The University of Tehran Press

Iranian Journal of Plant Protection Science

Online ISNN: 2008-4781

Homepage: http://ijpps.ut.ac.ir/

Transmissibility of citrus yellow vein clearing virus by three dominant citrus aphids

Reza Maghsoudi[1], Saeid Nassrollahnejad[2], Sirous Aghajanzadeh✉[3], Seyed Mehdi Bani Hashemian[4]

1. Department of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Golestan, Iran. E-mail: rezamaghsoudi2000@yahoo.com
2. Department of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Golestan, Iran. E-mail: snasrollahnejad@yahoo.com
3. Corresponding Author, Citrus and Subtropical Fruits Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Ramsar, Iran. E-mail: aghajanzadehs@yahoo.com
4. Citrus and Subtropical Fruits Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Ramsar, Iran. E-mail: mbanihashemian@yahoo.com

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 27 December 2022

Revised: 30 April 2023

Accepted: 22 May 2023

Published online: 18 September 2023

Keywords:

Aphid,

Eureka lemon,

Persian lime,

Virus.

ABSTRACT

Citrus yellow vein clearing virus (CYVCV) is in the genus of Mandarivirus that infects some citrus cultivars and causes damage. In this study, the transmission of CYVCV by Aphis spiraecola, *A. gossypii*, and *Toxoptera aurantii* was investigated. Several 30 adult aphids of each species after a 24-hour acquisition access period (AAP) on infected Persian Lime were transferred to Citrus lemon cv. Eureka seedlings for 24 and 48 hours' inoculation access period (IAP). Six months after inoculation, the infected plants were counted. Then their infection was confirmed by a two-step RT-PCR test. The results of the first test showed that 6 months' post-inoculation, the mean transmission rate of CYVCV by A. spiraecola, *A. gossypii*, and *T. aurantii* was 16.67%, 13.33%, and 26.67%, respectively, for 24h AAP/24h IAP. The mean transmission rate was 23.33%, 20%, and 33.33% for 24h AAP/48h IAP, respectively. By increasing the inoculation access period of aphids on virus-infected plants from 24 h to 48 h, the transmission rate increased. In the second test, all three species of aphids with an unknown AAP were collected from infected Persian lime trees in the orchard, under natural conditions and allowed to feed for 24 and 48 hours on Eureka lemon in the greenhouse. It was found that the tested aphids were capable of transmitting this virus. The present study confirmed that the virus is transmitted from Persian lime to Eureka lemon by these citrus aphids under controlled conditions.

Cite this article: Maghsoudi, R., Nassrollahnejad, S., Aghajanzadeh, S., & Bani Hashemian, S. M. (2023). Transmissibility of Citrus Yellow Vein Clearing Virus by Three Dominant Citrus Aphids. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 54 (1), 101-115. DOI: http//doi.org/ 10.22059/IJPPS.2023.353042.1007016

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.
DOI: http//doi.org/ 10.22059/IJPPS.2023.353042.1007016

Extended Abstract

Introduction

Citrus yellow vein clearing disease (CYVCD) was first observed on lemons (*Citrus limon* (L.) and sour oranges (*C. aurantium* L.) from Pakistan (Catara et al., 1993). It was also reported in lemon from Turkey (Onelge, 2002), India (Alshami et al., 2003), China (Chen et al., 2014), and Iran (Bani Hashemian and Aghajanzadeh, 2017). CYVCD reduces yield in Eureka lemon (*C. limon*) from 50-80% (Alshami et al., 2003; Zhou et al., 2017; Liu et al., 2019) and fruit quality is also reduced in China (Onelge et al., 2011a; Li et al., 2017; Zhang et al., 2018).

The results of the research showed rapid spreading of CYVCV in the citrus orchards. CYVCV is an aphid-transmissible virus (Onelge et al., 2011a; Afloukou et al., 2021). *Aphis spiraecola*, *A. gossypii*, and *Toxoptera aurantii* (Hemiptera: Aphididae) are the predominant aphids in citrus orchards of the north of Iran (Aghajanzadeh et al., 1997; Alavi and Rezvani, 2007). Here, the potential transmissibility of CYVCV by these aphids was studied.

Materials and Methods

Eureka lemon seedlings were used as receiver plants. A characterized isolate of CYVCV (Isolate LIE, GenBank accession number: KX902487) collected from an infected Persian lime tree in the north of Iran (Bani Hashemian and Aghajanzadeh, 2017) was graft-inoculated with bark patches onto several sour orange seedlings to create virus donor plants.

The Transmission of CYVCV by *A. spiraecola*, *A. gossypii*, and *Toxoptera aurantii* was conducted in two experiments. The virus-donor plants were fed by virus-free aphids for 24 24-hour acquisition access period (AAP). Thirty adult aphids were placed on young flushes of each 30 lemon seedling receptor plants, and given 24- and 48-hour inoculation access period (IAP), separately. After inoculation, the receptor plants were treated with insecticide and maintained in an isolated insect-proof greenhouse at 22 ± 3 °C. 30 virus-free Eureka lemon seedlings were considered as the negative control.

The appearance of CYVCV symptoms on the leaves of the donor plants and the inoculated receptor lemon seedlings was monitored and compared with non-inoculated control plants 6 months after the IAP in the experiments. The number of these plants was counted.

Six months after inoculation, the presence of CYVCV in the symptomatic donor and receiver plants was confirmed by a two-step Reverse Transcription Polymerase chain reaction (RT-PCR) using a specific primer pair of the virus coat protein gene (Chen et al. 2015), following the extraction of the total RNA of the new flashes of seedling samples by SDS-Potassium acetate method (Bani Hashemian and Aghajanzadeh, 2017).

To calculate the transmission efficiency, the number of approved infected plants by symptom evaluation and molecular test was divided by the total number of inoculated plants.

RESULTS and Discussion

Six months after inoculation, the infected plants were counted. Then their infection was confirmed by a two-step RT-PCR test. The results of the first test showed that 6 months' post-inoculation, the mean transmission rate of CYVCV by *A. spiraecola*, *A. gossypii*, and *T. aurantii* was 16.67%, 13.33%, and 26.67%, respectively, for 24h AAP/24h IAP. The mean transmission rate was 23.33%, 20%, and 33.33% for 24h AAP/48h IAP, respectively. By increasing the inoculation access period of aphids on virus-infected plants from 24 h to 48 h, the transmission rate increased. In the second test, all three species of aphids with an unknown AAP were collected on infected Persian lime trees in the orchard, under natural conditions and allowed to feed for 24 and 48 hours on Eureka lemon in the greenhouse. It was found that the tested aphids were capable of transmitting this virus. One of the important factors in the spread of viral disease is the presence of vectors in citrus orchards. The transmission of viruses by aphids has always been one of the most important ways, so the transmission of CYVCV by *A. spiraecola* from China (Zhang et al., 2018) and *A. gossypii* from Turkey (Afloukou et al., 2021) has been reported. Since the 3 species of studied aphids in this research are dominant aphids in citrus orchards (Aghajanzadeh et al., 1997; Alavi and Rezvani, 2007) and the presence of these aphids in virus-infected areas can be the reason for the virus transmission by these aphids.

