



## بررسی تنوع ژنتیکی و پراکنش ویروس لکه سیاه برگ چغندر قند (*Beet black scorch virus*) در برخی استان‌های ایران

اصغر سمعی<sup>1\*</sup> - محسن مهرور<sup>2</sup> - محمد زکی عقل<sup>3</sup>

تاریخ دریافت: 1396/02/11

تاریخ پذیرش: 1396/04/20

### چکیده

ویروس لکه سیاه برگ چغندر قند (BBSV) یکی از ویروس‌های خاکزاد جدید گزارش شده از مزارع چغندر قند در دنیا است که به لحاظ داشتن علائم مشابه (ریشه ریشی) با ویروس رایزومانی *Beet necrotic yellow veinvirus* و احتمالاً برخی برهمکنش‌های متقابل با این ویروس اهمیت اقتصادی بالایی دارد. به منظور بررسی پراکنش BBSV در مزارع چغندر قند ایران در سال‌های زراعی 1390-1393 در مجموع 309 مورد نمونه ریشه چغندر قند جمع‌آوری گردید. بررسی نمونه‌ها با استفاده از آزمون RT-PCR نشان داد که 147 مورد از 309 کل نمونه‌ها (48 درصد) به این ویروس آلوده بودند. همچنین این ویروس دارای یک قطعه ماهوارهای است که در 30 مورد (10 درصد) از نمونه‌ها ردیابی گردید. بر این اساس وجود ویروس BBSV در مزارع چغندر قند استان‌های خراسان رضوی، شمالی، جنوبی، لرستان، اردبیل، آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، قزوین، همدان، کرمان، کرمانشاه و زنجان تأیید گردید. براساس اهمیت پراکنش جغرافیائی مناطق چغندرکاری و علائم ایجاد شده در گلخانه، 5 جدایه شامل آذربایجان غربی، همدان، خراسان رضوی (مشهد)، خراسان شمالی (شیروان) و کرمانشاه برای بررسی تنوع ژنتیکی انتخاب گردیدند. دو ناحیه مهم شامل پروتئین پوششی و 3'UTR این پنج جدایه با یک جدایه چینی و یک جدایه آمریکائی مورد مقایسه قرار گرفت. در مجموع تحلیل توالی این دو ناحیه نشان داد که جدایه چینی و آمریکائی به یکدیگر شباهت بیشتری دارند تا با جدایه‌های ایرانی. شباهت جدایه‌های ایرانی با جدایه‌های چینی و آمریکائی در هر دو ناحیه حدود 88 درصد بود. در بین جدایه‌های ایرانی میزان شباهت بالا و بین 98 تا 99 درصد بود و تنها جدایه خراسان شمالی (شیروان) با شباهت کمتر در دسته‌ای جدا قرار گرفت. به نظر می‌رسد تفاوت‌ها در ناحیه 3'UTR خیلی مؤثر نبوده و در تمام جدایه‌ها ژنوم ویروس به خوبی بیان و تکثیر می‌گردد. اما در ناحیه پروتئین پوششی تغییرات آمینو اسیدها بخصوص در ناحیه N-terminal در ایجاد علائم و برهمکنش با سایر ویروس‌های خاکزاد تأثیر بسزائی داشته است.

واژه‌های کلیدی: ایران، BBSV، PCR، *Beta vulgaris*

### مقدمه

5). اخیراً نیز در کشورهای دیگر از جمله آمریکا (13 و 14) اروپا (6) و ایران (8) گزارش شده است. BBSV یک ویروس گرد با قطر 28 نانومتر و پروتئین پوششی به وزن 24kDa می‌باشد. ژنوم ویروس RNA مثبت تک لا فاقد cap در انتهای 5' و Poly A در انتهای 3' است. با اینکه ژنوم ویروس BBSV فاقد cap و دنباله PolyA می‌باشد ولی به دلیل داشتن BYDV-cap independent translation elements (CITE) در انتهای 3'UTR ژن‌ها بطور مؤثری در این ویروس ترجمه می‌شوند (12).

ژنوم کامل این ویروس دارای 3644 نوکلئوتید می‌باشد که در 7 چارچوب خوانش باز<sup>4</sup> در جدایه‌های چین و تا 8 چارچوب خوانش باز در جدایه آمریکا جای گرفته است (17).

