也低于阳性对照, 造成PLRV为阳性的原因也可能与接种病毒方法有关, PLRV采用蚜虫传毒, 有一定的随机性。试验结果也表明, 转4价CP基因株系的抗性程度不同, 因此有必要筛选抗性株系。引

起抗性差异的原因可能和转基因植株表达外源基因水平有关,也可能和病毒在植株体内增殖条件和症状发育条件不同有关。后续研究中将抗病植株抗病性与目的基因RNA的累积关系开展进一步研究,同时对转基因株系的表型、症状发育、田间表现、品质及产量也进行鉴定和分析,最终筛选出对4种病毒同时具有抗性的转基因马铃薯新种质,从而为马铃薯抗病育种工程提供良好的亲本材料。

[参 考 文 献]

- [1] Gebhardt C, Valkonen J P T. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2001, 39(1): 79–102.
- [2] Wang B, Ma Y L, Zhang Z B, *et al.* Potato viruses in China [J]. *Crop Protection*, 2011, 30(9): 1117–1123.
- [3] Abel P P, Nelson R S, DE B, *et al.* Delay disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene [J]. *Science*, 1986, 232(4751): 38–43.
- [4] 牛胜鸟, 黄学森, 王锡明, 等. 三价转基因抗病毒西瓜的培育 [J]. *农业生物技术学报*, 2005, 13(1): 10–15.
- [5] Vasil V, Castillo A M C, Fromm M E, *et al.* Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus [J]. *Biotechnology*, 1992, 10(6): 667–674.
- [6] 燕义唐, 王晋芳, 邱并生, 等. 悬浮细胞再生表达外壳蛋白的转基因水稻对水稻条纹病毒的抗病性 [J]. *中国病毒学*, 1997, 12(13): 261–269.
- [7] Van Tuyt J M, Van Holsteijn H C M. Lily breeding research in the Netherlands [J]. *Acta Horticulturae*, 1996, 414(2): 35–43.
- [8] 贾海燕, 焦阳, 芦强, 等. 三价病毒外壳蛋白基因介导的百合抗病毒初步研究 [J]. *核农学报*, 2013, 27(9): 1293–1301.
- [9] Lipsky A, Cohen A, Gaba V, *et al.* Transformation of *Lilium longiflorum* plants for cucumber mosaic virus resistance by particle bombardment [J]. *Acta Horticulturae*, 2002, 568(1): 209–214.
- [10] 徐品三, 刘华夏. 无病毒百合组培种球快速繁殖体系的建立 [J]. *中国农学通报*, 2009, 25(9): 174–178.
- [11] 宋艳茹, 李枫, 侯林林, 等. 双价外壳蛋白基因植物表达载体的构建及马铃薯转基因植物的鉴定 [J]. *植物学报*, 1994, 36(11): 842–848.
- [12] 张鹤龄, 宋艳茹, 彭学贤, 等. 表达马铃薯X病毒、Y病毒双价外壳蛋白基因马铃薯转基因植株的抗病性 [J]. *病毒学报*, 1996, 12(4): 360–366.
- [13] Jan F J, Fagoaga C, Pang S Z, *et al.* A single chimeric transgene derived from two distinct viruses confers multi-virus resistance in transgenic plants through homology-dependent gene silencing [J]. *Journal of General Virology*, 2000, 81(9): 2103–2109.
- [14] 白云凤, 郭志华, 王小琦, 等. 抗双病毒无标记转基因马铃薯的获得 [J]. *自然科学进展*, 2008, 18(11): 1250–1255.
- [15] 郭志鸿, 张金文, 陈正华, 等. 利用RNA干扰技术及微束激光转化法培育抗病病毒马铃薯 [J]. *激光生物学报*, 2006, 15(5): 525–531.
- [16] 陈晓艳, 孟亚雄, 贾小霞, 等. 四价抗马铃薯病毒植物表达载体构建及其对烟草的转化 [J]. *广西植物*, 2017, 37(1): 87–95.
- [17] 齐恩芳, 王一航, 文国宏, 等. ‘陇薯3号’和‘陇薯7号’试管结薯关键条件优化 [J]. *中国马铃薯*, 2015, 29(3): 141–145.
- [18] 张宁, 司怀军, 李学才, 等. 根癌农杆菌介导的马铃薯高效遗传转化体系的研究 [J]. *中国马铃薯*, 2004, 18(3): 132–135.
- [19] 于凤丽, 卢翠华, 李文斌, 等. 利用农杆菌介导法将PVA-CP基因导入马铃薯品种东农303的研究 [J]. *中国马铃薯*, 2005, 19(2): 77–80.
- [20] Chen L, Marmey P, Taylor N J. Expression and inheritance of multiple transgenes in rice plants [J]. *Nature Biotechnology*, 1998, 16(11): 1060–1064.
- [21] Lawson C, Kaniewski W, Haley L, *et al.* Engineer resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: Resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic Russet Burbank [J]. *Bio/technology*, 1990, 8: 127–134.
- [22] 张鹤龄, 彭学贤, 宋艳茹, 等. 表达PVY和PLRV双价外壳蛋白基因马铃薯的抗病性研究 [J]. *植物学报*, 1997, 9(3): 236–240.
- [23] 崔晓江, 彭学贤, 周雪荣, 等. 3价转病毒外壳蛋白基因马铃薯的获得 [J]. *科学通报*, 1994, 39(21): 1992–1995.
- [24] 吴兴泉, 吴祖建, 谢联辉, 等. 马铃薯S病毒外壳蛋白基因的克隆与原核表达 [J]. *中国病毒学*, 2002, 17(3): 248–251.
- [25] 齐恩芳, 刘石, 贾小霞, 等. 甘肃省马铃薯主要病毒病发生情况调查 [J]. *植物保护*, 2018, 44(4): 171–176.