

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2021)01-0075-06

DOI: 10.19918/j.cnki.1672-3635.2021.01.011

马铃薯A病毒的研究进展

魏旭言^{1,2}, 白艳菊³, 张 威³, 高艳玲³, 徐丽萍², 罗秋香^{1,2*}

(1. 东北林业大学东北盐碱植被恢复与重建教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040;

2. 东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 3. 黑龙江省农业科学院, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘 要: 马铃薯A病毒(Potato virus A, PVA)作为主要病毒之一, 对马铃薯种薯质量有着十分重要的影响。近年来, PVA的研究已从传统生物学研究转向了基因组的研究, 基因组编码的蛋白在基因组复制、蛋白加工和系统移动等方面具有重要作用。目前国内外对于PVA的研究主要集中在检测方面, 而蛋白功能的研究较少且还处于初级阶段, 随着国内PVA发病率的升高和马铃薯产业需要, 深入了解PVA基因组蛋白的功能及挖掘抗性基因资源、拓宽遗传背景对于揭示PVA致病机制、寻找抗病途径、促进产业发展具有重要意义。

关键词: PVA; 基因组蛋白; 抗性基因; 检测方法

Research Progress in Potato Virus A

WEI Xuyan^{1,2}, BAI Yanju³, ZHANG Wei³, GAO Yanling³, XU Liping², LUO Qiuxiang^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Saline-alkali Vegetation Ecology Restoration of Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin,

Heilongjiang 150040, China; 2. College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040, China;

3. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086, China)

Abstract: As one of the main viruses, potato virus A (PVA) has a very important impact on the quality of potato seed tubers. In recent years, PVA research has turned from traditional biological research to genome research. The proteins encoded by the genome play an important role in genome replication, protein processing and system movement. At present, the researches on PVA at home and abroad mainly focus on detection, while the research on protein functions is still in the initial stage. With increasing incidence rate of PVA and the needs of potato industry in China, deeply understanding the function of PVA genomic proteins, mining resistance gene resources, and broadening the genetic background will have great significance for revealing the pathogenic mechanism of PVA, finding ways to resist disease and promoting industrial development.

Key Words: PVA; genomic protein; resistance gene; detection method

马铃薯因含有丰富的碳水化合物、优质的蛋白质以及其他谷物所没有的维生素C, 2016年被农业部指定为主食作物^[1]。但经近几年的调查研究发现,

中国马铃薯主产区正处于病毒频发的阶段, 在不同的生物胁迫条件下, 病毒作为依赖寄主繁殖的病原体, 是导致马铃薯减产的主要因素^[2]。

收稿日期: 2020-07-16

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金C类项目(2572017CA10); 国家自然科学基金青年项目(31500317); 齐齐哈尔市科技一般指令项目(NYGG-201908)。

作者简介: 魏旭言(1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向为分子植物病理学。

***通信作者(Corresponding author):** 罗秋香, 博士, 副教授, 研究方向为植物生理生态学, E-mail: qxluo@nefu.edu.cn。

马铃薯A病毒(Potato virus A, PVA)与马铃薯Y病毒(Potato virus Y, PVY)同属, 寄主范围较广, 可侵染多种茄科植物, 是感染植物中最大的病毒家族之一^[3]。PVA于1975年在黑龙江省克山县首次被发现^[4], 随后在湖南、四川、福建等地也有报道^[5-7], 目前几乎遍布于马铃薯的各个主要产区, 导致马铃薯产量及质量下降。PVA既能单独侵染寄主, 又可与马铃薯X病毒(Potato virus X, PVX)、PVY等一起复合侵染, 从而加重病毒病的发生, 产生严重的花叶和叶脉坏死等症状, 导致马铃薯产量下降和品质变劣^[8]。2007年, 中华人民共和国进境植物检疫有害生物名录将其列为检疫性病害^[9], 因此, PVA的研究已成为当前马铃薯病毒研究中的热点之一。