Conclusion

The present study confirmed that the virus is transmitted from Persian lime to Eureka lemon by dominant citrus aphids (*A. spiraecola*, *A. gossypii*, and *T. aurantia*) under controlled conditions. Future studies need to obtain more information concerning different aspects of CYVCV and its vectors to integrate pest management programs for vector control.

نشریه دانش گیاهپزشکی ایران، دوره ۵۴، شماره ۱

انتشارات دانشگاه تهران

شاپا الکترونیکی: ۷۸۶۸-۲۴۲۳

Homepage: http://ijpps.ut.ac.ir/

بررسی انتقال‌پذیری ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات (Citrus yellow vein clearing virus) توسط سه گونه شته غالب مرکبات

رضا مقصودی[۱] | سعید نصرالله نژاد[۲] | سیروس آقاجانزاده[۳]✉ | سیدمهدی بنی هاشمیان[۴]

۱. گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گلستان، گرگان، ایران. رایانامه: rezamaghsoudi2000@yahoo.com

۲. گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گلستان، گرگان، ایران. رایانامه: snasrollahnejad@yahoo.com

۳. نویسنده مسئول، پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر، ایران. رایانامه: aghajanzadehs@yahoo.com

۴. پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر، ایران. رایانامه: mbanihashemian@yahoo.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۰۶

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۲/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۰۱

تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۶/۲۷

کلیدواژه‌ها:

اورکالمون، پرشین لایم، شته، ویروس.

چکیده

ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات از جنس Mandarivirus است که بعضی از ارقام مرکبات را آلوده کرده و موجب خسارت می‌شود. در این مطالعه، انتقال این ویروس توسط شته سبز مرکبات (*Aphis spiraecola*)، شته جالیز (*A. gossypii*) و شته سیاه مرکبات (*Toxoptera aurantii*) مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۳۰ شته بالغ از هر گونه پس از ۲۴ ساعت تغذیه گیرش روی پرشین لایم آلوده به ویروس، به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت برای تغذیه دهش روی گیاهچه‌های اورکالمون (Citrus limon cv. Eureka) منتقل شدند. شش ماه پس از انتقال، شمارش گیاهان دارای علایم تفکیک انجام شد و آلودگی آنها با آزمون آر.تی.پی.سی.آر دو مرحله‌ای مورد تائید قرار گرفت. در آزمون اول میزان انتقال ویروس در مدت ۲۴ ساعت تغذیه گیرش و دهش ویروس برای شته سبز مرکبات، جالیز و سیاه مرکبات به ترتیب ۱۶/۶۷، ۱۳/۳۳ و ۲۶/۶۷ درصد و در مدت ۲۴ ساعت تغذیه گیرش و ۴۸ ساعت تغذیه دهش ویروس به ترتیب ۲۳/۳۳، ۲۰ و ۳۳/۳۳ درصد محاسبه شد. با افزایش مدت زمان تغذیه شته‌ها از گیاهان گیرنده ویروس از ۲۴ ساعت به ۴۸ ساعت، میزان انتقال افزایش یافت. در آزمون دوم با مدت زمان نامعلوم تغذیه گیرش توسط هر سه گونه شته روی درختان پرشین‌لایم آلوده به ویروس در باغ تحت شرایط طبیعی و ۲۴ و ۴۸ ساعت تغذیه دهش روی اورکالمون سالم در گلخانه، مشخص شد که شته‌های مورد آزمایش قابلیت انتقال ویروس را داشتند. مطالعه حاضر تایید کرد که شته‌های مورد آزمایش، تحت شرایط کنترل شده قادرند ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات را از پرشین‌لایم به اورکالمون منتقل کنند.

استناد: مقصودی، رضا؛ نصرالله نژاد، سعید؛ آقاجانزاده، سیروس؛ و بنی هاشمیان، سیدمهدی (۱۴۰۲). بررسی انتقال‌پذیری ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات (Citrus yellow vein clearing virus) توسط سه گونه شته غالب مرکبات *نشریه دانش گیاهپزشکی ایران*، ۵۴ (۱)، ۱۱۵-۱۰۱. DOI: http//doi.org/10.22059/IJPPS.2023.353042.1007016

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: http//doi.org/ 10.22059/IJPPS.2023.353042.1007016

مقدمه

ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات (Citrus yellow vein clearing virus, CYVCV) از جنس *Mandarivirus*، خانواده Alfphafelexiviridae و راسته Tymovirales بوده و پیکره‌هایی حدود ۶۸۵ نانومتر طول و ۱۳–۱۴ نانومتر قطر با ژنوم آر.ان.ای تک رشته‌ای مثبت دارد (Loconsole *et al*., 2012). این ویروس اولین بار روی درختان نارنج (*Citrus aurantium L*) و لمون (*C. limon L*.) از کشور پاکستان (Catara *et al*., 1993) و بعد هند (Ahlavat, 1997)، ترکیه (Onelge, 2002)، چین (Chen *et al*., 2014) و ایران (Bani Hashemian & Aghajanzadeh, 2017) گزارش شد. گسترش این ویروس در مناطق مختلف و آلودگی درختان به آن موجب خسارت قابل توجهی به محصول شده است (Chen *et al*., 2014; Liu *et al*., 2019; Zhou *et al*., 2017; Onelge *et al*., 2011a).

انتقال CYVCV به روش‌های مختلف گزارش شده است. مایه‌زنی عصاره مرکبات آلوده به ویروس با روش مکانیکی به لوبیا (*Phaseolos vulgaris* L.) و لوبیا چشم بلبلی (*Vigna unguiculata* L.) (Onelg *et al*., 2011b)، به روش پیوند تاجی با پوستک آلوده در اکثر گونه‌های مرکبات (Iftikhar *et al*., 2010) و تیغ آلوده به CYVCV در نارنج و راف لمون (*C. jambhiri*) و اورکالمون موجب انتقال ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات شد (Zhang *et al*., 2018; Maghsoudi *et al*., 2022). در ارتباط با انتقال CYVCV توسط بذر، بررسی‌های انجام شده در چین نشان داد که این ویروس بوسیله بذر منتقل نمی‌شود (Zhou *et al*., 2015).

شته‌ها از مهم‌ترین ناقلین ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات هستند به‌طوری‌که انتقال آن توسط شته‌های سیاه یونجه (*Aphis craccivora*) و سبز مرکبات (*A. spiraecola*) از لوبیای (*Phaseolos Ph. vulgaris* var. Dermason) آلوده به لوبیای سالم و از لمون آلوده به لوبیای سالم گزارش شد (Onelge *et al*., 2011b). اولین مورد از انتقال CYVCV در مرکبات توسط شته سبز مرکبات در پرتقال رقم پاین اپل (*C. sinensis* cv. Pineapple) در چین (Zhang *et al*., 2018) و سپس توسط شته جالیز (*A. gossypii*) روی نارنج در ترکیه گزارش گردید (Afloukou *et al*., 2021). ناقلین دیگری از جمله سفید بالک مرکبات (*Dialeorodes citri*) باعث انتقال ویروس روی نهال‌های سالم نارنج در چین شده است (Zhang *et al*., 2019a; Zhang *et al*., 2019b).

در سال ۱۳۹۵ وقوع بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات در ایران گزارش گردید (Bani Hashemian & Aghajanzadeh, 2017). علائم بارز بیماری روی شاخساره‌های جدید درختان لمون، نارنج و پرشین لایم (*C. latifolia*) در باغ‌ها و نهالستان‌های شمال کشور مشاهده شد. مطالعات صورت گرفته در سال‌های اخیر نشان داد که نشانه‌های مشخص بیماری در تمامی مناطق شمالی کشور در حال افزایش است (Bani Hashemian, 2018; Bani Hashemian & Aghajanzadeh, 2020). بر اساس گزارش محققین شته‌های سبز و سیاه مرکبات و شته جالیز از جمله شته‌های غالب مرکبات در شمال کشور هستند (Aghajanzadeh *et al*., 1997; Alavi & Rezvani, 2007) که دارای جمعیت قابل ملاحظه‌ای روی ارقام مختلف مرکبات می‌باشند. با توجه به گسترش این بیماری در شمال ایران روی میزبان‌های مختلف بخصوص پرشین لایم، نارنج و لمون و همچنین وجود جمعیت بالای شته‌ها در این مناطق بویژه در درختان آلوده (شکل ۱) احتمال انتقال ویروس توسط ناقلین مد نظر قرار گرفت. از آنجایی که بررسی انتقال ویروس توسط شته‌ها به منظور پیشگیری از گسترش بیماری و ایجاد کانون‌های جدید بسیار حائز اهمیت است و می‌تواند به اتخاذ یک استراتژی مناسب در جهت مدیریت بیماری کمک کند، مطالعه حاضر با هدف بررسی امکان انتقال CYVCV توسط سه گونه شته غالب مرکبات انجام شد.

شکل ۱. کلنی شته‌های مرکبات در درختان پرشین لایم با علائم شاخص ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و جدایه‌های مورد مطالعه

اورکالمون (*C. limon* cv. Eureka) حساس‌ترین میزبان و گیاه محک بیماری رگبرگ روشنی است (Chen *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2017) که به عنوان گیاه دریافت کننده ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات در آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفت. همچنین نارنج به‌عنوان پایه برای تهیه نهال‌های منبع ویروس و پرورش شته‌ها در گلخانه استفاده شد. برای تهیه این گیاهان، ۵۰۰ بذر اورکالمون و ۲۰۰ بذر نارنج از درختان مادری سالم و فاقد علائم بیماری رگبرگ روشنی زرد مرکبات که سلامت آنها نسبت به این بیماری پیش‌تر مورد تایید قرار گرفت، جمع‌آوری و در بستر حاوی ۵۰ درصد کوکوپیت، ۲۵ درصد پرلیت و ۲۵ درصد ماسه که به مدت یک ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس و فشار ۱/۶ بار در اتوکلاو، ضدعفونی شده بودند، کشت و در گلخانه با دمای ۳ ± ۲۲ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در آزمایش اول برای بدست آوردن منبع همگن ویروس، جدایه LIE ویروس با توالی مشخص (رس‌شمار بانک ژن KX902487) موجود در گلخانه پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه گرمسیری (Bani Hashemian & Aghajanzadeh, 2020) روی پایه‌های نارنج سالم پیوند زده و در گلخانه با دمای C^{o} ۳ ± ۲۲ نگهداری و مورد استفاده قرار گرفتند. در آزمایش دوم از درختان پرشین‌لایم با آلودگی طبیعی به جدایه باغی LIE2 ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات (رس‌شمار بانک ژن MN547328) به عنوان نهال‌های آلوده و دهنده ویروس استفاده شد. آلودگی این درختان به CYVCV پیش‌تر مورد تایید قرار گرفته بود.

انتقال ویروس

آزمون‌های انتقال CYVCV توسط شته‌ها

از شته‌های غالب مرکبات شامل شته سبز مرکبات (*Aphis spiraecola*)، شته جالیز (*A. gossypii*) و شته سیاه مرکبات (*Toxoptera aurantii*) برای آزمون‌های انتقال استفاده شدند. (Aghajanzadeh *et al.*, 1997; Alavi and Rezvani, 2007)

برای شناسایی این شته‌ها پس از تهیه اسلاید میکروسکوپی از کلید شناسایی معتبر استفاده گردید (Blackman *et al*., 2007). بررسی امکان انتقال ویروس رگبرگ روشنی به دو روش انجام شد:

آزمون اول

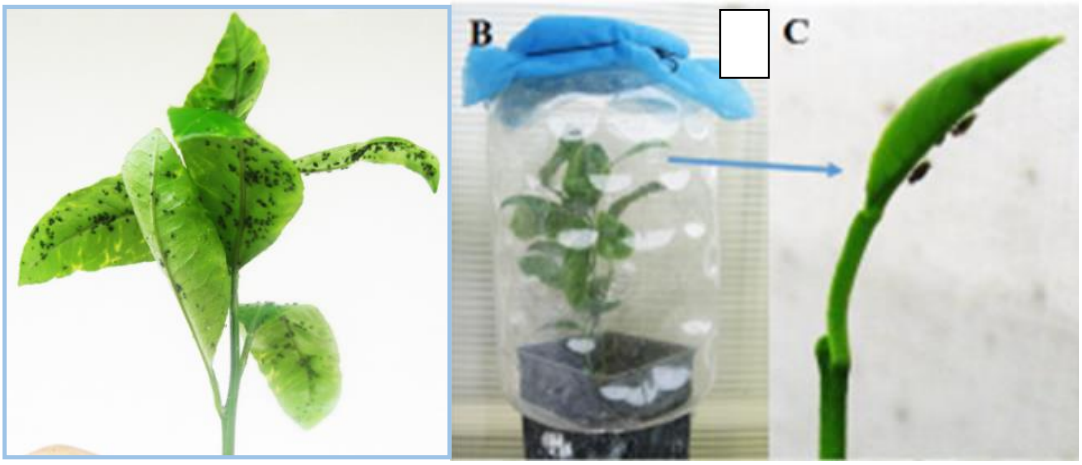
شته‌های سبز و سیاه مرکبات و شته جالیز از روی شاخساره‌های جوان درختان مرکبات در باغ‌های شهرستان رامسر جمع‌آوری و به داخل کیسه‌های پلاستیکی منتقل شدند. مشخصات هر نمونه شامل محل و تاریخ جمع آوری ثبت و بعد از انتقال به آزمایشگاه مورد شناسایی قرار گرفتند. در مرحله بعد شته‌ها به تفکیک هر گونه روی نهال‌های نارنج انتقال داده و پرورش داده شدند. پس از آن با انتقال ماده‌های بالغ روی نهال‌های جدید نارنج خالص‌سازی شته‌ها صورت گرفت. برای پرورش انبوه، شته‌ها به روی نهال‌های نارنج سالم انتقال یافته و پس از افزایش جمعیت، در آزمون‌های انتقال مورد استفاده قرار گرفتند (Marroquin *et al*., 2004). ماده‌های بالغ به تفکیک هر گونه شته انتخاب و روی نهال‌های پرشین لایم آلوده به ویروس که به عنوان گیاهان آلوده و دهنده ویروس در گلخانه نگهداری می‌شدند، قرار داده شدند تا به مدت ۲۴ ساعت از آنها تغذیه کنند. از این شته‌ها در دو گروه برای تغذیه از گیاهان گیرنده ویروس استفاده شد. در یک گروه تعداد ۳۰ شته ماده بالغ روی هر نهال سالم اورکالمون قرار گرفته تا به مدت ۲۴ ساعت تغذیه نماید و با تغذیه از گیاه سالم باعث انتقال ویروس شوند (شکل ۲). در گروه دیگر مدت زمان تغذیه شته‌ها از گیاهان سالم اورکا لمون ۴۸ ساعت بود. برای هر دوره زمانی ۳۰ اصله نهال در ۳ دسته ۱۰ تایی و در مجموع ۱۸۰ اصله نهال اختصاص یافت.

