

برخی ویژگی‌های مولکولی و زیستی ویروس پسروروز مرکبات آلوده کننده نارنگی ائشو دیررس *Citrus unshiu* Marc در شرق استان مازندران

فائزه فلکی^۱، سید وحید علوی^۲، فرشاد رخشنده رو^۳، امیر موسوی^۴

۱ و ۳- به ترتیب دانشجوی دکتری و استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران؛ ۲- سید وحید علوی، استادیار بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران؛ ۴- امیر موسوی، دانشیار گروه زیست فناوری مولکولی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
(تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۸؛ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۸)

چکیده

طی سال‌های اخیر علائم پوسته پوسته شدن تنه، نقوش موزاییکی و لکه‌های حلقوی روی میوه بالغ به‌خصوص در اطراف گلگاه و لکه‌های زرد رنگ گسترده و حلقوی روی برگ‌های مسن درختان نارنگی ائشو دیررس (*Citrus unshiu* (Yu.Tanaka ex Swingle) در استان مازندران مشاهده شده است. خصوصیات زیستی جدایه‌ها از طریق نموده سازی روی پایه‌های مختلف مرکبات بررسی شد و نتایج حاکی از حضور تیپ B ویروس پسروروز مرکبات در نمونه‌ها بود. ردیابی مولکولی CPsV توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نسخه برداری معکوس (RT-PCR) با یک جفت آغازگر اختصاصی طراحی شده صورت گرفت و قطعه مورد انتظار به طول حدود ۶۰۰ bp در نمونه‌های جمع آوری شده از باغ و گلخانه تکثیر شد. بررسی تبارزائی جدایه‌های منتخب بر مبنی توالی ژنتیکی پروتئین پوششی ویروس، جدایه‌های جهانی را در دو گروه مجزا و سه زیر گروه در گروه اول قرار داد. جدایه‌های ایرانی در زیرگروه دوم در کنار جدایه‌هایی از کشورهای آمریکا و ژاپن قرار گرفتند و کمترین میزان شباهت ژنتیکی را با جدایه‌هایی از کشورهای آمریکای لاتین و آفریقا داشتند.
واژه‌های کلیدی: تبارزائی، تغییرات ژنتیکی، توالی یابی، نموده سازی

Partial Biological and Molecular Characterization of Citrus psorosis virus Infecting Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc) in the east of Mazandaran province

F. FALAKI¹, S. VAHID ALAVI², F. RAKHSHANDEHROO³, A. MOUSAVI⁴

1 and 3. Ph.D. student & assistant professor respectively; Department of Plant Protection, College of Agriculture Sciences and Food Industries, Science and Research Branch, Islamic Azad university, Tehran, Iran; 2. Associate professor, Department of Plant Protection, Mazandaran Agricultural and Natural Resources Research Center, Sari, Iran; 4. Associate professor, Department of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

Abstract

A disorder on Satsuma mandarin, *Citrus unshiu* (Yu.Tanaka ex Swingle) trees with bark scaling of the trunk, ring spot or mosaic pattern symptoms on mature fruits especially around the calyx and extended yellow ring spot on the old leaves observed over the recent years in Mazandaran province. The results of virus mechanical inoculation on *Gomphrena globosa* indicator plants and indexing on different citrus stock and biological properties of the studied isolates indicated the presence of the type B citrus psorosis virus in samples. Molecular detection of CPsV was done by using RT-PCR and specific designed primers in which a desired amplicon with a size about 600bp amplified in infected samples collected from the orchards and greenhouse. Phylogenetic analysis of the representative isolates on the basis of nucleotide sequences of the CPsV-coat protein, categorized the representative isolates into two distinct groups which the group one further divided into three subgroups. Iranian isolates were clustered in the second subgroup beside the Americans and Japanese isolates and showed the lowest identity with the isolates from Latin American and African countries.

Keywords: Genetic variation, indexing, sequencing, phylogeny

مقدمه

مرکبات از مهمترین محصولات باغبانی در کشور است که به‌طور گسترده‌ای در مناطق مختلف کشور کشت می‌شود. میزان تولید مرکبات در کشور حدود ۴/۵ میلیون تن است که بعد از سیب رتبه دوم را دارد. ایران از نظر تولید مرکبات مقام هفتم، سطح زیر کشت رتبه هشتم و عملکرد رتبه نهم دنیا را دارد (FAOSTAT, 2016). نارنگی انشو (*Citrus unshiu* Marc.) در کشور ژاپن بسیار محبوب بوده و به دلیل خصوصیات خوب باغبانی مانند نداشتن بذر در میوه و همچنین مقاومت بالا به آفات و بیماری‌های گیاهی رتبه اول کشت را در میان ۲۰۰ گونه رقم مرکبات داشته و بیش از ۱۰۰ کشت را در سال ۱۳۰۹ برای اولین بار نهال نارنگی رقم انشو وارد کشور شد و در منطقه شمال کشور (ایستگاه تحقیقات رامسر) کاشته شد (Fotuhi-Ghazvini, 1999). در ایران رقم انشو تا سال ۱۳۴۲ ناشناخته بود ولی با نشان دادن مقاومت به سرما (۱۳ درجه سلسیوس زیر صفر)، از سال ۱۳۴۷ رسماً به‌عنوان اولین رقم نارنگی برای کاشت در شمال کشور معرفی شد و بهترین محل کاشت این رقم، شرق مازندران است (Fotuhi-Ghazvini, 1999). سالانه ۴/۵ میلیون تن مرکبات در کشور تولید می‌شود که مرکبات تولید شده مازندران شامل پرتقال، نارنگی، لیموترش، گریپ فروت و لیموشیرین و ارقام زینتی، با میزان ۲/۵ میلیون تن سهم مهمی را بر عهده دارد. نارنگی رقم انشو تنها در مناطق شمالی کشور کشت می‌شود و در استان مازندران ۲۲۰۰۰ هکتار سطح زیر کشت آن می‌باشد. میزان عملکرد آن در واحد سطح ۴۴۹۵۶ کیلوگرم در هکتار است (Anonymous, 2017). به دلیل آنکه این رقم یکی از زودرس‌ترین ارقام نارنگی در منطقه می‌باشد و از شهریورماه آماده برداشت می‌باشد، از محبوبیت زیادی در بین تولیدکنندگان برخوردار است (Nasrollahnezhad and Ebadi, 2011; Golein and Adoli, 2011).

از جمله مهمترین عوامل بیماری‌زای مرکبات در شمال کشور ویروس پسروروز مرکبات می‌باشد. این ویروس اولین

ویروس شناسایی شده در مرکبات و قدیمی‌ترین بیماری است که در این گیاهان مورد تحقیق قرار گرفته و جزو مخرب‌ترین بیماری‌ها در مرکبات نیز می‌باشد (Nasrollahnezhad and Ebadi, 2011; Fawcett, 1948). ویروس پسروروز مرکبات (CPsV) قابل انتقال با پیوند و اندام تکثیر آلوده بوده و در اغلب مناطق تحت کشت مرکبات دنیا از جمله آمریکا، ایتالیا، فرانسه، هند، لبنان، اسپانیا، آرژانتین، یونان و ایران گزارش شده است و در کشورهای آمریکای جنوبی سالانه حدود ۵٪ درختان مرکبات را از بین می‌برد (Achachi et al., 2014; Nasrollahnezhad and Ebadi, 2011; Martín et al., 2004). این ویروس گونه تیپ جنس Ophiovirus و عضو خانواده Aspiviridae است. تمام گونه‌های این جنس از نظر شکل پیکره و ژنوم مشابه یکدیگر می‌باشند. پیکره این ویروس رشته‌ای و پیچ خورده است (Achachi et al., 2014). ویروس CPsV دارای ژنوم سه بخشی با قطبیت منفی با طول‌های ۱۱/۳-۱۲/۵ کیلوگفت باز می‌باشد که هر قطعه ژنومی توسط یک پوشش پروتئینی مستقل پوشیده شده است (Achahi et al., 2014; Martín et al., 2005). پیکره‌های کوچک تر به طول ۶۹۰ تا ۷۶۰ نانومتر و پیکره‌های بزرگتر حدود ۴ برابر بلندتر هستند (Derrick et al., 1988; Milne, 2005). این ویروس محدود به آوند آبکشی بوده و تا کنون هیچ جسم درون سلولی برای آن گزارش نشده است و از قابلیت انتقال مکانیکی روی گیاهان محک *Chenopodium quinoa* و *Gomphrena globosa* نیز برخوردار است (Achahi et al., 2014).

