

کاربرد روش‌های مولکولی در ردیابی ویروس تریستزای مرکبات در شته جالیز

فرشته اسمعیل زاده میان‌لنگه^۱ - سید مهدی بنی‌هاشمیان^{۲*} - احمد روحی بخش^۳ - سیروس آقاجانزاده^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۰۸

چکیده

ویروس تریستزای مرکبات (*Citrus tristeza virus; CTV*)، عامل مهم‌ترین بیماری ویروسی مرکبات است و شته جالیز (*Aphis gossypii*) به عنوان ناقل کارای این ویروس در ایران معرفی شده است. در این تحقیق، روش‌های مختلف ردیابی ویروس تریستزای مرکبات در شته جالیز با استفاده از جدایه SD4 از کلکسیون ویروسی پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری مورد ارزیابی قرار گرفت. کلنی خالص این شته ابتدا به مدت ۴۸ ساعت روی منبع آلوده به ویروس و سپس روی گیاهچه‌های لیموترش مکزیکی (*Citrus aurantifolia*) تحت شرایط کنترل شده قرار داده شد. حضور ویروس در گیاهان گیرنده پس از سه ماه بر اساس علایم و روش سرولوژی ایمونوپرینت (Direct tissue blot immunoassay) تشخیص داده شد. آلودگی این گیاهان با استفاده از RT-PCR؛ Reverse transcription polymerase chain reaction؛ دو مرحله‌ای با جفت آغازگرهای اختصاصی پوشش پروتئینی T36CPF/T36CPR بر اساس اسیدریبونوکلیک استخراج شده به روش SDS-Potassium acetate از بافت گیاهی مورد تأیید قرار گرفت. در تشخیص مستقیم ویروس از شته، RT-PCR یک مرحله‌ای و اسیدریبونوکلیک استخراج شده از شته‌ها به روش تریازول به کار گرفته شد و باندهای خفیفی به اندازه ۶۷۲ جفت باز به دست آمد. با انجام مرحله دوم PCR، براساس فرآورده به دست آمده از مرحله اول و با استفاده از جفت آغازگرهای T36CPF/P25R، قطعات مشخص با اندازه ۳۶۲ جفت باز حاصل گردید. در حالی که RT-PCR آشیانه‌ای (RT-nested-PCR) با ترکیب آغازگرهای PexF/PexR-PinF/PinR، به دلیل ایجاد مثبت کاذب در شرایط مطالعه حاضر قادر به ردیابی ویروس در شته‌های آلوده نبود.

واژه‌های کلیدی: آزمون بیولوژی، تشخیص مستقیم، شته ناقل، ویروس تریستزا

مقدمه

۲۷ کیلو دالتون تشکیل شده است (۲۷). پراکنش تریستزا به مناطق جدید با جابه‌جایی مواد تکثیری آلوده و چند گونه شته انجام می‌شود (۳۰). در بین شته‌های مرکبات، شته قهوه‌ای (*Toxoptera citricida*) به عنوان مهم‌ترین ناقل این ویروس شناخته شده است. با این حال، این شته در مناطقی مانند آمریکای شمالی، حوزه مدیترانه، ایران و برخی کشورهای دیگر وجود ندارد. در این کشورها شته جالیز (*Aphis gossypii*) که دومین ناقل کارای ویروس تریستزا به حساب می‌آید، به عنوان ناقل اصلی ویروس فعالیت دارد (۳۱). این شته از طریق تغذیه مستقیم از شیره گیاهی، تولید عسلک و انتقال حدود ۷۶ ویروس بیماری‌زای گیاهی باعث خسارت جدی به محصولات کشاورزی می‌شود (۱۴). برای مدت‌های متمادی روش‌های مختلف بیولوژی و سرولوژی به منظور ردیابی تریستزا در ناقلین مورد استفاده قرار گرفت (۸ و ۲۳). در سال‌های اخیر تکنیک‌هایی چون RT-PCR (۱۶)، RT-PCR آشیانه‌ای (RT-nested-PCR) (۲۲ و ۲۶)، RT-nested-PCR Squash-capture (۱۵ و ۲۱) و Real-time

ویروس تریستزای مرکبات (*Citrus tristeza virus; CTV*) متعلق به جنس *Closterovirus* و خانواده *Closteroviridae*، عامل مهم‌ترین بیماری ویروسی مرکبات است (۱۹). پیکره ویروس از رشته‌های مارپیچی با اندازه حدود 2000×11 نانومتر و دو پروتئین ۲۵ و

۱ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی و استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه گیلان، رشت

۲- استادیار گروه ژنتیک و به‌نژادی، پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر

۳- نویسنده مسئول: (Email: m.banihashemian@areeo.ac.ir)

۴- دانشیار گروه فناوری و مدیریت تولید، پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر

DOI: 10.22067/jpp.v33i1.69613

RT-PCR (۷ و ۲۶) به این منظور به کار رفته‌اند. در ایران، تریستزا از مناطق مرکبات خیز شمال و جنوب گزارش و شته جالیز به عنوان ناقل بیماری معرفی شده است (۱، ۲۴، ۲۸ و ۳۳). ردیابی ویروس تریستزا در ناقلین پیشتر براساس روش‌های بیولوژی، سرولوژی و میکروسکوپ الکترونی صورت گرفته است (۲، ۶، ۱۲ و ۱۷). با این حال دستیابی به تکنیک‌های مولکولی سریع و حساس جهت انجام مطالعات اپیدمی‌شناسی خصوصاً با توجه به وقوع گسترده زوال درختان مرکبات روی پایه نارنج در مناطق مختلف کشور (۵) ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها

جدایه SD4 از کلکسیون ویروسی پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری جهت آزمون انتقال ویروس انتخاب گردید. این جدایه از باغات با علائم زوال پرتقال روی پایه نارنج در خارج از کانون اصلی آلودگی شهرستان ساری به دست آمد و کارایی روش‌های بیولوژی، سرولوژی و مولکولی در تشخیص آن پیش‌تر اثبات گردید (۴). گیاهچه‌های لیموترش مکزیکی (*Citrus aurantifolia*) آلوده به این جدایه، به عنوان میزبان دهنده ویروس، مورد استفاده قرار گرفت. شته جالیز پس از جمع‌آوری از درختان مرکبات، روی بوته‌های خیار پرورش یافت. قطعات برگ خیار حامل کلنی خالص شته‌ها (اعم از پوره و بالغ) روی برگ‌های جوان گیاهان محک لیموترش مکزیکی آلوده به ویروس قرار داده شد تا شته‌ها به مدت ۴۸ ساعت از آنها تغذیه کنند. پس از گذشت این زمان، شته‌ها با قلم‌مو جمع‌آوری و روی برگ‌های جوان گیاهچه‌های لیموترش بذری قرار داده شدند. تغذیه شته‌ها از این گیاهان نیز ۴۸ ساعت به طول انجامید. نهال‌ها پس از حذف شته‌ها با حشره‌کش به گلخانه خنک (به ترتیب ۲۴ و ۱۸ درجه سانتی‌گراد در روز و شب) با پوشش توری ضد حشره انتقال

یافتند. برای تلقیح ویروس، ۲۰ گیاهچه و به ازای هر گیاهچه، ۲۰ شته در نظر گرفته شد. صحت انتقال ویروس با شته، پس از سه ماه، با رصد علائم، سرولوژی و RT-PCR مورد تأیید قرار گرفت. در روش سرولوژی، تکنیک ایمونوپرینت (Direct tissue blot immunoassay) مطابق مراحل توصیف شده توسط کمبرا و همکاران (۹) با آنتی سرم تجاری شرکت بیوربا (Bioreba) به کار رفت. جهت انجام RT-PCR، ابتدا اسیدریبونوکلئیک کل از بافت گیاهان محک آلوده شده با شته به روش SDS-acetate Potassium Revert (۳) استخراج و سپس آزمون RT-PCR دو مرحله‌ای براساس دستورالعمل و پروفایل دمایی پیشنهادی کیت‌های Aid و PCR Master Mix (Fermentas) با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی ژن پروتئین پوششی 36CPF/T36CPR (جدول ۱) انجام و نتایج در ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت.

به منظور ردیابی مستقیم ویروس در شته، از روش استخراج اسیدریبونوکلئیک کل با تری‌ازول (Ambion and Life Technologies) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده گردید. آماده حاصله با واکنش RT-PCR یک مرحله‌ای با کمک آنزیم AMV Reverse Transcriptase (Fermentas) و شرایط و آغازگرهای T36CPF/T36CPR معرفی شده توسط کمپولو و همکاران (۱۱) مورد ارزیابی قرار گرفت. محصول نهایی این واکنش براساس روش ساپوناری و همکاران (۲۶) به عنوان الگو در nested-PCR با استفاده از آغازگرهای T36CPF/P25R وارد شد. آزمون RT-nested-PCR با ترکیب آغازگرهای ژن 3'UTR شامل PinF/PinR و PexF/PexR به ترتیب مربوط به مراحل اول و دوم نیز انجام گردید (۲۲). توالی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در ردیابی ویروس تریستزا در شته جالیز

Table 1- Primers used for detection of CTV in *A. gossypii*

پرایمر Primer	جهت Direction	ترادف Sequence (5'-3')	ژن هدف Target gene	کاربرد Application	منبع Reference
T36CP	Forward	ATGGACGACGAAACAAATTG	CP	RT-PCR	Hilf and Garnsey, 2000
T36CP	Forward	ATGGACGACGAAACAAATTG	CP	RT-nested-PCR	Hilf and Garnsey, 2000
T36CP	Reverse	TCAACGTGTGTTGAATTTCCCA	CP	RT-PCR	Hilf and Garnsey, 2000
P25	Reverse	TCAGTCCAAGTTTGTGAGA	CP	RT-nested-PCR	Saponari et al., 2008*
PEX	Forward	CATCTGATTGAAGTGGAC	3'UTR	RT-PCR	Olmos et al., 1999
PEX	Reverse	TAAACAACACACTCTAAGG	3'UTR	RT-PCR	Olmos et al., 1999
PIN	Forward	TATCACTAGACAATAACCGGATGGGTA	3'UTR	RT-nested-PCR	Olmos et al., 1999
PIN	Reverse	GGTTCACGCATACGTTAAGCCTCACT	3'UTR	RT-nested-PCR	Olmos et al., 1999

