



## Comparison of Symptoms, Whole Genome Sequencing, and Phylogenetic Analysis of Isolates of *Citrus tristeza virus* from Mazandaran and Fars Provinces in Iran

N. Rouhani<sup>1</sup>, M. Zakiaghl<sup>ID 2\*</sup>, M. Mehrvar<sup>ID 3</sup>

Received: 24-06-2023

Revised: 09-09-2023

Accepted: 13-09-2023

Available Online: 13-09-2023

**How to cite this article:**

Rouhani, N., Zakiaghl, M., & Mehrvar, M. (2023). Comparison of symptoms, whole genome sequencing, and phylogenetic analysis of isolates of *Citrus tristeza virus* from Mazandaran and Fars provinces in Iran. *Journal of Iranian Plant Protection Research*, 37(3), 237-258. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/jpp.2023.83109.1152>

### Introduction

*Citrus tristeza virus* (CTV) is one of the most devastating citrus diseases in Iran. The CTV genome is a positive single-stranded RNA molecule with a size of 19.3 kb containing 12 open reading frames (ORFs). CTV encodes two different coat proteins, of which the small coat protein (Cpm) covers only the 3' end of the genome. CTV infected trees show symptoms such as stunting, yellows, reduced vigor and death. In addition, CTV generates three typical disease syndromes, including quick decline, stem pitting and seedling yellows. In total, more than 259 thousand hectares of citrus are grown in the north and south of Iran. Considering the lack of the complete genome sequence of Iranian CTV isolates and the different climatic conditions in citrus cultivation in the north and south of Iran, the genome of CTV isolates from Iran was determined for the first time and their phylogenetic relationships with other CTV isolates were studied.

### Materials and Methods

In spring and fall 2015, 30 samples from Mazandaran province in northern Iran and 25 samples from Fars province in southern Iran were collected from trees suspected of being infected with CTVs. Total RNA was extracted using the RNX-Plus kit according to the manufacturer's instructions. CTV was identified using the specific primer pair CPF (5'AAAGAAGGCGACGATGTTGT3') and CPR (5'AGCTCCGGTCCAAGAAATCTG3') designed based on the coat protein gene of CTV. Reverse transcription was performed using MMuLV reverse transcriptase (Pars Tuos, Iran) and PCR reaction was performed using Amplicon 2x PCR Master Mix (Amplicon, Denmark). Infected samples were grafted onto sour orange seedlings. sRNAs were extracted using a protocol developed by Carra *et al.* (2006), and sRNA libraries were prepared according to the CATS protocol (Turchinovich *et al.*, 2014). One microgram of each library was sequenced on the Illumina HiSeq2500 platform from Macrogen, South Korea. The CTV strains were determined by virtual replication and digestion or alignment of the region between the small coat protein (Cpm) and coat protein (Cp) genes. The phylogenetic tree was constructed by the maximum likelihood method using the T92+I nucleotide substitution model with 500 bootstrap repeats by MEGA7. The nucleotide and amino acid similarity matrix was calculated using SDTv.1.2 software. Potential recombination events in the genome were determined using RDP v.5.5.

1, 2 and 3- Ph.D. Graduated in Plant Pathology and Associate Professors, Department of Plant Pathology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, respectively.

(\*- Corresponding Author Email: [zakiaghl@um.ac.ir](mailto:zakiaghl@um.ac.ir))

<https://doi.org/10.22067/jpp.2023.83109.1152>

## Results and Discussion

CTV infection was detected in 17 samples from Mazandaran province (56% of samples) and in 8 samples from Fars province (33% of samples) using a CPF/R-specific primer pair. CTV symptoms were mild to severe stunting, chlorosis, yellowing, vein yellowing, and severe decline in the citrus samples from the north of Iran, while CTV symptoms in the samples from the south of Iran were stunting, chlorosis, dieback and quick decline. Three months post inoculation, symptoms of severe stunting and chlorosis appeared in seedlings inoculated with isolates from the north, while mild stunting and yellowing appeared in seedlings of sour orange inoculated with CTV isolates from the south. By assembling the contigs obtained from the RNA-seq data, the complete genomes of IR-North1, IR-North2, IR-South1, and IR-South2 isolates were reconstructed with lengths of 19296, 19302, 19252, and 19251 nucleotides, respectively. The Iranian CTV isolates had nucleotide similarity in the range of 95.2-77.5% with other CTV isolates deposited in GenBank. The polymerase, P65, and coat protein genes of the Iranian CTV isolates showed identity at the amino acid level of 80.6-94.1%, 88-93.9%, and 92.4-96.4%, respectively, with other CTV isolates. Analysis of the CTV strains revealed that IR-North1 resembles the severe decline strain belonging to genotypic group T36, while IR-South2, IR-North2, and IR-South1 belong to the stem pitting and seedling yellows strains of genotypic group VT/T3 and are similar to strains T3, SY, and T318A, respectively. In the phylogenetic tree based on the full length of the CTV genome, three subclades were designated: VT, T68, and T36. IR-North2, IR-South1, and IR-South2 isolates were grouped into VT, and IR-North1 isolate was grouped into T36. Like the reference CTV isolate, the four Iranian CTV isolates had 12 open reading frames. Examination of the Replicase, RdRp, P65, P61, CPm, and CP proteins revealed 280 amino acid substitutions in 33 conserved motifs in Iranian CTV isolates. The isolate IR-North1 had only five substitutions; however, 97, 85, and 93 substitutions occurred in the isolates IR-North2, IR-South1, and IR-South2, respectively. Most substitutions were found in the replicase and p61 proteins, which are involved in virus replication and assembly, respectively. RdRp and p23 proteins had the least amino acid substitutions. No known conserved motif was observed in P33, P6, P18, P13, and P20 proteins. In addition, IR-North1, IR-North2, and IR-South1 were recombinant. In IR-North1, 1426 nucleotides in the P65 gene and 773 and 2444 nucleotides in the replicase gene were recombinant in IR-North2 and IR-South1 isolates, respectively.

## Conclusion

An analysis of symptoms, nucleotide diversity, dominant strains, and the phylogenetic relationship of the four Iranian CTV isolates sequenced in this study revealed that two isolates from northern Iran were quick decline and seedling yellows strains, falling within the genotypic groups T36 and VT. These groups were distinguished by distinct symptoms and a separate phylogenetic position. Conversely, the two southern CTV isolates were closely associated with CTV stem pitting strains, classified into genotypic groups VT and T3, sharing a close phylogenetic position.

**Keywords:** Citrus, Quick decline, NGS, Race, Seedling yellows, Stem pitting

## مقاله پژوهشی

جلد ۳۷ شماره ۳، پاییز ۱۴۰۲، ص. ۲۵۸-۲۳۷

## مقایسه علایم، تعیین توالی کامل و تحلیل فیلوژنتیکی جدایه‌های ویروس تریستزای مرکبات از استان‌های مازندران و فارس

ندا روحانی<sup>۱</sup> - محمد زکی عقل<sup>۲\*</sup> - محسن مهرور<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۰۳

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۶/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۲

## چکیده

ویروس تریستزای مرکبات (*Citrus tristeza virus-CTV*) یکی از بیماری‌های مهم درختان مرکبات در اغلب مرکبات کاری‌های ایران است. در این تحقیق توالی کامل ویروس تریستزای مرکبات از دو منطقه مرکبات خیز استان مازندران و استان فارس تعیین و برخی صفات بیولوژیکی و مولکولی آن‌ها با یکدیگر مقایسه شده است. ۵۶ درصد از نمونه‌های جمع‌آوری شده از استان مازندران و ۳۲ درصد نمونه‌های تهیه شده از استان فارس در آزمون زنجیره‌ای پلی‌مراز آلوده به ویروس تریستزای مرکبات بودند. علایم CTV در نمونه‌های مرکبات استان مازندران کوتولگی خفیف تا شدید، سرخشکیدگی، زردی، زردی رگبرگ و زوال سریع بود در حالی که در نمونه‌های استان فارس علایم CTV، کوتولگی، سبزخشکیدگی، زردی، و سرخشکیدگی شاخه‌ها بود. سه ماه پس از مایه‌زنی نیز علائم کوتولگی شدید، رگبرگ روشنی، زردی و ریزبرگی در نهال‌های مایه‌زنی شده با جدایه‌های استان مازندران و علایم کوتولگی خفیف، رگبرگ روشنی، زردی و ریزبرگی در نهال‌های نارنج بذری مایه‌زنی شده با جدایه‌های استان فارس ایجاد شد. از درختان مرکبات آلوده به تریستزا از استان‌های فارس و مازندران نمونه‌برداری و از آنها کتابخانه sRNA تهیه و توالی‌یابی شدند. نتایج نشان داد که طول ژنوم کامل بازسازی شده برای جدایه‌های IR-North1، IR-North2، IR-South1 و IR-South2 به ترتیب ۱۹۳۹۶، ۱۹۳۰۲، ۱۹۲۵۲ و ۱۹۲۵۱ نوکلئوتید است و در سطح نوکلئوتیدی با سایر جدایه‌های CTV موجود در بانک ژن بین ۹۵/۲-۷۷/۵ درصد شباهت داشتند. بررسی توالی پروتئین‌ها نشان دهنده وجود ۲۸۰ جایگزینی در ۳۳ موتیف در جدایه‌های توالی‌یابی شده CTV بود. کمترین تغییرات در جدایه IR-North1 با پنج جایگزینی بود. در جدایه‌های IR-North2، IR-South1 و IR-South2 به ترتیب ۹۷، ۸۵ و ۹۳ جایگزینی اتفاق افتاده بود. بیشترین جایگزینی در چارچوب‌های ژنی ORF1a و p61 بود. تعیین سویه جدایه‌ها با همانندسازی و هضم مجازی و هم‌ردیف‌سازی ناحیه بین ژن‌های پوشش پروتئینی کوچک (Cpm) و پوشش پروتئینی نشان داد که جدایه IR-North1 مشابه نژادهای مولد زوال سریع و سویه T36 و جدایه‌های IR-South2، IR-North2 و IR-South1 از نژادهای مولد ساقه آبله‌ای و زردی نهالچه و به ترتیب مشابه با سویه T3، SY و T318A هستند. در درخت فیلوژنی ترسیم شده بر اساس طول کامل ژنوم نیز سه جدایه IR-North2، IR-South1 و IR-South2، در گروه VT و جدایه IR-North 1 در گروه T36 قرار گرفتند. همچنین بررسی وقوع نوترکیبی احتمالی در جدایه‌های ایرانی نشان داد که جدایه‌های IR-North1، IR-South1 و IR-South2 در ژن‌های رپلیکاز و P65 نوترکیب هستند. نتایج بررسی علائم و توالی کامل چهار جدایه بدست آمده نشان داد که دو جدایه بدست آمده از استان مازندران از لحاظ نوع علائم و جایگاه فیلوژنی از هم متفاوت هستند ولی دو جدایه استان فارس از نظر فیلوژنی و ژنوتیپی با یکدیگر قرابت دارند.

واژه‌های کلیدی: توالی‌یابی نسل جدید، زردی نهالچه، زوال سریع، ساقه‌آبله‌ای، مرکبات، نژاد

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانش‌آموخته دکتری بیماری‌شناسی گیاهی و دانشیاران گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

\* - نویسنده مسئول: (Email: zakiaghl@um.ac.ir)

## مقدمه

(Cunha et al., 2021). معمولاً در طبیعت درختان مرکبات به بیش از یک سویه از CTV آلوده می‌شوند (Yokomi et al., 2019) اما اطلاعات چندانی از چگونگی ایجاد توازن در جمعیت سویه‌ها وجود ندارد. سویه غالب در یک منطقه می‌تواند تحت تاثیر شرایط آب و هوایی تغییر کند (Cowell et al., 2016).

در ایران سه ناحیه عمده مرکبات کاری شامل استان‌های گیلان و مازندران در استان مازندران، نواحی مرکزی مانند استان‌های فارس و کرمان و مرکبات کاری‌های نوار جنوبی ایران در استان‌های خوزستان تا سیستان و بلوچستان وجود دارد که در مجموع مساحتی حدود ۲۵۹ هزار هکتار دارند (آمارنامه جهاد کشاورزی، ۱۴۰۰). تریستزا در ایران اولین بار با استفاده از ایمینوالکترون میکروسکوپی (ISEM) توسط ابراهیمی نسبت و نینه‌اوس (Ebrahim-Nesbat and Nienhaus, 1978) گزارش شد، سپس سویه زردی گیاهچه به عنوان سویه غالب قابل انتقال توسط شته در استان مازندران مشخص شد. بررسی توالی ژن پوشش پروتئینی جدایه‌های CTV از استان مازندران بیانگر شباهت ۹۷ درصدی آنها با سویه ساقه آبله‌ای شدید (SY568) و سویه زردی گیاهچه ژاپن (NUAgA) بود ولی تفاوت چندانی بین جدایه‌های استان مازندران و استان فارس یافت نشد (Barzegar et al., 2006). علوی و همکاران (Alavi et al., 2005) نیز هفت جدایه جمع‌آوری شده از استان مازندران در ایران را بر اساس علائم در میزبان‌های مختلف در دو گروه مولد ساقه آبله‌ای و زوال شدید، و مولد زردی گیاهچه قرار دادند که جدایه‌های گروه اول توسط *Aphis gossypii* قابل انتقال بودند. این محققین بر اساس تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک ژن CP جدایه‌های شرق مازندران، دو منشا مستقل از CTV در ایران را پیشنهاد نمودند. مطالعات تنوع ژنتیکی بر روی جدایه‌های استان کرمان نیز این جدایه‌ها را در دو گروه متمایز قرار داد (Ahmadi et al., 2006). پاک نیت و همکاران (۲۰۰۲) نیز آلودگی به CTV را در تمام استان‌های جنوبی ایران گزارش نمودند، در حالی که نتوانستند هیچ نژاد شدیدی از این ویروس را در این نواحی ردیابی کنند.

