بسم الله الرحمن الرحيم

بسمه تعالی

آیین نامه چاپ پایان نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت های علمی-پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد زیر متعهد می شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله) خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به ((دفتر نشر آثار علمی)) دانشگاه اطلاع دهد.

ماده۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت زیر را چاپ کند:

((کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده در رشته بیوتکنولوژی کشاورزی است که در سال ۱۳۸۷ در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای دکتر مسعود شمس بخش و مشاوره جناب آقای دکتر باقر یخچالی از آن دفاع شده است.))

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به ((دفتر نشر آثار علمی)) دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس تادیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتاب های عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب امیر امیری صادقان دانشجوی رشته بیوتکنولوژی کشاورزی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام ونام خانوادگی: امیر امیری صادقان

تاریخ و امضا:

دستور العمل حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه : با عنایت به سیاست های پژوهشی دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسان ها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیات علمی، دانشجویان، دانش آموختگان و دیگر همکاران طرح در مورد نتایج پژوهش های علمی که تحت عناوین پایان نامه، رساله و طرح های تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱- حقوق مادی و معنوی پایان نامه ها، رساله های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هرگونه بهره برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین نامه ها و دستورالعمل های مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان نامه/رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی می باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما نویسنده مسئول مقاله باشند.

تبصره : در مقالاتی که پس از دانش آموختگی به صورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان نامه و رساله منتشر می شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان نامه، رساله و تمامی طرح های تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و براساس آیین نامه های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره های ملی، منطقه ای و بین المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان نامه، رساله و تمامی طرح های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸۴/۴/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم الاجرا است و هرگونه تخلف از مفاد این دستورالعمل از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

پایان نامه کارشناسی ارشد

مهندسی کشاورزی –بیوتکنولوژی

بیان ژن پروتئین پوششی ویروس تریستزای مرکبات در *Escherichia coli*

نگارش:

امیر امیری صادقان

استاد راهنما:

دکترمسعود شمس بخش

استاد مشاور:

دکتر باقر یخچالی

پاییز ۱۳۸۷

اگر قابل تقدیم باشد

تقدیم به

پدر و مادرم

که گوهر جوانی و عمر خویش را به پای فرزندانشان ریختند

رضایتشان، همه آرزویم است.

همسر فداکار و دلسوزم

که یار و همراهم در همه مشکلاتم است

پروردگارا سپاسگزارم از اینکه ذره کوچکی از دریای بیکران علمت را به من نمایاندی تا زیبایی و عظمتت را درک کنم

اکنون که کار نگارش این تحقیق به پایان رسیده بر خود لازم می دانم از کلیه عزیزانی که در طول این دوره مرا یاری کرده اند تشکر و قدر دانی کنم

از پدر ومادر عزیزم که نه تنها در این دوره بلکه در تمام مراحل زندگیم همواره پشتیبان من بودند سپاسگزارم

از همسر فداکار و مهربانم که همراهی است صبور و دلسوز سپاسگزارم

از استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر شمس بخش استاد علم و اخلاق که فراتر از علم سعه صدر و نیک اندیشی را از ایشان آموختم سپاسگزارم

از استاد ارجمند جناب آقای دکتر پنجالی که زحمت مشاوره این تحقیق را برعهده داشتند و از حمایت های بی دریغشان تشکر می نمایم

از استادگران قدر جناب آقای دکتر جلالی جوادان برای مساعدت های ایشان در رفع کاستی ها کمال تشکر را دارم

از استادان بزرگوار جناب آقای دکتر معینی دکتر کریم زاده و دکتر دهقانی که در طول دوره تحصیل زحمات زیادی را متحمل شدند تشکر و قدر دانی می نمایم

در پایان شایسته است از تمام دوستان آقایان اخوه شیردل موسوی میرجلیلی محمودی ملکی چره نوری نژاد خانم ها خدایاری سپه پور دیماد فابیریکی طاهری تشکر و قدردانی نمایم

چکیده

ویروس تریستزای مرکبات (CTV) *Citrus tristeza virus* مهمترین بیمارگر مرکبات می‌باشد و خسارت هنگفتی به صنعت تولید این محصول در دنیا وارد می‌کند. به دلیل گسترش و شیوع CTV در ایران، مدیریت کنترل آن اهمیت بسزایی یافته است. از این رو تشخیص به‌موقع، دقیق و ارزان بیماری نیاز به بکارگیری روشی مناسب دارد. امروزه روش Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA) روشی معمول، معتبر و ارزان برای تشخیص ویروس در سطوح وسیع است. به منظور استفاده از این روش نیاز به تامین منبع آنتی‌ژن ویروسی برای استفاده در فرآیند تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال می‌باشد. در تحقیق حاضر ژن پروتئین پوششی CTV، (CTV-CP25) جدا شده از ایران که در ناقل pTZ57R/T همسانه‌سازی شده بود با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر و در ناقل بیانی pET26b همسانه‌سازی گردید و pET-CP25 نامیده شد. دو سویه BL21 و Rosetta Gami (DE3) باکتری *Escherichia coli*، با pET-CP25 تراریخته شد و سویه تراریخته به مدت یک شب در محیط LB و دمای ۳۷°C همراه با تکان رشد داده شد و پس از واکشت در روز بعد، بیان پروتئین پوششی با استفاده از IPTG القاء گردید. سپس نمونه برداری در ساعات مختلف پس از القاء، انجام و پروتئین محلول تام استخراج و در SDS-PAGE تفکیک شد. پس از تایید بیان پروتئین نوترکیب، به منظور بررسی ماهیت آن، لکه-گذاری وسترن با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال اختصاصی پروتئین پوششی ویروس تریستزا (تهیه شده از شرکت DSMZ آلمان) انجام گردید. نتایج این تحقیق نشان داد که پروتئین پوششی CTV در سلول باکتری بیان شده است.

کلمات کلیدی: ویروس تریستزای مرکبات (CTV)، بیان ژن پروتئین پوششی، *Escherichia coli*

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

مقدمه ۱
۲-۱ جایگاه مرکبات در جهان ٤
۲-۲ جایگاه مرکبات در ایران ٥
۲-۳ بیماری تریستزای مرکبات در جهان ٦
۲-٤ بیماری تریستزای مرکبات در ایران ۷
۲-٥ رده‌بندی (Taxonomy) ۹
۲-٦ خصوصیات مورفولوژیکی CTV ۱۰
۲-۷ دامنه میزبانی ۱۰
۲-۸ علائم بیماری تریستزای مرکبات ۱۰
۲-۹ انتقال CTV ۱۲
۲-۱۰ خصوصیات بیوشیمیایی ویروس تریستزای مرکبات ۱٤
۲-۱۱ ژنهای کد کننده پروتئینهای پوششی CTV ۱٤
۲-۱۱-۱ ژن CP25 (25 KD coat protein) ۱٤
۲-۱۱-۲ ژن CP27 (27KD coat protein) ۱٥
۲-۱۲ روشهای تشخیص جدایه‌های CTV ۱٦
۲-۱۲-۱ روشهای بیولوژیکی ۱٦
۲-۱۲-۲ روشهای سرولوژیکی ۱۷
۲-۱۲-۳ روشهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۱۸
۲-۱۳ فناوری DNA نوترکیب ۱۸
۲-۱٤ سیستمهای مورد استفاده در تولید پروتئینهای نوترکیب ۱۸
۲-۱٥ سیستم بیان پروتئین در *E. coli* ۱۹
۲-۱٦ ناقلهای ژن در *E. coli* : ۲۱
۲-۱٦-۱ پلاسمیدها ۲۱
۲-۱٦-۲ باکتریوفاژها: ۲۲
۲-۱۷ راهکارهای تولید پروتئینهای نوترکیب در *E. coli* و عوامل موثر در آن ۲۲

