

بررسی پراکنش ویروس رگبرگ زردی نکروتیک چغندرقد و ناقل آن در منطقه
مرودشت با استفاده از روش‌های سرولوژیک و PCR
Determining the distribution of *Beet necrotic yellow vein virus* and its
vector in Marvdasht area by serological and PCR methods

سید محمد رضا موسوی*

تاریخ دریافت: ۸۶/۱/۲۹؛ تاریخ پذیرش: ۸۶/۱۰/۱۲

س. م. ر. موسوی. ۱۳۸۶. بررسی پراکنش ویروس رگبرگ زردی نکروتیک چغندرقد و ناقل آن در منطقه مرودشت با استفاده از روش‌های سرولوژیک و PCR. چغندرقد ۲۳(۲): ۱۷۵-۱۶۳

چکیده

به منظور بررسی گسترش آلودگی ویروس رگبرگ زردی نکروتیک چغندرقد و ناقل آن *Polymyxa betae* Keskin در منطقه مرودشت در استان فارس، تعداد ۳۵۳ نمونه تصادفی و ۱۲۴ نمونه از گیاهان دارای علائم رایزومانیا در تابستان سال ۱۳۸۳ جمع‌آوری گردید. به وسیله آزمون‌های سرولوژیکی ساندویچ سه طرفه الیزا و با استفاده از پادتن تک‌سویه ویروس، وجود ویروس به ترتیب در ۴۸/۲ درصد و ۸۱ درصد از نمونه‌های تصادفی و علائم‌دار ردیابی و مشاهده شد. عصاره ریشه‌های موئین نمونه‌های آلوده به صورت مکانیکی روی گیاهان محک مایه‌زنی شد و به ترتیب در *Chenopodium quinoa* منجر به لکه‌های کلروتیک و نهایتاً نکروتیک شد و در *C. amaranticolor* تولید لکه‌های نکروتیک موضعی کرد. آزمون زنجیره‌ای پلی‌مراز نیز در مورد گیاهان آلوده توسط آغازگرهای اختصاصی RNA1 تا RNA4 انجام شد و به صورت ملکولی وجود ویروس را تأیید کرد. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *P. betae* وجود قارچ ناقل در ۹۴ درصد از نمونه‌های جمع‌آوری شده ثابت گردید. در نهایت بخشی از RNA 4 این ویروس نیز تعیین توالی شد و با سایر توالی‌های ثبت شده در بانک ژن مقایسه گردید که به ترتیب ۹۹/۳ و ۹۹/۶ درصد با جدایه‌های گزارش شده از ژاپن و ایتالیا مشابهت داشت.

واژه‌های کلیدی: آزمون زنجیره‌ای پلی‌مراز، تعیین توالی، ساندویچ سه طرفه الیزا، ویروس رگبرگ زردی نکروتیک چغندرقد،

Polymyxa betae

مقدمه

بیماری رایزومانیا برای اولین بار از ایتالیا گزارش گردید (Canova 1959) و هم‌اکنون در اکثر مناطق چغندرکاری دنیا وجود دارد (Tamada 1999). این بیماری مهم‌ترین بیماری ویروسی شناخته‌شده در چغندرقد است و همه ساله خسارت زیادی را از طریق کاهش وزن ریشه و درصد قند وارد می‌نماید (Anonymous 2004). کاهش وزن ریشه در حدود پنجاه تا هفتاد درصد و کاهش درصد قند بین دو تا بیش از چهاردرصد ذکر گردیده است (Rush and Heidel 1995). عامل بیماری، ویروس رگبرگ زردی نکروتیک چغندر (BNYVV) از جنس *Benyvirus* است (Richard and Tamada 1992) که توسط قارچ خاکزی *Polymyxa beta* Keskin و به صورت پایا منتقل می‌گردد. این ویروس می‌تواند درون خاک و بدون حضور میزبان برای بیش از ده سال در اسپوره‌های استراحتی قارچ دوام آورد (Al Musa and Mink 1981). پیکره‌های ویروسی میله‌ای محکم با ژنوم چند قسمتی است که از چهار یا پنج RNA تک رشته‌ای تشکیل شده است و حاوی ۵ درصد اسیدنوکلئیک و ۹۵ درصد پروتئین می‌باشد. اندازه کل ژنوم ۱۳/۵ kb است (Richards 1991; Tamada 2002; Koeing 1996). در مزارع چغندر آلوده علائم آلودگی عمدتاً به صورت زردی است که به صورت لکه‌های دایره‌ای شکل در مزرعه به خصوص در قسمت‌های گود که پس از

بارندگی در آن‌ها آب باقی می‌ماند، دیده می‌شود. در طی توسعه بیماری در طی فصل تابستان حاشیه این لکه‌های دایره‌ای گسترش پیدا کرده و قسمت‌های آلوده در مزرعه به خوبی قابل مشاهده هستند. علائم رگبرگ روشنی (vein clearing)، زردی و نکروز بر روی برگ‌های آلوده در همان اوایل فصل ایجاد می‌گردد و شدت آن براساس حساسیت کولتیوارها، مرحله توسعه برگی و فاکتورهای محیطی (دما، نور و.....) متفاوت است. با توسعه علائم، برگ‌ها زرد شده و به خوبی در مزرعه قابل تشخیص می‌باشند. از دیگر علائم مشخصه این بیماری بلند شدن طول دمبرگ و باریک شدن پهنک برگ می‌باشد. برگ‌های با پهنک باریک شده، در مرکز گیاه به صورت مستقیم قرار می‌گیرند و بنابراین به خوبی قابل تشخیص هستند. تحت شرایط آلودگی شدید پژمردگی برگ‌ها نیز مشاهده می‌گردد. علائم مورفولوژیک این بیماری به خوبی در ریشه‌ها بصورت بدشکلی مشخص می‌گردد که می‌توان آن را به صورت مؤین شدن، کوتولگی ریشه‌ها یا باریک شدن ریشه‌ها در نظر گرفت. به همین دلیل این بیماری را رایزومانیا می‌نامند. در برش طولی در محل تجمع ریشه‌های مؤین، تومورهای کوچکی دیده می‌شود که نتیجه تقسیم بیش از حد سلولی (هیپرپلازی) سلول‌ها می‌باشد. هم‌چنین در برش عرضی و طولی چغندر قندهای آلوده تیره شدن آوندها دیده می‌شود که در نتیجه نکروز سلول‌های آوندی رخ می‌دهد

آن به وسیله آزمایش‌های دامنه میزبانی، سرولوژیکی و ملکولی و نیز تعیین توالی بخشی از RNA4 این ویروس است.

مواد و روش‌ها

جهت نمونه برداری

۱۶ مزرعه واقع در نه منطقه متفاوت شهرستان مرودشت تعیین و تعداد ۳۵۳ نمونه تصادفی و ۱۲۴ نمونه دارای علائم ظاهری برداشته شد. کل گیاه توسط بیل از خاک خارج گردید و هر نمونه به صورت جداگانه در پاکت پلاستیکی قرار گرفت و به آزمایشگاه منتقل شد. تا زمان انجام آزمایش نمونه‌ها در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تشخیص آلودگی به روش ساندویچ سه طرفه الیزا (Triple Antibody Sandwich، TAS-ELISA) (Enzyme Linked Immunosorbent Assay):

تشخیص آلودگی نمونه‌ها به روش ساندویچ سه طرفه الیزا مطابق روش Henry et al. (1992) انجام گرفت و از پادتن تک سویه ویروس BNYVV (خریداری شده از شرکت Adgen diagnostic انگلستان) براساس دستورالعمل کارخانه سازنده استفاده شد. جهت تشخیص آلودگی از عصاره ریشه‌های مؤیین به همراه کنترل مثبت و منفی (دو چاهک برای هر نمونه) استفاده شد. نمونه‌هایی که میزان جذب آن‌ها مساوی یا بیشتر از سه برابر نمونه منفی بود، آلوده در نظر گرفته شدند.

(Rush and Heidel 1995; Sutic et al. 1999; Wisler et al. 1994; Koeing et al. 1995).

اولین بار در ایران ایزدپناه و همکاران (۱۳۷۵) بیماری رایزومانیا را از استان فارس گزارش نمودند. همچنین این بیماری در کهگیلویه و بویراحمد (توده‌فلاح و همکاران ۱۳۷۹؛ دارابی و همکاران ۱۳۷۷؛ سهندپور و ایزدپناه ۱۳۷۷)؛ همدان (سهندپور و ایزدپناه ۱۳۷۷)، اصفهان (احمدی و جلالی ۱۳۷۷؛ توده‌فلاح و همکاران ۱۳۷۹؛ دارابی و همکاران ۱۳۷۷)، قزوین (توده‌فلاح و همکاران ۱۳۷۹؛ سهندپور و ایزدپناه، ۱۳۷۷)، خراسان (توده‌فلاح و همکاران ۱۳۷۹؛ جعفرپور و همکاران ۱۳۷۹)، سمنان (توده‌فلاح و همکاران ۱۳۷۹؛ شهرآیین و همکاران ۱۳۷۹)، اردبیل (توده‌فلاح و همکاران ۱۳۷۹)، لرستان (توده‌فلاح و همکاران ۱۳۷۹؛ سهندپور و ایزدپناه ۱۳۷۷) و کرمانشاه (سهندپور و ایزدپناه ۱۳۷۷) مشاهده و گزارش شده است.

چغندرقد یکی از مهم‌ترین محصولات صنعتی کشور بوده که نقش مهمی در تأمین فرآورده‌های غذایی انسانی و دامی بازی می‌کند. شهرستان مرودشت با سطح زیرکشت ۳۰۰۰ هکتار و تولید سالانه ۸۰۴۸۸ تن از مناطق مهم چغندرکاری کشور است (مرکز آمار ایران ۱۳۸۲). این ویروس از بیشتر استان‌های چغندرخیز ایران گزارش گردیده است و تحقیق درخصوص درصد آلودگی و پراکنش بیماری بسیار لازم به نظر می‌رسد. هدف این تحقیق بررسی انتشار و شیوع نسبی این ویروس و ناقل

مطالعه دامنه میزبانی

ریشه‌های مؤیین نمونه‌هایی که آلودگی آن‌ها در آزمون الیزا ثابت شده بود در بافر نیم مولار فسفات سدیم حاوی ۲- مرکاپتواتانول یک درصد با pH=7 خرد گردیدند. عصاره ریشه هر نمونه حداقل روی سه گیاه *Chenopodium amaranticolor* و *C. quinoa* که حداقل شش برگ کاملاً توسعه یافته داشتند مایه‌زنی گردید. سپس این گیاهان به مدت شش تا ۱۰

روز در دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و مرتباً از لحاظ ظهور علائم مورد بررسی قرار گرفتند.

آغازگرهای اولیگونوکلئوتیدی:

برای ردیابی ملکولی ویروس از چهار جفت آغازگر ساخته شده توسط شرکت MWG-Biotech (آلمان) استفاده گردید. این آغازگرها مخصوص RNA1 تا RNA4 بوده و توالی آن‌ها به این شرح می‌باشد (Koenig et al. 1995):

قطعه ژنوم	آغازگر	اندازه قطعه تکثیر شده (جفت باز)
RNA1	V1: 5'-GCATTTTGTGAATACCAGG-3'	500
	C1: 5'-GTACCACATAATCAAG AACC-3'	
RNA2	V2: 5'-GTGAACTAT AATTTCCGAT-3'	430
	C2: 5'-ACTCCACGTGAATTAATAATC-3'	
RNA3	V3: 5'-GTTGTTGTGTTTTCTGATCA-3'	860
	C3: 5'-ACCGTGAAATCACG TGTAGT-3'	
RNA4	V4: 5'-GGTGCT TTCTTAATGCCCCG-3'	600
	C4: 5'-AACGA GCCCGTTAATACAAT-3'	

برای ردیابی قارچ ناقل ویروس (*P. betae*) توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در عصاره ریشه‌های مؤیین از جفت آغازگرهای 5'- CAAACGCCTGAAATCATCTAAC-3' و 5'- GATGGCCCAATTCCTTACAC-3' استفاده شد (Meunier et al. 2003).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز براساس رونوشت‌برداری معکوس (RT-PCR)
در مرحله اول RNA ویروس براساس روش Hughes and Galau (1998) از ریشه‌های مؤیین استخراج شده و سپس آزمون دو مرحله‌ای RT-PCR مطابق روش Koenig et al. (1995) انجام شد. قطعات تکثیر شده با الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و بافر

توالی این قطعه از دو طرف (comfort read sequencing) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی توسط (Germany) MWG Biotech. Co. تعیین گردید (تعیین توالی سه بار و مستقل از یکدیگر انجام شد). توالی به دست آمده، در (NCBI) GenBank مورد جستجو قرار گرفت. همچنین این توالی با ناحیه‌ی مشابه سایر توالی‌های موجود در GenBank به کمک نرم‌افزار (MegAlign 5.00, DNASTAR) CLUSTAL W (Inc.) و نیز با برنامه‌ی (NCBI) BLAST مقایسه گردید.

نتایج و بحث

ساندویچ سه طرفه الیزا (TAS-ELISA)

آزمایشات سرولوژیکی نشان داد که از مجموع ۳۵۳ نمونه تصادفی تعداد ۱۷۰ نمونه (۴۸/۲٪) و از ۱۲۴ نمونه علائم‌دار تعداد ۱۰۰ نمونه (۸۱/۰٪) به ویروس BNYVV آلوده بودند. این داده‌ها نشان می‌دهد که این ویروس در استان فارس مسئول بخش زیادی از بیماری‌های ویروسی است. نمونه‌هایی که در آزمون الیزا آلوده به ویروس تشخیص داده شدند در مزرعه نیز علائم عمده گیاه بیمار را نشان دادند.

میزبان محک

تریس- بورات EDTA یک برابر از یکدیگر جدا شده و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید بررسی گردیدند.

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

استخراج DNA قارچ از ریشه گیاه براساس روش موتاسا و همکاران انجام شد (Mutasa et al. 1993). برای ردیابی قارچ ناقل ویروس (*P. betae*) (1995). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۵۰ میکرولیتر با اجزا ۱۸ pmol آغازگر، ۱۰ μl کلرید منیزیم (۲۵mM)، ۵ μl بافر ۱۰X پلی‌مراز *Taq*، ۱/۵ μl dNTPs (هرکدام ۱۰mM)، ۰/۵ μl پلی‌مراز *Taq* (۵ U/μl) و ۴ μl از DNA الگو انجام شد. چرخه‌های حرارتی شامل سه دقیقه واسرشتی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی به مدت سی ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر در دمای ۶۳ درجه سانتی‌گراد به مدت سی ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و نهایتاً بسط نهایی به مدت هفت دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود.

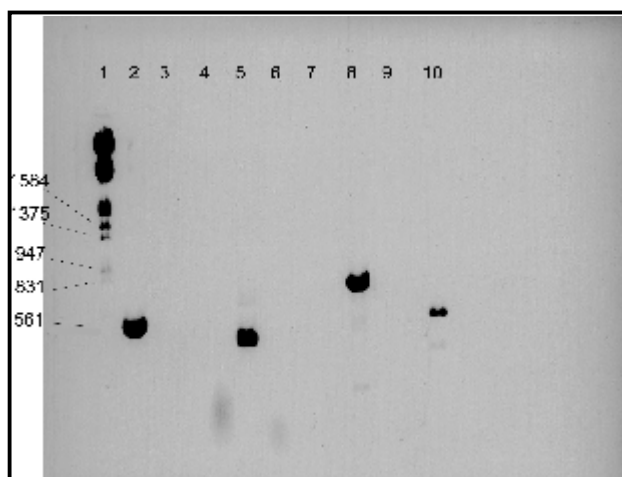
تعیین توالی

قطعه‌ی تکثیرشده به طول ۶۰۰ جفت باز مربوط به ناحیه‌ای از RNA-4 ویروس BNYVV با استفاده از کیت MN (Germany) به روش توصیه‌شده توسط شرکت سازنده، از مخلوط واکنش PCR جداسازی گردید.

ریشه توسط واکنش زنجیری پلی‌مراز 10^{-6} می‌باشد اما باید احتیاط‌های لازم را در خصوص آلودگی و پاسخ‌های مثبت اشتباه در نظر گرفت (Henry et al. 1995). شکل ۱ الگوی نواری محصول RT-PCR نمونه‌های آلوده و سالم را در ژل آگارز نشان می‌دهد. نمونه‌هایی که در آزمون الیزا آلوده تشخیص داده شده بودند، در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نیز به ترتیب قطعات موردنظر با اندازه‌های ۵۰۰، ۴۳۰، ۸۶۰ و ۶۰۰ جفت باز برای RNAهای شماره یک تا چهار تکثیر شد. این نتایج با نتایج قبلی همخوانی کامل دارد (Koenig et al. 1995). در کنترل‌های منفی هیچگونه تکثیری صورت نگرفت.

مایه‌زنی مکانیکی گیاه *Chenopodium amaranticolor* باعث به‌وجود آمدن لکه‌های نکروتیک موضعی مشابه موارد ذکر شده در منابع گردید و به‌صورت بیولوژیکی نیز حضور ویروس BNYVV تأیید شد. آلودگی مکانیکی *C. quinoa* نیز باعث به‌وجود آمدن لکه‌های کلروتیک و به دنبال آن لکه‌های نکروتیک گردید. این علائم نیز بر وجود BNYVV تأکید کرد (Richards 1991).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز براساس رونوشت‌برداری معکوس (RT-PCR): واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تقریباً ۸۰۰ برابر از TAS-ELISA حساس‌تر است. حد نهائی رقت قابل ردیابی ویروس در عصاره



شکل ۱ الگوی نواری محصول RT-PCR نمونه‌های آلوده به ویروس و نمونه‌های سالم. ردیف ۱: نشانگر وزن مولکولی Fermentas (Lithuania)، ردیف ۲: RNA 1 (500bp)، ردیف ۳: RNA 2 (430 bp)، ردیف ۴: RNA 3 (859 bp)، ردیف ۵: RNA 4 (602 bp)، ردیف‌های ۳، ۴، ۶، ۷ و ۹ مربوط به ریشه گیاه سالم هستند.

تجزیه‌های ملکولی نیز علاوه بر داده‌های قبلی وجود ویروس در منطقه مرودشت را تأیید کردند. این گزارش با استناد به داده‌های بیولوژیکی، سرولوژیکی و ملکولی پراکنش گسترده ویروس BNYVV را در منطقه مرودشت نشان می‌دهد. لیست روستاهای نمونه‌برداری شده و آلوده به شرح ذیل می‌باشد (جدول‌های ۱ و ۲):

جدول ۱ درصد آلودگی نمونه‌های تصادفی جمع‌آوری شده در منطقه مرودشت

ردیف	نام روستا	تعدادمزرعه	تعداد نمونه تصادفی	تعداد نمونه آلوده	درصد آلودگی
۱	فتح آباد	۸	۴۸	۳۱	۶۴/۶
۲	عمادآباد	۱۲	۶۴	۳۸	۵۹/۴
۳	شول	۷	۳۳	۱۱	۴۷/۸
۴	سارویی	۸	۳۷	۱۷	۴۵/۹
۵	شمس آباد	۱۱	۶۶	۳۶	۵۴/۵
۶	سیدان	۹	۳۹	۱۲	۳۰/۸
۷	کناره	۶	۳۳	۱۲	۵۲/۱
۸	مقصود آباد	۵	۱۹	۶	۳۱/۶
۹	قاسم آباد	۷	۳۴	۷	۲۰/۶
جمع کل		۷۳	۳۵۳	۱۷۰	۴۸/۲ میانگین

جدول ۲ درصد آلودگی نمونه‌های با علائم ظاهری جمع‌آوری شده در منطقه مرودشت

ردیف	نام روستا	تعدادمزرعه	تعداد نمونه مشکوک و دارای علائم	تعداد نمونه آلوده	درصد آلودگی
۱	فتح آباد	۸	۱۲	۱۰	۸۳/۳
۲	عمادآباد	۱۲	۱۹	۱۷	۸۹/۵
۳	شول	۷	۹	۶	۶۶/۷
۴	سارویی	۸	۱۴	۱۲	۸۵/۷
۵	شمس آباد	۱۱	۲۱	۱۹	۹۰/۵
۶	سیدان	۹	۱۶	۱۲	۷۵/۰
۷	کناره	۶	۱۰	۸	۸۰/۰
۸	مقصود آباد	۵	۸	۵	۶۲/۵
۹	قاسم آباد	۷	۱۵	۱۱	۷۳/۳
جمع کل		۷۳	۱۲۴	۱۰۰	۸۱/۰ میانگین

طول موردنظر را تکثیر کرد. نتایج به دست آمده وجود گسترده قارچ *P. betae* در شهرستان مرودشت را نشان می‌دهد. این قارچ ناقل ویروس در ۹۴ درصد از مزارع نمونه‌برداری شده (شامل مزارع سالم و آلوده به رایزومانیا) وجود داشت که نشان دهنده پتانسیل بالای گسترش این بیماری در کلیه مزارع چغندر قند منطقه می‌باشد. هر چند احتمال تفاوت در انتقال ویروس BNYVV بین جمعیت‌های مختلف این قارچ بعید نمی‌باشد، بررسی‌های بیشتری جهت تأیید این موضوع لازم است. نکته قابل توجه دیگر نقش احتمالی قارچ فاقد ویروس در کاهش محصول چغندر قند می‌باشد (Wisler et al. 2003). جدول ۳ نام روستاها و درصد آلودگی آن‌ها را نشان می‌دهد.

در برخی نمونه‌های با علائم رایزومانیا ویروس BNYVV ردیابی نگردید. این موضوع ممکن است به این دلیل باشد که این علائم می‌تواند توسط تعدادی از قارچ‌های خاکزی، فشردگی خاک مزرعه (Rush and Heidel 1995)، یا سایر ویروس‌های چغندر قند از قبیل ویروس پیچیدگی بوته چغندر قند (*Beet curly top virus-BCTV*) و ویروس زردی چغندر قند (*Beet yellows virus-BYV*) باشد (Whitney and Duffus 1998).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR): واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی روی DNA استخراج شده از عصاره ریشه‌های موئین، در تعدادی از نمونه‌ها قطعه‌ای با

جدول ۳ نام روستاها و درصد آلودگی آن‌ها به قارچ *P. betae* در منطقه مرودشت

ردیف	نام روستا	تعداد مزرعه	تعداد نمونه تصادفی و دارای علائم	تعداد نمونه آلوده	درصد آلودگی
۱	فتح آباد	۸	۶۰	۵۸	۹۶/۷
۲	عمادآباد	۱۲	۸۳	۸۰	۹۶/۴
۳	شول	۷	۳۲	۳۱	۹۶/۹
۴	سارویی	۸	۵۱	۴۷	۹۲/۲
۵	شمس آباد	۱۱	۸۷	۸۶	۹۸/۹
۶	سیدان	۹	۵۵	۴۹	۸۹/۱
۷	کناره	۶	۳۳	۳۲	۹۷/۰
۸	مقصود آباد	۵	۲۷	۲۴	۸۸/۹
۹	قاسم آباد	۷	۴۹	۴۱	۸۳/۷
جمع کل		۷۳	۴۷۷	۴۴۸	۹۴/۰ میانگین

بانک ژن (DQ163905) و با توالی‌های مشابه موجود در بانک ژن مورد مقایسه قرار گرفت. توالی به دست آمده به شرح ذیل می‌باشد:

تعیین توالی RNA4: قطعه‌ای از RNA شماره ۴ ویروس رگبرگ زرد نکروتیک چغندرقد به طول ۵۶۰ جفت باز پس از تکثیر به روش RT-PCR تعیین توالی گردیده و در بانک ژن به ثبت رسید (کد دسترسی در

```

BASE COUNT      142 a      76 c      123 g      219 t
ORIGIN
1  tgttatagtg gtggtgatgt tctgtctgat gagctatgtg aagctaatat tgttcatact
61  tcggtttcgt ctggtgcatg gttcaatagg tcgtacaaac ctgaagacgt ctggatgcta
121 ttacttacgt ctagtacttg ttatggttat catgatggtg ttggtgaaat agaccaatgt
181 acattacctt ctaatataga tgggtgtggt cattgttctg gcgtttgcta tttcaatgat
241 aatcattgta tttgtggtcg tcgtgatagt aatccatcca atccgccttg ttttcaattt
301 attaaagatt gtaatgagtt gtatggaaca aatgaaacta aacaattcat ttgtgacctt
361 gttggtgatg ataacttggg cagtgttaac actctaacia aagaagggtg gcgaaggttt
421 tgtgatgttc tttggaatac cacttatggt gatgttgagt ctcgactttt tgcacgcttt
481 ctgtggtttg tcttttatca cgattagtgg tatttatgat gtgttttagtt attcgagatc
541 caagaataat aatatgtata

```

Translation:

```

"CYSGVDVLSDELCEANIVHTSVSSVAMFNRSYKPEDVWMLLLTSSTCYGYHDDVVEIDQCTLPS
NIDGCVHCSGVCYFNDNHCI CGRRDSNPSNPPCFQFIKDCNELYGTNETKQFICDLVGDNDLDSV
NTLTKEGWRRFCDVLWNTTYGDVESRTFARFLWFVYHD"

```

بررسی و مقایسه توالی‌ها نشان می‌دهد که تفاوت‌ها مربوط به نواحی کدکننده ژنوم نبوده و احتمال یکسان بودن منشا این جدایه‌ها خصوصاً جدایه ایتالیایی که مثل ایران در منطقه مدیترانه قرار دارد را تقویت می‌نماید. پراکنش و فراوانی بالای رایزومانی در منطقه مرودشت می‌تواند به دلیل استفاده از ماشین‌آلات آلوده در

براساس نتایج به دست آمده، این توالی (به طول ۵۶۰ جفت باز) دارای بیشترین شباهت با توالی‌های مربوط به دو جدایه‌ی دیگر BNYVV شامل یک جدایه از ژاپن (D84410) و یک جدایه‌ی ویروس از کشور ایتالیا (AF197552) بود. شباهت جدایه‌ی مرودشت با این دو توالی به ترتیب برابر ۹۹/۳ و ۹۹/۶ درصد محاسبه گردید.

آبیاری، تناوب طولانی مدت و ضد عفونی خاک راه‌هایی است که در منابع از آن‌ها به عنوان راه‌های موفق کاهش شدت بیماری و میزان خسارت نام برده شده است (Rush and Heidel 1995; Tamada 2002). از طرف دیگر نظر به این که میزان پراکنش قارچ ناقل بیماری در منطقه بسیار بالاست باید اقدامات لازم در جهت آلوده نشدن مناطق جدید را معمول داشت.

سپاسگزاری

نگارنده بر خود لازم میدانند از دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت که هزینه انجام این تحقیق را تأمین نموده است، تشکر نماید.

عملیات زراعی، حمل و نقل خاک آلوده سطح ریشه چغندرقدن یا سایر محصولات و ورود فاضلاب و ضایعات کارخانه‌قدن مرودشت به مزارع اطراف باشد (Heijbroke 1988; Scott and Cooke 1993). با توجه به اهمیت اقتصادی بیماری و طولانی‌بودن دوره پنهان آن که باعث می‌شود در زمان ظهور علائم مایه تلقیح زیادی در مزرعه تولید شده باشد، توصیه می‌گردد اقدامات لازم در جهت به کنترل در آوردن تکثیر و توسعه این ویروس صورت پذیرد. کاشت ارقام مقاوم یا نسبتاً مقاوم و بهداشت زراعی موضوعی است که باید مورد توجه قرار گیرد. سایر اقدامات کنترلی مثل کاشت زودهنگام چغندر که باعث می‌شود ناقل ویروس هنوز غیرفعال باشد، کاهش طول زمان و افزایش دفعات

References:

منابع مورد استفاده:

- احمدی، ع.ر و جلالی، ص. ۱۳۷۷. وجود علائم ریشه‌ریشی چغندرقدن (شبه Rhizomania) در اصفهان. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، کرج. صفحه ۱۲۷.
- ایزدپناه، ک. ا. هاشمی، پ. کامران، ر. پاک نیت، م. سهن‌پور، آ و معصومی، م. ۱۳۷۵. وجود گسترده بیماری ریشه‌ریشی چغندرقدن (شبه Rhizomania) در فارس. مجله بیماری‌های گیاهی، جلد ۳۲: ۲۰۶-۲۰۰.
- توده‌فلاح، م. ارجمندی، ن و محمودی، ب. ۱۳۷۹. بررسی وضعیت آلودگی و پراکنش بیماری ریزومانیا (ریشه گنایی) چغندرقدن در ایران. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، اصفهان. صفحه ۷۲.
- جعفرپور، ب. جعفرپور، ب و فلاح‌تی رستگار، م. ۱۳۷۹. شیوع بیماری ریزومانیا در استان خراسان. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، اصفهان. صفحه ۷۳.

- دارابی، س. کامران، ر و ایزدپناه ک. ا. ۱۳۷۷. موقعیت بیماری ریشه گنایی (ریشه ریشی) چغندر قند در استان فارس و کهکیلویه و بویر احمد. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، کرج. صفحه ۱۲۸.
- مرکز آمار ایران، ۱۳۸۲. سالنامه آماری کشور. ۷۰۵ صفحه.
- سهندپور، آ و ایزدپناه، ک. ا. ۱۳۷۷. وقوع بیماری ریشه ریشی (Rhizomania) چغندر قند در چند استان کشور. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، کرج. صفحه ۲۶۲.
- شهرآیین، ن. حیدری، ا. نراقی، ل. فرزادفر، ش و قطبی، ت. ۱۳۷۹. اولین گزارش از وقوع بیماری ریزومانای چغندر قند در استان سمنان. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، اصفهان. صفحه ۲۶۱.
- Al Musa AM, Mink GI (1981) Beet necrotic yellow vein virus in North America. *Phytopathology*, 71: 773-776
- Anonymous (2004) Diagnostic protocols for regulated pests-beet necrotic yellow vein virus. *EPPO Bulletin*, 34: 229-237.
- Canova A (1959) Appunti di patologie della barbietola. *Inf. Fitopatol.*, 9: 390-396.
- Heijbroke W (1988) Dissemination of rhizomania by soil, beet seeds and stable manure. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 94: 9-15.
- Henry CM, Baker I, Morris J, Hugo SA (1995) Detection of beet necrotic yellow vein virus using reverse transcription and polymerase chain reaction. *Journal of Virology Methods*, 54: 15-28.
- Henry CM, Harju V, Brewer G, Barker I (1992) Methods for the detection of Rhizomania in soil. *Aspects of Applied Biology*, 32: 129-133.
- Hughes DW, Galau G (1998) Preparation of RNA from cotton leaves and pollen. *Plant Molecular Biology Reporter*, 6: 253-257.
- Koeing R (1996) Nucleotide sequence analysis of RNA-5 of five isolates of beet necrotic yellow vein virus and the identity of a deletion mutant. *Journal of General Virology*, 79: 575-580.

- Koeing R, Luddecke P, Haeberle AM (1995) Detection of beet necrotic yellow vein virus strains, variants and mixed infection by examining single-strand conformation polymorphisms of immunocapture RT-PCR products. *Journal of General Virology*, 77: 2051-2055.
- Meunier A, Schmit JF, Stas, A, Kutluk N, Bragard C (2003) Multiplex reverse transcription PCR for simultaneous detection of Beet necrotic yellow vein virus, Beet soil-borne virus, and Beet virus Q and their vector *Polymyxa betae* Keskin on sugar beet. *Applied Environmental Microbiology*, 69: 2356-2360.
- Mutasa ES, Chwarszczynska DM, Adams MJ, Ward E, Asher MJC (1995) Development of PCR for the detection of *Polymyxa betae* in sugar beet roots and its application in field studies. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 47: 303-313.
- Mutasa ES, Ward E, Adams MJ, Collier CR, Chwarszczynska DM, Asher MJC (1993) A sensitive DNA-probe for the detection of *Polymyxa betae* in sugar beet roots. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 43: 379-390.
- Richards KE (1991) Plant Viruses Online, Descriptions and Lists from the VIDE Database Beet necrotic yellow vein *furovirus*. <http://image.fs.uidaho.edu/vidе/dеscr 086.htm>.
- Richards KE, Tamada T (1992) Mapping functions on the multipartite genome of beet necrotic yellow vein virus. *Annual Review of Phytopathology*, 30: 291-313.
- Rush CM, Heidel GB (1995) *Furovirus* diseases of sugar beets in the United States. *Plant Disease*, 79: 868-875.
- Scott RK, Cooke DA (1993) *The Sugar Beet Crop: Science into Practice* (World Crop Series). Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.
- Sutic DD, Ford RE, Tosic MT (1999) *Hand book of plant virus diseases*. CRC Press. Boca Raton, Florida 33431, 982 pp.

- Tamada T (1999) Benyviruses. In Webster R, Granoff A (eds): Encyclopedia of virology, 2nd Ed. vol. II. Academic Press, New York, pp. 154-160.
- Tamada T (2002) Beet necrotic yellow vein virus. Description of plant viruses. CMI/A.A.B. No 391.
- Whiney ED, Duffus E (1998) Compendium of Beet Diseases and Insects, 3rd edition. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.
- Wisler GC, Lewellen RT, Sears JL, Wasson JW, Liu HY, Wintermantel WM (2003) Interactions between *Beet necrotic yellow vein virus* and *Beet soil-borne mosaic virus*. Plant disease, 87: 1170-1175.
- Wisler GC, Liu HY, Duffus JE (1994) Beet necrotic yellow vein virus and relationship to eight sugar beet furo-like viruses from the United States. Plant disease, 78: 995-1001.