بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه صنعتی اصفهان
دانشکده کشاورزی

بررسی مولکولی و شناسایی جدایه‌های ویروئید اگزوکورتیس مرکبات در استان مازندران

پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی

سید محمد علوی

اساتید راهنما

دکتر علی آهون‌منش

دکتر هاله هاشمی‌سهی

1384

تشکر و قدردانی

شکر و سپاس آفریدگاری را که بشر را قدرت تعقل و تفکر عطا فرمود. یقین که الطاف بی‌کران آن دانای بی‌همتا مرا یاری فرمود تا قدم در راه تحصیل بگذارم. از اساتید ارجمندم جناب آقای دکتر علی آهون‌منش و سرکار خانم دکتر هاله هاشمی‌سهی که در اجرای این تحقیق همواره راهنما و پشتیبان من بوده‌اند و استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر حشمت‌اله رحیمیان که مشاورت پایان نامه را عهده‌دار شده‌اند و رهنمودهای ایشان کمک بزرگی در رفع مشکلات علمی پایان‌نامه بوده در نهایت خضوع تشکر و قدردانی می‌کنم. از اساتید مهربانم جناب آقایان دکتر مسعود بهار، بهرام شریف‌نبی و سیدالاسلامی که در طول این دوره از محضرشان استفاده نمودم سپاسگذارم و از رهنمون‌ها و محبت‌های بی‌دریغشان سپاسگزاری می‌نمایم. همچنین از دوستان و همکاران بزرگوارم در پژوهشگاه ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و زیست فن‌آوری آقایان علی برزگر، امیر رحیمی، اکبر افشار، بهمن حسینی، امید تقویان، علی سمائیان، علی شرفی و هومن میرزایی و خانم‌ها جورابچی، جعفری، رادکیش، دکتر رضوی، دکتر سنجریان، شریعتی و دکتر لهراسبی و گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان به خصوص هم‌کلاسی‌های خوبم آقای اخوان وخانم‌ها رحیمی، زیرک، عسکریان و هراتیان و دوستان خوبم آقایان عظیمی‌پور، یامچی، طالبی، محمدی، مهدی کفایتی، علیرضا زاده بافقی، مجید شبان، موسوی و فرهودی وجناب آقایان دکتر علی‌رضا نبی‌پور و دکتر مجید هاشمی به پاس همفکریها و همدلی‌هایشان در انجام این پروژه،کمال تشکر خود را ابراز می‌دارم. از زحمات بی‌دریغ همکاران و دوستان خوبم در دانشکده کشاورزی ساری خانم‌ها فرشته عربی و زهرا نیک‌روش و آقایان اخوتیان و رضاییان تشکر و امتنان خود را ابراز می‌دارم و تندرستی و بهروزی روزافزونشان را در گذرگاه زمان از خداوند متعال مسالت دارم. از زحمات محققان گرامی واحد تحقیق و توسعه نهال‌های گواهی شده مرکبات شرکت فجر ساری آقایان مهندس صبوروح، عرب، قایخلو و حسینی و کارکنان دیگر آن واحد، تشکر و تقدیر می‌نمایم. بخشی از هزینه اجرایی این تحقیق از محل اعتبارات پژوهشی پژوهشگاه ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و زیست‌فن‌آوری تامین شده است، بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از ریاست محترم وقت پژوهشگاه جناب آقای دکتر صنعتی و جناب آقای دکتر علی هاتف سلمانیان معاونت محترم پژوهشی این پژوهشگاه اعلام می‌دارم. درپایان از کلیه سروران و عزیزانی که همواره مرا مرهون عنایات و الطاف خود داشته قدردانی نموده، تندرستی و بهروزی را از خداوند متعال مسالت دارم. همچنین یاد و خاطره دیگر دوستان خوبم که ذکر نامشان در این نوشته کوتاه نمی‌گنجد در یاد و خاطرم خواهد ماند و برای آنها آرزوی موفقیت می‌کنم.

سید محمد علوی

اسفندماه 1384

دانشگاه صنعتی اصفهان

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوریهای ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه صنعتی اصفهان است.

بخشی از هزینه اجرای این تحقیق از سوی سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی پرداخت گردیده است که بدینوسیله تشکر و قدردانی می‌گردد.

تقدیم به

پدر و مادر عزیزم

دو بیکران بی‌همتا، دو زلال پاک‌اندیش و دو سرو قامتی که گوهر وجودشان، نسیم کلامشان و باران محبتشان را همواره بی هیچ منت و ادعا مرهمی نمودند بر خستگی‌هایم. آنان که راستی تمام تلاش خود را در راه تحصیل به من عرضه داشتند. در برابر وجود گرامیشان زانوی ادب بر زمین می‌نهم و با دلی مملو از عشق و محبت بر دستان پرمهرشان بوسه می‌زنم.

