آفات و بيماري‌هاي گياهي
جلد ۸۰، شماره ۲، اسفند ۱۳۹۱

ويروس پسوروز مركبات، عامل عارضه نقش حلقوي در درختان پرتقال تامسون ناول در شرق مازندران

فائزه فلكي[۱]، سيد وحيد علوي[۲]✉ و فرشاد رخشنده رو[۱]
۱- گروه بيماري شناسي گياهي، دانشكده كشاورزي و منابع طبيعي، واحد علوم و تحقيقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامي، تهران
۲- بخش تحقيقات گياه پزشكي، مركز تحقيقات كشاورزي و منابع طبيعي مازندران، ساري
(تاريخ دريافت: مرداد ۱۳۹۱؛ تاريخ پذيرش: دی ۱۳۹۱)

چكيده

ويروس پسوروز مركبات (CPV)، عامل يكي از بيماري‌هاي خسارت‌زاي مركبات در جهان است. در سال‌هاي اخير عارضه اي روي درختان تامسون ناول با پايه‌هاي نارنج يا سيترنج در شرق استان مازندران مشاهده گرديده كه باعث ايجاد علائمي از قبيل نقوش يا لكه‌هاي حلقوي روي ميوه بالغ، به خصوص در اطراف گلگاه، و لكه‌هاي زرد رنگ گسترده و حلقوي بر روي برگ‌هاي مسن مي‌گردد. درختان مبتلا دچار ريزش شديد ميوه از زمان رنگ اندازي مي‌گردند. به منظور بررسي عامل بيماري فوق نمونه برداري از سرشاخه‌هاي بهاره درختان مبتلا صورت پذيرفت. بررسي‌هاي سرولوژيک اوليه با انجام الايزاي غير مستقيم و با استفاده از پادتن تک همسانه MA-13C5، موید حضور ويروس پسوروز مركبات در نمونه‌هاي آلوده بود. واكنش زنجيره اي پليمراز معكوس(RT-PCR) با چهار جفت آغازگر اختصاصي مرتبط با جدايه‌هاي ICRSV، CRSV-4، CPV-RNA2 و CPV-CPG روی برگ‌هاي جمع آوري شده از سي اصله درخت پرتقال تامسون ناول صورت گرفت. نمونه‌هاي مورد بررسي فقط با آغازگر اختصاصي مرتبط با جدايه ويروس لكه حلقوي (CRSV-4) واكنش داده و يک قطعه اختصاصي ۲۱۸bp تكثير شد. طول قطعه به دست آمده با قطعه‌اي كه از جدايه‌هاي لكه حلقوي ويروس پسوروز مركبات در ساير مناطق جهان به دست آمده، مشابه بود. هفت جدايه انتخاب شده براي نموده‌سازي، بر اساس علائم ايجاد شده روي گياهان محک به دو گروه بيولوژيكي تفكيک شدند. با توجه به نتايج به دست آمده و تشابه علائم ايجاد شده توسط جدايه‌هاي مورد مطالعه با ساير جدايه‌هاي لكه حلقوي ويروس پسوروز مركبات گزارش شده از كشورهاي مختلف، اين جدايه‌ها را مي‌توان در گروه بدون علائم تنه تيپ B ويروس پسوروز مركبات جاي داد.

واژه‌هاي كليدي: ويروس پسوروز مركبات (CPV)، *Ophiovirus*، نموده سازي، ويروس لكه حلقوي مركبات (CRSV).

***Citrus psorosis virus*, Causal Agent of Ring Pattern Disorder in Thomson Navel Trees in East of Mazandaran**

F. FALAKI[1], S. V. ALAVI[2]✉ and F. RAKHSHANDEHROO[1]
1. Dep. of Plant Pathology, College of Agriculture and Natural Resources, Islamic Azad University, Tehran Science and Research Branch, Iran
2- Plant Protection Division, Mazandaran Agricultural and Natural Resources Research Center, Sari, Iran

Abstract

Citrus psorosis virus (CPV) is causal agent of one of the important citrus diseases in the world. A disorder was observed on Thomson Navel orange trees on sour orange or citrange rootstocks, with ring spot symptoms on mature fruits, especially around the stylar end. It had often caused expanded yellow ring lesions on mature leaves. Severe fruit abscission was occurred in the infected trees. Leaf samples were collected from spring flashes of the infected trees and tested by TAS-ELISA, using *Citrus psorosis virus* (CPV) 13C5 monoclonal antibody and CPV infections were confirmed. RT-PCR was done with four pair primers closely related to ICRSV, CRSV-4, CPV-RNA2 and CPV-CPG on leaves of thirty infected Thomson Navel orange trees. The samples only amplified by CRSV-4 primers and produced a fragment about 218bp. This fragment length size was similar to the fragment obtained from CPV ring spot isolates from Florida and Argentina. Seven isolates were selected for biological indexing and based on the indicator plants divided into two groups. Based on the serological, molecular and biological results, the isolates can be settled into *Citrus psorosis virus*, B type group, without bark scaling symptoms.

Key words: *Citrus psorosis virus* (CPV), *Ophiovirus*, Ring spot isolates, Biological indexing.

✉ **Corresponding author: alavi_v@yahoo.com**

مقدمه

بيماري پسوروز مرکبات اولين بار در سال ۱۸۹۶ گـزارش (Swingle and Webber, 1896) و در سـال ۱۹۳۶ انتقـال آن از طريـق پيونـد مشـخص گرديـد (Fawcett, 1936). پيکـره‌هـاي ويروسي در نمونه‌هاي برگي درختان مبتلا به اين عارضه توسط Derrick *et al*. (1988) مشاهده شـد. ايـن ويـروس گونـه تيـپ جـنس *Ophiovirus* و ايـن جـنس تنهـا عضـو خـانواده *Ophioviridae* است. تمام گونه‌هاي متعلق به اين جنس از نظـر شکل پيکره و ژنوم مشابه مي‌باشند. پيکره اين ويروس رشته‌اي و پـيچ خـورده بـه صـورت حلقـه‌هـايي بـا قطـر ۳nm اسـت. پيکره‌هاي کوچك‌تر به طول ۶۹۰ تا ۷۶۰ نانومتر و پيکـره‌هـاي بزرگتر حدود ۴ برابر بلندتر است. ژنوم RNA آن تك رشـته‌اي با قطبيت منفي و سـه قسـمتي بـا انـدازه‌هـاي ۸۱۸۴، ۱۶۴۴ و ۱۴۵۴ نوکلئوتيد است (Milne, 2005). پروتئيني به جرم حـدود ۴۸-۴۹kDa به عنـوان واحـد سـاختماني پوشـش پروتئينـي در جدايه CRSV-4 شناسايي گرديده است (Derrick *et al*., 1988).

