بررسی پراکنش ویروس رگبرگ زردی نکروتیک چغندرقند و ناقل آن در منطقه مرودشت با استفاده از روش‌های سرولوژیک و PCR

Determining the distribution of *Beet necrotic yellow vein virus* and its vector in Marvdasht area by serological and PCR methods

سید محمد رضا موسوی*[۱]

تاریخ دریافت: ۸۶/۱/۲۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۶/۱۰/۱۲

س. م. ر. موسوی . ۱۳۸٦. بررسی پراکنش ویروس رگبرگ زردی نکروتیک چغندرقند و ناقل آن در منطقه مرودشت با استفاده از روش‌های سرولوژیک و PCR. **چغندرقند ۲۳(۲): ۱۷۵-۱٦۳**

چکیده

به منظور بررسی گسترش آلودگی ویروس رگبرگ زردی نکروتیک چغندرقند و ناقل آن *Polymyxa betae* Keskin در منطقه مرودشت در استان فارس، تعداد ۳۵۳ نمونه تصادفی و ۱۲٤ نمونه از گیاهان دارای علائم رایزومانیا در تابستان سال ۱۳۸۳ جمع‌آوری گردید. به وسیله آزمون‌های سرولوژیکی ساندویچ سه طرفه الیزا و با استفاده‌از پادتن تک‌سویه ویروس، وجود ویروس به ترتیب در ٤۸/۲درصد و ۸۱درصد از نمونه‌های تصادفی و علائم‌دار ردیابی و مشاهده شد. عصاره ریشه‌های موئین نمونه‌های آلوده به صورت مکانیکی روی گیاهان محک مایه‌زنی شد و به ترتیب در *Chenopodium quinoa* منجر به لکه‌های کلروتیک و نهایتاً نکروتیک شد و در *C. amaranticolor* تولید لکه‌های نکروتیک موضعی کرد. آزمون زنجیره‌ای پلی‌مراز نیز در مورد گیاهان آلوده توسط آغازگرهای اختصاصی RNA1 تا RNA4 انجام شد و به صورت ملکولی وجود ویروس را تأیید کرد. با استفاده‌از آغازگرهای اختصاصی *P. betae* وجود قارچ ناقل در ۹٤درصد از نمونه‌های جمع‌آوری شده ثابت گردید. در نهایت بخشی‌از RNA 4 این ویروس نیز تعیین توالی شد و با سایر توالی‌های ثبت شده در بانک ژن مقایسه گردید که به ترتیب ۹۹/۳ و ۹۹/٦ درصد با جدایه‌های گزارش شده از ژاپن و ایتالیا مشابهت داشت.

واژه‌های کلیدی: آزمون زنجیره‌ای پلی‌مراز، تعیین توالی، ساندویچ سه طرفه الیزا، ویروس رگبرگ زردی نکروتیک چغندرقند، *Polymyxa betae*

۱- استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت. mmousavi@miau.ac.ir *- نویسنده مسئول

مقدمه

بیماری رایزومانیا برای اولین بار از ایتالیا گزارش گردید (Canova 1959) و هم‌اکنون در اکثر مناطق چغندرکاری دنیا وجود دارد (Tamada 1999). این بیماری مهم‌ترین بیماری ویروسی شناخته‌شده در چغندرقند است و همه ساله خسارت زیادی را از طریق کاهش وزن ریشه و درصدقند وارد می‌نماید (Anonymous 2004). کاهش وزن ریشه درحدود پنجاه تا هفتاد درصد و کاهش درصد قند بین دو تا بیش از چهاردرصد ذکر گردیده است (Rush and Heidel 1995). عامل بیماری، ویروس رگبرگ زردی نکروتیک چغندر (BNYVV) از جنس *Benyvirus* است (Richard and Tamada 1992) که توسط قارچ خاکزی *Polymyxa beta* Keskin و به صورت پایا منتقل می‌گردد. این ویروس می‌تواند درون خاک و بدون حضور میزبان برای بیش از ده سال در اسپورهای استراحتی قارچ دوام آورد (Al Musa and Mink 1981). پیکره‌های ویروسی میله‌ای محکم با ژنوم چند قسمتی است که از چهار یا پنج RNA تک رشته‌ای تشکیل شده است و حاوی ۵درصد اسیدنوکلئیک و ۹۵درصد پروتئین می‌باشد. اندازه کل ژنوم ۱۳/۵ kb است (Richards 1991; Tamada 2002; Koeing 1996).

