نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۳، شماره ۲، نیمسال دوم ۱۳۸۸، ص ۱۹-۱۴

Journal of Plant Protection
Vol. 23, No. 2, Fall-Winter 2009-10, p.14-19

ردیابی ویروس خاکزاد چغندرقند در مزارع استان خراسان رضوی با استفاده از آزمون‌های سرولوزیکی و RT-PCR

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

تاریخ دریافت: ۸۵/۴/۳
تاریخ پذیرش: ۸۸/۷/۸

چکیده

ویروس خاکزاد چغندرقند (BSBV)، یکی از اعضای جنس پوموویروس بوده و دارای ذرات میله‌ای‌شکل و سه قطعه آر. ان. ای تک‌رشته‌ای مثبت می‌باشد. این ویروس از نظر مورفولوژی بسیار شبیه به ویروس عامل بیماری رایزومانیای چغندرقند است و همانند آن بوسیله قارچ خاکزاد پلی‌میکسا بتا منتقل می‌شود که سال‌های متمادی می‌تواند در خاک پایدار باقی بماند. دامنه میزبانی این ویروس محدود به خانواده سلمه است. به منظور شناسایی و تعیین پراکنش این ویروس در استان خراسان رضوی، در تابستان و پاییز ۱۳۸۴، حدود ۶۰۰ نمونه از مزارع مختلف استان از غده‌های مشکوک به آلودگی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه‌های آلوده به ویروس، با استفاده از آزمون تاس- الیزا مشخص شدند. همچنین برای اثبات دقیقتر نتایج، آزمون آر. تی- پی. سی. آر صورت گرفت که در آن استخراج آر. ان. ای ویروس از غده‌های آلوده، به روش رسوب با PEG_{6000} انجام شد. سپس بدنبال آن آزمون آر. تی با استفاده از پرایمرهای تصادفی هگزامر جهت سنتز دی. ان. ای مورد استفاده قرار گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ویروس انجام گردید. الکتروفورز محصول پی. سی. آر در ژل آگارز ۱/۵ درصد، قطعه تکثیر شده ۳۹۹ جفت‌باز مربوط به این ویروس را در نمونه‌های آلوده نشان داد. وجود این ناحیه تکثیرشده در نمونه‌های آزمایشی، آلودگی به ویروس مذکور را در مناطق مورد بررسی تأیید می‌کند.

واژه‌های کلیدی: ویروس خاکزاد چغندرقند (BSBV)، پوموویروس، آزمون تاس- الیزا، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

مقدمه

ویروس خاکزاد چغندرقند[5] یکی از اعضای جنس پوموویروس[6] می‌باشد (۹)، که اولین بار در سال ۱۹۸۲ از نورفولک[7] انگلستان گزارش شد و از آن به بعد در اکثر مناطق چغندرکاری دنیا یافت شده است. ویروس خاکزاد چغندرقند به همراه سه ویروس بافت‌مردگی باقلا[8] (BBNV) و سرجارویی سیب‌زمینی[9] (PMTV) و ویروس Q چغندرقند[10] (BVQ)، اعضای جنس پوموویروس را تشکیل می‌دهند (۱۰).

این ویروس برای اولین بار در خراسان در سال ۱۳۷۹ توسط جعفرپور از مزارع چغندرقند شهرستان چناران گزارش شد (۱) ولی تحقیقات دیگری در مورد وجود یا عدم وجود این ویروس در سایر شهرستان‌های استان صورت نگرفته است.

ویروس خاکزاد چغندرقند دارای ذرات میله‌ای‌شکل، به طول‌های ۶۵، ۱۵۰، ۳۰۰ و عرض ۱۹ نانومتر بوده که فاقد غشا می‌باشند. ساختار ژنوم این ویروس شامل سه قطعه آر. ان. ای[11] تک‌رشته‌ای مثبت می‌باشد و در انتهای ۳' هر یک از آر. ان. ای ها یک ساختمان t-RNA مانند وجود دارد.RNA1 در این ویروس متشکل از ۵۸۳۴ نوکلئوتید است که دارای چهارچوب ژنی[12] بزرگی جهت کدکردن یک

۱و۴- دانشجویان کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲و۳- استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(* - نویسنده مسئول: Email: Fatemeh_TabasiNezhad@yahoo.com)