* آغازگر توصیه شده برای Real time RT-PCR با تغییراتی در توالی، جهت RT-PCR طراحی گردید.

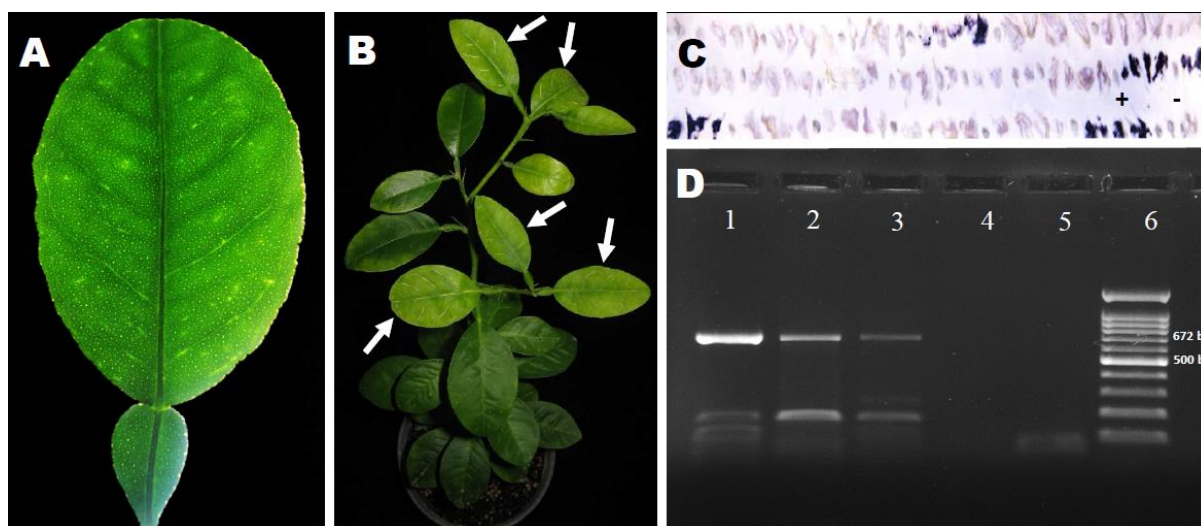
شته جالیز و نگهداری در گلخانه با شرایط کنترل شده دمایی، علائم مشخصه تریستزا در این گیاه محک یعنی رگبرگ روشنی (Vein

نتایج

از سه ماه پس از آلوده‌سازی گیاهچه‌های لیموترش مکزیکی با

و عصاره استخراج شده از گیاهان محک آلوده شده با شته جالیز به منظور تأیید نتایج آزمون‌های بیولوژی و سرولوژی انجام شد، قطعه مورد انتظار از ژن پروتئین پوششی ویروس تریستزای مرکبات به طول ۶۷۲ جفت باز علاوه بر لیموترش منبع تغذیه شته، در گیاهان محک آلوده شده با این حشرات نیز تکثیر شد (شکل D-۱).

(clearing) برگ‌های جوان (شکل A-۱) و رگبرگ کرکی (Vein corking) برگ‌های مسن (شکل B-۱) در بیست درصد گیاهان لیموترش نمایان شد. آلودگی این گیاهچه‌ها با آزمون ایمونوپرینت نیز مشخص گردید. به این صورت که تغییر رنگ مقطع بافت تنها در نمونه‌های آلوده به ویروس مشاهده شد (شکل C-۱). در RT-PCR که با استفاده از آغازگرهای اختصاصی 36CPF/T36CPR (جدول ۱)



شکل ۱- ردیابی ویروس تریستزا در شته جالیز به روش غیرمستقیم با آزمون گیاه محک لیموترش مکزیک با استناد به علائم رگبرگ روشنی (A) و رگبرگ کرکی (B)، تأیید آلودگی به روش ایمونوپرینت (C) و RT-PCR (D)

چاهک‌ها: ۱- لیموترش منبع تغذیه شته ۲ و ۳- گیاه محک آلوده شده با شته جالیز ۴- کنترل فاقد الگو ۵- لیموترش سالم ۶- نشانگر با اندازه ۱۰۰ جفت باز

Figure 1- Indirect detection of CTV in *A. gossypii* based on monitoring of vein clearing (A) and vein corking (B) symptoms in Mexican lime infected with the aphid. Infection confirmation by direct tissue blot immunoassay (C) and RT-PCR (D)
Lanes: 1. Infected source plant, 2 and 3. Indicator plant infected with aphids, 4. PCR control, 5. Negative healthy control, 6. 100 bp DNA marker.

