

الفهرسة البيولوجية (الحيوية) لبعض عزلات فيروس تريستيزا الحمضيات/الموالح في المنطقة الساحلية، سورية

إنصاف حسن عاقل¹، رحاب حمدان¹، علي الخطيب¹ وعماد داود اسماعيل²

(1) الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، مركز بحوث اللاذقية، سورية، البريد الإلكتروني: ensafake15n4a@gmail.com

(2) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية، البريد الإلكتروني: ismail.l@scs-net.org

الملخص

عاقل، إنصاف حسن، رحاب حمدان، علي الخطيب وعماد داود اسماعيل. 2019. الفهرسة البيولوجية (الحيوية) لبعض عزلات فيروس تريستيزا الحمضيات/الموالح في المنطقة الساحلية، سورية. مجلة وقاية النبات العربية، 37(1): 11-21.

يعد فيروس تدهور/تريستيزا الحمضيات/الموالح *Citrus tristeza virus* (CTV، جنس *Closterovirus*، عائلة *Closteroviridae*)، من أخطر الفيروسات المهددة لزراعة الحمضيات/الموالح عالمياً. هدفت هذه الدراسة التي أجريت خلال موسم 2016/2017 إلى تعريف العزلات المختلفة لفيروس تريستيزا الحمضيات/الموالح على أشجار الحمضيات/الموالح المنتشرة في الساحل السوري، تبعاً لردة فعل بعض الأصناف المستخدمة في العدوى وهي اللابم المكسيكي *Citrus aurantifolia*، الزفير (النارنج) *Citrus aurantium*، وبعض الأصناف المزروعة في الساحل السوري المطعمة على أصل الزفير. استخدمت ثلاث عزلات مختلفة من مناطق جغرافية متباعدة بعد تعريفها مصلياً باستخدام اختبار البصمة النسيجية المناعية (TBIA) والمصل المضاد المتعدد الكلون على أنها مصابة بفيروس تدهور/تريستيزا الحمضيات/الموالح، وتم تطعيمها على الأصناف سابقة الذكر. أظهرت النتائج اختلاف ردة فعل الصنف نفسه المستخدم في العدوى تجاه العزلات الثلاث المختلفة المصدر، وبخاصة اللابم المكسيكي، الزفير والجريب فروت *Citrus paradisi*، حيث لوحظت أعراض فيروسية مختلفة مثل الموزايك، الشحوب، تشوه الأوراق، التقاف الأوراق نحو الأعلى، الاصفرار والبرقشة، التقزم والاصفرار، ولم نلاحظ أي مظهر من مظاهر النقر الخشبية على الساق حتى بعد مرور عام كامل على الغراس المعدة بالفيروس. أشارت هذه النتائج إلى احتمال وجود سلالة الاصفرار إضافة إلى السلالة المعتدلة فقط لفيروس تدهور الحمضيات/الموالح (التريستيزا) في المنطقة الساحلية في سورية. **كلمات مفتاحية:** فيروس تريستيزا الحمضيات/الموالح، TBIA، ELISA، الساحل السوري.

المقدمة

(Yang et al., 1999)، ومنها المعتدلة (Vives et al., 1999)، وأشير إلى الاختلاف بين عزلته تبعاً للغلاف البروتيني (Amin et al., 2006)؛ وقد ميز للفيروس ثلاثة أنماط رئيسية (Rubio et al., 2001)، كما أشارت أحد الدراسات أن للفيروس ثلاثة جينات (P13، P18، P23)، تحدد المدى العواتلي لأصناف الحمضيات/الموالح الممكن إصابتها، حيث يعطي الجين P23 أعراض اصفرار الغراس على الليمون الحامض (Dawson et al., 2013)؛ (Tatineni et al., 2008). يسبب CTV ثلاثة أعراض مميزة وواضحة أمكن من خلالها تحديد أربع سلالات للفيروس بناء على الأعراض الناتجة عن كل منها وهي سلالة الموت السريع التي تسبب انهياراً ينتج عنه موت الأشجار، وتلاحظ على الأصناف التابعة لمجموعات البرتقال الحلو والمندرين والجريب فروت المطعمة على أصل الزفير *C. aurantium* stem (SP) pitting strain والتي تسبب تشوهاً وانحرافاً في نمو اللحاء ينتج عنه ظهور حفر واضحة ومرئية في الخشب (تنقرات) تتراوح من المعتدلة

يُعد فيروس تريستيزا الحمضيات/الموالح *Citrus tristeza virus* (CTV، جنس *Closterovirus*، عائلة *Closteroviridae*)، أحد أهم فيروسات اللحاء التي قيدت زراعة وإنتاج الحمضيات/الموالح عالمياً، حيث دمر الفيروس ملايين أشجار الحمضيات/الموالح (Dawson et al., 2013)، وهو الفيروس الأكثر خطورة على الحمضيات/الموالح في جميع مناطق زراعتها في العالم بشكل عام (Bar-Joseph & Lee, 1989)، وفي الساحل السوري بشكل خاص (مكوك وآخرون، 2008؛ حمدان، 2011؛ عاقل واسماعيل، 2017؛ Abou Kubaa et al., 2008). ينتقل الفيروس بسهولة بالتطعيم (Lovisol, 1993؛ Vidalakis et al., 2004)، وبوساطة العديد من أنواع المنّ بالطريقة شبه المثابرة (Lee & Bar-Joseph, 2000)، ومن المحتمل أنه ينتقل بوساطة الحامل *Cuscuta americana* (Knorr & Price, 1954). سُجل للفيروس العديد من العزلات منها الشرسة (Karasev et al., 1995؛ Pappu et al., 1994؛

طرائقه، وقد أشارت بعض الدراسات السابقة إلى إمكانية استخدام بعض النباتات الدالة لمعرفة الاختلاف في الخصائص البيولوجية للفيروس. وللاشارة إلى مدى الخطورة المحتملة على العوائل المهمة اقتصادياً (Garnsey et al., 2005)، وذلك استناداً إلى أعراض الإصابة الظاهرية على بعضها مثل اللابم المكسيكي (مكوك وآخرون، 2008؛ عاقل وآخرون، 2018)، والجريب فروت وبعض أصناف البرتقال الحلو مثل الصنف مدام فينوس للكشف عن سلالة تنقر الساق (Su & Tsai, 1991). وقد أُشير إلى نظام جديد من الفهرسة الحيوية باستخدام النباتات الدالة يعتمد على استخدام عقل تطعيم من النبات الدال بدلاً من الغراس ويطعم على الأصناف المختبرة، حيث تم تطوير هذه الطريقة للكشف عن العديد من الأمراض الفيروسية والفايرويدات على الحمضيات/الموالح (Elbackit et al., 2005؛ El Sayed, 2005) باستخدام عقل من اللابم المكسيكي في الكشف عن ثلاثة مصادر مختلفة للفيروس (Roistacher, 1991).

انطلاقاً من الأهمية الاقتصادية لمحصول الحمضيات/الموالح في سورية وإدخال أصناف جديدة من جهة، ومن أهمية فيروس تريستيزا الحمضيات/الموالح عالمياً، وقلة الدراسات المتعلقة بسلالات الفيروس في سورية من جهة أخرى، هدف البحث إلى تعريف العزلات السورية لفيروس تريستيزا الحمضيات/الموالح المرافقة لأشجار الحمضيات/الموالح باستخدام الفهرسة البيولوجية على بعض الغراس مثل اللابم المكسيكي والزفير وبعض الأصناف المزروعة المطعمة على أصل الزفير، وتعريف العزلات المحلية تبعاً لردة فعل الغراس المستخدمة في الدراسة تجاه ثلاث عزلات مختلفة للفيروس.