حداقل دو تیپ بیماریزا از این ویروس به نام‌های پسروروز A و پسروروز B را با بیماری پسروروز مرتبط دانسته اند (Danos, 1989; Frison and Taher, 1991; Velazquez et al., 2012). جمله علائم رایج در تیپ پسروروز A، پوسته پوسته شدن فلس مانند تنه درخت و شاخه‌ها است که معمولاً در ۱۰ تا ۱۵ سالگی ظاهر می‌گردد. در برگ‌های مسن معمولاً فاقد علائم مشخص بوده، اما رگه‌های روشنی در برگ‌های جوان ظاهر می‌شود. مهم‌ترین علائمی که برای تیپ پسروروز B ذکر گردیده، ورقه

توصیف گردید (Bani Hashemi and Taheri, 2016). تحقیقات نشان داده است که تیپ A بیماری‌زای ویروس در مقایسه با تیپ B در شهرهای نوشهر و ساری شیوع بیشتری داشته است (Habashi, 2004). همچنین با استفاده از روش مولکولی RT-PCR ویروس پسروروز از استان گلستان گزارش شده است و مشخص شده که سرم‌های تجاری خارجی موجود برای ردیابی نژادهای ایرانی ویروس کارآمد نیستند (Nasrollahnezhad and Ebadi, 2011). همچنین نوعی عارضه شبه ویروسی با علائم لکه‌های حلقوی روی برگ و میوه همراه با ریزش میوه‌های در آستانه بلوغ روی درختان پرتقال تامسون ناول مرتبط با آلودگی به ویروس پسروروز مرکبات در باغات شرق استان مازندران مشاهده شده است (Falaki et al., 2013)، با این وجود تا کنون این بیماری ویروسی از مرکبات جنوب کشور گزارش نشده است. با توجه به آنکه روش‌های مولکولی تا کنون قادر به تفکیک تیپ‌های بیماری‌زای CPsV در مرکبات نبوده است. در این پژوهش تلاش شد تا از طریق بررسی برخی خصوصیات تبارزایی و بیولوژیکی نسبت به ردیابی ویروس پسروروز در نارنگی‌های انشو دیر رس مشکوک به آلودگی در منطقه و همچنین شناخت تیپ آلودگی ویروس اقدام شود.

روش بررسی

نمونه برداری: از ۲۰ قطعه باغ واجد درختان نارنگی انشو دیررس *Citrus unshiu* Marc دارای پایه نارنج با محدوده سنی ۱۵ تا ۱۸ سال و با مساحت بیش از یک هکتار در منطقه شرقی استان مازندران (شهرستان ساری) بازدید و باغات واجد درختان نارنگی انشو دیررس با علائم مشخص پسروروز از قبیل پوسته پوسته شدن تنه درخت، لکه‌های گسترده

شدن سرتاسری پوست تنه و جدا شدن آن از چوب می‌باشد که گاهی به صورت یک شکاف طولی در تنه دیده می‌شود. در چنین درختانی، لکه‌های گسترده زرد رنگ در برگ‌های مسن به صورت پایدار ظاهر می‌شود و برخی مواقع لکه‌های حلقوی زرد یا نکروتیک نیز روی میوه‌ها پدیدار شده است (Roistacher, 1991; Whiteside et al., 1989; Velazquez et al., 2012). پیوندک‌های پرتقال شیرین آلوده به پسروروز B در نهالستان از رشد باز مانده و دچار نکروز عمومی و مرگ شده‌اند و در برخی موارد نیز پس از انتقال به باغ و در طی سه تا شش سال بعد به تدریج زوال یافته‌اند (Roistacher, 1991; Whiteside et al., 1989; Duran-Vila et al., 1993; Velazquez et al., 2012). مجموع تیپ B ویروس مهاجم تر از تیپ A بوده و سرعت انتشار آن در باغات مرکبات بیشتر است (Velazquez et al., 2012). در بیشتر مناطق زیر کشت مرکبات جهان، بر اساس علائم ظاهری به احتمال وجود این بیماری اشاره شده، و در موارد محدودی با انجام آزمون‌های بیولوژیکی، سرولوژیکی و مولکولی آلودگی درختان به ویروس پسروروز مرکبات تأیید شده است (Roistacher, 1991; Whiteside et al., 1989). اگر چه اولین مطالعات صورت گرفته در خصوص پسروروز، آن را به تیپ A و B تفکیک نموده است، اما بررسی‌های بعدی نشان داد که سویه‌های مختلفی از پسروروز در جهان وجود دارند که موجب بروز علائمی متفاوت از این دو نژاد یا تنها یکی از چند علائم ذکر شده برای هر یک از این نژادها روی درختان مرکبات شده‌اند (Wallace, 1957; Velazquez et al., 2012). با وجود تفاوت در نوع علائم مابین دو نژاد A و B، تا کنون اختلافات سرولوژیکی یا مولکولی دقیقی بین آن‌ها ذکر نشده است (Navas-Castillo et al., 1991; Roistacher, 1993; Martín et al., 2005).

بیماری پسروروز مرکبات اولین بار توسط دکتر منوچهری در مرکبات شمال ایران مشاهده شد و در سال ۱۳۴۴ به عنوان بیماری خسارت زای نقش حلقوی مرکبات در شمال کشور

شدند. از هر نهال دو تکرار برای هر نمونه مورد بررسی در نظر گرفته شد. برای هر نهال محک، دو جوانه برگی از هر نمونه پیوند شد. نهال‌ها سرزنی شده و برچسب مشخصات برای هر نهال الصاق گردید. نهال‌ها در شرایط گلخانه نگهداری شدند. دمای گلخانه در شش ماهه اول سال ۲۵-۳۵ درجه سلسیوس و شش ماهه دوم ۲۰-۱۰ درجه سلسیوس بود. علایم برگی و نحوه رشد، هر سه ماه یکبار ارزیابی و ثبت شد و حضور آلودگی در نهال‌ها توسط آزمون پی سی آر تأیید شد.

بررسی خصوصیات ساختمانی پیکره CPsV با استفاده از آزمون

Immunosorbent electron microscopy (ISEM).

