

网络出版时间:2014-07-30 16:13

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.09.007

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.09.007.html

陕北地区马铃薯 X 病毒 CP 基因的 RT-PCR 检测及其序列分析

冯光惠,杜虎平,李夏隆,亢福仁

(榆林学院 生命科学院,陕西 榆林 719000)

[摘要] **【目的】**分析陕北 8 个县(区)马铃薯 X 病毒外壳蛋白(CP)基因序列的一致性和变异性,明确病毒变异程度,为脱毒马铃薯的推广提供参考。**【方法】**以陕北 8 个县(区)种植 2~3 代疑似携带病毒的马铃薯叶片为材料,首先用 Trizol 法提取 8 个采样点马铃薯叶片总 RNA,以已公布的马铃薯 X 病毒 CP 基因序列设计特异引物,通过 RT-PCR 扩增目的 DNA 片段,用琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物;然后对 CP 基因进行克隆并测序,使用 DNASTAR 软件分析陕北马铃薯 X 病毒 CP 基因序列的一致性,并与国内外其他地区 12 个马铃薯 X 病毒进行比较,采用邻接法构建系统进化树。**【结果】**从陕北 8 个县(区)马铃薯叶片中均扩增到与预期大小一致的长度为 620 bp 目的片段,可知这些马铃薯均感染了 X 病毒。不同 CP 基因序列之间存在微小变异,8 个县(区)样品间 CP 基因的序列一致性在 95.2%~99.4%,与国内外其他地区 12 个样品 CP 基因的序列一致性在 92.9%~98.5%。系统进化树显示,将 X 病毒可分为 4 个类群,而陕北 8 县(区)马铃薯 X 病毒归属于其中的 2 个类群。**【结论】**马铃薯 X 病毒在陕北地区普遍存在,RT-PCR 方法可快速、准确地检测到马铃薯 X 病毒,X 病毒 CP 基因存在一定程度的变异。

[关键词] 马铃薯 X 病毒;外壳蛋白基因;RT-PCR;序列分析

[中图分类号] S435.32

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2014)09-0091-06

RT-PCR detection and sequence analysis of CP gene of potato virus X in northern Shaanxi

FENG Guang-hui, DU Hu-ping, LI Xia-long, KANG Fu-ren

(College of Life Science, Yulin University, Yulin, Shaanxi 719000, China)

Abstract: **【Objective】** The identity and variation of CP gene sequence of potato virus X in 8 counties (districts) in northern Shaanxi were detected by RT-PCR to clarify the virus variation and provide a reference for the promotion of detoxification potato. **【Method】** Taking leaves of suspected poison potatoes at 2—3 generations as materials, the total RNAs were extracted by Trizol method at 8 sampling sites. Specific primers were designed based on published CP gene sequences of potato virus X and DNAs were amplified using RT-PCR method. The PCR products were examined by agarose gel electrophoresis. Then the target gene was cloned and sequenced, and the identity of sequence was analyzed by DNASTAR software and compared with the CP gene identities of 12 X viruses at home and abroad. At last, phylogenetic tree was constructed using neighbor joining method. **【Result】** Expected fragments with the size of 620 bp were obtained from all 8 samples after amplification, indicating that all these potatoes were infected with potato virus X. There was minor difference between different CP genes sequence and identity of the tested sequences was

[收稿日期] 2014-04-03

[基金项目] 陕西省教育厅项目(08JK508, 08JK509)

[作者简介] 冯光惠(1977—),男,陕西横山人,讲师,硕士,主要从事植物组织培养与脱毒技术、分子生物学研究。

E-mail: fghui.99@126.com

95.2%—99.4%。The identity of all samples at home and abroad was 92.9%—98.5%。The potato virus X could be divided into 4 groups based on CP gene phylogenetic trees, and the samples from 8 counties (districts) of northern Shaanxi belonged to two groups. 【Conclusion】 Potato virus X was widespread in northern Shaanxi. It can be rapidly and accurately detected by RT-PCR, and there existed a certain degree of variation in the CP gene.

