نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۸، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳، ص. ۵۷۸-۵۷۳

Journal of Plant Protection
Vol. 28, No. 4, Winter 2015, P. 573-578

بررسی مولکولی شش جدایه ویروس زردی چغندر قند (*Beet yellows virus*) از استان‌های آذربایجان غربی، کرمانشاه و همدان بر اساس ناحیه پروتئین پوششی

محدثه گرامی[1*] - محسن مهرور[2] - سیده عاطفه حسینی[3]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۸/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۵/۱۱

چکیده

ویروس زردی چغندرقند (*Beet yellows virus*, BYV) متعلق به جنس *Closterovirus* و خانواده *Closteroviridae* از مهم‌ترین ویروس‌های چغندرقند به شمار می‌آید که در سراسر دنیا گسترده است. به منظور تعیین برخی از خصوصیات مولکولی این ویروس، در سال ۱۳۹۱ تعداد ۷۵ نمونه برگی دارای علائم از مزارع عمده این محصول در استان‌های آذربایجان غربی، کرمانشاه و همدان جمع‌آوری شد. نمونه‌ها دارای علائمی نظیر زردی، رگبرگ روشنی و ضخیم و شکننده شدن برگ، بودند. نمونه‌های جمع آوری شده توسط آزمون سرولوژیکی الایزا و آزمون مولکولی RT-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. در آزمون الایزا با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی آلودگی در ۶ نمونه تایید شد. قطعه‌ای مربوط به پوشش پروتینی به طول ۶۱۵bp در آزمون مولکولی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده BYV-F/R، تکثیر و در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید. نتایج تعیین توالی و مقایسه توالی‌های بدست آمده با جدایه‌های موجود در NCBI به وسیله نرم افزار DNAMAN7 نشان داد که جدایه‌های تعیین توالی شده دارای ۹۹-۸۹ درصد شباهت با جدایه‌های موجود در بانک ژن هستند. بیش‌ترین درصد شباهت جدایه‌های ایرانی در سطح نوکلئوتیدی (۹۹/۱۹ درصد) و آمینو اسیدی (۹۷/۵۵ درصد)، با جدایه ای از اوکراین (X73476) می‌باشد. آنالیز فیلوژنتیکی جدایه‌ها به وسیله نرم افزار MEGA5 انجام شد که طی آن جدایه‌های ایرانی در کنار جدایه اوکراین در یک گروه قرار گرفتند.

واژه‌های کلیدی: ویروس زردی چغندرقند، آذربایجان غربی، کرمانشاه و همدان، پروتئین پوششی

مقدمه

ویروس زردی چغندرقند (*Beet yellows virus*, BYV)، اولین ویروس شناخته شده در بین مجموعه ویروس‌های عامل زردی در این گیاه می‌باشد (۲ و ۲۴) که دارای گسترش جهانی بوده و چنان‌چه گیاه در مرحله گیاهچه‌ای باشد، بیش از ۶۰ درصد محصول را نابود می‌کند (۱۷). ویروس زردی چغندرقند گونه تیپ جنس *Closterovirus* از تیره *Closteroviridae* و محدود به آوند آبکش می‌باشد (۱۴ و ۱۵). پیکره ویروس، میله‌ای و قابل انعطاف بوده و حدود ۲۵۰ نانومتر طول و ۱۰ نانومتر قطر دارد (۲). ساختار پیکره‌ها دارای زیر واحدهایی است که در اطراف هاله‌ای تو خالی به فواصل حدود ۳/۴-۳ نانومتر مرتب شده‌اند (۱۹).

