

## بررسی آلودگی و تعیین پراکنش ویروس موزاییک چغندرقد (BtMV) در مزارع استان خراسان رضوی

ناهد گرایلی<sup>\*۱</sup> - بهروز جعفرپور<sup>۲</sup> - ماهرخ فلاحتی رستگار<sup>۳</sup> - عطیه ذبیح نیا مقدم<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۲۶

تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۲/۱۹

### چکیده

به منظور شناسایی ویروس موزاییک چغندرقد در استان خراسان رضوی در تابستان ۱۳۸۶ نمونه برداری از بوته های دارای علائم موزاییک، لکه های نکروتیک و پیچیدگی برگ های میانی از مزارع چغندرقد صورت گرفت و همچنین جهت تعیین پراکنش این ویروس در سطح استان نمونه برداری تصادفی انجام شد. نمونه های آلوده به ویروس با استفاده از آزمون DAS-ELISA مورد بررسی قرار گرفته و مشخص گردید. جهت استخراج RNA ی ویروس از برگ های آلوده از روش رسوب با PEG6000 استفاده شد. سپس با استفاده از آغازگر اختصاصی cDNA مربوطه ساخته و برای انجام RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت. باند محصول واکنش RT-PCR به اندازه ۶۵۸-bp بر روی ژل آگارز ۱ درصد مشاهده شد. وجود این ناحیه تکثیر شده در نمونه های آزمایشی، آلودگی به ویروس مذکور را در مناطق مورد بررسی تأیید می کند. نتایج بدست آمده نشان داد که متوسط میزان پراکنش BtMV در استان خراسان رضوی، از ۵۳۰ نمونه جمع آوری شده در این سال، ۱۴/۹ درصد می باشد. آلودگی در همه شهرستان های مورد مطالعه به نسبت های مختلف وجود داشت و بیشترین میزان آلودگی مربوط به شهرستان فریمان بوده است.

واژه های کلیدی: ویروس موزاییک چغندرقد، DAS-ELISA، RT-PCR

### مقدمه

مترادفی از جمله *Sugarbeet* و *Spinach mosaic virus* مترادفی از جمله *mosaic virus* نام گذاری شده است (۱۷). عضوی از جنس *Potyvirus* و خانواده *Potyviridae* می باشد. این موضوع هم چنین با بررسی مولکولی ژنوم RNA این ویروس توسط نمچینو به اثبات رسیده است (۱۴). اعضاء جنس *Potyvirus* به صورت رشته ای خمش پذیر به طول ۶۸۰-۹۰۰ نانومتر و قطر ۱۱-۱۳ نانومتر می باشند (۱۱). چغندرهای آلوده به این ویروس علائم گوناگون شامل لکه های کلروتیک و روشن شدن رگبرگ ها در برگ های جوان، موزاییک سیستمیک سبز و یا زرد همراه با تاول های سبز تیره و بدشکلی و پیچیدگی برگ ها را نشان می دهند (۱۰ و ۱۸). این ویروس توسط شته ها خصوصا شته سبز هلو<sup>۷</sup> با راندمان بالای ۵۰ درصد بطور ناپایا منتقل می گردد. حداقل زمان لازم برای کسب ویروس توسط شته *Myzus persicae* ۱۰-۶ ثانیه می باشد. پایداری ویروس در شته بسته به گونه شته دارد (۱۳ و ۱۷). ویروس موزاییک چغندرقد توسط بذر گیاه انگل سس، تماس بین گیاهان، بذر و دانه گرده منتقل نمی شود ولی به طریق مکانیکی و از طریق پیوند

ویروس موزاییک چغندرقد (*Beet Mosaic Virus*) ابتدا در سال ۱۸۹۸ در شمال فرانسه و سپس در سال ۱۹۱۵ از آمریکا و سایر کشورهای اروپایی گزارش شده است. در سال ۱۹۱۷ در شمال کلرادو و غرب نبراسکا، در سال ۱۹۵۶ در برانشویک آلمان بر روی چغندرقد مشاهده شد. سپس از دانمارک و سوئد و سایر کشورهای اروپایی گزارش گردید (۱۶). امروزه این ویروس یکی از ویروس های مهم چغندر قد محسوب می شود که پراکنش جهانی دارد و در تمام مناطق مهم چغندر کاری جهان دیده شده است (۱۲). این ویروس توسط روبینز<sup>۵</sup> و اسمیت<sup>۶</sup> توصیف و تاکنون با اسامی

