مجله حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۳، شماره ۱، نیمسال اول ۱۳۸۸، ص ۲۴-۱۷

Journal of Plant Protection
Vol. 23, No. 1, Spring-Summer 2009, p.17-24

شناسایی قارچ *Polymyxa betae* در ریشه های چغندرقند با استفاده از روش مولکولی RT-PCR در استان خراسان رضوی

سارا قارونی کاردانی[1*] - بهروز جعفرپور[2] - ماهرخ فلاحتی رستگار[3] - فاطمه طبسی نژاد[4]

تاریخ دریافت:۸۵/۹/۲۹
تاریخ پذیرش: ۸۷/۴/۲۴

چکیده

قارچ پلی میکسا بتا (*Polymyxa betae*) از پارازیتهای اجباری و انتشار جهانی دارد. این قارچ خاکزاد و پارازیت داخلی ریشه برخی گیاهان مانند اعضاء خانواده های خرفه (*Portulaceae*)، سلمه (*Chenopodiaceae*)، تاج خروسیان (*Amaranthaceae*) و ناقل تعدادی از ویروسهای بیماریزای گیاهی از جمله ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندرقند (BNYVV) می باشد. این ویروس از لحاظ اقتصادی از مهمترین ویروسهای آلوده کننده چغندرقند است. اسپورهای این قارچ قادرند سالها در خاک خشک باقی بمانند. با توجه به اهمیت این ویروس، در تابستان ۱۳۸۴ اقدام به جمع آوری خاک و نمونه‌های مشکوک به آلودگی از مزارع چغندرکاری استان گردید و تعداد ۴۸ نمونه از مزارع تربت حیدریه، چناران، نیشابور، فریمان و بجنورد جمع آوری شد. به منظور تشخیص ویروس BNYVV از آزمون داس الایزا (DAS-ELISA) استفاده گردید. از آزمون طعمه گذاری در خاک جهت جداسازی قارچ مورد نظر از خاک استفاده شد. شش هفته بعد ریشه ها از خاک خارج و پس از شستشو با آب در هیدروکسید پتاسیم ۱۰درصد قرار داده شد. سپس قطعاتی از آنها جهت مشاهده فرم پایدار قارچ با میکروسکوپ نوری بررسی شدند. استفاده از میکروسکوپ نوری جهت تعیین پلی میکسا بتا به علت اشکال در رویت فرمهای نابالغ و کوچک و عدم تمایز بین زئوسپورانژیومها و اسپورهای مقاوم سایر قارچها غیر قابل اطمینان و زمان بر است. بنابراین استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز به عنوان روشی سریع و دقیق مورد استفاده قرار گرفت. برای استخراج آر. ان. اِ از غده‌های نمونه‌های آلوده از روش رسوب با PEG_{6000} استفاده شد و بدنبال آن نسخه برداری به طریق وارونه (RT-PCR) جهت ساخت cDNA با استفاده از آغازگر اختصاصی ژنوم قارچ انجام پذیرفت. آزمون پی. سی. آر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رفت و برگشت ژنوم این قارچ بر اساس داده های مونیه و همکاران صورت گرفت. الکتروفورز محصول پی. سی. آر در ژل پلی اکریل آمید ۵ درصد و نیز آگارز ۱/۵ درصد تکثیر قطعه ای به اندازه ۱۷۰ جفت باز را تایید نمود که نشانگر آلودگی نمونه ها به قارچ پلی میکسا بتا بود. با بکار گیری این روش ردیابی قارچ پلی میکسا بتا به طور مستقیم از آر. ان. اِ استخراجی امکان پذیر می باشد.

واژه های کلیدی: پلی میکسا بتا، ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندرقند (BNYVV)، آزمون داس الیزا، واکنش زنجیره ای پلیمراز

