

انتقال ویروس تریستیزای مرکبات توسط مهم ترین شته های مرکبات در مازندران

غلامرضا رسولیان^۱، سیروس آقاچانزاده^۲، حشمت الله رحیمیان^۳ و غلامحسین مصاحبی^۴
۱، ۲ و ۴- دانشیار، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران
۳- دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه مازندران
تاریخ پذیرش مقاله ۷۹/۱۲/۱۷

خلاصه

آزمایشهایی به منظور بررسی امکان انتقال ویروس تریستیزای مرکبات (Citrus Tristeza virus (CTV توسط شته های *A. gossypii* و *Aphis citricola Toxoptera aurantii* روی پرتقال، نارنگی انشو و کی لایم به عنوان دهنده و هم به عنوان گیرنده ویروس انجام گرفت. نهال های آلوده شده با پیوندک درختان انشوی حامل CTV به عنوان منبع اصلی ویروس به کار رفت. این گیاهان علائم بیماری را به صورت روشن شدن رگبرگ ها و فنجان شدن برگ ها نشان داده و الودگی آنها با مشاهده پیکره های ویروس تریستیزا در عصاره ساقه و برگ بوسیله میکروسکوپ الکترونی محرز شد. مدت تغذیه شته ها از گیاهان منبع آلودگی و گیاهان محک ۴۸-۲۴ ساعت بوده و به ازای هر گیاه محک حداقل ۲۰ شته بالغ جهت تغذیه در نظر گرفته شد. گیاهان کی لایم از بیست روز بعد از آلوده سازی توسط شته و یا پیوندک درختانی که به وسیله شته های آلوده به CTV تغذیه شده بودند تا یک سال برای مشاهده واکنش ارزیابی شدند. نتیجه آنکه هیچ گونه علائمی که نشان دهنده انتقال ویروس توسط شته ها باشد مشاهده نگردید.

واژه های کلیدی: تریستیزا، شته مرکبات، انشو، فنجان شدن برگ.

مقدمه

ویروس تریستیزای مرکبات *Citrus tristeza virus* (CTV) یک *Closterovirus* با پیکره های رشته ای قابل انعطاف به ابعاد ۲۰۰ در ۱۲-۱۰ نانومتر است که در آوندهای آبکش درختان مرکبات آلوده به تریستیزا وجود دارد (۴، ۷ و ۱۰). ماهیت تریستیزا به عنوان یک بیماری مسری زمانی معین شده که منگینی در سال ۱۹۴۶ در برزیل ویروس را بوسیله شته قهوه ای مرکبات (*Toxoptera citricidus* (Kirkaldy)) و والاس و فاست در همان سال در کالیفرنیا توسط پیوندک منتقل کردند (۱۰). بنا به گزارش بارجوزف^۱ و همکاران (۴) این بیماری در بیشتر مناطق مرکبات خیز دنیا گسترش دارد. این ویروس بومی آسیای جنوب شرقی بوده و ظاهراً از آنجا به مناطق

مرکبات خیز بوسیله انتقال درختان مرکبات یا پیوندک های آلوده راه یافته است (۸). نورمن و گرانت در سال ۱۹۵۳ مطالعات انتقال را با شته سبز مرکبات *Aphis citricola* (Van der Goot) از پرتقال آلوده به عنوان گیاه منبع ویروس به کی لایم (*Citrus aurantifolia* Christm) به عنوان گیاه محک انجام داده و نتیجه گرفتند که این شته ویروس را انتقال می دهد (۱۴). نورمن و همکاران (۱۲) شته جالیز (*A. gossypii* Glover) را نیز به عنوان ناقل ویروس تریستیزا اعلام نمودند. همچنین بارجوزف و لوبنستاین (۵) علائم بیماری تریستیزا را ۲۰ روز بعد از تغذیه شته های آلوده به ویروس روی کی لایم مشاهده کردند.

کلوترز (۱۰) شته سیاه مرکبات، شته قهوه ای مرکبات، شته جالیز، شته اسپیره، شته سیاه یونجه و *Dactynotus jaceae* را به عنوان ناقلین CTV ذکر می کند.