اين ويروس محدود به آوند آبکشي نشده و در سلول‌هاي پارانشـيمي نيـز شناسـايي گرديـده اسـت. حـداقل دو عامـل ويروسي به نام‌هاي پسوروز A و پسوروز B با دو تيـپ علائـم روي درختان باغي را بـا بيمـاري پسـوروز مـرتبط دانسـته‌انـد (Danos, 1989; Frison and Taher, 1991). از جمله علائـم رايـج در تيپ پسوروز A ، پوسته پوسته شدن فلس مانند تنه درخـت و شاخه‌ها است که معمولاً در ۱۰ تا ۱۵ سالگي ظاهر مي‌گردد. در برگ‌هاي مسـن معمـولاً فاقـد علائـم مشخصـي بـوده، امـا رگه‌هاي روشني در برگ‌هاي جوان ظاهر مي‌گردد. مهـم تـرين علائمي که براي تيـپ پسـوروز B ذکـر گرديـده، ورقـه شـدن سرتاسري پوست تنه و جدا شـدن آن از چـوب مـي‌باشـد کـه گاهي به صورت يک شکاف طولي در تنـه ديـده مـي‌شـود. در چنين درختاني، لکه‌هاي گسترده زرد رنگ در برگ‌هـاي مسـن به صورت پايـدار ظـاهر مـي‌شـود و برخـي مواقـع لکـه‌هـاي حلقوي زرد يا نکروتيک نيز روي ميوه‌هـا پديـدار شـده اسـت (Klotz, 1973; Roistacher, 1991; Whiteside *et al*., 1989).

پيوندک‌هاي پرتقال شيرين آلوده به پسـوروز B در نهالسـتان از رشد باز مانده و دچار نکـروز عمـومي و مـرگ شـده‌انـد و در برخي موارد نيز پس از انتقال به باغ و در طي سه تا شش سـال بعد به تدريج زوال يافتـه‌انـد (Klotz, 1973; Roistacher, 1991; Whiteside *et al*., 1989; Duran-Vila and Moreno, 2000). در بيشتر مناطق زير کشت مرکبات جهان، بر اساس علائم ظاهري به احتمال وجود اين بيماري اشاره شده، و در موارد محـدودي با انجام آزمون‌هاي بيولوژيکي، سرولوژيکي و مولکولي آلودگي درختـان بـه ويـروس پسـوروز مرکبـات ثابـت شـده اسـت (Fawcett and Bitancourt, 1943; Roistacher, 1991; Whiteside *et al*., 1989). اگـر چـه اولـين مطالعـات صـورت گرفتـه در خصوص پسوروز، آن را به تيپ A و B تفکيک نمـوده اسـت، اما بررسي‌هاي بعـدي نشـان داده کـه جدايـه‌هـاي مختلفـي از پسوروز در جهان وجود دارد که موجب بروز علائمي متفـاوت از اين دو نژاد يا تنها يکي از چند علائم ذکر شده براي هر يک از اين نژادها را روي درختان مرکبات گرديده‌اند (Fawcett and Cochran, 1942; Wallace, 1957).

توانايي بعضي از جدايه‌ها در ايجاد لکه‌هـاي زرد رنـگ و حلقوي در برگ‌هاي مسن و گاهي روي پوست ميوه‌ها و گاهي بدون ظهور علائم مشخصي روي تنه درختان مرکبـات، سـبب شد تا سال‌ها به عنوان لکه حلقوي مرکبات تحت عنوان عامـل يک بيماري جداگانه مطرح شـوند (Wallace and Drake, 1968; Roistacher, 1993; Da Graça *et al*., 1991). با وجود تفـاوت در نوع علائم مابين دو نژاد A و B، تا کنون اختلافات سرولوژيکي يا مولکولي دقيقي بين آن‌ها ذکر نشـده اسـت (Navas-Castillo *et al*., 1991; Roistacher, 1993; Martín *et al*., 2005)، در سـالیان اخير از پادتن‌هاي تک همسـانه‌اي بـراي تفکيـک جدايـه‌هـا و تعيين گروه‌هاي سرولوژيکي (سروتيپ)جدايه‌هاي اين ويروس اسـتفاده شـده اسـت (Djelouah *et al*., 2000; Roistacher *et al*., 2000; Alioto *et al*., 1999). عامل بيمـاري پسـوروز مرکبـات از طريق مايه زني عصاره برگ آلوده به گياهان علفي انتقال يافتـه اسـت (Alioto *et al*., 2001; Garnsey and Timmer, 1980).

گزارش‌هايي از انتقال طبيعي پسوروز بدون تعيين دقيق نوع ناقل منتشر شده، ولي در حال حاضر گسترش آن در طبيعت تنها از طريق پيوندک آلوده اثبات گرديده است. اين ويروس از طريق بذر منتقل نمی‌شود و نژاد پسوروز A را نيز تنها از طريق سس و در شرايط آزمايشگاهي منتقل نموده‌اند (Weathers and Harjung, 1964). در هندوستان نوعي بيماري لکه حلقوي تنها از درختان نارنگي کينو Kinnow (*Citrus nobilis* Lour × *C. deliciosa* Tenora) گزارش شده است که عامل آن (*Indian citrus ringspot virus*, ICRSV)، متفاوت از CRSV (Sharma *et al.*, 2004; 2009) و به عنوان گونه تيپ در جنس *Mandarivirus* و خانواده *Flexiviridae* قرار گرفته است (Adams *et al.*, 2004; Rustici *et al.*, 2002; Thind *et al.*, 1998).

در ايران گزارش‌هايي منتشر شده که بر اساس علائم مشاهده شده در درختان مرکبات، ضمن معرفي نوعي بيماري با علائم لکه حلقوي روي برگ ومیوه، عامل آن نوعي ويروس با نام ويروس نقش حلقوي مرکبات *Citrus ring pattern virus* عنوان شده است (Dehyar and Habashi, 1974; Ebrahimi *et al.*, 1988; Bove, 1995) که علائمي شبيه به ويروس لکه حلقوي مرکبات (Timmer and Garnsey, 1980; Roistacher, 1991) را نشان داده‌اند. بررسي به عمل آمده روي درختان واجد علائم ويروس پسوروز مرکبات در گرگان، حاکي از عدم تشخيص سرولوژيکي با پادتن تک همسانه اي شرکت AgriTest ايتاليا و تشکيل شدن باند اختصاصي در تنها هفت و نيم درصد از دويست نمونه جمع آوري شده در واکنش زنجيره‌اي پليمراز با استفاده از آغازگر طراحي شده از روي ژن پروتئين پوششي ويروس پسوروز مرکبات بوده است (Ebadi, 2007). در سالیان اخير نوعي عارضه شبه ويروسي با علائم لکه‌هاي حلقوي روي برگ و ميوه همراه با ريزش ميوه‌هاي در آستانه بلوغ روي درختان پرتقال تامسون ناول در باغات شرق استان مازندران مشاهده شد و اين بررسي به منظور تعيين علت يا عامل اين عارضه صورت گرفت.