در مزارع چغندر آلوده علائم آلودگی عمدتاً به صورت زردی است که به صورت لکه‌های دایره‌ای شکل در مزرعه به خصوص در قسمت‌های گود که پس‌از بارندگی در آن‌ها آب باقی می‌ماند، دیده می‌شود. در طی توسعه بیماری در طی فصل تابستان حاشیه این لکه‌های دایره‌ای گسترش پیدا کرده و قسمت‌های آلوده در مزرعه به خوبی قابل مشاهده هستند. علائم رگبرگ روشنی (vein clearing)، زردی و نکروز بر روی برگ‌های آلوده در همان اوایل فصل ایجاد می‌گردد و شدت آن براساس حساسیت کولتیوارها، مرحله توسعه برگی و فاکتورهای محیطی (دما، نور و.....) متفاوت است. با توسعه علائم، برگ‌ها زرد شده و به‌خوبی در مزرعه قابل تشخیص می‌باشند. از دیگر علائم مشخصه این بیماری بلند شدن طول دمبرگ و باریک‌شدن پهنک برگ می‌باشد. برگ‌های با پهنک باریک شده، در مرکز گیاه به‌صورت مستقیم قرار می‌گیرند و بنابراین به خوبی قابل تشخیص هستند. تحت شرایط آلودگی شدید پژمردگی برگ‌ها نیز مشاهده می‌گردد. علائم مورفولوژیک این بیماری به‌خوبی در ریشه‌ها بصورت بدشکلی مشخص می‌گردد که می‌توان آن را به‌صورت مؤیین شدن، کوتولگی ریشه‌ها یا باریک‌شدن ریشه‌ها در نظر گرفت. به همین دلیل این بیماری را ریزومانیا می‌نامند. در برش طولی در محل تجمع ریشه‌های مؤیین، تومورهای کوچکی دیده می‌شود که نتیجه تقسیم بیش از حد سلولی (هیپرپلازی) سلول‌ها می‌باشد. هم‌چنین در برش عرضی و طولی چغندرقندهای آلوده تیره شدن آوندها دیده می‌شود که درنتیجه نکروز سلول‌های آوندی رخ می‌دهد

(Rush and Heidel 1995; Sutic *et al*. 1999; Wisler *et al*.1994; Koeing *et al*. 1995).

اولین بار در ایران ایزدپناه و همکاران (۱۳۷۵) بیماری رایزومانیا را از استان فارس گزارش نمودند. هم‌چنین این بیماری در کهکیلویه و بویراحمد (توده‌فلاح و همکاران ۱۳۷۹؛ دارابی و همکاران ۱۳۷۷؛ سهندپور و ایزدپناه ۱۳۷۷)؛ همدان (سهندپور و ایزدپناه ۱۳۷۷)، اصفهان (احمدی و جلالی ۱۳۷۷؛ توده‌فلاح و همکاران ۱۳۷۹؛ دارابی و همکاران ۱۳۷۷)، قزوین (توده‌فلاح و همکاران ۱۳۷۹؛ سهندپور و ایزدپناه، ۱۳۷۷)، خراسان (توده‌فلاح و همکاران ۱۳۷۹؛ جعفرپور و همکاران ۱۳۷۹)، سمنان (توده‌فلاح و همکاران ۱۳۷۹؛ شهرآیین و همکاران ۱۳۷۹)، اردبیل (توده‌فلاح و همکاران ۱۳۷۹)، لرستان (توده‌فلاح و همکاران ۱۳۷۹؛ سهندپور و ایزدپناه ۱۳۷۷) و کرمانشاه (سهندپور و ایزدپناه ۱۳۷۷) مشاهده و گزارش شده است.

چغندرقند یکی از مهم‌ترین محصولات صنعتی کشور بوده که نقش مهمی در تأمین فراورده‌های غذایی انسانی و دامی بازی می‌کند. شهرستان مرودشت با سطح زیرکشت ۳۰۰۰ هکتار و تولید سالیانه ۸۰۴۸۸تن از مناطق مهم چغندرکاری کشور است (مرکز آمار ایران ۱۳۸۲). این ویروس از بیشتر استان‌های چغندرخیز ایران گزارش گردیده است و تحقیق درخصوص درصد آلودگی و پراکنش بیماری بسیار لازم به‌نظر می‌رسد. هدف این تحقیق بررسی انتشار و شیوع نسبی این ویروس و ناقل آن به‌وسیله آزمایش‌های دامنه میزبانی، سرولوژیکی و ملکولی و نیز تعیین توالی بخشی از RNA4 این ویروس است.

