خالص‌سازی و تولید آنتی‌سرم جدایه ایرانی ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندرقند عامل بیماری ریزومانیا

Purification and antiserum production of Iranian isolate of *Beet Necrotic Yellow Vein Virus* (BNYVV), the causal agent of sugar beet rhizomania disease

سعید دارابی*[1]، محسن یاسایی[2] و کرامت‌اله ایزدپناه[3]

تاریخ دریافت: ۸۷/۶/۱۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۸/۶/۹

س. دارابی، م. یاسایی و ک. ایزدپناه . ۱۳۸۹. خالص‌سازی و تولید آنتی‌سرم جدایه ایرانی ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندرقند عامل بیماری ریزومانیا. **مجله چغندرقند ۲۶(۱): ۶۶-۵۳**

چکیده

ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندر قند (*Beet necrotic yellow vein virus*) عامل بیماری مهم ریشه‌گنایی یا ریزومانیا (Rhizomania) در چغندرقند است. در تحقیق حاضر طی سال ۱۳۸۴ در شیراز، به‌منظور استفاده از روش‌های سرولوژیکی (ازجمله آزمون الیزا) در تشخیص بیماری و نیز استفاده‌از این روش‌ها در برنامه‌های اصلاحی چغندرقند جهت انتخاب ژرم‌پلاسم متحمل به بیماری، جدایه ایرانی ویروس مذکور خالص‌سازی و آنتی‌بادی علیه آن تولید شد. بدین منظور ابتدا بافت موردنیاز برای خالص‌سازی با مایه‌زنی عصاره برگ چغندرقند آلوده به ویروس مذکور، روی برگ‌های *Chenopodium quinoa* Willd تهیه شد. خالص‌سازی ویروس از بوته‌های آلوده *C. quinoa* شامل عصاره‌گیری بافت آلوده در بافر فسفات، تصفیه مقدماتی، سانتریفوژ کردن از میان بالشک سوکروز ۲۰ درصد و سانتریفوژ کردن در ستون سوکروز دارای شیب چگالی بود. در نهایت، باند ویروسی در لوله سانتریفوژ به‌صورت پراکنده که عمدتاً در سه ناحیه دارای فشردگی بیشتری بود، تشکیل شد. برای تهیه آنتی‌سرم، ویروس خالص شده به‌طور زیر جلدی به خرگوش سفید نیوزلندی تزریق شد. آنتی‌سرم حاصل پس‌از جذب با عصاره گیاه سالم و جداسازی گاماگلوبولین و تهیه آنتی‌بادی متصل به آنزیم، برای آزمون الیزا قابل استفاده بود. آنتی‌سرم تهیه شده دارای کیفیت بالایی بود و با عصاره گیاه سالم واکنشی نشان نداد. آنتی سرم مذکور برای انجام تحقیقات موردنظر در مؤسسات آموزشی و پژوهشی قابل استفاده است.

واژه‌های کلیدی: آزمون الیزا، آنتی‌سرم، چغندرقند، خالص‌سازی ویروس، ریزومانیا،BNYVV

۱- مربی پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس *-نویسنده مسئول Darabi@farsagres.ir

۲- مربی پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس- بخش تحقیقات اصلاح و تهیه بذر و نهال

۳- استاد مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

مقدمه

بیماری ریشه‌گنایی یا ریزومانیا (Rhizomania) در حال حاضر یکی از مهم‌ترین بیماری‌های چغندرقند در دنیا محسوب می‌شود. عامل این بیماری، ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندرقند *Beet necrotic yellow vein virus* و ناقل آن *Polymyxa betae* Keskin است (Tamada and Baba 1973; Tamada 1975; Richards and Tamada 1992).

این بیماری انتشار جهانی دارد (Putz et al. 1990; Asher 1993) و در ایران نیز اولین بار در سال ۱۳۷۵ توسط ایزدپناه و همکاران از فارس گزارش شد (ایزدپناه و همکاران ۱۳۷۵). سپس وجود آن در اکثر نواحی چغندرکاری کشور به اثبات رسید (دارابی و همکاران ۱۳۷۷و۱۳۸۲؛ توده فلاح و همکاران ۱۳۷۹؛ جعفرپور و فلاحتی رستگار ۱۳۷۹؛ شهرآئین و همکاران ۱۳۷۹؛ Mehravar et al. 2009). میزان خسارت بیماری بستگی به ژنوتیپ چغندرقند، پاتوتیپ ویروس، میزان زادمایه (Inoculum) بیماری، زمان آلودگی و شرایط اقلیمی دارد (Scholten and Lange 2000; Rush et al., 2006; Mcgrann et al. 2009). در آلودگی‌های شدید بر روی رقم حساس، کاهش عملکرد شکر بین ۵۰ تا ۶۰ درصد و در مواردی تا ۹۰ درصد نیز گزارش شده است (Richard-Molard 1985; Johansson 1985; Asher 1993; Henry 1996). این کاهش عمدتاً ناشی‌از کاهش عملکرد ریشه به میزان ۵۰ و در مواردی تا ۹۰ درصد و هم‌چنین کاهش درصد قند ریشه بین ۸ تا ۴۸ درصد است (Henry 1996).

BNYVV در حال حاضر متعلق به جنس *Benyvirus* است (Tamada 1999; Van Regenmortel et al. 2000; Rush 2003). این ویروس میله‌ای شکل، خمش‌ناپذیر و دست کم دارای چهار قطعه RNA تک‌لای مثبت در چهار پیکره به طول‌های ۸۵، ۱۰۰، ۲۶۵ و ۳۹۰ نانومتر و قطری حدود ۲۰ نانومتر است (Brunt and Richards 1989; Richards and Tamada 1992). در بعضی‌از جدایه‌ها، قطعه پنجم نیز مشاهده شده است (Koenig et al. 1997; Tamada 1999; Koenig and Lennefors 2000). RNA_1 ویروس شامل یک چهارچوب ژنی (open reading frame) است که در تکثیر ویروس دخالت دارد (Bouzoubaa et al. 1987). RNA_2 دارای شش چهارچوب ژنی است و پروتئین پوششی نیز توسط آن کد می‌شود. هم‌چنین این RNA در حرکت پیکره‌های ویروسی در سلول‌های گیاهی نقش دارد (Bouzoubaa et al. 1986; Brunt and Richards 1989; Richards and Tamada, 1992). RNA_1 و RNA_2 برای آلودگی لازم هستند و همیشه در بافت آلوده وجود دارند (Koenig et al. 1986; Koenig and Burgermeister 1989). RNA_3 و RNA_4

هریک شامل یک چهارچوب ژنی هستند. RNA_3 از طریق توسعهٔ علایم و انتشار ویروس در سیستم ریشه‌ای سبب افزایش توان بیماری‌زایی می‌شود (Kuszala et al. 1986; Koenig et al. 1991). RNA_4 در انتقال ویروس با ناقل نقش دارد و جهت آلودگی طبیعی ضروری است (Tamada and Abe 1989; Richards and Tamada 1992). RNA_5 در تسهیل انتشار سیستمیکی ویروس درون ریشه و تشدید علایم بیماری دخالت دارد (Miyanishi et al. 1999; Liu et al. 2005). RNA_3 و RNA_4 همیشه در آلودگی طبیعی ریشه وجود دارند ولی معمولاً تمام یا بخشی از آن‌ها در اثر انتقال مکانیکی مکرر حذف می‌شود (Koenig et al. 1986).

با توجه به ماهیت بیماری، کاربرد روش‌های زراعی (از جمله تاریخ کاشت، روش آبیاری و تناوب زراعی)، همچنین روش‌های شیمیایی و بیولوژیکی در مبارزه با آن چندان مؤثر نیست و لذا استفاده از رقم‌های مقاوم بهترین و تنها راه مبارزه مؤثر با این بیماری محسوب می‌شود (Harveson and Rush 1994; Asher and Kerr 1996; Wisler et al. 1999; Biancardi et al. 2002; Harveson and Rush 2002). سطح مقاومت ژرم‌پلاسم (ژنوتیپ‌ها) نیز بستگی به غلظت ویروس موجود در ریشه آن‌ها دارد و بر این اساس ژرم‌پلاسم‌های متحمل به بیماری شناسایی و گزینش می‌شوند (Tuitert et al. 1994; Asher and Kerr 1996).

برای شناسایی این گونه ژرم‌پلاسم از روش‌های متعددی استفاده می‌شود که یکی‌از متداول‌ترین آن‌ها آزمون‌های سرولوژیکی ازجمله تست الیزا (ELISA) است. امروزه از این آزمون به‌طور وسیعی برای تشخیص BNYVV و همچنین در برنامه‌های اصلاحی چغندرقند برای انتخاب ژرم‌پلاسم برتر که دارای کم‌ترین مقدار ویروس در ریشه هستند، استفاده می‌شود (Giunchedi et al. 1985 and 1987; Whitney 1989; Wisler et al. 1994; Pelsey and Merdinoglu 1996; Scholten et al. 1996; Scholten and Lang 2000; Biancardi et al. 2002; Amiri et al. 2003).