5- Beet soilborne virus
6- Pomovirus
7- Norfolk
8- Broad bean necrosis virus
9- Potato mop-top virus
10- Beet virus Q
11- RNA
12- open reading frame (ORF)

پروتئین پیوسته‌خوانی به اندازه ۲۰۴ کیلو دالتون می‌باشد (۸). RNA2 در این ویروس از ۳۴۵۴ نوکلئوتید تشکیل شده که از لحاظ ساختار ژنتیکی بسیار شبیه به RNA3 در ویروس سرجارویی سیب‌زمینی است، هر چند که طول آن به اندازه ۱۱۰۰ نوکلئوتید بیشتر می‌باشد (۷). آر. ان. ای های ویروس خاکزاد چغندرقند همانند جنس فورووویروس فاقد دم پلی‌آدنین[1] بوده و به همین علت این ویروس قبلاً در جنس مذکور قرار می‌گرفته است (۶).

دو گروه سرولوژیکی[2] از این ویروس به نامهای ویرث[3] و آهلوم[4] شناسایی شده است که تحقیقات اخیر مشخص کرده‌اند، سروتیپ ویرث، یک گونه ویروسی مجزا بنام ویروس Q چغندرقند می‌باشد (۱۱).

ویروس خاکزاد چغندرقند از نظر مورفولوژی بسیار شبیه به ویروس رگبرگ زرد نکروتیک چغندرقند (BNYVV)[5] می‌باشد و همانند آن توسط قارچ خاکزاد پلی‌میکسا بتا[6] منتقل می‌شود. این قارچ پارازیت اجباری ریشه‌های چغندرقند است و اسپورهای مقاوم آن حتی در غیاب میزبان مناسب قادرند بیش از ۱۵ سال در خاک پایدار بمانند (۳ و ۴). با وجود این از نظر سرولوژیکی هیچگونه ارتباطی بین دو ویروس مذکور وجود ندارد (۱۲).

مونیه و همکارانش[7] در سال ۲۰۰۳ از آزمون Multiplex RT-PCR جهت شناسایی همزمان ویروسهای BSB، BNYVV، BVQ و همچنین قارچ *Polymyxa betae* استفاده کردند (۱۱).

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی ویروس خاکزاد چغندرقند در استان خراسان رضوی، در تابستان و پاییز سال ۱۳۸۴، حدود ۶۰۰ نمونه از مزارع چغندرقند شهرستان‌های مشهد، سبزوار، چناران، قوچان، تربت‌حیدریه، تربت‌جام، فریمان، کاشمر، گناباد، نیشابور و خواف جمع‌آوری گردید. نمونه‌های جمع‌آوری شده از تمامی مزارع موجود در هر شهرستان و با توجه به اندازه هر مزرعه بین ۲۰-۱۰ غده بود. نمونه‌برداری از غده‌های مشکوک به آلودگی با علائمی چون زردی بوته، راست‌ایستادن برگ‌ها و ازدیاد بیش از حد ریشک‌ها صورت گرفت، سپس غده‌های آلوده توسط پاکتهای کاغذی همراه با ثبت مشخصات بر روی آنها به آزمایشگاه منتقل گردید.

آزمون تاس- الیزا[8]: تمامی نمونه‌های آلوده (حدود ۷۰ نمونه) به ویروس خاکزاد چغندرقند با استفاده از آزمون تاس- الیزا (الیزا با آنتی بادی سه‌گانه ساندویچی) مشخص شدند و پراکنش این ویروس در شهرستانهای مختلف استان تعیین گردید. مراحل انجام این آزمون بر اساس روش کلارک و آدامز (۱۹۷۷) می‌باشد که توسط شرکت DSMZ آلمان به همراه آنتی‌سرمها و هماور مورد نیاز فرستاده شد (۵).

از آنجایی که ویروس خاکزاد چغندرقند و ویروس عامل بیماری رایزومانیا دارای ناقل یکسانی میباشند، در اکثر مواقع با هم یافت می‌شوند. بنابراین، نمونه‌های آلوده به ویروس رگبرگ زردی (BNYVV) با استفاده از آزمون داس- الیزا[9] مورد ردیابی قرار گرفتند و پس از مقایسه نتایج حاصل از دو آزمون فوق، نمونه‌های با آلودگی مختلط مشخص شدند.