روش بررسي

نمونه برداري: از ۲۳ قطعه باغ واجد درختان پرتقال تامسون ناول روي پايه نارنج با محدوده سني ۱۵ تا ۱۸ سال و با مساحت بيش از يک هکتار در منطقه شرقي استان مازندران (شهرستان‌هاي بهشهر و نکا) بازديد به عمل آمده و باغات واجد درختان پرتقال تامسون با علائم لکه حلقوي روي برگ و ميوه (شکل ۱) مشخص گرديدند. سپس با حرکت در دو قطر اين باغات، درختان واجد علائم مورد نظر شناسايي و علامت گذاري شدند. هر نمونه شامل سرشاخه‌هاي جوان از چهار سمت درختان واجد علائم بود. طول هر سرشاخه نمونه برداري شده معادل ۱۵ تا ۲۰ سانتي‌متر در نظر گرفته شد. هر نمونه در کيسه پلاستيکي جداگانه قرارداده شد و پس از ثبت مشخصات به آزمايشگاه منتقل گرديد.

شکل ۱ - علائم لکه حلقوي روي برگ و ميوه پرتقال تامسون ناول در شرق مازندران

Fig.1. Ring spot symptoms on leaves and fruits of Thomson Navel orange in East of Mazandaran

آزمون الايزا: آزمون سرولوژي مورد استفاده، آزمون الايزا به روش ساندويچ غير مستقيم سه طرفه پادتن (TAS-ELISA) بود. اين آزمون با استفاده از پادتن تک همسانه‌اي 13C5 به همراه کنترل منفي و مثبت (اهدايي دکتر Milne از ايتاليا) و به روش Alioto *et al.* (1999) با تغييراتي (Martin *et al.*, 2004) به شرح زير انجام گرفت.

ابتدا پادتن 13C5 به ميزان ۱/۴۰۰۰ در بافر پوششي (۲۵ ميلي مولار Na_2CO_3، ۷۰ ميلي مولار $NaHCO_3$، pH9.6) رقيق شده و ۱۲۰ ميکروليتر از آن در هر چاهک از بشقابک الايزا (MaxiSorp® Plate, Nunc, Denmark) ريخته شد و به مدت چهار ساعت در دماي ۳۷°C قرار گرفت. سپس پنج مرتبه و هر بار به مدت يک دقيقه چاهک‌ها با بافر شستشو (۸ ميلي‌مولار Na_2HPO_4، ۱/۵ ميلي مولار KH_2PO_4، ۲/۷ ميلي‌مولار KCl، ۰/۱۴ مولار NaCl، ۳ ميلي‌مولار NaN_3، ۰/۱ درصد Tween-20، pH7.4) شسته شد. ۰/۱ گرم بافت برگ جوان (چهار تکه برگ از سرشاخه‌هاي نمونه برداري شده از چهار سمت درخت) از هر يک از نمونه‌هاي جمع آوري شده با يک ميلي‌ليتر بافر عصاره گيري (هشت ميلي‌مولار Na_2HPO_4، ۱/۵ ميلي مولار KH_2PO_4، ۲/۷ ميلي‌مولار KCl، ۰/۱۴ مولار NaCl، ۳ ميلي‌مولار NaN_3، ۰/۱ درصد Tween-20، ۲ درصد PVP-10000، دو درصد شير بدون چربي، pH7.4) در هاون سترون و سرد عصاره گيري و ۱۰۰ ميکروليتر از عصاره به دست آمده در چاهک ريخته و به مدت يک شب در دماي ۴°C قرار گرفت. تنها اولين چاهک (A1) براي حذف اثر ميزان جذب پلي‌استيرن، عصاره گياهي به آن افزوده نشد (Blank). بشقابک مانند مرحله قبلي شسته شد و ۱۰۰ ميکروليتر از آنتي‌بادي 13C5 که در بافر عصاره گيري به ميزان ۱/۱۰۰۰ رقيق شده بود، درون چاهک‌ها ريخته شده و به مدت ۹۰ دقيقه در دماي ۳۷°C قرار داده شد. بشقابک مانند قبل شسته شد و پادتن تهيه شده عليه گاماگلوبولين موش و متصل به آنزيم آلکالين فسفاتاز (Boehringer Mannheim Co., Germany) در بافر عصاره‌گيري به ميزان ۱/۱۰۰۰۰ رقيق شد و ۱۰۰ ميکروليتر از آن در چاهک ريخته شد و به مدت ۹۰ دقيقه در دماي ۳۷°C نگهداري شد. پس از شستشوي بشقابک، ۱۰۰ ميکروليتر محلول پارانيترو فنيل فسفات ۱/۱۰۰۰ رقيق شده در بافر سوبسترا (۱۰ ميلي‌مولار دي اتانول آمين، ۰/۵ ميلي مولار $MgCl_2$، pH9.5) در هر چاهک ريخته شد و به مدت ۸۰ دقيقه در دماي اتاق و دور از نور مستقيم قرار گرفت. ميزان جذب چاهک‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه الايزا ريدر (ELISA Reader-Stat Fax2100, USA) اندازه‌گيري و نمونه‌هايي که ميزان جذب سه برابر چاهک حاوي عصاره نمونه سالم (کنترل منفي) را نشان دادند، به عنوان نمونه آلوده به CPV در نظر گرفته شد.

نموده سازي جدايه‌ها: به منظور بررسي دامنه ميزباني و نوع علائم ايجاد شده، جدايه‌هاي مورد بررسي روي گياهان محک به شرح زير مايه کوبي شدند. در مورد آلوده سازي گياهان محک علفي، عصاره گيري از برگ نمونه‌هاي جمع آوري شده در بافر ۰/۱ مولار فسفات پتاسيم با pH7 به نسبت يک به دو (وزني- حجمي) در هاون چيني استريل سرد انجام گرفت. عصاره به دست آمده با پودر کاربوراندوم و با استفاده از دستکش يک بار مصرف روي گياهان محک شامل *Chenopodium quinoa* و *Gomphrena globosa* ، در مرحله چهار برگي مايه کوبي شد. سپس برگ‌هاي مايه کوبي شده به آرامي با آب مقطر شستشو گرديدند. در هر گياه به ترتيب دو برگ با عصاره و دو برگ به عنوان شاهد با آب مقطر استريل مايه کوبي شد. گياهان تحت شرايط گلخانه‌اي و در حرارت ۵ ±۲۵ نگهداري و به صورت روزانه به مدت دو هفته مورد بررسي قرار گرفت (Ahlawat and Pant, 2008; Sharma *et al.*, 2009). جهت آلوده سازي نهال‌هاي مرکبات، نهال‌هاي بذري دو تا سه ساله نارنج محلي، سيترومِلو رقم سوينگل [*C. paradisi* Macf. × *P. trifoliata* (L.) Raf.(cv 'Swingle')]، سيترنج رقم تروير [*Citrus sinensis* × *Poncirus trifoliata* (cv 'Troyer')] و به منظور بررسي بيشتر گياهچه‌هاي دو ساله مرکبات شامل پرتقال تامسون ناول، نارنگي محلي, نارنگي انشو، تانجلو رقم مينولا [*Citrus paradisi* (cv 'Duncan') ×

