DOI: 10.22034/ijpp.2023.2003544.411

بیماری‌های گیاهی / جلد ۵۸ / شماره ۳/ سال ۱۴۰۱: ۱۷۰-۱۵۸

CC BY

مقاله پژوهشی

شناسایی و تعیین شدت پاسخ نسبی ژنوتیپ‌های لیموی حساس به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات

محمدحسن رستگار[۱]، احمد روحی‌بخش[۲] و سید مهدی بنی‌هاشمیان[۳]**

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۰۳)

چکیده

ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات در سال‌های اخیر در تعدادی از کشورهای آسیایی از جمله ایران گسترش یافته است. به منظور شناسایی میزبان‌های حساس به بیماری، ابتدا پیوندک ژنوتیپ‌های مهم لیموی کشور از درختان مادری بدون علائم جمع‌آوری شد و عاری‌بودن آنها از ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات با نمونه‌سازی بیولوژیکی گیاه محک نارنج (*Citrus aurantium*) مورد تائید قرار گرفت. سپس جوانه این ژنوتیپ‌ها روی پایه نارنج تکثیر و نهال‌ها به طور همزمان با جدایه ایرانی LEN با روش پیوند آلوده و به همراه نهال‌های شاهد مایه‌زنی نشده در شرایط دمایی کنترل شده (۲۴°C روز، ۱۸°C شب) نگهداری شدند. بر اساس بروز علائم بیماری در گیاهان آلوده شده، از بین ۲۱ ژنوتیپ مورد بررسی، پرشین‌لایم (*C. latifolia*) و نه رقم لمون (*C. limon*) به عنوان ارقام حساس به بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات تشخیص داده شدند. استخراج آران‌ای کل از پوست و رگبرگ جست‌های جدید و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با نسخه‌برداری معکوس توسط آغازگرهای اختصاصی تکثیرکننده ژن پروتئین پوششی، آلودگی به ویروس مورد مطالعه را در گیاهان مایه‌زنی شده دارای علائم ارقام مختلف لیمو تأیید نمود. در سایر ژنوتیپ‌های مورد بررسی تا یک سال پس از مایه‌زنی علائمی مشاهده نشد. در ژنوتیپ‌های آلوده، شدت بیماری بر اساس شدت علائم از مقیاس صفر تا چهار درجه‌بندی و این ارقام با توجه به شدت پاسخ در سه گروه خیلی حساس، حساس و با حساسیت کم دسته‌بندی شدند. به استناد نتایج تحقیق، ارتباط بین قرابت اجدادی ارقام لیمو و حساسیت به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات مورد تائید قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی: حساسیت، شدت علائم، لایم، لمون

---

* بخشی از رساله دکتری نگارندهٔ اول ارائه شده به دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه گیلان

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m.banihashemian@areeo.ac.ir

۱ دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت.

۲ استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت.

۳ دانشیار پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر.

DOI: 10.22034/ijpp.2023.2003544.411

Research Article

Identification of susceptible lime and lemon genotypes and determination their relative response severity to *Citrus yellow vein clearing virus*

Rastegar Mohammad Hassan[1], Rouhibakhsh Ahmad[2] and Bani Hashemian Seyed Mehdi[3]**

(Received: 31.05.2023; Accepted: 25.09.2023)

Abstract

Citrus yellow vein clearing virus (CYVCV), is the causal agent of a destructive disease that has been spreading in Iran and a number of countries in the region in recent years. To identify susceptible hosts of the disease, the budwoods of the important lime and lemon genotypes of Iran were collected from asymptomatic mother trees. Then the samples were confirmed to be CYVCV-free by biological indexing using the indicator plant. The buds of the genotypes were then propagated on sour orange (*Citrus aurantium*) rootstocks and the plants were simultaneously graft-inoculated with the Iranian LEN isolate (GenBank accession number: KX902488). The inoculated and control plants were maintained under controlled temperature conditions (24°C during the day and 18°C at night). Persian lime (*C. latifolia*) and nine lemon (*C. limon*) varieties were identified as disease-susceptible cultivars among the 21 studied genotypes. To confirm infection in symptomatic inoculated plants, total RNA was extracted from the bark and midrib of new flushes and a two-step RT-PCR was performed. No symptoms were observed in the other genotypes studied until one year after inoculation. Disease severity in susceptible genotypes was graded from 0 to 4 based on the severity of symptoms on the lateral veins and cultivars were divided into three groups according to the intensity of the response. The relationship between ancestral affinity of lemon cultivars and susceptibility to *Citrus yellow vein clearing virus* was discussed.

Keywords: Lemon, Lime, Symptom severity, Susceptibility

[*] A part of PhD thesis of the first author submitted to College of Agriculture of Guilan University

[**] Corresponding author's E-mail: m.banihashemian@areeo.ac.ir

1. Ph. D. Student of Plant Pathology, Plant Protection Department, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

2. Assistant Professor, Plant Protection Department, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

3. Associated professor, Citrus and Subtropical Fruits Research Center, Horticultural Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Ramsar, Iran.

