گیاه‌پزشکی (مجله علمی کشاورزی)
جلد ٤٤، شماره٤، زمستان ١٤٠٠

doi 10.22055/ppr.2021.17131

ارزیابی حساسیت ده رقم مرکبات به "*Candidatus* Liberibacter asiaticus" عامل فرم آسیایی بیماری هوانگ‌لونگ‌بینگ مرکبات

شیوا صفرپور کپورچالی[1]، علی علیزاده علی‌آبادی[2*]، محمد مهدی فقیهی[3]، سعیده رجایی[4] و مژده ملکی[5]

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

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

۳-استادیار بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، 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 بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی ایران، ورامین، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۰۱

چکیده

بیماری هوانگ‌لونگ‌بینگ (Huanglongbing = HLB) یا میوه‌سبز مرکبات ازنظر اقتصادی خسارت‌زاترین بیماری مرکبات در دنیا می‌باشد و بیش‌از یک‌دهه است که از جنوب ایران نیز گزارش شده است. تاکنون روش درمان قطعی برای این بیماری شناخته نشده است. باوجود این، یکی‌از موثرترین راه‌های مدیریت این بیماری، یافتن ارقامی است که از مقاومت نسبی یا تحمل بالایی در برابر این بیماری برخوردار هستند. در این پژوهش واکنش نهال‌های سه‌سالهٔ ده رقم و پایهٔ تجاری مرکبات نسبت‌به عامل فرم آسیایی بیماری *Candidatus* Liberibacter asiaticus HLB، ازطریق مایه‌زنی با پیوند بررسی شد. پس‌از مایه‌زنی، ردیابی *Ca.* L. asiaticus با استفاده از روش‌های پی‌سی‌آرِ معمولی و آشیانه‌ای، با کاربرد آغازگرهای اختصاصی باکتری، در فواصل زمانی دوماهه انجام و نیز اولین ظهور علائم بیماری، در نهال‌های مایه‌زنی شده یادداشت شد. سپس، بر اساس میانگین تعداد روزها تا اولین ردیابی *Ca.* L. asiaticus با پی‌سی‌آر و نیزدورهٔ کمون بیماری، حساسیت و تحمل نسبی نهال‌ها به HLB مشخص شد. براساس نتایج به‌دست آمده، لیموترش مکزیکی و لیمولیسبون بیشترین تحمل و پرتقال والنسیا و اورلاندوتانجلو بیشترین حساسیت را در برابر این بیماری داشتند. نهال‌های نارنج و لیموشیرین حساسیت متوسطی به بیماری داشتند و گریپ‌فروت، پرتقال محلی، نارنگی محلی و نارنگی کینو، بعداز پرتقال والنسیا واورلاندوتاجلو، در درجهٔ دوم حساسیت قرار گرفتند. نتایج این مطالعه برای انتخاب پایه‌ها و ارقام مناسب‌تر در مناطق آلوده به بیماری HLB و مدیریت بهتر بیماری می‌تواند مفید باشد.

کلیدواژه‌ها: مقاومت، تحمل، پی‌سی‌آر، دورهٔ کمون، میوه‌سبزمرکبات.

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 هوانگ‌لونگ‌بینگ[1] که قبلاً به نام میوه‌سبز یا گرینینگ مرکبات[2] نیز شناخته می‌شد، یکی‌از مهم‌ترین بیماری‌های مرکبات در مناطق مرکبات‌خیز دنیا است. این بیماری برای اولین‌بار در اواخر قرن نوزدهم در چین مشاهده و هوانگ‌لونگ‌بینگ (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 به‌مرور از سایر کشورهای آسیایی و آفریقایی گزارش گردید. تااین‌که در سال ۲۰۰۴ در برزیل روی درخت پرتقال (Coletta-Filho et al., 2004) و یک‌سال پس‌از آن از روی پوملو (درخت دارابی)[3] در فلوریدا گزارش شد (Halbert, 2005; Bove, 2006; Da Graçan, 2008). هم‌اکنون این بیماری در باغات مرکبات تمامی قاره‌های دنیا وجود دارد و هرساله خساراتی را به باغ‌داران وارد می‌کند. عامل بیماری غیرقابل‌کشت است و باکتریایی بودن عامل این بیماری پس‌از مشاهدهٔ سلول‌هایی با دیوارهٔ سلولی شامل غشای سیتوپلاسمی و غشای خارجی و یک لایه پپتیدوگلایکانی در بین آنها، به اثبات رسید (Garnier & Bové, 1977; Garnier et al., 1984a). عامل بیماری یک باکتری سخت کشت است و سه گونهٔ مهم عامل بیماری هوانگ‌لونگ‌بینگ در دنیا شامل *Candidatus* Liberibacter asiaticus Jagoeix et al., 1994 (CLas)، *Candidatus* Liberibacter africanus" Jagoeix et al., 1994 (CLaf) و *Candidatus* Liberibacter americanus" Teixeira et al., 2005 (Clam) می‌باشند که به‌ترتیب عامل فرم‌های آسیایی، آفریقایی و آمریکایی بیماری هستند (Jagoeix et al., 1994; Teixeira et al., 2005a). تاکنون بیش‌از ۴۰ گونه از گیاهان خانوادهٔ مرکبات و برخی تیره‌های دیگر به‌عنوان میزبان سه گونهٔ "*Ca.* Liberibacter" گزارش شده است. گونهٔ *Ca.* L. asiaticus مهم‌ترین گونه عامل بیماری HLB در دنیا و ازجمله ایران محسوب می‌شود (Bove, 2006; Da Graca et al., 2015).

ناقل این بیماری دو گونه از پسیل‌ها هستند، باکتری CLas توسط پسیل‌آسیایی *Diaphorina citri* Kuwayama و باکتری CLaf توسط پسیل‌آفریقایی‌مرکبات *Trioza erytreae* Del Guercio منتقل می‌شود (Alizadeh Aliabadi, 2009). تحمل CLaf و ناقلش به درجه‌حرارت‌های بالای ۲۶ درجهٔ‌سلسیوس، کم است، درصورتی‌که CLas و ناقلش درجه‌حرارت‌های بالا را نیز تحمل می‌کند. این حقیقت که CLaf به‌همراه ناقل آن هردو حساس و CLas و ناقلش هردو متحمل به حرارت‌های بالا هستند، نشان‌دهندهٔ سازگاری و تکامل همراه عامل و ناقل مربوطه می‌باشد. پسیل‌آسیایی‌مرکبات 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 حوزهٔ کارائیب گزارش شد (Bové et al., 1974; Halbert & Nunez, 2004; Alizadeh Aliabadi, 2009).

درحال‌حاضر CLas گونهٔ غالب عامل بیماری HLB در مرکبات برزیل و ایالات متحده است. در برزیل، جایی که زمانی CLam گونهٔ غالب و اصلی بود، امروزه درحد بسیار کمی یافت می‌شود. به‌نظر می‌رسد یکی‌از 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)

علائم کلی در درختان تازه‌آلوده‌شده علائم "شاخه‌زردی[1]" است. معمولاً به‌صورت یک شاخه با برگ‌های زرد در داخل درختی که بقیهٔ شاخه‌های آن سبز معمولی است، مشاهده می‌شود (McClean, 1970). علائم روی برگ به‌صورت سایه‌روشن‌هایی از زرد، سبزروشن و سبزتیره در طیف‌های مختلف روی یک برگ ظاهر می‌شود و به آن حالت موزاییک مانند یا پیسک[2] می‌دهد (Schneider, 1968). میوه‌های آلوده معمولا کوچک، غیرقرینه، نامتقارن، غرشده با محور کج و بذوری عقیم هستند. در میوه‌های آلوده ابتدا قسمت مجاور دم‌میوه[3] تغییر رنگ می‌دهد و منطقهٔ مجاور گل‌گاه میوه، سبز باقی می‌ماند. میوهٔ آلوده دارای بذور کوچک، پوک، چروکیده و قهوه‌ای متمایل به سیاه و عقیم هستند (McClean & Schwarz, 1970; Alizadeh Aliabadi, 2009).

درحال‌حاضر بیماری HLB، صنعت مرکبات را در بسیاری از مناطق آسیا، آفریقا و آمریکا ویران کرده است. بیماری HLB به‌سرعت 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 بالغبر ۷/۸ میلیارد دلار به محصول و کاهش بیش‌از ۷۰۰۰ شغل در یک‌دورهٔ 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 ازبین‌بردن این بیماری را، برای حفظ اقتصاد تولیدکنندگان مرکبات، به‌وضوح نشان می‌دهد.

بیماری HLB در سال ۲۰۰۹ از جنوب ایران در استان‌های سیستان و بلوچستان و هرمزگان گزارش شد (Faghihi et al., 2009). سپس، بیماری از سایر مناطق مرکبات‌خیز 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 ازسال ۲۰۰۷ برای تعیین پراکندگی این بیماری در ایران صورت گرفت و گزارش آن منتشر شد (Alizadeh Aliabadi et al., 2013). درخلال این‌مدت باکتری CLas در بدن نمونه‌های جمع‌آوری شده از پسیل‌آسیایی‌مرکبات نیز ردیابی شد (Alizadeh Aliabadi & Ghasemi, 2018). ضمناً نحوهٔ مدیریت این بیماری (تعیین پراکندگی عامل بیماری و ناقل آن و نحوهٔ مبارزهٔ شیمیایی، بیولوژیکی و فیزیکی با آنها) نیز مورد بررسی قرار گرفته است (Alizadeh Aliabadi, 2016; Moghbeli Gharaei et al., 2018). برخی‌از توصیه‌های فنی و ترویجی نیز در این مورد منتشر (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 کاشت‌وداشت مرکبات با تولید بالا، در کشورهایی که این بیماری شیوع دارد، مدیریت بیماری با استفاده از راه‌بردهای مدیریت تلفیقی است. شامل : ۱- تهیهٔ نهال سالم از نهالستان‌های عاری از آلودگی به‌منظور پیش‌گیری از گسترش آلودگی به‌درختان مناطق غیرآلوده، ۲- تمرکز روی کاهش مایهٔ آلودگی اولیه با حذف درختان و یا شاخه‌های آلوده و ۳- کنترل ناقلین و نگه‌داری 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، رنگپور،

1- yellow shoot
2- blotchy mottle
3- peducular

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

به‌دنبال آلودگی درختان مرکبات به این بیماری، برای ظهور علائم، بسته به سن درخت درهنگام عفونت، ممکن است یک دورهٔ طولانی از ماه‌ها تا سال‌ها لازم باشد. بااین‌حال، درختان آلوده، اما بدون علائم، می‌توانند به‌عنوان منابع آلوده‌سازی سایر درختان، به‌کمک پسیل‌آسیایی‌مرکبات عمل کنند (Irey et al., 2006; Albrecht et al., 2014)، این امر، مشکل مدیریت این بیماری را سخت‌تر می کند. با پیشرفت بیماری HLB، درختان مرکبات به‌دلیل بازدهٔ کم همراه با کیفیت پایین میوه، ضعیف می‌شوند و در نهایت از نظر اقتصادی غیرقابل صرفه می‌شوند (Gottwald, 2010).

به‌نظر می‌رسد، موثرترین راه برای کاهش تأثیر HLB، یافتن ارقامی است که مقاوم و یا متحمل در برابر بیماری هستند. به‌طور کلی مشخص شده است که هیچ مقاومت واقعی در برابر این بیماری وجود ندارد. آلودگی انواع مرکبات ازجمله پرتقال، گریپ‌فروت، لیمو، لایم، پوملو و نارنگی منجربه زوال آنها شده است (Bove, 2006; Gottwald, 2010). مرکبات محصولی است که به‌روش رویشی تکثیر می‌شود، بنابراین احتمال شناسایی مقاومت بالا به HLB در بین ارقام رایج مرکبات تجاری بعید به‌نظر می‌رسد. اگرچه اکثر انواع مرکبات پرورشی دارای علائم مرتبط با HLB هستند، اما به‌نظر می‌رسد برخی از انواع آن، به‌ویژه آن‌هایی‌که به‌عنوان 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 پایهٔ تجاری مرکبات به عامل فرم آسیایی بیماری HLB (CLas) ازطریق مایه‌زنی با پیوند بررسی و حساسیت و تحمل نسبی آن‌ها نسبت به این بیماری تعیین شد.

مواد و روش‌ها

انتخاب و تهیهٔ پایه‌ها و ارقام مرکبات

تعداد ده پایه و رقم تجاری مرکبات متداول در جنوب کشور، شامل لیموترش مکزیکی (لیموعمانی[1])، *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle، نارنج[2] *Citrus* × *aurantium* L.، نارنگی[3] *Citrus reticulata* L. var محلی (سیاهو)، نارنگی‌کینو[4]، نارنگی اورلاندوتانجلو[5] *Citrus* × *tangelo* J. Ingram & H. Moore، پرتقال *Citrus* ×*sinensis* (L.) Osbeck محلی جنوب، پرتقال‌والنسیا *Citrus sinensis* [L.] Osbeck، لیموشیرین[6]، *Citrus limetta* Risso، گریپ‌فروت *Citrus* × *paradise* Macfad و لیمولیسبون[7] *Citrus limon* (L.) Osbeck)، به‌صورت دانهال و نهال پیوندی (نارنج و لیموترش مکزیکی بذری و بقیه نهال‌ها با پایهٔ لیموترش مکزیکی) و از هر کدام، سه‌اصله نهال تهیه و در شرایط گلخانه نگهداری شدند. تعداد سه‌اصله نهال سه‌سالهٔ پرتقال‌والنسیای آلوده به HLB و دارای علائم مشخص این بیماری نیز برای تهیهٔ پیوندک، از باغ های شهرستان داراب (حوالی جنت‌شهر) 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 به‌صورت بذری و سایر ارقام و گونه‌ها روی پایهٔ لیموترش مکزیکی از نهالستانی معتبر و مورد تایید حفظ نباتات و مرکز تحقیقات کشاورزی (در خفر جهرم) خریداری و حدود شش ماه تا یک‌سال نگهداری شدند و پس‌از 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).

1- Mexican lime
2- Bitter orange, sour orange
3- mandarin orange
4- Kinnow mandarin
5- Orlando tangelo
6- sweet lemon
7- 'Lisbon' lemons

مایه‌زنی با پیوند

به‌منظور مایه‌زنی نهال‌ها با عامل بیماری HLB مرکبات، از شاخه‌های کوتاه و ظریف نهال‌های سه‌سالهٔ پرتقال‌والنسیای دارای علائم مشخص بیماری، که آلودگی آن‌ها به CLas به‌وسیله آزمون پی‌سی‌آر نیز تایید شده بود، پیوندک‌هایی تهیه و تعداد دو پیوندک آلوده به‌صورت جانبی، پیوند، و بااستفاده از پارافیلم زخم حاصل از پیوند بسته شد. سه‌نهال پرتقال‌محلی، والنسیا و نارنگی‌محلی نیز با پیوندک‌های یک نهال سه‌سالهٔ پرتقال والنسیای سالم و عاری‌از آلودگی به HLB، به‌عنوان شاهد منفی، پیوندزنی شدند. برای حفظ رطوبت و رشد بهتر پیوندک‌ها، قسمت‌های پیوندشده حداقل یک‌ماه در کیسهٔ پلاستیکی قرار گرفتند تا پیوندک‌ها رشد کنند. نهال‌ها در یک گلخانهٔ عاری از حشرات در دمای مناسب ۲۵ درجهٔ‌سلسیوس در شب و ۳۰ درجهٔ‌سلسیوس در روز نگهداری شدند.

ردیابی مولکولی عامل بیماری در نهال‌های مایه‌زنی شده

دو ماه پس‌از مایه‌زنی، با آزمون‌های پی‌سی‌آر معمولی و آشیانه‌ای[1] با آغازگرهای اختصاصی، به‌شرحی که در ادامه خواهد آمد، CLas، فرم آسیایی عامل بیماری، در نهال‌های پیوندزنی شده ردیابی شد. این ردیابی تا ۱۲ماه پس‌از مایه‌زنی، هردوماه یک‌بار، تکرار و نتایج منفی یا مثبت‌بودن آلودگی گیاهان مورد بررسی، به بیماری HLB، ثبت شد.

استخراج دی‌ان‌ای

استخراج دی‌ان‌ای کل بااستفاده‌از روش Hung et al. (1999) انجام شد. به‌این‌منظور، 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 (Tris-HCl, 100mM؛ EDTA, 100mM؛ NaCl, 250mM؛ Proteinase K,100 µg/ml با pH=۸) به‌همراه ۸۰ میکرولیتر اِن-لوریل‌سارکوزین[2] ۱۰درصد به‌آن اضافه و کاملاً به‌هم زده شد. لوله‌های اپندورف به‌مدت یک‌ساعت در دمای ۵۵ درجهٔ‌سلسیوس نگهداری و سپس در g ۴۰۰۰ به‌مدت پنج دقیقه سانتریفوژ شدند. رونشین آن جمع‌آوری و ۰/۱۲۵ حجم از نمک‌طعام پنج‌مولار و CTAB ۱۰درصد در ۰/۷مولار نمک‌طعام به‌آن اضافه گردید. مخلوط در دمای ۶۵ درجهٔ‌سلسیوس به‌مدت ۱۰دقیقه نگهداری و سپس به‌آن کلروفرم و ایزوآمیل‌الکل (۲۴ به یک) اضافه و در ۱۰۰۰۰ دور به‌مدت ۱۰دقیقه، سانتریفوژ، و این‌مرحله یک‌بار دیگر تکرار شد. رونشین جمع‌آوری و ۰/۶ حجم ایزوپروپانول با دمای منفی ۲۰ درجهٔ‌سلسیوس به‌آن اضافه و پس‌از ۲۰ دقیقه نگهداری در دمای منفی ۲۰ درجهٔ‌سلسیوس در g ۱۲۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس رونشین حذف و رسوب حاصل دوبار با الکل ۷۰ درصد شسته (با سانتریفوژ کردن پنج دقیقه در g۸۰۰۰) و خشک گردید. به‌هر لوله ۱۰۰میکرولیتر آب‌مقطر سترون اضافه و به‌عنوان دی‌ان‌ای قالب[3] 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 استفاده‌از 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 ۲میکرولیتر از محلول دی‌ان‌ای استخراج‌شده، ۱میکرولیتر از هریک از آغازگرهای رفت[4] آب مقطر خالص به‌کار رفت. مسترمیکس یک محلول آماده است شامل Taq DNA Polymerase، dNTPs، MgCl2

1- nested-PCR

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

و بافرهای مربوط به واکنش پی‌سی‌آر می‌باشد. برای انجام آزمون پی‌سی‌آر آشیانه‌ای، یک میکرولیتر از محلول رقیق‌شده (یک به پنج) از دور اول پی‌سی‌آر، به‌عنوان DNA قالب در آزمون پی‌سی‌آر آشیانه‌ای استفاده شد (جدول۲) (Jagoueixet et al., 1996; Hocquellet et al., 1999; Zhou et al., 2007).

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 یک‌درصد، الکتروفورز و الگوی باند تولیدشده، پس‌از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، روی دستگاه UV[1] مشاهده شد. سپس براساس وجود یا عدم باند موردنظر، واکنش‌های مثبت و منفی در 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 مایه‌زنی‌شده در گلخانه طیف وسیعی از علائم بیماری در زمان‌های مختلف مشاهده شد. این علائم شامل ماتلینگ (پیسه‌ای 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).

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
OI1	5′-GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA-3′	56	1160	16S rDNA	Jagoueix et al., 1996
OI2c	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′- ACAAAAGCAGAAATAGCACGAACAA-3′		703 (Las)		

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.
OI1/OI2&CGO3F/CGO5R	35	Denaturation	94	40 sec.
OI1/OI2&CGO3F/CGO5R	35	Annealing	56	45 min.
OI1/OI2&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.

1- Transilluminator UV

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

در جدول ۳ خلاصه‌ای از علائم مشاهده شده، در فواصل زمانی سه‌ماهه، تا ۲۴ ماه در میزبان‌های مختلف، به‌تفکیک آورده شده است. همان‌طورکه در این جدول مشخص است تا شش‌ماه پس‌از مایه‌زنی در هیچ‌یک از گونه‌ها و پایه‌های تجاری مرکبات علائمی از بیماری مشاهده نشد ولی، هشت و نه ماه پس‌از مایه‌زنی به‌ترتیب در یک و دو نهال پرتقال والنسیا و نیز نه ماه پس‌از مایه‌زنی در سه نهال اورلاندوتانجلو علائم بیماری ظاهر شد، درحالی‌که در سایر گونه‌های مایه‌زنی‌شده و گیاهان شاهد علائم بیماری مشاهده نشد. حدود یک‌سال پس از مایه‌زنی، علائم بیماری در ارقام مختلف پرتقال و نارنگی، بکرایی، گریپ‌فروت، رانگپورلایم و ماکروفیلا (آلِمو) اغلب به‌صورت ماتلینگ خفیف و زردی بین رگبرگ‌ها در برگ‌های بالایی گیاه قابل مشاهده بود. باوجوداین، در لیموشیرین، نارنج، لیموترش مکزیکی و لیمولیسبون پس‌از یک‌سال از مایه‌زنی علائمی از بیماری مشاهده نشد. ظهور علائم بیماری به‌صورت ماتلینگ خفیف و زردی بین‌رگبرگی بین ۱۳ تا ۱۵ ماه پس‌از مایه‌زنی روی نهال‌های

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 دورهٔ کمون بیماری HLB نشان می‌دهد. همان‌طور که در این جدول مشخص است، دورهٔ کمون بیماری HLB در گونه‌های مختلف مرکبات مایه‌زنی شده به‌صورت معنی‌داری متفاوت است.

مقایسه‌ی میانگین دورهٔ کمون بین ارقام و پایه‌های مرکبات نشان‌داد که بیشترین دورهٔ کمون در لیموترش مکزیکی و لیمولیسبون مشاهده می‌شود، که اختلاف معنی‌داری ($P<0.05$) با سایر نهال‌های مرکبات دارند. بعد از این گروه، ارقام لیموشیرین و نارنج قرار گرفته‌اند، به‌طوری‌که دارای دورهٔ کمون کوتاه‌تری نسبت به لیموترش مکزیکی و لیمولیسبون و دورهٔ کمون طولانی تری نسبت به ارقام پرتقال و نارنگی بودند. بین پرتقال محلی، نارنگی محلی، نارنگی کینو، و گریپ‌فروت اختلاف معنی‌داری ($P<0.05$) از نظر طول دورهٔ کمون بیماری در گلخانه مشاهده نشد (جدول ۵).

ردیابی *Ca*. L. asiaticus در ژنوتیپ‌ها با آزمون پی‌سی‌آر

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

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

	Symptoms (months after inoculation by grafting)							
Citrus genotypes	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 ٤- تجزیهٔ واریانس داده‌های مربوط به اثر ژنوتیپ بر دورهٔ 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 **	6.6
Exp. Error	20	14.0	0.7	-	
Total	29	260.3	-	-	

** Significant at 1%,

جدول ۵- مقایسهٔ میانگین دورهٔ 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.

بر تعداد روز لازم برای ردیابی CLas در نهال‌های مورد مطالعه اثرگذار و دارای اختلاف معنی‌داری است.

اولین‌زمان تشخیص CLas، عامل فرم آسیایی بیماری HLB، در نهال‌های سالم، پس‌از پیوند با نهال آلوده، با استفاده از روش پی‌سی‌آر معمولی و آشیانه‌ای در جدول ۷ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، حساسیت آزمون پی‌سی‌آر آشیانه‌ای در تشخیص CLas در نهال‌ها بیشتر از پی‌سی‌آر معمولی است و می‌تواند آلودگی را به‌طور متوسط، دو ماه زودتر تشخیص دهد. آنالیز آماری و مقایسهٔ میانگین تعداد روزهای بین زمان پیوندزدن نهال‌ها و اولین‌زمان ردیابی مثبت CLas با روش پی‌سی‌آر در نهال‌های مرکبات نشان‌داد واکنش ارقام و پایه‌های مختلف به HLB به‌طور معنی‌داری متفاوت است. مقایسه‌ی میانگین تعداد روزها در اولین ردیابی مثبت *Ca.* L. asiaticus با پی‌سی‌آر (میانگین پی‌سی‌آر مستقیم و دومرحله‌ای) در گونه‌های مرکبات نشان‌داد که *Ca.* L. asiaticus در پرتقال والنسیا و اورلاندو تانجلو در زودترین زمان، به‌ترتیب ۱۸۰ و ۲۰۰ روز پس‌از مایه‌زنی با پیوند، نسبت به سایر گونه‌ها ردیابی شد و از این‌نظر اختلاف معنی‌داری ($P<0.05$) با اغلب ژنوتیپ‌ها، نظیر پرتقال محلی، لیموشیرین، لیموترش مکزیکی، لیمولیسبون، نارنج و گریپ فروت نشان داد؛ درحالی‌که اختلاف معنی‌داری را با نارنگی کینو و محلی نشان ندادند. در گونه‌های مطالعه‌شده، CLas در لیموترش مکزیکی با بیشترین تاخیر (به‌طور میانگین ۳۳۰ روز پس‌از مایه‌زنی) ردیابی شد و لیمولیسبون و نارنج در رتبهٔ بعدی (به‌طور میانگین ۳۰۰ و ۲۹۰ روز پس‌از مایه‌زنی) قرار داشتند. باوجوداین، اختلاف معنی‌داری ($P<0.05$) در تعداد روز پس‌از مایه‌زنی تا واکنش مثبت در پی‌سی‌آر 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 اورلاندوتانجلو حساس در برابر تکثیر CLas بودند (جدول ۷ و شکل ۱).

بحث ونتیجه‌گیری

در این پژوهش واکنش نهال‌های سه‌سالهٔ ۱۰ رقم و پایهٔ تجاری مرکبات به عامل فرم آسیایی بیماری HLB (*Ca.* L. asiaticus) از طریق آلوده‌سازی با پیوند بررسی و براساس ردیابی باکتری عامل بیماری پس‌از پیوند با استفاده‌از روش پی‌سی‌آر و همچنین دورهٔ کمون بیماری (مدت‌زمان بین آلوده‌سازی با پیوند و ظهور اولین علائم بیماری) در نهال‌ها، حساسیت و تحمل نسبی آن‌ها نسبت به این بیماری تعیین شد.

جدول ٦- تجزیهٔ 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 **	13.6
Genotype	9	123840	13760	11.5 **	
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

	First positive detection of CLas (day post inoculation)		
Genotype	**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

از آن‌جاکه این باکتری سخت‌رشد[1] است و در محیط کشت‌های متداول رشد نمی‌کند، امکان تکثیر آن در محیط‌کشت‌های مصنوعی و آلوده‌سازی گیاه با آن وجود ندارد. تنها سه‌روش مرسوم برای انتقال و آلوده‌سازی میزبان با این‌گونه باکتری‌ها وجود دارد، که عبارت‌اند از: انتقال باکتری ازطریق ناقل آن، پسیل‌آسیایی‌مرکبات (Coletta-Filho et al., 2014; Canale et al., 2017; Canale et al., 2019)، استفاده از علف‌هرز انگل سس[2] (Zhou et al., 2007; Li et al., 2018) و پیوندزدن گیاه با پیوندک آلوده (Muhammad et al., 2012; Hilf & Lewis, 2016).

باتوجه‌به امکانات و شرایط موجود و هدف این تحقیق، انتقال ازطریق 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، مستقیما به بافت گیاه میزبان منتقل می‌شود، در این روش، برخلاف دو روش دیگر، زمان دقیق آلوده‌سازی، میزان مایهٔ

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

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 (ازجمله: 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 درمقایسه با نهال‌های شاهد در هرگونهٔ مرکبات، به‌عنوان علائم بیماری درنظر گرفته شد و در کنار آن نتایج پی‌سی‌آر نیز تاییدکنندهٔ آلودگی در نهال‌ها بود. علائم بیماری که اندکی اختصاصی‌تر هستند شامل ماتلینگ در برگ‌ها و پیسک لکه‌ای[1]، زردی برخی‌از شاخه‌ها و علائم در میوه‌ها مانند وارونگی رنگ می‌باشد، درحالی‌که علائم، ممکن است در شرایط گلخانه، متفاوت باشد. دربسیاری از موارد ماتلینگ، 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 مرکباتِ 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 پس‌از مایه‌زنی مشاهده شد. ازسوی دیگر اولین ردیابی مثبت CLas در نهال‌های پرتقال والنسیا و اورلاندوتانجلو با روش پی‌سی‌آر آشیانه‌ای، چهار تا شش‌ماه پس‌از پیوند و با روش پی‌سی‌آر معمولی، شش تا هشت‌ماه پس‌از پیوند، بود. بنابراین، دو تا چهارماه قبل‌از ظهور علائم به‌ترتیب با روش‌های پی‌سی‌آر معمولی و پی‌سی‌آر آشیانه‌ای باکتری عامل بیماری در نهال‌های پرتقال والنسیا و اورلاندوتاجلوی مایه‌زنی شده ردیابی شد. درمورد سایر ارقام و پایه‌ها نیز عامل بیماری در گیاه، چندین ماه قبل‌از ظهور علائم بیماری، قابل ردیابی بود (جدول ۳ و ۵). به‌عنوان مثال حدود ۱۰ تا ۱۳ ماه پس‌از 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 پس‌از پیوند و تقریباً بین چهار تا پنج ماه قبل‌از ظهور علائم بود. بیشترین دورهٔ کمون بیماری بین ۱۶ تا ۱۹ ماه در نهال‌های لیموترش مکزیکی و لیمولیسبون مشاهده شد، ولی آلودگی این نهال‌ها با پی‌سی‌آر بین ۱۰ تا ۱۲ ماه پس‌از مایه‌زنی با پیوند تایید شد. بنابراین، حتی در گیاهان متحمل‌تر، حداکثر تا یک‌سال پس‌از آلودگی، عامل بیماری با پی‌سی‌آر در گیاه قبل‌از مشاهده علائم قابل ردیابی است. ردیابی عامل بیماری پیش‌از 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).

ازآن‌جاکه برخی اوقات به‌دلیل غلظت پایین باکتری در بافت و یا وجود متابولیت‌های مزاحم در عصارهٔ بافت، با انجام پی‌سی‌آرِ معمولی امکان ردیابی دقیق و حساس باکتری در بافت وجود ندارد، در این تحقیق، علاوه‌بر پی‌سی‌آرِ معمولی از روش حساس‌تر پی‌سی‌آرِ آشیانه‌ای یا دومرحله‌ای نیز استفاده شد. به‌طورکلی، ردیابی CLas بااستفاده‌از روش

1- blotchy mottle

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

ازآنجایی که تکثیر باکتری در بافت گیاه میزبان و ایجاد علائم نشان‌دهندهٔ عدم موانع جدی متابولیکی و فیزیولوژیکی در گیاه میزبان برای جلوگیری از تکثیر و توسعهٔ عامل بیماری در میزبان است، بنابراین هرچه عامل بیماری بتواند سریع‌تر در میزبان مستقر شود و تکثیر پیداکند، علائم بیماری نیز زودتر ظاهر شده، که نشان-دهندهٔ حساسیت بیشتر آن میزبان به بیماری است. لذا هرچه زمان ردیابی عامل بیماری با روش پی‌سی‌آر در بافت گیاه پیوند شده زودتر صورت گیرد، نشان‌دهندهٔ 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. بدین‌ترتیب ردیابی زودتر باکتری عامل بیماری در برخی‌از میزبان‌ها، مانند پرتقال والنسیا و اورلاندوتانجلو نشان‌دهندهٔ تکثیر بهتر و افزایش سریع‌تر غلظت باکتری تا رسیدن به آستانهٔ ردیابی با پی‌سی‌آر است. همچنین، همبستگی بین ردیابی سریع‌تر CLas با دورهٔ کمون کوتاه‌تر بیماری در ارقام و پایه‌های مورد بررسی وجود داشت؛ بدین‌معنی که هرچه آلودگی نهال‌ها در آزمون پی‌سی‌آر زودتر مثبت می‌شد و در واقع غلظت بیمارگر زودتر بالا می‌رفت (مانند پرتقال والنسیا و اورلاندوتاجلو)؛ علائم بیماری هم زودتر خود را نشان می‌داد. به‌عبارت دیگر دورهٔ کمون بیماری کوتاه‌تر بود و در نتیجه این میزبان‌ها نسبت به بیماری HLB حساسیت بیشتری داشتند. براساس مطالعات انجام‌شده، غلظت باکتری عامل بیماری در گیاه غیریکنواخت بوده و در قسمت‌های دارای علائم گیاه آلوده، بیشتر از قسمت‌های بدون علائم است. این نشان‌دهندهٔ همبستگی مثبت بین تکثیر بیشتر باکتری در قسمت‌های دارای علائم گیاه است (Kunta & de Graca, 2014). براساس مقایسهٔ میانگین زمان ردیابی CLas با پی‌سی‌آر و ظهور علائم پس‌از مایه‌زنی با پیوند (دورهٔ کمون)، گونه‌های مایه‌زنی شدهٔ 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 مرکبات‌خیز جنوب کشور، مشاهده شده است که پسیل آسیایی مرکبات روی لیموترش مکزیکی دارای ترجیح میزبانی است و جمعیت بیشتری روی آن دارد، ولی شدت علائم بیماری روی لیموترش مکزیکی کمتر و درنتیجه 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 شدهٔ 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 شدهٔ مرکبات در درجات مختلف به این بیماری مبتلا می‌شوند. پرتقال‌ها، نارنگی‌ها، و تانژلو حساس‌تر، و گریپ‌فروت، لیمو و نارنج از تحمل بیشتری برخوردار هستند (McClean & 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، علاوه‌بر تولید محصولات

قابل‌استفاده و اقتصادی، به‌عنوان "پایه" نیز در نقاط مختلف کشور مورد استفاده قرار می‌گیرند. گزارش‌هایی حاکی‌از مقاومت‌نسبی پایه‌های مختلف به این بیماری نیز وجود دارد. ژنوتیپ‌های وحشی مرکبات مانند *C. indica* Tanaka و *C. macroptera* Mont در شمال‌شرقی هند علی‌رغم حضور پسیل آلوده در منطقه، بدون علائم باقی مانده‌اند (Bhagabati, 1993). در مطالعه‌ای دیگر لیموشیرین (*C. limetta* Risso) چندین رقم لمون (*C. limon* L.) پیوندزده شده با جوانهٔ 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*) پیوندشده با جوانه-های آلودهٔ درختان مرکبات بیمار، که از آفریقای جنوبی و تایوان نشأت گرفته بودند، هیچ‌گونه علائم بیماری را از خود بروز ندادند (McClean & Schwarz, 1970; Miyakawa, 1980). درصورتی‌که علائم بیماری از متوسط تا شدید روی این ژنوتیپ و هیبریدهای آن سیترنج کاریزو و تروییر [1] در هند مشاهده شده است (Nariani, 1981). McClean & Schwarz (1970) نیز گزارش دادند که سیترنج تروییر مایه‌کوبی‌شده با "*Las*" علائم بیماری را از خود بروز نداد (اگرچه پس‌از آلودگی، مقداری کاهش رشد نشان داد). اگرچه آنها در محصول و شکل ظاهری میوهٔ این درخت، که از قبل آلوده شده بود، تغییری مشاهده نکردند، اما نشان دادند که در میوه‌های این‌درخت 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 ژنوتیپ های مرکبات، غلظت و روند تکثیر CLas با استفاده‌از 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. نحوهٔ بهره‌مندشدن از این منابع هم می‌تواند به‌دو صورت استفاده به‌عنوان پایه و استفاده در اقدامات و تلاش‌های اصلاح‌گران برای تولید رقم مقاوم انجام شود.

سپاس‌گزاری

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

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).

1- Carrizo and Troyer citrange

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, JV., Douhan, G.W., Halbert, SE., Keremane, ML., 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 Infectedfected 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 homolouge 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, AW., Spreen, TH., 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.

McClean, 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/).

Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)

44(4), Winter, 2022

doi 10.22055/ppr.2021.17131

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

S. Safarpour Kapourchali[1], A. Alizadeh Aliabadi[2*], M. M. Faghihi[3], S. Rajaei[4] and M. Maleki[5]

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* (*Ca*.) 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