

ردیابی ویروس سوختگی سیاه برگ چغندر (*Beet black scorch virus*) و سایر ویروس‌های خاک‌زاد همراه و تعیین برخی خصوصیات مولکولی آنها

جمشید سلطانی ایدلیکی^۱ - محسن مهرور^{۲*} - محمد زکی عقل^۳ - سید باقر محمودی^۴ - منصور صلاتی^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۲/۰۸

چکیده

تاکنون در ایران ویروس‌های خاک‌زاد متعددی از جمله ویروس رگبرگ زرد نکروتیک چغندر (*Beet necrotic yellow vein virus*; BNYYV) و ویروس سوختگی سیاه برگ چغندر (*Beet black scorch virus*; BBSV) و ویروس سوختگی سیاه برگ چغندر (*Beet soil-borne virus*; BSBV) و ویروس Q چغندر (*Beet virus Q*; BVQ) روی ریشه چغندر شناسایی شده است. ویروس رگبرگ زرد نکروتیک چغندر، ویروس اصلی عامل ایجاد سندروم ریشه ریشی (ریزومانیا) است. با اینکه در بررسی‌های انجام‌شده در بعضی از نمونه‌های دارای علائم ریشه ریشی چغندر، هر سه ویروس مذکور و یا تعدادی از آنها همراه BNYYV یافت شده، اما تاکنون علائم سوختگی روی برگ چغندر در هیچ‌یک از مزارع کشت چغندر گزارش نشده است. اخیراً علائم سوختگی روی برگ‌ها و علائمی مشابه ویروس عامل بیماری ریزومانیا روی ریشه برخی از ارقام چغندر در مزارع چغندر استان خراسان رضوی مشاهده شده است. به‌منظور بررسی این موضوع، چغندرهای دارای علائم ریشه‌ریشی و با سوختگی برگ از مزارع مناطق مختلف استان شامل: مشهد، فریمان، چناران، جلگه رخ و جوبن جمع‌آوری و پس از استخراج ریونوکلیتیک‌اسید (RNA) کل آنها، دئوکسی ریونوکلیتیک‌اسید مکمل (cDNA) سنتز شد. با استفاده از واکنش پلیمرز با ترانویسی معکوس در همه نمونه‌ها BBSV ردیابی گردید، اما از سه ویروس خاک‌زاد دیگر تنها BNYYV در نمونه‌های مشهد، جلگه رخ و جوبن ردیابی شد. از بین سه تیپ مختلف BNYYV شناسایی شده در دنیا، جدایه‌های مورد مطالعه از نوع تیپ A تشخیص داده شد. نوع تتراد ویروس ریزومانیا در جدایه‌های مشهد و جلگه رخ از نوع ACHG بوده اما در جدایه جوبن، AHHG بود که در اسیدآمین شماره ۶۸ آن از سیستمین (C) به هیستیدین (H) در پروتئین p25 تغییر یافته بود که می‌توان جدایه را به‌عنوان یک جدایه شکننده مقاومت این ویروس محسوب نمود. در نتیجه کشت متوالی ارقام مقاوم چغندر دارای ژن مقاومت *Rz1* با تغییرات در اسیدآمین‌های ناحیه تتراد پروتئین p25 ویروس، جدایه‌های شکننده مقاومت جدیدی از ویروس ایجاد می‌کند که کشت چغندر را در این مزارع در سال‌های آتی با مشکل جدی مواجه خواهد نمود؛ بنابراین تحقیقات بیشتر در مورد بیماری‌زایی BNYYV و کنترل آن از طریق استفاده از منابع مقاومت جدید و روش‌های کنترل تلفیقی ضروری به نظر می‌رسد. از طرف دیگر اینکه، BBSV در حضور BNYYV موجب تشدید ریشه‌ریشی، نکروز آوندی و سوختگی برگ می‌گردد حال آنکه به‌تنهایی موجب نکروز آوندی در ریشه و سوختگی برگ می‌شود. این مطلب می‌تواند در تشخیص بیماری بر اساس علائم و جلوگیری از خطا در ارزیابی مقاومت ارقام چغندر در مزرعه بسیار حائز اهمیت باشد.

واژه‌های کلیدی: چغندر، ریزومانیا، ویروس سوختگی سیاه برگ چغندر

مقدمه

کشت چغندر در دنیا تحت تأثیر بیماری‌های متعددی از جمله ویروس‌های خاک‌زاد ریشه است. تاکنون ویروس‌های خاک‌زاد

۱- دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد و مربی پژوهشی، بخش تحقیقات چغندر، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران
۲ و ۳- به‌ترتیب دانشیار و استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
* - نویسنده مسئول: (Email: mehrvar@um.ac.ir)

۴- دانشیار، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۵- استادیار، بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران
DOI: 10.22067/jpp.v33i3.75150

خاکزاد چغندر و ویروس Q چغندر که از جنس *Pomovirus* و خانواده *Virgaviridae* هستند، دارای پیکره‌های میله‌ای شکل با ژنوم RNA چندبخشی بوده، در میزبان و ناقل با BNYVV اشتراک دارند و به طور فراوانی در آلودگی‌های توأم در ریشه‌های چغندر قند وجود دارند (۳۶). اگرچه BSBV مستقل از BNYVV است ولی BVQ برای تکثیر به حضور BNYVV نیاز دارد (۷). این دو ویروس برای اولین بار در ایران توسط فرزادفر و همکاران به ترتیب در سال‌های ۱۳۸۱ و ۱۳۸۴ گزارش شدند (۹ و ۱۰). ویروس خاکزاد سوختگی سیاه برگ چغندر، از جنس *Betanecrovirus* و خانواده *Tombusviridae* بوده (۵) و ناقل آن در طبیعت قارچ *Olpidium brassicae* است (۱۹ و ۳۹). این ویروس پیکره‌ای بیست‌وجهی داشته و ژنوم آن RNA تک‌رشته‌ای با سنس مثبت بوده که متشکل از شش قالب باز خواندنی (ORF) است. ژنوم BBSV فاقد CAP و دنباله PolyA است، ولی به دلیل داشتن ساختارهای ثانویه در انتهای 3'UTR عمل تکثیر و ترجمه ژن‌ها به طور مؤثری در آن انجام می‌گیرد (۴۵). این ویروس برای اولین بار در اواخر سال ۱۹۸۰ میلادی در مغولستان و چین شناسایی شد (۳۲). سپس از آمریکا (۵۱)، ایران (۲۳) و برخی کشورهای اروپایی (۱۳) نیز گزارش شد. در مزارع چغندر چین، علائم به صورت ایجاد لکه‌های نکروز شدید به رنگ سیاه روی برگ‌ها و نکروز در ریشه چغندر قند آلوده به این ویروس بروز می‌کند (۵ و ۱۴). جدایه‌های BBSV آمریکا، علائم سوختگی سیاه برگ چغندر قند را نشان نمی‌دهد؛ بلکه این ویروس ظاهراً علائم بیماری ریزومانی مانند تکثیر ریشه‌های فرعی را تشدید می‌کند (۵۱). در اسپانیا نیز در تعدادی از نمونه‌ها علی‌رغم وجود علائم بیماری ریزومانی، ویروس عامل ریزومانی در آن‌ها تشخیص داده نشده و فقط BBSV جداسازی شده است (۱۳). کوپینگ و همکاران برای اولین بار، این ویروس را از مزارع کشت چغندر قند ایران (تربت حیدریه خراسان رضوی) گزارش نمودند (۲۳). این ویروس در حال حاضر در ایران وجود این ویروس در مزارع ده استان دارای کشت چغندر قند (خراسان رضوی، خراسان شمالی، خراسان جنوبی، لرستان، اردبیل، آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، قزوین، همدان، کرمان، کرمانشاه و زنجان) تأیید گردیده است (۴۳). در تحقیقی دیگر، مهرور و همکاران (۱۳۸۸) نشان دادند که بعضی از جدایه‌های این ویروس در مزرعه هیچ‌گونه علائم سوختگی بر روی برگ چغندر قند نشان نداده، اما همراه BNYVV موجب تولید ریشه‌های فرعی فراوان می‌گردد (۳۴). چند سال اخیر در مزارع چغندر قند استان خراسان سوختگی برگی چغندر قند (به خصوص در ارقام حساس به ریزومانی) بیشتر مشاهده می‌شود (مشاهدات نگارندگان). برای مطالعه این موضوع تحقیقی در این زمینه، صورت گرفت که هدف اصلی آن جداسازی و شناسایی ویروس سوختگی سیاه چغندر قند و ویروس‌های همراه آن