1 PVA基因组结构及蛋白功能

1.1 PVA基因组

随着分子生物学的不断发展, PVA的研究已从传统生物学研究转向了基因组的研究时代。Kekarainen^[10]通过构建基因文库的方法, 基于噬菌体的转位反应探究出了一个完整的PVA基因组, 发现PVA是一种含有RNA的真核病毒家族的一员, 具有一个由9 565个核苷酸组成的单链RNA基因组, 5'端共价连接病毒编码蛋白VPg, 后接一个3-poly(A)尾, 且这两种末端结构都参与了基因组的复制及其表达调控。此外, Saha等^[11]在研究中发现, PVA与其他病毒一样, 基因组中大的开放阅读框架(ORF)分别能编码丝氨酸蛋白酶(P1)、辅助蛋白酶(HC-Pro)、第3蛋白(P3)、第1个6k蛋白、圆柱状内含体蛋白(CI)、第2个6k蛋白、连接蛋白(VPg)、核内含体蛋白a(NIa)、核内含体蛋白b(NIb)以及外壳蛋白(CP)。其中, CI是最保守的区域, P1和CP的N端是基因组中最大的变异区^[12]。通过以上研究, PVA的功能基因组学在近些年来已取得了一定的进展, 这将有利于对其基因组编码的各个功能蛋白进行更加深入的研究。

1.2 基因组复制相关蛋白

由于多种复制蛋白协同作用会导致PVA引起的病毒病发生, 因此研究基因组复制蛋白的功能十分重要。目前发现参与病毒复制的蛋白主要有6K2、NIa、NIb、VPg以及CI^[13]。

通过对PVY的研究发现, 6K2诱导形成的内质网分泌小泡是病毒复制的主要位点^[14], 小泡中包含病毒编码连接蛋白VPg, PVA在系统侵染植物时, VPg起到了至关重要的作用。Rajamäki等^[15]研究发现, VPg是能促进病毒扩增的特异调控因子, 作为病毒复制的引物来参与病毒的复制。因PVA没有RNA帽子结构, 故翻译的起始需与VPg互作而结合到病毒上, VPg充当帽状结构来启动病毒翻译, 又因VPg存在于6K2诱导产生的小泡中, 所以推测共同参与了病毒的复制。

Kamer和Argos^[16]在研究中发现核内含体蛋白NIb参与病毒的复制, 若其中的保守序列Gly-Asp-Asp变异, 病毒则会丧失复制的能力。此外, NIb中还有NLSI和NLSII两个独立的核定位信号, 这些信号赋予了核迁移的活性, 倘若发生位点突变, 病毒的复制将会终止^[17]。在之后的物理作用研究分析中发现, PVA的NIa蛋白酶结构域可能介导NIa和NIb互作, 其水解的多聚蛋白位点在复制蛋白CI和6K2之间, 因此推测NIa也参与了病毒的复制并且在病毒的循环复制中起到重要作用^[18]。

通过以前的研究, 了解到PVA的发生是靠多种复制蛋白协同作用的结果, 蛋白区域位点的变异会阻断病毒的复制能力^[19]。总之, PVA的复制机理已基本明确, PVA会一边复制合成子代核酸, 一边进行基因组的表达合成复制所需的蛋白, 在这一过程中, RNA链被CI蛋白解开后, NIb将连接在RNA上的VPg蛋白核糖酸化, 随后以VPg为引物开始病毒的复制。

1.3 运动相关蛋白

大多数马铃薯病毒蛋白是多功能的, 参与病毒生命周期的重要步骤。随着近年来分子生物学的不断发展, 发现了许多在病毒侵染循环过程中的运动作用因子, PVA能否成功侵染寄主主要取决于胞间连丝是否进行细胞间的移动, 而在细胞间的运动中, 主要有以下几种蛋白起作用, 分别是CP、HC-Pro、VPg及CI^[20]。

CP蛋白, 又称为多功能蛋白, 在病毒粒子的组装、复制和运动中发挥着重要作用, 其还参与了蚜虫的传毒和细胞间长距离的运输, 对于病毒的系统运动是必不可少的^[21]。Löhmus等^[22]研究证明蛋白激酶CK2介导的CP蛋白磷酸化对于PVA的复制很重要, 改变CP磷酸化位点将会导致PVA复制产生缺

陷。此外还有研究表明, CP的磷酸化能调节运动蛋白的功能, 以烟草为例, Hamalainen等^[23]发现PVA的CP磷酸化会导致病毒发生诱变从而失去在烟草中的病毒传输功能; 吴兴泉和陈士华^[24]通过研究发现, 同时诱变CP和HC-pro能抑制病毒在马铃薯细胞间的运动、延缓病毒在烟草中的传播。