اسید نوکلئیک ویروس از نوع آر. ان. ای تک رشته‌ای با قطبیت مثبت بوده، با اندازه ۱۴/۵ KB است که حدود ۶-۵ درصد از کل وزن ویروس را تشکیل می‌دهد و شامل نه چارچوب ژنی (ORF) می‌باشد (۷). ORF1a پروتئین ۲۹۵ کیلودالتونی، با ماهیت متیل تراسفرازی و هلیکازی را تولید می‌کند که بزرگ‌ترین محصول ژنومی این ویروس است (۱۰ و ۱۱). ORF1b، RNA-dependent RNA-Polymerase را که یک پروتئین ۵۳ کیلودالتونی است را کد می‌کند (۴). ORF2 ویروس تولید پروتئین ۶/۴ کیلودالتونی را بر عهده دارد که در حرکت سلول به سلول ویروس در گیاه نقش دارد (۷). پلی‌پروتئین ناشی از بیان ORF1a و ORF1b در اثر فعالیت یک پروتئولیتیک ناشناخته به پروتئین‌های عملکردی شکسته می‌شود (۱۳ و ۱۶). ORF3 اولین عضو خانواده پروتئین‌های HSP 70 را که ۶۵ کیلودالتونی است تولید کرده و محصول ORF4 پروتئین ۶۴ کیلودالتونی است که شبیه به توالی پروتئین HSP 90 دارد. ORF5 و ORF6 پروتئین پوششی را کد می‌کنند که به ترتیب ۲۲ و ۲۴ کیلودالتون وزن داشته و در حرکت سلول به سلول ویروس و نیز در مونتاژ ذره ویروس نقش ضروری بر عهده دارند (۱۱). ORF7 و ORF8 پروتئین‌هایی ۲۰ و ۲۱ کیلودالتونی تولید می‌کنند که شبیه به پروتئین همولوگ CTV هستند، که پروتئین ۲۰ کیلودالتونی در حرکت سیستمیک و پروتئین ۲۱ کیلودالتونی به عنوان بازدارنده خاموشی ژن عمل می‌کند (۴ و ۷).

۱ و ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email:Mohadese.gerami@yahoo.com)
۳- استادیار بیماری شناسی گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

جدایه‌های شدیدا بیماری زای BYV, در ابتدا باعث شفاف شدن رگبرگ یا زرد شدن رگبرگ در برگ‌های جوان بوته‌های آلوده می‌شوند. رگبرگ‌های ثانوی و میانی برگ‌ها غالبا فرو رفته و علامت سیاه شدگی را نشان می‌دهند. بافت مربوط به رگبرگ‌ها در برگ‌های بیمار شده در تشکیل برجستگی رگبرگ‌ها نقشی ندارند ولی مزوفیل به طور قابل ملاحظه‌ای ضخیم می‌شود (۱۴).

گستردگی دامنه میزبانی ویروس زردی چغندرقند متوسط است. گرچه حداقل، گونه‌های ۱۵ خانواده و ۱۲۱ گونه از دولپه‌ای‌ها را آلوده می‌کند، ولی اکثر میزبان‌های این ویروس در خانواده‌های *Chenopodiaceae*، *Aizoaceae*، *Amarantaceae* و *Caryophyllaceae* قرار دارند (۷ و ۱۱). گر چه ویروس حداقل توسط ۲۲ گونه شته به طریق نیمه پایا منتقل می‌شود ولی شته سبز هلو (*Myzus persicae*) و شته سیاه باقلا (*Aphis fabae*) از مهم‌ترین ناقلین ویروس عامل زردی چغندرقند هستند. ویروس به روش‌های مکانیکی به سختی منتقل می‌شود و بذر زاد نیست (۱۲، ۲۰ و ۲۲).

در ایران در سال ۱۳۴۸، BYV از چغندرکاری‌های کرج، اراک، کرمانشاه، بروجرد، قزوین و همدان گزارش و اثبات شد (۳) و پس از آن ایزد پناه (۵) این بیماری را در مزارع استان فارس مشاهده نمود.

در میان روش‌های مختلفی که برای شناسایی و بررسی این ویروس وجود دارد، روش‌های مبتنی بر RT-PCR و الایزا دارای دقت بالا بوده و مدت زمانی است که به عنوان روش پایه در شناسایی این ویروس مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۱).

استان آذربایجان غربی بزرگ‌ترین تولید کننده چغندر قند در ایران است، این استان با ۳۴/۷ درصد از کل محصول چغندرقند در کشور دارای بیش‌ترین سهم در تولید این محصول است. استان‌های همدان و کرمانشاه به ترتیب با ۶/۵ و ۳/۸ درصد رتبه‌های چهارم و پنجم را در تولید سالانه کشور دارا هستند (۱). با توجه به این‌که محصول چغندرقند نقش عمده‌ای در تولید قند کشور داشته، و بیماری‌های ویروسی از عوامل مهم خسارت‌زا به محصول چغندر قند می‌باشد از طرفی به دلیل این‌که BYV از ویروس‌های مهم در این گیاه بوده (۲۱) و تا کنون تحقیق جامعی بر روی آن در ایران انجام نشده است (۴)، لذا به منظور شناسایی و بررسی برخی از خصوصیات مولکولی این ویروس در این استان‌ها، که از مناطق مهم چغندرکاری در ایران به شمار می‌روند تحقیق مزبور انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

طی بهار و تابستان سال ۹۱ تعداد ۱۱۵ نمونه مشکوک به آلودگی از مزارع استان‌های آذربایجان غربی تعداد ۳۵ نمونه از شهرستان‌های میاندوآب، سلماس، خوی و بوکان، ۲۰ نمونه از کرمانشاه و ۲۰ نمونه از همدان نمونه‌برداری صورت گرفت. نمونه‌ها دارای علائمی مانند رگبرگ روشنی، زردی، ضخیم و شکننده شدن برگ‌ها و هم‌چنین نقاط نکروتیک بر روی برگ‌ها بودند.

ردیابی BYV در نمونه‌های مشکوک به روش ساندویچ دو طرفه الایزا

ردیابی BYV در نمونه‌های مشکوک، با استفاده از روش DAS-ELISA بر اساس روش کلارک و آدامز انجام گرفت (۸). آنتی‌سرم مورد استفاده در این تحقیق جهت شناسایی ویروس مورد نظر از شرکت DSMZ آلمان تهیه گردید. میزان تغییر رنگ چاهک‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر و با استفاده از دستگاه الایزا خوان (Epson Elisa Reader- LQ2170)ساخت ژاپن اندازه‌گیری و ثبت گردید. نمونه‌هایی که میزان جذب آن‌ها از آستانه محاسبه شده بر اساس فرمول $\bar{X} + 3SD + 10\%\ \bar{X}$ ($\bar{X}$ میانگین جذب سالم) بیش‌تر بود، به عنوان آلوده در نظر گرفته شدند.

مایه‌زنی برروی گیاه محک

مایه زنی مکانیکی در مرحله ۴-۳ برگی گیاه *Chenopodium quinoa* با استفاده از بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۱ مولار با pH ۷ و مقدار کمی پودر کاربوراندوم انجام گرفت. نهایتاً علائم هر یک از گیاهان بعد از ۳-۲ هفته بعداز مایه‌زنی مکانیکی ثبت و آلودگی گیاهان با انجام PCR مورد بررسی و تایید قرار گرفتند.

استخراج آر ان ای کل و آر تی- پی سی آر

برای تکثیر ژن پروتئین پوششی جدایه مورد بررسی، روش آر تی- پی سی آر (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) از جفت آغازگر اختصاصی BYM-F/BYM-R (جدول ۱) که خود طراحی کرده‌ایم، استفاده شد. این جفت پرایمرها برای ساخت کل ORF پوشش پروتئینی (ORF6) است. استخراج آر ان آ کل از بافت گیاهی با استفاده از کیت پرومگا (Promega- USA) بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. در واکنش ساخت رشته مکمل (cDNA)، به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر ،۳ میکرولیتر از آر. ان. ا. کل استخراج شده با ۲ میکرولیتر از آغازگر اختصاصی پسرو (جدول ۱) و ۸/۵ میکرولیتر آب دیونیزه مخلوط و میکروتیوب دردمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰دقیقه قرار داده شد. سپس ۲ میکرولیتر مخلوط dNTPs، ۴ میکرولیتر بافر 5x واکنش و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم نسخه بردار معکوس (Fermentase Reverse Transcriptase) به مخلوط اضافه گردیده و میکروتیوب به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد

ترموسایکلر قرار گرفت (۲۳).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در واکنش با حجم نهایی این واکنش ۲۵ میکرولیتر شامل ۴ میکرولیتر از cDNA، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر، ۲/۵ میکرولیتر PCR buffer ×10، ۱/۷۵ میکرولیتر (۵۰ میلی‌مولار) MgCl2، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTPs و ۰/۲۵میکرولیتر (۵ واحد در میکرو لیتر) Taq DNA Polymerase متعلق به شرکت Fermentase بود. پروفایل دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل یک چرخه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و ۳۰ چرخه شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه در مرحله واسرشت سازی، ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت یک سیکل ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰دقیقه با استفاده از ترموسایکلر (بیومترا–آلمان) انجام گردید.

محصول PCR در ژل آگارز ۱ درصد حاوی ۲ میکرولیتر از Green viwer به همراه سایز مارکر (GenRuler 100pb Plus DNA Ladder Fermentas, Cat No SM: 0321)، الکتروفورز و در نهایت در دستگاه ژل داک (ساخت شرکت GeneFlash ، اوکراین) عکس‌برداری شد. از هر استان چند نمونه آلوده انتخاب و محصول PCR با استفاده از Qiagen PCR purification kit خالص‌سازی شده و جهت تعیین ترادف رفت و برگشتی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد. توالی جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق با توالی جدایه‌های BYV ثبت شده در بانک ژن (NCBI) مقایسه شده و همردیف سازی چندگانه توالی ها توسط نرم افزار DNAMAN7 و MEGA5 آنالیز شد. یابی به وسیله نرم افزارهای DNAMAN7 و MEGA5 آنالیز شده و درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار MEGA 5. و به روش Neighbor joining با ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی Bootstrap رسم شد.

نتایج و بحث

مایه‌زنی مکانیکی روی گیاه محک

گیاهان مایه‌زنی شده *C. quinoa* با عصاره گیاهان دارای علائم و مشکوک به آلودگی ویروسی، بعد از ۱۲ روز علائمی از قبیل لکه‌های نکروتیک موضعی و موزائیک بسیار خفیف را نشان دادند (شکل ۱). از آن‌جایی که انتقال مکانیکی ویروس به سختی رخ می‌دهد (۱۲)، لذا در میان گیاهان مایه زنی شده تنها تعداد کمی از آن‌ها علائم ویروس را نشان دادند.

شکل ۱–لکه‌های نکروزه موضعی درسلمک ۱۲ روز بعد از مایه‌زنی

آزمون الایزا

نتایج حاصل از آزمون الایزا نشان داد که آلودگی در هر سه استان مورد بررسی وجود داشت (جدول ۲).

واکنش آر تی- پی سی آر

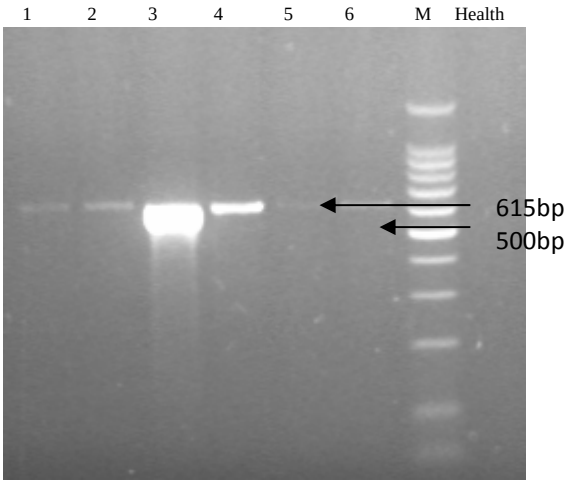
در واکنش آرتی–پی سی آر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن پروتئین پوششی قطعه ای به طول ۶۱۵ جفت باز در نمونه‌های آلوده به BYV تکثیر شد (شکل ۲)، در حالی‌که در نمونه گیاه سالم هیچ‌گونه باندی مشاهده نشد. همانند سازی پروتئین پوششی ویروس در آزمون آرتی– پی سی آر و تائید صحت قطعه همانندسازی شده پس از تعیین توالی تائید کننده آلودگی مزارع چغندرقند به ویروس زردی چغندرقند می‌باشد.

جدول شماره ۱–آغازگرهای اختصاصیBYV مورد استفاده در واکنش RT-PCR

نام آغازگر	توالی	طول	محل اتصال	شماره دسترسی جدایه
BYV_F	5'-ATGGGATCAGCTGAACCTAT-3'	۲۰	۱۳۶۴۰–۱۳۶۵۹	X-73476.1
BYV_R	5'-TCATCTCCCGGTGCCTAGAC-3'	۲۰	۱۴۲۳۵–۱۴۲۵۴	X-73476.1

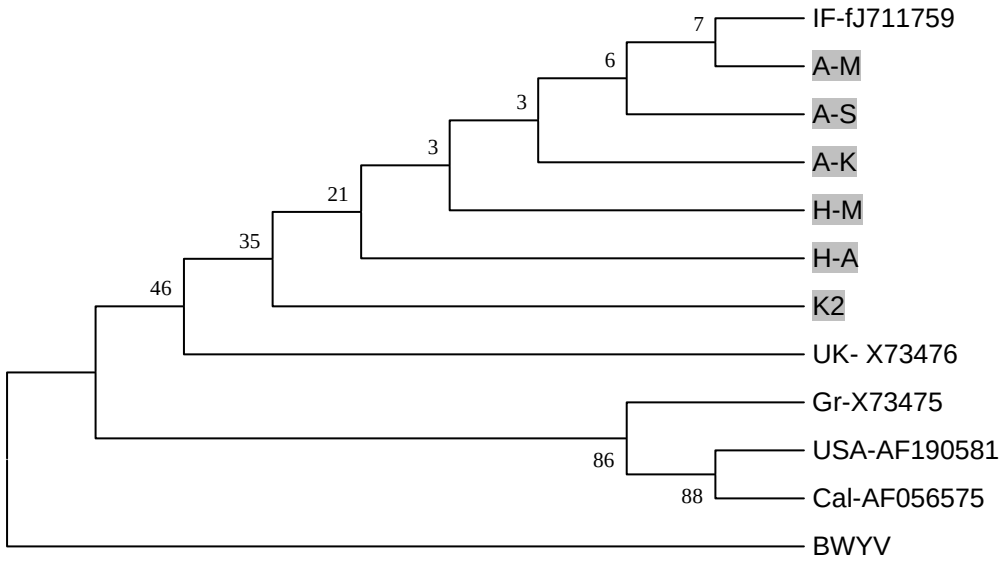
جدول شماره ۲- تعداد نمونه جمع‌آوری شده آلوده به BYV

استان	تعداد کل نمونه	تعداد نمونه آلوده	منطقه نمونه آلوده
آذربایجان غربی	۳۵	۳	خوی–میاندوآب– سلماس
کرمانشاه	۲۰	۱	کرمانشاه
همدان	۲۰	۲	اسد آباد– ملایر



شکل۲- قطعه تکثیر شده به اندازه ٦١٥ bp مربوط به ORF CP جدایه های BYV با استفاده از جفت آغازگر BYV-F/R در نمونه‌های آلوده. در چاهک مربوط به نمونه سالم (گیاهی گلخانه‌ای که خود آن را پرورش داده و در آزمون الایزا سلامت آن را محک زده بودیم) باندی دیده نشد. M مارکر(Fermentas, Cat No SM: 0321) نمونه اسدآباد (۱)، نمونه ملایر (۲)، نمونه میاندوآب (۳)، نمونه خوی (٤)، نمونه سلماس (٥) و نمونه کرمانشاه (٦)

از آن‌جایی که تعیین توالی نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی پروتئین پوششی ابزاری موثر در تعیین تنوع ژنتیکی و فیلوژنتیکی ویروس است (۶)، نتایج حاصل از هم‌ردیف سازی چندگانه توالی قطعه تکثیر شده از جدایه‌های این تحقیق و توالی‌های موجود در بانک ژن نشان داد که قطعه همانندسازی شده در واکنش RT-PCR توالی کامل ژن پروتئین پوششی ویروس زردی چغندرقند است.



شکل۳- درخت فیلوژنتیکی رسم شده برای ژن پوشش پروتئینی ویروس BYV به وسیله نرم افزار MEGA5.2 به روش Neighbor joining با ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی Bootstrap. جدایه BWYV-(EU636990) به عنوان جدایه Out Group به کار برده شده است. جدایه‌های مورد مطالعه داخل کادر خاکستری قرار گرفته‌اند. جدایه آذربایجان غربی-میاندوآب (A-M)، جدایه آذربایجان غربی-خوی (A-K)، جدایه همدان-اسدآباد (H-A)، جدایه همدان-ملایر (H-M)، جدایه کرمانشاه (K2)، جدایه آذربایجان غربی-سلماس (A-S). جدایه اصفهان (IF-FJ711759)، جدایه اوکراین (UK-X73476)، جدایه آلمان (Gr-x73475)، جدایه امریکا (USA-AF190581) و جدایه کالیفرنیا (Cal-AF056575).

بر اساس نتایج حاصله بیش‌ترین شباهت قطعات همانندسازی شده در سطح نوکلئوتیدی (۹۹/۱۹ درصد) و آمینو اسیدی (۹۷/۵۵ درصد) با جدایه ای از اوکراین (X73476) بود. هم‌چنین کم‌ترین شباهت در سطح نوکلئوتیدی (۸۹/۵۴ درصد) و آمینو اسیدی (۹۰/۶۹ درصد) با جدایه ای ار آمریکا (U71295) بود. این نتایج با یافته‌های تابع جماعت و همکاران (۲۳) نیز مطابقت داشت.

بر اساس درخت فیلوژنتیکی، تنوع ژنتیکی توالی‌ها در دو گروه طبقه بندی شده که جدایه‌های ایرانی مورد مطالعه در این پژوهش به همراه جدایه ایرانی گزارش شده از اصفهان (IF-fj711759) (۲۳) به همراه جدایه اوکراین (X73476) در یک گروه قرار گرفته‌اند وجدایه‌های آمریکا، کالیفرنیا و آلمان در گروه مجزا جای گرفتند.

هم ردیف‌سازی چندگانه به وسیله نرم افزار DNAMAN نشان دهنده تغییرات نوکلئوتیدی است منجر به ۳۳ موتاسیون آمینواسیدی (داده‌ها نشان داده شده‌اند) در این جدایه‌ها شده است که بررسی تاثیر این موتاسیون‌ها نیازمند مطالعات گسترده است. البته موتاسیون‌های نوکلئوتیدی بیش‌تر از این تعداد بود که نشان می‌دهد برخی از موتاسیون‌های اتفاق افتاده از نوع موتاسیون خاموش(Synonymos) بوده که تأثیری در نقش پروتئین ندارد.

در توالی آمینواسیدی ژن پوشش پروتئینی ویروس BYV تعداد ۴ آمینو اسید آسپاراژین، آرژنین، گلایسین و آسپاراتات (N، R، G و D) که به ترتیب در موقعیت ۱۱۱، ۱۱۴، ۱۴۵ و ۱۵۶ شمارش آمینواسیدی وجود دارند و در تمام اعضای خانواده *Closteroviridae* نیز محافظت شده‌اند (۲۵). دو آمینواسید R وD در پایداری پیکره ویروس نقش داشته و در واقع این دو آمینواسید با برقراری پل نمکی پیچشی مناسب برای ایجاد حفره میانی ذره ویروس ایجاد کرده که در تمام ویروس‌های رشته‌ای عمومیت دارد (۹). این آمینواسیدهای حفاظت شده، در ساختار پوشش پروتئینی جدایه‌های مورد بررسی در این مطالعه نیز موید این موضوع بوده و با یافته‌های محققان شباهت دارد.

بر این اساس دلایلی از قبیل مهاجرت، موتاسیون‌هایی تصادفی و یا موتاسیون‌هایی در راستای انتخاب طبیعی، ترکیب استرین‌های متفاوتی از ویروس با یکدیگر و ایجاد استرین جدید و تفاوت در میزبان و واریته آن می‌توانند باعث ایجاد تفاوت‌های ژنتیکی در ویروس‌های این خانواده گردند (۱۸).

بر اساس مطالعات دولجا و همکاران (۱۰) نشان داده شد که ۶ ژن از مجموع ژن‌های موجود درژنوم اعضاء خانواده کلسترو ویروس‌ها حفاظت شده بوده (ORF اول تا ششم) و سایر ژن‌ها گوناگونی زیادی در بین و داخل اعضاء جنس‌های مختلف آن دارند که در این تحقیق این تفاوت به طور آشکاری در داخل یک جنس (*Closterovirus*) نشان داده شد (۱۰).

منابع

۱- آمارنامه کشاورزی، ۱۳۹۰-۱۳۸۹، دفتر آمار و فن آوری وزارت جهاد کشاورزی

۲- ارجمند م.ن، ۱۳۷۷، بیماری‌های چغندر قند(۴۴۲-۳۵۷)، در"چغندر از علم تا عمل" تالیف دی.ا.کوک و اسکات، چاپ اول، نشر علوم کشاورزی، تهران.

۳- اسکندری ف.، آل آقا ن.، حجارود ق. و همتی ک. ۱۳۴۸، بیماری‌های چغندرقند در ایران. نشریه شماره ۱۰۶ گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.

۴- ذبیح نیا مقدم ع.، جعفرپور ب.، فلاحتی رستگار م. و گرایلی ن. ۱۳۸۹، بررسی آلودگی و تعیین پراکنش ویروس زردی چغندرقند (BYV) در مزارع خراسان رضوی، حفاظت گیاهان جلد ۲۴، شماره ۳، ۲۵۷-۲۵۲.

۵- ایزدپناه ک. ۱۳۶۱. لیست مشروح بیماری های ویروسی و شبه ویروسی در فارس، جهاد دانشگاهی شیراز، شیراز.

6- Adams M.J., Antoniw J.F., and Fauquet C.M. 2004. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. Archive of Virology, 150:459–479.

7- Agranovsky A.A., and Lesemann D.E. 2000. *Beet yellows virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant viruses: No. 377.

8- Clark M.F., and Adams A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Genetic virology, 34: 475-483.

9- Dolja V.V., Boyko V.P., Agranovsky A.A., and Koonin E.V. 1991. Phylogeny of capsid proteins of rod-shaped and lamentous RNA plant viruses two families with distinct patterns of sequence and probably structure conservation. Virology 184, 79±86.

10- Dolja V.V., Kreuze J.F., and Valkonen J.P.T. 2006. Comparative and functional genomics of *closteroviruses*. Virus Research, 117: 38–51

11- Dolja V.V. 2003. *Beet yellows virus*: the importance of being different. Molecular Plant Pathology 4: 91-98.

12- Duffus J.E. 1973. The yellowing virus diseases of Beet. Virus Research 8: 347-386

13- Erokhina T.N., Zinovkin R.A., Vitushkina M.V., Jelkmann W., and Agranovsky A.A. 2000. Detection of *Beet yellows closterovirus* methyltransferase-like and helicase-like proteins invivo using monoclonal antibodies. Genetic Virology, 81, 597–603.
14- Esau K. 1960. The development of inclusions in sugar beets infected with the *beet yellows virus*. Virology. 11: 317.
15- Esau K. Cronshaw J., and Hoefert L. 1967. Relation of *Beet yellows virus* to the phloem and to movement in the sieve tube. Cell Biology, 32: 71-87.
16- Gushchin V.A., Solovyev A.G., Erokhina T.N., Morozov S.Y., and Agranovsky A. 2013. *Beet yellows virus* replicase and replicative compartments: parallels with other RNA viruses. Microbiology, 4:1-6.
17- Koeijer K.J., and Werf V.W. 1999. Effects of *Beet yellows virus* and *Beet mild yellowing vir*us on leaf area dynamics of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Field Crops Research, 61: 163-177.
18- Rubio L., Guerri J., and Moreno P. 2013. Genetic variability and evolutionary dynamics of viruses of the family *Closteroviridae*. Microbiology, 4.
19- Russell G.E., Bell J. 1963. The structure of *Beet yellows virus* filaments. Virology, 21: 283-284.
20- Smith H.G., and Karasev A., 1991. Homepage of Plant Viruses Online, Descriptions and Lists from the VIDE Database. *Beet yellowsclosterovirus* Available online at http://image.fs.uidaho.edu/vide/descr093.htm.
21- Steven S.M., Hull R., Smith HO. 1997. Comparison of ELISA and RT-PCR for the detection of *Beet yellows closterovirusin* in plant and aphids. Virology Methods, 68:9–16.
22- Sylvester E.S. 1956. *Beet yellows virus* transmission by the green peach aphid. Economic Entomology 49, 789-800.
23- Tabejamaat Z., Massah A., and Ahoonmanesh A. 2013, Molecular Analysis of ORF6, ORF7 and ORF8 of *Beet yellows virus* Iranian Isolate. Phytopathology, 161: 574–577.
24- Watson M.A. 1940. Studies on the transmission of sugar *Beet yellows virus* by the aphid, *Myzuspersicae*. Proceeding of the Royal Society 128:535-52.
25- Zhu H.Y., Ling K.S., Goszczynski D.E., McFerson J.R., and Gonsalves D. 1998. Nucleotide sequence and genome organization of *grapevine leafroll-associated virus-2* are similar to *Beet yellows virus*, the *closterovirus* type member. Genetic Virology, 79, 1289±1298.