به منظور مشاهده پیکره ویروس پسروروز مرکبات، جدایه جدا شده از نارنگی انشو دیررس با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری مطابق دستورالعمل (Navas-Castillo and Moreno, 1995) مشاهده شد. برای این منظور از آنتی بادی تک همسانه ای ویروس (اهدائی توسط دکتر Pedro Moreno، از مرکز تحقیقات زراعی والنسیا کشور اسپانیا) با رقت ۲۰۰ برابر استفاده شد. شبکه‌های مسی ۳۰۰ مش پوشش داده شده با فرموار و کربن به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس روی ۱۰۰ میکرولیتر از IgG اختصاصی CPsV با رقت ۲۰۰ برابر غوطه ور شدند. پس از شستشوی شبکه‌های مسی توسط بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۶ مولار و خشک شدن، شبکه‌های مسی به مدت یک ساعت روی عصاره‌ی گیاهی قرار داده شدند. رنگ آمیزی منفی پیکره توسط محلول یورانیل استات ۲ درصد انجام پذیرفت. مشاهده پیکره‌ها و عکسبرداری از نمونه‌ها توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی گذاره مدل Philips EM-208 با ولتاژ ۸۰ کیلووات و بزرگنمایی ۸۰-۱۰۰ هزار برابر انجام شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی مرز با نسخه برداری معکوس (RT-PCR) استخراج RNA کل از نمونه‌های برگی با استفاده از کیت خالص سازی S10-10 (Dena Zist Asia Co., Iran) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای هر نمونه، به میزان

زرد رنگ در برگ‌های مسن و لکه‌های حلقوی زرد مشخص گردیدند. سپس با حرکت در دو قطر این باغات، درختان واجد علایم شناسایی و علامت گذاری شدند. از درختان واجد علایم فوق‌الذکر نمونه برداری انجام شد. در مجموع از برگ‌های جوان علایم دار نارنگی انشو دیررس با علایم متفاوت، تعداد ۱۱ نمونه برای تحقیق انتخاب شد. انتخاب نمونه‌ها به صورتی انجام پذیرفت که هر نمونه نماینده تعداد زیادی از نمونه‌های با علایم مشابه بود. هر نمونه در کیسه پلاستیکی جداگانه قرار داده شد و پس از ثبت مشخصات به آزمایشگاه منتقل گردید.

نمونه سازی جدایه‌ها: عصاره گیری از برگ‌های نمونه

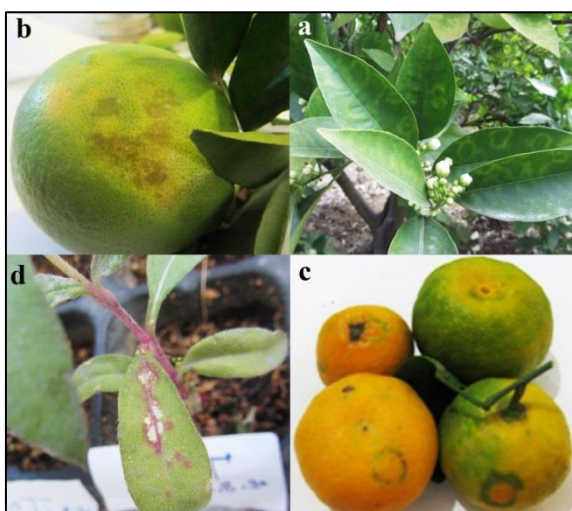
جمع آوری شده در بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با pH 7 به نسبت یک به دو (وزنی - حجمی) درهاون چینی سترون سرد انجام شد. عصاره به دست آمده با پودر کاربوراندوم و با استفاده از دستکش یک بار مصرف روی گیاه محک *Gomphrena globosa* L.، در مرحله چهار برگی مایه زنی شد. سپس برگ‌های مایه زنی شده به آرامی با آب مقطر شستشو شدند. در هر گیاه به ترتیب دو برگ با عصاره و دو برگ به عنوان شاهد با آب مقطر سترون در سه تکرار مایه زنی شد (Ahlawat and Pant, 2008; Sharma et al., 2009; Falaki et al., 2013). بروز علایم تا دو هفته پس از مایه زنی بررسی و اثبات آلودگی نمونه‌ها توسط آزمون پی سی آر انجام شد. همچنین مایه زنی برگشتی برای اثبات آلودگی و تکرار پذیری آزمون انجام شد. جهت آلوده سازی نهال‌های مرکبات، نهال‌های بذری دو تا سه ساله نارنگی انشو دیررس، نارنج محلی، سیتروملو رقم سونگل [*Citrus paradise* Macf. × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. (cv 'Swingle')] [*Citrus trifoliata* (L.) Raf. (cv 'Troyer') × *P. trifoliata* (cv 'Troyer')] و به منظور بررسی بیشتر گیاهچه‌های دو ساله مرکبات شامل نارنگی تانجلو رقم مینولا [*C. paradise* (cv. 'Duncan') × *Citrus reticulata* (cv 'Dancy')]، نارنگی رقم تانگور ارتانیکو، نارنگی رقم کلمانین و گریپ فروت رقم دانکن روی پایه نارنج به عنوان گیاه محک استفاده

ویروس طراحی شده بود. برنامه حرارتی برای تکثیر با هر کدام از آغازگرهای اختصاصی شامل ۹۳ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه برای واسرشت سازی اولیه و سپس ۳۵ چرخه حرارتی (۹۳ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه برای واسرشت سازی، ۵۱ درجه به مدت ۳۰ ثانیه برای اتصال و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه برای تکثیر) و در پایان ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه برای تکثیر نهایی بود.

تجزیه تبارزایی

برای این پژوهش قطعه‌ای به طول ۲۹۸ نوکلئوتید از ژن رمز کننده پروتئین پوششی ویروس واقع روی RNA-3 با آغازگر اختصاصی (CPV, FR) تکثیر شد. توالی جدایه‌ها براساس رقم مرکبات انتخاب شدند. قطعات تکثیر شده توسط پی سی آر با استفاده از کیت GF-1 Gel DNA Recovery (سیناکلون، ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده از ژل استخراج و خالص شد و با استفاده از سرویس تجاری (توپازژن کاوش)، در دو جهت و به روش سنجر تعیین توالی مستقیم شدند. سپس توالی‌های تعیین شده با استفاده از ابزار جستجوی Blast (Basic Local Alignment Search Tool) موجود در پایگاه اطلاعاتی (NCBI National Center for Biotechnology Information) با یکدیگر و با توالی‌های اسید آمینه‌ای و نوکلئوتیدی نظیر ثبت شده در بانک ژن (GenBank) مقایسه شدند. هم ردیف سازی چندگانه توالی مورد نظر با جدایه‌های ویروس CPsV موجود در بانک ژن که حاوی منطقه مورد نظر بودند (جدول ۲) توسط نرم افزارهای GenDoc و Clustal X مطابق روش استاندارد انجام شد. Altschul *et al.*, (1997). نمودار درختی این جدایه‌ها به روش Maximum likelihood برنامۀ MEGA7 ترسیم شد. تعداد بوت استرپ‌های استفاده شده برای تجزیه و تحلیل هزار بود. کلیه شاخه‌ها با ارزش بوت استرپ پایین‌تر از ۷۰ درصد ادغام شدند. ارزش‌های ریشه‌ای کمتر از ۷۰ درصد از گره‌های درخت تبارزایی حذف شدند. در این تجزیه *Tulip mild mottle mosaic virus* (TMMMV) به‌عنوان برون گروه (out group) مورد استفاده قرار گرفت.

۰/۵ گرم برگ پودر شده با ازت مایع در تیوب ۲ml سرد با بافر استخراج به‌میزان یک میلی‌لیتر مخلوط شد. پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس، بخش رونشین به تیوب جدید منتقل شد و ۲۰۰ میکرولیتر کلرفرم به آن افزوده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از انتقال رونشین به تیوب استریل به‌میزان نیمی از حجم آن ایزوپروپانول و نیمی از حجم بافر استخراج ۲ اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه نگهداری در شرایط آزمایشگاهی، سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سلسیوس با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سپس رسوب RNA حاصله پس از شستشو با اتانول ۷۰ درصد در ۵۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر سترون حل شد. ساخت DNA مکمل (cDNA synthesis) در لوله‌های ۲۰۰ میکرولیتری سترون و با استفاده از پنج میکرولیتر RNA خالص کل، ۴۰ پیکومول آغازگر معکوس (C-primer) و کیت Maxime™ RT-PCR PreMix Kit (iNtRON, Korea) انجام شد. پس از افزودن آب دیونیزه سترون برای رساندن حجم کل محلول واکنش به ۵۰ میکرولیتر، لوله‌ها به مدت سه دقیقه در ۹۴ درجه سلسیوس قرار داده شده (Denaturation) و بلافاصله به‌روی یخ منتقل شدند. پس از آن به مدت یک ساعت در دمای ۴۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. واکنش زنجیره‌ای پلی مرز با استفاده از پنج میکرولیتر محلول حاوی DNA مکمل (cDNA) به دست آمده در مرحله قبل و با استفاده از ۲۰ پیکومول از هر یک از آغازگرهای اختصاصی ویروس پس‌وروز مرکبات شامل U:5'-GCTTCCTGGAAAAGCTGATG-3', D:5'-TCTGTTTTTGTCAACACTCC-3' (Barthe *et al.*, 1998) و همچنین آغازگر طراحی شده در این تحقیق با توالی CPV-F: (5- GGAGTTGCACCAACAGCAG-3) CPV-R: (5-TGATCAACTGAAGCTCAAGGAG-3) در سه تکرار به‌وسیله دستگاه ترموسایکلر (MJ Mini 48-Well Personal thermal cyclor, Bio-Rad, USA) انجام شد. آغازگرهای مذکور برای تکثیر بخشی از منطقه ژنتیکی کد کننده پروتئین پوششی



