

خالص سازی و تولید آنتی سرم جدایه ایرانی ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندر قند عامل بیماری ریزومانیا

Purification and antiserum production of Iranian isolate of *Beet Necrotic Yellow Vein Virus* (BNYVV), the causal agent of sugar beet rhizomania disease

سعید دارابی^{۱*}، محسن یاسایی^۲ و کرامتاله ایزدپناه^۳

تاریخ دریافت: ۸۷/۶/۱۳؛ تاریخ پذیرش: ۸۷/۶/۹

س. دارابی، م. یاسایی و ک. ایزدپناه. ۱۳۸۹. خالص سازی و تولید آنتی سرم جدایه ایرانی ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندر قند عامل بیماری ریزومانیا. مجله چغندر قند ۲۶(۱): ۵۳-۶۶

چکیده

ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندر قند (*Beet necrotic yellow vein virus*) عامل بیماری مهم ریشه گنایی یا ریزومانیا (Rhizomania) در چغندر قند است. در تحقیق حاضر طی سال ۱۳۸۴ در شیراز، به منظور استفاده از روش‌های سرولوژیکی (از جمله آزمون الیزا) در تشخیص بیماری و نیز استفاده از این روش‌ها در برنامه‌های اصلاحی چغندر قند جهت انتخاب ژرم پلاسما متحمل به بیماری، جدایه ایرانی ویروس مذکور خالص سازی و آنتی بادی علیه آن تولید شد. بدین منظور ابتدا بافت مورد نیاز برای خالص سازی با مایه زنی عصاره برگ چغندر قند آلوده به ویروس مذکور، روی برگ‌های *Chenopodium quinoa* Willd تهیه شد. خالص سازی ویروس از بوته‌های آلوده *C. quinoa* شامل عصاره گیری بافت آلوده در بافر فسفات، تصفیه مقدماتی، سانتریفوژ کردن از میان بالشک سوکروز ۲۰ درصد و سانتریفوژ کردن در ستون سوکروز دارای شیب چگالی بود. در نهایت، باند ویروسی در لوله سانتریفوژ به صورت پراکنده که عمدتاً در سه ناحیه دارای فشردگی بیشتری بود، تشکیل شد. برای تهیه آنتی سرم، ویروس خالص شده به طور زیر جلدی به خرگوش سفید نیوزلندی تزریق شد. آنتی سرم حاصل پس از جذب با عصاره گیاه سالم و جداسازی گاماگلوبولین و تهیه آنتی بادی متصل به آنزیم، برای آزمون الیزا قابل استفاده بود. آنتی سرم تهیه شده دارای کیفیت بالایی بود و با عصاره گیاه سالم واکنشی نشان نداد. آنتی سرم مذکور برای انجام تحقیقات مورد نظر در مؤسسات آموزشی و پژوهشی قابل استفاده است.

واژه‌های کلیدی: آزمون الیزا، آنتی سرم، چغندر قند، خالص سازی ویروس، ریزومانیا، BNYVV

۱- مربی پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس *-نویسنده مسئول Darabi@farsagres.ir

۲- مربی پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس- بخش تحقیقات اصلاح و تهیه بذر و نهال

۳- استاد مرکز تحقیقات ویروس شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

مقدمه

میزان ۵۰ و در مواردی تا ۹۰ درصد و هم‌چنین کاهش درصد قند ریشه بین ۸ تا ۴۸ درصد است (Henry 1996).

BNYVV در حال حاضر متعلق به جنس *Benyvirus* است (Van 1999; Tamada 1999; Regenmortel et al. 2000; Rush 2003). این ویروس میله‌ای شکل، خمش‌ناپذیر و دست کم دارای چهار قطعه RNA تک‌لای مثبت در چهار پیکره به طول‌های ۸۵، ۱۰۰، ۲۶۵ و ۳۹۰ نانومتر و قطری حدود ۲۰ نانومتر است (Brunt and Richards 1989; Richards and Tamada 1992). جدایه‌ها، قطعه پنجم نیز مشاهده شده است (Koenig et al. 1997; Tamada 1999; Koenig and Lennefors 2000). RNA_1 ویروس شامل یک چهارچوب ژنی (open reading frame) است که در تکثیر ویروس دخالت دارد (Bouzoubaa et al. 1987). RNA_2 دارای شش چهارچوب ژنی است و پروتئین پوششی نیز توسط آن کد می‌شود. هم‌چنین این RNA در حرکت پیکره‌های ویروسی در سلول‌های گیاهی نقش دارد (Bouzoubaa et al. 1986; Brunt and Richards 1989; Richards and Tamada, 1992). RNA_1 و RNA_2 برای آلودگی لازم هستند و همیشه در بافت آلوده وجود دارند (Koenig et al. 1986; Koenig and Burgermeister 1989). RNA_3 و RNA_4

بیماری ریشه‌گنایی یا ریزومانیا (Rhizomania) در حال حاضر یکی از مهم‌ترین بیماری‌های چغندر قند در دنیا محسوب می‌شود. عامل این بیماری، ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندر قند *Beet necrotic yellow vein virus* و ناقل آن *Polymyxa betae* Keskin است (Tamada and Baba 1973; Tamada 1975; Richards and Tamada 1992).

