

## خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی چند جدایه ایرانی ویروس توت‌های رگبرگ مرکبات (CVEV)

سحر نوری<sup>۱</sup>، اکبر دیزجی<sup>۱\*</sup> و حشمت‌اله رحیمیان<sup>۲</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۱۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۱۲)

### چکیده

ویروس توت‌های رگبرگ مرکبات (Citrus vein enation virus, CVEV) گونه احتمالی جنس *Enamovirus*، با علائم رگبرگ توت‌های و گال چوبی در تنه، اخیراً از مرکبات ایران گزارش شده است. در تحقیق حاضر خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی تعدادی از جدایه‌های ویروس مطالعه شد. پس از انتقال پیوندی ۲۹ جدایه مختلف ویروس به سه گونه میزبان شامل نارنج (*Citrus aurantium*)، لیموی ولکامریانا (*C. volkameriana*) و لیموی پوست ناصاف (راف لمون، *C. jambhiri*)، نتایج نشان داد که زمان بروز، نوع و شدت علائم بیماری وابسته به جدایه و میزبان (پایه پیوند شده) بوده و بر این اساس جدایه‌های ویروس در سه گروه قرار گرفتند. این ویروس با شته سیاه باقلا (*Aphis fabae*) و با کارایی بالاتری نسبت به شته سبز پنبه (*Aphis gossypii*) انتقال یافت. این اولین گزارش از انتقال پذیری CVEV توسط شته سیاه باقلا است. نتایج RT-qPCR نشان داد که بافت‌های پوست ساقه یک ساله و دمبرگ دانه‌های نارنج آلوده به ترتیب دارای بیشترین و کمترین غلظت CVEV هستند. پایش ماهیانه ویروس در یک سال با آزمون RT-PCR نشان داد که ویروس فقط در دو بازه زمانی اواخر فروردین تا اوایل تیر ماه و اواسط شهریور تا اوایل مهرماه قابل ردیابی است، با وجود این به کارگیری روش RT-qPCR باعث افزایش شصت درصدی حساسیت ردیابی ویروس در آذرماه شد. نتیجه تبارزایی جدایه‌های مختلف ویروس بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ناحیه همپوشان چارچوب‌های خوانش ۱ و ۲ (ORF1 و ORF2)، آنها را به سه گروه تفکیک کرد که تاحدی با گروه‌های علائم شناسی همبستگی داشت.

کلیدواژه: انتقال پذیری، چارچوب خوانش ۲ (ORF2)، علائم بیماری، کارایی انتقال، *Enamovirus*

\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: adizaji@ut.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۲. استاد گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

## Biological and molecular characteristics of some Citrus vein enation virus (CVEV) isolates from Iran

S. Nouri<sup>1</sup>, A. Dizadji<sup>1\*\*</sup>, and H. Rahimian<sup>2</sup>

(Received: 12.7.2017; Accepted: 3.3.2018)

### Abstract

Citrus vein enation virus (CVEV), a tentative species of the genus *Enamovirus*, family *Luteoviridae*, which causes vein enation and trunk woody gall symptoms on citrus, has been recently reported from Iran. In the present research, biological and molecular properties of CVEV different isolates were studied. Following graft transmission of 29 CVEV isolates on sour orange (*Citrus aurantium*), volkamer lemon (*C. volkameriana*) and rough lemon (*C. jambhiri*), the results indicated that the incidence, type and severity of symptoms depend on the CVEV isolate and host (rootstock), accordingly virus isolates were classified into three groups. CVEV was transmitted by *Aphis fabae* with a significantly higher efficiency than that by *Aphis gossypii*. This is the first report of CVEV transmissibility by *A. fabae* in the world. Based on RT-qPCR results, the maximal and minimal concentrations of CVEV were determined in young bark and petioles tissues of infected sour orange seedlings, respectively. Monthly monitoring of the virus throughout the year by RT-PCR showed that CVEV was only detectable during two periods of late April to early July along with mid-September to early October, however, sensitivity of virus detection raised up to 60 percent in early December by using RT-qPCR. In the phylogenetic analysis of CVEV isolates based on nucleotide sequence of overlapped regions of ORF1 and ORF2, isolates were grouped into three clades which showed some correlation with symptomology groups.

**Keywords:** Diseases symptoms, *Enamovirus*, ORF2, Transmissibility, Transmission efficiency

---

\*Corresponding author's E-mail: adizaji@ut.ac.ir

1. PhD student and Assoc. Prof. of Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences and Engineering, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

2. Professor, Department of Plant Protection, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

## مقدمه

همپوشانی داشته، و پروتئین حاصل از ORF1 و ORF2 در تکثیر آن ای ویروس نقش دارند (Vives et al. 2013). لیموی پوست ناصاف، نارنج، لیموترش مکزیکی (*Citrus junos* (Christ.) Swing)، نارنگی یوزو (*C. unshiu* Marc.) Siebold ex Tanaka و نارنگی انشو (*C. sinensis* (L.) Osb.) و نارنگی (*C. limon* (L.) Burm. f) ویروس می‌باشند. لیموخواگی (*C. reticulata*) پرتقال (*C. sinensis* (L.) Osb.) و نارنگی (Blanco) از دیگر میزبان‌های این ویروس هستند که فقط در شرایط گلخانه‌ای علائم بیماری را بروز می‌دهند (Catara & Davino 1984). علائم بیماری توت‌های رگبرگ مرکبات شامل ایجاد برآمدگی‌های کوچک در ناحیه رگبرگ‌ها در سطح زیرین برگ و فرورفتگی‌هایی در همان محل در سطح رویی برگ درختان نارنج و لیموترش مکزیکی و با شدت کمتر در سایر گونه‌های میزبان (Wallace & Drake 1959) بوده و در تنه و شاخه‌های درختان لیموی پوست ناصاف و لیموی ولکامریانا (*Citrus volkameriana* Ten. and Pasq.) (Vives et al. 1959, Fraser 2013) گال چوبی ایجاد می‌کند. عامل بیماری توسط شته قهوه‌ای مرکبات، شته سیاه مرکبات (*Toxoptera aurantii* Boyer de Fonscolombo) (Maharaj & Graca 1989)، شته سبز پنبه (*Aphis gossypii* Glover) (Laird & Weathers 1961) و شته سبز هلو (*Myzus persicae* Sulz.) به صورت پایا منتقل می‌شود (Hermoso et al. 1993).

در سال‌های گذشته، علائم گال چوبی در درختان نارنج شهرهای شمالی (ساری، رامسر، چالوس، آمل، بابل و گرگان) و نیز جنوبی ایران (شیراز و جهرم) مشاهده شده است. بررسی‌های مقدماتی تک درخت نارنج در شهر ساری با علائم برآمدگی‌های کوچک در ناحیه رگبرگ‌ها

ویروس توت‌های رگبرگ مرکبات (*Citrus vein enation virus*, CVEV) اولین بار از ایالت کالیفرنیا در سال ۱۹۵۳، به عنوان یک بیماری قابل انتقال با پیوند با علائم ایجاد توت‌های رگبرگ‌های فرعی نارنج (*Citrus aurantium* L.) و سایر گونه‌های حساس مرکبات، گزارش گردید (Wallace & Drake 1953). سپس این بیماری و انتقال‌پذیری عامل آن توسط شته قهوه‌ای مرکبات (*Toxoptera citricida* Boyer de Fonscolombo) از آفریقای جنوبی گزارش شد (McClellan 1954). چند سال بعد بیماری دیگری با علائم گال‌های چوبی در تنه پایه‌های لیموی پوست ناصاف (راف لمون، *Citrus jambhiri*) Lush از استرالیا گزارش شد (Fraser 1959). بر اساس تحقیقات تکمیلی، ویروس توت‌های رگبرگ مرکبات عامل هر دو بیماری رگبرگ توت‌های و گال چوبی مرکبات تشخیص داده شد (Wallace & Drake 1960, 1961). تاکنون ترادف نوکلئوتیدی ژنوم کامل (۵۹۸۳ نوکلئوتید) چند جدایه ویروس توت‌های رگبرگ مرکبات از اسپانیا، چین و ژاپن تعیین شده است (Vives et al. 2013, Ai-jun et al. 2015, Nakazono-Nagaoka et al. 2017). بررسی‌ها نشان داد که این ویروس رابطه تبارزائی نزدیکی با ویروس موزائیک توت‌های نخودفرنگی (*Pea enation mosaic virus1*, PEMV1) از جنس *Enamovirus* دارد، در نتیجه این ویروس به عنوان گونه جدید احتمالی جنس *Enamovirus* از تیره *Luteoviridae* پیشنهاد شده است (Vives et al. 2013). این جنس در حال حاضر دارای دو گونه PEMV-1 و *Alfalfa enamovirus1* (AEV1) است. ژنوم اعضای جنس *Enamovirus* دارای پنج چارچوب ژنی (ORF) می‌باشد که چارچوب‌های ژنی ۰، ۱ و ۲ با هم

جدول ۱. آغازگرهای اختصاصی CVEV مورد استفاده در این تحقیق

**Table 1. Citrus vein enation virus specific primers used in this study**

Primers	Sequence (5' to 3')	Position on complete genome (nt)	Amplified fragment size (bp)	Used for	Reference
VE17r	AATGAGATAGCCCCGGTTGTCCAG	3466-3486	1232	Detection	(Vives <i>et al.</i> 2013)
VE5f	CGGGGCTTGGATTCTCAAAGG	4676-4698			
VEsLCf	GAAGCAGGTCGGCAGGGATGCC	2079-2100	862	Amplification	(Vives <i>et al.</i> 2013)
VE2r	TGGCTGCTTGGTACCGCAAAGAGC	2917-2940			
VERTf	ACCGAGATGTGGAAGTGCGTG	5018-5038	223	RT-qPCR	this study
VERTr	CAGCTCCCATCTGCCTTCCC	5222-5241			

