

胜红蓟上一种与双生病毒伴随的重组 β 卫星分子的鉴定

孙少双, 王冬雪, 杨秀玲*, 周雪平

(中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要 双生病毒是一类在全球范围内危害严重的单链环状 DNA 病毒。本研究从 2017 年采自云南的胜红蓟样品中(YN2017)获得了一条菜豆金色花叶病毒属病毒和一条 β 卫星的全基因组序列。该双生病毒的全长序列与烟草曲茎病毒的相似性最高, 为 99.60%, 确定为烟草曲茎病毒的分离物。YN2017 β 卫星与中国胜红蓟黄脉 β 卫星的同源性最高, 为 90.8%。进一步分析发现, 该 β 卫星的卫星保守区域(SCR)至富含腺嘌呤区(A-rich 区)之间约 1 kb 的序列与中国胜红蓟黄脉 β 卫星相应序列的相似性高达 97.2%; 其包含的 A-rich 区上游与 SCR 之间约 300 bp 的序列与中国胜红蓟黄脉 β 卫星相应序列的相似性仅为 70.2%, 而与烟草曲茎 β 卫星相应序列的相似性最高, 为 97.3%。重组分析发现, 所分离的 β 卫星是由中国胜红蓟黄脉 β 卫星和烟草曲茎 β 卫星重组产生。这是首次在中国发现由不同的 β 卫星重组产生的 β 卫星分子。

关键词 胜红蓟; 双生病毒; β 卫星; 重组

中图分类号: S 432.41 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2019253

Identification of a recombinant geminivirus-associated betasatellite from *Ageratum conyzoides*

SUN Shaoshuang, WANG Dongxue, YANG Xiuling*, ZHOU Xueping

(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract Geminiviruses are a group of single-stranded DNA viruses that cause severe losses to many crops worldwide. In this study, we determined the complete nucleotide sequences of a begomovirus and a betasatellite from an *Ageratum conyzoides* plant (YN2017) showing yellow vein and leaf curling symptoms in Yunnan. The begomovirus shared 99.60% sequence identity with *Tobacco curly shoot virus* (TbCSV) and thus was identified as an isolate of TbCSV. The YN2017 betasatellite shared the highest sequence identity (90.8%) with *Ageratum yellow vein China betasatellite* (AYVCNB). Further analysis of the betasatellite sequences showed that the sequences from the satellite conserved region (SCR) to the A-rich region shared 97.2% identity with the homologous sequences of AYVCNB, while the sequences between the SCR and the upstream A-rich region only shared 70.2% identity with that of AYVCNB. Instead, these sequences were more closely related (97.3% sequence identity) to the coordinated sequences of TbCSB. Recombination detection analysis showed that the betasatellite might result from the recombination of AYVCNB and TbCSB. This is the first report of a recombinant betasatellite that has arisen from betasatellites recombination in China.

Key words *Ageratum conyzoides*; geminivirus; betasatellite; recombination

双生病毒是一类具有孪生颗粒形态的单链环状 DNA 病毒, 病毒粒子大小为 18 nm × 30 nm。基于基因组结构、介体种类和寄主范围, 2017 年国际病

毒分类委员会(International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)将双生病毒科分为 9 个属和 2 个暂定种, 分别为玉米线条病毒属 *Mastrevirus*、

收稿日期: 2019-05-19

修订日期: 2019-05-29

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0300701); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(Y2017JC04)

* 通信作者 E-mail: xlyang@ippcaas.cn

菜豆金色花叶病毒属 *Begomovirus*、甜菜曲顶病毒属 *Curtovirus*、番茄伪曲顶病毒属 *Topocuvirus*、美杜莎潜隐病毒属 *Capulavirus*、画眉草条纹病毒属 *Eragrovirus*、伊朗甜菜曲顶病毒属 *Becurtovirus*、芜菁曲顶病毒属 *Turncurtovirus* 和葡萄红色斑点病毒属 *Grablovirus* 以及桑花叶型矮缩相关病毒和柑橘褪绿矮缩病毒^[1]。其中,种类最多、造成危害最严重的是由烟粉虱以持久性方式传播的菜豆金色花叶病毒属病毒。