۴و۱- دانشجویان کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی،

دانشگاه فردوسی مشهد

(Email: [na\\_ge20@yahoo.com](mailto:na_ge20@yahoo.com))

\* - نویسنده مسئول:

۳و۲- استادان گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

5- Robbins

6- Smith

7- *Myzus persicae* sutz

رضوی از جمله چناران، قوچان، فریمان، تربت جام، کاشمر، تربت حیدریه و نیشابور و حومه مشهد در تابستان سال ۱۳۸۶ به دو صورت جمع آوری گیاهان دارای علائم و هم چنین به روش تصادفی به منظور تعیین پراکنش در طول، عرض و دو قطر مزارع انجام گرفت. نمونه ها درون کیسه های پلاستیکی منفرد، پس از ثبت مشخصات، در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل شد و در یخچال در دمای ۴°C نگهداری گردید.

## ۲- کشت گیاهان محک در گلخانه

از آنجا که ویروس موزاییک چغندرقد در گلخانه به راحتی با روش مکانیکی منتقل می شود، بدین منظور برای تکثیر و نگهداری این ویروس تعدادی از ارقام مختلف چغندرقد و نیز گونه *Chenopodium album* از گیاه سلمه در شرایط دمایی  $25 \pm 5$  درجه سانتی گراد در گلخانه کشت و نگهداری شد. درجه حرارت گلخانه در طی تابستان به وسیله کولر و در زمستان بوسیله شوفاژ تثبیت گردید. ترکیب خاک مورد استفاده در گلدان ها مخلوطی از خاک زراعی معمولی، خاک برگ پوسیده و ماسه به نسبت ۲:۲:۱ بود. همچنین برای کنترل شته از متاسیتوکس<sup>۱</sup> به نسبت ۱/۵ در هزار و برای تقویت ریشه گیاه از کودهای معمول فسفره و ازته استفاده شد. جهت انتقال مکانیکی ویروس موزاییک چغندرقد به گیاهان محک که در مرحله ۴-۶ برگی بودند، پس از عصاره گیری برگهای آلوده شناسایی شده، با بافر فسفات ۰/۱ مولار و pH=۷/۴ تلقیح صورت گرفت.

## ۳- آزمون DAS-ELISA

به منظور تعیین پراکنش و شناسایی ویروس موزاییک چغندرقد از آزمون ساندویچ دوطرفه (DAS-ELISA) طبق روش کلارک و آدامز استفاده شد (۹). ارزیابی نتایج حاصل از این آزمون براساس تغییر رنگ چاهک ها (از بی رنگ تا زرد پررنگ) نسبت به شاهد منفی و نیز با استفاده از دستگاه الایزاخوان در طول موج ۴۰۵ نانومتر صورت گرفت. آنتی سرم ویروس موردنظر جهت انجام این آزمون از شرکت DSMZ آلمان تهیه شد.

## ۴- استخراج RNA

در این تحقیق برای استخراج RNA از روش رسوب با PEG6000<sup>۲</sup> استفاده شد (اشمیتز، ۲۰۰۳) که اجازه رسوب دهی اسیدهای نوکلئیک به صورت جزء به جزء را می دهد. به منظور

زدن انتقال می یابد (۱۵ و ۱۷).

در ایران بیماری مزبور در سال ۱۳۴۲ در مزارع چغندرکاری کرج، اصفهان، شیراز و مشهد مشاهده و گزارش گردید (۵). در ایران صادق جلالی بیشترین بررسی ها را بر روی ویروس موزاییک چغندرقد انجام داده است. او در سال ۱۳۷۲ عوامل ویروسی ایجاد کننده موزاییک در چغندرقد در منطقه کرج را مورد بررسی قرار داد. در سال ۱۳۷۴ دو میزبان طبیعی ویروس موزاییک چغندرقد در منطقه کرج را معرفی کرد (۲).

در سال ۱۳۸۰ دو ویروس BtMV و CMV را به عنون ویروس های عامل ایجاد علائم موزاییک چغندرقد در کرج جداسازی و شناسایی کرد. در این تحقیق او جهت شناسایی ویروس های مورد نظر از آزمون سرولوژیک نشئت متقابل در آگار و نیز میکروسکوپ الکترونی استفاده کرده است (۳).

وی در سال ۱۳۸۱ تأثیر ویروس موزاییک چغندر بر میزان تولید بذر چغندرقد در شرایط گلخانه را مورد بررسی قرار داد. بدین منظور جهت تکثیر و خالص سازی بیولوژیک ویروس از گیاه سلمک (*Chenopodium amaranticolor*) و چغندر برگی (*Beta vulgaris*) و جهت مایه زنی مکانیکی از بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار استفاده کرد (۴).

قربانی در سال ۱۳۷۰ به مطالعه سیتولوژیک برگ های چغندرقد آلوده به ویروس موزاییک چغندرقد با استفاده از میکروسکوپ الکترونی پرداخت (۷).

بیبا جعفرپور در سال ۱۳۷۹ به بررسی ویروس موزاییک چغندرقد در مزارع استان خراسان با استفاده از روش های الایزا، دات بلات و وسترن بلات پرداخت (۱).

علی پور در سال ۱۳۸۳ هم کنش ویروس های موزاییک خیار و موزاییک چغندر در چغندرقد را در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار داد و جهت انجام مطالعات خود از آزمون الایزا و نشئت دوطرفه در آگار استفاده کرد (۶).

هدف از این تحقیق، بررسی وجود ویروس موزاییک چغندر با استفاده از روش های مولکولی نوین در نمونه های مورد بررسی است. مطالعات پیشین بر روی این ویروس در ایران، صرفاً با بکارگیری روش های سرولوژیکی و یا میکروسکوپ الکترونی انجام می گرفت. از این رو، این مطالعه اولین گزارش در مورد بکارگیری روش های مولکولی نوین به منظور ردیابی ویروس موزاییک چغندر در ایران می باشد.

## مواد و روش ها

### ۱- نمونه برداری

نمونه برداری از مزارع چغندرکاری شهرستان های استان خراسان

1- metasis tox

2- Poly ethylene glycole

سانتی گراد، مرحله تکثیر قطعه در دمای ۹۴ درجه به مدت ۶۰ ثانیه، ۵۳ درجه به مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۹۰ ثانیه در ۳۵ سیکل و مرحله اتصال نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. برای بررسی کمی و کیفی محصول PCR، از روش الکتروفورز استفاده گردید.

## نتایج

### ۱- بررسی علائم ویروس موزاییک چغندر قند بر روی گیاهان محک در شرایط گلخانه

۱۰-۷ روز بعد از تلقیح برگ های آلوده به ویروس موزاییک چغندر قند به ارقام مختلف چغندر قند ابتدا علائم موزاییک بر روی برگ های جوان مرکزی دیده شد و به تدریج در برخی ارقام پیچیدگی و لوله ای شدن برگ های جوان مرکزی ظاهر گشت (شکل ۱). همچنین در گیاه سلمک (*Chenopodium album*)، ۴ تا ۷ روز بعد از تلقیح، علائم موزاییک و لکه های نکروتیک کوچکی بر روی برگ ها ظاهر شد و به تدریج برگ های انتهایی پژمرده شدند (شکل ۲).

### ۲- تعیین پراکنش ویروس موزاییک چغندر قند

جهت تعیین پراکنش، نمونه های تصادفی مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس نتایج حاصل از آزمون DAS-ELISA در سال ۱۳۸۶ از ۵۳۰ نمونه جمع آوری شده، تعداد ۷۹ نمونه آلوده به BtMV تشخیص داده شد، که ۱۴/۹ درصد کل نمونه ها را شامل شدند. حداکثر میزان آلودگی به این ویروس در شهرستان فریمان (درصد ۳۳/۴) و کمترین درصد آلودگی در شهرستان نیشابور (درصد ۴/۸) تخمین زده شد. به طور کلی اگرچه آلودگی در این سال در کلیه مناطق یاد شده وجود داشت اما میزان آلودگی و پراکنش این بیماری نسبتاً پایین بود (جدول ۳).