Key words: potato virus X; CP gene; RT-PCR; sequence analysis

马铃薯病毒家族成员包括 X 病毒(PVX)、Y 病毒(PVY)、A 病毒(PVA)、S 病毒(PVS)、卷叶病毒(PLRV)等,其中 PVX 是马铃薯病毒家族成员的典型类型。携带 X 病毒的马铃薯植株通常不表现出症状,但感染 X 病毒可导致植株叶片失绿、变小和块茎坏死病变等。PVX 与 PVY 和 PVA 复合感染可导致更严重的症状,由此造成的马铃薯产量损失超过任何单独病毒侵染。X 病毒主要靠汁液接触传播,也可以通过昆虫咀嚼式口器机械传播,除马铃薯外,烟草、辣椒、番茄也会成为 X 病毒的寄主^[1]。

由于马铃薯是无性繁殖作物,随着脱毒种薯种植代(年)数的增加,病毒在植株体内不断积累以及在植物间互相传播,导致马铃薯产量和品质逐渐下降,而且还会使马铃薯感染其他种类的病毒和类病毒。因此,及时、准确地检测田间种植马铃薯的带毒情况,采用茎尖剥离脱毒法、超低温疗法^[2-3]等脱毒技术控制病毒的蔓延,可为脱毒马铃薯的推广种植奠定基础。

检测马铃薯病毒最常用的方法有双抗体夹心酶联免疫吸附法(DAS-ELISA)、反转录 PCR 法(RT-PCR)和实时荧光定量 PCR 法。DAS-ELISA 法操作简单、直观、实用性强,准确度较高,但检测病毒含量较低的马铃薯时,灵敏度和准确度不高,会出现假阴性现象。而 RT-PCR 检测技术即使在马铃薯病毒含量极低时也可以快速检测出来,该方法具有灵敏、快速、准确度高、特异性强等优点,适用于马铃薯及其他植物病毒的检测^[4-6]。在 RT-PCR 检测技术基础上,研究人员应用多重 RT-PCR 对马铃薯多种病毒同时进行检测,如 Nie 等^[7]检测了马铃薯 PVX、PVY、PVA、PVS、PLRV 5 种病毒和 1 种纺锤类病毒(PSTVd);王中康等^[8]、董代幸等^[9]分别同时检测了马铃薯 PVX、PVS、PVY、PLRV 以及 PVX、PVA、PVY、PLRV 4 种病毒。随着实时荧光定量 PCR 技术的进一步发展,Bright 等^[10]利用该方法检测了马铃薯 PVX、PVY、PVA 和 PLRV 4 种病毒;Sheila 等^[11]采用该方法同时检测了 PVX、PVS、番茄斑萎病毒(TSWV)和 PLRV 4 种病毒。多重 RT-PCR 法和实时荧光定量 PCR 法极大地提

高了马铃薯病毒的检测效率,并逐渐应用到其他植物、动物病毒以及微生物的检测上,但多重 RT-PCR 法和荧光定量 PCR 法易出现假阴性现象,Gambino 等^[12]、牛建新等^[13]在利用多重 RT-PCR 检测葡萄病毒时也有类似报道。国内研究者采用 RT-PCR 方法检测了不同地区的马铃薯 X 病毒^[14-16],但尚未见用 RT-PCR 法检测和分析陕北地区马铃薯 PVX 的报道。因此,本试验以陕北 8 个县(区)种植 2~3 代的疑似携带病毒马铃薯为研究对象,采用 RT-PCR 方法检测该地区的马铃薯 PVX,并对 PVX 的外壳蛋白(Coat protein, CP)基因序列进行分析,明确病毒的变异程度,以期对脱毒马铃薯的推广种植提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品的采集 于 2013-07-10 在马铃薯生长盛期至成熟期,采集疑似携带病毒马铃薯植株的叶片,于常温下保存于保湿组织培养瓶中,运回实验室后于 4 ℃ 冰箱保存。马铃薯样品信息见表 1。