شکل ۱- علائم آلودگی به ویروس پسروروز در قسمت‌های مختلف میوه در نارنگی انشودیررس (*Citrus unshiu* (Yu.Tanaka ex Swingle) در شرق استان مازندران. a) لکه‌های کلروز حلقوی بر روی برگ، b) توده نکروز شده بافت پوست میوه با هاله کلروزه در اطراف، c) لکه حلقوی روی پوست میوه و d) لکه‌های موضعی نکروزه روی برگ گیاه محک *Gomphrena globosa* مایه زنی شده با جدایه ویروس مربوط به شرق مازندران، دو هفته پس از مایه زنی.

Fig 1. Symptoms of *Citrus psorosis virus* infection in different parts of the *Citrus unshiu* (Yu.Tanaka ex Swingle) plants in east of Mazandaran province. a) chlorotic ringspot on leaves, b) necrotic tissue on the skin of the fruit with chlorotic halo in the margin c) ring spot on the skin of the fruit and d) chlorotic local lesions on the leaves of the *Gomphrena globosa* indicator plant inoculated with the viral isolate from the east of the Mazandaran province, two weeks after inoculation.

نهال‌های مرکبات براساس نوع علائم ایجاد شده روی نهال‌های بذری و رقم‌های پیوندی مرکبات مایه زنی شده از طریق پیوند پوست در دو گروه بیولوژیکی قرار گرفتند (جدول ۱). گروه اول بیولوژیکی که شامل رقم‌های بذری نارنج محلی، سیتروملو رقم سوینگل و سترینج رقم ترویر بود، لکه‌های زرد روی برگ ایجاد کرد (شکل ۲) اما گروه دوم نکروز لبه‌های برگ و خشکیدگی را در ارقام پیوندی نارنگی تانجلو رقم مینولا، نارنگی رقم تانگور ارتانیکو، نارنگی رقم کلماتین، گریپ فروت رقم دانکن قابل مشاهده بود (شکل ۲) (جدول ۱). همچنین نمونه سازی پیوندک‌های آلوده جدا شده از درختان نارنگی انشو در باغ روی پایه‌های انشو در گلخانه موجب آلوده شدن پایه‌ها با علائم مشابه در نمونه‌های باغی شد. حداقل دو

نتایج و بحث

نمونه برداری: در بازدیدهای به عمل آمده درختان نارنگی انشو دیررس با علائم پوسته شدن مشکوک تنه، علائم حلقوی کلروزه روی برگ که در برگ‌های مسن خفیف تر بود، نقوش حلقوی روی پوست میوه که بیشتر در قسمت گلگاه مشاهده شد و علائم سطحی و فاقد هرگونه صمغ یا ترشحات دیگر دیده شد (شکل ۱). همچنین، روی درختان مورد نظر طی بازدیدهای فصلی و ماهیانه، تفاوت‌هایی در بروز و شدت و ضعف علائم در زمان‌های مختلف مشاهده شد. به این ترتیب که علائم برگ‌گی در فصل بهار به خوبی قابل مشاهده بود (شکل ۱)، اما بتدریج با گرم تر شدن هوا این علائم محو شدند و در فصل تابستان اصلاً قابل مشاهده نبودند و درختان کاملاً سالم به نظر می‌رسیدند. با خنک تر شدن هوا، علائم دوباره پدیدار می‌شد و در آذرماه به خوبی قابل مشاهده بودند. علائم روی میوه نیز از آغاز رنگدهی میوه شروع به ظاهر شدن نموده و سریعاً سبب ریزش میوه‌ها می‌شد. کم شدن شدت علائم ویروس پسروروز مرکبات با گرم شدن هوا در تحقیقات گذشته به اثبات رسیده است. براساس تحقیقات Velázquez و همکاران دمای پایین برای بروز علائم ویروس پسروروز مطلوب تر است و علائم در برگ‌های جوان به صورت شدید بروز می‌کند. همچنین در گذشته اثبات شده است که غلظت ویروس استخراج شده از برگ‌های جوان در فصول گرم و سرد سال متفاوت می‌باشد (Velázquez *et al.*, 2010; Achachi *et al.*, 2014).

نمونه سازی: مایه زنی عصاره برگ رقم‌های مورد بررسی روی برگ *Gomphrena globosa* تا دو هفته پس از مایه زنی لکه‌های موضعی نکروتیک را موجب شد و آلودگی سیستمیک را ایجاد نمود (شکل ۱d) آلوده بودن آن توسط پس سی آر تأیید شد (شکل ۳). علائم سیستمیک گل دکمه‌ای پس از مایه کوبی با CPsV قبلاً گزارش شده است (Alioto *et al.*, 1999; Falaki *et al.*, 2013; Achachi *et al.*, 2014).



شکل ۲- علائم مربوط به آلودگی نهال‌های مرکبات مختلف نموده سازی شده با جدایه CPsV جدا شده از نارنگی انشو دیررس *Citrus unshiu* (Yu.Tanaka ex Swingle) در شرق استان مازندران (a) کلروز بین رگبرگ در برگ نارنج (b) لکه‌های زرد روی برگ سیتروملو، (c, d) نکروز لبه‌های برگ‌های مربوط به مرکبات کلمانتین و تانگور

Fig 2. Symptoms for CPV infection in different citron seedlings indexing with the CPsV isolated from the *Citrus unshiu* (Yu.Tanaka ex Swingle) plant in east of the Mazandaran province a) interveinal chlorosis on Sour orange plant leaf b) yellow spots on the leaf of Citrumelo, c and d) marginal leaf necrosis on the leaves of the Clementine mandarin and Tangor mandarin citrons, respectively.

واکنش زنجیره‌ای پلی مرز با نسخه برداری معکوس (RT-PCR): نمونه‌های جمع آوری شده از درختان نارنگی انشو دیررس واجد علائم همچنین پایه‌های نموده سازی شده و گیاه علفی محک مایه زنی شده در این تحقیق با جفت آغازگرهای اختصاصی CPsV که در این تحقیق طراحی شده بودند واکنش مثبت نشان دادند و قطعه‌ای مورد انتظار به طول حدود ۶۰۰bp در ۱۱ نمونه آلوده توسط آنها تکثیر شد در حالی که نمونه‌های مربوط به درختان بدون علائم با آغازگرهای مذکور واکنش نشان ندادند (شکل ۳). جفت آغازگرهای U و D با هیچکدام از نمونه‌ها واکنش ندادند. آغازگرهای اختصاصی U,D برای تکثیر بخشی از ژن رمز کننده پروتئین پوششی CPsV طراحی شده است و کارایی آن در تحقیقات گذشته مورد تأیید قرار گرفته بود (Barthe *et al.*, 1998). با این وجود آغازگرهای طراحی شده در این پژوهش توان تفکیک تیپ‌های ویروس را نداشت و تا کنون محققین قادر به طراحی آغازگرهای تفکیک کننده تیپ‌های آلوده کننده ویروس نشده‌اند. علائم ظاهر شده در نهال‌های مایه زنی