روش الکترون میکروسکپی

از پوست و برگ سرشاخه‌های گیاهان گیرنده نمونه‌برداری و از روش بار جوزف و همکاران (۴) استفاده گردید تا پارتیکل‌های ویروس در گیاهان آلوده در میدان دید میکروسکپ الکترونی مشاهده گردد.

۲- گیاه محک (indicator plant)

بذور کی‌لایم از ایستگاه تحقیقات کشاورزی جهرم دریافت گردید. این بذور در ماسه کاشته شده و پس از چهار برگه شدن نشاها به داخل گلدان‌های پلاستیکی محتوی کود حیوانی، ماسه و خاک به نسبت‌های مساوی منتقل شده و به عنوان محک مورد استفاده قرار گرفتند. گیاهان در گلخانه با حرارت ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۳- آزمایش‌های انتقال

آزمایش‌های انتقال ویروس در سال‌های ۱۳۷۱ و ۱۳۷۲ در گلخانه شیشه‌ای و فضای محصور با توری در آزمایشگاه تحقیقات آفات تنکابن انجام گرفت. برای بررسی امکان انتقال طبیعی از شته‌های غالب مرکبات منطقه به نام‌های شته سبز مرکبات (*A. citricola*)، شته سیاه مرکبات (*Toxoptera aurantii* (Fons boyer de)) و شته جالیز (*A. gossypii*) استفاده گردید. این شته‌ها از باغات مرکبات مازندران جمع‌آوری و روی پرتقال و نارنگی انشو پرورش داده شدند. کلنی‌های خالص شده در آزمایش‌های انتقال مورد استفاده قرار گرفتند. برای خالص‌سازی شته‌ها، از ابتدا از هر کدام از گونه‌های مورد آزمایش، یک پوره سن آخر روی پرتقال و نارنگی انشو رهاسازی شده و پس از بالغ شدن، شته‌ها به پوره‌زائی پرداختند. پس از اتمام پوره‌زائی شته‌های مادر را حذف نموده و پرورش همچنان ادامه پیدا کرده است. تشخیص شته با استفاده از کلید و با تایید بخش رده‌بندی سازمان تحقیقات صورت گرفته است.

در یکی از آزمایش‌ها از پرتقال، انشو و کی‌لایم آلوده به CTV به عنوان گیاهان دهنده ویروس و از شته‌های سبز و سیاه مرکبات به عنوان ناقل استفاده گردید. در آزمایش دیگر از شته جالیز به عنوان ناقل و گیاهان کی‌لایم و انشو به عنوان دهنده ویروس و کی‌لایم به عنوان گیرنده ویروس استفاده گردید.

هرموسو و همکاران (۹) در آزمایش‌های مقایسه‌ای انتقال جدایه‌های CTV توسط شته‌ها از پرتقال (گیاه دهنده ویروس) به کی‌لایم (گیاه گیرنده ویروس) گزارش نمودند که شته جالیز جدایه زردی گیاهچه را با کارایی کمتری (۶۰٪) نسبت به جدایه T-۳۰۰ که در اسپانیا شیوع دارد (۹۰٪) انتقال می‌دهد. شته سبز مرکبات این دو جدایه را با کارایی خیلی پائین انتقال می‌دهد ولی شته سیاه مرکبات و شته سبز هلو قادر به انتقال CTV نبودند. اختلاف در راندمان انتقال CTV به جدایه ویروس و گونه ناقل بستگی دارد. همچنین محققین اخیرالذکر در آزمایش‌های دیگری که ارقام پرتقال، نارنگی و لیموشیرین به عنوان میزبان‌های گیرنده و دهنده ویروس استفاده کرده اعلام نمودند انتقال ویروس از پرتقال بیشترین راندمان را دارد ولی وقتی که از لیمو شیرین به عنوان میزبان دهنده یا گیرنده ویروس استفاده گردید راندمان انتقال بسیار پایین بود.