مختلفی در دنیا روی ریشه چغندر قند از جمله ویروس رگبرگ زرد نکروتیک چغندر قند (*Beet necrotic yellow vein virus*; BNYVV) (۳)، ویروس موزاییک خاک زاد چغندر قند (*Beet soil-borne mosaic virus* (BSBMV) (۳۱)، ویروس سوختگی سیاه برگ چغندر (*Beet black scorch virus*; BBSV) (۸)، ویروس خاکزاد چغندر (*Beet soil-borne virus*; BSBV) (۱۸) و ویروس Q چغندر (*Beet virus Q*; BVQ) (۱۹ و ۲۲) گزارش شده است. بیماری ریزومانی ابتدا در اوایل دهه ۵۰ میلادی در شمال ایتالیا گزارش شد (۳) و هم‌اکنون در اکثر نواحی کشت چغندر قند در دنیا، گسترش داشته (۳۳) و به عنوان یک بیماری مهم اقتصادی که باعث کاهش شدید عملکرد قند می‌شود، شناخته می‌شود (۲) در آلودگی‌های شدید ناشی از این بیماری روی رقم حساس، عملکرد شکر بین ۵۰ تا ۶۰ درصد و در مواردی تا ۹۰ درصد کاهش می‌یابد (۱ و ۱۵). عامل اصلی این بیماری، ویروس زرد نکروتیک رگبرگ چغندر قند بوده (۴۷) که توسط شبه قارچ *Polymyxa betae* Keskin منتقل می‌شود (۱۱). این ویروس از اعضاء جنس *Benyviridae* و خانواده *Benyviridae* بوده، ذرات آن میله‌ای شکل و دارای ژنوم چند قسمتی (Multipartite genome) است (۴۱). ژنوم ویروس از چهار یا پنج ریونوکلیک اسید تک رشته‌ای مثبت ($ssRNA^+$) تشکیل شده و ۱۲ یا ۱۳ پروتئین را کد می‌نماید (۲۹). اسید ریونوکلیک سوم ویروس به طول ۱۷۷۵ نوکلئوتیدی مسئول ایجاد بیماری زایی در میزبان است (۴۸). پروتئین p25 (۲۵ کیلو دالتون) به‌عنوان مهم‌ترین پروتئین عملکردی RNA3 ویروس در ارتباط با ایجاد علائم و شدت بیماری زایی در ریشه چغندر قند محسوب می‌شود (۳۸). اسید آمینه‌های موقعیت ۶۷-۷۰ به نام تتراد (۴۳) و موقعیت ۱۳۵ (۴۲) این پروتئین بسیار تغییرپذیر هستند. مطالعات مولکولی نشان داده است که جدایه‌های این ویروس در چهار تیپ به نام‌های A، B، P و J گروه‌بندی می‌شوند (۶ و ۴۴). تیپ A و B ویروس از نظر بیماری‌زایی تفاوتی ندارند و تنها تیپ P این ویروس قدرت بیماری‌زایی (حتی در ارقام مقاوم) بالایی دارد (۱۶). این بیماری در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۷۵ توسط ایزدپناه و همکاران از استان فارس گزارش گردید (۱۷) و امروزه تقریباً در تمام مناطق کشت چغندر قند در کشور، گسترش دارد (۲۴). بر اساس تحقیق انجام‌شده توسط مهرور و همکاران در سال ۱۳۸۸، تیپ غالب در ایران از نوع A بوده و در تعداد محدودی جدایه (هشت درصد) تیپ P فاقد RNA5 با تتراد SYHG مشابه جدایه‌های گزارش شده از فرانسه، قزاقستان، انگلستان و آمریکا یافتند (۳۴). ویروس موزاییک خاک زاد چغندر قند مشابه BNYVV، از جنس *Benyviridae* و خانواده *Benyviridae* بوده و ناقل مشترکی با آن دارد. این ویروس تاکنون به غیر از آمریکا از سایر نقاط دنیا بخصوص ایران گزارش نشده است (۳۵). ویروس

از جمله BNYVV، BVQ و BSBV در نمونه‌های چغندر قند استان خراسان رضوی و تعیین برخی خصوصیات مولکولی آن‌ها بود.

پ75 در RNA2 ویروس BNYVV، جفت آغازگر BSBV2 که قطعه ۳۹۹ جفت بازی از RNA2 ویروس BSBV و جفت آغازگر BVQ1 که قطعه ۲۹۲ جفت بازی از RNA1 ویروس BVQ را تکثیر می‌کنند (جدول ۱)، انجام شد. این آزمون با استفاده از دو میکرولیتر از cDNA ساخته شده به عنوان الگو، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس (هر یک با غلظت ۱۰ میکرومولار) و ۱۲/۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش Taq DNA Polymerase Master Mix Red-Ampliqon در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. چرخه دمایی این آزمون شامل: واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه، ۳۵ چرخه متوالی شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگر ۶۳ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای دو دقیقه و در نهایت مرحله گسترش نهایی برای پنج دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود.

برای ردیابی BBSV در نمونه‌های مورد مطالعه، cDNA با کیت RevertAid Reverse Transcriptase و با استفاده از آغازگر Random hexamer primer (شرکت دنا زیست) ساخته شد. آزمون زنجیره‌ای پلیمرز تکی برای تکثیر قطعه ۳۰۵ نوکلئوتیدی ناحیه انتهای 3'UTR ژنوم، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی BBSV-f و BBSV-r (جدول ۱) با کیت Master Mix Red-Ampliqon انجام شد. این آزمون با برنامه دمایی شامل: سه دقیقه به منظور واسرشتگی ابتدائی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و به دنبال آن ۴۰ چرخه شامل: ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در انتها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای تکمیل ساخت رشته مکمل، اجرا شد.

مواد و روش‌ها

استخراج اسید ریبونوکلئیک کل

استخراج اسید ریبونوکلئیک کل از ریشه‌های چغندر قند دارای علائم ریشه ریشی و یا سوختگی برگ جمع‌آوری شده از مزارع مناطق مشهد، فریمان، چناران، جلگه رخ و جوین با کیت استخراج (RNeasy Mini Kit) شرکت کیاژن بر اساس پروتکل شرکت سازنده (QIAGEN-Germany) انجام شد. پنج میکرولیتر از آن برای بررسی‌های کمی کیفی در معرض ژل الکتروفورز قرار گرفت.