هدف این تحقیق حاضر تهیه آنتی‌سرم علیه جدایه ایرانی BNYVV برای راه‌اندازی سیستم تشخیص سریع و صحیح بیماری (تست الیزا) و گزینش ژنوتیپ‌های متحمل به بیماری در راستای تولید رقم مقاوم بود.

مواد و روش‌ها

تکثیر بافت آلوده به ویروس

برای تهیه و تکثیر بافت آلوده به BNYVV، برگ چغندرقند دارای علایم بیماری برگرفته از مزرعه‌ای در شهرستان مرودشت (شکل ۱)، در بافر فسفات ۰/۱ مولار و pH= ۷/۱ خرد و عصاره حاصل

روی برگ‌های *C. quinoa* Willd – که با پودر کاربوراندوم گردپاشی شده بود- مایه‌زنی مکانیکی شد. در مایه‌زنی‌های بعدی از عصاره برگ *C. quinoa* دارای علایم، برای آلوده کردن بوته‌های سالم این گیاه استفاده شد. گیاهان مایه‌زنی شده، در شرایط گلخانه و دمای ۳۰- ۲۱ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

خالص‌سازی

برای خالص‌سازی BNYVV از برگ *C. quinoa* دارای علایم، از روش تامادا و همکاران (Tamada et al. 1989) و نیز روش کونیگ و همکاران (Koenig et al. 1984) با انجام تغییراتی به شرح زیر استفاده شد:

– ۵۰ گرم برگ آلوده *C. quinoa* در سه تا چهار حجم بافر فسفات ۰/۱ مولار و pH= ۷ شامل ۰/۰۰۱ مولار Na_2EDTA، در مخلوط‌کن خرد و سپس عصاره‌گیری شد.

– عصاره با پارچه ململ صاف و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به هم زده شد.

– عصاره به مدت ۱۰ دقیقه گردان Sorval SS34 با ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد.

– رسوب حاصل حذف و پس از افزودن دو درصد TritonX-100 به رونشین، محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه به هم زده شد.

– جهت خلوص بیشتر، عصاره حاصل روی بالشک سوکروز ۲۰ درصد در گردان شماره ۳۰ سانتریفوژ Beckman در ۲۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت دو ساعت سانتریفوژ شد.

– رسوب حاصل در ۷- ۶ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۱ مولار و pH= ۷، شامل یک درصد Triton x-100 به صورت تعلیق درآمد و به مدت ۱۲ ساعت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به هم زده شد.

– محلول حاصل به مدت پنج دقیقه گردان SS-34 با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد.

– رسوب حذف و رونشین بر روی ستون شیب چگالی ۱۰ تا ۴۰ درصد سوکروز که یک شب قبل تهیه شده بود، قرار داده شد و به مدت یک تا یک و نیم ساعت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد با گردان SW-28 سانتریفوژ Beckman با ۲۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد.

– باندهای ویروسی تشکیل شده در ستون سوکروز گردآوری شدند. سپس به‌منظور رسوب ویروس، به محلول حاصل بافر فسفات ۰/۰۱ مولار و pH= ۷ اضافه شد و این محلول در گردان شماره ۳۰ سانتریفوژ Beckman در ۲۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت دو ساعت سانتریفوژ شد.

– رونشین حذف و ویروس حاصل در یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۱ مولار و pH= ۷ حل شد. آموده (سوسپانسیون) به‌دست آمده که حاوی ویروس بود تا زمان استفاده در دمای منفی۲۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

سرولوژی

تهیه آنتی‌سرم

برای تهیه آنتی‌سرم هشت میلی‌گرم آموده نسبتاً خالص شده ویروس، طی چهار مرحله با فواصل یک هفته به خرگوش سفید نیوزلندی تزریق شد. تزریق به صورت

زیرجلدی در ناحیه گردن و هم‌چنین در ماهیچه ران انجام شد. قبل‌از هر تزریق آموده ویروسی با حجم مساوی روغن Freund's incomplete adjuvant مخلوط و سپس به‌خوبی به هم زده شد تا به صورت امولسیون درآید. ده روز بعداز آخرین تزریق از رگ کناری گوش، خون‌گیری انجام شد.

جذب آنتی‌سرم

برای حذف آنتی‌بادی‌های ناخواسته که بر علیه پروتئین‌های گیاهی تولید شده بودند، ابتدا برگ سالم *C. quinoa* در یک حجم آب مقطر، عصاره‌گیری شد. عصاره حاصل با پارچه ململ سترون صاف گردید و عصاره صاف شده به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب حذف گردید و سپس آنتی‌سرم با نیم حجم از رونشین، مخلوط و به مدت دو ساعت در دمای اتاق نگه‌داری شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و بعداز حذف رسوب مجدداً به میزان نیم حجم دیگر از عصاره گیاه سالم به آنتی‌سرم افزوده شد و بعداز یک شب نگه‌داری در چهار درجه سانتی‌گراد، مشابه روش مذکور سانتریفوژ شد.