(*Citrus reticulata* (cv 'Dancy')], گريپ فروت رقم دانكن, نارنگي رقم پيج, ليموترش رقم يوركا [(*Citrus limon* (L.) Burm.f. (cv 'Eureka')] و نارنگي رقم كلمانتين روي پايه سيترنج به عنوان گياهان محك استفاده شد. از هر نهال دو تكرار براي هر نمونه مورد بررسي در نظر گرفته شد. براي هر نهال محك، دو جوانه برگي از هر نمونه پيوند شد. نهال‌ها سرزني شده و برچسب مشخصات براي هر نهال الصاق گرديد. نهال‌ها در شرايط گلخانه‌اي نگهداري شدند. علائم برگي و نحوه رشد هر سه ماهه و علائم روي تنه و زير پوست پس ازهيجده ماه مورد ارزيابي قرار گرفتند (Roistacher *et al*., 2000; Sarachu *et al*., 1988).

واكنش زنجيره‌اي پلي‌مراز با نسخه برداري معكوس (**RT-PCR**): استخراج RNA از نمونه‌هاي برگي با استفاده از كيت خالص سازي GF-1 (Vivantis Co., USA) صورت گرفت. براي هر نمونه، ميزان ۰/۱ گرم برگ پودر شده با ازت مايع در تيوپ سرد با ml ۲/. آب مقطر عاري از RNAse مخلوط و بافر استخراج به آن اضافه شد. پس از سانتريفوژ در دور بالا به ميزان هم حجم به آن اتانول ۸۰% اضافه و از ستون RNA-Binding عبور داده شد. پس از پانزده دقيقه سانتريفوژ در 12000g، بافر شستشو به آن افزوده و مجدداً سانتريفوژ و به مايع استخراج شده، مخلوط حاوي آنزيم DNAse I و RNase Inhibitor افزوده و پس از پنج دقيقه سانتريفوژ به مدت پانزده دقيقه در در دور بالا سانتريفوژ و مايع به دست آمده به عنوان RNA خالص كل مورد استفاده قرار گرفت.

ساخت DNA مكمل (cDNA synthesis) در لوله‌هاي ۲۰۰ ميكروليتري سترون با استفاده از پنج ميكروليتر RNA خالص كل، ۴۰ پيكومول آغازگر معكوس (C-primer) و چهار ميكروليتر بافر RT-PCR 5x صورت گرفت. پس از افزودن آب ديونيزه استريل براي رساندن حجم كل محلول واكنش به پنجاه ميكروليتر، لوله‌ها به مدت ۳ دقيقه در ۹۴ درجه سانتي گراد قرار داده شده (Denaturation) و بلافاصله به روي يخ منتقل شدند. پس از آن به مدت ۳۰ دقيقه در دماي اتاق (annealing) نگهداري شدند. به مخلوط درون هر لوله، ۵ واحد آنزيم MMuLv-Reverse Transcriptase و دو ميكروليتر از مخلوط dNTP mix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) با غلظت ۰/۴ ميلي‌مولار براي هر يك از بازها به محلول واكنش افزوده شد. مخلوط حاصل به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتي‌گراد نگهداري شد (Garcia *et al*., 1997). واكنش زنجيره‌اي پلي‌مراز با استفاده از پنج ميكروليتر محلول حاوي DNA الگو (cDNA) به دست آمده در مرحله قبل و با استفاده از ۲۰ پيكومول از هر يک از آغازگرهاي اختصاصي ويروس‌هاي لكه حلقوي هندي مركبات ICRSV [U:5'-CCAACTGGATGAAAT-3', D:5'-GAGCCAAGCGTTCAGA-3'] (Nagpal *et al*., 2005)، لكه حلقوي مركبات CRSV [U:5'-ACAATAAGCAAGACAAC-3', D:5'-CCATGTCACTTCTATTC-3'] (Garcia *et al*., 1997)، RNA_2 پسوروز مركبات CPV [U:5'-GACAACTTCCTCCTCC-3', D:5'- GAAAGTAGTCATCCTT-3'] (De La Torre *et al*., 2002) و CPV [U:5'-GCTTCCTGGAAAAGCTGATG-3', D:5'- TCTGTTTTTGTCAACAACACACTCC-3'] (Barthe *et al*., 1998) در دستگاه ترموسايكلر (Primus25-MWG Biotech, Germany) انجام شد. برنامه حرارتي براي تكثير شامل ۹۴ درجه سانتي‌گراد به مدت پنج دقيقه براي واسرشت سازي اوليه و سپس ۳۵ چرخه حرارتي (۹۴ درجه سانتي‌گراد به مدت ۳۰ ثانيه براي واسرشت سازي، ۵۰ درجه سانتي‌گراد به مدت ۳۰ ثانيه براي اتصال و ۷۲ درجه سانتي‌گراد به مدت ۶۰ ثانيه براي تكثير) و در پايان ۷۲ درجه سانتي‌گراد به مدت پنج دقيقه براي تكثير نهايي بود (Garcia *et al*., 1997; De La Torre *et al*., 2002).

نتيجه و بحث

نمونه برداري: از ۲۳ قطعه باغ بازديد شده، شش باغ (چهار قطعه باغ در شهرستان نكا ودو قطعه باغ در شهرستان بهشهر) واجد درختان پرتقال با علائم لكه حلقوي روي برگ و ميوه بودند. در مجموع از ۳۰ درخت پرتقال تامسون ناول روي پايه نارنج در اين باغات نمونه برداري شد.

آزمون الایزا: سي نمونه جمع‌آوري شـده در ايـن آزمـون مورد بررسي قرار گرفت. متوسـط ميـزان جـذب چاهـک‌هـاي حاوي عصاره نمونه سالم برابـر بـا ۰/۲۰۳ بـود، در حـالي کـه چاهک‌هاي حاوي عصاره نمونه‌هاي جمع آوري شده جذبي از حداقل ۰/٦٧٧ تا ۱/۲۹۰ داشتند. چاهـک حـاوي عصـاره بـرگ شاهد مثبت متوسط جذبي معادل ۱/٥٩٤ را داشت. ايـن نتـايج نشان دهنده واکنش مثبت پادتن تک همسـانه‌اي 13C5 بـا سـي نمونه جمع آوري شده از درختان پرتقال تامسون نـاول واجـد علائم لکه حلقوي روي برگ و ميوه در شرق اسـتان مازنـدران بود. واکنش مثبت نمونه‌هاي جمع‌آوري شده با اين پادتن موید ارتباط آن‌ها با ويروس پسوروز مرکبات است و احتمالاً از ايـن پادتن براي تشخيص جدايه‌هاي مولـد لکـه حلقـوي ويـروس پسوروز مرکبات در شمال ايران می‌توان اسـتفاده نمـود. اظهـار نظر قطعي در اين خصوص و امکان استفاده از اين پادتن تـک همسانه‌اي براي تشخيص اين تيپ جدايه‌ها در بين جدايه‌هـاي مختلف پسوروز کـه احتمـالاً در شـمال ايـران وجـود دارنـد، نيازمند به بررسي‌هاي تکميلي است.

نموده سـازي: بـا توجـه بـه محـدوديت فضـاي گلخانـه قرنطينه در مرکز تحقيقات کشاورزي و منابع طبيعي مازندران و با توجه به يکسان بودن علائم روي درختـان پرتقـال تامسـون ناول، از هر يک از اين باغات در شهرستان نکا يک نمونه، و از دو باغ در شهرستان بهشهر سه نمونه براي بررسي دامنه ميزباني انتخاب گرديد. اين هفـت نمونـه (جدايـه) بـه ترتيـب تحـت عنوان M1 تا M7 نامگذاري گرديدند.

نهال‌هاي مرکبات: هفت جدايه انتخاب شده بر اساس نوع علائم ايجاد شده روي نهال‌هاي بـذري و پايـه- پيونـدک‌هـاي مرکبات مايه کوبي شده از طريـق پيونـد پوسـت در دو گـروه بيولوژيکي قرار گرفتند. کليه جدايه‌هـا علائـم مشخصـي روي نهال‌هاي سيترومِلو سوينگل، نارنج، پرتقـال تامسـون، نـارنگي محلي، نارنگي پيج، نارنگي انشو و تـانجلو رقـم مينـولا ايجـاد نکردنـد. جدايـه‌هـاي M1، M2، M3 و M4 در گـروه اول بيولوژيکي قـرار داده شـدند، بـه ايـن ترتيـب کـه روي بـرگ نهال‌هاي نارنگي کلمانتين و گريپ فروت دانکن لکه‌هـاي زرد ايجاد کردنـد (شـکل ۲) و روي ليمـوترش يورکـا نکـروز لبـه برگ‌ها (شکل ۳) را باعث گرديدند، اما جدايه‌هـاي M5، M6 و M7 کـه در گـروه دوم بيولـوژيکي جـاي داده شـدند علائـم مشخصي را روي اين گياهان محک ايجاد نکردند. جدايـه‌هـاي گروه دوم روي برگ‌هاي سيترنج ترويِر نقاط زرد رنگـي را بـه صـورت سيسـتميک موجـب گرديدنـد(شـکل ۴) کـه چنـين علائمي در جدايه‌هاي گروه دوم مشاهده نگرديد (جدول ۱).

شکل ۲- لکه‌هاي زرد روي برگ نارنگي کلمانتين مايه کوبي شده با جدايه‌هاي گروه اول (M1، M2، M3 و M4)

Fig.2. Yellow spots on Clementine mandarin leaf, inoculated with the first group isolates (M1, M2, M3 and M4).

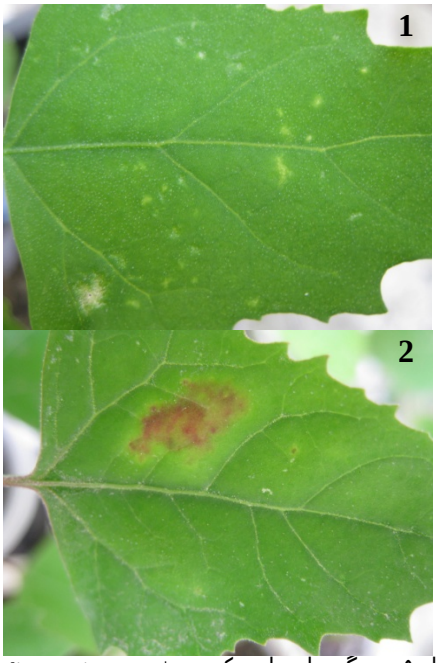
شکل ۳- نکروز لبه‌هاي برگ ليمو ترش يورکـا مايـه کـوبي شـده بـا جدايه‌هاي گروه اول (M1، M2، M3 و M4)

Fig.3. Leaf edge necrosis of Eureka lemon, inoculated with the first group isolates (M1, M2, M3 and M4)

شكل ۴- نقاط زرد رنگ روي برگ سيترنج تروير مايه كوبي شده با جدايه‌هاي گروه دوم (M5، M6 و M7)

Fig.4. Yellow spots on Troyer citrange leaf, inoculated with the second group isolates (M5, M6, and M7)

گياهان علفي: مايه كوبي عصاره برگ جدايه‌هاي مورد بررسي روي برگ *Chenopodium quinoa* منجر به تشكيل لكه‌هاي موضعي شد. جدايه‌هاي اولين گروه بيولوژيكي شامل M1، M2، M3 و M4 لكه‌هاي موضعي نكروزه سفيد و جدايه‌هاي دومين گروه شامل M5، M6 وM7 لكه‌هاي موضعي نكروزه قرمز رنگ ايجاد كردند (شكل ۵). كليه جدايه‌ها روي برگ گياهان *Gomphrena globosa* لكه‌هاي موضعي نكروتيک را موجب شدند (شكل ۶). جدايه‌هاي ويروسي مطالعه شده در اين بررسي با توجه به ايجاد لكه‌هاي موضعي روي *Gomphrena globosa* و علائم باغي متفاوت با ICRSV، به نظر نمي‌رسد كه از نظر بيولوژيكي ارتباطي با اين ويروس داشته باشند. حداقل دو عامل ويروسي را با بيماري پسوروز مرتبط دانسته‌اند. نوع اول آن يعني پسوروز A كه پسوروز حقيقي يا كلاسيک ناميده شده است و بر اساس علائم رگه رگه‌اي شدن روي برگ‌ها مشخص مي‌گردد و انتقال مكانيكي نمي‌يابد. دومين نوع، پسوروز B كه لكه حلقوي مركبات نيز ناميده شده، انتقال مكانيكي مي‌يابد (Danos, 1989) و مي‌توان بر اساس علائم ايجاد شده روي گياهان علفي آن را شناسايي نمود (Frison and Taher, 1991). اختلاف اصلي بين تيپ A و تيپ B ويروس پسوروز بروز علائم روي برگ‌هاي مسن و برخي مواقع روي ميوه‌ها و شديدتر بودن تيپ B در پوسته پوسته نمودن تنه نسبت به تيپ A ويروس پسوروز مركبات بوده است (Timmer *et al.*, 1978; Garnsey and Timmer, 1988).