شناسایی ویروس‌های همراه با BBSV در نمونه‌های

جمع‌آوری شده

برای ردیابی مولکولی ویروس‌های BVQ، BSBV و BNYVV که ناقل مشترک (*Polymyxa betae*) دارند، از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با ترانویسی معکوس چندگانه (MultiplexRT-PCR) پیشنهاد شده توسط مونی و همکاران (۱۳۸۲) استفاده شد (۳۶). در این روش برای سنتز cDNA از کیت یک مرحله‌ای RevertAid Reverse Transcriptase بر اساس پروتکل شرکت سازنده آن (Thermo Scientific-USA) و با استفاده از سه آغازگر برگشتی اختصاصی مربوط به هر ویروس، استفاده شد. پس از آن، آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با ترانویسی چندگانه با استفاده از سه جفت آغازگر مستقیم و معکوس اختصاصی طراحی شده توسط مونی و همکاران (۱۳۸۲) شامل: جفت آغازگر BNYVV2 که قطعه ۵۴۵ جفت بازی از ژن کد کننده پروتئین

جدول ۱- آغازگرهای اختصاصی استفاده شده جهت ردیابی ویروس‌های *Beet necrotic yellow vein virus*، *Beet soil-borne virus*، *Beet virus Q* و *Beet black scorch virus* در ریشه چغندر قند

Table 1- Specific primers pairs used for detection of *Beet necrotic yellow vein virus*، *Beet soil-borne virus*، *Beet virus Q* and *Beet black scorch virus* in sugar beet root

آغازگر Primer	توالی / به ۳' Sequence (5' to 3')	طول قطعه Amplification length	منبع Reference
BNYVV2-F	ACATTTCTATCCTCCTCCAC	545bp	36
BNYVV2-R	ACCCAACAAACTCTCTAAC		
BSBV2-F	CTTACGCTGTTCACTTTTATGCC	399bp	
BSBV2-R	GTCCGCACTCTTTTCAACTGTTC	292bp	
BVQ1-F	GCTGGAGTATATCACCGATGAC		
BVQ1-R	AAAATCTCGGATAGCATCCAAC		
BBSV-f	ATTAGATCCCACATCCTGGTGTGGTTAATC	305bp	35
BBSV-r	GGCACCTGGAAGACCAGGTATATAAG		

شناسایی تیپ‌های BNYVV

پس از استخراج اسید ریبونوکلیئیک کل، cDNA ویروس با استفاده از آغازگر Oligo dT-20 (شرکت دناریست) و کیت Easy™ cDNA Synthesis Kit بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده آن (پارس طوس) به‌عنوان الگو ساخته شد. به منظور شناسایی تیپ A و B ویروس BNYVV، از روش واکنش زنجیره‌ای چندگانه DuplexRT-PCR استفاده شد. در این واکنش از دو جفت آغازگر اختصاصی RhizoA (تکثیر قطعه ۳۲۴ جفت بازی مشخص‌کننده

تیپ A) و RhizoB (تکثیر قطعه ۱۷۸ جفت بازی بیانگر تیپ B) که ناحیه Triple Gene Block (TGB) از قطعه RNA2 ویروس را تکثیر می‌کنند (۴۰)، استفاده شد (جدول ۲). به‌منظور ردیابی تیپ P و به دنبال آن حضور RNA5 ویروس عامل ریزومانیا، از آغازگرهای اختصاصی BNYVV5 طراحی شده توسط شیمر و همکاران (2005) که ناحیه کد شونده P26 در قطعه RNA5 به طول ۸۸۶ جفت بازی را تکثیر می‌کند (۴۴)، استفاده شد (جدول ۲).

جدول ۲- ترادف آغازگرهای استفاده شده در این بررسی برای تفکیک تیپ‌های A، B و P ویروس BNYVV

Table 2- Specific primers pairs which used for detection of BNYVV types A, B and P

آغازگر Primer	توالی ۵' به ۳' Sequence (5' to 3')	طول قطعه Amplification lenght	منبع Refrence
RhizoA-f	TAATAGTATCACTGTTACAACGATTAAGA	324 bp	40
RhizoA-r	GTCACCTCTTTTACCATTATATCAG		
RhizoB-f	TTGGGCAGCAACTTA	178 bp	
RhizoB-r	ACGGTGAGTACAACATACTGA		
BNYVV5-f	GTTTTCCGGTCCGAGCACAAG	886 bp	44
BNYVV5-r	CGAGCCCGTAAACACCCGATA		

محصولات همه واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز صورت گرفته در این مطالعه در ژل آگارز یک و نیم درصد رنگ‌آمیزی شده با گرین ویور (TMDNA Green Viewer) (شرکت پارس طوس - ایران) با غلظت یک میکرولیتر در میلی‌لیتر با استفاده از دستگاه الکتروفورز Bio-Rad، ساخت شرکت PowerPac™ Basic Power) USA، از هم جدا شدند. پس از آن با استفاده از دستگاه Gel-Doc (AlphaImager Mini System)، از ژل حاوی باندهای تفکیک‌شده عکس‌برداری و سپس آن‌ها با استفاده از کیت (QIAquick Gel Extraction) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده آن (کیژن) خالص‌سازی گردیدند.

تکثیر ژن کد کننده پروتئین p25 از ژنوم RNA3 ویروس BNYVV

cDNA رشته RNA3 دو جدایه BNYVV با استفاده از کیت رونوشت برداری با ترانویسی معکوس PrimeScript™ Reverse Transcriptase بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده آن (Takara) به‌عنوان الگو ساخته شد. برای تکثیر قطعه RNA3 ویروس، از آزمون پلیمرز زنجیره‌ای با استفاده از کیت PrimeSTAR GXL DNA Polymerase شرکت تاکارا و بر اساس دستورالعمل سازنده آن و یک جفت آغازگر اختصاصی مستقیم و معکوس طراحی شده توسط پیفرمنج (2007) که قطعه‌ای به طول ۹۰۶ جفت بازی را تکثیر می‌کند، انجام شد (جدول ۳).

جدول ۳- ترادف آغازگرهای اختصاصی استفاده شده برای تکثیر ژن p25 واقع در RNA3 ویروس BNYVV

Table 3- Specific primer pairs used for amplification of BNYVV RNA3 (p25 gene)

آغازگر Primer	توالی ۵' به ۳' Sequence (5' to 3')	طول قطعه Amplification lenght	منبع Refrence
BNYVV3-F	TCGGAATATACAAGGTTTAAAAG	906bp	38
BNYVV3-R	GTCCCAACCAGATCAACAA		

برای انجام این واکنش به چهار میکرولیتر از محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با انتهای صاف هر ویروس به‌عنوان الگو، یک میکرولیتر از آنزیم TaqDNA polymerase (5u/μl)، شش‌دهم میکرولیتر از MgCl₂ (25 mM)، یک میکرولیتر بافر PCR Buffer 10x، دو میکرولیتر dATP (1mM) اضافه شد. در ادامه،

واکنش آدنین‌دار کردن (A-Tailing) رشته RNA3 ویروس BNYVV

برای آدنین‌دار کردن رشته تکثیرشده با انتهای صاف (Blunt end) ژن کد کننده پروتئین p25 (۹۰۶ جفت بازی) در رشته RNA3 سه جدایه BNYVV از روش کوبز و همکاران (1988) استفاده شد.

توسط مهرور و همکاران در ۳/۷ درصد از نمونه‌ها هر سه ویروس BNYVV، BVQ و BBSV موجود بودند و در هیچ‌یک از نمونه‌ها ویروس BSBV به همراه BBSV نبوده است که دلیل آن ممکن است رقابت دو ویروس بر سر اشغال سایت‌های تکثیری در میزبان باشد (۳۴). بر این اساس از پنج منطقه کشت چغندر قند استان خراسان رضوی با علائم متفاوت در اندام‌های هوایی و ریشه جمع-آوری (شکل ۱) و برای ردیابی این ویروس‌ها و تعیین برخی خصوصیات آن‌ها تلاش گردید.

در نمونه‌های برگ و ریشه‌های چغندر قند، با استفاده از آزمون پلیمرز زنجیره‌ای چندگانه، آلودگی‌های دوگانه با BNYVV و یا چندگانه با سایر ویروس‌های خاک زاد چغندر قند BVQ و BSBV مورد بررسی قرار گرفتند. از الکتروفورز محصول آزمون پلیمرز زنجیره‌ای جدایه‌های پنج منطقه مورد بررسی فقط قطعه ۵۴۵ بازی مورد انتظار برای BNYVV، از نمونه‌های ریشه سه منطقه شامل: مشهد، جوین و جلگه رخ که ریشه‌های چغندر قند دارای علائم ریشه ریشی بودند، به دست آمد. در نمونه‌های ریشه چغندر قند سه منطقه ذکر شده و دو منطقه فریمان و چناران (ریشه‌ها فاقد علائم ریشه ریشی)، هیچ‌یک از قطعات ۳۹۹ و ۲۹۲ جفت بازی مورد انتظار به ترتیب مربوط به BSBV و BVQ به دست نیامد. این نتایج نشان می‌دهد که نمونه‌های سه منطقه از پنج منطقه، آلودگی به BNYVV بوده و دو ویروس همراه دیگر در آن‌ها ردیابی نگردید (شکل ۲). نتایج بررسی و ردیابی ویروس‌ها در برگ‌های چغندر قند دارای علائم نکروز مناطق نشان داد که هیچ‌یک از ویروس‌های ذکر شده حضور ندارند. این نتیجه حاکی از آن است که عواملی دیگری در بروز این علائم نقش داشته باشد.