یاران با محبت روزهای زندگیم، **برادر و خواهرانم** که در تمام مراحل زندگی کمک و یاور من بوده‌اند.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست مطالب ..... هشت
فهرست جداول ..... یازده
فهرست شکل‌ها .....دوازده
چکیده فارسی.....1

فصل اول: **مقدمه و بررسی منابع**
1- 1- تاریخچه و اهمیت اقتصادی مرکبات در جهان و ایران 2
1- 2- تاریخچه بیماری اگزوکورتیس 4
1-3- اهمیت بیماری و اپیدمیولوژی 6
1-4- عامل بیماری 7
1-5- علایم بیماری و میزبان 9
1-6- روش های تشخیص 9
1-7- ویروئیدها و آرایه‌بندی آنها 10
1-8- ساختمان مولکولی ویروئیدها 11
1-9- خصوصیات فیزیکوشیمیایی ویروئیدها 15
1-10- محل استقرار ویروئیدها 16
1-11- تکثیر ویروئیدها.....16
1-12- حرکت ویروئیدها در گیاه 17
1-13- مکانیزم بیماریزایی 18
1-14- علایم ویروئیدها.....19
1-15- کنترل بیماری اگزوکورتیس 25
1-16- وضعیت بیماری اگزوکورتیس در ایران و لـزوم تحقیـق.....26

فصل دوم: **مواد و روشها**
2-1- نمونه‌برداری 28
2-2- مطالعات گلخانه‌ای و بررسی خصوصیات بیولوژیک نمونه‌ها 29
2-3 - استخراج آر. ان. ای کل 33
2-4- ارزیابی کمیت و کیفیت آر. ان. ای 34
2-5- واکنش نسخه‌برداری معکوس 37
2-6- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.....37
2-7- الکتروفورز روی ژل آگاروز.....38
2-8- آنالیز آنزیمی قطعه تکثیر شده 39

2-9- خالص‌سازی قطعه تکثیر شده از ژل آگاروز 40
2-10- آنالیز چند شکلی حاصل از فرم فضایی رشته های منفرد (SSCP) 40
2-11- استخراج پلاسمید pBluescript SK 41
2-12- برش آنزیمی و خالص‌سازی پلاسمید خطی شده 43
2-13- ساخت ناقل دارای انتهای اضافی تیمیدیلیک اسید از پلاسمید خطی شده 44
2-14- اتصال قطعه تکثیر شده ویروئید اگزوکورتیس به پلاسمید دارای انتهای تی اضافی 44
2-15- تهیه سلول مستعد از جدایه *E. coli* MC1061 45
2-16- انتقال دی. ان. ای نوترکیب به سلول مستعد باکتری 46
2-17- غربالگری 47
2-18- تعیین ترادف 49
2-19- آنالیز کامپیوتری ترادف‌ها 49
2-20- تهیه شناساگر 49
2-21- آزمون لکه گذاری نوکلئیک اسید 50
2-22- هیبریداسیون و ردیابی 50
2-23- RT – PCR ویروئیدهای دیگر مرکبات 52
2-24- آنالیز آنزیمی و تایید ویروئیدهای دیگر مرکبات 53
2-25- خالص‌سازی از ژل آگاروز و تعیین ترادف 53
2-26- Multiplex RT-PCR 53
2-27- الکتروفورز روی ژل آگاروز 55
2-28- استخراج آر. ان. ای از پوست میوه و RT–PCR ویروئید اگزوکورتیس و کوتولگی رازک 56

فصل سوم: نتایج و بحث

3-1- نمونه‌برداری و وضعیت بیماری اگزوکورتیس در استان مازندران 57
3-2- نتایج خصوصیات بیولوژیک نمونه‌ها 58
3-3- استخراج آر.ان.ای کل و بررسی کمی و کیفی آن 61
3-4- تکثیر ژنوم ویروئید اگزوکورتیس با روش RT-PCR 62
3-5- تایید محصول PCR با هضم آنزیمی 63
3-6- نتایج آنالیز چند شکلی حاصل از فرم فضایی رشته‌های منفرد 63
3-7- استخراج پلاسمید و برش آنزیمی 64
3-8- همسانه‌سازی دی. ان. ای ویروئید در ناقل دارای انتهای اضافی تی (T overhang) 65
3-9- تعیین ترادف و آنالیز کامپیوتری 67
3-10- نتایج آزمون لکه‌گذاری 68
3-11- RT-PCR ویروئید های دیگر مرکبات 69
3-12- نتایج Multiplex RT-PCR 71
3-13- مقایسه روشهای ردیابی انجام شده 72

3-14- نتایج RT-PCR ویروئیدهای کوتولگی رازک و اگزوکورتیس مرکبات از بافت پوست میوه 72

فصل چهارم: نتیجه‌گیری کلی و پیشنهادها

5 - 1- نتیجه‌گیری 74

5 - 1- پیشنهادها.....77

منابع 78

چکیده انگلیسی.....85

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول 1-1. علایم ایجاد شده توسط ویروئیدهای مرکبات روی پایه نارنج سه‌برگی 10
جدول 1-2. علایم ایجاد شده توسط ویروئیدهای مرکبات در بالنگ اتراگ 10
جدول 1-3. طبقه‌بندی ویروئیدها 13
جدول2-1. مشخصات نمونه‌های باغی 30
جدول2-2. نام، ترادف و دمای اتصال آغازگرهای مورد استفاده 39
جدول3-1. علائم ایجاد شده جدایه‌های مختلف روی بالنگ اتراگ Arizona 861-S1 با تعیین گونه ویروئید موجود در گیاه آلوده.....59
جدول3-2. میزان هم‌سانی ترادف جدایه‌های مازندران با جدایه‌های اگزوکورتیس بانک ژن (NCBI).....67
جدول 3-3. میزان هم‌سانی ترادف جدایه‌های مختلف ویروئید اگزوکورتیس مازندران با هم 68

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل 1-1. نواحی ساختمانی تعدادی از ویروئیدها 13
شکل1-2. ساختمان و مدل فضایی مولکول‌های ویروئیدها 20
شکل 1-3. علایم ایجاد شده توسط تعدادی از ویروئیدها در اندام‌های مختلف گیاهان میزبان 21
شکل1-4. کوتولگی درخت پرتقال روی پایه پونسیروس آلوده به بیماری اگزوکورتیس(چپ) در کنار درخت سالم (راست) 22
شکل 1-5. بدشکلی میوه بالنگ آلوده به بیماری اگزوکورتیس 22
شکل1-6. پیچیدگی برگ بالنگ آلوده به ویروییدهای مولد بیماری اگزوکورتیس(راست) در کنار بالنگ سالم (چپ) 23
شکل 1-7. مکانیسم تکثیر ویرئیدها در مسیرهای متقارن و نامتقارن با تشکیل دایره غلتان 23
شکل 1-8. مکانیسم فرضی بیماریزایی ویروئیدها با خاموش نمودن تعدادی ار ژنهای گیاهی و اثرات متقابل ژنوم ویروئیدها با پروتیین و آر. ان . ای میزبان در اندامکهایی که ویروئیدها تکثیر و حرکت می‌کنند 24
شکل1-9. حرکت درون سلولی، سلول به سلول و آوندی ویروئیدها در گیاه آلوده 24
شکل 2-1. علایم باغی تعدادی از جدایه‌ها 32
شکل 2-2. مشخصات ناقل pBluescript SK+/- 44
شکل3-1. تعدادی از علایم ایجاد شده در بالنگ اتراگ رقم Arizona 861-S1 60
شکل3-2. نتایج الکتروفورز آر. ان. ای در ژل آگاروز-فرمالدهید در حضو مارکر وزن مولکولی 100 جفت باز مثبت 61
شکل3-3. الکتروفورز محصول RT-PCR آر. ان. ای استخراج شده با آغازگرهای 18s rDNA 61
شکل3-4. نتایج RT-PCR ویروئید اگزوکورتیس در حضور مارکر وزن مولکولی 50 جفت باز(فرمنتاس) و گیاه سالم (چپ) 62
شکل3-5. الکتروفورز محصول برش آنزیمی جدایه‌های مختلف ویروئید اگزوکورتیس با مارکر 50 جفت باز (فرمنتاس) 63
شکل 3-6. پروفیل SSCP جدایه‌های مختلف ویروئید اگزوکورتیس 64
شکل 3-7. نتایج برش آنزیمی پلاسمید در مقایسه با مارکر 100 جفت باز مثبت و پلاسمید سالم(چپ) 65
شکل 3-8. اختلاف حرکتی پلاسمیدهای نوترکیب در روش غربالگری با حضور مارکر 100 جفت باز مثبت (فرمنتاس) 66
شکل 3-9. نتایج حاصل از کلنی PCR باکتریهای ترانسفورم شده با مارکر 100 جفت باز مثبت 66
شکل 3-10. الکتروفورز محصول PCR پلاسمیدهای نوترکیب با آغازگرهای M13 با حضور مارکر 100 جفت باز و پلاسمید غیر نوترکیب(چپ) 67

شکل 3-11. نتایج هیبریداسیون ژنوم ویروئید اگزوکورتیس.....69
شکل 3-12. نتایج RT-PCR ویروئیدهای مرکبات و مقایسه اندازه ژنوم انها با مارکر 100 جفت باز مثبت (راست).....70
شکل 3-13. آنالیز آنزیمی دی. ان. ای ویروئید کوتولگی رازک (*Cla* I) باحضور مارکر وزن مولکولی 50 جفت باز (Fermentas) 70
شکل 3-14. مقایسه دو روش Multiplex RT-PCR و Multiplex PCR برای ویروئیدهای مرکبات 71
شکل 3-15. نتیجه RT-PCR پوست میوه درخت پرتقال تامسون آلوده به ویروئیدهای مرکبات.....73