عامل ویروسی را با بیماری پسروروز مرتبط دانسته‌اند. نوع اول آن یعنی پسروروز A که پسروروز حقیقی یا کلاسیک نامیده شده است و براساس علائم رگه رگه‌ای شدن روی برگ‌ها مشخص می‌گردد و انتقال مکانیکی نمی‌یابد. دومین نوع، پسروروز B که لکه حلقوی نیز نامیده شده، انتقال مکانیکی می‌یابد و می‌توان براساس علائم ایجاد شده روی گیاهان علفی آن را شناسایی نمود. اختلاف اصلی بین تیپ‌های A و B ویروس پسروروز مرکبات، بروز علائم روی برگ‌های مسن و برخی مواقع روی میوه‌ها و شدیدتر بودن تیپ B در پوسته پوسته نمودن تنه نسبت به تیپ A بوده است. براساس نتایجی که تیمر در مایه کوبی بیولوژیکی به دست آورد علائم خالک (Flecking) مربوط به تیپ B ویروس پسروروز مرکبات می‌باشد. همچنین در نهال‌های مایه کوبی شده نقاط سبزرده (Chlorotic)، لکه‌های سوخته و نقش حلقوی مشاهده شد. برگ‌های دفرمه شده نیز در بعضی از کولتیوارها مشاهده شده است که آن را با ویروس پسروروز مرکبات مرتبط دانسته‌اند (Timmer, 1973).

با توجه به نوع علائم مشاهده شده در باغ و همچنین علائم به دست آمده از گیاهان مایه کوبی شده برای جدایه‌های مورد مطالعه در این پژوهش و شدت آنها و مقایسه آن با علائم گزارش شده می‌توان نتیجه گرفت که تیپ B ویروس CPsV در منطقه مورد نمونه برداری در پایه‌های نارنگی انشو دیررس وجود دارد (Velázquez *et al.*, 2012; Falaki *et al.*, 2013; Achachi *et al.*, 2014).

جدول ۱- نموده سازی جدایه ویروس پسروروز مرکبات، به دست آمده از

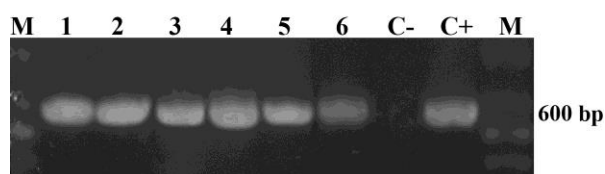
درختان نارنگی انشو دیررس شرق مازندران

Table 1. Indexing of Citrus psorosis virus isolate, obtained from Satsuma Mandarin trees in East of Mazandaran

Host	Biological group	Symptoms
Sour orange	1	cl
Citrumelo Swingle	1	cl
Troyer citrange	1	cl
Tangelo mandarin	2	tns
Tangor mandarin	2	tns
Clementine mandarin	2	tns
Duncan grapefruit	2	tns

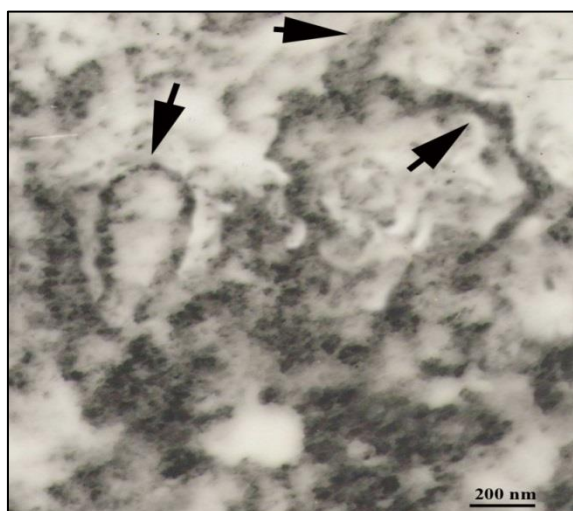
cl: لکه های زرد، tns: نکروز لبه های برگ

cl: Chlorotic lesions, tns: tip necrosis of leaves



شکل ۳- محصول پی سی آر حاصل از تکثیر بخشی از ژن پروتئین پوششی CPsV باندازه ۶۰۰ جفت باز جدا شده از ارقام مختلف مرکبات آلوده شامل (۱) نارنگی انشو دیررس، (۲، ۳، ۴، ۵) نارنج، سیتروملو، کلمناتین، تانگور و (۶) نمونه گیاه محک *Gomphrena globosa* مایه کوبی شده با CPsV، C-: شاهد سالم عاری از آلودگی، گرفته شده از نهال نارنگی انشو سالم رشد یافته در گلخانه تحقیقاتی، M: مارکر وزن مولکولی با فواصل ۱۰۰ جفت باز (شرکت فرمنتاس، آلمان)

Fig 3. An amplicon with a size about 600 bp obtained for a section of the coat protein gene of CPV from different infected citrons including 1) *Citrus unshiu*; 2,3,4 and 5) sour orange, citrumelo, clementine mandarin, tangor mandarin and 6) CPsV inoculated *Gomphrena globosa*, indicator plant. C-: healthy virus free control obtained from the healthy mandarin orange grown in the research greenhouse. M. 100bp molecular weight marker (Fermentas, Germany).



شکل ۴- پیکره های رشته‌ای (L شکل) CPsV جدا شده از عصاره خام برگ نارنگی انشو دیررس آلوده به ویروس در استان مازندران. پیکره ویروس ها توسط تکنیک ISEM برای عکاسی توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره شرکت فیلیپ مدل EM-208 آماده شدند. مکان حضور پیکره ها در تصویر با پیکان مشخص شده است. (Bar. 200nm).

Fig 4. Filamentous particle of CPsV (L-form) isolated from the crude unshiu mandarin orange extract infected with CPV in Mazandaran province. Viral particles prepared by the ISEM technique for the imaging by the Philip transmission electron microscope model EM-208. The location of the particles is indicated by an arrow (Bar. 200nm).

شده با علائم آلودگی گیاهان مادری یکی بوده که نشان دهنده آلودگی آنها به این ویروس می‌باشد (Achachi *et al.*, 2014).

بررسی با میکروسکوپ الکترونی (ISEM): با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری و تکنیک (ISEM) پیکره‌های رشته‌ای L شکل ویروس در عصاره خام برگ مربوط به نمونه‌های نارنگی انشو دیررس آلوده مشاهده و تصویربرداری شد. از این طریق پیکره‌های رشته‌ای ویروس CPsV با قطری حدود ۳ نانومتر مشابه ابعاد ذکر شده توسط محققان پیشین (García *et al.*, 1994; Navas-Castillo and Moreno, 1995; Milne *et al.*, 1996) در عصاره‌ی نمونه‌های آلوده مشاهده شد (شکل شماره ۴). میلن و همکاران در تحقیق خود با استفاده از تکنیک ISEM پیکره‌های رشته‌ای ویروس را با دو حلقه بینابینی در طول پیکره بلند نازک در عصاره مرکبات مشخص ساختند و آنرا فرم L ویروس نامیده بودند (Milne *et al.*, 1996). حلقه‌های بینابینی در پیکره‌های رشته ویروس پسروروز که در این پژوهش مورد ردیابی قرار گرفت نیز مشاهده شدند (حلقه‌ها با پیکان در تصویر شماره ۴ مشخص شده‌اند). در پژوهش‌های پیشین از روش ISEM توسط Loconsole و همکاران برای عکسبرداری از پیکره‌های این ویروس از عصاره گیاه محک آلوده شده *Chenopodium quinoa* استفاده شده بود (Loconsole *et al.*, 2009).

تعیین توالی قطعات تکثیر یافته: از میان ۱۱ نمونه‌ای که توسط PCR آلودگی آنها با ویروس پسروروز مرکبات تأیید شده بود تعداد ۴ جدایه با نام‌های V5، Ph9 و No2، Kho که از گونه‌های مختلف مرکبات شامل نارنگی، نارنج و ارقام مختلف پرتقال جدا شده بودند تعیین توالی شده و با استفاده از ابزار جستجوی BLAST با توالی‌های نوکلئوتیدی ثبت شده در بانک ژن مقایسه شد. پس از بررسی، توالی‌ها با رتس شماره‌های MK978768-71 در بانک جهانی ژن (NCBI) ثبت شدند. نتایج آنالیز BLAST و همچنین هم‌ردیفی سازی توالی‌های مورد بررسی، مشابهت ۹۷ درصد را با توالی نوکلئوتیدی پوشش پروتئینی (CP) ویروس پسروروز مرکبات مربوط به توالی مرجع (رتس شماره AF036926) (Barthe *et al.*, 1998) نشان داد. شباهت زیاد این دو توالی می‌تواند نشان دهنده

مشاهده شد و جدایه‌های سوریه (۹۱ درصد)، تونس (۹۳ درصد) و مراکش (۹۵ درصد) از لحاظ کمترین میزان مشابهت نوکلئوتیدی در مقام‌های بعدی قرار داشتند. از نظر میزان مشابهت در توالی اسید آمینه‌ای، کمترین میزان مشابهت بین جدایه‌های کشورهای مراکش (۸۶ درصد)، سوریه (۹۰ درصد) و تونس (۹۲ درصد) با جدایه‌های ایرانی وجود داشت.

در درخت تبارزایی حاصل از تجزیه کلاستر توالی‌ها به روش Maximum Likelihood، جدایه‌های مورد مطالعه از مناطق مختلف دنیا در ۲ گروه اصلی قرار گرفتند و گروه ۱ خود به ۳ زیرگروه دسته بندی شد. در زیرگروه یک جدایه‌های قاره‌های آسیا (کشور سوریه)، اروپا (کشورهای اسپانیا و ایتالیا) و آمریکا (کشورهای مکزیک و آمریکا)، در زیرگروه ۲

یکی بودن منشاء آن‌ها باشد. همچنین کمترین میزان مشابهت نوکلئوتیدی بین جدایه‌های ایرانی و جدایه‌های آمریکای لاتین (مکزیک و آرژانتین) و آفریقا دیده شد.

تجزیه تبارزایی: توالی مربوط به جدایه‌های ایرانی CPsV با رس شماره‌های MK978768-71 در بانک ژن ثبت شد (جدول ۲). براساس نتایج آنالیز میزان مشابهت توالی‌های نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای، جدایه‌های ایرانی به میزان ۹۸ درصد (جدایه Pn9) تا ۱۰۰ درصد با یکدیگر از نظر نوکلئوتیدی و ۱۰۰ درصد از نظر توالی اسید آمینه‌ای مشابه بودند (جدول ۲). همچنین از نظر میزان مشابهت‌ها بین جدایه‌های ایرانی با سایر جدایه‌های نظیر موجود در بانک ژن کمترین میزان شباهت نوکلئوتیدی بین جدایه آرژانتینی و جدایه‌های ایرانی به میزان ۸۶-۸۵ درصد

جدول ۲- شماره دسترسی، منشاء (کشور) و میزبان‌های جدایه‌های مختلف CPV موجود در بانک ژن و مورد استفاده برای تجزیه‌های تبارزایی.

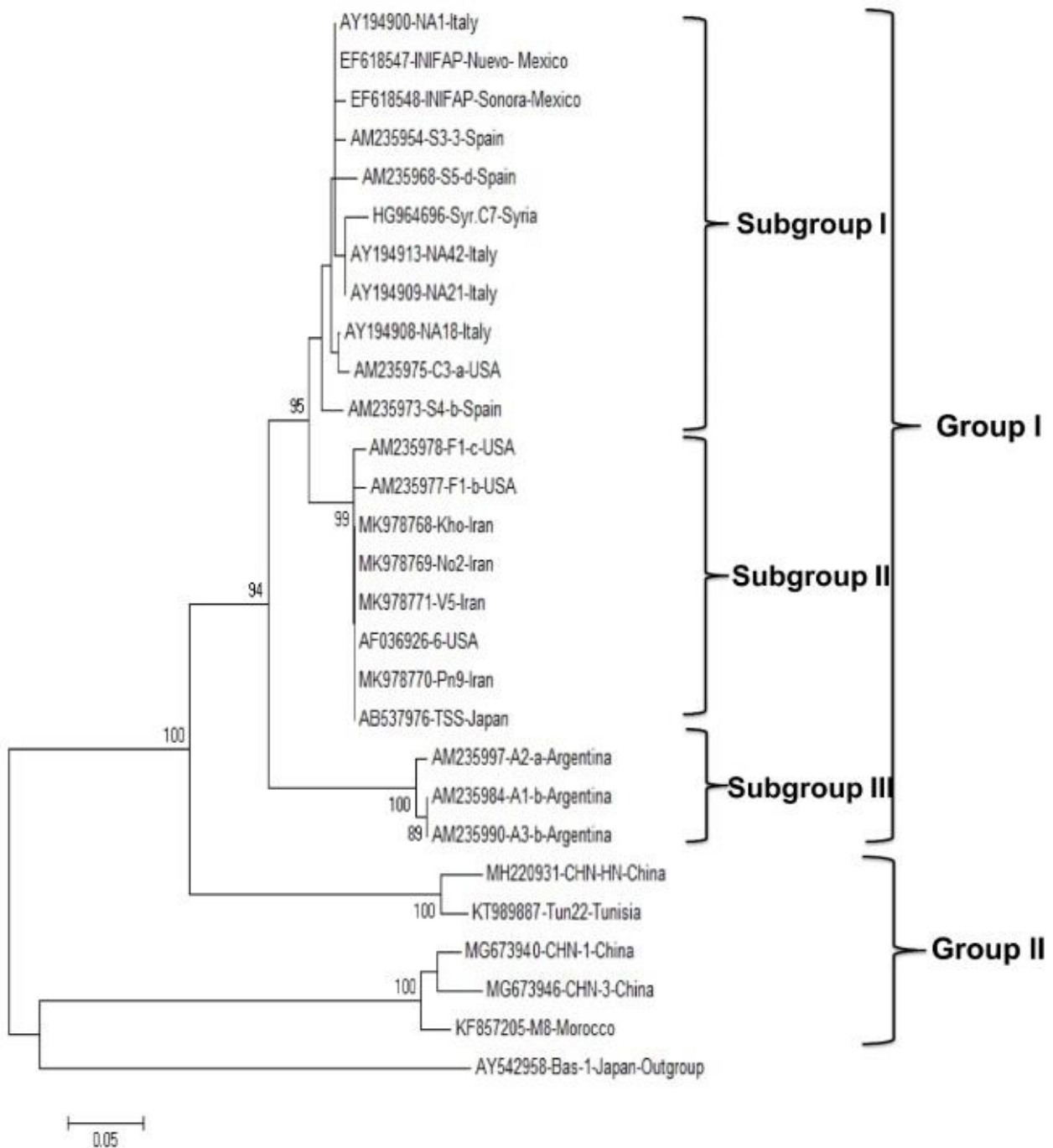
Table 2. Accession numbers, region and hosts of different strains of CPV in GenBank for phylogenetic analysis.