1.1.2 仪器与试剂 主要仪器有 PCR 仪(朗基,杭州)及电泳仪、凝胶成像系统(Bio-rad,意大利)。Trizol 试剂及 cDNA 合成试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、pGEM-Teasy 载体、Taq DNA 聚合酶、dNTP、10×buffer 均购自北京全式金生物科技有限公司。

1.1.3 引物设计 根据 GenBank 数据库中登录的 PVX CP 基因序列,利用引物设计软件 Primer 5 设计 1 对特异引物,上游引物为 5'-ACAGGCC-ACAGGGTCAACTAC-3',下游引物为 5'-CATCT-AGGCTGGCAAAGTCGT-3'。预期扩增片段长度为 620 bp,引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,将其用灭菌 TE (pH 8.0)稀释至浓度为 10 μmol/L。

1.2 方法

1.2.1 马铃薯 X 病毒的 RT-PCR 检测 1)总 RNA 的提取。采用 Trizol 法,参照文献^[17]方法进行,略做改动。具体步骤是:称取 0.1 g 马铃薯叶片在研钵中用液氮研磨,取 1.5 mL 离心管加入 1 mL

Trizol 液,将研磨液与 Trizol 液混合均匀;4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min;转移上清液至另一离心管中,加入 0.2 mL 氯仿,涡旋混匀,室温放置 5 min,4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min;取上清液(水相)于另一离心管中,按上清液体积分别加入 1/2 体积的异戊醇、0.8 mol/L 柠檬酸钠和 1.2 mol/L 氯

化钠,混合均匀,室温放置 5~10 min,4 ℃、12 000 r/min 离心 8 min,弃上清液,将沉淀用 1 mL 体积分数 75%乙醇洗涤 2 次,4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min,小心倒掉乙醇,室温自然干燥后溶于用焦碳酸二乙酯(DEPC)处理过的 ddH₂O,于-80 ℃条件下保存。

表 1 供试马铃薯样品的信息

Table 1 Information of potato samples collected in this study

编号 Code	地点 Location	品种 Variety	地理坐标 Geo-coordinate	土壤性质 Soil property	种植代数 Generation
X01	神木县尔林兔镇 Erlintu Town,Shenmu	夏波蒂 Shepody	N39°02′, E109°55′	沙壤土 Sandy soil	2
X02	榆阳区马合镇 Mahe Town,Yuyang	夏波蒂 Shepody	N38°31′, E109°25′	沙壤土 Sandy soil	2
X03	定边县定边镇 Dingbian Town,Dingbian	克新 1 号 Kexin No. 1	N37°35′, E107°36′	沙壤土 Sandy soil	2
X04	绥德县薛家河镇 Xuejiahe Town,Suide	克新 1 号 Kexin No. 1	N37°39′, E110°21′	黄绵土 Loessal soil	3
X05	子长县栒家坪乡 Luanjiaping Town,Zichang	克新 1 号 Kexin No. 1	N37°09′, E109°35′	黄绵土 Loessal soil	3
X06	志丹县顺宁镇 Shunning Town,Zhidan	陇薯 3 号 Longshu No. 3	N36°56′, E108°38′	黄绵土 Loessal soil	3
X07	宜川县丹川镇 Danchuan Town,Yichuan	克新 1 号 Kexin No. 1	N36°03′, E110°09′	黄绵土 Loessal soil	3
X08	宝塔区万花乡 Wanhua Town,Baota	克新 1 号 Kexin No. 1	N36°33′, E109°22′	黄绵土 Loessal soil	2