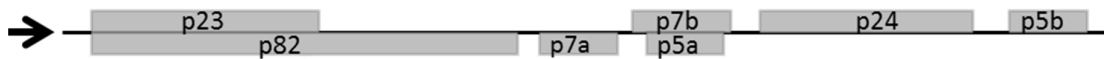
چغندر قند از گیاهان مهم صنعتی و یکی از منابع مهم تولید قند برای بشر است. این گیاه به شدت تحت تأثیر بیماری‌های مختلف بخصوص بیماری‌های ویروسی قرار می‌گیرد. ویروس لکه سیاه برگ چغندر قند (*Beet black scorch virus*) (BBSV) از جنس *Betanecrovirus* و خانواده *Tombusviridae* می‌باشد که اولین بار در اواخر دهه 1980 میلادی با ایجاد علائمی چون سوختگی‌های سیاه در برگ‌ها و نقاط نکروتیک بر روی غده‌ها در چین گزارش شد (1) و

1، 2 و 3- به ترتیب دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، دانشیار و استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(\* - نویسنده مسئول: Email: samiei1243@gmail.com)

DOI: 10.22067/jpp.v31i3.63126

4- Open reading frame(ORF)



شکل 1- قالب‌های خواندنی ژنوم ویروس Beet black scorch virus  
Figure 1- ORFs Of Beet black scorch virus

مختلف از این ناحیه از جدایه‌های ایرانی گزارش شد. اگر چه این موتاسیون‌ها بر روی ساختمان کلی BYDV- CITE که برای ترجمه و تکثیر مؤثر ژنوم مورد نیاز می‌باشد تأثیری ندارد (10).

### مواد و روش‌ها

به منظور بررسی پراکنش BBSV در برخی از مناطق مهم کشت چغندر قند ایران از مزارع چغندر قند استان‌های خراسان رضوی، شمالی، جنوبی، اردبیل، آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، قزوین، همدان، کرمان، کرمانشاه، زنجان و لرستان در مجموع 309 نمونه دارای علائم ریشه ریشی چغندر قند جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها پس از شستشوی کامل و خشک نمودن به آزمایشگاه جهت بررسی منتقل گردیدند.

RNA کل با استفاده از کیت TRI Reagent شرکت سیگما و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید. جهت شناسایی ویروس و قطعه ماهواره‌های آن به ترتیب از آغازگرهای اختصاصی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز RT-PCR استفاده شد. این واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به ترتیب قطعه‌ای به طول 303 نوکلئوتید از انتهای 3'UTR ژنوم اصلی (نوکلئوتید شماره 3341 تا 3644) ویروس و قطعه‌ای به طول 617 نوکلئوتید بر روی قطعه ماهواره‌ای ویروس را تکثیر کرد. به منظور سنتز cDNA از آنزیم MMLV-reverse transcriptase شرکت فرمنتاز مطابق با دستور شرکت سازنده استفاده گردید. در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 5 میکرولیتر از رشته الگو، یک میکرولیتر از هر آغازگر (با غلظت 10 پیکومول)، 5 میکرولیتر بافر واکنش با غلظت 5 برابر، 0/2 میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (5 واحد در میکرولیتر) مخلوط شد. پروفایل دمائی واکنش شامل 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 3 دقیقه به منظور واسرشتی ابتدائی و به دنبال آن 35 چرخه شامل 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه، 50 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه و 72 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در انتها به مدت 5 دقیقه در دمائی 72 درجه سانتی‌گراد برای تکمیل ساخت رشته مکمل استفاده گردید. محصول واکنش در ژل آگارز 1 درصد حاوی DNA Green (Parstous) 5 µg/ml Viewer الکتروفرورز شده، نتایج زیر نور UV و با استفاده از دستگاه (Syngene, UK) Gel documentation مورد بررسی قرار گرفت.

چارچوب خوانش باز شماره 1 پروتئین 23KDa را کد می‌کند که با چارچوب خوانش باز شماره 2 حالت پیوسته خوانی دارد. p23 احتمالاً در اتصال سیستم تکثیری ویروس به غشاء سلولی در سیتوپلاسم نقش داشته باشد (14). ترجمه پیوسته این دو قالب خواندنی پروتئین p82 را کد می‌کند که پروتئین تکثیری ویروس می‌باشد زیرا دارای توالی حفاظت شده GDD-motif است که توالی RNA dependent RNA polymerase (RDRP) در ویروس‌های با ژنوم RNA می‌باشد. این پروتئین بصورت مستقیم از RNA ژنومی ویروس ترجمه می‌گردد (14 و 15).

سه چارچوب خوانش باز همپوشان (ORF3, ORF4, ORF5) در منطقه مرکزی ژنوم قرار دارند که به ترتیب سه پروتئین p7a p5a و p7b را کد می‌نمایند و توسط RNA زیر ژنومی شماره یک<sup>1</sup> بیان می‌گردند. بررسی‌ها نشان می‌دهد که هر کدام از این سه ژن در حرکت موضعی، تجمع RNA ویروس و ایجاد لکه‌های موضعی بر روی برگ‌های *Ch. Amaranticolor* نقش دارند (16). چارچوب خوانش باز شماره 6 در انتهای 3' قرار گرفته و یک پروتئین به وزن 24KDa را کد می‌کند که همان پروتئین پوششی ویروس می‌باشد. این پروتئین توسط RNA زیر ژنومی شماره 2 کد می‌شود. پوشش پروتئینی ویروس علاوه بر نقش حفاظتی از ژنوم در ایجاد واکنش فوق حساسیت، خاموشی ژن و همچنین اختلال در خاموشی ژن میزبان می‌تواند دخالت داشته باشد (16 و 18).