آزمون دوم

شته‌های سبز و سیاه مرکبات و شته جالیز از روی شاخساره‌های جوان درختان پرشین لایم آلوده به CYVCV موجود در باغ مرکبات به عنوان گیاهان آلوده و دهنده ویروس جمع‌آوری و به گلخانه منتقل و روی نهال‌های سالم گیرنده ویروس مستقر شدند. بدین صورت که تعداد ۳۰ شته ماده بالغ روی برگهای جوان هر نهال اورکالمون سالم منتقل و اجازه داده شد تا مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در دو گروه مجزا تغذیه نمایند. برای هر دوره زمانی ۲۰ اصله نهال در ۲ دسته ۱۰ تایی و در مجموع ۱۲۰ اصله نهال اختصاص یافت.

در آزمایش اول تعداد ۹۰ اصله نهال سالم اورکالمون به‌عنوان نهال‌های شاهد در نظر گرفته شدند که ۳۰ اصله نهال بدون تغذیه شته و ۶۰ اصله نهال دیگر مورد تغذیه شته‌های سالم (۳۰ شته پرورش یافته روی هر نهال) به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در دو گروه مجزا قرار گرفتند. در آزمایش دوم تعداد ۳۰ اصله نهال سالم اورکالمون بدون تغذیه شته به‌عنوان نهال‌های شاهد در نظر گرفته شدند.

بعد از اتمام مدت زمان تغذیه شته‌ها از نهال‌های مورد آزمایش، نهال‌ها با شته‌کش پریمور با غلظت ۰/۶ در هزار سمپاشی شده و در گلخانه مجزا با دمای ۳ ± ۲۲ درجه سلسیوس نگهداری شدند.



شکل ۲. مراحل انتقال ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات توسط شته. A: تغذیه شته‌ها از منبع آلوده برای اخذ ویروس، B و C: تغذیه شته‌ها از نهال سالم برای انتقال ویروس

ارزیابی انتقال ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات

آزمون بیولوژیکی

علائم بیماری روی برگ نهال‌های میزبان بصورت روشنی رگبرگ در رگبرگهای جانبی برگ‌های جوان، لکه برگی و چروکیدگی برگ‌ها مشاهده می‌شود (Alshami *et al.*, 2003; Onelge, 2002; Onelge *et al.*, 2010). شش ماه بعد از انتقال ویروس، نهال‌های گیرنده ویروس و نهال‌های شاهد مورد ارزیابی قرار گرفتند. علائم بیماری روی برگ‌ها یادداشت و تعداد نهال‌های آلوده شده به ویروس توسط شته‌ها به تفکیک هر گونه شمارش و در جداول مربوطه ثبت شدند.

آزمون مولکولی: استخراج اسید نوکلئیک، RT-PCR و آنالیز تبارزایی

برای آزمون مولکولی جهت تائید انتقال CYVCV توسط شته‌ها از ۴۰ اصله گیاهچه اورکلمون دارای علائم بیماری و ۸ اصله بدون علائم بیماری، استفاده شد. علاوه بر گیاهان شاهد، ۷ اصله که شته‌های سالم از آن‌ها تغذیه کرده بودند و ۷ اصله بدون تغذیه شته به عنوان شاهد منفی در آزمون مولکولی به کار رفتند. به منظور انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با نسخه برداری معکوس (RT-PCR)، شش ماه بعد از انتقال، آر.ان.ا کل ویروس به روش SDS-Potassium acetate از بافت برگ و رگبرگ نهال‌های مورد آزمایش استخراج شد (Bernard *et al.*, 2006). نمونه‌های ۵۰۰ میلی‌گرمی از بافت گیاهی در داخل پاکت‌های پلاستیکی محکم محتوی ۵ میلی‌لیتر بافر (تریس ۰/۱ مولار، PH:۸؛ EDTA ۵۰ میلی‌مولار، کلرید سدیم ۰/۵مولار، بتا مرکاپتواتانول ۱۰ میلی‌مولار۶/۴۵ :PH)، قرار داده و عصاره گیری با سدیم دو دسیل سولفات به مدت 20 دقیقه در دمای 65درجه سلسیوس انجام شد. بعد استات پتاسیم به مدت 20 دقیقه در یخ تیمار شده و فاز رویی به وسیله اتانول رسوب دهی و تغلیظ گردید و سپس در 40 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′-GCAGAAATCCCGAACCACTA-3′ انجام و نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در ژل آگارز 1% مورد بررسی قرار گرفت (Bahri *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014). برای ساخت دی.ان.ای مکمل از آغازگر YVCPr و کیت Revert Aid EP0441 (Fermentas)و جهت انجام واکنش PCR از PCR Master Mix (2X) k0171 (Fermentas) استفاده شد. چرخه‌های حرارتی شامل 5 دقیقه در 94 درجه سلسیوس(یک چرخه)، 1 دقیقه در 94 درجه سلسیوس ، 1 دقیقه در 54 درجه سلسیوس و 1 دقیقه در 72 درجه سلسیوس (30 چرخه) و 10 دقیقه در72 درجه سلسیوس (1چرخه) به منظور تکثیر دی.ان.ای مکمل اجرا گردید. تعیین توالی نوکلئوتیدی محصول نهایی واکنش به کمک آغازگرهای مستقیم و معکوس انجام گرفت. تعیین توالی نوکلئوتیدی

محصول نهایی واکنش پی‌سی‌آر تکثیر شده با آغازگرهای اختصاصی ویروس توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی با استفاده از آغازگرهای مستقیم و معکوس انجام گرفت. دو بار خوانش توالی هر جدایه با برنامه ClustalW با توالی جدایه باغی مورد استفاده در آزمون انتقال ویروس (جدایه LIE2، رس‌شمار بانک ژن MN547328) هم‌ردیف، توالی نهایی استخراج و به کمک الگوریتم نوکلئوتید بلاست (nBlast) با سایر توالی‌های اسید نوکلئیک موجود در بانک ژن NCBI مقایسه شد. درخت تبارزایی اسید نوکلئیک جدایه‌های ایرانی ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات با توالی انتخابی جدایه‌های این ویروس در بانک ژن با کمک نرم‌افزار MEGA X 11 به روش Maximum Likelihood و بوت استرپ ۱۰۰۰ ترسیم گردید. در این تجزیه و تحلیل از تعدادی از جدایه‌های این ویروس از کشورهای درگیر بیماری شامل ایران، پاکستان، هندوستان، ترکیه و چین موجود در این بانک استفاده شد. دو جدایه ویروس لکه حلقوی هندی مرکبات (Indian Citrus Ring Spot Virus, ICRSV)، گونه دیگر جنس *Mandarivirus*، و ویروس ایکس سیب‌زمینی(PVX) به عنوان اعضای برون‌گروه در نظر گرفته شدند.

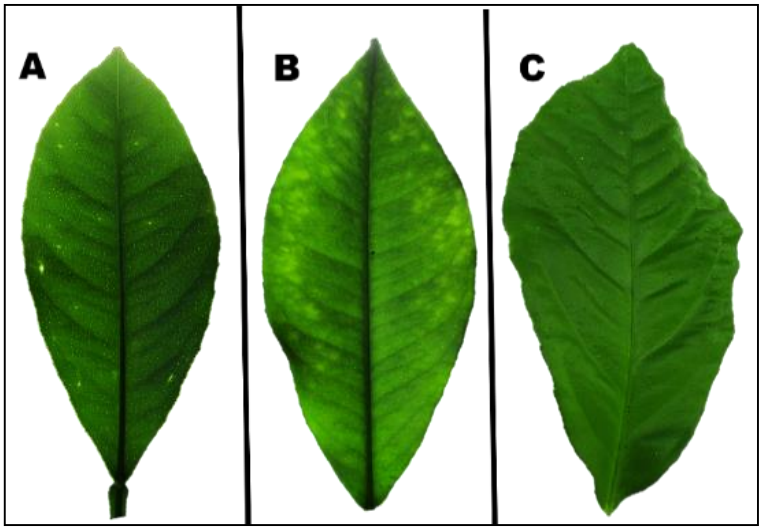
کارآیی شته‌ها در انتقال ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات

اثبات انتقال ویروس با شته، بر مبنای بروز علائم در گیاهچه‌های محک گیرنده ویروس و تایید آلودگی با پی سی آر در گیاهان دارای علائم صورت گرفت. میزان انتقال ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات توسط شته جالیز، شته‌های سبز و سیاه مرکبات به صورت درصد محاسبه شد. برای این منظور، تعداد نهال‌های آلوده شده به ویروس توسط هر گونه شته شمارش و در ۱۰۰ ضرب و بر کل نهال‌های مورد آزمون برای آن گونه شته تقسیم شد.

نتایج

نتایج آزمون بیولوژیکی

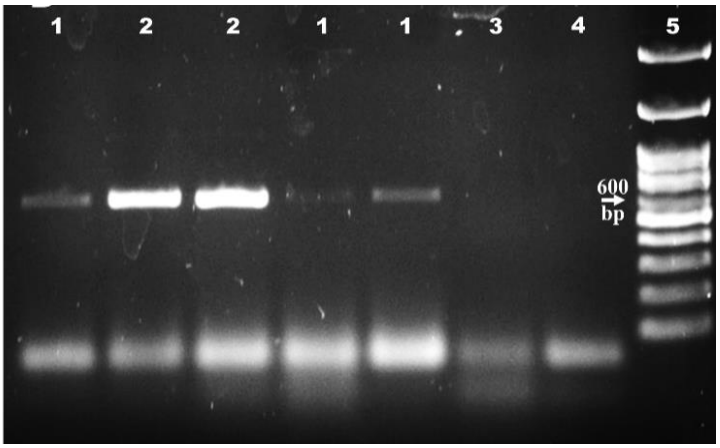
نتایج حاصل از بررسی انتقال ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات توسط شته‌های سبز مرکبات، جالیز و سیاه مرکبات در آزمون‌های اول و دوم نشان داد که علایم بیماری روی برگ نهال‌های اورکالمون شش ماه پس از آزمون انتقال به‌صورت رگبرگ روشنی خفیف، لکه برگی و چروکیدگی و پیچیدگی برگها بودند (شکل ۳). در برخی از نهال‌های اورکا لمون آلوده به ویروس فقط یک نوع علامت و در برخی دیگر دو و یا هر سه نوع علائم مشاهده گردید.



شکل ۳. علائم ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات روی برگ اورکا لمون شش ماه پس از آزمون انتقال ویروس توسط شته‌های مرکبات. رگبرگ روشنی روی رگبرگهای جانبی (A)، لکه‌برگی (B) و چروکیدگی (C)

آنالیز نتایج مولکولی

نتایج حاصل از آر.تی.پی.سی.آر با استفاده از آغازگرهای ژن پروتئین پوششی ویروس نشان داد که قطعه مورد انتظار با حدود ۶۰۰ جفت باز در آر.ان.ای.های استخراج شده از برگهای جوان نهال‌های اورکالمون دارای علایم بیماری، تکثیر یافت. چنین باندی در عصاره برگ نهال‌های شاهد و بدون علائم مشاهده نشد (شکل ۴). بدین ترتیب نهال‌های دارای علائم مشخص بیماری واکنش مثبت به آر.تی.پی. سی.آر داشتند ولی گیاهان بدون علائم دارای واکنش منفی بودند. این نتایج صحت علائم مربوط به انتقال ویروس توسط شته‌های سیاه و سبز مرکبات و شته جالیز را تایید کرد. بنابراین آلودگی نهال‌های اورکالمون که مورد تغذیه شته‌های مرکبات قرار گرفته و علائم بیماری ویروسی رگبرگ روشنی زرد مرکبات تا شش ماه بعد از انجام آزمایش در شرایط گلخانه روی برگ‌های آنها ظاهر شد، با نتایج آزمون مولکولی نیز مورد تأیید قرار گرفت.



شکل ۴. الکتروفورز نتایج آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات در تأیید آلودگی نهال‌های اورکالمون به ویروس پس از آزمون انتقال با شته جالیز. چاهک‌ها: ۱. گیاه گیرنده و آلوده به ویروس پس از مایه زنی با شته ۲. گیاه منبع ویروس برای تغذیه شته ۳. گیاه گیرنده ویروس از شته تغذیه شده روی نهال سالم (گیاه شاهد)، ۴. گیاه غیر آلوده (سالم بدون تغذیه شته) ۵. نشانگر با اندازه ۱۰۰ جفت باز (سیناکلون SL7041)

انتقال ویروس توسط شته‌ها

بررسی نتایج حاصل از علائم ایجاد شده روی برگهای اورکالمون و آنالیز نتایج مولکولی در آزمون اول نشان داد که میزان انتقال ویروس طی ۲۴ ساعت تغذیه شته سیاه مرکبات از پرشین لایم آلوده و ۲۴ ساعت تغذیه از اورکالمون سالم شش ماه پس از آزمون ۲۶/۶۷ درصد بود. این میزان برای شته سبز مرکبات ۱۶/۶۷ درصد و برای شته جالیز ۱۳/۳۳ درصد بود. میزان انتقال ویروس در مدت ۲۴ ساعت تغذیه گیرش و ۴۸ ساعت دهش ویروس بعد از شش ماه، توسط شته سیاه مرکبات به میزان ۳۳/۳۳ درصد، در شته سبز مرکبات ۲۳/۳۳ درصد و در شته جالیز ۲۰ درصد بود (جدول ۱). فراوانی علائم و میزان انتقال در مدت زمان ۴۸ ساعت تغذیه دهش ویروس توسط هر گونه شته بیشتر از ۲۴ ساعت بود.

بررسی امکان انتقال ویروس در آزمون دوم برای هر سه گونه شته با مدت زمان تغذیه گیرش نامعلوم روی درختان آلوده در باغ تحت شرایط طبیعی و تغذیه دهش ۲۴ و ۴۸ ساعت روی اورکالمون سالم در گلخانه، شش ماه پس از آزمون منجر به بروز علائم بیماری روی برگ نهال‌ها شد (شکل ۳).

جدول۱. فراوانی علائم روی اورکالمون و میزان انتقال ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات توسط شته‌ها شش ماه بعد از انجام آزمون اول

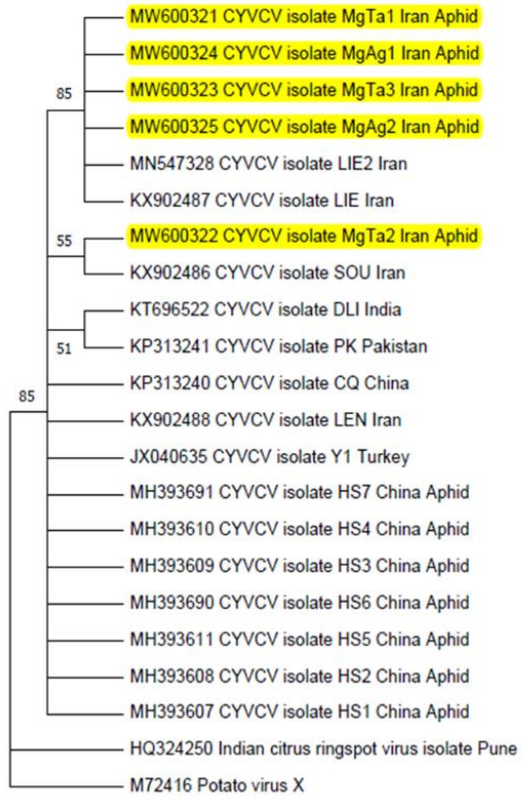
شته	زمان گیرش و دهش ویروس به ترتیب (ساعت)	تکرار	تعداد نهال آزمایشی	تعداد نهال دارای علائم	تعداد علائم (نوع)			میزان انتقال بعد از ۶ ماه (%)	میانگین میزان انتقال بعد از ۶ ماه (%)
					رگبرگ روشنی	لکه برگی	چروکیدگی		
T. aurantii	۲۴ و ۲۴	۱	۱۰	۲	۲	۲	۲	۲۰	۲۶/۶۶
		۲	۱۰	۳	۱	۳	۲	۳۰	
		۳	۱۰	۳	۳	۲	۳	۳۰	
	۲۴ و ۴۸	۱	۱۰	۳	۲	۳	۳	۳۰	۳۳/۳۳
		۲	۱۰	۴	۳	۴	۳	۴۰	
		۳	۱۰	۳	۲	۳	۳	۳۰	
A. spiraecola	۲۴ و ۲۴	۱	۱۰	۲	۲	۱	۲	۲۰	۱۶/۶۶
		۲	۱۰	۱	۱	۱	۱	۱۰	
		۳	۱۰	۲	۱	۲	۲	۲۰	
	۲۴ و ۴۸	۱	۱۰	۲	۲	۱	۲	۲۰	۲۳/۳۳
		۲	۱۰	۲	۱	۲	۲	۲۰	
		۳	۱۰	۳	۳	۱	۳	۳۰	
A. gossypii	۲۴ و ۲۴	۱	۱۰	۱	۱	۱	۱	۱۰	۱۳/۳۳
		۲	۱۰	۲	۲	۱	۲	۲۰	
		۳	۱۰	۱	۱	۱	۱	۱۰	
	۲۴ و ۴۸	۱	۱۰	۱	۱	۱	۱	۱۰	۲۰
		۲	۱۰	۲	۱	۲	۱	۲۰	
		۳	۱۰	۳	۳	۱	۱	۳۰	

جدول۲. فراوانی علائم روی اورکالمون و میزان انتقال ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات توسط شته‌ها شش ماه بعد از انجام آزمون دوم

شته	زمان گیرش و دهش ویروس به ترتیب (ساعت)	تکرار	تعداد نهال آزمایشی	تعداد نهال دارای علائم	تعداد علائم (نوع)		
					رگبرگ روشنی	لکه برگی	چروکیدگی
T. aurantii	نامعلوم و ۲۴	۱	۱۰	۱	۱	۱	۱
		۲	۱۰	۱	۰	۱	۱
	نامعلوم و ۴۸	۱	۱۰	۱	۱	۱	۰
		۲	۱۰	۲	۱	۲	۱
A. spiraecola	نامعلوم و ۲۴	۱	۱۰	۱	۱	۱	۰
		۲	۱۰	۱	۰	۱	۱
	نامعلوم و ۴۸	۱	۱۰	۲	۱	۲	۱
		۲	۱۰	۲	۱	۱	۲
A. gossypii	نامعلوم و ۲۴	۱	۱۰	۱	۰	۱	۱
		۲	۱۰	۱	۱	۱	۰
	نامعلوم و ۴۸	۱	۱۰	۱	۱	۲	۱
		۲	۱۰	۲	۱	۱	۲

نتایج آنالیز تبارزایی

پنج جدایه MgTa1، MgTa2، MgTa3، MgAg1(64a) و MgAg2(65a) با توالی مشخص (رس‌شمار بانک ژن) در میزبان اورکالمون با کد MW600321، MW600322، MW600323، MW600324 و MW600325 در بانک ژن ثبت شد. ترادف‌های حاصل با استفاده از موتور جستجوی بلاست با توالی‌های اسید نوکلئیک تعدادی از جدایه‌های منتخب ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات از کشورهای دارای این بیماری و جدایه‌های ایران موجود در این بانک مقایسه شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که در این توالی‌ها چهار جدایه MgTa1، MgTa3، MgAg1 و MgAg2 با جدایه ایرانیCYVCV از میزبان پرشین‌لایم (LIE & LIE2) متناظرند و ۹۹/۲۰ تا ۹۹/۸۴ درصد با آن شباهت دارند. همچنین جدایه MgTa2 حداقل ۹۸/۳۸ درصد با جدایه ایرانی SOU از میزبان نارنج مشابه می‌باشد (شکل ۵). براساس درخت تبارزایی تشابه توالی ژن پروتئین پوششی در توالی‌های این تحقیق با جدایه‌های ویروس در سایر کشورهای درگیر شامل پاکستان، هند، ترکیه و چین مشخص شد.