۲-۱۸ ناقلهای بیان کننده (Expression vectors) ۲۲
۲-۱۹ ارتباط بیان پروتئین با تعداد نسخه‌های پلاسمید ۲۵
۲-۲۰ نقش سیگنالهای نسخه‌برداری در بیان ۲۷
۲-۲۰-۱ پروموترها ۲۷
۲-۲۰-۲ خاتمه دهنده‌های رونویسی (Terminator) ۳۲
۲-۲۱ نقش سیگنالهای ترجمه در بیان ۳۳
۲-۲۱-۱ جایگاه اتصال ریبوزوم Ribosome Binding Site (RBS) ۳۳
۲-۲۱-۲ کدون شروع (AUG) ۳٤
۲-۲۱-۳ انتخاب کدون مناسب ۳٤
۲-۲۲ فیوژن پروتئینها (Gene Fusion یا Protein Fusion) ۳۵
۲-۲۳ هدایت پروتئینهای نوترکیب در *E. coli* ۳٦
۳-۱ تهیه محیط کشت ۳۸
۳-۲ نگهداری سویه‌ها و باکتریهای استفاده شده در این تحقیق ۳۸
۳-۳ استخراج DNA پلاسمیدی در مقیاس کم به روش لیز قلیایی (Miniprep) ٤۰
٤-۳ الکتروفورز DNA با ژل آگارز ٤۱
۵-۳ طراحی آغازگرهای اختصاصی ژن CTV-CP25 جهت همسانه‌سازی در ناقل بیانی pET26b ٤۲
٦-۳ انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ٤۵
۷-۳ تخلیص محصول PCR : ٤٦
۸-۳ برش آنزیمی محصول تخلیص شده PCR و تخلیص مجدد آن ٤۷
۹-۳ آماده سازی ناقل بیانی برای واکنش Ligation ٤۷
۱۰-۳ انجام واکنش Ligation ٤۸
۱۱-۳ تهیه سلولهای باکتری مستعد (Preparing Competent Cells) ٤۸
۱۲-۳ تراریخت‌سازی (Transformation) سلولهای باکتری مستعد توسط ناقلین پلاسمیدی ٤۹
۱۳-۳ غربالگری کلونی‌های ترانسفرم شده نوترکیب ۵۰
۱٤-۳ القاء بیان پروتئین نوترکیب و آماده‌سازی نمونه‌های پروتئین تام ۵۰
۱۵-۳ الکتروفورز پروتئین در ژل اکریل‌آمید و رنگ‌آمیزی ۵۱
۱٦-۳ وسترن بلاتینگ (Western Blotting) ۵۳

۳-۱۷: بررسی نرم‌افزاری تطابق کدونهای ژن CP25 همسانه‌سازی شده با کـدونهای معمـول *E. coli* ۵۵
٤-۱ استخراج پلاسمید از باکتری دارای ژن CP25 ..... ۵۷
٤-۲ تعیین دمای بهینه اتصال آغازگرهای اختصاصی ژن CP25 ..... ۵۷
٤-۳ تکثیر ژن CP25 ..... ۵۸
٤-٤ تخلیص محصول PCR ۵۹
٤-۵ استخراج پلاسمید pET26b (ناقل بیانی) ٦۰
٤-٦ غلظت‌سنجی و کنترل نهایی قطعات آماده Ligation ٦۰
٤-۷ غربالگری کلونی‌های تراریخت شده با پلاسمید نوترکیب pET-CP25 ..... ٦۱
٤-۸: بررسی بیان پروتئین نوترکیب CP25 ..... ٦۲
٤-۹ وسترن بلاتینگ ٦٤
٤-۱۰: بررسی میزان تطابق کدونهای توالی ژن CP25 همسانهسازی شده با کدونهای متعارف *E. coli* ٦٦
بحث: ٦۷
منابع ۷۰

فصل اول

مقدمه

مرکبات گروهی از میوه‌های گرمسیری و نیمه‌گرمسیری می‌باشد که در پنج قاره جهان و در ۱۱۳ کشور از جمله ایران پرورش داده می‌شود. مرکبات نه تنها از نظراقتصادی بلکه از نظر تغذیه-ای نیز از اهمیت زیادی برخوردار هستند (شمس‌کیا، ۱۳۸۳؛ وکیل‌پور ۱۳۸۳).

بطور کلی سطح زیر کشت مرکبات در ایران (شامل درختان بارور و نهال) در سال ۱۳۸٤ معادل ۲۷۰ هزار هکتار و میزان تولید معادل ٤۲۷۰ هزار تن بوده (بی‌نام، ۱۳۸٤) و امروزه ایران جزء ۱٤ کشور اول تولید کننده این محصول می‌باشد (Anonyme, 2007).

