



گیاه پزشکی (مجله علمی کشاورزی)

جلد ۴۴، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۰

doi 10.22055/ppr.2021.17131

ارزیابی حساسیت ده رقم مرکبات به "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" عامل

فرم آسیایی بیماری هوانگ لونگ بینگ مرکبات

شیوا صفرپور کپورچالی^۱، علی علیزاده علی آبادی^{۲*}، محمد مهدی فقیهی^۳، سعیده رجایی^۴ و مزده ملکی^۵

۱- دانشجوی دکتری تخصصی بیماری شناسی گیاهی، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی ایران، ورامین، تهران، ایران

۲- *نویسنده مسوول: دانشیار بخش تحقیقات گیاه پزشکی، موسسه تحقیقات گیاه پزشکی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران (aalizadeh1340@yahoo.com)

۳- استادیار بخش تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، زرقان، ایران

۴- استادیار پژوهشکده صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی، تهران، ایران

۵- استادیار گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی ایران، ورامین، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۰۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۰۳

چکیده

بیماری هوانگ لونگ بینگ ($Huanglongbing = HLB$) یا میوه سبز مرکبات از نظر اقتصادی خسارت زاترین بیماری مرکبات در دنیا می باشد و بیش از یک دهه است که از جنوب ایران نیز گزارش شده است. تاکنون روش درمان قطعی برای این بیماری شناخته نشده است. با وجود این، یکی از موثرترین راه های مدیریت این بیماری، یافتن ارقامی است که از مقاومت نسبی یا تحمل بالایی در برابر این بیماری برخوردار هستند. در این پژوهش واکنش نهال های سه ساله ده رقم و پایه تجاری مرکبات نسبت به عامل فرم آسیایی بیماری *Candidatus Liberibacter asiaticus* HLB، از طریق مایه زنی با پیوند بررسی شد. پس از مایه زنی، ردیابی *Ca. L. asiaticus* با استفاده از روش های پی سی آر معمولی و آشیانه ای، با کاربرد آغازگرهای اختصاصی باکتری، در فواصل زمانی دو ماهه انجام و نیز اولین ظهور علائم بیماری، در نهال های مایه زنی شده یادداشت شد. سپس، بر اساس میانگین تعداد روزها تا اولین ردیابی *Ca. L. asiaticus* با پی سی آر و نیز دوره کمون بیماری، حساسیت و تحمل نسبی نهال ها به HLB مشخص شد. براساس نتایج به دست آمده، لیمو ترش مکزکی و لیمولیسون بیشترین تحمل و پرتقال والنسیا و اورلاندو تانجلو بیشترین حساسیت را در برابر این بیماری داشتند. نهال های نارنج و لیموشیرین حساسیت متوسطی به بیماری داشتند و گریپ فروت، پرتقال محلی، نارنگی محلی و نارنگی کینو، بعد از پرتقال والنسیا و اورلاندو تانجلو، در درجه دوم حساسیت قرار گرفتند. نتایج این مطالعه برای انتخاب پایه ها و ارقام مناسب تر در مناطق آلوده به بیماری HLB و مدیریت بهتر بیماری می تواند مفید باشد.

کلیدواژه ها: مقاومت، تحمل، پی سی آر، دوره کمون، میوه سبز مرکبات.

دبیر تخصصی: دکتر رسول رضایی

Citation: Safarpour Kapourchali, S., Alizadeh Aliabadi, A., Faghihi, M. M., Rajaei, S., & Maleki, M. (2022). Evaluation of ten citrus cultivars' susceptibility to "*Candidatus Liberibacter asiaticus*", the causal agent of the Asian form of citrus Huanglongbing. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 44(4): 1-18. <https://doi.org/10.22055/ppr.2021.17131>

مقدمه

بیماری هوانگ لونگ بینگ^۱ که قبلاً به نام میوه سبز یا گرینینگ مرکبات^۲ نیز شناخته می‌شد، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مرکبات در مناطق مرکبات خیز دنیا است. این بیماری برای اولین بار در اواخر قرن نوزدهم در چین مشاهده و هوانگ لونگ بینگ (که به معنای زردی شاخساره و در زبان محلی به معنای اژدهای زرد است) نام گرفت. سپس، در سال ۱۹۲۸ در آفریقای جنوبی مورد توجه قرار گرفت و گرینینگ نامیده شد و به مرور از سایر کشورهای آسیایی و آفریقایی گزارش گردید. تا این که در سال ۲۰۰۴ در برزیل روی درخت پرتقال (Coletta-Filho et al., 2004) و یک سال پس از آن از روی پوملو (درخت دارابی)^۳ در فلوریدا گزارش شد (Halbert, 2005; Bove, 2006; Da Graça, 2008). هم‌اکنون این بیماری در باغات مرکبات تمامی قاره‌های دنیا وجود دارد و هر ساله خساراتی را به باغداران وارد می‌کند. عامل بیماری غیرقابل کشت است و باکتریایی بودن عامل این بیماری پس از مشاهده سلول‌هایی با دیواره سلولی شامل غشای سیتوپلاسمی و غشای خارجی و یک لایه پپتیدوگلیکانی در بین آنها، به اثبات رسید (Garnier & Bové, 1977; Garnier et al., 1984a). عامل بیماری یک باکتری سخت کشت است و سه گونه مهم عامل بیماری هوانگ لونگ بینگ در دنیا شامل *Candidatus Liberibacter asiaticus* Jagoueix et al., 1994 *Candidatus Liberibacter africanus* (CLas) و *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam) Jagoueix et al., 1994 می‌باشند که به ترتیب عامل فرم‌های آسیایی، آفریقایی و آمریکایی بیماری هستند (Jagoueix et al., 1994; Teixeira et al., 2005a). تاکنون بیش از ۴۰ گونه از گیاهان خانواده مرکبات و برخی تیره‌های دیگر

به عنوان میزبان سه گونه "*Ca. Liberibacter*" گزارش شده است. گونه *Ca. L. asiaticus* مهم‌ترین گونه عامل بیماری HLB در دنیا و از جمله ایران محسوب می‌شود (Bove, 2006; Da Graça et al., 2015).

ناقل این بیماری دو گونه از پسیل‌ها هستند، باکتری *Diaphorina citri* Kuwayama و باکتری *CLaf* توسط پسیل آفریقایی مرکبات *Trioza erythrae* Del Guercio منتقل می‌شود (Alizadeh Aliabadi, 2009). تحمل *CLaf* و ناقلش به درجه حرارت‌های بالای ۲۶ درجه سلسیوس، کم است، در صورتی که *CLas* و ناقلش درجه حرارت‌های بالا را نیز تحمل می‌کند. این حقیقت که *CLaf* به همراه ناقل آن هردو حساس و *CLas* و ناقلش هردو متحمل به حرارت‌های بالا هستند، نشان دهنده سازگاری و تکامل همراه عامل و ناقل مربوطه می‌باشد. پسیل آسیایی مرکبات حدود ۶۰ سال است که در برزیل حضور دارد و در فلوریدا از سال ۱۹۹۸ دیده شده است. ولی بیماری HLB تقریباً هم‌زمان در هر دو نقطه گزارش شد. این پسیل در سال ۲۰۰۱ از تگزاس (French, et al., 2001) و در سال ۲۰۰۴ از چند کشور حوزه کارائیب گزارش شد (Bové et al., 1974; Halbert & Nunez, 2004; Alizadeh Aliabadi, 2009).

در حال حاضر *CLas* گونه غالب عامل بیماری HLB در مرکبات برزیل و ایالات متحده است. در برزیل، جایی که زمانی *CLam* گونه غالب و اصلی بود، امروزه در حد بسیار کمی یافت می‌شود. به نظر می‌رسد یکی از دلایل کاهش شدید شیوع *CLam* در برزیل، پایین بودن غلظت آن در بافت درختان مرکبات است، که احتمال دستیابی و انتقال آن توسط پسیل آسیایی مرکبات را کاهش می‌دهد (Gabriel et al., 2020).

1- Huanglongbing = HLB
2- Citrus greening
3- *Citrus grandis* (pomelo)

2009). سپس، بیماری از سایر مناطق مرکبات خیز جنوب کشور و همچنین در استان‌های کرمان و فارس گزارش گردید (Alizadeh Aliabadi et al., 2010; Mohkami et al., 2011; Salehi et al., 2012).

مطالعات گسترده‌ای از سال ۲۰۰۷ برای تعیین پراکنندگی این بیماری در ایران صورت گرفت و گزارش آن منتشر شد (Alizadeh Aliabadi et al., 2013). در خلال این مدت باکتری CLas در بدن نمونه‌های جمع‌آوری شده از پسیل آسیایی مرکبات نیز ردیابی شد (Alizadeh Aliabadi & Ghasemi, 2018). ضمناً نحوه مدیریت این بیماری (تعیین پراکنندگی عامل بیماری و ناقل آن و نحوه مبارزه شیمیایی، بیولوژیکی و فیزیکی با آنها) نیز مورد بررسی قرار گرفته است (Alizadeh Aliabadi, 2016; Moghbeli Gharaei et al., 2018). برخی از توصیه‌های فنی و ترویجی نیز در این مورد منتشر شد (Alizadeh Aliabadi, 2017a; 2017b; 2017c and 2017d) و جنبه‌های مولکولی این بیماری نیز بررسی شده است (Ghayeb zamharir et al., 2014a; Ghayeb zamharir et al., 2014b; Hamzeh et al., 2014; Gholampour et al., 2014).

تنها راه برای کاشت و داشت مرکبات با تولید بالا، در کشورهایی که این بیماری شیوع دارد، مدیریت بیماری با استفاده از راه‌بردهای مدیریت تلفیقی است. شامل: ۱- تهیه نهال سالم از نهالستان‌های عاری از آلودگی به منظور پیش‌گیری از گسترش آلودگی به درختان مناطق غیر آلوده، ۲- تمرکز روی کاهش مایه آلودگی اولیه با حذف درختان و یا شاخه‌های آلوده و ۳- کنترل ناقلین و نگاه‌داری جمعیت پسیل در پائین‌ترین سطح ممکن، است.

اکثر گونه‌های جنس مرکبات میزبان HLB هستند. پرتقال، نارنگی، لیموشیرین، نارنج و گریپ‌فروت از حساسیت بیشتری نسبت به لیموترش مکزیکی، رنکپور،

علائم کلی در درختان تازه آلوده شده علائم "شاخه‌زردی" است. معمولاً به صورت یک شاخه با برگ‌های زرد در داخل درختی که بقیه شاخه‌های آن سبز معمولی است، مشاهده می‌شود (McClellan, 1970). علائم روی برگ به صورت سایه‌روشن‌هایی از زرد، سبزرشدن و سبزینه در طیف‌های مختلف روی یک برگ ظاهر می‌شود و به آن حالت موزاییک مانند یا پیسک^۲ می‌دهد (Schneider, 1968). میوه‌های آلوده معمولاً کوچک، غیرقرینه، نامتقارن، غر شده با محور کج و بدوری عقیم هستند. در میوه‌های آلوده ابتدا قسمت مجاور دم‌میوه^۳ تغییر رنگ می‌دهد و منطقه مجاور گل‌گاه میوه، سبز باقی می‌ماند. میوه آلوده دارای بذور کوچک، پوک، چروکیده و قهوه‌ای متمایل به سیاه و عقیم هستند (McClellan & Schwarz, 1970; Alizadeh Aliabadi, 2009).

در حال حاضر بیماری HLB، صنعت مرکبات را در بسیاری از مناطق آسیا، آفریقا و آمریکا ویران کرده است. بیماری HLB به سرعت به فلوریدا، کالیفرنیا، لوئیزیانا، کارولینای جنوبی، جورجیا و تگزاس در ایالات متحده، گسترش یافته است (Halbert & Manjunath, 2004; Kumagai et al., 2012; da Graca et al., 2015).

بیماری گرینینگ مرکبات، فقط در ایالت فلوریدا، باعث خسارت بالغ بر ۷/۸ میلیارد دلار به محصول و کاهش بیش از ۷۰۰۰ شغل در یک دوره ۷ ساله (از ۲۰۰۷ تا ۲۰۱۴)، شده است (Hodges et al., 2015). در سال ۲۰۱۷، ایالت فلوریدا (با سطح زیرکشت تقریباً دوبرابر، نسبت به ایالت کالیفرنیا)، در میزان تولید پرتقال از ایالت کالیفرنیا عقب افتاده است. این آمار، نیاز فوری و ضروری برای مبارزه و از بین بردن این بیماری را، برای حفظ اقتصاد تولیدکنندگان مرکبات، به وضوح نشان می‌دهد.

بیماری HLB در سال ۲۰۰۹ از جنوب ایران در استان‌های سیستان و بلوچستان و هرمزگان گزارش شد (Faghihi et al.,

1- yellow shoot
2- blotchy mottle
3- peducular

مواد و روش‌ها

انتخاب و تهیه پایه‌ها و ارقام مرکبات

تعداد ده پایه و رقم تجاری مرکبات متداول در جنوب کشور، شامل لیموترش مکزیکی (لیموعمانی^۱)، *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle، نارنج^۲، *Citrus × aurantium* L.، نارنگی^۳، *Citrus reticulata* L. var محلی (سیاهو)، نارنگی کینو^۴، نارنگی اورلاندوتانجلوه^۵، *Citrus × tangelo* J. Ingram & H. Moore، پرتقال *Citrus × sinensis* Osbeck (L.)، محلی جنوب، پرتقال والنسیا *Citrus sinensis* [L.] Osbeck، لیموشیرین^۶، *Citrus dimetta* Risso، گریپ‌فروت *Citrus × paradise* Macfad و لیمولیسبون^۷ *Citrus limon* Osbeck (L.)، به صورت دانهال و نهال پیوندی (نارنج و لیموترش مکزیکی بذری و بقیه نهال‌ها با پایه لیموترش مکزیکی) و از هر کدام، سه اصله نهال تهیه و در شرایط گلخانه نگهداری شدند. تعداد سه اصله نهال سه‌ساله پرتقال والنسیای آلوده به HLB و دارای علائم مشخص این بیماری نیز برای تهیه پیوندک، از باغ‌های شهرستان داراب (حوالی جنت شهر) که در سال ۲۰۱۷ آلودگی آن تشخیص داده شده بود فراهم و در محلی جدا و دور از نهال‌های پیوندی نگهداری شد.

بررسی سلامت نهال‌های انتخاب‌شده برای پیوند و تهیه پیوندک:

نارنج و لیموترش مکزیکی به صورت بذری و سایر ارقام و گونه‌ها روی پایه لیموترش مکزیکی از نهالستانی معتبر و مورد تایید حفظ نباتات و مرکز تحقیقات کشاورزی (در خفر جهرم) خریداری و حدود شش ماه تا یک سال نگهداری شدند و پس از اطمینان از سلامتی نهال‌ها، با آزمون پی‌سی‌آر نیز عدم آلودگی آن‌ها به HLB با استفاده از جفت پرایمر A2J5 مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱).

کلماندین و دارابی، به این باکتری، برخوردارند (Wang et al., 2013).

به دنبال آلودگی درختان مرکبات به این بیماری، برای ظهور علائم، بسته به سن درخت درهنگام عفونت، ممکن است یک دوره طولانی از ماه‌ها تا سال‌ها لازم باشد. با این حال، درختان آلوده، اما بدون علائم، می‌توانند به عنوان منابع آلوده‌سازی سایر درختان، به کمک پسپل آسیایی مرکبات عمل کنند (Irey et al., 2006; Albrecht et al., 2014)، این امر، مشکل مدیریت این بیماری را سخت‌تر می‌کند. با پیشرفت بیماری HLB، درختان مرکبات به دلیل بازده کم همراه با کیفیت پایین میوه، ضعیف می‌شوند و در نهایت از نظر اقتصادی غیرقابل صرفه می‌شوند (Gottwald, 2010).

به نظر می‌رسد، موثرترین راه برای کاهش تأثیر HLB، یافتن ارقامی است که مقاوم و یا متحمل در برابر بیماری هستند. به طور کلی مشخص شده است که هیچ مقاومت واقعی در برابر این بیماری وجود ندارد. آلودگی انواع مرکبات از جمله پرتقال، گریپ‌فروت، لیمو، لایم، پوملو و نارنگی منجر به زوال آنها شده است (Bove, 2006; Gottwald, 2010). مرکبات محصولی است که به روش رویشی تکثیر می‌شود، بنابراین احتمال شناسایی مقاومت بالا به HLB در بین ارقام رایج مرکبات تجاری بعید به نظر می‌رسد. اگرچه اکثر انواع مرکبات پرورشی دارای علائم مرتبط با HLB هستند، اما به نظر می‌رسد برخی از انواع آن، به ویژه آن‌هایی که به عنوان پایه استفاده می‌شوند، کمتر از دیگران تسلیم HLB شده‌اند (Folimonova et al., 2009; Shokrollah et al., 2009; Stover & McCollum, 2011).

در این پژوهش واکنش ده رقم و پایه تجاری مرکبات به عامل فرم آسیایی بیماری HLB (CLas) از طریق مایه‌زنی با پیوند بررسی و حساسیت و تحمل نسبی آن‌ها نسبت به این بیماری تعیین شد.

5- Orlando tangelo

6- sweet lemon

7- 'Lisbon' lemons

1- Mexican lime

2- Bitter orange, sour orange

3- mandarin orange

4- Kinnow mandarin

۸۰ میکرولیتر آن -
 لوریل سارکوزین^۲ ۱۰ درصد به آن اضافه و کاملاً بهم زده
 شد. لوله‌های اپندورف به مدت یک ساعت در دمای ۵۵
 درجه سلسیوس نگهداری و سپس در ۴۰۰۰ g به مدت پنج
 دقیقه سانتریفوژ شدند. روشن‌ترین آن جمع‌آوری و ۰/۱۲۵
 حجم از نمک طعام پنج مولار و CTAB ۱۰ درصد در
 ۰/۷ مولار نمک طعام به آن اضافه گردید. مخلوط در دمای
 ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری و سپس به آن
 کلروفرم و ایزوآمیل الکل (۲۴ به یک) اضافه و در ۱۰۰۰۰
 دور به مدت ۱۰ دقیقه، سانتریفوژ، و این مرحله یک بار دیگر
 تکرار شد. روشن‌ترین جمع‌آوری و ۰/۶ حجم ایزوپروپانول با
 دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس به آن اضافه و پس از ۲۰ دقیقه
 نگهداری در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس در ۱۲۰۰۰ g
 به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس روشن‌ترین حذف و
 رسوب حاصل دوبار با الکل ۷۰ درصد شسته (با سانتریفوژ
 کردن پنج دقیقه در ۸۰۰۰ g) و خشک گردید. به هر لوله
 ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر سترون اضافه و به عنوان دی‌ان‌ای
 قالب^۳ برای آزمون‌های پی‌سی‌آر از آن استفاده شد
 (Ruangwong et al., 2006).

آزمون‌های پی‌سی‌آر معمولی و آشیانه‌ای

برای ردیابی باکتری CLas در نمونه‌های گیاهی،
 از آزمون پی‌سی‌آر معمولی با استفاده از آغازگرهای
 اختصاصی این گونه، یعنی OI1/OI2c و A2/J5 و در
 آزمون پی‌سی‌آر آشیانه‌ای از جفت‌آغازگر
 OI1/OI2c در دور اول و از جفت‌آغازگر
 CGO5R/CGO3F، در دور دوم استفاده شد (جدول
 ۲). در هر واکنش پی‌سی‌آر معمولی و آشیانه‌ای میزان
 ۲ میکرولیتر از محلول دی‌ان‌ای استخراج شده،
 ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت^۴ آب مقطر
 خالص به کار رفت. مستر میکس یک محلول آماده است
 شامل MgCl₂, dNTPs, Taq DNA Polymerase

مایه‌زنی با پیوند

به منظور مایه‌زنی نهال‌ها با عامل بیماری HLB
 مرکبات، از شاخه‌های کوتاه و ظریف نهال‌های سه‌ساله
 پرتقال والنسیای دارای علائم مشخص بیماری، که آلودگی
 آن‌ها به CLas به وسیله آزمون پی‌سی‌آر نیز تایید شده بود،
 پیوندک‌هایی تهیه و تعداد دو پیوندک آلوده به صورت
 جانی، پیوند، و با استفاده از پارافیلیم زخم حاصل از پیوند
 بسته شد. سه نهال پرتقال محلی، والنسیا و نارنگی محلی نیز با
 پیوندک‌های یک نهال سه‌ساله پرتقال والنسیای سالم و
 عاری از آلودگی به HLB، به عنوان شاهد منفی، پیوندزنی
 شدند. برای حفظ رطوبت و رشد بهتر پیوندک‌ها،
 قسمت‌های پیوندشده حداقل یک‌ماه در کیسه پلاستیکی
 قرار گرفتند تا پیوندک‌ها رشد کنند. نهال‌ها در یک گلخانه
 عاری از حشرات در دمای مناسب ۲۵ درجه سلسیوس در
 شب و ۳۰ درجه سلسیوس در روز نگهداری شدند.

ردیابی مولکولی عامل بیماری در نهال‌های مایه‌زنی شده

دو ماه پس از مایه‌زنی، با آزمون‌های پی‌سی‌آر
 معمولی و آشیانه‌ای^۱ با آغازگرهای اختصاصی، به شرحی
 که در ادامه خواهد آمد، CLas، فرم آسیایی عامل
 بیماری، در نهال‌های پیوندزنی شده ردیابی شد. این
 ردیابی تا ۱۲ ماه پس از مایه‌زنی، هر دو ماه یک‌بار، تکرار و
 نتایج منفی یا مثبت بودن آلودگی گیاهان مورد بررسی، به
 بیماری HLB، ثبت شد.

استخراج دی‌ان‌ای

استخراج دی‌ان‌ای کل با استفاده از روش Hung et
 al. (1999) انجام شد. به این منظور، مقدار ۰/۳ گرم از
 رگبرگ‌های اصلی هر نهال آلوده، با ازت مایع خرد و به
 لوله‌های اپندورف دو میلی‌لیتری منتقل و ۸۰۰ میکرولیتر بافر
 استخراج دی‌ان‌ای (EDTA, Tris-HCl, 100mM؛
 Proteinase K, 100؛ NaCl, 250mM؛ 100mM

2- N-Lauroylsarcosine
 3- Template DNA
 4- Forward

1- nested-PCR

هر آزمایش ثبت شد. رتبه‌بندی ارقام از حساس‌ترین تا متحمل‌ترین، براساس تعداد روز بین زمان پیوندزنی نهال‌ها تا تاریخ اولین تشخیص آلودگی در نهال‌های پیوندی. در این روش میانگین تعداد روز هر رقم، تعیین و آنالیز داده‌ها با روش آنالیز واریانس انجام شد.

نتایج

علائم‌شناسی و دورهٔ کمون بیماری

طی دو سال نگهداری گیاهان مایه‌زنی شده در گلخانه طیف وسیعی از علائم بیماری در زمان‌های مختلف مشاهده شد. این علائم شامل ماتلینگ (پسه‌ای شدن) در برگ‌ها، زردی بین رگبرگ‌ها و علائمی شبیه به کمبود آهن و روی و ریزبرگی، زردی رگبرگ و زردی عمومی در قسمت‌هایی از گیاه بود (شکل ۱).

و بافرهای مربوط به واکنش پی‌سی‌آر می‌باشد. برای انجام آزمون پی‌سی‌آر آشیانه‌ای، یک میکرولیتر از محلول رقیق شده (یک به پنج) از دور اول پی‌سی‌آر، به‌عنوان DNA قالب در آزمون پی‌سی‌آر آشیانه‌ای استفاده شد (جدول ۲) (Jagoueix et al., 1996; Zhou et al., 2007; Hocquellet et al., 1999). چرخه‌های گرمایی مورد استفاده در آزمون‌های پی‌سی‌آر معمولی و آشیانه‌ای براساس اندازهٔ قطعهٔ هدف و دمای اتصال آغازگر در جدول ۲ آورده شده است. ده میکرولیتر از محصول‌های پی‌سی‌آر معمولی و آشیانه‌ای روی ژل آگارز یک درصد، الکتروفورز و الگوی باندها تولید شده، پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، روی دستگاه UV^۱ مشاهده شد. سپس براساس وجود یا عدم باندها مورد نظر، واکنش‌های مثبت و منفی در

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در آزمون‌های پی‌سی‌آر معمولی و آشیانه‌ای برای ردیابی *Ca. Liberibacter asiaticus*

Table 1. Characteristics of primers used in conventional and nested PCR tests to detect *Ca. Liberibacter asiaticus*

Primer name	Sequence	Annealing (°C)	Amplicon size (bp)	Target	Reference
O11	5'-GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA-3'	56	1160	16S rDNA	Jagoueix et al., 1996
O12c	5'-GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3'				
CGO3F	5'- RGGGAAAGATTTTATTGGAG-3'	56	800 (nested-PCR)	16S rRNA	Zhou et al., 2007
CGO5R	5'-GAAAATAYCATCTCTGATATCGT-3'				
A2	5'- TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTTT-3'	60	669 (Laf)	β-operon	Hocquellet et al., 1999
J5	5'- ACAAAGCAGAAATAGCACGAACAA-3'				

جدول ۲- چرخه‌های دمایی مورد استفاده در آزمون‌های پی‌سی‌آر

Table 2. Temperature cycles used in PCR tests

Primers	Cycle number	Reaction steps	Annealing temp. (°C)	Duration
All primers	1	Initial denaturation	93-94	3-4-min.
O11/O12&CGO3F/CGO5R	35	Denaturation	94	40 sec.
O11/O12&CGO3F/CGO5R	35	Annealing	56	45 min.
O11/O12&CGO3F/CGO5R	35	Extension	72	1.5 min.
A2/J5	35	Denaturation	94	30 sec.
A2/J5	35	Annealing	60	45 sec.
A2/J5	35	Extension	72	1 min.
All primers	1	Final extension	72	10 min.



شکل ۱- علائم بیماری HLB در برخی از گیاهان مایه‌زنی شده در گلخانه. الف: ماتلینگ و کلروز بین رگبرگی در پرتقال محلی؛ ب: پیسک لکه‌ای در برگ پرتقال والنسیا؛ ج: بلاتچی ماتل در برگ نارنج؛ د: علائم زردی و کمبود آهن در اثر HLB در نارنگی محلی.

Figure 1. Symptoms of HLB in some inoculated plants in greenhouse. a: Mottling and interveinal chlorosis in local orange, b: Mottling in Valencia orange leaves, c: Blotchy mottle in sour orange leaves, d: Yellowing and Fe deficiency like symptoms in Local mandarin

علائم بیماری مشاهده نشد. حدود یک‌سال پس از مایه‌زنی، علائم بیماری در ارقام مختلف پرتقال و نارنگی، بکرایی، گریپ‌فروت، رانگپورلایم و ماکروفیلا (آلمو) اغلب به صورت ماتلینگ خفیف و زردی بین رگبرگ‌ها در برگ‌های بالایی گیاه قابل مشاهده بود. باوجوداین، در لیموشیرین، نارنج، لیموترش مکزیکی و لیمولیسبون پس از یک‌سال از مایه‌زنی علائمی از بیماری مشاهده نشد. ظهور علائم بیماری به صورت ماتلینگ خفیف و زردی بین رگبرگی بین ۱۳ تا ۱۵ ماه پس از مایه‌زنی روی نهال‌های

در جدول ۳ خلاصه‌ای از علائم مشاهده شده، در فواصل زمانی سه‌ماهه، تا ۲۴ ماه در میزبان‌های مختلف، به‌تفکیک آورده شده است. همان‌طور که در این جدول مشخص است تا شش‌ماه پس از مایه‌زنی در هیچ‌یک از گونه‌ها و پایه‌های تجاری مرکبات علائمی از بیماری مشاهده نشد ولی، هشت و نه ماه پس از مایه‌زنی به‌ترتیب در یک و دو نهال پرتقال والنسیا و نیز نه ماه پس از مایه‌زنی در سه نهال اورلاندوتانجلو علائم بیماری ظاهر شد، درحالی‌که در سایر گونه‌های مایه‌زنی شده و گیاهان شاهد

به طوری که دارای دوره کمون کوتاه تری نسبت به لیموترش مکزیکی و لیمولیسبون و دوره کمون طولانی تری نسبت به ارقام پرتقال و نارنگی بودند. بین پرتقال محلی، نارنگی محلی، نارنگی کینو، و گریپ فروت اختلاف معنی داری ($P < 0.05$) از نظر طول دوره کمون بیماری در گلخانه مشاهده نشد (جدول ۵).

ردیابی *Ca. L. asiaticus* در ژنوتیپها با آزمون پی سی آر

تجزیه واریانس داده‌ها در مورد اثر روش پی سی آر و گونه مرکبات بر ردیابی *Ca. Liberibacter asiaticus* در جدول ۶ آورده شده است. بر اساس آن، روش پی سی آر (مستقیم و آشیانه‌ای) و نوع ژنوتیپ مرکبات

لیموشیرین و نارنج و بین ۱۶ تا ۱۹ ماه روی نهال‌های لیموترش مکزیکی و لیمولیسبون مشاهده شد.

جدول ۴ تجزیه واریانس تاثیر گونه‌های مختلف مرکبات را روی دوره کمون بیماری HLB نشان می‌دهد. همان‌طور که در این جدول مشخص است، دوره کمون بیماری HLB در گونه‌های مختلف مرکبات مایه‌زنی شده به صورت معنی داری متفاوت است.

مقایسه میانگین دوره کمون بین ارقام و پایه‌های مرکبات نشان داد که بیشترین دوره کمون در لیموترش مکزیکی و لیمولیسبون مشاهده می‌شود، که اختلاف معنی داری ($P < 0.05$) با سایر نهال‌های مرکبات دارند. بعد از این گروه، ارقام لیموشیرین و نارنج قرار گرفته‌اند،

جدول ۳- علائم بیماری HLB در میزبان‌های مایه‌زنی شده با پیوند در فواصل زمانی سه ماهه تا دو سال

Table 3. Symptoms of HLB disease in the graft inoculated hosts at intervals of three months up to two years

Citrus genotypes	Symptoms (months after inoculation by grafting)							
	3	6	9	12	15	18	21	24
Valencia orange	NS	NS	IC, MM	IC, MM, Fe/Zn Df	IC, MM, Fe/Zn Df	PY, IC, M, Fe/Zn Df	Y, M, IC, VY, Fe/Zn Df	Y, M, IC, VY, Fe/Zn Df
Local orange	NS	NS	NS	IC, MM	MM, Fe/Zn Df	IC, MM, Fe/Zn Df	M, Y, Fe/Zn Df	M, Y, Fe/Zn Df
Local mandarin	NS	NS	NS	MM, Fe/Zn Df	MM, Fe/Zn Df	IC, MM, Fe/Zn Df	IC, MM, Fe/Zn Df	IC, MM, Fe/Zn Df
Kinnow mandarin	NS	NS	NS	MM	IC, MM	IC, MM	IC, MM	Y, M, VY,
Orlando tangelo	NS	NS	IC, MM	IC, MM, Fe/Zn Df	IC, MM, Fe/Zn Df	IC, MM, Fe/Zn Df	IC, MM, Fe/Zn Df	Y, M, IC, VY, Fe/Zn Df
Grapefruit	NS	NS	NS	MM	MM	IC, MM, Fe/Zn Df	IC, MM, Fe/Zn Df	M, IC, Fe/Zn Df
Sweet lemon	NS	NS	NS	NS	MM	IC, Fe/Zn Df	IC, MM, Fe/Zn Df	M, Y, Fe/Zn Df
Lisbon lemons	NS	NS	NS	NS	NS	MM	Y, M, VY,	Y, M, VY,
Mexican lime	NS	NS	NS	NS	NS	MM	IC, MM	IC, MM
Sour orange	NS	NS	NS	NS	MM	MM, Fe/Zn Df	IC, MM, Fe/Zn Df	M, Y, Fe/Zn Df

* These symptoms were observed in at least one of the three replicates inoculated for each genotype. No symptom (NS); Interveinal chlorosis (IC); Vein yellowing (VY); Mottling (M); Mild mottling (MM); Symptom-like Fe and Zn deficiencies like symptoms, (Fe/Zn Df); Yellowing in a part of the plants (PY); General yellowing (GY); Blotchy mottle (BM).

جدول ۴- تجزیه واریانس داده‌های مربوط به اثر ژنوتیپ بر دوره کمون بیماری HLB

Table 4. Analysis of variance related to the effect of citrus genotypes on incubation period of HLB disease

Source of variation	Degrees of freedom	Sums of squares	Mean of Square	F statistic	Coefficient of variation
Genotype	9	246.3	27.4	39.1 **	
Exp. Error	20	14.0	0.7	-	6.6
Total	29	260.3	-	-	

** Significant at 1%,

جدول ۵- مقایسه میانگین دوره کمون بیماری HLB در ارقام و پایه‌های تجاری مرکبات

Table 5. Mean comparison of the incubation period of HLB disease in citrus genotypes

Citrus genotypes	Incubation period
Mexican lime	18.0 a
Lisbon lemons	16.7 a
Sour orange	14.0 b
Sweet lemon	14.0 b
Local orange	11.7 c
Grapefruit	12.3 c
Kinnow mandarin	11.3 c
Local mandarin	11.3 c
Orlando tangelo	9.0 d
Valencia orange	8.7 d
LSD	1.425

Means with at least one similar letter had no significant difference based on LSD at 5% of probability level.

در لیموترش مکزیکی با بیشترین تاخیر (به‌طور میانگین ۳۳۰ روز پس از مایه‌زنی) ردیابی شد و لیمولیسبون و نارنج در رتبه بعدی (به‌طور میانگین ۳۰۰ و ۲۹۰ روز پس از مایه‌زنی) قرار داشتند. با وجود این، اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) در تعداد روز پس از مایه‌زنی تا واکنش مثبت در پی‌سی آر بین لیموترش مکزیکی با لیمولیسبون و نارنج مشاهده نشده است (جدول ۷). براساس میانگین زمان ردیابی CLas در گونه‌های مایه‌زنی شده، لیموترش مکزیکی، لیمولیسبون و نارنج دارای بیشترین مقاومت (تحمل) در برابر تکثیر CLas بودند و دیرتر عامل بیماری در آن‌ها ردیابی شد. لیموشیرین، پرتقال محلی و گریپ فروت در سطح بعدی، یعنی مقاومت (تحمل) متوسط بودند؛ نارنگی محلی و نارنگی کینو نیمه‌حساس و پرتقال والنسیا و اورلاندو تانجلو حساس در برابر تکثیر CLas بودند (جدول ۷ و شکل ۱).

بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش واکنش نهال‌های سه‌ساله ۱۰ رقم و پایه تجاری مرکبات به عامل فرم آسیایی بیماری HLB (*Ca. L. asiaticus*) از طریق آلوده‌سازی با پیوند بررسی و براساس ردیابی باکتری عامل بیماری پس از پیوند با استفاده از روش پی‌سی آر و همچنین دوره کمون بیماری (مدت زمان بین آلوده‌سازی با پیوند و ظهور اولین علائم بیماری) در نهال‌ها، حساسیت و تحمل نسبی آن‌ها نسبت به این بیماری تعیین شد.

بر تعداد روز لازم برای ردیابی CLas در نهال‌های مورد مطالعه اثرگذار و دارای اختلاف معنی‌داری است. اولین زمان تشخیص CLas، عامل فرم آسیایی بیماری HLB، در نهال‌های سالم، پس از پیوند با نهال آلوده، با استفاده از روش پی‌سی آر معمولی و آشیانه‌ای در جدول ۷ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، حساسیت آزمون پی‌سی آر آشیانه‌ای در تشخیص CLas در نهال‌ها بیشتر از پی‌سی آر معمولی است و می‌تواند آلودگی را به‌طور متوسط، دو ماه زودتر تشخیص دهد. آنالیز آماری و مقایسه میانگین تعداد روزهای بین پیوند زدن نهال‌ها و اولین زمان ردیابی مثبت CLas با روش پی‌سی آر در نهال‌های مرکبات نشان‌داد واکنش ارقام و پایه‌های مختلف به HLB به‌طور معنی‌داری متفاوت است. مقایسه میانگین تعداد روزها در اولین ردیابی مثبت *Ca. L. asiaticus* با پی‌سی آر (میانگین پی‌سی آر مستقیم و دومرحله‌ای) در گونه‌های مرکبات نشان‌داد که *Ca. L. asiaticus* در پرتقال والنسیا و اورلاندو تانجلو در زودترین زمان، به ترتیب ۱۸۰ و ۲۰۰ روز پس از مایه‌زنی با پیوند، نسبت به سایر گونه‌ها ردیابی شد و از این نظر اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) با اغلب ژنوتیپ‌ها، نظیر پرتقال محلی، لیموشیرین، لیموترش مکزیکی، لیمولیسبون، نارنج و گریپ فروت نشان داد؛ در حالی که اختلاف معنی‌داری را با نارنگی کینو و محلی نشان ندادند. در گونه‌های مطالعه‌شده، CLas

جدول ۶- تجزیه واریانس داده‌ها در رابطه با اثر روش پی‌سی‌آر و گونهٔ مرکبات بر ردیابی *Ca. Liberibacter asiaticus*

Table 6. Analysis of variance related to effect of PCR method and citrus genotype on detection of *Ca. Liberibacter asiaticus*

Source of variation	Degrees of freedom	Sums of squares	Mean of Square	F statistic	Coefficient of variation
PCR	1	54000	54000	0.45 **	
Genotype	9	123840	13760	11.5 **	13.6
PCR × Genotype	9	7200	800	0.7 ns	
Exp. Error	40	4800	1200	-	
Total	59	133040	-	-	

ns**, ns= Significant and non-significant at 1%, respectively

جدول ۷- مقایسه میانگین تعداد روزهای بین پیوندزنی و تشخیص عامل بیماری HLB در ارقام مختلف مرکبات
Table 7. Mean comparison of the number of days between grafting and HLB diagnosis times in different citrus cultivars

Genotype	First positive detection of CLAs (day post inoculation)		
	Direct-PCR	Nested-PCR	Average (Host)
Mexican lime	†† 340 a	320 ab	† 330 A
Lisbon lemons	320 ab	280 bcd	300 AB
Sour orange	320 ab	260 cde	290 AB
Sweet lemon	320 ab	240 de	280 B
Local orange	300 abc	220 ef	260 BC
Grapefruit	280 bcd	240 de	260 BC
Kinnow mandarin	260 cde	180 fg	220 CD
Local mandarin	260 cde	180 fg	220 CD
Orlando tangelo	220 ef	180 fg	200 D
Valencia orange	220 ef	140 g	180 D
Average (Method)	284 A	224 B	

† There is no significant difference at the 5% level of the LSD test between the averages in the left column and the bottom row in capital letters (comparing the individual effect of two factors) and also †† Averages in the middle two columns of the table in lowercase (comparing the interaction of two factors), which have at least one letter in common. a= Each number is the average of 3 numbers related to 3 grafted seedlings of each cultivar

(Li et al., 2018) و پیوندزدن گیاه با پیوندک آلوده Muhammad et al., 2012; Hilf & Lewis,) (2016).

باتوجه به امکانات و شرایط موجود و هدف این تحقیق، انتقال از طریق پیوند، مناسب‌تر از سایر روش‌ها تشخیص داده شد. در این روش میزان معینی از مایهٔ اولیهٔ تلقیح (اینوکولوم اولیه)، که در بافت پیوندک وجود دارد، مستقیماً به بافت گیاه میزبان منتقل می‌شود، در این روش، برخلاف دو روش دیگر، زمان دقیق آلوده‌سازی، میزان مایهٔ

از آن‌جا که این باکتری سخت‌رشد^۱ است و در محیط کشت‌های متداول رشد نمی‌کند، امکان تکثیر آن در محیط کشت‌های مصنوعی و آلوده‌سازی گیاه با آن وجود ندارد. تنها سه‌روش مرسوم برای انتقال و آلوده‌سازی میزبان با این گونه باکتری‌ها وجود دارد، که عبارت‌اند از: انتقال باکتری از طریق ناقل آن، پس‌پس‌آسیابی مرکبات (Coletta-Filho et al., 2014;)، استفاده از علف‌هرز انگل سس^۲ (Zhou et al., 2007;)،

1- Fastidious
2- Parasitic plant dodder (*Cuscuta* spp.)

پی‌سی‌آر آشیانه‌ای باکتری عامل بیماری در نهال‌های پرتقال والنسیا و اورلاندو تانجلوی مایه‌زنی شده ردیابی شد. در مورد سایر ارقام و پایه‌ها نیز عامل بیماری در گیاه، چندین ماه قبل از ظهور علائم بیماری، قابل ردیابی بود (جدول ۳ و ۵). به‌عنوان مثال حدود ۱۰ تا ۱۳ ماه پس از مایه‌زنی، علائم بیماری در سایر ارقام پرتقال، نارنگی و گریپ‌فروت مشاهده شدند ولی، اولین ردیابی‌های مثبت عامل بیماری با پی‌سی‌آر در این ارقام و گونه‌ها شش تا هشت ماه پس از پیوند و تقریباً بین چهار تا پنج ماه قبل از ظهور علائم بود. بیشترین دورهٔ کمون بیماری بین ۱۶ تا ۱۹ ماه در نهال‌های لیموترش مکزیکی و لیمولیسون مشاهده شد، ولی آلودگی این نهال‌ها با پی‌سی‌آر بین ۱۰ تا ۱۲ ماه پس از مایه‌زنی با پیوند تایید شد. بنابراین، حتی در گیاهان متحمل‌تر، حداکثر تا یک‌سال پس از آلودگی، عامل بیماری با پی‌سی‌آر در گیاه قبل از مشاهده علائم قابل ردیابی است. ردیابی عامل بیماری پیش از ظهور علائم، به‌خصوص در شرایط طبیعی، به‌دلیل توزیع غیریکنواخت عامل بیماری و غلظت پایین آن در مرکبات مشکل است و روش حساس‌تر پی‌سی‌آر آشیانه‌ای می‌تواند وقوع آلودگی را چند ماه زودتر از روش پی‌سی‌آر معمولی نشان دهد.

روش‌های مولکولی مانند پی‌سی‌آر برای شناسایی و ردیابی گونه‌های مختلف CLas با موفقیت استفاده شده‌اند و آغازگرهای مناسب و کارا برای هر سه گونهٔ مختلف باکتری عامل بیماری HLB وجود دارند (Jagoueix et al., 1996; Hocquellet et al., 1999; Zhou et al., 2007).

از آن‌جاکه برخی اوقات به‌دلیل غلظت پایین باکتری در بافت و یا وجود متابولیت‌های مزاحم در عصارهٔ بافت، با انجام پی‌سی‌آر معمولی امکان ردیابی دقیق و حساس باکتری در بافت وجود ندارد، در این تحقیق، علاوه بر پی‌سی‌آر معمولی از روش حساس‌تر پی‌سی‌آر آشیانه‌ای یا دومرحله‌ای نیز استفاده شد. به‌طور کلی، ردیابی CLas با استفاده از روش

تلقیح اولیه (تعداد و اندازه پیوندک‌ها) و محل مایه‌کوبی، قابل کنترل و اندازه‌گیری است (Batool et al., 2007). اگرچه در این روش انتقال، محدودیت‌هایی نیز (از جمله: بقای بافت پیوندی، میزان سازگاری بافت پیوندک با بافت پایه، دمای محیط در زمان پیوندزنی و موارد دیگر) وجود دارد؛ ولی مزایای متعدد آن باعث انتخاب این روش آلوده‌سازی شد.

نظربه این‌که علائم در بیماری HLB چندان اختصاصی نیستند و نوع و شدت علائم ایجادشده در گلخانه ممکن است با علائم موجود در طبیعت (به‌دلیل سن گیاه، شرایط اقلیمی، وجود ناقل و...) متفاوت باشد، تغییر علائم روی نهال‌های آلوده در مقایسه با نهال‌های شاهد در هرگونهٔ مرکبات، به‌عنوان علائم بیماری در نظر گرفته شد و در کنار آن نتایج پی‌سی‌آر نیز تاییدکنندهٔ آلودگی در نهال‌ها بود. علائم بیماری که اندکی اختصاصی‌تر هستند شامل ماتلینگک در برگ‌ها و پیسک لکه‌ای، زردی برخی از شاخه‌ها و علائم در میوه‌ها مانند وارونگی رنگ می‌باشد، درحالی‌که علائم، ممکن است در شرایط گلخانه، متفاوت باشد. در بسیاری از موارد ماتلینگک، زردی بین رگبرگ‌ها و علائمی شبیه به کمبود آهن و روی در برگ‌های بالایی گیاه علائم غالب روی نهال‌های آلوده بود.

در گونه‌ها و پایه‌های تجاری مرکبات مورد مطالعه، علائم بیماری بین ۸ تا ۱۸ ماه روی نهال‌های مختلف ظاهر شد و در واقع دورهٔ کمون (نهفتگی) بین نهال‌ها تا ۱۰ ماه متفاوت بود. اولین علائم بیماری روی پرتقال والنسیا و اورلاندو تانجلو، هشت تا نه ماه پس از مایه‌زنی مشاهده شد. از سوی دیگر اولین ردیابی مثبت CLas در نهال‌های پرتقال والنسیا و اورلاندو تانجلو با روش پی‌سی‌آر آشیانه‌ای، چهار تا شش ماه پس از پیوند و با روش پی‌سی‌آر معمولی، شش تا هشت ماه پس از پیوند، بود. بنابراین، دو تا چهار ماه قبل از ظهور علائم به‌ترتیب با روش‌های پی‌سی‌آر معمولی و

بدون علائم است. این نشان‌دهنده همبستگی مثبت بین تکثیر بیشتر باکتری در قسمت‌های دارای علائم گیاه است (Kunta & de Graca, 2014). براساس مقایسه میانگین زمان ردیابی CLas با پی‌سی‌آر و ظهور علائم پس از مایه‌زنی با پیوند (دوره کمون)، گونه‌های مایه‌زنی شده لیموترش مکزیکی، لیمولیسبون دارای بیشترین تحمل، نارنج و لیموشیرین تحمل متوسط، پرتقال محلی، گریپ‌فروت، نارنگی کینو و نارنگی محلی، حساس و پرتقال والنسیا و اورلاندوتانجلو دارای بیشترین حساسیت در برابر بیماری بودند (جدول‌های ۳ و ۵ و شکل ۱).

در بازدیدها از مناطق مرکبات خیز جنوب کشور، مشاهده شده است که پسپل آسیایی مرکبات روی لیموترش مکزیکی دارای ترجیح میزبانی است و جمعیت بیشتری روی آن دارد، ولی شدت علائم بیماری روی لیموترش مکزیکی کمتر و در نتیجه در برابر بیماری متحمل‌تر است؛ درحالی‌که وقوع و شدت علائم این بیماری روی انواع درختان پرتقال و نارنگی بیشتر و راحت‌تر قابل تشخیص است. شواهد و گزارش‌های زیادی وجود دارد که تمام ارقام شناخته شده مرکبات در درجات مختلف به بیماری HLB مبتلا می‌شوند و در مطالعات مختلف نشان داده شده است که پرتقال‌ها و نارنگی‌ها حساس، گریپ‌فروت و نارنج نیمه‌حساس و لیمو از تحمل بیشتری نسبت به بیماری برخوردار هستند (Miyakawa & Zhao, 1990; Halbert & Manjunath, 2004; Folimonova et al., 2009).

شواهد و گزارش‌های زیادی وجود دارد که تمام ارقام شناخته شده مرکبات در درجات مختلف به این بیماری مبتلا می‌شوند. پرتقال‌ها، نارنگی‌ها، و تانژلو حساس‌تر، و گریپ‌فروت، لیمو و نارنج از تحمل بیشتری برخوردار هستند (McClellan & Schwarz, 1970; Miyakawa & Zhao, 1990; Halbert & Manjunath, 2004; Folimonova et al., 2009). لیموترش مکزیکی و نارنج که در این مطالعه از مقاومت نسبی بالایی برخوردار بودند، علاوه بر تولید محصولات

پی‌سی‌آر آشیانه‌ای در مقایسه با روش پی‌سی‌آر معمولی در گیاهان مایه‌زنی شده اختلاف معنی‌داری را با یکدیگر نشان دادند. همان‌طور که انتظار می‌رفت حساسیت روش پی‌سی‌آر آشیانه‌ای بیشتر بود و با این روش به‌طور متوسط عامل بیماری در گیاهان مایه‌زنی شده، دو ماه زودتر از روش پی‌سی‌آر معمولی ردیابی شد.

از آنجایی که تکثیر باکتری در بافت گیاه میزبان و ایجاد علائم نشان‌دهنده عدم موانع جدی متابولیکی و فیزیولوژیکی در گیاه میزبان برای جلوگیری از تکثیر و توسعه عامل بیماری در میزبان است، بنابراین هرچه عامل بیماری بتواند سریع‌تر در میزبان مستقر شود و تکثیر پیدا کند، علائم بیماری نیز زودتر ظاهر شده، که نشان‌دهنده حساسیت بیشتر آن میزبان به بیماری است. لذا هرچه زمان ردیابی عامل بیماری با روش پی‌سی‌آر در بافت گیاه پیوند شده زودتر صورت گیرد، نشان‌دهنده تکثیر بهتر و غلظت بیشتر عامل بیماری و مناسب‌تر بودن میزبان برای تکثیر عامل بیماری است. بنابراین، زمان تشخیص باکتری در بافت گیاه میزبان به‌همراه زمان ظهور علائم، می‌تواند شاخص مناسبی برای ارزیابی واکنش ارقام مختلف مرکبات باشد. بدین ترتیب ردیابی زودتر باکتری عامل بیماری در برخی از میزبان‌ها، مانند پرتقال والنسیا و اورلاندوتانجلو نشان‌دهنده تکثیر بهتر و افزایش سریع‌تر غلظت باکتری تا رسیدن به آستانه ردیابی با پی‌سی‌آر است. همچنین، همبستگی بین ردیابی سریع‌تر CLas با دوره کمون کوتاه‌تر بیماری در ارقام و پایه‌های مورد بررسی وجود داشت؛ بدین معنی که هرچه آلودگی نهال‌ها در آزمون پی‌سی‌آر زودتر مثبت می‌شد و در واقع غلظت بیمارگر زودتر بالا می‌رفت (مانند پرتقال والنسیا و اورلاندوتانجلو)؛ علائم بیماری هم زودتر خود را نشان می‌داد. به عبارت دیگر دوره کمون بیماری کوتاه‌تر بود و در نتیجه این میزبان‌ها نسبت به بیماری HLB حساسیت بیشتری داشتند. براساس مطالعات انجام شده، غلظت باکتری عامل بیماری در گیاه غیریکنواخت بوده و در قسمت‌های دارای علائم گیاه آلوده، بیشتر از قسمت‌های

محصول و شکل ظاهری میوه این درخت، که از قبل آلوده شده بود، تغییری مشاهده نکردند، اما نشان دادند که در میوه‌های این درخت تعداد غیرمعمولی بذر چروکیده و عقیم تولید شده است. همین نتیجه از تایوان نیز گزارش شده است (Miyakawa, 1980).

در مطالعات آتی بررسی واکنش تعداد بیشتری از ژنوتیپ‌های مرکبات نسبت به CLas می‌تواند با روش مایه‌زنی با پیوند انجام شود. همچنین، در میزبان‌هایی که به‌عنوان حساس و متحمل شناخته شده‌اند و سایر ژنوتیپ‌های مرکبات، غلظت و روند تکثیر CLas با استفاده از روش کمی پی‌سی‌آر در زمان واقعی (Real-time PCR) می‌تواند بررسی و با یکدیگر مقایسه شود.

باتوجه به نتایج این تحقیق و نتایج سایر محققین در دنیا، به‌نظر می‌رسد محققین باید منابع مقاومت به عامل بیماری HLB را بیشتر در گونه‌ها و ارقام پایه‌ای جستجو کنند. نحوه بهره‌مند شدن از این منابع هم می‌تواند به‌دو صورت استفاده به‌عنوان پایه و استفاده در اقدامات و تلاش‌های اصلاح‌گران برای تولید رقم مقاوم انجام شود.

سیاس‌گذاری

از مسئولین محترم مرکز تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی استان فارس و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری که امکانات، تجهیزات و زمینه مشاوره‌های علمی لازم برای انجام این تحقیق را فراهم نموده‌اند، تشکر و قدردانی می‌شود.

قابل‌استفاده و اقتصادی، به‌عنوان "پایه" نیز در نقاط مختلف کشور مورد استفاده قرار می‌گیرند. گزارش‌هایی حاکی از مقاومت نسبی پایه‌های مختلف به این بیماری نیز وجود دارد. ژنوتیپ‌های وحشی مرکبات مانند *C. indica* Tanaka و *C. macroptera* Mont در شمال شرقی هند علی‌رغم حضور پسیل آلوده در منطقه، بدون علائم باقی مانده‌اند (Bhagabati, 1993). در مطالعه‌ای دیگر لیموشیرین (*C. limetta* Risso) چندین رقم لیمون (*C. limon* L.) پیوندزده شده با جوانه درختان آلوده، هیچ علائمی را از خود نشان ندادند، و متحمل ارزیابی شدند (Nariani, 1981). چندین رقم لیمو و لایم نیز بسیار مقاوم به HLB شناخته شدند (Folimonova et al., 2009). درختان و نهال‌های پونسیروس (*Poncirus trifoliata*) پیوندزده با جوانه‌های آلوده درختان مرکبات بیمار، که از آفریقای جنوبی و تایوان نشأت گرفته بودند، هیچ‌گونه علائم بیماری را از خود بروز ندادند (McClellan & Schwarz, 1970; Miyakawa, 1980). در صورتی که علائم بیماری از متوسط تا شدید روی این ژنوتیپ و هیبریدهای آن سیترنج کاریزو و ترویر^۱ در هند مشاهده شده است (Nariani, 1981). (McClellan & Schwarz (1970). نیز گزارش دادند که سیترنج ترویر مایه‌کوبی شده با "Las" علائم بیماری را از خود بروز نداد (اگرچه پس از آلودگی، مقداری کاهش رشد نشان داد). اگرچه آنها در

References

- Albrecht, U., Hall, D.G. & Bowman, K.D. (2014). Transmission efficiency of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' and progression of huanglongbing disease in graft and psyllid-inoculated citrus. *HortScience*, 49: 367-377.
- Alizadeh Aliabadi, A. (2003). *Biological attacks on agricultural products. a new challenge to plant protection*. Plant Protection Organization of Iran. Agricultural Education Publication, (105 pp.) (In Persian with English summary).

Alizadeh Aliabadi, A. (2004). Citrus Greening: a serious threat to citrus orchards and nurseries of Iran. *Olive Journal*, 205: 14-8. (In Farsi with English summary).

Alizadeh Aliabadi, A. (2009). *Citrus Greening caused by Candidatus Liberibacter spp.* Iranian Research Institute of Plant Protection. Agricultural Research. Education and Extension Organization. *Agricultural Education Publication*, 232 pp. (In Farsi with English summary).

Alizadeh Aliabadi, A. (2017)a. *Detection of citrus greening disease in citrus orchards and nurseries of Iran.* Iranian Research Institute of Plant Protection. Agricultural Research. Education and Extension Organization. *Agricultural Education Publication*, 32 pp. (In Farsi with English summary).

Alizadeh Aliabadi, A. (2017)b. *How to collect and identify infected plants with citrus Greening disease.* Iranian Research Institute of Plant Protection. Agricultural Research, Education and Extension Organization. *Agricultural Education Publication*. 24 pp. (In Farsi with English summary).

Alizadeh Aliabadi, A. (2017)c. *Production of healthy seedlings free from citrus greening agent.* Iranian Research Institute of Plant Protection. Agricultural Research. Education and Extension Organization. *Agricultural Education Publication*, 20 pp. (In Farsi with English summary).

Alizadeh Aliabadi, A. (2017)d. *Removal methods of infected citrus greening trees.* Iranian Research Institute of Plant Protection. Agricultural Research. Education and Extension Organization. *Agricultural Education Publication*. 20 pp. (In Farsi with English summary).

Alizadeh Aliabadi, A. & Ghasemi, A. (2018). Detection of greening agent bacteria in the body of the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama in Orzuieh, Jiroft and Kahnooj regions. Iranian Research Institute of Plant Protection. *Agricultural Research, Education and Extension Organization*. (Research Report No. 53336), 26 pp. (In Farsi with English summary).

Alizadeh Aliabadi, A. (2016). Integrated Citrus Greening Management National Project. Iranian Research Institute of Plant Protection. *Agricultural Research, Education and Extension Organization*. (Research Report No. 51301), 180 pp. (In Farsi with English summary).

Alizadeh Aliabadi, A., Foroutan, A. & Golmohamadi, M. (2010). Occurrence of citrus greening caused by *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Sistan-Baluchestan province. *19th Iranian Plant Protection Congress*. 31 July-3 August (2010). Tehran. IRAN. p. 525. (In Farsi with English summary).

Alizadeh Aliabadi, A., Ghasemi, A., Salehi, M., Faqihi, M.M. & Forootan, A. (2013). Identification and distribution of citrus greening disease in Iran. Iranian Research Institute of Plant Protection. *Agricultural Research, Education and Extension Organization*. (Research Report No. 44237), 38 pp. (In Farsi with English summary).

Batool, A., Iftikhar, Y., Mughal, S.M., Khan, M.M., Jaskani, M.J., Abbas, M. & Khan, I.A. (2007). Citrus greening disease - A major cause of citrus decline in the world - A Review. *Horticultural Science*, 34(4): 159-166.

- Bhagabati, K.N. (1993). Survey of greening disease of mandarin orange in the northeastern states of India, (p. 441–442). In: Moreno, P., da Gracxa, J.V., & Timmer L.W. (eds.).. *12th International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (IOCV)*, Riverside, CA.
- Bové, J.M., Calavan, E.C., Capoor, S.P., Cortez, R.E. & Schwarz, R.E. (1974). Influence of temperature on symptoms of California stubborn, South African greening, Indian citrus decline and Philippines leaf mottling diseases. *6th International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings*, pp. 12-15.
- Bove, J.M. (2006). Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88: 7–37.
- Canale, M.C., Komada, K. & Lopes, J.R.S. (2019). Latency and incubation of ‘Candidatus Liberibacter asiaticus’ in citrus after vector inoculation. *Tropical Plant Pathology*, 45: 320-326.
- Canale, M.C., Tomaseto, A.F., Haddad, M.D.L., Lopes, J.R.S. & Filho, H.D.C. (2017). Latency and Persistence of “Candidatus Liberibacter asiaticus” in its Psyllid Vector, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). *Phytopathology*, 107: 264–272.
- Coletta-Filho H.D., Targon M.L.P.N., Takita M.A., De Negri J.D., Pompeu, J.J. & Machado, M.A. (2004). First Report of the Causal Agent of Huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. *Plant Disease*, 88: 1382.
- Coletta-Filho, H.D., Daugherty, M.P., Ferreira, C. & Lopes, J.R.S. (2014). Temporal Progression of “Candidatus Liberibacter asiaticus” Infection in Citrus and Acquisition Efficiency by *Diaphorina citri*. *Phytopathology*, 104: 416-421.
- Da Graça, J. V. (2008). Biology, history and world status of huanglongbing. Hermosillo, Sonora. México. Texas A & M University-Kingsville, Citrus Center, Weslaco TX 78596, USA. 7pp.
- Da Graca, J.V., Douhan, G.W., Halbert, S.E., Keremane, M.L., Lee, R.F. & Vidalakis, G. (2015). Huanglongbing: an overview of a complex pathosystem ravaging the world’s citrus. *Journal of Integrative Plant Biology*, 58: 373-387.
- Faghihi, M., Salehi, M., Bagheri, A. & Izadpanah, K. (2009). First report of citrus huanglongbing disease on orange in Iran. *Plant Pathology*, 58: 793-793.
- Folimonova, S.Y., Robertson, C.J., Garnsey, S.M., Gowda, S. & Dawson, W.O. (2009). Examination of the responses of different genotypes of citrus to huanglongbing (citrus greening) under different conditions. *Phytopathology*, 99: 1346-1354.
- French, J.V., Kahlke, C. & da Graça, J.V. (2001). Asian psyllid found on Texas citrus. *Citrus Center*, 19: 1.
- Gabriel, D., Gottwald, T.R., Lopes, S.A. & Wulff, N.A. (2020). Chapter 18: Bacterial pathogens of citrus: Citrus canker, citrus variegated chlorosis and Huanglongbing. In *The Genus Citrus*, Editor(s): Talon, M., Caruso, M., Gmitter, F. G. 2020. (pp. 371-38) Elsevier.

Garnier, M. & Bové, J.M. (1977). Structure trilamellaire des deux membranes qui entourent les organismes procaryotes associés à la maladie du "greening" des agrumes. *Fruits*, 32: 749-752.

Garnier, M., Danel, N. & Bové, J.M. (1984). Aetiology of Citrus Greening Disease. *Annual of Microbiology (Institute Pasteur)*, 135A: 169-179.

Ghayeb zamharir, M., Alizadeh, A. & Kachoei, S. (2014)a. Phylogenetic analysis of divergent structural organization of nucleotide binding domain encoded by resistance genes and gene homologes in Citrus. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 77: 379-385.

Ghayeb Zamharir, M., Hamzeh, K., Alizadeh, A. & Kachoei, S. (2014)b. A Semiquantitative Rt-Pcr Assay To Evaluated The Expression Patterns Of Nbs-Lrr Family Genes In Infected Citrus By *Candidatus Leiberibacter Asiaticus*. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, Available online at: www.ijagcs.com.

Gholampour, H., Ghayeb Zamharir, M., Karimi, J., Farrokhi, N., Alizadeh, A. & Taheri, P. (2014). Identification of Genes Expressed Differentially in Grapefruit Infected with *Candidatus Liberibacter asiaticus* in the Late Stage of Disease. *Journal of Phytopathology*, 162: 811-819.

Gottwald, T.R. (2010). Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. *Annual Review of Phytopathology*, 48: 119-139.

Halbert, S.E. (2005). The discovery of huanglongbing in Florida. *Proceedings Of 2nd International Citrus Canker and Huanglongbing Research Workshop, Florida Citrus Mutual, Orlando*, H-3.

Halbert, S.E. & Nuñez, C.A. (2004). Distribution of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Rhynchota: Psyllidae) in the Caribbean basin. *Florida Entomologist*, 87: 401-402.

Halbert, S.E. & Manjunath, K.L. (2004). Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist*, 87: 330-353.

Hamzeh, K., Ghayeb Zamharir, M., Alizadeh, A. & Kachoei, S. (2014). Study of quantitative expression of citrus tristeza virus resistance gene homologue in A., the infected citrus by citrus greening pathogen. *Applied plant protection*, 4: 12.

Hilf, M.E. & Lewis, R.S. (2016). Transmission and propagation of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' by grafting with individual citrus leaves. *Phytopathology*, 106:452-458.

Hocquellet, A., Toorawa, P., Bove, J.M. & Garnier, M. (1999). Detection and identification of the two *Candidatus liberobacter* species associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the β operon. *Molecular and Cellular Probes*, 13: 373-9.

Hodges, A.W., Spreen, T.H., Rahmani, M., Stevens, T.J. & Spreen, T.H. (2015). Economic Impacts of Citrus Greening-HLB in Florida, 2006/07–2010/11. *University of Florida's Institute of Food and Agricultural Sciences (UF/IFAS)*, pp 7-12.

Hung, T.H., Wu, M.L. & Su, H.J. (1999). Development of a rapid method for the diagnosis of citrus greening disease using the polymerase chain reaction. *Journal of Phytopathology*, 147: 599-604.

Irey, M.S., Gast, T. & Gottwald, T.R. (2006). Comparison of visual assessment and polymerase chain reaction assay testing to estimate the incidence of the huanglongbing pathogen in commercial Florida citrus. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 119: 89-93.

Jagoueix, S., Bové, J.M. & Garnier, M. (1994). The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the subdivision of the *Proteobacteria*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44: 397-386.

Jagoueix, S., Bove, J.M. & Garnier, M. (1996). PCR detection of the two “Candidatus” liberobacter species associated with greening disease of citrus. *Molecular and Cellular Probes*, 10: 43-50.

Kumagai, L.B., LeVesque, C.S., Blomquist, C.L., Madishetty, K., Guo, Y. & Woods, P.W. (2012). First Report of Candidatus Liberibacter asiaticus Associated with Citrus Huanglongbing in California. *Plant Disease*, 97: 283.

Kunta, M., da Graça, J.V., Malik, N.S.A., Louzada, E.S. & Sétamou, M. (2014). Quantitative distribution of Candidatus Liberibacter asiaticus in the aerial parts of the Huanglongbing-infected citrus trees in Texas. *Horticultural Science*, 49: 65-68.

Li, Y., Xu, M., Dai, Z. & Deng, X. (2018). Distribution pattern and titer of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in periwinkle (*Catharanthus roseus*). *Journal of Integrative Agriculture*, 17: 2501-2508.

McClellan, A.P.D. & Schwarz, R.E. (1970). Greening or blotchy-mottle disease of citrus. *Phytophylactica*, 2: 177-194.

Miyakawa, T. (1980). Experimentally-induced symptoms and host range of citrus likubin (greening disease). *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 46: 224-230.

Miyakawa, T. & Zhao, X.Y. (1990). Citrus host range of greening disease, In: Aubert, B., S. Tontyaporn, & D. Buangsuwon (eds.). *4th International Asia Pacific Conference on Citrus Rehabilitation*. FAO-UNDP, p. 118-121.

Moghbeli Gharaei, A., Ziaaddini, M. & Jalali, M.A. (2018). Olfactory responses of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hem.: Psyllidae) to chemical compounds Gamma-butyrolactone and Methyl salicylate in laboratory conditions. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 41(1): 11-22. (In Farsi with English summary).

Mohkami, A., Sattari, R., Lori, Z., Ehsani, A. & Nazemi, A. (2011). First report of citrus huanglongbing in the Orzooiyeh region in Kerman province (Orzooiyeh). *Iranian Journal of Plant Pathology*, 47:105.

Muhammad, F.R., Khana, I.A., Jaskania, M.J. & Basrab, S.M.A. (2012). Graft transmission and biological indexing of Huanglongbing on local citrus germplasm. *Science International* (Lahore), 24: 153-157.

Nariani, T.K. (1981). Integrated approach to control citrus greening disease in India. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, 1: 471-472.

Ruangwong, O. & Akrapisan, A. (2006). Detection of *Candidatus liberibacter asiaticus* causing citrus Huanglongbing disease. *Journal of Agricultural Technology*, 2: 111-120.

Salehi, M., Faghihi, M., Khanchezar, A., Bagheree, A. & Izadpanah, K. (2012). Distribution of citrus Huanglongbing disease and its vector in southern Iran'. *Iranian Journal of Plant Pathology*. 48: 195-208. (In Farsi with English summary).

Schneider, H. (1968). Anatomy of greening-diseased sweet orange shoots. *Phytopathology* 58: 1155-1160.

Shokrollah, H.T., Abdullah, L., Sijam, K., Abdullah, S.N.A. & Abdullah, N.A.P. (2009). Differential reaction of citrus species in Malaysia to Huanglongbing (HLB) disease using grafting method. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 4: 32-38.

Stover, E. & McCollum, G. (2011). Incidence and severity of Huanglongbing and 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' titer among field-infected citrus cultivars. *HortScience*, 46: 1344-1348.

Teixeira, D., do Carmo Dane, J.L., Eveillard, S., Martins, E.C., Jesus Junior, W.C., de Yamamoto, P.T., Lopes, S.A., Bassanezi, R.B., Ayres, A.J., Saillard, C. & Bové, J.M. (2005). Citrus Huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the "Candidatus" *Liberibacter* species associated with the disease. *Molecular Cellular Probes* 19: 173-179.

Wang, N. & Trivedi, P. (2013). Citrus Huanglongbing: a newly relevant disease presents unprecedented challenges. *Phytopathology*, 103: 652-665.

Yosefi Hamedani, E., Sharifnabi, B. & Bahar, M. (2012). Rapid detection of *armillaria mellea* causal agent of root and crown rot in soil and wood samples by nested pcr method. *Plant protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 35(3): 71-82. (In Farsi with English summary).

Zhou, L.J., Gabriel, D.W., Duan, Y.P., Halbert, S.E. & Dixon, W.N. (2007). First report of dodder transmission of Huanglongbing from naturally infected *Murraya paniculata* to citrus. *Plant disease*, 91: 227.



© 2022 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/>).



Evaluation of ten citrus cultivars' susceptibility to "*Candidatus Liberibacter asiaticus*", the causal agent of the Asian form of citrus Huanglongbing

S. Safarpour Kapourchali¹, A. Alizadeh Aliabadi^{2*}, M. M. Faghihi³, S. Rajaei⁴ and M. Maleki⁵

1. PhD student of Plant Pathology, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Tehran, Iran
2. *Corresponding Author: Associate Professor, Plant Protection Research Department, Iranian Research Institute of Plant Protection (IRIPP), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO) Tehran, Iran
3. Assistant Professor, Plant Protection Research Department, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Zarghan, Iran
4. Assistant Professor, Department of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic engineering and Biotechnology, NIGEB, Tehran, Iran
5. Assistant Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Tehran, Iran

Received: 25 August 2021

Accepted: 23 October 2021

Abstract

Background and Objectives

Citrus greening (HLB) is one of the most damaging citrus diseases worldwide. As well, the three most important causal agents of this disease in the world include "*Candidatus Liberibacter asiaticus* (\"CLas\"), *Ca. Liberibacter africanus* (\"CLaf\"), and *Ca. Liberibacter americanus* (\"CLam\"). Accordingly, these were reported from Asian-American, African, and American countries, respectively. Of note, \"CLas\" species is found as the most important causal agent of this disease in all countries in the world, including Iran. It seems that the most effective way to reduce HLB is finding those cultivars that are resistant or tolerant to HLB. Accordingly, in the present study, an attempt was made to evaluate the reaction of a number of common citrus cultivars to this bacterium.

Materials and Methods

In the present research, ten commercial rootstocks and cultivars of the common citrus in the south of Iran, including Mexican lime, sour orange, mandarin orange, Kinnow mandarin, Orlando tangelo mandarin, local orange, Valencia orange, sweet lemon, grapefruit, and Lisbon lemons were prepared as seedlings. After checking their health, they were inoculated with the citrus greening agent and then kept in an insect-free greenhouse at night at 25°C and during the day at 30°C. By passing two months from the inoculation, the pathogen was detected by performing specialized tests in inoculated seedlings. Thereafter, three two-year-old seedlings from each one of the above-mentioned rootstocks and cultivars were grafted with two infected buds. Two months after the inoculation, normal and nested PCR tests were performed on the vein tissue extract of the

infected seedlings, once every two months, for a 12-month duration. Finally, both sensitivity and relative resistance of cultivars were evaluated based on the average number of days until the detection of the first *Ca. L. asiaticus* by PCR and also the incubation period of the disease, in each seedling.

Results

The causal agent of this disease ("CLas") was detected at the earliest time (in Valencia oranges and Orlando tangelo mandarin after 180 and 200 days, respectively) after the inoculation with infected graft, compared to other cultivars and rootstocks. Among the studied species, the "CLas" was detected in both Mexican lime and Lisbon lemon with the longest delay (by passing 330 and 300 days from the inoculation, respectively). According to the results, "CLas" was detected in sour orange and sweet lemon 290 and 280 days after the inoculation with infected graft, respectively. Based on the average number of days until the detection of the first *Ca. L. asiaticus* by PCR and also the incubation period of the disease, in each seedling, Mexican lime and Lisbon lemon were found as the most tolerant species and Valencia oranges and Orlando tangelo mandarin were found as the most susceptible ones to HLB. Moreover, sour orange and sweet lemon seedlings were moderately susceptible ones; and grapefruit, local orange, local, and Kinnow mandarin were moderately tolerant to HLB.

Discussion

Due to the reason that this bacterium does not grow in conventional medium, in this study, it was not possible to multiply it in artificial medium and then contaminate the plant with it. Therefore, performing the inoculation through grafting the seedlings with HLB infected buds was considered as the most appropriate method for seedlings inoculation with the pathogen. The faster the pathogen can settle and multiply and the symptoms appear in the host, the greater the susceptibility of the host to the disease. Early pathogen's detection and symptoms' observation in some hosts such as Valencia oranges and Orlando tangelo mandarin, indicate better bacterial proliferation in both cultivars. Notably, no symptoms of the disease were observed in Mexican lime and Lisbon lemons after 15 months, and one year after the inoculation in sour orange and sweet lemon plants. There is evidence that all known citrus cultivars are affected to this pathogen with different degrees of susceptibility. Based on the results of this study and the results of previous researchers in the world, it seems that researchers should look for the sources of resistance factors to HLB in more species and cultivars. Correspondingly, these sources can be used in the following two ways: used as a rootstock or scion, and used in the efforts of breeders to produce a resistant cultivar.

Keywords: *Resistance, Tolerance, PCR, Latent period, Citrus greening*

Associate editor: R. Rezaei (Ph.D.)

Citation: Safarpour Kapourchali, S., Alizadeh Aliabadi, A., Faghihi, M. M., Rajaei, S., & Maleki, M. (2022). Evaluation of ten citrus cultivars' susceptibility to "*Candidatus Liberibacter asiaticus*", the causal agent of the Asian form of citrus Huanglongbing. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 44(4): 1-18. <https://doi.org/10.22055/ppr.2021.17131>