گیاه‌پزشکی (مجله علمی کشاورزی)
جلد ٤٥، شماره۳، پاییز ١٤٠١

doi 10.22055/ppr.2022.17660

بررسی شدت واکنش و علایم آلودگی در ارقام مرکبات حساس به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات در شرایط گلخانه

سید مهدی بنی‌هاشمیان*[۱]، احمد روحی‌بخش*[۲]، نیلوفر پژوهش[۳] و مالک قاسمی[۴]

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

۲- *نویسنده مسوول: استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران (a_rouhibakhsh@yahoo.com)

۳- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران

٤- استادیار گروه ژنتیک و به‌نژادی، پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۲۱

چکیده

ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات (*Citrus yellow vein clearing virus*)، ویروسی خسارت‌زا است که در سال‌های اخیر در تعدادی از کشورهای منطقه و ایران گسترش یافته است. نظر به اهمیت بیماری ناشی از این ویروس، واکنش ارقام تجاری مرکبات از گروه‌های پرتقال، نارنگی، نارنج، لیمو، گریپ‌فروت، بالنگ، تانجلو، پوملو و کامکوات پس از آلوده‌سازی در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. جوانه ارقام مورد بررسی روی پایه نارنج تکثیر و این نهال‌ها به طور همزمان با جدایه شناخته‌شده‌ای از ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات (رس‌شمار بانک ژن: KX902488) با روش پیوند آلوده و به همراه نهال‌های شاهد مایه‌زنی نشده در دمای ۱±۲۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بر اساس بروز علایم؛ زردی رگبرگ‌های جانبی در سطح رویی برگ‌های جوان، نواحی متناظر آب‌سوخته در زیر برگ‌های جوان، چروکیدگی برگ‌های مسن و لکه‌برگی برگ‌های مسن، از بین ۱۹ رقم مورد بررسی، ١٤ رقم حساس به بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات تشخیص داده شد. استخراج آران‌ای کل از پوست و رگبرگ جست‌های جدید به روش اس‌دی‌اس استات پتاسیم و واکنش زنجیره ای پلیمراز با ترانویسی معکوس توسط آغازگرهای اختصاصی تکثیرکننده ژن پروتئین پوششی، آلودگی به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات را در ارقام دارای علایم تأیید نمود. این ارقام با توجه به شدت واکنش در سه گروه با حساسیت زیاد، متوسط و کم دسته‌بندی شدند. درجات شدید و پایداری هر چهار نوع علایم شاخص، تنها در سه رقم بسیار حساس نارنج، لمون اورکا و پرشین‌لایم مشاهده شد. نارنگی‌های کلمانتین و انشو، پرتقال خونی و پوملو، به علت تشکیل نواحی آب‌سوخته ظریف یا محدود به بخشی از رگبرگ‌های جانبی در گروه میزبان‌های با حساسیت متوسط و نارنگی پونکن، تانجلوی مینیولا، پرتقال‌های تامسون ناول، والنسیا و سیاورز، کامکوات و بالنگ اتراگ به سبب بروز حداقل یکی از سه نوع علایم دیگر در گروه میزبان‌های با حساسیت کم قرار گرفتند. در ارقام متحمل لیموشیرین، مکزیکن‌لایم، نارنگی پیج و گریپ‌فروت‌های فلیم و ردبلاش تا یک سال پس از مایه‌زنی، علایمی ظاهر نشد. گروه‌بندی توصیفی انجام شده بر مبنای تعداد، شدت و ثبات علایم، با تجزیه خوشه‌ای براساس فاصله اقلیدسی Ward مطابقت داشت.

کلید واژه‌ها: تحمل، حساسیت، علایم، ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات

دبیر تخصصی: دکتر سعید تابعین

Citation: Bani Hashemian, S.M, Rouhibakhsh, A., Pajouhesh, N. & Ghasemi, M. (2022). Reaction severity and infection symptoms in citrus cultivars susceptible *to citrus yellow vein clearing virus* in the greenhouse conditions. Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), *45*(3), 1-14. https://doi.org/10.22055/ppr.2022.17660.

مقدمه

مرکبات متعلق به جنس *Citrus* و تیره *Rutaceae*، از میوه‌های مهم گرمسیری و نیمه‌گرمسیری و منبع غنی از ویتامین‌ها، اسیدهای آلی، املاح معدنی و آنتی‌اکسیدان هستند که پراکندگی وسیع جهانی دارند و تجارت آنها، دومین صنعت بزرگ میوه در دنیا را تشکیل می‌دهد (Golein & Aduli, 2011). ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات (*Citrus yellow vein clearing virus*, CYVCV)، عامل بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات و علت اصلی کاهش قابل ملاحظه کمیت وکیفیت محصول لمون[1] (لیموهای اسیدی با میوه درشت) (*Citrus limon* L.) در سال‌های اخیر در دنیا بوده است (Önelge et al., 2011a; Chen et al., 2014; Liu et al., 2019). خسارت محصول در باغ‌های با علایم بیماری در استان سیچوان که تولیدکننده ۸۰٪ لمون در کشور چین است، حدود ۵۰ تا ۷۰ درصد برآورد شده است (Liu et al., 2019). ایجاد رگه‌های زرد رنگ در رگبرگ‌های جانبی و نواحی آب‌سوخته متناظر در پشت برگ‌های جوان، علت نام‌گذاری بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات است. این علایم برای نخستین بار در دنیا در سال ۱۹۸۸ در درختان لمون و نارنج (*C. aurantium* L.) در کشور پاکستان مشاهده شد (Catara et al., 1993). سپس ماهیت ویروسی بیماری با استفاده از روش‌های انتقال بیولوژی و میکروسکوپ الکترونی مورد تأیید قرار گرفت (Grimaldi & Catara, 1996). تا به امروز وقوع و گسترش این ویروس علاوه بر پاکستان و چین، از کشورهای ترکیه، هند، ایران و قبرس نیز گزارش شده است (Önelge, 2002; Alshami et al., 2003; Chen et al., 2014; Bani Hashemian & Aghajanzadeh, 2017; Alas et al., 2019). ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات از نوع آران‌ای تک‌لا با سنس مثبت و دارای پیکره‌های خمش‌پذیر به قطر ۱۳ تا ۱۴ و طول ۶۷۰ تا ۷۰۰ نانومتر، متشکل از ۷۵۲۹ نوکلئوتید است که در جنس *Mandarivirus* و تیره *Alphaflexiviridae* قرار دارد (Loconsole et al., 2012). انتقال بذری ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات تاکنون به اثبات نرسیده است (Zhou et al., 2015). این ویروس با پیوندک و نهال آلوده، ابزار باغبانی، شته سبز مرکبات (*Aphis spiraecola* Patch)، شته سبز پنبه (*A. gossypii* Glover) و سفید بالک مرکبات (*Dialeorudes citri* Ashmead) منتقل می‌شود (Zhang et al., 2018; Zhang et al., 2019a; Zhang et al., 2019b; Afloukou et al., 2021). مایه‌زنی مکانیکی عصاره درختان آلوده به گیاهان محک لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) و لوبیا چشم‌بلبلی (*Vigna unguiculata* L.) باعث انتقال آلودگی و ایجاد علایم سیستمیک در آنها می‌شود (Önelge et al., 2011b). در آزمون انتقال با پیوند، ارقام نارنج، لمون و پرتقال مادام واینوس (*C. sinensis* (L.) Osbeck cv. Madam vinus)، میزبان‌های حساس و گریپ‌فروت دانکن (*C. paradisi* Macf. cv. Duncan)، مکزیکن لایم (*C. aurantifolia* Swing.) و نارنگی پارسون (*C. reticulata* Blanco. cv. Parson) به عنوان ارقام متحمل معرفی شده‌اند (Loconsole et al., 2012). در بررسی میدانی ۱۶۶ باغ آلوده در ۱۱ استان مهم کشت مرکبات در چین، زردی و آب‌سوختگی خفیف رگبرگ‌های جانبی و چروکیدگی برگ‌ها از علایم بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات در ارقام پوملو (*C. grandis* Osbeck)، انشو (*C. unshiu* Marcov.) و شاتانجو (*C. reticulata* Blanco. cv. Shatangju) ذکر شده است (Zhou et al., 2017). همچنین وقوع لکه‌برگی در درختان آلوده به رگبرگ روشنی زرد از ارقام پرتقال پاین‌اپل (*C. sinensis* (L.) Osbeck cv. Pineapple) و مالتا (*C. sinensis* (L.) Osbeck cv. Malta)، نارنگی کینو (*C. reticulata* Blanco. cv. Kinow) و بالنگ اتراگ (*C. medica* L. cv. Etrog) در هند گزارش شده است (Meena et al., 2019). نارنج، لمون، پرشین لایم (*C. latifolia*