چکیده

اگزوکورتیس (Exocortis) یکی از بیماریهای مهم مرکبات است که در مناطق مرکبات‌کاری دنیا مشاهده می‌شود. علایم این بیماری شامل پوسته‌پوسته شدن پایه نارنج سه‌برگی و کوتولگی درختان مرکبات می‌باشد که در برخی باغهای مازندران دیده شده است. احتمال ویروئیدی بودن بیماری در سال‌های گذشته توسط منتظری و همکاران به وسیله انتقال بیماری با پیوند و به روش مکانیکی به تعدادی از گیاهان محک و مشاهده نوار آر. ان . ای ویروئیدی با الکتروفورز اسید نوکلئیک استخراج شده از گیاهان آلوده در ژل پلی‌اکریل‌آمید مشخص شده است. اطلاعات دقیق و کاملی در خصوص وجود گونه ویروئیدی مشخصی در درختان مظنون وجود ندارد و قطعی بودن و اثبات وجود گونه ویروئیدی مولد بیماری اگزوکورتیس در مازندران نیاز به بررسی مولکولی دارد. از آنجایی که گسترش ویروس تریستزا در مازندران سبب استفاده از پایه‌های حساس به اگزوکورتیس نظیر سیترنج و سیترومله (مقاوم به تریستزا) گردیده است، معرفی روش دقیق و سریع در تشخیص درختان آلوده به ویروئیدهای مولد بیماری اگزوکورتیس در مرکبات مازندران ضروری است. در این راستا در سال 1382 پیوندک‌هایی از چند درخت پرتقال تامسون و سانگین روی پایه نارنج سه‌برگی دارای علایم اگزوکورتیس تهیه و روی نهال‌های بالنگ اتراگ (Arizona 861-S1) پیوند زده شد و نهال‌ها در شرایط گلخانه (30 – 25 درجه سانتی‌گراد) نگهداری گردید. بعد از گذشت شش ماه، علایم پیچیدگی برگها و کوتولگی خفیف تا شدیدی در بالنگ‌های پیوند شده مشاهده گردید. از برگهای بالنگ‌های تلقیح شده آر. ان. ای استخراج شد و واکنش زنجیره ای پلیمراز با نسخه برداری معکوس (RT–PCR) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ویروئید اگزوکورتیس (CEVd) انجام گرفت. محصول PCR در ژل آگاروز 2% الکتروفورز گردید. در چند نمونه هیچ گونه نواری مشاهده نشد ولی در تعدادی ازنمونه‌ها نوار دی. ان. ای مربوط به CEVd با استفاده از کیت خالص‌سازی بازیافت شد و مورد آنالیز چند شکلی حاصل از فرم فضایی رشته‌های منفرد (SSCP) قرار گرفت. با توجه به تفاوت‌های مشاهده شده در SSCP، دی. ان. ای حاصل از تکثیر پنج جدایه انتخاب و در پلاسمید pBluescrip SK و با ساخت ناقل دارای انتهای اضافی تیمیدیلیک اسید از این پلاسمید، کلون شده و پلاسمید دارای دی. ان. ای هر ویروئید CEVd با آغازگرهای استاندارد M_{13} تعیین ترادف گردید. ترادفهای تعیین شده با کمک نرم افزار BLAST با توالی ویروئید CEVd بانک ژن (NCBI) مقایسه و میزان همسانی (identity) آنها تعیین گردید. تعدادی از نمونه‌هایی که دارای علایم بیماری اگزوکورتیس بودند فاقد ویروئید اگزوکورتیس بوده و از آنجایی که ویروئیدهای I–LSS، OS، خمیدگی برگ، IV، III مرکبات و کوتولگی رازک نیز مولد بیماری اگزوکورتیس هستند، اقدام به تکثیر دی. ان. ای این ویروئیدها با استفاده ازآغازگرهای اختصاصی آنها به طریق RT–PCR شد. محصول PCR در ژل آگاروز 2% الکتروفورز گردید. چند جدایه از هر گونه ویروئیدی تعیین ترادف شدند و حضور ویروئیدهای مزبور نیز در نمونه‌های واجد علایم اگزوکورتیس و بدون CEVd با کمک نرم‌افزار BLAST اثبات گردید. حضور تعداد متفاوتی از این ویروئیدها به طور همزمان در گیاهان دارای علایم اگزوکورتیس می‌تواند علت تنوع علایم مشاهده شده در بالنگ های آلوده باشد. در میان روشهای Uniplex RT–PCR، Multipex RT–PCR و هیبریداسیون نوکلئیک‌اسید با شناساگر سنتز شده با نوکلئوتید نشاندار شده با دیگوکسی‌جنین (DIG – [11] – dUTP) که جهت ردیابی ویروئید CEVd به کار گرفته شد، روش Uniplex RT–PCR، دقیق‌ترین و حساس‌ترین روش ردیابی CEVd تعیین گردید. این اولین گزارش از وقوع چنین ویروئیدهایی در درختان آلوده مرکبات در ایران می باشد.