کارگیری تکنیک‌های سریع، مؤثر و کارآمد جهت ردیابی ویروس در ناقل حائز اهمیت است. تشخیص پیکره‌های ویروس در شته‌هایی که می‌توانند ویروس را منتقل کنند، علاوه بر مطالعات اپیدمی‌شناسی، به انتخاب راهبرد کنترل بیماری نیز کمک می‌کند. در مناطقی که تریستزا همه‌گیر است، مدیریت بیماری بر مبنای ترویج استفاده از پایه‌های متحمل در حالی که در نواحی با آلودگی محدود، بر ریشه‌کنی کانون‌ها استوار است (۱۰).

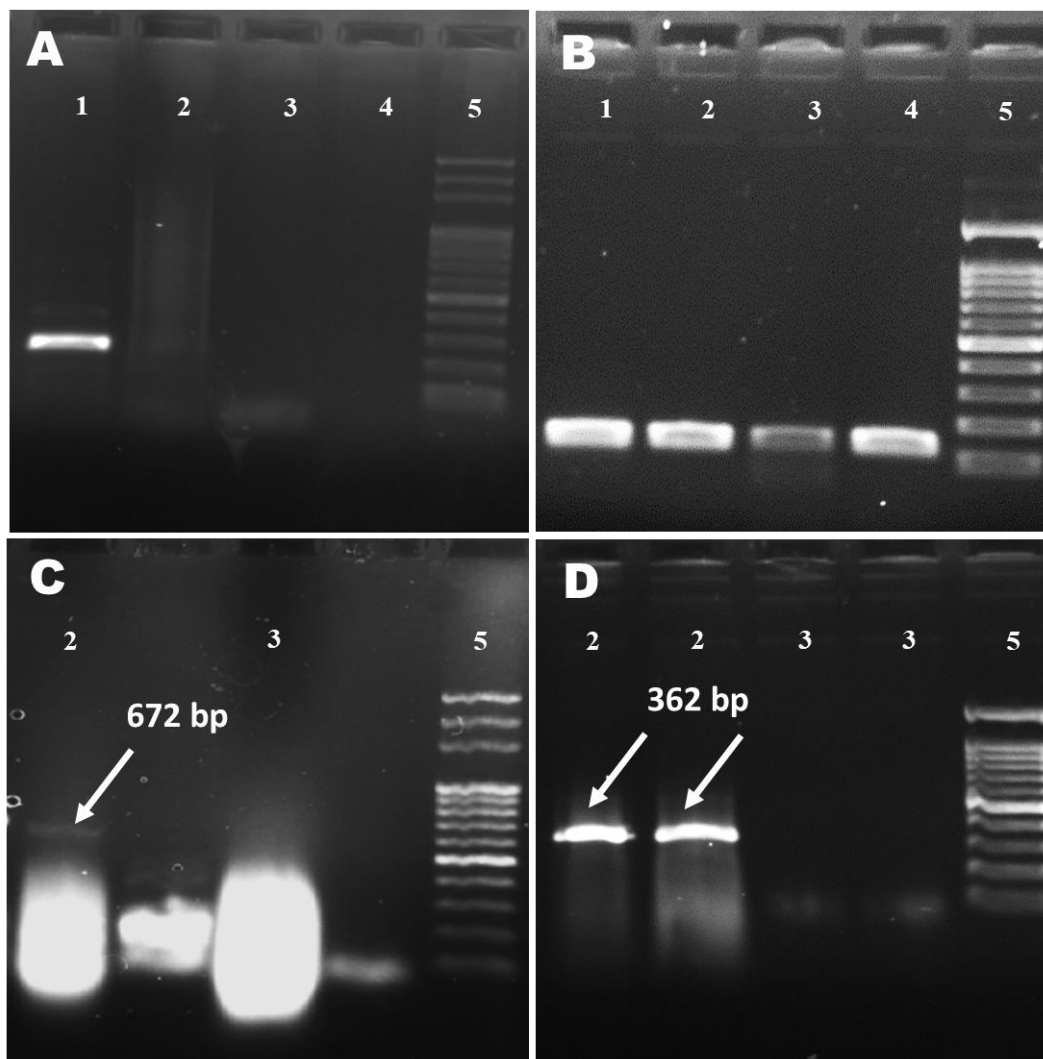
تیترا پایین ویروس‌ها در ناقلین ردیابی آن‌ها را دشوار ساخته است. به کارگیری روش مولکولی RT-PCR تنها در صورتی که کارایی استخراج اسیدریبونوکلئیک با استفاده از موادی مانند Gene Releaser و تریازول افزایش یابد، امکان تشخیص ویروس در شته را فراهم می‌آورد (۱۶ و ۲۶). با وجود اینکه این روش جهت ردیابی تعدادی از ویروس‌های گیاهی در ناقلین استفاده شده است (۲۰ و ۲۹)، با این حال، برای تشخیص ویروس‌های منتقل شده به صورت نیمه پایا از جمله ویروس تریستزا به تکنیک‌های حساس‌تری نیاز است