این بیماری انتشار جهانی دارد (Putz et al. 1993) و در ایران نیز اولین بار در سال ۱۳۷۵ توسط ایزدپناه و همکاران از فارس گزارش شد (ایزدپناه و همکاران ۱۳۷۵). سپس وجود آن در اکثر نواحی چغندرکاری کشور به اثبات رسید (دارابی و همکاران ۱۳۷۷ و ۱۳۸۲؛ توده فلاح و همکاران ۱۳۷۹؛ جعفرپور و فلاحتی رستگار ۱۳۷۹؛ شهرآئین و همکاران ۱۳۷۹؛ Mehravar et al. 2009). میزان خسارت بیماری بستگی به ژنوتیپ چغندر قند، پاتوتیپ ویروس، میزان زادمایه (Inoculum) بیماری، زمان آلودگی و شرایط اقلیمی دارد (Scholten and Lange 2000; Rush et al., 2006; Mcgrann et al. 2009). آلودگی‌های شدید بر روی رقم حساس، کاهش عملکرد شکر بین ۵۰ تا ۶۰ درصد و در مواردی تا ۹۰ درصد نیز گزارش شده است (Richard-Molard 1985; Johansson 1985; Asher 1993; Henry 1996). این کاهش عمدتاً ناشی از کاهش عملکرد ریشه به

شناسایی و گزینش می‌شوند (Tuitert et al. 1994; Asher and Kerr 1996).

برای شناسایی این گونه ژرمپلاسم از روش‌های متعددی استفاده می‌شود که یکی از متداول‌ترین آن‌ها آزمون‌های سرولوژیکی از جمله تست الیزا (ELISA) است. امروزه از این آزمون به‌طور وسیعی برای تشخیص BNYVV و هم‌چنین در برنامه‌های اصلاحی چغندرقد برای انتخاب ژرمپلاسم برتر که دارای کم‌ترین مقدار ویروس در ریشه هستند، استفاده می‌شود (Giunchedi et al. 1985 and 1987; Whitney 1989; Wisler et al. 1994; Pelsey and Merdinoglu 1996; Scholten et al. 1996; Scholten and Lang 2000; Biancardi et al. 2002; Amiri et al. 2003).

هدف این تحقیق حاضر تهیه آنتی‌سرم علیه جدایه ایرانی BNYVV برای راه‌اندازی سیستم تشخیص سریع و صحیح بیماری (تست الیزا) و گزینش ژنوتیپ‌های متحمل به بیماری در راستای تولید رقم مقاوم بود.

مواد و روش‌ها

تکثیر بافت آلوده به ویروس

برای تهیه و تکثیر بافت آلوده به BNYVV، برگ چغندرقد دارای علائم بیماری برگرفته از مزرعه‌ای در شهرستان مرودشت (شکل ۱)، در بافر فسفات ۰/۱ مولار و pH= ۷/۱ خرد و عصاره حاصل

هریک شامل یک چهارچوب ژنی هستند. RNA₃ از طریق توسعه علائم و انتشار ویروس در سیستم ریشه‌ای سبب افزایش توان بیماری‌زایی می‌شود (Kuszala et al. 1986; Koenig et al. 1991). RNA₄ در انتقال ویروس با ناقل نقش دارد و جهت آلودگی طبیعی ضروری است (Tamada and Abe 1989; Richards and Tamada 1992). تسهیل انتشار سیستمیکی ویروس درون ریشه و تشدید علائم بیماری دخالت دارد (Miyanishi et al. 1999; Liu et al. 2005). RNA₃ و RNA₄ همیشه در آلودگی طبیعی ریشه وجود دارند ولی معمولاً تمام یا بخشی از آن‌ها در اثر انتقال مکانیکی مکرر حذف می‌شود (Koenig et al. 1986).

