به‌زراعی کشاورزی

دوره ۱۶ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۳

صفحه‌های ۷۲۴-۷۱۷

استفاده از گرمادرمانی برای حذف ویروس تریستیزا در نهال‌های پرتقال ‘تامسون’ (*Citrus sinensis* L.)

مالک قاسمی[1]*، مهسا هاشمی سجادی[2]، ولی ربیعی[3]

۱. استادیار اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر، مؤسسهٔ تحقیقات مرکبات کشور، رامسر، ایران
۲. کارشناس‌ارشد گروه باغبانی، دانشکدهٔ علوم کشاورزی دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
۳. دانشیار گروه باغبانی، دانشکدهٔ علوم کشاورزی دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۲/۰۴/۲۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۲/۱۲

چکیده

بیماری تریستزا یکی از مهم‌ترین بیماری های ویروسی مرکبات است. گرمادرمانی یکی از روش‌های مدیریت این بیماری است که در این تحقیق استفاده شد. بدین منظور ۳۶ اصله نهال پرتقال رقم ‘تامسون ناول’ در فیتوترون قرارگرفت. ابتدا، نهال‌ها از طریق پیوند، آلوده شدند. به منظور اطمینان از آلودگی گیاهان آزمون سرولوژیکی الایزا استفاده شد. نهال‌ها به مدت دو هفته در دمای ۳۵ و ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد روز و شب پیش‌تیمار شدند و بعد یازده هفته در دمای ۴۰ و ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد روز و شب، به‌مدت دو هفته در دمای ۴۲ و ۳۲ درجهٔ سانتی‌گراد روز و شب و در نهایت به‌مدت ده روز در دمای ۴۴ و ۳۴ درجهٔ سانتی‌گراد روز و شب قرارگرفتند. در تیمار آخر، دوازده عدد از نهال ها خشک شد و در شش عدد از گیاهان باقی مانده آلودگی مشاهده نشد. در سایر گیاهان زنده (هجده عدد) بیماری مشاهده شد. در نهایت، از آنجا که گرمادرمانی زمینهٔ مناسبی را جهت کاهش غلظت ویروس فراهم کرد، می توان از آن در کنار پیوند نوک شاخساره (STG) و بالا بردن ضریب اطمینان از حذف ویروس استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: الایزا، ایمونوپرینتینگ، آزمون گیاه محک، تریستزا، سالم‌سازی.

* نویسنده مسئول Email: malek_ghasemi@yahoo.com

۱. مقدمه

به‌لحاظ اقتصادی، ویروس تریستزای مرکبات مهم‌ترین عامل بیماری‌زای ویروسی در مرکبات است و در سطح جهان یکی از مشکلات اصلی در تولید مرکبات قلمداد می‌شود [۱۷]. ویروس تریستزا از آسیا منشأ می‌گیرد و با جابه‌جایی مواد گیاهی آلوده و شته‌های ناقل در تمام مناطق مرکبات‌کاری جهان منتشر شده است.

اولین بار در اوایل قرن بیستم میلادی و از آفریقای جنوبی، تلفات درختان روی پایهٔ نارنج[1] گزارش شد. بیش از ۸۰ میلیون درخت پیوند شده روی پایهٔ نارنج در اثر این ویروس یا از بین رفتند یا تبدیل به درختان غیرمثمر شدند. ضایعات ایجادشده از این ویروس در کشور آرژانتین بیش از ۱۰ میلیون درخت، در برزیل بیش از ۶ میلیون درخت و در آمریکا بالغ بر ۳ میلیون درخت گزارش شده است [۶]. تنها در اسپانیا بالغ بر ۴۰ میلیون درخت به‌ویژه درختان پرتقال و نارنگی پیوند شده روی پایهٔ نارنج دچار زوال شدند [۹]. همچنین، ویروس تریستزا ممکن است در تعدادی از ارقام جنس سیتروس صرف‌نظر از آنکه روی چه پایه‌ای باشند، موجب فرورفتگی ساقه یا ساقهٔ آبله‌ای[2] شود که افت شدید کیفیت و عملکرد میوه را به‌دنبال خواهد داشت [۹].