مواد و روش‌ها

جهت نمونه‌برداری

۱۶ مزرعه واقع در نه منطقه متفاوت شهرستان مرودشت تعیین و تعداد ۳۵۳ نمونه تصادفی و ۱۲۴ نمونه دارای علائم ظاهری برداشته شد. کل گیاه توسط بیل از خاک خارج گردید و هر نمونه به‌صورت جداگانه در پاکت پلاستیکی قرار گرفت و به آزمایشگاه منتقل شد. تا زمان انجام آزمایش نمونه‌ها در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

تشخیص آلودگی به روش ساندویچ سه طرفه الیزا (TAS-ELISA، Triple Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay): تشخیص آلودگی نمونه‌ها به روش ساندویچ سه طرفه الیزا مطابق روش Henry et al. (1992) انجام گرفت و از پادتن تک سویه ویروس BNYVV (خریداری‌شده ازشرکت Adgen diagnostic انگلستان) براساس دستورالعمل کارخانه سازنده استفاده شد. جهت تشخیص آلودگی از عصاره ریشه‌های مؤیین به همراه کنترل مثبت و منفی (دو چاهک برای هر نمونه) استفاده شد. نمونه‌هائی که میزان جذب آن‌ها مساوی یا بیشتر از سه برابر نمونه منفی بود، آلوده در نظر گرفته شدند.

مطالعه دامنه میزبانی

ریشه‌های مؤیین نمونه‌هایی که آلودگی آن‌ها در آزمون الیزا ثابت شده بود در بافر نیم مولار فسفات‌سدیم حاوی ۲- مرکاپتواتانول یک‌درصد با pH=7 خرد گردیدند. عصاره ریشه هر نمونه حداقل روی سه گیاه *Chenopodium amaranticolor* و *C. quinoa* که حداقل شش برگ کاملا توسعه یافته داشتند مایه‌زنی گردید. سپس این گیاهان به مدت شش تا ۱۰ روز در دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند و مرتباً از لحاظ ظهور علائم مورد بررسی قرار گرفتند.

آغازگرهای اولیگونوکلئوتیدی:

برای ردیابی ملکولی ویروس از چهار جفت آغازگر ساخته شده توسط شرکت MWG-Biotech (آلمان) استفاده گردید. این آغازگرها مخصوص RNA1 تا RNA4 بوده و توالی آن‌ها به این شرح می‌باشد (Koenig et al. 1995):

قطعه ژنوم	آغازگر	اندازه قطعه تکثیرشده(جفت باز)
RNA1	V1: 5'-GCATTTTTGTGAATACCAGG-3' C1: 5'-GTACCACATAATCAAG AACC-3'	500
RNA2	V2: 5'-GTGAACTAT AATTTTCCGAT-3' C2: 5'-ACTCCACGTGAATTAAAATC-3'	430
RNA3	V3: 5'-GTTGTTGTGTTTTCTGATCA-3' C3: 5'-ACCGTGAAATCACG TGTAGT-3'	860
RNA4	V4: 5'-GGTGCT TTCTTAATGCCCCG-3' C4: 5'-AACGA GCCCGTTAATACAAT-3'	600

برای ردیابی قارچ ناقل ویروس (*P. betae*) توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در عصاره ریشه‌های مؤیین از جفت آغازگرهای 5'-CAAACGCCTGAAATCATCTAAC-3' و 5'-GATGGCCCAATTCCTTACAC-3' استفاده شد (Meunier et al. 2003).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز براساس رونوشت‌برداری معکوس (RT-PCR)

در مرحله اول RNA ویروس براساس روش Hughes and Galau (1998) از ریشه‌های مؤیین استخراج‌شده و سپس آزمون دو مرحله‌ای RT-PCR مطابق روش Koenig et al. (1995) انجام شد. قطعات تکثیر شده با الکتروفورز ژل آگارز یک‌درصد و بافر

تریس- بورات EDTA یک برابر از یکدیگر جدا شده و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید بررسی گردیدند.

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

استخراج DNA قارچ از ریشه گیاه براساس روش موتاسا و همکاران انجام شد (Mutasa et al. 1993, 1995). برای ردیابی قارچ ناقل ویروس (*P. betae*) واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۵۰ میکرولیتر با اجزا ۱۸ pmol آغازگر, ۱۰µl کلرید منیزیوم (۲۵mM)، ۵µl بافر ۱۰X پلی‌مراز *Taq*، ۱/۵µl dNTPs (هرکدام ۱۰mM)، ۰/۵µl پلی‌مراز *Taq* (۵ U/µl) و ۴µl از DNA الگو انجام شد. چرخه‌های حرارتی شامل سه دقیقه واسرشتی اولیه در دمای ۹۴درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۵چرخه شامل واسرشته‌سازی به مدت سی ثانیه در دمای ۹۴درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر در دمای ۶۳درجه سانتی‌گراد به مدت سی ثانیه و بسط در دمای ۷۲درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و نهایتاً بسط نهایی به مدت هفت دقیقه در ۷۲درجه سانتی‌گراد بود.

تعیین توالی

قطعه‌ی تکثیرشده به‌طول ۶۰۰ جفت باز مربوط به ناحیه‌ای از RNA-4 ویروس BNYVV با استفاده‌از کیت (Germany) MN به روش توصیه‌شده توسط شرکت سازنده، از مخلوط واکنش PCR جداسازی گردید. توالی این قطعه از دو طرف (comfort read sequencing) با استفاده‌از آغازگرهای اختصاصی توسط (Germany) MWG Biotech. Co. تعیین گردید (تعیین توالی سه‌بار و مستقل‌از یکدیگر انجام شد). توالی به دست آمده، در GenBank (NCBI) مورد جستجو قرار گرفت. هم‌چنین این توالی با ناحیه‌ی مشابه سایر توالی‌های موجود در GenBank به‌کمک نرم‌افزار CLUSTAL W (MegAlign 5.00, DNASTAR Inc.) و نیز با برنامه‌ی BLAST (NCBI) مقایسه گردید.

نتایج وبحث

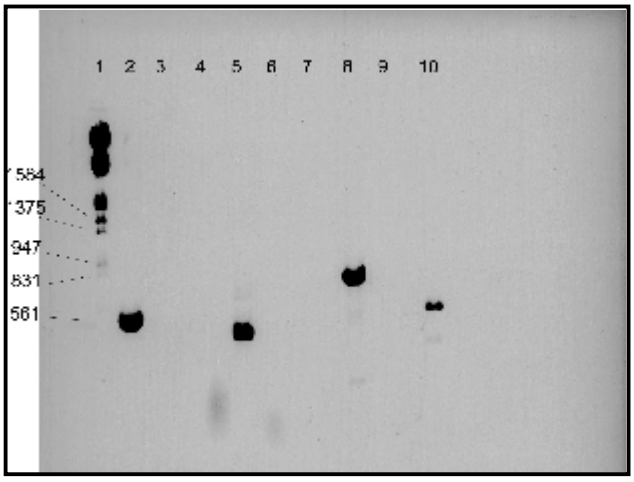
ساندویچ سه طرفه الیزا (TAS-ELISA)

آزمایشات سرولوژیکی نشان داد که از مجموع ۳۵۳ نمونه تصادفی تعداد ۱۷۰ نمونه (۴۸/۲٪) و از ۱۲۴نمونه علائم‌دار تعداد ۱۰۰ نمونه (۸۱/۰٪) به ویروس BNYVV آلوده بودند. این داده‌ها نشان می‌دهد که این ویروس در استان‌فارس مسئول بخش زیادی از بیماری‌های ویروسی است. نمونه‌هایی که در آزمون الایزا آلوده به ویروس تشخیص داده شدند در مزرعه نیز علائم عمده گیاه بیمار را نشان دادند.