2) cDNA 的合成。按照 cDNA 合成试剂盒说明书操作,对提取的马铃薯叶片总 RNA 进行反转录。具体反应体系如下:马铃薯总 RNA 5 μL,Anchored Oligo(dT)₁₈ (0.5 μg/μL) 1 μL,2×ES Reaction Mix 10 μL,EasyScript^{RT} Enzyme Mix 1 μL,加 RNase-free Water 至 20 μL。混匀后,水浴锅中 42 ℃孵育 30 min,在 PCR 仪中于 85 ℃条件下加热失活 5 min。

3) PCR 反应及产物检测。PCR 反应体系:cDNA 3 μL,上游引物 1 μL,下游引物 1 μL,10×buffer 5 μL,2.5 mmol/L dNTPs 4 μL,Taq DNA 聚合酶 1 μL,加 ddH₂O 至 50 μL。PCR 反应程序:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,35 个循环;72 ℃ 10 min。取 6 μL PCR 扩增产物与 1 μL Loading Buffer 混匀,用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,于凝胶成像系统中照相。

表 2 国内外 12 个不同地区马铃薯 X 病毒 CP 基因序列的信息

Table 2 CP gene sequences of potato virus X from 12 different regions at home and abroad

来源地区 Source area	GenBank 登录号 GenBank number	CP 基因大小/bp CP gene size	来源地区 Source area	GenBank 登录号 GenBank number	CP 基因大小/bp CP gene size
黑龙江 Heilongjiang	GU373815	711	美国 USA	HQ541822	505
北京 Beijing	U19790	789	加拿大 Canada	AF202462	714
宁夏 Ningxia	JN635309	558	阿根廷 Argentina	Z34261	711
贵州 Guizhou	KF225469	714	英国 UK	X88788	711
福建 Fujian	AF485891	711	印度 India	GU256064	714
新疆 Xinjiang	HM036199	732	澳大利亚 Australia	GU384736	714

2 结果与分析

2.1 马铃薯 X 病毒 CP 基因的 RT-PCR 检测

对采自陕北 8 个县(区)的马铃薯叶片 cDNA 的 PCR 产物用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行检测,结果(图 1)发现,均能扩增出长度为 620 bp 左右的目的条带,表明这些马铃薯植株均感染了 X 病毒。但

不同县(区)样品 PCR 产物的电泳条带亮度不一,其中,宜川县丹川镇(7 泳道)样品的 PCR 产物条带最亮,神木县尔林兔镇(1 泳道)、榆阳区马合镇(2 泳道)样品 PCR 产物条带亮度次之,其他 5 个县(区)样品 PCR 产物条带亮度较淡。可能是由于提取的样品总 RNA 品质不同,导致 PCR 体系中 cDNA 品质有差异所致。

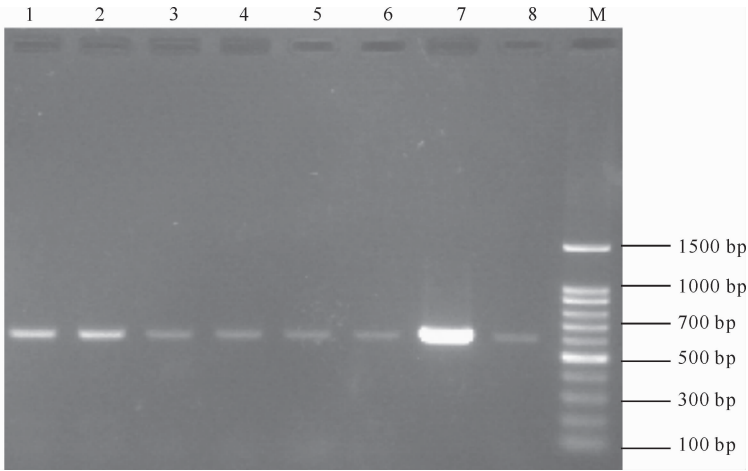


图 1 马铃薯 X 病毒 CP 基因的 RT-PCR 检测结果

1~8. 马铃薯样品 X01、X02、X03、X04、X05、X06、X07 和 X08;M. DNA Marker (DL1500)