مواد البحث وطرائقه

العزلات الفيروسية المستخدمة

تم اختيار ثلاث عزلات مختلفة من CTV بناء على دراسة سابقة (حمدان، 2011) من عينات أعطت تفاعلاً إيجابياً فقط مع المصل المضاد لفيروس تدهور/تريستيزا الحمضيات/الموالح، بناءً على شدة ظهور البقعة اللونية على ورق نترات السيليلوز، إضافة إلى التباعد الجغرافي، وهي كالتالي: العزلة 1 تم الحصول عليها من مزرعة الثرة طرطوس (شجرة يافاوي)، العزلة 2 تم الحصول عليها من بستان في جبلة (شجرة أبو صرة)، والعزلة 3 من بستان في اللاذقية (شجرة يافاوي).

الاختبارات المصلية/السيرولوجية المستخدمة

استخدم اختبار البصمة النسيجية المناعية (TBIA) على ورق نترات السيليلوز Nitrocellulose membrane (NCM) 0.2 من إنتاج شركة Bio-Blot الكندية وباستخدام أجسام مضادة متعددة الكلون لفيروس

إلى الشديدة على الأفرع والساق لأصناف الليمون الحلو والجريب فروت والمندرين، وهذه السلالة لا تسبب الموت للأشجار المصابة بل ضعفاً في قوة النمو ينتج عنه قلة الانتاج وصغر حجم الثمار وبالتالي خسائر اقتصادية كبيرة بغض النظر عن الأصل المستخدم (Rocha-Pena et al., 1995)، وسلالة اصفرار الشتول (Seedling yellows strain (SY) التي تتميز بأعراض التقزم واصفرار الأوراق في غراس الليمون الحامض والجريب فروت (Fraser, 1952)، وأخيراً السلالة الكامنة التي لا تسبب أية أعراض ظاهرية على أغلب الأصناف تقريباً وبخاصة على أنواع الليمون المتحملة أو المقاومة للفيروس رغم وجوده بتركيز عالٍ في النبات. ولوحظ أن السلالة المعتدلة من CTV تسبب شفافية خفيفة للعروق إضافة إلى برقشة على أوراق اللابم المكسيكي (*Citrus aurantifolia* Swingle) (Lee & Rocha, 1992)، وقد أمكن ملاحظة هذا التفاوت في مظاهر أعراض الإصابة المتسببة عن الفيروس حقلياً وضمن البيت الزجاجي تمثلت بشفافية العروق والاصفرار والتقزم (Dawson et al., 2013). وأشير إلى أن السلالة الموجودة في سورية هي سلالة ضعيفة ولم تبد الأشجار المصابة في بعض الحالات أية أعراض (Abou Kubaa et al., 2009)، إلا أن وجود السلالة الشرسة في تركيا يشكل تهديداً كبيراً لزراعة الحمضيات/الموالح في سورية (Cevik et al., 2013).

أمكن الكشف عن الفيروس مخبرياً باستخدام تقنيات مختلفة منها استخدام الاختبارات المصلية (السيرولوجية) مثل اختبار الإدمصاص المناعي المرتبط بالأنزيم Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)، باستخدام الأجسام المضادة متعددة الكلونات، أو وحيدة الكلون (Nikolaeva et al., 1996)، والتي زادت من كفاءة وحساسية اختبارات اليزا (Terrada et al., 2000؛ Permar et al., 1990؛ Vela et al., 1986). وقد أمكن فيما بعد الخلط بين نوعين من الأجسام المضادة وحيدة الكلون (3CA5 و 3DF1) للتعرف على معظم عزلات CTV في العينات المختبرة (Cambra et al., 1990). كما استخدم اختبار البصمة النسيجية المناعية Tissue Blot Immunoassay (TBIA) (Garnsey et al., 1993)، والاختبارات الجزيئية في الكشف عن الفيروس مخبرياً (Cevik et al., 1996؛ Mehta et al., 1997؛ Nolasco et al., 2009؛ Pappu et al., 1993؛ Roy et al., 2005). ولكن لم تحل أي من الاختبارات السابقة رغم تطورها المستمر محل استخدام الاختبارات الحيوية (الفهرسة الحيوية)، باستخدام النباتات الدالة مثل اللابم المكسيكي والشائع تجاه فيروس تريستيزا الحمضيات/الموالح، حيث لا يزال استخدام الفهرسة الحيوية إلزامياً (إجبارياً) في الكشف عن الفيروس وبخاصة في مشاتل إنتاج الغراس، ولا يزال استخدام الفهرسة الحيوية في التفريق بين الخصائص المميزة لسلالات الفيروس قائماً ومعتمداً على الرغم من التطور في طرائق الكشف المخبري بمختلف

النتائج والمناقشة

لوحظ نجاح التطعيم في جميع غراس الأصناف المختبرة من خلال البراعم المنبثقة بعد 20-30 يوماً من التطعيم. وتم التأكد من نجاح عملية الإعداء بفيروس تدهور/ترستيزا الحمضيات/الموالح باختبار إليزا باستخدام أنسجة نباتات أعطت أعراض ظاهرية وأخرى دون أية أعراض بعد مرور 3 أشهر من التطعيم. أعطت جميع الغراس المطعمة بالعزلات الثلاث تفاعلاً إيجابياً مع اختبار إليزا وتفاعلاً سلبياً بالنسبة لغراس الشاهد. أمكن باستخدام غراس التجربة الكشف عن فيروس تدهور/ترستيزا الحمضيات/الموالح، حيث بدأت أغلب الغراس المستخدمة بالإعداء بإظهار أعراض مختلفة شبيهة بأعراض الإصابات الفيروسية بعد حوالي عدة أسابيع (جدول 1). أظهرت النتائج اختلاف ردة فعل غراس الصنف نفسه تجاه العزلات الثلاث المختلفة المصدر من عقل الحمضيات الحاملة للفيروس، كما اختلفت الأعراض الناتجة عن الإصابة بالعزلة نفسها باختلاف الصنف، وهذا يتوافق مع نتائج Gandia et al. (2007) حيث وجدوا أن الأعراض التي تسببها الأمراض الفيروسية على الحمضيات ترتبط بشدة بنوع العائل وشراسة العزلة والظروف البيئية. اختلف موعد ظهور الأعراض الناتجة عن الإصابة بالعزلات الثلاث للفيروس وتطورها باختلاف الأصناف المدروسة، حيث لوحظ تطور الأعراض بعد 21-27 يوماً على أغلب غراس اللايم المكسيكي والزفير بينما تأخر موعد تكشف الأعراض على بقية الأصناف المطعمة على أصل الزفير والمستخدم في الدراسة إلى 33-45 يوماً من تاريخ الإعداء، حيث أن غراس اللايم المكسيكي والزفير تعد من النباتات الدالة للكشف عن الفيروس. يضاف لما سبق أن غياب منطقة التطعيم في النبات الدال اللايم المكسيكي والزفير يعني غياب أي عائق لانتقال وانتشار الفيروس في النبات باعتباره من الفيروسات المحددة باللحاء، بينما وجود منطقة التطعيم في الأصناف الأخرى قد يعيق ولو بشكل جزئي انتقال الفيروس نظراً لأن التوافق قد لا يكون تاماً مما ينعكس سلباً على سرعة انتشار الفيروس في العائل النباتي وبالتالي تأخر ظهور الأعراض.

