شیوع گسترده تیپ A ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندرقند در ایران

Extensive outbreak of the type A of Beet Necrotic Yellow Vein Virus in Iran

مریم ابراهیم قمی[۱]، سید باقر محمودی[۲]، فرشاد رخشنده‌رو[۳]*، مسعود نادرپور[۴] و پیمان نوروزی[۵]

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۶/۱۶ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۸/۲۹

م. ابارهیم قمی، س.ب. محمودی، ف. رخشنده رو، م. نادرپور و پ. نوروزی. ۱۳۹٦. شیوع گسترده تیپ A ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندرقند در ایران. **چغندرقند، ۳۳(۲): ۱٦۳- ۱۷٦.** DOI: 10.22092/jsb.2018.107517.1128

چکیده

هدف از این تحقیق، بررسی ژنوتیپ‌های مختلف Beet Necrotic Yellow Vein (BNYVV) در ایستگاه‌های تحقیقاتی چغندرقند کشور شامل طرق در خراسان رضوی، زرقان در فارس، میاندوآب در آذربایجان غربی و اکباتان در همدان بود. هم‌زمان نمونه‌هایی از مزارع حوزه کارخانه‌های قند تربت‌جام در خراسان رضوی، نهاوند در استان همدان، کمال‌آباد در استان البرز، نقده در استان آذربایجان‌غربی و قزوین در استان قزوین و نیز مزارع کشاورزان اراک در استان مرکزی مطالعه شد. جمعاً ۵۸ نمونه آلوده ریشه چغندرقند از این ایستگاه‌ها و مزارع فوق مورد بررسی قرار گرفتند. هم‌چنین تعداد ۳۰ نمونه خاک آلوده از مزارع چغندرقند مغان، طرق، زرقان و کمال‌آباد کرج جمع‌آوری و جهت تعیین نوع تیپ ویروس عامل بیماری رقم حساس در آنها کشت شد. برای تعیین نوع تیپ‌های A و B، ناحیه TGB ژنوم ویروس BNYVV با روش multiplex PCR تکثیر شد. به علاوه، با تکثیر قسمتی از ژنوم RNA5 ویروس از طریق تکنیک مولکولی RT-PCR و جفت آغازگر اختصاصی، ردیابی تیپ P یا J انجام گردید. بر این اساس در بین نمونه‌های آلوده مورد بررسی با روش multiplex PCR و جفت آغازگرهای اختصاصی A و B تنها قطعه ۳۲٤ جفت بازی تکثیر گردید. به این ترتیب در بین ۸۸ نمونه آلوده مورد بررسی، بدون استثنا تیپ A شناسایی و هیچ‌کدام از تیپ‌های B، P و J ردیابی نشدند. جدایه‌های BNYVV حاوی RNA5 در هیچ‌یک از نمونه ها یافت نشد.

واژه‌های کلیدی: چغندرقند، ریزومانیا، multiplex PCR، تیپ A، RNA5، BNYVV

۱- دانشجوی دکتری گروه بیماری شناسی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- دانشیار موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی ، کرج، ایران

۳- استادیار گروه بیماری شناسی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران *- نویسنده مسوول rakhshanderoo_fa@srbiau.ac.ir

۴- استادیار موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج ۱۵۱۶-۳۱۵۳۵، ایران

۵- دانشیار موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

مقدمه

ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندرقند (Beet Necrotic Yellow Vein Virus, BNYVV) عضو تیپ *Benyvius* عامل بیماری ریزومانیا (Rhizomania) در چغندرقند (*Beta vulgaris* L.,) است (Tamada and Baba 1973) و توسط زئوسپورهای شبه قارچ خاک‌زاد *Polymyxa betae* Keskin منتقل می‌شود (Abe and Tamada 1986). از زمانی که بیماری ریزومانیای چغندرقند توسط کانوا (Canova) در اواسط دهه ۱۹۵۰ میلادی در شمال ایتالیا مشاهده شد تا به حال تقریباً در تمام مناطق چغندرکاری دنیا گزارش شده است (Liu *et al*. 2007). خسارت و زیان بیماری به چغندرقند در غیاب روش‌های کنترل مؤثر می‌تواند در مناطق آلوده، شدید و اقتصادی باشد. ریشه اصلی فشرده، ضعیف و کوچک مانده و تکثیر غیرعادی و بیش از حد ریشه‌های فرعی به ریشه اصلی ظاهری مویی شکل داده که به آن دیوانگی ریشه (Madness root)گفته می‌شود. در مزارعی که به تیپ خاصی از BNYVV آلوده می‌گردند، به ندرت آلودگی سیستمیک یافت شده و برگ‌ها علائم زردی، چروکیدگی، پژمردگی و زردی رگبرگ‌ها را نشان می‌دهند که نام این ویروس هم بر گرفته از آن است (Tamada 2002; Tamada and Baba 1973).

پیکره میله‌ای شکل BNYVV دارای ژنوم چهار قطعه‌ای از نوع RNA تک‌لای مثبت است. در بعضی از جدایه‌های اروپا و آسیا، قطعه پنجم RNA نیز وجود دارد (Putz 1977; Kiguchi *et al*. 1996; Koenig *et al*. 1997). RNA1 و RNA2 مسوول تکثیر RNA، حرکت سلول به سلول، مونتاژ پیکره و بازداری از خاموشی ژن پس از نسخه‌برداری (PTGS) می‌باشند. اولین ORF مربوط به RNA3، پروتئین p25 را کد می‌کند که به‌عنوان عامل مهمی در بیماری‌زایی BNYVV عمل می‌کند و مسوول ایجاد علائم ریزومانیا در ژنوتیپ‌های چغندرقند است (Chiba *et al*. 2003; Vetter *et al*. 2004). هم‌چنین پروتئین p25 در ژنوتیپ‌های مقاوم به‌عنوان محصول ژن غیربیماری‌زایی (avr) عمل می‌کند (Chiba *et al*. 2008). توالی پروتئین p25 به ویژه در آمینواسیدهای موقعیت ۷۰-۶۷ (aa_{67-70}) که به آن تتراد (Tetrad) گفته می‌شود، تنوع بالایی را در مناطق مختلف دنیا نشان داده است (Tamada *et al*. 2002; Lemaire *et al*. 2003; Schirmer *et al*. 2005; Ratti *et al*. 2005). پروتئین p31 کد شونده به وسیله RNA4 برای انتقال مؤثر ویروس توسط *P. betae* نقش دارد (Tamada and Abe 1989). RNA5 دارای یک ORF به نام p26 است که پروتئینی با ۲۲۸ آمینواسید را کد می‌کند (Kiguchi *et al*. 1996)؛ جدایه‌های BNYVV دارای RNA5، با افزایش انتقال ویروس از طریق دستجات آوندی، علائم بیماری شدیدتری را در مقایسه با جدایه‌هایی که فاقد آن هستند، ایجاد می‌کنند (Heijbroek *et al*. 1999; Tamada *et al*., 1996; Link *et al*. 2005). برای توسعه علائم ریزومانیا، حضور و تعامل ژنوم RNA3 و RNA5 الزامی است، اگرچه آن‌ها نقش متمایزی دارند. هم‌چنین واریانت‌های ویروسی دارای RNA5 در ارقام مقاوم، باعث خسارت می‌شوند (Tamada *et al*. 1996). در حال حاضر، RNA5 در برخی از جدایه‌های چین و ژاپن (Tamada *et al*. 1989; Kiguchi *et al*. 1996; Miyanishi *et al*. 1999)، فرانسه (Koenig *et al*. 1997)، قزاقستان (Koenig and Lennefors 2000)، انگلستان (Harju *et al*. 2002; Ward *et al*. 2007)، آلمان (Koenig *et al*. 2008) و به تازگی از ترکیه (Yilmaz *et al*. 2016) گزارش شده است.

در ابتـدا، بر اساس روش‌های مولکولی RFLP (Kruse *et al.* 1994) و SSCP (Koenig *et al.* 1995) روی محصول RT-PCR (IC) ناحیه پروتئین پوششی (CP) و سپس تجزیه و تحلیل روابط فیلوژنی RNA1، RNA2، RNA3 و RNA4 ، تیپ‌های اصلی A، B و P در جدایه‌های مختلف در دنیا متمایز گردیده‌اند. در آسیا اما علاوه بر این تیپ‌ها، تیپ J هم شناسایی شده است. هیچ‌کدام از این تیپ‌ها از نظر سرولوژیکی قابل تمایز نیستند و اختلاف آن‌ها به تنوع توالی، بیماری‌زایی و منشأ جغرافیایی مربوط می‌شود (Koenig *et al.* 1995; Koenig *et al.* 1997; Koenig and Lennefors 2000; Munier *et al.* 2003; Tamada *et al.* 2003; Schirmer *et al.* 2005; Chiba *et al.* 2011).

تیپ‌های A و B دارای چهار RNA ژنومی بوده و در حدود ۹۹– ۹۶ درصد توالی‌ها باهم شباهت دارند. این دو تیپ در آمینواسیدهای موقعیت‌های ۶۳، ۱۰۳ و ۱۷۲ در ناحیه سیسترون CP با هم اختلاف دارند که به تمایز بین ایزوله‌های تیپ A (T_{62}-S_{103}-L_{172}) و B (S_{62}-N_{103}-F_{172}) منجر می‌شود (Miyanishi *et al.* 1999). تیپ A دارای انتشار جهانی است و در ایران و بسیاری از کشورهای اروپایی، آمریکا، چین، ژاپن، آسیای میانه (قزاقستان) و ترکیه گسترش دارد (Schirmer *et al.* 2005; Chiba *et al.* 2008; Liu *et al.* 2008; Mehrvar *et al.* 2009; McGrann *et al.* 2009; Yilmaz *et al.* 2016)؛ در حالی‌که تیپ B انتشار محدودتری داشته و عمدتاً در آلمان، فرانسه (Kruse *et al.* 1994; Koenig *et al.* 2008) ، ژاپن، چین (Miyanishi *et al.* 1999, Chiba *et al.* 2008) ، بلژیک، انگلیس (Ratti *et al.* 2005)، سوئد (Lennefros *et al.* 2000) و تنها در یک نمونه در ایران (Jahromi *et al.* 2005) گزارش شده است. با وجود این، برای تشخیص تیپ A از تیپ B نواحی مانند TGB (Triple Gene Block) در RNA2 دارای اختلافات کافی است که بر اساس تکنیک RT-PCR و با آغازگرهای اختصاصی انجام می‌گیرد (Ratti *et al.* 2005). هیچ‌گونه اختلاف بیماریزایی بین تیپ‌های A و B گزارش نشده است (Rush *et al.* 2006). تیپ P و J دارای یک قطعه RNA ژنومی اضافی یعنی RNA5 هستند و در حدود ۹۶ درصد، باهم تشابه توالی دارند (Ward *et al.* 2007). در جدایه‌های تیپ J، دو حذف (deletion) در آمینواسیدهای موقعیت ۷۷ و ۲۲۹– ۲۲۷ در سیسترون p26 نسبت به تیپ P صورت گرفته است. این تیپ عمدتاً در آسیا انتشار دارد و از ژاپن، چین، مزرعه‌ای در آلمان و اخیراً به‌طور گسترده در ترکیه گزارش شده است (Schirmer *et al.* 2005; Yilmaz *et al.* 2016; Chiba *et al.* 2011; Liu *et al.* 2008; Koenig *et al.* 2008). تیپ P هم مانند تیپ‌های A و B از نظر سرولوژیکی قابل تشخیص نیست. با این حال، رفتارهای بیولوژیک و خصوصیات ژنومی آن را از سایر تیپ‌ها جدا می‌سازد. ابتدا در منطقه پیتیویرز فرانسه گزارش شد (Koenig *et al.* 1997). با این وجود، RNA5 اولین بار در جدایه‌های ژاپنی پیدا شده است (Tamada *et al.* 1989). انتشار جغرافیایی این تیپ، محدود است و در حال حاضر، تیپ P با RNA5 از قزاقستان (Koenig and Lennefors 2000)، انگلستان (Harju *et al.* 2002) و سوئد (Koenig and Lennefors 2000) و تیپ P بدون RNA5 از ایران (Mehrvar *et al.* 2009) گزارش شده است. در گیاهان مقاوم چغندرقند، تیپ P در مقایسه با تیپ‌های A و B سریع‌تر حرکت می‌کند و مقدار آلودگی بیشتری در ریشه‌های اصلی این گیاهان دیده می‌شود (Heijbroek *et al.* 1999). بنابراین تیپ P یک تهدید بالقوه‌ای برای ارقام مختلف چغندرقند محسوب می‌شود؛ مخصوصاً این که کنترل ریزومانیا

در دنیا صرفاً بر اساس به‌کارگیری رقم‌های مقاوم به ویروس است (McGrann *et al*. 2009).