واکنش آماده‌شده در ترموسایکر با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید (۲۰). سپس از محصول به‌دست‌آمده چهار میکرولیتر بدون خالص‌سازی برای واکنش لیگاسیون در ناقل pGEM-T Easy Vector Systems (Promega- USA) استفاده شد.

همسازسازی و تعیین ترادف ژن کد کننده پروتئین p25 رشته RNA3 ویروس BNYVV

جهت تعیین ترادف نوکلئوتیدی پروتئین p25 از رشته RNA3 ویروس BNYVV، عمل همسازسازی در داخل حامل پلاسمید pGEM-T Easy Vector Systems انجام شد. پلاسمیدهای نوترکیب، به داخل سلول‌های مستعد *Escherichia coli* سویه DH5α تراریخت شدند. همسازها از طریق کلونی پی‌سی‌آر (Colony PCR) با استفاده از آغازگرهای عمومی M13 شناسایی شدند. پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از کیت GenetBio-Kit (PrimPrep Plasmid DNA isolation Korea) استخراج شده و جهت تعیین ترادف، به شرکت ماکروژن کره ارسال گردید. توالی‌های حاصل، با نرم‌افزار Chromas آنالیز و با استفاده از نرم‌افزار MEGA-X به روش Muscles (۲۵) هم‌ترازی شدند.

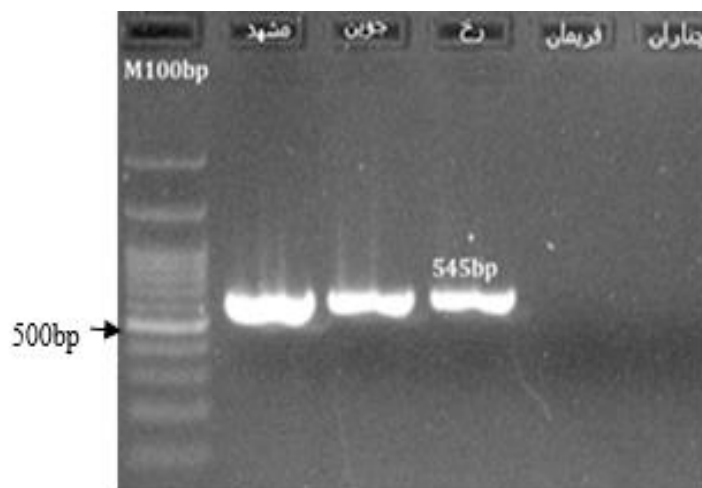
نتایج و بحث

ویروس‌های خاک زاد متعددی از جمله BNYVV، BVQ، BBSV و BSBV روی ریشه چغندر قند ایجاد بیماری می‌کنند. این ویروس‌ها به‌صورت آلودگی مخلوط در مزرعه روی ریشه چغندر قند دیده می‌شود (۳۶ و ۴۰). بنا بر بررسی‌های انجام‌شده در سال ۱۳۸۸



شکل ۱- علائم BNYVV به همراه BBSV روی ریشه (الف) و برگ چغندر قند (ب) در یک مزرعه چغندر قند در مشهد، ج: علائم نکروتیک برگ (بدون علائم ریشه ریشی) ناشی از BBSV در یک مزرعه چغندر قند در فریمان

Figure 1- A: Proliferation symptoms on root caused by BNYVV and BBSV, B: Necrosis on sugar beet leaves in a Mashhad field, C: Necrosis symptoms on leaves (without rootlet beardedness in root) by BBSV in a Fariman sugar beet field



شکل ۲- نقوش الکتروفورزی حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه ویروس‌های BNYVV، BSBV و BVQ. تکثیر قطعه ۵۴۵ جفت بازی نشان دهنده ویروس BNYVV، M: نشانگر با وزن مولکولی هزار جفت باز (SMOBIO، تایوان)

Figure 2- Agarose gel electrophoresis of mRT-PCR for detection of BNYVV, BSBV and BVQ viruses, 545bp fragment belonging to BNYVV. M: 1kb DNA ladder (SMOBIO, Taiwan)

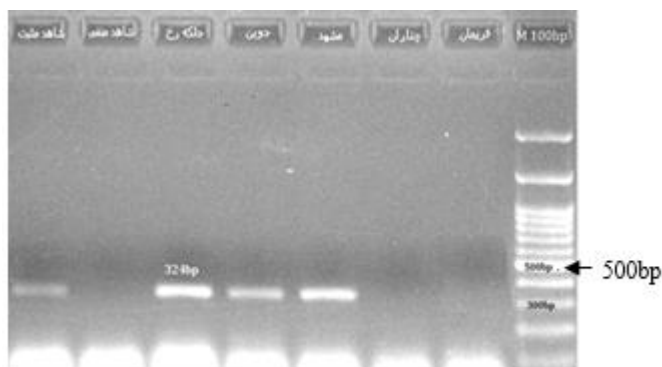
فقد RNA5 بود، اما تاکنون تیپ P دارای RNA5 این ویروس از ایران گزارش نشده است (۳۵). کوتلوک ییلماز و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که بیش از ۸۰ درصد نمونه‌های ترکیه‌ای حاوی تیپ A بوده و ۲۰ درصد از آن‌ها، تیپ P دارای RNA5 هستند. بعلاوه این محققین، اظهار کردند که هیچ‌گونه تعاملی بین ایجاد علائم و نوع تیپ این ویروس وجود ندارد (۲۷). در این مطالعه نیز سه جدایه از نظر RNA5 با استفاده از آزمون پلیمرز زنجیره‌ای مورد بررسی قرار گرفت و بر اساس آغازگرهای اختصاصی استفاده شده، قطعه ۸۸۶ جفت بازی مورد انتظار، در ژل الکتروفورزی به دست نیامد، در نتیجه جدایه‌های مورد بررسی فاقد RNA5 بودند (شکل ۴).

در ادامه این تحقیق برای مشخص شدن نوع تتراد جدایه‌ها، پس از همسانه سازی ژن کد کننده پروتئین p25 رشته RNA3 ویروس و استخراج پلاسמיד نو ترکیب آن، برای تعیین توالی ارسال و استفاده از نرم‌افزار MEGA7 به روش ClustalW هم‌ترازی شدند (۲۵). نتایج بررسی چهار اسید آمینه بسیار تغییرپذیر ۶۷-۷۰ (ناحیه تتراد پروتئین p25) RNA3 جدایه‌ها نشان داد که این ناحیه در جدایه‌های مشهد و جلگه رخ از نوع ACHG (تتراد وحشی ویروس) است (شکل ۵); این بدان معنی است که در ناحیه تتراد جدایه‌های مشهد و جلگه رخ جهشی صورت نگرفته است، تاکنون این تتراد از بسیاری از کشورها از جمله: یونان (۳۷)، ترکیه (۶ و ۲۸)، اسپانیا (۴۴)، فرانسه (۱۲)، بلغارستان، ایتالیا، سوئیس (۲۲) و چین (۵۳) گزارش شده است. کوتلوک ییلماز و همکاران (۲۰۱۸) 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 (۱۳۸۸) بیان کردند که این تتراد در همه استان‌های کشور،