شكل ۵- برگ‌هاي مايه كوبي شده *Chenopodium quinoa*. ۱: لكه‌هاي موضعي نكروزه سفيد ناشي از مايه كوبي با جدايه‌هاي گروه اول (M1، M2، M3 و M4)؛ ۲: لكه‌هاي موضعي نكروزه قرمز ناشي از مايه كوبي با جدايه‌هاي گروه دوم (M5، M6 و M7).

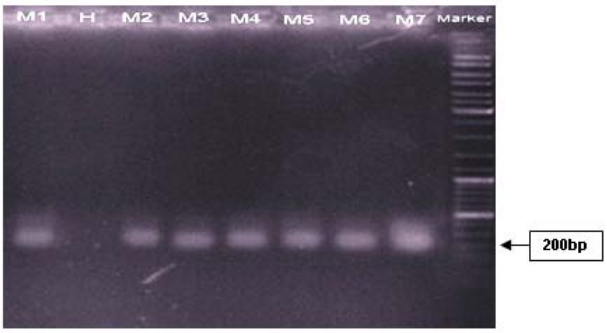
Fig. 5. Inoculated leaves of *Chenopodium quinoa*. 1: white necrotic local lesions, inoculated with the first group isolates (M1, M2, M3 and M4); 2: red necrotic local lesions, inoculated with the second group (M5, M6, and M7)

شكل ۶- لكه‌هاي موضعي نكروزه روي برگ گياه *Gomphrena globosa* مايه كوبي شده با جدايه‌هاي ويروس پسوروز مركبات در شرق مازندران

Fig.6. Necrotic local lesions on the leaves of *Gomphrena globosa*, inoculated with *Citrus psorosis virus* isolates in East of Mazandaran

بر اساس آزمون‌هاي حفاظت تقاطعي نيـز مشـخص شـده است که پسوروز B یک فرم شدید از پسـوروز A و مشـابه بـا CRSV می‌باشد اما یکسان با آن نیست (Da Graça *et al*., 1993). همچنین در بررسي‌هاي تفصيلي به عمل آمـده، پذيرفتـه شـده اسـت کـه CRSV تنهـا یـک تیـپ شـدید از پسـوروز اسـت (Roistacher, 1993; Da Graça *et al*., 1991). انـواعي از جدايه‌هاي مولد لکه حلقوي ويروس پسوروز مرکبات در ساير مناطق جهان، مشابه جدايه‌هاي لکه حلقوي مطالعه شده در اين بررسـي، باعـث ايجـاد لکـه‌هـاي موضـعي روي گيـاه محـک *Chenopodium quinoa*، عدم پوسته پوسته شدن تنـه در شـرايط باغي و بروز لکه‌هاي زرد حلقوي سيستميک روي برگ گريپ فروت در شرايط گلخانـه‌اي گرديـده بودنـد (Da Graça *et al*., 1993; Sarachu *et al*., 1988). بـا توجـه بـه نتـايج بـه دسـت آمده، جدايه‌هاي مورد مطالعه را مشـابه بـا جدايـه‌هـايي ماننـد CRSV-4 (Da Graça *et al*., 1991; Vogel and Bove, 1980)، می‌توان در گروه تيپ B بـدون علائـم تنـه ويـروس پسـوروز مرکبات جاي داد.

واکنش زنجيره‌اي پلي‌مراز با نسـخه بـرداري معکـوس: سي نمونه جمع آوري شده از درختـان پرتقـال تامسـون نـاول واجد علائم لکه حلقوي تنها بـا آغـازگر اختصاصـي ويـروس نقش حلقوي (CRSV) تکثير شده و يک قطعـه اختصاصـي در حدود ۲۰۰bp ايجاد نمودند (شکل ۷). اندازه اين قطعه با قطعه ۲۱۸bp که توسط اين جفـت آغـازگر بـراي جدايـه آرژانتينـي ويروس پسوروز مرکبات تکثير گرديـده (Garcia *et al*., 1997)، مطابقت داشـت. سـاير آغـازگرهـا شـامل آغـازگر اختصاصـي ويروس هنـدي لکـه حلقـوي مرکبـات (Nagpal *et al*., 2005)، آغـازگرهـاي مـرتبط بـا RNA2 (De La Torre *et al*., 2002) و RNA3 (Barthe *et al*., 1998) ويروس پسوروز مرکبات قادر بـه تشخيص جدايه‌هاي ايراني مورد بررسي نبودند. پادتن‌هاي چند همسانه يا تک همسانه‌اي توليد شـده عليـه پـروتئين پوششـي ويروس پسوروز مرکبات، نتايج متفاوتي در خصـوص توانـايي تشخيص جدايه‌هاي مختلف ويروس پسوروز مرکبات داشته‌اند (Derrick *et al*., 1988; Ebadi, 2007; Da Graça *et al*., 1993).



شکل ۷- قطعه حاصل از جدايه‌هاي به دست آمده از درختان پرتقـال واجد علائم لکه حلقوي، تکثير شـده توسـط آغـازگر اختصاصـي جدايـه CRSVويروس پسوروز مرکبات(جدايه‌هاي M1 تاM7 جدا شده از درختان پرتقال واجد علائم لکه حلقوي، H : نمونه جمع آوري شده از درخت فاقد علائم ، Marker : مارکر نردباني با فواصل ۱۰۰ جفت باز)

Fig.7. The obtained fragment from collected isolates of the orange trees with ring spot symptoms, amplified by the specific primer of *Citrus psorosis virus*-CRSV isolate (M1 to M7, the seven collected isolates; H, healthy samples collected from trees without any symptoms; Marker, molecular marker ladder with 100 bp intervals)

در بررسي‌هاي به عمل آمده روي دامنه ميزباني و گياهـان محک، از نظر بيولوژيکي نيـز اختلافـاتي در بـين جدايـه‌هـاي مختلـف ويـروس پسـوروز مرکبـات وجـود داشـته اسـت (Roistacher, 1991; Da Graça *et al*., 1993; Sharma *et al*., 2009). با توجه به نتايج به دست آمـده در واکـنش زنجيـره‌اي پلي‌مراز، می‌تـوان احتمـال داد کـه بـين جدايـه‌هـاي ايرانـي و جدايه‌هاي مولد لکـه حلقـوي ويـروس پسـوروز مرکبـات در برخي ديگر ازکشورها، قطعه‌اي مشابه و شـايد حفاظـت شـده روي RNA1 اين ويروس وجود داشته باشد و بتوان از آن براي شناسايي اين گروه از جدايه‌ها اسـتفاده نمـود. از سـوي ديگـر قابليت پادتن تک همسـانه‌اي 13C5 در تشـخيص جدايـه‌هـاي مولد لکه حلقوي، امکان استفاده از اين پادتن را براي شناسايي ساير جدايه‌هاي مولد لکه حلقوي ويروس پسوروز مرکبات در ديگر مناطق کشت مرکبات را مطرح می‌نمايد.