پیشتر برای ردیابی و شناسایی ویروس‌ها در سیر (Wylie et al., 2014)، فلفل (Jo et al., 2017)، گلابی (Jo et al., 2016)، انگور (Coetzee et al., 2010)، سیب‌زمینی شیرین (Kashif et al., 2012)، گوجه فرنگی (Li et al., 2012) و مرکبات (Matsumura et al., 2017) از تکنیک توالی‌یابی نسل جدید استفاده شده است. با توجه به فقدان توالی کامل ژنوم جدایه‌های ایرانی CTV و شرایط اقلیمی متفاوت مناطق مرکبات‌خیز استان مازندران و استان فارس، ردیابی، شناسایی، بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت CTV و تعیین سویه‌های این ویروس با روش‌های آزمایشگاهی پیشرفته ضروری می‌باشد. بنابراین در این تحقیق با استفاده از روش توالی‌یابی نسل جدید

ویروس تریستزای مرکبات (*Citrus tristeza virus-CTV*) متعلق به جنس *Closterovirus* از خانواده *Closteroviridae*. بزرگ‌ترین ویروس گیاهی شناخته شده و مخرب‌ترین و مهم‌ترین بیماری مرکبات با گسترش جهانی است. پیکره‌های CTV رشته‌ای با اندازه  $11 \times 2000$  nm می‌باشد. ژنوم شامل یک مولکول RNA تک رشته مثبت و با اندازه حدود 19.3 kb حاوی ۱۲ پارچوب خوانش (ORF<sup>۱</sup>) با تولید بالقوه ۱۷ پروتئین و دو ناحیه غیرقابل ترجمه (NTR<sup>۲</sup>) در انتهای ۵' و ۳' می‌باشد. CTV دارای دو پروتئین پوششی با وزن متفاوت است و پروتئین پوششی کوچک (CPm) تنها انتهای ۳' ژنوم را پوشش می‌دهد (Satyanarayana et al., 2004). نرخ تنوع نوکلئوتیدی در نیمه ۵' ژنوم زیاد و بیشتر توالی‌های محافظت شده در نیمه ۳' قرار دارند (Albiach-Marti et al., 2000b). نرخ تنوع ژنتیکی هر یک از ژن‌ها در ژنوم متفاوت است ولی از CP، p23، p20، p27 برای گروه‌بندی جدایه‌های CTV استفاده می‌شود (Herrera-Isidron et al., 2009).

CTV سه سندروم آشکار بیماری همراه با تعداد بی‌شماری الگوی متفاوت ایجاد می‌کند. سه سندروم CTV شامل زوال سریع (QD<sup>۳</sup>)، ساقه آبله‌ای (SP<sup>۴</sup>) و سندروم زردی گیاهچه می‌باشد و زمان لازم در توسعه علائم هر سندروم متفاوت است (Ruiz-Ruiz et al., 2006). سندروم زوال در آلودگی به برخی از سویه‌های CTV و بیشتر در پایه حساس نارنج مشاهده می‌شود. سندروم ساقه آبله‌ای بیشتر در پرتقال ایجاد می‌شود در حالی که گریپ‌فروت قابلیت ایجاد این سندروم را ندارد. سندروم زردی نهالچه از لحاظ اقتصادی اهمیت زیادی ندارد و علائمی شامل کوتولگی، کلروز برگ و گاهی توقف کامل رشد را نشان می‌دهد و در گلخانه سرعت مشخص می‌شود (Dawson et al., 2015). ویروس CTV دارای سویه‌های مختلفی است که بر مبنای علائم ایجاد شده در میزبان‌های مختلف (Ramirez-Pool et al., 2022)، قابلیت انتقال توسط شته (Yokomi, 2019)، نقشه پیتیدی (Albiach-Marti et al., 2000)، واکنش سرولوژیکی با آنتی‌بادی‌های منوکلونال (Iftikhar et al., 2021) و الگوی dsRNA (Moshe and Munir, 2000) با یکدیگر تفاوت دارند. این سویه‌ها در درخت فیلوژنی جدایه‌های CTV در هفت گروه ژنوتیپی شامل B165، HA16-5، VT-Like، HA18-9، RB و T36-Like، NZ-B18 و NZ-M16 قرار می‌گیرند (Pais da

- 1- Open reading frame
- 2- non translational region
- 3- Quick decline
- 4- Stem pitting

استخراج از ژل (یکتا تجهیز آزما، ایران) جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد. نتیجه توالی‌یابی با استفاده از ابزار BLAST با ترادهای نوکلئوتیدی موجود در بانک ژن مقایسه شد.

### مایه‌زنی به گیاه محک

پیوندک‌های آلوده به CTV بر روی نهال بذری سالم (گواهی شده توسط مرکز پرورش نهال مرکبات بنیاد مستضعفان ساری) پیوند زده شد و نهال‌های مایه‌زنی شده در شرایط گلخانه با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

### ساخت کتابخانه از RNAهای کوچک

برای ساخت کتابخانه، ابتدا sRNAها به روش کارا و همکاران (۲۰۰۷) از رگبرگ و دمیرگ استخراج و در ژل آگارز ۲٪ آشکارسازی و قطعات ۲۰-۳۰ نوکلئوتیدی با استفاده از کیت استخراج از ژل و تخلیص محصول PCR (شرکت یکتا تجهیز آزما، ایران) از ژل آگارز استخراج شدند. ساخت کتابخانه sRNA به روش CATS انجام شد (Turchinovich et al., 2014). از هر کتابخانه یک میکروگرم جهت توالی‌یابی در پلت فرم Illumina HiSeq2500 به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد.

### تجزیه و تحلیل داده‌ها

بررسی کیفیت خوانش در کتابخانه‌های sRNA توالی‌یابی شده با استفاده از نرم‌افزار FastQC 0.11.05 انجام شد و خوانش‌های با کیفیت پایین ( $\text{Phred quality} \geq 20$ ) و طول کمتر از ۱۸ نوکلئوتید با نرم‌افزار Alien trimmer 0.4.0 از داده‌های توالی‌یابی حذف شدند. خوانش‌های پالایش شده با سویه‌های مرجع CTV موجود در بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار UGene هم‌ردیف‌سازی شدند. توالی‌هایی که بیشترین پوشانندگی<sup>۳</sup> را داشتند انتخاب شدند و توالی توافقی آنها بدست آمد.

### تعیین سویه ویروس

تعیین سویه جدایه‌های مورد بررسی در شرایط *in Silico* با همانندسازی و هضم مجازی و هم‌ردیف‌سازی ناحیه بین ژن‌های پوشش پروتئینی کوچک (Cpm) و پوشش پروتئینی (Cp) به روش ساپوناری و یوکومی (Saponari and Yokomi, 2010) انجام شد. در ابتدا امکان همانندسازی مجازی سه قطعه ۷۸، ۲۳۵ و ۸۱۶ نوکلئوتیدی از Cpm و Cp بوسیله آغازگرهای P27، DDE و SSP

ترادف کامل ژنوم جدایه‌های CTV از دمنطقه عمده مرکبات کاری ایران تعیین و برخی خصوصیات بیولوژیکی، مولکولی و رابطه فیلوژنی آنها با یکدیگر مقایسه شده است.

### مواد و روش‌ها

#### نمونه‌برداری

در فصول بهار و پاییز سال ۱۳۹۵ از ساقه و برگ درختان مرکبات دارای علائم مشکوک به بیماری تریستزای مرکبات تعداد ۳۰ نمونه از شهرهای بابل، قائمشهر، ساری، نکا و بهشهر در استان مازنداران و ۲۵ نمونه از شهرهای خفر، چهرم و لار در استان فارس نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها در جعبه‌های حاوی یخ خشک به آزمایشگاه منتقل شدند.

#### استخراج نوکلئیک اسید

یک گرم از دمیرگ و رگبرگ گیاه دارای علائم درون هاون چینی با استفاده از ازت مایع پودر شد. سپس استخراج RNA کل با استفاده از کیت RNX Plus (EX6101 سیناکلون) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

#### شناسایی CTV با استفاده از آغازگر اختصاصی

تشخیص اولیه تریستزا در نمونه‌های جمع‌آوری شده، با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی  $\text{CPF}(5' \text{AAAGAAGGCGACGATGTTGT}3')/\text{CPR}(5' \text{AGCTCCGGTCAAGAAATCTG}3')$  که قطعه‌ای از ژن پوشش پروتئینی ویروس تریستزا (رس شمار NC001661) را همانندسازی می‌کند، انجام شد (Harper and Pearson, 2015).

واکنش ترانویسی معکوس<sup>۱</sup> با آنزیم رونوشت‌برداری معکوس MMuLV (پارس توس، ایران) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده آنزیم به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه‌سانتی‌گراد انجام شد. واکنش PCR با استفاده از مخلوط واکنش با غلظت ۲ برابر (آمپلیکون، دانمارک) انجام شد. پروفایل دمایی واکنش به صورت یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه‌سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه؛ ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. محصول واکنش PCR در ژل آگارز یک درصد حاوی DNA Green Viewer (Safe Stain Dye) (پارس توس، ایران) تحت ولتاژ ۸۰ ولت، الکتروفورز و آشکارسازی شد. محصول واکنش PCR پس از خالص‌سازی با کیت

2- smallRNA  
3- coverage

1- RT-PCR

(Saponari and Yokomi, 2010) بررسی شد.

(Invitrogen) 10.3.1 انجام شد.

### بررسی شباهت نوکلئوتیدی و روابط فیلوژنی

ترسیم درخت فیلوژنی با استفاده از توالی‌های CTV بدست آمده در این تحقیق و توالی کامل برخی جدایه‌های موجود در بانک ژن (جدول ۱) به روش Maximum likelihood با استفاده از مدل جانیشینی نوکلئوتیدی T92+I با ۵۰۰ تکرار در آزمون بوت استرپ در بسته نرم‌افزاری MEGA7 انجام شد.

میزان شباهت نوکلئوتیدی و آمینواسیدی در ژنوم و چارچوب‌های ژنی در جدایه‌های CTV با هم‌مدیف‌سازی در نرم‌افزار SDTV.1.2 در الگوریتم MUSCLE محاسبه شد. شناسایی چارچوب‌های ژنی موجود در ژنوم با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench v.21 انجام شد. سپس با استفاده از الگوریتم BlastP موتیف‌های محافظت شده موجود در توالی پروتئینی هر ژن مشخص و با توالی پروتئین ژنوم مرجع CTV (رس شمار U16304) مقایسه شد. ردیابی نوترکیب‌های احتمالی موجود در ژنوم جدایه‌های توالی‌یابی شده نیز با استفاده از نرم‌افزار RDP v.5.5 انجام شد.

سپس قطعه ۷۸ نوکلئوتیدی شامل ۲۵ نوکلئوتید انتهایی ۳ ژن پوشش پروتئینی کوچک و ۵۳ نوکلئوتید ناحیه بین‌ژنی ژن پوشش پروتئینی کوچک و ژن پوشش پروتئینی بزرگ (نوکلئوتید ۱۶۰۶۳ تا ۱۶۱۱۴ در جدایه رفرنس، رس شمار U16304) از جدایه‌های توالی‌یابی شده با قطعه متناظر آن در سویه‌های شناخته شده CTV هم‌مدیف‌سازی شد. همچنین هضم مجازی قطعه ۲۳۵ نوکلئوتیدی حاصل از ژن پوشش پروتئینی کوچک و پوشش پروتئینی بزرگ (نوکلئوتید ۱۵۹۸۷ تا ۱۶۲۲۲ جدایه رفرنس، رس شمار U16304) با استفاده از آنزیم *DdeI* تفکیک سویه‌های VT و T3 انجام شد، این در حالی است که در این ناحیه در سایر سویه‌های CTV محل برش این آنزیم وجود ندارد. همچنین هضم مجازی قطعه ۸۱۶ نوکلئوتیدی حاصل از ژن پوشش پروتئینی کوچک و بزرگ و ناحیه بین ژنی آنها (نوکلئوتید ۱۵۸۸۴ تا ۱۶۷۰۰ جدایه رفرنس، رس شمار U16304) با استفاده از آنزیم برشی *SspI* برای شناسایی سویه‌های خفیف CTV کاربرد دارد (Saponari and Yokomi, 2010). هم‌مدیفی توالی‌ها و شبیه‌سازی همانندسازی و هضم آنزیمی در نرم‌افزار Vector NTI

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های مورد استفاده در بررسی فیلوژنی CTV موجود در بانک ژن

Table 1- Characteristics of the CTV isolates used in the phylogenetic analysis available in the gene bank

رس شمار	سویه	طول ژنوم	منطقه	منبع
Accession number	Strain	Genome length	Location	Reference
AB046398	SY	19302	Japan	Suastika, 2000
AF260651	T30	19259	USA	Albiach-Marti and Dawson, 2000
AY340974	T36	19296	Egypt	Abdelmaksoud and Gamal El-din, 2003
DQ151548	T318A	19252	Spain	Ruiz-Ruiz <i>et al.</i> , 2005
EU937519	VT	19251	USA	Weng <i>et al.</i> , 2007
EU857538	SP	19251	New Zealand	Harper <i>et al.</i> , 2009
GQ454869	HA18-9	19245	USA, Hawaii	Melzer <i>et al.</i> , 2009
JQ798289	A18	19302	Thailand	Sindhvajiva <i>et al.</i> , unpublished data
KY110737	CSL01	19251	Brazil	Matsumura <i>et al.</i> , 2017
KY110738	CSL02	19243	Brazil	Matsumura <i>et al.</i> , 2017
KU589212	S1	19248	USA	Yokomi <i>et al.</i> , 2017
KU883265	RB	19270	South Africa	Cook <i>et al.</i> , 2016
KU883267	HA16-5	19280	South Africa	Cook <i>et al.</i> , 2016
MK033511	T68	19246	South Africa	Cook <i>et al.</i> , 2020
U16304	T36, Quick decline	19296	USA	Pappu <i>et al.</i> , 1994
Y18420	mild	19259	Spain	Vives <i>et al.</i> , 1999

رگبرگ، ریزبرگی، ریزش برگ، کوچکی میوه، زوال شدید و سریع بود و علایم غالب بترتیب فراوانی شامل زردی، ریزبرگی و کوتولگی خفیف بود. در نمونه‌های استان فارس علایم CTV بصورت کوتولگی، سبزخشکیدگی، رنگ پریدگی، زردی، ریزبرگی، ریزش برگ، سرخشکیدگی شاخه‌ها و علایم غالب شامل ریزش برگ‌ها و سبزخشکیدگی بود.