به منظور ردیابی مستقیم ویروس تریستزا در شته، آموده حاصله از استخراج اسیدریبونوکلئیک به روش تریازول ابتدا در واکنش RT-PCR با جفت آغازگرهای T36CPF/T36CPR مورد ارزیابی قرار گرفت و باندهای خفیفی به اندازه ۶۷۲ جفت باز به دست آمد (شکل C-۲). با انجام مرحله دوم PCR، براساس فرآورده به دست آمده از مرحله اول و با استفاده از جفت آغازگرهای T36CPF/P25R، T36CPF/P25R، قطعات مشخص با اندازه ۳۶۲ جفت باز حاصل گردید. در حالی که در شته‌های تغذیه کرده از گیاهان سالم و نمونه‌های فاقد الگو، این قطعه تکثیر نگردید (شکل D-۲). RT-nested-PCR با آغازگرهای PexF/PexR در مرحله اول (شکل A-۲) و PinF/PinR در فاز دوم با واکنش مثبت کاذب همراه گردید (شکل B-۲).

بحث

با گسترش مناطق آلوده به ویروس تریستزا در کشور (۱، ۲۸ و ۳۳) و قابلیت انتقال این ویروس توسط شته جالیز (۲۴)، لزوم به

(۱۵، ۲۲ و ۲۶). در تحقیق حاضر نیز امکان تشخیص ویروس در شته ناقل با روش RT-PCR به جهت استفاده از ترایزول میسر گردید.



شکل ۲- ردیابی ویروس تریستزا در شته جالیز به روش مستقیم؛ RT-PCR با جفت آغازگر PexF/PexR (A)، nested-RT-PCR با واکنش مثبت کاذب براساس محصول PCR شکل A و جفت آغازگر PinF/PinR (B)، RT-PCR با جفت آغازگر T36CPF/T36CPR (C)، nested-RT-PCR با جفت آغازگر T36CPF/P25R براساس محصول PCR شکل C (D)

چاهک‌ها: ۱- گیاه منبع تغذیه شته، ۲- شته تغذیه کرده از گیاه آلوده، ۳- شته تغذیه کرده از گیاه سالم، ۴- کنترل فاقد الگو، ۵- نشانگر با اندازه ۱۰۰ جفت باز

Figure 2- Direct detection of CTV in *A. gossypii*; RT-PCR with PexF/PexR primers (A), nested-RT-PCR with false positive by PinF/PinR based on PCR product of fig A (B), RT-PCR with T36CPF/T36CPR primers (C), nested-RT-PCR by T36CPF/P25R based on PCR product of fig C (D)

Lanes: 1- Infected source plant, 2. Positive aphid, 3. Negative aphid, 4. PCR control, 5. 100bp DNA marker

طولانی، نیاز به شرایط گلخانه‌ای خاص و تأثیر شرایط محیطی بر ظهور علائم از معایب آن است (۱۸). محک‌ها حساس‌ترین گیاهان شناخته شده از نظر تکثیر و بروز علائم برای ویروس‌های معین هستند. از این رو تیترو ویروس در ایندکس بیولوژی به شدت افزایش می‌یابد. ایندکس بیولوژی در این بررسی نیز با موفقیت برای ردیابی

ایندکس بیولوژی به عنوان ابزاری برای تشخیص بیماری‌های ویروسی و شبه‌ویروسی مرکبات استفاده می‌شود. اساس این روش مبتنی بر آلوده‌سازی گیاهان محک با پیوند یا ناقل و مشاهده علائم در آنها است (۳۲). سنجش عینی فعالیت‌های بیولوژی از قبیل توان انتقال و تکثیر براساس تولید علائم، از مزایای این آزمون و زمان

شته‌های تغذیه کرده از گیاه آلوده با جفت آغازگرهای T36CPF/T36CPR، باندهای خفیفی به اندازه ۶۷۲ جفت باز به دست آمد (شکل ۲-C). با انجام مرحله دوم PCR، براساس فرآورده به دست آمده از مرحله اول و با استفاده از جفت آغازگرهای T36CPF/P25R، قطعات مشخص با اندازه ۳۶۲ جفت باز حاصل گردید (شکل ۲-D). اما RT-PCR آشیانه‌ای با آغازگرهای PinF/PinR و PexF/PexR به دلیل پیدایش مثبت کاذب موفقیت آمیز نبود (شکل ۲-A و B). نتایج این پژوهش نشان می‌دهد RT-nested-PCR بر اساس روش استخراج کارآمد و انتخاب آغازگرهای مناسب، تکنیکی حساس، سریع و قابل اعتماد در ردیابی ویروس تریستزا در ناقل شته جالیز می‌باشد و به دلیل ردیابی مقادیر جزئی ویروس، در مطالعات اپیدمی‌شناسی و مدیریت بیماری تریستزا در کشور کارایی دارد.

سپاسگزاری

نویسندگان مراتب سپاس و تشکر خود را از پروفیسور پدرو مورنو (مؤسسه‌ی تحقیقات کشاورزی والنسیا، اسپانیا) جهت مشاوره علمی و خانم سیده نجمه بنی‌هاشمیان و آقای ایمان جورنپیان به علت کمک در آزمون‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای ابراز می‌دارند.

ویروس در شته جالیز به کار رفت و پس از آزمون انتقال ویروس با حشره به گیاه محک بیماری تریستزا یعنی لیموترش مکزیکی، علائم مشخصه بیماری در این گیاهان ظاهر گردید. ضمن اینکه حضور ویروس با آزمون سرولوژی و مولکولی هم مورد تأیید قرار گرفت. در RT-PCR از بافت گیاه محک، از روش SDS-Potassium acetate (۳) که نسبت به روش استخراج تریازول، ساده‌تر و کم‌هزینه‌تر است استفاده گردید. نتایج این تحقیق نشان داد که تشخیص ویروس تریستزا با روش RT-PCR از گیاه محک لیموترش مکزیکی مدتی پس از آزمون انتقال، نوعی ردیابی غیر مستقیم اما قابل اعتماد این ویروس در شته‌های ناقل به حساب می‌آید.

RT-PCR آشیانه‌ای یکی از حساس‌ترین روش‌هایی است که به منظور تشخیص مستقیم ویروس در ناقلین معرفی شده است. از آنجا که در این سیستم، محصول واکنش RT-PCR به عنوان الگو برای مرحله دیگری از PCR مورد استفاده قرار می‌گیرد، بروز آلودگی و تکثیر قطعات ناخواسته و ظهور واکنش مثبت کاذب خصوصاً در صورت عدم انتخاب آغازگرهای مناسب اجتناب ناپذیر است (۲۵). کارایی این تکنیک نیز مستقیماً با روش استخراج، ارتباط دارد (۲۶). در تحقیق حاضر، RT-nested-PCR با دو گروه آغازگری از دو ناحیه مختلف ژنوم (جدول ۱) در تشخیص ویروس تریستزای مرکبات در شته جالیز مورد بررسی قرار گرفت. در واکنش RT-PCR یک مرحله‌ای و اسیدریبونوکلئیک استخراج شده به روش تریازول از

منابع

- Ahmadi S., Afsharifar A., Niazi A., and Izadpanah K. 2008. Distribution and genetic diversity of *Citrus tristeza virus* isolates in Kerman province. *Iranian Journal of Plant Pathology* 43: 353-371. (In Persian with English abstract)
- Alavi V., and Rezvani A. 2007. Seasonal fluctuations of citrus aphid in the East of Mazandaran and *Citrus tristeza virus* transmissibility by the major species. *Plant Pests and Diseases* 75: 49-53. (In Persian with English abstract)
- Bahri B., Bani Hashemian S.M., Koolivand D., and Radmand O. 2013. Application of a simple nucleic acid extraction method for detection of *citrus tristeza virus*. In: 8th national biotechnology congress of Iran and 4th congress on biosafety and genetic engineering July 6-8, Tehran. (In Persian with English abstract)
- Bahri B. 2014. Tolerance of Bakraii rootstock to *Citrus tristeza Virus* in greenhouse condition. M. Sc. thesis, Islamic Azad University, Malekan Branch. (In Persian with English abstract)
- Bani Hashemian S.M., Gol Mohammadi M., Mohammad Alian Y., Golein B., and Moreno P. 2013. Decline of citrus trees in Iran. P. 39. In: 19th Conference of the International organization Of Citrus Virologist. 28th July–2nd Aug, South Africa.
- Barzegar A., Rahimian H., and Hashemi H. 2010. Comparison of the minor coat protein gene sequences of aphid-transmissible and non-transmissible isolates of *Citrus tristeza virus*. *Journal of General Plant Pathology* 76:143-151.
- Bertolini E., Moreno A., Capote N., Olmos A., Eduardo Vidal A., Pérez-Panadés J., and Cambra M. 2008. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology* 120: 177-188.
- Cambra M., Hermoso de Mendoza A., Moreno P., and Navarro L. 1981. Use of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of *Citrus tristeza virus* (CTV) in different aphid species. P. 444-448. In: International Citrus Congress, November 9-12, Japan.
- Cambra M., Gorris M.T., Román M.P., Terrada E., Garnsey S.M., Camarasa E., and Colomer M. 2000. Routine detection of *Citrus tristeza virus* by direct Immunoprinting-ELISA method using specific monoclonal and recombinant antibodies. P. 34-41. In: Proceedings of the 14th Conference of the International Organization of

Citrus Virologists, 13-18 September, Brazil.

- 10- Cambra M., Bertolini E., Olmos A., and Capote N. 2006. Molecular methods for detection and quantitation of virus in aphids. *Virus Diseases and Crop Biosecurity* 81-88.
- 11- Campolo O., Chiera E., Malacrino A., Laudani F., Fontana A., Albanese G.R., and Palmeri V. 2014. Acquisition and transmission of selected CTV isolates by *Aphis gossypii*. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 493-498.
- 12- Ghorbani S. 1983. Detection of *Citrus tristeza virus* in its aphid vector in northern Iran by Immunosorbent electron microscopy. P. 8. In: Proceedings of the 7th Iranian Plant Protection Congress. (In Persian with English abstract)
- 13- Hilf M.E., and Garnsey S.M. 2000. Characterization and classification of *Citrus tristeza virus* isolates by amplification of multiple molecular markers. P. 18-27. In: Proceedings of 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologists.
- 14- Kim J.J. 2007. Influence of *Lecanicillium attenuatum* on the development and reproduction of the cotton aphid, *Aphis gossypii*. *Biocontrol* 52: 789-799.
- 15- Marroquin C., Olmos A., Gorris M.T., Bertolini E., Martinez M.C., Carbonell E.A., Hermoso deMendoza A., and Cambra M. 2004. Estimation of the number of aphids carrying *Citrus tristeza virus* that visit adult citrus trees. *Virus Research* 100: 101-108.
- 16- Mehta P., Brlansky R.H., Gowda S., and Yokomi R.K. 1997. Reverse-transcription polymerase chain reaction detection of *Citrus tristeza virus* in aphids. *Plant Disease* 8: 1066-1069.
- 17- Minasian V. 1983. Use of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of *Citrus tristeza virus* (CTV) in aphids from the North of Iran. P. 82-83. In: Proceedings of the 7th Iranian Plant Protection Congress. (In Persian with English abstract)
- 18- Mohamed M.E., Bani Hashemian S.M., Dafalla G., Bove J.M., and Duran-Vila N. 2009. Occurrence and identification of citrus viroid from of Sudan. *Journal of Plant Pathology* 91: 185-190.
- 19- Moreno P., Ambros S., Albiach-Marti M.R., Guerri J., and Pena L. 2008. *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology* 9: 251-268.
- 20- Naidu R.A., Robinson D.J., and Kimmins F.M. 1998. Detection of each of the causal agents of groundnut rosette disease in plants and vector aphids by RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 9-18.
- 21- Olmos A., Dasí M.A., Candresse T., and Cambra M. 1996. Print capture PCR: a simple and highly sensitive method for the detection of *Plum pox virus* (PPV) in plant tissues. *Nucleic Acids Research* 24: 2192-2193.
- 22- Olmos A., Cambra M., Esteban O., Gorris M.T., and Terrada E. 1999. New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed tube. *Nucleic Acids Research* 27: 1564-1565.
- 23- Pirone T.P., and Harris K.F. 1977. Nonpersistent transmission of plant viruses by aphids, *Annual Review of Phytopathology* 15: 55-73.
- 24- Rahimian H., Alavi V., Shaygan J., and Hadizadeh A. 2000. Spread of *Citrus tristeza virus* by *Aphis gossypii* in the north of Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 36: 103. (In Persian with English abstract)
- 25- Roberts P.D. 1996. Survival of *Xanthomonas fragariae* on strawberry in summer nurseries in Florida detected by specific primers and nested polymerase chain reaction. *Plant Disease* 80: 1283-1288.
- 26- Saponari M., Manjunath K., and Yokomi R.K. 2008. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR. *Journal of Virological* 147: 43-53.
- 27- Satyanarayana T., Gowda S., Ayllón M.A., and 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. P. 799-804. In: Proceeding of National Academy of Science, USA.
- 28- Shafiee V., and Izadpanah K. 1998. Distribution of *Citrus tristeza virus* in southern Iran. P. 256. In: 13th Iranian Plant Protection Congress. (In Persian with English abstract)
- 29- Singh R.P., Dilworth A.D., Singh M., and McLaren D.L. 2004. Evaluation of a simple membrane-based nucleic acid preparation protocol for RT-PCR detection of potato viruses from aphid and plant tissues, *Journal of Virological Methods* 121: 163-170.
- 30- Timmer L.W., Garnsey S.M., and Graham J.H. 2000. *Compendium of Citrus Diseases*. St Paul, MN: APS Press.
- 31- Yokomi R.K., and Garnsey S.M. 1987. Transmission of *Citrus tristeza virus* by *A. gossypii* and *A. citricola* in Florida. *Phytophylactica* 19: 169-172.
- 32- Yokomi R.K., and DeBorde R.L., 2005. Incidence, transmissibility, and genotype analysis of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates from CTV eradicated and noneradicated districts in central California. *Plant Disease* 89: 859-866.
- 33- Zafari H., Bani Hashemian S.M., Ruhibakhsh A., and Bahri B. 2014. Detection of *Citrus tristeza virus* in Guilan province. *Iranian Journal of Plant Pathology* 49: 463-464. (In Persian with English abstract)