فصل اول
مقدمه و بررسی منابع

1-1- تاریخچه و اهمیت اقتصادی مرکبات در جهان و ایران

مرکبات که امروزه یکی از مهمترین میوه‌های نیمه‌گرمسیری دنیا را تشکیل می دهد متعلق به خانواده *Rutaceae* و مهمترین جنس آن *Citrus* می‌باشد [1]. با افزایش تقاضای مصرف میوه و فراورده‌های مرکبات، تولید آن از چین (خواستگاه) به بیشتر نواحی حاره‌ای و نیمه‌حاره‌ای جهان گسترش یافت. بیشتر تولید مرکبات، مربوط به پرتقال و بعد از آن نارنگی، گریپ‌فروت[1] و لیمو می باشد. برزیل و ایالات متحده بزرگترین تولید کننده پرتقال هستند که 60% پرتقال جهان را تولید می‌کنند. ایالات متحده به ویژه فلوریدا بزرگترین تولید کننده گریپ‌فروت و لیمو است. بیشترین محصول مرکبات در چین نیز نارنگی است. تولید مرکبات به شرایط آب و هوایی خاصی نیاز دارد که این شرایط در مناطق گرم بین دو مدار 40 درجه شمالی و 40 درجه جنوبی (کمربند مرکبات) برقرار است. مناطق عمده کاشت این کمربند، در عرض جغرافیایی 20 تا 40 درجه شمالی و 20 تا 40 درجه جنوبی قرار دارند. علاوه بر مصارف خوراکی، با توسعه صنایع فراوری مرکبات، امکان تولید فراورده‌های جانبی از مرکبات نیز فراهم گردیده است تا از بقایای پوست، اسانس‌های روغنی و ترکیبات دیگر آن، استفاده بهینه صورت گیرد [4]. اولین شواهد موجود در دنیا درباره مرکبات مربوط به 2000 سال قبل از میلاد در دوره آشوریان است که در یک لیست طبی آشوری که دارای 66 متن طبی بوده به سدارت[2] که همان بالنگ است اشاره شده که احتمالاً در آن زمان جنبه زینتی داشته است [3]. این میوه از سالها بعد یعنی 300 سال قبل از میلاد در ایران کاشته

۱- Grapefruit
۲- Cedrat

می‌شده و در یادداشتهای یک گیاه‌شناس یونانی به نام تئوفراستوس[1] که در آن زمان همراه اسکندر مقدونی به ایران آمده بود به سیب ایرانی که همان بالنگ[2] است اشاره شده که در شوش و شوشتر و مناطق گرمسیری استان خوزستان می‌روئیده است [3]. تئوفراستوس وجود ترنج را در اروپا 250 سال قبل از میلاد قید نموده که این تاریخ با ایران 50 سال اختلاف دارد. در این صورت شاید بتوان گفت مرکبات 50 سال پیش از اروپا به ایران آورده شده است. بعضی از ارقام مرکبات (نارنج، لیمو، لایم، نارنگی) به وسیله تجار عرب از اروپا به ایران وارد شده که بین 1000 – 800 سال سابقه دارند ولی سوابق نشان می‌دهد کشت اقتصادی مرکبات در ایران از 300 سال تجاوز نمی‌کند [3]. اولین گروه اصلاح شده مرکبات که حدوداً 15 رقم بودند در سال 1313 – 1309 از ترکیه، ایتالیا و فلسطین وارد شدند. در سال 1339 نیز بذر نارنج سه‌برگی (پونسیروس تریفولیاتا[4]) که توسط ظهیرالدوله از ژاپن وارد شده بود در ایستگاه تحقیقات مرکبات رامسر کشت و مورد بررسی قرار گرفت. سرمازدگی سال 1342 که یک سرمازدگی جهانی بود و خسارت فراوانی به خزانه‌ها و باغات مرکبات شمال وارد کرد موجب گردید که 700/000 پیوندک از ارقام مختلف مانند واشنگتن ناول[4] و غیره وارد و در ایستگاههای تحقیقاتی شمال و جنوب تکثیر و کاشته شود. بذر ترویر ستیرنج[5] نیز برای اولین بار با این محموله وارد کشور گردید. استانهایی از کشور که کشت مرکبات در آنها مرسوم است اگر چه از دیدگاه فنی پرورش مرکبات ایده‌آل نیستند ولی علی‌رغم وجود بعضی از نارساییهای خاکی، آبی و اقلیمی، میوه‌های نارنگی انشو[6]، گریپ فروت و لیموترش در شمال و جنوب کشور از بهترین کیفیت جهانی برخوردار هستند [3]. سه ناحیه عمده مرکبات‌کاری در ایران قابل شناسایی است. نواحی ساحلی دریای خزر که شامل استانهای گیلان و مازنداران با طول بیش از 400 کیلومتر در ناحیه شمالی ایران می‌باشد که از شمال به دریای خزر و از جنوب به رشته‌کوه البرز محدود می‌گردد. میانگین بارندگی سالانه استان مازندران به میزان 1000 میلی‌متر می‌رسد. این استان دوره خشکی در ماههای تیر و مرداد اما با رطوبت نسبی بیش از 80% دارد. دمای زمستانها معمولاً در محدوده یک درجه سانتی‌گراد زیر صفر است اگرچه کاهش دما گاهی تا هفت درجه زیر صفر نیز می‌رسد. گونه‌ها و ارقام مرکبات موجود در کمربند ساحلی خزر، شامل درختان بذری

۱- Theophrastus
۲- pome de pers, *Citrus medica*
۳- *Poncirus trifoliata*
۴- Washington navel
۵- Troyer citrange
۶- Unshiu, Satsuma mandarin

پرتقال محلی (55%)، پرتقال محلی پیوند شده روی نارنج (20%)، پرتقالهای واشنگتن ناول، تامسون ناول[1] و خونی[2] روی پایه نارنج (5%) نارنگی انشو، کلمانتین[3] و محلی روی پایه نارنج (15%) و انواع مرکبات دیگر (5%) می‌باشد. اگرچه نارنج، پایه تجاری اصلی مورد استفاده در مازندران است اما از پایه های دیگر مانند پونسیروس نیز به طور محدود استفاده شده است. مرکبات‌کاری جنوب کشور با مساحت 36000 هکتار و در استانهای خوزستان، فارس و کرمان با بارندگی سالیانه 300 – 100 میلی متر دیده می‌شود. ارقام مرکبات این نواحی شامل پرتقال محلی بذری و یا روی پایه‌های نارنج، بکرایی[4] و لیمو به میزان 52/5% و لیموترش (لیموآب) به میزان 28/7% ، نارنگی محلی بذری (11/6%) ، لیموشیرین (10/4%) و ارقام دیگر (2/8%) از کل مرکبات را تشکیل می دهد. حدود 6000 هکتار از مرکبات ایران در طول سواحل خلیج فارس و دریای عمان کشت می‌گردند. شرایط آب و هوایی این منطقه برای ارقام لیموترش[5]، لیموشیرین و لمون مناسب است [16]. بطور کلی بیش از 100 رقم مختلف مرکبات طی سالهای 1356 – 1312 وارد ایران شده است. این ارقام که از کشورهای مصر، هند، ایتالیا، لبنان، مراکش، فلسطین، ترکیه و اتحاد جماهیر شوروی سابق وارد کشور شده اند به احتمال زیاد به یک یا تعداد بیشتری ویروس یا ویروئید آلوده بوده‌اند [16].

1-2- تاریخچه بیماری اگزوکورتیس

بیماری اگزوکورتیس[6] مرکبات که تحت عنوان Scaly butt نیز نام گرفته بود اولین بار در سال 1948 توسط فاست وکلاتز[7] گزارش گردید. این بیماری سبب پوسته‌پوسته شدن پایه‌های نارنج سه‌برگی می‌شود. بیتر و بنتون[8] نشان دادند، بیماری اگزوکورتیس با پیوند قابل انتقال است [19]. نام این بیماری از ترکیب دو کلمه یونانی Exo به معنی بیرونی و Cortis به مفهوم پوستی تشکیل شده است[31]. درختان روی پایه نارنج سه‌برگی به شدت کوتوله مانده و قطر پایه نیزکم شده و زیر محل پیوند، پوست‌اندازی زیادی اتفاق می‌افتد[19]. بیماری مشابهی به نام Scaly butt از نارنج سه‌برگی در استرالیا و از رنگپورلایم[9] از برزیل گزارش و بعداً مشخص گردیدکه بوسیله همان عامل اگزوکورتیس بوجود

١- Thompson navel
٢- Blood
٣- Clementine
٤- Backraii
٥ - Acid Lime
٦- Exocortis
٧- Fawcett & Klotz
٨- Bitter & Benton
٩- Rangpur Lime

می‌آید. سالهای زیادی تصور می‌شد که عامل این بیماری یک ویروس است ولی در سال 1972 توسط سمانچیک و ودرز عامل بیماری را یک مولکول آر. ان. ای[1] با وزن مولکولی پایین معرفی واصطلاح ویروئید[2] را برای آن انتخاب نمودند [63 و 65]. در سالهای1970،که هنوز تکنولوژی اسیدهای نوکلئیک در سطح امروزی نبود، ویروس‌شناسان گیاهی با بکارگیری گیاهان محک علفی[3] اقدام به شناسایی و معرفی عامل بیماری می‌نمودند. در آن زمان ویروئید اگزوکورتیس[4] با استفاده از گیاه محک جینورا[5] و بر اساس بروز علایمی نظیر کوتولگی ، خمیدگی[6] و کمرنگی برگ[7] در بوته‌های مایه‌زنی شده جینورا شناسایی می‌گردید. در حال حاضر، ویروئید اگزوکورتیس یکی از شناخته شده‌ترین ویروئیدهای موجود از لحاظ ساختمانی، تکثیر، دامنه میزبانی و خصوصیات زیست‌شناسی می‌باشد. با استفاده از گیاهان محک بیشتری که برای توصیف بیماری اگزوکورتیس بکار برده شد معلوم گردیده که بیماری اگزوکورتیس توسط تعدادی از ویروئیدها بوجود می‌آید که این ویروئیدها دامنه میزبانی کمتری از ویروئید اگزوکورتیس دارند [18].

3-1- اهمیت بیماری و اپیدمیولوژی

بیماری اگزوکورتیس یکی از بیماریهای مهم مرکبات در مناطق کشت پایه‌های حساس شناخته شده است. وجود اگزوکورتیس در پایه‌های نارنج سه‌برگی و لیمو رنگپور موجب کاهش اندازه‌های درخت و کاهش بازدهی محصول، به میزان زیاد می‌گردد، به نحوی که پس از 11 سال آلودگی به اگزوکورتیس در حدود 68-55 درصد از سایه‌انداز و به میزان 49-65/3 درصد از محصول آن کاسته می‌گردد[19]. در برزیل که به دلیل خسارت بیماری تریستزا به جای استفاده از پایه‌های نارنج، به پایه‌های پونسیروس و لیمو رنگپور روی آوردند، این مساله سبب پراکنش بیش از حد اگزوکورتیس در باغهای آن کشور گردید [19]. مطالعات نشان داده که اگر از برخی پایه‌های دیگرمخصوصاً سیترنج، رقم ترویر[8](بعنوان پایه) استفاده می‌شود، اگزوکورتیس تا حد زیادی موثرتر خواهد شد [19]. نورمن[9] در فلوریدا ، 620 درخت از 27 رقم مختلف مرکبات را به صورت تصادفی آزمایش نمود و 55% آنها را آلوده به اگزوکورتیس

