



به زراعی کشاورزی

دوره ۱۶ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۳  
صفحه‌های ۷۱۷-۷۲۴

## استفاده از گرمادرمانی برای حذف ویروس تریستیزا در نهال‌های پرتقال 'تامسون' (*Citrus sinensis* L.)

مالک قاسمی<sup>۱\*</sup>، مهسا هاشمی سجادی<sup>۲</sup>، ولی ربیعی<sup>۳</sup>

۱. استادیار اصلاح و تهیه نهال و بذر، مؤسسه تحقیقات مرکبات کشور، رامسر، ایران  
۲. کارشناس ارشد گروه باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه زنجان، زنجان، ایران  
۳. دانشیار گروه باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۲/۱۲

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۲/۰۴/۲۸

### چکیده

بیماری تریستیزا یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی مرکبات است. گرمادرمانی یکی از روش‌های مدیریت این بیماری است که در این تحقیق استفاده شد. بدین منظور ۳۶ اصله نهال پرتقال رقم 'تامسون ناول' در فیتوترون قرار گرفت. ابتدا، نهال‌ها از طریق پیوند، آلوده شدند. به منظور اطمینان از آلودگی گیاهان آزمون سرولوژیکی الایزا استفاده شد. نهال‌ها به مدت دو هفته در دمای ۳۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد روز و شب پیش‌تیمار شدند و بعد یازده هفته در دمای ۴۰ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد روز و شب، به مدت دو هفته در دمای ۴۲ و ۳۲ درجه سانتی‌گراد روز و شب و در نهایت به مدت ده روز در دمای ۴۴ و ۳۴ درجه سانتی‌گراد روز و شب قرار گرفتند. در تیمار آخر، دوازده عدد از نهال‌ها خشک شد و در شش عدد از گیاهان باقی‌مانده آلودگی مشاهده نشد. در سایر گیاهان زنده (هجده عدد) بیماری مشاهده شد. در نهایت، از آنجا که گرمادرمانی زمینه مناسبی را جهت کاهش غلظت ویروس فراهم کرد، می‌توان از آن در کنار پیوند نوک شاخساره (STG) و بالا بردن ضریب اطمینان از حذف ویروس استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: الایزا، ایمونوپرینتینگ، آزمون گیاه محک، تریستیزا، سالم‌سازی.

## ۱. مقدمه

در حال حاضر در ایران، این بیماری در بعضی از مناطق مرکبات کاری کشور شایع است. به منظور کنترل این ویروس و جلوگیری از انتشار آن به نقاط دیگر، روش‌هایی نظیر قرنطینه، استفاده از پیوندک‌های عاری از بیماری و پایه‌های متحمل به ویروس تریتزا به کار گرفته می‌شود. همچنین، برنامه‌های ریشه‌کنی و استفاده از راه‌برد حفاظت تقاطعی، برای ایزوله‌های ملایم در کنترل بیماری مؤثر است [۲۳].

آلودگی درختان مرکبات مادری و پیوندک‌های حاصل از آن‌ها به عوامل ویروسی و شبه‌ویروسی موجب کاهش عمر متوسط و حتی مرگ و زوال درختان، افت عملکرد، کاهش اندازه و تعداد میوه می‌شود و مشکلاتی را در زمینه دریافت مواد غذایی و گرفتن پیوند ایجاد می‌کند. در نهایت، درخت را مستعد انواع تنش‌های محیطی می‌کند [۱۹].

گرمادرمانی یکی از روش‌های مدیریت بیماری‌های ویروسی در مرکبات شناخته شده و محققان مختلف به صورت موفقیت‌آمیزی به منظور حذف عوامل ویروسی و تشکیل کلون‌های سالم آن را به کار می‌برند [۷، ۱۱، ۲۱]. این روش را برای اولین بار به طور موفق گرت [۱۴] در حذف ویروس تریتزا و پسروروز از پیوندک مرکبات به کار گرفت. این روش اگرچه در حذف بیماری‌هایی نظیر تریتزا و برخی بیماری‌های ویروسی دیگر کارآمد گزارش شده است [۲۱]، ولی به منظور حذف برخی دیگر از بیماری‌های شبه‌ویروسی نظیر اگزوکورتیس و زایلوپروز به تنهایی مؤثر نبوده است [۲۵].

هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی امکان تولید پیوندک‌های عاری از ویروس تریتزا از نهال‌های آلوده به ویروس به کمک گرمادرمانی در اتافک با دمای کنترل شده (فیتوترون) است. این روش تاکنون با طیف وسیع تیمارهای دمایی انجام نشده است. همچنین، کاربرد این

به لحاظ اقتصادی، ویروس تریتزای مرکبات مهم‌ترین عامل بیماری‌زای ویروسی در مرکبات است و در سطح جهان یکی از مشکلات اصلی در تولید مرکبات قلمداد می‌شود [۱۷]. ویروس تریتزا از آسیا منشأ می‌گیرد و با جابه‌جایی مواد گیاهی آلوده و شته‌های ناقل در تمام مناطق مرکبات کاری جهان منتشر شده است.

اولین بار در اوایل قرن بیستم میلادی و از آفریقای جنوبی، تلفات درختان روی پایه نارنج<sup>۱</sup> گزارش شد. بیش از ۸۰ میلیون درخت پیوند شده روی پایه نارنج در اثر این ویروس یا از بین رفتند یا تبدیل به درختان غیرمثمر شدند. ضایعات ایجاد شده از این ویروس در کشور آرژانتین بیش از ۱۰ میلیون درخت، در برزیل بیش از ۶ میلیون درخت و در آمریکا بالغ بر ۳ میلیون درخت گزارش شده است [۶]. تنها در اسپانیا بالغ بر ۴۰ میلیون درخت به ویژه درختان پرتقال و نارنگی پیوند شده روی پایه نارنج دچار زوال شدند [۹]. همچنین، ویروس تریتزا ممکن است در تعدادی از ارقام جنس سیتروس صرف نظر از آنکه روی چه پایه‌ای باشند، موجب فرورفتگی ساقه یا ساقه آبله‌ای<sup>۲</sup> شود که افت شدید کیفیت و عملکرد میوه را به دنبال خواهد داشت [۹].

ویروس تریتزا کلستروویروسی با ذرات رشته‌ای شکل و منعطف به ابعاد تقریبی (۲۰۰۰×۱۱) نانومتر است [۳، ۶، ۱۱]. این ذرات شامل RNA تک‌رشته‌ای سنس مثبت با تعداد تقریبی ۱۹۲۹۶ نوکلئوتید است [۱۵] که کپسید پروتئینی اولیه آن ۲۵ کیلودالتون وزن دارد [۲۵]. ویروس تریتزا تعداد زیادی ایزوله دارد که در خصوصیات بیولوژیکی (علائم و شته ناقل)، سرولوژیکی [۲، ۸، ۲۰] و توالی ژن‌ها [۲۷] متفاوت‌اند.

1. *Citrus aurantium*
2. Stem pitting

شاهد آلوده و سالم، مورد آزمون سرولوژیکی الایزا قرار گرفتند. در این آزمون از کیت الایزا ساخت شرکت بیوربا<sup>۱</sup> با شماره کاتالوگ ۱۵۱۵۷۲ حاوی بافر استخراج و کنترل‌های مثبت و منفی استفاده شد. این آزمون بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده و به صورت روش مستقیم یا ساندویچ دوطرفه آنتی‌بادی<sup>۲</sup> انجام شد.

در آخرین مرحله الایزا، بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت مشاهده نتیجه آزمون به صورت چشمی یا با اندازه‌گیری میزان عددی جذب نوری هر یک از چاهک‌ها پس از سی، شصت و نود دقیقه در دو طول موج ۴۰۵ و ۴۹۲ نانومتر با دستگاه الایزایدر مدل مدیسپک ای‌اس‌ار<sup>۳</sup> انجام شد.

### ۲.۳. آزمون سرولوژی - ایمونوپرینتینگ

در پایان مراحل گرمادرمانی، چهار جانب نهال‌های داخل فیتوترون نمونه‌های برگ‌گرفته و دمبرگ آن‌ها به کمک تیغ تیز برش عرضی داده شد و لکه‌گذاری روی کاغذهای نیتروسلولوزی انجام شد. در جدول رسم شده در کاغذ نیترو سلولوزی، هر دو خانه متعلق به یک نهال و در هر خانه سه الی چهار لکه ایجاد شد. لایم بذری و آلوده به ترتیب شاهد منفی و مثبت استفاده شد. سپس، غشاهای نیتروسلولوزی جهت تثبیت ویروس در معرض محلول ۱ درصد آلبومین بووین<sup>۴</sup> قرار گرفت و بعد از سه بار شستشو، در غلظت مشخص آنتی‌بادی نشان‌دار غوطه‌ور و مجدداً شسته شد. بعد از مدت کوتاهی از اضافه کردن محلول سوبسترا، رنگ بنفش در لکه‌های مربوط به کنترل مثبت و نمونه‌های آلوده دیده شد، در حالی که کنترل منفی و نمونه‌های سالم بدون تغییر رنگ باقی ماند. دلیل انجام این آزمون مقایسه نتایج

روش در کنار سایر روش‌های تولید نهال سالم، نظیر کشت خامه، پیوند نوک شاخه و تلفیق گرمادرمانی با پیوند نوک شاخه، برای اولین بار در کشور انجام شد. نتایج آزمون‌های تکمیلی بخشی از پروژه ملی است که در این مقاله نیامده و نتایج آن در مقالات دیگر خواهد آمد.

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۲.۱. مواد گیاهی

سی‌وشش اصله نهال پرتقال دوساله رقم 'تامسون ناول'<sup>۵</sup> پیوندشده روی پایه نارنج به صورت دستی و از طریق پیوند آلوده شد. به منظور اطمینان از آلودگی آزمون الایزا انجام گرفت. سپس، به منظور تیمار گرمادرمانی به فیتوترون مؤسسه تحقیقات مرکبات رامسر، ساخت شرکت مرصوص کام با دامنه دمایی ۱۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد و قابلیت کنترل نور، دما و رطوبت نسبی انتقال داده شد. گیاهان مربوط به هر تیمار دمایی، به طور جداگانه تحت شرایط گرم قرار گرفت. برای هر تیمار دوازده اصله نهال در نظر گرفته شد.

### ۲.۲. مراحل گرمادرمانی

در این تحقیق، مراحل گرمادرمانی عبارت است از یک مرحله پیش‌تیمار (دمای ۳۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد (به ترتیب روز/شب)، به مدت دو هفته) و سه مرحله تیمار هوای گرم ۴۰ و ۳۰؛ ۴۰، ۳۰، ۴۲ و ۳۲؛ و ۴۴ و ۳۴ سانتی‌گراد (روز/شب)، به ترتیب طی سه بازه زمانی یازده هفته، دو هفته و ده روز. به منظور اطمینان از نتایج حاصل از مراحل فوق، گیاهان به مدت سه ماه در دمای ۲۲ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد روز و شب (مناسب برای تکثیر ویروس) قرار گرفتند [۱۹].

بعد از به پایان رسیدن هر تیمار دمایی، گیاهان جهت بررسی وضعیت غلظت ویروس در مقایسه با دو نمونه

1. BIOREBA
2. Double Antibody Sandwich-ELISA (DAS-ELISA)
3. Medispec ESR 200 Elisa Plate Reader
4. Albumin Buvin

مربکات از گرمادرمانی استفاده کردند، وجود پیش تیمار دمای ۳۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب روز/ شب، به مدت دو هفته قبل از اعمال تیمارهای گرمایی ضروری نشان داده شد [۱، ۲۱]. همچنین، در این تحقیق دمای ۴۲ و ۳۲ درجه سانتی‌گراد (روز/ شب) جهت غیرفعال کردن ویروس تریستزا مناسب تشخیص داده شد. این در حالی است که در آزمایش‌های آریف دمای نهایی ۵۰ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد (روز/ شب) به مدت یک هفته به دنبال انجام پیش تیمار دمایی صد در صد سالم‌سازی را گزارش کرده است [۱].

دمای ۴۰ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد (روز/ شب) به مدت هشت هفته [۷]، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت هفده هفته [۱۲] و دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ هفته [۲۶] به میزان صفر تا ۵۰ درصد در غیرفعال کردن این ویروس کارآمد گزارش شده است. آزمایش‌ها روی ویروس‌ها و گیاهان میزبان نشان می‌دهد هنگامی که گیاهان تحت دمای بالا قرار می‌گیرند (گرمادرمانی)، جمعیت ویروس کاهش می‌یابد [۱۶، ۲۰].

فرضیه‌های مختلفی برای این پدیده ذکر می‌شود. یکی از این فرضیه‌ها ایجاد رقابت بین سرعت تقسیم سلول‌های میزبان و اجزای ویروس به نفع سلول‌های میزبان است که موجب به هم خوردن تعادل بین سنتز و تجزیه اجزای ویروس می‌شود و غلظت ویروس را کاهش می‌دهد [۲۳]. فرضیه دیگر آن است که تحت دمای بالا به طور موقت پیوند بین اجزای پروتئینی که از اسید نوکلئیک ویروس محافظت به عمل می‌آورد، سست و زمینه برای فعالیت آنزیم نوکلئاز در جهت غیرفعال کردن ویروس و کاهش غلظت آن فراهم می‌شود [۹]. در نظریه دیگری موسوم به نظریه «پروتئین‌های شوک گرمایی»<sup>۲</sup> دمای بالاتر از ۳۵ درجه سانتی‌گراد برای سنتز غالب پروتئین‌های موجود

آن با نتایج آزمون الایزا بود. از آنجا که این روش نسبت به روش الایزا سریع‌تر و ارزان‌تر است، در صورتی که نتایج آن با روش الایزا منطبق باشد، توصیه می‌شود.

## ۴.۲. آزمون بیولوژی - آزمون گیاه محک

این آزمون بعد از گذشت سه ماه از تیمار آخر انجام گرفت و گیاه محک مورد استفاده مکزیکن لایم<sup>۱</sup> و اجرای پیوند به صورت تی معکوس بود [۱۹].

## ۳. نتایج و بحث

براساس نتایج آزمون الایزا در جدول ۱، رژیم حرارتی ۴۲ و ۳۲ (روز/ شب) نسبت به دمای ۴۰ و ۳۰ (روز/ شب) و ۴۴ و ۳۴ (روز/ شب) دمای مناسب‌تری جهت گرمادرمانی است، زیرا در کنار حفظ سلامت ظاهری نهال‌ها، در تعداد بیشتری از گیاهان جمعیت ویروس کاهش یافت (۹۱ درصد)، ولی ویروس‌ها به طور کامل از بین نرفت و پس از چند ماه مجدداً میزان جمعیت آن‌ها افزایش یافت. در دمای ۴۴ و ۳۴ (روز/ شب) علاوه بر خشک شدن تعدادی از نمونه‌ها که ممکن است به علت تأثیر روی آنزیم‌ها باشد، با افزایش جمعیت ویروس نیز روبه‌رو شدیم (تنها در ۶۲/۵ درصد از نمونه‌ها جمعیت ویروس کاهش یافت).

همچنین، بعد از گذشت سه ماه و قرارگیری نهال‌ها در دمای ۲۲ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد (دمای مناسب جهت تکثیر ویروس)، تنها در ۲۵ درصد از گیاهان باقیمانده، با آزمون الایزا، ایمونوپریتینگ و آزمون گیاه محک آلودگی مشاهده نشد. در این پژوهش، به منظور بالابردن مقاومت گیاهان به دماهای بالاتر، تمام نهال‌ها به مدت دو هفته در دمای ۳۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد (روز/ شب) قرار گرفتند. در تحقیقاتی که به منظور حذف ویروس تریستزا در

1. *C. aurantifolia* L.

2. Heat shocking

استفاده از گرمادرمانی برای حذف ویروس تریستزا در نهال‌های پرتقال 'تامسون' (*Citrus sinensis* L.)

جهت کاهش غلظت ویروس فراهم می‌کند (حتی اگر به‌طور کامل منجر به حذف ویروس نشود)، می‌توان از آن در کنار پیوند نوک شاخساره (STG) و بالا بردن ضریب اطمینان از حذف ویروس استفاده کرد. همچنین، از آنجا که در میان روش‌های تشخیص ویروس، فنون مولکولی از محدودهٔ ردیابی بسیار دقیق‌تری نسبت به فنون سرولوژیکی برخوردار است (۱۰ تا ۱۰۰ برابر دقیق‌تر) [۵ و ۱۷]، توصیه می‌شود در بررسی نتایج آزمون‌های گرمادرمانی و سایر روش‌های سالم‌سازی، از روش‌های تشخیص مولکولی استفاده شود.

گیاهی بازدارنده است و سنتز یک سری از پروتئین‌های جدید آغاز می‌شود. این پروتئین‌های جدید موجب کاهش غلظت آران‌ای ویروس می‌شوند [۱] به‌دلیل وجود گزارش‌های متفاوت و گاه متناقض، در این تحقیق سعی کردیم ترکیبی از گزارش‌های محققان دیگر را اعمال کنیم تا به ترکیب دمایی مناسب‌تر برسیم. علت این تفاوت در نتایج به‌دست آمده به‌دلیل بررسی ارقام مختلف از گونهٔ پرتقال یا پایه‌های به‌کار رفته است، زیرا تحمل ارقام و پایه‌های مختلف متفاوت است. در نهایت، از آنجا که گرمادرمانی زمینهٔ مناسبی را

جدول ۱. بررسی ویروس تریستزا در پرتقال رقم 'تامسون ناول' با آزمون‌های الایزا و ایمینیوپریتینگ بعد از تیمارهای گرمادرمانی

نمونه‌ها	تیمارها (°C)			
	۲۰ / ۲۲ ۳ ماه	۳۴ / ۴۴ ۱۰ روز	۳۲ / ۴۲ ۲ هفته	۳۰ / ۴۰ ۱۱ هفته
۱	+	خشکیدن نهال	-	+
۲	+	-	-	-
۳	+	خشکیدن نهال	-	-
۴	+	خشکیدن نهال	+	+
۵	+	+	-	-
۶	+	خشکیدن نهال	-	-
۷	+	+	-	+
۸	+	+	-	-
۹	+	-	-	+
۱۰	+	-	-	-
۱۱	-	-	-	-
۱۲	-	-	-	-

+ : نمونهٔ آلوده‌شده با ویروس تریستزا      - : نمونهٔ بدون آلودگی



ج



ب



الف

شکل ۱. علائم مشاهده شده در نمونه مبتلا به ویروس تریستزا

(الف) رگبرگ روشنی، (ب) برگ قاشقی یا فنجانی شکل شدن برگ‌ها و (ج) برگ گیاه سالم پس از تیمار گرمایی

Moscovitz M, Purcifull DE, Clark MF and Loebenstein G (1979) The use of enzyme-linked immuno sorbent assay for detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology*. 69: 190-194.

4. Bar-Joseph M, Marcus R and Lee RF (1989) The continuous challenge of citrus tristeza virus control. *Annual Review of Phytopathology*. 27: 291-316.
5. Bar-Joseph M and Garnsey SM (1981) Enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA): principles and applications for diagnosis of plant virus. In: K. Mara-moroschand K.F. Harris. *Plant Diseases and Vectors. Ecology and Epidemiology*. Academic Press, New York. Pp. 35-59.
6. Bar-Joseph M and Lee RF (1989) Citrus Tristeza Virus. *Description of Plant Viruses*. AAB, Wellesbourne (GB). No. 353. Pp 123.
7. Calavan EC, Roistacher CN and Nauer EM (1972) Thermo-therapy of citrus for inactivation of certain viruses. *Plant Disease Report*. 56: 976-978.
8. Cambra M, Camarasa E, Gorris MT, Garnsey SM, Gumpf DJ and Tsai MC (1993) Epitope diversity of citrus triteza virus (CTV) isolates in Spain. In: *Proc. Conf. Int. Organ. Citrus Virology*. 12th (Eds): P Moreno, JV Graca and LW Timmer. IOCV, Riverside, California. Pp. 33-38.

#### ۴. نتیجه گیری

گرمادرمانی یکی از روش‌های سالم‌سازی نهال‌های مرکبات است که بسته به نوع گونه گیاهی و ویروس آلوده‌کننده، به تنهایی یا در کنار پیوند نوک شاخساره (STG) منجر به تولید نهال سالم می‌شود. تفاوت در نتایج پژوهش‌ها و نتایج این تحقیق بیانگر ضرورت انتخاب ارقام و پایه‌های متحمل به گرماست. کم بودن درصد نمونه‌های سالم‌سازی شده بیانگر تفاوت در غلظت اولیه ویروس یا عدم کارایی این روش در حذف ویروس به تنهایی است و ضرورت استفاده از ترکیب روش گرمادرمانی و پیوند نوک شاخه را نشان می‌دهد.