مقدمه

قارچ *Polymyxa betae* از سلسله Protists و شاخه Plasmodiophoromycota و از پارازیتهای اجباری و انتشار جهانی دارد (۲۳). برای اولین بار کسکین در سال ۱۹۶۴ پلی میکسا بتا را به عنوان یک قارچ پارازیت ریشه های چغندرقند تشخیص و نامگذاری کرد (۱۷). این قارچ از اروپا توسط کانووا در سال ۱۹۶۶ (۹)، از آسیا توسط دی آمبرا و ماتو در سال ۱۹۷۷ (۱۱) و از آمریکا به وسیله دافوس در سال ۱۹۸۷ گزارش شده است (۱۳). در ایران ایزدپناه در سال ۱۳۷۵ وجود قارچ شبیه به پلی میکسا بتا را از مزارع چغندرقند استان فارس گزارش داده است (۱). این قارچ در ایران از گسترش وسیعی برخوردار است و علاوه بر مناطق انتشار بیماری به تنهایی در بسیاری از مزارع چغندرقند سالم نیز وجود دارد (۳،۵). اسپورهای مقاوم قارچ قادرند بیش از ۱۵سال در خاک خشک باقی بمانند (۷). جمعیت بالای پلی میکسا بتا در خاک مزارعی که بیش از ۱۷ سال در آنها گیاه حساس کشت نشده، گزارش شده است (۲۲). پلی میکسا بتا ناقل ویروسهای زردی نکروتیک رگبرگ چغندرقند[5]، ویروس خاکزاد چغندرقند[6]، ویروس موزائیک خاکزاد چغندرقند[7] و ویروس Q چغندرقند[8] میباشد (۲۶).

۱- دانشجوی دکتری ، گروه گیاهپزشکی ، دانشکده کشاورزی ، دانشگاه فردوسی مشهد
(* - نویسنده مسئول : Email: Saragharooni@yahoo.com)
۲و۳- اساتید گروه گیاهپزشکی ، دانشکده کشاورزی ، دانشگاه فردوسی مشهد
۴- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی ، دانشکده کشاورزی ، دانشگاه فردوسی مشهد

5- Beet necrotic yellow vein virus
6- Beet soil born virus
7- Beet soil born mosaic virus
8- Beet virus Q

BNYVV عامل بیماری ریزومانیا، در سالهای اخیر بیشترین توجه را به خود جلب کرده است و در حال حاضر از تمامی بیماریهای چغندرقند مخربتر بوده و از نظر اقتصادی مهمترین بیماری چغندرقند می باشد (۸). تحقیقات انجام شده در ژاپن نشان داد که عامل اصلی بیماری ریزومانیا، ویروس است و پلی میکسا بتا نقش ناقل ویروس را برعهده دارد (۱۴). BNYVV در شرایط طبیعی تنها با زئوسپورهای پلی میکسا بتا منتقل می شوند. ویروس در درون زئوسپور قارچ حمل شده و فقط در سلولهای گیاه (in vivo) توسط قارچ قابل گیرش است (۱۴، ۱۵). البته تمام جمعیتهای قارچ حاوی ویروس نیستند (۲). جدایه های پلی میکسا بتا فاقد ویروس می توانند BNYVV را از چغندرهایی که بطور مکانیکی آلوده شده اند کسب کنند. ویروس در خارج از ریشه، بدون محافظت توسط اسپورهای مقاوم پلی میکسا بتا به مدت طولانی قادر به بقاء نیست ولی همراه با قارچ در خاک قدرت آلوده کنندگی خود را بیش از ۱۵ سال حفظ می کند (۷). در سالهای اخیر به دلیل اهمیت بیماری ریزومانیا مطالعات زیادی روی جنبه های مختلف بیماری از جمله ویژگی های ناقل آن انجام شده است. با بکارگیری روش واکنش زنجیره ای پلیمرازی[1] که در مقایسه با روشهای معمول مثل مشاهده میکروسکوپی اسپورها و آزمون طعمه گذاری در خاک دارای دقت و سادگی بیشتری است و زمان کمتری می برد می توان این قارچ را ردیابی کرد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و تعیین آلودگی نمونه ها به BNYVV- با توجه به این که قارچ مزبور خاکزی و ناقل بیماری ریزومانیا بوده پس از بررسی مزارع چغندر قند در تابستان ۱۳۸۴، تعداد ۴۸ نمونه مشکوک به بیماری ریزومانیا از مزارع تربت حیدریه، چناران، نیشابور، فریمان و بجنورد جمع آوری گردید و پس از انتقال به آزمایشگاه بلافاصله مورد بررسی قرار گرفت. تشخیص نمونه های آلوده به ویروس به روش ساندویچ دو طرفه الیزا (DAS-ELISA)[2] مطابق روش کلارک و آدامس (۱۰) با آنتی سرم تهیه شده از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس انجام پذیرفت .

