شناسایی تیپ‌های ویروس رگبرگ زرد نکروتیک چغندر(BNYVV) عامل بیماری ریزومانیا در منطقه چناران

Detection of types of Beet Necrotic Yellow Vein *Benivirus*(BNYVV), causal agent of rhizomania in Chenaran region

اردشیر غلامی*[1]، محسن مهرور[2] و محمدعلی سبک‌خیز[3]

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۲/۲۵ ؛ تاریخ پذیرش ۸۶/۳/۱۹

ا. غلامی، م. مهرور و م. ع. سبک‌خیز. ۱۳۸٦. ردیابی تیپ‌های ویروس رگبرگ زرد نکروتیک چغندر(BNYVV) عامل بیماری ریزومانیا در منطقه چناران. **چغندرقند ۲۳(۱): ٦٦-۵۵**

چکیده

ویروس رگبرگ زرد نکروتیک چغندر (BNYVV) عامل بیماری ریزومانیا می‌باشد که یکی از بیماری‌های مهم چغندرقند به شمار می‌آید. BNYVV عضو تیپ جنس بنی‌ویروس بوده و دارای چهار تیپ A، B، P و J است که از نظر جغرافیایی به مناطق خاصی محدودند. از نظر بیماری‌زایی، بین تیپ‌های A و B تفاوتی وجود ندارد ولی تیپ‌های P و J دارای یک مولکول RNA5 بوده و بسیار مهاجم‌تر می‌باشند. هیچ‌یک از این تیپ‌ها را نمی‌توان به طریق سرولوژیکی از هم تشخیص داد. به منظور شناسایی تیپ‌های ویروس عامل بیماری ریزومانیا در منطقه چناران، ۲۸ نمونه ریشه چغندرقند دارای علائم ریشه‌ریشی مشکوک به ریزومانیا، از حوزه کارخانه‌قند چناران در تابستان ۱۳۸۵ جمع‌آوری گردید. ابتدا ویروس عامل بیماری (BNYVV) توسط آزمون الایزا به روش ساندویچ دو طرفه و واکنش RT-PCR در نمونه‌ها ردیابی شد. در نمونه‌های آلوده، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تیپ‌های ویروس BNYVV و واکنش RT-PCR، تیپ ویروس تعیین گردید. از ۲۸ نمونه دارای علائم مشکوک به ریزومانیا، آزمون الایزا در ۲۳ نمونه و واکنش RT-PCR در ۲۵ نمونه، ویروس BNYVV را ردیابی کرد. واکنش RT-PCR توسط آغازگرهای اختصاصی تیپ، فقط قطعه‌ای به اندازه ۳۲٤ جفت باز را تکثیر نمود. به این ترتیب در کلیه نمونه‌های آلوده، ویروس عامل بیماری، تیپ A تشخیص داده شد.

واژه‌های کلیدی: الایزا، بیماری ریزومانیا، تیپ ویروس، چغندرقند، چناران، ویروس رگبرگ زرد نکروتیک چغندر (BNYVV)، PCR

۱- کارشناس ارشد کارخانه قند چناران، gholami_ard@yahoo.com *- نویسنده مسئول

۲- دانشجوی PhD دانشگاه Louvain-La-Neuve بلژیک

۳- کارشناس ارشد گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

مقدمه

جنس بنی‌ویروس (*Benyvirus*) با عضو تیپ ویروس رگبرگ زردنکروتیک چغندر (Beet Necrotic Yellow Vein *Benyvirus* (BNYVV))، در سال ۱۹۹۷ پس از اصلاح جنس فورویروس (*Furovirus*)، توسط کمیته بین‌المللی رده‌بندی ویروس‌ها (ICTV) پذیرفته شد(Rush 2003). در این سال جنس فورویروس براساس مطالعات مولکولی به چهار جنس جداگانه به نام‌های فورویروس، بنی‌ویروس، پومویروس (*Pomovirus*) و پکلویروس (*Peclovirus*) گروه‌بندی شد (Rush 2003; Rush et al. 2006).

BNYVV عامل بیماری ریزومانیا (Rhizomania) است که بیماری بسیار مهمی در چغندرقند می‌باشد (Meunier et al. 2003; Rush 2003). در واقع پس از اولین گزارش این بیماری از ایتالیا در سال ۱۹۵۹، بیماری ریزومانیا از اکثر مناطق چغندرکاری جهان گزارش شده است (Rush 2003). جدایه‌های مزرعه‌ای BNYVV عموماً شامل چهار یا پنج مولکول RNA ژنومی با طول‌های مختلف می‌باشند. ولی در تلقیح‌های مکرر در گلخانه بر روی میزبان‌هایی که لکه موضعی ایجاد می‌نمایند، RNAهای کوچکتر حذف می‌شوند. فقط RNA1 و RNA2 برای آلودگی و تکثیر ضروری‌اند و RNA3 با توسعه علائم در ارتباط است. اما جدایه‌های مزرعه‌ای همیشه دارای RNA3 و RNA4 و گاهی RNA5 نیز هستند. تمامی RNAها در انتهای ۵` یک ساختار کلاهک و در انتهای ۳` یک Poly(A) دارند. RNA1، RNA3 و RNA4 هر کدام دارای یک و RNA2 دارای شش قاب خواندنی باز (ORF) می‌باشند (Rush et al. 2006).