با نمره‌دهی باینری به علایم نمونه‌های آلوده به CTV و رسم کلاودوگرام UPGMA (اطلاعات نشان داده نشده است) نمونه‌ها بر اساس علایم به سه گروه تقسیم شدند. در گروه اول نمونه‌های خفر،

## نتایج

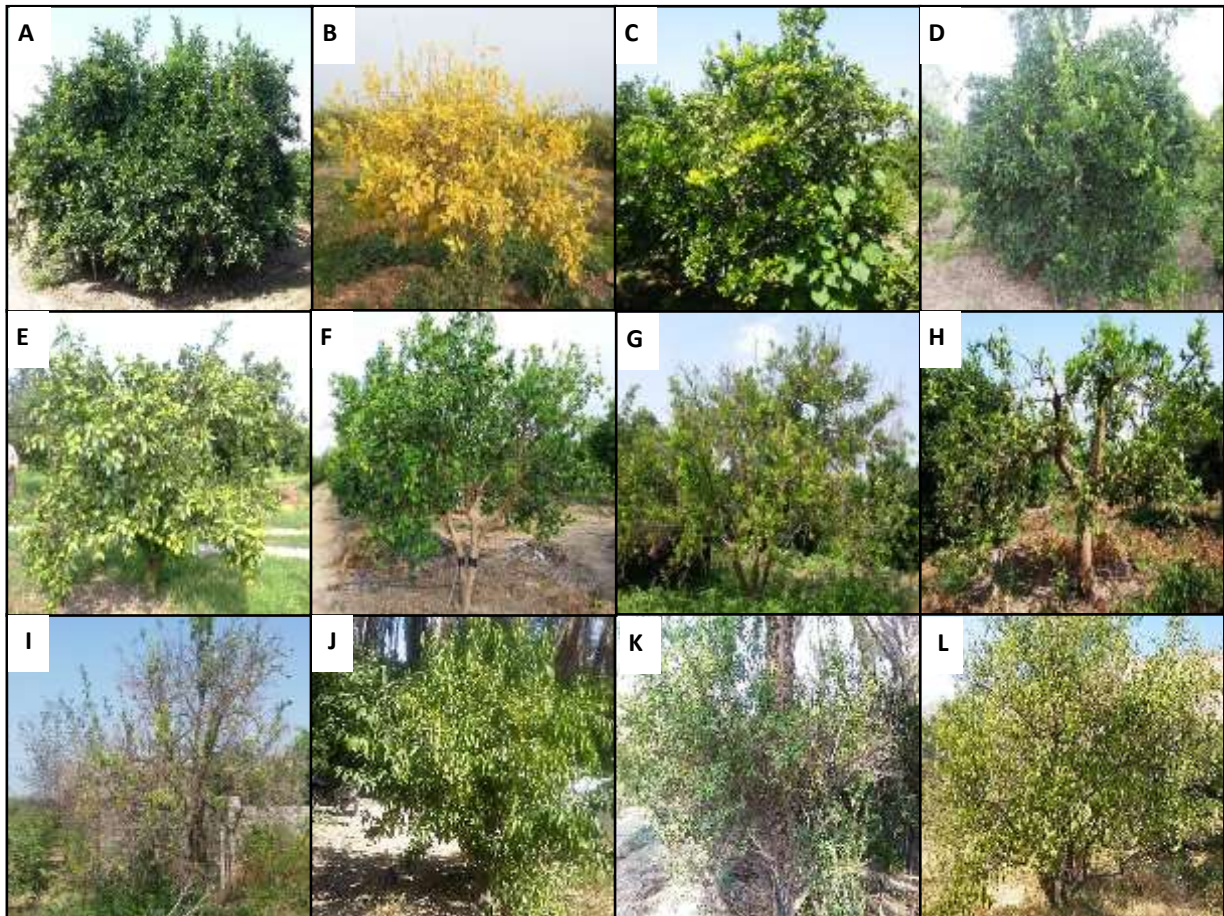
### علایم

درختان آلوده به CTV علائمی از قبیل کوتولگی، رنگ پریدگی برگ، ریزبرگی و ضعف عمومی، سرخشکیدگی و زردی داشتند (شکل ۱). علایم غالب CTV در تمام نمونه‌ها بترتیب فراوانی شامل زردی، ریزش برگ، ریزبرگی و کوتولگی بود. علایم CTV در نمونه‌های جمع‌آوری شده از مرکبات کاری‌های استان مازندران شامل کوتولگی خفیف تا شدید، سرخشکیدگی، رنگ پریدگی برگ‌ها، زردی، زردی



سوم نمونه‌هایی از ساری با علائم کوتولگی شدید یا سرخشیدگی شاخه، زردی و ریزبری قرار داشتند.

چهرم، قائمشهر، ساری، نکا با علائم غالب زردی، ریزش برگ و سبزخشیدگی یا زوال سریع؛ در گروه دوم نمونه‌های ساری، چهرم، خفر، نکا و علائم شایع کوتولگی خفیف، زردی، ریزبری و در گروه



شکل ۱- علائم همراه با تریستزای مرکبات. A: درخت پرتقال تامسون سالم (نکا) B: کوتولگی شدید، زردی و سرخشیدگی در درخت پرتقال خونی (ساری)، C: کوتولگی، زردی خفیف و ریزبری در درخت پرتقال رقم تامسون (نکا)، D: زردی خفیف و ریزبری در درخت پرتقال خونی (ساری)، E: کوتولگی، کوچک شدن میوه و زردی خفیف در درخت پرتقال رقم والنسیا (ساری)، F: کوتولگی، زردی خفیف و ریزبری در درخت پرتقال رقم تامسون (نکا) G: سرخشیدگی و زوال در درخت پرتقال (نکا)، H: سرخشیدگی، ریزبری و ریزش برگ در درخت پرتقال خونی (ساری)، I: زوال شدید و سرخشیدگی در درخت پرتقال خونی (ساری)، J: سبزخشیدگی، کوتولگی و ریزش برگ در درخت لیمو (خفر)، K: سبزخشیدگی، ریزبری و ریزش برگ در درخت لیمو عمانی (چهرم).

Figure 1- Symptoms associated with citrus tristeza disease. A: Healthy Thomson orange tree (Neka), B: Severe stunting, yellowing, and die back on blood orange tree (Sari), C: Stunting, mild yellowing, and small leaves on Thomson orange tree (Neka), D: Mild yellowing and small leaves on blood orange tree (Sari), E: Stunting, small fruit size, and mild yellowing on Valencia orange tree (Sari), F: Stunting, mild yellowing, and small leaves on Thomson orange tree (Neka), G: Decline and dieback on orange tree (Neka), H: Dieback, small leaves, and defoliation on blood orange tree (Sari), I: Severe decline and dieback on blood orange tree (Sari), J: Green decline, stunting, and defoliation on lemon tree (Khafr), K: Green decline, small leaves, and defoliation on lemon tree (Khafr), L: Green decline, small leaves, and defoliation on Omani lemon tree (Jahrom)

نمونه‌ها به ویروس تریستزای مرکبات بود. نتایج نشان داد که از ۳۰ نمونه جمع‌آوری شده از استان مازندران، ۱۷ نمونه و از ۲۵ نمونه استان فارس ۸ نمونه آلوده به ویروس تریستزای مرکبات هستند.

#### بررسی میزان آلودگی به CTV

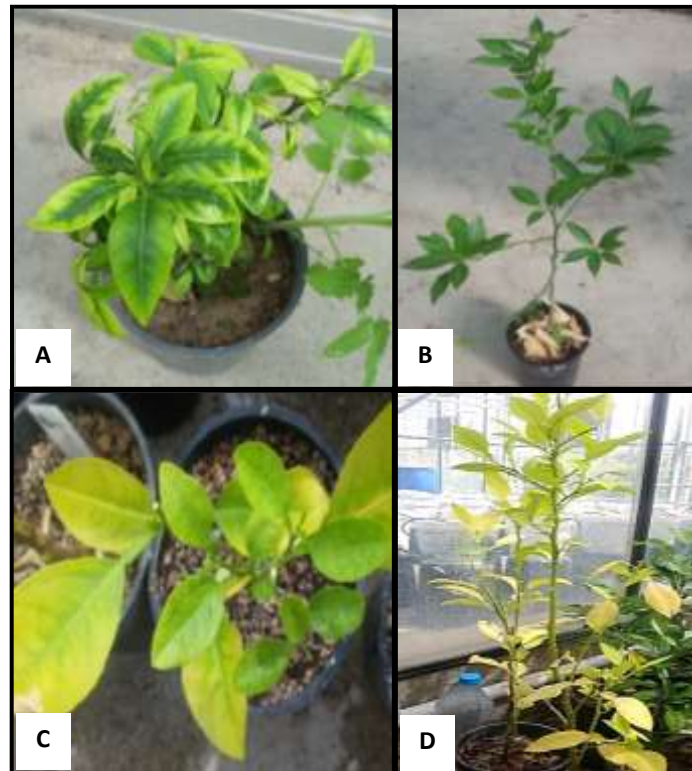
تکثیر قطعه ۵۰۰ جفت بازی از ژن پوشش پروتئینی CTV در آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی بیانگر آلودگی

مایه‌زنی علائم کوتولگی شدید تا خفیف، رگبرگ روشنی، زردی و ریزبرگی در نهال‌های مایه زنی شده با جدایه‌های استان مازندران و علایم کوتولگی خفیف، رگبرگ روشنی، زردی و ریزبرگی در نهال‌های نارنج مایه‌زنی شده با جدایه‌های استان فارس ایجاد شد (شکل ۲). آلودگی نهال‌های مایه‌زنی شده به CTV در آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و پروس نیز تایید شد.

توالی‌یابی محصول PCR و مقایسه آن با توالی‌های موجود در بانک ژن نشان داد که قطعه همانند سازی شده ۵۱۴ نوکلئوتید از ژن پوشش پروتئینی CTV است.

#### انتقال

نمونه‌هایی که آلودگی آنها به CTV در آزمون RT-PCR تایید شده بود بروی نهال‌های نارنج بذری پیوند زده شد. سه ماه پس از



شکل ۲- علایم جدایه‌های CTV روی نارنج بذری سالم سه ماه پس از مایه زنی. A: رنگ پریدگی برگ و کوتولگی شدید ناشی از مایه‌زنی جدایه IR-North1، B: کاهش رشد ناشی از مایه زنی جدایه IR-North2، C: زردی و کوتولگی ناشی از مایه‌زنی جدایه IR-South2، D: علائم زردی و کاهش رشد ناشی از مایه‌زنی جدایه IR-South1.

Figure 2- Symptoms of CTV isolates on healthy sour orange seedlings three months after inoculation. A: Leaf chlorosis and severe stunting caused by inoculation with IR-North1 isolate, B: Growth reduction caused by inoculation with IR-North2 isolate, C: Yellowing and stunting caused by inoculation with IR-South2 isolate, D: Symptoms of yellowing and growth reduction caused by inoculation with IR-South1 isolate.

South2 به ترتیب ۳۴۴۳۸۹۵ و ۱۳۰۵۷۶۰ بود. درصد GC برای هر ۴ کتابخانه ۴۴٪ بود. طول ژنوم کامل بازسازی شده برای جدایه‌های IR-North1، IR-North2، IR-South1 و IR-South2 به ترتیب ۱۹۲۹۶، ۱۹۳۰۲، ۱۹۲۵۲ و ۱۹۲۵۱ نوکلئوتید بود. جدایه‌های توالی-یابی شده با راس شماره‌های OR192037، OR192038، OR192039 و OR192040 در بانک ژن ثبت شدند.

#### نتایج توالی‌یابی و داده‌های بدست آمده

تعداد خوانش خام حاصل از توالی‌یابی کتابخانه IR-North1، ۵۶۸۹۵۵۷ باز بود که تعداد خوانش نهایی حاصل پس از پالایش خوانش‌ها ۳۸۶۰۰۴۶ باز بود. از توالی‌یابی کتابخانه IR-North2 ۲۷۹۸۷۰۲ باز خوانش خام بدست آمد که پس از پالایش ۲۳۴۸۳۳ باز حاصل شد. تعداد خوانش خام حاصل توالی‌یابی کتابخانه IR-South1 و کتابخانه IR-South2 به ترتیب ۵۴۴۶۶۴۹ و ۱۹۰۶۸۳۵ باز بود. خوانش‌های نهایی پس از پالایش دو کتابخانه IR-South1 و IR-



تعیین سویه جدایه‌ها

در جدایه IR-North1 آغازگرهای DDE و SSP امکان همانندسازی قطعه مورد نظر را داشتند ولی آغازگر P27 امکان اتصال به ژنوم را نداشت. قطعات ۲۳۵ و ۸۱۶ نوکلئوتیدی بترتیب فاقد محل آنزیم‌های برشی *DdeI* و *SspI* بودند (جدول ۲، شکل ۳). نتایج هم‌ردیف‌سازی قطعه ۷۸ نوکلئوتیدی نشان داد که جدایه IR-North1 از گروه T36 است (شکل ۳). بنابراین جدایه IR-North1 مشخصات مشابهی با سویه زوال سریع (نژاد T36، رس شمار U16304) دارد. در جدایه‌های IR-North2، IR-South1، IR-South2 آغازگرهای P27 و DDE امکان همانندسازی قطعه مورد نظر را داشتند ولی آغازگر SSP امکان در هر دو جدایه دارای محل آنزیم برشی *DdeI* بود (جدول ۲، شکل ۳). بعلاوه نتایج هم‌ردیف‌سازی قطعه ۷۸ نوکلئوتیدی نشان داد که این دو جدایه مشابه با اعضای گروه VT/T3 هستند. بنابراین جدایه های IR-North2، IR-South1 از نژادهای مولد ساقه‌آبله‌ای و زردی نهالچه و مشابه با سویه SY (AB046398) و سویه T318A (DQ252548) هستند.

در جدایه IR-South2 آغازگرهای P27، DDE و SSP به‌ترتیب امکان همانندسازی قطعات ۷۸، ۲۳۵ و ۸۱۶ را داشتند. قطعه ۲۳۵ نوکلئوتیدی دارای محل آنزیم برشی *DdeI* و قطعه ۸۱۶ نوکلئوتیدی فاقد محل آنزیم برشی *SspI* بود (جدول ۲، شکل ۳). بعلاوه نتایج

هم‌ردیف‌سازی قطعه ۷۸ نوکلئوتیدی این جدایه نشان داد که این متعلق به گروه VT/T3 است (شکل ۳). بنابراین جدایه IR-South2 نیز از نژادهای مولد ساقه‌آبله‌ای و زردی نهالچه و مشابه با سویه T3 (EU857538) است.

فقدان محل آنزیم برشی *SspI* در جدایه‌های IR-North1 و IR-South2 در قطعه ۸۱۶ نوکلئوتیدی نشان‌دهنده آن است که این جدایه‌ها از سویه‌های خفیف CTV محسوب نمی‌شوند. بعلاوه در توالی قطعه ۷۸ نوکلئوتیدی در هیچ یک از جدایه‌های توالی‌یابی شده شش نوکلئوتید الحاق شده در گروه T30 وجود نداشت.

شباهت نوکلئوتیدی

در ماتریکس شباهت نوکلئوتیدی جدایه‌های CTV در طول کامل ژنوم بین ۷۷/۵-۹۵/۲ درصد شباهت داشتند (جدول ۳). میزان شباهت نوکلئوتیدی ژن‌های RdRp، p65، و پروتئین پوششی جدایه های CTV به ترتیب در محدوده ۹۵/۷-۹۷/۷، ۸۵/۳-۹۶/۶ و ۹۱/۴ درصد بود و در سطح آمینواسیدی میزان شباهت به‌ترتیب بین ۸۰/۶-۹۴/۱، ۸۸-۹۳/۹ و ۹۲/۴-۹۶/۴ درصد بود (جدول ۳). جدایه IR-North1 در طول کامل ژنوم به ترتیب ۷۸٪، ۷۷/۹٪ و ۷۷/۵٪ با جدایه‌های IR-North2، IR-North1، IR-South1 و IR-South2 شباهت داشت.

IR-South1	16010	TATTTGTAGTTGTTTGC	CGGACGGTGGTATTAC	-----GCCATCCCATGAGCACTGCCTTAAGGG	16069	VT & T3
DQ151548-T318	16010	TATTTGTAGTTGTTTGC	CGGACGGTGGTATTAC	-----GCCATCCCATGAGCACTGCCTTAAGGG	16069	
IR-North2	16060	TATTTGTAGTTGTTTGC	CGGACGGTGGTATTAC	-----GCCATCCCATGAGCACTGCCTTAAGGG	16119	
AB046398-NUagA	16060	TATTTGTAGTTGTTTGC	CGGACGGTGGTATTAC	-----GCCATCCCATGAGCACTGCCTTAAGGG	16119	
KY110738-CSL02	16005	TATTTGTAGTTGTTTGC	CGGACGGTGGTATTAC	-----GCCATCCCATGAGCACTGCCTTAAGGG	16064	
EU937519-VT	16010	TATTTGTAGTTGTTTGC	CGGACGGTGGTATTAC	-----GCCATCCCATGAGCACTGCCTTAAGGG	16119	
IR-South2	16009	TATTTGTAGTTGTTTGC	CGGACGGTGGTATTAC	-----GCCATCCCATGAGCACTGCCTTAAGGG	16068	
EU857538-T3	16009	TATTTGTAGTTGTTTGC	CGGACGGTGGTATTAC	-----GCCATCCCATGAGCACTGCCTTAAGGG	16069	
JQ798289-A18	16008	TATTTGTAGTTGTTTGC	CGGACGGTGGTATTAC	-----GCCATCCCATGAGCACTGCCTTAAGGG	16119	
Y18420-T385	16008	TACTTGTAGTTGGTTTGGGGACGGTAATATATTATATATACCATCCCTTGAGCGCTGCCTTAAGGG			16073	
AF260651-T30	16008	TACTTGTAGTTGGTTTGGGGACGGTAATATATTATATATACCATCCCTTGAGCGCTGCCTTAAGGG			16073	
MK033511-T68	16004	TATTTGTAGTTGTTTGC	CGGACGGTGGTATTAC	-----GCCATCCCATGAGCACTGCCTTAAGGG	16063	T68
KU883267-HA16	16025	TATATATAGTTAGTTTGGGGACGGTATATTGC		-----GCCATCCCTTGAGCACTGCCTTAAGGG	16096	
KU589212-S1	16004	TACTTGTAGTTGGTTTGGGGACGGTAGTATTAT		-----GCCATCCTTTGAGCGCTGCCTTAAGGG	16063	
IR-North1	16053	TACTTATAGTTGGTTTGGGGACGGTAAACATTAT		-----ACTATCCCATGAGCGCTGCCTTAAGGG	16112	T36
U16304-T36	16053	TACTTATAGTTGGTTTGGGGACGGTAAACATTAT		-----ACTATCCCATGAGCGCTGCCTTAAGGG	16112	
AY340974-Qaha	16053	TACTTATAGTTGGTTTGGGGACGGTAAACATTAT		-----ACTATCCCATGAGCGCTGCCTTAAGGG	16112	
GQ454869-HA18	16010	TACGTGTAGTTGATTTTGGG-CGGTAATATCAT		-----ACCATCCCATGAGCGCTGCCTTAAGGG	16086	
KU883265-RB	16028	TACGTTTGTAGTTGATTTTGGG-CGGTAATATCAT		-----ACCATCCCTTGAGCGCTGCCTTAAGGG	16086	
KY110737-CSL01	16025	TACGTTTGTAGTTGATTTTGGG-CGGTAATATCAT		-----ACCATCCCTTGAGCGCTGCCTTAAGGG	16083	

شکل ۳- هم‌ردیفی قطعه ۷۸ نوکلئوتیدی شامل ۲۵ نوکلئوتید انتهای ناحیه ژن p27 و ابتدای ناحیه بین ژنی ژن‌های p27 و p25 در جدایه‌های توالی‌یابی شده و سویه‌های رفرنس CTV برای تعیین گروه ژنوتیپی جدایه‌های ایرانی توالی‌یابی شده

Figure 3- Alignment of a 78-nucleotide fragment containing the 25 nucleotides at the end of the p27 gene and the beginning of the intergenic region between p27 and p25 genes in the sequenced strains and reference strains of CTV for determining the genotypic group of Iranian CTV strains

جدول ۲- تفکیک سویه‌های ویروس تریستزای مرکبات با استفاده از همانندسازی ناحیه بین ژن‌های Cp و Cpm با آغازگرهای مختلف در واکنش زنجیره ای پلی مرز مجازی و شبیه‌سازی هضم آنزیمی قطعه همانندسازی شده با آنزیم برشی

Table 2- Differentiation of *Citrus tristeza virus* strains using *in silico* amplification of the intergenic region between Cp and Cpm genes with different primers and virtual enzymatic digestion of the amplified fragment with the restriction enzyme

سویه/جدایه Strain/Isolate	رس شمار Accession No.	محصول واکنش زنجیره ای پلی مرز مجازی Virtual PCR product			هضم آنزیمی مجازی Virtual enzymatic digestion		اسید آمینه شماره ۱۲۴ در پروتئین پوششی Amino acid at position 124 in coat protein
		P27 primer	DDE primer	SSPI primer	DdeI	SspI	
T30	AF260651	78	235	825	NF	197-628	Tyrosine
VT	EU937519	78	234	NF	80-154	NF	Phenylalanine
T3	EU857538	78	234	NF	80-154	NF	Phenylalanine
SY	AB046398	78	234	NF	80-154	NF	Phenylalanine
T36	U16304	NF	235	816	NF	NF	Phenylalanine
IR-North1	NF	NF	235	816	NF	NF	Phenylalanine
IR-North2	NF	78	234	NF	80-154	NF	Phenylalanine
IR-South1	NF	78	234	NF	80-154	NF	Phenylalanine
IR-South2	NF	78	234	816	80-154	NF	Phenylalanine

NF: not found

نوکلئوتیدی  $4/8 \pm 88/3$  شباهت داشت.

### تجزیه و تحلیل موتیف‌های حفاظت شده در چارچوب‌های ژنی

چهار جدایه CTV توالی‌یابی شده در این تحقیق، همانند جدایه مرجع CTV دارای ۱۲ چارچوب ژنی بودند (شکل ۵). چارچوب ژنی ORF1a بطول ۹۳۷۴ نوکلئوتید پروتئین رپلیکاز ویروس را رمزگذاری می‌کند. در این پروتئین سه ناحیه متیل ترانسفراز (MTR)، Zemlya و هلیکاز (HEL) وجود داشت (شکل ۵). از اسید آمینه‌های ۱۰۳۶ تا ۱۳۷۰ در ناحیه متیل ترانسفراز شش موتیف یافت شد که در چهار موتیف در جدایه‌های IR-North1، IR-South1 و IR-South2 نسبت به جدایه رفرنس تفاوت‌هایی وجود داشت (شکل ۵، جدول ۴). در موتیف MTR I جانشینی N1075M، در موتیف MTR IIa سه جانشینی I1157V، Y1162F و E1165D، در موتیف III جانشینی I1185V و در موتیف MTRIV جانشینی C1246Y در سه جدایه IR-North2، IR-South1 و IR-South2 و جانشینی R1248C در جدایه IR-South2 مشاهده شد. در موتیف‌های MTR Ia و MTR II جدایه‌های توالی‌یابی شده با جدایه مرجع تفاوتی وجود نداشتند. اسید آمینه‌های ۱۷۰۷ تا ۱۸۱۲ ناحیه Zemlya بود که در بازسازی غشاهای شبکه آندوپلاسمی در طی آلودگی نقش دارد (Gushchin *et al.*, 2017) و دارای چهار موتیف است. در موتیف Zemlya aA جانشینی‌های L1708M و L1718S در هر چهار جدایه و جانشینی I1716M در سه جدایه IR-North1، IR-South1 و North2 مشاهده شد.

شباهت جدایه IR-North 2 با دو جدایه IR-South1 و IR-South2 در طول کامل ژنوم نیز به ترتیب ۹۵/۲٪ و ۸۹/۴٪ بود. ژنوم دو جدایه IR-South1 و IR-South 2 با یکدیگر ۹۰/۳٪ شباهت داشت. جدایه IR-North1 بیشترین شباهت را با جدایه U16304 از فلوریدا به میزان ۹۶/۳٪ داشت در حالیکه بیشترین شباهت جدایه IR-North 2 با جدایه AB046398 از ژاپن به میزان ۹۷/۵٪ بود. جدایه IR-South1 با ۹۷/۶٪ و جدایه IR-South2 با ۹۶/۶٪ بیشترین شباهت را به ترتیب با سویه T318A از اسپانیا (رس شمار DQ151548) و جدایه T3 از نیوزیلند (رس شمار EU857538) داشتند. در جدایه‌های ایرانی CTV، جدایه IR-North1 کمترین شباهت (۷۷/۵٪) را با جدایه‌های MK033511 و GQ454869 از آفریقای جنوبی و هاوایی داشت. جدایه IR-North2 کمترین شباهت (۷۷/۵٪) را با جدایه AY340974 از مصر و جدایه‌های IR-South1 و IR-South2 کمترین شباهت نوکلئوتیدی را به ترتیب به میزان ۷۸/۴٪ و ۷۸/۱٪ با جدایه‌های AY340974 و U16304 داشتند.

### تجزیه و تحلیل فیلوژنی

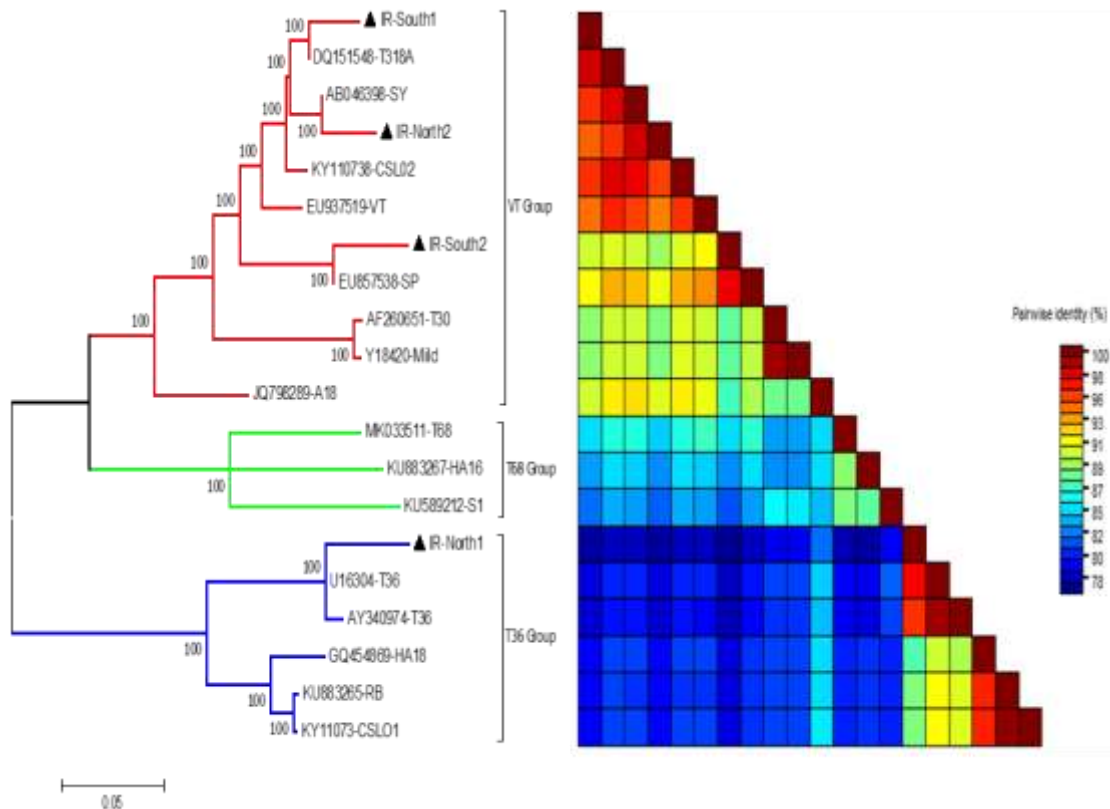
در درخت فیلوژنی ترسیم شده بر اساس طول کامل ژنوم، سه شاخه به نام‌های گروه VT، گروه T68 و گروه T36 با حمایت بوت استرپ بالا قابل شناسایی بود (شکل ۴). سه جدایه IR-North2 و IR-South1 و IR-South2 همراه با جدایه‌هایی از ژاپن، اسپانیا، برزیل، فلوریدا، نیوزیلند و تایلند در گروه VT و جدایه IR-North 1 همراه با جدایه‌هایی از فلوریدا، مصر، هاوایی، آفریقای جنوبی و برزیل در گروه T36 قرار گرفتند. در طول کامل ژنوم شباهت گروه T36 با دو گروه VT و T68 در سطح نوکلئوتیدی به ترتیب  $6/5 \pm 85/5$  و  $6/5 \pm 86/5$  درصد بود. گروه VT نیز با گروه T68 در سطح