Yelina等^[25]研究发现PVA是靠运动蛋白HC-pro来完成长距离的运动, 其是一种辅助蛋白, 既能参与病毒维管束的运动又能充当基因沉默剂来抑制植物对PVA的抗性。根据对马铃薯Y病毒属的研究发现, 其中的K1TC保守基序和PTK基序能促使病毒颗粒与蚜虫刺针结合, 以此来参与病毒传播, 因PVA与PVY同属, 所以推测PVA可能也是通过这种方式进行蚜虫的传播。除CP和HC-pro蛋白外, CI对于病毒细胞间的运动也是必不可少的, 其能通过增加胞间连丝附近锥形结构的穿透孔径来帮助病毒进行运动^[26]。此外, 基因连接蛋白VPg还可能通过与寄主之间的相互作用来参与病毒的系统运动, 其不但能在病毒循环侵染中发挥重要作用, 还能参与病毒的系统侵染^[27]。尽管植物导管系统结构比较复杂, 对于PVA系统运动的研究还相对较少, 但PVA的运动机理已基本明确。

2 PVA检测方法

2.1 生物学检测法

采用生物学的方法进行PVA鉴定具有成本低、操作简单易行、直观等优点, 但是具有人为观察等主观因素的局限。1929年, 美国病毒学家Holmes^[28]首先发现了指示植物检测法, 随后人们开始广泛使用此法鉴定各种不同的病毒。PVA的寄主范围较窄, 已知寄主为茄科植物, 包括番茄、假酸浆、普通烟、德伯尼烟、马铃薯等^[29]。刘卫平^[30]通过研究发现PVA的寄主有香料烟、枸杞、A6和直房丛生番茄。将PVA接种在不同的鉴定寄主上其症状表现也不同。以香料烟为对象, 接种叶片微明脉; 枸杞在接种后5~10 d产生明显的局部病斑; A6的接种叶片出现棕色星状斑点; 直房丛生番茄叶片出现褐色坏死斑。张维^[31]将湖南的PVA分离株系接种到洋酸浆上发现叶片出现褐色病斑、普通烟出现微明脉, 同时将其接种到黄苗榆烟上, 发现病毒含量呈现增高的趋势, 可以当作保毒植物。刘喜才和李芝芳^[32]研究发现PVA

的典型保毒植物是马铃薯‘布尔斑克’品种和普通烟, 能将PVA含量富集的很高, 适合作为繁殖寄主。

2.2 血清学检测法

自首次用乳胶凝聚反应做了病毒显性技术的研究并将其应用到PVA、PVX和马铃薯S病毒(Potato virus S, PVS)等的检测后^[33], 随着抗病育种和病毒鉴定工作的需要, 病毒的检测方法已不断的向更灵敏的方向发展。随着检测技术的不断发展, 特异性强、灵敏度高、检测速度快以及检测规模更大的血清学检测法已成为广为应用的检测技术, 包括双抗体夹心法(DAS-ELISA)和点免疫结合检测法(Dot-ELISA)等^[34]。张志军等^[35]经研究发现, 在不同的检测技术中, 双抗体夹心技术是最灵敏的技术之一, 其作用原理是将抗原-抗体反应与酶的高效催化作用有机结合, 根据产生的颜色反应来进行病毒的检测。吴建祥^[36]通过制备PVA抗体建立了酸性磷酸酶ACP-ELISA和Dot-ELISA检测技术, 宋志成等^[37]利用重组CP作为抗原制备出PVA的多克隆抗体并将其用于DAS-ELISA检测。

2.3 分子生物学检测法

传统生物学检测技术灵敏度较低、耗时较长。随着分子生物学的不断完善, 因其特异的灵敏度、适合大批次的检测, 已成为最具有发展前景的检测技术^[29]。目前, 检测PVA的方法主要包括反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)、实时荧光定量PCR技术(qPCR)以及基因芯片技术^[38]。刘洪义等^[39]研究并建立了PVA液相芯片快速检测技术和环介导等温扩增技术(LAMP), 为PVA的检测提供了更高效、特异的新方法。Agindotan等^[40]通过实时荧光定量PCR法成功的从休眠种薯中检测出PVA、PVX及PVY。在之后的研究中, 袁青等^[41]发现双重PCR技术适用于大批量样品的快速检测, 并应用此方法快速检测出了PVX和PVA的复合侵染病毒。陈阳婷等^[42]在此基础上建立了更加快速的三重PCR检测技术, 并应用到马铃薯中的多种病毒检测, 如PVX、PVS和PVA, PVX、PVA和马铃薯卷叶病毒(Potato leafroll virus, PLRV), PVS、PVA和PLRV等。Zhang等^[43]建立了PVA、PVX、PVY、PLRV和马铃薯M病毒(Potato virus M, PVM)五重RT-PCR分子检测技术, 并经过大量样品检测, 验证了该检测体系的特异性和灵敏度, 为PVA提供了快速检测方法。

2.4 电镜检测法

自20世纪初,首次在电子显微镜下发现烟草花叶病毒(TMV),随后,电镜检测法已逐步发展成为植物病毒研究中必不可少的技术之一。其原理是以电磁波作为光源,将被感染的植物组织放入电镜中直接观察,根据病毒的大小和形状来判断病毒的类型^[44]。刘海英等^[45]经研究发现电子显微镜的分辨率非常高,最高能达到0.1 nm。目前常用的电镜检测法主要有负染技术和免疫电镜技术。吴兴泉等^[46]通过电子显微镜观察到福建PVA的病毒粒子,粒子呈弯曲的线条状,长为730 nm,宽为15 nm,同时对湖南PVA株系进行了分子鉴定,发现呈现花叶症状的马铃薯感染上了PVA病毒。

3 马铃薯对PVA抗性

近年来,科学家对PVA的抗性基因进行了较为深入的研究,发现控制由蚜虫传播的病毒较难,保护马铃薯免受PVA的侵害从而有效阻止病毒繁殖的最有效的方法是发现持久抗性基因、培育抗病品种。马铃薯对PVA的抗性分为过敏抗性(HR)和极端抗性(ER)。Barker^[47]发现马铃薯的抗性是由单个显性基因控制,单个基因可以对多种病毒表现出综合抗性,如Rysto具有对PVY和PVA的综合抗性,此外还发现了对PVA具有特异性的ER基因,如具有Rasto和Raadg抗性的植物表现为局部坏死,可以阻止病毒进一步扩散。

Singh等^[48]研究发现,‘Shepody’对PVA具有极强的抗性,这种抗性是由两个独立的显性互补基因控制,用感染PVA的嫩枝嫁接‘Shepody’时,植物有时会发生顶部坏死,这方面‘Shepody’反应类似于HR。然而,高灵敏度的ELISA却不能从植株中检测到PVA,因此,‘Shepody’对PVA的反应可能包括HR和ER。此外研究中还发现马铃薯对PVA的抗性与品种有关,将PVA接种到不同的品种上,‘Desiree’表现出轻微的花叶,‘Maris Bard’出现褪绿斑,而‘King Edward’、‘Marisa Piper’、‘Cara’、‘Tomasa Condemayta’、‘Yungay’等品种则表现出顶端坏死^[49]。

4 PVA防治方法

4.1 化学防治

利用抗病毒化学物质消除马铃薯病毒能起到非常好的防治效果。研究表明,利巴韦林是最有希望

的抗马铃薯植物病毒的化学物质,高浓度的利巴韦林应用于马铃薯离体繁殖中更是可以成功的消除大多数流行的马铃薯病毒,如PVA、PVM、PVS和PVX^[50]。此外,对于虫害如蚜虫来说,可以及时喷洒对蚜虫天敌无害的药剂,目前使用较广的有抗蚜威、乐果乳油等^[51]。

4.2 生物防治

生物防治是一种主要针对于虫害防治的技术,通常利用一种生物去克制另一种生物,目前在马铃薯病毒的防治工作中已得到广泛应用,如果再结合昆虫信息素控制害虫将会取得良好的成效^[52]。研究发现反- β -法尼烯是蚜虫报警外激素的主要组分,在调控植物-蚜虫、植物-蚜虫-天敌互动中起重要作用,目前在生物防治过程中已取得良好的成效^[53]。

4.3 物理防治

物理防治就是利用各种物理因素或工具防治病害,这种方法具有简单方便、经济有效等优点^[54]。其中,利用病毒和宿主之间的差异进行热处理,以达到脱毒效果是最有效的方法,其在使病毒外壳蛋白变性的同时不会破坏植物组织^[55]。尹明华等^[56]将茎尖培养技术与热疗法结合,反复试验,成功脱除了马铃薯的PVA病毒。

5 总结与展望

PVA造成的产量损失可达40%左右,当与其他病毒复合侵染时,将会引起较为严重的花叶并伴有叶片皱缩和卷曲等现象^[57]。随着科研工作者对PVA重视度的提高,越来越多的基因组蛋白被深入研究,目前浙江、云南、福建等省已成功的克隆出PVA的外壳基因、复制酶基因,并通过外壳蛋白介导、复制酶基因介导等不同途径获得抗PVA的马铃薯栽培品种^[58],同时,又对PVA的检测技术、防治方法有了更深入的了解,但是PVA与寄主间的互作机制等方面仍有待进一步深入研究。

PVA病毒的传播主要依靠基因组中多种蛋白的协同作用,这些蛋白共同协调着病毒的复制及运动。目前国内外对于PVA的研究主要集中在检测方面,而蛋白功能的研究非常少且还处于初级阶段,但随着国内PVA病害的发生和马铃薯产业的需要,对PVA病毒进行系统而深入的研究显得至

关重要。因此, 深入研究PVA的致病机理, 明确PVA与马铃薯的互作机制, 详细阐明基因组蛋白的功能并深度挖掘抗性基因资源, 拓宽遗传背景将成为今后PVA研究的主要方向, 这将对马铃薯抗病育种及促进马铃薯产业发展具有非常重要的意义。

[参 考 文 献]

- [1] 李明娟, 张雅媛, 游向荣, 等. 广西马铃薯主粮化发展前景 [J]. 农业科技通讯, 2016(12): 11–16.
- [2] 聂碧华. 马铃薯Y病毒新变异株系的克隆鉴定及马铃薯-病毒互作机制研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- [3] 吴兴泉, 谭晓荣, 陈士华. 马铃薯A病毒复制相关蛋白研究进展 [J]. 中国马铃薯, 2006, 20(4): 231–234.
- [4] 李芝芳. 中国马铃薯主要病毒图鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [5] 姜立慧. 四川省6种主要马铃薯病毒的发生及其多重RT-PCR检测体系的建立 [D]. 成都: 四川农业大学, 2016.
- [6] 佚名. 福建马铃薯A病毒的分子鉴定及检测技术 [J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(1): 91–96.
- [7] 胡新喜, 雷艳, 何长征, 等. 湖南省马铃薯主产区马铃薯病毒种类及流行分析 [J]. 中国马铃薯, 2012, 26(6): 358–361.
- [8] 范国权, 高艳玲, 张威, 等. 马铃薯主要病毒侵染不同品种症状及对产量的影响 [J]. 中国马铃薯, 2019, 33(1): 34–42.
- [9] 张洪峰, 陈阳婷, 孟兴, 等. 马铃薯A病毒及其风险分析 [J]. 植物检疫, 2010, 24(4): 48–51.
- [10] Kekarainen T. Functional genomics on potato virus A: virus genome-wide map of sites essential for virus propagation [J]. Genome Research, 2002, 12(4): 584–594.
- [11] Saha S, Hafren A, Mkinen K. Dynamics of protein accumulation from the 3' end of viral RNA is different from the rest of the genome in potato virus A infection [J]. Journal of Virology, 2019, 93(19): 3021–3034.
- [12] Kekarainen T, Merits A, Oruetebarria I, *et al.* Comparison of the complete sequences of five different isolates of potato virus A (PVA), genus Potyvirus [J]. Archives of Virology, 1999, 144(12): 2355–2366.
- [13] Restrepo-Hartwig M A, Carrington J C. Regulation of nuclear transport of a pant potyvirus protein by autoproteolysis [J]. Journal of Virology, 1992, 66(9): 5662–5666.
- [14] Koonin E V, Dolja V V, Morris T J. Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences [J]. Critical Reviews in Biochemistry, 1992, 28(5): 375–430.
- [15] Rajamäki M L, Puustinen P, Ivanov K I, *et al.* Detection of the potyviral genome-linked protein VPg in virions and its phosphorylation by host kinases [J]. Journal of Virology, 2002, 76(24): 12703–12711.
- [16] Kamer G, Argos P. Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses [J]. Nucleic Acids Research, 1984, 12(18): 7269–7282.
- [17] Li X H, Valdez P, Olvera R E, *et al.* Functions of the tobacco etch virus RNA polymerase (NIb): subcellular transport and protein-protein interaction with VPg / proteinase (NIa) [J]. Journal of Virology, 1997, 71(2): 1598–1607.
- [18] Guo D Y, Rajamäki M L, Saarma M, *et al.* Towards a protein interaction map of potyviruses: protein interaction matrixes of two potyviruses based on the yeast two-hybrid system [J]. Journal of General Virology, 2001, 82(4): 935–939.
- [19] 杜霞, 吴阔, 苏晓霞, 等. 马铃薯A病毒在云南省的发生及其P3蛋白序列分析 [J]. 西南农业学报, 2020, 33(3): 516–523.
- [20] Ivanov K I, Eskelin K, Lohmus A, *et al.* Molecular and cellular mechanisms underlying potyvirus infection [J]. Journal of General Virology, 2014, 95: 1415–1429.
- [21] 崔晓艳, 魏太云, 陈新. 马铃薯Y病毒属病毒的细胞生物学研究进展 [J]. 中国农业科学, 2012, 45(7): 1293–1302.
- [22] Lohmus A, Hafrén Anders, Mäkinen K. Coat protein regulation by CK2, CPIP, HSP70 and CHIP is required for potato virus A replication and coat protein accumulation [J]. Journal of Virology, 2017, 91(3): 1–14.
- [23] Hamalainen J H, Kekarainen T, Gebhardt C, *et al.* Recessive and dominant genes interfere with the vascular transport of potato virus A in diploid potatoes [J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 2000, 13(4): 402–412.
- [24] 吴兴泉, 陈士华. 马铃薯A病毒(PVA)运动相关蛋白质的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(8): 2244–2245.
- [25] Yelina N E, Savenkov E I, Solovyev A G, *et al.* Long-distance movement, virulence, and RNA silencing suppression controlled by a single protein in hordei- and potyviruses: complementary functions between virus families [J]. Journal of Virology, 2002,