لوحظ على غراس اللايم المكسيكي تباين أعراض الإصابة الظاهرية باختلاف مصدر العقل من الحمضيات المصابة بفيروس CTV والمستخدم في التطعيم، وهذا يشير إلى احتمال وجود سلالات أو عزلات مختلفة للفيروس في المنطقة. تمثلت الأعراض على غراس اللايم المكسيكي في شفافية العروق، الاصفرار، البرقشة وتشوه الأوراق (شكل 1)، كما لوحظ اختلاف الفترة الزمنية اللازمة لظهور وتكشف الأعراض الظاهرية على الصنف نفسه من غراس النباتات الدالة (جدول 1)، وربما يعود ذلك إلى الاختلاف في نسب تركيز الفيروس بين العقل المستخدمة في التطعيم. لوحظ على غراس الزفير المعدة بالتطعيم أيضاً أعراض

من CTV من إنتاج شركة PlantPrint® الإسبانية، وفق ما هو موصوف من قبل الشركة المنتجة، للتأكد من خلو الغراس المستخدمة في الدراسة من الفيروس. كما استخدم اختبار الادمصاص المناعي المرتبط بالأنزيم (ELISA)، والمصل المضاد للفيروس من إنتاج شركة Bioreba السويسرية في اختبار جميع غراس التجربة المعدة بالفيروس والشاهد للتأكد من نجاح نقل الفيروس وخلو الشاهد منه.

تحضير الغراس للإعداء

استخدمت غراس بعمر السنة من الأصناف التالية: اللايم المكسيكي *C. aurantifolia*، الزفير (النارج) *C. aurantium*، والجريب فروت *C. paradise Macfad*، وهي نباتات أشير سابقاً إلى أنها عوائل حساسة لفيروس تريستيزا الحمضيات/الموالح وتستخدم في التفريق بين سلالاته (Garnsey et al., 2005؛ Rubio et al., 2001)، إضافة إلى استخدام غراس لأصناف اليافاوي، أبو صرة، البوميلو، كلمنتين، والهجين بونكان وهي غراس جميعها بعمر السنة ومطعمة على أصل الزفير الحساس للإصابة بالفيروس، تم الحصول عليها من مشتل فيديو، محافظة اللاذقية. وضعت جميع الغراس ضمن بيت زجاجي مع تغطية شبكية مانعة لوصول الحشرات. قُدمت للغراس العمليات الزراعية اللازمة لإعدادها لعمليات الإعداء بالتطعيم.

نقل الإصابة بفيروس تريستيزا الحمضيات/الموالح بالتطعيم من العقل الحاملة له إلى الغراس المستخدمة في الدراسة

اعتمدت طريقة النقل بالتطعيم من العقل الغضة الحاملة للفيروس والتي أشار إليها عدد من الباحثين نظراً لكون هذه الطريقة من الطرائق الأكثر كفاءة في نقل الفيروس إلى الغراس المستخدمة في الدراسة (Lovisolo, 1993؛ Roistacher, 1991؛ Vidalakis et al., 2004)، حيث أخذت العقل النباتية الحاملة للفيروس، وأجري منها تطعيم إلى مكرين (5 غراس/المكرر) من كل صنف من الغراس سابقة الذكر، وترك مكرر واحد دون إعداء (شاهد). وضعت جميع الغراس ضمن البيت الزجاجي في مركز البحوث الزراعية في بوقا باللاذقية. سُجّلت أعراض الإصابة الظاهرية على مختلف الغراس اسبوعياً بشكل دوري. أخذت بصمة نسيجية لجميع الغراس قبل الإعداء، وتم التأكد مصلياً من خلوها من فيروس تريستيزا الحمضيات/الموالح. اختبرت الغراس بعد ثلاثة أشهر من تاريخ الإعداء باستخدام اختبار الادمصاص المناعي المرتبط بالأنزيم، للتأكد من وجود الفيروس. درست أعراض الإصابة بالفيروس على النباتات المصابة وفق التقسيمات التالية: التقرم، الاصفرار والشحوب والموزايك والبرقشة، تشوه الأوراق.

Garnsey *et al.* (2005). لوحظت أعراض تشوه الأوراق وخشونة ملمسها في صنف أبو صرة (شكل 4)، وربما يكون السبب عائداً لزيادة تركيز النشاء فيها إذ وجد Mohamed (2009) أن نسبة النشاء في أوراق أشجار الزفير المصابة بالفيروس بلغت 135.52 مغ/غ مادة جافة بينما كانت 64.54 مغ/غ مادة جافة في أوراق الأشجار السليمة. لوحظ على غراس الكلمنتين أعراض تشوه والتفاف الاوراق الناتج عن العزلة 3، إضافة لأعراض الاصفرار الناتجة عن العزلة 1 (شكل 5). كما أن بعض الغراس لم تظهر عليها أعراض ظاهرية بالرغم من تأكيد إصابتها بالفيروس (جدول 1) مثل غراس البونكان والكلمنتين المعدة بالعزلة الثانية وكذلك الأمر بالنسبة لغراس اليافاوي المعدة بالعزلة الثالثة وبالتالي إن التفاعل الإيجابي لبعض العينات المجموعة من الغراس المعدة بالفيروس بالرغم من عدم ظهور أية أعراض عليها يشير إلى احتمال وجود السلالة الكامنه، وهذا يتوافق مع نتائج Abou Kubaa (2010).

الاصفرار بأشكاله المختلفة وأعراض التقزم على إحدى الغراس، إضافة إلى ظهور بقع صغيرة صفراء تحولت إلى بقع نكروزية و ظهرت أعراض تشوه الأوراق (الشكل القلبي) (شكل 2). أما على غراس الجريب فروت المطعم على أصل الزفير فقد ظهرت أعراض تحزم العروق بشكل واضح جداً وأعراض تشوه الأوراق (الشكل القلبي، بروز الحلمة)، واصفرار بين عروق الأوراق (شكل 3). هذا وقد ظهرت أعراض متباينة أخرى تمثلت بالنكرزة الجهازية على غراس صنف الجريب فروت والناتجة عن الاعداء بالعزلة ع 3 وصنف الزفير الناتجة عن التطعيم بالعزلة 1 وربما يشير ذلك إلى وجود سلالات مختلفة من الفيروس أو لوجود فيروسات أخرى لم نستخدم أمصالها في هذه الدراسة. ظهرت أعراض تشوه الأوراق على بعض الغراس المعدة بالفيروس وكانت أكثرها وضوحاً مظهر الورقة القلبية والتفاف حواف الأوراق نحو الأعلى لتأخذ شكل القارب أو الملعقة إضافة إلى تجعد الأوراق لا سيما الحديثة منها، وهذا يتوافق مع نتائج

جدول 1. أهم الأعراض الظاهرية ونتائج اختبار ELISA على غراس الأصناف المستخدمة في الدراسة والناتجة عن التطعيم بثلاث عزلات محلية مختلفة من فيروس CTV.

Table 1. Apparent symptoms observed and results of ELISA test on citrus cultivars used following inoculation with three local CTV isolates.

نتائج اختبار اليزا ELISA results	القراءة بعد التطعيم (شهر)			القراءة بعد التطعيم (يوم)				المكرر Replicate	العزلة Isolate	الصنف Variety
	Reading after grafting (months)			Reading after grafting (days)						
	12	6	3	60	45	30	15			
+	LR	Cvby, LR	Cvby	Cvby	CH	CH	*	1	1	اللايم المكسيكي Mexican lime
+	Cvby, LR	LR	Cvby	Cvby	Mvby	CH	*	2		
+	CM	M	CH	CH	*	*	*	1	2	
+	Cvby	Cvby	MY	*	*	*	*	2		
+	CVB	Cvby, CM	LR, CM	LR, Cvby	Cvby	*	*	1	3	
+	VB	Cvby	Y	*	*	*	*	2		
-	*	*	*	*	Mvby	*	*		شاهد Control	
+	VB	VB	Cvby, LM	CY	Mvby	*	*	1	1	الجريب فروت Grapefruit
+	Mvby	Mvby	Cvby	Mvby	Mvby	*	*	2		
+	LM	Mvby	Mvby	Mvby	*	*	*	1	2	
+	CVB	VB	-	CH	CH	*	*	2		
+	Ne	CVB	CM	CH	CH	*	*	1	3	
+	*	*	*	CH	CH	*	*	2		
-	*	*	*	*	*	*	*		شاهد Control	
+	LM, Cvby	LM, Cvby	Y	Cvby	CH	CH	*	1	1	الزفير Sour orange
+	Cvby	Cvby	Cvby	Cvby	Ne	*	*	2		
+	Cvby	LM	M	CM	-	*	*	1	2	
+	Cvby	Cvby	M	M	CH	*	*	2		
+	LM, ST	ST LM, Cvby	ST, Cvby	Y	*	*	*	1	3	
+	ST, LR	ST, Cvby	Cvby	Y	Mvby	*	*	2		
-	*	*	*	*	*	*	*		شاهد Control	
+	LR	LR	LR	LR	CH	*	*	1	1	اليافاوي Jafa orange
+	LR	LR	CH	CH	CH	*	*	2		
+	CH	CH	CH	CH	*	*	*	1	2	
+	CH	CH	CH	CH	*	*	*	2		
+	*	*	*	*	*	*	*	1	3	
+	*	*	*	*	*	*	*	2		
-	*	*	*	*	*	*	*		شاهد Control	

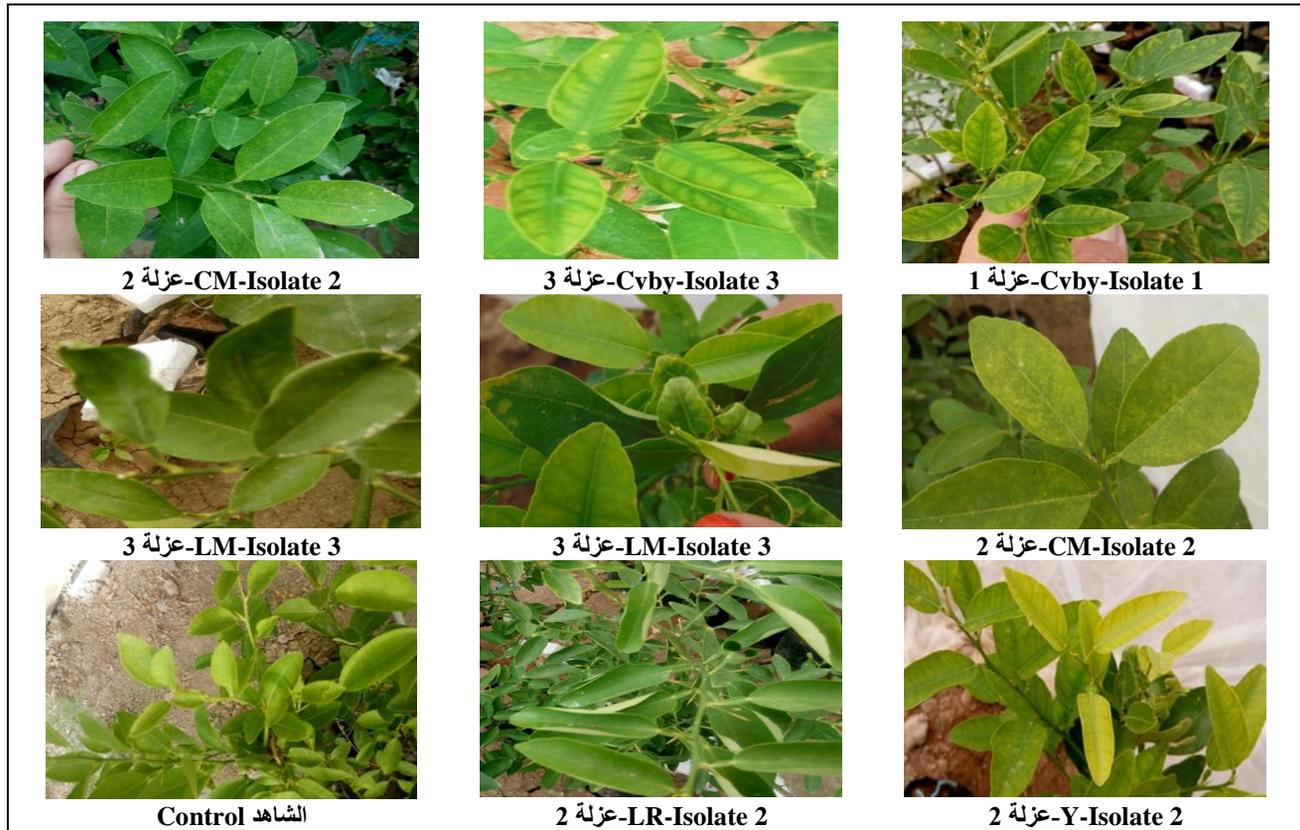
جدول 1 (تابع) Table 1 (Cont.)

+	Mvby	Mvby	Mvby	Mvby	*	*	*	1	1	أبو صرة
+	Mvby	Mvby	Mvby	*	*	*	*	2		Washington
+	M	M	M	M	*	*	*	1	2	navel
+	*	M	M	M	*	*	*	2		
+	LM	LM	LM	M	*	*	*	1	3	
+	LM	LM	LM	LM	*	*	*	2		
-	*	*	*	*	*	*	*			شاهد Control
+	CH	CH	*	*	*	*	*	1	1	بوميلو
+	CH	CH	*	*	*	*	*	2		Pomelo
+	CH	CH	CH	*	*	*	*	1	2	
+	CH	CH	CH	*	*	*	*	2		
+	M	M	M	*	*	*	*	1	3	
+	M	M	M	*	*	*	*	2		
-	*	*	*	*	*	*	*			شاهد Control
+	Y	Y	Y	CH	CH	*	*	1	1	كلمنين
+	Y	Y	Y	CH	CH	*	*	2		Clementine
+	*	*	*	*	*	*	*	1	2	
+	*	*	*	*	*	*	*	2		
+	LR	LR	LR	LM	*	*	*	1	3	
+	LR	LR	LM	LM	*	*	*	2		
-	*	*	*	*	*	*	*			شاهد Control
+	Mvby	Mvby	Mvby	Mvby	*	*	*	1	1	بونكان
+	Mvby	Mvby	Mvby	Mvby	*	*	*	2		Ponkan
+	*	*	*	*	*	*	*	1	2	
+	*	*	*	*	*	*	*	2		
+	*	CH	CH	CH	*	*	*	1	3	
+	*	CH	CH	CH	*	*	*	2		
-	*	*	*	*	*	*	*			شاهد Control

* = دون أعراض، Y= اصفرار الأوراق الحديثة، Mvby = اصفرار خفيف بين عروق الأوراق الحديثة، Cvby = اصفرار واضح بين العروق، CH= شحوب النبات، M= برقشة، CM= برقشة واضحة، LR= التفاف الأوراق الحديثة، LM= تشوه الأوراق الحديثة، ST= تقزم، Ne=نكروزة، VB=تحزم العروق، CVB=تحزم واضح للعروق، += موجب، -= سالب. *= No symptoms, Y= yellowing of young leaves, Mvby= mild yellowing between of young leaves, Cvby=clear yellowing between veins of young leaves, CH=chlorosis, M= mottling, CM= clear mottling, Lr=rolling of young leaves. LM= malformationof young leaves, ST= stunt, Ne= necrosis, VB= vein banding, CVB= clear vein banding, += positive, -= negative.

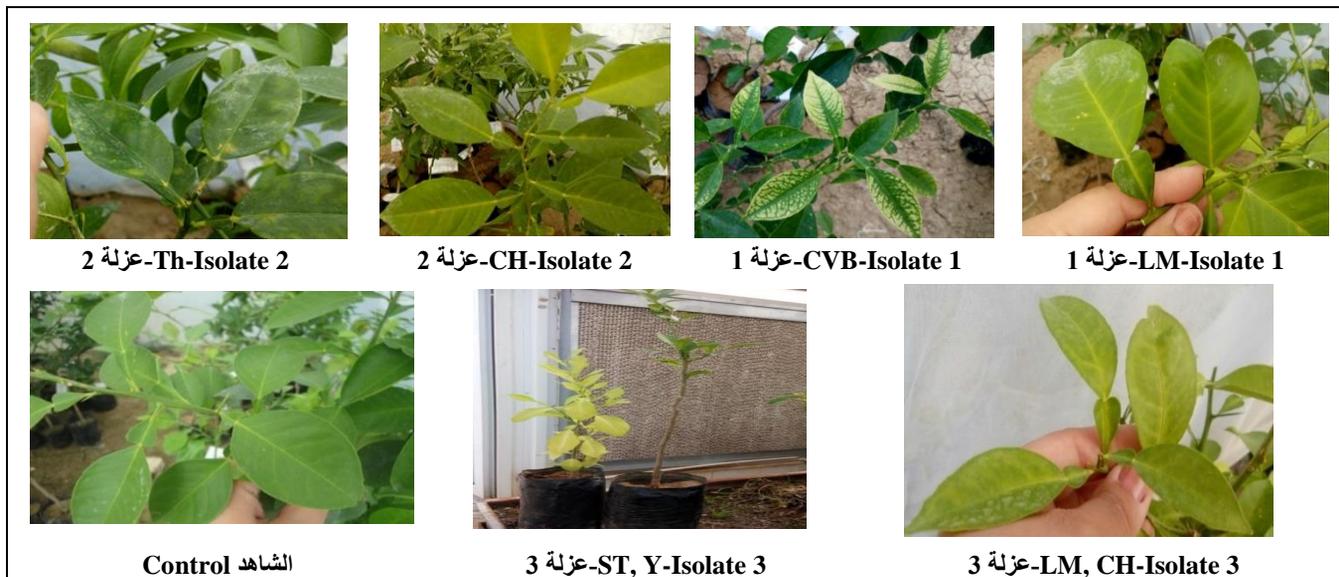
الأعراض المتمثلة بالتقزم واصفرار الغراس إلى أن الإصابة بالفيروس تسبب انخفاض كتلة المجموع الجذري في الأشجار المصابة من جهة حسب ما أشار إليه Wang *et al.* (2009) وتسبب تشوه الأنابيب الخشبية الناقلة للنسغ الناقص من جهة أخرى حسب نتائج Bekolo *et al.* (2007)، مما ينعكس سلباً على نمو المجموع الخضري وبالتالي تقزم واصفرار الغراس. أما بالنسبة لأعراض الموزاييك، فوجد أن الإصابة بالفيروس تسبب انخفاض محتوى الأوراق من الكلوروفيل، إذ وجد Mohamed (2009) انخفاض محتوى أوراق الزفير من الكلوروفيل من 1.09 مغ/غ في أوراق الأشجار السليمة إلى 0.29 مغ/غ في أوراق الأشجار المصابة، وهذا بدوره يؤثر في لون الأوراق ويؤثر في عملية التمثيل الضوئي أيضاً. ولا بد من الإشارة إلى عدم ملاحظة أعراض التدهور السريع والنقر الخشبية على الغراس المعذبة بالعزلات الثلاث للفيروس مما يشير إلى احتمال عدم وجود هاتين السلالتين حتى تاريخه، كما لوحظ تراجع أعراض الإصابة بالملاحظة مع ارتفاع درجات الحرارة في بعض الأصناف.

عموماً سببت العزلات الثلاث المستخدمة في الدراسة ظهور أعراض شغافية العروق على غراس اللابم المكسيكي (شكل 1)، وكانت أكثر وضوحاً وأسرع ظهوراً في العزلة الأولى وهذه النتائج تتوافق مع ما نشر سابقاً (Korkmaz *et al.*, 2008)، كما ظهرت أعراض الشحوب والاصفرار على بعض الغراس المعذبة بالفيروس واختلفت شدة هذه الأعراض تبعاً للعزلات المستخدمة وللصنف حيث سببت العزلة الثانية ظهور أعراض الشحوب والاصفرار على جميع الغراس باستثناء غراس اليافاوي والبونكان، كما ظهرت أعراض التقزم بشكل واضح على غراس الزفير المعذبة بالعزلتين الأولى والثالثة بينما لم تظهر على الغراس المعذبة بالعزلة الثانية، وهذا قد يشير إلى وجود سلالة اصفرار الشتول التي أشار لها Fraser (1952) والتي تتميز بأعراض التقزم واصفرار الأوراق في شتول أصناف الليمون الحامض والجريب فروت، كما يتوافق مع أحد الدراسات التي أشارت إلى وجود ثلاثة جينات للفيروس، حيث يعطي الجين P23 أعراض اصفرار الشتول (SY) على الليمون الحامض (Dawson *et al.*, 2013؛ Suastika *et al.*, 2001)، ويمكن أن نعزي



شكل 1. تباين أعراض الإصابة الظاهرية على غراس الليم المكسيكي بعد الإصابة بثلاث عزلات مختلفة من فيروس تريستيزا الحمضيات. Y= اصفرار الأوراق الحديثة، Cvby= اصفرار واضح بين العروق، CM= برقشة واضحة، LR= التفاف الأوراق الحديثة، LM= تشوه الأوراق.

Figure 1. Variation of symptoms produced on Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) after infection with three veins. Y= yellowing of young leaves, Cvby=clear yellowing between veins of young leaves, CM= clear molting, LR= rolling of young leaves, LM=leaves malformation.



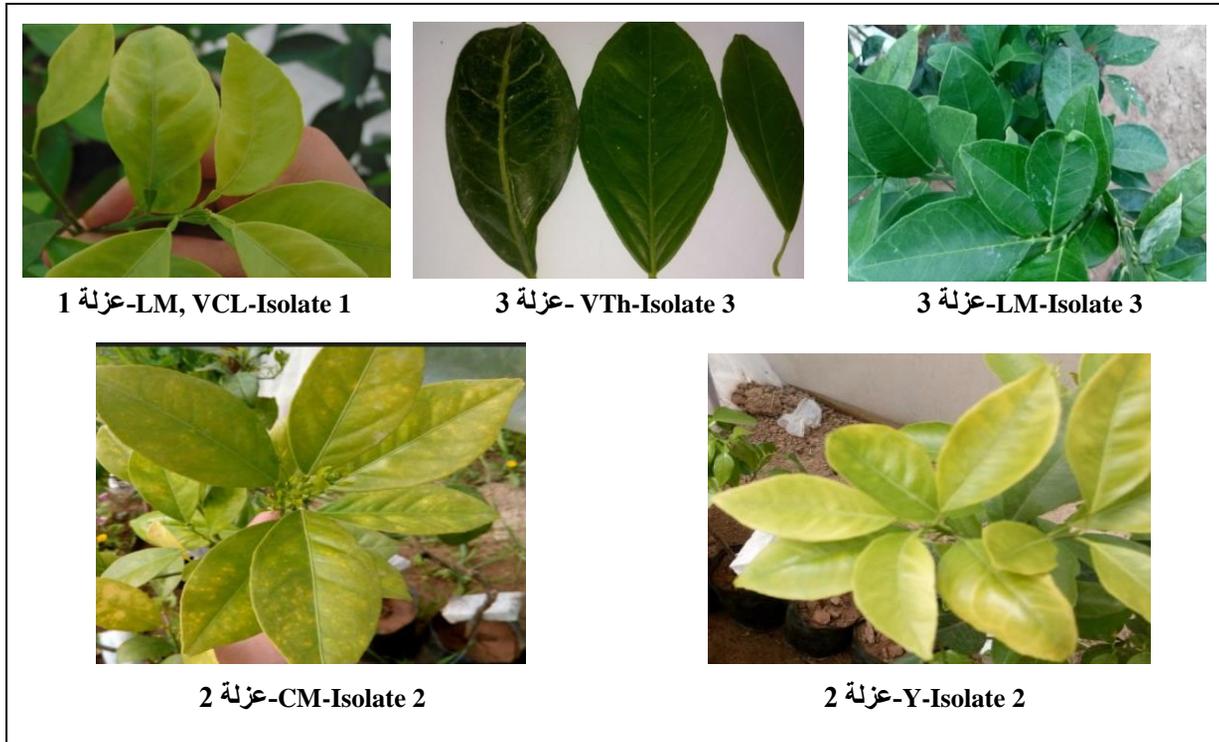
شكل 2. تباين أعراض الإصابة على غراس الزفير بعد الإصابة بثلاث عزلات مختلفة من فيروس تريستيزا الحمضيات. Y= اصفرار الأوراق الحديثة، CH= شحوب النبات، LM= تشوه الأوراق، ST= تقزم، CVB= تحزم واضح للعروق، Th= خشونة ملمس الأوراق الحديثة.

Figure 2. Variation of symptoms produced on sour orange, after infection with three different local CTV isolates. Y= yellowing of young leaves, Cvby=clear yellowing between of young leaves, CH=chloroses, LM=leaves malformation, ST= stunt, Th= thick touch of young leaves.



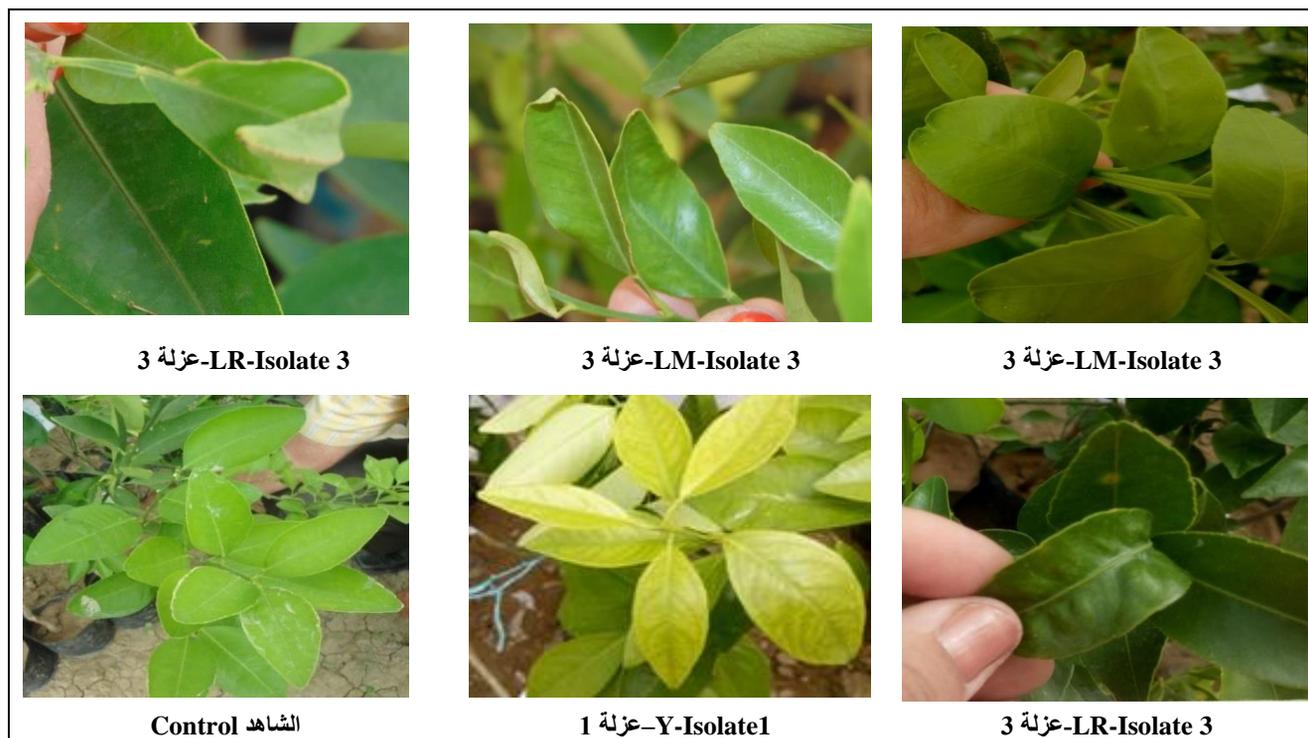
شكل 3. تباين أعراض الإصابة على غراس الجريب فروت بعد الإصابة بثلاث عزلات محلية مختلفة من فيروس تريستيزا الحمضيات. Y = اصفرار الاوراق الحديثة، Mvby = اصفرار خفيف بين عروق الأورق الحديثة، VB = تحزم العروق.

Figure 3. Variation of symptoms produced on grapefruit, after infection with three different local CTV isolates. Y= yellowing of young leaves, Mvby= mild yellowing between of young leaves, VB= vein banding.



شكل 4. تباين أعراض الإصابة على الصنف أبو صرة بعد الإصابة بثلاث عزلات محلية مختلفة من فيروس تريستيزا الحمضيات. Y = اصفرار الاوراق الحديثة، VTh = ثخانة (تفلن) العروق، CM = برقشة واضحة، LM = تشوه الأورق، VCL = شفافية العروق.

Figure 4. Variation of symptoms produced on Washington navel, after infection with three different local CTV isolates. Y= yellowing of young leaves, VCL= Vine clearing, CM= clear molting, LM=leaves malformation.



شكل 5. تباين أعراض الإصابة على غراس الكليمنتين بعد الإصابة بعزلتين مختلفتين من فيروس تريستيزا الحمضيات. LM= تشوه الأوراق، LR=التفاف الأوراق الحديثة، Y= اصفرار الأوراق الحديثة.

Figure 5. Variation of symptoms produced on Clementine, after infection with three different local CTV isolates. LR= rolling of young leaves, LM=leaves malformation, Y= yellowing of young leaves.

الساق نظراً لعدم وجود أعراض مماثلة لما تسببه هاتين السلالتين حتى بعد مرور عام كامل على متابعة القراءات على الغراس المعدة بالعزلات المختلفة الثلاث.

لذلك نوصي بأهمية متابعة التوصيف الجزيئي لهذه العزلات المختلفة من فيروس تدهور الحمضيات بالاعتماد على اختبار البوليميراز المتسلسل (PCR) والوقوف على عدد السلالات وأنواعها الموجودة في سورية، ومتابعة دراسة تأثير هذه العزلات في إنتاجية الأصناف المزروعة والمرغوبة في الساحل السوري.

نستنتج من هذه الدراسة تباين أعراض الإصابة الظاهرية الملاحظة على غراس الأصناف المستخدمة في الدراسة باختلاف مصدر العزلة وبخاصة صنف اللايم المكسيكي الذي يعد من النباتات الدالة المستخدمة على نطاق واسع في دراسة تباين عزلات فيروس CTV، إضافة إلى ظهور أعراض الاصفرار بكافة أشكاله على بعض غراس الأصناف المستخدمة في الدراسة وظهور أعراض التقزم والاصفرار على غراس الزفير والجريب فروت، مما يشير إلى وجود سلالات مختلفة للفيروس وعلى الاخص سلالة اصفرار وتقزم الشتول إضافة إلى السلالة المعتدلة في سورية، واستبعاد احتمالية وجود سلالة التدهور السريع، وسلالة تنقر

Abstract

Akel, I.H., R. Hamdan, A. El-Khatib and I.D. Ismail. 2019. Indexing of three *Citrus tristeza virus* isolates from the coastal region of Syria. *Arab Journal of Plant Protection*, 37(1): 11-21.

Citrus tristeza virus (CTV, Genus *Closterovirus*, Family *Closteroviridae*), is the most destructive and economically important viral disease limiting commercial citrus production worldwide. This study was conducted during 2016-2017 growing seasons in order to identify the prevalence of different variants of CTV along the Syrian coast. Citrus samples were collected from different locations, and tested for the presence of *Citrus tristeza virus* by using TBIA test and using polyclonal antisera. Three CTV Isolates were used as scions from different locations and grafted to different citrus indicators, such as Mexican lime, sour orange and sweet orange varieties grafted on sour orange rootstock. Results showed that different symptoms were produced by the different isolates on the same citrus indicators. Symptoms produced showed various mosaic, chlorosis, leaf malformation, leaf curling, and stunting levels. Moreover, no symptoms were observed on stems of the indicator plants such as stem pitting and quick decline, up to one year after inoculation. These results suggest the possibility of having two CTV variants present along the Syrian coast: a yellowing strain and a mild strain.

Keywords: CTV, citrus, biological indexing, TBIA, ELISA, Syrian coast.

Corresponding author: Insaf H. Akel, GCSAR, Lattakia Center, Syria, email: ensafakel5n4a@gmail.com

References

- contains a mixture of mild and severe strains. *Plant Pathology*, 29: 31-41.
<https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.09.2012.0141>
- Dawson, W.O., M. Garnsey, S.S. Tatineni, S.Y. Folimonova, S.J. Harper and S. Gowda.** 2013. *Citrus tristeza virus*-host interactions. *Front Microbiology*, 4: 88.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00088>
- Elbacki, A.M., R. Milano, K. Djelouah, R. Brandonisio and A.M. D'Onghia.** 2005. Improvement of detection of *Citrus exocortisviroids* (CEVd) and *Citrus cachexia viroid* (CCaVd). Proceedings of the 16th IOCV conference (Monterrey, 2004).
- EL Sayed, T.** 2005. Setting up of biological indexing of *Citrus tristiza virus* (CTV) and *Citrus infectious variegation* (CVV) using inoculated indicator cuttings. CIHEAM-IAMB, MSc thesis, Italy. 393 pp.
- Fraser, L.** 1952. Seedling yellows, an unreported virus disease of *Citrus*. *Agriculture Gazette, N.S.Wales*, 63: 125-131.
- Gandía, M., A. Conesa, G. Ancillo, J. Gadea, J. Forment, V. Pallás, R. Flores, N. Duran-Vila, P. Moreno and J. Guerri.** 2007. Transcriptional response of *Citrus aurantifolia* to infection by *Citrus tristeza virus*. *Virology*, 367: 298-306.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.05.025>
- Garnsey, S.M., T.A. Permar, M. Cambra and C.T. Henderson.** 1993. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of *Citrus tristeza virus* (CTV). Pages 39-50. In: Proceedings of the 12th Conference of International Organization of Citrus Virologists (IOCV). P. Moreno, J.V. Da Graça and L.W. Timmer (eds.). Riverside, California, USA.
- Garnsey, S.M., E.L. Civerolo, D.J. Gumpf, C. Paul, M. Hilf, R.F. Lee, R.H. Brlansky, R.K. Yokomi and J.S. Hartung.** 2005. Biological characterization of an international collection of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates. Pages 75-93. In: Proceedings of the 16th IOCV Conference, IOCV, University of California at Riverside, USA.
- Karasev, A.V., V.P. Boyko, S. Gowda, O.V. Nikolaeva, M.E. Hilf, E.V. Koonin, C.L. Niblett, K. Cline, D.J. Gumpf, R.F. Lee, S.M. Garnsey and W.O. Dawson.** 1995. Complete sequence of the *Citrus tristeza virus* RNA genome. *Virology*, 208: 511-520.
<https://doi.org/10.1006/viro.1995.1182>
- Knorr, M. and A. Price.** 1954. *Citrus tristeza virus*. Florida Agricultural Experiment Station. Report No. 195.
- Korkmaz, S., B. Cevik, S. Onder, K. Koc and O. Bozan.** 2008. Detection of *Citrus tristeza virus* (CTV) from Satsuma Owari mandarins (*Citrusunshiu*) by direct tissue blotimmunoassay (DTBIA), DAS-ELISA, and biological indexing. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 36: 239-246.
<https://doi.org/10.1080/01140670809510240>
- حمدان، رحاب بهجت.** 2011. حصر الأمراض لفيروسية المنتشرة في بساتين الحمضيات في الساحل السوري. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية. 74 صفحة.
- عاقل، إنصاف و عماد اسماعيل.** 2017. انتشار فيروس تدهور الحمضيات في الساحل السوري. المجلة السورية للبحوث الزراعية، 4: 160-170.
- عاقل، إنصاف، رحاب حمدان، علي الخطيب، و عماد اسماعيل.** 2018. تعريف بعض عزلات فيروس تدهور الحمضيات باستخدام اختبارات الفهرسة الحيوية في الساحل السوري. ملخصات بحوث المؤتمر العلمي الثاني عشر للهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، صفحة 143.
- مكوك، خالد، خالد الدجج، طلال الزدجالي، جبر خليل، أسماء نجار، حامد مزيد وفوزي أبو العباس.** 2008. الفيروسات و الفيرويدات التي تصيب الحمضيات. الصفحات 471-491. في: "الأمراض الفيروسية للمحاصيل الزراعية المهمة في المنطقة العربية" إعداد خالد مكوك، جابر فجلة و صفاء قمري. الجمعية العربية لوقاية النبات، بيروت، لبنان. 631 صفحة.
- Abou Kubaa, R.** 2010. Characterization and genomic variability of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates recovered in Apulia and Syria. PhD. Thesis, University of BARI, Italy. 83 pp.
- Abou Kubaa, R., K. Djelouah, A.M. D'Onghia, R. Addante and M. Jamal.** 2008. First report from Syria of *Citrus tristeza virus* in *Citrus* spp. *Plant Disease*, 92: 1468.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-92-10-1468C>
- Abou Kubaa, R., K. Djelouah, R. Addante, M. Jamal and A.M. D'Onghia.** 2009. Occurrence, distribution, characterization of *Citrus tristeza virus* and its vectors in Syria. *Journal of Plant Pathology*, 91: 303-309.
<https://doi.org/10.4454/jpp.v91i2.959>
- Amin, H.A., F. Fonseca, C. Santos and G. Nolasco.** 2006. Typing of Egyptian *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates based on the capsid protein gene. *Phytopathologia Mediterranea*, 45: 10-14.
<https://doi.org/10.14601/phytopathol Mediterr-1817>
- Bar-Joseph, M. and R.F. Lee.** 1989. *Citrus tristeza virus*. AAB Descriptions of Plant Viruses, No. 353.
- Bekolo, N., A. Zachée, B.M. Louis, N. Baptiste and O. Yvette.** 2007. Vigour and behaviour of fifteen citrus varieties against tristeza in the forest zone of Cameroon. *African Journal of Biotechnology*, 6: 1403-1409.
<https://doi.org/10.5897/AJB2007.000-2197>
- Cambra, M., S.M. Garnsey, T.A. Permar, C.T. Henderson, D. Gumph and C. Vela.** 1990. Detection of *Citrus tristeza virus* (CTV) with a mixture of monoclonal antibodies. *Phytopathology*, 80: 103.
- Cevik, B., S.S. Pappu, R.F. Lee and C.L. Niblett.** 1996. Detection and differentiation of *Citrus tristeza virus* using a point mutation and minor sequence differences in their coat protein genes. *Phytopathology*, 86: S101.
- Cevik, B., N. Yardimci and S. Korkmaz.** 2013. The first identified *Citrus tristeza virus* isolate of Turkey

- in the Caribbean and Central and North America. *Plant Disease*, 79: 437-445.
<https://doi.org/10.1094/PD-79-0437>
- Roistacher, C.N.** 1991. Graft-transmissible diseases of citrus. Handbook for detection and diagnosis. FAO, Rome. 286 pp.
- Roy, A., A. Fayad, G. Barthe and R. Brlansky.** 2005. A multiplex polymerase chain reaction method for reliable, sensitive and simultaneous detection of multiple viruses in citrus trees. *Journal of Virological Methods*, 129: 47-55.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.05.008>
- Rubio, L., M.A. Ayllón, P. Kong, A. Fernandez, M. Polek, J. Guerri, P. Moreno and B.W. Falk.** 2001. Genetic variation of *Citrus tristeza virus* isolates from California and Spain: evidence for mixed infections and recombination. *Journal of Virology*, 75: 8054-8062.
<https://doi.org/10.1128/Jvi.75.17.8054-8062.2001>
- Su, H.J. and M.C. Tsai.** 1991. The etiological and transmission of fruit virus and virus-like diseases in Taiwan. In: *Integrated Control of Plant Virus Diseases*. FFTC Supplement No. 1: 83-97.
- Suastika, G., T. Natsuaki, H. Terui, T. Kano, H. Ieki and S. Okuda.** 2001. Nucleotide sequence of *Citrus tristeza virus* seedling yellows isolate. *Journal of General Plant Pathology*, 67: 73-77.
<https://doi.org/10.1007/PL00012992>
- Terrada, E., R.J. Kerschbaumer, G. Giunta, P. Galeffi, G. Himmler and M. Cambra.** 2000. Fully "Recombinant enzyme-linked immunosorbent assays" using genetically engineered single-chain antibody fusion proteins for detection of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology*, 90: 1337-1344.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.12.1337>
- Tatineni, S., C.J. Robertson, S.M. Garnsey, M. Bar-Joseph, S. Gowda and W.O. Dawson.** 2008. Three genes of *Citrus tristeza virus* are dispensable for infection and movement throughout some varieties of citrus trees. *Virology*, 376: 297-307.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.12.038>
- Vela, C., M. Cambra, E. Cortés, P. Moreno, J. Miguét, C. Pérez de San Román and A. Sanz.** 1986. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Citrus tristeza virus* and their use for diagnosis. *Journal of General Virology*, 67: 91-96.
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-67-1-91>
- Vidalakis, G., S.M. Garnsey, J.A. Bash, G.D. Greer and D.J. Gumpf.** 2004. Efficacy of bio-indexing for graft-transmissible citrus pathogens in mixed infections. *Plant Disease*, 88: 1328-1334.
<https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.12.1328>
- Vives, M.C., L. Rubio, C. Lopez, J. Navas-Castillo, M.R. Albiach-Marti, W.O. Dawson, J. Guerri, R. Flores and P. Moreno.** 1999. The complete genome sequence of the major component of a mild *Citrus tristeza virus* isolate. *Journal of General Virology*, 80: 811-816.
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-3-811>
- Lee, R.F. and P. Rocha.** 1992. Mild strains of *Citrus tristieza virus*. *Plant Diseases of Fruit Crops*, 3: 226-241.
- Lee, R.F. and M. Bar-Joseph.** 2000. Tristeza. Pages 61-63. In: *Compendium of citrus diseases*. L.W. Timmer, S.M. Garnsey and J.H. Graham (eds). APS Press.
<https://trove.nla.gov.au/version/44428248>
- Lovisol, O.** 1993. Agro-ecology and centers of origin of graft-transmissible diseases of Citrus. Pages 406-411. In: *12th Proceedings of 12th IOCV Conference*, Riverside, California, USA.
- Mehta, P., R.H. Brlansky and S. Gowda.** 1997. Reverse transcription polymerase chain reaction detection of *Citrus tristeza virus* in aphids. *Plant Disease*, 81: 1066-1069.
- Miao, H. and M. Skaria.** 2002. Quantitative and Qualitative Differences of Inclusion Bodies Induced by *Citrus tristeza virus*. *Subtropical Plant Science*, 54: 1- 5.
- Mohamed, A.H.I.** 2009. Use of molecular and biochemical methods to determine *Citrus tristeza virus* (CTV) viral components and resistance in candidate rootstocks to replace sour orange. University of Florida, 183 pp.
- Moreno, P., S. Ambros, M.R. Albiach-Marti, J. Guerri and L. Pena.** 2008. *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology*, 9: 251-268.
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007000455.x>
- Nikolaeva, O.V., A.V. Karasev, C.A. Powell, D.J. Gumpf, S.M. Garnsey and R.F. Lee.** 1996. Mapping of epitopes for *Citrus tristeza virus*-specific monoclonal antibodies using bacterially expressed coat protein fragments. *Phytopathology*, 86: 974-979.
- Nolasco, G., C. Santos, G. Silva and F. Fonseca.** 2009. Development of an asymmetric PCR-ELISA typing method for *Citrus tristeza virus* based on the coat protein gene. *Journal of Virological Methods*, 155: 97-108.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.09.030>
- Pappu, H.R., S.S. Pappu, C.L. Niblett, R.F. Lee and E. Civerolo.** 1993. Comparative analysis of the coat proteins of biologically distinct *Citrus tristiza Closterovirus* isolates. *Virus Genes*, 73: 255-264.
<https://doi.org/10.1007/BF01702586>
- Pappu, H.R., A.V. Karasev, E.J. Anderson, S.S. Pappu, M.E. Hilf, V.J. Febres, R.M. Eckloff, M. McCaffery, V. Boyko, S. Gowda, V.V. Dolja, E.V. Koonin, D.J. Gumpf, K.C. Cline, S.M. Garnsey, W.O. Dawson, R.F. Lee and C.L. Niblett.** 1994. Nucleotide sequence and organization of eight 3' open reading frames of the *Citrus tristeza closterovirus* genome. *Virology*, 199: 35-46.
<https://doi.org/10.1016/viro.1994.1095>
- Permar, T.A., S.M. Garnsey, D.J. Gumpf and R. Lee.** 1990. A monoclonal antibody that discriminates strains of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology*, 80: 224-228.
<https://doi.org/10.1094/Phyto-80-224>
- Rocha-Pena, M.A., R.F. Lee, R. Lastra, C.L. Niblett, F.M. Ochoa-Corona, S.M. Garnsey and R.K. Yokomi.** 1995. *Citrus tristeza virus* and its aphid vector *Toxoptera citricida* Threats to citrus production

Yang, Z.N., D.M. Mathews, J.A. Dodds and T.E. Mirkov.
1999. Molecular characterization of an isolate of *Citrus tristeza virus* that causes severe symptoms in sweet orange. *Virus Genes*, 19: 131-142.
<https://doi.org/10.1023/A:1008127224147>

Wang, C.X., N. Hong, G.P. Wang, B. Jiang and X.D. Fan.
2009. Effects of *Citrus tristeza virus* on the growth of in vitro-cultured citrus. *Journal of Plant Pathology*, 91: 357-363.
<https://doi.org/10.4454/jpp.v91i2.965>

Received: October 7, 2018; Accepted: February 24, 2019

تاريخ الاستلام: 2018/10/7؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2019/2/24