آزمون الیزا

برای راه‌اندازی سیستم الیزا به‌روش مستقیم (DAS-ELISA)، از روش ارائه شده توسط کلارک و بار جوزف (Clark and Bar-Joseph 1984) استفاده شد. بدین منظور ابتدا آنتی‌بادی از سرم خون خرگوش جداسازی شد و سپس به آنزیم آلکالین فسفاتاز (Enzyme-antibody conjugate, EAC) متصل گردید. بعداز آن برای تعیین بهترین رقت آنتی‌بادی و آنتی‌بادی متصل به آنزیم، آزمون عیارسنجی انجام شد. در این آزمون از رقت‌های ۱/۵۰۰ ، ۱/۱۰۰۰ و ۱/۱۵۰۰ آنتی‌بادی در بافر پوششی و از همین رقت‌ها برای آنتی‌بادی متصل به آنزیم در بافر نمونه استفاده گردید (جدول۱). هم‌چنین برای تهیه آنتی‌ژن یک ریشه چغندرقند (رقم حساس IC) آلوده به بیماری، در ۵، ۱۰و ۱۰۰ حجم بافر نمونه عصاره‌گیری شد. در آزمون مذکور، میزان جذب نور در طول موج ۴۰۵ نانومتر حاصل‌از واکنش‌های انجام شده، ۳۰ دقیقه بعداز اضافه کردن محلول یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر ۴- نیتروفنیل فسفات (4-nitrophynyl phosphate) در بافر دی‌اتانول آمین با استفاده‌از دستگاه پلیت خوان (Microplate reader) اندازه‌گیری شد.

نتایج

نتایج مایه‌زنی مکانیکی روی برگ‌های *C. quinoa* عبارت بود از تشکیل لکه‌های موضعی کلروتیک که سپس نکروتیک شدند و علایم زردی که پس‌از مدتی در اطراف رگبرگ‌ها توسعه پیدا کرد (شکل ۲). علایم در این گیاه به‌طور میانگین بعد از ۱۰-۸ روز ظاهر شد.

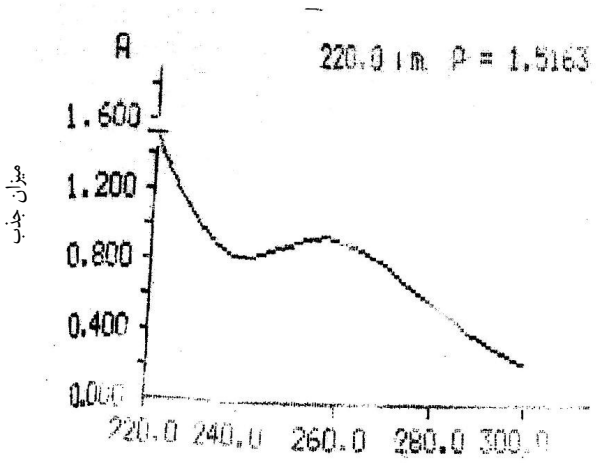
در خالص‌سازی BNYVV، بعداز سانتریفوژ کردن در ستون سوکروز دارای شیب چگالی، سه باند ویروسی در لوله سانتریفوژ تشکیل شد. در مواردی نیز باندها به صورت پراکنده (Light scattering) دیده شدند که این پراکندگی معمولاً در سه ناحیه از لوله دارای تراکم بیشتری بود. طیف جذبی این باندها مشابه طیف جذبی نوکلئوپروتئین بود (شکل ۳). در تحقیق حاضر در هر بار خالص‌سازی، به ازای ۵۰ گرم بافت

آلوده *C. quinoa* بین ۷ تا ۱۰ میلی‌گرم ویروس نسبتاً خالص به دست آمد.