ویروس تریستزا کلسترووویروسی با ذرات رشته‌ای شکل و منعطف به ابعاد تقریبی (۱۱×۲۰۰۰) نانومتر است [۳، ۶، ۱۱]. این ذرات شامل RNA تک‌رشته‌ای سنس مثبت با تعداد تقریبی ۱۹۲۹۶ نوکلئوتید است [۱۵] که کپسید پروتئینی اولیهٔ آن ۲۵ کیلودالتون وزن دارد [۲۵]. ویروس تریستزا تعداد زیادی ایزوله دارد که در خصوصیات بیولوژیکی (علائم و شتهٔ ناقل)، سرولوژیکی [۲، ۸، ۲۰] و توالی ژن‌ها [۲۷] متفاوت‌اند.

در حال حاضر در ایران، این بیماری در بعضی از مناطق مرکبات‌کاری کشور شایع است. به‌منظور کنترل این ویروس و جلوگیری از انتشار آن به نقاط دیگر، روش‌هایی نظیر قرنطینه، استفاده از پیوندک‌های عاری از بیماری و پایه‌های متحمل به ویروس تریستزا به‌کار گرفته می‌شود. همچنین، برنامه‌های ریشه‌کنی و استفاده از راهبُرد حفاظت تقاطعی، برای ایزوله‌های ملایم در کنترل بیماری مؤثر است [۲۳].

آلودگی درختان مرکبات مادری و پیوندک‌های حاصل از آن‌ها به عوامل ویروسی و شبه‌ویروسی موجب کاهش عمر متوسط و حتی مرگ و زوال درختان، افت عملکرد، کاهش اندازه و تعداد میوه می‌شود و مشکلاتی را در زمینهٔ دریافت مواد غذایی و گرفتن پیوند ایجاد می‌کند. در نهایت، درخت را مستعد انواع تنش‌های محیطی می‌کند [۱۹].

گرمادرمانی یکی از روش‌های مدیریت بیماری‌های ویروسی در مرکبات شناخته شده و محققان مختلف به‌صورت موفقیت‌آمیزی به‌منظور حذف عوامل ویروسی و تشکیل کلون‌های سالم آن را به‌کار می‌برند [۷، ۱۱، ۲۱]. این روش را برای اولین بار به‌طور موفق گرنت [۱۴] در حذف ویروس تریستزا و پسوروز از پیوندک مرکبات به‌کار گرفت. این روش اگرچه در حذف بیماری‌هایی نظیر تریستزا و برخی بیماری‌های ویروسی دیگر کارآمد گزارش شده است [۲۱]، ولی به‌منظور حذف برخی دیگر از بیماری‌های شبه‌ویروسی نظیر اگزوکورتیس و زایلوپروز به‌تنهایی مؤثر نبوده است [۲۵].

هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی امکان تولید پیوندک‌های عاری از ویروس تریستزا از نهال‌های آلوده به ویروس به‌کمک گرمادرمانی در اتاقک با دمای کنترل شده (فیتوترون) است. این روش تاکنون با طیف وسیع تیمارهای دمایی انجام نشده است. همچنین، کاربرد این

1. *Citrus aurantium*
2. Stem pitting

روش در کنار سایر روش‌های تولید نهال سالم، نظیر کشت خامه، پیوند نوک شاخه و تلفیق گرمادرمانی با پیوند نوک شاخه، برای اولین بار در کشور انجام شد. نتایج آزمون‌های تکمیلی بخشی از پروژهٔ ملی است که در این مقاله نیامده و نتایج آن در مقالات دیگر خواهد آمد.

۲. مواد و روش‌ها

۲. ۱. مواد گیاهی

سی‌وشش اصله نهال پرتقال دوسالهٔ رقم 'تامسون ناول' پیوندشده روی پایهٔ نارنج به‌صورت دستی و از طریق پیوند آلوده شد. به‌منظور اطمینان از آلودگی آزمون الایزا انجام گرفت. سپس، به‌منظور تیمار گرمادرمانی به فیتوترون مؤسسهٔ تحقیقات مرکبات رامسر، ساخت شرکت مرصوص کام با دامنهٔ دمایی ۱۰ تا ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد و قابلیت کنترل نور، دما و رطوبت نسبی انتقال داده شد. گیاهان مربوط به هر تیمار دمایی، به‌طور جداگانه تحت شرایط گرم قرارگرفت. برای هر تیمار دوازده اصله نهال در نظر گرفته شد.

۲. ۲. مراحل گرمادرمانی

در این تحقیق، مراحل گرمادرمانی عبارت است از یک مرحله پیش‌تیمار (دمای ۳۵ و ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد (به‌ترتیب روز/ شب)، به‌مدت دو هفته) و سه مرحله تیمار هوای گرم ۴۰ و ۳۰؛ ۴۰، ۳۰، ۴۲ و ۳۲؛ و ۴۴ و ۳۴ سانتی‌گراد (روز/ شب)، به‌ترتیب طی سه بازه زمانی یازده هفته، دو هفته و ده روز. به‌منظور اطمینان از نتایج حاصل از مراحل فوق، گیاهان به‌مدت سه ماه در دمای ۲۲ و ۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد روز و شب (مناسب برای تکثیر ویروس) قرارگرفتند [۱۹].

بعد از به پایان رسیدن هر تیمار دمایی، گیاهان جهت بررسی وضعیت غلظت ویروس در مقایسه با دو نمونهٔ شاهد آلوده و سالم، مورد آزمون سرولوژیکی الایزا قرارگرفتند. در این آزمون از کیت الایزا ساخت شرکت بیوربا[1] با شمارهٔ کاتالوگ ۱۵۱۵۷۲ حاوی بافر استخراج و کنترل‌های مثبت و منفی استفاده شد. این آزمون بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده و به‌صورت روش مستقیم یا ساندویچ دوطرفهٔ آنتی‌بادی[2] انجام شد.

در آخرین مرحلهٔ الایزا، بر اساس دستورالعمل شرکت سازندهٔ کیت مشاهدهٔ نتیجهٔ آزمون به‌صورت چشمی یا با اندازه‌گیری میزان عددی جذب نوری هر یک از چاهک‌ها پس از سی، شصت و نود دقیقه در دو طول موج ۴۰۵ و ۴۹۲ نانومتر با دستگاه الایزاریدر مدل مدیسپک ای‌اس‌ار[3] انجام شد.

۲. ۳. آزمون سرولوژی- ایمونوپرینتینگ

در پایان مراحل گرمادرمانی، چهار جانب نهال‌های داخل فیتوترون نمونه‌های برگی گرفته و دمبرگ آن‌ها به‌کمک تیغ تیز برش عرضی داده شد و لکه‌گذاری روی کاغذهای نیتروسلولزی انجام شد. در جدول رسم شده در کاغذ نیترو سلولوژی، هر دو خانه متعلق به یک نهال و در هر خانه سه الی چهار لکه ایجاد شد. لایم بذری و آلوده به‌ترتیب شاهد منفی و مثبت استفاده شد. سپس، غشاهای نیتروسلولزی جهت تثبیت ویروس در معرض محلول ۱ درصد آلبومین بووین[4] قرارگرفت و بعد از سه بار شستشو، در غلظت مشخص آنتی‌بادی نشان‌دار غوطه‌ور و مجدداً شسته شد. بعد از مدت کوتاهی از اضافه کردن محلول سوبسترا، رنگ بنفش در لکه‌های مربوط به کنترل مثبت و نمونه‌های آلوده دیده شد، در حالی که کنترل منفی و نمونه‌های سالم بدون تغییر رنگ باقی ماند. دلیل انجام این آزمون مقایسهٔ نتایج

1. BIOREBA
2. Double Antibody Sandwich-ELISA (DAS-ELISA)
3. Medispec ESR 200 Elisa Plate Reader
4. Albumin Buvin

آن با نتایج آزمون الایزا بود. از آنجا که این روش نسبت به‌روش الایزا سریع‌تر و ارزان‌تر است، در صورتی که نتایج آن با روش الایزا منطبق باشد، توصیه می‌شود.

۴.۲. آزمون بیولوژی- آزمون گیاه محک

این آزمون بعد از گذشت سه ماه از تیمار آخر انجام گرفت و گیاه محک مورد استفاده مکزیکن لایم[1] و اجرای پیوند به‌صورت تی معکوس بود [۱۹].

۳. نتایج و بحث

براساس نتایج آزمون الایزا در جدول ۱، رژیم حرارتی ۴۲ و ۳۲ (روز/ شب) نسبت به دمای ۴۰ و ۳۰ روز/ شب و ۴۴ و ۳۴ روز/ شب دمای مناسب‌تری جهت گرمادرمانی است، زیرا در کنار حفظ سلامت ظاهری نهال‌ها، در تعداد بیشتری از گیاهان جمعیت ویروس کاهش یافت (۹۱ درصد)، ولی ویروس‌ها به‌طور کامل از بین نرفت و پس از چند ماه مجدداً میزان جمعیت آن‌ها افزایش یافت. در دمای ۴۴ و ۳۴ روز/ شب علاوه بر خشک شدن تعدادی از نمونه‌ها که ممکن است به‌علت تأثیر روی آنزیم‌ها باشد، با افزایش جمعیت ویروس نیز روبه‌رو شدیم (تنها در ۶۲/۵ درصد از نمونه‌ها جمعیت ویروس کاهش یافت).

