

高通量测序在柑橘病毒鉴定与种群多样性分析中的应用¹

李向¹, 杨进¹, 黄爱军^{1,2}, 周俊^{1,2}, 易龙^{1,2*}

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

摘要: 我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, 快速且准确的病毒鉴定及遗传多样性研究显得愈发关键。高通量测序 (High-Throughput sequencing, HTS) 技术, 凭借其高通量、高效快速以及成本效益高的优势, 逐渐成为了柑橘病毒鉴定的核心技术手段。该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, 为研究人员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, 随着技术的持续发展和优化, 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。本文综述了 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及未来的发展前景。

关键词: 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)04-0001-08

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

LI Xiang¹, YANG Jin¹, HUANG Aijun^{1,2}, ZHOU Jun^{1,2}, YI Long^{1,2*}

(¹College of Life Sciences, Gannan Normal University, Ganzhou 341000; ²National Navel Orange Engineering Research Center, Ganzhou 341000)

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

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 (31860488)

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

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 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, like for 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 limit 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: High-throughput sequencing technology; citrus virus; Population diversity analysis

中国果树资源丰富，各类水果总产量稳居世界首位^[1]。柑橘作为世界第一大类水果，在全球超过 140 个国家种植。中国是柑橘的主要生产国之一，柑橘种植面积和产量均居水果之首^[2]。柑橘是芸香科 (*Rutaceae*) 多年生木本植物，被认为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^[3]。其峰顶和深谷构成了物种传播的潜在障碍，而该地区的气候、地质和地形的多样性则为植物区系的形成和发展提供了理想的环境^[4]。柑橘在长期进化和栽培过程中积累了多种病原体，其中包括病毒和类病毒。这些柑橘病毒病严重影响了柑橘的质量和产量，造成巨额的经济损失。随时间推移，柑橘病毒病种类不断增加，截至目前，已报道 30 多种能感染柑橘的病毒或类病毒病害。不同病毒或类病毒引发的症状各异，且在不同柑橘品种上呈现的症状亦存在差异^[5]。迄今为止，有少量柑橘病毒性病害的病原尚未被明确，随着柑橘产业的不断扩大，未知病毒引发新病害的潜在风险正在加剧。目前，尚无治疗柑橘病毒病的有效药剂，前期预防工作成为控制其发生和流行的主要手段。构建有效的柑橘病毒防控体系，离不开对已知和未知病毒的高效检测与准确鉴定^[6]。因此，对柑橘病毒的快速准确鉴定及其遗传多样性的深入理解，成为保障柑橘产业健康发展的关键所在。

病毒检测和鉴定主要是基于病毒生物学特性、病毒粒子物理特性、病毒蛋白质特性及核酸特性而建立了多种检测方法^[7]。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，均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，属于针对特定病毒或病毒类别的特异性检测手段。然而，在面对未知病毒的非特异性检测时，这些方法往往表现出较低的敏感性和特异性，检测周期长，从而极大地阻碍了对病毒病害的深入研究和及时防控^[8]。近年来，HTS 技术蓬勃发展，逐渐在柑橘已知或未知病毒病害的鉴定中展现出巨大潜力，

为柑橘病毒研究开辟了新的道路。本文旨在全面综述 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 (Deep Sequencing) [9]。HTS 技术的核心在于边合成边测序 (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, 且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 [10]。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, 其中应用最广泛的是 mNGS、RNA-seq 和 sRNA, 目前已广泛应用于生化、医学、食品等领域的研究 [11]。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) [12]。454 测序系统的读长最长, 运行速度快, 适合未知基因组从头测序; 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 [13]。Illumina 机器因各个方面的优势, 目前主导着 HTS 市场 [14]。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, 展现出卓越的性价比 [15]。

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、基因组测序流程以及新病毒病原体常规检测技术的进展 [16]。在柑橘病毒病的研究领域, 运用 HTS 技术对已知及未知病毒实施全面检测, 构成了研究的首要步骤。传统植物病毒鉴定所采用的经典步骤, 诸如双链 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, 长期以来已证明了其可靠性, 特别是在柑橘黄脉相关病毒 (CYVaV) 的发现历程中, HTS 技术提供了一种提供了一种更先进的替代解决方案 [17-19]。近年来, 凭借对小 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 (参见表 1)。

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	英文名	基因组	病毒科或目	年份	文献
Chinese name	English name	Genome	Viaceae or order	Age	Reference
柑橘褪绿矮缩 病毒	citrus chlorotic dwarf-associated virus	ssDNA	<i>Geminiviridae</i> 双生病毒科	2012	[20]
柑橘麻风病毒 质型 2	citrus leprosis virus 2	+ssRNA	<i>Kitaviridae</i> 北岛病毒科	2013	[21]
柑橘坏死斑点 病毒	citrus necrotic spot virus	-ssRNA	<i>Rhabdoviridae</i> 弹状病毒科	2014	[22]
柑橘荆门类似 病毒; 柑橘杆状 类似病毒	citrus jingmen-like virus; citrus virga-like virus	+ssRNA	<i>Martellivirales</i> 马尔特里病毒目	2017	[23]
柑橘麻风双分 体病毒核型	citrus leprosis N dichorhavirus	-ssRNA	<i>Rhabdoviridae</i> 弹状病毒科	2017	[24]
柑橘褪绿斑点 病毒	citrus chlorotic spot virus	-ssRNA	<i>Rhabdoviridae</i> 弹状病毒科	2018	[25]
柑橘凹胶伴随 病毒	citrus concave gum-associated virus	-ssRNA	<i>Phenuiviridae</i> 白纤病毒科	2018	[26]
柑橘病毒 A	citrus virus A	-ssRNA	<i>Phenuiviridae</i> 白纤病毒科	2018	[27]
柑橘树皮裂纹 类病毒	citrus bark cracking viroid	环状 RNA Circular RNA	<i>Pospiviroidae</i> 马铃薯纺锤块茎类病毒科	2020	[28]
柑橘黄脉伴随 病毒	citrus yellow vein-associated virus	+ssRNA	<i>Tolivirales</i> 番茄丛矮病毒目	2021	[29]
柑橘黄斑病毒	citrus yellow spot virus	+ssRNA	<i>Betaflexiviridae</i> 乙型线形病毒科	2022	[30]
柑橘 jivivirus 相 关病毒 1	citrus jivi-related virus 1	+ssRNA	<i>Virgaviridae</i> 植物杆状病毒科	2023	[31]
柑橘黄化脉明 病毒	citrus yellow vein clearing virus	+ssRNA	<i>Alphaflexiviridae</i> 甲型线形病毒科	2024	[32]

2.1 HTS 技术在 CTV 中的应用

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^[33]。柑橘衰退病是柑橘产业中的关键病害，主要由柑橘衰退病毒 (citrus tristeza virus,

CTV) 引发, 该病毒借助受感染的接穗、苗木以及多种蚜虫广泛传播^[34]。CTV 主要分布在我国南方和沿海地区, 有研究显示我国 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^[35]。

2021 年, Cunha 等^[36]在非洲安哥拉开展实地研究, 针对 CTV 鉴定与种群多样性进行分析。他们运用 HTS 技术, 通过大规模并行测序, 结合 RT-PCR 和 RNA-seq 方法, 从柑橘属植物中高效提取并扩增双链 RNA, 成功从混合样品中鉴定出多个 CTV 株系。借助随机引物 RNA-seq, 在无需依赖已知序列信息的条件下, 全面捕捉到病毒基因组的变异情况, 实现了对 CTV 早期检测的高灵敏度与高准确性。研究还全面揭示了安哥拉柑橘种植点中 CTV 株系广泛存在的现象, 这些株系与已知的严重株系以及其他地区新出现的株系高度相似, 为了解 CTV 的地理分布、遗传变异及种群结构提供了前所未有的数据支撑。同时, 此项研究采用 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大量样品处理, 进一步推动了与多分子标记扩增 (Multimolecular Marker Amplification, MMM) 等其他技术的融合应用^[37]。这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。

同年, Bester 等^[38]建立了 HTS 生物信息学管道, 用于鉴定单一或混合感染状态下的 CTV 基因型。通过该生物信息学管道成功地实现了基因型特异性基因组覆盖率阈值的精确设定, 并明确揭示了 50% 与 92% 这两个基因组覆盖率阈值在区分非目标基因型与潜在新型基因型过程中所扮演的关键角色。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, 成功攻克了混合感染样本中基因型区分的难题, 深入揭示了不同基因型之间复杂的相互作用机制。借助 HTS 技术与生物信息学分析的有机结合, Bester 等成功鉴定了已知的 CTV 基因型, 同时还发现了新的基因型变体或重组序列, 这一成果充分展示了此技术在病毒多样性探索领域的独特优势。同时, 他们所构建的高效生物信息学分析流程, 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发展, 这无疑是植物病毒学研究领域的一项重大突破。

2023 年, Ghorbani 等^[39]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。该研究不仅精确剖析了该病毒株的遗传特征及其进化关系, 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。通过深入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。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 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, 同时极大地推动了病毒与植物相互作用研究的深入发展, 为现代科技手段在柑橘病毒病研究领域的运用奠定

了坚实基础。2017年，Yu等^[40]运用sRNA测序技术，从患病柠檬树中快速且可靠地鉴定出CYVCV-CQ重庆分离株，并成功测定其全长基因组序列。这是重庆市首次发现的CYVCV分离株，亦是中国第二个拥有全长基因组的CYVCV分离物，极大地提升了病毒病原体的精准识别能力。在这一过程中，研究人员凭借sRNA测序技术的从头组装能力，揭示了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。同时，通过系统进化树分析，精准呈现不同地理来源CYVCV分离株之间的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Yu等^[41]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。他们成功鉴定了3691个差异表达基因，这些基因在苯丙素、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。通过深入的分析，研究揭示了植物激素代谢与光合作用途径在CYVCV侵染过程中的核心作用，并观察到不同激素相关基因对病毒侵染的差异化响应模式，以及光合作用相关基因普遍下调的趋势。这些发现为深入理解CYVCV的致病机理及其与柠檬植物的相互作用提供了新的视角。HTS技术凭借高通量、高灵敏度特性，为在复杂生物系统中迅速鉴别出关键候选基因提供有力支持。研究人员通过RT-qPCR验证了RNA-seq结果的准确性，进一步巩固了HTS技术在植物病毒研究中的可靠性与实用性。这一研究成果为柑橘产业的病害防控提供重要理论依据，充分展示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^[42]运用HTS技术，针对从韩国6个省9个地区采集的118个柑橘类植物叶片样品开展病毒诊断工作。研究成功鉴定出4种病毒，分别为CTV、柑橘叶斑驳病毒（citrus leaf blotch virus, CLB）、柑橘脉突病毒（citrus vein enation virus, CVEV）和CYVCV。其中，CYVCV的鉴定尚属韩国首次。这些发现扩充了已知柑橘病毒的种类，为后续开展柑橘病毒防控研究提供了新的目标对象。

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）的研究带来显著创新与突破。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，易于传播^[43]。然而，关于CTLV的基因组多样性特征，以及这种多样性在病毒检测过程中的具体影响机制，目前尚缺乏深入的了解。2019年，Tan等^[44]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，成功获取这12个CTLV分离株的全长基因组序列。此技术突破克服了传统测序仅针对少量分离株小基因组区域的分析局限，实现了对多个病毒分离株系统性的全基因组序列分析，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，极大地加速了病毒基因组的全面解析^[45]。基于这些全基因组数据，研究揭示了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与系统发育关系，为CTLV分类学地位的确立提供了更坚实的数据支撑。HTS技术在CTLV研究中的应用，于基因组序列的高效获取、病毒进化历程与多样性的深入分析方面取得了显著进展，并且，在病毒检测方法的创新设计与严格验证环节实现了技术上的突破，为植物病毒研究领域的未来发展开辟了新路径。这一创新显著增强了

CTLV 检测的准确性和可靠性，同时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，进而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, 能侵染多种宿主, 涵盖结果植物、观赏植物以及草本植物^[46]。CLBV 主要通过嫁接方式进行传播, 在我国的发生较为普遍^[47]。研究表明, 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*) 进行的基因组测序揭示, 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^[48]。2018 年, Cao 等^[49]利用 HTS 技术, 成功从表现出叶片褪绿斑点症状的 Haruka 柑橘树中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病毒基因组的从头组装, 并依托深度测序所获数据清晰地揭示 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, 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。这一发现首次基于全基因组序列分析, 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, 为病毒进化机制的理解提供了新的视角。此外, 研究人员通过一系列序列分析, 进一步确认了 CLBV-2 在柑橘属中的独特地位。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, 这一成果标志着柑橘病毒分类学领域取得了重要进展。

2022 年, Kim 等^[50]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, 高效获取大量 RNA 测序数据。经对这些数据进行质量过滤和重新组装, 研究人员发现与 CLBV 高度同源的大片段重叠群。该发现迅速通过序列比对和 RT-PCR 实验得以验证, 证实了柠檬植株中 CLBV 的自然感染情况。这是韩国首次报道柠檬植株自然感染 CLBV。此外, 研究人员基于 HTS 技术所得数据展开分析, 评估了柠檬植株中 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重要依据。HTS 技术的应用, 显著加快在柠檬中首次发现 CLBV 的进程, 通过精准定位和分析测序数据, 为病毒的存在及其基因序列提供确凿证据。

在呈现了 HTS 技术于柑橘主要病毒病研究中的成功应用实例后, 可清晰洞察到该技术在柑橘病毒学领域同样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^[51]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^[28]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, 廖睿玲等^[31]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, 通过生物学实验获取其全长序列, 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, 这种动态性同样映射到其潜在宿主范围的扩展或变迁上, 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^[52]。HTS 技术能够有效识别已知病毒并鉴定新型病毒, 同时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, 这些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^[53]。

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。2018 年, 王亚飞等^[54]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, 研究还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^[55]借助 HTS 技术, 揭示了柑橘黄化斑驳相关病毒 (citrus yellow mottle-associated virus, CiYMaV) 作为曼达里病毒属 (*Mandarinavirus*) 的新成员, 该病毒在巴基斯坦旁遮普省的柑橘树中广泛流行。其常与 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, 这一结果提示该病毒的地理分布或许存在限制, 或者其生态适应性具有差异。此项研究深化了对病毒种群多样性与地理分布特征的高通量解析。

2021 年, Liu 等^[56]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, 通过该技术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)。通过比较新发现的病毒序列与已知病毒之间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。这些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,李双花等^[57-58]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。经同源序列及系统发育分析,确定其代表一种新的 CTV 基因型-JY 基因型,该基因型全基因组序列差异超过 7.5%,且 *ORF1a* 的核苷酸和氨基酸序列差异均超 8%。研究人员进一步对该基因型开展遗传多样性分析。通过对 12 个分离物的 *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 基因型种群内部遗传变异程度较低,种群结构相对稳定。同时,JY 基因型与其他 CTV 基因型之间存在显著遗传差异。并且,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。此外,在系统发育树上,JY 分离物形成独立的簇,与已知的 CTV 基因型明显区分开来。

2024年,Jin 等^[32]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,这些基因组序列高度一致,相似度达 95.2%-98.8%,且均归属于同一进化分支,表明这些分离株遗传变异有限,却足以形成独特的种群结构。通过将韩国的 CYVCV 分离株与东亚及南亚(中国、巴基斯坦、印度、缅甸)的分离株对比后发现,尽管存在差异,但尚未达到界定新物种或亚种的显著程度。这一结果进一步证实 CYVCV 在全球范围内广泛传播。同时,研究发现不同地理区域的病毒种群间存在紧密的遗传交流与联系。上述成果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、灵敏的显著特性。在运用传统检测方法对未知病毒进行检测时,由于对病毒序列以及生物学特性缺乏充分认知,常致使检测过程耗时冗长,甚至难以获得理想的检测结果。与之相比,HTS 技术通常可在短短数日内完成测序反应,且数据的分析处理和结果验证工作亦能在较短时间内达成,这极大程度地提升了检测效率与准确性^[59];其二,HTS 技术拥有独特的样本处理能力,可实现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^[60]。

尽管 HTS 技术在柑橘病毒鉴定及种群多样性分析中展现出了巨大的潜力和优势,但其在实际应用中仍面临着一系列挑战。其一,测序周期冗长。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即时应用;其二,微生物高通量测序数据量庞大。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^[61];其三,存在核酸污染与序列拼接难题。2019年,Asplund 等^[62]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^[63],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)的准种序列具有高度异质性,HTS 产生的短读长(reads)在拼接时面临困难。例如,低丰度的植物病毒 sRNA 序列会致使拼接效率降低^[64],

同时引发人为嵌合体 (Chimeras) 的产生^[65]。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^[66]。虽然这些挑战限制了 HTS 技术的进一步推广和应用, 但是从另一角度看, 其为柑橘病毒研究领域规划出未来的发展路径与方向。

5 结语

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已彰显出突出的优越性。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, 极大地推动了该领域研究向综合化方向发展, 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。展望未来, HTS 技术在柑橘病毒研究领域将致力于提升性能、拓展应用场景, 并解决现存问题。在此过程中, 开展 HTS 技术在柑橘病毒与其他植物病毒检测应用中的对比极具重要意义。这一研究有助于明确该技术在不同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支撑。

参考文献 References:

- [1] 于云奇. 小 RNA 深度测序在柑橘新发病毒的鉴定及 TuMV 诱导的抗病毒新机制中的研究[D].重庆: 西南大学, 2017.
YU Yunqi. Small RNA deep sequencing in the identification of *Citrus* emerging viruses and the new mechanisms of antiviral resistance induced by TuMV[D].Chongqing: Southwest University, 2017.
- [2] 周常勇. 《中国果树科学与实践. 柑橘》[M].赵政阳, 西安: 陕西科学技术出版社, 2020.
ZHOU Changyong. Fruit tree science and practice in China. orange[M].ZHAO Zhengyang, Xian: Shaanxi Science and Technology Press, 2015.
- [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, 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] HERNÁNDEZ-R L, BENÍTEZ-G M J, BERTALMÍO A, RUBIO L, RIVAS F, ARRUABARRENA 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.
- [6] 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. Research on the diversity and molecular evolution of *Citrus* viruses based on viral metagenomics technology[D].Chongqing: Southwest University, 2022.
- [7] READ A D, 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.

- [8] 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(05): 120-126+167.
ZHAN Binhui, ZHOU Xueping. Application of next-generation sequencing technology in detection of plant and insect viruses[J].Plant conservation, 2018,44 (05): 120-126 + 167.
- [9] 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(09): 1675-1687.
JIN Xin, ZHANG Yanhui, TANG Meng, ZHOU Yan. Advances of diagnosis techniques for citrus virus and virus-like diseases[J].The Journal of Horticulture, 2016, 43(09): 1675-1687.
- [10] RADFORD A D, CHAPMAN D, DIXON L, CHANTREY J, DARBY A C, HALL N. Application of next-generation sequencing technologies in virology (review)[J].The Journal of General Virology : A Federation of European Microbiological Societies Journal, 2012, 93(9): 1853-1868.
- [11] GAO W, ZHANG L W. Comparative analysis of the microbial community composition between tibetan kefir grains and milks[J].Food Research International (Ottawa,Ont.), 2019, 116: 137-144.
- [12] 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.
- [13] KULSKI J K. Next generation sequencing-advances, applications and challenges[M].London: Intech Open, 2016.
- [14] 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 the diagnosis of viral diseases in wildlife [D].Jinan: Shandong Normal University, 2023.
- [15] 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]. Integration technology, 2012, 1(3): 20-24.
- [16] HADIDI A, FLORES R, CANDRESSE T, MARINA B. Next-generation sequencing and genome editing in plant virology[J].Frontiers in Microbiology, 2016, 7(5573): 1325-1336.
- [17] SADEGHI M S, AFSHARIFAR A, IZADPANAH K, LOCONSOLE G, DESTRADIS 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.
- [18] 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(1): 85
- [19] MASSART S, CHIUMENTI M, DE JONGHE K, GLOVER R, HAEGEMAN A, KOLONIUK L, KOMINEK P, KREUZE J, KUTNJAK D, LOTOS L. Virus Detection by High-Throughput Sequencing of Small RNAs: Large-Scale Performance Testing of Sequence Analysis Strategies[J].Phytopathology, 2019, 109(3): 488-497.
- [20] 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.

- [21] AVIJIT R, CHOUDHARY N, LEON G, SHAO J, ANANTHAKRISHNAN G, 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
- [22] CRUZ-JARAMILLO J L, RUIZ-MEDRANO R, ROJAS-MORALES L, LÓPEZ-BUENFIL J A, MORALES-GALVÁN O, CHAVARRÍN-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.
- [23] 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.
- [24] RAMOS-GONZÁLEZ P L, CHABÍ-JESÚS 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): 963-76.
- [25] CHABI-JESUS C, RAMOS-GONZÁLEZ P L, TASSI A D, GUERRA-PERAZA O., KITAJIMA E W, HARAKAVA R, BESERRA J E 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.
- [26] 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, 9(5): 1075-1089.
- [27] 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 Bunyvirales[J].Frontiersin Microbiology, 2018, 9: 2340.
- [28] 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): 8.
- ZHANG Liyan, 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): 8.
- [29] KWON S J, BODAGHI S, DANG T, GADHAVE K R, VIDALAKIS G. Complete nucleotide sequence, genome organization, and comparative genomic analyses of *Citrus* yellow-vein associated virus(CYVaV)[J].Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 1371.
- [30] 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 of *Citrus* macular virus and construction of an infectious

- clone[D].Chongqing: Southwest University, 2022.
- [31] 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 novel RNA viruses in two fruit trees[D].Chongqing: Southwest University, 2023.
- [32] 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].The plant pathology journal, 2024, 40(2): 125-138.
- [33] 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. High-throughput sequencing identification of two citrus viruses[D].Chongqing : Southwest University, 2018.
- [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 Tree, 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): 223-223.
- [36] PAIS DA CUNHA A T, 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.
- [37] 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.
- [38] BESTER R, COOK G, MAREE H J. *Citrus* tristeza virus genotype detection using high-throughput sequencing[J].Viruses, 2021, 13(2): 168-168.
- [39] 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): 0288068-0288068.
- [40] 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(02): 503-508.
- [41] YU B, 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(1): 65-65.
- [42] 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): 1229-1229.
- [43] 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): 423-31.
- [44] 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): 0223958.
- [45] BOSTOCK R, THOMAS C, HOENISCH R, GOLINO D, VIDALAKIS G. Plant health: how diagnostic networks and interagency partnerships protect plant systems from pests and pathogens[J].California Agriculture, 2014, 68(4): 117-124.
- [46] 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): 637-637.
- [47] 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.
- [48] LI P, LI M, ZHANG S, WANG J, YANG F Y, CAO M J, LI Z G. 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.
- [49] CAO M J, LI P, ZHANG S, YANG F Y, ZHOU Y, WANG X F, LI R H, LI Z G. Molecular characterization of a novel Citrivirus from citrus using next-generation sequencing[J].Archives of Virology, 2018, 163(12): 3483.
- [50] 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): 1693-1693.
- [51] 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. Rapid identification of two new negative-strand RNA viruses in fruit trees by metatranscriptomics technology[D].Chongqing: Southwest University, 2018.
- [52] 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.
- [53] 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.
LV Yuzhuo. Analysis of the population composition and molecular variation of pear virus based on high-throughput sequencing technology[D].Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2022.
- [54] 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. Genetic diversity of *Citrus* bark cracked viruses and the molecular mechanism of their antagonism[D].Chongqing: Southwest University, 2018.
- [55] 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 *Mandarivirus* associated with leaf yellow mottle disease of citrus in Pakistan.[J].Plant

- Disease, 2020, 104(6): 1593-1600.
- [56] LIU Q Y, ZHANG S, MEI S Q, ZHOU Y, WANG J H, HAN G Z, CHEN L, ZHOU C Y, CAO M J. (2021) Viromics unveils extraordinary genetic diversity of the family closteroviridae in wild citrus[J].Public Library of Science, 2021, 17(7): e1009751
- [57] 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 new genotypes of *Citrus tristeza virus* and establishment of multiple genotypes[D].Ganzhou: Gannan Normal University, 2023.
- [58] 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 daoxianensis* S.W. He & G.F. Liu., syn. *Citrus reticulata* blanco) in China[J].Tropical Plant Pathology, 2023, 48(3): 352-356.
- [59] 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 Conservation, 2016,42 (6): 1-10
- [60] ROSSINCK M J, SAHA P, WILEY G B, QUAN J, ROE BA. Ecogenomics:using massively parallel pyrosequencing to understand virus ecology[J].Molecular Ecology, 2010, 19(S1): 81-88.
- [61] 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 Shen Kun , 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.
- [62] ASPLUND M, KJARTANSDÓTTIR K R, MOLLERUP S, VINNER L, FRIDHOLM H, HERRERA 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.
- [63] 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].STAR: Science & Technology of Archaeological Research, 2017, 3(1): 1-14.
- [64] ANJA P, DENIS K, ION GA, IAN A, ADRIAN F, NEIL B, MAJA R. Next generation sequencing for detection and discovery of plant viruses and viroids : comparison of two approaches[J].Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1998.
- [65] TURCO S, GOLYAEV V, SEGUIN J, GILLI C, FARINELLI L, BOLLER T, SCHUMPP O, POOGGIN 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.
- [66] 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.