Identity (%) to isolates of the study

MgTa1	MgTa2	MgTa3	MgAg1	MgAg2
100	96.77	99.82	99.60	99.80
99.60	96.99	99.39	100	99.40
99.82	97.02	100	99.39	100
99.80	96.79	100	99.40	100
99.84	96.59	99.63	99.40	99.60
99.67	96.77	99.45	99.20	99.40
96.77	100	97.02	96.99	96.79
98.21	98.38	98.17	97.99	98.19
96.41	96.04	96.33	96.18	96.39
96.73	96.76	96.70	96.79	96.99
97.06	96.58	96.51	96.79	96.59
96.74	96.59	96.70	96.79	96.59
97.39	96.23	97.43	97.39	97.59
97.11	94.29	97.11	97.69	97.11
97.11	94.29	97.11	97.69	97.11
97.11	94.29	97.11	97.69	97.11
97.11	94.29	97.11	97.69	97.11
97.11	94.29	97.11	97.69	97.11
97.11	94.29	97.11	97.69	97.11
97.11	94.29	97.11	97.69	97.11

شکل ۵. درخت تبارزایی اسید نوکلئیک به روش Maximum Likelihood (با ارزش بوت استرپ بالاتر از ۵۰ درصد) پنج جدایه ایرانی CYVCV منتقل شده توسط شته‌های ناقل با توالی جدایه‌های مشابه در بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار MEGA 11. مقادیر بوت استرپ (٪) بر اساس ۱۰۰۰ تکرار در گره ها نشان داده شده است. رس‌شمار، نام جدایه، کشور مبدا و جدایه‌های این تحقیق مشخص شده‌اند. ویروس لکه حلقوی هندی مرکبات(ICRSV) و ویروس X سیب‌زمینی (Potato virus X) به عنوان برون‌گروه در نظر گرفته شدند. جدایه‌های حاصل از این تحقیق با رنگ زرد مشخص شده‌اند.

بحث

بیماری رگبرگ روشنی مرکبات، در سال ۱۹۸۸ در کشور پاکستان مشاهده شد (Catara *et al.*, 1993). پس از آن، وجود این بیماری در هند (Ahlavat, 1997)، ترکیه (Onelge, 2002)، چین (Chen *et al.*, 2014) و ایران (Bani Hashemian & Aghajanzadeh, 2017) گزارش شد. یکی از عوامل مهم و تاثیرگذار در گسترش این بیماری ویروسی در مناطق مرکبات‌خیز، وجود ناقلین فعال در باغ‌های مرکبات است. انتقال ویروس‌ها توسط حشرات همواره از مهم‌ترین راههای انتقال بوده و در این بین شته‌ها مهم‌ترین ناقلین ویروس‌های گیاهی هستند، به‌طوری‌که انتقال ویروس رگبرگ روشنی توسط شته سبز مرکبات از چین (Zhang *et al.*, 2018) و شته جالیز از ترکیه گزارش شده است (Afloukou *et al.*, 2021). با توجه به اینکه ۳ گونه شته مورد بررسی در این تحقیق از شته های مهم و غالب در باغ‌های مرکبات شمال کشور هستند (Aghajanzadeh *et al.*, 1997; Alavi & Rezvani, 2007) و بنابراین حضور فعال این شته‌ها در مناطق آلوده به ویروس می‌تواند دلیلی بر احتمال انتقال ویروس توسط این شته‌ها باشد. نتایج حاصل از آزمون اول مربوط به انتقال CYVCV در مطالعه حاضر دلالت بر انتقال این ویروس توسط سه گونه شته غالب مرکبات دارد که با نتایج بررسی‌های انجام شده در سایر کشورها منطبق است (Zhang *et al.*, 2018; Afloukou *et al.*, 2021). طبق یافته‌های حاصل از آزمون دوم این تحقیق نشان داد که شته‌های مورد آزمایش که در شرایط باغ از درختان پرشین لایم با آلودگی طبیعی به CYVCV تغذیه کرده بودند، قابلیت انتقال این ویروس را به نهال‌های اورکالمون داشتند.

گیاهان محک ابزار قدرتمندی برای تشخیص بیماریهای ویروسی و شبه‌ویروسی هستند (Roistacher, 1991) که حساس‌ترین گیاهان شناخته شده از نظر تکثیر و بروز علائم برای ویروس‌ها می‌باشند و غلظت ویروس در آنها به شدت افزایش می یابد. این بیماری در گونه‌های حساس مانند لمون‌ها و نارنج، ۳ نوع علایم روی برگ به‌صورت روشنی رگبرگ، لکه برگی و چروکیدگی و پیچیدگی ایجاد می‌کند (Alshami *et al.*,2003; Onelge, 2002; Chen *et al.*, 2014; Bani Hashemian *et al.*, 2022). که نتایج حاصل از این تحقیق مطابق با آن است. فزون براین در این بررسی علائم رگبرگ روشنی خفیف روی گیاهچه‌های اورکالمون مشاهده شد که ممکن است به دلیل تیتر پایین ویروس در انتقال با شته باشد و با نتایج مطالعات سایر محققین مشابهت دارد(Chen *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2018; Afloukou *et al.*, 2021). در این تحقیق، میزان انتقال ویروس رگبرگ روشنی توسط شته سیاه مرکبات در زمان ۲۴ ساعت تغذیه گیرش از پرشین لایم آلوده و ۲۴ ساعت تغذیه دهش از اورکالمون سالم ۲۶/۶۷ درصد و برای شته سبز مرکبات به میزان ۱۶/۶۷ درصد و شته جالیز ۱۳/۳۳ درصد شش ماه بعد از آزمون انتقال بود. وقتی مدت زمان تغذیه دهش شته‌ها از گیاه سالم از ۲۴ ساعت به ۴۸ افزایش یافت به میزان انتقال ویروس در هر سه گونه شته افزوده شد (شته سیاه مرکبات ۳۳/۳۳ ، شته سبز مرکبات ۲۳/۳۳ و شته جالیز ۲۰ درصد). مطالعات پیشین در ارتباط با انتقال ویروس توسط حشرات نشان داد که با افزایش جمعیت ناقل، زمان گیرش ویروس از گیاه آلوده و زمان دهش ویروس به گیاه سالم، میزان انتقال ویروس افزایش می‌یابد (Gray *et al.*, 1991). همان‌طوری میزان انتقال CYVCV توسط شته سبز مرکبات روی پرتقال رقم پاین اپل با ۲۴ ساعت تغذیه دهش ۴/۴ درصد و ۴۸ ساعت تغذیه دهش ۲۳/۳ درصد بود (Zhang *et al.*, 2018) گزارش‌ها نشان می‌دهند که راندمان انتقال CYVCV توسط شته جالیز روی نارنج با ۴۸ ساعت تغذیه دهش (۶۶/۷ درصد) بیشتر از ۲۴ ساعت تغذیه دهش با راندمان ۶۳/۳ درصد است (Aflouku *et al.*, 2021).