آزمون طعمه گذاری گیاهان در خاک (Soil bait test): این آزمون براساس روش توایترت (۱۹۹۰) با اندکی تغییر می باشد (۲۵). در این روش ۵۰۰ الی ۷۰۰ گرم خاک از مناطق نمونه برداری شده از عمق ۱۵ سانتی متری جمع آوری و سپس خاکهای جمع آوری شده با هم مخلوط گردید. تکه های درشت و به هم چسبیده کلوخه های خاک خرد گردید و از الک عبور داده شد. خاک جمع آوری شده به نسبت یک به سه با مخلوطی از خاک برگ و ماسه مخلوط گردید. در انتهای ظرفهای یک بار مصرف سوراخی ایجاد کرده و خاک مورد نظر در آنها تقسیم گردید. سپس سه تا پنج عدد بذر چغندرقند حساس (ارقام H5505، PP36، PP22، IC و ۷۲۳۳) با پنج تکرار در هر گلدان کاشته (بذرها را ابتدا به مدت چهار ساعت در آب خیس کرده، سپس آنها را در دستمال مرطوبی به مدت ۲۴ ساعت قرارداده شد تا جوانهٔ ریشه از بذر خارج شود) به منظور برداشتن بذرها از انبرک استریل استفاده شد. بین هر نمونه خاک انبرک استریل شد (برای ضدعفونی کردن انبرک از الکل ۷۰٪ استفاده شد). روی بذرها با مقداری ماسه پوشیده شد. سپس گلدانها به مدت شش هفته در شرایط مطلوب گلخانه ای ۵ $\pm$ ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شد. پس از مدت شش هفته ریشه های گیاهچه های هر گلدان از خاک خارج شد و در سطل آبی شستشو داده شد. برای هرنمونه خاک مورد آزمایش آب سطل عوض شد. سپس از قسمت‌های انتهایی ریشه گیاه جهت انجام آزمایشات استفاده شد (۲۲).

مشاهده فرم پایدار قارچ در سلولهای آلوده گیاهی: جهت مشاهده فرم پایدار قارچ پس از قرار دادن ریشکهای جانبی در هیدروکسید پتاسیم۱۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه و شستشو با آب مقطر آنها را در یک قطره گلیسرول روی لام قرار داده و با قرار دادن لامل بر روی آن نمونه در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمائی ×۴۰ برای مشاهده سیستوسورهای قارچ بررسی شد (۴).

استخراج آر. ان. ای: برای استخراج آر. ان. اِ کل، از ۴۸ غده چغندرقند، از روش رسوب با PEG_{6000} استفاده شد (۲۴،۶). ابتدا ۰/۲ گرم از بافت انتهایی غده های چغندرقند را که توسط ازت مایع کاملا به صورت پودر در آمده بود، درون میکروتیوبهای ۱/۵ ریخته و فورا به آن ۲ حجم فنل (۴۰۰ میکرولیتر) و ۲ حجم بافر TNE (۱۰۰ میلی مولار تریس–هیدروکلریک اسید (pH, ۸)، ۱۰۰ میلی مولار کلرید سدیم، ۱۰ میلی مولار EDTA، ۲٪ SDS ، ۲درصد ۲–مرکاپتواتانول) اضافه گردید و به شدت تکان داده شد. سپس مدت یک دقیقه با سرعت ۱۳۴۰۰ دور در دقیقه میان گریز شد. پس از انتقال بخش بالائی به میکروتیوب جدید، یک حجم فنل (۲۰۰ میکرولیتر) و یک حجم کلروفرم (۲۰۰ میکرولیتر) اضافه و مانند قبل میان گریز گردید. در این مرحله باید حجم دقیق مایع رویی مشخص شود . برای هر ۱۰۰ میکرولیتر فاز مایع رویی ۱۵/۰۹میکرولیتر PEG_{6000} ۵۰ درصد و ۱۰/۶۹ میکرولیتر کلرید سدیم[3] ۵ مولار اضافه گردید. میکروتیوبها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و ۱۰ دقیقه در یخ قرار داده شد. آر. ان. اِ با میان گریز کردن در ۱۳۴۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شد. رسوب بدست آمده ابتدا با اتانول۷۰٪ به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۴۰۰ دور میان گریز گردید. سپس مجددا با ۱۰۰ میکرولیتر اتانول۷۰٪ شسته شد. پس از خشک شدن در ۲۰ میکرولیتر بافر TE (۱۰ میلی مولار Tris-Hcl با pH=۸، یک میلی مولار EDTA با

1- Polymerase Chain Reaction (PCR)

2- Double-antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay

3- Nacl

pH=۸) حل شد و در دمای $^{\circ}C$ ۲۰- نگهداری گردید.

(جدول ۱)- ترادف آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در این تحقیق جهت تکثیر پلی میکسا بتا

آغازگر	ترادف[1] آغازگر (´۳-´۵)	موقعیت
آغازگر رفت[3] (PB4 For)	CAA ACG CCT GAA ATC ATC TAA C	۸۱۰-[2]۸۳۱
آغازگر برگشت[5] (PB4 Rev)	GAT GGC CCA ATT CCT TAC AC	۹۷۰-۹۵۱[4]

سنتز cDNA از آر. ان. ای (مرحله نسخه برداری معکوس):[6] به منظور سنتز cDNA طبق دستورالعمل شرکت فرمنتاس[7] عمل شد (۶). ابتدا ۱/۵ میکرولیتر آر. ان. اِ الگو را با ۱ میکرولیتر (۱۰ پیکامول) آغازگر اختصاصی برگشت[8] و۱۰ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC[9] مخلوط و در دمای۷۰°C به مدت ۵ دقیقه حرارت داده شد. پس از قرار دادن روی یخ به آن ۴ میکرولیتر بافرRT × ۵، ۲ میکرولیتر مخلوط ۱۰ میلی مولار dNTPs، ۲۰ واحد (۰/۵ میکرولیتر) Ribonuclease inhibitor اضافه شد. به مدت ۵ دقیقه در انکوباتور دمای ۳۷°C قرار داده شد. سپس به آن ۲۰۰ واحد آنزیم M-MLV Reverse transcriptase (فرمنتاس) افزوده شد. میکروتیوبها در دستگاه ترموسایکلر شرکت آلمانی بیومترا[10] با برنامه حرارتی۴۲ °C به مدت ۶۰ دقیقه و درجه حرارت ۷۰ °C به مدت ۱۰ دقیقه به منظور توقف واکنش و درجه نهایی ۴ °C به منظور خنک شدن قرار داده شد. cDNA حاصل در ۲۰ °C- نگهداری شد.

واکنش زنجیره ای پلی مراز (پی. سی. آر): جهت شناسایی قارچ پلی میکسا بتا از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده توسط مونیه و همکاران مطابق جدول (۱) استفاده گردید (۱۹). شرایط و مواد تشکیل دهنده واکنش زنجیره ای پلی مراز به شرح زیر بود:

۳ میکرولیتر دی. ان. ای قالب (الگو) ، ۱۰ پیکا مول از هر یک از آغازگرهای اختصاصی رفت و برگشت، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR×۱۰، ۱/۲۵ میکرولیتر کلرید منیزیوم ۵۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTPs ۱۰ میلی مولار، ۰/۲۵ میکرولیتر محلول پلیمراز تک[11](سیناژن، ایران) با غلظت ۵ واحد در میکرولیتر. برنامه دمایی دستگاه PCR شامل۴ دقیقه در دمای ۹۴°C، سپس ۳۵ سیکل (واسرشت سازی یک دقیقه ۹۴ °C اتصال آغازگرها یک دقیقه در ۶۰ °C و مرحله طویل شدن ۷۲ °C یک دقیقه) و طویل شدن نهایی به مدت ۶ دقیقه در دمای ۷۲ °C و درجه حرارت۴ °C به منظور خنک شدن در نظر گرفته شد. این برنامه در دستگاه ترموسایکلر شرکت آلمانی بیومترا انجام شد. مقدار ۸ میکرولیتر از محصول PCR هر نمونه با ۲ میکرولیتر بافر رنگ[12] در ژل آگارز ۱/۵ ٪ جداسازی شد. همچنین الکتروفورز ژل عمودی نیز به منظور مشاهده بهتر فرآورده های PCR به صورت غیر واسرشتی انجام گرفت. برای این منظور از ژل پلی اکریل آمید ۵٪ استفاده گردید (۶).

نتیجه و بحث

گیاهچه های چغندرقند در آزمون طعمه گذاری در خاک بعضی از علایم بیماری ریزومانیا مانند رنگ پریدگی بوته، پژمردگی برگها و زردی رگبرگ را در سطح اندامهای هوایی نشان دادند. گیاهان کشت شده در خاک آلوده رشد کندتری را نسبت به گیاهان شاهد (گیاهانی که در خاک سالم کشت شده بودند) داشتند (شکلهای۱و۲). با استفاده از میکروسکوپ نوری می توان مشاهده کرد که ریشه های برخی گیاهچه ها حاوی تعداد زیادی سیستوسورهای قارچ هستند که شامل تعداد متفاوتی سیست چند وجهی می باشند (شکل ۳). تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمرازی بدلیل دارا بودن حساسیت، سرعت و سهولت استفاده، از توانایی بالایی در امر شناسایی سریع عوامل بیماریزا برخوردار است. در این تحقیق با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و آزمون واکنش زنجیره ای پلیمرازی امکان تشخیص سریع قارچ پلی‌میکسا بتا فراهم گردید. واکنش زنجیره ای پلیمرازی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژنوم قارچ توانست قطعه ای در حدود ۱۷۰ جفت باز را تکثیر نماید در حالیکه هیچ باندی از نمونه های سالم و شاهد منفی حاصل نشد (شکلهای ۴و ۵). از تعداد ۴۸ غده بررسی شده ۲۸ غده آلوده به قارچ پلی میکسا بتا بودند. تمام غده های آلوده به BNYVV، حاوی قارچ پلی میکسا بتا بودند اما تعدادی از غده ها فقط آلوده به قارچ بودند (جدول ۲). این موضوع نشان دهنده این است که تمام جمعیتهای قارچ حاوی ویروس نیستند (۲). استفاده از میکروسکوپ نوری جهت تعیین پلی میکسا بتا به دلیل پاره ای از محدودیتها مثل اشکال در رویت فرمهای نابالغ و کوچک قارچ و عدم

1- Sequence
2- Relative to accession no.X83745
3- Reverse
4- Relative to accession no.X83745.1
5- Forward
6- Reverse Transcription
7- Fermentas
8- Hexamer
9- Di-ethyl pyrocarbonate
10- Biometra
11- Taq DNA polymerase
12- Loading buffer

تمایز بین زئوسپورانژیومها و اسپورهای مقاوم سایر قارچها غیر قابل اطمینان و زمان بر است. بنابراین استفاده از تکنیک PCR به عنوان روشی سریع و دقیق پیشنهاد شده است و میتوان از این تکنیک برای تعیین پلی میکسا بتا در ریشه های چغندرقند و مطالعات مزرعه ای استفاده کرد. پرایمرهای طراحی شده قادر به بسط انتخابی توالی های پلی میکسا بتا در تمامی مراحل چرخه زندگی (زئوسپورها، پلاسمودیومها، زئوسپورانژیومها و اسپورهای مقاوم) می باشند (۲۱). خسارت وارده به محصول توسط بیماری ریزومانیا بستگی زیادی به میزان فراوانی قارچ ناقل در خاک، شرایط آب و هوایی در طول فصل رویش و زمان آلودگی دارد. آزمون طعمه گذاری در خاک بسیار وقت گیر است و حدود شش هفته وقت لازم است، با بکارگیری پی. سی. آر این زمان را می توان به سه هفته کاهش داد و همچنین حساسیت و دقت بالاتری دارد (۱۶). با توجه به اینکه این قارچ، ناقل تعدادی از ویروسهای بیماریزای گیاهی است احتیاج به تکنیکهای حساس و اختصاصی برای ردیابی آن وجود دارد. در سال ۱۹۹۳ برای اولین بار موتاسا و همکاران از روش‌های مولکولی جهت ردیابی پلی میکسا بتا استفاده کردند (۲۰). در سالهای اخیر مونیه و همکاران با استفاده از روشهای مولکولی نه تنها قارچ مورد نظر، بلکه ویروسهایی که توسط این قارچ انتقال می یابند را شناسایی کردند. آنها از روش Multiplex RT-PCR جهت شناسایی همزمان ویروسهای BNYVV ,BSBV BVQ, و ناقل آنها، قارچ پلی میکسا بتا استفاده کردند (۱۹). با این روش ردیابی پلی میکسا بتا از آر. ان. اِ استخراجی امکان پذیر شده است که بسیار ساده تر از متدهای قبلی پیشنهاد شده بر پایه پی. سی. آر (۲۱)، روشهای کلاسیک مثل الایزا (۱۲، ۱۸) و مشاهده میکروسکپی سیستوسورها می باشد (۱۹). از آنجا که قارچ پلی میکسا بتا تاکنون به عنوان تنها ناقل ویروس BNYVV شناخته شده است و پراکنش و توسعه بیماری به شدت تابع انتشار این قارچ می باشد، لذا مطالعه پراکنش آن در استان خراسان، ضروری به نظر می رسد.

تشکر

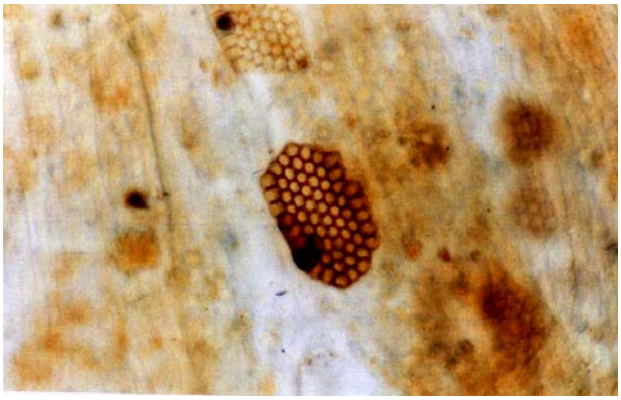
نگارندگان آقای دکتر محسن مهرور و آقای دکتر ذوالعلی به خاطر راهنمائی‌های ارزنده شان و آقای دکتر کلادیو راتی که با استفاده از آر.ان.اِ استخراجی ارسال شده برای ایشان با انجام دوباره آزمایشات مولکولی و آزمون پی. سی. آر نتایج بدست آمده را تایید نمودند تشکر می نمایند.

(جدول ۲)- نتایج بررسی نمونه ها جهت تعیین ویروس BNYVV و قارچ پلی میکسا بتا

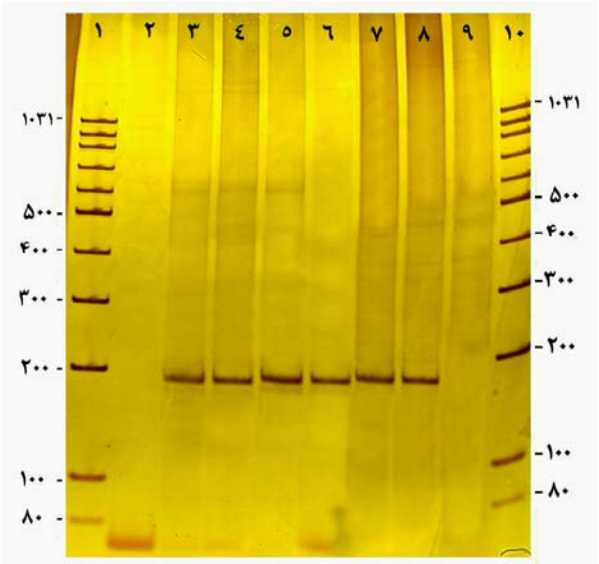
مناطق نمونه برداری شده	تربت حیدریه (جلگه رخ)	چناران	نیشابور(گنبد دراز)	فریمان	قوچان	بجنورد (قاریق)
تعداد نمونه های جمع آوری شده	۱۰	۸	۶	۶	۹	۹
تعداد نمونه های آلوده به ویروس BNYVV	۵	۴	۲	۲	۳	۶
تعداد نمونه های آلوده به قارچ پلی میکسا بتا	۶	۵	۳	۳	۵	۶

(شکل۱)- علایم رنگ پریدگی بوته در گیاهچه های چغندرقند (رقم PP22) در آزمون طعمه گذاری درخاک آلوده

(شکل۲)- گیاهان شاهد (رقم PP22) در آزمون طعمه گذاری در خاک سالم

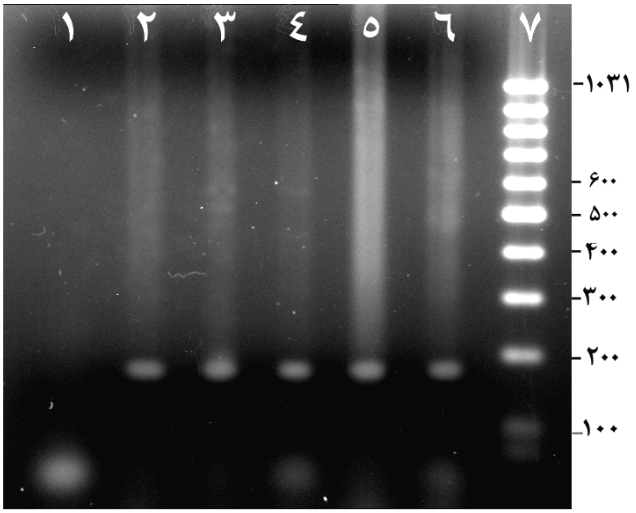


(شکل۳)- سیستوسورها را با بزرگنمایی ×۴۰ نشان می دهد.