#### منابع

1. Arif M, Ibrahim M, Ahmad A and Hassan SH (2005) Elimination of citrus tristeza closterovirus from citrus bud-wood through thermo-therapy. *Pakistan Journal of Botany*. 37(2): 423-430.
2. Ballester-Olmos JF, Pina JA, Carbonell E, Moreno P, Hermoso de Mendoza A, Cambra M and Navarro L (1993) Biological diversity of citrus tristeza virus (CTV) isolates in Spain. *Plant Pathology*. 42: 219-229.
3. Bar-Joseph M, Garnsey SM, Gonsalves D,

9. Cambra M, Gorrís MT, Marroquín C, Roman MP, Olmos A, Martínez MC, Hermoso de Mendoza A, López A and Navarro L (2000a) Incidence and epidemiology of citrus tristeza virus in the valencian community of Spain. *Virus Research*. 71: 85-95.
10. Desjardins PR, Wallace JM, Lange CT and Drake RJ (1957) The suppression of tristeza virus symptoms in Mexican lime seedlings by heat treatment. *Plant Disease Report*. 41: 230-31.
11. Gonsalves D, Purcifull DE and Garnsey SM (1978) Purification and Serology of citrus tristeza virus. *Phytopathology*. 68: 553-559.
12. Grant TJ, Jones JW and Norman GG (1960) Present status of heat treatment of citrus viruses. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. 72: 45-48.
13. Grant TJ (1967) Effect of heat treatments on tristeza and psorosis viruses in citrus. *Plant Disease Report*. 41: 232-234.
14. Karasev AV, Boyko VP, Gowda S, Nikolaeva, OV, Hilf ME, Koonin EV, Niblett CL, Cline K, Gump DJ, Lee RF, Garnsey SM and Dawson WO (1995) Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome. *Virology* 208: 511-520.
15. Kassanis B (1957) The use of tissue culture to produce virus-free clones from infected potato varieties. *Annals of Applied Biology*. 45: 422-427.
16. Lee RF and Bar-Joseph M (2000) Tristeza. *In: Compendium of Citrus Diseases*, 2nd edn (Ed. Timmer LW, Garnsey SM and Graham JH), APS Press, St Paul (US). Pp 61-63.
17. Matthews REF (1993) *Diagnosis of plant virus diseases*. CRC Press, Boca Raton, Florida. Pp 374.
18. Quak F (1977) Meristem culture and virus-free plants. *In: J. Reinert and Y.P.S. Bajaj (eds). Applied and fundamental aspects of plant cells, tissue, and organ culture*. Springer, Berlin. Pp. 598-615.
19. Roistacher CN (1977) Elimination of citrus pathogens in propagative bud-wood. 1. Budwood selection, indexing and thermotherapy. *Proceedings of the International Society of Citriculture*. 3: 965-972.
20. Roistacher CN and Bar-Joseph M (1984) Transmission of tristeza seedling yellow tristeza virus by *Aphis gossypii* from sweet orange, grapefruit, and lemon to Mexican lime, grape fruit, and lemon. *In: S.M. Garnsey and L. W. Timmer (Eds.), IOCV, Riverside, CA*. Pp. 9-18.
21. Roistacher CN and Calavan EC (1974a). Heat tolerance of preconditioned citrus bud-wood for virus inactivation. *In: Proceedings of 5th Conference of International Organization of Citrus Virology*. W.C. Price. (Ed.) University of Florida Press, Gainesville. Pp. 256-261.
22. Roistacher CN and Calavan EC (1974b) Inactivation of five citrus viruses in plants held at warm glass house temperatures. *Plant Disease Report*. 58: 850-853.
23. Roistacher CN and Moreno P (1991) The worldwide threat from destructive isolates of citrus triteza virus-A review. *In: Proceedings of the 11th Conference of IOCV*. RH Bransky, RH Lee and LW Timmer (Eds.), Reverside, CA. pp. 7-19.
24. Sekiya ME, Lawrence SD, McCaffery M and Cline K (1991) Molecular cloning and nucleotide sequencing of coat protein gene of tristeza virus. *General Virology*. 72: 1013-1020.
25. Skaria M, Roistacher CN and Dagraca JV (1996) A virus-free citrus bud wood program for

- Texas. Proceeding of International Society of Citriculture. Pp. 366-368.
26. Stubbs LL (1963) A phytotron cabinet for heat-therapy studies with virus-infected plants. Common wealth Phytopathology News. 9(4): 49-52.
27. Vives MC, Rubio L, Lopez C, Navas-Castillo J, Albiach-Marti MR, Dawson WO, Guerri J, Flores R and Moreno P (1999) The complete genome sequence of the major component of a mild citrus tristeza virus isolate. General Virology. 80: 811-816.

Archive of SID