۱- RNA
۲- Viroid
۳- Herbaceous indicator plants
۴- *Citrus exocortis viroid*
۵- *Gynura aurantiaca*
۶- Epinasty
۷- Distortion
۸ - Troyer citrange (*Poncirus trifoliate x Citrus sinensis*)
۹- Norman

تشخیص داد [19]. رویز[1] در ونزوئلا، 200 درخت از چهار رقم پرتقال در باغات مختلف را به صورت تصادفی ایندکس نمود. معلوم شد که 67% آنها به اگزوکورتیس آلوده می‌باشند [51]. حبشی براساس مشاهدات خود، علایم بیماری اگزوکورتیس و اشاعه آن در شمال ایران را شدید توصیف نموده است [8]. قدیمی‌ترین شواهد دال بر قدمت ویروئیدهای مرکبات در موزائیک کف یکی از پرستشگاههای قدیمی یهودیان در اسرائیل پیدا شده که شکل ظاهری میوه بالنگ (سیترون[2]) را با تغییر شکل[3] ناشی از بیماری اگزوکورتیس نشان می‌دهد. این یافته نشان می‌دهد که مرکبات و ویروئیدها دارای همزیستی[4] 1/5 تا 2 هزار ساله هستند. نتایج ایندکس کردن در نواحی زیادی از دنیا نشان می‌دهد که ویروئیدهای مرکبات دارای گسترش جهانی هستند [33]. قبلاً تصور می‌شد که گسترش یا افزایش میزان آلودگی به بیماری اگزوکورتیس عمدتاً نتیجه استفاده از پیوندک آلوده است. کالاوان[5] و همکاران، آلودگی به اگزوکورتیس را در سه درخت به ظاهر سالم که در شرایط خزانه، در مجاورت درختان آلوده به اگزوکورتیس هرس شده بودند را گزارش نمودند و اکنون این مسئله مطرح می‌شود که احتمالاً این آلودگی‌ها باید از طریق تماس ریشه ها و یا از طریق ناقلین اتفاق افتاده باشد. بنتون و همکاران در 1950 براساس شواهدی اظهار داشتند که بیماری بطور طبیعی در باغ انتقال نمی‌یابد و توسط بذر نیز قابل انتقال نیست زیرا گیاهچه های پونسیروس بدست آمده از بذر درخت آلوده، هیچکدام علایم بیماری را نشان نمی‌دهند [19]. علاوه بر این فریزر و لویت[6] حدود 1200 گیاهچه از بذور درختان آلوده تهیه کردند که بعد از گذشت 8 سال هیچکدام آثار بیماری را بروز ندادند. ولی بعداً مشخص شد که بیماری در گوجه فرنگی رقم راتگرز[7] از طریق بذر قابل انتقال می‌باشد [57]. لیرد و همکاران[8] در مورد امکان انتقال عامل بیماری اگزوکورتیس توسط حشراتی نظیر مگس سفید گلخانه[9]، عسلک[10]، شته سبز هلو[11]، شته پنبه[12]، شته اسپیره[13]، پسیل سیب زمینی[14] و زنجرک چغندرقند[15] تحقیقاتی انجام دادند. در این بررسی ها

---

١ - Ruiz
٢ - Citron (*Citrus medica*)
٣ - Malformation
٤ -Co-existed
٥ - Calavan
٦- Fraser & Levitt
٧ - Rutgers
٨ - Laird *et al*.
٩ - *Trialeurodes vaporariorum*
١٠ - *Bemisia tabaci*
١١ - *Myzus persicae*
١٢ - *Aphis gossypii*
١٣ - *Aphis spiraecola*
١٤ - *Paratioza cockerelli*
١٥- *Circulifer tenellus*

هیچگونه انتقال صورت نگرفت و محققین به این باور رسیدند که عامل بیماری اگزوکورتیس مرکبات، اساساً از طریق تکثیر گیاهان آلوده و وسایل پیوند و قلمه‌زنی اشاعه می‌یابد [38]. تحقیقات ابراهیمی و همکاران نیز نشان داد که راب[1] علیرغم ایجاد زخم روی شاخه‌های جوان، میوه و برگ مرکبات قادر به انتقال عامل بیماری اگزوکورتیس نیست [1]. ودرز[2] عامل اگزوکورتیس را توسط انگل سس[3] از مرکبات به مرکبات و از مرکبات به اطلسی با موفقیت انتقال داد. بعد از سیستمیک شدن پاتوژن در گل اطلسی، می‌توان آنرا توسط پیوند یا بوسیله مایه‌زنی عصاره آلوده انتقال داد [71]. گارنزی و جونز[4] ثابت کردند که بیمارگر مولد اگزوکورتیس توسط چاقوی پیوندزنی و وسایل هرس از بالنگ آلوده به بالنگ سالم قابل انتقال است. آنها اعلام نمودند که آلودگی درختان در باغات از طریق عملیاتی مثل هرس، بخصوص در مواقعی که پایه‌های بکار برده شده حساس به اگزوکورتیس باشند، اهمیت زیادی پیدا می‌کند [29]. نتایج بررسی‌ها نشان داده است که آلودگی درختان مرکبات به ویروئید II و III مرکبات، به صورت توأم بوده و این دو ویروئید در اکثر نمونه‌های دارای علایم اگزوکورتیس وجود دارند ولی ویروئید I مرکبات کمتر از بقیه دیده شده است. ویروئید IV مرکبات نیز به ندرت حضور دارد ولی فراوانی ویروئید اگزوکورتیس در نمونه‌های دارای علایم اگزوکورتیس متوسط می‌باشد [33].

1-4- عامل بیماری

تا قبل از 1968 تصور می‌شد که عامل بیماری غده‌دوکی سیب‌زمینی[5] و اگزوکورتیس مرکبات، ویروس می‌باشد. لذا برای تشخیص نوع ویروس عامل این بیماریها مطالعات زیادی صورت گرفت که بالاخره تلاش محققین برای خالص‌سازی عامل بیماریهای مزبور منجر به کشف ویروئید گردید [10]. تقریباً تمام اطلاعات موجود در مورد ویروئیدها، حاصل مطالعاتی است که روی عامل بیماری اگزوکورتیس و غده دوکی سیب‌زمینی صورت گرفته است. سمانچیک و ودرز مشخص نمودند که عامل بیماری اگزوکورتیس مرکبات در مقابل آنزیم دی اکسی ریبونوکلئاز[6] بی‌اثر نمی‌شود در حالیکه در حضور آنزیم ریبونوکلئاز[7] قدرت بیماریزایی خود را از دست می‌دهد. آنها با استفاده از فنول تا حدودی اقدام به خالص‌سازی عامل بیماری نمودند ولی در بررسی با میکروسکوپ الکترونی هیچ ذره ویروسی را

---

۱ - *Deroceras reticulatum*
۲ - Weathers
۳ - *Cuscuta subenclusa*
٤ - Garnsey & Jones
٥ - *Potato spindle tuber viroid*
٦- DNase
۷- RNase

مشاهده نکردند [62]. سمانچیک و ودرز با روش الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل امید نشان دادند که عامل بیماری اگزوکورتیس مرکبات یک مولکول آر.ان. ای با وزن مولکولی کم می‌باشد [62]. تقریباً همزمان با کشف عامل اگزوکورتیس مرکبات، دینر و رایمر[1] نیز در مورد پاتوژن بیماری غده دوکی سیب زمینی، براساس سرعت رسوب کم (10s)، حساسیت آن به آنزیم ریبونوکلئاز و عدم کاهش بیماریزایی پاتوژن تحت تاثیر فنول، پیشنهاد نمودند که عامل این بیماری یک آر. ان . ای آزاد می باشد [20]. دینر، نام ویروئید[2] را برای این عامل بیماری پیشنهاد نمود [18]. تاکنون هفت گونه ویروئید از مرکبات گزارش شده است که در بیماری اگزوکورتیس به عنوان عامل همراه با بیماری تلقی گردیده‌اند که عبارتند از:

ویروئید اگزوکورتیس مرکبات (*Citrus exocortis viroid*, CEVd)

ویروئید OS مرکبات (*Citrus viroid OS*, CVd – OS)

ویروئید I – LSS مرکبات (*Citrus viroid I – LSS*, CVd – I – LSS)

ویروئید خمیدگی برگ مرکبات (*Citrus bent leaf viroid*, CBLVd)

ویروئید کوتولگی رازک (*Hop stunt viroid*, HSVd)

ویروئید III مرکبات (*Citrus viroid III* , CVd – III)

ویروئید IV مرکبات (*Citrus viroid IV*, CVd – IV)

اگر این ویروئیدها به صورت توأم در گیاه آلوده وجود داشته باشند علایم شدید اگزوکورتیس و چنانچه تعداد کمتری از آنها با هم حضور داشته باشند علایم اگزوکورتیس، ملایمتر خواهد بود [33].

1-5- علایم بیماری و میزبان

کاملترین توصیف از اثرات اگزوکورتیس روی پونسیروس و سیترنج توسط بنتون و همکاران ارائه گردیده است [19]. مطابق گزارش آنها، اولین بار پوسته‌پوسته شدن روی تنه درخت، در زیر سطح خاک یا روی آن و یا در محل پیوند ظاهر می‌شود. پوسته مرده به عرض 2/5 -0/6 سانتی‌متر و به طول 7/5 سانتی‌متر بوده و ضخامت پوسته جدا شده 0/3 – 0/15 سانتی‌متر است. ممکن است مقدار کمی صمغ نیز در زیر پوست ترشح شود. گاهی این لکه‌ها به کندی گسترش یافته و برای چند سال فقط به قسمتی از پایه محدود می‌شوند. در حالات دیگر، پوسته‌پوسته شدن در مدت کوتاهی تمام سطح پایه را می‌گیرد. کنده شدن پوست در زیر خاک تا محدوده ریشه‌ها توسعه یافته و به دنبال آن ریشه‌های بزرگ از بین می‌روند.

۱- Diener & Raymer
۲- Viroid