(شکل۴)- الکتروفورز عمودی محصول PCR بر روی ژل پلی اکریل آمید ۵٪. ستون ۱ و ۱۰ نشانگر[1] ۱۰۰bp،ستون ۳-۷قطعه تکثیر شـده در محدوده ۱۷۸bp مربوط به قارچ *P.betae*، ستون ۲ شاهد منفی، ستون ۸ شاهد مثبت.

1- DNA ladder



(شکل ۵)- الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪، ستون ۷ نشانگر ۱۰۰bp ،ستونهای۲-۵ قطعه تکثیر شده در محدوده ۱۷۸ bp مربوط به قارچ *P.betae* ، ستون ۱ شاهد منفی، ستون ۶ شاهد مثبت.

منابع

۱- ایزدپناه ک.، هاشمی پ.، کامران ر.، پاک نیت م.، سهندپور آ.، و معصومی م. ۱۳۷۵. وجود گسترده بیماری ریشه ریشی (شبهRhizomania) در فارس. مجله بیماری های گیاهی. جلد۳۲، صفحات۲۰۰-۲۰۶.

۲- جعفرپور ب. ۱۳۷۹. بررسی و تعیین پراکنش ویروس موزائیک چغندر (BtMV) و ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندر(BNYVV) در شمال خراسان و شناسایی ویروس خاکزاد چغندر(BSBV) در ایران. پایان نامه کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی. دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد. ۱۳۲ صفحه.

۳- دارابی س. ۱۳۷۷. تشخیص، خالص سازی و پراکندگی ویروس عامل ریشه گنایی چغندرقند (BNYVV) در فارس و برخی استانهای دیگر. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز. ۱۰۹ صفحه.

۴- غلامی ا. ۱۳۸۰. تعیین پراکنش قارچ *Polymyxa betae* ناقل ویروس BNYVV در مزارع چغندرقند استان خراسان.پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.۷۲ صفحه.

۵- کامران ر.، ک. ایزدپناه و ع. شیروانی. ۱۳۷۹. بررسی پراکندگی *Polymyxa betae* ناقل ویروس ریشه گنایی چغندرقند در فارس. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان. اصفهان. جلد دوم، صفحه ۷۴.

۶- یازرلو آ. ۱۳۸۴. شناسایی و تعیین پراکنش ویروئید دوکی سیب زمینی در استان خراسان شمالی و رضوی. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد. ۳۰۰ صفحه.

7- Abe H., and Tamada T. 1986. Association of beet necrotic yellow vein virus with isolates of *polymyxa betae* Keskin. Ann. Phytopathol. Soc. jpn., 52:232-247.

8- Asher M.J.C. 1993. Rhizomania. In: Cooke, D.A., Scott, R.K. (Eds.), The Sugar Beet Crop: Science into Practice. Chapman and Hall, London, pp. 311–346.

9- Canova A. 1966. Si studia la rizomania della bietola. Inf. Fitopatol., 10: 235-239.

10- Clark M.F., and Adams A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of ELISA for the detection of plant viruses. Journal of General virology, 34:475-483.

11- D'Ambra V., and Mutto S. 1977. The ultrastructure of *Polymyxa betae* zoospore exit-tube differentiation. Canadian Jornal of Plant Pathol., 55: 831-839.

12- Delfosse P., Reddy A.S., Legreve A., Devi K.T., Abdurahman M.D., Maraite H., and Reddy D.V.R**.** 2000. Serological methods for detection of *Polymyxa graminis*, an obligate root parasite and vector of plant viruses. Phytopathology, 90**:**537–545.

13- Duffus J.E., and Liu H.Y. 1987. First report of rhizomania of sugar beet from Texas. Plant Dis., 71:557.

14- Fujisawa I., and Sugimoto T. 1976. Transmission of beet necrotic yellow vein virs by *Polymyxa betae*. Ann.