مشخص شده است که BNYVV شامل گروه‌های ژنوتیپی است که به مناطق جغرافیایی خاصی محدود بوده و خصوصیات بیماری‌زایی متفاوتی دارند. براساس مطالعات مولکولی، سه استرین اصلی برای BNYVV به عنوان تیپ‌های A، B و P شناسایی شد. تیپ A انتشار وسیعی داشته و از سرتاسر اروپا، امریکا، ژاپن، چین و ایران گزارش شده است. تیپ B عمدتاً از فرانسه و آلمان و گاهی از سوئد، چین و ژاپن گزارش شده است (Rush 2003; Rush et al. 2006; Schirmer et al. 2005). توالی‌های نوکلئوتیدی در جدایه‌های هریک از تیپ‌های A و B به شدت حفظ شده (بالای ۹۹درصد) ولی بین جدایه‌های تیپ‌های A و B، سه تا شش‌درصد تفاوت وجود دارد. بین تیپ‌های A و B تفاوتی در بیماری‌زایی گزارش نشده و نمی‌توان آن‌ها را به طریقه سرولوژیکی از هم تشخیص داد. جدایه‌های تیپ P دارای یک مولکول RNA5 بوده و انتشار جغرافیایی نسبتاً محدودی دارند. در ابتدا آن‌ها فقط در ناحیه پیتی ویرس (Pithiviers) فرانسه یافت شدند، ولی تاکنون از قزاقستان، انگلستان، چین و ژاپن نیز گزارش شده‌اند (Rush et al. 2006). تیپ P را نیز نمی‌توان با روش‌های سرولوژیکی از A و B تشخیص داد. تیپ P دارای خواص بیولوژیکی و ژنومیکی متفاوتی از سایر تیپ‌ها است. از نظر بیماری‌زایی، تیپ

P بسیار مهاجم‌تر از دو تیپ A و B بوده و قادر به ایجاد خسارت معنی‌دار بر روی ارقام دارای مقاومت جزئی می‌باشد. هم چنین تیپ P تنها تیپی است که دارای RNA5 می‌باشد (Rush et al. 2006). هر چند که تا کنون حضور تیپ‌های دارای RNA5 فقط در تعداد معدودی از نمونه‌ها تشخیص داده شده، ولی گزارشاتی مبنی‌بر بیماریزاتر بودن آن‌ها نسبت به سایر تیپ‌ها وجود دارد. علاوه‌بر این، جدایه‌های تیپ P در مقایسه با جدایه‌های دو تیپ دیگر، غلظت بیشتری از ویروس را در میزبان نشان می‌دهند. مطالعات اخیر نشان داده که تیپ P رابطه بسیار نزدیکی با تیپ A دارد، ولی تیپ P به شدت مهاجم‌تر بوده و علاوه‌بر چهار مولکول RNAژنومی، دارای یک مولکول RNA5 نیز می‌باشد (Rush 2003). اخیراً نیز در بررسی فیلوژنتیکی جدایه‌های جمع‌آوری شده از کشورهای مختلف، جدایه‌های دارای RNA5 را به سه گروه تقسیم کرده‌اند. گروه J_I شامل جدایه‌هایی از چین و ژاپن، گروه J_{II} شامل جدایه‌هایی از ژاپن و گروه P_{III} شامل جدایه‌هایی از فرانسه، انگلستان و قزاقستان (Schirmer et al. 2005).

در ایران نیز پس از اولین گزارش بیماری ریزومانیا (ایزدپناه و همکاران ۱۳۷۵)، تاکنون مطالعات زیادی در مورد گسترش و پراکندگی این بیماری انجام شده و مشخص گردیده که اکثر مناطق چغندرکاری کشور، به این بیماری آلوده است (ارجمند و آهون منش ۱۳۷۵؛ توده‌فلاح و همکاران ۱۳۷۹). بهترین راه عملی و در دسترس کاهش خسارت این بیماری مخرب، استفاده‌از ارقام متحمل و مقاوم می‌باشد (Asher 1993). به همین دلیل در سال‌های اخیر استفاده از این ارقام روند رو به رشدی در کشور داشته است. ولی باتوجه به سطح کشت وسیع ارقام مقاوم و خطر تغییرات ژنتیکی در ویروس عامل بیماری، لزوم بررسی تیپ‌های BNYVV در مناطق مختلف ضروری به نظر می‌رسد. اخیراً هر سه تیپ A، B و P از دو استان خراسان‌رضوی و شمالی گزارش شده و تیپ غالب تیپ A عنوان گردیده است (قارونی کاردانی و همکاران ۱۳۸۵). ولی باتوجه به گسترش سطح جغرافیایی تحقیق مذکور، تعیین تیپ‌های BNYVV در مناطق مختلف چغندرکاری استان ضروری به نظر می‌رسد. منطقه چناران با بیش از ۴۰۰۰ هکتار سطح زیرکشت و تولید سالانه حدود ۱۵۰ هزار تن چغندرقند (آمار تولید کارخانجات قند استان، ۱۳۸۵، منتشر نشده)، یکی از مناطق مهم چغندرکاری استان می‌باشد. بررسی اولیه پراکنش بیماری ریزومانیا در استان خراسان، نشان‌دهنده آلودگی بالای منطقه چناران به این بیماری بود (جعفرپور و همکاران ۱۳۷۹). بررسی حوزه‌های چغندرکاری کارخانه‌قند چناران مشخص کرد که از تعداد ۱۶۲ روستای چغندرکاری طرف قرارداد این کارخانه، اراضی ۱۲۸ روستا (۷۹درصد) آلوده به BNYVV می‌باشند (غلامی، پراکنش بیماری ریزومانیا در مزارع حوزه کارخانه‌قند چناران ۱۳۸۵، منتشر نشده). بنابراین سعی شد تا در حد امکانات موجود، تیپ غالب BNYVV در این منطقه مشخص گردد.

مواد و روش‌ها

در تابستان سال ۱۳۸۵ تعداد ۲۸ نمونه چغندرقند دارای علائم مشکوک بیماری ریزومانیا (ریشه‌ریشی بودن ریشه) از مزارع مختلف حوزه کارخانه‌قند چناران جمع‌آوری شد. نمونه‌ها شامل ارقام مختلف کشت شده در منطقه بودند. تعداد ۱۸ نمونه از ارقام فاقد هرگونه مقاومت به بیماری ریزومانیا و ۱۰ نمونه از ارقام مقاوم به این بیماری بودند (برمبنای اطلاعات شرکت‌های تولیدکننده بذر). نمونه‌ها پس‌از انتقال به آزمایشگاه، به صورت جداگانه و با استفاده‌از دستکش‌های مجزا، شسته‌شده و در مجاورت هوا خشک شدند. سپس مقداری از ریشه‌های فرعی هر ریشه، به صورت تصادفی توسط تیغ اسکالپل استریل جدا گردیده و جهت مراحل بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

آزمون الایزا

از هر نمونه حدود ۲۰۰ میلی‌گرم ریشه چه توزین و در داخل یک میلی‌لیتر بافر نمونه کاملاً له و عصاره‌گیری گردیدند. سپس طبق روش (Clark and Adams 1977) با کمی تغییرات، آزمون ساندویچ دو طرفه الایزا انجام شد. آنتی بادی‌ها از شرکت خارجی Bioreba خریداری شده بود. برای شاهد مثبت از عصاره یک نمونه آلوده تأیید شده قبلی و شاهد منفی از عصاره یک نمونه سالم استفاده شد. تغییر رنگ چاهک‌ها توسط دستگاه الایزا خوان بررسی شد. چاهک‌های دارای طول‌موج بالاتر از طول‌موج میانگین چاهک‌های شاهد منفی به علاوه سه برابر انحراف معیار آن‌ها ($\bar{x}+3\delta$) به عنوان نمونه‌های آلوده و طول موج‌های برابر با طول‌موج مذکور به عنوان مشکوک و کمتر از آن به عنوان منفی در نظر گرفته شد.

استخراج RNA

استخراج RNA توسط کیت جداسازی RNA (Promega, USA) انجام شد. حدود ۱۷۱ میلی‌گرم از مخلوط ریشه‌چه‌های هر نمونه، در داخل یک میلی‌لیتر بافر RLA کاملاً له‌شده و سپس طبق دستورالعمل کیت، استخراج انجام گردید. برای شاهد مثبت از یک نمونه آلوده تأییدشده قبلی استفاده شد ولی به علت محدودیت کیت استخراج، شاهد منفی در نظر گرفته نشد. RNAها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

واکنش RT-PCR

جهت واکنش نسخه‌برداری معکوس (RT)، یک میکرولیتر RNA استخراج‌شده به ۸/۵ میکرولیتر آب مقطر خالص و یک میکرولیتر آغازگر پایین دست (Rev پرایمر) افزوده شد. مخلوط حاصل برای ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری و سپس مستقیماً بر روی یخ منتقل شد. در مرحله بعد ۳/۲۵ میکرولیتر آب مقطر خالص، چهار میکرولیتر RT بافر، دو

میکرولیتر dNTPs (10 mM) ,۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم رونوشت‌برداری برگردان (M-MuLVRT) به مخلوط قبلی اضافه شد و برای ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. این مخلوط نیز بر روی یخ منتقل شد.

واکنش PCR

برای PCR، ۲/۵ میکرولیتر از cDNA به‌دست آمده در مرحله قبل را با ۱۵/۵ میکرولیتر آب مقطر خالص، ۲/۵ میکرولیتر Taq بافر، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر پایین دست (پرایمر Rev)، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر بالا دست (پرایمر For)، ۰/۷۵میکرولیتر dNTPs (10mM)، ۲/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (25 mM) و ۰/۲۵ میکرولیتر Taq پلی‌مراز (سیناژن، ایران) مخلوط کرده و مخلوط حاصل در دستگاه PCR (مدل Biometra Germany) قرار داده شد. برای نشانگر اندازه باند از نشانگر 100bp DNA Ladder استفاده گردید. درجه حرارت دستگاه ابتدا سه دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، سپس ۳۵ چرخه حرارتی به صورت ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۵۸ درجه سانتی‌گراد و دو دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در پایان نیز هفت دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. نمونه‌ها پس از PCR به مدت حدود ۴۵ دقیقه در ۷۵ ولت ثابت بر روی ژل آگارز یک درصد رانده شدند. ژل در محلول اتیدیوم بروماید با غلظت ۰/۵ µg/ml رنگ‌آمیزی گردید.

جهت ردیابی BNYVV در نمونه‌ها از آغازگرهای BNYVV2(1)، جهت تعیین تیپ A از آغازگرهای BNYVVRhizo (AF and AR)، جهت ردیابی تیپ B، از آغازگرهای BNYVVRhizo (BF and BR) و جهت ردیابی تیپ P از آغازگرهای BNYVV5(1) استفاده شد (جدول ۱) (Ratti et al. 2005).

جدول ۱ توالی آغازگرها و اندازه قطعات حاصله

آغازگر Primer	توالی Sequence 5`-3`	اندازه قطعات Products size (bp)
BNYVV2(1)For	ACA TTT CTA TCC TCC TCC AC	545
BNYVV2(1)Rev	ACC CCA ACA AAC TCT CTA AC	
RhizoAF	TAA TAG TAT CAC TGT TAC AAC GA	324
RhizoAR	GAT ATA ATG GTA AAA AGA GGT GAC	
RhizoBF	TTG GGC AGC AAC TTA	178
RhizoBR	TCA GTA TGT TGT ACT CAC CGT	
BNYVV5(1)For	GAT GTT GCC ACA AAT TTC CC	884
BNYVV5(1)Rev	TAA ACG AGC CCG TAA ACA CC	

نتایج

ردیابی BNYVV توسط آزمون الایزا

تغییر رنگ چاهک‌ها توسط دستگاه الایزاخوان بررسی شد. از تعداد ۲۸ نمونه آزمایش شده، ۲۲ نمونه

آلوده (مثبت)، دو نمونه مشکوک به آلودگی و چهار نمونه غیر آلوده (منفی) بودند (جدول ۲).

ردیابی BNYVV توسط RT-PCR

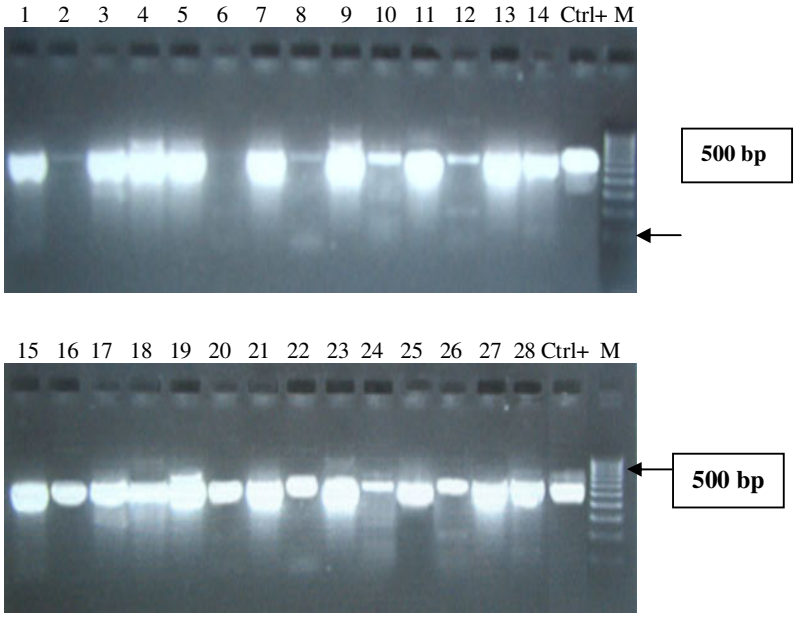
نتایج RT-PCR با استفاده از آغازگرهای BNYVV2(1) بر روی ژل آگارز یک درصد نشان داد که تعداد ۲۵ نمونه آلوده به BNYVV هستند (جدول ۲). با استفاده از نشانگر اندازه و شاهد مثبت، ظهور قطعات تکثیرشده در ناحیه ۵۴۵ bp، نشان‌دهنده حضور BNYVV در نمونه‌ها بود (شکل ۱).

ردیابی تیپ BNYVV توسط آغازگرهای اختصاصی

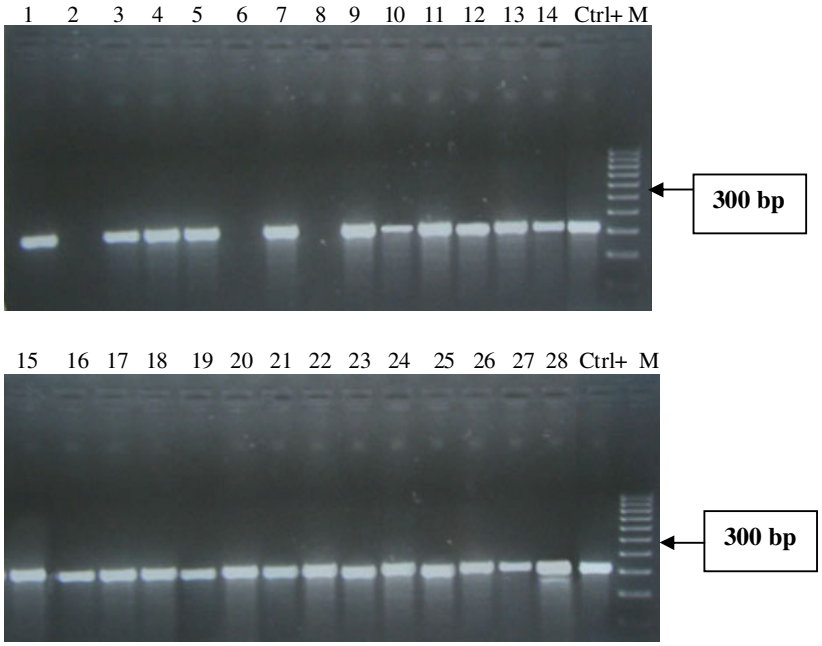
ظهور قطعات تکثیرشده در ناحیه ۳۲۴ bp توسط آغازگرهای Rhizo(A) با استفاده‌از نشانگر اندازه و شاهد مثبت، مشخص کرد که تمامی نمونه‌های آلوده، از نوع تیپ A می‌باشند (شکل ۲). بر روی ژل آگارز حاصل‌از RT-PCR توسط آغازگرهای اختصاصی تیپ‌های B و P، هیچ‌گونه قطعه تکثیر شده‌ای مشاهده نشد (شکل‌های ۳ و ۴).

بحث

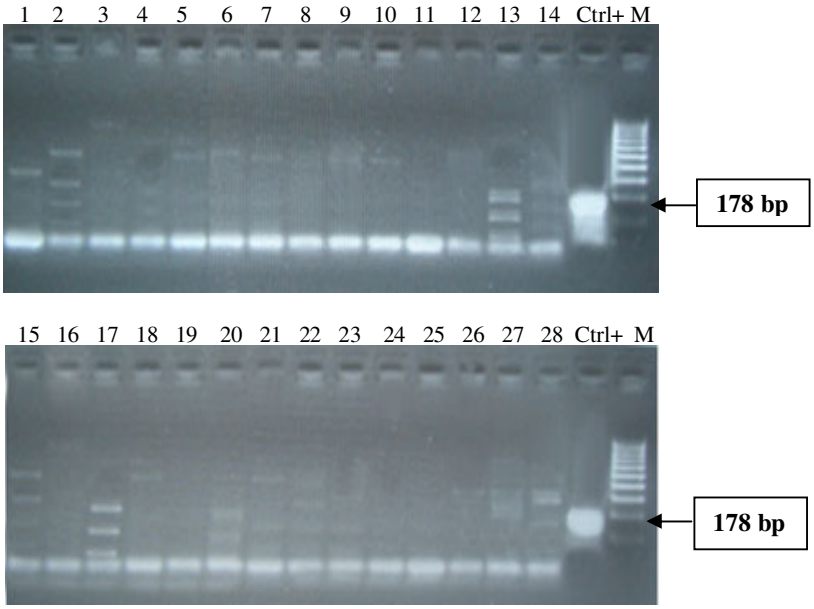
از تعداد ۲۸ نمونه چغندرقند دارای علائم ریشه‌ریشی مشکوک به ریزومانیا، با استفاده از آزمون الایزا تعداد ۲۲ نمونه آلوده و توسط RT-PCR تعداد ۲۵ نمونه آلوده به ویروس BNYVV بودند که نشان دهنده درصد بالای آلودگی منطقه به ریزومانیا می‌باشد (مطابق بررسی‌های قبلی، جعفرپور و همکاران ۱۳۷۹). نتایج ردیابی BNYVV توسط دو روش الایزا و RT-PCR، نشان‌دهنده حساسیت و دقت بیشتر روش RT-PCR بود. به طوری که نمونه‌هایی که در الایزا مشکوک به آلودگی بوده و نیز یکی از نمونه‌های منفی آن (نمونه شماره۱۲)، در RT-PCR مثبت بودند (جدول ۲). هرچند که نواحی تکثیر شده آن‌ها بر روی ژل آگارز ضعیف بوده و نشان‌دهنده غلظت پایین ویروس در آن‌هاست. هرچند آزمایشات مقایسه‌ای بین این دو روش نشان داده که برخی مواقع نمونه‌هایی هم بوده که در الایزا مثبت‌اند ولی در RT-PCR منفی شده‌اند. اگرچه تفسیری برای آن ارائه نشده است (Meunier et al. 2003; Harju et al. 2005).



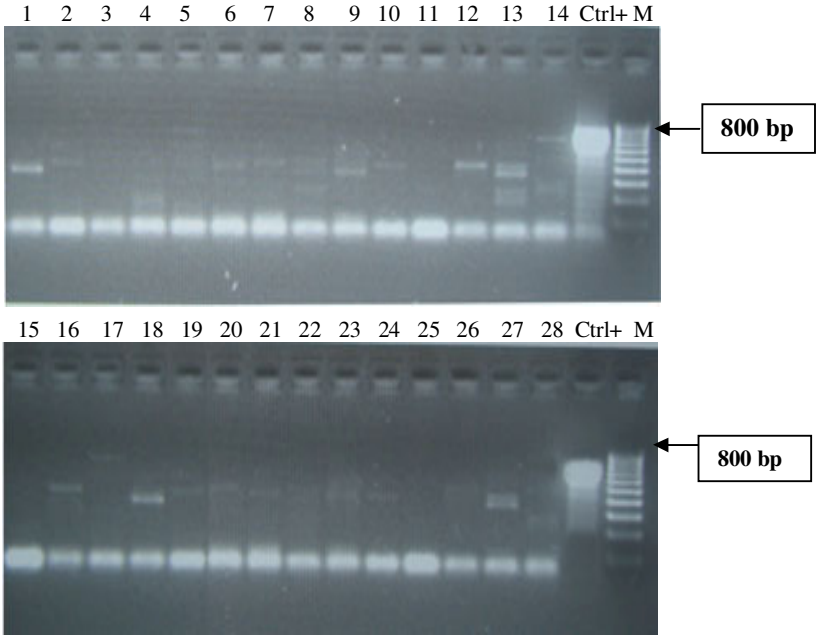
شکل ۱ ردیابی ویروس BNYVV با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ویروس.
M نشانگر اندازه باند و +Ctrl شاهد دارای ویروس می‌باشد



شکل ۲ ردیابی تیپ A ویروس BNYVV با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تیپ.
M نشانگر اندازه باند و +Ctrl شاهد تیپ A می‌باشد



شکل ۳ ردیابی تیپ B ویروس BNYVV با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تیپ.
M نشانگر اندازه باند و +Ctrl شاهد تیپ A می‌باشد



شکل ٤ ردیابی تیپ P ویروس BNYVV با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تیپ.
M نشانگر اندازه باند و +Ctrl شاهد تیپ A می‌باشد