1- Lemon

Tanaka)، انشو و کلمانتین (*C. clementina* Hort. ex Tan.) میزبان‌های طبیعی CYVCV در ایران هستند (Bani Hashemian, 2019). در نارنگی کلمانتین، دخالت ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات در بروز علایم لکه‌برگی ثابت شده است (Lohrasbi et al., 2018). نتایج بررسی‌های گذشته نشان داد که این ویروس در استان‌های شمالی کشور در حال گسترش است و انتقال نهال و پیوندک آلوده از این مناطق، خطر گسترش ویروس به سایر مناطق کشت مرکبات ایران را به دنبال دارد (Bani Hashemian & Aghajanzadeh, 2020). در مطالعه حاضر، واکنش ارقام مهم تجاری مرکبات کشور در راستای شناسایی میزبان‌های حساس و متحمل جهت به کارگیری در برنامه مدیریت بیماری مورد بررسی قرار گرفته است. میزبان‌های حساس شناسایی شده در شرایط کنترل شده، بر مبنای تعداد، شدت و ثبات علایم در سه گروه با حساسیت زیاد، متوسط و خفیف دسته‌بندی شدند.

مواد و روش‌ها

ارقام مورد مطالعه

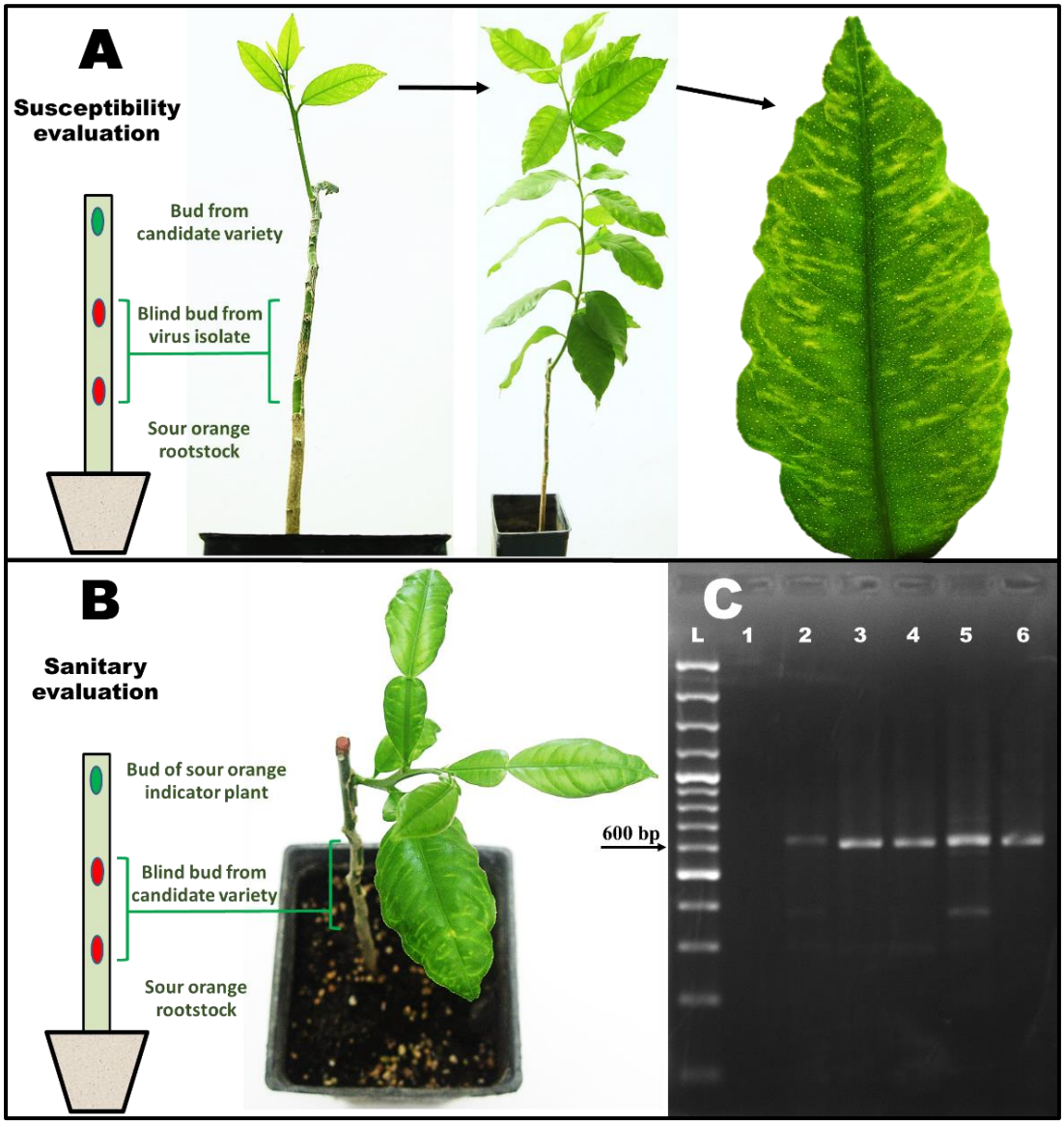
ارقام مهم تجاری مرکبات کشور از گروه‌های پرتقال، نارنگی، نارنج، لیمو، گریپ‌فروت، بالنگ و تانجلو شامل پرتقال‌های تامسون ناول (*C. sinensis* (L.) Osbeck cv. Thomson navel)، والنسیا (*C. sinensis* (L.) Osbeck cv. Valencia)، خونی مورو (*C. sinensis* (L.) Osbeck cv. Moro) و محلی سیاورز (*C. sinensis* (L.) Osbeck cv. Siavaraz)؛ نارنگی‌های کلمانتین، پونکن (*C. reticulata* Blanco. cv. Ponkan)، پیج (*C. reticulata* Blanco. cv. Page) و انشو؛ نارنج، لیمو شیرین (*C. limetta* Risso)؛ لیموترش‌های اورکا لمون (*C. limon* L. cv. Eureka)، پرشین لایم و مکزیکن لایم؛ گریپ‌فروت‌های فلیم (*C. paradisi* L. cv. Flame) و ردبلاش (*C. paradisi* x *C. reticulata* L. cv. Redblush)؛ تانجلوی مینیولا (*paradisi* cv. Mineola) و رقم بالنگ اتراگ از کلکسیون زیر پوشش (اسکرین‌هاوس[1]) گیاهان مادری پیوندک پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری و دو رقم پوملو و کامکوات (*C. japonica* Thunb.) از درختان منبع اخذ پیوندک یکی از نهالستان‌های بخش خصوصی واقع در شهرستان تنکابن تهیه شد (جدول ۱). پیوندک‌های جمع‌آوری شده مطابق دستورالعمل فریزون و طاهر (Frison & Taher, 1991) با محلول رقیق هیپوکلریت سدیم ضدعفونی و پس از آب‌شویی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یخچال نگهداری شدند.

آزمون‌های انتقال با پیوند

به منظور تعیین حساسیت ارقام مورد بررسی، پیوندک آنها به گلخانه آموزشی گروه گیاهپزشکی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان منتقل و با پیوند جوانه روی پایه نارنج تکثیر شدند. واکنش چهار نهال‌آلوده شده از هر یک از این ارقام با جدایه LEN (رس‌شمار بانک ژن: KX902488) از منشأ درختان لیموی اورکا آلوده به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات (Bani Hashemian & Aghajanzadeh, 2017) با گیاهچه‌های مایه‌زنی نشده شاهد در دمای ۱±۲۳ درجه سانتی‌گراد مورد مقایسه قرار گرفت (شکل ۱، A). در مراحل تکثیر و آلوده‌سازی، ضدعفونی ابزار باغبانی با محلول تجاری هیپو کلریت سدیم انجام شد. به موازات آزمون تعیین حساسیت ارقام مورد بررسی، ارزیابی سلامت آنها نسبت به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات از طریق آزمون گیاه محک درگلخانه تحقیقاتی پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری انجام شد. بستر حاوی ۵۰ درصد کوکوپیت، ۲۵ درصد پرلیت و ۲۵ درصد ماسه پس از مخلوط‌شدن با دستگاه میکسر، به مدت یک ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۶ بار در اتوکلاو ضدعفونی گردید. گیاهچه‌های بذری نارنج تولید شده در این بستر با جوانه عاری از ویروس همین رقم پیوند و به عنوان گیاهان محک مورد استفاده قرار گرفتند. آلوده‌سازی چهار گیاه از هر یک از محک‌ها به وسیله پیوند

1- Screenhouse

پوستک از ارقام مورد بررسی، مطابق روش Roistacher (1991) صورت گرفت. این گیاهان به همراه گیاهچه‌های مایه‌زنی نشده شاهد منفی و ۴ اصله نهال شاهد مثبت آلوده شده با جدایه LEN در شرایط دمایی کنترل شده (۲۴ درجه سانتی‌گراد روز و ۱۸ درجه سانتی‌گراد شب) نگهداری شدند (شکل ۱، B).



شکل ۱- ارزیابی حساسیت (A) و سلامت (B) ارقام مورد بررسی نسبت به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات با استفاده از آزمون‌های انتقال با پیوند در شرایط گلخانه و تائید آلودگی به ویروس از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با ترانویسی معکوس (C). چاهک‌ها: L- نشانگر با اندازه ۱۰۰ جفت باز (GeneRuler, Thermo Scientific)، ۱- کنترل فاقد الگوی آران‌ای، ۲ الی ٦- گیاهان دارای علایم.

Figure 1. Susceptibility (A) and sanitary (B) evaluation of the selected cultivars to CYVCV using graft transmission treatments under greenhouse conditions and confirmation of virus infection by reverse transcription polymerase chain reaction (C). Lanes: L. 100 bp DNA ladder (GeneRuler, Thermo Scientific), 1. RT control, 2 to 6. Symptomatic plants.

استخراج اسید نوکلئیک و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با ترانویسی معکوس (RT-PCR)

آرای کل استخراج شده به روش اس‌دی‌اس استات پتاسیم[1] (Bernad & Duran-Vila, 2006) از پوست و رگبرگ گیاهان دارای علایم جهت تائید مولکولی آلودگی به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با ترانویسی معکوس به کار رفت. پس از تشکیل جست‌های جدید و مشاهده علایم در ارقام مورد بررسی، عصاره‌گیری از ۵۰۰ میلی‌گرم بافت گیاهی در پاکت‌های پلاستیکی حاوی ۵ میلی‌لیتر بافر استخراج (0.1M Tris-HCl, pH 8.0; 50mM EDTA; 0.5M mercaptoethanol) انجام شد. این عصاره به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد با اس‌دی‌اس و به همین مدت در یخ با استات پتاسیم تیمار و رونشین به دست آمده به وسیله اتانول رسوب‌دهی، تغلیظ و نهایتا در ۴۰ میکرولیتر آب مقطر حل شد. ردیابی ویروس بر اساس آزمون RT-PCR دو مرحله‌ای در حضور جفت آغازگر اختصاصی ژن پروتئین پوششی (YVCPf 5'-TACCGCAGCTATCCATTTCC-3'/ YVCPr 5'-GCAGAAATCCCGAACCAC-3') (Chen et al., 2014) انجام شد و نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت. برای ساخت دی‌ان‌ای مکمل از آغازگر YVCPr و کیت Revert Aid (Fermentas) و جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از کیت PCR Master Mix (Fermentas) استفاده شد. به منظور تکثیر قطعه مورد نظر، چرخه‌های حرارتی شامل ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد (یک چرخه)، ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در ۵۴ درجه سانتی‌گراد و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۳۰ چرخه) و ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۱ چرخه) اجرا گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

اثر آلودگی به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات روی بروز علایم در مقایسه با گیاهان شاهد آلوده نشده در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۹ رقم، ۴ تکرار، ۴ نوع علایم و ۳ حالت شدت علایم مورد آزمایش قرار گرفت. رتبه‌بندی شدت واکنش هر یک از علایم ذکر شده براساس مقیاس یک تا ۳ (۱: بدون علایم؛ ۲: علایم خفیف و متوسط؛ ۳: علایم شدید) انجام شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ مورد آنالیز قرار گرفتند و میانگین‌ها با روش LSD مقایسه شدند. تجزیه خوشه‌ای ارقام با توجه به میانگین شدت علایم به روش فاصله اقلیدسی وارد[2] با استفاده از نسخه ۱۷ نرم‌افزار Minitab به دست آمد.

نتایج

تشخیص ارقام حساس به بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات توسط آزمون انتقال ویروس از طریق پیوند در شرایط گلخانه

بروز چهار نوع علایم؛ زردی رگبرگ‌های جانبی در سطح رویی برگ‌های جوان (علایم نوع A)، نواحی متناظر آب‌سوخته در زیر برگ‌های جوان (علایم نوع B)، چروکیدگی برگ‌های مسن (علایم نوع C) و لکه‌برگی بر روی برگ‌های مسن (علایم نوع D) در نهال‌های آلوده‌شده با پیوند در شرایط گلخانه، ملاک تشخیص حساسیت ارقام قرار گرفت (جدول ۱ و شکل ۲). علایم برگ‌های جوان (علایم نوع A و B)، پس از تشکیل جست‌های جدید و علایم برگ‌های مسن (علایم نوع C و D)، یک سال پس از مایه‌زنی مورد ارزیابی قرار گرفت. بر این اساس، از بین ۱۹ رقم تجاری مرکبات مورد بررسی در این تحقیق، ۱۴ رقم به عنوان ارقام حساس به بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات در بین ارقام مهم تجاری کشور تشخیص داده شدند. این در حالی است که در بقیه ارقام شامل لیموشیرین، مکزیکن‌لایم، نارنگی پیج و گریپ‌فروت‌های فلیم و ردبلاش تا یک سال پس از انتقال ویروس، هیچ گونه علایمی مشاهده نشد (جدول ۱).

درجه‌بندی واکنش میزبان‌های حساس، بر مبنای وقوع نوع شدید (علایم نوع A1، B1، C1 و D1) یا حالت خفیف و متوسط

1- SDS-Potassium acetate

2- Ward Euclidean distance

(علایم نوع A2، B2، C2 و D2) علایم شاخص بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات انجام شد و این ارقام با توجه به شدت واکنش در سه گروه با حساسیت زیاد، متوسط و کم دسته‌بندی شدند (جدول ۱). علایم برگ‌های جوان پس از تشکیل جست‌های جدید و از حدود یک ماه پس از آلوده‌سازی نهال‌های ارقام مورد بررسی با جدایه LEN در شرایط گلخانه ظاهر گردید. زردی شدید رگبرگ‌های جانبی مشتمل بر خطوط زرد مشخص با قطر زیاد یا محدود به کل رگبرگ‌های جانبی (علایم A1)، تنها در ارقام نارنج، لمون اورکا و پرشین لایم مشاهده شد و این سه رقم در گروه میزبان‌های خیلی حساس قرار گرفتند (جدول ۱، ارقام ۱ الی ۳). پایداری این علایم، از دیگر مشخصه‌های بیماری در این سه میزبان بسیار حساس است. به عبارت دیگر با کامل و مسن شدن برگ‌های جوان، زردی رگبرگ‌ها همچنان قابل ردیابی است. درجات خفیف‌تر این نوع از علایم شامل خطوط زرد ظریف، کم یا محدود به بخشی از رگبرگ‌های جانبی (علایم A2) علاوه بر سه میزبان یاد شده در سایر ارقام با حساسیت کمتر دیده شد (جدول ۱، ارقام ۱ الی ۱۳). بر خلاف ارقام خیلی حساس نارنج، لمون و پرشین لایم، علایم زردی رگبرگ‌ها در ارقام با حساسیت متوسط و کم (جدول ۱، ارقام ۴ الی ۱۳) به مدت محدودی پایدار بودند و با کامل و مسن شدن برگ‌های جوان به تدریج محو شدند.

تشکیل رگه‌های آب‌سوخته زیر برگ‌های جوان در نواحی متناظر با خطوط زرد سطح رویی، از علایم دیگر بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات به شمار می‌رود. نوع شدید این علایم به صورت نواحی آب‌سوخته مشخص با قطر زیاد یا محدود به کل رگبرگ‌های جانبی (علایم B1)، تنها در سه رقم خیلی حساس نارنج، لمون اورکا و پرشین لایم دیده شد (جدول ۱، ارقام ۱ الی ۳). بروز حالت خفیف‌تر علایم آب‌سوختگی به صورت مناطق آب‌سوخته ظریف یا محدود به بخشی از رگبرگ‌های جانبی (علایم B2) در نارنگی‌های کلمانتین و انشو، پرتقال خونی مورو و پوملو باعث شد تا این چهار رقم در گروه میزبان‌های با حساسیت متوسط قرار گیرند (جدول ۱، ارقام ۴ الی ۷). برخلاف گیاهان شاهد، چروکیدگی برگ‌های مسن (علایم نوع C) در ۱۳ رقم و لکه‌برگی بر روی برگ‌های مسن (علایم نوع D) در همه ۱۴ رقم حساس این تحقیق مشاهده گردید. موجی‌شدن یا چروکیدگی بخشی از سطح برگ (علایم C2) در همه ارقام حساس به جز بالنگ (جدول ۱، ارقام ۱ الی ۱۳) و علایم شدید چروکیدگی کل سطح برگ (علایم C1) در سه میزبان خیلی حساس و نارنگی‌های کلمانتین و انشو (جدول ۱، ارقام ۱ الی ۵) دیده شد. به همین صورت، لکه‌برگی شدید و خفیف به ترتیب با لکه‌های بیشتر و کمتر از ۵۰٪ سطح برگ (علایم D1 و D2)، در کلیه ارقام حساس به بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات تشخیص داده شد (جدول ۱، ارقام ۱ الی ۱۴).

تائید آلودگی به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات در ارقام مورد بررسی

به موازات آزمون ارزیابی حساسیت، بررسی سلامت ارقام جمع‌آوری شده نسبت به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات با نموده‌سازی بیولوژی در شرایط گلخانه انجام شد. پس از تشکیل جست‌های جدید محک نارنج، علایم بیماری شامل زردی رگبرگ‌های جانبی و آب‌سوختگی نواحی متناظر در سطح زیرین برگ‌های جوان، در گیاهان شاهد مثبت مایه‌زنی شده با جدایه LEN پدیدار گشت (شکل ۱، B). چنین علایمی در گیاهان مایه‌زنی نشده شاهد منفی مشاهده نشد. علایم بیماری همچنین در گیاهان محک آلوده شده با پوستک از ارقام پوملو و کامکوات نیز ظاهر گردید که بیانگر وجود آلودگی اولیه به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات در این دو رقم مورد بررسی است (جدول ۱، ارقام ۷ و ۱۳). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن پروتئین پوششی و آرانایِ کل استخراج شده از بافت پوست و رگبرگ جست‌های جوان نهال‌های دارای علایم، آلودگی به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات را در ۱۴ میزبان حساس مشخص شده در این تحقیق مورد تأیید قرار داد و قطعات مورد انتظار با اندازه حدود ۶۰۰ جفت باز در واکنش RT-PCR به دست آمد (شکل ۱، C). این قطعه در آرانایِ استخراج شده از گیاهان شاهد آلوده نشده و کنترل منفی فاقد الگوی آرانای و دی‌انای مکمل تکثیر نشد.

ارزیابی شدت آلودگی ارقام مرکبات به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات

با تجزیه خوشه‌ای داده‌های شدت واکنش به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات، ارقام با حساسیت متفاوت (جدول ۱) در خوشه‌های مجزا قرار گرفتند (شکل ۳). سه رقم خیلی حساس نارنج، لمون و پرشین لایم در اولین خوشه، چهار رقم با حساسیت متوسط کلمانتین، انشو، پرتقال خونی و پوملو در خوشه دوم و ارقام با حساسیت کم نارنگی پونکن، تانجلو، پرتقال‌های تامسون ناول، والنسیا و سیاورز، کامکوات و بالنگ در خوشه سوم گروه‌بندی شدند. در خوشه چهارم لیموشیرین، مکزیکن لایم، نارنگی پیج و دو رقم گریپ‌فروت قرار گرفتند که با وجود آلودگی، علایمی در آنها دیده نشد.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های آزمایش نشان داد که نوع رقم آلوده شده به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات در شدت بروز هر چهار نوع علایم؛ زردی رگبرگ‌های جانبی در سطح رویی برگ‌های جوان (علایم نوع A)، نواحی متناظر آب‌سوخته در زیر برگ‌های جوان (علایم نوع B)، چروکیدگی برگ‌های مسن (علایم نوع C) و لکه‌برگی بر روی برگ‌های مسن (علایم نوع D) تاثیر معنی‌دار داشته است (جدول ۲).

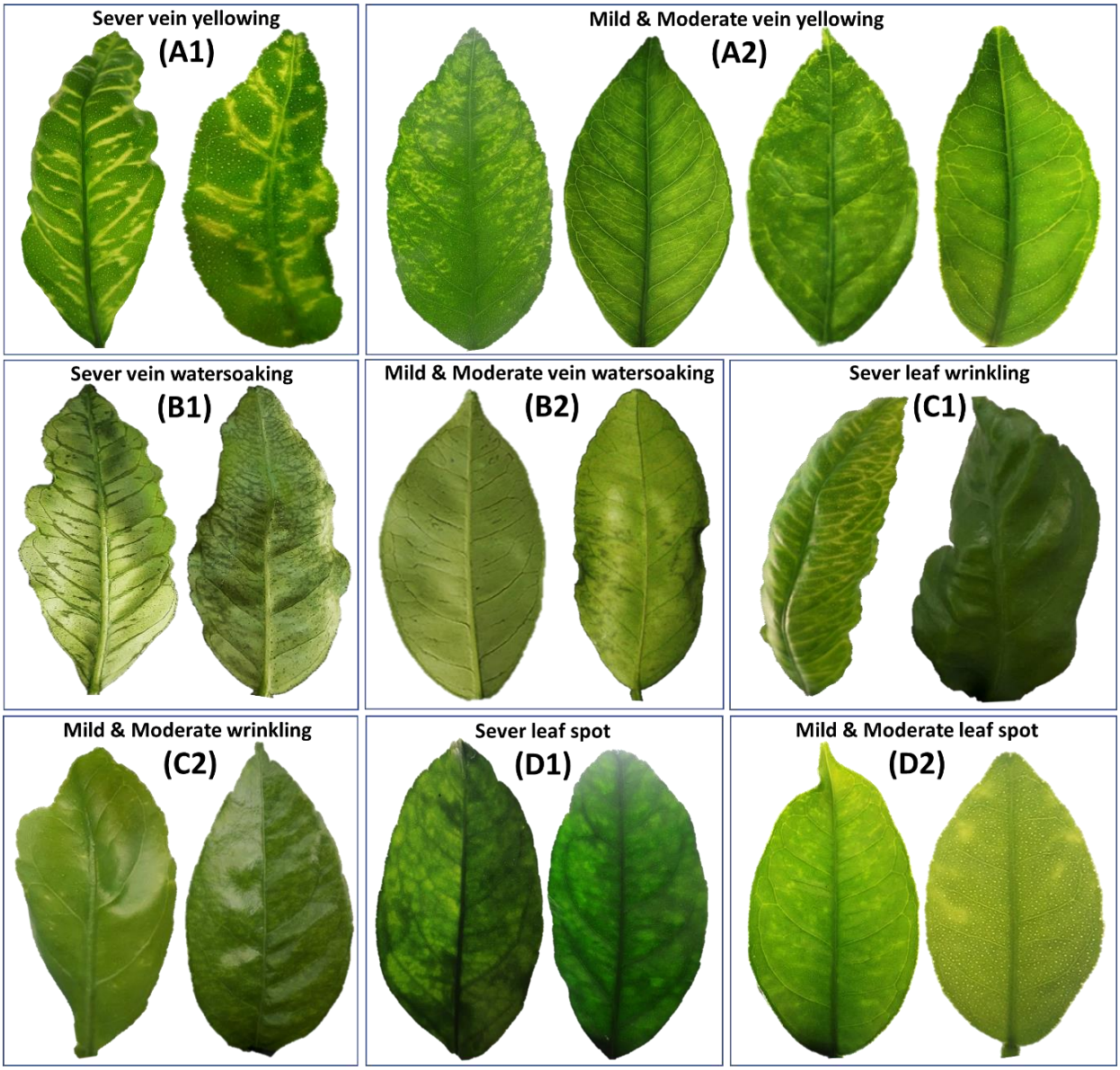
جدول۱- ارقام مورد بررسی، علایم و واکنش آنها به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات.

Table 1. Cultivars, symptoms and their reactions to CYVCV.

No.	Cultivar	Types of symptoms*				Reaction
1	Sour orange	A1,A2	B1	C1,C2	D1	High susceptible
2	Eureka lemon	A1,A2	B1	C1,C2	D1,D2	High susceptible
3	Persian lime	A1,A2	B1	C1,C2	D1	High susceptible
4	Clementine mandarin	A2	B2	C1,C2	D1	Moderate susceptible
5	Satsuma mandarin	A2	B2	C1,C2	D1	Moderate susceptible
6	Moro blood orange	A2	B2	C2	D1,D2	Moderate susceptible
7	Pummelo**	A2	B2	C2	D2	Moderate susceptible
8	Ponkan mandarin	A2	–	C2	D1,D2	Low susceptible
9	Mineola tangelo	A2	-	C2	D1	Low susceptible
10	Valencia sweet orange	A2	-	C2	D1	Low susceptible
11	Thomson navel orange	A2	-	C2	D1	Low susceptible
12	Siavaraz local orange	A2	-	C2	D1	Low susceptible
13	Kumquat**	A2	-	C2	D2	Low susceptible
14	Etrog citron	-	-	-	D1	Low susceptible
15	Sweet lime	-	-	-	-	Tolerant
16	Mexican lime	-	-	-	-	Tolerant
17	Page mandarin	-	-	-	-	Tolerant
18	Flame grapefruit	-	-	-	-	Tolerant
19	Redblush grapefruit	-	-	-	-	Tolerant

* - Distinct yellow lines with large diameter or limited to the entire lateral veins (A1); Delicate yellow lines, little or limited to part of the lateral veins (A2); Water-soaked areas with large diameter or limited to the entire lateral veins (B1); Delicate water-soaked areas, little or limited to part of the lateral veins (B2); Wrinkling of the entire leaf surface (C1); Wrinkling of part of the leaf surface (C2); Spots on more than 50% of leaf area (D1); Spots on less than 50% of leaf area (D2).

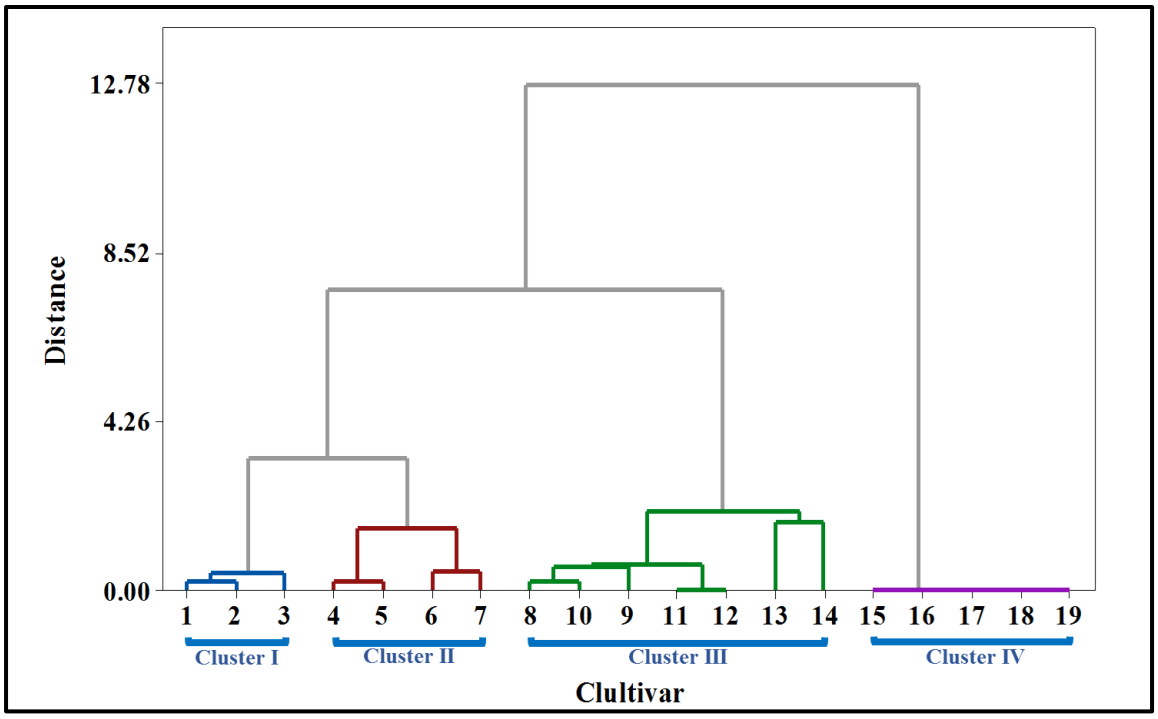
** - Primary infection with CYVCV was detected.



شکل ۲- انواع علایم در ارقام مورد بررسی پس از آلوده‌سازی با جدایه LEN از ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات در شرایط گلخانه.

Figure 2. Types of symptoms in the studied cultivars after inoculation with LEN isolate of CYVCV in greenhouse conditions.

تأثیر نوع رقم آلوده شده به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات در شدت بروز هر یک از علایم چهارگانه A، B، C و D در جدول ۳ خلاصه شده است. بر اساس این داده‌ها، ارقام آلوده را می‌توان از نظر شدت علایم زردی رگبرگ‌های جانبی برگ‌های جوان (علایم نوع A) در سه گروه مجزا قرار داد. این نوع دسته‌بندی بر مبنای علایم آب‌سوختگی رگبرگ‌های جانبی برگ‌های جوان و چروکیدگی و لکه‌برگی برگ‌های مسن (علایم نوع B، C و D) امکان‌پذیر نبود (جدول ۳). ارقام خیلی حساس نارنج، لمون اورکا و پرشین لایم (جدول ۱، ارقام ۱ الی ۳) با توجه به علایم A و B تفکیک شدند. ارقام با حساسیت متوسط و کم به جز بالنگ (جدول ۱، ارقام ۱ الی ۱۳)، بر اساس علایم A با هم در یک گروه قرار گرفتند.



شکل ۳ – گروه‌بندی ارقام مورد بررسی براساس داده‌های شدت واکنش به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات با استفاده از ضریب فاصله اقلیدسی Ward. اعداد ارقام در جدول ۱ تعریف شده است.

Figure 3. Grouping of varieties based on reactions to CYVCV using Ward Euclidean distance. Cultivar numbers are defined in Table 1.

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر آلودگی به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات بر شدت واکنش ارقام مورد مطالعه.

Table 2. Analysis of variance the effect of CYVCV infection on the reaction severity of the studied cultivars.

Source of variance	Degree of freedom	Mean of Squares of symptom severity			
		A	B	C	D
Cultivar	18	1.45**	2.39**	1.74**	2.70**
Error	57	0.04	0.01	0.15	0.27

** - Values are significant at $P<0.01$.

بحث

رگبرگ روشنی زرد مرکبات، بیماری ویروسی جدیدی است که در حال حاضر گسترش آن محدود به تعدادی از کشورهای جنوب آسیا است. پراکنش سریع و خسارت شدید این بیماری خصوصا در چین و ترکیه، دو کشور مهم تولید کننده محصول لیمو (http://faostat.fao.org/search/en/citrus)، باعث شد تا به عنوان تهدید جدیدی برای مرکبات دنیا در نظر گرفته شود. بر اساس دانش موجود راه درمان یا کنترل شیمیایی برای این بیماری وجود ندارد و مدیریت بر مبنای روش‌های پیش‌گیرانه و کشت ارقام مقاوم یا متحمل به جای انواع حساس صورت می‌گیرد (Liu et al., 2020).

ظهور علایم ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات، تحت تأثیر ژنوتیپ و عوامل محیطی قرار دارد (Iftikhar et al., 2010). بهترین دما برای بروز علایم در این بیماری، ۱۸ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد تعیین شده است (Zhou et al., 2017). بر این اساس تحقیق حاضر در شرایط گلخانه و در این محدوده دمایی انجام

شد تا از بین دو فاکتور مؤثر، اثر رقم در بروز علایم نمایان گردد. از طرف دیگر تفاوت در واکنش گونه‌ها و ارقام مرکبات به طور قطع به ویژگی‌های ژنتیکی آنها بستگی دارد. ژنوتیپ‌های متعداد متعلق به جنس *Citrus* به دلیل برخی ویژگی‌های مشترک در برگ، گل و میوه در کنار هم قرار گرفته‌اند. با وجود این، تنوع بین انواع مختلف مرکبات از جمله پرتقال، نارنگی، نارنج، لیمو، گریپ‌فروت، پوملو، بالنگ، کامکوات و پوملو به حدی است که از حدود ۱۰۰ سال قبل تا کنون سیستم های متفاوتی جهت طبقه‌بندی آنها به کار رفته است. در آخرین مطالعه تبارزایی ژنوم، ضمن انتقال کامکوات از جنسی مستقل به جنس *Citrus*، مشخص شد که انواع مرکبات از تلاقی بین این ژنوتیپ و گونه‌های اجدادی بالنگ، پوملو، نارنگی و میکرانتا (*C. micrantha* Wester) مشتق شده‌اند (Wu et al., 2018). تنوع فراوان در مرکبات، به ویژه در مورد لیموها به خوبی مشهود است. عبارت لیمو در زبان فارسی دو گروه لمون و لایم[1] را شامل می‌شود. لمون‌ها، لیموهای ترش با میوه درشت را تشکیل می‌دهند و اندازه میوه حتی در جست‌های رشدی درختان یک رقم خاص نیز متفاوت است. از این رو تشخیص ارقام در این گروه دشوار است.

جدول ۳- اثر آلودگی به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات بر میانگین شدت علایم در ارقام مورد مطالعه.

Table 3. The effect of CYVCV infection on the mean severity of symptoms in the studied cultivars.

Cultivar	Mean of symptom severity			
	A	B	C	D
1	2.75a	3a	2.75a	3a
2	2.75a	3a	2.75a	3a
3	2.5a	3a	2.75a	3a
4	2b	2b	2.5ba	3a
5	2b	2b	2cb	2.75a
6	2b	1c	1.75c	2.5ba
7	2b	1c	1.5dc	2b
8	2b	1c	1.5dc	2.5ba
9	2b	2b	2.5ba	3a
10	2b	1c	1.75c	2.5ba
11	2b	1c	1.75c	2.5ba
12	2b	1c	2cb	2.5ba
13	2b	2b	2cb	2.5ba
14	1c	1c	1d	1c
15	1c	1c	1d	1c
16	1c	1c	1d	1.25c
17	1c	1c	1d	1c
18	1c	1c	1d	1c
19	1c	1c	1d	1c

- The means with different letters have a significant difference.
- Cultivar numbers are defined in Table 1.

1- Lime

در مقابل درگروه لایم‌ها، انواع اسیدی و غیراسیدی و ارقامی مانند مکزیکن‌لایم، پرشین‌لایم و لیموشیرین به صورت گونه‌های متمایز قرار گرفته‌اند (Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996). در تحقیق حاضر اختلاف واکنش ارقام به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات مشخص شد و بروز علایم در ژنوتیپ‌های مختلف پس از مایه‌زنی در شرایط گلخانه، ملاک تشخیص حساسیت ارقام قرار گرفت. بر این اساس، غیر از ارقام لیموشیرین، مکزیکن‌لایم، نارنگی پیج و گریپ‌فروت‌های فلیم و ردبلاش، بقیه ارقام به عنوان ژنوتیپ‌های حساس تشخیص داده شدند (جدول ۱). نتایج این بررسی همچنین نشان داد که واکنش نسبت به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات از رقمی به رقم دیگر متفاوت است و نمی‌توان این عکس‌العمل را به کل گونه یا گروه مرکبات تعمیم داد. بر این اساس در بین ارقام لیمو، لمون اورکا و پرشین لایم در گروه خیلی حساس و در مقابل مکزیکن‌لایم و لیموشیرین در گروه متحمل قرار گرفتند. ارقام متحمل و حساس به همین ترتیب در بین نارنگی‌ها هم یافت شد. سه رقم پرتقال و دو رقم گریپ فروت مورد بررسی نیز به ترتیب واکنش حساسیت و تحمل نشان دادند (جدول ۱).

ویژگی اصلی و علت نام‌گذاری ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات، تشکیل رگه‌های زرد رنگ در رگبرگ‌های جانبی و نواحی آب‌سوخته متناظر با آن در پشت برگ‌های جوان درختان بیمار در دو میزبان شناخته‌شده در دنیا یعنی نارنج و لمون است (Grimaldi & Loconsole et al., 2012; Catara, 1996). از طرف دیگر چروکیدگی و لکه‌برگی نیز از دیگر علایم مرتبط با این بیماری است که پس از کامل و مسن شدن برگ‌های جوان در درختان آلوده نمایان می‌گردد (Zhou et al., 2017; Lohrasbi et al., 2018; Meena et al., 2019). در گزارش‌های میدانی و آزمون‌های انتقال با پیوند تعیین دامنه میزبانی در بین ارقام و گونه‌های دیگر مرکبات غیر از نارنج و لمون، پرتقال‌های مادام واینوس، پاین‌اپل و مالتا، نارنگی‌های انشو، کلمانتین، شاتانجو و کینو و ارقام پرشین‌لایم، پوملو و بالنگ اتراگ به عنوان میزبان‌های حساس و گریپ‌فروت دانکن، مکزیکن‌لایم و نارنگی پارسون به عنوان ارقام متحمل معرفی شده‌اند (Loconsole et al., 2012; Zhou et al., 2017; Bani Hashemian, 2019; Meena et al., 2019). در این مطالعه میزبان‌های حساس، بر مبنای تعداد، شدت و ثبات علایم در سه گروه با حساسیت زیاد، متوسط و خفیف دسته‌بندی شدند. حالت شدید و ثبات چهار نوع علایم زردی و آب‌سوختگی رگبرگ‌های جانبی برگ‌های جوان و چروکیدگی و لکه‌برگی برگ‌های مسن در سه میزبان خیلی حساس نارنج، لمون اورکا و پرشین لایم مشاهده شد. چهار نوع علایم مذکور با شدت کمتر در ارقام با حساسیت متوسط شامل نارنگی‌های کلمانتین و انشو، پرتقال خونی مورو و پوملو و حداقل یکی از این علایم در میزبان‌های با حساسیت کم دیده شد (جدول ۱ و شکل ۲). بر اساس اطلاعات موجود، مقایسه شدت و درجه‌بندی علایم در میزبان‌های ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات، برای اولین بار در دنیا در این تحقیق انجام شده است.

گروه‌بندی توصیفی ارقام مورد بررسی بر اساس تعداد، شدت و ثبات علایم (جدول ۱)، به طور دقیق با نتایج خوشه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای (شکل ۳) مطابقت داشت به طوری که در خوشه‌های یک تا چهار به ترتیب ارقام با حساسیت زیاد، متوسط، کم و متحمل قرار گرفتند. مقایسه میانگین داده‌های شدت بروز علایم چهارگانه مرتبط با ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات (جدول ۳) نشان داد که شدت علایم زردی رگبرگ‌های جانبی برگ‌های جوان، که واضح‌ترین نوع علایم بیماری است، اگرچه می‌تواند به عنوان شاخصی جهت بررسی واکنش نسبی ارقام نسبت به این بیماری مورد استفاده قرار گیرد اما تفکیک دقیق میزبان‌های حساس با در نظرگرفتن مجموع شاخص‌های توصیفی امکان‌پذیر است. بر این اساس، ارقام با حساسیت متوسط (جدول ۱، ارقام ۴ الی ۷) به دلیل بروز علایم آب‌سوختگی برگ‌های جوان از ارقام با حساسیت کم متمایز شدند. همچنین رقم بالنگ، نه به عنوان

رقمی متحمل (جدول ۳، ردیف ۱۴) بلکه به جهت تشکیل لکه‌برگی در برگ‌های مسن، در گروه ارقام با حساسیت کم (جدول ۱، ردیف ۱۴) قرار گرفت.

نتایج تحقیق حاضر همچنین نشان داد که ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات دامنه میزبانی وسیعی دارد و این ویروس می‌تواند علاوه بر نارنج و لمون، ارقام مختلف از انواع متنوع مرکبات را آلوده سازد. رصد علایم زردی و آب‌سوختگی رگبرگ‌های جانبی برگ‌های جوان و چروکیدگی و لکه‌برگی برگ‌های مسن جهت مدیریت بیماری در نهالستان‌ها و باغات مرکبات توصیه می‌گردد. بررسی هم‌زمان سلامت ارقام جمع‌آوری شده در این تحقیق نسبت به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات با نمونه‌سازی بیولوژی گیاه محک، آلودگی دو رقم پوملو و کامکوات را تائید نمود (جدول ۱). در نبود پیوندک کافی در گیاهان مادری این دو رقم درکلکسیون زیر پوشش ارقام پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری، پیوندک آنها از یکی از نهالستان‌های بخش خصوصی استان مازندران اخذ شد. مطالعات گذشته نشان داد که ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات حداقل در استان‌های شمالی کشور در حال گسترش است (Bani Hashemian & Aghajanzadeh, 2020). نتایج این تحقیق مشخص نمود که تهیه نهال و پیوندک از مناطق آلوده، خطر تکثیر و گسترش ویروس را به دنبال دارد. از این جهت، مدیریت بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات از طریق پیشگیری از گسترش آن به کانون‌های جدید با تولید و عرضه پیوندک و نهال سالم، نظارت مستمر بر نهالستان‌ها و معرفی ژنوتیپ‌های متحمل یا مقاوم به صورت جدی باید مورد توجه قرار گیرد.

سپاس‌گزاری

پروژه حاضر در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه گیلان و پروژه مصوب موسسه علوم باغبانی با عنوان واکنش ارقام مهم لیمو نسبت به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات به انجام رسیده است. نویسندگان مراتب سپاس و تشکر خود را از دکتر صدیقه موسی‌نژاد، عضو هیات علمی دانشگاه گیلان، دکتر طاهره رئیسی و دکتر بابک عدولی، اعضای هیات علمی موسسه علوم باغبانی، به جهت نظرات ارزنده و از کارشناسان این موسسه ایمان جوربنیان، معصومه کیااشکوریان، سینا نوری‌زاده، سیده نجمه بنی‌هاشمیان و فرهاد پورعسگری به علت همکاری در آزمون‌های گلخانه‌ای، آزمایشگاهی و آماری اعلام می‌دارند.

REFERENCES

Afloukou, F. M., Çalişkan, F., & Önelge, N. (2021). *Aphis gossypii* Glover is a vector of *Citrus yellow vein clearing virus*. *Journal of General Plant Pathology, 87*, 83-86. https://doi.org/10.1007/s10327-020-00976-6

Alas, T., Baloglu, S., Caglar, B. K., & Gunes, A. (2019). Detection and characterization of *citrus tatter leaf virus* (CTLV) and *citrus yellow vein clearing virus* (CYVCV) in citrus trees from Cyprus. *Saudi Journal of Biological Sciences, 26*, 995-998. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.02.001

Alshami, A. A. A., Ahlawat, Y. S., & Pant, R. P. (2003). A hitherto unreported yellow vein clearing disease of citrus in India and its viral etiology. *Indian Phytopathology, 56*, 422-427. https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.960.937&rep=rep1&type=pdf

Bani Hashemian, S. M., & Aghajanzadeh, S. (2017). Occurrence of *Citrus yellow vein clearing virus* in citrus species in Iran. *Journal of Plant Pathology, 99*, 290. http://www.sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/article/view/3849

Bani Hashemian, S. M. (2019). New natural hosts of *Citrus yellow vein clearing virus* in Iran. *First Iranian Plant Pathology Congress, Karaj*, 288-289. (In Farsi with English summary).

Bani Hashemian, S. M. & Aghajanzadeh, S. (2020). Identification of *Citrus yellow vein clearing virus* in Mazandaran province. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 43*, 49-61. (In Farsi with English summary). 10.22055/ppr.2020.15997

Bernad, L., & Durán-Vila, N. (2006). A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. *Molecular and cellular probes, 20*, 105-113. https://doi.org/10.1016/j.mcp.2005.11.001

Catara, A., Azzaro, A., Davino, M., & Polizzi, G. (1993). Yellow vein clearing of lemon in Pakistan. *Proceedings of the 12th International Organization of Citrus Virologists Conference, New Delhi, India,* 364-367. 10.5070/C52v63f19n

Chen, H. M., Li, Z. A., Wang, X. F., Zhou, Y., Tang, K. Z., Zhou, C. Y., Zhao, X. Y., & Yue, J. Q. (2014). First report of *Citrus yellow vein clearing virus* on lemon in Yunnan, China. *Plant Disease, 98*, 1747. https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-04-14-0343-PDN

Frison, E. A., & Taher, M. M. (Eds.). (1991). *FAO/IBPGR Technical guidelines for the safe movement of citrus germplasm.* FAO publication.

Golein, B., & Aduli, B. (2011). *Citrus*. Novin Poya press, Tehran. (In Farsi).

Grimaldi, V., & Catara, A. (1996). Association of a filamentous virus with yellow vein clearing of lemon. *Proceedings of the 13th International Organization of Citrus Virologists Conference, Fouzhou, China,* 343-345. 10.5070/C56687x3ts

Iftikhar, Y., Iqbal, Z., Ahmed, S., Awan, A. R., Saleem, U., & Sarwar, G. (2010). Effect of environmental factors on yellow vein clearing virus incidence in lemon. *Journal of Agricultural Research, 48*, 87-92.

Liu, Y., Wang, Y., Wang, Q., Zhang, Y., Shen, W., Li, R., Cao, M., Chen, L., Li, X., Zhou, C., & Zhou, Y. 2019. Development of a sensitive and reliable reverse transcription droplet digital PCR assay for the detection of *Citrus yellow vein clearing virus*. *Archives of virology, 164*, 691-697. https://doi.org/10.1007/s10658-019-01920-x

Liu, C., Liu, H., Hurst, J., Timko, M. P., & Zhou, C. (2020). Recent Advances on *Citrus yellow vein clearing virus* in Citrus. *Horticultural Plant Journal, 6*, 216-222. https://doi.org/10.1016/j.hpj.2020.05.001

Loconsole, G., Önelge, N., Potere, O., Giampetruzzi, A., Bozan, O., Satar, S., De Stradis, A., Savino, V., Yokomi, R. K., & Saponari, M. (2012). Identification and characterization of *Citrus yellow vein clearing virus*, a putative new member of the genus *Mandarivirus*. *Phytopathology, 102*, 1168-1175. https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PHYTO-06-12-0140-R

Lohrasbi, S., Bani Hashemian, S. M., & Seraji, A. (2018). Role of *Citrus yellow vein clearing virus* in the appearance of leaf spot in clementine mandarin. *Proceedings of the 23rd Iranian Plant Protection Congress, Gorgan*, 638-639. (In Farsi with English summary).

Meena, R. P., Prabha, K., & Baranwal, V. K. (2019). Genome characterization of *Citrus yellow vein clearing virus*: limited heterogeneity of viral genomes in Mandarivirus-infecting different citrus species. *3 Biotech, 9*, 1-11. https://doi.org/10.1007/s13205-019-1876-4

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

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

Önelge, N., Satar, S., Elibüyük, Ö., Bozan, O., & Kamberoolu, M. (2011b). Transmission studies on *Citrus yellow vein clearing virus*. *Proceedings of the 18th International Organization of Citrus Virologists Conference, Sao Paulo, Brazil*, 11-14. 10.5070/C54134f1xr

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

Spiegel-Roy, P., & Goldschmidt, E. E. (Eds.). (1996). *The biology of citrus.* Cambridge university press.

Wu, G. A., Terol, J., Ibanez, V., López-García, A., Pérez-Román, E., Borredá, C., Domingo, C., Tadeo, F. R., Carbonell-Caballero, J., Alonso, R., Curk, F., Du, D., Ollitrault, P., Roose, M. L., Dopazo, J., Gmitter, F. G., Rokhsar, D. S., & Talon, M. (2018). Genomics of the origin and evolution of Citrus. *Nature, 554*, 311-316. https://doi.org/10.1038/nature25447

Zhang, Y., Wang, Y., Wang, Q., Cao, M., Zhou, C., & Zhou, Y. (2018). Identification of *Aphis spiraecola* as a vector of *Citrus yellow vein clearing virus*. *European Journal of Plant Pathology, 152*, 841-844. https://doi.org/10.1007/s10658-018-1523-7

Zhang, Y. H., Liu, C. H., Wang, Q., Wang, Y. L., Zhou, C. Y., & Zhou, Y. (2019a). Identification of *Dialeurodes citri* as a vector of *Citrus yellow vein clearing virus* in China. *Plant disease, 103*, 65-68. https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-05-18-0911-RE

Zhang, Y., Liu, Y., Wang, Y., Wang, Q., He, S., Li, X., & Zhou, Y. (2019b). Transmissibility of *Citrus yellow vein clearing virus* by contaminated tools. *Journal of Plant Pathology, 101*, 169-171. https://doi.org/10.1007/s42161-018-0141-8

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

Zhou, Y., Chen, H. M., Cao, M. J., Wang, X. F., Jin, X., Liu, K. H., & Zhou, C. Y. (2017). Occurrence, distribution, and molecular characterization of *Citrus yellow vein clearing virus* in China. *Plant disease, 101*, 137-143. https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-05-16-0679-RE

© 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)

45(3), Autumn, 2022

doi 10.22055/ppr.2022.17660

Reaction severity and infection symptoms in citrus cultivars susceptible to *citrus yellow vein clearing virus* in the greenhouse conditions

S. M. Bani Hashemian[1*], A. Rouhibakhsh[2*], N. Pajouhesh[3], M. Ghasemi[4]

1. ***Corresponding Author:** Associate Professor, Genetic and Breeding Department, Citrus and Subtropical Fruits Research Center, Horticultural Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Ramsar, Iran (m.banihashemian@areeo.ac.ir)
2. ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture Science, Guilan University, Rasht, Iran (a_rouhibakhsh@yahoo.com)
3. M.Sc. Graduate of Plant Pathology, Department of Plant Protection, College of Agriculture Science, Guilan University, Rasht, Iran
4. Assistant Professor, Genetic and Breeding Department, Citrus and Subtropical Fruits Research Center, Horticultural Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Ramsar, Iran

Received: 1 May 2022 Accepted: 12 July 2022

Abstract

Background and Objectives

Citrus yellow vein clearing virus (CYVCV), is the causal agent of a significant and devastating disease that has spread in Iran and a number of countries in the region in recent years. In order to identify susceptible and tolerant cultivars for disease management, the reaction of a number of commercial citrus cultivars from the groups of orange, mandarin, grapefruit, citron, tangelo, pomelo, kumquat, lime and lemons was investigated after inoculation in the greenhouse conditions. The relative susceptibility of the cultivars was then determined according to the severity of the symptoms.

Materials and Methods

The buds of 19 commercial citrus cultivars of the country including Thomson navel orange, Valencia sweet orange, Moro blood orange, Siavaraz local orange, Clementine mandarin, Ponkan mandarin, Page mandarin, Satsuma mandarin, Sour orange, Sweet lime, Eureka lemon, Persian lime, Mexican lime, Flame grapefruit, Redblush grapefruit, Mineola tangelo, Etrog citron, Pummelo and Kumquat were propagated on sour orange rootstocks and the plants were simultaneously graft inoculated with a CYVCV isolate (Gene Bank number: KX902488). In order to confirm the infection, the total RNA of the symptomatic plants was extracted by SDS-Potassium acetate method. A two-step Reverse Transcription Polymerase chain reaction (RT-PCR) was carried out using a specific primer pair of the virus coat protein (CP) gene. The reaction of the inoculated plants was monitored under greenhouse conditions with controlled temperature.

Results

14 cultivars susceptible to citrus yellow vein clearing were detected based on the appearance of four types of symptoms in the inoculated plants including yellowing of the lateral veins on the upper surface of young leaves (symptoms type A), corresponding water soaked areas under the young leaves (symptoms type B), wrinkling of the old leaves (symptoms type C) and leaf spots on

the old leaves (symptoms type D). These cultivars were classified into three groups with high, medium and low susceptibility according to the symptom severity. No symptoms were found in tolerant cultivars of Sweet lime, Mexican lime, Page mandarin and two grapefruit cultivars up to one year after inoculation. Descriptive grouping of frequency, severity and stability of symptoms was consistent with cluster analysis based on Euclidean Ward distance coefficient.

Discussion

The management of citrus yellow vein clearing disease is based on preventive methods and the cultivation of resistant or tolerant cultivars instead of susceptible varieties. The results of the present study showed that *Citrus yellow vein clearing virus* has a wide host range and can infect different citrus species or groups. Sour orange, Eureka Lemon and Persian lime are the most susceptible hosts of the virus. Monitoring of four typical symptoms of the disease is recommended for disease management in citrus nurseries and orchards.

Keywords: Citrus yellow vein clearing virus, Susceptibility, Symptom, Tolerance

Associate editor: S. Tabein (Ph.D.)

Citation: Bani Hashemian, S.M, Rouhibakhsh, A., Pajouhesh, N. & Ghasemi, M. (2022). Reaction severity and infection symptoms in citrus cultivars susceptible *to citrus yellow vein clearing virus* in the greenhouse conditions. Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), *45*(3), 1-14. https://doi.org/10.22055/ppr.2022.17660.