- 76(24): 12981–12991.
- [26] Carrington J C, Jensen P E, Schaad M C. Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement [J]. *Plant Journal*, 2010, 14(4): 393–400.
- [27] Rajamäki M L, Valkonen J P T. Viral genome-linked protein (VPg) controls accumulation and phloem-loading of a potyvirus in inoculated potato leaves [J]. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 2002, 15(2): 138–149.
- [28] Holmes F O. Local lesions in tobacco mosaic [J]. *Botanical Gazette*, 1929, 87(1): 39–55.
- [29] Thomas P E. *Nicotiana megalosiphon*, a highly susceptible, new, and useful host for potato virus A [J]. *Plant Disease*, 2004, 88(10): 1160.
- [30] 刘卫平. 马铃薯A病毒分离鉴定技术的研究 [C]//屈冬玉, 陈伊里. 马铃薯产业与中国式主食. 哈尔滨: 哈尔滨地图出版社, 2016.
- [31] 张维. 马铃薯A病毒湖南分离物株系鉴定 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2013.
- [32] 刘喜才, 李芝芳. 马铃薯主要病毒保毒植物试管保存技术及其效果的研究 [J]. *马铃薯杂志*, 1996, 10(2): 79–85.
- [33] 田波. 马铃薯病毒研究的某些进展 (综述) [J]. *国外农学-杂粮作物*, 1981(2): 15–21.
- [34] 马国胜, 何博如. 烟草病毒研究现状与展望 [J]. *中国生态农业学报*, 2006, 14(2): 150–153.
- [35] 张志军, 惠霖, 吴玉峰, 等. 应用酶联免疫吸附法 (DAS-ELISA) 检测主要马铃薯病毒试验 [J]. *种子世界*, 2015(12): 40–43.
- [36] 吴建祥. 四种植物病毒单克隆抗体和传染性法氏囊病毒疫苗研制及应用 [D]. 杭州: 浙江大学, 2008.
- [37] 宋志成, 费新敏, 杨煜, 等. 马铃薯A病毒重组CP多克隆抗体的制备及其在DAS-ELISA检测中的应用 [J]. *华北农学报*, 2017, 32(1): 41–46.
- [38] 毛彦芝. 马铃薯病毒检测技术的研究概况 [J]. *中国蔬菜*, 2009 (12): 7–12.
- [39] 刘洪义, 辛言言, 刘忠梅, 等. 马铃薯A病毒RT-LAMP检测方法的建立 [J]. *中国农学通报*, 2015, 31(11): 143–147.
- [40] Agindotan B O, Shiel P J, Berger P H. Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan real-time RT-PCR [J]. *Journal of Virological Methods*, 2007, 142(1–2): 1201–1211.
- [41] 袁青, 殷幼平, 王中康, 等. 二重RT-PCR快速检测马铃薯病毒的方法 [J]. *植物检疫*, 2005, 19(3): 135–138.
- [42] 陈阳婷, 宁红, 张敏. 三重RT-PCR快速检测多种马铃薯病毒的研究 [J]. *湖南农业科学*, 2010(11): 75–77.
- [43] Zhang W, Zhang Z, Fan G, *et al.* Development and application of a universal and simplified multiplex RT-PCR assay to detect five potato viruses [J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2017, 83(1): 1–13.
- [44] 刘玲玲, 韩黎明, 张尚智, 等. 马铃薯病毒的常用检测方法 [J]. *中国马铃薯*, 2013, 27(4): 239–242.
- [45] 刘海英, 陈建保, 康俊, 等. 马铃薯病毒检测技术的研究进展与现状分析 [J]. *农产品加工*, 2017(22): 46–50.
- [46] 吴兴泉, 陈士华, 魏广彪, 等. 福建马铃薯A病毒的分子鉴定及检测技术 [J]. *农业生物技术学报*, 2004, 12(1): 90–95.
- [47] Barker H. Inheritance of resistance to potato virus Y and A in progeny obtained from potato cultivars containing gene *Ry*: Evidence for a new gene for extreme resistance to PVA [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 93(5–6): 710–716.
- [48] Singh R P, Nie X, Tai G C C. A novel hypersensitive resistance response against potato virus A in cultivar 'Shepody' [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 100(3–4): 401–408.
- [49] Jones R A C. Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyviruses in potato cultivars [J]. *Annals of Applied Biology*, 2008, 117(1): 93–105.
- [50] Nascimento A K Q, Lima J A A. A simple kit of plate-trapped antigen enzyme-linked immunosorbent assay for identification of plant viruses [J]. *Revista Ciencia Agronomica*, 2016, 48(1): 216–220.
- [51] 孙作举. 脱毒马铃薯病虫害的防治技术 [J]. *现代畜牧科技*, 2017 (1): 39.
- [52] 延海艳, 李志伟. 马铃薯病虫害防治技术研究 [J]. *北京农业*, 2015(12): 141.
- [53] Hudson R R, Richard R. A new statistic for detecting genetic differentiation [J]. *Genetics*, 2000, 155(4): 2011–2014.
- [54] 王红妹. 无公害蔬菜物理防治病虫害高招 [J]. *农民致富之友*, 2010(6): 29.
- [55] 苑智华. 马铃薯病毒病防治技术研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2013, 41(25): 10295–10298.
- [56] 尹明华, 刘燕, 郁雪婷, 等. 怀玉山高山马铃薯茎尖再生苗6种病毒的DAS-ELISA检测与分析 [J]. *浙江农业学报*, 2017, 29(10): 1699–1705.
- [57] He C, Zhang W, Hu X, *et al.* Molecular characterization of a Chinese isolate of potato virus A (PVA) and evidence of a genome recombination event between PVA variants at the 3'-proximal end of the genome [J]. *Archives of Virology*, 2014, 159(9): 2457–2462.
- [58] 丁铭, 方琦, 张丽珍, 等. 马铃薯A病毒云南分离物外壳蛋白基因的克隆与序列分析 [J]. *西南农业学报*, 2006, 19(6): 1078–1081.