### ۳- نتایج حاصل از آزمون RT-PCR

باند محصول واکنش RT-PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد با اندازه ۶۵۸bp مشاهده شد. در این تحقیق از نشانگر اندازه ۱۰۰ جفت بازی (100bp DNA Ladder Plus Fermentase) استفاده گردید. این ناحیه تکثیر شده در تمامی نمونه هایی که در آزمون DAS-ELISA واکنش مثبت نشان دادند و حتی در نمونه هایی که در این آزمون تغییر رنگ بسیار جزئی داشتند، ظاهر گردید. وجود این ناحیه تکثیر شده در نمونه های آلوده و مطابقت آن با نتایج مربوط به منابع موجود، آلودگی به ویروس موزاییک چغندر قند را در مناطق مورد بررسی تأیید می کند. همان طور که گفته شد جهت سنتز cDNA

بررسی کیفیت RNA استخراجی ۳ میکرولیتر RNA به همراه ۲ میکرولیتر بافر رنگ آمیزی<sup>۱</sup> بر روی ژل آگارز ۱ درصد با ولتاژ ثابت ۷۵ ولت به مدت ۱ ساعت الکتروفورز گردید.

### ۵- سنتز cDNA و تکثیر آن با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمران (RT-PCR)

در این تحقیق سنتز cDNA به صورت معمولی و نیز توسط کیت Accu Power<sup>(R)</sup> RT Pre Mix (سیناژن) صورت گرفت. به منظور سنتز cDNA از آغازگر Oligo dT و ترکیبات جدول ۱ استفاده شد.

جدول ۱- واکنش گره های مورد استفاده در انجام آزمون RT

واکنش گر (غلظت)	حجم نهایی (میکرولیتر)
آغازگر معکوس <sup>۲</sup>	۱۰
RNA الگو	۲
آب مقطر تزریقاتی سترون	۷/۵
بافر آنزیمی رونویسی معکوس <sup>۳</sup>	۴
بازدارنده <sup>۴</sup> RNAase	۰/۵
مخلوط نوکلئوتیدها	۲
آنزیم رونویسی معکوس <sup>۵</sup> M-MuLV	۱

در این تحقیق از آغازگرهای اختصاصی که وینترمانتل جهت ردیابی BtMV و بررسی غلظت آن در گیاهان آلوده طراحی کرده بود استفاده شد (۱۹). این آغازگرها مربوط به قطعه ۶۵۸ نوکلئوتیدی (بین نوکلئوتیدهای ۸۳۷۷ تا ۹۰۳۴) ژن تولید کننده پروتئین Nib و نیز پوشش پروتئینی می باشند.

این آغازگرها جهت ساخت به شرکت سیناژن سفارش داده شدند که توالی آنها در جدول ۲ آمده است.

به منظور تکثیر قطعه cDNA، واکنش زنجیره ای پلیمران به دو روش معمولی و نیز توسط کیت GenePak PCR Core (سیناژن) صورت گرفت. در این تحقیق واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر<sup>۶</sup> (مدل Biometra) انجام شد. برنامه دمایی واکنش به این ترتیب بود: مرحله واسرشت سازی اولیه به مدت ۳ دقیقه و با دمای ۹۴ درجه

- 1- Loading buffer
- 2- Reverse primer
- 3- 5X Reaction buffer
- 4- Ribonuclease inhibitor
- 5- Reverse transcriptase (RT)
- 6- Thermocycler

است و با استفاده از آن نتایج مطمئن تری حاصل گردید. علت این موضوع کاهش میزان آلودگی و خطا در اندازه گیری مواد است (شکل ۳).