تکثیر و نگهداری ویروس در گلخانه: از آنجایی که ویروس خاکزاد چغندرقند بروش مکانیکی قابل انتقال است، بمنظور بررسی علائم ناشی از آن بر روی گیاهان محک حساس (*Chenopodium quinoa، C. amaranticolar*) و غیر حساس (*Nicotiana tabacum*) و همچنین تکثیر و نگهداری ویروس در این گیاهان، نمونه‌های آلوده در ظرف حاوی یخ به گلخانه منتقل شدند. عصاره‌گیری از نمونه‌های آلوده به BSBV و نمونه‌های با آلودگی مختلط با BSBV و BNYVV در بافر فسفات ۰/۱ مولار و pH = ۷ حاوی ۲٪ بتا مرکاپتواتانول[10] انجام شد و گیاهان در مرحله ۶-۵ برگی پس از پاشیدن پودر کربوراندوم بر روی آنها، مورد مایه‌زنی با این عصاره‌ها قرار گرفتند. پنج دقیقه پس از مایه‌زنی، برگها را با آب شسته و در طی روزهای متمادی، زمان ظهور علائم و مشخصات آنها بطور منظم مورد بررسی و یادداشت‌برداری قرار گرفت.

در هفته‌های سوم و چهارم پس از مایه‌زنی، گیاهان مایه‌زنی‌شده جهت انجام آزمون‌های تشخیصی سرولوژیکی و مولکولی به آزمایشگاه منتقل شدند.

آزمون طعمه‌گذاری در خاک: این آزمون بر اساس روش تویترت (۱۹۹۰)، با اندکی تغییر انجام پذیرفت (۱۴). بدین ترتیب که خاک آلوده به ریزومانیا (گرفته شده از کارخانه قند چناران) را با خاک زراعی به نسبت ۱:۱ مخلوط کرده و درون گلدانهای یکبار مصرف از خاک پر گردید. سپس بذور واریته‌های حساس چغندرقند به ریزومانیا شامل ارقام H5505، BINGO، PP22، PP36 و7233 (ارسالی از شیراز و آلمان) با ده تکرار برای هر رقم در گلدان‌ها کاشته شد و روی بذور را با ماسه پوشانده و به مدت ۶ هفته بطور منظم آبیاری

1- Poly A tail
2- Serogroup
3- Wierthe
4- Ahlum
5- Beet necrotic yellow vein virus
6- Polymyxa betae Keskin
7- Meunier et al.

8- TAS-ELISA
9- DAS-ELISA
10- ß- Mercaptoethanol

صورت گرفت.

پس از پایان ۶ هفته، ریشکهای این گیاهان جهت انجام آزمایشات لازم و مشاهده اسپورهای مقاوم قارچ ناقل بیماری به آزمایشگاه منتقل گردید.

مشاهده فرم پایدار قارچ ناقل ویروس در سلولهای آلوده گیاهی: در این بررسی از چغندرهای کاشته شده در خاک آلوده که آزمون الایزا در آنها مثبت بود، استفاده شد. بدین منظور ابتدا ریشکهای آلوده جهت بی‌رنگ شدن به مدت ۳۰ دقیقه در هیدروکسید پتاسیم۱۰٪ قرار گرفته و بعد با آب مقطر شسته شدند، سپس یک قطره گلیسرول ۲۵٪ روی لام ریخته شد و ریشکها روی آن قرار گرفتند. لامل را روی ریشک گذاشته و فشار داده تا ریشک کاملاً پخش شود. در پایان با استفاده از میکروسکوپ نوری، فرم پایدار قارچ مورد مشاهده قرار گرفت.

استخراج آر. ان. ای ویروس: بدین منظور آر. ان. ای کل گیاهان آلوده بر اساس روش رسوب با PEG_{6000} به صورت زیر استخراج شد (۲ و ۱۳) :

پس از توزین لوله ۱/۵ میلی‌لیتری، مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از ریشه پودرشده با ازت مایع درون لوله ریخته شد و به آن ۲ برابر حجم بافر TNE (۱۰۰ میلی‌مولار تریس- هیدروکلریک‌اسید pH=۷/۵،۱۰۰میلی‌مولار کلرید سدیم، ۱۰ میلی‌مولار EDTA ، ۲٪ SDS ، ۲٪ ۲- مرکاپتواتانول) و ۲ برابر حجم فنل اضافه گردید (۴۰۰ میکرولیتر برای ۲۰۰ میلی‌گرم بافت پودر شده گیاهی) و سانتریفوژ به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۳۴۰۰ انجام شد. سپس فاز رویی به لوله جدیدی منتقل شد و به آن ۱ برابر حجم فنل و ۱ برابر حجم کلروفرم اضافه گردید، پس از تکان دادن لوله‌ها، سانتریفوژ به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۳۴۰۰ انجام شد. بعد از انتقال مایع رویی به لوله جدید، ۲ برابر حجم کلروفرم به آن اضافه نموده، تکان داده و پس از سانتریفوژ کردن، مجدداً فاز رویی به لوله جدیدی منتقل شد. بر حسب حجم مایع رویی موردنظر به ازاء هر ۱۰۰ میکرولیتر، مقادیر ۱۵/۰۹ میکرولیتر PEG_{6000} ۵۰٪ و ۱۰/۶۹ میکرولیتر کلرید سدیم ۵ مولار به لوله‌ها اضافه نموده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و ۱۰ دقیقه در یخ قرار داده شدند. پس از طی این مدت سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۳۴۰۰ انجام شد. در این مرحله مولکولهای بزرگ اسیدهای نوکلئیک جدا شده و رسوب می‌کنند، پس از دور ریختن مایع رویی، بر روی رسوب ته لوله، ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ ریخته و ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و بعد ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ریخته و مجدداً ۱۰ دقیقه سانتریفوژ انجام شد. در پایان اتانول درون لوله‌ها را دور ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه قرار داده شدند تا کاملاً خشک گردند. پس از آن به هر کدام از لوله‌ها ۲۰ میکرولیتر بافر TE اضافه نموده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

سنتز cDNA از آر. ان. ای ویروس (مرحله نسخه برداری معکوس): در این مرحله، مقدار ۱/۵ میکرولیتر آر. ان. ای استخراجی با ۲/۵ میکرولیتر (۰/۵ میکروگرم) آغازگر تصادفی شش‌تایی[1] و ۸/۵ میکرولیتر آب تیمارشده با DEPC مخلوط شده و آنگاه در بن‌ماری با دمای $70\ ^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند. پس از سرد کردن لوله‌ها روی یخ، به هر یک از آنها ۰/۵ میکرولیتر (40u/µl Ribonuclease inhibitor) ، ۲ میکرولیتر مخلوط (10 mM $dNTP_S$) و ۴ میکرولیتر بافر X ۵ اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه در انکوباتور در دمای $37\ ^{\circ}C$ قرار داده شدند. سپس ۱ میکرولیتر (۲۰۰ u) آنزیم M-MLV Reverse transcriptase را به مواد اضافه نموده و لوله‌ها در دستگاه ترموسایکلر Tpersonal ساخت شرکت بیومترا[2] با برنامه حرارتی $42\ ^{\circ}C$ به مدت ۶۰ دقیقه برای سنتز cDNA و $70\ ^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه بمنظور توقف واکنش و غیر فعال کردن آنزیم نسخه بردار معکوس قرار گرفتند و در پایان نمونه‌ها در $-20\ ^{\circ}C$ نگهداری شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: در مرحله نهایی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی با توالی‌های رفت[3] و برگشت[4] بترتیب: ۵´CTTACGCTGTTCACTTTTATGCC ۳´ و ۵´GTCCGCACTCTTTTCAACTGTTC ۳´ آزمون پی. سی. آر انجام گرفت (۱۱).