جدول ۳- میزان شباهت آمینواسیدی پروتئین‌های رمزگذاری شده جدایه‌های ایرانی CTV با یکدیگر و نژادهای مرجع ویروس تریستزای مرکبات  
Table 3- Similarity of the encoded protein amino acids of Iranian CTV strains with each other and reference strains of *Citrus tristeza virus*

سویه/جدایه Strain/Isolate	رس شمار Accession number	Full length	5'UTR	polymerase	RdRp	P33	P6	P65	P61	P27	P25	P18	P13	P20	P23	3'UTR		
IR-North1	T36	U16304	97	100	95.9	97	96.4	99.4	98.2	98.3	98.2	99.7	99.2	99.7	96.9	96.7	98.5	
	VT	EU937519	78.5	68	70.2	78.3	82.5	87.8	87.6	86.8	87.7	92.6	92.7	91.1	87.8	87.8	96	
	SY	AB046398	78.7	63.5	70.6	78	82.2	87.2	87.2	86.1	88.5	92.6	92.5	90.3	88.7	88.6	96.3	
	T318A	DQ151548	78.7	61.9	70.4	78.4	82.9	87.2	87.5	86.3	87.6	92.6	91.9	90.8	88.5	88.9	96	
	T3	EU857538	78.4	71.2	70.1	77.8	81.7	87.8	87.4	86.8	86.7	92.6	92.3	90.6	88.2	87.8	96	
	T30	AF260651	79.6	54.8	70.2	77.1	81.7	88.5	92	93.3	92.1	92.9	94.6	91.1	87.4	87.8	95.6	
	IR-North2	-	78	62.5	70	77.7	81.3	87.2	86.6	85.5	88.4	92.6	92.1	89.2	88.9	87.1	95.6	
	IR-South1	-	77.9	61.9	69.9	77.6	81.5	87.2	85.9	85.8	87.6	91.4	91.1	90.8	87.8	88.7	96	
	IR-South2	-	77.5	71.2	69.4	76.8	80.3	87.2	85.4	86	85.9	91.7	92.1	90	88	87.9	94.9	
IR-North2	T36	U16304	79.4	63.5	71.6	79.4	83.2	87.8	87.8	86	88.5	92.7	92.5	88.9	89.6	90	97.1	
	VT	EU937519	94.1	97.1	92.7	96.5	97.4	98.1	97.5	93.6	95.9	96.6	95.4	92.2	94.7	92.9	97.4	
	SY	AB046398	98.2	100	97.9	98.2	97.8	100	98.9	98.3	98.2	100	99.2	98.3	97.5	97.1	99.3	
	T318A	DQ151548	96.1	96.2	95.5	97.2	96.2	100	97.5	96.4	96.4	97.5	97.4	96.7	96.5	96	98.2	
	T3	EU857538	91.1	81.1	88.5	90.1	88.7	98.1	96.9	93.1	93.6	96.4	95.6	91.1	94.4	92.1	97.4	
	T30	AF260651	88.6	78.6	88.4	90.1	84.6	92.9	87.9	86.6	88.8	93	93.5	89.2	91.6	86.7	97.1	
	IR-South1	-	95.1	96.2	94.2	96.2	95.3	100	96	96.1	96.4	96.3	96.6	96.7	96	94.9	97.8	
	IR-South2	-	89.4	81.1	86.4	88.8	86.5	97.4	95.1	92.6	93.2	95.5	95	91.1	93.8	91.1	94.9	
	IR-South1	T36	U16304	79.4	61.9	71.7	79.4	83.8	87.8	86.6	86.5	88.7	91.7	91.9	91.1	89.6	90	96.3
VT		EU937519	94.7	97.4	94	96.6	94.7	98.1	96.2	94.2	95.7	94.9	94.8	94.7	94.9	92.1	97.4	
SY		AB046398	96	96.2	95.2	96.9	95.8	100	96	96.9	98.1	96.3	97.4	98.3	96.9	95.4	97.8	
T318A		DQ151548	98.2	100	98	98.1	97.6	100	97.4	98.8	100	98.8	99.2	100	97.8	96.5	98.9	
T3		EU857538	91.4	85.8	89.3	90	88.6	98.1	95.6	93.8	95	95.5	94.8	93.6	94.5	91	97.4	
T30		AF260651	88.9	78.8	89.2	89.9	84.9	92.9	86.7	86.9	89.6	91.5	92.3	90.8	91.4	86.3	96.3	
IR-South2		-	90.3	85.8	87.7	88.8	86.8	97.4	95.5	93.6	93.6	96.3	94.6	93.1	94.2	90.5	94.9	
IR-South2		T36	U16304	78.6	71.2	70.6	78.2	81.7	87.8	85.7	86.5	86.6	92	92.5	90.3	89.1	90.1	94.9
		VT	EU937519	91.4	90	90.1	89.7	87.8	98.1	95.4	96.7	96.5	97.3	97	97.8	96	95.6	97.4
	SY	AB046398	90.3	81.1	87.2	89.4	87.5	97.4	95.4	93.3	93.9	95.5	95.6	92.2	94.9	92.7	95.6	
	T318A	DQ151548	90.7	85.8	87.9	89.4	88.2	97.4	95.7	93.6	100	95.4	95	93.1	94.7	92.5	96	
	T3	EU857538	97.3	100	96.5	97.5	96.9	99.4	97.5	98.6	98.2	99	99.4	99.4	98	97.6	97.4	
	T30	AF260651	87.7	75.7	87.3	88.7	83	94.2	86.6	86.8	87.4	92.6	92.5	89.4	89.6	88.1	96.3	

و جانشینی V1802I در دو جدایه IR-North2 و IR-South1 و ردیابی شد. اسید آمینه ۲۹۸۴-۲۷۱۶ ناحیه هلیکاز و حاوی هفت موتیف بود که در موتیف‌های HEL I، HEL Ia، و HEL IV و HEL موتیف‌های توالی‌یابی شده با جدایه مرجع تفاوتی نداشتند. در حالی که در موتیف‌های HEL II، HEL III، HEL V، و HEL VI به ترتیب جانشینی‌های I2803V، K2825R، R2951K، و V2974T در سه جدایه IR-North2، IR-South1، و IR-South2 وجود داشت.

در سایر موتیف‌های این ناحیه در جدایه IR-North1 با توالی مرجع تفاوت نداشت. در موتیف Zemlya aB جانشینی‌های IR-1736I، R1744A، F1753Y، و L1754C در سه جدایه IR-North2، IR-South1، و IR-South2 و جانشینی‌های A1739R و A1746P در جدایه IR-North2 ردیابی شد. در موتیف Zemlya aC جانشینی T1769A، R1779E، و P1780A در هر سه جدایه IR-North2، IR-South1، و IR-South2 وجود داشت. جانشینی R1779E در جدایه IR-North2 و R1779S در جدایه‌های S1 و S2 وجود داشت. همچنین در این موتیف جایگزینی VSMVL به CKYGV در موقعیت ۱۷۷۸-۱۷۷۴ در جدایه IR-North2 وجود داشت. در موتیف Zemlya aD، جانشینی‌های A1789G، I1806V، و L1807F در سه جدایه IR-North2، IR-South1، و IR-South2

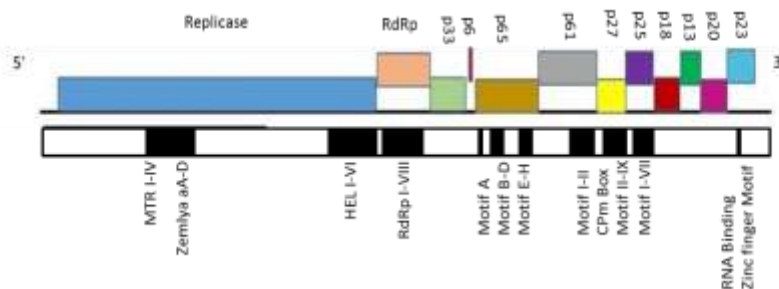


شکل ۴- درخت فیلوژنی ترسیم شده با استفاده از توالی نوکلئوتیدی ژنوم کامل جدایه‌های ایرانی توالی‌یابی شده و ژنوم کامل جدایه‌های CTV موجود در بانک ژن

رسم درخت به روش Maximum likelihood و با مدل جایگزینی نوکلئوتیدی Tamura-3- parameters با تکرار ۵۰۰ در آزمون بوت استرپ در بسته نرم‌افزاری MEGA7 انجام شده است. رس شمار و مشخصات جدایه‌های CTV موجود در بانک ژن در جدول ۱ ذکر شده است. جدایه‌های توالی‌یابی شده در این تحقیق با ▲ نشان داده شده‌اند.

Figure 4- A phylogenetic tree drawn using the nucleotide sequences of complete genomes of Iranian strains and complete genomes of CTV strains available in the gene bank

The tree was constructed using the Maximum Likelihood method and the Tamura-3-parameters nucleotide substitution model with 500 bootstrap replicates in the MEGA7 software package. The accession numbers and characteristics of the CTV strains available in the gene bank are listed in Table 1. The sequenced strains in this study are indicated by ▲



شکل ۵- تصویر شماتیک از سازمان ژنومی و نواحی محافظت شده موجود در پروتئین‌های رمزگذاری شده بوسیله CTV مشخصات و تغییر در نواحی محافظت شده در جدایه‌های ایرانی CTV در جدول ۴ ذکر شده است.

Figure 5- Schematic representation of the CTV genome organization and the conserved motifs found in CTV-encoded proteins

The characteristics of the motifs and variation of amino acids in conserved regions in Iranian CTV isolates are shown in Table 4.



جدول ۴- مقایسه تغییرات اسیدهای آمینه در موتیف‌های حفاظت شده در پروتئین‌های جدایه‌های ایرانی ویروس تریتستزای مرکبات در مقایسه با جدایه مرجع CTV (ارس شماره U16304). تغییرات هر موتیف با رنگ خاکستری مشخص شده است

Table 4- Comparison of amino acid changes in conserved motifs of proteins of Iranian CTV strains compared to the reference CTV strain (accession number U16304). The changes in each motif are highlighted in gray.

Gene	Motif	Motif position	محل جایگزینی Substitution Position	توالی موتیف Sequence of the motif	جایگزینی اسید آمینه Amino acid substitution				
					U16304	IR-North1	IR-North2	IR-South1	IR-South2
MTR	MTR I	1065-1079	1075	SDHPVAAGSKALENH	N	-	N1075M	-	N1075M
	MTR Ia	1090-1114		SDVGGCPLFHLRAGSHGVHCRPVY	-	-	-	-	-
	MTR II	1117-1123		KDAHRRV	I	-	I1164V	I1163V	I1163V
	MTR IIIa	1155-1165	1156	NILGECYHASE	Y	-	Y1169F	Y1168F	Y1168F
			1162		E	-	E1173D	E1172D	E1172D
	MTR III	1172-1186	1185	VYDVPLRELCRAMIN	E	-	E1193V	E1192V	E1192V
	MTR IV	1234-1248	1246	SAYTHIYSTICEMR	I	-	I1254Y	C1253Y	C1253Y
			1248		C	-	-	-	R1255C
	Zemlya aA	1708-1722	1708	LGLETCVSIALAIFD	R	-	-	-	L1700M
			1716		L	L1708M	L1716M	L1708M	-
			1718		I	I1124M	I1124M	I1708M	-
	Zemlya aB	1733-1756	1736	SFPVVCARVFGRLAMEVGSNFLFK	L	L1718S	L1126S	L1710S	L1710S
			1739		V	-	V1744I	V1728I	V1728I
			1744		A	-	A1747R	-	-
		1746		R	-	R1752A	R1736A	R1736A	
Replicase			1753-1754		A	A1754P	-	-	-
					A	-	F1761Y/L1762	F1745Y/F1746	F1745Y/F1746
					FL	-	C	C	C
					T	-	T1777A	T1761A	T1761A
					1774VSMVLI17	-	I774CKYGV17	-	-
					78	-	EA	SA	SA
					RP	-	A1798G	A1782G	A1782G
					A	-	V1811I	V1795I	-
					V	-	I1815V/I1815F	I1799V/L1800F	I1799V/L1800F
					IL	-	-	-	-
HEL	HEL I	2709-2722		LIVYEAPPGGKTHIS	-	-	-	-	-
	HEL Ia	2737-2751		CLVVTANKNSQTEIS	-	-	I2804V	I2803V	I2803V
	HEL II	2792-2799	2803	LLFDEICT	I	-	K2834R	K2833R	K2833R
	HEL III	2819-2826	2825	VFGDSKQ	K	-	-	-	-
	HEL IV	2856-2863		EVSRYCPW	-	-	-	-	-
	HEL V	2938-2955	2951	VNTVHEVCKGETYKRRLV	R	-	R2961K	R2960K	R2960K
	HEL VI	2973-2983	2973	VALTRHVDLSV	V	-	V2982I	V2981I	V2981I
	RdRp I	126-173		MVKRDAKVKLDD	-	-	-	-	-
	RdRp II	143-159		HPAAQNMIFHKFNAL	-	-	-	-	-
	RdRp III	180-193	180	VFFTEMTNAGLAEI	V	-	I193V	I193V	I193V
		193		I	-	-	-	-	
RdRp IV	208-219		EVDFSKFDKSDQ	-	-	-	-	-	
RdRp V	263-290	296	VDGRRSGGSNTWIGNSLVTLGHLSLY	D	-	D296E	D296E	D296E	
RdRp VI	296-310	300	DLLLVSGDDSLVSS	V	-	V300I	V300I	V300I	
		310		S	-	S310K	S310K	S310K	



CPm	CPm Box	41-67	455-461	ALIEGVISKLDINSIYEDSTKFTGEH	V	-	V455I T461D	V455I T461D	V455I T461D	
	Motif II	69-88	67	KYVMVTMDIFLENYKTKTE	H	-	H67Q	H67Q	H67Q	
	Motif III	89-93	95	DLIVH	-	-	-	-	-	
	Motif IV	94-120	96	LTMIQRLYTISTKTKFRDKGCISY	T	-	T95A	T95A	T95A	
	Motif V	125-166	102	M96V	M	-	M96V	M96V	M96V	
			103	Y102C	Y	-	Y102C	Y102C	Y102C	
			103	T103S	T	-	T103S	T103S	T103S	
			139	LCMA	I	-	-	-	-	I139M
	Motif VI	173-181	146	LCMA	I	-	-	-	-	I139M
			154	E146D	E	-	-	-	-	E146D
			157	F154C	F	-	-	-	-	F154C
			157	T157S	T	-	-	-	-	T157S
			165	M165T	M	-	-	-	-	M165T
Motif VII			182-216	190	YENKRITRA	L	-	L190F	L190F	L190F
Motif VIII			217-221	202	GTPHLKGYLSADFLSGSLPGYSEHERGHILRASES	S	-	S198P	S198P	S198P
Motif IX	226-238	219	MLARR	Y	-	Y202S	Y202S	Y202S		
		219	A219T	A	-	A219T	A219T	A219T		
CP	Motif I	29-44	31	EATELNLRLDLGK	V	-	V31L	V31L	V31L	
	Motif II	45-74	35	SSVNLHIDPILITMND	I	-	I35T	I35T	I35T	
			40	-	I	-	I40V	I40V	I40V	
			41	-	T	-	T41A	T41A	T41A	
	Motif III	80-101	49	VRQLSTQQNAALNRDLFLTLKGGKHPNLPDK	S	-	S49G	S49G	S49G	
			68	-	H	-	H68Y	H68Y	H68Y	
			69	IAMMLYRLAVKSSLSQDDDAT	P	-	P69S	P69S	P69S	
			80	-	I	-	I80L	I80L	I80K	
	Motif IV	110-151	91	-	S	-	S91G	S91G	S91G	
			100	-	A	-	A100T	A100T	A100T	
			122	VEVDLSDKLWTDVVFVNSKGGNRTNALRVWGRIND	V	-	-	-	-	V122I
			133	ALYLAFC	T	-	-	-	-	T133P
	Motif V	154-164	142	NRNLSYGGRRPL	T	-	T142S	T142S	T142S	
167-200			GIPAGYHYLCADFLTGAGLIDLECAVYIQAKEQL	-	-	-	-	-		
208-219			DVVVTVNRQLGK	D	-	-	-	-	D208E	
P23	Binding/Zinc finger Motif	51-86	53	RKNSYQGARFRARIHGVCVDCGRKHDKGLKTERKCK	N	-	-	-	N53T	
		69-78	69	78GLK80	V	-	-	-	V69M	
			78-80	78ASR80	-	-	-	-	78ASR80	

حفاظت شده است (شکل ۵). جانشینی‌های H67Q در CPM box، T95A، Y102C در موتیف IV و S196T در سه جدایه IR-North2، IR-South1 و IR-South2 مشابه بود. جانشینی‌های F154C در موتیف V، S198P و Y202S در موتیف VII در IR-North2 و IR-South2، و جانشینی‌های T157S در موتیف V، L190F در موتیف VII و A219T در موتیف VII و جانشینی M96V و T103S در موتیف IV تنها در جدایه IR-North2 جانشینی F154Y و T157A در موتیف V تنها در جدایه IR-South1 و جانشینی G45S در موتیف CPm Box و E146D، I139M و M165T در موتیف V فقط در IR-South2 اتفاق افتاده بود. هیچ جانشینی در موتیف‌های II، III، VI و IX مشاهده نشد. توالی آمینواسیدی CPm در جدایه IR-North1 مشابه با توالی جدایه رفرنس CTV بود.

چارچوب ژنی P25 بطول ۶۷۲ نوکلئوتید رمزگذاری پوشش پروتئینی با ۱۹۴ اسید آمینه را انجام می‌دهد. در پوشش پروتئینی CTV هفت موتیف حفاظت شده وجود داشت (شکل ۵). چهار جایگزینی مشابه T41A، H68Y، A100T و D208E به ترتیب در موتیف‌های I، II، III و VII در هر سه جدایه IR-North2، IR-South1 و IR-South2 مشاهده شد. در جدایه‌های IR-North2 و IR-South1 در موتیف I جانشینی V31L و در موتیف IV جانشینی T142S بود. جانشینی در اسید آمینه ۴۹ در موتیف II در جدایه‌های IR-North2 و IR-South2 بصورت S49G در حالیکه در جدایه IR-South1 بصورت S49T بود. همچنین در اسید آمینه ۸۰ در موتیف III نیز در جدایه‌های IR-South1 و IR-South2 جانشینی I80K در IR-North2 جانشینی I80L رخ داده بود. جانشینی‌های I35T در موتیف I، P69S در موتیف II و V122I در موتیف IV هر کدام به ترتیب تنها از جدایه‌های IR-South1، IR-South2 و IR-North2 ردیابی شدند. جانشینی I40V در موتیف I، S91G در موتیف III و T133P در موتیف IV نیز تنها در دو جدایه استان فارس دیده شد. در موتیف V و VI هیچ جایگزینی در جدایه‌های توالی‌یابی شده ردیابی نشد (جدول ۴). توالی آمینواسیدی پوشش پروتئینی جدایه IR-North1 با پوشش پروتئینی سویه مرجع CTV یکسان و فاقد جایگزینی بود.

در سازمان ژنی ویروس تریستزا، پس از ژن پوشش پروتئینی بزرگ به ترتیب ژن‌های p18، p13 و p20 قرار می‌گیرند که هر کدام به ترتیب ۵۰۴، ۳۶۰ و ۵۴۹ نوکلئوتید طول دارند و پروتئین‌هایی با ۵۰۴، ۳۶۰ و ۵۴۹ اسید آمینه را رمزگذاری می‌کنند. در پروتئین‌های این سه ژن موتیف حفاظت شده شناخته شده مشاهده نشد.

چارچوب ژنی P23 با ۶۳۰ نوکلئوتید پروتئینی با ۲۰۹ اسید آمینه را رمزگذاری می‌کند. نقش پروتئین P23 بازدارنده خاموشی ژن،

ن رپلیکاز با ۴۹۹ اسید آمینه را رمزگذاری می‌کند حاوی هشت موتیف حفاظت شده می‌باشد (شکل ۵). در موتیف III RdRp جدایه IR-South2 جانشینی V180I و جانشینی I193V در سه جدایه IR-North2، IR-South1 و IR-South2 وجود داشت. همچنین در موتیف VI RdRp سه جانشینی اسید آمینه D296E، V300I و S310K در این سه جدایه وجود داشت. در سایر موتیف‌های رپلیکاز جدایه‌ها با جدایه مرجع تفاوتی نداشتند.

چارچوب‌های ژنی بعدی به ترتیب ژن p33 به طول ۹۰۹ نوکلئوتید پروتئینی به طول ۳۰۲ اسید آمینه، و ژن p6 به طول ۱۵۶ نوکلئوتید پروتئینی با ۵۱ اسید آمینه را رمزگذاری می‌کنند که موتیف‌های حفاظت شده در این دو ژن ردیابی نشد.

چارچوب ژنی p65 به طول ۱۷۸۵ نوکلئوتید، پروتئین hsp70h با ۳۶۵ اسید آمینه که دارای هشت موتیف حفاظت شده را رمزگذاری می‌کند (شکل ۵). جانشینی‌های I168V، M170L و S174T در موتیف B، S227G و K239R در موتیف D و جانشینی‌های A247T، I380 و S458R به ترتیب در موتیف‌های E، F و H سه جدایه IR-North2، IR-South1 و IR-South2، جانشینی T384S در جدایه‌های IR-North2 و IR-South2، جانشینی R374K در موتیف F جدایه IR-South1، I380T در موتیف G جدایه IR-North2 و جانشینی S393T در جدایه IR-South2 ردیابی شد. موتیف A و C جدایه‌ها مشابه با توالی مرجع بودند (جدول ۴).

چارچوب ژنی p61 به طول ۱۶۰۸ نوکلئوتید پروتئینی با ۴۸۴ اسید آمینه را رمزگذاری می‌کند. این پروتئین همولوگ پروتئین HSP90 و دارای دو موتیف طویل حفاظت شده با ۷۳ و ۱۴۳ اسید آمینه است. در موتیف I پنج جانشینی M278V، V282T، J284G، Q313H و Y316H در سه جدایه IR-North2، IR-South1 و IR-South2، جانشینی N298Q در جدایه‌های IR-North2 و IR-South2، و جانشینی D321E در جدایه IR-South2 وجود داشت. در موتیف II پروتئین p61 جانشینی A348E در هر ۴ جدایه توالی‌یابی شده، ۱۲ جانشینی مشابه R333N، M350L، V356I، V360A، V455I، R431K، V409I، A395T، S387L، P369A، V364A و T461D در سه جدایه IR-North2، IR-South1 و IR-South2، دو جانشینی Q375R و S379N در IR-North2، IR-South1، جانشینی V361A در IR-South2 و جانشینی‌های C386A، N427I و L428F در IR-North2 رخ داده بود. پنج جانشینی IR-North2، G344D، H389R، R372N، G391S و E419K در دو جدایه IR-North2، IR-South1 مشابه و در IR-South2 بصورت G344N، R372H، H389G و G391T بود (جدول ۴).

چارچوب ژنی P27 بطول ۷۲۳ نوکلئوتید پوشش پروتئینی کوچک (CPm) با ۱۹۰ اسید آمینه را رمزگذاری می‌کند که دارای نه موتیف



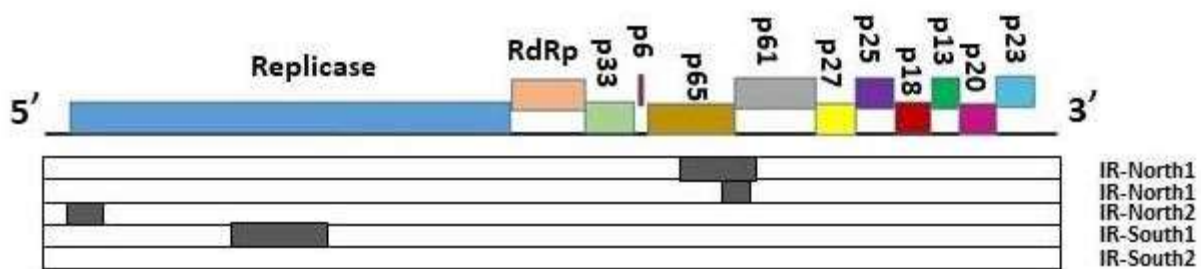
۱۲۷۱۲ تا ۱۴۱۳۸ نوترکیب بود. ناحیه نوترکیب شامل ژن‌های p65 (hsp70) و p61 در ژنوم CTV است (جدول ۵، شکل ۶). این قطعه حاصل نوترکیبی سویه مصری (Qaha، رس شمار AY340974) به عنوان والد اصلی و سویه T36 (U16304) به عنوان والد فرعی است. در جدایه IR-North2 نیز قطعه ۷۷۳ نوکلئوتیدی در موقعیت ۱۰۶ تا ۸۷۹ ژن رپلیکاز نوترکیب شناسایی شد (جدول ۵، شکل ۵). این قطعه حاصل نوترکیبی بین جدایه ژاپنی (NUagA، رس شمار AB046398) به عنوان والد اصلی و نژاد VT (رس شمار KC517494) به عنوان والد فرعی است. در جدایه IR-South1 نیز یک نوترکیبی در ژن رپلیکاز بطول ۲۴۴۴ نوکلئوتید در موقعیت ۳۹۷۴ تا ۶۴۱۸ ردیابی شد (جدول ۵، شکل ۵). این قطعه حاصل نوترکیبی بین نژاد VT (رس شمار EU937519) به عنوان والد اصلی و نژادهای SY568 (رس شمار AF001623) و VT (رس شمار EU937519) به عنوان والد فرعی است. هیچ نوترکیبی در جدایه IR-South2 شناسایی نشد.

تنظیم‌کننده سنتز RNA، افزایش آلودگی سیستمیک در نارنج و القای سندروم زردی گیاهچه در نارنج و گریپ‌فروت ( Flores *et al.*, 2013) است. این پروتئین دارای یک ناحیه حفاظت شده RNA binding و حاوی یک موتیف Zinc finger است (شکل ۵). بررسی توالی آمینواسیدی این پروتئین نشان داد که در ناحیه حفاظت شده RNA binding جدایه IR-South2 جانشینی N53T و V69M اتفاق افتاده است. سه جانشینی متوالی نیز در موقعیت ۷۸-۸۰ شامل G78A، L79S و K80R در سه جدایه IR-South1، IR-North2 و IR-South2 وجود داشت.

### تجزیه و تحلیل نوترکیبی

بررسی وقوع نوترکیبی احتمالی در جدایه‌های ایرانی CTV نشان داد که جدایه‌های IR-North1، IR-North2 و IR-South1 نوترکیب هستند (شکل ۶).

در جدایه IR-North1 قطعه ۱۴۲۶ نوکلئوتیدی در موقعیت



شکل ۶- تصویر شماتیک از محل وقوع نوترکیبی در ژنوم جدایه‌های ایرانی CTV

شاخص‌های قطعه نوترکیب در جدول ۵ ذکر شده است.

Figure 6- A schematic representation of the recombination event location in the genome of Iranian CTV strains. The breakpoints of the recombination fragment are listed in Table 5.

جدول ۵- مشخصات قطعه نوترکیب شناسایی شده در ژنوم جدایه‌های ایرانی CTV

Table 5- Characteristics of the identified recombination fragment in the genome of Iranian CTV strains

جدایه Isolate	فراوانی Frequency	طول length	موقعیت Position	والدین Parents		روش ردیابی Detection methods	معناداری آماري pValue
				اصلي Major	كمكي Minor		
IR-North1	2	1426	12712-14138	AY340974	U16304.1 NC001661	<b>R.G.B.M.C.S.Se</b>	2.23E-05
IR-North2	5	773	106-879	AB046398	KC517494	<b>R.G.B.M.C.S.Se</b>	1.37E-10
IR-south1	4	2444	3974-6418	EU937519 KJ790175 MK491895 MW689620	AF001623 EU937519	<b>R.G.B.M.C.S.Se</b>	9.39E-06

Abbreviations used for recombination detection programs; R: RDP, G: GENECONV, B: Bootscan, M: Maxchi, C: Chimaera, S: SiSscan, P: PhylPro, Se: 3Seq. Recombination-detecting programs representing significant signal showed in bold; (c): The greatest P-value calculated by the program for the recombination event. The highest reported P-value for the program showed in underlined in RDP4.

## بحث

در این تحقیق توالی کامل ویروس تریستزای مرکبات از دو منطقه مرکبات خیز استان مازندران و استان فارس مشخص و برخی صفات بیولوژیکی و مولکولی آنها با یکدیگر مقایسه شده است. علائم CTV در نمونه‌های آلوده جمع‌آوری شده از استان مازندران ایران شامل زردی، ریزبرگی، سرخشیدگی شاخه‌ها و کوتولگی بود و در تعداد معدودی زردی رگبرگ نیز مشاهده شد. علائم زردی و کوتولگی در مطالعه بزرگ و همکاران از مرکبات آلوده به CTV در استان مازندران کشور نیز گزارش شده است (Barzegar *et al.*, 2006). این علائم مشابه با علائم سندروم سویه‌های SP و SY تریستزا می‌باشد (Moreno *et al.*, 2008). در نمونه‌های استان فارس علائم ریزش برگ و سبزخشیدگی شایع بود که اغلب همراه با رنگ‌پریدگی، کوتولگی و ریزبرگی بود. علائم مشابه با آنها در آلودگی مرکبات به سویه NUagA از ژاپن و SY568 از کالیفرنیا نیز گزارش شده است (Suastika *et al.*, 2001). نهال‌های مایه‌زنی شده با جدایه‌های استان مازندران علائم کوتولگی، رگبرگ روشنی، ریزبرگی و زردی نشان دادند. علائم زردی، کوتولگی شدید، ریزبرگی همراه با رگبرگ روشنی علائم ناشی از وجود سویه SY در نهال نارنج می‌باشد (Barzegar *et al.*, 2006). علائم در نهال‌های مایه‌زنی شده با جدایه‌های استان فارس شامل رگبرگ روشنی، ریزبرگی، کوتولگی خفیف و زردی بود.

با استفاده از توالی‌یابی RNA seq و تجزیه و تحلیل داده‌ها، توالی کامل چهار جدایه CTV از مناطق مرکبات کاری استان مازندران و استان فارس بدست آمده که به عنوان اولین گزارش از توالی کامل ویروس تریستزای مرکبات از ایران است. بیشتر نیز از این رهیافت در شناسایی، سبب‌شناسی و توالی‌یابی ژنوم CTV استفاده شده است (Bester *et al.*, 2021، Ruiz Ruiz *et al.*, 2011). تا کنون تنها توالی ژن کدکننده پروتئین پوششی (Alavi *et al.*, 2005، Barzegar *et al.*, 2006، Ahmadi *et al.*, 2006) و ژن کدکننده پروتئین پوششی کوچک از جدایه‌های CTV در ایران گزارش شده است (Barzegar *et al.*, 2010). جدایه‌های IR-North2 و IR-North1 از مرکبات استان مازندران به ترتیب ۱۹۳۰۲ و ۱۹۲۹۶ نوکلئوتید و جدایه‌های IR-South1 و IR-South2 از مرکبات استان فارس ۱۹۲۵۲ و ۱۹۲۵۱ نوکلئوتید طول داشتند. این اختلاف در طول ژنوم مربوط به تفاوت در طول چارچوب‌های ژنی ORF1a، ORF1b، p33، p61 و نواحی 5'UTR و 3'UTR بود. بیشترین و کمترین شباهت بین جدایه‌های استان مازندران و استان فارس ۹۵/۲٪ و ۷۷/۵٪ و به ترتیب بین جدایه IR-North2 با IR-South1 و IR-North1 با North1 IR-South1 بود. جدایه IR-North1 با سویه زوال سریع

CTV (سویه T36، رس شمار U16304) (Pappu *et al.*, 1995)، جدایه IR-North2 با سویه کوتولگی و ساقه آبله‌ای شدید (سویه SY، رس شمار AB046398) (Suastika *et al.*, 2001)، جدایه IR-South1 با سویه ساقه آبله‌ای شدید CTV (سویه T318A، رس شمار DQ151548) (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2006) و جدایه IR-South2 با سویه ساقه آبله‌ای ملایم CTV (سویه T3، رس شمار EU857538) (Harper *et al.*, 2009) بیشترین شباهت را داشتند. بررسی توالی ژن کدکننده پروتئین پوششی CTV از مرکبات کاری‌های استان مازندران نیز شباهت ۹۸٪-۹۷٪ جدایه‌ها را با سویه SY نشان داده بود (Barzegar *et al.*, 2006). در درخت فیلوژنی ترسیم شده جدایه‌های CTV در سه گروه VT، T68 و T36 قرار گرفتند. توپولوژی درخت فیلوژنی مشابه با نتایج یوکومی و همکاران (Yokomi *et al.*, 2018) بود. در درخت فیلوژنی جدایه IR-North1 از مرکبات استان مازندران در گروه T36 همراه با سویه مرجع CTV (رس شمار U16304) و سه جدایه IR-North1، IR-South1 و IR-South2 در گروه VT قرار داشتند. جدایه IR-North2 ارتباط نزدیکی با سویه SY (رس شمار AB046398) داشت که علائم کوتولگی شدید، ساقه آبله‌ای و زردی نهالچه تولید می‌کند (Suastika *et al.*, 2001). جدایه‌های IR-South1 و IR-South2 از مرکبات کاری‌های استان فارس به ترتیب با نژاد T318A (رس شمار DQ151548) که مولد ساقه آبله‌ای شدید (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2006)، و نژاد T3 (رس شمار EU857538) که اغلب فاقد علائم یا با علائم ساقه آبله‌ای خفیف در پرتقال و غیرقابل انتقال با ناقل *Toxoptera citricida* بود (Harper *et al.*, 2009) رابطه نزدیکی داشتند. نتایج تعیین گروه ژنوتیپی جدایه‌ها با توجه به توالی ناحیه بین ژنی پوشش پروتئینی کوچک و بزرگ و هضم آنزیمی (Saponari *et al.*, 2010) نیز با گروه‌بندی درخت فیلوژنی جدایه‌ها تطابق داشت. اسید آمینه موقعیت ۱۲۴ در پروتئین پوششی CTV برای تعیین قدرت بیماری‌زایی سویه‌های CTV استفاده شده است (Gottwald *et al.*, 1998). جدایه‌های که در این موقعیت دارای اسید آمینه فنیل آلانین باشند در زمره سویه‌های شدید CTV قرار می‌گیرند. در سویه‌های خفیف CTV در این موقعیت هر اسید آمینه دیگر بجز فنیل آلانین قرار دارد (Lbida *et al.*, 2005). در هر چهار جدایه IR-North1، IR-North2، IR-South1 و IR-South2 در موقعیت ۱۲۴ پروتئین پوششی، اسید آمینه فنیل آلانین وجود دارد و بنابراین این چهار جدایه در گروه جدایه‌های با قدرت بیماری‌زایی زیاد قرار می‌گیرند. همچنین اسید آمینه موقعیت ۱۰۰ در پروتئین پوششی این ویروس به صورت حفاظت شده می‌باشد و در گروه فیلوژنی VT ترونین و در گروه فیلوژنی T36 آلانین است (Wu *et al.*, 2014). این موقعیت در جدایه IR-North1 شامل اسید آمینه آلانین و در سه جدایه دیگر

(Harper, 2013). فشار انتخاب منفی همراه با جریان ژن و نوترکیبی از مهم‌ترین نیروهای موثر در تکامل ویروس تریستزا هستند (Cheng et al., 2012).

سه جدایه توالی‌یابی شده در این تحقیق نوترکیب بودند. چارچوب ژنی ORF1a در جدایه‌های IR-North2 و IR-South1 از گروه فیلوژنی VT نوترکیب بود و در جدایه IR-North1 از گروه T36، دو چارچوب ژنی p61 و p65 نوترکیب بود که مشابه با نوترکیبی گزارش شده توسط هارپر (Harper, 2013) می‌باشد. در CTV بیشترین نوترکیبی در گروه VT و در نیمه 5' ژنوم گزارش شده است و در گروه T36 نوترکیبی کمتری مشاهده شده است (Biswas et al., 2012) که این مسئله احتمالاً به دلیل نرخ پایین تکامل و ثبات بالای ژنوم در اعضای این گروه می‌باشد (Harper, 2013). نوترکیبی یکی از نیروهای مهم در ظهور سویه‌های جدید در CTV است (Harper, 2013). جدایه‌های نوترکیب شناسایی شده CTV شامل جدایه SY568 از کالیفرنیا (Vives et al., 1999)، B165 (Roy and Brlansky, 2010)، Kpg3 (Biswas et al., 2012)، تمام اعضای نژاد RB و ژنوتیپ T68 (Harper, 2013) می‌باشند.

برآیند حاصل از بررسی علائم و توالی کامل چهار جدایه بدست آمده از این پژوهش نشان می‌دهد که دو جدایه بدست آمده از استان مازندران هرکدام در گروه ژنوتیپی T36 و VT (بصورت اختصاصی تر عامل SY) قرار می‌گیرند در حالی که از لحاظ علائم و جایگاه فیلوژنی از هم متفاوت هستند. دو جدایه استان فارس در گروه ژنوتیپی VT و T3 قرار می‌گیرند در حالی که از نظر فیلوژنی و ژنوتیپی با یکدیگر قرابت دارند. با توجه به اینکه دو جدایه استان فارس از لحاظ فیلوژنی و ژنوتیپی با یکی از جدایه‌های استان مازندران که در گروه ژنوتیپی VT قرار می‌گیرد قرابت دارند، به نظر می‌رسد تفاوت در جدایه‌های استان مازندران و استان فارس مربوط به سویه‌هایی از ویروس تریستزا در استان مازندران است که متعلق به گروه ژنوتیپی T36 می‌باشد.

اسید ترئونین بود. بنابراین جدایه IR-North1 در گروه فیلوژنی T36 و سه جدایه دیگر در گروه فیلوژنی VT قرار می‌گیرند که با نتایج تعیین سویه و بررسی رابطه فیلوژنی جدایه‌ها مطابقت دارد. بررسی پروتئین‌های CP، CPm، p61، p65، RdRp و Replicase بیانگر وجود ۲۸۰ جایگزینی در ۳۳ موتیف در جدایه‌های توالی‌یابی شده CTV بود. کمترین تغییرات در جدایه IR-North1 با پنج جایگزینی بود. در جدایه‌های IR-North2، IR-South1 و IR-South2 به ترتیب ۹۷، ۸۵ و ۹۳ جایگزینی رخ داده بود. بیشترین جایگزینی در چارچوب‌های ژنی ORF1a و p61 بود که به ترتیب در همانندسازی و مونتاژ ویروس نقش دارند. چارچوب‌های ژنی RdRp و p23 کمترین جایگزینی اسید آمینه را داشتند. بیشترین جانشینی در پروتئین‌های کد شده مختلف CTV در نژاد T36 در توالی آمینواسیدهای پروتئین‌های چارچوب‌های ORF1a و p61 بود (Harper, 2013). تحت انتخاب منفی با میزبان، تکامل یافته است و در تشکیل کمپلکس همانندسازی با چپرون پروتئین‌های میزبان تعامل دارد (Mine and Kuno 2012). پروتئین‌های مرتبط با همانندسازی چندین نقش به عهده دارند (Wang et al., 2009) بنابراین فشارهای انتخاب متعددی بر روی آنها اعمال و سبب تغییر در جهت ایجاد سازگاری بیشتر می‌شود. این تغییرات در ژنوتیپ‌ها و سویه‌های CTV از الگوی جانشینی مشابه پیروی می‌کند (Harper, 2013). تشابه در الگوی جانشینی بین دو جدایه IR-North2 و IR-South1 که رابطه فیلوژنی نزدیکی با یکدیگر دارند، مشاهده شد. پروتئین p61 همولوگ Hsp90 و یک چپرون مولکولی است که در مونتاژ و ویروس CTV (Satyanayana et al., 2006)، تشکیل کمپلکس همانندسازی ویروس (Huang et al., 2012) و خاموشی RNA نقش دارد (Iki et al., 2010) از آنجائی که بازدارنده‌های خاموشی ویروسی سرعت تکامل بالایی دارند (O'Neal et al., 2014) وجود تنوع در پروتئین Hsp90h قابل انتظار بود و تنوع جهش‌ها در چهار جدایه مورد بررسی ممکن است در اثر تعامل ویروس-میزبان برای سازگاری با میزبان اختصاصی ایجاد شده باشد

## منابع

- Ahmadi, S., Afsharifar, A., Niazi, A., Sadeghi, M., & Izadpanah, K. (2006). *Distribution and analysis of genetic diversity of Citrus tristeza virus (CTV) isolates in Kerman Province*. 17<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress, 289. (In Persian with English abstract)
- Alavi, A., Khatabi, B., & Salekdeh, G.H. (2005). Comparison of biologically distinct isolates of *Citrus tristeza virus* from Iran using major coat protein sequences. *Australian Plant Pathology*, 34(4), 577-582. <https://doi.org/10.1071/AP05079>
- Albiach-Martí, M.R., Guerri, J., Cambra, M., Garnsey, S.M., & Moreno, P. (2000). Differentiation of *Citrus tristeza virus* isolates by serological analysis of p25 coat protein peptide maps. *Journal of Virological Methods*, 88(1), 25-34. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(00\)00165-8](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(00)00165-8)
- Albiach-Martí, M.R., Mawassi, M., Gowda, S., Satyanarayana, T., Hilf, M.E., Shanker, S., Almira, E.C., Vives, M.C., Lopez, C., Guerri, J., Flores, R., Moreno, P., Garnsey, S.M., & Dawson, W.O. (2000b). Sequences of *Citrus tristeza virus* separated in time and space are essentially identical. *Journal of Virology*, 74, 6856-6865.