Fig. 1 Detection results CP gene of potato X virus by RT-PCR

1—8. Potato samples X01, X02, X03, X04, X05, X06, X07 and X08; M. DNA Marker (DL1500)

2.2 马铃薯 X 病毒 CP 基因序列的分析

将 X01~X08 8 个马铃薯 X 病毒 CP 基因片段提交 GenBank 数据库,获得的 GenBank 登录号分别为 KJ620839、KJ620840、KJ620841、KJ620842、KJ620843、KJ620844、KJ620845、KJ620846。用 DNASTar 软件比对后发现,8 个 CP 基因序列之间均有不同程度的差异,其(G+C)含量在 50.0%~51.29%,故从 GenBank 数据库中搜索(G+C)含量在 49.58%~51.96%的其他 12 个地区马铃薯 X 病毒 CP 基因,进行序列一致性分析,结果表明,本研究中的 8 个 CP 基因序列一致性较高,其中 X02(榆阳区)与 X03(定边县)样品 CP 基因一致性最低,为 95.2%;X01(神木县)与 X02(榆阳区)样品 CP 基因一致性最高,为 99.4%;来自陕北 8 个县(区)样品与从 GenBank 中搜索的国内外其他 12 个地区马铃薯 X 病毒 CP 基因的一致性为 92.9%~98.5%。

系统进化树(图 2)显示,陕北 8 个县(区)马铃薯 X 病毒 CP 基因的系统进化来源相似,虽聚为一个大类,但又分为 2 个区,其中,子长县、宝塔区、定边县和志丹县 X 病毒的 CP 基因序列分在 I 区,与阿根廷、加拿大及我国黑龙江 CP 基因分在同一个

区;神木县、榆阳区、绥德县和宜川县 X 病毒的 CP 基因序列分在 II 区,同时北京 CP 基因分在该区。就地理位置而言, I 区的陕北 4 个采样地主要分布在东北方向,靠近内蒙古和山西;而 II 区的陕北 4 个采样地分布在西南方向,与甘肃和宁夏毗邻。我国新疆、宁夏与印度、美国的 CP 基因序列来源相似,同分在 III 区;我国福建与澳大利亚的 CP 基因序列相似,我国贵州与英国的 CP 基因序列相似,以上 4 个 CP 基因同分在 IV 区。

3 讨论

本研究调查发现,陕北 8 个县(区)最近几年都在推广种植脱毒马铃薯,但一级脱毒种薯种植 2~3 年后,马铃薯叶片开始出现花叶、皱缩等症状,薯块性状发生变化,产量也呈下降趋势,说明 X 病毒或其他病毒可能在马铃薯体内存在。究其原因,一是地方检疫部门对马铃薯脱毒苗及各级种薯的检验检疫监督不严,造成将带毒种薯发放给农民种植;二是大部分农户分散种植马铃薯,且马铃薯与其他作物倒茬轮作种植,在倒茬种植时,原有茄科植物如西红柿、辣椒等感染的各种病毒,会由机械或汁液传播感