در این روش در هر لوله بترتیب مقادیر: ۱۰ پیکومول آغازگر رفت، ۱۰ پیکومول[5] آغازگر برگشت، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۱/۲۵ میکرولیتر کلرید منیزیم (۵۰ mM)، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTPs (۱۰ mM)، ۰/۲۵ میکرولیتر محلول پلیمراز تک[6] (سیناژن) (۵ u/µl) ۵) و ۳ میکرولیتر دی. ان. ای الگو حاصل از RT ها را با هم مخلوط کرده و با استفاده از آب تزریقاتی استریل، حجم نهایی به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. سپس لوله‌ها را در دستگاه ترموسایکلر با برنامه حرارتی، یک سیکل $94\ ^{\circ}C$ به مدت ۴ دقیقه، ۳۵ سیکل متشکل از $94\ ^{\circ}C$ به مدت ۱ دقیقه، $66\ ^{\circ}C$ به مدت ۱ دقیقه، $72\ ^{\circ}C$ به مدت ۱ دقیقه و در نهایت یک سیکل$72\ ^{\circ}C$ به مدت ۶ دقیقه، قرار داده و سپس نمونه‌ها در $-20\ ^{\circ}C$ نگهداری و ذخیره شدند.

الکتروفورز در ژل آگارز: بمنظور تشخیص قطعات تکثیریافته‌ی حاصل از واکنش پی. سی آر، از الکتروفورز افقی در ژل آگارز استفاده شد. بدین ترتیب که ۷ میکرولیتر از نمونه با ۲ میکرولیتر بافر رنگ[7]

1- Hexamer
2- Biometra
3- Forward
4- Reverse
5- pmol
6- Taq DNA Polymerase
7- Loading buffer

در ژل آگاروز ۱/۵٪ و بافر ۰/۵X TBE، تحت ولتاژ ثابت ۷۵ به مدت ۲ ساعت الکتروفورز گردید. در هر ژل یک چاهک بعنوان شاهد منفی و دو چاهک در طرفین برای نشانگر در نظر گرفته شد. پس از پایان الکتروفورز، رنگ‌آمیزی ژل با محلول اتیدیوم بروماید و رنگبری آن با آب مقطر صورت گرفت. سپس ژل بر روی صفحه UV transilluminator بررسی و با دستگاه gel documentation از آن عکسبرداری شد.

نتایج

تعیین پراکنش ویروس خاکزاد چغندرقند در استان خراسان رضوی: با استفاده از آزمون تاس- الایزا، تعداد نمونه‌های آلوده در هر شهرستان مشخص شد و سپس درصد آلودگی نسبت به ویروس خاکزاد چغندرقند و همچنین آلودگی مختلط با ویروس رگبرگ زرد چغندرقند در شهرستان‌های مختلف این استان تعیین گردید (شکل ۱).

علائم ایجادشده توسط ویروس: علائم ایجادشده در سلمه‌هایی که به هر دو ویروس آلوده بودند، شامل ایجاد لکه‌های کلروتیک و نکروتیک و در چغندرهای حساس شامل خطوط کلروتیک، زردی و کم‌رشدی بود. گیاهانی که تنها به ویروس خاکزاد چغندرقند آلوده بودند، بدون علائم یا علائم بسیار خفیف نشان دادند (شکل ۲).

آزمون طعمه‌گذاری در خاک: ۶ هفته پس از کاشت چغندرهای حساس در خاک آلوده، با استفاده از آزمونهای سرولوژیکی و مولکولی، وجود ویروس موردنظر در ۳۰٪ نمونه‌ها تایید شد که این امر نشان‌دهنده وجود قارچ ناقل در خاک می‌باشد.

با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ برابر، اسپورهای مقاوم قارچ یا سیستوسورها در سلولهای ریشک‌های آلوده مشخص شدند، که در ریشکهای سالم وجود نداشت.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و نشانگر نردبانی۱۰۰ جفت‌باز و همچنین مقایسه نمونه‌های سالم و آلوده، قطعه تکثیریافته ۳۹۹ جفت‌باز، مربوط به ویروس خاکزاد چغندرقند در نمونه‌های مورد آزمایش مشخص گردید (شکل ۳). به دلیل استفاده از آغازگرهای اختصاصی هر ویروس، این روش نسبت به روش الیزا از حساسیت و دقت بیشتری برخوردار می‌باشد و نسبت به غلظت کم ویروس واکنش نشان می‌دهد. وجود ناحیه تکثیر شده مذکور در نمونه‌ها نشان از آلودگی این ویروس در مناطق بررسی‌شده دارد.

بحث

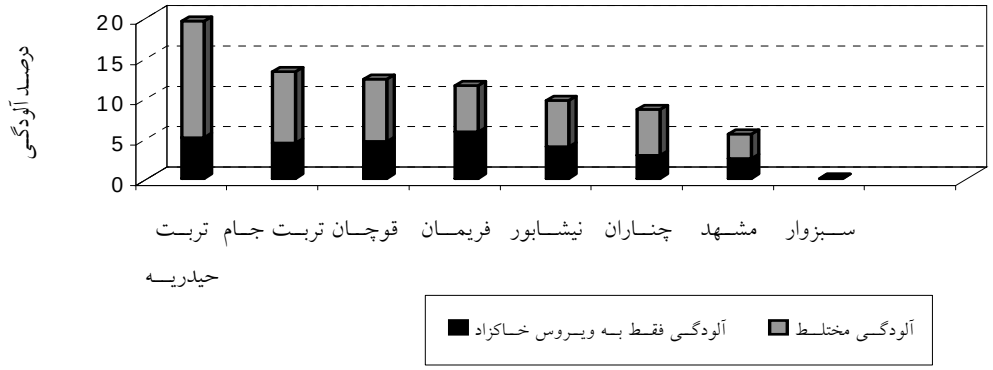
از آنجاییکه یکی از ویروسهای مهم چغندرقند ویروس عامل ریزومانیا (BNYVV) است و هر ساله خسارات زیادی را به این محصول وارد می‌نماید، لذا کارهای تحقیقاتی و مطالعاتی زیادی بر روی این ویروس صورت گرفته است. در سال ۱۹۹۷ کونیگ و همکارانش با بررسی عصاره چغندرهای آلوده به ریزومانیا مشاهده کردند که علاوه بر BNYVV ویروسهای دیگری نیز وجود دارند و با روش‌های آزمایشگاهی توانستند ژنوم ویروس خاکزاد را مورد شناسایی قرار دهند و بیان کردند که شاید این ویروس در تشدید علائم ایجاد شده توسط BNYVV نقش داشته باشد (۷ و ۸.)

در خراسان برای اولین بار در سال ۱۳۷۹ ویروس خاکزاد از مزارع چغندرقند چناران گزارش شد، بنابراین به نظر رسید بعنوان هدف اصلی بررسی و تعیین پراکنش این ویروس در منطقه کاری ضروری باشد. به این جهت ابتدا با استفاده از آزمون الیزا تمامی نمونه‌های جمع‌آوری شده مورد آزمایش قرار گرفتند و نمونه‌های آلوده در هر شهرستان مشخص شدند. سپس جهت تایید نتایج، آزمون RT-PCR در مورد ویروس خاکزاد چغندرقند برای اولین بار در خراسان با موفقیت انجام گرفت و با مقایسه نتایج حاصل از دو آزمون مشخص شد که حساسیت و دقت روش RT-PCR به مراتب بیشتر از روش الیزا می‌باشد. جهت انجام آزمون RT-PCR برای تعدادی از ویروس‌های چغندرقند (BNYVV، BSBMV، BSBV) به دلیل صرفه‌جویی در هزینه و زمان برای ساخت و سنتز cDNA از آغازگرهای تصادفی شش تایی استفاده شد، زیرا با انجام این کار از یک cDNA برای تمامی ویروسهای مذکور استفاده گردید.

همچنین با انجام کارهای گلخانه‌ای و انتقال مکانیکی عصاره‌های آلوده به BSBV و BNYVV و عصاره‌هایی که به هر دو ویروس آلوده بودند و مقایسه علائم ایجاد شده در هر سه گروه گیاهان محک، مشخص شد که علائم ایجاد شده در گیاهانی که به هر دو ویروس آلوده بودند بیشتر از گیاهانی بود که تنها به BNYVV آلوده بودند و این نشان‌دهنده این نکته است که احتمالاً ویروس خاکزاد بر روی BNYVV اثر سینرژیسم داشته و باعث افزایش خسارت به محصول می‌شود.