- <https://doi.org/10.1128/jvi.74.15.6856-6865.2000>
5. Barzegar, A., Rahimian, H., & Hashemi Sohi, H. (2010). Comparison of the minor coat protein gene sequences of aphid-transmissible and nontransmissible isolates of *Citrus tristeza virus*. *Journal of General Plant Pathology*, 76, 143-151. <https://doi.org/10.1007/s10327-009-0216-7>
  6. Barzegar, A., Sohi, H.H., & Rahimian, H. (2006). Characterization of *Citrus tristeza virus* isolates in northern Iran. *Journal of General Plant Pathology*, 72, 46-51. <https://doi.org/10.1007/s10327-005-0249-5>
  7. Bester, R., Cook, G., & Maree, H.J. (2021). *Citrus tristeza virus* genotype detection using high-throughput sequencing. *Viruses*, 13, 2-168. <https://doi.org/10.3390/v13020168>
  8. Biswas, K.K., Tarafdar, A., & Sharma, S.K. (2012). Complete genome sequence of mandarin decline *Citrus tristeza virus* of the northeastern Himalayan hill region of India: comparative analyses determine recombinant. *Archives of Virology*, 157, 579-583. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1165-y>
  9. Carra, A.M., Gambino, G., & Schubert, A. (2007) A cetyltrimethylammonium bromide-based method to extract low-molecular-weight RNA from polysaccharide-rich plant tissues. *Anal. Biochemistry*, 360, 318. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.09.022>
  10. Cheng, X.F., Wu, X.Y., Wang, H.Z., Sun, Y.Q., Qian, Y.S., & Luo, L. (2012). High codon adaptation in *Citrus tristeza virus* to its citrus host. *Virology Journal*, 9, 113. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-113>
  11. Coetzee, B., Freeborough, M.J., Maree, H.J., Celton, J.M., Rees, D.J.G., & Burger, J.T. (2010). Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: virome of a vineyard. *Virology*, 400(2), 157-163. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.01.023>
  12. Cook, G., van Vuuren, S.P., Breytenbach, J.H., Steyn, C., Burger, J.T., & Maree, H.J. (2016). Characterization of *Citrus tristeza virus* single-variant sources in grapefruit in greenhouse and field trials. *Plant Disease*, 100(11), 2251-2256. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-16-0391-RE>
  13. Cowell, S.J., Harper, S.J., & Dawson, W.O. (2016). Some like it hot: *Citrus tristeza virus* strains react differently to elevated temperature. *Archives of Virology*, 161, 3567-3570. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-3083-5>
  14. Dawson, W.O., Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M., & Moreno, P. (2015). *Citrus tristeza virus*: making an ally from an enemy. *Annual Review of Phytopathology*, 5, 137-155. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120012>
  15. Ebrahim-Nesbat, F., & Nienhaus, F. (1978). Occurrence of *Citrus tristeza virus* in Iran/Auftreten von *Citrus-Tristeza virus* in Iran. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*, 308-312.
  16. Flores, R., Ruiz-Ruiz, S., Soler, N., Sánchez-Navarro, J., Fagoaga, C., López, C., Navarro, L., Moreno, P., & Peña, L. (2013). *Citrus tristeza virus* p23: a unique protein mediating key virus-host interactions. *Frontiers in Microbiology*, 4, 98. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00098>
  17. Gottwald, T.R., Garnsey, S.M., & Borbón, J. (1998). Increase and patterns of spread of *Citrus tristeza virus* infections in Costa Rica and the Dominican Republic in the presence of the brown citrus aphid, *Toxoptera citricida*. *Phytopathology*, 88, 621-636. <https://doi.org/10.1094/PHTO.1998.88.7.621>
  18. Gushchin, V.A., Karlin, D.G., Makhotenko, A.V., Khromov, A.V., Erokhina, T.N., Solovyev, A.G., Morozov, S.Y., & Agranovsky, A.A. (2017). A conserved region in the Closterovirus 1a polyprotein drives extensive remodeling of endoplasmic reticulum membranes and induces motile globules in *Nicotiana benthamiana* cells. *Virology*, 502, 106-113. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.12.006>
  19. Harper, S.J., Dawson, T.E., & Pearson, M.N. (2009). Complete genome sequences of two distinct and diverse *Citrus tristeza virus* isolates from New Zealand. *Archives of Virology*, 154, 1505-1510.
  20. Harper, S.J., & Pearson, M.N. (2015). *Citrus tristeza virus* strains present in New Zealand and the South Pacific. *Journal of Citrus Pathology*, 2, 1. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0456-z>
  21. Harper, S.J. (2013). *Citrus tristeza virus*: evolution of complex and varied genotypic groups. *Frontiers in Microbiology*, 4, 93. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00093>
  22. Herrera-Isidrón, L., Ochoa-Sánchez, J.C., Rivera-Bustamante, R., & Martínez- Soriano, J.P. (2009). Sequence diversity on four ORFs of *Citrus tristeza virus* correlates with pathogenicity. *Virology Journal*, 6, 116. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-116>
  23. Huang, Y.W., Hu, C.C., Liou, M.R., Chang, B.Y., Tsai, C.H., & Meng, M. (2012). Hsp90 interacts specifically with viral RNA and differentially regulates replication initiation of *Bamboo mosaic virus* and associated satellite RNA. *PLoS Pathology*, 8, e1002726. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002726>
  24. Iftikhar, Y., Abbas, M., Mubeen, M., Zafar-ul-Hye, M., Bakhtawar, F., Bashir, S., Sajid, A., & Shabbir, M.A., (2021). Overview of strain characterization in relation to serological and molecular detection of *Citrus tristeza Closterovirus*. *Phyton*, 90(4), 1063. <https://doi.org/10.32604/phyton.2021.015508>
  25. Iki, T., Yoshikawa, M., Nishikiori, M., Jaudal, M.C., Matsumoto Yokoyama, E., & Mitsuhara, I. (2010). *In vitro* assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90. *Molecular Cell*, 39, 282-291. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.014>
  26. Jo, Y., Choi, H., Kim, S.M., Kim, S.L., Lee, B.C., & Cho, W.K. (2017). The pepper virome: natural co-infection of diverse viruses and their quasispecies. *BMC Genomics*, 1, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3838-8>



27. Jo, Y., Choi, H., Kim, S.M., Kim, S.L., Lee, B.C., & Cho, W.K. (2016). Integrated analyses using RNA-Seq data reveal viral genomes, single nucleotide variations, the phylogenetic relationship, and recombination for Apple stem grooving virus. *BMC Genomics*, 17, 1,1-12. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2994-6>
28. Kashif, M., Pietilä, S., Artola, K., Jones, R.A.C., Tugume, A.K., Mäkinen, V., & Valkonen, J.P.T. (2012). Detection of viruses in sweetpotato from Honduras and Guatemala augmented by deep-sequencing of small-RNAs. *Plant Disease*, 96(10), 1430-1437. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0268-RE>
29. Lbida, B., Bennani, A., Serrhini, M.N., & Zemzami, M. (2005). Biological, serological and molecular characterization of three isolates of *Citrus tristeza closterovirus* introduced into Morocco. *EPPO Bulletin*, 35(3), 511-517. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2005.00895.x>
30. Li, R., Gao, S., Hernandez, A.G., Wechter, W.P., Fei, Z., & Ling, K.S. (2012). Deep sequencing of small RNAs in tomato for virus and viroid identification and strain differentiation. *PloS One*, 7, e37127. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037127>
31. Matsumura, E.E., Coletta-Filho, H.D., Nouri, S., Falk, B.W., Nerva, L., Oliveira, T.S., Dorta, S.O., & Machado, M.A. (2017). Deep sequencing analysis of RNAs from citrus plants grown in a citrus sudden death-affected area reveals diverse known and putative novel viruses. *Viruses*, 9(4), 92. <https://doi.org/10.3390/v9040092>
32. Melzer, M.J., Borth, W.B., Sether, D.M., Ferreira, S., Gonsalves, D., & Hu, J.S. (2010). Genetic diversity and evidence for recent modular recombination in Hawaiian *Citrus tristeza virus*. *Virus Genes*, 40, 111-118. <https://doi.org/10.1007/s11262-009-0409-3>
33. Mine, A., & Okuno, T. (2012). Composition of plant virus RNA replicase complexes. *Current Opinion Virology*, 2, 669-675. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.09.014>
34. Moreno, P., Ambros, S., Albiach-Marti, M.R., Guerri, J., & Peoa, L. (2008). *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry *Molecular Plant Pathology*, 9, 251-268. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00455.x>
35. Moshe, B.J., & Munir, M. (2000). The Role of Defective RNAs in *Citrus Tristeza Virus* Diseases. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00132>
36. O'Neal, S.T., Samuel, G.H., Adelman, Z.N., & Myles, K.M. (2014). Mosquito-borne viruses and suppressors of invertebrate antiviral RNA silencing. *Viruses*, 6(11), 4314-4331. <https://doi.org/10.3390/v6114314>
37. Pais da Cunha, A.T., Chiumenti, M., Ladeira, L.C., Abou Kubaa, R., Loconsole, G., Pantaleo, V., & Minafra, A. (2021). High throughput sequencing from Angolan citrus accessions discloses the presence of emerging CTV strains. *Virology Journal*, 18(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01535-x>
38. Pappu, H.R., Pappu, S.S., Kano, T., Koizumi, M., Cambra, M., Moreno, P., & Niblett, C.L. (1995). Mutagenic Analysis and Localization of a Highly Conserved Epitope. *Phytopathology*, 85, 1311-1315. <https://doi.org/10.1094/Phyto-85-1311>
39. Ramírez-Pool, J.A., Xoconostle-Cázares, B., Calderón-Pérez, B., Ibarra-Laclette, E., Villafán, E., Lira-Carmona, R., & Ruiz-Medrano, R. (2022). Transcriptomic analysis of the host response to mild and severe CTV strains in naturally infected *Citrus sinensis* orchards. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2435. <https://doi.org/10.3390/ijms23052435>
40. Roy, A., & Brlansky, R.H. (2010). Genome analysis of an orange stem pitting *Citrus tristeza virus* isolate reveals a novel recombinant genotype. *Virus Research*, 151, 118-130. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.03.017>
41. Ruiz-Ruiz, S., Moreno, P., Guerri, J., & Ambrs S. (2006). The complete nucleotide sequence of a severe stem pitting isolate of *Citrus tristeza virus* from Spain: comparison with isolates from different origins. *Archives of Virology*, 151, 387-398. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0618-6>
42. Ruiz-Ruiz, S., Navarro, B., Gisel, A., Pena, L., Navarro, L., Moreno, P., Serio, F.D., & Flores, R. (2011). *Citrus tristeza virus* infection induces the accumulation of viral small RNAs (21-24-nt) mapping preferentially at the 3'-terminal region of the genomic RNA and affects the host small RNA profile. *Plant Molecular Biology*, 75, 607-619. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9754-4>
43. Saponari, M., & Yokomi, R.K. (2010). Use of the coat protein (CP) and minor CP intergene sequence to discriminate severe strains of *Citrus tristeza virus* (CTV) in three US CTV isolate collections. In *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)*, 17, 17.
44. Satyanayana, T., Gowda, S., Ayllón, M.A., & Dawson, W. O. (2004). Closterovirus bipolar virion: evidence for initiation of assembly by minor coat protein and its restriction to the genomic RNA 5' region. *Proceeding of National Academic Science. USA*, 101, 799-804. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307747100>
45. Suastika, C., Natsuaki, T., Terui, H., Kano, T., Ieki, H., & Okuda, S. (2001). Nucleotide sequence of *Citrus tristeza virus* seedling yellows isolate. *Journal of General Plant Pathology*, 67(1), 73-77. <https://doi.org/10.1007/PL00012992>
46. Turchinovich, A., Surowy, H., Serva, A., Zapatka, M., Lichter, P., & Burwinkel, B. (2014). Capture and Amplification by Tailing and Switching (CATS) An ultrasensitive ligation-independent method for generation of DNA libraries for deep sequencing from picogram amounts of DNA and RNA. *RNA biology*, 11(7), 817-828. <https://doi.org/10.4161/rna.29304>

47. Vives, M.C., Rubio, L., Lopez, C., Navas-Castillo, J., Albiach-Martí, M.R., Dawson, W.O., Guerri, J., Flores, R., Moreno, P. (1999). The complete genome sequence of the major component of a mild citrus tristeza isolate. *Journal of General Virology*, 80, 811–816. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-3-811>
48. Wang, X., Goregaoker, S. P., & Culver, J. N. (2009). Interaction of the *Tobacco mosaic virus* replicase protein with a NAC domain transcription factor is associated with the suppression of systemic host defenses. *Journal of Virology*, 83, 9720–9730. <https://doi.org/10.1128/JVI.00941-09>
49. Weng, Z., Barthelson, R., Gowda, S., Hilf, M. E., Dawson, W. O., Galbraith, D. W., & Xiong, Z. (2007). Persistent infection and promiscuous recombination of multiple genotypes of an RNA virus within a single host generate extensive diversity. *PLoS One*, 2(9), e917. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000917>
50. Wylie, S. J., Li, H., Saqib, M., & Jones, M. G. (2014). The global trade in fresh produce and the vagility of plant viruses: a case study in garlic. *PLoS One*, 9 (8), e105044. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105044>
51. Wu, G.W., Tang, M., Wang, G.P., Wang, C.X., Liu, Y., Yang, F., & Hong, N. (2014). The epitope structure of *Citrus tristeza virus* coat protein mapped by recombinant proteins and monoclonal antibodies. *Virology*, 448, 238–246. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.10.021>
52. Yokomi, R., Selvaraj, V., Maheshwari, Y., Chiumenti, M., Saponari, M., Giampetruzzi, A., Weng, Z., Xiong, Z., & Hajeri, S. (2018). Molecular and biological characterization of a novel mild strain of *Citrus tristeza virus* in California. *Archives of Virology*, 163, 1795–1804. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3799-5>
53. Yokomi, R. (2019). CTV vectors and interactions with the virus and host plants. *Citrus Tristeza Virus: Methods and Protocols*, 29–53. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9558-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9558-5_4).