مقایسه توالی قطعه تکثیر شده از ژن پروتئین پوششی ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات با سایر جدایه‌های بانک ژن نشان داد که تنوع ژنتیکی کمی (۳-۱نوکلئوتید) بین جدایه‌های مختلف وجود دارد. این موضوع با نتایج تحقیقی دیگر در زمینه ویژگی‌های مولکولی جدایه‌های مختلف جغرافیایی و میزبانی این ویروس منطبق است (Zhou *et al.*, 2017).

در درخت تبارزایی نتیجه همردیف سازی ترادف نوکلئوتیدی چارچوب ژنی پروتئین پوششی جدایه های این تحقیق و سایر جدایه‌های منتخب موجود در بانک ژن با استفاده از نرم افزار MEGA 11 بررسی شدند. مطالعه تبارزایی در این بررسی مشخص

نمود که چهار جدایه شته‌های ایران MgTa1، MgTa3، MgAg1 و MgAg2 شباهت بسیار بالایی به دو جدایه ایرانی LIE و LIE2 داشتند. جدایه MgTa2 به جدایه SOU ایران شبیه بود. همچنین جدایه‌های هند و پاکستان شباهت زیادی به هم داشتند (شکل ۵). نزدیکی جدایه‌های ایران به جدایه‌های کشورهای همسایه می‌تواند بیانگر وجود تبادل مواد گیاهی آلوده بین آنها و احتمال انتقال این ویروس باشد.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق مشخص گردید که ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات از پرشین لایم توسط شته‌های سبز و سیاه مرکبات و نیز شته جالیز به اورکالمون منتقل می‌شود. بنابراین لازم است مطالعات جامع‌تری روی انتقال این ویروس توسط سفید بالک مرکبات (*Dialeorodes citri*) و سایر شته‌های مرکبات صورت گیرد. بعلاوه بررسی جنبه‌های دیگری مانند حداقل زمان مورد نیاز برای تغذیه گیرش و دهش ویروس توسط ناقلین و تاثیر منابع ویروس در انتقال آن پیشنهاد می‌شود. همچنین در سالهایی که به علت مساعد بودن شرایط آب و هوایی، جمعیت شته‌ها افزایش می‌یابد، کنترل شته‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است. لذا نتایج این مطالعه می‌تواند به طراحی یک استراتژی برای مدیریت ناقلین ویروس رگبرگ روشنی زرد مرکبات در مناطق مرکبات‌خیز کشور و جلوگیری از شیوع آن کمک کند.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از حمایت‌ها و تأمین امکانات پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه گرمسیری در انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌شود.

REFRENCES

Afloukou1, 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(2), 83-86. https://doi.org/10.1007/s10327-020-00976-6.

Ahlawat, Y. S. (1997). Virus greening bacterium and viroids associated with citrus decline in India. Indian *Journal Agricultural Science*, 67, 51-57.

Aghajanzadeh, S., Rassoulian, Gh., & Rezvani, A. (1997). Investigation of phonetic aspects of citrus aphids in Mazandaran. *Journal of Plant Pests and Diseases*, 65 (1), 78-62. (In Persian)

Alavi, S.W. & Rezvani, A. (2007). Investigation of seasonal changes in citrus aphid population in East Mazandaran and the ability of important species to transmit citrus Tristeza virus. *Journal of Plant Pests and Diseases*, 75 (1), 49-53. (In Persian)

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 aetiology. *Indian Phytopathology*, 56, 422-427.

Bahri, B., Bani Hashemian, S. M., Kolyvand, D. & Radmand, A. (2013). Using a simple method of nucleic acid extraction to detect and identification citrus Tristeza virus. *The 8th Biotechnology Conference of the Islamic Republic of Iran and the 4th National Conference on Biosafety*, July 6-7. Tehran. (In Persian)

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

Bani Hashemian, S. M. (2018). Citrus yellow vein clearing disease, a new threat for citriculture of Iran. *Proceeding of the 23rd Iranian Plant Protection Congress, Gorgan, Iran*. pp. 626-627. (In Persian)

Bani Hashemian, S. M. & Aghajanzadeh, S. (2020). Identification of citrus yellow vein virus in Mazandaran province. *Scientific Journal of Plant Protection*. 43(2), 49-61. (In Persian)

https://doi.org/ 10.22055/PPR.2020.15997.

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. (In Persian) https://doi.org/ 10.22055/PPR.2022.17660

Bernad, L. & Durán-Vila, N. (2006). A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. *Molecular and cellular probes*, 20 (2), 105-113. https://doi.org/10.1016/j.mcp.2005.11.001.

Blackman, R. L. & Eastop, V. F. (2007). Aphids on the worlds Herbaceous Plants and Shrubs: An Identification and Information Guide. John Wiley and Sons: Chichester.

Catara, A., Azzaro, A., Davino, M. & Polizzi, G. (1993). Yellow vein clearing of lemon in Pakistan. in: *Proceeding of the 12th Conferrence IOCV*, pp. 364-367.

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, 1747–1747. https://doi.org/10.1094/PDIS-04-14-0343-PDN.

Gray, S. M., Power, A. G., Smith, D. M., Seaman, A. J. & Altman, N. S. (1991).Aphid transmission of Barley yellow dwarf virus: acquisition access periods and virus concentration requirements. *Phytopathology*, 81, 539-545.

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

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 (12), 1168-1175. https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-12-0140-R.

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 (3), 691-697. https://doi.org/10.1007/s00705-018-04123-7.

Maghsoudi, R., Nassrollahnejad, S., Aghajanzedeh, S. & Bani Hashemian, S. M. (2022). The role of contaminated horticultural tools in the transmission of Iranian isolate of citrus yellow vein clearing virus. *8th Iranian congress of virology*. (In Persian)

Marroquín, C., Olmos, A., Teresa Gorris, M., Bertolini, E., Carmen Martínez, M., Carbonell, EA., Hermoso de Mendoza, A., & Cambra, M. (2004). Estimation of the number of aphids carrying citrus tristeza virus that visit adult citrus trees. *Virus Reserche*, 100,101-8. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.12.018.

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. & Satar, S. (2010). Yellow vein clearing of lemons in Turkey. *Proceedings of the 17th International Organization of Citrus Virologists Conference, Adana, Turkey*. pp. 227-228.

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

Önelge, N., Satar, S., Elibüyük, O., 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*. pp. 11-14.

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

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 (3), 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 (1), 65-68. https://doi.org/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 (1), 169-171. https://doi.org/10.1007/s42161-018-0141-8.

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(1), 137–143. https://doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0679-RE.

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 (3), 1-3.