مواد و روشها

۱- گیاهان منبع آلودگی

برای تهیه گیاهان آلوده به ویروس تریستیزای مرکبات از سه منبع به شرح زیر استفاده گردید:

-درختان نارنگی انشو آلوده به ویروس تریستیزا موجود در باغ مهدشت ساری

-درخت کی‌لایم آلوده به ویروس موجود در ایستگاه تحقیقات مرکبات رامسر

-درختان کی‌لایم آلوده به ویروس موجود در آزمایشگاه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی تنکابن

آلودگی این درختان به تریستیزا قبلاً محرز گردیده است (۱، ۳ و ۶). از درختان فوق‌الذکر پیوندک تهیه و بر روی نهال‌های کی‌لایم (۱۷ اصله)، پرتقال (۱۴ اصله) و انشو (۱۶ اصله) پیوند گردید. جهت حصول اطمینان از آلودگی نهال‌های پیوند شده از دو روش زیر استفاده گردید:

روش مایه زنی

بعد از کشت ۶-۲ ماه از زمان برقراری ارتباط پایه و پیوندک از گیاه گیرنده پیوندک گرفته و روی نهال‌های کی‌لایم پیوند گردید تا در صورت آلودگی علایم بیماری روی برگ‌ها به صورت روشن شدن رگبرگ‌ها و فنجان‌ی شدن برگ ظاهر گردد.

بنابراین بر اساس نتایج حاصل از مطالعات دو ساله می‌توان گفت که شته‌های مذکور در شرایط آزمایش این تحقیق قادر به انتقال ویروس تریستیزی مرکبات از روی پرتقال، نارنگی انشو و کی‌لایم به پرتقال، نارنگی انشو و کی‌لایم نبوده‌اند.

تاکنون از انتشارات طبیعی این بیماری در باغ‌های مرکبات ایران گزارشی وجود ندارد حبشی (۱) عدم انتقال ویروس تریستیزی را توسط شته سبز مرکبات از روی کی‌لایم آلوده و درختان انشوی آلوده به ویروس در باغ مهدشت ساری گزارش نموده است.

میناسیان (۲ و ۳) در ارتباط با پراکندگی ویروس تریستیزا در شمال ایران می‌نویسد ۹۰ تا ۱۰۰ درصد درختان نارنگی انشوی مورد بررسی در باغ مهدشت مبتلا به ویروس هستند در ایستگاه خرم آباد تنکابن یک نمونه انشو و پرتقال‌ها ملین و تامسون مشکوک و در آزمایشگاه خشکداران یک نمونه لیمویوریکا و در عباس‌آباد یک نارنگی انشو واکنش مثبت نشان دادند. همچنین وجود ویروس در عصاره شته‌های سبز و سیاه مرکبات را با استفاده از آزمایش‌های تست الیزا گزارش و اعلام نمود که اکتساب ویروس به وسیله شته صرفاً دلیل بر ناقل بودن شته نمی‌باشد. راکه و همکاران (۱۳) عدم انتقال ویروس تریستیزا را توسط شته‌های سبز و سیاه مرکبات گزارش کردند. هرموسو و همکاران (۹) گزارش نموده‌اند که شته سبز مرکبات جدایه‌های زردی گیاهچه و T-۳۰۰ را در اسپانیا با کارایی خیلی پایین انتقال می‌دهد ولی شته سیاه مرکبات قادر به انتقال آنها نمی‌باشد. رویستاکر و بارجوزف (۱۵) بر اساس مطالعات انجام گرفته در دنیا موارد زیر را عنوان کرده‌اند:

- جدایه‌هایی از CTV وجود دارد که غیر قابل انتقال بوده یا انتقال پایینی دارند.

- قابلیت انتقال جدایه‌های مختلف CTV توسط شته‌های ناقل بسیار متفاوت است.

بر اساس نظر بارجوزف ۳۰ سال دوره خواب (dormant period) برای انتقال ویروس تریستیزی مرکبات ممکن است وجود داشته باشد. همانطوریکه این فرضیه در کالیفرنیا بوقوع پیوست در اوایل دهه ۱۹۰۰ یا قبل از آن تریستیزا در کالیفرنیا وجود داشت ولی تا اوایل دهه ۱۹۴۰ گسترش نیافت.

در تمام آزمایش‌های انتقال زمان تغذیه شته‌ها از گیاهان آزمایشی برای کسب و نیز برای انتقال ویروس ۲۴-۴۸ ساعت در نظر گرفته شد. قابلیت شته‌ها در انتقال CTV بدین طریق بررسی گردید که شته‌ها بوسیله قلم مو و یا قطعات برگ حامل کلنی آنها روی شاخه‌های جوان گیاهان منبع آلودگی قرار داده شدند. شته‌ها پس از ۲۴-۴۸ ساعت تغذیه جمع‌آوری و روی برگ‌های جوان نهال‌های محک سالم قرار داده شدند. بعد از ۴۸ ساعت نهالها با حشره‌کش سمپاشی شدند تا شته‌ها از بین بروند و سپس نهال‌ها به گلخانه دیگری منتقل گردیدند. حداقل ۲۰ و حداکثر ۷۰ شته (متوسط، ۴۰ شته) اعم از پوره و بالغ برای هر نهال مورد استفاده قرار گرفت. حداقل تعداد شته‌های بالغ در هر کلنی بکار رفته ۲۰ عدد بود. از نهال‌های کی‌لایم سالم که مورد تغذیه شته‌ها قرار نگرفته بودند به عنوان شاهد استفاده گردید.

در آزمایشهایی که گیاهان گیرنده ویروس پرتقال و نارنگی انشو بودند سه ماه بعد از تلقیح ویروس توسط شته، پیوندک گرفته و روی نهال‌های کی‌لایم پیوند شدند تا در صورت انتقال ویروس علائم بیماری در کی‌لایم ظاهر گردد. نهال‌های مورد بررسی در طول پاییز و زمستان در شرایط گلخانه نگهداری شدند.

نتایج و بحث

پس از آلوده‌سازی نهال‌های پرتقال، نارنگی انشو و کی‌لایم به ویروس تریستیزی مرکبات از طریق پیوندک آلوده به CTV، روی برگ‌های کی‌لایم علائم روشن شدن رگبرگ‌ها (vein clearing) و فنجان‌ی شدن برگ (leaf cupping) بعد از ۶۰ روز مشاهده گردید. بر اساس این علائم ثابت شد که نهال‌ها به ویروس تریستیزی مرکبات آلوده هستند. در گیاهان منبع آلودگی پیکره‌های ویروس تریستیزی مرکبات با الکترون میکروسکوپ مشاهده گردید.

از آزمایش‌های انجام گرفته نتیجه گرفته می‌شود علائمی که بر انتقال ویروس تریستیزی مرکبات توسط شته سبز مرکبات، شته سیاه مرکبات و شته جالیز به گونه‌های مرکبات دلالت کند روی گیاهان محک مشاهده نگردید و این گیاهان با گیاهان شاهد فرقی نداشته است (جداول شماره ۱ و ۲).

جدول ۱ - نتیجه آزمایشهای انتقال CTV توسط شته‌های سبز و سیاه مرکبات

گیاه‌دهنده	گیاه‌گیرنده	تعداد شته برای هر گیاه		تعداد گیاهان آلوده شده	
		شته سبز	شته قهوه ای	تعداد گیاهان مایه‌زنی شده	
				مرکبات	مرکبات
انشو	پرتقال	۴۰	۵۰	$\frac{۱}{۸}$	$\frac{۱}{۴}$
انشو	انشو	۳۰	-	$\frac{۱}{۱۰}$	-
انشو	کی‌لایم	۴۰	۴۵	$\frac{۱}{۱۳}$	$\frac{۱}{۳۴}$
کی‌لایم	پرتقال	۴۵	-	$\frac{۱}{۸}$	-
کی‌لایم	کی‌لایم	۴۵	۵۰	$\frac{۱}{۸۰}$	$\frac{۱}{۵۳}$
کی‌لایم	انشو	۳۵	-	$\frac{۱}{۱۰}$	-
پرتقال	پرتقال	۳۰	۳۵	$\frac{۱}{۱۷}$	$\frac{۱}{۵}$
پرتقال	انشو	۷۰	۴۵	$\frac{۱}{۶}$	$\frac{۱}{۲۵}$
پرتقال	کی‌لایم	۴۰	۳۵	$\frac{۱}{۱۵}$	$\frac{۱}{۲۴}$