Application of Molecular Methods for Detection of *Citrus tristeza virus* in *Aphis gossypii*

F. Esmailzadeh Mianlengh¹- S.M. Bani Hashemian^{2*}- A. Ruhibakhsh³- S. Aghajanzadeh⁴

Received: 13-01-2018

Accepted: 27-02-2019

Introduction: *Citrus tristeza virus* (CTV), the causal agent of the most important viral disease of citrus, is transmitted by infected reproductive materials and several aphid species. Tristeza has been reported from the north and south of Iran and *Aphis gossypii* has been known as the vector of Tristeza. Detection of the virus in the vectors has been before carried out based on biology, serology and electron microscopy. Access to rapid and sensitive molecular techniques for epidemiological studies is the aim of the study. Reverse transcription polymerase chain (RT-PCR) and RT-nested PCR techniques were applied in the present study.

Materials and Methods: The SD4-infected Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) seedlings acquired from the virus collection with origin of declining trees of Sari region were used as donor host for virus transmission assays. Pure colony of *A. gossypii* after rearing on cucumber (*Cucumis sativus*) was placed on the infected seedlings. 20 seedlings were considered for biological indexing. 20 aphids were placed carefully on healthy Mexican lime seedlings by brush. The acquisition and transmission feeding time of virus were 48 hours and 20 aphids were considered for each test plant. The seedlings were transferred to the conditioned greenhouse (23/16°C, day/night). Indirect virus detection was carried out by monitoring of symptoms, direct tissue blot immunoassay with Biorba antiserum and two step RT-PCR with RNA extracted from indicator plants using SDS-Potassium acetate method and T36CPF/T36CPR primers. In direct detection virus of aphid, RNA extracted by Trizol method and one step RT-PCR reaction using AMV Reverse Transcriptase enzyme by T36CPF/T36CPR primers were used. The final product of this reaction was introduced in the nested-PCR using T36CPF/P25R primers. RT-nested-PCR assay was applied also with PexF/PexR primers in the first stage and PinF/PinR in the second stage.

Results and Discussion: Indirect virus detection in melon aphid was carried out by survey of vein clearing and vein corking symptoms in the receptor indicator plants. A total of 4 of 20 Mexican lime seedlings showed the symptoms during 3 months after aphid transmission assay. The presence of virus in these seedlings was confirmed by direct tissue blot immunoassay and RT-PCR techniques. Also a product of about 672 bp was amplified using specific primers of coat protein gene. Direct virus detection with one-step RT-PCR and RNA extracted from aphids by Trizol method using T36CPF/T36CPR primers resulted 672 bp weak bands. By performing the second stage of PCR using T36CPF/P25R primers, 362 bp specific bands were obtained. On the other hand, RT-nested PCR with PinF/PinR and PexF/PexR primers was not able to detect the virus in the infected aphids due to false positive reactions. The purpose of this study was to evaluate the effectiveness of different methods in selecting an appropriate method for detection of virus in melon aphid, the most effective vector of CTV in Iran. The detection of virus-associated targets in vectors that are capable of transmitting viruses is crucial for both the studies of viral replication and the optimization of control strategies. Biological indexing is the earliest test of detection of virus in aphids, which has the advantages and disadvantages, including the objective measurement of biological activities such as ability to transmit and reproduce based on production of symptoms, the long time required, and the specific greenhouse conditions. Although RT-PCR method has been used to detect a number of plant viruses in vectors, the detection of virus by this method is possible if extraction efficiency of RNA is increased by use of materials such as Gene Releaser and Trizol. Nevertheless, more

1 and 3- M.Sc. Student of Plant Pathology and Assistant Professor, Plant Protection Department, Guilan University, Rasht

2- Assistant Professor, Genetic and Breeding Department, Citrus and Subtropical Fruits Research Center, Horticultural Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Ramsar

(*- Corresponding Author Email: m.banihashemian@areeo.ac.ir)

4- Associate Professor, Technology and Production Management Department, Citrus and Subtropical Fruits Research Center, Horticultural Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Ramsar

sensitive methods are required for detection of semi-persistently and non-persistently transmitted viruses. Detection of CTV by nested RT-PCR was directly related to appropriate primers and efficient extraction procedure.

Conclusion: According to this study, RNA extraction using Trizol method is the most appropriate method for extracting nucleic acid from aphids, so it has been shown that detection of CTV by nested RT-PCR technique was directly related to the used extraction procedure. In this research, detection of *Citrus tristeza virus* in melon aphid for the first time in Iran was performed using RT-PCR and RT-nested-PCR molecular methods. The results showed that RT-nested-PCR based on the efficient extraction method and the selection of appropriate primers is a reliable technical for detection Tristeza virus in its aphid vector, *A. gossypii*.

Keywords: Aphid vector, Biological indexing, Direct detection, Tristeza virus