BBSV با ژنوسپوره‌های قارچ *Olpidium brassicae* بصورت ناپایا منتقل می‌شود (7). با اینکه این ویروس در طبیعت فقط بر روی چغندر قند شناسائی شده است اما در شرایط گلخانه بر روی 13 گونه گیاهی از جمله: *Ch. quinoa*, *Beta vulgaris*, *Beta macrocarpa*, *Spinacia oleracea* و در *Lactuca sativa*, *Physalis florissana* و شش گونه توتون ایجاد آلودگی سیستمیکی نماید (3 و 10).

مقایسه توالی انتهائی 3'UTR سیزده جدایه اروپائی این ویروس با جدایه‌های چینی و آمریکائی حاکی از شباهت بسیار زیاد این ناحیه در ایزوله‌های چینی، آمریکائی و اروپائی بود (8). اما در مورد جدایه‌های ایرانی این مقایسه نشان داد که جدایه‌های ایرانی نسبت به جدایه‌های چینی و آمریکائی تنوع ژنتیکی بالاتری دارند. بطوری که در 3'UTR تعداد 56 موتاسیون نوکلئوتیدی دیده شد و حدود 26 توالی

ویروس گزارش شده بود با این تفاوت که در غده‌های چغندر قند آلوده به این ویروس در آمریکا ویروس *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) عامل بیماری رایزومانیا قابل ردیابی نبود. در غده‌های آلوده چغندر قند بررسی شده در این مطالعه آلودگی‌های دوگانه با BNYVV و یا چند گانه با سایر ویروس‌های خاکزاد چغندر قند *Beet virus Q* (BVQ) و *soil born virus* (BSBV) ردیابی گردید علائم ریشه ریشی در غده‌هایی که تنها به BBSV آلوده بودند نشان می‌دهد که این علائم مختص BNYVV نبوده، می‌تواند با آلودگی به BBSV به تنهایی نیز ایجاد گردد. این مطلب می‌تواند در تشخیص بیماری بر اساس علائم، تولید ارقام مقاوم چغندر قند و نیز جلوگیری از خطا در ارزیابی مقاومت ارقام بسیار حائز اهمیت باشد.

توالی نوکلئوتیدی پروتئین پوششی و 3'UTR پنج جدایه ایرانی شامل BBSV-AzGh1، BBSV-Ha1، BBSV-Sh1، BBSV-Msh1 و BBSV-Ksh1 به ترتیب مربوط به استان‌های آذربایجان غربی، همدان، خراسان شمالی (شیروان)، خراسان رضوی (مشهد) و کرمانشاه با توجه به پراکنش جغرافیائی و میزان سطح زیر کشت جهت تعیین روابط خویشاوندی و رسم درخت فیلوژنتیکی به همراه یک جدایه چینی BBSV-N و یک جدایه آمریکایی BBSV-CO با نرم افزار Mega6 مورد آنالیز و تحلیل قرار گرفتند. همچنین توالی آمینو اسیدهای پروتئین پوششی این 7 جدایه نیز با یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفته و فاصله ژنتیکی آنها نسبت به یکدیگر تعیین گردید.

انتهای 3'UTR این ویروس به دلیل نقشی که در بیان و تکثیر کل ژنوم دارد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است زیرا این ویروس بر خلاف بسیاری از ویروس‌های گیاهی در غیاب PolyA در انتهای 3' خود تنها با وجود ساختارهای ثانویه ویژه در این ناحیه قادر به ترجمه و تکثیر می‌باشد. ساختار BYDV-CITE با ساختمان و شکل خاصی که به انتهای 3' ژنوم می‌دهد باعث تسریع و تسهیل بیان و تکثیر ژنوم ویروس می‌گردد (12).

بررسی رابطه فیلوژنتیکی جدایه‌های مختلف BBSV در قسمت 3'UTR (تصویر 3) نشان داد که با وجود اینکه جدایه چینی بعلت قرارگیری در موقیت جغرافیایی نزدیک به ایران بر خلاف تصور که انتظار می‌رفت شباهت بیشتری به جدایه‌های ایرانی این ویروس داشته باشد اما بیشتر به جدایه آمریکایی شباهت داشت و شباهت نوکلئوتیدی بین جدایه‌های ایرانی بیشتر از جدایه چینی و آمریکایی بود. در بین جدایه‌های ایرانی جدایه آذربایجان غربی و کرمانشاه و همچنین جدایه‌های همدان و مشهد کاملاً شبیه یکدیگر بودند و در این بین جدایه شیروان با حدود 98 درصد شباهت در گروه جدایه‌های آذربایجان غربی و کرمانشاه قرار دارد. ولی در کل تفاوت بین جدایه‌های ایرانی از 1/5 درصد بیشتر نبود.