جدول ۱- نموده سازي هفت جدايه ويروس پسوروز مركبات، به دست آمده از درختان پرتقال تامسون ناول شرق مازندران

Table 1. Indexing of seven *Citrus psorosis virus* isolates, obtained from Thomson Navel trees in East of Mazandaran

جدايه **Isolate**	گروه بيولوژيكي **Biological group**	ميزبان و علائم **Host and symptoms**				محل نمونه برداري و علائم باغي روي درختان پرتقال تامسون ناول نمونه برداري شده **Sampling site and the symptoms on sampled Thomson Navel orange trees**
		نارنگي كلمانتين Clementine mandarin	گريپ فروت دانكن Duncan grapefruit	ليموترش يوركا Eureka lemon	سيترنج تروير Troyer citrange	
M1	1	cl	cl	tns	-	نكا، فاقد علائم پوسته شدن تنه، واجد نقوش و لكه‌هاي حلقوي كلروزه روي برگ‌هاي جوان و مسن و ميوه مخصوصاً در قسمت گلگاه، ريزش ميوه Neka, without any bark scaling symptoms, with chlorotic patterns and ring spots on mature and immature leaves and fruits, especially around the stylar end, fruit abscission
M2	1	cl	cl	tns	-	نكا، فاقد علائم پوسته شدن تنه، واجد نقوش و لكه‌هاي حلقوي كلروزه روي برگ‌هاي جوان و مسن و ميوه مخصوصاً در قسمت گلگاه، ريزش ميوه Neka, without bark scaling symptoms, with chlorotic patterns and ring spots on mature and immature leaves and fruits, especially around the stylar end, fruit abscission
M3	1	cl	cl	tns	-	نكا، فاقد علائم پوسته شدن تنه، واجد نقوش و لكه‌هاي حلقوي كلروزه روي برگ‌هاي جوان و مسن و ميوه مخصوصا در قسمت گلگاه، ريزش ميوه Neka, without any bark scaling symptoms, with chlorotic patterns and ring spots on mature and immature leaves and fruits, especially around the stylar end, fruit abscission
M4	1	cl	cl	tns	-	قائمشهر، فاقد علائم برگي و تنه، واجد لكه‌هاي حلقوي با ترشح صمغ روي ميوه، ريزش ميوه Ghaemshahr, without any bark and leaf symptoms, with ring spots along with gumming on fruit, fruit abscission
M5	2	-	-	-	cs	قائمشهر، فاقد علائم برگي و تنه، واجد لكه‌هاي حلقوي با ترشح صمغ روي ميوه، ريزش ميوه Ghaemshahr, without any bark and leaf symptoms, with ring spots along with gumming on fruit, fruit abscission
M6	2	-	-	-	cs	ساري، فاقد علائم پوسته شدن تنه، واجد نقوش و لكه‌هاي حلقوي كلروزه روي برگ‌هاي مسن و ميوه Sari, without any bark scaling symptoms, with chlorotic patterns and ring spots on mature leaves and fruits
M7	2	-	-	-	cs	ساري، فاقد علائم پوسته شدن تنه، واجد نقوش و لكه‌هاي حلقوي كلروزه روي برگ‌هاي مسن و ميوه Sari, without any bark scaling symptoms, with chlorotic patterns and spots on mature leaves and fruits

cl: لكه‌هاي زرد،tns: نكروز لبه‌هاي برگ، cs: نقاط زردرنگ، (-): بدون علائم

cl: Chlorotic lesions, **tns**: tip necrosis of leaves, **cs**: Chlorotic spots, **(-)**: without any symptoms

سپاسگزاري

از سركار خانم مهندس فاطمه پورولي، به خاطر در اختيار قرار دادن آنتي بـادي مونوكلونـال 13C5 و نمونـه‌هـاي شـاهد ليوفيليز شده (اهدايي دكتر مورنـو از اسـپانيا و دكتـر ميلنـي از ايتاليـا) صـميمانه تشـكر و قـدرداني مـي‌گـردد. از اتحاديـه شركت‌هاي تعاوني باغداران مازندران كه از هر گونه همكـاري در اين زمينه دريغ ننموده‌اند، سپاسگزاري به عمل مي‌آيد.

References

ADAMS, M. J., J. F. ANTONIW, M. BAR-JOSEPH, A. A. BRUNT, T. CANDRESSE, G. D. FOSTER, G. P. MARTELLI, R. G. MILNE and C. M. FAUQUET, 2004. The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation, Archives of Virology, No. 149: 1045–1060.

AHLAWAT, Y. S. and R. P. PANT, 2008. *Indian citrus ringspot virus*, In: Characterization, Diagnosis and Management of Plant Viruses, Volume 2: horticultural crops (RAO, G. P., A. MYRTA, K. S.LING, eds.). p. 97-107.

ALIOTO, D., M. GANGEMI, S. DEAGLIO, S. SPOSATO, E. LOISONI and R. G. MILNI, 1999. Improved detection of *Citrus psorosis virus* using polyclonal and monoclonal antibodies, Plant Pathology, No. 48: 735-741.

ALIOTO, D., M. MALFITANO, A. PELUSO, D. BOSCIA, and R. G. MILNE, 2001. Variability amongst *Citrus psorosis virus* (CPsV) sources in Campania, Italy, Abstracts, Proc. 14th Conf. IOCV. p. 439-440.

BARTHE, G. A., T. L. CECCARDI, 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, No. 79: 1531-1537.

BOVE, J. M. 1995. Virus and Virus-Like Disease of Citrus in the Near East Region, FAO Rome. 518 pp.

DA GRAÇA, J. V., M. BAR-JOSEPH and K. S. DERRICK, 1993. Imrnunoblot detection of citrus psorosis in Israel using citrus ringspot antiserum, Proc. 12th Conf. IOCV. p. 432- 434.

DA GRAÇA, J. V., R. F. LEE, P. MORENO, E. L. CIVEROLO and K. S. DERRICK, 1991. Comparison of citrus ringspot, psorosis and other virus like agents of citrus. Plant Disease, No. 75: 613-61 6.

DANOS, E. 1989. Development of psorosis-citrus pathosystems in controlled-environment chambers, Rivista di Agricoltura Subtropicale e Tropicale. No. 83: 275-282.

DE LA TORRE, S. M. E., C. LOPEZ, O. GRAU and M. L. GARCIA, 2002. RNA2 of *Citrus psorosis virus* is of negative polarity and has a single open reading frame in its complementary strand, Journal of General Virology, No. 83: 1777-1781.

DEHYAR, K. and M. HABASHI, 1974. *Citrus ring pattern virus* in the Caspian Sea area of Iran, Iranian Journal of Plant Pathology, No. 10: 17-20.

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, No. 78: 1298-1301.

DJELOUAH, K., O. POTERE, D. BOSCIA, A. M. D'ONGHIA and V. SAVINO, 2000. Production of monoclonal antibodies to Citrus psorosis associated virus, Proc. 14th Conf. IOCV. p. 152-159.

DURAN-VILA, N. and P. MORENO, 2000. Enfermedades de los Cítricos, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, Spain. 248 pp.

EBADI, A. 2007. Detection and distribution of *Citrus psorosis virus* (dominant type) by polymerase chain reaction(PCR) molecular method in Gorgan province and suburbs area, M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture, Gorgan Agricultural and Natural Sciences University. 69 pp. (in Persian with English summary).

EBRAHIMI, Y., F. ANVARI and K. SHAKHOLLESLAMI, 1988. Evaluation of eleven different cultivars as *ring pattern virus* disease indicator plants in Northern Iran, Proc. 10th Conf. IOCV. p. 62-64.

FAWCETT, H. S. 1936. Citrus Diseases and Their Control, 2nd ed., McGraw-Hill, New York. 659 pp.

FAWCETT, H. S. and A. A. BITANCOURT, 1943. Comparative symptomatology of psorosis varieties on citrus in California, Phytopathology, No. 33: 837-864.

FAWCETT, H. S. and L. C. COCHRAN, 1942. Symptom expression of psorosis of citrus as related to kind of inoculums, Phytopathology, No. 32: 22.

FRISON, E. A. and M. M. TAHER, 1991. Technical Guidelines for the Safe Movement of Citrus Germplasm, FAO/IBPGR, Rome, Italy, 45 pp.

GARCIA, M. L., M. E. SANCHEZ DE LA TORRE, E. DAL BO, K. DJELOUAH, N. ROUAG, E. LUISONI, R. G. MILNE and O. GRAU, 1997. Detection of *Citrus psorosis-ringspot virus* using RT-PCR and DAS-ELISA, Plant Pathology, No. 46: 830-836.

GARNSEY, S. M. and L. W. TIMMER, 1980. Mechanical transmissibility of *Citrus ringspot virus* isolates from Florida, Texas and California, Proc. 8th Conf. IOCV. p.

174-179.

GARNSEY, S. M. and L. W. TIMMER, 1988. Local lesion isolate of *Citrus ringspot virus* induces psorosis bark scaling, Proc. 10th Conf. IOCV. p. 334-339.

KLOTZ, L. J. 1973. Color Hand book of Citrus Diseases, 4th ed., Berkeley: University of California. 121 pp.

MARTIN, S., C. LOPEZ, M. L. GARCIA, G. NAUM-ONGANIA, O. GRAU, R. FLORES, P. MORENO and J. GUERRI, 2005. The complete nucleotide sequence of Spanish isolate of *Citrus psorosis virus*: Comparative analysis with other Ophioviruses, Archives of Virology, No. 150: 167-176.

MARTIN, 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 psorosis disease, Eur. Journal of Plant Pathology, No. 110: 747-757.

MILNE, R. G. 2005. Genus *Ophiovirus*, Proc. 8th Conf. IOCV. p. 673-679.

NAGPAL, A., S. SHARMA, B. SINGH, G. RANI, A. A. ZAIDI, V. HALLAN and G. S. VIRK, 2005. *In vitro* production of *Indian citrus ringspot virus* - free plants of kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour × *C. deliciosa* Tenora) by ovule culture, Journal of Plant Biotechnology, No. 7(4): 259-265.

NAVAS-CASTILLO, J. N, P. MORENO, J. F. BALLESTER-OLMOS, 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- A review, Proc. 12th Conf. IOCV. p. 139-154.

ROISTACHER, C. N., A. M. D'ONGHIA and K. DJELOUAH, 2000. Defining psorosis by biological indexing and ELISA, Proc. 14th Conf. IOCV, p. 144-151.

RUSTICI, G., R. G. MILNE and G. P. ACCOTTO, 2002. Nucleotide sequence, genome organization and phylogenetical analysis of *Indian citrus ringspot virus*, Archives of Virology, No. 147: 2215–2224.

SARACHU, A. N., E. L. ARRESE, C. CASAFUS, N. B. COSTA, M. L. GARCIA, O. GRAU, G. M. MARCO, and A. ROBLES, 1988. Biological assay and preliminary isolation of citrus psorosis disease agent from Argentina, Proc. 10th Conf. IOCV. p. 343-347.

SHARMA S., B. SINGH, G. RANI, A. ZAIDI, V. HALLAN, A. NAGPAL and G. S. Virk, 2004. Current status of *Indian citrus ringspot virus* (ICRSV) in kinnow orchards of Punjab and neighboring states, Journal of Current Bioscience, No. 2: 132–135.

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, No. 2: 27-31.

SWINGLE, W. T. and H. J. WEBBER, 1896. The principal disease of Citrus fruits in Florida. US Department of Agriculture, Division of Vegetable Physiology and Pathology, Bulletin, 8.

THIND, S. K., J. N. SHARMA, P. K. ARORA and S. S. CHEEMA, 1998. Effect of *Citrus ringspot virus* on quality of Kinnow mandarin fruits. Indian Journal of Virology, 14 (1): 91-92.

TIMMER, L. W. and GARNSEY, S. M. 1980. Natural spread of *Citrus ringspot virus* in Texas and its association with psorosis-like diseases in Florida and Texas, Proc. 8th Conf. IOCV. p. 167-173.

TIMMER, L. W., S. M. GARNSEY and J. J. MCRITCHIE, 1978. Comparative symptomatology of Florida and Texas isolates of *Citrus ringspot virus* on citrus and herbaceous hosts, Plant Disease Reporter, No. 62: 1054-1058.

VOGEL, R. and J. M. BOVE, 1980. Citrus ringspot in Corsica, Proc. 8th Conf. IOCV. p. 180-182.

WALLACE, J. M. 1957. Virus-strain interference in relation to symptoms of psorosis disease of citrus, Hilgar. No. 27: 223-245.

WALLACE, J. M. and R. J. DRAKE, 1968. Citrange stunt and ringspot, two previously undescribed virus diseases of citrus, Proc. 4th Conf. IOCV. p. 177-183.

WEATHERS, L. G. and M. K. HARJUNG, 1964. Transmission of citrus viruses by dodder, *Cuscuta subinclusa*, Plant Disease Reporter, No. 48: 102-103.

WHITESIDE, J. O., S. M. GARNSEY and L. W. TIMMER, 1989. Compendium of Citrus Diseases, APS Press. 80pp.