染马铃薯。

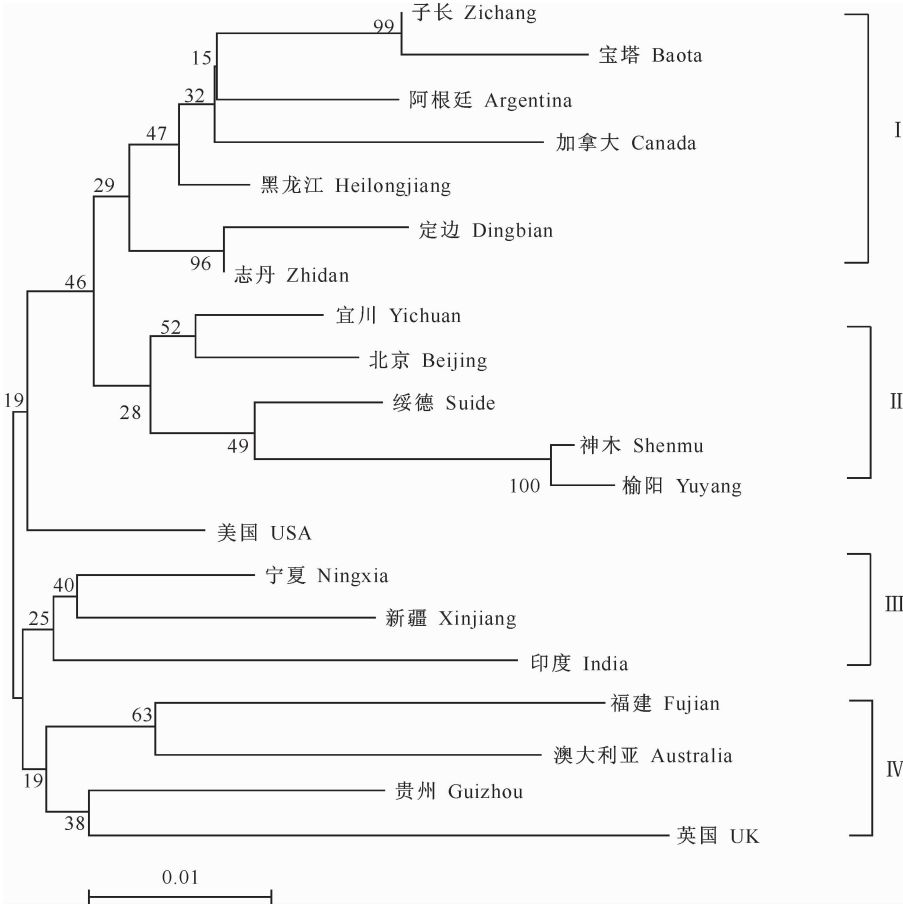


图 2 陕北及国内外不同地区马铃薯 X 病毒 CP 基因序列的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic trees of CP genes of potato virus X in northern Shaanxi and different regions at home and abroad

RT-PCR 分子检测技术可快速、准确地检测马铃薯的携带病毒情况,是近年来国内外应用较为普遍的病毒检测技术,该技术的应用对脱毒马铃薯种薯的推广及马铃薯产业的发展具有重要意义。笔者认为,采用 RT-PCR 法检测病毒时,只要提取的马铃薯总 RNA 品质高,设计不同的特异引物,就能扩增出预期的目的条带,不会发生假阴性现象,检测效果好。另外,在用 RT-PCR 法检测常见的 PVX、PVY、PVS、PVA、PVM 和 PLRV 6 种病毒以及类病毒 PSTVd 时,可通过改变 PCR 反应体系中的温度,从而在 PCR 仪中实现多种病毒的同步检测。

马铃薯 X 病毒 CP 基因序列的系统进化树表明,本研究中的陕北 8 个县(区)马铃薯 X 病毒 CP 基因的序列一致性为 95.2%~99.4%,与国内外 12 个不同地区马铃薯 X 病毒 CP 基因序列的一致性在 92.9%~98.5%。曲静等^[18]发现,山东马铃薯 X 病毒分离物与 GenBank 中 15 个有代表性的 X 病毒株系或分离物的 CP 基因序列的一致性在 80.1%~99.7%;张威等^[19]发现,黑龙江马铃薯 X 病毒分离物与 GenBank 中 17 个 X 病毒分离物的 CP 基因序列一致性在 75.5%~99.2%;姚东校等^[20]发现,贵州马铃薯 X 病毒分离物与 19 个不同地区 X 病毒分离物的 CP 基因序列一致性在 78.6%~97.5%。本研究中,陕北马铃薯 X 病毒 CP 基因与其他 12 个地区 CP 基因序列一致性较高,可能是因为陕北地区近几年引入马铃薯品种较多,引种时间较短所致。这与 Kawakami 等^[21]、Robertson 等^[22]对马铃薯 X 病毒 CP 基因序列的系统进化分析结果一致。总之,陕北地区马铃薯 X 病毒 CP 基因存在一定程度的变异,但其系统进化来源相似,聚为一个大类。主要是引种速度较快、引入品种较多所致。由于采集地和土壤性质不同,有关引进品种、机械操作方式和种植年代不同引起的马铃薯 X 病毒 CP 基因序列变异,还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Mary E B, Thomas A Z. Virus problems of potatoes [EB/OL]. (2005-04-11)[2014-04-03]. http://vegetable.mdoeline.ppath.comell.edu/News_Articles/Potato_Virus.htm.