جدول ۲ - نتیجه آزمایشهای انتقال CTV توسط شته جالیز

گیاه‌دهنده و ویروس	گیاه‌گیرنده و ویروس	تعداد شته برای هر گیاه	تعداد گیاهان آلوده شده	
			تعداد گیاهان شته زنی شده	تعداد گیاهان آلوده شده
کی‌لایم	کی‌لایم	۳۰	$\frac{۱}{۷}$	
انشو	کی‌لایم	۲۵	$\frac{۱}{۵}$	

بنابراین تمام نتایج بر تفاوت قابلیت انتقال ویروس یا عدم انتقال آن توسط شته‌ها در نقاط مختلف دنیا دلالت می‌کند.

مطالعات محققین دنیا نشان داده است که شته قهوه‌ای مرکبات کارآترین شته در انتقال ویروس تریتستیزای مرکبات است (۱۱ و ۱۲). ولی بررسی‌های فونستیک در طول سال‌های ۱۳۷۱-۱۳۷۲ فقدان این شته را در شمال کشور نشان می‌دهد که این خود می‌تواند دلیلی بر عدم انتشار طبیعی بیماری در شمال ایران باشد.

میزان انتقال ویروس تریتستیزا توسط شته جالیز در دنیا از صفر تا صد درصد گزارش شده است.

بنا به گزارش اسمیت و فارالد (۱۶) شته سبز مرکبات ویروس تریتستیزا را به میزان ۷۵ درصد انتقال داده است.

بر اساس گزارش‌های محققین دنیا شته قهوه‌ای مرکبات ناقل بسیار قوی است شته جالیز قبلاً یک ناقل قوی نبوده ولی اکنون در اسرائیل و ایالات متحده خطرناک شده است و شته‌های سبز و سیاه مرکبات ناقل‌های خطرناک نیستند (۹).

Study on Transmission of Citrus Tristeza Virus by Major Citrus Aphids in Mazandaran

**GH. RASOOLIAN¹, S.AGHA JAN ZADEH², H. RAHIMIAN³
AND GH. MOSAHEBI⁴**

**1,2&4- Associate Professor, Former Graduate student and
Assistant Professor. Faculty of Agriculture University of Tehran.**

**3- Associate Professor, Faculty of Agriculture
University of Mazandaran, Iran.**

SUMMARY

The ability of citrus aphids to transmit citrus tristeza virus in northern of Iran was studied using Citrus unshiu, C. Sinesis and C. Aurantifolia as donor and recipient host species. Aphis citricola, A. gossypii and Toxoptera aurantii were used in transmission trials. Forty adults of each aphid species, after 24-48 hours of acquisition access feeding were transferred on to healthy recipient species and allowed to feed on the latter. Recipient plants were indexed for tristeza, at least twenty days after inoculation access period, using C. aurantifolia as indicator species. None of aphid species examined could transmit citrus tristeza virus from any other species.

Key words: Tristeza, Citrus , Aphids, Unshiu, Leaf cupping.

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری‌های ارزنده آقایان مهندس مستوفی پور و حبشی اعضای هیئت علمی آزمایشگاه تحقیقات تات و بیماری‌های گیاهی تنکابن و خانم مهندس کوهی از دانشکده کشاورزی کرج و زحمات خانم نجمی و آقایان غفاری و شاه‌منصوری تکنسین‌های آزمایشگاه تنکابن صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

همانطوریکه گارنزی و لی (۱۷) اشاره کرده‌اند انتقال ویروس در ارتباط با گونه‌های شته، جدایه‌های ویروس و میزبان‌های دهنده و گیرنده ویروس تفاوت دارد لذا آگاهی از اینکه با کدام نژاد ویروس در شمال کشور مواجه هستیم مسئله‌ای بسیار مهم و با اهمیت است و روشن کننده بعضی ابهاماتی است که در ارتباط با انتقال ویروس توسط شته‌های مرکبات وجود دارد.