مقدمه

انواع لیمو متعلق به جنس *Citrus* و تیره *Rutaceae*، از میوه‌های مهم مرکبات به شمار می‌روند که به دلیل حساسیت به سرما و یخبندان، بیشتر در مناطق گرمسیری جهان کشت می‌شوند (Lim 2012). بر اساس آخرین آمار فائو در سال ۲۰۲۱، کشورهای هند، مکزیک، چین، آرژانتین، برزیل، آمریکا، ترکیه، اسپانیا، ایران و ایتالیا، به ترتیب مقام‌های اول تا دهم تولید لیمو در دنیا را به خود اختصاص داده‌اند (FAO 2023). نام عمومی لیمو در زبان فارسی، دو گروه لمون(Lemon) و لایم(Lime) را شامل می‌شود. لمون‌ها، لیموهای ترش با میوه درشت را تشکیل می‌دهند. بیشتر ارقام تجاری لمون در گونه *Citrus limon* L. طبقه‌بندی شده‌اند. در مقابل درگروه لایم‌ها، انواع ترش با میوه‌های کوچک‌تر و همچنین ارقام غیراسیدی قرار گرفته‌اند. *C. aurantifolia* Swing. (کی‌لایم(Key lime)، لایم مکزیکی (Mexican lime)، لیمو عُمانی (Omani Lime) یا اَمانی، لیمو شیرازی، لیمو آب شیراز، لیمو شیشه)، *C. latifolia* Tanaka (لیموی ایرانی یا پرشین‌لایم (Persian lime)، بیرس‌لایم (Bearss Lime)، لایم بی‌تیغ (Seedless Lime)، تاهیتی‌لایم(Tahiti lime)) و *C. limettioides* Tan. (لیمو شیرین(Sweet lime))، از مهم‌ترین گونه‌های لایم به حساب می‌آیند (Barry *et al.* 2020). سهم عمده تولید انواع لیمو در ایران به استان‌های جنوبی فارس، هرمزگان، کرمان، بوشهر، خوزستان، کهگیلویه و بویراحمد، سیستان و بلوچستان و کرمانشاه اختصاص دارد (Anonymous 2021).

رگبرگ روشنی زرد مرکبات (Citrus yellow vein clearing) تا کنون از کشورهای پاکستان، هند، چین، ترکیه، ایران و قبرس گزارش شده است (Alas *et al.* 2019, Alshami *et al.* 2003, Bani Hashemian & Aghajanzadeh 2017, Catara *et al.* 1993, Chen *et al.* 2014, Önelge 2002). پراکنش سریع و خسارت آن خصوصا در هند، چین و ترکیه که سهم به‌سزایی در تولید لیموی دنیا دارند (FAO 2023)، باعث شد تا این بیماری به عنوان تهدید جدید کشت مرکبات در نظر گرفته شود (Liu *et al.* 2020). در اثر آلودگی به بیماری، میزان محصول و اندازه میوه لیمو به شدت کاهش می‌یابد. در کشور چین، ۲۰ تا ۷۰ درصد افت تولید محصول لمون، به خسارت ناشی از آلودگی درختان به این بیماری نسبت داده شده است (Chen *et al.* 2014, Liu *et al.* 2019). ادعا شده که درختان آلوده به رگبرگ روشنی زرد مرکبات میوه‌های ریزتر، در حد نصف اندازه میوه درختان سالم، تولید می‌نمایند (Önelge *et al.* 2011).

ایجاد رگه‌های زرد رنگ در رگبرگ‌های فرعی و نواحی آب‌سوخته متناظر در پشت برگ‌ها (شکل ۱)، علت نام‌گذاری بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات است که اولین بار در درختان لمون در پاکستان مورد توجه قرار گرفت (Catara *et al.* 1993). با رصد علائم در کلکسیون‌های مرکبات این کشور، اختلاف پاسخ ارقام لمون مشاهده شد و ماهیت ویروسی بیماری با استفاده از آزمون‌های انتقال از طریق پیوند و مشاهده پیکره‌های رشته‌ای ویروس با میکروسکوپ الکترونی به اثبات رسید (Grimaldi & Catara 1996). عامل بیماری، ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات (*Citrus yellow vein clearing virus*, CYVCV) با ژنوم از نوع آرانا (RNA) با حدود ۷۵۲۹ نوکلئوتید است و در جنس *Mandarivirus* و خانواده *Alphaflexiviridae* طبقه‌بندی شده است (Loconsole *et al.* 2012). این ویروس با بذر انتقال نمی‌یابد (Zhou *et al.* 2015) اما 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 (Afloukou *et al.* 2021, Zhang *et al.* 2018, Zhang *et*

al. 2019a, Zhang *et al.* 2019b). در ترکیه آلودگی طبیعی به CYVCV ابتدا در دو رقم لمون اینتردوناتا (Interdonata) و کوتدیکن (Kütdiken) در ناحیه چوکوروا (Çukurova) دیده شد اما با مطالعات بعدی، حساسیت ارقام لمون لاماس (Lamas) و ایتالیایی (Italian) نیز مشخص گردید (Önelge *et al.* 2010). در سال ۱۳۹۵، ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات در ارقام لمون و پرشین‌لایم شمال ایران گزارش شد (Bani Hashemian & Aghajanzadeh 2017). انتقال نهال و پیوندک آلوده از این مناطق، خطر گسترش ویروس به نواحی مهم کشت لیمو در جنوب کشور را به دنبال دارد (Bani Hashemian & Aghajanzadeh 2020). بر اساس دانش موجود راه درمان یا کنترل شیمیایی برای بیماری‌های ویروسی در گیاهان وجود ندارد و مدیریت آنها بر مبنای روش‌های پیش‌گیرانه و کشت ارقام مقاوم یا متحمل به جای انواع حساس صورت می‌گیرد (Hull 2014). در مطالعه حاضر، پاسخ تعدادی از ارقام و ژنوتیپ‌های مهم لیموی کشور در راستای شناسایی میزبان‌های حساس و متحمل جهت استفاده در برنامه مدیریت بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات مورد بررسی قرار گرفته است. میزبان‌های حساس شناسایی شده، بر مبنای شدت علائم در سه گروه با حساسیت متفاوت دسته‌بندی شدند.

مواد و روش‌های بررسی

۱- ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

بیست و یک ژنوتیپ و رقم مهم لیموی کشور از کلکسیون زیر پوشش (اسکرین‌هاوس (Screenhouse)) ارقام و گلخانه تحقیقاتی پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری و همچنین از کلکسیون مرکبات جیرفت جمع‌آوری گردید (جدول ۱). پیوندک‌ها به منظور کاهش خطر انتقال آفات و عوامل بیماری‌زای سطحی مطابق دستورالعمل انتقال مواد تکثیری مرکبات (Frison & Taher 1991) در محلول ۰/۵٪ هیپوکلریت سدیم حاوی مایع خیس کننده به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی و پس از آب‌شویی در دمای چهار درجه سانتی‌گراد یخچال نگهداری شدند.

۲- نمونه‌سازی بیولوژیکی ژنوتیپ‌های لیمو

به منظور اطمینان از عدم آلودگی اولیه به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات در ژنوتیپ‌های لیمو بستر کشت حاوی ۵۰ درصد کوکوپیت، ۲۵ درصد پرلیت و ۲۵ درصد ماسه به مدت یک ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس و فشار ۱/۶ بار اتوکلاو خاک ضدعفونی گردید. گیاهچه‌های بذری نارنج (*C. aurantium* L.) تولید شده در این بستر به عنوان گیاهان محک (Indicator plants) مورد استفاده قرار گرفتند. چهار گیاهچه پس از رسیدن به قطر مناسب، به وسیله دو پوستک از هر یک از ژنوتیپ‌های مورد بررسی مطابق روش رویستاکر (Roistacher 1991) پیوند شدند. این گیاهان به همراه گیاهچه‌های مایه‌زنی نشده شاهد منفی و گیاهان شاهد مثبت آلوده شده با جدایه ایرانی LEN از منشا درختان لیموی آلوده به ویروس زردی رگبرگ مرکبات (رس‌شمار ژن‌بانک: KX902488) در شرایط دمایی کنترل شده (۲۴°C روز، ۱۸°C شب) نگهداری شدند. سه هفته پس از مایه‌زنی، سربرداری گیاهان به منظور تحریک تولید جست جدید صورت گرفت. در مراحل پیوند، ضدعفونی قیچی و چاقوی باغبانی با محلول تجاری سفیدکننده خانگی (هیپو کلریت سدیم) به منظور پیشگیری از گسترش مکانیکی عوامل ویروسی و شبه‌ویروسی انجام شد (Roistacher 1991).

۳- بررسی حساسیت ژنوتیپ‌های لیمو نسبت به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات

جوانه پیوندک از ژنوتیپ‌های مورد بررسی روی پایه

نارنج تکثیر و همزمان با دو پوستک از جدایه LEN مایه‌زنی شدند (Bani Hashemian & Aghajanzadeh 2020). چهار نهال‌آلوده شده از هر یک از این ارقام به همراه همین تعدادگیاهچه‌های مایه‌زنی نشده شاهد جهت بررسی پاسخ ارقام و ژنوتیپ‌ها و ثبت علائم در شرایط دمایی کنترل شده (۲۴°C روز، ۱۸°C شب) نگهداری شدند. سه هفته پس از پیوند، سربرداری گیاهان به منظور تحریک تولید جست جدید صورت گرفت.

۴- تائید آلودگی به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات در ژنوتیپ‌های حساس

آلودگی به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات در ارقام حساس، پس از تشکیل جست‌های جدید و مشاهده علائم از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با ترانویسی معکوس مورد تائید قرار گرفت. آرانای کل از پوست و رگبرگ این گیاهان به روش اس‌دی‌اس استات پتاسیم (SDS-Potassium acetate) استخراج شد (Bernad & Duran-Vila 2006). سپس ردیابی ویروس بر اساس آزمون دو مرحله‌ای در حضور جفت آغازگر اختصاصی ژن پروتئین پوششی YVCPf/YVCPr (Chen *et al.* 2014) انجام شد و نتایج واکنش در ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت. برای ساخت دی‌انای مکمل از آغازگر معکوس و کیت Revert Aid (Fermentas) و جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از کیت PCR Master Mix (Fermentas) استفاده شد. چرخه‌های حرارتی شامل پنج دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد (یک چرخه)، یک دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه در ۵۴ درجه سانتی‌گراد و یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۳۰ چرخه) و ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (یک چرخه) به منظور تکثیر قطعه مورد نظر به اجرا درآمد.

۵- تعیین شدت علائم بیماری و ارزیابی واکنش ژنوتیپ‌های لیمو به رگبرگ روشنی زرد مرکبات

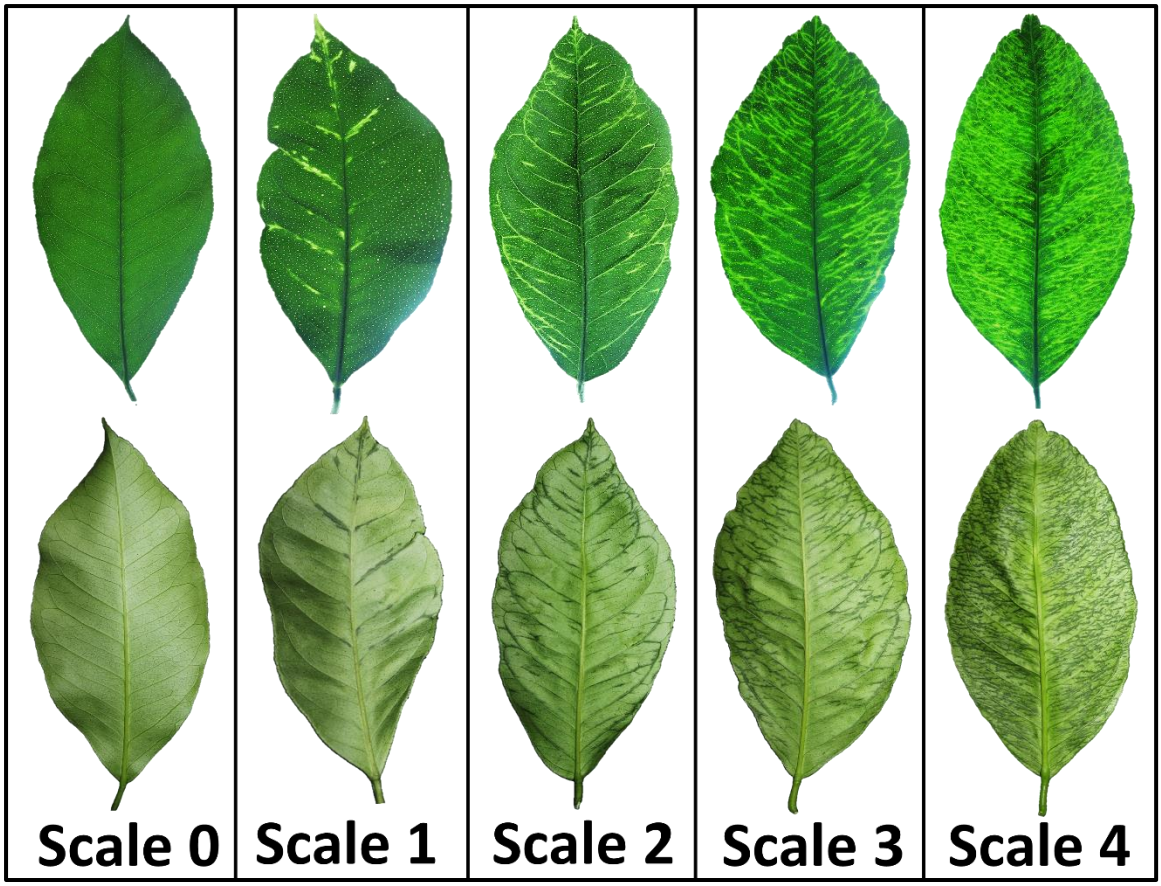
جهت محاسبه شدت بیماری، به علائم زردی و آب‌سوختگی رگبرگ‌های فرعی در برگ‌ها براساس مقیاس صفر تا چهار نمره داده شد (مقیاس صفر: بدون علائم؛ مقیاس ۱: علائم در کمتر از ۲۵٪ سطح برگ؛ مقیاس ۲: علائم در ۲۶٪ تا ۵۰٪ سطح برگ؛ مقیاس ۳: علائم در ۵۱٪ تا ۷۵٪ سطح برگ و مقیاس ۴: علائم در بیش از ۷۶٪ سطح برگ)(شکل ۱). سپس مقیاس علائم در تمام برگ‌های جست‌های اول و دوم تکرارهای مختلف به صورت نظری تعیین و درصد شدت بیماری (Disease Severity (DS)) با استفاده از رابطه زیر (Radwan *et al.* 2008) برای هر تکرار محاسبه شد. در این رابطه، DS شدت بیماری، n_i تعداد برگ‌های با شاخص مشابه، v_i شاخص مشخص شده برای هر برگ، N تعداد کل برگ‌های مورد ارزیابی در هر تکرار و V بالاترین شاخص است. اثر آلودگی به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات روی بروز علائم در ارقام و ژنوتیپ‌های لیمو نسبت به گیاهان شاهد آلوده نشده در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲۱ رقم، چهار تکرار و پنج حالت شدت علائم مورد آزمایش قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ مورد آنالیز قرار گرفتند و میانگین‌ها با روش LSD مقایسه شدند.

$$DS = \left(\frac{\sum n_i \times v_i}{N \times V}\right) \times 100$$

نتایج

۱- اطمینان از عدم آلودگی به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات در ژنوتیپ‌های لیمو

پیش از آزمون بررسی حساسیت ارقام و ژنوتیپ‌های منتخب، عاری‌بودن آنها از ویروس رگبرگ روشنی زرد



شکل ۱- الگوی پیشنهادی درجه‌بندی شدت بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات بر اساس درصد علائم در سطح رویی (ردیف بالا) و زیری (ردیف پایین) برگ. مقیاس صفر: بدون علائم؛ مقیاس ۱: علائم در کمتر از ۲۵٪ سطح برگ؛ مقیاس ۲: علائم در ۲۶٪ تا ۵۰٪ سطح برگ؛ مقیاس ۳: علائم در ۵۱٪ تا ۷۵٪ سطح برگ و مقیاس ۴: علائم در بیش از ۷۶٪ سطح برگ

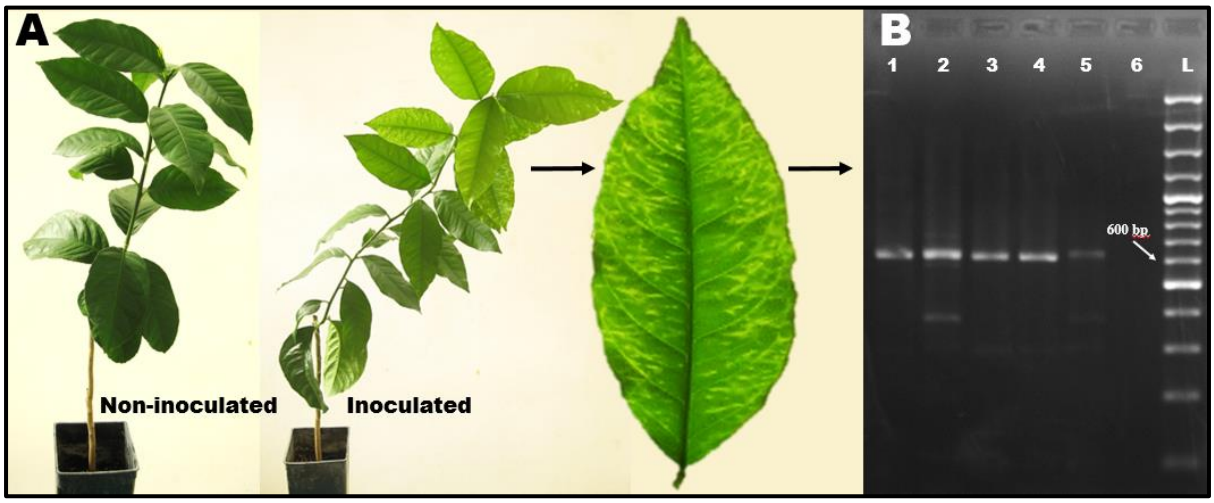
Fig. 1. A proposed pattern for scoring the severity of citrus yellow vein clearing disease based on the percentage of the symptoms on the upper (top row) and lower (bottom row) leaf surfaces (LS). Scale 0: no symptoms; Scale 1: symptoms in less than 25% of LS; Scale 2: symptoms in 26% to 50% of LS; Scale 3: Symptoms in 51% to 75% of LS and Scale 4: Symptoms in more than 76% of LS.

مرکبات با نمونه‌سازی بیولوژیکی و آزمون مولکولی مورد تایید قرار گرفت. پس از تشکیل جست‌های جدید گیاه محک نارنج، علائم بیماری شامل زردی رگبرگ‌های فرعی و آب‌سوختگی نواحی متناظر در سطح زیرین برگ‌های جوان، تنها در گیاهان شاهد مثبت مایه‌زنی شده با جدایه LEN پدیدار گشت. در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن پروتئین پوششی و آرانایِ کل استخراج شده از این گیاهان قطعات مورد انتظار با اندازه حدود ۶۰۰ جفت باز به دست آمد. این قطعه در آرانایِ استخراج شده از گیاهان شاهد آلوده نشده و کنترل منفی فاقد الگوی آرانای تکثیر نشد (شکل ۲). در مقابل در محک‌های مایه‌زنی شده با ارقام و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و گیاهان آلوده نشده شاهد منفی علائم بیماری مشاهده نگردید و ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات در آنها ردیابی نشد.

۲- تشخیص ژنوتیپ‌های حساس به بیماری رگبرگ

روشنی زرد مرکبات

در آزمون بررسی حساسیت ارقام و ژنوتیپ‌های منتخب، بروز علائم زردی رگبرگ‌های فرعی در سطح رویی و نواحی متناظر آب‌سوخته در زیر برگ‌های جوان در نهال‌های‌آلوده‌شده با پیوند در شرایط گلخانه، ملاک تشخیص حساسیت قرار گرفت. این علائم 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 (شکل ۲). بر این اساس، از بین ۲۱ ژنوتیپ این تحقیق، پرشین‌لایم (*C. latifolia*) و نه رقم لمون (*C. limon*) فینو، شماره پنج، ورنا، موناچلا، سنتاترسا، فراست اورکا، آلن اورکا، فراست لیسبون و کاسکاد به عنوان ارقام حساس به بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات تشخیص داده شدند (جدول ۱، ارقام ۱ الی ۱۰). این در حالی است که در ۱۱ ژنوتیپ دیگر شامل لیمو شیرین (*C. limettioides*)، مایر لمون (*C. meyeri* Tanaka)، کی لایم (*C. aurantifolia*)، ماکروفیلا (*C. macrophylla* Wester)، رنگپور لایم (*C. limonia* Osbeck)، ولکامر لمون (*C. volkameriana* Ten. & Pasq.)، راف لمون (*C. jambhiri* Lush.)، یوزو (*C. junos* Siebold ex Tanaka)، بکرایی و لیمو دورگ‌های شماره یک و دو (*Citrus* sp.)، تا یک سال پس از انتقال ویروس علائمی مشاهده نشد و این گروه به عنوان ژنوتیپ‌های غیرحساس در نظر گرفته شدند (جدول ۱، ارقام ۱۱ الی ۲۱). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از بافت پوست و رگبرگ جست‌های جوان نهال‌های دارای علائم، آلودگی به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات را در میزبان‌های حساس مورد تأیید قرار داد و قطعات مورد انتظار به دست آمد (شکل ۲).



شکل ۲- مقایسه گیاه شاهد مایه‌زنی نشده رقم حساس سنتاترسا (جدول ۱) با نهال‌آلوده شده این رقم (A) و تائید آلودگی با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با نسخه‌برداری معکوس (B). چاهک‌ها: ۱ الی ۴- تکرارهای آلوده شده رقم مورد مطالعه، ۵- شاهد مثبت مایه‌زنی شده با جدایه LEN، ۶- کنترل منفی فاقد الگوی آرانا، L - نشانگر با اندازه ۱۰۰ جفت باز.

Fig. 2. Comparison of non-inoculated and inoculated plants of the sensitive variety of Centatrosa (Table 1) (A) and confirmation of the infection by polymerase chain reaction with reverse transcription (B). Lanes: 1 to 4. Replications of the studied inoculated plants, 5. LEN isolate of CYVCV, 6. RT control, L. 100 bp DNA ladder (GeneRuler, Thermo Scientific).

۳- تعیین حساسیت نسبی ارقام و ژنوتیپ‌های لیمو نسبت به بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات

در میزبان‌های حساس، درجه‌بندی پاسخ بر مبنای شدت ظهور علائم زردی و آب‌سوختگی رگبرگ‌های فرعی انجام شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که نوع ژنوتیپ لیمو در شدت پاسخ و بروز علائم زردی رگبرگ‌های جانبی در سطح رویی و نواحی متناظر آب‌سوخته در زیر برگ‌ها (شکل ۱) در سطح احتمال یک درصد تاثیر معنی‌دار داشته است. بر اساس داده‌های شدت پاسخ، ارقام و ژنوتیپ‌های حساس (جدول ۱، ارقام ۱ الی ۱۰) با توجه به میانگین مربعات شدت پاسخ در سه گروه با حساسیت زیاد، متوسط و کم طبقه‌بندی شدند. در این مطالعه، دو رقم لمون فینو و شماره پنج شدیدترین واکنش را به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات نشان دادند و در گروه خیلی حساس قرار گرفتند (جدول ۱، ارقام ۱ و۲). ارقام لمون ورنا، موناچلا، فراست اورکا، سنتاترسا و آلن اورکا با شدت پاسخ کمتر نسبت به دو رقم فوق‌الذکر به عنوان ارقام حساس شناخته شدند (جدول ۱، ارقام ۳ الی ۷). به همین صورت ارقام لمون فراست لیسبون و کاسکاد و همچنین رقم پرشین‌لایم حساسیت کمی به آلودگی ویروسی نشان دادند و در گروه میزبان‌های کم حساس قرار گرفتند (جدول ۱، ارقام ۸ الی ۱۰).

جدول ۱- ارقام و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و پاسخ آنها به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات.

Table 1. Studied lime and lemon genotypes and their response to CYVCV.

No.	Genotype/Cultivar	Origin*	Disease severity in inoculated replications				Mean Disease severity**	Response
			1	2	3	4		
1	Fino lemon *(Citrus limon)*	A	86.00	94.00	73.00	68.00	80.25 a	Very susceptible
2	Lemon N.5 *(Citrus limon)*	B	84.00	78.00	73.00	69.00	76.00 a	Very susceptible
3	Verna lemon *(Citrus limon)*	A	55.00	82.00	56.00	64.00	64.25 b	Susceptible
4	Monachello lemon *(Citrus limon)*	B	68.00	61.00	48.00	59.00	59.00 b	Susceptible
5	Frost Eureka *(Citrus limon)*	B	73.00	55.00	66.00	58.00	63.00 b	Susceptible
6	Santa Teresa lemon *(Citrus limon)*	B	82.00	44.00	60.00	62.00	62.00 b	Susceptible
7	Allen Eureka lemon *(Citrus limon)*	B	39.00	69.00	58.00	50.00	54.00 b	Susceptible
8	Frost Lisbon lemon *(Citrus limon)*	B	25.00	45.00	44.00	42.00	39.00 c	Low susceptible
9	Cascade lemon *(Citrus limon)*	B	64.00	26.00	17.00	34.00	35.25 c	Low susceptible
10	Persian lime *(Citrus latifolia)*	A	38.00	22.00	34.00	26.00	30.00 c	Low susceptible
11	Sweet lime *(Citrus limettioides)*	A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 d	Non-susceptible
12	Meyer lemon *(Citrus meyeri)*	B	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 d	Non-susceptible
13	Mexican lime *(Citrus aurantifolia)*	A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 d	Non-susceptible
14	Alemow *(Citrus macrophylla)*	A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 d	Non-susceptible
15	Rangpur lime *(Citrus limonia)*	A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 d	Non-susceptible
16	Volkamer lemon *(Citrus volkameriana)*	A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 d	Non-susceptible
17	Rough lemon *(Citrus jambhiri)*	A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 d	Non-susceptible
18	Yuzu *(Citrus junos)*	A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 d	Non-susceptible
19	Bakraii *(Citrus* sp.*)*	A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 d	Non-susceptible
20	Lime hybrid N.1 *(Citrus* sp.*)*	A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 d	Non-susceptible
21	Lime hybrid N.2 *(Citrus* sp.*)*	A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 d	Non-susceptible

* - A: Collection of Citrus and Subtropical Fruits Research Center; B: Jiroft collection.

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

بحث

رگبرگ روشنی زرد مرکبات، بیماری ویروسی نسبتا جدیدی است که در ایران و تعدادی از کشورهای آسیایی مهم تولیدکننده لیمو در جهان گسترش دارد. پیشگیری از گسترش و کشت ارقام مقاوم یا متحمل به جای انواع حساس، راه‌کار مدیریت این بیماری بر اساس دانش موجود است (Liu *et al.* 2020). تحقیق حاضر نیز با هدف اطلاع از وضعیت حساسیت ارقام و ژنوتیپ‌های مهم لیموی کشور نسبت به رگبرگ روشنی زرد مرکبات به منظور استفاده در مدیریت بیماری انجام شده است. نمونه‌سازی بیولوژیکی مبتنی بر آلوده‌سازی گیاهان محک و مشاهده علائم در آنها، ابزاری مهم در تشخیص بیماری‌های ویروسی و شبه‌ویروسی خصوصا در منابع مادری و هسته های اولیه تکثیری مرکبات است. محک‌ها حساس‌ترین گیاهان شناخته‌شده از نظر تکثیر و بروز علائم برای ویروس‌های معین هستند (Roistacher 1991). بر اساس اطلاعات موجود، نارنج یکی از حساس‌ترین میزبان‌های ویروس رگبرگ روشنی زرد به شمار می‌رود (Chen *et al.* 2014, Loconsole *et al.* 2012, Zhou *et al.* 2017). در این بررسی نمونه‌سازی بیولوژیکی با کمک این گیاه در کنار واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت اطمینان از سلامت ارقام و ژنوتیپ‌های منتخب لیمو قبل از ارزیابی حساسیت به ویروس به کار رفت. ظهور علائم ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات، تحت تأثیر ژنوتیپ و دما قرار دارد (Iftikhar *et al.* 2010). بهترین دما برای بروز علائم در این بیماری، ۱۸ تا ۲۴ درجه سلسیوس تعیین شده است (Zhou *et al.* 2017). تحقیق حاضر در شرایط گلخانه و در این محدوده دمایی انجام شد تا از بین دو فاکتور مؤثر، اثر رقم در بروز علائم نمایان گردد. با این شیوه، حساسیت ارقام و ژنوتیپ‌های مهم لیموی کشور نسبت به بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات مشخص شد. بر اساس سوابق تحقیقات گذشته، ارقام لمون اینتردوناتا (Interdonata)، کوتدیکن (Kütdiken)، لاماس (Lamas) و ایتالیایی (Italian) به عنوان میزبان‌های حساس به رگبرگ روشنی زرد مرکبات در ترکیه معرفی شدند (Önelge *et al.* 2010). در پاکستان از بین چهار رقم لمون اورکا، لیسبون، ورنا و ماسرو (Masero)، علائم بیماری ابتدا در دو رقم اول مورد توجه قرار گرفت (Iftikhar *et al.* 2010). اما رصد علائم در کلکسیون شهر اسلام‌آباد، آلودگی تعداد بیشتری از ارقام لمون را نشان داد (Catara *et al.* 1993). تفاوت در واکنش گونه‌ها و ارقام مرکبات به طور قطع به ویژگی‌های ژنتیکی آنها بستگی دارد. در حال حاضر ژنوتیپ‌های متعداد متعلق به جنس *Citrus* به دلیل برخی ویژگی‌های مشترک در برگ، گل و میوه در کنار هم قرار گرفته‌اند. در عین حال، تنوع بین انواع مختلف مرکبات به حدی است که تا کنون سیستم‌های متفاوتی جهت طبقه‌بندی آنها به کار رفته است (Wu *et al.* 2018). به همین صورت در مورد لیموها نیز تنوع فراوان در شکل، اندازه، طعم و اسیدیته وجود دارد (Spiegel-Roy & Goldschmidt 1996). در تحقیق حاضر پاسخ ارقام و ژنوتیپ‌های مختلف لیمو نسبت به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات بررسی شد و بروز علائم در آنها پس از مایه‌زنی در شرایط کنترل شده، ملاک تشخیص حساسیت ارقام قرار گرفت.

بر اساس اطلاعات موجود، مقایسه شدت و درجه‌بندی علائم در ارقام لیموی حساس به رگبرگ روشنی زرد مرکبات، برای اولین بار در دنیا در این تحقیق انجام شده است. بر این مبنا میزبان‌های حساس، بر مبنای شدت علائم در سه گروه با حساسیت زیاد، متوسط و خفیف دسته‌بندی شدند (جدول ۱). با مقایسه میانگین داده‌های شدت بروز علائم زردی و آب‌سوختگی رگبرگ‌های فرعی (جدول ۱)، که واضح‌ترین نوع علائم بیماری است، مشخص شد که این شاخص می‌تواند در بررسی پاسخ نسبی ارقام نسبت به

این بیماری مورد استفاده قرار گیرد. نتایج این تحقیق همچنین نشان داد که پاسخ نسبت به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات در بین ژنوتیپ‌های لیمو متفاوت است و نمی‌توان این عکس‌العمل را به کل گروه لیموها تعمیم داد. بر این اساس در بین ژنوتیپ‌های لیموی مورد مطالعه، پرشین لایم و همه لمون‌های وابسته به گونه *C. limon* در گروه میزبان‌های حساس نسبت به این ویروس قرار گرفتند (جدول ۱، ارقام ۱ الی ۱۰). نارنج و لمون دو میزبان رایج ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات در همه مناطق آلوده دنیا به شمار می‌روند (Alas *et al.* 2019, Alshami *et al.* 2003, Bani Hashemian & Aghajanzadeh 2017, Catara *et al.* 1993, Chen *et al.* 2014, Önelge 2002). پرشین‌لایم نیز یکی دیگر از ارقام حساس به ویروس است که اولین بار در ایران به عنوان میزبان رگبرگ روشنی زرد مرکبات معرفی شد (Bani Hashemian & Aghajanzadeh 2017). مطالعات تبارزایی ارقام لیمو با استفاده از مارکرهای هسته و سیتوپلاسم نشان داد که نارنج جد مشترک همه ارقام گونه‌های *C. limon* و *C. latifolia* است (Curk *et al.* 2016). این موضوع احتمال ارتباط بین قرابت اجدادی ارقام لیمو و حساسیت به ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات را تقویت می‌کند. به عبارت دیگر ارقام حساس لمون و پرشین‌لایم که در این تحقیق شناسایی شدند (جدول ۱، ارقام ۱ الی ۱۰) با نارنج، یکی از میزبان‌های مهم این ویروس، خویشاوند هستند. در مقابل ارقام و ژنوتیپ‌های غیر حساس اجداد دیگری دارند. ارقام مایر، ولکامر و راف لمون، با وجود شباهت با لمون‌ها، به گونه‌های دیگری غیر از *C. limon* تعلق دارند. منشا فیلوژنی راف‌لمون، ولکامرلمون و رنگپورلایم به نارنگی، مایر لمون و لیموشیرین به *C. maxima* وکی‌لایم و آلمو به *C. micrantha* برمی‌گردد (Curk *et al.* 2016). رقم غیر حساس یوزو (جدول ۱، رقم ۱۸)، شبه‌لایمی است که در ژاپن و کشورهای شرق آسیا به عنوان پایه تکثیری مرکبات به کار می‌رود. قرابت ژنتیکی این گونه با سایر مرکبات هم‌چنان مورد مناقشه است (Swingle & Reece 1967). با این وجود بر اساس آنالیز مقایسه‌ای مولکولی، لیمو ایچانگ(Ichang) (*C. ichangensis*) به عنوان گونه اجدادی این رقم مشخص شده است (Asadi Abkenar *et al.* 2008). ایچانگ در ایران وجود ندارد و حساسیت آن در این تحقیق مورد بررسی قرار نگرفته است. لیمو دورگ‌های مورد آزمون در بررسی حاضر که در گروه غیر حساس به بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات قرار گرفتند (جدول ۱، ژنوتیپ‌های ۱۹ الی ۲۱)، شبه‌لایم‌هایی هستند که در قالب برنامه اصلاح مرکبات، جمع‌آوری یا تولید شده‌اند. در این میان قرابت ژنتیکی ژنوتیپ بکرایی با رقم غیر حساس راف‌لمون پیش‌تر به اثبات رسیده است (Golein *et al.* 2012).

روش به‌کار رفته برای غربالگری اولیه ارقام مرکبات از طریق مقایسه گیاهان مایه‌زنی شده و شاهد از نظر بروز علائم بسیار مشخص ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات در شرایط کنترل شده دمایی (Bani Hashemian *et al.* 2022)، در این تحقیق نیز مورد استفاده قرار گرفت و ژنوتیپ‌های حساس لیمو مشخص شدند. به منظور معرفی ارقام متحمل یا مقاوم به این ویروس، ضروری است تا ضمن به‌کارگیری جدایه‌های خالص و ارزیابی سلامت میزبان‌ها نسبت به عوامل مهم ویروسی و شبه‌ویروسی، ارزیابی کمی میزان ویروس در توده‌های انتخابی (Accessions) هر یک از گیاهان کاندید با تکنیک‌های مولکولی انجام شود. ارقام لمون و پرشین لایم حساس به بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات از طرف دیگر به عنوان ارقام متحمل به بیماری جاروک لیموترش (Witches' Broom Disease of Lime) معرفی شده‌اند (Salehi *et al.* 2005). جاروک، عامل زوال درختان کی لایم در ایران و تعدادی از کشورهای همسایه از جمله عمان و امارات متحده عربی است توسط نوعی فیتوپلاسما

به نام *Candidatus* Phytoplasma aurantifolia ایجاد می‌شود (Zreik *et al.* 1995). در ایران، بیماری جاروک ابتدا از سیستان و بلوچستان و متعاقبا در استان‌های هرمزگان، کرمان، فارس و برخی دیگر از مناطق جنوبی ایران گزارش شد و جایگزینی لایم با ارقام ترش متحمل در دستور کار قرار گرفت. (Salehi *et al.* 1997, 2010 Salehi *et al.*). ژنوتیپ‌های غیر حساسی که در این تحقیق مشخص شده‌اند، پس از انجام تحقیقات تکمیلی تحمل به بیماری‌های رگبرگ روشنی زرد مرکبات و جاروک می‌توانند به عنوان ارقام جایگزین معرفی شوند. ردیابی ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات در ایران نشان داد که این ویروس در استان‌های شمالی کشور در حال گسترش است (Bani Hashemian & Aghajanzadeh 2020). انتقال نهال و پیوندک از مناطق آلوده در فقدان سیستم کارآمد تولید و توزیع نهال سالم در کشور، خطر تکثیر و گسترش عوامل ویروسی و شبه‌ویروسی را به دنبال دارد (Bani Hashemian *et al.* 2013). مدیریت بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات از طریق پیشگیری از گسترش آن به کانون‌های جدید با ساماندهی واردات ارقام مرکبات، تولید و عرضه پیوندک و نهال عاری از ویروس، نظارت مستمر بر نهالستان‌ها و معرفی ژنوتیپ‌های متحمل یا مقاوم به صورت جدی باید مورد توجه قرار گیرد.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر در قالب پروژه مصوب موسسه علوم باغبانی سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی به انجام رسیده است. نویسندگان مراتب سپاس و تشکر خود را از دکتر طیبه کشاورز، عضو هیات علمی موسسه گیاهپزشکی و همچنین دکترعلیرضا شفیعی زرگر، دکتر احمد احمدپورجلگه، دکتر رضا فیفائی، دکتر بهروز گلعین، دکتر اسد اسدی آبکنار، دکتر طاهره رئیسی و همچنین کارشناسان ایمان جوربنیان، سید مسعود معصومی و فرهاد پورعسگری از موسسه علوم باغبانی به جهت نظرات ارزنده و همکاری در نمونه‌برداری و آزمون‌های گلخانه‌ای، آزمایشگاهی و آماری اعلام می‌دارند.

منابع

References

Asadi Abkenar, A., Isshiki, S., Matsumoto, R. and Tashiro, Y. 2008. Comparative analysis of organelle DNAs in acid citrus grown in Japan using PCR-RFLP method. Genetic Resources and Crop Evolution, 55, 487-492.

Afloukou, F. M., Çalişkan, F. and Önelge, N. 2021. *Aphis gossypii* Glover is a vector of *Citrus yellow vein clearing virus*. Journal of General Plant Pathology, 87*:* 83-86.

Alas, T., Baloglu, S., Caglar, B. K. and 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.

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

Anonymous. 2021. Agricultural Statistical, Ministry of Agriculture, Department of Planning and Economy, Center for Information and Communication Technology, Tehran, Iran.

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

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

Bani Hashemian, S. M. and Aghajanzadeh, S. 2020. Identification of *Citrus yellow vein clearing virus* in Mazandaran province. Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 43: 49-61. (In Persian with English summary).

Bani Hashemian, S. M., Rouhibakhsh, A., Pajouhesh, N. and 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: 1-14. (In Persian with English Abstract).

Barry, G. H., Caruso, M. and Gmitter J, F. G. 2020. Commercial scion varieties. In: The genus citrus. Woodhead Publishing. pp. 83-104

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

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

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

Curk, F., Ollitrault, F., Garcia-Lor, A., Luro, F., Navarro, L. and Ollitrault, P. 2016. Phylogenetic origin of limes and lemons revealed by cytoplasmic and nuclear markers. Annals of botany, 117: 565-583.

FAO. 2023. FAOSTAT. https://www.fao.org/faostat/en/.

Frison, E. A. and Taher, M. M. 1991. FAO/IBPGR Technical guidelines for the safe movement of citrus germplasm. FAO publication.

Golein, B., Bigonah, M., Azadvar, M. and Golmohammadi, M. 2012. Analysis of genetic relationship between 'Bakraee' (*Citrus* sp.) and some known Citrus genotypes through SSR and PCR-RFLP markers. Scientia horticulturae, 148: 147-153.

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

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

Hull, R. 2014. Ecology, Epidemiology, and Control of Plant Viruses. Plant Virology, 5th Edition, Academic Press.

Lim, T. K. 2012. Edible medicinal and non-medicinal plants, Vol. 4. Dordrecht, The Netherlands, Springer. pp. 656-687.

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

Liu, C., Liu, H., Hurst, J., Timko, M. P. and Zhou, C. 2020. Recent Advances on *Citrus yellow vein clearing virus* in Citrus. Horticultural Plant Journal, 6: 216-222.

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

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

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

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

Radwan, D. E. M., Lu, G., Fayez, K. A. and Mahmoud, S. Y. 2008. Protective action of salicylic acid against bean yellow mosaic virus infection in *Vicia faba* leaves. Journal of plant physiology, 165: 845-857.

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

Salehi, M., Izadpanah, K. and Rahimian, H. 1997. Witches'-broom disease of lime in Sistan, Baluchistan. Iranian Journal of Phytopathology, 33: 76.

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

Salehi, M., Mosallaie, K., Zakeri, M. and Firouz R. 2010. New distribution areas of witches'broom disease of lime in Fars province. 19th Iranian Plant Protection Congress, Tehran, Iran, 437.

Spiegel-Roy, P. and Goldschmidt, E. E. 1996. The biology of citrus. Cambridge university press.

Swingle, W. T. and Reece, P. C. 1967. The botany of Citrus and its wild relatives. In: The citrus industry, 2nd edn. University of California Press, 190–430.

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. and Talon, M. 2018. Genomics of the origin and evolution of Citrus. Nature, *554:* 311-316.

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

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

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

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

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

Zreik, L., Carle, P., Bové, J. M. and Garnier, M. 1995. Characterization of the mycoplasmalike organism associated with witches'-broom disease of lime and proposition of a Candidatus taxon for the organism, "*Candidates* phytoplasma aurantifolia". International Journal of Systematic Bacteriology 45: 449-453.