菜豆金色花叶病毒属病毒的基因组既有单组分,也有双组分。其中,双组分双生病毒的基因组含有大小约为 2.5~2.6 kb 的 DNA-A 和 DNA-B 两个组分,单组分的双生病毒仅含有一个在大小和结构上与双组分病毒的 DNA-A 组分类似的 DNA 组分^[2]。很多单组分的双生病毒都伴随有一类卫星 DNA 分子,大小约为 1.3 kb,称为 β 卫星(betasatellite)。虽然 β 卫星依赖辅助病毒进行复制、转录和装配,但是 β 卫星是一个多功能的 DNA 分子,能够逃脱 RNA 沉默等植物防御反应,并且是胜红蓟黄脉病毒 *Ageratum yellow vein virus* (AYVV)、木尔坦棉花曲叶病毒 *Cotton leaf curl Multan virus* 等多种菜豆金色花叶病毒诱导产生典型的病害症状所必需的^[3-5]。自 1999 年从感染 AYVV 的胜红蓟样品中首次分离鉴定出 β 卫星以来^[6],目前已鉴定的 β 卫星的全长序列多达 1 300 多条。由于 β 卫星的种类较多,2017 年 ICTV 将其划分为番茄曲叶病毒卫星科 *Tolecusatellitidae* β 卫星属 *Betasatellite*,包含了 61 个种(<http://talk.ictvonline.org/taxonomy>)。 β 卫星与其辅助病毒组成的病害复合体广泛分布于全球 37 个国家和地区,对棉花、番茄、番木瓜等多种作物造成了毁灭性危害^[4]。

杂草因其分布广泛、生存能力强,是多种双生病毒的中间寄主和初侵染源,在双生病毒的病害流行中具有重要作用^[7-8]。胜红蓟 *Ageratum conyzoides* L., 又称白华草,为菊科藎香蓟属一年生草本植物,主要分布在我国福建、云南、广东和贵州等地,具有清热解毒、止血止痛的功效。目前已有报道发现胜红蓟是多种双生病毒,如 AYVV、中国胜红蓟黄脉病毒 *Ageratum yellow vein China virus*、烟草曲茎病毒 *Tobacco curly shoot virus* (TbCSV) 和番木瓜曲叶病毒 *Papaya leaf curl virus* 的寄主^[6, 9-12]。本研究从云南采集了表现曲叶和黄脉症状的胜红蓟样

品,从中分离到了 TbCSV,并首次从中国分离到由不同的 β 卫星重组产生的 β 卫星分子。

1 材料与方法

1.1 病害样品的采集

2017 年 8 月从云南省采集了胜红蓟病株 (YN2017),该病株具有明显的黄脉和叶片卷曲等疑似双生病毒侵染的症状(图 1)。



图 1 从云南采集的疑似感染双生病毒的胜红蓟样品

Fig. 1 Characteristic symptoms of geminivirus-infected *Ageratum conyzoides* from Yunnan

1.2 植物总 DNA 的提取及 PCR 检测

利用 CTAB 法提取胜红蓟病株 YN2017 的叶片总 DNA^[13]。以提取的总 DNA 为模板,利用双生病毒科菜豆金色花叶病毒属病毒的简并引物 PA/PB (PA: 5'-TAATATTACCKGWKGVCCSC-3'; PB: 5'-TGGACYTTTCAWGGBCCTTCACA-3') 进行 PCR 检测。该引物扩增的目的片段约 500 bp,扩增区域包含该属病毒的基因间隔区及外壳蛋白保守区。同时,利用 β 卫星的通用引物 β 01/ β 02 (β 01: 5'-GGTACCACTACGCTACGCAGCAGCC-3'; β 02: 5'-GGTACCTACCCTCCCAGGGGTACAC-3') 扩增双生病毒 β 卫星的全长序列(约 1.3 kb)。PCR 反应体系为: 2×TransStart FastPfu DNA Polymerase mix(北京全式金生物公司) 10 μ L、20 μ mol/L 的上、下游引物各 0.2 μ L、植物总 DNA 200 ng,加超纯水补齐至 20 μ L。扩增条件: 95℃ 预变性 2 min; 95℃ 变性 20 s, 50℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 30 s (PA/PB 引物) 或 1 min (β 01/ β 02 引物), 循环 35 次; 72℃

延伸 10 min。PCR 反应结束后,用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测。在紫外灯下割取目的片段,利用 Omega DNA 凝胶回收试剂盒分离纯化目的片段,将回收产物与 *pEASY-blunt cloning vector* (全式金生物公司)连接,通过热激法转化到大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 中,涂布于含有卡那霉素的 LB 固体平板上,在 37℃ 条件下倒置培养过夜,菌落 PCR 鉴定后挑取阳性克隆送至擎科生物测序公司测序。

1.3 病毒 DNA-A 全长基因组的克隆

在测序获得的 500 bp 片段的 DNA-A 序列基础上,设计扩增病毒 DNA-A 全长的特异引物(A-F: 5'-GTCGAAGCGTCCAGCAGATA-3'; A-R: 5'-AGCGGGCGTGGAATGATTA-3')对胜红蓟样品中的 DNA-A 全长进行扩增,PCR 反应体系参考 1.2,PCR 扩增条件为:95℃ 预变性 2 min;95℃ 变性 20 s,50℃ 退火 20 s,72℃ 延伸 2 min,循环 35 次;72℃ 延伸 10 min。按 1.2 中的方法进行克隆测序。