با توجه به ماهیت بیماری، کاربرد روش‌های زراعی (از جمله تاریخ کاشت، روش آبیاری و تناوب زراعی)، هم‌چنین روش‌های شیمیایی و بیولوژیکی در مبارزه با آن چندان مؤثر نیست و لذا استفاده از رقم‌های مقاوم بهترین و تنها راه مبارزه مؤثر با این بیماری محسوب می‌شود (Harveson and Rush 1994; Asher and Kerr 1996; Wisler et al. 1999; Biancardi et al. 2002; Harveson and Rush 2002). سطح مقاومت ژرمپلاسم (ژنوتیپ‌ها) نیز بستگی به غلظت ویروس موجود در ریشه آن‌ها دارد و بر این اساس ژرمپلاسم‌های متحمل به بیماری

- رسوب حاصل در ۷-۶ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۱ مولار و $\text{pH}=7$ شامل یک درصد Triton x-100 به صورت تعلیق درآمد و به مدت ۱۲ ساعت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به هم زده شد.

- محلول حاصل به مدت پنج دقیقه گردان SS-34 با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد.

- رسوب حذف و روشن‌ترین بر روی ستون شیب چگالی ۱۰ تا ۴۰ درصد سوکروز که یک شب قبل تهیه شده بود، قرار داده شد و به مدت یک تا یک و نیم ساعت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد با گردان SW-28 سانتریفوژ Beckman با ۲۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد.

- باندهای ویروسی تشکیل شده در ستون سوکروز گردآوری شدند. سپس به‌منظور رسوب ویروس، به محلول حاصل بافر فسفات ۰/۰۱ مولار و $\text{pH}=7$ اضافه شد و این محلول در گردان شماره ۳۰ سانتریفوژ Beckman در ۲۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت دو ساعت سانتریفوژ شد.

- روشن‌ترین حذف و ویروس حاصل در یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۱ مولار و $\text{pH}=7$ حل شد. آماده (سوسپانسیون) به‌دست آمده که حاوی ویروس بود تا زمان استفاده در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

سرولوژی

تهیه آنتی‌سرم

برای تهیه آنتی‌سرم هشت میلی‌گرم آماده نسبتاً خالص شده ویروس، طی چهار مرحله با فواصل یک هفته به خرگوش سفید نیوزلندی تزریق شد. تزریق به صورت

روی برگ‌های *C. quinoa* Willd - که با پودر کاربوراندوم گردپاشی شده بود- مایه‌زنی مکانیکی شد. در مایه‌زنی‌های بعدی از عصاره برگ *C. quinoa* دارای علائم، برای آلوده کردن بوته‌های سالم این گیاه استفاده شد. گیاهان مایه‌زنی شده، در شرایط گلخانه و دمای ۳۰-۲۱ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

خالص‌سازی

برای خالص‌سازی BNYVV از برگ *C. quinoa* دارای علائم، از روش تامادا و همکاران (Tamada et al. 1989) و نیز روش کونیگ و همکاران (Koenig et al. 1984) با انجام تغییراتی به شرح زیر استفاده شد:

- ۵۰ گرم برگ آلوده *C. quinoa* در سه تا چهار حجم بافر فسفات ۰/۱ مولار و $\text{pH}=7$ شامل ۰/۰۰۱ مولار Na_2EDTA ، در مخلوط‌کن خرد و سپس عصاره‌گیری شد.

- عصاره با پارچه ململ صاف و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به هم زده شد.

- عصاره به مدت ۱۰ دقیقه گردان Sorval SS34 با ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد.

- رسوب حاصل حذف و پس از افزودن دو درصد TritonX-100 به روشن‌ترین، محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه به هم زده شد.

- جهت خلوص بیشتر، عصاره حاصل روی بالشک سوکروز ۲۰ درصد در گردان شماره ۳۰ سانتریفوژ Beckman در ۲۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت دو ساعت سانتریفوژ شد.

آنتی‌بادی متصل به آنزیم، آزمون عیارسنجی انجام شد. در این آزمون از رقت‌های ۱/۵۰۰، ۱/۱۰۰۰ و ۱/۱۵۰۰ آنتی‌بادی در بافر پوششی و از همین رقت‌ها برای آنتی‌بادی متصل به آنزیم در بافر نمونه استفاده گردید (جدول ۱). هم‌چنین برای تهیه آنتی‌ژن یک ریشه چغندر قند (رقم حساس IC) آلوده به بیماری، در ۵، ۱۰ و ۱۰۰ حجم بافر نمونه عصاره‌گیری شد. در آزمون مذکور، میزان جذب نور در طول موج ۴۰۵ نانومتر حاصل از واکنش‌های انجام شده، ۳۰ دقیقه بعد از اضافه کردن محلول یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر ۴- نیتروفنیل فسفات (4-nitrophenyl phosphate) در بافر دی‌اتانول آمین با استفاده از دستگاه پلیت خوان (Microplate reader) اندازه‌گیری شد.