- [2] 李凤云. 马铃薯茎尖脱毒效果影响因素的研究 [J]. 中国马铃薯, 2008, 22(4): 201-204.
Li F Y. Factors influencing potato meristem culture for elimination of viruses [J]. China Potato, 2008, 22(4): 201-204. (in Chinese)
- [3] 白建明, 陈晓玲, 卢新雄, 等. 超低温保存法去除马铃薯 X 病毒和马铃薯纺锤类病毒 [J]. 分子植物育种, 2010, 8(3): 605-611.
Bai J M, Chen X L, Lu X X, et al. Elimination of potato virus X and potato spindle tuber viroid by cryopreservation [J]. Molecular Plant Breeding, 2010, 8(3): 605-611. (in Chinese)
- [4] 吴兴泉, 时 妍, 杨庆东, 等. 马铃薯病毒的 RT-PCR 检测技术评述 [J]. 中国马铃薯, 2011, 25(4): 251-254.
Wu X Q, Shi Y, Yang Q D, et al. RT-PCR detection technology for potato viruses [J]. China Potato, 2011, 25(4): 251-254. (in Chinese)
- [5] 吴志明, 时 星, 谢晓亮, 等. 河北省马铃薯 Y 病毒株系分子鉴定及其 RT-PCR 检测 [J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(3): 54-59.
Wu Z M, Shi X, Xie X L, et al. Molecular identification of Hebei potato virus Y isolate and its detection by RT-PCR [J]. Journal of Agriculture University of Hebei, 2005, 28(3): 54-59. (in Chinese)
- [6] 王建辉, 刘建军, 陈克玲, 等. 三种葡萄病毒的 RT-PCR 检测和系统进化分析 [J]. 果树学报, 2013, 30(2): 197-201.
Wang J H, Liu J J, Chen K L, et al. RT-PCR detection and phylogenetic studies on three viruses from grapevine [J]. Journal of Fruit Science, 2013, 30(2): 197-201. (in Chinese)
- [7] Nie X, Singh R P. A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers [J]. Journal of Virological Methods, 2001, 91(1): 37-49.
- [8] 王中康, 夏玉先, 袁 青, 等. 马铃薯种苗复合感染病毒多重 RT-PCR 同步快速检测 [J]. 植物病理学报, 2005, 35(2): 109-115.
Wang Z K, Xia Y X, Yuan Q, et al. Detection of mix-infected potato viruses with multiplex RT-PCR [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2005, 35(2): 109-115. (in Chinese)
- [9] 董代幸, 张祥林, 罗 明, 等. 马铃薯病毒一步法多重 RT-PCR 检测技术的构建 [J]. 微生物学通报, 2011, 38(1): 131-137.
Dong D X, Zhang X L, Luo M, et al. Development of one-step multiplex RT-PCR for simultaneous detection of four potato viruses [J]. Microbiology China, 2011, 38(1): 131-137. (in Chinese)
- [10] Bright O A, Patrick J S, Philip H B. Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TanMan real-time RT-PCR [J]. Journal of Virological Methods, 2007, 142(1/2): 1-9.
- [11] Sheila M M, Michael G K, Roger A C. A single tube, quantitative real-time RT-PCR assay that detects four potato viruses simultaneously [J]. Journal of Virological Methods, 2009, 161(2): 289-296.
- [12] Gambino G, Gnbaudo I. Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex RT-PCR with coamplification of a plant RNA as internal control [J]. Virology, 2006, 96(11): 1223-1229.
