چغندرقند/ جلد ۳۷/ شماره ۱/ ۱۴۰۰

بررسی امکان تفکیک ژنوتیپ‌های چغندرقند از نظر مقاومت به ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندرقند (*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[۱]*، سیدباقر محمودی[۲] محسن مهرور[۳]و مژده کاکویی نژاد[۴]

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 چغندرقند از نظر مقاومت به ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندرقند (*beet necrotic yellow vein virus*) بر اساس علائم فنوتیپی در شرایط گلخانه. **چغندرقند، ۳۷(۱): ۹۹- ۱۱۴**

چکیده

در این تحقیق، از دو روش مختلف برای بررسی مقاومت به بیماری ریزومانیا، در ریشه و برگ گیاه چغندرقند 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 ازنظر آماری بین ارقام در صفات میزان غلظت ویروس (بر اساس آزمون الایزا) و درصد آلودگی ریشه گیاه‌چه‌ها اختلاف معنی‌دار وجود دارد؛ به‌طوری‌که 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 ریشه‌چه‌ها نشان دادند. نتایج مایه‌زنی مکانیکی ویروس روی برگ گیاه‌چه‌های ارقام ذکر شده نشان داد که ۱۰ روز پس از مایه‌زنی، علائم به‌صورت نقاط کلروز و نکروز روی برگ همه ارقام ظاهرشده و از این نظر بین ارقام مقاوم و حساس تفاوتی وجود نداشت. مایه‌زنی مکانیکی برگ‌های چغندرقند 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 می باشد.

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

۱- استادیار بخش تحقیقات چغندرقند، 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 چغندرقند 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 چغندرقند سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

CC BY

مقدمه

چغندرقند (*Beta vulgaris* L. *subspecies vulgaris*) توسط طیف وسیعی از عوامل ازجمله قارچ‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها و حشرات موردحمله 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 چغندرقند (Beet necrotic yellow vein virus, BNYVV)؛ 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 چغندرقند در دنیا گسترش‌یافته 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 چغندرقند در کشور (به‌استثنای استان خوزستان) گسترش یافته است (Mehrvar *et al.* 200). 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 چغندرقند 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 قابل‌کنترل نیست. درنتیجه، کنترل ریزومانیا در دنیا صرفاً بر اساس به‌کارگیری ارقام مقاوم به ویروس است (McGrann *et al.* 2009).

ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندرقند، یک ویروس RNAدار 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 چغندرقند در مزرعه ضروری هستند، ولی می‌توان با استفاده از RNAهای یک تا سه (بدون ناقل) روی چغندرقند 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 چغندرقند و تشکیل زخم‌های موضعی بر روی میزبان‌های محک مانند سلمه (*Chenopodium quinoa*) هستند، به‌خصوص پروتئین P25، که مهم‌ترین نقش را درشدت 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 ریبونوکلئیک (RNA۱-۴) هستند. تیپ سومی در فرانسه بنام P گزارش شد که دارای RNA5 بوده و علت شدید بودن بیماری ریزومانیا در این ناحیه را به وجود این اسید ریبونوکلئیک 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) گزارش‌شده است. اگرچه ژنوم RNA1 و RNA2 این ویروس بسیار حفاظت‌شده است، چیبا و همکاران (Chiba et al. 2008) نتیجه گرفتند که ژن کدکننده پروتئین P25 در ژنوم RNA3 ویروس در ژنوتیپ‌های مقاوم چغندرقند 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 ۷۰-۶۷ دیده

می‌شود (Schirmer *et al.* 2005). نتایج تحقیقات نشان داد که پاسخ مقاومت در لاین‌های چغندر وحشی (*Beta vulgaris subsp. maritima*) و همچنین در چغندرقند 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 باقی‌مانده است ولی ایجاد مقاومت ارقام چغندرقند 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. هنگامی‌که 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).

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 ژرم‌پلاسم‌های 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 *B. maritima* شناسایی شد (Lewellen et al. 1987). علاوه بر ژن‌های *Rz1* و *Rz2*، تاکنون ژن‌های مقاومت دیگری مانند *Rz3*، *Rz4* و *Rz5* شناسایی شده‌اند (Panella and Biancardi 2016). این ژن‌های مقاوم در محدود کردن تکثیر و انتقال ویروس در ریشه اصلی نقش دارند (Tamada *et al.* 1999; 2016).

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 چغندرقند با ژنتیک متفاوت به روش مایه‌زنی مکانیکی برگ و ارزیابی مقاومت در ریشه‌چه این ارقام با اندازه‌گیری میزان غلظت ویروس در شرایط گلخانه می باشد.

مواد و روش‌ها

ارزیابی مقاومت ارقام مختلف چغندرقند به ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندرقند در شرایط گلخانه

برای ارزیابی مقاومت در ریشه (کشت در خاک آلوده) و برگ (مایه‌زنی مکانیکی) چغندرقند نسبت به ویروس زردی نکروتیک رگبرگ (BNYVV) در شرایط گلخانه، از هشت رقم تجارتی 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 به‌منظور 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

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 هریک 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 طول‌موج 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 درصد بوته های 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 جمع‌آوری‌شده پس از پاستوریزه کردن آن با ماسه استریل به نسبت ۱:۴ (حجم به حجم) مخلوط و در دو تکرار، داخل گلدان مخلوط شدند. در هر گلدان پنج عدد بذر از هریک از ارقام موردبرر سی کشت شدند (Buttner *et al.* 2004). گلدان‌ها در گلخانه کنترل‌شده در فتوپریود ۱۶ ساعت با دمای ۲۵ درجه نگه‌داری شدند. جهت تقویت رشد گیاهچه‌ها، هر هفته از کود میکرو Bio-green (۲۰-۱۵-۲۰) به نسبت یک گرم در لیتر استفاده شد. سپس به‌منظور تلقیح مکانیکی برگ گیاهچه‌های ارقام چغندرقند، برگ آلوده به ویروس زردی نکروتیک رگبرگ (BNYVV) سیستمیک شده در برگ‌های چغندرقند جمع‌آوری از مزرعه آلوده (ایستگاه تحقیقات طرق- مشهد) و به‌عنوان تیپ وحشی ویروس به کار گرفته شد. پس از جمع‌آوری تعدادی از آنها در دمای منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند و تعدادی دیگر برای تکثیر و افزایش غلظت آن با مایه‌زنی مکانیکی روی برگ‌های گیاه محک سلمه استفاده شد. برای تهیه عصاره آلوده، قسمت‌های کلروز برگ و رگبرگ‌های چغندرقند با استفاده از اسکالپل ضدعفونی شده برش داده و توزین شد. این قطعات در هاون چینی استریل حاوی بافر فسفات سرد (KH_2PO_4 ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۷، ۳۰ گرم در لیتر کربوراندوم) به نسبت ۱ به ۴ (به ازای هر یک گرم چهار میلی‌لیتر از بافر) قرار داده شدند. پس از له کردن کامل و به‌دست آوردن محلول یکنواخت از عصاره آلوده، روی برگ‌های گیاه محک به آرامی مایه‌زنی مکانیکی انجام شد و بعد از پنج دقیقه با اسپری کردن آب مقطر، برگ گیاهان مایه‌زنی شده، شسته شد. در ادامه جهت تلقیح مکانیکی برگ‌های ارقام چغندرقند موردبررسی و داشتن جدایه خالص و یکنواخت از ویروس، تک لکه‌ای که مجزا از سایر علائم روی برگ آلوده گیاه محک سلمه ظاهر شده بود، برش داده شد و این کلونی مجدداً به روش ذکرشده روی برگ‌های سالم از گیاه محک سلمه سالم دیگری مایه‌زنی و به این نحو ویروس با ژنوم یکنواخت تکثیرشده، به دست آمد. پس از ایجاد علائم روی سلمه، این برگ‌ها جمع‌آوری و پنج هفته پس از کشت ارقام چغندرقند موردبررسی در شرایط گلخانه،

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

تعیین مشخصات مولکولی جدایه BNYVV در آزمون گلخانه‌ای

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

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

جدول ۱ ترادف آغازگرهای استفاده‌شده برای ردیابی ویروس‌های BNYVV، BSBV، BVQ

ردیف	آغازگر	توالی'3-'5	طول قطعه (جفت باز)
۱	BN2(1)-F	ACATTTCTATCCTCCTCCAC	۵۴۵
۲	BN2(1)-R	ACCCCAACAAACTCTCTAAC	
۳	BSBV2-F	CTTACGCTGTTCACTTTTATGCC	۳۹۹
۴	BSBV2-R	GTCCGCACTCTTTTCAACTGTTC	
۵	BVQ1-F	GCTGGAGTATATCACCGATGAC	۲۹۲
۶	BVQ1-R	AAAATCTCGGATAGCATCCAAC	

تعیین تیپBNYVV

شناسایی تیپ‌های A و B ویروس از روش مولکولی واکنش دوگانه زنجیره‌ای پلیمراز 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 به‌وسیله جفت آغازگر RhizoA مشخص‌کننده تیپ A و تکثیر قطعه ۱۷۸ جفت بازی به‌وسیله 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 به‌منظور ردیابی تیپ P و به دنبال آن حضور RNA5 ویروس عامل ریزومانیا در نمونه‌های گلخانه‌ای و برگ‌های آلوده سیستمیک شده موردمطالعه 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 RNA3جدایه‌های 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) به‌عنوان الگو با استفاده از آغازگر اختصاصی معکوس (BN3-R) ساخته شد.

جدول ۲ ترادف آغازگرهای استفاده‌شده برای شناسایی تیپ‌های A، B و P و تکثیر ژن کدکننده پروتئین P25 ویروسBNYVV

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

برای تکثیر قطعه ۹۰۶ جفت بازی از RNA ویروس حاوی ژن کدکننده پروتئین P25، از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 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) طراحی‌شده توسط وانگ و همکاران (Wang *et al.* 2011) استفاده شد (جدول ۲). محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، با استفاده از کیت(QIAquick Gel Extraction (Qiagen-Germany بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده آن استخراج و جهت تعیین ترادف به‌صورت خوانش دوطرفه با آغازگرهای عمومی M13، به شرکت ماکروژن کره‌جنوبی 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 (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 می شود. ازجمله شاخص‌های قابل‌اطمینان دیگر آلودگی ریشه، تکثیر ریشه‌های فرعی فراوان و نکروز آوندی در ریشه اصلی است (شکل ۲-۱). برش عرضی ریشه، قهوه‌ای شدن حلقه‌های آوندی تا نوک ریشه را نیز نشان داد (شکل ۳-۱)؛ ازجمله علائم بسیار نادر در مزارع ایران، سیستمیکی شدن ویروس در اندام هوایی است، با رصد کرت‌های آزمایشات بخش تحقیقات چغندرقند خراسان رضوی (ایستگاه تحقیقات طرق) در طول فصل زراعی، در اواخر شهریور علائم سیستمیکی شدن ویروس در اندام هوایی رقم حساس شریف (در ابتدا به‌صورت زردی رگبرگ‌ها و در ادامه به‌صورت نکروز) (شکل ۴-۱) مشاهده شد. این برگ‌ها جمع‌آوری و جهت تلقیح مکانیکی برگ های گیاه محک در شرایط گلخانه مورد استفاده قرار گرفت.

شکل ۱ علائم ویروس زردی رگبرگ نکروتیک چغندرقند (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 پلیمراز 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 BSBV و BVQ (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 چغندرقند دارای علائم کلروز و نکروز در برگ گیاهان جمع‌آوری‌شده از مزرعه نشان داد که هیچ‌یک از ویروس‌های ذکرشده به‌غیراز 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 کشت‌شده 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 پلیمراز 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 ازنظر RNA5 با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد بررسی قرار گرفت و بر اساس آغازگرهای اختصاصی استفاده شده، قطعه ۸۸۶ جفت بازی مورد انتظار، در ژل الکتروفورزی به‌دست نیامد، درنتیجه 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 نوترکیب آن، برای تعیین توالی ارسال و با استفاده از نرم‌افزار MEGAX (Kumar *et al.* 2018) به روش ClustalW هم‌ردیف‌سازی شد. نتایج بررسی چهار اسیدآمینه بسیار تغییرپذیر ۷۰-۶۷ (ناحیه تتراد پروتئین RNA3(P25 جدایه‌ها نشان داد که این ناحیه از نوع $A_{67}CHG_{70}$ است.

روش اول - نتایج آزمایش‌های بررسی واکنش ارقام چغندرقند 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 (تیتر ویروس کمتر) یا حساس (تیتر ویروس بیشتر) مشخص شدند. به‌طوری‌که 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 شاهد 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 ۰/۴۸-۰/۳۵ بود، به‌طوری‌که 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

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

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

تیمار	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		OD_{405}	درصد بوته‌های آلوده
رقم	۷	۰/۶۸**	۳۴۶۴/۹۱**
خطای آزمایش	۱۰۴	۰/۰۸	۰/۰۰۲
CV		۶۸/۹	۰/۱۱

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

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

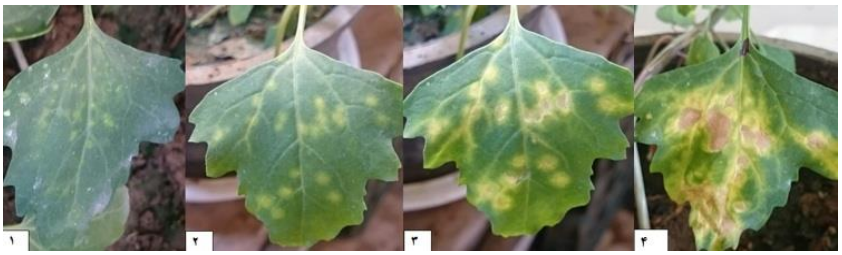
*حروف مشترک در هر ستون، با استفاده از آزمون LSD اختلاف آماری معنی‌دار در سطح پنج درصد ندارند. ** انحراف معیار

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 به‌عنوان 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 به‌صورت نقاط روشن رنگ‌پریده (شکل ۱-۲) ظاهر شد. نتایج بررسی نشان داد که پس از گذشت نه روز از تلقیح اولیه، این علائم با تکثیر ویروس توسعه‌یافته و نقاط به لکه‌های رنگ‌پریده و متمایل به زرد (شکل ۲-۲) تبدیل می شوند. 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 این‌که این نقاط حاوی ویروس که در کنار رگبرگ‌های اصلی قرار داشتند به‌صورت سیستمیک درآمده 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

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 منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد برای تحقیقات بعدی نگه‌داری شدند و جهت حصول اطمینان از حضور ویروس در برگ‌های آلوده واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با رونوشت‌برداری معکوس انجام گردید. تجربیات شخصی نشان داد که حتی با مایه‌زنی مکانیکی مجدد برگ‌های کاملاً نکروز شده روی برگ‌های سالم گیاه محک، علائم به‌صورت نقاط کلروز به تعداد محدودی ظاهر می‌شود. این نتیجه نشان می‌دهد که اگرچه غلظت ویروس در این‌گونه برگ‌ها به‌شدت 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. درنتیجه استفاده از آن برای تلقیح مکانیکی گیاهان بسیار آسان است.



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 چغندرقند

نتایج مایه‌زنی مکانیکی ویروس (جدایه تکثیر شده حاصل از تک کلون ویروس روی برگ‌های گیاه سلمه سالم) روی برگ گیاهچه‌های ارقام موردبررسی نشان داد که علائم کلروز یا رنگ‌پریدگی نقطه‌ای پس از ۱۲-۱۰ 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. این‌گونه 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 می شود. 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 ایجادشده ناشی از مایه‌زنی مکانیکی BNYVV روی برگ‌های گیاهچه چغندرقند رقم لودوینا در گلخانه: ۱- ظهور اولین علائم نقاط رنگ‌پریده روی پهنک‌برگ ۱۰ روز بعد از مایه زنی مکانیکی، ۲- کلروز و سیستمیک شدن ویروس، ۱۷ روز بعد از مایه‌زنی، ۳- علائم نکروز، ۲۰ روز بعد از مایه‌زنی

شکل ۴ علائم ایجادشده ناشی از مایه‌زنی مکانیکی BNYVV روی برگ‌های گیاهچه چغندرقند 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

شاخص اصلی شناسایی ویروس زردی نکروتیک رگبرگ (BNYVV) به‌صورت ظاهری در مزرعه، ایجاد علائم زردی رگبرگ و نکروز شدن آن در برگ‌های چغندرقند است، اگرچه این علائم در مزارع ایران بسیار نادر است. تامادا 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 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 ازنظر 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 به‌صورت تغییر رنگ رگبرگ‌ها مشاهده شد. برخلاف انتظار

که می‌بایست اندام‌های هوایی و ریشه در مواجه با ریزومانیا دچار کندی رشد می شدند، 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 به صورت سیستمیک ملاحظه نگردید. برای تکثیر این ویروس از روش تلقیح مکانیکی برگ‌های آلوده چغندرقند 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 ازنظر زمان و نوع تظاهر علائم متفاوت است به‌طوری که در بعضی از گیاهان محک ازجمله *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 می شود 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 رو شن روی برگ‌های چغندرقند ارقام مختلف (۱۲–۱۰ روز پس از مایه‌زنی) نیز با نتایج دیگر محققینی که اظهار کردند علائم پس از ۸–۶ روز پس از مایه زنی برگ‌های چغندرقند 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 اگرچه مقاومت در برابر ویروس زردی نکروتیک رگبرگ (BNYVV) به‌طورکلی با درجه آلودگی آن در ریشه گیاهان چغندرقند بررسی می‌شود، اما می‌توان پس از تلقیح مکانیکی برگ، گیاهان چغندرقند 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، به‌عنوان‌مثال از ساختار عفونت‌زای ویروس های *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 چغندرقند از نظر مقاومت به ویروس بود؛ اما بر اساس نتایج به‌دست‌آمده در این بررسی، این روش نتوانست انتظارات ما را برآورده کند. با این حال، مایه‌زنی مکانیکی برگ‌های چغندرقند 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 نمی گردند. بنابراین، نتایج به‌دست آمده با نتایج محققین دیگر از جمله چیبا 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) ازجمله BVQ، BSBV و BBSV روی ریشه چغندرقند ایجاد بیماری می‌کنند و ممکن است به‌صورت آلودگی مخلوط در مزرعه

روی ریشه چغندرقند دیده شود(Tamada 2013; Harju 2005). بنا بر بررسی‌های انجام‌شده توسط مهرور و همکاران (Mehrvar *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 گیاه‌چه‌های 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؛ درحالی‌که 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 پلیمراز ژن کدکننده پروتئین P26 در RNA5 اضافی BNYVV امکان‌پذیر است (Koenig *et al.* 1997). تاکنون این تیپ در تعداد محدودی از کشورهای اروپایی ازجمله 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 درنقاط دیگر ایران گزارش نشده است؛ اما گزارش‌های میدانی بسیاری وجود دارد که علائم شدید این بیماری در ارقام مختلف کشت‌شده در مناطق مختلف ایران ازجمله خراسان را نشان می‌دهد. پس از همسانه سازی ژن کد کننده پروتئین P25 (عامل بروز بیماری در چغندرقند)، توالی یابی و هم‌ردیف‌سازی آن، نوع اسیدآمینه‌های بسیار متغیر ناحیه تتراد آن ACHG شناسایی شد. این بدان معنی است که در ناحیه تتراد این جدایه جهشی صورت نگرفته است، تاکنون این تتراد از بسیاری از کشورها ازجمله: یونان (Pavli *et al.* 2011)، ترکیه (Chiba *et al.* 2011; Kruse *et al.* 1994)، 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، به‌خصوص در استان خراسان فراوانی بالاتری نسبت به سایر تترادها دارد. با توجه به غالب بودن این تتراد، احتمال می‌رود که در مناطقی از کشت چغندرقند 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) درصد آلودگی (۷۰/۵۹ درصد) و غلظت بالایی از ویروس (OD_{405}=۰/۹۳) را نشان می‌دهد درصورتی‌که 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 به‌طوری‌که رقم لودوینا (OD_{405}=۰/۳۵) با اجازه دادن به تکثیر ویروس در ریشه‌چه خود غلظت ویروس بیشتری نسبت به دو رقم دیگر یعنی پیرولا و ایزابلا (OD_{405}=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

عامل بیماری در ریشه‌های فرعی و جلوگیری از حرکت آن به داخل ریشه اصلی، موجب کاهش مایه تلقیح اولیه و خسارت حاصل از آن می شود (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 فشردگی در ناحیه‌ای از ریشه این رقم در مزرعه آلوده مشهد، 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 چغندرقند ارتباط بین مقاومت برگ و مقاومت در ریشه قابل‌اثبات 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. درنتیجه روش تلقیح مکانیکی برگ‌ها روش مناسبی برای تفکیک مقاومت ارقام در شرایط گلخانه نیست و روش کشت ارقام در خاک‌آلوده 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 چغندرقند، تحقیقات چغندرقند و گیاه‌پزشکی خراسان رضوی که ما را در این تحقیق یاری نمودند، قدردانی می نمایم.

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 Isolaten 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 Fitopatology. 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

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, Babaee 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. In50. 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, Aghaeezadeh 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* donot 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.