جدول ۲ محل نمونه برداری، ارقام و نتایج آزمون الایزا، RT-PCR و تشخیص تیپ BNYVV

شماره نمونه	محل نمونه برداری	رقم	ردیابی ویروس توسط الایزا	ردیابی ویروس توسط RT-PCR	تیپ ویروس
۱	موچنان	R	+	+	A
۲	موچنان	R	_	_	_
۳	موچنان	S	+	+	A
۴	عرب آباد	S	+	+	A
۵	عرب آباد	S	+	+	A
۶	چمن گاوباغ	S	_	_	_
۷	چناران	S	+	+	A
۸	رضا آباد شرقی	R	_	_	_
۹	عرب آباد	R	+	+	A
۱۰	بهر آباد	R	D	+	A
۱۱	جوقان	S	+	+	A
۱۲	قزلحصار	R	_	+	A
۱۳	قزلحصار	S	+	+	A
۱۴	کلاته سادو	S	+	+	A
۱۵	شادیاخ	S	+	+	A
۱۶	شادیاخ	S	+	+	A
۱۷	جمهوری	S	+	+	A
۱۸	جمهوری	S	+	+	A
۱۹	حسین آباد	S	+	+	A
۲۰	سید آباد	S	+	+	A
۲۱	سید آباد	S	+	+	A
۲۲	چهچه	R	+	+	A
۲۳	چهچه	R	+	+	A
۲۴	سلطان آباد	R	D	+	A
۲۵	خیرآباد شرقی	S	+	+	A
۲۶	گروه	R	+	+	A
۲۷	اخلمد	S	+	+	A
۲۸	اخلمد	S	+	+	A

(+) نمونه آلوده به BNYVV ، (–) نمونه غیر آلوده به BNYVV ، (D) نمونه مشکوک، (R) رقم مقاوم، (S) رقم حساس

بررسی تیپ ویروس در منطقه نیز نشان داد که تیپ غالب، تیپ A می‌باشد. هرچند در بررسی‌های قارونی کاردانی و همکاران (۱۳۸۵) تیپ‌های B و P نیز از استان خراسان گزارش شده است. ولی به علت پراکنش بسیار محدود این دو تیپ (خصوصاً تیپ P)، حتی در نمونه‌برداری مجدد از مناطقی که تیپ P از آن‌ها توسط قارونی و همکاران گزارش شده بود، تیپ P ردیابی نشد (مهرور، اطلاعات منتشر نشده). به علت

جمعیت‌های بسیار پایین تیپ P، حتی در سایر کشورهای بررسی شده نیز گاهی این عدم نتایج یکنواخت در آزمایشات از یک منطقه مشاهده شده است (Harju et al. 2005; Scirmer et al. 2005).

هم چنین باید توجه داشت که کشت وسیع ارقام متحمل دارای یک منبع منفرد مقاومت به ریزومانیا، باعث افزایش فشار انتخاب بر روی BNYVV شده و برای تولید چغندرقند یک خطر جدی است. زیرا وقتی چنین فشارهای انتخابی وجود داشته باشد، تغییر در جمعیت ویروس غیره منتظره نیست، همان‌گونه که در سال ۲۰۰۲ در مزارعی در کالیفرنیا و مینسوتای امریکا، علائم شدید بیماری در دو مزرعه کشت‌شده با ارقام مقاوم، به صورت پراکنده مشاهده شد و بررسی‌ها نشان داد که هیچ‌گونه RNA5 در ویروس موجود در این چغندرها وجود نداشته و آن‌ها تیپ A می‌باشند. اگرچه آنالیز ژن P25 بر روی RNA3، تغییراتی را در چند وضعیت نوکلئوتیدی تأیید کرد، ولی دقیقاً مشخص نشد که آیا این تغییرات با بیماری‌زایی مرتبط است یا خیر. سپس در سال ۲۰۰۳ در پنج مزرعه، ۲۰۰۴ در ۲۶ مزرعه و ۲۰۰۵ در ۲۸ مزرعه از مزارع کشت شده با ارقام مقاوم، علائم شدید بیماری ریزومانیا مشاهده گردید (Rush et al. 2006). در استان خراسان نیز طی سال‌های اخیر به صورت پراکنده بروز علائم شدید بیماری ریزومانیا بر روی ارقام مقاوم مشاهده شده است (گزارشات شفاهی کارخانجات قند استان). چنانچه در بررسی اخیر نیز تعداد ۱۰ نمونه از نمونه‌ها، از ارقام مقاوم رایج در منطقه بودند که با روش ELISA تعداد پنج نمونه مثبت، سه نمونه منفی و دو نمونه مشکوک بوده ولی با استفاده از RT-PCR که روش حساس‌تری است، تنها دو نمونه منفی بودند. لازم به ذکر است که نمونه‌های مذکور دارای علائم مشخصه بیماری با درجات مختلفی از شدت آلودگی بودند و اگر چه در هر دو روش غلظت ویروس در اکثر این ارقام پایین بود ولی در سه نمونه نیز غلظت بالایی داشتند (نمونه‌های یک، نه و ۲۳). پس لازم است بررسی‌های دقیقی به عمل آید تا مشخص شود که ظهور علائم در این ارقام مقاوم به علت آلودگی‌های مخلوط می‌باشند و یا میزان بالای مایه تلقیح یا شرایط محیطی مساعد برای بیماری موجب شکستن مقاومت شده و یا اینکه جدایه‌های مهاجم‌تری ازBNYVV بوجود آمده‌اند.