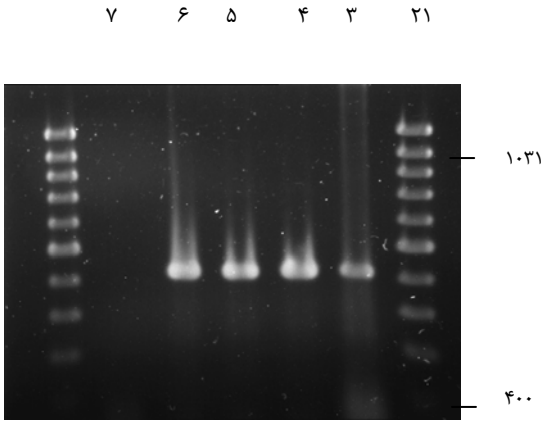
سپاسگزاری

بدینوسیله از آقای کلادیو راتی بخاطر تایید نتایج بدست آمده و همچنین از آقای دکتر ذوالعلی بخاطر راهنمایی‌های ارزنده‌شان کمال تشکر را دارم.



(شکل ۱)- درصد آلودگی مزارع چغندرقند شهرستان‌های مختلف استان خراسان رضوی به ویروس خاکزاد چغندرقند و درصد آلودگی مختلط با ویروس رگبرگ زرد نکروتیک چغندرقند با استفاده از آزمون الیزا

(شکل ۲)- عدم ایجاد علائم در گیاه غیر حساس توتون (*Nicotiana tabacum*) به BSBV در سمت راست و ایجاد لکه‌های کلروتیک و نکروتیک بسیار ریز در گیاه محک حساس سلمه (*Chenopodium quinoa*) به BSBV در سمت چپ



(شکل ۳)- قطعه تکثیریافته ۳۹۹ جفت باز مربوط به ویروس خاکزاد چغندرقند

چاهکها بترتیب: ۱ و ۷، نشانگر ۱۰۰ جفت‌باز، ۲، شاهد مثبت و ۶ شاهد منفی

منابع

۱- جعفرپور ب. و جعفرپور ب. ۱۳۷۹. آلودگی مزارع چغندرقند استان خراسان به ویروس خاکزاد چغندرقند. مجله علوم و صنایع کشاورزی. جلد ۱۴، شماره ۱.

۲- یازرلو آ. ۱۳۸۴. شناسایی و تعیین پراکنش ویروئید دوکی غده سیب‌زمینی در استانهای خراسان رضوی و شمالی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه فردوسی مشهد. ۳۰۰ صفحه.

3- Abe H., and Tamada T. 1986. Association of BNYVV with isolates of Polymyxa betae Keskin. Phytopathology. 52:232-247.

4- Campbell R.N. 1996. Fungal transmission of plant viruses. Phytopathology. 34:87-108.

5- Clark M.F., and Adams A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology, 34:475-483.

6- Kaufmann A., Koenig R., and Rohloff H. 1993. Influence of beet soil-borne virus on mechanically inoculated sugar beet. Plant Pathology, 42:413-417.

7- Koenig R., Commandeur U., Loss S., Beier C., Kaufmann A., & Lesemann D.E. 1997. Beet soilborne virus RNA_2: similarities and dissimilarities to the coat protein gene-carrying RNA_S of other furovirus. Journal of General Virology, 78:469-477.

8- Koenig R., and Loss S. 1997. Beet soilborne virus RNA_1: genetic analysis enabled by a starting sequence generated with primers to highly conserved helicase-encoding domains. Journal of General Virology, 78:3161-3165.

9- Kutluk Yilmaz N.D., Erkan S., and Ikis F. 2004. Effects of soil properties on the occurrence of Beet necrotic yellow vein virus and Beet soilborne virus on sugar beet in Tokat, Turkey. Phytopathology, 32:56-60

10- Lennefors B.L., Savenkov E.I., Mukasa S.B., and Valkonen P.T. 2005. Sequence divergence of four soilborne sugar beet-infecting viruses. Virus Genes. 31:57-64.

11- Meunier A., Schmit J.F., Stas A., Kutluk N., and 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, 69:2356-2360.

12- Rush C.M. 2003. Ecology and epidemiology of Benyviruses and plasmodiophorid vectors. Phytopathology, 41:567-592.

13- Schumacher G., Meyer N., Rienser D., and Wideman H.L. 1986. Diagnostic procedure for detection of viroids and viruses with circular RNAs by return gel electrophoresis. Phytopathology, 115:332-343.

14- Tuitert G. 1990. Assesment of the inoculum potential of *Polymyxa betae* and Beet necrotic yellow vein virus in soil using the most probable number method. Plant Pathology, 96:331-341.