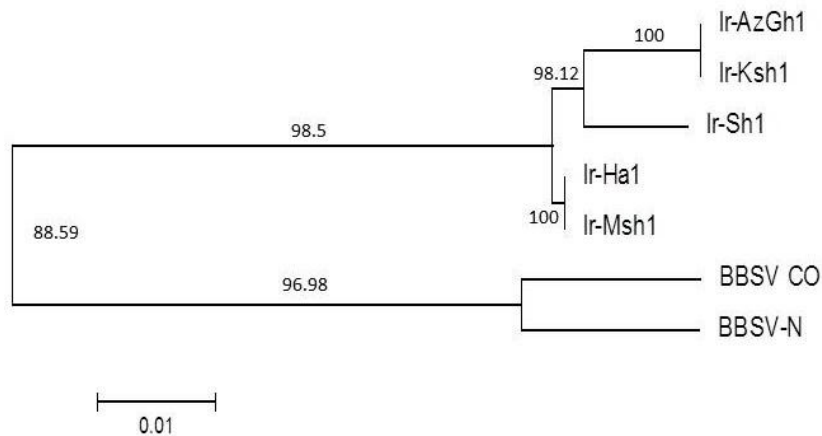
جهت تکثیر ژن پروتئین پوششی و انتهای 3'UTR ویروس BBSV از آغازگرهای اختصاصی BBSV1R و BBSV14F استفاده گردید. آنزیم مورد استفاده در تکثیر این بخش از ژنوم ویروس ترکیب Go Taq PCR Master Mix شرکت Promega بود که در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 2/5 میکرولیتر از رشته الگو، 12/5 میکرولیتر از Master mix، یک میکرولیتر از هر آغازگر (با غلظت 10 پیکومول) و 8 میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استفاده شد. پروفایل دمائی واکنش شامل 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 3 دقیقه به منظور واسرشتی ابتدائی و به دنبال آن 35 چرخه شامل 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه، 50 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه و 72 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در انتها به مدت 5 دقیقه در دمای 72 درجه سانتی‌گراد برای تکمیل ساخت رشته مکمل استفاده گردید. قطعه تکثیر شده به کمک کیت Silica Bead DNA Gel Extraction (Thermoscientific) از ژل استخراج و پس از خالص‌سازی DNA در پلاسمید pDrive همسانه‌سازی گردید. به منظور الحاق محصول PCR حاصله در پلاسمید، 3 میکرولیتر DNA، 1 میکرولیتر پلاسمید، 1 میکرولیتر آنزیم لیگاز در کل محلول 15 میکرولیتر به مدت 12 ساعت در دمای اتاق قرار گرفت سپس پلاسمیدهای نو ترکیب درون سلول‌های باکتریایی مستعد *E. coli* سویه DH5 $\alpha$  تراریخت شدند. باکتری‌های تراریخت شده در محیط کشت حاوی LB+IPTG+X-Gal+Amp. به مدت 12 ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد کشت گردیدند. همسانه‌های حاوی ژن مورد نظر با استفاده از آزمون PCR با کمک پرایمرهای BBSV1F و M13R شناسایی شدند. پلاسمیدهای نو ترکیب پس از خالص‌سازی به روش دستی با فنل و کلروفورم خالص‌سازی و جهت توالی‌یابی به کمپانی سیگما کشور آلمان ارسال شد. ترادف‌های حاصل با برنامه BLASTn در پایگاه اطلاعاتی NCBI با ترادف‌های موجود در بانک ژن مقایسه و آنالیز فیلوژنی توالی‌های نوکلئوتیدی جدایه‌ها با استفاده از نرم افزار Mega6 و به روش Neighbor joining و بر اساس 1000 تکرار ترسیم گردید.

## نتایج و بحث

از مجموع 309 نمونه جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کشور، ویروس BBSV در 147 مورد و قطعه ماهواره‌ای آن در 30 نمونه چغندر قند ردیابی گردید. از نظر علائم برخلاف جدایه‌های چین که ایجاد لکه‌های نکروتیک بر روی برگ‌های آلوده می‌کردند در بازدید از مزارع ایران هیچ گونه لکه‌های سوخته در برگ‌های چغندر قند مشاهده نگردید ولی علائم ریشه ریشی که از نشانه‌های بارز بیماری رایزومانیا نیز می‌باشد در غده‌های آلوده مشاهده گردید (تصویر 2). در جدایه‌های آمریکایی و اروپایی نیز علائم ریشه ریشی در بوته‌های آلوده به



شکل 2- علائم ریشه های چغندر قند آلوده به BBSV در مزارع شهرستان شیروان  
Figure 2- Symptoms of BBSV on sugar beet roots in shirvan farms



شکل 3- درخت فیلوژنتیکی بر اساس مقایسه توالی نوکلئوتیدیهای 3'UTR به روش Neighbor joining  
Figure 3- Phylogenetic tree of BBSV 3'UTR based on Neighbor joining method

آمریکایی در قسمت 3'UTR نسبتاً زیاد است (11/5 درصد تفاوت) ولی به نظر این امر در بیان و یا تکثیر ژنوم ویروس چندان تأثیری نداشته است بنابراین احتمالاً این نوکلئوتیدیهای تغییر یافته، نقش مشابهی در تشکیل ساختار BYDV-CITE داشته باشند.