این بیماری در مناطق عمده کشت چغندرقند کشور گزارش شده و به عنوان یک مشکل مهم مطرح و تا کنون تأثیر مخربی بر عملکرد چغندر داشته است. اولین بار، بیماری ریـزومانیا در استان فارس تشخیص و گزارش شد (Izadpanah *et al*. 1996). پس از این گزارش، بیماری در بسیاری از مناطق کشت چغندرقند کشور گزارش شد (Shahnejat-Bushehri *et al*. 2006; Farzadfar *et al*. 2007; Mehrvar *et al*. 2009). در سال ۲۰۰۴ مطالعاتی جهت شناسایی تیپ‌های BNYVV ایران در استان فارس انجام شد (Hashemi sohi and maleki 2004). توالی نوکلئوتیدی ژن *CP* از RNA2 و بخش‌هایی از RNA3 و RNA4 جدایه‌های BNYVV از استان فارس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج تجزیه و تحلیل ناحیه CP جدایه‌های فارس، در سطح اسیدآمینه و نوکلئیک‌اسید تشابه بالایی را با جدایه‌های تیپ A نشان دادند. همچنین M1ar یک جدایه متفاوت در استان خراسان، بر اساس الگوی RFLP و مقایسه ترکیب توالی CP آن با جدایه‌های دنیا در شبه تیپ B جای گرفت (Jahromi *et al*. 2005). تیپ‌های A و B در مزارع چغندرقند استان‌های خراسان رضوی و شمالی با استفاده از روش RT-PCR و آغازگرهای اختصاصی تیپ A (Gharooni Kardani *et al*. 2008) و آغازگرهای اختصاصی تیپ B که ناحیه TGB در RNA2 تکثیر می‌کند، تشخیص داده شدند. در تحقیق دیگری، نمونه‌های چغندرقند با علائم مشکوک به ریزومانیا از مناطق مختلف چغندرکاری کشور جمع‌آوری شدند. ناحیه p25 مربوط به RNA3 و قسمت‌هایی از RNA1، RNA2 و RNA4 با روش RT-PCR تکثیر و تعیین توالی شدند. براساس تجزیه و تحلیل ناحیه p25، علاوه بر تیپ A، تیپ P هم شناسایی شد. به‌طور کلی حدود ۹۲ درصد نمونه‌های چغندرقند مبتلا به BNYVV، تیپ A و بقیه تیپ P بودند. تیپ P از استان‌های اردبیل، آذربایجان‌غربی، خراسان‌رضوی، خراسان شمالی و کرمانشاه تشخیص داده شد (Mehrvar *et al*. 2009). هم‌چنین آلودگی ارقام مختلف چغندرقند در هشت استان عمده کشت چغندرقند کشور بررسی شد. نتایج این تحقیق وقوع روبه گسترش BNYVV را در کشور نشان داد (Ebrahim-Ghomi *et al*. 2016).

استفاده از ارقام مقاوم به ویروس تنها راه‌کار اقتصادی و موثر علیه بیماری ریزومانیا است و ژن *RZ1*، منبع مقاومت اولیه برای این بیماری است. با این وجود درجات متفاوتی از حساسیت یا تحمل ارقام مقاوم به واریانت‌های مختلف این ویروس دیده می‌شود. به جهت سطح زیرکشت وسیع ارقام مقاوم از یک طرف و خطر تغییرات ژنتیکی BNYVV و بروز واریانت‌های جدید مهاجم‌تر به علت افزایش فشار انتخابی و جهش‌های نقطه ای ویروس که قابلیت شکستن مقاومت Rz_1 را در ژنوتیپ‌های نسبتاً مقاوم دارند، بیم آن می‌رود که این واریانت‌ها تهدیدی برای رقم‌های مقاوم چغندرقند کشت شده در ایران باشد. بنابراین لزوم بررسی و تعیین تیپ‌های مختلف ویروس در مناطق عمده چغندرکاری کشور حائز اهمیت است. از آنجا که هرساله مؤسسه تحقیقات چغندرقند در ایستگاه‌های تحقیقاتی کشور مانند زرقان فارس، طرق خراسان رضوی، اکباتان همدان، مطهری البرز و میاندوآب آذربایجان غربی اقدام به ارزیابی و مقایسه مقاومت ارقام چغندرقند نسبت به بیماری ویروسی ریزومانیا و معرفی ارقام جدید را برای کشت می‌کند، لذا تعیین نوع تیپ ویروس موجود در این مناطق برای موفقیت در برنامه اصلاح و معرفی ارقام جدید بسیار ضروری است. در این مطالعه نوع تیپ BNYVV در ایستگاه‌های تحقیقاتی

چغندرقند و برخی مزارع از استان‌های کشور با روش multiplex PCR برای تشخیص همزمان تیپ‌های A و B و همچنین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی RNA5 برای ردیابی حضور قطعه پنجم ویروس عامل بیماری ریزومانیا که بیانگر وجود تیپ‌های P یا J است، بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه بیماری

در مهرماه سال ۱۳۹۲ و شهریورماه ۱۳۹۳ در ایستگاه‌های تحقیقات چغندرقند میاندوآب (آذربایجان‌غربی)، طرق (خراسان رضوی)، مطهری کرج (البرز)، اکباتان (همدان) و زرقان (فارس)، مزارع کارخانه‌های قند نقده در آذربایجان-غربی، قزوین، تربت‌جام در خراسان‌رضوی، مزارع کشاورزان نهاوند و اراک به منظور جمع‌آوری جدایه‌ها، نمونه‌برداری انجام گرفت. در مجموع ۲۱ ریشه چغندرقند از زرقان فارس دارای علائم ریشه‌مویی شدید، جامی شکل شدن ریشه، کاهش وزن و اندازه شدید و چند شاخه شدن ریشه از ارقام پارس (رقم متحمل)، تربت (رقم متحمل)، سانتا (رقم مقاوم خارجی)، پائولتا (رقم مقاوم خارجی) و جلگه (رقم حساس)، ۱۳ نمونه از طرق مشهد دارای علائم ریشه‌مویی شدید، جامی شکل شدن ریشه، کاهش وزن و اندازه شدید، نکروزه شدن آوندها و چند شاخه شدن ریشه در ارقام پارس، جام (رقم متحمل)، ارس (مقاوم خارجی)، سانتا، پائولتا و جلگه، دو نمونه از تربت جام با ریشه‌های شدیداً کوچک و کاهش یافته رقم جلگه، شش نمونه از میاندوآب با علائم کاهش وزن ریشه توام با ریشه‌مویی در ارقام جام و جلگه، سه نمونه از نقده دارای علامت ریشه مویی، سه نمونه از قزوین دارای علائم ریشه‌مویی و جامی شکل شدن ریشه، دو نمونه از کرج، چهار نمونه ازمنطقه خیرآباد اراک، دو نمونه از اکباتان همدان و دو نمونه از ناحیه فیروزان نهاوند انتخاب شدند. آلودگی تمام این نمونه‌ها با روش‌های الایزا و RT-PCR تایید و برای تعیین نوع تیپ BNYVV تعداد ۵۸ نمونه مورد بررسی قرار گرفتند.