Phytopathol. Soc. Jpn., 42:583-586.
15- Harju V.A. 2003. Protocol for the diagnosis of quarantine organism (*Beet necrotic yellow vein virus*), Central Science Laboratory, Sand Hutton, UK. Available on line at: http://www.csl.gov.uk/science/organ/ph/diagpro/bnyvv.pdf.
16- Henry C.M., Harju V., Brewer G., and Barker I. 1992. Methods for the detection of Rhizomania disease in soil. Aspects App. Biol., 32:129–133.
17- Keskin B. 1964. *Polymyxa betae* n.sp., ein Parasit in den Wurzeln von *Beta vulgaris* Tournefort, besonders während der Jugendentwicklung der Zuckerrübe. Arch. Mikrobiol., 49:348-374.
18- Kingsnorth, C.S., Asher M.J.C., Keane G.J.P., Chwarszczynska D.M., Luterbacher M.C., Mutasa-Göttgens E.S . 2003. Development of a recombinant antibody ELISA test for the detection of *Polymyxa betae* and its use in resistance screening. Plant Pathol., 52(6):673–680.
19- Meunier A., Schmit J.F., Stas A., Kutluk N., and Bragard C. 2003. Multiplex RT-PCR for the 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. Vol. 69. NO.4. p:2356-2360.
20- Mutasa E.S., Chwarszczynska D.M., Adams M.J., Ward E., and Asher M.J.C. 1995. Development of PCR for the detection of *Polymyxa betae* in Sugar beet roots and its application in field Studies. Physiol. Mol. Plant Pathol., 47: 303-313.
21- Mutasa E., Ward E., Adams M., Collier C., Chwarszczynska D., Asher M.J.C. 1993. A sensitive DNA probe for the detection of Polymyxa betae in sugar beet roots. Physiol. Mol. Plant Pathol., 43:379–90.
22- Payne, P.A., and Asher M J.C. 1990. The incidence of *Polymyxa betae* and other fungal root parasites of sugar beet in Britain. Plant Pathol., 39:443-451.
23- Putz C., Merdinoglu D., Lemaire O., Stocky G., Valentin P., and Weidemann S. 1990. Beet necrotic yellow vein virus, causal agent of sugar beet rhizomania. Rev. Plant Pathol., 69:247-254.
24- Schumacher j., meyer N., Riesner D., and Weideman H.L.(1986). Diagnostic procedure for detection of viroids and viruses with cicular RNAs by return gel electrophoresis. Phytopathol., 115:332- 343.
25- Tuitert G. 1990. Assessment of the inoculum potential of *Ploymyxa batae* and beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in soil using the most probable number method. Neth. J. Plant Pathol. 96, 331-341.
26- Wisler G.C., Winter J.N., Duffus J.E., Liu H.Y., and Sears J.L. 1997. A new report of rhizomania and other furoviruses infecting sugar beet in Minnesota. Plant Dis., 81:229.

Journal of Plant Protection
Vol. 23, No. 1, Spring-Summer 2009, p.17-24

مجله حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۳، شماره ۱، نیمسال اول ۱۳۸۸، ص ۲۴-۱۷

Detection of *Polymyxa betae* in sugar beet roots using RT-PCR method in Razavi Khorasan province

S. Gharooni Kardani[1*] - B. Jafarpour[2] - M. Falahati Rastegar[3] - F. Tabasinezhad[4]

Abstract

Polymyxa betae is an obligate parasite and has a worldwide distribution. This fungus is a soil-borne root endoparasite in some plant families such as *Portulaceae*, *Chenopodiaceae* and *Amaranthaceae*. This fungus is the vector of many plant viruses such as *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) which causes the disease known as rhizomania. BNYVV is the most economical important viral diseases of sugar beet. Resting spores of *P.betae* can survive in soil for many years. For detection of this fungus in Razavi Khorasan province, in summer of 2005, soil samples and plants with rhizomania symptoms were collected from the sugar beet fields. Infection of samples with BNYVV was confirmed by DAS-ELISA. Baiting technique was used for isolation of the fungus. Six-week old plant roots were taken from soil, washed and stained with KOH 10% for 30 minutes and roots were examined for the presence of resting spores under light microscope. Due to difficulty in observing the immature resting spores of the fungus and distinction between zoosporangium and resting spores of other fungi by light microscope, PCR technique was used to the detection of the fungus. Total RNA was extracted from roots of infected samples using PEG_{6000} precipitation method and cDNA was made using fungus specific forward primer. PCR was performed with the specific forward and reverse primers. After electrophoresis on 1.5% agarose gel and 5% polyacrylamid gel, the band of 170 bp was detected. This amplified region is specific for *P.betae*.

Key words: *Polymyxa betae*, Beet necrotic yellow vein virus, DAS-ELISA, Polymerase Chain Reaction

(* - Corresponding author Email: Saragharooni@yahoo.com)
1- Ph. D. Student, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
2,3 – Professor , Department of Crop Protection, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
4- M. SC Student, Department of Crop Protection, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad