ردیابی سرولوژیکی ویروس خاکزاد چغندرقند (BSBV) در استان خراسان شمالی

بهروز جعفرپور*- محمدعلی سبک‌خیز- فاطمه طبسی نژاد[1]

تاریخ دریافت:۸۷/۴/۲۵
تاریخ پذیرش:۸۷/۷/۲۴

چکیده

ویروس خاکزاد چغندرقند[2] (BSBV) یکی از اعضای جنس *Pomovirus* بوده و دارای پیکره‌های میله‌ای شکل و سه قطعه آر.ان.ای تک‌رشته‌ای مثبت می‌باشد. این ویروس توسط قارچ *Polymyxa betae* منتقل شده و دامنه میزبانی آن محدود به خانواده سلمه می‌باشد. به منظور شناسایی این ویروس از اوایل مردادماه تا اواخر مهرماه ۱۳۸۴ در مناطق مختلف استان خراسان شمالی، بوته‌هایی را که علایم زردی بوته، باریک شدن برگها، طویل شدن و راست ایستادن دمبرگها و ریشک‌دار شدن غده‌ها را نشان می‌دادند، از مزارع حومه شهرستانهای شیروان، بجنورد و اسفراین جمع‌آوری و پس از ثبت مشخصات نمونه‌ها، به آزمایشگاه منتقل گردید و با استفاده از آزمون TAS-ELISA اقدام به شناسایی ویروس شد. پس از مشاهدات نهایی و ثبت نتایج در طول موج ۴۰۵ nm با کمک دستگاه الیزاخوان مشخص گردید که مزارع حومه شهرستانهای شیروان و بجنورد واقع در استان خراسان شمالی به نسبتهای مختلف آلوده به این ویروس می‌باشند. همچنین جهت بررسی آلودگی همزمان دو ویروس BSBV و BNYVV تمام نمونه‌های فوق جهت شناسایی BNYVV با آزمون DAS-ELISA مورد ارزیابی قرار گرفتند و مشخص شد که در برخی نمونه‌ها آلودگی همزمان BSBV با BNYVV وجود دارد. این اولین گزارش از وجود ویروس خاکزاد چغندرقند در شهرستانهای شیروان و بجنورد می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: چغندرقند، ویروس خاکزاد چغندرقند (BSBV)، *Pomovirus*، استان خراسان شمالی، TAS-ELISA و DAS-ELISA

مقدمه

ویروس خاکزاد چغندرقند (BSBV) اولین بار از ریشه‌های چغندرقند (*Beta vulgaris*) در نورفولک[3] انگلستان در سال ۱۹۸۲ گزارش شد و از آن زمان به بعد از هلند، بلژیک، آمریکا، سوئد، آلمان، فرانسه و ایران گزارش گردید (۲،۶ و۷). لسمن[4] و همکاران در سال ۱۹۸۹ دوسروتیپ این ویروس به نامهای آهلوم[5] و ویرث[6] را توصیف نمودند (۶). بررسیهای اخیر مشخص کرد که سروتیپ ویرث، یک گونه ویروسی مجزا به نام ویروس Q چغندرقند[7] می‌باشد (۶). این دو ویروس به همراه دو ویروس بوته‌جارویی سیب‌زمینی[8] (PMTV) و ویروس بافت‌مردگی

۱ - به ترتیب استاد، کارشناس آموزشی و دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
*- نویسنده مسئول: Email:bjafarpour@ferdowsi.um.ac.ir

2- Beet soilborne virus
3- Norfolk
4- Lesmann
5- Ahlum
6- Wierthe
7- Beet virus Q
8- Potato mop top virus

باقلا[1] (BBNV) در جنس *Pomovirus* قرار می‌گیرند. ناقل ویروس‌های خاکزاد چغندرقند، Q چغندرقند و رگبرگ‌زردنکروتیک چغندرقند[2] (BNYVV) قارچ *Polymyxa betae* Keskin می‌باشد که یک پارازیت اجباری ریشه‌های چغندرقند، می‌باشد (۶).

ویروس خاکزاد چغندرقند دارای پیکره‌های میله‌ای شکل به اندازه‌های ۶۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ نانومتر با عرض ۱۹ نانومتر بوده، ژنوم آن مشتمل بر سه قطعه آر.ان.ای تک رشته‌ای مثبت می‌باشد و هر قطعه در یک پیکره قرار می‌گیرد. این پیکره‌ها در ریشه‌های چغندرقند وجود دارند (۱ و ۵). این ویروس ایجاد علایمی مشابه علایم بیماری رایزومانیا می‌کند و محصول را تا بیش از ۷۰ درصد کاهش می‌دهد. البته برخی محققان از تلقیح مکانیکی استفاده نموده و خسارتی حدود صفر تا ۴۰ درصد را با توجه به ایزوله ویروس و رقم چغندرقند گزارش داده‌اند. دامنه میزبانی این ویروس محدود به خانواده سلمه (*Chenopodiaceae*) می‌باشد.