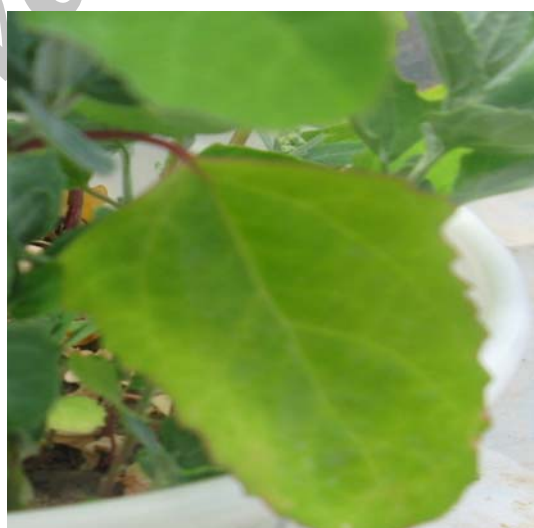
نیز PCR علاوه بر روش معمولی از کیت نیز استفاده شد. نتایج حاصله نشان داد استفاده از کیت Accu Power<sup>(R)</sup> RT Pre Mix در سنتز cDNA و کیت GenePak PCR Core در انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز بسیار راحت تر و دقیق تر از روش معمولی

جدول ۲- ترادف آغازگرهای اختصاصی ویروس موزاییک چغندر قند

اندازه قطعه (bp)	ترادف آغازگر	جهت	آغازگر
۶۵۸	5'-CCAAACTCCTGAAGCACAT-3'	رفت	BtMV(F) <sup>1</sup>
	5'-CCTCTCCATCCATCATAACC-3'	برگشت	BtMV(R) <sup>2</sup>

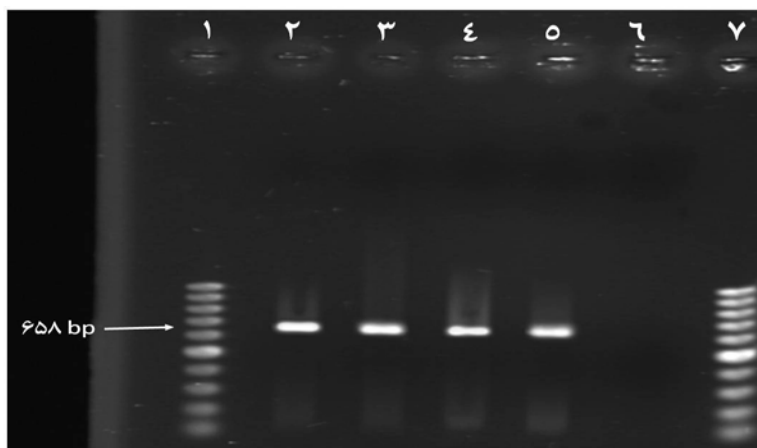


شکل ۱- علائم بدشکلی در برگ گیاه چغندر قند در اثر آلودگی به ویروس موزاییک چغندر قند (BtMV)



شکل ۲- برگ گیاه سلمه با علائم موزاییک در اثر آلودگی به ویروس موزاییک چغندر قند (BtMV)

1- Forward  
2- Reverse



شکل ۳- محصول واکنش RT-PCR و قطعه تکثیر شده ۶۵۸bp مربوط به BtMV بر روی ژل آگارز ۱٪. چاهک ها از سمت چپ: چاهک ۱: نشانگر اندازه (100bp DNA Ladder Plus Fermentase)، چاهک های ۲ و ۳: جدایه فریمان، چاهک های ۴ و ۵: جدایه تربت حیدریه، چاهک ۶: شاهد منفی و چاهک ۷: نشانگر اندازه

جدول ۳- پراکندگی و درصد فراوانی ویروس BtMV در مناطق مختلف استان خراسان رضوی

ردیف	نام شهر	درصد آلودگی
۱	تربت جام	۶
۲	تربت حیدریه	۲۲/۳
۳	چناران	۱۱/۷
۴	فریمان	۳۳/۴
۵	قوچان	۱۵/۶
۶	کاشمر	۱۰
۷	مشهد	۶/۷
۸	نیشابور	۴/۸
میانگین درصد آلودگی در سطح استان		۱۴/۹

## بحث

نتایج حاصل از این تحقیق وجود ویروس موزاییک چغندر قند را در تمام مناطق نمونه برداری شده استان خراسان رضوی در سال ۱۳۸۶ تأیید می کند. اما درصد آلودگی و میزان پراکنش این ویروس هنوز به میزان نگران کننده ای نرسیده و تاکنون خسارت جدی از این بیماری در این منطقه گزارش نشده است. شاید دلایل این موضوع را بتوان عدم مجاورت چغندرهای ریشه ای با چغندرهای بذری، مناسب نبودن شرایط آب و هوایی برای فعالیت ناقلین، عدم حساسیت ارقام حاضر در مزارع به ویروس موزاییک چغندر و عدم وجود میزبان های زمستان گذران ناقل و ویروس در منطقه دانست.

همان طور که گفته شد مهم ترین ناقلین این ویروس در مزرعه *Aphis fabae* و *Myzus persicae* می باشند. در چند سال اخیر شته غالب در مزارع چغندر قند استان خراسان رضوی *A. fabae* بوده

است که به میزان زیادی در مزارع دیده شده و احتمالاً ناقل مهم این ویروس در سال مورد مطالعه نیز همین شته می باشد (مکاتبه با کارشناسان مرکز تحقیقات چغندر قند مشهد).

از طرفی آلودگی در مناطق مورد بررسی با درصدهای متفاوتی وجود داشت، از آنجا که ارقام کاشته شده در مناطق مختلف استان از لحاظ مقاومتی تفاوتی با هم نداشتند، احتمالاً این تفاوت در میزان آلودگی مربوط به شرایط آب و هوایی و کارایی ناقلین می باشد.

وجود بیشترین درصد آلودگی در شهرستان فریمان نسبت به سایر مناطق می تواند به علت مساعدتر بودن شرایط آب و هوایی در این منطقه جهت فعالیت ناقلین، وجود مزارع و باغات مربوط به میزبان های اولیه حشرات ناقل و وجود مزارع تولید چغندرهای بذری در مجاورت و نزدیکی مزارع چغندر قند باشد.

مشخص شده است که شته های ناقل ویروس موزاییک چغندر قند در رطوبت هوای کمتر از ۵۰ درصد نسبت به رطوبت های بالا (۸۰ تا ۱۰۰ درصد) به میزان بیشتری قادر به انتقال این ویروس می باشند (۸). از این رو دلیل وقوع بیشتر بیماری در مناطق اطراف فریمان رطوبت پایین هوا در سال مورد مطالعه می باشد که این کارایی شته های ناقل در انتقال ویروس را افزایش داده است.

نتایج حاصل از آزمون های ELISA و RT-PCR نشان دهنده حساسیت بالای آزمون RT-PCR نسبت به ELISA جهت تشخیص این ویروس بود، به طوری که نمونه هایی که در آزمون الایزا واکنش بسیار ضعیفی نشان داده بودند، در آزمون های مولکولی به خوبی تشخیص داده شدند، زیرا این آزمون در غلظت های بسیار کم ویروس نیز به خوبی و با حساسیت بالا عمل می کند. لذا اگرچه

ویروس و در نتیجه وارد آمدن خسارات جدی به این محصول و کاهش عملکرد آن گشته و از آلودگی گیاهان تازه کشت شده جلوگیری به عمل آید.

از جمله اقدامات مناسب جهت کاهش این ویروس می توان به شناسایی و از بین بردن علف های هرز میزبان و زمستان گذران، کاشت زود هنگام چغندرقد و عدم کاشت آن در مجاور مزارع چغندر بذری و نیز بررسی و کشت ارقام مقاوم به این ویروس اشاره کرد.

آزمون های سرولوژیکی روشی مطمئن و سریع محسوب می شوند اما تأیید نتایج حاصل از آن با استفاده از آزمون های مولکولی می تواند باعث اطمینان بیشتر گردد.

از آن جا که این گیاه یکی از محصولات مهم استراتژیک در ایران است و اهمیت بسیار زیادی در صنعت تولید قند کشور دارد، لذا باید سعی شود تا با مدیریتی صحیح و عملیات کشاورزی مناسب تا حد امکان این ویروس را کاهش داده و مانع از رشد روزافزون این

## منابع

- ۱- جعفرپور ب. ۱۳۷۹. بررسی و تعیین پراکنش ویروس موزاییک چغندرقد (BtMV) و ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندرقد (BNYVV) در شمال خراسان و شناسایی ویروس خاکزاد چغندر (BSBV) در ایران. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه فردوسی مشهد.
- ۲- جلالی ص. ۱۳۷۴. معرفی دو میزبان طبیعی ویروس موزاییک چغندر در منطقه کرج. دوازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، آموزشکده کشاورزی کرج، صفحه ۱۲۷.
- ۳- جلالی ص، اخوت م، مصاحبی غ. و ارجمند م. ۱۳۸۰. جداسازی و شناسایی ویروس های عامل ایجاد علائم موزاییک چغندرقد در کرج. مجله چغندرقد، ۱۷ (۱): ۴۴-۵۶.
- ۴- جلالی ص، مصاحبی غ. و اخوت م. ۱۳۸۱. تأثیر ویروس موزاییک چغندرقد بر میزان تولید بذر چغندرقد در شرایط گلخانه. مجله چغندرقد، ۱۸ (۲): ۱۱۸-۱۰۹.
- ۵- رضائیان م.ع. ۱۳۴۸. بیماری ویروس موزاییک چغندرقد، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، ۸۶ صفحه.
- ۶- علیپور س. و افشاری فر ع. ۱۳۸۳. بررسی همکنش ویروس های موزاییک خیار و موزاییک چغندر در چغندرقد در شرایط گلخانه. مجله بیماری های گیاهی، ۴۰ (۳): ۲۳۵-۲۵۲.
- ۷- قربانی ش، و نوروزی ر. ۱۳۷۰. مطالعه سیتولوژیک برگ های چغندرقد آلوده به ویروس موزاییک چغندرقد در ایران. مجموعه مقالات دهمین کنگره گیاه پزشکی ایران، دانشگاه شهید باهنر کرمان.
- 8- Brěák j. 1959. Transmission of beet mosaic virus by the green peach aphid starved before infection feeding under different conditions of air humidity. *Biologia Plantarum*, 1: 330-332.
- 9- Clark M.F., and Adams A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.
- 10- Fujisawa I., Tsuchizaki T., and Iizuka N. 1983. Purification and serology of beet mosaic virus. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 49:22-31.
- 11- Jordan R., Hammond J. 1991. Comparison and differentiation of potyvirus isolates and identification of strain-, virus-, subgroup-specific and potyvirus group-common epitopes using monoclonal antibodies. *Journal of General Virology*, 72: 25-36.
- 12- Kaffka S.R., and Lewellen R.T. 2001. Homepage of How to Manage Pests. UC IPM Pest Management Guidelines: sugar beet diseases. Available on line at: <http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/sugarbeetdisease.html>.
- 13- Katis N., and Gibson R.W. 1984. Transmission of beet mosaic virus by creal aphids. *Plant pathology*, 33: 425-427.
- 14- Nemchinov L.G., Hammond I., Jordan R., and Hammond R.W. 2004. The complete sequence, genome organization, and specific detection of Beet Mosaic Virus. *Archives of Virology*, 149: 1201-1204.
- 15- Omar R.A., Sidaros S.A., El-Kewey S.A., Abd El-Kader H.S., Deif A.A., and Abass J.M. 2005. Biological and Serological studies on Beet mosaic Potyvirus (BtMV) in Egypt. *International Journal of Virology*, 1:17-17.
- 16- Russel G.E. 1971. Beet Mosaic Virus. CMI/AAB Descr. PL. Viruses NO. 533pp.
- 17- Smith H.G., Karasev a.V. 1991. Beet mosaic potyvirus. Available on line at: <http://biology.anu.edu.au/Grops/MES/vide/descr085.htm>.
- 18- Wang H.Y., Li X.D., Liu Y.Y., Wang B., and Zhu X.P. 2007. First report of Beet mosaic virus infecting lettuce, in China. *The British Society for Plant Pathology*.
- 19- Wintermantel W.M. 2005. Co-infection of Beet Mosaic Virus with beet yellowing viruses leads to increased symptom expression on sugar beet. *Plant Dis.* 89: 325-331.