Accession no.	Isolate	Origin	Host	Nucleotide (nt) and amino acid (aa) sequences identity with reference * (%)	
				nt	aa
MK978768	KhO	Iran	<i>C. unshiu</i>	100	100
MK978769	No2	Iran	<i>C. unshiu</i>	99	100
MK978770	Pn9	Iran	<i>C. unshiu</i>	98	100
MK978771	V5	Iran	<i>C. unshiu</i>	99	100
AM235968	S5-d	Spain	<i>Citrus sinensis</i>	93	95
AM235973	S4-b	Spain	<i>Citrus sinensis</i>	93	95
AM235954	S3-3	Spain	<i>Citrus sinensis</i>	92	95
AM235984	A1-b	Argentina	<i>Citrus sinensis</i>	85	99
AM235997	A2-a	Argentina	<i>Citrus sinensis</i>	85	99
AM235990	A3-b	Argentina	<i>Citrus sinensis</i>	86	99
AF036926	6	USA	<i>Citrus sinensis</i>	100	100
AM235975	C3-a	USA	<i>Citrus sinensis</i>	97	100
AM235978	F1-c	USA	<i>Citrus sinensis</i>	99	100
AM235977	CRSV-6 (F1-b)	USA	<i>Citrus sinensis</i>	99	100
AB537976	TSS	Japan	Citrus hybrid cultivar	98	100
MG673946	CHN-3	China	Citrus sp	98	100
MH220931	CHN-HN	China	Citrus sp	93	100
HG964696	Syr.C7	Syria	Navel orange	91	90
AY194908	NA18	Italy	Monreale clementine	94	100
AY194900	NA1	Italy	Sour orange	94	100
AY194913	NA42	Italy	Navel orange	94	100
MG673940	CHN-1	China	Citrus sp	94	100
EF618547	INIFAP-Nuevo	Mexico	Mars Orange	94	100
AY194909	NA21	Italy	Monreale clementine	94	100
KT989887	Tun22	Tunisia	Maltaise ovale	93	92
KF857205	M8	Morocco	Sweet orange	95	86
EF618548	INIFAP-Sonora	Mexico	Valencia orange	93	100
AY542958*	Bas-1	Japan	Tulipa		

* : Tulip mild mottle mosaic virus, Ophiovirus (Acc.No. AY542958) choosed as an outgroup

جهان شده است. بر مبنی آنالیزهای مولکولی مربوط به توالی نوکلئوتیدی قطعه RNA سوم از ژنوم ویروس، آچاچی و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که تکامل جدایه‌های مراکشی ویروس مستقل از سایر جدایه‌های جهانی صورت پذیرفته است (Achachi et al., 2015). در درخت تبارزائی مشخص شد که جدایه‌های ایرانی با فاصله کم در کنار تک جدایه کشور ژاپن قرار گرفته اند که احتمالاً به دلیل ارتباط نزدیک مولکولی جدایه‌های ایرانی موجود در پایه انشو در استان مازندران با جدایه‌های کشور ژاپن باشد. حضور جدایه‌هایی از قاره آمریکا در هر دو گروه اصلی درخت تبارزائی می‌تواند بیانگر تنوع ژنتیکی بالا و همچنین سابقه حضور دیرینه ویروس در این قاره باشد. در این بررسی نتایج توالی یابی و تبارزائی ژنتیکی بیانگر عدم ارتباط بین تنوع ژنتیکی و تنوع ارقام و گونه‌های مرکبات میزبان بود. از طرفی نتایج آزمون‌های بیولوژیکی نشان داد جدایه‌های مختلف ویروس که از ارقام متفاوت مرکبات جدا شده اند بر مبنی نوع علائمی که در پایه‌های محک نموده سازی شده اند متفاوت می‌باشند. از آنجائی که آغازگرهای مذکور برای تکثیر بخشی از منطقه ژنتیکی کد کننده پروتئین پوششی ویروس طراحی شده بود. این احتمال وجود دارد که منطقه ژنتیکی کد کننده پروتئین پوششی جدایه‌های ویروس پسروروز مرکبات بررسی شده در این پژوهش در بیماری‌زایی آنها تأثیر نداشته باشد. با این وجود جهت اثبات ورود نژادهای موجود در منطقه از کشور ژاپن می‌بایست در آینده تحقیق مولکولی دقیق‌تری انجام پذیرد.

جدایه‌های کشورهای آمریکا، ژاپن و ایران و در زیر گروه ۳ فقط جدایه‌های کشور آرژانتین قرار گرفتند (شکل ۵). جدایه‌ی ایران در کنار یکدیگر و بدون فاصله نسبت به جدایه‌هایی از کشور آمریکا و ژاپن قرار گرفتند. در گروه ۲، جدایه‌هایی از کشور چین در کنار جدایه‌هایی از قاره آفریقا (کشورهای تونس و مراکش) با فاصله از یکدیگر و سایر جدایه‌های مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج تحقیقات گذشته نیز نشان داده بود که جدایه‌های جهانی CPsV در دو گروه قرار می‌گیرند و جدایه‌های کشور آرژانتین در گروه مستقل از سایر جدایه‌های جهانی قرار می‌گیرند (Martín et al., 2006). آنالیز گروه بندی‌های تبارزائی حکایت از ارتباط بین تنوع جغرافیایی و گروه بندی‌های موجود داشت. در بررسی فیلوژنتیکی جدایه‌های CPsV در کشور ایتالیا مشخص شده بود که بین تنوع جغرافیایی و گروه بندی فیلوژنتیکی بر مبنی توالی نوکلئوتیدی منطقه ژنتیکی رمز کننده پروتئین پوششی ویروس ارتباط معنی‌داری وجود دارد (Alioto et al., 2003). همچنین نتایج تحقیقات گذشته مشخص ساخت که به دلیل نوترکیبی بین قطعات ژنومی ویروس و همچنین فشار انتخاب منفی موجود روی ژن رمز کننده پروتئین پوششی CPsV به‌عنوان یک ویروس دارای ژنوم منفی، تغییرات اسید آمینه‌ای کمی در پروتئین‌های آن در مقایسه با سایر ویروس‌های دارای ژنوم مثبت وجود دارد (Achachi et al., 2014). متمایز قرار گرفتن جدایه‌های چینی و آفریقایی ویروس در گروه دوم در درخت تبارزائی می‌تواند به دلیل تکامل مستقل و فرار ژن بین جدایه‌های چینی و آفریقایی ویروس باشد که موجب یکنواختی ژنومی آنها نسبت به سایر جدایه‌های موجود در



شکل ۵- درخت تبارزایی حاصل از بررسی توالی‌های نوکلئوتیدی منطقه رمز کننده نوکلئوکپسید پروتئین CPsV که در آن ۴ جدایه منتخب ایرانی با ۲۳ جدایه از جهان که در بانک ژن NCBI توالی کامل آنها ثبت شده بود بررسی شد. فاصله ژنتیکی ۰/۰۵، خط برش ۸۰ درصد، ارزش‌های کمتر از ۵۰ درصد از روی گره‌ها حذف شدند. ویروس *Tulip mild mottle mosaic virus* (TMMMV) (AY542958) به عنوان outgroup انتخاب گردید.

Fig 5. Phylogenetic tree constructed using nucleotide sequences of CPsV nucleocapsid protein coding region of 4 selected Iranian isolates in comparison to 23 related CPV isolates with complete nucleotide sequences in NCBI. Genetic distance and cut off are 0.05 and 80% respectively. Bootstrap values less than 50% are omitted from the phylogroups. *Tulip mild mottle mosaic virus* (TMMMV) (Accession No. AY542958) selected as an out-group.

References

- ACHACHI, A., E. A. BARKA, and M. IBRIZ, 2014. Recent advances in *Citrus psorosis virus*. *Virus Disease*, 25 (3): 261-276.
- ACHACHI, A., M. H. JIJAKLI, E. E. FAHIME, A. SOULAYMANI, and M. IBRIZ, 2015. Detection of *Citrus psorosis virus* using an improved one-step RT-PCR. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 40 (1): 7-13.
- AHLAWAT, Y. S., and R. P. PANT, 2008. *Indian citrus ringspot virus*. Characterization, diagnosis & management of plant viruses. Volume 2, horticultural crops, pp. 97-107.
- ALIOTO, D., M. GANGEMI, S. DEAGLIO, S. SPOSATO, E. LOISONI, and R. G. MILNE, 1999. Improved detection of *Citrus psorosis virus* using polyclonal and monoclonal antibodies. *Plant Pathology*, 48: 735-741.
- ALIOTO, D., M. MALFITANO, A. TROISI, S. PELUSO, R.G. MARTIN, J. MILNE, P.GURRI, and P. MORENO, 2003. Variability of the coat protein gene of *Citrus psorosis virus* in Campania, southern Italy. *Archives of Virology*, 148: 2155-66.
- ALTSCHUL, S. F., T. L. MADDEN, A. A. SCHAFFER, J. ZHANG, Z. ZHANG, W. MILLER, and D. J. LIPMAN, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389-3402.
- ANONYMOUS, 2017. Production and yield per hectare of mandarin crop by province. *Agricultural Statistics of the Crop Year 2014-2015*. Department of Statistics and Information of Ministry of Agriculture Jihad, 154 pages.
- BARTHE, G.A., T.L. TCECCARDI, K.L. MANJUNATH, and K.S. DERRICK, 1998. *Citrus psorosis virus*: nucleotide sequencing of the coat protein gene and detection by hybridization and RT-PCR. *Journal of General Virology*, 79:1531-1537.
- DANOS, E. 1989. Development of psorosis-citrus pathosystems in controlled-environment chambers, *Rivista di Agricoltura Subtropicale e Tropicale*. No. 83: 275-282.
- DERRICK, K. S., R. H. BRLANSKY, J. V. DA GRACA, R. F. LEE, L. W. TIMMER, and T. K. NGUYEN, 1988. Partial characterization of a virus associated with citrus ringspot. *Phytopathology*, 78: 1298-1301.
- DURAN-VILA, N., PINA, J. A. and NAVARRO, L. 1993. Improved indexing of citrus viroids. 12th. Conf. IOCV. 202-211.
- GARCÍA, M. L., E. DAL. BÓ, O. GRAU, and R. G. MILNE, 1994. The closely related *citrus ringspot* and *citrus psorosis viruses* have particles of novel filamentous morphology. *General Virology Journal*, 75: 3585-3590.
- FALAKI, F., S. V. ALAVI, and F. RAKHSHANDEHROO. 2013. *Citrus psorosis virus*, causal agent of ring pattern disorder in Thomson Navel trees in east of Mazandaran. *Iranian Journal of Applied Entomology and Phytopathology*, 80 (2): 161-172. (In Persian)
- FAO STAT, 2016. National Agricultural statistics Service, USDA. <http://www.faostat.fao.org>.
- FAWCETT, H.S. 1948. Psorosis (scaly bark) in the Rio Grande Valley. *Texas Fmg & Citricult.* 25(1): 15-16.
- FOTOHI-GHAZVINI, R. 1999. *Citrus Growing in Iran*. 1th Ed, Guilan University Press. Iran. 150pp
- FRISON, E. A. and M. M. TAHER, 1991. Technical Guidelines for the Safe Movement of Citrus Germplasm, FAO/IBPGR, Rome, Italy, 45 pp.
- FUJIII H., OHTA S., NONAKA K., K ATAYOSE Y, MATSUMOTO T., ENDO T, YOSHIOKA T, OMURA M and T. SHIMADA. 2016. Parental diagnosis of satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) revealed by nuclear and cytoplasmic markers. *Breeding science*, 66 (5): 683-691.
- GOLEIN, B and B. ADOLI, 2011. *Citrus (Planting)*, Novin Pouya Press, 160 p. (in Persian).
- HABASHI, M. 2004. Citrus virus diseases in north of Iran. *Journal of Plant Diseases*, 2: 127-133.
- LOCONSOLE, G., M. T. FATONE, and V. SAVINO, 2009. Specific digoxigenin-labelled riboprobes for detection of *Citrus psorosis virus* and *Citrus*

- variegation virus* by molecular hybridization, Plant Pathology Journal, 91 (2): 311-319.
- MARTÍN, S., M. L. GARCIA, A. TROISI, L. RUBIO, G. LEGARRETA, O. GRAU, D. ALIOTO, P. MORENO, and J. GUERRI, 2006. Genetic variation of populations of Citrus psorosis virus, Journal of General Virology. 87: 3097-3102.
- MARTÍN, S., C. LOPEZ, M. L. GARCIA, G. NAUMONGANIA, O. GRAU, R. FLORES, P. MORENO and J. GUERRI, 2005. The complete nucleotide sequence of Spanish isolate of *Citrus psoriasis virus*: Comparative analysis with other Polioviruses, Archives of Virology. 150: 167-176.
- MARTÍN, S., D. ALIOTO, R. G. MILNE, S. M. GARNSEY, M. L. GARCIA, O. GRAU, J. GUERRI and P. MORENO, 2004. Detection of *Citrus psorosis virus* by ELISA, molecular hybridization, RT-PCR and immunosorbent electron microscopy and its association with citrus psoriasis disease, European Journal of Plant Pathology. 110: 747-757.
- MILNE, R. G., K. DJELOUAH, M. L. GARCIA, E. DALBO and O. GRAU. 1996. Structure of Citrus Ringspot-Psorosis-Associated Virus Particles: Implications for Diagnosis and Taxonomy. 13th Conf. IOCV. 189-197.
- MILNE, R. G. 2005. Genus Poliovirus, Proc. 18th Conf. IOCV. p. 673-679.
- NASROLLAHNEZHAD, S. and A. EBADI, 2011. Serological and molecular detection of *Citrus psorosis virus* in Goleta province, New Genetics. 1: 65-74.
- NAVAS-CASTILLO, J. N, and P. MORENO. 1995. Filamentous flexuous particles and serologically related proteins of variable size associated with citrus psorosis and ringspot diseases. European Journal of Plant Pathology, 1(01): 343-348.
- NAVAS-CASTILLO, J. N, P. MORENO, J. F. BALLESTEROLMOS, J. A. PINA, and A. HERMOSO DE MENDOZA, 1991. Detection of a necrotic strain of *Citrus ringspot virus* in Star Ruby grapefruit in Spain, Proc. 11th Conf. IOCV. p. 345-351.
- ROISTACHER, C. N. 1991. Graft -Transmissible Diseases of Citrus, FAO: Rome. 286 pp.
- ROISTACHER, C. N. 1993. Psorosis-Areview. Proc. 12th Conf. IOCV. 139-154.
- SHARMA, S., B. SINGH, A. NAGPAL, G. S. VIRK and A. A. ZAIDI, 2009. Indexing tools for *Indian citrus ringspot virus* (ICRSV), The Open Biology Journal 2: 27-31.
- BANI HASHEMI, S.M., and TAHERI, H. 2016. Citrus psorosis disease. Citrus and Subtropical Fruits Research Center publication, AREEO, Iran (In Persian). 16pp.
- TIMMER, L. W, 1973. A necrotic strain of Citrus ringspot virus and its relationship to Citrus psorosis virus. Phytopathology, 64: 389-394.
- VELÁZQUEZ, K., A. RENOVELL, M. COMELLAS, P. SERRA, M. L. GARCÍA, J. A. PINA, L. NAVARRO, P. MORENO and J. GUERRI, 2010. Effect of temperature on RNA silencing of a negative-stranded RNA plant virus: *Citrus psorosis virus*. Plant Pathology: 59, 982-990.
- VELAZQUEZ K, J.A.PINA., I. NAVARRO, P. MORENO, and J. GUERRI. 2012. Association of citrus psorosis B symptoms with a sequence variant of the *Citrus psorosis virus* RNA 2. Plant Pathology, 61: 448-456.
- WALLACE, J. M. 1957. Virus-strain interference in relation to symptoms of psorosis disease of citrus, Hilgar. No. 27: 223-245.
- WHITESIDE, J. O., S. M. GARNSEY and L. W. TIMMER, 1989. Compendium of Citrus Diseases, APS Press. 80pp.