در آزمون عیارسنجی در تمام رقت‌های مورد استفاده، بین آنتی‌بادی و آنتی‌بادی متصل به آنزیم واکنش وجود داشت. به‌طور مثال، میزان جذب نور در کم‌ترین رقت‌های به‌کار رفته آنتی‌بادی و آنتی‌بادی متصل به آنزیم (رقت ۱/۱۵۰۰) با عصاره رقیق شده ریشه آلوده به نسبت یک به پنج و یک به ده، به ترتیب ۰/۳۰۴ و ۰/۱۸۳ بود (جدول ۱). هم‌چنین در این آزمون، میزان جذب نور در رقت‌های ۱/۱۰۰۰ آنتی‌بادی و آنتی‌بادی متصل به آنزیم با عصاره رقیق شده، ریشه آلوده به نسبت یک به پنج و یک به ده به ترتیب برابر با ۰/۶۲۲ و ۰/۴۴۳ بود (جدول ۱). با توجه به نتایج حاصل می‌توان از رقت‌های ۱/۱۰۰۰ آنتی‌بادی و ۱/۱۰۰۰ آنتی‌بادی متصل به آنزیم که رقت‌های معمول در آزمون الیزا هستند، برای انجام این آزمون استفاده کرد. در آزمون مذکور هیچ‌گونه جذبی در مورد نمونه‌های ریشه سالم و نمونه‌های بلانک دیده نشد.

شکل۱ علایم زردی و نکروز رگبرگ در برگ چغندرقند آلوده به BNYVV

شکل ۲ توسعه لکه‌های موضعی و زردی در رگبرگ‌های *C. quinoa*، پس از سپری شدن ۱۴ روز از زمان مایه‌زنی مکانیکی با عصاره برگ آلوده *C. quinoa*



طول موج (نانومتر)

شکل۳ طیف جذبی امونده خالص شده BNYVV

جدول ۱ نتایج آزمون عیارسنجی با آنتی‌بادی و آنتی‌بادی متصل به آنزیم (EAC) در رقت‌های مختلف تهیه شده علیه BNYVV پس‌از ۳۰ دقیقه

		رقت‌های آنتی بادی								
آنتی بادی‌ها		۱ / ۵۰۰			۱ / ۱۰۰۰			۱ / ۱۵۰۰		
شاهد		−۰/۰۵۱	−۰/۰۶۵	−۰/۰۸۷	−۰/۰۸۸	−۰/۰۸۸	−۰/۰۷۲	−۰/۰۸۲	−۰/۰۶۹	−۰/۰۸۹
۱ / ۵	H	−۰/۰۷۳	−۰/۰۶۳	−۰/۰۹۸	−۰/۰۹۴	−۰/۰۸۰	−۰/۰۷۴	−۰/۰۸۲	−۰/۰۹۶	−۰/۰۹۷
۱ / ۵	I	۰/۹۸۳	۰/۸۹۵	۰/۶۷۶	۰/۸۹۱	۰/۶۲۲	۰/۴۵۶	۰/۶۸۷	۰/۵۲۶	۰/۳۰۴
۱ / ۱۰	H	−۰/۰۷۶	−۰/۰۸۱	−۰/۰۷۶	−۰/۰۸۰	−۰/۰۸۷	−۰/۰۷۶	−۰/۰۸۰	−۰/۰۷۱	−۰/۰۷۸
۱ / ۱۰	I	۰/۹۵۳	۰/۷۷۰	۰/۵۶۰	۰/۷۹۹	۰/۴۴۳	۰/۲۶۴	۰/۵۰۱	۰/۲۴۴	۰/۱۸۳
۱ / ۱۰۰	H	−۰/۰۴۴	−۰/۰۹۰	−۰/۰۹۶	−۰/۰۷۶	−۰/۰۹۸	−۰/۰۹۶	−۰/۰۶۸	−۰/۰۷۷	−۰/۰۷۶
۱ / ۱۰۰	I	۰/۴۹۵	۰/۳۰۸	۰/۱۸۹	۰/۰۳۴۵	۰/۰۵۱	۰/۰۵۵	۰/۱۲۱	۰/۰۸۶	۰/۰۴۴
EAC		۱ / ۵۰۰	۱ / ۱۰۰۰	۱ / ۱۵۰۰	۱ / ۵۰۰	۱ / ۱۰۰۰	۱ / ۱۵۰۰	۱ / ۵۰۰	۱ / ۱۰۰۰	۱ / ۱۵۰۰
		رقت های آنتی بادی متصل به آنزیم								

H ریشه چغندرقند سالم

I ریشه چغندرقند آلوده به BNYVV (رقم IC)

EAC آنتی بادی متصل به آنزیم (Enzyme-antibody conjugate)

اعداد منفی به منزله صفر محسوب می‌شوند.

بحث

برای خالص‌سازی BNYVV روش‌های متعددی به کار رفته است (Putz and Kuszala 1978; Steven et al. 1981; Al Musa and Mink 1981; Gugerli 1984; Koenig et al. 1984). در برخی از روش‌های به‌کار رفته، برای

خالص‌سازی BNYVV که به راندمان خالص‌سازی اشاره شده است، از هر کیلوگرم بافت برگ آلوده *C. quinoa* بین ۵ تا ۲۰ میلی‌گرم ویروس استخراج شده است (Putz et al. 1990). در تحقیق حاضر از هر ۵۰ گرم بافت برگ آلوده *C. quinoa* بین ۷ تا ۱۰ میلی‌گرم ویروس استخراج شد که راندمان خالص‌سازی در مقایسه با روش‌های قبلی بسیار بالاتر است. ازجمله دلایل بالا بودن راندمان خالص‌سازی این است که در این تحقیق بافت مورداستفاده برای خالص‌سازی فقط از قسمت‌هایی از برگ‌های آلوده *C. quinoa* که علایم ویروسی را به‌خوبی نشان می‌دادند، گزینش شد. علاوه‌بر آن روش به‌کار رفته در این تحقیق برای خالص‌سازی BNYVV، در مقایسه با روش‌هایی که قبلاً برای خالص‌سازی این ویروس توصیه شده‌اند، آسان‌تر بوده و به‌دلیل این که در مدت زمان کم‌تری به انجام می‌رسد، احتمال از دست رفتن ویروس در هنگام خالص‌سازی کاهش یافته و هم‌چنین پیکره‌های ویروسی نیز آسیب کم‌تری می‌بینند. در خالص‌سازی ویروس در ستون سوکروز دارای شیب چگالی برخلاف انتظار فقط سه باند ویروسی که نشان‌دهنده سه پیکره از ویروس است، دیده شد. نبود یکی از پیکره‌ها ممکن است به‌دلیل استفاده‌از عصاره برگ چغندرقند برای تکثیر ویروس باشد زیرا RNA4 که در انتقال ویروس با ناقل نقش دارد، در آلودگی‌های سیستمیک که علایم در برگ چغندرقند ظاهر می‌شود، ممکن است به برگ انتقال نیابد (Koenig et al. 1986). هم‌چنین ممکن است در مایه‌زنی مکانیکی ویروس روی برگ *C. quinoa*، RNA مذکور حذف شده باشد (Koenig et al. 1986; Koenig and Burgermeister 1989). علاوه‌بر آن، این امکان نیز وجود دارد که عدم مشاهده باند چهارم، ناشی‌از حذف باند در مراحل خالص‌سازی باشد. در هر صورت، انجام بررسی‌های بیش‌تر در این زمینه، ضروری به‌نظر می‌رسد.

در آزمون عیارسنجی در بالاترین رقت آنتی‌بادی، آنتی‌بادی متصل به آنزیم، بلانک و نمونه‌های سالم هیچ‌گونه جذبی دیده نشد که نشان‌دهنده کیفیت مطلوب آنتی‌سرم تولید شده است. آنتی‌سرم مذکور برای انجام تحقیقات موردنظر در مؤسسات آموزشی و پژوهشی قابل استفاده است.

منابع مورد استفاده:

References:

ایزدپناه، ک. هاشمی، پ. کامران، ر. پاک نیت، م. سهندپور، آ و معصومی، م. ۱۳۷۵. وجود گسترده بیماری ریشه‌ریشی (شبه Rhizomania) در فارس. مجله بیماری‌های گیاهی، جلد ۳۲، صفحات ۲۰۶-۲۰۰.

توده‌فلاح، م. ارجمندی، ن و محمودی، ب. ۱۳۷۹. بررسی وضعیت آلودگی و پراکنش بیماری ریزومانیا (ریشه‌گنایی) چغندرقند در ایران. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان. اصفهان. جلد دوم، صفحه ۷۲.

جعفرپور، ب و فلاحتی رستگار، م. ۱۳۷۹. شیوع بیماری ریزومانیا در استان خراسان. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان. اصفهان. جلد دوم، صفحه ۷۳.

دارابی، س. کامران، ر و ایزدپناه، ک. ۱۳۷۷. موقعیت بیماری ریشه‌گنایی (ریشه‌ریشی) چغندرقند در استان فارس و کهگیلویه و بویراحمد. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، کرج. جلد دوم، صفحه ۱۲۸.

دارابی، س. معصومی، م و ایزدپناه، ک. ۱۳۸۲. ریشه‌گنایی (ریزومانیا) چغندرقند. انتشارات مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، ۵۰ صفحه.

شهرآئین، ن. حیدری، ا. ندافی، ل. فرزادفر، ش و قطبی، ت. ۱۳۷۹. اولین گزارش از وقوع بیماری ریزومانیای چغندرقند در استان سمنان. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان. اصفهان. جلد دوم، صفحه ۲۶۱.