همچنین، بعد از گذشت سه ماه و قرارگیری نهال‌ها در دمای ۲۲ و ۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد (دمای مناسب جهت تکثیر ویروس)، تنها در ۲۵ درصد از گیاهان باقیمانده، با آزمون الایزا، ایمونوپرینتینگ و آزمون گیاه محک آلودگی مشاهده نشد. در این پژوهش، به‌منظور بالابردن مقاومت گیاهان به دماهای بالاتر، تمام نهال‌ها به‌مدت دو هفته در دمای ۳۵ و ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد (روز/ شب) قرارگرفتند. در تحقیقاتی که به‌منظور حذف ویروس تریستزا در مرکبات از گرمادرمانی استفاده کردند، وجود پیش‌تیمار دمای ۳۵ و ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد به‌ترتیب روز/ شب، به‌مدت دو هفته قبل از اعمال تیمارهای گرمایی ضروری نشان داده شد [۱، ۲۱]. همچنین، در این تحقیق دمای ۴۲ و ۳۲ درجهٔ سانتی‌گراد (روز/ شب) جهت غیرفعال کردن ویروس تریستزا مناسب تشخیص داده شد. این در حالی است که در آزمایش‌های آریف دمای نهایی ۵۰ و ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد (روز/ شب) به‌مدت یک هفته به‌دنبال انجام پیش‌تیمار دمایی صد در صد سالم‌سازی را گزارش کرده است [۱].

دمای ۴۰ و ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد (روز/ شب) به‌مدت هشت هفته [۷]، دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت هفده هفته [۱۲] و دمای ۳۸ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۲۵ هفته [۲۶] به‌میزان صفر تا ۵۰ درصد در غیرفعال کردن این ویروس کارآمد گزارش شده است. آزمایش‌ها روی ویروس‌ها و گیاهان میزبان نشان می‌دهد هنگامی که گیاهان تحت دمای بالا قرارمی‌گیرند (گرمادرمانی)، جمعیت ویروس کاهش می‌یابد [۱۶، ۲۰]

فرضیه‌های مختلفی برای این پدیده ذکر می‌شود. یکی از این فرضیه‌ها ایجاد رقابت بین سرعت تقسیم سلول‌های میزبان و اجزای ویروس به نفع سلول‌های میزبان است که موجب به‌هم خوردن تعادل بین سنتز و تجزیهٔ اجزای ویروس می‌شود و غلظت ویروس را کاهش می‌دهد [۲۳]. فرضیهٔ دیگر آن است که تحت دمای بالا به‌طور موقت پیوند بین اجزای پروتئینی که از اسید نوکلئیک ویروس محافظت به عمل می‌آورد، سست و زمینه برای فعالیت آنزیم نوکلئاز در جهت غیرفعال کردن ویروس و کاهش غلظت آن فراهم می‌شود [۹]. در نظریهٔ دیگری موسوم به نظریهٔ «پروتئین‌های شوک گرمایی»[2] دمای بالاتر از ۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد برای سنتز غالب پروتئین‌های موجود

1. *C. aurantifolia* L.

2. Heat shoking

گیاهی بازدارنده است و سنتز یک سری از پروتئین‌های جدید آغاز می‌شود. این پروتئین‌های جدید موجب کاهش غلظت آرانای ویروس می‌شوند [۱] به‌دلیل وجود گزارش‌های متفاوت و گاه متناقض، در این تحقیق سعی کردیم ترکیبی از گزارش‌های محققان دیگر را اعمال کنیم تا به ترکیب دمایی مناسب‌تر برسیم. علت این تفاوت در نتایج به‌دست آمده به‌دلیل بررسی ارقام مختلف از گونهٔ پرتقال یا پایه‌های به‌کار رفته است، زیرا تحمل ارقام و پایه‌های مختلف متفاوت است.

در نهایت، از آنجا که گرمادرمانی زمینهٔ مناسبی را جهت کاهش غلظت ویروس فراهم می‌کند (حتی اگر به‌طور کامل منجر به حذف ویروس نشود)، می‌توان از آن در کنار پیوند نوک شاخساره (STG) و بالا بردن ضریب اطمینان از حذف ویروس استفاده کرد. همچنین، از آنجا که در میان روش‌های تشخیص ویروس، فنون مولکولی از محدودهٔ ردیابی بسیار دقیق‌تری نسبت به فنون سرولوژیکی برخوردار است (۱۰ تا ۱۰۰ برابر دقیق‌تر) [۵ و ۱۷]، توصیه می‌شود در بررسی نتایج آزمون‌های گرمادرمانی و سایر روش‌های سالم‌سازی، از روش‌های تشخیص مولکولی استفاده شود.

جدول ۱. بررسی ویروس تریستزا در پرتقال رقم ‘تامسون ناول’ با آزمون‌های الایزا و ایمینیوپرینتینگ بعد از تیمارهای گرمادرمانی

نمونه‌ها	تیمارها (°C)			
	۳۰ / ۴۰ ۱۱ هفته	۳۲ / ۴۲ ۲ هفته	۳۴ / ۴۴ ۱۰ روز	۲۰ / ۲۲ ۳ ماه
۱	+	-	خشکیدن نهال	*
۲	-	-	-	+
۳	-	-	خشکیدن نهال	*
۴	+	+	خشکیدن نهال	*
۵	-	-	+	+
۶	-	-	خشکیدن نهال	*
۷	+	-	+	+
۸	-	-	+	+
۹	+	-	-	+
۱۰	-	-	-	+
۱۱	-	-	-	-
۱۲	-	-	-	-

+ : نمونهٔ آلوده‌شده با ویروس تریستزا — : نمونهٔ بدون آلودگی

الف

ب

ج

شکل ۱. علائم مشاهده‌شده در نمونهٔ مبتلا به ویروس تریستزا

الف) رگبرگ روشنی، ب) برگ قاشقی یا فنجانی شکل شدن برگ‌ها و ج) برگ گیاه سالم پس از تیمار گرمایی

۴.نتیجه‌گیری

گرمادرمانی یکی از روش‌های سالم‌سازی نهال‌های مرکبات است که بسته به نوع گونهٔ گیاهی و ویروس آلوده‌کننده، به تنهایی یا در کنار پیوند نوک شاخساره (STG) منجر به تولید نهال سالم می‌شود. تفاوت در نتایج پژوهش‌ها و نتایج این تحقیق بیانگر ضرورت انتخاب ارقام و پایه‌های متحمل به گرماست. کم بودن درصد نمونه‌های سالم‌سازی‌شده بیانگر تفاوت در غلظت اولیهٔ ویروس یا عدم کارایی این روش در حذف ویروس به تنهایی است و ضرورت استفاده از ترکیب روش گرمادرمانی و پیوند نوک شاخه را نشان می‌دهد.

منابع

1. Arif M, Ibrahim M, Ahmad A and Hassan SH (2005) Elimination of citrus tristeza closterovirus from citrus bud-wood through thermotherapy. Pakistan Journal of Botany. 37(2): 423-430.
2. Ballester-Olmos JF, Pina JA, Carbonell E, Moreno P, Hermoso de Mendoza A, Cambra M and Navarro L (1993) Biological diversity of citrus tristeza virus (CTV) isolates in Spain. Plant Pathology. 42: 219-229.
3. Bar-Joseph M, Garnsey SM, Gonsalves D, Moscovitz M, Purcifull DE, Clark MF and Loebenstein G (1979) The use of enzyme-linked immuno sorbent assay for detection of citrus tristeza virus. Phytopathology. 69: 190-194.
4. Bar-Joseph M, Marcus R and Lee RF (1989) The continuous challenge of citrus tristeza virus control. Annual Review of Phytopathology. 27: 291-316.
5. Bar-Joseph M and Garnsey SM (1981) Enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA): principles and applications for diagnosis of plant virus. *In*: K. Mara-moroschand K.F. Harris. Plant Discases and Vectors. Ecology and Epidemiology. Academic Press, New York. Pp. 35-59.
6. Bar-Joseph M and Lee RF (1989) Citrus Tristeza Virus. Description of Plant Viruses. AAB,Wellesbourne (GB). No. 353. Pp 123.
7. Calavan EC, Roistacher CN and Nauer EM (1972) Thermotherapy of citrus for inactivation of certain viruses. Plant Disease Report. 56: 976-978.
8. Cambra M, Camarasa E, Gorris MT, Garnsey SM, Gumpf DJ and Tsai MC (1993) Epitope diversity of citrus triteza virus (CTV) isolates in Spain. In: Proc. Conf. Int. Organ. Citrus Virology. 12th (Eds): P Moreno, JV Graca and LW Timmer. IOCV, Riverside, California. Pp. 33-38.

9. Cambra M, Gorris MT, Marroquin C, Roman MP, Olmos A, Martinez MC, Hermoso de Mendoza A, Lopez A and Navarro L (2000a) Incidence and epidemiology of citrus tristeza virus in the valencian community of Spain. Virus Research. 71: 85-95.

10. Desjardins PR, Wallace JM, Lange CT and Drake RJ (1957) The suppression of tristeza virus symptoms in Mexican lime seedlings by heat treatment. Plant Disease. Report. 41: 230-31.

11. Gonsalves D, Purcifull DE and Garnsey SM (1978) Purification and Serology of citrus tristeza virus. Phytopathology. 68: 553-559.

12. Grant TJ, Jones JW and Norman GG (1960) Present status of heat treatment of citrus viruses. Proceedings of the Florida State Horticultural Society. 72: 45-48.

13. Grant TJ (1967) Effect of heat treatments on tristeza and psorosis viruses in citrus. Plant Disease Report. 41: 232-234.

14. Karasev AV, Boyko VP, Gowda S, Nikolaeva, OV, Hilf ME, Koonin EV, Niblett CL, Cline K, Gump DJ, Lee RF, Garnsey SM and Dawson WO (1995) Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome. Virology 208: 511-520.

15. Kassanis B (1957) The use of tissue culture to produce virus-free clones from infected potato varieties. Annals of Applied Biology. 45: 422-427.

16. Lee RF and Bar-Joseph M (2000) Tristeza. *In*: Compendium of Citrus Diseases, 2nd edn (Ed.Timmer LW, Garnsey SM and Graham JH), APS Press, St Paul (US). Pp 61-63.

17. Matthews REF (1993) Diagnosis of plant virus diseases. CRC Press, Boca Raton, Florida. Pp 374.

18. Quak F (1977) Meristem culture and virus-free plants. *In*: J. Reinert and Y.P.S. Bajaj (eds). Applied and fundamental aspects of plant cells, tissue, and organ culture. Springer, Berlin. Pp. 598-615.

19. Roistacher CN (1977) Elimination of citrus pathogens in propagative bud-wood. 1. Budwood selection, indexing and thermotherapy. Proceedings of the International Society of Citriculture. 3: 965-972.

20. 20. Roistacher CN and Bar-Joseph M (1984) Transmission of tristeza seedling yellow tristeza virus by *Aphis gossypii* from sweet orange, grapefruit, and lemon to Mexican lime, grape fruit, and lemon. In: S.M. Garnsey and L. W. Timmer (Eds.), IOCV, Riverside, CA. Pp. 9-18.

21. 21. Roistacher CN and Calavan EC (1974a). Heat tolerance of preconditioned citrus bud-wood for virus inactivation. In: Proceedings of 5th Conference of International Organization of Citrus Virology. W.C. Price. (Ed.) University of Florida Press, Gainesville. Pp. 256-261.

22. Roistacher CN and Calavan EC (1974b) Inactivation of five citrus viruses in plants held at warm glass house temperatures. Plant Disease Report. 58: 850-853.

23. Roistacher CN and Moreno P (1991) The worldwide threat from destructive isolates of citrus triteza virus-A review. In: Proceedings of the 11th Conference of IOCV. RH Bransky, RH Lee and LW Timmer (Eds.), Reverside, CA. pp. 7-19.

24. Sekiya ME, Lawrence SD, McCaffery M and Cline K (1991) Molecular cloning and nucleotide sequencing of coat protein gene of tristeza virus. General Virology. 72: 1013-1020.

25. Skaria M, Roistacher CN and Dagraca JV (1996) A virus-free citrus bud wood program for

Texas. Proceeding of International Society of Citriculture. Pp. 366-368.

26. Stubbs LL (1963) A phytotron cabinet for heat-therapy studies with virus-infected plants. Common wealth Phytopathology News. 9(4): 49-52.

27. Vives MC, Rubio L, Lopez C, Navas-Castillo J, Albiach-Marti MR, Dawson WO, Guerri J, Flores R and Moreno P (1999) The complete genome sequence of the major component of a mild citrus tristeza virus isolate. General Virology. 80: 811-816.