



شیوع ویروس تریستزا در باغات مرکبات استان فارس

کاوس ایازپور^{۱*}، محمود رضا صباحی^۲، گیلدا نجفی پور^۱

^۱ استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه بیماری شناسی گیاهی^۲ کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه بیماری شناسی گیاهی

چکیده

سابقه و هدف: بیماری تریستزا یکی از مهم ترین بیماری های ویروسی مرکبات در سراسر دنیا است. استان فارس به عنوان قطب دوم تولید مرکبات در ایران است که آلودگی به ویروس تریستزای مرکبات نیز در این استان گزارش شده است. این پژوهش با هدف ارزیابی پراکنش ویروس، تعیین میزان و درصد آلودگی گونه های مختلف مرکبات در شهرستان های مختلف استان فارس انجام شد.

مواد و روش ها: این پژوهش به صورت مقطعی-توصیفی برای ۲۳۰ نمونه از گونه های مختلف مرکبات جمع آوری شده از شهرستان های کازرون، فیروزآباد، قیروکارزین، جهرم، داراب و فسا انجام گرفت. ابتدا آلودگی نمونه ها به ویروس تریستزا با استفاده از آزمون الیزا بررسی شد. با توجه به تعداد نمونه های آلوده به کل نمونه ها میزان و درصد آلودگی محاسبه گردید. سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی نواحی ژن پوشش پروتئینی و ژن *p23* ویروس تریستزای مرکبات با روش PCR ارزیابی شد.

یافته ها: نتایج آزمون الیزا آلودگی تمامی گونه های مرکبات به ویروس را نشان داد. آلودگی به ویروس در همه مناطق مورد بررسی مشاهده شد. از مجموع ۲۳۰ نمونه مورد بررسی، آلودگی ۲۴/۳۵ درصد از مرکبات به ویروس تریستزا تایید گردید. بیشترین درصد آلودگی به ترتیب مربوط به شهرستان های جهرم، قیروکارزین، داراب، کازرون، فیروزآباد و فسا بود. همچنین بیشترین میزان آلودگی مربوط به گونه نارنگی و پس از آن گونه های لیمو لیسبون، لیموترش، پرتقال و لیموشیرین قرار داشتند.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش افزایش میزان آلودگی گونه های مختلف مرکبات به ویروس تریستزا، نسبت به سال های گذشته را نشان داد. از این رو ضرورت توجه بیشتر به کنترل این بیماری در منطقه مورد پژوهش وجود دارد.

واژگان کلیدی: کلاستروویروس، ویروس تریستزای مرکبات، درصد آلودگی.

پذیرش برای چاپ: بهمن ۹۱

دریافت مقاله: آبان ماه ۹۱

مقدمه

این بیماری تاکنون در آرژانتین، برزیل، پرو، آمریکا، اسپانیا و ونزوئلا موجب نابودی میلیون ها درخت مرکبات پیوند زده شده بر روی پایه نارنج گردیده است (۲ و ۳). به طور کلی ویروس تریستزای مرکبات بر حسب سویه ویروس، نوع رقم مرکبات، زمان آلودگی و شرایط محیطی علایم مختلفی را ایجاد می نماید (۴ و ۵). این ویروس سه علامت متفاوت، زوال سریع، ساقه آبله ای و زردی نهال در شرایط طبیعی را ایجاد می کند. زوال سریع درختان مرکبات، در درختانی اتفاق می افتد که روی پایه نارنج پیوند شده باشند.

امروزه مرکبات به عنوان یک محصول راهبردی در صنعت کشاورزی دنیا مطرح است. از مرکبات در بیش از صد صنعت مختلف استفاده می شود. آلودگی مرکبات به ویروس تریستزا (*CTV = Citrus Tristeza Virus*) سبب ایجاد خسارت به صنایع مرتبط با مرکبات در چندین کشور مختلف گردیده است و از نظر اقتصادی مهم ترین ویروس مرکبات به شمار می رود (۱).

* آدرس برای مکاتبه: جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، گروه بیماری شناسی گیاهی
تلفن: ۰۷۹۱۴۴۴۷۰۰۱
پست الکترونیک: Kayazpour@yahoo.com

انتشار این ویروس در سطح جهان گردیده است (۱۹). ویروس تریستنزای مرکبات از جنس کلاستروویروس و خانواده کلاستروویریده (*Closteroviridae*) است که دارای پیکره رشته ای ماریپیج و اندازه $10^{-11} \times 2000$ نانومتر می باشد. همچنین دو پروتئین پوششی ۲۵ و ۲۷ کیلو دالتون (P27 و P25) ویروسی به ترتیب ۹۵٪ و ۵٪ از طول پیکره را پوشانده است (۲۳-۲۰). هر پیکره حاوی یک قطعه RNA مثبت تک رشته (SSRNA) در حدود ۲۰ kb (۴، ۱۰، ۲۴ و ۲۵) با وزن مولکولی $10^6 \times 6/9$ تا $6/3$ کیلو دالتون است (۲۶). تعیین توالی کل ژنوم جدایه های T36 و T3 از فلوریدا و VT از اسرائیل، T385 از اسپانیا و Sy568 از کالیفرنیا و NuagA از ژاپن نشان دهنده آن است که ۱۲ چارچوب خوانش باز (ORF) و مناطق ترجمه نشده در دو پایانه ۳' و ۵' سازماندهی شده است که توانایی رمزگذاری ۱۹ پروتئین را دارد (۲۰، ۲۱ و ۲۷). میزان حساسیت گونه های مختلف مرکبات نسبت به ویروس تریستنزا متفاوت است. بیشتر ارقام نارنگی نسبت به ویروس مقاوت و تحمل دارند (۲۸). مصونیت پوملو (*Pomelo*) به بعضی جدایه های ویروس نیز در مطالعاتی مشاهده شده است. در بررسی یاد شده که در کشور مالزی انجام شده است، علاوه بر مصونیت پوملو مشاهده شده که بیشترین درصد آلودگی در لیموترش و کمترین آلودگی در نارنگی وجود داشته است (۲۰). تحقیقات انجام شده در ایران که یکی از هفت کشور مهم تولید کننده مرکبات در دنیا می باشد، گسترش این ویروس در مناطق شمالی، جنوبی و مرکزی کشور را نشان داده است (۲۹-۳۴).

احمدی (Ahmadi) و همکاران در سال ۱۳۸۶ پراکنش ویروس تریستنزا را در چهار منطقه مهم استان کرمان مورد بررسی قرار دادند (۲۹). با استفاده از آزمون الایزا مشخص شد که میزان آلودگی در این مناطق بین ۴۵ تا ۶۰ درصد بوده است. بررسی هایی نیز در مورد تنوع ژنتیکی این ویروس در ایران انجام گردیده است (۲۹ و ۳۷-۳۵). از آنجا که این ویروس همواره درختان مرکبات سراسر جهان را مورد حمله قرار می دهد و از دهه ۱۹۳۰ تاکنون اپیدمی های گسترده آن نابودی ده ها

ساقه آبله ای روی پیوندک و صرف نظر از نوع پایه مشاهده می گردد و موجب مرگ گیاه نمی شود. همچنین معمولاً با علایم دیگری مانند رگبرگ روشنی، چوب پنبه ای شدن رگبرگ و فنجانگی شدن برگ همراه است و در درختان آلوده، گودک ها یا فرورفتگی های نسبتاً عمیق طولی در قسمت چوب تنه و حتی شاخه های جوان به وجود می آید (۹-۵). این سویه ها روی پایه نیز تولید ساقه گودی می کنند. سویه دیگری موجب زردی نهال ها می شوند که این امر تلفات زیاد نهالستان ها را به دنبال دارد. سویه زردی نهال موجب توقف شدید رشد و زردی لیمو، نارنج و گریپ فروت می شود (۲ و ۱۰).

ویروس تریستنزای مرکبات به وسیله چند گونه شته به روش نیمه پایا انتقال می یابد. انتقال توسط هر ناقل معمولاً وابسته به جدایه ویروس است (۱۱ و ۱۲). گونه های مختلف شته از نظر قابلیت انتقال تریستنزا بسیار با یکدیگر متفاوت هستند. کاراترین گونه ناقل تاکزوپترا سیتریسیدا (*Toxoptera citricida*) معروف به شته قهوه ای مرکبات است. به طوری که مرکبات به عنوان تنها میزبان آن محسوب می شوند.

سایر گونه ها مانند: ایفیس گوسیپی (*Aphis gossypii*) (۷، ۱۵-۱۳)، ایفیس اسپیراکولا (*Aphis spiraecola*) (۱۵)، تاکزوپترا اورانتی (*Toxoptera aurantii*) (۱۴ و ۱۵)، میزوس پرسیکا (*Myzus persicae*) و ایفیس کراسیوورا (*Aphis craccivora*) کارایی کمتری در انتقال تریستنزا دارند (۱۲ و ۱۶). ایفیس گوسیپی، کاراترین شته پس از شته قهوه ای مرکبات است (۱۲ و ۱۷). میزان انتقال ویروس با توجه به گونه های شته، جدایه ویروس و میزبان های دهنده و گیرنده ویروس متفاوت می باشد (۱۸). کاهش قابل توجه انتقال ویروس تریستنزا با شته ها در گیاهان نگهداری شده در دماهای بالاتر مشاهده شده است (۱۳).

از آن جایی که بسیاری از گونه های مرکبات به روش های غیر جنسی تکثیر می شوند و تریستنزا به راحتی از طریق پیوند انتقال می یابد، استفاده از پیوندک آلوده تا حد زیادی موجب

یا پوست ساقه های جوان نمونه های آلوده (نمونه های مثبت در آزمون الیزا) درون هاون چینی وارد و با استفاده از ازت مایع منجمد و پودر گردید. پودر حاصل به لوله های ۱/۵ میلی لیتری استریل منتقل گردید. سپس ۴۰۰ میکرولیتر مخلوط فنل: کلروفورم: ایزوپروپانول (۱:۲۴:۲۴) و ۴۰۰ میکرولیتر بافر TES (۱۰۰ میلی مولار تریس اسیدی (Tris-HCl) با ۸ pH، ۲ میلی مولار EDTA و ۲٪ SDS) به لوله ها افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه به آرامی تکان داده شد تا سوسپانسیون یکنواختی به دست آمد.

سوسپانسیون به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ، فاز مایع رویی (حدود ۴۰۰ میکرو لیتر) به درون لوله های جدید منتقل گردید. سپس ۲۰۰ میکرولیتر الکل اتیلیک ۹۸٪ به آن افزوده شد و کاملاً مخلوط گردیدند. در ادامه با استفاده از کیت استخراج RNA (RNeasy mini kit, Qiagen) طبق دستورالعمل شرکت سازنده، RNA کل استخراج و در سنتز cDNA به عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت.

برای سنتز cDNA از RNA کل استخراج شده به عنوان الگو و از مخلوط الیگونوکلوئوتیدها (oligonucleotide) (ساخت شرکت سیناژن) به عنوان آغازگر استفاده شد. حجم نهایی واکنش ۲۰ میکرولیتر شامل ۵۰ میلی مولار تریس اسیدی (۸/۳ pH)، ۵۰ میلی مولار KCl، ۴ میلی مولار MgCl₂، ۱۰ میلی مولار DTT، ۰/۲ میلی مولار از هر کدام از dNTP ها، ۱ میکرومولار الیگونوکلوئوتید، ۲۰۰ واحد آنزیم نسخه بردار معکوس (Reverse transcriptase) (ساخت شرکت سیناژن) و ۹ میکرولیتر RNA کل بود. ابتدا RNA و آغازگر به آرامی مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد (حمام آب گرم) حرارت داده شد و بلافاصله به روی یخ منتقل گردید. سپس بقیه مواد اضافه و به آرامی مخلوط شدند. سپس در ترموسایکلر به ترتیب به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد و ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد (به منظور توقف واکنش) قرار داده شدند.

ج) واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR): آغازگرهای مورد استفاده

میلیون اصله درخت سراسر دنیا را به دنبال داشته است، از این رو یک تهدید جدی برای مناطق مرکبات خیز دنیا به حساب می آید (۲ و ۳).

استان فارس پس از استان مازندران مقام دوم تولید در کشور را دارد. اما متأسفانه تحقیقات زیادی در مورد این ویروس در این استان انجام نشده است. هدف از این پژوهش، ارزیابی پراکندگی و آلودگی ویروس تریستنزای مرکبات در گونه های مختلف مرکبات و شهرستان های مختلف استان فارس بود.

مواد و روش ها

الف) نمونه برداری: به منظور بررسی پراکنش ویروس در نواحی مختلف استان فارس با استفاده از روش پیشنهادهی احمدی (Ahmadi) و همکاران در سال ۱۳۸۶ (۲۹)، از شهرستان های مهم تولید مرکبات در استان فارس شامل جهرم، قیروکارزین، داراب، فسا، کازرون و فیروزآباد در فصل های پاییز و زمستان ۱۳۹۰ به صورت تصادفی از برگ و سرشاخه درختان مختلف مرکبات نمونه برداری انجام گرفت. در هر منطقه ۳ تا ۴ باغ از هر گونه مرکبات به طور تصادفی انتخاب و در هر باغ از حدود ۱۰٪ درختان به طور تصادفی نمونه برداری شدند. در مجموع ۲۳۰ نمونه از درختان لیموشیرین، لیموترش، لیمولیسبون، پرتقال و نارنگی جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید.

به منظور شناسایی گیاهان آلوده از آزمون الیزا (DAS_ELISA) با استفاده از آنتی سرم اختصاصی ویروس (Bioreba) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. در آزمون الیزا برای هر نمونه دو تکرار در نظر گرفته شد. نتایج آزمون با استفاده از دستگاه قرائت کننده الیزا مدل موکورا (Mukora) در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شد. میزان جذب بیش از دو برابر جذب نمونه شاهد منفی، به عنوان نمونه آلوده (مثبت) در نظر گرفته شد (۲۹).

ب) استخراج RNA و سنتز cDNA برای استخراج RNA کل از روش ایازپور (Ayazpour) و همکاران در سال ۲۰۱۱ استفاده شد (۲۰). برای این منظور ۰/۲ گرم از رگبرگ، دمبرگ

جدول ۱: میزان آلودگی (درصد آلودگی) به ویروس تریتستزای مرکبات در مناطق مختلف استان فارس

منطقه مورد بررسی	درصد آلودگی
جهرم (خفر و محمدآباد)	۳۶/۹۶
قیروکارزین	۲۵/۸۵
داراب	۱۵
کازرون	۱۲/۷۷
فیروزآباد	۱۲/۵۰
فسا	۵

جدول ۲: درصد آلودگی گونه های مختلف مرکبات به ویروس تریتستزای مرکبات در استان فارس

گونه مرکبات	درصد آلودگی
نارنگی	۴۰/۹۰
لیموترش	۲۱/۵۰
لیمولیسون	۲۵/۰۰
پرتقال	۱۹/۸۳
لیموشیرین	۱۸/۵۲

شده است. همان گونه که ملاحظه می شود بیشترین آلودگی مربوط به شهرستان جهرم و پس از آن به ترتیب مربوط به شهرستان های قیروکارزین، داراب، کازرون، فیروزآباد و فسا بود. از نظر درصد آلودگی در گونه های مختلف مرکبات، بیشترین میزان مربوط به گونه نارنگی و پس از آن به ترتیب مربوط به گونه های لیمولیسون، لیموترش، پرتقال و لیموشیرین بود (جدول ۲). درصد آلودگی شهرستان جهرم در دو منطقه خفر (منطقه معتدل) و محمدآباد (منطقه گرم) نیز جداگانه بررسی شد. میانگین آلودگی در خفر ۴۰/۳۸ درصد و در محمدآباد ۳۲/۵ درصد بود.

ب) نتایج آزمون واکنش زنجیره ای پلی مرآز: واکنش زنجیره ای پلی مرآز ژن *p23* با استفاده از آغازگرهای PM51 و PM50 روی ۱۰ جدایه از نمونه های مثبت آزمون الایزا از شهرستان

در این تحقیق عبارت بودند از: 5'-ATGGACGACGAAACAAAGAA-3' CP1، 5'-TCAACGTGTGTTGAATTTTC-3' CP2 برای ژن پوشش پروتئینی (۲۰ و ۲۱)، 5'-ACTAACTTTAATTCGAACA-3' PM50 و 5'-AACTTATTCGGTCCACTTC-3' PM51 برای ژن *p23* (۳۹). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتری شامل: ۱۰ میلی مولار تریس اسیدی (۸/۳ pH)، ۵۰ میلی مولار KCl، ۰/۰۵ میلی مولار از هر کدام از dNTP ها، ۲ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۰/۳ میکرومول از هر آغازگر CP1 و CP2 برای ژن پوشش پروتئینی یا PM50 و PM51 برای ژن *p23*، ۱/۲۵ واحد آنزیم Taq Polymerase (iNtRON Biotechnology) و ۴ میکرولیتر cDNA انجام شد (۲۱ و ۳۹).

در ادامه واکنش PCR با شرایط دمایی ۳ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه (برای ژن پوشش پروتئینی (۲۰))، ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه (برای ژن *p23* (۳۹))، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات PCR به ژل آگاروز ۱/۲ درصد واجد اتیدیوم برمایند منتقل و الکتروفورز گردیدند. باندهای ایجاد شده پس از انتقال به دستگاه ژل داک (Bio Rad) مشاهده و تصاویر حاصل ثبت گردیدند.

یافته ها

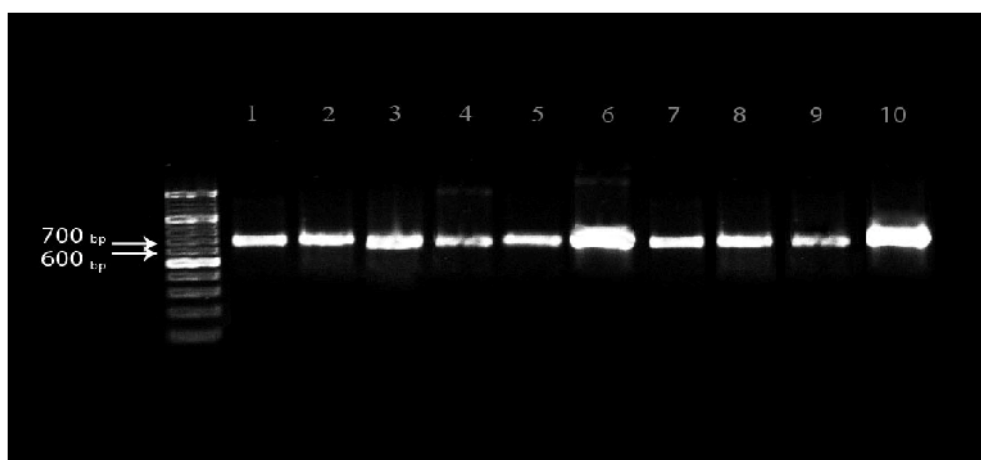
الف) پراکنش CTV در استان فارس: نتایج حاصل از آزمون الایزا نشان داد که همه مناطق استان فارس کم و بیش آلوده به ویروس تریتستزای مرکبات می باشند. از مجموع ۲۳۰ نمونه مرکبات جمع آوری شده از شهرستان های مختلف استان فارس، ۵۶ نمونه (۲۴/۳۵٪) آلوده به ویروس تریتستزای مرکبات بودند. نتایج میزان آلودگی مناطق مختلف در جدول ۱ خلاصه

آزمون نیز آلودگی نمونه ها به ویروس تریستنزای مرکبات را تأیید کرد و همانطور که در شکل ۲ مشاهده می شود قطعه ژنومی در حدود ۶۷۲ جفت باز تکثیر گردید.

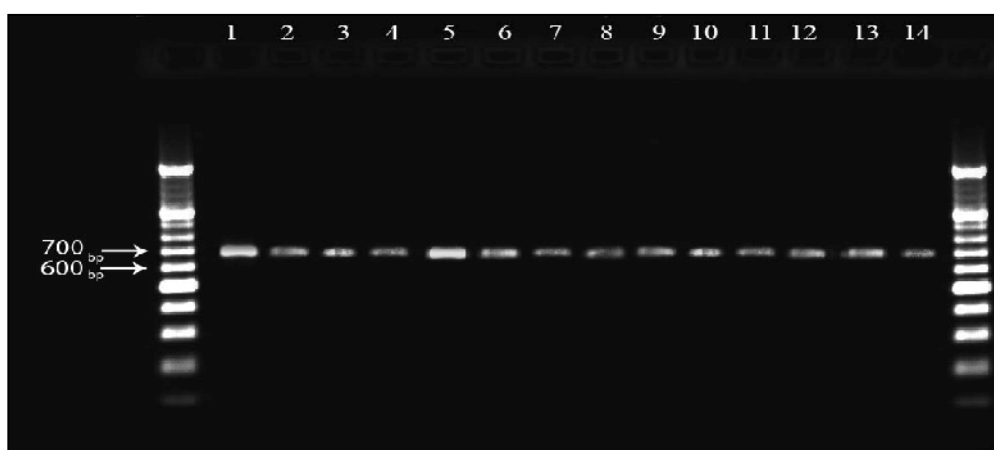
بحث

نتایج حاصل از آزمون الایزا نشان داد که از مجموع نمونه های مرکبات جمع آوری شده از شهرستان های استان فارس ۲۴/۳۵ درصد آلوده به ویروس تریستنزای مرکبات بودند. این میزان

های فیروزآباد، قیروکارزین، کازرون، جهرم، فسا و داراب انجام گردید. نتایج این آزمون نیز آلودگی به ویروس تریستنزای مرکبات در این نمونه ها را به اثبات رساند. همان گونه که در شکل ۱ ملاحظه می شود قطعه ژنومی به طول ۶۹۷ جفت باز تکثیر گردید. واکنش زنجیره ای پلی مرارژن پوشش پروتئینی با استفاده از آغازگرهای CP1 و CP2 روی ۱۴ جدایه از نمونه های مثبت آزمون الایزا از شهرستان های قیروکارزین، کازرون، جهرم، فسا و داراب انجام شد. نتایج این



شکل ۱: نتایج آزمون واکنش زنجیره ای پلی مرارژن تکثیر قطعات ۶۹۷ ژن *p23* از ۱۰ جدایه استان فارس. ستون سمت چپ مارکر (۱۰۰bp)، ستون ۱) جدایه فیروزآباد (نارنگی)، ستون های ۲ تا ۴) جدایه های قیروکارزین (به ترتیب پرتقال، لیموشیرین و لیمو لیسبون)، ستون های ۵ تا ۷) جدایه های کازرون (هر سه پرتقال)، ستون های ۸ تا ۱۰) جدایه های جهرم (به ترتیب، نارنگی، پرتقال و پرتقال).



شکل ۲: نتایج آزمون واکنش زنجیره ای پلی مرارژن تکثیر قطعات ۶۷۲ ژن *cp* از ۱۴ جدایه استان فارس. ستون های چپ و راست مارکر (۱۰۰bp)، ستون های ۱ تا ۳) جدایه های مربوط به شهرستان قیر و کارزین (به ترتیب، لیموشیرین، پرتقال و لیموترش)، ستون های ۴ تا ۷) جدایه شهرستان کازرون (به ترتیب، لیمو شیرین، نارنگی، پرتقال و پرتقال)، ستون های ۸ تا ۱۱) جدایه های مربوط به شهرستان جهرم (به ترتیب، نارنگی، لیموشیرین، پرتقال و لیموترش)، ستون ۱۲) جدایه مربوط به شهرستان فسا (پرتقال)، ستون ۱۳) جدایه مربوط به شهرستان فیروزآباد (نارنگی)، ستون ۱۴) جدایه مربوط به شهرستان داراب (پرتقال).

ویروس در استان فارس باشد. میانگین درصد آلودگی در خفر (۴۰/۳۸٪) بالاتر از دیگر مناطق جهرم و دیگر شهرستان های مورد بررسی بود. با توجه به اینکه دمای بالای محیط سبب می شود که میزان انتقال طبیعی ویروس تریسترا/ با شته ها کاهش یابد (۱۳)، دلیل درصد بالاتر آلودگی در خفر را می توان به میانگین دمای پایین تر این منطقه نسبت داد. از طرف دیگر مشاهدات انجام شده نشان می دهد که مدیریت علف های هرز در باغات خفر بسیار ضعیف تر از باغات جهرم است. همچنین از آنجا که علف های هرز میزبان شته ها می باشند این امر نیز می تواند دلیل بیشتر بودن میزان آلودگی مرکبات این منطقه به ویروس باشد. نتایج این تحقیق بیانگر وجود بیشترین آلودگی در شهرستان جهرم و پس از آن قیروکارزین و سپس داراب، کازرون، فیروزآباد و در پایان فسا بود. دلیل اینکه جهرم نسبت به دیگر شهرستان های استان فارس از آلودگی بالاتری برخوردار است را می توان در تنوع ارقام و نیز سابقه طولانی تر کشت مرکبات و همچنین علاقه باغداران به واردات ارقام جدید و در نتیجه انتقال ویروس با این ارقام جدید جستجو و توجیه نمود. از طرف دیگر خفر از آب و هوایی بسیار معتدل تر نسبت به دیگر بخش های شهرستان جهرم و دیگر شهرستان های استان فارس برخوردار است. این امر نیز می تواند علت بالاتر بودن میزان آلودگی به ویروس تریسترا/ مرکبات در این منطقه و در مجموع در شهرستان جهرم باشد. در این مطالعه مشاهده گردید که بیشترین درصد آلودگی مربوط به گونه نارنگی است (جدول ۲). در صورتی که نتایج تحقیقات محققین در سایر کشورها (۲۸) و مالزی (۲۰) نشان داده است که نارنگی از پایه های متحمل به بیماری است و درصد آلودگی در آن پایین تر از گونه های دیگر است. از این نظر نتایج به دست آمده در این تحقیق با نتایج پژوهش های یاد شده مطابقت ندارد. شاید دلیل این امر تفاوت در نوع ارقام مورد کاشت در ایران نسبت به سایر کشورها باشد. همچنین پاک نیت (Pakniat) و همکاران در سال ۲۰۰۲ گزارش کردند که تنوع ژنتیکی ویروس تریسترا/ مرکبات در استان فارس بسیار

آلودگی نسبت به میزان آلودگی مشاهده شده در استان کرمان کمتر است (۲۹). دلیل این امر نوع آنتی سرم مصرفی در آن تحقیق بوده است که این آنتی سرم در حال حاضر قابل دسترس نمی باشد. واکنش زنجیره ای پلی مرز ژن $p23$ با استفاده از آغازگرهای PM50 و PM51 روی ۱۰ جدایه از نمونه های مثبت آزمون الیزا از شهرستان های مختلف انجام گردید. نتایج این آزمون نیز آلودگی به ویروس تریسترا/ مرکبات در این نمونه ها را به اثبات رساند. این نتایج با یافته های سم باد (Sambade) و همکاران در سال ۲۰۰۳ هم خوانی دارد (۳۹). واکنش زنجیره ای پلی مرز ژن پوشش پروتئینی با استفاده از آغازگرهای CP1 و CP2 روی ۱۴ جدایه از نمونه های مثبت آزمون الیزا از شهرستان های مختلف نیز آلودگی نمونه ها به ویروس تریسترا/ مرکبات را تأیید کرد. این نتایج نیز با یافته های هوانگ (Huang) و همکاران در سال ۲۰۰۴ هم خوانی دارد (۴). نتایج ما در این پژوهش نشان داد که میانگین آلودگی لیموترش در استان فارس ۲۱/۰۵ درصد است. پاک نیت (Pakniat) و همکاران در سال ۲۰۰۲ در تحقیقی که فقط درختان لیموترش و نارنج (مرکباتی که با بذر تکثیر می شوند) را مورد بررسی قرار دادند، ضمن اثبات انتقال طبیعی این ویروس در استان های فارس و بوشهر از دو آنتی سرم یکی ایرانی (تهیه شده در دانشگاه شیراز) و دیگری ساخت شرکت بیوربا (Bioreba) (مشابه آنتی سرم مورد استفاده در این پژوهش) برای ردیابی ویروس تریسترا/ استفاده کردند (۴۰). با استفاده از آنتی سرم بیوربا درصد آلودگی لیموترش به ویروس ۱۵/۳ گزارش گردید. مطالعات پاک نیت (Pakniat) و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان داد که آنتی سرم ایرانی در تشخیص آلودگی مرکبات به ویروس حساس تر عمل می نماید (۴۰). اما به دلیل در دسترس نبودن و امکان پذیر نبودن تهیه این آنتی سرم از آن در این تحقیق استفاده نشد. نتایج این تحقیق نشان داد که درصد آلودگی لیموترش در مقایسه با نتایج تحقیق پاک نیت (Pakniat) و همکاران در سال ۲۰۰۲ بیشتر است (۴۰). این تفاوت می تواند نشان دهنده انتشار بیشتر ویروس در سال های اخیر و انتقال طبیعی

این مناطق باید تحقیقات بیشتری در این زمینه صورت گیرد. بنابراین پیشنهاد می شود که در تحقیقات دیگری توالی کل یا بخش های مهم ژنوم بررسی و با توالی های موجود در بانک ژن مقایسه گردد. از آنجا که ترکیب پایه و پیوندک در میزان بروز علائم و خسارت به گیاه مؤثر است و با توجه به احتمال تنوع و تفاوت ژنتیکی جدایه های ایرانی ویروس، ضرورت تحقیقات بیشتر در این مورد و بررسی حساسیت ارقام مختلف به ویروس تریستیزای مرکبات وجود دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم به دلیل حمایت های پژوهشی و علمی کمال امتنان را دارند.

زیاد است و به همین دلیل استفاده از آنتی سرم ایرانی نسبت به آنتی سرم های خارجی موجب تشخیص بهتر این ویروس می شود (۴۰). تفاوت ژنتیکی بین جدایه های ایرانی و خارجی ویروس می تواند دلیل آلودگی و حساسیت بیشتر نارنگی نسبت به سایر گونه های مرکبات باشد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که آلودگی به ویروس تریستیزا در همه باغات مرکبات شهرستان های مهم کاشت مرکبات استان فارس وجود دارد. همچنین میزان آلودگی گونه های مختلف مرکبات نسبت به سال های گذشته افزایش یافته است. بنابراین شایسته است توجه بیشتری به کنترل این بیماری شود. با توجه به احتمال تنوع ژنتیکی این ویروس در

References

1. Moreno P, Ambros S, Albiach-Marti MR, Guerri J, Pena L. *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Mol Plant Pathol*. 2008; 9: 251-268.
2. Rocha-Pena MA, Niblett CL, Lee RF, Ochoa-Corona FM, Lastra R, Garnsey SM, Yokomi RK. CTV and its aphid vector toxoptera citricidathreats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. *Plant Dis*. 1995; 79: 437-444.
3. Costa AS, Muller GW. Tristeza control by cross protection. *Plant Dis*. 1980; 64:538-542.
4. Huang Z, Rundell PA, Guan X, Powell CA. Detection and isolate differentiation of *Citrus tristeza virus* in infected field trees based on reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Dis*. 2004; 88: 625-629.
5. Satyanarayana T, Bar-Joseph M, Mawassi M, Albiach-Marti MR, Ayllon MA, Gowda S, Hilf ME, Moreno P, Garnsey SM, Dawson WO. Amplification of *Citrus tristeza virus* from a cDNA clone and infection of citrus trees. *Virology*. 2001; 280: 87-96.
6. Gmitter Jr FG, Xiao nY, Huang S, Hu XL, Garnsey SM, Deng Z. A localized linkage map of the *Citrus tristeza virus* resistance gene region. *Theor Appl Genet*. 1996; 92: 688-695.
7. Genc H. A new method for the detection of minor populations of *Citrus tristeza virus* strains infecting single citrus trees. *Turk J Agric For*. 2005; 29: 449-459.
8. Garnsey SM, Muller GW, Moll JN. Production and uses of infectious in vitro sources of *Citrus tristeza virus*. *Phytophylactica*. 1987; 19: 145-149.
9. Broadbent P, Brlanskey RH, Indsto J. Biological characterization of australian isolates of CTV

- and separation of subisolates by single aphid transmission. *Plant Dis.* 1996; 80: 329-333.
10. Ruiz-Ruiz S, Morenoa P, Guerri J, Ambros S. A real-time RT-PCR assay for detection and absolute quantitation of *Citrus tristeza virus* in different plant tissues. *J Virol Method.* 2007; 145: 96-105.
 11. Roistacher CN, Bar-Joseph M. Aphid transmission of *Citrus tristeza virus*: a review. *Phytophylactica.* 1987; 19: 163-167.
 12. Yokomi RK, Garnsey SM. Transmission of *Citrus tristeza virus* by *Aphis gossypii* and *Aphis citricola* in Florida. *Phytophylactica.* 1987; 19: 169-172.
 13. Bar-Joseph M, Marcus R, Lee RF. The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* control. *Ann Rev Phytopathol.* 1989; 27: 292-316.
 14. Brown LG, Denmark HA, Yokomi PK. *Citrus tristeza virus* and its vectors in Florida. 1988: Florida Department of Agriculture and Consumer Services. Division of Plant Industry.
 15. Gottwald TR, Gibson GJ, Garnsey SM, Irey M. Examination of the effect of aphid vector population composition on the spatial dynamics of *Citrus tristeza virus* spread by stochastic modeling. *Phytopathol.* 1999; 89: 603-608.
 16. Raccach B, Singer S. Incidence and vector potential of the aphids which transmit citrus tristeza virus in israel. *Phytophylactica.* 1987; 19: 173-177.
 17. Garnsey SM, Civerolo EL, Gumpf DJ, Yokomi RK, Lee RF. Development of a world wide collection of *Citrus tristeza virus*. In Proceedings of 11th Conference of International Organization of Citrus Virologists (IOCV). 1991. 113-120.
 18. Garnesy SM, Lee RF. Tristeza in compendium of citrus diseases. Whiteside JO, Garnesy SM, Timmer LW, (Editors). APS Press. 1988; pp: 48-50.
 19. Hadidi A, Khetarpal RK, Koganezawa H, eds. Plant virus disease control. APS Press: USA. 1998; pp: 684.
 20. Ayazpour K, Sijam K, Vadamalai G, Jaafar H. Status of *Citrus tristeza virus* (CTV) in Peninsular Malaysia. *Afr J Mic Res.* 2011; 5: 838-843.
 21. Ayazpour K, Sijam K, Vadamalai G, Jaafar H. Molecular characterization of *Citrus tristeza virus* strains in Peninsular Malaysia. *Afr J Mic Res.* 2011; 5: 2838-2846.
 22. Febres VJ, Ashoulin L, Mawassi M, Frank A, Bar-Joseph M, Manjunath KL, Lee RF, Niblett CL. The p27 protein is present at one end of *Citrus tristeza virus* particles. *Phytopathol.* 1996; 86: 1331-1335.
 23. Tatineni S, Gowda S, Dawson WO. Heterologous minor coat proteins of *Citrus tristeza virus* strains affect encapsidation, but the coexpression of hsp70h and p61 restores encapsidation to wild-type levels. *Virology.* 2010; 402: 262-270.
 24. Hilf M. Partial sequence characterization of *Citrus tristeza virus* associated with breaking of the general resistance to CTV expressed in *Poncirus trifoliata*. In Proceedings of 16th Conference of International Organization of Citrus Virologists (IOCV). 2005. USA. 52-60.
 25. Che X, Mawassi M, Bar-Joseph M. A novel class of large and infectious defective RNA of

- Citrus tristeza virus*. Virol. 2002; 298: 133-145.
26. Bar-Joseph M, Gumpf DJ, Dodds JA, Rosner A, Ginzberg I. A simple purification method for *Citrus tristeza virus* and estimation of its genome size. Phytopathol. 1985; 75: 195-198.
 27. Karasev AV. Genetic diversity and evolution of closteroviruses. Ann Rev Phytopathol. 2000; 38: 293-324.
 28. Garnsey SM, Gottwald TR, Yokomi RK. Control strategies for *Citrus tristeza virus*, in plant virus disease control. Hadidi A, Khetarpal RK, Koganezawa H, (Editors). APS Press. 1998; pp: 639-658.
 29. Ahmadi S, Afsharifar A, Izadpanah K. Distribution and genetic diversity of *Citrus tristeza virus* isolates in Kerman Province. Iran J Plant Pathol. 2007; 43: 353-371.
 30. Shafiee V, Izadpanah K. Report of *Citrus tristeza virus* in Southern Iran. Iran J Plant Pathol. 1996; 32: 191.
 31. Ebrahim-nesbat F, Nienhouse F. Occurrence of *Citrus tristeza virus* in Iran. Zeitschr Fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. 1978; 85: 308-312.
 32. Shafiee V, Izadpanah K. Distribution of *Citrus tristeza virus* in Southern Iran. In 13th Iranian Plant Protection Congress. 1998. 256.
 33. Shafiee V, Izadpanah K. Purification and serology of *Citrus tristeza virus* isolated from Southern Iran. In 13th Iranian Plant Protection Congress. 1998. 255.
 34. Rahimian H. Strains of *Citrus tristeza virus* in Mazandaran. Iran J Plant Pathol. 1994; 30: 81-83.
 35. Alavi V, Khatabi B, Salekdeh GH. Comparison of biologically distinct isolates of *Citrus tristeza virus* from Iran using major coat protein sequences. Aust J Plant Pathol. 2005; 34: 577-582.
 36. Barzegar A, Sohi HH, Rahimian H. Comparative sequence analysis of coat protein gene of Iranian *Citrus tristeza virus* isolates. J Phytopathol. 2005; 153: 457-463.
 37. Barzegar A, Sohi HH, Rahimian H. Characterization of *Citrus tristeza virus* in Northern Iran. J Gen Plant Pathol. 2006; 153: 457-463.
 38. Gilling M, Broadbent P, Indostro J, Lee RF. Characterization of isolates and strains of *Citrus tristeza* closterovirus using restriction analysis of the coat proteins gene amplified by the polymerase chain reaction. J Virol Method. 1993; 44: 305-317.
 39. Sambade A, Lopez C, Rubio L, Flores R, Guerri J, Moreno P. Polymorphism of a specific region in gene *p23* of *Citrus tristeza virus* allows discrimination between mild and severe isolates. Arch Virol. 2003; 148: 2325-2340.
 40. Pakniat A, Izadpanah K, Afsharifar A. Natural transmission of *Citrus tristeza virus* (CTV) in Fars and Bushehr Provinces. 2002. 15th Iranian Plant Protection Congress. 154.



The prevalence of *Citrus tristeza virus* in orchards of Fars Province

Kavous Ayazpour¹, Mahmoud Reza Sabahi², Gilda Najafipour¹

¹ Assistant Professor, Department of Plant Pathology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

² M.Sc., Department of Plant Pathology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Tristeza is one of the most important viral diseases in citrus products worldwide. Fars province is one the most important citrus growing regions in Iran. Infection to *Citrus tristeza virus* (CTV) has been reported from many citrus orchards in this region. The objectives of this research were to determine CTV distribution, evaluation of citrus species infection to CTV and to compare the infection prevalence rate to CTV in different regions of Fars province.

Material and methods: This cross sectional study was performed on 230 samples collected from different citrus species grown in Kazeroun, Firouzabad, Ghir-o-Karzin, Jahrom, Darab and Fasa regions. First existence of infection to Tristeza virus was detected using ELISA. The prevalence of infection was calculated based on the rate of infection in the total numbers of samples. Next, a PCR amplification was performed based on the primers specific for coat protein and *p23* genes.

Results: Based on the ELISA test, all citrus species were infected to CTV. The virus infection was detected in all the regions of interest. Totally, 24.35% out of 230 collected samples were infected to CTV. The highest infection prevalence was found in Jahrom, Ghir-o-Karzin, Darab, Kazeroun, Firouzabad and Fasa, respectively. Furthermore, mandarin was found the most infected fruit between all citrus family, followed by lemon Lesbon, lime, orange and sweet lime, respectively.

Conclusion: The results of this research showed that CTV infection has increased during the past years. As a result, control of the disease in this region is necessary.

Keywords: *Closterovirus*, *Citrus tristeza virus*, Percentage of infection.

Correspondence to: Kavous Ayazpour

Tel: +987914447001

E-mail: kayazpour@yahoo.com

Journal of Microbial World 2013, 6(3): 253-262.