میزبان محک

مایه‌زنی مکانیکی گیاه *Chenopodium amaranticolor* باعث به‌وجود آمدن لکه‌های نکروتیک موضعی مشابه موارد ذکر شده در منابع گردید و به‌صورت بیولوژیکی نیز حضور ویروس BNYVV تأیید شد. آلودگی مکانیکی *C. quinoa* نیز باعث به‌وجود آمدن لکه‌های کلروتیک و به دنبال آن لکه‌های نکروتیک گردید. این علائم نیز بر وجود BNYVV تاکید کرد (Richards 1991).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز براساس رونوشت‌برداری معکوس (RT-PCR): واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تقریباً ۸۰۰ برابر از TAS-ELISA حساس‌تر است. حد نهائی رقت قابل ردیابی ویروس در عصاره ریشه توسط واکنش زنجیری پلی‌مراز $^{-۶}$۱۰ می‌باشد اما باید احتیاط‌های لازم را در خصوص آلودگی و پاسخ‌های مثبت اشتباه در نظر گرفت (Henry et al. 1995). شکل ۱ الگوی نواری محصول RT-PCR نمونه‌های آلوده و سالم را در ژل آگارز نشان می‌دهد. نمونه‌هایی که در آزمون الیزا آلوده تشخیص داده شده بودند، در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نیز به‌ترتیب قطعات موردنظر با اندازه‌های ۵۰۰، ۴۳۰، ۸۶۰ و ۶۰۰ جفت باز برای RNAهای شماره یک تا چهار تکثیر شد. این نتایج با نتایج قبلی همخوانی کامل دارد (Koenig et al. 1995). درکنترل‌های منفی هیچگونه تکثیری صورت نگرفت.



شکل۱ الگوی نواری محصول RT-PCR نمونه‌های آلوده به ویروس و نمونه‌های سالم. ردیف ۱: نشانگر وزن مولکولی Fermentas (Lithuania)، ردیف ۲: RNA 1 (500bp)، ردیف ۵:RNA 2 (430 bp)، ردیف ۸: RNA 3 (859 bp)، ردیف ۱۰: RNA 4 (602 bp). ردیف‌های ۳، ۴، ۶، ۷ و ۹ مربوط به ریشه گیاه سالم هستند.

تجزیه‌های ملکولی نیز علاوه بر داده‌های قبلی وجود ویروس در منطقه مرودشت را تأیید کردند. این گزارش با استناد به داده‌های بیولوژیکی، سرولوژیکی و ملکولی پراکنش گسترده ویروس BNYVV را در منطقه مرودشت نشان می‌دهد. لیست روستاهای نمونه‌برداری شده و آلوده به شرح ذیل می‌باشد (جدول‌های ۱ و ۲):

جدول ۱ درصد آلودگی نمونه‌های تصادفی جمع‌آوری شده در منطقه مرودشت

ردیف	نام روستا	تعدادمزرعه	تعداد نمونه تصادفی	تعداد نمونه آلوده	درصد آلودگی
۱	فتح آباد	۸	۴۸	۳۱	۶۴/۶
۲	عمادآباد	۱۲	۶۴	۳۸	۵۹/۴
۳	شول	۷	۲۳	۱۱	۴۷/۸
۴	سارویی	۸	۳۷	۱۷	۴۵/۹
۵	شمس آباد	۱۱	۶۶	۳۶	۵۴/۵
۶	سیدان	۹	۳۹	۱۲	۳۰/۸
۷	کناره	۶	۲۳	۱۲	۵۲/۱
۸	مقصود آباد	۵	۱۹	۶	۳۱/۶
۹	قاسم آباد	۷	۳۴	۷	۲۰/۶
جمع کل		۷۳	۳۵۳	۱۷۰	۴۸/۲ میانگین

جدول ۲ درصد آلودگی نمونه‌های با علائم ظاهری جمع‌آوری شده در منطقه مرودشت

ردیف	نام روستا	تعدادمزرعه	تعداد نمونه مشکوک و دارای علائم	تعداد نمونه آلوده	درصد آلودگی
۱	فتح آباد	۸	۱۲	۱۰	۸۳/۳
۲	عمادآباد	۱۲	۱۹	۱۷	۸۹/۵
۳	شول	۷	۹	۶	۶۶/۷
۴	سارویی	۸	۱۴	۱۲	۸۵/۷
۵	شمس آباد	۱۱	۲۱	۱۹	۹۰/۵
۶	سیدان	۹	۱۶	۱۲	۷۵/۰
۷	کناره	۶	۱۰	۸	۸۰/۰
۸	مقصود آباد	۵	۸	۵	۶۲/۵
۹	قاسم آباد	۷	۱۵	۱۱	۷۳/۳
جمع کل		۷۳	۱۲۴	۱۰۰	۸۱/۰ میانگین

در برخی نمونه‌های با علائم رایزومانیا ویروس BNYVV ردیابی نگردید. این موضوع ممکن است به این دلیل باشد که این علائم می‌تواند توسط تعدادی از قارچ‌های خاکزی، فشردگی خاک مزرعه (Rush and Heidel 1995) ، یا سایر ویروس‌های چغندرقند ازقبیل ویروس پیچیدگی بوته چغندرقند (*Beet curly top virus*-BCTV) و ویروس زردی چغندرقند (*Beet yellows virus*-BYV) باشد (Whitney and Duffus 1998).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز(PCR): واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده‌از آغازگرهای اختصاصی روی DNA استخراج شده از عصاره ریشه‌های موئین، در تعدادی از نمونه‌ها قطعه‌ای با طول موردنظر را تکثیر کرد. نتایج به دست آمده وجود گسترده قارچ *P. betae* در شهرستان مرودشت را نشان می‌دهد. این قارچ ناقل ویروس در ۹۴درصد از مزارع نمونه‌برداری شده (شامل مزارع سالم و آلوده به رایزومانیا) وجود داشت که نشان دهنده پتانسیل بالای گسترش این بیماری در کلیه مزارع چغندرقند منطقه می‌باشد. هر چند احتمال تفاوت در انتقال ویروس BNYVV بین جمعیت‌های مختلف این قارچ بعید نمی‌باشد، بررسی‌های بیشتری جهت تأیید این موضوع لازم است. نکته قابل توجه دیگر نقش احتمالی قارچ فاقد ویروس در کاهش محصول چغندرقند می‌باشد (Wisler et al. 2003). جدول ۳ نام روستاها و درصد آلودگی آن‌ها را نشان می‌دهد.

جدول ۳ نام روستاها و درصد آلودگی آن‌ها به قارچ *P. betae* در منطقه مرودشت

ردیف	نام روستا	تعدادمزرعه	تعداد نمونه تصادفی و دارای علائم	تعداد نمونه آلوده	درصد آلودگی
۱	فتح آباد	۸	۶۰	۵۸	۹۶/۷
۲	عمادآباد	۱۲	۸۳	۸۰	۹۶/۴
۳	شول	۷	۳۲	۳۱	۹۶/۹
۴	سارویی	۸	۵۱	۴۷	۹۲/۲
۵	شمس آباد	۱۱	۸۷	۸۶	۹۸/۹
۶	سیدان	۹	۵۵	۴۹	۸۹/۱
۷	کناره	۶	۳۳	۳۲	۹۷/۰
۸	مقصود آباد	۵	۲۷	۲۴	۸۸/۹
۹	قاسم آباد	۷	۴۹	۴۱	۸۳/۷
جمع کل		۷۳	۴۷۷	۴۴۸	۹۴/۰ میانگین

تعیین توالی RNA4: قطعه‌ای از RNA شماره ۴ ویروس رگبرگ زرد نکروتیک چغندرقند به طول ۵۶۰ جفت باز پس از تکثیر به روش RT-PCR تعیین توالی گردیده و در بانک ژن به ثبت رسید (کد دسترسی در بانک ژن DQ163905) و با توالی‌های مشابه موجود در بانک ژن مورد مقایسه قرار گرفت. توالی به دست آمده به شرح ذیل می‌باشد:

```
BASE COUNT      142 a     76 c    123 g    219 t
ORIGIN
1   tgttatagtg gtgttgatgt tctgtctgat gagctatgtg aagctaatat tgttcatact
61  tcggtttcgt ctgttgcgat gttcaatagg tcgtacaaac ctgaagacgt ctggatgcta
121 ttacttacgt ctagtacttg ttatggttat catgatgttg ttgttgaaat agaccaatgt
181 acattacctt ctaatataga tgggtgtgtt cattgttctg gcgtttgcta tttcaatgat
241 aatcattgta tttgtggtcg tcgtgatagt aatccatcca atccgccttg ttttcaattt
301 attaaagatt gtaatgagtt gtatggaaca aatgaaacta aacaattcat ttgtgacctt
361 gttggtgatg ataacttgga cagtgttaac actctaacaa aagaagggtg gcgaaggttt
421 tgtgatgttc tttggaatac cacttatggt gatgttgagt ctcgtacttt tgcacgcttt
481 ctgtggtttg tcttttatca cgattagtgg tatttatgat gtgtttagtt attcgagatc
541 caagaataat aatatgtata

Translation:
     "CYSGVDVLSDELCEANIVHTSVSSVAMFNRSYKPEDVWMLLLTSSTCYGYHDVVVEIDQCTLPS
     NIDGCVHCSGVCYFNDNHCICGRRDSNPSNPPCFQFIKDCNELYGTNETKQFICDLVGDDNLDSV
     NTLTKEGWRRFCDVLWNTTYGDVESRTFARFLWFVFYHD"
```

براساس نتایج به‌دست آمده، این توالی (به طول ۵۶۰ جفت باز) دارای بیشترین شباهت با توالی‌های مربوط به دو جدایه‌ی دیگر BNYVV شامل یک جدایه از ژاپن (D84410) و یک جدایه‌ی ویروس از کشور ایتالیا (AF197552) بود. شباهت جدایه‌ی مرودشت با این دو توالی به ترتیب برابر ۹۹/۳ و ۹۹/۶درصد محاسبه گردید. بررسی و مقایسه توالی‌ها نشان می‌دهد که تفاوت‌ها مربوط به نواحی کدکننده ژنوم نبوده و احتمال یکسان بودن منشا این جدایه‌ها خصوصاً جدایه ایتالیایی که مثل ایران در منطقه مدیترانه قرار دارد را تقویت می‌نماید.

پراکنش و فراوانی بالای رایزومانیا در منطقه مرودشت می‌تواند به دلیل استفاده از ماشین‌آلات آلوده در

عملیـــات زراعی، حمل و نقل خاک آلـوده سطـح ریشه چغندرقنـد یا سایر محصولات و ورود فـاضلاب و ضایعـات کارخانهٔقند مرودشت به مزارع اطراف باشد (Heijbroke 1988; Scott and Cooke 1993). با توجه به اهمیت اقتصادی بیماری و طولانی‌بودن دوره پنهان آن که باعث می‌شود در زمان ظهور علائم مایه تلقیح زیادی در مزرعه تولید شده باشد، توصیه می‌گردد اقدامات لازم در جهت به کنترل در آوردن تکثیر و توسعه این ویروس صورت پذیرد. کاشت ارقام مقاوم یا نسبتاً مقاوم و بهداشت زراعی موضوعی است که باید مورد توجه قرار گیرد. سایر اقدامات کنترلی مثل کاشت زودهنگام چغندر که باعث می‌شود ناقل ویروس هنوز غیرفعال باشد، کاهش طول زمان و افزایش دفعات آبیاری، تناوب طولانی مدت و ضد عفونی خاک راه‌هایی است که در منابع از آن‌ها به عنـوان راه‌های موفق کاهش شدت بیماری و میزان خسارت نام برده شده است (Rush and Heidel 1995; Tamada 2002). از طرف دیگر نظر به این که میزان پراکنش قارچ ناقل بیماری در منطقه بسیار بالاست باید اقدامات لازم در جهت آلوده نشدن مناطق جدید را معمول داشت.

سپاسگزاری

نگارنده بر خود لازم میداند از دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت که هزینه انجام این تحقیق را تأمین نموده است، تشکر نماید.

منابع مورد استفاده: References:

احمدی، ع.ر و جلالی، ص. ۱۳۷۷. وجود علائم ریشه‌ریشی چغنـــدرقند (شبه Rhizomania) در اصـفهان. خلاصـه مقـالات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، کرج. صفحه ۱۲۷.

ایزدپناه، ک. ا. هاشمی، پ. کامران، ر. پاک نیت، م. سهندپور، آ و معصومی، م. ۱۳۷۵. وجود گسترده بیماری ریشه‌ریشی چغندرقند (شبه Rhizomania) در فارس. مجله بیماری‌های گیاهی، جلد ۳۲: ۲۰۶-۲۰۰.

توده‌فلاح، م. ارجمندی، ن و محمودی، ب. ۱۳۷۹. بررسی وضعیت آلودگی و پراکنش بیماری ریزومانیا (ریشه گنایی) چغندرقند در ایران. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، اصفهان. صفحه ۷۲.

جعفرپور، ب. جعفرپور، ب و فلاحتی رستگار، م. ۱۳۷۹. شیوع بیماری ریزومانیا در استان خراسان. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، اصفهان. صفحه ۷۳.

دارابی، س. کامران، ر و ایزدپناه ک. ا. ۱۳۷۷. موقعیت بیماری ریشه گنایی (ریشه ریشی) چغندرقند در استان فارس و کهکیلویه و بویر احمد. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، کرج. صفحه ۱۲۸.

مرکز آمار ایران، ۱۳۸۲. سالنامه آماری کشور. ۷۰۵ صفحه.

سهندپور، آ و ایزدپناه، ک. ا. ۱۳۷۷. وقوع بیماری ریشه ریشی (Rhizomania) چغندرقند در چند استان کشور. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، کرج. صفحه ۲۶۲.

شهرآیین، ن. حیدری، ا. نراقی، ل. فرزادفر، ش و قطبی، ت. ۱۳۷۹. اولین گزارش از وقوع بیماری ریزومانیای چغندرقند در استان سمنان. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، اصفهان. صفحه ۲۶۱.

Al Musa AM, Mink GI (1981) Beet necrotic yellow vein virus in North America. Phytopathology, 71: 773-776

Anonymous (2004) Diagnostic protocols for regulated pests-beet necrotic yellow vein virus. EPPO Bulletin, 34: 229-237.

Canova A (1959) Appunti di patologie della barbietola. Inf. Fitopatol., 9: 390-396.

Heijbroke W (1988) Dissemination of rhizomania by soil, beet seeds and stable manure. Netherlands Journal of Plant Pathology, 94: 9-15.

Henry CM, Baker I, Morris J, Hugo SA (1995) Detection of beet necrotic yellow vein virus using reverse transcription and polymerase chain reaction. Journal of Virology Methods, 54: 15-28.

Henry CM, Harju V, Brewer G, Barker I (1992) Methods for the detection of Rhizomania in soil. Aspects of Applied Biology, 32: 129-133.

Hughes DW, Galau G (1998) Preparation of RNA from cotton leaves and pollen. Plant Molecular Biology Reporter, 6: 253-257.

Koeing R (1996) Nucleotide sequence analysis of RNA-5 of five isolates of beet necrotic yellow vein virus and the identity of a deletion mutant. Journal of General Virology, 79: 575-580.

Koeing R, Luddecke P, Haeberle AM (1995) Detection of beet necrotic yellow vein virus strains, variants and mixed infection by examining single-strand conformation polymorphisms of immunocapture RT-PCR products. Journal of General Virology, 77: 2051-2055.

Meunier A, Schmit JF, Stas, A, Kutluk N, Bragard C (2003) Multiplex reverse transcription PCR for simultaneous detection of Beet necrotic yellow vein virus, Beet soil-borne virus, and Beet virus Q and their vector *Polymyxa betea* Keskin on sugar beet. Applied Environmental Microbiology, 69: 2356-2360.

Mutasa ES, Chwarszczynska DM, Adams MJ, Ward E, Asher MJC (1995) Development of PCR for the detection of *Polymyxa betae* in sugar beet roots and its application in field studies. Physiological and Molecular Plant Pathology, 47: 303-313.

Mutasa ES, Ward E, Adams MJ, Collier CR, Chwarszczynska DM, Asher MJC (1993) A sensitive DNA-probe for the detection of *Polymyxa betae* in sugar beet roots. Physiological and Molecular Plant Pathology, 43: 379-390.

Richards KE (1991) Plant Viruses Online, Descriptions and Lists from the VIDE Database Beet necrotic yellow vein *furovirus*. http://image.fs.uidaho.edu/vide/descr 086.htm.

Richards KE, Tamada T (1992) Mapping functions on the multipartite genome of beet necrotic yellow vein virus. Annual Review of Phytopathology, 30: 291-313.

Rush CM, Heidel GB (1995) *Furovirus* diseases of sugar beets in the United States. Plant Disease, 79: 868-875.

Scott RK, Cooke DA (1993) The Sugar Beet Crop: Science into Practice (World Crop Series). Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.

Sutic DD, Ford RE, Tosic MT (1999) Hand book of plant virus diseases. CRC Press. Boca Raton, Florida 33431, 982 pp.

Tamada T (1999) Benyviruses. In Webster R, Granoff A (eds): Encyclopedia of virology, 2nd Ed. vol. II. Academic Press, New York, pp. 154-160.

Tamada T (2002) Beet necrotic yellow vein virus. Description of plant viruses. CMI/A.A.B. No 391.

Whiney ED, Duffus E (1998) Compendium of Beet Diseases and Insects, 3rd edition. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.

Wisler GC, Lewellen RT, Sears JL, Wasson JW, Liu HY, Wintermantel WM (2003) Interactions between *Beet necrotic yellow vein virus* and *Beet soil-born mosaic virus*. Plant disease, 87: 1170-1175.

Wisler GC, Liu HY, Duffus JE (1994) Beet necrotic yellow vein virus and relationship to eight sugar beet furo-like viruses from the United States. Plant disease, 78: 995-1001.