



## بررسی امکان تفکیک ژنوتیپ‌های چغندرقد از نظر مقاومت به ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندرقد (*beet necrotic yellow vein virus*) بر اساس علائم فنوتیپی در شرایط گلخانه

### Evaluation of the possibility of differentiating sugar beet genotypes in terms of resistance to *beet necrotic yellow vein virus* based on phenotypic symptoms under greenhouse condition

جمشید سلطانی<sup>۱\*</sup>، سیدباقر محمودی<sup>۲</sup>، محسن مهرور<sup>۳</sup> و مژده کاکویی نژاد<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۲۷ : تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۰

نوع مقاله: پژوهشی

DOI:10.22092/jsb.2022.353609.1263

ج. سلطانی، س.ب. محمودی، م. مهرور و م. کاکویی نژاد. ۱۴۰۰. بررسی امکان تفکیک ژنوتیپ‌های چغندرقد از نظر مقاومت به ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندرقد (*beet necrotic yellow vein virus*) بر اساس علائم فنوتیپی در شرایط گلخانه. چغندرقد، ۳۷(۱): ۹۹-۱۱۴

#### چکیده

در این تحقیق، از دو روش مختلف برای بررسی مقاومت به بیماری ریزومانیا، در ریشه و برگ گیاه چغندرقد ارقام شریف، دوروتی، آریا، سینا، ایزابلا، پیرولا، لودوینا و بریجیتا در شرایط گلخانه استفاده شد. بذر این ارقام در خاک سالم (جهت مایه‌زنی مکانیکی برگ‌ها) و آلوده (جهت ارزیابی آلودگی ریشه‌ها) کشت شدند. نتایج تجزیه واریانس داده‌های گلخانه‌ای و آزمایشگاهی نشان داد که از نظر آماری بین ارقام در صفات میزان غلظت ویروس (بر اساس آزمون الایزا) و درصد آلودگی ریشه گیاهچه‌ها اختلاف معنی‌دار وجود دارد؛ به طوری که رقم حساس شریف با میانگین آلودگی (۷۰/۵۹ درصد) با بیشترین غلظت ویروس (۰/۹۳) و در مقابل، دو رقم پیرولا و ایزابلا با میانگین آلودگی (۲۱/۴۷ درصد)، کمترین غلظت ویروس (۰/۲) را در ریشه‌ها نشان دادند. نتایج مایه‌زنی مکانیکی ویروس روی برگ گیاهچه‌های ارقام ذکر شده نشان داد که ۱۰ روز پس از مایه‌زنی، علائم به صورت نقاط کلروز و نکروز روی برگ همه ارقام ظاهر شده و از این نظر بین ارقام مقاوم و حساس تفاوتی وجود نداشت. مایه‌زنی مکانیکی برگ‌های چغندرقد منجر به بروز علائم موضعی مستقل از ژنوتیپ شد و امکان تفکیک ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم نسبت به این ویروس میسر نشد. لذا مناسب‌ترین روش، تعیین غلظت این ویروس پس از دو ماه در ریشه گیاهان می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ریزومانیا، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه با رونویسی معکوس، مقاومت

۱- استادیار بخش تحقیقات چغندرقد، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران. \* -  
نویسنده مسئول: soltani\_jam@yahoo.com

۲- دانشیار مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقد سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

۳- دانشیار، بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران.

۴- استادیار مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقد سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.



## مقدمه

چغندرقد (*Beta vulgaris* L. subspecies *vulgaris*) توسط طیف وسیعی از عوامل از جمله قارچ‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها و حشرات مورد حمله قرار می‌گیرد. این عوامل به‌طور مستقیم یا از طریق انتقال عوامل بیماری‌زا به برگ‌ها و ریشه‌ها آسیب می‌رسانند (Harveson and Hein 2009). یکی از این بیماری‌ها، ریزومانیا که عامل آن، ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندرقد (Beet necrotic yellow vein virus, BNYYV) از جنس *Benyvirus* متعلق به خانواده *Benyviridae* است (Gilmer and Ratti 2017). این بیماری اولین بار در ایتالیا در اوایل دهه ۱۹۵۰ گزارش شد (Canova 1959)، اما محققین منشأ اصلی را شرق آسیا می‌دانند (Chiba et al. 2011). این ویروس در حال حاضر در اکثر مناطق کشت چغندرقد در دنیا گسترش یافته است (Canova and Biancardi 2016) و در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۷۵ از استان فارس (Izadpanah et al. 1996; Mahmoudi et al. 2020) گزارش گردید. امروزه تقریباً در اکثر مناطق کشت چغندرقد در کشور (به‌استثنای استان خوزستان) گسترش یافته است (Mehrvar et al. 2000). این بیماری با تأثیر منفی بر عملکرد ریشه و درصد قند باعث کاهش عملکرد شکر می‌شود (Darabi et al. 2017). این ویروس خاک‌برد توسط شبه قارچ پلاسمودیوفورومیست *Polymyxa betae* Keskin (Gilmer and Ratti 2017) منتقل می‌شود که موجب آلودگی بافت ریشه چغندرقد می‌گردد (Tamada and Kondo 2013). اسپورهای استراحتی *P. betae* می‌توانند بیش از ۱۵ سال در نمونه‌های خشک‌شده خاک زنده باقی بمانند (Abe and Tamada 1986). لذا این بیماری از طریق روش‌های زراعی قابل کنترل نیست. در نتیجه، کنترل ریزومانیا در دنیا صرفاً بر اساس به‌کارگیری ارقام مقاوم به ویروس است (McGrann et al. 2009).

ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندرقد، یک ویروس

RNA دار تک‌رشته‌ای با قطبیت مثبت و دارای یک ژنوم چهار یا پنج قسمتی است که هرکدام در یک پیکره میله‌ای شکل جداگانه پوشیده می‌شوند. درحالی‌که RNAهای ۱ تا ۴ برای آلودگی‌های ریشه چغندرقد در مزرعه ضروری هستند، ولی می‌توان با استفاده از RNAهای یک تا سه (بدون ناقل) روی چغندرقد و برخی از گیاهان محک آلودگی ایجاد کرد (Tamada 2016). مهم‌ترین نقش RNA1 و RNA2 همانندسازی، حرکت سلول به سلول در میزبان و انتقال ویروس توسط ناقل است (Kondo et al. 2013). RNA3 مسئول بروز و توسعه علائم بیماری بر روی ریشه چغندرقد و تشکیل زخم‌های موضعی بر روی میزبان‌های محک مانند سالمه (*Chenopodium quinoa*) هستند، به‌خصوص پروتئین P25، که مهم‌ترین نقش را در شدت علائم ریشه دارد (McGrann et al. 2009). مطالعات مولکولی بر اساس ژن کدکننده پروتئین پوششی در RNA2 نشان داده است که جدایه‌های این ویروس در دو تیپ اصلی A و B گروه‌بندی می‌شوند. این دو گسترده‌ترین تیپ‌های این ویروس بوده و فقط دارای چهار اسید ریبونوکلیک (۱-۴ RNA) هستند. تیپ سوم در فرانسه بنام P گزارش شد که دارای RNA5 بوده و علت شدید بودن بیماری ریزومانیا در این ناحیه را به وجود این اسید ریبونوکلیک اضافی، نسبت داده‌اند. این تیپ تاکنون فقط از فرانسه (Koenig and Lennefors 2000)، انگلستان (Harju et al. 2005) قزاقستان (Ward et al. 2007) و ایران (Mehrvar et al. 2009) گزارش شده است. اگرچه ژنوم RNA1 و RNA2 این ویروس بسیار حفاظت شده است، چیا و همکاران (Chiba et al. 2008) نتیجه گرفتند که ژن کدکننده پروتئین P25 در ژنوم RNA3 ویروس در ژنوتیپ‌های مقاوم چغندرقد به‌صورت یک ژن غیربیماری‌زا عمل نموده و در ژنوتیپ‌های حساس نیز فاکتور بیماری‌زایی بوده و می‌تواند مسئول بروز علائم سیستمیک باشد. این پروتئین بسیار متغیر بوده و این تغییرات اساساً در آمینواسیدهای ۶۷-۷۰ دیده