بعد از تأیید وجود ویروس BNYVV در نمونه‌های مناطق: مشهد، جلگه رخ و جوبین، تفکیک تیپ A از B ویروس بر اساس ناحیه TGB (Triple Gene Block) رشته RNA2 ویروس که بسیار حفاظت شده است، انجام گرفت. محصول آزمون پلیمرز زنجیره ای دوگانه بر اساس اندازه قطعه مورد انتظار (۳۲۴ جفت بازی) روی ژل الکتروفورزی برای نمونه‌های سه منطقه به دست آمد و نشان داد که تیپ این جدایه‌ها از نوع A است و هیچ‌یک از جدایه‌ها، قطعه‌ای به اندازه ۱۷۸ جفت بازی که نشان‌دهنده تیپ B باشد، نشان ندادند (شکل ۳). این نتیجه با نتایج مهرور و همکاران که بیان کردند تیپ B بیش از ۹۰ درصد جدایه‌های ایران از نوع A است، مطابقت دارد. تیپ B در ایران قبلاً توسط سوهی و مالکی در سال ۱۳۸۳ گزارش شد (۴۶)، 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. تاکنون این تیپ در تعداد محدودی از کشورهای اروپایی از جمله آلمان و فرانسه گزارش شده است (۲۶). تشخیص تیپ P از A و B از طریق آزمون پلیمرز زنجیره‌ای ژن کد کننده پروتئین P26 در RNA5 اضافی BNYVV امکان‌پذیر است (۲۱). این تیپ ویروس قدرت بیماری‌زایی بسیار بالاتری (حتی در ارقام مقاوم) نسبت به سایر تیپ‌ها دارد. دو نوع از این تیپ ویروس در دنیا گزارش شده: گروه اول BNYVV است که نوع تتراد در آن SYHG بوده و دارای اسید ربیونوکیک اضافی پنج را داراست و گروه دوم فاقد این اسید نوکلئیک بوده و فقط نوع تتراد آن مشابه تیپ نوع اول است. مهرور و همکاران (۱۳۸۸) از ایران تیپ P این ویروس را گزارش کردند که

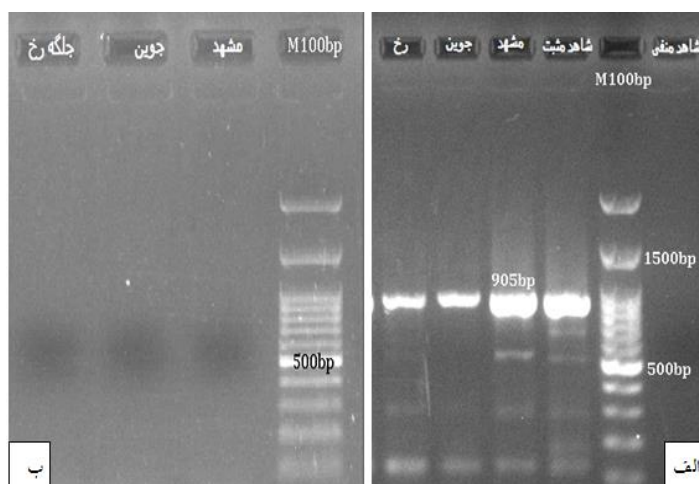
نیاز به بررسی بیشتر دارد. نتایج توالی یابی جدایه جوین نشان داد که در اسیدآمیننه ۶۸ (a68) جهش رخ داده است بطوریکه اسیدآمیننه سیستئین (C) به اسیدآمیننه هیستدین (H) تبدیل شده است (شکل ۵).

بخصوص در استان خراسان فراوانی بالاتری نسبت به سایر تترادهای دارد. با توجه به غالب بودن این تتراد، احتمال می رود که در مناطقی از کشت چغندر قند به عنوان یک جدایه شکننده مقاومت عمل کند، اگرچه این موضوع در این ایران بررسی نشده است، برای اثبات آن



شکل ۳- نقوش الکتروفورزی حاصل از تکثیر قطعه ۳۲۴ جفت‌بازی از ناحیه RNA2 TGB ویروس BNYVV نشان‌دهنده تیپ A ویروس در سه جدایه مشهد، جوین و جلگه رخ، M: نشانگر با وزن مولکولی صد جفت باز (SMOBIO، تایوان)

Figure 3- Agarose gel electrophoresis of 324bp fragment of BNYVV RNA2 TGB region which represents type A of the virus in Mashhad, Jovein and Jolge-Rokh isolates, M: 100bp DNA ladder (SMOBIO, Taiwan)



شکل ۴- الف: نقوش الکتروفورزی حاصل از تکثیر توالی ۹۰۶ نوکلئوتیدی p25، ب: ۸۸۶ نوکلئوتیدی توالی P26 ویروس BNYVV از جدایه‌های مشهد، جوین و جلگه رخ، M: نشانگر با وزن مولکولی صد جفت باز (SMOBIO، تایوان)

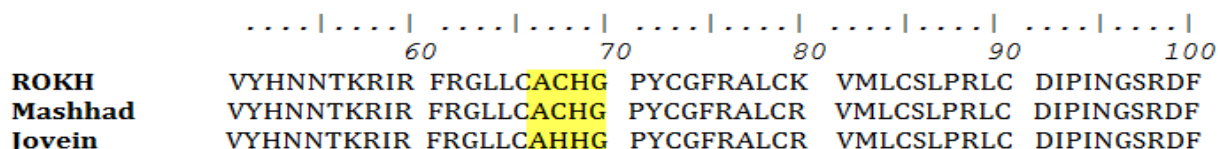
Figure 4- Agarose gel electrophoresis showing a 906bp fragment of p25(a) and 886 bp fragment of P26 (b) in BNYVV genome in from Mashhad, Jovein and Jolge-Rokh isolates, M: 100bp DNA ladder (SMOBIO, Taiwan)

می‌توان به عنوان یک جدایه شکست مقاومت محسوب نمود. در ایران بیش از ۹۰ درصد ارقام چغندر قند وارداتی دارای یک ژن مقاومت به ریزومانیا هستند. گسترش بیماری ریزومانیا به مناطق جدید کشت (به دلیل عدم رعایت بهداشت زراعی) و قلیایی شدن اراضی کشت با استفاده بی‌رویه از آب چاه‌ها (تحریک ناقل بیماری ریزومانیا به تکثیر)، به همراه کشت متوالی ارقام چغندر قند مقاوم (دارای ژن مقاومت Rz1) در اراضی، به دلیل فشار انتخابی نسبتاً قوی روی جمعیت

این تتراد قبلاً از ایران (مهرور و همکاران، ۱۳۸۸) و دنیا (۶، ۲۴ و ۳۰) گزارش شده است. چیپا و همکاران در سال ۱۳۹۰ بیان کردند که دو تتراد ACHG و AHHG در برخی از کشورها می‌تواند به عنوان یک جدایه شکست مقاومت (Resistance Breaking-RB) شوند. جدایه‌های شکست مقاومت ممکن است با تغییر در یک اسیدآمیننه تتراد یا در دیگر اسیدآمیننه‌های پروتئین p25 ظهور کنند (۳). در نتیجه با توجه به جهش رخ داده در این ناحیه از ژنوم RNA3 ویروس را

بنابراین تحقیقات بیشتر در مورد بیماری‌زایی BNYVV و کنترل آن از طریق استفاده از منابع مقاومت جدید و روش‌های کنترل تلفیقی ضروری به نظر می‌رسد.

ویروس (۵۰)، موجب شکست مقاومت آن‌ها گردیده و با تغییرات در اسیدآمینه‌های ناحیه تتراد پروتئین p25 ویروس، جدایه‌های شکست مقاومت جدیدی از ویروس ایجاد خواهد شد که کشت چغندر قند را در این مزارع در سال‌های آتی با مشکل جدی مواجه خواهد نمود؛



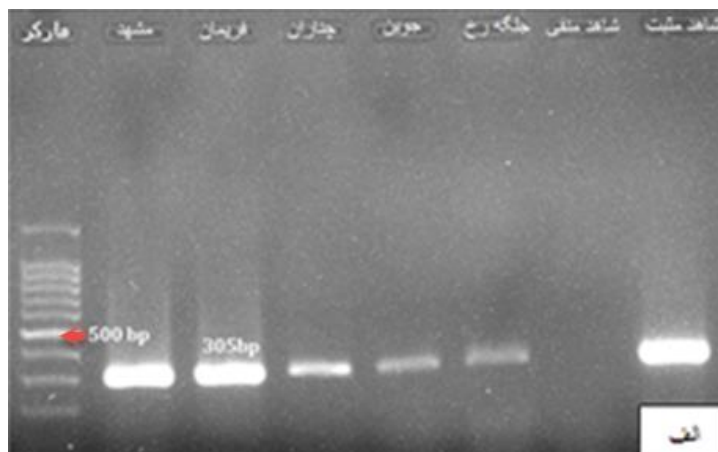
شکل ۵- هم‌ردیف سازی توالی اسیدآمینه پروتئین p25 ویروس BNYVV جدایه‌های مشهد، جلگه رخ و جوین با نرم‌افزار MEGA7
Figure 5- Multiple sequences alignment of (amino acid) of BNYVV RNA3 p25 protein in Mashhad, Jolge-rokh and Jovein isolates with MEGA X software

جدایه آمریکا، بدون ایجاد علائم نکروز برگ‌گی موجب ریشه ریشی شدن ریشه اصلی چغندر قند (۱۳) می‌شوند (جدول ۴). برای بررسی نمونه‌های مورد مطالعه برای ردیابی BBSV، از آغازگرهای که ناحیه 3'UTR این ویروس را تکثیر می‌کند، استفاده شد. نتایج الکتروفورز این بررسی نشان داد که قطعه ۳۰۵ نوکلئوتیدی مورد انتظار برای همه جدایه‌ها به دست آمد (شکل ۶) در نتیجه هر پنج نمونه دارای این ویروس بودند. نتایج این بررسی نشان داد که نمونه‌های مشهد، جلگه رخ و جوین که دارای ویروس عامل بیماری ریزومانیا (BNYVV) بودند BBSV را هم نیز، به همراه دارند. حال آنکه از نمونه‌های فریمان دارای علائم سوختگی در برگ و نکروز آوندی در ریشه (شکل ۲) و چناران که هیچ‌گونه علائم روی ریشه وجود نداشت فقط سوختگی برگ قابل رؤیت بود و به‌تنهایی BBSV تشخیص داده شد.

در مزارع خراسان رضوی علائم سوختگی در برگ‌های چغندر قند بخصوص در ارقام حساس به ریزومانیا (شریف، جلگه، پایا و ...)، به همراه علائم ریشه ریشی (نمونه مشهد) یا بدون علائم ریشه ریشی (نمونه چناران) در ریشه‌های آلوده جمع‌آوری شده، مشاهده گردید (شکل ۱). در نمونه فریمان علاوه بر سوختگی در برگ رقم داخلی شکوفا (واجد ژن *RzI* مقاوم به ریزومانیا) نکروز آوندی ریشه بدون علائم ریشه ریشی، مشاهده گردید (شکل ۱). محققین در چین اظهار نمودند که جدایه‌های چینی BBSV علاوه بر ایجاد نکروز در آوند ریشه، سبب ایجاد لکه‌های نکروتیک روی برگ‌های آلوده می‌شوند، با گسترش این لکه‌ها بعد از یک هفته موجب از بین رفتن کامل آن‌ها می‌شوند (۱۴). جدایه‌های آمریکایی بدون ایجاد نکروز در برگ و ریشه چغندر قند موجب تولید ریشه‌های فرعی فراوان مشابه بیماری ریزومانیا می‌گردند (۵۱) و در نمونه‌های چغندر قند اروپا نیز مشابه

جدول ۴- مقایسه نمونه‌های آلوده به BBSV ایرانی، آمریکایی، چینی و اروپایی از لحاظ علائم و آلودگی روی ریشه و برگ چغندر قند
Table 4-Comparison of the Iranian, American, Chinese and European BBSV isolates in terms of symptoms induction on roots and leaves of sugar beet

ردیف Row	جدایه Isolate	سوختگی سیاه برگ‌ها Black scorched leaves	نکروز آوندی ریشه Root vascular necrosis	ریشه ریشی Root proliferation	همراهی با BNYVV Accompanied by BNYVV
1	IR-Mashhad	+	+	+	+
2	IR-Fariman	+	+	-	-
3	IR-Chenaran	+	-	-	-
4	IR-Jovein	+	+	+	+
5	IR-Jolgeh-rokh	+	+	+	+
6	China	+	+	-	-
7	USA-CO	-	-	+	-
8	Europa(Spain)	-	+	+	-



شکل ۶- نقوش الکتروفورزی حاصل از تکثیر قطعه ۳۰۵ جفت بازی از ویروس سوختگی سیاه برگ چغندر در جدایه‌های مشهد، فریمان، چناران، جوین و جلگه رخ. M: نشانگر با وزن مولکولی صد جفت باز (SMOBIO، تایوان)

Figure 6- Agarose gel electrophoresis showing a 305bp fragment of the *Beet black scorch virus* in Mashhad, Fariman, Chenaran, Jovein and Jolge-rokh isolates; M: 100bp DNA ladder (SMOBIO, Taiwan)

بررسی خصوصیات مولکولی هر یک از آن‌ها قبل از ارزیابی ژنوتیپ‌ها در مزرعه آزمایشی ضروری به نظر می‌رسد. این مطلب می‌تواند در تشخیص نوع عامل بیماری و جلوگیری از خطا در ارزیابی مقاومت ارقام چغندر قند در مزرعه بسیار حائز اهمیت باشد.

سیاسگزاری

اجرای این تحقیق میسر نبود مگر با همکاری‌های بی‌شائبه رؤسا و همکاران بخش‌های تحقیقات گیاه‌پزشکی و چغندر قند مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی و موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند، که بدین‌وسیله از زحمات کلیه این عزیزان قدردانی می‌گردد.

قبلاً نیز محققین در اسپانیا و آمریکا نیز علی‌رغم وجود علائم بیماری ریزومانی، BNYVV در آن‌ها تشخیص داده ندادند و فقط BBSV جداسازی نمودند (۱۳ و ۵۱). مطالعات اخیر نشان داده است که تغییرات آمینواسیدها در پروتئین پوششی این ویروس موجب بروز علائم مختلف در گیاه میزبان می‌گردد (۴۹ و ۵۲).

یکی از فعالیت‌ها در زمینه تهیه و اصلاح بذر چغندر قند، ارزیابی و غربالگری مقاومت ژنوتیپ‌های به‌دست‌آمده از مرحله اصلاحی در مزرعه آلوده به بیماری است. با توجه به حضور همزمان دو ویروس یادشده در ریشه چغندر قند در مزارع آلوده، می‌تواند این ارزیابی‌ها را دچار خطا کند. محققین معتقد هستند که یکی از عوامل شکسته شدن مقاومت ارقام چغندر قند دارای ژن ($Rz1$) یا ژن‌های مقاومت ($Rz1+Rz2$) به BNYVV می‌تواند ناشی از حضور BBSV باشد (۵۰). در نتیجه ردیابی و شناسایی ویروس‌های همراه با BNYVV و

منابع

- 1- Asher MJC. 1993. Rhizomania. In: Cooke DA, Scott RK (eds) The sugar beet crop: science into practice. Chapman & Hall, London, pp 311–346.
- 2- Borodynko N., Hasiow-Jaroszewska B., and Pospieszny H. 2009. Evidence for the presence of *Beet necrotic yellow vein virus* types A and B in Poland. Journal of Plant Diseases and Protection 116(3): 106-108.
- 3- Bornemann K., and Varrelmann M. 2009. The variability of *Beet necrotic yellow vein virus* p25 pathogenicity factor previously allocated to geographically distinct isolates can be retrieved in single representative A- and B-type soils. Institute of Sugar Beet Research (IFZ) In DPG AK Pflanzenvirologie.
- 4- Canova A. 1959. Appunti di patologia della barbabietola. Informatore Fitopatologico 9(20): 390–396.
- 5- Cao Y., Cai Z., Ding Q., Li D., Han C., Yu J., and Liu Y. 2002. The complete nucleotide sequence of *Beet black scorch virus* (BBSV), a new member of the genus Necrovirus. Archives of Virology 147(12): 2431-2435.

- 6- Chiba S., Kondo H., Miyanishi M., Andika I.B., Han C., and Tamada T. 2011. 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* 24(2): 207-218.
- 7- Crutzen F., and Bragard C. 2010. Pomoviruses associated with the rhizomania syndrome: a reverse genetic approach of the genome and multiplication requirements in planta. Thèse de doctorat à l'Université catholique de Louvain. Belgique.
- 8- Cui X. 1988. An icosahedral virus found in sugar beet. *J Xinjiang Shihezi Agric College* 10: 73-78.
- 9- Farzadfar S., Pourrahim R., Golnaraghi A.R., and Shahraeen N. 2002. First report of *Beet soil-borne virus* in Iran. *Plant Disease* 86: 187.
- 10- Farzadfar S., Pourrahim R., Golnaraghi A.R., and Ahoonmanesh A. 2005. First report of *Beet virus Q* in sugar beet in Iran. *Plant Disease*. 88: 1359.
- 11- Fujisawa I., and Sugimoto T. 1977. Transmission of *Beet necrotic yellow vein virus* by *Polymyxa betae*. *Japanese Journal of Phytopathology* 43(5): 583-586.
- 12- Galein Y. 2013. The epidemiology of rhizomania in the Pithiviers region of France (Doctoral dissertation, UCL-Université Catholique de Louvain).
- 13- 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(1): 21-24.
- 14- Guo L.H., Cao Y.H., Li D.W., Niu S.N., Cai Z.N., Han C.G., Zhai Y.F., and Yu J.L. 2005. Analysis of nucleotide sequences and multimeric forms of a novel satellite RNA associated with *Beet black scorch virus*. *Journal of Virology* 79(6): 3664-3674.
- 15- Henry C. 1996. British Sugar beet review. *British Sugar Beet Review* (Vol. 64). I.J. Schapring.
- 16- Heijbroek W., Musters P.M.S., and Schoone A.H.L. 1999. Variation in pathogenicity and multiplication of *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in relation to the resistance of sugar-beet cultivars. *European Journal of Plant Pathology* 105(4): 397-405.
- 17- Izadpanah, K., Hashemi, P., Kamran, R., Pakniat, M., Sahandpour, A. and Masumi, M., 1996. Widespread occurrence of rhizomania-like disease of sugarbeet in Fars. *Iranian Journal of Plant Pathology* 32(3/4): 200-206. (In Persian)
- 18- Ivanovic M., Macfarlane I., and Woods R.D. 1983. Viruses of sugar beet associated with *Polymyxa betae*. *Annual Report of Rothamsted Experimental Station for, 1982: 189-190.*
- 19- Junxi J., Jingfeng Z., Shaochen C., Dajin Y., Jialin Y., Zhunan C., and Yi L. 1999. Transmission of *Beet black scorch virus* by *Olpidium brassicae*. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*. 21(4): 525-528.
- 20- Kobs G. 1997. Cloning blunt-end DNA fragments into the pGEM®-T Vector Systems. *Promega Notes*, 62, pp.15-18.
- 21- Koenig R., and Loss S. 1997. Beet soil-borne virus RNA1: genetic analysis enabled by a starting sequence generated with primers to highly conserved helicase-encoding domains. *J. gen.Virol.* 78: 3161-3165.
- 22- Koenig R., Pleij C.W., Beier C., and Commandeur U. 1998. Genome properties of *Beet virus Q*, a new furo-like virus from sugarbeet, determined from unpurified virus. *Journal of General Virology* 79(8): 2027-2036.
- 23- Koenig R., and Valizadeh J. 2008a. Molecular and serological characterization of an Iranian isolate of *Beet black scorch virus*. *Archives of Virology* 153(7): 1397-1400.
- 24- Koenig R., Kastirr U., Hotschulte B., Deml G., and Varrelmann M. 2008b. Distribution of various types and p25 subtypes of *Beet necrotic yellow vein virus* in Germany and other European countries. *Archives of Virology* 153: 2139-2144.
- 25- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35(6): 1547-1549.
- 26- Kutluk-Yilmaz N.D. 2016. Identification of strain types of some *Beet necrotic yellow vein virus* isolates determined in Northern and Central Parts of Turkey. *Eurasian Journal Soil Science* 5(3): 241-248.
- 27- Kutluk-Yilmaz N.D.K., Arli-Sokmen M., and Kaya R. 2018. p25 pathogenicity factor deletion mutants of *Beet necrotic yellow vein virus* occurring in sugar beet fields in Turkey. *Journal of Plant Diseases and Protection* 125(1): 89-98.
- 28- Kruse M., Koenig R., Hoffmann A., Kaufmann A., Commandeur U., Solovyev A.G., Savenkov I., and Burgermeister W. 1994. Restriction fragment length polymorphism analysis of reverse transcription-PCR products reveals the existence of two major strain groups of *Beet necrotic yellow vein*. *Journal of*

- General Virology 75(8): 1835-1842.
- 29- Lennfors B.L. 2006. Molecular breeding for resistance to rhizomania in sugar beets. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala 2006. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae. ISSN 1652-6880.
 - 30- Li M., Liu T., Wang B., Han C., Li D., and Yu J. 2008. Phylogenetic analysis of *Beet necrotic yellow vein virus* isolates from China. *Virus Genes* 36(2): 429-432.
 - 31- Liu H.Y., and Duffus J.E. 1988. The occurrence of a complex of viruses associated with rhizomania of sugarbeet. *Phytopathology*, 78, p.1583.
 - 32- Liu J., and Xian H. 1995. Preliminary report on *Beet black scorch virus*. *China Sugar Beet* 3: 30-31.
 - 33- Liu, H.Y., Sears, J.L. and Lewellen, R.T., 2005. Occurrence of resistance-breaking *Beet necrotic yellow vein virus* of sugar beet. *Plant Disease* 89(5): 464-468.
 - 34- Mehrvar M., and Bragard C. 2011. Iranian diversity of *Beet black scorch virus* and satellite. In Proceedings of the Eighth Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors, Louvain-La-Neuve, Belgium, 6-8 July, 2011 (pp. 41-46). International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors.
 - 35- Mehrvar M., Valizadeh J., Koenig R., and Bragard C.G. 2009. 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* 154(3): 501-506.
 - 36- Meunier A., Schmit J.F., Stas A., Kutluk N., and Bragard C. 2003. 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. *Appl. Environ. Microbiology* 69(4): 2356-2360.
 - 37- Pavli O., Prins M., Goldbach R., and Skaracis G.N. 2011. Efficiency of Rz1-based rhizomania resistance and molecular studies on BNYVV isolates from sugar beet cultivation in Greece. *European Journal of Plant Pathology* 130(2): 133-142.
 - 38- Pferdmenges F. 2007. Occurrence, spread and pathogenicity of different *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) isolates (Vol. 23). Cuvillier Verlag.
 - 39- Russo M., Martelli G.P., and Di Franco A. 1981. The fine structure of local lesions of *Beet necrotic yellow vein virus* in *Chenopodium amaranticolor*. *Physiological Plant Pathology* 19(2): 237-IN11.
 - 40- Ratti C., Clover G.R., Autonell C.R., Harju V.A., and Henry C.M. 2005. A multiplex RT-PCR assay capable of distinguishing *Beet necrotic yellow vein virus* types A and B. *Journal of Virological Methods* 124(1-2): 41-47.
 - 41- Rush C.M. 2003. Ecology and epidemiology of *Benyviruses* and plasmodiophorid vectors. *Annual review of Phytopathology* 41(1): 567-592.
 - 42- Rush C.M., Liu H.Y., Lewellen R.T., and Acosta-Leal R. 2006. The continuing saga of rhizomania of sugar beets in the United States. *Plant Disease* 90(1): 4-15.
 - 43- Samiei A., Mehrvar M., and Zakiaghl M. 2017. Genetic diversity and distribution of *Beet black scorch virus* in some provinces of Iran, 20(4): 540-547. (In Persian with English abstract)
 - 44- Schirmer A., Link D., Cognat V., Moury B., Beuve M., Meunier A., Bragard C., Gilmer D., and Lemaire O. 2005. Phylogenetic analysis of isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* collected worldwide. *Journal of General Virology* 86(10): 2897-2911.
 - 45- 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* 358(2): 448-458.
 - 46- Sohi H., and Maleki M. 2004. Evidence for presence of types A and B of *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in Iran. *Virus Genes* 29(3): 353-358.
 - 47- Tamada T. 1975. *Beet necrotic yellow vein virus*. CMI/AAB Descriptions of plant viruses, 144(4).
 - 48- Tamada T., Shirako Y., Abe H., Saito M., Kiguchi T., and Harada T. 1989. Production and pathogenicity of isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* with different numbers of RNA components. *Journal of General Virology* 70(12): 3399-3409.
 - 49- Wang X., Zhang Y., Xu J., Shi L., Fan H., Han C., Li D., and Yu J. 2012. The R-rich motif of *Beet black scorch virus* P7a movement protein is important for the nuclear localization, nucleolar targeting, and viral infectivity. *Virus Research* 167(2): 207-218.
 - 50- Webb K.M., Wintermantel W.M., Kaur N., Prenni J.E., Broccardo C.J., Wolfe L.M., and Hladky L.L. 2015. Differential abundance of proteins in response to *Beet necrotic yellow vein virus* during

- compatible and incompatible interactions in sugar beet containing Rz1 or Rz2. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 91: 96-105.
- 51- 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 US isolate of *Beet black scorch virus*. *Phytopathology* 97(10): 1245-1254.
- 52- Zhang Y., Zhang X., Niu S., Han C., Yu J., and Li D. 2011. Nuclear localization of *Beet black scorch virus* capsid protein and its interaction with importin α . *Virus Research* 155(1): 307-315.
- 53- Zhuo N., Jiang N., Zhang C., Zhang Z.Y., Zhang G.Z., Han C.G., and Wang Y. 2015. Genetic diversity and population structure of *Beet necrotic yellow vein virus* in China. *Virus Research* 205: 54-62.



Detection of *Beet black scorch virus* and other Associated Soil-borne Viruses and Determining some of their Molecular Aspects

J. Soltani Idliki¹- M. Mehrvar^{2*}- M. Zakiagh³- S.B. Mahmoudi⁴- M. Salati⁵

Received: 04-11-2018

Accepted: 28-04-2019

Introduction: Soil-borne sugar beet viruses are responsible for the destructive diseases of sugar beet. They can cause significant yield losses worldwide. Four of the soil-borne sugar beet viruses consisted of *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV), *Beet soil-borne mosaic virus* (BSBMV), *Beet soil-borne virus* (BSBV) and *Beet virus Q* (BVQ) are transmitted by the protist *Polymyxa betae*, a common root infecting parasite which ensures the long-term persistence of the viruses in the soils and one consisted of *Beet black scorch virus* (BBSV), is transmitting by *Ospidium brassicae*. So far, four out of five aforementioned viruses have been reported (except for BSBMV) in Iran. BNYVV is the causal agent of the rhizomania disease which has been reported in mixed-infections with BSBV, BVQ and/or BBSV. In previous studies, BSBV, BVQ and BBSV have been found alongside the BNYVV in some root samples. Nevertheless, up to now, no field has been spotted with black scorch symptoms of sugar beet leaves. Recently, we observed symptoms of burns on leaves and similar signs of rhizomania disease in the roots of some sugar beet cultivars in the fields of Khorasan Razavi province. The purpose of this study was to detect soil-borne viruses of sugar beet and determine some of their molecular aspects.

Materials and Methods: In this study, sugar beet with bearded roots and black scorching of leaves symptoms were collected from Mashhad, Fariman, Chenaran, Jolge-Rokh, and Jovein sugar beet fields. Total RNA was extracted from 100 mg of rootlets using RNeasy Mini Kit (Qiagen-Germany) based on the manufacturer's protocol. The presence of three viruses of BSBV, BVQ and BNYVV were analyzed by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (mRT-PCR). However, For BBSV detection, simplex RT-PCR was used to detect of the 3'-UTR of the genomic RNA. For the molecular characterization of the BNYVV isolates, the BNYVV type (A or B) was determined with duplex RT-PCR (dRT-PCR), using A/B-type-specific primers pairs for the triple gene block (TGB) gene in RNA-2 and the partial p25 gene of the RNA-3 segment of the virus. RT-PCR was done using the PrimeScript™ Reverse Transcriptase kits and the PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara, Japan). The PCR products were cloned in pGEM®-T Easy Vector (Promega-USA). The recombinant plasmids were extracted using PrimPrep Plasmid DNA isolation kit (GenetBio-Korea) and then sequenced (Macrogen, South Korea). Nucleotide sequences data were analyzed using Chromas (version 1.45) and MEGA7 softwares.

Results and Discussion: The results showed that in the three samples with bearded root symptoms (Mashhad, Jovein, and Jolge-rokh), only BNYVV (A-type) was present and there were no BSBV and BVQ in the tested samples. In addition, in the two samples (Fariman and Chenaran), none of the three viruses was detected. The results showed that the two BNYVV isolates had 'ACHG' (Mashhad and Jolge-Rokh isolates) or 'AHHG' (Jovein isolate) residues in the tetrad position. So that the amino acid cysteine (C) in a₆₈ position was converted to histidine (H). Although this A-type tetrad has been previously reported by Mehrvar et al. (2009) in Khorasan Razavi and Northern Khorasan, Semnan, Qazvin, Zanjan, Ilam, Hamedan, and West Azarbaijan

1- Ph.D. Student of Plant Pathology, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad and Research Instructor, Sugar Beet Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran

2 and 3- Associate Professor and Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

(*- Corresponding Author Email: mehrvar@um.ac.ir)

4- Associate Professor, Sugar Beet Seed Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karadj, Iran

5- Assistant Professor, Plant Protection Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research Center, AREEO, Mashhad, Iran

provinces. In this study, BBSV was detected in all samples. In Mashhad, Jolge-rokh, and Jovein samples, BNYVV was present accompanied by BBSV. However, BBSV was detected alone from Fariman (holding black scorching of the leaves and vascular necrosis of root symptoms) and Chenaran (black scorching of the leaves) samples. These results are consistent with the results of other researchers from Spain and the United States who reported the presence of rhizomonia symptoms in the BBSV infected roots.

Conclusion: While most of the farmers in Khorasan province cultivate resistant cultivars of sugar beet carrying the *Rz1* gene for successive years in a field, the breakdown of the resistance and emerging of new resistance breaking (RB) variant of the virus have occurred via amino acid changes. However, more research on BNYVV pathogenicity by the use of additional sources of resistance and alternative disease control majors is needed to have a suitable conclusion. In addition, the results of this study showed that the presence of both viruses (BBSV and BNYVV) together could exacerbate the Rhizomania syndrome symptoms while single infection by BBSV could just cause vascular necrosis in the root and black scorching symptoms of the leaves. This could be very important in symptoms based diagnosing of the disease and preventing errors in evaluating the resistance of sugar beet cultivars in the field.

Keywords: *Beet necrotic yellow vein virus, Beet black scorch virus, Sugar beet*