نتایج

نتایج مایه‌زنی مکانیکی روی برگ‌های *C. quinoa* عبارت بود از تشکیل لکه‌های موضعی کلروتیک که سپس نکروتیک شدند و علائم زردی که پس از مدتی در اطراف رگبرگ‌ها توسعه پیدا کرد (شکل ۲). علائم در این گیاه به‌طور میانگین بعد از ۱۰-۸ روز ظاهر شد.

در خالص‌سازی BNYVV، بعد از سانتریفوژ کردن در ستون سوکروز دارای شیب چگالی، سه باند ویروسی در لوله سانتریفوژ تشکیل شد. در مواردی نیز باندها به صورت پراکنده (Light scattering) دیده شدند که این پراکندگی معمولاً در سه ناحیه از لوله دارای تراکم بیشتری بود. طیف جذبی این باندها مشابه طیف جذبی نوکلئوپروتئین بود (شکل ۳). در تحقیق حاضر در هر بار خالص‌سازی، به ازای ۵۰ گرم بافت

زیرجلدی در ناحیه گردن و هم‌چنین در ماهیچه ران انجام شد. قبل از هر تزریق آماده و ویروسی با حجم مساوی روغن Freund's incomplete adjuvant مخلوط و سپس به‌خوبی به هم زده شد تا به صورت امولسیون درآید. ده روز بعد از آخرین تزریق از رگ کناری گوش، خون‌گیری انجام شد.

جذب آنتی‌سرم

برای حذف آنتی‌بادی‌های ناخواسته که بر علیه پروتئین‌های گیاهی تولید شده بودند، ابتدا برگ سالم *C. quinoa* در یک حجم آب مقطر، عصاره‌گیری شد. عصاره حاصل با پارچه ملل سترون صاف گردید و عصاره صاف شده به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب حذف گردید و سپس آنتی‌سرم با نیم حجم از رانشین، مخلوط و به مدت دو ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و بعد از حذف رسوب مجدداً به میزان نیم حجم دیگر از عصاره گیاه سالم به آنتی‌سرم افزوده شد و بعد از یک شب نگهداری در چهار درجه سانتی‌گراد، مشابه روش مذکور سانتریفوژ شد.

آزمون الیزا

برای راه‌اندازی سیستم الیزا به‌روش مستقیم (DAS-ELISA)، از روش ارائه شده توسط کلارک و بار جوزف (Clark and Bar-Joseph 1984) استفاده شد. بدین منظور ابتدا آنتی‌بادی از سرم خون خرگوش جداسازی شد و سپس به آنزیم آلکالین فسفاتاز جداسازی شد و سپس به آنزیم آلکالین فسفاتاز متصل (Enzyme-antibody conjugate, EAC) گردید. بعد از آن برای تعیین بهترین رقت آنتی‌بادی و

آزمون، میزان جذب نور در رقت‌های ۱/۱۰۰۰ آنتی‌بادی و آنتی‌بادی متصل به آنزیم با عصاره رقیق شده، ریشه آلوده به نسبت یک به پنج و یک به ده به ترتیب برابر با ۰/۶۲۲ و ۰/۴۴۳ بود (جدول ۱). با توجه به نتایج حاصل می‌توان از رقت‌های ۱/۱۰۰۰ آنتی‌بادی و ۱/۱۰۰۰ آنتی‌بادی متصل به آنزیم که رقت‌های معمول در آزمون الیزا هستند، برای انجام این آزمون استفاده کرد. در آزمون مذکور هیچ‌گونه جذبی در مورد نمونه‌های ریشه سالم و نمونه‌های بلانک دیده نشد.

آلوده *C. quinoa* بین ۷ تا ۱۰ میلی‌گرم ویروس نسبتاً خالص به دست آمد.

در آزمون عیارسنجی در تمام رقت‌های مورد استفاده، بین آنتی‌بادی و آنتی‌بادی متصل به آنزیم واکنش وجود داشت. به‌طور مثال، میزان جذب نور در کم‌ترین رقت‌های به‌کار رفته آنتی‌بادی و آنتی‌بادی متصل به آنزیم (رقت ۱/۱۵۰۰) با عصاره رقیق شده ریشه آلوده به نسبت یک به پنج و یک به ده، به ترتیب ۰/۳۰۴ و ۰/۱۸۳ بود (جدول ۱). هم‌چنین در این

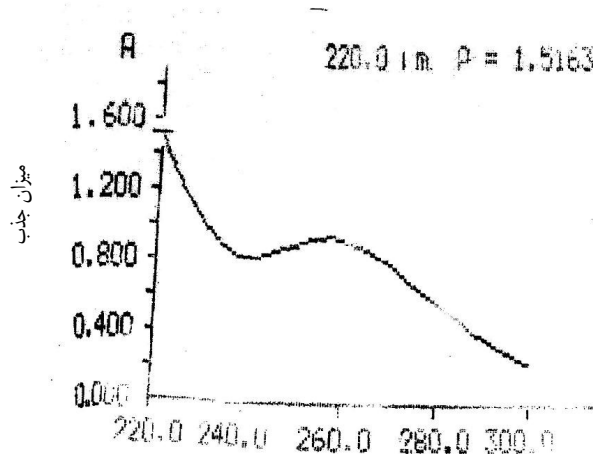


شکل ۱ علائم زردی و نکروز رگبرگ در برگ چغندر قند آلوده به BNYVV



شکل ۲ توسعه لکه‌های موضعی و زردی در رگبرگ‌های *C. quinoa*، پس از سپری شدن ۱۴ روز از زمان مایه‌زنی

مکانیکی با عصاره برگ آلوده *C. quinoa*



شکل ۳ طیف جذبی اموده خالص شده BNYVV
طول موج (نانومتر)

جدول ۱ نتایج آزمون عیارسنجی با آنتی بادی و آنتی بادی متصل به آنزیم (EAC) در رقت‌های مختلف تهیه شده علیه BNYVV پس از ۳۰ دقیقه

رقت‌های آنتی بادی									آنتی بادی‌ها
۱ / ۱۵۰۰			۱ / ۱۰۰۰			۱ / ۵۰۰			
- / ۰.۸۹	- / ۰.۶۹	- / ۰.۸۲	- / ۰.۷۲	- / ۰.۸۸	- / ۰.۸۸	- / ۰.۸۷	- / ۰.۶۵	- / ۰.۵۱	شاهد
- / ۰.۹۷	- / ۰.۹۶	- / ۰.۸۲	- / ۰.۷۴	- / ۰.۸۰	- / ۰.۹۴	- / ۰.۹۸	- / ۰.۶۳	- / ۰.۷۳	H ۱ / ۵
- / ۰.۳۴	- / ۰.۵۲۶	- / ۰.۶۸۷	- / ۰.۴۵۶	- / ۰.۶۲۲	- / ۰.۸۹۱	- / ۰.۶۷۶	- / ۰.۸۹۵	- / ۰.۹۸۳	I ۱ / ۵
- / ۰.۷۸	- / ۰.۷۱	- / ۰.۸۰	- / ۰.۷۶	- / ۰.۸۷	- / ۰.۸۰	- / ۰.۷۶	- / ۰.۸۱	- / ۰.۷۶	H ۱ / ۱۰
- / ۰.۱۸۳	- / ۰.۲۴۴	- / ۰.۵۰۱	- / ۰.۲۶۴	- / ۰.۴۴۳	- / ۰.۷۹۹	- / ۰.۵۶۰	- / ۰.۷۷۰	- / ۰.۹۵۳	I ۱ / ۱۰
- / ۰.۷۶	- / ۰.۷۷	- / ۰.۶۸	- / ۰.۹۶	- / ۰.۹۸	- / ۰.۷۶	- / ۰.۹۶	- / ۰.۹۰	- / ۰.۴۴	H ۱ / ۱۰۰
- / ۰.۴۴	- / ۰.۸۶	- / ۰.۱۲۱	- / ۰.۵۵	- / ۰.۵۱	- / ۰.۳۴۵	- / ۰.۱۸۹	- / ۰.۳۰۸	- / ۰.۴۹۵	I ۱ / ۱۰۰
۱ / ۱۵۰۰	۱ / ۱۰۰۰	۱ / ۵۰۰	۱ / ۱۵۰۰	۱ / ۱۰۰۰	۱ / ۵۰۰	۱ / ۱۵۰۰	۱ / ۱۰۰۰	۱ / ۵۰۰	EAC

رقت‌های آنتی بادی متصل به آنزیم

H ریشه چغندر قند سالم

I ریشه چغندر قند آلوده به BNYVV (رقم IC)

EAC آنتی بادی متصل به آنزیم (Enzyme-antibody conjugate)

اعداد منفی به منزله صفر محسوب می‌شوند.

1978; Steven et al. 1981; Al Musa and

Mink 1981; Gugerli 1984; Koenig et al.

(1984). در برخی از روش‌های به کار رفته، برای

بحث

برای خالص‌سازی BNYVV روش‌های

متعددی به کار رفته است (Putz and Kuszala)

نشان‌دهنده سه پیکره از ویروس است، دیده شد. نبود یکی از پیکره‌ها ممکن است به دلیل استفاده از عصاره برگ چغندر قند برای تکثیر ویروس باشد زیرا RNA4 که در انتقال ویروس با ناقل نقش دارد، در آلودگی‌های سیستمیک که علایم در برگ چغندر قند ظاهر می‌شود، ممکن است به برگ انتقال نیابد (Koenig et al. 1986). همچنین ممکن است در مایه‌زنی مکانیکی ویروس روی برگ *C. quinoa*، RNA مذکور حذف شده باشد (Koenig and Burgermeister 1989). علاوه بر آن، این امکان نیز وجود دارد که عدم مشاهده باند چهارم، ناشی از حذف باند در مراحل خالص‌سازی باشد. در هر صورت، انجام بررسی‌های بیش‌تر در این زمینه، ضروری به نظر می‌رسد.

در آزمون عیارسنجی در بالاترین رقت آنتی‌بادی، آنتی‌بادی متصل به آنزیم، بلانک و نمونه‌های سالم هیچ‌گونه جذبی دیده نشد که نشان‌دهنده کیفیت مطلوب آنتی‌سرم تولید شده است. آنتی‌سرم مذکور برای انجام تحقیقات مورد نظر در مؤسسات آموزشی و پژوهشی قابل استفاده است.

خالص‌سازی BNYVV که به راندمان خالص‌سازی اشاره شده است، از هر کیلوگرم بافت برگ آلوده *C. quinoa* بین ۵ تا ۲۰ میلی‌گرم ویروس استخراج شده است (Putz et al. 1990). در تحقیق حاضر از هر ۵۰ گرم بافت برگ آلوده *C. quinoa* بین ۷ تا ۱۰ میلی‌گرم ویروس استخراج شد که راندمان خالص‌سازی در مقایسه با روش‌های قبلی بسیار بالاتر است. از جمله دلایل بالا بودن راندمان خالص‌سازی این است که در این تحقیق بافت مورد استفاده برای خالص‌سازی فقط از قسمت‌هایی از برگ‌های آلوده *C. quinoa* که علایم ویروسی را به خوبی نشان می‌دادند، گزینش شد. علاوه بر آن روش به کار رفته در این تحقیق برای خالص‌سازی BNYVV، در مقایسه با روش‌هایی که قبلاً برای خالص‌سازی این ویروس توصیه شده‌اند، آسان‌تر بوده و به دلیل این که در مدت زمان کم‌تری به انجام می‌رسد، احتمال از دست رفتن ویروس در هنگام خالص‌سازی کاهش یافته و همچنین پیکره‌های ویروسی نیز آسیب کم‌تری می‌بینند. در خالص‌سازی ویروس در ستون سوکروز دارای شیب چگالی برخلاف انتظار فقط سه باند ویروسی که

منابع مورد استفاده:

References:

- ایزدپناه، ک. هاشمی، پ. کامران، ر. پاک نیت، م. سهندپور، آ و معصومی، م. ۱۳۷۵. وجود گسترده بیماری ریشه‌ریشی (شبه Rhizomania) در فارس. مجله بیماری‌های گیاهی، جلد ۳۲، صفحات ۲۰۶-۲۰۰.
- توده‌فلاح، م. ارجمندی، ن و محمودی، ب. ۱۳۷۹. بررسی وضعیت آلودگی و پراکنش بیماری ریزومانیا (ریشه‌گنایی) چغندر قند در ایران. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان. اصفهان. جلد دوم، صفحه ۷۲.

- جعفرپور، ب و فلاحتی رستگار، م. ۱۳۷۹. شیوع بیماری ریزومانیا در استان خراسان. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان. اصفهان. جلد دوم، صفحه ۷۳.
- دارابی، س. کامران، ر و ایزدپناه، ک. ۱۳۷۷. موقعیت بیماری ریشه‌گنایی (ریشه‌ریشی) چغندرقد در استان فارس و کهگیلویه و بویراحمد. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، کرج. جلد دوم، صفحه ۱۲۸.
- دارابی، س. معصومی، م و ایزدپناه، ک. ۱۳۸۲. ریشه‌گنایی (ریزومانیا) چغندرقد. انتشارات مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، ۵۰ صفحه.
- شهرآئین، ن. حیدری، ا. ندافی، ل. فرزادفر، ش و قطبی، ت. ۱۳۷۹. اولین گزارش از وقوع بیماری ریزومانیا چغندرقد در استان سمنان. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان. اصفهان. جلد دوم، صفحه ۲۶۱.
- Al Musa AM, Mink GI. *Beet nectrotic yellow vein virus* in North America. *Phytopathology*. 1981; 71: 773-776.
- Amiri R, Moghaddam M, Mesbah M, Sadeghian SY, Ghannadha MR, Izadpanah K. The inheritance of resistance to *Beet nectrotic yellow vein virus* (BNYVV) in *B. vulgaris* subsp. *maritima*, accession WB42: statistical comparisons with Holly-1-4. *Euphytica*. 2003; 132: 363-373.
- Asher MJC. Rhizomania. In D. A. Cooke and R. K. Scott (eds.): *The Sugar Beet Crop*. 1993; pp. 311-346. Chapman and Hall, London.
- Asher MJC, Kerr S. Rhizomania: Progress with resistance varieties. *Br. Sugar Beet Rev*. 1996; 64: 19-22.
- Biancardi E, Lewellen RT, DeBiaggi M, Erichsen AW, Stevanato P. The origin of rhizomania resistant in sugar beet. *Euphytica*. 2002; 127: 383-397.
- Bouzoubaa S, Quillex L, Guilley H, Jonard G, Richards K. Nucleotide sequence of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-1. *J. Gen. Virol*. 1987; 68:615-626.
- Bouzoubaa S, Ziegler V, Beck D, Guilley H, Richards K, Jonard G. Nucleotide sequence of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-2. *J. Gen. Virol*. 1986; 67: 1689-1700.

- Brunt AA, Richards KE. Biology and molecular biology of furoviruses. *Adv. Virus Res.* 1989; 36: 1-32.
- Clark MF, Bar- Joseph M. Enzyme immunosorbent assay in plant virology. *In* K. aramorosch and H. Koprowsky (eds.): *Methods in Virology*. 1984; pp. 51-58. Vol. VII. Academic Press, New York.
- Giunchedi L, De Biaggi M, Poggi-Pollini CP. Evaluation of ELISA technique for the screening of rhizomania- tolerant sugar beet genotype. *Proc. 48th Winter Congress, I.I.R.B., Brussels*: 1985; 385-390.
- Giunchedi L, De Biaggi M, Poggi-Pollini CP. Correlation between tolerance and *Beet necrotic yellow vein virus* in sugar beet genotypes. *Phytopath. Medit.* 1987; 26: 23-28.
- Gugerli P. Isopycnic centrifugation of plant viruses in nycodens density gradients. *J. Virol. Meth.* 1984; 9: 249-258.
- Harveson R, Rush CM. Evaluation of fumigation and rhizomania tolerant cultivars for control of a root disease complex of sugar beet. *Plant Dis.* 1994; 78: 1197- 1202.
- Harveson R, Rush CM. The influence of irrigation frequency and cultivar blends on the severity of multiple root disease in sugar beets. *Plant Dis.* 2002; 86: 901-908.
- Henry C. Rhizomania-its effect on sugar beet yield in the UK. *Br. Sug. Beet Rev.* 1996; 64: 24-26.
- Johansson E. Rhizomania in sugar beet- a threat to beet growing that can be overcome by plant breeding. *Sveriges Utsadesforenings Tidskrift.* 1985; 95: 115-121.
- Koenig R, Burgermeister W. Mechanical inoculation of sugar beet roots with isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* having different RNA compositions. *J. Phytopathol.* 1989; 124: 249-255.

- Koenig R, Burgermeister W, Weich H, Sebald W, Kothe C. Uniform RNA patterns of *Beet necrotic yellow vein virus* in sugar beet roots, but not in leaves from several plant species. J. Gen. Virol. 1986; 2043-2046.
- Koenig R, Haeberle A, Commandeur U. Detection and characterization of a distinct type of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA₅ in a sugar beet growing area in Europe. Arch. Virol. 1997; 147: 1499-1504.
- Koenig R, Jarausch W, Li Y. Effect of recombinant *Beet necrotic yellow vein virus* with different RNA compositions on mechanically inoculated sugar beets. J. Gen. Virol. 1991; 72: 2243-2246.
- Koenig R, Lesemann DE, Burgermeister W. *Beet necrotic yellow vein virus*, purification, preparation of antisera and detection by means of ELISA, immunosorbent electron microscopy and electro-blot immuno assay. Phytopathol. Z. 1984; 111: 244-250.
- Koenig R, Lennefors B. 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. Arch. Virol. 2000; 145: 1561-1570.
- Kuszala M, Ziegler V, Bouzoubaa S, Richards K, Putz C, Guilley H, Jonard G. *Beet necrotic yellow vein virus*: Different isolates are serologically similar but differ in RNA composition. Ann. Appl. Biol. 1986; 109: 155-162.
- Liu HY, Sears JL, Lewellen RT. Occurrence of resistance-breaking *Beet necrotic yellow vein virus* of sugar beet. Plant Dis. 2005; 89: 464-468.
- Mcgrann GRD, Grimmer MK, Mutasa-Gottgens ES, Stevens S. Progress towards the understanding and control of sugar beet rhizomania disease. Mol. Plant Pathol. 2009; 10: 129-141.
- Mehravar 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. Arch. Virol. 2009; 154: 501-506.
- Miyanishi M, Kusume T, Saito M, Tamada T. Evidence for three groups of sequence variants of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA5. Arch. Virol. 1999; 144: 879-892.
- Pelsey F, Merdinoglu D. Identification and mapping of random amplified polymorphic DNA markers linked to a rhizomania resistance gene in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by bulked segregant analysis. Plant Breeding. 1996; 115: 371-377.
- Putz C, Kuszala M. La rhizomanie de la betterave sucriere en Alasace. Recherche d'une nouvelle methode de purification du' *Beet necrotic yellow vein virus*'. Ann. Phytopathol. 1978; 10: 247-262.
- Putz C, Merdinoglu D, Lemaire O, Stocky G, Valentin P, Weidemann S. *Beet necrotic yellow vein virus*, causal agent of sugar beet rhizomania. Rev. Plant Pathol. 1990; 69:247-254.
- Richard-Molard M. Rhizomania: A worldwide danger to sugar beet. Span. 1985; 28: 92-94.
- Richards KE, Tamada T. Mapping functions on the multipartite genome of *Beet necrotic yellow vein virus*. Annu. Rev. Phytopathol. 1992; 30: 291-313.
- Rush CM. Ecology and epidemiology of *Benyviruses* and plasmodiophorid vectors. Annu. Rev. Phytopathol. 2003; 41: 576- 592.
- Rush CM, Liu HY, Lewellen RT, Acosta-Leal R. The continuing saga of rhizomania of sugar beets in the United State. Plant Dis. 2006; 90: 4-15.
- Scholten OE, Lange W. Breeding for resistance to rhizomania in sugar beet: A review. Euphytica. 2000; 112: 219-231.

- Scholten OE, Jansen RK, Keizer LCP, De Bock ThSM, Lange W. Major genes for resistance to *beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in *Beta vulgaris*. *Euphytica*. 1996; 91: 331-339.
- Steven AC, Trus BL, Putz C, Wurtz M. The molecular organization of *Beet necrotic yellow vein virus*. *Virology*. 1981;113:428-438.
- Tamada T. *Beet necrotic yellow vein virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses. 1975; No. 144.
- Tamada T. *Benyviruses*. 1999; Pages 154-160. In R.G. Webster and A.Granoff (eds.): *Encyclopedia of Virology*. Academic Press, London.
- Tamada T, Abe H. Evidence that *Beet necrotic yellow vein virus* RNA4 is essential for efficient transmission by the fungus *Polymyxa betae*. *J.Gen.Virol*. 1989; 70: 3391-3398.
- Tamada T, Baba T. *Beet necrotic yellow vein virus* from rhizomania-affected sugar beet in Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn*. 1973; 39: 325-332.
- Tamada T, Shirako Y, Abe H, Saito M, Kiguchi T, Harada T.) Production and pathogenicity of isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* with different number of RNA components. *J. Gen. Virol*. 1989; 70: 3399-3409.
- Tuitert G, Musters-Van Oorschot PMS, Hiejbroek W. Effect of sugar beet cultivars with different levels of resistance to *Beet necrotic yellow vein virus* on transmission of virus by *Polymyxa betae*. *Eur. J. Plant Pathol*. 1994; 100: 201- 220.
- Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR and Wickner RB. *Virus taxonomy*. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press. 2000; 1162p.
- Whitney ED. Identification, distribution and testing for resistance to rhizomania in *Beta maritima*. *Plant Dis*. 1989; 73: 287-290.

Wisler GC, Lewellen RT, Sears JL, Liu HY, Duffus JE. Specificity of TAS-ELISA for *Beet necrotic yellow vein virus* and its application for determining rhizomania resistance in field-grown sugar beet. *Plant Dis.* 1999; 83: 864-870.

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