BSBV یکی از ویروسهایی است که هرگز با درجه خلوص بالا به‌دست نیامده است زیرا پیکره‌های آن قابلیت شکنندگی و تمایل به چسبندگی[3] بالایی دارند. RNA1 این ویروس متشکل از ۵۸۳۴ نوکلئوتید است و دارای یک ORF بزرگ جهت کد کردن یک پروتئین پیوسته‌خوانی[4] به اندازه ۲۰۴ KDa می‌باشد که با یک کدون خاتمه داخلی (UAA) قطع می‌شود و تولید یک پروتئین ۱۴۵ kDa می‌کند. نواحی انتهایی N و C پروتئین ۱۴۵ KDa و ناحیه پیوسته خوانی پروتئین ۲۰۴ KDa به‌ترتیب شامل آنزیمهای متیل ترانسفراز[5]، هلیکاز و RNA پلی‌مراز می‌باشد و برخلاف فورووویروسها (*Furovirus*) و توبراویروسها (*Tobravirus*) فاقد ژنهای بیشتری در RNA1 می‌باشند(۳). RNA2 این ویروس نیز متشکل از ۳۴۵۴ نوکلئوتید بوده که از لحاظ سازمان ژنتیکی (genetic organization) بسیار مشابه RNA3 ویروس بوته‌جارویی سیب‌زمینی (PMTV) می‌باشد هرچند که طول آن به اندازه ۱۱۰۰ نوکلئوتید بزرگتر است. انتهای '۳ در RNA2 در BSBV برخلاف RNA3 در PMTV دارای ساختاری شبیه tRNA می‌باشد. RNA2 در BSBV دارای یک ORF بزرگ جهت کد کردن یک پروتئین پیوسته خوانی به اندازه kDa ۱۹ که بسیار شبیه پروتئین پوششی است، می‌باشد (۵).

هیچ ارتباط سرولوژیکی بین پیکره‌های دو ویروس BSBV و BVQ وجود ندارد هرچند که ۵۰ درصد توالی‌های اسیدآمینه پروتئین پوششی آنها یکسان هستند (۶). بین BSBV با BNYVV از لحاظ سرولوژیکی و همچنین هیبریداسیون اسیدنوکلئیک هیچ ارتباطی وجود ندارد. RNA های BSBV همانند فورووویروسها فاقد دنباله پلی‌آدنین (Poly-A tail) می‌باشد (۶).

در ایران ویروس خاکزاد چغندرقند (BSBV) برای اولین بار در سال ۱۳۷۹ از مزارع چغندرقند شهرستان چناران توسط جعفرپور و جعفرپور گزارش گردید (۲)، بنابراین با توجه به شناسایی این ویروس در استان خراسان رضوی و احتمال وجود این ویروس نیز در سایر مناطق، اقدام به ردیابی ویروس در شهرستانهای استان خراسان شمالی گردید. در این تحقیق، همچنین آلودگیهای همزمان چغندرقند به دو ویروس BSBV و BNYVV مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

به‌منظور بررسی ویروس خاکزاد چغندرقند در استان خراسان شمالی از اوایل مرداد ماه تا اواخر مهر ماه سال ۱۳۸۴ از مزارع چغندرقند شهرستانهای شیروان، بجنورد و

1- Broad bean necrosis virus
2- Beet necrotic yellow vein virus
3- Aggregation
4- Read-through protein
5- Methyl-transeferase

اسفراین بازدید به‌عمل آمد. در هر مزرعه سعی می‌شد تا بوته‌هایی را که زردی، باریک شدن برگها و طویل شدن دمبرگها را نشان می‌دادند، از زمین خارج کرده و پس از قطع کردن برگها، غده‌ها درون پاکتهای کاغذی همراه با ثبت مشخصات قرار داده می‌شد و سپس به آزمایشگاه منتقل می‌گردید. به‌منظور شناسایی و تشخیص ویروس خاکزاد چغندرقند از روش سرولوژیکی TAS-ELISA[1] استفاده شد. همچنین تمام نمونه‌های جمع‌آوری شده جهت بررسی آلودگی همزمان چغندرقند به ویروسهای خاکزاد چغندرقند (BSBV) و رگبرگ‌زردنکروتیک چغندرقند (BNYVV) مورد بررسی قرار گرفتند. جهت شناسایی ویروس رگبرگ‌زردنکروتیک چغندرقند (BNYVV) از روش سرولوژیکی DAS-ELISA [2] استفاده گردید.

