

# 高通量测序在柑橘病毒鉴定与种群多样性分析中的应用

李向<sup>1</sup>, 杨进<sup>1</sup>, 黄爱军<sup>1,2</sup>, 周俊<sup>1,2</sup>, 易龙<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>赣南师范大学生命科学学院, 江西赣州 341000; <sup>2</sup>国家脐橙工程技术研究中心, 江西赣州 341000)

**摘要:** 中国柑橘产业在全球占据至关重要的地位, 然而, 柑橘病毒病却给该产业带来了严重的经济损失。随着病毒种类的不断增多, 快速、准确地对病毒进行鉴定及遗传多样性分析变得愈发关键。高通量测序 (High-Throughput Sequencing, HTS) 技术, 具有高通量、高效快速以及效益高的优势, 逐渐成为了鉴定柑橘病毒的核心技术手段。HTS 技术的应用不仅成功揭示了多种新病毒的存在, 还深入挖掘了已知病毒的全基因组信息, 提供了大量的基因序列数据, 极大地推动了柑橘病毒在遗传变异、进化关系以及生态系统作用等方面的研究。展望未来, 随着技术的发展和优化, HTS 将在柑橘病毒鉴定与种群多样性分析中发挥更为重要的作用, 为柑橘产业的可持续发展提供坚实的支撑。综述了 HTS 技术在柑橘病毒检测与鉴定, 以及种群多样性分析方面的最新进展, 并深入探讨了当前面临的挑战、未来的发展前景及其意义。

**关键词:** 柑橘; 高通量测序技术; 柑橘病毒; 种群多样性分析

中图分类号: S666

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2025)03-0651-11

## Application of high-throughput sequencing in citrus virus identification and analysis of population diversity

LI Xiang<sup>1</sup>, YANG Jin<sup>1</sup>, HUANG Aijun<sup>1,2</sup>, ZHOU Jun<sup>1,2</sup>, YI Long<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Sciences, Gannan Normal University, Ganzhou 341000, Jiangxi, China; <sup>2</sup>National Navel Orange Engineering Research Center, Ganzhou 341000, Jiangxi, China)

**Abstract:** Citrus, as an important component of global economic crops, is the world's largest category of fruit. However, citrus is also a host for many viruses and bacterial pathogens, and its production conditions are threatened by various viral diseases. These diseases are widely distributed worldwide, causing severe impacts on the yield and quality of citrus, resulting in significant economic losses. The viruses that severely affect the citrus industry mainly include: citrus tristeza virus (CTV), citrus chlorotic dwarf-associated virus (CCDaV), citrus tatter leaf virus (CTLV), citrus yellow vein clearing virus (CYVCV), citrus psorosis virus (CPsV), citrus vein enation virus (CVEV), citrus exocortis viroid (CEVd), citrus leaf blotch virus (CLBV), citrus sudden death-associated virus (CSDaV), and satsuma dwarf virus (SDV), etc. Among them, CTV is one of the most destructive viral diseases in the citrus industry, leading to reduced citrus yield and quality, weakened tree vigor, and even death. CTV, a positive single-stranded RNA virus in the Closteroviridae family, exhibits significant genetic diversity and strain differentiation, resulting in varying pathogenicity. Based on symptoms and genomic sequences, it can be classified into quick decline, stem pitting, and yellow shoot strains. CYVCV, belonging to the *Mandarivirus* genus of the Alphaflexiviridae family, has a positive single-stranded RNA genome. Transmitted among citrus plants by citrus mealybugs, contaminated tools, it causes leaf wrinkling, chlorosis mottling, and

收稿日期: 2024-11-05 接受日期: 2025-01-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32160625)

作者简介: 李向, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为植物病害防控。E-mail: X18317513414@163.com

\*通信作者 Author for correspondence. E-mail: yilongswu@163.com

yellow vein clearing in lemons, posing a global threat. CTLV, a *Capillovirus* genus virus in the Betaflexiviridae family, is an ASGV strain, seriously harming citrus production. CLBV, a Betaclosteroviridae family *Citrivirus* genus member, is a positive single-stranded RNA virus with filamentous, wavy particles, infecting diverse hosts mainly via grafting and seeds. Lately, citrus viral diseases are on the rise, yet some pathogens remain undetermined, such as citrus cristicortis disease. Citrus-infecting viruses often have latency and are hard to detect directly. Therefore, accurate detection and identification of citrus viruses play a central role in the disease control system. In recent years, with the rapid advancement of molecular biology technology, rapid and accurate virus identification and in-depth study of their genetic diversity have become key to ensuring the healthy development of the citrus industry. Citrus virus detection and identification are mainly based on the biological characteristics, physical characteristics of virus particles, protein characteristics, and nucleic acid characteristics to establish some methods. At present, the conventional detection and identification methods for citrus viruses mainly include biological indexing, electron microscopy, serological detection, and molecular biological detection. The above methods are well-suited for known viruses and can be combined with multiple methods for detection and identification. However, when it is necessary to accurately identify unknown viruses or newly emerging viruses, the above methods are difficult to work. With the emergence of high-throughput sequencing (HTS) technology in recent years, the above problems have been solved. This technology uses the principle of sequencing by synthesis, which can sequence a large number of RNA and DNA molecules in a short time without prior knowledge of the virus's biological characteristics or genome structure, thus obtaining its nearly complete genomic sequence. This capability solves the limitations of traditional methods when facing unknown viruses and greatly accelerates the discovery and identification process of new viruses. Through HTS technology, researchers have revealed many previously unknown virus types and deepened the understanding of the genetic diversity of known viruses, providing a scientific basis for targeted control strategies. HTS technology also shows great potential in population diversity analysis. By sequencing a large number of virus samples, researchers can obtain rich genetic sequence data, thereby analyzing the genetic variation of viruses, evolutionary trajectories, and their interactions in the ecosystem. This provides a powerful tool for understanding the mechanisms of viral diseases, predicting virus variation trends, and assessing the effectiveness of control measures. Although HTS has achieved significant results in citrus virus research, it still faces some challenges. For example, the complexity of data analysis and the need for bioinformatics knowledge limits its popularization and application in some areas; the high cost of sequencing is still a major obstacle for resource-limited areas. In the future, with the continuous development and optimization of technology, HTS will play a more important role in the identification of citrus viruses and population diversity analysis, providing strong support for the sustainable development of the citrus industry. This article reviews the latest progress of HTS in the detection and identification of citrus viruses, as well as the challenges and future prospects in citrus virus research.

**Key words:** Citrus; High-throughput sequencing technology; Citrus virus; Population diversity analysis

中国果树资源丰富,各类水果的总产量稳居世界首位<sup>[1]</sup>。柑橘作为世界第一大类水果,在全球超过140个国家种植,中国是主要生产国之一。在中国,柑橘的种植面积和产量均居各类水果之首<sup>[2]</sup>。柑橘是芸香科(Rutaceae)多年生木本植物,起源于

喜马拉雅山脉的东南丘陵地带,包括印度东北部、缅甸北部和中国云南西北部地区。作为喜马拉雅生物多样性热点的一部分,云南山区是世界上植物多样性最丰富的地区之一<sup>[3]</sup>。在云南山区,峰顶和深谷构成的物种传播障碍以及气候、地质和地形的多样

性,不仅为植物区系的形成和发展提供了理想的环境,还为柑橘病毒及其宿主的共同进化创造了复杂的研究背景<sup>[4]</sup>。柑橘在长期进化和栽培过程中积累了多种病原体,包括病毒和类病毒,而病毒病严重影响了柑橘果实的质量和产量,造成巨额的经济损失。随着时间的推移,柑橘病毒病的种类不断增加,截至目前已有30多种<sup>[5]</sup>。不同病毒在同一柑橘品种或同一病毒在不同柑橘品种上呈现的症状均存在差异<sup>[6]</sup>。目前少量柑橘病毒性病害的病原尚未明确,随着柑橘产业的不断扩大,这些未知病毒引发新病害的潜在风险将会加剧。因为尚无治疗柑橘病毒病的有效药剂,所以前期的预防工作成为控制病毒发生和流行的主要手段。高效检测与准确鉴定病毒,深入理解病毒遗传多样性是构建有效的柑橘病毒防控体系的前提<sup>[7]</sup>,是保障柑橘产业健康发展的关键。

基于病毒生物学特性、病毒粒体物理特性、病毒蛋白质特性及核酸特性,建立了多种病毒检测和鉴定的方法<sup>[8]</sup>。传统的检测方法,包括指示植物鉴定法、电镜观察法、血清学方法以及聚合酶链式反应检测法(polymerase chain reaction, PCR)等,需预先了解目标病毒的生物学特性、血清学特性、基因组结构和核酸序列,属于针对特定病毒的特异性检测手段。然而,在面对未知病毒的非特异性检测时,传统检测方法往往表现出较低的敏感性和特异性,且检测周期长,这极大地阻碍了对病毒病害的及时防控和后续深入研究<sup>[9]</sup>。近年来,高通量测序(high-throughput sequencing, HTS)技术蓬勃发展,在柑橘已知或未知病毒病害的鉴定中均展现出巨大的潜力,为柑橘病毒研究开辟了新的道路。笔者全面综述HTS技术在柑橘病毒鉴定与种群多样性分析领域的最新进展,深入探讨其技术原理、应用现状、所面临的挑战以及未来的发展趋势。

## 1 高通量测序技术

HTS技术又称为第二代测序技术(next-generation sequencing, NGS)或深度测序技术(deep sequencing)<sup>[10]</sup>。HTS技术基于边合成边测序(sequencing by synthesis, SBS)原理,能够一次性对数十万至数百万个DNA分子进行测序,实现对物种基因组或转录组的详尽分析。此外,HTS技术无需预先了解病毒的生物学特性、血清学特征、基因组结构或序列信息,即可解析出大部分基因组序列<sup>[11]</sup>。

HTS技术主要包括:基因组重测序(genome resequencing, GR)、外显子测序(whole exon sequencing, WES)、从头测序(*de novo* genome sequencing, *De Novo*)、转录组测序(RNA sequencing, RNA-seq)、小RNA测序(small RNA sequencing, sRNA)、染色质免疫共沉淀技术(chromatin immunoprecipitation, ChIP)、染色质分离测序(CHIRP-Seq)以及宏基因组测序(metagenomic sequencing, mNGS)技术,其中RNA-seq、sRNA和mNGS已广泛应用于生化、医学、食品等领域的研究<sup>[12]</sup>。根据测序原理不同,HTS主要包括瑞士罗氏(Roche)公司的454焦磷酸测序(454 Pyrosequencing)、美国因美纳(Illumina)公司的Solexa聚合酶合成测序(Solexa polymerase synthesis sequencing)和美国应用生物系统(Applied Biosystems, ABI)公司的Solid连接酶测序技术(solid ligase sequencing technology)<sup>[13]</sup>。454测序系统的读长最长,运行速度快,适合未知基因组的从头测序;Solexa测序系统的测序通量高,价位低,适合基因组测序和重测序;Solid测序系统的读长最短,但测序精度高,适合单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)检测<sup>[14]</sup>。目前Illumina机器因各个方面具有优势,主导着HTS市场<sup>[15]</sup>。Illumina目前生产的MiSeq、NextSeq500、HiSeq系列、NovaSeq系列等测序仪,针对不同通量需求与时间限制进行了专门优化;其中HiSeq系列和NovaSeq系列平台最为成熟,兼具极高的测序通量与准确性,且运行速度快、成本低,展现出卓越性价比<sup>[16]</sup>。

## 2 高通量测序技术在柑橘病毒检测中的应用

HTS技术的出现极大地提高了研究人员全面探究柑橘病毒病的能力,显著加速了病毒发现、鉴定、基因组测序流程,并推动了基于HTS技术的新病毒病原体常规检测技术的研发与应用<sup>[17]</sup>。在柑橘病毒病的研究领域,运用HTS技术对已知及未知病毒进行检测成为首要步骤。传统植物病毒鉴定所采用的经典步骤,包括双链RNA(dsRNA)的提取、病毒相关核酸的制备、随机互补DNA(cDNA)的合成、克隆操作以及桑格测序等,长期以来已被证明具有可靠性。但在柑橘黄脉相关病毒(CYVaV)的发现历程中,HTS技术提供了一种更先进的替代解决方案<sup>[18-20]</sup>。近年来,通过对小RNA、总RNA及dsRNA

的高通量测序分析,已成功鉴定了众多柑橘病毒物种(表1)。

## 2.1 HTS技术在CTV中的应用

柑橘衰退病是柑橘产业中的关键病害,主要由

表 1 近年来通过高通量测序所鉴定到的柑橘病毒

Table 1 The citrus viruses identified through high-throughput sequencing in recent years

中文名 Chinese name	英文名 English name	基因组 Genome	病毒科或目 Viaceae or order	年份 Year	文献 Reference
柑橘褪绿矮缩病毒	Citrus chlorotic dwarf-associated virus	单链DNA ssDNA	双生病毒科 Geminiviridae	2012	[21]
柑橘麻风病毒质型2	Citrus leprosis virus 2	单链RNA +ssRNA	北岛病毒科 Kitaviridae	2013	[22]
柑橘坏死斑点病毒	Citrus necrotic spot virus	负单链RNA -ssRNA	弹状病毒科 Rhabdoviridae	2014	[23]
柑橘荆门类似病毒; 柑橘杆状类似病毒	Citrus jingmen-like virus; Citrus virga-like virus	单链RNA +ssRNA	马尔特里病毒目 Martellivirales	2017	[24]
柑橘麻风双分体病毒核型	Citrus leprosis N dichorha virus	负单链RNA -ssRNA	弹状病毒科 Rhabdoviridae	2017	[25]
柑橘褪绿斑点病毒	Citrus chlorotic spot virus	负单链RNA -ssRNA	弹状病毒科 Rhabdoviridae	2018	[26]
柑橘凹胶伴随病毒	Citrus concave gum-associated virus	负单链RNA -ssRNA	白纤病毒科 Phenuiviridae	2018	[27]
柑橘病毒 A	Citrus virus A	负单链RNA -ssRNA	白纤病毒科 Phenuiviridae	2018	[28]
柑橘树皮裂纹类病毒	Citrus bark cracking viroid	环状RNA Circular RNA	马铃薯纺锤块茎类病毒科 Pospiviroidae	2020	[29]
柑橘黄脉伴随病毒	Citrus yellow vein-associated virus	单链RNA +ssRNA	番茄丛矮病毒目 Tolivirales	2021	[30]
柑橘黄斑病毒	Citrus yellow spot virus	单链RNA +ssRNA	乙型线形病毒科 Betaflexiviridae	2022	[31]
柑橘jivivirus相关病毒1	Citrus jivi-related virus 1	单链RNA +ssRNA	植物杆状病毒科 Virgaviridae	2023	[32]
柑橘黄化脉明病毒	Citrus yellow vein clearing virus	单链RNA +ssRNA	甲型线形病毒科 Alphaflexiviridae	2024	[33]

柑橘衰退病毒(citrus tristeza virus, CTV)引发,该病毒借助受感染的苗木以及多种蚜虫广泛传播<sup>[34]</sup>。在中国,CTV主要分布在南方和沿海地区,有研究表明CTV起源于湖南、江西等地的野生柑橘,随后在四川、重庆、湖北、福建、浙江、广西、广东等地的栽培柑橘中扩散传播<sup>[35]</sup>。

HTS技术在柑橘衰退病鉴定与种群多样性分析方面的应用,为植物病毒研究带来了革命性创新<sup>[36]</sup>。2021年, Da Cunha等<sup>[37]</sup>运用HTS技术,通过大规模并行测序,结合RT-PCR和RNA-seq方法,从非洲安哥拉柑橘属植物中高效提取并扩增双链RNA,从混合样品中成功鉴定出多个CTV株系,并分析种群多样性。在无需序列信息的条件下,借助随机引物RNA-seq,全面捕捉到了病毒基因组的变异情况,实现了对CTV高灵敏度、高准确性的早期检测。该研究还全面揭示了CTV株系在安哥拉柑橘种植点中广泛存在的现象,且这些株系与已知的

严重致病株系以及其他地区新出现的株系高度相似,这为了解CTV的地理分布、遗传变异及种群结构提供了数据支撑。HTS技术克服了传统测序方法的局限性,以更低成本和更短时间完成了对大量样品的处理,也推动了测序技术与多分子标记扩增(multimolecular marker amplification, MMM)等其他技术的融合应用<sup>[38]</sup>,为安哥拉及非洲其他国家制定植物病毒防控策略提供了科学依据,有力推动了植物病毒研究领域的深入发展。

2021年, Bester等<sup>[39]</sup>建立了详尽的HTS生物信息学分析流程,用于鉴定CTV在单一或混合感染状态下的基因型。该流程的核心在于,它设定了基因型特异性的基因组覆盖率阈值,其中50%和92%这两个阈值在区分非目标基因型与潜在新型基因型时发挥了至关重要的作用。具体而言,当某个基因型的基因组覆盖率超过50%时,它被视为一个可能的候选基因型;而当覆盖率达到或超过92%时,该基因

型则被高度确认为目标基因型。此流程有效地区分了真实的基因型信号与非目标读段所产生的噪声信号,攻克了混合感染样本中基因型难以区分的难题,也深入揭示了不同基因型之间复杂的相互作用机制。通过HTS技术与生物信息学分析的有机结合,Bester等<sup>[39]</sup>利用该流程成功鉴定了已知的CTV基因型,还发现了新的基因型变体或重组序列,这充分展示了HTS技术在病毒多样性探索领域的独特优势。为CTV基因型的准确鉴定提供了坚实的技术支撑,有力推动了基于基因组覆盖率阈值系统的完善与发展,提高了鉴定准确性和效率,为植物病毒学研究领域带来了新的研究视角和方法论革新,同时强调了持续研究CTV多样性和开发准确参考数据库的重要性,以定义基因型边界,推动进一步的生物学特征和病毒群体进化研究,并可能提高对交叉保护的理解,这一成果无疑是植物病毒学研究领域的一项重大突破。

2023年,Ghorbani等<sup>[40]</sup>在伊朗北部的萨里地区,利用HTS技术,首次完成了CTV Sari株系的全基因组测序工作。他们的研究不仅精确剖析了Sari病毒株的遗传特征及进化关系,而且有力证明了Sari株系与其他基因型之间的独立性和独特性。通过探究病毒基因在感染植株中的表达差异,特别是聚焦于*P13*基因所展现出的高表达特性,为深入理解CTV的致病机制开辟了新的视角<sup>[41]</sup>。此外,借助HTS技术,研究人员还进一步揭示了特定基因变异与病毒功能特性之间的内在联系,为精准防控CTV以及促进柑橘产业的健康发展带来了重大的突破。

## 2.2 HTS技术在CYVCV鉴定中的应用

HTS技术应用于柑橘黄化脉明病毒(citrus yellow vein clearing virus, CYVCV)的鉴定及种群多样性分析领域,实现了对病毒病原体的精确识别与基因组深度解析,极大地推动了病毒与植物相互作用研究的发展,为将现代科技手段运用于柑橘病毒病研究领域奠定了坚实基础<sup>[42]</sup>。2017年,Yu等<sup>[43]</sup>运用sRNA测序技术,从患病柠檬树中快速、准确地鉴定出CYVCV-CQ重庆分离株,并成功测定其全长基因组序列。CYVCV-CQ是重庆市首次发现的CYVCV分离株,亦是第二个已知全长基因组的CYVCV分离物,它的发现极大地提升了对病毒病原体的精准识别能力。基于sRNA测序技术的从头组装能力,能够揭示植物体内复杂的基因沉默机制

与病毒防御之间的联系,为病毒-植物相互作用研究开辟全新路径。另外,通过系统进化树分析,精准呈现不同地理来源CYVCV分离株之间遗传关系与地理分布的一致性,为理解病毒种群多样性和进化动态提供有力的数据支撑。

2023年Bin等<sup>[44]</sup>利用HTS技术深入研究了柠檬植物在感染CYVCV后的全转录组响应,通过比较两组样本的基因表达情况,鉴定到3691个差异表达基因,这些差异基因在苯丙素、油菜素类固醇、类黄酮生物合成及光合作用等关键代谢途径中广泛分布。通过HTS技术,研究者发现CYVCV感染对柠檬植物中生长素、细胞分裂素、茉莉酸和乙烯的生物合成和信号传导途径具有显著的调节作用。同时,水杨酸信号传导途径受到抑制。这些变化可能促进了CYVCV的系统性感染,并影响了柠檬植物对病毒的防御反应;HTS数据还显示,所有与光合作用相关的差异表达基因在CYVCV感染的柠檬植物中均下调,揭示了植物激素代谢与光合途径在CYVCV侵染过程中的核心作用,为深入理解CYVCV的致病机制及其与柠檬植物的相互作用提供了新的视角。为了验证HTS结果的准确性,研究者选择了12个随机基因进行了实时荧光定量PCR(RT-qPCR)实验。实验结果表明,mRNA表达分析的结果与RNA-Seq的结果一致,进一步巩固了HTS技术在植物病毒研究中的可靠性。这项研究不仅展示了HTS技术在揭示复杂生物系统中基因表达模式变化方面的强大能力,还为理解CYVCV感染后柠檬植物症状发育的分子基础提供了新的见解,为未来柑橘产业的病害防控提供重要理论依据,充分展示了HTS技术在植物病毒研究领域的创新应用与巨大潜力。

2024年,Park等<sup>[45]</sup>运用HTS技术,针对从韩国6个省9个地区采集的118份柑橘类植物叶片样品开展病毒诊断工作,成功地从样品中鉴定出了4种病毒,分别为CTV、柑橘叶斑驳病毒(citrus leaf blotch virus, CLB)和CYVCV,其中,CYVCV在韩国是首次被报道的病毒种类。这些病毒种类的成功鉴定不仅扩充了当前已知的柑橘病毒库,还为后续开展针对性的柑橘病毒防控研究提供了宝贵的目标对象,有助于提升柑橘产业的健康与可持续发展。

## 2.3 HTS技术在CTLV中的应用

在植物病毒研究领域,HTS技术的应用为柑橘

碎叶病(citrus tatter leaf virus, CTLV)的研究带来创新与突破<sup>[46]</sup>。CTLV是一种严重危害柑橘生产的病毒,它能引起柑橘砧木的芽体皱缩,且易于传播<sup>[47]</sup>。然而,目前关于CTLV基因组的多样性特征,以及这种多样性如何具体影响病毒检测过程,尚缺乏了解。2019年,Tan等<sup>[48]</sup>借助HTS技术,对来自不同地区、保存多年的12种CTLV病毒样本展开研究,成功获取了所有分离株的全长基因组序列。基于这些全基因组序列,研究人员进行了系统发育分析,揭示了CTLV的起源、进化路径及其在不同植物物种间的溢出事件,并深入剖析了病毒基因组的多样性,为确立CTLV分类学的地位提供了更坚实的数据支撑。研究基于HTS数据的分析,开发了针对CTLV的RT-qPCR测定法,该测定法具有高度的特异性和灵敏度。HTS技术的应用克服了传统测序仅针对少量分离株小基因组区域进行分析的局限,实现了对多个病毒分离株全基因组序列系统性的分析,为分子病毒检测方法的设计与验证提供了指引,突破了时间和成本限制,极大地加速了对病毒基因组的全面解析<sup>[49]</sup>。这一利用HTS技术进行的系统性研究显著增强了CTLV检测的准确性和可靠性,为高价值作物种质计划中的病原体检测提供了更为全面和有力的技术支持,有助于减少病毒威胁,保障农业生产安全。

#### 2.4 HTS技术在CLBV中的应用

柑橘叶斑驳病毒(citrus leaf blotch virus, CLBV)隶属乙型线形病毒科(Betaflexiviridae),拥有约8.7 kb的线性、正义、单链基因组RNA,能感染多种宿主,涵盖结果植物、观赏植物以及草本植物<sup>[50]</sup>。CLBV主要通过嫁接方式进行传播,在中国的发生较为普遍<sup>[51]</sup>。研究表明<sup>[52]</sup>,CLBV病毒可能经由嫁接与播种两种途径扩散,导致来自不同柑橘种类及地理区域的分离株展现出稳定的遗传结构特征。对柑橘品种Haruka(*C. tamuranua*)进行基因组测序,发现其分离株与已知分离株间存在显著的遗传差异,暗示其可能代表了柑橘病毒的一种新型类别<sup>[53]</sup>。2018年,Cao等<sup>[54]</sup>利用HTS技术,从表现出叶片褪绿斑点症状的Haruka柑橘树中成功鉴定出一种新型正链RNA病毒,命名为“柑橘叶斑病毒2型”(CLBV-2)。HTS技术以快速且高效的方式实现了对病毒基因组的从头组装,利用深度测序能够清晰地揭示CLBV-2与已知CLBV分离株在基因组结构

维度上的相似性与差异性。尤为值得注意的是,与已知CLBV分离株相比,CLBV-2在5'非翻译区(5'-untranslated region, 5'-UTR)及复制酶多蛋白(ORF1)区域展现出较低的序列相似性,而在运动蛋白(ORF2)、外壳蛋白(ORF3)及3'非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)区域则表现出高度的相似性。基于全基因组序列分析,首次提出了CLBV-2可能通过与其他未知柑橘病毒发生重组从而获取特定基因片段的假说,为理解病毒进化的机制提供了新的视角。依据国际病毒分类学委员会(International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)所制定的种划分标准,CLBV-2被正式认定为Betaflexiviridae科内的一个新种,这一成果标志着CLBV-2在柑橘属中具有独特地位,也代表柑橘病毒分类学领域取得了重要进展。

2022年,Kim等<sup>[55]</sup>运用HTS技术,从韩国济州岛表现出斑点、变色症状的柠檬植株叶片中提取总RNA,进而构建cDNA文库并实施深度测序,高效获取了大量RNA测序数据。对这些数据进行质量过滤和重新组装后,研究人员发现了与CLBV高度同源的大片段重叠群,并通过序列比对和RT-PCR实验验证了柠檬植株中CLBV的自然感染情况,这在韩国属于首次报道柠檬植株自然感染CLBV。此外,分析HTS技术所得数据,评估柠檬植株中CLBV的发病率,为后续开展流行病学研究、制定病害防控策略提供了重要依据。应用HTS技术显著加快了在柠檬中首次发现CLBV的进程,也为精准鉴定病毒和分析病毒基因序列提供确凿的证据。

HTS技术已成功应用于柑橘主要病毒病的研究,在柑橘病毒学领域发挥着不可估量的作用,持续有力地推动着新病毒的发现与鉴定工作。2018年,田欣等<sup>[56]</sup>运用宏转录组学技术,鉴定出一种新型柑橘负链RNA病毒。由于该病毒在费纳·克列门丁叶片上引发褪绿斑点症状,因此它被暂命名为柑橘褪绿斑点相关病毒(citrus chlorotic dwarf-associated virus, CCDaV)。2020年,张丽勃等<sup>[29]</sup>借助sRNA深度测序技术并结合RT-PCR分析手段,发现上海地区的红美人柑橘普遍遭受CTV、CYVCV、柑橘树皮裂纹类病毒(citrus bark cracking viroid, CBCVd)以及其他柑橘类病毒(citrus viroids)的复合侵染。2023年,廖睿玲<sup>[32]</sup>通过RNA-seq技术在柑橘中发现一种至少具有6条链的多组分RNA新病毒,并通过

生物学实验获取了其全长序列,分析基因组结构、序列相似性及进化关系,确认其为柑橘 jivivirus 相关病毒,命名为柑橘 jivivirus 相关病毒 1 (citrus jivi-related virus 1, CJVV1)。

### 3 高通量测序技术在柑橘病毒种群多样性分析中的应用

植物病毒依赖于生物媒介的迁徙或人类活动的助力进行远距离扩散,它们的地理分布与时间出现模式展现出显著的动态特征,并且这种动态性映射到其潜在宿主范围的扩展或变迁上<sup>[57]</sup>。植物病毒对栽培作物产业具威胁性,因此,利用病毒组学技术探索病毒的物种多样性有一定的实际意义<sup>[58]</sup>。HTS 技术能够有效识别已知病毒、鉴定新型病毒,在柑橘病毒种群多样性分析、基因表达模式探究以及流行病学研究等多个科学领域扮演着至关重要的角色,HTS 技术的应用深化了对生物体遗传特性的认知,也推动了疾病传播机制及预防策略的研究与发展<sup>[59]</sup>。

近年来,通过 HTS 技术在柑橘种群内部及种群之间的遗传变异、基因流、适应性进化以及种群结构等方面有大量新的研究<sup>[60-62]</sup>。2018 年,王亚飞<sup>[63]</sup>利用 HTS 技术揭示了巴基斯坦柑橘中多种类病毒的全基因组,其中 CBCVd 与已知序列差异显著,表现出高度的遗传多样性,另创新性地通过一步法 RT-PCR 获得 CBCVd 二聚体 cDNA,并证实其侵染性,进一步证明了 CBCVd 的复杂性和变异性。

2020 年,Wu 等<sup>[64]</sup>借助 HTS 技术,从巴基斯坦旁遮普省的柑橘树皮组织中鉴定出柑橘黄化斑驳相关病毒 (citrus yellow mottle-associated virus, CiYMaV),其基因组特征与曼达里病毒属 (*Mandarinavirus*) 成员相似,并通过透射电子显微镜观察到病毒颗粒的形态。基于数据分析和系统发育分析显示,CiYMaV 与印度柑橘环斑病毒 (indian citrus ringspot virus, ICRSV) 和 CYVCV 具有高度同源性,但在血清学和生物学上可区分。流行病学调查发现 CiYMaV 在巴基斯坦柑橘树中流行率较高,且常与 CYVCV 及 CTV 混合感染,这表明病毒间存在潜在的相互作用与协同进化现象,体现出病毒的遗传多样性。在中国云南开展的初步高通量筛查中,并未检测到 CiYMaV,这一结果表明该病毒的地理分布存在限制,或者生态适应性具有差异。研究还开发

了特异性 RT-PCR 检测方法,并证实了 CiYMaV 的致病性,为防控该病毒的传播提供了重要依据。这项研究不仅深化了对病毒种群多样性与地理分布特征的高通量解析,还为人们理解柑橘病毒的进化、传播机制及其对柑橘产业的潜在影响提供了新的视角。

2021 年,Liu 等<sup>[65]</sup>利用 HTS 技术,对云南哀牢山地区野生柑橘病毒的多样性和复杂性进行了研究,并鉴定和表征了包括葡萄卷叶病毒属 (*Ampelovirus*) 的柑橘相关葡萄卷叶病毒 1 (citrus-associated ampelovirus1, CaAV-1) 和柑橘相关葡萄卷叶病毒 2 (citrus-associated ampelovirus2, CaAV-2) 以及可能代表长线形病毒科 (*Closteroviridae*) 新属的柑橘病毒 B (citrus virus B, CiVB)。通过比较基因组结构及特征分析、进化和重组分析,揭示了新病毒与已知病毒种群内部的遗传变异和重组事件,发现频繁的水平基因转移、基因重复和表达策略的改变塑造了 *Closteroviridae* 病毒的基因组复杂性和多样化。以上发现不仅拓宽了人们对 *Closteroviridae* 基因组和进化可塑性的理解,还揭示了病毒的遗传多样性和适应性,以及它们与真菌、细菌和植物等其他生物体之间相互作用的复杂机制。

2023 年,李双花<sup>[66]</sup>和 Li 等<sup>[67]</sup>运用 HTS 技术,从湖南道县野生柑橘中成功鉴定出一个新型 CTV 分离株 JY-2。同源序列比对及系统发育分析结果表明,该分离株代表一种新的 CTV 基因型-JY 基因型,其基因型全基因组序列差异超过 7.5%,*ORF1a* 的核苷酸和氨基酸序列差异均超 8%。通过对 12 个分离株的 *ORF1b*、*p33*、*p25*、*p23* 基因序列进行分子序列克隆与测序,并将所得序列与已知 CTV 基因型分离株的基因序列进行比对分析,发现 JY 基因型种群内部的遗传变异程度较低,种群结构相对稳定,JY 基因型与其他 CTV 基因型之间存在显著遗传差异。在系统发育树上,JY 分离株形成独立的簇,与已知的 CTV 基因型明显区分开来。CTV 在野生柑橘与栽培柑橘种群间的基因交流有限,差异明显。

2024 年,Jin 等<sup>[33]</sup>借助 HTS 技术,对从韩国地区采集的柑橘类植物叶片样本展开病毒鉴定及遗传多样性分析。结果显示,韩国各地及不同宿主来源的 CYVCV 分离株的基因组序列高度一致,相似度为 95.2%~98.8%,且均归属于同一进化分支,表明这些分离株虽遗传变异有限,却形成了独特的种群结

构。通过比对韩国的CYVCV分离株与东亚及南亚(中国、巴基斯坦、印度、缅甸)的分离株后发现,尽管存在差异,但尚未达到界定新物种或亚种的显著程度,也表明CYVCV在全球范围内广泛传播。不同地理区域的病毒种群间存在紧密的遗传交流与联系。上述发现为制定有效的病毒防控策略提供了科学依据,有力推动了柑橘病毒学领域的发展。

#### 4 高通量测序技术的优势和局限性

与传统的病毒检测方法相比,HTS技术的优势主要体现在以下几个方面。其一,HTS技术具有快速、灵敏的特性。在运用传统检测方法对未知病毒进行检测时,由于对病毒的序列以及生物学特性缺乏充分认知,检测过程耗时冗长,结果不理想。与之相比,HTS技术测序反应本身通常可在短短数日内完成,且数据的分析处理和结果验证工作亦能在较短时间内完成,极大程度地提升了检测效率与准确性<sup>[68]</sup>。其二,HTS技术拥有独特的样本处理能力,可实现对多个样本的同步检测,展现出超高的样品检测通量。在操作过程中,研究人员通过为每个样品的cDNA添加特异性标识序列,能够对来自不同地域、不同寄主物种的病毒进行全面的种类甄别、分布状况分析及变异进化特征研究<sup>[69]</sup>。

尽管HTS技术在柑橘病毒鉴定及种群多样性分析中展现出巨大的潜力和优势,但其在实际应用中仍面临着一系列挑战。其一,整体流程耗时较长。虽然测序反应本身快速,但从样本采集、处理到测序完成及数据获取和分析,整个流程耗时长达数月,这限制了其在需要快速响应的病害诊断中的及时应用;其二,微生物高通量测序数据量庞大,而处理大量数据需要与更多学科交叉研究,这无疑增加了数据分析的难度<sup>[70]</sup>;其三,存在核酸污染与序列拼接难题。2019年,Asplund等<sup>[71]</sup>对7000个公开的HTS数据进行分析,发现其中存在大量病毒序列污染现象。经推断,污染原因可能是测序过程中的交叉污染<sup>[72]</sup>,这可能导致对低浓度病毒的错误鉴定,影响研究结果的准确性。由于病毒(尤其是RNA病毒)准种内的序列具有高度异质性,拼接HTS产生的短读长(Reads)面临困难。例如,低丰度的植物病毒sRNA序列会致使拼接效率降低<sup>[73]</sup>,同时引发人为嵌合体(Chimeras)的产生<sup>[74]</sup>。此外,对于易发生自然重组的病毒而言,直接拼接的序列可能缺乏准

确性,需进行额外验证<sup>[66]</sup>。虽然这些挑战限制了HTS技术的进一步推广和应用,但也为柑橘病毒研究领域规划出未来的发展路径与方向。

#### 5 结 论

综上所述,尽管HTS技术在数据处理、技术实现等方面面临挑战,但其具备低成本、超高通量、流程简化、高灵敏度及高精度等显著优势,在柑橘病毒鉴定与种群多样性研究中彰显出优越性。HTS技术为病毒学研究,尤其是微生物群落研究开拓了全新视角,深化了对微生物群落的构成、分类及其功能特性的认知与探索,极大地推动了该领域研究向综合化的方向发展。展望未来,HTS技术在柑橘病毒研究领域将致力于解决现存问题、提升性能和拓展应用场景。比对HTS技术在柑橘病毒与其他植物病毒检测中的应用具有重要意义,有助于明确该技术在植物病毒体系中的共性与特性,为优化检测策略、推动植物病毒学的整体发展提供关键助力。

#### 参考文献 References:

- [1] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Crops and livestock products[DB/OL]. FAOSTAT, 2022. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>.
- [2] 中国国家统计局. 中国统计年鉴 2023[DB/OL]. 2023. <http://www.stats.gov.cn/english/>. National Bureau of Statistics of China. China Statistical Yearbook 2023[DB/OL]. 2023. <http://www.stats.gov.cn/english/>.
- [3] WU G A, TEROL J, IBANEZ V, LÓPEZ-GARCÍA A, PÉREZ-ROMÁN E, BORREDÁ C, DOMINGO C, TADEO F R, CARBONELL-CABALLERO J, ALONSO R, CURK F, DU D L, OLLITRAULT P, ROOSE M L, DOPAZO J, GMITTER F G, ROKHSAR D S, TALON M. Genomics of the origin and evolution of citrus[J]. *Nature*, 2018, 554(7692): 311-316.
- [4] QIU X. Studies on the forest ecosystem in ailao mountains, Yunnan, China[M]. Kunming: Yunnan Sciences and Technology Press, 1998: 1-12.
- [5] ZHOU C, DA GRAÇA J V, FREITAS-ASTUA J, VIDALAKIS G, DURAN-VILA N, LAVAGI I. Chapter 19—Citrus viruses and viroids[M]//TALON M, CARUSO M, GMITTER F G JR. The genus *Citrus*. Elsevier ScienceDirect: Woodhead Publishing, 2020: 391-410.
- [6] HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ L, BENÍTEZ-GALEANO M J, BERTALMÍO A, RUBIO L, RIVAS F, ARRUBARRENA A, ROLÓN R, COLINA R, MAESO D. Diversity of uruguayan citrus tristeza virus populations segregated after single aphid transmission[J]. *Tropical Plant Pathology*, 2019, 44(4): 352-362.
- [7] 张松. 基于宏病毒组学技术的柑橘病毒多样性及其分子进化研究[D]. 重庆: 西南大学, 2022. ZHANG Song. Metaviromics-based studies on diversity and mo-



- lecular evolution of citrus viruses[D]. Chongqing: Southwest University, 2022.
- [8] READ D A, PIETERSEN G. Diversity of citrus tristeza virus populations in commercial grapefruit orchards in Southern Africa, determined using Illumina MiSeq technology[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2017, 148(2):379-391.
- [9] 战斌慧,周雪平. 高通量测序技术在植物及昆虫病毒检测中的应用[J]. *植物保护*, 2018, 44(5):120-126.  
ZHAN Binhui, ZHOU Xueping. Application of next-generation sequencing technology in detection of plant and insect viruses[J]. *Plant Protection*, 2018, 44(5):120-126.
- [10] 金鑫,张艳慧,唐萌,周彦. 柑橘病毒类病害诊断技术研究进展[J]. *园艺学报*, 2016, 43(9):1675-1687.  
JIN Xin, ZHANG Yanhui, TANG Meng, ZHOU Yan. Advances of diagnosis techniques for citrus virus and virus-like diseases[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2016, 43(9):1675-1687.
- [11] RADFORD A D, CHAPMAN D, DIXON L, CHANTREY J, DARBY A C, HALL N. Application of next-generation sequencing technologies in virology[J]. *Journal of General Virology*, 2012, 93(Pt 9):1853-1868.
- [12] GAO W, ZHANG L W. Comparative analysis of the microbial community composition between Tibetan kefir grains and milks[J]. *Food Research International*, 2019, 116:137-144.
- [13] BARBA M, CZOSNEK H, HADIDI A. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology[J]. *Viruses*, 2014, 6(1):106-136.
- [14] KULSKI J K. Next generation sequencing- advances, applications and challenges[M]. London: Intech Open, 2016.
- [15] 宋丹丹. 高通量测序技术在野生动物病毒性疫病诊断中的应用研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2023.  
SONG Dandan. Application of high-throughput sequencing technology in diagnosis of viral diseases in wild animals[D]. Jinan: Shandong Normal University, 2023.
- [16] 张文力. 高通量测序数据分析现状与挑战[J]. *集成技术*, 2012, 1(3):20-24.  
ZHANG Wenli. Status and challenges on data analysis of high throughput sequencing[J]. *Journal of Integration Technology*, 2012, 1(3):20-24.
- [17] HADIDI A, FLORES R, CANDRESSE T, BARBA M. Next-generation sequencing and genome editing in plant virology[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7:1325.
- [18] SADEGHI M S, AFSHARIFAR A, IZADPANAH K, LOCONSOLE G, DE STRADIS A, MARTELLI G P, SAPONARI M. Isolation and partial characterization of a novel cytorhabdovirus from citrus trees showing foliar symptoms in Iran[J]. *Plant Disease*, 2016, 100(1):66-71.
- [19] VISSER M, BESTER R, BURGER J T, MAREE H J. Next-generation sequencing for virus detection: Covering all the bases[J]. *Virology Journal*, 2016, 13:85.
- [20] MASSART S, CHIUMENTI M, DE JONGHE K, GLOVER R, HAEGEMAN A, KOLONIUK I, KOMÍNEK P, KREUZE J, KUTNJAK D, LOTOS L, MACLOT F, MALIOGKA V, MAREE H J, OLIVIER T, OLMOS A, POOGGIN M M, REYNARD J S, RUIZ-GARCÍA A B, SAFAROVA D, SCHNEEBERGER P H H, SELA N, TURCO S, VAINIO E J, VARALLYAY E, VERDIN E, WESTENBERG M, BROSTAUX Y, CANDRESSE T. Virus detection by high-throughput sequencing of small RNAs: Large-scale performance testing of sequence analysis strategies[J]. *Phytopathology*, 2019, 109(3):488-497.
- [21] LOCONSOLE G, SALDARELLI P, DODDAPANENI H, SAVINO V, MARTELLI G P, SAPONARI M. Identification of a single-stranded DNA virus associated with citrus chlorotic dwarf disease, a new member in the family Geminiviridae[J]. *Virology*, 2012, 432(1):162-172.
- [22] ROY A, CHOUDHARY N, GUILLERMO L M, SHAO J, GOVINDARAJULU A, ACHOR D, WEI G, PICTON D D, LEVY L, NAKHLA M K, HARTUNG J S, BRLANSKY R H. A novel virus of the genus *Cilevirus* causing symptoms similar to citrus leprosis[J]. *Phytopathology*, 2013, 103(5):488-500.
- [23] CRUZ-JARAMILLO J L, RUIZ-MEDRANO R, ROJAS-MORALES L, LÓPEZ-BUENFIL J A, MORALES-GALVÁN O, CHAVARÍN-PALACIO C, RAMÍREZ-POOL J A, XOCONOSTLE-CÁZARES B. Characterization of a proposed dichorhavirus associated with the Citrus leprosis disease and analysis of the host response[J]. *Viruses*, 2014, 6(7):2602-2622.
- [24] MATSUMURA E E, COLETTA-FILHO H D, NOURI S, FALK B W, NERVA L, OLIVEIRA T S, DORTA S O, MACHADO M A. Deep sequencing analysis of RNAs from citrus plants grown in a citrus sudden death-affected area reveals diverse known and putative novel viruses[J]. *Viruses*, 2017, 9(4):92.
- [25] RAMOS-GONZÁLEZ P L, CHABI-JESUS C, GUERRA-PERAZA O, TASSI A D, KITAJIMA E W, HARAKAVA R, SALAROLI R B, FREITAS-ASTÚA J. Citrus leprosis virus N: A new dichorhavirus causing Citrus leprosis disease[J]. *Phytopathology*, 2017, 107(8):963-976.
- [26] CHABI-JESUS C, RAMOS-GONZÁLEZ P L, TASSI A D, GUERRA-PERAZA O, KITAJIMA E W, HARAKAVA R, Jr BESERRA J A, SALAROLI R B, FREITAS-ASTÚA J. Identification and characterization of citrus chlorotic spot virus, a new dichorhavirus associated with Citrus leprosis-like symptoms[J]. *Plant Disease*, 2018, 102(8):1588-1598.
- [27] NAVARRO B, MINUTOLO M, DE STRADIS A, PALMISANO F, ALIOTO D, DI SERIO F. The first phlebo-like virus infecting plants: A case study on the adaptation of negative-stranded RNA viruses to new hosts[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2018, 19(5):1075-1089.
- [28] NAVARRO B, ZICCA S, MINUTOLO M, SAPONARI M, ALIOTO D, DI SERIO F. A negative-stranded RNA virus infecting citrus trees: The second member of a new genus within the order *Bunyavirales*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9:2340.
- [29] 张丽勃,管丽琴,蒋飞,方献平,李水根,张学英. 利用小RNA深度测序技术鉴定上海地区‘红美人’柑橘病毒种类[J]. *植物保护*, 2021, 47(6):102-108.  
ZHANG Liqiong, GUAN Liqin, JIANG Fei, FANG Xianping, LI Shuigen, ZHANG Xueying. Identification of the viruses from Hongmeiren citrus in Shanghai by small RNA sequencing[J]. *Plant Protection*, 2021, 47(6):102-108.
- [30] KWON S J, BODAGHI S, DANG T, GADHAVE K R, HO T,

- OSMAN F, AL RWAHNIH M, TZANETAKIS I E, SIMON A E, VIDALAKIS G. Complete nucleotide sequence, genome organization, and comparative genomic analyses of citrus yellow vein associated virus (CYVaV) [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12:683130.
- [31] 杨柳. 柑橘黄斑病毒的分子鉴定及其侵染性克隆的构建[D]. 重庆: 西南大学, 2022.
- YANG Liu. Molecular identification and construction of infectious cDNA clone of citrus yellow spot virus[D]. Chongqing: Southwest University, 2022.
- [32] 廖睿玲. 两种果树多组分 RNA 新病毒的分子鉴定[D]. 重庆: 西南大学, 2023.
- LIAO Ruiling. Molecular identification of two new multicomponent RNA viruses infecting fruit trees[D]. Chongqing: Southwest University, 2023.
- [33] JIN T, KIM J K, BYUN H S, CHOI H S, CHA B, KWAK H R, KIM M. Occurrence and multiplex PCR detection of Citrus yellow vein clearing virus in Korea[J]. *Plant Pathology Journal*, 2024, 40(2): 125-138.
- [34] 申世凯, 曾婷, 乔兴华, 陈力, 任杰群, 周彦. 柑橘衰退病毒 RT-RPA-LFD 可视化检测方法的建立及应用[J]. *果树学报*, 2023, 40(12): 2652-2660.
- SHEN Shikai, ZENG Ting, QIAO Xinghua, CHEN Li, REN Jiequn, ZHOU Yan. Establishment and application of RT-RPA-LFD visualization assay for rapid detection of citrus tristeza virus[J]. *Journal of Fruit Science*, 2023, 40(12): 2652-2660.
- [35] WANG C N, CHEN C Y, CHEN Y Q, ZHONG K, YI L. Bayesian phylodynamic analysis reveals the evolutionary history and the dispersal patterns of citrus tristeza virus in China based on the p25 gene[J]. *Virology Journal*, 2023, 20(1): 223.
- [36] 李平. 两种柑橘病毒的高通量测序鉴定[D]. 重庆: 西南大学, 2018.
- LI Ping. Identification of viral causal agent for two citrus disease through high-throughput sequencing[D]. Chongqing: Southwest University, 2018.
- [37] DA CUNHA A T P, CHIUMENTI M, LADEIRA L C, KUBAA R A, LOCONSOLE G, PANTALEO V, MINAFRA A. High throughput sequencing from angolan citrus accessions discloses the presence of emerging CTV strains[J]. *Virology Journal*, 2021, 18(1): 62.
- [38] HILF M E, MAVRODIEVA V A, GARNSEY S M. Genetic marker analysis of a global collection of isolates of citrus tristeza virus: Characterization and distribution of CTV genotypes and association with symptoms[J]. *Phytopathology*, 2005, 95(8): 909-917.
- [39] BESTER R, COOK G, MAREE H J. Citrus tristeza virus genotype detection using high-throughput sequencing[J]. *Viruses*, 2021, 13(2): 168.
- [40] GHORBANI A, FAGHIHI M M, FALAKI F, IZADPANAH K. Complete genome sequencing and characterization of a potential new genotype of citrus tristeza virus in Iran[J]. *PLoS One*, 2023, 18(6): e0288068.
- [41] TATINENI S C, ROBERTSON C J, GARNSEY S M, DAWSON W O. A plant virus evolved by acquiring multiple nonconserved genes to extend its host range[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(42): 17366-17371.
- [42] ZHANG Y, ZHOU C, LIU Y, WANG X, LI Z, LI F, LIU H, ZHOU Y. Molecular characterization and population structure of Citrus yellow vein clearing virus in China[J]. *Plant Pathology*, 2019, 68(3): 487-496.
- [43] YU Y Q, WU Q, SU H N, WANG X F, CAO M J, ZHOU C Y. Small RNA deep sequencing reveals full-length genome of Citrus yellow vein clearing virus in Chongqing, China[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2017, 16(2): 503-508.
- [44] BIN Y, ZHANG Q, SU Y, WANG C Q, JIANG Q Q, SONG Z, ZHOU C Y. Transcriptome analysis of *Citrus limon* infected with Citrus yellow vein clearing virus[J]. *BMC Genomics*, 2023, 24: 65.
- [45] PARK C Y, PARK J, KIM H, YI S I, MOON J S. First report of citrus leaf blotch virus in satsuma mandarin in Korea[J]. *Journal of Plant Pathology*, 2019, 101(4): 1229.
- [46] 孙现超, 周常勇, 青玲, 杨水英. 柑橘碎叶病毒研究进展[J]. *果树学报*, 2009, 26(2): 213-216.
- SUN Xianchao, ZHOU Changyong, QING Ling, YANG Shuiying. Advances in research on citrus tatter leaf virus[J]. *Journal of Fruit Science*, 2009, 26(2): 213-216.
- [47] TATINENI S, AFUNIAN M R, HILF M E, GOWDA S, DAWSON W O, GARNSEY S M. Molecular characterization of Citrus tatter leaf virus historically associated with Meyer lemon trees: Complete genome sequence and development of biologically active *in vitro* transcripts[J]. *Phytopathology*, 2009, 99(4): 423-431.
- [48] TAN S H, OSMAN F, BODAGHI S, DANG T, GREER G, HUANG A, HAMMADO S, ABU-HAJAR S, CAMPOS R, VIDALAKIS G. Full genome characterization of 12 citrus tatter leaf virus isolates for the development of a detection assay[J]. *PLoS One*, 2019, 14(10): e0223958.
- [49] BOSTOCK R M, THOMAS C S, HOENISCH R W, GOLINO D A, VIDALAKIS G. EXCLUDING PESTS AND PATHOGENS: Plant health: How diagnostic networks and interagency partnerships protect plant systems from pests and pathogens[J]. *California Agriculture*, 2014, 68(4): 117-124.
- [50] GRESS J C, SMITH S, TZANETAKIS I E. First report of Citrus leaf blotch virus in peony in the USA[J]. *Plant Disease*, 2017, 101(4): 637.
- [51] YI L, CHEN Y Q, CHEN B, ZHOU J. Occurrence and molecular characteristics of citrus leaf blotch virus from citrus in China based on coat protein genes[J]. *Tropical Plant Pathology*, 2021, 46(6): 714-718.
- [52] VIVES M C, RUBIO L, GALIPIENSO L, NAVARRO L, MORENO P, GUERRI J. Low genetic variation between isolates of Citrus leaf blotch virus from different host species and of different geographical origins[J]. *The Journal of general virology*, 2002, 83(10): 2587-2591.
- [53] LI P, LI M, ZHANG S, WANG J, YANG F Y, CAO M J, LI Z A. Complete genome sequences of four isolates of Citrus leaf blotch virus from citrus in China[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2018, 17(3): 712-715.
- [54] CAO M J, LI P, ZHANG S, YANG F Y, ZHOU Y, WANG X F,

- LI R H, LI Z A. Molecular characterization of a novel citrivirus from citrus using next-generation sequencing[J]. Archives of Virology, 2018, 163(12):3479-3482.
- [55] KIM N Y, LEE K P, HAN Y S, PARK K B. First report of citrus leaf blotch virus (CLBV) infection among lemon trees in Korea[J]. Journal of Plant Pathology, 2023, 105(4): 1693.
- [56] 田欣. 宏转录组学技术快速鉴定两种果树负链 RNA 新病毒[D]. 重庆:西南大学, 2018.
- TIAN Xin. The identification of two novel negative viruses infecting fruits by metatranscriptomics[D]. Chongqing: Southwest University, 2018.
- [57] ROOSSINCK J M. Plant virus metagenomics: Biodiversity and ecology[J]. Annual Review of Genetics, 2012, 46(1): 359-369.
- [58] JONES R A C. Plant virus emergence and evolution: Origins, new encounter scenarios, factors driving emergence, effects of changing world conditions, and prospects for control[J]. Virus Research, 2009, 141(2): 113-130.
- [59] 吕玉琢. 基于高通量测序技术分析梨病毒的群体组成及分子变异[D]. 武汉:华中农业大学, 2022.
- LÜ Yuzhuo. Population composition and molecular diversity of pear viruses revealed by high throughput sequencing technology[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2022.
- [60] OLLITRAULT P, DE SAINT ROMAN M, BLOQUEL E, MIRANDA M, ATHIYANNAN N, MOURNET P, KRATTINGER S, BACHÈS B, BACHÈS M, OIHABI A, AL HAMEID A, BEHEIRY H, JULHIA L, FROELICHER Y. Genotyping by sequencing reveals the genetic diversity of citrus cultivars cultivated in AIUla[J]. Acta Horticulturae, 2024(1401): 67-74.
- [61] CURK F, ANCILLO G, GARCIA-LOR A, LURO F, PERRIER X, JACQUEMOUD-COLLET J P, NAVARRO L, OLLITRAULT P. Next generation haplotyping to decipher nuclear genomic interspecific admixture in citrus species: Analysis of chromosome 2[J]. BMC Genetics, 2014, 15: 152.
- [62] CURK F, ANCILLO G, OLLITRAULT F, PERRIER X, JACQUEMOUD-COLLET J P, GARCIA-LOR A, NAVARRO L, OLLITRAULT P. Nuclear species- diagnostic SNP markers mined from 454 amplicon sequencing reveal admixture genomic structure of modern citrus varieties[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0125628.
- [63] 王亚飞. 柑橘树皮裂纹类病毒的遗传多样性及其对裂皮类病毒拮抗作用的分子机理研究[D]. 重庆:西南大学, 2018.
- WANG Yafei. The study on genetic diversity of Citrus bark cracking viroid and its antagonistic mechanism against Citrus exocortis viroid[D]. Chongqing: Southwest University, 2018.
- [64] WU J X, ZHANG S, ATTA S, YANG C X, ZHOU Y, DI SERIO F, ZHOU C Y, CAO M J. Discovery and survey of a new mandarin virus associated with leaf yellow mottle disease of citrus in Pakistan[J]. Plant Disease, 2020, 104(6): 1593-1600.
- [65] LIU Q Y, ZHANG S, MEI S Q, ZHOU Y, WANG J H, HAN G Z, CHEN L, ZHOU C Y, CAO M J. Viromics unveils extraordinary genetic diversity of the family Closteroviridae in wild citrus[J]. PLoS Pathogens, 2021, 17(7): e1009751.
- [66] 李双花. 柑橘衰退病毒新基因型鉴定及其基因型多重鉴定体系的建立[D]. 赣州:赣南师范大学, 2023.
- LI Shuanghua. Identification of a novel genotype of Citrus tristeza virus and development of a multiplex genotype identification system[D]. Ganzhou: Gannan Normal University, 2023.
- [67] LI S H, ZHOU J, YI L, HUANG A J, HAN R Y, YOU P. Complete genome sequence of a novel variant of *Citrus tristeza virus* infecting Chinese wild mandarin (*Citrus daoixianensis* S. W. He & G. F. Liu., syn. *Citrus reticulata* Blanco) in China[J]. Tropical Plant Pathology, 2023, 48(3): 352-356.
- [68] 马宇欣, 李世访. 高通量测序技术在鉴定木本植物双生病毒中的应用[J]. 植物保护, 2016, 42(6): 1-10.
- MA Yuxin, LI Shifang. Application of next-generation sequencing technology in identification of geminiviruses from woody plants[J]. Plant Protection, 2016, 42(6): 1-10.
- [69] ROOSSINCK M J, SAHA P, WILEY G B, QUAN J X, WHITE J D, LAI H, CHAVARRÍA F, SHEN G A, ROE B A. Ecogenomics: Using massively parallel pyrosequencing to understand virus ecology[J]. Molecular Ecology, 2010, 19: 81-88.
- [70] 韩霞, 方佳丽, 孟沈坤儿, 朱晓尧, 李楠, 温海虹. 高通量测序技术在药用植物微生物多样性研究中的应用进展[J]. 浙江农业科学, 2024, 65(2): 329-334.
- HAN Xia, FANG Jiali, MENG Shenkuner, ZHU Xiaoyao, LI Nan, WEN Haihong. Application of high-throughput sequencing technology in the study of microbial diversity of medicinal plants[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2024, 65(2): 329-334.
- [71] ASPLUND M, KJARTANSDÓTTIR K R, MOLLERUP S, VINNER L, FRIDHOLM H, HERRERA J A R, FRIIS-NIELSEN J, HANSEN T A, JENSEN R H, NIELSEN I B, RICHTER S R, REY-IGLESIA A, MATEY-HERNANDEZ M L, ALQUEZAR-PLANAS D E, OLSEN P V S, SICHERITZ-PONTÉN T, WILLERSLEV E, LUND O, BRUNAK S, MOURIER T, NIELSEN L P, IZARZUGAZA J M G, HANSEN A J. Contaminating viral sequences in high-throughput sequencing viromics: A linkage study of 700 sequencing libraries[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2019, 25(10): 1277-1285.
- [72] LLAMAS B, VALVERDE G, FEHREN-SCHMITZ L, WEYRICH L S, COOPER A, HAAK W. From the field to the laboratory: Controlling DNA contamination in human ancient DNA research in the high-throughput sequencing era[J]. Science & Technology of Archaeological Research, 2017, 3(1): 1-14.
- [73] PECMAN A, KUTNJAK D, GUTIÉRREZ-AGUIRRE I, ADAMS I, FOX A, BOONHAM N, RAVNIKAR M. Next generation sequencing for detection and discovery of plant viruses and viroids: Comparison of two approaches[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1998.
- [74] TURCO S, GOLYAEV V, SEGUIN J, GILLI C, FARINELLI L, BOLLER T, SCHUMPP O, POOGGIN M M. Small RNA-omics for virome reconstruction and antiviral defense characterization in mixed infections of cultivated *Solanum* plants[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2018, 31(7): 707-723.
- [75] 黄江庆, 李彬. 高通量测序在细菌进化分析中的应用与展望[J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(2): 171-174.
- HUANG Jiangqing, LI Bin. Application and prospect of high throughput sequencing in bacterial evolutionary analysis[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2021, 44(2): 171-174.