### ردیابی ویروس توت‌های رگبرگ مرکبات با ترانویسی معکوس - واکنش زنجیره ای پلیمرز<sup>۱</sup> (RT-PCR)

برای ردیابی ویروس توت‌های رگبرگ مرکبات، آر آن ای کل گیاه از بافت‌های پوست شاخه‌های جوان یکساله و رگبرگ‌های نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از کیت RNX-Plus (سیناکلون، ایران) استخراج گردید. به اختصار، ۱۰۰ میلی گرم بافت پودر شده گیاهی با ازت مایع در یک میلی لیتر از محلول RNX-Plus عصاره گیری شد. پس از جداسازی آر آن ای کل با کلروفورم، رسوب دهی با ایزوپروپانول سرد و شستشو با اتانول ۷۵٪، رسوب آر آن ای در ۳۰ میکرولیتر آب عاری از آنزیم نوکلئاز به حالت سوسپانسیون درآمد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

ردیابی ویروس توت‌های رگبرگ مرکبات به روش RT-PCR و با استفاده از جفت آغازگر VE5f/VE17r (جدول ۱)، که قطعه‌ای به اندازه تقریبی ۱۲۰۰ جفت باز از ناحیه انتهایی کدکننده پلی‌مراز (ORF2) تا قسمت ابتدای چارچوب ژنی پروتئین پوششی (ORF3) را تکثیر می‌کند (Vives *et al.* 2013) انجام شد. ساخت دی آن ای مکمل (cDNA) در واکنش‌های ۲۱ میکرولیتری حاوی چهار

در سطح زیرین برگ و گال چوبی در تنه درخت حاکی از آلودگی آن به ویروس توت‌های رگبرگ مرکبات بود (Nouri *et al.* 2015). علیرغم مشاهده علائم گال چوبی در تنه برخی از گونه‌های مرکبات کشور و نیز گزارش اخیر وجود ویروس توت‌های رگبرگ مرکبات از شهرستان ساری، اطلاعاتی در خصوص پراکنش و نیز خصوصیات این ویروس در ایران وجود ندارد. در این تحقیق، پراکنش این ویروس در چند استان مرکبات خیز کشور و برخی خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی چند جدایه ایرانی CVEV مورد مطالعه قرار گرفته است.

### مواد و روش‌های بررسی

#### منبع ویروس

در بهار سال ۱۳۹۴ از درختان مرکبات علائم دار مشکوک به آلودگی با CVEV (توت‌های شدن رگبرگ‌ها و گال چوبی در تنه درختان) استان‌های مازندران (شهرستان‌های رامسر، چالوس، آمل و ساری)، گلستان (شهرستان گرگان) و فارس (شیراز و جهرم) به ترتیب ۶۰، ۱۵ و ۲۸ نمونه جمع‌آوری شد. نمونه‌ها بر روی یخ قرار گرفته و به آزمایشگاه منتقل شدند.

<sup>1</sup> Reverse transcription polymerase chain reaction

(Ladder, USA) انجام شد.

### مطالعه پاسخ سه گونه مرکبات به جدایه‌های مختلف CVEV

برای مطالعه پاسخ میزبانی به جدایه‌های CVEV از نظر زمان بروز، نوع و شدت علائم بیماری، سه گونه میزبان نارنج، لیموی ولکامریانا و لیموی پوست ناصاف با ۲۹ جدایه ویروس با منشا میزبانی و موقعیت‌های جغرافیایی مختلف (جدول ۲) به روش انتقال پیوندی مایه‌زنی شدند. برای تهیه پایه مرکبات، بذور رسیده درون میوه‌های سه گونه مرکبات در گلدان‌های حاوی مخلوط پرلیت متوسط، کوکوپیت و خاک باغچه استریل (به نسبت مساوی) کاشته و در شرایط گلخانه‌عاری از حشره نگهداری شدند. دانه‌ها بعد از یک سال و نیم جهت انتقال ویروس مورد استفاده قرار گرفتند. هر جدایه ویروس روی دو دانه‌ال (پایه) از هر گونه مرکبات به روش پیوندزنی مایه‌زنی شد. به منظور انتقال پیوندی، شکافی به شکل T معکوس بر روی ساقه‌ی هر دانه‌ال ایجاد و از پوست شاخه‌های آلوده به هر جدایه به عنوان پیوندک استفاده و محل پیوندها با پارافیلیم بسته شد. دانه‌ال‌های مایه‌زنی‌شده در شرایط گلخانه در دمای ۲۶-۱۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از حصول اطمینان از موفقیت پیوندزنی و سه ماه بعد از مایه‌زنی، آلودگی دانه‌ال‌ها به ویروس به روش RT-PCR و استفاده از جفت آغازگر VE5f/VE17r مورد بررسی قرار گرفت. دانه‌ال‌ها از نظر بروز علائم بیماری به صورت هفته‌ای یکبار به مدت بیش از یکسال تحت نظر قرار گرفتند.

بررسی انتقال‌پذیری CVEV با شته و تعیین کارایی انتقال انتقال‌پذیری و کارایی انتقال ویروس توت‌هی رگبرگ

میکرولیتر آر ان ای کل، یک پیکومول آغازگر معکوس VE17r و هشت میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام و بلافاصله روی یخ منتقل شد. به مخلوط واکنش دو میکرولیتر dNTPs (10 mM)، چهار میکرولیتر بافر پنج برابر RevertAid Reverse transcriptase (RT) نیم میکرولیتر RNase inhibitor (Thermo Fisher, USA) (۴۰ U/μL) و ۰/۷۵ میکرولیتر آنزیم RevertAid RT (Thermo Fisher, USA) (۲۰۰ U/μL) اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس مخلوط واکنش به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته بلافاصله به دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد. واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) در واکنش‌های ۲۵ میکرولیتری حاوی دو و نیم میکرولیتر cDNA، یک میکرومول بافر، مخلوط نوکلئوتیدها با غلظت نهایی ۰/۲ میلی‌مول، آغازگرهای رفت و برگشت هر یک با غلظت نهایی ۰/۴ میکرومول، ۱/۵ میلی‌مول  $MgCl_2$  و ۱/۵ واحد آنزیم SmartTaq DNA Polymerase (سیناژن، ایران) انجام شد. چرخه‌های دمایی واکنش شامل یک چرخه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه، ۳۵ چرخه که هر یک شامل دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸۰ ثانیه و یک چرخه بسط نهایی دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه بود. محصولات PCR در ژل آگاروز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید (EtBr) در بافر TBE (Tris-Borate-EDTA) الکتروفورز افقی شده و به وسیله دستگاه ژل خوان (GEL LOGIC 200, Kodak, USA) تخمین طول قطعات تکثیرشده با مقایسه آنها با نشانگر دی ان ای (Thermo Scientific GeneRuler 100 bp DNA ۱۰۰bp

جدول ۲. مشخصات جدایه‌های CVEV مورد استفاده در بررسی پاسخ سه گونه مرکبات

**Table 2. Characteristics of CVEV isolates used in response evaluation of three citrus species**

Accession number	Group based on the symptoms	Location	Host	Isolate
MG593826	1	Ramsar	( <i>Citrus limon</i> )	MRL5
MG593827	1	Ramsar	( <i>Citrus unshiu</i> )	MRU3
MG593824	1	Ramsar	( <i>Citrus aurantium</i> )	MR5
MG593825	2	Ramsar	( <i>C. aurantium</i> )	MR6
MG593822	2	Chalus	( <i>C. aurantium</i> )	MCh1
MG593823	2	Chalus	( <i>C. aurantium</i> )	MCh3
-	1	Chalus	( <i>Citrus sinensis</i> )	MChS8
MG593821	1	Amol	( <i>C. aurantium</i> )	MA3
-	1	Amol	( <i>C. aurantium</i> )	MA7
MG593828	1	Sari	( <i>C. aurantium</i> )	MSa1
-	1	Sari	( <i>C. aurantium</i> )	MSa2
-	1	Sari	( <i>C. aurantium</i> )	MSa3
MG593829	1	Sari	( <i>C. aurantium</i> )	MSa4
MG593831	1	Sari	( <i>C. sinensis</i> )	MSaS1
-	1	Sari	( <i>C. aurantium</i> )	MSa5
-	1	Sari	( <i>C. sinensis</i> )	MSaS11
-	1	Sari	( <i>C. unshiu</i> )	MSaU9
MG593830	1	Sari	( <i>Citrus myrtifolia</i> )	MSaM1
-	1	Gorgan	( <i>C. aurantium</i> )	GG2
MG593820	1	Gorgan	( <i>C. aurantium</i> )	GG3
-	1	Gorgan	( <i>C. aurantium</i> )	GG7
-	1	Gorgan	( <i>C. aurantium</i> )	GG10
-	1	Shiraz	( <i>C. aurantium</i> )	FSh2
MG593816	1	Shiraz	( <i>C. aurantium</i> )	FSh4
-	1	Shiraz	( <i>C. aurantium</i> )	FSh7
MG593817	3	Shiraz	( <i>C. aurantium</i> )	FSh8
MG593818	3	Shiraz	( <i>C. aurantium</i> )	FSh11
-	1	Jahrom	( <i>C. aurantium</i> )	FJ4
MG593819	1	Jahrom	( <i>C. aurantium</i> )	FJ5

\*Groups based on the symptoms were discussed in the text.

کارآیی انتقال) حشره بالغ از هر گونه شته با برس مویی روی ۱۰ دانهال شش ماهه سالم نارنج منتقل شدند. آزمون تعیین کارآیی انتقال در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار (ده دانهال در هر تکرار) انجام شد. بعد از دوره دسترسی تغذیه دهش به مدت ۷۲ ساعت، شته‌ها با سمپاشی دانهال‌ها با حشره کش پریمور (نیم در هزار) حذف شدند. در تیمار شاهد نیز پس از تغذیه گیرش شته‌ها از دانهال‌های سالم نارنج، دو دانهال سالم نارنج به ازای هر گونه شته در معرض تغذیه دهش شته‌ها قرار گرفتند. یکسال بعد از مایه‌زنی با شته، وضعیت آلودگی دانهال‌های مایه‌زنی شده با آزمون RT-PCR و استفاده از

مرکبات با سه گونه شته سبز مرکبات (*Aphis spiraecola* Patch.)، شته سیاه باقلا (*Aphis fabae* Scop.) و شته سبز پنبه مورد بررسی قرار گرفت. پس از تهیه کلونی خالص از هر گونه شته و تکثیر روی دانهال‌های بذری سالم نارنج، آزمون‌های انتقال شته ای ویروس در گلخانه عاری از حشره با شرایط دمایی ۱۸-۲۵ درجه سانتیگراد با ۱۸ ساعت روشنایی و ۶ ساعت تاریکی انجام گرفت. پس از دسترسی تغذیه گیرش شته‌ها به مدت ۴۸ ساعت روی دانهال‌های دو ساله نارنج آلوده به جدایه MSa1 (مایه‌زنی شده با پیوند پوست ساقه)، به ازای هر دانهال تعداد پنج (در آزمون انتقال‌پذیری) و یک (در آزمون تعیین

آغازگر جدید VERTf/VERTr (جدول ۱) با استفاده از برنامه OligoExplorer1.4 طراحی شد. ساخت cDNA با استفاده از RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher, USA) و آغازگر معکوس VERTr انجام شد و پس از پنج برابر رقیق‌سازی در آزمون qPCR مورد استفاده قرار گرفت. واکنش زنجیره ای پلیمراز کمی (q-PCR)، با سه تکرار از هر نمونه، در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتری، حاوی ۷/۵ میکرولیتر Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) (Thermo Fisher, USA)، ۰/۲ پیکومول از هر آغازگر رفت و برگشت VERTf/VERTr و ۲ میکرولیتر cDNA با استفاده از دستگاه StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA) چرخه دمایی شامل یک چرخه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۴۰ چرخه، هریک شامل دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه بود. در مرحله پی سی آر این آزمون از ژن خانه‌دار یوبی کیتین (Mafra et al. 2012) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. تمام مراحل بالا روی پایه نارنج سالم به عنوان تیمار شاهد انجام شد.

#### مقایسه حساسیت ردیابی CVEV به دو روش RT-PCR

##### و RT-qPCR

در مرحله اول، قابلیت ردیابی ویروس توت‌ه‌ی رگبرگ مرکبات در تک درخت نارنج علائم دار آلوده به CVEV-MSa1 در ماه‌های مختلف سال مورد بررسی قرار گرفت. پس از نمونه برداری ماهیانه (پانزدهم هر ماه، از تیر ماه سال ۱۳۹۴ تا خرداد ماه سال ۱۳۹۵) از بافت پوست ساقه یک ساله درخت و استخراج آر ان ای کل، امکان ردیابی ویروس با روش RT-PCR و با استفاده از جفت

جفت آغازگر VE17r و VE5f بررسی شد. داده‌ها به روش دانکن و با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

#### مقایسه غلظت جدایه‌های CVEV در بافتهای مختلف گیاه با آزمون RT-qPCR<sup>۲</sup>

مقایسه غلظت سه جدایه MSa1, MCh1, و GG3 ویروس توت‌ه‌ی رگبرگ مرکبات در سه نوع بافت مختلف (پوست ساقه یک ساله، دمبرگ و رگبرگ) نارنج آلوده به ویروس به طور همزمان انجام شد. پس از نمونه برداری از سه نوع بافت پایه‌های نارنج آلوده به سه جدایه مختلف در اردیبهشت سال ۱۳۹۵، آر ان ای کل با استفاده از کیت RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany) استخراج گردید. کیفیت آماده‌های آر ان ای کل استخراج‌شده با تعیین جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتری و نیز الکتروفورز در ژل آگاروز یک درصد بررسی شد. برای حذف دی ان ای ژنومی از آماده‌ها، هر آماده آر ان ای کل با غلظت نهایی یک میکروگرم در میکرولیتر با آنزیم (Thermo, USA) DNase I RNase free (Fisher) تیمار شد. برای این کار یک میکرولیتر آنزیم و یک میکرولیتر بافر واکنش با آر ان ای کل مخلوط و با آب عاری از نوکلئاز حجم واکنش به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت. جهت غیر فعال شدن DNase، یک میکرولیتر EDTA ۵۰ میلی مولار به هر نمونه اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از هم‌ردیف‌سازی ترادف‌های CVEV در دسترس ژن‌بانک و ترادف جدایه ایرانی MSa1 این ویروس (نتایج چاپ نشده)، جفت

<sup>2</sup> Reverse transcription real-time quantitative PCR



آغازگرهای VE5f و VE17r بررسی شد. در مرحله دوم و بر اساس نتایج به دست آمده از مرحله اول، قابلیت ردیابی ویروس در بافت پوست ساقه یک ساله ده درخت نارنج آلوده به CVEV (آلودگی طبیعی) از شهرستان ساری، در آذر ماه سال ۱۳۹۵ با دو روش RT-qPCR و RT-PCR مقایسه شد. به دنبال نمونه برداری از بافت رگبرگ‌های اصلی درختان و استخراج آر آن ای کل با استفاده از کیت RNX-Plus، آزمون‌های RT-PCR و RT-qPCR با جفت آغازگر VERTf و VERTr انجام و نتایج مقایسه شد.

آغازگرهای VE5f و VE17r بررسی شد. در مرحله دوم و بر اساس نتایج به دست آمده از مرحله اول، قابلیت ردیابی ویروس در بافت پوست ساقه یک ساله ده درخت نارنج آلوده به CVEV (آلودگی طبیعی) از شهرستان ساری، در آذر ماه سال ۱۳۹۵ با دو روش RT-qPCR و RT-PCR مقایسه شد. به دنبال نمونه برداری از بافت رگبرگ‌های اصلی درختان و استخراج آر آن ای کل با استفاده از کیت RNX-Plus، آزمون‌های RT-PCR و RT-qPCR با جفت آغازگر VERTf و VERTr انجام و نتایج مقایسه شد.

### نتایج و بحث

تحقیقات محدودی در مورد بیماری توت‌های رگبرگ مرکبات در جهان صورت گرفته است. علیرغم مشاهده علائم بیماری از دیرباز در کشورهای مرکبات خیز دنیا، ترادف نوکلئوتیدی کامل ژنوم اولین جدایه ویروس در سال ۲۰۱۳ تعیین شده است (Vives *et al.* 2013). در چند سال اخیر ترادف نوکلئوتیدی کامل ژنوم یک جدایه از چین (Ai-jun *et al.* 2015) و پنج جدایه از ژاپن (Nakazono-Nagoaka *et al.* 2017) گزارش شده است. در ایران این بیماری اولین بار از میزبان نارنج با علائم گال چوبی در تنه و توت‌های رگبرگ گزارش گردید (Nouri *et al.* 2015).

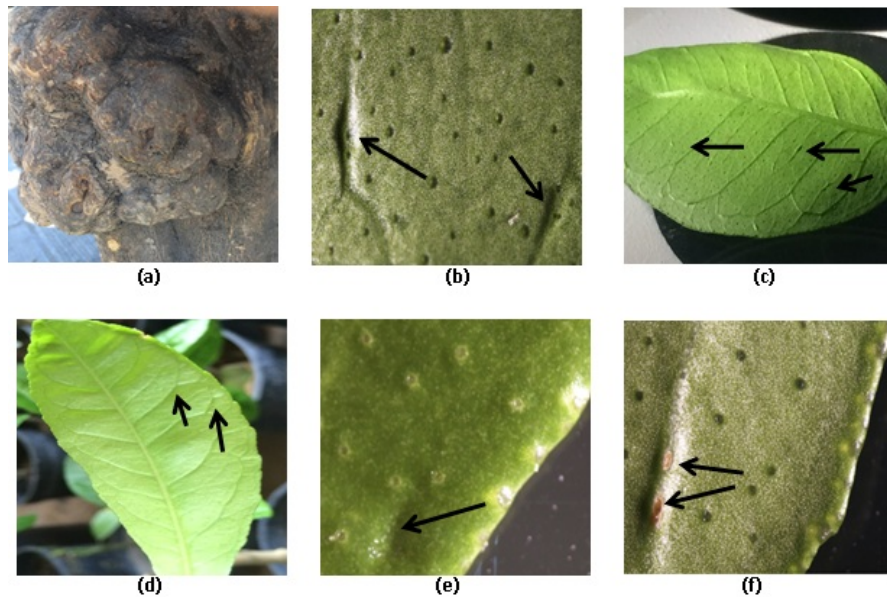
### علائم بیماری در آلودگی‌های طبیعی

در بازدیدهای به عمل آمده از درختان مرکبات استان-های مازندران، گلستان و فارس علائم بارز بیماری به صورت گال‌های چوبی در تنه درختان نارنج به وضوح دیده شد (شکل a ۱). همچنین در نمونه‌های نارنج، لیموخواگی و نارنج‌خوشه‌ای (*Citrus myrtifolia* Raf.) آلوده به ویروس، علائم توت‌های رگبرگ در سطح زیرین

### تعیین ترادف بخشی از ژنوم چند جدایه ایرانی CVEV و تحلیل تبارزایی جدایه‌های ویروس

بر اساس مناطق جغرافیایی، منشا میزبانی و نیز علائم ایجاد شده روی سه گونه مرکبات (پس از انتقال پیوندی ۲۹ جدایه)، ۱۶ جدایه CVEV (جدول ۲) انتخاب و ناحیه همپوشان ORF1 و ORF2 آنها با استفاده از جفت آغازگر VE2r و VEsLCF (جدول ۱) تکثیر شد. پس از استخراج محصول PCR از ژل با استفاده از کیت (کره جنوبی GeneAll Expin Combo GP، قطعات تکثیر شده با استفاده از InsT/AClone PCR (Thermo Fisher, USA) Product Cloning Kit طبق دستورالعمل شرکت سازنده در حامل پلاسمیدی pTZ57R/T الحاق و به سلول‌های مستعد *Escherichia coli* DH5a منتقل شد. پس از غربالگری کلنی‌های آبی-سفید در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۴۰ mg/ml)، X-gal (۲۰ mg/ml) و IPTG (۲۰ mg/ml) (سیناژن، ایران)، کلنی‌های سفید حاوی پلاسمید نوترکیب در محیط مایع کشت شدند. بعد از حصول اطمینان از وجود قطعه همسانه‌سازی شده در پلاسمید با استفاده از هضم آنزیمی، پلاسمید نوترکیب خالص و برای تعیین ترادف دو جهت و با استفاده از





شکل ۱. علائم CVEV در برگ‌ها و تنه‌ی درختان آلوده. (a) گال چوبی در تنه درخت نارنج، (b) توت‌های شدن سطح زیرین رگبرگ نارنج، (c) توت‌های زیاد در سطح زیرین رگبرگ نارنج خوشه‌ای، (d) توت‌های رگبرگ‌ها در لیموی پوست ناصاف، (e) فرورفتگی در سطح رویی برگ نارنج، (f) بافت مردگی توت‌ها.

**Fig. 1. Symptoms of CVEV in leaves and trunk of infected citrus. (a) woody gall on sour orange trunk; (b) vein enation on leaf underside of sour orange; (c) numerous enations leaf on underside of Chinotto; (d) vein enation on rough lemon; (e) depression on upper side of sour orange leaf; (f) enation necrosis.**

حال به نظر می‌رسد پراکنش و میزان آلودگی در شمال کشور (۶۲٪/۶) بیشتر از استان فارس (۲۵٪) بوده است. همچنین میزان آلودگی در ۱۹، ۷۰ و ۱۰ نمونه درختان نارنج، پرتقال و نارنگی انشو به ترتیب ۶۴/۲، ۱۵/۷ و ۲۰ درصد تعیین شد که حاکی از آلودگی بیشتر نارنج به این ویروس بوده است.

#### انتقال پیوندی و پاسخ سه گونه مرکبات به جدایه‌های مختلف CVEV

پس از حصول اطمینان از موفقیت پیوند روی دانه‌های نارنج، لیموی پوست ناصاف و لیموی ولکامریانا (سبز ماندن بافت پیوندک) آلودگی دانه‌های پیوندی به روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه پاسخ این سه میزبان به جدایه‌های متفاوت CVEV

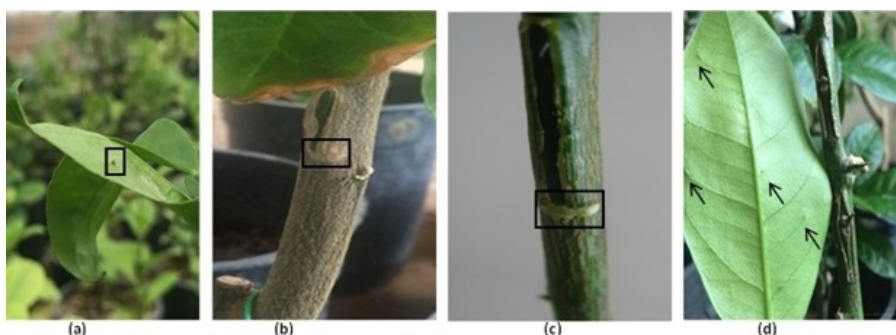
برگها قابل مشاهده بود (شکل ۱ b, c). درختان پرتقال و نارنگی انشو آلوده به CVEV، بدون گال چوبی در تنه بوده و تنها علائم بیماری وجود تورم در سطح رگبرگ‌های زیرین برگهای جوان مشاهده شد که به صورت توت‌های نبوده و به دلیل تورم در سطح وسیعتری از طول رگبرگ-فرعی، باعث ناهمواری سطح زیرین برگ شده بود (شکل 1d).

بر اساس نتایج آزمون RT-PCR، میزان آلودگی به CVEV در درختان مرکبات دار جمع‌آوری شده از استان‌های مازندران، گلستان و فارس، به ترتیب ۶۶/۶، ۴۶/۶ و ۲۵ درصد تعیین شد (جدول ۳). به دلیل نمونه برداری از درختان علائم دار، تعداد نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق و میزبان‌های مختلف، متفاوت بود و در نتیجه نمونه برداری تصادفی انجام نگرفت. با این

جدول ۳. درصد آلودگی نمونه‌های مرکبات آلوده به CVEV در سه استان مازندران، گلستان و فارس

**Table 3. CVEV infection rate in citrus samples collected from Mazandaran, Golestan and Fars provinces**

Sampling region	Host	Number of infected samples/collected samples	Infection rate (%) of citrus samples
Mazandaran	<i>Citrus aurantium</i>	31/40	66.6
	<i>Citrus sinensis</i>	3/10	
	<i>Citrus myrtifolia</i>	1/1	
	<i>C. unshiu</i>	2/6	
	<i>Citrus limon</i>	3/3	
Golestan	<i>Citrus aurantium</i>	7/10	46.6
	<i>Citrus sinensis</i>	0/5	
Fars	<i>Citrus aurantium</i>	7/20	25
	<i>Citrus sinensis</i>	0/4	
	<i>C. unshiu</i>	0/4	



شکل ۲. علائم ناشی از مایه زنی سه گروه از جدایه‌های CVEV با پیوند. (a) توت‌های درشت به تعداد کم در رگبرگ نارنج مایه زنی شده با جدایه MCh1، (b) تشکیل گال در محل پیوند لیموی ولکامریانا، در زمان بیش از یکسال بعد از مایه‌زنی با جدایه MCh1، (c) تشکیل گال در محل پیوند پایه نارنج سه هفته بعد از مایه زنی با جدایه F8، (d) توت‌های فراوان در سطح زیرین رگبرگ نارنج، بدون تشکیل گال در محل پیوند مایه زنی شده با جدایه MSa1.

**Fig 2. Symptoms caused by three groups of CVEV isolates following graft inoculation. (a) large and few vein enations on sour orange inoculated with MCh1 isolate; (b) gall formation on *Citrus volkameriana* graft union after more than one year post inoculation with MCh1; (c) gall formation on sour orange graft union three weeks post inoculation with F8 isolate; (d) numerous vein enation on leaf underside of sour orange without gall formation in the graft union inoculated with MSa1.**

در سطح زیرین رگبرگ اصلی لیموی پوست ناصاف و دو جدایه FSh8 و FSh11 که منجر به علائم توت‌های رگبرگ در هیچ یک از میزبان‌ها نشدند. جدایه‌های MCh1، MCh3 و MR6، توت‌هایی به تعداد کم ولی نسبتاً درشت‌تر (در حد یک میلی‌متر) در پایه‌های نارنج آلوده ایجاد کردند (شکل ۲ a,b)، در حالی که این جدایه‌ها در دو میزبان دیگر باعث بروز توت‌های بسیار کم و ریز گردیدند. علائم

نشان داد که زمان بروز، نوع و شدت علائم در دانه‌های آلوده به ویروس به دو عامل جدایه ویروس و میزبان (پایه پیوندشده) بستگی دارد. بین جدایه‌های ویروس از نظر ایجاد علائم توت‌های در سطح زیرین رگبرگ‌ها تفاوت‌هایی مشاهده شد، به طوری که اغلب جدایه‌های ویروس باعث ظهور توت‌های ریز در نواحی انتهایی رگبرگ‌های فرعی برگ‌ها گردیدند، به جز جدایه MR5 که باعث ایجاد توت‌

یک از میزبان‌ها، قادر به ایجاد گال‌های چوبی درشت در محل پیوند هر سه میزبان در مدت زمان سه هفته بعد از زمان مایه‌زنی بودند (شکل ۲c).

علی‌رغم اینکه اکثر جدایه‌های گروه اول از درختان نارنج دارای گال چوبی تنه بودند، بعد از انتقال با پیوند در هیچ یک از سه پایه مرکبات مورد مطالعه منجر به ایجاد گال در محل پیوند نشدند. در این پژوهش در تنه‌ی درختان مرکبات سطح شهرها و مسیرهای پر رفت و آمد که آلودگی‌شان به CVEV با روش RT-PCR تایید شده بود، گال‌های چوبی واضحی مشاهده شد. این در حالی است که در بسیاری از درختان مرکبات آلوده به ویروس در باغها، گال چوبی در تنه دیده نشد. والاس و درک (Wallace & Drake 1961) در تحقیقی با ایجاد زخم توسط سوزن بر تنه درخت آلوده به CVEV، باعث تحریک و ایجاد گال‌های چوبی فراوان در تنه شدند. بنابراین می‌توان تولید گال چوبی در تنه درختان آلوده به CVEV در مسیرهای پر رفت و آمد شهرها را به تحریکات ناشی از زخم و آسیب‌های وارده به تنه درختان نسبت داد.