آزمون طعمه‌گذاری گیاهان چغندرقند در خاک آلوده

در اواخر اسفندماه سال ۱۳۹۳ بذر ارقام ایرانی اکباتان، پایا، پارس، آریا، شکوفا و رقم مقاوم خارجی سانتا در گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک سالم و مخلوط با کمپوست کاشته و در شرایط گلخانه رشد داده شد. خاک‌های آلوده به ریزومانیا جمع‌آوری شده از مزارع چغندرقند مغان، کرج، مشهد و شیراز (که آلودگی آنها به ریزومانیا تایید شده بود) به گلخانه منتقل شدند، گیاهچه‌های چغندرقند ۴۰ روز بعد از رشد به خاک آلوده مناطق مختلف منتقل شد. گلدان‌ها با یک سوم خاک آلوده به ریزومانیا و دو سوم خاک سالم پر شدند و در شرایط دمایی ۳+۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دوماه نگه‌داری شدند.

آزمایش براساس کرت‌های یک بارخرد شده در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش ژنوتیپ چغندرقند وچهار نوع خاک مناطق مختلف در موسسه تحقیقات چغندرقند واقع در کرج اجرا شد. پس از گذشت دو ماه از رشد گیاهچه‌های چغندرقند در خاک آلوده، ریشه‌مویی آنها جمع‌آوری شد. ۰/۲ گرم از ریشه-مویی هر نمونه انتخاب و با روش الایزا DAS-ELISA و با استفاده از آنتی‌سرم جدایه‌های ایرانی BNYVV آلودگی آنها مورد بررسی قرار گرفت. از هر رقم، سی نمونه از بالاترین میزان جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر و پس از ۳۰ دقیقه، جهت تعیین تیپ ویروس انتخاب شد.

تعیین و تشخیص مولکولی تیپ‌های BNYVV

در ابتدا ۵۸ ریشه چغندرقند آلوده به BNYVV به دست آمده از ایستگاه‌های تحقیقاتی و مزارع مختلف کشور که با روش ELISA و واکنش RT-PCR آلودگی آنها تایید شده بودند (Ebrahim-Ghomi *et al*. 2016)، جهت تعیین نوع

تیپ ویروس انتخاب شدند. علاوه بر این ۳۰ نمونه از ریشه گیاهچه‌های چغندرقند رشد یافته در خاک‌های مغان و ایستگاه-های تحقیقاتی کرج، مشهد و زرقان که آلودگی آنها با روش سرولوژیکی الایزا تایید شده بودند، نیز جهت تعیین تیپ ویروس بررسی به عمل آمد.

استخراج RNA کل

استخراج RNA به روش نادرپور و همکاران (2011) انجام گرفت: در مرحله نخستین استخراج RNA، ۰/۱۲۵ گرم از بافت‌های ریشه مویی و انتهای ریشه چغندرقند نگه‌داری شده ۲۰- درجه سانتی‌گراد در نیتروژن مایع پودر و به میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری منتقل شدند. سپس ۸۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (100mM Tris-HCL pH,8.5, 100mM NaCl, 50 mM EDTA, pH 8.0, 2% SDS) به میکروتیوب‌ها اضافه گردید. با پیپت کردن، محتوای هر میکروتیوب کاملاً مخلوط و ۵۰۰ میکرولیتر مخلوط فنل/کلروفرم/ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲۴:۲۵) به هر میکروتیوب در روی یخ اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه به آرامی مخلوط گردید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ انجام گرفت. در مرحله بعد، ۵۰۰ میکرولیتر از فاز رویی به میکروتیوب جدید ۱/۵ میلی‌لیتر منتقل و ۵۰۰ میکرولیتر کلروفرم/ایزوآمیل الکل (۱:۲۴) به هر میکروتیوب اضافه شد. محتوای میکروتیوب‌ها به آرامی مخلوط شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد، ۴۰۰ میکرولیتر از فاز رویی جمع‌آوری و پس از انتقال به یک میکروتیوب جدید ۱/۵ میلی‌لیتری، ۷۰ میکرولیتر استات سدیم 3M (pH 5.6) و یک میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد به هر میکروتیوب افزوده شده و حداقل به مدت ۳۰ دقیقه در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و رسوب حاصل با یک میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد در ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه شستشو داده شد. رسوب در ۶۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به آرامی حل شد. ۳۰۰ میکرولیتر LiCl 8M به هر میکروتیوب اضافه و به مدت حداقل دو ساعت تا یک شب در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. در مرحله بعد، میکروتیوب‌ها ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. سپس شتشوی رسوب حاصل مانند قبل با اتانول ۸۰ درصد انجام شد. بعد از حذف اتانول، رسوب RNA حاصل در دمای اتاق خشک و در ۲۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد. محلول RNA به دست آمده تا زمان مصرف در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. برای صحت استخراج RNA، با دو روش اسپکتروفتومتر یا الکتروفورز کیفیت و کمیت RNA مورد ارزیابی قرار گرفت.

ساخت cDNA

سنتز cDNA از روی RNA ویروسی استخراج شده از مرحله قبل، طبق دستور شرکت MBI Fermentase و با استفاده از Random Hexamer Primer (RHP) انجام گرفت. ابتدا به میکروتیوب استریل یک تا دو میکرولیتر RNA با غلظت ۱/۵ میکروگرم بر میکرولیتر به همراه پنج میکرومولRHP اضافه شد و حجم آن به وسیله آب مقطر عاری از RNase به ۸ میکرولیتر رسانده شد. بعد از پیپت کردن و سانتریفیوژ کوتاه، میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و سپس بلافاصله میکروتیوب‌ها روی یخ منتقل شدند. پس از ۱۰ دقیقه، مواد پایه شامل چهار میکرولیتر از بافر واکنش نسخه‌برداری وارونه (250mM KCl, ،50mM DTT ،250mM $MgCl_2$، 250mM Tris- HCl ،pH, 8.3) و یک میکرولیتر dNTP با غلظت ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم مهار کننده ریبونوکلئاز