REFERENCES

مراجع مورد استفاده

۱. حبشی، م. ۱۳۶۳. بررسی بیماری تریستیزای مرکبات. گزارش پژوهشی سالانه آزمایشگاه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی تنکابن، ۳ صفحه.
۲. میناسیان، و. ۱۳۶۲. بررسی تعیین آلودگی شته‌های مرکبات به ویروس تریستیزا توسط تست الیزا. خلاصه مقالات هفتمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه تهران. ۷۸-۷۹.
۳. میناسیان، و. ۱۳۶۲. تعیین پراکندگی ویروس تریستیزا مرکبات در شمال ایران. خلاصه مقالات هفتمین کنگره گیاهپزشکی ایران. دانشگاه تهران. ۷۴-۷۵.
4. Bar – Joseph, M., G. Loebenstein and J. Cohen. 1970. Partial purification of viruslike particles associated with the Citrus disease. *Phytopathology* 60: 75-78.
5. Bar – Joseph, M. and G. Loebenstein. 1973. Effects of Strain, Source Plant and temperature on the transmissibility of citrus tristeza virus by the melon aphid. *Phytopathology* 63: 710-720.
6. Ebrahim – Nesbat, F. and F. Niehaus. 1978. Occurrence of citrus virus in Iran. *Zetitschrift Furp Lanzenkrankheiten und Pflanzenschut.* 85: 308-312.
7. Garnsey, S. M. and R. F. Lee. 1988. Tristeza. PP. 48-51. In Whiteside, J. O., S. N. Garnsey and L. W. timmer (eds.) *Compendium of Citrus Diseases.* APS Press.
8. Garnsey, S. M., E. L. Civerolo, D. J. Gumpf, R. K. K. Yokomi and R. F. Lee. 1991. Development of a worldwide collection of CTV isolates. *Proc. 11 the Conf. Int. Ore. Citrus Virologists.* PP. 113-120.
9. Hermoso De Mendoza, A., J. F. Ballester – olmos and J. A. Pina. 1986. Comparative aphid transmission of a common CTV isolate and a new severe CTV isolare recently introduced in Spain. *Proc. 10th Cont. int. Org. Citrus Virologists.* PP. 20-21.
10. Klots, L. J. 1973. *Color handbook of citrus diseases publisher. Riverside California.* 148 PP.
11. Knorr, L. C. and W. C. Price 1958. Tristeza. PP. 82-83. In Pratt, R. M. (ed.) *Florida guide to citrus Insects, Diseases and Nutritional Disorders in Color.* Florida.
12. Norman, P. A., R. A. Sutton and A. K. Burditt. 1968. Factors affecting transmission of tristeza virus by melon aphid *J. of EC. Ent.* 61: 238-242.
13. Raccah, B., G. Loebenstein and M. Bar – Joseph. 1976. Transmission of CTV by the melon aphid. *Phytopathology* 66: 1102-1104.
14. Roistacher, C. N. and M. Bar – Joseph. 1987. Aphid transmission of citrus tristeza virus. *Phytophy lactica* 19: 163-167.
15. Roistacher, C. N. and M. Bar – Joseph. 1984. Transmission of tristeza and seedling yellows tristeza virus by *A. gossypi* from sweet orange, grape fruit and lemon to Mexican lime, grapefruit and lemon. *Proc 9th. Conf. Int. Org. Citrus virologists.* PP. 9-18.
16. Smith, G. S. and C. G. Farrald. 1988. Experimental transmission of CTV by a Texas USA Population of *A. Citricola* from Mars orange. *J. Rio Grande Val. Hort. Soc.* 41: 111-114.