

柑橘鳞皮病毒 3 个分离物全基因组序列分析

李 敏, 周天宇, 张 松, 杨方云, 周 彦, 周常勇, 李中安*, 曹孟籍*

(西南大学/中国农业科学院柑桔研究所, 重庆 400712)

摘 要: 运用转录组测序和 RT-PCR 方法克隆测定了柑橘鳞皮病毒 (*Citrus psorosis virus*, CPsV) 3 个分离物 CHN-1、CHN-2 和 CHN-3 的全基因组。序列分析结果表明, CHN-1、CHN-2 和 CHN-3 的基因组全长分别为 11 282、11 279 和 11 278 nt, 均包含 4 个开放阅读框。CHN-1、CHN-2 和 CHN-3 之间的核苷酸相似性为 93.48%~95.98%, 编码氨基酸相似性为 98.18%~98.86%; 与 6 个已知国外 CPsV 分离物的外壳蛋白基因核苷酸序列相似性为 85.83%~95.23%, 其对应氨基酸序列相似性为 94.09%~99.32%。系统进化分析显示 CHN-1、CHN-2 和 CHN-3 与地中海沿岸国家的 CPsV 分离物聚为一簇, 可能具有共同的起源。

关键词: 柑橘; 柑橘鳞皮病毒; 全基因组; 系统发育分析

中图分类号: S 666

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2018) 10-2030-07

Complete Genome Sequence Analysis of Three *Citrus psorosis virus* Isolates

LI Min, ZHOU Tianyu, ZHANG Song, YANG Fangyun, ZHOU Yan, ZHOU Changyong, LI Zhongan*, and CAO Mengji*

(*Citrus Research Institute, Southwest University/Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China*)

Abstract: *Citrus psorosis virus* (CPsV) caused a destructive viral disease of citrus, while viral genome information associated with CPsV is still limited to date. In this study, we obtained the complete genome sequences of three CPsV isolates CHN-1, CHN-2 and CHN-3 by using transcriptome sequencing (RNA-Seq), RT-PCR, cloning and Sanger sequencing approaches. Genome sequence analysis showed that the full length sequences of CHN-1, CHN-2 and CHN-3 were 11 282 nucleotides (nt), 11 279 nt and 11 278 nt, respectively, and comprised of four open reading frames (ORFs). Nucleotide sequence similarity between genomic RNAs of the three CPsV isolates ranged from 93.48% to 95.98%, whereas their amino acid (aa) sequence similarities were from 98.18% to 98.86%. Comparing CP genes of the three isolates with six other reported CPsV-isolates, the nucleotide sequence similarities were from 85.83% to 95.23% while amino acid sequence similarities from 94.09% to 99.32%. Phylogenetic analysis indicated that the isolates CHN-1, CHN-2 and CHN-3 clustered together into a branch of evolutionary tree, suggesting they should have the same origin.

收稿日期: 2018-05-14; **修回日期:** 2018-07-21

基金项目: 国家重点研发计划政府间国际科技创新合作重点专项 (2017YFE0110900); 重庆市科委社会事业与民生保障科技创新专项 (cstc2016shms-ztzz800003); 重庆市基础科学与前沿技术研究专项 (cstc2017cyjBX0016); 国家自然科学基金项目 (31501611); 重庆市研究生科研创新项目 (CYS18133)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhongan@cric.cn, caomengji@cric.cn)

Keywords: *Citrus*; *Citrus psorosis virus*; genome; phylogenetic analysis

柑橘鳞皮病是一种对柑橘具有破坏性的病毒类病害, 该病自 20 世纪 90 年代在美国佛罗里达州和加利福尼亚州被首次发现以来, 相继在阿根廷、西班牙、埃及、意大利等国家广泛发生 (Roistacher, 1993)。柑橘鳞皮病主要危害甜橙、葡萄柚和宽皮柑橘, 致使果实产量大大降低 (Achachi et al., 2014)。柑橘鳞皮病毒 (*Citrus psorosis virus*, CPsV) 主要通过嫁接传播 (Martín et al., 2002), 卵菌亚纲的油壶菌也可以传播 CPsV (Palle et al., 2005; Vaira et al., 2007, 2009)。柑橘鳞皮病有鳞皮病 A (psorosis A, PsA) 和鳞皮病 B (psorosis B, PsB) 两种类型, PsA 最为常见。PsA 可引起植株主干树皮鳞片化开裂, 木质部导管充胶变色, 有时沿叶脉可见褪绿斑纹。PsB 的危害比 PsA 严重, 主要引起嫩枝充胶, 树皮大面积开裂, 老叶上形成变色环斑, 春、秋梢嫩叶上呈现橡形叶症状 (Velázquez et al., 2012)。10~20 年树龄的植株易出现树皮鳞皮状开裂 (Achachi et al., 2014)。

CPsV 属于蛇形病毒科 (*Ophioviridae*) 蛇形病毒属 (*Ophiovirus*), 是一种三分体负单链 RNA 病毒 (García et al., 2017)。CPsV 的病毒粒子具有裸露的线形核衣壳, 直径 3~4 nm, 可形成卷曲的环, 呈极弯曲扭绞线状。CPsV 基因组全长约 12 kb, RNA1 编码 280 kD 依赖 RNA 的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) (Naum-Onganen et al., 2003) 和一个功能未知 24 kD 蛋白; RNA2 编码 54 kD 的运动蛋白 (movement protein, MP) (Robles et al., 2013), RNA3 编码 49 kD 的外壳蛋白 (coat protein, CP) (Barthe et al., 1998), 其中 RNA1 编码的 24 kD 蛋白和 RNA2 编码的 MP 可抑制寄主的基因沉默 (RNA silencing) (Reyes et al., 2016, 2017)。

目前在 NCBI 数据库中已有多个 CPsV 分离物的 RdRp 基因、24 kD 蛋白基因、MP 基因和 CP 基因被报道, 其中 RdRp 基因和 24 kD 蛋白基因的序列有 2 条, MP 基因的序列有 5 条, CP 基因的序列有 6 条, 但是完整 CPsV 分离物的基因序列只有 1 个。本研究获得了 3 个 CPsV 分离物的全基因组序列, 分析了基因组结构特征及其与已报道的分离物的系统进化关系, 丰富了 CPsV 的遗传信息, 为研究 CPsV 的演化提供了重要的数据支撑。

1 材料与方法

1.1 植物材料

试验于 2017 年 3—12 月在西南大学柑桔研究所国家柑桔苗木脱毒中心进行。病毒分离物 CHN-1 和 CHN-3 为西南大学柑桔研究所国家柑桔苗木脱毒中心保存的毒源, CHN-2 来源于西南大学柑桔研究所柑桔种质资源圃保存的柑橘样品。采集具有典型鳞皮病症状的树皮开裂的柑橘植株叶片, 液氮速冻后 -80 °C 保存备用。

1.2 全基因组的克隆及分析

将 -80 °C 保存的样品送北京百迈客生物科技有限公司进行转录组测序, 将产出的 raw reads (单个 reads 文本序列读长为 150 bp) 去除接头序列, 过滤掉低质量的 reads, 得到 clean reads 再与甜橙 (*Citrus sinensis*) 和克莱门丁 (*C. clementina*) 的参考基因组进行比对, 去除与参考基因组匹配的 reads, 收集剩余的 read 组装成长片段 (contigs), 借助 BLAST 工具比对 NCBI 病毒数据库, 识别到 9 条与已报道的 CPsV 序列具高度同源的片段。

根据转录组测序数据拼接得到的 CPsV 序列设计全长特异性引物(表 1),利用分子克隆和 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术对片段加以验证并补全病毒基因组序列 (Pecman et al., 2017)。

表 1 本研究中使用的引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5' - 3') Primer sequence	片段长度/nt Product size
CPsV1(379)-F1	CCATTCTGACACCTTCCTTAG	2 053
CPsV1(2432)-R1	GGCATTTCCTCTTGTGGT	
CPsV1(1677)-F2	GGTGATTCTATTGTCGGCA	3 663
CPsV1(5340)-R2	TCTTCTGGACTACTCAGGTCA	
CPsV1(4611)-F3	TTGATGAACCTGGGTCC	3 410
CPsV1(8021)-R3	GTTTATGCCTGAAATCGTGC	
CPsV1-RACE-5'-653	CAGAAAAATAGGACAAGGGG	653
CPsV1-RACE-5'-515	GGAGCAAAGGGAAATAGAAG	515
CPsV1-RACE-3'-706	ATACAATCAAGCAACCTCAG	706
CPsV1-RACE-3'-604	TGCTCTAAGTTGCTTTTCATTCACG	604
CPsV2(288)-F1	TCCAACAACACATCATCTCC	954
CPsV2(1242)-R1	GTCACCCGTTTCATACACTCT	
CPsV2-RACE-5'-942	ATGAACAAAGCGTGCCTA	942
CPsV2-RACE-5'-765	AACAATGATGGATACCG	765
CPsV2-RACE-3'-785	TGTCCCTCGTCTGTTTACT	785
CPsV2-RACE-3'-726	ATCATAGGCACGCTTTGTTTC	726
CPsV3(286)-F1	CGGTTATTATCCTCTCGGC	1 017
CPsV3(1303)-R1	GCCTTCTGTCTGGGTTGT	
CPsV3-RACE-5'-635	ACCAAGTGCTGTCTGCCTA	635
CPsV3-RACE-5'-548	CAAGCAAAAAGTTGTCCCCTG	548
CPsV3-RACE-3'-561	TGTTCCAGCAGTAATGAGCA	561
CPsV3-RACE-3'-406	TTTCTTGCTCCATCTTCTGT	406

RT-PCR 一步法反应体系: 以 1 μ L RNA 和 1 μ L ddH₂O 为模板, 变性后加入 10 μ L 的混合液, 2 \times 1 step Buffer 5 μ L, 10 μ mol \cdot L⁻¹ 的上、下游引物各 0.2 μ L, PrimeScript 1 step Enzyme Mix 0.3 μ L (TaKaRa 公司, Prime ScriptTM One Step RT-PCR Kit Ver.2), ddH₂O 4.3 μ L。扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 解链 5 min; 50 $^{\circ}$ C 反转 30 min; 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 (1 kb \cdot min⁻¹), 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

RT-PCR 产物采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 在紫外灯下切取目标胶块, 用凝胶回收试剂盒回收纯化 (OMEGA 公司) 后连接到 pEASY-T1 克隆载体 (北京全式金生物技术有限公司), 转化到 Trans1-T1 感受态细胞, 阳性克隆经检测后, 送英潍捷基 (上海) 贸易有限公司进行测序。每个片段挑选 6 个阳性克隆序列, 保证测序结果的准确性。

用 DNASTART 中的 SeqMan 对测得的各片段序列进行拼接。根据全基因组中编码 ORF 并参考 NCBI 数据库中相关分离物的信息, 确定各蛋白的起始位置。用 DNASTar 中的 Megalign 对病毒分离物 CHN-1、CHN-2 和 CHN-3 及 NCBI 数据库中的 CPsV 分离物进行核苷酸序列和氨基酸序列的同源性分析。

利用 MEGA7 中的 CLUSTAL W 比对相关序列, 以莴苣环坏死病毒 (*Lettuce ring necrosis virus*, LRNV, AY535018) 为外组, 用近邻算法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统进化树, 自展值 (bootstrap) 设为 1 000。

不同来源的 CPsV 病毒分离物的信息见表 2。

表 2 本研究中使用的柑橘鳞皮病毒分离物 CP 基因信息
Table 2 Information of *Citrus psorosis virus* isolates used in this study

分离物名称 Isolate name	登录号 GenBank accession number	来源 Source
CRSA-UBAps110	AM159538	意大利阿普利亚 Apulia, Italy
Citrus ringspot virus-4 Egyptian	AF060855 KM206785	美国佛罗里达 Florida, USA 埃及 Egypt
Tun22	KT989887	突尼斯 Tunisia
4e	AF036338	美国佛罗里达 Florida, USA
P-121	AY654894	西班牙 Spain
CHN-1	MG673940	中国 China
CHN-2	MG673943	中国 China
CHN-3	MG673946	中国 China

2 结果与分析

2.1 CHN-1、CHN-2 和 CHN-3 转录组测序数据分析

病毒分离物 CHN-1、CHN-2 和 CHN-3 转录组测序总的 reads (150 bp) 数分别为 70 937 832、76 742 583 和 78 742 616, 去除可以比对到甜橙和克莱门丁的参考基因组上的 reads, 剩余的 reads 数分别为 13 933 643、11 903 687 和 12 909 672, 占总 reads 数的 19.64%、15.51% 和 16.39%。用剩余的 reads 组装成片段 (contigs), 组装之后分别得到 23 071、19 345 和 38 151 条片段, 其中最长的片段分别为 10 937、10 567 和 9 625 nt, 最短的片段均为 200 nt。转录组数据拼接得到的 CHN-1 的 RNA1 为 8 195 nt, RNA2 为 1 646 nt, RNA3 为 1 528 nt; CHN-2 的 RNA1 为 8 188 nt, RNA2 为 1 645 nt, RNA3 为 1 446 nt; CHN-3 的 RNA1 为 8 186 nt, RNA2 为 1 645 nt, RNA3 为 1 447 nt。CHN-1、CHN-2 和 CHN-3 的转录组数据还比对到柑橘衰退病毒 (*Citrus tristeza virus*, CTV)、柑橘黄化脉明病毒 (*Citrus yellow vein clearing virus*, CYVCV) 等病毒 (张艳慧 等, 2017)。

2.2 病毒分离物 CHN-1、CHN-2 和 CHN-3 的基因组结构分析

将表 2 中的引物通过 PCR 扩增, 测序后组装成完整的基因组序列, 并与转录组测序数据比对, 比对结果一致。由此获得了 CHN-1、CHN-2 和 CHN-3 的全基因组序列 (CHN-1 的 RNA1、RNA2 和 RNA3 的 NCBI 数据库登录号分别为: MG673938、MG673939 和 MG673940; CHN-2 的 RNA1、RNA2 和 RNA3 的 NCBI 数据库登录号分别为: MG673941、MG673942 和 MG673943; CHN-3 的 RNA1、RNA2 和 RNA3 的 NCBI 数据库登录号分别为: MG673944、MG673945 和 MG673946)。

序列分析结果显示, CHN-1 的 RNA1、RNA2 和 RNA3 的片段大小分别为 8 186、1 645 和 1 451 nt; CHN-2 的 RNA1、RNA2 和 RNA3 的片段大小分别为 8 188、1 645 和 1 446 nt; CHN-3 的 RNA1、RNA2 和 RNA3 的片段大小分别为 8 186、1 645 和 1 447 nt。3 个分离物与已报道的 CPsV 基因组结构相同, RNA1 均编码 240 kD 的 RdRp 和 1 个功能未知的 24 kD 蛋白, RNA2 编码 MP, RNA3 编码 CP (图 1)。

CHN-1、CHN-2、CHN-3 与 NCBI 数据库中的 P-121 株系 (NCBI 数据库登录号: AY654892、AY654893 和 AY654894) 的基因组存在部分变异, 其中 CHN-3 RNA2 编码区的第 3 个碱基由 C 突变为 G, 不再编码起始密码子, 比 P-121 株系少 2 个氨基酸; CHN-1 的 RNA3 的 5'UTR 比 P-121 的 RNA3 的 5'UTR 开始位置多了 4 个碱基 (GTTC), 可能发生了碱基插入。全基因组序列分析显示 CHN-1、CHN-2、CHN-3 和 P-121 的 RNA1 编码的两个 ORF 之间的基因间隔区分别有 108、110、

108 和 108 nt, 此区域富含 (A+U), (A+U) 在此区域所占的比例分别为 71.29%、72.73%、68.52% 和 69.40%, CHN-1 和 CHN-3 在该区域有 1 个 6 nt 重复序列为 (UUAAAA)₂ 可以形成发卡结构, 而 CHN-2 和 P-121 在该区域有 1 个 5 nt 重复序列为 (UUAAA)₂ 可以形成发卡结构。将本研究获得的 CPsV 分离物的 9 条链与 NCBI 已经公布的序列比对发现, CPsV 基因组序列的 3' 末端有 1 个 12 nt 的保守序列为 A₇GUAUC。

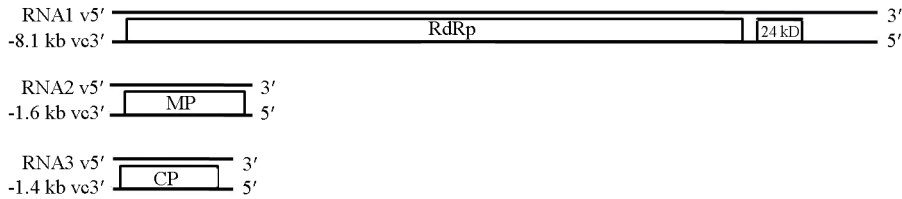


图 1 预测的柑橘鳞皮病毒的基因组结构

Fig. 1 The predicted genomic organization of *Citrus psorosis virus*

2.3 病毒分离物 CHN-1、CHN-2 和 CHN-3 与其他分离物的序列相似性分析

本研究获得的 3 个 CPsV 的分离物 CHN-1、CHN-2、CHN-3 与 GenBank 数据库的 P-121 分离物进行氨基酸序列比对分析发现, CPsV 的 RdRp 基因共编码 2 416 个氨基酸, 其中 CHN-1 有 219 个变异位点, CHN-2 有 212 个, CHN-3 有 329 个; CPsV 的 24 kD 蛋白基因共编码 206 个氨基酸, 其中 CHN-1 有 23 个变异位点, CHN-2 有 20 个, CHN-3 有 29 个; CPsV 的 MP 基因共编码 476 个氨基酸, 其中 CHN-1 和 CHN-2 各有 43 个变异位点, CHN-3 有 47 个; CPsV 的 CP 基因共编码 439 个氨基酸, 其中 CHN-1 有 43 个变异位点, CHN-2 有 58 个, CHN-3 有 48 个。

用 CLC Main Workbench 7.9.0.0 对 CHN-1、CHN-2、CHN-3 和 NCBI 数据库中的 CPsV 分离物进行核苷酸和氨基酸的同源性比对, CHN-1、CHN-2、CHN-3 和 P-121 的 RdRp 基因的核苷酸相似性为 93.12%~95.85%、氨基酸相似性为 96.69%~98.10%; CHN-1、CHN-2 和 CHN-3 的 CP 基因的核苷酸序列相似性为 93.48%~95.98%、氨基酸序列相似性为 98.18%~98.86%, 与国外已报道代表性 CPsV 分离物 CP 基因的核苷酸相似性为 85.83%~95.23%、氨基酸序列相似性为 94.09%~99.32% (表 3)。

表 3 CPsV 不同分离物 CP 基因的核苷酸 (对角线以下) 和氨基酸 (对角线以上) 序列相似性比较
Table 3 Identity between nucleotide (below the diagonal) and amino acid sequences (above the diagonal) of CP genes of CPsV different isolates

CPsV	Tun22	CRSA-UBAps110	P-121	Citrus ring spot virus-4	4e	Egyptian	CHN-1	CHN-2	CHN-3
Tun22		98.41	98.64	95.00	95.00	95.00	99.32	98.64	98.64
CRSA-UBAps110	97.65		98.41	94.32	94.77	94.77	98.64	97.85	97.95
P-121	96.89	97.27		94.09	94.55	94.55	98.86	98.18	98.18
Citrus ring spot virus-4	86.97	86.21	85.53		99.55	99.55	94.77	94.09	94.09
4e	86.89	86.29	85.61	99.47		100.00	95.23	94.55	94.55
Egyptian	86.89	86.29	85.61	99.47	100.00		95.23	94.55	94.55
CHN-1	95.23	95.00	95.23	86.44	86.52	86.52		98.86	98.86
CHN-2	94.47	94.02	94.09	85.83	85.91	85.91	95.98		98.18
CHN-3	94.92	94.85	95.08	86.06	86.14	86.14	94.77	93.48	

利用 MEGA7 中 CLUSTAL W 算法比对相关序列, 近邻算法 NJ 构建的系统进化树 (图 2) 显示, 9 个 CPsV 的分离物分成 2 簇, 第 I 簇包括 CHN-1、CHN-2、CHN-3 等 6 个分离物, 来自中国和地中海地区国家 (包括突尼斯、意大利、西班牙); 第 II 簇包括 Citrus ringspot virus-4 等 3 个分离物, 来自美国和埃及。

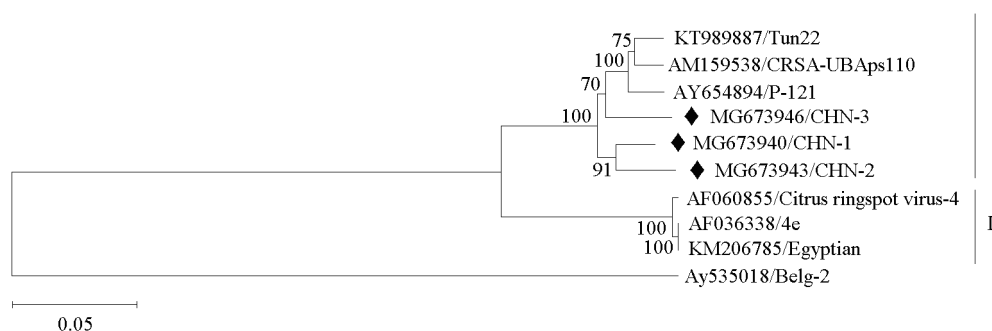


图 2 基于 CHN-1、CHN-2 和 CHN-3 的 CP 基因序列与其他 CPsV 分离物的 CP 基因序列的进化树分析

Fig. 2 The phylogenetic tree analysis of coat protein of CHN-1, CHN-2 and CHN-3 isolates and other pathogen isolates

3 讨论

本研究中对柑橘鳞皮病毒 3 个分离物进行全基因组序列分析显示, CHN-1、CHN-2、CHN-3 的 RNA1 编码的两个 ORF 之间的基因间隔区有一个 6 nt 的重复序列 (UUAAAA)₂, 可以形成发卡结构, Gabriela 等 (2003) 的研究指出在 RNA1 编码的两个 ORF 的间隔区有 1 个 6 nt 的重复序列为 (UUAAAA)₃, 二者有所不同。此外, 与 Gabriela 等 (2003) 的研究结果类似, CHN-1、CHN-2 和 CHN-3 的 RNA1 编码的两个 ORF 的间隔区分别为 108、110 和 108 nt, 此区域富含 (A + U), (A + U) 在此区域所占的比例分别为 71.29%、72.73% 和 68.52%。将本研究中的 3 个分离物进行序列比对发现, CPsV 中国分离物的 3'末端有 1 个 12 nt 的保守序列为 A₇GUAUC, 与 GenBank 上其他 CPsV 分离物的 3'末端一致, 蛇形病毒属的米拉菲里奥莴苣主脉病毒 (*Mirafiori lettuce big-vein virus*, MiLBVV) (Sasaya & Koganezawa, 2006) 的 3'末端也是保守的, 序列为 A₄₋₆UAAUC (van der Wilk et al., 2002)。

CHN-1、CHN-2 和 CHN-3 与其他地区 CPsV 分离物的核苷酸序列同源性在 85% 以上, CHN-1、CHN-2、CHN-3 和 P-121 株系的氨基酸比对显示 10% 左右的氨基酸位点发生变异, 系统进化树分析同样表明分离物之间的差异较小, 进一步说明 CPsV 的序列是非常保守的, 可能是和它们在寄主上的症状差异不大有关, 其中 CHN-1、CHN-2、CHN-3 在寄主叶片上的症状均为沿叶脉有褪绿斑纹。本研究中的 3 个 CPsV 分离物与地中海地区的分离物在系统进化树上比较接近, 推测有共同的起源, 这可能是地区间相互引种所致。

本研究中明确了 3 个 CPsV 分离物的全基因组序列、结构特征以及其在 CPsV 分离物中的分类地位, 丰富了 CPsV 的基因组信息, 为开展抗病育种材料的研究, 该病毒检测体系的建立以及致病机理的研究奠定理论基础。

References

- Achachi A, Ait Barka E, Ibriz M. 2014. Recent advances in *Citrus psorosis virus*. *Virus Disease*, 25 (3): 261 - 276.
- Barthe G A, Ceccardi T L, Manjunath K L, Derrick K S. 1998. *Citrus psorosis virus*: nucleotide sequencing of the coat protein gene and detection by hybridization and RT-PCR. *The Journal of General Virology*, 79 (6): 1531 - 1537.
- García M L, Bó E D, a Graça J V, Gago-Zachert S, Hammond J, Moreno P, Natsuaki T, Pallás V, Navarro J A, Reyes C A, Luna G R, Sasaya T, Tzanetakis I E, Vaira A M, Verbeek M. 2017. ICTV virus taxonomy profile: Ophioviridae. *Journal of General Virology*, 98 (6): 1161 - 1162.
- Martín S, Alioto D, Milne R G, Guerri J, Moreno P. 2002. Detection of *Citrus psorosis virus* in field trees by direct tissue blot immunoassay in comparison with ELISA, symptomatology, biological indexing and cross-protection tests. *Plant Pathology*, 51 (2): 134 - 141.
- Naum-Onganía G, Gago-Zachert S, Peña E, Grau O, García M L. 2003. *Citrus psorosis virus* RNA 1 is of negative polarity and potentially encodes in its complementary strand a 24K protein of unknown function and 280K putative RNA dependent RNA polymerase. *Virus Research*, 96 (1): 49 - 61.
- Palle S R, Miao H, Seyran M, Louzada E S, Graca J V D, Skaria M. 2005. Evidence for association of *Citrus psorosis virus* with symptomatic trees and an *Olpidium*-like fungus in Texas//International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957 - 2010), 16 (16): 423 - 426.
- Pecman A, Kutnjak D, Gutiérrez-Aguirre I, Adams I, Fox A, Boonham N, Ravnikar M. 2017. Next generation sequencing for detection and discovery of plant viruses and viroids: comparison of two approaches. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1998.
- Reyes C A, Ocolotobiche E E, Marmisollé F E, Robles Luna G, Borniego M B, Bazzini A A, Asurmendi S, García M L. 2016. Citrus psorosis virus 24K protein interacts with citrus miRNA precursors, affects their processing and subsequent miRNA accumulation and target expression. *Molecular Plant Pathology*, 17 (3): 317 - 329.
- Robles L G, Reyes C A, Peña E J, Ocolotobiche E, Baeza C, Borniego M B, Kormelink R, García M L. 2017. Identification and characterization of two RNA silencing suppressors encoded by ophioviruses. *Virus Research*, 235: 96 - 105.
- Robles Luna G, Peña E J, Borniego M B, Heinlein M, Garcia M L. 2013. Ophioviruses CPsV and MiLBVV movement protein is encoded in RNA 2 and interacts with the coat protein. *Virology*, 441 (2): 152 - 161.
- Roistacher C N. 1993. Psorosis-a review//Moreno P, da Graca J V, Timmer L W. Proceedings of 12th conference on international organisation of citrus virologists. University of California, Riverside: 139 - 154.
- Sasaya T, Koganezawa H. 2006. Molecular analysis and virus transmission tests place *Olpidium virulentus*, a vector of *Mirafiori lettuce* big-vein virus and *Tobacco stunt virus*, as a distinct species rather than a strain of *Olpidium brassicae*. *Journal of General Plant Pathology*, 72 (1): 20 - 25.
- Vaira A M, Hansen M A, Murphy C, Reinsel M D, Hammond J. 2009. First report of *Freesia sneak virus* in *Freesia* sp. in *Virginia*. *Plant Disease*, 93 (9): 965.
- Vaira A M, Kleynhans R, Hammond J. 2007. First report of *Freesia sneak virus* infecting *Lachenalia* cultivars in South Africa. *Plant Disease*, 91 (6): 770.
- van der Wilk F, Dullemans A M, Verbeek M, van J F. 2002. Nucleotide sequence and genomic organization of an ophiovirus associated with lettuce big-vein disease. *Journal of General Virology*, 83 (11): 2869 - 2877.
- Velázquez K, Pina J A, Navarro L, Moreno P, Guerri J. 2012. Association of *Citrus psorosis B* symptoms with a sequence variant of the *Citrus psorosis virus* RNA 2. *Plant Pathology*, 61 (3): 448 - 456.
- Zhang Yanhui, Liu Yingjie, Wang Qin, Li Xueyan, Hu Wenzhao, Dai Xiangsheng, Zhou Yan. 2012. Distribution and molecular characterization of *Citrus yellow vein clearing virus* in Zhejiang Province. *Acta Horticulturae Sinica*, 44 (10): 1978 - 1984. (in Chinese)
- 张艳慧, 刘莹洁, 王琴, 李雪燕, 胡文召, 戴祥生, 周彦. 2017. 浙江柑橘产区柑橘黄脉病毒的发生、分布与分子特性研究. *园艺学报*, 44 (10): 1978 - 1984.