با غلظت ۴۰ واحد بر میکرولیتر و یک میکرولیتر آنزیم نسخه‌برداری وارونه M-MULV با غلظت ۲۰۰ واحد بر میکرولیتر اضافه و حجم نهایی واکنش با آب مقطر استریل عاری از RNase، حجم به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. پس از یک سانتریفیوژ کوتاه، واکنش در دمای ۴۲°C به مدت ۶۰ دقیقه انجام شد. در نهایت به منظور مهار آنزیم نسخه‌برداری معکوس (Reverse Transcriptase- RT)، بلافاصله محلول واکنش ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از اتمام واکنش، محصول cDNA حاصل تا هنگام استفاده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

واکنش multiplex PCR جهت تکثیر تیپ‌های A و B ویروس

تعداد ۸۸ نمونه از مناطق مختلف مورد بررسی برای تعیین نوع تیپ ویروس انتخاب شدند. به منظور تعیین تیپ‌های A و B ویروس رگبرگ زرد نکروتیک چغندرقند از روش مولکولی multiplex PCR (mRT-PCR) و دو جفت آغازگر اختصاصی RhizoA و RhizoB که ناحیه TGB از RNA2 را تکثیر می‌کنند (جدول ۱)، استفاده شد (Ratti *et al*. 2005). تکثیر قطعه ۳۲۴ جفت بازی به وسیله جفت آغازگر RhizoA مشخص کننده تیپ A وتکثیر قطعه ۱۷۸ جفت بازی به وسیله آغازگرهای RhizoB بیانگر تیپ B ویروس است.

جدول ۱ ترادف و موقعیت آغازگرهای اختصاصی تیپ‌های A و B

نام آغازگر	توالی′3-′5	اندازه (bp)	موقعیت	منبع
RhizoA-F	TAATAGTATCACTGTTACAACGATTAAGA	۳۲۴	۱۴۴۴-۱۴۷۲	Ratti *et al*. (2005)
RhizoA-R	GTCACCTCTTTTACCATTATATCAG		۱۷۴۲-۱۷۶۷	
RhizoB-F	TTGGGCAGCAACTTA	۱۷۸	۱۴۰۵-۱۴۱۹	Ratti *et al*. (2005)
RhizoB-A	ACGGTGAGTACAACATACTGA		۱۵۶۲-۱۵۸۲	

واکنش mRT-PCR برای ردیابی تیپ‌های A و B به این صورت انجام گرفت که حجم نهایی محصول mRT-PCR برای هر واکنش ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد و مواد مورد نیاز برای هر واکنش شامل۲/۵ میکرولیترBuffer PCR 10X، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۵۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر رفت (RhizoF,A/B) و برگشت (RhizoR,A/B)، ۰/۷۵ میکرولیتر dNTPs با غلظت ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۲۵ میکرولیتر (1U) آنزیم Taq DNA polymerase (5u/µl) (سیناژن، ایران) و ۱/۵ میکرولیتر cDNA برای هر نمونه به عنوان الگو قرار گرفته شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر با برنامه دمایی و زمانی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال ۳۵ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد، مرحله بسط ۴۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط نهایی هفت دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت.

تشخیص تیپ P دارای RNA5

ردیابی RNA5 و تعیین تیپ‌های P و J ویروس عامل بیماری ریزومانیا در ریشه گیاهان آلوده چغندرقند با روش RT-PCR و آغازگرهای اختصاصی BNYVV5 انجام گرفت (جدول ۲). آغازگرهای اختصاصی BNYVV5، ناحیه کدشونده

p26 واقع در RNA5 به طول ۸۸۵ جفت‌باز را تکثیر می‌کند که علاوه بر تشخیص وجود RNA5 می‌تواند بیانگر وجود تیپ P یا تیپ J هم باشد (Miyanishi *et al*. 1999; Chiba *et al*. 2008).

جدول ۲ ترادف و موقعیت آغازگرهای اختصاصی RNA5

منبع	اندازه (bp)	توالی′3-′5	نام آغازگر
Miyanishi *et al*. 1999	۳۰۸-۳۲۶	GTTTTTCCGGTCGCAGCACAAG	BNYVV5(1)-F
	۱۱۷۲-۱۱۹۲	CGAGCCCGTAAACACCGCATA	BNYVV5(1)-R

تهیه cDNA نمونه‌های مورد استفاده در این آزمایش با random hexamer primer طبق روش فوق انجام و ۱/۵ میکرولیتر از آن به عنوان الگو در واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر استفاده شد. مواد مورد نیاز برای هر واکنش شامل ۲/۵ میکرولیتر Buffer PCR 10X، یک میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۵۰ میلی‌مولار، یک میکرولیتر از هر آغازگر رفت و برگشت، ۰/۷۵ میکرولیتر dNTPs با غلظت ۱۰ میلی-مولار و ۰/۲۵ میکرولیتر (1U) آنزیم Taq DNA (5u/µl) polymerase (سیناژن، ایران) بود.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر با برنامه دمایی و زمانی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال ۳۰ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد، مرحله بسط ۴۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط نهایی هفت دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت.

محصول PCR از هر نمونه در روی ژل آگاروز یک درصد با ولتاژ ۸۰ ولـت الکتـروفورز گردید. رویت باندهای تکثیر شده و نیز عکس‌بـرداری از آنها با استفاده از دستگاه Gel Documentation انجام شد.

نتایج و بحث

برای ارزیابی میزان آلودگی نمونه‌های چغندرقند به بیماری ریزومانیا هم از ریشه اصلی (Tap root) و هم از ریشه‌های‌مویی استفاده شد. با این وجود، در مواردی که ریشه‌های جمع‌آوری شده فاقد ریشه‌مویی اما دارای کاهش وزن شدید و یا سایر علائم ریزومانیا بودند، از نوک و پوست ریشه آنها استفاده شد.

نتایج تعیین تیپ BNYVV

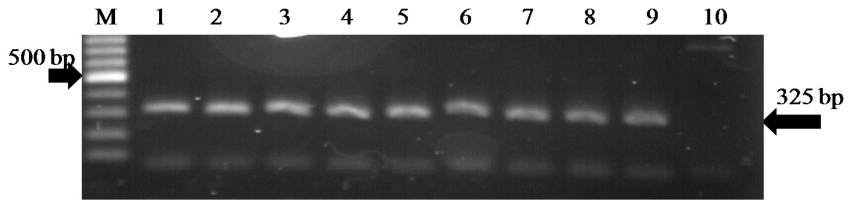
پس از انجام آزمون multiplex PCR با آغازگرهای اختصاصی تیپ A و B از ۸۸ جدایه‌های BNYVV جمع‌آوری شده از مزارع آلوده مختلف کشور و ریشه‌های جمع‌آوری شده از خاک‌های آلوده گلخانه، فقط قطعه ۳۲۴ جفت‌بازی تکثیر شد که نشان‌دهنده حضور تیپ A بود (شکل ۱). باند ۱۷۸ جفت بازی مربوط به تیپ B در هیچ‌یک از نمونه‌ها مشاهده نگردید (جدول ۳ و ۴).

جدول ۳ نوع تیپ BNYVV نمونه‌های ریشه جغندرقند جمع‌آوری شده از مزارع مناطق مختلف براساس واکنش mRT-PCR

تیپ ویروس	نوع نمونه	تعداد نمونه	محل نمونه برداری	نام منطقه
A	ریشه	۶	ایستگاه تحقیقات	میاندوآب
A	ریشه	۳	کارخانه قند	نقده
A	ریشه	۲	کارخانه قند	کرج
A	ریشه	۱۳	ایستگاه تحقیقات	طرق
A	ریشه	۲	کارخانه قند	تربت جام
A	ریشه	۲۱	ایستگاه تحقیقات	زرقان
A	ریشه	۴	روستای خیرآباد	اراک
A	ریشه	۲	ایستگاه تحقیقات	همدان
A	ریشه	۲	مزارع کشاورزان	نهاوند
A	ریشه	۳	کارخانه قند	قزوین

جدول ٤ نوع تیپ BNYVV نمونه‌های ریشه جغندرقند از گیاهان تلقیح شده با خاک‌های آلوده مناطق مختلف مستقر در گلخانه براساس واکنش mRT-PCR

تیپ ویروس	نوع نمونه	تعداد نمونه	محل نمونه برداری	نام منطقه
A	خاک	۷	مزارع پارس آباد	مغان
A	خاک	۵	ایستگاه تحقیقات	زرقان
A	خاک	۵	ایستگاه تحقیقات	کمالشهر
A	خاک	۱۳	ایستگاه تحقیقات	طرق



شکل ۱ الکتروفورز حاصل از محصول multiplex PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد. قطعه حدود ۳۲۵ جفت بازی مربوط به ناحیه TGB است. ستون‌های ۱ تا ۹ به ترتیب: نقده، همدان، زرقان، قزوین، اراک، مشهد، نهاوند، میاندوآب، تربت‌جام ستون ۱۰: نمونه سالم. ستون M: نشانگر تعیین اندازه 100bp ladder.

وجود تیپ A در کشور قبلاً نیز گزارش شده است (Hashemi sohi and maleki 2004). به طور مشابهی این تیپ BNYVV در مزارع چغندرقند استان‌های خراسان‌رضوی و شمالی با استفاده از روش RT-PCR و آغازگرهای اختصاصی تیپ A ردیابی شده است (Gharooni Kardani *et al.* 2008).

در بین ژنوتیپ‌های مختلف استفاده شده پارس، تربت، سانتا، پائولتا، ارس، جام و جلگه در این تحقیق که درجات متفاوتی از مقاومت را نسبت به BNYVV نشان دادند، نیز تیپ A ردیابی شد. بنابراین یکسان بودن نوع تیپ ویروس در تمام ارقام و در مناطق جغرافیایی مختلف نشان می‌دهد که این تیپ از نظر ژنتیکی در کشور بسیار پایدار است.

اگر چه تیپ و شبه تیپ B ویروس BNYVV قبلاً در نمونه‌هایی از استان خراسان گزارش شده است (Jahromi *et al.* 2005)، لیکن نتایج این تحقیق روی تعداد ۱۵ نمونه آلوده از این استان در ایستگاه تحقیقاتی طرق و مزارع حوزه کارخانه قند تربت‌جام، وجود این جدایه‌ها را تایید نکرد.

آزمون RT-PCR روی ۸۸ جدایه BNYVV جمع‌آوری شده از کشور با جفت آغازگرهای اختصاصی تکثیر کننده ناحیه RNA5-p26، نشان دهنده عدم ردیابی این قطعه RNA ژنومی در بین نمونه‌های مورد مطالعه بود. اما به دلیل شیوع گسترده جدایه‌های دارای RNA5 در کشور ترکیه و وجود مرز مشترک به ویژه در استان آذربایجان‌غربی، احتمال حضور آن حداقل در این استان وجود دارد. به همین دلیل برخی از نمونه‌های جمع‌آوری شده از جمله نمونه‌های مربوط به استان آذربایجان‌غربی، منطقه مغان که در تحقیق دیگری تیپ P بدون RNA5 در آن گزارش شده بود (Mehrvar *et al.* 2009)، استان‌های قزوین و همدان (شامل نهاوند و همدان) که دارای واریانت ALHG بودند (معمولاً همراه با این واریانت RNA5 وجود دارد) و نیز نمونه‌های سایر استان‌ها شامل مرکزی (اراک)، خراسان رضوی (طرق مشهد) و البرز (کمال‌آباد کرج) که در طول تحقیق جمع‌آوری شده بودند، بررسی شدند. اما در هیچ‌یک از مناطق مورد بررسی RNA5 تکثیر و ردیابی نشد. این نتایج با نتایج مهرو و همکاران (2009) مطابقت دارد.

نتایج این تحقیق و تحقیقات دیگر در ایران حاکی از این است که تیپ A از مدت‌ها قبل به صورت غالب وجود داشته و با وجود کشت وسیع ارقام حساس یا نسبتاً مقاوم مختلف، فقط همین تیپ در مزارع کشت چغندرقند گسترش دارد. این امر ممکن است به خاطر رقابت بین ژنوتیپ‌های مختلف BNYVV در اشغال آشیان اکولوژیک (Ecological niche) یا استرین‌های متفاوت *Polymyxa betae* در انتقال آنها باشد که جدایه خاصی از ویروس را می‌تواند انتقال دهد (Koenig *et al.* 2008). بنابراین این گونه به نظر می‌رسد که تیپ A ژنوتیپ BNYVV با شرایط اقلیمی ایران به خوبی سازگاری پیدا کرده و نسبت به سایر ژنوتیپ‌های ویروس، جهت آلوده کردن ارقام چغندرقند موفق‌تر است.

در این مطالعه آلودگی مخلوط تیپ‌های BNYVV مشاهده نشد. همچنان که در بیشتر نواحی کشت چغندرقند در سایر مناطق جهان، فقط تیپ A یا فقط تیپ B حضور دارند؛ با وجود این، آلودگی مخلوط هر دو تیپ فقط در نواحی مرزی این دو تیپ یافت شده و آلودگی مخلوط با ژنوتیپ‌های مختلف BNYVV در یک نمونه آلوده به ندرت مشاهده گردیده است (Schirmer *et al.* 2005, Kruse *et al.* 1994). راتی و همکاران (2009) آلودگی مخلوط تیپ‌های A و B را فقط در یک نمونه از ۷۲ نمونه ریشه چغندرقند آلوده که منشا آنها عمدتاً از کشورهای اروپایی بود، ردیابی کردند.

با توجه به نتایجی که از نمونه‌های آلوده ریشه جمع‌آوری شده از مزارع چغندرقند کشور در این مطالعه و نیز تحقیق گذشته (Ebrahim-Ghomi *et al.* 2016) به دست آمد، می‌توان گفت که بیماری ریزومانیا در کشور به طور قابل توجهی روبه گسترش است و تیپ A هم انتشار وسیعی دارد؛ همچنان که این تیپ در سراسر دنیا گسترش دارد (Schirmer *et al.* 2005; Chiba *et al.* 2008; Liu *et al.* 2008; Mehrvar *et al.* 2009; McGrann *et al.* 2009 Yilmaz *et al.* 2016). به غیر از تیپ A، سایر تیپ‌های BNYVV در هیچ‌یک از جدایه‌های ویروسی مورد بررسی ردیابی نشد؛ علاوه بر این تمام جدایه‌ها، فاقد RNA5 بودند، اگرچه امکان ورود جدایه‌های BNYVV دارای RNA5 از کشور ترکیه به ایران کماکان وجود دارد.

از آنجایی که کشت و صنعت چغندرقند در دنیا با معرفی ارقام نسبتاً مقاوم حفظ شده است؛ با این وجود مقاومت این ارقام تحت شرایط فشار شدید بیماری و ظهور واریانت‌های شکننده مقاومت ناکافی است (Liu *et al*. 2008). با توجه به این که تیپ A بیشترین تنوع واریانت را در دنیا دارد، بنابراین تعیین واریانت‌های ویروسی BNYVV به ویژه در مراکز تحقیقاتی چغندرقند کشور به منزله گام بعدی این تحقیق تلقی می شود.

سپاسگزاری

از مدیریت محترم مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند به جهت حمایت از این پژوهش قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده:

References:

Abe H, Tamada T. Association of Beet Necrotic Yellow Vein Virus with isolates of *Polymyxa betae* Keskin. Annals of Phytopatholgical Society of Japan. 1986, 52:235–47.

Izadpanah K, Hashemi P, Kamran R, Pakniat M, Sahandpour A, Masumi M. Widespread occurrence of Rhizomania like disease of sugar beet in Fars. Iranian Journal of Plant Pathology. 1996; 32: 200-206. (in Persian, abstract in English).

Chiba S, Kondo H, Miyanishi M, Andika I. B, Han C, Tamada T. The evolutionary history of Beet Necrotic Yellow Vein Virus deduced from genetic variation, geographical origin and spread, and the breaking of host resistance. Molecular Plant-Microbe Interactions. 2011, 24: 207‑18.

Chiba S, Miyanishi M, Andika IB, Kondo H, Tamada T. Identification of amino acids of the Beet Necrotic Yellow Vein Virus p25 protein required for induction of the resistance response in leaves of *Beta vulgaris* plants. Journal of General Virology. 2008, 89: 1314-323.

Chiba S, Miyanishi M, Kondo H, Tamada T. Single amino acid changes in the p25 protein of Beet Necrotic Yellow Vein Virus determine resistance responses of *Beta vulgaris* spp. *maritima*. In: Rush, C.M. (ed.). Proceedings of the Fifth Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors. Denver, CO: American Society of Sugar Beet Technologists. 2003, 5–8.

Ebrahim-Ghomi M, Mahmoodi B, Rakhshanderoo F, Naderpour M, Norouzi P. Widespread distribution of Beet Necrotic Yellow Vein Virus in Iranian sugar beet industry. Archives of Phytopathology and Plant Protection. 2016, 1-10.

Farzadfar S, Pourrahim R, Golnaraghi A. R, Ahoonmanesh A. surveys of Beet Necrotic Yellow Vein Virus, beet soil borne virus, beet virus Q and *Polymyxa betae* in sugar beet fields in Iran. Joural of Plant Pathology. 2007, 89: 277-81.

Gharooni Kardani S, Jafarpour B, Falahati Rastegar M, Tabasinezhad F. Detection of type A of Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV) using specific primers in RT PCR method in Razavi Khorasan province. Agricultural Science and Technology. 2007; 21 (1): 39-47. (in Persian, abstract in English).

Gharooni Kardani S, Jafarpour B, Sabokkhiz MA, Gharooni Kardani S. Occurrence of the B type of Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV) the causal agent of Rhizomania disease in Razavi and Northern Khorasan provinces. Agricultural Science and Technology. 2008; 22 (1): 19-25. (in Persian, abstract in English).

Harju VA, Mumford RA, Bockley A, Boonham N, Clover GRG. Occurence in the United Kingdom of Beet Necrotic Yellow Vein Virus isolates which contain RNA5. Plant Pathology. 2002, 51: 811.

Hashemi sohi H, Maleki M. Evidence for presence of type A and B beet necrotic Yellow Vein Virus in Iran. Virus Gene J. 2004, 29:353-358.

Heijbroek W, Musters PMS, Schoone AHL. 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. 1999, 105: 397-405.

Jahromi ZM, Azimpor M, Rashidiyan J, Rastgoo N, Arbabi M. Cloning and expression recombinant coat protein of an Iranian isolate of Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV) in *E. coli*. The 4th National Biotenology Congress. Kerman, Iran, 2005, 35.

Kiguchi T, Saito M, Tamada T. 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. 1996, 77: 575-580.

Koenig R, Haeberle AM, Commandeur U. Detection and characterization of a distinct type of Beet Necrotic Yellow Vein Virus RNA5 in a sugar beet growing area in Europe. Archives of Virology. 1997, 142: 1499-1504.

Koenig R, Kastirr U, Holtschulte B, Deml G, Varrelmann M. Distribution of various types and P25 subtypes of Beet Necrotic Yellow Vein Virus in Germany and other European countries. Archives of Virology. 2008, 153: 2139-2144.

Koenig R, Lesemann DE. Genus *Benyvirus*. In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Crstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB (eds). Virus Taxonomy. 7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Academic Press, San Diego, CA, USA. 2000, 917-922.

Koenig R, Lüddecke P, Haeberlé AM. Detection of Beet Necrotic Yellow Vein Virus strains, variants and mixed infections by examining single-stranded conformation polymorphisms of immunocapture RT-PCR products. Journal of General Virology. 1995, 76: 2051-2055.

Kruse M, Koenig R, Hoffmann A, Kaufmann A, Commandeur U. Restriction fragment length polymorphism analysis of reverse transcription- PCR products reveals the existence of two major strain groups of Beet Necrotic Yellow Vein Virus. Journal of General Virology. 1994, 75: 1835-1842.

Lemaire O, Beuve M, Weber C, Schirmer A, Link D, Meunier A, Bragard C, Gilmer D. Etiology and molecular epidemiology of a severe rhizomania disease occurring in confined locations in Europe: hypothesis for the implication of the RNA-3 and/or-5 of Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV)-P pathotype. Proceedings of the 1st joint IIRBASSBT Congress. San Antonio, TX, USA. 2003, 303–318.

Lennefors BL, Lindsten K, Koenig R. First record of A and B type Beet Necrotic Yellow Vein Virus in sugar beets in Sweden. European Journal of Plant Pathology. 2000, 106: 199–201.

Link D, Schmidlin L, Schirmer A, Klein E, Erhardt M, Geldreich A, Lemaire O, Gilmer D. Functional characterization of the Beet Necrotic Yellow Vein Virus RNA-5-encoded p26 protein: evidence for structural pathogenicity determinants. Journal of General Virology. 2005, 86: 2115-2125.

Liu H, Lewellen RT. Suppression of resistance-breaking Beet Necrotic Yellow Vein Virus isolates by Beet oak-leaf virus in sugar beet. Plant Disease. 2008, 92: 1043–1047.

Liu HY, Lewellen RT. Distribution and molecular characterization of resistance-breaking isolates of Beet Necrotic Yellow Vein Virus in the United States. Plant Disease. 2007, 91: 847-851.

McGrann GRD, Grimmer MK, Mutasa-Göttgens ES, Stevens M. Progress towards the understanding and control of sugar beet rhizomania disease. Molecular Plant Pathology. 2009, 10: 129-141.

Mehrvar M, Valizadeh J, Koenig R, Bragard CG. Iranian Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV): Pronounced Diversity of the p25 Coding Region in A type BNYVV and Identification of P-type BNYVV Lacking a Fifth RNA Species. Archives of Virology. 2009, 154:501-506.

Meunier A, Schmit JF, Stas, A, Kutluk N, Bragard C. 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 betae* KESKIN on sugar beet. Applied and Environmental Microbiogyl. 2003, 69: 2356- 2360.

Miyanishi M, Kusume T, Saito M, Tamada T. Evidence for three groups of sequence variants of Beet Necrotic Yellow Vein Virus RNA 5. Archives of Virology. 1999, 144: 879-892.

Naderpour M, Sadeghi L, Nouri Z, Kavand A. Development of multiplex RT-PCR assay for detection of the causal agents of citrus tristeza and cachexia diseases with coamplification of plant mRNA as an internal control. Iran J Virol. 2011, 5:28-33.

Putz C. Composition and structure of Beet Necrotic Yellow Vein Virus. Journal of General Virology. 1977, 35: 397-401.

Ratti C, Clover GRG, Autonell CR, Harju CM, Henry CM. A multiplex RT-PCR assay capable of distinguishing Beet Necrotic Yellow Vein Virus type A and B. Journal of Virology Methods. 2005, 124: 41-47.

Rush CM, Liu HY, Lewellen RT Acosta-Leal R. The continuing saga of rhizomania of sugar beets in the United States. Plant Disease. 2006, 90: 4-15.

Schirmer A, Link D, Cognat V, Moury B, Beuve M, Meunier, A, Bragard, C, Gilmer D, Lemaire O. Phylogenetic analysis of isolates of Beet Necrotic Yellow Vein Virus collected worldwide. Journal of General Virology. 2005, 86: 2897–2911.

Shahnejat-Bushehri AA, Adel J, Koohi Habibi M. Detection of Beet Necrotic Yellow Vein Virus with reverse transcription-polymerase chain reaction. International Journal of Agricultural Biology. 2006, 8:280-285.

Tamada T, Baba T. Beet Necrotic Yellow Vein Virus from Rhizomania affected sugar beet in Japan. Annual of Phytopathological Society of Japan. 1973, 39: 325-332.

Tamada T, Kusume T, Uchino H, Kiguchi T, Saito M. Evidence that Beet Necrotic Yellow Vein Virus RNA-5 is involved in symptom development of sugar beet roots. In: Sherwood JL. and Rush CM (Eds.). Proceedings of the 3rd Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors, Dundee, Scotland, 1996, 49-52.

Tamada T, Miyanishi M, Kondo H, Chiba H, Han G. Pathogenicity and molecular variability of Beet Necrotic Yellow Vein Virus isolates from Europe, Japan, China and The United States. Proceedings of the Fifth Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors, Zurich-Switzerland. 2003, 13-16.

Tamada T, Miyanishi M, Kondo H, Chiba S, Han CG. Pathogenicity and molecular variability of Beet Necrotic Yellow Vein Virus isolates from Europe, Japan, China and the United States. Proceedings of 5th Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors. American Society of Sugar Beet Technologists, Denver. 2002, 13–16.

Tamada T, Abe H. Evidence that Beet Necrotic Yellow Vein Virus RNA-4 is essential for transmission by the fungus *Polymyxa betae*. Journal of General Virology. 1989, 70: 3391-3398.

Tamada T. Beet Necrotic Yellow Vein Virus. CMI/AAB Description of Plant Viruses Wellesbourne: Association of Applied Biologists, 2002 , 391.

Vetter G, Hily JM, Klein E, Schmidlin L, Haas M, Merkle T, Gilmer D. Nucleo-cytoplasmic shuttling of the Beet Necrotic Yellow Vein Virus RNA-3-encoded p25 protein. Journal of General Virology. 2004, 85: 2459–2469.

Ward L, Koenig R, Budge G, Garrido C, McGrath C, Stubbley H, Boonham N. Occurrence of two different types of RNA-5-containing Beet Necrotic Yellow Vein Virus in the UK. Archives of Virology. 2007, 152: 59-73.

Yilmaz NDK, Sokmen MA, Kaya R, Sevik MA, Tunali B, Demirates S. The widespread occurrences of Beet soil borne virus and RNA-5 containing Beet Necrotic Yellow Vein Virus isolates in sugar beet production areas in Turkey. European Journal of Plant Pathology. 2016, 144: 443-455.