بنابراین بررسی‌های دقیق در مورد توالی ژنومی جدایه‌های BNYVV در مناطق مختلف کشور و تعیین تیپ و توالی ویروس‌هایی که موجب بروز علائم روی ارقام مقاوم رایج در منطقه می گردند، بسیار ضروری می باشد.

سپاسگزاری

از گروه محترم گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد و به خصوص از مساعدت‌های فراوان سرکار خانم دکتر مهدیخانی‌مقدم (مدیر گروه) قدردانی می‌شود. از مدیر محترم بخش کشاورزی کارخانه‌قند چناران به خاطر همکاری در جمع‌آوری نمونه‌ها تشکر می‌گردد. از آقای مهندس عالی‌منش

دانشجوی کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی به جهت همکاری و کمک در انجام برخی مراحل آزمایشگاهی قدردانی می‌شود. از آقای دکتر سیدباقر محمودی به خاطر راهنمایی‌های ارزنده‌شان سپاسگزاری می‌گردد.

منابع مورد استفاده: References:

ارجمند، م. ن. و آهون منش، ع. ۱۳۷۵. ریزومانیا بیماری نوظهور چغندرقند. مجله علمی- پژوهشی چغندرقند. ۱۲ (۱و۲): ۷۱-۶۲ .

ایزدپناه، ک. هاشمی، پ. کامران، ر. پاک نیت، م. سهندپور، آ. و معصومی، م. ۱۳۷۵. وجود گسترده بیماری ریشه‌ریشی (شبه ریزومانیا) در استان فارس. مجله بیماری‌های گیاهی. ۳۲ (۳و۴): ۲۰۶-۲۰۰ .

توده فلاح، م. ارجمند، م. ن. و محمودی، ب. ۱۳۷۹. بررسی وضعیت آلودگی و پراکنش بیماری ریزومانیا چغندرقند در ایران. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاه پزشکی ایران-اصفهان. جلد دوم. ص۷۲ .

جعفرپور، ب. جعفرپور، ب. و فلاحتی رستگار، م. ۱۳۷۹. بررسی و تعیین پراکنش ویروس موزائیک چغندر (BtMV) و ویروس رگبرگ زردنکروتیک چغندر (BNYVV) در شمال خراسان. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی. دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد. ص۱۳۲.

قارونی کاردانی، س. جعفرپور، ب. و فلاحتی رستگار، م. ۱۳۸۵. شناسایی تیپ های ویروس رگبرگ زردنکروتیک چغندر (BNYVV) در استان‌های خراسان شمالی و رضوی. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی. دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد. ص۱۸۵.

Asher MJC (1999) A continental view of Rhizomania. Brit. Sugar Beet Rev. 67(1): 28-33

Clark MF, Adams AN (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme- linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34: 475 – 483.

Harju VA, Skelton A, Clover GRG, Ratti C, Boonham N, Henry CM, Mumford RA (2005) The use of real time RT-PCR (Taq Man) and post-ELISA virus release for the detection of Beet necrotic yellow vein virus types containing RNA5 and its comparison with conventional RT-PCR. Jour. Viro. Meth. 123: 73-80

Meunier A, Schmit JF, Stas A, Marlier A, Wauters A, Steyer S, Bragard C (2003)The status of rhizomania in Belgium. Viro. 328: 120-132

Ratti C, Clover GRG, Harju VA, Henry CM (2005) Amultiplex RT-PCR assaycapable of distinguishing beet necrotic yellow vein virus types A and B. Jour.Virol. Meth. 124: 41-47

Rush CM (2003) Ecology and epidemiology of Benyviruses and Plasmodiophorid vectors. Annu. Rev. Phytopatho. 41: 567-92

Rush CM , Liu HY , Lewellen RT , Acosta-leal R (2006) The continuing saga of rhizomania of sugar beet in the United States. Plant Disease. 90: 4 -15

Schirmer A, Link D, Cognat V, Moury B, Beuve M, Bragard C, Gilmer D, Lemaire O (2005) Phylogenetic analysis of isolates of Beet necrotic yellow vein virus collected worldwide. Jour. Gene. Virol. 86: 2897-2911