Al Musa AM, Mink GI. *Beet nectoric yellow vein virus* in North America. Phytopathology. 1981; 71: 773-776.

Amiri R, Moghaddam M, Mesbah M, Sadeghian SY, Ghannadha MR, Izadpanah K. The inheritance of resistance to *Beet nectoric yellow vein virus* (BNYVV) in *B. vulgaris* subsp. *maritima*, accession WB42: statistical comparisons with Holly-1-4. Euphytica. 2003; 132: 363-373.

Asher MJC. Rhizomania. *In* D. A. Cooke and R. K. Scott (eds.): The Sugar Beet Crop. 1993; pp. 311-346. Chapman and Hall, London.

Asher MJC, Kerr S. Rhizomania: Progress with resistance varieties. Br. Sugar Beet Rev. 1996; 64: 19-22.

Biancardi E, Lewellen RT, DeBiaggi M, Erichsen AW, Stevanato P. The origin of rhizomania resistant in sugar beet. Euphytica. 2002; 127: 383-397.

Bouzoubaa S, Quillex L, Guilley H, Jonard G, Richards K. Nucleotide sequence of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-1. J. Gen. Virol. 1987; 68:615-626.

Bouzoubaa S, Ziegler V, Beck D, Guilley H, Richards K, Jonard G. Nucleotide sequence of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-2. J. Gen. Virol. 1986; 67: 1689-1700.

Brunt AA, Richards KE. Biology and molecular biology of furoviruses. Adv. Virus Res. 1989; 36: 1-32.

Clark MF, Bar- Joseph M. Enzyme immunosorbent assay in plant virology. *In* K. aramorosch and H. Koprowsky (eds.): Methods in Virology. 1984; pp. 51-58. Vol. VII. Academic Press,New York.

Giunchedi L, De Biaggi M, Poggi-Pollini CP. Evaluation of ELISA technique for the screening of rhizomania- tolerant sugar beet genotype. Proc. 48th Winter Congress, I.I.R.B., Brussels: 1985; 385-390.

Giunchedi L, De Biaggi M, Poggi-Pollini CP. Correlation between tolerance and *Beet necrotic yellow vein virus* in sugar beet genotypes. Phytopath. Medit. 1987; 26: 23-28.

Gugerli P. Isopycnic centrifugation of plant viruses in nycodens density gradients. J.Virol. Meth. 1984; 9: 249-258.

Harveson R, Rush CM. Evaluation of fumigation and rhizomania tolerant cultivars for control of a root disease complex of suger beet. Plant Dis. 1994; 78: 1197- 1202.

Harveson R, Rush CM. The influence of irrigation frequency and cultivar blends on the severity of multiple root disease in sugar beets. Plant Dis. 2002; 86: 901-908.

Henry C. Rhizomania-its effect on sugar beet yield in the UK. Br. Sug. Beet Rev. 1996; 64: 24-26.

Johansson E. Rhizomania in sugar beet- a threat to beet growing that can be overcome by plant breeding. Sveriges Utsadesforenings Tidskrift. 1985; 95: 115-121.

Koenig R, Burgermeister W. Mechanical inoculation of sugar beet roots with isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* having different RNA compositions. J. Phytopathol. 1989; 124: 249-255.

Koenig R, Burgermeister W, Weich H, Sebald W, Kothe C. Uniform RNA patterns of *Beet necrotic yellow vein virus* in sugar beet roots, but not in leaves from several plant species. J. Gen. Virol. 1986; 2043-2046.

Koenig R, Haeberle A, Commandeur U. Detection and characterization of a distinct type of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA_5 in a sugar beet growing area in Europe. Arch. Virol. 1997; 147: 1499-1504.

Koenig R, Jarausch W, Li Y. Effect of recombinant *Beet necrotic yellow vein virus* with different RNA compositions on mechanically inoculated sugar beets. J. Gen. Virol. 1991; 72: 2243-2246.

Koenig R, Lesemann DE, Burgermeister W. *Beet necrotic yellow vein virus*, purification, preparation of antisera and detection by means of ELISA, immunosorbent electron microscopy and electro-blot immuno assay. Phytopathol. Z. 1984; 111: 244-250.

Koenig R, Lennefors B. Molecular analyses of European A, B and P type sources of *Beet necrotic yellow vein virus* and detection of the rare P type in Kazakhstan. Arch. Virol. 2000; 145: 1561-1570.

Kuszala M, Ziegler V, Bouzoubaa S, Richards K, Putz C, Guilley H, Jonard G. *Beet necrotic yellow vein virus*: Different isolates are serologically similar but differ in RNA composition. Ann. Appl. Biol. 1986; 109: 155-162.

Liu HY, Sears JL, Lewellen RT. Occurrence of resistance-breaking *Beet necrotic yellow vein virus* of sugar beet. Plant Dis. 2005; 89: 464-468.

Mcgrann GRD, Grimmer MK, Mutasa-Gottgens ES, Stevens S. Progress towards the understanding and control of sugar beet rhizomania disease. Mol. Plant Pathol. 2009; 10: 129-141.

Mehravar M, Valizadeh J, Koenig R, Bragard CG. Iranian *beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV): Pronounced diversity of the p25 coding region in A-type

BNYVV and identification of P-type BNYVV lacking a fifth RNA species.Arch. Virol. 2009; 154: 501-506.

Miyanishi M, Kusume T, Saito M, Tamada T. Evidence for three groups of sequence variants of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA5. Arch. Virol. 1999; 144: 879-892.

Pelsey F, Merdinoglu D. Identification and mapping of random amplified polymorphic DNA markers linked to a rhizomania resistance gene in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by bulked segregant analysis. Plant Breeding. 1996; 115: 371-377.

Putz C, Kuszala M. La rhizomanie de la betterave sucriere en Alasace. Recherche d'une novelle methode de purification du' *Beet necrotic yellow vein virus*'.Ann. Phytopathol. 1978; 10: 247-262.

Putz C, Merdinoglu D, Lemaire O, Stocky G, Valentin P, Weidemann S. *Beet necrotic yellow vein virus*, causal agent of sugar beet rhizomania. Rev. Plant Pathol. 1990; 69:247-254.

Richard-Molard M. Rhizomania: A worldwide danger to sugar beet. Span. 1985; 28: 92-94.

Richards KE, Tamada T. Mapping functions on the multipartite genome of *Beet necrotic yellow vein virus*. Annu. Rev. Phytopathol. 1992; 30: 291-313.

Rush CM. Ecology and epidemiology of *Benyviruses* and plasmodiophorid vectors. Annu. Rev. Phytopathol. 2003; 41: 576- 592.

Rush CM, Liu HY, Lewellen RT, Acosta-Leal R. The continuing saga of rhizomania of sugar beets in the United State. Plant Dis. 2006; 90: 4-15.

Scholten OE, Lange W. Breeding for resistance to rhizomania in sugar beet: A review. Euphytica. 2000; 112: 219-231.

Scholten OE, Jansen RK, Keizer LCP, De Bock ThSM, Lange W. Major genes for resistance to *beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in *Beta vulgaris*. Euphytica. 1996; 91: 331-339.

Steven AC, Trus BL, Putz C, Wurtz M. The molecular organization of *Beet necrotic yellow vein virus*. Virology. 1981;113:428-438.

Tamada T. *Beet necrotic yellow vein virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses. 1975; No. 144.

Tamada T. *Benyviruses*. 1999; Pages 154-160. *In* R.G. Webster and A.Granoff (eds.): Encyclopedia of Virology. Academic Press, London.

Tamada T, Abe H. Evidence that *Beet necrotic yellow vein virus* RNA4 is essential for efficient transmission by the fungus *Polymyxa betae*.J.Gen.Virol. 1989; 70: 3391-3398.

Tamada T, Baba T. *Beet necrotic yellow vein virus* from rhizomania-affected sugar beet in Japan. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 1973; 39: 325-332.

Tamada T, Shirako Y, Abe H, Saito M, Kiguchi T, Harada T.) Production and pothogenicity of isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* with different number of RNA components. J. Gen. Virol. 1989; 70: 3399-3409.

Tuitert G, Musters-Van Oorschot PMS, Hiejbroek W. Effect of sugar beet cultivars with different levels of resistance to *Beet necrotic yellow vein virus* on transmission of virus by *Polymyxa betae*. Eur. J. Plant Pathol. 1994; 100: 201- 220.

Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR and Wickner RB. Virus taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic. Press. 2000; 1162p.

Whitney ED. Identification, distribution and testing for resistance to rhizomania in *Beta maritima*. Plant Dis. 1989; 73: 287-290.

Wisler GC, Lewellen RT, Sears JL, Liu HY, Duffus JE. Specificity of TAS-ELISA for *Beet necrotic yellow vein virus* and its application for determining rhizomania resistance in field-grown sugar beet. Plant Dis. 1999; 83: 864-870.

Wisler GC, Liu HY, Duffus JE (1994) *Beet necrotic yellow vein virus* and its relationship to eight sugar beet furo-like viruses from the United States. Plant Dis. 78:995-1001.