می‌شود (Schirmer et al. 2005). نتایج تحقیقات نشان داد که پاسخ مقاومت در لاین‌های چغندر وحشی (*Beta vulgaris subsp. maritima*) و همچنین در چغندر قند رقم Rizor به وضعیت این چهار آمینواسید بستگی دارد (Chiba et al. 2008). اگرچه مکانیسم مقاومت در برابر ویروس زردی نکروتیک رگبرگ (BNYVV) هنوز ناشناخته باقی مانده است ولی ایجاد مقاومت ارقام چغندر قند به ویروس با محدودیت در تکثیر و جابجایی ویروس در ریشه‌ها تظاهر پیدا می‌کند (Tamada et al. 1999). پدیده مشابهی در آزمایش‌های مبتنی بر فنوتیپ‌هایی که بر روی برگ‌های تلقیح شده چغندر وحشی ایجاد شده (Chiba et al. 2008 ; Tamada 2007) مشاهده شد. هنگامی که ارقام حساس و مقاوم با برخی از جدایه‌های خاص ویروس زردی نکروتیک رگبرگ (BNYVV) مایه‌زنی شدند، فنوتیپ مقاومت با طیف وسیعی از علائم شامل بدون علائم خاص تا ظهور لکه‌های نکروز خاکستری‌رنگ در محل تلقیح نشان داد و بر اساس فنوتیپ‌های تولیدشده پس از مایه‌زنی مکانیکی با ویروس زردی نکروتیک رگبرگ (BNYVV)، لاین‌های افتراقی MR0، MR1 و MR2 از *B. maritima* انتخاب شدند (Tamada 2007).

هدف از این تحقیق شناسایی و تعیین مشخصات مولکولی ویروس زردی نکروتیک رگبرگ (BNYVV)، تهیه مایه تلقیح اولیه یک جدایه برای ارزیابی مقاومت گیاهچه‌های چند رقم چغندر قند با ژنتیک متفاوت به روش مایه‌زنی مکانیکی برگ و ارزیابی مقاومت در ریشه‌چه این ارقام با اندازه‌گیری میزان غلظت ویروس در شرایط گلخانه می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

#### ارزیابی مقاومت ارقام مختلف چغندر قند به ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندر قند در شرایط گلخانه

برای ارزیابی مقاومت در ریشه (کشت در خاک آلوده) و برگ (مایه‌زنی مکانیکی) چغندر قند نسبت به ویروس زردی نکروتیک رگبرگ (BNYVV) در شرایط گلخانه، از هشت رقم تجارتي داخلی (آریا، سینا و شریف) و خارجی (دوروتی، ایزابلا، پیرولا، لودوینا و بریجیتا) مورد استفاده قرار گرفت. این ارزیابی به روش ذیل انجام شد.

#### روش اول - کشت ارقام در خاک آلوده در شرایط گلخانه

در این تحقیق به منظور تهیه جدایه ویروس زردی نکروتیک رگبرگ (BNYVV)، از مزرعه تحقیقاتی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی (ایستگاه طرق) (با اطلاع از سابقه مزرعه مبنی بر حضور این ویروس) خاک آلوده جمع‌آوری و به گلخانه انتقال یافت. پس از مخلوط و همگن کردن آن استفاده شد.

ابتدا بذر ارقام ذکر شده در گلدان‌های استریل کوچک حاوی خاک پاستوریزه کشت و پس از رسیدن به مرحله سه تا

عملی‌ترین و مؤثرترین اقدام کنترلی برای بیماری ریزومانیا استفاده از ارقام مقاوم است (Biancardi and Tamada 2016). در اواسط دهه ۱۹۶۰ غربالگری مقاومت در شمال ایتالیا آغاز شد (Biancardi et al. 2002) و از اواسط دهه ۱۹۸۰، اولین رقم مقاوم، Rizor، در مناطق آلوده در بسیاری از کشورها کشت گردید (Panella and Biancardi 2016). متعاقب آن، منبع مقاوم Holly (حاوی ژن مقاومت *Rz1*)، با سطح مقاومت بالاتر از Rizor، در آمریکا کشف شد. از آن زمان ژرم‌پلاس‌های مقاوم دارای *Rz1* به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته است (Lewellen et al. 1987; Panella and Biancardi 2016). در دانمارک، ژن مقاومت دوم *Rz2*، با سطح مقاومت بالاتر از *Rz1*، از جمعیت

پنج برگی، به گلدان‌های حاوی خاک‌آلوده به نسبت یک قسمت خاک‌آلوده و سه قسمت ماسه استریل منتقل شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی متعادل با ۱۴ تکرار و در مجموع ۱۱۲ گلدان (۳-۲ بوته در هر گلدان) انجام شد. این گلدان‌ها در شرایط معمول گلخانه‌ای شامل روشنایی نور طبیعی روزانه (۱۰ تا ۱۲ ساعت)، رطوبت نسبی ۶۵ تا ۷۵ درصد و دمای ۲۲ تا ۲۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

یک ماه بعد از انتقال به خاک‌آلوده، گیاهچه‌ها برداشت و وضعیت آلودگی به ویروس زردی نکروتیک رگبرگ (BNYVV) در ریشه‌چه ارقام (در محدوده بین ۱۹-۱۴ بوته از هر یک از ارقام) با استفاده از آزمون الایزا (DAS-ELISA) مورد بررسی قرار گرفت. عصاره‌گیری از بافت ریشه به نسبت یک گرم بافت در پنج میلی‌لیتر بافر، درون هاون سرد انجام گردید و از این عصاره‌ها برای آزمون الایزا استفاده شد. آزمون الایزا با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی ویروس (تهیه شده از بخش ویروس‌شناسی مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور) با رقت یک در هزار و به روش کلارک و آدامز (Clark and Adams 1977) انجام شد. میزان جذب نوری چاهک‌های الایزا در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه خوانش الایزا (ELISA Reader) سنجیده و ثبت شد. نمونه‌هایی که میزان جذب نوری چاهک آنها مساوی یا بزرگ‌تر از دو برابر میانگین جذب چاهک شاهد سالم (منفی) بود، به‌عنوان نمونه آلوده در نظر گرفته شد. سپس در صد بوته‌های آلوده مربوط به هر رقم محاسبه گردید. داده‌های به‌دست‌آمده از این آزمون با استفاده از نرم‌افزار SAS (9.4) مورد آنالیز واریانس و مقایسه میانگین قرار گرفتند.

### روش دوم- تلقیح مکانیکی برگ‌ها

جهت تولید گیاهچه‌های سالم به‌منظور تلقیح مکانیکی روی برگ‌های آنها، خاک سالم مزرعه جمع‌آوری شده پس از پاستوریزه کردن آن با ماسه استریل به نسبت ۱:۴ (حجم به

RNeasy Plant Mini Kit، بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (Qiagen- Germany) استخراج شد.

به منظور ردیابی و شناسایی ویروس‌هایی که ناقل مشترک با ویروس زردی نکروتیک رگبرگ (BNYVV) دارند از جمله *Beet soil borne virus*، *Beet virus Q* از روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه با رونویسی معکوس (Meunier et al. 2003) استفاده شد. ترادف آغازگرها برای ردیابی آنها در جدول ۱ آمده است.

ویروس زردی نکروتیک رگبرگ (BNYVV) خالص به دست آمده روی برگ گیاهچه‌های این ارقام مایه‌زنی شد.

## تعیین مشخصات مولکولی جدایه BNYVV در آزمون گلخانه‌ای

ابتدا RNA کل ریشه‌چه (روش اول) و برگ گیاهچه‌های مایه‌زنی شده (روش دوم) در گلخانه و همچنین برگ آلوده جمع‌آوری شده از مزرعه (سیستمیک شده) با استفاده از کیت

جدول ۱ ترادف آغازگرهای استفاده شده برای ردیابی ویروس‌های BNYVV، BSBV، BVQ

ردیف	آغازگر	توالی 5'-3'	طول قطعه (جفت باز)
۱	BN2(1)-F	ACATTTCTATCCTCCTCCAC	۵۴۵
۲	BN2(1)-R	ACCCCAACAAACTCTCTAAC	
۳	BSBV2-F	CTTACGCTGTTCACTTTTATGCC	۳۹۹
۴	BSBV2-R	GTCCGCACTCTTTCAACTGTTT	
۵	BVQ1-F	GCTGGAGTATATCACCGATGAC	۳۹۳
۶	BVQ1-R	AAAATCTCGGATAGCATCCAAC	

## تعیین تیپ BNYVV

شناسایی تیپ‌های A و B ویروس از روش مولکولی واکنش دوگانه زنجیره‌ای پلیمرز با رونویسی معکوس (Ratti et al. 2005) با استفاده از دو جفت آغازگر اختصاصی (RhizoA و RhizoB که ناحیه بلوک سه‌گانه Triple Gene (Block, TGB) از RNA2 را تکثیر می‌کنند (جدول ۲)، انجام شد، که در آن تکثیر قطعه ۳۲۴ جفت بازی به وسیله جفت آغازگر RhizoA مشخص‌کننده تیپ A و تکثیر قطعه ۱۷۸ جفت بازی به وسیله آغازگرهای RhizoB بیانگر تیپ B ویروس است. این واکنش در ترموسایکلر با برنامه دمایی و زمانی بر اساس روش رتی و همکاران (Ratti et al. 2005) انجام شد.

در ادامه به منظور ردیابی تیپ P و به دنبال آن حضور RNA5 ویروس عامل ریزو مازیا در نمونه‌های گلخانه‌ای و برگ‌های آلوده سیستمیک شده مورد مطالعه در این تحقیق انتخاب شدند و با روش RT-PCR و آغازگرهای اختصاصی

BNYVV5 بررسی انجام گرفت. آغازگرهای اختصاصی BNYVV5، ناحیه کدشونده p26 در RNA5 به طول ۸۸۶ جفت باز را تکثیر می‌کنند (جدول ۲) که علاوه بر تشخیص وجود این RNA، می‌توانند تیپ P را هم شناسایی کنند (Schirmer et al. 2005).

## تکثیر ژن کدکننده پروتئین P25 روی قطعه RNA3 ویروس BNYVV

DNA مکمل ژن کدکننده پروتئین P25 روی رشته RNA3 جدایه‌های ویروس زردی نکروتیک رگبرگ (BNYVV)، با استفاده از کیت رونوشت‌برداری معکوس (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده آن (Thermo Scientific-USA) به عنوان الگو با استفاده از آغازگر اختصاصی معکوس (BN3-R) ساخته شد.

جدول ۲ ترادف آغازگرهای استفاده شده برای شناسایی تیپ‌های A، B و P و تکثیر ژن کدکننده پروتئین P25 ویروس BNYVV

تیپ ویروس	آغازگر	توالی 5'-3'	طول قطعه (جفت باز)
B و A	RhizoA-F	TAATAGTATCACTGTTACAACGATTAAGA	۳۲۴
	RhizoA-R	GTCACCTCTTTTTACCATTATATCAG	
P	RhizoB-F	TTGGGCAGCAACTTA	۱۷۸
	RhizoB-R	ACGGTGAGTACAACATACTGA	
	BN5-F	GTTTTTCCGCTCGCACAAGCG	۸۸۶
	BN5-R	CGAGCCCGTAAACACCGCATA	
BN3-F	GTGATATATTAGGCGCAGTTTATG	۹۰۶	
BN3-R	TCATTATCATCAACACCGTCAG		

(BNYVV) در مزرعه در اندام‌های هوایی مانند رنگ‌پریدگی، پژمردگی و کوتاهی رشد (شکل ۱-۱)، طویل شدن دم‌برگ‌ها و یا رشد چندجوانه‌ای در قسمت طوقه مشاهده می‌شود. از جمله شاخص‌های قابل اطمینان دیگر آلودگی ریشه، تکثیر ریشه‌های فرعی فراوان و نکروز آوندی در ریشه اصلی است (شکل ۱-۲). برش عرضی ریشه، قهوه‌ای شدن حلقه‌های آوندی تا نوک ریشه را نیز نشان داد (شکل ۱-۳)؛ از جمله علائم بسیار نادر در مزارع ایران، سیستمیکی شدن ویروس در اندام هوایی است، با رصد کرت‌های آزمایشات بخش تحقیقات چغندر قند خراسان رضوی (ایستگاه تحقیقات طرق) در طول فصل زراعی، در اواخر شهریور علائم سیستمیکی شدن ویروس در اندام هوایی رقم حساس شریف (در ابتدا به صورت زردی رگبرگ‌ها و در ادامه به صورت نکروز) (شکل ۱-۴) مشاهده شد. این برگ‌ها جمع‌آوری و جهت تلقیح مکانیکی برگ‌های گیاه محک در شرایط گلخانه مورد استفاده قرار گرفت.

برای تکثیر قطعه ۹۰۶ جفت بازی از RNA ویروس حاوی ژن کدکننده پروتئین P25، از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از مسترمیکس کیت EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده آن (Takara-Japan) و یک جفت آغازگر اختصاصی مستقیم (BN3-F) و معکوس (BN3-R) طراحی شده توسط وانگ و همکاران (Wang *et al.* 2011) استفاده شد (جدول ۲). محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، با استفاده از کیت QIAquick Gel Extraction (Qiagen-Germany) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده آن استخراج و جهت تعیین ترادف به صورت خوانش دوطرفه با آغازگرهای عمومی M13، به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید. توالی‌های حاصل، با استفاده از نرم‌افزار MEGA-X به روش Muscles (Kumar *et al.* 2018) هم‌ردیف‌سازی شدند.

علائم حضور ویروس زردی نکروتیک رگبرگ



شکل ۱ علائم ویروس زردی رگبرگ نکروتیک چغندر قند (BNYVV) در مزرعه شدیداً آلوده مشهد: ۱- علائم رنگ‌پریدگی و زردی برگ‌های رقم حساس (شریف) و رنگ برگ‌های سبز تیره عادی در رقم مقاوم (ایزابلا)، ۲- ریشه‌های رقم حساس (شریف) با علائم دارای ریشه‌های فرعی فراوان، ۳- تغییر رنگ و نکروز آوندها در برش طولی ریشه رقم حساس (شریف)، ۴- سیستمیک شدن ویروس در برگ رقم حساس (شریف)

## نتایج

### نتایج شناسایی BNYVV و ویروس‌های همراه در آزمون گلخانه‌ای

نتایج الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه برای ویروس‌های BNYVV، BVQ و BSBV، فقط باند قطعه ۵۴۵ جفت بازی مورد انتظار برای ویروس زردی نکروتیک رگبرگ (BNYVV)، از نمونه‌ها به دست آمد و در ژل الکتروفورز باندهای مورد انتظار مربوط به BVQ و BSBV (به ترتیب ۳۹۹ و ۲۹۲ جفت بازی) مشاهده نشد. باند قطعه ۳۱۵ جفت بازی مورد انتظار برای اثبات حضور BBSV مشاهده نشد. این نتایج نشان می‌دهد که نمونه‌های گلخانه‌ای تنها آلودگی به ویروس زردی نکروتیک رگبرگ (BNYVV) داشته و سه ویروس دیگر همراه با این ویروس نبوده‌اند. نتایج بررسی و ردیابی ویروس‌های فوق به روش ذکرشده در برگ‌های چغندر قند دارای علائم کلروز و نکروز در برگ گیاهان جمع‌آوری‌شده از مزرعه نشان داد که هیچ‌یک از ویروس‌های ذکرشده به‌غیر از ویروس مذکور حضور ندارند.

### نتایج تعیین ترادف ژن کدکننده پروتئین P25 رشته RNA3

نتایج تعیین تیپ‌های ویروس زردی نکروتیک رگبرگ (BNYVV) و تعیین ترادف ژن کدکننده پروتئین P25 رشته RNA3 بعد از تأیید وجود این ویروس در نمونه‌های برگ‌ی سیستمیک شده و گیاهچه‌های کشت شده در گلخانه و تفکیک تیپ A از B ویروس بر اساس ناحیه بلوک ژن سه‌گانه رشته RNA2 ویروس که بسیار حفاظت‌شده است، انجام گرفت. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز دوگانه بر اساس اندازه قطعه مورد انتظار (۳۲۴ جفت بازی) روی ژل الکتروفورز نمونه‌های گلخانه‌ای و مزرعه‌ای (برگ‌های دارای علائم سیستمیک) نشان داد که تیپ این جدایه‌ها از نوع A است و هیچ‌یک از جدایه‌ها، قطعه‌ای به‌اندازه ۱۷۸ جفت بازی که نشان‌دهنده تیپ B باشد

را نشان ندادند؛ بنابراین در این مطالعه نیز از نظر RNA5 با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مورد بررسی قرار گرفت و بر اساس آغازگرهای اختصاصی استفاده شده، قطعه ۸۸۶ جفت بازی مورد انتظار، در ژل الکتروفورز به‌دست نیامد، در نتیجه جدایه‌های مورد بررسی فاقد RNA5 بودند (شکل ۳).

در ادامه برای مشخص شدن نوع تتراد جدایه، پس از همسان‌سازی ژن کدکننده پروتئین P25 از رشته RNA3 ویروس و استخراج پلاسمید نو ترکیب آن، برای تعیین توالی ارسال و با استفاده از نرم‌افزار MEGAX (Kumar *et al.*) (2018) به روش ClustalW هم‌ردیف‌سازی شد. نتایج بررسی چهار اسید آمینه بسیار تغییرپذیر ۷۰-۶۷ (ناحیه تتراد پروتئین RNA3(P25) جدایه‌ها نشان داد که این ناحیه از نوع A67CHG70 است.

### روش اول - نتایج آزمایش‌های بررسی واکنش ارقام چغندر قند به ویروس BNYVV در شرایط گلخانه‌ای

بر اساس نتایج حاصله آزمون الیزا ریشه‌چه ارقام کشت شده در خاک آلوده به ریزومانیا، واکنش ارقام نسبت به این ویروس به‌صورت مقاوم (تیترا ویروس کمتر) یا حساس (تیترا ویروس بیشتر) مشخص شدند. به‌طوری که نتایج تجزیه واریانس آزمایش‌های گلخانه‌ای و آزمایشگاهی نشان داد که بین ارقام از نظر دو صفت غلظت نسبی ویروس (شاخص جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر) و درصد آلودگی ریشه‌ها به ریزومانیا اختلاف معنی‌دار وجود دارد (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین داده‌های شاخص جذب در ریشه ارقام نشان داد که رقم حساس شریف دارای بیشترین میانگین شاخص (۰/۹۳) و دو رقم پیرولا و ایزابلا کمترین میانگین شاخص (۰/۲۷) را دارند، اما این شاخص در ارقام دیگر در دامنه بین ۰/۳۵-۰/۴۸ بود، به‌طوری که ارقام دوروتی (۰/۴۸)، بریجیتا (۰/۴۶)، سینا (۰/۳۹)، آریا (۰/۳۷) و لودوینا (۰/۳۵) به ترتیب از حساس تا مقاوم قرار گرفتند (جدول ۴). نتایج مقایسه میانگین داده‌های درصد آلودگی گیاهچه‌ها نشان داد که رقم شاهد حساس شریف با

گرفتند، به طوری که از نظر مقاومت ارقام بریجیتا (۴۴/۴۴) در (درصد)، دوروتی (۴۱/۱۸) درصد، آریا (۴۲/۸۶) درصد، سینا (۳۶/۸۴) درصد، لودوینا (۲۸/۵۷) درصد) به ترتیب از حساس تا مقاوم قرار گرفتند (جدول ۴).

بیشترین میانگین آلودگی گیاهچه‌ها (۷۰/۵۹ درصد) در مقابل دو رقم پیرولا و ایزابلا کمترین میانگین آلودگی (۲۱/۴۷ درصد) در ریشه‌چه‌ها را نشان دادند. در این بررسی، میانگین درصد آلودگی دیگر ارقام در محدوده بین ۲۸/۵۷ تا ۴۴/۴۴ درصد قرار

جدول ۳ تجزیه واریانس درصد آلودگی گیاهچه‌ها و غلظت ویروس به روش الیزا در ریشه‌چه ارقام

تیمار	درجه آزادی	میانگین مربعات
رقم	۷	OD <sub>405</sub> درصد بوته‌های آلوده ۰/۶۸**
خطای آزمایش	۱۰۴	۰/۰۰۲
CV		۰/۱۱

جدول ۴ مقایسه میانگین ارقام بر اساس درصد آلودگی ریشه و غلظت ویروس با استفاده از روش الیزا

رقم	تعداد بوته‌های مورد آزمون	تعداد بوته‌های آلوده	درصد بوته‌های آلوده	میانگین شاخص جذب کل بوته‌های مایه‌زنی
شریف	۱۷	۱۲	۷۰/۵۹ <sup>a</sup> ± ۱۵/۷۴**	۰/۹۳ <sup>a</sup> ± ۰/۱۹
دوروتی	۱۷	۷	۴۱/۱۸ <sup>d</sup> ± ۱۵/۷۴	۰/۴۸ <sup>b</sup> ± ۰/۱۹
بریجیتا	۱۸	۸	۴۴/۴۴ <sup>b</sup> ± ۱۵/۷۴	۰/۴۶ <sup>bc</sup> ± ۰/۱۹
سینا	۱۹	۷	۳۶/۸۴ <sup>e</sup> ± ۱۵/۷۴	۰/۳۹ <sup>bc</sup> ± ۰/۱۹
آریا	۱۴	۶	۴۲/۸۶ <sup>c</sup> ± ۱۵/۷۴	۰/۳۷ <sup>bc</sup> ± ۰/۱۹
لودوینا	۱۴	۴	۲۸/۵۷ <sup>f</sup> ± ۱۵/۷۴	۰/۳۵ <sup>bc</sup> ± ۰/۱۹
پیرولا	۱۴	۳	۲۱/۴۳ <sup>g</sup> ± ۱۵/۷۴	۰/۲۴ <sup>c</sup> ± ۰/۱۹
ایزابلا	۱۴	۳	۲۱/۴۳ <sup>g</sup> ± ۱۵/۷۴	۰/۲۴ <sup>c</sup> ± ۰/۱۹
میانگین	۱۵/۷۵	۶/۲۵	۳۸/۷	۰/۴۴
LSD			۰/۰۳	۰/۲۲
CV			۱/۸۸	۱/۹۸

\*حروف مشترک در هر ستون، با استفاده از آزمون LSD اختلاف آماری معنی‌دار در سطح پنج درصد ندارند. \*\* انحراف معیار

ویروس توسعه یافته و نقاط به لکه‌های رنگ پریده و متمایل به زرد (شکل ۲-۲) تبدیل می‌شوند. در ادامه بررسی روند توسعه ویروس پس از ۱۲ روز لکه‌های کلروز گسترش بیشتری یافتند و نقاط کلروز در مرکز آنها پدیدار گردید و نکته جالب این که این نقاط حاوی ویروس که در کنار رگبرگ‌های اصلی قرار داشتند به صورت سیستمیک درآمد و در مسیر آوندی حرکت و افزایش غلظت ویروس موجب تغییر رنگ آوندها به زرد روشن (۲-۳) شدند. لازم به توضیح است که این حرکت سیستمیک آوندی منحصر به همان برگ بود و در سایر برگ‌های گیاه هیچ

## روش دوم - نتایج تلقیح مکانیکی برگ با BNYVV

### ۱- تلقیح مکانیکی برگ گیاه محک

در این بررسی برگ‌هایی که ویروس زردی نکروتیک رگبرگ (BNYVV) در آنها سیستمیک شده بود به عنوان مایه اولیه تلقیح مکانیکی روی گیاه محک سلمه استفاده شد. یک هفته بعد از مایه‌زنی مکانیکی قسمت‌های آلوده این برگ‌ها روی برگ‌های جوان گیاه محک اولین علائم به صورت نقاط روشن رنگ پریده (شکل ۱-۲) ظاهر شد. نتایج بررسی نشان داد که پس از گذشت نه روز از تلقیح اولیه، این علائم با تکثیر



برگ‌های سالم گیاه محک، علائم به صورت نقاط کلروز به تعداد محدودی ظاهر می‌شود. این نتیجه نشان می‌دهد که اگرچه غلظت ویروس در این گونه برگ‌ها به شدت کاهش می‌یابد (بر اساس تعداد نقاط کلروز) ولی احتمال بقای آن وجود دارد. لازم به ذکر است که قدرت بیماری‌زایی این ویروس در عصاره گرفته‌شده از برگ‌های آلوده در بافر فسفات ۰/۰۱ با اسیدیته هفت در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته حفظ شد. در نتیجه استفاده از آن برای تلقیح مکانیکی گیاهان بسیار آسان است.

علائمی مشاهده نشد، زیرا این برگ‌ها دو هفته بعد از تلقیح اولیه کاملاً خشک شده و ریزش کردند (شکل ۴-۲). برگ‌های گیاه محک پس از نمایان شدن علائم نقاط کلروز و افزایش غلظت ویروس و قبل از ایجاد بافت نکروز، جمع‌آوری و در دمای منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد برای تحقیقات بعدی نگهداری شدند و جهت حصول اطمینان از حضور ویروس در برگ‌های آلوده واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با رونوشت‌برداری معکوس انجام گردید. تجربیات شخصی نشان داد که حتی با مایه‌زنی مکانیکی مجدد برگ‌های کاملاً نکروز شده روی



**شکل ۲** علائم در برگ گیاه محک سلمه (*C. quinoa*) مایه‌زنی شده با BNYVV: ۱- ظهور علائم نقاط رنگ‌پریده روی پهنک‌برگ هفت روز بعد از مایه‌زنی مکانیکی، ۲- گسترش نقاط رنگ‌پریده حاصل از تکثیر و توسعه ویروس روی پهنک‌برگ، ۹ روز بعد از مایه‌زنی ۳- کلروز، نکروز و سیستمیک شدن در آوندها و تغییر رنگ آوندی، ۱۲ روز بعد از مایه‌زنی، ۴- نکروز و تغییر رنگ آوندی، ۱۴ روز بعد از مایه‌زنی

## ۲- مایه زنی مکانیکی برگ ارقام چغندر قند

نتایج مایه‌زنی مکانیکی ویروس (جدایه تکثیر شده حاصل از تک کلون ویروس روی برگ‌های گیاه سلمه سالم) روی برگ گیاه‌چه‌های ارقام مورد بررسی نشان داد که علائم کلروز یا رنگ‌پریدگی نقطه‌ای پس از ۱۰-۱۲ روز روی سطح برگ‌ها بخصوص در حاشیه رگبرگ‌ها ظاهر می‌شود. زمان ظهور علائم و نوع علائم ایجاد شده در برگ ژنوتیپ‌ها با یکدیگر مشابه بودند. این گونه علائم روی برگ همه رقم مشاهده شد. به عنوان الگو، ظهور این گونه علائم در رقم لودوینا به عنوان شاهد مقاوم (شکل ۳) که بر اساس ادعای شرکت تولیدکننده آنها واجد دو ژن مقاوم به ریزومانیا ( $Rz1 + Rz2$ ) هستند و رقم شاهد حساس شریف بدون ژن مقاوم (شکل ۴) نشان داده می‌شود. حضور این ویروس در سایر برگ‌ها و

ریشه گیاه‌چه‌ها به روش مولکولی مورد بررسی قرار گرفت، اما در بافت اندام‌های یاد شده ردیابی نگردید. این نتیجه نشان داد که سیستمیک شدن این ویروس مختص همان برگ مایه‌زنی شده بوده و ویروس به حالت سیستمیک در کل بوته تبدیل نشده است. نتایج این روش نشان داد که اندام هوایی ارقام مورد بررسی در این مطالعه مشابه رقم شاهد حساس عمل نموده و مقاومتی نسبت به این ویروس بروز نمی‌دهد. این نتیجه نشان می‌دهد که مقاومت  $Rz1$  و یا  $Rz1 + Rz2$  نسبت به ویروس زردی نکروتیک رگبرگ (BNYVV) خاص ریشه بوده و با عکس‌العمل مقاومت برگ‌ها با ظهور لکه‌های موضعی متفاوت است.



شکل ۳ علائم ایجاد شده ناشی از مایه‌زنی مکانیکی BNYVV روی برگ‌های گیاهچه چغندرقد رقم لودوینا در گلخانه: ۱- ظهور اولین علائم نقاط رنگ‌پریده روی پهنک‌برگ ۱۰ روز بعد از مایه‌زنی مکانیکی، ۲- کلروز و سیستمیک شدن ویروس، ۱۷ روز بعد از مایه‌زنی، ۳- علائم نکروز، ۲۰ روز بعد از مایه‌زنی



شکل ۴ علائم ایجاد شده ناشی از مایه‌زنی مکانیکی BNYVV روی برگ‌های گیاهچه چغندرقد رقم حساس شریف در گلخانه: ۱- ظهور اولین علائم نقاط رنگ‌پریده روی پهنک‌برگ ۱۰ روز بعد از مایه‌زنی مکانیکی، ۲- کلروز و توسعه علائم با افزایش غلظت ویروس، ۱۳ روز بعد از مایه‌زنی، ۳- کلروز و سیستمیک شدن، ۱۵ روز بعد از مایه‌زنی، ۴- نکروز لکه‌ها، ۱۷ روز بعد از مایه‌زنی.

## بحث

آب و هوای گرم و خشک ایران، ویروس به‌ندرت می‌تواند در گیاه سیستمیک باشد و علائم این بیماری در مزارع ظاهر شود؛ اما در قسمتی از مزرعه تحقیقاتی واقع در مشهد که رقم حساس شریف در یک کرت شامل شش خط به طول ۵۰ متر کشت شده بود در انتهای کرت که اصولاً شرایط مناسب‌تری از نظر رطوبت و تغذیه برای گیاه فراهم می‌شود گیاهان این قسمت، از شرایط رشد مناسبی برخوردار بودند و علائم خاص بیماری ریزومانیا روی ریشه یا اندام‌های هوایی تا اواخر شهریور ملاحظه نگردید؛ اما با خنک شدن دمای هوا در اواخر تابستان، علائم سیستمیک شدن آن در برگ‌ها به صورت تغییر رنگ رگبرگ‌ها مشاهده شد. برخلاف انتظار

شاخص اصلی شناسایی ویروس زردی نکروتیک رگبرگ (BNYVV) به صورت ظاهری در مزرعه، ایجاد علائم زردی رگبرگ و نکروز شدن آن در برگ‌های چغندرقد است، اگرچه این علائم در مزارع ایران بسیار نادر است. تا مادام و همکاران (Tamada *et al.* 2013) به این نتیجه رسیدند که برخلاف حرکت سریع ویروس در برگ‌ها با تلقیح مکانیکی، حرکت ویروس از ریشه‌های جانبی به اصلی و رسیدن آن به اندام‌های هوایی بسیار کند است زیرا با سد معبرهای زیادی روبرو است. به دلیل

ویروس زردی نکروتیک رگبرگ (BNYVV) به‌طور کلی با درجه آلودگی آن در ریشه گیاهان چغندر قند بررسی می‌شود، اما می‌توان پس از تلقیح مکانیکی برگ، گیاهان چغندر قند آلوده را حداقل تا حدی بر اساس فنوتیپ ارزیابی کرد. ایشان توانست پس از تلقیح مکانیکی با ویروس روی برگ لاین‌های مختلفی از چغندر وحشی، لاین‌های افتراقی برای این ویروس انتخاب کند. تاکنون از روش تلقیح مکانیکی برای غربال مقاومت ارقام در نمونه‌های بسیاری از ویروس‌های دیگر استفاده می‌شود، به‌عنوان مثال از ساختار عفونت‌زای ویروس‌های *Mung bean yellow mosaic virus* (Sudha et al. 2013) و *Mung bean yellow mosaic India virus* (Bag et al. 2014) به ترتیب برای غربال مقاومت ارقام ماش و لوبیا استفاده می‌گردد. یکی از اهداف این پروژه، استفاده از روش مایه‌زنی مکانیکی ویروس برگ‌های ارقام مختلف و غربال ارقام و هیبریدهای اصلاح شده جدید مؤسسه تحقیقات چغندر قند از نظر مقاومت به ویروس بود؛ اما بر اساس نتایج به دست آمده در این بررسی، این روش نتوانست انتظارات ما را برآورده کند. با این حال، مایه‌زنی مکانیکی برگ‌های چغندر قند منجر به بروز علائم موضعی مستقل از ژنوتیپ شد، که نشان می‌دهد، ژن‌های *Rz1* به تنهایی یا هر دو ژن با هم (*Rz1+Rz2*) باعث ایجاد مقاومت خاص در ریشه می‌شوند اما این ژن‌ها در برگ‌ها فعال نبوده و موجب بروز مقاومت نمی‌گردند. بنابراین، نتایج به دست آمده با نتایج محققین دیگر از جمله چیپا و همکاران (2008)، و لیب و همکاران (Liebe et al. 2020)، مطابقت دارد و مقاومت *Rz1* و *Rz1+Rz2* خاص ریشه بوده و متفاوت از مقاومت بافت برگ ارقام است.

ویروس‌های خاک‌زاد متعددی (علاوه بر BNYVV)

از جمله BVQ، BSBV و BBSV روی ریشه چغندر قند ایجاد بیماری می‌کنند و ممکن است به‌صورت آلودگی مخلوط در مزرعه

که می‌بایست اندام‌های هوایی و ریشه در مواجهه با ریزومانیا دچار کندی رشد می‌شدند، چنین علائمی مشاهده نشد اما در ابتدای کرت که رشد بوته‌ها کمتر بود علائم متداول ریزومانیا محدود به ریشه بوده و در اندام‌های هوایی به‌صورت زردی برگ‌ها تظاهر کرد و در هیچ‌یک از بوته‌ها علائم به‌صورت سیستمیک ملاحظه نگردید. برای تکثیر این ویروس از روش تلقیح مکانیکی برگ‌های آلوده چغندر قند سیستمیک یافته روی برگ گیاه محک سلمه استفاده گردید. ظهور علائم روی برگ‌های جوان تلقیح شده گیاه محک مشابه نتایج محققینی بود که اظهار کردند ظهور علائم روی گیاهان محک از نظر زمان و نوع تظاهر علائم متفاوت است به‌طوری که در بعضی از گیاهان محک از جمله *Nicotiana benthamiana* ۱۰ روز پس از تلقیح و سیستمیکی شدن آن علائم کلروز و نکروز دیده نمی‌شود و در *Tetragonia expansa* مشابه *C. quinoa* کلروز به همراه نکروز بعد از ۱۴-۱۰ روز ظاهر می‌شود اما اولین علائم روی این گیاه محک سلمه ۷-۵ روز پس از تلقیح پدیدار می‌شوند (Biancardi and Tamada 2016). سیستمیک شدن ویروس در برگ تلقیح شده گیاه محک با نتایج محققینی که اظهار کردند که حرکت سلول به سلول و گسترش ویروس در مسافت طولانی به گیاه میزبان و ترکیب ژنومی آن بستگی دارد و در گیاهان محک سلمه حرکت سیستمیک رخ نمی‌دهد (Biancardi and Tamada 2016) مطابقت داشت. از سوی دیگر زمان ظهور علائم کلروز به صورت نقاط روشن روی برگ‌های چغندر قند ارقام مختلف (۱۲-۱۰ روز پس از مایه‌زنی) نیز با نتایج دیگر محققینی که اظهار کردند علائم پس از ۸-۶ روز پس از مایه‌زنی برگ‌های چغندر قند ظاهر می‌شود (Biancardi and Tamada 2016) مغایرت داشت. دلایل اصلی این اختلاف‌زمانی در ظهور علائم ممکن است شرایط محیطی گلخانه، سن گیاه و قدرت بیماری‌زایی جدایه باشد.

تامادا (2007) اظهار کرد که اگر چه مقاومت در برابر

ACHG شناسایی شد. این بدان معنی است که در ناحیه تتراد این جدایه جهشی صورت نگرفته است، تاکنون این تتراد از بسیاری از کشورهای از جمله: یونان (Pavli et al. 2011)، ترکیه (Chiba et al. 1994; Kruse et al. 2011)، اسپانیا (Schirmer et al. 2005)، فرانسه (Galein et al. 2013)، بلغارستان، ایتالیا، سوئیس (Koenig et al. 1998) و چین (Zhuo et al. 2015) گزارش شده است. کوتلوک و همکاران (2018) در تحقیقی اظهار کردند که این تتراد در جدایه‌های ترکیه در شرایط گلخانه موجب شکست مقاومت ارقام مقاوم دارای ژن مقاومت *Rz1* شده است. مهرور و همکاران (2009) بیان کردند که این تتراد در همه استان‌های کشور، به خصوص در استان خراسان فراوانی بالاتری نسبت به سایر تترادها دارد. با توجه به غالب بودن این تتراد، احتمال می‌رود که در مناطقی از کشت چغندرقد به‌عنوان یک جدایه شکننده مقاومت عمل کند، اگرچه این موضوع در ایران بررسی نشده است، اثبات آن نیاز به بررسی بیشتر دارد.

نتایج گلخانه‌ای این بررسی نشان داد که طبق انتظار، رقم فاقد ژن مقاومت (شریف) در صد آلودگی (۷۰/۵۹ درصد) و غلظت بالایی از ویروس (OD<sub>405</sub>=۰/۹۳) را نشان می‌دهد در صورتی که ارقامی که دارای فقط یک ژن هستند (آریا، سینا، دوروتی) نسبت به این ویروس تحمل داشته و دامنه متفاوتی از غلظت ویروس را نشان دادند اما برخلاف آنها ارقامی که دارای هر دو ژن مقاومت هستند (پیرولا، ایزابلا و لودوینا) و یا اصطلاحاً مقاومت دوگانه دارند درجات متفاوتی از غلظت را نشان دادند به طوری که رقم لودوینا (OD<sub>405</sub>=۰/۳۵) با اجازه دادن به تکثیر ویروس در ریشه‌چه خود غلظت ویروس بیشتری نسبت به دو رقم دیگر یعنی پیرولا و ایزابلا (OD<sub>405</sub>=۰/۲۴) با درصد آلودگی ۲۱/۴۷ درصد را نشان داد. نتایج به‌دست‌آمده در ارتباط با ارقام پیرولا و ایزابلا با یافته‌های محققین دیگر که اظهار کردند ارقام مقاوم با کاهش تکثیر ویروس

روی ریشه چغندرقد دیده شود (Tamada 2013; Harju 2005). بنا بر بررسی‌های انجام شده توسط مهرور و همکاران (Mehrvan et al. 2009) در ۳/۷ درصد از نمونه‌ها هر سه ویروس BNYVV، BVQ و BBSV را داشته‌اند. از آنجائی که این ویروس‌ها ممکن است روی یکدیگر اثرات متقابل داشته باشند به همین دلیل بر اساس آزمون مولکولی ریشه‌چه‌ها پس از برداشت گیاه چه‌های رقم حساس و ارقام مختلف در گلخانه تنها BNYVV ردیابی و تیپ آن نیز A تشخیص داده شد. این نتیجه با نتایج مهرور و همکاران (2009) که بیان کردند تیپ بیش از ۹۰ درصد جدایه‌های ایران از نوع A است، مطابقت دارد. تیپ B در ایران در سال ۱۳۸۳ توسط سوهی و مالکی گزارش شده است اما تاکنون گزارش دیگری مبنی بر حضور این تیپ در ایران ارائه نشده است. بر اساس اظهار محققین در یک منطقه، فقط تیپ A یا فقط تیپ B حضور خواهد داشت؛ درحالی که آلودگی مخلوط با هر دو تیپ فقط در نواحی مرزی این دو تیپ یافت می‌شود. تشخیص تیپ P ویروس از دو تیپ دیگر از طریق آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن کدکننده پروتئین P26 در RNA5 اضافی BNYVV امکان‌پذیر است (Koenig et al. 1997). تاکنون این تیپ در تعداد محدودی از کشورهای اروپایی از جمله آلمان و فرانسه گزارش شده است (Yilmaz et al. 2016). اگرچه توسط مهرور و همکاران (2009)، نوع P بدون RNA5 از تربت‌حیدریه (خراسان رضوی) و مغان (آذربایجان غربی) گزارش شده است، اما تاکنون این تیپ در نقاط دیگر ایران گزارش نشده است؛ اما گزارش‌های میدانی بسیاری وجود دارد که علائم شدید این بیماری در ارقام مختلف کشت شده در مناطق مختلف ایران از جمله خراسان را نشان می‌دهد. پس از همسانه سازی ژن کدکننده پروتئین P25 (عامل بروز بیماری در چغندرقد)، توالی یابی و هم‌ردیف سازی آن، نوع اسیدآمینوهای بسیار متغیر ناحیه تتراد آن

ارتباط بین مقاومت برگ و مقاومت در ریشه قابل اثبات نیست و تاکنون مکانیسم مقاومت نیز مشخص نشده است (Bornemann 2013). نتیجه این که بر اساس این روش نمی‌توان مقاومت را در گیاهچه‌های ارقام مختلف تشخیص داد و مقاومت در ریشه گیاه کاملاً متفاوت از اندام هوایی است. در نتیجه روش تلقیح مکانیکی برگ‌ها روش مناسبی برای تفکیک مقاومت ارقام در شرایط گلخانه نیست و روش کشت ارقام در خاک آلوده به ویروس با جدایه مشخص، عاری از سایر ویروس‌های همراه با BNYVV و عوامل بیماری‌زا می‌تواند در تعیین مقاومت ارقام نقش بسزایی داشته باشد.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاران بخش‌های گیاه‌پزشکی مؤسسه تحقیقات چغندر قند، تحقیقات چغندر قند و گیاه‌پزشکی خراسان رضوی که ما را در این تحقیق یاری نمودند، قدردانی می‌نمایم.

عامل بیماری در ریشه‌های فرعی و جلوگیری از حرکت آن به داخل ریشه اصلی، موجب کاهش مایه تلقیح اولیه و خسارت حاصل از آن می‌شود (Asher et al. 2002) و ارقامی که هر دو ژن مقاومت *Rz1* و *Rz2* را دارند سطح آلودگی کمتری را در مقابل جدایه‌های شکننده مقاومت نسبت به ارقامی که فقط ژن *Rz1* یا ژن *Rz2* را دارند، نشان می‌دهند (Liu and Lewellen 2007)، کاملاً مطابقت دارد؛ اما با توجه به اینکه رقم لودوینا حامل هر دو ژن یادشده است، می‌بایست کمترین آلودگی را نشان می‌داد ولی از این نظر در رتبه سوم قرار گرفت. اگرچه علائم شلغمی شدن و فشرده‌گی در ناحیه‌ای از ریشه این رقم در مزرعه آلوده مشهود، شکننده بودن مقاومت این رقم را اثبات می‌کند.

در این بررسی، نتایج گرفته شده از گلخانه به روش تلقیح مکانیکی با نتایج آزمون سرولوژیکی کاملاً متفاوت بود. نتایج این بررسی نشان داد که مقاومتی که در ریشه علیه این ویروس وجود دارد با آنچه در برگ‌هاست متفاوت است همان‌طوری که محققین نیز به این نتیجه رسیده بودند که در ژنوتیپ‌های مختلف چغندر قند

### منابع مورد استفاده:

### References:

- Abe H, Tamada T. Association of *Beet necrotic yellow vein virus* with isolates of *Polymyxa betae* Keskin. Japanese Journal of Phytopathology. 1986; 52(2): 235-47.
- Asher MJ, Chwarszczynska DM, Leaman M. The evaluation of rhizomania resistant sugar beet for the UK. Annals of Applied Biology. 2002; 141(2): 101-9.
- Bag MK, Gautam NK, Prasad TV, Pandey S, Dutta M, Roy A. Evaluation of an Indian collection of black gram germplasm and identification of resistance sources to *Mungbean yellow mosaic virus*. Crop Protection. 2014; 61: 92-101.
- Biancardi E, Lewellen RT, De Biaggi M, Erichsen AW, Stevanato P. The origin of rhizomania resistance in sugar beet. Euphytica. 2002;127(3): 383-97.
- Biancardi E, Tamada T. Editors. Rhizomania. Switzerland: Springer International Publishing; 2016.
- Bornemann K. Charakterisierung von resistenzüberwindenden Isolatzen des *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in Zuckerrüben und Stabilität der Resistenz in Abhängigkeit von Umweltbedingungen. Vol. 34. Cuvillier Verlag; 2013.

- Büttner G, Pfähler B, Märländer B. Greenhouse and field techniques for testing sugar beet for resistance to *Rhizoctonia* root and crown rot. *Plant Breeding*. 2004;123(2): 158-66.
- Canova A. Appunti di patologia della barbabietola. *Informatore Fitopatologia*. 1959; 9(20): 390–6.
- Canova A, Giunchedi L, Biancardi E. History and Current Status. In: *Rhizomania* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016 [cited 2018 Jun 12]. p. 29–51. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-30678-0\\_2](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-30678-0_2)
- Chiba S, Miyanishi M, Andika IB, Kondo H, Tamada T. Identification of amino acids of the Beet necrotic yellow vein virus p25 protein required for induction of the resistance response in leaves of *Beta vulgaris* plants. *Journal of General Virology*. 2008; 89(5):1314–23.
- Chiba S, Kondo H, Miyanishi M, Andika IB, Han C, Tamada T. The evolutionary history of Beet necrotic yellow vein virus deduced from genetic variation, geographical origin and spread, and the breaking of host resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2011; 24(2):207-18.
- Clark MF, Adams AN. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*. 1977; 34(3): 475–83.
- Darabi S, Bazrafshan M, Babae B, Mahmoodi SB. Impact of *Rhizomania Virus (Beet necrotic yellow vein virus)* on sugar beet yield and qualitative Characters. *Journal of Applied Researches in Plant Protection*. 2017; 6(3):67-82. (in Persian, abstract in English)
- Galein Y, Champeil A, Escriou H, Richard-Molard M, Legreve A, Bragard C. Evidence for *Beet necrotic yellow vein virus* BNYVV reassortment and diversity of the P25 avirulence gene in France. *Proc Ninth Symp Int Work Gr Plant Viruses with Fungal Vectors*, Obihiro, Hokkaido, Japan, 19-22 August 2013; (2003):1–4.
- Gilmer D, Ratti C. ICTV virus taxonomy profile: *Benyviridae*. *Journal of General Virology*. 2017;98(7):1571
- Harju VA, Skelton A, Clover GR, Ratti C, Boonham N, Henry CM, Mumford RA. The use of real-time RT-PCR (TaqMan®) and post-ELISA virus release for the detection of *Beet necrotic yellow vein virus* types containing RNA 5 and its comparison with conventional RT-PCR. *Journal of virological methods*. 2005; 123(1):73-80.
- Harveson RM, Hanson LE, Hein GL, editors. *Compendium of beet diseases and pests*. St. Paul, MN: APS press; 2009.
- Izadpanah K, Hashemi P, Kamran R, Pakniat M, Sahandpour A, Masumi M. Widespread occurrence of rhizomania-like disease of sugar beet in Fars. *Iranian Journal of Plant Pathology*. 1996; 32(3/4): 200- 206. (in Persian, abstract in English)
- Koenig R, Haeberlé AM, 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. *Archives of virology*. 1997; 142(7): 1499-504.
- Koenig R, Pleij CW, Beier C, Commandeur U. Genome properties of *Beet virus Q*, a new furo-like virus from sugar beet, determined from unpurified virus. *Journal of General Virology*. 1998 Aug 1;79(8):2027-36.

- Koenig R, Lennefors BL. 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. *Archives of virology*. 2000; 145(8):1561-70.
- Kondo H, Hirano S, Chiba S, Andika IB, Hirai M, Maeda T, Tamada T. Characterization of *burdock mottle virus*, a novel member of the genus *Benyvirus*, and the identification of benyvirus-related sequences in the plant and insect genomes. *Virus Research*. 2013;177(1):75-86.
- Kruse M, Koenig R, Hoffmann A, Kaufmann A, Commandeur U, Solovyev AG, Savenkov I, Burgermeister W. Restriction fragment length polymorphism analysis of reverse transcription-PCR products reveals the existence of two major strain groups of *Beet necrotic yellow vein virus*. *Journal of General Virology*. 1994;75(8):1835-42.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 2018; 35(6): 1547-9.
- Kutluk Yilmaz ND, Uzunbacak H, Arli-Sokmen M, Kaya R. Distribution of resistance-breaking isolates of beet necrotic yellow vein virus differing in virulence in sugar beet fields in Turkey. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B- Soil and Plant Science*. 2018; 68(6): 546-54.
- Lewellen RT, Skoyen IO, Erichsen AW. Breeding sugar beet for resistance to rhizomania: Evaluation of host-plant reactions and selection for and inheritance of resistance. In 50. Winter Congress of the International Institute for Sugar Beet Research, Bruxelles (Belgium), 11-12 Feb 1987. IIRB. Secretariat General.
- Liu HY, Lewellen RT. Distribution and molecular characterization of resistance-breaking isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* in the United States. *Plant Disease*. 2007; 91(7): 847-51.
- Liebe S, Wibberg D, Maiss E, Varrelmann M. Application of a reverse genetic system for beet necrotic yellow vein virus to study *Rz1* resistance response in sugar beet. *Frontiers in plant science*. 2020; 10:1703.
- Mahmoudi SB, Norouzi P, Khayamim S, Bazrafshan M, Mansouri H, Ahmadi M, Sadeghzadeh Hemayati S, Aghaezadeh M. Identification of proper maternal parent for producing sugar beet cultivars resistant to major soil borne diseases. *Journal of Sugar Beet*. 2020; 36(1): 1- 13. (in Persian, abstract in English)
- McGrann GR, Grimmer MK, Mutasa-Göttgens ES, Stevens M. Progress towards the understanding and control of sugar beet rhizomania disease. *Molecular Plant Pathology*. 2009; 10(1):129-41.
- Mehrvar 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. *Archives of virology*. 2009 Mar 1;154(3):501-6.
- Meunier A, Schmit JF, Stas A, Kutluk N, Bragard C. Multiplex reverse transcription-PCR for simultaneous detection of *Beet necrotic yellow vein virus*, *Beet soilborne virus*, and *Beet virus Q* and their vector *Polymyxa betae* Keskin on sugar beet. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003;69(4): 2356-60.
- Panella LW, Biancardi E. Genetic resistances. In *Rhizomania 2016* (pp. 195-220). Springer, Cham.

- Pavli O, Prins M, Goldbach R, Skaracis GN. Efficiency of Rz1-based rhizomania resistance and molecular studies on BNYVV isolates from sugar beet cultivation in Greece. *European Journal of Plant Pathology*. 2011;130(2):133-42.
- Ratti C, Clover GR, Autonell CR, Harju VA, Henry CM. A multiplex RT-PCR assay capable of distinguishing *Beet necrotic yellow vein virus* types A and B. *Journal of Virological Methods*. 2005; 124(1-2): 41-7.
- Schirmer A, Link D, Cognat V, Moury B, Beuve M, Meunier A, Bragard C, Gilmer D, Lemaire O. Phylogenetic analysis of isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* collected worldwide. *Journal of General Virology*. 2005; 86(10): 2897-911.
- Sudha M, Karthikeyan A, Nagarajan P, Raveendran M, Senthil N, Pandiyan M, Angappan K, Ramalingam J, Bharathi M, Rabindran R, Veluthambi K. Screening of mungbean (*Vigna radiata*) germplasm for resistance to *Mungbean yellow mosaic virus* using agroinoculation. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 2013; 35(3):424-30.
- Tamada T, Uchino H, Kusume T, Saito M. RNA3 deletion mutants of *Beet necrotic yellow vein virus* do not cause rhizomania disease in sugar beets. *Phytopathology*. 1999; 89(11):1000-6.
- Tamada T. Susceptibility and resistance of *Beta vulgaris subsp. maritima* to foliar rub-inoculation with *Beet necrotic yellow vein virus*. *Journal of General Plant Pathology*. 2007 Feb;73(1):76-80.
- Tamada T, Kondo H, Bouzoubaa S. Pattern of systemic movement of soil-borne plant viruses: evidence obtained from GFP-tagged *Beet necrotic yellow vein virus*. In Proceedings of the Ninth Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors, Obihiro, Hokkaido, Japan, 19-22 August 2013 (pp. 11-14). International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors.
- Tamada T, Kondo H. Biological and genetic diversity of plasmodiophorid-transmitted viruses and their vectors. *Journal of general plant pathology*. 2013 Sep;79(5):307-20.
- Wang Y, Fan H, Wang XB, Li M, Han C, Li D, Yu J. Detection and characterization of spontaneous internal deletion mutants of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA3 from systemic host *Nicotiana benthamiana*. *Virology Journal*. 2011; 8(1):1-9.
- Ward L, Koenig R, Budge G, Garrido C, McGrath C, Stubbley H, Boonham N. Occurrence of two different types of RNA-5-containing *Beet necrotic yellow vein virus* in the UK. *Archives of Virology*. 2007; 152(1):59-73.
- Yilmaz ND, Sokmen MA, Kaya R, Sevik MA, Tunali B, Demirtaş S. The widespread occurrences of *Beet soil borne virus* and RNA-5 containing *Beet necrotic yellow vein virus* isolates in sugar beet production areas in Turkey. *European Journal of Plant Pathology*. 2016 Feb 1;144(2):443-55.
- Zhuo N, Jiang N, Zhang C, Zhang ZY, Zhang GZ, Han CG, Wang Y. Genetic diversity and population structure of *Beet necrotic yellow vein virus* in China. *Virus Research*. 2015; 205:54-62.