1.4 病毒 DNA-A 及其 β 卫星的基因组结构和进化重组分析

利用 DNASTAR Lasergene 7 软件中的 Edit-Seq 和 SeqMan 对所测定的 DNA-A 和 β 卫星的序列进行处理和全长拼接;利用 NCBI 中的 BLAST 进行比对分析,寻找同源关系较近的序列;用 SnapGene 软件构建 β 卫星的基因组结构;利用 MEGA 7.0 软件的邻近相连法(neighbor-joining method)构建系统进化树,步差值设置为 1 000;利用 RDP 4.97 软件对序列进行重组分析,参数设置为:读宽 30 nts,置信概率 0.000 1,所测重组序列之间需要有 50%~100% 的序列相似性^[14]。

1.5 重组 β 卫星亲本序列的检测

以 YN2017 样品中的 DNA 为模板,分别采用 AYVCNB 的特异引物(AYVCNVB-F: 5'-CCATCT-CATATTTACGAAGTC -3'; AYVCNVB-R: 5'-GCCACCTCCGTGTTGGTACT-3'),以及 TbCSB 的特异引物(TbCSB-F: 5'-GTCTACACAGTACTACGTT-GA -3'; TbCSB-R: 5'-ACCCTCCCAGGGGTACA-CAAC-3')进行 PCR 扩增。

2 结果与分析

2.1 病毒 DNA-A 的基因组扩增及结构分析

以胜红蓟病株 YN2017 的总 DNA 为模板,利用引物 PA/PB 从样品中可以扩增得到约 500 bp 的

目的片段。将测序得到的序列在 NCBI 上进行 BLAST 分析,结果发现,克隆的片段与 TbCSV 的外壳蛋白的相似性高达 99%,表明该样品可能感染了双生病毒。进一步根据测序得到的序列设计扩增病毒全长的特异引物 A-F 和 A-R,从胜红蓟样品中扩增得到大约 2.8 kb 的特异片段。将目的片段克隆测序,并且进行序列拼接后得到的 DNA-A 全长序列为 2 746 bp(GenBank 登录号:MK948360)。序列分析发现,所获得的 DNA-A 具有菜豆金色花叶病毒属病毒典型的基因组结构,共编码了 6 个开放阅读框(open reading frames, ORFs),其中病毒链编码了 AV1(294 - 1 064 nt)和 AV2(134 - 481 nt),互补链编码了 AC1(1 513 - 2 598 nt)、AC2(1 206 - 1 610 nt)、AC3(1 061 - 1 465 nt)和 AC4(2 148 - 2 570 nt),AC1 和 AV2 之间含有一个 283 nt 的基因间隔区(intergenic region, IR)。IR 区中具有一个茎环结构,包含了病毒复制和转录起始所需的 9 碱基保守序列 TAATATTAC。

2.2 病毒 DNA-A 的进化和重组分析

利用 NCBI 的 BLAST 将 YN2017 分离物 DNA-A 的全长基因组序列与 GenBank 数据库中的序列进行比较,发现其与 TbCSV-[Y282](AJ971266.1)的全长序列相似性最高,为 99.60%。利用 MEGA 7.0 软件构建系统进化树,发现 TbCSV-[YN2017]与 TbCSV 的云南分离物 TbCSV-[Y282](AJ971266.1)和 TbCSV-[Y35](AJ420318.1)的亲缘关系最近(图 2)。根据 ICTV 制定的双生病毒种的分类标准,TbCSV-[YN2017]为 TbCSV 的一个分离物。RDP 重组分析表明,TbCSV-[YN2017]并无重组事件发生。

2.3 β 卫星的基因组扩增及结构分析

很多单组分的菜豆金色花叶病毒都伴随有 β 卫星分子, β 卫星与其辅助病毒形成的病害复合体给农作物生产造成了巨大危害。前期研究表明,有些 TbCSV 的分离物伴随有 β 卫星,有些分离物不含有 β 卫星分子^[15]。为了明确采集的 YN2017 样品中是否伴随有 β 卫星分子,利用双生病毒 β 卫星的通用引物 β 01/ β 02 从样品中扩增得到了约 1.3 kb 左右的目的片段。将片段回收后进行克隆测序,序列拼接后得到 1 335 bp 的全长序列(GenBank 登录号:MK948361)。对其基因组结构进行分析,发现该 β 卫星具有典型的 β 卫星的结构,主要包括三个特征:

1) 含有一个大小约 120 bp 的卫星保守区 (satellite conserved region, SCR)。SCR 区含有保守的茎环结构和 9 碱基核苷酸序列 TAATATTAC; 2) 互补

链上编码一个大小约为 13 kD 的 β C1 蛋白; 3) β C1 上游还含有一个腺嘌呤富含区 (A-rich region), 表明 YN2017 分离物伴随有 β 卫星分子。

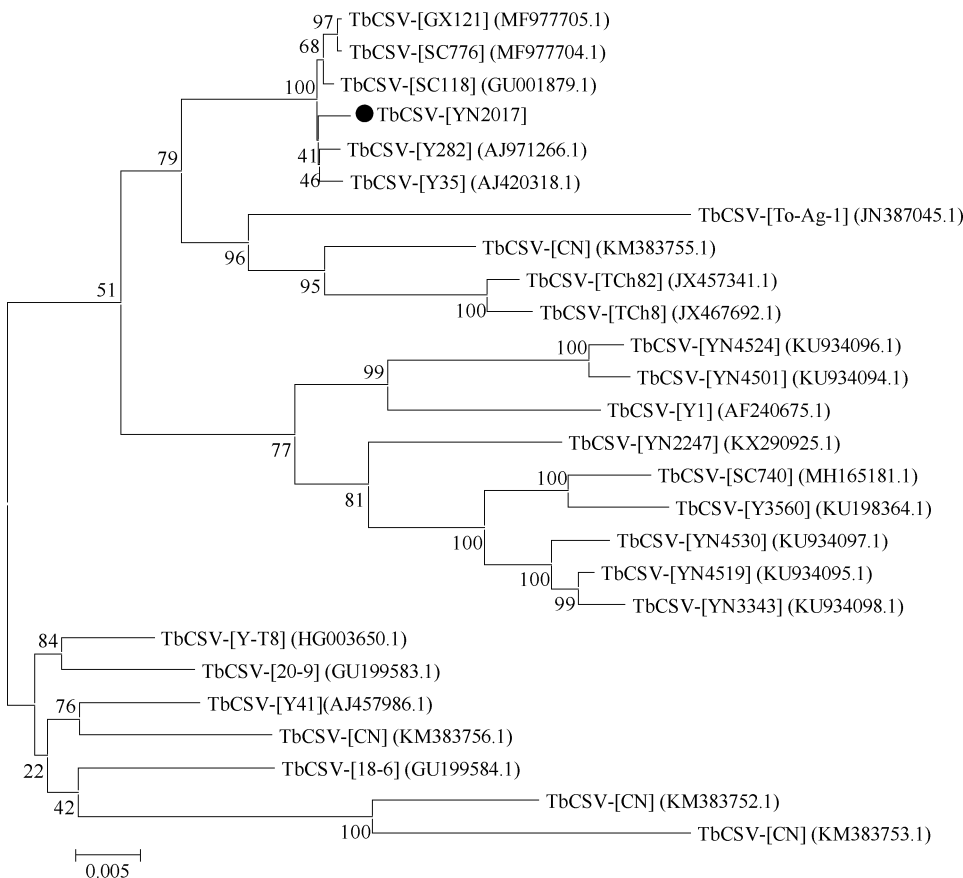


图 2 基于 YN2017 DNA-A 和烟草曲茎病毒不同分离物的全长基因组序列构建的系统进化树

Fig. 2 A phylogenetic dendrogram generated based on the complete nucleotide sequences of YN2017 and other isolates of *Tobacco curly shoot virus*

2.4 β 卫星的进化和重组分析

利用 BLAST 对 YN2017 样品中的 β 卫星的全长基因组序列与 GenBank 数据库中的序列进行比对,发现该 β 卫星与中国胜红蓟黄脉 β 卫星 *Ageratum yellow vein China betasatellite* (AYVCNB)海南分离物 AYVCNB-[Hn9] (AM048835.1) 和 AYVCNB-[Hn2] (AM048834.1) 的相似性最高,均为 90.8%。进一步分析发现,YN2017 β 卫星的 1—979 nt 和 1 282—1 335 nt 的序列与 AYVCNB-[Hn9] 相应序列的相似性高达 97.2%; 980—1 281 nt 的序列与 AYVCNB-[Hn9] 相应序列的相似性仅为 70.2%,而与烟草曲茎 β 卫星 TbCSB-[Y35] (AJ421484.1) 相应序列的相似性高达 97.3%,暗示着 YN2017 β 卫星可能是由重组产生的。利用 RDP 软件进行分析,发现 YN2017 β 卫星是由 AYVCNB 和 TbCSB 重组产生

的一个 β 卫星分子,AYVCNB 为主要亲本,TbCSB 为次要亲本,重组的位点主要包括 A-rich 上游以及 SCR 之间的区域,重组的置信概率为 2.676×10^{-33} (图 3)。基于 β 卫星的全基因组序列构建了系统进化树,发现 YN2017 样品中的 β 卫星在进化树上单独聚为一支(图 4)。

为了明确 YN2017 样品中是否存在重组 β 卫星的亲本,结合 YN2017 β 卫星、AYVCNB 和 TbCSB 的序列设计了检测 AYVCNB 和 TbCSB 的特异引物。结果发现,利用 AYVCNB-F 和 AYVCNB-R 以及 TbCSB-F 和 TbCSB-R 均检测不到目的条带,但是利用 AYVCNB-F 和 TbCSB-R 能够检测到约 1.3 kb 的条带,回收该片段并且进行克隆测序后,发现 AYVCNB-F 和 TbCSB-R 所扩增的条带确实为重组的 β 卫星分子。

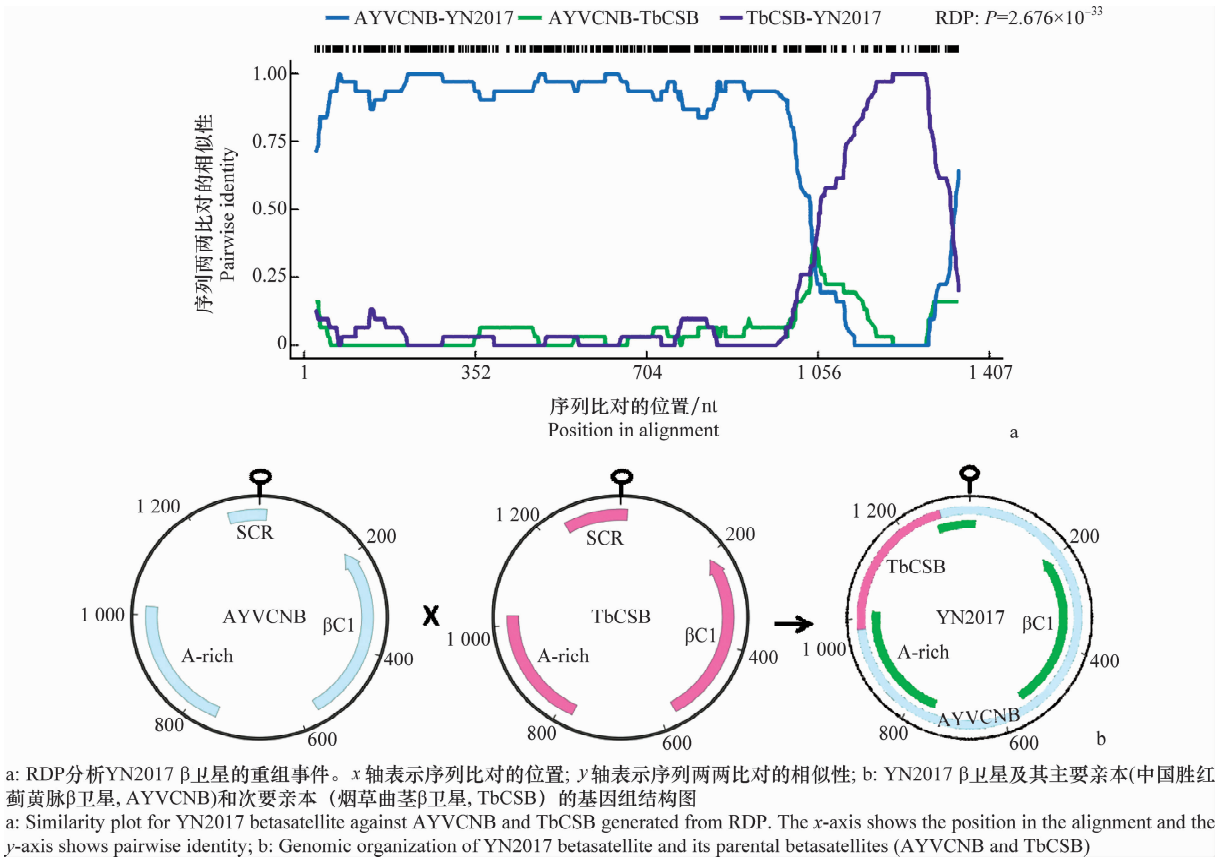


图 3 YN2017 β 卫星的重组示意图

Fig. 3 Graphic representation of recombination in the YN2017 betasatellite

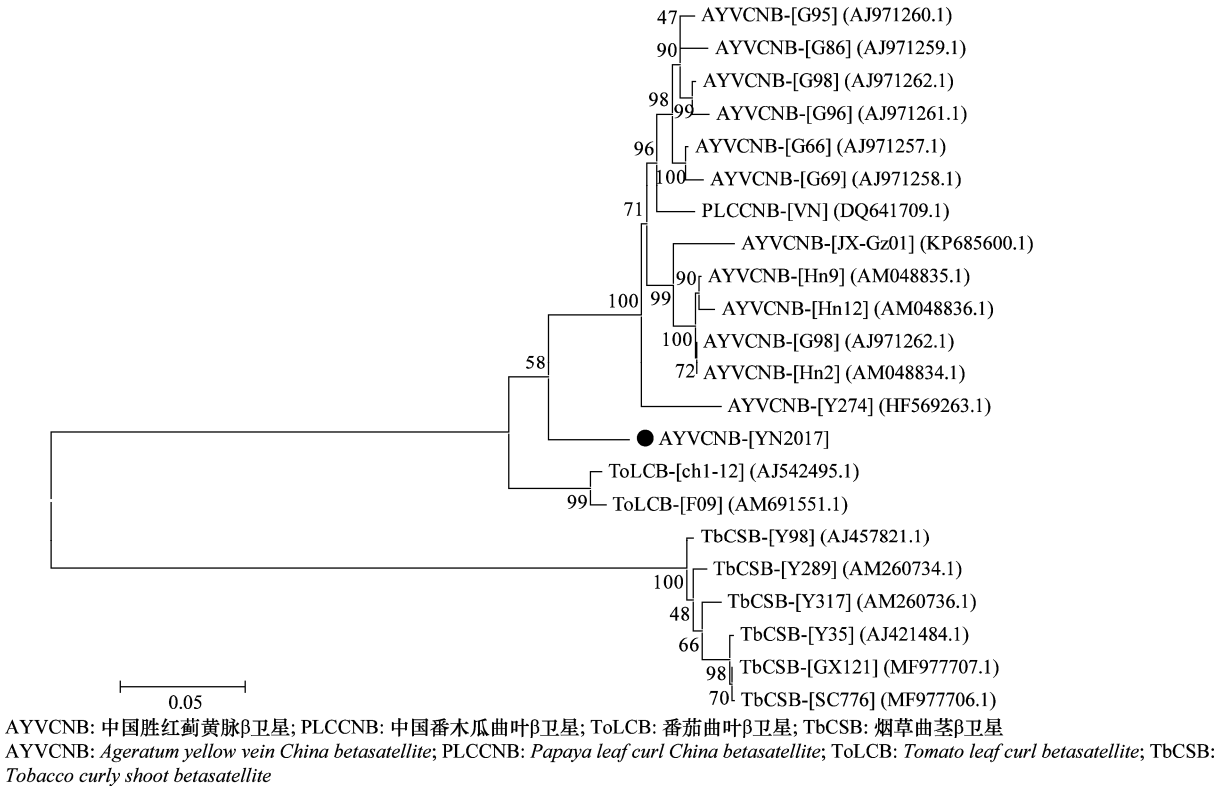


图 4 基于 YN2017 β 卫星和其他 β 卫星的全长基因组序列构建的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic dendrogram generated based on the complete nucleotide sequences of YN2017 betasatellite and other betasatellites

3 结论与讨论

近年来,双生病毒在全国范围内的危害日益严重,给作物生产造成了严重威胁^[16]。杂草是双生病毒重要的原始寄主或中间寄主,在双生病毒的侵染循环和病毒的暴发流行中具有重要作用。我们于2017年8月从云南采集了一份疑似感染双生病毒的胜红蓟样品,染病的胜红蓟叶片出现叶脉黄化、曲叶等症状。通过分子克隆以及序列分析,我们发现该样品中病毒 DNA-A 的全长序列与 TbCSV-[SC118]的相似性最高,为 TbCSV 的一个分离物。我们还发现该样品中伴随有 β 卫星,且该 β 卫星是由 AYVCNB 和 TbCSB 重组产生。这是在我国首次发现双生病毒不同的 β 卫星之间可以发生重组产生新的 β 卫星分子。

Li 等^[15]对采自云南的番茄样品的病原进行检测,发现与 TbCSV 伴随的卫星为 TbSCB。Jiao 等^[12]对2010年采自云南的胜红蓟样品的病原进行检测,发现侵染云南胜红蓟的病毒是 TbCSV,伴随的卫星为 AYVCNB。由于所鉴定的 YN2017 β 卫星是由 AYVCNB 和 TbCSB 重组产生,我们利用 AYVCNB 和 TbCSB 的特异引物去检测所采集的 YN2017 样品中是否存在重组 β 卫星的亲本序列,结果均检测不到 AYVCNB 和 TbCSB;而将 AYVCNB 和 TbCSB 的特异引物进行交叉组合时能检测到重组 β 卫星。双生病毒除了以滚环扩增的方式在寄主植物的细胞核中进行复制外,还能够以依赖于重组的方式进行复制。我们推测可能是由于 AYVCNB 和 TbCSB 的复合侵染增加了病毒基因组重组的概率,导致了重组 β 卫星分子的产生。由于双生病毒对 β 卫星的复制具有复制选择性^[17-19],在长期的进化过程中 TbCSV 可能更倾向于复制和维持重组的 β 卫星。

重组是驱动双生病毒种群间遗传多样性和形成新种群的重要机制。重组产生的新病毒或株系往往具有更强的致病性,导致新的病毒或株系的形成,引起病毒病的大流行。其中一个典型的例子就是非洲木薯花叶病毒 *African cassava mosaic virus* (ACMV) 和东非木薯花叶病毒 *East African cassava mosaic virus* (EACMV) 重组后产生新病毒株系 EACMV-[UgV],重组病毒与 ACMV 复合侵染引起乌干达木薯花叶病的大流行,导致该国木薯毁灭

性死亡^[20]。目前已有多项研究表明,双生病毒的重组经常发生在同科不同属的病毒之间,也可以发生在同属不同种的病毒之间,或者发生在 β 卫星和辅助病毒之间,但是关于不同 β 卫星重组产生的 β 卫星的报道较少。2009 年 Mubin 等^[21]从巴基斯坦的棉花产区表现黄脉和曲叶症状的单年生杂草中首次鉴定到一种由不同的 β 卫星重组产生的重组 β 卫星,发现该重组 β 卫星是由烟草曲叶 β 卫星和木尔坦棉花曲叶 β 卫星重组产生;而我们的研究也是从杂草中鉴定到重组 β 卫星,表明杂草不仅可以作为双生病毒的初侵染源或中间寄主,而且容易使双生病毒发生重组产生新的病毒种类。因此需进一步加强对杂草上的病毒开展系统调查和检测,并在双生病毒病的防治过程中及时彻底清除田间杂草。

参考文献

- [1] ZERBINI F M, BRIDDON R W, IDRIS A, et al. ICTV virus taxonomy profile: *Geminiviridae* [J]. *Journal of General Virology*, 2017, 98(2): 131–133.
- [2] ROJAS M R, HAGEN C, LUCAS W J, et al. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2004, 43(1): 361–394.
- [3] ZHOU Xueping. Advances in understanding begomovirus satellites [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2013, 51(1): 357–381.
- [4] YANG Xiuling, GUO Wei, LI Fangfang, et al. Geminivirus-associated betasatellites: exploiting chinks in the antiviral arsenal of plants [J]. *Trends in Plant Science*, 2019, 24(6): 519–529.
- [5] LI Fangfang, YANG Xiuling, BISARO D M, et al. The β C1 protein of geminivirus-betasatellite complexes: a target and repressor of host defenses [J]. *Molecular Plant*, 2018, 11(12): 1424–1426.
- [6] SAUNDERS K, BEDFORD I D, BRIDDON R W, et al. A unique virus complex causes *Ageratum* yellow vein disease [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(12): 6890–6895.
- [7] GUO Wei, JIANG Tong, ZHANG Xian, et al. Molecular variation of satellite DNA β molecules associated with *Malvastrum yellow vein virus* and their role in pathogenicity [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(6): 1909–1913.
- [8] MCLAUGHLIN P D, MCLAUGHLIN W A, MAXWELL D P, et al. Identification of begomoviruses infecting crops and weeds in Belize [J]. *Plant Viruses*, 2008, 2(1): 58–63.
- [9] 王禄, 林文武, 欧阳智刚, 等. 江西胜红蓟黄脉病病原的分子鉴定 [J]. *江西农业大学学报*, 2016, 38(5): 866–870.

布研究[J]. 浙江农业科学, 2016, 57(12): 1976-1979.

- [19] 杨帅. 无人机低空喷雾雾滴在作物冠层的沉积分布规律及防治效果研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2014.
- [20] 高圆圆, 张玉涛, 张宁, 等. 小型无人机低空喷洒在小麦田的雾滴沉积分布及对小麦吸浆虫的防治效果初探[J]. 作物杂志, 2013(2): 139-142.
- [21] ALM S R, REICHARD D L, HALL F R. Effects of spray drop size distribution of drops containing bifenthrin on *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) [J]. Journal of Economic Entomology, 1987, 80(2): 517-520.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 11 页)

- [49] TEMPLE T N, DU TOIT L J, DERIE M L, et al. Quantitative molecular detection of *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* in carrot seed before and after hot-water treatment [J]. Plant Disease, 2013, 97(12): 1585-1592.
- [50] 冯建军, 刘杰, 王飞, 等. PMA 结合实时荧光 PCR 进行玉米细菌性枯萎病菌细胞活性检测初步研究[J]. 植物检疫, 2014, 28(2): 27-32.
- [51] 王帅, 徐进, 许景升, 等. PMA-qPCR 定量检测青枯菌活菌方法的建立[J]. 植物保护, 2018, 44(6): 122-128.
- [52] 肖妍, 刘芸宏, 高贵田, 等. PMA-qPCR 方法检测陕西猕猴桃溃疡菌优势病原菌活菌的研究[J]. 食品与机械, 2019, 35(4): 48-53.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 24 页)

