

Identification of new tetrad variants of beet necrotic yellow vein virus in Iran

1. Jamshid Soltani Idliki¹*: Assistant Professor, Sugar Beet Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran
2. Mohsen Mehrvar²: Associate Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

*Corresponding Author's Email Address: Soltani51@gmail.com

Article Type:

Original Research

Received: 20 April 2025

Revised: 21 February 2026

Accepted: 21 February 2026

How to Cite: Soltani Idliki, J., & Mehrvar, M. (2024). Identification of new tetrad variants of beet necrotic yellow vein virus in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 60(4), 379-400.

DOI: 10.22034/IJPP.2026.2021847.481

Abstract:

Rhizomania is a destructive viral disease in sugar beet. It is caused by the beet necrotic yellow vein virus (BNYVV; *Benyvirus necrobetae*), and, a Benyvirus transmitted by the soil inhabiting plasmodiophorid *Polymyxa betae*. Despite identification of resistance genes, BNYVV remains a major constraint because of resistance-breaking events as well as its ability to survive for long periods in soils in resting spores of *P. betae*. In this study, severe symptoms of rhizomania disease were observed in resistant sugar beet genotypes carrying the Rz1 gene in the fields, which indicated the resistance-breaking events. Plants from severely infected fields were sampled and total RNA was extracted from root hairs. BNYVV was detected using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The virus isolates were tested for the presence of RNA5 and RNA3 using RT-PCR targeting P26 and P25 genes, respectively. The results showed that all the tested BNYVV isolates were type A. However, types B and P were not detected. Next, the P25 protein coding gene of the RNA3 strand of these isolates was sequenced and nucleotide synonyms were determined. Determining the sequence of 650 base pairs of P25 protein, eight types of tetrad variants were identified in the so-called tetrad region (aa67-70). These tetrad variants included ACHG, AHHG, TLHG, VHHG, VCHG, AYHG, ALHG and ARHG, of which three variants TLHG, ARHG and VCHG are reported for the first time from the sugar beet fields of Khorasan province and Iran. As a result, greater study into the pathogenicity of new variants, as well as control via novel resistance sources and integrated control strategies, is required.

Keywords: Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), Rhizomania disease, Tetrad variant, Sugar beet, Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV)



© 2024 the authors. Published by Maher Publishing Institute. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) License.

Extended Abstract

Introduction

Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) is a member of the genus *Benyvirus* within the family *Benyviridae* (Gilmer et al., 2017). This virus is the causal agent of rhizomania, one of the most economically important diseases of sugar beet worldwide (McGrann et al., 2009), resulting in substantial reductions in root yield and sugar content. BNYVV is transmitted by the soil-borne plasmodiophorid vector *Polymyxa betae* (Abe and Tamada, 1986). Rhizomania is characterized by root constriction, excessive proliferation of lateral roots (“bearding”), and leaf chlorosis, particularly in susceptible cultivars (Acosta-Leal et al., 2008). Members of the genus *Benyvirus* possess rod-shaped particles approximately 20 nm in diameter, with four predominant particle lengths of about 390, 265, 100, and 85 nm. In some European and Asian isolates, a fifth RNA segment has also been reported (Koenig et al., 1995, 1997). All genomic RNAs contain a poly(A) tail at the 3' end, consisting of approximately 65–140 adenosine residues, and a cap-like structure at the 5' end (Richards & Tamada, 1992). RNAs 1 and 2 encode all functions required for viral replication, cell-to-cell movement, virion assembly, and suppression of post-transcriptional gene silencing. Field isolates typically contain four or five genomic RNA segments. RNA3, excluding the poly(A) tail, is approximately 1,773 nucleotides in length and encodes the P25 protein (Bouzoubaa et al., 1986). The first open reading frame of RNA3 encodes the 25-kDa P25 protein, a major pathogenicity determinant responsible for systemic infection and the induction of rhizomania symptoms in different sugar beet pathotypes (Vetter et al., 2004). The P25 protein plays a critical role in symptom development, including proliferation of adventitious roots in sugar beet and the formation of local lesions on leaves of experimental hosts such as *Chenopodium quinoa* (Jupin et al., 1992). In resistant genotypes, P25 also functions as the product of an avirulence (*avr*) gene (Chiba et al., 2008). Notably, the amino acid

sequence of P25—particularly positions 67–70 (aa67–70), known as the “tetrad” region—exhibits high variability among isolates from different geographic regions (Ratti et al., 2005; Schirmer et al., 2005; Tamada et al., 2002). In addition to P25, RNA3 encodes two other proteins: the P protein, which is involved in the development of necrotic symptoms, and the P4.6 protein, whose function remains unclear (Jupin et al., 1991). Previous studies in Iran have identified several tetrad motifs, including AFHR, SYHG, AYHG, ACHG, AHHG, and ALHG, with varying frequencies (Mehrvar et al., 2009). Ebrahimi et al. reported that AYHG and ACHG are the most prevalent tetrads in Iran, particularly in northeastern Khorasan Province, with frequencies of 41% and 18%, respectively. Other nationwide studies have shown that AHHG, ACHG, and AYHG are among the most common tetrads, with frequencies of 27%, 28%, and 23%, respectively. One of the primary objectives of the present study was to identify resistance-breaking virus isolates and to detect novel tetrad variants in surveyed sugar beet fields.

Methods and Materials

In this study, rhizomania disease was investigated in major sugar beet-growing areas of Khorasan Razavi Province, including Mashhad, Fariman, Jolgeh-Rukh, Torbat-Jam, Torbat-e Heydarieh, Chenaran, Jovin, and Gonabad. Root and leaf samples were collected from various domestic and foreign sugar beet cultivars showing symptoms suggestive of rhizomania and transported to the laboratory for analysis. Total RNA was extracted using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's instructions. Complementary DNA (cDNA) was synthesized using the Easy™ cDNA Synthesis Kit (Pars Toos Biotechnology Company, Iran) following the manufacturer's protocol. Detection of *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) was carried out by reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR). For molecular detection and identification of BNYVV, polymerase chain reaction (PCR) was performed following

cDNA synthesis using BNYVV-specific primers (BN2(1)-F and BN2(1)-R designed by Meunier et al. (2003). A multiplex RT-PCR (mRT-PCR) assay was conducted using RhizoA primers (amplifying a 324 bp fragment specific to type A) and RhizoB primers (amplifying a 178 bp fragment specific to type B) as described by Ratti et al. (2005). To differentiate virus types A and B, double-stranded reverse transcription PCR (dRT-PCR) was also performed. To detect P-type isolates through amplification of RNA5, a pair of specific BN5 primers designed by Schirmer et al. (2005) was used. These primers amplify the complete coding region of the P26 gene within the 886 bp RNA5 fragment. For nucleotide sequence determination of the P25 protein-coding gene located on the RNA3 segment of BNYVV, PCR products were cloned using T4 DNA ligase and the pGEM-T Easy Vector System according to the manufacturer's protocol. The extracted DNA plasmids were sent to Macrogen Inc. (South Korea) for sequencing analysis. Sequence analysis was performed using Geneious Prime, and multiple sequence alignment was conducted with MEGA X using the MUSCLE algorithm (Kumar et al., 2018).

Findings

The results indicated that all tested isolates of BNYVV belonged to type A, while types B and P were not detected. The P25 protein-coding gene located on the RNA3 segment of these isolates was subsequently sequenced, and nucleotide substitutions were analyzed. Sequence analysis of a 650-bp fragment of the P25 gene revealed eight distinct tetrad variants within the hypervariable tetrad region (amino acids 67–70). These variants were ACHG, AHHG, TLHG, VHHG, VCHG, AYHG, ALHG, and ARHG. Among them, the TLHG, ARHG, and VCHG variants are reported here for the first time from sugar beet fields in Khorasan Province, Iran.

Discussion and Conclusion

One of the objectives of this study was to identify resistance-breaking (RB) isolates in the surveyed fields. RB

isolates previously reported worldwide were also detected in this study; however, further investigations are required to confirm their resistance-breaking capacity. In this study, Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) isolates were obtained from sugar beet plants carrying the *RzI* resistance gene. These plants were collected from different regions of the province and exhibited severe rhizomania symptoms. Sequencing analysis of the p25 gene of these isolates revealed the tetrads AYHG, AHHG, ACHG, ALHG, VLHG, TLHG, and VCHG. The widespread cultivation of resistant varieties across the country appears to provide effective protection against rhizomania. Although the use of varieties carrying the *RzI* gene has so far been sufficient to control the disease, the potential emergence of resistance-breaking virus isolates in the future cannot be disregarded, as has been reported in several sugar beet-producing countries worldwide. Furthermore, in Iran, the presence of P-type isolates in regions where resistant varieties are cultivated represents a significant concern for the sustainable production of this strategic crop.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest in conducting the present study.

Ethical Considerations

All ethical principles and standards were fully observed in the conduct of this research.

Acknowledgments

The authors would like to express their sincere gratitude to all those who contributed to the various stages of this study.

شناسایی تتراد واریانتهای جدید ویروس نکروتیک زردی رگبرگ چغندر قند در ایران

۱. جمشید سلطانی ایدلیکی^{ID}: استادیار پژوهشی، بخش تحقیقات چغندر قند، مرکز تحقیقات و آموزش و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران
۲. محسن مهرور^{ID}: دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران
*پست الکترونیک نویسنده مسئول: Soltani51@gmail.com

نوع مقاله:

چکیده

پژوهشی اصیل

ریزومانیای یک بیماری ویروسی مخرب در چغندر قند است. این بیماری توسط ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندر قند (*beet necrotic yellow vein virus; BNYYV; Benyvirus necrobetae*) ایجاد می‌شود. علیرغم شناسایی ژن‌های مقاومت، BNYYV به دلیل شکست مقاومت و همچنین توانایی آن برای زنده ماندن برای مدت طولانی در اسپوره‌های در حال استراحت قارچ ناقل داخل خاک، به‌عنوان یک محدودیت اصلی کشت چغندر قند باقی‌مانده است. در این بررسی، پس از جمع‌آوری ریشه‌های آلوده با علائم شدید بیماری ریزومانیای در ژنوتیپ‌های چغندر قند مقاوم حامل ژن *Rz1* از مزارع کشت چغندر قند استان خراسان رضوی، استخراج آران‌ای کل از ریشه، BNYYV با استفاده از روش آزمون زنجیره‌ای پلیمرز همراه با ترانویسی معکوس ردیابی شد. جدایه‌های ویروس برای حضور RNA3 و RNA5 با استفاده از روش آزمون زنجیره‌ای پلیمرز همراه با ترانویسی معکوس به ترتیب باهدف قراردادن ژن‌های P25 و P26 مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که همه جدایه‌های مورد بررسی BNYYV از نوع A بوده و تیپ‌های B و P ردیابی نشدند. در ادامه ژن رمزکننده پروتئین P25 رشته RNA3 این جدایه‌ها، همسانه‌سازی و تعیین ترادف نوکلئوتیدی شدند. تعیین توالی ۶۵۰ جفت‌بازی از پروتئین P25، هشت نوع تتراد واریانت در ناحیه موسوم به تتراد (*aa_{vv}v*) شناسایی شد. این تتراد واریانتهای شامل TLHG، AHHG، ACHG، VHHG، VHHG، ALHG، AYHG، VCHG و ARHG بودند که از این تعداد سه واریانت TLHG، ARHG و VCHG برای اولین بار است که از مزارع چغندر قند استان خراسان و ایران گزارش می‌شود و تتراد VCHG قبلاً به‌عنوان واریانت شکننده مقاومت شناسایی شده است. بنابراین تحقیقات بیشتر در مورد بیماری‌زایی واریانتهای جدید شناسایی شده و کنترل آن‌ها از طریق استفاده از منابع مقاومت جدید و روش‌های کنترل تلفیقی ضروری به نظر می‌رسد.

کلیدواژه‌گان: آزمون زنجیره‌ای پلیمرز همراه با ترانویسی معکوس، بیماری ریزومانیای، تتراد واریانت، چغندر قند، ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندر قند

تاریخ دریافت: ۳۱ فروردین ۱۴۰۴

تاریخ بازنگری: ۲ اسفند ۱۴۰۴

تاریخ پذیرش: ۲ اسفند ۱۴۰۴

نحوه استناددهی: سلطانی ایدلیکی، جمشید، و مهرور، محسن. (۱۴۰۳). شناسایی تتراد واریانتهای جدید ویروس نکروتیک زردی رگبرگ چغندر قند در ایران. *بیماری‌های گیاهی*، ۶۰(۴)، ۳۷۹-۴۰۰.

DOI:

10.22034/IJPP.2026.2021847.481



مجوز و حق نشر: © ۱۴۰۳ تمامی حقوق انتشار این مقاله متعلق به نویسنده است. انتشار این مقاله توسط انتشارات ماهر به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با گواهی (CC BY 4.0) صورت گرفته است.

بلوک سه گانه ژن^۲ در RNA2 دارای اختلافات کافی برای تشخیص پاتوتیپ A از پاتوتیپ B است که بر اساس تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمرز با رونویسی معکوس^۳ و با آغازگرهای اختصاصی انجام می گیرد (Ratti et al., 2005). هایبروک و همکاران (۱۹۹۹) گزارش کرده اند که پاتوتیپ A کمی بیماری زاتر از پاتوتیپ B در ارقام چغندر قند به نظر می رسد. با این حال، پاتوتیپ P قدرت بیماری زایی بیشتری نسبت به پاتوتیپ A و B دارد. سویه های دیگر، P و L حاوی یک بخش پنجم اضافی (RNA-5) هستند. جدایه های نوع L دارای دو حذف در موقعیت های aa77 و ۲۲۷-۲۲۹ در پروتئین P26 در مقایسه با سویه نوع P هستند (Schirmer et al., 2005). سویه نوع P فقط در قزاقستان، فرانسه و انگلیس وجود دارد (Koenig & Lennefors, 2000; Schirmer et al., 2005; Ward et al., 2007). در حالی که سویه L به طور گسترده در ژاپن (Tamada et al., 2002)، چین (Li et al., 2008) و ترکیه (Kutluk Yilmaz et al., 2016) گسترش یافته است و از یک مزرعه در آلمان گزارش شده است (Koenig et al., 2008). پیکره BNYVV، میله ای شکل و به قطر ۲۰ نانومتر است. ژنوم چهار قطعه ای آن از نوع RNA تک رشته ای با قطبیت مثبت است که طول آن ها به ترتیب ۸۰، ۱۰۰، ۲۶۵ و ۳۹۰ نانومتر است. در بعضی جدایه های اروپا و آسیا، قطعه پنجم RNA نیز وجود دارد (Koenig et al., 1997; Koenig et al., 1995). تمام RNA ژنومی آن در قسمت انتهایی^۳ دارای تعداد زیادی آدنوزین (۶۵ تا ۱۴۰ واحد) بنام polyA و در قسمت انتهایی^۵ دارای ساختمان درپوش مانند (Cap structure) می باشد (Richards & Tamada, 1992). RNA های ۱ و ۲ تمام اطلاعات ضروری برای اعمالی مانند تکثیر RNA، حرکت سلول به سلول، مونتاژ پیکره و بازداری از خاموشی ژن پس از نسخه برداری^۴ را دارا می باشند. جدایه های مزرعه ای، دارای چهار یا پنج قطعه

ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندر (BNYVV)، گونه ای از جنس *Benyvirus* از خانواده *Benyviridae* است. ویروس عامل بیماری ریزومانیای یکی از مهم ترین بیماری های اقتصادی چغندر قند است که در سرتاسر جهان گسترش یافته است و باعث کاهش چشمگیری در عملکرد و درصد قند می شود. این ویروس توسط ناقل پلاسمودیوفورید (*Polymyxa betae*) (Keskin) منتقل می شود. بیماری ناشی از ویروس با ایجاد فشردگی ریشه، رشد بیش از حد ریشه های جانبی و کلروز برگ، به ویژه در ارقام حساس چغندر قند مشخص می شود (Acosta-Leal et al., 2008). جدایه های BNYVV را می توان به چهار نوع سویه طبقه بندی کرد (Chiba et al., 2005; Schirmer et al., 2011). هیچ کدام از این پاتوتیپ ها از نظر سرولوژیکی قابل تمایز نیستند و اختلاف آن ها به تنوع توالی، بیماری زایی و منشأ جغرافیایی آن ها مربوط می شود (Chiba et al., 2013; Schirmer et al., 2005). سویه های نوع A و B حاوی چهار بخش RNA، گسترده ترین پراکندگی را دارند (Bornemann & Varrelmann, 2013). تیپ A انتشار جهانی دارد و در بسیاری از کشورهای اروپایی، آمریکا، مراکش، چین، ژاپن، ایران، آسیای میانه (قزاقستان) و ترکیه گزارش شده است؛ در حالی که تیپ B انتشار محدودتری داشته و عمدتاً در آلمان، فرانسه، ژاپن، چین، سوئد (Ratti et al., 2005) انگلیس و بلژیک (Chiba et al., 2008) و ایران (Sohi & Maleki, 2004) گزارش شده است. تفاوت در توالی نوکلئوتیدی پاتوتیپ A و B کم و بین ۳-۶ درصد و شباهت توالی نوکلئوتیدی درون هر پاتوتیپ در حدود ۹۹-۹۶ درصد (Koenig & Lennefors, 2000; Meunier et al., 2003) و به خصوص در ناحیه پوشش پروتئینی^۱ در سراسر جهان بسیار حفاظت شده است (Schirmer et al., 2005). با وجود این، نواحی مانند

³ Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

⁴ Post-transcriptional gene silencing (PTGS)

¹ Coat protein (CP)

² Triple gene block (TGB)

شکننده مقاومت، (AF) آلانین و فنیل-آلانین، (AL) آلانین و لوسین، (SH) سرین و هیستیدین، (VC) والین و سیستئین، (VL) والین و لوسین و (AC) آلانین و سیستئین وجود داشتند (Liu & Lewellen, 2007). چنین تنوع‌هایی روی بیماری‌زایی و نیز شکستن مقاومت ژن *Rz1* اثر می‌گذارد. اسیدآمینۀ موقعیت ۶۸ در P25 برای القای مقاومت در برگ‌های گیاهان *B. vulgaris* موردنیاز است (Chiba et al., 2008). V67 در P25، تأییدی بر واریانت‌های شکننده مقاومت BNYVV در آمریکاست؛ درحالی‌که پاتوتیپ وحشی P25 دارای A67 است (Acosta-Leal & Rush, 2007). چنانچه والین در موقعیت ۶۷ (V67) باشد، نسبت به حالتی که آلانین (A67) باشد، تجمع خیلی زیاد ویروس در ریشه‌چه گیاه‌چه‌های مقاوم چغندر قند که به‌طور مکانیکی آلوده شدند را باعث می‌گردد (Koenig et al., 2008). در کشورهای اروپایی، واریانت‌های شکننده مقاومتی شناسایی شده‌اند که دارای اسیدآمینۀ پرولین در موقعیت ۶۹ (P69) بودند (Bornemann et al., 2015). همچنین، تصور بر این است که اسیدآمینۀ‌های موقعیت‌های ۱۲۹، ۱۳۵ و ۱۷۶ در P25 با جدایه‌های شکننده مقاومت و موقعیت تتراد مرتبط هستند (Acosta-Leal & Rush, 2007; Chiba et al., 2008). بررسی‌های محققین نشان می‌دهد که اسیدآمینۀ‌های آلانین (A67) و والین (V67) در موقعیت ۶۷، لوسین، سیستئین، هیستیدین، فنیل آلانین و تیروزین در موقعیت (L68، C68، H68، F68 و Y68)، هیستیدین در موقعیت ۶۹ (H69) و گلیسین ۷۰ (G70) و آرژنین در موقعیت (R70) در موتیف تتراد جدایه‌های ایرانی حضور دارند (Nassaj et al., 2013). اخیراً Galein و همکاران (۲۰۱۸) وجود ۲۱ گونه را در یک منطقه کوچک کشت چغندر قند واقع در منطقه Pithivier (فرانسه) گزارش کردند (Galein et al., 2018).

طبق مطالعات انجام‌شده تترادهای شناسایی شده از ایران، SYHG، AFHR، ACHG، AYHG، AHHG و ALHG بیشترین فراوانی را دارند (مهرور و

RNA ژنومی هستند؛ درحالی‌که اغلب در جدایه‌های آزمایشگاهی که در گلخانه نگهداری می‌شوند، این رشته به‌استثنای دم پلی (A) به طول ۱۷۷۳ نوکلئوتید است و پروتئین P25 را رمزگذاری می‌کند (موقعیت‌های نوکلئوتیدی ۱۱۰۲-۴۴۵) این پروتئین دارای سه چارچوب خواندنی باز^۱ بوده (Bouzoubaa et al., 1986) و مسئول توسعه علائم، ازدیاد ریشه‌های فرعی در چغندر قند و تشکیل لکه‌های موضعی در برگ‌های گیاهان محکی مانند *C. quinoa* می‌باشد (Jupin et al., 1992). اولین چارچوب خواندنی باز، پروتئین ۲۵ کیلو دالتونی P25 را رمز می‌کند که به‌عنوان عامل مهمی در بیماری‌زایی BNYVV عمل می‌کند و مسئول ایجاد آلودگی سیستمیک و ایجاد علائم ریزومانیا در ژنوتیپ پاتوتیپ‌های مختلف چغندر قند است (Vetter et al., 2004). همچنین، پروتئین P25 در ژنوتیپ‌های مقاوم به‌عنوان محصول ژن غیربیماری‌زایی (avr) عمل می‌کند (Chiba et al., 2008). توالی پروتئینی P25 به‌ویژه در اسیدآمینۀ‌های موقعیت ۷۰-۶۷ (aa67-70) که به آن تتراد گفته می‌شود، تنوع بالایی را در مناطق مختلف دنیا نشان داده است (Ratti et al., 2005; Schirmer et al., 2005; Tamada et al., 2002). ژنوم RNA3 دو پروتئین دیگر را نیز رمز می‌کند که پروتئین P در ایجاد علائم نکروز در گیاه نقش داشته و عمل پروتئین P4.6 هنوز به‌خوبی شناخته‌نشده است (Jupin et al., 1991).

تجزیه و تحلیل توالی P25 برخی از جدایه‌های سراسر دنیا توسط (Liu & Lewellen, 2007) نشان داد که مقاومتی که در برخی خاک‌ها در اروپا و آمریکا از دست‌رفته است، دارای تنوع توالی قابل توجهی است و پیشنهاد کردند که P25 در مقاومت نقش دارد. آمینواسیدهای مکان‌های ۷۰-۶۷ از پروتئین P25 که به‌عنوان تتراد خوانده می‌شود، در جدایه‌های سراسر دنیا تنوع بالایی دارند. این اسیدآمینۀ‌ها در جدایه‌های وحشی^۲، به‌صورت (AC) آلانین و سیستئین حفاظت‌شده هستند؛ درحالی‌که در همین موقعیت‌ها در جدایه‌های

² Wild Type (WT)

¹ Open Reading Frame (ORF)

۳. واکنش زنجیره ای پلی مرز همراه با ترانویسی معکوس

۴. ساخت دی.ان.ای مکمل قطعات هدف

برای ساخت دی.ان.ای مکمل از کیت سنتز شرکت بیوتکنولوژی پارس طوس بنام Easy™ cDNA Synthesis Kit بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد.

از کیت Taq DNA Polymerase Master Mix 2x RED که مخلوطی از ترکیبات Tris-HCl pH 8.5, (NH₄)₂SO₄, 3 Mm MgCl₂, 0.2% Tween 20 و 0.2 units/μl 0.4 Mm of each dNTP. Taq DNA Polymerase Ampliqon می باشد جهت تهیه مخلوط برای واکنش زنجیره ای پلیمرز قطعات هدف در این تحقیق استفاده شد.

۵. آزمون واکنش زنجیره ای پلی مرز برای ردیابی BNYVV

برای ردیابی و تشخیص مولکولی BNYVV، از واکنش زنجیره ای پلیمرز پس از ساخت دی.ان.ای مکمل با استفاده از آغازگرهای اختصاصی BNYVV (BN2(1)-R, BN2(1)-F) طراحی شده توسط Meunier و همکاران (۲۰۰۳) انجام گرفت. این جفت آغازگر قطعه ۵۴۵ جفت بازی (جدول ۱)، مربوط به بخشی از ژن p75 در RNA2 از ژنوم BNYVV را تکثیر می کنند (Meunier et al., 2003).

آزمون واکنش زنجیره ای پلیمرز دوگانه جهت شناسایی تیپ های

BNYVV

پس از استخراج اسید ریبونوکلئیک اسید کل، دی.ان.ای مکمل به عنوان رشته الگو ساخته شد. به منظور شناسایی تیپ A و B ویروس، از روش زنجیره ای پلی مرز همراه با ترانویسی معکوس دوگانه استفاده شد. در این واکنش از دو جفت آغازگر اختصاصی RhizoA (تکثیر قطعه ۳۲۴ جفت بازی مشخص کننده تیپ A) و RhizoB (تکثیر قطعه ۱۷۸ جفت بازی بیانگر تیپ B) که ناحیه TGB از قطعه RNA2 ویروس را تکثیر می کنند (Ratti et al.,

همکاران ۲۰۰۹). ابراهیمی و همکاران در تحقیقی نشان دادند که موتیف های با تتراد AYHG و ACHG به ترتیب با ۴۱ و ۱۸ درصد فراوانی بیشترین شیوع و گسترش بخصوص شمال شرق استان خراسان را در ایران دارند. در مطالعه های قبلی AHHG، ACHG و AYHG به ترتیب با ۲۷، ۲۸ و ۲۳ درصد به ترتیب بیشترین فراوانی را در کشور نشان دادند. از اهداف مهم این تحقیق یافتن جدایه های ویروسی شکننده مقاومت و شناسایی تتراد واریانت های جدید ویروس در مزارع مورد مطالعه بود.

مواد و روش ها

در این تحقیق، به منظور مطالعه بیماری ریزومانیا مناطق عمده کشت چغندرقد استان خراسان رضوی (مشهد، فریمان، جلگه رخ، تربت جام، تربت حیدریه، چناران، جوین و گناباد) انتخاب شدند. نمونه ریشه و برگ ارقام مختلف داخلی و خارجی چغندرقد مشکوک به آلودگی به بیماری ریزومانیا جمع آوری به آزمایشگاه انتقال داده شد و پس شستشو، از بافت هر نمونه ریشه، سه تکرار برداشته و در کیسه های پلاستیکی مخصوص قرار داده شدند. یک تکرار از نمونه های ریشه در یخچال با دمای چهار درجه سلسیوس و سایر تکرار نمونه ها در فریزر منهای ۲۰ درجه سلسیوس برای مراحل بعدی نگهداری شدند.

۱. تشخیص و تعیین آلودگی نمونه ها

۲. استخراج آر.ان.ای کل^۱

استخراج آر.ان.ای کل، ۰/۲ گرم از بافت های ریشه مویی و انتهای ریشه چغندرقد، توزین و سپس در نیتروژن مایع با کمک هاون چینی پودر شدند. پودر حاصل به لوله دو میلی لیتری منتقل شدند. جهت استخراج آر.ان.ای کل، از کیت کیاژن RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen-Germany) استفاده گردید.

^۱ Total RNA

Master Mix RED برای هر واکنش انجام گرفت. این واکنش در دستگاه ترموسایکلر با برنامه دمایی واسرشتگی ابتدایی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه و سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۴۰ ثانیه در دمای ۵۶ درجه سلسیوس، مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

(2005)، استفاده شد (جدول ۱). به‌منظور ردیابی تیپ P از طریق بررسی حضور RNA5 ویروس عامل بیماری ریزومانیا، از جفت آغازگرهای اختصاصی BN5 طراحی شده توسط شیمیر و همکاران (2005) که ناحیه رمزشونده کامل ژن P26 در قطعه RNA5 به طول ۸۶ جفت بازی را تکثیر می‌کند (Schirmer et al., 2005) استفاده شد (جدول ۱).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز همراه با ترانویسی معکوس دوگانه در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با استفاده از کیت Taq DNA Polymerase 2x

جدول ۱- آغازگرهای استفاده‌شده جهت تشخیص، تعیین تیپ‌های A، B و P، تکثیر ژن P25 از رشته RNA3 مربوط به ژنوم BNYVV و آغازگرهای عمومی

M13

Table 1. PCR primers used for detection, determination of A, B and P types and amplification of P25 gene from RNA3 strand of

BNYVV genome and general M13 primers

Oligo name	Sequence (5' toward 3')	product length (bp)
BN2(1)-F	ACATTTCTATCCTCTCCAC	545
BN2(1)-R	ACCCCAACAACTCTCTAAC	
RhizoA-F	TAATAGTATCACTGTTACAACGATTAAGA	324
RhizoA-R	GTCACCTCTTTTACCATTATATCAG	
RhizoB-F	TTGGGCAGCAACTTA	178
RhizoB-R	ACGGTGAGTACAACATACTGA	
BN5-F	GTTTTTCCGCTCGACAAGCG	886
BN5-R	CGAGCCCGTAAACACCGCATA	
BN3-F	GTGATATATTAGGCGAGTTTATG	650
BN3-R	TCATTATCATCAACACCGTCAG	
M13-F	TGTAACGACGGCCAGT	650
M13-R	CAGGAAACAGCTATGACC	

کیت pGEM-T Easy Vector Systems بر اساس شرکت سازنده آن انجام شد. پلاسمیدهای نوترکیب، به داخل سلول‌های مستعد *Escherichia coli* سویه DH5 α تراریخت شدند. همسانه‌ها از طریق کلونی پی‌سی‌آر با استفاده از آغازگرهای عمومی M13 شناسایی شدند (جدول ۱). پلاسمیدهای نوترکیب استخراج و جهت تعیین ترادف به‌صورت خوانش دوطرفه با آغازگرهای عمومی M13، به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید. توالی‌های حاصل، با نرم‌افزار Geneious Prime واکاوی و سپس با استفاده

از جدایه BNYVV به‌دست‌آمده از نمونه‌های مزارع استان که برای تکثیر ناحیه p25 انتخاب‌شده بودند، قطعه ۶۵۰ جفت بازی ژن p25 موردنظر، با استفاده از آزمون RT-PCR و آغازگرهای اختصاصی رفت‌وبرگشت BN3-F و BN3-R تکثیر شدند (جدول ۱).

همسانه سازی^۱ و تعیین ترادف ژن رمزکننده پروتئین P25 رشته RNA3 جهت تعیین ترادف نوکلئوتیدی ژن رمزکننده پروتئین P25 رشته RNA3 ویروس BNYVV، عمل همسانه‌سازی با کمک آنزیم لیگاز T4 با استفاده از

¹ Cloning

درصد آن‌ها ژن مقاومت Rz1 را دارند. در سال‌های اخیر، علائم ریزومانیا در ریشه بسیاری از این ارقام مشاهده شده است (شکل ۱). در نتیجه، این نشان می‌دهد که مقاومت ارقام حاوی ژن Rz1 در اکثر مناطق زیر کشت چغندر قند از جمله استان خراسان رضوی شکسته شده است. ییلماز و همکاران در سال (2018) بر اساس تحقیقات انجام‌شده اظهار کردند که ممکن است ظهور انواع سویه‌های شکننده مقاومت به BNYVV با استفاده گسترده از ارقام حامل ژن Rz1 در ارتباط باشد (Kutluk Yilmaz et al., 2018).

از نرم‌افزار MEGA-X به روش Muscles (Kumar et al., 2018) هم‌ردیف‌سازی شدند.

نتایج و بحث

سطح زیر کشت چغندر قند در ایران ۱۲۶۰۰۰ هکتار است که از این نظر خراسان رضوی بعد از آذربایجان غربی رتبه دوم کشوری را دارد. ۶۵ درصد از ارقام وارداتی در کشور، دارای ژن مقاوم به ریزومانیا هستند که بیش از ۹۵



شکل ۱. علائم بیماری ریزومانیا. سمت راست، علائم زردی برگ‌ها و اختلاف ارقام مقاوم (رنگ سبز تیره برگ‌ها) و حساس (زردی برگ‌ها) در مزرعه

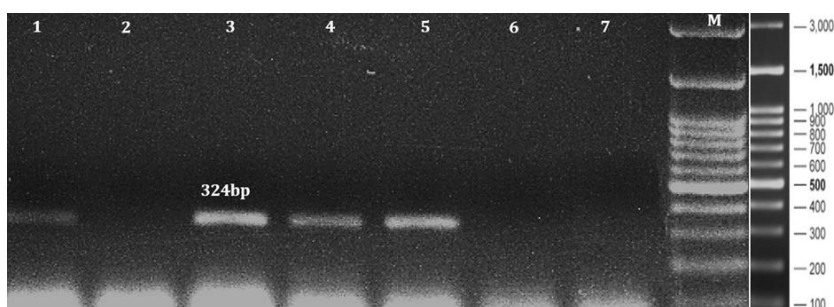
کشاورز. سمت چپ، علائم ریشه ریشی ناشی از این بیماری روی ریشه‌ها ارقام موریللا و ایزابلا

Fig1. Symptoms of rhizomania disease. right, symptoms of yellowing leaves and the difference between resistant varieties (dark green color of leaves) and susceptible (yellowing of leaves) in the farmer's field. left, Symptoms of hairy roots caused by this disease on the roots of Murilla and Isabella varieties

گرفت. محصول این آزمون بر اساس اندازه قطعه مورد انتظار (۳۲۴ جفت باز) روی ژل الکتروفورز برای نمونه‌های مناطق به دست آمد و نشان داد که تیپ این جدایه‌ها از نوع A است (شکل ۲). این نتیجه با نتایج مهرور و همکاران که بیان کردند که تیپ بیش از ۹۰ درصد جدایه‌های ایران از نوع A است، مطابقت دارد.

تعیین تیپ‌های BNYVV در استان خراسان رضوی

پس از تأیید وجود BNYVV در ۱۹۷ نمونه از مزارع چغندر قند مناطق مختلف استان خراسان رضوی (مشهد، فریمان، جلگه رخ، تربت‌جام، تربت‌حیدریه، چناران، جوین و گناباد)، تفکیک تیپ A ویروس بر اساس ناحیه بلوک سه‌گانه در RNA2 ویروس که بسیار حفاظت‌شده است، انجام



شکل ۲- نقوش حاصل از الکتروفورز محصول duplex-PCR در ژل آگارز ۱/۲ درصد با استفاده از جفت آغازگرهای RhizoA-F، RhizoA-R، RhizoB-F و RhizoB-R. RhizoB-R. قطعه ۳۲۴ جفت بازی مربوط به ناحیه TGB است. راهک اول تا هفت، الگوی از نمونه‌های موردبررسی. ستون M، نشانگر تعیین اندازه 100bp

شرکت SMBIO، تایوان

Fig 2. Agarose gel electrophoresis pattern for duplex PCR amplification product of 324bp TGB protein Using the primer pairs RhizoA-F, RhizoA-R and RhizoB-F, RhizoB-R. Lane: 1 to 7 are pattern of examined samples, lane 8(M): The DM2100 ExcelBand™ 100 bp DNA Ladder (SMBIO, Taiwan)

زنجیره‌ای پلیمرز موردبررسی قرار گرفتند که نتایج حاصله نشان‌دهنده عدم وجود RNA5 در جدایه‌های موردبررسی بود. اگرچه مهرور و همکاران (۲۰۰۹)، نوع P بدون RNA5 را از خراسان رضوی، اردبیل و آذربایجان غربی گزارش نمودند، اما تاکنون این تیپ از دیگر مناطق کشور گزارش نشده است. باین وجود گزارش‌ها بسیاری وجود دارد که علائم شدید این بیماری را در بسیاری از ارقام بخصوص ارقام مقاوم چغندر قند کشت شده در مناطق مختلف ایران از جمله خراسان رضوی نشان می‌دهد. محققین دلیل ایجاد علائم شدید این بیماری را در تیپ P این ویروس به توانایی حرکت سریع‌تر آن در میزبان نسبت می‌دهند (Galein et al., 2018). با توجه به شرایط اقلیمی ایران، این ویروس به ندرت می‌تواند در گیاه سیستمیک شده و واجد علائم برگ‌مانند نکروز رگبرگی در مزارع باشد. در بیشتر مواقع علائم شامل زرد شدن برگ‌ها و ظاهر ریشه‌ریشی ریشه است.

محققین علت قدرت بیشتر تیپ P دارای RNA5 این ویروس را در همکاری RNA3 و RNA5 آن می‌دانند که این عمل موجب شکست مقاومت ارقام دارای ژن مقاوم Rz1 می‌شود و نتایج تحقیقات نشان داده است که RNA5 به‌تنهایی فقط علائم مشابه جرب روی ریشه چغندر قند ایجاد می‌کند (Tamada et al., 2021).

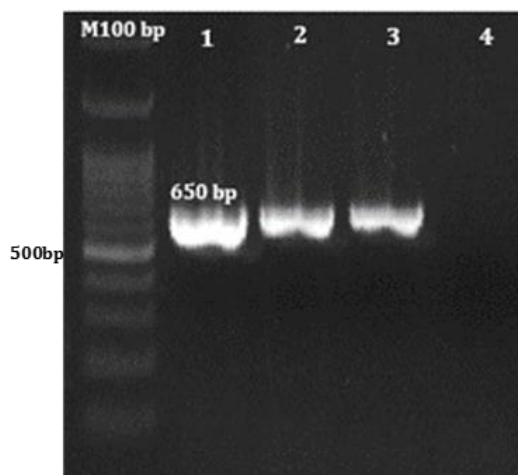
تکثیر قطعه p25 از RNA3 و تعیین نوع تتراد

قطعه کامل ۶۵۰ جفت بازی ژن p25 جدایه BNYVV از نمونه‌های مزارع استان، با استفاده از آزمون RT-PCR و آغازگرهای اختصاصی رفت و برگشت

تیپ B در ایران قبلاً توسط هاشمی سوهی و مالکی در سال ۱۳۸۳ گزارش شده بود (Sohi & Maleki, 2004)؛ اما تاکنون گزارش دیگری مبنی بر حضور این تیپ در ایران ارائه نشده است. بر اساس اظهار محققین در یک منطقه، فقط تیپ‌های A یا B حضور خواهد داشت؛ در حالی که 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، فرانسه و بلژیک گزارش شده است (Kutluk Yilmaz et al., 2017). تشخیص تیپ P از A و B از طریق آزمون زنجیره‌ای پلیمرز ژن رمزکننده پروتئین P25 در BNYV RNA3 امکان‌پذیر است (Koenig et al., 1998). 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 است. گروه اول BNYVV می‌باشد که نوع تتراد در آن SYHG بوده و دارای اسید ریونوکلیک 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 فاقد RNA5 بود، اما تاکنون تیپ P دارای RNA5 این ویروس از ایران گزارش نشده است (Mehrvar, 2009). 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 (Kutluk Yilmaz et al., 2016). در این مطالعه نیز جدایه‌ها از نظر وجود یا عدم وجود RNA5 ویروس با استفاده از آزمون

BN3-F و BN3-R تکثیر و در فرآیند همسانه سازی استفاده شدند (شکل

۳).



شکل ۳- الگوی نقوش حاصل از الکتروفورز محصول RT-PCR در ژل آگارز ۱/۲ درصد. قطعه ۶۵۰ جفت بازی مربوط به ژن رمزکننده پروتئین P25 است.

نمونه ۱، مشهد؛ نمونه ۲، تربت جام؛ نمونه ۳، جوین؛ M، نشانگر تعیین اندازه 100bp شرکت SMBIO، تایوان

Fig 3. Agarose gel electrophoresis pattern for 650bp RT-PCR amplicon of P25 protein. 1, Mashhad; 2, Torbat-e-Jam; 3, Jovein; M, DM2100 ExcelBand™ 100 bp DNA Ladder (SMBIO, Taiwan)

نتایج همسانه سازی قطعه P25 از RNA3

محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز رشته RNA3 مربوط به BNYVV مربوط به جدایه‌های که در توالی‌یابی نشان از جهش در ناحیه تتراد پروتئین P25 که مربوط به شهرستان‌های استان بودند، بعد از تخلیص از ژل، با کمک آنزیم لیگاز T4 وارد پلاسمید pgEM®-T Easy Vector شدند. بعد از انتقال پلاسمید به درون باکتری (ترانسفورمسیون) و کشت باکتری تراریخت شده در روی محیط کشت LB آگار حاوی آمپیسیلین، تعداد زیادی کلونی سفید و آبی روی محیط کشت باکتری رشد کردند. کلونی‌های سفید انتخاب و در واکنش PCR Colony به وسیله آغازگرهای اختصاصی رشته ناحیه P25، قطعه مورد نظر ۶۵۰ جفت بازی ویروس، تکثیر شد که این موضوع نشان‌دهنده صحت همسانه سازی ژن P25 ویروس در پلاسمید را نشان داد.

در ادامه این تحقیق، به منظور تعیین نوع تتراد جدایه‌ها، پس از همسانه سازی ژن رمزکننده پروتئین P25 ویروس جهت تعیین توالی دوطرفه ارسال

و پس از دریافت نتایج با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 (Kumar et al., 2018)

به روش ClustalW هم‌تراز شدند. نتایج بررسی چهار اسیدآمین به بسیار تغییرپذیر ناحیه تتراد پروتئین P25 جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق نشان داد که این ناحیه در جدایه‌های اکثر مناطق خراسان رضوی از نوع ACHG (تیپ A ویروس) است؛ این بدان معنی است که در ناحیه تتراد این جدایه جهشی صورت نگرفته است، تاکنون این تتراد از بسیاری از کشورها از جمله یونان (Pavli et al., 2011)، ترکیه (Chiba et al., 2011)، اسپانیا (Schirmer et al., 2005)، فرانسه (Galein et al., 2013)، بلغارستان، ایتالیا، سوئیس (Koenig et al., 2008) و چین (Zhao et al., 2015) گزارش شده است. بیلماز و همکاران (2018) در تحقیقی اظهار کردند که این تتراد در جدایه‌های ترکیه در شرایط گلخانه موجب شکست مقاومت ارقام مقاوم دارای ژن مقاومت Rz1 شده است (Kumar et al., 2018). همچنین مهرور و همکاران (۱۳۸۸) بیان کردند که این نوع تتراد در جدایه‌های این ویروس از استان‌های مختلف کشور، بخصوص در استان خراسان فراوانی

AHHG در برخی از کشورها می‌تواند به‌عنوان جدایه‌های شکننده مقاومت منظور شوند.

نشان داده‌شده است که اسیدآمینه‌های تتراد در موقعیت ۷۰-۶۷ از RNA3-رمزکننده پروتئین P25 در تیپ A ویروس، تنوع قابل توجهی دارند. تاکنون سیزده تتراد از جدایه‌های ایران گزارش شده است، از جمله AYHG, ACHG, AHHG, VHHG, SYHG, ALHG, VLHG, AFHG, AFHR, AHYG, TLHG, ARHG و VCHG. نه تتراد اول قبلاً توسط مهرور و همکاران در جدایه‌های ایران گزارش شده بود (Mehrvan et al., 2009)؛ درحالی‌که سه تتراد ARHG, TLHG و VCHG شناسایی شده در این تحقیق جدید بوده و قبلاً از مزارع چغندرقد ایران گزارش نشده است. تتراد VCHG که مسئول شکستن مقاومت در ارقام مقاوم چغندرقد معرفی شده است برای اولین بار از اسپانیا گزارش گردیده است (Schirmer et al., 2005). در این مطالعه تتراد ARHG از مزرعه تحقیقاتی ایستگاه تحقیقات کشاورزی طرق در مشهد شناسایی شد، همانطوریکه ملاحظه می‌گردد در این واریانت در اسیدآمینه ۶۸ پروتئین P25 جهش رخ داده و تغییرات نوکلئوتیدی (سیتوزین به یوراسیل در موقعیت نوکلئوتیدی ۲۰۰ از ژن P25) در اسیدآمینه سیستئین (C) به آرژینین (R) تبدیل شده است. این تتراد قبلاً فقط از چین توسط Zhuo و همکاران (Zhao et al., 2015) گزارش شده است. بررسی نتایج نشان داد که در تتراد نوع T67L68HG، اسیدآمینه‌های ۶۷ و ۶۸ تغییر یافته‌اند؛ بطوریکه در موقعیت اسیدآمینه ۶۷، اسیدآمینه آلانین (A) به ترئونین (T) و در موقعیت ۶۸ اسیدآمینه سیستئین (C) به لوسین (L) جهش یافته است. بر اساس نتایج محققین، اسیدآمینه موقعیت ۶۸، نقش مهمی در پاسخ به مقاومت میزبان توسط ویروس ایفا می‌کند. فنیل آلانین (F) یا تیروزین (Y) در این موقعیت، فاکتور کلیدی مهمی در تعیین پاسخ مقاومت در لاین‌های مقاوم *B. maritime* و رقم مقاوم Rizor دارد. هرگونه تغییر در این اسیدآمینه، منجر به بروز حساسیت می‌شود.

بالتری نسبت به سایر تترادها دارد. با توجه به غالب بودن این تتراد، احتمال می‌رود که در مناطقی از کشت چغندرقد جدایه‌های حامل این نوع تتراد به‌عنوان یک جدایه شکننده مقاومت عمل کند؛ اگرچه این موضوع در ایران نیاز به بررسی بیشتر دارد.

در تحقیقی بورنمن و همکاران در سال ۲۰۱۳ با استفاده از توالی یابی نسل جدید^۱ و آزمون‌های بیولوژیکی دریافتند که ژنوتیپ‌های چغندرقد اثر انتخابی قوی بر تجمع انواع مختلف تتراد دارند. جهش‌های تتراد در استرین‌های شکننده مقاومت این ویروس (RB) با از دست دادن سازگاری نسبی، همراه هستند به‌استثنای تیپ P این ویروس که از دست دادن سازگاری نسبی در آن‌ها صورت نمی‌گیرد (Bornemann & Varrelmann, 2013). برخی از ژنوتیپ‌های چغندرقد برای توسعه سویه‌های ویروسی انتخاب می‌شوند و برخی از ژنوتیپ‌های دیگر باعث توسعه سایر سویه‌های ویروسی غیر مرتبط می‌شوند (Galein et al., 2018).

نتایج توالی‌یابی جدایه‌های مشهد نشان داد که در یکی از جدایه‌ها در اسیدآمینه ۶۸ (aa68) جهش رخ داده است. بطوریکه اسیدآمینه قطبی و غیر باردار سیستئین (C) به اسیدآمینه باردار آرژینین (R) تغییر یافته بود (ARHG). این تتراد برای اولین بار از ایران و خراسان گزارش می‌شود و تاکنون در دنیا از چین توسط ژائو و همکاران (۲۰۱۵) گزارش گردیده است. تاکنون روی بیماری‌زایی این جدایه حامل این نوع تتراد تحقیقاتی صورت نگرفته است.

نتایج توالی‌یابی یکی از جدایه‌های مربوط به شهرستان جوین نشان داد که در اسیدآمینه ۶۸ (aa68) جهش رخ داده است. بطوریکه اسیدآمینه قطبی غیر باردار سیستئین (C) به اسیدآمینه باردار هیستیدین (H) تبدیل شده است. این تتراد (AHHG) قبلاً از ایران (Mehrvan et al., 2009) و دنیا (Chiba et al., 2015; Koenig et al., 2008; Zhao et al., 2011) گزارش شده است. چیا و همکاران در سال ۱۳۹۰ بیان کردند که دو تتراد ACHG و

¹ Next-Generation Sequencing (NGS)

گزارش کردند که تنوع در چهار اسیدآمینو پروتئین P25 و بروز انواع جدید واریانت ویروس مستقیماً بر مقاومت ارقام تأثیر نمی‌گذارد (Chiba et al., 2011).

تاکنون، طبق مطالعات انجام‌شده تترادهای شناسایی‌شده از ایران، AFHR، SYHG، AYHG، ACHG، AHHG، ALHG بیشترین فراوانی را دارند (Mehrvar et al., 2009). این محققین گزارش کردند که در ایران، فراوانی

سه تتراد ACHG، AHHG و AYHG بیش از سایر تترادها است. تتراد AYHG بیشتر در استان فارس یافت می‌شود که دارای آب‌وهوای گرم‌تری نسبت به مناطق دیگر است، در این مطالعه تتراد AYHG در استان خراسان (مزارع چغندرکند کشت و صنعت جوین) شناسایی شد. اگرچه مهرور و همکاران (۲۰۰۹) گزارش دادند که فراوانی سایر تترادها متفاوت است، به‌عنوان مثال در برخی استان‌های ایران مانند استان‌های خراسان (ACHG)، فارس و کرمانشاه، تترادهای AYHG و AHHG غالب است اما به‌طور پراکنده این تترادها در همه استان‌ها یافت می‌شود. نتیجه اینکه در مطالعات قبلی توسط مهرور و همکاران (۲۰۰۹) و این بررسی مشخص گردید که تتراد ACHG در استان خراسان غالب است (Mehrvar et al., 2009). با نمونه‌برداری از ۱۵ مزرعه کشت و صنعت خضری (جنوب خراسان رضوی-گناباد) که از ارقام داخلی و خارجی مقاوم از جمله ایزابلا، بریجیتا، موریلا استفاده‌شده بود، علائم بیماری ریزومانی در همه مزارع مشاهده شد (شکل ۱). در این بررسی انتظار بر این بود که واریانت‌های جدیدی از ویروس شناسایی شود ولی با بررسی‌های مولکولی انجام‌شده مشخص گردید که تتراد از نوع ACHG موجب شکسته شدن مقاومت ارقام و بروز علائم شده است. در این مطالعه، همه تترادهای ACHG از انواع مقاوم و حساس پیدا شدند، اما هیچ‌یک از دیگر تترادهای شناسایی‌شده، از ارقام حساس تشخیص داده نشد. به‌این ترتیب، این تتراد در ارقام حامل ژن‌های مقاومت "Pecora" و "Bregita" (Rz1rz1)KWS، ارقام حساس (Rz1rz1+Rz2rz2) "Izabella" و ارقام حساس (rz1rz1rz1) با علائم

تصور براین است که تغییر در آمینواسید موقعیت ۶۸ می‌تواند برآمادگی فاکتورهای میزبان که به‌طور اختصاصی این پروتئین ویروس را شناسایی می‌کند، اثر قوی داشته باشد و گیاه را قادر می‌سازد تا در برابر ویروس، واکنش مقاومت نشان دهد بطوریکه در صورت تغییر این اسیدهای آمینو امکان تشخیص و واکنش دفاعی مناسب از میزبان سلب خواهد شد (Chiba et al., 2008).

لیو و لولن (۲۰۰۷) از ایالات متحده، شش تتراد مختلف بر اساس دو آمینواسید ۶۷ و ۶۸ در پروتئین P25 شامل AC، VL، AL، VC، AF و SY شناسایی کردند، همه آن‌ها مشابه تترادهای شناسایی‌شده در دوازده تتراد مختلف ایران است و از میان تترادهای شناسایی‌شده در جدایه‌های ایرانی، شش تتراد مشابه تترادهای شناسایی‌شده در جدایه‌های چینی شامل AYHG، ACHG، ASHG، AHHG، AYHR، AFHR، AHHR، AYPG، ACRG، ADHG، VCHG و ARHG است (Zhao et al., 2015). اخیراً دو تتراد VCHG و ARHG در چین توسط ژائو و همکاران (۲۰۱۵) شناسایی شده‌اند. در این مطالعه، تتراد واریانت VCHG از یک مزرعه که رقم مقاوم حامل ژن مقاومت (Rz1) کشت‌شده بود، شناسایی شد. برعکس، پاولی و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که به نظر نمی‌رسد وجود والین (V) در موقعیت ۶۷ با افزایش بیماری‌زایی و مقاومت در برابر شکسته شدن جدایه BNYVV در یونان همراه باشد، اما بسیاری از محققان گزارش کردند که تترادهای VCHG و VLHG قادر به شکست مقاومت ارقام حامل ژن Rz1 بوده و به‌عنوان یک واریانت شکننده مقاومت محسوب نمودند (Acosta-Leal et al., 2010; Bornemann et al., 2015; Chiba et al., 2011; Galein et al., 2016; Hanse & Raaijmakers, 2016; Tamada et al., 2013). در فرانسه، تتراد VCHG را در ارقام مقاوم حامل دو ژن مقاومت (Rz1rz1Rz2rz2) شناسایی کردند و آن را به‌عنوان یک واریانت محسوب کردند (Galein et al., 2018) از سوی دیگر، چیبیا و همکاران (۲۰۱۱)

پیش‌ازاین، کوئینگ و همکاران، (۲۰۰۵) گزارش کردند که این تتراد مرتبط با تیپ A، در جدایه‌های اسپانیایی به‌عنوان یک واریانت شکننده مقاومت (RB) شناخته شده است (Koenig et al., 2005).

نتایج این بررسی نشان داد که در مزارع چغندرقد چناران، مشهد، فریمان و جوین دو تتراد واریانت، ACHG و AHHG بیشترین فراوانی را دارند (جدول ۲). تاکنون این تتراد در بیشتر مزارع چغندرقد استان‌های کشور از قبیل خراسان شمالی، رضوی، آذربایجان غربی، ایلام، قزوین، سمنان و زنجان شناسایی شده است (Mehrvan et al., 2009). اخیراً نیز از مزارع استان البرز گزارش شده است و دلیل شیوع آن را در این استان به علت هم‌جواری با استان‌های قزوین و زنجان ذکر نموده‌اند (Ebrahim-Ghomi et al., 2016). تاکنون این واریانت از بسیاری از کشورهای دنیا از جمله چین، ترکیه، فرانسه، بلژیک، سوئیس و سوئد نیز شناسایی شده است (جدول ۳)؛ اما تتراد واریانت VHHG فقط در دو منطقه مشهد و جوین شناسایی شد و این احتمال می‌رود که این واریانت از تتراد واریانت AHHG مشتق شده باشد. بطوریکه در این واریانت اسیدآمین ۶۷ از تتراد واریانت AHHG که اسیدآمین آلانین می‌باشد به والین تغییر یافته است (شکل ۴). این واریانت تاکنون تنها از ایران (Mehrvan et al., 2009) و ترکیه (Dide & Yilmaz, 2016) گزارش شده است.

ریشه‌شناسی شناسایی شد. مشاهدات عینی در مزرعه بیانگر این موضوع بود که خسارت تتراد ACHG، در ارقام فاقد ژن مقاومت بیش از سایر ارقام است. نتایج کوتلوک و همکاران (۲۰۱۸) در شرایط گلخانه نیز نشان داد که جدایه‌های ترکیه‌ای واجد این نوع تتراد (ACHG)، توانایی غلبه بر مقاومت ارقام مقاوم حامل ژن Rz1 را دارا است (Kutluk Yilmaz et al., 2018). پیش‌تر از این در آمریکا، لیو و لولن (۲۰۰۷) اظهار داشتند که بر اساس تغییر دو اسیدآمین در موقعیت (۶۷ و ۶۸) نمی‌توان تفاوتی بین جدایه‌های شکننده مقاومت و غیرشکننده قائل شد (Liu & Lewellen, 2007). این نوع تتراد قبلاً از جدایه‌های ایران (Mehrvan et al., 2009)، یونان (Pavli et al., 2011)، ترکیه و اسپانیا (Schirmer et al., 2005)، فرانسه (Galein et al., 2013)، بلغارستان، اسپانیا، ایتالیا و سوئیس (Koenig et al., 2008) و چین (Zhao et al., 2015) شناسایی شده است (جدول ۳) مقاومت و غیرشکننده قائل شد (Liu & Lewellen, 2007).

مشابه آنچه مهرور و همکاران در سال ۲۰۰۹ گزارش کرده‌اند، هیچ جدایه‌ای با تتراد واریانت ALHG در استان خراسان شناسایی نشد و این تتراد فقط از استان کرمانشاه گزارش شده است، اما تتراد واریانت VLHG قبلاً از جدایه‌های خراسان و سایر مناطق ایران گزارش شده است. در این مطالعه هم این تتراد از ریشه ارقام حامل ژن‌های مقاوم Rz1 تشخیص داده شد.



شکل ۴- احتمال روند تغییرات ایجاد واریانت های جدید از تتراد وحشی در پروتئین P25 مربوط به ژنوم BNYVV در مشهد

Fig 4. Probability of changes in the process of creating new variants of the wild tetrad in the P25 protein of the BNYVV genome in Mashhad sugar beet fields

نتایج بررسی توالی نوکلئوتیدی ژن P25 نشان داد که در این جهش می توان این تغییرات نوکلئوتیدی در موقعیت های ۱۹۹ (گوانین به آدنین)، ۲۰۲ (یوراسیل به سیتوزین) و ۲۰۳ (گوانین به یوراسیل) را مشاهده نمود. در این مزارع این احتمال وجود دارد که به علت کشت مداوم ارقام مقاوم ویروس حامل تتراد نوع ACHG تحت فشار مقاومت میزبان قرار گرفته و با جهش در موقعیت اسیدآمین ۶۷ و ۶۸ و تبدیل به ترتیب اسیدآمین سیستئین (C) به اسیدآمین لوسین (L) و آلانین به ترئونین تتراد واریانت ALHG جهت فرار از مقاومت میزبان به تتراد واریانت TLHG تبدیل شده است (شکل ۵). همچنین به دلیل مشابه تتراد ACHG در برخی از جدایه های ویروس اسیدآمین آلانین به والین تغییر یافته است و تتراد نوع VCHG ایجاد شده است (شکل ۵).

در این تحقیق از مزارع چغندرقد شهرستان تربت جام، علاوه بر تتراد ACHG، سه تتراد واریانت شامل، ALHG، VCHG و TLHG نیز شناسایی شد (جدول ۲). هر تتراد می تواند به عنوان یک واریانت محسوب شود، بطوریکه در تتراد واریانت ALHG اسیدآمین سیستئین (C) در موقعیت ۶۸ پروتئین P25 به اسیدآمین لوسین (L) تبدیل شده است (شکل ۵). این تغییرات از جایگزینی نوکلئوتید در موقعیت های ۲۰۲ (یوراسیل به سیتوزین) و ۲۰۳ (گوانین به یوراسیل) ناشی شده است. در تتراد نوع VCHG در موقعیت ۶۷، اسیدآمین آلانین (A) به والین (V) تغییر یافته است. این جهش از جایگزینی نوکلئوتید در موقعیت های ۲۰۰ (سیتوزین به یوراسیل) به وجود آمده است. در نهایت در تتراد TLHG در دو موقعیت ۶۷ و ۶۸ جهش رخ داده است بطوریکه در موقعیت ۶۷ اسیدآمین آلانین (A) به ترئونین (T) تغییر یافته است و اما در موقعیت ۶۸ اسیدآمین سیستئین (C) به لوسین (L) تغییر یافته است (شکل ۵).



شکل ۵- احتمال روند تغییرات ایجاد واریانت های جدید از تتراد وحشی در پروتئین P25 مربوط به ژنوم BNYVV در منطقه تربت جام

Fig 5. Probability of changes in the process of creating new variants of the wild tetrad in the P25 protein of the BNYVV genome in Torbat-e-jam sugar beet fields

تغییر یافته است (شکل ۶). تغییرات در VHHG، ناشی از جایگزینی نوکلئوتیدی در موقعیت های ۲۰۰ (سیتوزین به یوراسیل)، ۲۰۲ (یوراسیل به سیتوزین) و ۲۰۳ (گوانین به آدنین) بوده و تغییرات در AYHG از تغییر نوکلئوتیدی فقط در موقعیت ۲۰۳ (گوانین به آدنین) بوده است (شکل ۶). قابل ذکر است که در

نتایج بررسی نمونه های مزارع کشت و صنعت جوین (سبزوار) نشان داد که علاوه بر ACHG دو واریانت AHHG و AYHG در این مزارع گسترش دارد. در این تترادها فقط در موقعیت اسیدآمین ۶۸ جهش رخ داده است بطوریکه در این موقعیت اسیدآمین سیستئین (C) به اسیدآمین های هیستیدین (H) در تتراد واریانت VHHG و تیروزین (Y) در موتیف تتراد AYHG

این تحقیق نمونه‌های ارسالی از استان فارس (زرقان) بررسی شد و موتیف

تتراد آن AYHG تشخیص داده شد (شکل ۶).



شکل ۶- احتمال روند تغییرات ایجاد واریانت‌های جدید از تتراد وحشی در پروتئین P25 مربوط به ژنوم BNYVV در مزارع چغندر قند جویین

Fig 6. Probability of changes in the process of creating new variants of the wild tetrad in the P25 protein of the BNYVV genome in Jovain sugar beet fields.

اگرچه در مزارع چغندر قند سه منطقه گناباد، جلگه رخ و تربت‌حیدریه، است، جایی که سازگاری به شرایط متغیر باوجود جهش در ژنوم به حفظ تنها ویروس (های) واجد تتراد نوع ACHG شناسایی شد (جدول ۲). با این وجود، ممکن است به دلیل تعداد کم نمونه از این مناطق سایر انواع تتراد در این مناطق شناسایی نشده باشد. همچنین مهرور و همکاران در سال ۲۰۰۹ توانستند از منطقه جلگه رخ تیپ P واجد تتراد SYHG فاقد RNA5 را گزارش نمایند (Mehrvar, 2009).

است، جایی که سازگاری به شرایط متغیر باوجود جهش در ژنوم به حفظ استحکام ژنتیکی و سازگاری ویروس کمک می‌کند (Schirmer et al., 2005). به گفته بورنمن و وارلمن، ژنوتیپ‌های مختلف چغندر قند از توسعه جمعیت‌های ویروسی واگرا حمایت می‌کند (Bornemann & Varrelmann, 2013). در مطالعه حاضر نیز تنوع تتراد بالاتری در منطقه موردبررسی پیدا ردیابی گردید.

تنوع مشاهده شده در خراسان می‌تواند بازتابی از کشت ارقام مقاوم در منطقه باشد. تنوع یک عامل کلیدی در بیماری‌زایی ویروس‌های RNA دار

جدول ۲. مناطق نمونه‌برداری شده و تترادهای شناسایی شده در این تحقیق

Table 2. Sampling areas and identified tetrads in this research

Sampled areas	A-Type Tetrads													P-Type	Tested samples
	ACH G	AHHG	ALHG	AYHG	VCH G	TLHG	ARHG*	AFHR	VLHG	AHYG	AFHG	VHH G	SYHG		
Mashhad	20	10	0	0	0	0	4	0	0	0	0	10	0	44	
Fariman	20	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	35	
Jolge rokh	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	
Torbat e jam	5	0	10	0	5	10	0	0	0	0	0	0	0	30	
Torbat e hydarie	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	
Chenaran	5	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	
Jovein	10	8	0	5	0	0	0	0	0	0	0	5	0	28	
Gonabad	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	
Total Sampels	105	43	10	5	5	10	4	0	0	0	0	15	0	197	

*تترادهای جدید، +تترادهایی که در این بررسی شناسایی نشدند

جدول ۳. تیپ‌ها و اسیدآمینوهای مختلف شناسایی شده در ناحیه تتراد (در موقعیت‌های ۶۷-۷۰) از پروتئین p25 مربوط به BNYVV که در این مطالعه و بررسی‌های قبلی در ایران شناسایی شده است.

Table 3. Different types and amino acids identified in the tetrad region (at positions 67-70) of the BNYVV-related p25 protein identified in this study and previous studies in Iran.

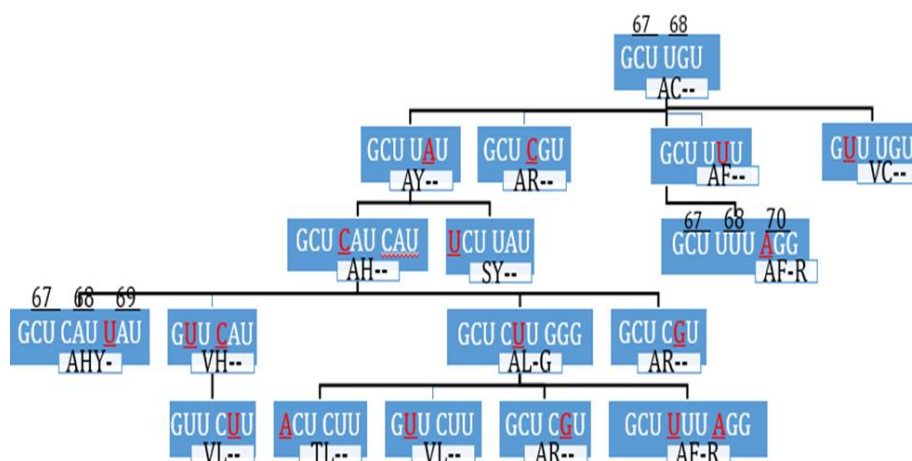
Reported from other countries	Identified in Iran	Amino acids of the tetrad region	Virus type	
			P	A
Spain, China	"New" identified in this research	VCHG	×	1
-	"New" identified in this research	TLHG	×	2
China	"New" identified in this research	ARHG	×	3
Spain, China, France, Bulgaria, Türkiye, Switzerland	(Mehrvar et al., 2009) and this research	ACHG	×	4
China	(Mehrvar et al., 2009) and this research	AHHG	×	5
China, Sweden, France, Switzerland, Belgium	(Mehrvar et al., 2009) and this research	AYHG	×	6
France, Italy, Netherlands, Spain, Switzerland, Hungary, USA, Brazil	(Mehrvar et al., 2009) and this research	ALHG	×	7
-	(Mehrvar et al., 2009) and this research	VHHG	×	8
USA	(Mehrvar et al., 2009)	VLHG	×	9
France	(Mehrvar et al., 2009)	AFHG	×	10
France	(Mehrvar et al., 2009)	AFHR	×	11
-	(Mehrvar et al., 2009)	AHYG	×	12
France	(Mehrvar et al., 2009)	SYHG	×	13

جدیدی از ویروس ایجاد خواهد شد که کشت چغندر قند را در این مزارع در سال‌های آتی با مشکل جدی مواجه خواهد نمود؛ 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. در مزارع خراسان رضوی علائم سوختگی در برگ‌های چغندر قند بخصوص در ارقام حساس به ریزومانیا (شریف، جلگه، پایا)، به همراه علائم ریشه ریشی (نمونه مشهد) یا بدون علائم ریشه ریشی (نمونه چناران) در ریشه‌های آلوده جمع‌آوری شده، مشاهده گردید. در نمونه فریمان علاوه بر سوختگی در برگ رقم داخلی شکوفا (واجد ژن *Rz1* مقاوم به ریزومانیا) نکروز آوندی ریشه بدون علائم ریشه ریشی، مشاهده گردید.

جدایه‌های شکننده مقاومت ممکن است با تغییر در یک اسیدآمینو تتراد یا در دیگر اسیدآمینوهای پروتئین P25 ظهور پیدا کنند (Bornemann & Varrelmann, 2009). در نتیجه با توجه به جهش رخ داده در این ناحیه از ژنوم RNA3 ویروس را می‌توان به‌عنوان 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 قلبیایی 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 ویروس (Webb et al., 2015). موجب شکست مقاومت آن‌ها گردیده و با تغییرات در اسیدآمینوهای ناحیه تتراد پروتئین P25 ویروس، جدایه‌های شکست مقاومت

موقعیت از اسیدآمینو در یک جدایه با تتراد AYRV (AB563031) در ژاپن، دو جدایه با تترادهای TFPR (MG839241)، AFPR (MG839240) در فرانسه و سه جدایه با تتراد AYPG (EF473103, KP006470,) در چین یافت شده است، اگرچه شکننده بودن مقاومت آنها موردبررسی قرار نگرفته است (Chiba et al., 2011; Galein et al., 2013). از نظر گروه‌بندی این تترادها، در تیپ A این ویروس قرار دارند. اسیدآمینو G (گلیسین) در موقعیت ۷۰ پروتئین P25 حفاظت شده است و در مواردی (FM210565 و AM745631) اسیدآمینو R (آرجنین) بجای آن مشاهده می‌گردد.

خصوصیات تترادهای پروتئین P25 جدایه‌های شناسایی شده BNYVV آمینواسید در موقعیت ۶۹ در تمام تترادها، به‌غیر از یک جدایه از خراسان (FJ230957) بدون تغییر H (هیستیدین) است. در تمام جدایه‌هایی که تاکنون از ایران و دنیا تعیین ترادف شده‌اند، این اسیدآمینو بسیار حفاظت شده بوده است؛ بنابراین به نظر می‌رسد که این آمینواسید در فعالیت پروتئین P25 نقش مهمی داشته باشد. البته واریانت P69 با ترکیب غیرمعمول تتراد AYPR در برخی از کشورهای اروپایی از جمله آلمان (MN148886)، انگلیس (KJ722802) و فرانسه (MG839239) (عنوان واریانت شکننده مقاومت) معرفی شده است (Bornemann et al., 2015). همچنین تغییر در این



شکل ۷- فلوجارت تغییرات احتمالی نوکلئوتیدی در موتیف تتراد ژن P25 از RNA3 مربوط به ژنوم ویروس BNYVV در جدایه‌های خراسان

Fig 7. Flowchart of possible nucleotide changes in tetrad motif of P25 gene from RNA3 of BNYVV genome in Khorasan isolates

چین حاکی از این است که سایر موقعیت‌ها در P25 یا ژن یا ژن‌های دیگری در شکستن مقاومت میزبان تأثیرگذار باشند (Chiba et al., 2011). مشخص شده است که اسیدآمینوهای واقع در موقعیت‌های ۱۲۹، ۱۳۵ و ۱۷۹ این پروتئین نیز همانند تتراد با شکستن مقاومت مرتبط هستند (Chiba et al., 2008; Koenig et al., 2008). در آمریکا واریانت‌های VL (V67L68) غالب بوده و با شکسته شدن مقاومت در ارقام ارتباط داشته‌اند (Acosta et al., 2008). با روش ژنتیک معکوس کوئینینگ و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که تغییر در اسیدآمینو V67 به‌تنهایی مسئول ایجاد توانایی

اسیدآمینو در موقعیت ۶۸ پروتئین P25 در جدایه‌های ایرانی بسیار متنوع است. از ۱۳ تتراد شناسایی شده در شش مورد، این اسیدآمینو متغیر است و شامل اسیدآمینوهای Y، L، C، F، H و R می‌شود. گزارش‌های قبلی نشان می‌دهد که اسیدآمینو ۶۸ در P25 نقش مهمی را در پاسخ به مقاومت ایفا می‌کند؛ اگرچه موقعیت‌های دیگر در این پروتئین نیز شکستن مقاومت را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Chiba et al., 2011). واریانت‌های C و H در موقعیت ۶۸ جدایه‌های ایتالیا شکننده مقاومت بودند؛ اما واریانت‌های C و H در چین ظاهراً شکننده مقاومت نبودند. تفاوت اسیدآمینوهای P25 در ایتالیا و

جدایه های شکننده ای که در دنیا معرفی شده اند در این تحقیق نیز یافت شدند، اما برای اثبات شکننده ی مقاومت در آن ها نیاز به تحقیق بیشتری وجود دارد. در این مطالعه جدایه های BNYVV از گیاهان دارای ژن مقاومت *Rz1* جدا شدند که از نواحی مختلف استان جمع آوری شده و دارای علائم شدید بیماری ریزومانی بودند. توالی یابی ژن p25 این جدایه ها تترادهای AHHG, AYHG, ACHG, VLHG, ALHG, TLHG و VCHG را نشان داد. به نظر می رسد که استفاده از ارقام مقاوم در سراسر کشور به طور مؤثری این محصول را در مقابل ریزومانی محافظت می کند. اگرچه به کارگیری ارقام مقاوم با ژن *Rz1* تاکنون جهت حفظ محصول علیه ریزومانی کافی به نظر رسیده است؛ اما احتمال فائق آمدن جدایه های ویروسی شکننده مقاومت در آینده را نمی توان در نظر نگرفت، همچنان که این مسئله در چندین کشور تولیدکننده چغندر قند در دنیا رخ داده است. همچنین در ایران نیز وجود تیپ P ویروس در مناطقی که ارقام مقاوم در آن ها کشت می شود از نگرانی های عمده کشت این محصول استراتژیک محسوب می شود.

تعارض منافع

در انجام مطالعه حاضر، هیچ گونه تضاد منافی وجود ندارد.

موازین اخلاقی

در انجام این پژوهش تمامی موازین و اصول اخلاقی رعایت گردیده است.

تشکر و قدردانی

از تمامی کسانی که در طی مراحل این پژوهش یاری رساندند تشکر و قدردانی می گردد.

References

Acosta-Leal, R., Bryan, B. K., & Rush, C. M. (2010). Host effect on the genetic diversification of *Beet necrotic yellow vein virus* single-plant populations. *Phytopathology*, 100(11), 1204-1212. [Link]

شکنندگی مقاومت در استرین تیپ A اروپاست. در کل پیشنهاد شده که توانایی نسبی شکست مقاومت (RB) واریانت های BNYVV در موقعیت 6V و 6A به صورت (Chiba et al., 2011). دیگر انواع از P25 دارای تغییرات S (China-B) (Li et al., 2008)، TY (French-P) (Ward et al., 2007)، یا H (Germany) (Koenig et al., 2008) گزارش شده است اما شکننده بودن مقاومت این جدایه ها مشخص نیست. لازم به ذکر است که بسیاری از محققین تترادهای مانند VLHG, VCHG, AYPR و TYPR از تیپ A ویروس با چهار رشته RNA و تیپ P ویروس دارای رشته پنجم RNA را شکننده مقاومت در ارقام دارای ژن *Rz1* می دانند (Bornemann et al., 2015; Hanse & Raaijmakers, 2016).

در این بررسی (نمونه های کشت و صنعت خضری-گناباد) نیز تتراد ACHG در ارقام حساسی مانند شریف تا ارقام مقاومی مانند موربلا، پائولتا و ایزابلا ردیابی شد. در ایالات متحده آمریکا هم دو آمینواسید AC که در جدایه BNYVV حفاظت شده هستند و در ارقام حساس و بدون ژن مقاومت *Rz1* یافت می شوند، در ارقام مقاوم چغندر قند دارای ژن *Rz1* نیز حضور دارند؛ بنابراین این دو اسید آمینه AC، هم در واریانت غیر شکننده مقاومت و هم در واریانت شکننده مقاومت ردیابی شدند؛ از این رو این گونه به نظر می رسد که تنها نمی توان تغییر در یک یا دو آمینواسید را دلیل شکستن مقاومت دانست بلکه نواحی دیگری از P25 یا ژنوم ویروس نیز احتمالاً در شکستن مقاومت تأثیر دارند (Chiba et al., 2008)؛ بنابراین نمی توان به طور قطعی بیان کرد که جدایه شکننده مقاومت وجود نداشته باشد. یکی از اهداف این تحقیق یافتن جدایه های ویروسی شکننده مقاومت در مزارع مورد مطالعه بود؛

- Acosta-Leal, R., Fawley, M. W., & Rush, C. M. (2008). Changes in the intrasolate genetic structure of *Beet necrotic yellow vein virus* populations associated with plant resistance breakdown. *Virology*, 376(1), 60-68. [Link]
- Acosta-Leal, R., & Rush, C. M. (2007). Mutations associated with resistance-breaking isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* and their allelic discrimination using TaqMan technology. *Phytopathology*, 97(3), 325-330. [Link]
- Bornemann, K., Hanse, B., Varrelmann, M., & Stevens, M. (2015). Occurrence of resistance-breaking strains of *Beet necrotic yellow vein virus* in sugar beet in northwestern Europe and identification of a new variant of the viral pathogenicity factor P25. *Plant Pathology*, 64(1), 25-34. [Link]
- Bornemann, K., & 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*.
- Bornemann, K., & Varrelmann, M. (2013). Effect of sugar beet genotype on the *Beet necrotic yellow vein virus* P25 pathogenicity factor and evidence for a fitness penalty in resistance-breaking strains. *Molecular Plant Pathology*, 14(4), 356-364. [Link]
- Bouzoubaa, S., Ziegler, V., Beck, D., Guilley, H., Richards, K., & Jonard, G. (1986). Nucleotide sequence of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-2. *Journal of General Virology*, 67(8), 1689-1700. [Link]
- Chiba, S., Hleibieh, K., Delbianco, A., Klein, E., Ratti, C., Ziegler-Graff, V., Bouzoubaa, S., & Gilmer, D. (2013). The Benyvirus RNA Silencing Suppressor Is Essential for Long-Distance Movement, Requires Both Zinc-Finger and NoLS Basic Residues but Not a Nucleolar Localization for Its Silencing-Suppression Activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions (MPMI)*, 168(2), 168-181. [Link]
- Chiba, S., Kondo, H., Miyanishi, M., Andika, I. B., Han, C., & 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 (MPMI)*, 24(2), 207-218. [Link]
- Chiba, S., Miyanishi, M., Andika, I. B., Kondo, H., & Tamada, T. (2008). 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*, 89(5), 1314-1323. [Link]
- Dide, N., & Yilmaz, K. (2016). Identification of strain types of some *Beet necrotic yellow vein virus* isolates determined in Northern and Central Parts of Turkey. *Eurasian J Soil Sci*, 5(3), 241-248. [Link]
- Ebrahim-Ghomi, M., Mahmoodi, B., Rakhshanderoo, F., Naderpour, M., & Norouzi, P. (2016). Widespread distribution *Beet necrotic yellow vein virus* in Iranian sugar beet industry. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 49(1-4), 1-10. [Link]
- Galein, Y., Champeil, A., Escriou, H., Richard-Molard, M., Legreve, A., & Bragard, C. (2013). Evidence for *Beet necrotic yellow vein virus* BNYVV reassortment and diversity of the P25 avirulence gene in France. *Proceedings of the Ninth Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors*, 1-4.
- Galein, Y., Legrève, A., & Bragard, C. (2018). Long Term Management of Rhizomania Disease - Insight into the Changes of the *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-3 Observed under Resistant and Non-Resistant Sugar Beet Fields. *Frontiers in Plant Science*, 9, 795. [Link]
- Hanse, B., & Raaijmakers, E. (2016). Rhizomania: spread of and research on resistance breaking BNYVV tetrad types in the Netherlands.
- Jupin, I., Guilley, H., Richards, K. E., & Jonard, G. (1992). Two proteins encoded by beet necrotic yellow vein virus RNA 3 influence symptom phenotype on leaves. *Journal of General Virology*, 11(2), 479-488. [Link]
- Jupin, I., Tamada, T., & Richards, K. (1991). Pathogenesis of *Beet necrotic yellow vein virus*. *Seminars in Virology*, 2(2), 121-129.
- Koenig, R., Haeblerlé, A. M. M., & Commandeur, U. (1997). Detection and characterization of a distinct type of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA 5 in a sugarbeet growing area in Europe. *Archives of Virology*, 142(7), 1499-1504. [Link]
- Koenig, R., Kastirr, U., Holtschulte, B., Deml, G., & Varrelmann, M. (2008). Distribution of various types and P25 subtypes of *Beet necrotic yellow vein virus* in Germany and other European countries. *Archives of Virology*, 153(11), 2139-2144. [Link]
- Koenig, R., & Lennefors, B. L. (2000). Molecular analyses of European A, B and P type sources of *Beet necrotic yellow vein virus* and detection of the rare P type in Kazakhstan. *Archives of Virology*, 145(8), 1561-1570. [Link]

- Koenig, R., Luddecke, P., Haeberle, A. M., Lüddecke, P., Haeberle, A. M., Luddecke, P., & Haeberle, A. M. (1995). Detection of *Beet necrotic yellow vein virus* strains, variants and mixed infections by examining single-strand conformation polymorphisms of immunocapture RT-PCR products. *Journal of General Virology*, 76(8), 2051-2055. [Link]
- Koenig, R., Pferdmenges, F., Buttner, G., Herrenschwand, W., Devl, G., & Varrelmann, M. (2005). Distribution of various types of *Beet necrotic yellow vein virus* in Europe and abroad. working group on plant viruses with fungal vectors, 67, 5.
- Koenig, R., Pleij, C. W. A., Beier, C., & 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. [Link]
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. [Link]
- Kutluk Yilmaz, N. D., Arli-Sokmen, M., & Kaya, R. (2017). 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). [Link]
- Kutluk Yilmaz, N. D., Arli-Sokmen, M., & 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. [Link]
- Kutluk Yilmaz, N. D., Kaya Altop, E., Phillippo, C. J., & Mennan, H. (2016). New natural weed host *Raphanus raphanistrum* L. (Brassicaceae) for *Beet necrotic yellow vein virus* and its vector *Polymyxa betae* Keskin. *TURKISH JOURNAL OF AGRICULTURE AND FORESTRY*. [Link]
- Li, J., Li, M., Li, C., Gao, Y., Li, D., Han, C., & Yu, J. (2008). Effects on the local symptoms of subgenomic RNAs expressions and their translational products of Tobacco necrosis virus A Chinese isolate. *Chin Sci Bull*, 53.
- Liu, H. Y., & Lewellen, R. T. (2007). Distribution and molecular characterization of resistance-breaking isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* in the United States. *Plant Disease*, 91(7), 847-851. [Link]
- Mehrvar, M. (2009). Diversity of soil-borne sugar beet viruses in Iran: a comprehensive study of *Beet necrotic yellow vein virus*, *Beet black scorch virus* and other pomoviruses in Iran Ph. D. Thesis Universite catholique de Louvain, Belgium.
- Mehrvar, M., Valizadeh, J., Koenig, R., & 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. [Link]
- Meunier, A., Schmit, J. F., Stas, A., Kutluk, N., & 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 2356-2360. [Link]
- Pavli, O. I., Stevanato, P., Biancardi, E., & Skaracis, G. N. (2011). Achievements and prospects in breeding for rhizomania resistance in sugar beet. *Field Crops Research*, 122(3), 165-172. [Link]
- Ratti, C., Clover, G. R. G., Autonell, C. R., Harju, V. A., & 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. [Link]
- Richards, K. E., & Tamada, T. (1992). Mapping functions on the multipartite genome *Beet necrotic yellow vein virus*. *Annual Review of Phytopathology*, 30(1), 291-313. [Link]
- Schirmer, A., Link, D., Cognat, V., Moury, B., Beuve, M., Meunier, A., Bragard, C., Gilmer, D., & Lemaire, O. (2005). Phylogenetic analysis of isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* collected worldwide. *Journal of General Virology*, 86(10), 2897-2911. [Link]
- Sohi, H. H., & 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. [Link]
- Tamada, T., Kondo, H., & Chiba, S. (2016). Genetic Diversity of *Beet Necrotic Yellow Vein Virus*. In Rhizomania. [Link]
- Tamada, T., Miyanishi, M., Kondo, H., Chiba, H., & Han, C. G. (2002). Pathogenicity and molecular variability of *Beet necrotic yellow vein virus* isolates from Europe, Japan, China, and the United States Proceedings of the 5th Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors.
- Tamada, T., Uchino, H., Kusume, T., Iketani-Saito, M., Chiba, S., Andika, I. B., & Kondo, H. (2021). Pathogenetic roles *Beet necrotic yellow vein virus* RNA5 in the exacerbation of symptoms and yield reduction, development of scab-like symptoms, and Rz1-resistance breaking in sugar beet. *Plant Pathology*, 70(1), 219-232. [Link]
- Vetter, G., Hily, J. M., Klein, E., Schmidlin, L., Haas, M., Merkle, T., & Gilmer, D. (2004). Nucleo-cytoplasmic shuttling of the *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-3-encoded p25 protein. *Journal of General Virology*, 85(8), 2459-2469. [Link]

- Ward, L., Koenig, R., Budge, G., Garrido, C., McGrath, C., Stubbley, H., & Boonham, N. (2007). Occurrence of two different types of RNA-5-containing *Beet necrotic yellow vein virus* in the UK. *Archives of Virology*, 152(1), 59-73. [[Link](#)]
- Webb, K. M., Wintermantel, W. M., Kaur, N., Prenni, J. E., Broccardo, C. J., Wolfe, L. M., & 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. [[Link](#)]
- Zhao, X., Wang, X., Dong, K., Zhang, Y., Hu, Y., Zhang, X., Chen, Y., Wang, X., Han, C., Yu, J., & Li, D. (2015). Phosphorylation of *Beet black scorch virus* coat protein by PKA is required for assembly and stability of virus particles. *Scientific Reports*, 5, 11585. [[Link](#)]