تریستزا یکی از مخرب‌ترین و از نظر اقتصادی مهمترین بیماری مرکبات در دنیا است (Bar-Joseph *et al*., 1989). در سال ۱۳٤۷ پس از یک دوره سرمای شدید در منطقه دریای خزر، اکثر درختان در باغ‌های استان مازندران از بین رفتند. صاحبان وقت باغ مهدشت ساری، بدون توجه به مقررات قرنطینه نباتی، تعداد ٤۰،۰۰۰ اصله نهال نارنگی انشو در سال ۱۳٤۷ و ۱۵۰۰۰ اصله نهال مشابه دیگر در سال ۱۳٤۹ از ژاپن وارد کردند (Bove, 1995). ویروس تریستزای مرکبات در ژاپن بومی (Endemic) بوده و طبق گزارش‌های محققین ژاپنی، اغلب درختان انشو در این کشور به *Citrus tristeza virus* (CTV) مبتلا بودند (Tanaka *et al*., 1968). لذا اینگونه تصور می‌رود که تمامی یا اکثر ۵۵۰۰۰ اصله نهال انشوی وارده از ژاپن به CTV آلوده بوده‌اند. این درختان روی پایه پونسیروس که مقاوم به CTV بوده و متداول‌ترین پایه در ژاپن است، قرار داشته (Miyakawa, 1987)، این نهال‌ها رشد و تولید متعارفی در باغ‌های مهدشت داشتند.

ویروس تریستزای مرکبات توسط شته‌ها قابل انتقال است. مهم‌ترین ناقل ویروس شته قهوه‌ای مرکبات (*Toxoptera citricida* Kirkaldy) می‌باشد که در ایران گزارش نشده است. به نظر می-رسد که در مناطقی که شته قهوه‌ای مرکبات وجود ندارد، شته پنبه (*Aphis gossypii* Golver) به عنوان یک ناقل موثر عمل می‌کند. در ایران شته جالیز یا پنبه (*A. gossypii*) وجود دارد (Bove, 1995).

اولین گزارش مستند از وجود بیماری تریستزا در باغ مهدشت ساری توسط ابراهیم‌نسبت و نین‌هاوس منتشر گردید (Ebrahim-Nesbeat and Nienhaus, 1978). وجود سویه‌های مختلف

ویروس تریستزا در درختان آلوده مهدشت، بر اساس واکنش‌های افتراقی گونه‌ها و ارقام مرکبات، به اثبات رسید (Rahimian, 1994). با مشاهده علائم زوال در درختان پرتقال پایه نارنج موجود در مجاورت درختان انشوی آلوده، اولین گزارش مربوط به شروع انتقال طبیعی ویروس منتشر گردید (Rahimian *et al.*, 2000a). درعین حال قابلیت انتقال چند جدایه CTV توسط شته پنبه در شرایط گلخانه‌ای بررسی گردید و به اثبات رسید (Rahimian *et al.* 2000b).

با توجه به عدم ورود نهال‌های آلوده به ویروس تریستزا و همچنین دماهای بالا در مناطق جنوبی، اینگونه تصور می‌شد که این مناطق عاری از ویروس باشند. در صورتی که حضور ویروس در این مناطق و قابلیت انتقال آن بررسی و اعلام گردید (Izadpanah *et al*., 2002).

راه‌کارهای متفاوتی برای کنترل بیماری تریستزا استفاده می‌شود. این راه‌کارها بر اساس حضور یا عدم حضور CTV در نواحی تولید مرکبات مورد استفاده قرار می‌گیرد. در مناطقی که CTV حضور ندارد با گواهی کردن پیوندک‌ها و اعمال اقدامات قرنطینه‌ای از ورود آن به این مناطق جلوگیری می‌شود. در مناطقی که حضور CTV کم باشد، بیماری را می‌توان با از بین بردن نهال-های آلوده کنترل کرد. استفاده از پایه‌های مقاوم به CTV، ایجاد مقاومت تقاطعی با استفاده از سویه‌های ضعیف، و در آینده استفاده از پایه‌های دست‌کاری شده از نظر ژنتیکی، از جمله روش-های کنترلی است که در مناطقی که CTV حالت اندمیک دارد استفاده می‌گردند (Lee and Rocha-pena, 1992). بنابراین اتخاذ استراتژی‌های مناسب جهت کاهش یا حذف خسارت ناشی از این پاتوژن و جلوگیری از گسترش آن، وابستگی شدید به تشخیص آن دارد که در حال حاضر در سطح وسیع، با استفاده از روش Enzyme Linked Immunosorbent assey (ELISA)، که روشی معمول و معتبر است، انجام می‌گیرد (Rocha-Pena and Lee, 1991). استفاده از این روش در مقیاس وسیع نیازمند مقادیر فراوانی از آنتی‌سرم اختصاصی و تامین مداوم آنتی‌ژن مربوطه برای فرآیند ایمن‌سازی (Immunization) است. تلاش‌های زیادی برای خالص‌سازی پیکره‌های ویروس تریستزا برای تهیه آنتی‌بادی پلی‌کلونال اختصاصی صورت گرفته است (Bar-Joseph *et al.*, 1989; Gonsalves *et al.*,1978; Lee *et al.*,1987;). به دلیل محدود بودن CTV به آوند

آبکشی، خالص‌سازی CTV مشکل بوده و عیار ویروس خالص شده پائین است و حتی در بهترین روش‌های تهیه آنتی‌بادی آلودگی به مواد گیاهی مشاهده گردیده است (Lee *et al*., 1987). برای فائق آمدن بر این مشکل، از راه‌های مختلفی از جمله جذب تقاطعی آنتی سرم با عصاره گیاه سالم (Rocha-Pena *et al*., 1991)، تولید پروتئین پوششی از طریق همسانه‌سازی ژن مربوطه و بیان آن در شرایط آزمایشگاهی (Nikolaeva *et al*., 1995) و یا خالص‌سازی پروتئین پوششی از طریق الکتروفورز نمونه خالص شده نسبی با SDS-PAGE (Marco and Gumpf, 1991) استفاده شده است.

یکی از رایج‌ترین میزبان‌ها برای تولید پروتئین نامتجانس (Heterologus)، باکتری *Escherichia coli* است. پیشرفت‌های اخیر در فهم اساس رونویسی، ترجمه و تاخوردن پروتئین و همچنین قابل دسترس بودن ابزارهای پیشرفته ژنتیکی، این باکتری را به یکی از میزبان‌های با ارزش برای بیان پروتئین‌های نوترکیب، تبدیل کرده است (Baneyx, 1999).

ویروس تریستزای مرکبات واجد یک پروتئین پوششی ۲۵ کیلو دالتونی است که ٪۹۵ طول پیکره ویروس را می‌پوشاند (Pappu *et al*., 1993b). ژن‌های پروتئین پوششی (CP25) جدایه‌های مختلفی از CTV با منشا جغرافیائی متفاوت به روش RT-PCR تکثیر و با یکدیگر مقایسه شده است (Penaranda *et al*., 1996; Roy *et al*., 2003; Sekiya *et al*., 1991; Mooney *et al*., 2000). نتایج این مطالعات نشان داد که توالی پروتئین پوششی جدایه‌های مختلف تا حد ٪۹۰ مشابهت دارد. و همچنین با توجه به بررسی پلی‌مرفیسم طول قطعات حاصل از برش آنزیم (RFLP[1]) توالی ژن کپسید ۲۲ ایزوله CTV جمع‌آوری شده از مناطق مختلف شمال و جنوب ایران تفاوت فاحشی بین ایزوله‌ها وجود ندارد (Barzegar *et al*., 2005).

با توجه به مطالب ذکر شده، تولید داخلی آنتی‌بادی علیه CTV برای استفاده در فرایند تشخیص به روش‌های سرولوژی مثل ELISA، در سطح وسیع، ضروری به نظر می‌رسد از این رو

1-RFLP: Restriction Fragments Length Polymorphism

در این تحقیق برای فراهم ساختن منبع نامحدود و مناسبی از آنتی‌ژن بـرای ایمـن‌سـازی در فراینـد تولید آنتی‌بادی، پروتئین پوششی (CP-25) این ویروس در باکتری *Escherichia coli* بیان گردید.

فصل دوم

بررسی منابع

۲-۱ جایگاه مرکبات در جهان

مرکبات میوه‌های گرمسیری و نیمه گرمسیری هستند که در اکثر نقاط دنیا از جمله ایران پرورش داده می‌شود. مرکبات نقش مهمی در اقتصاد و تغذیه دارد (شمس‌کیا، ۱۳۸۳؛ وکیل‌پور ۱۳۸۳). میوه مرکبات حاوی املاح و سرشار از ویتامین های A, B, C و P (ویتامین مانند) بوده و جنبه غذایی و دارویی دارند. نزدیک یکصد صنعت، از مرکبات در تولید فرآورده خود استفاده می-کنند (Clark and Prakash, 2001). از موارد مهم و قابل توجه در صنعت تولید و فرآوری مرکبات، بالا بودن ارزش افزوده این محصول از طریق تولید محصولات جانبی است. این محصولات شامل مواد اولیه دارویی، مواد غذایی، آرایشی و بهداشتی است. اسانس پوست میوه مرکبات می‌تواند به عنوان محصولی جانبی در کارخانجات صنایع تبدیلی مورد توجه قرار گیرد و یا اینکه به عنوان یک محصول اصلی به طور خاص از ارقام معینی استخراج شود. در سال ۱۹۷۹ نیمی از واردات اسانس کشور امریکا را اسانس تهیه شده از محصولات مرکبات بود (فقیه نصیری و همکاران، ۱۳۸٤).

مرکبات بین عرض‌های جغرافیایی ٤۰ درجه شمالی و جنوبی از خط استوا با خاک مناسب، رطوبت کافی و عدم یخبندان تولید می‌شود. اما به نظر می رسد در سطوح تجاری، مناطق عمده تولید مرکبات در نواحی نیمه‌گرمسیر بالاتر از ۲۰ درجه شمالی یا جنوبی قرار دارد (Davis and Albrigo, 1994). جایگاه خویشاوندان وحشی مرکبات درمناطق جنوب چین و هندوچین، جزایر مالزی و اندونزی و دامنه‌های جنوبی و گرمسیر کوه هیمالیا پراکنده است (Bar-Joseph *et al.*, 1989). طبق آمار FAO، (Food and Agriculture Organization of the united nation) در سال ۲۰۰۷، سطح زیر کشت مرکبات جهان ۱۰ میلیون هکتار و میزان تولید سالانه بالغ بر هفت میلیون تن می‌باشد (Anonyme, 2007).

در میان کشورهای عمده تولید کننده مرکبات، کشورهای نیجریه، چین، کلومبیا، گینه، فیلیپین از نظر سطح زیر کشت و تولید مقام‌های اول تا پنجم را به خود اختصاص می‌دهند و از لحاظ

عملکرد به ترتیب French polynesia، آمریکا، ایتالیا، قرقیزستان و آفریقای‌جنوبی، مقام‌های اول تا پنجم را دارند.

۲-۲ جایگاه مرکبات در ایران

مرکبات تاریخچه دیرینه‌ای در ایران دارد. بالنگ یا بادرنگ (*Citrus medica* L.) اولین گونه مرکبات است که در حدود ۲۵۰۰ سال پیش در ایران کشت شده است. نارنج، لمون (*C. limon* L.) و لیموترش‌های ریز (*C. aurantifolia*) توسط اعراب در سال ۱۰۰۰ میلادی به خاور نزدیک و ایران وارد شد. پرتقال در دوره صفویه به ایران و کشورهای عربی حوزه خلیج فارس آورده شد (Khoi, 1992). بدون شک بسیاری از گونه‌های مرکبات از هندوستان (در حدود سال ۱۵۰۰ میلادی) و سپس از اتحاد جماهیر شوروی سابق به ایران منتقل گردیدند (Bove, 1995).

سه ناحیه عمده کشت مرکبات در ایران وجود دارد، کمربند ساحلی دریای خزر، حوزه شمالی کاشت مرکبات در ایران است که از شمال به دریای خزر و از جنوب به سلسله جبال البرز محدود می‌گردد (Khoi, 1992). استان مازندران با تولید ۱/٦ میلیون تن، اولین استان مرکبات خیز کشور است (بی‌نام، ۸٤). در این استان متوسط باران سالیانه ۱۰۰۰ میلیمتر با یک دوره خشکی در ماه-های تیر و مرداد بوده و رطوبت نسبی معمولا بیش از ۸۰٪ است. دمای زمستان معمولا به حداقل یک درجه سانتیگراد زیر صفر رسیده ولی کاهش دما تا ۷- درجه همراه با بارش برف سنگین (تا ارتفاع یک متر) نیز اتفاق افتاده است (Khoi, 1992). گونه‌ها و ارقام مرکبات موجود در کمربند ساحلی خزر شامل درختان بذری پرتقال محلی (*Citrus sinensis* (L). Osb.) ۵۵ درصد، پرتقال محلی پیوند شده روی نارنج (*C. aurantium* L.) ۲۰ درصد، پرتقال واشنگتن‌ناول (Washington navel)، تامسون‌ناول (Thomson navel) و خونی (Blood) همگی روی پایه نارنج ۵ درصد، نارنگی انشو یا ساتسوما (*C. unshiu* (Macf.) Marc.) و کلمانتین (*C.reticulata* Blanco Clementine) ۱۵ درصد، و انواع دیگر مرکبات ۵ درصد می‌باشد (Khoi, 1992). نارنج، پایه

تجاری اصلی مورد استفاده در مازندران بوده ولی به طور محدود از پایه‌های دیگر مانند پونسیروس (*Poncirus trifoliate* Raf.) نیز استفاده شده است (Bove, 1995).

باغ‌های مرکبات نواحی جنوبی در استان‌های خوزستان، فارس و کرمان با میزان بارش سالیانه ۳۰۰-۱۰۰ میلیمتر وجود دارد. ارقام مرکبات این مناطق شامل: درختان پرتقال محلی بذری بر روی پایه نارنج، بکرائی و لیمو (lemon) ۵۲/۵ درصد، درختان پرتقال لیموترش یا لیموآب ۲۸/۷ درصد، درختان نارنگی محلی بذری ۱۱/٦ درصد، درختان لیمو شیرین ۱۰/٤ درصد و سایر ارقام ۲/۸ درصد است (Bove, 1995). در حدود ٦۰۰۰ هکتار از مرکبات ایران در طول سواحل خلیج فارس و دریای عمان گسترده شده است. شرایط آب و هوائی این منطقه برای ارقام لیمواسیدی، لیموشیرین و لمون مناسب می‌باشد (Bove, 1995). امروزه ایران با سطح زیر کشت ۲۷۰ هزار هکتار و میزان تولید معادل٤۲۷۰ هزار تن (بی‌نام، ۱۳۸٤) جزء ۱٤ کشور اول تولید کننده این محصول است (Anonyme, 2007).

۲-۳ بیماری تریستزای مرکبات در جهان

تریستزا یکی از مخرب‌ترین و از نظر اقتصادی از مهم‌ترین بیماری‌های مرکبات در دنیا است (Bar-Joseph *et al*., 1989). اگر چه منشاء ویروس تریستزا جنوب شرقی آسیاست (Wallace and Drake, 1978)، اما برای اولین بار بیماری ناشی از آن به صورت زوال مرکبات پیوند شده روی پایه نارنج در آفریقای جنوبی در حدود سال‌های ۱۹۱۰ گزارش گردید. یک نمونه مشابه از زوال در سال ۱۹۳۰ که باعث از بین رفتن درختان پرتقال روی پایه نارنج شد، از آژانتین و برزیل گزارش گردید. در ابتدا تصور می‌شد که تریستزا ناشی از ناسازگاری پایه و پیوندک و یا مشکلات تغذیه‌ای و بیماری ریشه‌ای باشد (Weber, 1943). در سال ۱۹٤٦ این بیماری توسط شته‌ها منتقل شده و بطور آزمایشگاهی ثابت شد که منشا ویروسی دارد (Bar-Joseph *et al*., 1989; Lee and Rocha-Pena, 1992). گزارش‌های اولیه مبنی بر ناسازگاری پایه و پیوندک، مشکلات تغذیه‌ای و زوال درختان مرکبات، بعنوان اشکال مختلف بیماری ویروسی که توسط CTV ایجاد می‌گردند،