- [10] 巩焕然. 云南和广西省胜红蓟黄脉病的病原研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2010.
- [11] XIONG Qing, FANG Sanwei, WU Jianxiang, et al. Ageratum yellow vein China virus is a distinct begomovirus species associated with a DNA β molecule [J]. Phytopathology, 2007, 97(4): 405-411.
- [12] JIAO Xiaoyang, GONG Huanrang, LIU Xuejian, et al. Etiology of Ageratum yellow vein diseases in South China [J]. Plant Disease, 2013, 97(11): 1497-1503.
- [13] YANG Xiuling, GUO Wei, MA Xinying, et al. Molecular characterization of tomato leaf curl China virus, infecting tomato plants in China, and functional analyses of its associated betasatellite [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(9): 3092-3101.
- [14] MARTIN D P, MURRELL B, GOLDEN M, et al. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes [J/OL]. Virus Evolution, 2015, 1(1): vev003. DOI: 10.1093/ve/vev003.
- [15] LI Zhenghe, XIE Yan, ZHOU Xueping, et al. Tobacco curly shoot virus DNA β is not necessary for infection but intensifies symptoms in a host-dependent manner [J]. Phytopathology, 2005, 95(8): 902-908.
- [16] ROJAS M R, MACEDO M A, MALIANO M R, et al. World

- [22] 袁会珠, 王国宾. 雾滴大小和覆盖密度与农药防治效果的关系 [J]. 植物保护, 2015, 41(6): 9-16.
- [23] 杨帅, 王国宾, 杨代斌, 等. 无人机低空喷施苯氧威防治亚洲玉米螟初探[J]. 中国植保导刊, 2015, 35(2): 59-62.
- [24] 高赛超, 周晓欣, 秦维彩, 等. 利用风洞评价助剂对杀虫剂航空喷雾雾滴飘移的影响[J]. 应用昆虫学报, 2018, 55(4): 654-658.
- [25] 张龙, 马金龙, 陈树茂, 等. 小型多旋翼无人机在玉米植株上雾滴沉积分布及对玉米锈病防治效果的影响初探[J]. 农业工程技术, 2018(9): 84-87.

- [53] VILANOVA L, USALL J, TEIXIDÓ N, et al. Assessment of viable conidia of *Monilinia fructicola* in flower and stone fruit combining propidium monoazide (PMA) and qPCR [J]. Plant Pathology, 2017, 66(8): 1276-1287.
- [54] CHRISTOFOROU M, PANTELIDES I S, KANETIS L, et al. Rapid detection and quantification of viable potato cyst nematodes using qPCR in combination with propidium monoazide [J]. Plant Pathology, 2014, 63(5): 1185-1192.
- [55] AL-DAOUD F, GOSSEN B D, ROBSON J, et al. Propidium monoazide improves quantification of resting spores of *Plasmidiophora brassicae* with qPCR [J]. Plant Disease, 2017, 101(3): 442-447.

(责任编辑: 田 喆)

- management of geminiviruses [J]. Annual Review Phytopathology, 2018, 56: 637-677.
- [17] QING Ling, ZHOU Xueping. Trans-replication of, and competition between, DNA β satellites in plants inoculated with *Tomato yellow leaf curl China virus* and *Tobacco curly shoot virus* [J]. Phytopathology, 2009, 99(6): 716-720.
- [18] ZHANG Tong, XU Xiongbiao, HUANG Changjun, et al. A novel DNA motif contributes to selective replication of a geminivirus-associated betasatellite by a helper virus-encoded replication-related protein [J]. Journal of Virology, 2016, 90(4): 2077-2089.
- [19] XU Xiongbiao, QIAN Yajuan, WANG Yaqin, et al. Iterons homologous to helper geminiviruses are essential for efficient replication of betasatellites [J/OL]. Journal of Virology, 2019, 93(5): e01532-18. DOI: 10.1128/JVI.01532-18.
- [20] ZHOU Xueping, LIU Yule, CALVERT L, et al. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination [J]. Journal of General Virology, 1997, 78(Pt8): 2101-2111.
- [21] MUBIN M, BRIDDON R W, MANSOOR S, et al. Diverse and recombinant DNA betasatellites are associated with a begomovirus disease complex of *Digera arvensis*, a weed host [J]. Virus Research, 2009, 142(1/2): 208-212.

(责任编辑: 田 喆)