شناسایی ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات در استان مازندران

سید مهدی بنی‌هاشمیان[1*] و سیروس آقاجانزاده[2]

۱- ***نویسنده مسوول:** استادیار پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر، ایران (m.banihashemian@areeo.ac.ir)

۲- دانشیار پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۵/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۸/۰۷

چکیده

ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات (*Citrus yellow vein clearing virus*)، ویروسی خسارت‌زا از جنس *Mandarivirus* است که در سال‌های اخیر وقوع آن پس از کشورهای پاکستان، هند، ترکیه و چین، از ایران هم گزارش شده است. در میزبان‌های حساس شناخته شده در کشور شامل نارنج، لمون و پرشین‌لایم، علائم زردی رگبرگ‌های جانبی با نواحی آب‌سوخته متناظر در پشت برگ ظاهر می‌شود. این علائم مبنای تشخیص اولیه بیماری در نهال‌ها و درختان نارنج، لمون و پرشین‌لایم در نهالستان‌ها و باغ‌های مرکبات استان مازندران قرار گرفت. از تعداد ۵۳ نمونه جمع‌آوری شده از شهرستان‌های این استان در بهار سال‌های ۱۳۹۵، ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷، سه جدایه SOU، LEN و LIE از میزبان‌های فوق جهت آزمون‌های تکمیلی انتخاب شدند. انتقال مکانیکی و پیوندی این جدایه‌ها در گلخانه با دمای کنترل شده به گیاهان لوبیا، نارنج و لمون با موفقیت انجام شد. در شرایط باغ نیز، علائم شاخص بیماری پس از پیوند ارقام حساس عاری از ویروس روی تنه درختان بیمار به دست آمد. به منظور تأیید آلودگی گیاهان محک نارنج و لمون و نمونه‌های باغی، استخراج آران‌ا کل به روش SDS-Potassium acetate از بافت‌های جوان علائم‌دار انجام پذیرفت. بررسی نمونه‌ها با استفاده از آزمون RT-PCR دو مرحله‌ای و جفت آغازگر اختصاصی ژن پروتئین پوششی ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات، منجر به تکثیر قطعه مورد نظر با اندازه ٦١٤ جفت باز شد. ترادف این ناحیه از ژن در جدایه‌های مورد بررسی با توالی سایر جدایه‌های ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات از چین، هند، پاکستان و ترکیه در سطح ۹۵/۷۵ تا ۹۸/۳۷ درصد شباهت داشت. درخت تبارزایی بر اساس این قسمت از ژنوم، جدایه‌های ایرانی را با دو جدایه از هند و ترکیه و دو جدایه پاکستانی در یک گروه قرار داد. با توجه به شناسایی ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات در استان مازندران و نظر به شیوه‌های مختلف انتقال و خسارت بیماری ناشی از این ویروس، پیشگیری از گسترش آن به کانون‌های جدید بسیار حائز اهمیت است.

کلیدواژه‌ها: پرشین‌لایم، لمون، نارنج، ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات

مقدمه

ایجاد رگه‌های زرد رنگ در رگبرگ‌های جانبی با نواحی آب‌سوخته متناظر در پشت برگ‌های جوان، علت نام‌گذاری بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات است که اولین بار در سال ۱۹۸۸ در درختان نارنج (*Citrus aurantium* L.) و لمون (*C. limon* L.) در پاکستان

دبیر تخصصی: دکتر سعید تابعین

مورد توجه قرار گرفت (Catara et al., 1993). ماهیت ویروسی بیماری در جدایه‌های پاکستانی با استفاده از آزمون‌های انتقال از طریق پیوند و مشاهده پیکره‌های رشته‌ای ویروسی با میکروسکوپ الکترونی به اثبات رسید (Grimaldi and Catara, 1996). پس از مدتی، وقوع و گسترش بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات در همین ارقام از هند، چین و ترکیه که به ترتیب جایگاه‌های اول، سوم و ششم تولید لیمو در دنیا را در اختیار دارند (FAOSTATE, 2018) نیز گزارش شد (Önelge, 2002; Alshami et al., 2003; Chen et al., 2014). علاوه بر پتانسیل گسترش سریع، در اثر آلودگی به بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات، اندازه و میزان محصول لیمو نیز به شدت کاهش می‌یابد. پایش‌های انجام گرفته در استان‌های مهم کشت مرکبات کشور چین، آلودگی وسیع بسیاری از باغ‌ها را مشخص نمود (Zhou et al., 2017) و ۲۰ تا ۷۰ درصد افت تولید محصول لیموترش به خسارت ناشی از آلودگی درختان به این بیماری نسبت داده شد (Chen et al., 2014; Liu et al., 2019).

عامل بیماری، ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات (*Citrus yellow vein clearing virus*, CYVCV) است که در جنس *Mandarivirus* و تیره *Alphaflexiviridae* طبقه‌بندی شده است (Loconsole et al., 2012). این ویروس با بذر انتقال نمی‌یابد (Zhou et al., 2015) اما مایه‌زنی عصاره مرکبات آلوده به روش مکانیکی به گیاهان سلمه‌تره (*Chenopodium quinoa* Willd)، لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) و لوبیا چشم‌بلبلی (*Vigna unguiculata* L.) باعث انتقال آلودگی و ایجاد علائم سیستمیک در دو میزبان آخر می‌شود (Önelge et al., 2011b). به تازگی قابلیت انتقال این ویروس با ابزار باغبانی، شته سبز (*Aphis spiraecola* Patch) و سفید بالک مرکبات (*Dialeorudes citri* Ashmead) نیز به تأیید رسیده است (Zhang et al., 2018, 2019a and 2019b)، که این موضوع گسترش سریع ویروس در کشورهای منطقه را توجیه می‌نماید.

در سال ۱۳۹۵ گسترش علائم رگبرگ روشنی زرد مرکبات در منطقه غرب مازندران مشاهده شد (Bani Hashemian and Aghajanzadeh, 2017). برخی شیوه‌های انتقال، تشخیص بیولوژی و مولکولی و رابطه تبارزایی جدایه‌های منتخب ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار گرفته است. نظر به شیوه‌های مختلف انتقال و خسارت بیماری ناشی از این ویروس، پیشگیری از گسترش آن به کانون‌های جدید بسیار حائز اهمیت است.

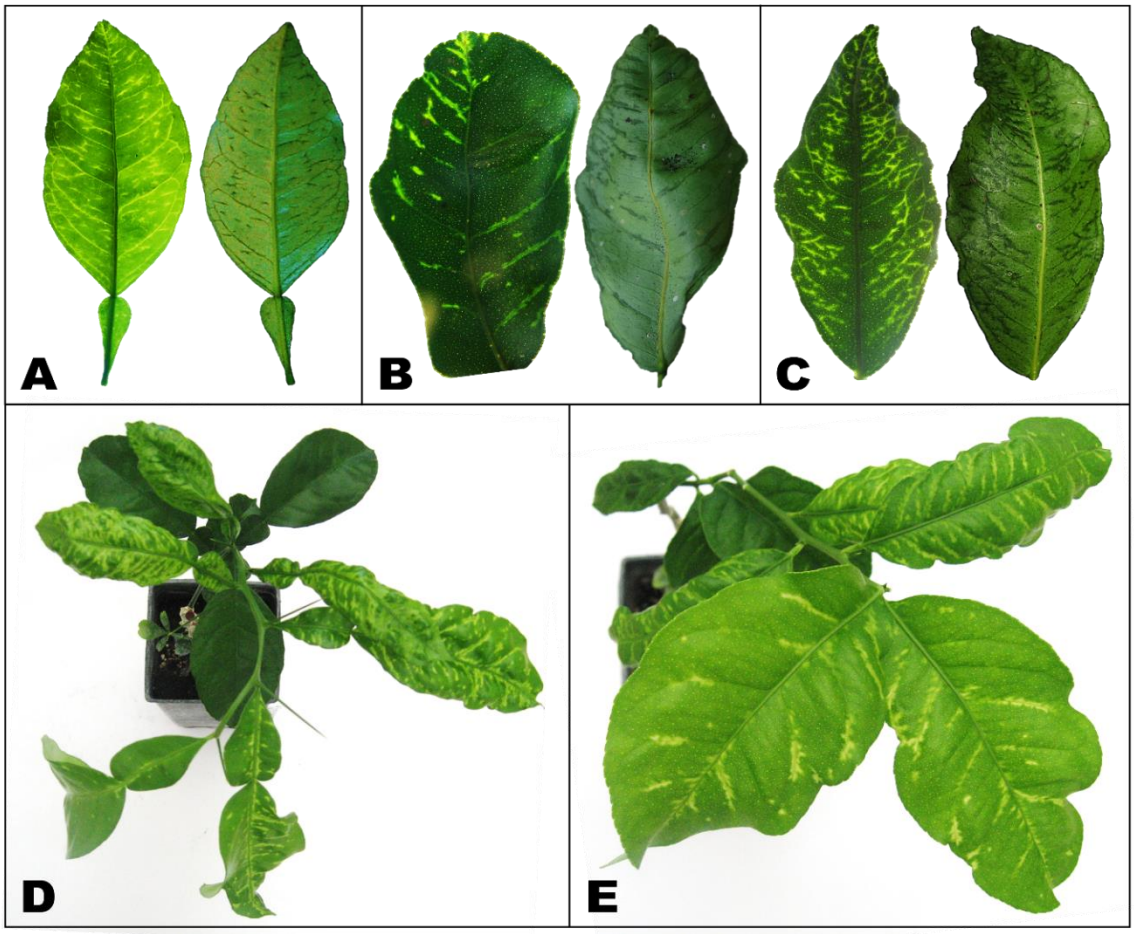
مواد و روش‌ها

جدایه‌های مورد مطالعه

در نمونه‌های ارسال شده به آزمایشگاه گیاه‌پزشکی پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری و بازدیدهای انجام شده از شهرستان‌های استان مازندران در بهار سال‌های ۱۳۹۵، ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷، علائم مشخص بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات شامل زردی رگبرگ‌های جانبی و نواحی آب‌سوخته متناظر در زیر برگ‌های جوان، علاوه بر درختان نارنج حاشیه خیابان شهرها، در درختان نارنج و نهال‌های لمون و پرشین‌لایم (*C. latifolia* Tan.) نهالستان‌ها و باغ‌های مرکبات مشاهده شد (شکل ۱). از تعداد ۵۳ نمونه سرشاخه و برگ جمع‌آوری شده از این مناطق، سه جدایه SOU (نارنج، عباس‌آباد)، LEN (لمون، تنکابن) و LIE (پرشین‌لایم، رامسر) جهت آزمون‌های انتقال و مطالعات توالی‌یابی مورد استفاده قرار گرفتند.

آزمون‌های انتقال با پیوند و مایه‌زنی مکانیکی

جهت بررسی قابلیت انتقال با پیوند ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات، واکنش جدایه‌های ایرانی این ویروس روی گیاهان محک درگلخانه تحقیقاتی پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری



شکل ۱- علائم مشخص بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات شامل زردی رگبرگ‌های جانبی و نواحی آب‌سوخته متناظر پشت برگ‌های جوان در سه میزبان نارنج (A)، لمون (B) و پرشین لایم (C) و در نهال‌های محک نارنج (D) و لمون اورکا (E) پس از آلوده‌سازی در شرایط گلخانه با جدایه SOU از ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات

Figure 1. Typical symptoms of citrus yellow vein clearing disease including yellowing of the lateral veins with corresponding water soaked areas behind the young leaves in the three hosts; sour orange (A), lemon (B), and Persian Lime (C) and two indicators, sour orange (D) and lemon (E) after inoculation with SOU isolate of CYVCV under greenhouse condition

مورد بررسی قرار گرفت. بستر حاوی ۵۰ درصد کوکوپیت، ۲۵ درصد پرلیت و ۲۵ درصد ماسه پس از مخلوط‌شدن در دستگاه میکسر، به مدت یک ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۶ بار در اتوکلاو ضدعفونی گردید. ارقام نارنج و لمون اورکا (*C. limon* cv. Eureka)، که شناخته‌شده‌ترین میزبان‌های حساس بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات به حساب می‌آیند (Loconsole et al., 2012; Chen et al., 2014; Zhou et al., 2017)، از منشا گیاهان مادری سالم انتخاب شدند. نهال‌های تکثیری این دو رقم روی پایه سیترنج (*Poncirus trifoliate X C. sinensis*) در این بستر تولید شدند و به عنوان گیاهان محک آزمون بیولوژی مورد استفاده قرار گرفتند. آلوده‌سازی چهار نهال از هر یک از محک‌ها به وسیله پیوند پوستک از جدایه‌های مورد بررسی، مطابق روش Roistacher (1991) صورت گرفت. این گیاهان به همراه نهال‌های مایه‌زنی نشده شاهد (۴ اصله) در شرایط دمایی کنترل شده (۲۶ درجه سانتی‌گراد روز و ۱۸ درجه سانتی‌گراد شب) نگهداری شدند.

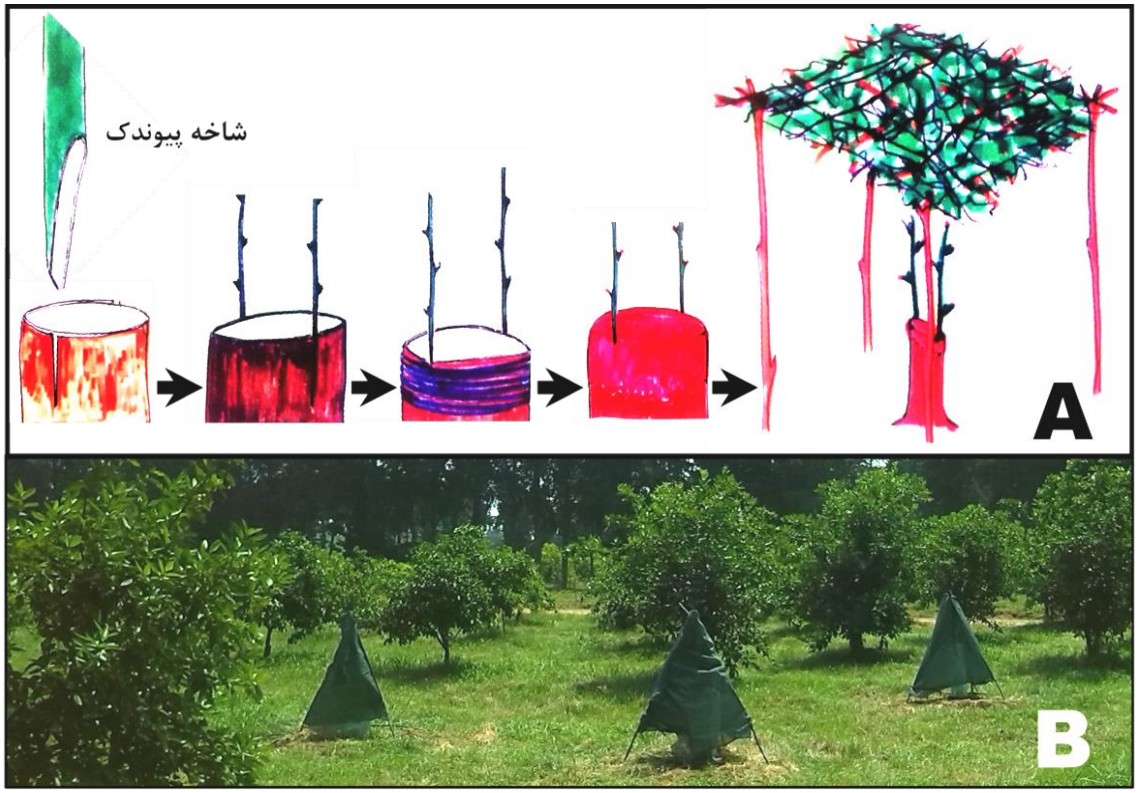
اثبات ماهیت ویروسی بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات، از طریق پیوند ارقام حساس عاری از ویروس روی درختان بیمار انجام شد. به این منظور پیوند تاجی[1] با استفاده از شاخه پیوندک ارقام نارنج و لمون اورکا از منشا گیاهان بذری نگهداری شده در گلخانه ضدحشره مطابق روش Ebrahimi and Nematollahi Sani (2003) در باغی با سابقه آلودگی در رامسر روی تنه سه درخت پرشین لایم با علائم مشخص بیماری به اجرا در آمد (شکل ۱). به این صورت که شاخه پیوندک ارقام محک پس از برش مورب در زیر پوست تنه باقیمانده از درختان امحا شده وارد و با نوار نایلونی بسته شد. در مراحل اخذ پیوندک و تکثیر، ضدعفونی ابزار باغبانی با محلول تجاری هیپو کلریت سدیم (سفیدکننده خانگی) صورت گرفت و محل پیوند با کمک چسب باغبانی و ایجاد سایبان محافظت گردید (شکل ۲).

انتقال مکانیکی ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات با عصاره‌گیری از برگ‌های جوان درختان دارای علائم جدایه‌های SOU، LEN و LIE در بافر استخراج (بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار، pH 7) و مایه‌زنی برگ‌های جوان لوبیا (*P. vulgaris* cv. red Kidney) با کمک کاربوراندوم انجام شد. گیاهان شاهد با بافر استخراج مایه‌زنی و در شرایط دمایی (۲۶ درجه سانتی‌گراد روز و ۱۸ درجه سانتی‌گراد شب) گلخانه نگهداری شدند.

استخراج اسید نوکلئیک، RT-PCR و آنالیز تبارزایی

آرانا کل استخراج شده به روش SDS-Potassium acetate (Bernad and Duran-Vila, 2006) از پوست و برگ جست‌های جدید دارای علائم گیاهان مورد بررسی جهت تائید مولکولی آلودگی به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR) به کار رفت. از ۵۰۰ میلی‌گرم بافت گیاهی بدون استفاده از نیتروژن مایع در پاکت‌های پلاستیکی حاوی ۵ میلی‌لیتر بافر استخراج (0.1M Tris-HCl, pH 8.0; 50mM EDTA; 0.5M mercaptoethanol) عصاره‌گیری، با SDS به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و استات پتاسیم به مدت ۲۰ دقیقه در یخ تیمار و رونشین به وسیله اتانول رسوب‌دهی و تغلیظ و در ۴۰ میکرولیتر آب مقطر حل شد. ردیابی ویروس بر اساس آزمون RT-PCR دو مرحله‌ای در حضور جفت آغازگر اختصاصی ژن پروتئین پوششی (YVCPf 5'-TACCGCAGCTATCCATTTCC-3'/ YVCPr 5'-GCAGAAATCCCGAACCAC-3')(Chen et al., 2014) انجام و نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت. برای ساخت دی‌انا مکمل از آغازگر YVCPr و کیت Revert Aid (Fermentas) و جهت انجام واکنش PCR از PCR Master Mix (Fermentas) استفاده شد. چرخه‌های حرارتی شامل ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد (یک چرخه)، ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در ۵۴ درجه سانتی‌گراد و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۳۰ چرخه) و ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۱ چرخه) به منظور تکثیر دی‌انا مکمل اجرا گردید. به منظور حذف باندهای اضافی، دمای مرحله اتصال تا ۵۷ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. تعیین توالی نوکلئوتیدی محصول نهایی واکنش پی‌سی‌آر تکثیر شده با آغازگرهای اختصاصی ویروس توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی با استفاده از آغازگرهای مستقیم و معکوس انجام گرفت. دو بار خوانش توالی هر جدایه با برنامه ClustalW با توالی مرجع ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات (جدایه CQ، رس‌شمار KP313240) هم‌ردیف، توالی نهایی استخراج و به کمک الگوریتم نوکلئوتید بلاست (nBlast) با سایر توالی‌های اسید نوکلئیک موجود در بانک ژن NCBI مقایسه شد. درخت تبارزایی اسید نوکلئیک جدایه‌های ایرانی ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات با توالی جدایه‌های این ویروس در بانک ژن در دامنه همپوشانی

1- Top work grafting



شکل ۲- A) مراحل پیوند تاجی (Ebrahimi and Nematollahi Sani, 2003)؛ B) باغ محل انجام آزمون انتقال با پیوند
Figure 2. A) Top work grafting process (Ebrahimi and Nematollahi Sani, 2003); B) the orchard of transmission study

۹۹ و ۱۰۰ درصد با کمک نرم‌افزار MEGA X به روش Neighbor joining و بوت استرپ ۱۰۰۰ ترسیم گردید. توالی‌های صد در صد مشابه هر کشور حذف و کلیه شاخه‌های با ارزش بوت استرپ کمتر از ۵۰ درصد ادغام شدند. در این تجزیه و تحلیل از دو جدایه ویروس لکه حلقوی هندی مرکبات (*Indian Citrus Ring Spot Virus*, ICRSV)، گونه دیگر جنس *Mandarivirus*، به عنوان اعضای برون‌گروه [1] استفاده شد.

نتایج

تشخیص ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات با آزمون گیاه محک

علائم بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات شامل زردی رگبرگ‌های جانبی و نواحی آب‌سوخته متناظر با آنها در سطح زیرین برگ‌های جوان، پس از تشکیل جست‌های جدید و از حدود یک ماه پس از آلوده‌سازی نهال‌های سالم نارنج و لمون با سه جدایه SOU، LEN و LIE در شرایط گلخانه ظاهر گردید (شکل ۱). چنین علائمی در گیاهان شاهد مشاهده نشد.

آزمون انتقال با پیوند ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات در شرایط باغ

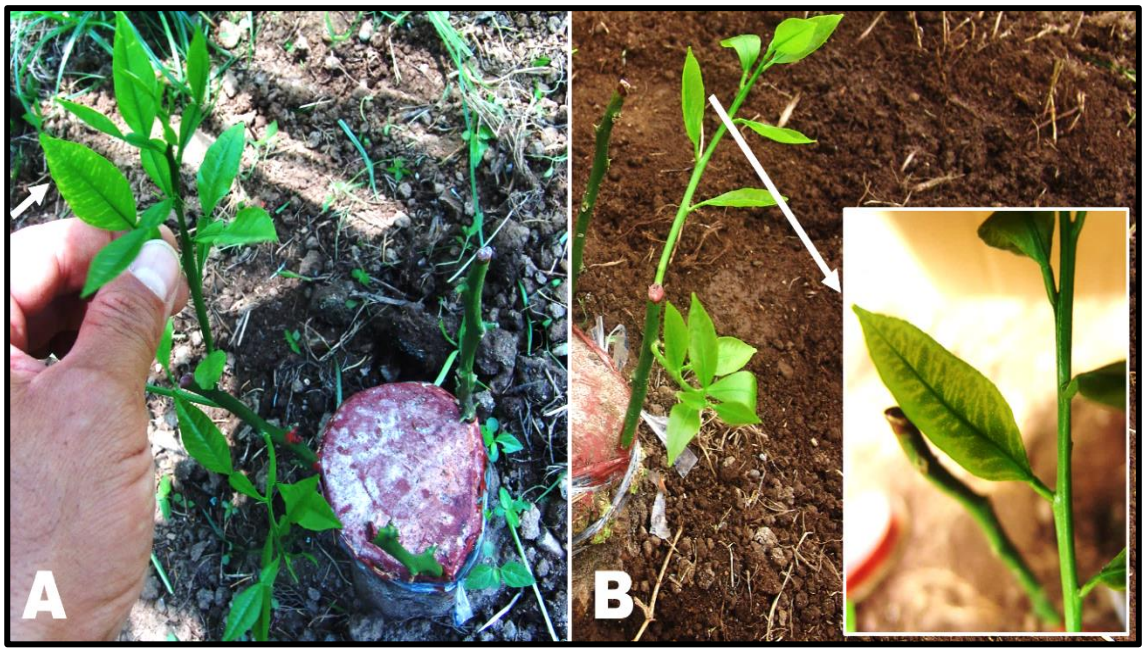
پس از انجام پیوند تاجی ارقام حساس نارنج و لمون از منشأ گیاهان عاری از ویروس بر روی تنه کف‌بر شده درختان دارای علائم بیماری رگبرگ روشنی زرد، چنین علائمی در برگ‌های جست اولیه برآمده از ارقام پیوند شده نیز پدیدار گشت (شکل ۳).

آزمون انتقال مکانیکی

یک هفته پس از انتقال سه جدایه ایرانی ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات به برگ‌های جوان محک لوبیا با کمک پودر کاربوراندوم در شرایط

1- Out group

گلخانه، علائم سیستمیک چروکیدگی و تغییر شکل برگ‌ها بر خلاف گیاهان شاهد مایه‌زنی شده با بافر استخراج، در گیاهان آلوده شده با عصاره گیاهی مشاهده شد (شکل ۴).



شکل ۳- علائم بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات در ارقام نارنج (A) و لمون (B) پس از پیوند تاجی روی تنه کف‌بر شده درختان دارای علائم

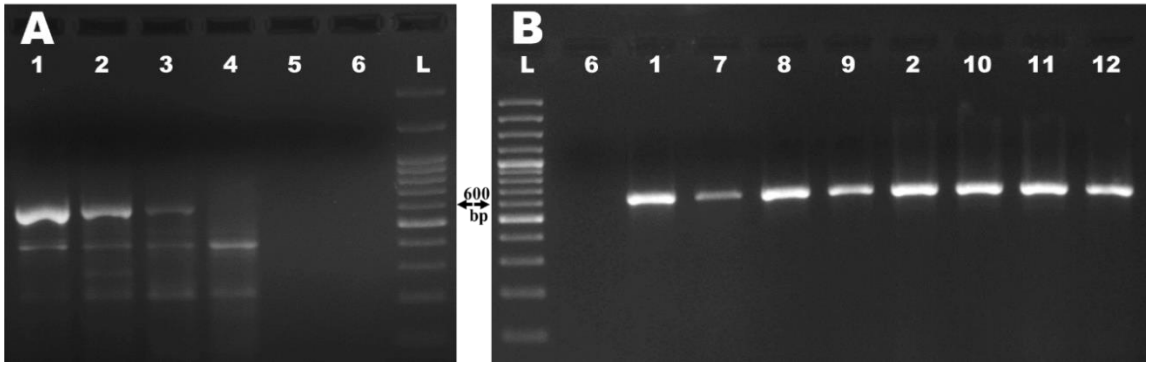
Figure 3. Typical symptoms of citrus yellow vein clearing disease on the leaves of sour orange (A) and lemon (B) varieties after top work grafting on the symptomatic trees

شکل ٤- برگ گیاه شاهد (A) در مقایسه با برگ‌های چروکیده و تغییرشکل‌یافته بوته‌های لوبیا پس از مایه‌زنی با جدایه‌های ایرانی نارنج (B)، لمون (C) و پرشین‌لایم (D) ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات

Figure 4. Leaves of healthy plant (A) compared to wrinkled and deformed leaves of bean plants inoculated with Iranian CYVCV isolates of SOU (B), LEN (C), and LIE (D)

شناسایی مولکولی

آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای ژن پروتئین پوششی ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات، قطعه مورد انتظار با اندازه ۶۱۴ جفت باز را در آران‌اهای استخراج شده از بافت پوست و برگ‌های جوان جست‌های بهاره درختان دارای علایم نارنج، لمون و پرشین لایم، تکثیر کرد. چنین باندی در عصاره گیاهان شاهد بدون علائم و نمونه‌های فاقد الگوی آرانا و دی‌انا مکمل مشاهده نشد (شکل 5A). به منظور حذف باندهای اضافی، دمای مرحله اتصال تا ۵۷ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و با این شیوه آلودگی به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات پس از آزمون‌های انتقال در شرایط گلخانه (شکل 5B) و باغ نیز مورد تأیید قرار گرفت. ردیابی ویروس همواره در برگ‌های جوان دارای علائم نمونه‌های جمع‌آوری شده از استان مازندران با استفاده از آزمونRT-PCR امکان‌پذیر بود. در حالی‌که در آزمون RT-PCR با استفاده از آرانا استخراج شده از برگ‌های مسن یا بدون علائم درختان بیمار، تکثیری صورت نگرفت و یا قطعات تکثیریافته به هنگام الکتروفورز افقی، باندهای ضعیفی در ژل آگارز ایجاد کردند.

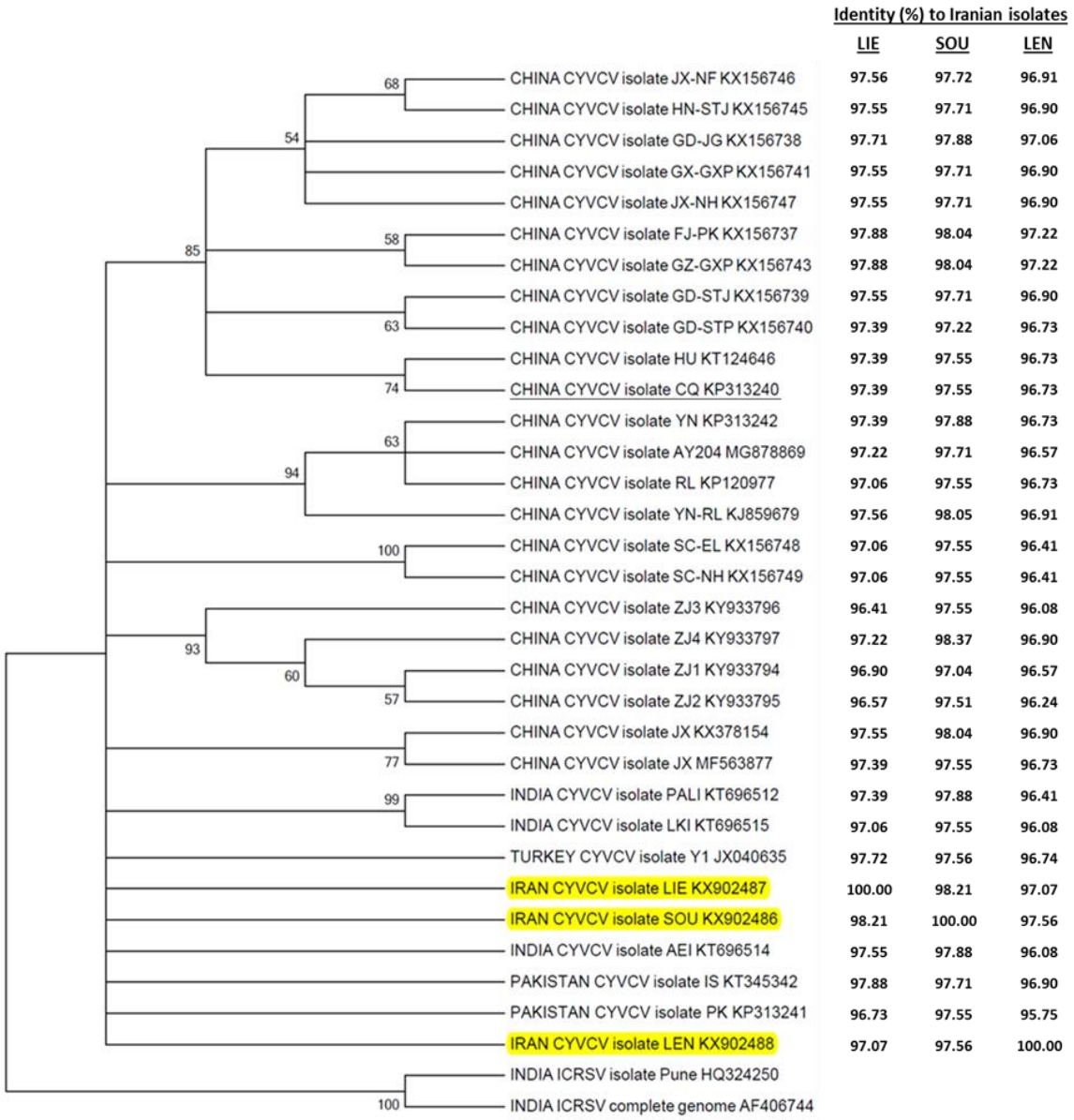


شکل ۵- الکتروفورز نتایج آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات در تشخیص سه جدایه مورد بررسی (A) و تأیید آلودگی پس از آزمون انتقال با پیوند (B). چاهک‌ها: ۱- جدایه نارنج SOU، ۲- جدایه لمون LEN، ۳- جدایه پرشین‌لایم LIE، ٤- گیاهچه نارنج عاری از ویروس، ٥- کنترل فاقد الگوی آران‌ا، ٦- کنترل فاقد الگوی دی‌ان‌ا مکمل، ۷ الی ۹- گیاهان محک نارنج آلوده شده، ۱۰ الی ۱۲- نهال‌های محک لمون اورکا آلوده شده، L- نشانگر با اندازه ۱۰۰ جفت باز (GeneRuler, Thermo Scientific)

Figure 5. Detection of three isolates of *Citrus yellow vein clearing virus* by RT-PCR using specific primers (A) and confirming the infection by the virus after graft transmission (B). Lanes: 1. SOU isolate, 2. LEN isolate, 3. LIE isolate, 4. virus-free sour orange seedling, 5. RT control, 6. PCR control, 7 to 9. Infected sour orange indicators, 10 to 12. Infected lemon indicators, L. 100 bp DNA ladder (GeneRuler, Thermo Scientific)

توالی‌یابی مستقیم قطعه تکثیر شده در واکنش RT-PCR از سه جدایه SOU، LEN و LIE از میزبان‌های نارنج، لمون و پرشین لایم انجام شد و به ترتیب تحت رس‌شمارهای KX902486، KX902487 و KX902488 در بانک ژن به ثبت رسید (Bani Hashemian and Aghajanzadeh, 2017). ترادف‌های حاصل با استفاده از موتور جستجوی بلاست با توالی‌های اسید نوکلئیک موجود در این بانک مقایسه شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که این توالی‌ها با موقعیت ۶۱۷۷ تا ۶۷۸۸ از ترادف کامل جدایه مرجع ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات (جدایه CQ) متناظرند و ۹۶/۷۳ تا ۹۷/۵۵ درصد با آن شباهت دارند. همچنین ۹۵/۷۵ تا ۹۸/۳۷ درصد تشابه بین جدایه‌های ایرانی سایر جدایه‌های ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات از چین، هند، پاکستان و ترکیه مشاهده شد (شکل ۶). درخت

تبارزایی بر اساس ۶۱۴ نوکلئوتید از ژن پوشش پروتئینی، سه جدایه SOU، LEN و LIE را با دو جدایه از هند و ترکیه و دو جدایه پاکستانی در یک گروه قرار داد (شکل ۶).



شکل ٦- درخت تبارزایی اسید نوکلئیک به روش Neighbor joining (با ارزش بوت استرپ بالاتر از ۵۰ درصد) جدایه‌های ایرانی ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات با توالی جدایه‌های مشابه در بانک ژن در دامنه همپوشانی ۹۹ و ۱۰۰ درصد با استفاده از نرم‌افزار MEGA X. مقادیر بوت استرپ (٪) بر اساس ۱۰۰۰ تکرار در گره ها نشان داده شده است. کشور مبدا، نام جدایه، رس‌شمار، جدایه‌های ایرانی و مرجع مشخص شده‌اند. دو جدایه ویروس لکه حلقوی هندی مرکبات (ICRSV) به عنوان برون‌گروه در نظر گرفته شدند.

Figure 6. Condensed neighbor joining phylogenetic tree (50% bootstrap value level) of NCBI nucleotide sequences of the coat protein of isolates similar to Iranian isolates of *Citrus yellow vein clearing virus* at query cover of 99 and 100%. The analysis was conducted with the MEGA X program. Bootstrap values (%) based in 1000 replications are shown at the nodes. The country of origin, name of isolate, accession number, Iranian and reference sequences are indicated. Two isolates of ICRSV are considered as outgroup.

بحث

رگبرگ روشنی زرد مرکبات، بیماری ویروسی خطرناکی است که به جز در تعدادی از کشورهای جنوب آسیا هنوز به سایر مناطق مهم کشت مرکبات دنیا راه نیافته است. اگرچه بیش از سی سال از مشاهده اولین موارد بیماری در پاکستان می‌گذرد (Catara et al., 1993)، ولی اهمیت آن زمانی مشخص شد که در کشورهای آسیایی تأثیرگذار از نظر تولید لیمو در جهان همه‌گیر شد. در ترکیه، وقوع این بیماری ابتدا در سال ۲۰۰۰ در ناحیه چوکوروا[1] (Önelge, 2002) و سپس گسترش سریع آن به سایر مناطق در سال ۲۰۱۰ گزارش گردید (Önelge et al., 2010). در این مناطق، درختان آلوده محصول کمتر و میوه‌های ریزتری تقریباً به اندازه نصف میوه درختان سالم تولید می‌کنند (Önelge et al., 2011a). بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات در سال ۲۰۰۹، ابتدا در یکی از استان‌های چین مشاهده و کاهش محصول ناشی از آن در حدود ۲۰٪ کل محصول ارزیابی گردید (Chen et al., 2014). اما پس از مدتی، آلودگی تمام ۱۱ استان مهم کشت مرکبات این کشور را فرا گرفت و صنعت لیموترش با کاهش تولید ۵۰ تا ۷۰ درصدی در اثر این بیماری مواجه شد (Zhou et al., 2017; Liu et al., 2019).

در ایران، گسترش علائم رگبرگ روشنی زرد مرکبات برای اولین بار در غرب مازندران مشاهده شد (Bani Hashemian and Aghajanzadeh, 2017). به طور قطع ضعف قرنطینه و جابجایی مواد گیاهی آلوده، راه اصلی ورود بیماری‌های گیاهی به کشور و متعاقبا استان‌های مختلف است. وقوع ویروس تریستزا در ایران به عنوان مثال ابتدا در نهال‌های نارنگی انشو (*C. unshiu* Marc.) وارداتی از ژاپن در باغی در ساری به اثبات رسید (Ebrahim-nesbat and Nienhouse, 1978). گیاهان آلوده به تریستزا سپس در بین نهال‌های مرکبات انتقال یافته از مبدأ نهالستان‌های شرق استان مازندران به غرب این استان یا تکثیر شده با پیوندک آلوده از آن مناطق شناسایی شد (Tarviji et al., 2012). انتقال ویروس تریستزا به دو استان مجاور مازندران، یعنی گیلان و گلستان نیز به روش مشابه متصور است (Nasrollanejad et al., 2012; Zafari et al., 2013). به همین شیوه و در فقدان سیستم کارآمد تولید و توزیع نهال سالم، ویروئیدها و سایر عوامل بیماری‌زای قابل انتقال با پیوند نیز در مناطق شمالی و جنوبی کشت مرکبات کشور گسترش یافته‌اند (Bani Hashemian, 2012; Bani Hashemian et al., 2013).

در مطالعه حاضر علاوه بر اطمینان از ماهیت ویروسی بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات از طریق انجام آزمون انتقال در شرایط باغ (شکل ۲)، قابلیت انتقال مکانیکی جدایه‌های ایرانی ویروس عامل بیماری نیز به اثبات رسید و مشابه تحقیق انجام شده در ترکیه (Önelge et al., 2011b)، پس از تلقیح عصاره گیاهی از مرکبات به لوبیا، علائم سیستمیک به دست آمد (شکل ۴). نمودهسازی بیولوژی ابزاری قدرتمند در تشخیص بیماری‌های ویروسی و شبه‌ویروسی مبتنی بر آلوده‌سازی گیاهان محک با پیوند و مشاهده علائم در آنها است. این روش اگرچه به فضای گلخانه‌ای با قابلیت کنترل دمایی و افراد آموزش‌دیده نیاز دارد و برای بررسی حجم زیاد نمونه‌ها قابل استفاده نیست، اما همچنان بخشی جدانشدنی از مرحله ارزیابی سلامت منابع مادری و هسته‌های اولیه تکثیری مرکبات را تشکیل می‌دهد (Roistacher, 1991). محک‌ها حساس‌ترین گیاهان شناخته‌شده از نظر تکثیر و بروز علائم برای ویروس‌های معین هستند و غلظت ویروس در آنها به شدت افزایش می‌یابد. بر اساس اطلاعات موجود، نارنج و لمون رقم اورکا بهترین میزبان‌های ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات در بین مرکبات هستند. آزمون بیولوژی با کمک این گیاهان محک در این بررسی با موفقیت به کار رفت و پس از انتقال ویروس با پیوند، علائم مشخص بیماری در آنها

1- Çukurova

ظاهر گردید (شکل ۱). ضمن اینکه حضور ویروس در این گیاهان با آنالیز مولکولی هم مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۵). بر اساس نتایج این تحقیق، آزمون RT-PCR با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی ژن پروتئین پوششی YVCPf/YVCPr (Chen et al., 2014)، تکنیک مناسبی برای ردیابی مستقیم ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات در نمونه‌های باغی است مشروط به این که استخراج آرانا از بافت‌های جوان دارای علائم انجام پذیرد. با این شیوه نمونه‌برداری هدفمند، به جای روش‌های گران قیمت استخراج آرانا، می‌توان حتی از انواع ساده و کم‌هزینه مانند SDS-Potassium acetate (Bernad et al., 2006) نیز استفاده نمود. مقایسه توالی قطعه تکثیر شده از ژن پوشش پروتئینی ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات با سایر جدایه‌های بانک ژن نشان داد که تنوع ژنتیکی کمی بین جدایه‌های مختلف وجود دارد. این موضوع با نتایج تحقیق دیگری در زمینه ویژگی‌های مولکولی جدایه‌های مختلف جغرافیایی و میزبانی این ویروس (Zhou et al., 2017) منطبق است. مطالعه تبارزایی در این بررسی همچنین مشخص نمود که جدایه‌های ایرانی نسبت به جدایه‌های چینی، قرابت بیشتری با جدایه‌های پاکستان، هند و ترکیه دارند (شکل ۶) که می‌تواند بیانگر تبادل مواد گیاهی آلوده بین کشورهای منطقه باشد.

بررسی حاضر همچنین نشان داد که رگبرگ روشنی زرد حداقل در شمال کشور وجود دارد. به استناد بازدیدهای انجام شده، وقوع این ویروس به جز در استان گیلان، در سایر مناطق ایران هنوز مورد تائید قرار نگرفته است (نتایج منتشر نشده). با در نظر گرفتن شیوه‌های مختلف انتقال ویروس و پتانسیل بالای خسارت‌زایی رگبرگ روشنی زرد مرکبات (Liu et al., 2019)، تأکید بر مدیریت بیماری بسیار حائز اهمیت است. لمون و پرشین‌لایم، دو رقم حساس به رگبرگ روشنی زرد به حساب می‌آیند. خطر سرایت بیماری به استان‌های جنوبی کشور از طریق پیوندک و نهال آلوده لمون و پرشین‌لایم که به عنوان ارقام متحمل به بیماری جاروک معرفی شده‌اند (Salehi et al., 2005) بسیار محتمل است. با این دیدگاه، تهدید گسترش و خسارت این بیماری در ایران پیشتر مورد تاکید قرار گرفت (Bani Hashemian, 2018). پیشگیری از گسترش بیماری به کانون‌های جدید با تولید و عرضه پیوندک و نهال سالم و نظارت مستمر بر نهالستان‌ها که تنها روش مدیریت بیماری به استناد اطلاعات موجود است (Zhou et al., 2017) به صورت جدی باید مورد توجه قرار گیرد.

سپاس‌گزاری

پروژه حاضر در قالب طرح مصوب موسسه علوم باغبانی با عنوان تعیین روش‌های تشخیص و انتقال ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات درایران به انجام رسیده است. نویسندگان مراتب سپاس و تشکر خود را از استاد فقید یونس ابراهیمی جهت مشاوره و ارسال نمونه، دکتر حسین طاهری و مهندسین سیده نجمه بنی‌هاشمیان، ایمان جوربنیان، محمد حسن رستگار، رضا مقصودی و حسن زیتونی به علت همکاری در آزمون‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای و ترسیم درخت تبارزایی اعلام می‌دارند.

REFERENCES

Alshami, A.A.A., Ahlawat, Y.S., and Pant, R.P. 2003. A hitherto unreported yellow vein clearing disease of citrus in India and its viral etiology. Indian Phytopathology, 56 (4): 422-427.

Bani Hashemian, S.M. 2012. Current situation of virus and virus-like diseases of citrus trees. 6th Iranian congress of virology, Tehran, Iran. P. 113.

Bani Hashemian, S.M., Taheri, H., Alian, Y.M., Bové, J.M., and Durán-Vila, N. 2013. Complex mixtures of viroids identified in the two main citrus growing areas of Iran. Journal of plant pathology, 95: 647-654.

Bani Hashemian, S.M., and Aghajanzadeh, S. 2017. Occurrence of *Citrus yellow vein clearing virus* in citrus species in Iran. Journal of Plant Pathology, 99 (1): 290.

Bani Hashemian, S.M. 2018. Citrus yellow vein clearing disease, a new threat for citriculture of Iran. Proceedings of the 23rd Iranian Plant Protection Congress, Gorgan, Iran. P. 626-627.

Bernad, L., and Durán-Vila, N. 2006. A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. Molecular and cellular probes, 20 (2): 105-113.

Catara, A., Azzaro, A., Davino, M., and Polizzi, G., 1993. Yellow vein clearing of lemon in Pakistan. Proceedings of the 12th International Organization of Citrus Virologists Conference, New Delhi, India. P. 364-367.

Chen, H.M., Li, Z.A., Wang, X.F., Zhou, Y., Tang, K.Z., Zhou, C.Y., Zhao, X.Y., and Yue, J.Q. 2014. First report of *Citrus yellow vein clearing virus* on lemon in Yunnan, China. Plant Disease, 98 (12): 1747.

Ebrahimi, Y., and Nematollahi Sani, S. 2003. Top working is a suitable method for improving citrus orchards in northern Iran. Extensional publication of Iran Citrus Research Institute, Ministry of Jihad Agriculture (In Farsi).

Ebrahim-Nesbat, F., and Nienhouse, F. 1978. Occurrence of *Citrus tristeza virus* in Iran. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, 85: 308-312.

FAOSTAT. 2018. Crop statistics of Food and Agriculture Organization. Retrieved December 12, 2019, from http://www.fao.org/faostat.

Grimaldi, V., and Catara, A. 1996. Association of a filamentous virus with yellow vein clearing of lemon. Proceedings of the 13th International Organization of Citrus Virologists Conference, Fouzhou, China. P. 343-345.

Liu, Y., Wang, Y., Wang, Q., Zhang, Y., Shen, W., Li, R., Cao, M., Chen, L., Li, X., Zhou, C., and Zhou, Y. 2019. Development of a sensitive and reliable reverse transcription droplet digital PCR assay for the detection of *Citrus yellow vein clearing virus*. Archives of virology, 164 (3): 691-697.

Loconsole, G., Önelge, N., Potere, O., Giampetruzzi, A., Bozan, O., Satar, S., De Stradis, A., Savino, V., Yokomi, R.K., and Saponari, M. 2012. Identification and characterization of *Citrus yellow vein clearing virus*, a putative new member of the genus *Mandarivirus*. Phytopathology, 102 (12): 1168-1175.

Önelge, N. 2002. First report of yellow vein clearing of lemons in Turkey. Journal of Turkish Phytopathology, 32: 53-55.

Önelge, N., Bozan, O., Gök, M., and Satar, S. 2010. Yellow vein clearing of lemons in Turkey. Proceedings of the 17th International Organization of Citrus Virologists Conference, Adana, Turkey. P. 227-228.

Önelge, N., Satar, S., Elibüyük, Ö., and Bozan, O. 2011a. *Citrus yellow vein clearing virus*: A new aphid-transmitted citrus virus. Citrograph, 1: 22-24.

Önelge, N., Satar, S., Elibüyük, Ö., Bozan, O., and Kamberoolu, M. 2011b. Transmission studies on *Citrus yellow vein clearing virus*. Proceedings of the 18th International Organization of Citrus Virologists Conference, Sao Paulo, Brazil. P. 11-14.

Nasrollanejad, S., Ziyarat, M.A., and Fakhrabad, F.Z. 2012. The determination of *Citrus tristeza virus* strains in the North of Iran. International Journal of Agriculture and Crop Sciences, 4 (22): 1714-1719.

Roistacher, C.N. 1991. Graft-transmissible diseases of citrus: Handbook for detection and diagnosis. FAO publications, Rome.

Salehi, M., Nejat, N., Tavakkoli, A.R., and Izadpanah, K., 2005. Reaction of citrus cultivars to *Candidatus* phytoplasma aurantifolla in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology, 41: 363-376 (In Farsi with English summary).

Tarviji, M., Bani Hashemian, S.M., Elahinia, S.A., and Ebrahimi Moghaddam, L. 2012. Biological and molecular characterization of two *Citrus tristeza virus* isolates obtained from west part of Mazandaran province. Proceeding of the 20th Iranian Plant Protection Congress. Shiraz, Iran. P. 888.

Zafari, H., Bani Hashemian, S.M., Ruhibakhsh, A., and Bahri, B. 2013. First report of *Citrus tristeza virus* from Guilan province. Iranian Journal of Plant Pathology, 49: 175-176 (In Farsi with English summary).

Zhang, Y., Wang, Y., Wang, Q., Cao, M., Zhou, C., and Zhou, Y. 2018. Identification of *Aphis spiraecola* as a vector of *Citrus yellow vein clearing virus*. European Journal of Plant Pathology, 152 (3): 841-844.

Zhang, Y.H., Liu, C.H., Wang, Q., Wang, Y.L., Zhou, C.Y., and Zhou, Y. 2019a. Identification of *Dialeurodes citri* as a vector of *Citrus yellow vein clearing virus* in China. Plant disease, 103 (1): 65-68.

Zhang, Y., Liu, Y., Wang, Y., Wang, Q., He, S., Li, X., and Zhou, Y. 2019b. Transmissibility of *Citrus yellow vein clearing virus* by contaminated tools. Journal of Plant Pathology, 101 (1): 169-171.

Zhou, Y., Chen, H.M., Wang, X.F., Li, Z.A., Tang, M., and Zhou, C.Y. 2015. Lack of evidence for seed transmission of *Citrus yellow vein clearing virus* despite its frequent detection in seed tissues. Journal of Plant Pathology, 97: 1-3.

Zhou, Y., Chen, H.M., Cao, M.J., Wang, X.F., Jin, X., Liu, K.H., and Zhou, C.Y. 2017. Occurrence, distribution, and molecular characterization of *Citrus yellow vein clearing virus* in China. Plant disease, 101 (1): 137-143.

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Identification of *Citrus yellow vein clearing virus* in Mazandaran province

S. M. Bani Hashemian[1*] and S. Aghajanzadeh[2]

1. *__Corresponding Author:__ Assistant Professor of Plant Pathology, Citrus and Subtropical Fruits Research Center, Horticultural Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Ramsar, Iran (m.banihashemian@areeo.ac.ir)

2. Associate Professor of Agricultural Entomology, Citrus and Subtropical Fruits Research Center, Horticultural Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Ramsar, Iran

(DOI): 10.22055/PPR.2020.15997

Received: 15 August 2020 Accepted: 28 October 2020

Abstract

Background and Objectives

Citrus yellow vein clearing virus (CYVCV), a new member of the genus *Mandarivirus* (family *Alfafelxiviridae*), has been recently reported from Iran after being recognized in Pakistan, India, Turkey and China. Typical symptoms of infection on the leaves of sour orange, lemon and Persian lime, as local sensitive hosts, consist of yellowing lateral veins with corresponding water-soaked appearance on the lower surface of the leaves. Biological and molecular detection, some modes of transmission and phylogenetic analysis of CYVCV isolates of Mazandaran province have been investigated in the present study.

Materials and Methods

Typical induced symptoms by CYVCV infection; namely yellowing and water soaking of the lateral veins, was considered as the initial criterion for diagnosis of the disease within seedlings and trees of sour orange, lemon and Persian lime cultivars in nurseries and orchards in Mazandaran province. Three isolates, out of 53 samples, were selected for more analysis from the region collected during the spring of 2016, 2017, and 2018. Inoculation of these isolates into bean plants, sour oranges and lemons were performed using mechanical and grafting methods under greenhouse conditions with controlled temperatures. In order to confirm the infection, total RNA of the collected samples and the inoculated plants were extracted by the SDS-Potassium acetate method. A two-step Reverse Transcription Polymerase chain reaction (RT-PCR) was carried out using a specific primer pair of the virus coat protein (CP) gene.

Results

Characteristic symptoms of the disease were expressed after top-work grafting of the susceptible virus-free orchard cultivars on the trunks of diseased trees. Using specific primer pair in RT-PCR, an expected 614 bp fragment was amplified in symptomatic samples. The consensus sequences, obtained from direct sequencing the PCR products of the studied isolates based on forward and reverse specific primes, were similar to the sequences of other CYVCV isolates of China, India, Pakistan and Turkey at the level of

95.75 to 98.37%. A phylogenetic tree of this part of the genome, grouped Iranian isolates with two isolates from India and Turkey and two Pakistani isolates.

Discussion

The present study confirmed the presence of *Citrus yellow vein clearing virus* in the north of the country. Lemon and Persian lime are the two most important susceptible hosts of the virus. These citrus varieties are also valuable cultivars in the south of the country and are considered tolerant genotypes to Witches' broom disease, which is prevalent in these areas. Preventing the spread of the yellow vein clearing disease to the new infection foci by continuous monitoring of the citrus nurseries should be seriously considered.

Keywords: Citrus yellow vein clearing virus, Lemon, Persian lime, Sour orange