- [13] 牛建新, 马兵钢, 何 梅, 等. 库尔勒香梨主要病毒多重 RT-PCR 检测技术研究 [J]. 植物病理学报, 2006, 36(1): 12-21.
Niu J X, Ma B G, He M, et al. Multiple RT-PCR detection of viruses in pear [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2006, 36(1): 12-21. (in Chinese)
- [14] 白建明, 杨琼芬, 李先平, 等. 利用 RT-PCR 快速检测马铃薯 X 病毒(PVX) [J]. 西南农业学报, 2009, 22(6): 1596-1598.
Bai J M, Yang Q F, Li X P, et al. Rapid detection of potato virus X by RT-PCR [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2009, 22(6): 1596-1598. (in Chinese)
- [15] 张艳萍, 厚毅清, 裴怀弟, 等. 马铃薯 X 病毒的分子生物学方法检测探究 [J]. 种子, 2011, 30(12): 75-77.
Zhang Y P, Hou Y Q, Pei H D, et al. Probation the detecting method of potato X virus by molecular biology [J]. Seed, 2011, 30(12): 75-77. (in Chinese)
- [16] 朱云芬, 程 群, 沈艳芬, 等. 马铃薯 X 病毒的 RT-PCR 和 IC-RT-PCR 检测 [J]. 中国马铃薯, 2012, 26(6): 370-373.
Zhu Y F, Cheng Q, Shen Y F, et al. Detection of potato virus X by RT-PCR and IC-RT-PCR [J]. China Potato, 2012, 26(6): 370-373. (in Chinese)
- [17] Courtney E J, Amy O C, David K W. Evaluation of isolation methods and RNA integrity for bacterial RNA quantitation [J]. Journal of Microbiological Methods, 2008, 75(2): 318-324.
- [18] 曲 静, 朱常香, 温孚江, 等. 一个马铃薯 X 病毒分离物的外壳蛋白基因序列分析与株系鉴定 [J]. 植物保护学报, 2003, 30(4): 358-364.
Qu J, Zhu C X, Wen F J, et al. Coat protein genes analysis and identification of an isolate of potato virus X [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2003, 30(4): 358-364. (in Chinese)
- [19] 张 威, 白艳菊, 申 宇, 等. 马铃薯 X 病毒黑龙江分离物外壳蛋白基因克隆与序列分析 [J]. 黑龙江农业科学, 2010(8): 1-5.
Zhang W, Bai Y J, Shen Y, et al. Cloning and sequences analysis of CP gene of potato virus X Heilongjiang isolate [J]. Heilongjiang Agriculture Sciences, 2010(8): 1-5.
- [20] 姚东校, 洪 鲲, 杨立昌, 等. 马铃薯 X 病毒贵州分离物的分子鉴定 [J]. 广东农业科学, 2013(13): 139-142.
Yao D X, Hong K, Yang L C, et al. Molecular identification of a potato virus X isolated from potatoes in Guizhou [J]. Journal of Agricultural Sciences of Guangdong, 2013(13): 139-142. (in Chinese)
- [21] Kawakami K, Fuji S, Miyoshi K. Complete nucleotide sequence of a new potexvirus, "Phaius virus X", isolated from *Phaius flavus* Lindl [J]. Archives of Virology, 2008, 153(3): 527-531.
- [22] Robertson N L, Smeenk J, Anderson J M. Molecular characterization of potato leafroll virus, potato virus A, and potato virus X isolates from potatoes in Alaskan cities and villages [EB/OL]. (2011-02-09) [2014-04-03]. <http://www.plant-managementnetwork.org/pub/php/brief/2011/potato/>.