در کل 273 نوکلئوتید ناحیه 3'UTR جدایه‌های بررسی شده تنها 34 تغییر نوکلئوتیدی مشاهده گردید و این عدد در بین جدایه‌های ایرانی تنها 6 مورد بود. مقایسه تعداد تغییرات در این ناحیه حاکی از آن است که بیشترین تغییرات در  $\frac{1}{3}$  ابتدای 3'UTR اتفاق افتاده است (جدول - 1).

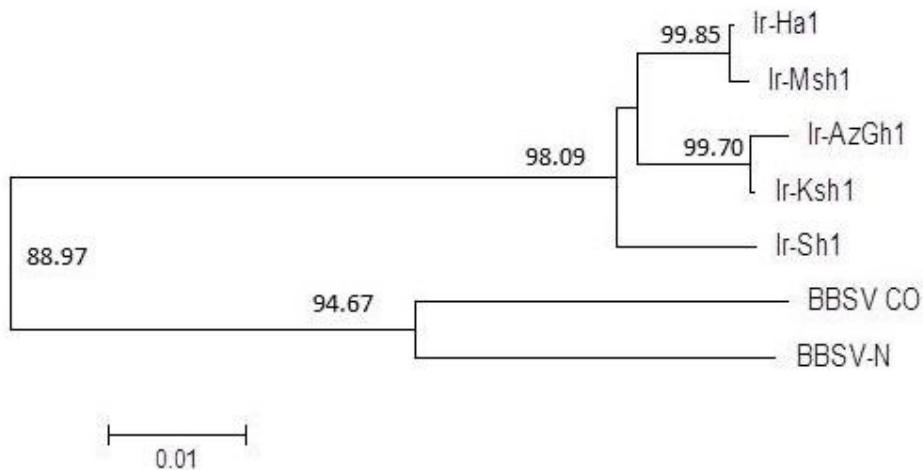
با اینکه فاصله ژنتیکی بین جدایه‌های ایرانی با جدایه چینی یا

جدول 1- اختلاف نوکلئوتیدهای 3'UTR جدایه‌های ایرانی، آمریکایی و چینی  
Table 1- 3'UTR nucleotide differences in Iranian, US and Chinese isolates

	2	2	3	3	3	4	5	5	8	8	7	7	8	9	9	3	4	4	5	5	8	8	8	7	8	8	0	0	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2											
	1	5	2	7	8	1	5	8	7	9	3	9	8	0	8	5	8	9	1	7	2	8	9	0	1	2	0	0	5	7	9	0	7	9																
-Ha1	A	A	A	A	T	A	G	A	T	T	C	G	C	A	G	A	C	T	G	T	G	A	A	G	T	C	C	C	G	A	C	C	T	C																
-Msh1																																																		
-Sh1																																																		
-AzGh1																																																		
-Ksh1																																																		
BBSV CO	T	G	C	C	A	G	A	C	C	C	T	A	T	G	A	G	T	C	C	A	C	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T				
BBSV-N	T	G	C	C	A	G	A	C	C	C	T	A	T	G	A	G	T	C	C	A	C	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T			

داد که جدایه Ha1 و Msh1 با تشابه 99/85 درصد در گروه یک و جدایه‌های AzGh1 و Ksh1 با تشابه 99/70 درصد در گروه دوم قرار دارند و جدایه Sh1 با شباهت 98/09 درصد بصورت جداگانه از دو گروه فوق قرار گرفت. دو جدایه آمریکایی و چینی 94/67 درصد شبیه یکدیگر بودند و با جدایه‌های ایرانی تنها 88/59 درصد شباهت داشتند (شکل 3).

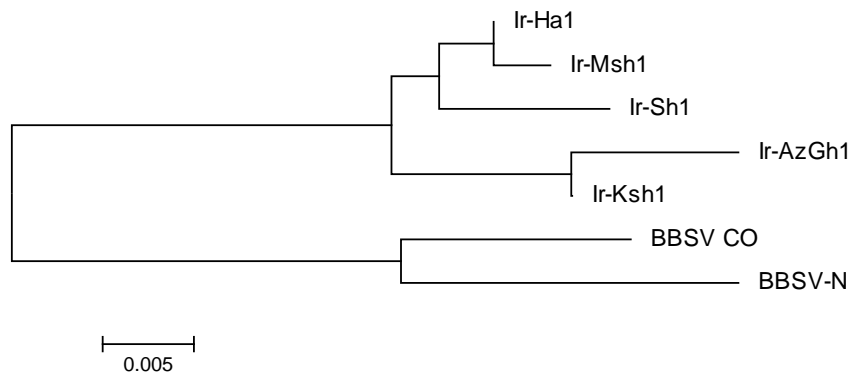
پروتئین پوششی در BBSV علاوه بر نقش حفاظتی از ژنوم می‌تواند در بیماریزایی، افزایش شدت علائم، واکنش فوق حساسیت و اختلال در خاموشی ژن میزبان نیز نقش داشته باشد (16 و 17). لذا توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی چارچوب خوانش باز شماره 6 ژنوم (پروتئین پوششی) نیز مورد بررسی و تحلیل قرار گرفت. مقایسه جدایه‌ها در سطح نوکلئوتیدی پروتئین پوششی نشان



شکل 4- درخت فیلوژنتیکی بر اساس مقایسه توالی نوکلئوتیدی پروتئین پوششی به روش Neighbor joining  
Figure 4- Phylogenetic tree of BBSV coat protein nucleotides based on Neighbor joining method

جدایه‌های فوق نشان داد که جدایه Ha1 و Msh1 با تشابه 99/69 درصد در گروه یک و جدایه‌های AzGh1 و Ksh1 با تشابه 99/07 درصد در گروه دوم قرار دارند و جدایه Sh1 با گروه یک شباهت 98/61 درصد و با گروه دو 97/36 درصد شباهت دارد و در بین دو گروه قرار گرفت. دو جدایه آمریکایی و چینی 96/89 درصد شبیه یکدیگر بودند و با جدایه‌های ایرانی تنها 93/13 درصد شباهت داشتند.

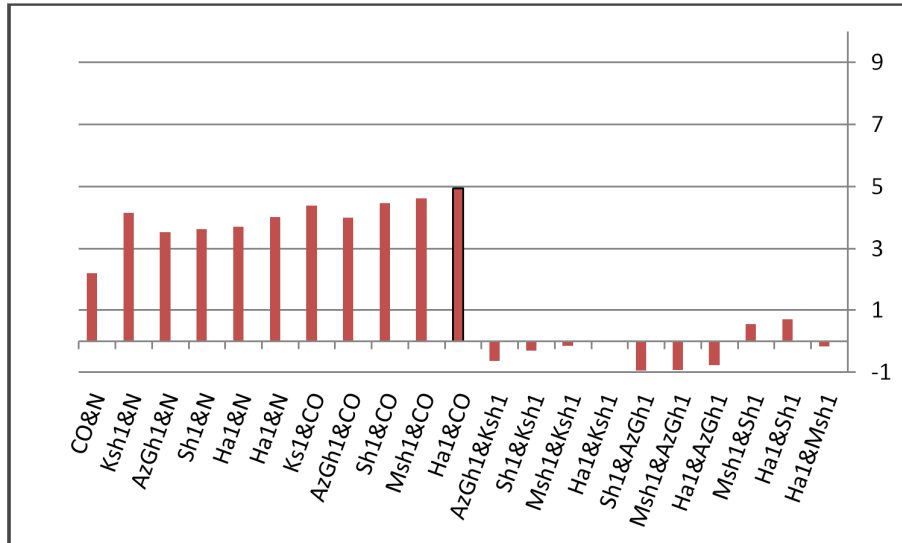
در این مقایسه نوکلئوتیدی جدایه Sh1 بر خلاف مقایسه ناحیه 3'UTR که با جدایه‌های AzGh1 و Ksh1 در یک طبقه قرار گرفته بود به تنهایی جدا از هر چهار جدایه ایرانی قرار گرفت ولی در مجموع شباهت جدایه‌های ایرانی در هر دو ناحیه تفاوت چندانی نداشت. در جدایه‌های چینی و آمریکایی اما 2/31 درصد شباهت پروتئین پوششی در مقایسه با ناحیه 3'UTR کاهش داشت. مقایسه هم‌ردیف‌سازی چندگانه ترادف آمینواسیدی هر یک از



شکل 5- درخت فیلوژنتیکی بر اساس مقایسه توالی آمینو اسیدهای پروتئین پوششی به روش Neighbor joining  
Figure 5- Phylogenetic tree of BBSV coat protein amino acids based on Neighbor joining method

نوکلئوتیدی نشان از افزایش درصد شباهت داشت. این افزایش شباهت نشان می‌دهد که بیشتر موتاسیون‌ها در این ناحیه حالت خاموش (Silent) دارند.

مقایسه این درخت فیلوژنتیکی با درخت فیلوژنتیکی نوکلئوتیدی این ناحیه حاکی از رفتار متفاوت جدایه Sh1- بود به گونه‌ای که در مقایسه آمینواسیدهای این جدایه با جدایه‌های Ha1- و Msh1- نزدیکی بیشتری وجود داشت. مقایسه درصد شباهت جدایه‌ها در سطح آمینواسیدی با سطح



شکل 6- افزایش درصد شباهت بین دو جدایه در سطح آمینو اسیدها با نوکلئوتیدها در پوشش پروتئینی

Figure 6- Increasing the percentage of similarity between the two isolates at the level of nucleotides and amino acids in coat protein

(شکل 6). این بدان معنی است که علی‌رغم تفاوت نوکلئوتیدی جدایه‌های ایرانی و چینی یا ایرانی و آمریکایی ولی آمینواسیدهای پروتئین پوششی آنها به یکدیگر شباهت بیشتری دارند تا هر یک از جدایه‌های ایرانی نسبت به یکدیگر.

مقایسه میزان افزایش شباهت در سطح آمینواسیدها با نوکلئوتیدی ناحیه پروتئین پوششی بین جدایه‌های مختلف نشان داد که بیشترین افزایش شباهت بین جدایه‌های ایرانی و هر یک از جدایه‌های چینی و آمریکایی و بطور میانگین حدود 4/16 درصد بود

BNYVV در جدایه‌های چینی، ایرانی و آمریکایی در جدول 2 مقایسه شده است. با توجه به اهمیت آمینواسیدهای پروتئین پوششی در ایجاد علائم، برهمکنش ویروس- میزبان و ویروس با سایر ویروس‌ها شاید بتوان این تفاوت‌های رفتاری ویروس BBSV را در تفاوت آمینواسیدهای این ناحیه جستجو کرد.

در جدایه چینی مقایسه تغییر آمینواسیدهای پروتئین پوششی نشان داد که تفاوت منحصر به فرد جدایه چینی با جدایه‌های دیگر آمینواسید شماره 12 و 207 است که به ترتیب آمینواسیدهای سرین (S) و ترئونین (T) است که با توجه به اهمیت قسمت N-terminal پروتئین پوششی آمینواسید S12 احتمالاً در ایجاد لکه‌های نکروتیک روی برگ‌های چغندرقد در مزرعه نقش اساسی داشته باشد.

با توجه به اهمیت پروتئین پوششی در برهمکنش بین میزبان و ویروس، تغییرات آمینواسیدها در این پروتئین از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و هر تغییر جزئی در پوشش پروتئینی می‌تواند عامل ایجاد علائم متفاوت در چغندرقد باشد (4 و 16).

مطالعات زیادی نشان داده است که تغییرات پروتئین پوششی در جدایه‌های مختلف یک ویروس باعث ایجاد علائم گوناگون بر روی میزبان می‌گردد و در ویروس BBSV ناحیه N-terminal پروتئین پوششی به لحاظ اینکه در شکل سه بعدی پروتئین پوششی، در قسمت خارجی آن قرار می‌گیرد بطور مستقیم در برهمکنش بین ویروس و میزبان دخالت دارد (2، 11 و 17). مهمترین تفاوت از نظر علائم و همچنین همراهی با ویروس

جدول 2- مقایسه جدایه‌های ایرانی، آمریکایی و چینی از لحاظ علائم و آلودگی دوگانه

Table 2- Compare of Iran, US and Chinese isolates based on symptoms and dual infection

ردیف Row	جدایه (Isolate)	لکه سیاه در مزرعه Black Scorch in field	دیوانگی ریشه (Root proliferation)	همراهی BNYVV (Accompanied by BNYVV)
1	چینی (China)	+	-	-
2	آمریکایی (USA)	-	+	-
3	ایرانی (Iran)	-	+	+

این جدایه در غیاب BNYVV در غده‌های چغندرقد می‌گردد. بویژه آمینو اسید S9 به دلیل قرار گرفتن در ناحیه N-terminal احتمالاً نقش مهم‌تری داشته باشد (جدول 3).

تغییرات منحصر به فرد در جدایه آمریکایی که در جدایه‌های دیگر دیده نمی‌شود آمینواسیدهای شماره 9، 56 و 99 می‌باشد شاید وجود این آمینواسیدها در جدایه آمریکایی باعث ایجاد ریشه ریشی در

جدول 3- مقایسه آمینواسیدهای در پروتئین پوششی جدایه‌های ایرانی، آمریکایی و چینی

Table 3- Compare of Amino acids in coat protein of Iran, US and Chinese isolates

	9	10	12	28	48	56	93	99	145	154	158	176	207
Ir-Ha1	G	R	T	I	S	V	S	I	D	D	T	R	S
Ir-Msh1	G	R	T	I	S	V	S	I	Y	D	T	R	S
Ir-Sh1	G	R	T	I	S	V	S	I	D	D	I	R	S
Ir-AzGh1	G	R	I	V	S	V	S	F	D	D	T	G	S
Ir-Ksh1	G	R	I	I	S	V	S	I	D	D	T	R	S
BBSV-CO	S	K	T	I	T	I	A	V	D	E	T	R	S
BBSV-N	G	K	S	I	T	V	A	I	D	E	T	R	T

قند) غده‌های چغندرقد دارد. علائم ریشه ریشی (رایزومانیا) ممکن است به تنهایی توسط BBSV یا در آلودگی دو گانه دو ویروس BBSV+BNYVV نیز ایجاد شود بنابراین این ویروس را باید در تشخیص‌های مزرعه‌ای با علائم ریشه ریشی در نظر گرفت. از آنجا که ارقام مقاوم مهمترین راه کاهش خسارت ویروس‌های خاکزاد چغندرقد می‌باشند ویروس BBSV در تولید ارقام مقاوم و همچنین در آزمایشات ارزیابی مقاومت ارقام از اهمیت بسزایی برخوردار است.

در بین جدایه‌های ایرانی نیز تغییرات متنوعی دیده می‌شود که احتمالاً مهم‌ترین این تغییرات آمینواسید ایزولوسین I12 در جدایه‌های BBSV-AzGh1 و BBSV-Ksh1 باشد که به دلیل قرار گرفتن در ناحیه N-terminal از اهمیت بسزایی برخوردار است. آمینواسیدهایی که در تمام جدایه‌های ایرانی مشترک بوده و در جدایه‌های چینی و ایرانی تغییر کرده است R10، S48، S93 و D154 می‌باشد.

*Beet black scorch virus* ویروس مهمی در مزارع چغندرقد ایران است و احتمالاً خسارت بالایی در کاهش کمیت و کیفیت (عیار

## منابع

- 1- Cai Z.N., Chen D.H., Wu M.S., Cui X.M., Yu J.L., and Liu Y. 1993. Identification of pathogenic virus of beet black scorch disease and detection by synthesized cDNA probes. *Journal of Beijing Agriculture University*, 19:112.
- 2- Callaway A., Giesman-Cookmeyer D., Gillock E.T., Sit T.L., and Lommel S.A. 2001. The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 39:419-60.
- 3- Cao Y.H., Cai Z.N., Ding Q., Li D.W., Han C.G., Yu J.L., and Liu Y. 2002. The complete nucleotide sequence of Beet black scorch virus (BBSV), a new member of the genus Necrovirus. *Archive of Virology*, 147:2431-2435.
- 4- Cao Y., Yuan X., Wang X., Guo L., Cai Z., Han C., Li D., and Yu J. 2006. Effect of *beet black scorch virus* coat protein on viral pathogenicity. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 33:127-134.
- 5- Cui X.M., Gong Z.X., and Yu N.J. 1988. Studies on two virus isolates from sugar beet in Xinjiang. *Journal of Shihezi Agriculture College*, 10:78.
- 6- González-Vázquez M., Ayala J., García-Arenal F., and Fraile A. 2009. Occurrence of Beet black scorch virus infecting sugar beet in Europe. *Plant Disease*, 93:21-24.
- 7- Jiang J.X., Zhang J.F., Che S.C., Yang D.J., Yu J.L., Cai Z.N., and Liu Y. 1999. Transmission of beet black scorch virus by *Olipidium brassicae*. *Journal of Jiangxi Agriculture University*, 21:525-528.
- 8- Koenig R., and Valizadeh J. 2008. Molecular and serological characterization of an Iranian isolate of Beet black scorch virus. *Archive of Virology*, 153:1397-400.
- 9- Mehrvar M., and Bragard C.G. 2008. Distribution and characterization of Iranian beet black scorch virus. *Proceedings of the seventh symposium of the international working group on plant viruses with fungal vectors*, 1:1-5.
- 10- Mehrvar M., and Bragard C.G. 2009. *Beet black scorch virus* satellite is linked with a single adenine within the virus 3' untranslated region and contains a partial argonaute sequence. *Journal of General Virology*.
- 11- Qu F., Ren T., and Morris T.J. 2003. The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. *Journal of Virology*, 77:511-22.
- 12- Shen R., and Miller W.A. 2007. Structures required for poly (A) tail-independent translation overlap with, but are distinct from, cap-independent translation and RNA replication signals at the 3' end of Tobacco necrosis virus RNA. *Virology*, 35:844-858.
- 13- Weiland J.J., Larson R.L., Freeman T.P., and Edwards M.C. 2006. First report of beet black scorch virus in the United States. *Plant Disease*, 90:828.
- 14- Weiland J.J., Van Winkle D., Edwards M.C., Larson R.L., Shelver W.L., Freeman, T.P., and Liu H.Y. 2007. Characterization of a U.S. Isolate of Beet black scorch virus. *Phytopathology*, 97:1245-54.
- 15- Yuan X., Cao Y., Xi D., Guo L., Han C., Li D., Zhai Y., and Yu J. 2006. Analysis of the subgenomic RNAs and the small open reading frames of Beet black scorch virus. *Journal of General Virology*, 87:3077-86.
- 16- Zhang Y.J., Zhang X.F., Niu S.F., Han C.G., Yu J.L., and Li D.W. 2011. Nuclear localization of Beet black scorch virus capsid protein and its interaction with importin. *Virus Research*, 155:307-15.
- 17- Zhang X.F., Zhao X.F., Zhang Y.J., Niu S.F., Qu F., Zhang Y.L., Han C.G., Yu J.L., and Li D.W. 2013. N-terminal basic amino acid residues of beet black scorch virus capsid protein play a critical role in virion assembly and systemic movement. *Virology*, 10:200.
- 18- Zhao X.F., Wang X.L., Dong K., Zhang Y.L., Hu Y., Zhang X., Chen Y., Wang X.B., Han C.G., Yu J.L. and Li D. 2015. Phosphorylation of Beet black scorch virus coat protein by PKA is required for assembly and stability of virus particles. *Nature.com/Scientific reports*, 5:11585.