#### انتقال‌پذیری CVEV با شته و تعیین کارایی انتقال

یک سال بعد از مایه‌زنی دانه‌های نارنج با جدایه CVEV-MSa1 توسط سه گونه شته، وضعیت آلودگی آنها با آزمون RT-PCR بررسی شد. نتایج نشان داد که در هیچ یک از دانه‌های مایه‌زنی‌شده با شته سبز مرکبات، ویروس توت‌های رگبرگ مرکبات ردیابی نشد. در حالی که از هر ده دانه‌های مایه‌زنی‌شده با شته سیاه باقلا و شته سبز پنبه، به ترتیب آلودگی هفت و پنج دانه‌ها به ویروس به اثبات رسید. در دانه‌های آلوده به ویروس، علائم توت‌های شدن رگبرگ‌ها قابل مشاهده بود اما گال چوبی در ساقه

توت‌های رگبرگ سطح زیرین برگ‌های جوان در دانه‌های آلوده نارنج در مقایسه با دو میزبان دیگر در مدت زمان کوتاه‌تر سه تا چهار ماهه بروز کرد، در حالی که این علائم در میزبان‌های لیموی پوست ناصاف و لیموی ولکامریانای آلوده به ویروس حداقل بعد از نه ماه ظاهر شد. علائم گال چوبی در محل پیوند فقط توسط شش جدایه ایجاد شد، بدین صورت که جدایه‌های MCh1, MCh3 و MR6 فقط در پایه‌های لیموی پوست ناصاف و لیموی ولکامریانا باعث ایجاد گال چوبی کوچک در محل پیوند و بعد از بیش از یک سال از مایه‌زنی گردیدند. دو جدایه FSh8 و FSh11 نیز سه هفته بعد از پیوند باعث ایجاد گال‌های بزرگی (به قطر تقریبی سه میلیمتر) در محل پیوند در هر سه میزبان شدند (شکل ۲c). با جمع بندی نتایج فوق، جدایه‌های ویروس بر اساس علائم در سه گروه طبقه‌بندی شدند. گروه اول که شامل اغلب جدایه‌ها بوده و اعضای آن توت‌های کوچک و فراوان در سطح زیرین رگبرگ‌های برگ‌های جوان هر سه میزبان ایجاد کردند، این گروه از جدایه‌ها در هیچ‌کدام از میزبان‌ها، قادر به تشکیل گال چوبی در محل پیوند نبوده و تفاوتی بین آنها از لحاظ شدت علائم ایجادشده در سه میزبان مورد مطالعه، مشاهده نشد (شکل ۲d). گروه دوم شامل جدایه‌های MCh1, MCh3 و MR6 بوده و توت‌های درشت (در حد یک میلی‌متر) به تعداد بسیار اندک (دو تا چهار عدد) در کل برگ‌های دانه‌های نارنج و توت‌های بسیار کم و ریز در دو میزبان دیگر ایجاد کردند و به جز پایه نارنج، در پایه‌های لیموی پوست ناصاف و لیموی ولکامریانا باعث ایجاد گال چوبی ریز در محل پیوند در مدت زمان بیش از یکسال گردیدند که از نظر اندازه گال چوبی در دو میزبان تفاوت معنی داری وجود نداشت. گروه سوم نیز با دو جدایه FSh8 و FSh11، بدون ایجاد علائم توت‌های رگبرگ در هیچ

## مقایسه غلظت CVEV در بافتهای مختلف گیاه و حساسیت ردیابی ویروس به دو روش RT-PCR و RT-qPCR

نسبت جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ و ۲۳۰ (به ترتیب ۲- و ۱/۸ و  $>2$ ) بیانگر کیفیت مطلوب آموده‌های آر ان ای استخراج شده از بافتهای پوست ساقه، دمبرگ و رگبرگ دانهال‌های نارنج آلوده به جدایه‌های MSa1، GG3، MCh1 و نیز نارنج سالم (شاهد) بود. نتایج RT-qPCR نشان داد که میانگین چرخه آستانه ژن خانه‌دار ubiquitin در نمونه‌ها با اختلاف کمتر از ۰/۵ بود. مقایسه میانگین چرخه آستانه هر سه بافت مورد آزمایش نشان داد که بافت پوست ساقه دانهال نارنج آلوده دارای بیشترین غلظت CVEV بوده و غلظت ویروس به ترتیب در بافتهای رگبرگ و دمبرگ در جایگاه‌های بعدی قرار داشت. این روند در هر سه جدایه مورد مطالعه مشاهده شد.

قابلیت ردیابی ویروس توت‌ای رگبرگ مرکبات از یک درخت آلوده نارنج آلوده به جدایه MSa1 به صورت ماهیانه در زمان‌های معین با آزمون RT-PCR نشان داد که این ویروس تنها در دو بازه زمانی مشخصی از سال، از اواخر فروردین تا اوایل تیر ماه و اواسط شهریور تا اوایل مهرماه در بافت پوست ساقه یکساله قابل ردیابی است. در گام بعد، با توجه به انتخاب آذر ماه سال ۹۵ برای نمونه برداری همین بافت از ۱۰ درخت نارنج آلوده به CVEV، طبق انتظار ویروس با روش RT-PCR در هیچ یک از درختان آلوده ردیابی نشد در حالی که با روش RT-qPCR، CVEV در ۶ درخت آلوده به ویروس و با میانگین چرخه آستانه ۲۵ ردیابی شد. نتایج نشان می‌دهد که غلظت ویروس در ماههای سرد سال به شدت پایین بوده و قابل ردیابی با روش معمول RT-PCR نمی‌باشد. عدم ردیابی ویروس در چهار درخت آلوده نارنج با

نهال‌ها به وجود نیامد، با اینکه جدایه MSa1 از درخت نارنج دارای علائم گال چوبی در تنه تهیه شده بود. بنابراین هر دو گونه شته سیاه باقلا و شته سبز پنبه، قادر به انتقال CVEV به دانهال نارنج بوده که بر اساس نتایج تحقیق حاضر، این اولین گزارش از انتقال‌پذیری CVEV توسط شته سیاه باقلا در دنیا می‌باشد. در آزمون تعیین کارایی انتقال ویروس توت‌ای رگبرگ مرکبات توسط دو گونه شته ناقل، از ۳۰ دانهال مایه‌زنی شده در سه تکرار با تک شته بالغ شته سیاه باقلا آلودگی به ترتیب سه، دو و سه دانهال و در مورد شته سبز پنبه آلودگی یک دانهال در هر تکرار تعیین شد. بر اساس این نتایج، میانگین کارایی انتقال CVEV توسط شته سیاه باقلا و شته سبز پنبه ۲۶/۶ و ۱۰ درصد (به ترتیب) تعیین شد. تحلیل آماری انتقال ویروس توسط دو شته در تکرارهای سه گانه نشان داد که کارایی انتقال ویروس توسط شته سیاه باقلا با اختلاف معنی داری بیشتر از شته سبز پنبه می‌باشد. در مطالعات پیشین، فراوانی شته‌های مرکبات در استان مازندران در سال ۱۳۸۳ به ترتیب برای شته‌های سبز پنبه، سبز و سیاه مرکبات و سیاه باقلا تعیین شده بود که انتقال ویروس ترისტزای مرکبات (*Citrus tristeza virus, CTV*) فقط توسط شته سبز پنبه موفقیت آمیز بوده است (Alavi & Rezvani 2007). با توجه به فراوانی بالای شته سبز پنبه در باغهای مرکبات، علاوه بر انتقال CTV باید به انتقال ویروس توت‌ای رگبرگ مرکبات نیز توجه نمود. از طرفی دیگر علیرغم فراوانی کم شته سیاه باقلا در باغهای مرکبات، کارایی بالای انتقال ویروس توت‌ای رگبرگ مرکبات با این ناقل حائز اهمیت می‌باشد. برای دستیابی به راهکارهای مدیریتی مناسب، مطالعات بیشتری در خصوص تعیین فراوانی شته‌های غالب باغهای مرکبات و انتقال CVEV ضروری است.

جدول ۴: درصد یکسانی (محور افقی) و واگرایی (محور عمودی) ترادف نوکلئوتیدی ناحیه همپوشان ORF1 و ORF2 جدایه‌های ایرانی، ژاپنی و اسپانیایی CVEEV. به روش Clustal W (برنامه Megalign)

**Table 4. Nucleotide sequence identity/divergence matrix based on overlapped region of ORFs 1 and 2 among Iranian, Japanese and Spanish CVEEV isolates. Alignment was carried out using Clustal W method in Megalign software.**

		Percent Identity																									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
Divergence	1	■	98.0	98.0	99.9	97.7	97.7	97.3	97.3	97.3	99.5	98.0	98.0	99.4	99.5	99.4	99.5	97.6	97.8	97.8	97.8	97.9	97.8	97.6	97.6	1	MSa1
	2	2.0	■	100.0	98.1	99.2	98.7	98.1	98.1	98.1	97.8	100.0	100.0	97.9	98.0	97.9	98.3	97.2	99.3	98.1	98.1	99.4	99.1	97.4	97.9	2	MSa4
	3	2.0	0.0	■	98.1	99.2	98.7	98.1	98.1	98.1	97.8	100.0	100.0	97.9	98.0	97.9	98.3	97.2	99.3	98.1	98.1	99.4	99.1	97.4	97.9	3	MSaM1
	4	0.1	1.9	1.9	■	97.8	97.8	97.4	97.4	97.4	99.7	98.1	98.1	99.5	99.7	99.5	99.7	97.7	97.9	97.9	97.9	98.0	97.9	97.7	97.7	4	MSaS1
	5	2.4	0.8	0.8	2.3	■	99.5	98.0	98.0	98.0	97.4	99.2	99.2	98.0	98.1	97.6	97.9	97.1	99.0	97.8	97.8	98.8	99.0	97.3	97.3	5	MRU3
	6	2.4	1.3	1.3	2.3	0.5	■	97.8	97.8	97.8	97.7	98.7	98.7	98.3	98.1	97.6	97.9	97.1	98.7	97.6	97.6	98.6	98.7	97.3	97.3	6	MRL5
	7	2.7	1.9	1.9	2.6	2.0	2.3	■	100.0	100.0	97.1	98.1	98.1	97.4	97.6	97.2	97.6	96.8	98.1	97.9	97.9	98.0	97.9	97.1	97.2	7	MR6
	8	2.7	1.9	1.9	2.6	2.0	2.3	0.0	■	100.0	97.1	98.1	98.1	97.4	97.6	97.2	97.6	96.8	98.1	97.9	97.9	98.0	97.9	97.1	97.2	8	MCh3
	9	2.7	1.9	1.9	2.6	2.0	2.3	0.0	0.0	■	97.1	98.1	98.1	97.4	97.6	97.2	97.6	96.8	98.1	97.9	97.9	98.0	97.9	97.1	97.2	9	MCh1
	10	0.5	2.3	2.3	0.3	2.6	2.4	3.0	3.0	3.0	■	97.8	97.8	99.4	99.3	99.2	99.3	97.3	97.6	97.6	97.6	97.7	97.6	97.3	97.3	10	MR5
	11	2.0	0.0	0.0	1.9	0.8	1.3	1.9	1.9	1.9	2.3	■	100.0	97.9	98.0	97.9	98.0	97.9	98.3	97.2	99.3	98.1	98.1	97.4	97.9	11	MA3
	12	2.0	0.0	0.0	1.9	0.8	1.3	1.9	1.9	1.9	2.3	0.0	■	97.9	98.0	97.9	98.3	97.2	99.3	98.1	98.1	99.4	99.1	97.4	97.9	12	GG3
	13	0.6	2.1	2.1	0.5	2.0	1.8	2.6	2.6	2.6	0.6	2.1	2.1	■	99.9	99.3	99.4	97.7	97.9	97.9	97.9	97.8	97.9	97.7	97.4	13	FSh11
	14	0.5	2.0	2.0	0.3	1.9	1.9	2.5	2.5	2.5	0.7	2.0	2.0	0.1	■	99.4	99.5	97.8	98.0	98.0	98.0	97.9	98.0	97.8	97.6	14	FSh8
	15	0.6	2.1	2.1	0.5	2.5	2.5	2.9	2.9	2.9	0.8	2.1	2.1	0.7	0.6	■	99.4	97.4	97.7	97.7	97.7	97.8	97.9	97.4	97.4	15	FSh4
	16	0.5	1.8	1.8	0.3	2.1	2.1	2.5	2.5	2.5	0.7	1.8	1.8	0.6	0.5	0.6	■	97.6	98.0	97.8	97.8	98.1	98.0	97.6	97.6	16	FJ5
	17	2.5	2.9	2.9	2.4	3.0	3.0	3.4	3.4	3.4	2.7	2.9	2.9	2.4	2.3	2.6	2.5	■	97.2	97.9	97.9	97.1	97.2	98.6	98.1	17	CVEV-YM1
	18	2.3	0.7	0.7	2.1	1.1	1.3	1.9	1.9	1.9	2.5	0.7	0.7	2.1	2.0	2.4	2.0	2.9	■	97.9	97.9	99.4	99.3	97.4	97.7	18	CVEV-VE1
	19	2.3	1.9	1.9	2.1	2.3	2.5	2.1	2.1	2.1	2.5	1.9	1.9	2.1	2.0	2.4	2.3	2.1	2.1	■	100.0	97.8	97.7	98.1	98.1	19	CVEV-STM-2
	20	2.3	1.9	1.9	2.1	2.3	2.5	2.1	2.1	2.1	2.5	1.9	1.9	2.1	2.0	2.4	2.3	2.1	2.1	0.0	■	97.8	97.7	98.1	98.1	20	CVEV-STM-1
	21	2.1	0.6	0.6	2.0	1.2	1.4	2.0	2.0	2.0	2.4	0.6	0.6	2.3	2.1	2.3	1.9	3.0	0.6	2.3	2.3	■	99.4	97.3	97.8	21	CVEV-RR-IVIA
	22	2.3	0.9	0.9	2.1	1.1	1.3	2.1	2.1	2.1	2.5	0.9	0.9	2.1	2.0	2.1	2.0	2.9	0.7	2.4	2.4	0.6	■	97.4	97.4	22	CVEV-PV52-IVIA
	23	2.5	2.6	2.6	2.4	2.7	2.7	3.0	3.0	3.0	2.7	2.6	2.6	2.4	2.3	2.6	2.5	1.4	2.6	1.9	1.9	2.7	2.6	■	98.4	23	CVEV-NGS
	24	2.5	2.1	2.1	2.4	2.7	2.7	2.9	2.9	2.9	2.7	2.1	2.1	2.6	2.5	2.6	2.5	1.9	2.4	1.9	1.9	2.3	2.6	1.6	■	24	CVEV-IBK
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24			

قطعات ژنومی (MG593816- MG593831) در ژنبانک NCBI در جدول ۲ نوشته شده است. همردیف‌سازی ترادف نوکلئوتیدی و اسیدآمینهای پیش‌بینی‌شده این ناحیه از ژنوم شانزده جدایه ایرانی با هشت جدایه موجود در ژنبانک، شامل سه جدایه اسپانیایی (RR-, PV52-IVIA, CVEV-VE1 و CVEV-VE1 و CVEV-IVIA) و پنج جدایه ژاپنی (CVEV-STM1, CVEV-STM2, CVEV-YM1, CVEV-IBK, CVEV-NGS) نشان داد که جدایه‌های ایرانی در این ناحیه از ژنوم، ۱۰۰-۹۷/۱ درصد یکسانی ترادف نوکلئوتیدی دارند (جدول ۴). میزان یکسانی ترادف اسید آمینهای پیش‌بینی‌شده بخش تعیین ترادف‌شده از ORF1 (پروتئین پیتیداز) و بخش ابتدایی پروتئین رپلیکاز (ناحیه همپوشان) به ترتیب ۹۵-۱۰۰ و ۹۴/۷-۱۰۰ درصد تعیین شد. بیشینه میزان یکسانی ترادف نوکلئوتیدی و اسید آمینهای پیش‌بینی‌شده بخشی از پروتئین‌های پیتیداز و رپلیکاز

RT-qPCR نیز قابل تامل بوده و با بررسی‌های بیشتر باید بهترین زمان ردیابی ویروس با RT-qPCR در دوره ای از سال که به دلیل غلظت کم ویروس در درختان امکان ردیابی با روش RT-PCR وجود ندارد، تعیین گردد.

### تعیین و تحلیل ترادف بخشی از ژن پلی‌مراز جدایه‌های CVEV

با استفاده از جفت آغازگر VE2r و VEsLCf، قطعه ای به طول ۸۶۲ جفت باز (شامل ۱۲۳ نوکلئوتید قبل از ناحیه تغییر چارچوب خوانش، ناحیه همپوشان چارچوب‌های خوانش ۱ و ۲ (۷۱۲ نوکلئوتید) و ۲۷ نوکلئوتید بعدی از چارچوب خوانش ۲) از ژنوم ۱۶ جدایه ایرانی ویروس توت‌های رگبرگ مرکبات (که بر اساس مناطق جغرافیایی، میزبان و علائم روی سه گونه مرکبات انتخاب شده بودند) تکثیر و ترادف نوکلئوتیدی آنها تعیین شد. رس شمار این



MSaM1 بیشترین (۹۹/۴٪ با RR-IVIA) و جدایه‌های گروه دوم علائم شناسی کمترین (۹۶/۸٪ با YM1) یکسانی ترادف نوکلئوتیدی دارند. بررسی ترادف اسید آمینه‌ای پیش‌بینی‌شده ده جدایه‌ی ژاپنی نشان داده بود که سه اسید آمینه بخش ابتدایی پروتئین رپلیکاز (موقعیت‌های ۱۱۳-۱۰۴-۸۳) حفاظت شده بوده و با اسید آمینه‌های متناظر در جدایه‌های اسپانیا متفاوت می‌باشد (Nakazono- (Nagaoka *et al.* 2017). هم‌ردیف‌سازی ترادف اسید آمینه-ای پیش‌بینی‌شده همین بخش از پروتئین رپلیکاز جدایه‌های ایران با جدایه‌های در دسترس در ژن‌بانک (ژاپن و اسپانیا)، وجود تنوع بین جدایه‌های ایرانی در سه اسید آمینه در موقعیت‌های ۱۱۳-۱۰۴-۸۳ را نشان داد، به طوری که جدایه‌های ایرانی در پنج گروه قرار گرفتند (شکل ۳). گروه اول شامل تمام جدایه‌های جنوب ایران و جدایه‌های MSa1، MSa1، MR5 و MSa1 از شمال کشور که با ترادف FGV (سه اسید آمینه فوق) مشابه جدایه‌های ژاپنی و گروه دوم شامل جدایه‌های MA3، MSaM1، MSa4 و GG3 که با ترادف LRI مشابه جدایه‌های اسپانیا بودند. گروه سوم شامل جدایه‌های گروه دوم علائم شناسی (MCh1، MCh3 و MR6) با ترادف FRT، گروه چهارم شامل جدایه‌ی انشو (MRU3) با ترادف LRT و گروه پنجم شامل جدایه لیموخواگی رامسر (MRL5) با ترادف LGT می‌باشند. اسید آمینه موقعیت ۱۱۳ (ترئونین) در جدایه‌های گروه‌های سه، چهار و پنج با اسید آمینه متناظر در جدایه‌های قابل دسترس در ژن‌بانک متفاوت بوده و دو اسید آمینه دیگر نیز با ترکیبی از اسید آمینه‌های متناظر در گروه‌های یک و دو می‌باشد. این گروه بندی (بر اساس حفاظت شدگی انتهای آمینی رپلیکاز) تا حد زیادی با درخت تبارزایی جدایه‌های ایرانی و جدایه‌های قابل دسترس در ژن‌بانک بر اساس

بین تعدادی از جدایه‌های گروه اول علائم شناسی (برای مثال چهار جدایه GG3، MA3، MSa4 و MSaM1) (به ترتیب سه جدایه نارنج و یک جدایه نارنج خوشه‌ای)) و نیز بین جدایه‌های گروه دوم علائم شناسی (سه جدایه نارنج MCh1، MCh3 و MR6) و کمینه میزان یکسانی ترادف نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای پیش‌بینی‌شده بخشی از پروتئین پپتیداز بین جدایه‌های نارنج MR5 (از گروه اول علائم شناسی) و MCh1، MCh3 و MR6 (از گروه دوم علائم شناسی) تعیین شد. در حالی که کمینه میزان یکسانی ترادف اسید آمینه‌ای پیش‌بینی‌شده بخشی از پروتئین رپلیکاز بین سه جدایه از گروه اول علائم شناسی (FSh4، جدایه نارنج شیراز و MRL5، MRU3 (جدایه‌های انشو و لیموخواگی رامسر)) به دست آمد. بین جدایه‌های گروه سوم علائم شناسی (FSh11 و FSh8)، یکسانی ترادف نوکلئوتیدی ۹۹/۹ درصد و اسید آمینه‌ای پیش‌بینی‌شده در هر دو سطح پپتیداز و رپلیکاز بخشی ۹۹/۶ درصد تعیین شد. به طور کلی و بر اساس ترادف ناحیه ژنومی مورد مطالعه این ویروس، یکسانی ترادف نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای پیش‌بینی‌شده بین جدایه‌های جنوب ایران به ترتیب ۹۹/۳-۹۹/۹ و ۹۸/۲-۹۹/۶ درصد، بین جدایه‌های شمال ایران به ترتیب ۹۷/۱-۱۰۰ و ۹۴/۷-۱۰۰ درصد و بین جدایه‌های شمال و جنوب ایران به ترتیب ۹۷/۲-۹۹/۴ و ۹۴/۷-۹۹/۶ درصد تعیین شد. بر اساس نتایج فوق به نظر می‌رسد بین ترادف این ناحیه از ژنوم جدایه‌ها و گروه علائم شناسی همبستگی خوبی برقرار است در حالی که بین ترادف این ناحیه ژنومی جدایه‌ها از یک طرف و منشا میزبانی و جغرافیای آنها همبستگی خوبی برقرار نمی‌باشد. مقایسه ترادف نوکلئوتیدی جدایه‌های ایرانی و جدایه‌های موجود در ژن‌بانک نشان داد که GG3، MA3، MSa4 و

	83	104	113
ژاپن	CVEV-NGS	EKFPKGKESSTSCSERTSIRENGGGIQTGGQEV	GRTCEGSAKEECAQGT
	CVEV-IBK	EKFPKGKESSTSCSERTSIRENGGGIQTGGQEV	GRTCEGSAKEECAQGT
	CVEV-STM1	EKFPKGKESSTSCSERTSIHENGGGIQTGGQEV	GRACEGSAKEECAQGT
	CVEV-STM2	EKFPKGKESSTSCSERTSIHENGGGIQTGGQEV	GRACEGSAKEECAQGT
	CVEV-YM1	EKFPKGKESSTSCSERTSIRENGGGIQTGGQEV	GRTCEGSAKEECAQGT
ایران	FJ5	ERFPKGKESSTSCSERTSAHENGGGIQTGGQEV	GRACEGPAKEECAQGT
	FSh4	ERFPKGKESSTSCSERTSAHENGGGIQTGGQEV	GRACEGPAKEECAQGT
	FSh8	ERFPKGKESSTSCSERTSAHENGGGIQTGGQEV	GRVCEGPAKEECAQGT
	FSh11	ERFPKGKESSTSCSERTSAHENGGGIQTGGQEV	GRVCEGPAKEECAQGT
	MR5	ERFPKGKESSTSCSERTSAHENGGGIQTGGQEV	GRACEGPAKEECAQGT
	MSa1	ERFPKGKESSTSCSERTSAHENGGGIQTGGQEV	GRACEGPAKEECAQGT
	MSaS1	ERFPKGKESSTSCSERTSAHENGGGIQTGGQEV	GRACEGPAKEECAQGT
	MCh1	EKFPKGKESSTSCSERTSAHENGRIQTGGQET	GRACEGSAKEECAQGT
	MCh3	EKFPKGKESSTSCSERTSAHENGRIQTGGQET	GRACEGSAKEECAQGT
	MR6	EKFPKGKESSTSCSERTSAHENGRIQTGGQET	GRACEGSAKEECAQGT
	MRL5	EKLPKGKESSTSCSERTSAHENGGGIQTGGQET	GRVCEGSAKEECAQGT
	MRU3	EKLPKGKESSTSCSERTSAHENGRIQTGGQET	GRVCEGSAKEECAQGT
	GG3	EKLPKGKESSTSCSERTSAHENGRIQTGGQET	GRACEGSAKEECAQGT
	MSa4	EKLPKGKESSTSCSERTSAHENGRIQTGGQET	GRACEGSAKEECAQGT
	MSaM1	EKLPKGKESSTSCSERTSAHENGRIQTGGQET	GRACEGSAKEECAQGT
اسپانیا	MA3	EKLPKGKESSTSCSERTSAHENGRIQTGGQET	GRACEGSAKEECAQGT
	CVEV-PV52	EKLPKGKESSTSCSERTSAHENGRIQTGGQET	GRACEGSAKEECAQGT
	CVEV-RR	EKLPKGKESSTSCSERTSAHENGRIQTGGQET	GRACEGSAKEECAQGT
	CVEV-VE1	EKLPKGKESSTSCSERTSAHENGRIQTGGQET	GRAREGSAKEECAQGT

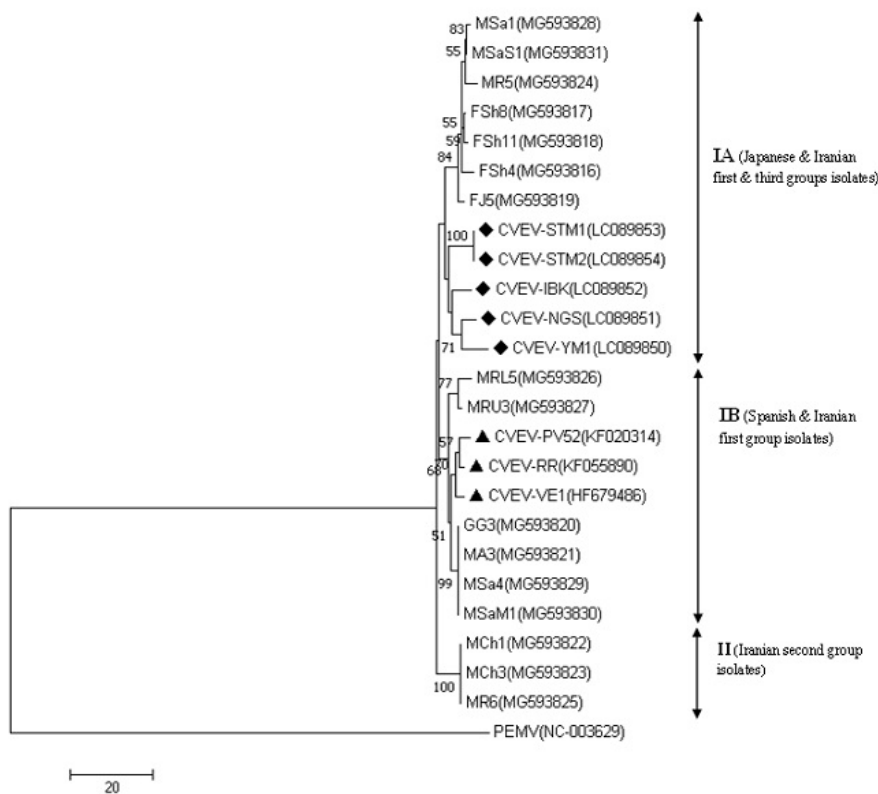
شکل ۳: مقایسه ترادف آمینواسیدی انتهای آمینی پروتئین رپلیکاز جدایه‌های ایرانی، ژاپنی و اسپانیایی ویروس توت‌های رگبرگ مرکبات (CVEV). اسیدآمین‌های حفاظت شده در جدایه‌های ژاپن با رنگ آبی و در جدایه‌های اسپانیا با رنگ قرمز نشان داده شده است.

Fig 3. Amino acid sequence comparison of replicase N-terminal region among CVEV isolates from Iran, Japan and Spain. Amino acids that are conserved in Japanese isolates are highlighted in blue and those conserved in Spanish isolates are highlighted in red.

ترادف ۸۶۲ نوکلئوتیدی نیز مطابقت دارد، به طوری که جدایه‌های این ویروس در درخت تبارزایی بر اساس ترادف نوکلئوتیدی، در سه شاخه مجزا از هم قرار می‌گیرند (شکل ۴). گروه IA مطابق گروه اول حفاظت شدگی انتهای آمینی رپلیکاز شامل جدایه‌های جنوب ایران، MR5، MSa1 و MSaS1 (از شمال کشور) و جدایه‌های ژاپنی است. در این گروه غیر از جدایه‌های FSh8 و FSh11 (گروه سوم علائم شناسی که در خوشه مجزا قرار گرفته‌اند)، سایر جدایه‌های ایرانی متعلق به گروه اول علائم‌شناسی هستند. گروه IB شامل گروه دوم حفاظت شدگی انتهای آمینی رپلیکاز (سایر جدایه‌های گروه اول علائم‌شناسی از شمال کشور و جدایه‌های اسپانیا) و نیز گروه چهارم و پنجم حفاظت شدگی انتهای آمینی رپلیکاز است. گروه II نیز مطابق گروه سوم حفاظت شدگی انتهای

آمینی رپلیکاز (گروه دوم علائم‌شناسی) می‌باشد. بر اساس مقایسه ترادف نوکلئوتیدی قسمتی از ناحیه همپوشان ORF1 و ORF2 جدایه‌ها و تحلیل تبارزایی در این تحقیق، همبستگی خاصی بین ترادف این ناحیه از ژنوم جدایه‌ها و جدایی جغرافیایی آنها وجود ندارد. در درخت تبارزایی بر پایه ترادف نوکلئوتیدی، جدایه‌های گروه دوم و سوم علائم‌شناسی در خوشه‌های جداگانه قرار گرفتند این در حالی است که در درخت تبارزایی بر پایه ترادف اسیدآمین‌های پیش‌بینی شده جدایه‌های گروه سوم علائم‌شناسی از سایر جدایه‌ها تفکیک نشدند (شکل ۵). بنابراین به نظر می‌رسد همبستگی بین گروه‌های علائم‌شناسی و ترادف نوکلئوتیدی این ناحیه ژنومی بیشتر از ترادف اسید آمین‌های پیش‌بینی شده آن برقرار باشد. با توجه به نتایج این تحقیق به نظر می‌رسد که خاستگاه جدایه‌های ایرانی



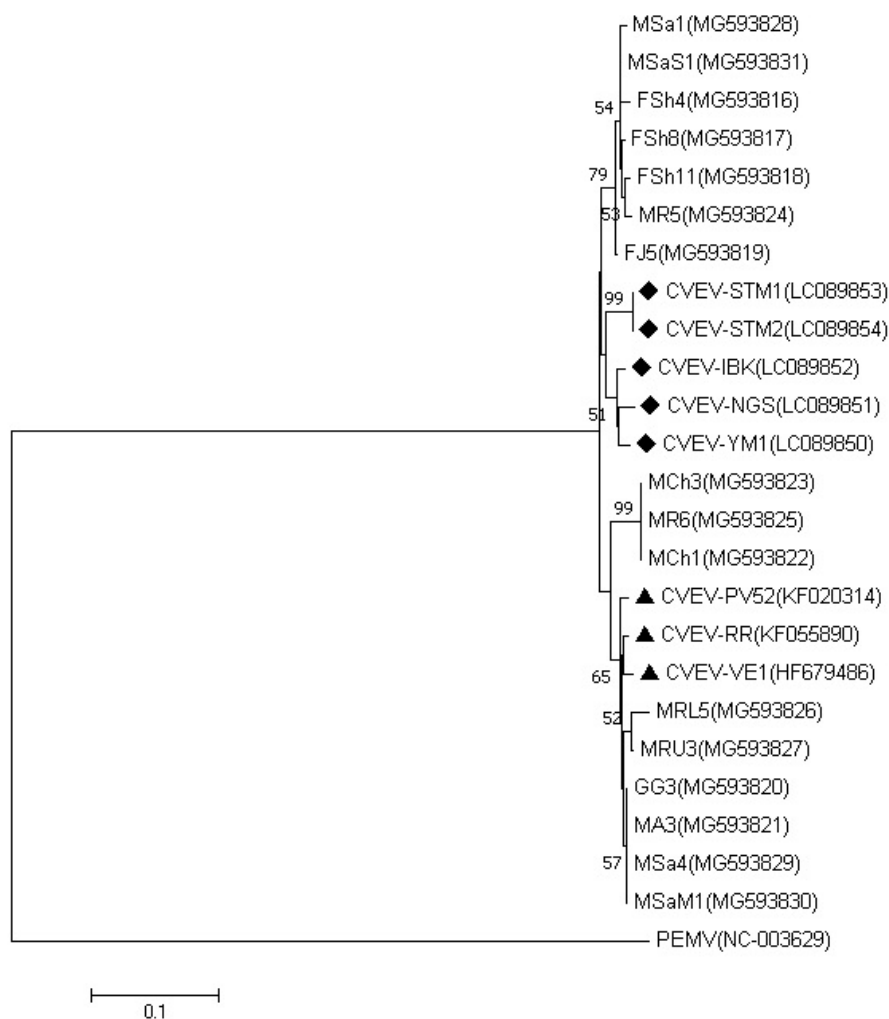


شکل ۴. درخت تبارزائی حاصل از مقایسه ترادف نوکلئوتیدی ناحیه همپوشان ORF1,2 جدایه‌های ایرانی، ژاپنی و اسپانیایی ویروس توت‌های رگبرگ مرکبات با استفاده از نرم افزار MEGA7 و مدل K2+I به روش maximum likelihood و ۱۰۰۰ تکرار. جدایه‌های اسپانیایی و ژاپنی قابل دسترس در ژن‌بانک به ترتیب با ▲ و ◆ مشخص شده‌اند. ویروس موزائیک توت‌های نخود فرنگی (PEMV-1, NC003629) به عنوان برون گروه در نظر گرفته شده است.

**Fig. 4. Phylogenetic tree based on nucleotide sequence of overlapped region of ORFs 1 and 2 of CVEV isolates from Iran, Japan and Spain reconstructed using MEGA7 and K2+I model by maximum likelihood method with 1000 bootstrap replications. Spanish and Japanese isolates available in GenBank are marked by ▲ and ◆ PEMV-1 (NC003629) was used as outgroup.**

تحقیق قابل تامل می‌باشد. در تحقیق حاضر انتقال این ویروس توسط شته سیاه باقلا و با کارایی بیشتری نسبت به شته سبز پنبه برای اولین بار در دنیا آشکار شد. با توجه به پراکنش و نرخ آلودگی CVEV در باغهای مرکبات شمال و جنوب کشور، انتقال آن توسط پیوند و نیز شته‌های رایج و شباهت جدایه‌های ایران با جدایه‌های ژاپنی و اسپانیایی، رعایت اصول بهداشتی در تهیه پیوندک از درختان مادری عاری از ویروس، کنترل شته‌های مرکبات و نیز توجه در رعایت اصول قرنطینه ای در

متفاوت بوده و مطالعات بیشتری نیاز دارد. به دنبال اولین گزارش از وجود ویروس توت‌های رگبرگ مرکبات در ایران، این اولین تحقیق در مورد خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی آن در کشور می‌باشد. با توجه به ردیابی ویروس در ۵۲/۴ درصد مرکبات علائم داربه نظر می‌رسد سطح آلودگی در کشور بالا باشد که البته مطالعات تکمیلی با تعداد نمونه بیشتر برای روشن تر شدن پراکنش این ویروس ضروری می‌باشد. از طرف دیگر آلودگی بیشتر نارنج نسبت به سایر میزبان‌ها مورد مطالعه در این



شکل ۵. درخت تبارزایی بر پایه ترادف اسید آمینه‌ای پیش بینی شده انتهای پروتئین رپلیکاز جدایه‌های ایرانی، ژاپنی و اسپانیایی ویروس توت‌های رگبرگ مرکبات (CVEV)، با استفاده از نرم افزار MEGA7 و مدل JTT به روش maximum likelihood و ۱۰۰۰ تکرار. جدایه‌های اسپانیایی و ژاپنی قابل دسترس در ژن‌بانک به ترتیب با ▲ و ◆ مشخص شده‌اند. ویروس موزائیک توت‌های نخودفرنگی به عنوان برون گروه در نظر گرفته شده است.

**Fig 5. Phylogenetic tree based on amino acid sequence of replicase N-terminal region among Iranian, Japanese and Spanish CVEV isolates reconstructed using MEGA7 and JTT model by maximum likelihood method with 1000 bootstrap replications. Spanish and Japanese isolates available in GenBank are marked by ▲ and ◆ PEMV-1 (NC003629) was used as outgroup.**

واردات نهال در سال‌های گذشته وارد ایران شده‌اند که مطالعات بیشتری برای روشن تر شدن این فرضیه مورد نیاز می‌باشد. مطالعه برهمکنش این ویروس با سایر ویروس و ویروئیدهای مهم مرکبات مانند ویروس تریستزا و ویروئید آگزوکورتیس مرکبات جالب توجه می‌باشد.

مرکبات بین شهرهای کشور بسیار ضروری است. در سال‌های گذشته واردات نهال مرکبات از اسپانیا به کشور بصورت محدود مواردی صورت گرفته است. شباهت برخی از جدایه‌های ایرانی به جدایه‌های اسپانیایی احتمال می‌دهد که خاستگاه این جدایه‌ها اسپانیا بوده و به واسطه

منابع

- Ai-jun H., Zhen S., Meng-ji C., Hong-ming C., Zhong-an L. and Chang-yong Z. 2015. The complete genome sequence of Citrus vein enation virus from China. *Journal of Integrative Agriculture* 14(3): 598-601.
- Alavi S. V. and Rezvani A. 2007. Seasonal fluctuations of citrus aphids in the East of Mazandaran and *Citrus tristeza virus* transmissibility by the major species. *Journal of Applied Entomology and Phytopathology* 75: 39-50 (In Persian with English summary)
- Catara A. and Davino M. 1984. Citrus diseases not found in Italy, caused by viruses and virus-like pathogens. *Informatore Fitopatologico* 34 (11): 9-21.
- Chen G. Q., Yan S. X. and Roistacher C. N. 1992. First report of citrus vein enation disease in China. *Plant Disease* 76: 1077.
- Fraser L. R. 1959. Woody gall, a suspected virus disease of rough lemon and other citrus varieties. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* 84: 332-336.
- Hermoso de Mendoza A., Pina J. A., Ballester-Olmos J. F. and Navarro L. 1993. Persistent transmission of citrus vein enation virus by *Aphis gossypii* and *Myzus persicae*. Pages 361-362 In: P. Moreno J. V. da Graça and L. W. Timme (Eds). 12<sup>th</sup> IOCV, Riverside, CA.
- Kumar S., Stecher G. and Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.
- Laird E. F. and Weathers L. G. 1961. *Aphis gossypii*, a vector of citrus vein-enation virus. *Plant Disease Reporter* 45:877.
- Mafra V., Kubo K. S., Alves-Ferreira M., Ribeiro-Alves M., Stuart R. M., Boava L., Rodrigues C. M. and Machado M. A. 2012. Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. *PLoS One* 7:e31263.
- Maharaj S. B. and da Graça J. V. 1989. Transmission of citrus vein enation virus by *Toxoptera citricidus*. *Phytophylactica* 21:81-82.
- McClellan A. P. D. 1954. Citrus vein-enation virus. *South African Journal of Science* 50:147-151.
- Nakazono-Nagaoka E., Fujikawa T. and Iwanami T. 2017. Nucleotide sequences of Japanese isolates of Citrus vein enation virus. *Archives of Virology* 162: 879-883.
- Nouri S., Dizadji A. and Rahimian H. 2015. First report of Citrus Vein Enation Virus (CVEV) from Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 51: 107-110 (In Persian with English summary)
- Vives M. C., Velázquez K., Pina J. A., Moreno P., Guerri J. and Navarro. L. 2013. Identification of a new *Enamovirus* associated with Citrus vein enation disease by deep sequencing of small RNAs. *Phytopathology* 103(10):1077-86.
- Wallace J. M. and Drake R. J. 1953. A virus-induced vein enation in citrus. *Citrus Leaves* 33:22-24.
- Wallace J. M. and Drake R. J. 1959. Citrus vein enation. Pages 163-165. In: J. M. Wallace (Ed). *Citrus Virus Diseases*. University of California Division of Agricultural Science, Berkley, CA.
- Wallace J. M. and Drake R. J. 1960. Woody galls on citrus associated with vein-enation virus infection. *Plant Disease Reporter* 44:580-584.
- Wallace J. M. and Drake R. J. 1961. Induction of woody galls by wounding of citrus infected with vein enation virus. *Plant Disease Reporter* 45:682-686.