آزمون تاس- الیزا (TAS-ELISA) جهت شناسایی ویروس خاکزاد چغندرقند: در این روش از آنتی‌بادی چندهمسانه‌ای به عنوان آنتی‌بادی به دام اندازنده و از آنتی‌بادی تک‌همسانه‌ای به عنوان شناسنده استفاده شد[3]. اصول کار با اندک تغییرات شبیه به روش کلارک و آدامز (۱۹۷۷) بود (۳). در این روش پس از پوشش حفرات پلیت با IgG خالص، محلول بلوکینگ (Blocking) شامل شیر کم چربی در بافر PBST (به نسبت ۲ میلی‌لیتر شیر کم چربی +۹۸ میلی‌لیتر PBST) افزوده و پس از خارج کردن محلول بلوکینگ و ۳ مرتبه شستشوی پلیت، عصاره مورد آزمایش به هر چاهک اضافه شد و پس از انکوباسیون در حرارت ۴ درجه سانتیگراد به مدت یک شب و شستشوی پلیت، آنتی‌بادی تک‌همسانه‌ای (Mab) که در بافر کانژوگیت (PBST+%2PVP+%2 egg albomin) به نسبت ۱/۱۰۰۰ رقیق شده بود به هر چاهک اضافه و به مدت ۴-۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد، پس از شستشوی پلیت، آنتی‌بادی متصل به آنزیم آلکالین فسفاتاز که در بافر کانژوگیت به نسبت ۱/۱۰۰۰ رقیق شده بود، اضافه گردید و پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت و شستشو، محلول سوبسترا (پی‌نیتروفنیل‌فسفات) به چاهکها اضافه شد و پس از ۳۰ تا ۶۰ دقیقه نتایج بر اساس مشاهده چشمی و تعیین میزان جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر در دستگاه الیزاخوان (ELISA Reader, Avareness, Stat fax-2100) مورد ارزیابی قرار گرفت.

آزمون داس- الیزا (DAS-ELISA) جهت شناسایی ویروس BNYVV و بررسی آلودگی همزمان دو ویروس: در این روش نیز پس از پوشش حفرات با IgG خالص و انکوباسیون به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، عصاره نمونه‌های مورد آزمایش به هر چاهک اضافه شد و پس از انکوباسیون در ۴ درجه سانتیگراد به مدت یک شب، آنتی‌بادی متصل به آنزیم آلکالین فسفاتاز به هر چاهک اضافه گردید وپس از انکوباسیون به مدت ۴-۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، محلول سوبسترا به چاهکها اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه نتایج بر اساس مشاهده چشمی و تعیین میزان جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر در دستگاه الیزاخوان مورد ارزیابی قرار گرفت. لازم به ذکر است که در تمام آزمایشها از نمونه‌های آلوده و سالم به‌عنوان شاهد استفاده می‌شد.

نتایج و بحث

آزمون تاس- الیزا (TAS-ELISA) جهت شناسایی ویروس BSBV در مناطق مختلف: پس از انجام آزمون و پس از مشاهدات نهایی و مقایسه چاهک نمونه‌ها با شاهدهای مثبت و منفی و همچنین ثبت نتایج در طول موج ۴۰۵ nm مشخص گردید که مزارع حومه شهرستانهای شیروان و بجنورد به

1- Triple Antibody Sandwich ELISA
2- Double Antibody Sandwich ELISA
۳- معرفهای این آزمون از شرکت DSMZ آلمان خریداری شدند.

نسبتهای مختلف آلوده به این ویروس بودند و در مزارع شهرستان اسفراین، آلودگی مشاهده نشد. این اولین گزارش از وجود ویروس خاکزاد چغندرقند در شهرستانهای شیروان و بجنورد واقع در استان خراسان شمالی می‌باشد.

بررس آلودگی همزمان به ویروسهای BSBV و BNYVV: پس از انجام آزمونهای تاس- الیزا (TAS-ELISA) و داس- الیزا (DAS-ELISA) بر روی تمام نمونه‌های جمع‌آوری شده از مزارع مختلف استان خراسان شمالی، مشخص گردید که از مجموع ۹۰ نمونه جمع‌آوری شده ۱۵ نمونه آلوده به BSBV و ۳۰ نمونه آلوده به BNYVV بودند که در این بین ۱۰ نمونه آلودگی همزمان به BSBV و BNYVV داشتند (جدول-۱). بررسی آلودگیهای همزمان در مزارع شهرستانهای شیروان و بجنورد نشان داد که علایم بیماری در هر کدام از این نمونه‌ها در مقایسه با علایم بوته‌های آلوده به هر ویروس، نسبتا شدیدتر بود. همچنین مشخص گردید که علایم آلودگی به BSBV و BNYVV در مزرعه قابل تفکیک و تمایز نمی‌باشد و برای تشخیص دقیق هر یک نیاز به بهره‌گیری از روشهای سرولوژیکی و آزمایشگاهی است.

جدول ۱: نتایج بررسی آلودگی مزارع چغندرقند استان خراسان شمالی به BSBV و BNYVV

نام شهرستان	تعداد نمونه	BSBV	BNYVV	آلودگی همزمان به دو ویروس
بجنورد	۳۰	۸	۱۷	۶
شیروان	۳۰	۷	۱۳	۴
اسفراین	۳۰	۰	۱۰	۰

با توجه به اینکه بیماری رایزومانیا در سالهای اخیر خسارت زیادی به چغندرکاریهای کشور وارد نموده است تصور می‌شود که شناسایی و بررسی خسارت ویروس خاکزاد چغندرقند مورد توجه قرار نگرفته است. نظر به اینکه ناقل هر دو ویروس ذکر شده قارچ *Polymyxa betae* می‌باشد و با توجه به منابع گزارش شده در ارتباط با شناسایی BSBV در سطح استان و کشور احتمال می‌رود که ویروس خاکزاد چغندرقند (BSBV) نیز همانند BNYVV در سایر نقاط استان و احتمالاً سطح کشور به‌طور گسترده وجود داشته باشد که لازم است بررسیهای بیشتری در این زمینه به‌عمل آید. همانطور که ذکر شد ناقل این ویروس از گسترش زیادی در منطقه برخوردار است که این خود سبب بقاء و گسترش روز افزون این قارچ در صورت کشت مداوم ارقام حساس چغندرقند می‌شود لذا بررسی دقیق قارچ ناقل و ارایه راه‌کارهای کاهش جمعیت آن امری بسیار ضروری می‌باشد.

جهت پیشگیری از آلودگی و از انتشار هرچه بیشتر این دو بیماری در مزارع استان و با توجه به مشترک بودن ناقل این دو ویروس، رعایت تناوب زراعی طولانی مدت، عدم کشت در مزارع آلوده و رعایت بهداشت زراعی پیشنهاد می‌گردد.

منابع

۱-جعفرپور، ب. ، ب. جعفرپور و م. فلاحتی رستگار. ۱۳۸۲. بررسی ویروسهای رگبرگ زرد نکروتیک چغندر (BNYVV) و خا کزاد چغندر (BSBV) در شمال استان خراسان. مجله علوم و صنایع کشاورزی. جلد ۱۷ شماره ۱.

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

3. Clark, M. F., A. N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. gen. Virol 34:475-483.
4. Koenig, R. and S. Loss. 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.
5. Koenig, R., C. W. A. Pleij and G. Buttner. 2000. Structure and variability of the 3' end of RNA 3 of Beet soil-borne pomovirus – a virus with uncertain pathogenic effects. Archives of Virology, 145, 1173-1181.
6. Koenig, R., U. Commandeur, S. Loss, C. Beier, A. Kaufmann and D. E. Lesemann. 1997. Beet soilborne virus RNA 2: similarities and dissimilarities to the coat protein gene-carrying RNAs of other furoviruses. Journal of General Virology, 78, 469-477.
7. Meunier, A., J. F. Schmit, A. Stas, N. Kutluk and C. Bragard. 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.
8. Mouhanna, A. M., A. Nasrallah, G. Lengen and E. Schlosser. 2002. Surveys for beet necrotic yellow vein virus (the couse of rhizomania), other viruses, and soil-borne fungi infecting sugar beet in Syria. J. Phytopathology, 150, 657-662.

Investigation on *Beet soilborne virus* (BSBV) in Northern Khorasan province

B. Jafarpour*- M. A. Sabokkhiz- F. Tabasinejad[1]

Abstract

Beet soilborne virus (BSBV) is a member species of the genus *Pomovirus* with rigid rod particles and 3 positive single stranded RNAs. The virus is transmitted by *Polymyxa betae* and restricted to Chenopodiaceae. A survey was conducted in 2005 for identification of BSBV in Northern Khorasan province. Samples showing yellowing, elongated and upright petioles with narrow leaf lamina and hairy roots were collected from fields of Shirvan, Bojnord and Esfarayen. Detection of BSBV was based on TAS-ELISA test. Our survey showed that different fields in Shirvan and Bojnord were infected with BSBV. Also for detection of mixed infection with BNYVV, samples were tested by DAS-ELISA as well. Our investigation showed that some fields in Shirvan and Bojnord had mixed infection with both viruses. This is the first report of infection with BSBV in Shirvan and Bojnord located in Northern Khorasan province.

Key words: Sugarbeet, *Beet soilborne virus* (BSBV), *Pomovirus*, Northern Khorasan, TAS-ELISA and DAS ELISA.

*-Corresponding author Email: bjafarpour@ferdowsi.um.ac.ir
1- Contribution from College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad